

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.11.004

· 基础研究 ·

RGD肽段修饰TiO₂纳米管对MG63成骨细胞黏附增殖能力的影响

丁祥龙¹, 王敬旭², 郭泽鸿¹, 赖春花¹, 高岩¹, 林曦¹, 徐淑兰¹

1. 南方医科大学口腔医院种植中心, 广东 广州(510280); 2. 广州医科大学第一附属医院口腔科, 广东 广州(510120)

【摘要】 目的 探讨经RGD肽段修饰的大直径TiO₂纳米管的纯钛表面对MG63成骨细胞黏附增殖能力的影响,为种植体表面改良提供实验依据。**方法** 纯钛样本分为4组:①SLA组,通过大颗粒喷砂酸蚀(sand-blasted, large grit, acid-etched, SLA)法在商业纯钛表面制作微米级粗糙的形貌;②SLA+80组,通过SLA法以及阳极氧化法在商业纯钛表面制作微纳混合的形貌;③DOPA组,在经SLA法及阳极氧化法电化学修饰后的钛片表面通过多巴胺(dopamine, DOPA)修饰;④RGD组,使用分子自组装技术在经过电化学修饰和多巴胺修饰后的钛片表面接枝RGD多肽的生物活性涂层。借助场发射扫描电镜(field emission scanning electron microscope, FE-SEM)以及X射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)对各组的表面形貌以及表面元素进行观察分析;将MG63成骨细胞接种到各组钛片表面,对每组表面的生物活性进行检测评价;荧光显微镜下观察细胞早期黏附能力、MTS法检测细胞增殖能力、qRT-PCR法检测细胞成骨相关基因碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)mRNA表达水平。**结果** FE-SEM及XPS观察显示在钛片表面经过SLA法成功制得微粗糙的表面形貌,通过阳极氧化法可在SLA的表面附加大直径纳米管,通过引入DOPA修饰成功将RGD肽段接枝到纳米管表面。体外细胞实验显示,RGD组与另外3组相比,更利于细胞黏附、增殖($P < 0.05$),RGD组ALP、OCN mRNA表达水平显著强于SLA组、DOPA组($P < 0.05$)。**结论** 通过RGD肽段修饰的表面为大直径TiO₂纳米管的微纳混合的形貌,其生物学性能有了显著提升,可用于种植体表面的改良,提高早期骨结合效果。

【关键词】 种植体; RGD肽; 纳米管; 成骨细胞; 黏附; 表面形貌; 粗糙

【中图分类号】 R783.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)11-0706-06

【引用著录格式】 丁祥龙,王敬旭,郭泽鸿,等. RGD肽段修饰TiO₂纳米管对MG63成骨细胞黏附增殖能力的影响[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(11): 706-711.

Effects of RGD-grafted TiO₂ nanotubes on the adhesion and proliferation of MG63 osteoblasts DING Xianglong¹, WANG Jingxu², GUO Zehong¹, LAI Chunhua¹, GAO Yan¹, LIN Xi¹, XU Shulan¹. 1. Center of Oral Implantology, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 2. Stomatology Department of the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: XU Shulan, Email: xushulan@vip.163.com, Tel: 0086-20-84408890

【Abstract】 Objective To investigate the effect of pure titanium surface of large diameter TiO₂ nanotubes modified by RGD peptide on the adhesion and proliferation of MG63 osteoblasts. to provide theoretical proof for developing titanium implants. **Methods** Commercially pure titanium discs were divided into four groups and treated with SLA to obtain a microrough surface (SLA group). Then, nanotubes were imposed on this microrough surface by anodization (SLA+80 group). The surface was then modified by dopamine (DOPA) (DOPA Group), after which bioactive RGD peptide layers

【收稿日期】 2018-04-08; **【修回日期】** 2018-06-15

【基金项目】 广东省医学科学技术研究基金项目(A015208);南方医科大学口腔医院科研培育计划项目(PY2018016)

