

表面电荷的调控对钛表面纤维连接蛋白吸附能力影响的研究

丁祥龙¹, 李少冰¹, 郭泽鸿¹, 卢海宾¹, 赖春花¹, 吴静漪¹, 高岩¹,
王敬旭², 徐淑兰¹

(1. 南方医科大学 口腔医院种植中心, 广东 广州 510280)

(2. 广州医科大学 第一附属医院口腔科, 广东 广州 510120)

摘要: 通过对钛片表面电荷的调控来改变纯钛表面的蛋白吸附能力, 改善其生物学性能。将大颗粒喷砂酸蚀的样本分别浸泡在不同的溶液中, 分别观察检测不同样本表面形貌及表面元素构成, 各组样本的表面粗糙度, 以及各组样本表面的电荷状况。最后检测各组样本的纤维连接蛋白吸附能力。结果表明, 各组样本表面具有相似的表面形貌, 不同组表面因为浸泡的液体不同其表面元素各不相同; 各组样本的表面粗糙度无显著差异; 而浸泡在氯化钙溶液中的钛片具有最高蛋白吸附能力 ($P < 0.01$), 而对照组大颗粒喷砂酸蚀组吸附能力最弱。将钛片浸泡在含有二价钙离子的氯化钙溶液中可以改变钛片表面的电荷状态, 提升蛋白吸附能力, 从而改善其生物学性能。

关键词: 表面电荷; 蛋白; 种植体; 细胞

中图分类号: TG146.23; TB383

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2020)07-2431-05

牙科种植体的表面对细胞与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的互动起重要作用, 甚至对骨结合的发生起至关重要的作用^[1,2]。目前种植体常用的微粗糙表面, 其骨结合情况虽然取得了较好的效果, 但是也有报道指出微粗糙的表面虽然能够一定程度的促进成骨细胞的分化, 但是却抑制成骨细胞的粘附、增殖, 与光滑组相比较这可能会导致较少的骨量累积, 并最终可能会影响骨结合的效果^[3,4]。

种植体表面常用的改良方法包括对表面形貌、化学元素组成、分子结构、电荷状态、表面自由能、亲疏水性等方面进行不同程度的改性, 从而改善种植体表面的生物学性能, 进一步影响到种植体与机体之间复杂的生物学效应^[5-7]。已知的大部分基础研究主要集中在种植体表面的形态结构、化学元素组成等对成骨细胞生物学行为的影响。然而, 对于种植体表面电荷状态的改变与体内蛋白之间的互动尚无系统研究。根据本课题组之前的研究显示, 紫外线照射钛种植体之后其表面携带的负电荷显著减少, 将会显著增强与蛋白之间通过静电作用力 (electrostatic force) 的互动, 促进蛋白在其表面的吸附, 并且在细胞早期粘附过程中起到促进作用。因此, 不同的表面电荷状态将影响

钛表面的生物学活性, 进而干预早期骨结合形成的效率^[8,9]。

然而, 本课题组以及其他的报道结果显示^[10-12], 无论是新鲜处理的钛样本, 还是经过紫外线照射之后表面携带正电荷具有高活性的样本, 都存在一个生物学老化的现象, 只要在普通环境中保存, 在较短的时间内其表面都会被碳氢化合物污染, 由最初的亲水表面变为疏水表面, 表面正电荷变为负电荷, 蛋白吸附能力也会随之降低, 成骨细胞的早期粘附、增殖、分化以及矿化能力都会降至未经紫外线照射之前的水平, 这种现象被称为生物活性老化。更加重要的是这种污染在普通环境中几乎是不可避免的, 造成这种生物学活性老化的原因或许与以下几个方面有关: 随着样本在普通环境中保存时间的延长, 钛表面将会逐渐积累碳氢化合物; 另外与亲水性以及表面正电荷随着保存时间延长迅速消失负电荷增多有关^[13,14]。并且目前没有更好的方法改变这一情况。

为改变种植体表面的电荷状况, 在本研究中将原本带负电荷的纯钛浸泡于氯化钙溶液中, 原创性的使用二价钙离子作为桥接离子检测钛片表面的电荷变化, 其一个正电荷与带负电荷的钛片连接, 另一个正

