doi:10.11659/jjssx.11E022044

·基础研究·

锆等离子体浸没离子注入增强聚醚醚酮材料的细胞相容性

许 朗[1],黄忠卫[2],石 锐[3] (1.北京积水潭医院口腔科,北京 100035;2.北京王府中西医结合医院口腔科,北京 102200;3.北京市创伤骨科研究所/北京积水潭医院研究所,北京 100035)

[摘 要] **目的** 使用等离子体浸没离子注入技术(PIII)将锆离子注入到聚醚醚酮(PEEK)材料中,并初步评价该材料与人牙龈成纤维细胞(HGFs)的生物相容性。**方法** 将经过PIII改性的PEEK试件作为改性组,未经改性的试件作为对照组,然后与HGFs在体外共培养,扫描电镜观察试件表面形貌,显微镜下对HGFs的细胞形态进行分析,CCK-8检测细胞增殖率以评价材料的生物相容性。**结果** PIII注入锆离子可在PEEK材料表面成功构建改性层。在培养4 h后,2组试件表面上均有HGFs铺展,且改性组试件表面细胞铺展更开,细胞形态更长,出现的伪足更多。在培养3 d、5 d、7 d后,改性组表面细胞吸光度值较对照组增高,差异有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 锆等离子体浸没离子注入可在PEEK材料表面成功改性,材料表面的氧化锆纳米结构能够促进HGFs的黏附、增殖,有利于软组织黏附。

[关键词] 人牙龈成纤维细胞;聚醚醚酮;黏附;增殖;等离子体浸没离子注入技术;锆离子
[中图分类号] R783.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-11-09

Zirconium with plasma immersion ion implantation enhances the cytocompatibility of polyether ether ketone materials

XU Lang[1], HUANG Zhong-wei[2], SHI Rui[3] (1. Department of Stomatology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China; 2. Department of Stomatology, Beijing Royal Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing 102200, China; 3.Beijing Research Institute of Traumatology and Orthopaedics/Research Institute of Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

Abstract: Objective Zirconium ions were implanted into the polyether ether ketone (PEEK) materials by plasma immersion ion implantation (PIII), to preliminarily evaluatethe cytocompatibility of this material with human gingival fibroblasts (HGFs). **Methods** The PEEK specimens modified by PIII were used as the modification group, and the unmodified specimens were used as the control group, and then co-cultured with HGFs in vitro. The surface morphology was observed by scanning electron microscopy, the cell morphology was analyzed under a microscope, and the cell proliferation rate was determined by CCK-8 to evaluate the biocompatibility of the material. **Results** Zirconium ions with PIII implantation could successfully construct a modified layer on the surface of PEEK materials. After cultured for 4 hours, the surface of both groups of specimens had HGFs spreading, and the cells in the modified group were spread better, with longer cell morphology and more pseudopodia. After cultured for 3 days, 5 days and 7 days, the cell absorbance values of surface in the modified group were higher than those in the control group, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** The surface of PEEK materials can be successfully modified with zirconium implantation by PIII, and the zirconia nanostructure on the surface of the material can promote the adhesion and proliferation of HGFs, which is conducive to soft tissue adhesion.

Keywords: human gingival fibroblasts; polyether ether ketone; adhesion; proliferation;plasma immersion ion implantation;zirconium ions

随着人们生活水平的提高,口腔种植牙也逐渐被接受。长期以来,钛及其合金因具有较好的生物相容性和机械性能而广泛应用于口腔种植[1-2]。然而,钛本身存在金属离子释放,高弹性模量等问题,限制了其应用。近年来聚醚醚酮(polyether ether ketone,PEEK)成为备受关注的金属替代材料,其分子结构以苯环、醚键和羰基为特征,其中苯环是刚性结构,醚键是柔性结构,羰基结构可以提高分子间作用力。PEEK的分子结构[3],使其具有耐高温、耐水解、耐磨、耐腐蚀性和耐燃烧等优异的机械性能。此外,PEEK的弹性模量与人体骨组织较为匹配,可以有效减少应力屏蔽效应引起的骨吸收和骨萎缩,提高种植成功率,有望替代传统钛合金种植体[4]。然而,PEEK属于生物惰性材料,不具有生物活性,不利于细胞的黏附与生长[5],限制了其在口腔种植体领域的应用。因此,提高PEEK材料生物活性对其在口腔种植中的应用很有意义。

