译文

大鼠骨髓间充质干细胞和成骨细胞在钛表面掺锶羟基磷灰石涂层上的成骨研究

Osteogenesis of Rat Mesenchymal Stem Cells and Osteoblastic Cells on Strontium-Doped Nanohydroxyapatite-Coated Titanium Surfaces

Qiao-hong Jiang, Xue Gong, Xiao-xiang Wang, Fu-ming He

原载　Int J Oral Maxillofac Implants, 2015, 30: 461-471.（英文）

黄明娣　译　　滕　伟　审

摘　要

目的：本研究旨在比较体外三种类型钛表面对促进成骨的作用：掺锶羟基磷灰石（Sr–HA）涂层表面，纳米 HA 涂层表面以及无涂层的粗糙表面。**材料和方法：**通过电化学沉积方法将 Sr–HA 和 HA 沉积于粗糙的钛表面上。在 Sr–HA 涂层、HA 涂层和无涂层的粗糙钛表面上进行 MC3T3–E1 前成骨细胞和小鼠骨髓间充质干细胞培养，在不同时间点测定细胞的黏附、增殖、存活、分化和矿化结节形成。**结果：**对比于无涂层的粗糙钛表面和纳米 HA 涂层表面，通过简单的电化学沉积处理，Sr–HA 涂层明显提高了小鼠骨髓间充质干细胞和 MC3T3–E1 细胞黏附、铺展，碱性磷酸酶活性和细胞外基质钙矿化。**结论：**这项研究表明，通过电化学沉积产生的掺锶纳米羟基磷灰石涂层 Sr–HA 提高了微粗糙钛表面的骨传导性。

关键词　牙科种植体；电化学沉积；骨结合；掺锶羟基磷灰石；钛

1　引言

锶（Sr）被用于治疗骨质疏松症，因为其对骨髓间充质干细胞（MSCs）和成骨细胞有骨促进作用。各种体外研究表明，锶离子（Sr^{2+}）是一个潜在的、增强成骨生物活性的元素。成骨细胞，作为主要的成骨细胞，来源于骨髓间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）。锶对成骨细胞相关基因的表达有正效应，如 Cbfa1 和骨连接蛋白以及其他骨形成指标，如碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）活性等。锶能有效诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化，进一步促进骨形成。此外，它可以抑制破骨细胞的分化。因此，它增强基质沉积和抑制骨吸

译者单位　福中山大学附属口腔医院
广东省广州市陵园西路 56 号　510060

收活性，最终促进新骨的形成。因此，锶被认为能有效提高一些生物材料的生物活性和生物相容性。有研究表明，锶可以刺激成骨活性，并抑制破骨细胞增殖，甚至是当掺入羟基磷灰石（Hydroxyapatite，HA）里。含锶的生物活性玻璃和羟基磷灰石被证明能刺激成骨活性和抑制破骨活性。改善钛种植体在较差质量骨中的生存率以及缩短种植体植入后骨结合所需的愈合期，是口腔种植领域至关重要的问题。因此，在种植体表面掺入 Sr 离子可能提高种植体周围骨形成，并提高骨结合。许多方法已被用来添加 Sr^{2+} 至钛种植体表面，包括羟基磷灰石的电化学沉积涂层，磷灰石涂层的仿生沉积，溶胶—凝胶—浸渍羟基磷灰石涂层，等离子喷涂羟基磷灰石涂层，羟基磷灰石涂层的脉冲激光沉积，复合磷酸钙涂层，阳极氧化二氧化钛纳米管的水热处理和钛氧化分层。这些锶改性的表面成骨作用已被进行体外的研究，而且一些体内研究也评估了含锶表面对去除扭力矩和皮质骨、松质骨骨沉积的影响。这些结果表明，含锶表面可提高体外生物活性并增强体内种植体的骨结合能力。掺锶的羟基磷灰石涂层展现出的骨响应性能优于纯羟基磷灰石涂层。然而，掺锶潜在有益性能的分子机制仍然没有被研究透彻。

通过电化学沉积产生的涂层，具有六角形截面的棒状羟基磷灰石晶体，直径约 90nm，类似于骨羟基磷灰石结构，并能增加涂层植入体周围骨形成，从而提高了种植体与骨之间的机械强度。许多实验研究表明，细胞和组织的反应是由植入物表面形貌所影响。钛基纳米多孔表面显著影响宿主在细胞和组织水平反应。曾有报道，钛表面纳米级改性倾向于促进成骨细胞的黏附、增殖和分化，因此能加速种植体周围的愈合。一般来说，涂层是在成骨细胞的早期定植和骨组织成血管的发展中所需的。经过植入的后期阶段（约 8 周后），这些涂层已被吸收或降解，并被新骨所取代，所以对长期的骨结合并没有负面影响。而且随着涂层的吸收，新骨组织普遍结合于多孔植入体表面。电化学方法通过在电解质里添加额外的镁或锶盐，能够在羟基磷灰石上沉积镁或锶。最近有研究证明，采用电化学沉积工艺产生的掺锶羟基磷灰石涂层能提高种植体骨结合能力。由 Sr-HA 涂层溶解提供的高水平的游离钙离子（Ca^{2+}）和 Sr^{2+} 可能是提高种植体周围骨形成和骨结合的主要原因。在局部骨组织区域的成骨细胞系中，含锶种植体骨愈合增强的作用机制可能与 Sr 离子活化细胞外钙敏感受体（CaR）相关，从而促进后续的成骨细胞分化。然而，释放的离子通过作用于哪种细胞这一机制仍是个迷，是前成骨细胞还是骨髓间充质干细胞呢？

Sr 可以诱导 MSCs 和成骨细胞前体（MC3T3-E1 骨源细胞）向成骨细胞分化并进一步促进骨形成。因此，本研究探讨小鼠骨髓间充质干细胞和前成骨细胞 MC3T3-E1 在 Sr-HA 表面的行为。MC3T3-E1 是来自小鼠颅顶的成骨细胞前体。本研究的目的是分析小鼠 MSCs 与 MC3T3-E1 细胞与 Sr-HA 涂层表面接触后，细胞的黏附、增殖、存活、成骨分化、矿化结节的形成，并比较其与纳米 HA 涂层及无涂层的粗糙钛表面效果的差异。

