DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2014.11.016

纯钛表面加载 RGD 多肽的体外实验研究

徐基亮[1],夏 荣[1],孙 磊[1],胡小晔[2],刘 春[1],孙子环[1]

摘要 **目的** 探讨纯钛表面加载 RGD 多肽进行生物功能化修饰的可行性。**方法** 借助电化学和分子自组装技术在纯钛表面构建 TiO_2 纳米管-聚多巴胺-RGD 多肽活性层,采用场发射扫描电镜(FESEM)、X 射线光电子能谱(XPS)对各组钛片进行表面形貌和元素组成分析。培养小鼠骨髓基质干细胞(BMSCs),对处理前后的钛片进行体外生物活性评价。**结果** SEM 和 XPS 显示,两步阳极氧化后在纯钛表面形成蜂窝多孔的 TiO_2 纳米管,多巴胺在 TiO_2 纳米管上自聚合成聚多巴胺涂层,同时向外接枝偶联 RGD 多肽,最终在纯钛表面成功形成了 TiO_2 纳米管-聚多巴胺-RGD 多肽活性层,体外细胞培养显示,该活性层有利于细胞黏附、增殖和分化。**结论** RGD 多肽功能化修饰的钛片有良好的生物相容性,这种钛表面功能化修饰法可望用于改善钛种植体,提高骨结合。

关键词 钛;TiO_2 纳米管;RGD 多肽;多巴胺;骨髓基质干细胞

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)11-1591-05

种植体界面之间的骨结合是种植修复成功的关键因素。在钛种植体表面构建生物活性层,进行生物改性,可促进骨结合,提高种植体保存率。研究[1-2]证实,TiO_2 纳米管比表面积大,吸附能力强,能促进成骨细胞的黏附和增殖。多巴胺具有亲水性,在碱性溶液中容易引发自聚-交联反应,在固体材料表面可形成紧密附着的复合层,且具有很好的生物相容性[3]。RGD 多肽广泛存在于多种生物活性物质中。该序列具有调节细胞与血清及胞外基质蛋白附着的作用,将其固定于钛种植体表面可促进成骨细胞的黏附、生长及成骨[4-5]。该研究拟通过多巴胺接枝偶联在纯钛表面构建 TiO_2 纳米管-多巴胺-RGD 多肽活性层,探讨其对小鼠骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)增殖和分化的影响,以期为钛种植体表面生物改性提供新的思路。

2014-07-14 接收

基金项目:安徽省科技厅年度重点科研资助项目(编号:12070403070);安徽省学术和技术带头人科研活动经费资助(编号:2014H030)

作者单位:[1] 安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

[2] 安徽省纳米材料与纳米结构重点实验室,中国科学院合肥物质研究院固体物理研究所,合肥 230031

作者简介:徐基亮,男,硕士研究生;

夏 荣,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xiarongqh@aliyun.com

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料 纯度 99.99%、长宽 10 cm×10 cm、厚度 0.25 mm 的高纯钛箔片(北京中金研新材料科技有限公司);小鼠 BMSCs(上海晶旷生物科技有限公司);乙二醇(上海苏懿化学试剂有限公司);氟化铵、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);多巴胺、RGD 多肽(上海晶纯生化科技股份有限公司);Tris(美国 Amresco 公司)。

1.1.2 主要仪器 Sirion-200 场发射扫描电子显微镜(FESEM,美国 FEI 公司);RXN-603D 直流电源(深圳兆信电子仪器设备厂);KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AR124CN 电子天平(上海奥豪斯仪器有限公司);HC-2062 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);ELX800 酶标仪(美国 BIO-TEK 公司);X 射线光电子能谱(XPS,美国 Thermo 公司)。

1.2 钛片处理及检测分析

1.2.1 钛片预处理及 TiO_2 纳米管制备 厚度 0.25 mm 的纯钛箔片加工成直径为 12 mm 的钛片,金相砂纸(800#到 7000#)逐级打磨抛光至镜面效果,丙酮、乙醇、去离子水中依次超声清洗 20 min,氮气流中吹干。继而将上述钛片放入盛有 88 mmol/L 氟化铵的乙二醇电解液中,钛片作阳极,石墨作阴极,分两步阳极氧化:第 1 步先在 60 V 电压下通电 2.5 h,取出钛片放入去离子水中,超声震荡去除钛片表面阳极化形成的氧化膜;第 2 步改在 12 V 电压下通电 40 min,取出钛片,去离子水中超声清洗至溶液澄清,氮气流中吹干,备用。

