

# 氧化钛涂层润湿性对免疫成骨性能的影响规律

上官丽<sup>1,2</sup>, 聂晓双<sup>2,3</sup>, 叶奎材<sup>2,3</sup>, 崔苑苑<sup>1</sup>, 乔玉琴<sup>2,4</sup>

(1. 上海大学 材料科学与工程学院, 上海 200444; 2. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 高性能陶瓷与超微结构国家重点实验室, 上海 200050; 3. 中国科学院大学 材料科学与光电工程研究中心, 北京 100049; 4. 上海大学 生命科学学院, 200444)

**摘要:** 钛及其合金以其优异的机械性能和生物相容性而被广泛应用作硬组织植入器械, 但其表面缺乏生物活性以及植入后的炎症反应易导致骨整合不佳。本研究利用不同气氛中的热处理工艺调控氧化钛涂层的润湿性, 并研究表面润湿性能对免疫反应和成骨性能的影响规律。研究表明, 与亲水(接触角 $\sim 10^\circ$ )的氧化钛涂层相比, 处于亲水/疏水临界状态的氧化钛涂层(接触角 $\sim 90^\circ$ ), 在仅培养巨噬细胞时, 抑制了巨噬细胞向 M1 促炎方向极化; 在共培养小鼠骨髓间充质干细胞和巨噬细胞时, 促进了巨噬细胞向 M2 抗炎方向极化, 同时显著上调了骨髓间充质干细胞成骨相关标记物的基因表达, 显示出更好的免疫促成骨性能。

**关键词:** 表面润湿性; 氧化钛涂层; 退火; 免疫成骨

中图分类号: R318 文献标志码: A

## Effects of Surface Wettability of Titanium Oxide Coatings on Osteoimmunomodulatory Properties

SHANGGUAN Li<sup>1,2</sup>, NIE Xiaoshuang<sup>2,3</sup>, YE Kuicai<sup>2,3</sup>, CUI Yuanyuan<sup>1</sup>, QIAO Yuqin<sup>2,4</sup>

(1. School of Materials Science and Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. State Key Laboratory of High Performance Ceramics and Superfine Microstructure, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; 3. Center of Materials Science and Optoelectronics Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**Abstract:** Titanium and its alloys have been widely used as hard tissue implants due to their excellent mechanical properties and biocompatibilities. However, the lack of biological activity on its surface and the inflammatory reaction after implantation can easily lead to unsatisfactory osseointegration. In this work, the wettability of titanium oxide coatings was modulated by annealing in different atmospheres, and the effects of surface wettability on polarization of macrophages and osteogenic differentiation of mBMSCs were studied. The results showed that, compared to the hydrophilic titanium oxide coating ( $\sim 10^\circ$ , PEO-A), the titanium oxide coating with contact angle about  $90^\circ$  (PEO-A-V) inhibited the polarization of macrophages towards M1 pro-inflammatory direction under the mono-culture condition. However, under the co-culture condition, the titanium oxide coating with contact angle

收稿日期: 2023-05-19; 收到修改稿日期: 2023-06-16; 网络出版日期: 2023-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(32171344); 上海自然科学基金面上项目(20ZR1465100); 上海市生物医药科技支撑专项(20S31903300)

National Natural Science Foundation of China (32171344); Shanghai Natural Science Foundation (20ZR1465100); Shanghai Science and Technology Pillar Program for Biomedicine (20S31903300)

作者简介: 上官丽(1997-), 女, 硕士研究生. E-mail: 20724695@shu.edu.cn

SHANGGUAN Li (1997-), female, Master candidate. E-mail: 20724695@shu.edu.cn

通信作者: 乔玉琴, 副研究员. E-mail: qiaoyq@mail.sic.ac.cn; 崔苑苑, 副教授, E-mail: cui-yy@shu.edu.cn

QIAO Yuqin, associate professor. E-mail: qiaoyq@mail.sic.ac.cn; CUI Yuanyuan, associate professor. E-mail: cui-yy@shu.edu.cn

about 90° promoted macrophage polarization towards M2 and significantly upregulated gene expressions of osteogenic markers related to mBMSCs, indicating better immunomodulatory effects on osteogenic differentiation of mBMSCs.

**Key words:** surface wettability; titanium oxide coating; annealing; osteoimmunomodulatory effect

钛及其合金具有优异的机械性能、耐腐蚀性和生物相容性,在生物医学领域被广泛用作人工关节、牙种植体和血管支架等<sup>[1-2]</sup>。然而由于其表面缺乏生物活性,一方面在植入体内后无法与骨组织形成牢固的化学键合,另一方面,植入后引发的炎症反应会影响骨重建/整合<sup>[3-4]</sup>。近年来的研究表明,生物材料植入体内后会引发周围组织的局部炎症反应,免疫细胞(如中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞等)和其释放的细胞因子,以及免疫细胞和骨细胞之间的相互作用,也会对骨稳态调节、骨组织愈合和修复起重要作用<sup>[5-6]</sup>。越来越多的证据表明,免疫反应过度会破坏骨形成和骨吸收之间的微妙平衡,进而导致骨重塑过程延迟,而适当的抗炎免疫微环境有利于成骨细胞增殖和分化<sup>[7]</sup>。巨噬细胞作为先天免疫应答的主要效应细胞之一,在调节新骨形成和生物材料介导的免疫反应中发挥关键作用<sup>[8]</sup>。激活的 M1 型巨噬细胞表达促炎细胞因子,如肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和诱导型一氧化氮合酶(iNOS),以启动免疫应答并促进炎症。相反地,激活的 M2 型巨噬细胞表达抗炎细胞因子,如白细胞介素 10(IL-10)、白细胞介素-1、受体拮抗剂(IL-1ra)和精氨酸酶 1(Arg-1),可促进伤口愈合和组织修复<sup>[9-10]</sup>。这些骨再生过程中的免疫机制为新型骨损伤修复材料的设计提供了理论依据。

生物材料界面是材料与机体发生相互作用的主要场所,利用表面改性技术构建功能化表面是赋予钛及其合金生物活性的有效途径之一<sup>[11]</sup>。研究表明,材料的表面特征如表面微纳结构、化学成分和电学性质等对免疫反应和成骨性能影响显著<sup>[12-14]</sup>。Huang 等<sup>[15]</sup>在钛表面构建的微/纳米结构促进骨整合的同时,还可激活巨噬细胞向 M2 抗炎表型极化;He 等<sup>[16]</sup>在钛表面构建了具有纳米片状结构的 Mg(OH)<sub>2</sub> 薄膜,在独特的纳米片状形貌和持续释放镁离子的共同作用下,可促进巨噬细胞极化为组织愈合 M2 表型,并促进成骨。