2　材料和方法

2.1　试验和控制板的制备

两种不同尺寸的工业纯钛平片（24 块圆板，直径 25mm，厚度 1.5mm，72 块方形片，10mm×10mm×1mm；浙江广慈医疗器械有限公司）如前所述是粗糙处理。电化学沉积的掺锶羟基磷灰石和羟基磷灰石涂层制作如前所述。简而言之，钛样品作为工作电极（阴极），而铂片作为对电极。通过将分析纯硝酸钙 [$Ca(NO_3)_2$，1.2mmol/L] 和磷酸氢二铵（$NH_4H_2PO_4$，0.72mmol/L）溶解于蒸馏水制备（Ca+Sr）/P 摩尔比为 1.67 的电解液，然后加入硝酸钠（$NaNO_3$）（0.1mol/L）以提高电解液的导电性。3V，85℃直流电源进行沉积过程 30min。掺锶羟基磷灰石涂层的制备采用相同的步骤，并且在电解质溶液中加入 Sr/(Ca+Sr) 摩尔比为 10% 的氯化锶（$SrCl_2$）。

2.2　表面的一般表征

采用场发射扫描电子显微镜（FESEM）（FEI，SIRION100）（对于每个涂层 n=2）观察涂层及无涂层的钛表面形貌。原子浓度的 Ca，Sr 和 P 原子浓度利用 X 射线光电子能谱（XPS）进行定量（AXIS ULTRADLD Kratos）。每个样品类型取两个样品进行扫描，所有值取平均值。

2.3　掺锶羟基磷灰石涂层的降解

为了探讨实验组涂层的降解，37℃下 Sr-HA 涂层钛片浸泡在 1ml 的磷酸盐缓冲液（PBS）（pH7.4）。在每个预定时间内，收集缓冲液，原子吸收分光光度法（AA320N，Shanghai Analytical Instrument Co）测量释放的 Sr^{2+} 浓度。

每组包含 6 个样本。

2.4 细胞准备与培养

骨髓间充质干细胞（BMSCs）由新生雄性 Sprague–Dawley 鼠贴壁培养法分离得到。在无菌条件下，吸取股骨和胫骨骨髓的细胞悬浮液，含 10% 胎牛血清（Gibco）、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的 α–MEM 培养基（α–MEM，Gibco）中培养。细胞在 75cm^2 培养瓶（Corning），37℃、5%CO_2 孵箱中培养。48h 后更换培养基，并每隔 3d 更换一次培养基。当贴壁细胞达到 90% 融合度，用 0.25% 胰蛋白酶－乙二胺四乙酸（Gibco）温和处理分离细胞，按三分之一密度继续传代。青霉素和链霉素在后续代数可忽略。第三代细胞用于以下实验。

小鼠前成骨细胞（MC3T3–E1 细胞，Cellbank of Chinese Science Academy）也培养在含 10% 胎牛血清的 α–MEM 培养基。

为评价细胞黏附、细胞形态、细胞活力，细胞（骨髓间充质干细胞或前成骨细胞）以每孔 1×10^4 个细胞 /ml 的密度接种于已经加入钛片的 24 孔板内。为测定涂层对成骨细胞分化和细胞外基质（ECM）钙矿化的作用，细胞以每孔 1×10^5 个细胞 /2ml 的密度接种于六孔板，其培养基换为成骨细胞诱导培养基（培养基中添加 0.1μmol/L 地塞米松，10mmol/L β－甘油磷酸钠，50μg/ml 抗坏血酸，2mmol/L 谷氨酰胺，所有材料来自 Sigma 公司）孵育过夜。每 3 ～ 4d 更换成骨诱导培养基。

2.5 流式细胞仪鉴定骨髓间充质干细胞

抗原特异性表达的骨髓间充质干细胞和造血干细胞由流式细胞鉴定。简而言之，收获的细胞用 PBS 冲洗（武汉博士德生物工程）2 次，4℃下用 1μl 异硫氰酸荧光素（FITC）抗鼠 CD11b/c（201805，biolegend） 和 CD45（202205，biolegend）以及 10μl FITC 标记的抗 CD29（MA–81468，Biolegend）和抗 CD90（MA–81572，biolegend）单克隆抗体分别孵育约 10^6/100μl 的细胞 30min。作为同型对照，进行匹配 FITC 标记的小鼠免疫球蛋白 G1κ（IgG1κ）同型对照（CD45），FITC 标记的小鼠 IgG1 同型对照（CD90），FITC 标记的仓鼠 IgG 同型控制（CD29），FITC 标记的小鼠 IgG2aκ 同型对照（CD11b/c）。作为阴性对照，细胞没有任何抗体孵育。利用细胞组学 FC500（Beckman Coulter）和软件 CXP 2.2 分析。

2.6 初始细胞附着的测定

探讨骨髓间充质干细胞附着，细胞接种于 24 孔板，分别培养 0.5、2、4h。然后，钛片的处理按文献所述处理。钛片在 4℃用含 4% 多聚甲醛固定的 0.1mol/L PBS（pH 7.4）中 30min，含 0.2% TritonX–100（Sigma）的 PBS 中渗透以除去核膜和可溶性核材料，然后含 0.5% 牛血清白蛋白的 PBS 封闭 。5μg/ml FITC 标记的鬼笔环肽（Sigma）（绿色荧光）鉴定肌动蛋白微丝，细胞核由 Hoechst 33342 染色液（碧云天）（蓝色荧光）染色。使用尼康 Eclipse 80i 荧光显微镜 DXM1200F 电荷耦合分配器进行荧光图像拍照。

用以前描述的形状因子来研究细胞形态。形状因子 $\phi=4\pi A/P$，其中 A 代表细胞面积，P 代表细胞的周长。钛片上细胞的面积由细胞投射的最大轮廓来表示。该形状因子值小，暗示细胞投射大，意味着细胞铺展好。圆形细胞有最大的面积周长比，$\phi=1$），即细胞铺展少。使用 Image J 图像软件（美国国立卫生研究院）定量单个细胞的面积和周长。随机选取 60 个试验及控制组钛片上的细胞来计算形状因子。

2.7 细胞活性检测

使用 alamarBlue 细胞活力试剂（Invitrogen）计算细胞数量。Alamar Blue 通过刃天青转换为试卤灵来测定细胞活性及增值能力。刃天青是一种非荧光指示剂染料。通过代谢活跃细胞的还原反应，刃天青被转化成深红色荧光的试卤灵。产生的荧光的数量与活细胞的数量成正比。分别进行 1、4 和 7d 细胞存活率的检测。500μl 的新鲜培养基更换后，每孔加入 50μl alamar Blue 细胞活性刺激试剂，37℃培养 4h，然后，移除含测试试剂的培养基，并添加 1ml 的新鲜培养。在 535nm 的荧光激发波长和 595nm 的荧光发射波长下测定培养基中的荧光。通过绘制荧光强度与化合物浓度的数据分析数据。