1.2.2 多巴胺修饰及加载 RGD 多肽 电化学修饰后的钛片,浸泡于 50 ml、2 mg/ml 多巴胺溶液(10 mmol/L Tris-buffer,pH 8.5)中 12 h,避光,保持周围

气流通畅。取出修饰后的钛片，去离子水反复冲洗去除表面未聚合残余的多巴胺，室温下自然晾干。将上述钛片再浸泡于 30 ml、200 μg/ml RGD 多肽溶液中(10 mmol/L Tris-buffer，pH 8.5)，37 ℃恒温摇床上孵 12 h，取出处理后的钛片，去离子水反复冲洗去除表面未结合牢固残余的多肽，室温下自然晾干。

1.2.3 实验分组 光滑钛片作为 Ti 组，阳极化处理的钛片作为 TiO_2 组，在 TiO_2 纳米管基础上多巴胺浸泡修饰的钛片作为 PDOP 组，通过多巴胺接枝偶联 RGD 多肽的钛片作为 RGD 组。

1.2.4 表面形貌和元素组成检测 FESEM 观察钛片表面形貌特征，XPS 分析表面元素组成。

1.3 体外细胞学评价

1.3.1 细胞黏附 常规培养 MSCs 生长铺展到 80% ~90%，PBS 冲洗，0.25% 胰酶消化 2 min，制备细胞悬液。将悬液的细胞浓度调到 1×10^5/ml 时，接种到各组试件(环氧乙烷消毒处理)表面，继续 37 ℃、5% CO_2 条件下常规培养，3 d 后取出钛片，PBS 清洗去除未牢固黏附的细胞，2.5% 戊二醛固定 20 min，PBS 反复冲洗，自然风干，喷金，SEM 观察钛片表面细胞的形态和生长状况。

1.3.2 细胞增殖 将胰酶消化后的悬液重悬，细胞浓度调整到 1×10^5/ml 时，依次接种到各试件表面，37 ℃、5% CO_2 环境下常规培养，第 1、3、5 天取出，PBS 清洗 3 次，并置于 24 孔板中，每孔加入 200 μl MTT(5 mg/ml)、800 μl 无血清无酚红 DMEM，37 ℃孵育 4 h 后弃上清液，加入 1ml DMSO 溶解生成的紫色结晶物，每孔分别取 3 份 200 μl 溶解液转移至 96 孔培养板，空白孔调零，测定 490 nm 各孔的吸光度(OD_{490})值。

1.3.3 细胞分化 将悬液的细胞浓度调到 1×10^5/ml，接种到试件表面，常规培养至第 3、5、7 天时，吸去原有培养液并用 PBS 清洗细胞，0.2% Triton X-100 裂解细胞 30 min 后，按 AKP 检测试剂盒说明操作，取 30 μl 细胞裂解液、0.5 ml 缓冲液、0.5 ml 基质液混合摇匀，37 ℃水浴 15 min 后，加入 1.5 ml 显色液摇匀，测定 490 nm 各孔的吸光度(OD_{490})值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 表面形貌 FESEM 下 Ti 组表面比较粗糙，有清晰可见的划痕；TiO_2 组表面为蜂窝状多孔的 TiO_2 纳米管，外管为六边形，内、外管直径分别约为 20、160 nm；PDOP 组表面纳米管管径部分变窄或被封闭；RGD 组表面可见散落颗粒状的 RGD 多肽，部分进入纳米管中，见图 1。

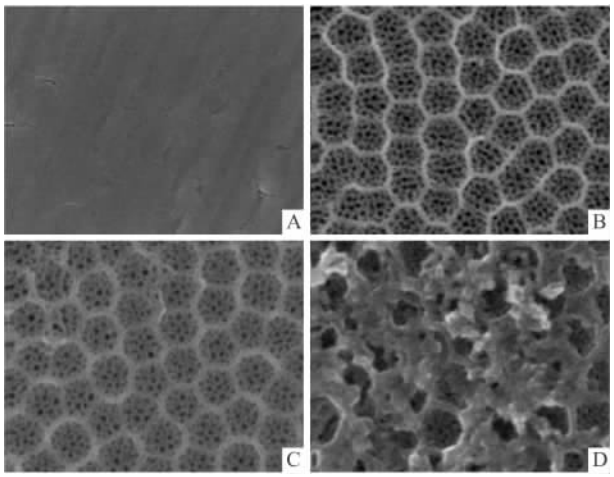

图 1 4 组试件 SEM 下的表面形貌

A：Ti 组 ×20 000；B：TiO_2 组 ×100 000；C：PDOP 组 ×100 000；D：RGD 组 ×100 000

2.2 表面元素分析 纯钛表面有 C 元素，可能来自于周围环境中碳氢化合物的物理性黏附，这是不可避免的。图 2 中显示了 4 组中 C 和 N 元素波谱的变化，进一步证实了在纯钛表面依次形成了 TiO_2 纳米管，聚多巴胺涂层和 RGD 多肽修饰层。

