

• 基础研究 •

经多巴胺或硅烷化修饰的氧化石墨烯 钛表面涂层的体外成骨性能研究

吴清霖 赖颖真 黄艳玲 谢泽宇 林彦吟

厦门医学院口腔医学院 口腔生物材料福建省高校工程研究中心, 厦门 361023

[摘要] **目的** 本研究通过比较经多巴胺或硅烷化修饰的氧化石墨烯钛表面涂层的成骨性能差异, 旨在尝试为钛表面氧化石墨烯涂层的修饰提供较为适宜的方案。**方法** 钛经碱热处理后分别进行多巴胺和硅烷化改性, 被覆氧化石墨烯涂层, 设计对照组: 纯钛(Ti)组; 实验组: 钛经碱热处理(Ti-NaOH)组、钛经碱热处理后硅烷化改性(Ti-APTES)组、钛经碱热处理后多巴胺改性(Ti-DOPA)组、钛经硅烷化改性表面修饰氧化石墨烯(Ti-APTES/GO)组、钛经多巴胺改性表面修饰氧化石墨烯(Ti-DOPA/GO)组。利用扫描电子显微镜、接触角测量仪、X射线光电子能谱分析仪及拉曼光谱分析仪对材料表面的理化性能进行分析。通过细胞活性检测、免疫荧光染色后激光共聚焦显微镜观察小鼠胚胎成骨细胞前体细胞MC3T3-E1在材料表面的增殖及黏附形态。通过碱性磷酸酶、茜素红染色及定量、实时荧光定量聚合酶链反应研究对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响。**结果** 氧化石墨烯涂层修饰后扫描电子显微镜观察可见覆盖一层薄膜样结构, 实验组亲水性皆有改善, 其中Ti-DOPA/GO组亲水性最佳。X射线光电子能谱学和拉曼光谱分析显示氧化石墨烯修饰后的材料均出现典型D峰和G峰, 表面出现大量含氧官能团。细胞计数盒检测可见各组材料均无细胞毒性, Ti-APTES/GO组增殖水平高于Ti-DOPA/GO组。激光共聚焦显微镜下可见Ti-DOPA/GO组和Ti-APTES/GO组细胞铺展更为饱满。Ti-DOPA/GO组与Ti-APTES/GO组碱性磷酸酶染色最深, Ti-APTES/GO组茜素红染色矿化结节最多, 茜素红染色定量结果最高; 在Ti-DOPA/GO组和Ti-APTES/GO组中, 早期成骨相关基因RUNX2的表达均达到较高水平, 而在晚期成骨相关基因OPN和OCN的表达上, Ti-APTES/GO组的表现优于Ti-DOPA/GO组。**结论** Ti-APTES/GO在促进MC3T3-E1细胞的黏附、增殖及体外成骨分化方面, 效果显著优于Ti-DOPA/GO。

[关键词] 钛; 氧化石墨烯; 表面改性; 成骨分化

[中图分类号] R782 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2024357



本文链接 开放科学标识码

In vitro osteogenic performance study of graphene oxide-coated titanium surfaces modified with dopamine or silane

Wu Qinglin, Lai Yingzhen, Huang Yanling, Xie Zeyu, Lin Yanyin

School of Stomatology, Xiamen Medical College & Engineering Research Center of Stomatological Biomaterials, Fujian Province University, Xiamen 361023, China

Supported by: Fujian Natural Science Foundation Project (2022J011408); Xiamen City Medical and Health Guiding Project (3502Z20244ZD1134); Scientific Research Project of Xiamen Medical College (K2023-01)

Correspondence: Lai Yingzhen, E-mail: dentistyz@126.com

[Abstract] **Objective** This study aimed to compare the osteogenic performance differences of titanium surface coatings modified by dopamine or silanized graphene oxide, and to provide a more suitable modification scheme for titanium surface graphene oxide coatings. **Methods** Titanium was subjected to alkali-heat treatment and then modified with dopamine and silanization, respectively, followed by coating with graphene oxide. Control and ex-

[收稿日期] 2024-09-25; **[修回日期]** 2024-11-29

[基金项目] 福建省自然科学基金(2022J011408); 厦门市医疗卫生指导性项目(3502Z20244ZD1134); 厦门医学院校级科研项目(K2023-01)

[第一作者] 吴清霖, 学士, E-mail: 1976717712@qq.com

[通信作者] 赖颖真, 教授, 博士, E-mail: dentistyz@126.com

perimental groups were designed as follows: pure titanium (Ti) group; titanium after alkali-heat treatment (Ti-NaOH) group; titanium after alkali-heat treatment and silanization modification (Ti-APTES) group; titanium after alkali-heat treatment and dopamine modification (Ti-DOPA) group; titanium with silanization-modified surface decorated with graphene oxide (Ti-APTES/GO) group; titanium with dopamine-modified surface decorated with graphene oxide (Ti-DOPA/GO) group. The physical and chemical properties of the material surfaces were analyzed using scanning electron microscopy (SEM), contact angle goniometer, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and Raman spectrometer. The proliferation and adhesion morphology of mouse embryonic osteoblast precursor cells MC3T3-E1 on the material surfaces were observed by cell viability detection and immunofluorescence staining followed by laser confocal microscopy. The effects on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells were studied by alkaline phosphatase (ALP) staining, alizarin red staining and quantification, and real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results** After modification with graphene oxide coating, a thin-film-like structure was observed on the surface under SEM. The hydrophilicity of all experimental groups was improved, among which the Ti-DOPA/GO group had the best hydrophilicity. XPS and Raman spectroscopy analysis showed that the modified materials exhibited typical D and G peaks, and XPS revealed the presence of a large number of oxygen-containing functional groups on the surface. CCK8 assay showed that all groups of materials had no cytotoxicity, and the proliferation level of the Ti-APTES/GO group was higher than that of the Ti-DOPA/GO group. Under the laser confocal microscope, the cells in the Ti-DOPA/GO and Ti-APTES/GO groups spread more fully. The Ti-DOPA/GO and Ti-APTES/GO groups had the deepest ALP staining, and the Ti-APTES/GO group had the most alizarin red-stained mineralized nodules and the highest quantitative result of alizarin red staining. In the Ti-DOPA/GO and Ti-APTES/GO groups, the expression of the early osteogenic-related gene RUNX2 reached a relatively high level, while in the expression of the late osteogenic-related genes OPN and OCN, the Ti-APTES/GO group performed better than the Ti-DOPA/GO group. **Conclusion** Ti-APTES/GO significantly outperformed Ti-DOPA/GO in promoting the adhesion, proliferation, and *in vitro* osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells

[Key words] titanium; graphene oxide; surface modification; osteogenic differentiation

种植修复逐渐成为牙及牙列缺失等临床疾病治疗的主流, 在种植修复中骨结合决定了种植体的长期稳定。Brånemark等^[1]在20世纪60年代提出了骨结合理论, 这一理论至今仍被大量学者^[2-3]深入研究, 旨在提高种植体的骨结合效果。钛及钛合金因其卓越的生物相容性、化学惰性和机械性能, 在牙科植入物领域得到了广泛应用。然而, 作为生物惰性材料, 钛及钛合金在生物活性方面存在局限性, 如细胞在其上的生长黏附受限, 以及诱导新骨再生的能力有限, 这导致了种植体骨结合速度缓慢的问题^[4]。为了克服这些局限, 通过表面涂层技术提升钛及钛合金种植体在体内的骨结合能力已成为研究的焦点。近年来, 聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 或硅烷化作为中间层介导的表面涂层技术得到了大量应用。PDA是由多巴胺自聚合形成的一种黏附蛋白^[5], 能有效接枝多种生物分子, 如骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)^[6]、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)^[7]等, 同时还能负载阿仑膦酸钠^[8]、甲硝唑^[9]等药物。另一方面, 硅烷偶联剂, 如3-氨丙基三乙氧基硅烷

(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES), 能为材料表面嫁接-NH₂活性基团, 进而与其他生物活性分子、蛋白等共价结合, 从而提升材料的生物相容性和成骨性能^[10-12]。氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 作为一种碳衍生物, 在作为涂层时能为材料带来丰富的含氧基团, 改善材料表面的亲水性, 促进细胞的增殖和黏附, 并具有诱导成骨的能力^[13-15]。然而, 关于如何选择中间层修饰GO以取得最佳的成骨性能, 目前尚缺乏相关的比较研究。本研究通过多巴胺或硅烷化对GO进行修饰, 并采用小鼠胚胎成骨细胞前体细胞MC3T3-E1作为研究植入材料体外成骨的常用细胞模型^[16-17]。本研究横向比较了2种不同中间涂层对MC3T3-E1细胞的生物学行为及成骨性能的影响, 旨在为钛表面GO涂层提供较优的成骨修饰方案。

1 材料和方法

1.1 材料的制备

1.1.1 不同涂层修饰钛材料的制备

将钛材料 (钛含量99.5%, Thermo Fisher SCI-

ENTIFIC公司,美国)切割为1 cm×1 cm、2 cm×2 cm 2种尺寸,其中1 cm×1 cm用于24孔板实验,2 cm×2 cm用于6孔板实验。对照组:纯钛组(Ti),实验组:钛经碱热处理组(Ti-NaOH)、钛经碱热处理后硅烷化改性组(Ti-APTES)、钛经碱热处理后多巴胺改性组(Ti-DOPA)、钛经硅烷化改性表面修饰GO组(Ti-APTES/GO)、钛经多巴胺改性表面修饰GO组(Ti-DOPA/GO)。具体制备方法如下。

Ti组:将钛材料通过丙酮(中国医药集团有限公司)、无水乙醇(中国医药集团有限公司)和蒸馏水中依次超声清洗10 min,60 °C干燥。Ti-NaOH组:Ti在5 mol/L的氢氧化钠(西陇科学股份有限公司)中室温振荡浸泡12 h,在120 °C下水热反应4 h,蒸馏水冲洗。Ti-DOPA组:盐酸多巴胺(H-8502, Sigma-Aldrich公司,美国)溶解于pH=8.5的10 mmol/L Tris-HCL缓冲体系配置为2 mg/mL DOPA溶液, Ti-NaOH在室温震荡24 h,蒸馏水冲洗。Ti-APTES组:3%的APTES(440140, Sigma-Aldrich公司,美国)倒入材料浸泡2 h,无水乙醇清洗3次,RO水清洗3次。室温将Ti-DOPA组与Ti-APTES组浸泡在1 mg/mL GO(777676, Sigma-Aldrich公司,美国)溶液中24 h,超纯水清洗样品3次,空气干燥,分别得到Ti-APTES/GO组和Ti-DOPA/GO组。各组样品均乙醇浸泡1 h,双面各照射30 min紫外线用于后续实验。

1.1.2 材料表面理化性能表征

材料表面超声清洁后室温干燥,表面喷金处理,使用LEO1530型扫描电子显微镜(ZEISS公司,德国)观察材料的表面微形貌;通过DSA30型接触角测量仪(KRÜSS公司,德国)测量材料表面亲水性,每组材料随机选取3个点测定,重复测定3次取平均值;PHI Quantum 2000X型射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron pectroscopy, X-PS)(PHI公司,美国)分析材料表面化学元素;IDSPeC型拉曼光谱分析仪(Princeton Instruments公司,瑞士)分析材料GO涂层的特征峰。

1.2 材料细胞生物学行为表现

1.2.1 成骨细胞培养

后续细胞实验均采用MC3T3-E1细胞(GNM-15,中科院细胞库)。完全细胞培养基:α-MEM培养基、10%胎牛血清(Gibco公司,美国)、1%青霉素-链霉素(Caisson公司,美国)。细胞株生长至培养皿面积的80%左右时进行传代,3~4代用于后续实验。

1.2.2 细胞活性检测

各组样品经消毒灭菌后放入24孔板,以每孔 4×10^4 密度均匀接种于材料上,在对应的1、3、5 d将各组样品夹出放入新的24孔板中,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗后,每孔加入提前配置的细胞活性CCK8试剂(CK04, Dojindo公司,日本)于37 °C避光孵育2 h。每孔100 μL转移到96孔板中, Cytation 5型酶标仪(BioTek公司,美国)测量450 nm处的吸光度值,重复测定3次。

