

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.02.0138

锶掺杂改性羟基磷灰石的生物学性能研究

高建勇, 田刚, 朱强, 王少海, 汪大林*

第二军医大学长海医院口腔科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究不同锶(Sr)掺杂量的羟基磷灰石(HA)的生物相容性及生物学活性。**方法** 以Sr含量分别为0%、1%、5%、10%、20%的5组Sr掺杂的HA(Sr-HA)材料作为试样,检测各组试样浸提液中 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 浓度;通过溶血试验检测5组材料的体外溶血性;将L929成纤维细胞在5组材料浸提液中接种培养2、7 d,通过MTT法检测5组材料体外细胞毒性,用倒置相差显微镜观察细胞形态;将MG63成骨细胞接种到5种材料表面,采用MTT方法检测培养1、4、12 h后成骨细胞在材料表面的黏附活性和1、4、7 d时细胞在材料表面的增殖活性,并对培养1、3、5 d时成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性进行检测。**结果** 在5组Sr-HA材料浸提液中, Ca^{2+} 浓度以5% Sr含量组最高、1% Sr含量组最低, Sr^{2+} 浓度以20% Sr含量组最高、0% Sr含量组最低;各组Sr-HA溶血率均低于5%,显微镜观察5组材料表面接种培养的L929细胞形态与阴性对照组相似,MTT法检测5组材料体外细胞毒性评级为0级、1级;MG63成骨细胞在材料表面培养4、12 h,5% Sr含量、10% Sr含量、20% Sr含量3组材料表面细胞黏附数量明显高于0% Sr含量、1% Sr含量组($P<0.05$, $P<0.01$);MG63成骨细胞在材料表面培养4、7 d,5% Sr含量、10% Sr含量、20% Sr含量3组材料表面细胞增殖数量明显高于0% Sr含量、1% Sr含量组($P<0.05$);MG63成骨细胞在5组材料表面接种培养3 d时,5% Sr含量、10% Sr含量2组ALP活性高于0% Sr含量、1% Sr含量2组($P<0.05$),5 d时5% Sr含量、10% Sr含量、20% Sr含量3组ALP活性高于0% Sr含量、1% Sr含量2组。**结论** 不同Sr含量的Sr-HA具有良好的生物相容性;一定浓度的Sr掺杂能够有效提高HA的生物学活性,Sr含量为5%、10%时Sr-HA生物学效果最佳。

[关键词] 锶;羟基磷灰石类;成骨细胞;生物学活性;生物相容性

[中图分类号] R 783.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)02-0138-07

Study on the biological properties of strontium doped hydroxyapatite

GAO Jian-yong, TIAN Gang, ZHU Qiang, WANG Shao-hai, WANG Da-lin*

Department of Stomatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the biocompatibility and biological activity of hydroxyapatite (HA) with different strontium (Sr) contents. **Methods** The Sr doped HA (Sr-HA) materials containing 0%, 1%, 5%, 10%, and 20% Sr were prepared and the concentrations of Ca^{2+} and Sr^{2+} in the leaching liquor of them were determined in each group. Hemolysis tests were performed *in vitro* for the 5 materials. L929 fibroblasts were seeded and cultured with leaching liquor of materials for 2 d and 7 d; cell morphology was observed under microscope and the *in vitro* cytotoxicity of the five materials was detected by MTT assay. The MG63 bone cells were seeded on the surface of the 5 materials; then cell adhesion was observed at 1, 4, 12 h of culture, and the proliferation of cells was observed on day 1, 4 and 7 of culture by MTT method; and alkaline phosphatase (ALP) activity of the osteoblasts was detected on day 1, 3, and 5. **Results** The highest Ca^{2+} concentration was found in the leaching liquor of 5% Sr group, and the lowest was found in the 1% Sr group; the highest Sr^{2+} concentration was found in the leaching liquor of 20% Sr group, and the lowest was found in 0% Sr group. The hemolytic rates of Sr-HA materials were lower than 5% in all the five Sr-HA groups. The morphology of L929 fibroblasts in the five Sr-HA groups was similar to that of the negative control group; and MTT assay showed that the overall cytotoxicity of the five Sr-HA groups was grade 0 or 1. After 4 and 12 h culture, the number of adhered MG63 osteoblasts in 5%, 10%, and 20% Sr groups were significantly more than those

[收稿日期] 2015-11-17 **[接受日期]** 2016-01-09

[基金项目] 军事口腔医学国家重点实验室开放课题(2014KB07),上海市卫生局局级课题面上项目(20133124),第二军医大学长海医院“1255”基金项目(CH125541800)。Supported by State Key Laboratory Program of Military Stomatology (2014KB07), General Program of Health Bureau of Shanghai (20133124) and the “1255” Project of Changhai Hospital of Second Military Medical University (CH125541800).

