

## 抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 表面构建成骨细胞膜片的实验研究

李抒缦<sup>1</sup>, 许雄程<sup>2</sup>, 何梦娇<sup>2</sup>, 钟泉<sup>2,3</sup>, 陈超<sup>2,3</sup>, 伍晓红<sup>2,3</sup>, 骆凯<sup>2,3</sup>

1. 福建省老年医院口腔科, 福建 福州 350003; 2. 福建医科大学口腔组织工程研究室, 福建 福州 350002; 3. 福建医科大学附属口腔医院牙周科, 福建 福州 350002

**【摘要】目的:**探讨大鼠颌骨成骨细胞在抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 表面构建细胞膜片的可行性。**方法:**体外培养大鼠颌骨成骨细胞, 采用富含维生素 C 培养基在抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 表面构建细胞膜片(细胞膜片组), 并以单纯培养基作对照(对照组), 检测膜片形成过程中碱性磷酸酶(ALP)和成骨相关基因 ALP、I 型胶原(Col-1)、骨形成蛋白 2(BMP-2)的表达情况。**结果:**采用富含维生素 C 的培养基连续培养可在抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 表面成功构建成骨细胞膜片, 该细胞膜片由多层细胞构成, 富含胞外基质。相对于对照组, 细胞膜片组的膜片形成过程中成骨细胞 ALP 活性及成骨相关基因 ALP、Col-1、BMP-2 的表达均显著增高。**结论:**在抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 表面可成功构建成骨细胞膜片, 有望与 Ti6Al4V-6Cu 联合应用于引导性骨再生术。

**【关键词】**抗菌钛合金; Ti6Al4V-6Cu; 金属; 成骨细胞; 细胞膜片

**【中图分类号】**R318; R681

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2020)12-1589-05

## Construction of osteoblast membrane sheet on the surface of antibacterial titanium alloy Ti6Al4V-6Cu

LI Shuman<sup>1</sup>, XU Xiongcheng<sup>2</sup>, HE Mengjiao<sup>2</sup>, ZHONG Quan<sup>2,3</sup>, CHEN Chao<sup>2,3</sup>, WU Xiaohong<sup>2,3</sup>, LUO Kai<sup>2,3</sup>

1. Department of Stomatology, Geriatric Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350003, China; 2. Laboratory of Oral Tissue Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China; 3. Department of Periodontology, Hospital of Stomatology Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China

**Abstract: Objective** To study the feasibility of constructing rat jaw osteoblast membrane sheet on the surface of antibacterial titanium alloy Ti6Al4V-6Cu. **Methods** Osteoblasts were isolated and cultured in vitro from jaw bone of rats firstly. Osteoblast membrane sheets were then constructed on the surface of the antibacterial titanium alloy Ti6Al4V-6Cu by using vitamin C-rich medium, and with those using pure medium as the control group, the expression of alkaline phosphatase (ALP) and osteoblast-related genes ALP, type I collagen (Col-1), and bone morphogenetic protein (BMP-2) was detected and analyzed. **Results** Osteoblast membrane sheet can be successfully constructed on the surface of antibacterial titanium alloy Ti6Al4V-6Cu by continuous culture using vitamin C-rich medium. The osteoblast membrane sheet was composed of multiple layers of osteoblasts and rich in extracellular matrix. Compared with the control group, the ALP activity of osteoblasts and the expression of osteoblast-related genes ALP, Col-1, BMP-2 were significantly increased in the osteoblast membrane sheet group during formation. **Conclusions** Osteoblast membrane sheets can be successfully constructed on the surface of antibacterial titanium alloy Ti6Al4V-6Cu, so it is hopeful to combinedly apply Ti6Al4V-6Cu to guided bone regeneration.

