

表面纳米形貌对牙周膜干细胞衰老的作用研究

孙艳萍 廖立

口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 国家口腔疾病临床医学研究中心
教育部口腔转化医学工程研究中心 四川大学华西口腔医院, 成都 610041

[摘要] **目的** 探讨二氧化钛纳米管形貌对衰老牙周膜干细胞分化能力的影响。**方法** 利用阳极氧化法, 分别于20、70 V电压下制备出2种具有二氧化钛纳米管形貌的钛片(20V-NT、70V-NT), 观察其表面形貌特征。在成骨诱导条件下培养年轻牙周膜干细胞, 挑选具有促进成骨分化作用的表面形貌。用RO3306和Nutlin-3a诱导年轻牙周膜干细胞衰老, 获得衰老的牙周膜干细胞。诱导衰老牙周膜干细胞成骨分化, 观察表面形貌对衰老牙周膜干细胞成骨分化的影响。**结果** 阳极氧化法可在钛片表面形成纳米管形貌, 且纳米管直径随电压的增大而增大; 不同直径纳米管形貌对年轻牙周膜干细胞成骨分化的影响存在较大差异, 20V-NT表面纳米形貌促成骨分化效果更明显。与光滑钛片相比, 20V-NT表面纳米形貌提高了衰老牙周膜干细胞碱性磷酸酶阳性数量, 促进了钙沉积以及成骨标志基因Runt相关转录因子2、骨桥蛋白、骨钙素的表达。**结论** 特定的表面纳米形貌能增强衰老牙周膜干细胞的分化能力, 为牙周再生和进一步提高种植体的性能提供了一种有效方法。

[关键词] 表面形貌; 钛; 纳米管; 成骨; 衰老; 牙周膜干细胞

[中图分类号] R318.08 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2023244



本文链接 开放科学标识码

Effects of surface nanomorphology on the senescence of periodontal ligament stem cells

Sun Yanping, Liao Li

State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Engineering Research Center of Oral Translational Medicine, Ministry of Education & West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Supported by: National Key R&D Program of China (2021YFA1100603); National Nature Science Foundation of China (82071092); Key R&D Projects of Sichuan Province (2023YFS0056)

Correspondence: Liao Li, E-mail: lliao@scu.edu.cn

[Abstract] **Objective** The effect of TiO₂ nanotube morphology on the differentiation potency of senescent periodontal ligament stem cells was investigated. **Methods** Two types of titanium sheets with TiO₂ nanotube morphology (20V-NT and 70V-NT) were prepared via anodic oxidation at 20 and 70 V separately, and their surface morphology was observed. Young periodontal ligament stem cells were cultivated in an osteogenic induction medium, and the most effective surface morphology in promoting osteogenic differentiation was selected. RO3306 and Nutlin-3a were used to induce the aging of young periodontal ligament stem cells, and senescent periodontal ligament stem cells were obtained. The osteogenic differentiation of senescent periodontal ligament stem cells was induced, and the effect of surface morphology on osteogenic differentiation was observed. **Results** Nanotube morphology was achieved on the surfaces of titanium sheets through anodic oxidation, and the diameters of the nanotubes increased with voltage. A significant difference in

the effect of nanotube morphology was found among nanotubes with different diameters in the young periodontal ligament stem cells. The surface nanotube morphology of 20V-NT had a more significant effect that promoted osteogenic differentiation. Compared with a smooth tita-

[收稿日期] 2023-08-07; **[修回日期]** 2023-09-16

[基金项目] 国家重点研发计划(2021YFA1100603); 国家自然科学基金(82071092); 四川省重点研发项目(2023YFS0056)

[作者简介] 孙艳萍, 硕士, E-mail: 2021224030011@stu.scu.edu.cn

[通信作者] 廖立, 副研究员, 博士, E-mail: lliao@scu.edu.cn

nium sheet, the surface nanotube morphology of 20V-NT increased the number of alkaline phosphatase-positive senescent periodontal ligament stem cells and promoted calcium deposition and the expression of osteogenic marker genes Runt-related transcription factor 2, osteopontin, and osteocalcin. **Conclusion** A special nanotube morphology enhances the differentiation ability of senescent periodontal ligament stem cells, provides an effective method for periodontal regeneration, and further improves the performance of implants.

[Key words] surface morphology; titanium; nanotubes; osteogenesis; senescence; periodontal ligament stem cells

钛及钛合金具有良好的生物相容性、低毒性及优异的机械性能,因此近几十年来被广泛用作骨植入物^[1]。但在临床应用中仍存在许多问题,主要与钛植入物的骨整合失败有关。老年患者,尤其是伴有骨质疏松的患者骨整合率低,严重影响了钛植入物的成功率^[2]。而且,种植体周围没有牙周组织保护,缺乏本体感受器,应力作用也缺少缓冲,受力过载也是其失败的重要原因^[3]。种植的研究重点已经从单纯的实现骨结合转变为保护和预防种植体周围软硬组织丢失。已有研究^[4]表明,与去除牙周膜相比,保留牙周膜纤维的植入物周围产生了更多的新骨,保留的牙周组织直接促进了新骨的形成和骨整合。牙周膜的特殊生物功能不能被忽视。

衰老是一个受多因素影响的复杂过程,表现为组织器官的正常生理功能下降,可导致虚弱、死亡和慢性疾病,如骨质疏松、心血管疾病和认知障碍等的发生^[5]。细胞衰老、干细胞耗竭是公认的机体衰老主要特征之一,其对组织器官衰老的影响不容忽视^[6]。研究^[7]已经证明,随着机体的衰老或体外长期培养,干细胞会发生功能退化并逐渐失去干性,因而限制了其应用。如何恢复衰老干细胞的自我更新及增殖能力、多谱系分化潜力和免疫调节功能,是抗衰老的关键^[8]。

