

# 纳米钛膜种植体-骨界面的骨整合研究

刘媛媛<sup>1</sup> 李果<sup>1</sup> 任家银<sup>1</sup> 赵书平<sup>1</sup> 聂晶<sup>2</sup> 王虎<sup>1</sup>

(1.四川大学华西口腔医院放射科; 2.种植科 成都 610041)

**[摘要]** 目的 研究纳米材料在种植体骨整合方面的作用。方法 以磁控溅射法在纯钛种植体表面制备纳米钛膜,观测其形貌,将其植入动物体内,研究其在动物体内的早期骨整合情况。结果 表面形貌分析显示,磁控溅射在片状种植体和柱状种植体上形成的纳米级颗粒尺度相近,片状种植体纳米颗粒分布更均匀。动物试验显示,纳米级颗粒钛膜可增加种植体在种植初期的骨整合、骨小梁数量和骨量。结论 在材料表面行纳米粒度钛膜改性,有助于提高材料与骨之间的生物活性。

**[关键词]** 钛种植体; 磁控溅射; 表面改性; 纳米结构; 动物试验

**[中图分类号]** R 783.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.03.009

**The osseointegration research of the interface between bone and implant coating by nano-scale titanium thin film** Liu Yuanyuan<sup>1</sup>, Li Guo<sup>1</sup>, Ren Jiayin<sup>1</sup>, Zhao Shuping<sup>1</sup>, Nie Jing<sup>2</sup>, Wang Hu<sup>1</sup>. (1. Dept. of Radiology, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Implantation, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** The aim of this article is to study on the nano-scale materials in the role of implant osseointegration. **Methods** In this study, nano-scale titanium films were prepared by direct magnetron sputtering on titanium implants. Then the prepared implants coating with the nano-scale thin film are implanted in the bones of animals. The study of the early integration of the bone will be done between the experimented and control groups. **Results** Analyzed superficial configuration by magnetron sputtering, it showed that nano-scale granular diaphragm formed and it was homogeneous and compact. Dimension of nano-scale granular on lamellar implants was similar with that on columnar implants. However, nano-scale granular was more homogeneous in lamellar ones. The result of animal experiment showed that initial osseointegration increased after implant surgery utilized implants coating by nano-scale titanium thin film. **Conclusion** Serial animal experimentation manifested that bioactive can be improved after nano-scale titanium thin film formed on the surface of materials.

**[Key words]** titanium implant; magnetron sputtering; surface modification; nanostructure; animal experimentation

随着材料学的不断发展,种植修复已成为修复牙列缺失十分重要的方法。种植体的成功在于种植体材料与人体骨组织之间的相互作用,即形成早期的骨结合。为了提高成骨细胞在种植体材料表面的黏附和增殖,加速骨整合过程,种植体表面形貌的研究已经从微米领域逐渐深入到纳米领域。本研究将镀有纳米粒度的钛膜种植体植入活体动物的骨组织内,观测种植体-骨界面的骨整合情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 制备种植体

选用直径为 15 mm、厚度为 1 mm 的商业纯钛片(TiA<sub>2</sub>)和直径为 3 mm、高度 4 mm 的商业纯钛棒(TiA<sub>2</sub>)为基体材料,以直流磁控溅射技术在纯钛表面制备纳米粒径的钛膜。共制备镀膜柱状种植体、未镀膜柱状种植体和片状种植体(一面镀膜,一面未镀膜)各 12 枚,分别编号(表 1)。形貌观测和动物试验所用种植体于每组内随机选取。

### 1.2 材料的表面形貌观测

本试验选择在四川大学分析测试中心,采用 SPI3800N—Seiko(日本精工)原子力显微镜(atomic

[收稿日期] 2011-07-04; [修回日期] 2012-02-07

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(10675087, 10574095)

[作者简介] 刘媛媛(1984—),女,四川人,住院医师,硕士

[通讯作者] 王虎, Tel: 028-85503662

force microscope, AFM), 轻敲模式完成。分别对片状、柱状材料钛膜以及对照组进行表面形貌观测, 观测钛基底上的处理组与对照组材料表面纳米颗粒大小, 同时以 AFM 自带的统计参数图(statistical parametric mapping, SPM)分析软件行其表面粗糙度计算。

