文章编号:1000-5404(2014)12-1273-06

论著

不同管径钛纳米管对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响

王 明,杨 生,邓 锋,王 璐,张 翼,张 赫 (401147 重庆,重庆医科大学口腔医学院,口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室)

[摘要] **目的** 研究不同管径钛纳米管表面结构对体外培养SD大鼠骨髓间充质干细胞(rat mesenchymal stem cells, rMSCs)粘附、增殖及成骨向分化的影响。**方法** 分离并扩增rMSCs,成骨向诱导分化及流式细胞鉴定;阳极氧化法分别制备管径30、70、100 nm的TiO_2纳米管,扫描电镜观察表面形貌、接触角测试材料表面亲疏水性;MTT法检测细胞在材料表面粘附及增殖情况,激光共聚焦显微镜观察细胞在材料表面形貌。评价细胞在纯钛,管径30、70、100 nm的TiO_2纳米管表面成骨向分化过程中碱性磷酸酶活性变化特征及矿化情况。Real-time PCR检测诱导14 d后Runx2及OSX基因表达情况。**结果** 分离获得的rMSCs具有成骨向分化的能力,CD29阳性细胞为99.65%;扫描电镜观察各组材料表面管径均达到设计要求;管径为70 nm的TiO_2纳米管材料表面亲水性较好($P<0.05$);MTT结果显示70 nm组rMSCs的粘附、增殖均较其他组明显增高($P<0.05$);30 nm组在成骨诱导7 d后,碱性磷酸酶活性均高于其他组($P<0.05$)。30 nm组在成骨诱导21 d后表面矿化高于其他组($P<0.05$)。30 nm组在成骨诱导14 d后Runx2及OSX基因表达高于其余组($P<0.05$)。**结论** 与光滑面纯钛相比,不同管径的TiO_2纳米管对rMSCs的作用各不相同,rMSCs在70nm表面增殖能力和粘附性较好,但在30 nm表面的成骨向分化能力较强。

[关键词] TiO_2纳米管;骨髓间充质干细胞;成骨向分化
[中图法分类号] R318.08;R329.28;R331.22 [文献标志码] A

Effects of different-diameter TiO_2 nanotubes on proliferation and osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells

Wang Ming, Yang Sheng, Deng Feng, Wang Lu, Zhang Yi, Zhang He (Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, College of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of different-diameter TiO_2 nanotubes prepared by anodization on the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of Sprague-Dawley rat mesenchymal stem cells (rMSCs). **Methods** The isolated rMSCs were characterized by osteogenic differentiation and flow cytometry. TiO_2 nanotubes having diameter of 30, 70 and 100 nm were fabricated by anodization with different voltages. The topography and hydrophilicity of the nanotubes were accessed with scanning electron microscopy (SEM) and contact angle test, respectively. MTT assay was applied to evaluate the cell adhesion and proliferation on different substrates. Cell morphologies were observed by confocal microscopy. The activity of alkaline phosphatase and mineralization of rMSCs on plane titanium and TiO_2 nanotubes (diameter = 30, 70 and 100 nm) were also detected during osteogenic differentiation. The expression of Runx2 and OSX was analyzed by real-time PCR in 14 d after osteogenic differentiation. **Results** The osteogenic differentiation of rMSCs was successfully induced, and CD29 positive cells were 99.65%. TiO_2 nanotubes of different diameters were generated. The TiO_2 nanotubes of 70 nm diameter were more hydrophilic ($P<0.05$) and exhibited better cell adhesion and proliferation compared with other substrates ($P<0.05$). The cells cultured on the TiO_2 nanotubes of 30 nm diameter displayed much higher activity of alkaline phosphatase than those on other substrates in 7 d after osteogenic induction ($P<0.05$), higher mineralization in 21 d after osteogenic induction ($P<0.05$) and more

[基金项目] 重庆医科大学口腔医学院博士科研启动基金(2011);重庆市卫生局面上项目(2012-2-121);重庆市科委自然科学基金(CSTC2012jjA0178);高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题(20125503120009)
[通信作者] 张 赫,E-mail: ysdentist@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140114.1843.001.html(2014-01-14)

Runx2 and OSX gene expression in 14 d after osteogenic induction ($P<0.05$). **Conclusion** TiO_2 nanotubes with different diameters have different influences on rMSCs as compared to plane titanium. The TiO_2 nanotubes of 70 nm diameter are more advantageous for adhesion and proliferation of rMSCs, while TiO_2 nanotubes of 30 nm diameter facilitate osteogenic differentiation.

