

珍珠质自然涂层钛种植体表面对 MC3T3E1 成骨样细胞的作用*

朱丽琴¹⁾ 王慧明^{1)**} 徐俊华¹⁾ 魏 栋¹⁾ 赵文权¹⁾ 王小祥²⁾ 吴南屏³⁾

¹⁾浙江大学附属第一医院口腔医疗中心, 杭州 310003; ²⁾浙江大学材化学院, 杭州 310000;

³⁾浙江大学附属第一医院传染病研究所, 杭州 310003)

摘要 为了研究珍珠质自然涂层钛种植体表面的体外生物相容性, 将珍珠质自然涂层的钛片与 MC3T3E1 成骨样细胞复合培养以观察细胞的生长、增殖和分化. 分别以羟基磷灰石涂层钛片和没有涂层的纯钛片作为对照组, 以 MC3T3E1 细胞单纯培养作为空白组, 分别培养 3 天, 5 天和 7 天, 通过倒置相差显微镜和扫描电镜观察细胞生长情况, 流式细胞技术检测细胞增殖活性, 金氏比色法检测碱性磷酸酶(ALP)活性以及蛋白质印迹(Western blotting)法测定转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达水平. 结果发现, 细胞在珍珠质周围能形成良好附着, 在其表面生长丰满. 细胞培养第 3 天, 第 5 天和第 7 天时, 珍珠质表面的细胞增殖指数分别为 $(35.9\pm 2.5)\%$ 、 $(69.7\pm 3.3)\%$ 和 $(58.2\pm 2.6)\%$, ALP 活性分别为 (6.123 ± 2.917) U/g、 (17.486 ± 1.986) U/g 和 (23.987 ± 1.372) U/g. 第 5 天和 7 天时, 实验组的细胞增殖指数、ALP 活性和 TGF- β 1 表达水平显著高于对照组和空白组($P < 0.05$). 珍珠质自然涂层钛表面有利于 MC3T3E1 细胞的生长、增殖和分化, 表明了珍珠质涂层能提高种植体表面的生物相容性, 有可能会促进种植后的骨整合.

关键词 成骨细胞, 生物相容性, 碱性磷酸酶

学科分类号 R78, R318.08, Q81

外伤、肿瘤和先天畸形都会导致牙齿缺失, 应用牙种植体修复缺失牙已经成为口腔临床医学中一项流行的治疗方法. 纯钛因其良好的机械性能和低致畸致瘤性而被广泛应用于制作牙种植体, 但是纯钛种植体与骨组织之间通常有纤维结缔组织相隔, 随着时间的推移, 如果纤维层不能被人体逐渐吸收, 将导致种植体的相对移动而最终脱落^[1]. 钛表面的物理化学性质及表面结构影响着细胞的黏附、生长、增殖以及分化^[2]. 一些研究表明纯钛种植体表面经修饰后会促进成骨细胞的附着^[3]. 在过去的几年里, 在钛表面制备羟基磷灰石(HA)涂层备受关注. 虽然 HA 涂层可提高种植体的生物相容性, 有利于成骨细胞的黏附、增殖与分化^[4], 但是在种植后期, HA 涂层的降解和剥落将导致种植体骨界面失稳, 甚至植入失败^[5]. 为了克服纯钛种植体和 HA 涂层种植体的上述缺陷, 近年来, 对种植体表面的仿生生物涂层作了大量研究.

珍珠质(nacre or mother of pearl)是软体动物珍珠贝科或蚌科动物的贝壳内层以及珍珠的组成成分, 其主要成分为文石型碳酸钙, 并含有少量有机

质和微量金属元素. 国外大量研究表明, 珍珠质具有骨生物相容性^[6,7], 是一种骨诱导材料, 在体内外都能诱导骨组织的形成^[7~9]. 文献还报道珍珠质具有与钛相近的机械性能^[10], 其破裂韧度为单纯文石的 3 000 倍^[10]. 基于珍珠质上述优点, 我们首创将种植体植入到三角帆蚌的囊膜内获得了新型珍珠质涂层的种植体^[11]. 本实验旨在研究珍珠质天然涂层钛种植体表面的体外生物相容性.

