

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2023.08.002

· 基础研究 ·

钛表面微纳层级结构促 MC3T3-E1 细胞黏附增殖及载药潜力评价

丁彤^{1,2}, 王健辉^{3,4}, 肖智勇^{3,4}, 武腾飞⁵, 杨瑟飞^{1,2}

1. 中国人民解放军医学院, 北京(100853); 2. 中国人民解放军总医院第一医学中心口腔科, 北京(100853); 3. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京(100850); 4. 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京(100850); 5. 航空工业北京长城计量测试技术研究所, 北京(100095)

【摘要】 目的 探讨钛表面微纳层级结构对 MC3T3-E1 细胞黏附增殖的影响和载药潜力的评价, 为钛表面选区改性并载药缓释提供参考。方法 根据钛表面处理方式将纯钛样本(直径 10 mm, 厚 2.5 mm)随机分为: 抛光组(T)、阳极氧化组(TO)和微纳层级结构组(FTO)。T组仅做抛光处理; TO组采用阳极氧化技术处理; FTO组采用飞秒激光蚀刻联合阳极氧化技术处理。用扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)观察3种表面形貌, 接触角测量其表面的润湿性, X射线能谱仪(energy dispersive spectroscopy, EDS)分析表面化学成分; 激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)测量FTO结构深度和表面粗糙度; 免疫荧光染色、CCK-8和茜苏红染色半定量分析评估MC3T3-E1细胞在各组样本表面的黏附增殖分化; 应用冷冻干燥法加载重组人源骨形成蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic proteins-2, rhBMP-2), 酶联免疫吸附反应(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)评估不同表面结构的载药潜力。结果 SEM观察到T组钛板表面可见方向一致且均匀的抛光痕迹; TO组表面为纳米级蜂窝状的二氧化钛(titanium dioxide, TiO₂)纳米管结构; FTO组形成直径约为100 nm的规则有序的微纳层级结构。FTO组的接触角最小, 为 $32^{\circ} \pm 1.7^{\circ}$, 润湿性最好; 一级结构圆孔平均深度为93.6 μm , 粗糙度1.5 ~ 2 μm 。TO组和FTO组含氧量占比多, 提示TiO₂形成。FTO组表面细胞增殖最显著($P < 0.001$), 细胞黏附表面积最大($P < 0.05$)。FTO组加载rhBMP-2后缓慢释放14 d, 且能促进细胞外基质矿化($P < 0.001$)。结论 钛表面微制备的纳米层级结构有促进MC3T3-E1细胞黏附增殖和成骨分化的作用, 有载药潜力, 是钛表面处理的新方式。

【关键词】 钛; 激光; 表面处理; 阳极氧化; 微纳层级结构; 细胞黏附; 细胞增殖; 细胞分化; 骨形成蛋白-2; 药物载体; 药物释放

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2023)08-0543-09

【引用著录格式】 丁彤, 王健辉, 肖智勇, 等. 钛表面微纳层级结构促 MC3T3-E1 细胞黏附增殖及载药潜力评价[J]. 口腔疾病防治, 2023, 31(8): 543-551. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2023.08.002.

Micro/nano hierarchical structure of titanium surface promotes MC3T3-E1 adhesion proliferation and drug loading potential evaluation DING Tong^{1,2}, WANG Jianhui^{3,4}, XIAO Zhiyong^{3,4}, WU Tengfei⁵, YANG Sefei^{1,2}.

1. Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; 2. Department of Stomatology, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 3. Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China; 4. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Beijing 100850, China; 5. Avic Changcheng Institute of Metrology & Measurement, Beijing 100095, China

Corresponding author: YANG Sefei, Email: yang_sf@hotmail.com, Tel: 86-10-66936599

【Abstract】 Objective To investigate the effect of micro/nano hierarchical structures on the adhesion and proliferation of MC3T3-E1 cells, evaluate the drug delivery potential of titanium surfaces, and provide a reference for the modifi-

【收稿日期】 2022-12-31; **【修回日期】** 2023-02-20

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(62175229)

【作者简介】 丁彤, 医师, 硕士研究生, Email: elladingtong@foxmail.com

【通信作者】 杨瑟飞, 副主任医师, 副教授, 博士, Email: yang_sf@hotmail.com, Tel: 86-10-66936599



微信公众号

cation of selected areas of titanium surfaces to enhance drug delivery and slow drug release. **Methods** Pure titanium samples (10 mm in diameter and 2.5 mm in thickness) were randomly divided into a polished group (T), anodized group (TO), and micro/nano hierarchical structure group (FTO) according to the surface treatment of the titanium. The T group was polished, the TO group was treated with anodic oxidation technology, and the FTO group was treated by femtosecond laser etching combined with anodic oxidation technology. The three surface morphologies were observed by scanning electron microscopy (SEM), the wettability of the surface was measured by the contact angle, and the surface chemical composition was analyzed by X-ray energy dispersive spectroscopy (EDS). The depth of the FTO structure and the surface roughness were measured by confocal laser scanning microscopy (CLSM). MC3T3-E1 cell adhesion proliferation and differentiation on the surface of each group of samples was assessed by immunofluorescence staining, CCK-8, and semiquantitative analysis of Alizarin staining. A freeze-drying method was applied to load recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assess the drug-loading potential of different surface structures. **Results** SEM revealed that the surface of T group titanium plates showed uniform polishing marks in the same direction. The surface of the TO group was a nanoscale honeycomb-like titanium dioxide (TiO₂) nanotube structure, and the FTO group formed a regular and ordered micro/nano layered structure. The contact angle of the FTO group was the smallest at $32^\circ \pm 1.7^\circ$. Its wettability was the best. The average depth of the first-level structure circular pores was 93.6 μm , and the roughness was 1.5-2 μm . The TO and FTO groups contained a high percentage of oxygen, suggesting TiO₂ nanotube formation. The FTO group had the most significant surface cell proliferation ($P < 0.001$) and the largest cell adhesion surface area ($P < 0.05$). rhBMP-2 was slowly released for 14 d after loading in the FTO group and promoted extracellular matrix mineralization ($P < 0.001$). **Conclusion** Titanium surface microprepared hierarchical structure has the effect of promoting MC3T3-E1 cell adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation with drug loading potential, which is a new method of titanium surface treatment.