[**Key words**] TiO_2 nanotubes; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

Supported by the Doctoral Starting Fund of College of Stomatology of Chongqing Medical University (2011), the General Program of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-2-121), the Natural Science Foundotion of Chongqing (CSTC2012jjA0178) and the Project for New Feachers From High Educational Doctorial Discipline Science Foundation (20125503120009). Corresponding author: Zhang He, E-mail: ysdentist@hotmail.com

钛是一类用于制作骨科或牙科种植体最常用的生物材料。虽然其具有优良的机械和生物学性能,但长期观察表明,该类材料在体内的骨整合速度和能力相对较差[1]。如何改善钛的生物学性能,提高钛与周围组织的相容性,促进和加速骨整合已经成为众多学者研究的焦点。很多学者认为材料表面形态和结构是影响细胞附着和生长的一个最重要因素[2-4]。近年来,TiO_2纳米管结构对细胞的生物学作用已成为研究热点。虽然这种结构具有高比表面积和吸引细胞响应的能力[5],但关于不同管径 TiO_2 纳米管对细胞粘附、增殖及分化能力的影响尚存争议。Park 等[6]认为管径小于30 nm 的 TiO_2 纳米管能刺激骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,而大管径的 TiO_2 纳米管抑制其向成骨方向分化。骨髓间充质干细胞在管径15 nm 的 TiO_2 纳米管表面粘附、增殖及分化为成骨细胞的能力最佳[7]。持有不同意见的学者们认为细胞在管径30nm 等小管径 TiO_2 纳米管表面粘附性较好,在 70 nm 和 100 nm 等大管径的 TiO_2 纳米管表面更有利于成骨向分化[8]。针对上述研究现状,本实验旨在比较光滑面钛片与管径30、70、100 nm 的 TiO_2 纳米管对 SD 大鼠来源的骨髓间充质干细胞粘附、增殖及成骨向分化能力的影响,为种植体生物材料的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的提取、分离及培养

选择3周龄健康雄性 SD 大鼠1只,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,颈椎脱臼处死。快速无菌去除 SD 大鼠股骨及胫骨的皮肤、肌肉及筋膜等结缔组织,将股骨和胫骨置于5 mL 含1%青/链霉素、10%胎牛血清、12 μmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM/F12 培养基(CIM)中,剪去股骨及胫骨的两端,暴露骨髓腔,用无菌注射器吸取培养基冲洗骨髓腔并过滤骨碎片及血凝块[9]。将过滤后的细胞悬液于37 ℃,5% CO_2孵育。48 h 后首次更换培养液,之后隔日换液。待细胞融合约80%时按1∶2的比例传代。传代细胞依次标记为 P1、P2、P3 等。

1.2 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的诱导成骨分化鉴定

选取 P3 代 rMSCs 以 $(5\sim6)\times10^3/cm^2$ 细胞密度接种于6孔板中,使用成骨诱导液(含50 μg/mL 抗坏血酸、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、10%胎牛血清、1%青/链霉素的 DMEM/F12 培养基)培养,21 d 后茜素红染色检测 rMSCs 诱导成骨向分化的能力。

1.3 SD 大鼠骨髓间充质干细胞流式细胞鉴定

选取 P3 代 rMSCs 进行流式细胞鉴定,在100 μL 5×10^6/mL 细胞悬液中加入20 μL FITC 标记的小鼠抗大鼠 CD29 抗体,混匀,4 ℃避光反应 30 min,1 500 r/min 离心 5min,弃上清,PBS 清洗2次,加入 PBS 重悬,流式细胞仪分析(美国 BD 公司,型号 FACSVantage)。按此方法进行 FITC 标记的小鼠抗大鼠 CD45 抗体的流式细胞检测。设立同型阴性对照。

1.4 TiO_2纳米管阵列的制备

将厚度为0.25 mm,纯度为99.9%的钛片(重庆大学生物医学工程系蔡开勇教授课题组提供),制作成1 cm×1 cm 大小并锤压平整。超声清洗 15 min,双蒸水清洗3次,之后按75%酒精、丙酮、75%酒精的顺序超声清洗各 15 min,双蒸水清洗5次,干燥。然后采用电化学阳极氧化法制备 TiO_2 纳米管,方法同文献[10-11]。反应结束后取出钛片,大量双蒸水清洗,干燥备用。

1.5 TiO_2纳米管阵列的形貌

所有待测样本经喷金处理后在 100kV 电压条件下扫描电镜(FEINova 400 Nano SEM, Phillips Co, Holland)观察光滑面钛片及制备好的 TiO_2 纳米管表面形貌,拍照,计算 TiO_2 纳米管的管径。

