

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.007

碳 / 碳材料含硅羟基磷灰石涂层体外成骨细胞相容性研究 *

钟 萍¹ 倪昕晔¹ 周 栋¹ 熊信柏² 林 涛¹ 赵公吟¹ 徐南伟^{1Δ}

(1 南京医科大学附属常州市第二人民医院 江苏 常州 213003; 2 深圳大学材料学院 广东 深圳 518060)

摘要 目的:成骨细胞在碳 / 碳复合材料表面羟基磷灰石涂层上有良好的长入,该实验在羟基磷灰石(hydroxyapatite HA)涂层中掺入硅后,研究成骨细胞对该涂层的生物活性,为临床骨科应用提供实验基础。**方法:**本研究采用化学液相气相沉积 / 水热法在碳 / 碳材料表面制备了含硅羟基磷灰石(silicon-hydroxyapatite Si-HA)涂层。在体外成骨细胞相容性的研究中,以 HA 涂层为对照,通过甲基噻唑基四唑 (methylthiazolyl tetrazolium MTT) 法测定细胞增殖反应和对细胞毒性反应,碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase ALP)测定细胞的分化,扫描电镜观察细胞生长形态,免疫荧光显影技术测定细胞的长入。**结果:**在 HA 涂层中引入硅后,Si-HA 涂层和 HA 涂层在第 2 天、第 4 天的成骨细胞增殖实验表明前者的细胞长入数较后者多,两者的差异有统计学意义,而 Si-HA 涂层浸泡液中的 ALP 活性下降较 HA 涂层而言更明显,两者的差异有统计学意义,电镜扫描及荧光染色均提示在 Si-HA 涂层中成骨细胞的增值数更多。**结论:**在 HA 涂层中引入硅后,改变了涂层自身的晶体结构及表面电荷,同时诱导成骨细胞分泌胶原,使得成骨细胞更好的贴壁生长和增殖,成骨能力增加。在临床骨科植入物表面涂层改性上有很好的应用前景。

关键词:硅;羟基磷灰石;细胞相容性;成骨细胞

中图分类号:RQ95-3;R318.08 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)15-2827-04

In Vitro Study of the Osteoblast Compatibility of Silicon Hydroxyapatite Coatings on Carbon/carbon Material*

ZHONG Ping¹, NI Xin-ye¹, ZHOU Dong¹, XIONG Xin-bo², LIN Tao¹, ZHAO Gong-yin¹, XU Nan-wei^{1Δ}

(1 Changzhou Second People's Hospital Affiliated Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu, 213003, China;

2 Materials College of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong, 518060, China)

ABSTRACT Objective: Osteoblasts have good growth in hydroxyapatite coating on carbon/carbon composites. To evaluate the biological activity of osteoblasts to the hydroxyapatite coating includes silicon in this study, it may provide an experimental basis for clinical orthopedic applications. **Methods:** In this study, silicon hydroxyapatite (Si-HA) coating on C/C material was made by the way of chemical liquid-vaporized deposition / hydrothermal. In vitro cytocompatibility study, as the control of HA coating by MTT method for the determination of cell proliferation and cytotoxicity, Alkaline phosphatase for the cell differentiation, scanning electron microscopy for cell morphology, immunofluorescence imaging techniques for cell ingrowth. **Results:** After the introduction of silicon in the HA coating, osteoblast proliferation experiment showed that the number of cells grew into Si-HA coating more than HA coating on day 2 and day 4, there was significant difference between the two, the ALP activity in Si-HA coating soaking decreased more than it in HA coating, there was significant difference between the two, scanning electron microscopy and staining suggested that more osteoblasts added in Si-HA coating. **Conclusions:** After the introduction of silicon into HA coating, the crystal structure and surface charge of the coating changed, it induced osteoblasts secreted collagen, Si-HA coating promoted the adherent growth and proliferation of osteoblasts. It may have good prospects in clinical orthopedic implants' surface modification.

