



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R783.1

U D C 616.31

密 级 公开

硕士学位论文

钛表面微纳米形貌 Rho GTPases/Wnt/ β -catenin
信号调控 rBMSCs 形态与功能的研究

李广文

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 口腔医学

二级学科(专业) 口腔临床医学(修复)

研 究 方 向 种植体表面优化

指 导 教 师 张玉梅 教授(主任医师)

培 养 单 位 第四军医大学口腔医院修复科

二〇一七年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____ 日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____ 导师签名：_____ 日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
英文摘要	7
前 言	12
文献回顾	14
正 文	23
第一部分 试样表面形貌制备分析与 rBMSCs 培养鉴定	23
1 材料、试剂和仪器	23
2 实验方法	24
3 实验结果	27
4 讨论	31
5 结论	32
第二部分 微纳米形貌对 rBMSCs 细胞形态与功能影响的研究	33
1 材料、试剂和仪器	33
2 实验方法	33
3 实验结果	39
4 讨论	47
5 结论	49
第三部分 微纳米形貌通过 Cdc42/Wnt/ β -catenin 信号通路对 rBMSCs 调控的研究	51
1 材料、试剂和仪器	51
2 实验方法	52
3 实验结果	61
4 讨论	70
5 结论	73
第四部分 微纳米形貌通过 Rac1/MAPK 通路对 rBMSCs 调控的研究	74

1 材料、试剂和仪器	74
2 实验方法	75
3 实验结果	77
4 讨论	83
5 结论	84
小 结	85
参考文献	87
个人简历及研究成果	93
致 谢	96

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ALP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
α -MEM	alpha modified minimum essential medium	改良型最低必须培养基
BCA	bicinchoninic acid	BCA 蛋白浓度测定
rBMSCs	bone marrow mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
BMP	bone morphogenic protein	骨形态发生蛋白
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
DEPC	diethylpyrocar-bonate	焦碳酸二乙酯
CLSM	confocal laser scanning microscope	激光共聚焦扫描显微镜
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
OD	optical density	吸光度
OPN	osteopontin	骨桥蛋白
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
OCN	osteocalcin	骨钙蛋白
SEM	field emission scanning electron microscope	场发射扫描电镜
PBS	phosphate buffer solution	磷酸缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
Runx2	runt-related transcription factor 2	Runt 相关转录因子 2
siRNA	small interfering RNA	小干扰 RNA

Ti	titanium	钛
AFM	atomic force microscope	原子力显微镜
BSP	bone sialoprotein	骨涎蛋白
COL-1	collagen type 1	I 型胶原
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
MAPK	mitongen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
CCK	cell counting kit	细胞计数试剂盒
ERK1/2	extracellular regulated protein kinases	细胞外调节蛋白激酶 1/2
JNK	c-Jun NH2 terminal kinase	c-Jun 氨基端激酶
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯

钛表面微纳米形貌 Rho GTPases/Wnt/ β -catenin 信号调控 rBMSCs 形态与功能的研究

硕士研究生：李广文

导师：张玉梅 教授

辅导教师：王 薇 博士

第四军医大学口腔医学院，修复科，西安，710032

资助基金项目：国家自然科学基金（31400820 81530051）

中文摘要

随着我国进入老龄化社会和全民对口腔健康重视程度的不断提升，人们对口腔种植体修复缺失牙齿以提高生活质量的需求日趋增加。虽然目前成品生产的种植体骨结合较好，但骨结合周期较长，难以满足早期或即刻修复，所以缩短种植体骨结合周期是目前种植体研究的热点^[1]。在缩短种植体愈合周期，获得早期和更高的骨结合强度的多种途径中，骨植入材料材料表面微纳米仿生优化被认为是一种具有较大研究前景的方法。本研究中先 HF 酸蚀再进一步采用阳极氧化方法形成与天然骨组织形貌更相似的微纳米复合梯度形貌。课题组前期体外实验证实该形貌能够促进成 rBMSCs 的多项生物学功能，但是涉及的具体机制目前还不清楚。因此，探明骨植入材料表面形貌对细胞及组织的影响机制，将为骨植入材料的表面优化设计提供分子生物学依据。

本研究首先制备微纳米形貌试样并对材料表面微观结构与性状分析，原代培养 rBMSCs 并完成鉴定；然后应用 rBMSCs 细胞，评价不同微纳米形貌对 rBMSCs 细胞粘附、增殖、形态、骨架形态和成骨分化功能影响的研究；最后检测不同微纳米形貌表面 rBMSCs 细胞内 Rac1、Cdc42、RhoA 及 Wnt/ β -catenin 相关通路蛋白的活

性。通过免疫荧光、western blot 及实时定量 RCR 检测，明确并梳理不同试样微纳米形貌表面 rBMSCs 细胞内 Rho GTPases 家族、Wnt/ β -catenin 及 MAPK 相关通路关键蛋白之间关系的分子网络调控机制，为相关材料的表面优化研究提供指导。

第一部分 试样表面形貌制备分析与 rBMSCs 培养与鉴定

【目的】构建微纳米形貌试样并进行表面结构与性状分析，对 rBMSCs 进行原代培养及鉴定，为后续实验提供基础。

【方法】HF 酸蚀在纯钛表面形成微米坑形貌后采用阳极氧化方法在微米坑基础上形成均匀的 TiO₂ 纳米管结构并结合 SEM、AFM 及接触角测量仪进行表面结构与性状分析。rBMSCs 原代培养并检测 rBMSCs 的生长曲线、细胞克隆形成及成脂成骨分化情况。

【结果】SEM 下微纳米形貌试样表面明显可见分布相对均匀的纳米管结构。S、R、R5 及 R20 组试样表面接触角测量值平均值由 58.6° 逐渐降到 3.8°。培养的 rBMSCs 具有增殖、克隆形成及成脂成骨分化能力。

【结论】制备微纳米形貌试样及培养的 rBMSCs 是符合实验要求的。

第二部分 微纳米形貌对 rBMSCs 形态与功能的影响

【目的】观察不同形貌表面对 rBMSCs 形态与功能的影响。

【方法】通过在微纳米形貌表面进行细胞黏附计数、活力测定、细胞形态及细胞骨架观察、碱性磷酸酶分泌、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨基因表达等检测评价微纳米形貌对 rBMSCs 形态与成骨分化功能的影响。

【结果】细胞黏附计数、碱性磷酸酶分泌、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨基因表达等方面，R5 及 R20 组明显优于对照组，而 R5 及 R20 组细胞活力与对照组相比，3 天、7 天时均无明显变化。微纳米形貌表面 rBMSCs 更为伸展，且板状与丝状伪足更加明显。同时在共聚焦显微镜下微纳米形貌表面细胞胞浆内红色纤维网状结构更多更清晰。

【结论】 钛种植体表面微纳米形貌不仅显著改变了骨髓间充质干细胞表面粘附能力、形态及骨架，而且较大地促进 rBMSCs 成骨分化能力。

第三部分 微纳米形貌通过 Cdc42/Wnt/ β -catenin 通路对 rBMSCs 调控的研究

【目的】 探索可能存在的微纳米形貌调控 rBMSCs 形态与功能变化的机制，为材料表面优化设计提供研究依据和新思路。

【方法】 通过对比 Cdc42siRNA 转染前后进行细胞形态及细胞骨架观察、碱性磷酸酶分泌、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨基因表达等检测评价微纳米形貌表面 Cdc42 介导对 rBMSCs 形态与成骨分化功能的调控作用。采用实时定量 PCR 及 Western blot 方法检测 Cdc42 对 Wnt/ β -catenin 的影响。

【结果】 相对于 Cdc42siRNA 转染前，转染后微纳米形貌表面 rBMSCs 细胞黏附计数、碱性磷酸酶分泌、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨基因表达等均明显下降，微纳米形貌表面细胞处于相对萎缩状态，丝状伪足和板状伪足明显减少，在共聚焦显微镜下胞浆内红色纤维网状结构染色明显减弱。Cdc42siRNA 转染大大降低了微纳米形貌表面 β -catenin mRNA 表达 ($P < 0.05$)，同时 Cdc42siRNA 转染明显抑制了 R5 及 R20 组表面 Nucleus β -catenin 及 p-GSK3 β 蛋白表达。R5 及 R20 组明显促进了 Wnt1、Wnt3a 及整合素 Integrin β 1、Integrin β 3 和 Integrin β 6 的 mRNA 表达

【结论】 微纳米形貌通过 Cdc42/Wnt/ β -catenin 通路参与调控 rBMSCs 形态及成骨分化功能。

第四部分 微纳米形貌通过 Rac1/MAPK 通路对 rBMSCs 调控研究

【目的】 探索可能存在的 Rac1 与 MAPK 信号通路间串联调节是材料微纳米形貌表面的另一个分子调控机制，为材料表面优化设计提供研究依据和新思路。

【方法】 通过对比 Rac1siRNA 转染前后进行细胞形态及细胞骨架观察、碱性磷酸酶

分泌、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨基因表达等检测评价微纳米形貌表面 Rac1 介导对 rBMSCs 形态与成骨分化功能的调控作用。采用 PCR 及 Western blot 检测 Rac1 对 MAPK 通路的影响。

【结果】微纳米形貌表面显著上调了 Rac1、p-ERK1/2、p-p38 表达水平,而未检测到 JNK 相关蛋白的表达。Rac1siRNA 转染后微纳米形貌表面 rBMSCs 片状伪足数量和长度均减少、胞浆内纤维网状结构显著减少、特异性抗体 Rac1 的免疫荧光强度明显减弱。相比于野生型, Rac1siRNA 显著抑制微纳米形貌表面碱性磷酸酶合成、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨相关基因的表达。Western blot 结果显示 Rac1siRNA 转染明显抑制了 R5 及 R20 组表面 p-p38 和 p-ERK1/2 的蛋白表达,而试样表面 t-p38 和 t-ERK1/2 的表达水平无明显改变。

【结论】微纳米形貌通过 Rac1/MAPK 通路参与调控 rBMSCs 形态及成骨分化功能。

关键词: 钛, 微纳米形貌, Cdc42, β -catenin , Rac1, MAPK, 分子机制

Mechanisms of Rho GTPases / Wnt / β -catenin Mediated rBMSCs Morphology and Function on Micro/nanotextured Topography of Titanium Surface

Candidate for master: Li Guangwen

Supervisor: Prof. Zhang Yumei

Tutor: PhD. Wang Wei

Department of prosthetic dentistry, Stomatology hospital, Fourth Military Medical
University, Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Natural Science Foundation of China (31400820 and
81530051)

Abstract

As our country enters an aging society and continues to improve the importance of oral health, there is an increasing demand for dental implants to repair missing teeth to improve the quality of life. Although a variety of commercial implants used in current clinic can achieve excellent osseointegration and meet the need of clinical implanting, part of patients need to restore missing teeth by early implanting or even immediate implanting. Therefore, shortening the healing period of implanting and obtaining more excellent osseointegration has become the core research on implanting materials, both in China and abroad. There are various ways to solve the problem above and micro/nanotextured topography of titanium surface is considered to be one of promising methods. Micro/nanotextured topography of titanium surface of this research is prepared by acid etching and anodic oxidation to simulate nature structure of bone tissue. Cytological experiments in vitro were confirmed to promote a series of biological functions of osteoblasts and rBMSCs. However, the lack of relevant molecular

mechanisms might lead to bad design on topography of titanium implanting surface. Thus, it is important to explore the mechanisms of topography of titanium implanting surface and to provide the molecular basis for better design of implanting.

First of all, we prepare micro/nanotextured topography of titanium surface of this research and analyze microstructures and properties of surface of the material. At the same time, rBMSCs are cultured identified. Then, rBMSCs are used to evaluate the effects of cell adhesion, proliferation, morphology, skeletal morphology and osteogenic differentiation on micro/nanotextured topography of titanium surface. Furthermore, mRNA expression of Rac1, Cdc42 and RhoA, and protein molecules of Wnt / β -catenin signaling pathway on micro/nanotextured topography were measured. Eventually, signal mechanism of Rho GTPases / Wnt / β -catenin or MAPK signaling pathway on micro/nanotextured topography might be discovered by immunofluorescence, western blot and real-time quantitative RCR to guide excellent design of titanium surface.

Part I Preparation and analysis of micro/nanotextured topography and identification of rBMSCs

[Objective] To prepare micro/nanotextured topography of titanium surface and identify rBMSCs as the basis of further experiments.

[Methods] Micro/nanotextured topography of titanium surface and microstructures is prepared by acid etching and anodic oxidation to simulate nature structure of bone tissue and properties of surface of the material are analyzed by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscope (AFM) and Contact Angle Meter. rBMSCs are cultured and identified by measuring growth curve, clonal formation of cells and osteogenesis differentiation.

[Results] There are a lot of uniform nanotubes on micro/nanotextured topography of titanium surface under the scanning electron microscopy (SEM). The average values of Contact Angle Meter on the samples of S, R, R5 and R20 decrease from 58.6 ° to 3.8 °.

rBMSCs cultured in vitro have the ability of proliferation, cell clonal formation and osteogenesis differentiation.

[Conclusion] Prepared samples of micro/nanotextured topography of titanium surface and cultured rBMSCs is suitable for future experiments.

Part II Effects of rBMSCs morphology and function on micro/nanotextured topography of titanium surface

[Objective]To evaluate the biological properties of micro/nanotextured topography of titanium surface by observing biological changes of morphology and function of rBMSCs .

[Methods] Effects of rBMSCs morphology and function of osteogenic differentiation on micro/nanotextured topography of titanium surface are evaluated by cell adhesion counting, viability determination, cell morphology and cytoskeleton observation, alkaline phosphatase secretion, cell collagen secretion, extracellular matrix mineralization and osteogenic gene expression.

[Results] Micro/nanotextured topography of titanium surface is significantly better than control group in cell adhesion counting, alkaline phosphatase secretion, cell collagen secretion, extracellular matrix mineralization and osteogenic gene expression, while there are no significant changes in cell viability between Micro/nanotextured topography and control group. rBMSCs on micro/nanotextured topography of titanium surface are more stretched, and lamellipodiums and filopodiums are significantly more. At the same time, the red fiber network structures on micro/nanotextured topography are more clearer under Confocal Laser Scanning Microscope(CLSM).

[Conclusion] Micro/nanotextured topography of titanium surface not only significantly changes morphology and skeleton of rBMSCs, but also greatly promotes the osteogenic differentiation of rBMSCs.

Part III Mechanisms of Cdc42 / Wnt / β -catenin Mediated rBMSCs Morphology and Function on Micro/nanotextured Topography of Titanium Surface

[Objective] To discover signal mechanisms of Cdc42 / Wnt / β -catenin mediated rBMSCs morphology and function on micro/nanotextured topography and to provide basis and new ideas for guiding excellent design of titanium surface.

[Methods] Effects of rBMSCs morphology and function of osteogenic differentiation on micro/nanotextured topography of titanium surface after transfection of Cdc42 siRNA are evaluated by cell adhesion counting, viability determination, cell morphology and cytoskeleton observation, alkaline phosphatase secretion, cell collagen secretion, extracellular matrix mineralization and osteogenic gene expression. Signal mechanisms of Cdc42 / Wnt / β -catenin mediated rBMSCs morphology and function on micro/nanotextured topography are detected by RT-qPCR and Western blot.

[Results] Micro/nanotextured topography of titanium surface after transfection of Cdc42 siRNA is significantly decreased in alkaline phosphatase secretion, cell collagen secretion, extracellular matrix mineralization and osteogenic gene expression. rBMSCs are in a relatively atrophic state and lamellipodiums and filopodiums are significantly reduced. At the same time, the red fiber network structures on micro/nanotextured topography are stained under Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Cdc42 siRNA transfection significantly reduces the expression of β -catenin mRNA on micro/nanotextured topography ($P < 0.05$). Cdc42 gene silencing significantly inhibits the expression of Nucleus β -catenin and p-GSK3 β on micro/nanotextured topography. The mRNA expressions of Wnt3a, Wnt1, Integrin β 1, Integrin β 3 and Integrin β 6 are significantly up-regulated on micro/nanotextured topography.

[Conclusion] Cdc42 / Wnt / β -catenin signaling pathway is involved in regulation of

rBMSCs morphology and function on micro/nanotextured topography.

Part IV Mechanisms of Rac1/MAPK Mediated rBMSCs Morphology and Function on Micro/nanotextured Topography of Titanium Surface

[Objective] To discover another signal mechanisms of Rac1/MAPK mediated rBMSCs morphology and function on micro/nanotextured topography and to provide basis and new ideas for guiding excellent design of titanium surface.

[Methods] Effects of rBMSCs morphology and function of osteogenic differentiation on micro/nanotextured topography of titanium surface after transfection of Rac1 siRNA are evaluated by cell adhesion counting, viability determination, cell morphology and cytoskeleton observation, alkaline phosphatase secretion, cell collagen secretion, extracellular matrix mineralization and osteogenic gene expression. Signal mechanisms of Rac1/MAPK mediated rBMSCs morphology and function on micro/nanotextured topography are detected by Western blot.

[Results] Micro/nanotextured topography of titanium surface after transfection of Rac1 siRNA is significantly decreased in alkaline phosphatase secretion, cell collagen secretion, extracellular matrix mineralization and osteogenic gene expression. rBMSCs are in a relatively atrophic state and lamellipodiums are significantly reduced. At the same time, the red fiber network structures on micro/nanotextured topography are stained under Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Rac1 siRNA transfection significantly inhibits the expression of p-p38 and p-ERK1/2 on micro/nanotextured topography.

[Conclusion] Rac1/MAPK signaling pathway is also involved in regulation of rBMSCs morphology and function on micro/nanotextured topography.

Key words: titanium; micro/nanotextured topography; Cdc42; β -catenin; Rac1; MAPK; molecular mechanism.

前 言

随着我国进入老龄化社会和全民对口腔健康重视程度的不断提升，人们对口腔种植体修复缺失牙齿以提高生活质量的需求日趋增加。虽然目前成品生产的种植体骨结合较好，但骨结合周期较长，难以满足早期或即刻修复，所以缩短种植体骨结合周期是目前种植体研究的热点^[1]。表面形貌是影响种植体骨结合周期和效率的重要因素之一。骨植入材料表面微米级纳米级仿生设计可以模拟人体天然组织中细胞外环境的结构从而有望能够获得更理想的生物学功能。本课题组王薇等^[2]首先通过 HF 酸蚀在纯钛表面形成微米坑形貌以模拟骨的天然粗糙度，再进一步采用阳极氧化方法在微米坑基础上形成形态一致的纳米管，以模仿骨组织的胶原纤维结构，从而形成与天然骨组织形貌更相似的微纳米复合梯度形貌，且前期体外实验证实该形貌能够促进成 rBMSCs 的多项生物学功能，但是涉及的具体机制目前还不完全清楚。因此，探明骨植入材料表面形貌对细胞及组织的影响机制，为研究骨植入材料对细胞及骨组织的影响提供研究思路，并最终为材料的表面优化设计提供分子生物学依据。

文献资料表明材料表面形貌导致的细胞形态改变与 rBMSCs 功能有很大的相关性，而细胞形态主要是由胞浆内部的细胞骨架系统来调控的^[3]。研究发现 Rho GTPases 信号与细胞骨架系统和整合素都密切相关，Rho GTPases 被认为是参与调节肌动蛋白细胞骨架合成和降解主要蛋白激酶，并且通过调控细胞骨架中肌动蛋白的收缩或者肌动蛋白和细胞膜的相互作用的方式调控整合素的聚集^[4]。因此探索 rBMSCs 在不同形貌表面 Rho GTPases 与细胞骨架的变化规律，是本课题探索材料表面形貌影响细胞功能分子机制的思路。伴随分子生物学的快速发展，人们发现 Rho GTPases 作为信号网络枢纽关键蛋白广泛参与调控胞内多种信号途经。其中，Wnt/ β -catenin 通路是 Rho GTPases 下游较为重要信号通路^[5]。虽然 Rho GTPases 在骨植入材料表面成骨细胞成骨分化中的研究较少，但是基于以上研究和我们前期的研究结果提出如下假设：材料表面微纳米形貌对 rBMSCs 整合素、细胞形态和细胞功能的影响源于 Rho GTPases 信号被激活。Rho GTPases 作为微纳米形貌调控 rBMSCs 形态和功能的核心蛋白分子，通过下游的 β -catenin 通路途经将表面形貌刺激传递到细胞核内，促进成

骨。

另外, Rho GTPases 作为通路枢纽关键蛋白, 不仅调控着 β -catenin 通路的活性, 也可调控 MAPK 通路的活性。Rho GTPases 家族主要成员 Rac1、Cdc42 和 RhoA 均能够激活 MAPK 信号成员之一细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 信号, Rac1 和 Cdc42 能激活 MAPK 信号另外两个成员—Jun 氨基末端激酶 (Jun amino-terminal kinase, JNK) 和 p38 MAP 激酶信号^[6]。由此可见也可能存在 Rho GTPases 作为微纳米形貌调控成骨细胞形态和功能的关键分子, 通过下游的 MAPK 信号途经将材料 面形貌刺激传递到细胞核内, 促进成骨。以上问题的阐明可以从分子水以上问题的阐明可以从分子水平揭示材料表面形貌影响骨形成的分子机制, 指导材料表面形貌的设计。

文献回顾

一、骨植入材料表面优化设计

1、骨植入材料表面纳米化技术

表面形貌是影响种植体骨结合周期和效率的重要因素之一。大量研究证实，纳米级表面形貌可以通过更有利的机械嵌合与细胞附着等优势加强材料植入的早期稳定性^[7-9]。目前比较常用的制备种植体纳米形貌技术主要有^[10, 11]：1) 表面化学处理，即为使用酸或碱与试样表面反应，形成试样表面纳米形貌，此方法骨植入材料表面修饰文献报道较多。2) 离子束辅助沉积 (IBAD)，即使用等离子注入技术和同步溅射技术，从而将涂层材料在金属材料表面形成薄膜沉积的表面修饰方法。3) 纳米颗粒紧压法，即通过较大的压强下把均匀大小的纳米颗粒紧紧地结合在材料表面的形貌制备方法。Webster 等研究发现该方法保留了试件材料化学成分，仅仅使其表面粗糙度和形貌发生了改变。4) 阳极氧化，即在恒定电流或电压的条件下，置于一定酸性反应溶液下，以钛试件为阳极，石墨等为阴极，进行一系列电化学反应，从而在试件表面形成一定形貌的二氧化钛氧化膜。5) 微弧氧化，即在高工作电压条件下，在钛试样表面获得一定形貌且厚度均匀的二氧化钛氧化膜。6) 分子自组装，即使用非共价键力让分子自发结合到具有一定特异性的试样表面，而结合的分子链末端组分布在试样最表面。通过在功能性末端组组装不同生物学作用的功能性分子来实现不同的生物学功能，此方法也是目前研究的热点内容。7) 溶胶-凝胶转化沉积，即通过金属化合物或其混合物溶胶凝胶固化原理获得钛金属表面纳米化形貌修饰构建，从而形成纳米涂层。

2、微纳米复合梯度形貌

虽然纳米形貌可通过更有利的机械嵌合与细胞附着等优势加强材料植入的早期稳定性，同时微米形貌也对材料植入的早期稳定性作用巨大。自然骨组织是一个由纳米级功能单元组装成微米级功能单元，然后再组装成宏观骨组织的梯度结构，骨组织中微米级和纳米级结构同时存在必有其合理性。因此，鉴于微米级和纳米级形貌对细胞和组织各自的优点，我们将两者合理的组合创新性制备出微米坑表面复合

TiO₂ 纳米管的微纳米复合梯度形貌。本课题组王薇等^[2]在前期实验研究中惊喜的发现该梯度形貌能够更好地促进原代大鼠成骨细胞的胶原分泌与矿化、促进 MG63 细胞系的成骨分化。

二、骨植入材料评价现状及存在的问题

目前骨植入材料研究存在的一个关键问题是对材料表面特性如微米级和纳米级形貌生物学作用的细胞学层面的研究较多^[12, 13]，而分子机制深入探索较少，这导致材料表面形貌设计无理论指导而更多地处于盲目的浅层次评价性研究状态，极大地阻碍了其合理设计与相关的临床应用。我们课题组前期基于微纳米形貌的研究和其他实验研究^[2, 14, 15]提示 β -catenin 与 MAPK 通路均参与介导骨植入材料表面形貌对成骨相关细胞功能的调控作用。但是，目前材料表面形貌是通过哪些关键的信号调控分子激活 β -catenin 和 MAPK 通路仍然还不清楚。

三、Rho GTPases 及其成骨密切相关的细胞信号通路

1、Rho GTPases

Rho GTPases，一种单亚基信号多肽，大量存在与真核细胞中，早在 1985 年就被研究发现，其后陆续发现其相关亚家族蛋白，在调控细胞形态与功能上具有重要作用。目前发现了 21 个 Rho GTPases 亚家族蛋白，其由 200 至 300 个氨基酸组成，蛋白分子质量分布范围为 21 至 30 kD 之间，主要分为 8 个不同的亚族，包括：Rho(A/B/C)；Rac(1/2/ 3)与 RhoG； Cdc42，Rho Q 与 Rho J； Rnd(Rnd1/Rnd6， Rnd2/RhoN， Rnd3/RhoE)； Rho D 及 Rho F； RhoBTB1 与 Rho BTB2； RhoV 与 RhoU； RhoH 等，其中研究最多的是 RhoA、Rac1 和 Cdc42。Rho GTPases 由于存在 GTP 酶活性,又常被称为 Rho GTP 酶，其可作为关键的信号转导分子,不仅可以通过上游效应蛋白如整合素、Wnt 蛋白受体、黏附分子受体等结合 GTP 或 GDP 后发挥分子开关作用，将胞外分子信号快速地传导至胞内，从而调控包括肌动蛋白细胞骨架调节等多项细胞生物学行为^[16]。

2、Rho GTPases 对细胞骨架调节作用

细胞骨架是主要指位于胞质内，两端连接于胞膜与核膜，由相互交织的网络状蛋白细丝（微丝、微管及中间丝）组成，主要参与保持细胞形态、调节细胞运动等相关细胞生物学过程，同时其也参与肌动蛋白形成的丝状伪足、板状伪足等胞外结构。Rho GTPases 控制肌动蛋白骨架，例如肌动蛋白被组装进入各种细胞结构中，也

广泛参与调节很多需要肌动蛋白参与的细胞活动，例如细胞形态、运动、黏附及收缩等，其中 Rho GTPases 家族具有最为重要的作用。其次，迄今的发现表明 Rho GTPases 主要的家族成员参与了建立不同类型的粘附结构，包括焦点复合物，粘附接点和紧接点。这些普通的特征提示这些特殊粘附复合物的形成为由 Rho GTPases 主导的细胞各种形态学和机械性能提供了一种可供解释的分子学基础^[16]。目前分子学技术的快速发展为 Rho GTPases 家族功能的研究提供了更多阐释机制的方法。Rho GTPases 主要的家族成员里研究最多的主要是 Cdc42、Rac1 及 RhoA。研究表明，根据 Rho GTPases 主要的家族成员对细胞的调节作用可大致分为三类^[17]：Cdc42 主要参与调控分布于运动细胞或神经细胞的细胞丝状伪足及介导靶蛋白 WASP 调节加强肌动蛋白聚合；Rac1 主要参与调控运动细胞板状伪足，Rac1 借助 IRSp53 靶蛋白激活下游蛋白复合体，引起细胞内新的肌动蛋白聚合，也可使质膜内的肌动蛋白丝脱帽，进而减少肌动蛋白丝解聚数量，调节肌动蛋白组装过程，促进片状伪足的形成；RhoA 主要参与调控张力纤维及细胞收缩，可借助抑制 cofilin 蛋白分子介导解聚肌动蛋白或刺激 PIP5K 蛋白激酶聚合 F-actin 作用于细胞骨架，调控细胞迁移，继而导致细胞中相关信号通路的级联反应激活膜突蛋白活性，重排细胞肌动蛋白，进而调控细胞张力纤维及细胞收缩。Rho GTPases 主要成员（RhoA、Rac1 和 Cdc42）通过以上三类方式调节细胞骨架，进而影响细胞生物学行为。细胞粘附到材料表面之后会快速形成丝状伪足和板状伪足并伴随着 Cdc42 和 Rac1 的激活，随着细胞的进一步伸展，大片的黏着斑和肌动蛋白张力纤维形成，在这过程中 RhoA 被激活，进而促进细胞内张力纤维和黏着斑的形成。在细胞骨架调节方面，Cdc42 与 Rac1 调节方向基本相同，但 RhoA 则可能存在相反的调节方向，Rac1, RhoA 之间可能存在依次激活^[18]。研究发现 Rho GTPases 也具有通过改变干细胞形态控制干细胞的分化方向和最终的骨形成与介导材料表面细胞骨架和细胞行为调控的能力^[19]。种植体表面形貌与加载到细胞表面的各种机械力一样都是通过机械力学传导机制将其表面的力学信息传递给细胞，而 Rho GTPases 信号又恰恰是调控骨组织对机械力反应的重要信号途经之一^[20]。事实上，Rho GTPases 信号也确实介导了材料表面形貌产生的力学刺激对细胞骨架和细胞行为的调控^[21, 22]。另外，大量的文献报道，Rho GTPases 与整合素和黏着斑复合体内信号分子有广泛的相互作用^[23]。细胞粘附到细胞外基质（ECM）是机械力传导的必要条件，在此过程中整合素的聚集和黏着斑复合体的成熟扩大起

到了主要的作用。Blomqvist 等指出在不同尺寸纳米管表面整合素 $\beta 1$ 亚单位表达不同, 在整合素 $\beta 1$ 表达较高的材料表面 BMSCs 的粘附与成骨分化更好^[24]。王薇等^[25]研究也发现含微纳米形貌试样表面增强了 Integrin $\beta 1$ 与 $\beta 3$ 的水平。

