



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R783.1

U D C 616.31

密 级 公开

硕士学位论文

CS/siCkip-1 修饰的功能化种植体的成骨功效及体内应用研究

张 力

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 专业学位

一级学科(专业类) 口腔医学

二级学科(专业) 口腔修复学

研 究 方 向 种植体表面优化

指 导 教 师 张玉梅 教授(主任医师)

培 养 单 位 第四军医大学口腔医院修复科

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

| | |
|---|----|
| 缩略语表 | 1 |
| 中文摘要 | 3 |
| 英文摘要 | 7 |
| 前 言 | 11 |
| 文献回顾 | 13 |
| 正 文 | 27 |
| 第一部分 CS/siCkip-1 功能化种植体的制备及表面性状分析 | 27 |
| 1 材料、试剂和仪器 | 27 |
| 2 实验方法 | 28 |
| 3 实验结果 | 30 |
| 4 讨论 | 33 |
| 5 结论 | 35 |
| 第二部分 CS/siCKIP-1 功能化种植体对骨髓间充质干细胞 (rBMMSC) 行为影响的研究 | 36 |
| 1 材料、试剂和仪器 | 36 |
| 2 实验方法 | 37 |
| 3 实验结果 | 39 |
| 4 讨论 | 43 |
| 5 结论 | 44 |
| 第三部分 CS/siCkip-1 功能化种植体对骨质疏松大鼠种植体骨结合效应的评价 | 45 |
| 1 材料、试剂和仪器 | 45 |
| 2 实验方法 | 46 |
| 3 实验结果 | 48 |

| | |
|----------------|----|
| 4 讨论..... | 53 |
| 5 结论..... | 55 |
| 小 结..... | 56 |
| 参考文献..... | 57 |
| 个人简历和研究成果..... | 67 |
| 致 谢..... | 68 |

缩略语表

| 缩略词 | 英文全称 | 中文全称 |
|---------------|---|-------------|
| ALP | alkaline phosphatase | 碱性磷酸酶 |
| α -MEM | minimum essential medium, alpha modified | 最低必需培养基 |
| BCA | bicinchoninic acid | 二喹啉甲酸 |
| BMMSCs | bone marrow mesenchymal stem cells | 骨髓间充质干细胞 |
| BMP | bone morphogenic protein | 骨形态发生蛋白 |
| BSA | bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| CCK-8 | cell counting kit-8 | CCK-8 试剂盒 |
| CLSM | confocal laser scanning microscope | 激光共聚焦扫描显微镜 |
| Col-1 | collagen type 1 | I 型胶原 |
| CS | chitosan | 壳聚糖 |
| DEPC | diethylpyrocar-bonate | 焦碳酸二乙酯 |
| ECM | extracellular matrix | 细胞外基质 |
| EDX | energy dispersive X-Ray spectroscopy | 能量色散 X 射线光谱 |
| FE-SEM | field emission scanning electron microscope | 场发射扫描电镜 |
| FN | fibronectin | 层粘连蛋白 |
| miRNA | microRNA | 微小 RNA |
| mRNA | messenger ribonucleic acid | 信使核糖核酸 |
| OVX | Ovariectomy | 去卵巢 |

| 缩略词 | 英文全称 | 中文全称 |
|------------------|-------------------------------------|-----------------|
| PBS | phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| RGD | Arg-Gly-Asp peptide | 精氨酸 -甘氨酸 -天冬氨酸肽 |
| RISC | RNA-induced silencing complex | RNA 诱导的沉默复合物 |
| RUNX2 | runt-related transcription factor 2 | Runt 相关转录因子 2 |
| SDS | sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| siRNA | small interfering RNA | 小干扰 RNA |
| Ti | titanium | 钛 |
| TA | thermal-alkali | 碱热处理 |
| TiO ₂ | titanium dioxide | 二氧化钛 |
| VG | van Gieson | 苦味酸-酸性品红染色 |

CS/siCkip-1 修饰的功能化种植体的成骨功效 及体内应用研究

硕士研究生：张 力

导 师：张玉梅 教授

辅 导 教 师：赵领洲 教授

第四军医大学口腔医学院，修复科，西安，710032

资助基金项目：国家自然科学基金（81470785）

中文摘要

近年来，伴随着牙种植技术的迅速发展，种植修复已成为缺牙患者所选择的主要修复方式之一，临床种植成功率可达到 95%左右。但是，系统性骨疾病（如骨质疏松）患者仍存在骨形成能力弱、骨结合不良等现象，增加了种植失败的风险。在提高骨质疏松患者种植体骨结合的多种途径中，种植体的生物功能化被认为是一种极具前景的方法。酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1 (Ckip-1) 参与骨代谢，是成骨细胞分化和骨形成过程中至关重要的负调控因素，通过 RNA 干扰技术全身应用 Ckip-1siRNA (siCkip-1) 对其进行基因沉默，能够提高骨质疏松条件下的骨形成。因此，采用 siCkip-1 对种植体表面进行修饰有望促进种植体表面骨形成，从而提高骨质疏松患者的种植体成功率。

本研究首先采用壳聚糖（CS）作为基因载体，通过静电作用与 siCkip-1 形成 CS/siCkip-1 复合物，将该复合物加载于碱热处理种植体表面，制备得到 CS/siCkip-1 功能化的种植体，并对该种植体表面进行表面微观结构和表面性状分析；然后应用骨髓间充质干细胞，评价 siCkip-1 的转染情况及该细胞在种植体表面的增殖和成骨分化水平；最后将种植体植入骨质疏松大鼠体内，初步探索该种植体在骨质疏松条件下早期骨结合能力。通过全面评价 Ckip-1siRNA 的作用，证实其在种植体表面应

用的可行性，为骨质疏松种植体表面 siRNA 功能化修饰提供依据，为功能化种植体的表面设计提供指导。

第一部分 CS/siCkip-1 功能化种植体的构建及表面性状分析

【目的】构建 CS/siCkip-1 功能化种植体并对其表面性状进行分析，为后续体内外实验提供模型。

【方法】TA-CS/siCkip-1 种植体的制备：制备壳聚糖/Ckip-1siRNA (CS/siCkip-1) 复合物，马尔文激光粒度分析仪测量该复合物的粒径及 zeta 电位。纯钛种植体 (PT) 经过在 NaOH 溶液中加热处理，形成碱热处理钛 (TA)。将 CS/siCkip-1 复合物加载在 TA 表面，制备形成 TA-CS/siCkip-1 种植体。

TA-CS/siCkip-1 种植体的表面形状分析：扫描电镜 (SEM) 观察 PT、TA 和 TA-CS/siCkip-1 表面微观形貌。Cy-3 标记 siCkip-1，激光共聚焦逐层扫描观察 siCkip-1 在试样表面分布情况。接触角系统获取液滴图像并测量各组试样表面接触角，评价试样表面亲水性。将试样浸入 BSA 蛋白 24 h 后使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定试样表面蛋白吸附水平。

【结果】壳聚糖和 Ckip-1siRNA 通过静电作用结合，形成 CS/siCkip-1 复合物。该复合物粒径大小约为 235.9 ± 25.6 nm，zeta 电位为 $+13.7 \pm 2.77$ mV。

碱热处理后形成 TA，呈现多孔的纤维网状结构。CS/siCkip-1 复合物能够均匀的加载在 TA 种植体表面，还可进入到多孔结构内部，形成厚约 2000 nm 的 siCkip-1 层。

接触角测量结果显示，碱热处理使种植体亲水性增加，TA-CS/siCkip-1 亲水性低于 TA 组，但明显高于 PT。对各组试样表面蛋白吸附进行定量，TA-CS/siCkip-1 组蛋白吸附量显著高于 PT 及 TA 组。

【结论】壳聚糖和 siCkip-1 能够在静电作用下形成粒径分布较一致、呈正电性的 CS/siCkip-1 复合物。CS/siCkip-1 复合物能够均匀地加载在碱热处理后的种植体表面，构建出的 TA-CS/siCkip-1 种植体表现出较高的亲水性和蛋白吸附水平。

第二部分 CS/siCkip-1 功能化种植体对大鼠骨髓间充质干细胞 (rBMMSC) 生物学行为的影响

【目的】 观察 siCkip-1 的细胞转染情况, 评价 TA-CS/siCkip-1 种植体对 rBMMSCs 增殖及成骨分化能力的影响。

【方法】 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞, 将细胞接种于 TA-CS/siCkip-1 表面, 培养 48 h 后激光共聚焦观察 siCkip-1 的细胞转染情况。

rBMMSCs 接种 1、4、7 天后 CCK-8 法检测抛光组 (PT)、碱热处理组 (TA)、碱热处理-壳聚糖组 (TA-CS)、碱热处理-壳聚糖/siRNA 对照组 (TA-CS/siNC) 和碱热处理-壳聚糖/siCkip-1 组 (TA-CS/siCkip-1) 试样表面细胞增殖情况, 评价细胞活性。成骨诱导 7、14、21 天后分别检测试样表面碱性磷酸酶 (ALP) 表达、胶原分泌、细胞外基质 (ECM) 矿化水平, 评价成骨分化能力。

【结果】 培养出 rBMMSCs 细胞形态及生长状态良好, 选择 2 - 4 代细胞进行体外实验研究。细胞接种 48 h 后, 在壳聚糖的保护和携带作用下, 几乎所有的 siCkip-1 转染进入 rBMMSCs 细胞内, 分布于细胞核的周围。

与 PT 组相比, TA、TA-CS、TA-CS/siNC 和 TA-CS/siCkip-1 促进了表面 rBMMSCs 细胞增殖, 且这四组试样表面细胞增殖水平没有显著性差异。siCkip-1 在细胞内发挥 RNA 干扰作用, 促进了 ALP 的表达、胶原分泌和细胞外基质矿化。

【结论】 CS/siCkip-1 功能化的种植体表现出良好的细胞生物相容性, siCkip-1 能够高效的转染入胞, 促进 rBMMSCs 的成骨分化。

第三部分 CS/siCkip-1 功能化的种植体对骨质疏松大鼠骨结合效应的研究

【目的】 建立大鼠骨质疏松模型, 探究 TA-CS/siCkip-1 种植体植入后对骨质疏松条件下早期骨结合的影响。

【方法】 对雌性 SD 大鼠行双侧卵巢切除术, 术后 3 个月后 micro-CT 扫描评价大鼠

骨质疏松模型建立情况。

将碱热处理 (TA)、碱热处理-壳聚糖组 (TA-CS)、碱热处理-壳聚糖/siRNA 对照组 (TA-CS/siNC) 和碱热处理-壳聚糖/siCkip-1 组 (TA-CS/siCkip-1) 植入骨质疏松大鼠双侧股骨。植入后不同时期 (4 w、12 w) 评价骨结合情况, 具体方法如下: 新生骨的 Micro CT 重建分析; 组织学染色 (VG 染色) 观察; 骨-种植体界面元素扫描分析; 机械力学测定 (拔出实验)。

【结果】 双侧卵巢切除 3 个月后, Micro CT 结果显示大鼠骨质疏松建立成功。种植体植入 4 周及 12 周后骨结合分析结果: Micro CT 重建及定量分析可见, 各组种植体周围均有新骨形成, TA-CS/siCkip-1 骨量最多且结构致密; 组织学 VG 染色显示: TA-CS/siCkip-1 组新骨连续, 与种植体紧密结合; 对骨-种植体界面元素扫描, 各组种植体表面新骨的组成结构类似于正常骨, 且 TA-CS/siCkip-1 组骨厚度显著高于其它组; 各组种植体拔出力均随时间的延长而增大, TA-CS/siCkip-1 组在各个时间点最大拔出力 and 剪切强度均显著高于其它组。

【结论】 在骨质疏松条件下, TA-CS/siCkip-1 能够在体内发挥作用, 在种植体周围形成早期、良好的骨结合。

关键词: 钛种植体, 碱热处理, 骨结合, siRNA, 骨质疏松。

The osteogenic effects and in vivo application of Chitosan/siCkip-1 biofunctionalized titanium implant

Candidate for master: Zhang Li

Supervisor: Prof. Zhang Yumei

Tutor: PhD. Zhao Lingzhou

Department of prosthetic dentistry, Stomatology hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Natural Science Foundation of China (81470785)

Abstract

With the rapid development in recent years, dental implant has become one of the major prosthodontic approaches for edentulous patients, and the 10-year survival rate could be about 95%. However, patients with systemic bone disease, such as osteoporosis, still suffer from the risk of implant failure, which is due to impaired bone formation and osseointegration. There are many approaches to improve the osseointegration in osteoporotic condition, among which biofunctionalization represents a promising one. It is found that casein kinase-2 interacting protein-1 (Ckip-1) is key to bone metabolism by negatively regulating the osteoblast differentiation and bone formation. The Ckip-1 knockdown by siCkip-1 notably increases the bone formation in osteoporotic condition. Thus, Ckip-1 siRNA (siCkip-1) is a good candidate for the implant biofunctionalization to improve the bone formation, thereby to increase the success rate of dental implants.

In this study, using chitosan as a gene carrier, we prepared CS / siCkip-1 complex through electrostatic interactions, and then developed CS/siCkip-1 biofunctionalized TA Ti

implant (TA-CS/siCkip-1) by coating the CS/siR complex onto the thermal alkali (TA) treatment Ti implants. At first, we observed the implant surface microstructure and analyzed its surface properties; then we evaluated the transfection of siCkip-1, as well as the cell proliferation and osteogenic differentiation level of the rat primary bone marrow mesenchymal stem cells (rBMMSCs) on the surface of the implant; finally, the in vivo osseointegration in the osteoporotic rat model was assessed. Our study was designed to confirm the feasibility of the application of siCkip-1 by evaluating its effects comprehensively. The purpose of our study is to provide a basis for surface modification by siRNA in osteoporotic condition and to guide the design of biofunctionalized implants.

Part I Preparation and surface analysis of TA-CS/siCkip-1

[Objective] To develop TA-CS/siCkip-1 and analyze its surface properties, and provide a suitable model for the following experiments.

[Methods] The hydrodynamic size and the zeta potential of the CS/si Ckip-1 complex were examined by a Malvern zeta sizer. For TA treatment, the PT samples were soaked in sodium hydroxide aqueous solution at 60 °C. Then the CS/si Ckip-1 complex was loaded onto the TA samples, and TA-CS/siCkip-1 was developed.

The surface morphology of PT, TA and TA-CS/siR substrates were observed by scanning electron microscopy (SEM). The surface of Ti-CS/siCkip-1 with Cy3 labeled siCkip-1 was scanned by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The surface wettability of the Ti samples was evaluated by using the contact angle system. The protein adsorption of BSA was quantified by the BCA protein quantification kit.

[Results] The size of CS/ siCkip-1 complex varied from 100 to 1000 nm with an average value of $\sim 235.9 \pm 25.6$ nm. The mean zeta potential of CS/ siCkip-1 complex was about 13.7 ± 2.77 mV.

TA possessed a microporous/nanofibrous network structure. CS/siCkip-1 complex was evenly covered on the TA and could enter into the microporous and the interfibrous space. The thickness of the CS/ siCkip-1 complex layer was about 2000 nm.

TA treatment could significantly increase the surface wettability. And the contact angle of TA-CS/siCkip-1 was much lower compared to that of TA but still higher than that of PT. TA-CS/siCkip-1 resulted in significantly enhanced protein adsorption amounts which were even higher than those induced by PT and TA.

[Conclusion] CS/siCkip-1 complex formulated by electrostatic interaction owned low poly dispersion index and showed positive charge. The complex could cover on the TA implants evenly. TA-CS/siCkip-1 showed enhanced wettability and protein adsorption ability.

Part II The regulation of TA-CS/siCkip-1 on biological function of rBMMSCs

[Objective] To evaluate the proliferation and osteogenic differentiation of rBMMSCs on TA-CS/siCkip-1 implants.

[Methods] The rBMMSC cells were isolated using all bone marrow adherence method and seeded on TA-CS/siCkip-1 with Cy3 labeled siCkip-1. After culturing for 24 hours, the transfection of siCkip-1 was observed by confocal laser scanning microscopy. 1, 4 and 7 days after seeding, the cell proliferation was evaluated quantitatively using CCK-8. At predetermined time points, the alkaline phosphatase (ALP) production, collagen secretion and extracellular matrix (ECM) mineralization were measured to evaluate the osteogenic differentiation of MSCs on the Ti samples

[Results] The cells at passage 2–4 were used in the experiments. 48 h after the cell seeding, almost all the siCkip-1 was located surrounding the cell nucleus, indicating a successful cellular internalization of the CS/si Ckip-1 complex.

Compared to PT, TA led to significantly higher cell proliferation. No apparent difference in cell proliferation was observed among TA, TA-CS, TA-CS/siNC and TA-CS/siCkip-1 at all time slots. TA-CS/siCkip-1 generated much more ALP and collagen product and better ECM mineralization than all the controls.

[Conclusion] TA-CS/siCkip-1 showed good biocompatibility, and siCkip-1 could enter

into the cells and improve the proliferation and osteogenic differentiation of rBMMSCs.

Part III The effects of TA-CS/siCkip-1 on osseointegration of osteoporotic rat

[Objective]To establish the rat osteoporosis model and evaluate the effect of TA-CS/siCkip-1 on the osseointegration in osteoporotic condition.

[Methods]The female SD rats underwent bilateral ovariectomy (OVX) ,and after three months the femurs were scanned by micro-CT.

The implants were inserted into the femurs of the osteoporotic rats. After 4 and 12 weeks, the osseointegration was evaluated using Micro-CT reconstruction and quantitative analysis, histological observation (Van-Greson staining), EDX scanning of bone-implant interface and biomechanical assessment(pull-out test).

[Results]Micro-CT showed that the osteoporotic model was successful established. Micro-CT indicated that the new bone formation around TA-CS/siCkip-1 was far better than the controls. VG staining showed that the bone on TA-CS/siCkip-1 was continuous and closely contacted the implant surface. The line-scanning indicated that TA-CS/sickip-1 had the maximum range of newly formed bone around implants, as indexed by the Ca and P rich substance. Bone-implant bonding strength increased with the healing time from 4 to 12 weeks. TA-CS/siCkip-1 showed obviously higher maximal pull-out force and ultimate shear strength compared to the three controls at both time slots.

[Conclusion] In vivo, TA-CS/siCkip-1 could significantly improve the osseointegration in osteoporotic condition.

Key words: titanium implants; biofuncionalization; siRNA; osseointegration; osteoporosis.