Key words: Silicon; Hydroxyapatite; Cytocompatibility; Osteoblasts

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R318.08 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)15-2827-04

前言

随着生命科学的发展,生物材料的发展,也取得了飞快的进步。全球每年这些材料^[1]的营业额都在不断的增加。碳 / 碳复合材料作为其中的一种,它的优点是弹性模量和人体骨骼接近,生物相容性良好,不会有应力遮挡效应产生,缺点是和人体

组织不能形成化学键结合,且植入人体后,表面颗粒容易脱落,分布在植入物周围,为止需要对该植入物进行表面改性,以便能更好的应用到临床骨科中。羟基磷灰石已被证实生物活性良好^[2],和人体骨骼有良好的键合。人体骨组织^[3]由有机相和无机相组成,无机相主要由羟基磷灰石组成,实际人骨中的无机组分由羟基磷灰石、硅、钠、镁、锌、和碳酸根等离子组成,因此在

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(51172147)

作者简介:钟萍(1981-),男,硕士研究生,研究方向:脊柱外科,电话:15295168576, E-mail:zp19810216@163.com

Δ 通讯作者:徐南伟, E-mail:xunanwei1963@126.com

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-12)

临床使用羟基磷灰石时,常需在其中添加一些微量元素来改善其临床活性。含硅羟基磷灰石就是其中的一类改性材料。本实验采用(Sprague Dawley, SD)大鼠骨髓原代细胞^[6]培养成骨样细胞,以 HA 涂层为对照,进行 Si-HA 涂层对细胞生长和细胞活性方面的测定,评估硅加入涂层后对成骨细胞的增殖能力和长入效果进行,探讨其成骨能力。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 大鼠由江苏省实验动物中心提供。

1.2 实验材料

HA 涂层碳 / 碳复合材料和含硅 HA 涂层碳 / 碳复合材料(由深圳大学材料学院提供),制作方法:将低密度的碳 / 碳复合材料,放入高氯酸钠溶液中进行水热处理,用蒸馏水洗净、烘干后,置于含硝酸钙、磷酸二氢氨的流动水溶液中,通过超高频电磁致热法^[9]使其表面沉积出磷酸氢钙涂层、进而将碳 / 碳复合材料磷酸氢钙涂层置于含氨水水溶液的水热釜中进行水热处理,得到碳 / 碳复合材料羟基磷灰石涂层。接着,将碳 / 碳复合材料羟基磷灰石涂层置于含有硅酸钠水溶液的水热釜中,再进行水热处理,得到碳 / 碳复合材料含硅羟基磷灰石涂层。

1.3 主要试剂及仪器

胎牛血清 (HyClone 南美); (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)培养基(Lonza 美国);胰蛋白酶(Sigma 美国);MTT(Sigma 美国);二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma 美国);倒置显微镜 Olympus; 荧光显微镜 Olympus DP73; 扫描电镜 (SU-70 日本日立); 酶标仪(BIO-RAD Model 680)。

1.4 成骨细胞的分离和培养

将 SD 大鼠使用颈椎脱臼法处死后无菌下取颅骨,去除骨膜后剪碎,加入 0.25 %胰酶消化,终止消化后用(Phosphate Buffered Saline, PBS)(pH=7.3) 洗涤三次,1000 转 / 分共 4 分钟离心收集细胞^[6]放入培养瓶中,加入(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)培养基,再加入 10 % 小牛血清,将培养瓶置于 5 % CO₂、37 °C 的培养箱中培养一周左右,隔天进行换液,除去不贴壁的细胞,培养贴壁细胞,继续传代培养,得到含成骨细

胞的培养液。

1.5 成骨细胞的增殖

将已制成的材料(深圳大学材料学院提供)直径为 1.0 cm,厚度为 0.4 cm,表面分别为 HA 涂层和 Si-HA 涂层,放入 6 孔板中,分别加入含成骨细胞的培养液 1.5 mL,完全淹没材料,加入含 10 % 小牛血清及 DMEM 培养基,放入 5 % CO₂、37 °C 的培养箱中培养 4 天,隔天加 10 % 小牛血清,以利于成骨细胞生长。分别于第 2 天,第 4 天,将培养液吸尽,PBS 冲洗材料三遍,然后加入 2.5 % 的胰酶将长入材料中的成骨细胞从材料上消化下来,加入 PBS 终止消化,再将该液体接种到 96 孔板中,加入 5 mg/mL MTT^[7]试剂 5 μ L,继续在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h,然后加入 150 μ L 二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO),10 min 后在酶标仪中测定 570 nm 波长下的吸收率。