2.3 细胞黏附 Ti 组细胞生长一般，胖梭形，铺展比较局限。TiO_2 组细胞铺展较开，但是细胞之间的触角较少。PDOP 和 RGD 组细胞生长铺展良好，细梭形，细胞伸出的触角较多，且 RGD 组细胞之间接触比 PDOP 组更多，见图 3。

2.4 细胞增殖 4 组在第 1 天增殖活力有增加的趋势，但差异无统计学意义。与 Ti 组比较，TiO_2、PDOP、RGD 组在第 3 天和第 5 天增殖活力增加差异有统计学意义($P<0.05$)；与 TiO_2、PDOP 组分别比较，RGD 组在第 3 天和第 5 天增殖活力增加差异有统计学意义($P<0.05$)，见表 1。

表 1 各组不同时间点 MTT 实验 OD_{490} 值($n=36$，$\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天
Ti	0.100 3 ± 0.015 6	0.252 3 ± 0.017 2	0.625 7 ± 0.010 0
TiO_2	0.104 3 ± 0.009 1	0.416 7 ± 0.023 9*	0.739 7 ± 0.053 5*
PDOP	0.125 0 ± 0.019 1	0.433 7 ± 0.027 8*	0.698 3 ± 0.003 1*
RGD	0.121 7 ± 0.019 5	0.503 7 ± 0.003 2$^{*\,\&\#}$	0.796 3 ± 0.015 4$^{*\,\&\#}$