[作者简介] 高建勇, 博士, 主治医师。E-mail: yongjiangao1976@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162027, E-mail: wang_dento@163.com

in 0% and 1% Sr groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). On day 4 and 7 of culture, the proliferation rates of MG63 osteoblasts in 5%, 10% and 20% Sr groups were significantly higher than those in 0% and 1% Sr groups ($P < 0.05$). The ALP activity of MG63 osteoblasts in 5% and 10% Sr groups was significantly higher than that in 0% and 1% Sr groups on day 3 of culture ($P < 0.05$); and that in 5%, 10%, and 20% Sr groups was higher than that in 0% and 1% Sr groups on day 5 of culture. **Conclusion** Sr-HA material with different Sr contents has good biocompatibility; the combination with certain concentration of Sr can effectively improve the biological activity of HA, with the best activity seen when Sr ratio is 5% or 10%.

[Key words] strontium; hydroxyapatites; osteoblasts; bioactivity; biocompatibility

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(2): 138-144]

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)与人骨磷灰石成分组成、结构相似,因其良好的生物相容性、生物活性已广泛应用于硬组织缺损修复、植入体表面涂层和骨缺损充填。然而其结晶度、结构稳定性比骨磷灰石高,植入后不易降解,作为残留于骨组织中的异质,容易成为植入部位感染源和种植障碍物,不利于骨缺损修复及种植体的骨性结合^[1]。HA在人自然骨中的形态是缺钙羟基磷灰石,其准确的表述式为 $(Ca, M)_{10}(PO_4, Y)_6(OH, X)_2$,其中M为取代的阳离子,X为取代的阴离子。天然骨组织中存在的无机离子如 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Sr^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 等在骨生物学、机械性能等方面起着重要作用,无机离子替代能引起HA晶体大小、结晶度、溶解性和表面形貌等结构变化,并最终提高材料的生物学性能^[2]。基于仿生的理念,离子掺杂成为近年来HA改性的研究热点,而锶(strontium, Sr)因其在人体骨组织中的浓缩存在,正备受关注。

有研究发现, Sr掺杂导致HA晶格改变,改善了结晶度、溶解度和材料的生物降解性^[3],体外细胞实验结果也显示Sr能促进成骨细胞的增殖和成骨性胶原合成、抑制破骨细胞分化^[4-5];并且Sr掺杂可以促进体内骨形成,抑制骨吸收,改善骨的微细结构^[6-8],使其更好地与自然骨匹配和融合。但是,对于任何一种元素在体内都存在最佳生物学浓度范围,超过这一范围就会存在潜在的毒性风险。低含量Sr可以促进骨形成、抑制骨的吸收,而高含量Sr会造成体内骨钙代谢异常^[9-10]。Braux等^[1]就不同Sr离子浓度对成骨细胞分化进行研究,发现Sr离子浓度为 5×10^{-5} mol/L的时候,成骨细胞标记物表达最高;当浓度上升至 10^{-3} mol/L时则抑制成骨细胞的增殖。本研究对不同含量Sr掺杂的HA(Sr-HA)生物相容性及生物学活性进行比较分析,探讨Sr离子掺杂HA的安全剂量及最佳生物学效应。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 YJ-875超净工作台(苏州净化设备厂);CO₂细胞培养箱(Forma Scientific,美国);DMEM培养液(Gibco,美国);新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);胰蛋白酶(Sigma,德国);碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);MTT、DMSO(上海化学试剂厂);ELX800酶联免疫检测仪(Bio-TEK,美国);X射线衍射仪(XRD-7000;岛津制作所;日本);相差显微镜(Olympus,日本);电感耦合等离子体发射光谱仪(Profile Spec,美国)。

1.2 Sr-HA试样制备及分组 不同含量Sr掺杂的HA来源于上海中国科学院硅酸盐研究所课题组。根据Sr含量不同(0%、1%、5%、10%、20%)将Sr-HA分为5组。每组均有粉体及10 mm×10 mm×1 mm片状2种。

1.3 材料晶相结构测试 应用X射线衍射仪分析Sr-HA试样表面晶相结构,衍射起始角、终止角分别为10°和60°,步宽为0.02°,波长为1.540 56 nm。

