

文章编号: 1000-324X(2008)02-0341-05

碳 / 碳复合材料表面粗糙度对成骨细胞生长行为的影响

张磊磊, 李贺军, 李克智, 李新涛, 翟言强, 张雨雷

(西北工业大学 材料学院, 西安 710072)

摘 要: 采用化学气相沉积工艺制备了碳 / 碳 (C/C) 复合材料, 用表面轮廓仪检测了表面粗糙度, 用 MG-63 成骨细胞进行了细胞试验, 研究了 C/C 复合材料表面粗糙度对成骨细胞形貌、粘附和增殖的影响规律. 结果表明: C/C 复合材料表面粗糙度越高则成骨细胞在其表面的粘附率越高, 增殖率越低; C/C 复合材料表面粗糙度对成骨细胞的生长方向和形貌具有诱导作用, 粗糙度越高则方向诱导作用越明显, 且细胞附着形貌呈梭形或长条状, 立体感强, 反之成骨细胞则呈现片状, 铺展状态好.

关 键 词: 碳 / 碳复合材料; 粗糙度; 成骨细胞

中图分类号: R318 **文献标识码:** A

Effect of Surface Roughness of Carbon/Carbon Composites on Osteoblasts Growth Behaviour

ZHANG Lei-Lei, LI He-Jun, LI Ke-Zhi, LI Xin-Tao, ZHAI Yan-Qiang, ZHANG Yu-Lei

(School of Materials Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: The aim of this study is to investigate the role of surface roughness of carbon/carbon (C/C) composites on osteoblasts morphology, adhesion and proliferation. C/C composites were prepared by chemical vapor infiltration and three different values of surface roughness were created by treatment with two kinds of grinding paper and mechanical polishing. The surface roughness of C/C composites was measured by Talysurf profilometer, and cell culture was performed with MG-63 osteoblasts. The adhesion rate, morphology and proliferation rate were assessed. The results show that the adhesion rate increase and the proliferation rate decrease with the increase of roughness. The orientation of the osteoblasts is affected by the roughness, the higher the roughness, the greater the effect. As surface roughness increasing, the morphology of the osteoblasts changes from shuttle and strip shape to slice shape.

Key words: carbon/carbon composites; roughness; osteoblasts

1 引言

碳 / 碳 (C/C) 复合材料继承了碳材料固有的生物相容性, 同时兼具纤维增强复合材料的高韧性和高强度的特点, 且疲劳性能好, 弹性模量与骨骼相当, 是一种极具潜力的骨修复和骨替代生物惰性材料^[1-3].

骨修复和骨替代的关键是良好的骨整合和长期的稳定性. 由于骨植入材料和组织的交互作用主要发生在材料表面, 所以材料的表面物理化学状态对骨整合具有重要的意义, 特别是材料表面粗糙度可以直接影响细胞的附着、增殖和分化, 进而影响着植入体周围新生骨的数量和质量^[4,5]. 已有研究表明, 生物医用 Ni-Ti 合金、钛和羟基磷灰石的

收稿日期: 2007-04-25, 收到修改稿日期: 2007-06-07

基金项目: 国家自然科学基金 (50572091)

作者简介: 张磊磊 (1982-), 男, 博士研究生. E-mail: zhangleilei2004@mail.nwpu.edu.cn

通讯联系人: 李贺军, 教授. E-mail: lihejun@nwpu.edu.cn

表面粗糙度都可以显著地影响细胞的生长行为. 羟基磷灰石和 Ni-Ti 合金表面粗糙度越高, 细胞在其表面增殖率越高, 金属钛表面粗糙度越低, 细胞在其表面增殖率越高^[6-8]. 材料的化学成分不同导致细胞对材料表面粗糙度的响应行为不尽相同. C/C 复合材料虽然已经公认具有优异的生物相容性, 但其表面状态对生物学性能的影响规律研究较少, 特别是表面粗糙度对成骨细胞生长行为的影响还未见深入报道. 本工作用体外细胞培养的方法研究了成骨细胞在具有不同表面粗糙度的 C/C 复合材料表面的生长状况, 以期得到成骨细胞粘附、增殖和生长形貌受表面粗糙度的影响规律, 为后续的体内实验和临床应用提供理论依据.

