

网络出版时间: 2017-7-20 23:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.034.html>

钛表面碱酸热处理的体外实验研究

刘春¹, 夏荣¹, 孙磊¹, 闵曦², 徐基亮¹, 孙子环¹, 章辉¹, 朱一铭¹

摘要 通过碱、稀酸、热处理在纯钛表面构建纳米级网状生物活性层,采用场发射电镜和 X 射线能量色散谱仪观察三组试件表面微观形貌和元素组成。小鼠骨髓间充质干细胞与三组试件共培养,体外评价试件表面的生物活性。结果表明碱酸热处理组试件表面仍呈现精细的网状结构,碱酸热处理可以脱除试件表面钠元素。体外细胞培养结果表明,碱酸热处理表面具有良好的生物活性。

关键词 二氧化钛;纳米网状结构;生物活性

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)09-1405-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.034

钛具有优越的生物相容性,但其生物活性差、骨诱导能力缺乏。为了改善钛种植体的表面性能,形成有利于细胞黏附、分化的良好环境,需要对钛表面进行各种改性处理^[1],理化处理就是其中一种方

法。通过改性处理形成的均匀一致的微观形貌能更好地诱导骨形成。该研究采用碱、酸、热处理在纯钛表面构建纳米网状结构,观察形成的纳米结构形貌并探讨表面网状结构对细胞活性的影响,为钛表面改性提供新方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 直径 12 mm、厚 0.25 mm 圆形纯钛片(纯度 99.99%,北京中金研新材料科技有限公司);Sirion200 型扫描电子显微镜(美国 FEI 公司);SX-4-10 型箱式电阻炉(天津泰斯特仪器有限公司);SW 型电热恒温水槽(上海博迅实用有限公司医疗设备厂);氢氧化钠、盐酸(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 试件制备与检测

1.2.1 钛片表面预处理 纯钛片 72 枚,800 目至 7000 目砂纸逐级将钛片表面打磨抛光,试件依次在丙酮、无水乙醇、去离子水中超声荡洗各 20 min,干燥备用。制备好的试件称为光滑(pure Titanium, PT)组试件。

1.2.2 碱酸热处理 随机从 PT 组中选取 48 枚试件,浸泡于 60 °C、5 mol/L NaOH 水溶液中 24 h 后取出、去离子水冲洗、干燥。随机从经 NaOH 处理的

2017-03-15 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1508085MH156);安徽省学术和技术带头人科研活动经费资助项目(编号:2014H030)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

²安徽医学高等专科学校口腔系,合肥 230601

作者简介:刘春,男,硕士研究生;

夏荣,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xiarongqh@aliyun.com

Distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells in tumor-draining lymph nodes of human gastric cancer

Wang Likun, Yuan Xiao, Xu Aman, et al

(Dept of General Surgery, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract To compare the number and distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) in tumor-draining lymph nodes (TDLN, N1) and N2 to assess whether Treg may contribute to the lymphatic metastasis in human gastric cancer. Foxp3⁺ regulatory T cells in N1 and N2 were detected by immunohistochemical staining. Foxp3⁺ Treg showed diffuse distribution in paracortex and medulla. TDLN tended to be enriched in Foxp3⁺ Treg compared with N2 ($P < 0.01$). Foxp3⁺ regulatory T cells in TDLN from advanced gastric cancer were significantly higher than that from early gastric cancer ($P < 0.01$). Foxp3⁺ regulatory T cells exhibit increased recruitment to TDLN, which could facilitate the immune tolerance and contribute to lymphatic metastasis of tumor cells.