【作者简介】 丁祥龙,主治医师,博士,Email:393041675@qq.com

【通信作者】 徐淑兰,主任医师,硕士,Email: xushulan@vip.163.com, Tel: 0086-20-84408890

were generated on the TiO₂ nanotube surfaces via electrochemical and molecular self-assembly techniques (RGD group). The titanium surface morphology and elemental composition of each group were characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). MG63 cells were cultured in vitro to evaluate biological activities of titanium before and after treatment, including the evaluation of early-stage cell adhesion capacity by fluorescence microscopy, proliferation capacity by MTS assay, and mRNA expression of the cell osteoblast-related genes alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) by qRT-PCR. **Results** FE-SEM and XPS showed that hierarchical micro/nanosurfaces decorated with TiO₂ nanotubes were produced on titanium using sandblasting and large grit etching combined with anodization, dopamine was then self-polymerized to form a polydopamine film on the TiO₂ nanotube surfaces, and RGD peptides were then conjugated to the polydopamine film, finally forming RGD peptide-modified bioactive layers. In vitro experiments showed that compared with the other three materials, the RGD-modified material was more conducive to cell adhesion and proliferation ($P < 0.05$). The expression levels of ALP and OCN mRNA in the RGD group were significantly higher than those in the SLA group and DOPA group ($P < 0.05$). **Conclusion** Hierarchical micro/nanosurfaces decorated with TiO₂ nanotubes functionally modified with RGD peptides have good biocompatibility and could be used for developing titanium implants and further improving early osseointegration.

【Key words】 Implant; RGD peptides; Nanotubes; Osteoblast; Adhesion; Surface topography; Roughness

种植体的表面形貌对细胞与细胞外基质的互动,甚至对骨整合的发生起着重要作用^[1-2],因此对于种植体表面的改性处理一直是科研人员研究的重点,有研究报道大颗粒喷砂酸蚀法(sand-blasted, large grit, acid-etched, SLA)处理的表面能够通过其微粗糙的表面与骨组织之间形成良好机械嵌合,但是与光滑的表面相比较,其表面细胞黏附、增殖以及分化能力较差,这可能是限制SLA表面生物性能的因素之一,根据课题组之前的研究,在SLA的表面通过阳极氧化法附加大直径纳米管能够增强成骨细胞在其表面的分化能力,但是细胞黏附增殖能力并没有得到明显增强^[3]。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)多肽广泛存在于多种生物活性物质中,是至今为止应用于生物材料表面并促进细胞黏附的最有效和应用最多的蛋白质序列之一。将RGD肽段固定于生物材料表面,通过细胞表面的整合素超家族受体识别RGD多肽序列,可以调控细胞的黏附,该序列具有调节细胞与血清及细胞外基质蛋白黏附的能力,将其固定于生物材料表面可促进细胞在其表面的黏附、生长及分化^[4]。本研究使用多巴胺偶联法将RGD多肽吸附到大直径纳米管修饰的SLA表面,通过吸附的RGD多肽促进成骨细胞在大直径纳米管表面的黏附、增殖,为种植体表面改性提供新的方法。

1 材料和方法

1.1 样本制备

实验用到的纯钛样本为商用4级纯钛(深圳兴

宏德金属有限公司),切割成直径15 mm,厚度为1.5 mm的钛片。具体的表面处理方法如下。

SLA组:将钛片依次用SiC防水砂纸(320目、600目、800目、1 200目)同向逐级打磨至镜面样光滑的表面,再依次用丙酮、无水酒精和去离子水分别超声清洗15 min,常温干燥,在4.5 kPa气压下,喷口距离钛片1 cm,用直径120 μm的Al₂O₃颗粒垂直对钛片表面均匀喷砂30 s,随后再依次用丙酮、无水酒精和去离子水分别超声清洗15 min,常温自然干燥;将钛片置于49% H₂SO₄/18% HCl(1:1)混合酸中,60℃水浴加热酸蚀40 min,然后将钛片置于去离子水中超声清洗15 min,常温干燥。

