两种钛表面对成骨细胞膜片碱性磷酸酶表达的影响*

吴 镭[1,2**],毛久凤[3],郭 艺[1],曾 筱[1],李 治[1],王碧超[4],董 强[1***]
(1. 贵州医科大学 口腔医学院 口腔修复学教研室,贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属口腔医院 口腔内科,贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学附属省人民医院 口腔修复科,贵州 贵阳 550002; 4. 贵州医科大学 口腔医学院 口腔正畸学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**:研究成骨细胞膜片在两种不同改性钛表面上碱性磷酸酶(ALP)的表达。**方法**:原代培养 SD 大鼠成骨细胞,分别在阳极氧化处理钛表面(实验组)及光滑钛表面(对照组)上构建成骨细胞膜片,连续培养 7 d 和 14 d,采用 ALP 活性检测初步评价成骨细胞膜片在两种钛表面的成骨效应。**结果**:通过 SD 大鼠原代成骨细胞培养、纯化和鉴定,其形态学特征符合成骨细胞特性;将成骨细胞接种在两种钛表面,在第 7 天或第 14 天时实验组 ALP 活性均高于对照组($P<0.05$),两组成骨细胞膜片第 14 天 ALP 活性均低于第 7 天($P<0.05$)。**结论**:阳极氧化相对于光滑处理的钛表面而言,具有更显著的促进成骨细胞膜片成骨分化的作用。

[关键词] 成骨细胞; 细胞培养; 碱性磷酸酶; 阳极氧化钛表面; 光滑钛表面
[中图分类号] R783.3 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)03-0327-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.018

Effect on the Expression of Two Kinds of Titanium Surfaces on Osteoblast Cell Sheets ALP

WU Lei[1,2], MAO Jiufeng[3], GUO Yi[1], ZENG Xiao[1], LI Zhi[1], WANG Bichao[4], DONG Qiang[1]
(*1. Department of Prosthodontics, School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*; *2. Department of Oral Medicine, School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*; *3. Department of Prosthodontics, Affiliated Province Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*; *4. Department of Orthodontics, School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the expression of alkaline phosphatase (ALP) of osteoblast cell sheets on two kinds of titanium surface. **Methods**: To culture primary osteoblasts of SD rats, then build osteoblast cell sheets 7 Days and 14 Days on the titanium surface of anodic oxidation (experimental group) and smooth (control group) respectively. By using ALP activity detection to preliminary evaluate the osteogenesis effect of osteoblast cell sheets on two kinds of titanium surface. **Results**: Through primary osteoblasts cultivation, purification and identifying, the morphology characteristics conformed to the osteoblasts. On the 7 Day or the 14 Day, the experimental group ALP activity was higher than that of the control group ($P<0.05$). Both groups of osteoblast cell sheets ALP activity on the 14^{th} Day were lower than that on the 7^{th} Day ($P<0.05$). **Conclusion**: The anodic oxidation titanium surface has a more significant promoting effect on the osteogenic promotion comparing with the smooth titanium surface.

[**Key words**] osteoblast cell sheets; cell culture; alkaline phophatase; anodic oxidation titanium surface; smooth titanium surface

*[基金项目]贵州省科技厅省校合作协议项目[黔科合 LH 字(2014)7115 号];贵阳市科技计划项目[筑科合同(2014)100139 号]
**贵州医科大学 2014 级硕士研究生
***通信作者 E-mail:dongq666@163.com
网络出版时间:2017-3-18 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2320.014.html

种植义齿修复是口腔缺牙患者首选的治疗方案之一,有效迅速地进行种植修复一直是临床研究的重点。钛种植体表面改性是口腔种植骨整合界面研究的重要方法之一,通过钛表面改性,有望更好的促进骨基质的合成、分泌和矿化,从而有效地缩短种植体周围的成骨时间。阳极氧化是钛表面处理方法之一,作为电化学方法,易于形成纳米级规则有序的阵列微孔,类似天然骨的仿生结构[1],但此表面形态能否为细胞的生长提供适宜微环境值得研究;此外,对于种植区骨质条件差、骨缺损范围较大的患者,往往需要骨移植,虽然自体骨移植仍是最有效的方法,但往往需要开辟第二术区,增加患者的手术创伤以及术中或术后并发症的风险。因此,如果所采用的骨替代材料能够获得类似自体骨移植的成骨效果,又能明显减少手术创伤,将能明显提高临床的治疗效果。近年来,细胞膜片技术在骨组织工程研究中发展迅速[2-3],采用细胞膜片技术在不同钛表面能否获得良好的骨再生效应,目前尚未见相关文献报道。本研究体外构建成骨细胞膜片,通过检测成骨细胞膜片碱性磷酸酶(ALP)活性,探讨成骨细胞膜片在不同钛表面成骨分化的情况。