2.8 碱性磷酸酶的测定

ALP 活性是早期成骨的指标。每块板接种细胞密度为 1×10^5，培养 7d 和 14d。使用商业 ALP 底物试剂盒（Wako）测定碱性磷酸酶活性。温和收集培养基（收集后用于骨钙素释测定），用 PBS 洗涤，用 Cellytic Buffer（Sigma）裂解细胞。细胞裂解液 4℃下离心 15min。将 20μl 细胞裂解液与工作液 100μl 混合，震荡器上震荡 1min，然后在 37℃

孵育 15min。每孔添加 80μl 终止液，混合液摇匀 1min，然后，酶标仪（Sunrise–Basic TECAN）测定在 405nm 处的吸光度。总蛋白是由 BCA 蛋白定量试剂盒（碧云天）定量，ALP 活性表示为每小时细胞总蛋白每微克对硝基苯酚每纳摩尔的释放量。

2.9　骨钙素释放实验

骨钙素的表达是晚期成骨的标志物。使用小鼠的骨钙蛋白试剂盒（生物医学技术），根据制造商的说明测定培养基中分泌的骨钙蛋白。将细胞以 1×10^5 的密度接种在涂有 HA 和 Sr–HA 的钛片（直径 25mm× 厚度 1.5mm）上。细胞培养 7d 和 14d 后收集培养基。结果表示为细胞每微克总蛋白的小鼠骨钙素纳克含量。

2.10　茜素红 S 染色

利用半定量的茜素红 S 染色（Sigma）法测定成骨诱导液条件下培养的细胞外基质钙矿化。经过 28d 的培养后，细胞用 PBS 洗 3 次，在 4℃ 用 4% 多聚甲醛固定 10min，PBS 洗涤 3 次，室温下用新制备的含 0.1% 茜素红的 0.05mmol/L Tris 盐酸（pH 8.3）染色 60min，PBS 洗涤 3 次，干燥，并拍照。最后，细胞在 100mmol/L 氯化十六烷基吡啶溶液中脱色 30min，在 562nm 处测定溶液的吸光度（OD）。样品的 OD 值由空白氯化十六烷基吡啶溶液吸光度校准。校准值与钙矿化量成正比。

2.11　统计分析

细胞活力、ALP、骨钙素和茜素红检测实验，每组 3 个副孔，每组重复 2 次。数据以均值 ± 标准偏差表述。每两组间的比较采用独立样本 t 检验。意义的水平设置在 $\alpha=0.05$。统计分析均采用 SPSS19.0 统计软件（SPSS Inc）。

3　结果

3.1　表面特性

扫描电镜观察粗糙组表面、HA 的表面、Sr–HA 表面，如图 1 所示。粗糙组表面形貌观察到约 10 ~ 30μm 的凹坑，其中包括约 0.5 ~ 3μm 的不规则微阱（图 1a 和 1b）。粗糙组表面未见爆破颗粒或其他杂质。电化学处理后，表面上可见 HA 涂层，为六边形截面的棒状晶体，直径约 90nm（图 1c 和 1d）。随着 Sr^{2+} 的掺入，晶体变薄，直径约为 70 ~ 80nm（图 1e 和 1f）。XPS 分析追踪每个表面的不同化学成分（表 1）。钙，磷，氧和碳在 Sr–HA 和 HA 组均可检测到。Sr 仅仅在 Sr–HA 组发现。

3.2　实验组涂层的降解

图 2 显示了研究中不同时间释放至 PBS 缓冲液中的 Sr^{2+} 的浓度。随着时间的推移，在涂层中的

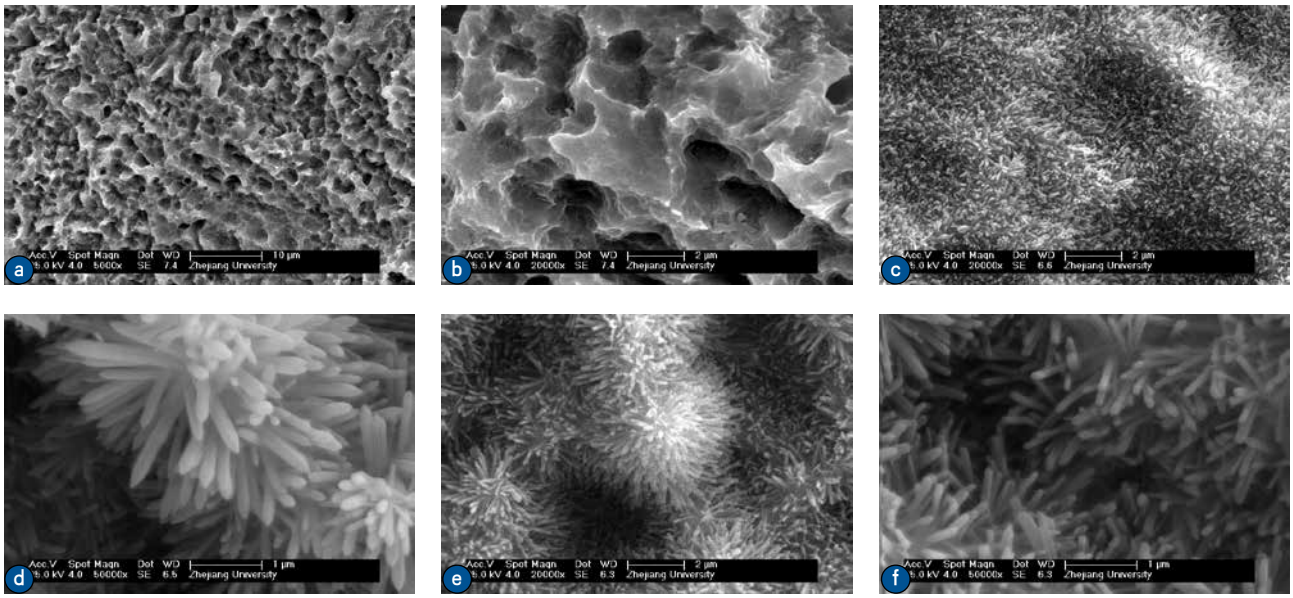

图 1　扫描电镜照片，粗糙表面（a 和 b），HA 表面（c 和 d），Sr–HA 表面（e 和 f）

表 1　XPS 测量 HA 和 Sr–HA 样品的相对原子浓度（%）

元素	HA	Sr–HA
Ca	12.205	10.255
O	31.82	35.825
P	10.25	8.855
C	45.725	43.425
Sr		1.64

Sr^{2+} 的量减少。24h 后，在缓冲液中的 Sr^{2+} 的浓度约为 600ppb。5d 后，Sr^{2+} 的浓度约为 1 100ppb，11d 后，Sr^{2+} 的浓度约为 1 650ppb。

