

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.07.001
文章编号: 1005-8982(2016)07-0001-03

论著

钛合金表面纳米氧化锌薄膜的体外细胞毒性研究*

刘冠花¹,王金清²,邱宜农¹

[1.兰州军区兰州总医院 口腔科,甘肃 兰州 730050;2.中国科学院兰州化学物理研究所
(固体润滑国家重点实验室),甘肃 兰州 730000]

摘要:目的 评价钛合金表面纳米氧化锌薄膜对细胞毒性的作用。**方法** 观察小鼠胚胎成纤维 L-929 细胞在含纳米氧化锌薄膜的钛合金析出液中的生长情况,采用噻唑蓝比色法测定各组细胞的吸光度值,并计算出相对的细胞增殖率,进行细胞毒性评价。**结果** 各组细胞生长状况良好,细胞形态无异常,增值率 >80%,细胞毒性等级为 1 级。**结论** 钛合金表面纳米氧化锌薄膜对细胞生长无毒害作用。

关键词: 钛合金;纳米氧化锌;细胞毒性;噻唑蓝比色法;生物相容性

中图分类号: R783.1

文献标识码: A

In vitro cytotoxicity study of nano-ZnO thin film on surface of titanium alloy*

Guan-hua Liu¹, Jin-qing Wang², Yi-nong Qiu¹

[1. Department of Stomatology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of PLA, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. Lanzhou Institute of Chemical Physics (State Key Laboratory of Solid Lubrication), Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China]

Abstract: Objective To evaluate the cytotoxicity of nano-ZnO thin film on titanium alloy. **Methods** The growth of L-929 cells in the culture solutions consisting of the ions released from nano-ZnO thin film on the surface of titanium alloy was observed. And the absorbance values of the cells were tested by MTT method. The relative growth rate of L-929 cells was calculated and the cytotoxicity of nano-ZnO thin film on the surface of titanium alloy was evaluated. **Results** The relative growth rate of each L-929 cell group was above 80% and the cytotoxicity grade was grade 1. **Conclusions** Nano-ZnO thin film on the surface of titanium alloy has almost no cytotoxicity.

Keywords: titanium alloy; nano-ZnO; cytotoxicity; MTT method; biocompatibility

种植技术是修复牙列缺损、缺失的重要方法,在临床上应用越来越广泛。种植体周围炎是种植修复的主要并发症之一,是导致种植失败的主要原因^[1],源于种植体基台与牙龈袖口间的细菌感染。减少基台周围细菌定植及繁殖成为防治种植体周围炎的关键。种植体基台的主要材料为钛或钛合金,其本身不具有抗菌性。前期笔者通过溶胶-凝胶法在种植体

基台表面构建一层纳米氧化锌抗菌膜^[2],起到良好的抗菌杀菌作用。本实验旨在评价纳米氧化锌涂层对细胞的毒性作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

小鼠胚胎成纤维 L-929 细胞,由中国科学院昆明

收稿日期:2015-10-30

*基金项目:中国科学院兰州化学物理研究所固体润滑国家重点实验室开放课题(No: LSL-1309)

[通信作者] 邱宜农, E-mail: yinongqiu@hotmail.com; Tel: 0931-899469

细胞库提供, 达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium, DMEM)及小牛血清均购自美国 Gibco 公司, 双抗噻唑蓝(美国 Amresco 公司), 二甲基亚砷(Dimethylsulphoxide, DMSO)(美国 Amresco 公司), 0.25%胰酶消化液。酶联免疫检测仪(瑞士 Tecan 公司), 生物安全柜(HFsafe-1200, 上海力申科学仪器有限公司), 气体培养箱(HF160W, 上海力申科学仪器有限公司), Olympus IX-71 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), 96 孔细胞培养板(美国 Coster 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 浸提液的制备 参照试件表面积与浸提介质体积之比为 0.5 ~ 6.0 cm²/ml, 按 1.0 cm²/ml 的浸提比例将高温高压消毒后的实验组钛片(表面含纳米氧化锌涂层)和阴性对照组钛片(表面不含涂层)分别浸泡在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 在 37℃ 培养箱内放置 24 h 后制成各组材料的浸提液, 放入 4℃ 冰箱保存^[3]。