表面改性是一种改变材料表面或近表面的理化性质,而不改变基体材料整体特性的方法。等离子体浸没离子注入技术(plasma immersion ion implantation,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82072406)
[通信作者] 石 锐,E-mail:shirui@jst-hosp.com.cn

PIII)是一种全方位、高反应活性的新型表面改性技术[6],等离子体浸没离子注入后,高分子材料表面会发生交联、断链、消熔和刻蚀等反应,从而在材料表面形成活性官能团和微纳结构,且不影响基体材料的整体性能;同时改性层与基体之间结合牢固,无明显界面,减少了涂层改性剥落的风险,尤为适合种植体一类不规则形状材料的制备,是提高PEEK材料生物活性的良好方法。

种植体周围软组织封闭包括上皮附着与纤维结缔组织附着。上皮附着是阻止细菌侵入的第一道屏障,但其具有沿种植体表面向根端迁移的特性,细菌可随之向根部侵入。纤维结缔组织层主要由人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts,HGFs)及其产生的胶原纤维构成。HGFs在种植体颈部的有效黏附与增殖可保证牙龈软组织封闭和骨整合的稳定,决定了种植体穿龈部位的软组织封闭效果。种植体与周围牙龈组织紧密结合,早期形成软组织屏障以隔绝细菌入侵是形成良好骨结合的基本保障。目前PEEK的研究局限于骨整合层面,对种植体周围软组织封闭也主要使用钛合金作为种植体材料,或将PEEK作为种植体材料时注入钛、钙、锌等金属。与其他金属相比,锆易获取、价格较低。体外细胞实验表明纳米氧化锆和氧化锆薄膜具有良好的生物活性,能显著促进干细胞的增殖和分化[7],因而广泛应用于牙科、整形和骨修复领域。关于锆离子注入PEEK后对HGFs的影响目前尚未见相关实验研究,故本研究首次使用锆离子注入PEEK形成氧化锆纳米结构,观察PEEK材料的表面特征,研究此类新材料作为口腔种植体与HGFs的细胞相容性,期望为优化口腔种植基台和种植体材料提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

PEEK板材(医用级,江苏常州君华公司)、扫描电镜S-3000N、自动细胞计数仪、荧光显微镜、多功能酶标仪、2代HGFs冻存株(北京口腔医学研究所)、DAPI抗淬灭封片剂、CCK-8。

1.2 细胞复苏与培养

将装有2代HGFs冻存株的冻存管水浴融化,使用含有10%胎牛血清、1%双抗溶液、1% L-谷氨酰胺的MEM α培养基传代培养。使用自动细胞计数仪进行细胞计数,制备1×10^5/mL浓度的细胞悬液,使用传代到第4~6代的HGFs进行后续实验。

1.3 试件制备

将PEEK制备成圆形样品(直径10 mm,厚1 mm),然后依次使用600目、800目和1 200目碳化硅砂纸进行打磨。将试件置于超声清洗装置中,以丙酮、无水乙醇及去离子水作为震荡液,超声清洗去除表面杂质,然后随机分为改性组和对照组,改性组试件置于离子注入装置内,注入锆离子,改性处理参数:电压30 kV,脉宽500 μs,频率10 Hz,真空度5×10^{-3} Pa,阴极触发脉宽500 μs,注入时间2 h。在进行PIII前,将主腔室抽真空至5×10^{-3} Pa压力。样品置于与高压相连的样品台上;锆使用高压脉冲源可控触发,电离并带正电,通过施加脉冲负高压植入锆离子,并连续旋转样品台使离子植入均匀。

1.4 扫描电镜观察试件表面形貌

2组试件进行表面喷金后采用扫描电镜观察其表面形态学特征。

1.5 细胞形态观察

将2组试件置于无菌24孔板内,改良组试件离子注入面朝上,HGFs悬液接种于2组试件表面,分别孵育1 h、4 h和24 h后取出试件,4%多聚甲醛溶液固定15 min,罗丹明标记的鬼笔环肽染色液(细胞骨架染色剂)在黑暗条件下染色30 min,在黑暗条件下将1滴DAPI(细胞核染色剂)抗淬灭封片剂滴于试件表面,在荧光显微镜下对3个不同时间点的HGFs的铺展和形态进行观察。

