

## 磷灰石涂层用于调控神经细胞的生物学行为

罗丹丹<sup>a</sup>, 崔正阳<sup>a</sup>, 冯 翠<sup>a</sup>, 马矢徒<sup>a</sup>, 孔祥东<sup>b</sup>

(浙江理工大学, a. 生命科学学院; b. 材料与纺织学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 利用仿生矿化法在钛合金表面制备磷灰石(Apatite)涂层,并通过仿生共沉积的方式在该涂层表面固定层粘连蛋白(Laminin, LN),在钛合金表面构建磷灰石-LN功能性复合涂层。通过场发射扫描电子显微镜(FESEM)和X射线光电子能谱仪(XPS)对磷灰石与磷灰石-LN复合涂层进行表征,发现制备的磷灰石涂层呈现均一的多孔片层状结构,对LN分子有良好的固定能力。磷灰石-LN复合涂层的LN释放实验结果表明:构建的磷灰石-LN复合涂层中的LN分子可从涂层表面缓慢而持续地释放。神经细胞PC12与磷灰石、磷灰石-LN复合涂层的联合体外培养实验结果表明:磷灰石、磷灰石-LN复合涂层具有良好的生物相容性,且磷灰石-LN复合涂层具有一定的促进神经细胞贴附和增殖的作用。制备的磷灰石涂层作为仿生共沉积生物活性分子的理想载体,在调控神经细胞生长以及周围神经损伤的修复领域有着良好的应用前景。

**关键词:** 磷灰石;层粘连蛋白;释放;PC12细胞

**中图分类号:** TS195.644

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2018)07-0484-07

### 0 引 言

周围神经损伤在现代生产生活中极为常见,具有较高的致残率,给病人、家庭和社会带来巨大的精神负担和经济损失<sup>[1]</sup>。如何促进受损神经的再生和恢复神经功能一直是生物医学界关注的热点。近年来,研究结果发现影响神经再生和修复的关键因素在于损伤神经所在的局部微环境<sup>[2]</sup>。因此,大量科学家致力于创造一些更能满足神经细胞生长需求的生理环境,以调控神经细胞的粘附、迁移、增殖和分化等生物学行为<sup>[3]</sup>。随着组织工程技术的高速发展,使用具有良好的生物相容性和生物可降解性的生物材料,并在其表面固定一系列生物活性分子,如细胞外基质蛋白中的层粘连蛋白(Laminin, LN),逐渐成为调控神经细胞和促进神经修复的有效手段<sup>[4-5]</sup>。

目前研究中,在生物材料表面固定生物活性分子的常用方法主要为物理吸附法和化学共价接枝法<sup>[6-7]</sup>。Ong等<sup>[8]</sup>在医用钛表面吸附胶原-骨形态发生蛋白,他们发现改性后的材料促细胞成骨分化的

能力得到了显著的提高。Yang等<sup>[9]</sup>在高聚物基底首先制备聚多巴胺涂层,并通过聚多巴胺的活性基团共价固定精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸蛋白质多肽,从而成功地促进了神经干细胞的增殖和分化。运用物理吸附法固定生物活性分子,不仅其吸附效率较低,而且固定的生物活性分子易从材料表面快速扩散,故该方法在实际运用中比较受到限制<sup>[10]</sup>。化学共价接枝生物活性分子,需要与有机化学溶液进行繁琐的交联,但可能会破坏基底材料的表面特征并使固定的生物活性分子变性<sup>[11]</sup>。因此,对于固定生物活性分子,开发一种简单而有效的固定化策略至关重要。

磷灰石是一种天然存在的无机材料,由于其具有优异的生物相容性和生物可降解性,同时对大量分子具有亲和力<sup>[12-14]</sup>,因此被广泛用于生物医学领域。通过使用磷灰石涂层固定各种生物活性分子来调节细胞行为<sup>[15-17]</sup>,将化学处理后的金属基底浸入含有CaCl<sub>2</sub>的Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水中,生成多孔结构的磷灰石涂层<sup>[16]</sup>,该磷灰石涂层的优点在于生物活性分子可以通过与磷灰石同时共沉积来有

效控制其用量<sup>[18]</sup>。此外,多种分子可以共沉积到磷灰石涂层中,并且可以从涂层表面进行缓慢而持续的释放,从而调控贴附的细胞行为。目前的研究表明,以磷灰石涂层作为载体,通过在其表面固定成骨生长肽和纤连蛋白,可促进间充质干细胞的粘附,增殖和成骨分化,并且固定雷帕霉素的磷灰石涂层具有抑制平滑肌细胞增殖的作用<sup>[16]</sup>。对于磷灰石涂层作为载体固定生物活性分子能否运用于调控神经细胞生长,国内外鲜有报道。

