

载硅烷和 BMP-2 的多孔钛表面构建及其成骨活性评价

李 为,江崇英,张 雷,孙晓瑜,何 昕,洪 彪,程 楠,李向阳

摘要 目的 探究钛材纳米多孔表面载硅烷和骨形态发生蛋白-2(BMP-2)的制备方法和制备表面促成骨能力评价。方法 采用碱热处理、硅烷化修饰和 BMP-2 固定,构建硅烷和 BMP-2 修饰的纳米多孔表面,扫描电子显微镜、X 射线光电子能谱、红外光谱和水接触角检测分别表征制备过程中表面形貌、元素、官能团和亲水性的变化,免疫荧光观察固定的 BMP-2,细胞活性测试和细胞荧光染色分析表面促成骨细胞黏附和增殖能力,碱性磷酸酶活性评估促细胞成骨能力。结果 材料表征手段证实硅烷和 BMP-2 成功固定在纳米多孔钛表面,细胞评价证实制备表面不但显著增强成骨细胞的黏附和增殖,而且大幅提升成骨细胞的成骨活性。结论 该修饰方法构建的表面对成骨细胞具有更好的相容性,有望改善钛基种植体的骨整合能力。

关键词 种植体;纳米多孔结构;硅烷;骨形态发生蛋白-2;成骨细胞

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1423-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.030

2023-06-15 接收

基金项目:安徽高校科学研究项目(编号:KJ2021A0270)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,
安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

作者简介:李 为,男,副主任医师,副教授;

李向阳,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:xiangyang@ahmu.edu.cn

种植义齿已经成为失牙患者的首选治疗方式,其成功的关键在于种植体与骨组织形成骨整合(osseointegration)^[1]。目前种植体表面改性主要包括:①形貌改性,通过物理化学手段构建表面超微结构以增加种植体-骨接触面积,促进成骨细胞黏附和分化而加速骨整合^[2];②表面化学改性,功能分子负载以加速表面矿化、促进骨整合^[3];③生物分子改性,通过生物化学修饰将特定蛋白^[4]或多肽^[5]固定在种植体表面,诱导成骨细胞增殖分化以促进骨整合。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)作为骨基质中的高效骨诱导物质,已经通过涂覆和静电吸附等方法复合到材料表面,然而其材料结合较弱,容易脱落^[6-7],所以寻找共价固定 BMP-2 的方法意义重大。该研究采用碱热处理在钛材表面获得富羟基的纳米孔结构,并进一步通过羟基与硅烷偶联剂键合反应赋予表面 Si 元素和用于接枝蛋白分子的氨基,最后通过戊二醛将 BMP-2 共价接枝在硅烷层的氨基上,实现载硅烷和 BMP-2 的多孔钛表面成功构建以改善钛表面的骨整合能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 材料 纯钛购自山西宝鸡有色金属有限公

analyzed. The IGF1 protein and mRNA levels in HOK and OSCC cell lines (CAL-27, TCA-8113, SCC-15 and SCC-25) were detected by Western blot and qRT-PCR. **Results** The high expression rate of IGF1 in OSCC group was 72.17%, which was significantly higher than that in normal group (2.70%) ($P < 0.001$). The proportion under ROC curve (AUC) of OSCC diagnosed by IGF1 was 0.81, the sensitivity was 0.73, and the specificity was 0.82. The expression of IGF1 was related to the degree of differentiation, T stage and depth of invasion ($P = 0.03$, $P = 0.02$, $P = 0.02$), but not to gender, age, N stage, TNM stage, smoking, alcohol consumption, or HPV infection ($P > 0.05$). Kaplan-Meier and COX regression analysis showed that the high expression of IGF1, the degree of differentiation, the T stage and the depth of infiltration were the related factors affecting the prognosis of patients ($P < 0.01$, $P = 0.04$, $P = 0.03$, $P = 0.04$). COX multivariate indicated that high expression of IGF1 was an independent factor affecting the prognosis of patients ($P = 0.01$). Western blot and qRT-PCR results indicated that the expression of IGF1 in OSCC cell lines was higher than that in HOK ($P < 0.05$). **Conclusion** IGF1 can be a potential diagnostic and poor prognostic marker in oral squamous cell carcinoma.

