

微量硅掺杂改性羟基磷灰石的制备及对成骨细胞功能活性的影响

高建勇¹,王 铭²,田 刚¹,王少海¹,汪大林^{1*}
1. 第二军医大学长海医院口腔科,上海 200433
2. 中国科学院上海硅酸盐研究所无机涂层材料研究实验室,上海 200050

[摘要] **目的** 研究以硅在天然骨中的含量为掺杂量制备的硅-羟基磷灰石(Si-HA)对成骨细胞活性的影响。**方法** 以水热法制备微量硅掺杂改性的 Si-HA;通过 X 射线衍射(X-ray diffraction,XRD)及扫描电镜观察材料表面构相;MG63 细胞在材料表面分别接种培养 1、6、12 h 及 1、4、7、14 d,通过 CCK8 方法分别检测 MG63 细胞在材料表面的黏附、增殖情况;通过 DAPI 染色法验证 CCK8 检测细胞黏附数量;并对 1、4、7、14 d 成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性进行检测;采用 RT-PCR 检测成骨细胞特异性基因 *ALP*、I 型胶原(*Col-I*)、骨钙素(*OC*) 在 1、4、7、14 d 的表达。**结果** Si 的掺杂未改变 HA 表面结构及组成;MG63 细胞在材料表面培养 6、12 h,Si-HA 表面细胞附着数量明显高于 HA 表面($P<0.05$);DAPI 染色法与 CCK8 实验结果相同;细胞培养 4、7 d 时,Si-HA 较 HA 表面的增殖细胞数量增多($P<0.05$)。细胞培养 4、7 d 时,Si-HA 材料表面 ALP 活性及基因表达高于 HA 表面($P<0.05$);4、7、14 d 时 *Col-I* 基因在 Si-HA 表面的表达量明显高于 HA 表面($P<0.05$)。7、14 d 时,*OC* 基因在 Si-HA 表面的表达量明显高于 HA 表面($P<0.05$)。**结论** 以硅在天然骨中的含量为掺杂量的 Si-HA 能够促进 MG63 成骨细胞黏附、增殖,上调成骨特异性基因的表达,提高了 HA 材料的生物学活性。

[关键词] 羟基磷灰石类;硅;成骨细胞;生物学活性
[中图分类号] R 783.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)04-0405-06

Preparation of microdosage silicon-doped hydroxyapatite and its effect on functional activity of osteoblasts

GAO Jian-yong¹, WANG Ming², TIAN Gang¹, WANG Shao-hai¹, WANG Da-lin^{1*}
1. Department of Stomatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Key Lab of Inorganic Coating Materials, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of silicon-doped hydroxyapatite (Si-HA), which is prepared in accordance with the silicon content in natural bone, on the activity of osteoblasts. **Methods** Hydrothermal synthesis method was used to prepare hydroxyapatite doped by microdosage silicon. The surface of the material was observed by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscope. MG63 osteoblast-like cells were cultured on the surface of materials for 1, 6, 12 h and 1, 4, 7, 14 d, respectively; then the adhesion and proliferation of MG63 cells were detected by CCK8 method; and the number of cell adhesion was verified by DAPI staining. Alkaline phosphatase (ALP) activity of the MG63 cells was assessed with ALP assay kit; RT-PCR was used to detect the expression of osteoblast specific genes (*ALP*, *Collagen I* and *osteocalcin*) at 1, 4, 7, and 14 d. **Results** The surface structure and composition of hydroxyapatite were not changed by Si. After cultured for 6 and 12 h, the MG63 cells adhered to Si-HA surface was significantly more than that to HA surface ($P<0.05$), which was consistent with the findings of DAPI staining. After cultured for 4 and 7 d, the number of cells on Si-HA surface increased significantly compared with that on HA surface($P<0.05$). ALP activity in cells cultured on Si-HA surface were significantly higher than those on HA surface ($P<0.05$); the expression of *Collagen I* gene in Si-HA group was significantly higher than that in HA group on day 4, 7, and 14 ($P<0.05$), and the expression of *osteocalcin* gene was significantly higher on day 7 and 14 ($P<0.05$). **Conclusion** Silicon-doped hydroxyapatite in accordance with silicon content in the natural bone can promote the adhesion, proliferation and the expression of osteogenic specific genes of osteoblast MG63 cells, indicating that the prepared material has an improved

