

含镁介孔生物活性玻璃/铈黄长石复合支架的成骨活性

马 振^{1,2}, 孙 伟², 叶丹丹^{1,2}, 赵晓兵¹, 王国成²

(1. 常州大学材料科学与工程学院, 江苏 常州 213164; 2. 中国科学院深圳先进技术研究院, 广东 深圳 518055)

摘 要: 骨修复支架的成骨活性和力学性能对其使用效果至关重要。以具有良好力学性能的铈黄长石($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$, HT)为基体, 以 Mg 掺杂的生物可降解介孔生物活性玻璃(MBG)为涂层, 制备 Mg-M/HT 多孔复合支架。研究 Mg 掺杂对复合支架微观结构和成骨活性的影响。利用 X 射线衍射仪、透射电子显微镜和 Fourier 变换红外吸收光谱仪等手段对复合支架的物化性能进行表征。利用人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)考察 Mg 掺杂对支架成骨活性的影响。结果表明: Mg 掺杂虽然一定程度上降低了 MBG 的介孔有序度, 但 Mg-M/HT 复合支架仍具有均匀有序的孔道结构。与 MBG 改性的 HT 生物支架(M/HT)相比, Mg-M/HT 支架具有更高的细胞内黏着斑蛋白和整合素以及碱性磷酸酶、钙结节和骨钙素的表达量, 表明 Mg 掺杂可促进 M/HT 支架的成骨细胞活性, 在骨组织修复领域具有较好的应用潜力。

关键词: 骨修复; 介孔生物活性玻璃; 铈黄长石; 镁; 成骨活性

中图分类号: R318 文献标志码: A 文章编号: 0454-5648(2022)07-1964-08

网络出版时间: 2022-05-30



Osteogenic Activity of Mg-Containing Mesoporous Bioactive Glass/ Hardystonite Composite Scaffold

MA Zhen^{1,2}, SUN Wei², YE Dandan^{1,2}, ZHAO Xiaobing¹, WANG Guocheng²

(1. School of Materials Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, China;

2. Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China)

Abstract: The osteogenic activity and mechanical properties of the bone repair scaffold are important for its clinical application. Mg-M/HT porous composite scaffold was prepared with hardystonite ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$, HT) with good mechanical properties as a matrix and Mg-doped biodegradable mesoporous bioactive glass (MBG) as a coating. The effect of Mg doping on the microstructure and osteogenic activity of the M/HT composite scaffold was investigated. The microstructures of the composite scaffolds were characterized by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The osteogenic activity of the scaffolds was investigated with human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs). The results show that Mg doping can reduce the mesoporous order of MBG to a certain extent, but Mg-M/HT composite scaffold still has a uniform and ordered pore structure. Compared with M/HT scaffold, Mg-M/HT scaffold has higher intracellular focal adhesion proteins and integrins, as well as alkaline phosphatase, calcium nodules and osteocalcin expression, indicating that Mg doping can promote the osteoblast activity of M/HT scaffold. Mg-M/HT scaffold has a potential application in the field of bone tissue repair.

Keywords: bone repair; mesoporous bioactive glass; hardystonite; magnesium; osteogenesis

随着自然灾害与车祸的频繁发生以及人口老龄化的加剧, 人们对高质量骨修复支架的需求量逐年增加^[1]。良好的骨修复支架不仅需要具有足够的机械强度维持其在生物体内的稳定, 还需要具有良好

的生物活性以提高骨缺损部分的骨再生能力^[2]。

铈黄长石(HT)具有较高的弯曲强度、断裂韧性及化学稳定性, 能够满足支架在植入体内后的早期力学稳定要求^[3]。但是 HT 的降解速率较慢, 导致

收稿日期: 2021-10-15。 修订日期: 2021-12-06。

基金项目: 国家自然科学基金(51872318); 江苏省研究生科研与实践创新计划(SJGX20-0974)。

第一作者: 马 振(1995—), 男, 硕士研究生。

通信作者: 赵晓兵(1975—), 男, 博士, 教授。

Received date: 2021-10-15. Revised date: 2021-12-06.

First author: MA Zhen (1995—), male, Master candidate.

E-mail: 1274639736@qq.com

Correspondent author: ZHAO Xiaobing (1975—), male, Ph. D., Professor.

E-mail: zhaoxiaobing00@163.com

活性离子(Ca^{4-5} 、 Zn^{6} 、 Si^{7-8})释放不足,进而影响其生物活性,导致早期骨修复能力不足。与传统生物活性玻璃相比,Mg 掺杂的生物可降解介孔生物活性玻璃(MBG)具有特殊的介孔孔道结构和高比表面积以及孔容,这些特性赋予其更高的生物活性^[9-10]。高连通大孔是促进细胞迁移、营养输送和骨组织生长的必要条件;丰富的表面微-纳米结构是促进细胞黏附、铺展,提高材料与周围骨组织稳定键合的关键^[11-12]。Ye 等^[13]已经制备出具有优良力学性能和生物学性能的 MBG 改性的 HT 生物支架(M/HT)。但是 M/HT 支架在早期存在生物活性离子释放不足的问题,影响其骨修复能力。已有研究表明^[14-15],为了提高 MBG 的生物性能,研究人员在 MBG 中添加不同的离子(金属和非金属)以达到改善其性能的目的。Rahman 等^[16]通过在 MBG 中添加 Ag^{2+} 调高其载药率和骨修复能力。Wang 等^[17]添加 Cu^{2+} 合成 Cu-MBG 复合材料,通过调节 Cu^{2+} 的取代率控制 Cu^{2+} 的释放,从而刺激血管生成。本研究通过添加生物活性离子提高 MBG 的生物活性,达到改善 M/HT 支架的生物性能的目的。

