

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.07.005

· 基础研究 ·

激光蚀刻的纯钛表面对MG63细胞早期增殖的影响

郭泽鸿, 宁颖圆, 徐淑兰, 朱培君, 丁祥龙, 高岩
南方医科大学口腔医院种植中心, 广东 广州(510280)

【摘要】 目的 探讨激光蚀刻的纯钛表面对人成骨肉瘤细胞MG63增殖的影响,为种植体表面改性提供研究基础。方法 将纯钛板通过数控机床切割成钛片,分光滑表面组和激光蚀刻组,激光蚀刻组的表面采用Nd:YAG连续波激光,在预定参数下蚀刻钛表面,扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)观察各组钛片表面微形貌, X射线能谱仪(energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS)检测钛片表面相对元素含量,使用Veeco粗糙度检测仪检测各组表面的Ra值。将MG63细胞接种于2组钛片上,接种后1 h、3 h、6 h,显微镜下观察2组钛片上细胞粘附情况。接种后24 h,采用细胞肌动蛋白F-actin直接免疫荧光染色,激光共聚焦显微镜观察细胞骨架形态。采用MTS试剂盒检测1 d、3 d、5 d细胞的增殖情况,获得数据采用SAS 9.4进行分析。结果 光滑表面组表面光滑平整,元素组成为纯钛,粗糙度Ra为179.23 nm,激光蚀刻组表面形成规则、大小较均匀的孔洞结构,成分主要由Ti、O、C等,表面粗糙度Ra为14.11 μm 。1 h、3 h、6 h观察2组钛片都可见大量细胞均匀粘附。接种后24 h, MG63细胞在2组钛片上已经完全伸展且伸出大量伪足和微丝状结构与周边细胞发生交联,可以观察到细胞分裂相。2组1 d、3 d、5 d的细胞增殖,随时间呈显著的增加趋势,说明2组表面均无细胞毒性,但激光蚀刻组细胞增殖优于光滑表面组。结论 钛表面经过激光蚀刻处理后,表面形貌可控,有利于增加钛表面的微结构,无细胞毒性,能促进MG63细胞的早期增殖。

【关键词】 激光蚀刻; 纯钛; 表面处理; 粗糙度; MG63; 增殖

【中图分类号】 R783.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)07-0435-06

【引用著录格式】 郭泽鸿, 宁颖圆, 徐淑兰, 等. 激光蚀刻的纯钛表面对MG63细胞早期增殖的影响[J]. 口腔疾病防治[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(7): 435-440.

Effect of laser-etched pure titanium surface on early proliferation of MG63 cells GUO Zehong, NING Yingyuan, XU Shulan, ZHU Peijun, DING Xianglong, GAO Yan. Center of Oral Implantology, Stomatological Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: NING Yingyuan, Email: 50878976@qq.com, Tel: 86-20-84408890

【Abstract】 Objective To investigate the effect of a laser-etched pure titanium surface on proliferation of the human osteosarcoma cell line MG63 and to provide a basis for study of implant surface modification. **Methods** The pure titanium plate was cut into titanium pieces by a numerical control machine tool and divided into smooth surface and laser etching groups. The titanium surface of the laser etching group was etched with an Nd:YAG continuous wave laser using predetermined parameters, and the surfaces were observed by scanning electron microscopy (SEM). The surface micro-morphology of each titanium sheet was evaluated. The relative element content of the titanium surface was measured by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The Ra value of each surface was determined using the Veeco roughness tester. MG63 cells were inoculated on 2 sets of titanium tablets. At 1, 3, and 6 h postinoculation, cell adhesion to the two groups of titanium sheets was observed under the microscope. At 24 h after inoculation, cellular F-actin was directly stained using immunofluorescence, and the morphology of the cytoskeleton was observed by laser confocal microscopy.