Key words gastric carcinoma; regulatory T cell; tumor-draining lymph node; lymphatic metastasis

试件中选取 24 枚 ,浸泡于 40 ℃、5 mmol/L HCl 水溶液中 24 h 后取出、去离子水冲洗 ,干燥。继而将经 NaOH 处理、NaOH-HCl 处理的试件放入电阻炉中 ,600 ℃ 条件下加热 1 h ,随炉自然冷却。制备好的试件称为碱热 (alkali-heat , AH) 组、碱酸热 (alkali-acid-heat , AAH) 组试件。

1.2.3 表面形貌及表面元素分析 各组试件中随机选取 3 枚试件 ,扫描电镜 (SEM) 观察试件表面形貌、X 射线能量色散谱仪 (EDS) 分析试件表面元素组成。

1.3 体外细胞学评价

1.3.1 细胞接种 常规培养小鼠骨髓间充质干细胞 待其铺展到 80% ~ 90% 时 ,终止培养 ,PBS 冲洗 ,胰酶消化 ,制备细胞悬液 ,按 4×10^4 个/ml、500 μ l/孔接种至试件表面 (经高压蒸汽灭菌) ,添加 500 μ l 完全培养基 ,继续培养。

1.3.2 细胞形态学观察 培养 24 h 后 ,随机从三组试件各选取 3 枚 ,PBS 漂洗、2.5% 戊二醛固定、酒精脱水、干燥、表面喷金 ,SEM 下观察各组试件表面的细胞形态。

1.3.3 CCK-8 检测 细胞接种后第 1、3、5 天各选取 3 枚试件 ,吸去培养基 ,PBS 漂洗 ,试件置于新的 24 孔板中 ,每孔加入 500 μ l 完全培养基、50 μ l CCK-8 37 ℃ 孵育 4 h ,待培养基变色 ,终止培养 ,每

孔吸 100 μ l 液体至 96 孔板中 ,酶标仪测定吸光度值 (波长为 450 nm) 。

1.3.4 碱性磷酸酶活性测定 细胞接种后第 3、5、7 天各选取 3 枚试件 ,去培养基 ,漂洗 ,每孔加入 300 μ l 浓度为 0.2% 的 Triton X-100 ,30 min 后取 10 μ l 细胞裂解液于新 24 孔板 ,分别加入 100 μ l 基质液、100 μ l 缓冲液 ,混匀 ,37 ℃ 水浴 15 min 后 ,加入 300 μ l 显色液摇匀 ,每孔吸 100 μ l 液体至 96 孔板中 ,酶标仪测定吸光度值 (波长为 490 nm) 。

1.4 统计学处理 运用 SPSS 10.0 统计软件进行分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ;对同一时点数据采用单因素方差分析 ,组间比较采用 SNK 检验 ,检验水准双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 表面微观形貌 SEM 显示 :PT 组试件表面有砂纸打磨后留下的划痕 ;AH 组试件表面有纳米网状结构形成 ;AAH 组试件表面仍有纳米网状结构存在 ,且表面结构较 AH 组相比未见明显改变。见图 1。

2.2 表面元素分析 EDS 显示 :PT 组试件表面存在钛和硅元素 ;AH 组试件表面元素有钛、硅、钠和氧存在 ;AAH 组试件表面元素有钛、硅、氧 ,无钠元素存在。见图 2。