1.6 TiO_2纳米管阵列的亲水性

采用接触角测试仪(Harke-spca,北京哈科试验仪器厂)检测样本表面的接触角。检测用蒸馏水滴体积为5μL,待水滴稳定30 s 后,用相机拍照记录样本表面水滴铺展度图像,然后使用厂商所提供的软件进行检测分析。

1.7 TiO_2纳米管对 rMSCs 粘附的影响

采用 MTT 法检测样本表面对 rMSCs 粘附的影响。将制备好的样本置于超净台内紫外消毒灭菌,随后置于24孔培养板内,每种钛片样本设5个重复对照。将 P3 代 rMSCs 以密度 $2\times10^4/cm^2$ 均匀接种于样本表面。1 h 后 MTT 检测(碧云天试剂盒)。弃培养液,PBS 清洗3次,将样本取出放置于新的干净培养孔内,每孔加入1 mL 无血清 DMEM/F12 培养基及 200 μL 5 mg/mL的 MTT 溶液,37 ℃孵育 4 h。弃培养液,然后添加1 mL Formanzan 溶解液,避光孵育 4 h,待 Formanzan 结晶完全溶解后,吸取100 μL 液体至96孔板,酶标仪 570 nm 测定光密

度,计算平均光密度值。

1.8 TiO_2纳米管对 rMSCs 增殖的影响

采用 MTT 法检测样本表面对 rMSCs 增殖的影响,方法同 1.7。调整细胞接种密度为 5×10^3/样本表面。rMSCs 在各种样本上培养 1、3、7 d 后进行检测。

1.9 激光共聚焦荧光显微镜检测 rMSCs 在 TiO_2纳米管表面的生长形态

在消毒灭菌后的光滑面钛片,管径 30、70、100 nm 的 TiO_2 纳米管样本表面分别接种 8×10^3细胞,培养 24 h 后,用 PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 3 次,0.2% Triton X-100 处理 10 min,PBS 清洗 3 次,5% BSA 封闭 1 h,PBS 清洗 3 次,之后加入适量罗丹明-鬼笔环肽(5 U/mL)溶液浸没样本,4 ℃避光静置 12 h,PBS 洗 3 次,使用 10 μg/mL 的 DAPI 染色 3~5 min。PBS 清洗 3 次,抗淬灭封固剂封片。激光共聚焦荧光显微镜(Nikon A1R confocal microscope)观察、拍照。

1.10 碱性磷酸酶活性测试检测 TiO_2纳米管对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

在普通培养基和成骨培养基中分别考察 TiO_2纳米管对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响。普通培养基为含 10% 胎牛血清,1% 青/链霉素,12 μmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM/F12 培养基,用 R 表示。成骨培养基在上述普通培养基基础上加入 50 μg/mL 抗坏血酸,10 mmol/L β-甘油磷酸钠,用 O 表示。在光滑面钛片,管径 30、70、100 nm 的 TiO_2纳米管表面按 2×10^4/cm^2 细胞密度分别接种 rMSCs 后,用上述 2 种培养体系培养。每组设 5 个重复对照。培养 3、7、14 d 后进行碱性磷酸酶活性检测。操作步骤及碱性磷酸酶(AKP)活性值的计算公式由购买的 AKP 测试盒(南京建成,A059-2)厂家提供。

1.11 rMSCs 在不同材料表面成骨向分化后矿化程度评估

按 1.9 方法在材料表面培养 rMSCs,21 d 后进行矿化测试。2.5% 戊二醛固定,PBS 清洗,40 mmol/L 茜素红室温染色 20 min,双蒸水洗,加入 400 μL 10% HAC(体积比),孵育 30 min 后收集混悬液至 EP 管。85 ℃加热 10 min 后离心,取上清,加入 200 μL 10% NH_4OH,405 nm 酶标仪检测光密度值[D(405)]。

1.12 Real-time PCR 检测成骨相关基因的表达

按 1.9 方法使用成骨培养液在 4 种材料表面培养 rMSCs。诱导第 14 天进行 Real-time PCR 测试 Runx2 及 OSX 基因表达情况。重复 3 次实验。设计引物 Runx2 上游 5′-CCGGTCTCCT-TCCAGGAT-3′,下游 5′-GGGAGCTGCTGTGGCTTC-3′(上海生工)。OSX 上游 5′-GGGAAAAGGAGGCACAAAGAA-3′,下游 5′-AGGAAATGAGTGGGGAAAGGG-3′。GAPDH 上游 5′-CCTG-GAGAAACCTGCCAAG-3′,下游 5′-CACAGGAGACAACCTGGT-CC-3′(华大基因)。按 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, Code RR9108),逆转录试剂盒(TaKaRa,Code RR047A)及 SYBR 定量 PCR 试剂盒(TaKaRa,Code RR820A)说明书进行操作。

