

Sr²⁺/NO/OGP 协同提高钛表面 TiO₂ 纳米管的成骨性能研究

潘长江¹, 马文富², 丁平云¹, 张秋阳², 邓林红¹

(1. 常州大学生物医学工程与健康科学研究院, 常州 213164;

2. 淮阴工学院江苏省医用材料及高端医疗器械研究工程中心, 淮安 223003)

摘要 首先, 采用阳极氧化和水热处理技术在钛表面原位制备装载 Sr²⁺ 的 TiO₂ 纳米管阵列; 然后, 采用电泳沉积的方法在纳米管表面制备羧甲基壳聚糖(CMCS)涂层; 最后, 依次在纳米管中装载 NO 释放分子(*N*-亚硝基-*N*-苯基羟胺铵盐)和成骨生长肽(OGP), 通过 Sr²⁺、NO 气体分子以及 OGP 的协同促进成骨细胞的黏附、生长和功能表达. 研究表明, 功能化的纳米管阵列不仅可以诱导羟基磷灰石(HA)的仿生沉积, 还可以持续释放 Sr²⁺ 和 NO 气体信号分子, 显著促进成骨细胞的黏附、增殖以及碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)和 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)的表达. 在装载 OGP 后, 成骨细胞的黏附生长和功能表达进一步提高. 因此, 本文的表面改性策略可用于在钛合金表面构建具有优异生物相容性的生物活性涂层, 从而提高钛基骨替代材料的骨整合性能.

关键词 钛; 成骨细胞; NO 气体分子

中图分类号 O69

文献标志码 A

doi: 10.7503/ejcu20240523

Synergistically Improving Osteogenic Properties of TiO₂ Nanotubes on Titanium Surface by Sr²⁺/NO/OGP

PAN Changjiang^{1*}, MA Wenfu², DING Pingyun¹, ZHANG Qiuyang², DENG Linhong¹

(1. Institute of Biomedical Engineering and Health Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China;

2. Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Biomaterials and Advanced Medical Devices, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China)

Abstract In this study, anodization and hydrothermal treatment techniques were first employed to prepare Sr²⁺-loaded TiO₂ nanotube arrays on the titanium surface. Then, carboxymethyl chitosan (CMCS) coating was fabricated on the nanotube surface by electrophoretic deposition. Finally, NO-releasing molecules (*N*-Nitroso-*N*-phenylhydroxylamine ammonium salt, Cupferron) and osteogenic growth peptides (OGP) were sequentially loaded into the nanotubes, achieving synergistically promoting osteoblast adhesion, proliferation, and functional expression by Sr²⁺, NO gas molecule, and OGP. The results indicated that the functionalized nanotube arrays could not only induce biomimetic deposition of hydroxyapatite (HA), but also continuously release Sr²⁺ and NO gas signaling molecules, significantly promoting the adhesion and growth of osteoblasts, as well as the expressions of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), and Runt related transcription factor 2 (RUNX2). After loading OGP, the osteoblast adhesion, growth, and functional expression were further enhanced. Therefore, the surface modification strategy of the present study can be used to construct the bioactive coating with excellent biocompatibility on titanium alloy surfaces to improve the bone integration ability of titanium-based bone-substituted materials.

收稿日期: 2024-11-29. 网络首发日期: 2025-03-18.

联系人简介: 潘长江, 男, 博士, 教授, 主要从事生物材料表面改性方面的研究. E-mail: pej@cczu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 31870952)和江苏省自然科学基金(批准号: BK20241941)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31870952) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20241941).

Keywords Titanium; Osteoblast; NO gas molecule

钛及其合金具有优异的力学性能和良好的耐生理腐蚀性,在骨植入材料中得到了广泛的研究和应用,但其骨整合能力和骨诱导能力亟待提高.通过物理或化学方法对钛表面进行改性,如等离子喷涂^[1]、离子注入^[2]、酸碱处理^[3]、微弧氧化^[4]、生物分子原位固定^[5]、磷酸钙涂层^[6]和高分子涂层^[7]等,可以提高成骨细胞的黏附生长能力,并增强骨整合能力和骨诱导能力.然而,目前的表面改性层大多不具备天然骨的微纳多孔结构,因而其骨整合能力仍有待进一步提高.研究表明,在钛表面构建微纳多孔结构不仅可以增强成骨细胞的黏附和增殖能力,还可以促进骨组织向内生长,从而实现更好的骨整合^[8],提高材料的体内植入效果.阳极氧化是一种经济简便的可以在钛表面原位制备纳米管阵列的表面改性技术^[9],通过调整电压、电解质组成和氧化时间等参数可以很好地控制纳米管的尺寸,从而可以在钛表面原位制备多孔微纳结构,有利于提升钛材料的骨整合能力.同时,阳极氧化构建的纳米孔结构可以进一步负载各种药物、生物活性物质和纳米粒子,从而可以进一步提高材料的生物相容性和骨整合能力^[10].一氧化氮(NO)是一种重要的健康成年人产生的内源性气体信号分子,生理浓度范围内的NO可以促进成骨细胞的增殖和分化,对骨组织的生长和修复具有多方面的正向调节作用^[11].NO不仅能够刺激骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,进而促进新骨组织的形成^[12],还可以促进骨组织修复过程中的血管新生,从而加速骨组织的修复与再生^[13].此外,NO还可以通过调节细胞的免疫响应促进骨折愈合和骨组织的恢复^[14].因此,在阳极氧化形成的纳米管中装载可释放NO的供体物质,在生理条件下缓慢释放NO,可以有效促进骨组织的生长和愈合,从而提高材料的骨整合能力.成骨生长肽(OGP)是一种天然的可以调节骨生理过程的生物活性分子^[15],OGP可以有效提高骨细胞的迁移和黏附能力,从而能够诱导和促进骨组织的形成^[16].

本文在阳极氧化原位制备TiO₂纳米管阵列的基础上,首先采用水热处理方法装载可以促进骨生长的Sr²⁺,然后通过电泳沉积的方法在纳米管阵列中制备羧甲基壳聚糖(CMCS)涂层,进一步通过静电相互作用在CMCS修饰的纳米管中装载NO释放分子(*N*-亚硝基-*N*-苯基羟胺铵盐, Cupferron)和OGP,从而协同促进骨细胞的生长和功能表达,提高钛基骨植入材料的生物相容性.结果表明,功能化的纳米管不仅可以诱导羟基磷灰石(HA)涂层的形成,还可以释放Sr²⁺,NO和OGP协同提高成骨细胞的黏附生长性能,并上调成骨细胞的功能表达.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

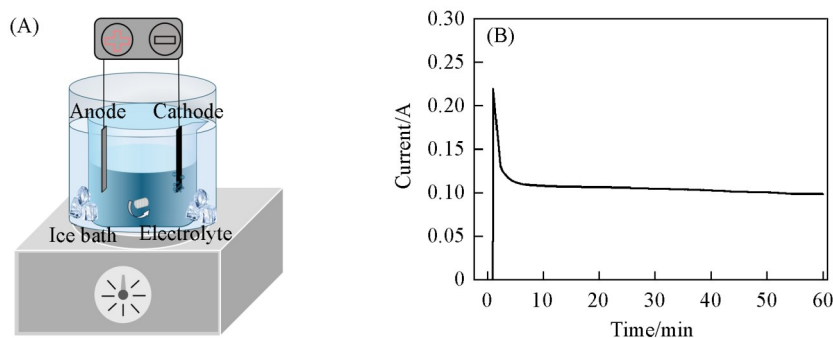
钛箔(TA2),宝鸡钛业有限公司;羧甲基壳聚糖(CMCS)、成骨生长肽(OGP)、NO试剂盒、小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3-E1)、成骨细胞功能表达试剂盒(ALP, OCN和RUNX2)、细胞培养基及细胞培养相关材料,上海泰坦科技股份有限公司;*N*-亚硝基-*N*-苯基羟胺铵盐(Cupferron),分析纯,上海阿拉丁化学试剂有限公司;Griess试剂,上海碧云天生物技术有限公司;其余试剂(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司.