3、Wnt 信号通路

在发现 Wnt 信号通路过去几十年里, 在阐明调节 Wnt 信号的分子机制方面已经取得了很大的进展, 同时也确定了由特定的 Wnt 配体激活的具体分支^[26]。Wnt 信号通路蛋白家族由各种含半胱氨酸的糖蛋白组成, 主要对胚胎发育细胞或组织细胞等进行再生、干细胞多能性、细胞极性和迁移等多个方面的调控。Wnt 信号的多效性包括对有丝分裂原刺激的影响以及细胞增殖与分化^[27]。Wnt 配体结合卷曲受体形成共同受体, 继而通过一个上下游依赖的方式激活 Wnt 下游信号通路^[28]。目前至少确认存在两条 Wnt 通路, 其中一条主要通路是 Wnt/ β -catenin 通路, 涉及一些 Wnt 配体家族成员在细胞膜上结合 Frizzled 受体及 LRP5/6 受体, 形成的蛋白配合物称为“信号转导体”^[29]。信号转导体的形成激活了细胞内的几个动员蛋白质, 包括 Axin 和 GSK3 β 。如果缺乏 Wnt 配体, 由 Axin, APC 及 GSK3 β 组成的复合体可通过磷酸化和泛素化降解 β -catenin 蛋白^[30]。如果存在 Wnt 配体, 该复合体则被诱导转移至胞浆内膜上, 在胞浆内膜上促进 β -catenin 蛋白合成。新合成的 β -catenin 蛋白入核, 从而导致靶基因转录及 TCF/LEF 家族成员转录因子被激活^[31]。一些蛋白调节在细胞外调节 Wnt / β -catenin 信号通路, 包括 Dickkopf 家族 (Wnt / β -catenin β 信号通路抑制剂) 和 R-Spondin 蛋白家族 (Wnt / β -catenin 信号通路激动剂)^[32, 33]。另外一条公认的 Wnt 通路即其另一个重要分支, 通常定义为“非经典 Wnt 信号通路”, 独立于经典 Wnt / β -catenin 通路, 但下游通路与经典 Wnt 通路有一些交替和重叠^[34, 35]。非经典 Wnt 通路主要参与胚胎发育, 主要包括 Wnt/PCP 信号通路、细胞内钙离子的释放和转运等, 涉及第二组相互作用的 Wnt 配体与 Frizzled 受体及一些共同受体, 其中包括 Strabismus/ Vangl2, RYK, Ror2, PTK7, 其可激活部分细胞内的蛋白质, 包括 JNK、CaMK 和其他蛋白^[36]。与 Frizzled 受体结合的支架蛋白 Dishevelled是在 Wnt 信号通路发挥作用的胞内支架蛋白。例如, 支架蛋白 Dishevelled 与 Axin 在一起形成可以与之交互的大量细胞膜受体。反过来, Axin 结合 LRP5/6, 从而通过 GSK3 β 和 CK1 γ 使 LRP6 磷酸化^[37]。因此, 支架蛋白 Dishevelled是 Wnt 通路上下游的一个关键组成部分。

4、Rho GTPases 参与调控 Wnt/ β -catenin 信号通路

Rho GTPases 本身位于多条通路的上游，尤其与成骨密切相关的 Wnt/ β -catenin 通路关系密切。由于 Wnt/ β -catenin 通路途经在促进成骨与抑制骨吸收方面的双重作用，使得干预 Wnt/ β -catenin 信号来调控成骨已成为研究热点。Rho GTPases 联合 Wnt/ β -catenin 通路广泛参与调节增殖、成骨分化及细胞极性等多种细胞过程。Rho GTP 酶激活 Wnt/ β -catenin 通路的功能性角色已经在以往基因小鼠模型研究中被证实。Van Hengel 等^[38]提供的实验证据表明，编码 Rho gtpase-cdc42-induces 小鼠慢性肝损伤和肝肝癌基因缺失将导致不能成功激活 Wnt 信号，由 GSK3 β 、APC 和 Axin 组成的复合体磷酸化的 β -catenin 经蛋白酶体途径降解，不能转位入核启动靶基因的表达。最近的研究发现材料表面形貌的不同能引起 Wnt 通路活性的改变。Carlo Galli 等^[39]发现酸蚀和喷砂形成的粗糙钛表面 Wnt/ β -catenin 通路活性增强，进而通过对细胞信号转导调控来调节 rBMSCs 的成骨分化。在 TiO₂ 纳米管表面，Yu 等^[40]采用基因芯片技术发现 β -catenin 是调控成骨细胞 MG63 功能分化中心蛋白分子。王薇等研究证实材料表面微纳米形貌可通过改变 Wnt 蛋白的分泌水平激活下游 Wnt/ β -catenin 通路，促进成骨分化^[2]，但材料表面形貌激活和调控 Wnt 通路的具体分子事件还尚未可知。研究发现^[41]，Rho GTPases 成员 Cdc42 将降解复合体中的 GSK3 β 磷酸化，促使降解复合体解体，释放出 β -catenin 蛋白，使得 β -catenin 蛋白浓度在胞浆内累积，进而得以转位入核调控基因表达。因此，在以上文献回顾基础上，我们有理由推测 RhoGTPases 成员 Cdc42 可能在微纳米形貌表面被激活且参与了下游 Wnt 通路的调控。

5、MAPK 信号通路

分裂素激活蛋白激酶 (MAPK) 是一类广泛分布于胞浆中的蛋白激酶家族，主要成员包括 ERK、JNK 及 p38，其参与一系列胞外刺激的过程及影响细胞的行为，例如环境应力、生长因子和细胞因子等。在某些情况下，分裂素激活蛋白激酶 (MAPK) 常作为细胞内信号通路集线器在其中不同的细胞信号通路激活上下游信号分子，发挥协调作用^[42] 传统 MAPK 家族成员具体包含 ERK1/2、ERK5、JNK1 / 2 / 3、p38 α 、p38 β 、p38 γ 及 p38 δ ，由一系列磷酸化功能单元构成并对下游的非磷酸化分子起到关键作用。所以，一旦外界刺激细胞、MAPKK kinases (MAP3K) 被激活并同时磷酸化激活 MAPK kinases (MAP2K)，反过来 MAPK kinases (MAP2K)

磷酸化和激活 MAPKs。每条 MAPK 信号通路拥有自己独立系列上游激活分子并代表一个特定的信号级联^[43]。MAPK 酶家族早在二十年前就被证实在骨骼发育和骨骼的动态平衡，特别是影响成骨细胞形态与分化起到关键性作用。在经典的 MAPK 信号通路中，已经有大量科学证据证实 p38、JNK 和 ERK 活性对成骨相关细胞骨架起到决定性作用^[42-44]。值得注意的是，目前已有大量体内和体外研究的论文报道，p38、JNK 和 ERK 在从 rBMSCs 分化为成骨细胞的形态改变与分化过程具有重要作用^[43]。MAPK 特异性抑制剂可以通过细胞定向敲除等方式来研究 MAPK 信号通路上下游分子间特定的因果关系，为成骨相关细胞骨架与成骨分化机制提供了一些途径。因此，其发现和使用促进了这一领域研究进展。

(1) p38-MAPK 信号通路

p38 MAPK 家族由四种蛋白构成，分别是 p38 α （由 Mapk14 基因编码）、p38 β （MAPK11）、p38 γ （MAPK12）及 p38 δ （MAPK13）。p38 MAPK 家族编码基因具有明显的组织分布，并在不同组织间出现差异表达，其中 Mapk14 最高表达。p38 MAPK 是 MAP2K（MKK6，和 MKK3，MKK4）信号通路下游分子。MAP2K（MKK6，和 MKK3，MKK4）主要依赖于外界刺激和细胞类型激活下游 p38 MAPKs。活化下游 p38 MAPK 信号通路的 MAP3Ks 信号分子主要有 ASK1、DLK1、TAK1、TAO1、TAO2、TPL2、MLK3、MEKK3、MEKK4 和 ZAK1。p38 α 可以通过 ZAP70、p56^{lck}、TAB1 激活而自身磷酸化或下调 Cdc47。众所周知，一些上游复合物分子通过 MAPK 通路可促进 MAPK- MAP2K 分子相关作用或局部增加 MAPK 通路级联效应浓度，从而达到对信号通路精确的时间空间调控^[45]。与此功能相关的分子最常见属于 JIP 蛋白质家族（从 c-Jun 氨基末端激酶相互作用的蛋白），可将 p38 和 JNK 与上游 MAP2K 结合。JLP 蛋白质家族（JIP4 亚型、SPAG9 和 JIP2）通过 MKK3，MEKK3 和 MKK4 结合调控 p38。有相关研究结果表明 MKK3 或 MEK1 激活 BMP 诱导成骨，可能是由于这些 JLP 支架蛋白的作用在调节 MAP2K 分子行为。除了 JLP 支架蛋白，还有其它潜在的 MAPK 信号通路支架蛋白质分子，例如 RACK1、KSR-2、sec8 和 Rac-MEKK3-MKK3（OSM）。除了上述这些 MAPK 支架蛋白分子，Mapk8ip2（JIP2）在细胞骨架发育中被发现，同时在骨细胞中与 JIP4 结合的 Exoc4（Sec8 蛋白）发现有表达。除了上述蛋白分子 TAK1 与 TAB1 可能也被认为是一种支架蛋白，其有助于召集和激活上游 p38 信号通路分子。在体内成骨分化研究中，MAPK 骨架蛋白的作

用已经得到证实。p38 MAPKs 的抑制主要通过某些磷酸酶（DUSP 酶家族）去磷酸化作用^[43]。此外，根据在信号通路激活循环中苏氨酸或酪氨酸残基被磷酸化的数量调控催化活性 p38 α 。与其他相关支架蛋白分子相似，p38 也是通过乙酰化，蛋白质降解和稳定因子等机制进行调控，同时在其编码基因上出现表达的明显变化。p38 α 主要存在于胞核和胞质中。当 p38 不存在细胞核定位信号时，p38 α 定位主要依赖于激活和激活相关分子转移。众所周知，DNA 损伤有利于磷酸化和核 p38 α 积累，可能通过释放来自于 TAP1 或 MK2 的 p38 α 作为胞浆锚。

(2) JNK-MAPK 信号通路

MAPK 作为高度保守的蛋白激酶，其相关通路在真核细胞中通过 MAPKKK、MAPKK 及 MAPK 的连续磷酸化进行信号转导。MAPK 亚家族在哺乳动物细胞中已被克隆和鉴定，其中包括 JNK1 / 2 / 3，其上游激酶的活化后，不同信号分子通过多个转录因子及酶进行调控细胞的炎症、应激、生长及分化等过程^[46]。JNK 最早被确定为 SAPKs 激酶，并在小鼠肝脏与放线菌酮一起诱导炎症。由于与 c-Jun 磷酸化活性相关转录因子，更名为 JNK。在真核细胞中 JNKs 有三种基因编码表达分子 JNK1、JNK2 和 JNK3。其中，JNK1 和 JNK2 在体内广泛表达而 JNK3 仅在大脑、心脏和睾丸细胞中表达。JNK 可由一些因素激活，包括紫外线和氧化应激，从而诱导细胞凋亡或生长抑制。MKK4 和 MKK7，即 JNK 信号通路上游激酶（MAP2K）可被上游不同 MAP3K 分别激活。一旦 MKK4 和 MKK7 被激活，JNKs 即可从胞浆转移至细胞核内。JNK 信号通路下游目标包括 c-Jun，在 JNK 磷酸化后 c-Jun 进入细胞核。c-Jun 被众所周知是因为其可以调控凋亡或抗凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 的表达^[47]。一旦被激活，JNK 将磷酸化丝氨酸残基 63 与 73，从而激活 c-Jun 氨基末端 c-jun，继而增强其转录活性。有研究报告^[48]表明除了激活关系外，JNK 和 c-Jun 之间联系较为稳定。从目前的研究来看，JNK 在成骨功能中的作用似乎有些矛盾，发现不同的研究其功能作用不同。例如，IL-1 β 和 TNF α 有助于 JNK 激活，这作用是人骨膜成骨细胞分化的决定因素。此外，有研究发现^[49]用化学抑制剂或 siRNA 抑制 JNK 信号途径可导致成骨相关细胞矿化的减少和一些成骨标志物的下调，而 JNK 信号途径的激活来自于成骨相关细胞形态诱导成骨。这些影响至少部分是由于减少 SMAD6 结合 BMPRI (BMP 受体 I) 引起的，同时 BMPRI 使得 SMAD1 结合相关下游受体。然而，在另一方面 JNK 的激活可能对调控成骨的影响是负面的。在 Ser104 磷酸化过程中，JNK1 减少

了 Runx2 转录。此外，在 BMSCs 中，JNK 抑制剂（SP600125）增强了 BMP-2 诱导的 ALP 活性。上述抑制作用也可能作用于 SMAD1 通路，因为在 GSK3 β 诱导 SMAD1 降解的过程中，MAPK 磷酸化对于 GSK3 β （糖原合酶激酶 3 β ）是十分必要的。

（3）ERK-MAPK 信号通路

表达于成骨细胞的 ERK1 和 ERK2 有骨代谢相关功能。有遗传学证据证实 ERK 通路在成骨诱导发挥关键性作用^[50]。首先，在骨钙素启动子（mog2: mek1dn）的调控下 MEK1 显性负表达可致颅骨和锁骨的缺陷，从而通过这种方式来模拟 Runx2 缺陷表达。Runx2^{+/-}表型的恢复可通过交叉这些突变小鼠的基因活性形式 MEK1（mog2: tgmek1sp）^[63]。同时也发现了双突变体 ERK1^{-/-}和 ERK2^{prx1: Cre}，ERK1 和 ERK2 对成骨细胞分化中起到了积极作用，并对软骨细胞具有 MAPKs 抑制作用。此外，ERK 对细胞中 RANKL 具有一定的作用及对破骨细胞活化也有影响。ERK 在成骨细胞中可促进 Runx2 磷酸化已被广泛研究。首先，利用 MEK1 抑制剂（PD98059）阻断 Runx2 诱导的骨钙。另一 MEK1/2 抑制剂（U0126），阻止骨钙素和 BMP7 和抗坏血酸介导的 Ibsp 表达^[64]。此外，FGF 激活 pERK，并随后磷酸化的 Runx2 基因表达^[51]。再次，以上这些通路均可被 MEK1/2 抑制剂（U0126）阻止。最后，四种丝氨酸残基（Ser43、Ser301、Ser319 和 Ser510）在实验中被证实同时存在。通过 ERK1/2 目标。Ser301 和 Ser319 被发现在 Runx2 激活起到一定作用。ERK 诱导的 pRunx2 转录活性的增加可能是由于 p38 磷酸化中的辅助因子如 CREB 结合，CBP/p300 或维生素 D 受体。与此有关，胞质中 ERK 量的提高可能与在核跨膜糖蛋白 CD99 上过度表达 Runx2 增量有关，这恰巧证实 Runx2 磷酸化发生在胞质中^[52]。NF1（神经纤维瘤 I 型）是一个 GTP 酶激活蛋白，可关闭 ERK 信号通路传导中的 RAS 功能。根据不同的发展状态这个失活突变的 NF1 可能有不同的结果。事实上，对 NF1 突变分析表明，当 U0126 抑制 ERK 后，BMP-2 表达反而增强。除了成骨分化，ERK 也参与其他相关的细胞活动，例如 CyclinD1、PTH 和 PTHrP 增强及有利于成骨细胞增殖。最近研究成果表明 ERK 调控 EGF 的抗凋亡和增殖作用。

6、Rho GTPases 参与调控 MAPK 信号通路

研究表明，MAPK 的三个成员均参与了成骨分化、活化成骨重要转录因子如 Runx2 和 Osterix 促进成骨^[42-44]。近年来种植体表面形貌调控细胞信号转导通路的研究渐渐受到生物材料研究者的注意，初步的研究发现 MAPK 通路在细胞对种植材

料的反应中发挥作用。Hamilton 等与王薇等^[2, 25, 53]均发现微米级形貌或微纳米形貌调控 ERK1/2 的磷酸化和胞核转移及成骨分化。由此可见，材料表面 MAPK 信号活性与成骨细胞的功能表达水平关系重大，但是材料表面形貌具体是通过何种分子途经介导和调节 MAPK 信号活性的，目前仍是个未解之谜。事实上，Rho GTPases 作为信号开关分子，是 MAPK 系统上游极为重要的信号转导分子之一。Ras 作为 Rac1 的上游信号分子，能够同时激活 Rac1 和 ERK 信号。Rac1 和 Cdc42 都能够激活 JNK 和 p38 信号。RhoA 参与整合素激活 MAPK 信号和黏着斑激酶信号 (focal adhesion kinase, FAK) ^[6]。所以，我们认为种植体表面 Rho GTPases 是激活与调控 MAPK 信号的关键蛋白分子，参与介导成骨相关细胞对微纳米形貌的生物学反应。

综上所述，基于课题组王薇等发现的基础上，针对目前微纳米形貌影响细胞形态和功能的机制仍不明确现状，我们提出了微纳米形貌调控成骨细胞的可能机制：微纳米形貌通过激活 Rho GTPases 成员 Rac1, Cdc42 和 RhoA 引起细胞骨架变化；Rho GTPases 一方面通过成员 Cdc42 磷酸化 GSK3 β 阻止 β -catenin 胞浆内降解，使 β -catenin 在胞浆内累积并转位入核，上调 β -catenin 信号活性；另一方面通过 Rac1, Cdc42 和 RhoA 分别激活 MAPK 信号，这两方面信号传递入核共同促进成骨细胞的功能。本实验主要对以上推测进行验证。

正文

第一部分 试样表面形貌制备分析与

rBMSCs 培养鉴定

虽然目前成品生产的种植体骨结合较好，但骨结合周期较长，难以满足早期或即刻修复，所以缩短种植体骨结合周期是目前种植体研究的热点。在缩短种植体愈合周期，获得早期和更高的骨结合强度的多种途径中，骨植入材料材料表面微纳米仿生优化被认为是一种具有较大研究前景的方法。本研究中纯钛表面微纳米形貌首先通过酸蚀形成微米坑形貌而后阳极氧化方法制备出纳米管结构形成微纳米复合梯度形貌。骨髓间充质干细胞 (Bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMMSC), 即动物骨髓内存在的一种非造血干细胞，大鼠骨髓来源称为 rBMSCs 细胞。rBMSCs 来自中胚层间充质，主要作用为支持和调控成骨，其可分布于多种组织与器官，具有成骨、成脂等多向分化能力，是成骨类实验常用细胞。

在本实验中，选用纯钛方形试样 (10.0*10.0*1.0mm)，将其表面通过 HF 酸酸蚀及阳极氧化方法构建出纯钛试样表面微纳米复合梯度形貌并对其表面结构与性状分析，为后续实验研究提供材料学方面的参考与依据。同时，为保证实验后续进行，需将原代培养的 rBMSCs 进行体外纯化与鉴定，以获取足量实验需要的符合标准的 rBMSCs。

1 材料、试剂和仪器

10.0mm*10.0mm*1.0mm 方形纯钛试样 (西北有色研究院); 增强型碳化硅砂纸 (STARMM, 德国); 无水酒精 (山东淄博丹阳化工厂); 丙酮溶液 (山东淄博丹阳化工厂); 24 孔培养板 (美国 Nunc 公司); 96 孔培养板 (美国 Nunc 公司); HF 酸 (山东淄博丹阳化工厂); 去离子水 (山东淄博丹阳化工厂); 阳极氧化仪器 (MQ119, 深圳市日欣设备厂); 场发射扫描电子显微镜 (S-4800, 美国 BRANSONIC 公司);

一周龄 SD 大鼠（动物中心）；酶标仪（美国 BioTek 公司）； α -MEM 培养基（美国 Hyclone 公司）；胎牛血清（美国 Sigma 公司）；胰蛋白酶（美国 Sigma 公司）；青霉素/链霉素（美国 Sigma 公司）；L-谷氨酰胺（美国 Sigma 公司）；0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸（EDTA）（中国碧云天公司）；L-抗坏血酸(Vc)（中国碧云天公司）；地塞米松（Dex）（中国碧云天公司）； β -甘油磷酸钠（ β -GP）（中国碧云天公司）；吡啶美辛（中国碧云天公司）；3-异丁基-1-甲基黄嘌呤（IBMX）（中国碧云天公司）；油红 O（中国碧云天公司）；CCK8 试剂（美国 Sigma 公司）；碱性磷酸酶染色试剂盒（美国 Sigma 公司）；天狼星红/苦味酸染色试剂（中国碧云天公司）；茜素红染色试剂（美国 Sigma 公司）；HERACELL 细胞培养箱（美国 BRANSONIC 公司）；倒置相差显微镜（CK40-F200，日本 Olympus 公司）；体视显微镜（美国 BRANSONIC 公司）；超声波振荡清洗设备（TY250B，美国 BRANSONIC 公司）；原子力显微镜（SPM-9600 日本 Shimadzu 公司）；接触角测量仪器（EasyDrop Standard，德国 KRUSS 公司）。

2 实验方法

2.1 试样表面构建

具体制备方法如图 1.0 所示，先将纯钛方形试样（10.0*10.0*1.0mm），使用德国进口砂纸逐级从 800 目抛光至 10000 目。将上述部分镜面抛光试样作为光滑组（S）。将试样放入 0.5wt% HF 酸中浸泡酸蚀 30 分钟，均匀搅拌酸蚀液促使酸蚀表面均匀一致形成微米坑形貌，将其中部分作为微米组（R）。上述酸蚀处理剩余部分试样在 0.5wt% HF 和 1M H₃PO₄ 电解液中通过 5V 电压下阳极氧化作用 60 分钟，使其在微米坑形貌表面形成管径 30nm 纳米管阵列，将次部分试样作为 5V 微纳米管组（R5）。上述酸蚀处理剩余部分试样在 0.5wt% HF 反应液中通过 20V 电压下作用 30 分钟，使其在微米坑形貌表面形成管径 100nm 纳米管阵列，将次部分试样作为 20V 微纳米管组（R20）。超声振荡清洗 30 分钟，其后在室温下干燥，送 Co60 照射中心进行封存消毒备用。

2.2 试样表面结构与性状分析

2.2.1 试样表面微纳米形貌观察

使用 SEM 观察 S、R、R5 及 R20 组试样表面微纳米形貌，其 SEM 显微镜放大

倍数分别为 200×与 100000×。

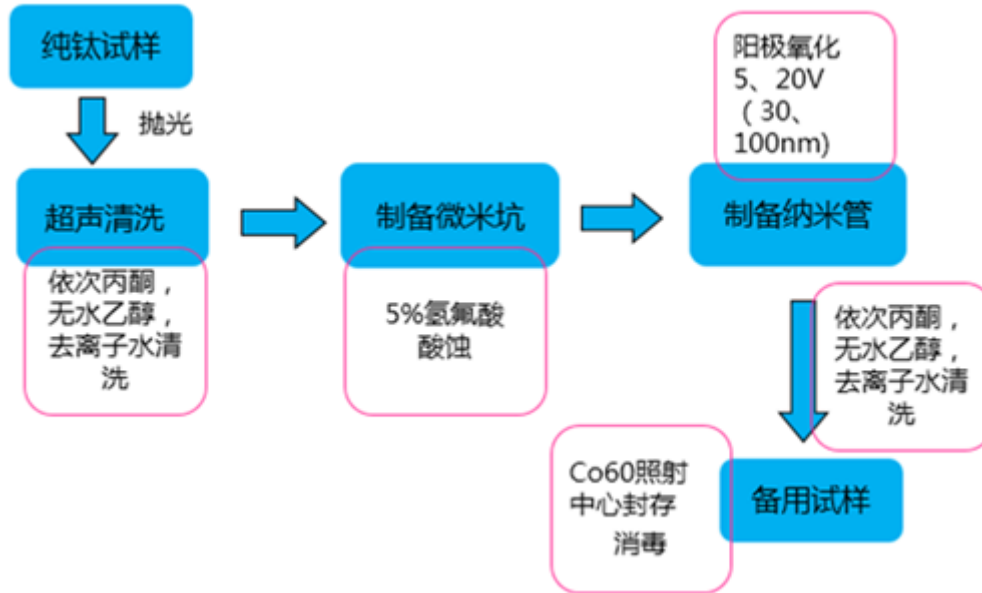


图 1.0 微纳米形貌制备流程图

2.2.2 表面形貌粗糙度分析

使用 AFM 观察形貌，并检测粗糙度（算术平均粗糙度 Ra 与轮廓最大高度 Rz）。

2.2.3 试样表面接触角测量

通过接触角测量仪器（EasyDrop Standard，德国 KRUSS 公司）注射管将去离子水滴在 S、R、R5 及 R20 组试样表面，使用接触角测量仪器显微镜采集液滴接触试样表面 10 秒后图像，用 DSA1 专用软件分析接触角测量数据。每组 6 个试样测量值取平均值。

2.3 rBMSCs 原代培养

首先将 1 周龄健康 SD 大鼠通过脱颈处死，在实验中心超净工作台无菌环境下用手术器械在底部放置冰袋的无菌培养皿中剥离出大鼠股骨和胫骨，眼科剪切断股骨与胫骨两端，培养液反复多次冲洗髓腔，至其变白，收集液体离心 5 分钟，去上清，加培养液重悬接种培养瓶培养。3 天后半换液，并观察细胞情况；5 天后全换液，培养 7-10 天左右，rBMSCs 呈比较均匀的成纤维细胞样，贴壁生长至长满 90% 左右传代。一般可按照 1:3 或 1:4 进行传代培养。rBMSCs 传代方法如下：去掉废液，加

入 PBS 液漂洗，加入胰蛋白酶消化至细胞凸起缩微为圆形时，加入等量培养液终止消化，收集消化液于离心后重悬接种于 3-4 个培养瓶中。

2.4 rBMSCs 鉴定

2.4.1 细胞生长曲线测定

将 3 代纯化 rBMSCs 稀释浓度到 5×10^3 个/毫升，应用细胞计数板进行计数，按 200 微升/每孔细胞接种 96 孔板，分 12 组 \times 8 个孔培养。从接种后第一天开始每日取 1 组（8 孔），去除废液，每孔加 100 微升培养液及 10 微升 CCK8 溶液孵箱内培养 3 小时。另取 96 孔培养，从原 96 孔板培养板添加 CCK8 孔中吸取 100 微升溶液至新 96 孔板中，用酶标仪在 450 nm 波长处检测 OD 值，计算均值，用 GraphPad Prism 6 软件绘制生长曲线（横坐标为天数，纵坐标为均值）。

2.4.2 克隆形成

将 3-4 代纯化 rBMSCs 稀释浓度到 0.1×10^3 个/毫升，接种至直径 100 毫米培养皿培养。每 2 天培养液全换液 1 次。培养至第 14 天终止，使用浓度为 2.5% 的戊二醛溶液固定 10 分钟，而后加入 8 毫升浓度为 0.1% 甲苯胺蓝染色剂进行 10 分钟染色，PBS 溶液反复漂洗 3 次，体式显微镜下对 rBMSCs 细胞克隆形成情况。

2.4.3 成脂诱导分化

将 3-4 代纯化 rBMSCs 稀释至 5×10^5 个/毫升/孔接种，待 rBMSCs 贴壁生长、融合达到 80% 左右时，添加 1 毫升/孔的成脂诱导液（含 5% 胎牛血清的 α -MEM 培养基，100 nM 地塞米松(Dex), 0.01 mg/ml 胰岛素, 0.5 mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx), 50 mM 吡哆美辛, 50 μ g/ml 的 L-抗坏血酸(Vc)) 诱导 2 周，每 3 天更换诱导液 1 次。2 周终止培养，戊二醛溶液固定 10 分钟，而后加入 1 毫升油红 O 染色剂进行 10 分钟染色，漂洗 3 次，体式显微镜下对 rBMSCs 脂滴形成情况观察拍照。

2.4.4 成骨诱导分化

将 3-4 代纯化 rBMSCs 稀释至 5×10^5 个/毫升/孔接种，待 rBMSCs 贴壁生长、融合达到 80% 左右时，加入成骨诱导液（含 5% 胎牛血清的 α -MEM 培养基，50 μ g/ml L-抗坏血酸(Vc), 10 mM β -甘油磷酸钠 (β -GP), 100 nM 地塞米松 (Dex)) 进行培养，每 3 d 更换诱导液 1 次。其中部分细胞成骨诱导 1 周终止培养，使用浓度为 2.5% 的戊二醛溶液固定 10 分钟，碱性磷酸酶试剂盒染色，体式显微镜下对 rBMSCs 碱性磷酸酶形成情况观察拍照；其余 rBMSCs 继续诱导至 4 周后终止培养，使用戊二醛溶

液固定 10 分钟，茜素红染色剂染色后体式显微镜下对 rBMSCs 矿化情况观察拍照。

2.5 统计学分析

以上数据使用均数 \pm 标准差描述，统计分析采用 SPSS 21.0 统计学软件，制图采用 GraphPad Prism 6 软件。使用 ANOVA 和 LSD(L)检验各组之间差异， $p<0.05$ 作为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 试样表面微纳米形貌

SEM 放大倍数 200 \times 下可见抛光纯钛组 (S) 相对比较光滑，表面仅含有相对平行的较为细小的沟纹与划痕，而微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 试样表面呈现为高低不平，且分布较为均匀的坑洼状微米坑形貌。放大倍数 100000 \times 下，可见抛光纯钛组 (S)、微米组(R) 试样表面均没有纳米管结构形貌，但 5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 试样表面明显可见分布相对均匀的纳米管结构，其管径平均约为 30nm 和 100nm (图 1)。在实验中，通过增大阳极氧化电压方式，增大钛表面纳米管结构的管径与管壁，进而制备试样表面不同管径的纳米管结构。

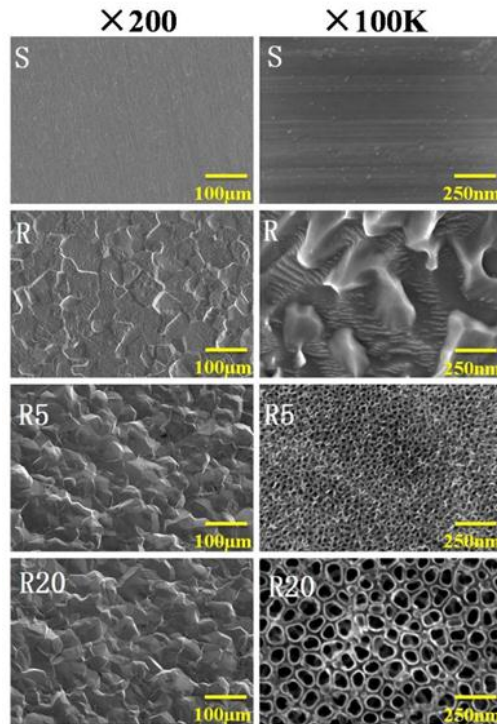


图 1.1 抛光纯钛组 (S)、微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 试样扫描电镜照片。放大倍数分别为 200×和 100000×