1.4 Sr-HA试样浸提液中Ca²⁺、Sr²⁺离子浓度测定 浸提液为DMEM培养液(含体积分数为10%的胎牛血清),按照Sr-HA试样粉末:浸提液为2 g:10 mL的比例配制,37°C下在无菌、化学惰性的密封容器中浸提24 h。浸提液用过滤器除菌。采用电感耦合等离子体发射光谱仪测量5组Sr-HA试样浸提液中的Ca²⁺、Sr²⁺浓度。

1.5 Sr-HA试样溶血作用检测 按国家标准《医疗器械生物学评价.第4部分:与血液相互作用试验选择》^[11]规定的医疗器械及其成分的溶血性能评价方法执行。试样组预备:分别称取5组Sr-HA试样粉末各0.2 g,加入含生理盐水10 mL的离心管中;阳性对照:含10 mL蒸馏水的试管;阴性对照:含10

mL生理盐水的试管。各试管 37℃保温 30 min 后,加入稀释为 2%的兔血 0.2 mL,轻摇,再次放入 37℃水浴箱,保温 60 min。室温下 2 500 r/min 离心 5 min,取上清液在酶标仪上测定 540 nm 处的光密度(D)。按公式计算相应的溶血率:溶血率(%) = $(D_{\text{试样}} - D_{\text{阴性对照}}) / (D_{\text{阳性对照}} - D_{\text{阴性对照}}) \times 100\%$ 。溶血评价标准:溶血率 ≤ 5%,符合医用材料溶血实验要求;溶血率 > 5%,提示材料具有溶血作用。

1.6 Sr-HA 试样体外细胞毒性检测 按 1.4 项方法制备浸提液,分别加入不同比例 DMEM 培养液稀释,得 50%、20%、10% Sr-HA 浸提液。采用 MTT 法检测细胞毒性。设定阴性对照为 DMEM 培养液,阳性对照为 6.4 g/L 苯酚溶液。将 L929 小鼠成纤维细胞(由上海中国科学院硅酸盐研究所提供)以 1×10^7 /L 接种于 24 孔板,贴壁良好,24 h 后弃原液,PBS 清洗 2 次,按实验分组分别加入浸提液或培养液。将培养 2、7 d 的 L929 细胞用 MTT 比色法检测。实验观察期,弃培养板内浸提液或培养液,加入 5 g/L 的 MTT (20 μL/孔),继续培养 6 h,弃原液加入 DMSO (150 μL/孔),振荡培养板 10 min,用酶标仪在 500 nm 波长处测定各孔 D 值,计算细胞相对增殖率。细胞相对增殖率(%) = $(D_{\text{试样}} / D_{\text{阴性对照}}) \times 100\%$ 。根据细胞相对增殖率进行细胞毒性的结果评价:≥100%,毒性 0 级,合格;75%~99%,毒性 1 级,合格;50%~74%,毒性 2 级,结合细胞形态综合分析;25%~49%,毒性 3 级,不合格;1%~24%,毒性 4 级,不合格;0,毒性 5 级,不合格。细胞形态毒性分析:通过倒置相差显微镜观察 5 组试样不同浸提液浓度培养下的细胞形态。

1.7 Sr-HA 试样对 MG63 细胞黏附的影响 5 组片状试样各 6 个放在 24 孔培养板内,将生长良好的第 3 代 MG63 成骨细胞(上海中国科学院硅酸盐研究所)以 6×10^4 /孔的密度接种,加 DMEM 培养液 1 mL,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养,分别于培养 1、4、12 h 后弃培养液,PBS 漂洗 2 次,每孔加入 5 g/L MTT 200 μL,37℃继续孵育 4 h,弃上清,加入 1 mL DMSO,结晶充分溶解后,取 200 μL/孔移至 96 孔培养板,震荡 10 min,用酶联免疫检测仪测定 570 nm 处的 D 值。每组重复 3 次实验,结果取平均值。

1.8 Sr-HA 试样对 MG63 细胞增殖的影响 以

2×10^4 /孔的密度将生长良好的第 3 代 MG63 成骨细胞接种于 5 组试样各 6 个的 24 孔培养板内,分别于 1、4、7 d 种植培养。培养条件和 MTT 检测方法同 1.7 项。