X-Max 20型X射线能谱仪(EDS),英国牛津仪器公司;Quanta 250型扫描电子显微镜(SEM),美国FEI公司;Scientific K-Alpha型X射线光电子能谱仪(XPS),美国Thermo Fisher公司;Scintxtra型X射线衍射仪(XRD),瑞士ARL公司;DSA25型接触角测量仪,德国Krüss GmbH公司;Tensor27型衰减全反射傅里叶变换红外光谱仪(ATR-FTIR),德国布鲁克公司;Optima 7000 DV型电感耦合等离子体发射光谱仪,英国PerkinElmer公司;Eons型微孔板分光光度计,美国Bio-Tek公司;Zeiss A2型倒置荧光显微镜,德国Carl-Zeiss公司.

1.2 实验过程

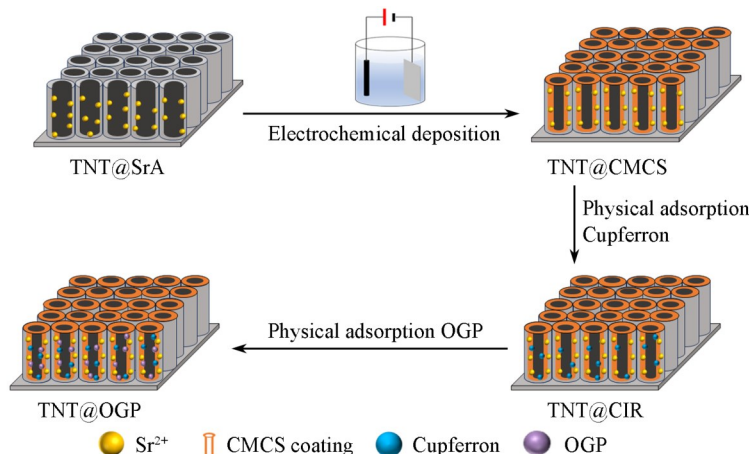
1.2.1 钛表面TiO₂纳米管的制备及生物功能改性 将厚度为0.1 mm的钛箔(标记为Ti)清洗、干燥后浸没到250 mL电解质[质量分数0.5%的NH₄F的去离子水(5 mL)-乙二醇(245 mL)溶液]中,用Ti作为阳极,石墨棒作为阴极,在45 V直流电压下氧化1 h.氧化过程中采用磁力搅拌器进行搅拌,阴、阳极

距离设置为 4 cm, 并将烧杯置于冰浴环境中. 对氧化后的样品进行清洗、干燥并命名为 TNT. 阳极氧化装置示意图及氧化过程中的电流变化如 Scheme 1 所示. 初始电流较高是因为初始钛表面被氧化形成致密氧化层的原因; 在 5 min 后电流趋于稳定, 这是因为氟离子对氧化层产生了刻蚀作用使电流降低, 并在氧化和刻蚀之间达到动态平衡. 将 TNT 浸泡在 0.02 mol/L $\text{Sr}(\text{OH})_2$ 水溶液中, 于 200 °C 下水热反应 1 h, 清洗、干燥并标记为 TNT@Sr; 为了进一步提高 Sr^{2+} 与纳米管的结合力, 将 TNT@Sr 在 450 °C 空气环境中热处理 3 h, 缓慢冷却后命名为 TNT@SrA.



Scheme 1 Schematic diagram of the device for preparing TiO_2 nanotube arrays by anodic oxidation(A) and the curve of current change with time during the oxidation process(B)

可释放 NO 和 OGP 的纳米管制备路线如 Scheme 2 所示. 首先利用电泳沉积法在 TNT@SrA 表面沉积羧甲基壳聚糖, 电解液为 5 mg/mL 的羧甲基壳聚糖溶液 (pH=6.0), 以样品 TNT@SrA 为阴极, 电压为 5 V 恒定直流电压, 电泳沉积 10 min 后清洗、干燥, 所得样品记为 TNT@CMCS. 为了装载 NO 释放分子, 将 TNT@CMCS (10 mm×10 mm) 置于 1 mL 浓度为 2 mg/mL 的 *N*-亚硝基-*N*-苯基羟胺铵盐的水溶液中, 在 2~8 °C 的环境中充分吸附 10 min 后低温干燥, 这一过程重复 3 次, 并将样品命名为 TNT@CIR. 进一步将 50 μL 浓度为 1 mg/mL 的 OGP 溶液 (生理盐水配制) 均匀滴加在 TNT@CIR 表面, 并在 2~8 °C 下低温干燥, 清洗、干燥后命名为 TNT@OGP.



Scheme 2 Schematic diagram of the preparation route of Sr^{2+} /NO/OGP-modified TiO_2 nanotube arrays on titanium surface

1.2.2 表面表征 通过 SEM 观察样品的表面与截面形貌, 并结合 EDS 分析截面元素分布; 不同样品表面的化学结构采用 ATR-FTIR (扫描范围为 650~4000 cm^{-1}) 和 XPS 进行分析; 采用 XRD 表征材料改性前后的晶体结构变化, 扫描范围为 15°~85°; 通过测量表面水接触角表征表面润湿性.

1.2.3 Sr^{2+} 离子与 NO 释放行为 Sr^{2+} 离子释放行为: 将装载 Sr^{2+} 的样品浸入 10 mL 37 °C 的 PBS (pH=7.4) 溶液中, 在不同时间取样 0.5 mL, 并补充 0.5 mL 新鲜 PBS 溶液, 通过电感耦合等离子体发射光谱仪测定 Sr^{2+} 离子浓度, 根据标准曲线计算 Sr^{2+} 离子释放浓度并绘制释放曲线.

NO 释放行为: 采用 Griess 试剂法测定 TNT@CIR 和 TNT@OGP 的 NO 释放情况. 将样品浸入 10 mL PBS 溶液中, 并分别置于 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 与 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 的环境中, 在不同时间点取 50 μL PBS 溶液加到 96 孔板中, 依次添加 50 μL Griess 试剂 I 和 II. 通过微孔板分光光度计测定 540 nm 处的吸光度, 并根据标准曲线计算 NO 的释放量.

1.2.4 羟基磷灰石诱导形成能力评价 首先制备模拟体液 (SBF, 每 1 L SBF 溶液含有 8.00 g NaCl, 0.40 g KCl, 0.35 g NaHCO_3 , 0.14 g CaCl_2 , 0.06 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g KH_2PO_4 , 0.01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 1.00 g 葡萄糖), 并调节 $\text{pH}=7.40$. 将不同样品 (10 mm \times 10 mm) 分别浸泡在 10 mL SBF 溶液中, 在 37°C 环境下浸泡 4, 7, 21 和 28 d (SBF 溶液每 2 d 更新), 干燥后利用电子天平测量其质量变化. 对浸泡 7 d 后的样品表面进行 SEM 观察, 对表面羟基磷灰石的形貌结构进行表征. 通过 XRD 表征 TNT@OGP 样品浸泡 21 d 后的表面晶体结构.

1.2.5 细胞生长行为及功能表达 细胞的黏附: 将灭菌后的样品置于 24 孔培养板中, 在每个样品中加入 0.5 mL (5×10^4 个/mL) MC3T3-E1 细胞悬液和 1.5 mL 培养基, 在 37°C 、5% CO_2 湿润环境下分别培养 1 和 3 d, 用 PBS 洗涤样品 3 次. 样品表面黏附细胞用 200 μL 罗丹明 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PBS 作溶剂) 和 200 μL DAPI (500 ng/mL, PBS 作溶剂) 分别避光染色 20 和 3 min. 染色后的样品采用荧光显微镜分析细胞的数量和形态.

细胞增殖: 首先将 MC3T3-E1 细胞接种在不同材料的表面, 采用上述相同的方式分别培养 1 和 3 d 后, 用 PBS 洗涤样品 3 次. 加入 0.5 mL CCK-8 溶液 (10%, 生理盐水作为溶剂), 在 37°C 培养箱中反应 3.5 h 后, 吸取 200 μL 反应液加入 96 孔板中, 测定 450 nm 处的吸光度 (A) 来表征细胞的增殖活性.

