

# 钛表面不同改性处理后修饰胶原对体外成骨性能影响的比较研究

董丹妮 黄艳玲 赖颖真 尹戈

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

**[摘要]** **目的** 对纯钛表面分别进行碱蚀、碱蚀后硅烷化、碱蚀后多巴胺修饰等不同方式改性后在其表面制备生物胶原蛋白涂层, 评价钛表面不同改性处理后胶原修饰的方案对细胞增殖黏附与成骨分化能力的影响。**方法** 胶原蛋白通过交联剂作用附着于纯钛 (Ti-C)、碱蚀钛片 (Ti-Na-C)、碱蚀后硅烷化修饰钛片 (Ti-A-C) 及碱蚀后多巴胺修饰钛片表面 (Ti-D-C), 以纯钛为对照组。采用扫描电子显微镜 (SEM) 观察材料表面微形貌, X射线光电子能谱仪 (XPS) 分析材料表面元素组成, 表面接触角测量仪评估材料表面亲水性。体外培养 MC3T3-E1 细胞, 通过 CCK-8、激光共聚焦显微镜、碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测、茜素红染色及定量检测评价材料表面成骨细胞的增殖黏附与成骨分化能力, 实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测成骨相关基因 ALP、I 型胶原蛋白 (COL-1)、骨钙素 (OCN)、骨桥蛋白 (OPN) 的 mRNA 表达水平。**结果** SEM 与 XPS 结果表明胶原已成功修饰于钛片表面, Ti-Na-C 组有较厚的胶原纤维层覆盖。表面接触角测量结果显示, 除了 Ti-Na-C 组与 Ti-Na 组的接触角差异无统计学意义, 其余胶原修饰后的材料表面具有更好的亲水性。CCK-8 结果显示各组材料均无明显细胞毒性, 胶原修饰后的材料表面成骨细胞增殖高于相应的未经胶原修饰材料; 共聚焦显微镜检测结果可见, 胶原修饰后材料表面细胞铺展面积更大; ALP 染色与茜素红染色结果均提示, Ti-Na-C 组体外成骨效果最佳, 茜素红定量结果显示 Ti-Na-C 组吸光度值最高; RT-qPCR 检测结果显示 Ti-Na-C 组的 OPN 基因表达量最高。**结论** 在碱蚀、碱蚀后硅烷化、碱蚀后多巴胺修饰等对钛表面进行不同改性处理后修饰胶原的方案中, 钛表面经过碱蚀处理后直接修饰胶原的方法最有利于 MC3T3-E1 黏附铺展、增殖与成骨分化, 可作为胶原修饰的方案。

**[关键词]** 钛; 胶原; 成骨细胞; 成骨

**[中图分类号]** R783.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2023451



本文链接 开放科学标识码

**Effects of collagen modification on the osteogenic performance of different surface-modified titanium samples *in vitro***

Dong Danni, Huang Yanling, Lai Yingzhen, Yin Ge

Dept. 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); Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202312631025); Scientific Research Project of Xiamen Medical College (K2023-01)

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

**[Abstract]** **Objective** The aim of this study was to evaluate the effects of collagen modification on the osteogenic performance of different surface-modified titanium, including alkaline etching, alkaline etching followed by silanization, and alkaline etching followed by dopamine modification. The proliferation, adhesion, and osteogenic differentiation abilities of MC3T3-E1 cells on the surfaces with collagen modification were analyzed and compared.

**Methods** Collagen was immobilized on the surfaces of pure titanium (Ti-C), alkaline-etched titanium (Ti-Na-C),

**[收稿日期]** 2023-12-25; **[修回日期]** 2024-03-18

**[基金项目]** 福建省自然科学基金面上项目 (2022J011408); 大学生创新创业训练计划 (202312631025); 厦门医学院校级科研项目 (K2023-01)

**[作者简介]** 董丹妮, 学士, E-mail: ddd\_danny@163.com

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

alkaline-etched and silanized titanium (Ti-A-C), and alkaline-etched and dopamine-modified titanium (Ti-D-C), with pure titanium (Ti) as the control group. The surface morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM), and the surface elemental composition was analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Contact angle measurements were conducted to evaluate the hydrophilicity of the surfaces. MC3T3-E1 cells were cultured on the surfaces, and their proliferation, adhesion, and osteogenic differentiation abilities were assessed using CCK-8 assay, laser scanning confocal microscope, alkaline phosphatase (ALP) staining, Alizarin red staining and quantitative analysis, as well as real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) to evaluate the mRNA expression levels of osteogenic-related genes, including ALP, type I collagen (COL-1), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN). **Results** SEM and XPS results confirmed the successful immobilization of collagen on the titanium surfaces, with the Ti-Na-C group exhibiting a higher amount of collagen modification. Contact angle measurements showed improved hydrophilicity of the surfaces after collagen modification. CCK-8 results indicated good compatibility of the materials with MC3T3-E1, with enhanced cell proliferation on the collagen-modified surfaces. Cell fluorescence staining revealed better cell spreading on the collagen-modified surfaces, and ALP and Alizarin red staining results suggested that the Ti-Na-C group exhibited the best osteogenic performance, with significantly higher absorbance values in the Alizarin red quantification analysis. RT-qPCR analysis showed that the Ti-Na-C group had the highest expression of the osteogenic-related gene OPN. **Conclusion** Among the different collagen modification approaches employed in this study, collagen modification on alkaline-etched titanium surfaces showed the most conducive effects on MC3T3-E1 cell adhesion, spreading, proliferation, and osteogenic differentiation. This approach can be considered as the optimal collagen modification strategy for enhancing osteogenesis on titanium surfaces.