【收稿日期】 2019-02-02; **【修回日期】** 2019-04-30

【基金项目】 广东省科技厅援疆科技(特派员)项目(2017B020247009);南方医科大学口腔医院科研培育项目(PY2017013)

【作者简介】 郭泽鸿, 副主任医师, 博士, Email: 36648547@qq.com

【通信作者】 宁颖圆, 主治医师, 硕士, Email: 50878976@qq.com, Tel: 86-20-84408890

Cell proliferation was examined at 1, 3, and 5 d using a MTS kit, and the data were analyzed with SAS 9.4. **Results** The surface of the smooth surface group was smooth and flat, the element composition was pure titanium, and the roughness Ra was 179.23 nm. The surface of the laser-etched group formed a regular and uniform pore structure. The composition was mainly Ti, O, C, etc, and the surface roughness Ra was 14.11 μm . A large number of cells were uniformly distributed on the two titanium sheets in the observations at 1, 3, and 6 h. At 24 h postinoculation, MG63 cells were completely stretched on the two sets of titanium sheets and had extended a large number of pseudopods and microfilaments to cross-link with peripheral cells; moreover, the cell division phase was observed. The cell proliferation of the two groups at 1, 3, and 5 d showed a significant increase with time, indicating that no cytotoxicity occurred on the surfaces of the two groups. However, the cell proliferation in the laser-etched group was superior to that in the mechanical smooth surface group. **Conclusion** The surface morphology of titanium can be controlled by laser etching, which is conducive to increase the microstructure of implants without cytotoxicity and promoting osteoblast proliferation in the early stage.

【Key words】 laser etching; pure titanium; surface treatment; roughness; MG63; proliferation

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(7): 435-440.

纯钛和钛合金具有良好物理化学稳定性和生物相容性,已经广泛地被制造成整形和牙科植入材料,是口腔种植体的首选材料。为了提高种植体的表面性能,需要做各种表面处理,缩短种植体骨结合的时间。激光蚀刻处理钛表面,可以得到独特的微观结构,增加硬度、耐腐蚀性或得到其他有用的表面性质^[1]。有研究报道激光处理的种植体表面有高纯度和足够的粗糙度,提高了钛表面的亲水性,有利于种植体形成良好的骨整合^[2]。由于激光处理方法污染最小,而且在早期骨整合过程中,激光处理的种植体表面与SLA处理的种植体表面相比,骨结合强度无显著差异,因此,激光表面处理技术被认为是一种很有前景的表面处理方法^[3]。此外,钛种植体表面可以通过激光蚀刻获得理想的表面结构如沟槽、较大级别的孔洞结构等,可以为种植体表面做预粗化处理^[4-5]。本研究在前期筛选出激光表面处理参数的基础上,进一步评估纯钛种植体激光蚀刻处理后的表面形貌特征、理化性能及细胞相容性。

1 材料和方法

1.1 材料

纯钛(深圳市兴宏德金属有限公司),数控机床(四川深扬数控机械有限公司),扫描电镜(HITACHI,日本),X线衍射仪(Bruker公司,德国),Veeco粗糙度检测仪(Veeco公司,美国),MG63细胞(南方医科大学细胞生物学实验室提供),10%胎牛血清(Gibco,美国),低糖DMEM培养液(Gibco,美国),MTS试剂(Promage,美国),Hoechst33342

(Invitrogen,美国),TritonX-100(鼎国,中国),Alexa Fluor488Phalloidin(Invitrogen,美国),荧光显微镜(Olympus,日本),免疫680酶标仪(BIO-RAD,美国),CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promage,美国)。

1.2 样品制备

将商业纯钛片材料通过数控机床切割,加工成为直径为15 mm、厚度为1.2 mm的30个纯钛圆片样品,均分2组如下。

机械表面光滑处理(光滑表面组):用200~800目碳化硅砂纸逐级打磨,分别在丙酮、无水乙醇、去离子水中超声荡洗10 min。

激光蚀刻处理(激光蚀刻组):用200~800目碳化硅砂纸逐级打磨,随后分别依次在丙酮、无水乙醇、去离子水中超声荡洗各10 min,室温下干燥后做激光蚀刻处理。根据前期对参数筛选的结果,采用Nd:YAG连续波激光照射,激光波长为1.064 μm (重复精度为0.003 mm),频率7 500 Hz,电流16.0 A,平均激光功率100 kW。处理过程在空气中进行。

将表面处理后的2组钛片样品浸泡在去离子水中超声振荡5 min,室温下自然干燥后,对2组样品随机各抽取12个样品,均分4份,分别以扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)观察钛片表面微形貌,X射线能谱仪(energy dispersive x-ray spectroscopy, EDS)检测钛片表面元素含量,X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD)检测钛片表面晶相结构。采用Veeco粗糙度检测仪检测表面粗糙度Ra值。