前 言

随着种植体设计的不断优化，牙科种植体在近年来取得了巨大发展，十年成功率可达到 95%^[1]。早期、良好的种植体骨结合的形成决定着种植体加载受力和长期稳定，与种植的成功密切相关。因此，快速地建立骨结合是口腔种植体研究和发展的目标^[2]。骨结合受到多种因素影响，全身疾病如骨质疏松、糖尿病都不利于骨结合的形成。骨质疏松是一种以骨量减少、骨组织微结构退化和再生能力减弱为特点的系统性的疾病，是最常见的人类代谢性骨疾病。骨质疏松条件下，患者自身骨质量降低、骨再生能力下降，造成了骨结合形成过程中骨重建的不平衡。种植体骨结合强度减弱、形成时间延长，无法发挥早期和长期支持作用，甚至会造成种植体脱落导致种植的失败，限制了骨质疏松患者牙种植体的应用^[3]。

表面处理是提高种植体骨结合的有效途径。针对种植体表面处理的研究主要包括两个方面^[4]：一方面，表面形貌修饰如表面形貌纳米化，多种物理化学技术可以构建纳米化的种植体表面，影响骨形成。另一方面，表面生物修饰如加载生物因子实现表面功能化。细胞外基质蛋白、生长因子等都可作为生物因子加载于种植体表面，对体内外骨结合发挥促进作用。RNAi 是基因治疗的重要组成部分，主要包括 miRNA 及 siRNA 两个方面，近年来在多种疾病包括骨质疏松治疗方面得到广泛研究^[5]。RNAi 技术可与种植体表面处理相结合，调控影响成骨分化。我们课题组前期研究中，将 miR-29b、miR-148b 和 anti-miR-138 加载在微弧氧化钛表面，显示出对成骨分化的促进作用，为生物材料的 miRNA 修饰提供了依据。然而，siRNA 修饰的功能化种植体在以往文献中未见报道。

siRNA 在基因载体携带下，能够有效转染入胞，并到达特定区域与相应的 mRNA 形成 RNA 诱导沉默复合物（RISC complex），降解 mRNA 抑制编码特定蛋白的靶基因的表达。siRNA 由于其高度特异性、固有生物学效应和良好的基因沉默效率，转染后可以引起特定基因有效的长久的转录后基因沉默，被用于多种疾病治疗的研究。骨质疏松是一种多过程、多因子参与的系统性疾病，随着大量目标靶点的出现和 RNAi 研究的不断深入，siRNA 用于骨质疏松治疗具有巨大的潜力^[6]。酪蛋白激酶 2

相互作用蛋白 1 (Ckip-1) 是成骨细胞分化和骨形成过程中至关重要的负调控因素，Ckip-1 通过其 PH 区与 Smad 泛素化调节因子 1 (Smurf1) 的 WW 结构域结合，促进 Smurf1 对底物的作用，增强其抑制成骨细胞活性的功能，负向影响骨形成，可作为治疗骨质疏松的靶点^[7]。采用 RNAi 全身应用 Ckip-1siRNA 进行基因敲除，已显示出在骨质疏松条件下的成骨促进功能。

本研究中，拟将 siCkip-1 与壳聚糖基因载体结合，形成 CS/siCkip-1 复合物。将该复合物加载于碱热处理种植体表面，制备形成 CS/siCkip-1 生物功能化的种植体。全面评估其在体内外的成骨效应，以达到提高骨质疏松条件下种植体骨结合的目的，为对骨质疏松或其它疾病有治疗作用的 siRNA 的种植体表面加载提供依据。

文献回顾

种植体骨结合与骨质疏松

1. 种植体骨结合

种植体骨结合理论最初是由等 Branemark 等人提出的，最早被定义为：种植体表面直接的骨沉积。随着相关研究的发展和深入，拓展为在整齐排列的活性骨和受力种植体之间直接的结构和功能的结合^[8]。种植体骨结合的过程和直接的骨折愈合过程相类似，都存在着特定界面新骨形成而产生的结合。两者之间根本区别在于，种植体骨结合不是将骨和骨结合在一起，而是骨与一种外来的材料即种植体表面发生作用，最终产生结合。在此过程中，骨与植入种植体界面新骨形成，两者之间无纤维结缔组织和纤维软组织的形成。骨结合的形成对于植入体稳定是至关重要的，被认为是种植体加载受力和保证临床长期成功率的先决条件^[9]。快速的建立骨结合是口腔种植体研究和发展的目标，它可以改进和扩大牙科种植体的系统适应症，使种植体更好的发挥修复缺失牙，恢复患者口腔功能和美观的作用。

骨结合的过程是一个复杂的时间依赖性的愈合过程，涉及到初始的牙槽骨和植入体之间的机械锁合和后来通过不断骨附着和重构形成的生物学固定。大量的因素影响着种植体表面骨的形成与稳定，不仅包括生物材料的生物相容性，还有机械环境与生理环境的改变。总的来说，骨结合的过程是由骨基质的损伤激发的。种植体植入手术后，骨组织受到刺激和损伤，骨基质暴露于细胞外液，促进非胶原蛋白和生长因子的释放，激活骨髓中骨原细胞，它们在趋化作用下迁移到损伤部位，分化增殖为成骨前细胞和成骨细胞，并在缺陷壁、骨断端和种植体表面上开始骨沉积，破骨细胞并不参与这一过程。骨结合的形成被激活后，正常情况下骨修复过程主要分为三个阶段：编制骨的形成、骨量的沉积和骨结构的改建^[2, 10]。编制骨是最早形成的骨组织，是一种原始类型的骨组织，其特点是随机交织的胶原纤维、形状不规则的骨细胞和起初相对较低矿物质密度。它可形成棒状和板状的支架，以较快的速度延伸到周围组织。早期形成的编制骨可以作为桥梁，从周围组织延伸到种植体表面，

在填充创伤形成的空隙中发挥重要作用,这一过程在种植体植入后持续 4-6 周。随后,开始了骨量沉积的过程。骨量沉积是骨微结构变化的结果,主要表现为平行排列的纤维骨及层状骨的沉积。层状骨是最理想的骨形态,有最高的强度,平行排列的纤维骨是介于两者之间的中间形态。骨改建和重塑是骨结合的最终阶段,起于种植体植入手术后第三个月,经过快速期后逐渐变缓,伴随着人的一生。骨改建使骨组织能适应受力:一方面,能改善骨质量,以成熟板层骨取代原有的坏死骨和/或最初形成的原始的编织骨;另一方面,它会引起骨骼形态和排列方向及功能上的改变,从而使其能够不断地适应负载。骨改建过程中,成骨和破骨同时进行,两者在正常情况下一直处于平衡状态且这种平衡的机制是多因素的、复杂的,若平衡失调,则会影响种植体骨结合^[11]。

种植体良好的初期稳定性及骨结合的形成依赖于相互关联的各个部分,一方面是与植入体及种植手术因素,如种植体良好的生物相容性、种植体表面设计的宏观和微观结构(表面形貌,表面粗糙度,机械强度等)、正确的手术方法、不受干扰的愈合期和适宜的受力情况等密切相关^[2]。另一方面,取决于患者的身体状况。与正常人良好的骨质骨量相比,糖尿病、骨质疏松等系统性疾病及吸烟饮酒等不良生活习惯会干扰骨正常愈合的过程,引起过量的骨吸收,最终导致骨质和骨量的破坏,被认为是种植体失败的危险因素^[12, 13]。

2. 骨质疏松症与种植体骨结合

骨质疏松是一种以骨量减少、骨组织微结构退化和再生能力减弱为特点的系统性的疾病,是最常见的人类代谢性骨疾病^[14]。它主要影响绝经后妇女与老年人群,已成为一个严重的社会问题。骨质疏松条件下,破骨细胞的活动远远大于成骨细胞。骨吸收与骨形成的不平衡,骨再生和重建能力受损,导致骨量显著降低,骨的微观结构被破坏。骨基质包括胶原纤维的属性、矿物/基质比、碳磷比、基质蛋白的分布、骨晶体的成核和微观结构、物理化学成分发生变化。矿化的胶原纤维质量下降, Ca/P 比下降,骨晶体形成受阻,骨的矿化程度、晶粒大小和晶体形状不同于健康骨。变化的骨结构和成分影响骨的物理性质,包括骨的硬度、溶解度、脆性和热稳定性。

骨质疏松影响全身骨骼,包括颌面部骨^[15]。骨质疏松患者颌骨骨骼结构和属性的改变类似于其他部位的骨,缺牙部位牙槽骨质量下降,导致颌骨骨强度降低,骨密度减小,骨皮质量降低。对骨质疏松条件下的种植体骨结合进行分析,可以发现

骨质疏松会降低种植体周围骨形成和骨改建能力，影响骨结合形成^[16]。骨质疏松条件下，种植体周围成骨过程与正常骨相似，但又有着自身的特点。以往研究者^[17, 18]观察了纯钛种植体和羟基磷灰石涂层钛种植体植入后 7 天至 168 天整个愈合过程，比较正常和骨质疏松条件下的种植体周围成骨情况发现，正常情况下，随着时间的增长，种植体周围骨量和骨种植体接触率都是呈不断增长趋势。但是，在骨质疏松条件下，特别是骨松质内，由于骨骼结构和机械强度变化，骨形成细胞（成骨细胞）的数量减少，破骨细胞的活性增加，骨再生能力下降，造成骨结合形成过程中骨重建的不平衡。Motahashi 等研究发现，骨质疏松情况下，种植体植入后，骨再生过程发生变化，种植体周围新生的支持骨骨小梁量减少，骨微结构不良，引起骨种植体接触百分比和骨种植体界面机械强度较正常情况下明显降低，不能为骨结合提供足够的稳定性，种植体结合强度减弱且形成时间延长。这些都不利于种植体获得良好的初期稳定性、发挥早期和长期支持作用，最终甚至会造成种植体脱落，从而导致种植的失败。因此，骨质疏松是牙种植体的危险因素之一，是临床缺牙患者和医务人员选择种植作为修复方式时的必要考虑因素。

Fini M 等^[3]研究了骨结合相关的因素，全面分析了骨质疏松条件下种植体骨结合能力降低的原因，认为与以下几个方面共同作用相关：（1）骨结构和机械性能的变化；（2）有成骨分化能力的间充质细胞数的减少；（3）破骨细胞的数量和活性的增加；（4）骨重建过程中有关合成代谢和分解代谢局部因素（生长因子和细胞因子）之间的不平衡；（5）对全身和局部刺激（激素，生长因子和细胞因子）异常的细胞反应性和机械应力。这些生理上的变化，引起骨微观结构和生物力学性质的变化，增加在骨质疏松条件下骨生物材料植入后失败的风险。D'Ippolito G 等发现，随着年龄的增加，有成骨分化能力的间充质细胞数数目减少，可能与年龄相关的骨质疏松条件下，骨形成能力的降低有关^[19]。Torricelli 等比较健康的和骨质疏松来源的成骨细胞，观察到两种来源的细胞在细胞增殖率、I 型胶原、骨钙素（OC）、TGF- β 1 和 IL-6 的合成等方面存在差异^[20]。R. L. JILKA^[21]发现，绝经后雌激素减少，对 IL-6 的抑制能力减弱，导致骨吸收和破骨细胞前体分化为成熟破骨细胞增加，破骨能力增强。

为了提高骨质疏松患者种植体的骨结合，多种治疗手段被应用于研究和临床。系统性地应用针对骨质疏松的药物，如雌激素替代疗法、降钙素甲状旁腺素、二磷

酸盐和雷尼酸锶等的全身性应用等的有效性已经在以往研究中得到证实^[22-25]。然而，这些药物在促进种植体结合的同时，往往也引发全身用药的一系列不良反应^[26]，如雌激素引起的潮热，双磷酸盐的胃肠反应及雷尼酸锶的超敏反应等，使其应用得到限制。因此，通过种植体表面改性，促进骨质疏松患者种植体周围骨形成与骨结合成为另一研究方向^[27]。局部改性的方法以形貌改变为基础，运用物理化学技术改变表面形貌，在形貌优化基础上在种植体表面形成涂层，主要包括治疗性涂层和非治疗性涂层两大类^[28]：一方面，将羟基磷灰石，含锶、锌等的无机涂层或是生物分子如胶原纤维、生物活性肽、骨形成蛋白等加载在种植体表面，形成非治疗的涂层。另一方面，将具有治疗作用的药物如双磷酸盐加载在种植体表面，形成治疗性涂层。这些种植体在骨质疏松条件下，都表现出一定的促进成骨的作用。

种植体表面处理技术

钛由于其优良的理化性质，如弹性模量低、抗疲劳强度高、良好的生物相容性、抗腐蚀性等特点，已经被广泛用作种植体的材料。然而，多种优良特性存在的同时，纯钛种植体也存在着生物活性低、成骨作用较弱等一系列问题。种植体的表面性质是骨结合速率和程度的重要因素，影响种植体表面和骨的直接接触面积、骨累积的速率，也影响骨种植体连接的机械强度。因此，可以通过对纯钛种植体进行表面处理，达到增加早期成骨、缩短愈合时间的目的^[29]。

1. 纳米化种植体

物理化学等多种技术，能够改变种植体表面形貌，形成宏观形貌和微观形貌（微米化和纳米化）的种植体。宏观形貌和微米级形貌的种植体已被证实可在体内、外促进种植体的生物学效应。但宏观形貌和微米级形貌的表面特性只对细胞活性产生间接的影响，所以它们的作用能力是有限的^[30]。

研究证实，材料和组织之间的相互作用主要是由纳米化表面所调控的^[31]，纳米化种植体调控骨结合过程和机制是复杂的。纳米形貌影响材料和蛋白之间的相互作用，Webster等^[32]研究发现，相比于传统种植体，纳米形貌促进材料表面玻连蛋白的吸附。同时，材料表面的纳米化与细胞粘附和运动有关，纳米化表面的空间结构和

密度会影响细胞间的相互作用。对粘附细胞具有选择性是纳米化表面另一特性, Price RL 等^[33] 将成骨细胞、成纤维细胞、软骨细胞和平滑肌细胞接种在纳米化种植体表面, 结果显示, 这种形貌选择性地促进成骨细胞的粘附。Brunette DM.^[34]发现纳米形貌表面成骨细胞和成纤维细胞粘附比例为 3:1, 而纯钛种植体表面两者比例为 1: 1。细胞增殖活性也受到纳米化形貌的调节, Price RL 等^[35] 研究发现, 成骨细胞在纳米化的钛表面表现出明显增强的增殖活性。我们课题组前期研究也发现, 纳米化表面能够提高粘附增殖能力及细胞活性, 同时也可以促进细胞的成骨分化, 影响骨结合。纳米化种植体如何影响细胞的生物反应, 进而促进骨结合, 其确切机制尚不清楚, 可能包括以下几个方面^[36]: (1) 提高植入物相邻骨的接触面积; (2) 促进细胞在植入物表面的附着; (3) 增加植入物表面骨量; (4) 改善植入物和骨之间的生物力学相互作用。

多种理化方法可用于纯钛种植体表面的纳米改性, 主要包括: (1) 物理方法, 如单层自组装、纳米颗粒压缩和离子束沉积; (2) 化学方法, 如酸蚀、过氧化、碱处理 (NaOH) 和阳极氧化; (3) 纳米颗粒沉积像溶胶 - 凝胶 (胶体粒子沉积) 和离散晶体沉积; (4) 光刻和接触打印技术^[37]。这些方法各自具有不同的特性和作用原理, 如单层自组装, 可以将具有不同功能骨诱导或细胞粘附分子加载于种植体; 酸蚀结合其他方法 (喷砂和/或过氧化) 可除去污染物, 赋予种植体纳米化的表面; 阳极氧化: 可以基于使用的材料, 在材料表面创建一个新的氧化层; 溶胶 - 凝胶: 形成纳米化的化学特性可控的薄膜。

2. 碱热处理

碱热处理是由 Hyun-Min Kim 等提出的一种种植体表面化学处理方法, 是一种方法简单且低成本的处理技术^[38]。碱热处理自提出以来已经被广泛应用于多种金属如钛、镁、铝及其合金等的表面处理。碱热处理纯钛种植体的作用原理是, 在强碱和热的共同作用下, 钛耐蚀性迅速减退, 种植体表面 TiO_2 与 OH^- 反应, 形成 HTiO_3^- , 通过水化作用形成 $\text{HTiO}_3^- \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。它们在溶液中和 Na^+ 反应, 最终形成无定型的钛酸钠水凝胶层^[39]。碱热处理后, 种植体表面表现为均匀一致的纳米多孔样网格结构, 种植体表面理化性质发生改变^[40, 41], 为促进成骨创造了有利条件。种植体在模拟体液中, 可以和溶液中的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 发生反应, 促进羟基磷灰石 (HA) 的成核与沉积, 显示出良好的生物活性。形成的羟基磷灰石结构类似于形成天然骨的磷灰石,

因此可以作为植入物和骨组织之间的连接体。通过化学反应，不仅使种植体基底和磷灰石涂层紧密结合，也在骨到种植体表面形成均匀的应力梯度，利于其承载受力[42]。

碱热处理种植体的体内外效应也得到了广泛研究。Bo-Ah lee 等研究者观察胎鼠颅骨细胞在碱热处理表面的增殖分化，发现碱热处理后，种植体细胞增殖和分化能力明显提高。Ken 等科学家研究原代骨髓间充质干细胞在碱热处理种植体表面的成骨活性，发现细胞的粘附及伸展增多，材料表面细胞成骨相关因子碱性磷酸酶（ALP）、I 型胶原（Col-1）、骨钙素（OCN）等表达显著增强^[43, 44]。将碱热处理种植体植入犬、兔体内，研究其在生物体内的效应。机械力学测试，组织学染色及形态学分析等结果均显示，处理过的种植体在体内促进了种植体表面新骨的生成和骨种植体接触，骨结合能力增强^[45, 46]。碱热处理也可以结合其他表面处理方法，彼此发生协同作用，产生更优越的促成骨效应。Achariya Rakngarm 等^[47]将种植体碱处理后浸入富含 Ca^{2+} 的溶液中，形成钛酸钙，在模拟体液中可以促进羟基磷灰石的沉积，增加沉积速率，且形成的羟基磷灰石与基底呈现出高的粘结强度。生物活性成分也可加载在碱热处理钛表面与其共同作用，Bougas K 等在碱热处理表面加载生物因子釉基质蛋白，促进羟基磷灰石形成。Kodama T 将碱热处理后的种植体加载 BMP-2 和肝素（heparin）模拟体液中，随后观察 MC3T3-E1 细胞在该种植体表面成骨分化情况，发现碱性磷酸酶、骨钙素等成骨相关成分的表达水平均上升，且该种植体植入体内后，能够同时促进种植体表面水平和垂直方向的新骨形成^[48, 49]。

2. 种植体的功能化

近年来在种植体表面处理方面，出现了一个新的有前景的研究领域：仿生^[4]。即将生物活性成分加载在表面，形成功能化的钛种植体，从而达到促进愈合过程、缩短愈合周期的目的。用于种植体表面仿生的生物活性成分是一些人为选择的特殊成分，它们可以通过与细胞外基质蛋白相互作用引发特定的细胞内反应，种植学科专业术语称之为“能够复制或模仿人体结构(解剖)和/或功能(生理)”。应用于种植体表面的仿生成分需要具有以下特性：能够诱导适当细胞的分化，增强新骨形成；合成和生产工序简单；避免从异体中提取，从而降低传播疾病的风险；具有生物可吸收性；避免引起机体产生相应的免疫反应。迄今为止，仿生成分的研究主要包括以下四个方面：

生物陶瓷如羟基磷灰石等。羟基磷灰石是研究最早和最多的表面改性物质，可通过等离子喷涂等多种方法加载于种植体表面，有利于种植体和生活的骨之间早期的化学反应。随后经过早期涂层的溶解，离子交换等一系列途径，HA 被生活的骨取代，促进骨改建，产生快速骨结合^[50]。在 HA 的基础上，进一步改性，如在 HA 表面加载 BMP-2，制备掺锶 HA 等，已被用于研究种植体表面改性对骨结合的影响^[51]。

离子：如氟离子^[52]。在水溶液中氟离子是具有高活性的离子，可与其他元素形成非常稳定的化合物。在种植体表面形成氟磷灰石，提高成骨细胞分化和碱性磷酸酶的活性，最终促进磷灰石结晶，在种植体和骨之间形成紧密连接。

高分子聚合物：如壳聚糖。壳聚糖作为一种天然的多糖，在自然界中普遍存在。其有利的化学和结构特性使其在许多方面得到应用，如止血等。对于骨组织来说，它可以形成成骨细胞的天然支架，利于细胞外基质的沉积，促进骨前体细胞分化为成骨细胞。壳聚糖与其他处理技术联合应用于种植体功能性涂层，可共同影响成骨分化^[53, 54]。

生物活性的蛋白加载：骨形态发生蛋白、I 型胶原 (col-1)、纤维黏连蛋白 (FN)、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽 (GDG)、生长因子等是种植体周围组织中的固有成分，与骨形成过程中蛋白粘附细胞功能等密切相关。它们可作为生物分子加载于种植体表面，调控种植体周围的生物反应过程，影响骨形成^[55]。BMP-2 可以通过激活 MAPK 等信号通路调控骨代谢，Pavlova TV 等^[56]将 BMP-2 与喷砂处理钛结合，表现出增强的骨形成能力。精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸 (RGD) 序列和肌动蛋白细胞骨架跨膜连接，能够激活细胞内信号通路促进细胞粘附等细胞功能，RGD 肽加载于钛种植体可以促进成骨分化^[57]。I 型胶原是骨形成过程中重要的蛋白成分，Sverzut AT 等在种植体结合 I 型胶原，促进了成骨细胞分化^[58]。

RNA 干扰技术及 Ckip-1

1. RNA 干扰技术

基因治疗 (gene therapy) 是近年来兴起的一种技术复杂但实用有效的疾病治疗手段，是以往临床疾病治疗方法的重要补充。基因治疗的主要方法为靶向基因治疗，即通过不同途径，将外源性的遗传物质 (DNA 或 RNA) 引入哺乳动物细胞内，诱发