与 Ti 组比较：$^{*}P<0.05$；与 TiO_2 组比较：$^{\&}P<0.05$；与 PDOP 组比较：$^{\#}P<0.05$

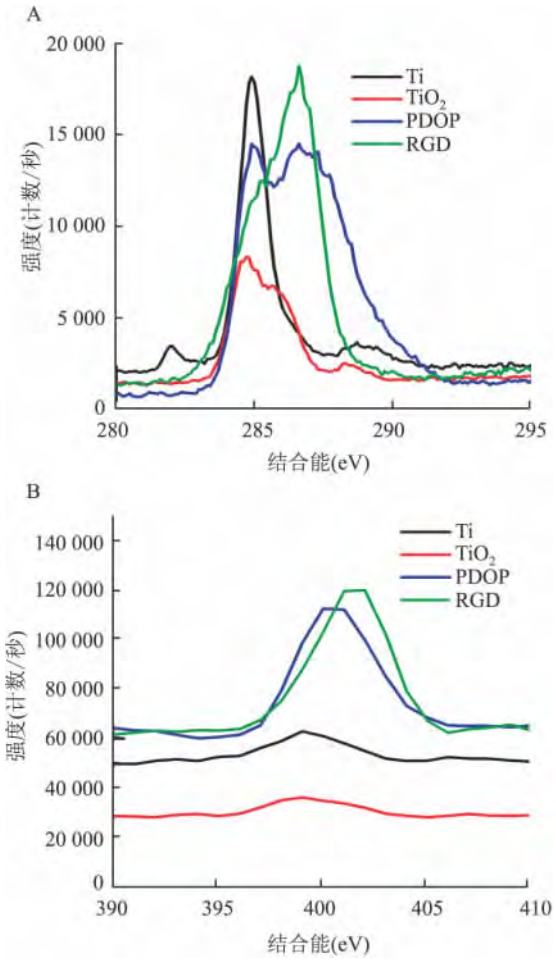

图2 4组试件XPS下的表面元素分析

A:C峰;B:N峰

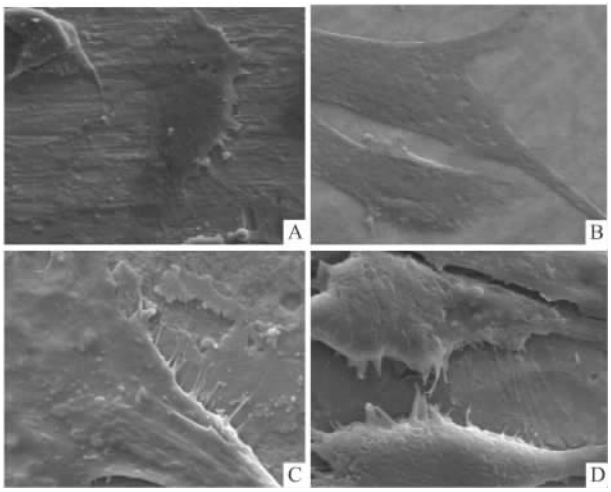

图3 4组试件上生长3 d的MSCs在SEM下的形态

A:Ti组×2 000;B:TiO_2组×5 000;C:PDOP组×5 000;D:RGD组×5 000

2.5 细胞分化 4组在第3天和第5天AKP活力有增加的趋势,但差异无统计学意义。第7天时,相对于Ti组,TiO_2、PDOP、RGD组AKP活力增加差异有统计学意义($P<0.05$);相对于TiO_2组、PDOP组、RGD组AKP活力增加差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 各组不同时间点AKP实验OD_{490}值($n=36$,$\bar{x}\pm s$)

组别	第3天	第5天	第7天
Ti	0.050 3±0.006 0	0.070 0±0.009 0	0.091 0±0.002 6
TiO_2	0.052 3±0.004 7	0.071 7±0.005 5	0.100 0±0.004 0*
PDOP	0.054 0±0.004 0	0.077 7±0.001 5	0.102 7±0.001 5*
RGD	0.055 3±0.001 5	0.078 7±0.007 1	0.111 3±0.004 0*&#

与Ti组比较:*$P<0.05$;与TiO_2组比较:&$P<0.05$;与PDOP组比较:#$P<0.05$

3 讨论

骨结合是钛种植体修复成功的基础。纯钛及钛合金具有良好的生物相容性、耐腐蚀性和较高的机械强度,经过数十年临床应用的考验,目前成为口腔种植体的首选材料,已广泛应用于临床牙列缺损及缺失患者的修复治疗。然而,钛作为生物惰性材料,存在诸如骨结合时间较长、骨结合强度低及金属腐蚀所释放的游离离子对人体组织的潜在影响等问题,因此对钛种植体表面进行改性处理,使其表面具有骨引导、骨诱导,促进成骨细胞在其表面的黏附、增殖、分化继而矿化,达到与骨组织形成骨结合,缩短骨结合时间,提高种植义齿远期成功率至关重要。

在钛种植体表面处理方法中,有研究[6]显示,阳极氧化处理得到的TiO_2纳米管能显著增加纳米级别的粗糙度,使钛表面类似于骨组织,骨形成细胞、成骨细胞更容易黏附,进而增加骨形成的质量和速度。因此,可以在TiO_2纳米管基础上对钛做进一步的生物修饰。

RGD多肽是一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的短链,广泛存在于生物活性物质中,如纤维黏连蛋白、玻璃黏连蛋白、骨桥蛋白及骨涎腺蛋白等。该序列具有调节细胞与血清及胞外基质蛋白附着的作用,将其固定于钛种植体表面可促进成骨细胞的黏附、生长及成骨作用[4-5]。Germanier et al[7]将RGD共轭连接到由聚(L-赖氨酸)接枝的PEG上,形成单分子吸附层,对钛种植体表面进行修饰。Oya et al[8]利用共价连接的方法将RGD沉积到聚乙二醇修饰的钛表面,显著改善了材料表面的矿化作用。He et al[9]将RGD和重组骨形成蛋白混合掺入HA涂层修饰的钛表面,能明显促进BMSCs的增殖、分化。Porté-Durrieu et al[10]利用硅烷化、交联、

硫基键合三步反应将 RGD 嫁接到钛表面，促进了人类骨髓基质干细胞的黏附。Kammerer et al[11] 通过化学法分别将 RGD 键合到酸蚀处理和大颗粒喷砂酸蚀处理的钛片表面，相对于未用 RGD 修饰的对照组，实验组明显激活血小板的功能，进而促进成骨细胞的增殖、分化。

