

低弹性模量医用钛合金梯度 复合材料对 L929 细胞周期及凋亡的影响

李楠¹, 吴文慧¹, 许莹², 魏子琰²

摘要 将实验对象分为 3 组, 分别为低弹性模量医用钛合金试件、经氧化处理、经氧化处理并在其表面喷涂钽的低弹性模量医用钛合金试件, 制备浸提液培养小鼠成纤维细胞 L929。利用流式细胞术检测细胞周期及凋亡并与常规钛合金 Ti-6Al-4V 试件及阴性组(含 10% FBS 的培养液 18 ml) 进行比较。浸提液培养 48 h 后, G2 期细胞周期比例涂层组为 (14.43 ± 0.18)%, Ti-6Al-4V 组为 (13.97 ± 1.39)% ($P > 0.05$); 细胞早期凋亡率涂层组为 (1.39 ± 0.08)%, Ti-6Al-4V 组为 (1.40 ± 0.05)% ($P > 0.05$)。低弹性模量医用钛合金梯度复合材料与 Ti-6Al-4V 比较对 L929 细胞周期及凋亡无差异, 细胞相容性良好。

关键词 低弹性模量医用钛合金梯度复合材料; 流式细胞术; 细胞周期; 细胞凋亡; 小鼠成纤维细胞 L929

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020)03 - 0480 - 04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.03.031

通常用于生物医学应用的金属具以下特点: 必须无毒的、非免疫原性的、无血栓和非致癌, 并且表现出高耐蚀性^[1]。近年来, 钛合金由于其良好的抗疲劳性、高耐腐蚀性和良好的生物相容性被广泛用于各个领域, 包括整形外科、牙科植入和组织工程。许多用于替换身体部位或功能的商业产品, 例如人工关节置换、骨创伤产品和口腔植入物, 已由钛合金制造^[2]。目前, 新型钛合金的设计与研发也成为热点话题。为了提升钛合金的生物学和力学性能, 现设计一种低弹性模量医用钛合金梯度复合材料, 用无毒元素钽、铌、锆、钼制备合金基底 (Ti-27Nb-6Zr-5Mo), 阳极氧化法在合金基底表面原位构建纳米氧化层, 以作为生物涂层制备的过渡层; 采用等离子喷涂法在钛合金表面制备 Ta 涂层, 形成以新型钛合金

为基底, 纳米管氧化层为过渡层, 表面覆盖钽活性涂层的新型医用钛合金梯度复合材料。该实验采用流式细胞仪法, 探究低弹性模量医用钛合金梯度复合材料对细胞周期及凋亡的影响, 为其应用于临床提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 L929 小鼠成纤维细胞 (华北理工大学口腔医学院实验室提供)。低弹性模量医用钛合金梯度复合材料 (华北理工大学材料与工程学院)、Ti-6Al-4V (宝鸡钛业有限公司, 宝鸡)、RPMI1640 (CORNING, 美国)、PBS (BI, 以色列)、FBS (Cegrogen, 德国)、25% 胰蛋白酶 (BI, 以色列)、台盼蓝 (Leagene, 北京)、Propidium Iodide (Sigma, 美国)、Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (BD, 美国)、MoFlo XDP 流式细胞仪 (Beckman, 美国)。

1.2 实验分组 按低弹性模量医用钛合金梯度复合材料梯度处理的过程, 分为 Ti-27Nb-6Zr-5Mo 组 (A 组) 经氧化处理的 Ti-27Nb-6Zr-5Mo 组 (B 组), 经氧化处理并在其表面等离子喷涂钽涂层的 Ti-27Nb-6Zr-5Mo 组 (C 组) (8 个圆形试件/组, 直径 10 mm、厚度 2 mm); Ti-6Al-4V 组 (D 组) (6 个方形试件/组, 长 10 mm、厚 1 mm); 同时设立阴性对照组 (E 组) (含 10% FBS 的培养液 18 ml)。

1.3 浸提液制备 将试件用无水乙醇浸泡 30 min, 超声波清洗器清洗 15 min, 去离子水冲洗数遍, 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。将处理好的试件置于 24 孔板中, 试件表面积与浸提液体积比 1.25 cm²/ml^[3]。将所有试件以含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基为介质, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中浸提 72 h, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌备用。