1.3 动物试验

健康犬 2 条, 适应性喂养 1 周。在严格的无菌环境下, 选择在其两下肢股骨髁部外侧从上至下分别植入一枚镀膜柱状种植体、一枚片状种植

体(镀膜面向上, 未镀膜面向下)和一枚未镀膜柱状种植体(表 2)。共计 12 枚种植体。饲养 2 个月处死动物, 取出相应的骨块。

表 1 种植体分组编号

**Tab 1 Groups number of implant**

分组	形貌分析	动物试验	备用
镀膜柱状种植体	1、6、7、8	2、4、9、10	3、5、11、12
片状种植体	2、5、11、12	1、3、4、10	6、7、8、9
未镀膜柱状种植体	4、6、7、11	3、5、10、12	1、2、8、9

表 2 种植体植入股骨内情况

Tab 2 The implants in the dog femurs

分组	1 号犬	1 号犬	2 号犬	2 号犬
镀膜柱状种植体	左股骨上段	右股骨上段	左股骨上段	右股骨上段
片状种植体	左股骨中段	右股骨中段	左股骨中段	右股骨中段
未镀膜柱状种植体	左股骨下段	右股骨下段	左股骨下段	右股骨下段

1.4 骨整合分析

骨整合分析采用微型计算机 X 线断层摄影术(micro-computer tomography, micro-CT)以及包含种植体的硬组织切片术。

1.4.1 钛膜与骨松质的骨整合情况和骨-种植体界面力学性能分析 试验于四川大学口腔疾病研究国家重点实验室完成。以  $\mu$ CT80(瑞士 Scano 公司)micro-CT 在分辨率为  $21 \mu\text{m} \times 21 \mu\text{m} \times 21 \mu\text{m}$  的条件下扫描, 运用 micro-CT 分析软件 CTAn(比利时 SkyScan 公司)对扫描后图像进行模型分析, 取与种植体相邻的相同体积的感兴趣区(regions of interest, ROI)行骨计量学分析。

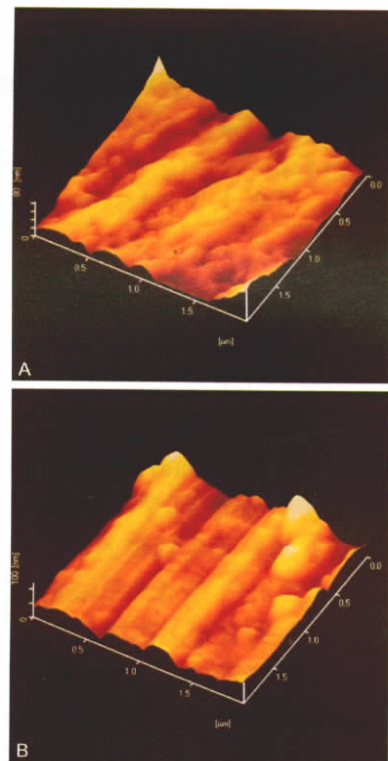
1.4.2 骨-种植体界面组织含种植体的硬组织切片技术分析 试验于四川大学临床医学院-华西医院科技园生物治疗国家重点实验室完成。以 SP1600 修片机和 SM2500E 硬组织切片器(德国 Leica 公司)对骨-种植体界面组织包含种植体的骨块进行修片和切片。

2 结果

2.1 材料表面形貌的 AFM 观测

图 1A、B 为钛片处理组和对照组材料表面纳米钛膜的 AFM 三维图像, 扫描范围  $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ; 图 2A、B 为钛柱处理组和对照组材料表面纳米钛膜的 AFM 三维图像, 扫描范围  $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ 。由此可见, 钛片处理组所呈现出大小不等的颗粒

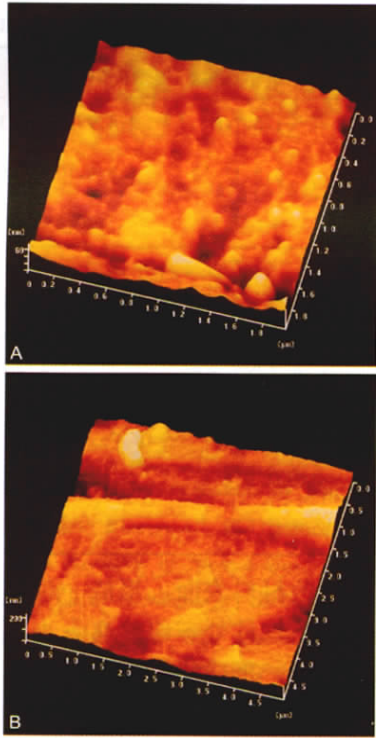
沉积于有沟壑的材料表面, 形成一种高低不平的波浪状的钛膜; 钛柱处理组仅有大小不等的颗粒沉积于材料表面, 形成比较平整的钛膜。对照组材料表现为较为均匀平整的表面。



