

纯钛表面阳极氧化增强成骨细胞生物活性及护骨素基因的表达

付晓龙¹, 李 莺¹, 李宝娥², 李长义¹ (¹天津医科大学口腔医院, 天津市 300070; ²河北工业大学材料科学与工程学院, 天津市 300019)

文章亮点:

1 研究显示, 纳米结构尺寸与天然骨的组成更为相近, 因此, 相对于微米环境来说, 成骨细胞更习惯于在纳米结构表面生长。因而, 在纯钛表面制备纳米结构更有利于成骨细胞的黏附、增殖和成骨, 促进骨结合。
2 实验的特色在于研究阳极氧化技术应用于纯钛表面处理形成纳米孔结构, 对成骨细胞活性及护骨素基因表达的影响, 证实阳极氧化后形成纳米孔结构的钛片更有利于成骨细胞的黏附、增殖和护骨素基因的表达, 进而促进成骨细胞生长, 具有良好的生物相容性。

关键词:

生物材料; 口腔生物材料; 阳极氧化; 钛; 纳米孔; 成骨细胞; 增殖; 生物活性; 护骨素; 河北省自然科学基金

主题词:

钛; 纳米孔; 成骨细胞

基金资助:

天津市高等学校科技发展基金项目(20120126), 课题名称“种植体表面仿生图案促进成骨细胞活性的分子网络研究”; 河北省自然科学基金(E2013202021), 课题名称“阳极氧化法改性钛合金表面生物学性能的研究”; 中国科学院特种无机涂层重点实验室2012年度开放基金(KLICM-2012-02), 课题名称“钛合金表面纳米化和功能化研究”

摘要

背景: 纯钛阳极氧化改性后形成的纳米结构与骨组织具有良好的生物相容性。

目的: 观察纯钛表面纳米孔结构的形貌和物相构成, 以及其对 MC3T3-E1 小鼠前成骨细胞增殖、黏附等生物学行为和促成骨基因护骨素表达的影响。

方法: 取纯钛片 24 份, 其中 12 份仅进行机械抛光, 作为对照组; 另外 12 份进行机械抛光后, 应用阳极氧化技术在纯钛表面制备纳米孔结构, 作为实验组。将小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 分别接种于两组试件表面, 接种 7 d 后扫描电镜下观察细胞形态, 采用 MTT 法检测细胞增殖情况, 绘制生长曲线; 同时检测细胞促成骨基因护骨素的表达。

结果与结论: 阳极氧化后钛片表面形成规格统一的纳米孔结构, 但是物相构成并未发生变化。与接种于对照组试件上的成骨细胞相比, 实验组试件表面的细胞密度变大, 覆盖金属的面积更多, 呈现多边形结构, 突触向周围移行, 可见板状伪足向周围材料伸出; 接种第 7 天时, 实验组细胞数目约为对照组的 1.4 倍, 同时纳米孔表面成骨细胞护骨素基因的表达高于对照组($P < 0.01$)。结果表明阳极氧化后形成纳米孔结构的钛片更有利于成骨细胞的黏附、增殖和护骨素基因的表达, 进而促进成骨细胞生长, 具有良好的生物相容性。

付晓龙, 李莺, 李宝娥, 李长义. 纯钛表面阳极氧化增强成骨细胞生物活性及护骨素基因的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(39):6240-6245.

Improvement of osteoblast bioactivity and osteoprotegerin gene expression of titanium surface by anodic oxidation

Fu Xiao-long¹, Li Ying¹, Li Bao-e², Li Chang-yi¹ (¹Stomatological Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ²School of Materials Science and Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract

BACKGROUND: Nanostructure formation on titanium surface by anodic oxidation has good biocompatibility with bone tissue.

OBJECTIVE: To observe the surface morphology and crystalline constitution of nanopores microstructure on titanium surface formed by anodic oxidation and to further observe its influence on the MC3T3-E1 osteoblast cells' biological behavior and the gene expression of osteoprotegerin.

METHODS: Nanopores forming on titanium surface by anodic oxidation was prepared as experimental group and polished titanium as control group (12 samples for each group). Mouse MC3T3-E1 osteoblasts were co-cultured with polished pure titanium plate group and anodic oxidation nanopores group. After 7 days of inoculation, cell morphology was observed using scanning electron microscopy, MTT method was used for the cell proliferation test and the growth curve was made. Gene expression of osteoprotegerin was also detected.