1.2.3 免疫荧光染色

各组样品消毒灭菌后放于24孔板中,以每孔 3×10^4 的密度接种并培养细胞1 d后,吸去原培养基, PBS冲洗,4%多聚甲醛室温固定15 min,0.5% Triton X-100(T8787, Sigma-Aldrich公司,美国)室温破膜5 min,1%BSA(B2064, Sigma-Aldrich公司,美国)室温封闭30 min;细胞骨架Rhodamine Phalloidin(PHDR1, Cytoskeleton公司,美国),以300 μL/孔于37 °C避光30 min后PBS润洗1~2次。DAPI(D9542, Sigma-Aldrich公司,美国)染色:室温避光3~5 min后PBS润洗1~2次,将各组样品倒扣在滴有抗淬灭封片剂(S2100,北京索莱宝科技有限公司)的共聚焦扫描显微镜专用小皿(201100,北京索莱宝科技有限公司),在4 °C避光保存,TCS SP8型激光共聚焦显微镜(Leica公司,德国)观察拍照。

1.3 材料对细胞的成骨功能影响

1.3.1 成骨诱导液的配置及MC3T3-E1成骨诱导

成骨诱导液配置:完全培养基、10 mmol/L β-甘油磷酸钠(G9422, Sigma公司,美国)、0.01 μmol/L地塞米松(D4902, Sigma-Aldrich公司,美国)、50 μg/mL维生素C(A4403, Sigma-Aldrich公司,美国)。MC3T3-E1细胞成骨诱导:根据后续实验需求接种于6孔板或24孔板中,24 h后更换为配置的成骨诱导液,后续每3 d更换一次成骨诱导液。

1.3.2 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色

各组样品消毒后放入24孔板中,以每孔 4×10^4 接种于24孔板,诱导分化培养7 d。ALP染色:诱导7 d后将各组样品夹出放入新的24孔板中PBS润洗1~2次,4%多聚甲醛固定30 min,洗去固定液。根据BCI-P/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒(C-3206,上海碧云天生物技术股份有限公司)要求配置所需工作液,每孔加入300 μL染色工作液,

37 °C环境下避光孵育 1 h, PBS 润洗至完全去除染色液, AZ100 型正置荧光显微镜 (Nikon 公司, 日本) 拍照。

1.3.3 茜素红染色与定量检测

各组样品消毒灭菌后, 将细胞以每孔 3×10^4 密度接种于 6 孔板中, 材料表面细胞成骨诱导培养 14 d, 去除培养基后 PBS 润洗 1~2 次, 加入配置 1% 茜素红染液 (A5533, Sigma-Aldrich 公司, 美国), 调整 pH 为 4.2, 于室温下避光孵育 1 h, 数码相机和 AZ100 型正置荧光显微镜 (Nikon 公司, 日本) 拍照。

将上述染完色的样品放置于室温下干燥后, 吸取配置好的 10% 氯化十六烷基吡啶 1 mL 于各样品孔, 吸取 100 μ L 溶液至 96 孔板中, 空白孔加入 100 μ L 配置好的染色洗脱液, 测定 560 nm 处的吸光度值, 每个样品重复测定 3 次。

1.3.4 成骨相关基因表达检测

各组样品消毒灭菌后, 以每孔 6×10^5 细胞接种在 6 孔板中成骨诱导 7 d, 以每孔 5×10^5 细胞成骨诱导 14 d。相应时间点每个样品组以 1 mL 裂解液消化并抽提 RNA, 进行实时荧光定量聚合酶链反应。以 GAPDH 为内参基因, 计算成骨相关基因相对表达量。成骨相关基因引物的序列见表 1。

1.3.5 统计学分析

采用 Graphpad prism 8 软件进行统计分析, 使用单因素方差分析法比较 6 组样本的细胞增殖、茜素红定量及成骨基因表达, 以双侧 $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

表 1 成骨分化相关基因引物序列

Tab 1 Primer sequences for osteogenic differentiation-related genes

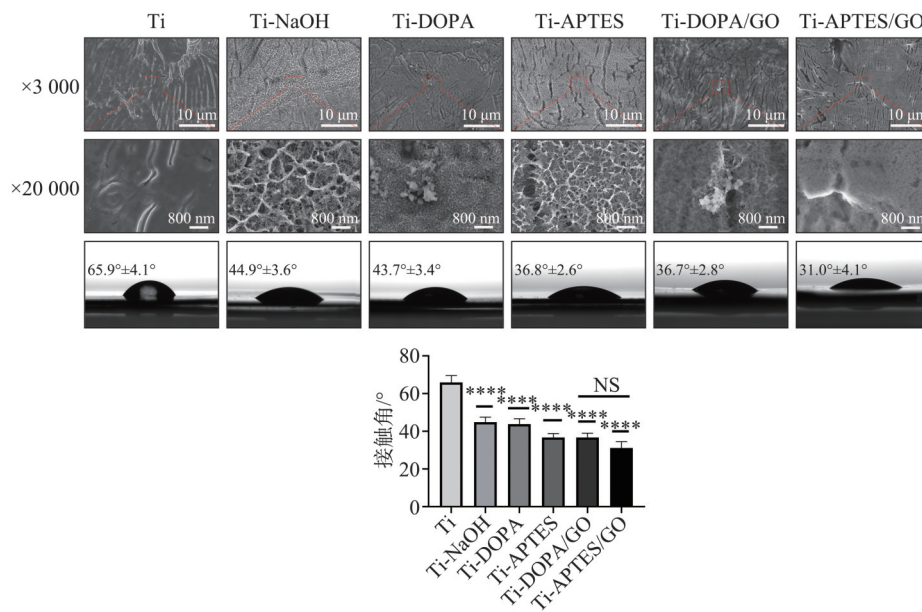
基因	引物序列 (5'-3')
RUNX2	AACGATCTGAGATTGTGGGC CCTGCGTGGGATTTCTTGTT
ALP	CCAACTCTTTGTGCCAGAGA GGCTACATTGGTGTGAGCTTT
COL-I	GCTCCTCTTAGGGGCCACT CCACGTCTACCATTTGGGG
OCN	CTGACCTCACAGATCCCAAGC TGGTCTGATAGCTCGTCACAAG
OPN	AGCAAGAACTCTTCCAAGCAA GTGAGATTCGTACAGATTCATCCG
Osterix	ACCCCAAGATGTCTATAAGCCC CGCTCTAGCTCCTGACAGTTG
GAPDH	ACAACCTTGGTATCGTGGAAGG GCCATCACGCCACAGTTTC