机体自身的修复途径，编码人体内细胞或组织中特定蛋白质，修复至关重要的基因的功能缺陷或废除特定的疾病基因从而最终达到治疗目的^[59]。早期基因治疗采用的遗传物质主要为 DNA，随着对基因治疗及 RNA 研究的深入，以 RNA 为基础的基因治疗也逐渐发展成为基因治疗的另一重要方面。RNAi 技术最早是由植物生物学家在 20 世纪 80 年代后期观察到的，但当时其分子机制仍不清楚。直到上世纪 90 年代末，当 Fire 等科学家们研究秀丽隐杆线虫时发现，RNAi 是一种进化保存的、细胞控制外源基因表达的防御机制。通过双链 RNA 的序列特异性转录，使基因沉默保留在生物体内^[60]。

RNAi 主要包括两个参与部分^[5]：微小 RNA(microRNA)及小干扰 RNA(siRNA)。两者作用机制不尽相同，但最终都可通过与目标 mRNA 特异性结合，抑制其表达，达到基因调控的目的。miRNA 来源于自身基因组，它的作用机制是，初级 miRNA 在核糖核酸酶 III (RNaseIII)、转运蛋白 exportin-5 等一系列作用下，由核转移到细胞质，形成成熟的 miRNA。通过选择性的结合形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 作用于同源基因 mRNA，影响 mRNA 翻译过程，从而调控目标基因的表达。miRNA 基因调控的特异性是复杂的，单独 miRNA 能够调控不同 mRNA 的表达，一个 mRNA 也能同时被多个 miRNA 所调控。迄今研究发现，miRNA 能够调控约 1/3 的人类基因的表达，参与人体的一系列生物过程，如调节细胞循环、凋亡、分化等^[61]。siRNA 多为外源性。当病毒感染真核细胞，或者当转座子和转基因随机整合到宿主基因组，外源基因产生特定的 dsRNA，他们被加工成短 dsRNA，引发一系列后续的生物化学反应^[62]。在核糖核酸酶 III (RNaseIII) 的作用下，dsRNA 被剪切为较短序列的小干扰 RNA(siRNA)，到达特定区域，与相应的 mRNA 形成 RNA 诱导沉默复合物 (RISC complex)。在 ATP 依赖的解螺旋过程后，降解 mRNA (转录后基因沉默)，抑制编码特定蛋白的靶基因的表达。

2. 骨质疏松的 RNAi 治疗

RNAi 由于其高度的特异性和有效性，被认为是生物医学领域研究靶基因最好的工具。人工合成 siRNA 与 miRNA，已被广泛用于哺乳动物细胞的基因筛选和基因功能的分析^[63]。RNAi 可以作为疾病治疗的工具，为多种疾病设计新的基因特异性治疗方法^[60]。siRNA 与 miRNA 因其本身有良好的药代动力学特性，可以作用于全身多个组织器官，同时具有高度特异性、固有生物学效应和良好的基因沉默效率，使之成

为疾病治疗特异性且有效的方法，克服了以往药物化学治疗的局限性。在疾病治疗过程中，针对相应的疾病，引入外源性的特定 siRNA/miRNA，使其转染进入特定组织器官，到达细胞指定部位发挥作用，结合并降解相应 mRNA，使疾病相关基因沉默，从而达到治疗疾病的效果。RNAi 可用于多种疾病的治疗，如遗传性疾病肌萎缩性侧束硬化症等，感染性疾病如 HIV、HBV，肿瘤性疾病如尤因氏骨瘤、横纹肌肉瘤等。骨疾病是由于一些环境或遗传引起的全身或局部的紊乱导致的，基于 DNA 的转基因治疗已被证明具有治疗肌肉骨骼疾病的潜力，为以 RNA 为基础的基因治疗的研究奠定了坚实的基础。RNAi 可应用于多种骨组织类型的治疗，主要是骨和软骨。在以往的研究中，以 RNAi 为基础的骨疾病的治疗已经被应用于治疗类风湿性关节炎病、异位骨化症等骨疾病。

骨质疏松是因为骨重建的不平衡引起的，多种 miRNA 通过针对骨重建过程中具有重要作用的转录因子的编码基因，调节骨重建，改变骨的表型，它们影响骨质疏松骨重建的作用机制及调节效应各不相同^[64]。抑制骨形成的 miRNA 包括 miR-2861、miR-214、miR-21, 23a, 24, 100, 125b 等多种。miR-2861 是第一个临床发现的与骨质疏松有关的 miRNA，它作用于 RUNX2 负调控因子 HDAC5，影响骨代谢。Seeliger C 等研究发现，骨质疏松患者血清和骨组织内 miR-21, 23a, 24, 100, 125b 的表达升高。MiR-214 随着年龄增长而上调，作用于 ATF4，抑制成骨细胞形成和骨矿化。正向促进骨形成的 miRNA 有 miR-29a、miR-31、miR-15b 等。miR-29a 能够负向调节 Dkk1、sFRP2 和 Kremen2 等 wnt 信号通路抑制因子，促进骨形成。miR-31 靶向作用于 RhoA，从而抑制破骨细胞的功能。miRNA 的研究是骨质疏松的 RNA 干扰中的重要部分，应用 miRNA 抑制剂 (anti-miR) 或 miRNA mimics(模拟物)，能够起到促进骨形成、治疗骨质疏松的作用^[65, 66]。Wang 应用 anti-miR124，有效地促进正常和骨质疏松条件下骨形成。应用 miR-29a，抑制了糖皮质激素诱导的 Wnt 和 Dkk-1 功能的失衡，促进成骨细胞分化和矿物沉积。

siRNA 用于骨质疏松治疗的研究已十分广泛，siRNA 作用的发挥，需要满足以下条件：可靠的 mRNA 疾病特异性靶点；疾病特异性，以避免非疾病位点基因敲除；治疗指数足够宽，以适应剂量的变化，避免产生毒性影响治疗效果^[6]。骨代谢调节通路一直是 siRNA 治疗的焦点，特定的基因对这些信号转导机制至关重要，并作为潜在的 siRNA 敲除的目标。骨质疏松的 RNAi 主要针对三个方面，每一方面都包括一

系列可以作为目标靶点的细胞因子：破骨细胞生成（活化 T 细胞核因子（NFATc1）等），破骨吸收过程（组织蛋白酶 K（cathepsin K）等）和破骨细胞活性（表皮生长因子受体（EGFR）等）。大量的目标靶点的存在和 RNAi 研究的不断深入，表明 RNAi 用于骨质疏松治疗存在巨大的潜力^[67]。RANKL，是破骨细胞的一个关键的分化和活化因子，存在于成骨细胞，活化 T 细胞，滑膜成纤维细胞和骨髓基质细胞。它能够结合 NF- κ B（RANK），激活特异性膜受体和促进破骨细胞分化。应用针对 RANK 的 siRNA 可有效抑制破骨细胞生成和骨吸收^[68-71]。锌指蛋白 467（Zfp467）对脂肪干细胞向脂肪细胞和成骨细胞分化有着重要作用，针对 Zfp467 的 RNAi 可抑制脂肪细胞形成和刺激向成骨细胞方向的分化。活化 T 细胞核因子 1 蛋白(NFATc1)是参与细胞因子产生和破骨细胞形成的转录因子，是破骨细胞形成的关键调节因素，应用 siRNA，使炎性细胞因子水平降低，成熟破骨细胞生成减少。法尼焦磷酸合酶（FPPS）siRNA 可以选择性抑制破骨细胞介导的骨吸收，并以不同的方式影响破骨细胞和成骨细胞，选择性的抑制了破骨细胞介导的骨吸收，增加骨形成和骨量。DKK1 抑制 Wnt 信号通路的传导，是骨形成内源性的负调控因子，对其基因沉默可促进骨形成。此外，c-jun、PPAR-g、MMP-1 及-13、PTK2、GNAS1、Noggin 等都可作为骨质疏松 RNAi 治疗的目标靶点，通过引入其 siRNA，特异性基因沉默，从而达到治疗目的^[6]。

3. 基因载体和壳聚糖

基因治疗的过程中，裸露的 siRNA/miRNA 的有效转染需满足以下条件：避免被体液内切酶降解及引起免疫反应；能够到达并作用于目标细胞；能够与负电性的细胞膜作用，通过内吞作用跨越细胞膜；在细胞内避免被溶酶体摄取和降解，到达作用部位释放 siRNA/miRNA，使其加载到 RNA 诱导沉默复合体上，激活 RNAi 途径，从而保证后续基因沉默作用。因此，基于 siRNA/miRNA 的基因治疗的广泛应用很大程度上依赖于能够有效地将 siRNA/miRNA 传递至目标细胞和目标部位的基因传递系统，即安全有效的基因载体^[72]。基因载体主要包括病毒基因载体和非病毒基因载体。病毒基因载体转运效率高且调控治疗基因的高水平长期表达，多种病毒如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和痘病毒等在以往研究中已得到了应用，用于研究感染性疾病、肿瘤、心血管疾病等多器官多系统疾病。但由于存在着易引发机体免疫应答、致癌性、无细胞特异性、无法转运尺寸较大的基因、成本高等缺

点, 限制了其应用。非病毒性基因载体有着低成本、低免疫原性、非传染性、良好的依从性和临床重复应用等一系列潜在的优势, 成为基因载体的另一种选择。非病毒基因载体分为阳离子脂质体和阳离子聚合物两大类。它们可以通过静电作用与负电荷的 DNA/RNA 相结合形成复合物, 这种复合物促进了细胞的摄取, 提高细胞内基因传递和保护 DNA/RNA 免受核酸酶降解。最后, 一部分 DNA/RNA 释放到细胞质和迁移到细胞特定部位并表达^[73]。

阳离子脂质体由于其优良的生物相容性、易合成、比病毒载体易得到且免疫原性低等优势, 可以作为多种成分如化疗药物, 低聚核苷酸、DNA、RNA、抗原和蛋白等的载体, 是最常使用的非病毒基因载体。自 Felgner P.L. et al^[74]首次将它用来作为基因载体以来, 已经被广泛用于基因载体的研究。它能快速与 DNA/RNA 通过静电作用形成复合物, 复合物的大小、结构等会影响其转染效率。阳离子脂质体作为基因载体, 已经应用于 siRNA/miRNA 等多种基因临床研究, 目前商品化的脂质体载体主要有脂质体 2000, 1,2-二油酰基-3-三甲基铵 - 丙烷 (DOTAP), TransIT-TKO 等^[75]。我们课题组前期也应用脂质体 2000, 用于成骨相关的 mi-138、mi-148 的种植体表面功能化, 研究发现, 在其作用下, miRNA 有效地转染入细胞, 并在细胞内发挥作用, 表现出成骨促进作用。研究也发现, 阳离子脂质体作为 siRNA 的基因载体存在一些问题: 首先, 虽然其能有效的结合 siRNA, 但在体内的基因敲除作用却是有限的, 可能与其在胞内稳定、不能有效地释放 siRNA 有关。另外, 阳离子脂质体存在一定的毒性, 且易被血液清除, 成为限制其临床应用的另一个原因^[76]。

阳离子聚合物是核酸递送的新型材料, 并已成为近年来基因载体领域一个活跃的研究方向。作为基因载体的阳离子聚合物主要包括天然的聚合物如壳聚糖, 树枝状聚合物如聚酰胺-胺, 多肽如多聚赖氨酸、多聚精氨酸、多鸟氨酸、组蛋白精蛋白, 以及其他类型的聚合物, 如聚乙烯亚胺聚磷酸酯等。壳聚糖 (chitosan), 化学名称为聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基-B-D 葡萄糖, 是由 β -(1-4) 糖苷键连接 D-葡萄糖胺和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖形成, 是一种天然的线性阳离子多糖, 在自然界中广泛存在。它的特点为: 毒性低; 生物相容性好, 已被证明在体内外可以和活细胞发生作用, 保持其功能而不产生毒性和引发免疫应答, 在鼠体内它的半数致死量 (LD50) 低, 和蔗糖等同^[77]; 生物可降解性: 溶菌酶等可将壳聚糖降解, 最终以二氧化碳的形式排出。此外, 它还有一定的抗感染能力、粘膜粘附性和较低的免疫原性^[78]。壳聚糖本身有

着多方面的生物学功能，包括降胆固醇，治疗肾功能不全，促进伤口愈合，降低胃溃疡的损伤，抗菌和治疗糖尿病，影响体内钙代谢等。此外，壳聚糖的低毒性和缓释作用也使其大量应用于药物的递送^[79]。2006年 Haliza Katas 等科学家首次提出将壳聚糖作为 siRNA 的基因载体，他们对复合物的制备方法、平均粒径、载荷效率、稳定性、生物活性及细胞毒性等进行了研究和评价，证实了其可行性，是壳聚糖应用于 RNA 转染的基础。并在近年来，在感染、肿瘤等多种疾病的基因治疗研究方面大量应用^[80]。如 chitosan/ NS1siRNA 引入动物体内降低呼吸道和胞体病毒引起的炎症和感染^[72]。壳聚糖结合针对抑制松弛素受体 RXFP1 的 siRNA，降低前列腺癌细胞的生长和转移^[81]。利用 Chitosan/ EGFRsiRNA 增强胶质母细胞瘤细胞的药物敏感性^[82]。当壳聚糖/核酸复合物暴露于更复杂的生物学环境时，体外研究得到的复合物的参数不一定完全适用，所以参数的选择需要考虑到给药的途径从而保证在机体内的作用及安全性。现有的复合物体内应用的途径主要包括两类，一类为系统性的应用，即将复合物直接注射入静脉使其通过血液循环到达指定部位发挥作用，该方面的研究主要针对于肿瘤治疗。另一类为局部应用，这种途径避免了复合物的血液中不稳定、吞噬吸收、到达目标器官数量不足等缺点，能直接将复合物作用于目标部位，效率更高。而且相比于全身用药，局部用药剂量减少，保证了最小的副作用。局部应用方法，如肿瘤内注射，直接将治疗成分递送至靶器官，主要包括：通过粘膜黏附进行粘膜内注射、腹腔注射等。局部应用由于其特有的优势，将得到进一步深入的探索研究^[83, 84]。Morten Ø. Andersen 等^[85]用壳聚糖支架和 TNF- α siRNA 结合，表现出长期稳定的基因沉默效果，因此他们提出壳聚糖/siRNA 局部应用于医用种植物表面改性是可行的。

4. Ckip-1

Ckip-1, 酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1, 最初被认为是一种与酪蛋白激酶 2 的 α 亚基 (CK₂) 相互作用的一种特定蛋白^[86]。随着对其结构和功能的不断研究发现，Ckip-1 基因是广泛表达和编码的一种 46kDa 的蛋白质，蛋白的结构中包含氨基端的普列克底物蛋白结构域 (PH)，羧基端的亮氨酸拉链 (LZ) 和五个富含脯氨酸的结构区^[87]。这些结构的存在使它可以和大量细胞蛋白发生相互作用: Ckip-1 与 CK2 α 结合，促进质膜对 CK2 的招募，与胰岛素受体等底物相互作用促进其磷酸化; 与肌动

蛋白成帽蛋白 α 亚基(CP α)结合,显著降低 CP 的成帽活性,加速 F-肌动蛋白(F-actin)解聚作用,形成一条细长的成纤维细胞样的细胞形态; Ckip-1 直接与磷脂和丝氨酸/苏氨酸激酶蛋白激酶作用,调节磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) 信号,调控细胞生长和存活; Ckip-1 还能依赖半胱天冬酶-3 (caspase-3) 来调控激活蛋白 1 (AP-1) 信号通路,同时还能激活半胱天冬酶-3,从而增加凋亡,形成一个正反馈循环; Ckip-1 可以招募部分核共济失调突变基因 (ATM) 到达质膜,参与 DNA 损伤修复和质膜上生长因子受体信号的调节。干扰素 (IFN) 诱导蛋白质 IFP35 及其同系物 N-Myc 相互作用蛋白质 (Nmi) 是另外两个与 CKIP-1 相互作用的蛋白质,提示 CKIP-1 可能参与细胞因子信号,在体内作为 IFP35 和 Nmi 的生理调控因子。Ckip-1 通过不同的方式作用,影响细胞质膜招募,参与转录活性调控和转录后调控。另外,它的亚细胞定位是细胞依赖性的,取决于几个关键氨基酸,它在细胞核和细胞膜的转运取决于细胞压力的变化。作为一种调节蛋白,它与相应蛋白结合后,参与调控多种重要的信号通路,控制细胞骨架和细胞的生长、凋亡、分化等多个阶段^[88]。

Ckip-1 可以通过调节酶-底物相互作用介导蛋白质的转录后调控,促进蛋白质的磷酸化和泛素化。2008 年, Lu.等科学家在 Nature 杂志上发表的研究结果指出, Ckip-1 通过其 PH 区与 Smad 泛素化调节因子 1(Smurf1)的 WW 结构域结合,促进 Smurf1 对底物的作用,增强其抑制成骨细胞活性的功能,是成骨细胞分化和骨形成过程中至关重要的负调控因素。Smurf1 是 E3 泛素连接酶家族的成员,调控大量底物蛋白,在细胞生长、凋亡和体内骨平衡重发挥重要作用。Ckip-1 与 Smurf1 在 Smurf1 底物结合区域的临近区域相结合,发挥剂量相关的作用,促进 Smurf1-底物的结合,使复合物的结构发生改变,加快 Smurf1 介导的蛋白质泛素化过程和 Smad1/5、RhoA、MEKK2 等底物的降解,发挥对成骨过程的负向调控作用。对 Ckip-1 生理功能进行体内研究,通过基因敲除完全抑制 Ckip-1mRNA 的表达,基因敲除后 smurf1 功能减弱,骨密度 (BMD) 及骨体积/组织体积 (BV/TV) 较对照组增加,骨形成加快,且出现了年龄相关性的骨量增长。成骨细胞功能标志物碱性磷酸酶 (ALP)、I 型胶原 (Col-1) 等表达增高,而破骨相关标志物骨保护素 (OPG)、酸性磷酸酶 (TRAP) 等未发生明显变化,说明 Ckip-1 基因敲除后显著地促进骨形成的作用而不影响骨吸收。揭示其在基因治疗骨疾病尤其是骨质疏松方面的潜力^[89]。Ckip-1siRNA 同其他 siRNA 一样,具有难以跨越细胞膜及容易被酶降解等共性,需要借助安全有效的基因载体

提高转染效率，突破转运过程的一系列障碍，到达指定部位发挥有效的作用。Zhang 等研究者利用(AspSerSer)₆liposome 作为载体，将 Ckip-1siRNA 转染入细胞，及引入正常和骨质疏松动物体内，研究其体内外效应，发现在载体的有效携带下，Ckip-1siRNA 的细胞转染及作用增强，体内外成骨作用得到提升^[7]。Jia 等^[90]将 Ckip-1siRNA 与 Flt-1siRNA（可溶性 VEGF 受体 1）结合在壳聚糖形成的支架上，这种支架可以使 siRNA 在中性磷酸盐缓冲生理盐水中保持 2 周以上而不失去其效能。体外实验显示，靶基因沉默、骨钙素、碱性磷酸酶、细胞外基质矿化能力等得到显著提升。应用于体内时，也表现出良好的骨形成能力。因此，Ckip-1 可以作为目标基因，通过选择安全高效的基因载体，引入 Ckip-1siRNA 对其进行沉默，抑制 ckip-1 与 smurf1 相互作用及一系列底物的活化，最终达到促进骨形成的目的，应用于骨疾病特别是骨质疏松的治疗。

通过以上文献回顾，基于本课题前期在 miRNA 修饰种植体的研究结果，我们认为，RNAi 结合种植体表面处理技术，在提高骨质疏松条件下的种植体骨结合方面有巨大的潜力。我们设想，siRNA 能够应用于种植体表面修饰，调控种植体周围成骨。本课题旨在构建 siRNA 修饰的功能化种植体，通过研究其对成骨分化及体内骨结合影响，对我们的假设进行验证，探究其可行性。