3.2 表面形貌粗糙度分析结果

AFM 检测各组试样表面微纳米形貌表面粗糙度。观察结果如图 1.2 所示：抛光纯钛组 (S) 表面相对较为平坦；5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 表面存在较为均匀的微小凸起，且两组间差异较小。相对于 5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20)，微米组(R) 表面凸起较为明显。各组试样表面微纳米形貌表面在 AFM 微观表现与 SEM 扫描电子显微镜下观察的大致形貌基本一致。检测试样表面粗糙度的参数较多，此次实验选择了两个最常用的粗糙度参数 Ra（轮廓算术平均偏差）与 Rz（轮廓最大高度）进行评价。试样表面粗糙度与微纳米形貌密切相关，基本趋势一致。抛光纯钛组 (S) 表面粗糙度最小，5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 表面粗糙度较大，微米组(R) 表面粗糙度最大。

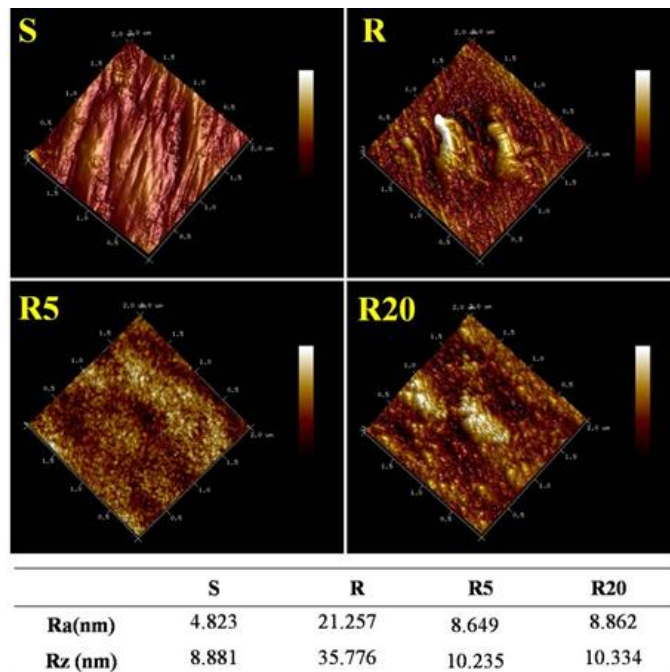


图 1.2 抛光纯钛组 (S)、微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 试样表面 AFM 微纳米形貌与表面粗糙度

3.3 试样表面接触角测量结果

使用接触角测量仪器显微镜采集液滴接触试样表面 10 秒后图像如图 1.3 所示，S、

R、R5 及 R20 组试样表面接触角测量值平均值由 58.6° 逐渐降到 3.8°。

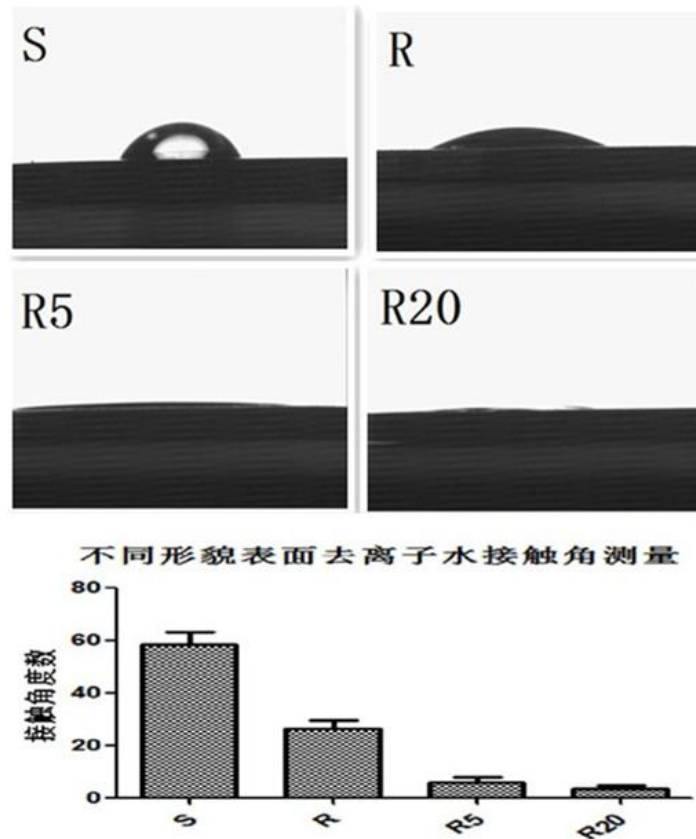


图 1.3 抛光纯钛组 (S)、微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 试样表面亲水性观察与接触角检测

3.4 rBMSCs 原代培养

采用全骨髓细胞贴壁法对 rBMSCs 进行原代培养。如图 1.4 所示，初接种的 rBMSCs 一般悬浮于培养液中，1 小时后逐渐贴壁生长，1 天后细胞基本贴壁生长，且较圆。置于 37°C 5%CO₂ 环境下的孵箱中培养 3 天，显微镜下可见部分细胞呈成纤维细胞样，但部分杂细胞仍呈类圆形状，即可进行首次全换培养液。置于孵箱中培养 5 天，rBMSCs 开始集落，且大多数细胞呈成纤维细胞样，其中仍有少量杂细胞。置于孵箱中培养 7 天，杂细胞基本消除，rBMSCs 呈比较均匀的成纤维细胞样，贴壁生长至长满 90% 左右即可进行传代培养。继续传代得到 2-4 代纯化 rBMSCs，纯化的 rBMSCs 呈均一的成纤维细胞样，旋涡状或辐射状排列。

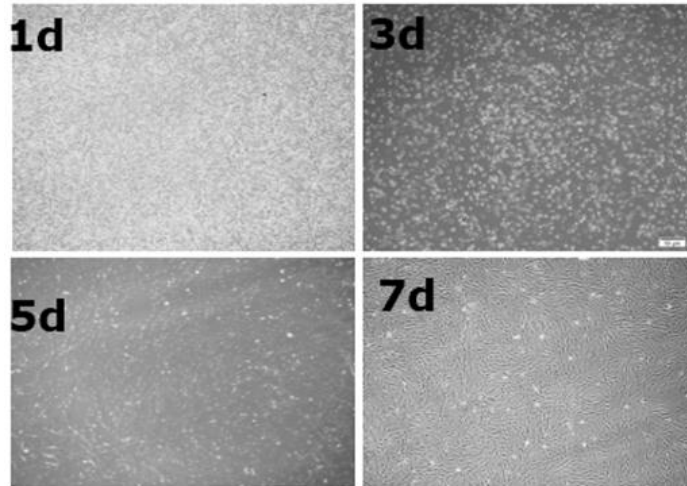


图 1.4 骨髓间充质干细胞原代培养

3.5 细胞生长曲线测定

使用 CCK8 方法检测 rBMSCs 生长曲线。如图 1.5 所示, rBMSCs 生长曲线呈“S”形, 其中第 1~2 天生长较为缓慢, 从第 3 天起进入对数生长期并在细胞生长第 8 天达到峰值后进入平台期。

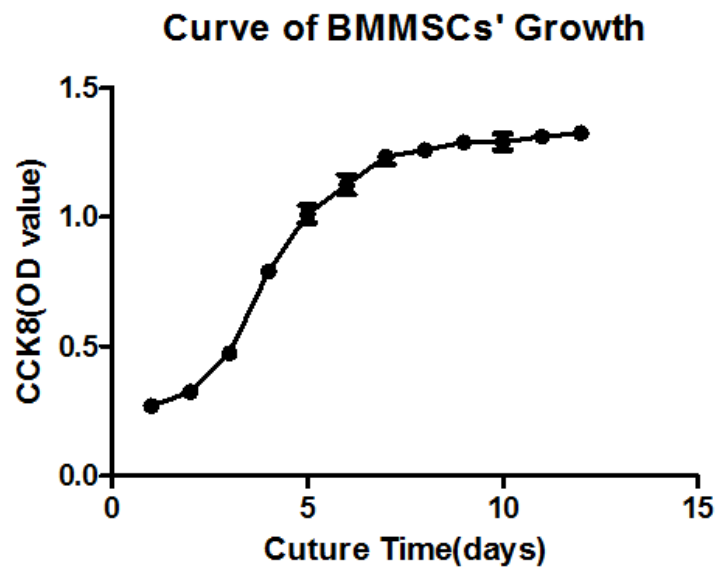


图 1.5 第 3 代骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 的生长曲线

3.6 克隆形成及多向分化潜能

将 3-4 代纯化 rBMSCs 稀释浓度到 0.1×10^3 个/毫升, 接种至培养皿培养 14 天,

明显可见集落样生长的细胞克隆团块(图 1.6-A)。将 3-4 代纯化 rBMSCs 稀释至 5×10^5 个/毫升, 成脂诱导分化 2 周后, 油红 O 染色, 显微镜下可见 rBMSCs 内及细胞间广泛分布着不均匀的红色脂滴(图 1.6-B)。成骨诱导 1 周碱性磷酸酶试剂盒染色, 体式显微镜下可见细胞内蓝色结晶(图 1.6-C)。成骨诱导 4 周茜素红染色剂染色, 体式显微镜下可见形成明显不规则大小的红色矿化结节(图 1.6-D)。

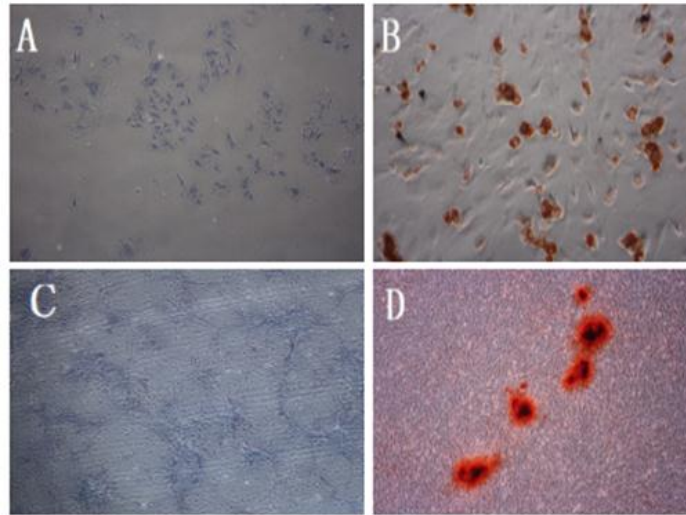


图 1.6 骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 克隆形成及体外多向分化潜能鉴定

4 讨论

虽然目前成品生产的种植体骨结合较好, 但骨结合周期较长, 难以满足早期或即刻修复, 所以缩短种植体骨结合周期是目前种植体研究的热点^[1]。在缩短种植体愈合周期, 获得早期和更高的骨结合强度的多种途径中, 骨植入材料材料表面微纳米仿生优化被认为是一种具有较大研究前景的方法。由于微米形貌和纳米形貌的各自具有的生物学特点, 本实验中首先通过酸蚀的方法在纯钛表面形成微米坑形貌以模拟骨的天然粗糙度, 再阳极氧化制备出管径精密可控的 TiO₂ 纳米管结构, 以模仿骨组织的胶原纤维结构, 从而形成与天然骨组织形貌更相似的微纳米复合梯度形貌^[54-56]。TiO₂ 纳米管是在各种纳米结构的制备中设备和方法都较简单并且制备的的纳米结构均匀整齐, 可精确控制其纳米管直径与长度, 其制备也受到氢氟酸浓度、反应液组分、电压高低及作用时间等多个条件影响。而本实验主要依靠调节电压进行对纳米管直径的控制^[57]。本实验中通过在氢氟酸酸蚀后在 5V 与 20V 电压下进行阳极氧化反应从而制备出直径分别为 30nm 与 100nm 的纳米管结构, 作为本实验的 5V

微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20)。有研究表明以上方法制备出的钛表面纳米管由 TiO_2 和极少量残留的氟组成。Park 等^[57]研究证实 rBMSCs 细胞生长不受钛表面 TiO_2 纳米管处理残留的低浓度氟影响。在扫描电子显微镜下可见微纳米形貌的试样表面有质地均匀的纳米管结构, 其直径平均约为 30nm 和 100nm。在原子力显微镜下可见微纳米形貌的试样表面相对于光滑表面存在较为均匀的微小凸起, 其微观表现基本与扫描电子显微镜下形貌一致。接触角实验证实制备的微纳米形貌接触角测量值远小于对照组, 亲水性也更好。提示此次实验制备的试样符合具有纳米结构均匀整齐, 可精确控制 TiO_2 纳米管的微纳米形貌要求。

rBMSCs 是多能干细胞之一, 具有增殖、自我更新、分化潜能等多向能力。rBMSCs 也是常用的评价材料成骨功能的多能干细胞。目前 rBMSCs 体外分离培养方法主要有: 密度梯度离心法、全骨髓贴壁法等多种方法。从目前文献研究来看, 全骨髓贴壁培养法因其操作简便、纯度较高而使用较为广泛。全骨髓贴壁法主要通过添加培养液使 rBMSCs 贴壁生长的方式提取动物全骨髓中的 rBMSCs^[58, 59]。在本实验中, 通过 CCK8 方法测量的细胞生长曲线, 表明提取的细胞是具有增殖与自我更新能力的。通过克隆形成集落形成情况可知提取的细胞具有增殖与群体依赖能力。将提取的细胞成骨诱导后进行 ALP 染色发现出现大量碱性磷酸酶颗粒, 茜素红矿化染色出现红色钙化结节, 证实提取的细胞具有一定的成骨分化潜能。同时进行成脂诱导后油红 O 染色出现红色脂滴, 提示提取的细胞也具有成脂分化潜能。

综上所述, 本实验通过阳极氧化反应制备的均匀、尺寸精确可控的微纳米形貌及分离纯化的 rBMSCs 均符合本次研究实验要求, 为后续实验研究提供良好的研究材料。

5 结论

(1) 通过先酸蚀后阳极氧化的方法在微米坑基础上制备的纯钛试样表面是实验要求的管径精密可控的 TiO_2 纳米管微纳米形貌。

(2) 通过原代培养、分离、纯化的 rBMSCs 是符合实验要求的, 具有自我更新和增殖能力以及多向分化潜能的 rBMSCs。

第二部分 微纳米形貌对 rBMSCs 细胞形态 与功能影响的研究

由于 rBMSCs 具有增殖、自我更新及多向分化潜能等特点, rBMSCs 是常用于评价材料生物学功能的多能干细胞之一。纯钛种植体在植入经历血液包裹以及蛋白吸附等过程后即开始 rBMSCs 在种植体材料表面粘附、增殖与分化等系列生物学行为。因此, rBMSCs 的粘附、增殖水平、形态及成骨细胞方向分化能力与种植体骨结合及长期稳定关系密切。此实验中, 通过观察在微纳米形貌表面 rBMSCs 形态与功能的系列生物学行为来评价微纳米形貌的生物学性能, 以便为后续种植体表面优化设计提供实验基础。

1 材料、试剂和仪器

材料、试剂及仪器同实验一 1.0。

2 实验方法

2.1 细胞黏附计数

按第一部分实验 2.1 的方法处理构建各组试样表面。rBMSCs 培养方式同第一部分实验 2.3。将第 3 代纯化 rBMSCs 稀释浓度到 2×10^4 个/毫升/孔细胞接种 24 孔板培养。S 组为对照组, R、R5 及 R20 组为实验组。培养时间分别为 30 分钟、1 小时、2 小时和 3 小时, 终止细胞培养后用 PBS 液反复漂洗去除未附着的 rBMSCs。用 2.5% 戊二醛溶液固定细胞, 在严格避光条件下使用 DAPI 细胞核染色剂染色 20 分钟, PBS 液反复漂洗数次后, 将纯钛试样轻轻反扣在新的 24 孔板后置于倒置荧光显微镜下观察, 将激发波长调整为 400nm, 随机选同一孔板中 5 个不同视野拍照记录, 利用 ImageJ 软件进行细胞计数并取均值。

2.2 试样表面细胞活力测定

试样表面处理、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.1。培养 3 天和 7 天，采用 CCK-8 试剂盒检测 rBMSCs 增殖情况，具体方法同第一部分实验 2.4.1。

2.3 扫描电镜观察细胞形态

试样表面处理、细胞培养同第二部分实验 2.1。rBMSCs 按 5×10^3 个/孔接种 24 孔板培养 1 天，终止培养后将试样转移到新的 24 孔板，2.5%戊二醛溶液固定过夜，依次分别按 50%、70%、80%、90%、100%酒精梯度脱水各 0.5 小时，空气中干燥喷金，采用 SEM 电镜观察细胞形态。

2.4 细胞骨架观察

试样表面处理、细胞培养、接种方法同第二部分实验 2.3。培养 3 天，终止培养后将试样转移到新的 24 孔板，4%多聚甲醛溶液固定 10 分钟，在避光条件下取浓度为 150ug/ml 罗丹明标记鬼笔环肽溶液加入每孔 200ul，室温摇床上孵育 30 分钟，弃废液。取浓度为 300ug/ml DAPI 溶液加入每孔 200ul 避光条件下染细胞核 15 分钟，最后使用 CLSM 显微镜观察试样表面的细胞骨架并拍照。

2.5 Cdc42 在细胞内表达

试样表面处理、细胞培养同第二部分实验 2.1。rBMSCs 按 2×10^3 个/孔接种培养 3 天，终止培养后将试样转移到新的 24 孔板。4%多聚甲醛溶液冰上固定 15 分钟，0.1%triton-X100 溶液加入 500ul/孔，室温放置 15 分钟，后加入 500ul/孔山羊血清，室温封闭 1 小时，去掉血清，加入 200ul/孔现配一抗溶液(PBS 溶液稀释 100 倍)，4℃冰箱内孵育过夜，室温复温 1 小时，避光加入 200ul/孔现配 FITC 标记的二抗溶液(PBS 溶液稀释 100 倍)，室温避光孵育 1 小时，避光条件下加入浓度为 150ug/ml 罗丹明标记的鬼笔环肽 200ul/孔孵育 40 分钟，再避光条件下加入 200ul/孔现配浓度为 300ug/ml DAPI 溶液染色 15 分钟，采用荧光淬灭剂进行封片。采用倒置荧光显微镜观察特异性的免疫荧光抗体 Cdc42 在细胞内的表达。

2.6 碱性磷酸酶分泌检测

试样表面处理、接种方法同第二部分实验 2.1。rBMSCs 按 2×10^4 个/孔接种 24

孔板培养，细胞接种 48 小时后，将培养液更换为成骨诱导培养液培养 7 天。其具体配方如下：含 10%胎牛血清、10mM β -甘油磷酸钠、0.1 μ M 地塞米松、0.2mM 维生素 C，其余为 α -MEM 改良型培养基。将试样转移到新的 24 孔板，4%多聚甲醛溶液冰上固定 15 分钟，采用 NBT/BCIP 碱性磷酸酶活性试剂盒对试样进行 ALP 分泌检测，根据试剂盒说明流程加样显色 20 分钟。室温下自然干燥后置于体式显微镜下观察拍照。另取部分成骨诱导培养试样采用 AKP 试剂盒与 BCA 试剂盒进行 AKP 活性测试，根据试剂盒说明流程加样检测。计算公式如下：细胞 AKP 活性={[(测定 OD 值—空白 OD 值) / (标准 OD 值—空白 OD 值)]*标准品浓度 (0.1mg/ml) }/待测样本蛋白浓度。

2.7 细胞胶原分泌检测

试样表面处理、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.6。成骨诱导培养 2 周后终止培养。将试样转移到新的 24 孔板，4%多聚甲醛溶液冰上固定 30 分钟，室温下采用 1%天狼星红/苦味酸溶液染色 24 小时，吸弃染色溶液，室温环境中自然干燥。采用体式显微镜观察细胞胶原分泌情况。半定量检测方法如下：用 0.2 M 氢氧化钠和 99%甲醇溶液以 1: 1 的比例配制洗脱液，在每孔中加入 500 μ l，在摇床上振荡 30 分钟将胶原及染色剂从试样表面清洗下来，洗脱混合液置于酶标仪下 540 nm 处检测其 OD 值。

2.8 细胞外基质矿化检测

试样表面处理、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.6。成骨诱导培养 2 周后终止培养。将试样转移到新的 24 孔板，4%多聚甲醛溶液冰上固定 30 分钟，室温下采用茜素红溶液（14.41 克茜素红粉剂+100ml 去离子水充分溶解混匀，PH 值调至 4.1 并过滤）染色 20 分钟，吸弃染色溶液，室温环境中自然干燥。采用体式显微镜观察细胞外基质矿化情况。细胞外基质半定量检测方法如下：用氯化十六烷基吡啶和 10 mM 磷酸钠以 1: 9 的比例配制洗脱液，PH 值调至 7.0，在每孔中加入 500 μ l，在摇床上振荡 30 分钟将染色剂从试样表面清洗下来，洗脱混合液置于酶标仪下 620 nm 处检测其 OD 值。

2.9 成骨基因表达检测

为了评价试样表面微纳米形貌对细胞成骨分化功能的影响, 采用实时定量 PCR 方法对试样表面 rBMSCs 中的成骨相关基因表达情况进行检测。常用成骨相关基因主要包括 Col I、Ocn、Opn、OSX、BSP、BMP、ALP、Runx2 等。

2.9.1 目标基因特异性引物序列设计

rBMSCs 成骨相关目标基因特异性引物序列如下表 1 所示:

表 1 成骨相关目标基因特异性引物

基因名称	上游序列 (5'-3')	下游序列 (5'-3')
Ocn	CAGCGGCCCTGAGTCTGA	GCCGGAGTCTGTTCACCTTA
Runx2	CACTGGCGCTGCAACAAGA	CATTCCGGAGCTCAGCAGAATAA
Bsp	CCGGCCACGCTACTTTCTT	TGGACTGGAAACCGTTTCAGA
Col I	CGCCCCCTCCCTGAACTCT	TGCCTGCCTGGGATCTGTA
Opn	GCGGTGAGTCTAAGGAGTCCC	TGATCAGAGGGCATGCTCAG
ALP	CCTTGTAGCCAGGCCATTG	GGACCATTCCCACGTCTTCAC
BMP	CAACACCGTGCTCAGCTTCC	TTCCCACTCATTCTGAAAGTTCC
OSX	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC	GGCCTCACCCCATTGATGT
Gapdh	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC	GGCCTCACCCCATTGATGT

2.9.2 细胞总 RNA 的提取

试样表面处理、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.6。培养 7 天后终止, 使用 Trizol RNA 提取法分别提取各试样表面 rBMSCs 的总 RNA, 其主要步骤如表 2 所示:

表2 Trizol RNA 提取法 rBMSCs 总 RNA

步骤	具体操作
(一)	先将各组试样转移至新 24 孔培养板, 同组每 12 个试样用于提取细胞的总 RNA;
(二)	在每个试样表面加入 200 微升 Trizol 溶液, 反复吹打混匀成为细胞匀浆不粘连, 放置于冰面上裂解 15 分钟;
(三)	收集各组试样表面细胞裂解液, 将其转移至 DEPC 处理无酶 EP 管中;
(四)	按氯仿与 Trizol 溶液 1:5 比例加氯仿, 反复混匀 20 秒, 静置 3 分钟;
(五)	4℃12000rpm 离心 10 分钟, 取上层约 300-600 微升水液转移至新的无酶 EP 管中;
(六)	按异丙醇与 Trizol 溶液 1:2 比例加异丙醇, 反复混匀 20 秒;
(七)	-20℃下静置 2 小时, 4℃12000rpm 条件下离心 15 分钟, 去上清;
(八)	按 75%乙醇与 Trizol 溶液 1:1 比例加预冷的 DEPC 水配制 75%乙醇, 4℃12000rpm 离心 5 分钟, 去上清;
(九)	置于室温条件下 3 分钟开盖反扣晾干 RNA;
(十)	加入适量经 DEPC 处理去离子水溶解 RNA;
(十一)	用酶标仪测量 RNA 浓度与纯度;
(十二)	置于-80℃条件中保存备用。

2.9.3 逆转录反应

采用 Takara PrimeScript™ RT reagent kit 逆转录试剂盒对以上提取的总 RNA 逆转录。其逆转录总体系为 20 微升。PCR 仪反应逆转录条件: 37℃反应 15 分钟, 85℃反应 5 秒。按照试剂盒提供的说明书配制逆转录反应相关试剂, 具体试剂配制比例如表 3 所示:

表 3 逆转录试剂配制比例

成组	使用量
5×PrimeScript™ Buffer	2.0μl
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5μl
Oligo dT Primer	0.5μl
Random 6 mers	0.5μl
Total RNA	500ng
RNase Free dH ₂ O	补至 10μl

通过以上逆转录反应合成 cDNA，从而成为后续 PCR 扩增的模板。将合成 cDNA 置于 -20℃ 条件下保存备用。

2.9.4 实时定量 PCR 反应

采用 Takara SYBR Premix Ex TaqII™ 试剂盒进行实时定量 PCR 的检测，按照 SYBR Premix Ex TaqII™ 试剂盒提供的说明书配制反应试剂，具体试剂配制比例如表 4 所示：

表 4 实时定量 PCR 试剂配制成分

组分	使用量
SYBR Premix Ex Taq II™	10μl
ROX Reference Dye II	0.4μl
上游引物 (10μM)	0.8μl
下游引物 (10μM)	0.8μl
cDNA	2.0μl
ddH ₂ O	6.0μl
总计	20.0μl

实时定量 PCR 反应条件：按表 4 组分比例配制好的反应液加入 CFX96 (Bio-rad) 实时定量 PCR 仪反应。具体反应程序：预变性：95℃ 反应 30 秒为 1 次循环；PCR 扩增：95℃ 反应 5 秒，退火 55℃ 反应 30 秒，72℃ 延伸，20 秒为 40 次循环。

2.10 统计学分析

以上数据使用均数 \pm 标准差描述，统计分析采用 SPSS 21.0 统计学软件，制图采用 GraphPad Prism 6 软件。使用 ANOVA 和 LSD(L)检验各组之间差异， $p<0.05$ 作为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 细胞黏附计数

rBMSCs 在各组试样表面分别培养 30 分钟、1 小时、2 小时和 3 小时。如图 2.1 所示，在激发波长 400nm 的倒置荧光显微镜下，5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 试样表面的细胞黏附明显多于抛光纯钛组 (S)、微米组(R)试样表面，尤其在 20V 微纳米管组 (R20) 细胞黏附最多。随机选择同一孔板中 5 个不同视野拍照记录，利用 ImageJ 分析软件进行细胞计数统计发现试样表面的细胞黏附计数 20V 微纳米管组 (R20) >5V 微纳米管组 (R5) >微米组(R)>抛光纯钛组 (S)，且微纳米试样表面纳米管管径较大者细胞粘附计数更高 ($p<0.05$)。

3.2 试样表面细胞活力测定

培养 3 天和 7 天后采用 CCK-8 试剂盒检测 rBMSCs 增殖情况，结果如图 2.2 所示。与抛光纯钛组 (S) 相比，两个时间点的微米组(R)表面 rBMSCs 的活力有所下降，与其他三组相比不具有统计学差异。微纳米形貌 5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 与抛光纯钛组 (S) 相比，3 天、7 天时细胞活力均无明显变化。

3.3 扫描电镜观察细胞形态

采用场发射扫描电镜 (SEM) 观察 rBMSCs 在各组试样表面培养 1 天的细胞形态。如图 2.3 所示，在低放大倍数下细胞在抛光纯钛组 (S) 表面铺展较好，呈略有些伸长的多边形，在高倍镜下可见细胞边缘伸展出部分较少板状及丝状伪足。而在微米组(R)表面，细胞伸长明显大于抛光纯钛组 (S)，细胞两极伸展出的丝状伪足与试样表面或者相邻细胞接触；在试样微纳米形貌表面，5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 细胞整体形态伸长大于抛光纯钛组 (S) 及微米组(R)，细胞两端呈尖尖的梭形。在高倍镜下可见细胞呈较为伸展的多边形，细胞间板状伪足较抛光纯钛组 (S) 及微米组(R)更多且更宽大，细胞末端伸展出的丝状伪足明显更多，尤

其在 20V 微纳米管组 (R20) 表面表现更加明显。

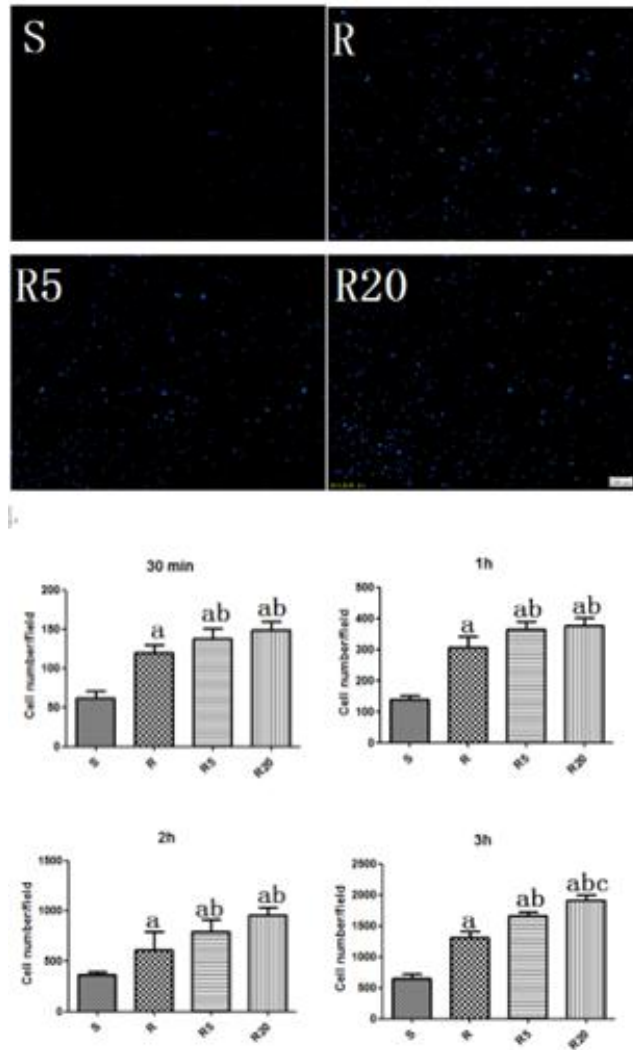


图 2.1 抛光纯钛组 (S)、微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20)

