

钛种植体表面固定生物素的实验研究

杜明亮 钱海燕 吴明月 李全利

摘要 目的 利用生物素-亲和素系统,将生物素共价键合在钛基材表面,为钛种植体表面接枝生物活性分子提供新的实验方法。方法 使用3-氨丙基膦酸(APP)对钛基材表面进行酸蚀处理并使其获得游离氨基,由碳二亚胺(EDC)介导,通过与羧基反应形成酰胺键以实现生物素-亲和素系统在钛种植体表面的固定。结果 通过环境扫描电镜、傅立叶变换红外光谱、X射线光电子能谱、免疫荧光等检测方法对样品进行表征,证实钛基材表面已成功接枝生物素。结论 采用生物素-亲和素系统,可以在氨基化的钛基材表面成功接枝生物素,为钛种植体表面生物化修饰的研究提供新的方法和思路。

关键词 钛种植体;3-氨丙基膦酸;生物素-亲和素系统;共价键合

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0463-04

生物化修饰是目前钛种植体表面改性研究的热点^[1],该方法是将具备特定信号识别功能的生物分子与生物材料相结合,诱导特殊细胞分化和组织改造,以期实现对材料的表面改性。对于牙种植体而言,就是利用骨组织形成过程中的一些决定性的生物活性分子,影响成骨细胞增殖和分化,最终促进骨整合。而如何将这些特定的生物活性分子固定在种植体的材料表面,一直是该方面研究的难点。该实验首先使用3-氨丙基膦酸(3-aminopropylphosphonic acid,APP)对钛基材进行表面处理,膦酸基团与TiO₂形成共价键合,使钛基材表面获得游离氨基;再利用生物素-亲和素系统,与生物素上的羧基形成酰胺键,从而将生物素固定在基材表面,由此为进一步接枝生物大分子奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂 钛棒购于陕西宝鸡非铁金属有限公司;APP购于美国Sigma-Aldrich公司;生物素

购于北京索莱宝科学技术有限公司;亲和素标记的Cy3荧光试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。实验所用其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器 环境扫描电镜(ESEM,荷兰Philips公司);傅立叶变换红外光谱仪(FTIR,美国Thermo Fisher Scientific公司);X射线光电子能谱仪(XPS,美国Thermo-VG Scientific公司);正置荧光显微镜(日本Nikon公司)。

1.3 方法

1.3.1 钛片的制备和酸蚀 将钛棒加工成直径为10 mm厚1 mm的圆形钛片,金相砂纸打磨至镜面效果,依次用丙酮、乙醇、去离子水清洗2次共1 h。将上述钛片置于10 mmol/L APP中,60℃恒温下静置18 h后取出,吸去表面液体,120℃高温干燥8 h,用去离子水超声清洗干燥后备用,样品记为APP/TiO₂。分别使用ESEM、FTIR及XPS对钛片进行表征。

1.3.2 钛片表面接枝生物素 将10 mg生物素加入到20 ml 0.05 mol/L 2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethane sulfonic acid monohydrate, MES)水溶液中,然后依次加入 2.2×10^{-5} mol N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)和 3.6×10^{-5} mol 1-(3-二甲氨基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺[1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide-dehydrochloride, EDC],搅拌后将钛片置于上述溶液中,于室温反应4 h,用去离子水超声清洗,真空干燥。样品记为Bio/APP/TiO₂。

1.3.3 免疫荧光分析 在已生物素化的钛片表面滴加1%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液,室温下于湿盒内孵育30 min,吸出BSA。用PBS缓冲液漂洗3次,每次5 min。然后在生物素化钛片、光滑钛片及APP酸蚀钛片表面滴加0.01%的20 μl亲和素标记的Cy3荧光素,湿盒内避光室温孵育30 min。用含1% Tween-20的PBS缓冲液超声清洗20 min,后漂洗3次,每次5 min,置于荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 钛片表面形貌观察 ESEM观察显示钛片在