**[Key words]** titanium; collagen; osteoblasts; osteogenesis

纯钛作为一种金属材料,既具有良好的抗疲劳性和耐腐蚀性,又具有良好的生物相容性,所以被广泛地应用为牙种植体修复材料<sup>[1-3]</sup>。种植体成功的关键在于种植体植入后与骨形成良好的骨整合,然而纯钛在常温下形成的钝化膜导致其与骨组织之间无法形成稳定的化学结合,早期骨结合不充分,这可能是导致种植体失败的主要原因<sup>[4]</sup>。此外,糖尿病等种植牙成功率较低的患者不断增多,拔牙后即刻种植的广泛应用等,都需要钛种植体具有更快与更稳定的骨结合能力。

表面改性是促进钛种植体骨结合的重要手段<sup>[4-6]</sup>,通过制备钛表面生物活性涂层以增强钛种植体骨结合已有诸多研究<sup>[7-10]</sup>。然而,生物活性涂层修饰前钛改性的方法并不唯一。通过物理吸附的方法将涂层直接修饰于钛表面上,既高效方便,也保留了纯钛的原始表面。单纯碱蚀处理可以形成多孔粗糙表面,增加细胞的锚固度<sup>[11]</sup>。也可通过碱处理结合其他化学改性的方法,如碱蚀后硅烷化,在材料表面引入如氨基、羟基等官能团后通过共价键结合生物活性分子,促进涂层结合的稳定<sup>[12]</sup>;另有碱蚀后经过多巴胺附加涂层,通过邻苯二酚和胺基共价接枝结合生物活性分子的方法增加材料亲水性,促进细胞黏附和成骨矿化<sup>[13]</sup>,但也有研究<sup>[13-14]</sup>认为其骨诱导能力略有不足。以上的改性方法已被证实能够实现生物活性涂层的修

饰,并且各有其独特的优势<sup>[15]</sup>。

胶原蛋白作为细胞外骨基质,广泛存在于人体的骨髓、软骨和皮肤及其他结缔组织,对于骨组织的形成至关重要<sup>[7-8,15-16]</sup>。胶原蛋白同时具有生物可降解性、低免疫原性、促细胞增殖及成骨分化的作用<sup>[7,17]</sup>,这些是纯钛种植体所缺乏的。利用胶原在钛表面进行生物涂层能模拟天然骨组织微环境,增强植入物的成骨活性,提高种植体骨结合能力<sup>[7,15,18]</sup>。然而目前尚未有通过不同改性处理方法在钛表面制备胶原涂层后对成骨细胞生物学行为和成骨分化功能的横向比较研究。

本实验拟通过钛直接浸泡<sup>[16,19-20]</sup>胶原作为对照组,比较碱蚀处理<sup>[11]</sup>、碱蚀处理结合硅烷化<sup>[7,12,19,21]</sup>、碱蚀处理结合多巴胺<sup>[19,22]</sup>3种不同钛表面改性处理后修饰胶原涂层对成骨细胞的增殖黏附及成骨分化能力影响的差异,明确具有最佳成骨性能的钛表面处理修饰胶原的方案,为促进钛种植体骨结合提供研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料与设备

纯钛(99.5%, Thermo Fisher Scientific公司,美国),多巴胺(H8502)、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)(440-

140)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐[N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC] (E1769)、N-羟基丁二酰亚胺 (N-Hydroxysuccinimide, NHS) (130672)、3%戊二醛 (G5882)、细胞核染液 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (D9542)、BSA 封闭剂 (B2064)、TritonX-100 破膜剂 (T8787)、茜素红染液 (A5533) (Sigma-Aldrich 公司, 美国), 大分子胶原 (新鲜猪皮提取, 成都科乐生物技术有限公司), PBS 缓冲液 (C-3580-0500, Vivacell, 上海逍鹏生物技术有限公司), 小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 (GNM15, 中国科学院细胞库),  $\alpha$ -MEM 培养基 (上海源培生物科技股份有限公司)、10%胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), 1%青霉素/链霉素双抗溶液 (Caisson 公司, 美国), CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 细胞骨架染液罗丹明标记的鬼笔环肽 (Rhodamine-Phalloidin) (PHDR1, Cytoskeleton 公司, 美国), 抗淬灭封片剂 (S2100, 北京索莱宝科技有限公司), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 测试盒 (南京建成生物技术有限公司), Trizol Reagent (Invitrogen 公司, 美国), Prime-Script<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq Kit (TaKaRa 公司, 日本), 氯仿 (西陇化工股份有限公司)。

扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) (LEO1530, Zeiss 公司, 德国), X 射线光电子能谱仪 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) (PHI Quantum 2000, PHI 公司, 美国), 标准型光学接触角仪 (DSA30, KRUSS 公司, 德国), 激光共聚焦显微镜 (TCS SP8, Leica 公司, 德国), 酶标仪 (Cytation 5, BioTek 公司, 美国), 高速冷冻离心机 (Eppendorf 5424, Eppendorf 公司, 德国), 台式高速冷冻离心机 (3K15, Sigma Laborzentrifugen 公司, 德国), 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪 (2720, Applied Biosystem 公司, 美国), 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 仪 (LightCycler 480, Roche 公司, 美国)。

## 1.2 材料的制备与分组

根据制备方法, 将材料分为 8 组: 纯钛 (Ti) 组, 钛碱蚀处理 (Ti-Na) 组, 钛表面碱蚀处理后硅烷化修饰 (Ti-A) 组, 钛表面碱蚀处理后多巴胺修饰 (Ti-D) 组, 纯钛表面修饰胶原 (Ti-C)

组, Ti-Na 表面修饰胶原 (Ti-Na-C) 组, Ti-A 表面修饰胶原 (Ti-A-C) 组, Ti-D 表面修饰胶原 (Ti-D-C) 组。制作方法如下。

### 1.2.1 表面多孔钛片的制备

准备钛片, 将打磨抛光后的纯钛裁剪为 1 cm×1 cm、2 cm×2 cm 的正方形, RT-qPCR 实验所用为 2 cm×2 cm 的正方形, 其他实验为 1 cm×1 cm 的正方形。将钛片依次置于丙酮、无水乙醇、反渗透 (reverse osmosis, RO) 水中超声清洗 10 min, 60 °C 烘箱中干燥。将钛片浸泡于 5 mol/L NaOH 中, 室温、摇床震荡浸泡 12 h, RO 水彻底冲洗 3 次, 再放入水热反应釜中, 120 °C 烘箱中水热处理 4 h。取出处理过的钛片, RO 水清洗 3 次, 每次 10 min, 最后浸泡 1 h, pH 计检测酸碱度显示中性后, 自然晾干储存, 命名为 Ti-Na。

### 1.2.2 表面复合多巴胺及硅烷化多孔钛片的制备

在 Tris-HCl 缓冲溶液 (10 mmol/L, pH=8.5) 中加入多巴胺配置为 2 mg/mL 的盐酸多巴胺溶液, 将碱处理过后的钛片置于其中, 室温下避光摇床震荡 24 h, RO 水彻底冲洗 3 次, 命名为 Ti-D。将碱处理过后的钛片放入 3%APTES 水溶液中进行硅烷化, 浸泡 2 h。RO 水彻底冲洗 3 次, 命名为 Ti-A。