Mg 是人体中最丰富的金属元素之一,大约有 50%~65% 的 Mg 存在于骨骼当中^[18-19]。Mg 可刺激新骨的形成并增加骨细胞的黏附和渗透^[20-21]。Mg 的缺乏也会延缓骨骼生长、降低成骨活性以及减少骨质^[22-23]。研究人员在羟基磷灰石中进行了用 MgO 取代 CaO 的研究,结果表明 MgO 取代的羟基磷灰石材料显示出更高的骨传导性和更高的材料吸收率^[24]。

本研究在前期工作基础上制备 Mg 掺杂 M/HT 骨修复支架,并对其孔道结构和在磷酸缓冲盐(PBS)溶液中的 pH 值进行测试表征,并考察了 Mg 掺杂对 M/HT 复合支架成骨活性的影响。

1 实验

1.1 HT 支架的制备

将 CaCO_3 、 ZnO 、 SiO_2 粉末按摩尔比为 2:1:2 称取,置于球磨罐中,加入 2 倍的二氧化锆球,加入与粉体总质量相当的无水乙醇,然后球磨 4 h,浆料过 80 目筛后,于鼓风干燥箱中 60 °C 烘干;然后将混合均匀的粉体用马弗炉 1 200 °C 烧结(升温速率为 5 °C/min,保温 4 h)。将烧结的粉体球磨过 200 目筛,烘干后获得 $\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$ 粉末。采用聚氨酯海绵(PU, 50 ppi)模板法制备 HT 支架^[25]。使用 PU 海绵作为支架大孔模板,将 PU 海绵剪成相应规格,

将 HT 粉末与浓度为 6% 的 PVA 溶液以适当比例均匀混合,并浇注于聚氨酯海绵模板上,经高温烧结(1 250 °C, 1 °C/min 升温至 400 °C 保温 30 min, 5 °C/min 升温至 1 250 °C 保温 3 h,随炉冷却)去模板后得到 HT 支架。

1.2 MBG 与 Mg-MBG 溶胶的制备

MBG 溶胶的制备方法为^[13]:水浴锅预热 30 °C,在 800 mL 烧杯中加入 300 mL 无水乙醇和 6.00 g 浓度为 0.5 mol/L 的 HCl,然后称取 24.00 g F127 ($\text{EO}_{106}\text{PO}_{70}\text{EO}_{106}$, $M_w=12\ 600$)加入烧杯剧烈搅拌 1 h 直至全部溶解,再称量 6.62 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 加入烧杯搅拌至其完全溶解,接着加入 1.71 g 磷酸三乙酯(TEP),搅拌 15 min,最后用分液漏斗逐滴加入 31.20 g 正硅酸乙酯(TEOS)。当所有试剂加完后,于 30 °C 水浴中继续搅拌反应 24 h,最终可以制备出 MBG 溶胶。采用聚氨酯海绵(PU, 50 ppi)模板法,将所得到的溶胶在 600 °C 下烧结 6 h 获得 MBG 支架。为了表征支架的物相与结构,将支架球磨过筛获得均匀的 MBG 粉末。

为了引入 Mg 离子,在前期的成果^[13]以及探索工作基础上,使用 5.71 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 代替 6.62 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (其他步骤不变),制备 Mg-MBG 溶胶与 Mg-MBG 粉末。

1.3 M/HT 与 Mg-M/HT 支架的制备

将制备好的 HT 支架在 MBG 或 Mg-MBG 溶胶中浸渍 10 min 后进行离心操作(100 r/min, 1 min),以除去过量的溶胶,然后将支架置于 -80 °C 冻干,最后在 600 °C 烧结 6 h(升温速率为 1 °C/min)得到 MBG 或 Mg-MBG 涂覆的锌黄长石支架(M/HT 或 Mg-M/HT)。

1.4 结构表征

利用 X 射线衍射仪(XRD, Rigaku, D/max 2500PC, 日本)、透射电子显微镜(TEM, JEM-2100, 日本)和扫描电子显微镜(SEM, Zeiss Supra® 55, 德国)对样品的物相组成、表面形貌以及介孔结构进行分析。小角/广角 X 射线衍射具体参数为: Cu- K_α 辐射,特征波长 $\lambda=0.154\ 056\ \text{nm}$,衍射角(2θ)的扫描速度为 0.02 (°)/s,广角扫描范围在 10°~80°,小角范围扫描在 0.5°~4.0°。

1.5 支架在 PBS 缓冲溶液中的 pH 值变化情况

将样品(直径 5 mm,高 4 mm,质量 0.05 g)浸泡在 PBS 缓冲溶液(2 mL)中,置于 37 °C 恒温培养箱中静置浸泡,并每天更换 PBS,连续 7 d 测量不同时间点(6 h、1 d、2 d、3 d、7 d)PBS 溶液的 pH 值。

1.6 细胞增殖和细胞行为

1.6.1 人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)的培养与接种 hBMSCs 购买自 ATCC, 细胞培养基使用 a-MEM(含 10% FBS、1%双抗), 传代时用 0.05%胰酶消化 1.5 min, 然后用含血清的 a-MEM 培养基终止消化。灭菌后, 在经过消毒处理并在无血清培养基中浸泡 24 h 的支架上接种细胞悬液, 然后置于 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱内孵育。

1.6.2 细胞增殖、黏附和渗透 使用 Live/Dead® 细胞活性/细胞毒性分析试剂盒对在支架上培养了 24 h 的细胞进行存活率分析, 用绿色荧光钙黄绿素-AM 对活细胞染色, 用红色乙锭二聚体-1 对缺失细胞质膜的死细胞进行染色; 将细胞分别培养 1、3 d 和 7 d, 并在每个时间点更换培养基, 使用增强型 CCK-8 试剂评价支架上的细胞增殖情况。

为了评估细胞黏附, 将 hBMSCs (1×10⁴ cells/well)接种于支架上培养 24 h 后固定细胞(4%多聚甲醛); 加入 Vinculin 或 α5β1 一抗于 4 °C 孵育过夜, 稀释对应的二抗 Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)或 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647)室温避光孵育; 最后用 FITC-Phalloidin(鬼笔环肽)对细胞骨架染色, 使用 DAPI 对细胞核染色。