2 结果

2.1 材料表面理化性能

2.1.1 材料扫描电镜观察和接触角测量

如图 1 所示, Ti 在经过碱热处理后表面形成了不规则的多孔网状结构, 在高倍下观察 Ti-DOPA 组表面有多巴胺颗粒黏附。在 Ti-DOPA/GO 组和 Ti-APTES/GO 组的材料表面, 可见有一层薄膜样结构覆盖其上, 该结构为 GO。



与 Ti 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

图 1 材料表面扫描电镜图及材料表面接触角测量结果

Fig 1 Scanning electron microscopy images of the material surface and the results of contact angle measurements on the material surface

图1中接触角测量可见，在经过碱热处理后材料接触角降低，在经过DOPA和APTES改性下Ti-DOPA组和Ti-APTES组的表面接触角均有不同程度下降，进一步修饰GO涂层后Ti-DOPA/GO组和Ti-APTES/GO组表面接触角均有所下降，但两者之间差异无统计学意义。

2.1.2 拉曼光谱分析

图2中Ti-DOPA/GO组在1345 cm⁻¹和1596 cm⁻¹、Ti-APTES/GO组在1342 cm⁻¹和1601 cm⁻¹处各分别出现了石墨类物质的典型的D峰和G峰，结果表明材料成功修饰了氧化石墨烯涂层。

2.1.3 X射线光电子能谱分析

图3为表面化学改性的材料进行GO涂层修饰后的XPS分析，E、F图表中在284.8 eV出现了C-C的特征峰，286.8 eV出现C-O的特征峰，288.8 eV出现C=O的双键特征峰。由此可见，材料表面经GO涂层修饰后出现大量的含氧官能团。

2.2 细胞生物学行为

2.2.1 细胞活性检测

图4可见，各组材料均无毒性，从D1到D5组

的所有材料均显示出促进细胞增殖的效果，Ti-DOPA/GO组增殖水平低于Ti-APTES/GO组，差异有统计学意义。

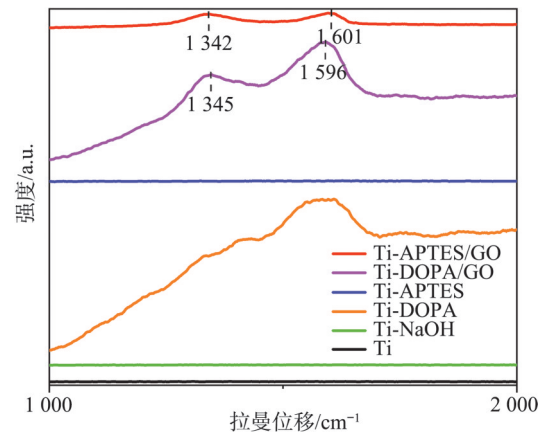
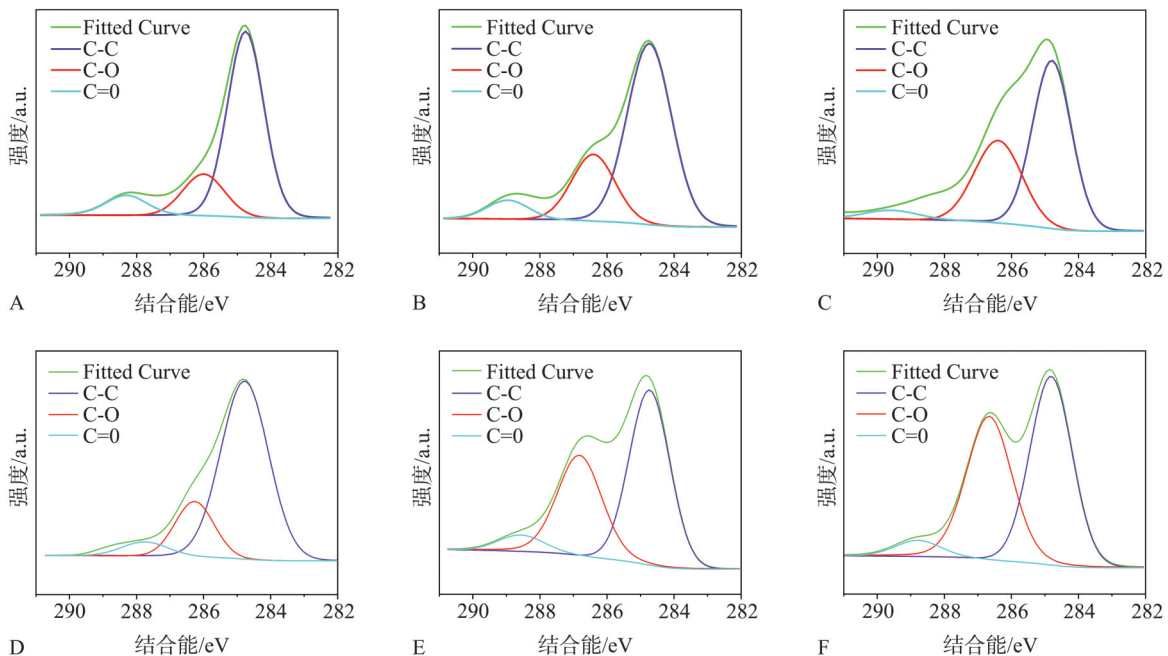