本文在医用钛合金基底仿生制备磷灰石涂层,通过仿生共沉积的方式在磷灰石涂层上固定层粘连蛋白 LN,构建磷灰石-LN 功能性复合涂层;通过利用场发射扫描电子显微镜和 X 射线光电子能谱仪对磷灰石-LN 复合涂层进行表征,并对复合涂层中 LN 的固定量和释放情况进行研究;同时探究与复合涂层共培养的神经细胞 PC12 的生物学行为。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

钛合金(直径为 10 mm,厚度为 1 mm)、氯化钙溶液(100 mL,美国 Sigma 公司)、DPBS(不含钙、镁,美国 Thermo Fisher 公司)、层粘连蛋白 Laminin(1 mg,美国 Sigma 公司)、MicroBCA 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)、CCK-8 试剂盒(上海碧云天公司)、live-dead 活死染液(美国 Thermo Fisher 公司)、鬼笔环肽-FITC(上海碧云天公司)、鬼笔环肽-罗丹明(美国 Thermo Fisher 公司)和 PC12 细胞(上海中科院细胞库)。所用试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

ULTRA55 型场发射扫描电子显微镜(德国 ZEISS 公司)、K-Alpha 型 X 射线光电子能谱仪(美国 Thermo Scientific Corporation 公司)、酶标仪(瑞士 TECEN 公司)、荧光倒置显微镜 IX71-22FL/PH(日本 Nikon A 公司)和激光共聚焦显微镜(日本 Nikon A 公司)。

### 1.3 制备磷灰石-LN 复合涂层

用 SiC 砂纸(600 目)仔细打磨钛片,之后依次用丙酮、无水乙醇、去离子水超声清洗 10 min,37 °C 下烘干备用。清洗后的钛片进行碱热预处理,具体步骤如下:将其放入水热反应釜中,并用 30 mL 1 mol/L NaOH 溶液浸泡,于 140 °C 下反应 6 h,碱热反应后得到的样品称为活化钛片,用去离子水对活化钛片进行三次超声清洗,每次持续 3 min,37 °C 下烘干备用。

量取 450  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> 母液,加入至 500 mL Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水(DPBS)溶液中,振荡至完全溶解,使 Ca<sup>2+</sup> 浓度为 100 mg/L,配制成本实验中用于磷灰石涂层制备的仿生矿化液,简称为 mDPBS(Modified DPBS)溶液。再量取 400  $\mu$ L LN 母液,溶解于 10 mL mDPBS 溶液,配制得到浓度为 40  $\mu$ g/mL 的 LN 溶液,简称为 mDPBS-LN40。对 mDPBS-LN40 溶液进行浓度梯度稀释,分别得到 20、10  $\mu$ g/mL 和 5  $\mu$ g/mL 的 LN 溶液,简称为 mDPBS-LN20、mDPBS-LN10 和 mDPBS-LN5,用于制备磷灰石-LN 涂层。

将活化钛片浸泡在 mDPBS 溶液中,37 °C 下反应 24 h;反应结束后,用去离子水清洗样品表面,室温下干燥,得到钛表面的磷灰石涂层,样品标记为 Apatite。将样品 Apatite 分别浸泡于 1 mL mDPBS-LN5、mDPBS-LN10、mDPBS-LN20 和 mDPBS-LN40 溶液中,25 °C 下反应 24 h,获得磷灰石-LN 涂层,分别标记为 Apatite-LN5、Apatite-LN10、Apatite-LN20 和 Apatite-LN40。

### 1.4 材料表征

用场发射扫描电子显微镜(FESEM)表征钛表面 Apatite 涂层的表面形貌设定扫描电压为 15.0 kV。用 X 射线光电子能谱仪(XPS)对 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层进行表征,检测两者的元素含量的差异,设定测试条件为:扫描型 Ar<sup>+</sup> 枪,溅射速率约为 94 nm/min,发射电流为 20 mA,能量为 4.0 kV。