**Keywords:** antibacterial titanium alloy; Ti6Al4V-6Cu; metals; osteoblast; membrane sheet

**【收稿日期】**2020-06-21

**【基金项目】**福建省发改委第三批省级预算内投资计划项目; 福建省自然科学基金(2017J01805); 福建省教育厅面上项目(JA15199)

**【作者简介】**李抒缦, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 牙周再生, E-mail: yixueyuan2008@163.com

**【通信作者】**伍晓红, 硕士, 主治医师, 研究方向: 牙周病防治, E-mail: 181904719@qq.com

### 前言

当前, 临床上常采用引导性骨再生术(Guided Bone Regeneration, GBR)对牙槽骨缺损部位进行再生治疗<sup>[1]</sup>。尽管在严重骨缺损部位进行 GBR 治疗时, 采用钛网、钛膜可长期维持骨缺损的空间, 最大限度地保证新骨的形成, 但由于受到多因素的影响, 其疗效并不确切<sup>[2-4]</sup>。随着生命科学技术的发展, 组织工程技术的出现为实现牙槽骨的再生提供了新的方法。现阶段学者们报道

采用细胞膜片技术(Cell Sheet Technology, CST)可避免酶消化对细胞生物学功能的影响,最大程度地保留细胞外基质,利于细胞间及细胞与细胞外基质间的相互作用<sup>[5]</sup>。报道显示将CST应用于牙周组织工程可有效实现牙周骨缺损的再生修复<sup>[6-7]</sup>,利用骨髓间充质干细胞及牙周膜干细胞构建的复合干细胞膜片联合富血小板纤维蛋白可形成具有生理性结构的牙周组织<sup>[8]</sup>。CST在牙周组织再生中的应用使得将CST与钛网联合应用获得理想的GBR效果成为可能。课题组前期研究发现抗菌钛合金Ti6Al4V-6Cu具有良好的生物安全性<sup>[9]</sup>,本研究拟进一步探讨在该材料表面构建细胞膜片的可行性,为利用该材料制备钛网、钛膜与细胞膜片联合应用于GBR加速牙槽骨的再生提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 同批次100~120 g雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠10只,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002。大鼠饲养于南京军区福州总医院比较医学科,按啮齿类动物标准饲料喂养,环境温度(23±2)℃,湿度50%~60%,通风良好,12 h白昼和黑夜循环更替,自由饮水摄食,适应性喂养1周后进行实验。

**1.1.2 样品** Ti6Al4V-6Cu由中科院海西研究院先进制造技术集成研究所提供,规格为10 mm×10 mm×3 mm,经SiC砂纸逐级打磨,丙酮、无水乙醇、75%乙醇、三级水逐级超声清洗、烘干、高温高压消毒。

**1.1.3 试剂** DMEM培养液、胎牛血清(FBS,美国Hyclone公司);青霉素、链霉素、Triton X-100、BCA蛋白测定试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒、RIPA裂解液(上海碧云天生物技术研究);胰蛋白酶(美国Gibco公司);维生素C(美国Sigma公司);Trizol Reagent(美国Invitrogen公司);PrimeScript®逆转录试剂盒、SYBR green PCR反应试剂盒(日本大连TaKaRa生物工程公司);去RNA酶水、DEPC水(上海申能博彩生物技术公司);苏木素(上海国药集团化学试剂有限公司);伊红[中国医药(集团)上海化学试剂公司]。

**1.1.4 仪器** HEAL FORCE超净工作台(苏州净化设备有限公司);生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);细胞培养箱(德国Heraeus公司);全自动酶标仪(美国iMARK公司);电热恒温水槽(DK-8D,上海精宏实验设备有限公司);倒置相差显微镜(广州光学仪器厂);Olympus倒置相差荧光显微镜(带摄影系统)(日本Olympus公司);电子天平(德国Sartorius公司);台式离心机(Labofuge 400R,德国Heraeus公司);实时荧光定量PCR仪(LightCycler 480,德国Roche公司);生物组织包埋机、摊片烤片机(孝感宏业医用仪器有限公司);

石蜡组织切片机(德国Leica公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠颌骨成骨细胞体外培养** 无菌条件获取SD大鼠下颌骨,彻底去除肌肉、筋膜等软组织后剪成2 mm×2 mm的骨块,PBS缓冲液反复冲洗,加入0.25%胰蛋白酶消化10 min,将消化后的骨块经DMEM反复漂洗后置于培养瓶底。在培养瓶中加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,保持骨片与瓶壁紧贴,37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养。当骨片周围成骨细胞密集生长相互汇集,移除骨片,常规方法对细胞进行消化传代。

