

纯钛表面不同处理方法对成纤维细胞生长影响的研究

沈 彬,刘向辉,孙卫革,张 磊,程义成,叶长林

摘要 将钛片随机分成光滑组、双重酸蚀喷砂组、氢氟酸蚀喷砂组、微弧氧化组,分别进行不同表面处理。将小鼠成纤维细胞接种于不同钛片表面,MTT法检测成纤维细胞在不同钛片表面的黏附和增殖情况,并在培养24 h后利用扫描电子显微镜观察成纤维细胞在试件表面的铺展形态。结果显示细胞黏附情况存在差异($P < 0.05$),光滑组 < 氢氟酸蚀喷砂组 < 双重酸蚀喷砂组 < 微弧氧化组;细胞增殖测试中,微弧氧化组在各时间点都显著高于另外3组。相较于其他3种表面处理方法,成纤维细胞能够在经微弧氧化处理的试件表面更好地黏附、增殖。

关键词 纯钛;喷砂酸蚀;微弧氧化;成纤维细胞

中图分类号 R 782

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0775-04

种植体修复已经成为牙列缺失、缺损的常用修复方法。植入患者口内的种植体想要获得良好的稳定性,长期行使功能,不仅需要其与骨组织紧密整合,还要与软组织形成牢固的生物学封闭屏障。Puckett et al^[1]通过实验证明采用不同方法处理种植体表面会影响成纤维细胞的黏附、增殖。然而,目前国内的研究基本集中在钛种植体与骨组织的结合,与软组织结合的研究较少。该实验通过对纯钛进行不同的表面处理后进行成纤维细胞与材料的共培养,研究细胞在不同处理表面的生长情况,从而探讨更有利于与软组织结合的种植体表面形态。

1 材料与方法

1.1 实验材料和设备 纯钛棒(TA2,宝鸡和信泰金属有限公司);L-929小鼠成纤维细胞(南京凯基生物科技发展有限公司); β -甘油磷酸二钠盐五水(国药集团化学试剂有限公司);乙酸钙(南京凯基生物科技发展有限公司);优质胎牛血清(杭州四季

青生物工程材料有限公司);DMEM(美国Gibco公司);DMSO(美国Sigma公司);微弧氧化相关设备(西安理工大学自制);S-3400N II扫描电子显微镜(日本日立公司);超净工作台(SW-CJ-1FD,苏州净化设备有限公司);CO₂培养箱(日本SANYO公司);生物倒置显微镜(日本Olympus公司);台式低速离心机(中国上海医疗器械股份有限公司医疗设备厂);酶标仪(美国BioTek公司)。

1.2 方法

1.2.1 纯钛片的制备及分组 将纯钛棒线性切割成直径为10 mm,厚为1 mm的圆形钛片试件,在流水下用耐水砂纸逐级打磨至1200#后,打磨膏抛光,依次用丙酮、无水乙醇、去离子水超声清洗30 min后干燥备用。根据不同处理方法将纯钛片随机分为光滑组、双重酸蚀喷砂组(先在0.5 Mpa气压下将直径为200 μ m的Al₂O₃颗粒对钛片表面进行均匀的垂直喷射,距离钛片1 cm;喷砂后用去离子水超声清洗后浸入66% HNO₃与40% HF的混合液溶液中10 min,取出后去离子水清洗)、氢氟酸蚀喷砂组(喷砂方法与双重酸蚀喷砂组相同,试件喷砂后去离子水超声清洗后浸入质量百分比为0.5%的HF溶液中10 min,取出后去离子水清洗)、微弧氧化组(以纯钛为阳极,不锈钢锅为阴极,以0.04 mol/L β -甘油磷酸二钠盐五水和0.2 mol/L乙酸钙的去离子水溶液为电解液,采用脉冲直流电源进行微弧氧化处理。所有试件在制备完成后经过高温高压消毒备用。处理参数为:电压300 V,频率500 Hz,占空比12%,处理时间为3 min。处理好后的试件立刻用去离子水冲洗、吹干)。

1.2.2 试件表面形态观察 将不同处理表面的钛片置于扫描电子显微镜下观察表面形态。

1.3 成纤维细胞在不同处理表面生长情况

1.3.1 成纤维细胞在不同试件表面的黏附 将存有L-929小鼠成纤维细胞的冻存管从液氮罐中取出,立即放入37 $^{\circ}$ C恒温水浴箱中,快速晃动冻存管1~2 min后,取出冻存管,用吸管吸出细胞悬液,加入到含培养液的离心管中并以1 000 r/min离心5 min后弃上清液,调整细胞密度,接种于培养瓶中培养。成纤维细胞复苏后按1:3的比例进行传代,选