### 1.5 磷灰石-LN 复合涂层的 LN 固定量的检测

将具有 Apatite 涂层的钛片在 DPBS-LN 溶液浸泡 24 h 后,收集残余溶液。浸泡前 DPBS-LN 溶液为对照组,浸泡后残余溶液为实验组 Apatite-LN5、Apatite-LN10、Apatite-LN20 和 Apatite-LN40 复合涂层组,用 Micro-BCA 试剂盒检测对照组和实验组的 LN 浓度,计算出浸泡前 LN 的不同浓度下,Apatite 涂层对 LN 的固定含量。

### 1.6 磷灰石-LN 复合涂层的 LN 的体外释放实验

选取 Apatite-LN20 复合涂层,将其浸泡在 PBS 溶液中,分别于浸泡后 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 和 28 d 时收集残余溶液,通过 Micro-BCA 试剂盒检测溶液中 LN 的浓度,计算出 Apatite-LN 复合涂层的 LN 的释放量与 LN 固定含量的百分比。

### 1.7 细胞实验

#### 1.7.1 磷灰石涂层与磷灰石-LN 复合涂层的细胞相容性研究

用 CCK-8 试剂盒测定 Apatite 涂层与 Apatite-

LN 复合涂层的生物相容性。其方法是将含有涂层的钛片灭菌后置于 48 孔板,用 DMEM 高糖培养基浸泡 72 h,制备出 Apatite 涂层与 Apatite-LN20 复合涂层的浸提液。将 PC12 细胞以  $5 \times 10^4$  个/mL 的细胞密度接种于 96 孔板,12 h 后吸取培养基,分别添加 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的浸提液、新鲜的 DMEM 高糖培养基和 0.64% 的苯酚。Apatite 涂层与 Apatite-LN20 复合涂层的浸提液为实验组,新鲜培养基和 0.64% 的苯酚组分别为阴性和阳性对照组。换液培养 24 h 和 48 h 后,进行 CCK-8 实验,在波长 450 nm 处用酶标仪测取 OD 值,记录结果,并计算平均值。

将 PC12 细胞以  $5 \times 10^4$  个/mL 的细胞密度接种于 48 孔板,12 h 后吸取培养基,分别添加 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的浸提液、新鲜的 DMEM 高糖培养基和 0.64% 的苯酚。换液培养 24 h 和 48 h 后,进行 live-dead 细胞染色法对细胞进行染色并观察。

### 1.7.2 磷灰石涂层与磷灰石-LN 复合涂层对细胞贴附性能的研究

将含有 Apatite 涂层与 Apatite-LN5、Apatite-LN10、Apatite-LN20 和 Apatite-LN40 复合涂层的钛片灭菌后置于 48 孔板,之后将 PC12 细胞以  $4 \times 10^5$  个/mL 的细胞密度接种于涂层表面,种植于 48 孔板表面的细胞作为对照组,在无血清的 DMEM 高糖培养基中孵育 4 h。采用 CCK-8 试剂盒定量检测 PC12 细胞在涂层表面的贴附情况,利用 SPSS 软件进行统计学分析。并进行鬼笔环肽-FITC/DAPI 双染来观察 PC12 细胞在涂层表面贴附的形貌。

### 1.7.3 磷灰石涂层与磷灰石-LN 复合涂层对细胞增殖性能的研究

将含有 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的钛片灭菌后置于 48 孔板,之后将 PC12 细胞以  $2 \times 10^4$  个/mL 的细胞密度接种于涂层表面,种植于 48 孔板表面的细胞作为对照组,在 DMEM 高糖培养基中分别培养 1、3 d 和 5 d。采用 CCK-8 试剂盒定量检测 PC12 细胞在涂层表面增殖 1、3 d 和 5 d 的情况,利用 SPSS 软件进行统计学分析;通过鬼笔环肽-罗丹明/DAPI 双染来观察 PC12 细胞在涂层表面增殖 5 d 的形貌。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磷灰石涂层的形貌分析

碱热预处理后的钛片浸泡于 DPBS 溶液中 24 h

后,实验过程中肉眼可观察到其表面形成一层肉眼可见的白色涂层。图 1 为涂层的 FE-SEM 图,结果显示,该涂层由一种多孔均一的片层状结构晶体组成,与先前研究中观察到的结果相一致<sup>[15]</sup>。Apatite 涂层这种彼此相连的微孔结构,使其具有一定的固定生物活性分子的能力,从而能够构建 Apatite-LN 复合功能性涂层。

