

不同生物活性涂层对钛表面改性的研究进展

袁青 章可可

温州医科大学 口腔医学院 浙江温州 325035

摘要: 钛材料及其合金因其具有生物相容性和高耐腐蚀性,被广泛应用于口腔种植修复体、整形外科骨组织修复替代材料等。但钛及其合金是惰性材料,植入后不能快速与骨组织结合,导致种植体周围形成骨性连接缓慢,从而影响创伤处的骨重建速度;除此以外,种植体材料极易造成周围组织感染或细菌性炎症,导致口腔种植手术的成功率降低。因此,对钛及其合金种植体表面进行生物修饰,以提高合金的抗菌能力和促进细胞分化成骨能力,一直是生物材料领域的研究热点。本文就钛材料表面用酶、蛋白质及其核酸涂层进行生物改性的研究进展作一综述,以期促进钛材料在口腔临床实践中的应用。

关键词: 钛;酶涂层;生物涂层;生物修饰;表面改性

纯钛及其合金因具有良好的生物学性能和机械性能,被作为骨内植入体的首选材料。但一方面,由于钛及其合金的表面惰性,植入后与骨结合速度缓慢,影响植入体与骨周围组织的骨性连接,进而会影响种植的成功率;另一方面,钛抗菌极不充分,细菌易粘附在钛基种植体表面,形成生物膜,植入后易引起植入体周围相关感染或细菌性炎症。临床研究显示,种植体周围黏膜炎的患病率为63.4%^[1]。因此,为提高治疗手术的成功率,我们需要对钛材料及其合金的抗菌能力和促进细胞成骨能力进行提高。

种植体材料表面改性是提高上述能力的有效方法。现有的材料改性方式有很多,如改善表面粗糙度、掺入生物活性物质、制备纳米管阵列等。其中掺入生物活性物质是指,在钛材料表面覆上某种特定的生物活性物质涂层,对其表面进行改性。近年来,研究发现了有各种各样的涂层,如抗生素涂层,银锌涂层和抗菌肽涂层。然而,上述方法常会伴有细胞毒性或出现耐药菌株等副作用。最近,有大量研究使用生物活性物质涂层,如,酶,多肽,蛋白质等对钛材料表面进行改性处理,以达到抗菌和促进细胞成骨的双重目的。因此,本文就主要的生物活性物质涂层(酶,蛋白质和核酸)对钛材料表面的改性研究进展作一综述。

一、酶

1. 脱氧核糖核酸酶 I

脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 是一种分泌性核酸内

切酶,主要作用于细胞凋亡期间,负责促进染色质的分解,在体液如血清和尿液中含量较高。除此以外, DNase I 还是一种有效的生物膜分散酶,能够特异性降解胞外膜外 DNA 这一重要成分^[1]。

细菌的生物膜是由细菌群落组成的,并且受到细胞外聚合物的支撑和保护。其细胞外聚合物由蛋白质、多糖、水和细胞外 DNA (eDNA) 组成。其中 eDNA 是细胞外聚合物的中最长的分子,它将细胞外聚合物连接在一起,从而维持生物膜的稳定和细菌的粘附^[2]。而 DNase I 可以降解广泛微生物的细胞外 DNA^[3], 由此可以破坏其生物膜的稳定性,抑制其粘附。

研究表明,在各时间下,体外 DNA 均有利于变异链球菌在釉质表面黏附和聚集,从而使生物膜形成和稳定,而 DNase I 可以降解 eDNA, 即,该酶对变异链球菌的粘附和生物膜的形成均有抑制作用。2013 年,有人把多巴胺作为中间体,将 DNase I 附着在聚甲基丙烯酸甲酯上,以此来抑制细菌生物膜的形成,最终发现 DNase I 涂层大大降低了金黄色葡萄球菌(95%)和铜绿假单胞菌(99%),可以防止生物膜形成长达 14 小时,而不会影响哺乳动物细胞的黏附和增殖^[2]。在之后的几年中, Jing Ye、Can Shao 等人通过聚多巴胺将 DNase I 附着在钛片表面,形成 Ti-pDA-DNase I 复合结构,检测 MC3T3-E1 成骨细胞活性和 DNase I 抑制变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, 简称 *S. mutans*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 简称 *S. aureus*) 粘附、生物膜形成的效果和对细胞活性的影响; Can Shao、Xin Zhang 等人通过检测同种复合结构对放线菌 (A.A) 和核梭杆菌 (F.N) 的粘附和生物膜形成的影响情况,最终发现,