细胞外基质的硬度、表面形貌和黏附配体会影响干细胞的增殖、分化及旁分泌功能^[9]。细胞外基质硬化已被证明会在衰老过程中损害毛囊干细胞功能^[10],而大脑中的小生境硬化会导致少突胶质祖细胞功能随年龄增长而下降^[11]。通过调控细胞外基质的硬度可改变机械反应,减轻细胞对衰老环境的负面反应^[11]。其机制是通过将细胞外机械信号转化为细胞内生化信号,调节基因表达并最终影响干细胞功能^[12]。

表面形貌同样会改变细胞所受的力学刺激^[13],利用表面形貌形成特定结构可以控制间充质干细胞的自我更新或分化行为^[14]。阳极氧化法制备的二氧化钛纳米管,形态可调控^[15],模拟了天然骨

组织的超微结构^[16],可以激活间充质干细胞成骨标志性基因的表达,促进间充质干细胞成骨分化^[13]。牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSC)在体外诱导培养条件下具有成骨、成脂和成软骨特性^[17]。在动物模型中,PDLSC的移植可促进受损牙周组织中骨、牙骨质和功能性牙周膜的形成^[18]。研究^[19]表明,二氧化钛纳米管形貌对年轻的PDLSC起到了促进成骨作用,并且在二氧化钛表面形成了牙骨质样组织,其结构与天然牙周膜非常相似。但能否通过特定的表面形貌改善衰老间充质干细胞的功能尚不明确。本研究的目的是探究纳米管形貌能否提高衰老的PDLSC的干性,增强成骨分化能力,从而希望利用二氧化钛纳米管这种特定的表面形貌提高衰老干细胞的干性,促进成骨分化能力,提高老年患者牙周和种植手术的成功率。

1 材料和方法

1.1 主要材料和设备

钛(宝钛集团有限公司),氟化铵(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),胎牛血清、基础培养基(Gibco公司,美国),青霉素链霉素、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),RO-3306、BI-2536、Nutlin-3a(Selleck公司,美国),人相关干细胞成骨诱导分化试剂盒、茜素红染色剂(赛业生物科技有限公司),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色剂、RIPA裂解液、BCA蛋白含量检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司),氯化十六烷基吡啶一水合物(BBI生命科学有限公司),RNA提取试剂盒、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),一抗ALP(ab-126820)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)(ab638-56)(Abcam公司,英国),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(200306-7E4)、二抗辣根过氧化物酶标记山

羊抗小鼠IgG (H+L) (511103)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG (H+L) (511203) (成都正能生物技术有限责任公司)。

扫描电子显微镜 (Inspect F, FEI 公司, 美国), 光学轮廓仪 (Contour GT-K, Bruker 公司, 德国), X射线衍射仪 (Ultima IV, Rigaku 公司, 日本), 接触角测试仪 (DSA30S, KRUSS 公司, 德国), 多功能酶标仪 (Synergy LX, BioTek 公司, 美国)。

1.2 二氧化钛纳米管制备

纯钛 (99.9%, 1级) 片 (直径 14 mm, 厚度 1 mm; 直径 20 mm, 厚度 1 mm) 由宝钛集团有限公司提供。钛片抛光至 5 000 目, 并依次在乙醇和去离子水中洗涤, 得到表面光滑的钛片样品。

利用阳极氧化法^[15]制备二氧化钛纳米管形貌修饰钛片表面。室温下, 将光滑钛片样品置于电解液 (1wt% 氟化铵+90vol% 甘油+10vol% 水) 中, 电压在 30 min 逐步分别升高至 20、70 V, 并在恒定电压下阳极氧化 120 min, 对应得到 2 种不同纳米管形貌的钛片, 即 20 V 电压下制备的具有纳米管形貌的钛片 (20V-nanotube, 20V-NT) 和 70 V 电压下制备的具有纳米管形貌的钛片 (70V-nanotube, 70V-NT), 超声震荡 2 min。

所有钛片在 450 °C 下退火处理 3 h。通过扫描电子显微镜观察钛片表面形貌特征。用接触角测试仪对钛片表面接触角进行测量, 评估亲水性。用光学轮廓仪分析钛片表面粗糙度。用 X 射线衍射仪对钛片表面成分进行物相定性, 该衍射在 10°~80°的 2θ 范围内, 步长为 0.02°。

1.3 细胞培养

选择 13~18 岁因正畸治疗需要拔除前磨牙的患者, 提取 PDLSC。培养在含 10% 胎牛血清并添加 1% 青霉素链霉素的新鲜培养基中, 放置在 37 °C 含 5%CO₂ 湿度适宜的培养箱中, 每 2 d 换一次液。将传至第 3~6 代的年轻牙周膜干细胞 (young-periodontal ligament stem cells, Y-PDLSC) 用于后续的研究。

参考高效诱导人成纤维细胞系 hHCA2 衰老的方法^[20], 用 RO3306 和 Nutlin-3a 诱导细胞衰老, 先用 9 μmol/L RO3306 处理细胞 24 h, 使细胞同步在 G2 期。之后用 9 μmol/L RO3306 和 5 μmol/L Nutlin-3a 处理 8 h, 然后用 5 μmol/L Nutlin-3a 处理 1.5 d, 最后用 100 nmol/L BI-2536 处理 10 d, 获得的衰老牙周膜干细胞 (senescent-periodontal ligament stem cells, S-PDLSC) 用于后续实验。