Key words oral squamous cell carcinoma; insulin like growth factor 1; immunohistochemistry; prognosis

司;丙酮、戊二醛购自上海国药集团化学试剂有限公司;二乙烯三胺基丙基三甲氧基硅烷、Triton X-100、罗丹明 123 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;胰酶、牛血清白蛋白、Ⅱ型胶原酶、重组人 BMP-2、兔抗 BMP-2 抗体、生物素标记山羊抗兔 IgG、Cy3 标记链霉亲和素购自生工生物工程股份有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.1.2 仪器 扫描电子显微镜购自荷兰 FEI 公司;X 射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)购自美国 Perkin Elmer 公司;接触角测试仪购自德国 Dataphysics 公司;酶标仪购自瑞士 Tecan 公司;荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.2 样品制备

1.2.1 碱热处理 将直径 10 mm 的钛片打磨抛光后,依次浸没于丙酮、无水乙醇、去离子水中分别超声清洗 3 次,每次 10 min,取出晾干,标记为 Ti;将 Ti 浸没于 60 ℃ 的 NaOH 溶液(2.5 mol/L) 24 h,取出钛片并置于煮沸的去离子水 30 min,去离子水超声清洗 3 次,每次 10 min,取出吹干表面,标记为 pTi。

1.2.2 硅烷化处理 将 pTi 置于含 1% (W/V) 二乙烯三胺基丙基三甲氧基硅烷的无水乙醇溶液中,摇床反应 10 h,然后取出样品于 120 ℃ 烘箱中 2 h,取出后无水乙醇超声清洗 2 次,每次 5 min,吹干表面,标记为 pTi-S。

1.2.3 BMP-2 接枝 将 pTi-S 浸没于 1% 的戊二醛水溶液室温反应 1 h,然后超声清洗去除未反应的戊二醛,将终浓度为 0.5 μg/ml 的重组人 BMP-2 工作液 50 μl 铺展在样品表面,室温反应 24 h,去离子水漂洗后吹干,标记为 pTi-S-B。

1.3 表面分析表征 每组取 1 个样品利用 XPS 检测表面各元素百分含量;每组取 1 个样品通过场发射扫描电子显微镜观察样品表面形貌;每组取 4 个样品(每个样品选 2 个位置)利用水接触角测试仪(WCA)测量表面亲水性。每组取 1 个样品通过免疫荧光染色观察表面接枝的 BMP-2,步骤如下:① 1% 的牛血清白蛋白溶液浸泡样品 30 min 以封闭非特异性吸附位点;② 取出并吹干表面,滴加 20 μl 的兔抗 BMP-2 抗体工作液(稀释 100 倍),恒温箱中 37 ℃ 孵育 2 h, PBS 漂洗 2 次,每次 2 min;③ 吸干表面液体,加入生物素标记山羊抗兔 IgG 工作液,继续 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 漂洗 2 次;④ 吹干表面液体,滴加 Cy3 标记链霉亲和素试剂,37 ℃ 孵育 30 min,

PBS 漂洗 2 次,荧光观察,并通过 Image J 软件统计荧光强度。

1.4 细胞相容性评价

1.4.1 成骨细胞的获取 取新生 24 h 的 SPF 级雄性 SD 大鼠经脱颈处死后分离的头盖骨,将其剪成 2~5 mm² 碎片, PBS 清洗碎片后采用胰酶消化 20 min,离心去上清液后加入Ⅱ型胶原酶消化 20 min,收集消化液并采用 1 200 r/min 离心 5 min,收集沉淀后 DMEM 培养基(20% 胎牛血清)重悬并接种于培养皿中,5% CO₂ 和 37 ℃ 下培养 2 d,然后改用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 3 d 后换液,待细胞达到 80% 融合时传代培养。

1.4.2 材料的成骨细胞相容性评价 胰酶消化细胞后,采用 DMEM 培养基(10% 胎牛血清)分散细胞且密度为 1 × 10⁴ 个/ml,每组取 23 个样品置于 24 孔板中,每孔加入 1 ml 细胞悬液,5% CO₂ 和 37 ℃ 下继续培养且隔天换液。在培养至 1、3、5 d 时,每组取出 1 个样品经戊二醛固定 1 h 后,罗丹明 123 染液染色 15 min, PBS 漂洗后再荧光观察;每组取出 4 个样品放入新孔,按照噻唑蓝法 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 评价材料对成骨细胞增殖的影响。培养至 7 d 和 14 d 时,每组取出 4 个样品, PBS 清洗 2 次后吹干表面水分并滴加 0.1% Triton X-100 溶液 50 μl 裂解细胞,取 30 μl 用 ALP 试剂盒检测细胞 ALP 含量。取 10 μl 按照 BCA 法蛋白定量试剂盒检测蛋白含量。ALP 活性最终以 U/mg 蛋白表示。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,实验数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,亲水角测试、MTT 测试、ALP 活性测试的组间比较均采用单因素方差分析,并采用 LSD 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样品表征