### 1.2.3 表面修饰大分子胶原钛片的制备

将 0.01% 胶原加入在 5% 的醋酸溶液中, 室温下磁力搅拌 24 h 至胶原溶解。再依次添加 EDC (10 mmol/L) 和 NHS (25 mmol/L), 搅拌均匀后放入 Ti、Ti-Na、Ti-A、Ti-D 中, 4 °C 下反应 48 h, RO 水冲洗 3 次, 4 °C 下储存在 PBS (pH=7) 中, 命名为 Ti-C、Ti-Na-C、Ti-A-C、Ti-D-C。

## 1.3 钛表面理化性能表征

材料制备完成后, 采用单反相机 (EOS5D, 佳能公司, 日本) 拍摄观察材料表面宏观形貌; SEM 观察材料表面微形貌; XPS 分析材料表面不同元素组成; 采用接触角测量仪评估材料的表面亲水性, 将 2  $\mu$ L 水滴于材料表面, 测量材料表面水接触角大小。

## 1.4 成骨细胞体外培养

复苏冻存的小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞, 采用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素双抗溶液的  $\alpha$ -MEM 培养基, 在 37 °C、95% 相对湿度、含 5%CO<sub>2</sub> 的细胞恒温培养箱内静置培养。隔天换液并于光学显微镜下观察细胞生长状态, 定期传代, 采用 3~8 代的细胞进行实验。当细胞密度达培养皿面积的 80%~90% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 消化,

离心后重悬,计数并分离细胞,用于后续实验。

1.5 成骨细胞增殖活性检测

分别将8组材料置于24孔板中,MC3T3-E1成骨细胞(3×10<sup>4</sup>/孔)接种于材料表面,培养1、3、5 d后,每孔加入500 μL含10% CCK-8试剂的新鲜培养基,继续孵育2 h。再将孔中含有CCK-8的培养基加入96孔板(100 μL/孔),每组设置3个复孔。采用酶标仪测定各孔在450 nm处的吸光度值。

1.6 成骨细胞黏附铺展观察

分别将8组材料置于24孔板中,MC3T3-E1成骨细胞(5×10<sup>4</sup>/孔)接种于材料表面,培养24 h后,加入4%多聚甲醛室温放置30 min,PBS清洗1~2次。加入0.1% Triton X-100,室温放置5 min,PBS清洗2~3次。再加入1% BSA室温孵育30 min,PBS清洗2次。罗丹明标记的鬼笔环肽室温下避光染色30 min,PBS清洗后,DAPI室温避光染色5 min。将材料片夹入共聚焦专用小皿,蘸取2~3滴抗淬灭剂滴于材料片表面。激光共聚焦显微镜下观察材料表面细胞黏附形态。

1.7 ALP活性检测

分别将8组材料置于24孔板中,MC3T3-E1成骨细胞(2×10<sup>4</sup>/孔)接种于材料表面,培养7、14 d后,用PBS清洗,4%多聚甲醛固定30 min,PBS清洗1~2次,再加入ALP染液直到材料染色显示。再次用PBS清洗,比较各组ALP染色强度。光学显微镜下观察拍照。

1.8 茜素红染色及定量检测

茜素红定性检测:分别将8组材料置于24孔板中,MC3T3-E1成骨细胞(2×10<sup>4</sup>/孔)接种于材料表面,培养14 d后,用PBS清洗,4%多聚甲醛固定30 min,PBS清洗1~2次,再加入茜素红染液直到材料染色显示。再次用PBS清洗,比较各组茜素红染色吸光度。光学显微镜下观察拍照。

茜素红定量检测:将染色好的细胞浸润在10%氯化十六烷基嘧啶(500 μL/孔)中孵育15 min,释放出茜素红染液,混合吹打使染液均色后,加入96孔板(100 μL/孔),每组设置3个复孔。采用酶标仪测定各孔在562 nm处的吸光度值。

1.9 RT-qPCR检测成骨相关基因的mRNA表达

分别将8组材料(2 cm×2 cm)置于6孔板中,MC3T3-E1成骨细胞(5×10<sup>4</sup>/孔)接种于材料表面,培养14 d后,弃去上清,PBS清洗2次,提取RNA,进行RT-qPCR反应,选取GAPDH作为内参以分析靶基因的相对表达量。成骨相关基因ALP、I型胶原蛋白(type I collagen, COL-1)、

骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的引物序列设计见表1。

表1 成骨分化相关基因引物序列

Tab 1 Primer sequences for osteogenic differentiation-related genes

基因名称	序列
GAPDH	上游: AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC 下游: CAACAATCTCCACTTTGCCACTG
ALP	上游: CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA 下游: GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT
COL-1	上游: GCTCCTCTTAGGGGCCACT 下游: CCACGTCTCACCATTGGGG
OCN	上游: CTGACCTCACAGATCCCAAGC 下游: TGGTCTGATAGCTCGTCACAAG
OPN	上游: AGCAAGAACTCTTCCAAGCAA 下游: GTGAGATTCGTCAGATTCATCCG

1.10 统计学分析

实验数据均采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析,数据经方差齐性检验后,采用ANOVA单因素方差分析对结果进行显著性分析,P<0.05代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 材料表面形貌观察

材料表面形貌观察见图1。除了Ti-Na-C组可见材料表面有明显丝状纹路存在外,其他组未见差异。

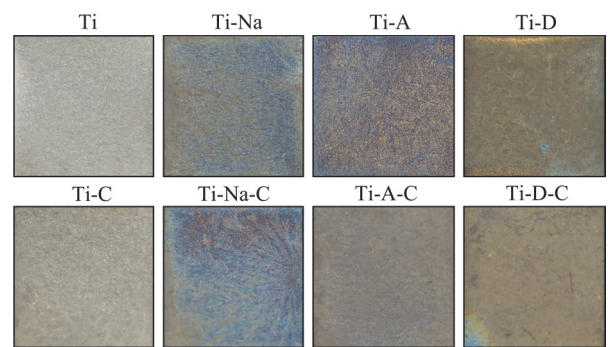


图1 材料表面形貌观察

Fig 1 Observation of material surface

2.2 材料表面SEM观察

材料表面SEM观察见图2。胶原修饰前,材料经过碱处理后(Ti-Na组)在表面有效形成了许多大小不一的孔隙,Ti-A组孔隙结构与Ti-Na组差别不大,Ti-D组可见多巴胺颗粒沉积在孔隙上方。胶原修饰后,Ti-C组未见明显胶原覆盖,Ti-Na-C

