

硼硅酸盐生物活性玻璃体内外成骨效应对比分析

陈亭利¹, 杜 萍¹, 李 贤¹, 苏 昆¹, 李帅杰¹, 崔 旭¹, 潘浩波^{1,2}

(1. 中国科学院深圳先进技术研究院, 广东 深圳 518055; 2. 深圳市中科海世御生物科技有限公司, 广东 深圳 518055)

摘 要: 针对硼硅酸盐生物活性玻璃(BBG)临床应用的瓶颈问题, 对比不同硼硅比(样品 0B、样品 1.5B、样品 3B)生物活性玻璃与 30% (质量分数)柠檬酸混合形成的骨水泥浸提液在体外对人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)增殖活性与成骨分化的影响, 及该骨水泥体内移植后对大鼠股骨缺损的修复效果。结果表明: 骨水泥的降解速率随生物玻璃中 B 元素含量的增加而增快, 同时其浸提液在体外对 hBMSCs 增殖活性与成骨分化的抑制效果更明显; 然而, 含最高浓度 B 的骨水泥(样品 3B)在体内诱导更多新骨生成, 展示出更好的骨修复性能。基于 BBG 在体内外生物学效应的显著性差异, 本工作为硼基生物活性材料特性的优化设计及其体外有效性评价体系的构建提出了思考和建议。

关键词: 硼硅酸盐生物活性玻璃; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 骨缺损; 硼

中图分类号: R318.08 文献标志码: A 文章编号: 0454-5648(2023)10-2518-09

网络出版时间: 2023-08-07



Osteogenic Effect of Borosilicate Bioactive Glass *In Vitro* and *In Vivo*

CHEN Tingli¹, DU Ping¹, LI Xian¹, SU Kun¹, LI Shuaijie¹, CUI Xu¹, PAN Haobo^{1,2}

(1. Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China; 2. Shenzhen Healthemes Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518055, Guangdong, China)

Abstract: In recent years, borosilicate bioactive glass (BBG) is widely studied due to its osteoinductive activities. However, the ions accumulated in the extracts can induce cytotoxicity and hemolysis when evaluating the biological properties of the degradable materials using the extracts of the materials. In this paper, the BBGs were prepared at different ratios of B₂O₃ (0B, 1.5B, and 3.0B samples), and bone cements were fabricated by mixing the BBGs with 30% (in mass fraction) citric acid. The cytotoxic and osteogenic effects of the bone cements extracts were evaluated using human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs), and the bone healing effects of the bone cements were evaluated using a rat femoral defect model, respectively. The results show that the extracts of bone cement formed at a greatest ratio of B₂O₃ in the bioactive glass can induce a maximum inhibitive effect on the proliferation and osteogenesis of hBMSCs *in vitro*. However, the degradation and bone healing effect of the bone cement increase directly with the ratio of B₂O₃ in BBG upon transplantation. Also, there is a huge discrepancy with the *in vivo* and *in vitro* evaluation systems for the biodegradable biomaterials. Understanding the mechanisms of the different biological effects of BBG *in vitro* and *in vivo* will provide some guidance for the design of a more effective borate-containing bioactive materials and the construction of a better evaluation system for bioactive materials *in vitro*, thus facilitating the clinical applications of BBG.

Keywords: borosilicate bioactive glass; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; bone defect; boron

第七次人口普查数据显示^[1], 我国超过 65 岁的人群占全国人数的 18%, 达到 2.64 亿人。随着老龄化加剧, 老龄高发性骨质疏松逐渐引起广泛关注^[1-2]。

骨质疏松及骨质疏松性骨折致残性高, 这将严重影响患者的生活质量, 并给社会医疗系统带来沉重的经济负担^[3]。当骨缺损较小时, 机体可实现自愈,

收稿日期: 2023-03-30。 修订日期: 2023-04-21。

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2400500); 国家自然科学基金委-广东联合基金重点项目(U2001221); 国家自然科学基金委国际(地区)合作与交流项目(内地-香港) (32161160327); 深圳市基础研究重点项目(JCYJ20200109114620793, JSGGKQTD2021083117433001, ZDSY20130401165820356)。

第一作者: 陈亭利(1998—), 女, 硕士研究生。

通信作者: 潘浩波(1978—), 男, 博士, 研究员。

Received date: 2023-03-30. Revised date: 2023-04-21.