2.1.1 表面形貌 扫描电子显微镜观察材料表面形貌变化,结果显示,相较于纯钛(Ti),碱热处理(pTi)后的钛表面出现多孔结构,孔径约为 100 nm;硅烷化处理(pTi-S)和 BMP-2 接枝(pTi-S-B)表面的孔洞被填充、深度变浅,但纳米结构依然存在。见图 1。

2.1.2 元素分析 X 射线光电子能谱全谱检测分析了材料表面化学元素组成,结果如图 2A 所示,硅烷化处理的表面 Ti 元素的峰几乎消失,且出现了 N

和 Si 的峰,仅有硅烷试剂中存在大量的氨基和硅氧键;BMP-2 接枝后, Ti_{2p} 峰完全消失, Si_{2p} 和 Si_{2s} 峰减弱,不存在硅元素的 BMP-2 在表面接枝导致 XPS 检测深度范围内 Ti 消失并且 Si 含量降低。图 2B、C 分别是硅烷化处理表面和 BMP-2 接枝表面碳元素的高分辨结果,可以看到 BMP-2 固定后出现 $C=O$, 硅烷试剂中不含 $C=O$ 键,而 BMP-2 中含有大量的酰胺键。

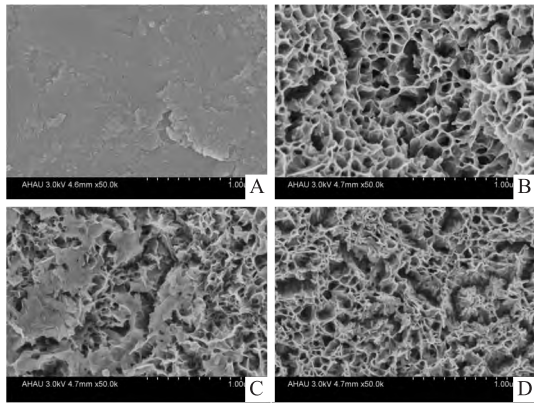


图1 各步处理表面的扫描电子显微镜照片 $\times 50\,000$

A:Ti;B:pTi;C:pTi-S;D:pTi-S-B

2.1.3 亲水性 单因素方差分析结果显示,表面亲水性与表面结构及元素组成密切相关 ($F = 140.14$, $P < 0.01$),纯钛、碱热处理、硅烷化处理和 BMP-2 接枝表面的水接触角分别为 $(58.3 \pm 7.0)^\circ$ 、 $(14.5 \pm 3.4)^\circ$ 、 $(92.7 \pm 8.3)^\circ$ 和 $(68.4 \pm 10.7)^\circ$, Turkey 检验进行两两比较发现组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.1.4 BMP-2 荧光检测 特异性荧光染色可以观察 BMP-2 在表面的分布,如图 3 所示,硅烷化处理

表面未观察到均匀分布的红色荧光,只观察到零星的红点,BMP-2 接枝表面大部分区域分布着红色荧光;通过 Image J 软件测量照片中荧光强度数值,硅烷化处理、BMP-2 接枝表面的荧光强度值分别为 32 130 和 6 850 320,后者是前者的 213 倍。

2.2 成骨细胞相容性评价

2.2.1 细胞黏附与增殖 材料表面成骨细胞相容性分别通过 MTT 实验和 Rodamine123 荧光染色来分析,MTT 结果显示:培养第 1 天时硅烷化表面的细胞数量高于碱热处理组 ($P < 0.05$);第 3 天和第 5 天时,硅烷化表面与碱热处理表面的细胞数量差异无统计学意义;不同孵育时间 BMP-2 接枝组表面黏附细胞数量均显著多于其他两组,三组的方差分析显示差异有统计学意义 ($F = 79.678$ 、 103.204 、 6.255 , $P < 0.05$)。见图 4、5。

