

## 在不同钛表面上的成骨细胞膜片的增殖变化<sup>\*</sup>

夏 茜<sup>1</sup>, 吴 镭<sup>2</sup>, 毛久凤<sup>3</sup>, 郭 艺<sup>2</sup>, 曾 筱<sup>2</sup>, 李 治<sup>2</sup>, 王碧超<sup>4</sup>, 董 强<sup>2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学附属口腔医院 口腔内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学口腔医学院 口腔修复学教研室, 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: 研究不同表面钛片上成骨细胞膜片的生长增殖情况。方法: 制备光滑表面钛片(对照组)和喷砂酸蚀表面钛片(实验组), 把鉴定后的体外培养原代成骨细胞置两种钛片上制备成骨细胞膜片; 通过电镜扫描(SEM)观察两组钛片上的成骨细胞形态及附着情况, 采用 CCK-8 法评估两组钛片表面对成骨细胞膜片生长增殖的影响。结果: SEM 可见对照组钛片表面较光滑, 成骨细胞附着后多单层均匀生长, 基质连接处有断裂; 实验组钛片表面粗糙, 形成大小不一, 凹凸不平的“蜂窝状”多级微孔, 细胞黏附后多层生长, 基质连接紧密; CCK-8 结果显示, 两组膜片吸光度(OD)值随培养时间延长而增高, 实验组各时间点 OD 值均高于对照组, 除第 1、3 天外, 其它时间点 OD 值比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 喷砂酸蚀钛表面对成骨细胞膜片增殖促进作用明显高于光滑钛表面。

**[关键词]** 成骨细胞膜片; 光滑钛表面; 喷砂酸蚀钛表面; CCK-8

**[中图分类号]** R783.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)05-0536-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.05.009

## Proliferation Changes of Osteoblast Cell Sheets on Different Titanium Surface

XIA Qian<sup>1</sup>, WU Lei<sup>2</sup>, MAO Jiufeng<sup>3</sup>, GUO Yi<sup>2</sup>, ZENG Xiao<sup>2</sup>, LI Zhi<sup>2</sup>, WANG Bichao<sup>4</sup>, DONG Qiang<sup>2</sup>

(1. Department of Oral Medicine, the Affiliated Stomatological Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Prosthodontics, the School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Prosthodontics, the Affiliated Provincial Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550002, Guizhou, China; 4. Department of Orthodontics, the School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the growth and proliferation of osteoblast cell sheets on different titanium surfaces. **Method:** Cultivating smooth surface titanium sheets (control group) and sand acid etched titanium sheets (experiment group); planting the cultivated in vitro osteoblast cell on the two titanium surfaces to be osteoblast cell sheets. Observing the form of different titanium surfaces and the condition of cell attachment through Scanning Electron Microscope (SEM). The effect of growth and proliferation of osteoblast cell sheets on both surfaces were assessed by using Cell Counting Kit 8 (CCK-8). **Result:** Observing by SEM, the surface of control group was smooth and the osteoblast cell sheets growth were monolayer after cell attachment, and there are some fractures of cellular matrix. However, the surface of experimental group was rough and formed alveolate multistage microporous, the osteoblast cell sheets growth were multilayer after cell attachment, cellular matrix connection was tight. CCK-8 indicated that OD value of osteoblast cell sheets of each group increased with culturing time extension. At each time point, the OD value of experimental group is higher than that of control group, except the first day and the third day, other time point has statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Con-**

<sup>\*</sup> [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]

<sup>\*\*</sup> 通信作者 E-mail: dongq666@163.com

网络出版时间: 2017-5-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170518.2227.006.html>

**clusion:** Compared with the surface of smooth titanium, the surface of sand acid etched titanium has a more significant role on the osteoblast cell sheets proliferation. ?