1.6 成骨细胞碱性磷酸酶测定

分别于第 2 天,第 4 天,将上述 6 孔板中的培养液吹打均匀,分别采样,并制成 1 mL 细胞悬液,采用磷酸苯二钠法^[8]测定样品 ALP 活性。

1.7 成骨细胞生长形态观察

在第 2 天、第 4 天时将板中的培养液吸尽,用 PBS 液冲洗材料三遍后加入 2.5 % 戊二醛,4 °C 固定过夜,然后使用 30 %、50 %、70 %、90 %、95 % 乙醇逐步梯度脱水,将材料表面喷金后使用扫描电镜^[9]观察细胞生长的形貌情况。

1.8 细胞荧光染色

在第 2 天、第 4 天时将板中培养液吸尽,加入 PBS 冲洗,用甲醛进行固定 15 min,再用 5 ug/ml 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)进行荧光^[10]染色 15 min,最后用抗荧光淬灭液封片,在 OLYMPUS DP73 下观察细胞荧光染色。

2 结果

2.1 成骨细胞的增殖测定

从(表 1)MTT 测定的结果可以看出在第 2 天和第 4 天,HA 涂层和 Si-HA 涂层表面均有成骨细胞长入,且随着时间的增加,二者成骨细胞的长入数目也随之增加,而 Si-HA 涂层表面长入的成骨细胞数较单纯 HA 涂层要多,两者的差异有统计学意义(n=4,P<0.05)。

表 1 MTT 法测定
Table 1 MTT determine

Time	Hydroxyapatite	Silicon-hydroxyapatite
Day 2	0.1516 $\pm$ 0.0042	0.2765 $\pm$ 0.0051
Day 4	0.1538 $\pm$ 0.0037	0.3411 $\pm$ 0.0063

2.2 成骨细胞的 ALP 活性测定

从(表 2)得出在第 2 天 Si-HA 涂层浸泡液比 HA 涂层的浸泡液中的 ALP 活性下降更明显,而第 4 天 Si-HA 涂层的浸

泡液的 ALP 活性下降相对缓慢,两者的差异有统计学意义(n=4,P<0.05)。

表 2 碱性磷酸酶测定
Table 2 ALP determine

Time	Hydroxyapatite	Silicon-hydroxyapatite
Day 2	0.4012 $\pm$ 0.0071	0.2766 $\pm$ 0.0054
Day 4	0.3233 $\pm$ 0.0062	0.2633 $\pm$ 0.0049

2.3 成骨细胞的长入

在第2天(图1),同一视野下在涂层表面均有成骨细胞的长入,有的黏附在材料间隙,并伸出伪足,形貌不规则,Si-HA

涂层的成骨细胞数量要比HA涂层的多,在第4天(图2),两涂层表面的成骨细胞长入更好,呈群落状分布在材料的表面,Si-HA涂层的成骨细胞的密度要大于HA涂层的成骨细胞。