【Key words】 titanium; laser; surface treatment; anodizing; micro/nano hierarchical structure; cell adhesion; cell proliferation; cell differentiation; bone morphogenetic protein 2; drug carriers; drug liberation

J Prev Treat Stomatol Dis, 2023, 31(8): 543-551.

【Competing interests】 The authors declare no competing interest.

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 62175229).

目前临床研究证实,种植修复治疗方式在适证人群中的10年成功率已达96.4%^[1]。但如果患者患有糖尿病、骨质疏松等系统代谢类疾病,特别是伴有牙周炎等口腔局部问题,相互协同作用会造成牙槽骨骨质和骨量的重度破坏,显著降低种植治疗的成功率。但是这类患者的种植修复诉求正逐渐增多,若扩大该类患者的适应证,往往需要采用抗菌、促进骨生成的措施。种植体表面处理以促进骨整合^[2]、种植体表面载药^[3]等有望成为扩大该类患者种植修复适应证的新思路。

激光精密制造工程是微纳米结构制造的先进加工方式^[4],因其空间分辨率高和热扩散区小,留存熔融材料少^[5],几何纹理可提高钛合金的生物相容性和抗磨损性能^[6],使商品化植体表面规则有序的升级处理成为可能。阳极氧化的纳米制造工程可以产生由TiO₂组成的有序纳米管结构,能够实现局部药物递送^[7],使商品化植体表面载药成为可能。

本研究应用飞秒激光蚀刻技术构建规则有序的微米级结构,联合阳极氧化技术形成纳米管,构建出微纳层级结构,评估其表面形貌、化学成分及润湿性等表面理化性能,且基于MC3T3-E1细胞黏附增殖等对该结构的生物学性能进行评价,加载rhBMP-2后检测其释放及成骨效能,旨在对商品化植体选区改性的载药潜能做初步探索。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

钛板(GB/T13810-2007,奥斯泰克,中国);SiC砂纸(240#~2000#,鹰牌,中国);直流电源(UTP1306S,优利德,中国);飞秒激光器(Pharos, Light conversion,立陶宛);扫描电子显微镜(US8220, HITACHI, 日本);X射线能谱仪(FlatQuad, Bruker, 德国);激光共聚焦显微镜(LSM 800, Zeiss, 德国);视频光学接触角测量仪(OCA 25, Dataphysics, 德国);MC3T3-E1细胞(军事医学

研究院毒物药物研究所提供); α -MEM培养基、1%抗生素溶液(Gibco,美国);0.05%胰蛋白酶/EDTA(Macgene,中国);荧光显微镜(DM2500,Leica,德国);细胞计数试剂盒-8(Dojindo,日本);罗丹明标记鬼笔环肽(Solarbio,中国);DAPI、茜苏红染色试剂盒(Beyotime,中国);重组人源骨形成蛋白-2、rh-BMP-2 ELISA检测试剂盒(SinoBiological,中国);L-抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、地塞米松(MCE,美国)。

1.2 实验分组及表面处理方式

将钛板(直径10 mm,厚2.5 mm)随机分为3组:抛光组(T)、阳极氧化组(TO)、微纳层级结构组(FTO),每组3~5个样本,各组样本处理方法如下。

T组:样本用SiC砂纸从240#、800#、1 500#和2 000#逐号打磨抛光,同一号砂纸都向同一方向打磨,每换一号砂纸钛板顺时针旋转90°,直到上一号砂纸形成的痕迹全部没有后换下一号砂纸,最后打磨至钛板成镜面状(此过程是所有样本表面改性的预处理程序)。置于异丙醇、乙醇和去离子水中,分别超声清洗15 min,干燥后真空保存备用。所有分组在进行下一步前都重复该清洗流程,并真空保存。

TO组:阳极氧化处理,电解液配比(0.27 mol/L NH_4F 粉末,丙三醇与去离子水溶液体积比3:2),阴极为箔片,阳极为钛板,阳极和阴极距离约6 cm,使用直流电源,20 V/5 A电压下室温阳极氧化1 h(预实验所得参数)。

FTO组:飞秒激光蚀刻,脉冲宽度2 ps,中心波长1 030 nm,重复频率250 kHz。将样本置于X-Y-Z三维移动平台上,经焦距为180 mm的凸透镜将激光垂直聚焦到样品上,进行激光处理。选域加工钉洞型,直径150 μm ,深80 μm ,加工区域占样本表面积的5%(参数为前期课题组实验的最优抗磨损结果)。重复清洗流程后,进行阳极氧化处理(同TO组)步骤。

1.3 表面检测

1.3.1 表面形貌及化学成分 扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)观察样本的表面形貌,随机选择3个位点。用X射线能谱仪(energy dispersive spectroscopy, EDS)进行表面化学成分分析,每个样本随机选取3个位点,观测其表面元素组成,各组样本表面各元素的原子百分比取平均值,并计算O/Ti比值。激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)测量激光加工孔洞深度和表面粗糙度,每个样本随机选取3个位点进行

测量。

1.3.2 表面润湿性 采用液滴法在视频光学接触角测量仪上测量各组样本的润湿性,液滴体积1 μL ,液滴和表面接触后立即拍照,接触角根据照片由曲线拟合得到。每个样本随机选取3个位点。

1.4 细胞培养

将MC3T3-E1细胞悬浮在含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%抗生素溶液的 α -MEM培养基中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 含5% CO_2 细胞培养箱中培养72 h,细胞培养生长至汇合80%,用0.05%胰蛋白酶/EDTA消化,并在完全培养基中以适当密度稀释。以1:5的比例传代,使用3~4代的MC3T3-E1细胞。重复3遍。在MC3T3-E1细胞接种之前,将样本灭菌,转移到无菌的24孔板上。