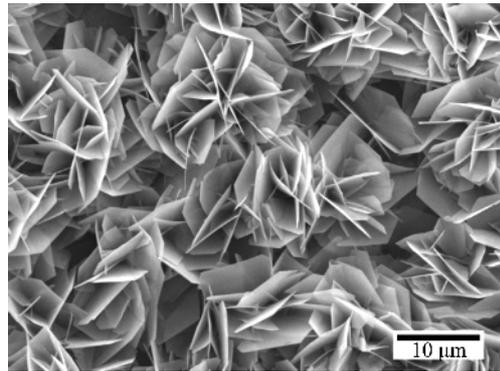


图 1 钛表面 Apatite 涂层的 FE-SEM 图

### 2.2 磷灰石涂层与磷灰石-LN 复合涂层的 N 元素含量分析

表 1 为通过 XPS 所检测的 Apatite 涂层与 Apatite-LN5、Apatite-LN10、Apatite-LN20、Apatite-LN40 复合涂层的各种元素含量的比较,由表可见,Apatite 涂层中由于不含有 LN 而无法检测到 N 元素,而 Apatite-LN 复合涂层的 N 元素含量显著提高,并且随着 LN 浓度的提高,Apatite-LN 复合涂层中所能检测到的 N 元素含量也逐渐提高,表明 LN 被成功地共沉积到 Apatite 涂层上。

表 1 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的所含元素分析 %

	At	Ca 2p	P 2p	C 1s	O 1s	N 1s
Apatite	17.68	14.06	18.61	49.08	0.57	
Apatite-LN5	14.73	11.76	27.01	43.37	3.13	
Apatite-LN10	13.41	10.88	31.24	40.16	4.31	
Apatite-LN20	9.74	8.26	40.61	33.89	7.50	
Apatite-LN40	8.54	7.27	44.11	31.63	8.45	

### 2.3 磷灰石-LN 复合涂层的 LN 固定量的分析

通过 Micro-BCA 试剂盒,对于实验组 Apatite-LN5、Apatite-LN10、Apatite-LN20 和 Apatite-LN40 复合涂层组和对照组 LN 浓度的检测与计算,结果如表 2 所示;在 LN 原始浓度分别为 5、10、20  $\mu\text{g/mL}$  和 40  $\mu\text{g/mL}$  时,磷灰石涂层所能固定的 LN 含量分别为 1.43、3.96、4.14  $\mu\text{g}$  和 5.88  $\mu\text{g}$ 。本实验结果证明 Apatite 涂层这种多孔的微晶结构对于 LN 分子具有比较良好的固定性能。

表 2 Apatite 涂层中 LN 含量的分析

涂层	Apatite-LN5	Apatite-LN10	Apatite-LN20	Apatite-LN40
层粘连蛋白 LN 的固定量/ $\mu\text{g}$	1.43 $\pm$ 0.55	3.96 $\pm$ 0.88	4.14 $\pm$ 0.75	5.88 $\pm$ 1.23

2.4 磷灰石-LN 复合涂层的 LN 的体外释放的分析

将 Apatite-LN20 复合涂层,将其浸泡在 PBS 溶液中 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 和 28 d 后,对涂层中 LN 在 PBS 溶液中的释放量进行计算对比,结果如图 2 所示。图 2 表明,LN 分子在 14 d 内进行相对快速地释放,14 d 的释放量达到 19.75%,随后 LN 分子基本保持了相对较为缓慢的释放率,直到释放实验至 28 d,其释放量达到 20.72%,这表明固定的 LN 分子是从涂层表面缓慢而持续地释放出来,达到较好的缓释效果。通过物理吸附方式在材料表面固定的蛋白分子在短时间内会进行暴释,而仿生共沉积的 LN 分子 1 d 和 3 d 的释放量较低,分别为 3.47%和 3.82%;同时有研究表明,仿生共沉积的荧光标记蛋白在磷灰石涂层内部可被直接观察,且共沉积蛋白后的涂层为碳化的磷灰石涂层<sup>[19]</sup>,因此固定于涂层中的 LN 分子可能不是简单的吸附在其表面,而是参与到涂层的晶格构建中。