1 材料与方法

1.1 材料

实验组材料通过将钛片植入三角帆蚌囊膜内获得, 见前期实验研究结果^[11]. 对照组 1 通过羟基磷灰石电化学沉积于纯钛(Ⅱ级)表面获得, 对照组 2 为表面经过酸蚀的Ⅱ级商业纯钛. 所有样品大小均为 8 mm × 4 mm × 0.3 mm, 清洁后用辐射量为

* 国家自然科学基金资助项目(30572061/C03031102).

** 通讯联系人.

Tel: 0571-87236893, E-mail: wangmysm@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-10-28, 接受日期: 2007-12-04

2.5 mrad 的 X 射线消毒。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和分组处理。

新生小鼠颅骨源性的成骨样细胞系(MC3T3E1 细胞)是从日本大阪齿科大学购得。细胞培养在含 10%胎牛血清(杭州四季清公司)、1%丙酮酸钠(Sigma 公司)和 100 U/ml 青链双抗(Gibcol 公司)的 DMEM 培养基(HYQ 公司)中, 培养条件为 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度。

取 24 孔培养板 4 块, 实验组每孔加入一片珍珠质涂层的钛片, 对照组 1 每孔加入一片 HA 涂层的钛片, 对照组 2 每孔加入一片没有涂层的钛片, 空白组不加任何样品。将 MC3T3E1 细胞以 1×10^4 /ml 的密度接种于培养板。每孔加入含 5%胎牛血清的 DMEM 培养基 1.5 ml, 每 3 天换液一次。并于培养第 3 天、第 5 天、第 7 天时进行以下实验。

1.2.2 倒置相差显微镜观察。 Olympus 倒置相差显微镜观察材料周围细胞的生长情况。

1.2.3 扫描电镜观察。 将样品从培养孔中取出, PBS 清洗 2 次, 在 4℃环境下用 2.5%戊二醛溶液固定, 梯度乙醇脱水, 临界点干燥、喷金, 于环境扫描电镜(XL30, Philips)中观察细胞的生长情况。

1.2.4 细胞增殖指数测定(流式细胞仪)。 分别收集实验组、对照组和空白组的细胞, 用 70%乙醇固定 30 min, PBS 冲洗 2 次。使用流式细胞周期试剂(Coulter Beckman, USA)进行细胞周期分析。操作严格按试剂说明进行。以增殖指数(proliferation index, *PI*)表示样品对 MC3T3E1 细胞分裂增殖的影响。 $PI = (S + G_2M) / (G_0G_1 + S + G_2M) \times 100\%$ 。

1.2.5 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测。 分别收集实验组、对照组和空白组的细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 0.2% Triton X-100 50 μ l, 冰上放置 30 min, 离心, 取上清, 用 BCA 蛋白定量试剂(Bio-Rad)检测蛋白质浓度。采用碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物有限公司)检测样品中 ALP 活性。严格按说明书进行操作。结果判断以每克蛋白质在 37℃与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 金氏单位(U)。

1.2.6 Western blotting 检测 TGF- β 1。 收集各组细胞, 加细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.5% Triton X-100, 0.6% NP-40 和蛋白酶抑制剂, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L pepstatin A 和 2 mg/L aprotinin)冰上裂解 30 min 后, 离心取上清液, 用 BCA 蛋白质定量试剂 (Bio-Rad)

检测蛋白质浓度。取 20 μ g 蛋白质样本加入 2 $\times$ SDS 上样缓冲液煮沸 5 min, 以 10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜(Bio-Rad 公司), 用封闭液(含 7.5%脱脂奶粉, 2% BSA, 0.1% Tween-20 的 PBS)封闭 1 h 后, 加入兔抗 TGF- β 1 抗体(1:800) 4℃过夜。用洗涤缓冲液(含 0.1% Tween-20 的 PBS)洗膜 3 次, 加入过氧化物酶交联的羊抗兔 IgG (Pierce, 用封闭液 1:10 000 稀释)室温下作用 1 h, PBS 洗膜后, 使用 ECL chemiluminescence detection system (Amersham)显影, X 光片暗室曝光。显影结束后, 膜用抗体洗脱液(Re-blot, 美国 Chemicon 公司)室温孵育 20 min, 封闭液封闭 30 min 后, 同法用兔抗 Actin 抗体反应作内参照。

1.2.7 统计学分析。 利用 SPSS 11.0 统计分析软件对实验结果进行单因素方差分析, 并做两两比较。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结 果

