论文

TiO₂ 纳米管阵列的表面特性对猪肾小管上皮细胞生长状态的影响

柳慧琼, 朱文*, 刘剑峰, 刘喜, 仝大利

华中科技大学生命科学与技术学院, 材料成形与模具技术国家重点实验室, 武汉 430074

* 联系人, E-mail: wennar@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2011-02-11; 接受日期: 2011-03-14

国家自然科学基金(批准号: 30970717 和 20873048)、高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 200804871011)和中央高校基本科研业务费(批准号: 2010MS113)资助项目

doi: 10.1360/052010-549

摘要 TiO₂ 纳米管阵列由于其优异的生物相容性及光催化效应, 在生物医学领域引起了广泛关注. 但能否将肾小管上皮细胞较好地黏附于 TiO₂ 纳米管材料并使其发挥肾小管的功能, 目前还未见报道. 为研究 TiO₂ 纳米管材料的表面特性对猪肾小管上皮细胞株(LLC-PK₁)的黏附及增殖影响, 采用阳极氧化法制备新型高强度的 TiO₂ 纳米管阵列, 利用荧光显微镜考察了 TiO₂ 纳米管阵列光照特性、晶型结构及几何形貌参数对 LLC-PK₁ 细胞黏附的影响, 采用 MTT 方法检测了黏附细胞的活性; 同时使用扫描电子显微镜观察了 4 种不同管径上细胞生长的形态, 并与纯钛片上细胞的生长形态进行对照. 结果表明, 管径为 70 nm 的 TiO₂ 纳米管阵列膜最有利于 LLC-PK₁ 细胞的黏附及增殖, 且细胞的活性最高; 未经紫外光照射时锐钛矿型的 TiO₂ 比无定型更有利于细胞的黏附, 然而锐钛矿型 TiO₂ 经紫外光照射后会导致细胞凋亡. 扫描电子显微镜观察显示, 细胞在纳米管上延伸为长条状, 而在钛片上则呈堆积平板状. 证实 TiO₂ 纳米管阵列膜具有良好的生物相容性, 有助于改善细胞与材料的黏附.

关键词TiO₂ 纳米管阵列
表面特性
生物相容性
猪肾小管上皮细胞
细胞黏附

肾脏疾病已成为威胁人类健康的重大疾病, 肾脏移植因供体器官太少而受到极大限制^[1,2]. 传统的血液透析或血液滤过至今仍是一种维持性替代治疗方式, 尽管能明显地延长终末期肾病患者的存活期, 但患者需要频繁进入专门的医院接受费用高昂的治疗, 既冗长又痛苦的过程已使患者不堪重负, 严重影响了患者的正常生活. 探索研究微型化、且便于携带或移植的新型生物人工肾可极大地改善患者治疗现状, 成为今

后血滤疗法发展的主要任务. 此外, 目前的血滤疗法仅局限于体外肾小球滤过功能的替代, 由于缺乏体外肾小管功能的替代而导致透析慢性并发症大量出现, 这些多系统并发症已成为肾衰患者的主要死因. 因此, 在探索研究微型化、便于携带或移植的新型生物人工肾的同时, 还要赋予其多重复合功能, 这将成为今后研究的重点. 在功能复合方面, Humes 等人^[3,4]于 1997 年首次用犬肾细胞株(the madin-darby canine kidney

英文引用格式: Liu H Q, Zhu W, Liu J F, et al. Effect of surface characteristics of TiO₂ nanotube arrays on porcine renal tubular epithelial cell growth. SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 249–257, doi: 10.1360/052010-549