2.2.2 细胞成骨能力 各表面所黏附成骨细胞的 ALP 活性见图 6,培养第 7 天和第 14 天时,硅烷化表面 ALP 活性高于碱活化多孔钛 ($P < 0.05$),BMP-2 接枝表面的 ALP 活性远高于其它,三组间差异有统计学意义 (7 d: $F = 57.370$, $P < 0.05$; 14 d: $F = 109.703$, $P < 0.05$)。

3 讨论

由于具有优异的机械性能、抗腐蚀性能、化学稳定性和生物惰性,钛及其合金被认为是牙科及骨科等领域的最佳植入金属材料,但也因生物惰性、高弹性模量等问题导致其骨整合缓慢或应力集中,进而愈合时间长,影响成功率^[8]。骨整合指种植体与骨表面直接紧密结合,无任何插入组织,故成骨细胞越早黏附到种植体表面并执行成骨功能,骨整合效果越好。粗糙多孔表面降低材料的弹性模量,且提供

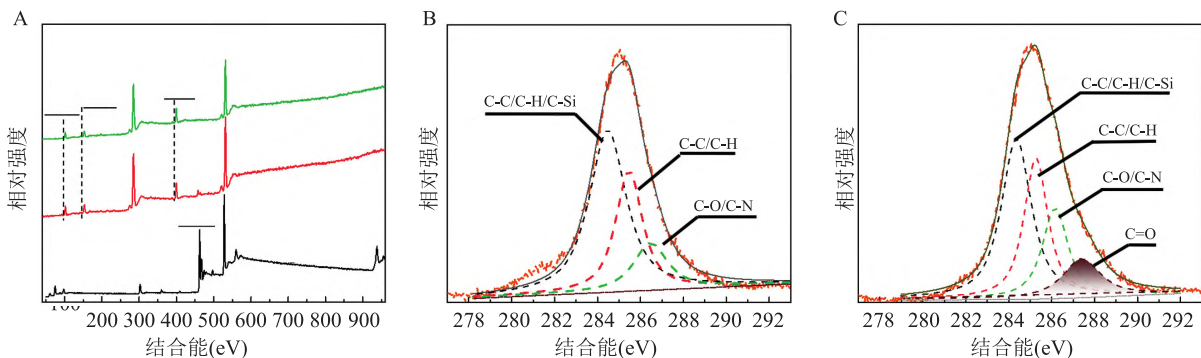


图2 表面 XPS 结果

A:各表面的 XPS 全谱图;B、C:硅烷化处理和 BMP-2 接枝表面碳 1s ($C1s$) 的高分辨谱

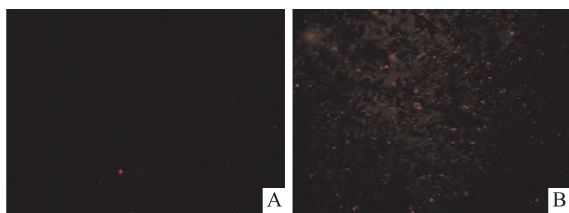


图3 表面 BMP-2 的免疫荧光检测

A:pTi-S;B:pTi-S-B

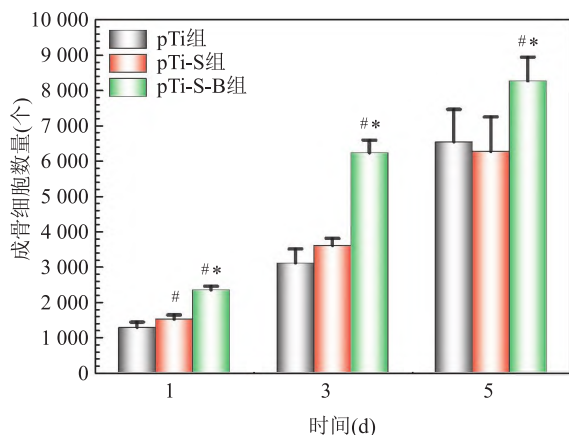


图4 各表面与细胞孵育第1、3、5天时黏附成骨细胞数量

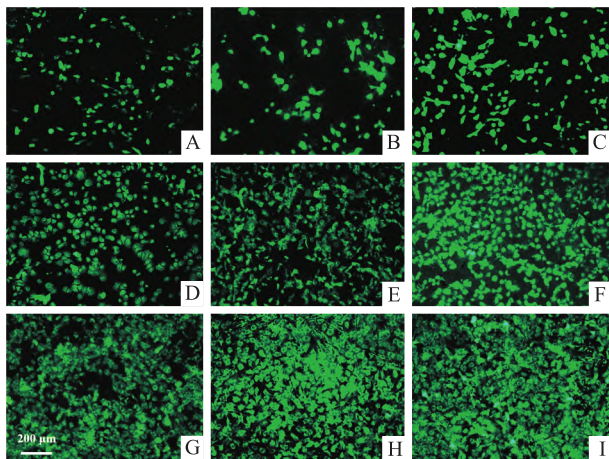
与 pTi-S 组比较: * $P < 0.05$; 与 pTi 组比较: [#] $P < 0.05$ 

图5 各表面与细胞孵育第1、3、5天时

黏附成骨细胞的荧光照片 ×100

A、D、G:pTi 孵育第1、3、5天时;B、E、H:pTi-S 孵育第1、3、5天时;C、F、I:pTi-S-B 孵育第1、3、5天时