第一作者简介: 袁青 (2002.12), 女, 汉族, 四川省成都市, 本科, 温州医科大学, 学生, 口腔微生物。

DNase I有良好的生物相容性, 具有增强细胞增值的潜力, 且在24h内能够有效抑制细菌的粘附和生物膜的形成, 以达到抗菌的效果^[4]。

2. 乳过氧化物酶

乳过氧化物酶 (Lactoperoxidase, EC 1.11.1.7, 简称LP) 是哺乳动物过氧化物酶家族中的一员, 广泛分布于自然界和动植物中。它们的主要功能是催化某些分子氧化, 以过氧化氢为反应物, 从而产生具有广泛抗菌活性的产物。LP是一种含血红素的抗菌酶, 存在于人类和动物的分泌液中, 在初乳中含量尤其丰富。它和硫氰酸根可以形成具抑菌作用的“乳过氧化物酶体系 (LPS)”, 在非冷藏条件, 下可以抑制革兰氏阳性菌和阴性菌的生长, 且对哺乳动物的细胞无害即没有不良副反应。

LP参与抑制微生物生长首先被Hanssen提出, 他指出LP参与构成宿主对抗入侵微生物的天然防御系统。除此之外, LP还具有抗菌活性、降解各种致癌物质以及保护动物细胞被过氧化的能力。

早些年, Mohamed Ahariz等人将钛片处理后浸入乳过氧化物酶中进行吸附试验, 并评估其种植体植入后的术后效果、检测体外抗菌能力, 结果表明钛片对LP的吸附能力较好, 但其抗菌效果和临床应用有待进一步研究和确定^[5]。近几年, 有研究通过纳米银固定乳过氧化物酶, 来提高其抗菌活性, 但没有人研究其吸附在钛片上的抗菌效果。

二、蛋白质

1. 胶原蛋白

胶原蛋白 (Collagen) 是生物高分子, 动物结缔组织中的主要成分, 也是哺乳动物体内含量最多、分布最广的功能性蛋白。具有丰富的生物相容性、高孔隙率、易与其他材料结合、易加工、亲水性、抗原性低、在体内可吸收等优点, 因此, 有作为骨组织工程生物材料的潜力。Collagen作为骨细胞外基质的主要有机成分, 常被用于提高细胞活性, 如在生物材料表面的粘附、增殖和分化。而I型胶原蛋白可形成90%以上骨组织, 是许多间质结缔组织的主要胶原, 因此最有希望促进成骨细胞增殖分化并运用于生物材料表面的胶原蛋白。

早些年, 有研究发现I型胶原蛋白可刺激细胞粘附、细胞分化和矿化。2006年, Juliette van den Dolder使用硝基苯基氯甲酸酯固定I型胶原蛋白涂层与钛片上, 并取大鼠骨髓成骨细胞进行实验, 检测对硝基苯基氯甲酸酯细胞毒性、进行DNA分析、细胞钙含量的测量等, 以此判断该改性材料对成骨细胞增殖分化的情况。结果发现, 初期细胞对用硝基苯基氯甲酸酯固定的I型胶原蛋白涂层钛的吸附少, 增值率低, 但随着培养时间增长,

该种胶原涂层能够促进骨髓细胞的成骨分化^[6]。后来有研究采用羟基磷灰石与胶原蛋白联合, 形成胶原-羟基磷灰石层状支架 (Col-HA), 并用MTT测定骨髓间充质干细胞活力, 但发现, 该种层状支架能够有效促进体外软骨和骨组织的生成, 但促进软骨形成的效果并不明显^[7]。在此之前, 有人将HA纳入COL支架为驱动HMSCs软骨形成创造了一个不利的微环境, 含HA的物质可能结合蛋白质, 进而结合Ca²⁺, 作为矿化的成核剂^[8], 参与HA对软骨形成的损害, 上述实验结果与之前的研究一致。接下来的几年中, 有研究将I型胶原功能化钛种植体 (TiColl) 植入大鼠股骨髁中, 进行Microtomographic和osteointegration评估; 也有人取牙槽脊的前庭骨碎片上的成骨细胞进行MTT细胞活性检测、碱性磷酸酶的活性检测和线粒体核糖体蛋白的测定^[9], 二者均发现该种植体对周围组织和细胞有积极作用。而近几年, Daniel G.Costa等人将I型胶原蛋白吸附于纳米级钛片上, 并用大鼠颅骨分离成骨细胞进行实验, 测定细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性、细胞外基质矿化、骨标志物和细胞增殖标志物 (Ki67 Bcl2相关X蛋白的基因表达情况), 并用免疫荧光标记测定骨相关蛋白; 结果表明, I型胶原蛋白涂层可上调相关参数、加速成骨细胞的增殖和分化, 即有利于骨整合过程^[10]。

