

# 钛表面双层纳米管制备及生物活性的测定

孙磊<sup>1</sup> 夏荣<sup>1</sup> 徐基亮<sup>1</sup> 胡小晔<sup>2</sup> 刘春<sup>1</sup> 孙子环<sup>1</sup>

**摘要** 采用电化学两步阳极氧化法在钛表面制备纳米管,光滑纯钛作为对照组,通过场发射电镜、X射线能量色散谱和原子力显微镜观察分析试件表面微观形貌、元素组成和三维形貌并计算粗糙度。体外培养小鼠骨髓间质干细胞(BMSCs)进行生物活性的测定。结果显示在钛表面制备出有序的双层蜂窝状二氧化钛纳米管阵列,纳米管的表面由钛和氧元素组成,纳米管组粗糙度值大于光滑组,两组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),纳米管组试件促进了BMSCs的黏附、增殖和分化。

**关键词** 钛;阳极氧化;纳米管;骨髓间质干细胞;生物活性  
中图分类号 R 783.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1492-04

钛因其优异的生物相容性、良好的抗腐蚀性和高机械强度,作为口腔种植体材料已被广泛应用于临床牙列缺损及牙列缺失患者的修复治疗中。种植义齿修复成功的决定因素是种植体界面的骨结合。然而种植体的表面形貌及表面成分对骨结合具有重大影响,因此种植体表面改性处理是植入材料的研究热点之一。该研究采用电化学两步阳极氧化法构建一种新型二氧化钛( $\text{TiO}_2$ )双层纳米管阵列,观察分析其微观结构并测定其生物活性,以期能为钛种植体表面修饰提供一种新的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

**1.1.1 主要材料和试剂** 直径为12 mm,厚度为0.25 mm的钛片(纯度为99.99%,北京中金研新材料科技有限公司);小鼠骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)和干细胞完全培

养基(上海晶旷生物科技有限公司提供);乙二醇(上海苏懿化学试剂有限公司);氟化铵(国药集团化学试剂有限公司)。

**1.1.2 主要仪器** Sirion-200 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(FEI, 美国);原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)(Innova Veeco, 美国);LP6003D型直流稳压电源(深圳市乐达精密工具有限公司);Axioskop2 plus 荧光显微镜(ZEISS, 德国);ELX800 酶标仪(BIO-TEK, 美国); $\text{CO}_2$  培养箱(Thermo, 美国)。

### 1.2 制备纳米管阵列

**1.2.1 钛片预处理** 将厚度为0.25 mm的纯钛片切割成直径为12 mm的圆片70枚,使用800#、2000#、3000#、5000#和7000#的砂纸将其表面逐级打磨抛光至镜面状,依次在丙酮、乙醇和去离子水中超声清洗20 min后干燥备用。制备好的试件称为光滑组试件。

**1.2.2 阳极氧化** 取上述光滑组试件35枚分别放入含有88 mmol/L氟化铵的乙二醇电解液中,与阳极相连,石墨为阴极,在设定的电压和时间下,分两步进行阳极氧化:60 V 2.5 h;12 V 40 min。取出钛片在去离子水中超声清洗15 min,干燥后备用。制备好的试件称为纳米管组试件。

### 1.3 表面微观结构及理化特性分析

**1.3.1 表面微观结构以及元素分析** 在光滑组和纳米管组中各随机选取3枚试件,SEM观察分析试件表面微观形貌,X射线能量色散谱(energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS)分析试件表面元素组成。

**1.3.2 表面三维形貌及粗糙度** 在光滑组和纳米管组中各随机选取3枚试件,在试件表面不同半径上随机选择3个位点,利用AFM观察和测定其表面的三维形貌及平均粗糙度(roughness average, Ra),取3个位点Ra的平均值。

### 1.4 体外生物活性测定

**1.4.1 试件灭菌** 将光滑组和纳米管组每组各29枚共58枚试件用环氧乙烷(55℃, 2 h)灭菌。

**1.4.2 细胞黏附计数** 从两组试件中随机各选取

2014-03-24 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)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

