

## 纳米网状结构对骨髓间充质干细胞生物活性的影响

阮征<sup>1,2</sup>, 尹庆水<sup>2</sup>, 张余<sup>2</sup> (<sup>1</sup>南方医科大学研究生院, 广东省广州市 510515; <sup>2</sup>解放军广州军区广州总医院骨科医院, 广东省广州市 510010)

### 文章亮点:

- 1 纳米结构钛可提高成骨细胞功能, 增加骨融合, 与传统的钛金属相比具有更好的生物活性。以往的文献研究较多的是研究纳米管和纳米棒状形貌, 其他的纳米形貌对细胞生物活性的影响报道较少。
- 2 实验利用碱热处理法制备出纳米网状结构, 通过观察材料对细胞增殖、黏附及成骨矿化等各项指标的影响, 初步评价材料的生物相容性及生物活性。

### 关键词:

生物材料; 纳米材料; 钛; 纳米网; 骨髓间充质干细胞; 碱热处理; 细胞形态; 细胞骨架; 成骨矿化; 黏附; 增殖; 碱性磷酸酶; 973 项目

### 主题词:

钛; 骨髓间充质干细胞; 细胞骨架; 碱性磷酸酶

### 基金资助:

973 课题子项目(2012CB619106)

### 摘要

**背景:** 有研究表明不同的纳米表面形貌对细胞的生物活性具有不同的影响, 但纳米网状结构至今少有报道。

**目的:** 观察纳米网状结构对骨髓间充质干细胞生物活性的影响。

**方法:** 实验利用碱热处理法, 制备获得纳米网状的表面形貌材料, 利用纯钛作为对照组材料, 将两种材料分别与骨髓间充质干细胞共培养, 利用扫描电镜及免疫荧光分别观察细胞形态及细胞骨架, 再利用培养不同时间后细胞的吸光度值依次检测细胞早期黏附、增殖及成骨分化情况。

**结果与结论:** 两组材料与细胞共培养 30, 60, 120 min 时, 纳米网状结构组材料表面黏附的细胞数量明显多于纯钛。共培养第 1, 3, 5 天时, 纳米网状结构组材料均可以明显促进细胞增殖, 吸光度值明显高于纯钛组 ( $P < 0.05$ )。两组材料与细胞成骨诱导培养 14 d 后, 与纯钛组相比, 纳米网状结构组材料的碱性磷酸酶值明显升高 ( $P < 0.05$ ), 其材料表面的细胞形态及细胞骨架结构均较好。结果证实, 与传统的纯钛材料相比, 纳米网状结构可以更好的调节骨髓间充质干细胞的生物活性。

阮征, 尹庆水, 张余. 纳米网状结构对骨髓间充质干细胞生物活性的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(25):3987-3992.

## Effects of nanonetwork topography on bone marrow mesenchymal stem cell bioactivity

Ruan Zheng<sup>1,2</sup>, Yin Qing-shui<sup>2</sup>, Zhang Yu<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Hospital of Orthopedics, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Many studies have shown that different nanostructures produce different influences on cell bioactivity, but the nanonetwork structure is not reported yet.

**OBJECTIVE:** To study the influence of the nanonetwork topography on the bioactivity of bone marrow mesenchymal stem cells.

**METHODS:** The nanonetwork topography was fabricated on biomedical titanium surface by alkali-heat treatment, and pure titanium served as control group. Bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured with the above two types of samples. Cell morphology and cytoskeleton were observed using scanning electron microscope and immunofluorescence method. The cell adhesion, proliferation and osteogenic differentiation were detected by measurement of absorbance values at different culture time.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The nanonetwork topography had significant advantage on the number of adherent cells at 30, 60 and 120 minutes of co-culture. The cell proliferation was significantly accelerated by the nanonetwork topography at days 1, 3, 5 of co-culture, and the absorbance values in the nanonetwork group were significantly higher than those in the pure titanium group ( $P < 0.05$ ). The alkaline phosphatase activity in the nanonetwork group was also significantly higher than that in the pure titanium group at 14 days of osteogenic induction ( $P < 0.05$ ). The cell shape and cytoskeleton on the nanonetwork surface were better than those on the titanium surface. These findings indicate that the nanonetwork topography has better effects on cell bioactivity compared with pure titanium.