2.1 倒置相差显微镜观察

细胞接种第 3 天, 实验组和对照组材料周围均有细胞生长, 细胞生长状况与空白组无明显区别。随培养时间延长, 材料周围细胞均逐渐增多。图 1 所示: 第 5 天珍珠质周围的细胞与珍珠质接触紧密, 无明显生长间隙, 细胞数量多于对照组, 而对照组材料周围仍存在少量生长间隙, 尚未长满细胞。第 7 天, 珍珠质周围细胞出现团聚状, 团块内细胞相互融合, 不能区分细胞形状, 而对照组和空白组未出现上述现象(第 3 天和第 7 天图未列)。

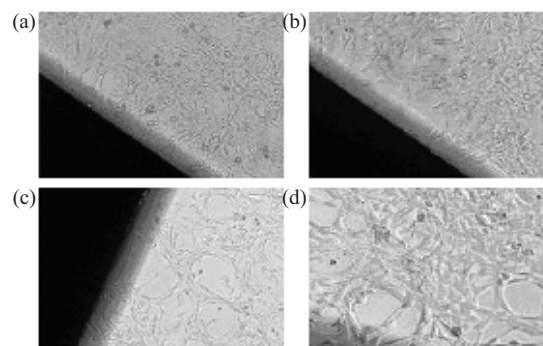


Fig. 1 Micrograph of MC3T3E1 cells under inverted phase contrast microscope of four groups on 5 days ($\times 100$)
(a) Titanium coated with nacre. (b) Titanium coated with HA. (c) Titanium coated with nothing. (d) Blank.

2.2 扫描电镜观察

图 2 所示: 细胞培养第 3 天, 实验组和对照组表面的细胞呈梭形或三角形, 细胞通过伪足贴附于

钛表面. 珍珠质表面的细胞比较丰满, 伪足较多较长, 紧密贴附于珍珠质表面, 伸展良好. 而纯钛表面的细胞瘦小, 伪足少而短, 细胞与钛表面贴附性差. 羟基磷灰石涂层钛表面的细胞形态介于两者之间. 细胞培养第 5 天, 珍珠质表面长满细胞, 能辨别细胞形态. 羟基磷灰石涂层钛表面和纯钛表面的细胞尚存在生长间隙. 第 7 天, 珍珠质表面的细胞融合成一片, 不能完全区分细胞形态(第 5 天和第 7 天图未列).

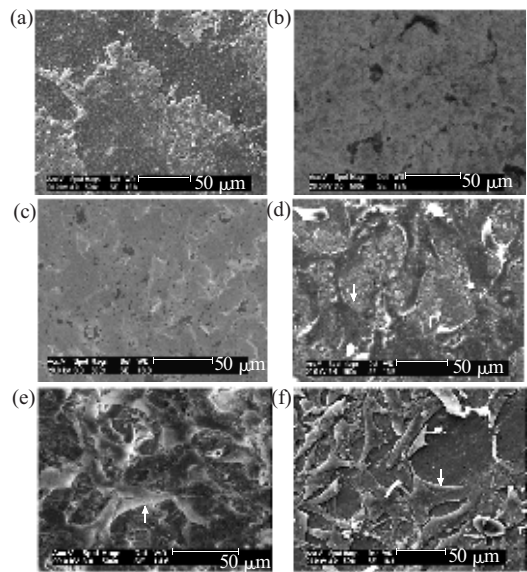


Fig. 2 SEM micrograph of MC3T3E1 cells on 3days on titanium surface of four groups (×500)
(a) Titanium coated with nacre. (b) Titanium coated with HA. (c) Titanium coated with noting. (d) Cell on titanium coated with nacre. (e) Cell on titanium coated with HA. (f) Cell on titanium coated with nothing. Black arrowheads direct cell.

2.3 细胞增殖指数测定

检测结果见表 1, 细胞与材料复合培养第 3 天、第 5 天和第 7 天, 实验组细胞增殖指数分别为 (35.9±2.5)%、(69.7±3.3)%和(58.2±2.6)%. 实验组、对照组和空白组细胞均在第 5 天时增殖指数达到最高. 经统计学检验, 第 5 天和第 7 天时实验组与对照组和空白组相比, 细胞增殖指数有显著性差异 ($P < 0.05$). 提示珍珠质涂层的钛表面有利于细胞的黏附和增殖.