生物材料表面润湿性能也是调控细胞行为的关键因素之一。生物材料植入体内与血液接触后,首先发生蛋白质吸附,而材料表面的润湿性会影响吸附蛋白质的种类、数量和三维构象,并进一步影响这

些蛋白质介导的细胞黏附及细胞间相互作用<sup>[17-18]</sup>。Xian 等<sup>[19]</sup>在聚醚醚酮(PEEK)表面沉积了一种预接枝聚多巴胺(PDA)的介导层,用以辅助纳米颗粒结构的氧化钛涂层生长。该氧化钛涂层呈现超亲水性,在显著改善成骨细胞的黏附和增殖的同时,还能通过抑制巨噬细胞 M1 表型标志物 TNF- $\alpha$  表达来减少炎症反应。Li 等<sup>[20]</sup>构建了高陶瓷颗粒度、表面作亲水性修饰的 3D 打印柔性 PCL/HA 骨再生支架,该支架可以调节巨噬细胞向 M2 表型极化,体内组织学染色证实该支架显著促进了新骨形成。这些研究设计的材料多呈超亲水性,但这种特性会使材料失去部分由疏水性介导的免疫反应带来的骨修复促进作用。研究发现,细胞的免疫活性随着材料疏水性的增加呈线性增大<sup>[21]</sup>。目前的研究主要聚焦于超亲水和超疏水表面对生物学性能的调控规律,而对处于亲水/疏水临界状态的表面(接触角~90°)调控细胞行为的规律几无涉及。为此,本研究着重探讨处于亲水/疏水临界状态的表面对巨噬细胞和骨髓间充质干细胞及其相互作用的影响规律。

研究表明,材料表面的润湿性能可通过调节材料表面的光催化性能、化学成分和粗糙度来实现<sup>[22-24]</sup>。Lü 等<sup>[24]</sup>发现在紫外线照射下,Ti 植入物表面氧化钛薄膜的亲水性增加,但该方法制备的亲水性表面状态仅能保持 2 w 的稳定性;Wang 等<sup>[25]</sup>同时使用紫外线和臭氧,可将垂直排列的碳纳米管表面由超疏水性转变为超亲水,与紫外线处理方法相比,该组合方法对条状碳纳米管图案造成的损伤最小;Huang 等<sup>[1]</sup>发现通过掺杂铌(Nb)元素和锆(Zr)元素可以显著提高氧化钛纳米管的亲水性能。但上述调节表面亲疏水性能的方法并不适用于调控研究生物学效应,比如,稳定时间较短无法确保实验结果的稳定性,元素掺杂不利于分析亲疏水性单一作用对生物学性能的影响。而 Yue 等<sup>[26]</sup>在真空和空气环境下对 ZnO 纳米线涂层进行交替退火,使其可在高疏水性和超亲水性之间切换,不改变涂层的化学成分,却实现了长期稳定的润湿性能(> 2 w),这为制备具有油水分离等防污性能的材料提供了一种简单的研究方法。

本研究利用不同气氛下的退火热处理工艺调控氧化钛表面的润湿性,并进一步探索润湿性能对巨

噬细胞极化、巨噬细胞和骨髓间充质干细胞相互作用的影响规律。

## 1 实验方法

### 1.1 氧化钛涂层制备和表面润湿性调控

对线切割的 10 mm×10 mm×1 mm 的纯钛片(纯度 >99.85%)进行超声酸洗(酸洗液体积比 HF:HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O = 1:5:4),之后用纯酒精超声清洗 10 min,室温下风干待用。随后采用微弧氧化工艺(Plasma Electrolytic Oxidation, PEO)在钛表面原位生成氧化钛涂层,电解液成分为 0.2 mol/L 乙酸钙(Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 纯度为 98%, VETEC)和 0.02 mol/L 甘油磷酸钠(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>P, β-GP, AR, KESHI),工艺参数为:恒流模式下电流 0.8 A,正负占空比均为 7.5%,频率为 500 Hz。制备的涂层在纯酒精中超声 10 min 以去除表面杂质,命名为 PEO。

PEO 样品置于马弗炉(EC51-8-13, 广益)在空气气氛中进行退火热处理(450 °C, 保温 2 h),随炉冷却,命名为 PEO-A; PEO-A 样品置于管式炉 CVD(OTF-1200X, 烯成)在真空气氛中(275 °C, 保温 2 h)进一步退火,随炉冷却,该样品命名为 PEO-A-V。细胞实验前,各样品均通过高温高压灭菌、烘干备用。

### 1.2 理化性能表征

采用钨灯丝扫描电镜(SEM, S-3400N Type I, Hitachi)观察样品的表面形貌,并用配套的能谱仪(EDS, ixrf-550I, IXRF SYSTEMS, USA)分析涂层元素组成和含量。采用 X 射线衍射仪(XRD, Diffractometer D8, Bruker)分析涂层的晶体结构,扫描参数为:扫描速率 0.02 (°)/s,扫描范围 2θ=5°~80°,射线源为镍过滤的 CuKα。利用电化学工作站(AUTOLAB302N, 512011-0499)通过三电极法测试样品的耐腐蚀性,电解液为生理盐水(质量分数 0.9% NaCl),参比电极为 Ag/AgCl(25 °C 时电位为 0.2224 V)电极。采用光学接触角仪(SL200B, Solon)测量涂层的接触角。

### 1.3 细胞培养

实验用小鼠骨髓间充质干细胞(Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, mBMSCs, ScienCell)、小鼠单核巨噬细胞(Raw264.7, 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。mBMSCs 采用由 Mesenchymal Stem Cell Medium (MSCM, ScienCell)、5%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, ScienCell)、1%的干细胞生长添加剂(Mesen-

chymal Stem Cell Growth Supplement, MSCGS, ScienCell, USA)和 1%青霉素/链霉素(Penicillin/Streptomycin, ScienCell)组成的完全培养基培养。Raw 64.7 和 mBMSCs 在样品表面培养时,均采用由 DMEM、10%的 FBS、1%青霉素/链霉素组成的完全培养基培养,每 2~3 d 传代一次。培养环境为 37 °C、相对湿度 95%、含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱。

共培养步骤如下:将 mBMSCs 以 3×10<sup>4</sup> cell/well 的密度接种在材料表面后置于 37 °C 培养箱中培养,每 3 d 换一次液,培养至第 6 天,将 Raw264.7 以 1×10<sup>5</sup> cell/well 的密度接种在材料表面后置于 37 °C 培养箱中培养 1 d;然后将分别接种 mBMSCs 和 Raw264.7 的样品移至同一个孔内,继续培养 3 d。