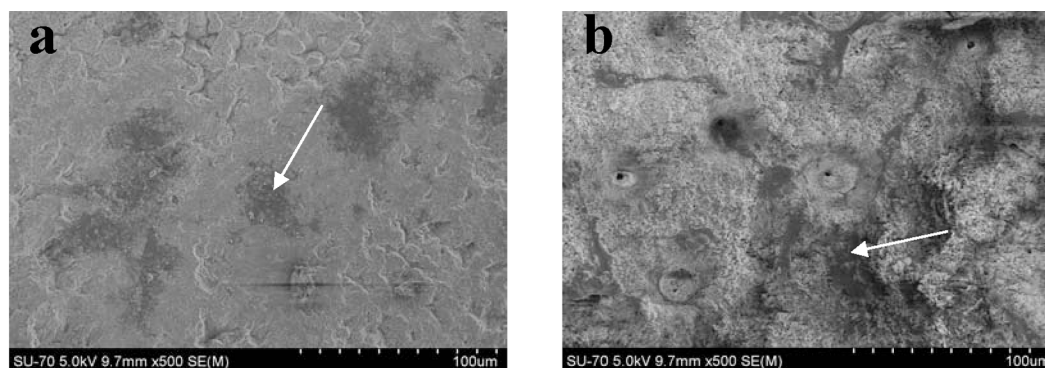


图1 第2天HA涂层(a)和Si-HA涂层(b)扫描电镜下成骨细胞

Fig.1 Osteoblast in HA coating(a) and Si-HA coating(b) Scanning electron microscope day 2

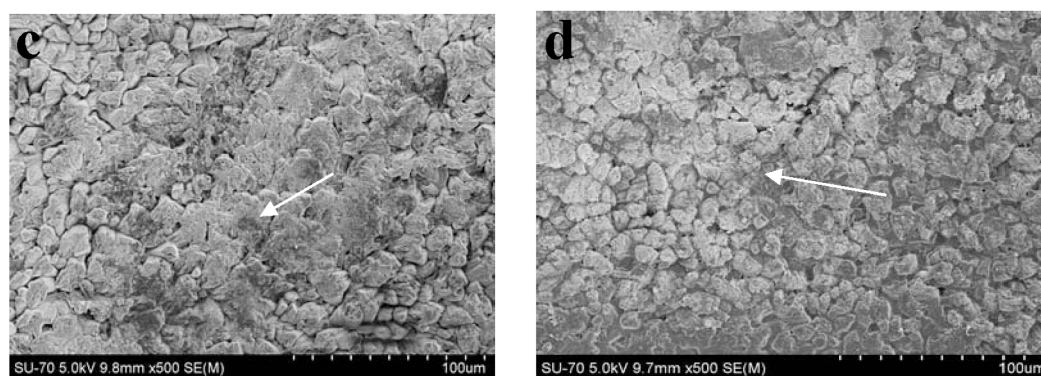


图2 第4天HA涂层(c)和Si-HA涂层(d)扫描电镜下成骨细胞

Fig.2 Osteoblast in HA coating(c) and Si-HA coating(d) Scanning electron microscope day 4