阮征, 男, 1987 年生, 安徽省铜陵市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士。

通讯作者: 尹庆水, 教授, 博士生导师, 解放军广州军区广州总医院骨科, 广东省广州市 510010

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.25.009

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)25-03987-06

稿件接受: 2014-05-15

Ruan Zheng, Studying for master's degree, Graduate School of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; Hospital of Orthopedics, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Corresponding author: Yin Qing-shui, Professor, Doctoral supervisor, Hospital of Orthopedics, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-05-15

**Subject headings:** titanium; bone marrow mesenchymal stem cells; cytoskeleton; alkaline phosphatase  
**Funding:** the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2012CB619106

Ruan Z, Yin QS, Zhang Y. Effects of nanonetwork topography on bone marrow mesenchymal stem cell bioactivity. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(25):3987-3992.

## 0 引言 Introduction

目前在临床上应用最广泛的骨科金属植入材料依然是钛及其合金, 其优点是拥有良好的耐腐蚀性及生物相容性<sup>[1]</sup>, 但也因其自身的生物学活性不高, 缺乏与周围组织的有效结合, 导致了较低的骨整合能力<sup>[2]</sup>。有研究指出, 与生物活性较好的材料相比, 其促进骨整合的时间要晚几个月甚至更长时间, 甚至可以使得1.5%–2.5%的髌、膝关节置换患者存在因为感染导致手术失败的风险<sup>[3]</sup>。因此, 人们希望在保留钛及其合金原有优势的基础上, 通过不同的方式来提高它的生物活性, 取得更满意的临床疗效。近年来, 有很多研究证明, 对钛及其合金进行表面纳米化的改性可以明显提高它的生物活性<sup>[4-5]</sup>, 目前报道的已有的纳米植入材料有纳米陶瓷<sup>[6]</sup>、纳米纤维<sup>[7]</sup>、纳米复合物等<sup>[8]</sup>。

通过不同的方法, 可以获得不同表面形貌的纳米化结构, 均对细胞具有不同程度的影响<sup>[9-11]</sup>。有学者认为, 之所以会产生不同影响, 主要是表面形貌通过对细胞外基质中蛋白黏附及对细胞黏附的调节产生的。细胞表面的受体可以识别并结合特定的细胞外基质中结合蛋白的形状, 并与材料相结合。不同的纳米表面形貌可以对细胞外基质中的整合蛋白产生不同的调节作用。这些整合蛋白受体与细胞骨架相互作用, 可以影响细胞的形状, 增殖及分化等方面<sup>[12]</sup>。有研究证明了利用阳极氧化法制造的纳米化表面比传统的钛金属有更高的表面粗糙度, 这样可以显著增加亲水性蛋白的吸附从而促进细胞的黏附。有研究发现, 钛金属表面利用阳极氧化法构建纳米化形貌后, 成骨细胞的黏附率可以增加33%, 纤维蛋白和玻连蛋白的吸附率分别增加了30%和18%。在经过21 d的培养之后, 纳米钛的碱性磷酸酶和钙沉积都明显比普通钛要高<sup>[13]</sup>。有研究发现纳米钛可以调节人骨髓间充质干细胞的分化<sup>[14]</sup>, 他们发现孔径更小的纳米结构可增加细胞吸附性, 对细胞分化无明显影响, 而孔径更大点的纳米结构可使细胞的形态延长10倍, 他们认为这种细长的细胞形态可以使骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞样细胞, 从而促进细胞的成骨分化功能。

利用碱热处理法获得纳米形貌材料是一种较为新兴的方法, 以往已有文献报道通过碱热处理法处理的纳米管状结构较传统的纯钛材料具有更好的生物活性<sup>[15]</sup>, 然而关于纳米网状结构材料对细胞生物活性影响的研究并不多见。实验通过碱热处理方法, 制备出纳米网状结构的表面形貌, 以纯钛为对照组材料, 通过与间充质干细胞共同培养, 观察细胞形状, 对比细胞黏附、增殖及分化的指标, 观察纳米网状结构形貌对骨髓间充质干细胞生物活性的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 材料细胞学实验。

**时间及地点:** 于2013年1至12月在解放军广州军区广州总医院骨科实验室完成。

**材料:**

**细胞:** 小鼠骨髓间充质干细胞购于美国菌种保藏中心(NO.CRL-12424)。

**钛片:** 选用医用钛片(宝鸡启辰新材料科技有限公司)做为实验基体材料(纯度 $\geq 99.5\%$ , 35.0 mm $\times$ 35.0 mm $\times$ 0.1 mm)。生物医用钛薄片经过酸浸蚀后, 放入含有70 mL, 浓度为2 mol/L的氢氧化钠溶液的聚四氟乙烯高压灭菌锅内, 将温度调控为60  $^{\circ}\text{C}$ , 样品处理24 h, 等待温度降至室温后, 取出样品用等离子水冲洗数遍, 自然风干。待样品干燥后放入浓度为1 mol/L的盐酸溶液中进行酸处理48 h。酸处理完成后将样品放入熔炉内, 在550  $^{\circ}\text{C}$ 下行退火处理2 h。样品制作完成后裁剪成直径为1 cm的圆片状, 便于后续实验的进行。