1.6 细胞增殖检测

HGFs悬液接种于2组试件表面,置于含有10%胎牛血清、1%双抗溶液和1% L-谷氨酰胺的MEM α培养基中培养,在1 d、3 d、5 d和7 d后将各组试件取出,向各孔内加入含有10%新鲜配制的CCK-8反应液的MEM α培养基,于37 ℃恒温培养箱内继续孵育2 h,然后多功能酶标仪检测溶液在450 nm波长处的吸光度值。

1.7 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。符合正态分布和方差齐性的计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用两独立样本t检验;符合正态分布,但方差不齐,采用校正t检验。检验水准$\alpha=0.05$,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

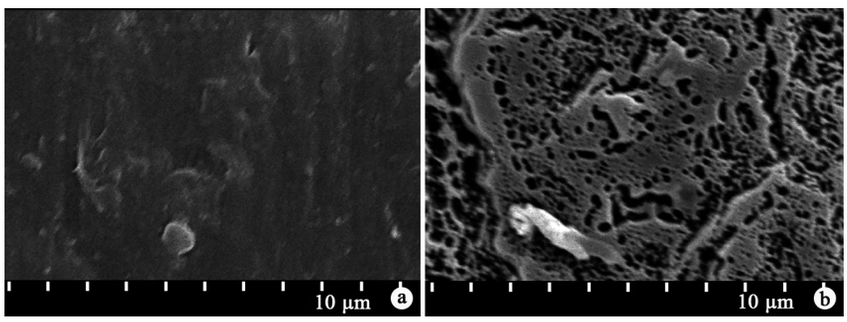
2.1 扫描电镜下试件表面形貌

抛光后PEEK表面相对平坦(图1a);锆离子注入改性后表面出现均匀分布的孔状结构,孔结构大小不一,部分孔壁不完整(图1b)。

2.2 细胞形态

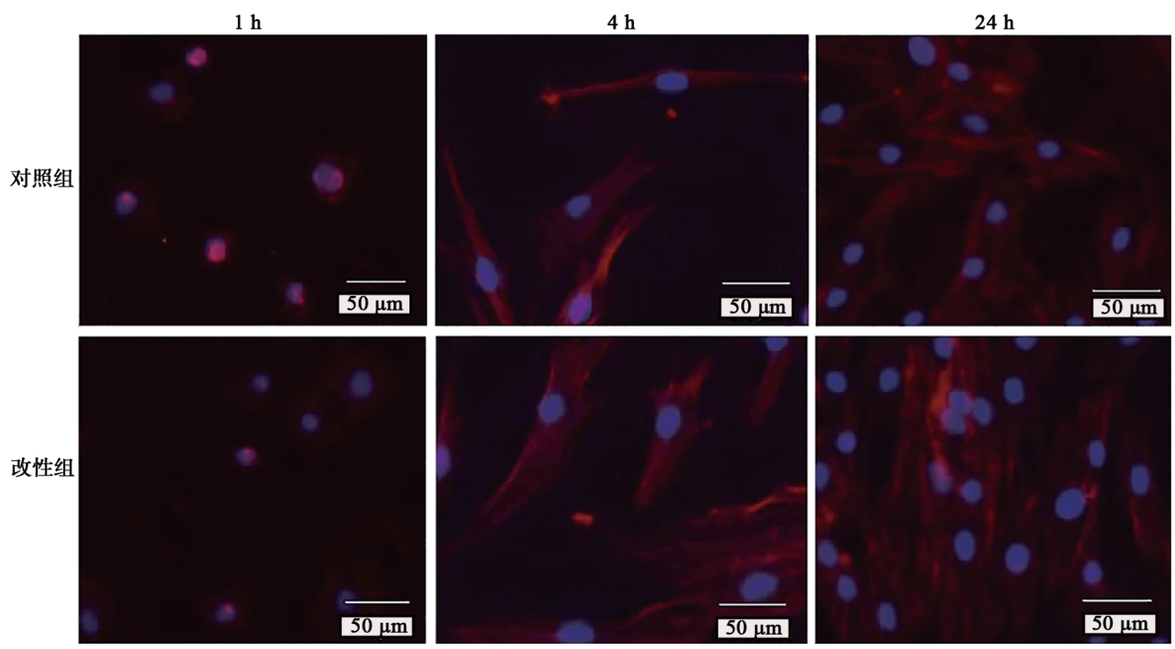
培养1 h后,2组试件表面HGFs均呈圆形或椭圆

形。培养4 h后,2组试件表面细胞均有铺展,并且细胞骨架进一步向外延伸,对照组试件表面上细胞铺展面积小于改性组;培养24 h后,2组试件表面细胞均表现为细长的纺锤状或梭形,生长良好,见图2。