试样表面黏附的 DAPI 染色及软件细胞计数

(a:与 S 组相比 $P<0.05$; b:与 R 组相比 $P<0.05$; c:与 R5 组相比 $P<0.05$)

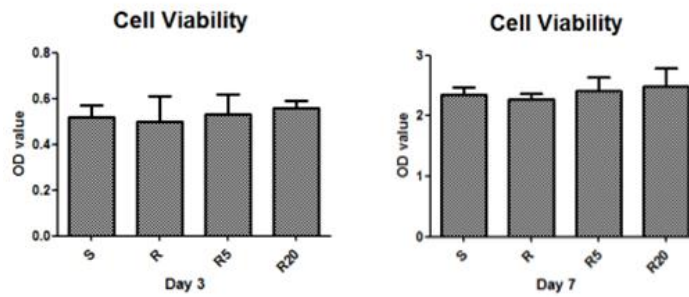


图 2.2 抛光纯钛组 (S)、微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组

(R20) 试样表面细胞活力测定

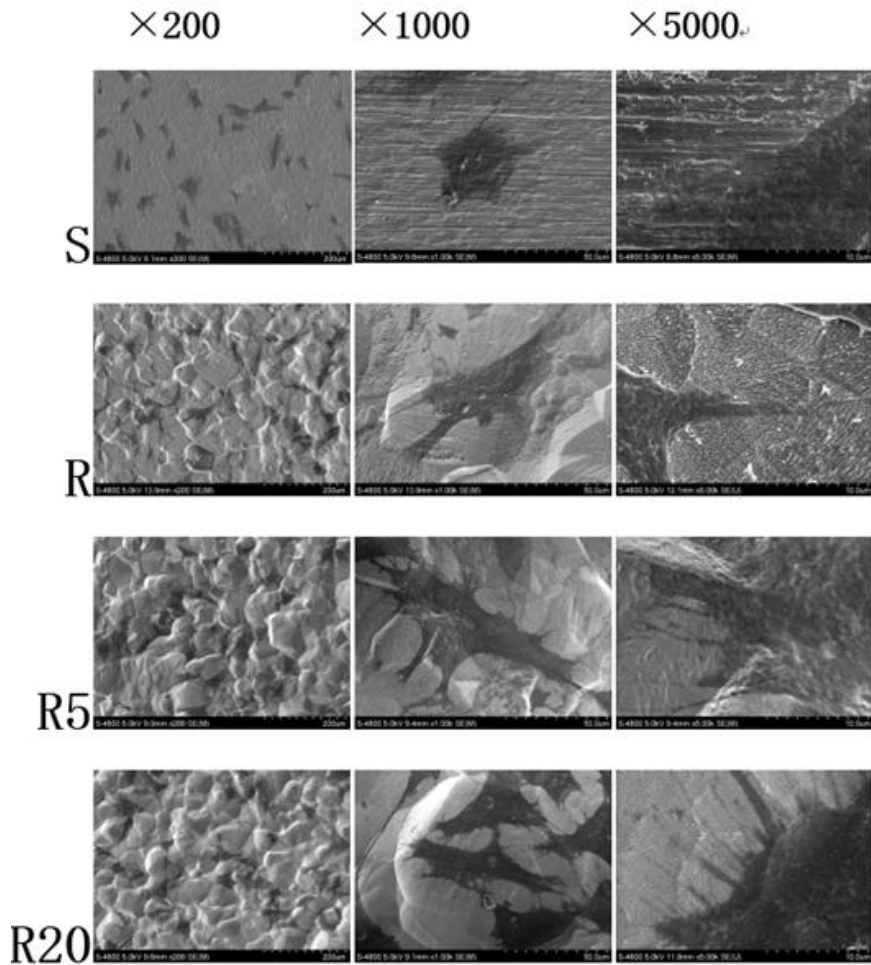


图 2.3 扫描电镜下不同形貌 (S、R、R5、R20) 表面骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 培养 1 天时细胞形态

3.4 细胞骨架观察

采用 CLSM 观察 rBMSCs 在各组试样表面培养 3 天的细胞骨架形态。如图 2.4 所示, 在低放大倍数下抛光纯钛组 (S) 可见细胞略显较圆, 高倍镜下细胞胞浆内可见部分红色丝状细胞骨架及少量细长纤维聚集。在微米组 (R) 表面可见细胞呈较为伸长的多边形, 高倍镜下细胞胞浆内可见较为清晰的纤维网状结构; 在试样微纳米形貌表面可见细胞整体形态呈明显伸长的梭形, 高倍镜下明显可见细胞胞浆内清晰的红色纤维网状结构, 且在 20V 微纳米管组 (R20) 表面红色纤维网状结构最为明显。

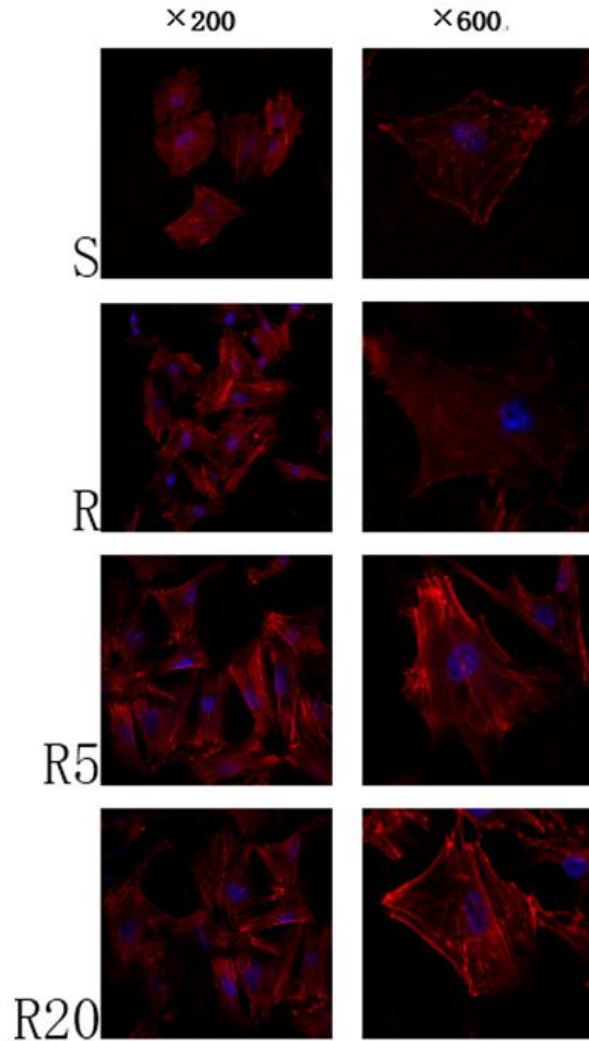


图 2.4 共聚焦显微镜下不同形貌(S、R、R5、R20)表面骨髓间充质干细胞(rBMSCs)培养 3 天时细胞骨架形态

3.5 Cdc42 在细胞内表达

采用倒置荧光显微镜观察特异性的免疫荧光抗体 Cdc42 在 rBMSCs 细胞内的表达如图 2.5 所示，使用 Cdc42 特定抗体免疫荧光显示 Cdc42 在细胞质中广泛分布，且荧光强度在 5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 明显高于抛光纯钛组 (S) 及微米组(R)，提示在微纳米试样表面，Cdc42 活性明显增强。

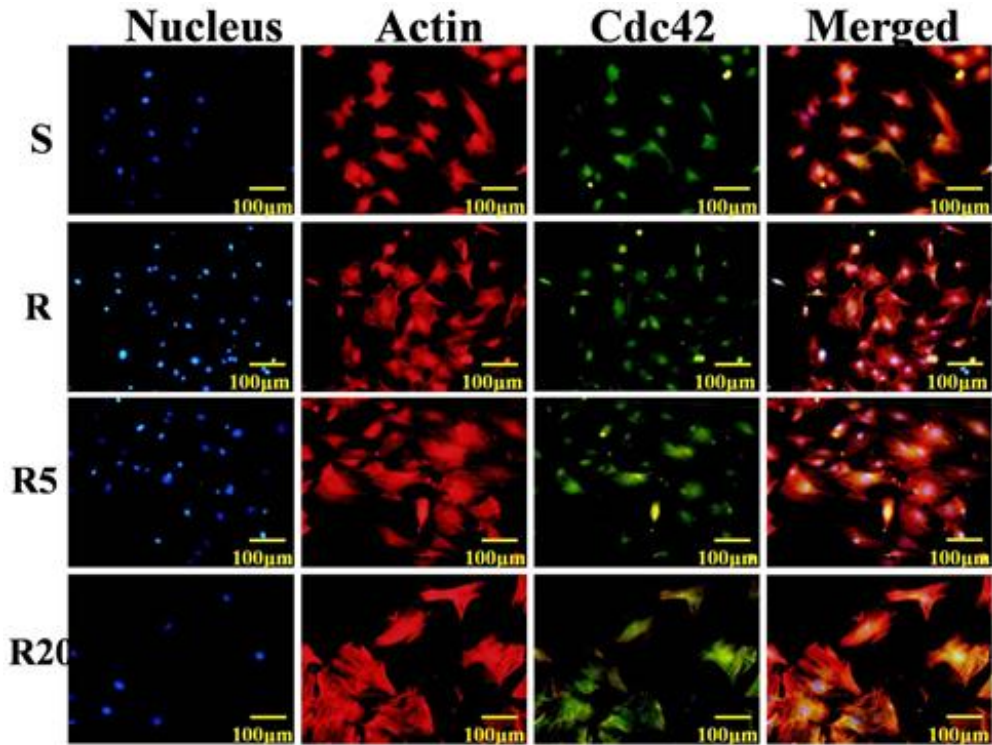


图 2.5 倒置荧光显微镜下不同形貌（S、R、R5、R20）表面骨髓间充质干细胞（rBMSCs）培养 3 天时细胞骨架蛋白 Cdc42 在细胞内分布情况

3.6 碱性磷酸酶分泌检测

采用体式显微镜观察 rBMSCs 在各组试样表面成骨诱导培养 7 天的 ALP 染色情况。如图 2.6 所示，S、R、R5 及 R20 组形貌表面均发现深蓝色碱性磷酸酶结晶。与抛光纯钛组（S）相比，微米组（R）、5V 微纳米管组（R5）及 20V 微纳米管组（R20）表达量明显更多，且颜色更深，在 20V 微纳米管组（R20）形貌表面表达量最多。采用 AKP 试剂盒与 BCA 试剂盒进行 AKP 活性测试，显示 AKP 活性 20V 微纳米管组（R20）>5V 微纳米管组（R5）>微米组（R）>抛光纯钛组（S），且以上各组间差异显著($p < 0.05$)。

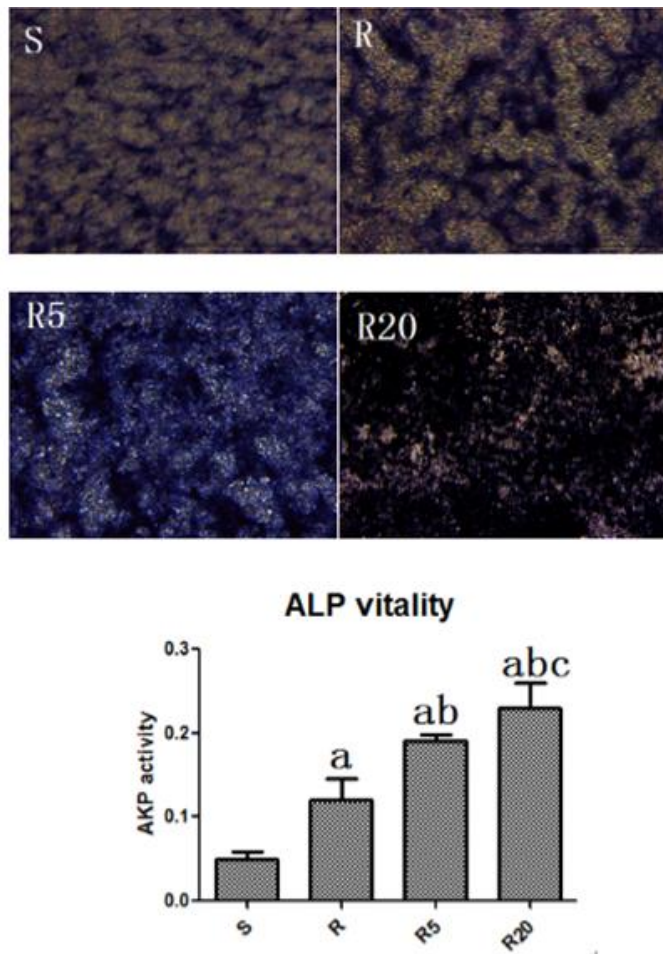


图 2.6 不同形貌 (S、R、R5、R20) 表面骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 成骨诱导培养 7 天时碱性磷酸酶活性染色及 AKP 活性情况(a:与 S 组相比 $P<0.05$; b:与 R 组相比 $P<0.05$; c:与 R5 组相比 $P<0.05$)

3.7 细胞胶原分泌检测

采用体式显微镜观察 rBMSCs 在各组试样表面成骨诱导培养 2 周的天狼星红/苦味酸溶液染色情况。如图 2.7 所示, S、R、R5 及 R20 组形貌表面均分泌粉红色丝絮状颗粒物, 在微米形貌 (R) 与微纳米形貌组 (R5/R20) 胶原分泌量明显更多。胶原分泌半定量检测结果显示 5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 胶原分泌明显高于抛光纯钛组 (S), 20V 微纳米管组 (R20) 胶原分泌量最大, 微米组 (R) 与 5V 微纳米管组 (R5) 间无统计学差异。

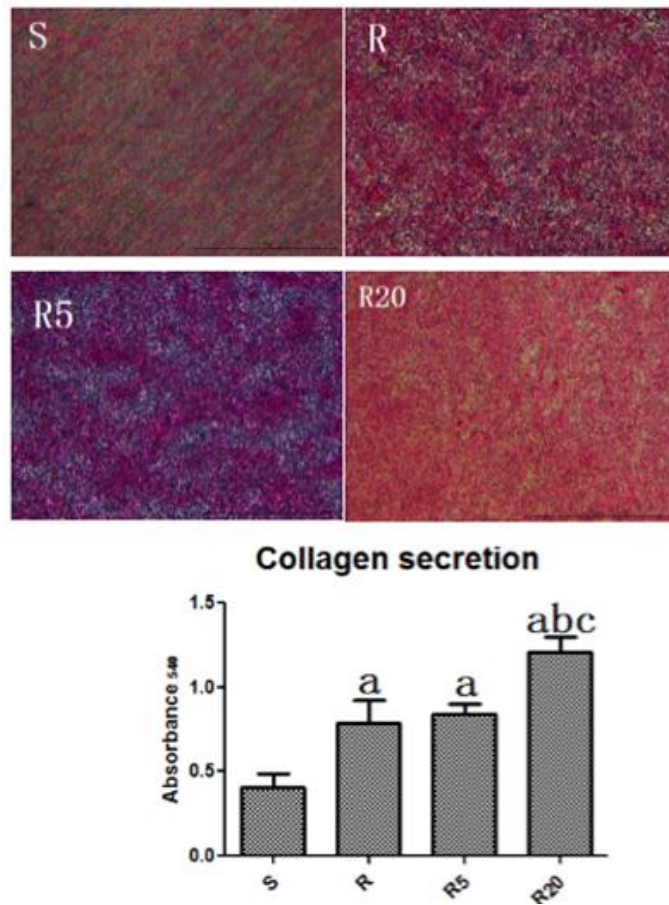


图 2.7 不同形貌 (S、R、R5、R20) 表面骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 成骨诱导培养 2 周时天狼星红/苦味酸溶液染色及胶原分泌半定量检测结果(a:与 S 组相比 $P<0.05$; b:与 R 组相比 $P<0.05$; c:与 R5 组相比 $P<0.05$)

3.8 细胞外基质矿化检测

采用体式显微镜观察 rBMSCs 在各组试样表面成骨诱导培养 2 周的茜素红溶液染色情况。如图 2.8 所示, 抛光纯钛组 (S)、微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 形貌表面均出现红色矿化结节, 在微米形貌 (R) 与微纳米形貌组 (R5/R20) 矿化染色更加明显。细胞外基质矿化半定量检测结果显示与抛光纯钛组 (S) 相比, 微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 基质矿化水平明显较高, 且在 20V 微纳米管组 (R20) 形貌表面胞外基质矿化能力 (OD 值) 最高, 提示微米和微纳米形貌显著提高了细胞外基质矿化的能力。

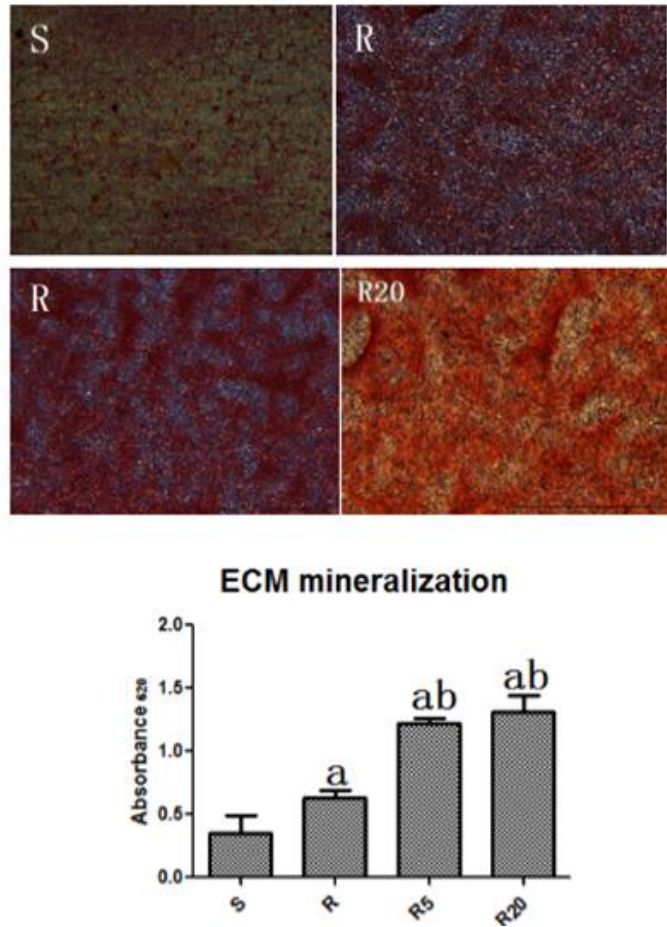


图 2.8 不同形貌 (S、R、R5、R20) 表面骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 成骨诱导培养 2 周时茜素红染色及外基质矿化半定量检测结果(a:与 S 组相比 $P<0.05$; b:与 R 组相比 $P<0.05$; c:与 R5 组相比 $P<0.05$)

3.9 成骨基因检测

通过采用实时定量 PCR 方法对试样表面 rBMSCs 中的成骨相关基因检测来评价试样表面微纳米形貌对细胞成骨分化功能的影响。此次检测的与成骨相关基因 Col I、Ocn、Opn、OSX、BSP、BMP、ALP、Runx2 表达情况如图 2.9 所示, 整体来讲, 微纳米形貌组成骨相关基因表达高于抛光纯钛组 (S)。在 Opn、ALP、Runx2 基因表达上, 20V 微纳米管组 (R20) > 5V 微纳米管组 (R5) > 微米组 (R) > 抛光纯钛组 (S), 且以上各组间差异显著 ($p<0.05$)。而在 Col I、BSP、BMP 基因表达上, 微米组 (R) 与 5V 微纳米管组 (R5) 基因表达量相似或低于抛光纯钛组 (S), 但 20V 微

纳米管组 (R20) 基因表达量均明显高于抛光纯钛组 (S)。在 Ocn、OSX 基因表达上, 20V 微纳米管组 (R20) 与 5V 微纳米管组 (R5) 或 5V 微纳米管组 (R5) 与微米组(R)间基因表达量一致或近似 ($p>0.05$)。

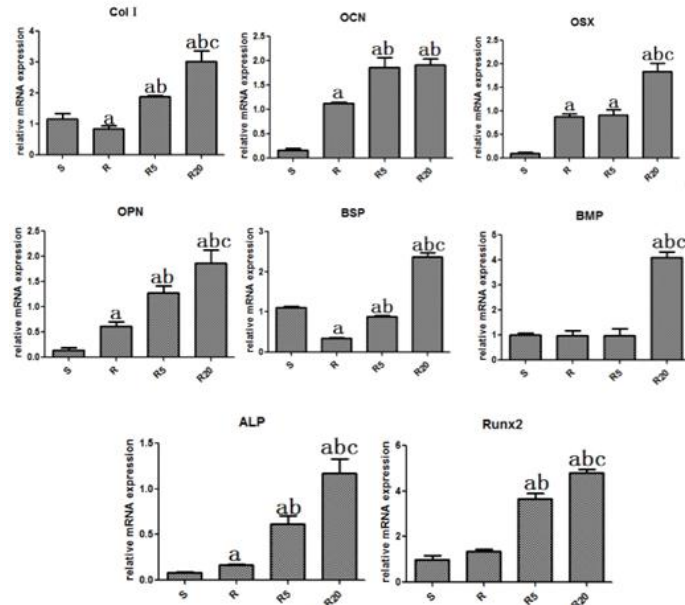


图 2.9 不同形貌 (S、R、R5、R20) 表面骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 成骨相关基因表达检测结果(a:与 S 组相比 $P<0.05$; b:与 R 组相比 $P<0.05$; c:与 R5 组相比 $P<0.05$)

4 讨论

有大量研究表明, 骨植入材料表面形貌修饰是可显著调控骨组织周围细胞反应及影响骨结合效率。其中, 骨植入材料材料表面微纳米仿生优化被认为是一种具有较大研究前景的方法。王薇等^[2]发现通过氢氟酸酸蚀结合阳极氧化的方法制备出的微纳米复合形貌进行体外的细胞学实验证实该形貌能够促进成骨细胞和 MG63 细胞系的多项生物学功能。本实验进一步对具有管径精密可控的二氧化钛 (TiO₂) 纳米管结构的微纳米复合梯度形貌表面的 rBMSCs 生物学行为与成骨功能进行评价。

细胞黏附能力主要与植入体表面形貌、表面接触角及粗糙度等表面性能相关因素密切相关^[60, 61]。本实验结果显示实验组 (R、R5 及 R20 组) 细胞粘附明显多于对照组 (S 组), 且微纳米试样表面纳米管管径较大者细胞粘附计数更高 ($p<0.05$)。与此相对应, 第一部分实验结果显示实验组 (微米组、5V 微纳米管组及 20V 微纳米管组) 与对照组 (抛光纯钛组) 在形貌、接触角 (亲水性) 及表面粗糙度等上存在明

显差异。20V 微纳米管组 (R20) 试样表面的细胞早期黏附数量最多说明大管径微纳米形貌组表面生物学性能更佳, 使细胞能更好地粘附。rBMSCs 成骨分化是从细胞增殖阶段开始的。其通过细胞增殖来连接 rBMSCs 黏附伸展与成骨分化两大过程。本实验结果表明, 相比于对照组(抛光纯钛组), 两个时间点的微米组(R)表面 rBMSCs 的增殖活力有所下降, 而微纳米形貌 5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 与对照组相比, 3 天、7 天时细胞活力均无明显差异。提示说明微纳米形貌对 rBMSCs 细胞增殖阶段影响较小。

细胞形态观察是最直观的反映形貌对细胞影响的重要方法之一。由场发射扫描电镜 (SEM) 下照片可见, 在实验组 (微米组、5V 微纳米管组及 20V 微纳米管组) 与对照组 (抛光纯钛组) 表面的 rBMSCs 形态具有较大差异。5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 等微纳米形貌表面细胞呈略有些伸长的多边形, 类纺锤体状, 同时各组在细胞板状与丝状伪足上具有显著差异。微纳米形貌中大管径纳米管结构表面骨髓间充质干细胞伪足的数量和长度明显更多, 表明相对于对照组, rBMSCs 在 20V 微纳米管组 (R20) 组表面黏附最为牢固与稳定。有文献表明细胞通过感知材料表面形貌生物学信号对其本身形态改变的现象, 可能是与细胞将感知的材料表面形貌生物学信号转化传递到细胞内, 从而导致胞内的各种复杂级联反应的生物学行为^[62]。文献证实^[16]细胞形态与细胞骨架肌动蛋白与 Rho GTPases 密切相关, Rho GTPases 蛋白家族可与 GDP 或 GTP 进行结合发挥分子开关作用, 进而影响细胞肌动蛋白骨架。由共聚焦显微镜下照片可见, 相对于对照组, 微纳米形貌表面细胞整体形态呈明显伸长的梭形, 胞浆内红色纤维网状结构更多更清晰, 且在 20V 微纳米管组 (R20) 表面红色纤维网状结构最为明显, 提示植入材料表面微纳米形貌可能通过相关机械力学传导方式将其形貌表面的力学信号传导至骨髓间充质干细胞, 从而激发植入材料表面微纳米形貌产生的 Rho GTPases 相关信号通路介导的力学刺激调控细胞骨架从而对 rBMSCs 多种生物学功能产生影响。在倒置荧光显微镜下可见使用 Cdc42 特定抗体免疫荧光显示 Rho GTPases 蛋白家族重要成员 Cdc42 在细胞质中广泛分布, 且荧光强度与致密度在 5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 均明显高于抛光纯钛组 (S) 及微米组(R), 提示在微纳米试样表面, 尤其是在大管径微纳米结构表面, Cdc42 活性明显增强, 也证实了微纳米形貌表面 Rho GTPases 相关信号介导的力学刺激对 rBMSCs 生物学功能的调控作用。

研究表明 BMSCs 分化主要分为三个阶段，分别是增殖阶段、基质成熟阶段及矿物质沉淀阶段^[63]。在 BMSCs 成骨分化第二阶段即基质成熟阶段，BMSCs 开始碱性磷酸酶与细胞胶原的大量分泌表达，其表达有利于第三阶段矿化及矿物质沉淀。通常可以将碱性磷酸酶与细胞胶原的分泌检测作为 BMSCs 成骨分化鉴定的生化标志^[64, 65]。本实验结果显示无论是碱性磷酸酶分泌还是细胞胶原分泌，R、R5 及 R20 组表达量明显优于 S 组，且颜色更深，在 20V 微纳米管组（R20）形貌表面表达量最多，提示微纳米形貌表面更利于骨髓间充质干细胞基质成熟，更容易成骨分化，具有更高的成骨功能。钙磷沉积等矿物质的沉积及细胞外基质矿化主要出现在骨髓间充质干细胞成骨分化第三阶段，因此检测细胞外基质矿化水平（EMC）是检测 rBMSCs 成骨分化能力的重要指标^[66]。本实验结果显示 S、R、R5 及 R20 组形貌表面均出现红色矿化结节，但在微米形貌（R）与微纳米形貌组（R5/R20）矿化结节更加明显。半定量检测结果也证实 5V 微纳米管组（R5）及 20V 微纳米管组（R20）基质矿化水平明显较高，20V 微纳米管组（R20）形貌表面胞外基质矿化最大，提示微纳米形貌显著提高了细胞外基质矿化的能力。Col I、Ocn、Opn、OSX、BSP、BMP、ALP、Runx2 等成骨相关蛋白由成熟的成骨相关细胞特异性合成与分泌，其可以特异性反映成骨细胞活性与骨转化能力，对骨组织矿化水平与钙离子平衡具有重要意义，因此通常用于 rBMSCs 成骨分化能力的标志^[67]。本实验结果显示在 Opn、ALP、Runx2、Col I、BSP、BMP 基因表达上，在实验组微纳米形貌表面基因表达产量与对照组差异显著($p < 0.05$)，20V 微纳米管组（R20）基因表达量均明显高于其他各组，说明微纳米表面明显提高了骨髓间充质干细胞成骨分化能力。但 Ocn、OSX 基因表达上各组形貌间无明显差异 ($p > 0.05$)，可能是因为 Ocn、OSX 是 rBMSCs 成骨分化晚期才表达的缘故，而此次实验仅仅检测了细胞培养 7 天的基因表达，可能这时 Ocn、OSX 还没开始表达。

5 结论

- (1) 钛种植体表面微纳米形貌显著改变了 rBMSCs 表面粘附能力、形态及骨架。
- (2) 在碱性磷酸酶合成、胶原分泌、细胞外基质矿化水平及成骨相关基因表达量等方面微纳米形貌表面显著优于对照组，钛种植体表面微纳米形貌较大地促进 rBMSCs 的成骨分化能力。