[**Key words**] osteoblast cell sheets; smooth titanium surface; sand acid etched titanium surface; CCK-8

目前常规植牙已进入非常成熟的阶段,有较好的远期疗效,但是,对于骨壁缺失或骨质吸收严重的患者,牙槽骨的重建修复仍面临很多问题。自体骨修补较大范围骨缺失时,易造成供区损伤及手术并发症,增加感染的几率;而同种异体或异种骨可能存在免疫排斥反应,成骨效果不如自体骨<sup>[1]</sup>;常用的人工骨材料无骨诱导活性,难以塑形,对大面积骨缺损修复效果不确定。因此,研发无免疫排斥反应、成骨快及吸收较慢的骨替代材料,具有重要的临床意义。在相关研究中,骨组织工程技术对于解决骨重建、骨增量等问题有较好的应用前景<sup>[2]</sup>。同时,如何提高种植体与骨结合的质与量也非常重要。纯钛作为种植体的基底材料,与骨的结合质量受多重因素影响,其中,钛表面改性是影响因素之一。本研究将细胞膜片技术与钛表面改性相结合,观察在不同钛表面的成骨细胞膜片的增殖变化情况。

## 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),CCK-8 试剂盒(同仁化学,日本);S3400N 扫描电镜(日立,日本),ELX800UV 酶标仪(Bio-Tek 公司,美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 钛片的制备** 定制 TA1 工业纯钛片直径 14.5 mm,厚度 1 mm。TA1 钛基底表面经 800#、1200#、2000#金相砂纸逐级打磨至光滑镜面,作为光滑组(对照组);TA1 钛基底用直径 400  $\mu\text{m}$  棕刚玉以 4  $\text{kg}/\text{cm}^2$  压力,倾斜 45°,工作距离 15 cm 作喷砂处理,再放于 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴中,以 10% HCL 和 60%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  混合液浸泡 1 h,去离子水洗净,作为喷砂酸蚀组(实验组)。

**1.2.2 原代成骨细胞培养、鉴定** 麻醉后处死新生 SD 大鼠并取其颅盖骨剪碎,加入 0.25% 胰蛋白酶于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化 20 min 后去上清,PBS 冲洗沉

淀后倒掉;再加 I 型胶原酶于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中消化 15 min,每隔 5 min 剧烈摇晃 1 次,收集上清,加入完全培养基终止消化,重复该步骤 3 次;上清离心,收集沉淀后重悬即得原代成骨细胞。每隔 2 d 换液 1 次,细胞长满培养瓶底 75% ~ 85% 后 0.25% 胰酶消化,完全培养基终止消化,分装培养瓶进行传代,传至第 3 代备用。原代提取或传代后采用差速贴壁法纯化细胞。采用 HE、茜素红及 I 型胶原染色进行细胞鉴定,按试剂盒说明书操作步骤进行染色。

**1.2.3 膜片的制备** 将不同表面钛片平放于 24 孔板中。取第 3 代成骨细胞以  $0.5 \times 10^9$  个/L 密度接种于各组钛片上,加入含 16% 胎牛血清(SBF)的完全培养基培养,隔天换液后加入 50 mg/L 抗坏血酸。于细胞培养箱中连续培养数天,择期观察细胞膜片形态。

**1.2.4 电镜扫描** 不同钛表面处理好后,喷金,电镜扫描其形貌;在不同钛表面培养成骨细胞膜片 14 d 后,戊二醛固定,乙醇(50%、70%、80%、90%)逐级脱水,每次 10 min,最后用 100% 乙醇脱水 3 次,每次 10 min,表面喷金,电镜下观察扫描膜片生长情况。

**1.2.5 成骨细胞膜片 CCK-8 增殖检测** 两组细胞分别培养 1、3、5、7、10、14 d,相应时间点前 1 天换液 1 次,当天于 96 孔板中每孔依次加入培养液 100  $\mu\text{L}$ ,CCK-8 溶液 10  $\mu\text{L}$ ,每组各设 6 个平行样本,将 96 孔培养板于培养箱中孵育 150 min,用酶标仪以 450 nm 测定各孔吸光度(OD)值。以含有成骨细胞或细胞膜片的培养基、CCK-8 溶液、光滑钛表面或喷砂酸蚀钛表面作为测定孔;含有光滑钛表面或喷砂酸蚀钛表面的培养基、CCK-8 溶液,不含成骨细胞或细胞膜片作为标准孔;不含成骨细胞或细胞膜片的培养基,不含两种钛表面,但含有 CCK-8 溶液作为空白孔。不同钛表面细胞膜片最终 OD 值 = 测定孔 OD 值 - 标准孔 OD 值 - 空白 OD 值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析。实验数据采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较时采用单因素方差分析,两两比较采用配对  $t$  检

