

氧化锆基微量元素共掺杂羟基磷灰石增韧涂层研究

代钊¹, 王铭², 王双¹, 李静¹, 陈翔¹, 汪大林¹, 祝迎春²

(1. 上海第二军医大学附属长海医院, 上海 200433; 2. 中国科学院上海硅酸盐研究所, 中国科学院特种无机涂层重点实验室, 上海 200050)

摘要: 氧化锆陶瓷具有良好的力学性能和生物相容性, 是一种应用前景广阔的硬组织植入体材料。为促进植入体与骨组织形成稳定的骨结合, 本研究利用等离子喷涂制备了氧化锆增韧的锶、硅、氟微量掺杂羟基磷灰石(ZrO_2 -DHA)涂层, 对涂层物相、形貌以及力学性能和体外生物学性能进行了研究。结果表明, 锶、硅、氟的共掺杂通过成骨分化的信号转导通路提高了羟基磷灰石涂层对成骨细胞的黏附和分化等生物学性能; 不同复合组分的 ZrO_2 -DHA 涂层均不同程度地促进了小鼠成骨前体细胞的细胞活力和成骨分化相关基因的表达。在细胞培养的第 7 d, DHA 含量为 70% 的 ZrO_2 -DHA 涂层(7DHA) *Alp* 和 *Col-1* 的相对表达量分别是对照组的约 2.8 倍和 2.3 倍; ZrO_2 -DHA 涂层的力学性能随氧化锆组分的增加而增强, DHA 涂层和 7DHA 涂层的硬度和结合强度分别为 250.8、313 HV 和 25.1、31.8 MPa; 7DHA 涂层中的交织网络结构, 对残余热应力、压应力和拉伸力的承受能力较 DHA 涂层明显提升, 满足植入体应用需求。

关键词: 锶、硅、氟微量掺杂羟基磷灰石; 等离子喷涂; 氧化锆增韧; 力学性能; 成骨

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

Zirconia Reinforced Trace Element Co-doped Hydroxyapatite Coating

DAI Zhao¹, WANG Ming², WANG Shuang¹, LI Jing¹, CHEN Xiang¹, WANG Da-Lin¹, ZHU Ying-Chun²

(1. Hospital of Changhai, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Key Laboratory of Inorganic Coating Materials, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract: Zirconia is a kind of prospective hard tissue implant materials, which possesses superior mechanical properties and excellent biocompatibilities. To promote the stable osseointegration between Zirconia implants and tissue, zirconia-toughened trace Sr-, Si- and F- co-doped hydroxyapatite (ZrO_2 -DHA) was coated by plasma spraying on zirconia. The phase composition and structure of coatings were characterized, and the mechanical properties and *in vitro* biological properties were investigated. The results show that co-doping of trace Sr, Si and F enhances the biological properties of coatings on adhesion and differentiation of osteoblasts through the signal transduction pathway of osteogenic differentiation. All of ZrO_2 -DHA coatings promote the cell viability and gene expression in osteogenic differentiation of MC3T3-E1. On the 7th day of cell culture, the relative expression levels of *Alp* and *Col-1* in the ZrO_2 -DHA coating containing 70% DHA (7DHA) were about 2.8 times and 2.3 times higher than those in the ZrO_2 substrate group, respectively. Mechanical properties of ZrO_2 -DHA coatings are improved with the increment of zirconia ratio. Hardness of DHA coating and 7DHA coating are 250.8 and 313 HV respectively and their bond strength are 25.1 and 31.8 MPa, respectively. 7DHA coatings with network structure possess both excellent mechanical and biological per-

收稿日期: 2019-01-27; 收到修改稿日期: 2019-04-02

基金项目: 国家自然科学基金(51232007) National Natural Science Foundation of China (51232007)

作者简介: 代钊(1989-), 男, 硕士研究生. E-mail: zhaodai313@126.com

DAI Zhao (1989-), male, Master candidate. E-mail: zhaodai313@126.com

通讯作者: 汪大林, 教授. E-mail: wang_dento@163.com; 祝迎春, 研究员. E-mail: yzhu@mail.sic.ac.cn

WAN Da-Lin, professor. E-mail: wang_dento@163.com; ZHU Ying-Chun, professor. E-mail: yzhu@mail.sic.ac.cn

formance for the implant coating application.

Key words: Sr/Si/F trace-doped hydroxyapatite; plasma spraying; zirconia reinforcing; mechanical property; osteogenesis

近年来,氧化锆(Zirconia, ZrO_2)陶瓷作为硬组织植入物受到了持续关注,在口腔植入体方面的应用逐渐增加。氧化锆陶瓷具有优异的断裂韧性、弹性模量^[1-3],能够耐受长期负荷,其生物相容性也早已得到证实^[4-5]。此外,氧化锆还能够满足患者日益提高的美学要求,避免钛金属引起的潜在健康危害,如植入体周围炎症、过敏反应等^[6-8]。然而氧化锆属于生物惰性陶瓷,在其表面制备生物活性涂层是促进植入体早期骨整合的有效方法。

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)作为植入体涂层材料已有多年临床应用,是一种与人体骨磷灰石结构类似的人工合成钙磷陶瓷材料。而天然羟基磷灰石含有除钙磷以外其他多种微量元素,微量元素掺杂的羟基磷灰石(DHA)与人体骨磷灰石结构更接近,且已被证明具有更优越的生物活性和更少的植入物炎症反应^[9],前期进行的微量元素掺杂羟基磷灰石研究印证了上述观点^[10-14]。然而,磷灰石的高度脆性使其在频繁承载负荷后发生过早的磨损和断裂,影响性能发挥的持久性。引入力学性能优良的增韧材料制备复合涂层,是目前改进这一缺陷的有效方法^[15-17]。