1.4.1 细胞形态特征 将细胞以 4×10^4 个/孔的密度加载至各组试件表面,每孔滴加完全培养基完全覆盖钛板表面,细胞培养箱内孵育12 h。2.5%戊二醛在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下固定2~3 h,乙醇脱水(50%、70%、80%、90%乙醇各10 min,95%乙醇、无水乙醇各2次,每次脱水10 min),叔丁醇与无水乙醇1:1混合后再次脱水15 min,室温干燥。喷金仪喷金后,SEM下观察MC3T3-E1在各组试件上的形态。每个样本随机选择3个视野。

1.4.2 细胞增殖 CCK-8用于间接定量不同表面处理方式下钛板上黏附细胞的数量。MC3T3-E1细胞接种24 h后,将样本取出移至新的孔板内,向每个孔中加入完全培养基和10% CCK-8的混合溶液,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育4 h。测定450 nm处的吸光度,以检验细胞在不同表面处理的钛板上的增殖。72 h后以相同的方式继续对细胞进行定量。

1.4.3 细胞黏附 将MC3T3-E1细胞以 4×10^4 个/孔的密度加载至各组试件表面,细胞培养箱内孵育24 h后,4%多聚甲醛在室温固定10 min,0.5% Triton X-100溶液透化处理5 min,取200 μL 浓度100 nmol/L的罗丹明标记鬼笔环肽工作液覆盖试样上的细胞,对肌动蛋白进行染色,室温避光孵育30 min。用200 μL DAPI工作液对细胞核进行复染,孵育5 min。在荧光显微镜下观察,每个试件随机选取3个视野。使用被标记为红色的肌动蛋白的数据,用Image J软件(2.0.0)中的程序进行量化,得出细胞平均所占面积。

1.5 rhBMP-2加载释放

所有样品在超声波浴缸中重复清洁,高温高压灭菌后,烘箱内烘干。每个钛板加载rh-BMP-2溶液20 μL (释放部分加载10 μL),浓度

50 ng/ μL , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存6 h以上,冷冻干燥机进行冻干6 h。喷金仪喷金后,SEM下观察药物加载情况。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,试样在磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)中孵化1、3、5、7、10、14 d,使用rhBMP-2 ELISA试剂盒测量rhBMP-2的含量。根据校准曲线计算药物浓度,并将累计释放量除以rhBMP-2总量计算rhBMP-2的释放百分比。

1.6 细胞外基质矿化

将MC3T3-E1细胞以 2×10^4 个/孔的密度加载至各组载药试件表面,细胞培养箱内孵育24 h后进行成骨诱导,2~3 d更换成骨诱导培养基(α -MEM+10%FBS+0.2% L-抗坏血酸+1% β -甘油磷酸钠+0.01% 地塞米松)。分别诱导4 d和7 d后弃培养基,PBS冲洗2次,试剂盒固定液固定20 min,再次PBS冲洗3次。加入适量茜苏红染色液,均匀覆盖细胞,室温染色30 min,蒸馏水充分洗涤。每孔加入1 mL 10%氢化十六烷基吡啶,避光条件下孵育1 h。收集脱色液,轻摇混匀后用酶标仪检测562 nm处的吸光度值。

1.7 统计学分析

采用Prism 9.2.0软件包对数据进行统计学分析。计量资料符合正态分布,数据用均数 \pm 标准差

表示,使用方差分析比较;当方差齐时,进一步两两比较采用LSD法,方差不齐时,两两比较采用Dunnett法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 表面形貌

T组钛板表面可见方向一致且均匀的抛光痕迹;TO组形成具有一定粗糙度的纳米管,无明显的高低起伏变化,整个表面呈现蜂窝状形貌,可见大量直径约为100 nm的孔洞;FTO组可清晰见到飞秒激光蚀刻留下的深浅一致的孔洞,孔洞之间排列整齐,形成规则的钉洞形结构,孔洞内壁光滑,边缘基本无残渣堆积,呈底小口大的倒锥形结构,放大后可见洞内、洞边缘及表面均是直径约为100 nm蜂窝状纳米管结构,表明规则有序的微纳层级结构构建成功(图1a)。

2.2 表面润湿性

用视频静态接触角测量仪测量不同处理组钛板表面的润湿性,结果显示润湿性好(图1b),T组表面静态接触角为 $50.6^{\circ}\pm 0.8^{\circ}$,TO组表面静态接触角为 $41^{\circ}\pm 2.4^{\circ}$,FTO组的表面静态接触角最小为 $32^{\circ}\pm 1.7^{\circ}$,但差异无统计学意义($F=5.520, P=0.099$)。