1.3 观察MG63细胞在2组钛表面的粘附

将消毒后的2组钛片置于24孔培养板内,将MG63细胞以 1×10^4 个/cm²的浓度接种于培养板内的钛片表面,每孔加入10%胎牛血清和1%双抗的低糖DMEM培养液1.0 mL,在37℃饱和湿度、5%CO₂的恒温孵箱中密闭培养,48 h换液。钛片以PBS缓冲液冲洗液冲洗,1 h、3 h、6 h时通过Hoechst33342染核,以Hoechst33342(1:10 000稀释)避光染色20 min后,在荧光显微镜下观察细胞的粘附情况。

1.4 激光共聚焦显微镜观察2组钛表面细胞骨架

将MG63接种于钛片表面,方法及密度同前,将培养24 h的钛片分别取出,以PBS缓冲液冲洗后,用3.7%多聚甲醛固定15 min,随后PBS缓冲液冲洗,加入0.1%TritonX-100裂解5 min,再次PBS缓冲液冲洗,加入Alexa Fluor488Phalloidin(1:100稀释)及Hoechst33342(1:10 000稀释)避光染色20 min,染色后用PBS缓冲液冲洗,最后甘油封片。在激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)下观察细胞肌动蛋白的形态。

1.5 MTS法检测MG63细胞在2组钛表面的增殖

将消毒后的2组钛片置于24孔培养板内,将人成骨肉瘤细胞系MG63以 1×10^4 个/cm²的浓度接种于培养板内的钛片表面,每孔加入含10%胎牛血清和1%双抗的低糖DMEM的培养液1.0 mL。2组

分别在1 d、3 d、5 d各选取出12孔,去除培养液后PBS液反复清洗3次,每孔加入培养液1 mL和CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay MTS试剂200 μL,稍微震荡后,置于温度为37℃、饱和湿度、5%体积分数的CO₂恒温培养中孵育3 h后,48 h换液。于每孔中吸取100 μL溶液注入96孔酶标板中,使用免疫680酶标仪,在波长490 nm下,测光密度(optical density, OD)值,重复测量3次,取平均值。比较2组钛片上粘附的MG63成骨细胞的增殖水平。通过SAS 9.4软件(SAS Institute, Cary, NC),将获得数据进行多组重复测量方差分析。

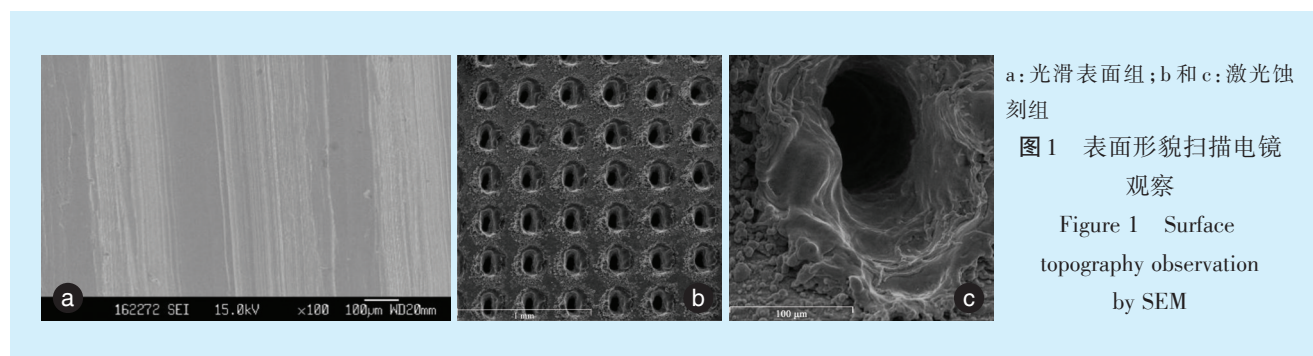
1.6 统计学分析

本研究采用多组重复测量方差分析光滑组和激光组OD值的差异、不同时间点(1 d、3 d、5 d)OD值的变化,所有数据的分析均基于SAS 9.4软件(SAS Institute, Cary, NC)进行。