1.9 Sr-HA 试样对 MG63 成骨细胞 ALP 活性的影响 以 2×10^4 个/cm² 密度将 MG63 成骨细胞接种于含有 5 组试样的 24 孔培养板中,分别于 1、3、5 d 终止培养,弃去培养液,PBS 清洗 3 次,加入细胞裂解液 0.25% Triton X-100,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液收集后置于 -80℃ 冷藏,待所有试样收集完毕后按照 ALP 试剂盒说明测定 405 nm 处的 D 值,用空白管调零。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用独立样本 t 检验分析组间差异。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Sr-HA 试样表面晶相结构及浸提液中 Ca²⁺、Sr²⁺ 浓度 如图 1, Sr 掺杂 HA X 射线衍射图谱显示: $r(\text{Sr}^{2+}) > r(\text{Ca}^{2+})$, Sr²⁺ 取代 Ca²⁺, 使 HA 的晶格发生畸变,从而引起晶面间距扩大,结晶度改变。掺 Sr 后, X 射线衍射峰位左移, Sr²⁺ 含量愈多,偏移量愈大。不同 Sr 含量的 Sr-HA 浸提液中 Ca²⁺、Sr²⁺ 浓度研究结果发现,在 5 组试样中, Ca²⁺ 浓度以 Sr 掺杂量为 5% 组最高, Sr 掺杂量为 1% 组最低; Sr²⁺ 浓度随着 Sr 掺杂量增加而增加, Sr 掺杂量为 20% 组最高, Sr 掺杂量为 0% 组最低(表 1)。

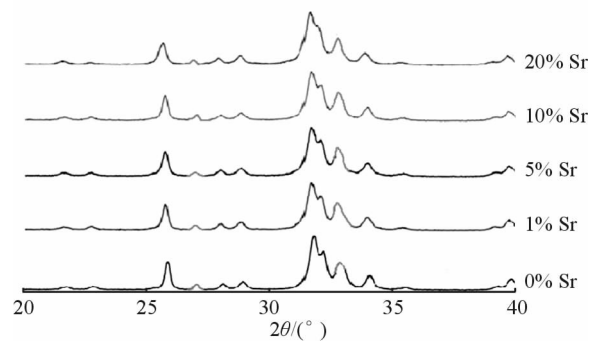


图 1 不同含量 Sr 掺杂 Sr-HA 试样表面晶相结构 X 射线衍射图谱

Fig 1 X-ray diffraction of Sr-HA surface crystal phase structure of the five Sr-HA groups

Sr-HA: Strontium doped hydroxyapatite

2.2 Sr-HA 试样溶血实验结果 不同 Sr 含量(0%、1%、5%、10%、20%)试样的溶血率分别为

0.813%、0.922%、0.125%、0.147%、2.451%。试管中红细胞下沉,上层液变清无红色,吸取少量含红细胞的下层液在显微镜下观察,未发现红细胞破裂现象,表明材料在此浓度范围内符合医用材料的溶血实验要求。

表 1 不同含量 Sr 掺杂 Sr-HA 试样浸提液中 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 浓度
Tab 1 Concentrations of Ca^{2+} and Sr^{2+} in the leaching liquor of the five Sr-HA groups

Sr-HA	$\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	Ca^{2+}	Sr^{2+}
0% Sr	8.24	0
1% Sr	4.10	4.02
5% Sr	26.31	11.03
10% Sr	23.20	17.69
20% Sr	21.05	23.40

Sr-HA: Strontium doped hydroxyapatite

表 2 不同含量 Sr 掺杂 Sr-HA 试样浸提液浓度作用 L929 成纤维细胞 2 d 和 7 d 相对增殖率和毒性分级

Tab 2 Relative growth rate(RGT)and toxicity grade of L929 fibroblasts cultured for 2 and 7 days in the five Sr-HA groups

Time	Sr-HA	10% Diluted		20% Diluted		50% Diluted		Undiluted	
		RGT(%)	Toxicity grade	RGT(%)	Toxicity grade	RGT(%)	Toxicity grade	RGT(%)	Toxicity grade
Day 2	0% Sr	100.6	0	106.2	0	103.9	0	98.3	1
	1% Sr	95.1	1	102.9	0	101.6	0	95.1	1
	5% Sr	104.2	0	106.5	0	103.9	0	101.6	0
	10% Sr	103.6	0	105.2	0	98.3	1	96.1	1
	20% Sr	100.6	0	104.5	0	96.7	1	95.1	1
Day 7	0% Sr	101.3	0	103.4	0	103.2	0	100.6	0
	1% Sr	98.5	1	101.1	0	100.3	0	100.0	0
	5% Sr	103.6	0	106.2	0	104.9	0	101.6	0
	10% Sr	102.9	0	104.2	0	102.9	0	99.1	1
	20% Sr	100.1	0	100.8	0	100.0	0	97.0	1