2.3 体外细胞学评价

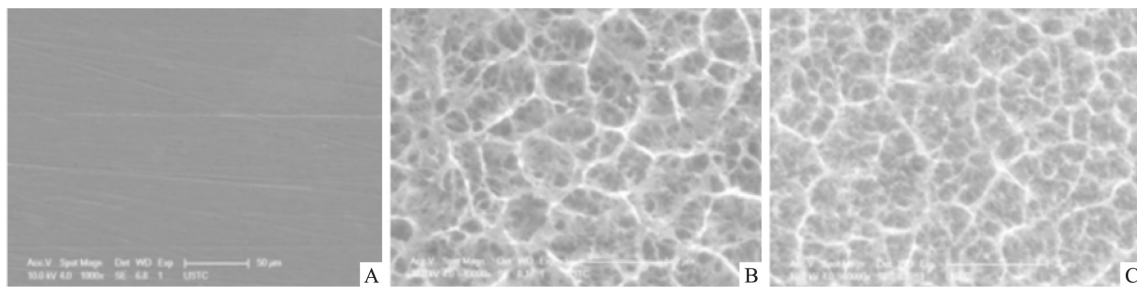


图 1 三组试件在 SEM 下表面微观形貌图

A:PT 组 $\times 1\ 000$;B:AH 组 $\times 40\ 000$;C:AAH 组 $\times 40\ 000$

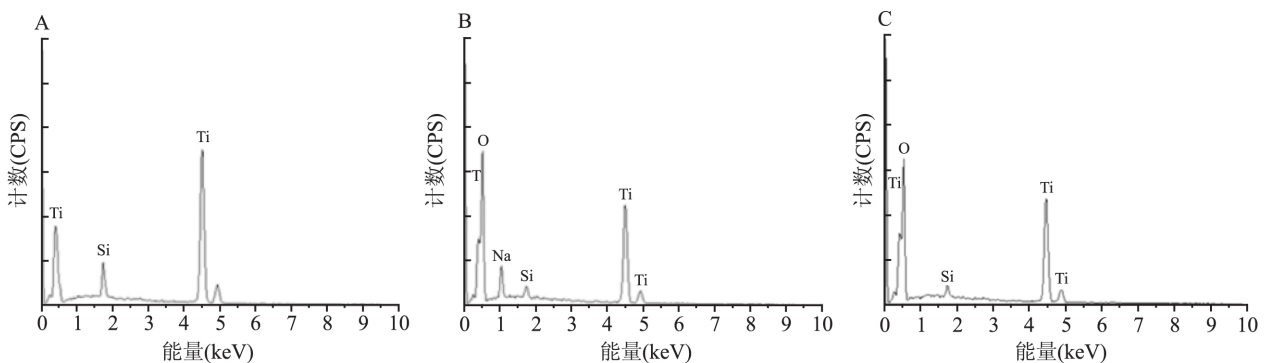


图 2 三组试件表面能谱图

A:PT 组 ;B:AH 组 ;C:AAH 组

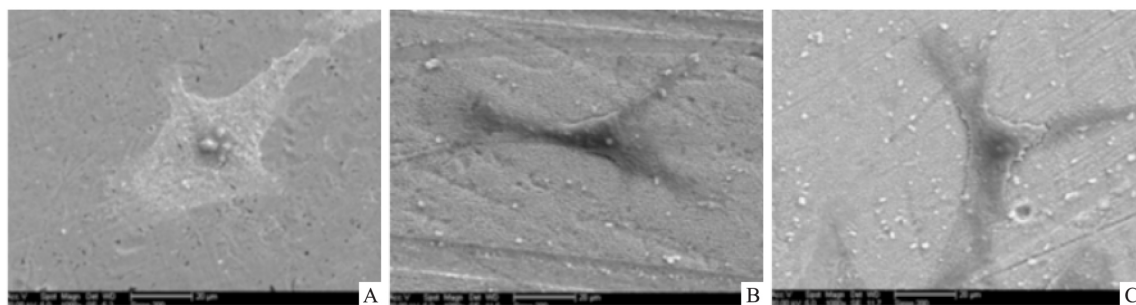


图3 三组试件表面生长 24 h 的骨髓间充质干细胞在 SEM 下的形态

A:PT 组 $\times 1\ 000$; B:AH 组 $\times 1\ 000$; C:AAH 组 $\times 1\ 000$ 表1 不同时间点 3 组试件细胞增殖活性的比较 ($n=27 \bar{x} \pm s$)

组别	PT 组	AH 组	AAH 组	F 值	P 值
第 1 天	0.235 8 \pm 0.006 5	0.239 3 \pm 0.011 2	0.242 5 \pm 0.011 4	1.677	0.199
第 3 天	0.396 6 \pm 0.017 7	0.439 5 \pm 0.013 0	0.460 9 \pm 0.016 7	63.303	0.000
第 5 天	0.667 7 \pm 0.022 1	0.818 7 \pm 0.016 7	0.851 7 \pm 0.014 9	436.514	0.000