纳米网状结构对骨髓间充质干细胞生物活性的影响实验相关试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
$\alpha$ -MEM 培养基	Hyclone
二甲基亚砜	Sigma
噻唑蓝、钙黄绿素、乙锭均二聚物-1、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶	广州威高生物科技有限公司
Triston X-100	AMRESO
马弗炉	Thermo
场发射扫描电子显微镜	FESEM
X射线衍射仪	Germanv Bruker
酶标仪	Biocell It <sub>2</sub>
倒置荧光显微镜	Olympus
扫描电镜	Hitachi S-370N

**方法:**

**纳米化表面形貌材料的分析及观察:** 将制备完成的纳米化表面形貌材料表面喷金处理后, 采用场发射扫描电子显微镜(FESEM, Nova Nano SEM 430, Germany)观察材料的表面细形态, 并采用HORIBA EMAX能谱仪分析样品的表面元素组成。

**细胞培养和分组:** 小鼠骨髓间充质干细胞用含有体积分数10%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基培养, 每隔两三天全量换液1次。细胞成骨分化时所用成骨诱导液由10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠, 50 mg/L维生素C,  $10^{-8}$  mmol/L地塞米松配

制而成。细胞放在含体积分数5%CO<sub>2</sub>, 37 °C的孵箱内培养。实验随机分为纳米网结构组和纯钛组, 每组材料均与细胞浓度为 $2 \times 10^7$  L<sup>-1</sup>的细胞悬液500 μL共培养。实验重复3次。

**扫描电镜观察:** 将细胞悬液与材料共培养24 h, 体积分数3%戊二醛4 °C固定6 h, PBS冲洗3遍。依次用体积分数为50%, 70%, 95%, 100%的乙醇脱水干燥, 各浓度干燥2次, 每次10 min, 用扫描电镜观察各组材料表面细胞形态。

**细胞骨架的免疫荧光染色:** 将材料与细胞悬液共培养24 h, PBS清洗3遍后, 用40 g/L多聚甲醛在4 °C条件下固定30 min, PBS清洗3遍, 体积分数0.2% Triton 4 °C通透10 min后PBS清洗3遍, 用血清封闭液室温下封闭1 h, PBS清洗3遍, 每次5 min, 每孔添加TRITC-conjugated phalloidin(鬼笔环肽, 质量浓度5 mg/L) 4 °C下避光孵育过夜。PBS清洗3遍后, 37 °C条件下DAPI避光染色30 min, PBS清洗3遍后用正置荧光显微镜拍照。对比观察细胞骨架形态。

**细胞黏附:** 将材料与细胞悬液分别共培养30, 60, 120 min。采用48孔板每孔用PBS清洗3遍, 40 g/L多聚甲醛4 °C固定20 min, PBS清洗3遍, 每孔加入DAPI, 37 °C避光孵育30 min。PBS清洗6遍后, 用正置荧光显微镜观察细胞早期黏附情况。每片材料在荧光显微镜下随机选取5个视野拍照, 拍照后统计细胞数量。

**MTT检测:** 分别测试细胞与材料共培养后第1, 3, 5天的细胞增殖情况。在共培养达到预定时间后, 吸弃上清液。每孔内加入适量等比例的α-MEM培养基与MTT溶液(10:1), 孵箱内避光孵育4 h。加入DMSO溶液, 振荡10 min。每孔吸出100 μL与96孔板内, 在酶标仪紫外线490 nm波长下测量吸光度值。

**胞内总蛋白及碱性磷酸酶测量:** 以 $5 \times 10^7$  L<sup>-1</sup>的细胞浓度配制细胞悬液, 与材料共培养1 d后, 更换成骨诱导液培养至第15天, 期间隔天更换诱导液。更换成骨诱导液培养14 d后, 吸弃上清液, PBS清洗3遍, 加入体积分数0.2% Triton X-100在4 °C裂解过夜。次日摇匀孔内上清后, 每孔吸出100 μL, 加入等量的P-NPP工作液中, 37 °C孵育30 min后再加入100 μL体积分数0.1% NaOH溶液。每孔取100 μL溶液在酶标仪紫外线405 nm波长下测量吸光度值。从加入NaOH的溶液中取25 μL与BCA试剂盒中的溶液混合, 37 °C孵育30 min, 每孔取100 μL在酶标仪紫外线562 nm波长下测量吸光度值。将碱性磷酸酶测量所得吸光度值与相对应的BCA测量所得吸光度值相比, 所得即为标准化的碱性磷酸酶活力值。