Table 1 The cell proliferation index of different groups				
Groups	3d	5d	7d	
Test group	35.9±2.5	69.7±3.3*	58.2±2.6*	
Control 1	34.0±2.1	55.4±2.8	47.4±1.9	
Control 2	33.8±2.0	50.4±2.1	40.7±3.9	
Blank	34.8±2.3	55.1±3.5	44.5±2.5	

Test group: Titanium coated with nacre; Control 1: Titanium coated with HA; Control 2: Titanium coated with noting; Blank: Cells. Compared with controls and blank, * $P < 0.05$.

2.4 碱性磷酸酶活性检测

图 3 所示: 实验组珍珠质表面与细胞复合培养 3 天, 5 天和 7 天, 其 ALP 活性逐渐增高, 第 7 天时已达(23.987±1.372) U/g, 而且第 5 天和 7 天 ALP 活性比对照组和空白组明显增高($P < 0.05$).

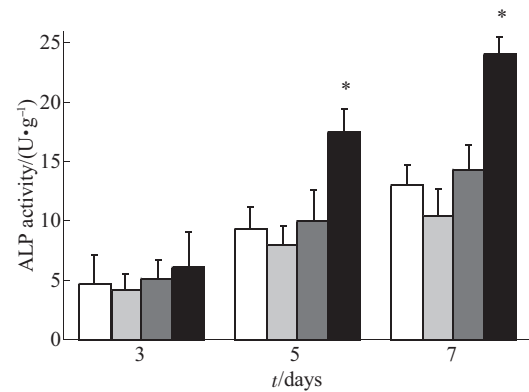


Fig. 3 ALP activities of MC 3T3 E1 cells on the respective group for 3, 5 and 7days
Nacreous group had a significantly higher ALP activity than that of other coatings on 5 days and 7 days (* $P < 0.05$). □: Blank; ▒: Non-coating titanium; ▒: HA-coating titanium; ■: Nacre-coating titanium.

2.5 Western blotting 检测 TGF-β1 蛋白表达

图 4 所示: MC3T3E1 细胞在实验组珍珠质表面随培养时间的延长, 细胞表达的 TGF-β1 条带浓度逐渐增高. 培养第 3 天时, 实验组、对照组和空白组的条带浓度无明显差异, 第 5 天和第 7 天时, 实验组条带浓度明显高于对照组和空白组.

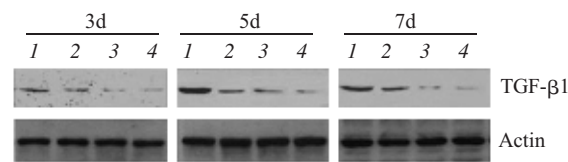


Fig. 4 The protein expressions of TGF-β1 in MC3T3E1 treated were analyzed by Western blotting
1: The group of titanium coated with nacre; 2: The group of titanium coated with HA; 3: The group of titanium coated with nothing; 4: Blank.

3 讨 论

骨整合(osteointegration)是指活性骨组织与承重种植体表面之间的直接结构和功能的结合. 骨整合的形成是一个复杂的过程, 离不开一系列成骨细胞的生物学行为, 包括细胞附着、伸展、增殖和成骨细胞表型的表达^[12]. 种植体的表面性能影响着细胞的黏附、增殖和分化^[2].

成骨细胞的生长分化和基因表达经历几个阶

段: a. 分化增殖期, 以 DNA 复制、组蛋白合成为其特征; b. 基质形成、成熟期, 以碱性磷酸酶 (ALP) 活性升高、I 型胶原分泌为其特征; c. 基质钙化期, 以骨钙蛋白 (OCN) 分泌、钙离子沉积为其特征, 并伴有 ALP 活性持续升高. ALP 是成骨细胞分化的主要特征酶之一^[13], 它的表达代表骨形成状况, 表明细胞分化的开始, 并随细胞分化的发展而增强, 其活性的高低可反映成骨细胞的成骨能力.

在成骨细胞的增殖、分化过程中, 许多生长因子都参与此过程并发挥了重要作用. 其中对 TGF- β 的研究比较多. TGF- β 是一族多肽生长因子, 在骨生长、形态诱导及修复中占有非常重要的地位. 它能促进成骨细胞分化、增殖, 刺激骨细胞和软骨细胞合成与分泌细胞外基质蛋白^[14].