1.13 统计学分析

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组资料均数总体的比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 检验。采用 SPSS 19.0 统计软件。用 Graphpad Prism 5 作图。

2 结果

2.1 TiO_2纳米管表面形貌及亲疏水性

扫描电镜观察光滑面钛片表面由几微米到十几微米的不规则凹凸结构组成。10、20、30V 电压条件下分别制备的 TiO_2 纳米管平均管径约为 30、70、100 nm,阵列整齐,管径均匀。无纳米管层塌陷、碎裂、剥脱等现象(图 1)。

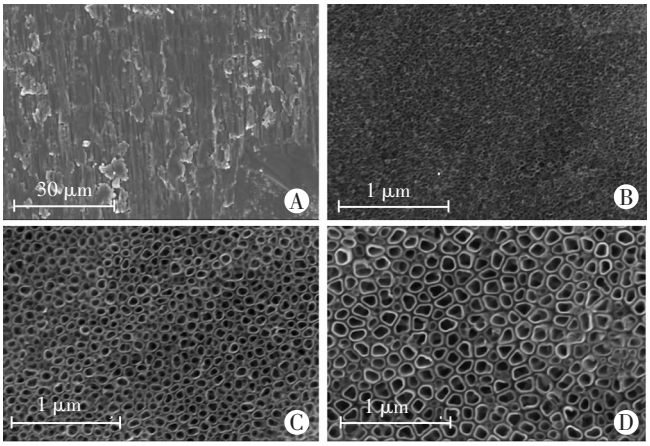


图 1 扫描电镜观察光滑面纯钛片(A)及管径 30(B)、70(C)、100 nm(D)的 TiO_2纳米管表面观

接触角测试结果显示光滑面钛片表面接触角为(49.17±0.18)°,管径 30 nm 的 TiO_2 纳米管表面接触角为(38.43±1.12)°,管径 70 nm 的 TiO_2 纳米管表面接触角为(16.41±0.51)°,管径 100 nm 的 TiO_2 纳米管表面接触角为(41.45±1.06)°。各样本表面接触角关系:70 nm 组 < 30 nm 组 < 100 nm 组 < 纯钛组。两两比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。材料表面接触角越小,亲水性越强,疏水性越差。由此可知,各组材料表面的亲水性关系:70 nm 组 > 30 nm 组 > 100 nm 组 > 纯钛组。

2.2 rMSCs 鉴定

成骨诱导 7 d 后少量细胞形态由长梭形、纺锤形或多边形变圆,两端突起变短。诱导 10 d 时发生形态改变的细胞数目增多,出现许多圆三角形的细胞。诱导 14 d 出现少量较小的透明或棕黄色钙结节。诱导 21 d 出现较多钙结节,茜素红染色阳性(图 2)。

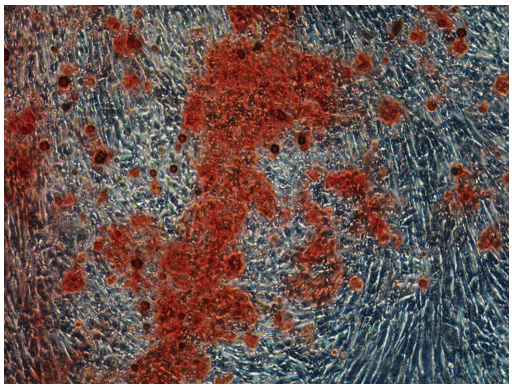
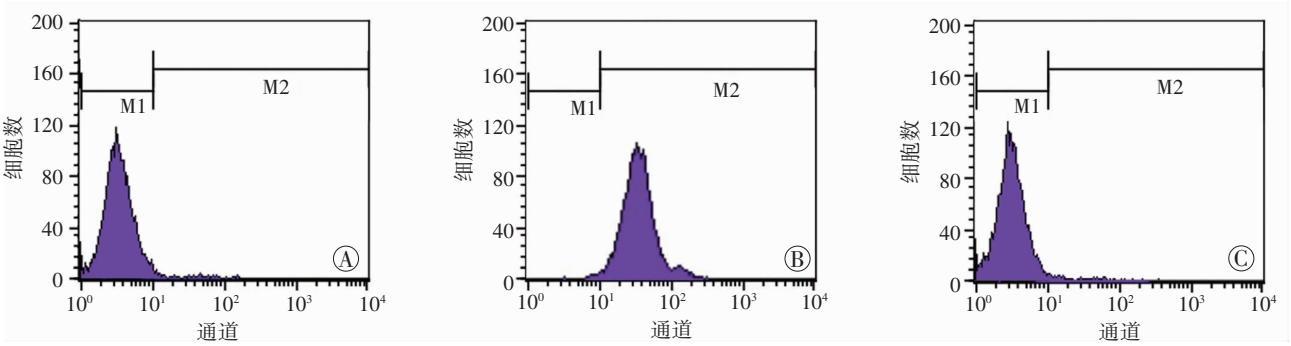