图2 拉曼光谱图
Fig 2 Raman spectrum

2.2.2 材料表面MC3T3-E1细胞免疫荧光染色

图5免疫荧光染色图可见，与其余组比较，Ti-APTES/GO组和Ti-DOPA/GO组细胞黏附形态铺展更为饱满，但两者在形态学上没有典型差异。



A: Ti组; B: Ti-NaOH组; C: Ti-DOPA组; D: Ti-APTES组; E: Ti-DOPA/GO组; F: Ti-APTES/GO组。

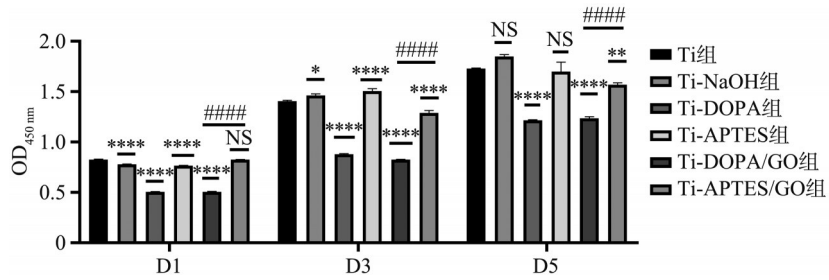
图3 XPS分析
Fig 3 XPS analysis

2.3 细胞在材料上诱导成骨分化的影响

2.3.1 碱性磷酸酶染色与茜素红染色与定量

图6A中ALP染色结果可见，Ti-DOPA/GO组和Ti-APTES/GO组的碱性磷酸酶染色较其他组有明显深蓝色沉积物。茜素红染色结果可见，Ti-AP-

TES/GO组和Ti-APTES组可见较多的深红色的矿化结节沉淀，其中Ti-APTES/GO组的矿化结节最为明显。对染色后的材料进行茜素红定量检测，如图6B，可见Ti-APTES/GO组显著高于Ti-DOPA/GO组，差异具有统计学意义。



与Ti组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ 。Ti-DOPA/GO组与Ti-APTES/GO组比较, #### $P < 0.0001$ 。

图4 材料表面MC3T3-E1细胞CCK-8检测结果

Fig 4 Results of CCK-8 assay for MC3T3-E1 cells on the material surface

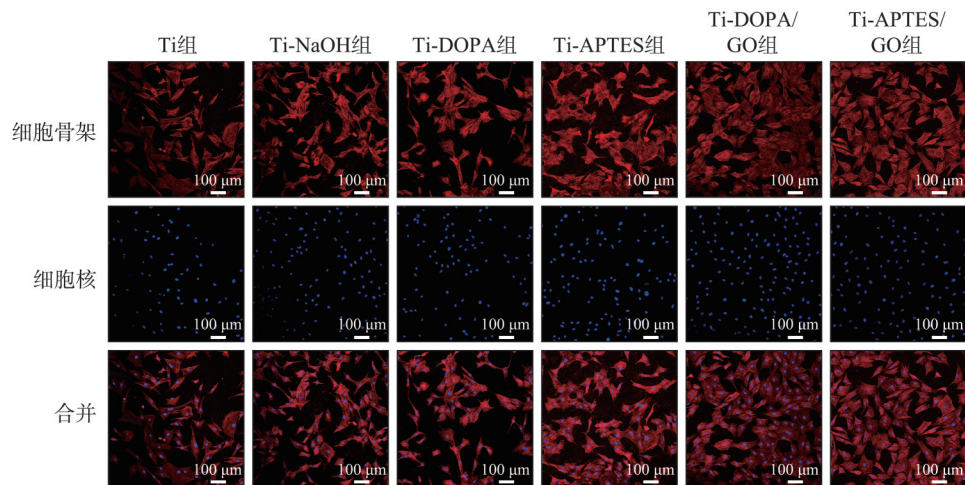
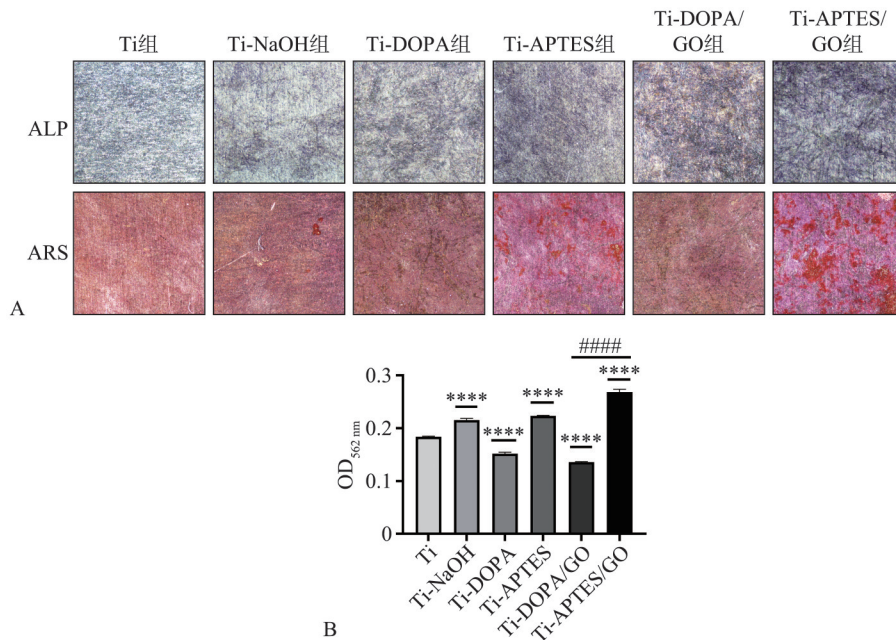


图5 材料表面MC3T3-E1细胞黏附形态 免疫荧光染色 ×100

Fig 5 Adhesion morphology of MC3T3-E1 cells on the material surface immunofluorescence staining ×100



A: ALP及茜素红染色 ×10; B: 茜素红定量结果 ×10。*与Ti组比较, **** $P < 0.0001$ 。Ti-DOPA/GO组与Ti-APTES/GO组比较, #### $P < 0.0001$ 。