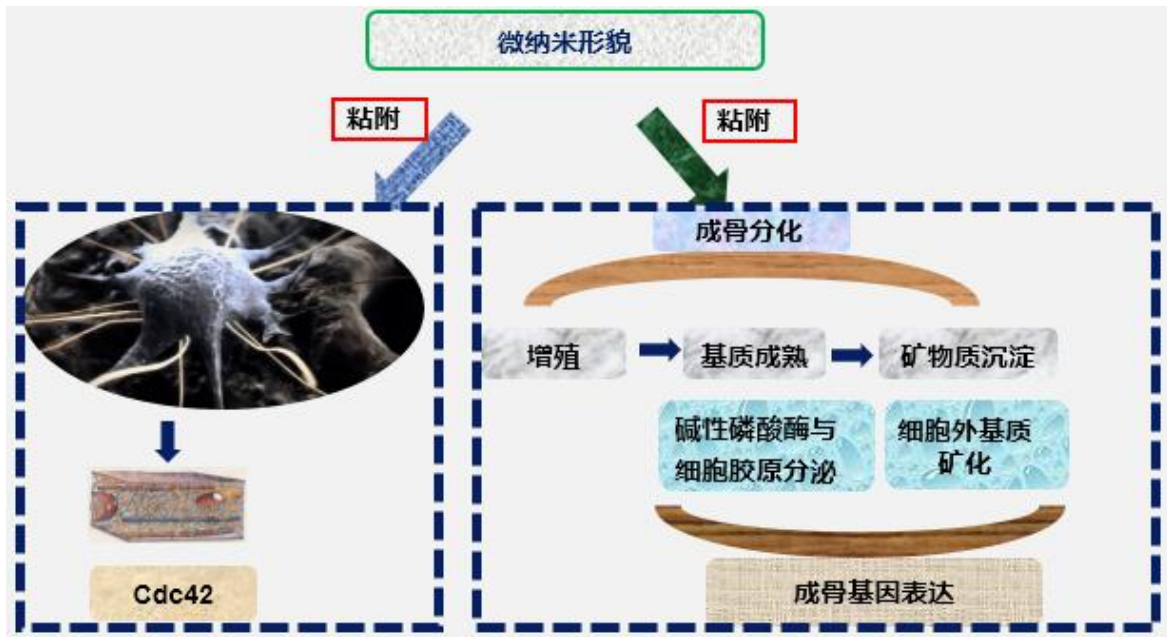


图 2.10 微纳米形貌对骨髓间充质干细（rBMSCs）细胞形态与功能影响

第三部分 微纳米形貌通过 Cdc42/Wnt/ β -catenin 信号通路对 rBMSCs 调 控的研究

虽然目前成品生产的种植体骨结合较好，但骨结合周期较长，难以满足早期或即刻修复，所以缩短种植体骨结合周期是目前种植体研究的热点。在缩短种植体愈合周期，获得早期和更高的骨结合强度的多种途径中，骨植入材料表面微纳米仿生优化被认为是一种具有较大研究前景的方法。以上体外实验证实与天然骨组织形貌更相似的微纳米复合梯度形貌能够促进 rBMSCs 的成骨功能及引起表面细胞形态改变。然而相关的分子机制缺乏深入系统的认识，不利于对骨植入材料表面进行表面优化设计。本实验通过多种细胞分子实验方法对不同微纳米形貌表面 rBMSCs 内 Rac1、Cdc42 和 RhoA 活性、Rho GTPases/Wnt/ β -catenin 信号通路进行检测，探索可能存在的微纳米形貌调控 rBMSCs 形态与功能变化的机制，为骨植入材料表面表面优化设计提供研究依据和新思路。

1 材料、试剂和仪器

细胞浆核蛋白提取盒（中国碧云天公司）；PMSF（中国中生瑞泰公司）；SDS-PAGE 凝胶配制盒（中国沃尔森公司）；RIPA 裂解液（中国碧云天公司）；Cdc42si-RNA（中国吉马公司）；脂质体 2000 转染试剂（中国碧云天公司）；ECL 蛋白条带发光试剂盒（美国 Millipore 公司）；特异性抗 Cdc42 抗体（美国 abcam 公司）； β -catenin 抗体（美国 abcam 公司）；抗 α -tubulin 抗体（美国 abcam 公司）、抗 GSK-3 β 抗体（美国 abcam 公司）；抗 p-GSK-3 β 抗体（美国 abcam 公司）；抗 β -actin 抗体（美国 CST 公司）；FITC 标记抗兔及抗小鼠二抗（美国 abcam 公司）；Hoechst 试剂盒（中国碧云天公司）；其余材料、试剂及仪器同实验一 1.0。

2 实验方法

2.1 细胞 Rho GTPases 基因表达水平

试样表面分组情况、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.1。培养 7 天终止培养后按实验二 2.9 方法进行总 RNA 提取、逆转录及实时定量 PCR 反应。Rho GTPases 蛋白主要包括 Cdc42、Rac1 及 RhoA。相关引物具体如表 5 所示：

表 5 Cdc42、Rac1 及 RhoA 基因特异性引物

基因名称	上游序列 (5'-3')	下游序列 (5'-3')
Cdc42	CTCCITTCCTTGCTTGTCGGG	GGGCTGTTCGTTCTTTCCTC
Rac1	TTGAGTCCTCGCTGTGTGAG	GAGTGTGTCGCTCCTGAGTT
RhoA	CTGGTGATTGTTGGTGATGG	CGGTCATAATCTTCCTGTCC

2.2 β -catenin 信号活性及 Cdc42 蛋白表达水平

试样表面分组情况、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.1。培养 7 天终止培养后按实验二 2.9 方法进行总 RNA 提取、逆转录及实时定量 PCR 反应。采用实时定量 PCR 方法检测试样表面细胞 β -catenin mRNA 表达水平。特异性 β -catenin 引物为：上游引物：ATCCCTTCCTGCTTAGTCGC，下游引物：CGCTGATTCGTCCTTCCCTA。提取各组试样表面 rBMSCs 总蛋白并使用 Western blot 方法检测微纳米形貌表面细胞 Cdc42、Nucleus β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达水平，具体方法如下。

2.2.1 蛋白样品提取

其具体提取步骤如表 6 所示：

表 6 蛋白样品提取步骤

步骤	具体操作
(一)	弃废液，预冷的 PBS 溶液反复漂洗 3 次，每次 3 分钟。冰上预冷的 PBS 溶液加至试样表面并使用细胞刮反复轻柔刮下细胞，将刮下的细胞悬液转移至新 EP 管中；
(二)	4℃条件下 1200rpm 离心 3 分钟，弃上清液；
(三)	现配 RIPA 细胞裂解液与 PMSF 混合细胞裂解液，按终浓度 1mM 每管加入 200 μ l 细胞裂解液并与样品混合均匀，冰上裂解 20 分钟，同时使用枪头反复抽吸混合促进裂解；
(四)	细胞裂解充分后，4℃12000rpm 离心 15 分钟，取其上清即为所需的蛋白样品并轻轻吸取上清液转移至新 EP 管中，随后按照说明书开始蛋白样品 BCA 法蛋白浓度测定。

2.2.2 BCA 法蛋白浓度测定及蛋白样品处理

采用中国碧云天公司 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，具体方法如表 7 所示：

表 7 BCA 法蛋白浓度测定步骤

步骤	具体操作
(一)	按照说明书将 20mg 标准蛋白溶解配制浓度为 25mg/ml 的蛋白标准溶液；
(二)	吸取一定去离子水将 25mg/ml 的蛋白标准溶液稀释为浓度 0.5mg/ml 的标准蛋白溶液；
(三)	按说明书比例，A 试剂与 B 试剂加入 15 毫升离心管中以 50:1 配制一定量 BCA 工作液，反复颠倒离心管充分混匀；
(四)	依次将蛋白样品以 0, 1, 4, 8, 12, 16, 20 μ l 加入至新的 96 孔板中，同时再添加稀释液补满 20 μ l；
(五)	依次加入各组 2 μ l 待测蛋白样品至新的 96 孔板中，同时再添加稀释液补满 20 μ l。每组样品设置 3 个副孔，便于取平均值；
(六)	每孔添加 BCA 工作液 200 μ l，置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中反应 30 分钟；
(七)	取出 96 孔板，按酶标仪软件说明设置 562nm 波长检测蛋白样本的 OD 值；
(八)	根据检测的 OD 值及标准浓度在 EXCEL 软件上绘制标准曲线，从而进一步计算各组试样表面样品蛋白的浓度；
(九)	在以上制取的蛋白样本按 4:1 的体积比加入上样缓冲液，使用枪头将其反复均匀混合，EP 管用薄膜封口置于浮漂上 100 $^{\circ}$ C 沸水中 5 分钟，置于常温中冷却，放置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2.3 凝胶配制

- (1) 组装干燥配胶专用玻璃板及灌胶支架备用。
- (2) 分离胶及浓缩胶配制组分及方法见表 8 与表 9。

表 8 分离胶配制组分[↵]

组分 [↵]	使用量 [↵]
30%丙烯酰胺 [↵]	2.7 ml [↵]
10%SDS [↵]	100 μ l [↵]
1.5M Tris-HCL (pH8.8) [↵]	2.5 ml [↵]
10%过硫酸铵 [↵]	100 μ l [↵]
ddH ₂ O [↵]	4.6 ml [↵]
TEMED (终末加入) [↵]	3 μ l [↵]
总计 [↵]	10 ml [↵]

首先使用枪头反复混匀以上各组分液体，使用 1 毫升枪头慢慢加入组装好的玻璃板及灌胶支架夹层内，添加过程中尽量不能产生气泡，随后添加适量无水乙醇覆盖封胶，静置 20 分钟左右，倒掉上层覆盖封胶的无水乙醇，残留无水乙醇可小心使用滤纸吸净。

表 9 浓缩胶的配制组分[↵]

组分 [↵]	使用量 [↵]
0.5M Tris-HCL (pH6.8) [↵]	0.25 ml [↵]
30%丙烯酰胺 [↵]	0.17 ml [↵]
10%过硫酸铵 [↵]	10 μ l [↵]
10%SDS [↵]	10 μ l [↵]
ddH ₂ O [↵]	0.56 ml [↵]
TEMED (终末加入) [↵]	1 μ l [↵]
总计 [↵]	1.0 ml [↵]

首先使用枪头反复混匀以上各组分液体，使用 1 毫升枪头慢慢加入至玻璃板夹层内分离胶上面，将洁净干燥的梳子插入玻璃板夹层内，操作过程注意梳子正反面积及避免气泡产生，静置 30 分钟后使用或置于 4℃冰箱中可保存过夜使用。

2.2.4 蛋白上样与电泳

电泳缓冲液配制组分及方法见表 10。提前组装好电泳槽装置，将双层配胶玻璃板与电泳装置结合组装，在电泳槽内添加配制好的电泳缓冲液，液面平齐玻璃板外层，缓缓地取出双层配胶玻璃板中的梳子。依次在凝胶上样孔添加 5 μ l 彩虹 marker 及预先计算配制好的 20 μ l 各组蛋白样品。电泳装置按电源正负极对应连接好电源，电泳装置置于冰渣堆积的盆中，保持电泳过程在 4 $^{\circ}$ C 条件下进行。先在 90V 电压条件下作用 20 分钟，当彩虹 marker 条带分散开后调整电压至 120V，继续电泳 60 分钟，可通过玻璃板观察到样品蛋白条带适度分离。

表 10 电泳缓冲液配制组分[□]

组分 [□]	使用量 [□]
甘氨酸 [□]	14.4g [□]
SDS [□]	1g [□]
Tris-base [□]	3.03g [□]
ddH ₂ O [□]	定容至 1000ml [□]

2.2.5 转膜

(1) 转膜缓冲液组分及方法见表 11。

表 11 转膜缓冲液配制组分[□]

组分 [□]	使用量 [□]
甲醇 [□]	200ml [□]
Tris-base [□]	3.03g [□]
甘氨酸 [□]	14.4g [□]
ddH ₂ O [□]	定容至 1000ml [□]

(2) 在甲醇溶液中浸泡处理 PVDF 膜 30 秒，关闭电泳装置电源，将双层玻璃板拆解，在转膜缓冲液中打开双层玻璃板，切取需要的部分胶板。

(3) 依次按阴极黑夹—海绵垫—三层滤纸—切取胶—PVDF 膜—三层滤纸—海绵垫—阳极白夹顺序组装好转膜装置，将转膜缓冲液倒入湿式转膜仪中后放置组装好转膜装置置于冰渣堆积的盆中调整恒定电压进行转膜。不同样品蛋白由于分子量大小不同，选择的转膜电压也不同。一般来说，分子量为 30-40KD 样品蛋白需在 90V 恒压下转膜 30 分钟，分子量为 40-100KD 样品蛋白需在 90V 恒压下转膜 60 分钟，分子量大于 100KD 样品蛋白需在 90V 恒压下转膜 90 分钟。

2.2.6 封闭

TBST 缓冲液配制组分及方法见表 12，TBST 缓冲液溶解 BSA 蛋白配制封闭液。关闭转膜装置电源，取出完成转膜的 PVDF 膜放于洁净培养皿中，加入 TBST 缓冲液置于摇床上反复清洗 3 次，然后加 BSA 蛋白配制好的封闭液进入培养皿中继续封闭 40 分钟。

表 12 TBST 缓冲液配制组分

组分	使用量
NaCl	8g
Tween-20	1ml
Tris-base	2.42g
ddH ₂ O	定容至 1000ml

2.2.7 孵育一抗和二抗

吸取封闭液存于离心管中备用，在培养皿中反复清洗 PVDF 膜 3 次。按加一抗说明书稀释配制一抗稀释液，使用透明薄膜将 PVDF 膜与适量一抗稀释液封存，避免出现气泡，在 4℃ 冰箱中孵育 12 小时。而后将 PVDF 膜室温复温 60 分钟，吸去一抗，在培养皿中反复清洗 PVDF 膜 3 次。按二抗说明书稀释配制 FITC 标记的二抗稀释液，加入含 PVDF 膜的培养皿在摇床上孵育 60 分钟。吸去二抗，在培养皿中反复清洗 PVDF 膜 5 次。

2.2.8 显色

按照 ECL 说明书现配现用显色剂，A 液：B 液以 1:1 在避光条件下配制 ECL 显色液，并使用枪头反复混匀。使用眼科镊将 PVDF 膜放于凝胶成像分析仪玻璃板

中心，注意 PVDF 膜正反面。避光条件下在 PVDF 膜表面均匀加入约 200 微升显色液，启动专业软件进行发光显像并保存图像。

2.3 Cdc42siRNA 转染及转染效率检测

2.3.1 FAM 绿色荧光标记的 Cdc42siRNA 转染步骤

Cdc42siRNA 转染步骤如表 13 所示：

表 13 FAM 绿色荧光标记的 Cdc42siRNA 转染步骤

步骤	具体操作
(一)	骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 按 5×10^4 个/孔接种 24 孔板，每孔加 400 μ l 无抗生素的培养基，置于 37 $^{\circ}$ C 5%CO ₂ 环境下的孵箱中培养 1 天，让细胞密度达到 60%-80%；
(二)	每个孔中加入 50 μ l Opti-MEM 无血清培养基与 1 μ 脂质体 2000 混合液，常温孵育 10 分钟；
(三)	按照 Opti-MEM: FAM 绿色荧光标记 Cdc42siRNA =50 μ l: 2 μ l 比例稀释混合均匀备用；
(四)	将 (2) 与 (3) 液体均匀混合后常温静置 15 分钟；
(五)	将 (4) 混合液加入培养板中，每孔加入 500 μ l，置于 37 $^{\circ}$ C 5%CO ₂ 环境下的孵箱中培养 5 小时后换为含血清的完全培养基继续培养至 24 小时。

2.3.2 Cdc42siRNA 转染效率检测

含血清的完全培养基继续培养至 24 小时后终止培养，PBS 溶液清洗 3 次。观察部分试样 FAM 绿色荧光标记的 Cdc42siRNA 发光情况及细胞状态，其余试样用于 PCR 检测。具体方法同实验二 2.9。

2.4 Cdc42siRNA 转染对细胞活力的影响

试样表面分组情况、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.1。培养 3 天和 7 天后终止培养，采用 CCK-8 检测 rBMSCs 增殖情况，具体方法见实验二 2.2。

2.5 Cdc42siRNA 转染对细胞形态的影响

试样表面分组情况、细胞培养同第二部分实验 2.1。将野生型和 Cdc42siRNA 转染后 rBMSCs 按 5×10^3 个/孔接种 24 孔板培养 1 天, 终止培养后将试样转移到新的 24 孔板, 采用 SEM 电镜观试样表面细胞形态, 具体方法见实验二 2.3。

2.6 Cdc42siRNA 转染对细胞骨架的影响

试样表面分组情况、细胞培养及接种方法同第三部分实验 2.5。培养 3 天, 终止培养后将试样转移到新的 24 孔板, 使用激光共聚焦显微镜观察试样表面的细胞骨架并拍照, 具体方法见实验二 2.4。

2.7 Cdc42siRNA 转染对 Cdc42 在细胞内表达的影响

试样表面分组情况、细胞培养同第二部分实验 2.1。将野生型和 Cdc42siRNA 转染后 rBMSCs 按 2×10^3 个/孔接种培养 3 天, 终止培养后将试样转移到新的 24 孔板, 采用倒置荧光显微镜观察转染对 Cdc42 在细胞内表达的影响, 具体方法见实验二 2.5。

2.8 Cdc42siRNA 转染对碱性磷酸酶分泌的影响

试样表面分组情况、细胞培养同第二部分实验 2.1。将野生型和 Cdc42siRNA 转染后 rBMSCs 按 2×10^4 个/孔接种培养, 细胞接种 48 小时后, 将培养液更换为成骨诱导培养液即包含 10% 胎牛血清、10mM β -甘油磷酸钠以及 0.1 μ M 地塞米松和 0.2mM 维生素 C 的 α -MEM 改良型培养基, 7 天后终止培养 ALP 染色。采用体式显微镜观察拍照并采用 AKP 试剂盒与 BCA 试剂盒进行 AKP 活性测试, 具体方法见实验二 2.6。

2.9 Cdc42siRNA 转染对细胞胶原分泌的影响

试样表面分组情况、细胞培养同第二部分实验 2.1。将野生型和 Cdc42siRNA 转染后 rBMSCs 按 2×10^4 个/孔接种培养, 细胞接种 48 小时后, 将培养液更换为成骨诱导培养液即包含 10% 胎牛血清、10mM β -甘油磷酸钠以及 0.1 μ M 地塞米松和 0.2mM 维生素 C 的 α -MEM 改良型培养基, 2 周后终止培养天狼星红/苦味酸溶液染色, 采用体式显微镜观察拍照并进行半定量检测, 具体方法见实验二 2.7。

2.10 Cdc42siRNA 转染对细胞外基质矿化的影响

试样表面分组情况、细胞培养同第二部分实验 2.1。将野生型和 Cdc42siRNA 转染后 rBMSCs 按 2×10^4 个/孔接种培养, 细胞接种 48 小时后, 将培养液更换为成骨诱

导培养液即包含 10%胎牛血清、10mM β -甘油磷酸钠以及 0.1 μ M 地塞米松和 0.2mM 维生素 C 的 α -MEM 改良型培养基, 2 周后终止培养茜素红染色。采用体式显微镜观察细胞外基质矿化情况并进行细胞外基质半定量检测, 具体方法见实验二 2.8。

2.11 Cdc42siRNA 转染对成骨相关基因表达的影响

试样表面分组情况、细胞培养同第二部分实验 2.1。将野生型和 Cdc42siRNA 转染后 rBMSCs 稀释浓度到 2×10^4 个/毫升/孔细胞密度接种, 7 天后终止培养, 使用 Trizol RNA 提取法、逆转录反应及实时定量 PCR 反应进行试样表面细胞成骨基因表达检测, 具体方法见实验二 2.9。

2.12 Cdc42siRNA 转染对 β -catenin 信号活性及 Cdc42 蛋白表达水平的影响

试样表面分组情况、细胞培养同第二部分实验 2.1。将野生型和 Cdc42siRNA 转染后 rBMSCs 稀释浓度到 2×10^4 个/毫升/孔细胞密度接种, 7 天后终止培养, 采用 PCR 方法检测 β -catenin mRNA 表达水平, 具体方法见实验二 2.9。采用 Western blot 方法检测 Nucleus β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达水平, 具体方法见实验三 2.2。

2.13 Wnt 信号通路基因表达情况

试样表面处理、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.6。7 天后终止培养, 采用实时定量 PCR 方法检测 Wnt1、Wnt3a、Wnt5a、Wnt4、Wnt11、Wnt7a 的 mRNA 表达水平, 具体方法见实验二 2.9。

2.14 整合素基因表达情况

试样表面处理、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.6。12 小时后终止培养, 采用实时定量 PCR 方法检测 $\beta 1$ — $\beta 8$ 的 mRNA 表达水平, 具体方法见实验二 2.9。

2.15 统计学分析

以上数据使用均数 \pm 标准差描述, 统计分析采用 SPSS 21.0 统计学软件, 制图采用 GraphPad Prism 6 软件。使用 ANOVA 和 LSD(L)检验各组之间差异, $p < 0.05$ 作为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 细胞 Rho GTPases 基因表达水平

采用实时定量 PCR 检测 Rho GTPases 相关蛋白 Cdc42、Rac1 及 RhoA 的 mRNA 表达水平。如图 3.1 所示，总体来看，与抛光纯钛组（S）比较，微米形貌及微纳米形貌均上调了各个 Rho GTPases 基因的表达水平，且 20V 微纳米管组（R20）的上调作用更明显。其中在 Cdc42、Rac1 两个蛋白基因表达上，微纳米形貌表面明显高于微米形貌及光滑形貌，20V 微纳米管组（R20）>5V 微纳米管组（R5）>微米组（R）>抛光纯钛组（S），组间存在统计学差异（ $P<0.05$ ）。

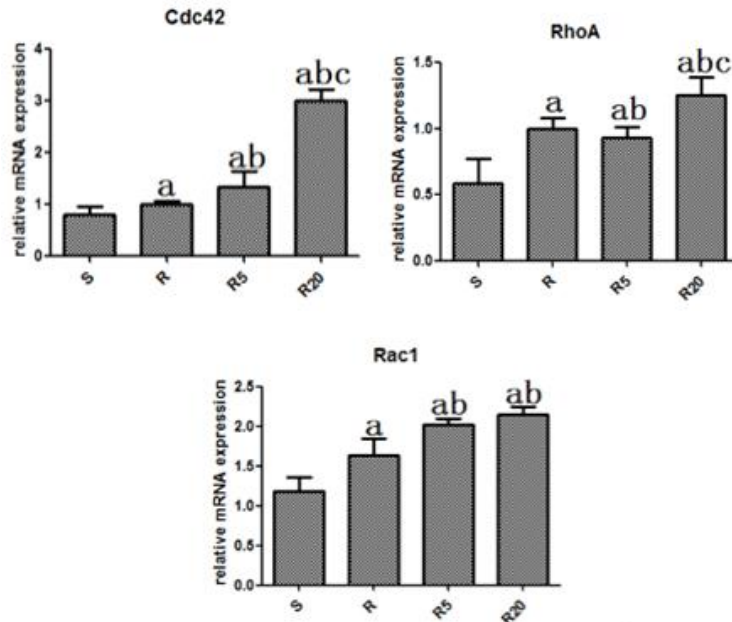


图 3.1 不同形貌（S、R、R5、R20）表面骨髓间充质干细胞（rBMSCs）Rho GTPases 基因表达水平(a:与 S 组相比 $P<0.05$; b:与 R 组相比 $P<0.05$; c:与 R5 组相比 $P<0.05$)

3.2 β -catenin 信号活性及 Cdc42 蛋白表达水平

图 3.2 显示微纳米形貌表面细胞 β -catenin mRNA 表达水平明显增强，且 Nucleus β -catenin、p-GSK3 β 蛋白表达明显高于微米形貌及光滑形貌，而 GSK3 β 在各组试样表面表达基本相近，表明微纳米形貌激活了 β -catenin 信号通路。同时在 Rho GTPases 重要成员 Cdc42 蛋白表达水平检测上，微纳米形貌表面蛋白表达量明显多于微米形

貌及光滑形貌，尤其在 20V 微纳米管组（R20）形貌表面表达水平最高。

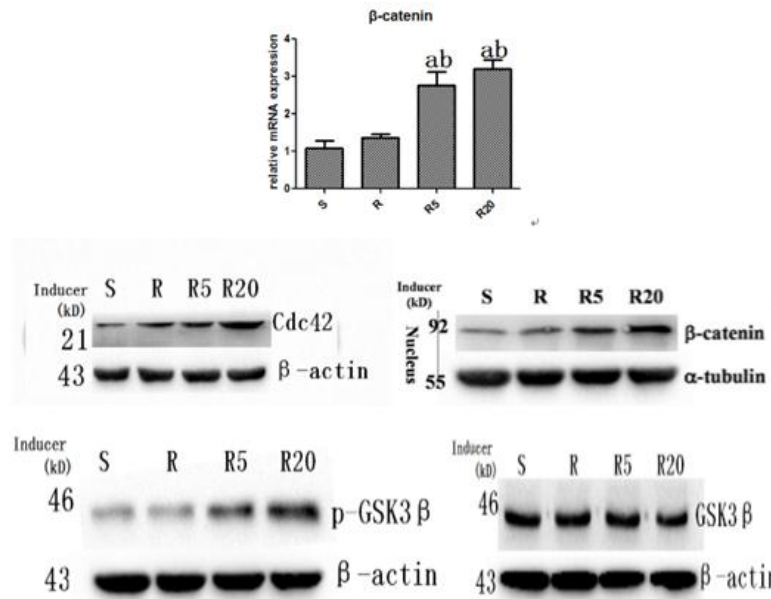


图 3.2 qRT-PCR 和 Western Blot 方法检测微纳米形貌表面 β -catenin 信号活性及 Cdc42 蛋白表达水平(a:与 S 组相比 $P<0.05$; b:与 R 组相比 $P<0.05$; c:与 R5 组相比 $P<0.05$)

3.3 Cdc42siRNA 转染效率检测

采用 PCR 方法检测 Cdc42siRNA 转染效率。如图 3.3-A 所示，266#Cdc42siRNA 基因沉默效率最高；其余试样置于倒置荧光显微镜下可见转染效率基本与实时定量 PCR 检测结果一致（图 3.3-B）。

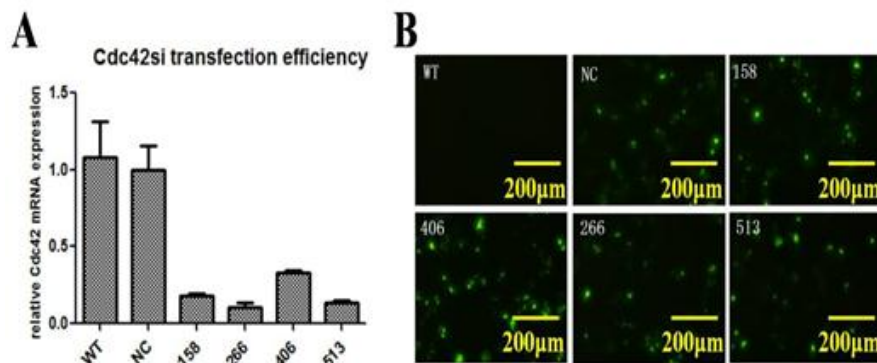


图 3.3 A.实时定量 RT-PCR 方法检测 Cdc42siRNA 转染 24 小时后 Cdc42 基因沉默效率 B. 倒置荧光显微镜下 FAM 绿色荧光标记的 Cdc42siRNA 发光情况

3.4 Cdc42siRNA 转染对细胞活力的影响

采用 CCK-8 试剂盒检测微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染培养 3 天和 7 天对细胞活力的影响。如图 3.4 所示，使用特异性 Cdc42siRNA 沉默了 Cdc42 的表达后，在微纳米形貌表面骨髓间充质干细胞活力无明显变化，仅在培养了 7 天时显示抛光纯钛组（S）出现了较为明显的细胞活力下降。

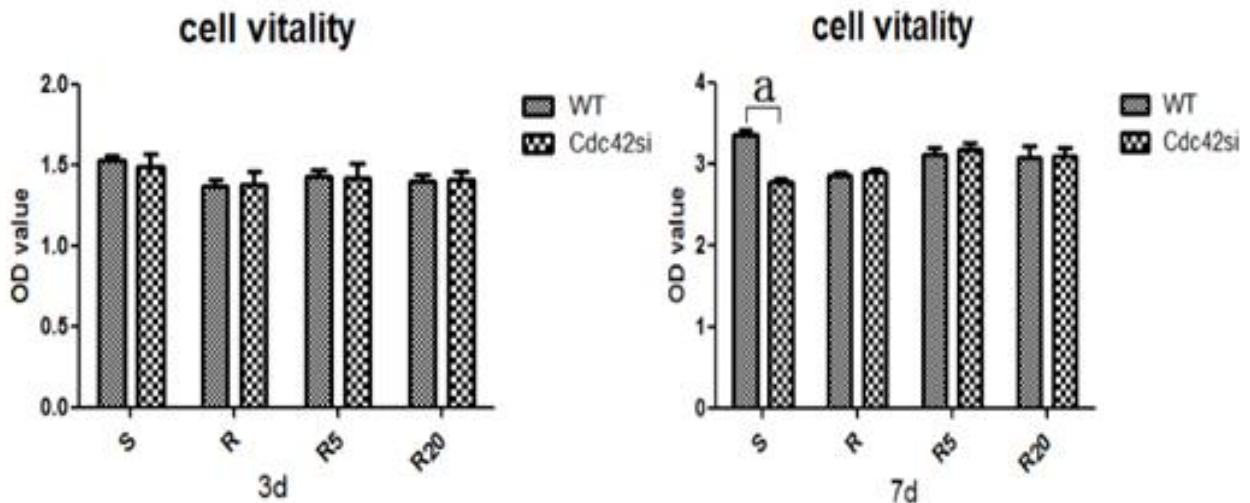


图 3.4 CCK8 法检测微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染培养 3 天和 7 天对细胞活力的影响（a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P < 0.05$ ）

3.5 Cdc42siRNA 转染对细胞形态的影响

采用 SEM 电镜观察微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对细胞形态的影响。如图 3.5 所示，总体来讲，Cdc42siRNA 转染使试样表面细胞形态发生了较大改变。转染后的 rBMSCs 处于相对萎缩状态，在高倍数扫描电镜下转染后的 rBMSCs 丝状伪足和板状伪足明显减少，尤其在 5V 微纳米管组（R5）及 20V 微纳米管组（R20）形貌表面变化最为明显。

3.6 Cdc42siRNA 转染对细胞骨架的影响

使用共聚焦显微镜观察试样表面微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对细胞骨架的影响。图 3.6 显示 Cdc42siRNA 转染使试样表面细胞骨架发生了较大变化。转染后的 rBMSCs 细胞骨架肌动蛋白染色强度变弱，尤其 5V 微纳米管组（R5）及 20V 微纳米管组（R20）两种微纳米形貌表面胞浆内清晰的红色纤维网状结构明显减弱。