更多的细胞“锚定”位点,有利于形成更牢固骨整合,且多孔结构可以在植入体和骨界面之间形成机械锁合,从而提高骨结合强度^[9]。本研究采用碱热处理,获得了纳米级多孔表面;有研究^[2,10]证明多孔结构中,纳米孔结构相比微米孔结构更利于成骨细

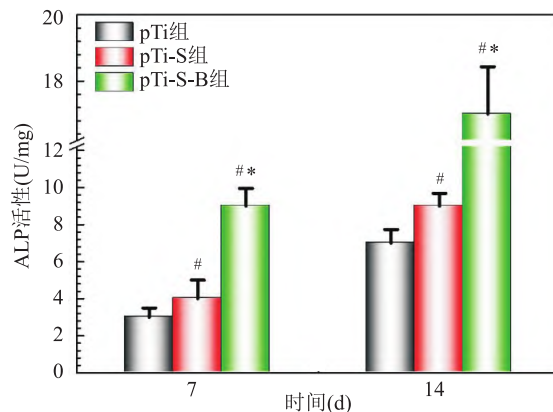


图6 各表面黏附的成骨细胞培养7 d和14 d时的ALP活性

与 pTi 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 pTi-S 组比较: * $P < 0.05$

胞的黏附和增殖。另外,多孔结构的表面积显著增加,可以增加硅烷偶联剂的连接位点,进而增加其固定量^[11]。

硅作为人体必需的微量元素,对骨组织生长过程具有重要影响。有研究证明含硅涂层在机体内有效促进成骨细胞增殖、分化和钙矿化沉积作用^[3]。本研究采用二乙烯三胺基丙基三甲氧基硅烷,一端为甲氧基与表面的羟基连接^[12],一端为氨基可以用于连接生物活性分子。本研究结果显示相较于碱热处理表面,硅烷化表面显著促进了成骨细胞黏附(培养1 d),但促成骨细胞增殖上未显示出与碱热处理表面的显著差异;其表面ALP表达量显著增加,证明其具有一定的促成骨分化能力^[13]。

大量生物活性分子已经被证明可以有效提升骨修复的速度和质量。BMP家族是确定的促成骨因子,对骨原细胞的分化起决定性作用,也能影响其它细胞的转分化^[14];其中BMP-2是BMP家族成员中作用最强的因子,可以促进ALP表达以增加成骨细胞矿化,也可以通过调控骨代谢以抑制骨吸收和促进骨形成。采用BMP-2直接或者通过其他载体局部应用可促进骨的形成已经过实验证实^[15],但这些物理方式运载BMP-2到骨缺损部位,其在体内容易降解或扩散,无法充分发挥其功能。本研究利用戊二醛连接硅烷试剂上的氨基和BMP-2上的氨基,将BMP-2共价连接到纯钛表面,用以增加钛表面与成骨细胞的相容性。成骨细胞黏附和增殖结果和ALP含量检测结果均显示,该表面不但有利于成骨细胞黏附和增殖,而且可以诱导成骨细胞表达更多的ALP,促成骨作用。