组原有的多孔结构明显消失，有较厚的胶原纤维层覆盖，而Ti-A-C组与Ti-D-C组胶原纤维覆盖量

明显较少，且高倍镜下可见Ti-D-C组中胶原选择性地出现在多巴胺颗粒上方。

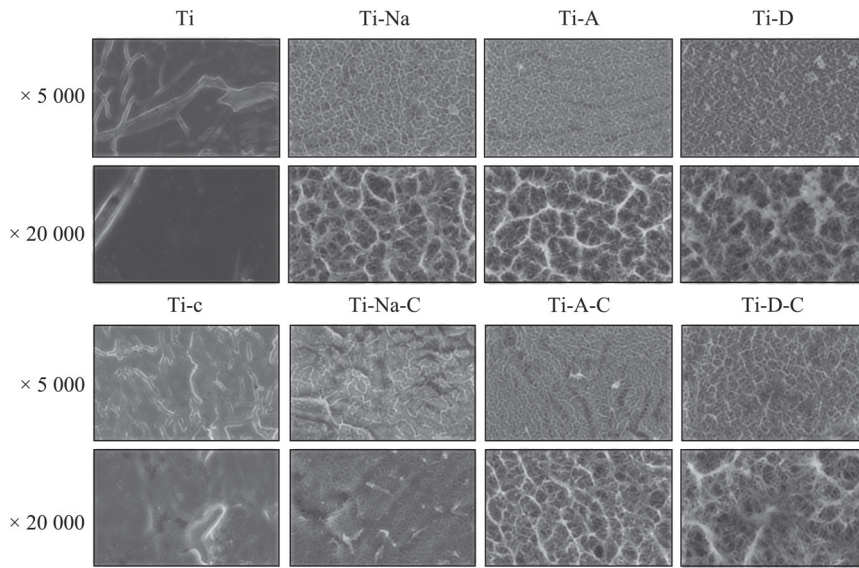


图 2 材料表面SEM图

Fig 2 SEM images of the material surface morphology

2.3 材料表面元素组成

材料表面元素XPS分析结果见图3。与胶原修饰前的组别相比，胶原修饰后的4个组别表面的氮元素特征峰有所增加，钛元素和氧元素峰降低。

2.4 材料表面接触角

材料表面接触角测量结果见图4。Ti-Na-C组与Ti-Na组间的差异无统计学意义，其余胶原修饰后材料的表面接触角都小于Ti组，差异具有统计学意义 (P<0.000 1)。Ti-Na-C组、Ti-A-C组、Ti-D-C组表面接触角都小于Ti-C组 (P<0.000 1)。Ti-Na-C组表面接触角大于Ti-A-C组 (P<0.05) 和Ti-D-C组 (P<0.01)，Ti-A-C组与Ti-D-C组差异无统计学意义。材料表面的接触角大小与材料亲水性成反比，这表明胶原修饰后材料的亲水性优于Ti

组，Ti-A-C组与Ti-D-C组的亲水性最佳。

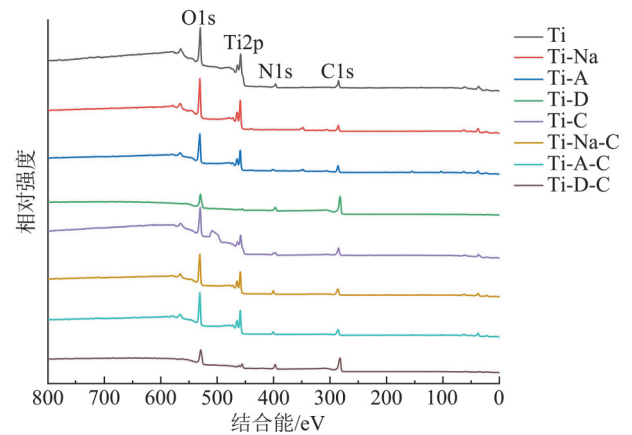
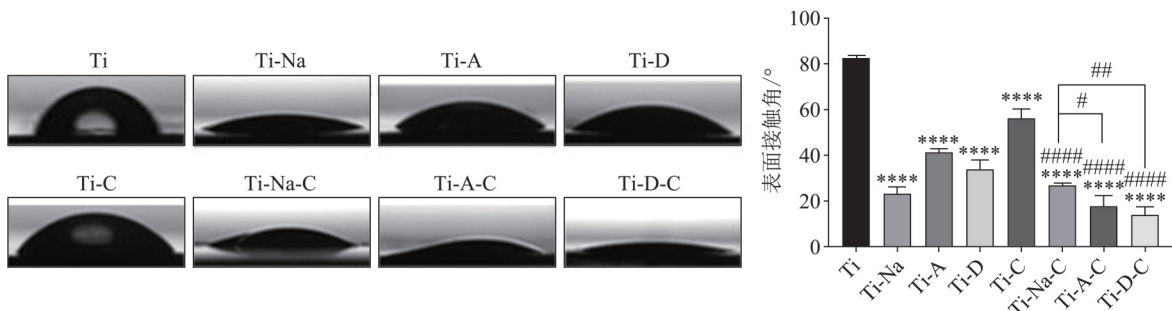


图 3 材料表面元素XPS分析

Fig 3 XPS analysis of the surface elements of the materials



\*\*\*\*: 与Ti组相比, P<0.000 1; #号为Ti-C、Ti-Na-C、Ti-A-C、Ti-D-C组间比较, 未标明比较对象者为与Ti-C组间的比较, #P<0.05, ##P<0.01, ####P<0.000 1。

