

仿骨成分多元掺杂羟基磷灰石体外成骨性能研究

程 瑶¹, 王 铭², 王星星¹, 徐征丽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: 羟基磷灰石因有良好的生物学活性被广泛应用于人工骨替代材料, 但纯羟基磷灰石存在的自身不足限制了其临床应用范围。人体硬组织中含有多种具有重要生化作用的微量元素, 本研究按照骨骼中微量元素含量对羟基磷灰石进行掺杂改性, 制备出一种新型仿骨成分多元掺杂纳米结构羟基磷灰石材料(HA₂)。通过碱性磷酸酶活性染色、半定量 PCR 测量和茜素红染色等不同方法对比了未掺杂纳米结构羟基磷灰石(HA₁)和多元掺杂纳米结构羟基磷灰石材料(HA₂)对小鼠成骨前体细胞(MC3T3-E1)增殖及分化的影响。碱性磷酸酶活性染色实验证明 HA₂ 比 HA₁ 具有更强的促进细胞产生 ALP 的作用; 半定量 PCR 测量证明 HA₂ 比 HA₁ 对成骨基因的表达有更为显著的促进作用; 茜素红对矿化结节的染色实验同样证明 HA₂ 比 HA₁ 更有利于成骨细胞发生矿化。相对于未掺杂纳米结构 HA₁, 多元掺杂纳米结构 HA₂ 对小鼠成骨前体细胞 MC3T3-E1 的分化及成骨有显著促进作用。多元掺杂改性使人工合成纳米结构羟基磷灰石更接近人体骨的无机成分, 具有优良的成骨性能, 是一种有前途的硬组织植入体材料。

关 键 词: 羟基磷灰石; 微量元素; 多元掺杂; 纳米结构; 成骨活性

中图分类号: Q297 文献标识码: A

Investigation on *In Vitro* Osteogenic Properties of Multiple-doped Hydroxyapatite with Natural Bone Content

CHENG Yao¹, WANG Ming², WANG Xing-Xing¹, XU Zheng-Li¹, 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: Hydroxyapatite (HA) has been widely used as artificial bone substitutes because of its good biological activity, but the disadvantages of pure HA have limited its clinical applications. In human natural hard tissues, there are many trace elements doped in hydroxyapatite, which play beneficial roles in biological actions. In this study, multi-doped nanostructured hydroxyapatite (HA₂) was synthesized by doping trace elements in HA according to the contents in human bones. Alkaline phosphatase activity staining, semi-quantitative PCR measurement (ALP, OCN and OPN) and alizarin red staining were carried out to detect the effect of pure nanostructured hydroxyapatite (HA₁) and multi-doped nanostructured hydroxyapatite (HA₂) on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells. Alkaline phosphatase activity experiments prove that the HA₂ has a stronger role than HA₁ in promoting cell production. Semi quantitative PCR measurement confirms that HA₂ is more effective than HA₁ in promoting the expression of osteogenic genes. Alizarin red staining results show that HA₂ is better than HA₁ for MC3T3-E1 cells to produce mineralized nodules. Multiple-doped nanostructured hydroxyapatite (HA₂) has an obvious promoting effect on the

收稿日期: 2016-03-08; 收到修改稿日期: 2016-05-03

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

作者简介: 程 瑶(1987-), 女, 硕士研究生. E-mail: 1600686693@qq.com

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

differentiation and osteogenesis of MC3T3-E1 comparing with the undoped nanostructured HA₁. Multi-doped nanostructured hydroxyapatite (HA₂) is more beneficial to bone formation, which has the inorganic composition more close to human bone and is a promising biomaterial for human hard tissue implants.