**1.2.2 大鼠颌骨成骨细胞碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)和矿化结节检测** 将颌骨成骨细胞以2×10<sup>4</sup>个/孔的密度接种于24孔板内培养,37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养24 h后更换为成骨诱导液(10%胎牛血清的DMEM培养液+10 mmol/L β-甘油磷酸钠+10<sup>-9</sup> mol/L地塞米松+50 μg/mL维生素C),培养7 d后终止培养,加入95%酒精固定。参照试剂盒操作说明进行ALP染色。颌骨成骨细胞以5×10<sup>4</sup>个/孔的密度接种于12孔板内,培养24 h后更换为成骨诱导液,每3 d换液一次,培养14 d后终止培养,95%酒精固定后Von Kossa染色观察钙结节形成情况。

**1.2.3 Ti6Al4V-6Cu表面构建颌骨成骨细胞膜片** 将颌骨成骨细胞以1×10<sup>5</sup>/孔密度接种于Ti6Al4V-6Cu表面,细胞膜片组(CST)加入膜片诱导培养液(10% FBS的DMEM培养液中加入50 μg/mL维生素C),对照组(Control)仅加入含10% FBS的DMEM培养液。每3 d更换培养液,连续培养14 d CST组可用细胞刮沿培养皿边缘小心分离获得细胞膜片,将细胞膜片经4%多聚甲醛固定、冲洗、梯度酒精脱水、浸蜡包埋、切片、苏木素-伊红染色观察膜片结构。

**1.2.4 Ti6Al4V-6Cu表面成骨细胞膜片形成过程中ALP表达检测** 颌骨成骨细胞以1×10<sup>5</sup>/孔的密度接种于Ti6Al4V-6Cu表面,CST组加入膜片诱导培养液,Control组仅加入含10% FBS的DMEM培养液。每3 d更换培养液,于7、14 d弃原培养液,PBS洗3次,加入100 μL 1% TritonX-100,震荡3 min,4℃冰箱过夜。吸取细胞裂解上清液,参考ALP试剂盒说明书用酶标仪检测各组ALP含量,结果用细胞总蛋白进行标准化。

**1.2.5 Ti6Al4V-6Cu表面成骨细胞膜片形成过程中成骨相关基因表达检测** 颌骨成骨细胞以1×10<sup>5</sup>/孔的密度接种于Ti6Al4V-6Cu表面,CST组加入膜片诱导培养液,Control组仅加入含10% FBS的DMEM培养液,每3 d更换培养液,于第7、14天采用实时荧光定量RT-PCR(qRT-PCR)检测材料表面成骨细胞成骨相关基因ALP、I型胶原(Col-1)、骨形成蛋白2(BMP-2)的表达情况。引物序列见表1。

表1 引物序列  
Tab.1 Primer sequence

基因(登记序号)	引物序列	产物大小/碱基对
骨形成蛋白2(NC_017178.1)	5'-ATGGGTTTGTGGTGGAAGTG-3'	169
	5'-TCTCGTTTGTGGAGTGGATG-3'	
碱性磷酸酶(NM_013059)	5'-CCTAGACACAAGCACTCCCACTA-3'	138
	5'-GTCAGTCAGGTTGTTCCGATTC-3'	
I型胶原(NM_053304)	5'-TCTGACTGGAAGAGCGGAGAG-3'	112
	5'-GAGTGGGGAACACACAGGTCT-3'	
GAPDH(NC_005103.3)	5'-CGGCAAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	129
	5'-ACGACATACTCAGCACCAGCATCACC-3'	

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,检测结果采用两样本 *t* 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD大鼠颌骨成骨细胞体外培养与鉴定

大鼠颌骨骨片接种至培养瓶 3 d 后,骨片周边贴

壁细胞增多,向周围移行生长,呈梭形或多边形。12~14 d 细胞汇合成片即可进行传代(图 1a)。实验选择三代以内的细胞进行。体外成骨诱导液培养的细胞 ALP 染色阳性(图 1b),连续培养 14 d 可见颗粒状矿化结节形成,Von Kossa 染色阳性(图 1c),上述结果提示所培养的细胞为成骨细胞。