2 结果

2.1 表面形态扫描电镜观察

光滑表面组,可见钛机械光滑表面光滑平整(图1a)。激光蚀刻组,激光处理后钛片表面形成规则的、大小和间距基本一致的微孔,为弹坑状,弹坑周围可见熔融后形成的不规则颗粒状突起。表面微孔效果与预期基本一致,孔径约80~120 μm,孔深为150~200 μm(图1b~图1c)。



a: 光滑表面组; b和c: 激光蚀刻组

图1 表面形态扫描电镜观察
Figure 1 Surface topography observation by SEM

2.2 表面化学成分及粗糙度Ra值

通过X线衍射分析,发现光滑表面组和激光蚀刻组的主要化学成分为钛(图2),通过电子探针对于每组钛表面的化学元素分析,发现光滑表面组表面为纯钛;而激光蚀刻组经过激光蚀刻后表面增加了氧和碳两种元素(表1),但是之前的X线衍射分析并未检出TiO₂和TiC,可见其含量极少未能被检出。测得光滑表面组钛片表面的Ra值为179.23 nm,激光

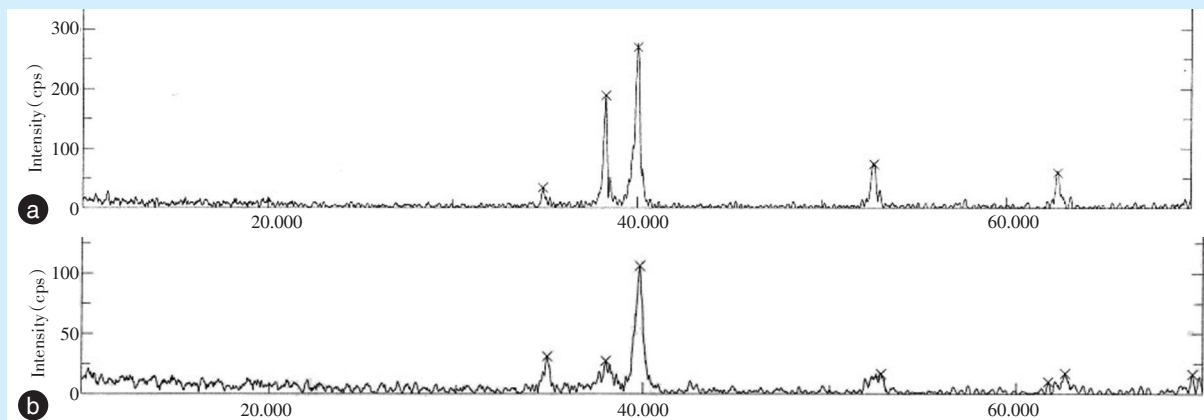
蚀刻组表面的Ra值为14.11 μm。

2.3 MG63在2组钛片的早期粘附观察

光滑表面组和激光蚀刻组2组钛片上1 h、3 h、6 h的观察中都可见大量细胞均匀分布(图3)。

2.4 2组钛表面上的MG63细胞骨架形态

根据共聚焦显微镜观察细胞骨架结果:2组处理表面上的MG63细胞在接种24 h时已经完全伸展且伸出大量伪足和丝状结构与周边细胞发生交



a: 光滑表面组; b: 激光蚀刻组

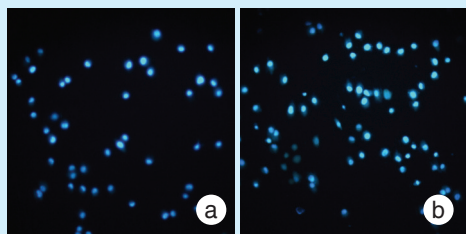
图2 2组X线衍射分析图

Figure 2 X-ray diffraction analysis in the two groups

表1 2组表面的化学元素成分

Table 1 The component of two kinds of titanium surface %

组别	表面所含的元素		
	Ti	O	C
光滑表面组	100	0	0
激光蚀刻组	86.6	16.5	0.9



100倍镜下,光滑表面组(a)和激光蚀刻组(b)均可见MG63细胞均匀粘附

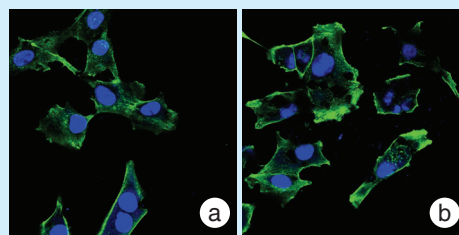
图3 2组表面的MG63细胞粘附的情况
荧光显微镜 × 100

Figure 3 Adhesion of MG63 cells to the surfaces in the two groups fluorescence Microscope × 100