目前已上市的氧化锆植入体几乎均未使用涂层^[18],且尚未见氧化锆植入体上制备羟基磷灰石涂层相关研究。本研究将锶、硅、氟微量掺杂羟基磷灰石(DHA)与氧化锆按不同比例复合,通过等离子喷涂法在氧化锆基体上制备氧化锆增韧的锶、硅、氟微量掺杂羟基磷灰石(ZrO_2 -DHA)复合涂层,并对涂层的力学性能和体外生物学性能进行了研究。

1 实验方法

1.1 试剂和材料

氧化锆基材 $\phi 10\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ 和 $\phi 25.4\text{ mm} \times 2.5\text{ mm}$ 、氧化锆粉体分别购自苏州阿洛泰和江苏立达公司,分析级 $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ 、 $Ca(OH)_2$ 、SrO、 SiO_2 、 CaF_2 和生物级 4-硝基苯磷酸二钠(PNPP)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)购自上海阿拉丁公司。小鼠成骨前体细胞 MC3T3-E1 购自中科院细胞库, α -MEM 培养基、青-链双抗购自赛默飞世尔,胎牛血清购自杭州四季青, β -甘油磷酸钠(β -GP)、抗坏血酸(AA)购自西格玛奥德里奇,茜素红 S 染色液购自北京索莱宝。

1.2 实验方法

1.2.1 涂层的制备

以 $Ca(OH)_2$ 和 $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ 为原料,以 SrO、 SiO_2 和 CaF_2 为微量元素引入剂,水热法合成 HA 和 DHA。三种元素的掺杂量按照既往研究^[12]投料,使其在 DHA 中的质量分数与天然骨磷灰石保持一致^[19-21]。采用喷雾造粒法制备热喷涂粉,其中, DHA 和 ZrO_2 分别按照质量比为 7:3、5:5、3:7 复合造粒。氧化锆基材经喷砂增加表面粗糙度,然后使用大气等离子喷涂设备(Dualumsch. Wasser, Sulzer Metco, Switzerland)按照表 1 中喷涂参数制备 HA/DHA 涂层和质量比分别为 7:3、5:5、3:7 的 ZrO_2 -DHA 涂层(分别记为 7DHA、5DHA、3DHA)。将得到的涂层样品在 $650\text{ }^\circ\text{C}$ 晶化处理 2 h,备用。

1.2.2 表征和力学性能

X 射线衍射仪(Ultima IV, Rigaku, Japan)和傅里叶变换红外光谱仪(IRAffinity-1, Shimadzu, Japan)检测样品相组成。扫描电镜(s-4800, Hitachi, Japan)和光学显微镜观察涂层表面和截面形貌。力学性能实验设 7DHA、5DHA、3DHA 涂层实验组和 DHA 涂层对照组。维氏硬度计(HMV-G21DT, Shimadzu, Japan)和万能试验机(UTM 5592-F2-G2, Instron, USA)检测涂层硬度和结合强度:硬度检测随机选择涂层表面 10 个点测硬度值,万能试验机检测每组 5 个样品的涂层结合强度,结果用($\bar{x} \pm s$)表示。

1.2.3 体外生物学性能检测

(1) 实验分组、细胞培养和涂层浸提液制备

体外生物学性能实验增加空白对照组、 ZrO_2 基材组和阳性对照组(HA 涂层)。小鼠成骨前体细胞在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养,每 2 d 换液一次,确保

表 1 喷涂参数
Table 1 Plasma spraying parameters

Parameter	HA/DHA coating	ZrO_2 -DHA coatings
Primary gas flow rate/($L \cdot \text{min}^{-1}$)	Ar/40-41	Ar/40-42
Auxiliary gas flow rate/($L \cdot \text{min}^{-1}$)	H_2 /6-7	H_2 /8-9
Carrier gas flow rate/($L \cdot \text{min}^{-1}$)	Ar/6-6.5	Ar/6-6.5
Powder feed rate/($g \cdot \text{min}^{-1}$)	18	20
Current/A	650	570
Gun transverse speed/($\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$)	500	500
Standoff distance/mm	100	100

生长状态良好。参照国家标准 GB/T16886.12-2017^[22], 制备涂层浸提液。

(2) 细胞活力实验和毒性评级

涂层样品灭菌后置于 24 孔板, MC3T3-E1 以 4×10^4 Cells/well 接种, 细胞贴壁后更换低血清培养基 (含 0.5% 胎牛血清的基础培养基) 孵育 24 h, 避光加入 100 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 母液, 细胞继续培养 4 h 后吸出孔内液体, 加入 500 μ L DMSO 充分溶解结晶, 吸取 300 μ L 紫色液体至 96 孔板, 酶标仪 (Multiskan FC, Thermo Fisher) 检测 490 nm 的吸光度。通过计算细胞相对增值率 (Relative Growth Rate, RGR) 来评价涂层细胞毒性, 即 $RGR = (\text{涂层组吸光度值} / \text{基材对照组吸光度值}) \times 100\%$ 。若 $RGR \geq 100\%$, 则细胞毒性为 0 级。

(3) 细胞黏附实验

相同方法接种多孔板, 在接种 1、6 和 12 h 后吸去培养液, 加入 500 μ L 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 冲洗 2 次, 避光加入 300 μ L DAPI 荧光染液, 倒置荧光显微镜 (TH4-200, Olympus, Japan) 下观察, 每个样品随机选取 5 个不同视野拍照并计数细胞, 细胞数用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

(4) 碱性磷酸酶活性实验

相同方法接种多孔板, 细胞贴壁后更换成骨诱导分化培养基, 每 2 d 换液一次, 于第 1、7 d 终止培养, 加入 0.2% 曲拉通 200 μ L 裂解细胞, 收集细胞裂解液离心, 吸取上清液 50 μ L 至 96 孔板, 加入 100 μ L 浓度为 1 mg/mL 的 PNPP 工作液, 细胞培养条件继续孵育 30 min 后用酶标仪检测 405 nm 吸光度 OD_{ALP} 。BCA 蛋白试剂盒检测各孔总蛋白量 (mg), $OD_{ALP} / \text{总蛋白值}$ 用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