1.4 衰老相关 β-半乳糖苷酶 (senescence-associated beta-galactosidase, SA-β-Gal) 染色

取单细胞悬浮液接种在 6 孔细胞培养板中, 培养 1 d 后, 使用 SA-β-Gal 染色试剂盒, 按照说明书推荐的方法进行细胞染色, 置于显微镜下观察。

1.5 ALP 与茜素红染色

取单细胞悬浮液接种在底部置有钛片的 24 孔细胞培养板中, 使用人相关干细胞成骨诱导分化试剂盒诱导培养 14 d 后进行 ALP 染色, 培养 21 d 后进行茜素红染色。培养结束后用 PBS 溶液清洗细胞, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗后, 加入 ALP 染色剂或茜素红染色剂染色 10 min, 再次用 PBS 溶液清洗, 将钛片置于显微镜下观察。在茜素红染色后, 为进行定量分析, 加入 10% 十六烷基吡啶一水合物后置室温下 30 min, 吸取上清, 用多功能酶标仪在 562 nm 处测定吸光度值。

1.6 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测

取 Y-PDLSC 单细胞悬浮液接种在底部置有钛片的 12 孔细胞培养板中, 使用人相关干细胞成骨诱导分化试剂盒对 Y-PDLSC 成骨诱导 14 d 后进行 RT-PCR, 检测钛片表面的细胞中成骨标志性基因 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、OPN、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 的表达水平, GAPDH 作参考基因。RUNX2、OPN、OCN、BM-P2、GAPDH 的引物序列见表 1。

取 S-PDLSC 单细胞悬浮液接种在底部置有钛片的 12 孔细胞培养板中, 使用人相关干细胞成骨诱导分化试剂盒对 S-PDLSC 成骨诱导 7 d 后进行 RT-PCR, 检测钛片表面的细胞中成骨标志性基因 RUNX2、OPN、OCN 的表达水平, GAPDH 作参考基因。

为评估 Y-PDLSC 与 S-PDLSC 中增殖相关基因 Ki-67 的表达水平, 细胞传代后培养 2 d 进行 RT-PCR。增殖标志物 Ki-67 (marker of proliferation Ki-67, MKI67) 的引物见表 1, GAPDH 作参考基因。培养结束后, 将样品在 PBS 中洗涤, 并用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。使用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒在每 10 μL 含有 1 μg cDNA 样品和特异性引物的 PCR 混合物中进行 RT-PCR 反应。反应条件: 95 °C 持续 30 s, 然后 95 °C 持续 10 s, 40 次循环, 60 °C 持续 30 s, 最后 95 °C 持续 15 s, 60 °C 持续 60 s。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequences

基因	引物 (5'-3')
RUNX2	上游: TGGTTACTGTTCATGGCGGGTA
	下游: TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA
OPN	上游: GAAGTTTCGACAGACCTGACAT
	下游: GTATGCACCAATCAACTCCTCG
OCN	上游: CACTCCTCGCCCTATTGGC
	下游: CCCTCCTGCTTGGACACAAAAG
BMP2	上游: ACCCGCTGTCTTCTAGCGT
	下游: TTTTCAGGCCGAACATGCTGAG
MKI67	上游: TCCTTTGGTGGGCACCTAAGACCTG
	下游: TGATGGTTGAGGTCGTTCTTGTATG
GAPDH	上游: CTTTGGTATCGTGGAAAGGACTC
	下游: GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT

1.7 蛋白免疫印迹法

使用人相关干细胞成骨诱导分化试剂盒对 S-PDLSC 诱导培养 14 d 后, RIPA 裂解液收获并裂解细胞。用 BCA 蛋白含量检测试剂盒测定成骨相关蛋白的表达。煮沸均衡蛋白质提取物后, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离蛋白质, 将其电泳转移到 PVDF 膜上。

然后将膜与 ALP、OPN 和 GAPDH 的特异性抗体一起孵育, 4 °C 震荡过夜, 清洗后加入二抗稀释液, 室温下孵育 2 h, 并进行显影以显示目的蛋白质。