收稿日期: 2019-07-20

基金项目: 国家自然科学基金 (81600900); 南方医科大学培育基金 (PY2018016); 南方医科大学口腔医院培育基金 (PY2018N089)

作者简介: 丁祥龙, 男, 1984年生, 博士, 主治医师, 南方医科大学口腔医院种植中心, 广东 广州 510280, 电话: 020-84408890, E-mail: 393041675@qq.com

电荷与携带负电荷的人纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)相连接, 这样便可以改变两者之间的静电排斥作用, 从而改善纯钛种植体的生物学性能。

1 实验

实验材料为纯钛片, 厚度为 1.5 mm, 直径为 15 mm, 使用砂纸从 100# 依次打磨至 1000#, 然后将钛片放在丙酮、无水乙醇中依次超声清洗 20 min, 之后用大量去离子水冲洗。再将钛片至于室温下自然干燥。实验共分为 4 组分别如下:

大颗粒喷砂酸蚀组 (sand-blasted, large grit, acid-etched, SLA): 在 4.5 kPa 气压下, 喷口距离钛片 1 cm, 用直径 120 μm 的 Al_2O_3 颗粒垂直对样本表面均匀喷砂 30 s, 随后再依次用丙酮, 无水乙醇和去离子水分别超声清洗 15 min, 室温自然干燥; 将样本置于 49% H_2SO_4 /18% HCl (1:1) 混合酸中, 60 $^\circ\text{C}$ 水浴加热酸蚀 40 min, 然后将样本置于去离子水中超声清洗 15 min, 室温干燥, 避光保存 2 周作为第 1 组。

SLA-NaCl 组: 将第 1 组的一部分取出浸泡在生理盐水中至少 48 h 作为第 2 组。

SLA- Ca^{2+} 组: 将第 1 组的一部分取出浸泡在 1% 氯化钙溶液 (调节 pH 为 7.4) 中至少 48 h 作为第 3 组。

SLA- Ca^{2+} -NaCl 组: 将第 3 组的一部分取出浸泡于生理盐水中至少 48 h 作为第 4 组。

采用场发射扫描电镜 (FE-SEM, 1530VP, LEO, Germany) 对样本表面形貌及表面元素做相应观察及检测, 表面粗糙度通过光学干涉轮廓仪进行检测 (Wyko NT9300, Veeco, USA), 样本表面电荷检测通过固体表面 Zeta 电位仪 (Anton Paar, Graz, Austria) 进行检测, 设定 pH 值为 7.4。以上检测各组均取 5 个试件进行检测。

人纤维连接蛋白 (Fn) 在本实验中作为模型蛋白, 使用 BCA 蛋白试剂盒检测蛋白吸附能力。用 PBS 配

置成 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7.4 的蛋白测试液并绘制标准曲线。将 4 组钛片分别放入 24 孔板, 每孔加 300 μL 蛋白工作液, 在 37 $^\circ\text{C}$ 无菌条件下分别孵育 0.5、1、2 h, 之后分别将钛片转移到新的 24 孔板中, 用 PBS 轻柔漂洗 3 次, 去除钛片表面未吸附的多余蛋白。将清洗好的钛片每孔加入 500 μL 、1% 十二烷基硫酸钠溶液 (sodium dodecyl sulfate, SDS), 放置在匀速摇床上摇动 1 h, 洗脱粘附在钛片上的蛋白待测, 随后取每组每孔 100 μL 的待测样本, 按要求与等体积的 microBCA 混合, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, 采用紫外分光光度仪在 562 nm 波长下读板, 结合蛋白标准曲线计算蛋白吸附量, 以上测试每组每时间点设 3 个平行样本, 重复 3 次。

统计学方法: 用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 数据经过正态分布和方差齐性检验后, 以分析因设计方差分析检测处理因素的主效应、交互作用, 再分别使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Bonferroni 检测或两独立样本 t 检验进行总体和组间比较。若数据正态分布但方差不齐, 则分别使用 Welch 检验和 Dunnett's T3 检验或两独立样本 t 检验行总体和组件比较。若数据非正态分布和 (或) 方差不齐, 则分别应用 Kruskal-Wallis H 非参数检验和 Nemenyi 多重比较进行总体和组件比较。检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 实验结果