### 1.4 细胞增殖

通过 alamarBlue 试剂(Invitrogen)检测细胞在各涂层表面的增殖。将 mBMSCs 和 Raw264.7 分别以 3×10<sup>4</sup> 和 1×10<sup>5</sup> cell/well 的密度接种在材料表面后置于 37 °C 培养箱中培养。待培养特定时间后,吸去原有培养基,加入 500 μL 含 10% alamarBlue 的培养基。在 37 °C 培养箱中孵育 2 h 后,每孔取 100 μL 培养液放入 96 孔黑色酶标板,利用酶标仪(Cytation 5, Biotek)测定还原的 alamarBlue 的荧光强度(FI),其中激发波长为 560 nm,发射波长为 590 nm。

### 1.5 细胞形态

涂层上生长的巨噬细胞形态通过固定、脱水、干燥后使用 SEM 观察,具体实验步骤简述如下:将 Raw264.7 以 1×10<sup>5</sup> cell/well 的密度接种于样品表面后置于 37 °C 培养箱中培养,培养至特定时间点(4 h、1 d 和 4 d),用磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)洗涤样品两次,加入 2.5%戊二醛(C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)固定。然后依次经过不同体积分数的乙醇溶液(30%; 50%; 75%; 90%; 95%; 100%)、六甲基二硅胺烷(HMDS)/乙醇溶液(2:1; 1:1; 1:2)和纯 HMDS 中脱水,并在通风橱中充分干燥。然后在表面喷金,并在钨灯丝扫描电镜下观察。

通过免疫荧光染色后使用荧光显微镜观察样品表面干细胞的骨架形态,具体实验步骤简述如下:将 mBMSCs 以 3×10<sup>4</sup> cell/well 的密度接种在材料表面后置于 37 °C 培养箱中培养。培养特定时间(4、12 和 24 h)后,吸去原有培养基,用 PBS 清洗样品 2 遍,加入 4%多聚甲醛(Paraformaldehyde, PFA)室温固定 10 min。用 PBS 清洗 3 次后,依次使用 0.1% TritonX-100(Sigma-aldrich)对细胞进行通透,1%重量的牛血清蛋白(Bovines Serum Albumin, BSA)封闭,罗丹明-鬼笔环肽染料室温染色 30 min, DAPI 染料

对细胞核室温染色 5 min。随后置于荧光显微镜 (IX71, Olympus) 进行观察并拍照。

### 1.6 免疫和成骨相关基因表达

采用实时荧光定量 PCR 方法 (RT-qPCR) 检测样品表面培养的细胞成骨和炎症相关基因的表达水平, 具体实验步骤简述如下: 将 Raw264.7 和 mBMSCs 分别以  $1 \times 10^5$  和  $3 \times 10^4$  cell/well 的密度接种于样品表面后置于 37 °C 培养箱中培养, 培养至一定时间后, 用 Trizol 试剂裂解并将其收集在 1.5 mL 离心管。按照 Trizol 的试剂使用说明书, 依次用氯仿、异丙醇和 75% 乙醇依次提取纯化 RNA, 通过酶标仪定量计算 RNA 浓度和纯度。采用反转录试剂盒 Transcriptor First-strand cDNA Synthesis Kit (Roche) 将符合纯度要求的 RNA 按照说明书操作进行反转录获得 cDNA。按照 Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche) 操作说明书将得到的 cDNA 加入检测体系, 使用 Roche Light Cycler 480 II 全自动荧光定量 PCR 系统进行 Real-time PCR 反应。靶基因的表达水平用参考基因 GAPDH 的水平作标准化。该实验所用的引物序列见表 1。

### 1.7 统计分析

使用统计分析软件 GraphPad Prism 进行数据统

表 1 RT-qPCR 所用引物序列  
Table 1 Primers for real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Gene	Primer sequence (F: forward; R: Reverse; 5'-3')
Arg1	F: GCC AGG GAC TGA CTA CCT TAA R: AGT TCT GTC TGC TTT GCT GTG
IL4	F: TCA TCC TGC TCT TCT TTC TCG R: CTT CTC CTG TGA CCT CGT TCA
CD206	F: AGG GAA GAG AAG AAG ATC CAG R: TGG GAG AAG ATG AAG TCA AAC
TNF- $\alpha$	F: TAG CCA GGA GGG AGA ACA GA R: CCA GTG AGT GAA AGG GAC AGA
IL6	F: ACC AAG ACC ATC CAA TTC ATC R: CTG ACC ACA GTG AGG AAT GTC
CD86	F: TCT CCA ACA GCC TCT CTC TTT R: ATC TTC ATT GAC TCC GTT TCC
OCN	F: ACC GCC TAC AAA CGC ATC TA R: AGA GGA CAG GGA GGA TCA AGT
OPN	F: CTT GAG CAT TCC AAA GAG AGC R: CTT GTG GCT GTG AAA CTT GTG
BMP2	F: TAA GTT CTG TCC CCA GTG ACG R: TTC GGT GCT GGA AAC TAC TGT
TGF- $\beta$ 1	F: AAC CAA GGA GAC GGA ATA CA R: CGT GGA GTT TGT TAT CTT TGC
Runx2	F: GCA GCA CGC TAT TAA ATC CAA R: GCC AAA CAG ACT CAT CCA TTC

计分析, 分析结果表示为平均值  $\pm$  偏差。通过一维方差分析对比实验分析不同组实验变量间有无显著差异。每组变量至少包含三个有效值, 显著性差异  $p < 0.05$  表示数据存在统计学意义上的显著性差异,  $0.01 < p < 0.05$  时标记为“\*”,  $0.001 < p < 0.01$  时标记为“\*\*”,  $p < 0.0001$  时标记为“\*\*\*\*”。

## 2 结果与讨论

### 2.1 涂层的理化性能表征

图 1(a) 为不同热处理的氧化钛涂层的表面形貌, 各涂层均显示出多孔结构, 且孔径均匀, 约为 1~3  $\mu\text{m}$ , 表明两种退火热处理工艺处理的涂层 (PEO-A 和 PEO-A-V) 的表面形貌无显著差异。图 1(b) 显示涂层中 Ti、O、Ca 和 P 的含量均无明显变化。从图 1(c) 的 XRD 结果可以看出, 不同热处理后的氧化钛涂层的相组成均以锐钛矿相二氧化钛为主, 伴有少量金红石相<sup>[27]</sup>。采用电化学工作站表征涂层的耐腐蚀性能, 图 1(d) 为涂层的动电位极化曲线, 与对照组纯 Ti 相比, 涂层的腐蚀电位均在 -0.2~-0.1 V 之间, 不同退火热处理后的氧化钛涂层均具有良好的耐腐蚀性。涂层的水接触角结果如图 1(e) 所示。空气热处理的涂层 PEO-A 的接触角约为 8°, 真空热处理的涂层 PEO-A-V 的接触角显著增大到 90°, 这是由于真空退火通过氧气解析使涂层具有更多的氧空位, 而空气退火 (富氧气氛) 会钝化涂层的氧空位。有文献<sup>[26]</sup>报道, 较少的氧空位会导致水分子解离, 这些水分子会被涂层表面的氧原子吸引从而产生羟基官能团进而吸附更多水分子, 相反地, 真空退火热处理通过去除附着在涂层上的含氧官能团使其变得疏水<sup>[28]</sup>, 由此推测在空气退火和真空退火过程中, 吸附和解吸氧气可以实现涂层的亲疏水性转换。