RESULTS AND CONCLUSION: After anodic oxidation, a homogeneous and uniform array of nanopores formed;

付晓龙, 男, 1988 年生, 山东省青岛市人, 汉族, 天津医科大学口腔医院在读硕士, 主要从事口腔种植材料方面的研究。

通讯作者: 李长义, 博士, 教授, 主任医师, 天津医科大学口腔医院, 天津市 300070

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

2014.39.002

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)39-06240-06

稿件接受: 2014-08-23

Fu Xiao-long, Studying for master's degree, Stomatological Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Li Chang-yi, M.D., Professor, Chief physician, Stomatological Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Accepted: 2014-08-23

however it had no significant influence on the crystalline phase of the titanium sample surfaces. Titanium surface with nanopore structure was more favorable than polished titanium surface for cell attachment and spreading. Cells on the anodized surface with nanopores had higher cell density and bigger metal coverage area. Cells on the nanopores surface also exhibited a polygonal shape with many filopodia extending in all directions. MTT method showed that the anodized nanopore surface had higher cell amount than the as-polished titanium, and the former was about 1.4 times of the latter group after 7 days of culture. The gene expression level of osteoprotegerin in the MC3T3-E1 cells cultured on anodized titanium surface with nanopores was significantly higher than that on the as-polished titanium ($P < 0.01$). The anodic oxidation treatment is more advantageous for the osteoblasts adhesion and gene expression of osteoprotegerin, thereby promoting the growth of osteoblasts.

Subject headings: titanium; nanopores; osteoblasts

Funding: the Scientific and Technological Developmental Foundation in Tianjin Universities, No. 20120126; the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. E2013202021; Foundation of Key Laboratory of Inorganic Coating Materials, Chinese Academy of Sciences, No. KLICM-2012-02

Fu XL, Li Y, Li BE, Li CY. Improvement of osteoblast bioactivity and osteoprotegrin gene expression of titanium surface by anodic oxidation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(39):6240-6245.

0 引言 Introduction

钛及钛合金具有优越的生物相容性、良好的抗腐蚀性、不导磁及较低的弹性模量, 成为口腔种植领域的首选材料^[1]。但由于钛及钛合金是生物惰性材料, 与骨组织的早期骨结合强度低, 植入体内后存在愈合时间长等问题。为了增进纯钛的生物学特性、促进骨结合^[2], 需要进行适当的种植体表面改性以提高种植成功率。常用的种植体表面改性方法有酸蚀、喷砂^[3]、等离子喷涂(喷涂羟基磷灰石、硅灰石和二氧化钛等^[4-6]), 通过这些方法获得理想的表面形貌和化学组成, 增进骨结合^[7]。尽管这些传统方法可以产生更有利于成骨细胞生长的表面, 促进骨结合, 但他们无法产生具有高度可控性能的表面特征(特别是化学组成和纳米形貌)。此外, 这些表面修饰方法有可能产生损害成骨细胞功能的表面残留物^[8]。近年来, 纳米科学的迅猛发展赋予纯钛表面纳米结构, 获得了理想的生物学性能^[9-10]。研究显示, 纳米结构尺寸与天然骨的组成更为相近, 因此, 相对于微米环境来说, 成骨细胞更习惯于在纳米结构表面生长。因而, 在纯钛表面制备纳米结构更有利于成骨细胞的黏附、增殖和成骨, 促进骨结合^[11-12]。

成骨细胞的特点是容易获取, 易于在体外培养和扩增, 是目前体外研究比较理想的细胞之一。成骨细胞在种植体表面的黏附、聚集是成骨的关键^[13]。本实验通过成骨细胞体外培养, 研究纯钛钛片阳极氧化改性后形成纳米孔表面微形貌的生物学特性, 以及其对MC3T3-E1小鼠前成骨细胞分泌和表达护骨素基因mRNA的影响, 试图从分子生物学和细胞角度, 探讨生物材料表面改性后的生物学特性与MC3T3-E1小鼠前成骨细胞生物学行为的相关性, 为实现钛种植体和骨组织之间的早期骨结合及钛种植体表面改性的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 对比观察体外细胞学实验。

时间及地点: 实验于2013年3至6月在天津医科大学实验中心完成。

材料:

纯钛表面阳极氧化增强成骨细胞生物活性实验的材料和试剂:

材料与试剂	来源
MC3T3-E1 小鼠前成骨细胞株	上海中科院
医用纯钛板	河北工业大学
总 RNA 提取液 Trizol	Invitrogen 公司, 美国
MTT 细胞增殖检测试剂盒、二甲亚砜	Solarbio, 北京
反转录 PCR 试剂盒、Real Master mix SYBR green 1	Newbio, 天津
PCR 引物	上海生工生物工程技术服务有限公司

纯钛表面阳极氧化增强成骨细胞生物活性实验的仪器:

仪器	来源
直流(DC)电源供应器	wyk-150, 扬州, 中国
超声波清洗机	天津市瑞普电子仪器公司, 中国
扫描电子显微镜	SEM, 日立 S-4800 型, 日本
RIGAKUD/MAX2500 型衍射仪	理学, 日本
NanoDrop 2000c	Thermo, 美国
7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪	Applied Biosystems, 美国

实验方法:

试件制备与分组: 实验分为2组, 每组12个试样。对照组为磨光后的光滑钛片, 实验组为磨光后阳极氧化20 min的钛片。

将10 mm×10 mm×1 mm的商业纯钛片用1 000目碳化硅砂纸打磨抛光, 然后分别在丙酮、乙醇和去离子水中用超声波清洗5 min, 干燥后备用。使用钛板做为阳极, 石墨(40 mm×40 mm×5 mm)作为阴极, 阳极和阴极之间的距离为40 mm, 电解液为1 mol/L的氟化钠溶液, 室温在直流(DC)电压源下, 用20 V恒定电压对磨光钛片阳极氧化20 min。在实验过程中溶液采用磁力搅拌器搅拌。阳极氧化处理后, 样品在去离子水中漂洗, 然后干燥。将制备好

的试件置于无水乙醇中超声波清洗10 min, 然后用双蒸水清洗, 干燥、高温高压消毒后备用。采用扫描电镜观察试件表面形貌, X射线衍射方法检测试样表面的物相。

MC3T3-E1小鼠前成骨细胞的培养与接种: 细胞培养于25 cm²的培养瓶中, 置于37 °C、饱和湿度、体积分数5%CO₂的孵箱中密闭培养, 隔天换液, 以后视细胞铺满壁底为传代的指证, 重复上述步骤。定期观察细胞的生长情况, 将传至第3代的成骨细胞(接种浓度6×10⁸ L⁻¹)接种到放有实验组与对照组试件的24孔培养板内, 1 h后, 加入含体积分数10%胎牛血清、3%青链霉素混合液的alpha-MEM培养液1 mL, 继续在37 °C、体积分数5%CO₂环境下培养。

MC3T3-E1小鼠前成骨细胞形态的扫描电镜观察: 培养第7天后, 先用PBS漂洗去除材料表面未黏附的细胞, 用25 g/L戊二醛4 °C固定, 乙醇梯度脱水干燥, 真空表面喷金, 在扫描电镜下观察成骨细胞的形态。

MTT法检测细胞增殖情况: 在细胞培养1, 3, 5, 7天时分别取出相应的24孔板, 吸走样品上的培养液后, PBS清洗2遍, 加入900 μL新鲜培养液, 再加入100 μL的MTT溶液。置于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱分别培养孵育4 h后, 吸掉上清, 每孔加入1 mL Formazan溶解液(DMSO), 置于摇床20 min后, 将24孔板内液体转移100 μL到96孔板上。放入酶标仪, 于490 nm波长处测量, 分别检测实验组与对照组培养细胞1, 3, 5, 7 d的吸光度(A)值, 绘制细胞生长曲线。3 d换液1次, 实验重复3次, 取平均值。

RT-PCR定性检测成骨细胞护骨素mRNA的表达: 细胞接种后培养7 d后, 按照Trizol试剂盒说明书提取总RNA。取总RNA样品1 μL, 在Nanodrop仪上进行RNA浓度和质量鉴定, 选取质量可靠的RNA, 按照反转录RT-PCR试剂盒说明, 在PCR仪上进行反转录, 得到模板cDNA。采用上海生工生物工程技术服务有限公司合成的引物序列进行反转录, 采用1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 加样: Marker加5 μL, 其余孔加5 μL DNA样品和1 μL 10×Loading Buffer, 100 V电压电泳45 min, 紫外灯检测, 用照相系统对电泳结果进行记录。以GAPDH为内参, 引物序列见表1。