1.8 数据处理及统计分析

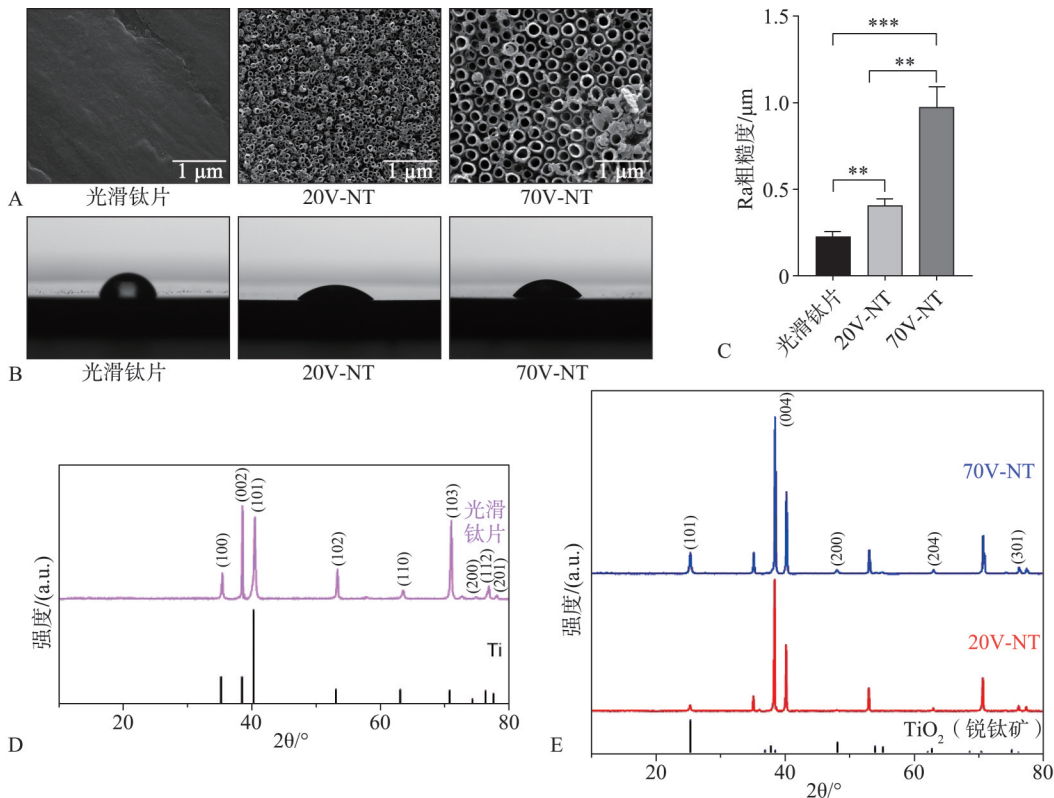
所有实验至少重复 3 次, 每次设 3 个复孔, 以确保观察结果的有效性。数据采用均数±标准差表示。采用 Graph-Pad Prism 9.0 软件进行统计分析。使用 *t* 检验对各组数据进行两两比较。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同表面纳米形貌的钛片

利用阳极氧化法制备出规律排列的二氧化钛纳米管形貌来修饰钛片表面。通过调控阳极氧化电压, 得到了 20V-NT 和 70V-NT。

扫描电子显微镜观察可见, 光滑钛片的表面整体光滑平整; 20V-NT 及 70V-NT 表面的纳米管分布均匀, 其中 20V-NT 表面纳米管直径约为 40 nm, 70V-NT 表面纳米管直径约为 170 nm (图 1A)。纳米管径随着阳极氧化电压的增大而增大。



A: 扫描电子显微镜观察表面形貌; B: 亲水性测试 (接触角); C: 表面粗糙度, ***P*<0.01, ****P*<0.005; D: 光滑钛片的 X 射线衍射; E: 不同表面纳米管形貌钛片的 X 射线衍射。

图 1 钛片表面特征

Fig 1 Surface characterizations of titanium sheets

接触角检测显示，光滑钛片的表面接触角最大，70V-NT次之，20V-NT最小（图1B）。这表明表面有纳米管形貌的钛片的亲水性较光滑钛片好，且20V-NT的亲水性更好。

表面粗糙度检测显示，光滑钛片、20V-NT、70V-NT的表面粗糙度的差异具有统计学意义，20V-NT、70V-NT的粗糙度大于光滑钛片，70V-NT的粗糙度大于20V-NT（图1C）。

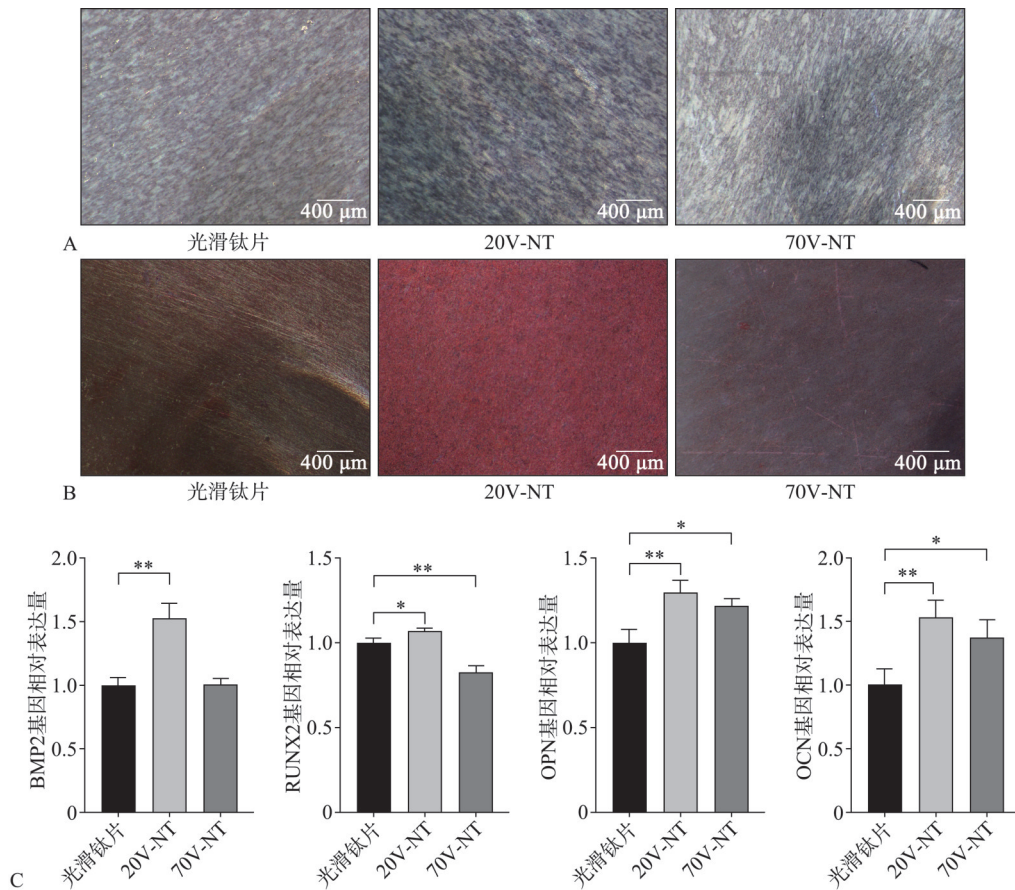
X射线衍射检测显示，20V-NT、70V-NT的表面形成了二氧化钛，并且70V-NT的吸收峰较20V-NT高（图1D、E），表明其结晶度更高。