### 2.2 氧化钛涂层润湿性对巨噬细胞的影响

采用 alamarBlue 方法检测样品表面亲疏水性能对巨噬细胞增殖的影响。如图 2 所示, 培养 1 d 后, 钛和氧化钛涂层对巨噬细胞的黏附均无显著影响, 培养到第 4 天时, 微弧氧化制备的氧化钛涂层相对于钛, 促进了巨噬细胞的增殖, 但不同亲疏水性的氧化钛涂层对巨噬细胞增殖未表现出显著差异 ( $p > 0.05$ )。

通过 SEM 进一步观察培养 4 h、1 d 和 4 d 后接种在不同样品表面的巨噬细胞的形态 (图 3)。培养 4 h 时, 涂层上黏附的细胞数量较少, 细胞在所有表面均呈圆球形。培养 1 d 时, 细胞数量逐渐增加, 细

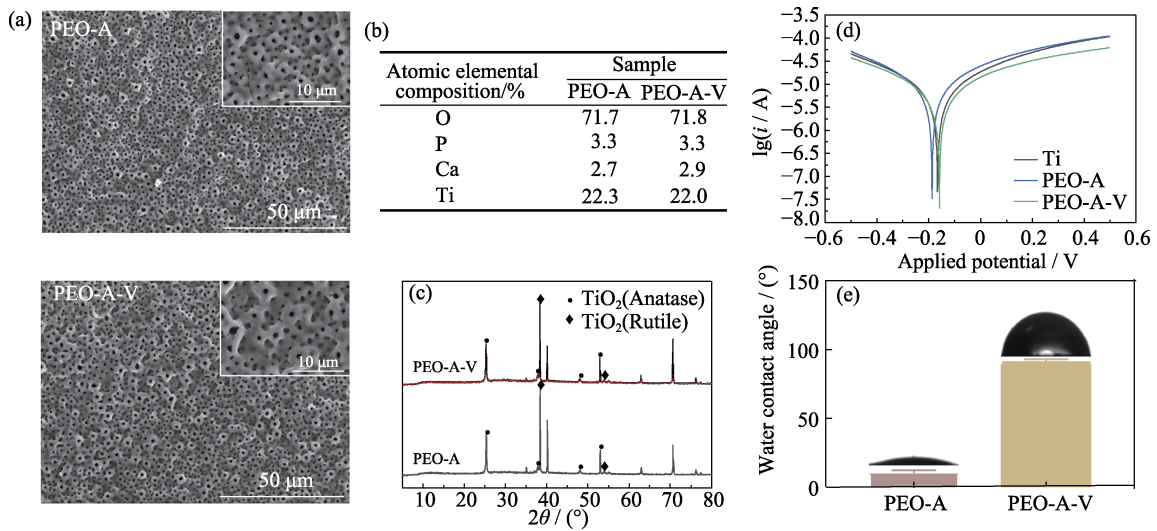


图 1 样品的(a)表面形貌、(b)元素组成、(c)物相组成、(d)电化学极化曲线和(e)接触角

Fig. 1 (a) Surface morphologies, (b) element compositions, (c) phase compositions, (d) electrochemical polarization curves, and (e) water contact angles of the samples  
 Coloful figures are available on website

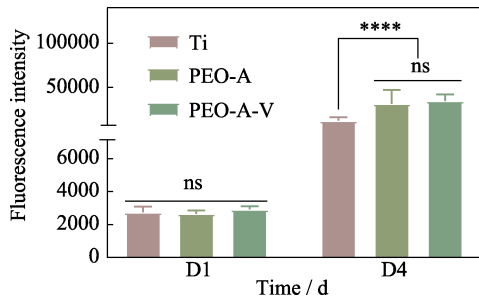


图 2 在不同样品表面培养 1 和 4 d 的 Raw264.7 的增殖结果  
 Fig. 2 Proliferation of Raw264.7 incubated on different samples for 1 and 4 d

Data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\*\*\*:  $p < 0.0001$   
 Coloful figures are available on website

胞逐渐铺展, 有丝状伪足开始沿各个方向伸展。培养 4 d 时, 样品表面的细胞呈聚团生长的趋势, 与 PEO-A 相比, 处于亲水/疏水临界状态的 PEO-A-V 样品表面生长的细胞表面没有褶皱, 铺展得更加充分。结果表明, 涂层的润湿性对黏附和铺展巨噬细胞无显著影响。

将 Raw264.7 细胞在样品表面培养 4 d 后, 通过 RT-qPCR 测定炎症相关基因的表达水平, 结果如图 4 所示。与 PEO-A 相比, 处于亲水/疏水临界状态的 PEO-A-V 上抗炎症基因 Arg-1 的表达显著上调, 同时促炎基因 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 CD86 的表达显著下调。

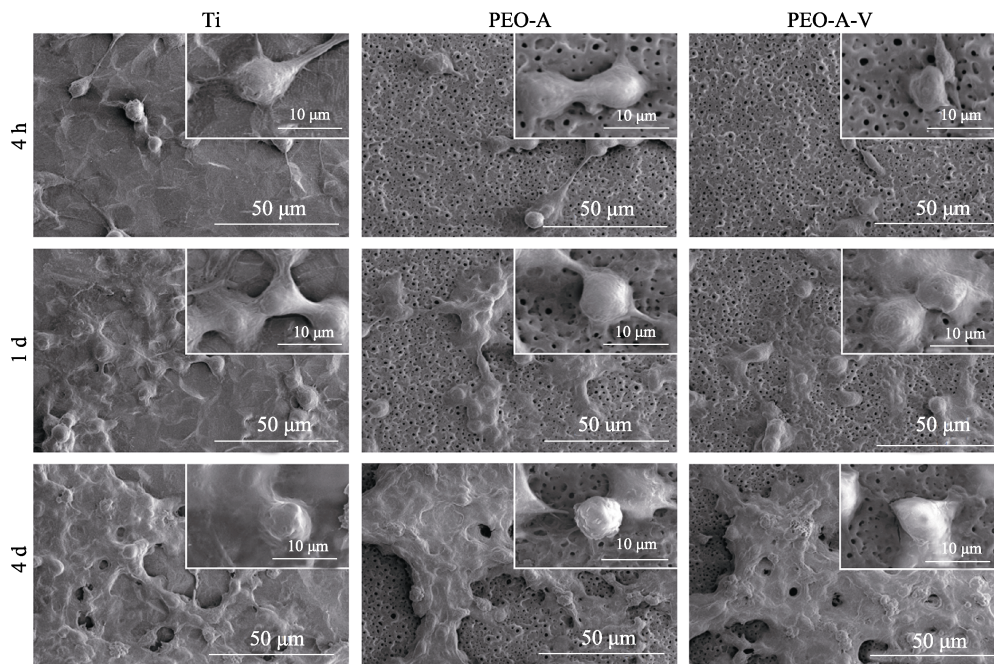


图 3 Raw264.7 在不同样品表面培养 4 h、1 d 和 4 d 的细胞形态

Fig. 3 Morphologies of Raw264.7 cultured on different samples for 4 h, 1 d and 4 d