材料学中广泛使用的多巴胺具有亲水性，在碱性溶液中很容易引发自聚-交联反应，在几乎任何一种固体材料表面可形成紧密附着的聚多巴胺薄膜层，该复合层中含有丰富的邻苯二酚基团，碱性条件下，这些基团又很容易被氧化成醌式结构，从而与含有巯基、氨基、亚氨基的有机分子发生共轭加成和席夫碱反应，将功能分子引入材料表面[3]。并且 RGD 多肽链中含有羧基和氨基等活性基团，因此能通过多巴胺在 TiO_2 纳米管表面自聚合形成聚多巴胺中间层进而向外接枝偶联 RGD 多肽进而形成 TiO_2 纳米管-聚多巴胺-RGD 多肽活性层。本研究中，SEM 和 XPS 显示，在纯钛表面依次形成了 TiO_2 纳米管，聚多巴胺涂层和 RGD 多肽修饰层，即成功构建出了 TiO_2 纳米管-聚多巴胺-RGD 多肽活性层。本研究显示，该活性层能促进 BMSCs 的黏附、增殖和分化。至于该修饰活性层对钛种植体体内骨结合的影响，有待于进一步研究。

参考文献

[1] Eaninwene G N, Yao C, Webster T J. Enhanced osteoblast adhesion to drug-coated anodized nanotubular titanium surfaces [J]. Int J Nanomedicine, 2008, 3(2):257 - 64.

[2] Balasundaram G, Yao C, Webster T J. TiO_2 nanotubes functionalized with regions of bone morphogenetic protein-2 increases osteoblast adhesion [J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 84(2):447 - 53.

[3] 徐又一，蒋金泓，朱利平，等. 多巴胺的自聚-附着行为与膜表面功能化 [J]. 膜科学与技术，2011,31(3):32 - 8.

[4] Cao X, Yu W Q, Qiu J, et al. RGD peptide immobilized on TiO_2 nanotubes for increased bone marrow stromal cells adhesion and osteogenic gene expression [J]. J Mater Sci Mater Med, 2012, 23(2):527 - 36.

[5] Wang D, Mao J, Zhou B, et al. A chimeric peptide that binds to titanium and mediates MC3T3-E1 cell adhesion [J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(1):191 - 7.

[6] Yao C, Slamovich E B, Webster T J. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures [J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 85(1):157 - 66.

[7] Germanier Y, Tosatti S, Broggini N, et al. Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs [J]. Clin Oral Implants Res, 2006, 17(3):251 - 7.

[8] Oya K, Tanaka Y, Saito H, et al. Calcification by MC3T3-E1 cells on RGD peptide immobilized on titanium through electrodeposited PEG [J]. Biomaterials, 2009, 30(7):1281 - 6.

[9] He J, Huang T, Gan L, et al. Collagen-infiltrated porous hydroxyapatite coating and its osteogenic properties: *in vitro* and *in vivo* study [J]. J Biomed Mater Res A, 2012, 100(7):1706 - 15.

[10] Porté-Durrieu M C, Guillemot F, Pallu S, et al. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion [J]. Biomaterials, 2004, 25(19):4837 - 46.

[11] Kammerer P W, Gabriel M, Al-Nawas B, et al. Early implant healing: promotion of platelet activation and cytokine release by topographical, chemical and biomimetical titanium surface modifications *in vitro* [J]. Clin Oral Implants Res, 2012, 23(4):504 - 10.

Study of pure titanium surface loaded with RGD peptide *in vitro*

Xu Jiliang, Xia Rong, Sun Lei, et al

(*Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230601)

Abstract ***Objective*** To investigate the feasibility of pure titanium surface functionalization with RGD peptide. ***Methods*** TiO_2 nanotubes-polydopamine-RGD peptide bioactive layers were built on titanium surface with electrochemistry and molecular self-assembly technique. Titanium surface morphology and elemental composition analysis of each group were characterized by field emission scanning electron microscopy (FESEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Mouse bone marrow stromal cells (BMSCs) were cultured *in vitro* to evaluate biological activity of titanium before and after treatment. ***Results*** SEM and XPS showed that honeycomb porous TiO_2 nanotubes were formed on pure titanium after the two-step anodization, dopamine self-polymerized to a polydopamine film onto surfaces of TiO_2 nanotubes, polydopamine film was then utilized to conjugate RGD, finally forming TiO_2 nanotubes-polydopamine-RGD peptide bioactive layers. *In vitro* cell culture showed that the active layer was conducive to cell

不同转移潜能的肝癌细胞系定量磷酸化蛋白质组学研究

衣泰龙[1,2],田苗苗[2],翟琳辉[2],徐忠伟[2],杨晓明[1,2],徐 平[1,2]