Key words: hydroxyapatite; trace elements; multi-doping; nanostructure; osteogenic properties

骨组织的缺损、丢失和坏死是世界范围内重要的临床难题, 其治疗结果极大地影响着患者的美观和身心健康^[1]。目前临床治疗骨缺损的方法主要包括自体骨或异体骨移植等方法。自体骨移植是骨替代的金标准, 但由于自体骨来源有限且引起新的损伤, 患者可接受度低, 制约了其临床应用^[2]。异体骨和异种骨移植存在传播疾病的风险和免疫排斥的可能^[3]。随着临床对骨替代材料要求的不断提高, 研制具有良好生物相容性、生物降解性、骨传导性的人工合成骨缺损修复材料逐渐成为治疗骨缺损领域的研究热点^[4]。

羟基磷灰石材料因与天然骨组织无机成分结构相似, 且具有良好的生物相容性、骨引导性, 使其逐渐成为临床工作中应用最为广泛的人工合成骨缺损替换植入材料之一^[5-6]。人工合成的纯羟基磷灰石材料在稳定性、骨整合速率和力学强度等方面存在不足, 这在一定范围内制约了 HA 的临床应用^[7-9]。研究发现天然骨组织的无机成分 HA, 并非完全按照标准的化学计量比 Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ 的形式存在, 而是被不同的阴离子和阳离子置取代, 天然骨的无机成分中含有镁、钠、钾、锶、硅、氟、锌、镁等多种不同的微量元素^[10-11]。微量元素掺杂羟基磷灰石是近年来的研究热点之一, 关于单一元素掺杂羟基磷灰石的研究报道较多, 如硅掺杂羟基磷灰石。纯羟基磷灰石材料易于在体内降解吸收^[12]; 氟和锌掺杂羟基磷灰石可提高抑菌性^[13-14]; 镁和锶掺杂羟基磷灰石有利于成骨细胞增殖及促进成骨^[15-16]。但是关于多种元素掺杂羟基磷灰石的研究还未见文献报道, 依据人体骨微量元素的含量, 将 Na、K、Mg、Al、Zn、Sr、Si、F 和 C 多种元素引入羟基磷灰石中, 制备出仿人体骨成分多元掺杂纳米结构羟基磷灰石材料(HA₂), 研究了 HA₂ 对 MC3T3-E1 成骨及分化性能的影响, 实验结果表明多元离子掺杂改性纳米结构 HA 能明显促进成骨作用。

1 实验方法

1.1 材料和主要仪器

1.1.1 试剂和材料制备

实验材料包括未掺杂纳米结构羟基磷灰石^[17]和

多元掺杂纳米结构羟基磷灰石粉体。以 Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 和 Ca(OH)₂ 为反应原料, 采用水热法来制备纯 HA₁ 粉体。采用 SiO₂、SrO、NaF、Mg(H₂PO₄)₂、Zn(H₂PO₄)₂·2H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、KH₂PO₄、Al(H₂PO₄)₃·H₂O 和 CaCO₃, 合成了多元离子(Si、Sr、F、Mg、Zn、Na、K、Al 和 C)掺杂纳米结构羟基磷灰石材料, 每种元素的含量与人体硬组织的含量保持在同一数量级。文献曾经报道的反应物和掺杂源大多数为可溶性硝酸盐、氯盐、铵盐、钠盐或钾盐等, 但是这些反应物容易造成 Na⁺、Cl⁻、NO₃⁻ 等外源离子通过反应物引入羟基磷灰石材料, 而本方法能够避免在羟基磷灰石材料中引入目标离子以外的杂质离子。

按照所得 HA 摩尔数为 0.005 mol, 即约 5 g 的产量进行反应。按照化学计量比称取所需 Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 和 Ca(OH)₂ 放入 120 mL 聚四氟乙烯反应釜中, 再加入 80 mL 去离子水, 用玻璃棒搅拌使之初步均匀混合。对于多元微量元素掺杂 HA, 分别配制掺杂源均匀溶液或者悬浮液, 用移液管取用所需体积加入到反应体系中, 将聚四氟乙烯反应釜放入不锈钢钢套中, 并固定在可旋转的均相反应器中, 调节温度至 150℃, 反应 12 h 后取出。待冷却后, 打开钢套和反应釜, 真空抽滤得到沉淀物, 在 80℃ 烘箱里烘干 12 h, 得到白色的羟基磷灰石粉末。