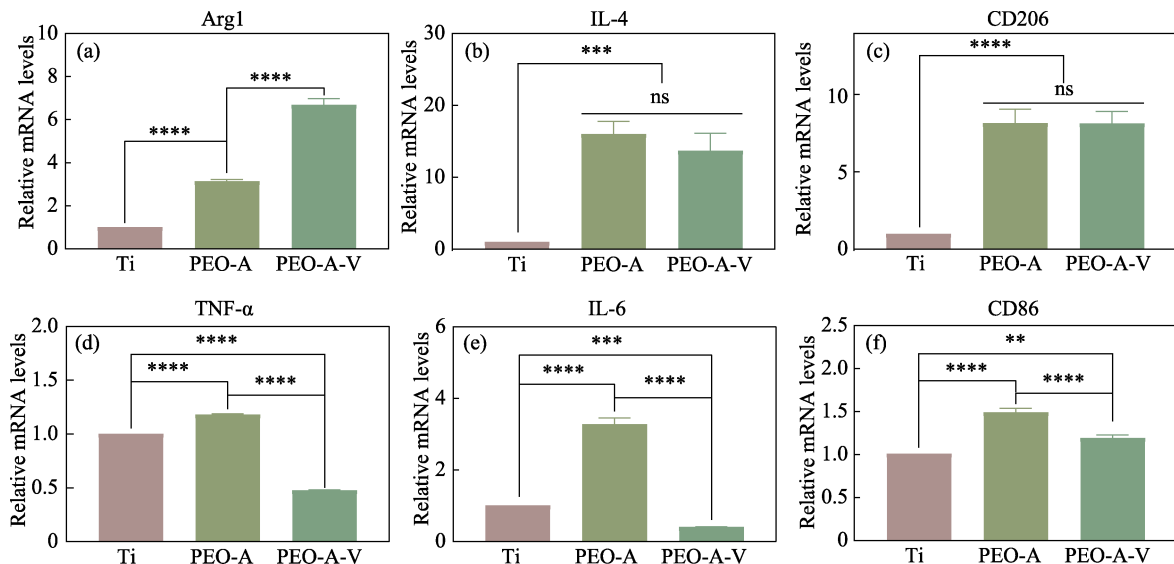


图 4 在不同样品表面培养 4 d 的 Raw264.7 的炎症相关基因的表达水平

Fig. 4 Relative mRNA levels of inflammatory genes of Raw264.7 incubated on different samples for 4 d (a) Arg-1; (b) IL-4; (c) CD206; (d) TNF- $\alpha$ ; (e) IL-6; (f) CD86

Data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.05 < p < 0.01$

Colorful figures are available on website

这些结果表明, 氧化钛涂层表面接触角由亲水向亲水/疏水临界状态转变时, 可抑制巨噬细胞向 M1 促炎方向极化。据报道促炎基因 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达的下调和抗炎基因 Arg-1 表达的上调是通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路实现的<sup>[29]</sup>。

### 2.3 氧化钛涂层润湿性能对干细胞增殖分化的影响

采用 alamarBlue 表征样品的生物相容性。图 5 显示了不同亲疏水性氧化钛涂层对 mBMSCs 细胞增殖的影响。培养 1 d 时, 处于亲水/疏水临界状态的 PEO-A-V 样品表面的细胞数量略高, 继续培养至第 4 天以及第 7 天时, 不同亲疏水性的氧化钛样品表面

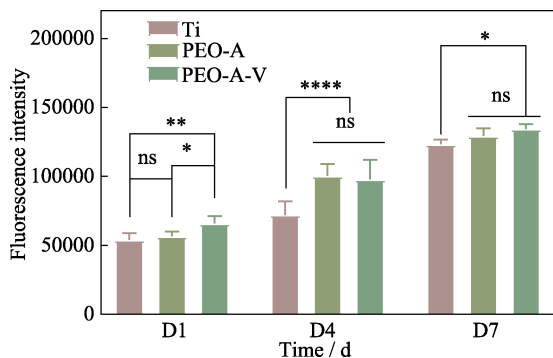


图 5 在不同样品表面培养不同时间的 mBMSCs 的细胞增殖结果

Fig. 5 Cell proliferation of mBMSCs incubated on different samples for different time

Data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; \*\*:  $0.05 < p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$

Colorful figures are available on website

的细胞数量没有显著差异( $p > 0.05$ )。然而与对照组 Ti 相比, PEO-A 和 PEO-A-V 组的细胞数量均显著增加。

mBMSCs 在样品表面分别培养 4、12 和 24 h 后的骨架染色结果如图 6 所示。培养 4 h 时, 样品表面的细胞大多呈现圆形或未充分铺展的不规则形状。随着培养时间延长(12 和 24 h), 各样品表面的细胞数量显著增加, 细胞体积增大, 伪足开始沿不同方向充分延长。与 PEO-A 相比, 处于亲水/疏水临界状态的 PEO-A-V 上生长的干细胞呈星状, 肌动蛋白表达更充分, 铺展面积更大。

将 mBMSCs 细胞在样品表面培养 10 d 后, 通过 RT-qPCR 测定成骨基因的表达水平(图 7)。PEO-A 和 PEO-A-V 上培养的干细胞的成骨相关基因的表达没有明显差异。结果表明, 材料的亲疏水性对成骨性能没有显著影响( $p > 0.05$ )。

### 2.4 润湿性在共培养条件下对免疫成骨性能的影响

Raw264.7 与 mBMSCs 共培养 3 d 后的炎症基因表达水平结果如图 8 所示。与 PEO-A 相比, 处于亲水/疏水临界状态的 PEO-A-V 上抗炎基因 Arg-1 的表达上调, IL-4、CD206 的表达显著上调( $p < 0.0001$ ), 同时促炎基因 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 CD86 的表达显著下调。与单独培养相比, 抗炎基因 IL-4 的表达由没有显著差异转向呈现显著上调的趋势。因此, 处于亲水/疏水临界状态的氧化钛涂层上生长的巨噬细胞更利于向 M2 抗炎型方向极化。研究表明, IL-4 通过抑制 MAPK 信号通路诱导巨噬细胞向 M2 表型极化,