1.4 流式细胞仪法

1.4.1 细胞培养及同步化 取对数生长期的 L929 细胞, 用含 0.5% FBS 培养基同步化 24 h 后, 分别以 A、B、C、D 组浸提液置换旧培养基, E 组加入 10% FBS 的培养基, 继续培养 48 h; 25% 胰蛋白酶

2019 - 11 - 25 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 51874140)

作者单位: 华北理工大学¹ 口腔医学院、² 材料与工程学院, 唐山 063000

作者简介: 李楠, 女, 硕士研究生;

吴文慧, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wuwenhui120@163.com

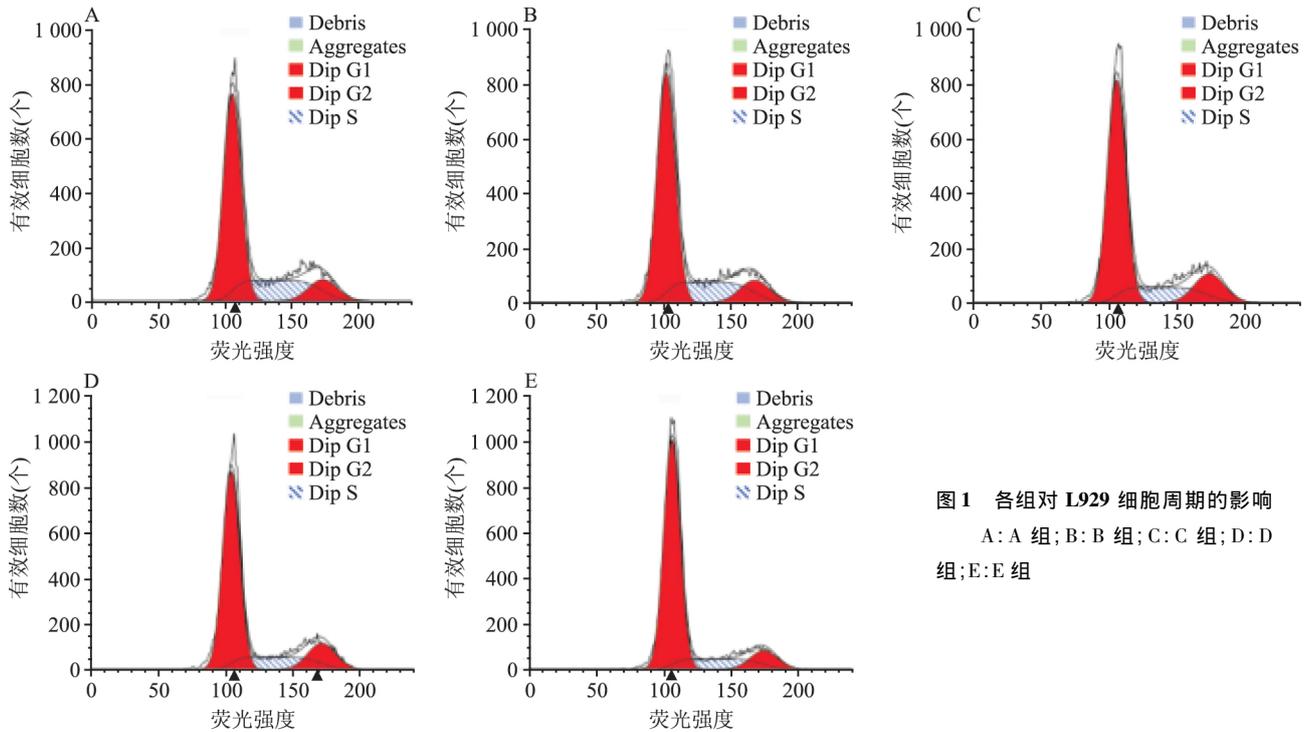


图1 各组对 L929 细胞周期的影响
A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组

消化细胞,含 10% FBS 培养基终止消化吹打细胞,1 000 r/min 离心 5 min 弃上清液加 3 ml PBS 重悬细胞,计数板计数,使每组细胞密度至 1×10^6 个/ml。

1.4.2 台盼蓝鉴定细胞活性 取 100 μ l 细胞悬液在 1.5 ml EP 管中,加入 100 μ l 台盼蓝(浓度 0.4%)轻轻混匀,静置染色 3 min,用细胞计数板分别计数活细胞和死细胞数,计算活细胞率。活细胞率(%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) \times 100%。

