



载有雷奈酸锶壳聚糖的钛表面涂层对成骨细胞的影响

Osteoblast Response to Titanium Surfaces Coated with Strontium Ranelated-Loaded Chitosan Film

Ai Tian, Jun-jiang Zhai, Yan Peng, Li Zhang, Min-hua Teng, Jian Liao, Xu Sun, Xing Liang

原载 The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 2014; 29(6), 1446-1453. (英文)

于依霖 译 滕伟 审

摘要

目的: 改善种植体周围骨质量对于种植体植入术后的骨质疏松症患者有显著临床意义。**材料和**
方法: 在本研究中, 在不同雷奈酸锶 (Strontium ranelate, SR) 浓度 (锶离子 $[Sr^{2+}]$ 浓度分别为 0、2、
20、40 和 80mmol/L) 溶液中实现钛表面雷奈酸锶-壳聚糖涂层的包覆, 以期利用锶离子 (Sr^{2+})
促进骨组织结合的作用。采用 X 线衍射仪 (X-ray diffraction, XRD), 扫描电镜 (Scanning electron
microscopy, SEM) 和傅立叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 表征载雷奈
酸锶的壳聚糖涂层的理化性能。采用电感耦合等离子体发射光谱法 (Inductively coupled plasma optical
emission spectrometry, ICP-OES) 测定药物涂层溶解/释放机制。同时, 通过研究原代成骨细胞 (Primary
osteoblasts, POBs) 细胞增殖情况, 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 活性, 关键成骨基因表
达定量分析评估体外细胞应答水平。**结果:** XRD 和 FTIR 结果显示, 只有少量雷奈酸锶通过氢键或共轭
效应与壳聚糖发生化学反应。 Sr^{2+} 的爆发性释放期 (70%–85%) 出现于最初三天, 紧接着进入较为
缓慢的释放阶段。当雷奈酸锶处于较低浓度 (2mmol/L 或者 20mmol/L) 时, 载有雷奈酸锶的壳聚糖
涂层对细胞应答的促进作用体现在原代成骨细胞增殖上升, ALP 活性增加以及人骨形成蛋白-2 (Bone
morphogenetic protein 2, BMP-2)、人 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor, Runx-
2)、ALP 和骨钙蛋白高表达; 但当雷奈酸锶处于较高浓度 (40mmol/L 或者 80mmol/L), 该涂层反而
抑制原代成骨细胞 (POB) 生长。**结论:** 上述实验结果表明, 钛表面包覆的雷奈酸锶负载壳聚糖涂层对
成骨细胞增殖分化的促进作用具有浓度依赖性, 为钛种植体表面改性提供一个潜在的新方法。

译者单位 中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院
广东省广州市越秀区陵园西路 56 号 510060

1 引言

全球有约 20 亿人遭受骨质疏松的困扰。随着世界老龄化人口的迅速增长,这个数字还会逐渐攀升。由于骨吸收量大于骨生成量,骨质疏松可导致上下颌骨骨质、骨量的下降。由此导致种植体稳定性差甚至使得种植体松动或脱落。钛因其优良的生物相容性和机械性能,被作为种植体材料广泛应用于牙科和整形外科。然而钛作为生物惰性材料却缺乏令人满意的骨引导性能。因此,目前急需一种更好的方法促进成骨和骨结合。在钛表面融入生物活性离子,可促进种植体周围骨愈合,从而实现迅速有效的骨结合,尤其是在骨质较差的区域。

锶元素 (Strontium, Sr^{2+}) 是一种碱土金属元素,与钙元素同属一族;它同时也是一种天然的骨靶向元素,且与钙元素有相似的理化特性,在骨组织代谢中也起到重要作用。因此锶元素是一种令人关注的促进骨形成的新药。大量研究表明, Sr^{2+} 对骨代谢有双重药理学作用,一方面促进胶原蛋白和非胶原蛋白的合成、成骨细胞的增殖和分化,另一方面降低破骨细胞的活性和分化。种植体表面结合锶改性的氧化钛层已被证实不仅可提高成骨细胞体外应答活性,还会促进体内骨沉积和种植体扭力消除。研究表明,种植体表面锶取代的羟基磷灰石涂层可提高卵巢摘除大鼠 (Ovariectomized, OVX) 的骨结合能力,增强体外成骨细胞活动,抑制体外破骨细胞增殖。在种植体表面结合锶元素可能成为提高种植体表面骨引导作用的有效改性方式。