2 实验

2.1 实验材料

实验用 C/C 复合材料采用化学气相沉积工艺制备, 实验中以碳毡为预制体, 以天然气为有机前躯体, 氮气为保护载气, 在 900~1200℃ 经多次沉积制备出密度为 1.70g/cm³ 的 C/C 复合材料. 经机械加工制得尺寸为 10mm×10mm×2mm 试样, 分别用 240#、800# 砂纸手工打磨和用金刚石磨粒 (W0.5) 机械抛光, 然后经丙酮、无水乙醇、去离子水超声波清洗, 制备了具有不同表面粗糙度的三组材料, 分别记做 1#、2# 和 3#.

2.2 材料表面检测

采用表面轮廓仪 (Taylor Hobson, PGI1240) 检测试样表面粗糙度, 每组随机选取 3 个试样, 各选取 2mm 的取样长度, 记录表面轮廓曲线, 检测主要粗糙度参数值 (R_a 、 R_z 、 R_t). R_a 表示对材料轮廓所有点的轮廓偏距求平均值, R_z 表示轮廓微观不平度十点高度, R_t 表示材料表面偏离基准线的峰值和谷值之差.

用扫描电镜 (JSM-6460) 观察了具有不同表面粗糙度的 C/C 复合材料的表面形貌.

2.3 细胞培养

将三组试样经高压灭菌后置于 24 孔板中, 取医用载玻片为对照试样, 加入培养液 (MEM+10% 胎牛血清) 浸润过夜, 将成骨细胞 MG-63 以 1×10^5 /mL 的密度接种于材料表面, 在 5% 的 CO₂、饱和湿度、37℃ 环境中培养, 分别培养 0.5h、2h 后取出试样, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗、4% 的多聚甲醛固定, 用 5μg/mL 的碘化丙啶 (PI) 染色 15min、抗荧光淬灭液封片. 采用荧光显微镜 (Nikon80i) 观察

细胞核计数, 每组试样取三个, 每个试样重复计数 5 次, 求平均值并计算细胞粘附率, 粘附率 (%)=(实验组表面细胞数 / 对照组表面细胞数)×100%. 同法以 1×10^4 /mL 的密度接种, 培养 1、2、3、4、8d 后统计试样表面细胞数并计算细胞增殖率, 增殖率 (%)=(实验组表面细胞数 / 对照组表面细胞数)×100%.

2.4 细胞形貌观察

细胞培养方法同上, 分别在细胞培养 4h、3d 后, 弃去培养液, 用 PBS 冲洗、3% 的戊二醛固定, 用乙腈 (20%、50%、70%、90%、100%) 梯度脱水, 真空干燥、喷金制备标本, 用扫描电镜 (S-3400) 观察细胞形貌^[9].

2.5 统计学分析

用 Graph pad-Prism 统计学软件对生物学实验结果进行统计学单因素多变量方差分析, 取可信度 $P < 0.05$.

3 结果和讨论

3.1 表面检测结果

C/C 复合材料表面轮廓曲线 (图 1) 反映了三组试样的表面状况. 三组试样表面轮廓起伏都在基准线附近波动, 说明试样表面粗糙程度分布均匀; 试样 1# 偏离基准线波动幅度最大, 在 8μm 左右, 材料表面粗糙度最高, 试样 3# 偏离基准线在 1.0μm 左右, 材料表面粗糙度最低, 试样 2# 粗糙度介于两者之间. 三组试样的粗糙度参数值见图 1.

图 2 是 C/C 复合材料表面的扫描电镜照片. 由图可以看出, 三组材料表面形貌有明显差异, 试样 1# 和 2# 表面存在打磨形成的平行定向沟槽, 并且试样 1# 表面沟槽最深, 表面高低起伏最大, 试样 3# 表面光滑平整.

3.2 成骨细胞的粘附和增殖

成骨细胞的粘附和增殖是细胞与生物材料相互作用的系列生物学行为之一, 直接影响着细胞的成熟、分化以及组织形成和免疫反应, 是评价材料生物学性能的重要参数^[10].