2015-02-19 接收

基金项目:2012年度南京军区医学科技创新课题项目面上A类(编号:12MA040)

作者单位:安徽医科大学解放军八一临床学院(中国人民解放军八一医院)口腔科,南京 210002

作者简介:沈 彬,男,硕士研究生;

刘向辉,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:njbylxh864234@sina.com

取快速生长期的第4代细胞,0.25%胰蛋白酶消化细胞系后制成 1.0×10^5 个/ml浓度的单细胞悬液。从4组中各取5片试件分别置于24孔培养板内,接种单细胞悬液,每孔200 μ l;加入DMEM培养液(含10%胎牛血清)2 ml,37 $^{\circ}$ C、95%湿度、5% CO₂条件下分别培养1、2、4 h 停止;PBS轻轻漂洗数次,然后每孔加入200 μ l MTT(5 mg/ml)和800 μ l的DMEM培养液置于37 $^{\circ}$ C条件下孵育4 h后,弃掉孔内上清液;加入1 ml的DMSO振荡10 min,取24孔培养板内液体按原顺序转移至96孔培养板内,酶标仪在490 nm光波长处测其光吸收值。计算各组吸光度均值,进行统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.3.2 成纤维细胞在不同试件表面的增殖效果

每组分别取5个试件分别置于24孔培养板内,取第4代成纤维细胞,制成 2.0×10^5 个/ml浓度的单细胞悬液,接种于试件表面,每孔200 μ l,加入DMEM培养液(含10%胎牛血清)2 ml,37 $^{\circ}$ C、95%湿度、5% CO₂条件下分别培养1、3、5 d 停止。用MTT法检测细胞吸光度值。具体方法同1.3.1。

1.3.3 成纤维细胞在不同试件表面的铺展 从4组中各取3片试件分别置于24孔培养板内,取第4代成纤维细胞,制成 4.0×10^5 个/ml浓度的单细胞悬液,接种于试件表面,每孔200 μ l;加入DMEM培养液(含10%胎牛血清)2 ml,37 $^{\circ}$ C、95%湿度、5% CO₂条件下培养24 h后取出。扫描电子显微镜观察各组试件表面细胞的铺展形态。

1.4 统计学处理 使用SPSS 20.0软件对数据进行单因素方差分析,SNK-q检验比较组间差异。

2 结果

2.1 扫描电子显微镜下观察各组表面形态 光滑组试件表面无明显凹陷;双重酸蚀喷砂组试件表面形成不规则的微孔结构,试件表面可见Al₂O₃颗粒,颗粒形态不规则;氢氟酸酸蚀喷砂组表面形成不规则浅凹坑,少量Al₂O₃颗粒嵌于表面之中,凹坑的边缘较锐利,坑壁不规则;微弧氧化组经微弧氧化处理后,表面形成多孔样结构,形成的孔隙孔径较均匀,向内凹陷,四周隆起,类似于“火山口”状。见图1。

2.2 MTT法检测细胞的黏附结果 细胞在培养1、2、4 h各时间点,经过表面处理的粗糙表面的吸光度大于光滑表面,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。粗糙表面的吸光度氢氟酸酸蚀喷砂组 < 双重酸蚀喷砂组 < 微弧氧化组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

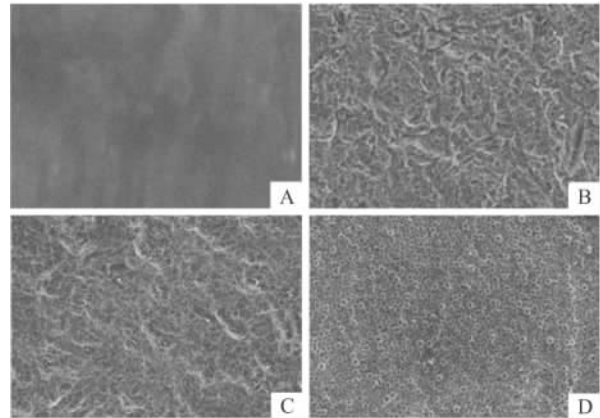


图1 各组试件表面扫描电镜照片

A:光滑组 $\times 50\ 000$;B:双重酸蚀喷砂组 $\times 500$;C:氢氟酸酸蚀喷砂组 $\times 500$;D:微弧氧化组 $\times 500$