1.2.2 细胞培养 生长旺盛的 L-929 细胞传代 48 h, 制成 1 × 10⁵ 个/ml 细胞悬液, 分注于 3 个 96 孔培养板, 每孔 100 μl, 每一板设 3 组(实验组、阴性对照组和空白对照组), 每一组接种 8 孔, 置于培养箱内(37℃, 体积分数为 5% 二氧化碳 CO₂)培养。24 h 后细胞贴壁生长良好时, 弃去原培养液, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 2 次, 实验组每孔分别加入 100 μl 的含纳米氧化锌涂层的钛片浸提液, 阴性对照组每孔分别加入 100 μl 不含涂层的钛片浸提液, 空白对照组每孔分别加入 100 μl 新鲜培养液。继续置于细胞培养箱内培养。

1.2.3 细胞形态观察及噻唑蓝比色法检测 3 个 96 孔板分别培养 24、48 和 72 h 后终止培养, 终止培养前均在倒置显微镜下观察各组细胞形态变化和生长状况并摄影, 然后每孔加入 5 g/L 噻唑蓝溶液 20 μl, 继续置于细胞培养箱内培养 4 h 后, 吸弃原液, 每孔加入 DMSO 150 μl, 置于振荡器上振荡 10 min, 使用酶联免疫检测仪在波长 490 nm 处测定各孔的吸光度值(A₄₉₀)。

1.2.4 细胞毒性评价 细胞相对增殖率(the relative growth rate, RGR)的计算公式^[4]: RGR = 实验组 A 值 / 阴性对照组 A 值 / 空白对照组 A 值。美国药典中细胞相对增殖率与细胞毒性分级如下^[5]: 0 级为 RGR ≥ 100%; 1 级为 RGR 80% ~ 100%; 2 级为 RGR 50% ~ 80%; 3 级 RGR 为 30% ~ 50%; 4 级为 RGR

0% ~ 30%。当 RGR ≥ 80%, 即毒性级别 ≤ 1 级时, 样品对细胞的增殖无毒害作用; 反之, 对细胞的增殖有毒害作用。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 各组吸光度值(A 值)用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 每个时间段各组组间比较及各组 3 个时间点 A 值比较用单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。根据细胞毒性计算公式和分级标准直接计算并评价其对细胞的毒性。

2 结果

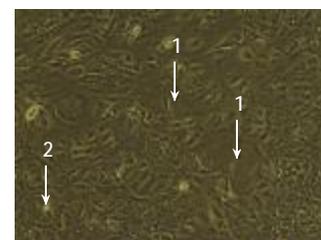
2.1 培养 72 h 细胞形态

可见各组细胞形态基本相似, 呈梭性或多角形, 部分圆形细胞的细胞核处于分裂期, 表明细胞生长旺盛。见图 1。

2.2 各组 A 值与细胞毒性

2.2.1 各组同一时间 A 值比较 分别培养 24、48、72 h 后, 各组间 A 值比较, 差异无统计学意义(F 值分别为 0.211、8.089 和 1.509, P 值分别为 0.811、0.067 和 0.244)(见表 1), 提示每个时间段各组细胞生长增殖比较, 差异无统计学意义。

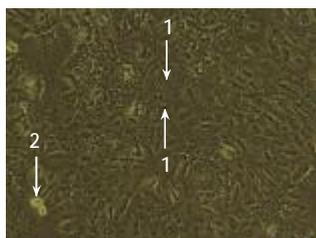
2.2.2 各组 3 个时间段 A 值比较 实验组、阴性对照组、空白对照组 3 个时间段的 A 值比较, 经方差分析, 差异有统计学意义(F 值分别 380.171、625.354 和 194.550, P 值分别为 0.000、0.000 和 0.002)。各组 3 个时间段的 A 值均呈线性关系(P = 0.002), 各组 A 值均随着时间的延长而逐渐增大。见表 1。



A



B



C

A:实验组;B:阴性对照组;C:空白对照组;箭头1示生长旺盛的分裂期细胞;箭头2示坏死细胞

图1 各组细胞培养72h形态图 (×100)

表1 各组3个时间段的A值 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
实验组	0.181 ± 0.045	0.409 ± 0.065	0.882 ± 0.102
阴性对照组	0.195 ± 0.080	0.428 ± 0.075	0.837 ± 0.073
空白对照组	0.201 ± 0.106	0.470 ± 0.083	0.934 ± 0.111