[收稿日期] 2015-12-01 **[接受日期]** 2016-03-29
[基金项目] 国家自然科学基金(81271177),军事口腔医学国家重点实验室开放课题(2014KB07),长海医院“1255”学科建设计划科研创新探索项目(CH125541800), Supported by National Natural Science Foundation of China (81271177), State Key Laboratory of Military Stomatology (2014KB07), and the “1255” Subject Construction and Scientific Innovation Program of Changhai Hospital (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: 021-83663679, E-mail: wangdento@163.com

biological activity compared with pure HA.

[Key words] hydroxyapatites; silicon; osteoblasts; bioactivity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(4): 405-410]

天然骨组织无机构成主要是羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA),同时含有 Si^{4+} 、 F^- 、 CO_3^{2-} 、 Sr^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Na^+ 等微量成分,研究认为这些微量成分在天然骨理化性质、生物学功能等方面发挥着重要作用^[1]。人工合成 HA 的组分与结构单一,无法完全实现天然硬组织的功能。因此,HA 无机离子掺杂改性广受关注。

硅(silicon, Si)是人体必需的微量元素,在骨形成、矿化和骨功能代谢中起着重要作用,缺 Si 后可导致骨骼异常、畸形、牙齿釉质发育不良等^[2-3]。Si 掺杂改性 HA 的研究发现, SiO_4^{4-} 取代部分 PO_4^{3-} 导致 HA 晶格畸变、降低了结晶度,促进了材料的骨诱导再生能力^[4]。但是, Si 在 HA 中的掺杂量是有一定量度的,为 0.1%~5%(质量分数),超过最大量度时 HA 晶体相组成出现杂相,但 0.5%和 1%的掺杂时 HA 的生物活性明显提高^[5]。Jokic 等^[6]研究认为, Si-HA 促进成骨细胞增殖最佳掺杂量是 0.8%(质量分数),高于此量产生一定细胞毒性,对细胞增殖有抑制作用。研究发现, 2.2%(质量分数)的 Si 掺杂量是提高其生物活性的最佳浓度^[7]。目前关于 Si-HA 中最佳掺杂量仍存在着争议,而以 Si 在天然骨中的含量为掺杂量的 Si-HA 的研究鲜有报道。

本实验通过水热法制备以天然骨 Si 含量为掺杂量的 Si-HA,对比研究 HA、Si-HA 对 MG63 成骨细胞黏附、增殖、碱性磷酸酶(ALP)活性及成骨特异性基因表达的影响,全面评价微量 Si 离子掺杂改性的 Si-HA 对成骨细胞功能活性的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 场发射扫描电镜(S-4800, 日本);X 射线衍射仪(XRD, Ultima IV, 日本);YJ-875 超净工作台(苏州净化设备厂);倒置荧光显微镜(Axiovert 200, 德国); CO_2 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);CCK8 试剂盒(Dojindo Laboratories, 日本);DAPI 染色剂(Invitrogen, 美国);ALP 检测试剂盒(Lab Assay ALP, 日本);

ELX800 酶联免疫检测仪(Bio-TEK, 美国);PCR 扩增仪(Bio-Rad, 美国);低温高速离心机(Beckman Coulter, 美国)。

1.2 材料制备及实验分组 HA 由中国科学院上海硅酸盐研究所无机涂层材料研究实验室提供;硅源选用 SiO_2 。按照骨骼中 Si^{4+} 的含量进行配比,取 $x = 0.002$,使 Si 在 HA 中的质量分数约为 0.005 6%。以 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和纳米 SiO_2 为反应原料,通过以下方程式,采用水热法制备 Si-HA 粉体:
 $(3 - 0.5x)\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 + (7 + 0.5x)\text{Ca}(\text{OH})_2 + x\text{SiO}_2 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x} + 12\text{H}_2\text{O}$ 。将粉体压片制备成 10 mm×10 mm×1 mm 实验用圆片。制片参数为 0.2 g 粉体在 10 MPa 压力下保压 1 min,并在 1 000℃下烧结 1 h。分为实验组(Si-HA)和对照组(HA)两组。