联,细胞之间形成相互交通,可以观察到细胞分裂相(图4)。

2.5 钛表面对MG63增殖的影响

重复测量方差分析光滑表面组和激光蚀刻组2组的MTS增殖OD值在1 d、3 d、5 d的变化, Mauchly 球形检验结果显示数据的方差协方差矩阵符合球形假设($\chi^2 = 4.44, P = 0.108$),重复测量方差分析结果显示不同天数的OD值差异有统计



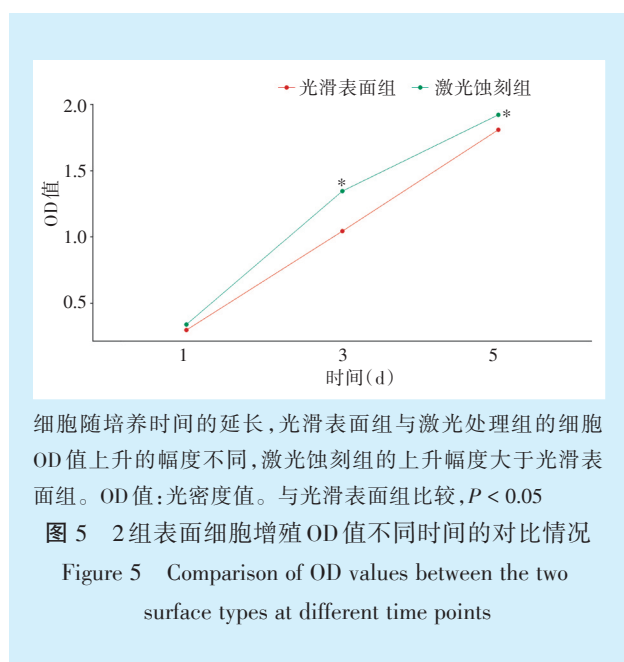
400倍镜下,光滑表面组(a)和激光蚀刻组(b)MG63接种24 h后,都可以观察到细胞呈典型的多边形伸展,伸出细胞突触较多,细胞之间呈现更多的交联关系

图4 2组细胞肌动蛋白F-actin直接免疫荧光染色
激光扫描共聚焦显微镜 × 400

Figure 4 Direct immunofluorescence staining of F-actin in the two groups confocal laser scanning microscope × 400

学意义($F = 1\ 601.26, P < 0.05$),2组OD值随着天数的增加而增加,且光滑表面组和激光蚀刻组在不同天数的平均OD值不同,差异具有统计学意义($F = 12.09, P < 0.05$)。在各时间点,激光蚀刻组的OD值均高于光滑表面组,且3 d和5 d时2组的差异均具有统计学意义。

两两比较结果显示,无论是在光滑表面组还是激光蚀刻组,任意两个时间点的OD值均具有统计学意义($P < 0.05$)。细胞的增殖在2组表面处理和时间之间存在交互效应,细胞随培养时间的延长,光滑表面组与激光处理组的细胞OD值上升的幅度不同,以激光蚀刻组的上升幅度最大(图5)。



3 讨论

研究表明表面形态能影响细胞的附着、增殖、分化和局部因子的合成^[6-7]。因此种植体表面改性和预处理一直是研究的热点,常用方法有物理、化学和生物等。激光蚀刻作为物理改性法中的一种,其较其他改性方法最大的优势是钛表面污染最小,直接在样品上培养的细胞的活性和增殖在所有钛表面上都是相似的,无论激光修饰如何,都显示出良好的细胞相容性^[8],且工艺不繁琐、操作简单;钛表面形貌、孔隙率大小等精确可控制;可形成均匀的、规则的三维立体结构^[4]。通过调节激光元件来控制激光的方向、散度、波长,以及激光束的频率,不同激光能量则可形成不同形貌的表面^[9]。除此之外,激光治疗是一种清洁和容易执行的方法,无需直接接触钛表面并能较精准地控制它们的表面形貌,改善激光处理表面的抗腐蚀性。