将细胞(2×10⁴ cells/well)在支架上培养 1 d 和 7 d 后取出, 加入细胞骨架染色液 FITC-Phalloidin 和细胞核染色液 DAPI, 用激光共聚焦荧光显微镜观察细胞在支架上的铺展和渗透情况。

1.6.3 细胞成骨分化 将 hBMSCs(2×10⁴ cells/well)接种于支架上, 加成骨诱导液培养 7 d 和 14 d 后, 将细胞裂解收集蛋白质以进行碱性磷酸酶(ALP)分析。以对硝基苯基磷酸酯(pNPP)为底物测定在支架上细胞的 ALP 活性。于 405 nm 波长下测定吸光度来定量 ALP 活性; 使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定每种细胞裂解物的总蛋白含量; ALP 水平用总蛋白含量标准化。使用 BCIP/NBT 染色工作液对 ALP 染色。

使用茜素红 S(ARS)染色检查成骨培养中的钙沉积物, 将支架清洗之后固定细胞, 然后加入 1% 的茜素红染色液(染色 30 min), 倒置显微镜拍照。使用二抗对骨钙素(OCN)一抗以及 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647) OCN 进行染色。

1.6.4 qRT-PCR 分析(成骨相关基因表达) 将 hBMSCs(8×10⁴ cells/well)接种到支架, 在生长培养基中孵育 24 h, 然后在成骨培养基中培养 3、7 d 和 14 d。分别在每个时间点, 提取总 RNA 进行 qRT-PCR

分析。使用 PrimeScript RT 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 并将 cDNA 用作实时荧光定量 PCR 的模板。实验中使用的实时荧光定量 PCR 引物如表 1 所示。将所有基因的 mRNA 水平相对于内部对照(GAPDH)标准化。qRT-PCR 分析的详细步骤可以在以前的工作中可以找到^[26]。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence list

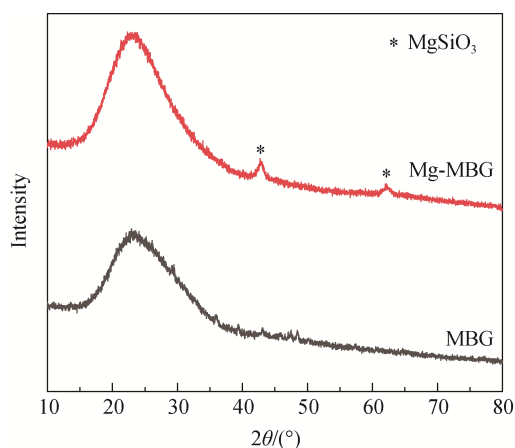
Gene	Direction	Sequence (5'-3')
BSP	Forward	ACAGCTGACGCTGGAAAGTTG
	Reverse	ACCTGCTCATTTTCATCCACTTC
Runx-2	Forward	ATCCAGCCACCTTCACTTACACC
	Reverse	GGGACCATTTGGGAAGTATAGG
Col-1	Forward	CGTGACCAAAAACAAAAGTGC
	Reverse	GGGGTGGAGAAAAGGAACAGAAA
OCN	Forward	GACGGCCGAGGTGATAGCTT
	Reverse	CATGGCTGGTCTTCCCGTTGC

2 结果与讨论

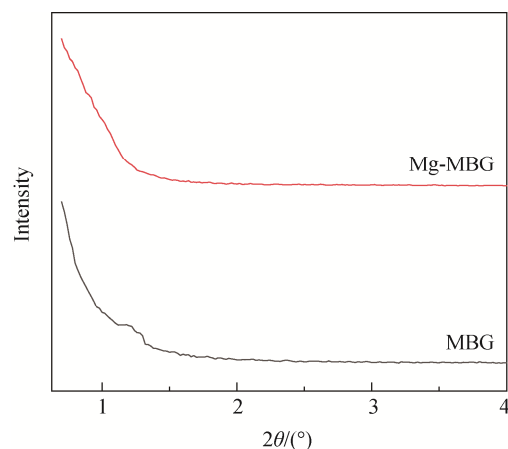
2.1 样品表征

图 1a 为 MBG 与 Mg-MBG 粉末的 XRD 谱。在 2θ 为 20°~30°之间出现 1 个较宽衍射峰, 表明样品的主相是与硅酸盐相关的低结晶相。粉末在 10°~80°之间无明显衍射峰存在, 说明所制备的 MBG 中的 SiO₂ 和无机物以无定型态存在; Mg-MBG 粉末出现 MgSiO₃ 衍射峰(JCPDS 72-1507), 所形成的硅酸镁结晶相的量相对较少。图 1b 为 MBG 和 Mg-MBG 在 2θ 为 0.5°~4.0°之间的 SAXRD 谱。2θ 为 1.1°~1.4°处对应(100)晶面衍射峰。从图 1b 可以看出, MBG 在 2θ 为 1.25°~1.30°位置出现衍射峰, Mg-MBG 则观察不到明显衍射峰, 表明 Mg²⁺的掺杂使得 MBG 的介孔结构有序度遭到破坏。