<sup>2</sup>安徽省纳米材料与纳米结构重点实验室,中国科学院固体物理研究所,合肥 230031

作者简介:孙磊,女,住院医师,硕士研究生;

夏荣,男,主任医师,医学博士,硕士生导师,责任作者,

E-mail: xiarongqh@aliyun.com

9枚置于24孔培养板中,将BMSCs按 $1 \times 10^5$ 个/ml、500  $\mu$ l/孔接种至试件表面。细胞孵箱中培养30、60和120 min后每组各取3孔,用PBS漂洗3次,4%多聚甲醛固定BMSCs,室温下用Hoechst 33342避光染色10 min,正置荧光显微镜观察,随机选3个视野拍摄照片,利用软件进行细胞计数。

**1.4.3 细胞伸展形态观察** 从两组试件中随机各选取2枚置于24孔培养板中,细胞接种同细胞黏附实验,BMSCs培养120 min后终止培养,用PBS轻柔漂洗3次,加入2.5%戊二醛固定24 h后干燥,喷金后SEM观察BMSCs生长状况。

**1.4.4 细胞增殖检测** 试件放置同细胞黏附实验,BMSCs接种密度为 $2 \times 10^4$ 个/ml、500  $\mu$ l/孔,BMSCs培养1、3和5 d后分别终止,用PBS清洗3次后每孔加入200  $\mu$ l MTT(5 mg/ml)和800  $\mu$ l无血清无酚红DMEM,37  $^{\circ}$ C孵育4 h后吸弃上清液,加入1 ml DMSO,每孔分别取3份200  $\mu$ l溶解液转移至96孔培养板,空白孔调零,酶标仪在490 nm波长下检测吸光度(optical density, OD)值。

**1.4.5 细胞分化检测** 试件放置和细胞接种同细胞黏附实验,BMSCs培养至第3、5和7天,用0.2% Triton X-100溶液裂解细胞30 min后滴加 AKP检测试剂,37  $^{\circ}$ C水浴15 min,加入1.5 ml显色液,酶标仪在490 nm波长下检测OD值。

**1.5 统计学处理** 采用SPSS 10.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本的 $t$ 检验。

## 2 结果

**2.1 微观形貌观察** SEM结果显示光滑组试件表面偶见裂隙和划痕。纳米管组试件表面则形成了蜂窝状有序的TiO<sub>2</sub>纳米管阵列,由上、下两层TiO<sub>2</sub>纳米管组成,上层纳米管为有序的六边形和五边形阵列,孔径约为160 nm;下层纳米管开口端位于上层纳米管中,各管开口端在轴向上互相粘合,孔径约为20 nm,深度约为500 nm,见图1。

**2.2 元素分析** EDS结果显示光滑组试件表面元素为钛,纳米管组试件表面钛元素质量百分比为75.81%,氧元素质量百分比为24.19%,见图2。

**2.3 立体形貌观察和粗糙度测量** AFM三维立体形貌图可见光滑组表面有细微的划痕,纳米管组表面呈典型的蜂窝状三维立体形貌,见图3。经统计分析,光滑组试样的Ra值为 $(20.3 \pm 4.4)$  nm,纳米管组试件的Ra值为 $(37.8 \pm 1.8)$  nm,纳米管组粗糙

度大于光滑组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $t = 6.3168$ )。

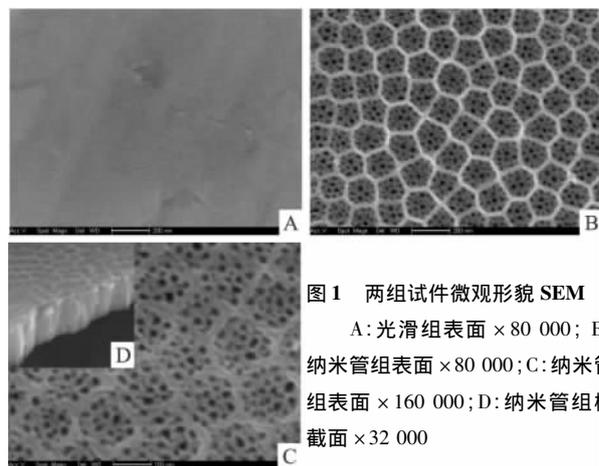


图1 两组试件微观形貌 SEM  
A:光滑组表面 $\times 80\ 000$ ; B:纳米管组表面 $\times 80\ 000$ ; C:纳米管组表面 $\times 160\ 000$ ; D:纳米管组横截面 $\times 32\ 000$