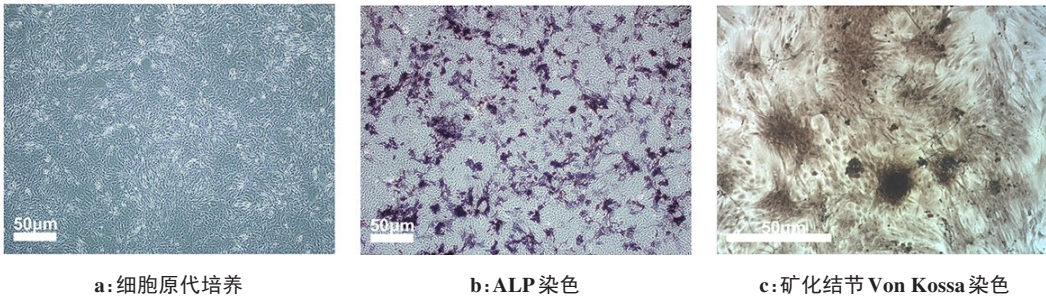


图1 成骨细胞体外培养与鉴定  
Fig.1 Culture and identification of osteoblasts *in vitro*

2.2 Ti6Al4V-6Cu表面构建颌骨成骨细胞膜片

体外培养 14 d,CST 组经膜片诱导培养液连续培养在 Ti6Al4V-6Cu 表面可观察到一薄层乳白色膜状物(图 2a),用细胞刮小心从边缘刮起可获得完整的,

具有一定韧性的细胞膜片,膜片具有一定的收缩性,而 Control 组即常规培养液处理的对照组不能形成完整的膜片。组织学染色显示所构建的颌骨成骨细胞膜片含 2~3 层细胞,富含细胞外基质(图 2b、图 2c)。

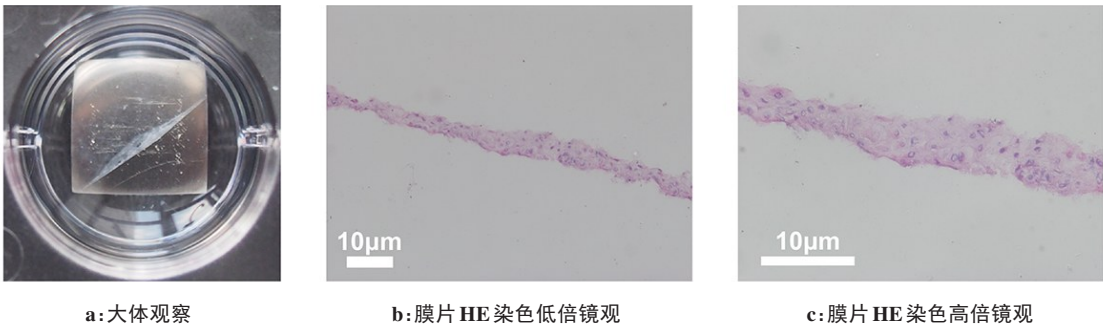


图2 Ti6Al4V-6Cu表面构建的颌骨成骨细胞膜片  
Fig.2 Osteoblast membrane sheet on the surface of Ti6Al4V-6Cu



### 2.3 Ti6Al4V-6Cu表面颌骨成骨细胞膜片形成过程中ALP的表达情况

ALP活性检测结果显示,Ti6Al4V-6Cu表面CST组在膜片诱导培养液连续诱导7、14 d后,颌骨成骨细胞的ALP活性显著高于Control组( $P<0.05$ )(图3)。

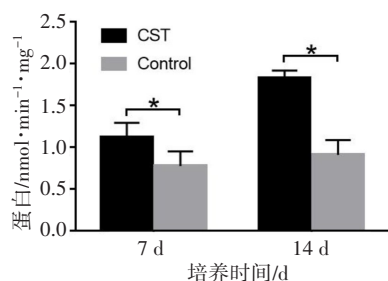


图3 Ti6Al4V-6Cu表面颌骨成骨细胞膜片形成过程中ALP活性检测( $n=6$ ,  $*P<0.05$ )

Fig.3 ALP activity in theformationof jaws osteoblast membrane sheet on the Ti6Al4V-6Cu surface ( $n=6$ ,  $*P<0.05$ )