SLA+80组:将经过喷砂酸蚀处理的钛片连接到直流稳压电源的阳极,将铂片连到阴极,钛片与铂片之间距离为1 cm且互相平行,把钛片与铂片一同置于5%的氢氟酸中,打开电源,调整电压为20 V氧化20 min,在钛片表面制作的纳米管直径约为80 nm;阳极氧化结束后,将钛片迅速放入流水中冲洗,去除表面可能残存的氢氟酸,常温干燥;最后把钛片置于马弗炉中450℃煅烧2 h,随炉自然冷却至室温。收集备用。

DOPA组:电化学修饰后的钛片,浸泡于20 mL、2 mg/mL多巴胺溶液(10 mmol/L Tris-buffer, pH 8.5)中避光孵育24 h,取出孵育后的钛片,去离子水反复冲洗去除表面未聚合的多巴胺,室温下自然晾干。

RGD组:将多巴胺修饰后钛片再浸泡于20 mL、

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RGD 多肽溶液中(10 mmol/L Tris-buffer, pH 8.5), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上孵育 12 h, 取出处理后的钛片, 去离子水反复冲洗去除表面未结合牢固的多肽, 室温下自然晾干。

1.2 表面形貌观察分析

采用 FE-SEM (Quanta 400, FEI, USA) 观察 SLA 组及 SLA+80 组的表面形貌。在超真空的环境下, 电子加速电压为 20 kV, 观察不同处理组钛片表面形貌。XPS (Thermo, USA) 分析四组样本表面元素组成。

1.3 细胞培养

在 5% 体积分数 CO_2 浓度 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 用含青链双抗的 DMEM 培养液 (Hyclone, USA) (含质量分数 10% 胎牛血清) 将 MG63 细胞贴壁培养于细胞培养瓶中, 培养至 80% 融合时, 用 0.25% 胰酶消化, 将细胞以 2.4×10^4 个/ cm^2 接种到钛片上, 隔天换液。

1.4 细胞早期黏附能力比较

细胞在不同样本表面早期黏附能力采用荧光显微镜下计数并做定量比较。细胞接种到样品后的 0.5、1、2 h 移除 24 孔板中的培养液, 用 PBS 小心清洗 3 遍, 加入 4% 多聚甲醛 500 μL /孔室温下固定 10 min, 用 PBS 小心漂洗, 然后用 0.1% Triton X-100 室温下通透 5 min, PBS 小心漂洗, 非特异结合位点通过 1% BSA/PBS 封闭 1 h, 加入 Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 300 μL /孔对细胞核进行染色, 避光孵育 5 min 后, PBS 小心漂洗 3 次, 待钛片干燥后于荧光显微镜下观察不同钛片表面细胞核, 每个样品在 100 \times 放大倍数下随机选取 10 个视野 (1 800 $\mu\text{m} \times 1$ 350 μm) 拍照记录, 然后通过 Image-Pro Plus 6.0 软件计算细胞核数量, 并作统计。

1.5 细胞形态学观察

细胞接种 24 h 后通过 FE-SEM 观察细胞的形态。将培养基以及未黏附到钛片表面的细胞小心的去除, PBS 冲洗 3 次。用 2.5% 的戊二醛固定 20 min, 随后 PBS 小心冲洗 3 次每次 5 min。之后样本用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 以及无水乙醇依次脱水每次 10 min。临界点干燥, 扫描电镜下观察细胞形态。

1.6 细胞增殖检测

接种到钛片的细胞增殖情况采用 MTS (MTS, Promega Corporation, Madison, USA) 法进行检测。在接种后的第 1、3、5、7 d 将样品用 PBS 小心的清洗并转移到新的 24 孔板中, 每孔加 500 μL DMEM 培养基 100 μL MTS 试剂 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h。取 100 μL

至 96 孔板, 酶标仪 490 nm 测吸光值。

1.7 qRT-PCR 检测成骨相关基因表达

在细胞接种到钛片上培养 1、2 周之后, 检测各组样本表面细胞成骨相关基因碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) mRNA 表达水平, 以检测细胞分化能力。将细胞以 2.4×10^4 个/ cm^2 接种到钛片上培养至第 1、2 周。总 RNA 使用 TRIzol 试剂提取。使用 qRT-PCR 的方法进行检测成骨基因表达水平 (Bio-Rad Laboratories Inc.)。ALP、OCN 的相对表达水平通过管家基因 GAPDH 来进行标准化。