2.4 细胞荧光染色

在第2天(图3)HA涂层里的成骨细胞(白色箭头所指)呈零星状分布,而Si-HA涂层的成骨细胞较HA涂层密度更高,

到第4天(图4)同一涂层的成骨细胞密度比第2天明显增加,此时Si-HA涂层的成骨细胞增加数目更多。

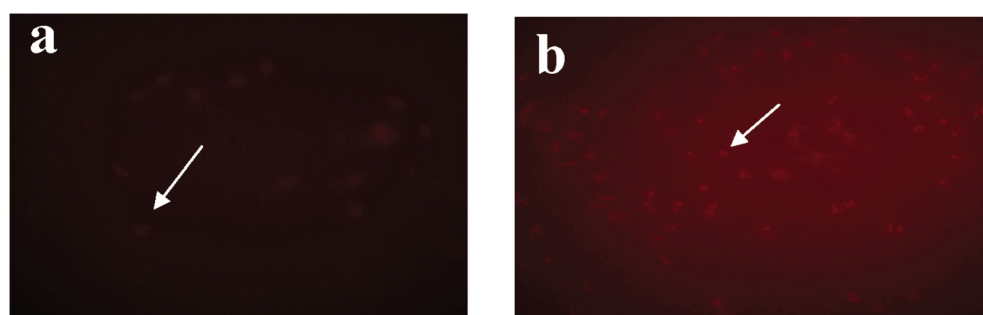


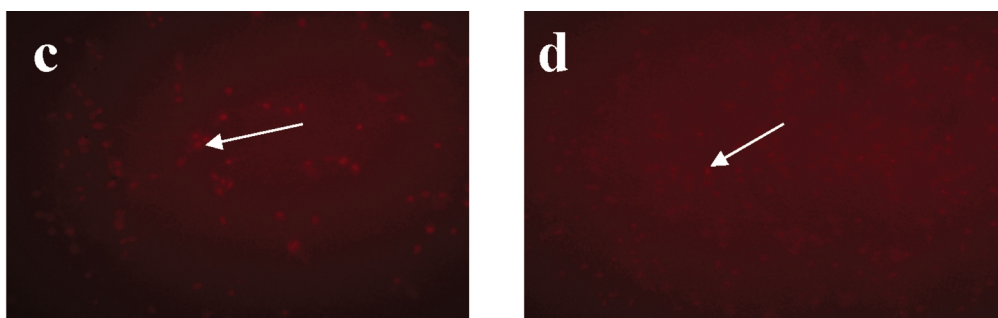
图3 第2天HA涂层(a)和Si-HA涂层(b)荧光镜下的成骨细胞(×40)

Fig.3 Osteoblast in Fluorescence microscopy in HA coating (a) and Si-HA coating (b) day 2(×40)

3 讨论

目前在临床骨科使用的植入物表面,大多都有生物活性涂层,这样可以增加植入物的生物相容性,而羟基磷灰石涂层是应用得最多和最成熟的,而在长期的临床随访中发现,随着植入物在人体内时间的增加,因涂层的松动和脱落进而导致内植

入物的稳定性困扰着临床医生,为此,研究内植入物涂层进一步改性,提高涂层的活性和稳定性显得很有必要。结合人体骨骼的无机成分,在涂层中掺入硅,有可能提高涂层的性能。本实验在人体骨骼替代物碳/碳复合材料表面覆盖上含硅HA涂层,并和单纯HA涂层进行生物活性比对。本实验MTT法检测成骨细胞增殖提示:在两种涂层中成骨细胞均有增殖,说明两

图4 第4天 HA 涂层(c)和 Si-HA 涂层(d)荧光镜下的成骨细胞($\times 40$)Fig.4 Osteoblast in Fluorescence microscopy in HA coating(c) and Si-HA coating(d) day 4($\times 40$)

涂层对成骨细胞均有良好的生物相容性和活性,有利于成骨细胞的增殖,对成骨细胞的毒性^[11]为0,从增殖数据得出:Si-HA 涂层中成骨细胞的增殖数较 HA 涂层中要多,说明在涂层中加入硅离子后对成骨细胞的增殖有很好的促进作用。已有研究报道在钛合金表面覆盖含硅 HA 涂层能提高植入物在体内外的生物活性,这可能与硅离子的加入改变了 HA 的自身结构以及降低涂层本身所带的电位有关,当硅离子加入后,将取代先前的一部分磷离子,使得硅离子能和周围的氧原子重新构成新的四面体结构^[12],相比原来的磷-氧四面体结构,成骨细胞和该结构可有更多的接触面积,这样就有利于成骨细胞更好的长入和增殖,与此同时,磷酸根被硅酸根取代后,HA 自身的负电荷^[13]发生改变,增加了负电荷,成骨细胞因电荷吸引而更易于黏附,进而能更牢靠结合在 HA 表层,有利于成骨生长及增殖,本实验在碳/碳复合材料表面覆盖含硅 HA 涂层得到了一致的结果。Kim^[14]及 J Lee 等^[15]用兔软骨细胞的增殖实验分别来评定纯 HA 涂层和 Si-HA 涂层的生物活性,实验结果显示,二者的细胞增殖数随着时间的增加而有不同程度的增加,而 Si-HA 组细胞增殖数目多于 HA 组,该实验说明 Si-HA 相比 HA 而言,是一类生物相容性更好的材料,本实验结果和它符合。另外,当硅加入 HA 后,由于硅离子的刺激作用,成骨细胞可能产生一种胶原^[16],而正是这种胶原使得成骨细胞能和 HA 更广的黏附以及散布,结合更牢靠,这样,成骨细胞能更好的长入,而该观点已经在人的成骨细胞实验中得到证实,Botelho 等^[17]进行的人成骨细胞 (HOB) 繁殖实验表明硅能够促进 HOB 细胞的增殖,具体的胶原类型需进一步的实验研究。因此,在实际临床工作中,内植入物表面有 Si-HA 涂层时,成骨细胞能更好的长入,更利于骨折的愈合,同时能使新生骨和内植入物更牢靠的结合在一起。成骨细胞在进行体外培养时,一般而言,细胞的增殖和分化^[18]呈现负相关,本实验结果表明:Si-HA 涂层的浸泡液中 ALP 较 HA 涂层少,说明在该时间段内,相比 HA 涂层而言, Si-HA 涂层能更好的促进细胞增殖,抑制细胞分化,进而可得知 Si-HA 涂层的生物活性更佳,更利于成骨细胞长入,使得内植入物的稳定性更佳。从扫描电镜看出,成骨细胞群落^[19]明显增多,密度增加,分布在材料孔隙周围,和材料黏附在一起,在该段时间内,成骨细胞群落数逐步增加,同一时间点看, Si-HA 涂层的细胞数要多于 HA 涂层,这和荧光扫描所提示的符合。这和 MTT 增殖实验的结果相符合。由此可见,在短期内, Si-HA 涂层有更好的生物相容性,更利于新骨的生成,能更好的应用到临床骨科中去。综上所述,目前国内外尚无碳/碳复合材料