cell line, MDCK) 构建生物人工肾小管辅助装置 (bioartificial renal tubule assist device, RAD), 体外初步测定其具有肾小管的选择性重吸收功能. 在其后几年中又陆续出现了有关 RAD 功能鉴定及构建方法方面的报道^[5,6]. 2001 年, 应旭旻^[7,8] 采用永生化细胞株 LLC-PK₁ 构建 RAD 并测定其功能, 结果证明这种新型的 RAD 同样具有理想的选择性重吸收功能, 且这种功能在 5 h 内能稳定维持. 尽管 RAD 研究取得了很大进展, 但目前透析装置及 RAD 都只分别模拟了肾小球、肾小管部分功能, 治疗过程需将两者串联, 结构复杂且不利于生物人工肾的微缩化. 2008 年, 中国人民解放军总医院肾脏研究所陈香美课题组首次报道了利用细胞混合种植法构建生物人工肾小管的研究, 初步表明混合细胞能在聚砜膜纤维上较好地黏附生长并融合成单层, 并检测到混合种植的血管内皮细胞和肾小管上皮细胞均能发挥各自的生理功能, 从而证明利用混合种子细胞构建具有复合功能的生物人工肾小管是可行的^[9,10]. 这为生物人工肾的微缩化、功能复合化提供了新的发展思路. 探索研究结构小巧、能实现人体肾脏完整功能替代、且高效稳定的新型生物人工肾的关键是高性能透析膜材料. 理想情况下, 适合携带或移植条件的人工肾应依靠毛细血管压作为超滤的驱动力. 在此情况下, 如要满足相应临床的超滤系数, 其孔的密度大约在 5×10^{10} 个/cm²^[11]. 现用的透析膜材料, 如纤维素和一些高分子聚合物薄膜的孔密度都较低 ($< 10^9$ /cm²), 导致流通量下降^[12-14], 且孔径分布不均匀, 不利于透析装置的微型化和体内移植. 而新型 TiO₂ 纳米管阵列薄膜有望克服一些现今透析膜材料的限制. TiO₂ 纳米管阵列膜具有良好的生物相容性, 光致双亲效应, 均匀的孔径, 被认为是理想的生物医用材料, 已被用做牙、髋关节的替代物及骨移植材料等^[15-19]. 采用电化学阳极氧化法制备 TiO₂ 纳米管阵列膜, 操作简便、成本低, 且能通过调节工艺参数获得不同尺度的薄膜^[20], 将制备的纳米管退火后能改变其晶型结构, 同时这种纳米管状结构孔密度较高 ($> 10^{10}$ 个/cm²), 有利于生物人工滤器体积的微化. 近两年来在细胞植入方面, Peng 等人^[21,22] 将血管内皮细胞、平滑肌细胞种植在 TiO₂ 纳米管材料上, 观察细胞的黏附, 增殖及内分泌等的影响, 实验结果证明这种特殊的管状结构能很好地促进细胞的黏附和生长, 有望成为更安全的血管支架移植材料, 这为本实验的设计提供了坚实的理论基础.

1 材料与方法

1.1 时间与地点

实验于 2010 年 1 月~7 月在华中科技大学材料学院及生命科学学院分子生物学实验室完成. TiO₂ 纳米管阵列膜为本实验室制备; LLC-PK₁ 细胞株购自上海复祥生物科技有限公司. 实验材料: DMEM 高糖培养基(美国 Gibco)、胎牛血清(杭州四季青)、胰酶(美国 Sigma)、Hoechst33342(碧云天生物科技有限公司, 浓度 10 μg/mL)、倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、低速离心机(中佳 SC-3610)和场发射扫描电子显微镜(FESEM, Sirion 200).

1.2 实验方法

(1) 新型高强度 TiO₂ 纳米管薄膜的制备及表面处理. 采用高纯度(99.8%)钛箔, 尺寸为 10 mm×85 mm×0.5 mm, 工作面积为 10 mm×20 mm. 钛箔先经 600#, 800#, 1000#, 1200# 砂纸打磨, 然后分别用丙酮、蒸馏水及无水乙醇各超声清洗 10 min, 最后吹干备用. 预处理的钛箔作为阳极, 铂电极为阴极, 两电极间距 20~30 mm. 电解液为 100 mL 乙二醇、体积分数为 2% 的蒸馏水及不同质量分数的 NH₄F, 在恒压 60 V, 室温下阳极氧化 30 h. 采用此方法制备的 TiO₂ 纳米管顶部开口底端封闭, 通过一定浓度的 HF 对底部进行轻微刻蚀, 可获得两端通透的 TiO₂ 纳米管, 将制备的 TiO₂ 纳米管从 Ti 基底剥落下来, 干燥后置于真空烧结炉中 400℃ 退火, 升温速率为 10℃/min, 恒温 120 min 后随炉冷却至室温, 然后采用 X-ray diffraction(XRD)检测其晶型.