细胞功能表达: 成骨细胞的 ALP, OCN 和 RUNX2 表达均采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测量. 将细胞以上述相同的方式培养 1 和 3 d 后, 吸取细胞培养上清液, 并采用稀释液将上清液稀释 5 倍, 于 37°C 孵育 30 min, 再将样品板清洗 5 次后, 加入 50 μL 酶标试剂, 继续于 37°C 孵育 30 min, 之后用洗涤液洗涤 5 次; 最后加入显色剂 A 和 B 各 50 μL , 于 37°C 避光显色 10 min 后加入 50 μL 终止液终止反应. 采用微孔板分光光度计测定 450 nm 处的吸光度值, 并根据相应的标准曲线计算 ALP, OCN 和 RUNX2 的浓度.

1.2.6 统计分析 对于纳米管的水接触角、成骨细胞增殖及 ALP、OCN 和 RUNX2 表达, 测试 5 个平行样品, 结果取平均值并表示为平均值 \pm 标准差 (SD). 结果利用 SPSS 软件采用单因素方差分析进行统计分析, * $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 表面表征

图 1 示出了不同样品的表面形貌、截面 SEM 图以及截面元素分布图. 可以看出, 阳极氧化后在钛表面形成了内径约为 100~110 nm、长度约为 3~4 μm 的规整纳米管结构, 并同时引入了大量的氧元素和少量的氟元素, 这主要是由于阳极氧化过程中使用的含氟电解液在氧化过程中与 Ti^{4+} 形成了 TiF_6^{4-} 的缘故^[17]. 水热处理装载锶离子以及退火处理后, 尽管纳米管的直径略有减小, 但表面仍然保持完整的纳米管结构, 并且 Sr^{2+} 在纳米管内部分布较为均匀, 同时氟元素几乎完全消失, 这是由于高温高压环境下会使氟元素从氟化物中水解出来^[18]. 电泳沉积是一种利用电场作用将带电颗粒沉积在电极表面的技术, CMCS 在酸性环境下带正电荷, 因此可以采用电泳沉积将 CMCS 沉积到 TiO_2 纳米管的表面. 由于纳米管对 CMCS 的机械锚定作用以及水热处理后纳米管表面的负电荷羟基与 CMCS 的静电相互作用, 电泳沉积可以在基体表面形成具有良好结合力的 CMCS 涂层. 电泳沉积制备 CMCS 涂层以及物理吸附固定 *N*-亚硝基-*N*-苯基羟胺铵盐和 OGP 后, 纳米管表面逐渐变得粗糙, 纳米管内径也逐渐缩小; 同时, EDS 图中出现了较多的 N 元素, 在装载 NO 释放分子和 OGP 后 N 元素含量增加. 由于阳极氧化以及装载 Sr^{2+} 的纳米管不含 N 元素, 以上结果均说明 CMCS、NO 释放分子和 OGP 被成功装载到纳米管中.

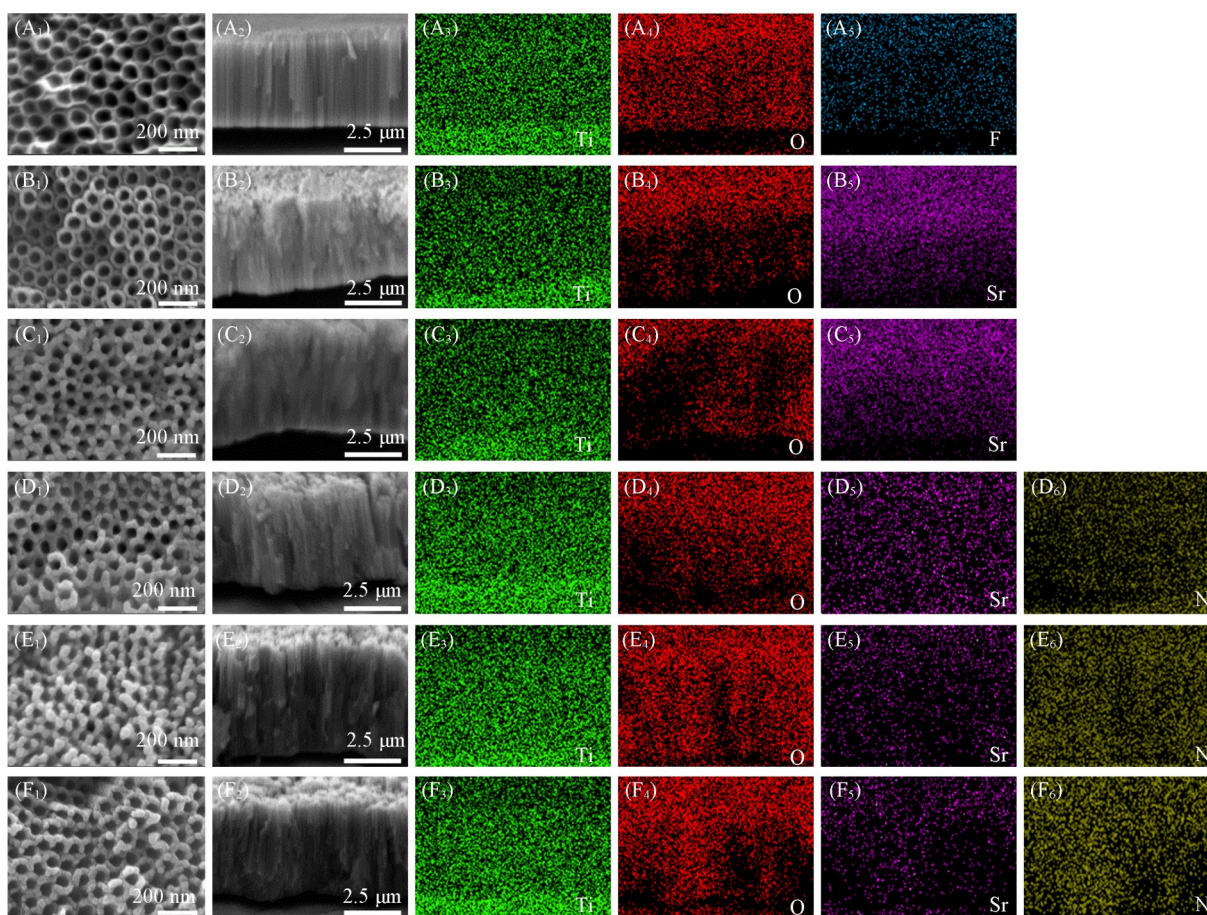


Fig. 1 Surface sectional(A₁—F₁), cross-sectional(A₂—F₂) morphologies, and distribution mappings of major elements determined by EDS(A₃—F₃, A₄—F₄, A₅—F₅, D₆—F₆) for different modified samples (A₁—A₅) TNT; (B₁—B₅) TNT@Sr; (C₁—C₅) TNT-SrA; (D₁—D₆) TNT@CMCS; (E₁—E₆) TNT@CIR; (F₁—F₆) TNT@OGP.

图2、图3和表1分别示出了不同样品表面的XPS全谱、主要元素的高分辨率XPS谱图和XPS分析的表面原子相对含量。钛表面由于自然氧化, 含有较多的氧元素, 而阳极氧化在形成纳米管的同时也引入了大量的氧元素, 并且出现F元素的吸收峰。TNT@Sr表面出现较强的Sr_{3d}特征峰(摩尔分数为11.83%), 而F元素完全消失, 这与EDS的分析结果一致。TNT@Sr表面的Ti_{2p}, O_{1s}, C_{1s}高分辨XPS谱与TNT的较相似, 峰位稍有偏移, Sr_{3d}的XPS谱可拟合成132.91和134.64 eV处的2个特征峰, 这主要是形成了钛酸锶的缘故^[19]。退火处理后样品的高分辨XPS谱和元素含量未发生明显变化。TNT@CMCS表面N_{1s}峰(摩尔分数为5.24%)的出现说明成功制备了CMCS涂层, 高分辨XPS图谱上398.99 eV处的峰对应N—H/C—N; C_{1s}的XPS可以拟合为284.00 eV处的C—C/C—H、285.69 eV处的C—O/C—N和287.12 eV处的C=O吸收峰。由于羧甲基壳聚糖涂层的覆盖, TNT@CMCS表面Sr_{3d}和Ti_{2p}的峰强度略有下降。TNT@CIR表面的C_{1s} XPS可以拟合成284.64 eV(C—C/C—H), 286.12 eV(C—O/C—N), 287.99 eV(C=O)和291.77 eV(苯环)处的4个峰^[20], N_{1s}的XPS峰出现在结合能399.23和400.96 eV处, 分别为N—H/C—N和N=O/N—O的特征峰, 结合EDS和XPS表征的N元素变化, 充分说明NO释放分子被装载到纳米管中。TNT@OGP的C_{1s}