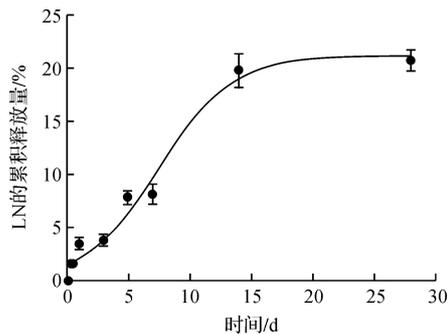


图 2 Apatite-LN 复合涂层中 LN 的释放量

2.5 磷灰石涂层与磷灰石-LN 复合涂层对神经细胞 PC12 的生物学行为的研究分析

2.5.1 磷灰石涂层与磷灰石-LN 复合涂层的细胞相容性研究分析

图 3 为 CCK-8 检测结果,结果表明:与阴性对

照组相比,实验 24 h 后,Apatite 和 Apatite-LN 组的 PC12 细胞活力分别为 119.73%和 148.96%;实验 48 h 后,其细胞活力稍稍降低,分别为 108.91%和 114.35%。这明显高于根据 ISO 标准 (ISO 10993-5-2009) 所设定的 70%的细胞毒性阈值<sup>[20]</sup>。这表明,与阴性对照相比,Apatite 涂层和 Apatite-LN 复合涂层浸提液,有利于细胞生长。而与 Apatite 组相比,Apatite-LN 组的细胞活力相对有所提高,其原因可能由于在制备 Apatite-LN 复合涂层浸提液的过程中,LN 从中释放出来,在一定程度上,促进神经细胞 PC12 的生长。

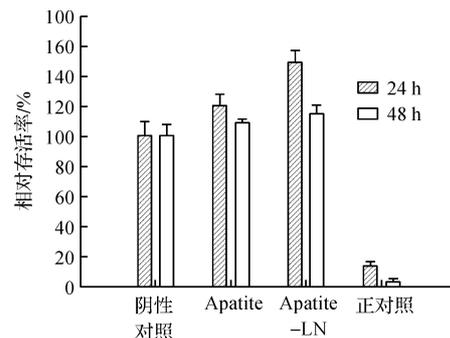


图 3 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层浸提液对 PC12 细胞生长影响的分析

图 4 为 PC12 细胞 dead/live 染色图,从图中可以看出,阴性对照、Apatite 涂层和 Apatite-LN 复合涂层活细胞数目较多,与 CCK-8 检测结果相一致,表明 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的细胞相容性比较优异。

2.5.2 磷灰石涂层与磷灰石-LN 复合涂层对细胞贴附性能的分析

PC12 细胞在无血清的 DMEM 高糖培养基中培养 4 h 后,对 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层上贴附的细胞进行定量分析,结果如图 5 所示。

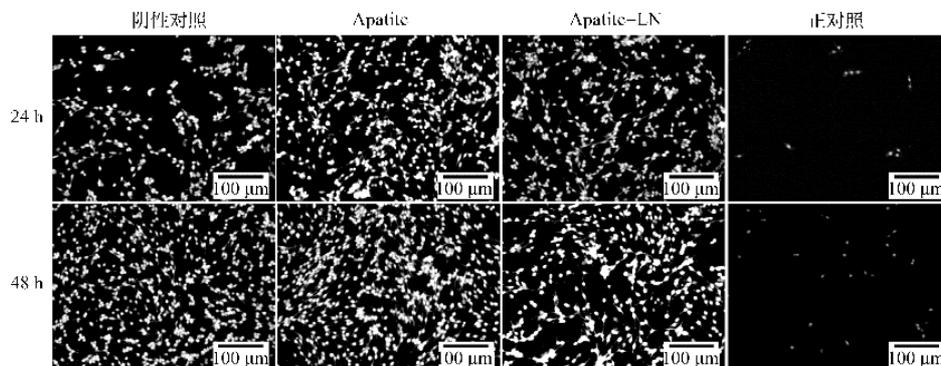


图 4 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的浸提液培养后的 PC12 细胞 dead/live 染色

从图5中可以看出, Apatite 涂层表面贴附的 PC12 细胞数量明显低于对照组, 而固定 LN 分子后的 Apatite-LN 复合涂层表面贴附的 PC12 数量则明显增大。其中, Apatite-LN5 组材料的促细胞贴附能力接近于对照组, 而 Apatite-LN10、Apatite-LN20 和 Apatite-LN40 组材料的促细胞贴附能力均优于对照组, 且随着 Apatite 涂层结合的 LN 的增加, 涂层表面促 PC12 细胞贴附能力逐渐增强。这说明, Apatite 涂层能够作为固定 LN 分子的有效载体, 具有应用于神经细胞生长的潜在价值。本文通过鬼笔环肽-FITC/DAPI 双染法来观察 PC12 细胞在 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的贴附形貌, 结果如图6所示。图6中可见贴附在 Apatite 涂层的细胞最少, 当 Apatite 涂层固定有 LN 分子时, 更多的细胞贴附在样品表面, 且随着 LN 浓度的增加, 细胞贴附数目逐渐增多, 与图3所述的细胞贴附的定量检测结果一致。并且, Apatite-LN40 组贴附的