**主要观察指标:** 细胞形态、细胞骨架形态、细胞黏附数量、细胞吸光度值、碱性磷酸酶值和胞内蛋白含量。

**统计学分析:** 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验所得数据运用SPSS 13.0软件进行分析, 组间均数差异采用两样本t检验进行比较,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 材料表面特性变化** 利用扫描电镜分析纳米化表面形貌的材料后发现, 在碱热处理中将温度控制为60 °C后获得了纳米网状结构, 见图1。利用X射线衍射检测获得了纳米网状结构材料表面后发现, 生物活性医用钛表面形成的纳米形貌的晶体结构主要由锐钛矿构成, 晶体的结晶度因锻造时不同的调控温度而不同, 能谱分析结果显示此4种纳米化表面材料的表面元素组成及元素的比例, 结果提示此4种材料表面组成一样, 都完全是钛元素。

**2.2 小鼠骨髓间充质干细胞与纯钛材料和纳米网状结构材料分别共培养后细胞形态及细胞骨架结构变化** 将纳米网状结构材料和纯钛分别与细胞悬液共培养24 h后, 通过扫描电镜观察细胞形态, 见图2。通过图片实验可以发现, 纳米网状结构材料表面细胞形态较好, 细胞贴服效果最好, 细胞铺展面积最大, 可见板状伪足。在纯钛组材料表面仅可见有丝状伪足伸出, 细胞明显纤细, 呈长条状, 有隆起部分, 贴服不够充分。图3为细胞与两种材料共培养24 h后利用TRITC染色在正置荧光显微镜下观察到的细胞骨架情况。与扫描电镜结果相似的是, 纳米网状结构材料表面细胞较纯钛组材料表面细胞铺展的面积更大, 纯钛组材料表面细胞虽有丝状伪足突出, 但整体形态较细长, 或为不规则形。

**2.3 小鼠骨髓间充质干细胞与纯钛材料和纳米网状结构材料分别共培养后材料与细胞黏附情况** 图4为骨髓间充质干细胞与两种材料分别共培养30, 60, 120 min后, 在材料表面黏附的情况。图4C显示, 无论是在最初的30 min, 还是在60, 120 min时, 纳米网状结构材料表面黏附的细胞数量较纯钛组都有明显的增多( $P < 0.05$ )。同时实验还发现, 两组材料表面黏附的细胞数量随时间增长而增加, 呈时间依赖性( $P < 0.05$ ), 表明材料对细胞无毒不良反应。

**2.4 小鼠骨髓间充质干细胞与纯钛材料和纳米网状结构材料共培养后细胞增殖情况** 将两组材料与骨髓间充质干细胞共培养, 用MTT法分别检测共培养第1, 3, 5天的吸光度值, 并采用统计学方法分析细胞增殖情况, 见图5。由统计图实验可以看见, 在共培养第1, 3, 5天, 纳米网状结构组材料的吸光度值都明显高于纯钛组( $P < 0.05$ )。同时, 实验还可以看出, 在共培养第1, 3, 5天的时间里, 纳米网状结构组材料的吸光度值呈一上升趋势( $P < 0.05$ ), 这表明随着时间的延长, 纳米网状结构可以促进更多的细胞增殖。

**2.5 小鼠骨髓间充质干细胞与纯钛材料和纳米网状结构材料分别共培养后细胞碱性磷酸酶活性变化** 将两组材料与细胞共培养14 d后, 检测各组材料的碱性磷酸酶值及胞内蛋白含量, 计算碱性磷酸酶与胞内蛋白的比值来比较各组材料的成骨效应, 见图6。由图可以看出, 纳米网状结构组材料较纯钛组材料有显著性的促成骨功能( $P < 0.05$ )。

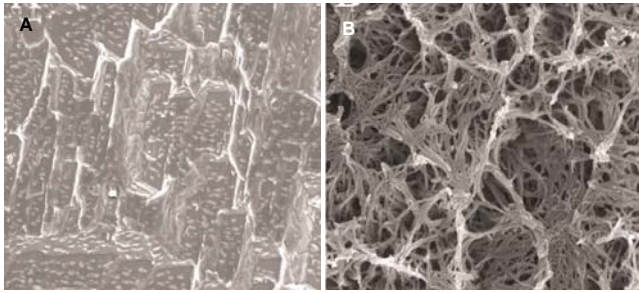


图 1 纯钛材料和纳米网状结构材料表面超微结构(扫描电镜, ×100 000)