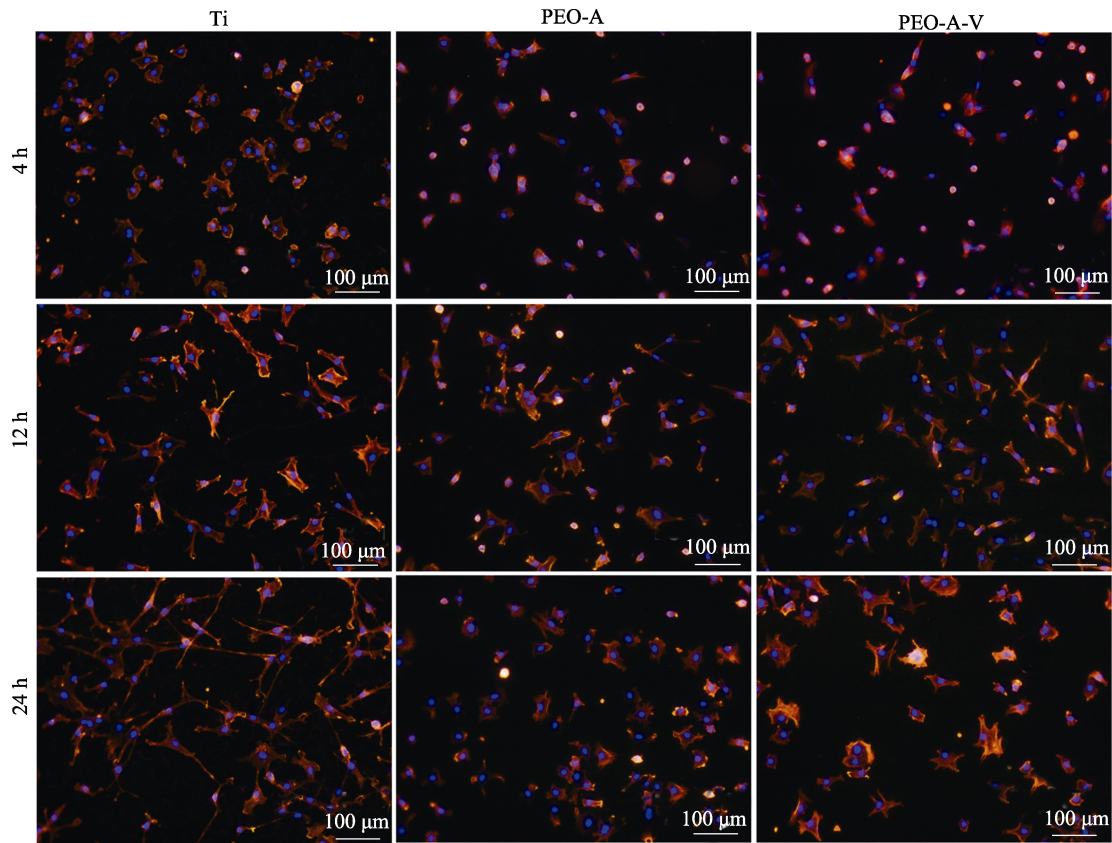


图 6 在不同样品表面培养 4、12 和 24 h 的 mBMSCs 细胞骨架染色  
 Fig. 6 Cytoskeleton staining of mBMSCs incubated on different samples for 4, 12 and 24 h

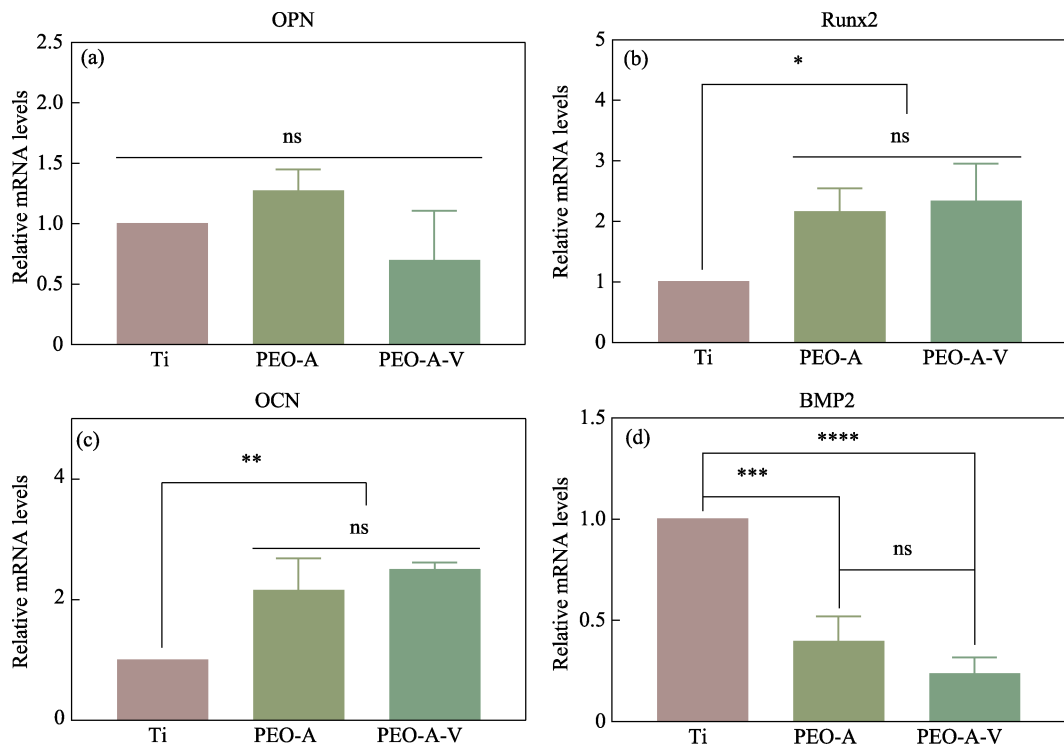


图 7 在不同样品表面培养 10 d 的 mBMSCs 的成骨相关基因(a) OPN, (b) Runx2, (c) OCN 和(d) BMP2 的表达水平  
 Fig. 7 Relative mRNA levels of osteogenic genes of mBMSCs cultured on different samples for 10 d  
 (a) OPN; (b) Runx2; (c) OCN; (d) BMP2

Data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.05 < p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$