雷奈酸锶既可以抑制骨丢失,又可以增加骨强度,现已被批准作为治疗妇女绝经后骨质疏松的一线药物,以降低绝经后妇女脊柱和臀部骨折的风险。在大多数案例中,雷奈酸锶经口服被系统性用于患者。然而,雷奈酸锶的绝对生物利用度很低,并可能伴有其他副作用。局部用药可在所需部位选择性靶向给药,从而可减少或消除口服给药的副作用。本研究假定雷奈酸锶的局部给药系统可通过持续释放锶离子 (Sr^{2+}) 而促进骨组织形成。

壳聚糖膜具有良好的生物相容性和渗透性,是理想的递药材料。在早先的研究中,壳聚糖因可促进前成骨细胞分化,最终促进新骨形成而被用作促创伤愈合药物。当用冻干 N-甲基吡咯烷酮壳聚糖治疗骨缺损时,病理观察结果显示有大量新生骨组织出现。因此,本实验选定壳聚糖为药物载体,

利用壳聚糖膜负载雷奈酸锶的方法将雷奈酸锶连接在钛种植体表面。

本实验的研究目的:(1)明确负载雷奈酸锶的壳聚糖涂层的作用;(2)采用 X 线衍射仪 (X-ray diffraction, XRD)、扫描电子显微镜 (Scanning electron microscopy, SEM) 和傅立叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析载有雷奈酸锶的壳聚糖涂层的理化特性;(3)采用电感耦合等离子体发射光谱法 (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES) 测定雷奈酸锶的释放/溶解机制;(4)从碱性磷酸酶活性和细胞增殖的角度研究体外原代成骨细胞的细胞应答,并且定量分析关键成骨表型基因人骨形成蛋白 (Bone morphogenetic protein 2, BMP-2)、人 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor, Runx-2)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 和骨钙蛋白 (Osteocalcin, OCN) 的表达水平。

2 材料和实验方法

2.1 载雷奈酸锶壳聚糖涂层的制备

喷砂和酸蚀处理钛片 (直径为 14mm, 厚度为 1mm 的商业性纯钛) 使其获得标准多级多孔表面。再将 200 μL 2% 醋酸, 2% 壳聚糖和不同浓度的雷奈酸锶 (0、2、20、40、80mmol/L 的 Sr^{2+}) 的混合物逐滴滴到每一个钛片上, 确保该混合液均匀分布且未超出钛片边界。随后在温度低于 50 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中干燥钛片使其表面成膜, 并用 γ 射线对其进行灭菌处理。根据反应混合液中不同的 Sr^{2+} 浓度将成膜后的钛片分为 S0、S2、S20、S40、S80 五组。

2.2 载雷奈酸锶的壳聚糖涂层的理化性能

扫描电子显微镜 (Inspect-F, FEI 公司) 下观察纯钛片对照组和 S20 组的钛片的表面形态。X 线衍射仪 (X' Pert Pro MPD, Philips 公司) 测量得到纯钛片对照组, S0 组和 S20 组的 XRD 图谱。用 FTIR (Nicolet 6700, Thermo Scientific 公司) (400-4000 cm^{-1}) 分析壳聚糖、雷奈酸锶 (S0 组) 和载有雷奈酸锶的壳聚糖涂层 (S20 组) 中的化学官能团组成。

电感耦合等离子体发射光谱法 (Spectro Arcos Analytical Instruments) 测定从形成涂层后的钛片中释放的锶离子浓度, 钛片被分别浸润在装有 37 $^{\circ}\text{C}$

溶菌酶溶液 (1mg/ml) 的玻璃管 (4ml/片) 中 ($n=5$ 片/组/时间点)。在第 30 和 60 分钟; 第 2、6 和 12 小时; 第 1、3、5、7、14 和 21 天, 将钛片轻柔地从玻璃管中取出并用 1ml 溶菌酶溶液 (1mg/L) 冲洗干净。后收集 6ml 样本以建立体外药物释放曲线。

2.3 成骨细胞的培养

本实验已被四川大学动物保护协会批准。从 1-3 天龄的新生小鼠颅骨分离得到原代成骨细胞 (POBs)。于 37℃, 5%CO₂ 饱和湿度的环境中, 使用含 12% 胎牛血清, 100IU/L 青霉素和 100 μg/L 链霉素的 F12 培养基进行培养。这些原代成骨细胞生长良好并表现出大量成骨细胞特性 (相关结果未在本文中列举)。后续实验使用四次传代后的细胞。