实时荧光定量PCR定量分析护骨素mRNA的表达水平: 使用SYBR Green试剂通过7500 Fast实时荧光定量PCR生物系统仪器进行检测。反应体系包括10 μL的Real Master Mix SYBR green 1, 0.4 μL的正向和反向引物, 4 μL cDNA为模板, 最终配成20 μL的cDNA样品反应物。热反应循环曲线设定为: 95 °C 30 s, 接着是95 °C 5 s运行40个循环, 60 °C 30 s。在每个循环周期中的60 °C 进行数据收集。应用仪器软件对循环周期(Ct)的阈值进行计算。目的基因的mRNA的表达值归一化到管家基因GAPDH。

主要观察指标: 与阳极氧化处理前后的钛片联合培养后, 成骨细胞的形态及目的基因护骨素的表达水平。

统计学分析: 将MC3T3-E1细胞分别与两组钛片联合培养后提取RNA后反转录得到的mRNA的水平进行定量比

表1 反转录聚合酶链式PCR和实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR and real-time fluorescence PCR

基因	基因文库地址	cDNA 引物	序列	大小(碱基对)
GAPDH	NM_008084.3	上游引物	5'-GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG-3'	233
		下游引物	5'-CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG-3'	
护骨素	NM_008764.3	上游引物	5'-ACC CAG AAA CTG GTC ATC AGC-3'	157
		下游引物	5'-CTG CAA TAC ACA CAC TCA TCA CT-3'	

较, 使用学生t检验进行统计学分析, P < 0.01认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 扫描电镜观测试件表面形貌 图1分别是纯钛试件和阳极氧化形成的纳米孔结构的表面形貌。由图可见, 打磨抛光后的纯钛表面显示较为均匀的光滑表面(图1A), 在NaF溶液中阳极氧化后的表面形成一层均一的纳米孔结构(图1B), 纳米孔的直径为(25±2) nm。

2.2 X射线衍射分析试件表面物相 由图2可知, 对照组与实验组钛片在物相上没有明显区别, 都只显示出钛基体的特征峰。通过进一步X射线衍射分析阳极氧化处理前后的物相变化发现: 尽管阳极氧化使得钛片表面形貌发生了明显变化, 但钛片表面的物相并没有明显改变, 对照组和实验组均可见钛的特征性峰, 也就是说, 在较低电压下, 二氧化钛纳米孔的主要物相是无定形的。

2.3 扫描电镜观察细胞形态 图3为两组试件与成骨细胞共同培养的扫描电镜结果, 对照组细胞数目相对较少, 大部分细胞呈双向或三极纺锤形态(图3A); 实验组表面细胞密度变大, 覆盖金属的面积也更多, 呈现多边形结构, 突触向周围移行, 可见板状伪足向周围材料伸出(图3B)。

从图4细胞生长曲线可以看出, 在两组试件表面生长的成骨细胞具有相似的生长趋势: 接种第一二天为细胞潜伏适应期, 第3-7天生长曲线基本为线性曲线, 表明这段时间是细胞的对数生长期, 细胞数生长旺盛; 第7天后曲线变得平缓, 细胞增殖明显减慢, 进入平台期。两组试样对于细胞生长不同的影响在于: 纳米孔表面的成骨细胞比光滑表面组的增殖更快, 从第1天开始, 实验组就比对照组具有更快的细胞增殖速度。随着培养时间的延长, 实验组细胞数目显著增加, 第5天, 实验组和对照组在细胞数目上出现显著差异; 到第7天时, 实验组细胞数目约为对照组的1.4倍。该实验结果显示, 实验组纯钛表面阳极氧化后形成的纳米孔结构可以有效促进成骨细胞的增殖, 具有良好的生物相容性。