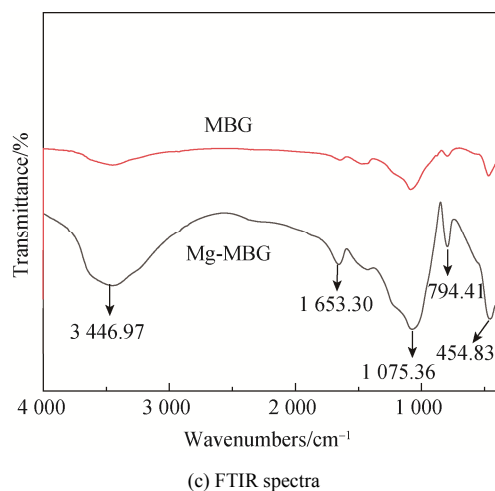
图 1c 为 MBG 和 Mg-MBG 的红外光谱。1 653 cm⁻¹ 与 3 446 cm⁻¹ 附近是空气中水的官能团峰位。红外光谱显示了 1 075 cm⁻¹ 附近的 Si—O—Si 不对称伸缩振动, 794 cm⁻¹ 附近的 Si—O 对称伸缩振动和 454 cm⁻¹ 附近的 Si—O—Si 弯曲振动。1 075 cm⁻¹ 处出现 Si—O—Si 不对称伸缩振动, 比位于 1 000~1 300 cm⁻¹ 范围内的纯 SiO₂ 的强度高。SiO₂ 结构中阳离子的存在会引起非桥氧数量的增加和 Si—O—Si 吸附带向较低波长移动。Si—O—Si 不对称伸缩振动的能带移动可归因于 Si—O—Si 键角, 键角受到 MBG 结构中金属阳离子 Mg²⁺的影响。较小尺寸的金属阳离子的存在会导致较小的 Si—O—Si 键角^[27], Mg 的共价离子半径小于 Ca, 所以 Mg²⁺的添加导致更小的 Si—O—Si 键角, 使得 Si—O—Si 不对称拉伸增加。



(a) XRD patterns



(b) SAXRD patterns



(c) FTIR spectra

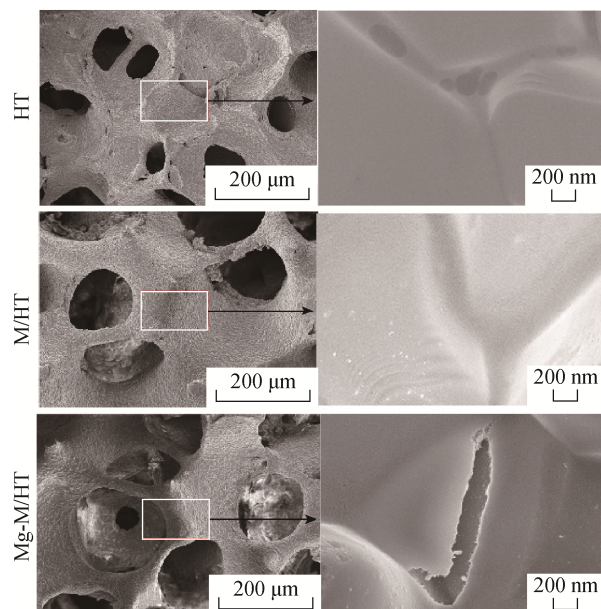
图 1 MBG 和 Mg-MBG 的 XRD 谱和 FTIR 谱

Fig. 1 XRD patterns and FTIR spectra of MBG and Mg-MBG

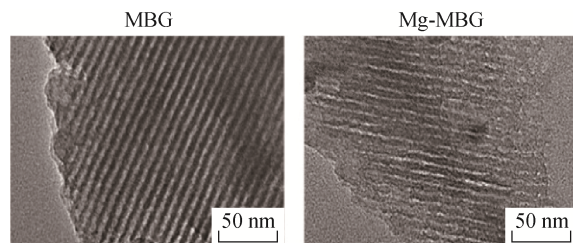
图 2a 为支架的 SEM 照片。从图 2a 可以看出 HT、M/HT 和 Mg-M/HT 支架均保留了聚氨酯海绵高连通的大孔网络结构, 孔尺寸约为 $300\ \mu\text{m}$ 。从高倍 SEM 照片可以看出, HT 支架晶粒表面光滑, 具有明显的晶界; 而 M/HT 与 Mg-M/HT 支架表面具有一层薄膜, 其晶界较 HT 支架略显模糊。此结果

证明 MBG 与 Mg-MBG 涂层能够均匀连续的覆盖在 HT 支架表面。

图 2b 为垂直于(001)方向拍摄的支架孔结构的 TEM 照片。从图 2b 可以发现明显垂直于[001]方向的孔结构, 介孔孔道为相互平行的圆筒孔, 表明 2 个样品均具有规则排列的介孔结构, 与 SAXRD (图 1b)的结果一致。



(a) SEM images of HT, M/HT and Mg-M/HT scaffolds



(b) TEM images of MBG and Mg-MBG on scaffolds

图 2 支架的形貌照片

Fig. 2 Morphologies of the scaffolds

综上, Mg^{2+} 的添加改变了 MBG 支架的相组成与介孔结构(孔径约为 $4.5\sim 5.0\ \text{nm}$), 但依然保留了 MBG 的大孔结构、均匀的表面形貌与介孔的有序性, 同时缩小了 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 键角。

2.2 M/HT 和 Mg-M/HT 支架在 PBS 缓冲溶液中的 pH 值变化

M/HT 和 Mg-M/HT 支架在 PBS 溶液中的 pH 值变化情况如图 3 所示。溶液 pH 值随着时间增加而逐渐下降, 相比于 M/HT 支架的 pH 值在 2 d 左右均达到人体生理 pH 值($7.0\sim 7.4$), Mg-M/HT 支架在浸泡 7 d 后达到人体生理 pH 值。因此, Mg-M/H 支架在 PBS 中浸泡 7 d 后, 更有益于细胞的培养。

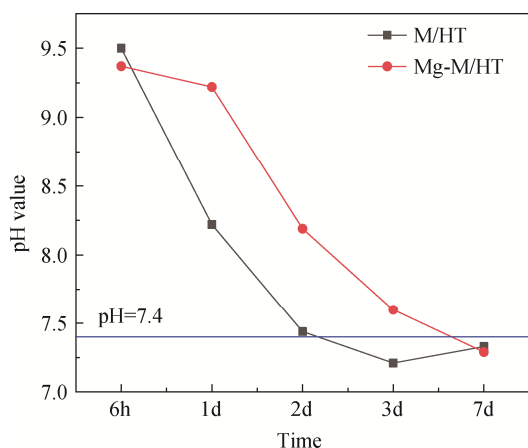
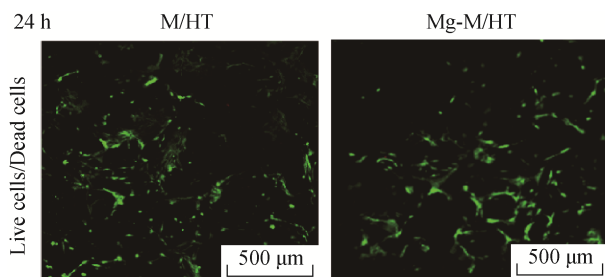