A: 镀膜钛片; B: 纯钛片对照。

图 1 片状种植体表面的三维图像 AFM  $1 \times 10^7$   
Fig 1 Three-dimensional image of lamellar implants surface AFM  $1 \times 10^7$

材料表面的粗糙程度用算术平均粗糙度( $R_a$ )和均方根粗糙度( $R_{ms}$ )表示。处理组表面均较相应的对照组表面粗糙。片状种植体镀膜面表面粗糙度最大,柱状种植体未镀膜面表面粗糙度最小。



A: 镀膜钛柱; B: 纯钛柱对照。

图2 柱状种植体表面的三维图像 AFM  $1 \times 10^7$

Fig 2 Three-dimensional image of columnar implants surface AFM  $1 \times 10^7$

表3 各样本的表面粗糙度

Tab 3 Surface roughness of each samples mm

分组	$R_a$	$R_{ms}$
片状种植体镀膜面	47.97	61.21
片状种植体未镀膜面	30.39	37.71
镀膜柱状种植体	31.11	39.96
未镀膜柱状种植体	18.34	24.88

### 2.2 骨密度及其微结构参数的比较

micro-CT 扫描显示的主要参数如下。1)骨体积分数:骨小梁的体积(trabecular bone volume, BV)除以 ROI 的体积(TV)。2)结构模型指数(structure model index, SMI):骨小梁是趋向杆状还是趋向板状结构的参数,一般用于评价骨小梁的结构形态;理想杆状结构的 SMI 为 3,理想板状结构的 SMI 为 0,致密结构可为负数;发生骨质疏松时,骨小梁从板状向杆状转变,SMI 增加,骨松质结构退变,板状结构穿孔、消失,杆状结构比例增高。3)骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th):以毫米表示。4)骨小梁数目(trabecular number, Tb.N):以毫米的倒数表示。5)骨小梁间隙(trabecular separation/spacing, Tb.Sp):以毫米表示。骨计量学参数结果表明,相对于未镀膜种植体,钛膜种植体其 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 均有不同程度的增加,而其 SMI 和 Tb.Sp 降低。

表4 各组样本的 micro-CT 扫描结果比较

Tab 4 Comparison of each group samples in the micro-CT scanning results

分组	BV/TV/%	Tb.Th/mm	Tb.N/mm <sup>-1</sup>	Tb.Sp/mm	SMI
未镀膜	13.06±2.03	0.25±0.14	1.69±0.18	0.52±0.21	2.56±0.56
镀膜	23.25±1.17	0.31±0.17	1.86±0.33	0.49±0.12	1.83±0.34

### 2.3 材料表面形貌的显微镜下观测

以甲苯胺蓝O(toluidine blue O, TBO)染色,光学显微镜下观测种植体-骨界面的骨整合情况,结果显示在镀有纳米粒度钛膜的种植体周围有明显的新生骨小梁长出,新骨生长良好。图3示种植体周围皆有新生的骨小梁围绕,但未完全矿化。图4、5示在柱状种植体组,镀有纳米尺度颗粒的种植体周围,新生骨小梁明显较镀膜组增多增粗,而留白部分为种植体在切片过程中脱片造成。图6示在片状种植体组种植体周围,新生骨小梁明显较镀膜组增多增粗,图中紫黑色块状影为片状种植体,其下方为镀膜面,上方为未镀膜面。