图 3 为成骨细胞在 C/C 复合材料表面和对照试样表面的粘附率. 由图可知, C/C 复合材料的粘附率始终高于对照组, 说明其具有优异的生物相容性. 并且 C/C 复合材料表面粗糙度越高, 细胞粘附率越高, 粗糙度最高的试样 1# 细胞粘附率明显高于粗糙度最低的试样 3#, 并有显著的统计学差异 ($P < 0.01$), 说明 C/C 复合材料表面粗糙度高有利

于细胞的附着, 这与文献中报道的在钛合金及羟基磷灰石表面研究成骨细胞的粘附结果相吻合^[8,11]. 原因是细胞的附着需要周围环境提供相应的附着位置, 粗糙度高的表面为细胞的生长提供更多的附着点, 另外种植体的表面形貌具有特殊的细胞效应性, 能改变细胞的功能, 粗糙的种植体表面有利于成骨细胞的附着^[12,13].

图 4 为成骨细胞在 C/C 复合材料 and 对照试样表面的增殖率. 由图可以看出, 在细胞增殖的初期, 各组试样增殖率没有明显差别, 细胞培养 3d 后, C/C 复合材料表面细胞增殖率明显高于对照

组, 在细胞培养 4d 后, 粗糙度最低的试样 3# 表面细胞增殖率高于其他各组并都有显著统计学差异 ($P < 0.05$), 并且随着细胞培养时间的增长, 增殖率差异更明显, 说明 C/C 复合材料表面粗糙度低有利于细胞的增殖. 这与文献中报道的在 Ti6Al4V 和 CaO-P₂O₅-SiO₂ 体系生物活性玻璃表面培养细胞得到的结果相吻合^[4,14]. 原因是细胞在粗糙度低的材料表面粘附期形态平展、细胞伪足数量较少, 从而促进了细胞后期的增殖; 另外在细胞和生物材料的交互作用中, 细胞粘附越少则细胞长期生长情况