正文

第一部分 CS/siCkip-1 功能化种植体的制备及 表面性状分析

牙科种植体近年来被广泛应用于牙齿缺失的修复治疗，然而，纯钛种植体由于生物活性不足，影响植入后的骨形成及稳定，尤其是在骨质疏松等疾病的条件下，种植体成骨能力减弱，无法形成良好的骨结合，导致愈合时间延长甚至引发种植的失败。为了获得更快、更好的骨结合，种植体表面改性得到广泛研究，表面改性的主要方法包括物理化学的表面处理和生物因子的加载即表面生物功能化。

碱热处理是种植体表面常用的一种处理方法。纯钛经碱热处理后，种植体的表面形貌、物理化学性质如亲水性、粗糙度等都会发生明显变化，可结合其他理化处理和生物因子共同作用，协同促进骨形成^[42]。Ckip-1 是骨代谢的调控因素，通过结合 Smurf1，引发一系列反应，最终引发破骨效应^[89]。通过 RNA 干扰技术，siCkip-1 与基因载体通过静电结合形成复合物，介导其高效转染到达细胞特定部位，特异性地沉默靶基因，抑制破骨过程，促进骨质疏松条件下的骨形成，可用于骨质疏松的治疗。

在本实验中，选用壳聚糖（CS）作为基因载体，与 siCkip-1 形成复合物。将其加载在碱热处理的钛种植体表面，制备 CS/siCkip-1 功能化的种植体 TA-CS/siCkip-1。观察 siCkip-1 加载分布情况，分析 TA-CS/siCkip-1 的表面性状，为后续体内外实验研究提供材料学方面的依据。

1 材料、试剂和仪器

1.1 主要试剂与材料

方形成品纯钛试件（西北有色研究院）；碳化硅砂纸（STARCKE,德国）；无水乙醇（分析纯，天津科密欧化学试剂有限公司）；丙酮（分析纯，天津科密欧化学试剂

有限公司); 氢氧化钠粉剂(天津科密欧化学试剂有限公司); 醋酸钠粉剂(天津科密欧化学试剂有限公司); Ckip-1siRNA(吉玛, 上海); 壳聚糖(Sigma, 美国); 牛血清白蛋白 BSA(Sigma, 美国); 十二烷基磺酸钠 SDS(天津科密欧化学试剂有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天, 中国); 24 孔和 96 孔培养板(Nunc, 美国)

1.2 实验仪器

超声波清洗器(KQ250B, 昆山市超声波仪器有限公司); 扫描电子显微镜(S-4800, Hitachi, 日本); 接触角测量系统(EasyDrop Standard, KRUSS, 德国); 激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000, 日本); 激光粒度分析仪(Zetasizer Nano-ZS90, Malvern, 美国); 酶标仪(BioTek, 美国)

2 实验方法

2.1 CS/siCkip-1 功能化种植体(TA-CS/siCkip-1)的构建

2.1.1 壳聚糖/siCkip-1(CS/siCkip-1)复合物的制备

用醋酸钠粉剂与纯水配制形成 0.2 mol/L 的醋酸钠溶液, 调节 pH 至 4.5。将壳聚糖粉末加入该醋酸钠缓冲液中, 配制成 0.8 mol/mL 的壳聚糖溶液, 调节 pH 至 5.5。参照配制说明将 siCkip-1 粉剂高速离心后加入 DEPC 水, 形成终浓度为 20 μmol 的 si Ckip-1 溶液。壳聚糖与 siRNA 以 16 : 1 的体积比混合, 制备出 CS/siCkip-1 复合物溶液, 震荡混匀备用。

2.1.2 CS/siCkip-1 复合物粒径及 zeta 电位分析

CS/siCkip-1 复合物的粒径和 zeta 电位均由马尔文激光粒度分析仪(Zetasizer Nano-ZS90)测定。取 1 mL 上述制备的 CS/siCkip-1 复合物溶液, 加入测定槽中, 测定温度 25°C。粒径和 zeta 电位分别测量 5 次。

2.1.3 碱热处理纯钛种植体(TA)的制备

方形纯钛试件(10×10×1 mm³)经 400 目、800 目、1200 目、1500 目、2000 目砂纸依次打磨抛光, 丙酮、无水乙醇和去离子水各超声清洗 15 min 后, 37°C 恒温干燥, 形成抛光钛(PT)。氢氧化钠粉剂与纯水配制形成 5 mol/L 的 NaOH 溶液, 将纯钛试件浸入该溶液中, 60°C 恒温烘箱中加热处理 24 h。处理完成后, 试样依次用无水乙醇、去离子水超声清洗 10 min, 37°C 恒温烘干备用, 形成碱热处理钛(TA)。

2.1.4 CS/siCkip-1 复合物在碱热处理种植体表面的加载

将 TA 放置于 24 孔板中, 每孔加入 400 μL 的 CS/siCkip-1 复合物溶液, 避光, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜吸附 (12 h)。试样取出后, 用醋酸缓冲液轻轻漂洗, 室温条件下自然晾干, 制备形成 CS/siCkip-1 功能化的种植体即 TA-CS/siCkip-1, 备用。根据实验所需, 同时制备其余对照组试样, 最终分组如下:

PT: 抛光纯钛组;

TA: 碱热处理组;

TA-CS: 碱热处理-壳聚糖组 (TA 试样浸没在 400 μL 的壳聚糖溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜吸附);

TA-CS/siNC: 碱热处理-壳聚糖/无功能 siRNA 组 (TA 试样浸没在 400 μL 由壳聚糖和无功能的 siRNA 16 : 1 混合形成的溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜吸附);

TA-CS/siCkip-1: 碱热处理-壳聚糖/Ckip-1 siRNA 组;

2.2 TA-CS/siCkip-1 表面性状分析

2.2.1 种植体表面形貌的观察

使用 SEM 观察抛光纯钛组 (PT), 碱热处理组 (TA), 碱热处理-壳聚糖/siCkip-1 组 (TA-CS/siCkip-1) 试样的表面微观形貌, 放大倍数分别为 2000 \times 和 50000 \times 。

2.2.2 siCkip-1(cy-3)在种植体表面分布情况分析

使用 cy-3 标记的荧光 siCkip-1, 在避光条件下, 按第一部分实验 2.1 中复合物制备及加载方法, 制备形成 TA-CS/siCkip-1 (cy-3)。将该试样倒扣在盖玻片上, 置于激光共聚焦显微镜 (CLSM) 下以 400 nm 层厚从表面至底面逐层扫描, 得到不同层面的 siCkip-1 分布图像。

2.2.3 种植体表面接触角的测量

将去离子水滴在 PT、TA、TA-CS、TA-CS/siCkip-1 组试样表面, 采用图像分析显微镜采集液滴接触试样表面 10 s 后的图像, 应用 DSA1 软件分析图像, 进行各组试样接触角的测量。每组 5 个试样, 每个图像的接触角连续测量三次。

2.2.4 种植体表面蛋白吸附的分析

将 PT、TA、TA-CS、TA-CS/siCkip-1 各组试样 (每组 5 个) 放置在 24 孔培养板中, 加入 1 mL 的浓度为 0.5 mg/mL 牛血清白蛋白, 恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h。吸去蛋白液用 PBS 轻轻漂洗试样后, 每孔加入 250 μL 1% 的 SDS 液将试样表面吸附的蛋白洗

脱。参照 BCA 蛋白定量试剂盒使用方法，使用酶标仪在 562 nm 波长下测量吸光度，得到各组蛋白浓度。

2.3 统计学分析

该数据描述均采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式，统计学分析使用 SPSS 17.0 (SPSS, USA)软件，GraphPad Prism 5 统计软件做图。

3 实验结果

3.1 CS/siCkip-1 复合物粒径及 zeta 电位测量结果

图 1.1 是 CS/siCkip-1 复合物的粒径测量结果。分析可知，该复合物的粒径值范围约在 100 nm 至 1000 nm，平均粒径约为 235.9 ± 25.6 nm。zeta 电位值约为 $+13.7\pm 2.77$ mV。

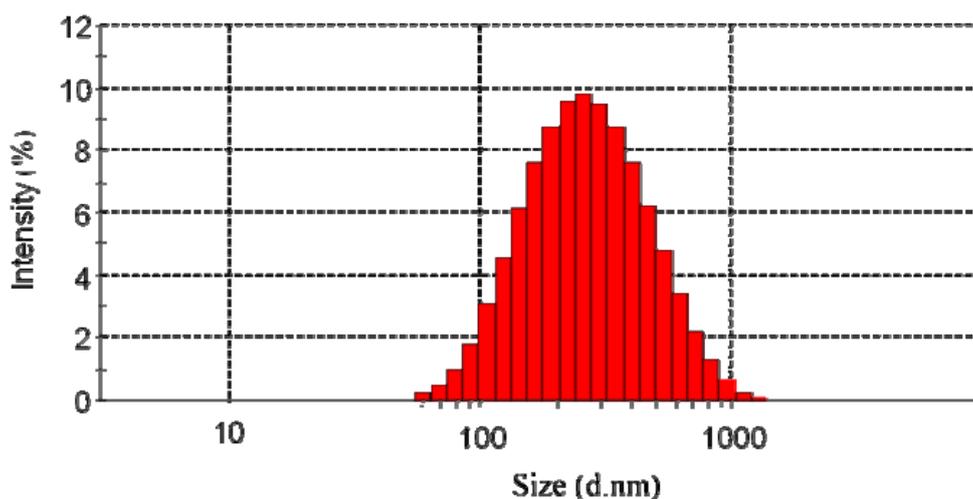


图 1.1 CS/siCkip-1 复合物粒径大小的分布图。

3.2 扫描电镜观察种植体表面形貌

扫描电镜观察到的 PT、TA 和 TA-CS/siCkip-1 三组试样的表面形貌如图 1.2 所示。PT 组在低倍观察下仅可见由于抛光等原因形成的表面划痕，高倍数时呈较光滑的表面。碱热处理后，表面形貌发生明显变化，形成孔径大小不一、多孔网状结构，表面积随之增加。经过在 CS/siCkip-1 液体中的浸没及吸附加载，可以观察到，TA 表面均匀地覆盖了一层半透明的 CS/siCkip-1 复合物涂层，隐约还可见到 TA 基底，一部分复合物可以渗透进入多孔结构和孔间的连接纤维结构中。

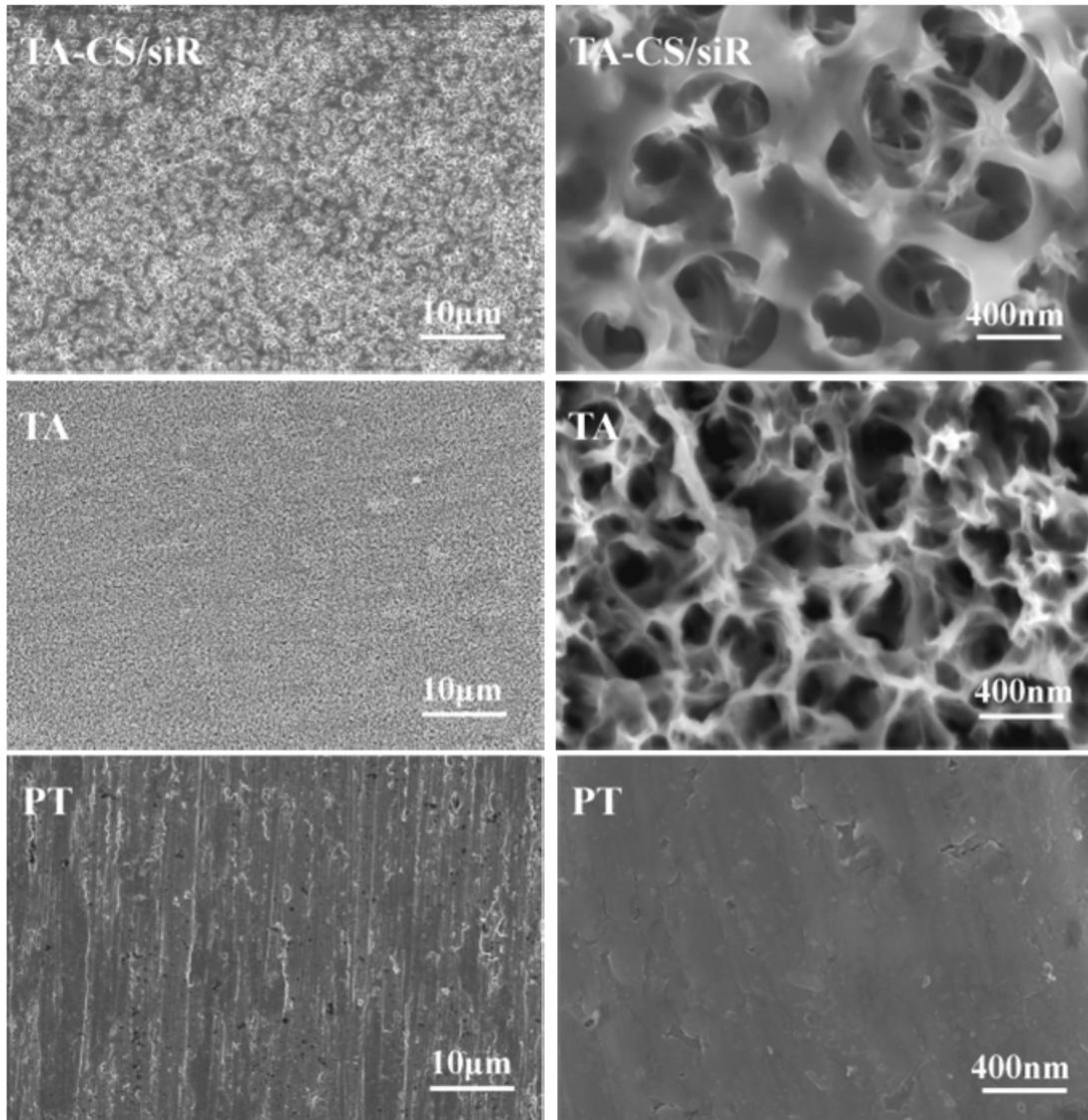


图 1.2 纯钛组 (PT)、碱热处理组(TA)、碱热处理-壳聚糖/siCkip-1(TA-CS/siR)组试样的扫描电镜照片。放大 2000×和 50000×

3.3 激光共聚焦观察种植体表面 Cy-3siCkip-1 分布

采用 Cy-3 红色荧光标记的 siCkip-1, 观察其加载后的分布情况。激光共聚焦共聚焦将 TA-CS/siCkip-1 (Cy-3) 试样从表层到底层逐层扫描, 选取的扫描层距为 400 nm。观察一系列获取图像可见, 表层和底部的 siCkip-1 分布量较少, 主在密集分布在 CS/siCkip-1 层中部。siCkip-1 分布于整个试样, 并可进入到 TA 表面纳米孔状结构的内部。通过计算, 试样表面吸附的 CS/siCkip-1 复合物的厚度约为 2000 nm。

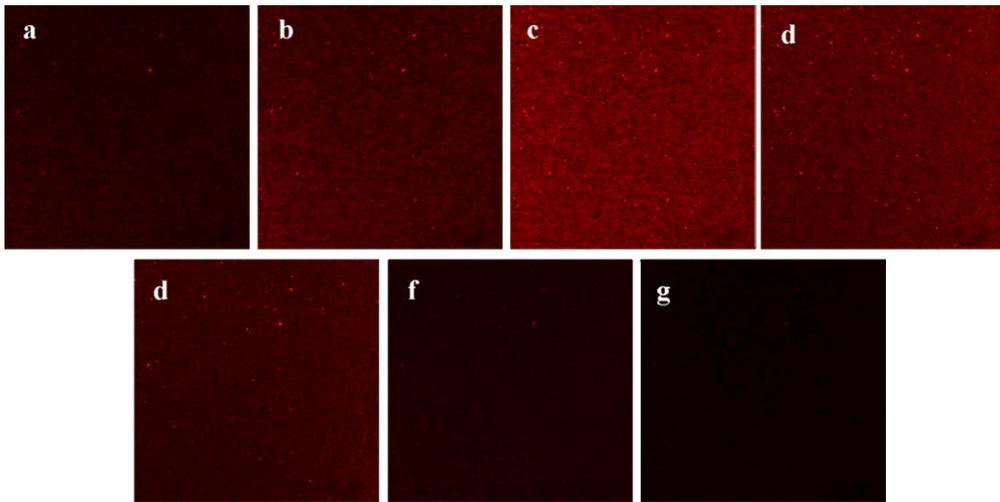


图 1.3 加载 Cy-3 标记的 siCkip-1 后，种植体表面的激光共聚焦分层扫描图像。从试样表层至底层扫描（a→g），层距为 400 nm。

3.4 种植体表面接触角测量结果

如图 1.4 所示，纯钛试样表面接触角最大，约为 $65 \pm 8^\circ$ ，液滴可在试样表面停留较长时间而不发生形态变化。碱热处理后，液滴滴落到试样表面后在短时间内迅速扩散铺开，几乎无法观察到液滴停留的形态，测量到的接触角接近于 0° 。加载 CS 与 CS/siCkip-1 复合物后，试样表面接触角较 TA 组有所升高，约为 $30 \pm 3^\circ$ ，但仍明显低于 PT 表面。

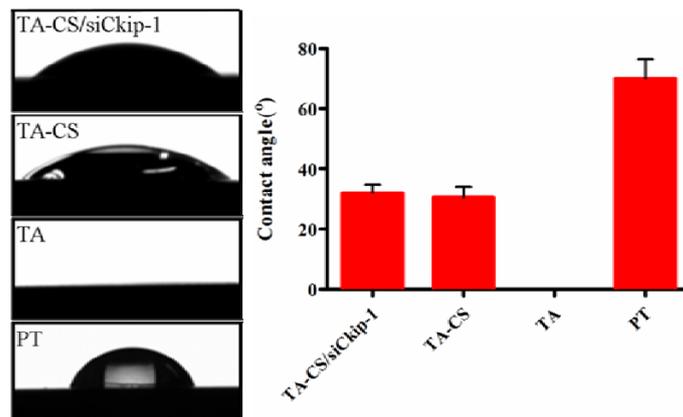


图 1.4 液滴接触试样表面 10s 后采集的液体图像及各组试样接触角的定量分析。左图为图像分析显微镜采集到的各组试样表面的液滴图像，右图为 DSA1 软件分析各组图像得到的接触角测量值。

3.5 种植体表面蛋白吸附定量结果

PT、TA、TA-CS 和 TA-CS/siCkip-1 的表面 BSA 蛋白吸附结果如图 1.5 所示，经过在 BSA 中 24 h 的孵育，PT 试样表面的蛋白吸附量约为 $80 \pm 8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。碱热处理后，蛋白吸附量明显降低，TA 的蛋白吸附测量值约为 $45 \pm 5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。壳聚糖与 CS/siCkip-1 复合物在试样表面的加载，显著的提高了试样表面蛋白吸附能力，两组吸附量接近，TA-CS/siCkip-1 组的蛋白吸附量约为 $100 \pm 12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

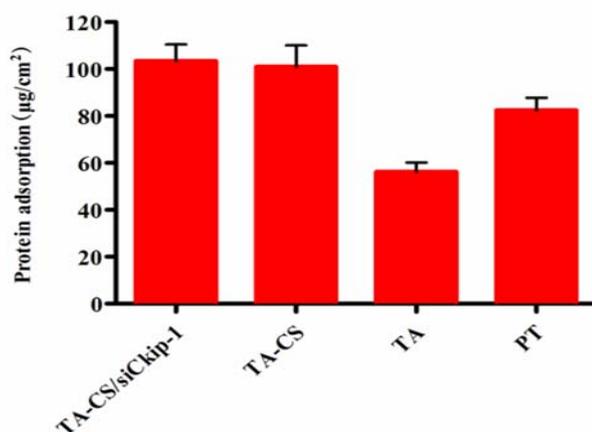


图 1.5 置于 BSA 中孵育 24h 后 PT、TA、TA-CS 和 TA-CS/siCkip-1 各组试样表面的蛋白吸附定量分析结果。

4 讨论

壳聚糖是基因研究中常用的基因载体之一，本身的正电性使其可以通过静电作用和 siRNA 形成聚电解复合物，对 siRNA 产生保护和携带作用。壳聚糖分子量、脱乙酰度、壳聚糖与 siRNA 的浓度及配比（N/P 比）等多种因素会影响两者的结合能力和复合物的性质，如复合物的粒径、zeta 电位、稳定性，从而影响细胞转染和 RNAi 效应^[91]：以往研究发现，较高分子量的壳聚糖可以产生有效的基因敲除效应；脱乙酰度高的壳聚糖（80%）与 siRNA 形成更紧密的结合及更高的 RNA 干扰效应；N/P 比影响复合物的 zeta 电性，合适的正电性可以一方面保护 siRNA、维持复合物的稳定，另一方面又与转染效率密切相关。因此，在此次研究中，我们参考大量文献，最终选择 150 kDa，95% 脱乙酰度的壳聚糖，以 16 : 1 的体积比形成复合物。对该 CS/siRNA 复合物的粒径和 zeta 电位进行测量。粒径值约为 $235.9 \pm 25.6 \text{ nm}$ ，平均 zeta 电位值约为 $+13.7 \pm 2.77 \text{ mV}$ ，这一结果与文献中一致^[92, 93]，我们认为，该复合物适用