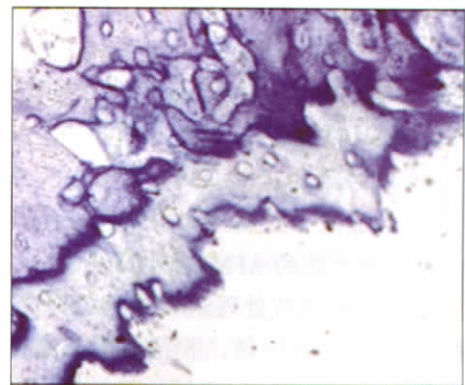


图3 种植体周围的新生骨小梁示例 TBO  $\times 100$

Fig 3 New trabecular example of implants around TBO  $\times 100$

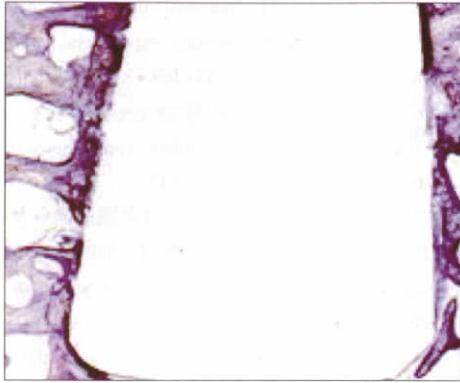


图 4 镀膜种植体周围骨小梁示例 TBO × 100

Fig 4 Trabecular example of coating columnar implant around TBO × 100

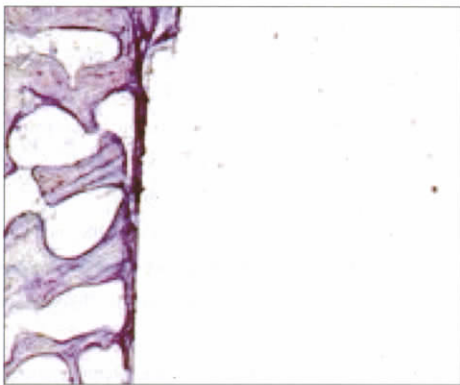


图 5 未镀膜种植体周围骨小梁示例 TBO × 100

Fig 5 Trabecular example of non-coating columnar implant around TBO × 100

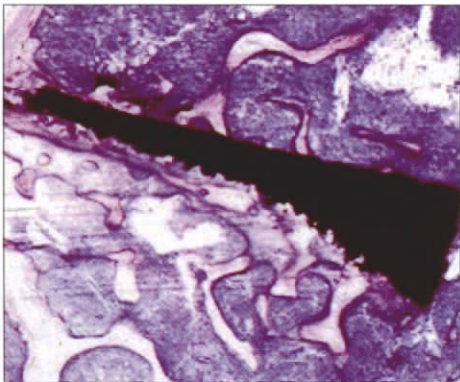


图 6 片状种植体切片示例 TBO × 100

Fig 6 Slice example of lamellar implant TBO × 100

### 3 讨论

种植体的稳定性取决于材料与患者自身骨质的结合，即骨整合。这一复杂过程涉及成骨细胞的趋向、黏附、增殖、分泌和矿化等多个步骤，而材料表面的纳米化可以促进成骨细胞的早期黏附和合成功能<sup>[1-3]</sup>。

成骨细胞的黏附包括理化黏附和生物学黏附。

理化黏附主要是指成骨细胞直接附着在材料表面，且附着取决于材料的表面特性，包括形貌、表面能、电荷和成分<sup>[4-7]</sup>。以往的研究显示，粗糙化的材料可促进细胞的附着、分化并分泌基质<sup>[8-9]</sup>，而高能表面可促进细胞的附着和扩展<sup>[10-11]</sup>。纳米材料因这种优良的表面特性而有利于成骨细胞的黏附及其功能的表达。将纳米技术应用于植入材料的表面改性，可有效地改善种植体的初期稳定性和骨结合率<sup>[12-13]</sup>。有研究<sup>[14-15]</sup>显示，由于硅片和铝片不具备良好的生物相容性，没有足够的生物力学强度，故不能以其为镀膜基底，亦不能将其作为种植体的植入材料，即种植材料表面改性需要生物相容性较好的钛或钛合金作为基底材料。本试验以纯钛作为溅射底层材料，研究在其表面溅射形成的纳米粒度钛膜的表面形貌及理化特征。前期试验表明，在纯钛表面溅射的薄膜无法掩盖基底上起伏的磨痕；因此，基底的形貌必将影响其表面膜的形貌，而形成一种特殊的表面形貌，类似一种复合结构：一级结构为纯钛基底上方向一致的划痕，二级结构为沉积在凹凸起伏的材料表面的纳米级颗粒<sup>[16]</sup>。这种粗糙的表面有利于增加材料的比表面积，为细胞的附着提供更大的空间。

成骨细胞的生物学黏附过程复杂，涉及诸多活性分子，其中主要是指一类黏附蛋白与成骨细胞表面膜受体间的相互作用和结合的过程。前期体外试验<sup>[17]</sup>证实：表面纳米化钛金属较非表面纳米化钛金属更能增加黏附蛋白的附着，促进成骨细胞的黏附；同时，成骨细胞在纳米材料表面增殖速度更快，细胞形态更丰满，伸展更充分，活性更高。在对骨钙蛋白的检测中，纳米材料组也明显优于非纳米材料组，而骨钙蛋白正是反映成骨细胞合成能力和骨质矿化的特异性生物指标。