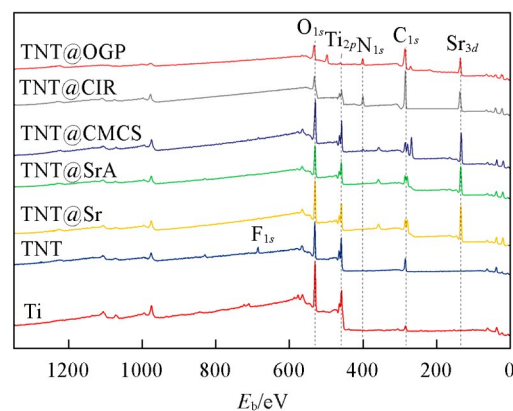


Fig. 2 XPS survey spectra of different samples' surfaces

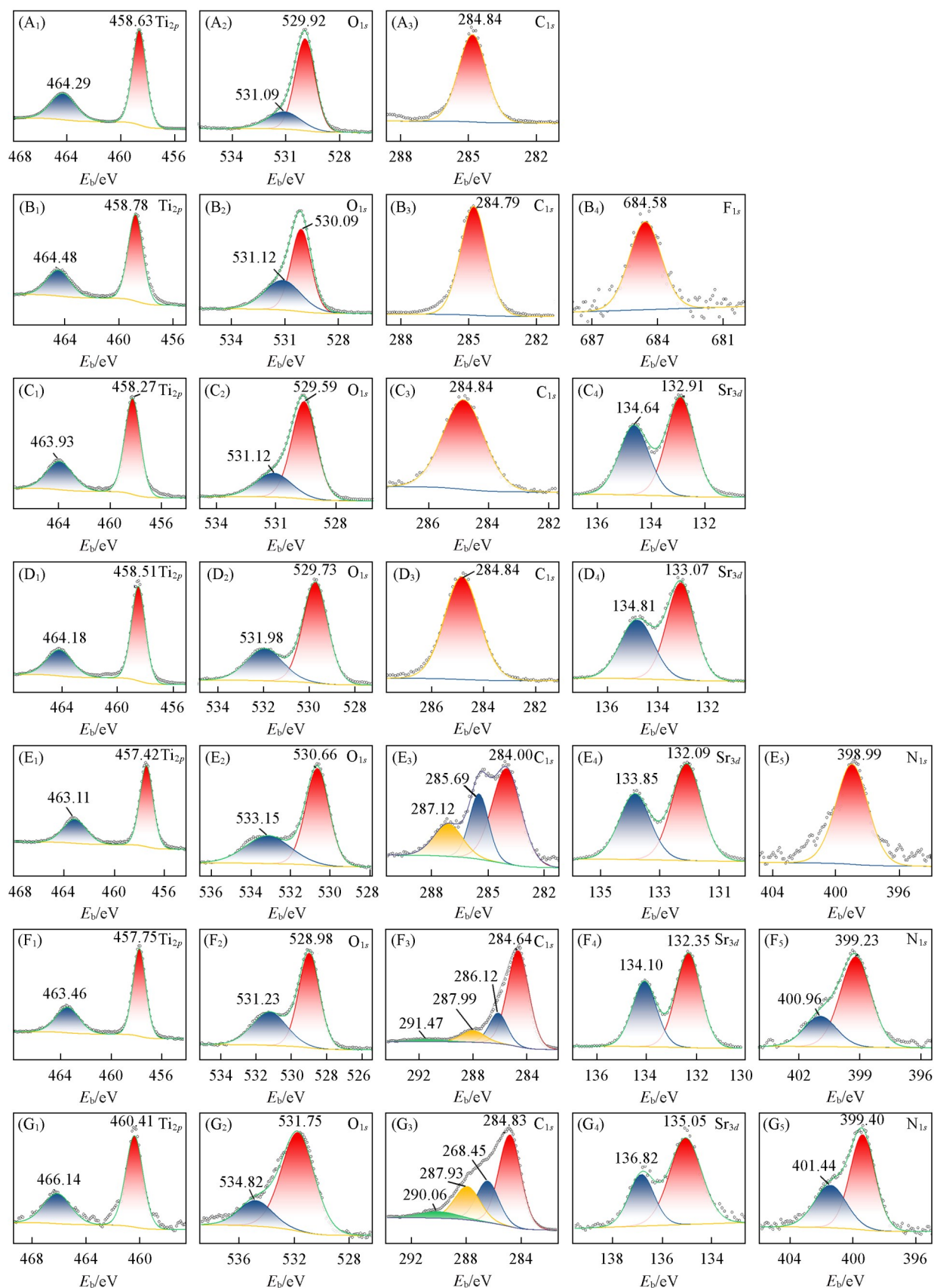


Fig. 3 High-resolution XPS spectra of different samples

(A₁–A₃) Ti; (B₁–B₄) TNT; (C₁–C₄) TNT@Sr; (D₁–D₄) TNT@SrA; (E₁–E₅) TNT@CMCS; (F₁–F₅) TNT@CIR;
(G₁–G₅) TNT@OGP.

Table 1 XPS elemental analysis results of different samples' surfaces

Sample	Molar fraction (%)					
	Ti	O	C	F	Sr	N
Ti	22.40	47.72	29.88	—	—	—
TNT	17.89	35.71	40.53	5.87	—	—
TNT@Sr	10.23	31.62	46.32	—	11.83	—
TNT@SrA	11.36	30.01	46.51	—	12.12	—
TNT@CMCS	11.46	35.88	37.59	—	9.83	5.24
TNT@CIR	10.31	31.30	40.10	—	8.25	10.04
TNT@OGP	6.97	32.72	41.65	—	6.94	11.72

拟合峰与TNT@CIR相比变化不大, N_{1s} 峰在结合能399.40 eV处对应于OGP中的氨基($-NH_2$)官能团, 结合能401.44 eV处对应于OGP中的氨基酰胺^[21]. 另外, 值得注意的是, 由于装载OGP时溶液采用生理盐水进行配制, Na^+ 与OGP的结合导致在975.12 eV出现了Na的俄歇峰. 随着成功装载NO释放分子和OGP, Ti_{2p} 和 Sr_{3d} 的XPS峰强度和元素含量显著下降, 表明成功装载了这两种生物活性物质.

图4(A)为不同样品的XRD谱图. 可以看出, 阳极氧化后, 与Ti相比, TNT的XRD谱几乎没有变化, 表明两者晶体结构基本一致. 在TNT@Sr中, 检测到了 $SrTiO_3$ 在 $2\theta=22.82^\circ$ (100), 32.43° (110), 46.45° (200), 57.77° (211)和 67.75° (220)的衍射峰, 表明水热处理使部分 Sr^{2+} 与纳米管发生化学反应形成了 $SrTiO_3$, 这与XPS的分析结果一致. 在进行退火处理后, TNT@SrA的XRD谱中出现了 α -Ti和 $SrTiO_3$ 的衍射峰, 以及锐钛矿相 TiO_2 (A- TiO_2)的(101)和(004)晶面的衍射峰, 说明退火处理不仅可以增加Sr离子的结合强度, 也改变了纳米管的晶体结构. 依次固定CMCS、N-亚硝基-N-苯基羟胺铵盐和OGP后, 与TNT@SrA相比, XRD谱图中的主要衍射峰位置未发生变化, 但 α -Ti、 $SrTiO_3$ 和锐钛矿的衍射峰强度都有逐渐减弱的趋势, 这主要是因为涂层厚度的增加使得XRD检测信号强度有所降低.