1.4.3 流式细胞仪法检测细胞周期 取不少于 1×10^6 个细胞,逐滴加入 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 无水乙醇使其终浓度为 70%,并不停振摇,以免细胞成团, $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件固定过夜;将固定好的细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min 去固定液,加 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的 PBS 重悬离心,洗涤 2 次 300 μ l 预冷 PBS 重悬;将离心管内各组细胞悬液移入待测试管并进行标记,加 50 μ l PI (50 $\mu\text{g/ml}$) 染液混匀,避光染色 30 min,取 300 目筛网过滤细胞悬液,1 h 内应用流式细胞仪检测。

1.4.4 流式细胞仪法检测细胞凋亡 取不少于 1×10^6 个细胞, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的 PBS 离心洗涤细胞,300 目筛网过滤;1 000 r/min 离心 5 min 500 μ l Binding buffer 重悬,加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ l PI 混匀,于室温避光孵育 15 min,1 h 内应用流式细胞仪检测。

1.5 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,各实验组、对

照组不同细胞周期的细胞比例及早期凋亡率比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组对细胞周期影响 流式细胞仪检测各组浸提液培养 L929 细胞 48 h 后细胞周期结果。见图 1。在 G1 期、S 期与 G2 期 4 个实验组与阴性对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表1 各组细胞 48h 不同细胞周期的细胞比例(% $n=3 \bar{x} \pm s$)

组别	G1 期	S 期	G2 期
A	63.25 \pm 0.57 [#]	25.39 \pm 1.26 [#]	11.36 \pm 0.73 [#]
B	66.70 \pm 0.43	23.49 \pm 0.50 [#]	10.31 \pm 0.39 [#]
C	67.12 \pm 0.21	18.45 \pm 0.39	14.43 \pm 0.18
D	67.66 \pm 0.81	18.38 \pm 2.2	13.97 \pm 1.39
E	75.65 \pm 0.71	15.51 \pm 0.63	8.85 \pm 1.02
F 值	201.766	25.977	45.486
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与 D 组比较:[#] $P < 0.05$

2.2 各组对细胞凋亡影响 流式细胞仪检测各组浸提液培养 L929 细胞 48 h 后细胞凋亡结果。见图 2。A 组与 D 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); B、C、D 组与 E 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