1　材料与方法

1.1　材料

钛片(西安泰金工业电化学技术有限公司),24 h 内新生的 SD 大鼠(贵州医科大学动物实验中心),胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司),DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、青 - 链霉素(美国 Gibco 公司),Ⅰ型胶原酶及抗坏血酸(美国 Sigma 公司);碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(南京建成公司)及 ELX800UV 酶标仪(Bio-Teck 公司,美国)。

1.2　方法

1.2.1　原代成骨细胞培养、鉴定　取 24 h 内新生 SD 大鼠颅盖骨刮掉骨膜并剪成碎骨块,依次用 0.25% 胰蛋白酶及Ⅰ型胶原酶于 37 ℃水浴中消化,离心重悬收集沉淀即得原代成骨细胞;采用差速贴壁法纯化,37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养,隔 2 d 换液。细胞长满培养瓶底75% ~85% 后胰蛋白酶消化进行传代,传至第 3 代备用。采用碱性磷酸酶、茜素红、Ⅰ型胶原染色对第 3 代成骨细胞进行观察和鉴定,按剂盒说明书操作。

1.2.2　肽片制备及分组　将光滑处理的钛表面作为对照组,阳极氧化处理的钛表面作为实验组,每组样本各 12 片,分别连续培养 7 d、14 d。钛片直径(14.5 ±0.3)mm,厚度(1 ±0.2)mm,为圆形;钛片经 800#、1200#、2000#3 种型号金相砂纸打磨至光滑镜面(对照组);实验组的处理则在对照组处理后通过丙酮,无水乙醇及去离子水分别依次浸泡 15 min 后,脱脂去杂质,以 5% H_2SO_4 和 3% H_3PO_4 混合溶液作为电解液,光滑钛片作为阳极,石墨作为阴极,直流电压100 V作用 20 min,洗净晾干,高压备用。取第 3 代成骨细胞,消化、离心,重悬,以 0.5×10^6/mL 密度接种于装有钛片的 24 孔板,每孔加入适量 16% 完全培养基及浓度为 50 mg/L的抗坏血酸。于 37 ℃,5% CO_2 培养箱中连续培养,于第 7、14 天时倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.2.3　成骨细胞膜片 ALP 活性检测　采用酶标仪法检测 ALP 活性,成骨细胞接种钛表面培养后,在第 7 天,14 天分别收集各组培养液以1 000 r/min 离心 15 min,收集上清。每组设定测定孔、标准孔及空白孔,测定孔依次加入上清中段 50 μL,缓冲液及基质液各 50 μL;标准孔依次加入酚标准应用液(0.1 g/L)50 μL,缓冲液及基质液各50 μL;空白孔依次加入三蒸水 50 μL,缓冲液及基质液各 50 μL。测定孔、标准孔及空白孔各设 12 个平行样本,在 96 孔板上标记,充分摇匀后放入 37 ℃水浴 20 min。各孔再加入显色剂 150 μL,轻微摇动混匀,用酶标仪以波长 490 nm 测定各孔 D 值。计算 ALP 活力(金氏单位/mL) =(测定孔 D 值/空白孔 D 值 - 标准孔 D 值/空白孔 D 值)× 酚标准品浓度 ×100 mL × 样本测定前稀释倍数。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计学分析。实验数据采用均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$),组间比较时采用单因素方差分析,组内比较采用配对 t 检验,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　成骨细胞观察及鉴定

培养后第 2 天(图 1A),镜下可见细胞多呈三角形或树杈型,几乎各自独立相互无基质连接。第 4 天(图 1B),细胞呈梭形生长趋势,且有少量细胞通过基质相互连接生长;第 8 天(图 1C),细胞多呈

梭形,长满培养瓶底,且相互之间有基质连接,生长密集;第 3 代细胞第 5 天(图 1D),细胞多呈短梭形,结瓦状生长。第 3 代成骨细胞茜素红染色阳性,镜下见红色灶状钙节结生长(图 2A);ALP 染色阳性,镜下观察见细胞质为条梭状、三角状或树杈状,胞质呈棕灰色深染;细胞核呈紫蓝色(图 2B);Ⅰ型胶原染色阳性,细胞基质呈浅棕黄色,细胞核呈深棕黄色(图 2C)。