小鼠成骨前体细胞(MC3T3-E1)购自中科院细胞库; MEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素-链霉素双抗、β-甘油磷酸钠为 Gibco 公司产品; CCK-8 试剂盒、Hochest33324/PI 双染试剂盒为日本同仁化工产品; ALP 染色试剂盒为上海斯丹塞生物技术有限公司提供; 地塞米松、茜素红染色液为上海榕柏公司产品; Trizol 抽提试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒为 TakaRa 公司产品。矿化诱导液的成分为: MEM 培养基, 10%胎牛血清, 1%双抗, 50 μg/mL 抗坏血酸、10 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠。

1.1.2 仪器

5%细胞培养箱(美国热电公司); 超声仪(SZ-IIID)(上海狄昊实业发展有限公司); 离心机(5415r) (德国

艾本德公司生产); VirioSkan Flash 微光孔板检测仪; NanoDrop1000 分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司); ABI Veriti 梯度 PCR 仪(Veriti™ 96)(美国应用生物系统公司); 罗氏实时荧光定量 PCR 系统(LightCycler® 480II)(瑞士罗氏公司)。采用场发射扫描电镜(S-4800, 日立)观察 HA₁ 和 HA₂ 两种材料的微观形貌。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及实验分组设置

将小鼠成骨前体细胞(MC3T3-E1)放置在大皿内培养, 2~3 d 换液一次, 4~5 d 传代确保细胞生长状态良好。培养条件为 MEM+10%胎牛血清, 1%双抗(青霉素 1000 U/mL, 链霉素的含量为 1 mg/mL), 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养。

实验共设 4 个组, 包括一个对照组和三个实验组。对照组只加入单纯的细胞培养液; 诱导矿化组加入成骨细胞矿化诱导液; HA₁ 组加入含有 0.05 mg/mL HA₁ 的矿化诱导混悬液; HA₂ 组加入含有 0.05 mg/mL HA₂ 的矿化诱导混悬液。

1.2.2 碱性磷酸酶活性染色

将 MC3T3-E1 消化制备细胞悬液, 以每孔 20 万个细胞数目加入 6 孔板中, 孵育 24h 后细胞完全贴壁, 按照 1.2.1 中实验设计分为 4 组进行处理。每 3 天半量换液一次, 共处理 10 d, 吸出培养液, 4%多聚甲醛固定 2 min, 吸出固定液, PBS 洗 2 次, 用 TBST 润洗 2 次, 用碱性磷酸酶染液染色, 避光放置 30 min, 吸出染液, PBS 润洗 1 次, 显微镜拍照。

1.2.3 相关成骨基因检测(Real-time PCR)

将 MC3T3-E1 制成 1×10⁵ cells/mL 的细胞悬液, 铺 6 孔板, 孵育 24 h 后, 分组方法见 1.2.1, 分别在第 3、5、7、10、14 d 收集样本进行测量。Trizol 抽提细胞总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA 模板。PCR 扩增成骨相关基因, 其引物序见表 1:

实验以小鼠的 β-action 为内参。罗氏实时荧光定量 PCR 仪上机得出 CP 值进行计算。

1.2.4 茜素红染色

消化 MC3T3-E1, 以每孔 2×10⁵ 个细胞铺 6 孔

板, 待 24 h 以后, 按照上述分组进行矿化处理, 每 3 天半量换液一次至第 21 d。4%多聚甲醛固定待检测的细胞 30 min, 0.1%茜素红染色 10 min, PBS 清洗 3 次, 显微镜拍照。