2.2 表面纳米形貌对Y-PDLSC成骨功能的影响

针对二氧化钛纳米管形貌对Y-PDLSC成骨功能的影响进行验证。细胞成骨诱导培养14 d后进行ALP染色，ALP染色阳性的细胞核呈蓝紫色，细胞质呈淡紫色，染色结果显示，20V-NT表面可

见ALP染色更深，阳性细胞数更多（图2A），70V-NT表面与光滑钛片无明显区别。细胞成骨诱导培养21 d后进行茜素红染色，染色结果显示，20V-NT表面染色比光滑钛片及70V-NT更深（图2B）。ALP染色和茜素红染色结果均表明，20V-NT可促进PDLSC的成骨分化，而70V-NT对PDLSC的成骨分化无明显的促进作用。

细胞成骨诱导培养14 d，RT-PCR检测成骨标志性基因的表达情况，结果显示，与光滑钛片相比，20V-NT表面细胞的BMP2、RUNX2、OPN、OCN基因表达均升高；70V-NT表面细胞的OPN、OCN基因表达升高不如20V-NT明显，甚至RUNX2基因的表达下降（图2C）。结果表明，20V-NT对Y-PDLSC的成骨分化有明显的促进作用，而70V-NT对Y-PDLSC的促成骨分化作用不明显。选择具有促成骨分化作用的20V-NT进行后续实验。



A: Y-PDLSC成骨诱导培养14 d后ALP染色；B: Y-PDLSC成骨诱导培养21 d后茜素红染色；C: Y-PDLSC成骨诱导培养14 d后，RT-PCR检测BMP2、RUNX2、OPN、OCN基因的表达，*P<0.05，**P<0.01。

图2 表面纳米形貌对Y-PDLSC的影响

Fig 2 The effect of surface nanomorphology on Y-PDLSC

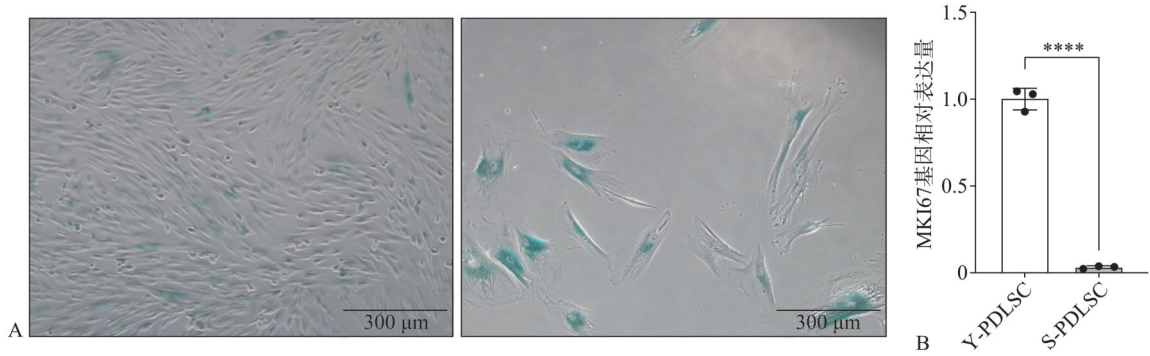
2.3 建立PDLSC体外衰老模型

应用Nutlin-3a瞬时激活p53诱导细胞衰老，SA-β-Gal染色结果显示，细胞经过诱导后，SA-

β-Gal阳性细胞率接近100%，并且细胞形态也发生了明显的改变，与Y-PDLSC呈现的典型的细长梭状不同，细胞面积更大，形状不规则（图3A），

MKI67基因表达也明显降低(图3B),细胞的增殖能力显著下降,处于增殖停滞状态。这些都是衰

老细胞的体外特征,本研究成功诱导了年轻的PDLSC衰老,获得了S-PDLSC。



A: 从左到右为Y-PDLSC、S-PDLSC的SA-β-Gal染色; B: RT-PCR检测Y-PDLSC与S-PDLSC的MKI67基因表达, ****P<0.001。