本研究中, MC3T3E1 细胞在珍珠质表面能良好地贴附, 并且生长丰满, 伪足多而长. 流式细胞仪检测结果显示, 细胞在珍珠质表面培养初期以增殖为主, 到达第 5 天时增殖指数达到最高, 以后逐渐下降, 而 ALP 活性和 TGF- β 1 表达水平在初期时较低, 随着培养时间的延长逐渐升高. 这符合成骨细胞的生长分化和基因表达所经历的几个阶段. 经统计学分析, 珍珠质表面细胞的增殖指数、ALP 的活性和 TGF- β 1 的表达明显高于 HA 涂层钛表面和纯钛表面的细胞以及空白组, 我们在后期的研究中发现实验组骨钙蛋白的表达也高于对照组(另文报道), 这表明珍珠质对成骨细胞的黏附、增殖和分化有良好的促进作用.

众所周知, 珍珠质与骨组织并非同源, 但是珍珠质和骨组织有相似性——它们均是由有机质和无机矿物质组成的复合生物源性材料, 尽管在无机物的成分和结构上有所不同, 骨组织中的矿物相是以羟基磷灰石形式存在的磷酸钙, 而珍珠质中是以文石形式存在的碳酸钙^[15]. 曾有研究报道珍珠质中的部分有机质可以在体液中被溶解出来, 而且被证实有 4 个氨基酸片段 SE1~SE4, 分子质量分别为 115~150, 80, 65 和 35~45 ku^[5]. 珍珠质的水溶性提取物能够促进成骨细胞增殖和碱性磷酸酶表达^[5]. 这与本实验中珍珠质表面细胞的增殖指数和碱性磷酸酶活性高于对照组和空白组报道相一致. 推测珍珠质水溶性提取物可能存在一些类似于骨形态发生蛋白或转化生长因子的蛋白质而促进细胞生长^[6].

也有文献报道珍珠质中有机物质的溶解增加了

珍珠质表面的湿润性^[5], 而湿润性能促进生物材料的生物活性^[16, 17]. 因而珍珠质能增进成骨细胞的生物活性.

总而言之, 珍珠质也许是通过多种机制联合作用而促进成骨细胞的增殖和分化.

细胞增殖和分化是通过多种细胞信号转导通路来调节的, 其中包括 TGF- β /Smad 信号转导通路. TGF- β 信号的传导始于 TGF- β I 型和 II 型受体形成的异源二聚体, 激活的 TGF- β I 型受体使 Smad 2, Smad 3 磷酸化, 而 Smad 4 与之形成异源三聚体, 移位至核, 完成 TGF- β 信号由胞浆至胞核的转导, 进而调节目的基因的表达^[14]. 本实验中我们观察到珍珠质表面的细胞表达的 TGF- β 1 水平较高. 在后期的实验中, 我们通过抗体阻断试验中和 TGF- β 1, 发现珍珠质表面细胞的增殖活性和碱性磷酸酶活性降低. 我们并且观察到珍珠质表面细胞的 Smad2、Smad3 和 Smad4 表达亦增高(另文报道). 这表明珍珠质可能通过激活表面细胞的 TGF- β /Smad 信号转导通路, 从而促进了细胞增殖和分化. 珍珠质可能同时激活其他信号通路, 如 Wnt 信号转导通路等, 这有待于我们进一步研究.

本研究结果初步表明珍珠质自然涂层钛种植体可以促进成骨细胞的增殖和分化. 由于我国是淡水珍珠生产大国, 基于本研究, 在种植体表面自然涂层珍珠质, 提高种植体表面的生物相容性, 促进种植后的骨整合, 是一种可行的、有应用前景的种植体表面处理方法.

参 考 文 献

- 1 Sandrini E, Morris C, Chiesa R. *In vitro* assessment of the osteointegrative potential of a novel multiphase anodic spark deposition coating for orthopaedic and dental implants. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005, **73B**(2): 392~399
- 2 Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. Acta Biomater, 2007, **3**(4): 573~585
- 3 Zhang Y M, Bataillon-Linez P, Huang P, *et al.* Surface analyses of micro-arc oxidized and hydrothermally treated titanium and effect on osteoblast behavior. J Biomed Mater Res, 2004, **68A**(2): 383~391
- 4 胡科军, 陈必胜, 陶长仲. 羟基磷灰石涂层种植体的生物学行为. 国外医学生物医学工程分册, 1999, **22** (4): 228~232
Hu K J, Chen B S, Tao C Z. Foreign Medical Sciences Biomedical Engineering, 1999, **22**(4): 228~232
- 5 Mouries L P, Almeida M J, Milet C, *et al.* Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk Pinctada maxima in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow

- stromal cells and osteoblasts. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2002, **132**(1): 217~229
- 6 Lamghari M, Almeida M J, Berland S, *et al.* Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies. *Bone*, 1999, **25**(2 suppl): 91S~94S
 - 7 Atlan G, Delattre O, Lopez E, *et al.* Interface between bone and nacre implants in sheep. *Biomaterials*, 1999, **20**(11): 1017~1022
 - 8 Atlan G, Balmain N, Lopez E, *et al.* Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *C R Acad Sci III*, 1997, **320**(3): 253~258
 - 9 Lopez E, Vidal B, Berland S, *et al.* Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained *in vitro*. *Tissue Cell*, 1992, **24**(5): 667~679
 - 10 Camprasse S, Camprasse G, Lopez E, *et al.* Artificial dental root made of natural calcium carbonate (bioracine). *Clin Mater*, 1990, **5** (2-4): 235~250
 - 11 Wang X X, Xie L, Wang R Z. Biological fabrication of nacreous coating on titanium dental implant. *Biomaterials*, 2005, **26** (31): 6229~6232
 - 12 Marinucci L, Balloni B, Becchetti E, *et al.* Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2006, **21**(5): 719~725
 - 13 Gundberg C M. Biochemical markers of bone formation. *Clin Lab Med*, 2000, **20** (3): 489~501
 - 14 Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, *et al.* Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta and ran-dependent manner. *Mol Boil Cell*, 2001, **12**(4): 1079~1091
 - 15 Ni M, Ratner B D. Nacre surface transformation to hydroxyapatite in a phosphate buffer solution. *Biomaterials*, 2003, **24** (23): 4323~4331
 - 16 Kim Y W, Kim J J, Kim Y H, *et al.* Effects of organic matrix proteins on the interfacial structure at the bone-biocompatible nacre interface in vitro. *Biomaterials*, 2002, **23**(9): 2089~2096
 - 17 Bahar H, Yaffe A, Binderman I. The influence of nacre surface and its modification on bone apposition: a bone development model in rats. *J Periodontol*, 2003, **74**(3): 366~371

Effects of Titanium Implant Surface Coated With Natural Nacre on MC3T3E1 Cell Line *In vitro**

ZHU Li-Qin¹⁾, WANG Hui-Ming^{1)**}, XU Jun-Hua¹⁾, WEI Dong¹⁾,
ZHAO Wen-Quan¹⁾, WANG Xiao-Xiang²⁾, WU Nan-Ping³⁾

¹⁾The Stomatology Centre of The First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China;

²⁾Department of Materials Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China;

³⁾The Research Institute of The Infection Disease of The First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

Abstract To study the biocompatibility of the titanium dental implant surfaces coated with nacre *in vitro*, osteoblast-like cells (MC3T3E1) growth on the substrates coated with nacre were compared with that growth on the substrates coated with hydroxyapatite (HA) or nothing and the cells of the blank. MC3T3E1 were incubated on the respective surface for 3days, 5days and 7 days. Cell morphology was estimated by inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope (SEM) and cell proliferation was measured by flowcytometry. The King's chromometry was used for measuring the activity of ALP in the cell lysate and the expression of TGF- β 1 was detected by Western blotting. The results showed that MC3T3E1 cultured on the nacre-coated surface were more spreaded and plumper than the controls on the 3days, 5days and 7days of culture. Meanwhile, the test group showed a superiority to control groups and blank with respects to the cell proliferation index[(35.9 $\pm$ 2.5)%, (69.7 $\pm$ 3.3)% , (58.2 $\pm$ 2.6)%], ALP activity [(6.123 $\pm$ 2.917), (17.486 $\pm$ 1.986), (23.987 $\pm$ 1.372) U/g] and TGF- β 1 level. In conclusion, the surface coated nacre can promote the proliferation and differentiation of osteoblast, which the mechanism partly may be the increasing expression of TGF- β 1.

Key words osteoblast, biocompatibility, alkaline phosphatase

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30572061/C03031102).

**Corresponding author.

Tel: 86-571-87236893, E-mail: wangmysm@yahoo.com.cn

Received: October 28, 2007 Accepted: December 4, 2007