a:抛光后PEEK表面;b:锆离子注入后PEEK表面

图1 扫描电镜下PEEK表面形貌

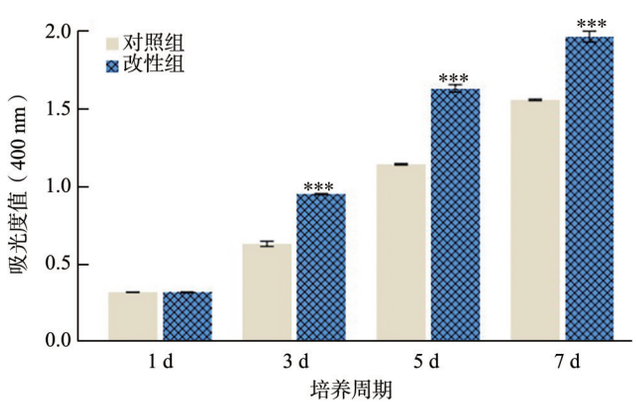


红色:细胞骨架染色;蓝色:细胞核染色

图2 2组试件HGFs的荧光染色

2.3 细胞增殖结果

HGFs在所有试件表面吸光度值均随时间延长而增高;在培养1 d后,2组表面吸光度值比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示2组细胞增殖率无显著变化;在培养3 d、5 d、7 d后,改性组表面吸光度值较对照组显著增高($P<0.05$),提示其细胞增殖率较高,见图3。



***:与对照组比较,$P<0.001$

图3 CCK-8检测结果

3 讨论

PIII是一种有效、可控的生物材料表面改性技术,通过改变脉冲电压、频率和注入时间,可以调节生物材料的形貌和化学成分等表面性质。与传统的涂层技术不同,PIII中的高能离子可以渗透到PEEK基体中,且不会在基体和改性层之间形成明显的边界。以往研究证明,锆等离子体浸没离子注入的PEEK暴露于大气中后,表面形成了氧化锆[8]。本研究率先使用

锆离子注入PEEK,观察PEEK材料的表面特征,并分析PEEK材料对HGFs的细胞相容性的影响,探讨其作为新型口腔材料的可能性。

Pandoleon等[9]将氧化铈稳定的氧化锆/氧化铝纳米复合材料通过喷砂、氧化和酸蚀来控制表面形貌,发现表面形成了纳米结构和氧化锆纳米颗粒,材料的生物相容性得以改善。Zheng等[10]使用等离子体处理氧化锆后,可促进氧化锆表面HGFs的黏附及增殖,黏附初期HGFs形态铺展更佳,伪足更多,从而提高了HGFs在氧化锆表面的早期黏附能力。Yang等[11]通过粗糙化处理加紫外光照射氧化锆试件,处理后的氧化锆试件对HGFs的生物学行为有积极的影响,可促进细胞黏附、增殖和胶原释放。Rohr等[12]探讨了传统钛种植体颈部注入锆之后对HGFs的活性影响,氧化锆分别经过加热、打磨、喷砂、酸蚀等处理后水接触角明显减低,细胞活性在光滑加热+打磨组氧化锆表面明显增高,HGFs在加热+打磨+喷砂组氧化锆表面平坦延伸,广泛附着。因此,氧化锆是一种有前途的牙科种植材料。PEEK具有适合人体的弹性模量,利用PIII将氧化锆注入PEEK后,可提高其对种植体周围软组织封闭效果,改善生物相容性。理想的种植材料需改善骨整合和软组织整合,以保证种植后的长期稳定性。只有种植体穿龈处形成良好的软组织封闭,才能形成防止口腔微生物侵入和预防种植体周围组织感染的生物屏障[13]。本实验制备的试件经过粗糙度不同的碳化硅砂纸打磨后,荧光染色显示,从培养1~24 h,细胞形态由圆形、椭圆形转变为纺锤状或梭形,细胞骨架进一步向外延伸,出现较多丝状伪足;HGFs在2组PEEK材料表面为梭形生长,形态不规则,是典型的成纤维细胞形态;细胞培养4 h后,HGFs在2组试件表面均有铺展,在改性组试件表面的黏附数量多于对照组,表面细胞铺展更开,细胞更长,出现更多伪足,说明HGFs在经过PIII改性后试件表面黏附性更好。本实验检测发现,改性组表面吸光度值较对照组显著增高,说明锆离子注入PEEK表面可促进HGFs早期黏附增殖。良好的生物密封不仅可以抑制不必要的软组织退缩和边缘骨吸收,而且有助于抵抗细菌入侵[14]。锆离子注入PEEK表面降低了微生物在种植体表面定植繁殖的风险,促进了种植体周围牙龈组织早期封闭,使种植体周围软组织早期及时愈合,减少微生物的滞留时间。因此,锆离子注入的PEEK表面可促进种植体周围软组织的整合,加快PEEK在牙种植体中的应用。