参考文献

- [1] 姚峥杰, 杨迪诚, 李伟, 等. 人工种植牙材料及表面处理的研究进展[J]. 中国材料进展, 2021, 40(2): 139–46.
- [2] Shu T, Zhang Y, Sun G, et al. Enhanced osseointegration by the hierarchical micro-nano topography on selective laser melting Ti-6Al-4V dental implants[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 8: 621601.
- [3] Zhao X, You L, Wang T, et al. Enhanced osseointegration of titanium implants by surface modification with silicon-doped titania nanotubes[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 8583–94.
- [4] Li Y, Liu Y, Bai H, et al. Sustained release of VEGF to promote angiogenesis and osteointegration of three-dimensional printed biomimetic titanium alloy implants[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 757767.
- [5] Li X, Liu Z, Xu S, et al. A drug delivery system constructed by a fusion peptide capturing exosomes targets to titanium implants accurately resulting the enhancement of osseointegration peri-implant[J]. *Biomater Res*, 2022, 26(1): 89.
- [6] Perera D, Devkota L, Garnier G, et al. Hard-to-cook phenomenon in common legumes: chemistry mechanisms and utilisation[J]. *Food Chem*, 2023, 415: 135743.
- [7] Correia A, Straub D, Read M, et al. Inhibition of BMP2 and BMP4 represses Barrett's esophagus while enhancing the regeneration of squamous epithelium in preclinical models[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15(5): 1199–217.
- [8] Gao X, Fraulob M, Haïat G. Biomechanical behaviours of the bone – implant interface: a review[J]. *J R Soc Interface*, 2019, 16(156): 20190259.
- [9] Matos G. Surface roughness of dental implant and osseointegration[J]. *J Maxillofac Oral Surg*, 2021, 20(1): 1–4.
- [10] Wan Y, Zhao Z, Yu M, et al. Osteogenic and antibacterial ability of micro-nano structures coated with ZnO on Ti-6Al-4V implant fabricated by two – step laser processing[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2022, 131: 240–52.
- [11] Wang S, Yang Y, Li W, et al. Study of the relationship between chlorhexidine-grafted amount and biological performances of micro/nanoporous titanium surfaces[J]. *ACS omega*, 2019, 4(19): 18370–80.
- [12] 杨园梦, 王爽, 李娇娇, 等. 氯己定接枝改善多孔钛抗菌性能初探[J]. 中华口腔医学杂志, 2020, 55(2): 104–10.
- [13] 李伟琼, 张雨晴, 徐建光, 等. BoneCeramic 与 Bio-Oss 促进大鼠 PAOO 术后成骨与骨髓基质细胞成骨分化效果的比较研究[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(9): 1430–5.
- [14] 喻刚, 蒋玉清, 刘文钊, 等. 人骨形成蛋白 7 对人牙髓细胞增殖和分化的作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(11): 1672–6.
- [15] Howard M T, Wang S, Berger A G, et al. Sustained release of BMP-2 using self-assembled layer-by-layer film-coated implants enhances bone regeneration over burst release[J]. *Biomaterials*, 2022, 288: 121721.

Construction of porous titanium surface loaded with Silane and BMP-2 and evaluation of its osteogenic activity

Li Wei, Jiang Chongying, Zhang Lei, Sun Xiaoyu, He Xin, Hong Biao, Cheng Nan, Li Xiangyang
(*Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032*)

Abstract Objective To study the preparation method of silane and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on the nano-porous titanium surface and evaluate the osteogenic ability of the prepared surface. **Methods** Silane and BMP-2 modified nano-porous titanium surfaces were constructed by alkali-heat treatment, silanization modification and BMP-2 grafting. Scanning electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, infrared spectroscopy and water contact angle tests were used to characterize the changes of surface morphology, elements, functional groups and hydrophilicity during the preparation process. Immunofluorescence was used to observe the BMP-2 grafted on the surface. Cell activity test and cell fluorescence staining were used to analyze the ability to promote osteoblast adhesion and proliferation, and alkaline phosphatase activity was used to evaluate the ability to promote cell osteogenesis. **Results** Material characterization results confirmed that silane and BMP-2 were successfully immobilized on the nano-porous titanium surface. Cell evaluation confirmed that the prepared surface not only significantly enhanced the adhesion and proliferation of osteoblasts, but also greatly enhanced the osteogenic ability of osteoblasts. **Conclusion** The constructed surface has better compatibility with osteoblasts and is expected to improve the osseointegration ability of titanium-based implants.

Key words implant; nano-porous structure; Silane; bone morphogenetic protein-2; osteoblast