2015-01-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81170993)

作者单位:安徽医科大学附属口腔医院,安徽医科大学口腔医学院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:杜明亮,男,硕士研究生;

吴明月,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: wumingyue321@126.com

APP 处理前表面较光滑,可见有打磨时留下的机械划痕。钛片经 APP 处理后,表面呈现均匀散在分布的坑凹、多孔状结构,其底部及周壁有微孔,孔径约 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 。见图 1。

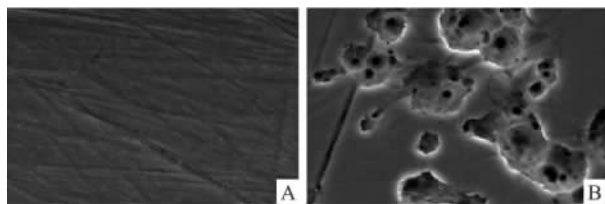


图 1 钛片经 APP 处理前后表面形貌 $\times 2000$
A:光滑钛片;B:APP 处理后钛片

2.2 APP 处理后钛片表面红外光谱分析 FTIR 显示在 $2800 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ 处出现了连续的波峰,分别为 CH_2 的对称和反对称伸缩振动峰,提示有烷烃链的存在;而在 1533 cm^{-1} 处出现的吸收峰为 NH_2 变角振动峰,提示有 NH_2 出现。以上结果表明 APP 已固定在钛片表面,并证实经 APP 处理的钛片表面已获得了游离的氨基。见图 2。

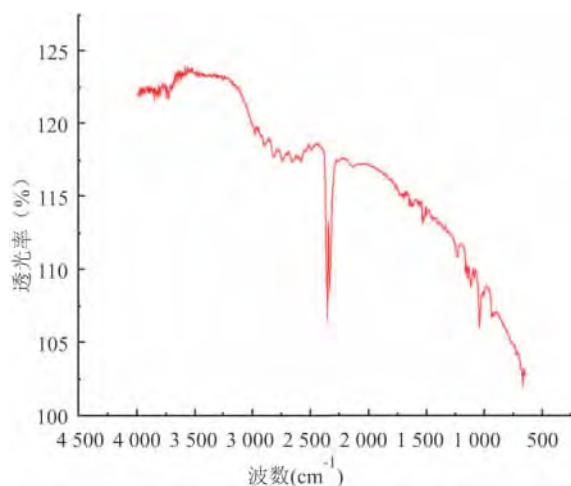


图 2 APP/TiO₂ 的表面 FTIR 分析

2.3 APP 处理后钛片表面 XPS 分析 XPS 分析图谱显示,与光滑钛片比较,经 APP 处理后的钛片图谱在 133 eV、191 eV 两处出现了 P 元素波峰。见图 3。APP 处理后钛片 N、P 元素的含量较光滑钛片明显提高,表明 APP 已固定于钛片表面。见表 1。

表 1 APP 处理前后钛片表面薄膜各元素含量(%)

项目	C	N	O	P	Ti	Zn
光滑钛片	28.03	3.29	52.91	0.48	15.29	—
APP/TiO ₂	32.07	4.90	48.87	4.11	8.39	1.66