ALP 引物: 上游 5'-CATGCTGAGTGACACAGACAAGAA-3'; 下游 5'-ACAGCAGACTGCGCCTGGTA-3'。OCN 引物: 上游 5'-GACGAGTTGGCTGACCACA-3'; 下游 5'-CAAGGGGAAGAGGAAAGAAGG-3'。GAPDH 引物: 上游 5'-TGGCACCAGCACAATGAA-3'; 下游 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'

1.8 统计学分析

所有实验均重复 3 次, 使用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 使用 one-way ANOVA 对组间数据进行统计分析。检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 样本表面形貌

如图 1 所示, 经过 SLA 法处理可以得到微米级的粗糙表面, 再通过阳极氧化法在 SLA 表面附加大直径的纳米管, 根据之前的研究^[4]以及 FE-SEM 照片显示得到纳米管直径约为 80 nm 左右。

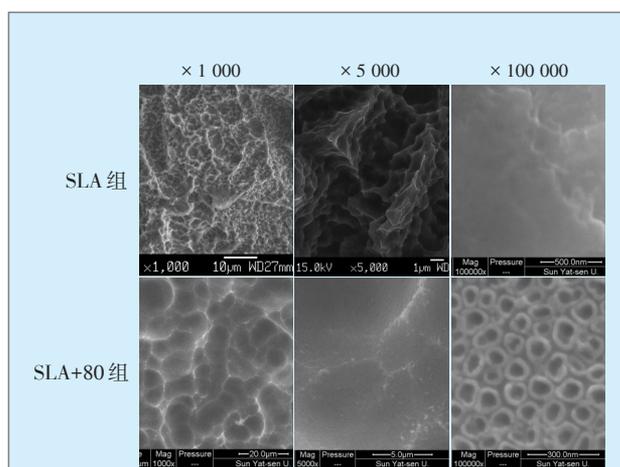
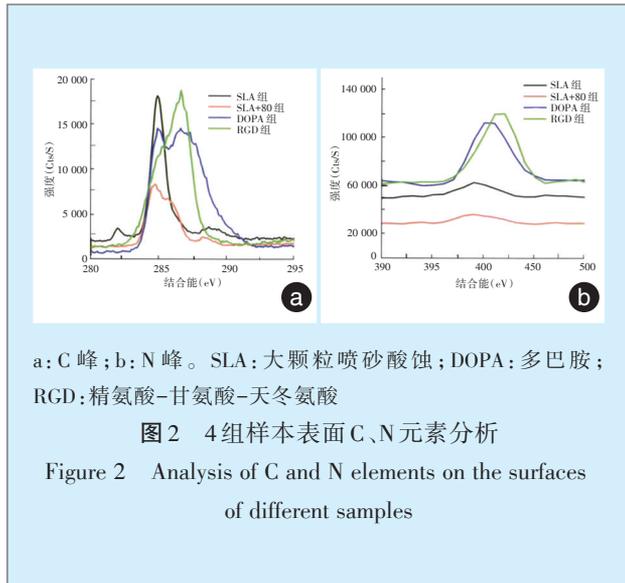


图 1 场发射扫描电镜下观察样本表面形貌
Figure 1 Representative FE-SEM images of the SLA and SLA+80 surfaces

2.2 表面元素分析

通过XPS检测发现纯钛样本表面存在C元素,可能是因为样本在制作及保存过程中受到周围环境中碳氢化合物的污染,图2中显示了4组中C和N元素波谱的变化,进一步证实了在纯钛表面依次形成了TiO₂纳米管,聚多巴胺涂层和RGD多肽修饰层。