图3 M/HT 和 Mg-M/HT 支架在 PBS 缓冲溶液中的 pH 值变化情况

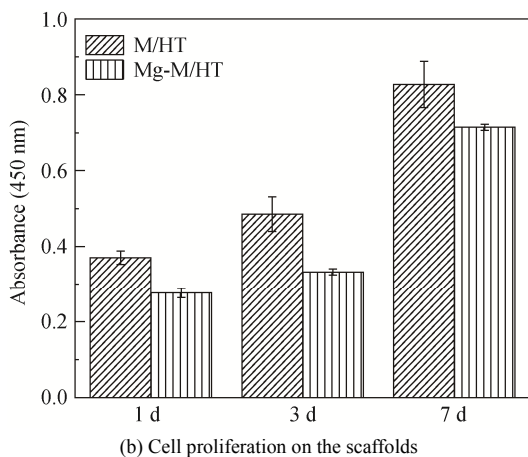
Fig. 3 pH value changes of M/HT and Mg-M/HT scaffolds in PBS buffer solution

2.3 Mg 掺杂对 M/HT 支架上人骨髓间充质干细胞活性的影响

图 4a 为 hBMSCs 在分别在 M/HT 和 Mg-M/HT 支架上培养 24 h 后的激光共聚焦显微镜照片。图 4a 中显示细胞在 2 种支架上基本呈绿色(活细胞), 而红色荧光(死细胞)表达量极少, 证明了 Mg-M/HT 与 M/HT 支架同样具有良好的细胞相容性, 进而说明 Mg 掺杂 MBG 涂层支架具有良好的细胞相容性。



(a) Live/Dead staining of hBMSCs cultured for 24 h



(b) Cell proliferation on the scaffolds

图4 M/HT 与 Mg-M/HT 支架上 hBMSCs 细胞活力

Fig. 4 Viability of hBMSCs on M/HT and Mg-M/HT scaffolds

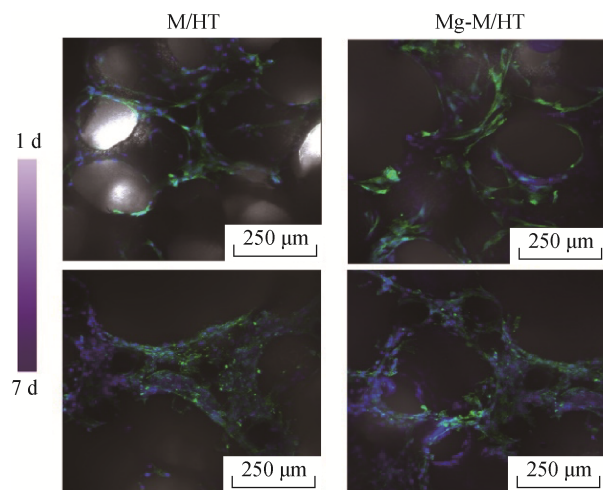
图 4b 为细胞在 M/HT 与 Mg-M/HT 支架上的增

殖情况。可以看出, 细胞生长状态正常, 光密度(OD) 值随时间而增加。比较 2 组在 1、3 d 和 7 d 的 OD 值, 发现 Mg-M/HT 支架的 OD 值比 M/HT 支架略低, 但 2 组之间无显著性差异。这是前期受到高 pH 值的影响, 略微降低了细胞增殖速率^[28], 后期受到活性离子 Mg^{2+} 的影响, 增殖速率有所增加。

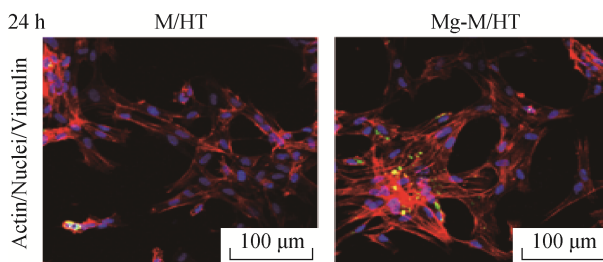
该实验说明添加 Mg^{2+} 的涂层不仅能够充分保留介孔生物活性玻璃本身的结构特点和成分优势, 而且使得细胞在材料表面具有良好的生长活力。 Mg^{2+} 对细胞增殖并无不良影响, 能够作为细胞生长的优良载体。

2.4 Mg 掺杂对人骨髓间充质干细胞在 M/HT 支架上黏附和铺展的影响

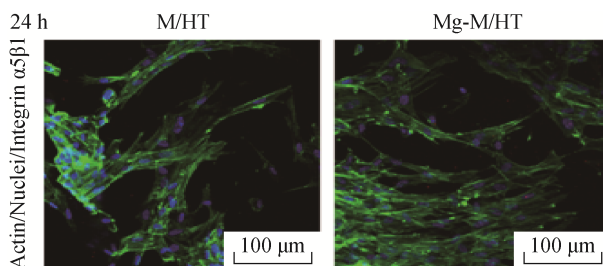
图 5a 为细胞在 M/HT 与 Mg-M/HT 支架上的激



(a) Confocal images of cells on M/HT and Mg-M/HT scaffolds



(b) Immunofluorescence staining of Vinculin



(c) Immunofluorescence staining of integrin $\alpha 5 \beta 1$

图5 人骨髓间充质干细胞在 M/HT 和 Mg-M/HT 支架上的黏附和铺展

Fig. 5 Adhesion and spreading of hBMSCs on M/HT and Mg-M/HT scaffolds

光共聚焦显微照片。可以看出, 细胞在支架表面生长状态良好。培养 1 d 后, 细胞在 M/HT 和 Mg-M/HT 支架表面能更好的铺展; 培养 7 d 后, 细胞除了在支架大孔骨架表面黏附, 还能在 Mg-M/HT 支架表面较好地生长。结果表明 Mg-M/HT 支架可为细胞提供充分的生长空间, 同时 Mg^{2+} 亦提高了细胞活力。