Sr-HA: Strontium doped hydroxyapatite

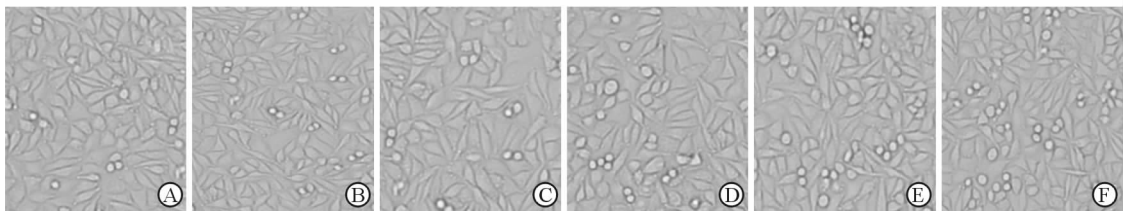


图 2 不同含量 Sr 掺杂 Sr-HA 试样作用 L929 成纤维细胞 7 d 细胞形态观察

Fig 2 Morphology of L929 fibroblasts on day 7 of culture in the five Sr-HA groups and control groups

A: Negative control; B: 0% Sr; C: 1% Sr; D: 5% Sr; E: 10% Sr; F: 20% Sr. Sr-HA: Strontium doped hydroxyapatite. Original magnification: $\times 200$

2.4 不同 Sr 掺杂量 HA 对 MG63 成骨细胞黏附的影响 由图 3 可见,细胞在不同 Sr 含量(0%、1%、

2.3 Sr-HA 试样体外细胞毒性实验结果 由表 2 可见,细胞培养 2、7 d,各组细胞生长呈明显增长趋势,不同 Sr 含量(0%、1%、5%、10%、20%)试样总体毒性评级为 0 级、1 级,说明不同 Sr 含量 Sr-HA 合格,体外培养对 L929 细胞无毒性,符合《医疗器械生物学评价》中关于实验材料细胞毒性的要求(国家标准 GB/T16886.5-2003)。

通过倒置相差显微镜观察,不同 Sr 含量(0%、1%、5%、10%、20%)试样浸提液(未稀释)培养的 L929 细胞与阴性对照组比较细胞形态无明显差异,细胞均贴壁生长,形态呈梭形或多角形,细胞突充分伸展,并见圆形的分裂状态细胞,胞质内有离散颗粒,细胞无溶解(图 2)。

5%、10%、20%)试样表面黏附量随培养时间延长而增加。培养 1 h 时,5 组试样随着 Sr 含量的增加,

MG63 细胞黏附量增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$);4 h 时,5% Sr 含量、10% Sr 含量、20% Sr 含量 3 组表面细胞黏附量明显上升,与 0% Sr 含量、1% Sr 含量 2 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);12 h 时,5% Sr 含量、10% Sr 含量、20% Sr 含量 3 组与 0% Sr 含量、1% Sr 含量 2 组表面细胞黏附量差异有统计学意义($P < 0.01$),1% Sr 含量组与 0% Sr 含量组差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。说明与纯 HA 相比,随着 Sr 掺杂量的增加,促进了 MG63 细胞的黏附,但高于 5% 的 Sr 掺杂量促进作用无进一步增强,5% Sr 掺杂量取得了更有效的作用。

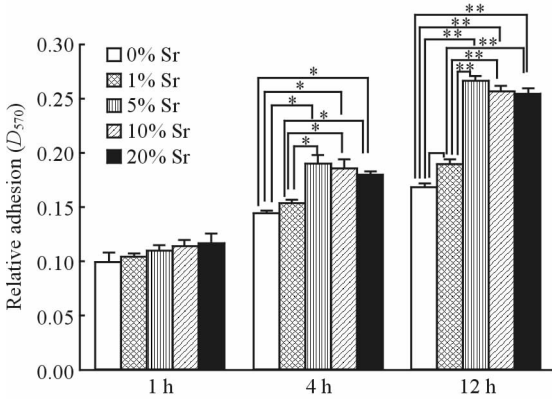


图3 MG63 成骨细胞在不同含量 Sr 掺杂 Sr-HA 试样表面培养 1、4、12 h 的黏附情况

Fig 3 Adhesion of MG63 osteoblasts after 1, 4, and 12 h culture on the surface of Sr-HA material in the five Sr-HA groups

Sr-HA: Strontium doped hydroxyapatite. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.5 不同 Sr 掺杂量 HA 对 MG63 成骨细胞增殖的影响 由图 4 可见,不同 Sr 含量(0%、1%、5%、10%、20%)试样表面细胞增殖数量随培养时间增加而增加。第 1 天各组间细胞增殖数量随 Sr 含量呈递趋势但差异无统计学意义($P > 0.05$);第 4 天 5% Sr 含量、10% Sr 含量、20% Sr 含量 3 组与 0% Sr 含量、1% Sr 含量 2 组相比细胞增殖数量明显增加且差异有统计学意义($P < 0.05$);第 7 天 5% Sr 含量、10% Sr 含量、20% Sr 含量 3 组与 0% Sr 含量、1% Sr 含量 2 组比较明显增加且差异有统计学意义($P < 0.05$),1% Sr 含量组与 0% Sr 含量组比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。说明 Sr 的掺杂能够促进 MG63 细胞的增殖,但 Sr 含量的增加与促