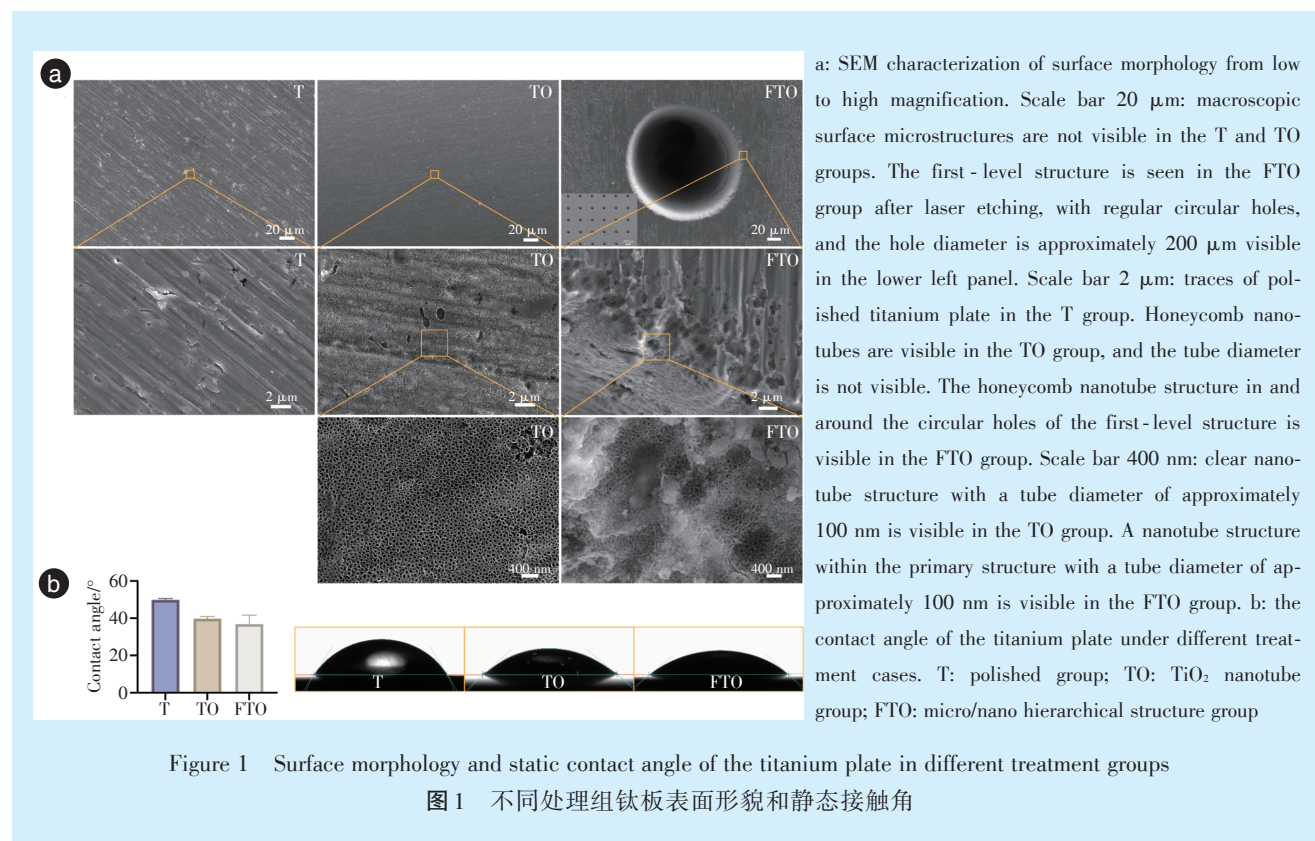


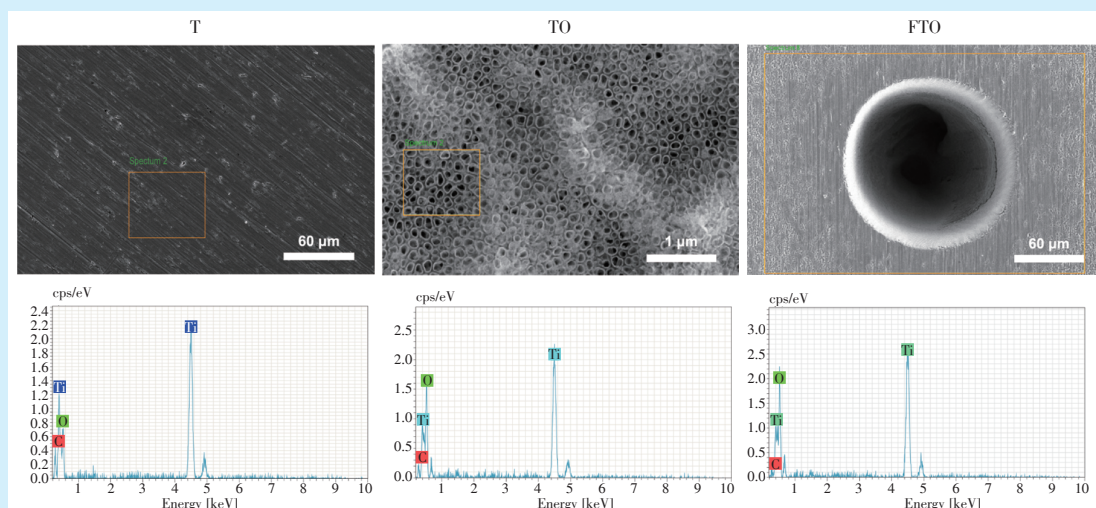
Figure 1 Surface morphology and static contact angle of the titanium plate in different treatment groups

图1 不同处理组钛板表面形貌和静态接触角

2.3 表面化学成分

为了量化不同处理组的元素比,EDS分析结果显示每组样本表面均有C、Ti、O元素(图2)。T组、

TO组、FTO组钛表面含O元素,O/Ti比值分别为0.38、1.36、1.38。TO组、FTO组含氧量多(表1),意味着TO组和FTO组表面生成了TiO₂纳米管。



The yellow box indicates the EDS scanning range. Scale bars 60 μm and 1 μm . Peak values of elemental Ti in the T group. Peak values of elemental Ti and O appear in the TO and FTO groups, indicating an increase in oxygen content. T: polished group; TO: TiO₂ nanotube group; FTO: micro/nano hierarchical structure group

Figure 2 Energy dispersive spectroscopy spectra of different treatment groups

图2 不同处理组X射线能谱仪的表征

表1 表面化学元素组成

Table 1 Surface chemical element composition

Group	Elements of the atom (%)				Total
	C	O	Ti	O/Ti	
T	3.18	18.06	78.75	0.23	100
TO	1.35	56.91	41.73	1.36	100
FTO	3.55	55.87	40.58	1.38	100

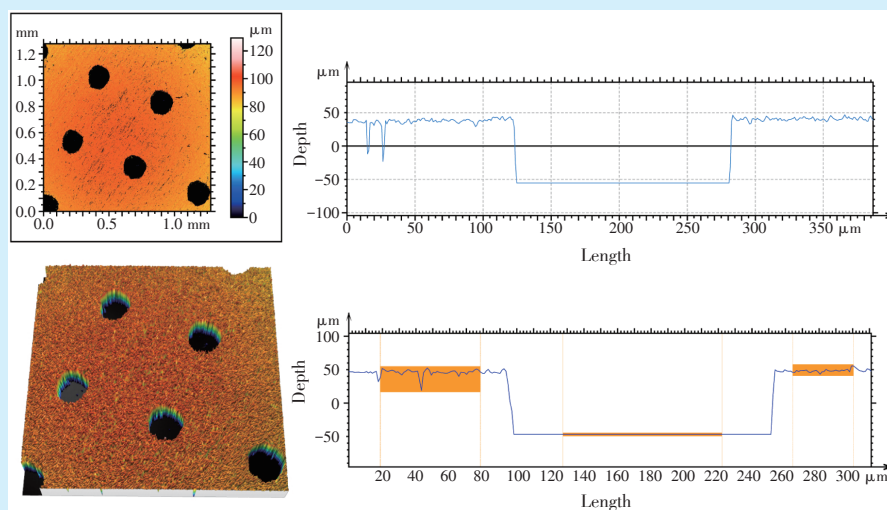
T: polished group; TO: TiO₂ nanotube group; FTO: micronano hierarchical structure group