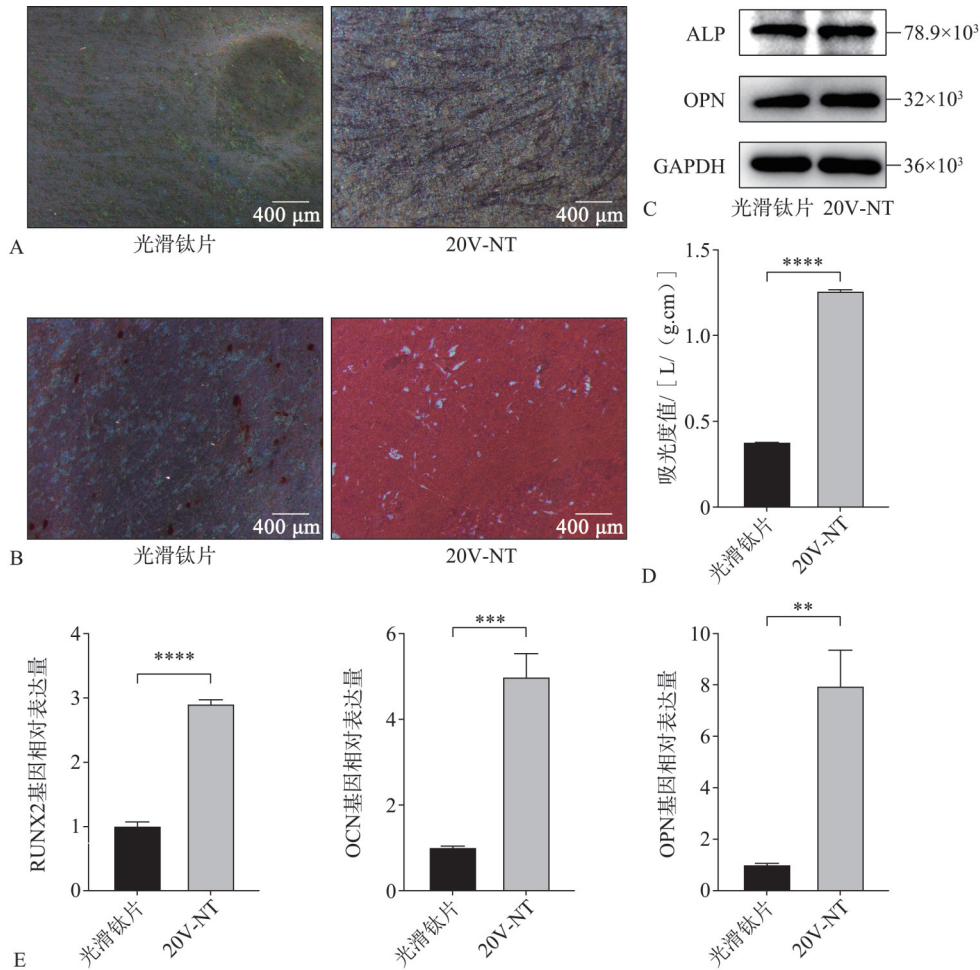
图3 诱导Y-PDLSC衰老

Fig 3 Induced Y-PDLSC senescence

2.4 表面形貌对S-PDLSC成骨功能的影响

由于70V-NT表面纳米形貌对细胞的促成骨分

化作用不明显,故仅对20V-NT进行研究了解表面形貌对衰老细胞成骨功能的影响,结果见图4。



A: S-PDLSC成骨诱导培养14 d后ALP染色; B: S-PDLSC成骨诱导培养21 d后茜素红染色; C: S-PDLSC成骨诱导14 d后,蛋白质印迹法检测S-PDLSC中ALP和OPN的表达; D: S-PDLSC成骨诱导培养21 d后,茜素红染色吸光度检测; E: S-PDLSC成骨诱导培养7 d后,RT-PCR检测RUNX2、OCN、OPN基因的表达, **P<0.01, ***P<0.005, ****P<0.001。

图4 表面纳米形貌对S-PDLSC的影响

Fig 4 The effect of surface nanomorphology on S-PDLSC

S-PDLSC 成骨诱导培养 14 d 后, ALP 染色结果显示, 20V-NT 表面染色更深, ALP 阳性细胞更多 (图 4A)。成骨诱导培养 21 d 后, 茜素红染色结果显示, 光滑钛片表面有少量钙沉积物形成, 而 20V-NT 表面有大量钙沉积物形成 (图 4B), 20V-NT 表面的茜素红吸光度高于光滑钛片 (图 4D)。无论是 ALP 染色还是茜素红染色, 都表明 20V-NT 促进了 S-PDLSC 的成骨分化。

细胞成骨诱导培养 14 d 后, 蛋白质免疫印迹法检测成骨相关蛋白的表达情况, 结果显示, 与光滑钛片相比, 20V-NT 表面 S-PDLSC 的 ALP、OPN 表达升高 (图 4C)。

细胞成骨诱导培养 7 d 后, RT-PCR 检测成骨标志性基因的表达情况, 结果显示, 与光滑钛片相比, 20V-NT 表面 S-PDLSC 的 RUNX2、OPN、OCN 表达升高 (图 4E)。

3 讨论

近年来, 材料表面形貌对细胞成骨分化影响的研究逐渐深入^[21], 本研究通过观察纳米管形貌结构对 S-PDLSC 的影响, 探究纳米管形貌是否有助于恢复 S-PDLSC 的成骨分化能力。通过分析文献中阳极氧化相关的重要参数, 包括电压、时间、电解质成分和浓度、电解质 pH、温度、电解质中氟化物 and 水的浓度^[22], 了解到通过控制这些变量, 能够在材料表面形成稳定的纳米管形貌。本研究所制备出的二氧化钛纳米管形貌, 具有良好的可重复性。而当这些关键参数发生改变时, 纳米管的长度、壁厚、直径等也会随之发生变化。随着电压的增大, 纳米管径会逐渐增大, 纳米管长度也会增加^[23]。在本研究中重点关注表面形貌的改变, 管径是一项直观且易于测量的形貌特点, 可以看到纳米管径随着电压的增大而增大。本研究表明, 利用阳极氧化法控制电压的大小, 可制备出规律而稳定的纳米管形貌。