1.3 材料表征的检测 使用 XRD 进行材料表面晶相分析。扫描参数每步 0.02°,起始角 20°,终止角 60°。片状材料固定在样品台上,其表面喷金,扫描电镜(SEM)完成对样品的形貌观察和比较。

1.4 CCK8 方法检测 Si-HA 对 MG63 成骨细胞黏附、增殖的影响 MG63 成骨细胞来自中国科学院上海硅酸盐研究所无机涂层材料研究实验室。将传代至第 3 代且生长良好的 MG63 细胞以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 和 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 密度分别接种于含两组样品的 24 孔细胞培养板中,成骨细胞黏附实验于 1、6、12 h 终止培养,成骨细胞增殖实验于 1、4、7、14 d 终止培养。弃上层培养液,每孔加入 100 μL PBS 溶液及 10 μL CCK8 反应液,在细胞培养箱内继续孵育 3 h 后,吸取 10 μL 上层液体至 96 孔酶标板中,采用酶标仪测量 450 nm 波长的光密度值(D 值)。记录结果,以时间为横轴、D 值为纵轴绘制相对细胞生长柱状图。

1.5 成骨细胞在材料表面黏附数量定性观察(DAPI 染色法) 如 1.4 项下细胞黏附培养方法,培养 1、6、12 h,以 PBS 冲洗 3 次,室温下用 4%多聚甲醛溶液固定细胞 20 min,DAPI (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 核染 10 min,晾干后通过倒置荧光显微镜(蓝光激发)观察黏附细胞的细胞核。

1.6 Si-HA 对 ALP 活性的影响 MG63 细胞以

2×10^4 个/ cm^2 密度接种于含 2 组样品的 24 孔细胞培养板中,1、4、7、14 d 后终止培养,弃培养液,PBS 清洗 3 次,加细胞裂解液(0.25% Triton X-100), $1\,000\times g$ 离心 15 min,取上清液,根据 ALP 试剂盒使用说明,酶标仪在 405 nm 读取 D 值,根据取得的标准曲线换算 ALP 活性。同一样本采用 BCA 蛋白检测法检测总蛋白,酶标仪在 570 nm 读取 D 值,根据标准曲线计算得出细胞总蛋白浓度。以相应的细胞总蛋白浓度校准各实验组 ALP 活性,获得 ALP 相对活性值。

1.7 RT-PCR 方法检测 Si-HA 对成骨细胞特异性基因表达的影响 以 1×10^4 /孔细胞密度接种于含有 2 组样品的 24 孔板中,培养 1、4、7、14 d 后终止培养,弃培养液,PBS 清洗 3 次,TRIzol 溶解材料表面细胞并收集胞内总 RNA,每组 $2\,\mu\text{g}$ 的总 RNA 用 TaKaRa 公司的 cDNA 合成试剂盒反转录为 cDNA。在 GenBank 中查得 ALP、I 型胶原(*Col-I*)、骨钙素(OC)目的基因 RNA 引物序列,以 Primer express 6.0 根据引物设计原则设计特异性引物对。目的基因 ALP、*Col-I*、OC 的扩增采用 SYBR GREEN 法扩增,以 GAPDH 作为内参基因。ALP F: 5'-AAC GTG GCC AAG AAC ATC ATC A-3', R: 5'-TGT CCA TCT CCA GCC GTG TC-3';*Col-I* F: 5'-GTG GAA ACC CGA GCC CTG CC-3', R: 5'-CAG ACG GGA CAG CAC TCG CC-3';OC F: 5'-CCT ATT GGC CCT GGC CGC AC-3', R: 5'-CGC TGC CCT CCT GCT TGG AC-3';GAPDH F: 5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3', R: 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3'。 ΔC_T =目的基因 C_T -内参基因 C_T 。目的基因相对表达量= $2^{-\Delta C_T}$ 。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件行统计学分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示定量数据,应用独立样本 t 检验比较组间差异,检验水准(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 Si-HA 的相组成 XRD 结果表明,图谱中每个衍射峰都属于 HA 相,没有观察到其他杂相峰(图 1),说明所得产物是纯 HA 相,掺入 Si 以后没有引入杂相,符合实验预期,并且峰形尖锐,说明产物结晶性良好。