1.3 统计分析

所获得的数据用 spss19.0 软件处理, 3 组以上数据用方差分析(ANOVA), 2 组之间用 *t* 检验, *p*<0.05 判断差异显著。

2 实验结果

2.1 细胞及粉体材料形貌观察

MC3T3-E1 的形貌如图 1 所示, 细胞呈长梭形, 生长状态良好。

羟基磷灰石材料的扫描电镜形貌如图 2 所示。如图 2(a)、2(c)所示, 在微米尺度上, 掺杂前后的羟基磷灰石形貌基本一致, 由(10~20) μm×0.25 μm 左右的片状结构组成。如图 2(b), 2(d)所示, 片状结构是由 20 nm×100 nm 的纳米短棒状结构排列而成。图 2(c)的插图为多元掺杂纳米结构羟基磷灰石



图 1 MC3T3-E1 细胞株
Fig. 1 MC3T3-E1 cell line

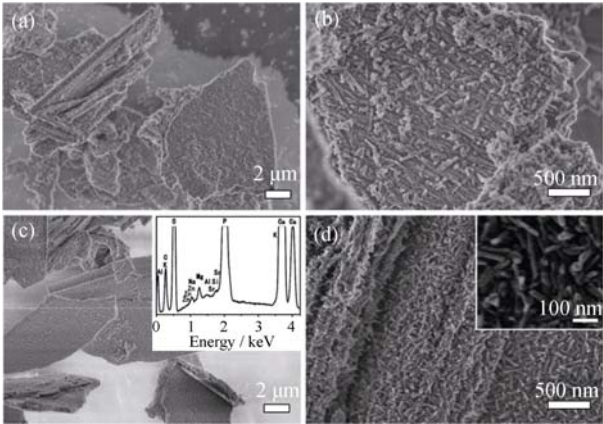


图 2 羟基磷灰石材料的 SEM 照片
Fig. 2 SEM images of hydroxyapatite materials
(a, b) HA₁ and (c, d) HA₂. Inset in (c) is EDS of HA₂, inset in (d) is the enlarge image of HA₂

表 1 成骨基因相关引物 Table 1 Gene related primers	
Gene	Sequence
ALP	F: 5'- AAGCTGGGAAGAACACTCCA-3'
	R: 5'- CAAACAGGAGAGCCACTTCA-3'
OCN	F: 5'- AAGCAGGAGGGCAATAAGGT-3'
	R: 5'- TTTGTAGGCGTCTTCAAGC-3'
OPN	F: 5'- GCAGGCATTCTCGGAGGAAA-3'
	R: 5'-TCTGAGCTGCCAGAATCAGTC-3'

的 EDS 图谱, 可见 HA₂ 中存在 Si、Sr、Mg、Al、Zn、Na、K 和 C 的多种元素。图 2(d)插图清晰显示了多元掺杂纳米结构羟基磷灰石的纳米形貌。HA₁ 与 HA₂ 的颗粒形貌及尺寸均与人体硬组织羟基磷灰石基本结构相似^[18]。

2.2 多元掺杂羟基磷灰石对细胞碱性磷酸酶活性的影响

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色结果如图 3 所示, 图片中蓝色越深代表 ALP 活性越高。对比图 3(a)与 3(b)可以看出, 矿化诱导液处理可加速细胞产生 ALP。比较图 3(b)、3(c)、3(d)可以看出, HA₁ 和 HA₂ 组比单纯矿化诱导液更易于促进细胞产生 ALP, 同时也证明 HA₂ 比 HA₁ 具有更强的促进细胞产生 ALP 的作用。