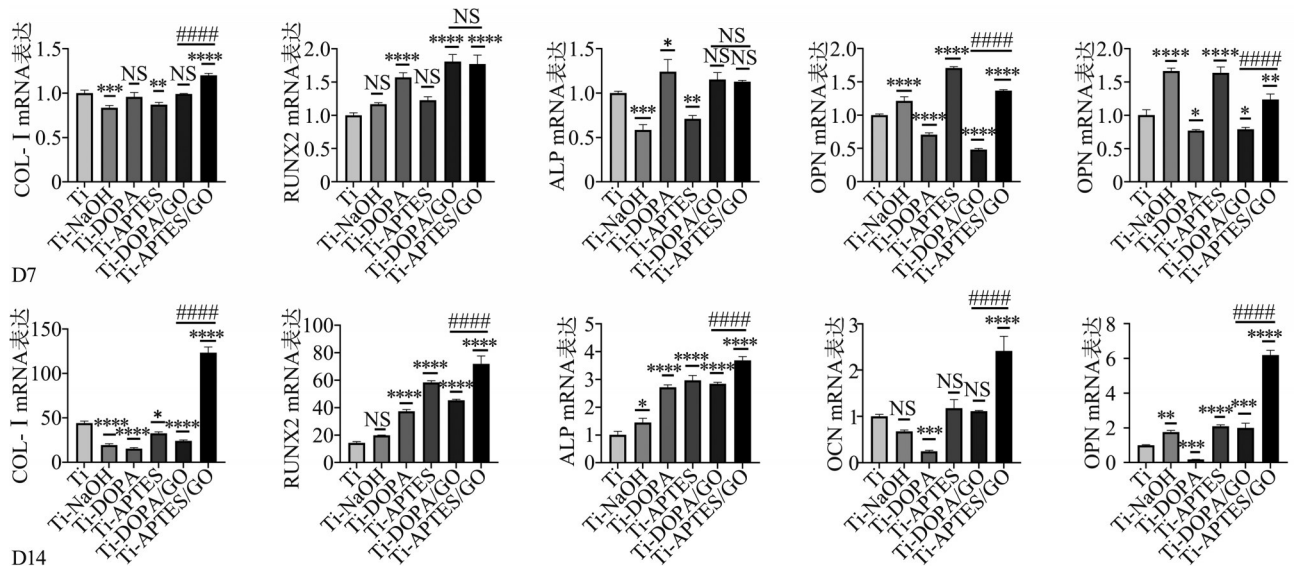
图6 成骨相关染色及定量 ×10

Fig 6 Osteogenesis-related staining and quantification ×10

2.3.2 成骨相关基因的表达

在诱导分化的第7天各成骨相关基因的表达如图7, 在成骨分化早期基因RUNX2于Ti-DOPA/GO组和Ti-APTES/GO组的基因表达较其他组均有显著增高, 两者间差异不大; ALP基因于Ti-DO-

PA组、Ti-DOPA/GO组、Ti-APTES/GO组表达最高; Ti-APTES/GO组在COL- I 基因表达最高, 差异有统计学意义。在第14天时, 成骨分化基因COL-I、RUNX2、ALP、OPN、OCN于Ti-APTES/GO组表达最高, 差异具有统计学意义。



与Ti组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。Ti-DOPA/GO组与Ti-APTES/GO组比较, #### $P < 0.0001$ 。NS: $P > 0.05$ 。D7: 第7天。D14: 第14天。

图7 材料表面成骨基因表达

Fig 7 Osteogenic gene expression on the material surface

3 讨论

在种植修复中, 骨结合是治疗成功的基础^[18]。然而, 钛种植体的生物惰性特性限制了其在临床中的应用^[19]。鉴于钛种植体表面生物活性在植入过程中的重要作用, 种植体的表面改性技术得到了广泛应用^[20]。通过改变骨和种植体之间接触面的粗糙程度可以增加与骨组织的接触面积, 在骨组织与种植体交互界面提高结合能力, 更有利于形成长期稳定的骨结合。有相关研究^[21-22]表明, 在材料表面所形成的不规则的纳米形貌具有促进Ca和P离子的吸附, 有利于磷灰石晶体的沉积形成和促进成骨。碱热处理在生物材料领域有非常广泛的应用, 通过碱热处理不仅可以在材料表面形成纳米多孔层^[23], 而且可促进 PO_4^- 的沉积, 从而加速羟磷灰石的形成^[24]。碱热处理还能够增加材料表面粗糙度, 有利于蛋白质吸附^[25], 也可以去除材料表面的污染物, 提高材料的亲水性^[26]。本研究中经过碱热处理材料的亲水性显著提升, 细胞铺展伪足更为舒展与亲水性的提升有关。

近年来以聚多巴胺为中间层介导的表面涂层技术在各领域广泛应用。PDA凭借其生物相容性和优异黏附性, 是改善界面性质的理想中间层材料。弱碱性环境下, PDA可以在大部分有机或无机材料表面形成具有黏附特性的涂层, 该涂层的黏附能力和化学反应性来源于其丰富的伯胺、仲胺和儿茶酚基团^[27], 这一系列基团为涂层表面进行再次修饰提供了活性平台^[28]。在本研究中, 相较于对照组, Ti-DOPA组对细胞的增殖水平表现出一定的抑制作用。但在早期成骨相关基因RUNX2和ALP 2个指标均高于对照组, 中晚期成骨相关基因OP和OCN低于对照组, 可见负载多巴胺在早期是有一定促成骨作用的, 可能由于多巴胺受体存在并作用于骨组织^[29], 在成骨黏附早期通过激活成骨细胞表面多巴胺D1受体一定程度促进成骨^[30-31], 而晚期成骨作用有限, 需要进一步接枝其他涂层进一步保证成骨促进效能^[32-33]。

APTES是一种独特的氨基硅烷, 其结构中包含2种不同化学性质的基团, 常被用于金属表面的生物偶联技术中^[34]。凭借其特殊的物理性质, APTES分子能够同时与无机材料和有机材料发生化

学结合,从而在表面处理时增强结合界面的强度。对钛种植体表面进行改性时,通过碱热处理使种植体表面负载大量羟基,可为硅烷偶联剂的处理提供一个更加坚定稳定的化学环境^[35]。经过碱热处理后的种植体表面,其羟基会与APTES中的甲氧基或乙氧基(在水解后)发生缩聚反应,进而形成Ti-O-Si键。随后,通过加热处理,这些Ti-O-Si键会进一步转化为更加稳定的Si-O-Si键^[36]。经过表面改性的界面中,硅烷基团末端在溶液中可水解为带正电荷的 NH_3^+ ,该基团有利于蛋白质的吸附,从而促进细胞黏附、增殖化^[12]。也有研究表明通过硅烷偶联剂处理后,可促进人成骨样细胞黏附生长^[11]及体内促进成骨^[22]。本研究中Ti-APTES组在早期成骨相关基因表达均低于对照组,而中晚期成骨相关基因表达均高于Ti-DOPA,且OPN的表达高于对照组,可见单独APTES涂层成骨效果比DOPA更为有限,作为中间层,同样需要进行其他促成骨物质的叠加^[37]。