(5) 成骨分化相关基因表达实验

相同方法接种多孔板, 细胞贴壁后更换诱导分化培养液, 每 2 d 换液一次, 于第 1、7 d 终止培养, 加入 1 mL Trizol 抽提细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 荧光定量 PCR 仪 (Step one plus, ABI, USA) 扩增成骨分化相关基因 *Alp*、*Col-1* 和内参基因 *Gadph* (引物序列见表 2), 得到 Ct 值, 使用 Δ Ct 法计算各组各基因

的相对表达量。

(6) 成骨矿化染色实验

相同方法接种多孔板, 细胞贴壁后更换涂层浸提液, 每 2 d 换液一次, 于第 14 d 终止培养, 每孔加入 4% 多聚甲醛 500 μ L 固定 15 min, PBS 清洗 2 次后加入茜素红 S 染色液 200 μ L 避光染色 15 min, PBS 清洗至清洗液无色, 于倒置显微镜下观察拍照。

1.2.4 数据处理

所得数据及图像用 Jade6.5、OMNIC32、Microsoft Excel 和 Origin2018 软件处理、作图。2 组之间比较用 *t* 检验, $p < 0.05$ 为具有显著性。

2 实验结果

2.1 粉体和涂层结构表征

图 1(a) 可见经喷砂处理后, 氧化锆基材呈现出粗糙表面, 该表面有利于喷涂粉体与基材之间形成稳固的结合。图 1(b) 可见高温熔融的液滴状颗粒堆积而成的涂层表面, DHA 粉体熔融状态良好, 呈现等离子喷涂涂层表面形貌特征。图中可见涂层微裂纹, 有助于释放涂层内应力, 防止涂层剥落, 提高结合强度。涂层的粗糙表面有利于细胞的黏附、生长。

图 2(a~c) 分别为 7DHA 涂层表面抛光后的 SEM 照片及 Ca (绿色)、Zr (蓝色) 元素分布的 SEM 照片, 深灰色区域 (A) 为含 Ca 的 DHA, 灰白色区域 (B) 为 ZrO_2 。图 2(d~f) 和图 2(g~i) 分别是 DHA、7DHA、3DHA 涂层的平面和截面照片, 可见 DHA 和 ZrO_2 在涂层的三维结构中呈现相互交错和包绕状态。

图 3(a) 是 HA 和 DHA 粉体的 XRD 图谱, 符合羟基磷灰石标准谱 (JCPDS No.09-0432), 表明本实验合成了羟基磷灰石材料; 插图为 $2\theta = 30^\circ \sim 35^\circ$ 的局部放大, 可见 DHA 峰位出现了右移, 说明元素的引入使 DHA 发生了晶格畸变。图 3(b) 为两者的 FT-IR 图

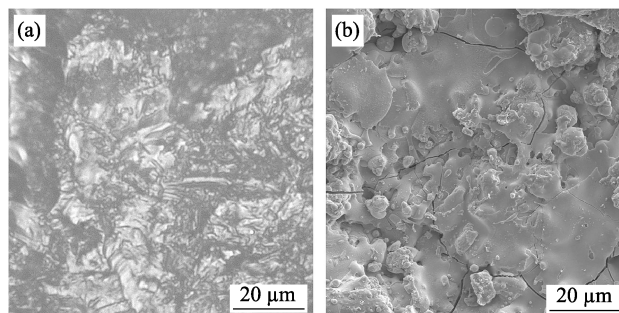


图 1 氧化锆基材(a)和 DHA 涂层表面(b)的 SEM 照片
Fig. 1 SEM images of ZrO_2 substrate (a) and as-sprayed DHA coating (b)

表 2 引物序列
Table 2 Sequence of primers

Gene	Sequence
<i>Alp</i>	F: 5-AACGTGGCCAAGAATCATCA-3 R: 5-TGTCCATCTCCAGCCGTGTC-3
<i>Col-1</i>	F: 5-CCAGAAGAAGTGGTACATCAGCAA-3 R: 5-CGCCATACTCGAAGTGAATC-3
<i>Gadph</i>	F: 5-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3 R: 5-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3