本研究在经过前期预实验筛选的参数下通过激光蚀刻技术使钛表面形成了规则的、大小和间距基本一致的弹坑状微孔,孔径约80~120 μm,孔深为150~200 μm。有研究者表明因骨细胞大小以及其转运和迁移需要,骨生长所需的最小孔隙直径是100 μm,而孔隙直径≥300 μm是新骨和毛细血管形成推荐的最大孔径^[10-11]。本实验组孔径接近以往研究者推荐的孔径大小。激光蚀刻表面形成孔洞后,检测面积包含孔洞结构,粗糙度Ra高达14.11 μm,由于检测技术问题无法排除孔洞深度的影响,所以粗糙度较高,远大于目前市面上种

植体表面粗糙度1~5 μm,尽管整体粗糙度较高,但是实验观察细胞粘附和增殖都没有受到不利影响。

通过X线衍射分析激光蚀刻的纯钛表面的主要元素组成为钛以及微量的氧和碳,没有其他杂质含量,如氮和铝等,表明激光处理是一种绿色环保的加工技术,具有无交互接触和清洁无污染的优点。而表面氧的含量增加,表明形成了更厚的氧化钛层,这可能会提高材料表面的亲水性,碳元素在类似钛表面处理研究中也发现,但是未见影响MG63细胞增殖^[12]。

成骨细胞体外培养是研究种植材料生物相容性中的一种常用方法,具有重复性好、试验条件易控制等优点。人成骨肉瘤细胞MG63具有成骨细胞生物学特性,因此,本实验通过在激光蚀刻表面接种MG63细胞进行体外培养研究其对成骨细胞的影响。Cei等^[13]的体外研究证明激光形成的多孔表面比喷砂表面及光滑表面更能促进白蛋白和纤维连接蛋白的吸附。本实验MG63在接种6 h时,细胞能成功粘附在钛片上,24 h时可见细胞伸展且伸出大量伪足和丝状结构与周边细胞发生交联,细胞之间形成相互交通,增殖分裂,说明2组钛表面对细胞的生长增殖没有负面影响。接种1、3、5 d的检测结果可见随着时间的增加,2组的增殖的趋势均上涨,但在3 d和5 d时,激光蚀刻组细胞的增殖明显优于光滑表面组。由此可见,激光蚀刻纯钛表面对细胞无毒性,能促进MG63细胞的早期增殖。研究表明表面粗糙度和亲水性能增强成骨细胞样细胞的初始粘附和迁移,以及分化标记物的表达、成骨相关因子的分泌^[14]。Györgyey等^[15]的体外研究也表明,MG63在激光处理的表面细胞的粘附、增殖与喷砂酸蚀组无明显差异;Trisi等^[16]通过动物体内研究证实激光处理表面较机械光滑表面能够增加骨整合量,两种植体骨结合率(bone to implant contact, BIC)的差异大约30%。有研究证实,激光改性的纯钛植体有利于骨组织锚定,在植入兔子胫骨内8周后扭出力提高153%^[17]。本研究的激光蚀刻表面提高了纯钛表面的粗糙度,提高了其亲水性。有类似研究发现激光熔蚀的钛表面更具有生物相容性的条件,能增加细胞的增殖^[18]。

激光蚀刻处理为口腔种植体的表面改性提供了一种新的方法,能通过设置不同的参数来决定种植体表面的粗糙度,并获得一个形状、直径和孔深可重复的多孔状微貌;既能获得期望的粗糙度,

又能不污染种植体表面。Lepore等^[19]研究还表明:与光滑表面和喷砂表面相比,细胞在激光处理的多孔表面上粘附和生长同样良好,且能诱导N-钙黏着蛋白和 β -连环蛋白的表达和定位,这表明激光处理的能促进成骨细胞分化。Perez-Diaz等^[20]对比了6种不同的表面处理方法,发现激光处理和钛粉烧结的处理能够获得较深的表面形貌,虽然几种表面中钛粉烧结组在细胞活力和粘附方面获得最优的效果,但是提示了激光处理的具有较深孔洞的表面更具有骨长入的条件。