GO作为石墨烯的衍生物,是具有二维蜂窝状晶格的扁平单层碳原子纳米薄片。GO表面分布有羟基、羧基、环氧基和羰基等大量活性含氧官能团,这些官能团可以与水分子形成氢键从而显著改善亲水性。GO还能够促进细胞增殖和种植体的骨结合^[13],作为一种独特的复合生物功能材料还可以促进成骨,负载药物、蛋白或离子等。Seok等^[38]通过构建氧化石墨烯涂层增强的多巴胺改性支架,发现GO修饰后显著提高了RUNX2、OCN和OPN基因的表达,增强材料的生物活性,促进了成骨分化。Su等^[33]通过构建钛-多巴胺-GO复合涂层,证明了多巴胺包被GO的钛材料具有良好的生物相容性、促进成骨分化和成骨免疫调节作用。Li等^[39]对钛材料进行酸蚀处理,随后进行硅烷化处理,并在其表面制备了氧化石墨烯涂层。这一材料显著增强了材料表面的亲水性,并提高了蛋白质的黏附能力。同时能够有效促进骨髓间充质干细胞在体外的增殖、黏附以及成骨分化。Ren等^[40]采用碱热处理和硅烷偶联剂制备了钛被覆功能化的GO,研究发现材料促进了MC3T3-E1细胞增殖和成骨分化,并通过负载阿司匹林进一步改善成骨性能,证明了表面功能化的Ti-GO负载阿司匹林等药物具有临床应用的潜力。与本研究的結果相似,经GO修饰后的材料表现出成骨促进作用。然而,目前尚缺乏对APTES和DOPA这两种方式修饰GO在成骨性能方面的比较研究。因此,在实际应用中,选择哪种作为GO偶联的中间

涂层是至关重要的。

本研究发现,Ti-APTES/GO组在细胞增殖、中晚期成骨相关的钙结节沉积均优于Ti-DOPA/GO组。其中成骨相关的早期基因COL- I表达水平Ti-APTES/GO组高于Ti-DOPA/GO组,而2组在RUNX2、ALP表达最高无显著差异,与ALP蓝紫色染色最深对应,可见早期成骨Ti-APTES/GO的优势有限,而到了14 d COL- I、RUNX2、ALP、OPN、OCN成骨相关基因的表达,尤其OPN、OCN中晚期基因的表达Ti-APTES/GO显著高于Ti-DOPA/GO,有效弥补了单独的多巴胺或硅烷化涂层在中晚期成骨不足的问题。这可能与硅烷偶联剂与GO涂层之间获得的稳定的共价连接有关。本研究中,经过碱热处理使钛表面形成了多孔网状结构并负载了大量羟基^[35],通过APTES与钛表面上大量的羟基发生缩聚反应,形成Ti-O-Si键,在水热反应下形成了更加稳定的Si-O-Si键^[36]。GO是一种石墨衍生物,含有大量的含氧基团如环氧基、羧基和羟基,GO的环氧基团可以与APTES分子的氨基基团发生共价结合,羧基基团也可与APTES的氨基基团之间发生酰胺化反应^[41-42]。通过这些反应,将GO稳定的被覆在种植体表面^[43],发挥了从成骨早期到中晚期持续的体外成骨促进效能,具体影响成骨的相关机制有待进一步研究。

综上所述,单独使用PDA或APTES修饰的钛材料在体外成骨促进方面存在不足,因此需要通过叠加GO修饰来增强效果。在比较经PDA修饰的GO与经APTES修饰的GO在钛表面的早期成骨性能时,两者差异并不显著。然而,在晚期成骨性能方面,多巴胺修饰的GO表现相对欠佳。相比之下,APTES修饰的GO由于通过共价结合更为稳定,因此在促进MC3T3-E1细胞的增殖、黏附及成骨相关基因的表达方面展现出更多优势。建议对钛表面依次进行硅烷化处理和GO修饰,该处理方式可显著促进MC3T3-E1细胞在体外的成骨分化性能。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Brånemark PI, Adell R, Breine U, et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies[J]. Scand J Plast Reconstr Surg, 1969, 3(2): 81-100.
- [2] Xu JY, Zhang JW, Shi YF, et al. Surface modification of biomedical Ti and Ti alloys: a review on current advanc-