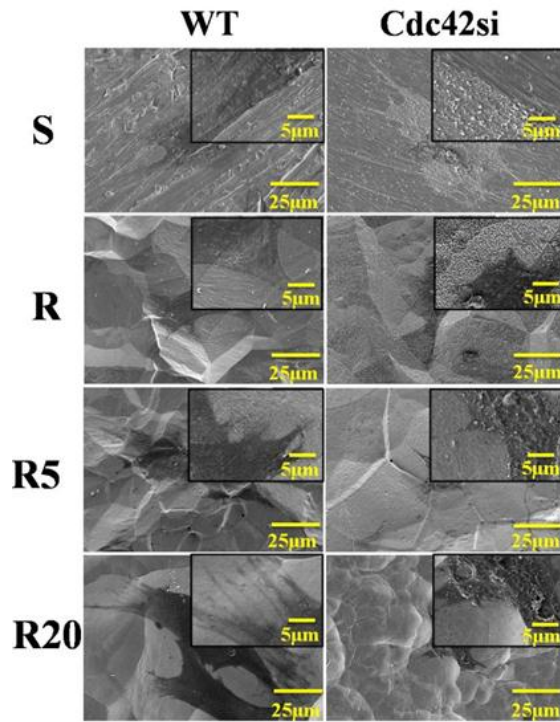


图 3.5 场发射扫描电镜 (SEM) 观察微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对细胞形态的影响

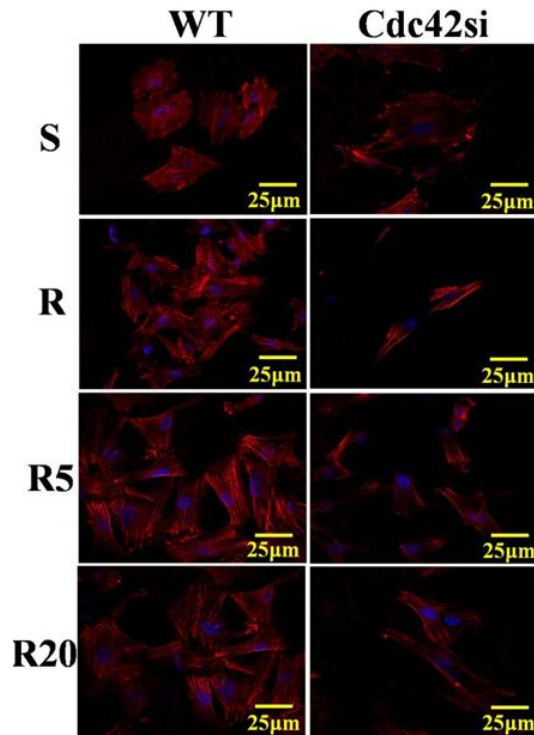


图 3.6 共聚焦显微镜观察微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对细胞骨架的影响

3.7 Cdc42siRNA 转染对 Cdc42 在细胞内表达的影响

采用倒置荧光显微镜观察微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对 rBMSCs 特异性的免疫荧光抗体 Cdc42 在细胞内分布的影响。如图 3.7 所示，Cdc42siRNA 转染使微米及微纳米形貌表面细胞特异性的免疫荧光抗体 Cdc42 在细胞内的分布及荧光强弱发生了较大改变，特别是在 5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 两种微纳米形貌表面转染后的 rBMSCs 特异性的免疫荧光抗体 Cdc42 染色强度明显变弱，而 Cdc42siRNA 转染对抛光纯钛组 (S) 影响相对较小。

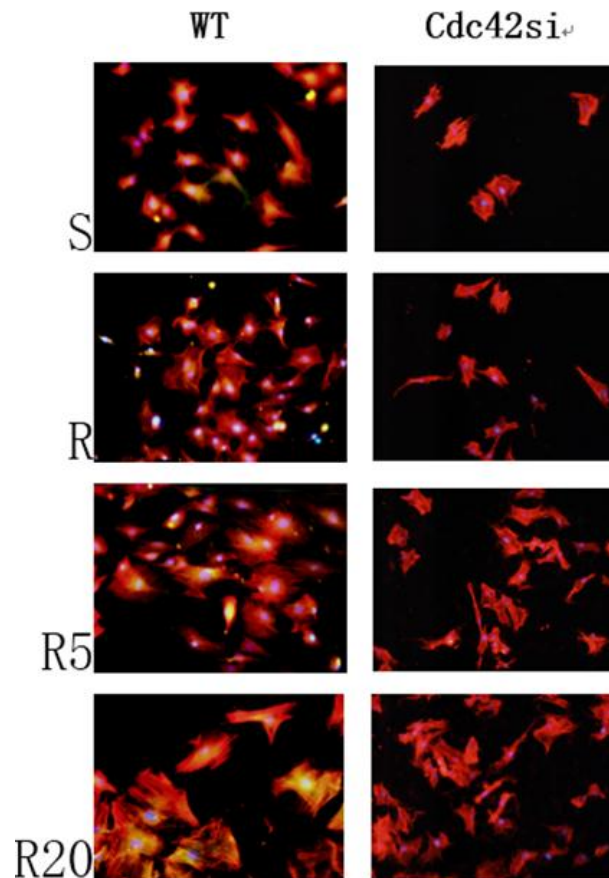


图 3.7 倒置荧光显微镜观察微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对 rBMSCs 细胞内 Cdc42 分布的影响

3.8 Cdc42siRNA 转染对细胞碱性磷酸酶分泌的影响

如图 3.8 所示，除抛光纯钛组 (S) 外，Cdc42siRNA 转染明显降低了微米及微纳米形貌表面细胞碱性磷酸酶分泌量，在微米组 (R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 分别降低了约 20%、40% 及 40%。

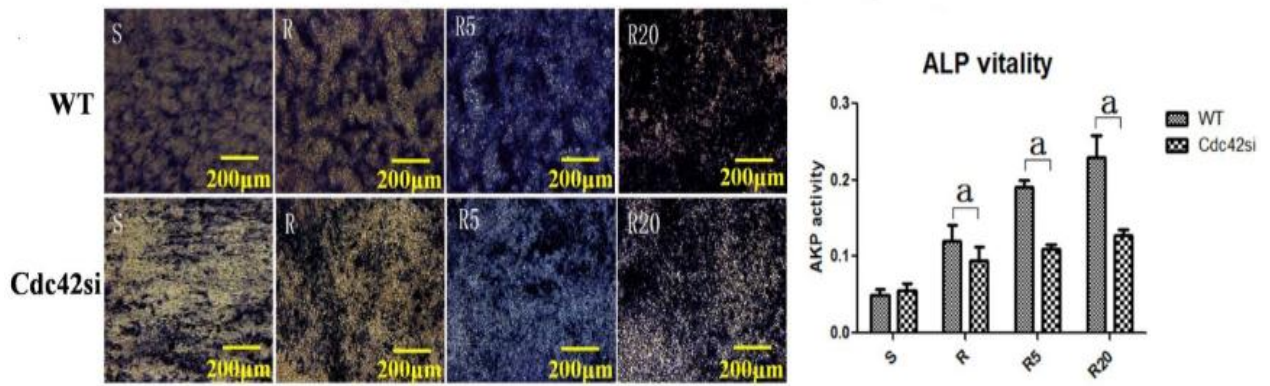


图 3.8 微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对细胞碱性磷酸酶分泌的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P < 0.05$)

3.9 Cdc42siRNA 转染对细胞胶原分泌的影响

如图 3.9 所示，除抛光纯钛组 (S) 外，Cdc42siRNA 转染明显降低了微米及微纳米形貌表面细胞胶原分泌量，在微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V 微纳米管组 (R20) 分别降低了约 30%、55% 及 60%。

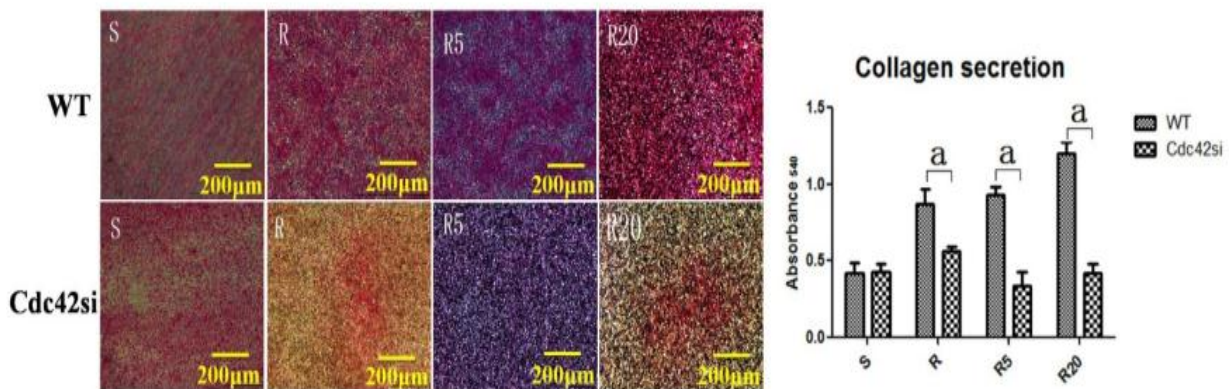


图 3.9 微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对细胞胶原分泌的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P < 0.05$)

3.10 Cdc42siRNA 转染对细胞外基质矿化的影响

如图 3.9 所示，除抛光纯钛组 (S) 外，Cdc42siRNA 转染明显降低了微米及微纳米形貌表面细胞外基质矿化水平，在微米组(R)、5V 微纳米管组 (R5) 及 20V

微纳米管组 (R20) 分别下降了约 45%、70% 及 70%。

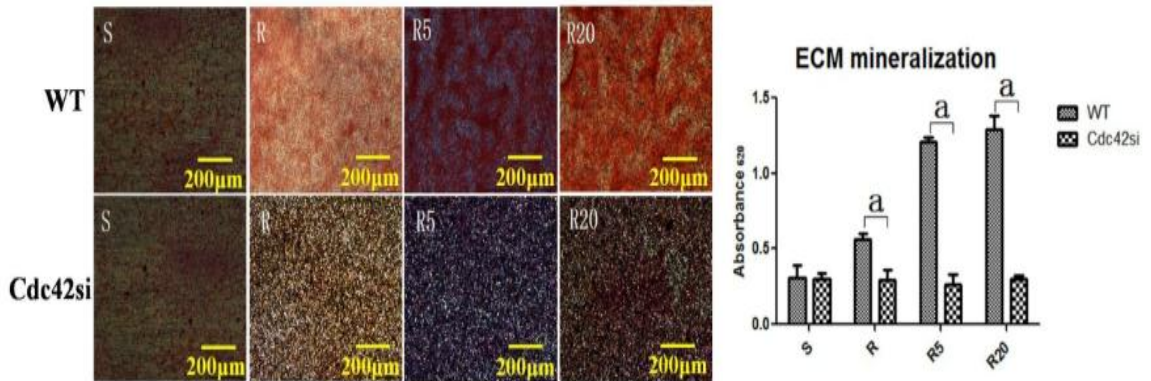


图 3.10 微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对细胞外基质矿化的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P < 0.05$)

3.11 Cdc42siRNA 转染对成骨基因表达的影响

如图 3.11 所示, 总体来说, Cdc42 介导增强了微纳米形貌表面 rBMSCs 多数成骨基因表达。在 Col I、OCN、OPN、BSP、BMP、ALP、Runx2 等成骨基因表达上, Cdc42siRNA 转染明显抑制了微纳米形貌表面 (R5 及 R20) 成骨相关基因表达, 而对抛光纯钛组 (S) 影响较小。在 OSX 基因表达上, Cdc42siRNA 转染前后各组试样表面基因表达无明显差异 ($P > 0.05$)。

3.12 Cdc42siRNA 转染对 β -catenin 信号活性及 Cdc42 蛋白表达水平的影响

如图 3.11 所示, 总体来说, Cdc42 激活了微纳米形貌表面 rBMSCs β -catenin 信号通路活性。在 β -catenin mRNA 表达表达上, Cdc42siRNA 转染大大降低了微纳米形貌表面 (R5 及 R20) β -catenin mRNA 表达 ($P < 0.05$)。Cdc42 基因沉默明显抑制了微纳米形貌表面 (R5 及 R20) β -catenin 通路活性蛋白 Nucleus β -catenin 及 p-GSK3 β 蛋白表达。

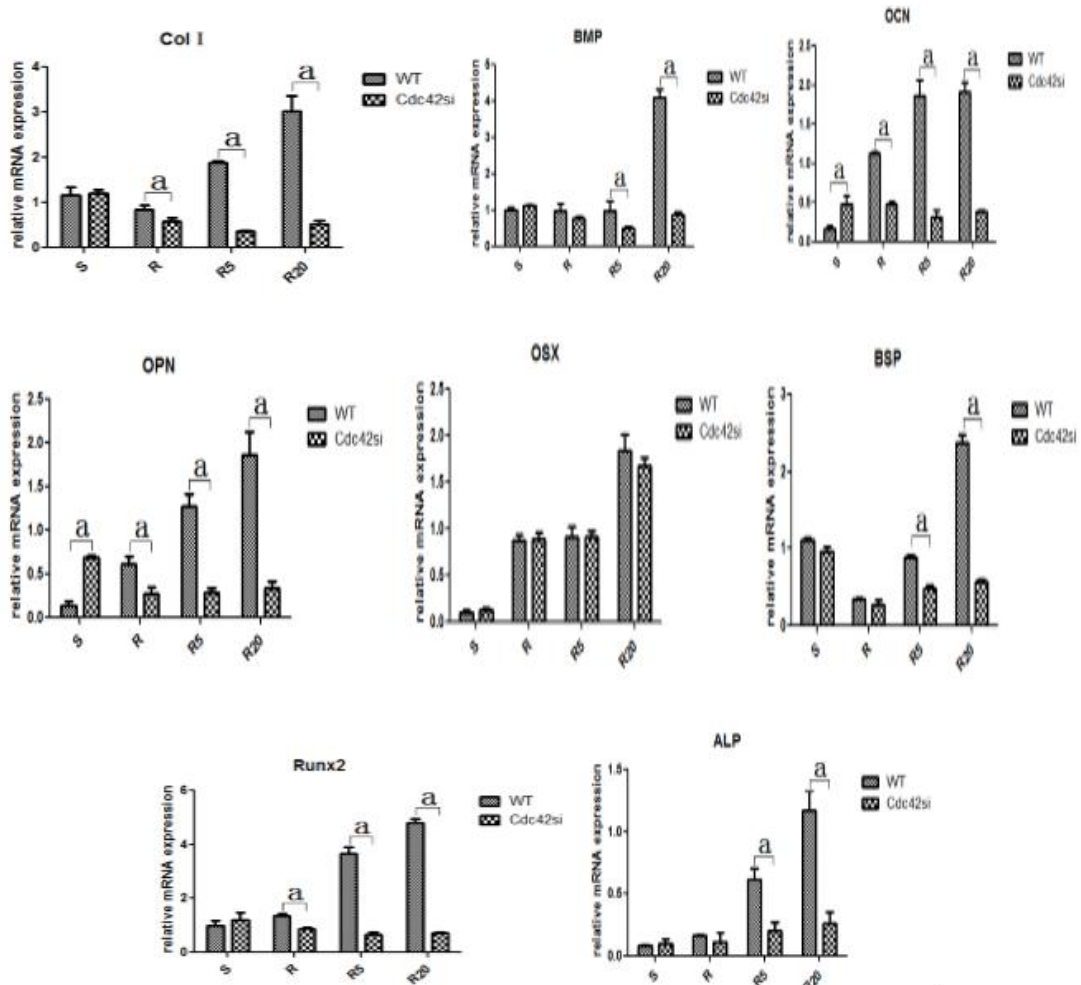


图 3.11 微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对成骨基因表达的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P < 0.05$)

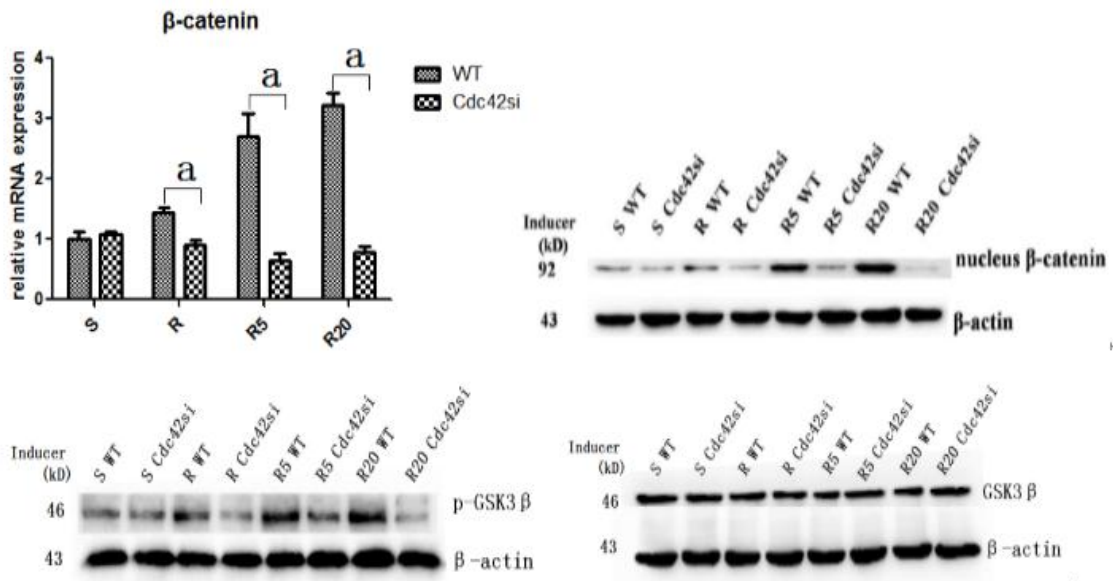


图 3.12 微纳米形貌表面 Cdc42siRNA 转染对 β -catenin 信号活性及 Cdc42 蛋白表达水平的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P < 0.05$)

3.13 Wnt 蛋白基因表达情况

采用实时定量 PCR 方法检测 Wnt 信号通路 Wnt 蛋白 Wnt1、Wnt3a、Wnt5a、Wnt4、Wnt11、Wnt7a 的 mRNA 表达水平。如图 3.13 所示，微纳米形貌（R5、R20）明显增强了 Wnt 经典配体 Wnt3a、Wnt1 的 mRNA 表达，而对 Wnt 非经典配体 Wnt5a、Wnt4、Wnt11、Wnt7a 的 mRNA 表达无明显影响。

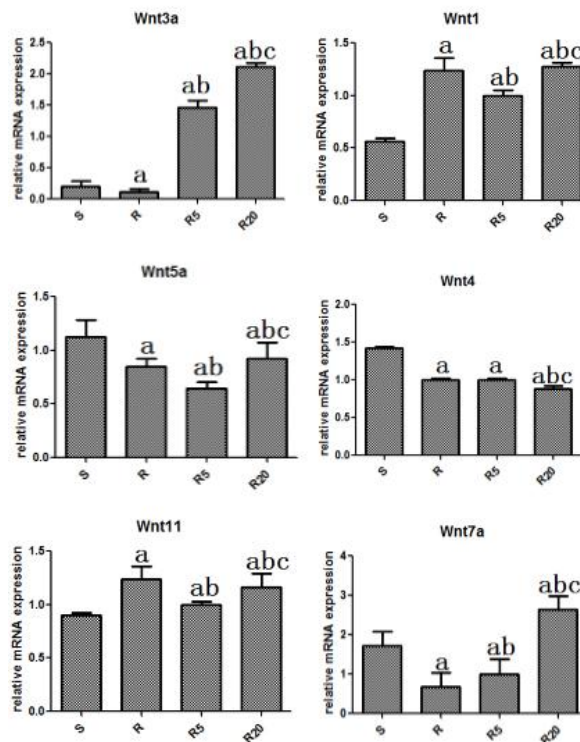


图 3.13 不同形貌（S、R、R5、R20）表面骨髓间充质干细胞（rBMSCs）Wnt 蛋白基因表达水平(a:与 S 组相比 $P<0.05$; b:与 R 组相比 $P<0.05$; c:与 R5 组相比 $P<0.05$)

3.14 整合素基因表达情况

如图 3.14 所示，微纳米形貌显著上调了 Integrin β 1、Integrin β 3 和 Integrin β 6 的 mRNA 表达，尤其在 5V 微纳米管组（R5）及 20V 微纳米管组（R20）的表达量明显高于抛光纯钛组（S）及微米组(R)表面。在 Integrin β 4 和 Integrin β 4 的表达上，20V 微纳米管组（R20）的表达量显著强，但微纳米形貌对 Integrin β 2、Integrin β 5 及 Integrin β 8 mRNA 表达没有明显调控作用。

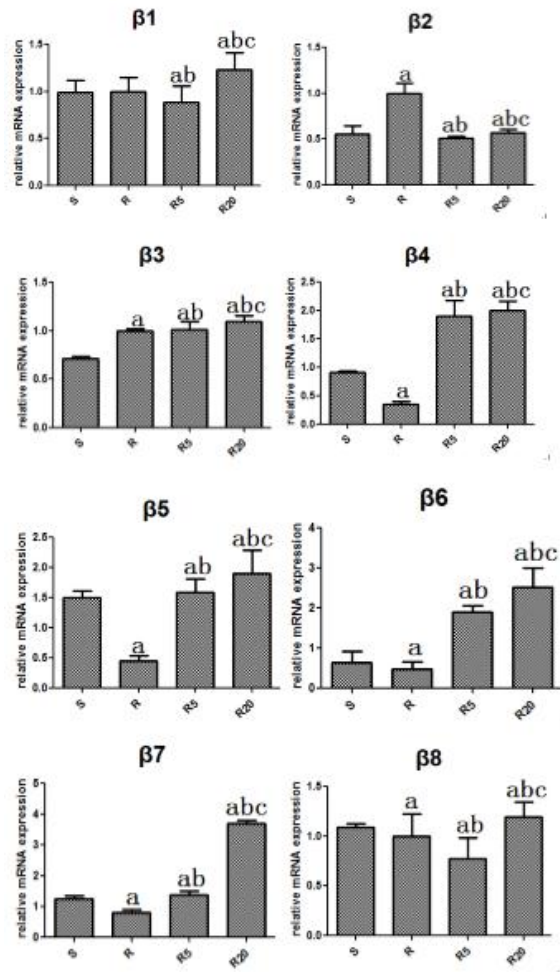


图 3.14 不同形貌 (S、R、R5、R20) 表面骨髓间充质干细胞 (rBMSCs) 整合素 $\beta 1$ — $\beta 8$ mRNA 表达水平(a:与 S 组相比 $P < 0.05$; b:与 R 组相比 $P < 0.05$; c:与 R5 组相比 $P < 0.05$)

4 讨论

第二部分体外的细胞学及分子学实验表明钛种植体表面微纳米形貌不仅显著改变了 rBMSCs 表面粘附能力、形态及细胞骨架, 而且较大地促进 rBMSCs 的成骨分化能力。因此, 材料表面形貌导致的细胞形态改变与成骨细胞功能有很大的相关性, 而细胞形态主要是由胞浆内部的细胞骨架系统来调控的。大量文献表明 Rho GTPases 信号与细胞骨架系统和整合素都密切相关, Rho GTPases 被认为是参与调节肌动蛋白细胞骨架合成和降解主要蛋白激酶, 并且通过调控细胞骨架中肌动蛋白的收缩或者肌动蛋白和细胞膜的相互作用的方式调控整合素的聚集^[3, 4]。由于 Wnt/ β -catenin 通路途经在促进成骨与抑制骨吸收方面的双重作用, 使得干预

Wnt/ β -catenin 信号来调控成骨已成为研究热点。王薇等^[2, 25]研究证实材料表面微纳米形貌可通过改变 Wnt 蛋白的分泌水平激活下游 Wnt/ β -catenin 通路，促进成骨分化，但材料表面形貌激活和调控 Wnt 通路的具体分子事件还尚未可知。因此本实验主要对骨植入材料表面微纳米形貌是否通过 Rho GTPases/Wnt/ β -catenin 信号途经将材料表面形貌刺激传递到细胞核内，促进 rBMSCs 成骨进行探究。

Rho GTPases 控制肌动蛋白骨架，例如肌动蛋白被组装进入各种细胞结构中，也广泛参与调节很多需要肌动蛋白参与的细胞活动^[19]。本实验结果显示微纳米形貌均不同程度上调了 Rho GTPases 相关蛋白 Cdc42、Rac1 及 RhoA 的 mRNA 表达水平，在 20V 微纳米管组（R20）的上调作用最为显著，同时微纳米形貌表面 Rho GTPases 重要成员 Cdc42 蛋白表达水平明显高于对照组，提示 Rho GTPases 参与了微纳米形貌对 rBMSCs 信号调控，微纳米形貌导致了 Cdc42 的活化。 β -catenin 广泛参与了 Wnt 信号通路的调控过程，是其通路中极其重要的蛋白分子。本实验表明微纳米形貌表面细胞 β -catenin mRNA 表达水平明显增强，Nucleus β -catenin、p-GSK3 β 蛋白表达也明显高于对照组，而 GSK3 β 在各组试样表面表达无明显差异，表明微纳米形貌激活了 β -catenin 信号通路。

Cdc42 主要参与调控细胞丝状伪足及介导靶蛋白 WASP 调节加强肌动蛋白聚合^[68]。通过在微纳米表面发现 Cdc42 蛋白水平和更致密的 Cdc42 免疫荧光染色表明微纳米形貌促进了 Cdc42 活化。为了进一步确定微纳米形貌对细胞形态、骨架改变及促进成骨分化作用是否由 Cdc42 介导，本实验检测了基因沉默 Cdc42（Cdc42si）对 rBMSCs 形态、骨架改变及成骨分化能力的影响。本实验结果显示 Cdc42siRNA 转染使试样表面细胞形态发生了较大改变。转染后的 rBMSCs 处于相对萎缩状态，丝状伪足和板状伪足明显减少，尤其 20V 微纳米管组（R20）形貌表面变化最为明显。同时转染后的微纳米形貌表面细胞骨架肌动蛋白染色强度、胞浆内清晰的红色纤维网状结构及特异性的免疫荧光抗体 Cdc42 染色强度也明显减弱。以上均表明 Cdc42 是调节细胞形态与细胞骨架的关键分子蛋白。与此同时，Cdc42siRNA 转染均显著降低了微纳米形貌表面细胞碱性磷酸酶合成、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及多数成骨基因表达，说明 Cdc42 介导增强了微纳米形貌表面 rBMSCs 成骨分化功能。

Wnt 信号通路蛋白家族由各种含半胱氨酸的糖蛋白组成，主要对胚胎发育细胞或组织细胞等进行再生、干细胞多能性、细胞极性和迁移等多个方面的调控。Wnt

信号的多效性包括对有丝分裂原刺激的影响以及细胞增殖与分化^[27]。Wnt 配体结合卷曲受体形成共同受体，继而通过一个上下游依赖的方式激活 Wnt 下游信号通路[28]。目前至少确认存在两条 Wnt 通路，其中一条主要通路是 Wnt/ β -catenin 通路，涉及一些 Wnt 配体家族成员在细胞膜上结合 Frizzled 受体及 LRP5/6 受体，形成的蛋白配合物称为“信号转导体”^[29]。信号转导体的形成激活了细胞内的几个动员蛋白质，包括 Axin 和 GSK3 β 。如果缺乏 Wnt 配体，由 Axin, APC 及 GSK3 β 组成的复合体可通过磷酸化和泛素化降解 β -catenin 蛋白。如果存在 Wnt 配体，该复合体则被诱导转移至胞浆内膜上，在胞浆内膜上促进 β -catenin 蛋白合成。新合成的 β -catenin 蛋白入核，从而导致靶基因转录及 TCF/LEF 家族成员转录因子被激活^[30, 31]。一些蛋白调节在细胞外调节 Wnt / β -catenin 信号通路，包括 Dickkopf 家族（Wnt / β -catenin β 信号通路抑制剂）和 R-Spondin 蛋白家族（Wnt / β -catenin 信号通路激动剂）。另外一条公认的 Wnt 通路即其另一个重要分支，通常定义为“非经典 Wnt 信号通路”，独立于经典 Wnt / β -catenin 通路，但下游通路与经典 Wnt 通路有一些交替和重叠^[35]。为了检测微纳米形貌表面调控中 Cdc42 是否为 β -catenin 通路的关键上游分子，本实验检测了基因沉默 Cdc42(Cdc42si)对 β -catenin 信号通路的影响。本实验结果显示 Cdc42siRNA 转染大大降低了微纳米形貌表面 β -catenin mRNA 表达 ($P < 0.05$)。同时 Cdc42 基因沉默明显抑制了微纳米形貌表面 Nucleus β -catenin 及 p-GSK3 β 蛋白表达，提示 Cdc42 激活了微纳米形貌表面 rBMSCs β -catenin 信号通路活性。微纳米形貌 (R5、R20) 明显增强了 Wnt 经典配体 Wnt3a、Wnt1 的 mRNA 表达，而对 Wnt 非经典配体 Wnt5a、Wnt4、Wnt11、Wnt7a 的 mRNA 表达无明显影响，表明微纳米形貌主要受经典 Wnt 信号通路调控。研究表明^[68]植入材料表面形貌是通过间接或直接对机械力学方式的传导改变来调控细胞生物学行为。其中，粘着斑 Fas 相关信号通路是机械力学方式传导的主要机制之一。整合素 亚基在细胞内端结合粘着斑 Fas 形成复合体是细胞内外沟通作用的重要效应器。本实验结果显示微纳米形貌显著上调了 Integrin β 1、Integrin β 3 和 Integrin β 6 的 mRNA 表达，但微纳米形貌对 Integrin β 2、Integrin β 5 及 Integrin β 8 mRNA 调控作用较弱，表明部分整合素 亚基参与了微纳米形貌细胞调控作用。

综上所述，我们可以推测 Cdc42/Wnt/ β -catenin 信号通路参与了微纳米形貌 rBMSCs 形态及成骨分化功能的调控。具体路径包括微纳米形貌通过整合素 亚基与

粘着斑 Fas 复合体传导机械力学刺激，激活细胞 Wnt 蛋白，进而通过激活 Rho GTPases 成员 Cdc42 引起细胞形态骨架变化，同时 Cdc42 磷酸化 GSK3 β 阻止 β -catenin 胞浆内降解，使 β -catenin 在胞浆内累积并转位入核，上调 β -catenin 信号活性。

5 结论

(1) Cdc42/Wnt/ β -catenin 信号通路参与了微纳米形貌 rBMSCs 形态及成骨分化功能的调控。

(2) 微纳米形貌 rBMSCs 调控可能存在的分子机制，如图 3.15 所示：微纳米形貌促进了整合素 亚基和经典 Wnt 蛋白表达，从而激活 Cdc42 引起细胞形态骨架变化，活化的 Cdc42 磷酸化 GSK3 β 阻止 β -catenin 胞浆内降解，使 β -catenin 在胞浆内累积并转位入核，上调 β -catenin 信号活性，促进 rBMSCs 的成骨分化功能。