表面含硅羟基磷灰石涂层的报道,本实验采用化学液相气相化沉积/水热法在碳/碳材料表面制备含硅羟基磷灰石涂层,相对羟基磷灰石涂层来讲,含硅羟基磷灰石涂层更有利于成骨细胞的长入,有更好的细胞增殖活性,这可能与硅掺入后使电位降低而有利于成骨细胞更易贴壁,同时硅掺入后改变了晶体结构,使得成骨细胞更容易长入,另外也可能为硅刺激成骨细胞产生胶原,这样使得成骨细胞易黏附涂层表面。本实验主要研究在碳/碳复合材料表面 HA 涂层的改性,可为人体植入物表面改性^[20]提供实验基础及参考,有广泛的应用前景。而长期的体外实验结果、体内实验结果及确切的机制尚待进一步实验来检验。

参考文献(References)

- [1] 隋金玲, 李木森, 吕宇鹏. 人体承重骨替换用碳/碳复合材料的研发现状[J]. 生物医学工程学杂志, 2004, 21(4): 686-689
Sui Jin-ling, Li Mu-sen, Lv Yu-peng. Progress of Researches on Carbon/Carbon Composites Used in Human Loaded Bones[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2004, 21(4): 686-689
- [2] GEESINK R G T. Hydroxyapatite-coated total hip prostheses two-year clinical and roentgenographic results of 100 cases[J]. Clinical orthopaedics and related research, 1990, 26(1): 39-58
- [3] 刘健. 纳米含硅羟基磷灰石的制备及其细胞相容性研究 [D]. 华中科技大学, 2010: 2-9
Liu jian. Preparation and cell compatibility of nanometer silicon hydroxyapatite [D]. Huazhong University of Science and Technology, 2010: 2-9
- [4] 王宾, 程云霄, 吕云霄, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞向肝细胞诱导分化研究[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(1): 169-170
Wang Bin, Cheng Yun-xiao, Lv Yun-xiao, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into hepatocytes [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2013, 30(1): 169-170
- [5] Chen Y, Wang C G, Zhao W. Fabrication of a Self-Healing Pure SiC Coating by a Two-Step Technique [J]. Acta Physico-Chimica Sinica, 2012, 28(1): 239-244
- [6] 全仁夫, 杨迪生, 苗旭东, 等. 二氧化锆梯度复合羟基磷灰石生物材料对大鼠成骨细胞体外活性的影响 [J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(11): 852-857
Quan Ren-fu, Yang Di-sheng, Miao Xu-dong, et al. Effect of graded composite zirconia-hydroxyapatite on viability of rat osteoblast cells cultured in vitro [J]. Chinese Journal of Trauma, 2006, 22(11): 852-857

- chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. *Genome Res*, 1997, 7(10):996-1005
- [18] Dastsooz H, Vahedi N, Fardaei M. DNA Sequence Fragment Containing C to A Mutation as a Convenient Mutation Standard for DHPLC Analysis[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2013, 16(8): 946-949
- [19] Hayward-Lester A, Oefner PJ, Sabatini S, et al. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC[J]. *Genome Res*, 1995, 5(5): 494-499
- [20] Oefner PJ, Huber CG, Huber A. A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 782(1-2): 27-55

(上接第 2830 页)

- [7] Gomes P S, Botelho C, Lopes M A, et al. Evaluation of human osteoblastic cell response to plasma-sprayed silicon-substituted hydroxyapatite coatings over titanium substrates [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2010, 94(2): 337-346
- [8] 王明海, 董有海, 洪洋, 等. 四种不同载体材料体外生物相容性比较[J]. *中华实验外科杂志*, 2009(11): 1539-1541
- Wang Ming-hai, Dong You-hai, Hong Yang, et al. The comparative study on the biocompatibility of four kinds of scaffolds [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2009(11): 1539-1541
- [9] 卢向东, 郭庆华, 刘强, 等. 转基因干细胞构建组织工程骨的初步实验研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2010, 33(2): 143-145
- Lu Xiang-dong, Guo Qing-hua, Liu Qiang, et al. Preliminary experimental study of genetically modified stem cells to build tissue engineering bone [J]. *Chinese Journal of Microsurgery*, 2010, 33(2): 143-145
- [10] 左林, 柏树令, 潘锋, 等. 镁合金表面含硅涂层对成骨细胞的黏附、形态和细胞周期的影响[J]. *解剖学杂志*, 2011, 34(2): 152-155
- Zuo Lin, Bai Shu-ling, Pan-Feng, et al. Influence of silicate coating on the surface of the magnesium on osteoblastic adhesion, morphous and cell cycle [J]. *Chinese Journal of Anatomy*, 2011, 34(2): 152-155
- [11] 赵彬, 翁文剑, 王慧明, 等. 含氟羟基磷灰石涂层体外细胞相容性研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2005, 24(5): 606-610
- Zhao Bin, Wen Wen-jian, Wang Hui-ming, et al. In vitro Study on the Cytocompatibility of Fluoridated Hydroxyapatite Coatings [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2005, 24(5): 606-610
- [12] Manzano M, Lozano D, Arcos D, et al. Comparison of the osteoblastic activity conferred on Si-doped hydroxyapatite scaffolds by different osteostatin coatings[J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(10): 3555-3562
- [13] Thian E S, Huang J, Best S M, et al. Novel silicon-doped hydroxyapatite (Si HA) for biomedical coatings: An in vitro study using acellular simulated body fluid [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2006, 76(2): 326-333
- [14] Kim S R, Lee J H, Kim Y T, et al. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 1389-1398
- [15] Kim S R, Lee K S, Chang J S, et al. Biocompatibility of Si-substituted hydroxyapatite[J]. *Key Engineering Materials*, 2004, 254: 135-138
- [16] Shepherd J H, Shepherd D V, Best S M. Substituted hydroxyapatites for bone repair[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012, 23(10): 2335-2347
- [17] Botelho C M, Brooks R A, Best S M, et al. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 79(3): 723-730
- [18] 陆博, 郑启新. 羟基磷灰石 / 聚 DL- 乳酸复合内固定材料对成骨细胞活性影响的体外研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2003, 22(4): 350-357
- Lu Bo, Zheng Qi-xin. An in vitro study of hydroxyapatite/ poly-dl-lactide composite internal fixation on osteoblasts [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2003, 22(4): 350-357
- [19] Kikuchi M. Hydroxyapatite/Collagen bone-like nanocomposite [J]. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2012, 36(11): 1666-1669
- [20] Liu X, Chu P K, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications[J]. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2004, 47(3): 49-121