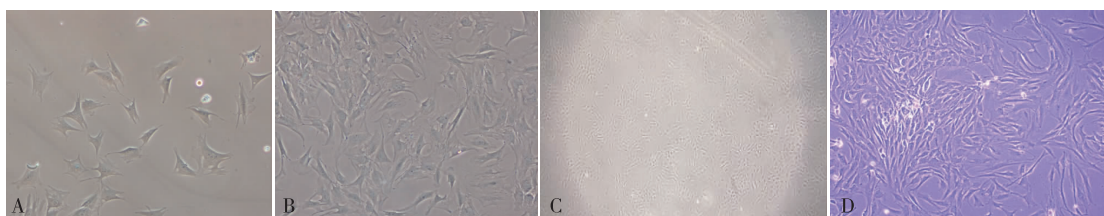
验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成骨细胞观察及鉴定

原代细胞培养第 3 天,镜下可见细胞多呈三角形不规则形,细胞各自独立,相互几乎无基质连接,偶见视野中有杂质混入(图 1A);原代细胞培养第 7 天,细胞基质增多,细胞间通过基质连接生长,细

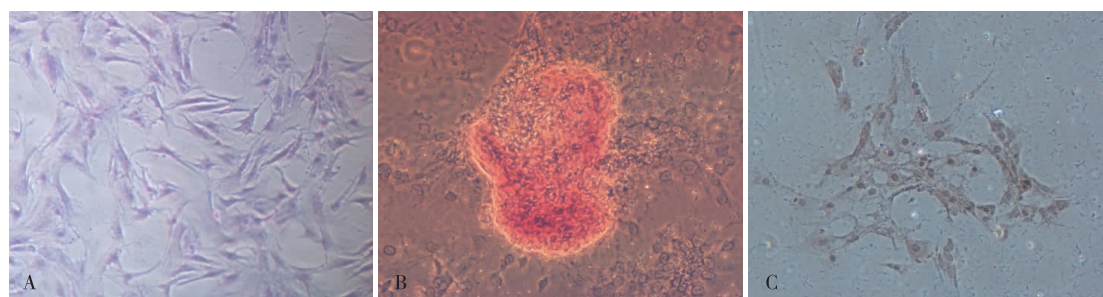
胞多呈梭形或三角形(图 1B);细胞传代后第 4 天,细胞形态较为一致,多呈短梭形,视野中几乎无杂质混入(图 1C);第三代细胞培养第 2 天,可见少量散在钙化灶,周围短梭形细胞旋涡状围绕生长,且相互之间有基质连接,生长较密集(图 1D)。HE 染色阳性:见细胞核呈紫蓝色,胞质为淡紫色(图 2A)。茜素红染色阳性:见红色灶状钙节结生长(图 2B)。I 型胶原染色阳性:细胞核呈深棕黄色,细胞基质呈浅棕黄色(图 2C)。



注:A、B 为原代细胞培养第 3 和 7 天(200 $\times$ ),C 为传代细胞培养第 4 天(100 $\times$ ),D 为第 3 代细胞培养第 2 天(200 $\times$ )

图 1 原代及传代培养的成骨细胞

Fig. 1 Original and subculture osteoblast cell observation



注:A 为 HE 染色,B 为茜素红染色,C 为 I 型胶原染色

图 2 成骨细胞鉴定(200 $\times$ )