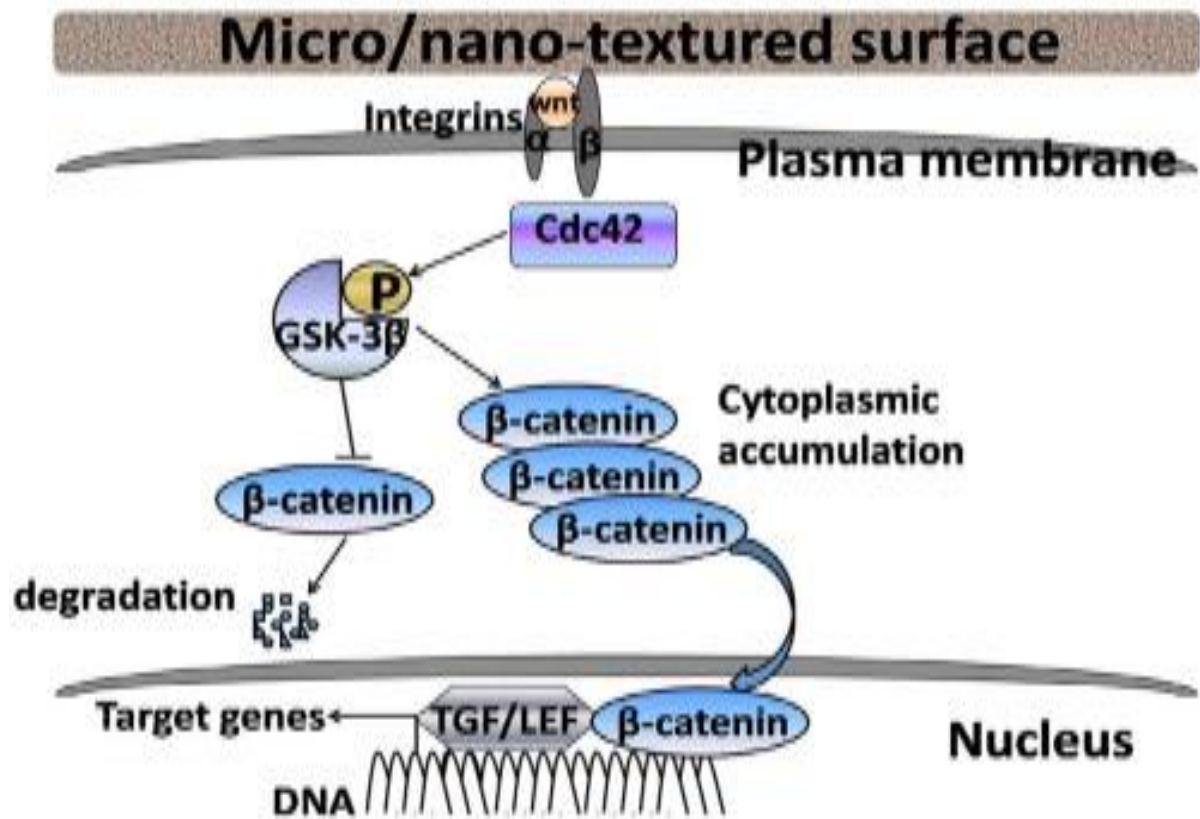


图 3.15 微纳米形貌表面 Cdc42/Wnt/ β -catenin 信号通路示意图

第四部分 微纳米形貌通过 Rac1/MAPK 通路 对 rBMSCs 调控的研究

近年来种植体表面形貌调控细胞信号转导通路的研究渐渐受到生物材料研究者的注意。分裂素激活蛋白激酶 (MAPK) 是一类广泛分布于胞浆中的蛋白激酶家族, 主要成员包括 ERK、JNK 及 p38, 其参与一系列胞外刺激的过程及影响细胞的行为, 例如环境应力、生长因子和细胞因子等。在某些情况下, 分裂素激活蛋白激酶 (MAPK) 常作为细胞内信号通路集线器在其中不同的细胞信号通路激活上下游信号分子, 发挥协调作用^[42]。Hamilton 等与王薇等^[2, 53]均发现微米级形貌或微纳米形貌调控 ERK1/2 的磷酸化和胞核转移及成骨分化。由此可见, 材料表面 MAPK 信号活性与成骨细胞的功能表达水平关系重大, 但是材料表面形貌具体是通过何种分子途经介导和调节 MAPK 信号活性的, 目前仍是个未解之谜。事实上, Rho GTPases 作为信号开关分子, 是 MAPK 系统上游极为重要的信号转导分子之一。Ras 作为 Rac1 的上游信号分子, 能够激活 Rac1 信号。同时, Rac1 也能够激活 ERK1/2、p38 信号等下游信号分子^[6]。Hall 等发现 Rac1 能够增加肌动蛋白聚合, 促进板状伪足的形成, Rac1 与 Cdc42 对细胞骨架具有相似的调节作用^[3]。鉴于 Rac1 在实验第二部分在微纳米形貌 rBMSCs 内 mRNA 表达明显优于对照组, 我们认为 Rac1 与 MAPK 信号通路间串联调节也可能是参与介导 rBMSCs 对材料微纳米形貌的生物学反应的另一个分子机制。为了验证以上推测, 本实验通过多种细胞分子实验方法对不同微纳米形貌表面 rBMSCs 内 Rac1 表达水平、Rac1 对材料 MAPK 微纳米形貌表面 rBMSCs 的生物学反应的影响、及 Rac1 对 MAPK 信号通路活性的影响。

1 材料、试剂和仪器

Rac1 小干扰 RNA (Rac1siRNA, 中国 Ribbo 公司); LipofectamineTM2000 试剂 (美国 Invitrogen 公司); FAM 绿色荧光标记的特异性抗 Rac1 抗体 (美国 abcam 公司); 抗 α -tubulin 抗体 (美国 abcam 公司); 抗 β -actin 抗体 (美国 CST 公司); 抗 p-p38

抗体（美国 CST 公司）；抗 t-p38 抗体（美国 CST 公司）；抗 p-ERK1/2 抗体（美国 CST 公司）；抗 t-ERK1/2 抗体（美国 CST 公司）；抗 p-JNK 抗体（美国 CST 公司）；抗 t-JNK 抗体（美国 CST 公司）；其余材料、试剂和仪器同实验一 1.0。

2 实验方法

2.1 微纳米形貌表面 MAPK 信号活性及 Rac1 蛋白表达水平

试样表面分组情况、细胞培养及接种方法同第二部分实验 2.1。培养 7 天终止培养后按实验二 2.9 方法进行 Rac1 总 RNA 提取、逆转录及实时定量 PCR 反应。特异性 Rac1 引物为：上游引物：TTGAGTCCTCGCTGTGTGAG，下游引物：GAGTGTGTCGCTCCTGAGTT。提取各组试样表面 rBMSCs 总蛋白并使用 Western blot 方法检测微纳米形貌表面细胞 Rac1、ERK1/2、p38、JNK 蛋白表达水平，实验方法同实验三 2.2。

2.2 Rac1siRNA 转染及转染效率检测

2.2.1 FAM 绿色荧光标记的 Rac1siRNA 转染步骤

具体实验方法同实验三 2.3.1。

2.2.2 Rac1siRNA 转染效率检测

具体实验方法同实验三 2.3.2。

2.3 Rac1siRNA 转染对细胞活力的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面培养 3 天和 7 天。采用 CCK-8 试剂盒检测 rBMSCs 增殖情况，具体实验方法同实验三 2.4。

2.4 Rac1siRNA 转染对细胞形态的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面培养 1 天，采用 SEM 电镜观察试样表面细胞形态，具体实验方法同实验三 2.5。

2.5 Rac1siRNA 转染对细胞骨架的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面培养 3 天，使用 CLSM 观察试样表面的细胞骨架并拍照，具体方法同实验三 2.6。

2.6 Rac1siRNA 转染对细胞骨架蛋白 Cdc42 分布的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面培养 3 天，采用倒置荧光显微镜观察 Rac1siRNA 转染对 Cdc42 在细胞内表达的影响，具体方法同实验三 2.7。

2.7 Rac1siRNA 转染对碱性磷酸酶分泌的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面培养 7 天，采用体式显微镜观察拍照并采用 AKP 试剂盒与 BCA 试剂盒进行 AKP 活性测试，具体方法同实验三 2.8。

2.8 Rac1siRNA 转染对细胞胶原分泌的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面成骨诱导培养 2 周，采用体式显微镜观察拍照并进行半定量检测，具体方法同实验三 2.9。

2.9 Rac1siRNA 转染对细胞外基质矿化的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面成骨诱导培养 2 周，采用体式显微镜观察细胞外基质矿化情况并进行细胞外基质半定量检测，具体方法同实验三 2.10。

2.10 Rac1siRNA 转染对成骨相关基因表达的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面培养 7 天，使用 Trizol RNA 提取法、逆转录反应及实时定量 PCR 反应进行试样表面细胞成骨基因表达检测，具体方法同实验三 2.11。

2.11 Rac1siRNA 转染对 MAPK 信号通路活性的影响

将野生型和 Rac1siRNA 转染后 rBMSCs 分别在 S、R、R5 及 R20 组表面培养 7 天，采用 Western blot 方法检测 ERK1/2、p38 蛋白表达水平，具体方法同实验三 2.12。

2.12 统计学分析

以上数据使用均数 \pm 标准差描述，统计分析采用 SPSS 21.0 统计学软件，制图采用 GraphPad Prism 6 软件。使用 ANOVA 和 LSD(L)检验各组之间差异， $p < 0.05$ 作为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 MAPK 信号活性及 Rac1 蛋白表达水平

如图 4.1 所示，微纳米形貌表面细胞明显增加了 Rac1 mRNA 表达与蛋白表达水平，特别是在 R20 组更为显著。在总的 t-p38 及 t-ERK1/2 表达量基本相同情况下，微纳米形貌显著上调了 p-p38 及 p-ERK1/2 蛋白表达水平。但在微纳米形貌表面并未检测到 JNK 相关蛋白的表达。

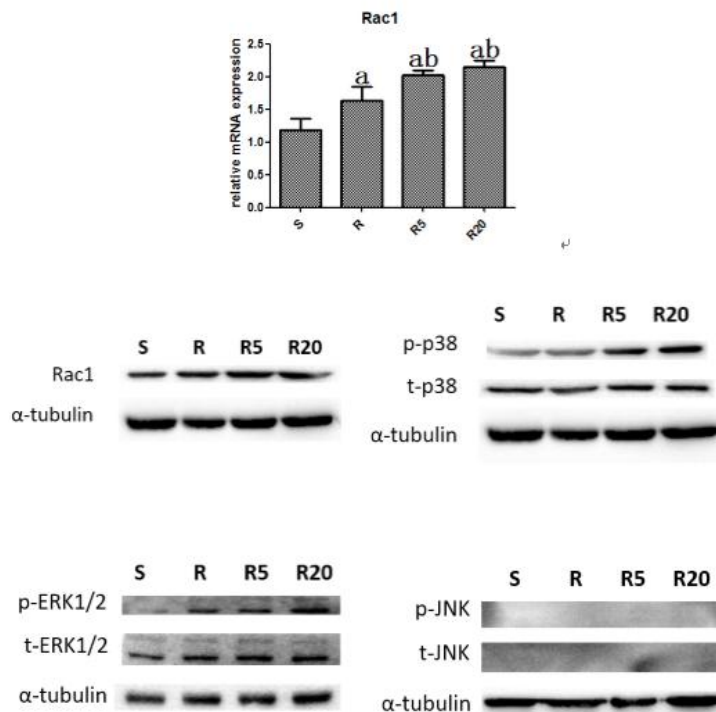


图 4.1 qRT-PCR 和 Western Blot 方法检测微纳米形貌表面 MAPK 信号活性及 Rac1 蛋白表达水平(a:与 S 组相比 $P < 0.05$; b:与 R 组相比 $P < 0.05$; c:与 R5 组相比 $P < 0.05$)

3.2 Rac1siRNA 转染效率检测

如图 4.2 所示，478#Rac1siRNA 基因沉默效率最高；其余试样置于倒置荧光显微镜下观察 FAM 绿色荧光标记的 Rac1siRNA 发光情况，转染效率与实时定量 PCR 检测结果基本一致。

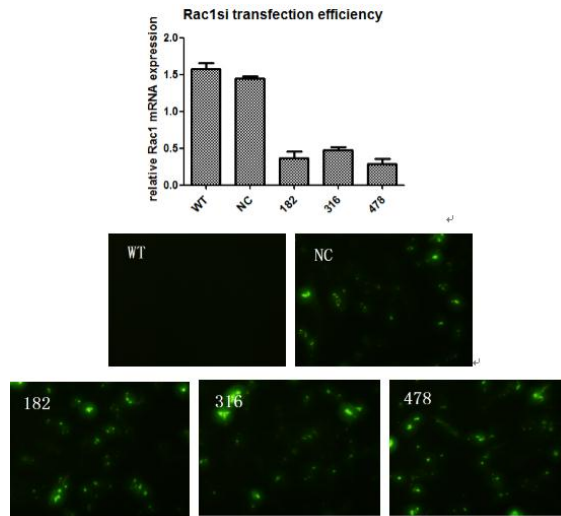


图 4.2 实时定量 PCR 方法检测 Rac1siRNA 转染 24 小时后 Rac1 基因沉默效率及 FAM 标记的 Rac1siRNA 荧光情况

3.3 Rac1siRNA 转染对细胞活力的影响

采用 CCK-8 试剂盒检测微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染培养 3 天和 7 天对细胞活力的影响。如图 4.3 所示，使用特异性 Rac1siRNA 沉默了 Rac1 的表达后，在培养 3 天时微纳米形貌表面 rBMSCs 活力较转染前略降低，在培养 7 天时各组均出现较为明显的细胞活力下降。

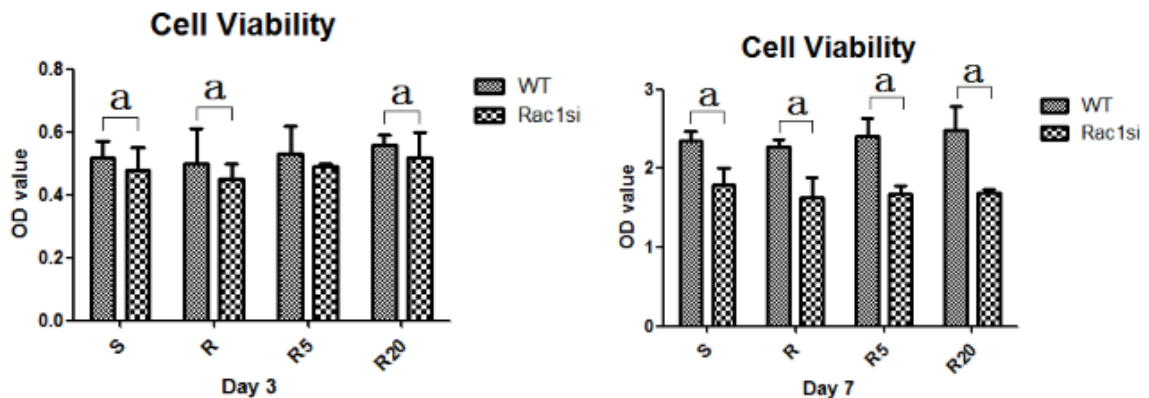


图 4.3 CCK8 法检测微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染培养 3 天和 7 天对细胞活力的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P < 0.05$)

3.4 Rac1siRNA 转染对细胞形态的影响

如图 4.4 所示, 微纳米形貌表面 rBMSCs 呈多边形且存在大量丝状伪足和片状伪足, 特别是 R20 组表面细胞更加明显。Rac1siRNA 转染后微纳米形貌表面 rBMSCs 明显伸展不良且片状伪足数量和长度均减少。

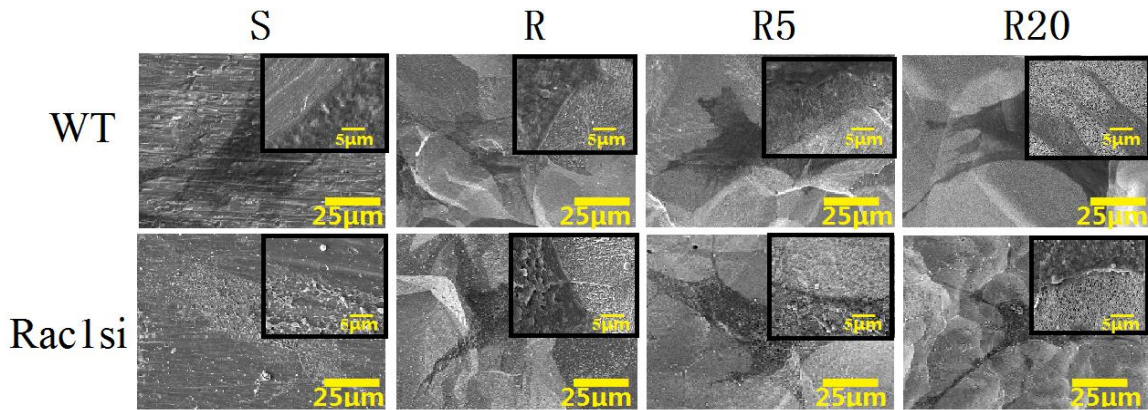


图 4.4 场发射扫描电镜 (SEM) 观察微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对细胞形态的影响

3.5 Rac1siRNA 转染对细胞骨架的影响

使用共聚焦显微镜观察试样表面微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对细胞骨架的影响。如图 4.5 所示, 转染后的 rBMSCs 细胞骨架肌动蛋白染色强度变弱且细胞明显伸展不良, 尤其 R5 与 R20 组微纳米形貌表面胞浆内清晰的红色纤维网状结构显著减少。

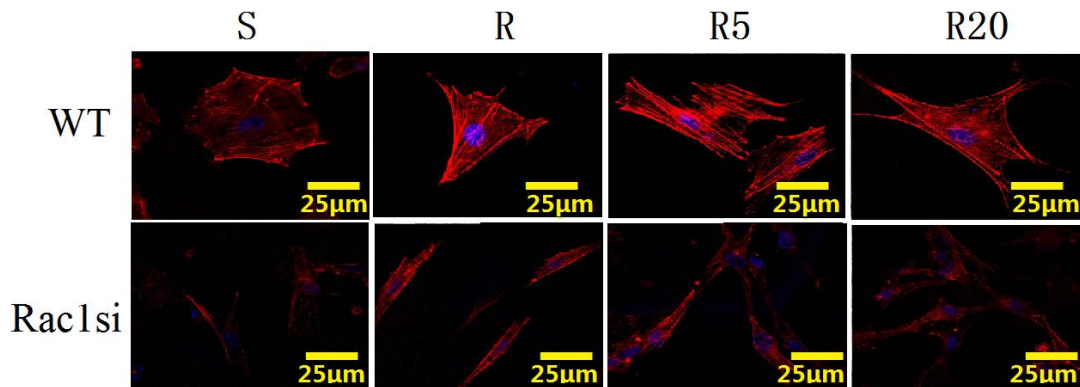


图 4.5 共聚焦显微镜观察微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对细胞骨架的影响

3.6 Rac1siRNA 转染对 Rac1 在细胞内分布的影响

如图 4.6 所示，Rac1siRNA 转染明显减弱了微纳米形貌表面细胞特异性抗体 Rac1 的免疫荧光强度，而 Rac1siRNA 转染对抛光纯钛组（S）影响相对较小。

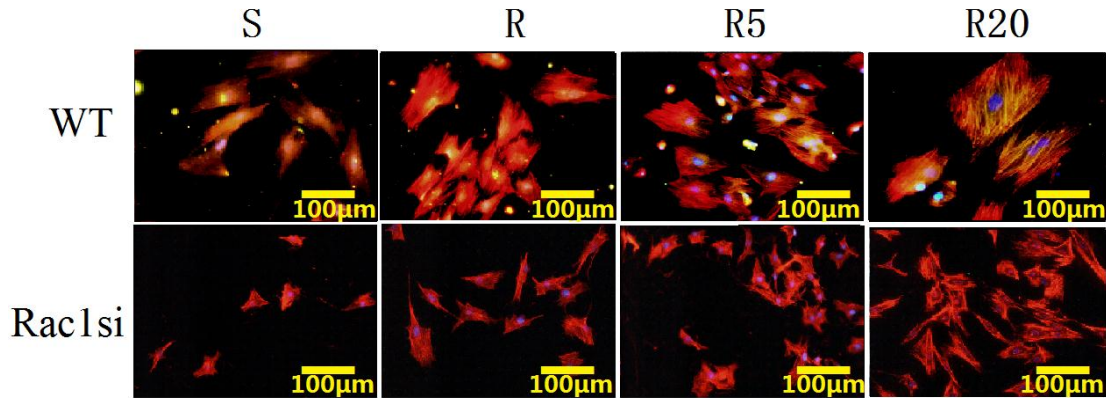


图 4.6 倒置荧光显微镜观察微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对 rBMSCs 细胞内 Cdc42 分布的影响

3.7 Rac1siRNA 转染对细胞碱性磷酸酶分泌的影响

如图 4.7 所示，相比于抛光纯钛组（S），Rac1siRNA 显著抑制微纳米形貌表面碱性磷酸酶的表达，相比于野生型，Rac1siRNA 转染后 R5 及 R20 组表面试样表面形成较少量的蓝紫颗粒。

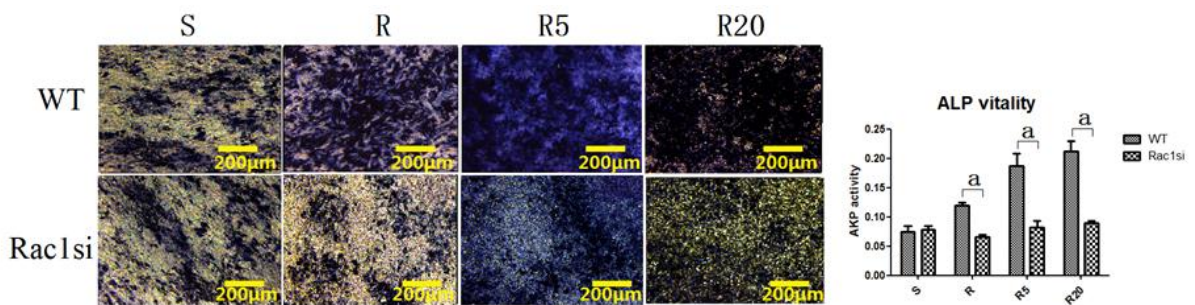


图 4.7 微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对细胞碱性磷酸酶分泌的影响（a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P<0.05$ ）

3.8 Rac1siRNA 转染对细胞胶原分泌的影响

如图 4.8 所示，在细胞胶原分泌方面，微纳米形貌表面分泌具有和 ALP 分泌类

似的趋势。Rac1siRNA 转染明显降低了 R5 及 R20 组表面细胞胶原分泌量。

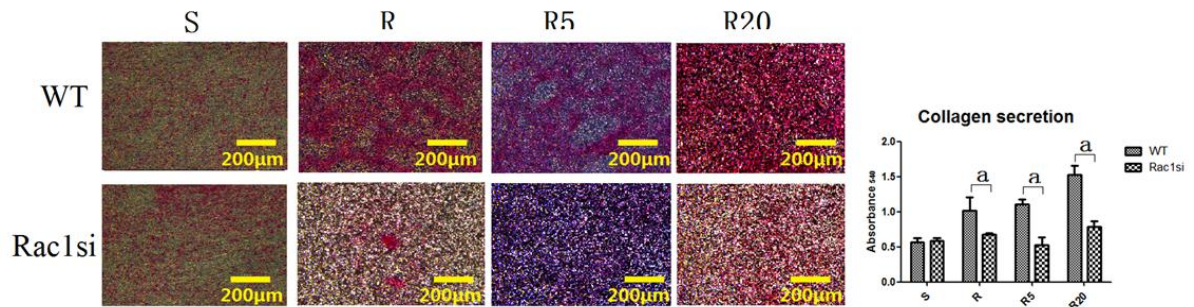


图 4.8 微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对细胞胶原分泌的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P<0.05$)

3.9 Rac1siRNA 转染对细胞外基质矿化的影响

如图 4.9 所示，类似 ALP 及胶原分泌趋势，Rac1siRNA 转染后 R5 及 R20 组表面细胞外基质矿化水平受到明显抑制。

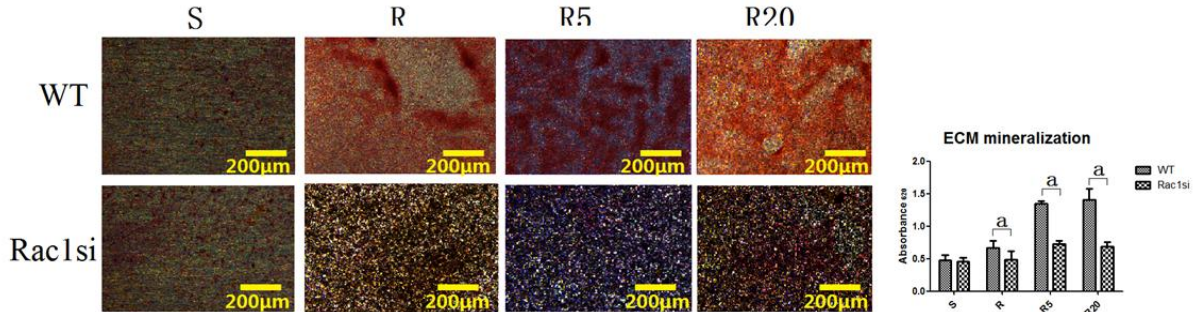


图 4.9 微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对细胞外基质矿化的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P<0.05$)

3.10 Rac1siRNA 转染对成骨基因表达的影响

如图 4.10 所示，在 Col I、OCN、OPN、BSP、BMP、ALP、Runx2 等成骨基因表达上，Rac1siRNA 转染明显下调了微纳米形貌表面（R5 及 R20）成骨相关基因表达，而对抛光纯钛组（S）影响较小。

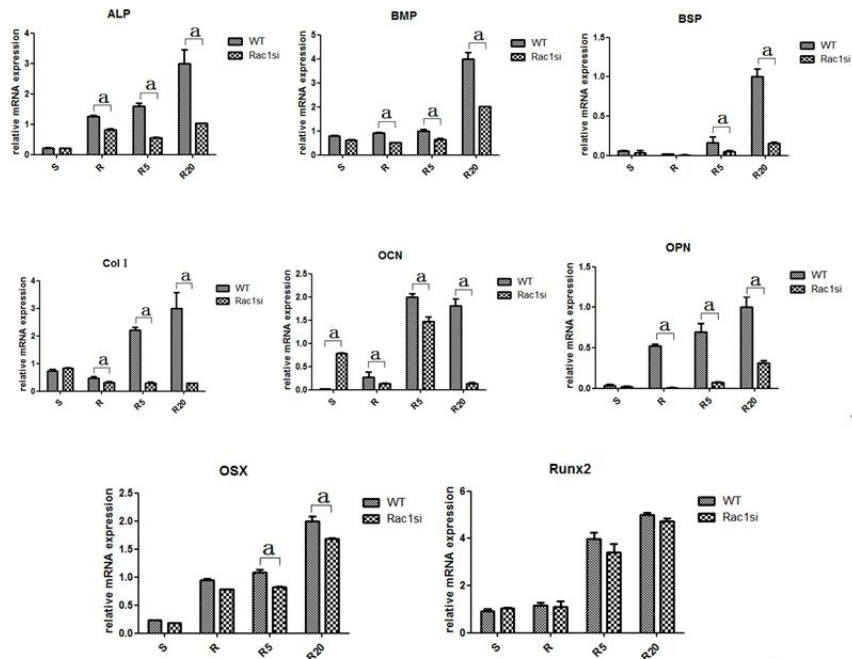


图 4.10 微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对成骨基因表达的影响 (a:与同试样表面野生型细胞组相比 $P < 0.05$)

3.11 Rac1siRNA 转染对 MAPK 信号通路的影响

如图 4.11 所示，Cdc42 基因沉默明显抑制了微纳米形貌表面 p-p38 和 p-ERK1/2 的蛋白表达，而试样表面 t-p38 和 t-ERK1/2 的表达水平无明显改变。提示 Rac1 参与调控微纳米形貌表面 rBMSCs MAPK 信号通路。

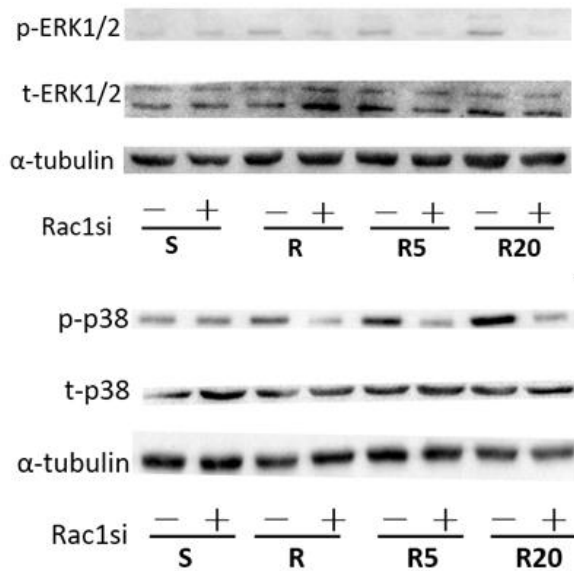


图 4.11 微纳米形貌表面 Rac1siRNA 转染对 MAPK 信号通路的影响

4 讨论

分裂素激活蛋白激酶 (MAPK) 是一类广泛分布于胞浆中的蛋白激酶家族, 主要成员包括 ERK、JNK 及 p38, 其参与一系列胞外刺激的过程及影响细胞的行为, 例如环境应力、生长因子和细胞因子等。在某些情况下, 分裂素激活蛋白激酶 (MAPK) 常作为细胞内信号通路集线器在其中不同的细胞信号通路激活上下游信号分子, 发挥协调作用。在经典的 MAPK 信号通路中, 已经有大量科学证据证实 p38、JNK 和 ERK 活性对成骨相关细胞骨架起到决定性作用。同时 Rho GTPases 作为信号开关分子, 是 MAPK 系统上游极为重要的信号转导分子之一。研究表明 Rac1 能够激活 MAPK 系统 p38 信号等重要信号^[42-44]。所以, 我们猜测种植体表面 Rac1 可能是激活与调控 MAPK 信号的关键蛋白分子, 参与介导成骨相关细胞对微纳米形貌的生物学反应。