于后续体内外实验的研究。

siRNA 在种植体表面的成功加载对其效应的发挥至关重要。在实验中，我们使用扫描电镜和激光共聚焦观察了加载后的试样，结果显示该复合物能够均匀覆盖在种植体表面，siCkip-1 密集分布，形成 2000 nm 的加载层，还可进入表面的网状多孔结构内。我们认为，CS/siCkip-1 的成功加载取决于加载基底和复合物本身多种因素的共同作用：（1）碱热处理后，种植体表面出现大量的活性羟基基团，从而呈现出负电性^[41]，可与正电的 Chitosan/siRNA 复合物产生静电吸附作用；（2）测量碱热处理种植体表面接触角，表现出高亲水性，与以往研究结果一致^[94]。高亲水性可能有利于复合物加载后的快速均匀扩散，使 siRNA 能够均匀分布于整个种植体表面；（3）相比于纯钛种植体，碱热处理的表面形成的多孔结构，使种植体表面积增加，粗糙度增加^[95]。SEM 扫描试样表面，可以看到部分复合物进入微孔结构中，提示复合物与种植体接触范围增大，这也可能影响加载量；（4）碱热处理钛和壳聚糖都有多种化学基团，化学基团之间的化学反应可能也参与了这一加载过程。今后的研究中，我们需要对这一加载机制进行进一步深入探究，同时寻找合适的方法对吸附 siRNA 进行定量，探索提高 siRNA 的表面加载能力的方法。

材料表面蛋白吸附能力对其体内效应的发挥至关重要^[96]。蛋白吸附是植入手术后最早发生的生物反应。种植体植入体内后，立即被血液等包裹，随机的吸附体液中的蛋白成分，短时间内就表面覆盖一层由血浆蛋白，主要是血清白蛋白、纤维蛋白原、IgG 抗体、纤连蛋白等形成的蛋白层。其中，血清白蛋白的黏附量最多。这一蛋白形成的“调节层”调控宿主的细胞反应，如黏附、增殖和分化，最终影响植入物周围骨组织的生长^[97]。我们对种植体表面蛋白吸附进行测量，发现碱热处理后，蛋白吸附量明显降低，壳聚糖与 CS/siCkip-1 复合物在试样表面的加载，显著地提高了试样表面蛋白吸附能力，TA-CS 和 TA-CS/siCkip-1 两组吸附量接近。我们认为，这可能与材料亲水性有关。以往研究普遍认为，疏水表面较亲水表面更有利于蛋白的黏附^[98]。同时，除亲水性外，其余因素如表面化学键等也会影响蛋白吸附能力。Paul Thevenot^[99] 等分析了材料化学特性和蛋白吸附量的关系发现，蛋白吸附与化学基团有关。如羟基表面蛋白吸附能力降低，氨基 (-NH₂) 使表面带正电荷，促进纤维粘连蛋白和骨桥蛋白的表面粘附，促进成骨细胞的生长、分化和矿化。壳聚糖富含氨基，可能影响了本实验中 TA-CS 和 TA-CS/siCkip-1 的蛋白吸附能力。此外，表面电

荷，微观形貌也可能参与了对蛋白吸附量的影响。

5 结论

(1) 壳聚糖和 siRNA 能够静电在静电作用下形成粒径分布较一致、呈正电性的 CS/siCkip-1 复合物。

(3) CS/siCkip-1 复合物能够在碱热处理种植体表面均匀地加载，形成 2000 nm 的 siCkip-1 层，制备得到 CS/siCkip-1 功能化的种植体即 TA-CS/siCkip-1。

(3) 碱热处理能够提高纯钛材料表面亲水性。加载 CS/siCkip-1 复合物后，种植体表面蛋白吸附能力明显增强。

第二部分 CS/siCkip-1 功能化种植体对骨髓间充质干细胞 (rBMMSC) 生物学行为的影响

骨髓间充质干细胞 (BMMSC) 是骨髓中一种具有高度增殖和自我更新能力的细胞, 具有良好的分化潜能, 可以分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等多种细胞^[100]。种植体植入骨髓腔后, 经过血液包裹, 蛋白吸附等一系列生物过程后, BMMSC 粘附在材料表面, 开始增殖和分化。BMMSC 的增殖水平和成骨细胞方向分化能力对骨形成至关重要, 决定着最终良好的骨结合的形成和种植体的长期稳定。本实验中, 我们观察了 siCkip-1 的大鼠骨髓间充质细胞 (rBMMSC) 转染情况, 对 CS/siCkip-1 功能化种植体表面细胞的增殖活性和成骨分化 (碱性磷酸酶合成、胶原分泌、细胞外基质矿化) 能力进行评价, 初步探究 CS/siCkip-1 功能化种植体的体外成骨功效, 为后续的体内研究提供实验基础。

1 材料、试剂和仪器

1.1 主要材料和试剂

α -MEM (Gibco, 美国); 胎牛血清 (Gibco, 美国); 胰蛋白酶 (Sigma, 美国); PBS (Gibco, 美国); 青霉素/链霉素 (Sigma, 美国); Ckip-1 siRNA (吉玛, 上海); Hoechst (碧云天, 中国); β -甘油磷酸钠 (Sigma, 美国); 地塞米松 (Sigma, 美国); 维生素 C (Sigma, 美国); 新生 SD 大鼠 (第四军医大学实验动物中心); Hoechst 染色试剂盒 (碧云天, 中国); CCK-8 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); ALP 染色试剂盒 (碧云天, 中国); 0.1% 天狼星红/苦味酸染色试剂 (第四军医大学骨科实验室); 茜素红试剂 (Sigma, 美国); 24、96 孔培养板及细胞培养瓶 (Nunc, 美国)

1.2 主要仪器

超净工作台 (苏州净化); 细胞培养箱 (Thermo, 美国); 激光共聚焦显微镜 (Olympus FV1000, 日本); 倒置相差显微镜 (Leica DM6000B, 德国); 分光光度计 (Thermo Scientific NanoDrop 2000, 美国); 体视显微镜 (Leica M80, 德国)

2 实验方法

2.1 rBMMS C 细胞的培养

rBMMS C 取自 1 周龄的 SD 大鼠骨髓。大鼠处死后 75%乙醇消毒 15 min，在无菌条件下将大鼠的两侧股骨和胫骨分离，去净表面附着的组织和骨头双侧干骺端。注射器吸入 PBS 后反复冲洗，将骨髓腔内骨髓等内含物冲入预先配好的 10 mL 含 10%胎牛血清的 α -MEM 培养液中，直至骨头完全成白色。收集液体以 1000 rpm 离心 5 min 后，弃去上清，将细胞重新悬浮于培养基中，反复吹打使细胞团块分散，吹打分散的细胞接种在 50 mL 细胞培养瓶内，在含 5% CO₂ 的 37°C 孵箱内常规培养，避免移动培养瓶。3 天后换液，以后每隔一天换液，定期观察贴壁细胞数目，当细胞达到 80%左右时，胰酶消化，常规传代（比例为 1:2）。之后定期换液，传代。细胞实验部分选取 2-4 代生长状态良好的细胞。

2.2 siCkip-1 的转染

采用 Cy-3 标记的 siCkip-1，按照第一部分实验 2.1 的方法制备形成 TA-CS/siCkip-1 (Cy-3) 试样。将试样置于 24 孔培养板中，rBMMS C 细胞冲悬后以 2×10^4 /孔的密度接种于试样表面。孵育 24 h 后弃去培养液，PBS 轻轻漂洗试样 3-5 遍，每次 3 min。加入 1 mL 的 4%多聚甲醛固定液，固定 15 min 后再用 PBS 漂洗 3-5 遍，每次 3 min。每孔加入 Hoechst 染液 300 μ L，孵育 5 分钟后吸除染色液，PBS 洗涤试样 2-3 次。激光共聚焦观察 siCkip-1 细胞转染并采集图像。

2.3 种植体表面细胞增殖的测定

构建不同处理的试样表面，PT 试样 ⁶⁰Co 照射消毒后，在无菌条件下按第一部分实验 2.1.4 的方法处理形成 PT、TA、TA-CS、TA-CS/siNC、TA-CS/siCkip-1。细胞培养方式同第二部分实验 2.1。将各组试样分别放入 24 孔板中，rBMMS Cs 细胞冲悬后以 2×10^4 /孔的密度接种于试样表面。细胞培养 1 天，4 天及 7 天后，采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况，方法如下，PBS 漂洗试样 3-5 次，每次 3 分钟。将 400 μ L 细胞培养液和 40 μ L CCK-8 检测液混合后加入各个试样孔内，将培养板避光放在震荡机上快速震荡 5 min，使培养液和检测液充分混匀后，置于 37°C 孵箱内孵育。2 h 后取出培养板，每孔吸出 100 μ L 染色液，转移到 96 孔板内，应用分光光度计测定

波长 450 nm 时的吸光度值。

2.4 种植体表面碱性磷酸酶表达的检测

分组情况、细胞培养及接种方法同第二部分 2.3。细胞接种两天后，弃去原培养液，改用成骨诱导培养液（含 10%胎牛血清、10 mM β -甘油磷酸钠以及 0.1 μ M 地塞米松和 0.2 mM 维生素 C 的 α -MEM 改良型培养基）培养细胞，每隔一天更换一次成骨诱导培养液。培养 7 天后吸除培养液，PBS 漂洗 3-5 次，每次 3 分钟。4% 多聚甲醛固定细胞 15 min 后并用 PBS 漂洗后，应用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒检测试样表面 ALP 表达情况。配制检测液，比例如下：

| | |
|----------------|------------|
| 碱性磷酸酯酶显色缓冲液 | 6 mL |
| BCIP 溶液(300X) | 20 μ L |
| NBT 溶液(150X) | 40 μ L |
| BCIP/NBT 染色工作液 | 6.06 mL |

每孔加入 500 μ m 检测液，孵育显色 20 分钟后吸去染色液，加入去离子水终止反应，漂洗 3-5 次后，室温干燥试样，体式显微镜下观察并采集图像。

2.5 种植体表面胶原分泌的检测

分组情况、细胞培养、接种及成骨诱导过程同第二部分实验 2.4。细胞培养接种，成骨诱导 14 天后吸去培养液，终止培养。PBS 漂洗 3-5 遍，每次 3 分钟，加入 4% 多聚甲醛固定细胞过夜。PBS 漂洗后，使用预先配制的 0.1%天狼星红/苦味酸染色液对胶原进行染色：每孔加入 500 μ L 染色液，室温条件下避光染色 24 h 后，去离子水终止反应，漂洗后室温干燥，体式显微镜观察采集图像。对各组试样表面胶原分泌情况半定量分析：用 0.2 M 氢氧化钠溶液和 99%甲醇以 1:1 的体积比混合配制成胶原洗脱液，每孔加入 500 μ L。室温条件于摇床上振荡洗脱半小时后，将染色液等体积（每孔 100 μ L）加入 96 孔板，应用分光光度计测定波长 540 nm 时的吸光度值。

2.6 种植体表面细胞外基质矿化的检测

分组情况、细胞培养、接种及成骨诱导同第二部分实验 2.4。细胞培养接种、成骨诱导 21 天后，弃去培养液，PBS 漂洗 3-5 遍，每次 3 分钟。4%多聚甲醛固定细胞 15 min，PBS 再次漂洗。每孔加入 500 μ L 配制好的 40 mM 的茜素红，室温避光染色 20 min 后去离子水终止反应，用去离子水多次漂洗直至漂洗液无红色析出为止。室

温干燥后，将试样取出，体式显微镜下观察并拍照。对各组试样表面矿化结节形成能力进行半定量分析：将氯化十六烷基吡啶溶解在 10 mM 磷酸钠溶液中配制形成矿化结节洗脱液。每孔加入 500 μL 。室温条件下于摇床上振荡洗脱 15min 后，将染色液等体积（每孔 100 μL ）加入 96 孔板，应用分光光度计测定波长 620 nm 时的 OD 值。

2.7 数据统计分析

该数据描述均采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm\text{sd}$)的形式，统计学分析使用 SPSS 17.0 (SPSS, USA)软件, GraphPad Prism 5 统计软件做图。各组之间差异比较采用 one way ANOVA 和 Student-Newman-Keuls *post hoc* tests 检验， $p<0.05$ 具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 激光共聚焦观察转染效果

以 Cy-3 荧光标记的 siCkip-1 作为示踪剂，CS/siCkip-1 转染细胞后，激光共聚焦观察红色荧光的 siCkip-1 及 Hoechst Dye 蓝染的细胞核。由图 2.1 可以看出，红色荧光的 siCkip-1 主要分布在蓝染的细胞核的周围，部分还可以进入细胞核内部。siCkip-1 的分布和细胞分布基本一致，图像中没有细胞的位置仅可见少量 siCkip-1 的分布。

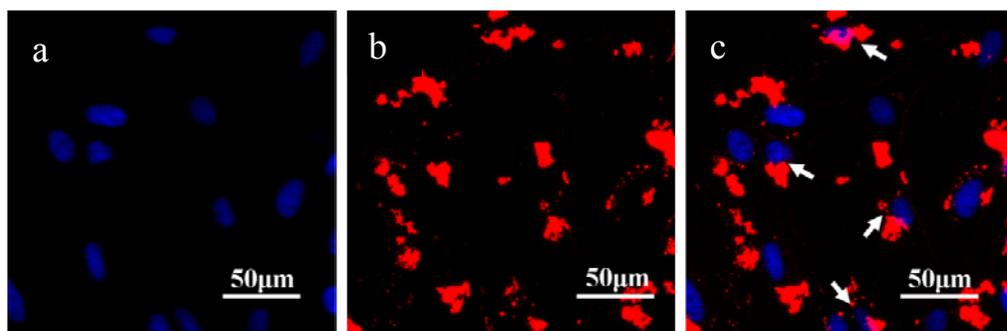


图 2.1 CS/siCkip-1 复合物转染 rBMMSC 细胞 48 h 后，激光共聚焦扫描图像。(a) Hoechst Dye 标记的细胞核（蓝色）、(b) Cy-3 荧光标记的 siCkip-1（红色）和 (c) 合并的照片。

3.2 种植体表面细胞增殖情况

图 2.2 显示的是 CCK-8 法检测的接种 1、4 及 7 天后，各组试样表面的细胞增殖情况。统计结果可以看出，从 1 天至 7 天，随着细胞培养时间的延长，各组试样表

面的细胞活性均呈上升趋势。相比纯钛试样，碱热处理后，试样表面细胞增殖水平明显提高。TA、TA-CS、TA-CS/siNC 和 TA-CS/siCkip-1 在各个时间点各组间细胞增殖水平无统计学差异，但都显著高于 PT 组 ($p<0.05$)。

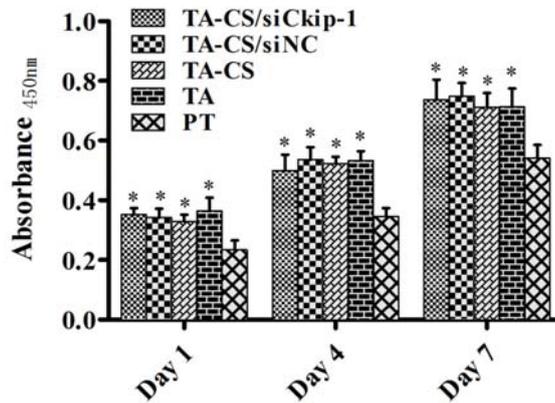


图 2.2 CCK-8 法检测的 rBMMSCs 在各组试样表面接种 1、4 及 7 天后的细胞增殖活性。*表示与 PT 组相比有统计学差异 ($p<0.05$)

3.3 种植体表面的碱性磷酸酶表达水平

成骨诱导 7 天后，各组试样表面 ALP 表达情况如图 2.3 所示。各组试样表面均可观察到蓝紫色碱性磷酸酶颗粒。TA-CS/siCkip-1 组的颜色最深，ALP 表达水平高于其他组。TA、TA-CS 和 TA-CS/siNC 三组 ALP 表达量相近，虽低于 TA-CS/siCkip-1 组，但相比于光滑钛组有所增加。

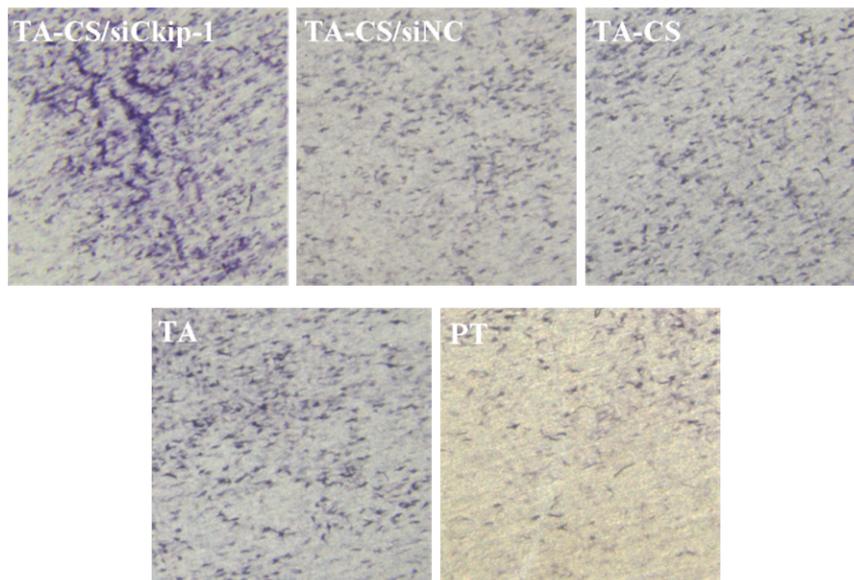


图 2.3 成骨诱导 7 天后，rBMMSCs 在各组试样表面碱性磷酸酶 (ALP) 的表达。

3.5 种植体表面胶原分泌能力

应用苦味酸/天狼星红染色法对成骨诱导 14 天后试样表面分泌的胶原进行染色。图 2.4 可见，胶原染色后，呈现出红色，不规则的纤维状结构。根据红色的深度可以看出，各组胶原分泌情况与 ALP 表达一致。PT 组胶原分泌最少，TA-CS/siCkip-1 组分泌能力显著增高，优于其余四组，TA、TA-CS 和 TA-CS/siNC 则介于两者之间。半定量结果呈现出相同的趋势，TA-CS/siCkip-1 胶原分泌能力约为 PT 组的 2 倍、其余三组的 1.5 倍左右。