总之,激光处理种植体表面将是一个有前景的改性方法。但其提高种植体的骨整合能力的有效性需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Asri R, Harun W, Samykano M, et al. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: a review[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017, 77: 1261-1274.
- [2] Ayobianmarkazi N, Karimi M, Safarhajhosseini A. Effects of Er: YAG laser irradiation on wettability, surface roughness, and biocompatibility of SLA titanium surfaces: an *in vitro* study[J]. Lasers Med Sci, 2015, 30(2): 1-6.
- [3] Park KS, Al Awamleh AG, Cho SA. Comparison of removal torques between laser - etched and modified sandblasted acid - etched Ti implant surfaces in rabbit tibias[J]. J Adv Prosthodont, 2018, 10(1): 73-78.
- [4] Guo ZH, Zhou L, Rong MD, et al. Bone response to a pure titanium implant surface modified by laser etching and microarc oxidation[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2010, 25(1): 130-136.
- [5] Zwahr C, Guenther D, Brinkmann T, et al. Laser surface patterning of titanium for improving the biological performance of dental implants[J]. Adv Healthc Mater, 2017, 6(3): 1600858.
- [6] Naganawa T, Ishihara Y, Iwata T, et al. *In vitro* biocompatibility of a new titanium-29niobium-13tantalum-4zirconium alloy with osteoblast-like MG63 cells[J]. J Periodontol, 2004, 75(12): 1701-1707.
- [7] Wang M, Ning Y, Zou H, et al. Effect of Nd: YAG laser-nitriding-treated titanium nitride surface over Ti6Al4V substrate on the activity of MC3T3-E1 cells[J]. Biomed Mater Eng, 2014, 24(1): 643-649.
- [8] Hartjen P, Nada O, Silva TG, et al. Cytocompatibility of direct laser interference-patterned titanium surfaces for implants[J]. In Vivo (Brooklyn), 2017, 31(5): 849-854.
- [9] Tavakoli J, Khosroshahi ME. Surface morphology characterization of laser-induced titanium implants: lesson to enhance osseointegration process[J]. Biomed Eng Lett, 2018, 8(3): 249-257.
- [10] Peng W, Xu LW, You J, et al. Selective laser melting of titanium alloy enables osseointegration of porous multi-rooted implants in a rabbit model[J]. Biomed Eng Online, 2016, 15(1): 85.
- [11] Gotz HE, Muller M, Emmel A, et al. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants[J]. Biomaterials, 2004, 25(18): 4057-4064.
- [12] 丁祥龙, 王敬旭, 郭泽鸿, 等. RGD肽段修饰TiO₂纳米管对MG63成骨细胞黏附增殖能力的影响[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(11): 32-37.
- [13] Cei S, Karapetsa D, Aleo E, et al. Protein adsorption on a laser-modified titanium implant surface[J]. Implant Dent, 2015, 24(2): 134-141.
- [14] Phani MK, Kumar A, Arnold W, et al. Elastic stiffness and damping measurements in titanium alloys using atomic force acoustic microscopy[J]. J Alloys Compd, 2016, 676: 397-406.
- [15] Györgyey Á, Ungvári K, Kecskeméti G, et al. Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells(MG-63)on laser-ablated titanium implant material[J]. Mater Sci Eng C, 2013, 33(7): 4251-4259.
- [16] Trisi P, Berardini M, Colagiovanni M, et al. Laser-treated titanium implants: an *in vivo* histomorphometric and biomechanical analysis [J]. Implant Dent, 2016, 25(5): 575-580.
- [17] Shah FA, Johansson ML, Omar O, et al. Laser-modified surface enhances osseointegration and biomechanical anchorage of commercially pure titanium implants for bone - anchored hearing systems [J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157504.
- [18] Arifagaoglu O, Oncul S, Ercan A, et al. HGF-1 proliferation on titanium dental implants treated with laser melting technology[J]. Niger J Clin Pract, 2019, 22(2): 251-257.
- [19] Lepore S, Milillo L, Trotta T, et al. Adhesion and growth of osteoblast-like cells on laser-engineered porous titanium surface: expression and localization of n-cadherin and beta-catenin[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2013, 27(2): 531-541.
- [20] Perez-Diaz L, Dedavid BA, Gehrke S. Evaluation of fibroblasts cells viability and adhesion on six different titanium surfaces: an *in vitro* experimental study[J]. Recent Pat Biotechnol, 2018, 12(2): 145-153.

(编辑 张琳,曾曙光)