(2) 细胞的培养及传代. 将 LLC-PK₁ 细胞置于倒置相差显微镜下观察细胞的生长情况, 当细胞覆盖瓶底 90% 时立即传代. 弃去旧培养液, 用 PBS(不含钙、镁离子)清洗 1~2 次, 加 2 mL 消化液(0.25% Trypsin-0.02% EDTA)于培养瓶中, 置于 37℃ 培养箱预热 3~5 min 后翻转培养瓶数下, 倒置显微镜下观察到细胞大部分收缩变圆, 轻敲几下瓶壁, 细胞随机脱落下来时加入 3 mL DMEM 高糖培养液终止消化, 将细胞悬液吸入离心管中, 134×g 离心 5 min 后弃上清, 加入 6~8 mL 培养液, 吸出, 分离到新的培养瓶中, 1:4 传代, 细胞每 2~3 天传代 1 次.

(3) 材料-细胞共混. 为验证材料表面的光照特性及晶型结构对 LLC-PK₁ 细胞生长形态的影响, 设计

4 组实验, 分别为: 材料未退火未光照组、未退火光照组、退火未光照组及退火光照组. 材料表面的光照特性采用光强为 $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外光照 1 h. 为进一步考察 TiO_2 纳米管的几何形貌参数对细胞黏附及生长形态的影响, 分别采用 NH_4F 质量浓度为 0.28%, 0.32%, 0.36% 及 0.40% 的电解液制备了 4 种不同管径的纳米管材料, 均经退火未光照处理, 同时设立纯钛片对照组, 种植相同的细胞. 将上述材料放入 24 孔板中, 向每孔滴加相同密度(1×10^5 个/mL)的细胞悬液 1 mL, 培养 24 h 后取出材料固定并用细胞核染料 Hoechst33342 染色, 采用荧光显微镜观察 4 组材料表面的细胞黏附状况; 为考察细胞生长形态随时间变化的影响规律, 对种有细胞的 4 种不同管径的纳米管及纯钛片, 分别于 1, 2 和 3 天时取样制备成扫描电子显微镜样品, 采用场发射扫描电子显微镜进行观察.

(4) 细胞活性检测. 分别将 4 种不同管径但相同大小($10 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$)的材料放入 24 孔板中, 每种管径的材料设置 3 个平行对照组(即 3 组参数完全一致的重复实验), 共 12 组材料, 均经退火未光照处理. 每孔加入 1 mL 相同密度(40000 个/ cm^2)的细胞悬液, 24 h 后将 12 组材料换入另外的新孔中, 每孔滴加 1 mL 培养液, 再加入 $100 \mu\text{L}$ MTT(浓度为 $5 \text{ mg}/\text{mL}$), 于 37°C 培养箱继续放置 4 h, 待形成结晶后, 小心吸弃上清, 向每孔中加入 1 mL DMSO, 放置在 37°C 培养箱 20 min 使结晶全部溶解后用多功能酶标仪检测 490 nm 处的吸光值. 进一步, 将 12 块含 0.36% NH_4F 、大小为 $10 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$ 的材料放入 24 孔板中, 每孔加入 1 mL 相同密度(40000 个/ cm^2)的细胞悬液, 按上述方法分别在 1, 3, 5, 7 天 4 个时间点设计 MTT 实验, 以检测细胞在该材料上的增殖情况, 纯钛片作为对照组, 每个时间点的实验组及对照组样品均设置 3 个平行对照. 所有测量数据均采用 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示.

2 结果

2.1 TiO_2 纳米管阵列的形貌特性

采用阳极氧化法成功制备了顶端开口底部封闭且排列规整的 TiO_2 纳米管阵列(图 1(A)和(B)), 经浓度为 0.2% 的 HF 腐蚀 45 min 后, 管底部显示被打通, 出现较规整的纳米管(图 1(C)). 通过调节电解液中 NH_4F 的含量, 制备了不同管径的 TiO_2 纳米管阵列膜, 其中, 纳米管的管内径是利用扫描电子显微镜的标尺选取每种管径材料上多个分散的孔进行测量的, 然后用统计学方法计算, 取平均值的整数, 计算结果显示 0.28, 0.32, 0.36 和 0.40g NH_4F 对应的纳米管管内径分别约为 140, 120, 70 和 45 nm. 结果与文献^[23]报道一致, 即随着电解液中 NH_4F 含量的增加, TiO_2 纳米管的管径减小, 管壁变厚.