图 4 材料表面接触角测量结果

Fig 4 Contact angle measurement results of the material surfaces

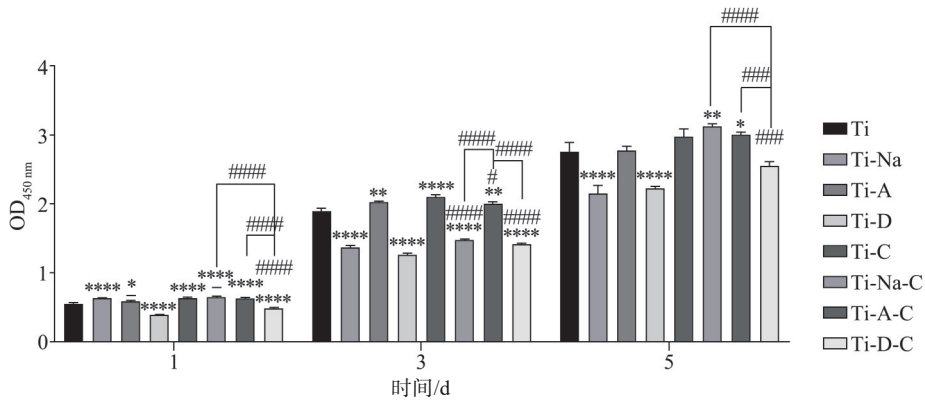
### 2.5 材料表面成骨细胞的增殖活性

材料表面 MC3T3-E1 细胞增殖活性的 CCK-8 检测结果见图 5。各组材料表面成骨细胞增殖水平均随培养时间的延长而升高,表明材料均无明显细胞毒性。第 5 天可见表面修饰胶原的组别成骨细胞增殖水平都高于相应的未经胶原修饰的组别, Ti-Na-C 组高于 Ti-Na 组, Ti-A-C 组高于 Ti-A 组, Ti-D-C 组高于 Ti-D 组, 表明胶原能促进成骨细胞

的增殖。第 5 天 Ti-Na、Ti-D 组细胞增殖水平最低。

### 2.6 材料表面成骨细胞的黏附铺展

材料表面 MC3T3-E1 细胞的激光共聚焦显微镜下结果见图 6。胶原修饰后比对应的胶原修饰前, 细胞铺展面积更大, 而且细胞骨架清晰, 胞浆内丝状骨架清晰分明, 细胞铺展更加充分。在胶原修饰后的 4 组材料中, Ti-Na-C、Ti-A-C、Ti-D-C 组比 Ti-C 组细胞铺展更好、面积更大。



\*号为与 Ti 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; #号为 Ti-C、Ti-Na-C、Ti-A-C、Ti-D-C 组间比较, 未标明比较对象者为与 Ti-C 组间的比较, ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$ 。

图 5 材料表面 MC3T3-E1 细胞 1、3、5 d 的 CCK-8 检测结果

Fig 5 CCK-8 assay results of MC3T3-E1 cells on the material surfaces at 1, 3, and 5 days

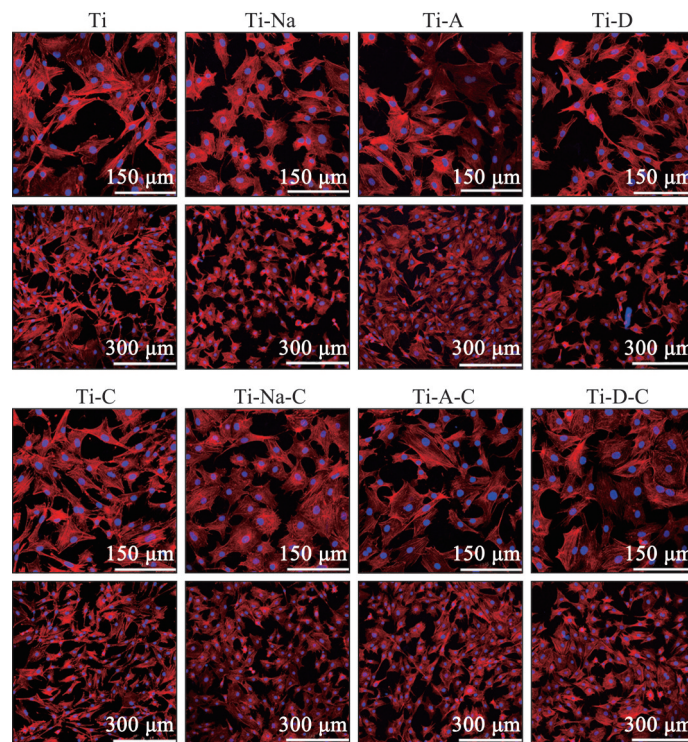


图 6 材料表面 MC3T3-E1 细胞黏附形态 激光共聚焦显微镜

Fig 6 Cell adhesion morphology of MC3T3-E1 cells on the material surfaces laser scanning confocal microscope

### 2.7 材料表面成骨细胞的 ALP 染色

材料表面 MC3T3-E1 细胞的 ALP 活性染色结

果见图 7。第 7 天胶原修饰前后各组无明显差异。第 14 天可见胶原修饰后, 除了 Ti-C 组染色程度反

而比Ti组浅，其余组的染色均比相应的未修饰胶原组深，其中Ti-Na-C组染色最深，表明其ALP表达最多，成骨效果最佳。

2.8 材料表面成骨细胞的茜素红染色及定量检测

材料表面MC3T3-E1细胞的茜素红染色及定量检测结果见图8。茜素红染色与ALP染色结果一致。茜素红定量结果（图8右）显示，Ti-Na-C组吸光度值最高（ $P<0.0001$ ），Ti组与Ti-C组吸光度值最低。

2.9 RT-qPCR检测材料成骨相关基因mRNA表达情况

材料表面MC3T3-E1细胞成骨相关基因ALP、COL-1、OCN、OPN mRNA表达的检测结果见图9。与Ti组相比，胶原修饰的4组材料除了Ti-D-C组COL-1、OCN表达降低（ $P<0.001$ ）外，其余的ALP、COL-1、OCN表达与Ti组相似，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。与Ti组相比，胶原修饰组中除了Ti-D-C组OPN表达降低外，其余各组OPN表达均增加（ $P<0.001$ ），且4组胶原修饰的材料中，Ti-Na-C组OPN表达最高，差异具有统计学意义