表2 不同时间点 3 组试件细胞碱性磷酸酶活性的比较 ($n=27 \bar{x} \pm s$)

组别	PT 组	AH 组	AAH 组	F 值	P 值
第 3 天	0.049 7 \pm 0.000 5	0.050 2 \pm 0.000 9	0.050 4 \pm 0.000 9	2.156	0.132
第 5 天	0.069 5 \pm 0.001 3	0.073 7 \pm 0.001 0	0.074 1 \pm 0.001 3	50.288	0.000
第 7 天	0.089 2 \pm 0.001 5	0.093 4 \pm 0.002 1	0.095 9 \pm 0.001 7	43.713	0.000

2.3.1 形态学评价 PT 组细胞伪足少且伸展较局限,未呈现间充质干细胞的长梭状形态;AH 组试件表面细胞伸展呈长梭形,有伪足伸入网状结构内;AAH 组试件表面细胞伸展面积较 AH 组面积大,且细胞胞体周围伸出的细小触角也较多。见图 3。

2.3.2 CCK-8 检测 细胞接种后,细胞增殖活性均有增长的趋势。细胞接种第 3、5 天, AH、AAH 组细胞增殖活性与 PT 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AAH 组细胞增殖活性与 PT 组和 AH 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.3.3 细胞碱性磷酸酶活性检测 细胞接种后,细胞碱性磷酸酶活性均有增加的趋势。细胞接种第 5、7 天, AH、AAH 组细胞碱性磷酸酶活性与 PT 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞接种第 7 天, AAH 组细胞碱性磷酸酶活性与 PT 组和 AH 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

3 讨论

钛表面的纳米改性能改变种植体表面的微观形貌和化学组成,使其表面具有直接影响周围分子和细胞活动的的能力,如通过整合素调节细胞的信号传导,影响蛋白质的吸附、细胞的增殖和分化,以达到

最终调控成骨细胞对种植体表面的整体反应、促进种植体周围的骨形成^[2]。

碱热处理是钛表面纳米级生物功能化改性处理的方式之一,能在钛表面形成具有生物活性的钛酸钠层,具有制备方法简单,所形成的生物活性层薄且均匀,不会改变种植体表面螺纹和多孔结构的优势。骨组织能通过钛酸钠生物活性层与钛表面发生骨结合,且此生物活性层与钛表面结合强度高,有足够的强度耐受负载。

碱热处理的钛表面在体内外研究中均能表现出很高的生物活性,但在高湿环境下其表面磷灰石形成能力不稳定,且钛酸钠生物活性层中的钠元素可能对成骨有副作用^[3]。稀酸处理不仅能去除生物活性层中的钠元素,还能在碱处理后的表面继续形成细小的纳米级微孔。通过在钛表面利用稀酸进行脱钠处理,能够进一步提高钛表面的生物活性,且表面磷灰石的形成能力在高湿环境下也更为稳定。脱钠处理是通过将碱处理所形成的钛酸钠水凝胶结构经酸处理转变为二氧化钛的水凝胶结构,后续的加热处理能使二氧化钛的水凝胶结构脱水变为致密的二氧化钛凝胶结构(锐钛矿型为主)。纳米级二氧化钛结构中锐钛矿型是三种晶型(无定形、锐钛矿

型、金红石型)中最有利于细胞生长的晶型。其原因与锐钛矿的晶型与诱导形成的 HA 晶型匹配有关,也与所诱导形成的纳米级 HA 呈针状、能与骨内针状的纳米 HA 相匹配^[4-5]有关。因此,经脱钠处理后在钛表面形成的纳米级锐钛矿型结构能有效地诱导磷灰石成核。