2.4 细胞增殖评估

将涂层后的钛片分组置于六孔培养板中, 每孔含有或不含有不同浓度的 Sr²⁺ 溶液。将原代成骨细胞 (POBs) 接种于上述培养板 (5 × 10⁴ 细胞/ml; 2ml/孔)。接种后第 1、3、5 和 7 天 ($n=5$ 片/组/时间点), 用噻唑蓝比色法 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 测试细胞增殖情况。在上述培养时间后, 每孔更换 2ml 新鲜培养液, 同时加入 200 μl MTT 试剂 (5mg/mL), 后在 37℃ 培养 3 小时。随后, 弃掉培养液, 向每孔加入 200 μl 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 并轻柔的震荡 30min。随后, 将 200 μl DMSO 溶液转移至 96 孔板, 并用酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA) 在酶标仪波长为 492nm 时测定其吸光度。最终所得吸光度为 5 个平行样本的平均值。

另外, 培养三天后, 取出钛片的一部分并用磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 轻柔的冲洗三遍, 在 4℃ 下置于多聚甲醛中固定 2 小时, 再次冲洗后用 1 μg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI 染色 15 分钟 ($n=3$)。用荧光显微镜观察着色后细胞。钛片的剩余部分经上述方法冲洗后用 2.5% 戊二醛在 4℃ 时固定过夜, 后用不同浓度的乙醇 (30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 99.5%) 对其进行梯度脱水。用扫描电子显微镜 (SEM) 观察经过处理后的钛片。

2.5 碱性磷酸酶活性

将涂层后钛片分组置于十二孔培养板中, 每孔含有或不含有不同浓度的 Sr²⁺ 溶液。将原代成骨细胞 (POBs) 接种于上述培养板 (5 × 10⁴ 细胞/ml; 1ml/孔)。培养 1、3、5 和 7 天后 ($n=5$ 片/组/时间点) 从每孔中收取细胞, 并用碱性磷酸酶检测试剂和蛋白定量检测试剂盒 (南京建成有限公司) 根据试剂盒配套说明测定 ALP 活性, 并用酶联免疫吸附法 (ELISA) 在酶标仪波长为 490nm 时测定其吸光度, ALP 活性通过下列公式计算而得: ALP (U/g 蛋白质) = ([测试管内吸光度 / 标准管内吸光度] × 标准管内含酚总量) / 样本中蛋白质含量 (以克记)。

2.6 实时聚合酶链式反应

将成膜后钛片分组置于六孔培养板中, 每孔含有或不含有不同浓度的 Sr²⁺ 溶液。将原代成骨细胞 (POBs) 接种于上述培养板 (5 × 10⁴ 细胞/ml; 2ml/孔), 培养 1、3、5 和 7 天。在上述培养时间, 根据一步法酸酚胍盐提取法用试剂盒试剂 (Life Technology 公司) 提取出细胞层全部 RNA。将所得 RNA 在 260nm 用分光光度法进行定量后冷冻于 -80℃。为了得出关键成骨细胞基因 (BMP-2, Runx-2, ALP, OCN, mRNA 和 磷酸甘油醛脱氢酶基因 [GAPDH], 该基因被认为是一种管家基因) mRNA 表达水平, 我们用如前所述的 ABI Prism 7300 序列探测系统 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) 进行实时定量 PCR 对所得 RNA 进行扩增 (基因引物未在本文中展示)。

2.7 统计学数据分析

我们用平均数和标准差 (SD) 描述数据。同时, 我们在 SPSS (IBM SPSS) 中用方差分析 (ANOVA) 测试数据有无的统计学意义。P < 0.05, 实验数据存在统计学意义。

3 结果

3.1 载有雷奈酸锶的壳聚糖涂层的理化

扫描电镜清晰的显示出纯钛片对照组和载有雷奈酸锶的壳聚糖涂层组 (S20 组) 的表面形态。(图 1) 纯钛片对照组表面表现为典型的多级多孔结构。其上分布有经喷砂和酸蚀后获得的微米级别的大孔和大小相似的纳米级别的小孔。与之相反, 涂层钛

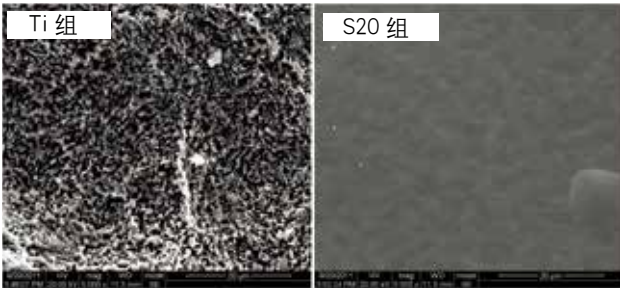
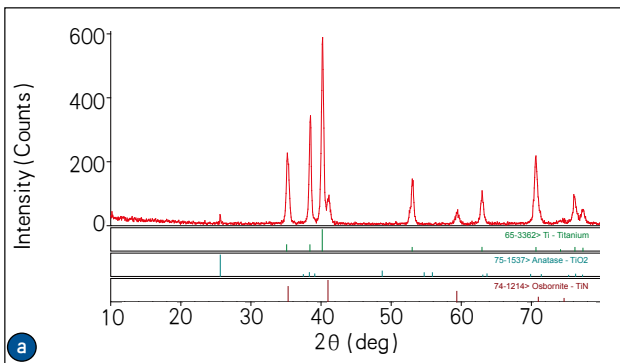