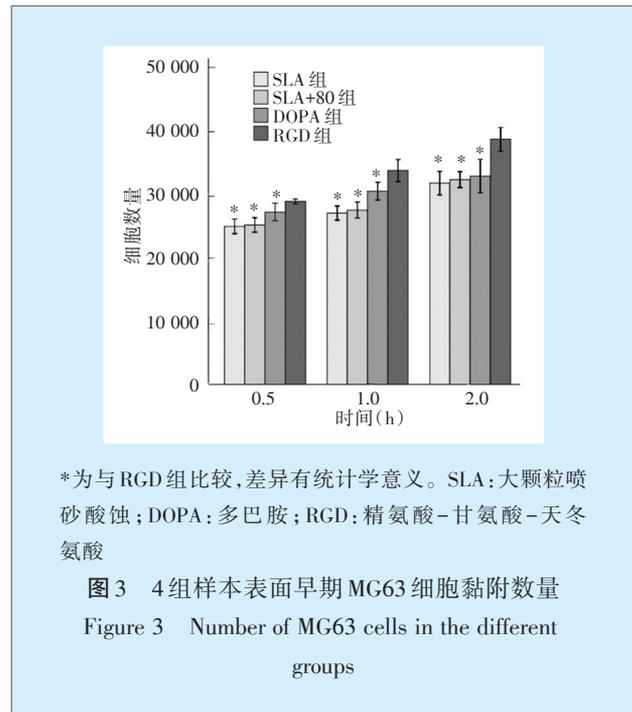


2.3 细胞早期黏附能力

不同样本表面细胞黏附能力如图3所示,在0.5 h、1 h、2 h 3个时间点各组样本表面细胞黏附数量逐渐递增,其中RGD组细胞早期黏附能力显著高于另外3组($P < 0.05$),另外3组之间两两比较,差异均无统计学意义。