3.3　流失细胞术的观察

流式细胞仪分析表明，本研究中使用的第三代 BMSCs 的 CD29、CD90（骨髓间质干细胞表面标记物）免疫阳性（> 95%），CD11b/c 和 CD45 免疫阴性（< 5%），这些是淋巴造血细胞相关的细胞表面标志（图 3）。

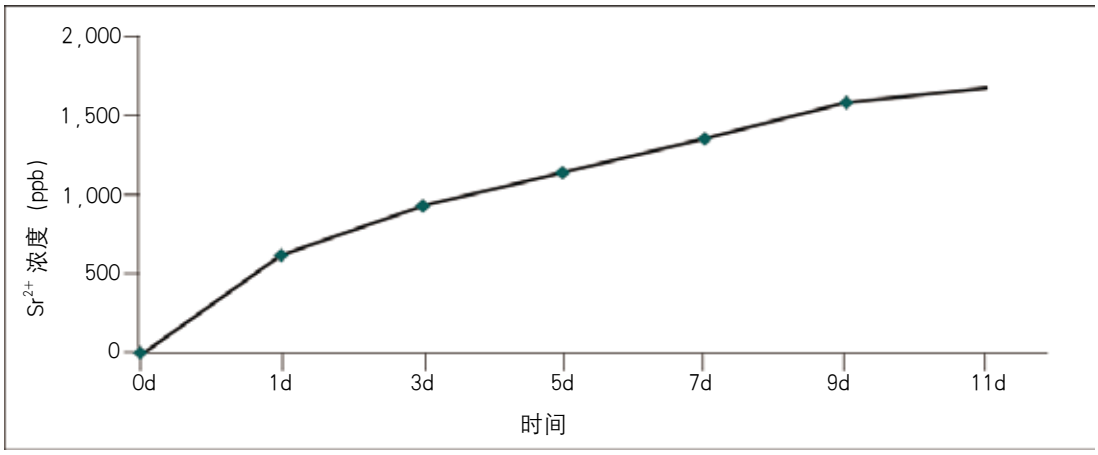

图 2　释放至 PBS 缓冲液中的 Sr^{2+} 浓度。

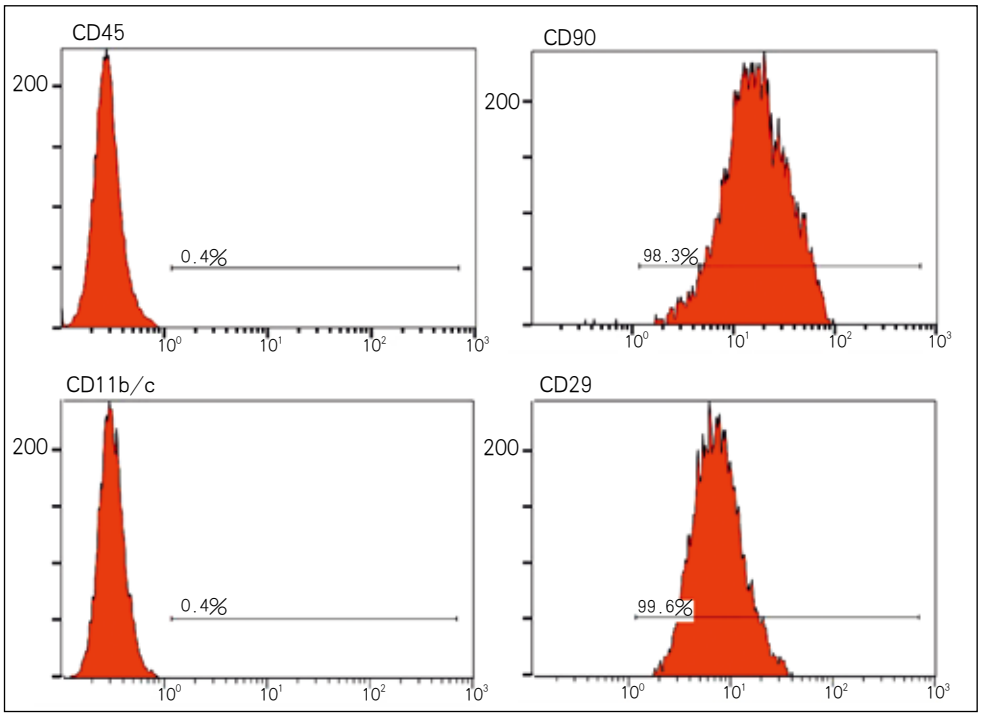

图 3　骨髓间充质干细胞的细胞表面标记物鉴定

3.4　荧光显微镜结果

荧光染色后细胞内的肌动蛋白细胞骨架和细胞核在钛片上显像（图 4）。在细胞接种后 0.5h，细胞都是相似的圆形，但相比于其他两组，粗糙表面上细胞的伪足更少且较短。所有组钛片上的细胞铺展少；肌动蛋白纤维重叠于细胞核，细胞呈绿色。在细胞接种后 2h，所有表面上的细胞为不规则的多边形，并观察到丰富的伪足和肌动蛋白丝。细胞边缘区域出现暗绿色，肌动蛋白丝不够清晰度，证明了许多肌动蛋白纤维的重叠。细胞培养 4h 后，所有不同的表面肌动蛋白丝网状分布并铺展在整个细胞质；并观察到长的伪足。

形状因子数值的变化与细胞形态改变相一致（表 2）。在细胞接种后 0.5h，在粗糙表面，细胞形状因子平均值明显大于 Sr–HA 表面（P=0.013）和 HA 表面（P=0.013）表面的形状因子。在培