2. 乳铁蛋白

乳铁蛋白 (Lactoferrin, LF) 是一个80 kDa的铁结合糖蛋白, 由两叶组成, 具有基本相同的结构褶皱和铁结合位点, 属于转铁蛋白家族。它在初乳和牛奶中含量高, 在眼泪、唾液、精液、鼻和支气管分泌物、胆汁和胃肠液等粘膜分泌物中的含量较低。乳铁蛋白具有广谱的抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌的能力, 还可以有效抑制大肠杆菌、伤寒沙门杆菌、链球菌等的生长。通常认为, 乳铁蛋白是通过螯合铁离子, 竞争性地剥夺细菌生长所需要的铁元素, 从而抑制细菌的生长。也有研究表明, 乳铁蛋白能与脂质A结合, 促使脂质A从革兰氏阴性菌的细菌壁上剥离出来, 从而导致细菌死亡。乳铁蛋白的N-末端有一段编码乳铁素的序列, 而乳铁素是一种具有天然抗菌活性的抗菌肽。

LF是唾液膜不可分割的一部分, 它可以通过释放抗菌肽, 抑制细菌在口腔中的定植、生长和侵袭。同时, 乳清蛋白还能够促进成骨细胞的增殖和分化。21世纪初, LF被发现成骨细胞的强剂量依赖性增殖和抗凋亡作用以及抑制破骨细胞的生成作用^[11], 在生理浓度下, LF对体外成骨细胞和软骨细胞增殖的幅度甚至可以超过已观察到的其他骨骼生长因子。

由于乳铁蛋白的抑菌和促进成骨的双重作用, LF改

性入骨种植体的应用前景广阔。因此,在2015年,有人对乳铁蛋白在钛(Ti)、不锈钢(SUS)、氧化锆(ZrO₂)和聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)上的吸附情况进行研究,结果发现在Ti和SUS的吸附量,ZrO₂和PMMA上的吸附量无明显差异,但前者的吸附量更大^[12]。后来有研究表明,乳铁蛋白虽然是一种铁结合蛋白,但也可以和包括铜在内的其他金属离子结合。还可以通过酪氨酸配体与金属离子结合来增加与金属的亲合力,且可以维持乳铁蛋白的形态和一些生理功能^[13]。

2014年,有人用含黏蛋白的人工唾液孵育钛片,使乳铁蛋白吸附在钛片表面,研究LF在钛上的吸附能力(CLSM)、对戈登氏酵母菌(链球菌)的粘附(荧光标记、SEM)、活力和细胞形态的影响。结果发现LF吸附明显降低了细菌的粘附力,且有杀灭细菌的效果,未来有望应用于种植体钛表面,预防钛周围的种植体炎症反应^[14]。而近几年,又有研究钛表面通过多巴胺辅助羟基磷灰石的沉积,再附着上乳铁蛋白,形成多巴胺羟基磷灰石-乳铁蛋白复层结构涂层,能够调节骨形成和骨吸收之间的动态平衡,并且具有良好的抗菌活性。实验通过MTT检测细胞活性、用扫描电镜和共聚焦激光扫描显微镜观察成骨细胞形态等(含体内体外实验),检测改性后的抗菌和成骨效果。结果表明该结构具有很大的应用潜力,不仅能够促进成骨细胞的增殖分化、调节破骨细胞的成熟,还能够降低细菌活性。经过进一步的LF浓度研究,能同时满足抑制破骨细胞和长期抑菌的双重效果^[15]。