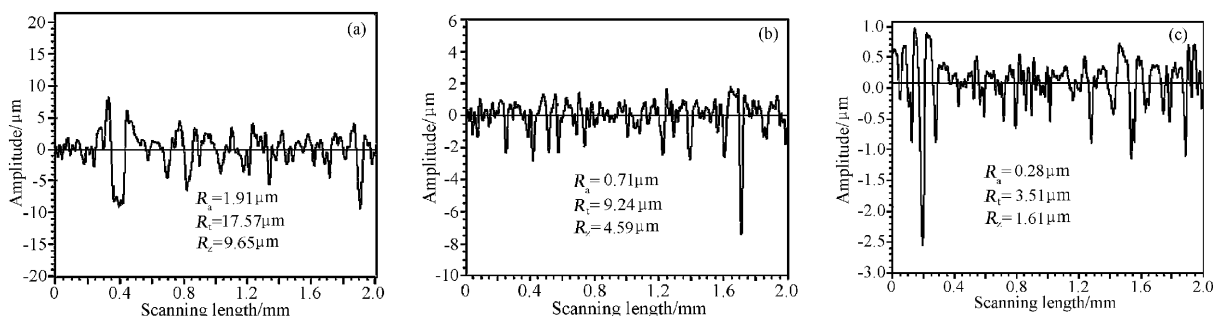


图 1 不同表面粗糙度的 C/C 复合材料表面轮廓曲线

Fig. 1 Surface profiles curves of C/C composites with different roughnesses

(a) Sample 1#; (b) Samples 2#; (c) Sample 3#

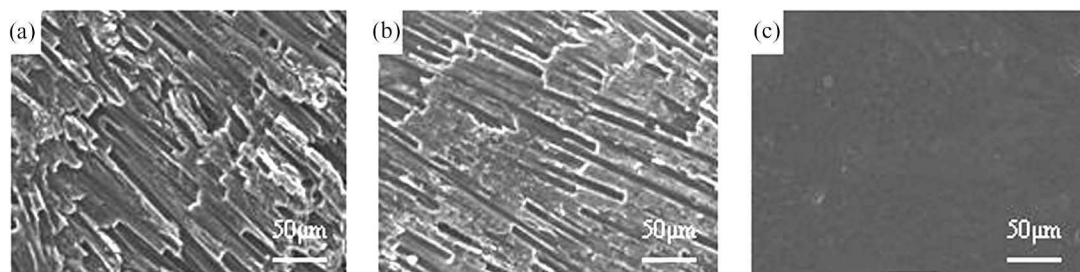


图 2 不同表面粗糙度的 C/C 复合材料表面扫描电镜照片

Fig. 2 SEM images of C/C composites surfaces with different roughnesses

(a) Sample 1#; (b) Samples 2#; (c) Sample 3#

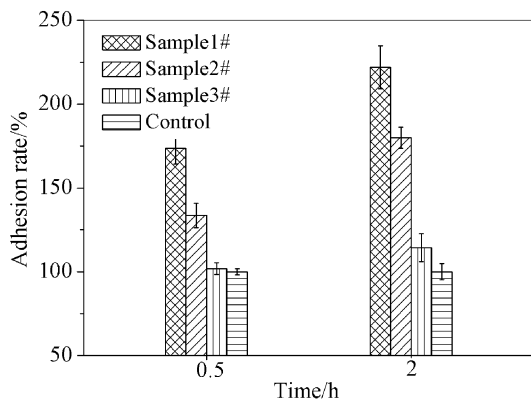


图 3 成骨细胞在 C/C 复合材料 and 对照试样表面的粘附率

Fig. 3 Adhesion rate of osteoblasts on the surfaces of C/C composites and control sample

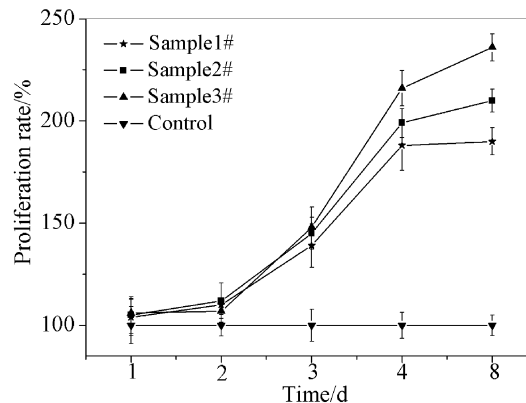


图 4 成骨细胞在 C/C 复合材料 and 对照试样表面的增殖率

Fig. 4 Proliferation rate of osteoblasts on the surfaces of C/C composites and control sample

越好^[15].

成骨细胞在 C/C 复合材料表面的荧光显微照片(图 5)更加直观的反映了细胞在不同粗糙度 C/C 复合材料表面的粘附和增殖状况. 细胞附着 2h 后, 试样 1# 表面细胞粘附数量多于试样 3#, 同时试样 1# 表面单个细胞伸展面积小于试样 3#(图 5(a)、(c)), 原因是细胞的附着形貌不同, 图 6 证明细胞在粗糙度高的材料表面呈梭形, 立体感强, 反之细胞呈片状, 铺展状态好. 细胞生长 8d 后, 细胞大量增殖, 几乎布满材料表面并且试样 3# 表面细胞增殖率高于试样 1#(图 5(b)、(d)).

3.3 细胞生长形貌

图 6 为 MG-63 细胞在 C/C 复合材料表面附着 4h 后的扫描电镜照片. 由图可知, 细胞在试样 1# 表面呈梭状或长条形, 已经形成较好的伸展且表面布满微绒毛, 细胞生长的位置在材料的孔隙和打磨形成的沟槽中(图 6(a)). 细胞在试样 3# 表面呈片状, 形态平展, 细胞表面微绒毛较少(图 6(b)). 试样 1# 和 3# 表面细胞形貌有较大差异, 说明细胞几何形状与生长的环境息息相关, 细胞的形态