2.2　成骨细胞膜片培养及观察

第 7 天镜下见成骨细胞密集,可见钛片边缘与孔壁间细胞生长良好,呈梭形生长,相互有基质连接(图 3A)。第 14 天,钛片上刮取膜片,肉眼仔细观察,见一层透明的镜面样薄膜,中间平滑均匀,边缘呈皱褶状(图 3B);第 14 天镜下观察,膜片中部细胞均匀地紧密重叠生长(图 3C),细胞形态及细胞间界限不清。

2.3　成骨细胞膜片 ALP 活性检测

第 7 天或第 14 天时,实验组成骨细胞膜片 ALP 活性均高于对照组($P<0.05$);两组成骨细胞膜片在第 14 天 ALP 活性均低于第 7 天($P<0.05$),见表 1。

表 1　两组钛表面成骨细胞 ALP 活性($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1　The ALP activity of osteoblast cells sheets on two kinds of titanium surface

分组	n	ALP(u/L)	
		第 7 天	第 14 天
对照组	12	3.741 ± 0.314	1.499 ± 0.300[(2)]
实验组	12	6.490 ± 1.221[(1)]	4.684 ± 1.428[(1)(2)]

[(1)] 与对照组相比,$P<0.05$;[(2)] 与第 7 天相比,$P<0.05$

3　讨论

细胞膜片技术是一种无支架的组织工程方法,通过细胞自分泌的基质相互连接后,向三维方向密集生长而成,其形态质地均匀,细胞利用率较高,无炎症、坏死等不良反应[4]。而水溶性的抗坏血酸以 50 mg/L 浓度加入培养,能催化成骨细胞增殖、矿化的进程[5]。作为种子细胞之一的成骨细胞,是种植体周围骨组织形成的中心,是骨形成和改建中最重要的功能细胞,在基质的合成、分泌和矿化过程中发挥作用[6]。天然纯钛表面的氧化膜本是一种惰性物质,不能促进磷酸盐的沉积[7],但是可以通过对其表面的改性来获得理想的表面形貌和化学组成,以提高吸附钙、磷离子的能力,促进磷酸盐的形成,从而促进成骨[7-10]。众多表面改性方法中,阳极氧化处理容易在金属和合金表面实现具有一致性和可控性纳米结构的表面形貌,更有益于细胞的黏附、增殖及成骨[11]。

成骨细胞中富含 ALP,它是成骨细胞早期矿化的标志,以 ALP 活性检测来评价成骨细胞膜片不同时期的增殖分化情况,可以反映出在不同钛表面上培养的成骨细胞膜片向成骨分化的速率[12]。本研究结果显示,组间比较,实验组在各时间点 ALP 活性均高于对照组。这可能与在酸性电解质溶液中,钛片表面作阳极氧化改性后,易在其表面形成粗糙的二氧化钛纳米孔结构及亲水性增加有关。粗糙的表面增大了表面积,为细胞的附着提供更多的位点,为细胞提供足够的生长空间[13];Thirugnanam 等[14]证实粗糙的表面形成丰富的 OH 基团,亲水性的增加,使该表面带负电荷,吸引胎牛血清培养基中带正电荷的钙、磷离子相结合,促使磷酸盐的沉积,从而促进成骨细胞膜片向成骨基质方向分化。Deligianni 等[15]证实了粗糙的钛表面亲水性增加,而 Liu 等[16]也已证实粗化的表面亲水性增加,利于细胞附着蛋白质的吸附量增大。组内比较,两组第 14 天 ALP 活性均低于第 7 天。因成骨细胞是一种分化较高的细胞,以其制备的细胞膜片较其他间充质干细胞诱导分化而来的膜片有着更高的成熟度,提示细胞可能已处于快速增殖的早期向骨基质分泌、矿化的成熟阶段。

综上所诉,与光滑钛片相比,阳极氧化钛片对成骨细胞早期增殖分化有着更显著的促进作用,但对其具体作用机制还有待进一步研究。

4　参考文献

[1] 左杨, 夏荣, 屠姗姗, 等,纯钛种植体表面的纳米改性研究[J]. 安徽医科大学学报,2013(10):1214 - 1217.