2.1 各组样本的表面形貌

图 1 为 4 组样本的 SEM 表面形貌。如图 1 所示, 经过大颗粒喷砂酸蚀处理后样本表面呈现具有多级孔洞的微粗糙形貌。其中经过喷砂颗粒的轰击生成直径 10~30 μm 的大孔, 大孔相互交错形成一级粗糙度, 大孔周围形成尖锐的峰嵴。而经过酸蚀之后形成直径为 1~3 μm 的小孔, 形成二级粗糙度。各组样本之间表面形貌基本无显著差异, 均由一二级孔洞构成微粗糙的形貌特征。

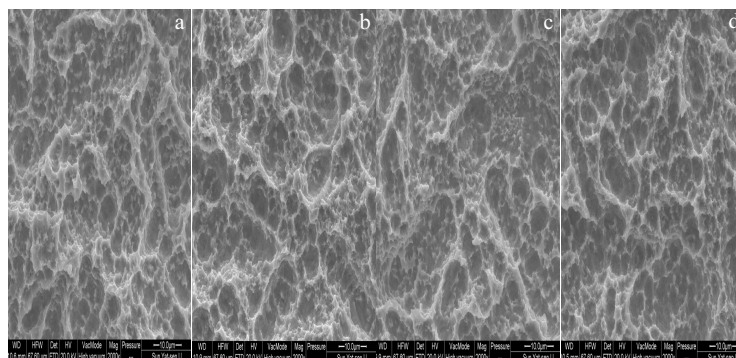


图 1 4 组样本的 SEM 表面形貌

Fig.1 Typical FE-SEM images of four different groups: (a) SLA, (b) SLA-NaCl, (c) SLA- Ca^{2+} , and (d) SLA- Ca^{2+} -NaCl

2.2 表面元素构成

表 1 为 4 组样本表面元素化学成分。如表 1 所示，4 组样本表面除 SLA 组之外，另外 3 组因浸泡在不同液体中，所以含有相应的元素，当然含量非常少，除此之外各组均含有 Ti 元素，另外因为普通环境下的污染各组均含有 C 元素。

2.3 表面粗糙度

各组样本表面粗糙度检测 R_a 结果如图 2 所示，SLA 组为(2.92±0.14) μm ，SLA-NaCl 组为(2.85±0.09) μm ，SLA-Ca²⁺组为(3.03±0.09) μm ，SLA-Ca²⁺-NaCl 组为(2.91±0.19) μm ，各组之间并无显著差异。

2.4 各组样本表面电荷

Zeta 电位检测揭露各组样本表面电荷的差异。如图 3 所示，在 pH 值为 7.4 的条件下，SLA-Ca²⁺组其表面电荷的绝对值最小，显著小于另外 3 组；而 SLA-NaCl 组与 SLA-Ca²⁺-NaCl 组两者之间无显著差异，但是其绝对值均显著小于 SLA 组。

2.5 各组样本表面 Fn 吸附能力

本研究中使用 BCA 蛋白定量检测试剂盒进行测试，结果如图 4 所示各组样本随孵育时间的延长蛋白吸附能力均呈增长趋势，其中 SLA-Ca²⁺组在各个时间

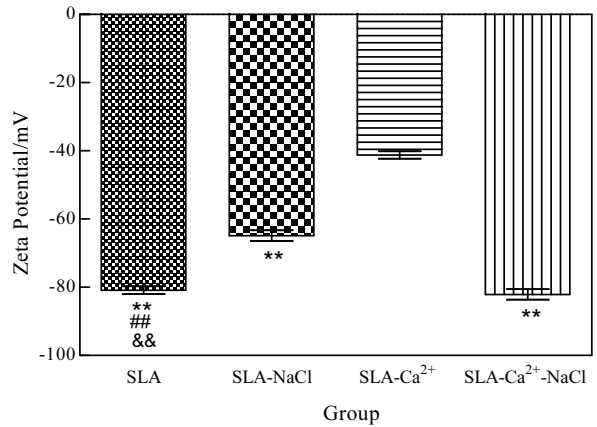


图 3 4 组样本表面 Zeta 电位的比较

Fig.3 Comparison of Zeta-potential at pH=7.4 for different groups (** $P < 0.01$ compared to the group of SLA-Ca²⁺; ## $P < 0.01$ compared to the group of SLA-NaCl; && $P < 0.01$ compared to the group of SLA-Ca²⁺-NaCl)