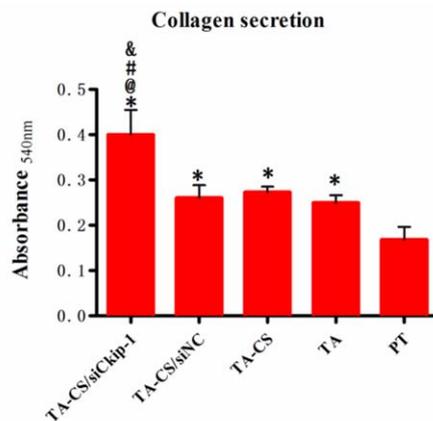
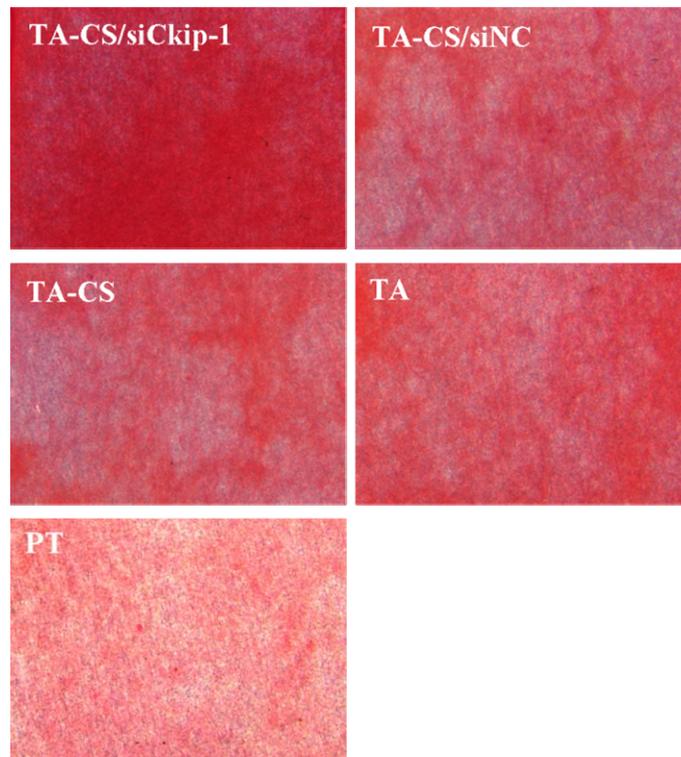


图 2.4 成骨诱导 14 天后，rBMSCs 在各组试样表面的胶原分泌。上图为体式显

显微镜拍摄的胶原染色照片，下图为胶原分泌的定量分析结果。*表示与 PT 组比较有统计学差异 ($p<0.05$)；@示与 TA 组比较有统计学差异 ($p<0.05$)；#表示与 TA-CS 组比较有统计学差异 ($p<0.05$)；&表示与 TA-CS/siNC 组比较有统计学差异 ($p<0.05$)

3.6 种植体表面细胞外基质矿化水平

茜苏红染色可以显示成骨诱导 21 天后，细胞外基质矿化形成的矿化结节。图 2.5 可以看出，经染色后，矿化结节表现为没有固定形状的红色的结节状物。体式显微镜图像和半定量结果趋势一致，较 PT、TA、TA-CS、TA-CS/siNC 组，TA-CS/siCkip-1 能够诱导更多的细胞外基质矿化。TA、TA-CS 和 TA-CS/siNC 组细胞外基质矿化水平显著高于 PT 组 ($p<0.05$)。

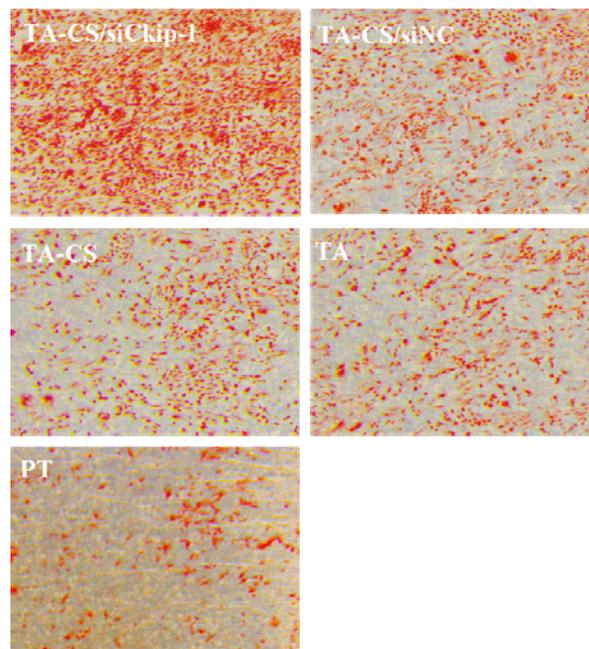


图 2.5 成骨诱导 21 天后，各组试样表面的细胞外基质矿化水平。上图为体式显微镜

拍摄的各組试样表面矿化结节染色图，下图为细胞外基质矿化的定量分析结果。*表示与 PT 组比较有统计学差异($p<0.05$)；@示与 TA 组比较有统计学差异($p<0.05$)；#表示与 TA-CS 组比较有统计学差异 ($p<0.05$)；&表示与 TA-CS/siNC 组比较有统计学差异 ($p<0.05$)

4 讨论

Zhang 等^[7]研究发现，相比于裸露 siRNA，合适的载体的选择能够携带 siCkip-1，使其更有效的转染入细胞，发挥 RNAi 效应，影响成骨分化。本实验中，我们使用壳聚糖/siCkip-1 (Cy-3) 转染细胞，细胞核行 Hoechst 染色后，使用激光共聚焦系统观察荧光情况。细胞接种 48 h 后，可以观察到明显的红色荧光 siCkip-1 环绕蓝染的细胞核周围，且红色荧光的分布与细胞分布一致，这与文献中 CS/siRNA 转染后的分布情况一致^[93]。这一结果说明 150 kDa，95% 脱乙酰度的壳聚糖是高效的基因载体，以合适的 N/P 比结合形成 CS/siCkip-1 复合物能够将 siCkip-1 高效转染进入细胞，成为其后续结合 RISC、降解 Ckip-1mRNA、实现基因沉默效应作用基础。在今后的研究中，我们还需要对转染效率进行测定，同时通过优化壳聚糖参数、壳聚糖/siRNA 配比等方式，获得最优的转染效率。

成骨分化过程主要包括三个阶段^[101]，细胞增殖、细胞外基质的成熟、细胞外基质的矿化。细胞在种植体表面的黏附增殖是第一步，本实验中，我们用 CCK-8 法测量细胞接种后 1、4、7 天的增殖情况，发现细胞增殖能力随着时间的延长呈整体上升趋势。与 PT 相比，碱热处理后，细胞增殖活性明显提高，壳聚糖及 CS/siCkip-1 复合物加载后，细胞仍保持较高的增殖水平。我们认为细胞增殖能力受到了材料亲水性、表面蛋白量的双重影响。Gittens RA 等对材料表面亲水性与细胞增殖的关系进行分析^[102]，发现亲水的表面比疏水表面更有利于早期细胞的黏附、增殖、促进成骨分化和骨沉积。Christina Kim 等^[95]将 MC3T3-E1 等细胞接种于碱热处理形成的高亲水性材料后，发现细胞增殖水平明显高于钛表面。表面蛋白吸附作为种植体植入后宿主生物反应的第一步，会对宿主细胞的伸展、增殖分化等能力产生影响，影响骨形成^[97]。因此，TA-CS/siCkip-1 表面较高的细胞增殖活性可能是这两种因素共同作用的结果。

成骨分化第二阶段为细胞外基质成熟，其标志是 ALP 活性的提高和胶原合成。

ALP 是成骨细胞产生的酶，作为成骨分化的产物，ALP 表达水平标志着成骨细胞及骨形成活性，是评价成骨细胞活性最重要的生物化学标志物之一^[103]。胶原的分泌是结缔组织形成的关键因素^[104]。成骨细胞可产生 I 型和 III 型胶原，I 型胶原也是成骨细胞早期标志，是骨主要的细胞外基质成分，能够起到维持组织构架的作用，是矿物质沉积的基础。成骨分化最后阶段为细胞外基质矿化^[105]，矿化结节是成熟骨细胞重要的功能标志。在本实验中，我们分别用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色，天狼星红/苦味酸染色和茜素红染色法对 ALP 表达，胶原分泌及细胞外基质矿化能力测定。结果表现出相同的趋势，与对照组相比，TA-CS/siCkip-1 能显著地提高 ALP 表达、胶原分泌量和细胞外基质矿化水平，促进了 rBMMSC 的成骨分化。

5 结论

- (1) siCkip-1 在壳聚糖载体的作用下，能够高效的转染入胞，分布在细胞核周围。
- (2) 与 PT 相比，碱热处理后试样表面的 rBMMSC 细胞增殖能力显著提高。以 TA 为基底的各组 (TA、TA-CS、TA-CS/siNC、TA-CS/siCkip-1) 种植体均表现出良好的细胞生物相容性，细胞的增殖活性没有明显的差异。
- (3) siCkip-1 在细胞内发挥 RNA 干扰作用，相比对照组，增强了成骨分化过程中 ALP 合成、胶原分泌和细胞外基质矿化，显著促进 rBMMSC 的成骨分化。

第三部分 CS/siCkip-1 功能化种植体对骨质疏松大鼠 种植体骨结合效应的评价

骨质疏松被认为是牙科种植体应用的危险因素之一。骨质疏松条件下，成骨与破骨失衡，一方面使患者自身骨质破坏、骨量降低，另一方面，种植体周围骨形成能力减弱，影响种植体的稳定和成功率。大量研究认为，种植体通过合适的表面修饰（理化修饰和生物修饰）后，能够在局部发挥促成骨效应，是提高骨质疏松条件下骨结合的有效途径。Ckip-1 是骨形成的负调控因子，以往研究已经证实，体内系统性全身应用 siCkip-1 能够特异性沉默 Ckip-1，进而产生对正常和骨质疏松条件下骨形成的促进作用。在本实验中，我们将 siCkip-1 生物功能化的种植体植入骨质疏松大鼠体内，运用 Micro-CT 重建分析、组织学染色（VG 染色）、骨-种植体接触界面 EDX 线扫描、生物力学测试（拔出实验）等方法评价 siCkip-1 的体内成骨功效。为对骨质疏松及其它疾病有治疗作用的 siRNA 应用于种植体表面修饰，提供研究依据和新的思路。

1 材料、试剂和仪器

1.1 主要材料和试剂

规格为 $\text{Ø}1.56\text{mm} \times 12\text{mm}$ 的纯钛棒（西北有色金属研究院提供）；按照第一部分 2.1.4 的方法制备的 TA、TA-CS、TA-CS/siNC、TA-CS/siCkip-1 种植体；1%戊巴比妥、4%多聚甲醛（科昊，西安）、注射用青霉素、苦味酸-酸性品红（VG）染色液（第四军医大学骨科实验室提供）。

1.2 实验动物

选用两月龄的 SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只（解放军第四军医大学动物中心提供），体重约为 200-250 g，常规饲养。

1.3 实验仪器

种植系统（KAVO，德国）；micro-CT 系统（Siemens Inveon CT，德国）；硬组

织切片机 (leica SP1600, 德国); 万能试验机 (AGS-10KNG, 日本); 扫描电子显微镜 (S-4800, 日本); 体式显微镜 (leica M80, 德国)

2 实验方法

2.1 大鼠骨质疏松模型的建立

2.1.1 去势手术

将 75 只大鼠随机分为去势手术组 (OVX, 65 只) 和假手术组 (SHAM, 10 只), 于第四军医大学口腔医院动物中心常规饲养 10 天, 适应环境。对 OVX 组施以双侧卵巢切除术: 选用 1%戊巴比妥以 40 mg/kg 剂量腹腔注射, 麻醉大鼠后将其俯卧固定。触及背部中线及肋骨下缘, 在其交角的旁开一指部位做一横向长约 1.5 cm 的切口, 分离皮肤, 皮下筋膜等进入腹腔, 即可看见白色脂肪。将脂肪轻轻提出, 在深面即可见到粉红色卵巢和细长的输卵管。止血钳夹住卵巢下输卵管的位置, 完整切除卵巢, 输卵管结扎。将脂肪组织轻轻放入腹腔, 避免损伤腹部脏器, 分层严密缝合。术后连续注射青霉素三天, 预防感染。SHAM 组保留卵巢, 仅切除和 OVX 组相同质量的脂肪组织, 其余手术方法相同。常规饲养, 定期观察。

2.1.2 评价骨质疏松建模情况

大鼠常规饲养三个月后, 各组随机选取 8 只, 过量麻药注射处死。取双侧股骨, 去净附着的肌肉等组织, 置于 4%多聚甲醛中固定样本。固定三天后, 将样本置于 Micro-CT 机中进行全方位扫描和三维重建。选取感兴趣部位 (ROI) 为股骨远端干骺端, 得到 2-D 和 3-D 方向的扫描重建图, 检测指标为: (1) 骨体积分数 (bone volume fraction, BV/TV), 是指在选择的感兴趣区 (ROI) 的总体积中, 骨小梁的体积所占的百分比; (2) 骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th), ROI 范围内骨小梁厚度的测量值, 单位为 mm; (3) 骨小梁数目 (trabecular number, Tb.N), ROI 范围内总的骨小梁数目, 单位为 mm^{-1} ; (4) 骨小梁间隙 (trabecular spacing, Tb.Sp) ROI 范围内骨小梁之间的间隔距离, 单位为 mm。结合 OVX 及 SHAM 组重建图像及骨小梁各参数的定量分析结果, 评价骨质疏松建模情况。

2.2 种植体植入手术

手术动物为第三部分实验 2.1 建立的骨质疏松大鼠。手术过程如图 3.1 :大鼠仰卧,

1%戊巴比妥以 40 mg/kg 剂量腹腔麻醉。触及膝关节后，左手稳定固定。在膝关节内侧部位做一长约 1.5 cm 长的纵向切口，轻柔分离皮肤，皮下组织及脂肪，直至关节囊的位置。稳定固定股骨，在生理盐水冲洗冷却下，种植机钻头以 2000 rpm 的转速在关节囊稍上方位置向骨髓腔方向快速钻入形成长 12 mm，直径 1.56 mm 的种植窝。生理盐水轻轻冲洗种植窝后，置入种植体，分层严密缝合创口。将各组大鼠分笼饲养，做好分组标记。术后连续注射三天青霉素，密切观察大鼠状态和伤口状况，常规饲养。

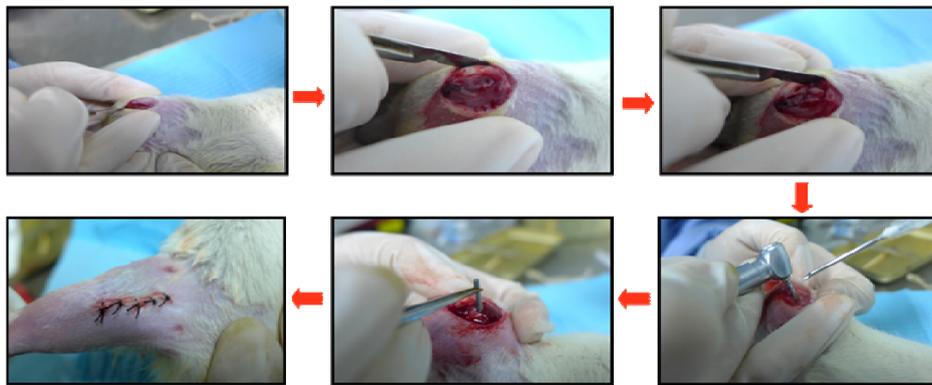


图 3.1 种植体植入手术过程图。(切开→分离→暴露→备窝→植入→缝合)

2.3 不同时期（4 w、12 w）骨结合的评价

2.3.1 新生骨的 Micro-CT 重建分析

植入术后 12 周，随机选择每组 5 只大鼠，过量麻药处死并取双侧带种植体的股骨，4% 多聚甲醛固定。固定三天后，将股骨从多聚甲醛中取出，使用 Micro-CT 系统进行扫描重建及分析。选取的 ROI 区域在矢状面上为股骨干骺端生长线以下 1 mm - 3 mm 的种植体范围，横截面上为距种植体表面 200 μm 的环形区域（如图 3.2）。通过扫描得到二维和三维的重建图，对 ROI 区新骨进行分析选取的骨小梁参数的检测指标为：（1）骨体积分数（BV/TV）；（2）骨小梁厚度（Tb.Th）；（3）骨小梁数目（Tb.N）；（4）骨小梁间隙（Tb.Sp）。

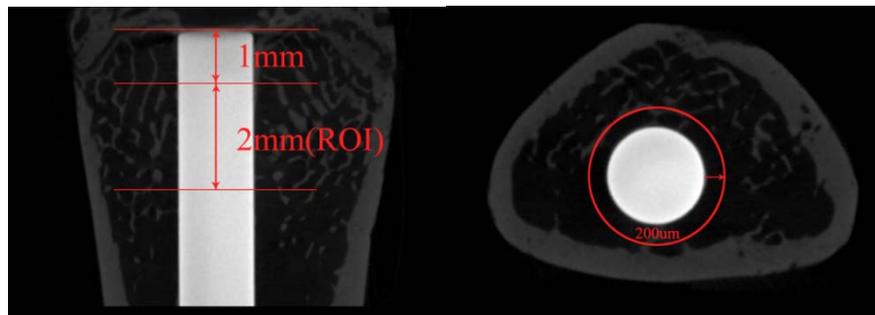


图 3.2 Micro-CT 分析种植体周围成骨时选取的感兴趣区（ROI）示意图。

2.3.2 新生骨的组织学染色观察

种植术 4 周和 12 周后, 随机选取每组 5 只大鼠, 过量麻药处死并取材, 取材后立即将左侧股骨放入液氮内保存, 用于后续拔出试验。右侧股骨放入 4% 多聚甲醛固定液中, 固定样本。固定三天后, 取出样本, 对股骨进行修整, 去除股骨近端不含种植体的部分。经 70%、80%、95%、100% 梯度酒精脱水、二甲苯透明、渗透液渗透一系列处理后, 将样本树脂包埋。切片时, 将包埋块固定在硬组织切片机上, 在流水冷却下沿着平行于种植体长轴的方向切出厚约 200 μm 的包含种植体的超硬切片。将切片固定在载玻片上, 流水冷却下置于磨片机上磨至厚约 70 μm 。切片抛光冲洗后, 置于配制好的 VG 染液中染色 15 min, 最终梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

2.3.3 骨-种植体界面元素扫描分析

术后 12 周, 将第三部分 2.3.2 实验中的切片后剩余的包埋块修整至厚度约 3 mm, 固定在扫描电镜试样板上。使用扫描电镜观察骨种植体界面并采集图像, 应用扫描电镜的能量色散 X 射线光谱 (EDX) 系统, 随机选取观察视野内一条跨越骨-种植体界面的线, 对这条线上的元素进行扫描和定量分析, 观察该区域内所含元素的种类、含量及分布变化情况。

2.3.4 骨结合的机械力学测定 (拔出实验)

种植术后 4 周及 12 周, 拔出实验测量骨种植体机械结合力。将第三部分实验 2.3.2 中保存于液氮中的埋有种植体的股骨取出, 用涡轮机切削掉一部分干骺端种植体周围的骨, 暴露出长约 4 mm 的种植体。将暴露出的种植体和另一端骨头分别用自凝树脂包埋固定, 形成长方体的树脂块。固定好后, 将树脂块两端固定在万能试验机的固定装置的两端, 调整位置, 确保拔出的方向沿着种植体的长轴。将拔出速度设定匀速的 1 mm/min, 记录种植体拔出瞬间的力值即最大拔出力 (Maximal pull-out force), 计算相应的剪切强度 (Ultimate shear strength)。

2.4 统计分析

该数据描述均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm\text{sd}$) 的形式, 统计学分析使用 SPSS 17.0 (SPSS, USA) 软件, 各组之间差异比较采用 one way ANOVA 和 Student-Newman-Keuls *post hoc* tests 检验, $p<0.05$ 具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 骨质疏松模型成功建立

去势手术 12 周后，应用 Micro-CT 扫描去势组及假手术组股骨干骺端，分析骨小梁参数，结果如图 3.3 所示。由重建图像可见，SHAM 骨密度较高，骨小梁排列致密，OVX 骨密度明显降低，骨小梁较细且骨小梁之间存在大量空隙，排列疏松。定量分析结果与重建图像所显示一致，与 SHAM 相比，去势组骨小梁参数 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 值都显著降低($p<0.05$)，Tb.Sp 值则显著增高($p<0.05$)，骨质疏松模型建立成功。