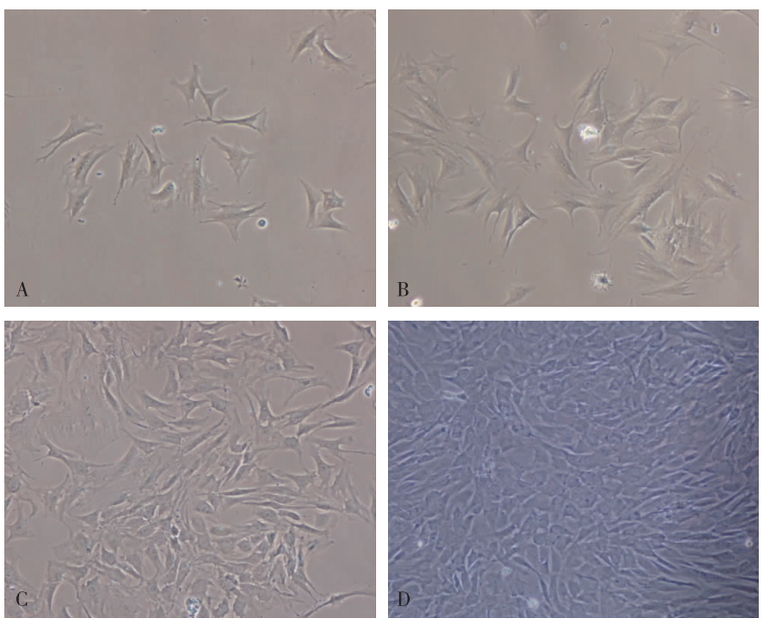
[2] Mohammadi Z, Afshari JT, Keramati MR, et a1. Differentiation of adipocytes and osteocytes from human adipose and placental mesenchymal stem cells[J]. Iran J Basic Med Sci,2015(3):259 - 266.

[3] Du MC, Liang H, Mou CC, et a1. Regulation of human mesenchymal stem cells differentiation into chondrocytes in extracellular matrix - based hydrogel scaffolds[J]. Colloids and Surfaces B:Biointerfaces, 2014(114):314 - 323.

[4] Okano T, Yamada N, Sakai H, et a1. A novel recovery

system for cultured cells using plasma – treated polysty rene dishes grafted with poly (N – isopropylacrylamide) [J]. Biomed Mater Res,1993(10):1243 – 1251.

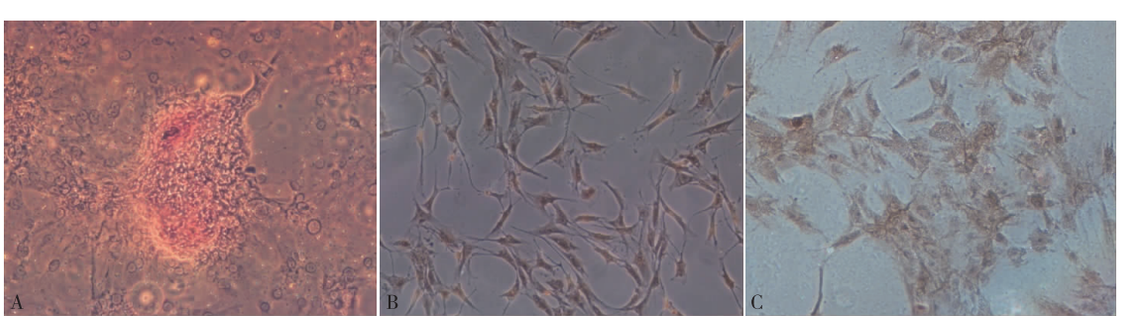
[5] 周成菊,周建奖,杨红,等. 抗坏血酸对大鼠成骨细胞膜片 BMP – 2 mRNA 表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志,2015(3):305 – 308.



注:A 为原代第 2 天,B 为原代第 4 天,C 为原代第 8 天,D 为第 3 代第 5 天

图 1　成骨细胞形态(200 ×)

Fig. 1　Primary cells observation



注:A 为茜素红染色,B 为碱性磷酸酶染色,C 为Ⅰ型胶原染色

图 2　第 3 代成骨细胞鉴定(200 ×)

Fig. 2　Osteoblast cells identification



注:A 为膜片镜下第 7 天(200 ×),B 为膜片肉眼下观察,C 为膜片中部镜下第 14 天(200 ×)

图 3　成骨细胞膜片观察

Fig. 3　Osteoblast cell sheets observation

[6] Choi BH, Cheong H, Ahn JS, et al. Engineered mussel bioglue as a functional osteoinductive binder for grafting of bone substitute particles to accelerate in vivo bone regeneration[J]. Journal Of Materials Chemistry, 2015(4): 546 - 555.