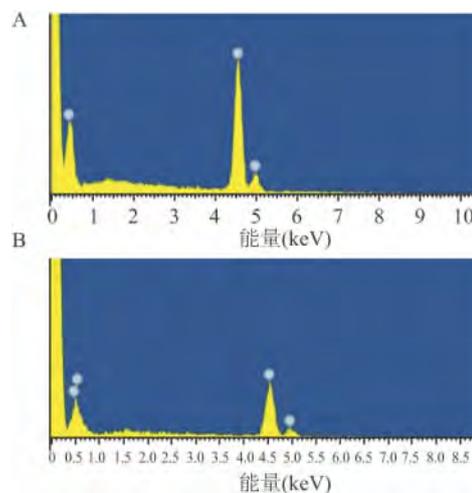


图2 两组试件能谱图 EDS

A:光滑组试件表面元素为钛; B:纳米管组试件表面元素为钛和氧

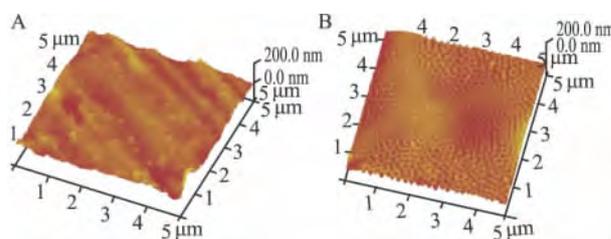


图3 两组试件表面三维立体照片 AFM

A:光滑组有细微的划痕; B:纳米管组呈典型蜂窝状

## 2.4 生物活性测定

**2.4.1 细胞黏附** 光滑组和纳米管组表面的BMSCs在培养30、60和120 min后细胞数差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

**2.4.2 细胞形态** 培养120 min后,光滑组和纳米

管组表面 BMSCs 均向四周伸展,纳米管组板状伪足更宽大而明显,细胞出现两极改变并伸长,长轴两端出现大量细小的丝状伪足,见图 4。

表 1 两组 3 个时间点 BMSCs 细胞计数的比较 ( $n \bar{x} \pm s$ )

时间	光滑组	纳米管组	t 值
30 min	291 ± 11	405 ± 13*	11.456 1
60 min	382 ± 13	419 ± 16*	3.169 1
120 min	339 ± 9	365 ± 8*	3.835 6

与光滑组比较: \*  $P < 0.05$

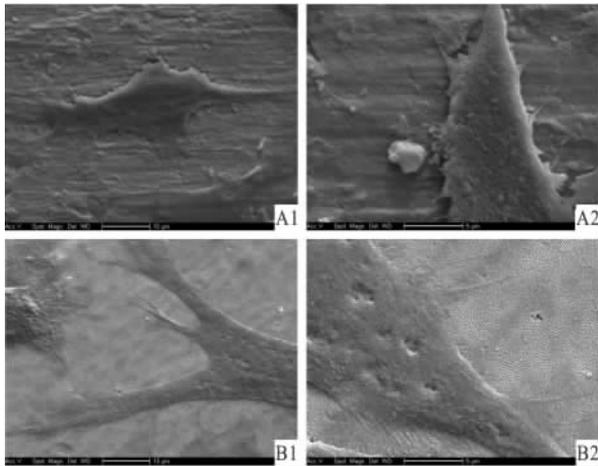


图 4 培养 120 min 后两组试件表面的 BMSCs 形态  
A:光滑组; B:纳米管组; 1:SEM × 2 000; 2:SEM × 5 000

2.4.3 细胞增殖 与光滑组比较,纳米管组在第 1、3、5 天的 BMSCs 增殖活力均有增加,其中第 3、5 天明显增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 两组 3 个时间点 MTT 实验 OD 值 ( $n = 18 \bar{x} \pm s$ )