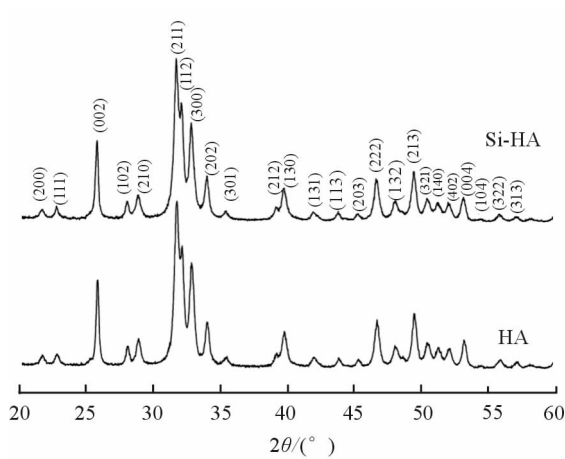


图 1 HA 和 Si-HA 的 X 射线衍射分析图
Fig 1 XRD analysis of HA and Si-HA materials
HA: Hydroxyapatite; Si: Silicon; XRD: X-ray diffraction

2.2 扫描电镜观察 Si-HA 表面形貌 如图 2 所示,Si-HA 与文献^[8]报道的纯 HA 形貌相似,产物 HA 纳米颗粒有序排列组装成微米级的片状结构。可以看到在片状颗粒的表面 20~50 nm 宽、100~200 nm 长的 HA 短棒状结构沿着长轴方向整齐排列(2C)。

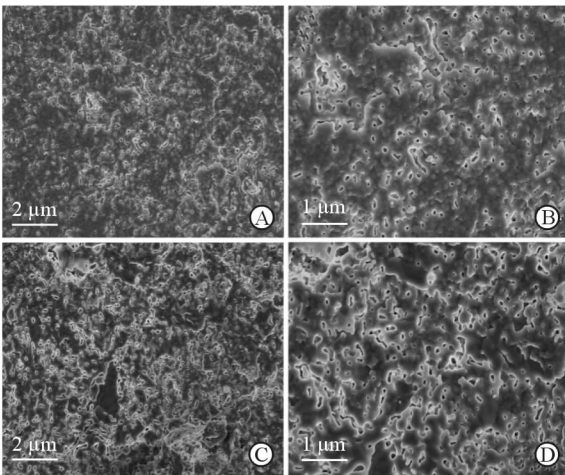


图 2 HA(A,B)及 Si-HA(C,D)的扫描电镜结果
Fig 2 Scanning electron microscopy results of HA (A, B) and Si-HA (C, D) materials
HA: Hydroxyapatite; Si: Silicon

2.3 CCK8 法检测成骨细胞在材料表面黏附结果 细胞在材料表面培养 1 h 时,两组材料表面黏附细胞数量的差异无统计学意义($P>0.05$);随着培养时间延长,两组材料表面黏附细胞数量均上升,6、12 h 时 Si-HA 表面细胞附着数量高于 HA($P<0.05$),见图 3。可见微量 Si 的掺杂促进了成骨细胞在 HA 表面的附着。