细胞在样品表面铺展良好, 可以明显观察到细胞呈梭形且伸出伪足, 这能进一步提升细胞的贴附性能。细胞的早期贴附对于随后的增殖是极其重要的, LN 作为一种细胞粘附蛋白, 可以促进细胞的贴附, 并且对于细胞的贴附形貌和细胞的功能至关重要。

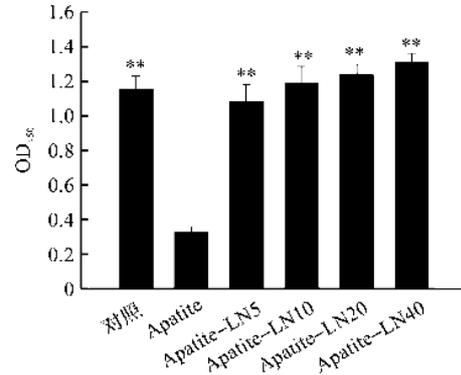


图5 PC12 细胞贴附于 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的定量分析

注: \*\*表示  $p < 0.01$ , 分别对 Apatite 组和其他组进行统计学分析。

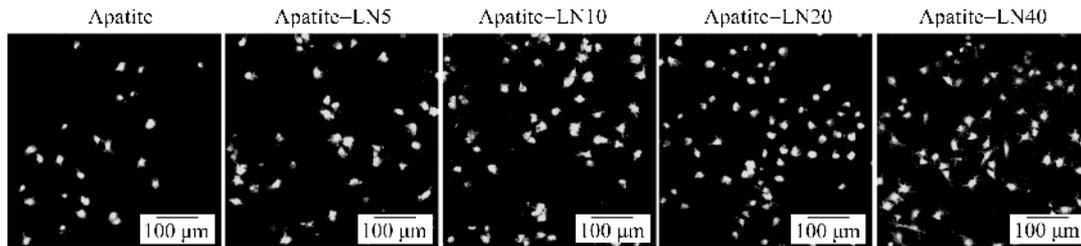


图6 PC12 细胞贴附于 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的鬼笔环肽-FITC/DAPI 染色

### 2.5.3 磷灰石涂层与磷灰石-LN 复合涂层对细胞增殖性能的研究分析

经过 5 d 的 PC12 细胞与 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层的共培养和 CCK-8 实验的检测, 结果如图7所示。细胞在 Apatite 涂层、Apatite-LN 复合涂层上展现出较好的增殖。细胞增殖 1 d 后, 对照组细胞的增殖水平明显高于 Apatite 和 Apatite-LN 组 ( $p < 0.05$ )。Apatite-LN 复合涂层上种植的手机在 1 d 后开始进入增殖速率较快速的增殖期, 并且在第 3 d 后, 种植于 Apatite-LN 复合涂层表面的细胞增殖情况与对照组已无明显差异 ( $p > 0.05$ )。第 5 d 时, Apatite-LN 复合涂层上的细胞增殖数目与对照组几乎持平 ( $p > 0.05$ )。Apatite 涂层上的细胞处于不断增殖状态, 然而, 在增殖 1、3 d 和 5 d 时, 细胞增殖水平仍然明显低于对照组和 Apatite-LN 组 ( $p < 0.05$ )。这说明, Apatite 涂层能够维持神经细胞 PC12 的生长增殖, 而固定有细胞粘附蛋白的 Apatite-LN 复合涂层由于其表面的 LN 分子的缓慢持续释放, 从而表现出对于神经细胞 PC12 的良好促增殖能力。

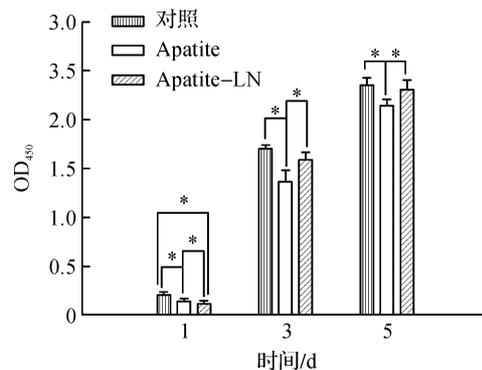


图7 PC12 细胞于 Apatite 涂层与 Apatite-LN 复合涂层上培养不同时间的定量分析

注: \* 表示  $p < 0.05$ , 分别对对照组、Apatite 组和 Apatite-LN 组两两进行统计学分析。

细胞生长至第 5 d 的鬼笔环肽-罗丹明/DAPI 染色结果如图8所示, 结果显示: 在 Apatite-LN 复合涂层上的细胞数目明显较纯 Apatite 涂层多, 与 CCK-8 实验的检测结果相一致; 种植于 Apatite-LN 复合涂层的细胞铺展良好, 较多的 PC12 细胞长有突起和树枝状的细胞连接, 呈现出神经元样的外观形貌; 而种植于纯 Apatite 涂层上的细胞未明显见到神经突的形