表 1 4 组样本表面元素化学成分

Group	Ti	C	Na	Cl	Ca
SLA	97.99	2.01	-	-	-
SLA-NaCl	96.32	2.04	0.97	0.67	-
SLA-Ca ²⁺	97.51	2.02	-	0.26	0.21
SLA-Ca ²⁺ -NaCl	96.44	2.02	0.79	0.53	0.22

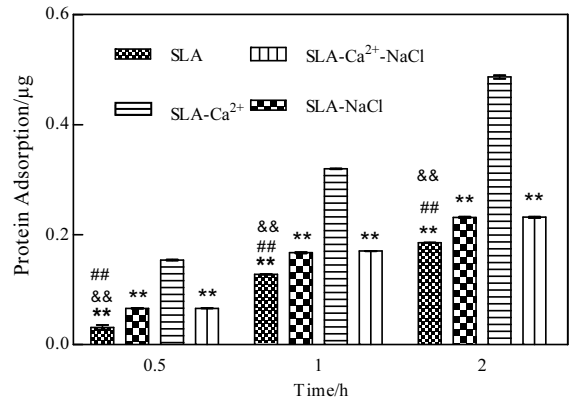


图 4 4 组样本表面不同时间点蛋白吸附能力的比较

Fig.4 Protein adsorptive capacity of four groups assessed using fibronectin: (** $P < 0.01$ compared to the group of SLA-Ca²⁺; ## $P < 0.01$ compared to the group of SLA-NaCl; && $P < 0.01$ compared to the group of SLA-Ca²⁺-NaCl)

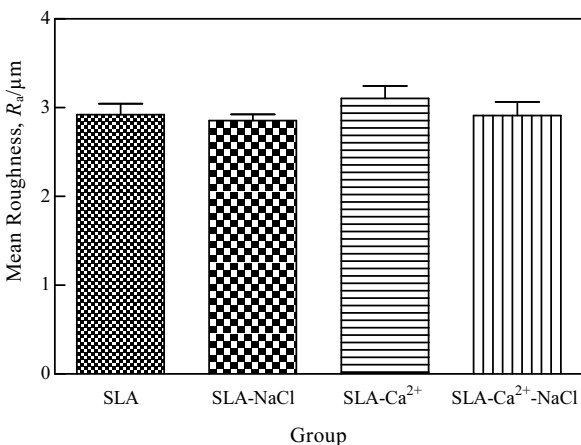


图 2 4 组样本表面粗糙度 R_a 的比较

Fig.2 Quantitative measurement of surface roughness parameters R_a for different groups

点其蛋白吸附能力均显著高于另外 3 组，而 SLA-NaCl 组与 SLA-Ca²⁺-NaCl 组两者之间无显著差异，但是在各个时间点均显著高于 SLA 组。

3 讨论

牙科种植修复能够获得理想功能是在建立在种植体与骨组织之间良好的骨结合之上的。骨结合的发生与形成涉及到相当复杂的生理学过程，牵涉到人工材料与机体宿主之间的相互识别、反应与结合。当钛种植

体以及其他生物材料在植入到宿主体内之后，首先是与血液环境中的蛋白、纤维、离子、细胞因子等成分互相识别，随后发生的是成骨细胞的粘附、增殖、分化以及矿化，最终形成骨结合^[15]。因此，蛋白在种植体表面的识别与附着以及成骨细胞的粘附是骨结合发生的关键环节，粘附过程的迅速完成是快速实现骨结合的要求之一。在成骨细胞粘附的程序当中，纤维连接蛋白 (fibronectin, Fn) 又是 ECM 中介导成骨细胞完成粘附步骤的主要引导蛋白。所以，在本研究中使用 Fn 作为模型蛋白来检测。