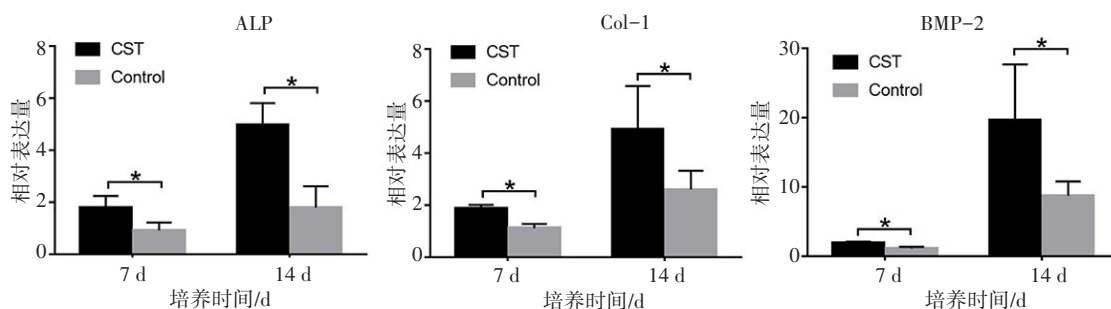


图4 Ti6Al4V-6Cu表面颌骨成骨细胞膜片形成过程中成骨相关基因表达情况( $n=6$ ,  $*P<0.05$ )

Fig.4 Osteogenesis-related gene expression in the osteoblast membrane formation on Ti6Al4V-6Cu surface( $n=6$ ,  $*P<0.05$ )

ALP:碱性磷酸酶;COL-I:I型胶原;BMP-2:骨形成蛋白2

在细胞膜片构建方面,学者们主要采用温度敏感性培养皿法<sup>[12]</sup>和维生素C连续诱导培养法<sup>[13]</sup>。维生素C诱导法无需特殊材料,简单易行,所获得的细胞膜片可满足组织再生需要,已被广泛应用于细胞膜片的相关研究中。维生素C作为人体所必需的营养素之一,在机体胶原和其他胞外基质的合成中发挥重要作用。采用维生素C连续诱导培养,不仅可上调牙周膜干细胞的端粒酶活性,促进细胞胞外基质的合成,还可增强细胞的增殖和成骨分化能力<sup>[14-15]</sup>。已有报道利用维生素C可构建出由3~4层细胞组成的富含I型胶原和纤维连接蛋白等细胞外基质的具有一定的机械性能和可操作性的犬骨髓间充质干细胞细胞膜片<sup>[16]</sup>。课题组前期报道利用维生素C连续诱导培养法成功构建出富含胞外基质的骨质疏松大鼠骨髓基质细胞膜片<sup>[17]</sup>。本实验结果也证实采用维生素C连续诱导培养可在抗菌钛合金表面形成具有一定韧性的细胞膜片,组织学染色显示该细胞膜片由多层细胞构成,膜片富含细胞外基质。

### 2.4 Ti6Al4V-6Cu表面颌骨成骨细胞膜片形成过程中成骨相关基因(ALP、Col-1、BMP-2)的表达情况

实时荧光定量PCR检测结果显示,Ti6Al4V-6Cu表面CST组在膜片诱导培养液连续诱导7、14 d,颌骨成骨细胞基因ALP、Col-1、BMP-2的表达均显著高于Control组( $P<0.05$ )(图4)。

## 3 讨论

现有的关于钛合金材料表面构建细胞膜片的相关研究还鲜有报道。毛久凤等<sup>[10-11]</sup>报道在钛片表面成功构建出成骨细胞膜片,且随着培养时间的延长,细胞膜片逐渐增厚,且通过对钛表面进行改性处理能够有效黏附细胞膜片,触发膜片的早期分化。本实验参考以往文献报道,在课题组前期研究工作基础上以颌骨成骨细胞为种子细胞,探讨在抗菌钛合金Ti6Al4V-6Cu表面构建成骨细胞膜片的可行性。