Figure 1 Micrographs images of titanium and nanonetwork materials (scanning electron microscope, ×100 000)

图注: 图中 A 为纯钛组, B 为纳米网状结构组。由图可见, 纯钛材料表面为较为平坦的形貌, 纳米网状结构组材料表面为孔径大小不一的网状结构。

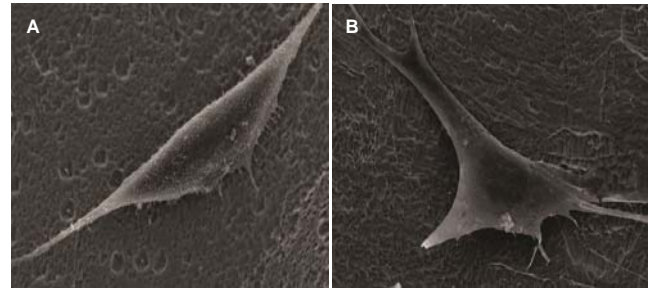


图 2 细胞与材料共培养 24 h 后纯钛材料和纳米网状结构材料表面细胞形态(扫描电镜)

Figure 2 Cell morphology at 24 hours after co-culture of cells with titanium and nanonetwork materials under scanning electron microscope

图注: 图中 A 为纯钛组(×1 500), B 为纳米网状结构组(×2 500)。由图可见, 纯钛组表面细胞形态细长, 有隆起, 贴服不充分; 纳米网状结构组材料表面细胞形态更为舒展, 贴服效果更好。

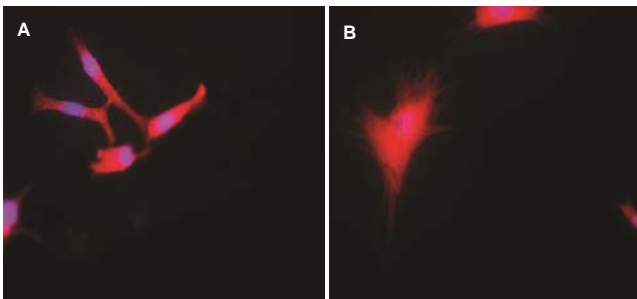


图 3 细胞与材料共培养 24 h 后纯钛材料和纳米网状结构材料表面细胞骨架形态(免疫荧光, ×200)

Figure 3 Immunofluorescent images of the cytoskeleton at 24 hours after cells were co-cultured with titanium and nanonetwork materials (×200)

图注: 图中 A 为纯钛组, B 为网状纳米结构组。由图可见, 纯钛组表面细胞的细胞骨架较为细长, 纳米网状结构组材料表面细胞的细胞骨架更为宽大。

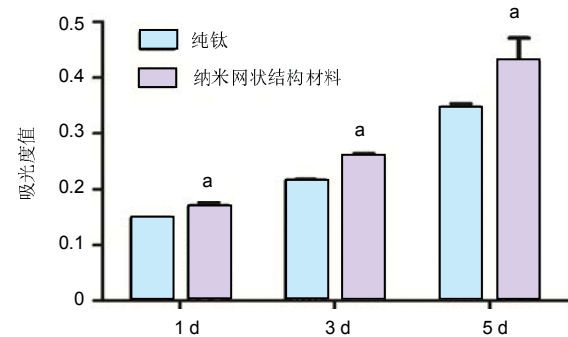


图 5 小鼠骨髓间充质干细胞与纯钛材料和纳米网状结构材料分别共培养第 1, 3, 5 天细胞增殖情况

Figure 5 Cell proliferation at days 1, 3, 5 after mouse bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured with titanium and nanonetwork materials

图注: 与纯钛组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。共培养第 1, 3, 5 天, 纳米网状结构组材料的吸光度值都明显高于纯钛组。