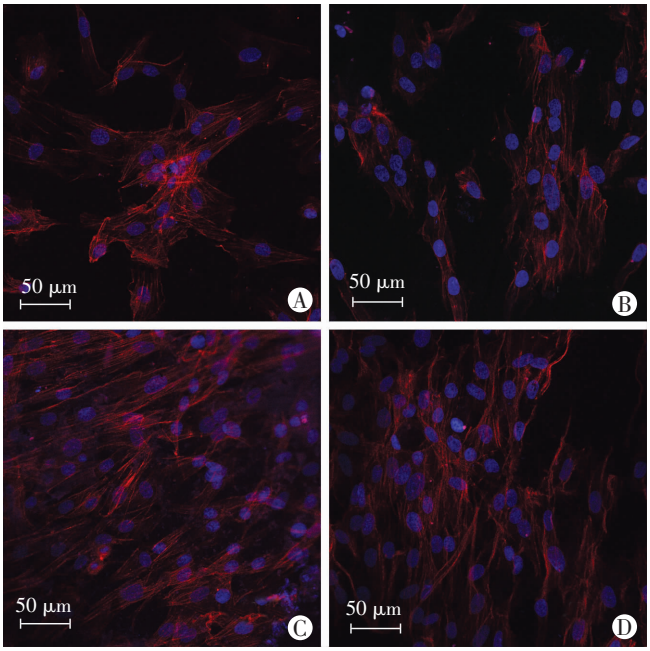
图 2 成骨诱导 21 d 后茜素红染色观察 rMSCs 矿化结节(LM×100)



A:同型阴性对照;B:CD29;C:CD45

图3 流式细胞术检测 rMSCs 表面蛋白 CD29、CD45 阳性率变化

流式细胞仪检测结果显示,rMSCs 表面蛋白 CD29 阳性率为 99.65%,造血谱系分子 CD45 阳性率为 1.42%(图 3)。表明所提取的 rMSCs 为较为纯化的 SD 大鼠骨髓间充质干细胞。

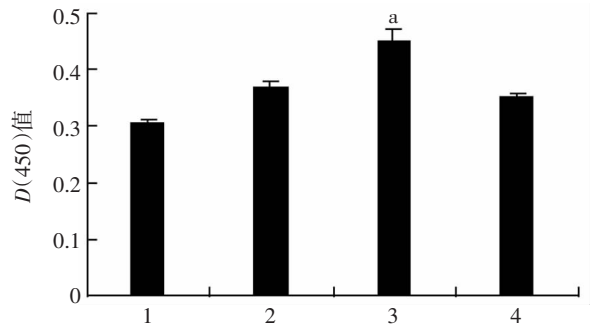


A:光滑面纯钛片;B:管径 30 nm 的 TiO_2 纳米管;C:管径 70 nm 的 TiO_2 纳米管;D:管径 100 nm 的 TiO_2 纳米管

图4 激光共聚焦显微镜观察 rMSCs 在材料表面培养 1 d 后的生长形态

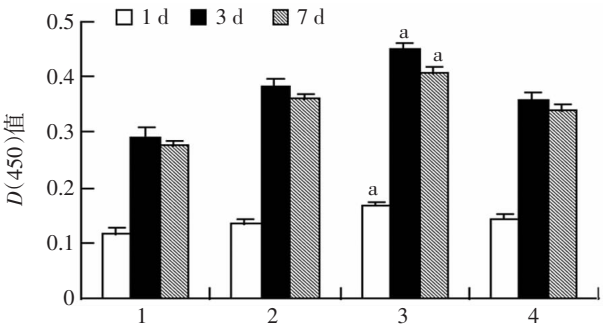
2.3 TiO_2 纳米管对 rMSCs 粘附和增殖的影响

激光共聚焦显微镜观察发现,光滑面纯钛片表面细胞基本处于铺展状态,细胞骨架较清晰,细胞数量相对较少。在钛纳米管表面,随着管径的增加,细胞逐渐变成梭形,细胞骨架排列紧密,细胞量在 70 nm 表面明显增多(图 4)。图 5 显示 rMSCs 在样本表面培养 1 h 后所产生甲臜的情况。结果表明 rMSCs 在管径 70 nm 的钛纳米管表面粘附能力较其余组好,两两比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。图 6 显示粘附在各组材料表面的细胞培养 1、3、7 d 后所产生的甲臜光密度值。结果表明相对于其余组,孔径 70 nm 的 TiO_2 纳米管表面细胞增殖能力最强,差异具有统计学意义($P<0.05$)。