综上,锆离子注入的PEEK具有更好的生物相容性,能够在体外促进HGFs的黏附增殖,有利于软组织黏附,为锆等离子体浸没离子注入PEEK作为种植材料提供一定依据。

[参考文献]

[1] Maté Sánchez de Val JE, Gomez-Moreno G, Martinez CP, et al. Peri-implant tissue behavior around non-titanium material: experimental study in dogs[J]. Ann Anat, 2016, 206: 104-109. doi: 10.1016/j.aanat.2016.03.005.

[2] Durmus NG, Webster TJ. Nanostructured titanium: the ideal material for improving orthopedic implant efficacy?[J]. Nanomedicine (Lond), 2012, 7(6): 791-793. doi: 10.2217/nnm.12.53.

[3] 刘黎明,曹文瑞,鲁守涛,等. 聚醚醚酮及改性材料在口腔修复学中的应用[J]. 组织工程与重建外科杂志,2018,14(4):234-237. doi: 10.3969/j.issn.1673-0364.2018.04.015.

[4] Lu T, Qian S, Meng F, et al. Enhanced osteogenic activity of poly ether ether ketone using calcium plasma immersion ion implantation[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 142: 192-198. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.056.

[5] Li J, Qian S, Ning C, et al. rBMSC and bacterial responses to isoelastic carbon fiber-reinforced poly (ether-ether-ketone) modified by zirconium implantation[J]. J Mater Chem B, 2016, 4(1): 96-104. doi: 10.1039/c5tb01784j.

[6] Akiyama Y, Iwasa F, Hotta Y, et al. Effects of surface roughness of ceria-stabilized zirconia/alumina nanocomposite on the morphology and function of human gingival fibroblasts[J]. Dent Mater J, 2021, 40(2): 472-480. doi: 10.4012/dmj.2019-435.

[7] Liu X, Huang A, Ding C, et al. Bioactivity and cytocompatibility of zirconia (ZrO(2)) films fabricated by cathodic arc deposition[J]. Biomaterials, 2006, 27(21): 3904-3911. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.007.

[8] Lu T, Liu X, Qian S, et al. Multilevel surface engineering of nanostructured TiO2 on carbon-fiber-reinforced polyetheretherketone[J]. Biomaterials, 2014, 35(22): 5731-5740. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.003.

[9] Pandoleon P, Bakopoulou A, Papadopoulou L, et al. Evaluation of the biological behaviour of various dental implant abutment materials on attachment and viability of human gingival fibroblasts[J]. Dent Mater, 2019, 35(7): 1053-1063. doi: 10.1016/j.dental.2019.04.010.

[10] Zheng M, Yang Y, Liu XQ, et al. Enhanced biological behavior of in vitro human gingival fibroblasts on cold plasma-treated zirconia[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140278. doi: 10.1371/journal.pone.0140278.

[11] Yang Y, Zhou J, Liu X, et al. Ultraviolet light-treated zirconia with different roughness affects function of human gingival fibroblasts in vitro: the potential surface modification developed from implant to abutment[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015, 103(1): 116-124. doi: 10.1002/jbm.b.33183.

[12] Rohr N, Zeller B, Matthisson L, et al. Surface structuring of zirconia to increase fibroblast viability[J]. Dent Mater, 2020, 36(6): 779-786. doi: 10.1016/j.dental.2020.03.024.

[13] 郑 铮,陈文川. 生物学宽度概念在口腔种植中的结构、尺度及功能意义[J]. 国际口腔医学杂志,2019,46(4):481-487. doi: 10.7518/gjkq.2019066.

[14] Wang L, Luo Q, Zhang X, et al. Co-implantation of magnesium and zinc ions into titanium regulates the behaviors of human gingival fibroblasts[J]. Bioact Mater, 2021, 6(1): 64-74. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.07.012.

(编辑:龙小芬)