

[文章编号] 1000-1182(2007)06-0529-03

粗化处理对新型骨植入钛合金的生物相容性影响

魏艳萍¹, 张玉梅¹, 赵彦涛¹, 于振涛², 许智轩³

(1.第四军医大学口腔医院 修复科, 陕西 西安 710032;

2.西北有色金属研究院 生物材料中心, 陕西 西安 710016; 3.黄山市532医院 口腔科, 安徽 黄山 245000)

[摘要] 目的 研究国内新研制的骨植入钛合金TZS进行喷砂并酸蚀处理对成骨细胞生物学行为的影响。方法 采用SD大鼠体外原代培养方法培养成骨细胞,并将细胞分别接种于新型钛合金(光滑表面)及表面处理的材料表面,建立体外共同培养模型。采用MTT比色法检测第3天成骨细胞的增殖率,扫描电镜(SEM)观察细胞形态学变化,培养第5天进行细胞碱性磷酸酶功能活性检测。结果 喷砂与酸蚀处理组表面的成骨细胞,在3 d时的细胞增殖率与光滑组比较有统计学差异($P<0.05$);5 d时的处理组碱性磷酸酶活性检测值与光滑组比较无统计学差异($P>0.05$);SEM观察成骨细胞在喷砂与酸蚀组表面具有典型形态特征,伸展良好,具有丰富的板状、丝状伪足,优于光滑组。结论 喷砂并酸蚀处理的新型钛合金在体外实验表现为不同程度的促进成骨细胞增殖及功能活性表达。

[关键词] 钛合金; 喷砂; 酸蚀; 成骨细胞; 生物相容性

[中图分类号] R783.1 [文献标识码] A

Studying the biocompatibility of implant titanium alloy after surface treatment by sandblasting and etching
WEI Yan-ping¹, ZHANG Yu-mei¹, ZHAO Yan-tao¹, YU Zhen-tao², XU Zhi-xuan³.(1. Dept. of Prosthodontics, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 2. Biology and Material Center, Northwest Institute for Nonferrous Metal Research, Xi an 710016, China; 3. Dept. of Stomatology, 532 Hospital, Huangshan 245000, China)

[Abstract] Objective The aim of this study was to investigate the in vitro effect of cell behavior on a new titanium alloy and coarsening surface with sandblasting and duplicate treated by sandblasting and acid etching (SLA), including cell proliferation, morphology as well as alkaline phosphatase expression. Methods The cell derived from calvarial bone of neonate and co-cultured with the surface treated titanium alloys in vitro. The samples were treated by mechanical polishing, the sandblasting and the SLA. Cell proliferation on samples for 3 d was examined by MTT assay and cell morphology was observed by scan electron microscope. Alkaline phosphatase activity was measured at 5 d by ALP-special assay. Results The sandblasting and the SLA surface showed a significant different to smooth surface in the proliferation osteoblasts. The cells were elongated and spread well and having plentiful filopods on the coarse surface. The basal ALP activity indicated that optical density value of osteoblasts was not significant difference between coarse surface and smooth surface. Conclusion The observed effects are attributed to coarsening surface and support the concept that roughness can enhance the differentiation, good morphology and alkaline phosphatase expression of the cells. These results suggest that the good biological performance evaluation of sandblasting and etching surface is merited.

[Key words] titanium alloy; sandblasting; etching; osteoblasts; biocompatibility

骨内植入材料中,钛及钛合金具有良好的骨生物相容性及耐腐蚀性能,且能与骨组织最终形成材料与骨结合。种植体与骨组织整合过程会受到材料的物理、化学、形状等因素干扰,以及骀力加载、

种植外科技术和患者余留骨组织等条件的影响^[1]。牙种植体的表面特性可影响种植体植入后的生物学反应,对种植体的功能十分重要^[2]。传统光滑表面钛及钛合金种植体植入骨内后需3~4个月组织愈合期,且结合力较弱,而表面粗化的钛种植体能够获得更快的骨整合、更大的骨结合面积和更强的抗剪切能力。本课题组依据医用骨内种植体生物及力学相容性好的原则开发了新型钛合金骨植入体材料,

[收稿日期] 2006-11-17; [修回日期] 2007-01-05

[基金项目] 国家“863”计划资助项目 2002AA326070)