2.4 细胞形态观察

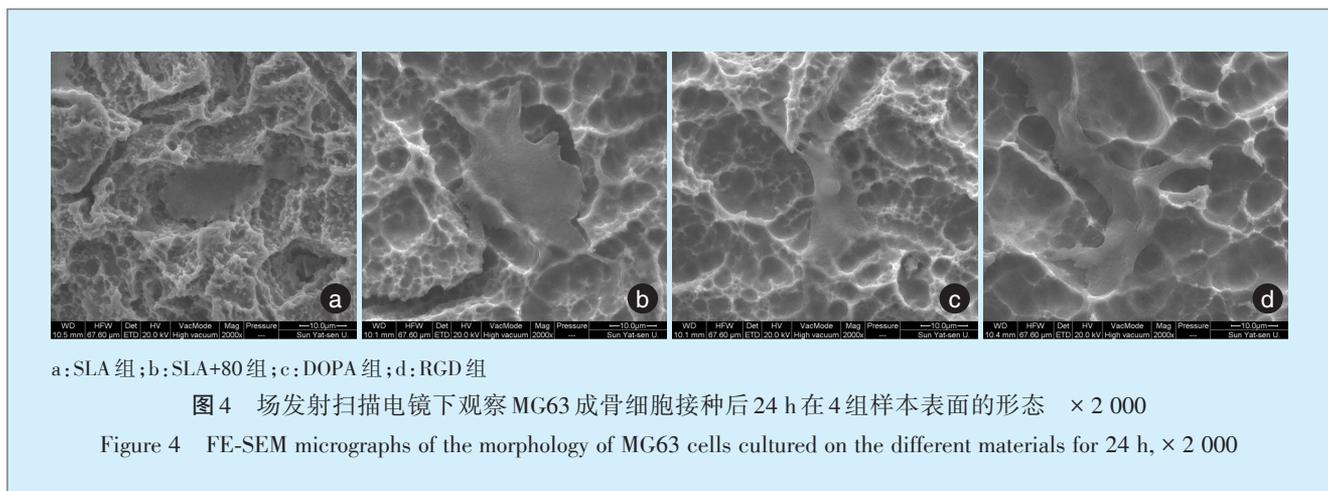
细胞黏附到样本表面24 h之后通过FE-SEM

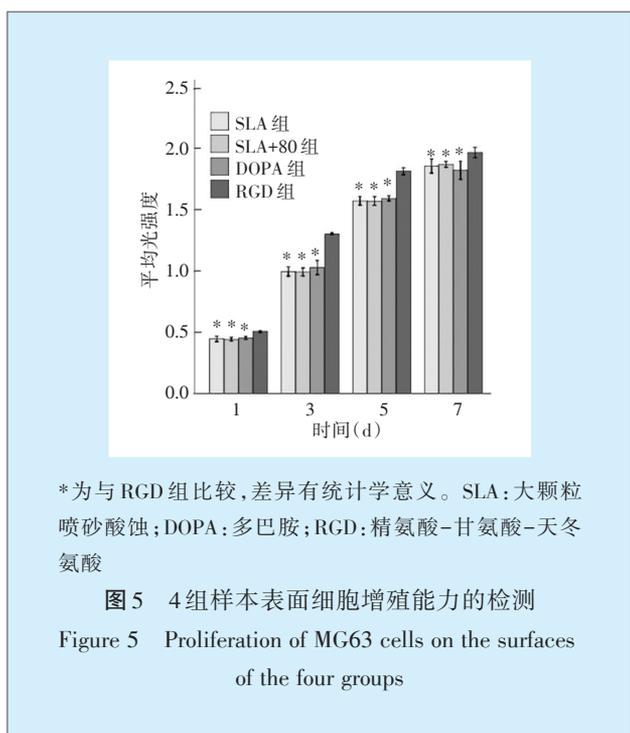


可以观察各组样本表面细胞的形态,如图4所示,在SLA组表面细胞形态相对规则,呈长椭圆形或者圆形,而在SLA+80组、RGD组以及DOPA组表面细胞伸出板状伪足,细胞形态更加不规则,尤其RGD组表面细胞铺展较大,伸出更长的板状伪足。

2.5 细胞增殖

各组样本在不同时间点的增殖情况如图5所示,随着孵育时间的延长均呈显著的增长趋势,在第5天到第7天细胞增殖速度放缓,在不同的时间点RGD组细胞的增殖能力均显著强于另外3组($F_{1d} = 18.75$ 、 $F_{3d} = 22.19$ 、 $F_{5d} = 11.32$ 、 $F_{7d} = 8.26$, $P < 0.05$);而另外3组之间两两比较,差异均无统计学意义。