图1 扫描电子显微镜下纯钛片对照组和 S20 组表面形态 (5000 倍)

表面附着有一层不定型多孔物质，而钛表面多级多孔结构则消失了。

X 线衍射仪 (XRD) 测试反映出涂层钛片表面 5- 到 10- μm 厚的膜层的化学组成。如图 2a 所示，衍射峰的位置和强度表明喷砂和酸蚀后的钛表面含三种组成成分。除了金属钛之外，另两种成分



为 TiN 和 TiO_2 。如图 2b 所示，钛基质的典型衍射峰并没有较大改变。同时，在 12° ， 18° 和 23° 的三个主要的结晶峰无论是在壳聚糖涂层组 (蓝色) 还是在连有雷奈酸锶的壳聚糖涂层组 (红色) 均很明显。雷奈酸锶引入后，这三个衍射峰的相对强度轻度下降。

FTIR 可分析出壳聚糖，雷奈酸锶和负载雷奈酸锶的壳聚糖涂层中的官能团。如图三所示，与单纯壳聚糖和雷奈酸锶的红外光谱相比，负载雷奈酸锶的壳聚糖的红外光谱中，酰胺的吸收峰移向更低频率，同时在 3200cm^{-1} 至 3400cm^{-1} 范围内形成一个宽广的波形，且在 1158cm^{-1} ， 1412cm^{-1} 和 1307cm^{-1} 新出现了三个吸收峰。

图四所示是体外释药曲线。很显然，在最初的三天，载有 SR 的壳聚糖涂层释锶速率很快 (开始时的爆发性释放期在 1 天内释出 70% 的 Sr^{2+} ，3 天内释出 85% 的 Sr^{2+})，在接下来的 21 天中， Sr^{2+}

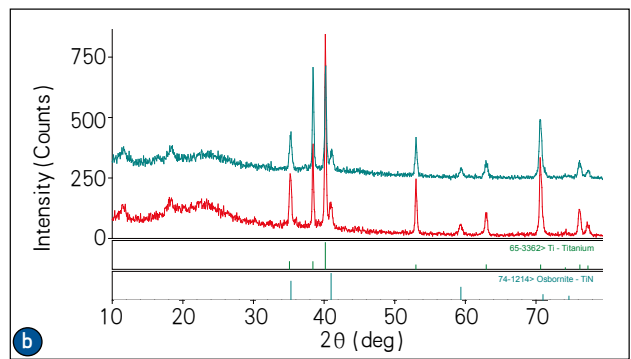


图2 X 线衍射图谱 (a) 纯钛组, (b) S0 组 (蓝色), S20 组 (红色)

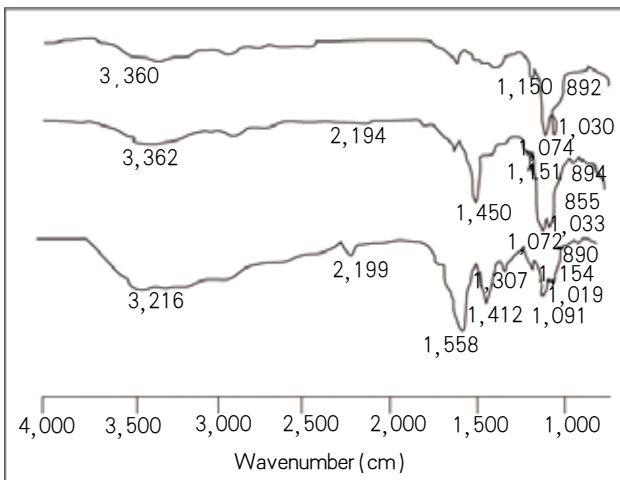


图3 壳聚糖、雷奈酸锶，连有雷奈酸锶的壳聚糖膜 FTIR 光谱 (CR= 壳聚糖; CS+SR: = 连有 SR 的壳聚糖涂层)