（ $P<0.0001$ ）。

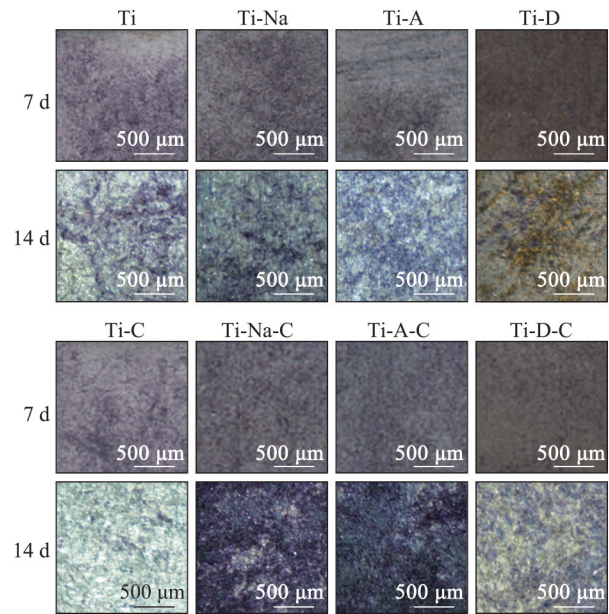
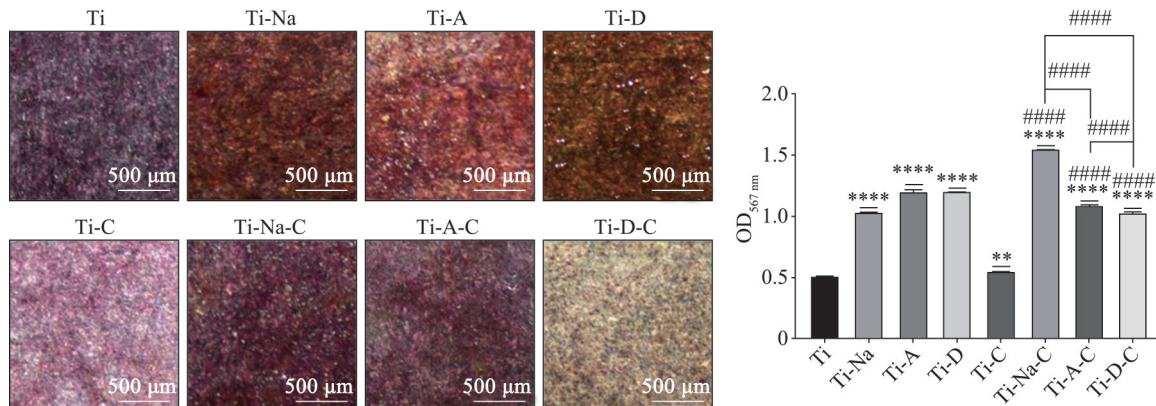


图7 材料表面MC3T3-E1细胞ALP染色结果 ×20

Fig 7 ALP staining results of MC3T3-E1 cells on the material surfaces ×20



左：茜素红染色 ×20。右：定量检测，\*号为与Ti组比较，\*\* $P<0.01$ ，\*\*\*\* $P<0.0001$ ；#号为Ti-C、Ti-Na-C、Ti-A-C、Ti-D-C组间比较，未标明比较对象者为与Ti-C组间的比较，#### $P<0.0001$ 。

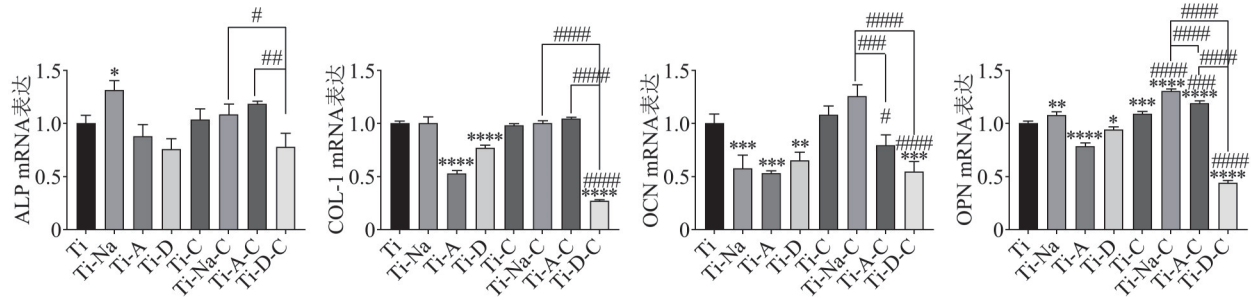
图8 材料表面培养MC3T3-E1细胞14 d的茜素红染色及定量检测

Fig 8 Alizarin red staining results and quantitative analysis of MC3T3-E1 cells cultured on the material surfaces for 14 day

3 讨论

胶原蛋白是主要的细胞外基质蛋白之一，可以调节、增强细胞功能，包括细胞黏附、迁移、增殖、分化和基因表达等一系列细胞生命活动<sup>[7-8,15]</sup>。张文思等<sup>[16]</sup>用配置的COL-I凝胶在钛表面进行涂层制备，之后用紫外线照射，将胶原以物理方法交联附着于钛表面，所制成的钛表面复合胶原蛋白凝胶涂层显著地增强了钛表面生物活性，有利于成骨细胞的黏附和增殖，同时能有效

加速成骨的分化进程。Liu等<sup>[7]</sup>将钛表面进行碱性处理后，利用天然交联剂京尼平（genipin）固定胶原，具有良好的涂层黏附性，改善了细胞黏附和迁移，促进了人间充质干细胞（human mesenchymal stem cells, hMSCs）细胞外基质的矿化和特定成骨标志物（OPN、骨唾液蛋白和OCN）的表达。Kim等<sup>[22]</sup>在聚醚醚酮（polyetheretherketone, PEEK）表面通过聚多巴胺涂层共价结合I型胶原获得多孔PEEK，同样有效地促进了骨形成。此外，研究<sup>[23]</sup>发现，胶原蛋白不仅对成骨具有促进作用，对成血管也有促进作用。



\*号为与Ti组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; #号为Ti-C、Ti-Na-C、Ti-A-C、Ti-D-C组间比较, 未标明比较对象者为与Ti-C组间的比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$ 。

图9 材料表面培养MC3T3-E1细胞14d后的成骨相关基因mRNA表达情况

Fig 9 mRNA expression of osteogenic-related genes in MC3T3-E1 cells cultured on the material surfaces for 14 days