目前, 对纳米管形貌的最佳直径尚未达成一致。有学者^[24]对直径 30~100 nm 纳米管进行研究, 发现随着纳米管直径的增加, 成骨细胞伸长, ALP 表达水平增加, 骨形成能力增强。而也有学者^[25]对直径 15~100 nm 纳米管进行研究, 发现直径 15 nm 的纳米管形貌可以促进间充质干细胞和造血干细胞的细胞黏附、增殖、迁移和分化, 随着纳米管直径的增加而成骨能力降低。当然, 也有学者^[26]研究发现, 在 50、70、100 nm 纳米管中, 70 nm

的纳米管形貌促进人脂肪干细胞成骨分化的效果最佳, 因此认为纳米管直径不是越大或越小越好, 存在最适宜的直径。这些结论的不同, 可能是由于细胞种类的不同, 也可能是受到纳米管壁厚度、长度等因素的影响。因此, 本研究首先筛选出促进 Y-PDLSC 成骨分化作用最显著的纳米管形貌, 结果发现, 并不是所有的纳米管形貌都能明显地促进成骨分化, 20V-NT 表面纳米的形貌促成骨分化效果更明显。

在以往关于纳米管形貌对细胞影响的研究中, 缺乏衰老细胞相关的研究, 因此本研究进一步了解纳米管形貌对衰老细胞的影响。首先要快速稳定地获得衰老的 PDLSC, 本研究参考诱导人类成纤维细胞系 hHCA2 衰老的方法^[20], 应用 Nutlin-3a 瞬时激活 p53 诱导细胞衰老, 其中 BI-2536 的作用时间由原来的 9 d 延长至 10 d, 以保证清除增殖细胞的效果更稳定。结果 PDLSC 经过诱导后, SA- β -Gal 染色结果显示, SA- β -Gal 阳性细胞率接近 100%, 并且细胞形态也发生了明显的改变, 与 Y-PDLSC 呈现的典型的细长梭状不同, 细胞面积更大, 形状不规则, 这些都是衰老细胞的体外特征^[27]。除此之外, 与细胞增殖能力相关的 MKI67 基因表达也明显降低, 细胞的增殖能力显著下降, 处于增殖停滞状态, 这也是细胞衰老的特征之一^[27]。本研究结果与 Johmura 等^[20]的结果相符, Johmura 还将此诱导方法与 DNA 损伤诱导衰老、氧化诱导衰老和复制衰老进行了对比, 发现 P16 的表达和 SA- β -Gal 阳性率高于其他方法诱导的细胞; RNA-seq 分析表明, 此方法诱导衰老细胞的转录组与其他诱导方法的转录组相似。本研究成功诱导了年轻的 PDLSC 衰老, 获得了 S-PDLSC。

在衰老过程中, 干细胞的再生潜力和组织分化能力下降^[28], 与细胞之间及细胞外基质之间通信方式变化相关^[6]。最近的一项研究^[29]表明, 衰老组织的结构和功能衰退与细胞机械信号 Yes 相关蛋白 (Yes associated protein, YAP) /含 WW 结构域的转录调节蛋白 1 (WW domain-containing transcription regulator protein 1, WWTR1, 也称 TAZ) 的主要效应物的功能减弱相关。YAP 响应机械刺激从细胞质易位到细胞核^[30], 纳米管形貌也是通过促进细胞核内 YAP 的表达来促进干细胞的增殖和成骨分化^[13]。YAP/TAZ 活性在细胞的生理老化过程中下降, 而维持 YAP 功能可使衰老细胞恢复活力, 并对抗衰老相关特征的出现^[29]。因此本研究推测纳米形貌可能是通过促进 YAP 的核内表达

来对抗细胞衰老,维持细胞干性。当然,纳米形貌影响S-PDLSC分化的具体作用机制仍有待深入研究和进一步验证。

纳米形貌在促进骨整合、调节免疫应答、控制感染等方面的作用都具有临床应用价值^[31]。间充质干细胞的衰老是成骨能力降低的重要原因,导致成骨破骨失衡^[32]。在卵巢切除鼠的体内实验已经证明,纳米形貌能够提高植入物的骨整合率,增加骨质疏松症的手术成功率^[33]。本研究表明,纳米形貌能提高S-PDLSC减弱的分化能力,促进成骨分化,为提高老年患者骨再生能力及术后骨整合提供了可能,进一步拓宽手术的适应证。纳米管形貌促进老年患者植入物周围形成牙周膜样组织,为成功的牙周再生和进一步提高种植体的性能提供了一种有临床应用价值的方法,是实现全牙再生的重要组成部分。本研究进一步证明了细胞外基质对衰老细胞的影响,其中,形貌对细胞衰老的影响是一个值得关注的重点。