[7] Liu XY, ChuPK, DingCX. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications[J]. Mater Sci Eng, 2004(3 - 4):49.

[8] Liu L, Song LN, Yang GL, et al. Fabrication, characterization, and biological assessment of multilayer DNA coatings on sandblasted - dual acid etched titanium surface [J]. J Biomed Mater Res A, 2011(3):300 - 310.

[9] Wang Y, Wen C, Hodgson P, et al. Biocompatibility of TiO_2 nanotubes with different topographies[J]. J Biomed Mater Res A, 2014(3):743 - 751.

[10] Gu YX, Du J, Si MS, et al. The roles of PI3K/Akt signaling pathway in regulating MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on SLA and SLActive titanium surfaces[J]. J Biomed Mater Res A, 2013(3):748 - 754.

[11] Minagar S, Wang J, Berndt CC, et al. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys[J]. J Biomed Mater Res A, 2013(9):2726 - 2739.

[12] 周屹立,丁仲娟,唐玲. 钛片表面粗糙度和氧化膜对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 上海口腔医学,2013(3):282 - 286.

[13] Minagar S, Wang J, Berndt CC, et al. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys[J]. J Biomed Mater Res A, 2013(9):2726 - 2739.

[14] Thirugnanam A, Kumar TSS, Uday C. Tailoring the bioactivity of commercially puretitanium by grain refinement using groove pressing [J]. Mater Sci C, 2010(30):203 - 208.

[15] Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, et al. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti6A14 V on human bone marrow cell response and on protein adsorption[J]. Biomaterial, 2001(22):1241 - l251.

[16] Liu X, Zhao X, Li B, et al. Ultra - violet iradiation generate bioactive nano - TiO2 surface[J]. Applied Physics Letters, 2008(4):544 - 552.

(2016-12-22 收稿,2017-02-27 修回)
中文编辑: 周　凌; 英文编辑: 赵　毅

(上接第 321 页)

[5] Tang KF, Zheng JZ, Xing JP. Molecular analysis of SNP12 in estrogen receptor α gene in hypospadiac or cryptorchid patients from northwestern china [J]. Urologia Internationalis, 2011 (3): 359 - 362.

[6] Bouty A, Ayers KL, Pask A. et al. The genetic and environmental factors underlying hypospadias [J]. Sex Dev, 2015 (5):239 - 259.

[7] Palrasu M, Nagini S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review [J]. Curr Drug Targets, 2017(1):17 - 24.

[8] 王瑞芳,董治亚,王伟,等. 52 例尿道下裂患者 5α - 还原酶 2 型基因突变研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2012(9):693 - 696.

[9] 唐华建,袁继炎. 尿道下裂与Ⅱ型 3β 羟类固醇脱氢酶基因突变的研究[J]. 临床小儿外科杂志,2002 (4): 282 - 285.

[10] 刘乐,杨屹,王常林. FGFR2 单核苷酸多态性 rs2981582 位点(C/T)与尿道下裂的相关性研究[J]. 中华小儿外科杂志,2011 (3):202 - 205.

[11] Maimoun L, Philibert P, Cammas B. et al. Phenotypical, biological and molecular heterogeneity of 5alpha - reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011 (2): 296 - 307.

[12] Watanabe M, Yoshida R, Ueoka K, et al. Haplotype analysis of the estrogen receptor 1 gene in male genital and reproductive abnormalities[J]. Hum Reprod, 2007 (5): 1279 - 1284.

[13] Takahashi T, Shimotakahara A, Miyahara K, et al. Activating transcription factor 3 is not up - regulated in hypospadias patients in Japan [J]. Afr J Paediatr Surg, 2013 (4):371 - 373.

[14] Shehata BM, Elmore JM, Bootwala Y, et al. Immunohistochemical characterization of sonic hedgehog and its downstream signaling molecules during human penile development [J]. Fetal Pediatr Pathol, 2011 (4):244 - 251.

[15] Kurahashi N, Sata F, Kasai S, et al. Maternal genetic polymorphisms in CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 and the risk of hypospadias[J]. Mol Hum Reprod, 2005(2):93 - 98.

[16] Shekharyadav C, Bajpai M, Kumar V, et al. Polymorphism in CYP1A1, GSTMI, GSTT1 genes and organochlorine pesticides in the etiology of hypospadias [J]. Hum Exp Toxicol, 2011(10):146414 - 146474.

(2017-01-03 收稿,2017-02-27 修回)
中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 赵　毅