2.4 结构深度和表面粗糙度

CLSM 测量层级结构上飞秒激光蚀刻的结构深度和表面粗糙度。对FTO组样本进行扫描测得的圆孔平均深度为93.6 μm ,粗糙度(Ra)为1.5 ~ 2 μm (图3),提示微纳层级结构具有一定的粗糙度。

2.5 细胞形态

为了评估不同处理组钛表面对MC3T3-E1细胞形态的影响,MC3T3-E1细胞黏附在钛表面12 h



The average depth of the round hole is 93.6 μm , and Ra is 1.5-2 μm

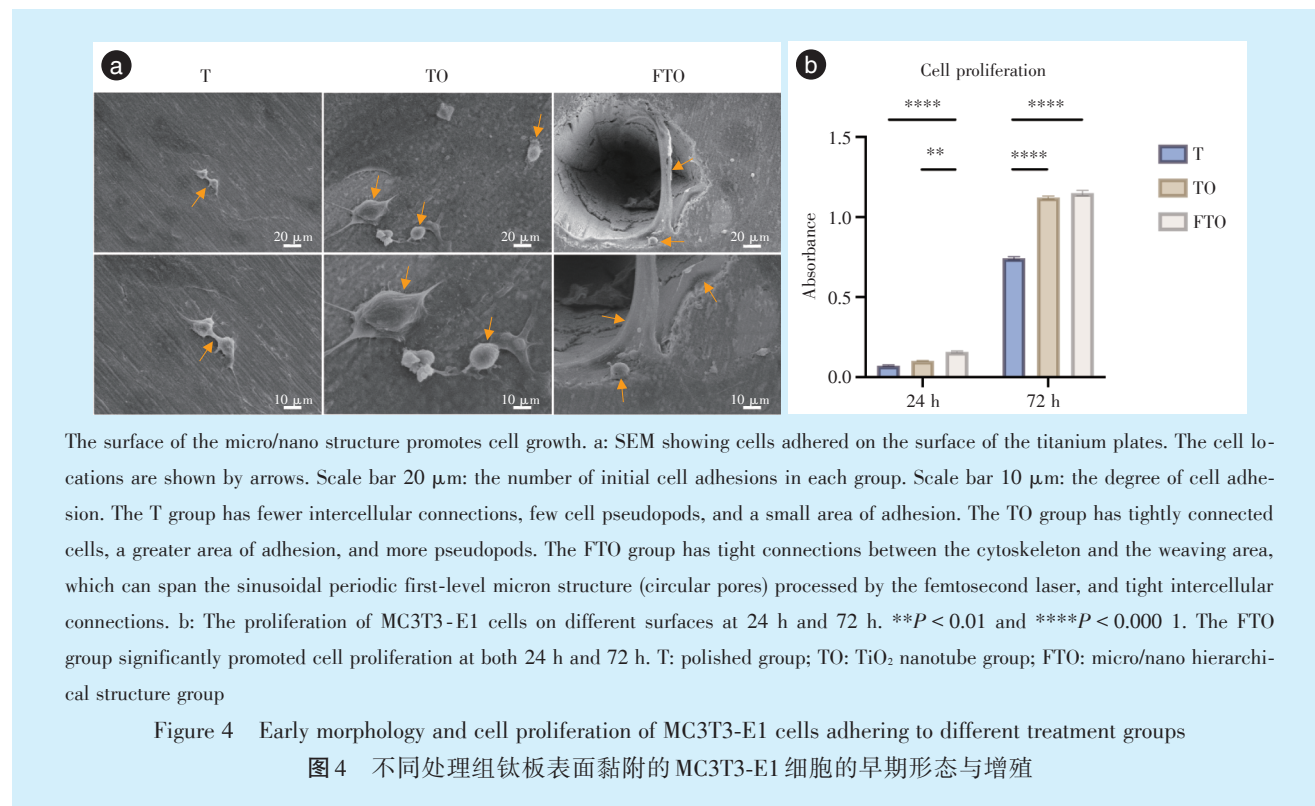
Figure 3 Depth and surface roughness of round holes after laser machining measured by confocal laser scanning microscopy

图3 激光共聚焦显微镜测量激光加工后一级结构圆孔深度及表面粗糙情况

后,不同处理组细胞形态如SEM所示(图4a),细胞形态在FTO组上铺展的最优。T组细胞间连接较少,形态细长,细胞伪足少且黏附面积小;TO组细胞黏附的面积增多,相比于T组,细胞间联结更紧密,细胞伪足多;FTO组可见细胞骨架跨越一级微米结构(圆孔样),细胞与钛表面织构区域连接紧密。

2.6 细胞增殖

为了评估不同处理组的钛表面对MC3T3-E1细胞增殖的影响,细胞黏附在钛表面24、72 h后,以CCK-8法量化细胞数量变化情况(图4b)。24 h时,与T组和TO组相比,FTO组促进了细胞的增殖;在72 h时,与T组相比,TO组与FTO组促进了细胞增殖($P < 0.01$)。



2.7 细胞黏附

荧光显微镜观察显示:T组表面黏附MC3T3-E1细胞的形态呈椭圆形和短梭形,分布不均匀;TO组表面黏附细胞数量增多;FTO组表面黏附细胞分布均匀,细胞核大且细胞骨架拉伸的更好,细胞高度融合,细胞数量多于前两组,细胞的表面覆盖率增加(图5a)。与T组、TO组相比,FTO组细胞黏附面积增大($F = 32.579, P < 0.001$,图5b),表明微纳层级结构可促进细胞黏附。