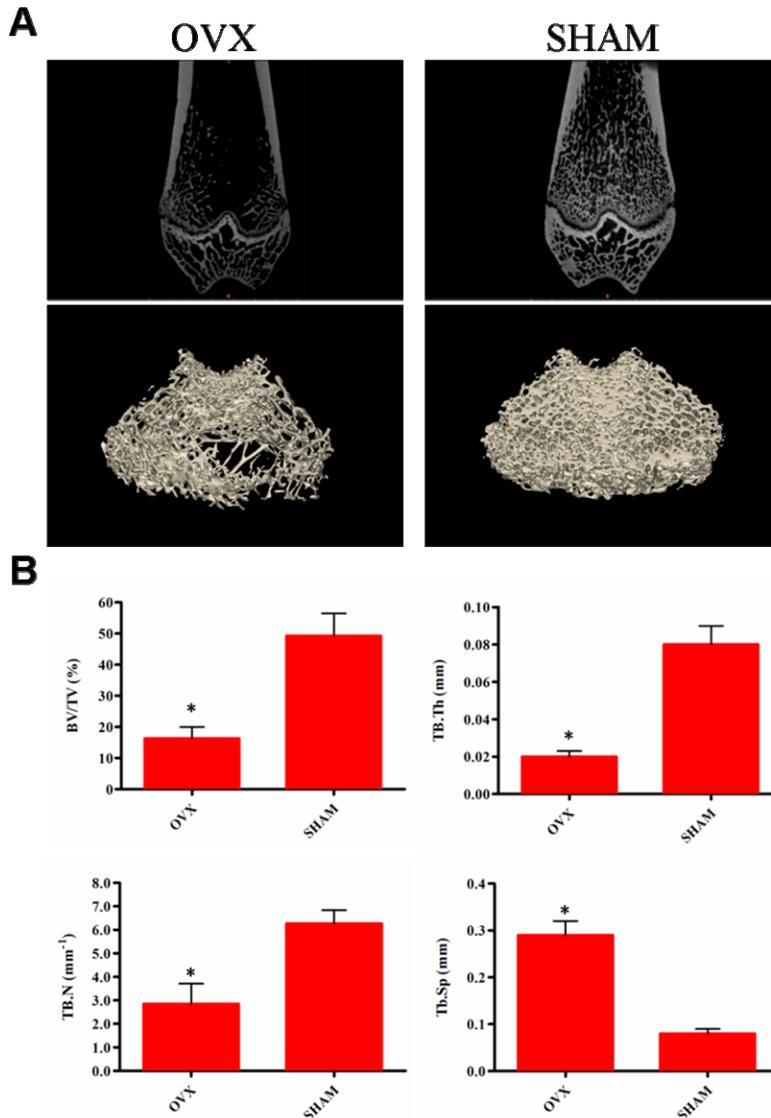


图 3.3 (A) 去势手术 3 个月后去势组 (OVX) 与假手术组 (SHAM) 股骨远端干骺端的 Micro-CT 二维及三维扫描图像。(B) 去势组 (OVX) 与假手术组 (SHAM) 骨小梁参数：骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数目 (Tb.N)、和骨小梁间隙 (Tb.Sp) 的定量分析结果。*表示与 SHAM 相比有统计学差异 ($p<0.05$)

3.2 Micro CT 新生骨重建及定量分析

图 3.4 显示了 Micro CT 扫描重建及分析结果。图 A 中的横截面二维图像可以看出，TA-CS/siCkip-1 组种植体周围可见一圈围绕着种植体的新骨，连续且均匀。TA、TA-CS、TA-CS/siNC 种植体周围观察到的新骨较少，在种植体表面间断不连续，且厚度不均一。三维图像观察，TA、TA-CS、TA-CS/siNC 表面骨分布不均匀，有的部分种植体表面未见骨覆盖，新骨排列较疏松。而 TA-CS/siCkip-1 组试样周围新骨形成量明显增高，白色的新骨完全覆盖并紧密贴合在整个种植体周围，形成良好的骨-种植体结合。骨小梁参数定量分析结果显示：TA-CS/siCkip-1 组 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 明显高于 TA、TA-CS、TA-CS/siNC 组，Tb.Sp 则显著低于这三个对照组，TA-CS/siCkip-1 与对照组骨小梁参数的差异有统计学意义 ($p<0.05$)。

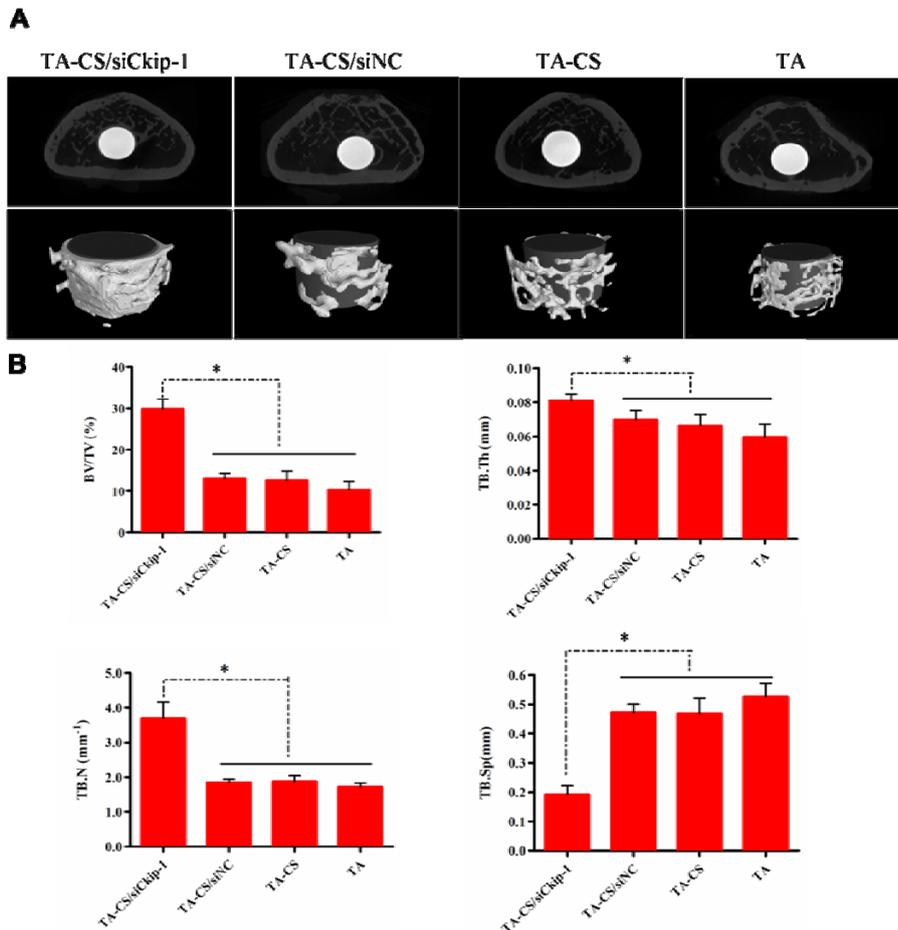


图 3.4 (A) 种植手术 12 周后各组感兴趣区 Micro-CT 二维及三维图像扫描重建图像。(B) 各组感兴趣区内骨小梁参数：骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数目 (Tb.N)、骨小梁间隙 (Tb.Sp) 的定量分析结果。*表示与 TA-CS/siNC、TA-CS、TA 组相比较有统计学差异 ($p<0.05$)

3.3 VG 染色观察新生骨情况

如图 3.5，种植体表面新骨与苦味酸-酸性品红染色液发生反应，显示出紫红色。4 周时，各组试样表面新骨形成量均较少，TA、TA-CS、TA-CS/siNC 仅能够观察到小范围的紫红色块状新骨沉积，且新骨间断不连续，与种植体结合不紧密且可见间隙。TA-CS/siCkip-1 则可见覆盖于种植体表面的连续骨沉积，厚度约为 20 μm 。12 周时，TA-CS/siCkip-1 诱导更多的新骨形成，骨量较 4 周明显增加，新骨与种植体接触紧密，厚度约为 90 μm 。TA、TA-CS、TA-CS/siNC 组较 4 周时，骨形成量有所增加，表现为种植体薄层的连续新骨沉积，但沉积的新骨厚度仍明显低于 TA-CS/siCkip-1 组。

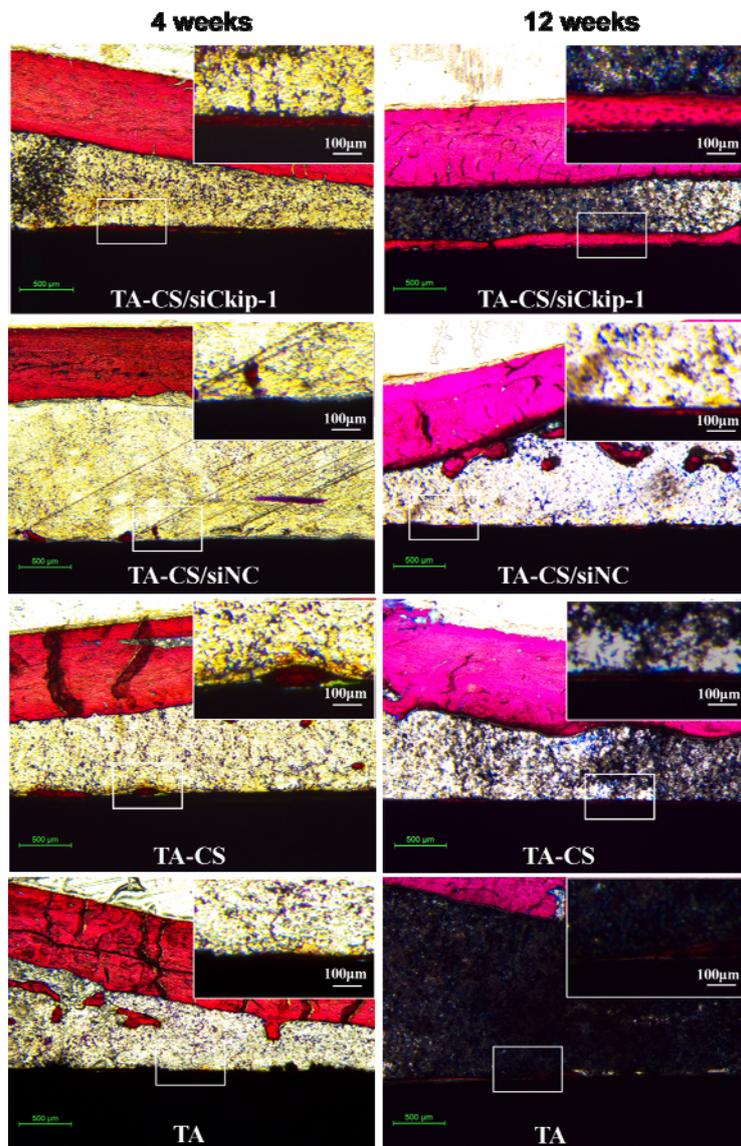


图 3.5 种植手术 4 周及 12 周后 TA、TA-CS、TA-CS/siNC 和 TA-CS/siCkip-1 各组种植体表面新生骨的 VG 染色图。

3.4 骨-种植体界面元素 EDX 扫描分析结果

对术后 12 周的骨-种植体接触界面元素进行 EDX 线扫描，结果如图 3.6 所示。种植体界面元素以 Ti 为主，骨髓腔侧元素则主要以 C、O 为主。从种植体到骨髓腔侧扫描，到达骨-种植体界面时 Ti 元素含量迅速降低，伴随 Ca、P 元素含量的明显上升及 C 及 O 元素含量的轻度上升，这一范围为形成的新骨层。对元素含量进行定量，各组新骨层中 Ca、P 含量比相近，约为 2 : 1。分析新骨层厚度可见，TA、TA-CS、TA-CS/siNC 组新骨层厚度约为 20-35 μm ，在 CS-siCkip-1 组则明显增厚，约 85 μm 。

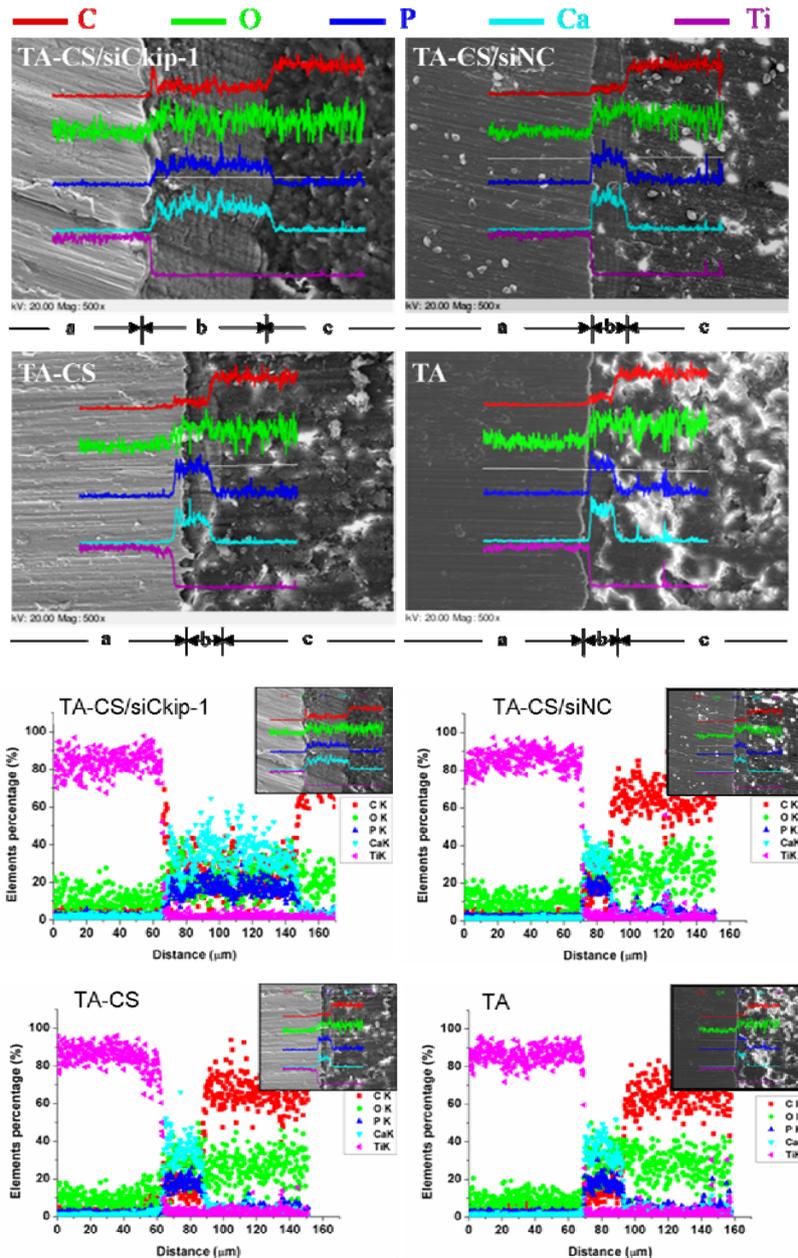


图 3.6 种植手术 12 周后各组骨-种植体接触界面的扫描分析。上图为骨-种植体界面

元素的 EDX 扫描图像 (a:种植体、b:新生骨、c:骨髓腔), 下图为各组骨-种植体接触界面各元素含量的定量分析图。

3.5 种植体拔出力测量结果

种植体拔出力的测量, 是对骨-种植体界面骨结合情况的一种检测手段。最大拔出力 and 剪切强度是反映骨种植体机械结合强度的良好指标, 能反映整个种植体与骨分离瞬间的力值和单位面积骨-种植体的结合力。由表 1 可见, 从 4 周到 12 周的愈合期内, 最大拔出力 and 剪切强度均随着时间的延长而不断增大。TA-CS/siCkip-1 的最大拔出力 (Maximal pull-out force) and 剪切强度 (Ultimate shear strength) 在 4 周和 12 周两个时间点均显著高于 TA、TA-CS、TA-CS/siNC 组 ($p < 0.05$), 数值约为其余组的 1.5 倍左右。

表 1 种植术后 4 周及 12 周各组种植体的最大拔出力 (N) 和剪切强度 (N/mm²)

| Treatment | 4 weeks | | 12 weeks | |
|----------------|----------------------------|--|----------------------------|--|
| | Maximal Pull-out force (N) | Ultimate shear Strength (N/mm ²) | Maximal Pull-out force (N) | Ultimate shear Strength (N/mm ²) |
| TA-CS/siCkip-1 | 46.67±4.01* | 1.09±0.12* | 93.05±8.85* | 2.17±0.20* |
| TA-CS/siNC | 33.90±3.96 | 0.79±0.07 | 56.30±5.01 | 1.31±0.11 |
| TA-CS | 32.07±3.15 | 0.75±0.07 | 54.03±5.55 | 1.26±0.12 |
| TA | 29.37±2.63 | 0.68±0.06 | 48.53±4.17 | 1.13±0.09 |

* $p < 0.05$

4 讨论

Lu 等^[89]对 Ckip-1 影响成骨的分子机制进行全面分析, 认为 Ckip-1-Smurfl 相互作用可以作为治疗靶点, 用于研究骨疾病如骨质疏松症的治疗。Zhang 等^[7]将 siCkip-1 通过静脉注射全身应用于骨质疏松大鼠体内, 使骨量增加, 骨微观结构得到明显改善, 证实其全身应用于骨质疏松时的成骨促进作用。我们创新性的将 CS/siCkip-1 功能化的种植体植入骨质疏松大鼠体内, 评价其骨结合情况, 初步探究 siCkip-1 能否在种植体周围局部发挥作用。

骨-种植体骨结合的评价包括宏观及微观的多种方法。宏观方面包括松动度等大体观察、CT 等影像学观察、生物力学测试等。微观方面包括硬组织切片染色、脱钙

骨免疫组化、电镜观察、EDX 扫描等。Micro-CT 能够在不破坏标本原貌的情况下，对标本进行全方位三维空间的扫描，通过三维重建真实的还原其结构。在此基础上利用分析软件选择感兴趣区，定量分析感兴趣内骨的微观结构参数，是分析比较骨结合的一种优良方法^[106]。组织学染色能够对通过特定的化学反应，使特定组织显色，有利于骨代谢、重建和结构的分析。常用的骨组织染色有甲苯胺蓝蓝色、Goldner 三色法、苦味酸酸性品红（VG）染色^[107]。骨种植体的结合强度对种植体的稳定性与长期成功十分重要，种植体的结合的机械力学测定包括拔出实验、扭转实验等，对于圆柱形种植体分析时常采用拔出实验。

在本实验中，我们参考以往文献选择感兴趣区^[24]，应用 Micro-CT 重建获得横截面和三维图像，观察到 CS/siCkip-1 组形成的新骨围绕种植体周围，且骨量大，结构致密。定量分析感兴趣区内 BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp 四个骨小梁参数可见，TA-CS/siCkip-1 组 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 均明显高于其余对照组，Tb.Sp 明显低于其它组。VG 染色观察种植体周围新骨，发现各组新骨形成均随时间而增加，TA-CS/siCkip-1 组表现出最高的厚度和连续性。对骨种植体界面元素进行 EDX 分析，各组种植体周围新骨层中 Ca、P 元素含量明显上升且 Ca/P 比基本相同约为 2:1，这一比例类似于与正常骨组织，且 TA-CS/siCkip-1 新骨层厚度明显高于其余对照组。拔出力值受到新骨形成量骨和骨结构的影响，表现出时间依赖性，随着时间延长各组最大拔出力值和剪切强度均呈现上升趋势，且 TA-CS/siCkip-1 组在各个时间点拔出力的显著高于其余组。综合以上结果，我们认为，siCkip-1 加载与种植体表面植入体内后，能够在局部释放，进入种植体周围细胞，发挥基因沉默作用，促进种植体的骨结合。

EDX 对骨-种植体界面进行分析显示，形成的新骨紧密结合在种植体的表面。在种植体表面没有检测到壳聚糖的主要元素之一氮元素的存在，说明壳聚糖已经全部降解。壳聚糖本身具有生物可降解性，其降解速率受到壳聚糖脱乙酰化等因素的影响^[108]。作为基因载体，壳聚糖在体内的降解伴随着 siRNA 的释放，可能与 siRNA 的效能有关。因此，在今后研究中，需要选择合适的方法，研究壳聚糖的体内外降解及复合物中 siRNA 释放的速率，深入了解其体内整个作用周期，更好的指导 siRNA 功能化种植体的研究和应用。

5 结论

- (1) 对雌性 SD 大鼠施行双侧卵巢切除术，术后三个月后骨质疏松建模成功。
- (2) CS/siCkip-1 功能化的种植体能够在骨质疏松条件下发挥 RNA 干扰作用，促进骨质疏松种植体周围早期、良好骨结合的形成。