时间	光滑组	纳米管组	t 值
第 1 天	0.099 7 ± 0.015 0	0.103 7 ± 0.008 5	0.400 9
第 3 天	0.200 7 ± 0.075 9	0.415 0 ± 0.024 3*	4.655 6
第 5 天	0.624 7 ± 0.010 0	0.742 3 ± 0.054 1*	3.705 7

与光滑组比较: \*  $P < 0.05$

2.4.4 细胞分化 与光滑组比较,纳米管组在第 3、5、7 天 BMSCs 的 AKP 活力均有增加,其中第 7 天明显增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 两组 3 个时间点 AKP 实验 OD 值 ( $n = 18 \bar{x} \pm s$ )

时间	光滑组	纳米管组	t 值
第 3 天	0.049 0 ± 0.006 0	0.050 7 ± 0.005 0	0.368 6
第 5 天	0.069 0 ± 0.008 5	0.071 0 ± 0.005 3	0.344 7
第 7 天	0.089 7 ± 0.003 5	0.099 3 ± 0.004 0*	3.127 2

与光滑组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

文献<sup>[1-2]</sup>首次报道了 TiO<sub>2</sub> 纳米管用于生物材料的表面修饰,与光滑的钛表面相比,TiO<sub>2</sub> 纳米管排序高度规整有序、表面积增大、机械强度高、吸附能力强、不易发生光腐蚀、耐酸碱性好、具有很好的生物相容性且对机体无毒;TiO<sub>2</sub> 纳米管是在原有的钛基底直接构建的,与在钛表面进行外来涂层修饰所不同,不易发生剥脱和分层现象;垂直排列的 TiO<sub>2</sub> 纳米管的管状形貌可以提供药物和生物因子所需的空间结构<sup>[3]</sup>。制备 TiO<sub>2</sub> 纳米管的方法主要有:溶胶-凝胶法、模板法、水热合成法以及电化学阳极氧化法。阳极氧化法工艺简单,成本低廉,可操作性强,更适合应用于形状复杂的种植体表面的处理。然而,这些工作都集中在垂直的 TiO<sub>2</sub> 纳米管阵列,即从管顶部到管底部的直径都相等的 TiO<sub>2</sub> 纳米管。随着纳米科学的发展,这种仅仅具有单一直径的 TiO<sub>2</sub> 纳米管阵列或许不能完全满足临床的应用需求。因此探究一种简便、有效的合成方法,制备结构复杂有序的新型 TiO<sub>2</sub> 纳米管将具有重要意义。

本研究中通过两步阳极氧化法成功制备出新型蜂窝状 TiO<sub>2</sub> 双层纳米管阵列。SEM 结果显示纳米管的结构均匀,排列有序,可用作载体,并可使装载均匀;EDS 结果分析 TiO<sub>2</sub> 纳米管试样成分主要为钛和氧元素;纳米管修饰钛表面后,Ra 值增大,材料表面的粗糙度是骨组织与种植体能否形成牢固结合的影响因素之一,研究<sup>[4]</sup>表明粗糙表面的种植体增加了接触面积,改变成骨细胞的排列堆积方式,促进成骨细胞的黏附、增殖和表达;体外 BMSCs 细胞培养实验表明纳米管组钛表面较光滑组钛表面更有利于细胞的黏附、增殖和分化。

### 参考文献

[1] 左杨,夏荣,屠姗姗,等. 纯钛种植体表面的纳米改性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(10): 1214-7.

[2] Shrestha N K, Macak J M, Schmidt-Stein F, et al. Magnetically guided titania nanotubes for site-selective photocatalysis and drug release[J]. Angew Chem Int Ed Engl 2009, 48(5): 969-72.

[3] Ma Q, Mei S, Ji K, et al. Immobilization of Ag nanoparticles/FGF-2 on a modified titanium implant surface and improved human gingival fibroblasts behavior[J]. J Biomed Mater Res A, 2011, 98(2): 274-86.