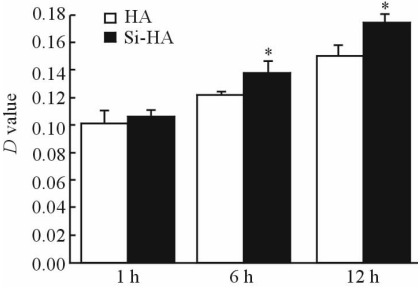


图 3 两组材料对成骨细胞黏附活性的影响
Fig 3 Effect of two materials on the adhesion activity of osteoblasts

HA: Hydroxyapatite; Si: Silicon. * $P<0.05$ vs HA group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

2.4 DAPI 染色法观察材料表面成骨细胞黏附数量结果 由图 4 可见, MG63 细胞随着培养时间延

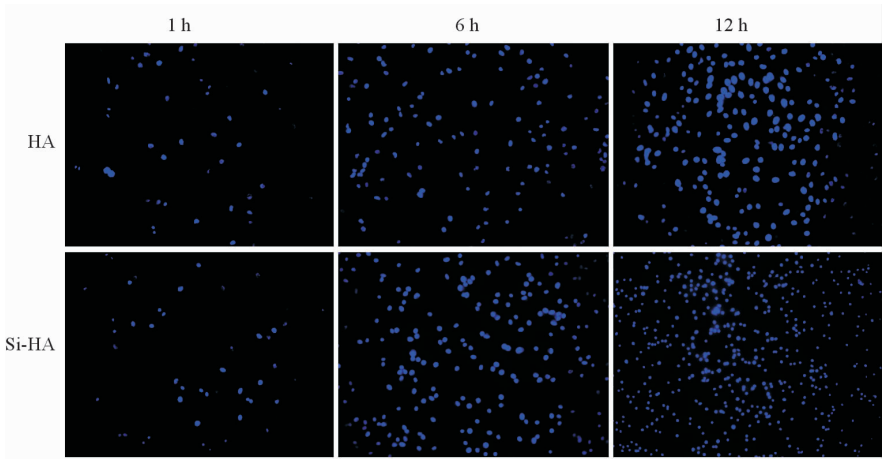


图 4 不同时间点 MG63 细胞在不同材料表面的黏附的数量(DAPI 染色法)

Fig 4 Adhesion of MG63 cells on the surface of different materials at different time points (DAPI staining)

HA: Hydroxyapatite; Si: Silicon. Original magnification: $\times 10$

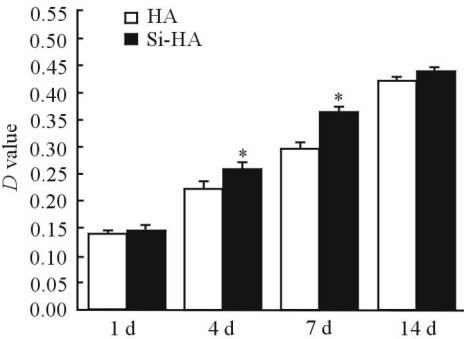


图 5 两组材料对成骨细胞增殖活性的影响
Fig 5 Effects of two materials on the proliferation activity of osteoblasts

HA: Hydroxyapatite; Si: Silicon. * $P<0.05$ vs HA group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

2.6 两组材料表面 ALP 活性检测结果 由 6 图可见, 细胞接种 1 d, ALP 的表达在两组材料表面差异不明显; 在 4、7 d 时, Si-HA 材料表面 ALP 活性高于 HA 表面 ($P<0.05$); 而在 14 d 时, Si-HA 表面

长附着在两组材料表面的数量增加, 提示 HA 及 Si-HA 有良好的生物相容性, 成骨细胞能够有效黏附、铺展。细胞培养 1 h, 两组材料细胞黏附的数量较少且数量近似; 培养 6、12 h 时, Si-HA 表面附着细胞数量高于 HA 表面, 与 CCK-8 检测定量结果一致。
2.5 成骨细胞在材料表面增殖情况 从图 5 可以看到, MG63 成骨细胞在培养第 1 天, 两种材料表面增殖细胞数量差异无统计学意义 ($P>0.05$); 随着培养时间延长到第 4、7 天时, Si-HA 较 HA 表面增殖细胞数量增多 ($P<0.05$); 第 14 天时, Si-HA 表面生长细胞数量仍高于 HA, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。提示 Si 能促进成骨细胞的增殖活性。