[作者简介] 魏艳萍(1975-),女,兰州人,硕士

[通讯作者] 张玉梅, Tel: 029-84776126

前期研究^[3-4]检测了其生物力学和生物安全性，本研究进一步对其进行表面粗化处理，观察处理后材料表面的形貌改变对成骨细胞相容性的影响。

1 材料和方法

1.1 试样的制备

将新型研制钛合金TZ6 (西北有色金属研究院提供)制备成直径14.5 mm、厚度1.0 mm的圆片，依次用400、800号碳化硅砂纸进行表面抛光处理。喷砂组采用600 μm棕刚玉颗粒在压力8 kPa条件下进行处理；酸蚀组在喷砂处理的基础上，采用HCl (体积分数18%)和H₂SO₄ (体积分数48%)在55℃条件下与材料反应1 min；未作粗化处理的光滑组作为对照。所有试样依次在丙酮、无水乙醇、双蒸水中进行超声清洗。细胞培养前采用高温高压法消毒试样。

1.2 试样表面形貌观察

采用JSM-840电子扫描显微镜 (scanning electron microscope, SEM) (Jeol公司, 日本)观察喷砂组、酸蚀组及光滑组材料表面的形貌。

1.3 成骨细胞培养

采用细胞原代培养技术，取SD大鼠颅盖骨组织，分离成骨细胞并培养进行细胞实验。细胞培养液为质量浓度为450 g/L基本培养基DMEM (Gibco公司, 美国)、磷酸盐缓冲液、浓度2 mmol/L L-谷氨酰胺、体积分数为50 mL/L的胎牛血清和抗生素 (质量浓度为50 μg/mL的链霉素和50万 U/mL青霉素)。成骨细胞原代培养至第7天，在倒置相差显微镜下观察，成骨细胞呈梭形或三角形，并伸出数量不等、长短不一、形态各异突起，呈集落化生长趋势。

1.4 成骨细胞与材料共同培养后MTT活性检测

将喷砂、酸蚀、光滑组试样放入24孔培养板内，组织盖玻片作为对照。细胞接种密度为1 × 10⁴个/孔，4个平行试样，72 h后加入质量浓度为5 mg/L MTT溶液80 μL/孔，37℃继续孵育4 h，终止培养，加入DMSO 600 μL，振荡10 min，将100 μL移入96孔板，用酶联免疫仪在490 nm处测吸光度值。

1.5 成骨细胞与材料共同培养后形态学观察

成骨细胞接种方法同上，各组试样及对照组体外共同培养72 h后，弃上清液，终止培养，加质量浓度为3 g/L戊二醛1 mL/孔4℃固定，进行样品制备，SEM下观察试样上的成骨细胞形态。

1.6 成骨细胞与材料共同培养后碱性磷酸酶活性的检测

接种方法及细胞数量同步骤1.4，细胞培养5 d后终止培养，PBS清洗3次，加入质量浓度为3 g/L triton-X100 400 μL，4℃过夜。加入150 μL碱性磷

酸酶底物液，37℃孵育40 min，加50 μL浓度1 mol/L NaOH终止反应。将100 μL移入96孔板用酶联免疫仪在410 nm处测吸光度值。

1.7 统计方法

用SPSS 10.0统计分析软件对第3天细胞增殖实验和第5天细胞碱性磷酸酶活性检测结果进行统计分析，P<0.05表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 试样表面形貌

光滑组材料表面仅有砂纸打磨痕迹 (图1)。喷砂及酸蚀组表面在放大500倍时具有相似的形貌；而放大3 000倍可以观察到细微不同。酸蚀组与喷砂组相比较，酸蚀组表面粗糙，边缘较圆钝，蜂窝状孔隙的直径较均匀且清晰 (图2、3)。