[4] 范震,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): 128-31.

# MSCT 和<sup>18</sup>F-FDG PET-CT 显像对食管癌术前分期诊断的价值

李爽, 吕维富, 汪世存, 潘博, 倪明

**摘要** 经内镜和病理证实并接受手术治疗的 182 例食管癌患者入组, 患者均在术前 1 周接受多层螺旋 CT (MSCT) 和氟代脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描 CT (<sup>18</sup>F-FDG PET-CT) 扫描, 结合图像信息, 记录其术前分期, 并与术后病理结果比较。MSCT 与<sup>18</sup>F-FDG PET-CT 扫描对判断 T 分期准确率的差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.540$ ,  $P = 0.463$ ), 而<sup>18</sup>F-FDG PET-CT 扫描对判断 N 分期的灵敏度、特异度及准确率均高于 MSCT ( $P < 0.05$ ); 术前 MSCT 扫描检测 T、N 分期与术后病理一致性差 ( $Kappa = 0.376$ ,  $Kappa = 0.317$ ,  $P < 0.01$ ), 而术前<sup>18</sup>F-FDG PET-CT 扫描检测 N 分期与术后病理高度一致 ( $Kappa = 0.750$ ,  $P < 0.01$ )。

**关键词** 食管肿瘤; 体层摄影术; 肿瘤分期; 诊断; 评价研究

中图分类号 R 730.44; R 735.1; R 814.42; R 817.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1495-04

常规的食管癌扫描手段难以提供准确的术前分

期, 而多层螺旋 CT (multi-slice computer tomography, MSCT) 和氟代脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描 CT (<sup>18</sup>F-FDG positron emission tomography combined computed tomography, <sup>18</sup>F-FDG PET-CT) 借助其良好的组织分辨率能显示食管轮廓变化、确定食管腔外肿瘤侵犯程度及淋巴结转移情况<sup>[1]</sup>, 但目前对食管癌临床分期价值尚存争议。现收集经纤维食管镜证实并接受手术治疗的食管癌患者 182 例, 回顾性分析 MSCT 及<sup>18</sup>F-FDG PET-CT 扫描图像并进行 TNM 分期, 与术后病理分期进行对比分析, 以评价 MSCT 和<sup>18</sup>F-FDG PET-CT 在食管癌分期中的价值。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 回顾性分析安徽医科大学附属省立医院 2009 年 1 月~2013 年 1 月经纤维食管镜和病理活检证实且资料完整的 182 例食管癌患者的临床资料, 患者均接受手术治疗。患者的主要症状为进行性吞咽困难, 或伴呕吐、胸背痛、消瘦、声音嘶哑等。患者均在术前 1 周内行 MSCT 及<sup>18</sup>F-FDG PET-CT 扫描并作出临床分期, 术前均未接受过抗肿瘤治疗。182 例患者中, 男 155 例, 女 27 例, 年龄 35~90

2014-03-19 接收

基金项目: 安徽省卫生厅医学科研课题计划 (编号: 13ZC020)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院影像科, 合肥 230001

作者简介: 李爽, 女, 硕士研究生;

吕维富, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lwf99@126.com

## The preparation of titanium surface coated with double-layers nanotubes and the determination of its biological activity

Sun Lei, Xia Rong, Xu Jiliang, et al

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

**Abstract** Two-step electrochemical anodic oxidation method was applied to prepare nanotube on titanium surface. Smooth titanium samples were regarded as a control group. Surface morphology, elemental composition, three-dimensional topography, and the roughness were observed and analyzed by field emission scanning electron microscope, X-ray energy dispersive spectroscopy and atomic force microscopy, respectively. The mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured to determine the biological activity *in vitro*. The results showed that double honeycomb titania nanotube arrays were successfully prepared. The elements in the surface of nanotubes composed of titanium and oxygen. The roughness of nanotube group was greater than that in smooth group with significant difference ( $P < 0.05$ ). The surface of nanotube group promoted BMSCs adhesion, proliferation and differentiation.

**Key words** titanium; nanotubes; anodic oxidation; bone marrow mesenchymal stem cells; biological activity