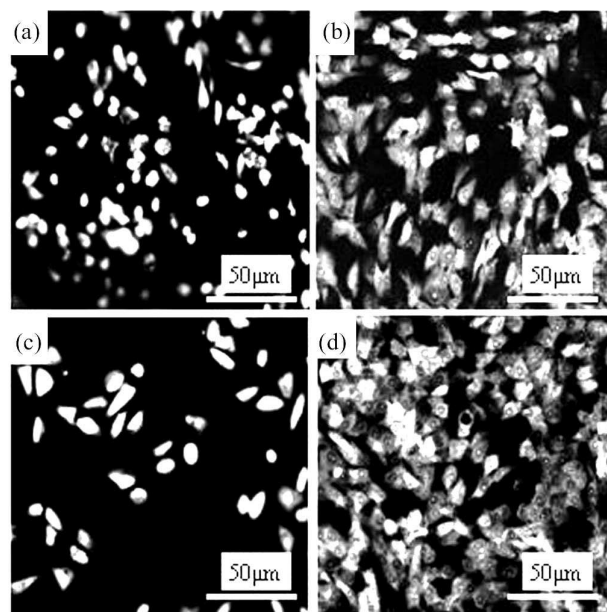


图 5 成骨细胞在 C/C 复合材料表面的荧光显微照片
Fig. 5 Fluorescent micrographs of osteoblasts on the surfaces of C/C composites
(a) Sample 1#, 2h; (b) Samples 1#, 8d; (c) Sample 3#, 2h; (d) Sample 3#, 8d

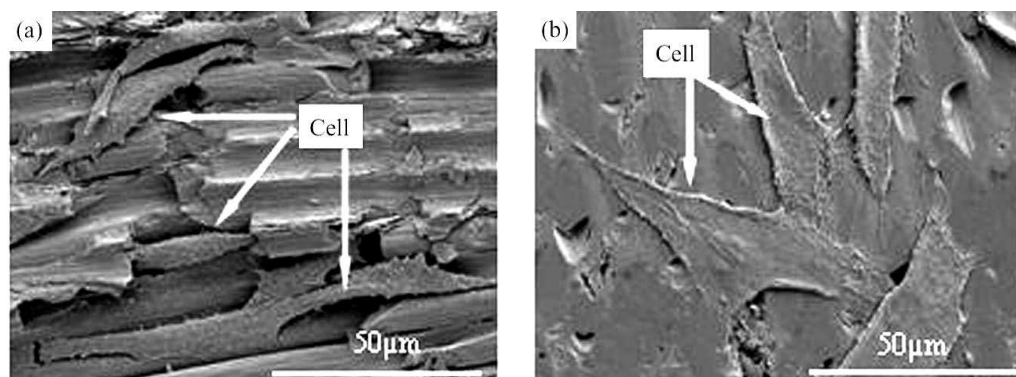


图 6 成骨细胞在 C/C 复合材料表面附着 4h 后的扫描电镜照片
Fig. 6 SEM images of osteoblasts culture for 4h on the surface of C/C composites
(a) Sample 1#; (b) Sample 3#

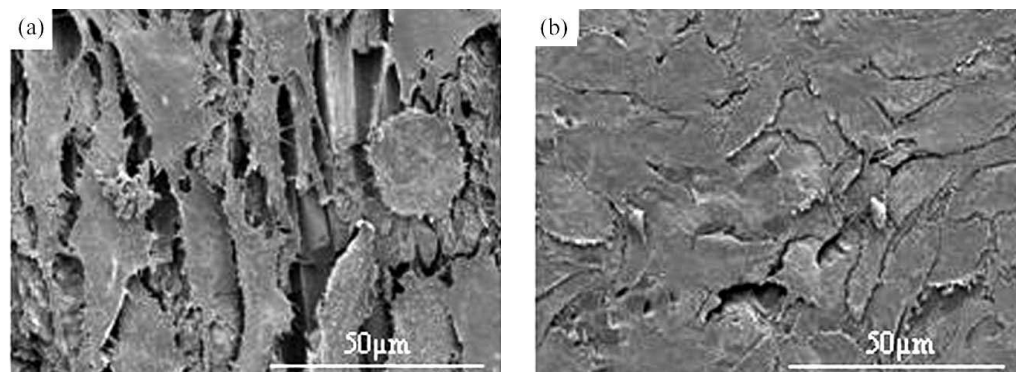


图 7 成骨细胞在 C/C 复合材料表面生长 3d 后的扫描电镜照片
Fig. 7 SEM images of osteoblasts culture for 3d on the surface of C/C composites
(a) Sample 1#; (b) Sample 3#

会顺应材料的表面状态. 表面粗糙度高则材料表面高低起伏明显, 细胞在垂直方向上伸展空间大, 细胞形状的立体感就越强, 故细胞呈梭形或条形; 而表面粗糙度低则材料表面光滑平整, 细胞形态平展, 呈片状形貌.