ALP是一类含锌的糖蛋白,可在碱性环境中水解各种磷酸单酯化合物底物,去除其磷酸基团,产生磷酸根离子和羟基并释放到细胞外以促使钙盐沉积,形成钙化结节。对ALP活性的检测可反映出细胞的成骨分化和钙盐沉积的能力和趋势<sup>[18]</sup>。Col-1是成骨细胞分泌的特异性细胞外基质胶原蛋白,它所形成网状结构为成骨细胞矿化功能提供重要保障<sup>[19]</sup>。研究证实,体外培养成骨细胞进入分化期后I型胶原的分泌进入高峰,因此体外环境中Col-1表达量成为成骨细胞分化程度和成骨能力的重要指标之一<sup>[20]</sup>。BMP-2是转化生长因子 $\beta$ 超家族成员之一,是一种分泌性多功能蛋白,它对稳定和加速成骨细胞的分化和矿化过程及新骨的形成都起到重要的作用<sup>[21-22]</sup>。本实验对颌骨成骨细胞膜片构建过程中成骨相关基因的检测结果表明,体外采用富含维生素C培养基连续培养,在抗菌钛合金Ti6Al4V-6Cu表面所构建的成骨细胞膜片富含ALP,同时反映细胞成骨分化能力的相关基因如ALP、Col-1及BMP-2均有显

著增加。该结果提示抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 具有良好的生物相容性,在材料表面所构建的膜片不仅富含细胞外基质,还具有一定的成骨能力。

在 GBR 治疗中常由于钛网、钛膜的暴露,引起细菌感染,最终影响骨再生效果<sup>[4]</sup>。铜离子由于具有较好的生物活性和出色的抗菌性能,常被添加到钛合金中以增强材料的抗菌能力。姚孟宇<sup>[23]</sup>报道以 Ti6Al4V 合金为基础制备的 Ti6Al4V-5Cu 具有良好的生物相容性,可促进小鼠成骨细胞在其表面粘附增殖与分化。课题组所使用的含铜钛合金材料 Ti6Al4V-6Cu 同样表现出良好的生物安全性及细胞相容性,并具有较强的抗菌性能<sup>[9,24]</sup>,有望制备成钛网、钛膜应用于临床。本实验结果进一步发现在抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 表面可成功构建出具有成骨分化能力的细胞膜片,有望与该含铜钛合金制备的钛网、钛膜联合应用于 GBR 实现牙槽骨的再生。考虑到骨组织再生过程受多因素调控,后续还需通过体内实验进一步验证抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 表面构建的细胞膜片的成骨能力并阐明其骨再生作用机制。