3. 骨形态发生蛋白

骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)是β-TGF超家族成员之一,在骨发育和再生中发挥着重要作用。它能强烈上调MSCs成骨基因的表达,提高成骨细胞活性和骨的结合,对体内新骨形成有显著促进作用。其中BMP-2的效果尤为明显,可以刺激间充质干细胞向成骨细胞分化,因此被广泛应用。

在之前的研究中发现重组人骨形态发生蛋白2(rhBMP-2)在与不同类型的钛金属表面相互作用时表现出不同的骨诱导率^[16]。为使BMP-2在钛片上发挥的效果更优,人们对其固定材料进行了深入研究,发现肝素/BMP-2复合物固定化Ti基质可以有效提高成骨细胞的活性^[17]。此以,肝素(肝素可控制BMP-2的释放速度,并且与碱性成纤维细胞生长因子有亲和性)移植和BMP-2固定在钛表面,不仅可以促进成骨功能,还能抑制手术过程中,患者自身皮肤或黏膜对植入材料产生的炎症反应,降低植入体局部骨质破坏,种植失败的概率^[18]。研究发现,PDA也能有效促进BMP-2在Ti表面的固定。并且由该种方式修饰的Ti基质,可以通过整合介导的细

胞-基质粘附机制高度增强牙周韧带干细胞(PDLSCs)的成骨分化^[19]。甚至还出现了许多含有BMP-2的仿生混合涂层,如Soon Eon Bae等人^[20]认为在新骨形成和最终骨再生中,骨传导率和骨诱导率同样是非常重要的方面,因此他们利用BMP-2和硫酸软骨素之间的离子相互作用,制备了一种纳米复合物,成功形成了一种成骨诱导和成骨传导的作用环境,形成更好的成骨表面环境,来增强种植体的成活率。

而该家族内的其他蛋白也有着诱导成骨的能力,如已有研究发现,BMP-9的成骨潜能与Ti-nano的诱导成骨能力结合可能是促进钛种植体骨结合的一种有前景的策略^[21]。

三、核酸

1. DNA

相比于其他生物大分子而言,DNA的抗菌性较低,但因为它含有大量的磷酸基团,可以结合钙化合物,故试图将其应用于钛表面涂层,促进种植体骨的形成。试验后发现DNA/PAH或PDL涂层可以通过增加骨钙素的沉积来影响成骨细胞的分化;也有人将DNA/蛋白固定在Ti表面来促进早期骨愈合;但二者都使用的双链DNA(DNA-d)。在2018年,Nagahiro Miyamoto等人尝试使用单链DNA(DNA-s),并检测体外磷灰石的形成情况,结果表明,DNA-s/鱼精蛋白涂层能也促进骨的早期形成^[22]。即单、双链DNA多层涂层对钛植入物的表面改性有用。

2. RNA

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由合成小干扰RNA或内源性microma介导的一种重要的转录后基因沉默的过程。由于RNAi对靶基因沉默的高特异性,可以考虑引入钛表面,改变植入体表面的生物功能。

在2018年,有研究将壳聚糖/siRNA纳米颗粒与透明质酸聚合后,吸附到钛表面形成薄膜涂层,并通过荧光标记检测人成骨样细胞的成骨分化情况,最终发现,该涂层无毒性且可以明显增强成骨分化^[23]。

四、展望

钛种植体表面的进行生物改性,对种植体的成活和防止其周围炎症的发生有具有重要意义。目前,已有多生物活性材料被成功附着于钛种植体表面,并发挥作用,达到提高种植体成活率的目的。但是生物改性的操作都较为复杂,且生物活性材料的保存较物理、化学改性后材料的保存而言更为困难。因此,还需要进一步的研究,实现生物改性钛种植体的临床应用。

参考文献

[1]Shao Can., Zhang Xin., Ye Jing.et al.

Surface functionalization of titanium substrates with Deoxyribonuclease I inhibit peri-implant bacterial infection. *Dent Mater J*, undefined(undefiend), undefined. doi:10.4012/dmj.2020-055

[2]Long Non-Coding RNA Cancer Susceptibility 9 (CASC9) Up-Regulates the Expression of ERBB2 by Inhibiting miR-193a-5p in Colorectal Cancer [Retraction]. *J. Cancer Manag Res*, 2020, 12: 11675.

[3]张尧, 徐哲, 索海强, 等.骨科金属植入物表面载药抗菌涂层的研究进展[J].中国修复重建外科杂志, 2017, 31 (11): 1396-1401.