摘要 **目的** 研究具有不同侵袭转移能力的肝癌细胞系的磷酸化蛋白质组的动态变化。**方法** 首先用含有重稳定同位素标记的精氨酸和赖氨酸的培养基对 MHCC97-L 进行重稳定同位素标记氨基酸的细胞培养(SILAC);用含有轻稳定同位素标记的精氨酸和赖氨酸的培养基对 MHCC97-H 进行 SILAC 标记。将完成标记的两种肝癌细胞系的蛋白质按照 1∶1 混合,并用 trypsin 进行溶液消化;对消化得到的肽段进行除盐,并通过固相金属离子亲和色谱(IMAC)的方法进行磷酸化肽段的富集。磷酸化肽段通过质谱进行检测,并通过 MaxQuant 进行鉴定和定量。最后通过 Z 检验进行统计学分析,并对差异调控的磷酸化肽对应的蛋白质进行基因本体(GO)分析和 STRING 网络分析。**结果** 最终鉴定了 918 个磷酸化肽段,其中 806 个磷酸化肽段的磷酸化位点可以定位和定量。通过 Z 检验,共得到了 91 个磷酸化修饰水平发生变化的肽段,对应 25 个磷酸化蛋白质。通过对这 25 个蛋白质进行 GO 分析发现,细胞骨架重塑过程中的蛋白质在 MHCC97-L 和 MHCC97-H 中磷酸化修饰形式严重失调。通过 STRING 分析发现,NES 和 PRKCA 处于网络的重要节点位置。**结论** 细胞骨架重塑这一生物学过程与肝癌侵袭转移能力密切相关;参与细胞骨架重塑的 NES 蛋白和参与 MAPK 信号通路和黏合斑信号通路的 PRKCA 蛋白磷酸化修饰水平的变化是影响低转移潜能 MHCC97-L 细胞向高转移潜能细胞 MHCC97-H 变化的重要调控机制。

2014-06-27 接收

基金项目:国家重点基础研究发展计划("973"计划)(编号:2011CB910600);国家高技术研究发展计划("863"计划)(编号:SS2012AA020502);国家自然科学基金(编号:31070673);北京市自然科学基金(编号:5112012)

作者单位:[1]安徽医科大学研究生院,合肥 230032

[2]军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京蛋白质组研究中心,蛋白质组学国家重点实验室,北京 102206

作者简介:衣泰龙,男,硕士研究生;

杨晓明,男,研究员,博士生导师,责任作者,E-mail:xiaomingyang@sina.com;

徐 平,男,研究员,博士生导师,责任作者,E-mail:xupingghy@gmail.com

关键词 定量磷酸化蛋白质组学;SILAC;固相金属离子亲和色谱;肝细胞癌;侵袭转移

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)11-1595-05

研究[1]显示在肝癌转移过程中 RAF/MEK/ERK 与磷酸化相关的信号通路通常处于活化状态,表明蛋白质的磷酸化修饰与肝癌的侵袭转移机制密切相关。因此深入研究肝癌的磷酸化蛋白质组对于揭示肝癌侵袭转移的调控机制十分重要。对于肝癌,至今尚无基于稳定同位素标记氨基酸的细胞培养(stable isotope labeling by amino acids in cell culture,SILAC)的高精度定量磷酸化蛋白质组学研究的报道。为了揭示肝癌侵袭转移过程中蛋白质磷酸化的调控规律,该研究通过 SILAC 定量的方法研究了具有相同遗传背景的 MHCC97-L 和 MHCC97-H 两株细胞系的磷酸化蛋白质组学数据并分析两种细胞系之间差异调控的蛋白质,旨在揭示肝癌侵袭转移过程中磷酸化蛋白质的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 MHCC97-L 和 MHCC97-H 由上海复旦大学医学院附属中山医院肝癌研究所刘银坤教授惠赠。细胞于液氮中保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 [$^{3}C_{6}{}^{15}N_{4}$] arginine (+0.010 008 3 ku)和[$^{3}C_{6}$] lysine (+0.006 020 1 ku)购自美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司;碳酸氢铵(NH_4HCO_3)、甲醇、乙腈(ACN)、甲酸(FA)、三氟乙酸(TFA)、磷酸酶抑制剂 cocktail 2 和磷酸酶抑制剂 cocktail 3 购自美国 Sigma 公司;蛋白酶抑制剂 cocktail 购自瑞士 Roche 公司;尿素、碘乙酰胺和 Tris-HCl 购自美国 Amresco 公司;透析胎牛血清购

adhesion, proliferation and differentiation. ***Conclusion*** Titanium disks of functional modification with RGD peptide have good biocompatibility, which could be used for developing the titanium implants and further to improve osseointegration.

Key words titanium; TiO_2 nanotubes; RGD peptide; dopamine; bone marrow stromal cells