Fig. 2 Identification of osteoblast cells

### 2.2 钛表面及成骨细胞膜片电镜扫描

光滑钛表面经机械抛光后呈相对“镜面”样表面(图 3A),而经喷砂酸蚀的表面十分粗糙,呈“蜂窝状”结构,可见凹凸不平、大小不一的一级或二级孔(图 3B);细胞分别接种于两种钛表面培养第 14 天时,对照组表面大量细胞通过其基质较为有序的相互连接,但多处连接有断裂,且生长趋于单一层面,较为平整(图 3C);实验组表面覆盖多层细胞及基质,层次较多,界限不清,且不均匀(图 3D)。

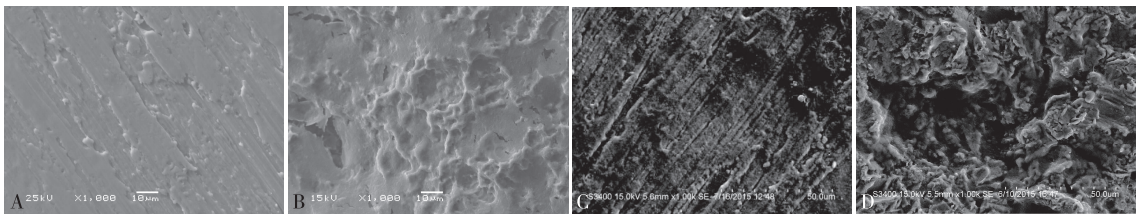
### 2.3 成骨细胞膜片培养及观察

第 14 天时,在钛表面上刮取细胞膜片,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 4A);镜下观察可见,膜片中部细胞紧密重叠生长,钙化节结有由边缘向中心蔓延的趋势;边缘部细胞形态及界限不清,钙化明显(如图 4B)。

### 2.4 成骨细胞膜片 CCK-8 增殖检测

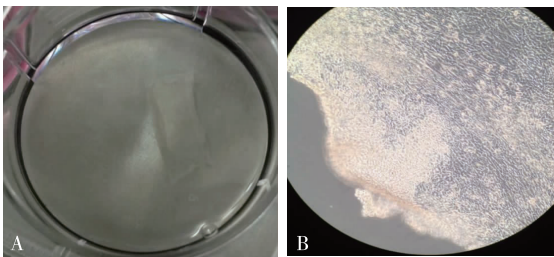
结果显示,细胞接种后制膜第 1 天到第 14 天,OD 值随培养时间的延长而升高,呈较为平缓的“S”型,实验组曲线在第 1~3 天和第 10~14 天则相对平缓,提示细胞增殖速率较缓慢,第 5~10 天,曲线陡峭,提示细胞增殖速率较快。组间比较,各时间点实验组 OD 值高于对照组,除第 1、3 天外,其他时间点差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 5。



注:A 为光滑钛表面,B 为喷砂酸蚀钛表面,C 为对照组成骨细胞膜片,D 为实验组成骨细胞膜片

图 3 两种钛表面及其成骨细胞膜片(1 000 ×)

Fig. 3 SEM images of two kinds of titanium surface and corresponding osteoblast cell sheets



注:A 为肉眼观,B 为镜下观(100 ×)

图 4 成骨细胞膜片(第 14 天)

Fig. 4 Observation of osteoblast cell sheets

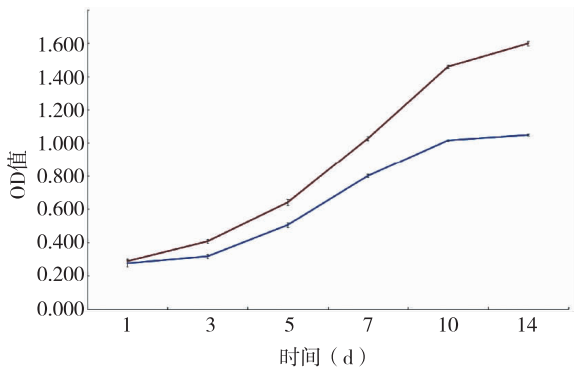


图 5 两种钛表面对成骨细胞膜片增殖的影响

Fig. 5 The effect of two kinds of titanium surface on osteoblast cell sheets proliferation