进细胞增殖作用非线性关系,Sr 掺杂量 10% 以上时促增强作用不再加强,5% Sr 含量、10% Sr 含量 2 组表现出良好的促进成骨细胞增殖作用。

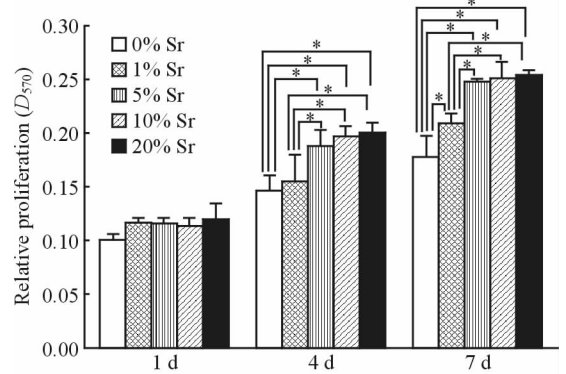


图4 MG63 成骨细胞在不同含量 Sr 掺杂 Sr-HA 试样表面培养 1、4、7 d 增殖情况

Fig 4 Proliferation of MG63 osteoblasts after 1, 4, and 7 d of culture on the surface of Sr-HA material in the five Sr-HA groups

Sr-HA: Strontium doped hydroxyapatite. * $P < 0.05$, $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.6 不同 Sr 掺杂量 HA 对 MG63 成骨细胞 ALP 活性的影响 由图 5 可见,MG63 成骨细胞在不同 Sr 含量(0%、1%、5%、10%、20%)试样表面 ALP 活性随培养时间的增加而增加。第 1 天 ALP 在各组试样表面表达差异无统计学意义($P > 0.05$);第 3 天,5% Sr 含量、10% Sr 含量 2 组试样表面 ALP 的活性明显高于 0% Sr 含量、1% Sr 含量 2 组($P < 0.05$);第 5 天,5% Sr 含量、10% Sr 含量、20% Sr 含量 3 组 ALP 的表达明显高于 0% Sr 含量、1% Sr 含量 2 组($P < 0.05$),1% Sr 含量组明显高于 0% Sr 含量组($P < 0.05$)。说明 Sr 掺杂 HA 能够促进成骨细胞 ALP 的活性,但当掺杂量到一定比例后再增加 Sr 量不能进一步提高其促进作用。

3 讨论

HA 作为一种骨修复植入生物材料,良好的生物相容性是其得以应用的重要前提。我们采用溶血实验、体外细胞毒性实验等方法考察了不同 Sr 含量(0%、1%、5%、10%、20%)Sr-HA 材料的生物相容性。溶血实验是常用的急性毒性实验中的初筛实验方法之一,通过检测材料对红细胞溶解的作用来评价材料的毒性^[12]。本研究结果显示,各组 Sr-HA 的溶血率均小于 5%,同时显微镜观察血细胞未见细

胞破裂。提示制备的不同 Sr 含量的 Sr-HA 不引起溶血反应,符合相关溶血实验要求。体外细胞培养法具有简便、快速、灵敏、重复性好的优点,MTT 法是常用的检测材料体外细胞毒性的方法^[13]。我们选用 L-929 小鼠成纤维细胞对试样材料进行细胞毒性分析,结果发现制备的不同 Sr 含量的 5 组 Sr-HA 试样材料细胞毒性评级均为 0 或 1 级,各组材料表面细胞形态良好,未见明显毒性反应。实验结果与陈德敏等^[14]关于 Sr 掺杂 HA 的细胞毒性研究结论相似,说明 Sr 掺杂 HA 材料具有较好的生物安全性。