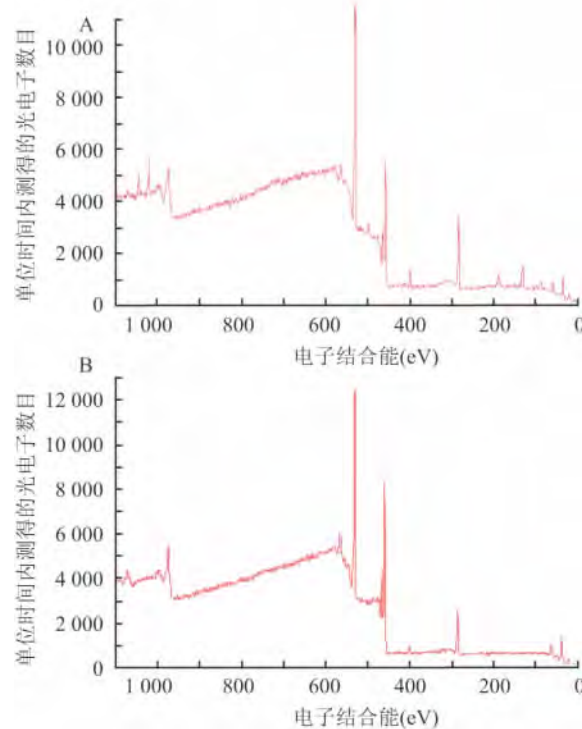


图 3 XPS 分析
A:APP/TiO₂; B:光滑钛片

2.4 免疫荧光分析 荧光显微镜下可见光滑钛片和 APP 处理后钛片表面荧光较少,结果为阴性,而接枝生物素的钛片表面可见大量均匀分布的荧光,结果为阳性,这表明生物素、亲和素已在钛基材表面接枝成功。见图 4。

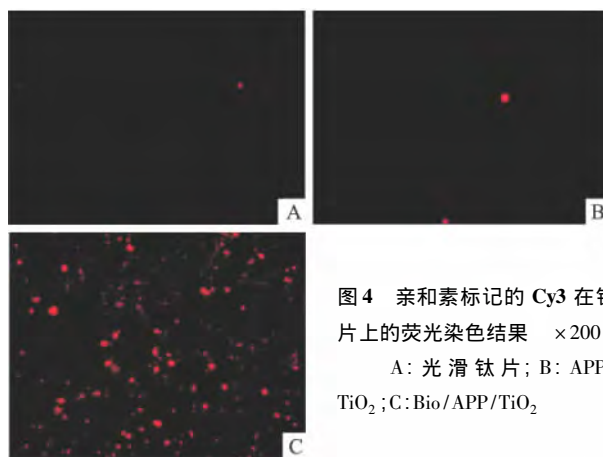


图 4 亲和素标记的 Cy3 在钛片上的荧光染色结果 $\times 200$
A:光滑钛片;B:APP/TiO₂;C:Bio/APP/TiO₂

3 讨论

3.1 钛基材表面获得 $-\text{NH}_2$ 功能基团 近年来,运用生物化技术对生物材料进行表面改性取得可喜进展,经过生物化改性后,材料表面可获得更好的骨诱

导性,种植体能主动与机体结合,促进了骨整合^[2]。进行生物化修饰的前提和基础是材料表面必需具有丰富的反应性功能基团,这些功能基团主要包括羧基、羟基、氨基。钛为惰性金属,其表面为致密的TiO₂氧化膜,仅含少量羟基,无法满足其表面固定生物大分子的需求。如何将生物分子与钛种植体良好结合充分发挥其活性,是目前生物化修饰的中心问题^[3]。本实验使用APP处理钛种植体基材表面,其磷酸基团与氧化钛形成化学键结合,“尾部基团”氨基游离于钛基材表面,成为蛋白质分子固定的“分子手臂”。磷酸键具有更好的抗水解性,稳定性更佳^[4]。经过APP的酸蚀处理后,钛种植体基材表面呈现出多孔的粗糙表面,这样的表面形貌为蛋白质的吸附及细胞的黏附、生长提供了良好的外部环境。