2.4 成骨细胞护骨素基因RT-PCR定性分析与Real-time PCR定量分析结果 RT-PCR结果显示, 两组的GAPDH基

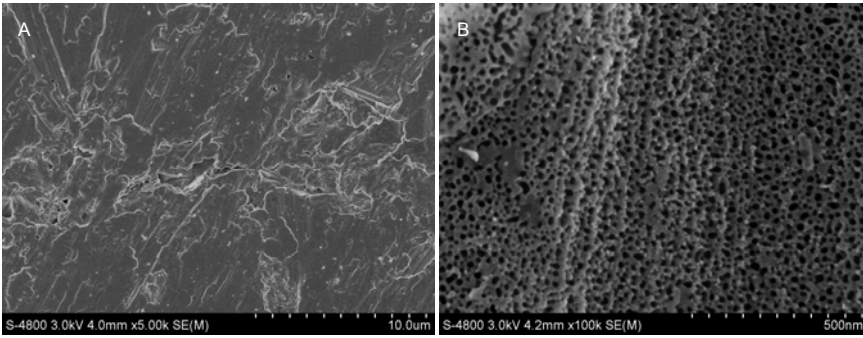


图 1 扫描电镜观察阳极氧化前后的钛片表面形貌

Figure 1 Scanning electron microscope view of the surface morphology of as-polished titanium surface and titanium plate with nanopore structure

图注: 图中 A 为打磨抛光后的纯钛, 显示较为均匀的光滑表面; B 为阳极氧化后的钛片, 表面形成一层均匀的纳米孔结构, 纳米孔的直径为 (25±2) nm。

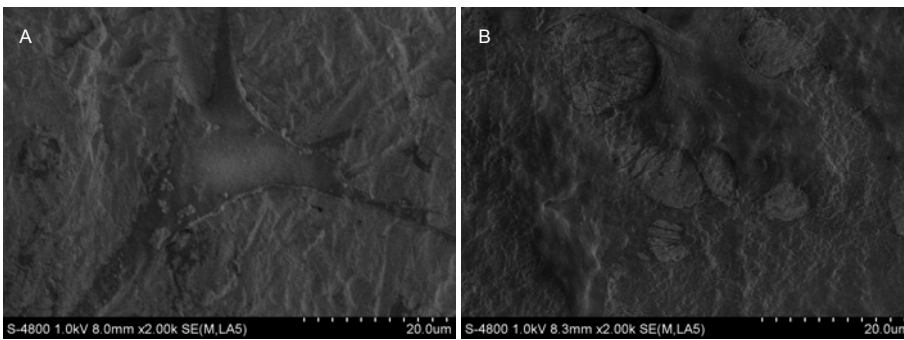


图 3 扫描电镜观察与阳极氧化处理前后钛片共培养 MC3T3-E1 成骨细胞的细胞形态

Figure 3 MC3T3-E1 cell morphology on the titanium surface before and after anodic oxidation under scanning electron microscope

图注: 图中 A 为阳极氧化前的钛片表面, 细胞呈现出双向或三极纺锤状形态; B 为阳极氧化后的钛片表面, 细胞呈现出多边形, 并在各个方向上出现许多丝状伪足。

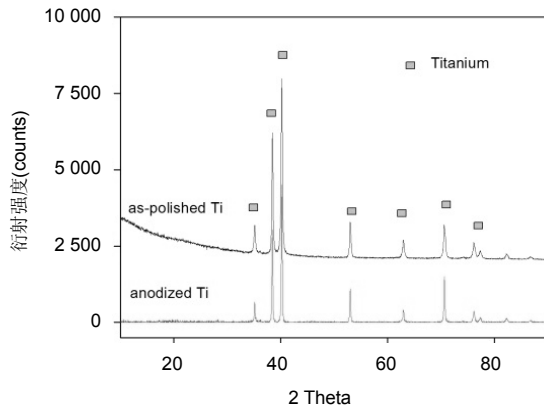


图 2 钛片阳极氧化处理前后的 X 射线衍射图谱

Figure 2 The X-ray diffraction pattern of the as-polished and anodized titanium with nanopore structure

图注: 阳极氧化后的钛片表面物相并没有明显改变, 仍然可见钛的特征峰。

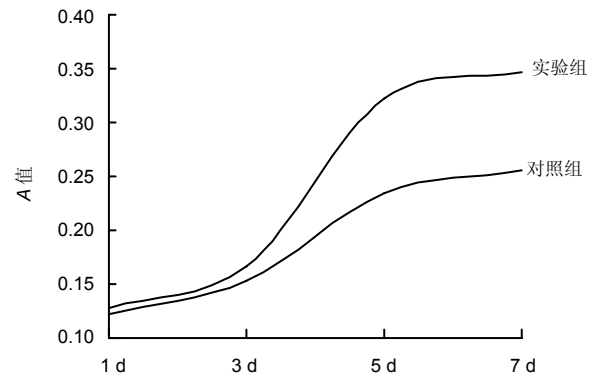


图 4 MC3T3-E1 成骨细胞在对照组和实验组试件表面的生长曲线

Figure 4 The MTT growth curve of MC3T3-E1 cells in each group

图注: 在两组试件表面生长的成骨细胞具有相似的生长趋势: 接种第一二天为细胞潜伏适应期, 第 3-7 天生长曲线基本为线性曲线, 第 7 天后曲线变得平缓, 细胞增殖明显减慢, 进入平台期; 但实验组细胞增殖更快。