正常的人体中血液的 pH 值在 7.35~7.45 之间，人体内大部分蛋白质其等电点基本小于 7，例如 Fn 其等电点在 5.8 左右、对骨形成有重要作用的重组人骨形成蛋白 2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2 rhBMP2) 其等电点在 4.8 左右，也就是说在正常人体内的血液中大部分蛋白质都带负电荷(甚至成骨细胞表面同样带负电荷)^[16]。所以，经过 UV 照射过的带正电荷或者负电荷显著减少的钛表面将会与带负电荷的蛋白通过静电吸引迅速的形成早期粘附，然而未经处理的种植体表面在血液环境下其表面将会携带大量的负电荷，植入人体内将与各种蛋白之间存在较强的静电排斥作用，并且之前的研究基本上忽略了这点。因此，如果种植体表面携带的是正电荷或者与对照组相比携带较少的负电荷将使种植体表面与蛋白之间由原来的静电排斥变为静电吸引或者静电排斥明显减弱，将会进一步提升钛种植体表面的蛋白吸附能力，也将会显著提升植入材料的生物学性能。

在本研究中通过大颗粒喷砂酸蚀技术在钛片表面制得了微粗糙的表面，通过 FE-SEM 观察可以见到典型的一二级孔洞结构，这种表面形貌有利于种植体与骨组织之间形成机械嵌合获得良好的初始稳定性。通过表面元素检测发现除 SLA 组之外，另外 3 组因为浸泡在不同的液体中其表面均保留了极少量的相应元素。Zeta 电位是一个反应固体-液体界面之间电荷状况的参数，在本研究中使用固体表面 Zeta 电位仪检测各组样本表面的电荷情况，这在相关研究中尚属首次，固体表面电荷受多种因素影响例如表面化学构成，以及周围环境 pH 值等均可影响表面电荷的状态^[8]。在本研究中将 pH 值设定在正常生理条件下的数值，以更好的模拟真实情况，根据之前的研究检测纯钛的等电点约为 4.2，因此在 pH 值为 7.4 的环境下其表面将携带大量负电荷^[8]，使用携带二价正电荷的钙离子作为桥接离子，其一个正电荷连接到带负电荷的钛片表面，另一个正电荷便可以与同样携带负电荷 Fn 相吸附(见图 5)，表面电荷检测结果表明，经过二价钙离子处理

之后 SLA-Ca²⁺组表面总体上携带最少的负电荷，因此其表面 Fn 吸附能力也是最强的，而 SLA-NaCl 组因为钛片在生理盐水中浸泡之后其表面的负电荷一部分会与 Na⁺相中和，所以其表面负电荷相对较少；与之类似的是 SLA-Ca²⁺-NaCl 组，经过二价钙离子处理之后其表面本应该携带最少的负电荷，但是再次经过生理盐水浸泡后，其表面的正电荷便被 Cl⁻所中和。因此，2 组样本表面携带的负电荷与 SLA 组想比较均显著减少，而 SLA 组表面总体上携带最多的负电荷。这一结果在 Fn 吸附能力的检测中被再次验证，表面负电荷最少的 SLA-Ca²⁺组其 Fn 吸附能力最强，SLA-NaCl 组与 SLA-Ca²⁺-NaCl 组两者均有相似的 Fn 吸附能力，均显著高于 SLA 组，而 SLA 组因为表面携带的负电荷最多与 Fn 之间静电排斥作用也最强，因此其表面蛋白吸附能力最弱。

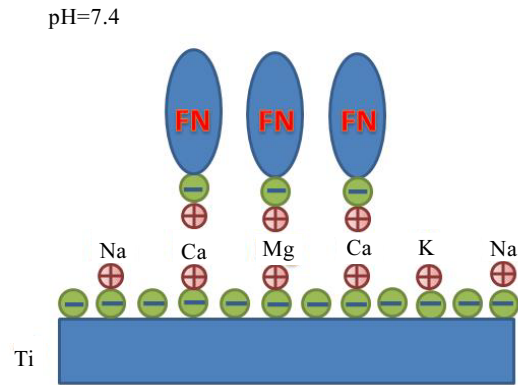


图 5 pH 值为 7.4 的环境下通过桥接离子改变钛表面电荷与 Fn 静电吸附作用原理示意图

Fig.5 Schematic description of the mechanism underlying electrostatic interactions between fibronectin molecules and titanium surfaces bridging by different ions