ALP 活性高于 HA 表面, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。提示 Si 的掺杂促进了 MG63 细胞 ALP 活性, 但随着时间延长到一定程度, 这种促进作用减弱。

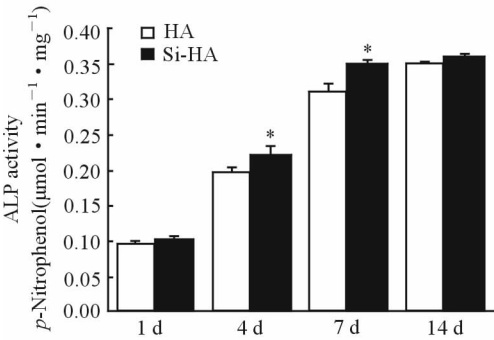


图 6 不同时间两组材料表面 MG63 成骨细胞 ALP 的活性检测

Fig 6 ALP activity of MG63 cells cultured on the surface of the two materials at different time points

HA: Hydroxyapatite; Si: Silicon. * $P<0.05$ vs HA group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

2.7 成骨细胞特异性基因 *ALP*、*Colt*-I、*OC* 在两组材料表面表达结果 由图 7 可以看到:细胞培养 1 d,两组材料表面均有 *ALP*、*Colt*-I 及 *OC* 基因表达,但两组间无明显差异;随着细胞培养时间的延长,在 4、7 d 时 Si-HA 材料表面 *ALP* 表达量明显高于 HA 表面($P<0.05$),而在 14 d 时两组材料表面

ALP 表达差异无统计学意义($P>0.05$),与 CKK8 检测 *ALP* 活性结果相同。在 4、7、14 d 时,*Colt*-I 在 Si-HA 表面的表达量高于 HA 表面($P<0.05$)。*OC* 在两组材料表达的差异出现在细胞接种的 7、14 d ($P<0.05$)。说明 Si^{4+} 的掺杂促进 MG63 成骨细胞成骨特异性基因的表达。

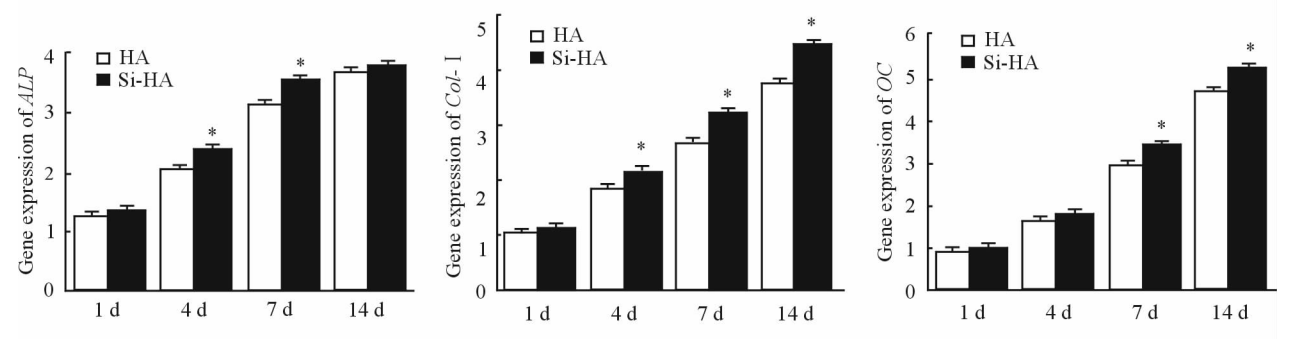


图 7 成骨细胞特异性基因 *ALP*、*Colt*-I 和 *OC* 在两组材料表面表达结果

Fig 7 Expression of osteogenic specific genes *ALP*, *Colt*-I and *OC* in osteoblasts cultured on the surface of two materials
ALP: Alkaline phosphatase; Col-I: Collagen I; OC: Osteocalcin; HA: Hydroxyapatite; Si: Silicon. * $P<0.05$ vs HA group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