2.8 rhBMP-2 加载与释放

SEM观察不同处理组钛板表面形貌:T组局部可见少量药物附着;TO组药物层下隐约可见TiO₂纳米管;FTO组层级结构内被药物填满,药物附着在整个洞内和洞外(图6)。表面的rhBMP-2释放如图7所示,大致分为两个阶段:快速释放阶段和缓慢释放阶段。第1天,T组表面rhBMP-2快速释

放66.1%,TO组表面快速释放40.8%;5 d后,rhBMP-2的释放率达到了一个平稳期,T组表面剩余11.6%的rhBMP-2,TO组表面rhBMP-2已释放68.6%;FTO组表面几乎没有快速释放阶段,第1天仅释放12.9%,表现出平缓的连续释放曲线,在最初的5 d内释放了38.9%,随后5 d释放了29.4%,14 d共释放了82.6%。表明规则有序的层级微纳结构赋予了FTO表面缓慢持久释放生物分子的能力。

2.9 细胞外基质矿化

第4天时FTO组与T组($P < 0.001$)、TO组($P = 0.016$)相比细胞外基质矿化增高;第7天时TO组和FTO组细胞外基质矿化较T组均增高($P < 0.001$)。FTO组在第4天和第7天均显示出最高的细胞外基质矿化(图8),表明FTO组加载rhBMP-2后可促进MC3T3-E1的成骨分化。

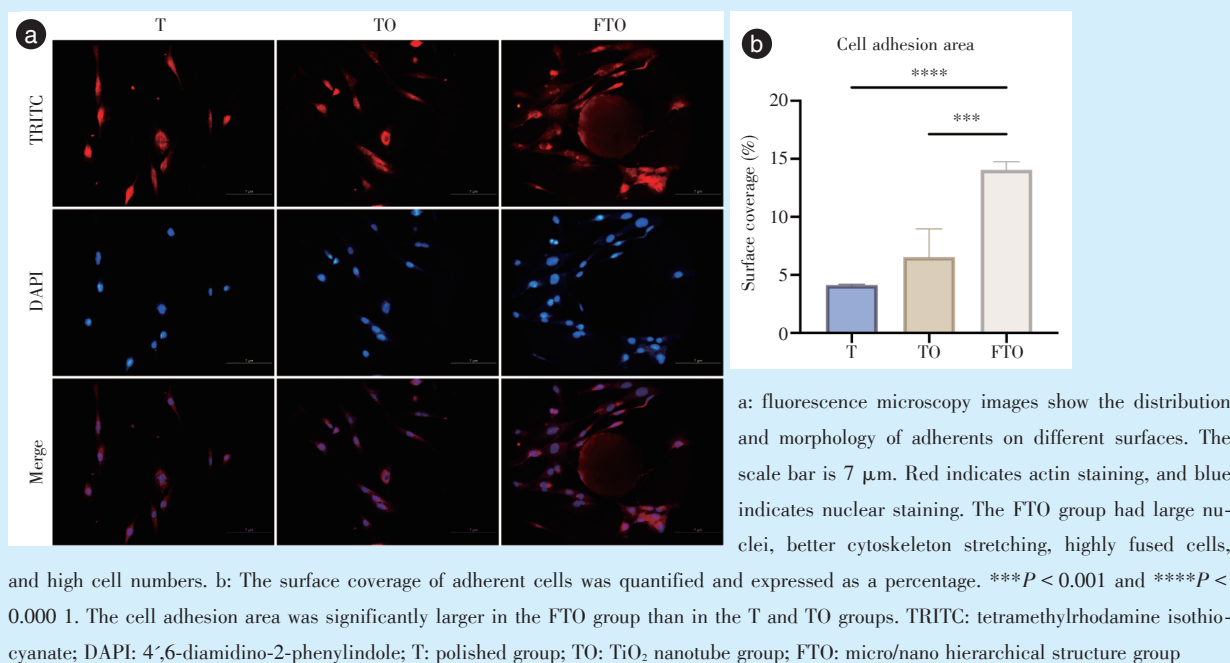


Figure 5 Adhesion of MC3T3-E1 cells on the surface of titanium plates in the different treatment groups

图5 MC3T3-E1细胞在不同处理组钛板表面的黏附

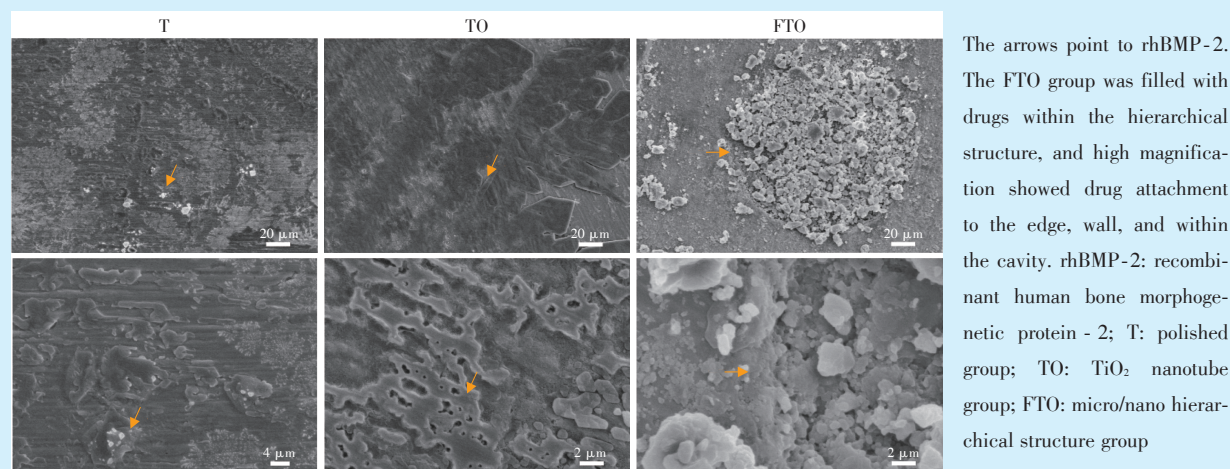


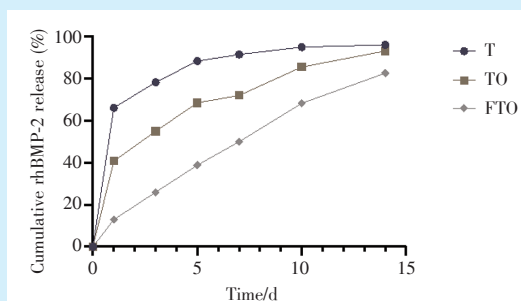
Figure 6 rhBMP-2 loading on titanium plates with different surface treatments