成。以上结果证实:Apatite-LN 复合涂层持续释放的 LN 分子能够形成促进神经突生长的环境,固定有细胞粘附蛋白的 Apatite-LN 复合涂层是适合神经细胞贴附和生长的材料,具有一定的神经相容性。

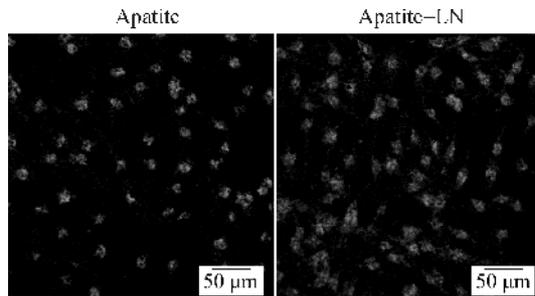


图 8 PC12 细胞于涂层上培养 5 d 后的鬼笔环肽-罗丹明/DAPI 染色图

### 3 结 论

本文运用仿生共沉积法在 Apatite 涂层表面固定 LN 分子,构建 Apatite-LN 功能性复合涂层。首先对涂层的微观形貌和化学组成进行了检测和分析;其次,对涂层的蛋白固定性能和缓释性能进行了研究;最后探究与涂层共培养的神经细胞 PC12 的生物学行为,主要研究结论如下:

a) FE-SEM 结果表明,通过仿生矿化法可以制备出多孔均一的 Apatite 涂层,并且 XPS N 元素检测结果显示,运用仿生共沉积法可以在其表面固定 LN 分子,形成 Apatite-LN 复合涂层。

b) 通过蛋白定量检测可知,当蛋白原始浓度分别为 5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,Apatite-LN 复合涂层中的蛋白含量约为 1.31、3.90、4.20  $\mu\text{g}$  和 4.55  $\mu\text{g}$ 。实验结果表明,本文采用的仿生矿化共沉积法能够在 Apatite 涂层上迅速有效地共沉积 LN 分子。

c) Apatite-LN 复合涂层中 LN 分子体外释放结果表明,LN 保持相对较为缓慢的释放率,在体外可以进行持续可控的释放,直到释放实验至 28 d,其释放量约为 20.72%。

d) 通过神经细胞 PC12 的体外培养研究表明,Apatite-LN 涂层的生物相容性比较优异,且仿生共沉积的 LN 分子能够显著地提高 PC12 细胞的贴附和铺展能力,并能够有效地促进细胞的增殖和突触形成。

本文制备的 Apatite/LN 涂层对蛋白分子具有良好的固定能力;对于所固定的蛋白分子达到比较优异的缓释效果;在对神经细胞 PC12 的培养、贴附和增殖方面起到一定的促进作用,显示 Apatite 涂