在本研究中，镀有纳米粒度钛膜的种植体，其周围明显有新生骨小梁长出，新骨生长良好，且表面钛膜与骨组织之间无间隙，其表面新生的骨小梁明显较未镀膜种植体周围骨小梁更粗更多。正是因为特殊的纳米级表面有利于成骨细胞的黏附和增殖，从而促进了成骨细胞的生物活性和含钙矿物质的沉积<sup>[18-21]</sup>，故最终促进了骨小梁的生长，加速骨的改建，增加了种植体早期的稳定性。

### 4 参考文献

[1] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase

- ceramics[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(3) :475-483.
- [2] 巴凯, 张静, 王虎, 等. 纳米颗粒钛膜对成骨细胞合成功能的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2009, 27(6) :592-594.
- [3] 杨振宇, 张静, 王虎, 等. 不同纳米尺度钛膜表面蛋白黏附的研究[J]. *临床口腔医学杂志*, 2009, 25(12) :710-714.
- [4] Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response[J]. *Biomaterials*, 1996, 17(2) :137-146.
- [5] Healy KE, Thomas CH, Reznia A, et al. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry [J]. *Biomaterials*, 1996, 17(2) :195-208.
- [6] Nishiguchi S, Kato H, Neo M, et al. Alkali- and heat-treated porous titanium for orthopedic implants[J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 54(2) :198-208.
- [7] Hunter A, Archer CW, Walker PS, et al. Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use[J]. *Biomaterials*, 1995, 16(4) :287-295.
- [8] Gronthos S, Stewart K, Graves SE, et al. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(8) :1189-1197.
- [9] Lumbikanonda N, Sammons R. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2001, 6(5) :627-636.
- [10] Jones FH. Teeth and bones : Applications of surface science to dental materials and related biomaterials[J]. *Surf Sci Rep*, 2001, 42(3/4/5) :75-205.
- [11] Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, et al. Relationship between surface properties(roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour[J]. *Mater Sci Eng C*, 2003, 23(4) :551-560.
- [12] Liu H, Webster TJ. Nanomedicine for implants : A review of studies and necessary experimental tools[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(2) :354-369.
- [13] Balasundaram G, Webster TJ. A perspective on nanophase materials for orthopedic implant applications[J]. *J Mater Chem*, 2006, 16(38) :3737-3745.
- [14] 赵越, 刘实, 汪伟, 等. 纳米晶钛薄膜的制备及结构分析[J]. *原子能科学技术*, 2002, 36(4) :380-383.
- [15] Rabiei A, Thomas B, Jin C, et al. A study on functionally graded HA coatings processed using ion beam assisted deposition with in situ heat treatment[J]. *Surf Coat Technol*, 2006, 200(20/21) :6111-6116.
- [16] 刘媛媛, 游梦, 王虎, 等. 纳米颗粒钛膜的构建及其表面形貌特征研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2009, 27(4) :455-458.
- [17] 张静. 磁控溅射法制备纳米粒度钛膜的微结构及生物相容性的研究[D]. 成都 : 四川大学, 2008.
- [18] Wei Z, Xiaoxia Z, Xiaochen W, et al. The effect of surface roughness and wettability of nanostructured TiO<sub>2</sub> film on TCA-8113 epithelial-like cells[J]. *Surf Coat Technol*, 2006, 200(20/21) :6155-6160.
- [19] Cai K, Bossert J, Jandt KD. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 49(2) :136-144.
- [20] Savaloni H, Khojier K, Alaea MS. Characteristics of nanostructure and electrical properties of Ti thin films as a function of substrate temperature and film thickness[J]. *J Mater Sci*, 2007, 42(8) :2603-2611.
- [21] Liu X, Zhao X, Fu RK, et al. Plasma-treated nanostructured TiO<sub>2</sub> surface supporting biomimetic growth of apatite[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(31) :6143-6150.

(本文编辑 刘世平)

(上接第 311 页)

- 作用及机制研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23(2) :140-144.
- [13] 黄开, 章庆国, 蔡国锋. 成骨细胞与诱导剂对骨髓基质干细胞的增殖与成骨分化的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(1) :125-129.
- [14] 李华壮, 周跃, 郭国宁. 核心结合因子 $\alpha_1$ 促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(2) :121-124.
- [15] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(5) :1233-1239.
- [16] 李健, 龙星, 朱帆, 等. 颞下颌关节滑膜间充质干细胞成骨潜能的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2005, 23(2) :145-147.
- [17] Wai PY, Mi Z, Gao C, et al. Ets-1 and runx 2 regulate transcription of a metastatic gene, osteopontin, in murine colorectal cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(28) :18973-18982.
- [18] Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(3) :445-453.

(本文编辑 刘世平)