3 讨论

细胞膜片技术作为一种新的组织重建方式,自 20 世纪 90 年代由日学者 Okano 等<sup>[3]</sup>首次提出后,现已迅速发展,学者们已成功构建出多种细胞膜片<sup>[4]</sup>,并在重建心肌组织、角膜及治疗糖尿病和食道溃疡方面取得了深入进展<sup>[5-8]</sup>。细胞膜片具有一定的机械性能及可塑性,能修复较大面积骨缺失<sup>[9]</sup>。Uchihara 等<sup>[10]</sup>通过实验,将成骨细胞膜片包被经 X 射线灭活的自体骨植入裸鼠骨折断裂处,60 d 后骨折愈合。提示细胞膜片具有修复骨

缺损严重区域及促进成骨的能力。

本实验 CCK-8 检测结果,各时间点实验组 OD 值均高于对照组,除了第 1 天和第 3 天,其他时间点差异均有统计学意义;且两组在第 5 天到第 10 天,增殖曲线上升陡峭,提示该时间段为膜片增殖高峰期,这一时期实验组比对照组持续更长。该结果可能与喷砂酸蚀处理获得粗糙的表面形成了多级微孔,增加了材料表面积,利于细胞伪足的长入和蛋白的吸附,使钛表面具有更高的表面吸附能力有关<sup>[11]</sup>。但是,周屹立等<sup>[12]</sup>认为,一定范围内钛表面粗糙度的增加并不能影响细胞早期的黏附率,而表面形态和氧化膜结构才是影响细胞黏附增殖的主要原因,这可能是钛表面处理参数的不同带来的结论不一致。本实验结果中,CCK-8 增殖趋势与本课题组前期研究结果不同处理表面钛片上成骨细胞膜片 ALP 活性检测结果相匹配,前期毛久凤等<sup>[13]</sup>发现光滑钛表面组及喷砂酸蚀组 1 周形成的成骨细胞膜片 ALP 含量较 2 周 ALP 含量高,提示随着培养时间的延长,ALP 活性会有所降低,细胞正处于早期分化向成熟阶段过渡;而在本实验 CCK-8 增殖检测中,各组细胞在培养第 10 天达到增殖高峰后呈增殖速度减缓,提示成骨细胞正处于逐渐的自分泌成膜和矿化阶段;结合电镜扫描结果,成骨细胞能在喷砂酸蚀钛表面及光滑钛表面生长、分泌外基质,两种钛表面材料均未对细胞产生毒性致细胞凋亡等影响,只是不同的钛表面形貌,使得成骨细胞呈不同的导向性生长,喷砂酸蚀组钛表面呈大小不一,孔中有孔的“蜂窝状”钛表面,形成膜片后细胞基质连续且丰富,向三维方向多层次生长;而光滑钛表面呈相对“镜面”样表面,细胞呈单层生长,且细胞基质纵向间多有不延续。CCK-8 检测在第 10 天后细胞增殖率下调现象,这可能是由于随着细胞增殖分化,在有限的培养空间微环境中较大的细胞密度所致单个细胞生长空间不足和营养受限所致。