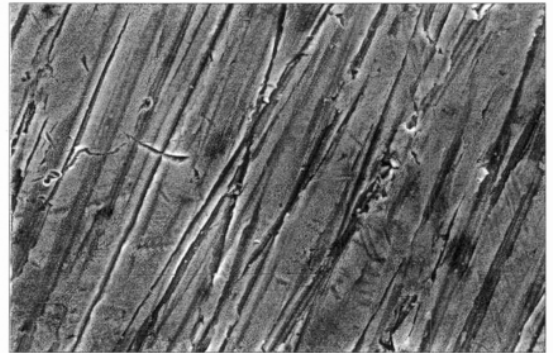


图1 光滑组试样表面形貌 扫描电镜 ×500
Fig 1 Original magnification of smooth group SEM ×500

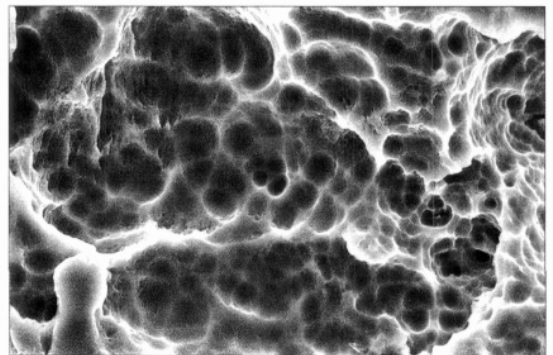


图2 喷砂组试样表面形貌 扫描电镜 ×3 000
Fig 2 Original magnification of blasting group SEM ×3 000

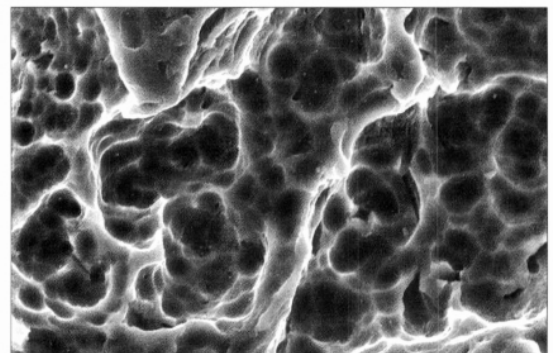


图3 酸蚀组试样表面形貌 扫描电镜 ×3 000
Fig 3 Original magnification of etching group SEM ×3 000

2.2 成骨细胞与材料共同培养后的增殖

成骨细胞在各组材料表面培养3 d后的吸光度值经统计学分析表明, 喷砂组(0.422)与酸蚀组(0.426)之间无显著性差异; 而前两者与光滑组(0.396)之间均有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 成骨细胞与材料共同培养后的形态

成骨细胞在喷砂、酸蚀组与光滑组材料表面均紧密贴附, 光滑组表面细胞伸长为梭型, 沿材料表面的磨痕方向排列伸展(图4); 在喷砂及酸蚀组表面, 成骨细胞不仅伸展良好并有板层伪足及丝状伪足突起, 细胞核微微隆起, 胞体丰满, 富有分泌颗粒; 且在材料表面有较多沉淀物及细胞外基质(图5、6)。

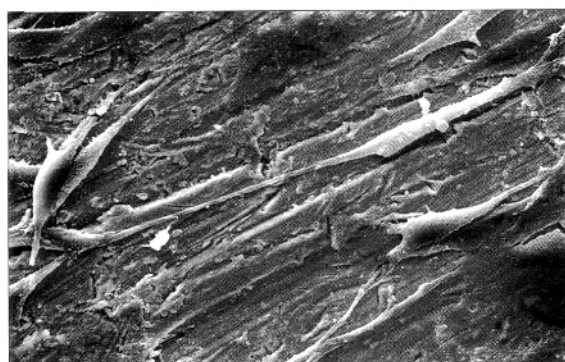


图4 成骨细胞在光滑组表面的附着形态 扫描电镜 $\times 500$
Fig 4 Morphology of osteoblasts on smooth group SEM $\times 500$

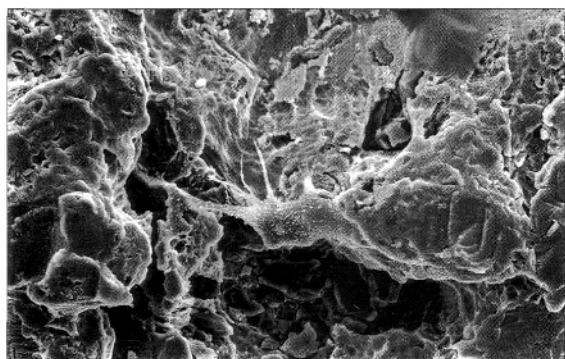


图5 成骨细胞在喷砂组表面的附着形态 扫描电镜 $\times 500$
Fig 5 Morphology of osteoblasts on blasting group SEM $\times 500$