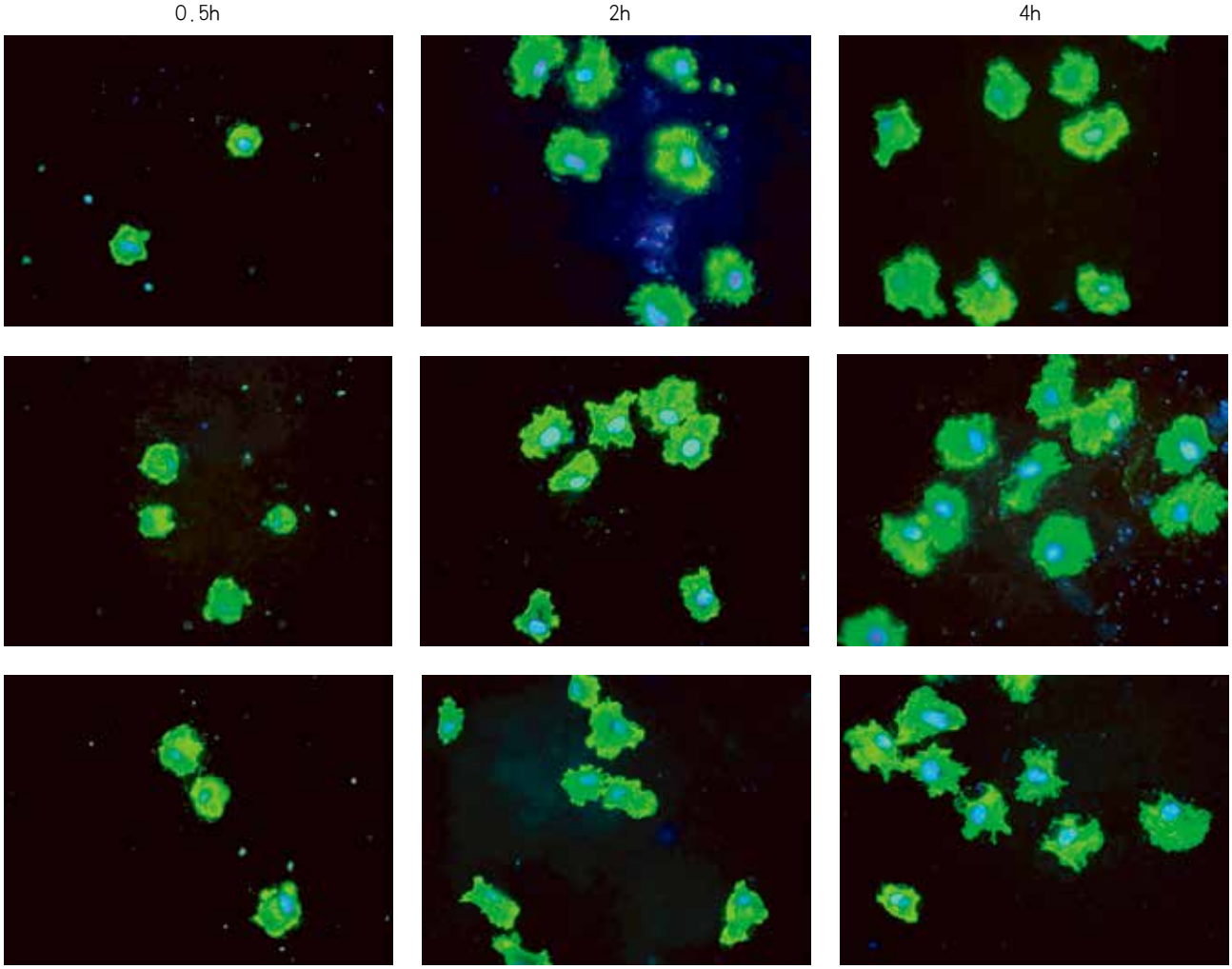

图 4　荧光显微图像显示 BMSCs 细胞肌动蛋白细胞骨架和细胞核，（自上而下）为 Sr–HA 表面，HA 表面，和粗糙表面。（×40）。

表 2　在不同表面上的骨髓间充质干细胞形状因子（φ）的均值（标准差）（P=60）

表面	0.5h	2h	4h
Sr–HA 表面	0.58（0.15）*	0.49（0.13）*	0.41（0.12）*†
HA 表面	0.60（0.13）*	0.50（0.13）	0.48（0.13）
粗糙表面	0.68（0.10）	0.54（0.12）	0.48（0.14）

*P < 0.05，Sr–HA 或 HA 表面对粗糙表面；†P < 0.05，Sr–HA 表面对 HA 表面

养 2h 和 4h 后，Sr–HA 涂层表面的形状因子值显著小于粗糙表面的形状因子值（分别为 P=0.028，P=0.009）。在第 4 小时，Sr–HA 表面的平均形状因子值也显著小于 HA 表面（P=0.008）。

3.5　细胞的生长

alamarBlue 检测所有基板上的 BMSCs 细胞 1d、4d 和 7d 的活性（图 5a）。直到在培养至第 7 天，在任何时间点三种表面的细胞增殖率未见统计学差异，这似乎表明，Sr–HA 和 HA 处理并没有抑制骨髓间充质干细胞的增殖。

MC3T3–E1 细胞培养 1d、3d 和 7d 后评估其生长（图 5b）。第 1 天和第 3 天，对比其他两组表面，粗糙钛表面可见更多的细胞。直到培养第 7 天，三种表面的细胞增殖率无统计学差异。

骨髓间充质干细胞和前成骨细胞 MC3T3–E1 细胞在不同表面的碱性磷酸酶活性如图 6 所示。在第 7 天，Sr–HA 表面的骨髓间充质干细胞 ALP 活性 [2.00±0.07nmol/（μg·h）]（P=0.007），在 HA 表面的 ALP 活性[1.24±0.20nmol/(μg•h)]（P=0.037），二者的 ALP 活性显著高于粗糙表面[0.78±0.05nmol/（L·μg·h）]。Sr–HA 和 HA 表面也有显著差异（P=0.008）。MC3T3–E1 细胞在 Sr–HA 表面的 ALP 活性[0.24±0.01nmol/

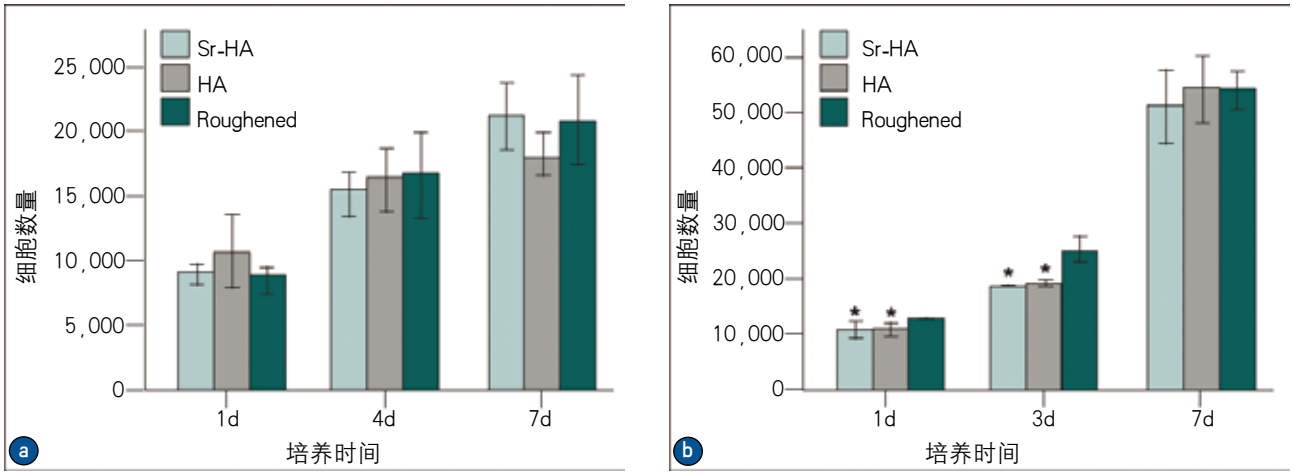

图 5　培养在不同涂层（n=6）的（a）骨髓间充质干细胞和（b）MC3T3–E1 细胞的生存能力。* $P < 0.05$。 Sr–HA 或 HA 表面对粗糙表面 3.6　ALP 活性