2.2 光照特性及晶型结构对细胞生长状态的影响

将同一种管径(70 nm)的纳米管材料分别按未退火未光照、未退火光照、退火未光照及退火光照 4 种不同方式处理. 图 2 为退火后的 TiO_2 纳米管 XRD 衍射图谱, 显示无定型 TiO_2 纳米管经 400°C 退火后已转变为锐钛矿型. 分别于 4 组材料上种植相同状态和密度的细胞(1×10^5 个/mL), 24 h 后固定染色. 图 3 显示前 3 组材料上细胞的状态良好, 其中退火未光照组材料(c 组)上细胞黏附情况最佳, 黏附的细胞数最多, 细胞形态大小一致呈均匀铺展, 细胞核圆润且胞质清晰. 图 3(A)和(B)对比可见, 无定型 TiO_2 纳米管经紫外光照射后细胞的黏附数量增加; 图 3(A)和(C)对比显示, 在未经紫外光照射下, 锐钛矿型的 TiO_2 纳米管比无定型更有利于 LLC-PK₁ 细胞的黏附. 图 3(D)为锐钛矿型 TiO_2 经紫外光照射后细胞黏附状态, 显示细胞已凋亡, 染色质减少, 核片段化, 最终形成许

图 1 乙二醇中含 0.36 g NH_4F , 电压 60 V 时制备的 TiO_2 纳米管阵列扫描电子显微镜照片

(A) 纳米管顶部图; (B) 纳米管底部图; (C) 经酸刻蚀后的管底部图

多凋亡小体。

2.3 纳米管几何形貌参数对细胞生长状态的影响

图 4 显示, 细胞经 Hoechst33342 核染后用荧光显微镜观察到的不同管径材料上细胞的黏附状况(所有

材料均经退火未光照处理)。对比发现, LLC-PK₁ 细胞在 70 nm 管径的材料表面的生长状态最佳, 细胞核正常且胞质清晰, 细胞形态大小一致, 铺展均匀; 140 nm 管径的材料表面尽管细胞黏附较多, 但铺展不均匀, 有堆积的现象, 且显示有凋亡迹象; 120 nm 管径

图 2 TiO₂ 在 400℃退火后的 XRD 图

图 3 LLC-PK₁ 细胞黏附在未退火未光照(A)、未退火光照(B)、退火未光照(C)及退火光照(D)4 种不同材料上的荧光显微镜照片(×400)

图 4 LLC-PK₁ 黏附在 4 种不同管径材料上的荧光显微镜照片(×400)

(A) 管径为 140 nm (0.28 g NH₄F); (B) 管径为 120 nm(0.32 g NH₄F); (C) 管径为 70 nm (0.36 g NH₄F); (D) 管径为 45 nm(0.40 g NH₄F)

的材料表面细胞黏附数量非常少, 表明材料表面的黏附性能较差, 大部分细胞可能都已死亡随清洗液流失; 而 45 nm 管径的材料表面上细胞出现了聚集, 没有分裂现象, 且细胞核呈碎裂状, 出现凋亡小体。

2.4 细胞在材料上的增殖活性

为进一步考察 TiO_2 纳米管表面形貌特性对黏附细胞活性的影响, 采用 MTT 活性检测研究了 LLC-PK₁ 细胞在不同管径纳米管上的黏附状况及增殖活性情况, 并与纯钛片做对照分析。图 5(A) 为 4 种不同管径纳米管上细胞 MTT 活性检测结果, 显示 70 nm 管径上吸光值最大, 即黏附细胞的活性最高; 120 nm 管径上吸光值最小, 表明细胞活性最低, 这与图 4(B) 的结果吻合。图 5(B) 为 70 nm 管径样品及纯钛片对照组样品上细胞随时间的增殖情况, 可见在同等种植时间点, TiO_2 纳米管均比纯钛片的吸光值大, 表明纳米管更有利于细胞的黏附及增殖。同时实验组与对照组的吸光值均随种植时间的延长而增加, 表现为细胞的活性越来越高。

2.5 细胞在材料表面的生长形态变化情况

采用 FESEM 考察了 4 种不同管径的纳米管以及纯钛片上种植 LLC-PK₁ 细胞的生长形态随时间变化的规律。结果显示, 在 TiO_2 纳米管上, 由于纳米管管径的不同会使表面种植的细胞数量及形态有一定的差别。图 6(A) 为细胞于 140 nm 管径上种植 1~3 天的形貌图, 140 nm 管径与另外 3 种管径的材料相比细胞黏附的数量最大, 反应细胞在该材料上增殖较快, 种