本实验结果显示微纳米形貌表面显著上调了 Rac1、p-ERK1/2、p-p38 表达水平, 而未检测到 JNK 相关蛋白的表达, 提示 Rac1 及 MAPK 信号通路参与了微纳米形貌的生物学反应, JNK 未参与。细胞粘附到材料表面之后会快速形成丝状伪足和板状伪足并伴, 随着 Rac1 的激活, 随着细胞的进一步伸展, 大片的黏着斑和肌动蛋白张力纤维形成^[3]。Rac1siRNA 转染后微纳米形貌表面 rBMSCs 片状伪足数量和长度均减少、胞浆内红色纤维网状结构显著减少、特异性抗体 Rac1 的免疫荧光强度明显减弱等变化, 表明 Rac1 能够增加肌动蛋白聚合, 促进板状伪足的形成, 结果基本与 Hall 等人的发现一致。研究表明, MAPK 信号通路参与了成骨细胞分化过程, 活化成骨重要转录因子促进成骨^[43]。本实验显示相比于野生型, Rac1siRNA 显著抑制微纳米形貌表面碱性磷酸酶合成、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨相关基因的表达, 说明 Rac1 参与调控微纳米形貌对 rBMSCs 成骨分化功能。种植体表面形貌调控细胞信号转导通路的研究是目前国际研究关注的热点, 研究表明 MAPK 信号通路在细胞对种植材料的反应中发挥重要作用^[42-44]。本实验通过 Western blot 方法探索 Rac1 蛋白分子是否对 MAPK 信号通路进行调控。结果显示 Cdc42 基因沉默明显抑制了微纳米形貌表面 p-p38 和 p-ERK1/2 的蛋白表达, 而试样表面 t-p38 和 t-ERK1/2 的表达水平无明显改变, 表明 Rac1 参与调控微纳米形貌表面 rBMSCs MAPK 信号通路。

综上所述, 我们可以推测 Rac1/MAPK 信号通路也参与了微纳米形貌 rBMSCs

形态及成骨分化功能的调控。具体路径包括微纳米形貌通过整合素 α 亚基与粘着斑 Fas 复合体传导机械力学刺激，激活 Rho GTPases 成员 Rac1 引起细胞形态变化，激活 MAPK 信号传递入核共同促进 rBMSCs 的成骨功能。

5 结论

- (1) Rac1/MAPK 信号通路参与了微纳米形貌 rBMSCs 形态及成骨分化功能的调控。
- (2) 微纳米形貌 rBMSCs 调控可能存在的分子机制，如图 4.12 所示：微纳米形貌通过整合素 α 亚基与粘着斑 Fas 复合体传导机械力学刺激，激活 Rho GTPases 成员 Rac1 引起细胞形态变化，激活 MAPK 信号传递入核共同促进 rBMSCs 的成骨功能。

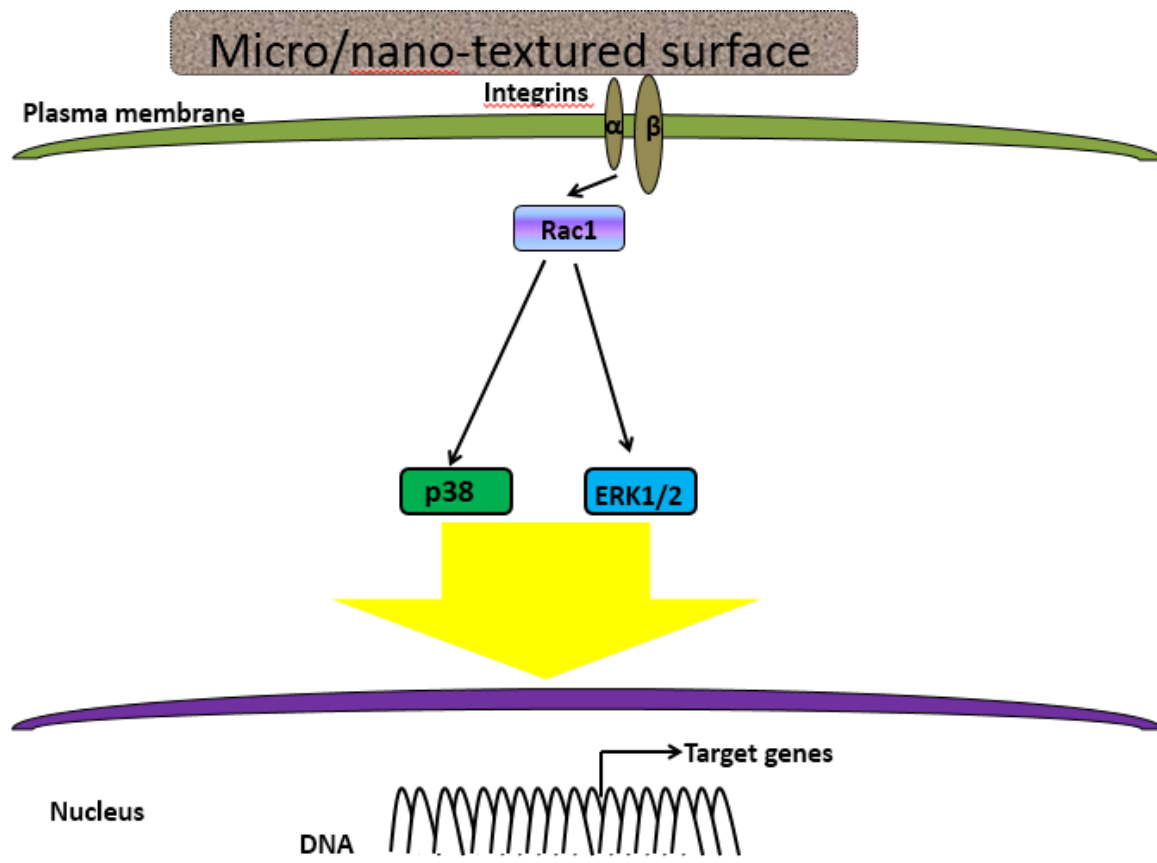


图 4.12 微纳米形貌表面 Rac1/MAPK 信号通路示意图

小 结

本研究创新性地通过酸蚀配合阳极氧化方法制备类似于骨结构的微纳米复合梯度形貌，并结合 SEM、AFM 及接触角测量仪进行表面结构与性状分析。观察微纳米形貌表面细胞黏附计数、活力测定、形态及骨架观察、碱性磷酸酶分泌、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨基因表达等对 rBMSCs 形态与成骨分化功能的影响，通过对比 Cdc42siRNA 及 Rac1siRNA 转染前后 rBMSCs 形态与成骨分化功能评价微纳米形貌表面 Rho GTPases 成员 Cdc42、Rac1 介导对 rBMSCs 的调控作用。采用实时定量 PCR 及 Western blot 方法检测 Cdc42 对 Wnt/ β -catenin 信号通路及 Rac1 对 MAPK 信号通路的影响，从而探索微纳米形貌表面可能存在的调控 rBMSCs 形态与功能变化的分子机制。结果如下：

1. 微纳米形貌试样表面明显可见分布相对均匀的纳米管结构。S、R、R5 及 R20 组试样表面接触角测量值平均值由 58.6° 逐渐降到 3.8°。培养的 rBMSCs 具有增殖、细胞克隆形成及成脂成骨分化能力。
2. 细胞黏附计数、碱性磷酸酶分泌、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨基因表达等方面，实验组表达明显优于对照组，而细胞活力与对照组相比，3 天、7 天时均无明显变化。R5 及 R20 组表面细胞更为伸展，细胞板状伪足和丝状伪足明显更多。同时在共聚焦显微镜下微纳米形貌表面细胞胞浆内红色纤维网状结构更多更清晰。
3. 转染后微纳米形貌表面 rBMSCs 细胞黏附计数、碱性磷酸酶分泌、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨基因表达等均明显下降，微纳米形貌表面细胞处于相对萎缩状态，丝状伪足和板状伪足明显减少，在共聚焦显微镜下胞浆内红色纤维网状结构染色明显减弱。Cdc42siRNA 转染大大降低了微纳米形貌表面 β -catenin mRNA 表达 ($P < 0.05$)。同时 Cdc42 基因沉默明显抑制了 R5 及 R20 组表面 Nucleus β -catenin 及 p-GSK3 β 蛋白表达。R5 及 R20 组明显增加了 Wnt 经典配体 Wnt3a、Wnt1 及整合素 Integrin β 1、Integrin β 3 和 Integrin β 6 的 mRNA 表达。

4. 微纳米形貌表面显著上调了 Rac1、p-ERK1/2、p-p38 表达水平,而未检测到 JNK 相关蛋白的表达。Rac1siRNA 转染后微纳米形貌表面 rBMSCs 片状伪足数量和长度均减少、胞浆内红色纤维网状结构显著减少、特异性抗体 Rac1 的免疫荧光强度明显减弱。相比于野生型, Rac1siRNA 显著抑制 R5 及 R20 组表面碱性磷酸酶合成、细胞胶原分泌、细胞外基质矿化及成骨相关基因的表达。Western blot 结果显示 Cdc42 基因沉默明显抑制了 R5 及 R20 组表面 p-p38 和 p-ERK1/2 的蛋白表达,而试样表面 t-p38 和 t-ERK1/2 的表达水平无明显改变。

综上所述, Cdc42/Wnt/ β -catenin 与 Rac1/MAPK 信号通路均参与调控微纳米形貌 rBMSCs 形态及成骨分化功能。其机制主要为:微纳米形貌通过激活 Rho GTPases 成员 Rac1、Cdc42 引起细胞形态骨架变化; Rho GTPases 一方面通过成员 Cdc42 磷酸化 GSK3 β 阻止 β -catenin 胞浆内降解,使 β -catenin 在胞浆内累积并转位入核,上调 β -catenin 信号活性;另一方面通成员 Rac1 激活 MAPK 信号,这两方面信号传递入核共同促进细胞的成骨功能。

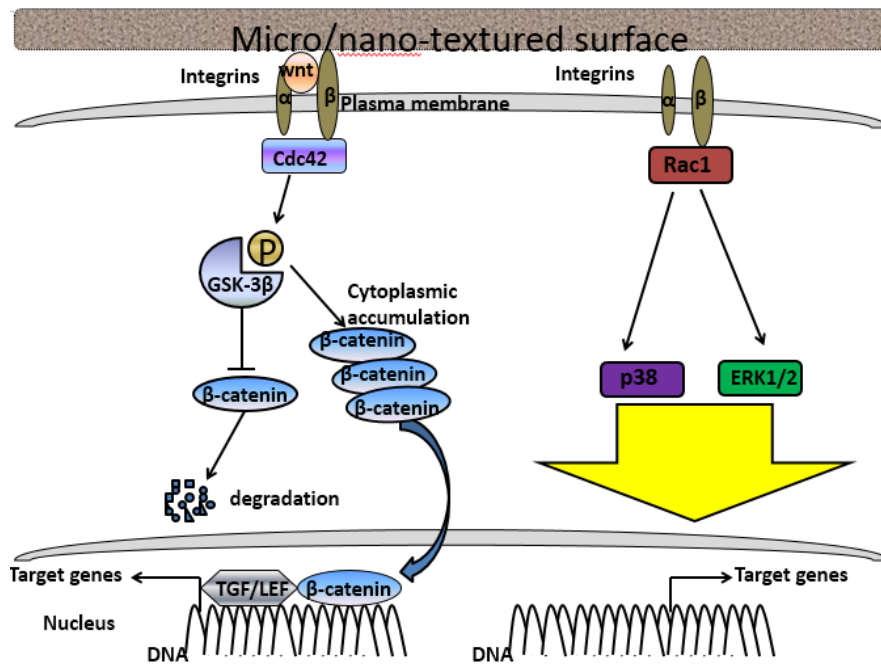


图 5. 微纳米形貌表面 rBMSCs 形态与成骨分化功能调控分子信号通路示意图

参考文献

- [1]. Friberg B, Ekestubbe A, Mellstrom D, Sennerby L. Branemark implants and osteoporosis: a clinical exploratory study. *Clinical implant dentistry and related research*. 2001;3:50-6..
- [2]. Wei Wang, Lingzhou Zhao, Qianli Ma, Qintao Wang, Paul K. Chu*, Yumei Zhang*, The role of the Wnt/ β -catenin pathway in the effect of implant topography on MG63 differentiation. *Biomaterials*, 2012.33(32),7993-8002.
- [3]. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998;279:509-14..
- [4]. Machesky LM, Hall A. Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 1996;6:304-10.
- [5]. Lechel A, Rudolph KL. Rho GTPase and Wnt signaling pathways in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134:875-8..
- [6]. Symons M. Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci*. 1996;21:178-81..
- [7]. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007;370(9597):1508-19..
- [8]. Parithimarkalaignan S, Padmanabhan TV. Osseointegration: An Update. *J Indian Prosthodont Soc*. 2013;13:2-6..
- [9]. Fini M, Giavaresi G, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(9):487-93..
- [10]. Kim TI, Jang JH, Kim HW, Knowles JC, Ku Y. Biomimetic approach to dental implants. *Curr Pharm Des*. 2008;14(22):2201-11.
- [11]. Wang Y, Grainger DW. Developing siRNA therapies to address osteoporosis. *Ther Deliv*. 2013;4(10): 1239-46.
- [12]. Zhang G, et al. A delivery system targeting bone formation surfaces to facilitate RNAi-based anabolic therapy. *Nat Med*. 2012;18(2):307-14.

- [13].Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983;50:399-410.
- [14].Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000.* 1998;17:22-35.
- [15].Motohashi M, Shirota T, et al. Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 87(2):145-52.
- [16].Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995;81:53-62.
- [17].Albrektsson TO, Johansson CB, Sennerby L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. *Periodontol 2000.* 1994;4:58-73.
- [18].Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983;50:399-410.
- [19].Fini M, Giavaresi G, Salamanna F, et al. Harmful lifestyles on orthopedic implantation surgery: a descriptive review on alcohol and tobacco use. *J Bone Miner Metab.* 2011;29:633-44.
- [20].Mellado-Valero A, Ferrer-Garcia JC, Calvo-Catala J, Labaig-Rueda C. Implant treatment in patients with osteoporosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(1):e52-e7.
- [21].Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:435-48.
- [22].von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis a review. *Clin Oral Investig.* 2001;5:71-82.
- [23].Motohashi M, Shirota T, et al. Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 87(2):145-52.
- [24].Blomqvist JE, Alberius P, Isaksson S, Linde A, Hansson BG. Factors in implant integration failure after bone grafting: an osteometric and endocrinologic matched analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996;25(1):63-8.

- [25].Wei Wang, Lingzhou Zhao, Kaimin Wu, et al.Qian.The role of integrin-linked kinase/ β -catenin pathway in the enhanced MG63 differentiation by micro/nano-textured topography. *Biomaterials* 34 (2013) 631-640.
- [26].D'Ippolito G, Schiller PC, et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1999;14(7):1115-22.
- [27].Torricelli P, Fini M, et al. Isolation and characterization of osteoblast cultures from normal and osteopenic. *J Biomed Mater Res.* 2000;52(1):177-82.
- [28].Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone.* 1998;23(2): 75-81.
- [29].Honig S, Rajapakse CS, Chang G. Current treatment approaches to osteoporosis - 2013. *Bull Hosp Jt Dis* (2013). 2013;71(3):184-8.
- [30].Rizzoli R, Reginster JY, et al. Adverse reactions and drug-drug interactions in the management of women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2011;89(2):91-104.
- [31].Alghamdi HS, Jansen JA. Bone regeneration associated with nontherapeutic and therapeutic surface coatings. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(3):233-53.
- [32].Liu H, Webster TJ. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials.* 2007;28(2): 354-69
- [33].Webster TJ, Ergun C, et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res.* 2000;51(3):475-83.
- [34].Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J Biomed Mater Res A.* 2004;70(1):129-38.
- [35].Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1988;3(4):231-46.
- [36].Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res.* 1996;32:409-17.
- [37].Lee BA, Kang CH, et al. Surface characteristics and osteoblastic cell response of

- alkali-and heat-treated titanium-8tantalum-3niobium alloy. *J Periodontal Implant Sci.* 2012;42:248-55.
- [38]. Van Hengel, et al. Inactivation of p120 catenin in mice disturbs intrahepatic bile duct development and aggravates liver carcinogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2016;370(9597): 574-584..
- [39]. Galli C, Passeri G, Ravanetti F, Elezi E, Pedrazzoni M, Macaluso GM. Rough surface topography enhances the activation of Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010;95:682-90.
- [40]. Yu W, Zhang Y, Xu L, Sun S, Jiang X, Zhang F. Microarray-based bioinformatics analysis of osteoblasts on TiO(2) nanotube layers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;93:135-42.
- [41]. Tsuji E, Tsuji Y, Fujiwara T, Ogata S, Tsukamoto K, Saku K. Splicing variant of research communications. 2006;339:1083-8.
- [42]. Kawaki H, Kubota S, Suzuki A, Suzuki M, Kohsaka K, Hoshi K, et al. Differential roles of CCN family proteins during osteoblast differentiation: Involvement of Smad and MAPK signaling pathways. *Bone.* 2011;49:975-89.
- [43]. Lee CH, Huang YL, Liao JF, Chiou WF. Ugonin K promotes osteoblastic differentiation and mineralization by activation of p38 MAPK- and ERK-mediated expression of Runx2 and osterix. *Eur J Pharmacol.* 2011;668:383-9.
- [44]. Choi YH, Gu YM, Oh JW, Lee KY. Osterix is regulated by Erk1/2 during osteoblast differentiation. *Biochemical and biophysical research communications.* 2011;415: 472-8.
- [45]. Symons M. Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci.* 1996;21:178-81.
- [46]. Lim W1; Jeong M1, et al. Coumestrol Inhibits Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells by Regulating AKT, ERK1/2 and JNK MAPK Cell Signaling Cascades. .2017 . 232 (4):862-871.
- [47]. Chuang WL1; Lin PY2; , et al. The Apoptotic Effect of Ursolic Acid on SK-Hep-1 Cells is Regulated by the PI3K/Akt, p38 and JNK MAPK Signaling Pathways.

- Molecules 2016 .21 (4): 1420-3049.
- [48]. Yang Y1;Ye Y2,et al. Triptolide inhibits the migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes by blocking the activation of the JNK MAPK pathway.2016, Int Immunopharmacol .41 (3):8-16.
- [49]. Tao Liu,et al. Capsaicin mediates caspases activation and induces apoptosis through P38 and JNK MAPK pathways in human renal carcinoma. BMC Cancer .2016.6 (9): 1471-2407.
- [50]. Joseph Cursons,et al. Regulation of ERK-MAPK signaling in human epidermis. BMC Systems Biology .2015 .9 (1):1752-0509.
- [51]. Pfaff, Miles,et al. FGFR2c-mediated ERK-MAPK activity regulates coronal suture development. Dev Biol.2016 .5 (2):242-250.
- [52]. Zhiwei Zhang ,et al.Kidney injury molecule-1 (KIM-1) mediates renal epithelial cell repair via ERK MAPK signaling pathway. Mol Cell Biochem .2016. 41(2):109-116.
- [53]. Hamilton DW, Brunette DM. The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. Biomaterials. 2007;28:1806-19.
- [54]. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. Med Eng Phys. 1998;20:92-102.
- [55]. Santos MI, Tuzlakoglu K, Fuchs S, Gomes ME, Peters K, Unger RE, et al. Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fibrous scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2008;29:4306-13.
- [56]. Tan J, Saltzman WM. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. Biomaterials. 2004;25:3593-601.
- [57]. Park J, Bauer S, Schmuki P, von der Mark K. Narrow window in nanoscale dependent activation of endothelial cell growth and differentiation on TiO₂ nanotube surfaces. Nano Lett.2009;9:3157-64.
- [58]. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, SP. B. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem. 1997;64: 295-312.

- [59].Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, et al. Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One* 2012;7:e36569.
- [60].Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999;284:143-7.
- [61].Anselme K, Bigerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta biomaterialia*. 2005;1:211-22.
- [62]. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81:53-62.
- [63].Yamamoto Y, Ohsaki Y, Goto T, Nakasima A, Iijima T. Effects of Static Magnetic Fields on Bone Formation in Rat Osteoblast Cultures. *Journal of Dental Research*. 2003;82:962-6.
- [64].Zhao L, Liu L, Wu Z, Zhang Y, Chu PK. Effects of micropitted/nanotubular titania topographies on bone mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biomaterials*. 2012;33:2629-41.
- [65].Wlodarski KH, AH.. R. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int*. 1986;39:382-5.
- [66].Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clinical oral implants research*.2005;16:650-6.
- [67].Franceschi RT. The Developmental Control of Osteoblast-Specific Gene Expression: Role of Specific Transcription Factors and the Extracellular Matrix Environment. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1999;10:40-57.
- [68].Machesky LM, Hall A. Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 1996;6:304-10.

个人简历及研究成果

个人简历

李广文，男，党员，汉族，1986.01，四川自贡人。2005年进入第四军医大学口腔医学五年制本科专业学习，2010年分配至解放军96617部队卫生所工作；2014年考入第四军医大学口腔修复专业张玉梅教授的学术型硕士研究生，主要研究方向为种植体表面微纳米形貌分子机制及军事口腔医学相关课题。硕士期间共计署名发表论文12篇，其中第一作者刊发SCI论文1篇（*Acta Biomaterialia* IF=6.008），署名发表SCI论文1篇（*Acta Biomaterialia* IF=6.008），另1篇SCI论文正在撰写，第一作者发表中文期刊论文7篇，其他署名中文期刊论文3篇。第一申请人获课题资助1项（军事口腔医学国家重点实验室开放课题项目批准编号2014KB11），参与国家自然科学基金2项，相关研究成果通过军队科技成果鉴定1项，申报国家专利10项，获授权6项，获2016年度第四军医大学优秀学员及学校一等奖学金，参加全国性学术会议4次，论文大会收录摘要2篇，壁报展示1次。

攻读硕士学位期间发表论文

1. Guangwen Li, Yanyan Song, Yumei Zhang, etc. Mechanisms of Cdc42-mediated rat MSCs differentiation on micro/nano-textured topography [J]. *Acta Biomaterialia*. 49(2017): 235–246. (IF=6.008)
2. Yumei Zhang, Mengqi Shi; Wen Song; Tianxiao Han; Bei Chang; Guangwen Li; Jianfeng Jin. Role of unfolded protein response in topography-induced osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*. 54(2017): 175–185. (IF=6.008)
3. Mechanisms of Rac1/MAPK pathway in the osteoblast functions on micro/nano-textured topography (撰写中)
4. 李广文, 宋艳艳, 常蓓, 宋文, 韩天啸, 赵领洲, 王薇, 张玉梅. 钛表面微纳米形貌对大鼠骨髓间充质干细胞形态与成骨功能的影响 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂

- 志.2016, 26(3): 156-162.
5. 栾海燕 , 李广文, 李卉, 王军, 辛越, 杨朝艳.SD 大鼠骨髓间充质干细胞培养、纯化及鉴定. 西南国防医药杂志.2016.26(2):117-120.
 6. 丁 鑫, 武海波, 岳广娜, 李广文, 张玉梅. Nobel Replace™ Tapered 种植体早期稳定性相关影响因素的研究. 牙体牙髓牙周病学杂志.2016, 26(2): 78-81.
 7. 方科达, 丁鑫, 周慧, 李广文, 张玉梅.CAD/CAM 个性化瓷基台的体外力学性能研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志.2017, 27(2): 1005-2593.
 8. 李广文, 李 卉, 李刚, 辛越, 王军, 王卿, 田青. 辐射密切接触工作人员口腔医疗保健情况问卷调查分析, 西南军医杂志.2016; 18(1):36-42.
 9. 李广文, 李 卉, 宋保龙, 李刚, 王军.可喷雾型便携式牙刷设计.医疗卫生装备杂志. 2016; 37(2):48-55.
 10. 李广文, 李 卉, 李刚, 王军, 杨朝艳, 何伟, 田青. 低剂量慢性辐射环境工作人员口腔医疗需要自我评估情况问卷调查分析, 临床军医杂志 .2016; 44(2):136-140.
 11. 李广文, 李卉, 李刚, 辛越, 王军, 杨朝艳, 田青. 特殊环境工作人员知识结构对口腔卫生保健行为影响的分析, 西北国防医学杂志.2015; 36(10):664-669.
 12. 李广文, 李卉, 李刚, 辛越, 王军.特殊环境工作人员饮食习惯与吸烟对口腔疾病的影响.西南军医杂志.2015.17(4):389-393.
 13. 李广文, 王军, 李刚.新型口腔卫勤模式探讨, 西南军医杂志.2015; 17(5):586-593.

国家专利

1. 张玉梅, 李广文, 赵领洲, 王薇, 宋艳艳, 常蓓, 曹灿, 刘倩, 马千里, 韩天啸. 一种钛及钛合金的阳极氧化装置.2015.06.01.中国. ZL 2015203679067.(实用新型授权)
2. 李广文, 张玉梅, 王薇, 宋艳艳, 常蓓, 宋文, 刘茜, 赵领洲, 闫钧, 张力, 马千里, 方科达, 丁鑫.一种骨植入材料表面体外细胞形态与成骨功能的检测与评价方法. 2015.09.21. 中国.申请号 2015106043700 (发明专利实质性审查中)
3. 李广文, 李刚, 李卉, 王军.一种抗辐射防龋消炎的口腔药物组合物及其制剂.

- 2014.12.30. 中国. ZL 2014108431532 (发明专利授权)
4. 李广文, 李卉, 李刚, 王军, 辛越, 梁政, 栾海燕, 方科达, 丁鑫, 张陈兵, 曹思樟, 田青, 何伟, 裴永泉.一种电离辐射防护套装.2015.06.24. 中国. ZL 2015204382081(实用新型授权)
 5. 李广文, 李刚, 李卉, 王军.一种可喷雾型便携式牙刷.2014.12.30. 中国. ZL 2014208585930(实用新型授权)
 6. 李广文, 李刚, 李卉, 王军.一种军用电离辐射口腔防护凝胶的存储及使用装置.2016.03.23. 中国. ZL 2016202315886) (实用新型授权)
 7. 王瑞, 李广文, 王军, 冯军强.一种军用迷彩保护色抗冲击防牙伤多功能防护牙套. 2016.07.28. 中国. ZL 2016208086842) (实用新型授权)

参加会议

1. 2015 年中国（西部）第十四届国际口腔设备与材料展览会暨口腔医学学术会议
2. 2016 年中国生物材料学会医用金属材料分会年会
3. 2016 年丝绸之路国际口腔医学论坛暨丝绸之路国际口腔器材设备展览会
4. 2016 年第十次全国口腔修复学术大会

攻读硕士学位期间获得荣誉

1. 2016 年获第四军医大学优秀学员
2. 2016 年获 2015-2016 学年度第四军医大学一等奖学金

致 谢

记得三年前从西南腹地的深山沟里再一次回到阔别四年的母校，一切都是那么的新鲜，压抑不住心中喜悦，因为这次上学的机会我真的来之不易，感谢在人生旅途中的对我点滴帮助的朋友、领导及家人。刚到学校 and 导师张玉梅教授见面，恩师的叮嘱和教诲还时刻回响在耳边：“硕士阶段需要做的学习内容很多，希望你能抓紧时间好好学习，获得自己需要的知识和技能”，而我信心满满地给导师保证“我不会让您失望的”。因为四年基层部队枯燥的生活，无尽的种树与拔草，让我懂得了人生的颓废、生活的艰辛与机会的不易，我要抓紧时间把四年失去的东西补回来。现在三年过去了，回首紧张而充实的三年硕士阶段，无论在生活、学习还是临床工作上，有太多的感慨和感激。

首先，非常感谢我敬爱的导师张玉梅教授，是恩师在我每次松懈和懒惰的时候一直督促和鼓励着我坚持初心，勇往直前。回想实验初期在实验细胞培养的困境、实验思路混乱以及后期论文撰写和临床学习，都是恩师不断的支持和帮助带我走上了学习和工作的正轨。在实验上，导师张玉梅教授给我宽松的科研环境，提供一切实验平台让我可以专心进行课题研究，在临床，导师张玉梅教授给我足够的学习自由，让我可以对口腔医学各个专业的短板进行快速的学习和弥补。感谢她对我科研研究、知识学习以及临床工作孜孜不倦的教诲与帮助，导师高尚的医德、人格给我树立了做人、做事的榜样。在此，再次感谢我敬爱的恩师！

其次，感谢我的指导老师王薇师姐，虽然我与王薇师姐从未谋面，但是师姐对我课题影响却是极大的。王薇师姐总是像一位可爱可亲的姐姐一样，虽然她要照顾自己的孩子、有着繁忙的临床工作及繁杂的家庭事务，但她总是顾不得休息，在休息间隙用她那春风化雨般的语言和对研究极高的造诣让我对科研工作有了不断深入的认识，让我的课题研究不断进入新阶段。正是王薇师姐亲切的指导和鼓励，让我克服了科研中的困境，一路走来。在此，感谢我能遇到如此亲切的王薇师姐！

在实验研究中，非常感谢赵领洲、宋文、宋艳艳、刘茜、闫钧、马千里、张力等师兄师姐以及方科达、丁鑫、孟凡辉、王津津、常蓓、韩天啸等课题组成员给予

无私帮助，正是导师团结而强大的课题组，让我们互相为依靠，共同前进进步。感谢修复科和其他临床科室的老师给我学习的机会和指导及感谢临床学习中的护士老师的配合和帮助。感谢修复实验沈丽娟老师、颌面外科实验室罗娜、苟群芳及仪器中心胡希望、李艳玲等老师在实验方面的帮助和指导。感谢研究生院北楼 424 宿舍及 14 级军人硕士队三区队三班宋保龙、方科达、许广杰、王新革、秦东泽、谢乔、傅先军等兄弟们一起宝贵支持和陪伴。最后，感谢一直给我默默支持和鼓励的爱人及家人，是你们无私的支持让我有千里迢迢到西安好好学习的动力，也是你们支持我风雨兼程，披荆斩棘，一路前行！

李广文 谨致

2017 年 5 月