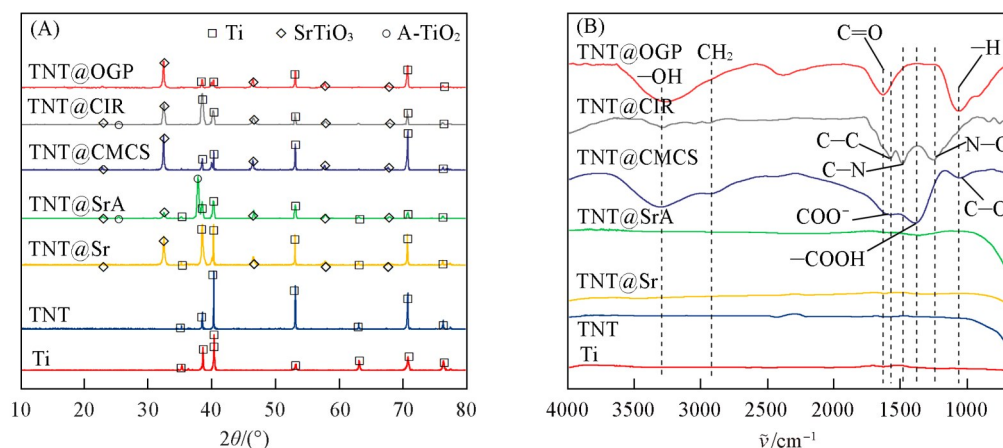


Fig. 4 XRD patterns(A) and ATR-FTIR spectra(B) of different samples

图4(B)为不同样品的ATR-FTIR谱图. Ti, TNT, TNT@Sr和TNT@SrA没有明显的红外吸收峰, 说明其表面基本没有有机化学基团, 但是电泳沉积CMCS后出现了明显的多个红外吸收峰, 1046 cm^{-1} 处为C—O的伸缩振动峰, 1612 和 1393 cm^{-1} 处的峰分别对应于羧基($-COOH$)的非对称伸缩振动和弯曲振动^[22], 2900 cm^{-1} 处为甲基($-CH_3$)和亚甲基($-CH_2$)的伸缩振动吸收峰, 这些结果表明成功制备了CMCS涂层. 在TNT@CIR的ATR FTIR谱图中, 1250 cm^{-1} 处为N-亚硝基中的氮氧键的峰, 1482 cm^{-1} 处的峰与芳香环的C—N伸缩振动相关, 这表明NO释放分子成功装载到纳米管中. TNT@OGP表面在 1062 cm^{-1} 处观察到氢键的伸缩振动峰, 这应与羧基和羟基相关, 羧基通常来自多肽的羧基末端, 而羟基则来自OGP中的酪氨酸或苏氨酸残基^[23]; 1625 cm^{-1} 处为胱氨酸残基中羰基(C=O)的拉伸振动的峰或与蛋白质酰胺I基团相关; 3273 cm^{-1} 处为蛋白质中酸性或碱性氨基酸残基的羟基振动峰, 表明OGP已被固定到材料表面.

图5是不同样品的水接触角测量结果. 阳极氧化后材料的亲水性显著改善, 这与表面阳极氧化引入大量的氧元素和形成了特殊的纳米管结构有关: 氧元素的引入增加了表面的亲水性, 而特殊的纳米管结构由于毛细管效应可以吸收水分子进入纳米管中, 因而显著增加了亲水性能. 同时表面粗糙度的增加也加大了与水接触的比表面积, 也在一定程度上增加了亲水性能. 水处理搭载锶离子和450 °C退火在一定程度上进一步改善了样品的亲水性能, 这与表面氧元素含量增加以及少量亲水性羟基的形成有关, 另外, 水处理完全去除了疏水性的氟元素, 也有利于增加材料的亲水性能, 而退火热处理则将无定形的TiO₂转变成亲水性能更好的锐钛矿结构, 从而增加了材料的亲水性能. 羧甲基壳聚糖分子富含亲水的羟基和羧基, 使得TNT@CMCS的水接触角进一步降低. 装载Cupferron后, TNT@CIR的水接触角有所增大, 这主要与固定Cupferron对纳米管的填充作用以及Cupferron中的亚硝基官能团较强的亲脂性有关. OGP的装载进一步填充了纳米管, 减小了纳米管对水分子的亲和性, 因此TNT@OGP的水接触角有所增大.

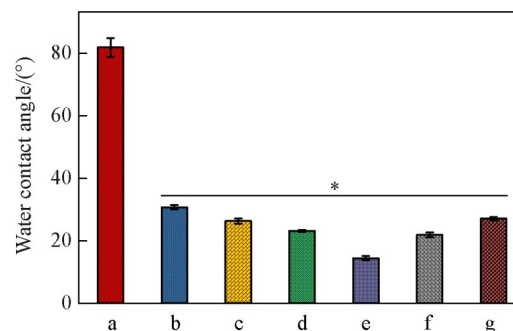


Fig. 5 Water contact angles of different surfaces
a. Ti; b. TNT; c. TNT@Sr; d. TNT@SrA; e. TNT@CMCS; f. TNT@CIR; g. TNT@OGP. In comparison with Ti, significant differences in water contact angles of other samples were observed (* $P < 0.05$, $n = 5$).

2.2 Sr²⁺离子与NO释放行为

图6(A)示出了不同样品在PBS中的Sr²⁺离子释放行为. 结果显示, 所有装载Sr²⁺的材料在14 d内均表现出可持续释放Sr²⁺离子的特性, 释放总量分别为0.88 mg/L(TNT@Sr), 0.29 mg/L(TNT@SrA), 0.18 mg/L(TNT@CMCS), 0.17 mg/L(TNT@CIR)和0.16 mg/L(TNT@OGP). 同时, 所有材料的Sr²⁺释放均存在24 h左右的突释行为, 随后锶离子的释放速度趋于稳定. 其中, TNT@Sr的Sr²⁺离子释放量最大, 这是因为水处理虽然装载了大量的Sr²⁺并形成了SrTiO₃, 但是因为大部分Sr²⁺与纳米管表面仍然是物理结合, 并且形成的SrTiO₃结构也不稳定, 导致在短时间内Sr²⁺的大量释放, 表现出明显的突释行为. 退火处理一方面使更多的物理结合Sr²⁺进入TiO₂纳米管的晶格中, 形成了更多稳定的锶化合物, 另一方面也增加了形成化合物的稳定性, 这都增加了Sr²⁺在生理环境中的扩散难度, 使得Sr²⁺的突释速率以及随后的稳定阶段释放速率显著降低. 依次固定CMCS, Cupferron和OGP后, 样品的Sr²⁺突释速率和稳定阶段的释放速率进一步降低, 这是因为Sr²⁺的释放主要经过从纳米管中分离以及扩散2个阶段, 由于退火热处理使得Sr²⁺的结合更加紧密, 而表面形成的相应功能涂层(包括电泳沉积的CMCS涂层、CIR和OGP涂层)使得Sr²⁺的扩散距离延长, 因此Sr²⁺的释放速度明显降低, 这表明退火热处理和功能涂层都可以用于Sr²⁺的控制释放; TNT@CMCS、TNT@CIR以及TNT@OGP三者之间的Sr²⁺释放速度变化不大.

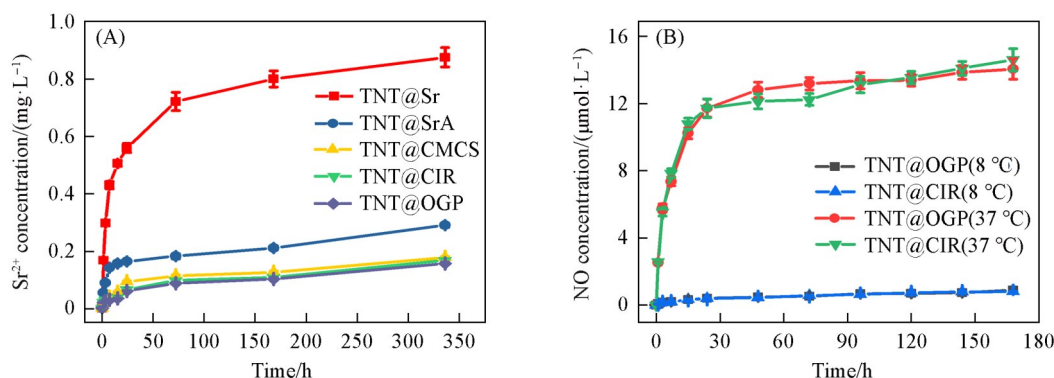


Fig. 6 Sr²⁺(A) and NO(B) release behaviors of different samples in PBS

Three parallel samples were measured and the values were averaged.