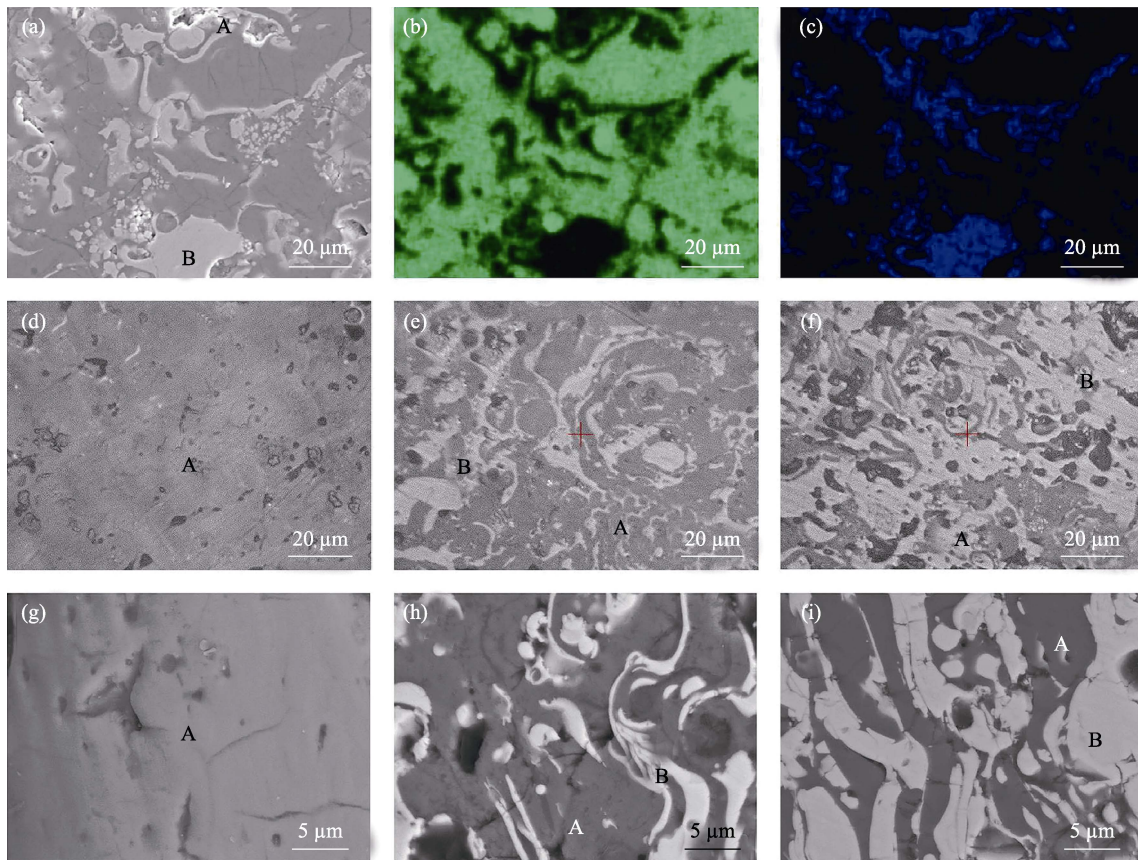


图 2 7DHA 涂层的 SEM 照片(a)和元素分布扫描照片(Ca(b)和 Zr(c)); 涂层平面(d~f)和截面(g~i)的 SEM 照片:
DHA(d, g)、7DHA (e, h)、3DHA (f, i)

Fig. 2 SEM images (a) and elemental mapping of Ca (green) (b) and Zr (blue) (c) of 7DHA coating, and SEM images of surface (d-f) and cross sections (g-i) of DHA (d, g), 7DHA (e, h) and 3DHA (f, i)

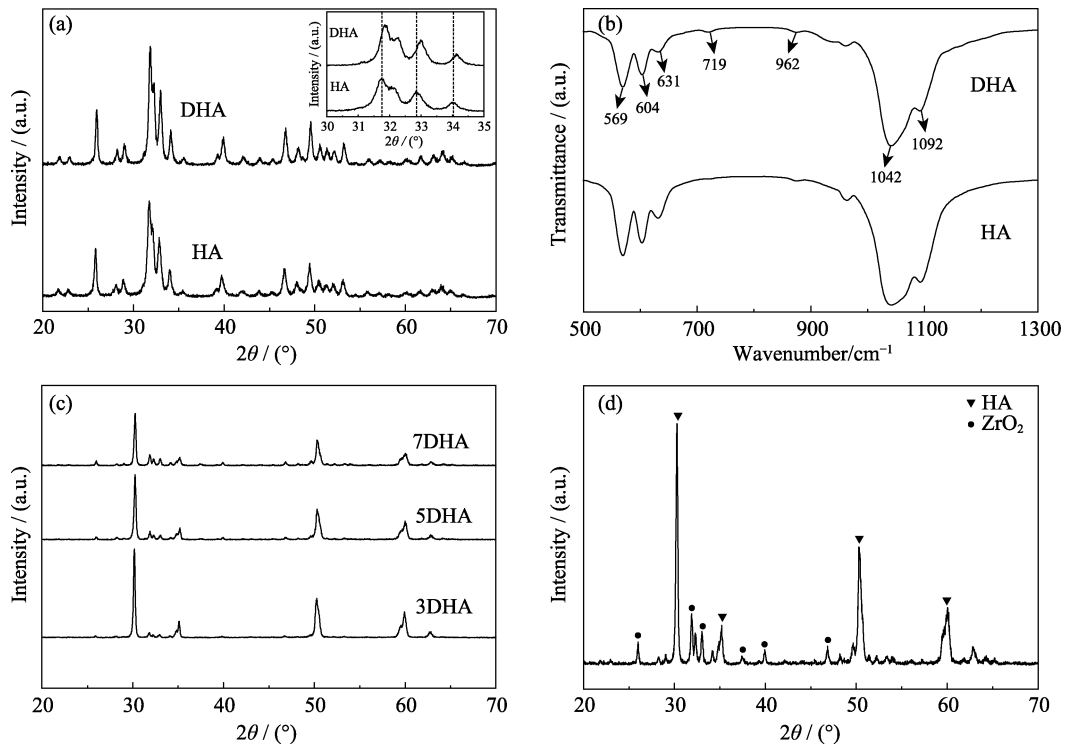


图 3 HA 和 DHA 粉体的 XRD 图谱(a)及 FT-IR 谱图 (b), DHA 涂层的 XRD 图谱(c)及 7DHA 涂层的放大 XRD 图谱(d)
Fig. 3 XRD patterns of HA and DHA powders with inset showing the enlarged parts (a), FT-IR spectra of HA and DHA powders (b), and XRD patterns of 7DHA, 5DHA and 3DHA coatings (c) with enlarged pattern of 7DHA coating (d)