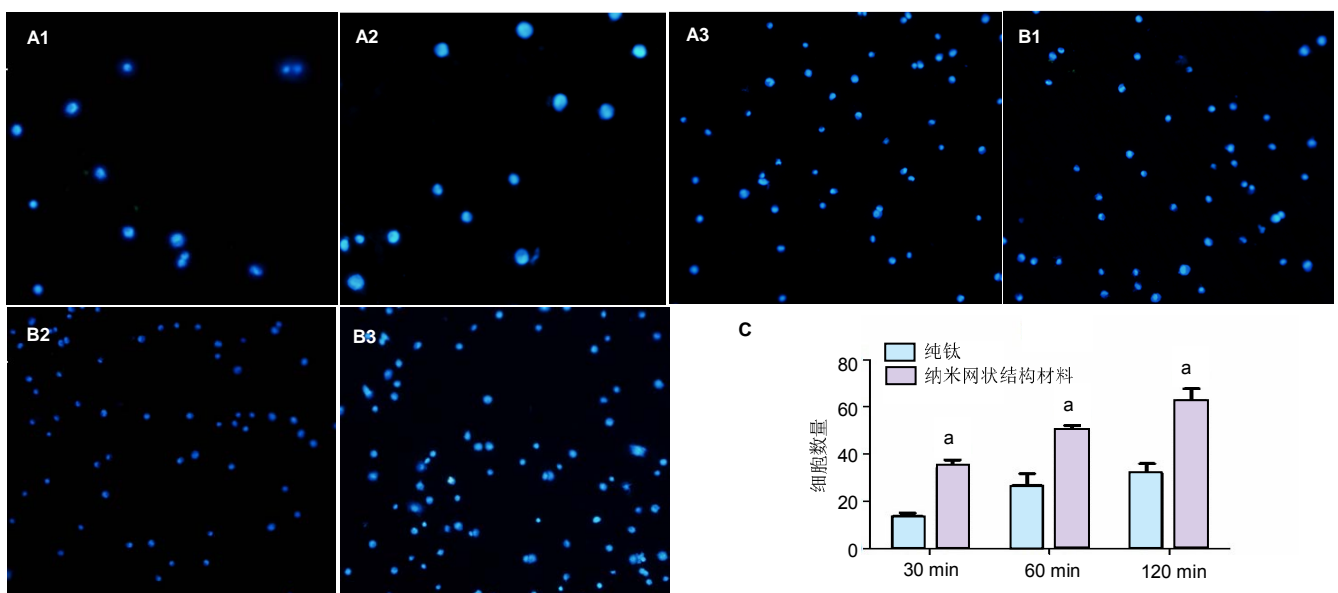


图 4 小鼠骨髓间充质干细胞与纯钛材料和纳米网状结构材料分别共培养后材料表面细胞黏附的情况(×100)

Figure 4 Cell adhesion after mouse bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured with titanium and nanonetwork materials (×100)

图注: 图为小鼠骨髓间充质干细胞与两种材料分别共培养 30 min(A1, B1)、60 min(A2, B2)和 120 min(A3, B3)后利用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色法并在荧光显微镜 100 倍下观察材料表面细胞黏附的情况。C 图为利用 DAPI 染色后对比各时间点细胞吸光度值变化情况。与纯钛组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。纳米网状结构组材料表面黏附的细胞数量均较纯钛组表面细胞多, 呈时间依赖性。

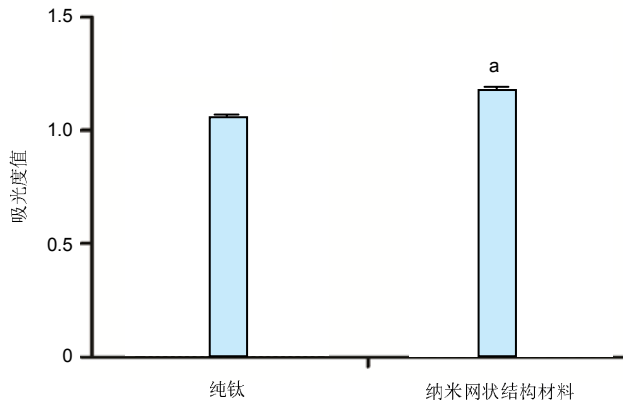


图6 小鼠骨髓间充质干细胞与材料成骨分化诱导共培养14 d后碱性磷酸酶与总蛋白吸光度的比值变化

Figure 6 The absorbance value ratio of alkaline phosphatase to total protein at 14 days after mouse bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured with titanium and nanonetwork materials

图注: 与纯钛组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。纳米网状结构组材料较纯钛组材料有显著性的促成骨功能。

**2.6 生物相容性分析** 纳米网状结构组材料在细胞形态、细胞黏附、细胞增殖、细胞骨架以及细胞成骨分化等各方面均优于纯钛组材料, 说明纳米网状结构较纯钛具有更好的生物相容性。

### 3 讨论 Discussion

不同纳米化表面对细胞的影响不尽相同<sup>[13-14]</sup>。金属钛表面进行纳米化的改性使得材料与宿主之间建立了更稳定的机械固体界面的同时, 对细胞的黏附、再生、增殖和分化产生了不同程度的影响。已有大量的文献报道证实了骨髓间充质干细胞具有向成骨细胞分化的潜能, 并且已经广泛应用于口腔科及整形外科的材料研究当中, 因此探讨纳米网状结构形貌的材料对骨髓间充质细胞的生物活性影响是文章的重点。