[4]Ye Jing,Shao Can,Zhang Xu et al. Effects of DNase I coating of titanium on bacteria adhesion and biofilm formation.[J].*Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 78: 738-747.

[5]Ahariz M, Mouhyi J, Louette Pet al. Adsorption of peroxidase on titanium surfaces: A pilot study. *J Biomed Mater Res*. 2000 Dec 5;52(3):567-71.

[6]Dolder J, Jansen JA. The response of osteoblast-like cells towards collagen type I coating immobilized by p-nitrophenylchloroformate to titanium. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Dec 1;83(3):712-9.

[7]Zhou J, Xu C, Wu G, et al. In vitro generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen-hydroxyapatite layered scaffolds. *Acta Biomater*. 2011 Nov;7(11):3999-4006.

[8]Bernhardt A, Lode A, Mietrach C, et al. In vitro osteogenic potential of human bone marrow stromal cells cultivated in porous scaffolds from mineralized collagen. *J Biomed Mater Res A* 2009;90:852 - 62.

[9]Lao W, Luo Q, Chen Y, et al. Preparation and biological evaluations of a collagen-like hierarchical Ti surface with superior osteogenic capabilities. *J Mater Chem B*. 2020 Jul 1;8(25):5472-5482.

[10]Costa DG, Ferraz EP, Abuna RPF, et al.The effect of collagen coating on titanium with nanotopography on in vitro osteogenesis. *J Biomed Mater Res A*. 2017 Oct;105(10):2783-2788.

[11]Cornish, J., Callon, K. E., Naot, D., et al.Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology*, 2004, 145(9), 4366-74.

[12]Yoshida E, Hayakawa T. Adsorption Analysis of Lactoferrin to Titanium, Stainless Steel, Zirconia,

and Polymethyl Methacrylate Using the Quartz Crystal Microbalance Method. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3961286.

[13]Berlutti F, Pantanella F, Natalizi T, et al.Antiviral properties of lactoferrin—a natural immunity molecule. *Molecules*. 2011 Aug 16;16(8):6992-7018.

[14]Nagano-Takebe F, Miyakawa H, Nakazawa F, et al. Inhibition of initial bacterial adhesion on titanium surfaces by lactoferrin coating. *Biointerphases*. 2014 Jun;9(2):029006.

[15]Shen T, Yang W, Shen X, et al. Polydopamine-Assisted Hydroxyapatite and Lactoferrin Multilayer on Titanium for Regulating Bone Balance and Enhancing Antibacterial Property. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018 Sep 10;4(9):3211-3223.

[16]Xiao M, Biao M, Chen Y, et al. Regulating the osteogenic function of rhBMP 2 by different titanium surface properties. *J Biomed Mater Res A* 2016;104(8):1882-1893.

[17]Lee SY, Yun YP, Song HR, et al. The effect of titanium with heparin/BMP-2 complex for improving osteoblast activity. *Carbohydr Polym*. 2013 Oct 15;98(1):546-54.

[18]Kim SE, Song SH, Yun YP, et al. The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. *Biomaterials*. 2011 Jan;32(2):366-73.

[19]Lee JS, Lee JC, Heo JS. Polydopamine-assisted BMP-2 immobilization on titanium surface enhances the osteogenic potential of periodontal ligament stem cells via integrin-mediated cell-matrix adhesion. *J Cell Commun Signal*. 2018 Dec;12(4):661-672.

[20]Bae SE, Choi J, Joung YK,et al. Controlled release of bone morphogenetic protein (BMP)-2 from nanocomplex incorporated on hydroxyapatite-formed titanium surface. *J Control Release*. 2012 Jun 28;160(3):676-84.

[21]Souza ATP, Bezerra BLS, Oliveira FS, et al. Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. *J Cell Biochem*. 2018 Nov;119(10):8441-8449.

[22]Miyamoto N, Yamachika R, Sakurai T, et al. Bone Response to Titanium Implants Coated with Double- or Single-Stranded DNA. *Biomed Res Int*. 2018 Jun 13;2018:9204391.

[23]Song W, et al. Chitosan/siRNA functionalized titanium surface via a layer-by-layer approach for in vitro sustained gene silencing and osteogenic promotion. *Int J Nanomedicine*. 2015 Mar 24.