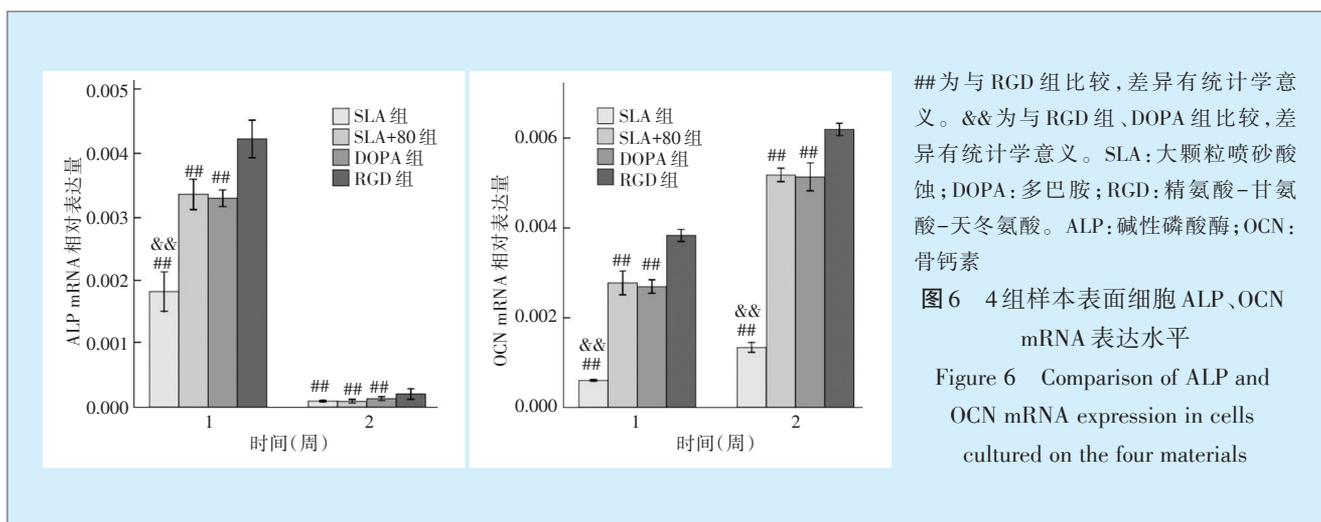
2.6 成骨相关基因ALP、OCN mRNA表达水平

从图6可以看出, 在1周时, RGD组的ALP mRNA表达水平显著高于另外3组 ($F = 20.18, P < 0.001$), 而SLA+80组与DOPA组表达水平相同显著高于SLA组 ($P < 0.01$), 由于ALP是细胞分化的早期指标, 所以孵育到第2周时, 各组表达水平均显著下降, RGD组仍然显著高于另外3组 ($F = 16.44, P = 0.001$)。

成骨过程的另外一个指标OCN, 在1周 ($F = 35.84, P < 0.001$)、2周 ($F = 65.49, P < 0.001$)时, RGD组OCN mRNA表达水平均为最高, 并显著高于另外3组 ($P < 0.01$), 其中SLA+80组与DOPA组表达水平类似, 均显著高于SLA组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

细胞与种植体表面良好的互动是实现骨结合的基础, 促进成骨细胞在种植体表面的黏附增殖



是目前种植体表面改性的热点^[5-6], 在之前的研究中, 通过阳极氧化法, 在微粗糙的表面附加不同直径的TiO₂纳米管, 形成微纳混合的形貌, 其中附加80 nm的表面(SLA+80组)其细胞分化能力显著强于其他实验组, 但是在其表面细胞的黏附及增殖能力却相对较差, 因此如何提升其表面细胞的黏附增殖能力将是进一步改善其生物学性能的关键之一^[3]。

RGD多肽是一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的短肽, 该肽段能够显著提升细胞在生物材料表面的黏附水平, 它广泛存在于纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、血纤维蛋白及玻连蛋

白ECM中。RGD肽是ECM蛋白与相应细胞的结合位点, 它能与黏附细胞的细胞膜整合素亚基识别并与其结合, 形成粘着斑连接, 随之启动细胞内的信号转导, 激活与生长、增殖相关基因表达, 促进细胞代谢和蛋白质合成, 增强细胞黏附、增殖、分化以及矿物质沉积^[7-8]。Secchi等^[4]学者将RGD肽接枝到光滑钛片表面, 发现实验组能够显著提升成骨细胞活性, 说明RGD肽可以成功的接枝到钛片表面并且提高成骨细胞活性。Huang等^[9]将RGD肽粘附于纯钛表面, 再在其上培养成骨细胞, 发现RGD肽能够促进细胞的黏附和铺展。除此之外Gao等^[10]将带有RGD肽涂层的光滑种植体

植入兔的股骨,发现接近种植体周围 RGD 肽组比对照组有更厚的新骨形成,在 2 周和 4 周时新生骨厚度分别为 $(26.2 \pm 1.9) \mu\text{m}$ 和 $(32.7 \pm 4.6) \mu\text{m}$,而对照组仅为 $(20.5 \pm 2.9) \mu\text{m}$ 和 $(22.6 \pm 4.0) \mu\text{m}$ 。