如扫描电镜图片所示, 利用碱热处理法, 将温度控制为60 °C后, 在钛金属表面形成了类似于网状的纳米结构。相关的研究证明, 经过表面纳米化改性的材料的细胞黏附能力比光滑表面的材料更高<sup>[15]</sup>。纳米化表面可以提高材料对细胞早期的黏附和增殖<sup>[16]</sup>。不同的结构所形成的表面与细胞的接触面积不同, 这也直接决定了细胞与材料的黏附情况, 而黏附有较多细胞的纳米表面材料获得了更高的骨整合能力的可能。之前较多的文献报道的为纳米管或是纳米棒状结构, 实验结果提示纳米网状结构的材料对细胞的早期黏附较其纯钛也更具优势。这可能是由于纳米网状结构较纯钛组材料相比, 可以提供更大的接触面积, 其表面形成的网孔的直径较小, 也利于更多的细胞黏附。与之相对应的, 较多的细胞早期黏附可以影响后期更高的细胞增殖率, 实验用MTT法检测细胞的增殖率, 结果也与细胞早期黏附的结果相一致, 纳米网状结构组材料明显优于纯钛组。

碱性磷酸酶被认为是早期成骨分化及骨形成的重要标志物<sup>[17-18]</sup>, 其水平升高意味着具有较强的成骨活性。碱性磷酸酶是一类水解酶, 主要分布在人或动物的肝脏和骨骼中<sup>[19-20]</sup>。骨损伤后, 在新骨形成过程中, 会有大量的碱性磷酸酶表达。碱性磷酸酶表达越多, 说明细胞向成骨分化能力越强<sup>[21]</sup>。细胞碱性磷酸酶活性与获取的细胞数目呈正相关性, 而碱性磷酸酶活性与蛋白浓度的比值, 即酶的比活性更能准确地反映细胞的成骨分化。实验通过检测细胞内的碱性磷酸酶活性, 同时以总蛋白浓度进行标准化, 排除细胞生长密度对实验结果的干扰, 客观比较了各组细胞的成骨分化活性。实验的发现, 与纯钛组材料相比, 纳米网状结构具有更好的促成骨能力。之前的研究指出, 当细胞形态变的细长的时候可以使骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞样细胞, 从而促进细胞的成骨分化功能。结合实验中扫描电镜观察细胞形态的结果, 作者认为, 当细胞形态更为舒展时可以更好的促进细胞的成骨分化。当然, 通过其它工艺所获得的纳米表面形貌可能获得不同的实验结果。

有研究发现, 当细胞骨架受到外界张力大小改变的影响后, 其自身可以通过调节转录因子或者细胞核孔的方式改变mRNA的转录<sup>[22]</sup>, 增加的张力通过完成的细胞骨架传递到核纤层蛋白<sup>[23-24]</sup>。另外一些研究认为, 细胞核的基因表达可以被纳米结构通过调节细胞骨架而发生改变<sup>[25]</sup>, 他们发现, 细胞可以通过增加细胞骨骼肌的伸缩性从而间接增加与黏附及骨骼肌相关的信号转导因子, 如细胞外调节蛋白激酶(ERK), 局部黏着斑激酶(FAK)等<sup>[26-30]</sup>。实验通过免疫荧光法观察骨髓间充质干细胞与纳米化材料共培养后形成的细胞骨架形态, 并结合扫描电镜观察细胞形态, 通过实验可以发现, 纳米网状结构表面的细胞铺展的更为舒展, 细胞与材料贴服更为紧密, 细胞周围衍生出更过的板状伪足与材料相结合。而纯钛组材料表面的细胞形态显得较为细长, 有丝状伪足伸出, 伪足数量较少, 细胞贴服效果不理想。这也与之前的相关实验结果相吻合, 这说明与传统的纯钛组材料相比, 纳米网状结构可以诱导骨髓间充质干细胞发挥最好的生物活性。

总之, 实验比较了利用碱热处理法获得了纳米网状结构与传统纯钛材料对骨髓间充质干细胞的生物活性的影响。实验结果显示纳米网状结构较传统的纯钛材料在对细胞的黏附、增殖、分化和成骨影响等各方面显现出更具优势。这也提示纳米网状结构态是一种具有潜力的纳米表面形貌。未来实验将对纳米网状结构对细胞促进的机制进行更深一步的研究, 以及探究多大网径的纳米网状结构最具优势。