谱, 图中可见羟基磷灰石的 $\text{PO}_4^{3-}\nu_4$ ($569, 604 \text{ cm}^{-1}$)、 $\text{PO}_4^{3-}\nu_3$ ($962, 1042, 1092 \text{ cm}^{-1}$)和 OH^- (631 cm^{-1}) 的振动峰, 以及 719 cm^{-1} 处的 OH^- 键振动峰。图 3(c) 是三种组分 ZrO_2 -DHA 涂层的 XRD 图谱, 三者具有相似的衍射峰相, 氧化锆特征峰随其含量增加而增强。图 3(d) 是放大的 7DHA 涂层的 XRD 图谱, 可见明显的羟基磷灰石和氧化锆衍射峰, 未见其他杂质峰相。

2.2 涂层力学性能

图 4(a) 可见, 涂层硬度和结合强度随氧化锆含量的增加而增大, 其中, DHA 涂层的硬度和结合强度分别达到 $(250.8 \pm 18.9) \text{ HV}$ 和 $(25.1 \pm 2.6) \text{ MPa}$, 3DHA 涂层的硬度和结合强度达到 $(526.2 \pm 23.6) \text{ HV}$ 和 $(46.2 \pm 4.3) \text{ MPa}$ 。不同涂层组的硬度值和结合强度值之间的差异具有统计学意义。图 4(b) 为 5DHA 涂层的拉伸断面照片, 图中可见, 涂层拉伸断面出现在基材-涂层界面、涂层内部及涂层-胶水界面, 表明 ZrO_2 -DHA 涂层的拉伸断裂属于混合型失效模式。

2.3 涂层体外生物学性能

2.3.1 涂层对细胞活力的影响

图 5 表示经过 24 h 低血清培养后各组样品对 MC3T3-E1 细胞活力的影响。DHA 组、7DHA 组、HA 组和氧化锆基材组的 OD 值分别为 (0.46 ± 0.02) 、 (0.44 ± 0.02) 、 (0.39 ± 0.01) 和 (0.37 ± 0.01) , 各组差异存

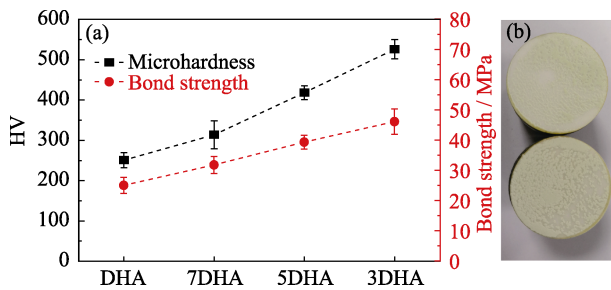


图 4 涂层显微硬度、结合强度(a)以及拉伸断面照片(b)
Fig. 4 Microhardness and bond strength of coatings (a), and the section image of stretching test (b)

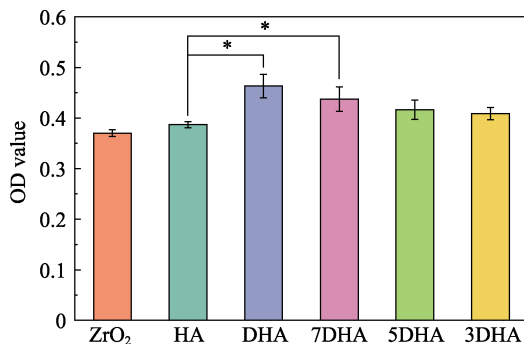


图 5 细胞活力实验 OD 值
Fig. 5 OD values of cell viability test (* $p < 0.05$)

在统计学意义, 表明 DHA 涂层和 7DHA 涂层组与 HA 涂层和氧化锆基材组相比, 具有较高的细胞活力。相对于氧化锆基材, 各种 DHA 含量涂层的 RGR 均大于 100%, DHA 涂层的最大值达到 125.3%, 提示各涂层的细胞毒性评级均为 0 级。

2.3.2 涂层对细胞黏附的影响

图 6(a~f) 是各组样品在细胞接种后第 6 h 的细胞黏附照片, 蓝色斑点为荧光染色着色的细胞核。图 6(g) 是各组样品在三个时间点细胞黏附数量柱状图。在第 6 h, HA 组、DHA 组和 7DHA 组的细胞黏附数量分别为 29.40、41.60 和 39.20, 后两组明显高于前者, 差异具有统计学意义; 但 5DHA 组和 3DHA 组的细胞黏附数量分别为 30.20、29.00, 与 HA 组相比未见明显差异。在第 1 和 12 h 可见相同的趋势。DHA 涂层和 7DHA 涂层与 HA 涂层相比促进了成骨细胞的黏附, 而随着 ZrO_2 含量的增加, 促进作用逐渐减弱。

2.3.3 涂层对细胞成骨细胞分化的影响

图 7(a~f) 是培养 14 d 的 MC3T3-E1 茜素红 S 染色照片, 可见 DHA 组矿化最明显, 其次为 7DHA 组, 两组结果均优于其他各组。图 7(g) 是 MC3T3-E1 培养 1、7 d 后的碱性磷酸酶活性柱状图。可见随培养时间的延长, ALP 活性逐渐增强; 在第 7 d, DHA 组和 7DHA 组的 ALP 活性分别达到 (0.96 ± 0.02) 和 $(0.89 \pm 0.01) \text{ OD/mg}$, 明显高于 HA 组的 $(0.82 \pm 0.01) \text{ OD/mg}$, 差异具有统计学意义。矿化染色实验和 ALP 活性实