因表达情况基本一致, 而护骨素表达水平不同, 对照组表面成骨细胞的护骨素基因表达低于实验组成骨细胞的护骨素基因表达 ($P < 0.05$), 见图 5A。采用实时定量 PCR 来进一步进行基因表达的定量分析, 见图 5B 所示, 实验组成骨细胞的护骨素 mRNA 基因表达增加为对照组的 2.6 倍 ($P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

阳极氧化是一种可以在钛表面创建可控钛纳米级表面特征的卓有成效方法。阳极氧化作为电化学方法, 很容易在金属和合金表面实现具有一致性和可控性纳米结构的表面形貌, 这是一项经济、简单、灵活可行的技术^[11]。到目前为止, 这种方法已被广泛应用在金属(例如铝, 钛基合金)

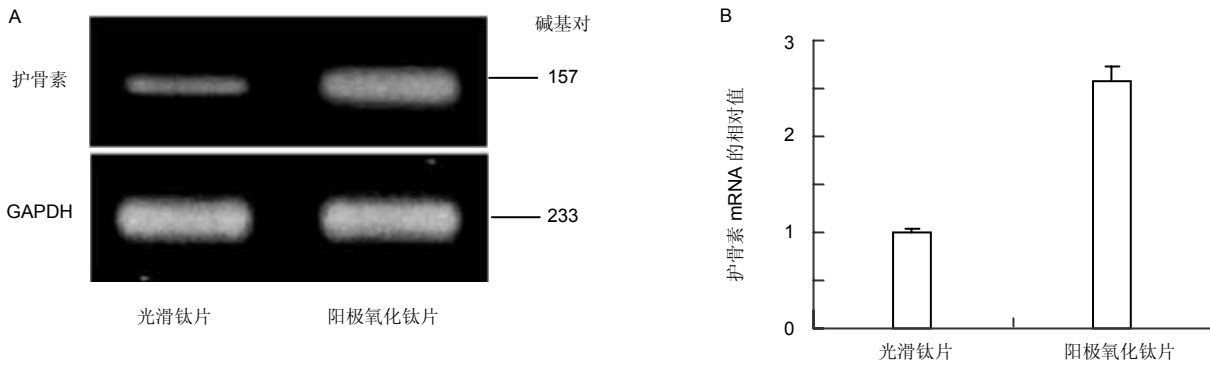


图 5 RT-PCR 与实时荧光定量 PCR 定量检测阳极氧化处理前后钛片表面 MC3T3-E1 细胞中护骨素 mRNA 的表达

Figure 5 Osteoprotegerin mRNA expression on the titanium surface before and after anodic oxidation detected by RT-PCR and real-time fluorescence PCR

图注: 图中 A 为 RT-PCR 检测结果, B 为实时荧光定量 PCR 检测结果。结果显示, 阳极氧化处理前钛片表面成骨细胞的护骨素基因表达低于阳极氧化处理后钛片表面成骨细胞的护骨素基因表达($P < 0.05$)。

表面处理以获得所需的纳米结构和组成, 然而, 以往的研究工作通常集中于提高耐腐蚀或磨损, 在外部表面方面提高其粘接能力^[14-16]。在生物医学领域, 这一方法被用于在金属种植体上形成钙磷涂层^[17]、提高催化效果或发展药物缓释系统^[18-19]。阳极氧化形成的纳米孔表面, 对于钛基种植材料生物学性能直接影响的研究相对较少。本实验选择成骨细胞体外培养实验, 通过对纳米孔表面表征, 纳米孔微形貌与成骨细胞联合培养后的细胞形态和促成骨特异性基因护骨素的表达, 来研究纳米孔结构对其生物活性的影响。