2.3 多元掺杂羟基磷灰石的成骨基因表达

不同处理组成骨相关基因表达结果如图 4~6 所示。图 4 为碱性磷酸酶(ALP)基因水平, HA₁ 和 HA₂

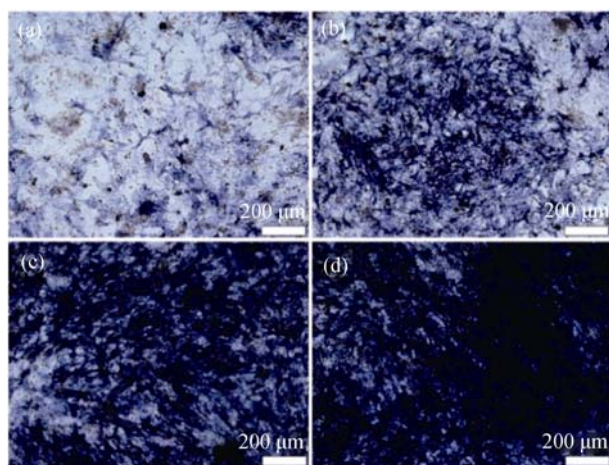


图 3 碱性磷酸酶染色照片

Fig. 3 Light microscopic photos of samples after alkaline phosphatase staining

(a) Control group; (b) Mineralization group; (c) HA₁ group; (d) HA₂ group

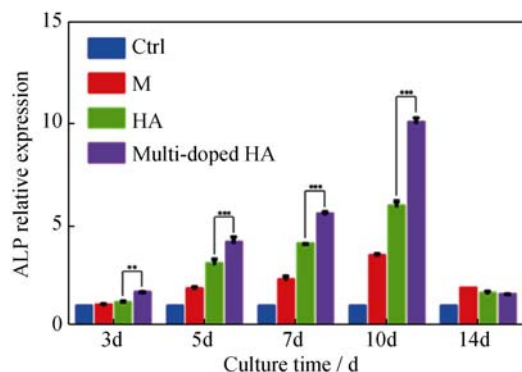


图 4 ALP 基因表达量培养时间变化图

Fig. 4 ALP genes expression with culture time

Ctrl: control group; M, M+HA₁, M+HA₂: mineralization groups (* $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.0001$)

组在处理的第 3d 就产生显著性差异($p<0.005$)。随着培养时间延长, 组间差异不断增加($p<0.0001$), ALP 基因表达水平在处理的第 10 天达到高峰。图 5 为骨钙素(osteocalcin, OCN)基因水平, 如图所示, 在处理的早期阶段不同处理组 OCN 基因水平并无明显差异, 从第 5 天起各组间逐渐产生差异($p<0.05$), 且随着培养时间延长, 组间差异性不断增大。HA₂ 处理组明显比其他组表现出更高的 OCN 水平。图 6 为骨桥蛋白(osteopontin, OPN)基因水平, 如图所示, 在处理的第 3 d, HA₁ 和 HA₂ 矿化组间差异不明显, 但这两组 OPN 的表达水平明显高于对照组和空白矿化组。不同粉体处理的差异性从第 5 天开始体现, HA₂ 处理组对 OPN 表达的促进作用明显强于 HA₁ 处理组。

2.4 多元掺杂羟基磷灰石对成骨前体细胞矿化的影响

镜下观察成骨细胞状态良好, 在第 15 天就可以看到一些有矿化小点形成, 培养至第 21 天可见典型矿化结节形成。结果如图 7 所示, 图片中红染的块

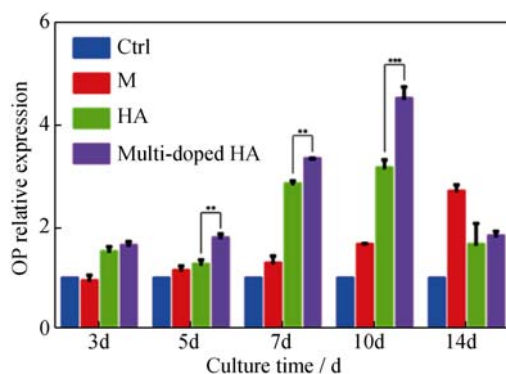


图 5 OCN 基因表达量随培养时间变化图

Fig. 5 OCN genes expression with culture time

Ctrl: control group; M, M+HA₁, M+HA₂: mineralization groups (* $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.0001$)