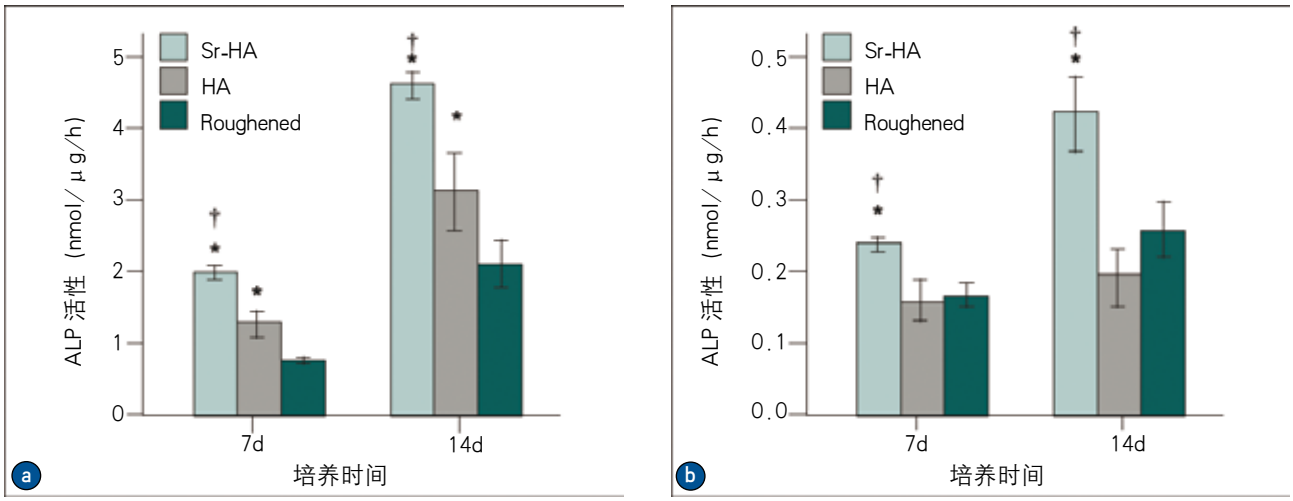

图 6　培养在不同涂层（n=6）的（a）骨髓间充质干细胞和（b）MC3T3–E1 细胞 7d 和 14d 的碱性磷酸酶活性。* $P < 0.05$，Sr–HA 或 HA 表面对粗糙表面；† $P < 0.05$，Sr–HA 表面对 HA 表面

（μg·h）]显著高于在粗糙表面的 ALP 活性[0.17±0.02nmol/（μg·h）]（P=0.011）。Sr-HA 表面的 ALP 活性和 HA 表面的 ALP 活性[0.16 ±0.03nmol/（μg·h）]之间也有统计学差异（P=0.016）。

第 14 天后，在 Sr-HA 表面上的骨髓间充质干细胞 ALP 活性[4.61±0.19nmol/(μg·h)](P=0.003)，在 HA 表面上的细胞 ALP 活性[3.16±0.52nmol/（μg·h）]（P=0.017），显著高于粗糙表面的 ALP 活性[2.06±0.32nmol/（μg·h）]。在 Sr-HA 表面上的骨髓间充质干细胞 ALP 活性也显著高于 HA 表面上的 ALP 活性（P=0.028）。在 Sr-HA 表面上的 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性[0.42±0.05nmol/（μg·h）]（P=0.041）显著高于粗糙表面的 ALP 活性[0.26±0.04nmol/（μg·h）]。在 Sr-HA 面的 ALP 活性也高于 HA 表面[0.19±0.04nmol/（μg·h）]（P =0.011）。在 HA 表面上的 ALP 活性与粗糙表面的相比，在任何时间点比较均无显著性差异。

3.7　骨钙素的分泌

图 7 显示了在第 7 天和第 14 天，不同涂层表面的 BMSCs 和 MC3T3-E1 细胞所分泌至培养基中的骨钙素的含量。在培养第 7 天，Sr-HA 涂层表面的 BMSCs 分泌至培养基中的骨钙素显著高于 HA 表面（P=0.028）和粗糙表面的骨钙素（P=0.043）。在 Sr-HA 表面的 MC3T3-E1 细胞分泌的骨钙素显著高于 HA 表面（P=0.049）和粗糙表面的骨钙素（P=0.031）。

在第 14 天，在 Sr-HA 表面的 BMSCs 分泌的骨钙素量（P=0.018）和 HA 表面的（P=0.003）再次高于粗糙表面的骨钙素含量。在 Sr-HA 表面的 MC3T3-E1 细胞分泌的骨钙素（P=0.030）和 HA 表面的（P=0.030）也高于粗糙表面的骨钙素量。在 Sr-HA 表面和 HA 表面之间未见显著性差异（P=0.038）。

3.8　茜素红染色结果

图 8 显示了不同涂层表面的 BMSCs 和 MC3T3-E1 细胞在成骨诱导液培养中的茜素红 S 染色。培养 28d 后，在 Sr-HA 表面对比于 HA 表面，BMSCs 产生的钙化更多，并且粗糙表面的钙化面积最少。同样，培养 28d 后，在 Sr-HA 表面对比于 HA 表面，MC3T3-E1 细胞产生的钙化更多，并且粗糙表面的钙化面积最少。

对茜素红的吸光度值进行定量，结果如图 9。经过 28d 的培养，在 Sr-HA 表面 BMSCs 产生的茜素红染色的吸光值（P=0.005）和在 HA 表面的（P=0.007），显著高于粗糙表面者。在 Sr-HA 表面和 HA 表面之间也有显著性差异（P=0.044）。来自 MC3T3-E1 细胞的茜素红吸光度分别是 Sr-HA（P=0.004）和 HA（P=0.004），显著高于粗糙表面形成的茜素红吸光度。在 Sr-HA 表面释放的钙化结节多于 HA 表面（P=0.012）。