小 结

本研究创新性的将 RNA 干扰技术与种植体表面碱热处理相结合，成功构建出 CS/siCkip-1 修饰的功能化种植体。对该种植体表面性状进行分析，观察表面 Ckip-1siRNA 加载分布和大鼠骨髓间充质干细胞转染情况，评估该种植体诱导大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的能力和对骨质疏松大鼠种植体骨结合的作用效应。结果如下：

1. siCkip-1 能够通过静电作用与壳聚糖形成粒径分布一致、呈正电性的复合物，该复合物能够成功加载在碱热处理种植体表面，构建出 CS/siCkip-1 生物功能化的种植体。siCkip-1 在该种植体表面均匀密集分布，且 CS/siCkip-1 表面加载促进了种植体表面蛋白吸附能力。
2. CS/siCkip-1 功能化的种植体能够使 siCkip-1 高效地转染进入大鼠骨髓间充质细胞内，表现出良好的生物相容性，促进种植体表面细胞增殖。同时，该种植体能够促进间充质干细胞成骨分化，使种植体表面碱性磷酸酶的合成、胶原分泌及细胞外基质矿化水平显著提高。
3. CS/siCkip-1 功能化的种植体能够在骨质疏松动物体内发挥作用，诱导骨形成，提高骨形成质、量及骨种植体结合强度，在种植体周围形成良好的早期骨结合。

综上所述，研究表明种植体的 siRNA 生物功能化修饰是可行的，可以用来提高骨质疏松条件下种植体的骨结合能力。同时，该研究也为其它具有治疗作用的 siRNA 的种植体表面修饰提供了借鉴，为种植体表面优化提供了指导和新的思路。今后的研究中，我们一方面将尝试载体参数等的优化，以获得更高效的 siRNA 表面加载及细胞转染，另一方面，采用不同的 siRNA 或尝试多种 siRNA 的联合应用，进一步提高种植体骨结合。

参考文献

- [1] Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007;370(9597):1508-19.
- [2] Parithimarkalaigan S, Padmanabhan TV. Osseointegration: An Update. *J Indian Prosthodont Soc*. 2013;13:2-6.
- [3] Fini M, Giavaresi G, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(9):487-93.
- [4] Kim TI, Jang JH, Kim HW, Knowles JC, Ku Y. Biomimetic approach to dental implants. *Curr Pharm Des*. 2008;14(22):2201-11.
- [5] Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2005;107:222-39.
- [6] Wang Y, Grainger DW. Developing siRNA therapies to address osteoporosis. *Ther Deliv*. 2013;4(10): 1239-46.
- [7] Zhang G, et al. A delivery system targeting bone formation surfaces to facilitate RNAi-based anabolic therapy. *Nat Med*. 2012;18(2):307-14.
- [8] Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983;50:399-410.
- [9] Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000. 1998;17:22-35.
- [10] Albrektsson TO, Johansson CB, Sennerby L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. *Periodontol* 2000. 1994;4:58-73.
- [11] Javed F, Ahmed HB, Crespi R, Romanos GE. Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation. *Interv Med Appl Sci*. 2013;5(4): 162-7.
- [12] Fini M, Giavaresi G, Salamanna F, et al. Harmful lifestyles on orthopedic implantation surgery: a descriptive review on alcohol and tobacco use. *J Bone*

- Miner Metab. 2011;29:633-44.
- [13] Mellado-Valero A, Ferrer-Garcia JC, Calvo-Catala J, Labaig-Rueda C. Implant treatment in patients with osteoporosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(1):e52-e7.
- [14] Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther*. 2013;7:435-48.
- [15] von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis a review. *Clin Oral Investig*. 2001;5:71-82.
- [16] Blomqvist JE, Alberius P, Isaksson S, Linde A, Hansson BG. Factors in implant integration failure after bone grafting: an osteometric and endocrinologic matched analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1996;25(1):63-8.
- [17] Motohashi M, Shiota T, et al. Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 87(2):145-52.
- [18] Motohashi M, Shiota T, et al. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87(4):411-8.
- [19] D'Ippolito G, Schiller PC, et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1999;14(7):1115-22.
- [20] Torricelli P, Fini M, et al. Isolation and characterization of osteoblast cultures from normal and osteopenic. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(1):177-82.
- [21] Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone*. 1998;23(2): 75-81.
- [22] Qi MC, Zhou XQ, et al. Oestrogen replacement therapy promotes bone healing around dental implants in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(3):279-85.
- [23] Dikicier E, Karaçaylı Ü, Dikicier S, Günaydın Y. Effect of systemic administered zoledronic acid on osseointegration of a titanium implant in ovariectomized rats. *J*

- Craniomaxillofac Surg. 2014;42(7): 1106-11.
- [24] Li Y, Li X, et al. Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. Clin Oral Implants Res. 2012;23(9):1038-44.
- [25] Honig S, Rajapakse CS, Chang G. Current treatment approaches to osteoporosis - 2013. Bull Hosp Jt Dis (2013). 2013;71(3):184-8.
- [26] Rizzoli R, Reginster JY, et al. Adverse reactions and drug-drug interactions in the management of women with postmenopausal osteoporosis. Calcif Tissue Int. 2011;89(2):91-104.
- [27] Torstrick FB, Guldberg RE. Local strategies to prevent and treat osteoporosis. Curr Osteoporos Rep. 2014;12(1):33-40.
- [28] Alghamdi HS, Jansen JA. Bone regeneration associated with nontherapeutic and therapeutic surface coatings. Tissue Eng Part B Rev. 2013;19(3):233-53.
- [29] Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7(4):329-45.
- [30] Celletti R, Marinho V, et al. Bone contact around osseointegrated implants: a histologic study of acid-etched and machined surfaces. J Long Term Eff Med Implants. 2006;16(2):131-43.
- [31] Liu H, Webster TJ. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. Biomaterials. 2007;28(2): 354-69.
- [32] Webster TJ, Ergun C, et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. J Biomed Mater Res. 2000;51(3):475-83.
- [33] Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. J Biomed Mater Res A. 2004;70(1):129-38.
- [34] Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. Int J Oral Maxillofac Implants. 1988;3(4):231-46.
- [35] Price RL1, Gutwein LG, Kaledin L, Tepper F, Webster TJ. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. J Biomed Mater Res A. 2003;67(4): 1284-93.

- [36] Pachauri P, Bathala LR, Sangur R. Techniques for dental implant nanosurface modifications. *J Adv Prosthodont*. 2014;6(6):498-504.
- [37] Thakral G, Thakral R, Sharma N, Seth J, Vashisht P. Nanosurface - the future of implants. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(5):ZE07-10.
- [38] Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res*. 1996;32:409-17.
- [39] Lee BH, Do Kim Y, Shin JH, Hwan Lee K. Surface modification by alkali and heat treatments in titanium alloys. *J Biomed Mater Res*. 2002;61:466-73.
- [40] Wang XJ, Li YC, et al. In vitro bioactivity evaluation of titanium and niobium metals with different surface morphologies. *Acta Biomater*. 2008;4:1530-5.
- [41] Lee BA, Kang CH, et al. Surface characteristics and osteoblastic cell response of alkali-and heat-treated titanium-8tantalum-3niobium alloy. *J Periodontal Implant Sci*. 2012;42:248-55.
- [42] Jonášová L, Müller FA, Helebrant A, Strnad J, Greil P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials*. 2004;25:1187-94.
- [43] Nishio K, Neo M, et al. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:652-61.
- [44] Pesskova V, Kubies D, Hulejova H, Himmlova L. The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18:465-73.
- [45] Lu X, Wang Y, et al. Spectroscopic analysis of titanium surface functional groups under various surface modification and their behaviors in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84:523-34.
- [46] Nishiguchi S, Nakamura T, et al. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials*. 1999;20:491-500.
- [47] Rakngarm A, Miyashita Y, Mutoh Y. Formation of hydroxyapatite layer on bioactive Ti and Ti-6Al-4V by simple chemical technique. *J Mater Sci Mater Med*.

- 2008;19(5):1953-61.
- [48] Kodama T, Goto T, Miyazaki T, Takahashi T. Bone formation on apatite-coated titanium incorporated with bone morphogenetic protein and heparin. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23:1013-9.
- [49] Bougas K, Stenport VF, Currie F, Wennerberg A. Laminin Coating Promotes Calcium Phosphate Precipitation on Titanium Discs in vitro. *J Oral Maxillofac Res*. 2012;2(4):e5.
- [50] Yang DH, et al. Surface modification of titanium with hydroxyapatite-heparin-BMP-2 enhances the efficacy of bone formation and osseointegration in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014.
- [51] Li Y, et al. Cancellous bone response to strontium-doped hydroxyapatite in osteoporotic rats. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2015;13(1).
- [52] Hong YS, Kim MJ, Han JS, Yeo IS. Effects of hydrophilicity and fluoride surface modifications to titanium dental implants on early osseointegration: an in vivo study. *Implant Dent*. 2014;23(5):529-33.
- [53] Long T, et al. Hydrothermal fabrication of hydroxyapatite/chitosan/carbon porous scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(8):1740-8.
- [54] Tian A, et al. Osteoblast response to titanium surfaces coated with strontium ranelate-loaded chitosan film. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(6):1446-53.
- [55] Hanawa T. A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. *J Periodontal Implant Sci*. 2011;41(6):263-72.
- [56] Pavlova TV, et al. Comparative characterization of the skull bones after implantation of titanium biocomposites containing BMP-2 in their coating structure. *Bull Exp Biol Med*. 2014;158(2):274-7.
- [57] Rammelt S, et al. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials*. 2006;27(32):5561-71.
- [58] Sverzut AT, et al. Effects of type I collagen coating on titanium osseointegration: histomorphometric, cellular and molecular analyses. *Biomed Mater*.

- 2012;7(3):035007.
- [59] Kerr WG, Mulé JJ. Gene therapy: current status and future prospects. *J Leukoc Biol.* 1994;56:210-4.
- [60] Grimm D, Kay MA. RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:473-81.
- [61] Dogini DB, Pascoal VD, et al. The new world of RNAs. *Genet Mol Biol.* 2014;37(1 Suppl):285-93.
- [62] Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(2-3):75-86.
- [63] Demir K, Boutros M. Cell perturbation screens for target identification by RNAi. *Methods Mol Biol.* 2012;910:1-13.
- [64] Kim KM, Lim SK. Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol.* 2014;16:133-41.
- [65] Wang X, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med.* 2013;19(1):93-100.
- [66] Wang FS, et al. MicroRNA-29a protects against glucocorticoid-induced bone loss and fragility in rats by orchestrating bone acquisition and resorption. *Arthritis Rheum.* 2013;65(6):1530-40.
- [67] Li YL, Quarles LD, Zhou HH, Xiao ZS. RNA interference and its application in bone-related diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;361(4):817-21.
- [68] Wang Y, Grainger DW. siRNA knock-down of RANK signaling to control osteoclast-mediated bone resorption. *Pharm Res.* 2010;27(7):1273-84.
- [69] Fahid FS, et al. Application of small interfering RNA for inhibition of lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and cytokine stimulation. *J Endod.* 2008;34(5):563-9.
- [70] Wang Y, Panasiuk A, Grainger DW. Small interfering RNA knocks down the molecular target of alendronate, farnesyl pyrophosphate synthase, in osteoclast and osteoblast cultures. *Mol Pharm.* 2011;8(4):1016-24.
- [71] Morvan F, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in

- bone. *J Bone Miner Res.* 2006;21(6):934-45.
- [72] Pouton CW, Seymour LW. Key issues in non-viral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46:187-203.
- [73] Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14:46-60.
- [74] Felgner PL, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(21):7413-7.
- [75] Bochicchio S, Dalmoro A, Barba AA, Grassi G, Lamberti G. Liposomes as siRNA Delivery Vectors. *Curr Drug Metab.* 2014;15(9):882-92.
- [76] Boulaiz H, Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Aranega A. Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005;51:3-22.
- [77] Chandy T, Sharma CP. Chitosan--as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs.* 1990;18:1-24.
- [78] Raftery R, O'Brien FJ, Cryan SA. Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications. *Molecules.* 2013;18:5611-47.
- [79] Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53:1047-67.
- [80] Giovino C, Ayensu I, Tetteh J, Boateng JS. Development and characterisation of chitosan films impregnated with insulin loaded PEG-b-PLA nanoparticles (NPs): A potential approach for buccal delivery of macromolecules. *Int J Pharmaceut.* 2012;428:143-51.
- [81] Sakka S, Coulthard P. Bone quality: a reality for the process of osseointegration. *Implant Dent.* 2009;18:480-5.
- [82] Messaoudi K, Saulnier P, Boesen K, Benoit JP, Lagarce F. Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide. *Int J Nanomed.* 2014;9:1479-90.
- [83] Ragelle H, Vandermeulen G, Preat V. Chitosan-based siRNA delivery systems. *J Control Release.* 2013;172(1):207-18.

- [84] Guang Liu W, De Yao K. Chitosan and its derivatives--a promising non-viral vector for gene transfection. *J Control Release*. 2002;83:1-11.
- [85] Andersen MØ, et al. Delivery of siRNA from lyophilized polymeric surfaces. *Biomaterials*. 2008; 29(4):506-12.
- [86] Olsten ME, Canton DA, Zhang C, Walton PA, Litchfield DW. The Pleckstrin homology domain of CK2 interacting protein-1 is required for interactions and recruitment of protein kinase CK2 to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2004;279:42114-27.
- [87] Xi S, et al. N-terminal PH domain and C-terminal auto-inhibitory region of CKIP-1 coordinate to determine its nucleus-plasma membrane shuttling. *FEBS Lett*. 2010;584:1223-30.
- [88] Nie J, et al. CKIP-1: a scaffold protein and potential therapeutic target integrating multiple signaling pathways and physiological functions. *Ageing Res Rev*. 2013;12(1):276-81.
- [89] Lu K, et al. Targeting WW domains linker of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 for activation by CKIP-1. *Nat Cell Biol*. 2008;10(8):994-1002.
- [90] Jia S, et al. Incorporation of osteogenic and angiogenic small interfering RNAs into chitosan sponge for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:5307-16.
- [91] Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):12-27.
- [92] Holzerny P, et al. Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. *J Control Release*. 2012;157(2):297-304.
- [93] Howard KA, et al. Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TNF-alpha knockdown in peritoneal macrophages for anti-inflammatory treatment in a murine arthritis model. *Mol Ther*. 2009;17(1):162-8.
- [94] Hu X, Neoh KG, Zhang J, Kang ET. Bacterial and osteoblast behavior on titanium, cobalt-chromium alloy and stainless steel treated with alkali and heat: a

- comparative study for potential orthopedic applications. *J Colloid Interface Sci.* 2014;417:410-9.
- [95] Kim C, et al. Comparison of titanium soaked in 5 M NaOH or 5 M KOH solutions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(1):327-39.
- [96] Hassert R, Beck-Sickinger AG. Tuning peptide affinity for biofunctionalized surfaces. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(1):69-77.
- [97] Liao J, et al. Reversibly controlling preferential protein adsorption on bone implants by using an applied weak potential as a switch. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(48):13068-72.
- [98] Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem.* 2008;8(4):270-80.
- [99] Simón-Vázquez R, Lozano-Fernández T, Peleteiro-Olmedo M, González-Fernández Á. Conformational changes in human plasma proteins induced by metal oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014; 113:198-206.
- [100] Lu X1, Li S, Cheng J. Bone marrow mesenchymal stem cells: progress in bone/cartilage defect repair. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2002;19(1):135-9.
- [101] Yamamoto Y, et al. Effects of static magnetic fields on bone formation in rat osteoblast cultures. *J Dent Res.* 2003;82(12):962-6.
- [102] Gittens RA, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* 2014;10(7):2907-18.
- [103] Leung KS, et al. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg Br.* 1993;75(2):288-92.
- [104] Pivodova V, Frankova J, Ulrichova J. Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011;155(2):109-16.
- [105] Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57(4):318-23.

- [106] Vanderoost J, van Lenthe GH. From histology to micro-CT: Measuring and modeling resorption cavities and their relation to bone competence. *World J Radiol.* 2014;6(9):643-56.
- [107] Vedi S, Compston J. Bone histomorphometry. *Methods Mol Med.* 2003;80:283-98.
- [108] Aiba S. Studies on chitosan: 2. Solution stability and reactivity of partially N-acetylated chitosan derivatives in aqueous media. *Int J Biol Macromol.* 1989;11(4):249-52.

个人简历和研究成果

个人简历

张力，女，汉族，1989年02月出生，陕西延安人，中国共产党党员。2007年考入苏州大学口腔医学五年制专业；2012年进入第四军医大学口腔医院修复科，攻读硕士学位，导师张玉梅教授。硕士期间，主要从事碱热处理牙种植体表面 siRNA 生物修饰的研究。以第一作者完成 SCI 论文一篇，投稿至 *Scientific Reports* (IF=5.078)，现已接收。以共同第一作者发表国际 SCI 论文 1 篇，发表于 *Biomaterials* (IF=8.312)。

攻读硕士学位期间主要成果

1. **Li Zhang**[#], Kaimin Wu[#], Wen Song, Haiyan Xu, Ran An, Lingzhou Zhao*, Bin Liu*, Yumei Zhang*. Chitosan/siCkip-1 biofunctionalized titanium implant for improved osseointegration in the osteoporotic condition. *Scientific Reports* (IF=5.078) 已接收
2. Qian Liu[#], Wei Wang[#], **Li Zhang**[#](共同第一), Lingzhou Zhao*, Wen Song, Xiaohong Duan, Yumei Zhang*. Involvement of N-cadherin/b-catenin interaction in the micro/ nanotopography induced indirect mechanotransduction. *Biomaterials*. 35(2014):6206-6218. (IF=8.312)
3. 宋艳艳, 赵领洲, **张力**, 曹灿, 张玉梅。压力对纳米管表面干细胞分化的影响。《牙体牙髓牙周病学杂志》. 2015,25(4):210-215.
4. 曹灿, 宋艳艳, **张力**, 党永刚, 张玉梅。钴掺杂二氧化钛纳米管种植体涂层的制备及毒性研究。《实用口腔医学》. 2015,31(2):175-179.

致 谢

此刻，站在硕士研究生生涯的终点线上，回首三年来的学习、生活，我心中充满无限感慨和感激。首先，我想感谢我的导师张玉梅教授，感谢她对我学习、科研孜孜不倦的教诲，对我临床工作耐心细致的指导以及对我生活、成长无微不至的关怀。老师对工作精益求精，对科学热忱探索，对学生无私奉献，对患者真诚负责，她用智慧和学识带领着我学会学习、学会钻研，她的医德和人格引导着我学会做人、学会做事。能够在她的指导和帮助下度过硕士研究生生涯，我感到无比幸运和自豪。对我而言，老师是良师，亦是益友，她带给我的是受用一生的宝贵财富。在此，向敬爱的恩师表达最崇高的敬意和最深切的祝福！

其次，还要衷心感谢指导老师赵领洲讲师对我实验工作、论文写作及发表过程中给予的无私的指导和帮助。

衷心感谢口腔医院修复科全体老师对我的学习和工作的关怀和帮助；感谢口腔医院实验动物中心刘斌教授，徐海燕和安然老师在动物实验方面给我的最大帮助和支持；感谢西京医院骨科白建萍、成西侠老师为我细胞实验创造良好的实验环境；感谢口腔医院仪器中心实验室段建红主任、胡希望老师、李艳玲老师、董楠老师等的悉心指导和帮助；感谢西京医院骨科实验室吕荣老师、李静老师、吴拮老师在超硬组织切片和染色方面给予我的帮助和支持；感谢宋文、刘茜、宋艳艳、闫钧、马千里、张程程、常蓓、韩天啸等课题组成员和胡鑫、周青、朱宏、贾森、帅毅、班晶浩、李勇等友人在我的实验、临床工作和生活中对我的帮助和关心，能和你们携手走过这三年时光，一起快乐的学习、工作和生活，我感到无比幸运和幸福。

最后，感谢一路走来站在身后默默鼓励支持和陪伴我的家人，是他们无私的付出使我在求知道路上充满力量和希望。他们的爱是我前进路上的动力，鼓励着我克服困难，不断超越，追寻更好的自己。

张力 谨致

2015年5月