3.2 钛基材表面固定生物素 生物素-亲和素系统作为一种分子识别工具,广泛应用于生物医学研究^[5],其结合常数(K_a)高达10¹⁵ L/mol,比抗原抗体之间的亲和力(K_a=10^{5~11} L/mol)至少高1万倍,并且不受试剂浓度、pH环境和蛋白变性剂等有机溶剂的影响。同时,生物素分子中侧链末端的羧基很容易被活化,结合蛋白质分子且不破坏其生化性质,常用以标记生物大分子。Nishi et al^[6]使用生物素、亲和素作为中介在有机聚合物上固定精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(RGD)肽衍生物获得成功,并且取得了良好的细胞学评价。亲和素是一种由4个相同亚基组成的碱性糖蛋白,理论上可以特异性结合4个生物素分子。但是由于空间位阻的原因,在固体表面一般1分子亲和素大约可以结合2分子生物素衍生物^[7-8]。本实验通过EDC/NHS/MES催化体系介导的交联反应,首先通过羧基与氨基反应生成酰胺键在氨基化的钛基材表面固定生物素,然后再通过生物素、亲和素的特异性结合实现亲和素在钛基材表面的固定,为进一步接枝各种目的蛋白大分子的生物素化衍生物奠定了可靠的基础。经过上述反应程序,一方面通过氨基化钛基材表面对生物素-亲和素系统的结合,解决了钛金属表面对生物大分子固定的惰性问题,二者的共价键和方式为钛基材表面生物固定的牢固性提供了切实的保障;另一方面,通过上述的多级放大效应,亦克服了材料表面因空间位阻导致的蛋白质分子接枝量有限的难题。

亲和素、生物素缺少能在红外光谱中进行区分鉴别的特征峰^[9]。本实验采用免疫荧光分析来证

明生物素-亲和素已经固定成功。在经过APP处理后的钛基材表面接枝生物素,然后滴加亲和素标记的Cy3荧光素,可见大量均匀荧光,表明生物素固定成功。

课题组的前期研究已获得如下成果:以人颅骨成骨细胞作为阳性靶细胞,人牙龈成纤维细胞为阴性吸附细胞,对噬菌体展示十二肽库进行全细胞筛选获得了与成骨细胞特异性结合的多肽序列,固相合成该多肽并将其生物素化。在此基础上,课题组后续准备实施的研究如下:拟通过本实验将该特异性生物素化多肽固定在钛种植体表面,再通过体外细胞学实验以及体内动物实验来进一步检测该特异性识别表面的生物学效应。希望通过上述系列实验,为构建人成骨细胞特异性识别牙种植体表面提供前期研究基础,进一步能够为牙种植体表面的生物化修饰研究提供新的思路和策略。

参考文献

- [1] Beutner R, Michael J, Schwenzer B, et al. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox [J]. *J R Soc Interface* 2010 7 Suppl 1: S93-105.
- [2] Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration [J]. *Dent Mater* 2007 23(7): 844-54.
- [3] Schuler M, Trentin D, Textor M, et al. Biomedical interfaces: titanium surface technology for implants and cell carriers [J]. *Nano-medicine (Lond)* 2006 1(4): 449-63.
- [4] Silverman B M, Wiegand K A, Schwartz J. Comparative properties of siloxane vs phosphonate monolayers on a key titanium alloy [J]. *Langmuir* 2005 21(1): 225-8.
- [5] Laitinen O H, Nordlund H R, Hytönen V P, et al. Brave new (strept)avidins in biotechnology [J]. *Trends Biotechnol* 2007 25(6): 269-77.
- [6] Nishi M, Kobayashi J, Pechmann S, et al. The use of biotin-avidin binding to facilitate biomodification of thermoresponsive culture surfaces [J]. *Biomaterials* 2007 28(36): 5471-76.
- [7] Wang Z, Jin G. Feasibility of protein A for the oriented immobilization of immunoglobulin on silicon surface for a biosensor with imaging ellipsometry [J]. *J Biochem Biophys Methods* 2003 57(3): 203-11.
- [8] Dai Z F, Wilson J T, Chaikof E L. Construction of pegylated multilayer architectures via (strept) avidin/biotin interactions [J]. *Mater Sci Eng C* 2007 27(3): 402-8.
- [9] 陈卓玥, 李全利, 赵元聪, 等. 钛表面固定特异性识别内皮祖细胞的多肽适配子 [J]. *高等学校化学学报* 2011 32(1): 100-4.