4　讨论

这项研究的结果表明，钛表面的成骨能力可以通过含锶纳米羟基磷灰石涂层的电化学沉积来改

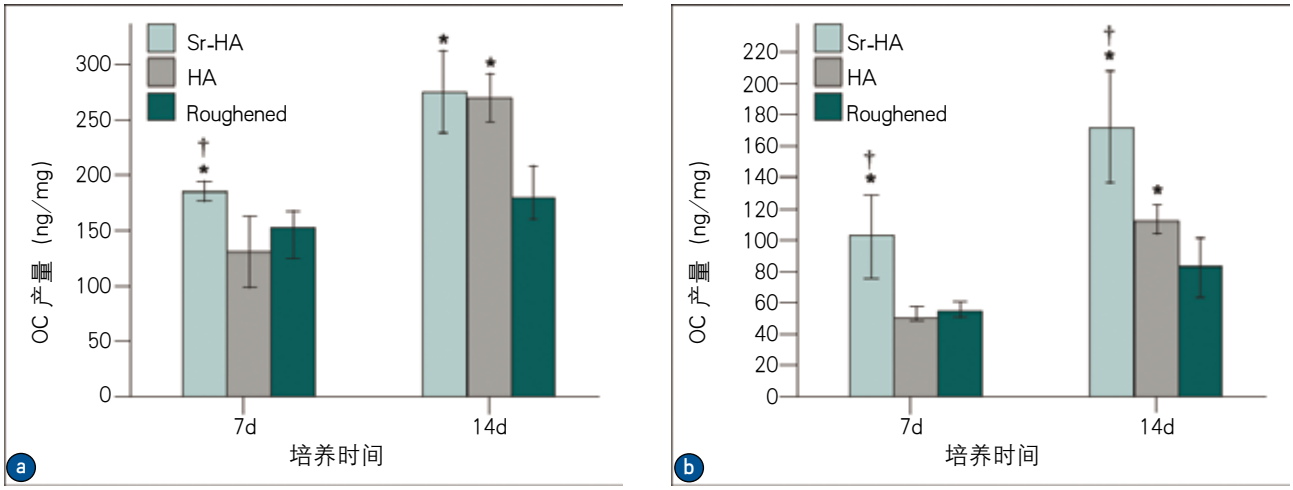

图 7　第 7 天和第 14 天培养后，不同表面（n=6）的 BMSCs（a）和 MC3T3-E1 细胞（b）分泌至培养基中的骨钙素（OC）量。*P < 0.05，Sr-HA 表面或 HA 表面对粗糙表面；†P < 0.05，Sr-HA 表面与 HA 表面

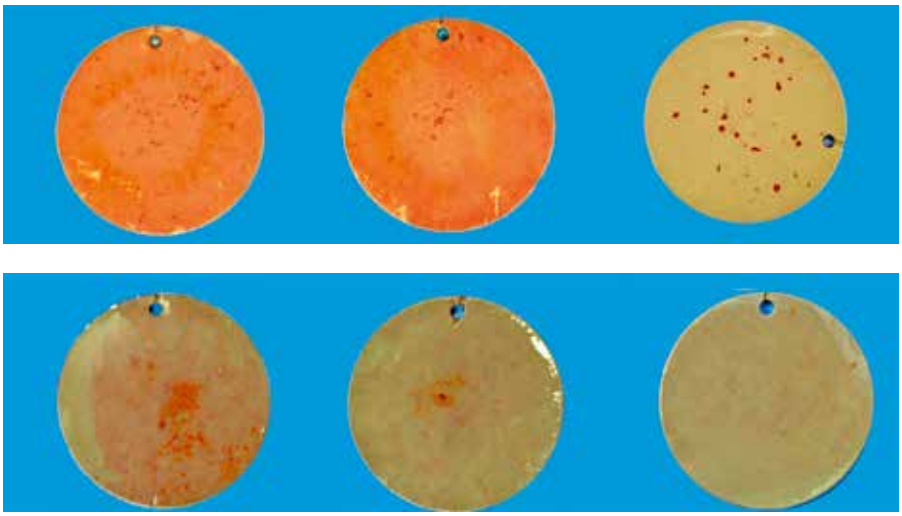

图 8　28d 后在不同表面培养结果，BMSCs 的钙化面积（上）和 MC3T3–E1 细胞（下）。从左到右：Sr–HA 表面，HA 表面，粗糙表面

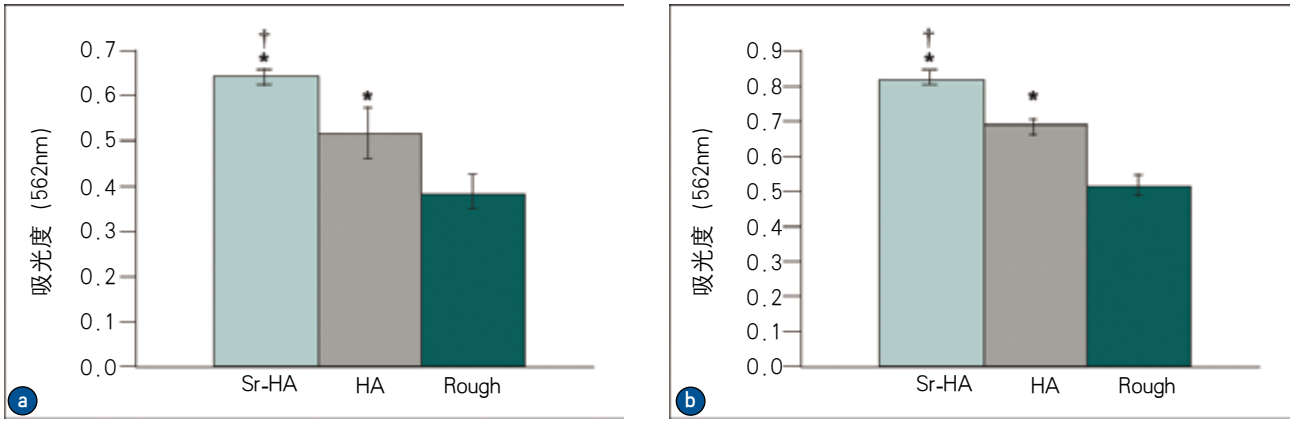

图 9　吸光度用来衡量 28d 后（n=6）不同表面（a）BMSCs 和（b）MC3T3–E1 细胞 ECM 钙矿化情况。$^{*}P < 0.05$，Sr–HA 表面或 HA 表面对粗糙表面；$^{\dagger}P < 0.05$，Sr–HA 表面对 HA 表面