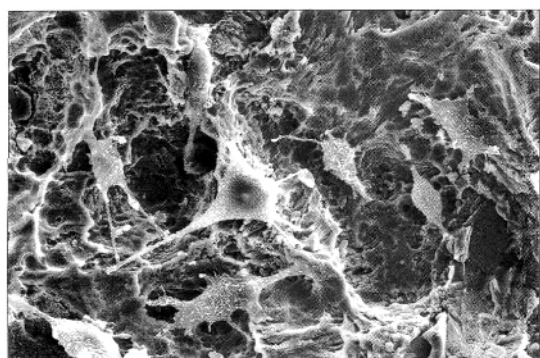


图6 成骨细胞在酸蚀组表面的附着形态 扫描电镜 $\times 500$
Fig 6 Morphology of osteoblasts on etching group SEM $\times 500$

2.4 成骨细胞与材料共同培养后碱性磷酸酶表达

成骨细胞在试样表面生长5 d后, 碱性磷酸酶的吸光度值分别为光滑组0.907、喷砂组1.074、酸蚀组1.200, 碱性磷酸酶表达依次增强, 但统计学分析显示, 各组间无显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

新型钛合金TZS在组成上用Mo、Zr替代V、Al等有毒元素, 提高了生物安全性, 降低了细胞毒性^[6]。同时TZS的弹性模量为58-84 GPa, 较纯钛(106.4 GPa)及钛合金Ti6Al4V(101 GPa)更接近骨组织, 综合性能更优, 更适合临床对骨植入体材料的要求^[9]。成骨细胞作为骨组织的主要功能细胞, 承担着骨的修复和改建功能, 它在骨植入材料表面的形态及功能变化, 可客观反映该替代材料的细胞相容性。比较建系细胞与原代培养方法, 虽然原代细胞培养由于取材组织与物种来源不同对细胞生物学行为会有一定影响, 但不会影响到实验结果; 而建系细胞很大程度丢失了成骨特征能力^[9], 因此本研究采用成骨细胞为原代培养获得, 以便为体内实验提供相关实验参数。

本研究在新合金生物安全性实验和力学性能测试的基础上^[3-4], 采用成骨细胞与钛合金TZS粗化处理表面体外共同培养, 对其进行细胞生物相容性评价。扫描电镜显示材料表面粗化处理后, 喷砂组较酸蚀组边缘锐利, 这可能会影响细胞张力丝的形成进而干扰细胞早期附着^[6]。MTT活性实验、碱性磷酸酶检测结果显示, 细胞3 d增殖率在喷砂、酸蚀组分别与光滑组有显著性差异, 喷砂与酸蚀组之间未见明显差别, 说明钛合金表面粗化能够提高细胞增殖率。碱性磷酸酶活性在各组之间无明显差异。成骨细胞与材料共同培养后扫描电镜显示细胞形态: 钛合金粗化处理后, 其表面细胞不仅伸展良好且细胞膜表面有大量分泌小泡突起, 与光滑组相比细胞质更加丰满。以上结果的得出可能有以下几点原因: 首先, 材料表面粗化处理后, 细胞才有可能伸入其空隙产生机械嵌合而增强细胞附着作用。其次, 喷砂、酸蚀处理使得钛合金表面面貌发生改变, 粗糙使材料表面积增大, 获得细胞与材料良好界面关系。再者, 粗糙面影响血液液体动力, 有利于细胞、氨基酸、蛋白质、多种离子的吸附, 提供组织细胞生长条件^[7]。这些都利于细胞有丝分裂、增殖, 合成大量细胞外基质, 最终利于细胞分化及功能表达, 获得良好、稳定合金-组织界面。

没有发现有龋组菌斑中钙、磷、氟质量分数与dmfs相关。这是否是乳牙列特有的表现,尚需证实。

菌斑和食物中蔗糖与龋病的发生密切相关,频繁进食甜食是造成婴幼儿龋的主要危险因素^[6],菌斑中的致病菌代谢糖产生有机酸,pH值下降,菌斑中钙、磷、氟质量分数也会发生变化。但是有关摄食糖后菌斑中钙、磷、氟质量分数的变化尚有争议。研究^[9-10]证实,频繁摄食蔗糖会减少菌斑矿物质含量,使其缓冲力下降,增加菌斑的致龋性。S-ECC组儿童进食甜食频率远高于CF组,两组菌斑中无机成分也应存在差异,但是本实验S-ECC组儿童菌斑固相中的无机成分与CF组无统计学差异。也许是菌斑液无机成分含量存在差异,尚需证实。本研究将菌斑固相中钙、磷、氟质量分数与问卷中进食甜食、甜饮料的次数进行了相关性分析,也未发现这些变量间的相关性关系。研究中S-ECC组高频率摄糖的人数远超过CF组,但这只是反映了S-ECC组儿童长期的饮食习惯。由于S-ECC组儿童均为儿童口腔科门诊就诊的患儿,家长此时已发现孩子口腔内的龋齿情况严重,是否在近日已对孩子饮食中的糖加以了限制,并未做详尽地统计;本研究所收集的菌斑是否能全面反映出高频率摄食糖后的菌斑特点,还不十分确切。因此,有关乳牙菌斑中无机成分在进食糖后的变化,还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Dong YM, Pearce EI, Yue L, et al. Plaque pH and associated parameters in relation to caries[J]. *Caries Res*, 1999, 33(6): 428-436.
- [2] 周学东. 口腔生物化学[M]. 成都: 四川大学出版社, 2002: 91-