4 结 论

1) 通过将纯钛浸泡在氯化钙溶液中，其表面的电荷状况得到了改变，二价钙离子作为桥接离子可以与纯钛表面的负电荷相吸附，当然其他的二价阳离子甚至多价阳离子理论上也具有作为桥接离子的能力。

2) 表面电荷状况改变之后的钛片，可以通过桥接离子吸附更多的带负电荷的蛋白质，例如对细胞粘附伸展起重要作用的 Fn，然而表面电荷的变化对吸附到其表面的蛋白构象的影响以及对细胞的粘附增殖分化等能力的影响需要进一步检测。

参考文献 References

- [1] Anselme K. *Biomaterials*[J], 2000, 21(7): 667
- [2] Kim H, Choi S H, Ryu J J *et al. Biomed Mater*[J], 2008, 3(2): 25011
- [3] Liu P, Hao Y, Zhao Y *et al. Colloids Surf B Biointerfaces*[J], 2017, 160: 110
- [4] Nazarov D V, Zemtsova E G, Solokhin A Y *et al. Nanomaterials*[J], 2017, 7(1): 15
- [5] Cho H J, Perikamana S K, Lee J H *et al. ACS Applied Materials & Interfaces*[J], 2014, 6(14): 11 225
- [6] Shi Q, Qian Z, Liu D *et al. Front Physiol*[J], 2017, 8: 574
- [7] Ding X L, Yang X Q, Zhou L *et al. International Journal of Nanomedicine*[J], 2013, 8: 569
- [8] Wu J, Zhou L, Ding X L *et al. Langmuir*[J], 2015, 31(36): 10037
- [9] Ding X L, Zhou L, Wang J X *et al. International Journal of Nanomedicine*[J], 2015, 10: 6955
- [10] Att W, Hori N, Takeuchi M *et al. Biomaterials*[J], 2009, 30(29): 5352
- [11] Iwasa F, Tsukimura N, Sugita Y *et al. International Journal of Nanomedicine*[J], 2011, 6: 1327
- [12] Iwasa F, Hori N, Ueno T *et al. Biomaterials*[J], 2010, 31(3): 2717
- [13] Lu H B, Wan L, Zhang X Y *et al. Rare Metal Materials and Engineering*[J], 2013, 42(8): 1558
- [14] Aita H, Hori N, Takeuchi M *et al. Biomaterials*[J], 2009, 30(6): 1015
- [15] Raphel J, Karlsson J, Galli S *et al. Biomaterials*[J], 2016, 83(3): 269
- [16] Lv L, Li K, Xie Y *et al. Materials Science and Engineering C*[J], 2017, 78(14): 96

Effect of Regulation of Surface Charge on Titanium Surfaces for Fibronectin Adsorption

Ding Xianglong¹, Li Shaobing¹, Guo Zehong¹, Lu Haibin¹, Lai Chunhua¹, Wu Jinyi¹, Gao Yan¹,
Wang Jingxu², Xu Shulan¹

(1. Center of Oral Implantology, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China)

(2. Stomatology Department of the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: The fibronectin adsorptive capacity of pure titanium surfaces was investigated to improve its biological properties by regulating its surface charge. The different surfaces of titanium sheet were obtained by sandblasting with large grit and acid-etching (SLA), and then immersing in different solutions. Surface morphology, elemental composition, roughness, and surface charge status were studied, and fibronectin adsorption assay was performed for comparative analysis. The results show that the surface morphology of each group is similar, but the surface elements of the different groups are different because of immersion in different liquids. There is no significant difference in the surface roughness of each group. Titanium sheets immersed in calcium chloride solution have the highest protein adsorption capacity ($P < 0.01$), whereas the control group has the lowest adsorption capacity. Immersion of titanium sheets in calcium chloride solution containing divalent calcium ions can change their surface charge, enhance their protein adsorption capacity, and thus improve their biological properties.

Key words: surface charge; protein; implant; cell AC loss

Corresponding author: Xu Shulan, Professor, Center of Oral Implantology, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, P. R. China, Tel: 0086-20-84408890, E-mail: xushulan@vip.163.com