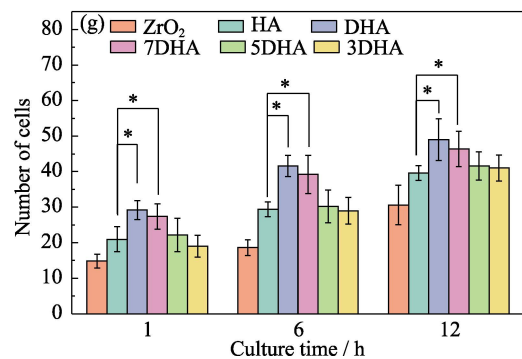
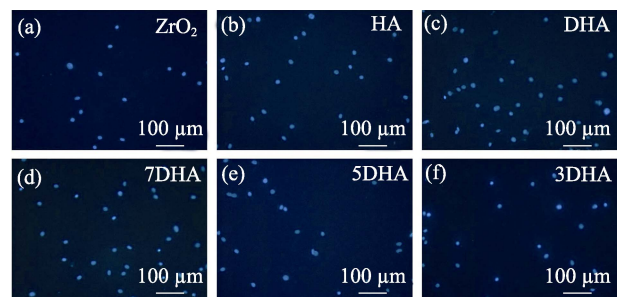


图 6 细胞黏附实验的荧光照片(a~f)和细胞黏附数量(g)
Fig. 6 Fluorescence images (a-f) and cell numbers of cell adhesion test (g) (* $p < 0.05$)

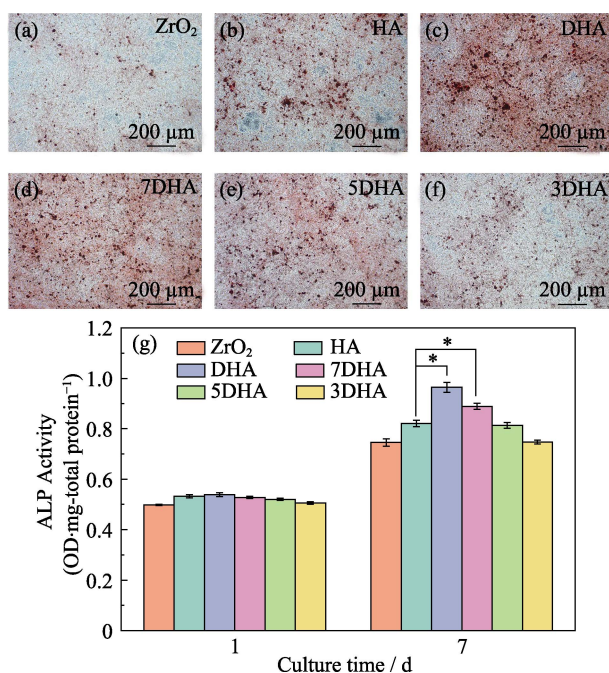


图7 MC3T3-E1 细胞茜素红染色照片(a~f)和 ALP 活性比较(g)
Fig. 7 Optical images of MC3T3-E1 cell Alizarin red S staining (a-f) and comparison of ALP activity (g) (* $p < 0.05$)

验提示, DHA 涂层和 7DHA 涂层促进成骨分化能力优于 HA 涂层。

2.3.4 涂层对细胞成骨分化相关基因表达的影响

成骨分化相关基因 *Alp* 和 *Col-I* 的相对表达见图 8。图 8(a)可见, 在细胞培养的第 1 d, 各组 *Alp*

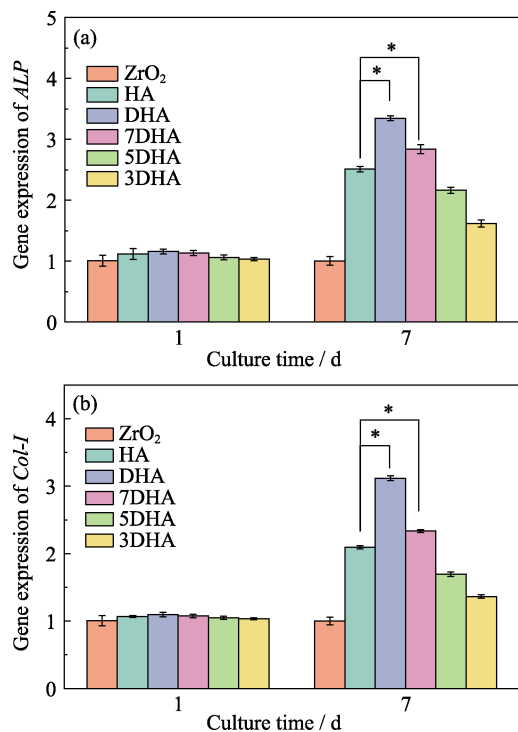


图 8 成骨相关基因表达随时间变化图

Fig. 8 Osteogenesis-related genes expression with culture time (a) *Alp* expression; (b) *Col-I* expression (* $p < 0.05$)

表达几乎未见差别。在细胞培养的第 7 d, DHA 组和 7DHA 组的 *Alp* 相对表达量分别达到 3.35 和 2.84, 明显高于 HA 组的 2.51, 差异具有统计学意义。图 8(b)中, *Col-I* 的表达情况与 *Alp* 出现相同的趋势, 提示与 HA 涂层相比, DHA 涂层和 7DHA 组可促进成骨细胞早期表达成骨功能基因。

3 讨论

体外生物学实验表明, DHA 涂层的促成骨性能优于 HA 涂层和 ZrO₂ 基材, 三种微量元素的引入是涂层促成骨性能提升的主要因素。锶是钙的同族元素, 取代 HA 中钙(1)后可使晶格尺寸增加、晶格稳定性下降^[23], 从而提高溶解度^[24]; 硅元素取代 PO₄³⁻, 使 HA 产生晶格缺陷和更多的负电表面^[25]; 氟元素引入 HA 后造成 Ca(2)空位, 引起晶格缺陷^[14]。本研究合成的 DHA 的 XRD 图谱中, 特征峰位发生了右移, 提示元素成功引入羟基磷灰石晶格中, 并导致了晶格结构改变。因微量元素引入造成的晶格缺陷提高了 DHA 在体液环境中的溶解度, 释出的 Sr²⁺ 拥有刺激成骨细胞分泌新生骨组织基质, 抑制破骨细胞活性、减少骨吸收的双重调节功能^[26-29], Si 元素和 F 则促进成骨细胞增殖和分化^[14,30-32]。体外生物学性能的研究结果表明, 本研究所制备的 DHA 涂层在促成骨性能提高方面具有多元素协同作用^[12], 相比于 HA 涂层表现出明显的优势。