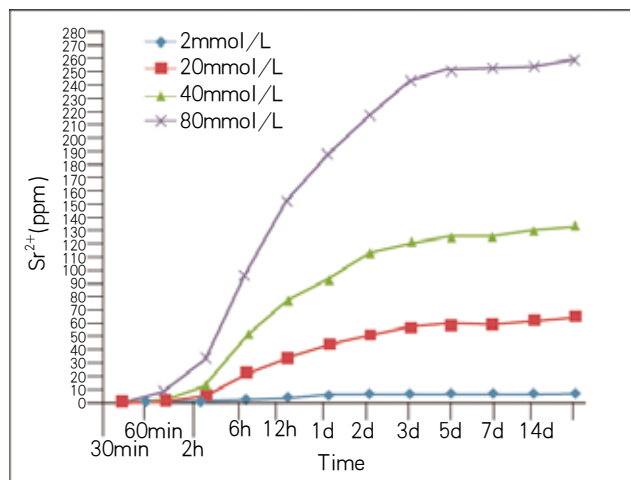


图4 连有雷奈酸锶的壳聚糖涂层释放锶离子曲线

则以较低速率缓慢释放。形成壳聚糖膜时溶液中的 Sr^{2+} 浓度越高, 在最初三天从涂层中释放 Sr^{2+} 的速率越快。

3.2 细胞的贴附和增殖

第5天时, S2组和S20组原代成骨细胞(POBs)的增殖程度较纯钛片空白对照组为高($P < 0.05$)。而S80组的原代成骨细胞(POBs)的增殖程度在第1, 3, 5和7天内较纯钛片空白对照组为低。

在荧光显微镜下观察发现, 原代成骨细胞(POBs)在所有实验组中均生长良好, 且均匀的分布在整个钛表面(图6)。原代成骨细胞(POBs)在钛表面表现为典型的纺锤形、三角形或多角形的细胞形态, 且组间无显著差别。在扫描电镜下观察发现, 原代成骨细胞(POBs)伸展良好, 表面形成

向四周延伸的突起, 同时细胞与相邻细胞之间呈重叠生长。

3.3 碱性磷酸酶活性

第1、3、5和7天, S0、S2和S20组的ALP活性较纯钛片空白对照组高($P < 0.05$) (图8)。在第1天, S40组的ALP活性较纯钛片空白对照组为高, 而在第5和7天则为低($P < 0.05$)。在第3、5和7天, S80组的ALP活性较纯钛片的空白对照组为低($P < 0.05$)。此外, S0、S2和S20组的ALP活性随时间的推移而逐渐增加。