图6 不同处理方式的钛板表面上负载的rhBMP-2

3 讨论

钛及钛合金具有良好的生物相容性,弹性模量在所有金属中最接近骨组织而有利于外力传递,植入骨组织后能形成骨性结合,现已广泛应用于牙科植入物。目前商品化种植体主流的处理技术是大颗粒喷砂加酸蚀^[8],喷砂使光滑的钛种植体表面形成直径约200 μm的一级机械性窝洞,再通过酸蚀表面进一步形成20 μm的二级窝洞,形成不规则的粗糙表面结构,从生理学角度看,粗糙表面对血液具有更好的黏附性,有利于骨结合^[9]。但是

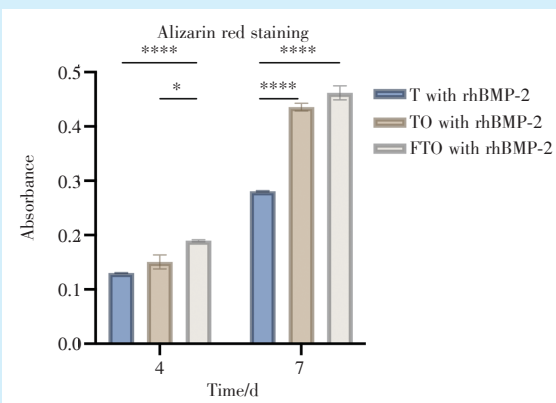
这种结构无序扁平、不规则,使其本身药物加载的量不可控,导致入血药物浓度不稳定,因此需要表面处理才能具备载药缓释能力^[10]。本研究揭示了激光微加工区域的熔渣和热融区域很少,形成规则有序的一级窝洞阵列,从载药需求角度看,这是其相比于酸蚀喷砂处理的优势所在。阳极氧化形成二级蜂窝状结构TiO₂纳米管,其表面积高、生物相容性好、耐腐蚀性、低成本且稳定,可促进骨的再生和修复^[11],提高生物活性和骨传导性^[12],可控制植入物中的药物释放^[13]。以上两者优势结



Each group was released in PBS (pH 7.4) for 14 days. The release rate of rhBMP-2 was quantified and expressed as a percentage. The peak of rapid release was on Day 1 in Group T, and a slow release curve in the FTO group occurred over 14 days. rhBMP-2: recombinant human bone morphogenetic protein-2; T: polished group; TO: TiO₂ nanotube group; FTO: micro/nano hierarchical structure group

Figure 7 Release of rhBMP-2 from the surface of titanium plates under different treatments

图7 不同处理方式下钛板表面上的rhBMP-2释放情况



Extracellular matrix mineralization was optimal in the FTO group. * $P = 0.016$; **** $P < 0.0001$. T: polished group; TO: TiO₂ nanotube group; FTO: micro/nano hierarchical structure group

Figure 8 Extracellular matrix mineralization was determined semiquantitative analysis of Alizarin red staining

图8 茜苏红染色半定量分析细胞外基质矿化

合,形成一个类似骨组织的微纳层级仿生结构,中等粗糙度,其中一级微米结构类似于骨陷窝,有利于成骨细胞的黏附;二级纳米结构刺激细胞增殖,有利于骨结合,符合骨组织仿生的生物学理念,是钛表面选区改性处理的新方式。

据仿生学研究,钛表面形貌显著影响细胞的延伸^[14],黏附实现了细胞的附着和铺展,对细胞增殖有利。本研究层级结构上的细胞骨架拉伸好,跨越了一级结构,与表面微纳结构连接紧密。评估不同处理组表面黏附细胞的早期增殖后,发现微纳层级结构上细胞增殖最明显,可能是由于微纳结构的表面积增加及其润湿性较好共同促进的。黏附细胞的数量随着微结构密度的增加而增加,高密度的激光加工凸起,代表着更高的表面积,可能有助于增强结构上的细胞黏附^[15]。本研究中TiO₂纳米管结构及微纳层级结构都促进了细胞在钛板表面上的黏附,微纳层级结构尤为突

出。层级结构不同的粗糙度为细胞定向和扩散提供物理线索,而激光蚀刻的一级结构可为组织的重塑和药物的存储提供空间。

国内外现有大量体外研究证明载药涂层释放各种生物大分子和药物,能够发挥成骨及抗菌的作用^[16-18]。BMP-2与骨愈合及骨再生相关^[19],几乎影响骨骼、软骨和关节等所有方面^[20-23],且在口腔领域的应用极为广泛,是目前美国食品和药物管理局批准的唯一临床用作骨移植替代物的骨诱导生长因子^[24]。本研究rhBMP-2可加载到微纳层级结构内,且一级阴性结构内可比单纯的TiO₂纳米管容纳更多的药物。与原始钛表面相比,TiO₂纳米管的药物释放性能得到了提高,微纳层级结构的药物释放性能最优。原因可能是:①润湿性好,亲水性能优的表面处理可能有利于蛋白质的吸附^[25];②微纳层级结构的一级阴性结构增加表面积,联合高密度的纳米管,提供了更多的rhBMP-2储存空间;③微纳层级结构表面的一级圆孔结构和纳米管的管状结构共同加强了其对药物释放的抵抗力,从而延长了药物释放周期。因此,微纳层级结构具有更持久的药物释放特性。微纳结构和rhBMP-2协同作用,促进MC3T3-E1细胞的成骨分化。此种表面处理方式加工可控,形态规则,载药量可控,促进细胞成骨分化,在未来的载药缓释领域值得继续探索。

4 小结

本研究结果表明:①飞秒激光联合阳极氧化技术在钛表面可成功构建规则有序的微纳层级结构;②微纳结构能够促进MC3T3-E1细胞在其表面上的黏附增殖;③微纳结构具备载药缓释潜力,促进MC3T3-E1细胞成骨分化。