本研究在此基础上,进一步对钛片进行不同表面改性后再进行胶原修饰,以探究不同表面改性处理方式对成骨细胞黏附增殖及成骨分化能力的影响。SEM观察表明,不同方式表面改性后再进行胶原修饰的钛片上均可见到胶原的存在,Ti-Na-C组胶原修饰的量最多,与表面形貌观察结果一致,Ti-A-C组、Ti-D-C组次之,Ti-C组未见明显胶原。Ti-Na-C组胶原明显修饰,推测其原因可能是经碱蚀处理后钛片表面出现的多孔隙结构增加了材料表面粗糙度,从而有利于胶原的修饰。Ti-Na-C与Ti-A-C、Ti-D-C组之间的对比,则是材料表面胶原修饰位点数量之间的对比,与之前的研究<sup>[19]</sup>一致,经过碱活化的材料表面有更多羟基及多孔结构,这大大提高了材料的表面亲水性,有利于细胞外基质中的蛋白质成分黏附<sup>[24]</sup>,因此促进了胶原的黏附修饰。而经过硅烷化和多巴胺修饰的材料,主要依靠官能团之间的反应(共价键结合)结合更多的细胞外基质,反应位点有限<sup>[19]</sup>,导致Ti-A-C和Ti-D-C组材料表面的胶原蛋白修饰量少于Ti-Na-C组。胶原主要成分为蛋白质,其元素主要为氮元素,材料表面XPS元素分析显示,除Ti-Na组外各组别均存在N1s峰,由于钛表面的TiO<sub>2</sub>氧化膜本身就含有氮元素<sup>[25]</sup>,故N1s峰的存在和表达增强可作为胶原成功修饰于材料上的参考,可结合接触角与电镜结果明确胶原的修饰。接触角检测结果显示,碱蚀处理和胶原修饰都可以显著改善材料表面的亲水性。经过碱蚀处理的Ti-Na组表面已存在许多亲水的羟基基团和疏松、有利亲水的多孔隙结构,使得亲水性较Ti组显著增高,而Ti-Na-C组虽然表面修饰了同样具有亲水性的胶原,但是由于修饰量较多,碱蚀后表面的羟基和多孔隙结构被胶原掩盖,亲水的效果难以叠加,最终仅呈现为胶原改善的亲水结

果,故Ti-Na-C组与Ti-Na组相比亲水性未见明显改善。

细胞增殖活性的CCK-8检测结果可见,材料均不存在细胞毒性,且经过胶原修饰的组别比未经过胶原修饰的组别细胞增殖情况好,表明胶原具有良好的生物相容性,这除了与材料表面亲水性改善有关<sup>[7-8,15-16]</sup>,还与其胶原中的肽通过激活成骨细胞中的PI3K/Akt通路促进细胞增殖有关<sup>[17]</sup>。ALP活性和茜素红染色及定量检测结果表明:Ti-C组ALP和茜素红染色最浅,茜素红表达量最低,除了Ti组/Ti-C组外,其他胶原修饰组都比对应的无胶原修饰组的染色要深,推测Ti-C组因为其表面修饰上的胶原蛋白的不稳定性,在细胞培养过程中有脱落可能,导致了最终Ti-C组成骨染色结果甚至没有Ti组好。这一现象的原因在Han等<sup>[19]</sup>关于PEEK表面改性方法的文章中有提到——诸多表面改性方式里物理吸附法操作简单,能达到一定的材料改性效果,但形成的涂层厚度不均匀,涂层与材料间的结合力也比较弱,稳定性和再现性较差,难以维持持久的生物活性,这就使得Ti-C组在ALP染色和茜素红染色中的结果甚至比Ti组差。其次,染色最深的是Ti-Na-C组,这个结果与Ti-Na-C组CCK-8检测和SEM的结果相符合,证实了该组的胶原修饰量比其他组要更丰富,并且胶原与材料的结合较为稳定,分析其原因:经过碱处理的材料表面有更为广泛分布的羟基及其多孔结构,通过交联剂EDC和NHS与胶原产生广泛化学结合,使得更多的胶原修饰在多孔结构中,即物理结合力与化学结合力二者相协同,起到稳定地修饰大量胶原的效果。而Ti-A-C组由于硅烷化剂APTES的存在,材料表面活性位点有限,胶原的负载量也因此受到限制<sup>[19]</sup>。Ti-D-C组是通过多巴胺接枝胶原蛋白,也就是通过附加涂层沉积

的方式来共价结合胶原。这种方式不仅可以连接胶原蛋白,还可以增加材料亲水性和生物相容性等,这一优点在本实验的接触角测量中得到验证,该组材料亲水性最好,在共聚焦显微镜下则体现为Ti-D-C组细胞铺展面积也较大。然而14 d后Ti-D-C组在成骨细胞增殖与成骨分化功能上反而减弱,可见亲水性并非是最终决定细胞增殖与成骨的唯一因素<sup>[26]</sup>。

RT-qPCR结果显示,胶原修饰后的材料上调了OPN基因的表达量,且Ti-Na-C组表达最高( $P < 0.0001$ )。OPN是一种多功能蛋白,是磷酸化、糖基化的细胞外基质蛋白编码基因,是骨形成和骨重建的标志物之一<sup>[27]</sup>,是成骨分化中后期标志物<sup>[28]</sup>。这提示在成骨细胞诱导培养14 d后,MC3T3-E1细胞的分化进程已进入中后期,胶原的修饰能够有效促进其成骨相关基因OPN的表达,从而促进成骨细胞的增殖、分化和细胞外基质的形成、成熟与矿化,从基因的层面再一次证明Ti-Na-C组的成骨活性最佳。

然而,本实验仍然存在一定的局限性,尚未涵括和横向比较全部的钛改性方式和胶原修饰方法。在钛表面修饰胶原的方式不止本实验中所采用的这几种方式,还有其他的多种方式。如Hsueh等<sup>[29]</sup>通过微弧氧化法在钛表面制备多孔氧化膜,然后利用电化学沉积法在多孔钛表面上沉积银和胶原蛋白涂层,以此分析评估具有该生物涂层的钛的理化性质、抗菌活性和细胞相容性。Cho等<sup>[30]</sup>分别利用戊二醛和伽马射线来制备钛表面的胶原蛋白涂层,并且通过比格犬的体内实验来比较这2种修饰胶原方法的骨结合能力和成骨分化功能的差异。今后的研究尚需要进行更多、更严谨的实验设计,并开展更多的动物体内实验及对其中涉及到的机制进一步深入研究,同时需要关注胶原修饰的长期效应。

本实验结果表明,胶原修饰能够有效改善钛材料的生物相容性和亲水性,促进成骨细胞的增殖、黏附与铺展,对MC3T3-E1细胞成骨分化中后期阶段的OPN基因表达有上调作用,可促进细胞的成骨分化进程。在胶原修饰方法中,如钛片未经任何处理直接浸泡胶原,胶原结合力及稳定性较差,成骨促进效果不明显;碱蚀后进行硅烷化或多巴胺涂层,因位点有限导致胶原修饰数量受限,成骨促进作用不佳;而通过碱蚀处理后直接修饰胶原,胶原结合较稳定,促成骨作用较佳。本实验结果为钛种植体表面修饰胶原或其他生物