3.4 成骨细胞基因表达

BMP-2基因在第1、3、5天, S0、S2和S20组表达水平较对照组为高; 在第1、3、5和7天,

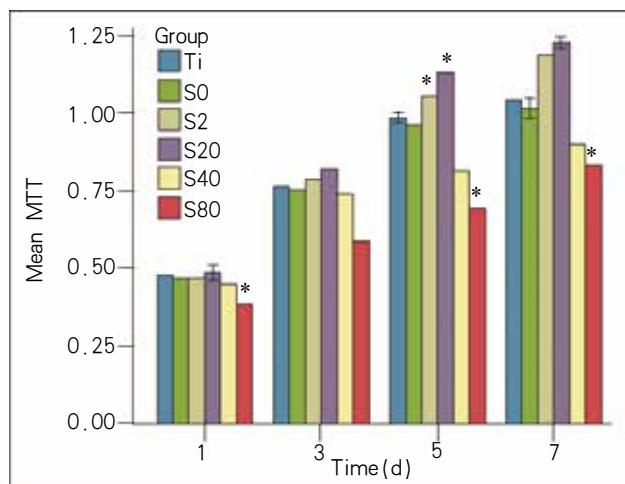


图5 不同锶离子浓度钛表面上原代成骨细胞(POBs)增殖, 与纯钛组相比 $P < 0.05$ 。

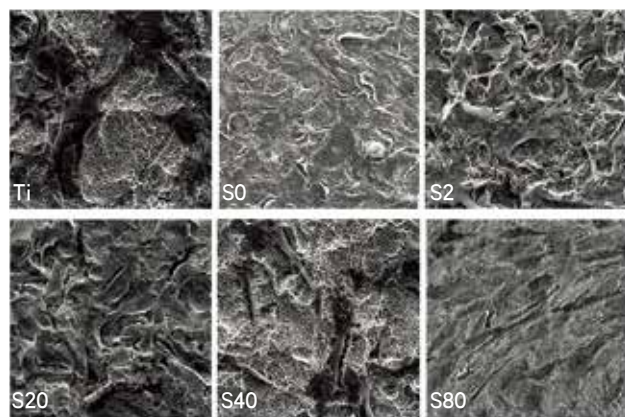


图7 扫描电镜下不同锶离子浓度组钛表面上原代成骨细胞(POBs)形态

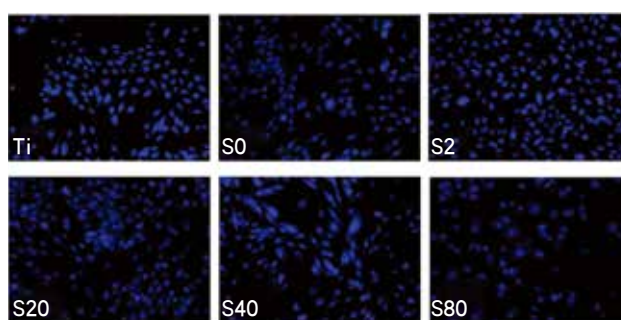


图6 荧光显微镜下不同锶离子浓度组原代成骨细胞DAPI染色。

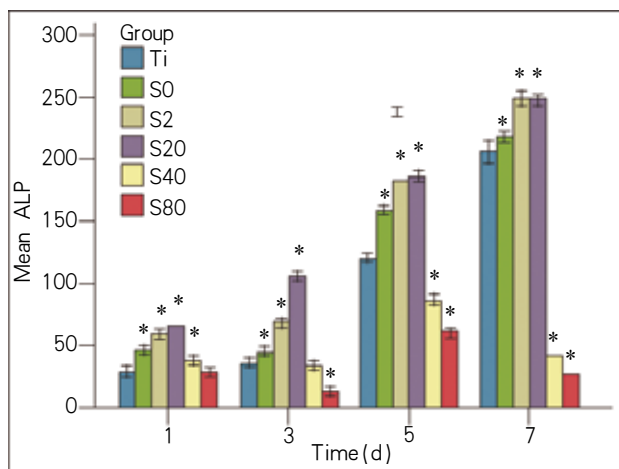


图8 不同锶离子浓度组碱性磷酸酶活性

S40 和 S80 组中 BMP-2 基因表达水平较对照组为低 ($P < 0.05$) (图 9)。Runx-2 基因在第 1、3 和 5 天, S0、S2、S20 和 S40 组中的表达水平较对照组为高; 在第 1 和 5 天, S80 组中的表达水平较对照组为低 ($P < 0.05$); 在第 7 天, S40 组和 S80 组中的表达水平较对照组为低。ALP 基因在第 1、3、5、7 天, S0、S2 和 S20 组中的表达水平较对照组为高; 而对于 S40 组来说, ALP 基因的表达水平逐渐下降, 在第 1、3 和 5 天时较对照组为高, 第 7 天时已降至低于对照组。更甚的是, 对于 S80 组, ALP 基因的表达水平在第一天较对照组为低, 后在第 3 天时上升至高于对照组, 最终在第 7 天时又降至低于对照组 ($P < 0.05$) (图 9)。OCN 基因在第 1、3、5 和 7 天, S0、S2 和 S20 组中的表达水

平较对照组为高; 在第 1 和 5 天, S40 和 S80 组中的表达水平较对照组为高, 而在第 3 和 7 天的表达水平较对照组为低 ($P < 0.05$) (图 9)。总的来说, 在低浓度组 (S2, S20) 中, 成骨细胞表型基因 (BMP-2, Runx-2, ALP, OCN) 的表达水平显著升高, 而在高浓度组 (S40, S80) 中则有所降低。

4 讨论

复合涂层技术指的是将生物活性分子整合于种植体表面涂层以形成一个生物活性界面。为了形成一个控释系统, 该生物活性分子应在一个较长的时间段缓慢而持续的释放到周围组织中。骨吸收量大于骨生成量将导致包括骨质疏松在内的众多骨组织