## 【参考文献】

- [1] SANZ-SÁNCHEZ I, ORTIZ-VIGÓN A, SANZ-MARTÍN I, et al. Effectiveness of lateral bone augmentation on the alveolar crest dimension: a systematic review and meta-analysis[J]. J Dent Res, 2015, 94(Suppl 9): 128-142.
- [2] LEE S H, MOON J H, JEONG C M, et al. The mechanical properties and biometrical effect of 3D preformed titanium membrane for guided bone regeneration on alveolar bone defect[J]. Biomed Res Int, 2017: 7102123.
- [3] DI STEFANO D A, GRECO G B, CINCI L, et al. Horizontal-guided bone regeneration using a titanium mesh and an equine bone graft[J]. J Contemp Dent Pract, 2015, 16(2): 154-162.
- [4] WATZINGER F, LUKSCH J, MILLESI W, et al. Guided bone regeneration with titanium membranes: a clinical study[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2000, 38(4): 312-315.
- [5] LU Y, ZHANG W, WANG J, et al. Recent advances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration[J]. Int J Oral Sci, 2019, 11(2): 17.
- [6] TSUMANUMA Y, IWATA T, KINOSHITA A, et al. Allogeneic transplantation of periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cell sheets in canine critical-size supra-alveolar periodontal defect model[J]. Biores Open Access, 2016, 5(1): 22-36.
- [7] 雷鸣,高丽娜,陈发明,等. 细胞膜片技术在牙周、牙髓牙本质再生中的应用研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2014, 30(5): 705-708.  
LEI M, GAO L N, CHEN F M, et al. The use of cell-sheet technology in the regeneration of periodontal tissue and pulp-dentin complex[J]. Journal of Practical Stomatology, 2014, 30(5): 705-708.
- [8] WANG Z S, FENG Z H, WU G F, et al. The use of platelet-rich fibrin combined with periodontal ligament and jaw bone mesenchymal stem cell sheets for periodontal tissue engineering[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28126.
- [9] 李抒缦,许雄程,钟泉,等. 抗菌钛合金 Ti6Al4V-6Cu 生物安全性初步研究[J]. 福建医科大学学报, 2017, 51(6): 386-390.  
LI S M, XU X C, ZHONG Q, et al. Preliminary study on the biological safety of the antibacterial titanium alloy Ti6Al4V-6Cu[J]. Journal of Fujian Medical University, 2017, 51(6): 386-390.
- [10] 毛久凤,夏茜,吴镭,等. 钛表面构建骨细胞膜片的体外研究[J]. 贵阳医学院学报, 2016, 41(5): 535-538.  
MAO J F, XIA Q, WU L, et al. Study in vitro of osteoblast cell sheet on titanium surface[J]. Journal of Guiyang Medical College, 2016, 41(5): 535-538.
- [11] 毛久凤,夏茜,吴镭,等. 不同表面处理方法对钛表面成骨细胞膜片 ALP 活性的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2016, 41(4): 410-413.  
MAO J F, XIA Q, WU L, et al. Active changes of ALP of osteoblasts cell sheet with different treated titanium surfaces[J]. Journal of Guiyang Medical College, 2016, 41(4): 410-413.
- [12] OH H H, KO Y G, UYAMA H, et al. Fabrication and characterization of thermoresponsive polystyrene nanofibrous mats for cultured cell recovery[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 480694.
- [13] WEI F, QU C, SONG T, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(9): 3216-3224.
- [14] ABDELFAHATTAH M I, HASSIB N F. The efficacy of vitamin C in the formation of periodontal ligament stem cell sheet: an in-vitro study[J]. Egypt J Hist, 2015, 38(4): 837-843.
- [15] ZHANG H, LIU S, ZHU B, et al. Composite cell sheet for periodontal regeneration: crosstalk between different types of MSCs in cell sheet facilitates complex periodontal-like tissue regeneration[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1): 168.
- [16] GUO P, ZENG J J, ZHOU N. A novel experimental study on the fabrication and biological characteristics of canine bone marrow mesenchymal stem cells sheet using vitamin C[J]. Scanning, 2015, 37(1): 42-48.
- [17] 何梦娇,江俊,郑宝玉,等. 骨质疏松大鼠骨髓基质细胞膜片的体外构建研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8): 996-1001.  
HE M J, JIANG J, ZHENG B Y, et al. Construction of osteoporotic rat bone marrow stromal cell sheet *in vitro* [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2017, 23(8): 996-1001.
- [18] WU X, ZHANG M. Effects of androgen and progestin on the proliferation and differentiation of osteoblasts[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 4722-4728.
- [19] NIE X, SUN X, WANG C, et al. Effect of magnesium ions/Type I collagen promote the biological behavior of osteoblasts and its mechanism[J]. Regen Biomater, 2020, 7(1): 53-61.
- [20] 马永海,巩栋,王伟,等. 异烟肼、利福平联合应用对体外培养成骨细胞生物活性的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(2): 141-145.  
MA Y H, GONG D, WANG W, et al. Effects of different concentrations of Isoniazide and Rifampin on the bioactivity of cultured osteoblasts *in vitro* [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2019, 25(2): 141-145.
- [21] CARREIRA A C, LOJUDICE F H, HALCSIK E, et al. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives[J]. J Dent Res, 2014, 93(4): 335-345.
- [22] ONDINE P L, OLGA S, GRIGORE B, et al. The role of bone morphogenetic proteins in tissue engineering particulate bone grafts[J]. Part Sci Tech, 2014, 32(4): 377-383.
- [23] 姚孟宇. 新型抗菌钛合金 Ti6Al4V5Cu 的生物相容性及成骨性能研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.  
YAO M Y. Study on biocompatibility and osteogenesis of Ti6Al4V5Cu, a new Cu-bearing antibacterial titanium alloy [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2016.
- [24] GUO S, LU Y, WU S, et al. Preliminary study on the corrosion resistance, antibacterial activity and cytotoxicity of selective-laser-melted Ti6Al4V-xCu alloys[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017, 72(1): 631-640.

(编辑:陈丽霞)