1:光滑面纯钛;2:管径 30 nm;3:管径 70nm;4:管径 100 nm;a:$P<0.05$,与光滑面纯钛比较

图5 MTT 法检测 rMSCs 在不同管径的 TiO_2 纳米管表面粘附能力



1:光滑面纯钛;2:管径 30 nm;3:管径 70 nm;4:管径 100 nm

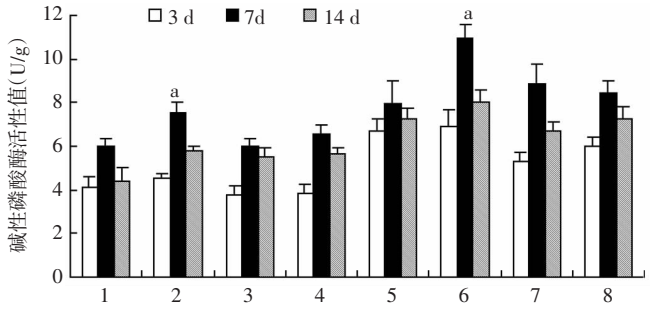
a:$P<0.05$,与光滑面纯钛比较

图6 MTT 法检测 rMSCs 在不同管径的 TiO_2 纳米管表面细胞培养不同时间的增殖变化

2.4 TiO_2 纳米管对 rMSCs 向成骨细胞方向分化的影响

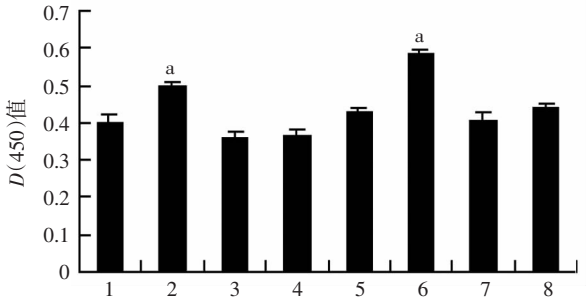
rMSCs 在同种材料表面培养 3、7、14 d 后,成骨培养体系组碱性磷酸酶的活性高于普通培养体系组。培养 7 d 后,与其余材料表面相比,30 nm 组在 2 种培养体系中碱性磷酸酶的活性均高于其他组,差异具有统计学意义($P<0.05$)(图 7)。

矿化测试结果表明不论在普通培养基还是成骨培养基,30 nm 组表面 rMSCs 矿化能力高于其余组,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 8)。



1－4:常规培养体系;5－8:成骨培养体系;1、5:光滑面纯钛;2、6:管径 30 nm;3、7:管径 70 nm;4、8:管径 100 nm;a:$P<0.05$,与同种培养体系下的光滑面纯钛和管径 70、100 nm 的 TiO_2 纳米管比较

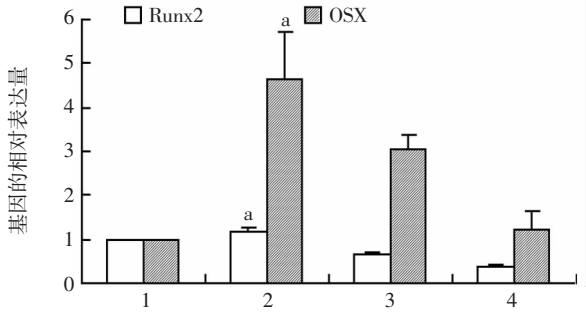
图 7 rMSCs 接种不同时间碱性磷酸酶活性检测结果



1－4:常规培养体系;5－8:成骨培养体系;1、5:光滑面纯钛;2、6:管径 30 nm;3、7:管径 70 nm;4、8:管径 100 nm;a:$P<0.05$,与同种培养体系下的光滑面纯钛和管径 70、100 nm 的 TiO_2 纳米管比较