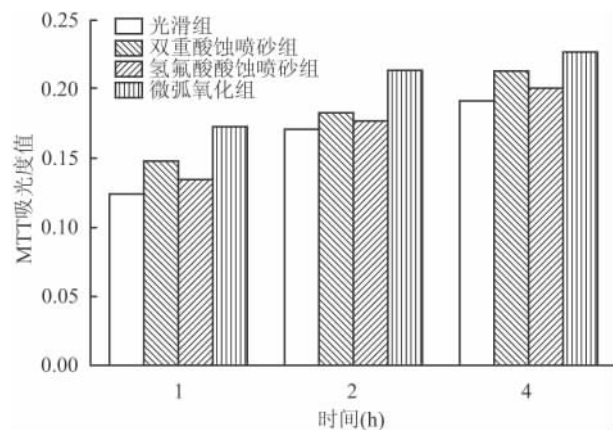


图2 成纤维细胞在各组试件表面黏附效果

2.3 MTT法检测细胞的增殖结果 细胞在培养1、3、5 d各时间点,经过表面处理的粗糙表面的吸光度大于光滑表面,微弧氧化组的吸光度最高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在1、3 d时间点吸光度氢氟酸酸蚀喷砂组 < 双重酸蚀喷砂组,差异有统计学意义($P < 0.05$);在5 d时,双重酸蚀喷砂组、氢氟酸酸蚀喷砂组的吸光度相似,差异无统计学意义。见图3。

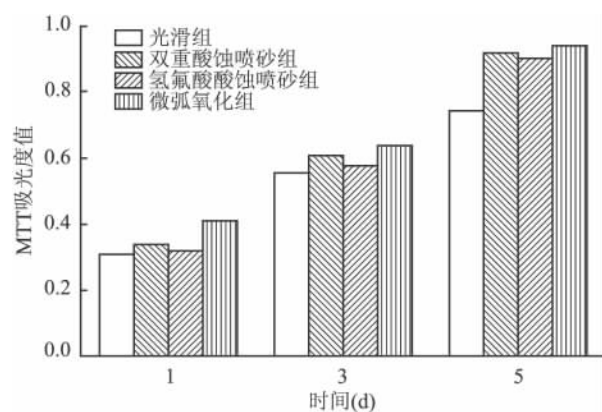


图3 成纤维细胞在各组试件表面增殖效果

2.4 各组试件表面成纤维细胞生长形态 光滑组试件表面成纤维细胞呈圆形或椭圆形,偶可见细胞伸出细小伪足;双重酸蚀喷砂组试件表面成纤维细胞呈圆形或椭圆形,胞体丰满,伸展良好,有较多伪足伸出,试件表面可见细胞外基质;氢氟酸酸蚀喷砂组试件表面细胞形态与双重酸蚀喷砂组相类似;微弧氧化组试件表面可见成纤维细胞胞体丰满,在试件表面良好铺展,细胞之间伸出大量伪足并相互融合,细胞伸出的伪足伸入试件表面的孔隙之中,“锚定”在试件表面,与试件紧密附着,试件表面存在大量细胞外基质。见图4。

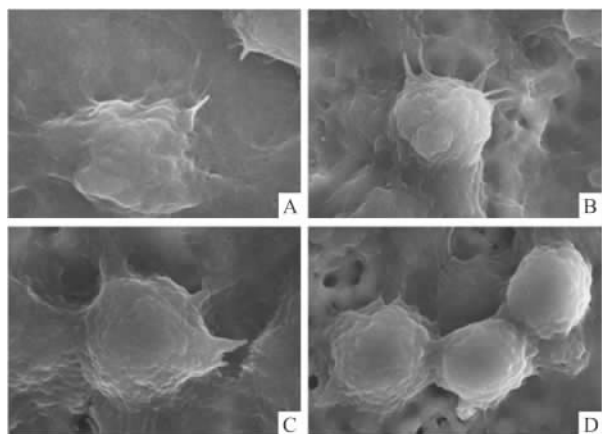


图4 各组试件表面成纤维细胞铺展形态

A:光滑组 $\times 5\ 000$;B:双重酸蚀喷砂组 $\times 5\ 000$;C:氢氟酸酸蚀喷砂组 $\times 5\ 000$;D:微弧氧化组 $\times 3\ 500$