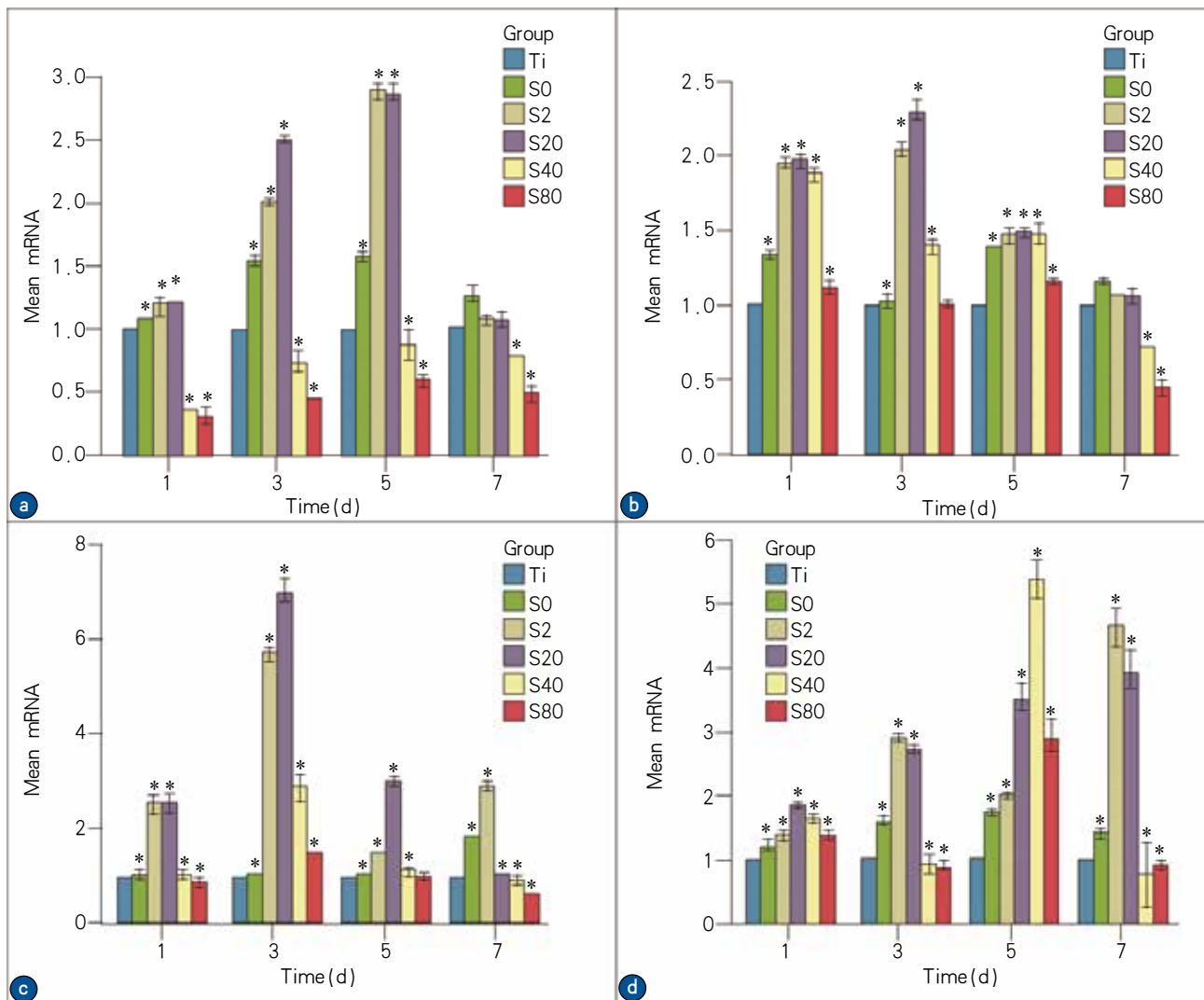


图 9 成骨细胞表型基因 (a) BMP-2, (b) Runx-2, (c) ALP, (d) OCN 表达水平

疾病。为了提高种植体的骨整合率，同时提高牙科种植体修复在骨质疏松患者中的成功率，一些包括雌激素、糖皮质激素、甲状旁腺素、双磷酸盐和锶离子在内的影响骨组织代谢的药物同样已经被应用于种植体表面涂层。

雷奈酸锶，是一种治疗骨质疏松的新型药物，由一个有机成分（雷奈酸）和两个稳定的非放射性锶原子构成。雷奈酸锶已被证实对骨质疏松有卓越的治疗作用。它可以使骨吸收和骨形成达到最佳平衡从而增加骨密度。每天服用 1g 雷奈酸锶可以增加绝经后妇女的骨组织质量，同时预防绝经后骨质疏松；此外，每天服用 2g 雷奈酸锶可治疗绝经后骨质疏松并且降低骨折的风险。关于使用雷奈酸锶提高种植体骨整合率的研究包括全身应用和局部应用两个方面。因为局部应用雷奈酸锶更直接且更有效，本实验尝试通过钛表面涂层的方式将雷奈酸锶引入钛表面。

在本实验中，XRD 结果显示， 12° ， 18° 和 23° 的三个主要结晶峰的相对强度因为雷奈酸锶的负载而轻度下降，这表明雷奈酸锶能与壳聚糖发生化学结合，同时化学作用产生的三维空间结构限制了壳聚糖的运动。以下结果由 FTIR 分析得到。雷奈酸锶连接后，在 3200cm^{-1} 至 3400cm^{-1} 范围内形成一个变宽的酰胺吸收峰，同时在 1158cm^{-1} ， 1412cm^{-1} 和 1307cm^{-1} 新出现了三个酰胺键吸收峰。峰值的移动同样表明雷奈酸锶可以与壳聚糖发生化学反应，可能因为壳聚糖和雷奈酸锶结合后，壳聚糖中的羟基基团和雷奈酸锶中的羰基基团反应形成了羧基和氢键。