[Author contributions] Ding T wrote the article. Wang JH, Xiao ZY, Wu TF processed and analyzed the data. Yang SF designed the study. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Howe MS, Keys W, Richards D. Long-term (10-year) dental implant survival: a systematic review and sensitivity meta-analysis [J]. *J Dent*, 2019, 84: 9-21. doi: 10.1016/j.jdent.2019.03.008.
- [2] Souza JCM, Sordi MB, Kanazawa M, et al. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration [J]. *Acta Biomater*, 2019, 94: 112-131. doi: 10.1016/j.actbio.2019.05.045.
- [3] Bassand C, Verin J, Lamatsch M, et al. How agarose gels surrounding PLGA implants limit swelling and slow down drug release [J]. *J Control Release*, 2022, 343: 255 - 266. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.01.028.
- [4] Lin Z, Hong M. Femtosecond laser precision engineering: from micron, submicron, to nanoscale [J]. *Ultrafast Sci*, 2021. doi: 10.34133/2021/9783514.
- [5] Xie X, Zhu Y, et al. Debris-free femtosecond laser micromachining of stainless steel vascular stent [J]. *J Mech Eng*, 2021, 57(5): 251. doi: 10.3901/jme.2021.05.251.
- [6] Xue X, Lu L, Wang Z, et al. Improving tribological behavior of laser textured Ti-20Zr-10Nb-4Ta alloy with dimple surface [J]. *Mater Lett*, 2021, 305: 130876. doi: 10.1016/j.matlet.2021.130876.
- [7] Ran Q, Yu Y, Chen W, et al. Deferoxamine loaded titania nanotubes substrates regulate osteogenic and angiogenic differentiation of MSCs via activation of HIF-1 α signaling [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 91: 44-54. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.098.
- [8] Velasco-Ortega E, Ortiz-Garcia I, Jiménez-Guerra A, et al. Osseointegration of sandblasted and acid-etched implant surfaces. A histological and histomorphometric study in the rabbit [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8507. doi: 10.3390/ijms22168507.
- [9] Shin YC, Bae JH, Lee JH, et al. Enhanced osseointegration of dental implants with reduced graphene oxide coating [J]. *Biomater Res*, 2022, 26(1): 11. doi: 10.1186/s40824-022-00257-7.
- [10] Li Y, Chen R, Wang F, et al. Antimicrobial peptide GL13K immobilized onto SLA-treated titanium by silanization: antibacterial effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *RSC Adv*, 2022, 12(11): 6918-6929. doi: 10.1039/D1RA04974G.
- [11] Xu N, Fu J, Zhao L, et al. Biofunctional elements incorporated nano/microstructured coatings on titanium implants with enhanced osteogenic and antibacterial performance [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020: e2000681. doi: 10.1002/adhm.202000681.
- [12] Guo T, Gulati K, Arora H, et al. Orchestrating soft tissue integration at the transmucosal region of titanium implants [J]. *Acta Biomater*, 2021, 124: 33-49. doi: 10.1016/j.actbio.2021.01.001.
- [13] Ke, Shen. The sustained release of dexamethasone from TiO₂ nanotubes reinforced by chitosan to enhance osteoblast function and anti-inflammation activity [J]. *Mater Sci Eng C*, 2020, 116: 111241. doi: 10.1016/j.msec.2020.111241.
- [14] Chen CY, Kim DM, Lee C, et al. Biological efficacy of perpendicular type-I collagen protruded from TiO₂-nanotubes [J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12: 36. doi: 10.1038/s41368-020-00103-3.
- [15] Wang X, Yu H, Yang T, et al. Density regulation and localization of cell clusters by self-assembled femtosecond-laser-fabricated micropillar arrays [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(49): 58261-58269. doi: 10.1021/acsami.1c13818.
- [16] Moses JC, Mandal BB. Mesoporous silk-bioactive glass nanocomposites as drug eluting multifunctional conformal coatings for improving osseointegration and bactericidal properties of metal implants [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(13): 14961 - 14980. doi: 10.1021/acsami.2c00093.
- [17] Wang FF, Li Y, Liu HC. Preparation of icariin/TiO₂ nanotube composite coating on pure titanium surface and analysis of early drug release [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(5): 1864-1873. doi: 10.26355/eurrev_201903_17221.
- [18] Fathi M, Akbari B, Taheriazam A. Antibiotics drug release controlling and osteoblast adhesion from Titania nanotubes arrays using silk fibroin coating [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 103: 109743. doi: 10.1016/j.msec.2019.109743.
- [19] Fitzpatrick V, Martín-Moldes Z, Deck A, et al. Functionalized 3D-printed silk-hydroxyapatite scaffolds for enhanced bone regeneration with innervation and vascularization [J]. *Biomaterials*, 2021, 276: 120995. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120995.
- [20] Sales A, Khodr V, Machillot P, et al. Differential bioactivity of four BMP-family members as function of biomaterial stiffness [J]. *Biomaterials*, 2022, 281: 121363. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121363.
- [21] Lowery JW, Rosen V. The BMP pathway and its inhibitors in the skeleton [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2431-2452. doi: 10.1152/physrev.00028.2017.
- [22] Ximu, Zhang, . Aligned electrospun cellulose scaffolds coated with rhBMP-2 for both *in vitro* and *in vivo* bone tissue engineering [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 213: 27-38. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.02.038.
- [23] Pulkkinen HH, Kiema M, Lappalainen JP, et al. BMP6/TAZ-Hippo signaling modulates angiogenesis and endothelial cell response to VEGF [J]. *Angiogenesis*, 2021, 24(1): 129-144. doi: 10.1007/s10456-020-09748-4.
- [24] Gillman CE, Jayasuriya AC. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 130: 112466. doi: 10.1016/j.msec.2021.112466.
- [25] Kitajima H, Hirota M, Iwai T, et al. Computational fluid simulation of fibrinogen around dental implant surfaces [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2). doi: 10.3390/ijms21020660.

(编辑 罗燕鸿,邵龙泉)



官网