纯钛表面经过阳极氧化后形成纳米孔结构的机制可以通过以下过程来说明: 最初, 首先在电场的作用下, 阳极的钛被氧化并与水电离的氧离子作用, 在钛的表面形成一层致密的TiO₂氧化层, 即阻挡层形成。然后, 存在于电解液中的氟离子在电场作用下发生两种效应, 效应一是氟离子与起初形成的TiO₂氧化层作用, 形成可溶性的[TiF₆]²⁻络合物, 致使该TiO₂氧化层发生局部溶解刻蚀, 形成大量随机分布的孔核; 效应二是氟离子在电场作用下可以穿透该TiO₂氧化层, 在钛膜与氧化层的界面处聚集, 形成一层富氟离子层。随着阳极氧化时间的延长, 这些随机分布的孔核不断地加深、加宽生长, 并自行调整成有序的纳米孔结构^[20-21]。

从纯钛表面获得纳米孔结构后的材料表征可见, 扫描电镜结果显示, 单纯抛光纯钛片表面表现出较为光滑均一的结构; 而阳极氧化处理后则形成了均一的纳米孔结构, 纳米孔的直径约为25 nm。进一步分析其X射线衍射图谱可见, 与纯钛光滑表面组相比, 阳极氧化纳米孔结构对于纯钛的物相组成并无破坏和影响, 改性后所获得的物相应是无定形二氧化钛纳米孔, 这一结果与以往文献报道在较低电压下, 由阳极氧化所获得的氧化膜以无定形结构为主的结论一致^[22]。

细胞体外培养实验结果表明, 纳米改性的表面能够有效促进在种植体骨界面上的骨结合^[23]。Balasundaram等^[24]指出用传统材料制作的种植体(或者材料的构成尺寸大于1 μm)在很长一段时间内无法产生足够的细胞与骨发

生反应, 使种植获得成功。因此, 纳米改性的钛表面更有益于细胞的黏附、增殖及成骨, 最终形成良好的骨整合^[11]。实验组细胞密度变大, 覆盖金属的面积也更多, 呈现多边形结构, 突触向周围移行, 可见板状伪足向周围材料伸出, 说明阳极氧化后形成的纳米孔试件表面生物活性明显增加。

本实验进一步从分子水平研究阳极氧化后的纳米孔结构对成骨特异性基因骨保护素表达的影响。骨保护素属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族成员^[25], 在骨组织中, 护骨素作为一种诱骗受体, 可以竞争性地与RANKL(核因子κB受体活化因子配体)结合, 封闭RANKL与破骨细胞表面的RANK结合, 抑制破骨细胞的分化成熟, 从而抑制成熟破骨细胞的活性, 诱导破骨细胞凋亡, 保护骨吸收^[26-28]。在正常的生理条件下, 护骨素和RANKL的浓度水平处于动态平衡^[29]。本实验发现, RT-PCR的定性结果和实时荧光定量PCR结果均显示纳米孔结构纯钛表面相对于光滑钛表面的护骨素基因表达明显升高, 这一结果提示, 纳米孔结构的表面可以通过升高护骨素基因的表达抑制破骨作用, 促进成骨细胞的分化。

在实验条件下, 阳极氧化处理可以在纯钛表面形成均匀一致的纳米孔结构, 但并不改变纯钛的物相构成。钛片与成骨细胞联合培养后, 实验组与对照组相比细胞密度变大, 呈现多边形结构, 向周围材料伸出更多的板状伪足, 同时护骨素的基因表达明显高于对照组。研究提示, 纳米孔表面能够提高种植材料的生物活性, 增强促成骨基因的表达。今后需要在本次实验的基础上进行更为深入的研究, 来获得直径最佳的纳米孔以利于骨细胞的识别和黏附, 进行动物体内植入实验, 对体外细胞培养结果进行验证, 揭示纳米孔结构对成骨细胞行为特性的影响。

作者贡献: 李莺进行实验设计, 实验实施为付晓龙, 实验评估为李宝斌, 资料收集为付晓龙, 付晓龙成文, 李长义审校, 李长义对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 阳极氧化-是一种可以在钛表面创建可控钛纳米级表面特征的卓有成效的方法。阳极氧化作为电化学方法很容易在金属和合金表面实现具有一致性的和可控性的纳米结构表面形貌, 这是一项经济, 简单, 灵活可行的技术。