对支架表面黏附细胞的黏着斑蛋白和整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 进行免疫荧光标记。图 5b 为黏着斑蛋白荧光标记图, 使用绿色荧光标记, 图 5c 为整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 荧光标记图, 使用红色荧光标记。从图 5c 可以看出, 常规培养 24 h 后, 与 M/HT 支架相比, Mg-M/HT 支架的细胞黏着斑蛋白和整合素的荧光强度更高。这得益于 Mg 掺杂改变了 MBG 中 SiO_2 的网络结构^[25], 同时 Mg^{2+} 增加了细胞黏附和稳定性, 这可能是整联蛋白相互作用的结果。

2.5 Mg-M/HT 支架对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

为了进一步验证 Mg-M/HT 支架的成骨分化能力, 对在支架上培养的细胞的碱性磷酸酶(ALP)活性进行检测。图 6a 为在 M/HT 和 Mg-M/HT 支架上培养细胞的 ALP 活性照片。结果表明, 在 Mg-M/HT 支架上培养的细胞在 7 d 和 14 d 的 ALP 表达量近乎是在 M/HT 支架上培养细胞的 2 倍, 说明 Mg 掺杂对 M/HT 支架上的细胞成骨分化作用效果较为明显。图 6b 为在 2 种支架上培养细胞的 ALP 染色照片。该结果与 ALP 活力定量检测表现出一致的趋势, Mg-M/HT 支架上的细胞呈现更深的蓝紫色。说明活性离子 Mg^{2+} 的添加提高了细胞的成骨分化活性。图 6c 为 2 种支架上培养细胞的茜素红染色结果。从图 6c 可以看出, 相比于 M/HT 组支架, Mg-M/HT 支架上观察到更多的钙结节(红棕色斑点), 证明了 Mg 掺杂 MBG 涂层具有优异的促细胞成骨分化活性。图 6d 为细胞中的骨钙素进行免疫荧光染色照片(红色荧光)。由图 6d 可明显看出, 细胞在 Mg-M/HT 支架上显示出比 M/HT 支架上更强荧光强度, 表明细胞在 Mg-M/HT 上的生长状态更佳。

图 7 为 M/HT 和 Mg-M/HT 支架上培养细胞的骨相关基因表达情况。与 M/HT 支架相比, 在 3 d 时, Runx2、BSP、COL-I 和 OCN 在 Mg-M/HT 支架上的表达水平更高, 其中早期成骨标志物(COL-I 和 Runx2)差异显著; 在 7 d 时, Mg-M/HT 支架显著上调了晚期成骨标志物(BSP 和 OCN)的表达。结合 2 种支架在 PBS 缓冲溶液中的 pH 值, Mg-M/HT 支

架的 pH 值在前期高于 M/HT 支架的 pH 值, 不难发现由于在成骨早期 Mg-M/HT 支架的生物活性离子释放较多, 明显提高相关成骨基因的表达; 后期二者离子释放行为趋于一致, 这也是 BSP 和 COL-I 的表达量在后期无明显差异的原因。

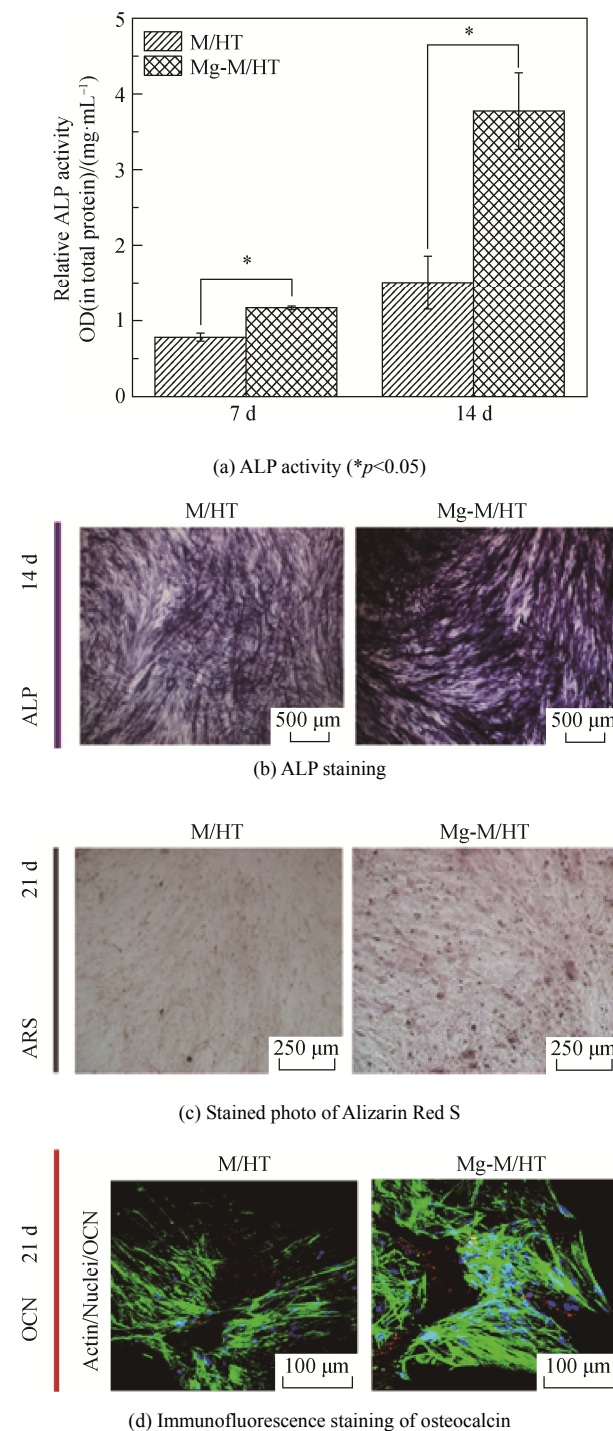


图 6 M/HT 和 Mg-M/HT 支架的成骨分化能力
Fig. 6 Osteogenic differentiation of M/HT and Mg-M/HT scaffolds