图 8 rMSCs 接种 21 d 后细胞矿化定量检测结果

Real-time PCR 检测结果显示,成骨培养体系下诱导 14 d 后,管径 30 nm 的 TiO_2 纳米管表面 Runx2 及 OSX 基因表达较其余组高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Runx2 在管径 30、70、100 nm 的 TiO_2 纳米管表面的表达分别为光滑面纯钛的 1.19、0.64、0.37 倍。OSX 在管径 30、70、100 nm 的 TiO_2 纳米管表面的表达分别为光滑面纯钛的 4.66、3.04、1.21 倍(图 9)。



1:光滑面纯钛;2:管径 30 nm;3:管径 70 nm;4:管径 100 nm;a:$P<0.05$,与光滑面纯钛及管径 70、100 nm 的 TiO_2 纳米管比较

图 9 Real-time PCR 检测成骨诱导液培养各种材料表面 rMSCs 14 d 后 Runx2 与 OSX 成骨细胞基因的表达

3 讨论

金属钛已广泛应用于制作骨科及牙科种植体,其缺点是长期生理状态下易疲劳以及骨结合能力差[1]。目前钛材料表面常规的改性办法是喷砂酸蚀(SLA)、酸蚀(SA)、等离子喷涂(TPS)、羟基磷灰石喷涂(HA)等[12]。这些处理方式的主要目的一方面是提高比表面积,增加材料周围组织和细胞与材料的贴附面积,通过粗糙面对细胞施加一定的机械力;另一方面是改变材料的化学组分从而提高种植体的骨结合率[12-13]。从微观结构看,上述处理办法主要集中在微米级结构的修饰,而随着纳米技术的发展,种植材料表面纳米结构对于细胞的作用也日益吸引了众多研究者的目光[14]。经过喷砂、酸蚀处理的金属钛表面可以形成 300～500 nm 的不规则凹坑状结构,但这种无序的表面结构无益于清晰的认识纳米结构对细胞的作用,很多学者则考虑利用有序的纳米结构或自组装纳米结构来深入研究这一问题。由于钛纳米管所具有的高比表面积及吸引细胞响应等独特性能,可以用来更好的认识细胞与纳米结构的关系[5]。虽然纳米管在生物医学领域显示出无可比拟的优势,但是学者们对干细胞在这种结构表面响应规律的认识还很不清晰。

为了考察干细胞在钛纳米管表面的生物学特性,本实验成功分离并纯化了 SD 大鼠骨髓间充质干细胞,实验将 P3 代 rMSCs 分别接种在上述制备的钛纳米管材料表面,分别考察了经常规培养基和成骨培养基中培养后材料表面 rMSCs 生长、增殖、粘附及成骨向分化的特点。

在普通培养基条件下,MTT 结果显示,rMSCs 在管径 70nm 的 TiO_2 纳米管表面表现出良好的增殖能力,这与 Popat 等[3]报道的结果相一致。而 Park 等[6-7]研究认为,管径小于 30 nm 的范围内细胞的增殖能力较强,尤以 15 nm 最佳,但其未进一步阐明具体的相关机制和原理。本研究发现 rMSCs 在管径 70 nm 的 TiO_2 纳米管表面增殖能力较光滑面纯钛组提高近 0.5 倍。有报道认为材料表面亲水性越高,细胞的增殖能力越强,而且钛纳米管管径与其表面的亲疏水性密切相关[15-16]。根据文策尔法则,材料表面的接触角越小,亲水性越强[16]。Das 等[17]报道,细胞在材料表面的粘附、增殖和材料特征及其表面吸附的蛋白层相关,材料表面的亲疏水性在某种程度上调控着影响细胞粘附的材料表面的蛋白吸附情况。材料表面接触角越小,则促进细胞粘附增殖的表面自由能越大。接触角测试结

果显示在70 nm表面接触角最小,因此可推断,管径70 nm的TiO_2纳米管表面亲水性较好,rMSCs在该表面呈现较快的生长速度和较高的增殖能力。MTT结果也恰好证实rMSCs在这种表面的生存和增殖能力最强。除此之外,MTT检测数据显示,管径70 nm的TiO_2纳米管表面有利于细胞的粘附。

材料表面结构对细胞分化也有明显影响。本研究发现,无论在ALP活性、钙沉积量及Runx2和OSX表达方面,30 nm钛纳米管均显示出促进rMSCs成骨向分化的作用。与文献[6-7]报道相似。Park等[6-7]认为TiO_2纳米管表面骨髓间充质干细胞的粘附、增殖、迁移、分化主要取决于纳米管的管径。管径小于30 nm的范围内,能加速整合素聚集和粘着斑的形成,有利于细胞成骨向分化。