细胞周期有 2 个重要阶段,即 G1 期至 S 期,G2

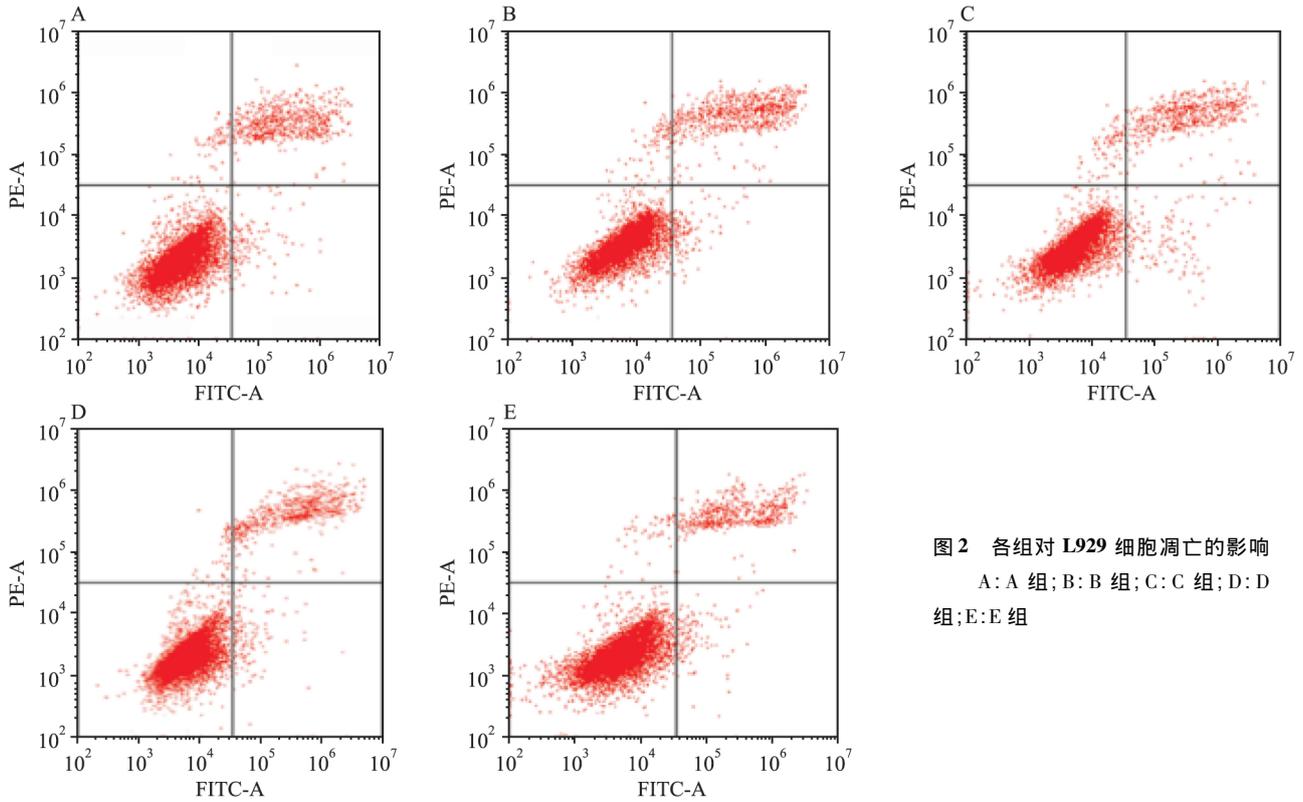


图2 各组对 L929 细胞凋亡的影响
A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组

表2 各组细胞 48 h 凋亡率 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡率 (%)
A	1.08 ± 0.05 [#]
B	1.34 ± 0.09 [*]
C	1.39 ± 0.08 [*]
D	1.40 ± 0.05 [*]
E	1.13 ± 0.12 [#]
F	9.971
P	0.002

与 E 组比较: * P < 0.05; 与 D 组比较: # P < 0.05

期至 M 期。在 G1 期 细胞开始合成 RNA 和蛋白质为 DNA 合成做准备; S 期即 DNA 合成期, DNA 含量介于二倍体与四倍体之间; G2 期是 DNA 合成后期, 此时 DNA 合成已经完成成为四倍体状态, 为下一步有丝分裂做准备; M 期为细胞分裂期。由于细胞周期不同时呈现不同特征, 故使用流式细胞术分析处理后细胞的 DNA 含量。由于决定细胞增殖是在即将开始 DNA 合成并在细胞周期的其余部分进行之前的 G1 阶段进行的, 因此在此阶段检测 DNA 合成可以确定细胞培养物中生长调节的状态^[4]。为不影响实验的重复性, 课题组采用血清饥饿法 将细胞周期阻滞在 G0/G1 期。本研究表明, A、B、C 组与 D 组 S 期与 G2 期的细胞比例均有所增加, 钽涂层组处理 48 h 后结果更明显, 由此可知, 低弹性模量医用钛合金梯度复合材料可以促进 DNA 合成增加。

细胞凋亡是生物材料细胞毒性检测的一项重要指标^[5]。细胞凋亡也被称为细胞程序性死亡, 是指在一定的生理或病理条件下, 细胞主动地、高度有序地、自己结束其生命的过程^[6]。检测细胞凋亡的方法有多种, 如电子显微镜下观察形态、DNA 电泳实验等。而流式细胞术是非常重要的检测细胞凋亡的方法, 不仅可以定性还可以定量。其中 Annexin V/PI 双染法最为常用。细胞凋亡染色结果表明, 实验组与对照组细胞均以活细胞与早期凋亡细胞为主, 晚期凋亡与坏死细胞较少; 早期凋亡率 A 组与 E 组比较差异无统计学意义 (P > 0.05), 而 B、C 两组与 E 组比较差异有统计学意义, 与 D 组比较差异无统计学意义 (P > 0.05), 说明 B、C 组与 D 组对细胞凋亡有一定程度影响, 但由于 Ti-6Al-4V 已广泛应用于临床, 符合要求, 并结合细胞周期实验, 课题组的数据表明低弹性模量医用钛合金梯度复合材料生物相容性良好。