Andreadis 和 Geer 提出，亲水性物质的弥散控制系统首先出现一个爆发性释放阶段，随后变为从基质中缓慢释药阶段。Park 等人发现，可吸收性爆发介质表面 (RBM) / 锶样本在第一天释放出的 Sr^{2+} 相对较多，随后释放量随时间递减。在本实验中也做出了相似的结果。 Sr^{2+} 在早期阶段释放较快，在前三天便释放出 70%–85% 的 Sr^{2+} ，随后的 21 天进入了持续缓慢释放阶段。最初典型的快速率的出现可能是因为大部分药物通过物理性的吸附和沉淀粘附在壳聚糖的浅表和分子间空隙，而随之而来的慢速释放阶段则可能是由于只有一小部分雷奈酸锶靠氢键和共轭效应与壳聚糖连接，这种推测可被 FTIR 和 XRD 结果证实。

锶元素可直接调节和控制原代成骨细胞

(POBs) 的新陈代谢。尽管已有研究表明，低浓度 Sr^{2+} 对骨形成有促进作用，高浓度的 Sr^{2+} 可能会有全身毒性作用， Sr^{2+} 在骨形成中的作用是复杂和多相的，而且根据 Sr^{2+} 剂量不同而可能通过多种通路实现。

Chattopadhyay 等人已证实雷奈酸锶可促进小鼠原代成骨细胞增殖。Fromigué 等人发现雷奈酸锶通过作用于钙感应受体而促进成骨细胞增殖，Caverzasio 已证实 SR 促进 C3H10T1/2 和 MC3T3-E1 细胞复制。本研究发现，雷奈酸锶在一定浓度范围内可促进成骨细胞增殖。在较低浓度时 (2mmol/L 和 20mmol/L)，实验组细胞增殖程度较对照组为高，然而浓度增加时 (40mmol/L 和 80mmol/L)，SR 抑制成骨细胞增殖，这与先前的研究结果相一致。DAPI 和 SEM 结果显示成骨细胞在钛表面伸展生长良好，同时各组细胞在形态学上无显著差异。

ALP 活性增高被认为是成骨细胞早期分化的标志。本研究中，载有雷奈酸锶的壳聚糖涂层呈剂量依赖性的提高 ALP 活性。空白对照组 (0mmol/L) 和低浓度组 (2mmol/L 和 20mmol/L) ALP 活性升高，而高浓度组 (40mmol/L 和 80mmol/L) ALP 活性则受到抑制。一个成骨细胞存活实验也同样显示出高浓度雷奈酸锶抑制成骨细胞增殖。细胞数量减少可能也是高浓度组 ALP 活性较低的原因之一。之后的 PCR 结果也显示低浓度组 (2mmol/L 和 20mmol/L) 增加了 ALP 基因的表达，与 ALP 活性水平相一致。

BMP-2 和 Runx-2 均为骨形成信号分子，它们在抑制成骨细胞分化和促进成骨细胞基因表达中起着协同作用。ALP 和 OCN 为成骨细胞表型基因，同样也是成骨细胞分化的标志。Bonnelye 等人报道，对于小鼠颅骨细胞，无论是持续给以还是在增殖或分化阶段给以雷奈酸锶处理，均可促进成骨细胞形成，增加成骨细胞标志 ALP、骨唾液蛋白 (BSP) 和 OCN 的表达。Zhu 等人发现，当暴露于雷奈酸锶环境中时，成骨细胞中 Runx-2，BSP 和 OCN 的表达呈有意义的时间-浓度依赖性增长。然而，该项目所得的细胞中基因表达的感知现象似乎具有一定细胞特异性。本研究得出，负载雷奈酸锶的壳聚糖提高成骨细胞表型基因 (BMP-2，Runx-2，ALP 和 OCN) 的表达呈浓度依赖性。低浓度雷奈酸锶促进成骨细胞分化，然而高浓度雷奈酸锶抑制成骨细胞分化。

当然,本研究也存在一些局限性。首先,只有一小部分雷奈酸锶可以与壳聚糖发生化学反应形成氢键或共轭效应,这直接导致后期药物释放过缓。其次,成骨细胞对负载雷奈酸锶的壳聚糖涂层的应答只做过体外试验,负载雷奈酸锶的壳聚糖涂层到底能否在动物模型中也可以对骨形成有促进作用还待进一步研究。

5 结论

研究表明,钛表面的负载雷奈酸锶的壳聚糖涂层可以促进成骨细胞的增殖和分化,并具有浓度依赖性。这可能为钛种植体表面改性提供一种新方案。