植 2 天时细胞已出现堆积, 3 天时大部分细胞延伸出的伪足缠结严重; 120 nm 管径上细胞数相对最少, 只集中在材料的小部分面积上, 图中可见 1 天时细胞已达到分裂期, 其中较大的细胞接近凋亡, 种植 2 天后, 分裂出了很多新生的细胞, 大部分还未铺展开, 继续生长至第 3 天, 球状细胞基本长成长片状(图 6(B)); 70 nm 管径上细胞种植 1 天时, 表面黏附的细胞出现明显的丝状伪足, 局部可见明显的细胞质基质成分(这是细胞与材料良好黏附生长的条件), 随种植时间延长, 细胞数逐渐增多, 基本能覆盖材料表面, 且分泌的细胞质基质成分也越多。至第 2 天时, 丝状伪足不断向两端延伸, 形成长条状, 种植 3 天时长出的新细胞越来越多, 细胞伪足延伸更长(图 6(C)); 45 nm 管径上种植 1 天的细胞就出现了聚集, 至第 2 天时细胞基本未分裂, 且细胞聚积更严重, 第 3 天时细胞开始凋亡(图 6(D))。相对 TiO_2 纳米管而言, 在纯钛片上种植的细胞生长形态发生了明显的变化, 细胞由最初的球状发出丝状伪足, 再连成片状伪足, 种植 3 天后可见细胞基本已铺展为平板状, 且细胞堆积较严重(图 6(E)), 反映了在纯钛片上种植细胞的活性相对较低, 这也从另一角度证实了前面 MTT 活性检测结果。值得一提的是, 对比发现在纯钛片上种植细胞生长形态演变过程与在聚合物薄膜上非常相似。如浙江大学陈江华课题组将非洲绿猴肾细胞株种植在聚酰胺中空材料上进行检测, 扫描电子显微镜观察显示, 细胞形态是从最初的球状逐渐发出丝状伪足, 再在表面继续延伸长大, 形成片状伪足, 最终铺展为板层状^[14]。陈香美课题组将人的肾小管上皮细

图 5 LLC-PK₁ 细胞在材料上的黏附及增殖活性

(A) LLC-PK₁ 细胞在不同管径上的黏附状况; (B) LLC-PK₁ 细胞的增殖情况

图 6 LLC-PK₁ 细胞种植在纳米管及纯钛片上的扫描电子显微镜照片(×20000)

胞与肾小球内皮细胞混合种植在聚砜膜中空纤维上, 扫描电子显微镜照片显示这两种细胞在聚砜膜材料表面也呈片状混合生长^[9,10]. 与聚砜膜材料上培养细胞不同的是, 本实验检测 LLC-PK₁ 细胞在 TiO₂ 纳米管上的生长形态一般是从球状延伸出很长的伪足, 随种植时间的延长, 细胞在纳米管表面多呈现长条状. 尽管种植时间及种植密度与上面文献中的不同, 但从细胞生长的趋势可以推测, 细胞在纳米管材料表面很难铺展为板层状或扁平状. 在 TiO₂ 纳米管上种植其他类型细胞(如间充质干细胞、内皮细胞等)也出现类似的结果^[19,21,22]. 有文献报道, 长条状的细胞形态比完全铺展开的平板状形态更能增加细胞在材料上的增殖速率以及细胞外基质成分, 导致更大的迁移率, 这可能使细胞更容易迁移到受损的组织或器官处, 从而更有利于体外移植^[21,24,25]. 这似乎也说明在细胞培养方面 TiO₂ 纳米管比高分子聚合物膜更好.