(上接第531页)

[参考文献]

- [1] Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: A 5-year analysis[J]. *J Periodontol*, 1991, 62(1): 2-4.
- [2] 李秉琦. 口腔黏膜病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 65.
Li Bing-qi. Diseases of oral mucosa[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 65.
- [3] 于振涛, 周廉, 王克光. 生物医用型钛合金的设计与开发[J]. 稀有金属快报, 2004, 28(1): 5-10.
YU Zhen-tao, ZHOU Lian, WANG Ke-guang. Design and development of biomedical -titanium alloy[J]. *Rare Metal Letters*, 2004, 28(1): 5-10.
- [4] 许智轩, 张玉梅, 王忠义, 等. 医用新型钛合金的口腔刺激实验[J]. 稀有金属材料与工程, 2006, 36(1): 110-113.
XU Zhi-xuan, ZHANG Yu-mei, WANG Zhong-yi, et al. Oral mucous membrane irritation tests of new type titanium alloy in

93.

- ZHOU Xue-dong. Oral biological chemistry[M]. Chengdu: Sichuan University Publishing House, 2002: 91-93.
- [3] Ashley FP. Relationship of diet, saliva, plaque and caries[J]. *J Dent Res*, 1972, 51(5): 1234.
 - [4] Agus HM, Un PS, Cooper MH, et al. Ionized and bound fluoride in resting and fermenting dental plaque and individual human caries experience[J]. *Arch Oral Biol*, 1980, 26(8/9): 517-522.
 - [5] Pearce EI, Dong YM, Yue L, et al. Plaque minerals in the prediction of caries activity[J]. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2002, 30(1): 61-69.
 - [6] Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure[J]. *J Dent Res*, 1992, 71(11): 1776-1784.
 - [7] Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, et al. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition[J]. *Caries Res*, 2002, 36(5): 347-352.
 - [8] 李少敏, 邹静, 徐庆鸿, 等. 成都市学龄前儿童患龋因素分析[J]. 华西口腔医学杂志, 1998, 16(4): 3-4.
LI Shao-min, ZOU Jing, XU Qing-hong et al. Analysis of factors for caries of pre-school children in Chengdu area[J]. *West China J Stomatol*, 1998, 16(4): 3-4.
 - [9] 行勇军, 刘鲁川, 韩旭, 等. 频繁摄食蔗糖对口腔牙菌斑钙、磷、氟储库和龋病相关性的研究[J]. 口腔医学研究, 2005, 21(1): 23-26.
XING Yong-jun, LIU Lu-chuan, HAN Xu, et al. The relationship between the mineral content of dental plaque formed in the frequent sucrose exposure and enamel demineralization in 7-days[J]. *J Oral Sci Res*, 2005, 21(1): 23-26.
 - [10] Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque[J]. *Caries Res*, 1997, 31(5): 356-360.

(本文编辑 汤亚玲)

medical apply[J]. *Rare Metal Materials Engineering*, 2006, 36(1): 110-113.

- [5] Dieudonné SC, van den Dolder J, de Ruijter JE, et al. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titanium[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(14): 3041-3051.
- [6] Lüthen F, Lange R, Becker P, et al. The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2423-2440.
- [7] 胡航. 种植体表面粗糙度及其种植体骨界面生物学特性影响的研究进展[J]. 国外医学口腔医学分册, 2004, 31(3): 204-206.
HU Hang. The development of research on the surface roughness of implant and its effects on the bionomics of the bone interface[J]. *Foreign Medical Science (Stomatology)*, 2004, 31(3): 204-206.

(本文编辑 汤亚玲)