图6(B)为不同样品在不同温度下的NO释放曲线.可以看出,低温(8 °C)下,由于NO供体较稳定,TNT@CIR和TNT@OGP的NO释放量较少,释放速度也比较缓慢.而在生理环境温度(37 °C)下,NO释放速率明显增加,说明温度升高可促进Cupferron供体分子释放NO,这也表明本文制备的涂层可以在生理环境下稳定释放NO气体分子,从而有利于持续地促进骨细胞生长和功能表达,提高骨整合能力.另外,在37 °C环境中,TNT@CIR与TNT@OGP在前24 h内NO释放速度较快,这是由于NO释放分子的初始浓度较高,在37 °C下分解较容易;随着NO释放分子的逐渐分解,材料表面及纳米管内部的NO释放分子浓度显著减小,使得NO的释放量也显著减小,导致后期NO释放累积量增加并不明显,但仍然保持了持续释放特征.TNT@CIR与TNT@OGP的NO释放总量接近,7 d的释放总量分别是14.2和14.8 $\mu\text{mol/L}$,说明OGP的装载并没有显著影响NO的释放行为.

2.3 羟基磷灰石诱导形成能力

图7(A)为不同样品在SBF溶液中浸泡7 d后表面HA的SEM照片,图7(B)示出了不同样品表面的质量增加情况.Ti表面诱导HA形成的能力较差,因此仅有零星的HA颗粒,表面增重也比较缓慢.TNT表面的纳米结构为HA仿生沉积提供了更多的成核位点,表面HA颗粒聚集程度增加,因而表面增重速度有所增加,这也表明纳米结构有利于HA的诱导沉积.而TNT@Sr和TNT@SrA通过 Sr^{2+} 离子释放,参与了离子交换和HA成核过程,具有更好的HA诱导形成能力,但由于 Sr^{2+} 离子释放速率的不同,HA形成能力存在一定的差异.羧甲基壳聚糖可以整合SBF中的 Ca^{2+} ,并且其正电荷特性也可以促进磷酸盐离子在其表面的吸附,从而可以加速HA的沉积^[24,25],因此TNT@CMCS表面HA沉积增重更加明显,表面覆盖的羟基磷灰石也比较均匀、致密和完整,7 d时间已经形成了具有纳米片状结构的连续HA涂层.纳米管中装载Cupferron后,TNT@CIR表面HA沉积量略有降低,但仍高于TNT@SrA,这是因为固定Cupferron在一定程度上削弱了CMCS诱导HA形成的能力. OGP作为骨形态蛋白,与骨骼具有较强的亲和力,但TNT@OGP表面HA增量明显降低,这是因为装载OGP对CMCS涂层进一步的覆盖降低了诱导HA形成的能力.尽管如此,仍然可以在TNT@CIR和TNT@OGP表面观察到完整连续的具有纳米片状结构的HA涂层.图7(C)为TNT@OGP在SBF中浸泡21 d后表面的XRD谱图,除了 α -Ti, SrTiO_3 和锐钛矿相 TiO_2 相关的衍射峰外,在 $2\theta=25.32^\circ$, 31.77° 和 32.47° 处还检测到HA的衍射峰,说明

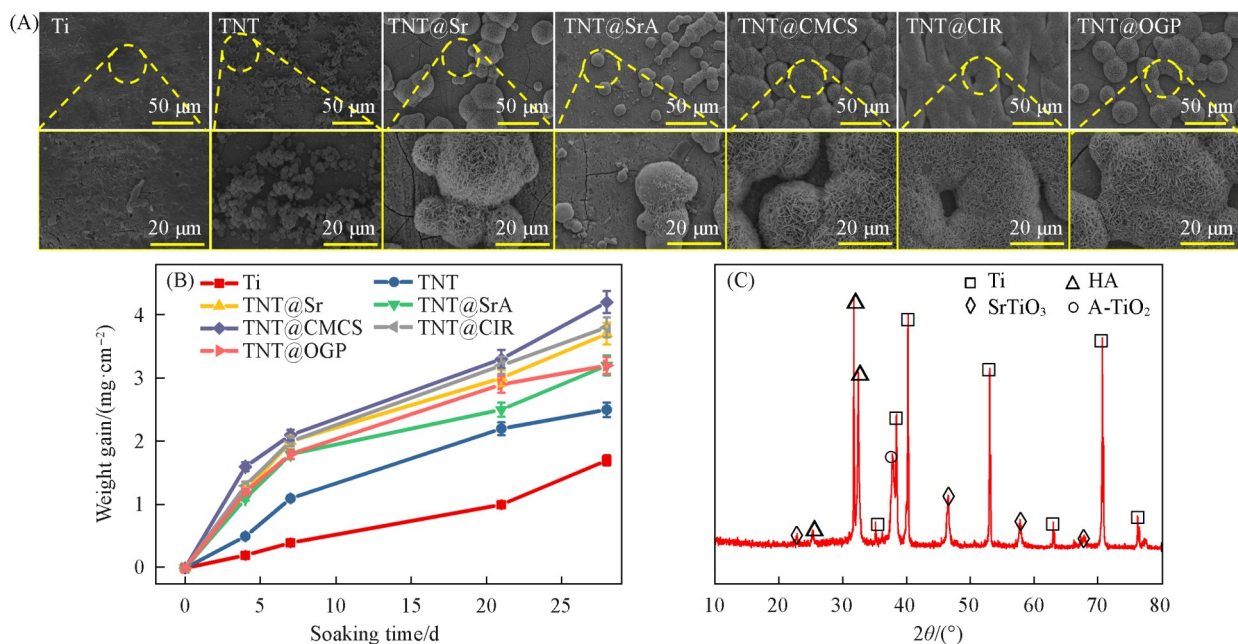


Fig. 7 SEM images of different samples immersed in SBF for 7 d(A), weight changes of different samples during the immersion experiments($n=3$)(B), and XRD patterns of TNT@OGP after immersion for 21 d in SBF(C)

样品表面沉积的固体颗粒涂层主要成分为羟基磷灰石。

2.4 细胞生长行为及功能表达

图8示出了成骨细胞在不同样品上的黏附情况,图9(A)为黏附在样品表面细胞的数量统计结果,图9(B)为CCK-8表征的细胞增殖情况.可以看出,Ti表面的成骨细胞数量很少,并且黏附的细胞大小不均匀,表明成骨细胞在Ti表面的铺展和生长性能较差,因而其增殖性能十分有限.阳极氧化后,TNT表面细胞黏附数量明显增加,且铺展效果也更为明显,这是因为TNT粗糙的表面以及良好的亲水性能有利于细胞的黏附与生长^[26].Sr是人体必需微量元素之一,与人体骨骼的形成密切相关,是骨骼和牙齿的主要成分,人体中的Sr 99%存在于骨骼和牙齿中,因此,Sr被广泛用于骨替代材料和骨组织工程的研究.水热处理装载Sr²⁺后,TNT@Sr表面的亲水性进一步提高,氟元素等杂质得到有效去除,有利于成骨细胞的黏附与增殖;释放的Sr²⁺也可通过与细胞表面的特定受体结合^[27],触发细胞信号转导途径,从而促进细胞黏附与增殖;同时,Sr²⁺离子还可以激活成骨细胞活性,直接促进骨基质矿化及钙盐沉积,降低骨吸收速率,因此TNT@Sr表面黏附的细胞数量继续增加,其铺展状态也更好,表明细胞具有更好的迁移生长能力.经过退火热处理后,TNT@SrA表面成骨细胞黏附数量进一步增加,这是因为不仅Sr²⁺的释放可以促进细胞黏附和增殖,热处理形成的锐钛矿相TiO₂也可以吸附更多的蛋白质,为细胞提供更多的结合位点,从而促进细胞黏附与增殖^[28].CMCS具有良好的生物相容性,可以模拟细胞外基质的一些特性^[29],CMCS富含的氨基在酸性环境中与质子结合使得CMCS带上大量的正电荷,从而可以与带负电荷的细胞产生静电相互作用,这些都有利于促进细胞的黏附和生长,因此TNT@CMCS表面成骨细胞黏附效果得到进一步增强,细胞黏附数量和CCK-8值也进一步显著增高.NO能够调节成骨细胞表面的黏附分子,如整合素和选择蛋白的表达,从而增强细胞与细胞外基质的黏附能力^[30];NO还可以通过影响细胞膜的渗透性和流动性,使得细胞膜更容易与基质结合,从而促进成骨细胞的黏附^[31];另外,NO还可以影响多种细胞内信号通路,例如cGMP信号通路和蛋白激酶G(PKG)通路等,这