3 讨论与结论

比较图 3(A)和(B), 未退火样品经光照后细胞的数量在增加, 但据此并不能说明经光照后都是有利于细胞的黏附. 具体要看材料所处的晶型结构, 即材料的晶型结构决定于紫外光照对细胞的黏附是否有利. 已有文献^[26]报道, 锐钛矿型 TiO₂ 比无定型 TiO₂

更适合培养成骨细胞. 从图 3(A)和(C)对比分析, 也说明在未光照情况下锐钛矿型(退火状态)TiO₂ 比无定型(未退火状态)更有利于 LLC-PK₁ 细胞的黏附. 但在光照情况下锐钛矿型 TiO₂ 纳米管上出现了严重的细胞凋亡, 反而不及光照情况下无定型样品. 其主要原因可能与锐钛矿型 TiO₂ 纳米管的光催化活性有关^[27]: 锐钛矿型 TiO₂ 在紫外光照射下, 表现出较高的光催化活性, 使空穴与电子发生分离, 并分别与水和溶解氧作用生成 OH⁻, H₂O₂ 等活性氧类. 这些活性氧类与细胞中的 C, H 等反应, 直接或通过一系列过氧化链式反应破坏细胞结构, 导致细胞死亡. 至于未退火样品光照后细胞数量的增加, 是由于其无定型结构经光照后并不具有光催化活性, 光照后并未改变材料的表面特性, 仅仅起到了杀菌消毒的作用, 因此有利于细胞数量的增加.

对比纳米管表面和纯钛片表面细胞的生长形态, 说明 TiO₂ 纳米管表面更能促进 LLC-PK₁ 细胞的黏附及生长. 另外, 从不同管内径纳米管上细胞的生长状态、细胞黏附的增殖活性及细胞在材料表面的生长形态变化等分析, 可以初步证明管内径为 70 nm 的 TiO₂ 纳米管薄膜对 LLC-PK₁ 细胞的种植情况最优. 当然, 70 nm 管径的新型 TiO₂ 纳米管阵列是否也利于肾小球内皮细胞的黏附生长或以上两种细胞的混合生长, 能否构建具有复合功能的生物人工肾, 本实验室将在后一阶段的实验中进行验证.

参考文献

- 1 Sun I F, Lee S S, Lin S D, et al. Continuous arteriovenous hemodialysis and continuous venovenous hemofiltration in burn patients with acute renal failure. *Kaohsiung J Med Sci*, 2007, 23: 344–351
- 2 Zobel G, Rodl S, Urlesberger B, et al. Continuous renal replacement therapy in critically ill patients. *Kidney Int Suppl*, 1998, 66: 169–173
- 3 Humes H D, Buffington D A, Mackay S M, et al. Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 451–455
- 4 Humes H D, Mackay S M, Funke A J, et al. Tissue engineering of the bioartificial renal tubule assist device: *in vitro* transport and metabolic characteristics. *Kid Int*, 1999, 55: 2502
- 5 Humes H D, Weitzel W F, Bartlett R H, et al. Initial clinical results of the bioartificial kidney containing human cells in ICU patients with acute renal failure. *Kid Int*, 2004, 66: 1578
- 6 Humes H D, Buffington D A, Lou L, et al. Cell therapy with a tissue-engineered kidney reduces the multiple-organ consequences of septic shock. *Crit Care Med*, 2003, 31: 2421
- 7 应旭旻. 生物人工肾小管体外构建及功能测定的研究. 南京: 南京医科大学硕士论文, 2001
- 8 应旭旻. 生物人工肾小管体外构建、功能优化、治疗 MODS/MOF 并 ARF 的实验研究. 南京: 南京医科大学博士论文, 2004
- 9 黄大伟, 傅博, 陈香美, 等. 细胞混合种植法构建生物人工肾小管的初步研究. *中国药物与临床*, 2008, 8: 165–167
- 10 黄大伟. 生物人工肾单位的构建与体外功能评估. 北京: 中国人民解放军军医进修学院博士论文, 2008
- 11 Fissell W H, Dubnisheva A, Eldridge A N, et al. High-performance silicon nanopore hemofiltration membranes. *J Membr Sci*, 2009, 326: 58
- 12 Cornelius T W, Apel P Y, Schiedt B, et al. Investigation of nanopore evolution in ion track-etched polycarbonate membranes. *Nucl Instrum*