Mg-M/HT 支架 Runx2、BSP 与 COL-I 基因在

14 d 的表达低于 M/HT 支架的原因如下: 生物活性离子(Mg)的添加会一定程度上破坏 MBG 的介孔结

构^[27], 因此蛋白质的吸附也会受到相应的影响, 从而产生上述结果。

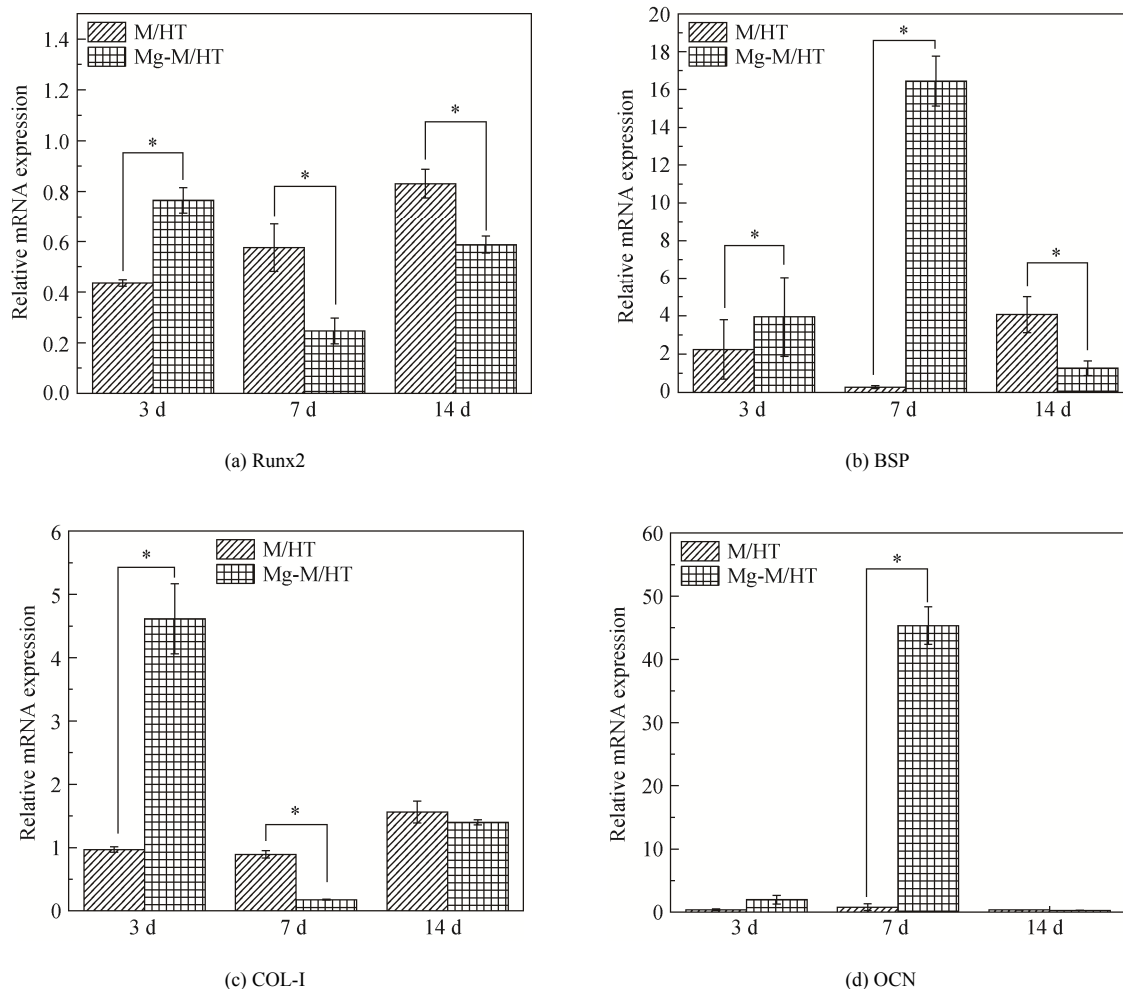


图 7 成骨相关基因表达(* $p < 0.05$)

Fig. 7 mRNA expression levels of Runx2, BSP, COL-I and OCN (* $p < 0.05$)

3 结论

1) Mg 离子取代 Ca 离子改变了 MBG 涂层的物相组成并对 MBG 的介孔有序度有一定影响, 但仍具有良好的大孔结构和表面形貌并保留了一定的介孔有序性;

2) 较 M/HT 支架, Mg-M/HT 支架能够促进细胞黏着斑蛋白、整合素、ALP、钙结节和骨钙素的表达, 表明 Mg 掺杂可提高 M/HT 支架的成骨活性;

3) 从基因层面而言, 和 M/HT 相比, Mg-M/HT 支架在 3 d 时上调了早期成骨标志物(COL-I 和 Runx2), 在 7 d 时上调了晚期成骨标志物(BSP 和 OCN), 表明 Mg 掺杂一定程度上提高了细胞的成骨分化能力。

参考文献:

- [1] SLOAN M, PREMKUMAR A, SHETH N P. Projected volume of primary total joint arthroplasty in the US, 2014 to 2030[J]. J Bone Joint Surg Am, 2018, 100(17): 1455–1460.
- [2] FU Q, SAIZ E, RAHAMAN M N, et al. Toward strong and tough glass and ceramic scaffolds for bone repair[J]. Adv Funct Mater, 2013, 23(44): 5461–5476.
- [3] RAMASWAMY Y, WU C T, ZHOU H, et al. Biological response of human bone cells to zinc-modified Ca-Si-based ceramics[J]. Acta Biomater, 2008, 4(5): 1487–1497.
- [4] WU C T, RAMASWAMY Y, SOEPATTO A, et al. Incorporation of titanium into calcium silicate improved their chemical stability and biological properties[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 86(2): 402–410.
- [5] 喻小鹏, 吴成铁. 3D 打印生物陶瓷功能改进的研究进展[J]. 硅酸盐学报, 2021, 49(5): 829–843.
YU Xiaopeng, WU Chengtie. J Chin Ceram Soc, 2021, 49(5): 402–410.
- [6] HU H J, ZHANG W J, QIAO Y Q, et al. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂

- coatings on titanium[J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(2): 904–915.
- [7] BALAMURUGAN A, REBELO A, LEMOS A F, et al. Suitability evaluation of sol–gel derived Si-substituted hydroxyapatite for dental and maxillofacial applications through in vitro osteoblasts response[J]. *Dent Mater*, 2008, 24(10): 1374–1380.
- [8] THIAN E S, HUANG J, BEST S M, et al. The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(13): 2692–2698.
- [9] YAN X X, YU C Z, ZHOU X F, et al. Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43(44): 5980–5984.
- [10] LALZAWMLIANA V, ANAND A, ROY M, et al. Mesoporous bioactive glasses for bone healing and biomolecules delivery[J]. *Mater Sci Eng C*, 2020, 106:110180.1–110180.14.
- [11] XIE P, DU J H, LI Y L, et al. Robust hierarchical porous MBG scaffolds with promoted biomineralization ability[J]. *Colloids Surf B*, 2019, 178: 22–31.
- [12] LI Y, LIU Y Z, LONG T, et al. Mesoporous bioactive glass as a drug delivery system: Fabrication, bactericidal properties and biocompatibility [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24(8): 1951–1961.
- [13] YE D D, TANG W, XU Z J, et al. Application of MBG as a coating material on mechanically stronger but less degradable ceramic scaffolds for enhanced osteogenesis[J]. *Mater Lett*, 2018, 223: 105–108.
- [14] ZHAO S C, ZHANG J H, ZHU M, et al. Three-dimensional printed strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for repairing rat critical-sized calvarial defects[J]. *Acta Biomater*, 2015, 12: 270–280.
- [15] MELCHERS S, UESBECK T, WINTER O, et al. Effect of aluminum ion incorporation on the bioactivity and structure in mesoporous bioactive glasses[J]. *Chem Mater*, 2016, 28(10): 3254–3264.
- [16] RAHMAN M S, TAHIR M A, NOREEN S, et al. Osteogenic silver oxide doped mesoporous bioactive glass for controlled release of doxorubicin against bone cancer cell line (MG-63): In vitro and in vivo cytotoxicity evaluation[J]. *Ceram Int*, 2020, 46(8): 10765–10770.
- [17] WANG X J, CHENG F, LIU J, et al. Biocomposites of copper-containing mesoporous bioactive glass and nanofibrillated cellulose: Biocompatibility and angiogenic promotion in chronic wound healing application[J]. *Acta Biomater*, 2016, 46: 286–298.
- [18] RUDE R K, GRUBER H E. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations[J]. *J Nutr Biochem*, 2004, 15(12): 710–716.
- [19] OKUMA T. Magnesium and bone strength[J]. *Nutrition*, 2001, 17(7–8): 679–680.
- [20] YAMASAKI Y, YOSHIDA Y, OKAZAKI M, et al. Synthesis of functionally graded MgCO_3 apatite accelerating osteoblast adhesion[J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 62(1): 99–105.
- [21] 吴成铁, 常江, 汪正, 等. 溶胶–凝胶法与两步沉淀法制备的铉黄长石粉体的体外生物活性比较[J]. *硅酸盐学报*, 2005, 33(2): 225–229. WU Chengtie, CHANG Jiang, WANG Zheng, et al. *J Chin Ceram Soc*, 2005, 33(2): 225–229.
- [22] WU L L, FEYERABEND F, SCHILLING A F, et al. Effects of extracellular magnesium extract on the proliferation and differentiation of human osteoblasts and osteoclasts in coculture[J]. *Acta Biomater*, 2015, 27: 294–304.
- [23] YU Y Q, JIN G D, XUE Y, et al. Multifunctions of dual Zn/Mg ion co-implanted titanium on osteogenesis, angiogenesis and bacteria inhibition for dental implants[J]. *Acta Biomater*, 2017, 49: 590–603.
- [24] GAUTAM C R, KUMAR S, BIRADAR S, et al. Synthesis and enhanced mechanical properties of MgO substituted hydroxyapatite: A bone substitute material[J]. *RSC Adv*, 2016, 6(72): 67565–67574.
- [25] TANG W, LIN D, YU Y M, et al. Bioinspired trimodal macro/micro/nano-porous scaffolds loading rhBMP-2 for complete regeneration of critical size bone defect[J]. *Acta Biomater*, 2016, 32: 309–323.
- [26] XU Z J, LONG J, ZHANG N F, et al. Strong mineralization ability of strontium zinc silicate: Formation of a continuous biomorphic mineralized layer with enhanced osteogenic activity[J]. *Colloids Surf B*, 2019, 176: 420–430.
- [27] LI X, WANG X P, HE D N, et al. Synthesis and characterization of mesoporous $\text{CaO-MO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ ($\text{M}=\text{Mg, Zn, Cu}$) bioactive glasses/composites[J]. *J Mater Chem*, 2008, 18(34): 4103–4109.
- [28] VARANASI V, SAIZ E, LOOMER P, et al. Enhanced osteocalcin expression by osteoblast-like cells (MC3T3-E1) exposed to bioactive coating glass ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-MgO-K}_2\text{O-Na}_2\text{O}$ system) ions[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(9): 3536–3547.