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] Zhuang LF, Jiang HH, Qiao SC, et al. The roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in regulating osteogenic differentiation of murine preosteoblasts MC3T3-E1 cells on roughened titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2012; 100(1):125-133.
- [2] Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, et al. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008;29(28):3822-3835.
- [3] Liu L, Song LN, Yang GL, et al. Fabrication, characterization, and biological assessment of multilayer DNA coatings on sandblasted-dual acid etched titanium surface. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97(3):300-310.
- [4] Xue W, Tao S, Liu X, et al. In vivo evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings having different crystallinity. *Biomaterials*. 2004;25(3):415-421.
- [5] Li B, Liu X, Cao C, et al. Biological and antibacterial properties of plasma sprayed wollastonite/silver coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;91(2):596-603.
- [6] Wang Y, Wen C, Hodgson P, et al. Biocompatibility of TiO₂ nanotubes with different topographies. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(3):743-751.
- [7] Gu YX, Du J, Si MS, et al. The roles of PI3K/Akt signaling pathway in regulating MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on SLA and SLActive titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(3):748-754.
- [8] Balasundaram G, Yao C, Webster TJ. TiO₂ nanotubes functionalized with regions of bone morphogenetic protein-2 increases osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 84(2):447-453.
- [9] Zhuang XM, Zhou B, Ouyang JL, et al. Enhanced MC3T3-E1 preosteoblast response and bone formation on the addition of nano-needle and nano-porous features to microtopographical titanium surfaces. *Biomed Mater*. 2014;9(4):045001.
- [10] Nune KC, Misra RD. Pre-adsorption of protein on electrochemically grooved nanostructured stainless steel implant and relationship to cellular activity. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(7):1320-1335.
- [11] Minagar S, Wang J, Berndt CC, et al. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(9):2726-2739.
- [12] Yu X, Ning C, Li J, et al. In vivo evaluation of novel amine-terminated nanopore Ti surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(12):3428-3435.
- [13] 范霞, 贾爽, 苏剑生. 种植体表面粗糙度对成骨细胞增殖及ALP含量的影响[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2009, 19(2):128-131.
- [14] Park IS, Lee MH, Bae TS, et al. Effects of anodic oxidation parameters on a modified titanium surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;84(2):422-429.
- [15] Wang YB, Li HF, Cheng Y, et al. In vitro and in vivo studies on Ti-based bulk metallic glass as potential dental implant material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(6): 3489-3497.
- [16] Liang B, Fujibayashi S, Neo M, et al. Histological and mechanical investigation of the bone-bonding ability of anodically oxidized titanium in rabbits. *Biomaterials*. 2003; 24(27):4959-4966.
- [17] Roguska A, Pisarek M, Andrzejczuk M, et al. Surface characterization of Ca-P/Ag/TiO₂ nanotube composite layers on Ti intended for biomedical applications. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(8):1954-1962.
- [18] Zhang G, Huang C, Zhou L, et al. Enhanced charge storage by the electrocatalytic effect of anodic TiO₂ nanotubes. *Nanoscale*. 2011;3(10):4174-4181.
- [19] Portan DV, Kroustalli AA, Deligianni DD, et al. On the biocompatibility between TiO₂ nanotubes layer and human osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(10):2546-2553.
- [20] Li B, Li Y, Li J, et al. Influence of nanostructures on the biological properties of Ti implants after anodic oxidation. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(1):199-205.
- [21] 李朋, 赵昆渝, 郭军, 等. TiO₂纳米孔到纳米管结构转变的因素及其机理研究[J]. *材料工程*, 2014, 59(1):58-63, 74.
- [22] Macak JM, Ghicov A, Yasuda K, et al. TiO₂ nanotubes: self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2007;11:3-18.
- [23] Brinkmann J, Hefti T, Schlottig F, et al. Response of osteoclasts to titanium surfaces with increasing surface roughness: an in vitro study. *Biointerphases*. 2012; 7(1-4): 34.
- [24] Balasundaram G, Webster TJ. Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2006;1(2):169-176.
- [25] Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK, et al. Transcriptome analysis of beta-TCP implanted in dog mandible. *Bone*. 2011;48(4): 864-877.
- [26] Zhan X, Zhang C, Dissanayaka WL, et al. Storage media enhance osteoclastogenic potential of human periodontal ligament cells via RANKL-independent signaling. *Dent Traumatol*. 2013;29(1):59-65.
- [27] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12): 5050-5055.
- [28] Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1): 49-60.
- [29] Mizrak S, Turan V, Inan S, et al. Effect of Nicotine on RANKL and OPG and Bone Mineral Density. *J Invest Surg*. 2014. [Epub ahead of print].