- Meth B, 2007, 265: 553
- 13 Paulose M, Lily P, Grimes C A, et al. Fabrication of mechanically robust, large area, polycrystalline nanotubular/porous TiO₂ membranes. *J Membr Sci*, 2008, 319: 199–205
 - 14 董兴刚. 生物人工肾小管体外构建的初步研究. 浙江: 浙江大学博士论文, 2009
 - 15 Popat K C, Leoni L, Grimes C A, et al. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials*, 2007, 28: 3188–3197
 - 16 Popat K C, Eltgroth M L, Grimes C A, et al. Titania nanotubes: a novel platform for drug-eluting coatings for medical implants. *Wiley Inter Science*, 2007, 3: 1878–1881
 - 17 Popat K C, Eltgroth M L, Grimes C A, et al. Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials*, 2007, 28: 4880–4888
 - 18 Park J, Bauer S, Schmuki P, et al. Narrow window in nanoscale dependent activation of endothelial cell growth and differentiation on TiO₂ nanotube surfaces. *Nano Lett*, 2009, 9: 3157–3164
 - 19 Bauer S, Park J, Mark K, et al. Improved attachment of mesenchymal stem cells on super-hydrophobic TiO₂ nanotubes. *Acta Biomater*, 2008, 4: 1576–1582
 - 20 陶杰, 陶海军, 包祖国, 等. 有机电解液中钛基材表面 TiO₂ 纳米管阵列生长机制的研究. *稀有金属材料与工程*, 2009, 38: 967–971
 - 21 Peng L, Eltgroth M L, Grimes C A, et al. The effect of TiO₂ nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation. *Biomaterials*, 2009, 30: 1268–1272
 - 22 Peng L, LaTempa T J, Grimes C A, et al. Whole genome expression analysis reveals differential effects of TiO₂ nanotubes on vascular cells. *Nano Lett*, 2010, 10: 143–148
 - 23 李广忠, 张健, 张文彦, 等. TiO₂ 纳米管阵列膜的制备及结构研究. *稀有金属材料与工程*, 2009, 38: 311–315
 - 24 Tanaka M, Takayama A, Ito E, et al. Effect of pore size of self-organized honeycomb-patterned polymer films on spreading, focal adhesion, proliferation, and function of endothelial cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, 7: 763–772
 - 25 McGrath J L, Osborn E A, Tardy Y S, et al. Regulation of the actin cycle *in vivo* by actin filament severing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6532–6537
 - 26 Yu W Q, Jiang X Q, Zhang F Q, et al. The effect of anatase TiO₂ nanotube layers on MC3T3-E1 preosteoblast adhesion, proliferation, and differentiation. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 94: 1012–1022
 - 27 王竹梅, 李月明, 夏光华, 等. TiO₂ 纳米管阵列的制备及其光催化性能研究. *人工晶体学报*, 2009, 38: 1410–1415

Effect of Surface Characteristics of TiO₂ Nanotube Arrays on Porcine Renal Tubular Epithelial Cell Growth

LIU HuiQiong, ZHU Wen, LIU JianFeng, LIU Xi & TONG DaLi

*State Key Laboratory of Material Processing and Die & Mould Technology, School of Life Science and Technology,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China*

TiO₂ nanotube arrays are becoming increasingly more attractive for their excellent biocompatibility and photocatalytic properties in biomedical fields. However, no work has been reported on the adhesion characteristic of renal tubular epithelial cells to TiO₂ nanotube film in order to fulfill a function of renal tubular. In the present study, novel titania nanotube arrays are fabricated on a pure titanium foil by means of the electrochemical anodization in this group. The effects of illumination performance, crystal structure, and geometry parameters of TiO₂ nanotubes on the adhesion of Lewis-lung cancer porcine kidney 1 (LLC-PK1) are investigated by fluorescence microscope. The cell viability is examined by MTT. Furthermore, the morphologies of cell growth on nanotubes with four various pore sizes are observed using field emission scanning electron microscope (FESEM); micrographs for cell growth on the pure titanium foil are also provided as a contrast. The results show that the TiO₂ nanotube arrays with pore size of about 70 nm have an advantage of optimal adhesion and proliferation for LLC-PK1 cell, and as a consequence giving higher cell viability. In comparison with the amorphous TiO₂, the anatase nanotube arrays are more favorable to cell adhesion under a condition of the absence of UV irradiation; however, anatase TiO₂ irradiated with UV light can cause apoptosis. SEM studies show that the LLC-PK1 cells grown on nanotube arrays have an elongated strip morphology, whereas cells grown on pure titanium foil exhibit the plate-like accumulation state. It demonstrates that novel titania nanotube array films have good biocompatibility, which can help to improve the cell adhesion.

titania nanotube arrays, surface characteristics, biocompatibility, LLC-PK1, cell adhesion

doi: 10.1360/052010-549