3 讨论

随着技术的不断改进,目前纯钛种植体修复10年的成功率已达到98.5%^[2]。人们将研究的重点主要集中于如何提高纯钛种植体与骨组织之间的结合^[3],忽略了纯钛种植体与软组织结合的重要性。研究^[4]表明种植体与软组织结合形成良好的生物学封闭可以保证种植体获得长久的稳定性。如何促进种植体与软组织之间的结合,进一步提高种植修复的成功率已成为目前研究的热点之一。本实验通过比较纯钛表面不同处理方法对成纤维细胞生长的影响,探讨更利于软组织结合的表面处理方法。

本实验中表面处理采用喷砂酸蚀法和微弧氧化法,其中喷砂酸蚀表面已经成为使用最广泛的种植体表面。经过喷砂酸蚀处理过的种植体表面可有效促进成骨细胞的黏附与增殖^[5]。经过微弧氧化处理不仅可以获得均匀的氧化膜,而且形成的膜有更好的耐腐蚀性,与试件表面结合更紧密,不易脱落^[6]。研究^[7]表明微弧氧化有良好地生物相容性,

可以与骨组织形成良好地结合。

本实验通过MTT法检测显示微弧氧化较喷砂酸蚀更能促进成纤维细胞早期在试件表面黏附、增殖,从而利于软组织与种植体的结合。扫描电镜下观察,发现成纤维细胞在微弧氧化表面拥有更好的铺展形态。推测可能是由于一些不可控因素^[8]影响了喷砂酸蚀表面与细胞的结合。

微弧氧化技术不仅能够通过调整工艺参数、电解液的成分制备出具备不同特性的涂层,而且微弧氧化涂层自身所具备的多孔样结构可以为其他生物活性因子提供附着空间,使微弧氧化表面具备新的功能。已有学者^[9]将抗菌剂卤代咪喃酮化合物嵌于微弧氧化的微孔中来预防种植体可能出现的相关感染,促进种植体与软组织的结合。此外微弧氧化技术所需操作设备成本较低、操作方法简单、制备效率高,可以同时制备多个试件,适合商业化大规模生产。这使经微弧氧化处理的种植体应用于临床成为了可能。当然负荷、冠修复、感染及全身状况等因素都会影响种植体与软组织形成良好结合,只有临床医师综合考虑各方面因素才能有效提高使种植体的成功率及长期使用率。

参考文献

- [1] Puckett S D, Lee P P, Ciombor D M, et al. Nanotextured titanium surfaces for enhancing skin growth on transcutaneous osseointegrated devices[J]. *Acta Biomater* 2010, 6(6):2352-62.
- [2] Mangano F G, Shibli J A, Sammons R L, et al. Short (8-mm) locking-taper implants supporting single crowns in posterior region: a prospective clinical study with 1-to 10-years of follow-up[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2014, 25(8):933-40.
- [3] 孙敏, 唐旭炎, 吴占傲, 等. 钛酸钙涂覆的纯钛片对成骨细胞生长的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(11):1324-05.
- [4] Inubushi T, Tanaka E, Rego E B, et al. Effects of ultrasound on the proliferation and differentiation of cementoblast lineage cells[J]. *J Periodontol* 2008, 79(10):1984-90.
- [5] 贾彦, 邓嘉胤. 钛种植体表面改性的研究现状及应用进展[J]. *中国组织工程研究与临床康复* 2009, 13(12):2321-4.
- [6] 马臣, 王颖慧, 曲立杰, 等. 钛合金微弧氧化技术的研究现状及展望[J]. *中国陶瓷工业* 2007, 14(1):46-9.
- [7] Wu J, Liu Z M, Zhao X H, et al. Improved biological performance of microarc-oxidized low-modulus Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn alloy[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010, 92(2):298-306.
- [8] Martin D C, O'Ryan F S, Indresano A T, et al. Characteristics of implant failures in patients with a history of oral bisphosphonate therapy[J]. *J Oral Maxillofac Surg* 2010, 68(3):508-14.
- [9] Cheng Y, Wu J, Gao B, et al. Fabrication and *in vitro* release behavior of a novel antibacterial coating containing halogenated furanone-loaded poly(L-lactic acid) nanoparticles on microarc-oxidized titanium[J]. *Inter J Nanomed* 2012(7):5641-52.