2.2.3 细胞增殖率和细胞毒性级别比较 细胞的相对增殖率均 >80%,细胞毒性级别是1级(见表2),表明细胞生长没有受到抑制,钛片表面纳米氧化锌涂层具有良好的细胞相容性。

表2 各组材料的细胞相对增殖率和细胞毒性级别

组别	培养24h		培养48h		培养72h	
	细胞相对增殖率/%	细胞毒性级别	细胞相对增殖率/%	细胞毒性级别	细胞相对增殖率/%	细胞毒性级别
实验组	90	1	87	1	94	1
对照组	97	1	91	1	90	1

3 讨论

氧化锌是一种无机抗菌剂,作为添加成分主要应用于皮肤科外用、日用化妆品、水消毒及纺织品防腐等方面^[6-7]。纳米氧化锌与细菌微生物产生更广泛的接触面积^[8],其抗菌性能远大于传统的氧化锌杀菌剂^[9],具有安全性高、效力持久和不易耐药的特点^[10]。

细胞毒性试验是口腔新型材料生物相容性研究中重要的检测指标之一。噻唑蓝比色法是一种检测体外培养细胞生长存活的方法,酶联免疫比色分析法测定的吸光度值的大小可反映存活细胞数量的多少及细胞代谢活性的强弱,因而吸光度值降低程度即可反映材料析出液的细胞毒性大小^[11-12],由于该法简便、灵敏、结果客观且重复性好,广泛用于细胞毒性检测。

本研究结果显示纳米氧化锌薄膜组细胞生长状

态良好,可见圆形分裂期细胞,细胞增殖率 >80%,细胞毒性是1级,对细胞的增殖无毒害作用,利于细胞分化及功能表达,达到良好的钛合金-组织界面^[13]。但毕竟体外实验条件与真实人体口腔环境有较大差异,纳米氧化锌涂层能否应用于临床,还需要进一步的生物学和动物学实验研究证实。

参考文献:

- [1] Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, et al. Prevalence of peri-implant diseases: a cross-sectional study based on private practice environment[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2012, 39: 490-494.
- [2] 刘冠花,王金清,刘晓辉,等.钛合金表面纳米氧化锌薄膜的制备及抗菌性研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(32): 1-4.
- [3] 国家药品监督管理局. GB/T16886.5-1997 医疗器械生物学评价标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2005.
- [4] 吕晓迎, Fkappert H. 牙科材料细胞毒性评定的新方法[J]. *中华口腔医学杂志*, 1995, 30(6): 377-379.
- [5] Zhu SH, Huang BY, Zhou KC, et al. Hydroxyapatite nanoparticles as a novel gene carrier[J]. *J Nanopart Res*, 2004, 6: 307-311.
- [6] Talebian N, Nilforoushan MR, Zargar EB. Enhanced antibacterial performance of hybrid semiconductor nanomaterials: ZnO/SnO₂ nanocomposite thin films[J]. *Applied Surface Science*, 2011, 258: 547-555.
- [7] WAhabh A, Salam AA, El-saeid AA, et al. Optical, structural and morphological studies of (ZnO) nano-rod thinfilms for biosensor applications using sol gel technique [J]. *Results in Physics*, 2013, 3: 46-51.
- [8] Tavassoli S, Alaghemande H, Hamze F, et al. Antibacterial, physical and mechanical properties of ?owable resin composites containing zinc oxide nanoparticles[J]. *Dental Material*, 2013, 29(4): 495-505.
- [9] Jones N, Ray B, Ranjit KT, et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 279: 71-76.
- [10] Huang Z, Zheng X, Yan D, et al. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria[J]. *Langmuir*, 2008, 24: 4140-4144.
- [11] Lin X, Yang XM, Tan LL, et al. In vitro degradation and biocompatibility of a strontium-containing micro-arc oxidation coating on the biodegradable ZK60 magnesium alloy [J]. *Applied Surface Science*, 2014, 288: 718-726.
- [12] Guo YJ, Long T, Chen W, et al. Bactericidal property and biocompatibility of gentamicin-loaded mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres[J]. *Materials Science and Engineering C*, 2013, 33: 3583-3591.
- [13] 李军,魏建华,张玉梅,等.新型医用钛合金生物相容性评价[J]. *实用口腔医学杂志*, 2010, 26(5): 636-640.

(申海菊 编辑)