在复杂的人体生理环境中, 除了生物相容性好这一基本要求外, 还特别要求医用金属材料具有生物功能性、长期稳定性、与骨组织之间有较好的生物力学适配性^[7]。因此, 在确定低弹性模量医用钛合金梯度复合材料是否可以应用临床前, 还需进行长期的生物安全性试验与骨整合试验等。

(下转第 486 页)

and evaluate the value of laparoscopic surgery in the treatment of congenital intestinal malrotation. The clinical data of 183 cases with congenital intestinal malrotation were retrospectively analyzed ,including 124 cases of laparoscopic operation and 59 cases of open operation. In patients with intestinal malrotation without midgut volvulus or with midgut volvulus less than 360° , there was no significant difference in operation time , postoperative complication rate and postoperative hospital stay between laparoscopic operation group and open operation group. In patients with intestinal malrotation and midgut volvulus reaching or exceeding 360° , the operation time of laparoscopic surgery group was significantly prolonged ,but the postoperative hospital stay was significantly shortened ,and the difference was statistically significant. Laparoscopic surgery is safe and effective in the treatment of congenital intestinal malrotation. Although the operation time is prolonged in the group with midgut volvulus reaching or exceeding 360° , postoperative hospital stay is shortened. Laparoscopic surgery has certain advantages and is worth promoting.

Key words laparoscopes; congenital intestinal malrotation; midgut volvulus; Ladd’s procedure; neonate

(上接第 482 页)

参考文献

[1] Trevisan F ,Calignano F ,Aversa A ,et al. Additive manufacturing of titanium alloys in the biomedical field: processes , properties and applications [J]. *J Appl Biomater Funct Mater* ,2018 , 16 (2) :57 – 67.

[2] Zhu C ,Lv Y ,Qian C ,et al. Microstructures ,mechanical , and biological properties of a novel Ti-6V-4V/zinc surface nanocomposite prepared by friction stir processing [J]. *Int J Nanomedicine* , 2018 , 13: 1881 – 98.

[3] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局中国国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价第 12 部分: 样品制备与参照材料[S]. 中华人民共和国国家标准 GB/T 16886. 12-2017/ISO10993-12: 2012 ,2017.

[4] Cecchini M J ,Amiri M ,Dick F A. Analysis of cell cycle position in mammalian cells[J]. *J Vis Exp* ,2012(59) : 3491.

[5] 马凤森 ,喻 炎 ,章 捷 ,等. 生物材料细胞毒性评价研究进展[J]. *材料导报* ,2018 ,32(1) : 76 – 85.

[6] 陈朱波 ,曹雪涛. 流式细胞术:原理、操作及应用[M]. 北京: 科学出版社 2010:130.

[7] 于振涛 ,余 森 ,程 军 ,等. 新型医用钛合金材料的研发和应用现状[J]. *金属学报* ,2017 ,53(10) :1238 – 64.

Effect of medical titanium alloy gradient composites with low elastic modulus on cell cycle and apoptosis of L929 cells

Li Nan¹ , Wu Wenhui¹ , Xu Ying² , et al

(¹*School of Stomatology* ,²*College of Materials and Engineering , North China University of Science and Technology , Tangshan 063000*)

Abstract The subjects were divided into three groups: medical titanium alloy with low elastic modulus , oxidation , medical titanium alloy with low elastic modulus treated by oxidation and coated with tantalum on its surface. The extract was prepared and used to culture mouse fibroblast L929 cells. Flow cytometry method was used to test the cycle distribution and apoptosis of L929 cells and the results were compared by Ti-6Al-4V and negative control group 18 ml culture solution containing 10% FBS. After cultured in the extracts for 48 h , the cell proportion of G2 stage in tantalum coatings and Ti-6Al-4V group were (14. 43 ± 0. 18) % and (13. 97 ± 1. 39) % (*P* > 0. 05) , the cell apoptosis rate in tantalum coatings and Ti-6Al-4V group were (1. 39 ± 0. 08) % and (1. 40 ± 0. 05) % (*P* > 0. 05). Compared with Ti-6Al-4V , medical titanium alloy gradient composites with low elastic modulus had no significant difference in cell cycle and apoptosis of L929 cells , and had good cell compatibility.

Key words medical titanium alloy gradient composites with low elastic modulus; flow cytometry method; cell cycle; cell apoptosis; mouse fibroblast L929 cells