不同活度¹²⁵I 粒子植入治疗兔 VX2 肝癌的研究

王伟昱¹ 秦汉林¹ 朱先海¹ 谢 韬¹ 周 磊¹ 施长杲¹ 高 斌²

摘要 目的 观察并比较不同活度¹²⁵I 粒子组织间植入对肝癌的抑瘤作用及对机体的损伤。方法 从 36 只新西兰大白兔制成的 VX2 肝癌模型中选取 24 只,随机均等分为 3 组,分别植入活度为 0、25.9、37.0 MBq 的¹²⁵I 粒子。分别检测瘤兔体重、肿瘤体积、血常规、肝肾功能变化,术后 5 周处死实验兔,观察移植瘤病理改变。结果 两治疗组瘤兔体重减轻及肿瘤体积增加均较对照组慢($P < 0.05$),其中 37.0 MBq 组的肿瘤体积增加量较 25.9 MBq 组小($P < 0.05$);两治疗组白细胞(WBC)值先升后降,各组治疗前后红细胞(RBC)及血红蛋白(Hb)无明显变化;2 周时两治疗组瘤兔谷丙转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST)明显降低($P < 0.05$);4 周时 37.0 MBq 组较 25.9 MBq¹²⁵I 数值下降更明显($P < 0.05$);两治疗组肿瘤坏死增加,37.0 MBq 组坏死更加明显。结论 不同活度¹²⁵I 粒子植入均可抑制肿瘤的生长,促使肿瘤细胞坏死;¹²⁵I 粒子植入对机体损伤小;37.0 MBq¹²⁵I 粒子组作用优于 25.9 MBq¹²⁵I 粒子组。

关键词 ¹²⁵I 粒子;VX2 肝癌;不同活度;抑瘤;辐射损伤
中图分类号 R 735.7
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0778-04

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是目前治疗中晚期原发性肝癌的主要手段,但 TACE 有不完全栓塞及肿瘤侧枝循环易形成的特点,远期疗效不满意,对原发性肝癌采用不同手段联合治疗是当前治疗肝癌的热点之一^[1]。该研究以动物实验的方法探讨不同活度¹²⁵I 粒子组织间植入治疗兔 VX2 肝癌的疗效,对瘤周正常组织及机体的损伤情况,为¹²⁵I 粒子组织间植入治疗原发性肝癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 兔 VX2 肝癌模型的制作 选取健康成年新西兰大白兔 36 只,2~3(2.50±0.32) kg,由安徽医科大学实验动物中心提供。采用 VX2 肝癌细胞株进行细胞培养,收集细胞混悬液注射到新西兰大白兔双侧后肢皮下,建立荷瘤动物移植瘤种兔模型。2 周后将荷瘤种兔处死,取出肿瘤灶,选取肿瘤组织有

2015-03-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81071240)

作者单位:¹安徽省肿瘤医院肿瘤介入科,合肥 230001

²安徽医科大学第三附属医院,合肥 230061

作者简介:王伟昱,男,博士,硕士生导师,副主任医师;

高斌,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: gaobinrm@hotmail.com

The study of the influence of the different pure titanium surface treatment on the growth of fibroblast

Shen Bin, Liu Xianghui, Sun Weige, et al

(Dept of Stomatology, College of Clinical Medical, Anhui Medical University, PLA 81st Hospital, Nanjing 210002)

Abstract Titanium plates were randomly divided into four groups, each with different surface treatments (smooth group, double acid corrosion sandblasting group, HF acid etching sandblasting group, microarc oxidation group). Mouse fibroblast cells were inoculated on different groups of titanium plates and tested by MTT to detect cells' adhesion and proliferation. Cells were cultured for 24h and observed on the surface of plates by scanning electron microscope. The comparison between the rates of fibroblasts' adhesion was smooth group < HF acid etching sandblasting group < double acid corrosion sandblasting group < microarc oxidation group ($P < 0.05$). Fibroblasts' proliferation was higher than on microarc oxidation group than those on the other three groups. Compared with the other three kinds of surface treatment, fibroblasts can be on the specimen surface treated by microarc oxidation better adhesion and proliferation.

Key words pure titanium; sandblasting and acid etching; microarc oxidation; fibroblasts