◇预防医学研究◇

产前应激加剧慢性子代应激诱导的子鼠学习记忆能力损伤

唐 伟,王正玉,程 娟,韩振敏,姚余有

摘要 目的 探讨产前应激是否进一步加剧慢性应激所致的6月龄雄性 APP^{swe}/PS1^{dE9} 子鼠学习记忆损伤及其可能机制。方法 以 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠为研究对象,实验分为产前慢性应激-子代慢性应激组(TT组)、产前慢性应激-子代正常处理组(TC组)、产前正常处理-子代慢性应激组(CT组)和产前正常处理-子代正常处理组(CC组)。应用 Morris 水迷宫检测子代小鼠的空间学习、记忆能力,通过 HE 染色观察小鼠海马 CA3 区神经元的病理组织形态,采用 Congo red 染色检查小鼠脑组织的淀粉样斑块,采用 Western blot 法检测小鼠海马组织淀粉样前体蛋白(APP)、淀粉样前体蛋白 β 位点分裂酶1(BACE1)和 β -淀粉样蛋白1-42(A β_{42})的表达量,运用 ELISA 法检测血清皮质酮含量。结果 与 CC 组相比,CT 组小鼠的逃避潜伏期

和游泳距离延长($P < 0.05$),平台象限游泳时间和穿越平台次数减少($P < 0.05$);海马 CA3 区损伤的神经元数目明显增加($P < 0.05$),排列疏松紊乱,脱失现象明显,核固缩、浓染;脑组织淀粉样斑块数目增多;海马组织 APP、BACE1 和 A β_{42} 的表达量升高($P < 0.05$);血清皮质酮浓度升高($P < 0.05$)。与 CT 组相比,TT 组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离进一步延长($P < 0.05$),平台象限游泳时间和穿越平台次数进一步减少($P < 0.05$);脑组织淀粉样斑块和海马 CA3 区损伤的神经元数目进一步增加($P < 0.05$);海马组织 APP、BACE1 和 A β_{42} 的表达量和血清皮质酮浓度进一步升高($P < 0.05$)。结论 产前应激进一步加剧慢性应激所致的子鼠学习记忆损伤,其机制可能与其升高小鼠血清皮质酮水平,促进 APP 和 BACE1 表达,进而增加 A β_{42} 的生成,最终引起海马 CA3 区神经元损伤有关。

关键词 产前应激;慢性应激;皮质酮;淀粉样前体蛋白;学习记忆

中图分类号 R 338.64

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0466-06

2014-12-30 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH145);安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2011Z161)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院,合肥 230032

作者简介:唐 伟,男,硕士研究生;

姚余有,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

yaoanqi71@yahoo.com.cn

慢性应激会导致下丘脑-垂体-肾上腺轴的过度激活和功能紊乱,损害大脑的认知功能^[1]。海马

The experimental study of immobilization of biotin on the titanium implant surface

Du Mingliang, Qian Haiyan, Wu Mingyue, et al

(Stomatologic Hospital & College, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases
Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To covalently immobilize biotin on the surface of the titanium substrate by biotin-avidin technology. Eventually, the study provides new experimental methods for titanium implant surface grafting bioactive molecules. **Methods** The surface of the titanium substrate was treated by 3-aminopropylphosphonic acid (APP), and enabled them to obtain free amino groups, which reacted with carboxyl groups to form amide bond to immobilize the biotin-avidin system on the surface of titanium implant by carbodiimide (EDC)-mediated. **Results** The samples were characterized by environmental scanning electron microscopy, fourier transform infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and immunofluorescence, which demonstrated that biotin was successfully bonded to the titanium surface. **Conclusion** The biotin can be successfully immobilized on the surface of titanium implant with grafted amino groups through biotin-avidin technology. This study develops a new research approach and experimental foundation of the biolization modification on the surface of titanium implant.

Key words titanium implant; 3-aminopropylphosphonic acid; biotin-avidin system; covalently bonding