综上,本研究在钛片上制备出了不同直径的二氧化钛纳米管形貌,从中挑选出了有明显促成骨分化效果的纳米形貌,并证明20V-NT表面纳米管形貌显著促进了S-PDLSC的成骨分化,说明通过特定表面纳米形貌可以有效恢复衰老干细胞的功能,从而有望应用于种植体的表面修饰,提高老年患者体内的骨结合及手术成功率。当然,本研究还存在着明显的不足,功能性验证较为单一,缺少体内实验,关于纳米形貌对抗细胞衰老的机制也缺乏探讨。在接下来的研究中,将会对以上内容进行深入探索,完善功能性验证实验,明确纳米形貌发挥作用的机制。在未来,可以尝试在不同材料上制备纳米形貌,拓宽纳米形貌的应用范围。同时,也可以进一步探索纳米形貌对其他衰老组织细胞的影响,希望可以用于更多组织的再生。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective[J]. *Biomaterials*, 1998, 19(18): 1621-1639.
- [2] Rocca M, Fini M, Giavaresi G, et al. Osteointegration of hydroxyapatite-coated and uncoated titanium screws in long-term ovariectomized sheep[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(4): 1017-1023.
- [3] Robinson D, Aguilar L, Gatti A, et al. Load response of the natural tooth and dental implant: a comparative biomechanics study[J]. *J Adv Prosthodont*, 2019, 11(3): 169-178.
- [4] Pei X, Wang L, Chen C, et al. Contribution of the PDL to osteotomy repair and implant osseointegration[J]. *J Dent Res*, 2017, 96(8): 909-916.
- [5] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging[J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1194-1217.
- [6] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. Hallmarks of aging: an expanding universe[J]. *Cell*, 2023, 186(2): 243-278.
- [7] Weng Z, Wang Y, Ouchi T, et al. Mesenchymal stem/stromal cell senescence: hallmarks, mechanisms, and combating strategies[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11(4): 356-371.
- [8] Li Y, Wu Q, Wang Y, et al. Senescence of mesenchymal stem cells (review)[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(4): 775-782.
- [9] Doron G, Temenoff JS. Culture substrates for improved manufacture of mesenchymal stromal cell therapies[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(15): e2100016.
- [10] Koester J, Miroshnikova YA, Ghatak S, et al. Niche stiffening compromises hair follicle stem cell potential during ageing by reducing bivalent promoter accessibility [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(7): 771-781.
- [11] Segel M, Neumann B, Hill MFE, et al. Niche stiffness underlies the ageing of central nervous system progenitor cells[J]. *Nature*, 2019, 573(7772): 130-134.
- [12] Rolvien T, Amling M. Disuse osteoporosis: clinical and mechanistic insights[J]. *Calcif Tissue Int*, 2022, 110(5): 592-604.
- [13] Liu X, Hou W, He L, et al. AMOT130/YAP pathway in topography-induced BMSC osteoblastic differentiation [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 182: 110332.
- [14] Cun X, Hosta-Rigau L. Topography: a biophysical approach to direct the fate of mesenchymal stem cells in tissue engineering applications[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(10): 2070.
- [15] Khudhair D, Bhatti A, Li Y, et al. Anodization parameters influencing the morphology and electrical properties of TiO₂ nanotubes for living cell interfacing and investigations[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 59: 1125-1142.
- [16] Tzaphlidou M. The role of collagen in bone structure: an

- image processing approach[J]. *Micron*, 2005, 36(7/8): 593-601.
- [17] Alves L, Machado V, Botelho J, et al. Enhanced proliferative and osteogenic potential of periodontal ligament stromal cells[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(5): 1352.
- [18] Aydin S, Şahin F. Stem cells derived from dental tissues [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1144: 123-132.
- [19] Gao H, Li B, Zhao L, et al. Influence of nanotopography on periodontal ligament stem cell functions and cell sheet based periodontal regeneration[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 4009-4027.
- [20] Johmura Y, Yamanaka T, Omori S, et al. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders[J]. *Science*, 2021, 371(6526): 265-270.
- [21] Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of *in vivo* senescence[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(7): 397-408.
- [22] Brammer KS, Frandsen CJ, Jin S. TiO₂ nanotubes for bone regeneration[J]. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(6): 315-322.
- [23] Cipriano AF, Miller C, Liu H. Anodic growth and biomedical applications of TiO₂ nanotubes[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(10): 2977-3003.
- [24] Ryu WH, Park CJ, Kwon HS. Synthesis of highly ordered TiO₂ nanotube in malonic acid solution by anodization[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2008, 8(10): 5467-5470.
- [25] Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, et al. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(8): 3215-3223.
- [26] Park J, Bauer S, Schlegel KA, et al. TiO₂ nanotube surfaces: 15 nm—an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation[J]. *Small*, 2009, 5(6): 666-671.
- [27] Lv L, Liu Y, Zhang P, et al. The nanoscale geometry of TiO₂ nanotubes influences the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by modulating H3-K4 trimethylation[J]. *Biomaterials*, 2015, 39: 193-205.
- [28] Brunet A, Goodell MA, Rando TA. Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(1): 45-62.
- [29] Sladitschek-Martens HL, Guarnieri A, Brumana G, et al. YAP/TAZ activity in stromal cells prevents ageing by controlling cGAS-STING[J]. *Nature*, 2022, 607(7920): 790-798.
- [30] Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, et al. Force triggers YAP nuclear entry by regulating transport across nuclear pores[J]. *Cell*, 2017, 171(6): 1397-1410.
- [31] Gulati K, Zhang Y, Di P, et al. Research to clinics: clinical translation considerations for anodized nano-engineered titanium implants[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2022, 8(10): 4077-4091.
- [32] Zheng Y, Deng J, Wang G, et al. P53 negatively regulates the osteogenic differentiation in jaw bone marrow MSCs derived from diabetic osteoporosis[J]. *Heliyon*, 2023, 9(4): e15188.
- [33] Lotz EM, Cohen DJ, Schwartz Z, et al. Titanium implant surface properties enhance osseointegration in ovariectomy induced osteoporotic rats without pharmacologic intervention[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2020, 31(4): 374-387.

(本文编辑 李彩)