本实验考察范围仅限于管径方面的考虑,对于细胞来说,纳米管长度如何影响细胞的粘附、增殖和分化利用现有条件较难获得更清楚的认识。但是结合本实验结果并依据阳极氧化法制备钛纳米管的条件,可默认为相同电压条件下,相同电解液配比,相同阳极氧化时间所制备的纳米管长度近似相等[10-11,18]。因此,综合文献和本实验结果,课题组认为钛纳米管管径对干细胞的影响最为明显。

rMSCs能在TiO_2纳米管表面生长良好,其粘附、增殖、分化能力均较在光滑面钛片表面好;不同管径的TiO_2纳米管对rMSCs的作用各不相同。rMSCs在管径70 nm的TiO_2纳米管表面增殖能力和粘附性较好,而在管径30 nm的TiO_2纳米管表面的成骨向分化能力较强。本实验将在以上研究的基础上,增加相应的检测内容,深入研究钛纳米管对细胞作用的机制等问题,为今后优化种植体表面设计提供参考。

参考文献:

[1] Maho A, Linden S, Arnould C, *et al*. Tantalum oxide/carbon nanotubes composite coatings on titanium, and their functionalization with organophosphonic molecular films: a high quality scaffold for hydroxyapatite growth[J]. J Colloid Interface Sci, 2012, 371(1): 150-158.

[2] Brammer K S, Choi C, Frandsen C J, *et al*. Comparative cell behavior on carbon-coated TiO_2 nanotube surfaces for osteoblasts vs. osteo-progenitor cells[J]. Acta Biomater, 2011, 7(6): 2697-2703.

[3] Popat K C, Leoni L, Grimes C A, *et al*. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells[J]. Biomaterials, 2007, 28(21): 3188-3197.

[4] Kommireddy D S, Sriram S M, Lvov Y M, *et al*. Stem cell attachment to layer-by-layer assembled TiO_2 nanoparticle thin films[J]. Biomaterials, 2006, 27(24): 4296-4303.

[5] Tan A W, Pingguan-Murphy B, Ahmad R, *et al*. Review of titania nanotubes: Fabrication and cellular response[J]. Ceramics International, 2012, 38(6): 4421-4435.

[6] Park J, Bauer S, Schlegel K A, *et al*. TiO_2 nanotube surfaces: 15 nm--an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation[J]. Small, 2009, 5(6): 666-671.

[7] Park J, Bauer S, von-der-Mark K, *et al*. Nanosize and vitality: TiO_2 nanotube diameter directs cell fate[J]. Nano Lett, 2007, 7(6): 1686-1691.

[8] Oh S, Brammer K S, Li Y S J, *et al*. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(7): 2130-2135.

[9] Zhu H, Guo Z K, Jiang X X, *et al*. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone[J]. Nat Protoc, 2010, 5(3): 550-560.

[10] Hu Y, Cai K, Luo Z, *et al*. TiO_2 nanotubes as drug nanoreservoirs for the regulation of mobility and differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Acta Biomater, 2012, 8(1): 439-448.

[11] Lai M, Cai K, Zhao L, *et al*. Surface functionalization of TiO_2 nanotubes with bone morphogenetic protein 2 and its synergistic effect on the differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Biomacromolecules, 2011, 12(4): 1097-1105.

[12] Mellado-Valero A, Buitrago-Vera P, Sola-Ruiz M F, *et al*. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2013, 18(6): e869-e876.

[13] Mamalis A, Silvestros S. Modified Titanium surfaces alter osteogenic differentiation; a comparative microarray-based analysis of human mesenchymal cell response to commercial titanium surfaces[J]. J Oral Implantol, 2013, 39(5): 591-601.

[14] 曹馨, 于卫强, 张富强. 钛纳米管表面RGD修饰工艺的初步研究[J]. 口腔医学研究, 2011, 27(4): 281-284.

[15] Bauer S, Park J, von-der-Mark K, *et al*. Improved attachment of mesenchymal stem cells on super-hydrophobic TiO_2 nanotubes[J]. Acta Biomater, 2008, 4(5): 1576-1582.

[16] Lan M Y, Liu C P, Huang H H, *et al*. Diameter-sensitive biocompatibility of anodic TiO_2 nanotubes treated with supercritical CO_2 fluid[J]. Nanoscale Res Lett, 2013, 8(1): 150.

[17] Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti[J]. Acta Biomater, 2007, 3(4): 573-585.

[18] Yu W Q, Jiang X Q, Xu L, *et al*. Osteogenic gene expression of canine bone marrow stromal cell and bacterial adhesion on titanium with different nanotubes[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2011, 99(2): 207-216.

(**收稿**:2013-11-26;**修回**:2013-12-14)

(编辑 张 维)