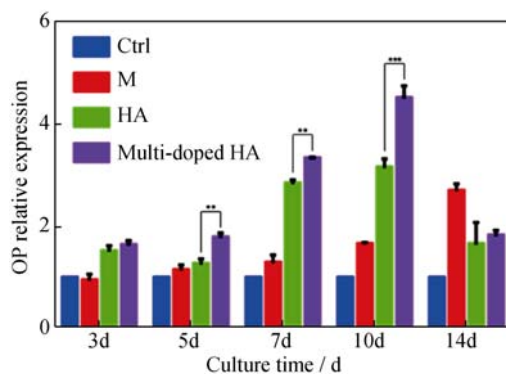


图 6 OPN 基因表达量随培养时间变化图

Fig. 6 OPN genes expression with culture time

Ctrl: control group; M, M+HA₁, M+HA₂: mineralization groups. (* $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.0001$)

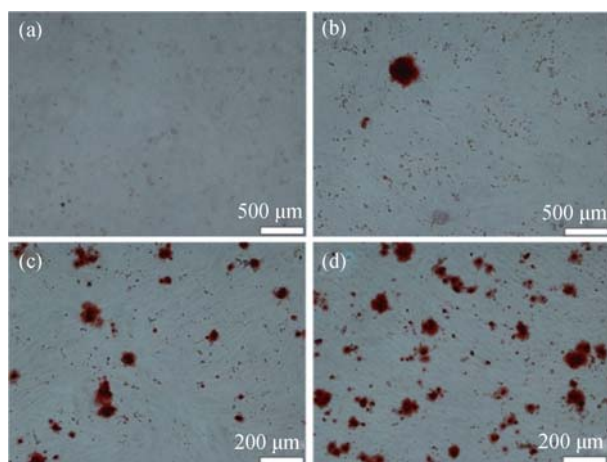


图 7 茜素红染色照片

Fig. 7 Light microscopic photos of samples after Alizarin red staining

(a) Control group; (b) Mineralization group; (c) HA₁ group; (d) HA₂ group

状结节代表成骨矿化诱导的效果。图 7(a)为对照组, 表示单纯培养基培养 MC3T3-E1 不具备成骨矿化能力。图 7(b)仅可见少量红色的矿化结节, 证明诱导液有诱导并促进细胞矿化的作用。图 7(b)、7(c)、7(d)比较可以看出 HA₁ 和 HA₂ 比单纯矿化诱导液更易于促进细胞矿化作用, 产生矿化结节, 同时也证明 HA₂ 比 HA₁ 具有更强的促进细胞产生矿化的作用。

3 讨论

生物学实验表明, 通过动态反应制备的多元素掺杂纳米结构羟基磷灰石材料表现出优良的生物学效应。通过 ALP 活性染色实验发现, 在 HA₁、HA₂ 处理 MC3T3-E1 细胞相同时间下, ALP 活性染色强度均比矿化组明显加深, 证明掺杂与非掺杂纳米结构羟基磷灰石均可促进细胞产生 ALP。但 HA₂ 组比 HA₁ 组染色更深, 证明多元掺杂改性使羟基磷灰石材料更易于促进细胞产生 ALP, 促进成骨。

多元掺杂纳米结构羟基磷灰石体外成骨性能基因水平研究表明, 三种不同的成骨基因包括碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)、骨桥蛋白(OPN), 其表达产物均与成骨作用息息相关, 其中碱性磷酸酶(ALP)可增加游离的磷酸盐, 调节细胞信号传导刺激成骨^[19-20]。骨钙素(osteocalcin, OCN)与 I 型胶原蛋白结合促进羟基磷灰石晶体成核, 与细胞成骨密切相关^[21]。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)与骨组织中的羟基磷灰石紧密结合, 参与调节骨钙的沉积, 对于细胞成骨分化具有重要调节作用^[22-23]。不同处理组成骨相关基因水平变化表明, HA₁ 和 HA₂ 均比矿化

组更易于促进成骨相关基因 ALP、OCN、OPN 的表达, 且 HA₂ 比 HA₁ 对成骨基因的促进作用更强, 表明多元掺杂更易刺激成骨相关基因的表达, 从而促进成骨。