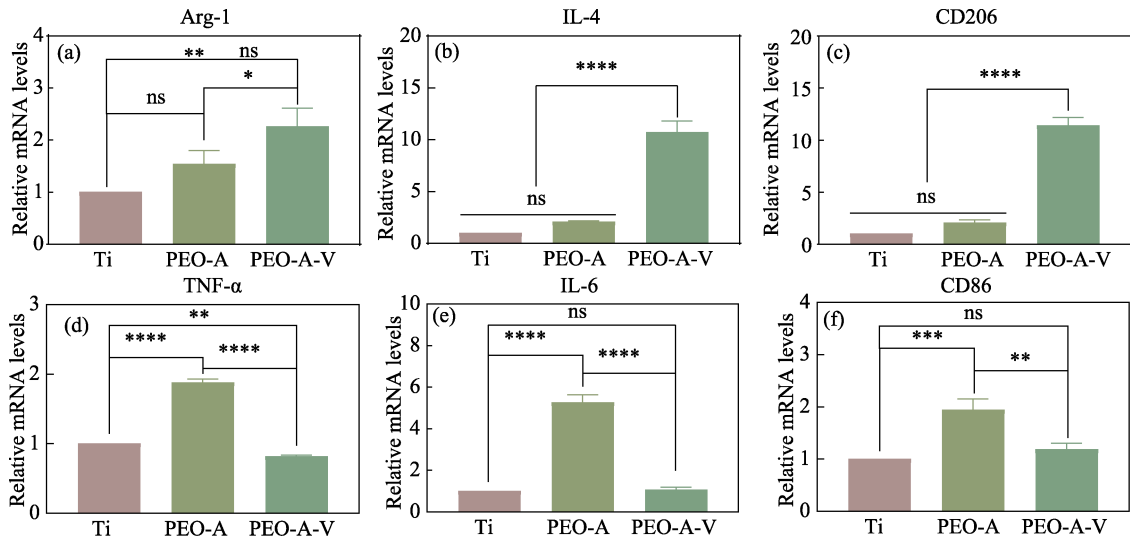


图 8 在不同样品表面上与 mBMSCs 共培养 3 d 的 Raw264.7 炎症相关基因的表达水平

Fig. 8 Relative mRNA levels of inflammatory genes of Raw264.7 co-cultured with mBMSCs on different samples for 3 d (a) Arg-1; (b) IL-4; (c) CD206; (d) TNF- $\alpha$ ; (e) IL-6; (f) CD86

Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.05 < p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$

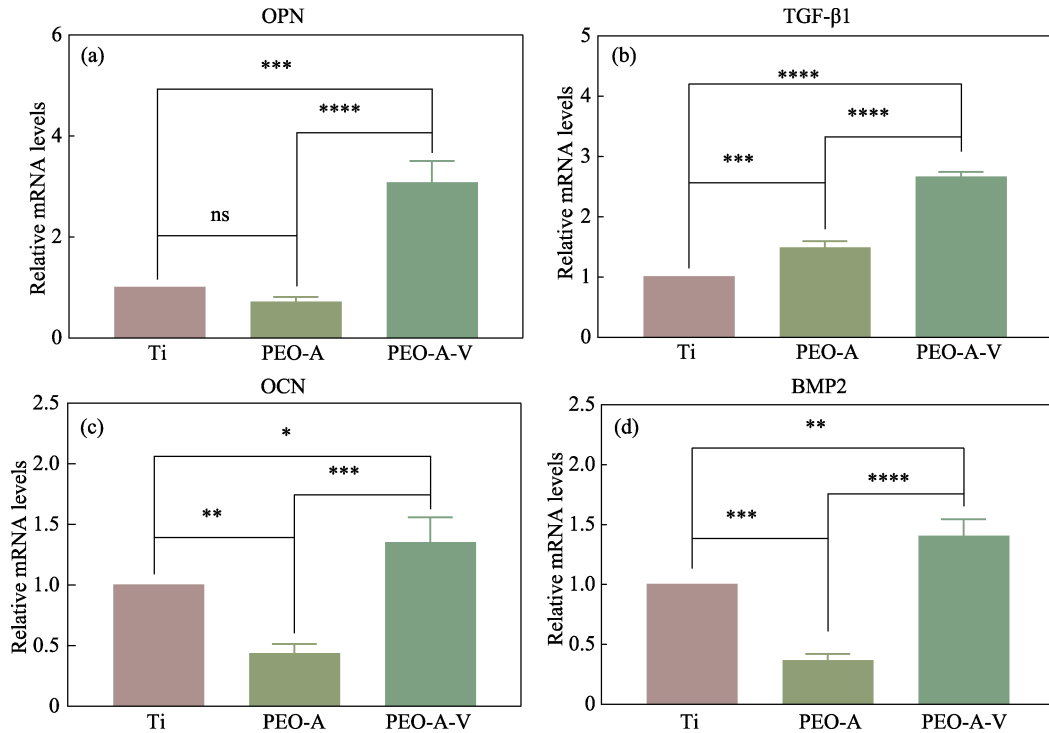


图 9 在不同样品上和 Raw264.7 共培养 3 d 的 mBMSCs 的成骨相关基因表达水平

Fig. 9 Relative mRNA levels of osteogenic genes of mBMSCs co-cultured with Raw264.7 on different samples for 3 d (a) OPN; (b) TGF- $\beta$ 1; (c) OCN; (d) BMP2

Data are presented as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.05 < p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$

并上调 CD206 的表达, 同时降低 CD86/CD206 的比例<sup>[30]</sup>。

mBMSCs 与 Raw264.7 共培养 3 d 后的成骨基因表达水平如图 9 所示。对于成骨分化的中期标志物 OPN 以及晚期标志物 OCN<sup>[31]</sup>, 在 PEO-A-V 涂层的表达与 PEO-A 相比出现显著上调, 骨形态蛋白-2 (BMP2) 和转化生长因子(TGF- $\beta$ 1) 的表达亦显著上

调( $p < 0.0001$ )。与单独培养相比, 处于亲水/疏水临界状态的涂层 PEO-A-V 在共培养系统诱导的炎症微环境中表现出更好的促成骨性能。

### 3 结论

本工作采用微弧氧化技术在钛表面制备氧化钛



涂层后, 通过在不同气氛下对涂层进行退火热处理以调控其表面润湿性, 成功制备了具有亲水性(接触角 $\sim 10^\circ$ , PEO-A)和处于亲水/疏水临界状态(接触角 $\sim 90^\circ$ , PEO-A-V)的氧化钛涂层。不同气氛的退火热处理对涂层表面形貌、化学成分、相组成和耐腐蚀性均无显著影响。退火后涂层仍具有良好的表面形貌以及生物相容性, 生物学实验结果表明处于亲水/疏水临界状态的氧化钛涂层 PEO-A-V 在单独培养条件下可显著抑制巨噬细胞的 M1 型极化, 而在共培养条件下可显著上调巨噬细胞抗炎基因的表达、下调促炎基因的表达, 促进巨噬细胞向 M2 型极化, 并显著促进成骨标记物的基因表达, 表现出更好的免疫成骨性能。这一研究结果为开发具有免疫成骨性能的生物材料表面提供了新的研究思路。