层可作为生物分子的有效载体,在调控神经细胞生长以及周围神经损伤的修复领域有着良好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] Li R, Liu Z, Pan Y, et al. Peripheral nerve injuries treatment: A systematic review[J]. *Cell Biochemistry & Biophysics*, 2014, 68(3):449-454.
- [2] Zochodne D W. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves[J]. *Muscle & Nerve*, 2015, 23(S9):S33-S38.
- [3] Gu X, Ding F, Williams D F. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(24):6143-6156.
- [4] Neal R A, Tholpady S S, Foley P L, et al. Alignment and composition of laminin-polycaprolactone nanofiber blends enhance peripheral nerve regeneration[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2011, 100A(2):406-423.
- [5] Li A, Hokugo A, Yalom A, et al. A bioengineered peripheral nerve construct using aligned peptide amphiphile nanofibers[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(31):8780-8790.
- [6] Costa F M, Maia S R, Gomes P A, et al. Dhvar5 antimicrobial peptide (AMP) chemoselective covalent immobilization results on higher antiadherence effect than simple physical adsorption[J]. *Biomaterials*, 2015, 52(1):531-538.
- [7] Holt A P, Bocharova V, Cheng S, et al. Controlling interfacial dynamics: Covalent bonding versus physical adsorption in polymer nanocomposites[J]. *Acs Nano*, 2016, 10(7):6843-6852.
- [8] Ong J L, Bess E G, Bessho K. Osteoblast progenitor cell responses to characterized titanium surfaces in the presence of bone morphogenetic protein-atelopeptide type I collagen in vitro[J]. *Journal of Oral Implantology*, 1999, 25(2):95-100.
- [9] Yang K, Lee J S, Kim J, et al. Polydopamine-mediated surface modification of scaffold materials for human neural stem cell engineering[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(29):6952-6964.
- [10] Gagner J E, Qian X, Lopez M M, et al. Effect of gold nanoparticle structure on the conformation and function of adsorbed proteins[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(33):8503-8516.
- [11] Guo Y, Xu K, Wu C, et al. Surface chemical-modification for engineering the intrinsic physical properties of inorganic two-dimensional nanomaterials [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(3):637-646.

- [12] Cazalbou S, Bertrand G, Drouet C. Tetracycline-loaded biomimetic apatite: An adsorption study[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2015, 119(7): 3014-3024.
- [13] Chen C, Zhang S M, Lee I S. Immobilizing bioactive molecules onto titanium implants to improve osseointegration[J]. *Surface & Coatings Technology*, 2013, 228(8): 312-317.
- [14] Choimet M, Tourrette A, Drouet C. Adsorption of nucleotides on biomimetic apatite: The case of cytidine 5' monophosphate (CMP)[J]. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2015, 456: 132-137.
- [15] Chen C, Li H, Kong X, et al. Immobilizing osteogenic growth peptide with and without fibronectin on a titanium surface: Effects of loading methods on mesenchymal stem cell differentiation[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 283-295.
- [16] Chen C, Yao C, Yang J, et al. Biomimetic apatite formed on cobalt-chromium alloy: A polymer-free carrier for drug eluting stent[J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2017, 151: 156-164.
- [17] Chen C, Lee I S, Zhang S M, et al. Biomimetic apatite formation on calcium phosphate-coated titanium in Dulbecco's phosphate-buffered saline solution containing  $\text{CaCl}_2$  with and without fibronectin[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(6): 2274-2281.
- [18] Liu Y, Layrolle P, De B J, et al. Biomimetic coprecipitation of calcium phosphate and bovine serum albumin on titanium alloy[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2015, 57(3): 327-335.
- [19] Chen C, Kong X, Zhang S M, et al. Characterization and in vitro biological evaluation of mineral/osteogenic growth peptide nanocomposites synthesized biomimetically on titanium[J]. *Applied Surface Science*, 2015, 334(1): 62-68.
- [20] Van Essen T H, Van Z L, Possemiers T, et al. Biocompatibility of a fish scale-derived artificial cornea: Cytotoxicity, cellular adhesion and phenotype, and in vivo immunogenicity[J]. *Biomaterials*, 2016, 81(3): 36-45.

## Biological behavior of apatite coating used to regulate nerve cell

LUO Dandan<sup>a</sup>, CUI Zhengyang<sup>a</sup>, FENG Cui<sup>a</sup>, MA Shitu<sup>a</sup>, KONG Xiangdong<sup>b</sup>

(a. College of Life Science; b. College of Materials and Textiles,  
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Apatite coating was prepared on titanium alloy surface with biomimetic mineralization method. Laminin (LN) was fixed on the coating through bionic codeposition. Apatite-LN functional composite coating was constructed on the titanium alloy surface. Apatite and apatite-LN coating were characterized by field emission scan electron microscope (FE-SEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The results showed that the prepared apatite coating presented uniform porous lamella structure, and had good fixation ability for LN molecule. The results of release test of apatite-LN coating suggested that, LN molecule in f apatite-LN coating could release slowly and continuously from the coating surface. Combined in-vitro culture experiment of nerve cell PC12, apatite and apatite-LN coating shows that, apatite and apatite-LN coating had good biocompatibility, and apatite-LN coating had the function of promoting attachment and proliferation of nerve cell. The prepared apatite coating as the ideal carrier of bionic codeposition bioactive molecule has the excellent application prospect in regulating nerve cell growth and repairing the peripheral nerve injury.

**Key words:** apatite; laminin; release; PC12 cell

(责任编辑:唐志荣)