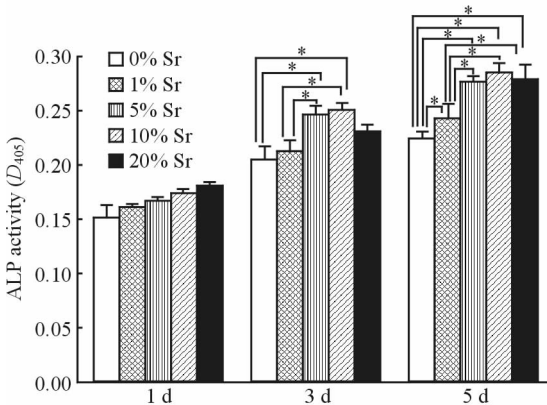


图5 MG63 成骨细胞在不同含量 Sr 掺杂 Sr-HA 试样表面培养 1、3、5 d 时 ALP 表达

Fig 5 ALP expression in MG63 osteoblasts after 1, 3, and 5 d of culture on the

surface of Sr-HA material in the five Sr-HA groups

Sr-HA: Strontium doped hydroxyapatite; ALP: Alkaline phosphatase. * $P < 0.05$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

成骨细胞属于锚合依赖性细胞,其在材料表面的黏附是材料骨界面锚合的第一步,是由一系列动态的蛋白质、生长因子介导的细胞活动^[15]。当细胞黏附、铺展后,经过滞留期,开始增殖。既往实验结果表明,掺入 Sr 的 Sr-HA 能有效地促进成骨细胞的增殖^[16-17]。我们通过 MTT 法研究了不同 Sr 含量掺杂的 HA 对 MG63 细胞黏附、增殖的影响,结果发现,各组材料表面细胞黏附、增殖数量随培养时间增加而增加,Sr 掺杂量为 5% 时促进细胞黏附作用最为显著。在细胞增殖实验中,培养第 1 天,各组材料表面细胞增殖数量并无明显差异,这可能与作用时间短有关,研究认为 Sr^{2+} 促进成骨细胞显著增殖的作用时间始于 48 h^[18-19];培养 4、7 d 时,Sr 掺杂量为 5% 和 10% 2 组表现出良好的促进成骨细胞增殖的作用。 Sr^{2+} 通过钙离子感受器作用,启动相关

的信号受体,促进生长因子的释放、细胞的黏附及增殖^[20-21]。Sr 掺杂量较高(20%)时对促进细胞黏附、增殖作用并无明显优势,表明 Sr 的掺入量与材料的离解度并非成简单的正比关系,不是随 Sr^{2+} 代替 Ca^{2+} 比例增加 Sr-HA 的生物降解度也直线增加^[22],当 Sr 掺杂量在 10% 以上时,虽然 Sr^{2+} 浓度较高,但其对成骨细胞的黏附、增殖作用不会显著增强。Choudhary 等^[23]研究动物体内骨种植的实验结果也证实了这一现象。

ALP 是成骨细胞分化、矿化过程中必需的酶之一,分析检测 ALP 活性是评价成骨细胞分化的重要指标。有研究证实 Sr^{2+} 具有促进成骨细胞分化作用^[24-25],能增加 ALP 的表达。本研究结果发现,Sr 掺杂量的增加可以促进 ALP 的表达,但 Sr 掺杂量在 5%、10% 和 20% 时,3 组间差异无统计学意义。同时 Sr^{2+} 促进 ALP 的表达具有一定的延迟性,在培养第 3 天后出现了明显促进作用。Chung 等^[18]研究认为, Sr^{2+} 、 Ca^{2+} 都是 Ca 受体激活剂,但亲和力有一定差异, Ca^{2+} 强而 Sr^{2+} 弱,它们在介导的钙敏受体传导通道中的活性作用存在差异。我们认为,Sr-HA 作用早期,降解的 Ca^{2+} 浓度明显高于 Sr^{2+} ,在高 Ca/Sr 摩尔比下, Sr^{2+} 并不能竞争 Ca^{2+} , Sr^{2+} 生物活性较 Ca^{2+} 弱^[26]。此时, Ca^{2+} 因高浓度、高活性成为促进 ALP 表达的主要因素。随着作用时间延长, Sr^{2+} 浓度进一步增加,其对 ALP 表达的作用逐渐增强,在 Sr^{2+} 及 Ca^{2+} 双重作用下共同促进了 ALP 的表达。因此, Sr^{2+} 促进 ALP 显著增强表达具有延迟性,始于 48 h 后^[19]。我们推测, Sr^{2+} 作用于成骨细胞分化存在可能的负反馈调节,即 Sr^{2+} 存在最佳体液-细胞平衡浓度范围,此时,细胞膜表面与 Sr^{2+} 相关作用受体饱和,当高于这一浓度范围时, Sr^{2+} 促进成骨细胞分化作用无进一步增强或可能减弱,但还需要进一步在细胞水平和分子水平上阐明其促进成骨细胞 ALP 表达的作用机制。