成骨分化相关基因的表达数据, 从机制角度佐证了上述促成骨性能实验的结果。*ALP* 和 *Col-I* 是成骨分化标志性功能蛋白, 两者在早期成骨细胞分化、骨组织基质形成等方面发挥了重要作用。在细胞培养第 7 d, DHA 涂层的 *Alp* 和 *Col-I* 表达量是 ZrO₂ 基材的 3~4 倍, 明显高于 HA 涂层。锶元素可引起以 *Runt* 相关转录因子(*Runx2*)以及 *Wnt/β-catenin* 信号通路中的关键分子 β-连环蛋白(*β-catenin*)和卷曲 8 (*Fzd8*)的上调^[33-34], 而该信号通路在骨骼发育及骨稳态中发挥核心作用。Honda 等^[31]证明微量硅掺杂 HA 可上调成骨分化相关基因 *Alp*、*Col-I*、*Opn*、*Ocn* 和 *Runx2* 表达, Sun 等^[10]进一步检测了微量硅掺杂 HA 对多达 20 余种成骨分化信号通路相关基因的表达, 发现 *Mapk3*、*Fzd1*、*Wnt1*、*Lrp6* 和 *Bmp2* 的高表达。Li 等^[30]则证明微量氟掺杂 HA 可上调 *ALP*、*COL-I*、*RUNX2* 和 *BGLAP* 的表达, Wang 的研究^[14]进一步表明微量氟掺杂 HA 可增加 *Bmp2* 和 *Bmp4* 的表达。ZrO₂-DHA 涂层含有锶、硅、氟三种微量元素, 三种元素通过不同的分子生物学机制提高了 ZrO₂-DHA 涂层的成骨活性。

ZrO₂-DHA涂层的促成骨性能与涂层中DHA的含量呈正相关,DHA的含量越多,涂层生物学性能越好。MTT实验结果表明,DHA涂层和ZrO₂-DHA涂层对MC3T3-E1毒性评级为0;而与ZrO₂基材相比,DHA涂层和ZrO₂-DHA涂层在不同程度上增强了细胞活力。促成骨分化实验证实,DHA涂层和ZrO₂-DHA涂层的早期促成骨性能明显优于ZrO₂基材。这些结果显示ZrO₂-DHA作为涂层材料在植入体促成骨性能方面具有明显优势。

ZrO₂-DHA涂层力学性能与ZrO₂含量呈正相关,ZrO₂含量越多,涂层力学性能越好。力学性能的提升来自ZrO₂的增韧作用,最先沉积在氧化锆基材表面的ZrO₂熔融液滴,与氧化锆基材的结合力较DHA更强。DHA和ZrO₂粉体在密度、粒径等方面存在差异,熔融状态不完全一致,在氧化锆基材上沉积时相互交织、包绕和穿插,形成三维网状结构。这种结构使ZrO₂-DHA涂层对残余热应力、压应力和拉伸力的承受能力较DHA涂层明显提升,对植入体涂层在硬组织内发挥长期作用具有重要意义。

ZrO₂-DHA涂层的生物活性虽有所减弱,但7DHA涂层的早期促成骨活性仍优于HA涂层。结合生物学性能方面的优势,7DHA涂层在早期促成骨性和对植入体受到硬组织机械力的抗性均优于HA涂层,是一种理想的生物活性涂层材料。

4 结论

本研究通过等离子喷涂法在氧化锆基材上制备了锶、硅、氟微量掺杂羟基磷灰石涂层和氧化锆增韧锶、硅、氟微量掺杂羟基磷灰石涂层,为氧化锆植入体的表面改性提供了新的依据。通过涂层的力学性能和体外生物学性能的研究得到以下结论:

1) DHA涂层在体外的早期促成骨性能优于HA涂层和ZrO₂基材。

2) ZrO₂-DHA涂层的促成骨性能明显优于ZrO₂基材,这是由涂层中的DHA组分决定的。ZrO₂-DHA复合涂层的促成骨性能与DHA含量呈正相关。

3) ZrO₂-DHA涂层的力学性能明显优于DHA涂层,涂层中ZrO₂与DHA复合形成三维结构。ZrO₂-DHA涂层的力学性能与ZrO₂含量呈正相关。

4) 相对于HA涂层,7DHA涂层在体外促成骨性能和力学性能方面具有明显的优势。在氧化锆植入体表面制备DHA和ZrO₂比例为7:3的涂层,是一种具有应用前景的硬组织植入材料。

参考文献:

[1] PAYER M, HESCHL A, KOLLER M, *et al.* All-ceramic restora-

tion of zirconia two-piece implants—a randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*, 2015, **26(4)**: 371–376.

[2] BANKOGLU G M, AYDIN C, YILMAZ H, *et al.* An overview of zirconia dental implants basic properties and clinical application of three cases. *Journal of Oral Implantology*, 2014, **40(4)**: 485–494.

[3] BAN S. Reliability and properties of core materials for all-ceramic dental restorations. *Japanese Dental Science Review*, 2008, **44(1)**: 3–21.

[4] GAHLERT M, ROEHLING S, SPRECHER C M, *et al.* *In vivo* performance of zirconia and titanium implants: a histomorphometric study in mini pig maxillae. *Clinical Oral Implants Research*, 2012, **23(3)**: 281–286.