近年的研究^[3]提出,经脱钠处理的钛表面具有生物活性,能诱导表面磷灰石的形成,其形成机制可能与生物活性中二氧化钛的静电吸引作用有关。其研究指出,钛表面经适宜浓度酸处理后,其表面会有酸性基团吸附,且所吸附的酸性基团在高温高湿环境下仍能存在,所以经过酸处理的钛表面仍具有很高的诱导磷灰石形成能力。酸性基团的释放能使周围体液变成酸性环境,二氧化钛在酸性环境下表面 Ti-OH 基团会带有正电荷^[6],其表面正电荷量与酸浓度成正比,酸的浓度越高,其表面正电荷的量越多^[7]。带有正电荷的钛表面,会首先吸附带负电荷的磷酸盐离子,随着磷酸盐离子在钛表面的浓聚,其表面会带有负电荷,继而选择性的吸附带正电荷的钙离子形成磷酸钙,钛表面所形成的磷酸钙最终将转变为稳定的磷灰石结构^[8]。

本实验通过碱热处理能在钛表面构建含钠元素的纳米网状结构,稀酸处理能脱除碱热处理钛表面的钠元素,且不会明显改变碱热处理在表面所形成的网状结构。实验结果表明形成的纳米网状活性层有利于细胞的黏附和伸展,脱钠后的生物活性层能进一步促进间充质干细胞的增殖和分化。对于脱钠生物活性层促进磷灰石沉积、细胞的黏附和伸展的

机制以及对生物体内骨结合的影响等还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Amin Yavari S, van der Stok J, Chai Y C, et al. Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(24): 6172-81.
- [2] Zhuang X M, Zhou B, Ouyang J L, et al. Enhanced MC3T3-E1 preosteoblast response and bone formation on the addition of nano-needle and nano-porous features to microtopographical titanium surfaces [J]. *Biomed Mater* 2014, 9(4): 045001.
- [3] Yamaguchi S, Takadama H, Matsushita T, et al. Preparation of bioactive Ti-45Zr-4Nb-4Ta alloy from HCl and heat treatments after a NaOH treatment [J]. *J Biomed Mater Res A* 2011, 97(2): 135-44.
- [4] Xing H, Komasa S, Taguchi Y, et al. Osteogenic activity of titanium surfaces with nanonetwork structures [J]. *Int J Nanomedicine* 2014, 9: 1741-55.
- [5] Jimbo R, Coelho P G, Bryington M, et al. Nano hydroxyapatite-coated implants improve bone nanomechanical properties [J]. *J Dent Res* 2012, 91(12): 1172-7.
- [6] Pattanayak D K, Yamaguchi S, Matsushita T, et al. Apatite-forming ability of titanium in terms of pH of the exposed solution [J]. *J R Soc Interface* 2012, 9(74): 2145-55.
- [7] Pattanayak D K, Yamaguchi S, Matsushita T, et al. Nanostructured positively charged bioactive TiO₂ layer formed on Ti metal by NaOH, acid and heat treatments [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(8): 1803-12.
- [8] Kokubo T, Yamaguchi S. Bioactive titanate layers formed on titanium and its alloys by simple chemical and heat treatments [J]. *Open Biomed Eng J* 2014, 9(Suppl 1-M2): 29-41.

Study of titanium surface by acid and heat treatments after alkali treatment *in vitro*

Liu Chun, Xia Rong, Sun Lei, et al

(Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract The nanoscale bioactive layer was fabricated on the surface of pure titanium by alkali, dilute acid and heat treatment. The surface morphology and elemental composition was analyzed by field emission scanning electron microscope and X-ray energy dispersive spectroscopy, respectively. Bone mesenchymal stem cells (BMSCs) and modified titanium specimen were co-cultured to evaluate the effect of modified bioactive layer on the biological activity of BMSCs. The result showed that fine nano-network structure was also generated on the surface by alkali-acid-heat treatment, sodium in the surface was removed by alkali-acid-heat treatment. The bioactive layer with a fine nano-network structure on the surface of pure titanium can show good biocompatibility.

Key words titania; nano-network structure; biological activity