图 7 为成骨细胞在 C/C 复合材料表面生长 3d 后的形貌. 由图可知, 细胞在生长 3d 后大量增殖, 几乎布满材料表面, 细胞形态更加伸展, 同时细胞生长具有明显的方向性, 细胞沿着打磨形成的沟槽的方向择优生长 (图 7(a)), 细胞生长的排列方向与 C/C 复合材料表面形貌 (图 2) 相一致, 说明细胞可以感知材料的表面状态并做出响应, 细胞生长方向受到材料表面粗糙度的诱导, 并且粗糙度越高, 诱导作用越明显 (图 7(a)、(b)). Curits 和 Varde 证明了细胞生长受周围环境形状的影响^[16]. 本实验进一步证明了细胞的生长可以响应材料的表面状态, 生长方向受表面粗糙度的诱导.

4 结论

1. C/C 复合材料表面粗糙度越高则成骨细胞在其表面的粘附率越高, 增殖率越低.
2. 成骨细胞在粗糙度高的 C/C 复合材料表面呈梭形或长条状, 立体感强; 反之成骨细胞呈片状, 形态平展.
3. C/C 复合材料表面粗糙度对成骨细胞的生长方向具有诱导作用, 粗糙度越高诱导作用越明显.

参考文献

- [1] 李贺军 (LI He-jun). 新型碳材料 (New Carbon Materials), 2001, **16** (2): 79–80.
- [2] 徐国忠, 李贺军, 白瑞成, 等 (XU Guo-Zhong, *et al*). 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2006, **21** (6): 1385–1390.
- [3] 熊信柏, 李贺军, 李克智, 等 (XIONG Xin-bo, *et al*). 稀有金属材料与工程 (Rare Metal Materials and Engineering), 2003, **32** (11): 923–926.
- [4] Linez-Bataillon P, Monchau F, Bigerelle M, *et al*. *Biomolecular Engineering*, 2002, **19** (2–6): 133–141.
- [5] Borsari Veronica, Giavaresi Gianluca, Fini Milena, *et al*. *Biomaterials*, 2005, **26** (24): 4948–4955.
- [6] Wirth C, Comte V, Lagneau C, *et al*. *Materials Science and Engineering*, 2005, **25** (1): 51–60.
- [7] Lincks J, Boyan B D, Blanchard C R, *et al*. *Biomaterials*, 1998, **19** (23): 2219–2232.
- [8] Deligianni Despina D, Katsala Nikoleta D, Koutsoukos Petros G, *et al*. *Biomaterials*, 2001, **22** (1): 87–96.
- [9] 司徒振强. 细胞培养, 第 1 版. 西安: 世界图书出版公司, 1992. 209–210.
- [10] Hatano K, Inoue H, Kojo T, *et al*. *Bone*, 1999, **25** (4): 439–445.
- [11] Deligianni D D, Katsala N, Ladas S, *et al*. *Biomaterials*, 2001, **22** (11): 1241–1251.
- [12] Lange R, L ü then F, Beck U, *et al*. *Biomolecular Engineering*, 2002, **19** (2–6): 255–261.
- [13] Göransson A, Jansson E, Tengvall P, *et al*. *Biomaterials*, 2003, **24** (2): 197–205.
- [14] Laczka-Osyczka A, Lacaka M, Kasugai S. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, **42**: 433–442.
- [15] Ben-Ze'ev. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, **9** (1): 99–108.
- [16] Ponsonnet L, Comte V, Othmane A, *et al*. *Materials Science and Engineering C*, 2002, **21**: 157–165.