钙结节成骨实验表明, 在第 21 天对不同处理组染色发现对照组并未产生矿化结节, 说明 MC3T3-E1 是一种成骨前体细胞, 在单纯培养液作用下不能发生矿化形成钙结节, 而矿化诱导液可以使 MC3T3-E1 矿化产生钙结节, 但红染颗粒明显少于 HA₁ 和 HA₂ 处理组, 证明两种纳米结构的羟基磷灰石粉体比矿化诱导液更易于促进细胞矿化作用, 产生矿化结节。HA₂ 组比 HA₁ 具有更多的矿化结节, 证明掺杂对成骨前体细胞矿化作用更强。

本工作中的多元掺杂纳米结构羟基磷灰石材料含有多种人体骨所含元素, 对成骨前体细胞的分化、矿化作用明显优于未掺杂纳米结构羟基磷灰石粉体。其作用机理可能是多元掺杂引入多种人体骨成分, 不同元素在细胞培养的液体环境中游离出并作用于 MC3T3-E1 细胞周围, 多种元素协同作用开启成骨信号通路, 促进成骨基因的表达及矿化产物的形成。其中的氟元素可增加其稳定性, 有利于成骨细胞附着及早期形成骨结合。硅元素的掺杂可以改变材料原有的表面结构及电荷水平, 硅、锌元素掺杂易于成骨细胞附着成骨^[24-25]。钠、氟、碳掺杂的纳米结构羟基磷灰石更接近于人体骨的无机结构相, 易于磷灰石沉积, 具有良好的生物相容性^[26]。

4 结论

实验根据人体骨骼中各微量元素的含量配比制备出仿骨成分纳米结构羟基磷灰石, 通过 MC3T3-E1 标准细胞株, 研究对比了 HA₁ 和 HA₂ 对 MC3T3-E1 成骨作用的影响。通过碱性磷酸酶染色发现 HA₂ 组碱性磷酸酶活性明显高于 HA₁ 处理组, 证明 HA₂ 可以更好地促进 MC3T3-E1 产生碱性磷酸酶。从基因角度进一步研究表明, HA₁、HA₂ 均可促进 MC3T3-E1 细胞中成骨相关三种基因表达量(ALP、OCN、OPN)的升高, 且 HA₂ 比 HA₁ 更有益于促进 MC3T3-E1 的成骨基因的表达。最后通过茜素红染色发现 HA₂ 组形成的矿化结节数目及红染范围均明显多于 HA₁ 组, 再次说明多元掺杂改性的 HA 更有益于成骨作用。本研究揭示了仿生骨材料新的生物学性能, 所制备的仿骨成分多元离子掺杂羟基磷灰石具有优良的成骨性能, 是一种有前途的硬组织植入体材料。

参考文献:

- [1] KAILASANATHAN C, SELVAKUMAR N, NAIDU V, *et al.* Structure and properties of titania reinforced nano-hydroxyapatite/gelatin bio-composites for bone graft materials. *Ceram. Int.*, 2012, **38(1)**: 571–579.
- [2] KIM J H, KIM D K, LEE O J, *et al.* Osteoinductive silk fibroin/titanium dioxide/hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, **82**: 160–167.
- [3] PAPE H C, EVANS A, KOBBE P, *et al.* Autologous bone graft: properties and techniques. *J. Orthop. Trauma.*, 2010, **24(1)**: 36–40.
- [4] TANG D, TARE RS, YANG LY, *et al.* Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Bio-materials*, 2016, **83**: 363–382.
- [5] SHAKIR M, JOLLY R, KHAN MS, *et al.* Nano-hydroxyapatite/chitosan–starch nanocomposite as a novel bone construct: synthesis and *in vitro* studies. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **80**: 282–292.
- [6] LASGORCEIX M, CHAMPION E, CHARTIER T, *et al.* Shaping by microstereolithography and sintering of macro–micro-porous silicon substituted hydroxyapatite. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 2016, **36(4)**: 1091–1101.
- [7] LI X Y, LIU H C, WANG J N, *et al.* Preparation and characterization of plla/nha nonwoven mats *via* laser melt electrospinning. *Mater. Lett.*, 2012, **73(8)**: 103–106.
- [8] MURUGAN R, RAMAKRISHNA S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Bio-materials*, 2004, **25(17)**: 3829–3835.
- [9] LI H, GONG M, YANG A, *et al.* Degradable biocomposite of nano calcium-deficient hydroxyapatite-multi(amino acid) copolymer. *Int. J. Nanomedicine*, 2012, **7(7)**: 1287–1295.
- [10] KULANTHAIVEL S, MISHRA U, AGARWAL T, *et al.* Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion. *Ceram. Int.*, 2015, **41(9)**: 11323–11333.
- [11] ZOFKOVA I, NEMCIKOVA P, MATUCHA P, *et al.* Trace elements and bone health. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, **51(8)**: 1555–1561.
- [12] PORTER A E, PATEL N, SKEPPER J N, *et al.* Comparison of *in vivo* dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials*, 2003, **24(25)**: 4609–4620.
- [13] GE X, LENG Y, BAO C Y, *et al.* Antibacterial coatings of fluoridated hydroxyapatite for percutaneous implants. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2010, **95(2)**: 588–599.
- [14] CHEN X, TANG Q L, ZHU Y J, *et al.* Synthesis and antibacterial property of zinc loaded hydroxyapatite nanorods. *Mater. Lett.*, 2012, **89**: 233–235.
- [15] ZHAO S F, JIANG Q H, PEEL S, *et al.* Effects of magnesium-substituted nanohydroxyapatite coating on implant osseointegration. *Clin. Oral Implants Res.*, 2013, **24(100)**: 34–41.
- [16] CAPUCCINI C, TORRICELLI P, SIMA F, *et al.* Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: *in vitro* osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomater.*, 2008, **4(6)**: 1885–1893.
- [17] WANG M, GAO J, SHI C, *et al.* Facile one-pot synthesis of oriented pure hydroxyapatite with hierarchical architecture by topo-tactic conversion. *Cryst. Growth Des.*, 2014, **14(12)**: 6459–6466.
- [18] SADJADI M S, MESKINFAM M, SADEGHI B, *et al.* In situ biomimetic synthesis, characterization and *in vitro* investigation of bone-like nanohydroxyapatite in starch matrix. *Mater. Chem. Phys.*, 2010, **124(1)**: 217–222.
- [19] GUNDBERG C M, LOOKER A C, NIEMAN S D, *et al.* Patterns of osteocalcin and bone specific alkaline phosphatase by age, gender, and race or ethnicity. *Bone*, 2002, **31(6)**: 703–708.
- [20] BECK G R, MORAN E, KNECHT N, *et al.* Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including *nrf2*. *Exp. Cell Res.*, 2003, **288(2)**: 288–300.
- [21] CHEN L, JACQUET R, LOWDER E, *et al.* Refinement of collagen–mineral interaction: a possible role for osteocalcin in apatite crystal nucleation, growth and development. *Bone*, 2015, **71**: 7–16.
- [22] KLANING E, CHRISTENSEN B, SORESEN E S, *et al.* Osteopontin binds multiple calcium ions with high affinity and independently of phosphorylation status. *Bone*, 2014, **66(9)**: 90–95.
- [23] CHEN Q, SHOU P, ZHANG L Y, *et al.* An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2014, **32(2)**: 327–337.
- [24] MIAO S, WENG W J, CHENG K, *et al.* Sol-Gel preparation of zn-doped fluoridated hydroxyapatite films. *Surf. Coat. Technol.*, 2005, **198(1)**: 223–226.
- [25] ROBERT J, HELEN F, DAVID V, *et al.* Synthesis, characterization and modelling of zinc and silicate co-substituted hydroxyapatite. *J. R. Soc. Interface*, 2015, **12(108)**: 20150190.
- [26] ZHANG L L, LI H J, LI K Z, *et al.* Synthesis and characterization of nanobelt-shaped na, f and carbonate multi-substituted hydroxyapatite. *Mater. Lett.*, 2015, **138(2)**: 48–51.