本实验以 SiO_2 为硅源制备 Si-HA,既能够提供 Si,又能作为反应物参与反应,有利于 Si^{4+} 进入到 HA 晶格中。反应体系副产物只有水,HA 结构中不会引入除了 Si 以外的外源离子,因而可以消除杂质离子的影响。本实验以水热法制备的 Si-HA,晶粒有序排列,大小均匀,与天然骨组织中 HA 大小相当,其微观构型表征与以往报道相同^[6,9]。

成骨细胞黏附是在特定信号因子及相关蛋白介导下完成的,是其在植入物表面发挥增殖、分化及成骨功能的基础^[10]。我们以 Si 在天然骨中含量为掺杂量制备的 Si-HA,微量 Si 离子的析出同样促进了成骨细胞在材料表面的黏附活性。微量 Si 的掺杂使 HA 晶粒变小,增加了接触能,同时形成了硅酸,碱化了细胞微环境,致使细胞跨膜蛋白结构发生了改变,更易于材料表面蛋白、细胞的结合,促进成骨细胞在 Si-HA 表面黏附^[7,11]。

植入材料对成骨细胞增殖的影响是其生物学功能研究的重要内容^[12],Si 掺杂改性的 HA 能够促进成骨细胞的增殖^[11]。本实验通过 CCK8 检测 MG63 成骨细胞在 HA、Si-HA 表面增殖,结果表明 Si 能促进成骨细胞在 HA 表面的增殖,但在后期这种促进增殖能力减弱。我们认为微量 Si 掺杂 Si-HA 与体液接触初期及后期 Si 离子析出量小,其促进成骨细胞增殖作用不明显;而在中期,Si 析出浓度增大,

其促进成骨细胞增殖的作用逐渐显现出来。成骨细胞分化经过细胞增殖、胞外基质成熟、基质矿化 3 个阶段,在分化成熟的过程中密切相关的成骨细胞表型标记物序列表达,共同协调细胞外骨基质分泌和矿化。通过对这些特异性标记物检测,可以了解成骨细胞分化情况。

ALP 通过磷酸代谢的调节,在骨代谢中局部形成较高浓度磷离子,为 HA 结晶、沉积提供必需条件,从而启动成骨细胞外的基质矿化和钙磷沉积的骨形成过程^[13-14]。本实验发现,Si-HA 表面 *ALP* 活性与基因表达高于 HA 表面,且本实验 Si 掺杂量少,表明以微量 Si 掺杂同样能够提高 Si-HA 表面成骨细胞 *ALP* 蛋白活性及基因表达,促进了成骨细胞的早期分化。

成骨细胞在分化阶段分泌大量 *Col*-I,其致密的结构相互立体交联构成了细胞外基质中的支架,在骨细胞增殖和分化、组织张力维持及钙盐沉积等方面起着重要作用^[15-16]。本实验结果发现,在 4、7、14 d 时,*Col*-I 在 Si-HA 表面的表达量高于 HA 表面($P<0.05$)。其可能的机制为析出的 Si^{4+} 可以造成一个碱化的细胞超微环境,细胞微环境变化促进了脯氨酰羟化酶与糖胺的结合,同时抑制胶原蛋白酶的降解,促进了 *Col*-I 基因的表达^[17]。

OC 是成骨细胞分化成熟的标志,在成骨细胞成熟、矿化、骨形成中起着重要作用,随成骨细胞分化、矿化过程其表达增加^[18-19]。本实验中,细胞接种的

1、4 d 即出现了 OC 基因的表达,但微量 Si 掺杂并未明显促进 OC 表达,可能由于在成骨细胞培养初期基础 OC 蛋白表达较低,且 Si 析出量较少。在接种 7、14 d,OC 在两组材料表达均增加,且 Si-HA 组表达量高于 HA 组表达量($P<0.05$)。证明微量 Si^{4+} 的掺杂促进了 OC 基因的表达,成骨细胞后期分化成熟。