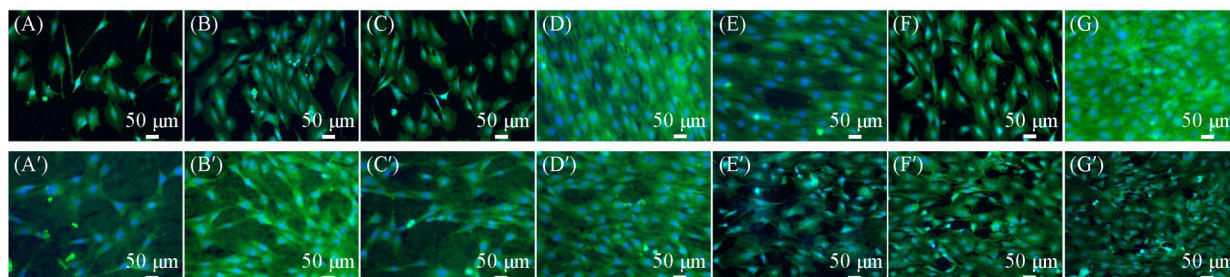


Fig. 8 Fluorescent images of cells attached to the different surfaces after being cultured for 1 d(A—G) and 3 d(A'—G'), respectively
(A, A') Ti; (B, B') TNT; (C, C') TNT@Sr; (D, D') TNT@SrA; (E, E') TNT@CMCS; (F, F') TNT@CIR; (G, G') TNT@OGP.

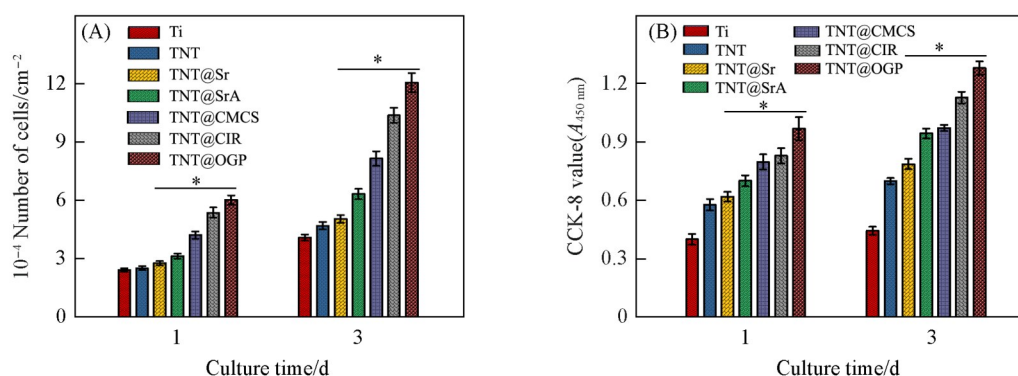


Fig. 9 Cell numbers(A) and CCK-8 values(B) for different samples

The cells were cultured on different surfaces for 1 and 3 d. Statistical significances are indicated by * $P < 0.05$ ($n = 5$) compared with Ti and TNT.

些信号通路可通过改变细胞骨架结构、细胞外基质分泌等途径影响细胞黏附^[32]。基于这些原因,在纳米管中装载NO释放分子后,材料表面的细胞黏附数量进一步增加,CCK-8值也相应增大,表明NO的释放促进了成骨细胞的黏附和生长。TNT@OGP表面成骨细胞黏附数量进一步显著增加,且细胞铺展形态更好。一方面,OGP可以通过影响细胞外基质的组成,提高纤连蛋白和层黏连蛋白的表达,从而提高成骨细胞在材料表面的黏附能力;另一方面,OGP可以调节整合素等黏附蛋白的磷酸化状态,从而影响其与基质结合的能力^[33];同时,OGP也可以通过与细胞表面受体的结合来激活细胞内的多种信号传导通路,从而促进成骨细胞的黏附生长^[34],因此,TNT@OGP表面成骨细胞的黏附和增殖性能得到进一步的改善。

图10(A)~(C)分别示出了不同样品表面成骨细胞培养1和3d后ALP,OCN和RUNX2的表达情况。可以清楚地看到,TNT表面成骨细胞ALP,OCN和RUNX2的表达高于Ti,这是因为TNT表面特殊的微纳结构和良好的亲水性能促进了细胞的黏附生长,细胞的铺展状态更好,有利于细胞功能的表达。TNT@Sr的功能表达显著提高是由于样品表面释放出来的Sr²⁺离子是成骨细胞分化的必需元素,可以调节成骨细胞的钙离子浓度与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路,促进ALP,OCN和RUNX2功能表达^[35]。同时,Sr²⁺离子还可以通过激活钙感受受体(CaSR)形成对骨骼代谢、免疫应答和炎症反应的协同调控网络,从而更加有效地调控成骨细胞的功能表达^[36]。而经过退火后样品(TNT@SrA)形成的锐钛矿相TiO₂不仅可以促进成骨细胞黏附和增殖,在提高ALP,OCN和RUNX2功能表达方面,锐钛矿相TiO₂的效果也远高于无定形TiO₂^[37];另外,持续稳定释放的Sr²⁺离子也有助于提高成骨细胞的功能表达。电泳沉积CMCS后,由于CMCS可以促进成骨细胞的生长,因而其功能表达也增强。研究表明,NO不仅可以影响Wnt/ β -catenin信号通路来调节成骨细胞功能的表达^[38],还可以调节多种细胞核转录因子的活性,例如核因子kappaB(NF- κ B)及核因子E2相关因子2(Nrf2)等,这些转录因子可直接或间接地调节ALP和OCN等成骨标记物的基因转录^[39],所以,TNT@CIR对成骨细胞功能表达具有明显的促进效果。TNT@OGP表面成骨细胞功能表达进一步增强,这是因为OGP可以激活细胞内的cAMP(环磷酸腺苷酸)/PKA(蛋白激酶A)信号通路,这一途径的激活已被证明与促进成骨细胞分化和功能表达相关^[40]。

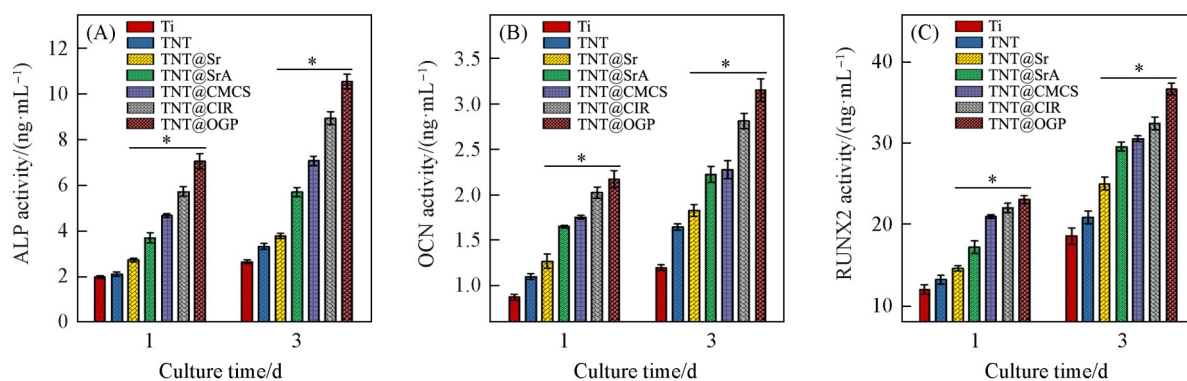


Fig. 10 ALP(A), OCN(B), and RUNX2(C) expressions of cells on different surfaces after 1 and 3 d of growth

Statistical significances are indicated by * $P < 0.05$ ($n = 5$) compared with Ti and TNT.