综上,本研究发现,不同 Sr 掺杂量的 Sr-HA 具有良好的生物相容性,Sr 掺杂能够促进成骨细胞的黏附、增殖和分化。在提高 HA 生物学活性方面,Sr 掺杂量存在一个适合范围,掺杂量为 5% 和 10% 时 Sr-HA 具有良好的生物学性能。

[参考文献]

[1] Braux J, Velard F, Guillaume C, Bouthors S, Jallot

- E, Nedelec J M, et al. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7: 2593-2603.
- [2] Shi D L. Introduction to biomaterials[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2006:16-28.
- [3] Christoffersen J, Christoffersen M R, Kolthoff N, Bärenholdt O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection[J]. *Bone*, 1997, 20: 47-54.
- [4] Zhou J, Han Y, Lu S. Direct role of interrod spacing in mediating cell adhesion on Sr-HA nanorod-patterned coatings[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 1243-1260.
- [5] Boanini E, Torricelli P, Fini M, Bigi A. Osteopenic bone cell response to strontium-substituted hydroxyapatite[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22: 2079-2088.
- [6] Li Y, Li Q, Zhu S, Luo E, Li J, Feng G, et al. The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 9006-9014.
- [7] 闫 钧, 张玉梅, 憨 勇, 赵彦涛, 孙继锋, 闫 昊. 锶磷灰石涂层钛种植体骨结合的动物实验[J]. *中华口腔医学杂志*, 2010, 45: 89-93.
- [8] Yang G L, Song L N, Jiang Q H, Wang X X, Zhao S F, He F M. Effect of strontium-substituted nanohydroxyapatite coating of porous implant surfaces on implant osseointegration in a rabbit model[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2012, 27: 1332-1339.
- [9] Zhang W, Shen Y, Pan H, Lin K, Liu X, Darvell B W, et al. Effects of strontium in modified biomaterials [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7: 800-808.
- [10] Naveau B. Strontium: a new treatment for osteoporosis[J]. *Joint Bone Spine*, 2004, 71: 261-263.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价. 第4部分: 与血液相互作用试验选择: GB/T 16886. 4-2003 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [12] Piattelli A, Cosci F, Scarano A, Trisi P. Localized chronic suppurative bone infection as a sequel of peri-implantitis in a hydroxyapatite-coated dental implant [J]. *Biomaterials*, 1995, 16: 917-920.
- [13] Li Q, Ionut I, Jeff L, Wei L, Michael S, Jules K. Numerical simulation of crack formation in all ceramic dental bridge[J]. *Key Eng Mater*, 2006, 312: 293-298.
- [14] 陈德敏, 傅远飞. 不同含锶量的掺锶羟磷灰石陶瓷细胞毒性评价[J]. *现代口腔医学杂志*, 2003, 17: 501-503.
- [15] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials[J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 667-681.
- [16] Ni G X, Yao Z P, Huang G T, Liu W G, Lu W W. The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts *in vitro* [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22: 961-967.
- [17] Ni G X, Shu B, Huang G, Lu W W, Pan H B. The effect of strontium incorporation into hydroxyapatites on their physical and biological properties[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100: 562-568.
- [18] Chung C J, Long H Y. Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7: 4081-4087.
- [19] Capuccini C, Torricelli P, Sima F, Boanini E, Ristoscu C, Bracci B, et al. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: *in vitro* osteoblast and osteoclast response [J]. *Acta Biomater*, 2008, 4: 1885-1893.
- [20] Saidak Z, Marie P J. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis[J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 136: 216-226.
- [21] Caverzasio J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms[J]. *Bone*, 2008, 42: 1131-1136.
- [22] Wu C, Ramaswamy Y, Kwik D, Zreiqat H. The effect of strontium incorporation into CaSiO₃ ceramics on their physical and biological properties [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 3171-3181.
- [23] Choudhary S, Halbout P, Alander C, Raisz L, Pilbeam C. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells; involvement of prostaglandins [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22: 1002-1010.
- [24] Querido W, Rossi A L, Farina M. The effects of strontium on bone mineral: a review on current knowledge and microanalytical approaches[J]. *Micron*, 2016, 80: 122-134.
- [25] Yang L, Perez-Amodio S, Barrère-de Groot F Y, Everts V, van Blitterswijk C A, Habibovic P. The effects of inorganic additives to calcium phosphate on *in vitro* behavior of osteoblasts and osteoclasts [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 2976-2989.
- [26] Boanini E, Torricelli P, Gazzano M, Della Bella E, Fini M, Bigi A. Combined effect of strontium and zoledronate on hydroxyapatite structure and bone cell responses[J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 5619-5626.