### 参考文献:

- [1] HUANG L, NING C, DING D, *et al.* Wettability and *in vitro* bioactivity of doped TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Journal of Inorganic Materials*, 2010, **25**(7): 775.
- [2] HOQUE M E, SHOWVA N-N, AHMED M, *et al.* Titanium and titanium alloys in dentistry: current trends, recent developments, and future prospects. *Heliyon*, 2022, **8**(11): e11300.
- [3] NIE X, ZHANG X, LEI B, *et al.* Regulation of magnesium matrix composites materials on bone immune microenvironment and osteogenic mechanism. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, **10**: 842706.
- [4] DU P, LI K, ZHU B, *et al.* Development of non-toxic low-cost bioactive porous Ti-Fe-Si bulk metallic glass with bone-like mechanical properties for orthopedic implants. *Journal of Materials Research and Technology*, 2022, **17**: 1319.
- [5] MI B, CHEN L, XIONG Y, *et al.* Osteoblast/osteoclast and immune cocktail therapy of an exosome/drug delivery multifunctional hydrogel accelerates fracture repair. *ACS Nano*, 2022, **16**(1): 771.
- [6] GEURTZEN K, LÓPEZ-DELGADO A C, DUSEJA A, *et al.* Laser-mediated osteoblast ablation triggers a pro-osteogenic inflammatory response regulated by reactive oxygen species and glucocorticoid signaling in zebrafish. *Development*, 2022, **149**(8): dev199803.
- [7] LIANG H, JIN C, MA L, *et al.* Accelerated bone regeneration by gold-nanoparticle-loaded mesoporous silica through stimulating immunomodulation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, **11**(44): 41758.
- [8] PAJARINEN J, LIN T, GIBON E, *et al.* Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials*, 2019, **196**: 80.
- [9] SHEN H, SHI J, ZHI Y, *et al.* Improved BMP2-CPC-stimulated osteogenesis *in vitro* and *in vivo* via modulation of macrophage polarization. *Materials Science and Engineering: C*, 2021, **118**: 111471.
- [10] HOTCHKISS K M, SOWERS K T, OLIVARES-NAVARRETE R. Novel *in vitro* comparative model of osteogenic and inflammatory cell response to dental implants. *Dental Materials*, 2019, **35**(1): 176.
- [11] JIANG P, ZHANG Y, HU R, *et al.* Advanced surface engineering of titanium materials for biomedical applications: from static modification to dynamic responsive regulation. *Bioactive Materials*, 2023, **27**: 15.
- [12] ZHENG X, CHEN L, TAN J, *et al.* Effect of micro/nano-sheet array structures on the osteo-immunomodulation of macrophages. *Regenerative Biomaterials*, 2022, **9**: rbac075.
- [13] LIANG W, GAO M, LOU J, *et al.* Integrating silicon/zinc dual elements with PLGA microspheres in calcium phosphate cement scaffolds synergistically enhances bone regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, **8**(15): 3038.
- [14] MAO L, BAI L, WANG X, *et al.* Enhanced cell osteogenesis and osteoimmunology regulated by piezoelectric biomaterials with controllable surface potential and charges. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, **14**(39): 44111.
- [15] HUANG Q, OUYANG Z, TAN Y, *et al.* Activating macrophages for enhanced osteogenic and bactericidal performance by Cu ion release from micro/nano-topographical coating on a titanium substrate. *Acta Biomaterialia*, 2019, **100**: 415.
- [16] HE Y, YAO M, ZHOU J, *et al.* Mg(OH)<sub>2</sub> nanosheets on Ti with immunomodulatory function for orthopedic applications. *Regenerative Biomaterials*, 2022, **9**: rbac027.
- [17] LIU J, SHEN X, TANG S, *et al.* Improvement of rBMSCs responses to poly(propylene carbonate) based biomaterial through incorporation of nanolaponite and surface treatment using sodium hydroxide. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020, **6**(1): 329.
- [18] FERREIRA S A, GAMA F M, VILANOVA M. Polymeric nanogels as vaccine delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2013, **9**(2): 159.
- [19] XIAN P, CHEN Y, GAO S, *et al.* Polydopamine (PDA) mediated nanogranular-structured titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) coating on polyetheretherketone (PEEK) for oral and maxillofacial implants application. *Surface and Coatings Technology*, 2020, **401**: 126282.
- [20] LI W, XU F, DAI F, *et al.* Hydrophilic surface-modified 3D printed flexible scaffolds with high ceramic particle concentrations for immunopolarization-regulation and bone regeneration. *Biomaterials Science*, 2023, **11**: 3976.
- [21] MOYANO D F, GOLDSMITH M, SOLFIELL D J, *et al.* Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**(9): 3965.
- [22] BHUSHAN B, JUNG Y C, KOCH K. Micro-, nano- and hierarchical structures for superhydrophobicity, self-cleaning and low adhesion. *Philosophical Transactions Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 2009, **367**(1894): 1631.
- [23] ZHANG C, YI Y, YANG H, *et al.* Wide spectrum solar energy absorption based on germanium plated ZnO nanorod arrays: energy band regulation, finite element simulation, super hydrophilicity, photothermal conversion. *Applied Materials Today*, 2022, **28**: 101531.
- [24] LV L, XIE Y, LI K, *et al.* Unveiling the mechanism of surface hydrophilicity-modulated macrophage polarization. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, **7**(19): 1800675.
- [25] WANG H Z, HUANG Z P, CAI Q J, *et al.* Reversible transformation of hydrophobicity and hydrophilicity of aligned carbon nanotube arrays and buckypapers by dry processes. *Carbon*, 2010, **48**(3): 868.
- [26] YUE X, ZHANG T, YANG D, *et al.* *In situ* fabrication dynamic carbon fabrics membrane with tunable wettability for selective oil-water separation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2018, **61**: 188.
- [27] 翦奉林, 冯军, 李必文, 等. TA2 纯钛微弧氧化制备 TiO<sub>2</sub> 涂层的性能研究. *材料保护*, 2023, **56**(1): 64.
- [28] AU-ARIA A I, AU-GHARIB M. Dry oxidation and vacuum annealing treatments for tuning the wetting properties of carbon nanotube arrays. *JoVE*, 2013, **(74)**: e50378.
- [29] TIAN T, WANG Z, CHEN L, *et al.* Photobiomodulation activates undifferentiated macrophages and promotes M1/M2 macrophage polarization via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Lasers in Medical Science*, 2023, **38**(1): 86.
- [30] ZHAO X N, LI Y N, WANG Y T. Interleukin-4 regulates macrophage polarization via the MAPK signaling pathway to protect against atherosclerosis. *Genetics and Molecular Research*, 2016, **15**(1): 15017348.
- [31] LI K, YAN T, XUE Y, *et al.* Intrinsically ferromagnetic Fe-doped TiO<sub>2</sub> coatings on titanium for accelerating osteoblast response *in vitro*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, **6**(36): 5756.