3 结 论

综合利用阳极氧化、水热反应和电泳沉积在钛表面原位制备了装载Sr²⁺和CMCS功能化的TiO₂纳米管微纳阵列结构,并进一步成功地在纳米管内装载了NO释放分子和成骨生长肽(OGP)。功能化的纳米管具有良好的亲水性能和规整的微纳多孔结构,可以诱导HA涂层的快速形成。在生理条件下,功能化的纳米管材料可以缓慢释放Sr²⁺和NO气体信号分子,协同OGP促进成骨细胞的黏附和生长,并显著上调成骨细胞的ALP、OCN和RUNX2等功能因子的表达,提高材料的生物相容性。因此,本文的涂层构建策略可用于提高钛基生物材料的骨整合性能。

参 考 文 献

- [1] Singh S., Kumar A., Kamboj M., Das B., Rakha K., Singh H., *J. Alloy. Compd.*, **2024**, *976*, 173094
- [2] Yu Y. Q., Jin G. D., Xue Y., Wang D. H., Liu X. Y., Sun J., *Acta Biomater.*, **2017**, *49*, 590—603
- [3] Camargo W. A., Takemoto S., Hoekstra J. W., Leeuwenburgh S. C. G., Jansen J. A., van den Beucken J. J., Alghamdi H. S., *Acta Biomater.*, **2017**, *57*, 511—523
- [4] Du Q., Wei D. Q., Wang Y. M., Cheng S., Liu S., Zhou Y., Jia D. C., *Bioact. Mater.*, **2018**, *3*(4), 426—433
- [5] Gao P. F., Zuo Y. P., Yang Y. L., Yu J. X., Fan W. Z., Bai R. Q., Yang W. H., Cai K. Y., *Chem. Eng. J.*, **2023**, *474*, 145608
- [6] Salaie R. N., Besinis A., Le H. R., Tredwin C., Handy R. D., *Mat. Sci. Eng. C: Mater.*, **2020**, *107*, 110210
- [7] Zhu B., Jia E. R., Zhang Q. M., Zhang Y. Y., Zhou H., Tan Y., Deng Z. N., *Colloid. Surface. B*, **2023**, *226*, 113293
- [8] Huang Y. Z., Cai B. Y., Yuan D. L., Guo Z. J., *J. Mater. Res. Technol.*, **2024**, *30*, 2986—2998
- [9] Makurat-Kasprolewicz B., Ossowska A., *Mater. Today Commun.*, **2023**, *34*, 105425
- [10] Bhattacharjee A., Pereira B., Soares P., Popat K. C., *Nanoscale*, **2024**, *16*(26), 12510—12522
- [11] Cheng Y. N., Huo Y. F., Yu Y. L., Duan P., Dong X. Z., Yu Z. R., Cheng Q., Dai H. L., Pan Z. Y., *Mater. Today Bio.*, **2024**, *28*, 101180
- [12] Cho D. H., Hwang Y. J., Park J. H., Lee J. Y., Park J. H., Jo I., *Bioorg. Chem.*, **2023**, *135*, 10648
- [13] Zhou Z. Z., Liu Y., Li W. J., Zhao Z. J., Xia X. W., Liu J. L., Deng Y. G., Wu Y. B., Pan X. Q., He F., Yang H. L., Lu W. H., Xu Y., Zhu X. S., *Adv. Healthc. Mater.*, **2024**, *13*(3), 2302153
- [14] Andrabi S. M., Sharma N. S., Karan A., Shahriar S. M. S., Cordon B., Ma B., Xie J. W., *Adv. Sci.*, **2023**, *10*(30), 2303259
- [15] Safari B., Davaran S., Aghanejad A., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, *175*, 544—557
- [16] Tao B. L., Lin C. C., He Y., Yuan Z., Chen M. W., Xu K., Li K., Guo A., Cai K. Y., Chen L. X., *Chem. Eng. J.*, **2021**, *423*, 130176
- [17] Regonini D., Bowen C. R., Jaroenworarluck A., Stevens R., *Mat. Sci. Eng. R.*, **2013**, *74*(12), 377—406
- [18] Milošev I., Frankel G. S., *J. Electrochem. Soc.*, **2018**, *165*(3), C127—C144
- [19] Phoon B. L., Lai C. W., Juan J. C., Show P. L., Pan G. T., *Int. J. Hydrogen Energ.*, **2019**, *44*(28), 14316—14340
- [20] Chen X. N., Wang X. H., Fang D., *Fuller. Nanotub. Car. N.*, **2020**, *28*(12), 1048—1058
- [21] Leinweber P., Kruse J., Walley F. L., Gillespie A., Eckhardt K. U., Blyth R. I. R., Regier T., *J. Synchrotron Radiat.*, **2007**, *14*, 500—511
- [22] Grabowska B., *Arch. Foundry Eng.*, **2010**, *10*(4), 43—46
- [23] Podstawka E., *J. Raman Spectrosc.*, **2008**, *39*(9), 1290—1305
- [24] Dumont V. C., Mansur A. A. P., Carvalho S. M., Borsagli F. G. L. M., Pereira M. M., Mansur H. S., *Mat. Sci. Eng. C: Mater.*, **2016**, *59*, 265—277
- [25] Pakdel P. M., Peighambaroust S. J., *Carbohydr. Polym.*, **2018**, *201*, 264—279
- [26] Cai S. X., Wu C. X., Yang W. G., Liang W. F., Yu H. B., Liu L. Q., *Nanotechnol. Rev.*, **2020**, *9*(1), 971—989
- [27] Silingardi F., Salamanna F., Español M., Maglio M., Sartori M., Giavaresi G., Bigi A., Ginebra M., Boanini E., *Biomater. Adv.*, **2024**, *163*, 213968
- [28] Dias-Netipanyj M. F., Sopchenski L., Gradowski T., Elifio-Esposito S., Popat K. C., Soares P., *J. Mater. Sci. -Mater. M.*, **2020**, *31*(11), 94
- [29] He X. C., Tang K. Y., Li X. M., Wang F., Liu J., Zhou F. F., Yang M. Y., Li M. X., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**, *137*, 45—53
- [30] Ye. J., Jiang J. K., Zhou Z. R., Weng Z. Z., Xu Y. Y., Liu L. B., Zhang W., Yang Y. F., Luo J., Wang X. L., *ACS Nano*, **2021**, *15*(8), 13692—13702
- [31] Lin Y. J., Chen C. C., Chi N. W., Nguyen T., Lu H. Y., Nguyen D., Lai P. L., Sung H. W., *Adv. Mater.*, **2018**, *30*(22), 1705605
- [32] Lee J. K., Kim D. S., Park S. Y., Baek S. W., Jung J. W., Kim T. H., Han D. K., *Adv. Sci.*, **2023**, *10*(6), 2205336
- [33] Li M. T., Wei F., Yin X. Q., Xiao L., Yang L., Su J. H., Weng J., Feng B., Xiao Y., Zhou Y. H., *Mat. Sci. Eng. C: Mater.*, **2020**, *109*, 110508
- [34] Amso Z., Cornish J., Brimble M. A., *Med. Res. Rev.*, **2016**, *36*(4), 579—640
- [35] Zhang Y. N., Wang K., Song Y., Feng E. P., Dong K., Han Y., Lu T. L., *Appl. Surf. Sci.*, **2020**, *528*, 147055
- [36] Wang L. Y., Jiang S. J., Zhou J. L., Gholipourmalekabadi M., Cao Y., Lin K. L., Zhuang Y., Yuan C. Y., *Bioact. Mater.*, **2025**, *49*, 85—120
- [37] Li Y. R., Wang S., Dong Y. J., Mu P., Yang Y., Liu X. Y., Lin C. J., Huang Q. L., *Bioact. Mater.*, **2020**, *5*(4), 1062—1070
- [38] Kalyanaraman H., Schall N., Pilz R. B., *Nitric Oxide-Biol. Ch.*, **2018**, *76*, 62—70
- [39] Yao H. Y., Emre E. S. T., Fan Y., Wang J. L., Liu F., Wei J. C., *Bioact. Mater.*, **2025**, *48*, 200—216
- [40] Wang Q., Yang X. J., Wang G. F., Wan L. L., Wang S. W., Niu X. Y., Wu J. N., Pan J. S., *Mater. Des.*, **2020**, *193*, 108811

(Ed.: X, V, K, M)