进。含锶纳米羟基磷灰石涂层显著增强小鼠骨髓间充质干细胞和前成骨细胞 MC3T3–E1 细胞黏附、铺展、分化和细胞外基质钙矿化，但它并没有促进细胞增殖。表面形貌对细胞的反应是非常重要的。事实上，微粗糙对于骨形成的有利影响在文献中已有阐述，有实验研究证实，纳米结构植入种植体表面已显示出可喜的成果，临床上也已有证实。本研究表明，SEM 和 XPS 结果表明纳米结构可以通过微粗糙简单而有效地在钛表面叠加而成。

在这项研究中，培养的骨髓间充质干细胞表型已表征，然后，进行探索 Sr 对成骨细胞分化过程中的影响。作者发现，培养的 BMSCs 表达标准 MSC 标记，如 CD29 和 CD90，不表达淋巴造血细胞标记，如 CD11b/c、CD45。第二，相对于 HA 涂层表面或未处理粗糙钛表面，骨髓间充质干细胞和前成骨细胞 MC3T3–E1 在 Sr–HA 涂层表面显示 ALP 活性、分泌骨钙素和钙化面积显著增加。这些结果表明，BMSCs 和 MC3T3–E1 细胞在骨传导微粗糙钛表面的反应，可以通过电化学沉积方法产生的掺锶纳米羟基磷灰石涂层改进。

这些结果与其他研究所发现的 Sr 对骨髓间充质干细胞和成骨细胞行为的刺激作用结果一致。Sr–HA 涂层促进骨前体细胞附着，表面产生更多的局部接触，并刺激骨前体细胞分化和 ALP 的表达。人骨肉瘤细胞株 Saos–2 与生物活性玻璃接触培养，增加 Sr 代替品，显示促进增殖与碱性磷酸酶活性，

而破骨细胞采用典型吸收形态。与无任何 Sr 含量的 HA 涂层相比，采用脉冲激光沉积的 Sr 取代的 HA 薄膜涂层明显增加成骨样细胞 MG63 的 ALP 活性及骨钙素产生。一种生物陶瓷中的生物活性离子特异性结合（锶、锌、硅）相比传统的 β－磷酸三钙，显著提高骨髓基质干细胞成骨分化。在粗糙钛表面用水热法生产钛酸锶（$SrTiO_3$）涂层，在此涂层表面培养小鼠原代骨髓间充质干细胞，促进早期和晚期骨髓间充质干细胞的细胞反应，包括生长，显著增强黏着、铺展、焦点黏附、ALP 活性和临界整合素与成骨细胞表型的基因表达。然而，在目前的研究中，虽然细胞铺展得到提高，因为无论是在培养的第 2 个小时还是第 4 个小时，相对于粗糙表面，在 Sr−HA 表面观察到更小的形状因子值，但是在 Sr−HA 表面上的 MSCs 的增殖与其他表面上的细胞增殖类似。

大量的研究试图阐明 Sr 的机制，但确切的机制仍不清楚。Sr 活化 Wnt 和细胞外信号调节激酶 1/2− 有丝分裂原 − 活化蛋白激酶信号通路，通过提高启动 BMSCs 由成骨细胞向脂肪细胞分化增加 Runx2 表达并减少过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的表达，从而降低脂肪的合成和增加成骨，骨的形成，使小鼠的骨量增加。Sr 促进成骨细胞的复制、分化和生存，通过活化钙受体并指向成骨细胞的下游通路，从而促进成骨。Sr 还激活了破骨细胞的钙受体和下游信号通路，导致破骨细胞的分化、活性和生存，并减少骨吸收。然而，在这项研究中，对比于早期（第 1 天和第 3 天）的粗糙表面，Sr−HA 表面和 HA 表面仅轻微抑制 MC3T3−E1 细胞的增殖。这与其他报道不相符。在体外，掺入 Zn 和 Sr 的磷酸钙骨水泥刺激成 MC3T3−E1 细胞增殖成熟。在掺杂 Sr 的 HA 涂层上培养的 MG63 细胞显示正常形态和良好的增殖。这些结果意味着不同的骨前体细胞对 Sr 和不同表面形貌的反应可能会导致不同的结果。确切的机制仍不清楚。

体外研究表明，需用一定浓度的 Sr（超过 68ppb）提高各种成骨前体细胞或多能间充质细胞的分化。这似乎表明，Sr 在很宽的浓度范围内起效（从 0.01 至 4mmol/L，在已发表的研究中）。如图 2 所示，随着培养时间的增加，从 Sr−HA 表面释放至 PBS 的锶离子浓度从 0 至 1600ppb。锶离子浓度高于刺激成骨细胞分化的较低锶浓度。

在这项研究中，培养 28d 后，骨髓间充质干细胞和前成骨细胞 MC3T3−E1 在 Sr−HA 表面比 HA 和粗糙表面观察到更多的钙化。有研究已表明，雷奈酸锶在不影响前成骨细胞系 MC3T3 细胞骨矿化的前提下增加 ALP 活性。然而，也有报道，雷奈酸锶处理可促进成骨前体细胞分化为成熟的成骨细胞，增加骨结节数与 0.1mmol/L Sr^{2+} 的效果相当。这些结果表明，在培养液中的不同的锶浓度和不同的细胞可能会产生不同的细胞反应和结果。

此研究首次阐明掺 Sr 纳米羟基磷灰石涂层在微粗糙钛表面可增强 BMSCs 和 MC3T3−E1 细胞在细胞功能的各个阶段的反应。因此，在钛种植体微粗糙表面由电化学沉积产生的掺 Sr 的纳米羟基磷灰石涂层，通过提高成骨细胞早期和晚期的骨愈合过程中细胞的反应来提高骨结合。

5　结论

在这项研究中，由一种简单的电化学沉积处理产生掺锶纳米羟基磷灰石涂层，对比于未处理的喷砂微粗糙钛表面和羟基磷灰石涂层，能显着增强小鼠骨髓基质细胞和前成骨 MC3T3−E1 细胞的黏附、铺展、碱性磷酸酶活性和细胞外基质钙矿化。这可以通过促进在骨愈合过程的早期和晚期阶段的成骨细胞的反应，从而提高种植体骨结合。这项研究表明，由电化学沉积产生的掺锶纳米羟基磷灰石涂层能提高微粗糙钛表面的骨传导性。

6　致谢

感谢浙江省自然科学基金（批准号：LQ13H140001）。作者报告没有与本研究相关的利益冲突。