**致谢:** 感谢广州军区广州总医院尹庆水教授以及张余副教授对本次实验的指导, 感谢华南理工大学的宁成玉老师和于鹏博士提供的实验材料。

**作者贡献:** 实验设计为第一、二和通讯作者。实验实施和成文为第一作者。通讯作者审核。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验不涉及伦理学方面内容。

**学术术语:** 纳米结构-通常是指尺寸在 100 nm 以下的微小结构。也就是以纳米尺度的物质单元为基础, 按一定规律构筑或组装一种新的体系, 它包括一维的、二维的、三维的体系, 这些物质单元包括纳米微粒、稳定的团簇或人造超原子、纳米管、纳米棒、纳米丝以及纳米尺寸的孔洞。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Chaudhari A, Braem A, Vleugels J, et al. Bone tissue response to porous and functionalized titanium and silica based coatings. *PLoS One*. 2011;6(9):e24186.
- [2] Tran N, Webster TJ. Nanotechnology for bone materials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009; 1(3): 336-351.
- [3] Lentino JR. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis*. 2003;36(9):1157-1161.
- [4] de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004; 25(3):403-413.
- [5] Mendonça G, Mendonça D, Aragao FJ, et al. Advancing dental implant surface technology—from micron-to nanotopography. *Biomaterials*. 2008;29(28):3822-3835.
- [6] Sato M, Aslani A, Sambito MA, et al. Nanocrystalline hydroxyapatite/titania coatings on titanium improves osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(1): 265-272.
- [7] Fujihara K, Kotaki M, Ramakrishna S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials*. 2005;26(19): 4139-4147.
- [8] Kay S, Thapa A, Haberstroh KM, et al. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. *Tissue Eng*. 2002;8(5):753-761.
- [9] Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, et al. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcif Tissue Int*. 2002;71(6):519-529.
- [10] Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, et al. Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res A*. 2004;69(3): 462-468.
- [11] Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials*. 2005;26(14):1837-1847.
- [12] Damsky CH. Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone*. 1999; 25(1):95-96.
- [13] Ercan B, Webster TJ. The effect of biphasic electrical stimulation on osteoblast function at anodized nanotubular titanium surfaces. *Biomaterials*. 2010;31(13):3684-3693.
- [14] Variola F, Vetrone F, Richert L, et al. Improving biocompatibility of implantable metals by nanoscale modification of surfaces: an overview of strategies, fabrication methods, and challenges. *Small*. 2009;5(9):996-1006.
- [15] 于卫强,张益琳,张富强,等. 阳极氧化TiO<sub>2</sub>纳米管碱热处理对成骨细胞行为的影响[J]. *口腔医学研究*, 2009, 25(6):696-698.
- [16] Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, et al. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J*. 2007;92(8):2964-2974.
- [17] Curtis ASG. Small is beautiful but smaller is the aim: review of a life of research. *Eur Cell Mater*. 2004;8:27-36.
- [18] Dalby MJ, Kayser MV, Bonfield W, et al. Initial attachment of osteoblasts to an optimised HAPEXTM topography. *Biomaterials*. 2002;23(3):681-690.
- [19] Xu L, Pan F, Yu G, et al. In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy. *Biomaterials*. 2009;30(8):1512-1523.
- [20] Heidi A, Ronald M, Leo I, et al. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials*. 2005;26:4964-4974.
- [21] Webster TJ, Erqun C, Doremus RH, et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 2000;21: 1803-1810.
- [22] Allen MJ. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet Clin Pathol*. 2003;32:101-113.
- [23] Salvatore F, Sacchetti L, Castaldo G. Multivariate discriminant analysis of biochemical parameters for the differentiation of clinically confounding liver diseases. *Clin Chim Acta*. 1997; 257(1):41-58.
- [24] D'Amico E, Paroli M, Fratelli V, et al. Primary biliary cirrhosis induced by interferon- $\alpha$  therapy for hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci*. 1995;40(10):2113-2116.
- [25] Mcnamara LE, McMurray RJ, Biggs MJ, et al. Nanotopographical control of stem cell differentiation. *J Tissue Eng*. 2010;2010:120623.
- [26] Dalby MJ, Biggs MJ, Gadegaard N, et al. Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning. *J Cell Biochem*. 2007; 100(2):326-338.
- [27] Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*. 2003;116(7):1157-1173.
- [28] Anselme K, Davidson P, Popa AM, et al. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater*. 2010;6:3824-3826.
- [29] Dalby MJ, Andar A, Nag A, et al. Genomic expression of mesenchymal stem cells to altered nanoscale topographies. *J R Soc Interface*. 2008;5(26):1055-1065.
- [30] Hamilton DW, Brunette DM. The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. *Biomaterials*. 2007;28(10): 1806-1819.