本研究中使用多巴胺,是一种受到海洋贝壳类生物启发的多功能活性物质,不仅具有良好的亲水性,而且在碱性环境中比较容易引发自聚-交联反应,可在几乎所有的固体材料表面(例如金、银、铂、不锈钢、铜、纯钛、玻璃、羟基磷灰石等)形成附着牢固的聚多巴胺活性层,该活性层中含有大量的邻苯二酚基团,在碱性溶液中,这些基团又极易容易被氧化成醌式结构,可与含有羧基、氨基、亚氨基的有机分子发生共轭加成和席夫碱反应,从而将功能分子接枝到固体材料表面^[11]。RGD 肽链中含有大量的羧基和氨基等活性基团,因此可以与多巴胺在 TiO_2 纳米管表面自聚合形成聚多巴胺活性涂层,在此基础上可向外接枝偶联 RGD 肽链,便可形成 TiO_2 纳米管-聚多巴胺-RGD 多肽复合表面。

本研究通过 FE-SEM 观察显示,在纯钛样本表面形成了微粗糙的 SLA 表面,通过阳极氧化法成功的将大直径纳米管(80 nm)附加到 SLA 的表面,形成了微米级粗糙的表面,经 XPS 检测显示,通过涂布 DOPA 以及 RGD 多肽,成功地在微米级粗糙表面附加了 DOPA 涂层以及成功地接枝 RGD 多肽。随后进行体外细胞实验,细胞早期黏附能力的检测结果显示,在 0.5 h、1 h、2 h 3 个时间点, RGD 组显著高于另外 3 组($P < 0.05$),而另外 3 组之间两两比较差异无统计学意义,这与之前的报道结果类似^[8],经 RGD 修饰后钛表面的细胞早期黏附能力得到了显著改善;通过 MTS 法检测细胞增殖能力,结果显示 RGD 组其表面细胞增殖能力显著强于另外 3 组;通过 qRT-PCR 检测不同组表面 MG63 成骨细胞成骨相关基因 mRNA 表达水平,其中 ALP 为成骨过程中早期标记物,其活性越高说明成骨细胞向成熟的成骨细胞分化越明显,OCN 是在骨基质矿化过程中由成骨细胞合成的非胶原蛋白,是反映成骨活动和骨转换的重要标志,为成

骨阶段的晚期经典标记物,检测结果显示不论在 1 周还是 2 周时,ALP 及 OCN 在这两个时间点均是 RGD 组表达最强($P < 0.01$);以上结果显示 RGD 多肽修饰的大直径纳米管表面其细胞的黏附、增殖和分化能力显著得到了增强,这为种植体的表面改性提供了一些新的思路。

参考文献

- [1] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(7): 667-681.
- [2] 丁祥龙,王敬旭,林曦,等. 钛酸盐纳米线控制细胞的粘附及其活性[J]. *稀有金属材料与工程*, 2017, 46(11): 3394-3399.
- [3] Ding X, Zhou L, Wang J, et al. The effects of hierarchical micro/nanosurfaces decorated with TiO_2 nanotubes on the bioactivity of titanium implants *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 6955-6973.
- [4] Secchi AG, Grigoriou V, Shapiro IM, et al. RGDS peptides immobilized on titanium alloy stimulate bone cell attachment, differentiation and confer resistance to apoptosis[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 83(3): 577-584.
- [5] 丁祥龙,周磊. TiO_2 光催化效应对种植体生物活性的影响[J]. *口腔疾病防治*, 2016, 24(1): 49-52.
- [6] Ding X, Yang X, Zhou L, et al. Titanate nanowire scaffolds decorated with anatase nanocrystals show good protein adsorption and low cell adhesion capacity[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 569-579.
- [7] Aita H, Hori N, Takeuchi M, et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(6): 1015-1025.
- [8] Hori N, Ueno T, Minamikawa H, et al. Electrostatic control of protein adsorption on UV-photo functionalized titanium[J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(10): 4175-4180.
- [9] Huang S, Gethin O, Douglas W, et al. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGD SP-peptide sequence: a cell morphology study[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(21): 4003-4015.
- [10] Gao L, Feng B, Wang J, et al. Micro/nanostructural porous surface on titanium and bioactivity[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 89(2): 335-341.
- [11] Lee H, Dellatore SM, Miller WM, et al. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings[J]. *Science*, 2007, 318(5849): 426-430.

(编辑 张琳,黄元瑾)