- es[J]. Materials (Basel), 2022, 15(5): 1749.
- [3] 杨帮成, 周学东, 于海洋, 等. 钛种植体表面改性方法[J]. 华西口腔医学杂志, 2019, 37(2): 124-129.
Yang BC, Zhou XD, Yu HY, et al. Advances in titanium dental implant surface modification[J]. West China J Stomatol, 2019, 37(2): 124-129.
- [4] Spriano S, Yamaguchi S, Bains F, et al. A critical review of multifunctional titanium surfaces: new frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination[J]. Acta Biomater, 2018, 79: 1-22.
- [5] Xiao X, Xu Y, Fu JJ, et al. Enhanced hydroxyapatite growth and osteogenic activity on polydopamine coated Ti implants[J]. Nanosci Nanotechnol Lett, 2015, 7(3): 233-239.
- [6] Pan HT, Zheng QX, Guo XD, et al. Polydopamine-assisted BMP-2-derived peptides immobilization on biomimetic copolymer scaffold for enhanced bone induction *in vitro* and *in vivo*[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 142: 1-9.
- [7] Cui DP, Guo W, Chang J, et al. Polydopamine-coated polycaprolactone/carbon nanotube fibrous scaffolds loaded with basic fibroblast growth factor for wound healing[J]. Mater Today Bio, 2024, 28: 101190.
- [8] Zhao L, Zhang MY, Guo YF, et al. Alendronate-modified polydopamine-coated paclitaxel nanoparticles for osteosarcoma-targeted therapy[J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2019, 53: 101133.
- [9] Yan M, Liang W, Du L, et al. Metronidazole-loaded polydopamine nanomedicine with antioxidant and antibacterial bioactivity for periodontitis[J]. Nanomedicine (Lond), 2023, 18(29): 2143-2157.
- [10] Daneshmandi L, Barajaa M, Tahmasbi Rad A, et al. Graphene-based biomaterials for bone regenerative engineering: a comprehensive review of the field and considerations regarding biocompatibility and biodegradation[J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10(1): e2001414.
- [11] Moore L, Gatica M, Kim H, et al. Multi-protein delivery by nanodiamonds promotes bone formation[J]. J Dent Res, 2013, 92(11): 976-981.
- [12] Hao LJ, Li TJ, Wang L, et al. Mechanistic insights into the adsorption and bioactivity of fibronectin on surfaces with varying chemistries by a combination of experimental strategies and molecular simulations[J]. Bioact Mater, 2021, 6(10): 3125-3135.
- [13] Schünemann FH, Galárraga-Vinueza ME, Magini R, et al. Zirconia surface modifications for implant dentistry[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 98: 1294-1305.
- [14] Shin RS, Li Y, Jang LH, et al. Graphene-based materials for tissue engineering[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 105 (PB): 255-274.
- [15] Hermenean A, Codreanu A, Herman H, et al. Chitosan-graphene oxide 3D scaffolds as promising tools for bone regeneration in critical-size mouse calvarial defects[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 16641.
- [16] Xu K, Tang X, Xiang Y, et al. Impact of high sodium diet on neovascularization and osseointegration around titanium implant: an *in vivo* and *in vivo* study[J]. Biomed Environ Sci, 2024, 37(7): 739-753.
- [17] He XH, Guo CQ, Wang YH, et al. Enhancing osseointegration of titanium implants through MC3T3-E1 protein-gelatin polyelectrolyte multilayers[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2024, 112(2): e35373.
- [18] Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, et al. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man[J]. Acta Orthop Scand, 1981, 52(2): 155-170.
- [19] Kaur M, Singh K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications[J]. Mater Sci Eng C, 2019, 102: 844-862.
- [20] Han X, Ma JX, Tian AX, et al. Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical orthopaedics applications: a review[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2023, 227: 113339.
- [21] Li X, Wang L, Fan Y, et al. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(8): 2424-2435.
- [22] Sjöström T, Brydone AS, Meek RM, et al. Titanium nanofeaturing for enhanced bioactivity of implanted orthopedic and dental devices[J]. Nanomedicine (Lond), 2013, 8(1): 89-104.
- [23] Chen X, Zhu RF, Gao H, et al. A microstructural study on the alkali-treated titanium subjected to induction heating[J]. J Mater Res Technol, 2022, 20: 281-290.
- [24] Gao H, Jie YF, Wang ZQ, et al. Bioactive tantalum metal prepared by micro-arc oxidation and NaOH treatment[J]. J Mater Chem B, 2014, 2(9): 1216-1224.
- [25] Gailite L, Scopelliti PE, Sharma VK, et al. Nanoscale roughness affects the activity of enzymes adsorbed on cluster-assembled titania films[J]. Langmuir, 2014, 30

- (20): 5973-5981.
- [26] Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 74(1): 49-58.
- [27] Cheng W, Zeng XW, Chen HZ, et al. Versatile polydopamine platforms: synthesis and promising applications for surface modification and advanced nanomedicine[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(8): 8537-8565.
- [28] Guo Q, Chen JS, Wang JL, et al. Recent progress in synthesis and application of mussel-inspired adhesives[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(3): 1307-1324.
- [29] Yang HL, Xu YZ, Zhu M, et al. Inhibition of titanium-particle-induced inflammatory osteolysis after local administration of dopamine and suppression of osteoclastogenesis via D2-like receptor signaling pathway[J]. *Biomaterials*, 2016, 80: 1-10.
- [30] Hanami K, Nakano K, Saito K, et al. Dopamine D2-like receptor signaling suppresses human osteoclastogenesis [J]. *Bone*, 2013, 56(1): 1-8.
- [31] Wang C, Chen X, Knierim JJ. Egocentric and allocentric representations of space in the rodent brain[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2020, 60: 12-20.
- [32] Wu MH, Chen FX, Liu HF, et al. Bioinspired sandwich-like hybrid surface functionalized scaffold capable of regulating osteogenesis, angiogenesis, and osteoclastogenesis for robust bone regeneration[J]. *Mater Today Bio*, 2022, 17: 100458.
- [33] Su JH, Du ZB, Xiao L, et al. Graphene oxide coated titanium surfaces with osteoimmunomodulatory role to enhance osteogenesis[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 113: 110983.
- [34] Dettin M, Herath T, Gambaretto R, et al. Assessment of novel chemical strategies for covalent attachment of adhesive peptides to rough titanium surfaces: XPS analysis and biological evaluation[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 91(2): 463-479.
- [35] Yu X, Xu R, Zhang Z, et al. Different cell and tissue behavior of micro-/nano-tubes and micro-/nano-nets topographies on selective laser melting titanium to enhance osseointegration[J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 3329-3342.
- [36] Senna PM, de Almeida Barros Mourão CF, Mello-Machado RC, et al. Silane-coating strategy for titanium functionalization does not impair osteogenesis *in vivo* [J]. *Materials (Basel)*, 2021, 14(7): 1814.
- [37] Wang H, Lai YZ, Xie ZY, et al. Graphene oxide-modified concentric microgrooved titanium surfaces for the dual effects of osteogenesis and antiosteoclastogenesis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(49): 54500-54516.
- [38] Seok JM, Choe G, Lee SJ, et al. Enhanced three-dimensional printing scaffold for osteogenesis using a mussel-inspired graphene oxide coating[J]. *Mater Des*, 2021, 209: 109941.
- [39] Li Q, Wang Z. Involvement of FAK/P38 signaling pathways in mediating the enhanced osteogenesis induced by nano-graphene oxide modification on titanium implant surface[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 4659-4676.
- [40] Ren LP, Pan S, Li HQ, et al. Effects of aspirin-loaded graphene oxide coating of a titanium surface on proliferation and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15143.
- [41] Zheng D, Neoh KG, Shi ZL, et al. Assessment of stability of surface anchors for antibacterial coatings and immobilized growth factors on titanium[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2013, 406: 238-246.
- [42] Ou JF, Wang JQ, Liu S, et al. Tribology study of reduced graphene oxide sheets on silicon substrate synthesized via covalent assembly[J]. *Langmuir*, 2010, 26(20): 15830-15836.
- [43] Felgueiras HP, Evans MDM, Migonney V. Contribution of fibronectin and vitronectin to the adhesion and morphology of MC3T3-E1 osteoblastic cells to poly(NaSS) grafted Ti₆Al₄V[J]. *Acta Biomater*, 2015, 28: 225-233.

(本文编辑 洪潇)