[5] KOHAL R J, WOLKEWITZ M, HINZE M, *et al.* Biomechanical and histological behavior of zirconia implants: an experiment in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, 2009, **20(4)**: 333–339.

[6] BIANCO P D, DUCHEYNE P, CUCKLE J M. Local accumulation of titanium released from a titanium implant in the absence of wear. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1996, **31**: 227–234.

[7] TSCHMITSCHKE H, BORCHERS L, GEURTSSEN W. Nonalloyed titanium as a bioinert metal—a review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2006, **96(1)**: 523–530.

[8] FRANSSON C, LEKHOLM U, JEMT T, *et al.* Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clinical Oral Implants Research*, 2005, **16(4)**: 440–446.

[9] ZHOU H, LEE J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2011, **7(7)**: 2769–2781.

[10] SUN T, WANG M, SHAO Y, *et al.* The effect and osteoblast signaling response of trace silicon doping hydroxyapatite. *Biological Trace Element Research*, 2018, **181(1)**: 82–94.

[11] XIAO S, WANG M, WANG L, *et al.* Environment-friendly synthesis of trace element Zn, Sr, and F codoping hydroxyapatite with non-cytotoxicity and improved osteoblast proliferation and differentiation. *Biological Trace Element Research*, 2018, **185(1)**: 148–161.

[12] GAO J, WANG M, SHI C, *et al.* A facile green synthesis of trace Si, Sr and F multi-doped hydroxyapatite with enhanced biocompatibility and osteoconduction. *Materials Letters*, 2017, **196**: 406–409.

[13] GAO J, WANG M, SHI C, *et al.* Synthesis of trace element Si and Sr codoping hydroxyapatite with non-cytotoxicity and enhanced cell proliferation and differentiation. *Biological Trace Element Research*, 2016, **174(1)**: 208–217.

[14] WANG L, WANG M, LI M, *et al.* Trace fluorine substituted calcium deficient hydroxyapatite with excellent osteoblastic activity and antibacterial ability. *CrystEngComm*, 2018, **20(38)**: 5744–5753.

[15] YUGESWARAN S, YOGANAND C P, KOBAYASHI A, *et al.* Mechanical properties, electrochemical corrosion and *in-vitro* bioactivity of yttria stabilized zirconia reinforced hydroxyapatite coatings prepared by gas tunnel type plasma spraying. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012, **9**: 22–33.

[16] KHOR K A, GU Y W, PAN D, *et al.* Microstructure and mechanical properties of plasma sprayed HA/YSZ/Ti-6Al-4V composite coatings. *Biomaterials*, 2004, **25(18)**: 4009–4017.

[17] 吴永智. 等离子喷涂羟基磷灰石纳米氧化锆梯度涂层的研究. 北京: 北京工业大学硕士学位论文, 2008.

[18] XIE L, WU X, LI W, *et al.* Latest research on zirconia implant surface treatment. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2017, **21(10)**: 1623–1628.

[19] SZURKOWSKA K, KOLMAS J. Hydroxyapatites enriched in silicon–bioceramic materials for biomedical and pharmaceutical applications. *Progress in Natural Science: Materials International*, 2017, **27(4)**: 401–409.

[20] ZIPKIN I, MCCLURE F J, LEE W A. Relation of the fluoride content of human bone to its chemical composition. *Arch Oral Biol*,

- 1960, **2**: 190–195.
- [21] TRUEMAN CN, TUROSS N. Trace elements in recent and fossil bone apatite. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 2002, **48(1)**: 489–521.
- [22] GBT16886.12-2017/ISO10993-12:2012, Biological evaluation of medical devices-Part 12: Sample preparation and reference materials.
- [23] FRASNELLI M, CRISTOFARO F, SGLAVO V M, *et al.* Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. *Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications*, 2017, **71**: 653–662.
- [24] NI GX, SHU B, HUANG G, *et al.* The effect of strontium incorporation into hydroxyapatites on their physical and biological properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2012, **100(2)**: 562–568.
- [25] TANG Q, BROOKS R, RUSHTON N, *et al.* Production and characterization of HA and SiHA coatings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, **21(1)**: 173–181.
- [26] CANALIS E, HOTT M, DELOFFRE P, *et al.* The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation *in vitro*. *Bone*, 1996, **18(6)**: 517–523.
- [27] BONNELYE E, CHABADEL A, SALTEL F, *et al.* Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*. *Bone*, 2008, **42(1)**: 129–138.
- [28] TAKAHASHI N, SASAKI T, TSOUDEROS Y, *et al.* S 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption *in vitro*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003, **18(6)**: 1082–1087.
- [29] BUEHLER J, CHAPPUIS P, SAFFAR J L, *et al.* Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*, 2001, **29(2)**: 176–179.
- [30] LI Z, HUANG B, MAI S, *et al.* Effects of fluoridation of porcine hydroxyapatite on osteoblastic activity of human MG63 cells. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2015, **16(3)**: 035006.
- [31] HONDA M, KIKUSHIMA K, KAWANOBE Y, *et al.* Enhanced early osteogenic differentiation by silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated *via* ultrasonic spray pyrolysis route. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012, **23(12)**: 2923–2932.
- [32] HONDA M, KIKUSHIMA K, KAWANOBE Y, *et al.* Cell proliferation, morphology and differentiation of transgenic-cloned pig calvarial osteoblasts on the silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated *via* ultrasonic spray-pyrolysis technique. *Journal of the Australian Ceramic Society*, 2011, **47(1)**: 37–41.
- [33] ZHOU J, LI B, LU S, *et al.* Regulation of osteoblast proliferation and differentiation by interrod spacing of Sr-HA nanorods on microporous titania coatings. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013, **5(11)**: 5358–5365.
- [34] YANG F, YANG D, TU J, *et al.* Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and *in vivo* bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem Cells*, 2011, **29(6)**: 981–991.