活性涂层提供了利于促进骨结合的前期改性方案。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Antoci V, Chen AF, Parvizi J. Orthopedic implant use and infection[J]. *Comprehen Biomater*, 2017, 7: 133-151.
- [2] Jakubowicz J. Special issue: Ti-based biomaterials: synthesis, properties and applications[J]. *Materials (Basel)*, 2020, 13(7): E1696.
- [3] 韩宇. 抗菌肽GL13K涂层钛的抗腐蚀性能检测及其调节巨噬细胞促进成骨、成血管分化的基础研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2021.  
Han Y. Detection of corrosion resistance of titanium modified by antimicrobial peptide GL13K and regulation of macrophage behavior to promote osteogenic differentiation and angiogenic differentiation[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2021.
- [4] Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, et al. Surface modifications and their effects on titanium dental implants[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 791725.
- [5] Nicholson JW. Titanium alloys for dental implants: a review[J]. *Prosthesis*, 2020, 2(2): 100-116.
- [6] Kurup A, Dhattrak P, Khasnis N. Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical dental applications: a review[J]. *Mater Today Proceed*, 2021, 39: 84-90.
- [7] Liu CF, Chang KC, Sun YS, et al. Immobilizing type I collagen via natural cross-linker genipin to enhance the osteogenic responses to titanium implant surface[J]. *J Mater Res Technol*, 2021, 15: 885-900.
- [8] Norris K, Mishukova OI, Zykwincka A, et al. Marine polysaccharide-collagen coatings on Ti6Al4V alloy formed by self-assembly[J]. *Micromachines (Basel)*, 2019, 10(1): E68.
- [9] Van den Borre CE, Zigterman BGR, Mommaerts MY, et al. How surface coatings on titanium implants affect keratinized tissue: a systematic review[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2022, 110(7): 1713-1723.
- [10] Popova AD, Sheveyko AN, Kuptsov KA, et al. Osteoconductive, osteogenic, and antipathogenic plasma electrolytic oxidation coatings on titanium implants with BMP-2[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(31): 37274-37289.
- [11] Wall I, Donos N, Carlqvist K, et al. Modified titanium

- surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells *in vitro*[J]. *Bone*, 2009, 45(1): 17-26.
- [12] Zhao Y, Sun Y, Hang R, et al. Biocompatible silane adhesion layer on titanium implants improves angiogenesis and osteogenesis[J]. *Biomater Adv*, 2022, 139: 213033.
- [13] Lee DJ, Tseng HC, Wong SW, et al. Dopaminergic effects on *in vitro* osteogenesis[J]. *Bone Res*, 2015, 3: 15020.
- [14] Yu Y, Li X, Li J, et al. Dopamine-assisted co-deposition of hydroxyapatite-functionalised nanoparticles of poly-dopamine on implant surfaces to promote osteogenesis in environments with high ROS levels[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 131: 112473.
- [15] Behrens C, Kauffmann P, von Hahn N, et al. Collagen-based osteogenic nanocoating of microrough titanium surfaces[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7803.
- [16] 张文思, 朱文卿, 邱憬. 纯钛表面复合胶原蛋白凝胶涂层改性及其生物学性能初探[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2021, 41(9): 1329-1335.
- Zhang WS, Zhu WQ, Qiu J. Modification of collagen gel coating on pure titanium surface and its biological properties: a preliminary study[J]. *J Nanjing Med Univ (Nat Sci)*, 2021, 41(9): 1329-1335.
- [17] Zhu LY, Xie YY, Wen BT, et al. Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Function Food*, 2019, 64:103697.
- [18] Chen W, Li W, Xu K, et al. Functionalizing titanium surface with PAMAM dendrimer and human BMP2 gene via layer-by-layer assembly for enhanced osteogenesis [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2018, 106(3): 706-717.
- [19] Han X, Gao W, Zhou Z, et al. Application of biomolecules modification strategies on PEEK and its composites for osteogenesis and antibacterial properties[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 215: 112492.
- [20] Mieszkowska A, Beaumont H, Martocq L, et al. Phenolic-enriched collagen fibrillar coatings on titanium alloy to promote osteogenic differentiation and reduce inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): E6406.
- [21] Babaei M, Bonakdar S, Nasernejad B. Selective biofunctionalization of 3D cell-imprinted PDMS with collagen immobilization for targeted cell attachment[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 12837.
- [22] Kim H, Lee YH, Kim NK, et al. Immobilization of collagen on the surface of a PEEK implant with monolayer nanopores[J]. *Polymers (Basel)*, 2022, 14(9): 1633.
- [23] Li X, Liu X, Xing Y, et al. Erianin controls collagen-mediated retinal angiogenesis via the RhoA/ROCK1 signaling pathway induced by the alpha2/beta1 integrin-collagen interaction[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2022, 63(1): 27.
- [24] Manivasagam VK, Sabino RM, Kantam P, et al. Surface modification strategies to improve titanium hemocompatibility: a comprehensive review[J]. *Mater Adv*, 2021, 2(18): 5824-5842.
- [25] 徐丽娜, 虞颖娟, 孙健. 低密度脂蛋白在钛金属表面的吸附行为分析[J]. *上海口腔医学*, 2021, 30(1): 50-54.
- Xu LN, Yu YJ, Sun J. Adsorption behavior of low density lipoprotein on titanium surface[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2021, 30(1): 50-54.
- [26] Li H, Huang J, Wang Y, et al. Nanoscale modification of titanium implants improves behaviors of bone mesenchymal stem cells and osteogenesis *in vivo*[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2235335.
- [27] Yin J, Zhuang G, Zhu Y, et al. miR-615-3p inhibits the osteogenic differentiation of human lumbar ligamentum flavum cells via suppression of osteogenic regulators GDF5 and FOXO1[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(7): 779-786.
- [28] Kim JY, Kim BI, Jue SS, et al. Localization of osteopontin and osterix in periodontal tissue during orthodontic tooth movement in rats[J]. *Angle Orthod*, 2012, 82(1): 107-114.
- [29] Hsueh YH, Cheng CY, Chien HW, et al. Synergistic effects of collagen and silver on the deposition characteristics, antibacterial ability, and cytocompatibility of a collagen/silver coating on titanium[J]. *J Alloy Compound*, 2020, 830: 154490.
- [30] Cho WT, Kim SY, Jung SI, et al. Effects of gamma radiation-induced crosslinking of collagen type I coated dental titanium implants on osseointegration and bone regeneration[J]. *Materials (Basel)*, 2021, 14(12): 3268.

(本文编辑 李彩)