本实验表明以 Si 在天然骨中含量为掺杂量制备的 Si-HA 具有良好的生物学活性,促进了成骨细胞的黏附、增殖及分化。Si 掺杂是 HA 改性的较好选择,Si-HA 可能成为与天然骨更加匹配的硬组织植入材料。但 Si 促进成骨细胞活性的细胞分子机制及其在天然骨组织中的生理机制仍需深入研究。

[参考文献]

- [1] Shi D L. Introduction to biomaterials[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2006: 16-28.
- [2] Bissé E, Epting T, Beil A, Lindinger G, Lang H, Wieland H. Reference values for serum silicon in adults [J]. Anal Biochem, 2005, 337: 130-135.
- [3] Carlisle E M. Silicon: an essential element for the chick[J]. Science, 1972, 178: 619-621.
- [4] Vallet-Regí M, Arcos D. Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants[J]. J Mater Chem, 2005, 15: 1509-1516.
- [5] Gibson I R, Bonfield W. Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 59: 697-708.
- [6] Jokic B, Mitric M, Popovic M, Sima L, Petrescu S M, Petrovic R, et al. The influence of silicon substitution on the properties of spherical- and whisker-like biphasic α -calcium-phosphate/hydroxyapatite particles[J]. J Mater Sci Mater Med, 2011, 22: 2175-2185.
- [7] Thian E S, Huang J, Best S M, Barber Z H, Brooks R A, Rushton N, et al. The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films[J]. Biomaterials, 2006, 27: 2692-2698.
- [8] Wang M, Gao J, Shi C, Zhu Y, Zeng Y, Wang D. Facile one-pot synthesis of oriented pure hydroxyapatite with hierarchical architecture by topotactic conversion[J]. Cryst Growth Des, 2014, 14: 6459-6466.
- [9] Aminian A, Solati-Hashjin M, Samadikuchaksaraei A, Bakhshi F, Gorjipour F, Farzadi A, et al. Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite by a hydrothermal method with two different phosphorous sources[J]. Ceram Int, 2011, 37: 1219-1229.
- [10] Webster T J, Ergun C, Doremus R H, Siegel R W, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51: 475-483.
- [11] Liu X, Morra M, Carpi A, Li B. Bioactive calcium silicate ceramics and coatings [J]. Biomed Pharmacother, 2008, 62: 526-529.
- [12] MacDonald D E, Rapuano B E, Schniepp H C. Surface oxide net charge of a titanium alloy: comparison between effects of treatment with heat or radiofrequency plasma glow discharge [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011, 82: 173-181.
- [13] Han P, Ji W P, Zhao C L, Zhang X N, Jiang Y. Improved osteoblast proliferation, differentiation and mineralization on nanophase Ti6Al4V[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124: 273-279.
- [14] Ker E D, Chu B, Phillippi J A, Gharaibeh B, Huard J, Weiss L E, et al. Engineering spatial control of multiple differentiation fates within a stem cell population[J]. Biomaterials, 2011, 32: 3413-3422.
- [15] Lynch M P, Stein J L, Stein G S, Lian J B. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization [J]. Exp Cell Res, 1995, 216: 35-45.
- [16] Karsenty G. The genetic transformation of bone biology[J]. Genes Dev, 1999, 13: 3037-3051.
- [17] Reffitt D M, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung H F, Evans B A, Thompson R P, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells *in vitro* [J]. Bone, 2003, 32: 127-135.
- [18] Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H, et al. Osteocalcin secretion as an early marker of *in vitro* osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2009, 15: 169-180.
- [19] Barrère F, Mahmood T A, Groot K D, Blitterswijk C A V. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: instructive and smart function[J]. Mater Sci Eng R, 2008, 59: 38-71.

[本文编辑] 尹 茶