综上所述,本研究中,与光滑钛表面相比,喷砂后酸蚀钛表面对促进成骨细胞膜片增殖有着更显著的作用,但有关的作用机制还有待进一步研究。

#### 4 参考文献

- [1] Gusić N, Ivković A, VaFaye J, et al. Nanobiotechnology and bone regeneration; a mini - review [J]. *Int Orthop*, 2014(9):1877 - 1884.
- [2] Ran JB, Hu JX, Sun GL, et al. Comparisons between gelatin - tussah silk fibroin /hydroxyapatite and gelatin - Bombyxmori silkfibroin/hydroxyapatite nano - composites for bonetissue engineering [J]. *RSC Advances*, 2015 (93):76526 - 76537.
- [3] Okano T, Yamada N, Sakai H, et al. A novel recovery system for cultured cells using plasma - treated polystyrene dishes grafted with poly(N - isopropylacrylamide) [J]. *Biomed Mater Res*, 1993(10):1243 - 1251.
- [4] Yang J, Yamato M, Shimizu T, et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering[J]. *Biomaterials*, 2007(34):5033 - 5043.
- [5] Sakaguchi K, Shimizu T, Okano T, et al. Construction of three - dimensional vascularized cardiac tissue with cell sheet engineering [J]. *Journal of Controlled Release*, 2015(1):83 - 88.
- [6] Amagai Y, Karasawa K, Kyungsook J, et al. Development of a novel carrier optimized for cell sheet transplantation [J]. *Biomater*, 2015(1):1027 - 1036.
- [7] Ohashi K, Okano T. Functional tissue engineering of the liver and islets [J]. *The Anatomical Record*, 2014(1):73 - 82.
- [8] Ohki T, Yamato M, Ota M, et al. Application of regenerative medical technology using tissue - engineered cell sheets for endoscopic submucosal dissection of esophageal neoplasms [J]. *Digestive Endoscopy*, 2015(2):182 - 188.
- [9] 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.
- [10] Uchihara Y, Akahane M, Shimizu T, et al. Osteogenic matrix cell sheets facilitate osteogenesis in irradiated rat bone [J]. *Biomed Res Int*, 2015(1):1 - 7.
- [11] Liu X, Zhao X, Li B, et al. Ultra - violet irradiation generate bioactive nano - TiO<sub>2</sub> surface [J]. *Applied Physics Letters*, 2008(4):544 - 552.
- [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] 毛久凤, 夏茜, 吴镭, 等. 不同表面处理方法对钛表面成骨细胞膜片 ALP 活性的影响 [J]. *贵州医科大学学报*, 2016(41):410 - 413.

(2017-02-05 收稿, 2017-04-28 修回)  
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 535 页)

#### 4 参考文献

- [1] Capaldo A, Gay F, Scudiero R, et al. Histological changes, apoptosis and metallothionein levels in *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela) exposed to environmental cadmium concentrations [J]. *Aquat Toxicol*, 2016(173):63 - 73.
- [2] Szrok S. Metallothioneins 1 and 2, but not 3, are regulated by nutritional status in rat white adipose tissue [J]. *Genes & Nutrition*, 2016(1):1 - 12.
- [3] Grasselli E, Compalati AD, Voci A, et al. Altered oxidative stress/antioxidant status in blood of alcoholic subjects is associated with alcoholic liver disease [J]. *Drug & Alcohol Dependence*, 2014(1):112 - 119.
- [4] O'Connor KS, Parnell G, Patrick E, et al. Hepatic metallothionein expression in chronic hepatitis C virus infection is IFNL3 genotype - dependent [J]. *Genes Immun*, 2014(2):88 - 94.
- [5] Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol - induced liver injury [J]. *Arch Toxicol*, 2009(6):519 - 548.
- [6] 刘爱东, 谢岚, 蒋慧, 等. 不同品质的食用白酒对大鼠肝脏形态及其肝功能的影响 [J]. *酿酒科技*, 2014(1):125 - 128.
- [7] 江源. 2016 年 6 月全国白酒产量 116 万千升 [J]. *酿酒科技*, 2016(8):27.
- [8] Qu W, Waalkes MP. Metallothionein blocks oxidative DNA damage induced by acute inorganic arsenic exposure [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015(3):267 - 274.
- [9] 田鹏. 水体中镉暴露对草鱼的氧化胁迫研究 [D]. 重庆·西南大学, 2013.
- [10] Nagamine T, Nakajima K. Significance of metallothionein expression in liver disease [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2013(4):420 - 426.
- [11] 叶兰, 熊陶, 黄能慧, 等. 高脂饲料和酒精诱导大鼠肝纤维化的实验研究 [J]. *贵阳医学院学报*, 2003(2):152 - 154.
- [12] 刘昊, 梁文妹. 贵州某白酒对大鼠睾丸间质细胞内类固醇激素急性调节蛋白表达及血清睾酮水平的影响 [J]. *解剖学报*, 2016(3):386 - 390.

(2017-02-13 收稿, 2017-04-25 修回)  
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 苏晓庆