First author: CHEN Tingli (1998—), female, Master candidate.

E-mail: tl.chen@siat.ac.cn

Correspondent author: PAN Haobo (1978—), male, Ph.D., Professor.

E-mail: hb.pan@siat.ac.cn

但当缺损程度过大时, 使用骨修复材料帮助愈合是首要选择^[4]。第一代生物材料由 Jonathan Cohen 博士在 1967 年定义^[5], 此类材料通常为生物惰性材料如钛合金、聚合物[如聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)]等; 第二代生物材料具有生物活性与可降解性, 如磷酸钙、胶原蛋白和生物玻璃等; 第三代材料是在第二代材料基础上, 通过添加活性成分激活内源分子最终促进机体损伤愈合。20 世纪 70 年代, Hench 等^[6]发明并定义 45S5 生物玻璃, 奠定了生物玻璃研发与应用的基础。随着对生物玻璃研究的深入, 本世纪初科学家利用硼酸盐完全或部分替代二氧化硅研发出硼硅酸盐生物活性玻璃(BBG)。硼与硅具有相似的化学性质, 并且硼具有多样化的生物学效应如免疫调节、抗氧化能力和维持骨稳态平衡等, 因此 BBG 可更有效地应用于骨组织修复与功能重建^[7]。

前期研究^[8-10]表明, BBG 在体内具有更好的骨再生性能, 这是因为 B 元素的添加使材料的降解与新骨生成速率更匹配^[11-12], 然而, 大多数体外研究发现, 高浓度硼对细胞具有毒性^[13]。因此, 本研究制备不同硼硅比的生物活性玻璃, 制备其浸提液并进行系列稀释, 在体外研究不同浓度浸提液对骨髓间充质干细胞增殖、活性、成骨分化及基质矿化的影响, 并将不同硼硅比玻璃应用于大鼠股骨缺损的治疗, 旨在比较不同硼硅比 BBG 在体内外的成骨效应, 明确硼酸根发挥治疗效果的浓度范围, 最终为 BBG 中硼酸根含量的优化、释放等提供指导。

1 实验

1.1 不同硼硅比生物玻璃的制备

采用熔融法制备玻璃, 按计算比例(表 1)称取所需原料(Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、碱式碳酸镁、 CaCO_3 、 SiO_2 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 均购于国药集团), 放入高温炉, 样品 0B 和样品 1.5B 在 1300 °C, 样品 3B 在 1350 °C 煅烧熔合 2 h, 冰水中淬火降温, 球磨 4 h, 过 380 目筛, 得到直径小于 40 μm 的 3 种玻璃粉末。用质量分数为 30% 柠檬酸水溶液作为液相, 玻璃粉作为固相, 取磷酸三钙(α -TCP)粉末(购于美国 Aladdin 公司)用作实验对照组。将样品 0B、样品 1.5B、样品 3B 玻璃粉体和 α -TCP 粉末分别与 30% 柠檬酸溶液按照质量比 2:1 的固液比混合, 将混合物装入模具, 风干 24 h, 获得直径为 5 mm, 高为 5 mm 的骨水泥圆片。

1.2 骨水泥浸提液制备

按照国际标准医疗器械生物学评价第 5 部分: 体外细胞毒性试验(ISO10993-5)制备浸提液。取 1 g

表 1 样品 0B、样品 1.5B、样品 3B 的摩尔分数

Table 1 Mole fraction (x) of 0B, 1.5B, 3B samples x/%

Samle No.	Na_2O	K_2O	MgO	CaO	B_2O_3	P_2O_5	SiO_2
0B	6	8	8	22	0	2	54
1.5B	6	8	8	22	27	2	27
3B	6	8	8	22	54	2	0

玻璃骨水泥圆片浸泡于 5 mL 最低需求培养基(α -MEM)中, 37 °C 震荡 24 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 0.22 μm 滤膜过滤, 得到质量浓度为 200 mg/mL 骨水泥浸提液; 将等体积 α -MEM 培养基与骨水泥浸提液充分混合获得 1/2 质量浓度(100 mg/mL)骨水泥浸提液, 将 1/2 质量浓度的浸提液按照以上方法进行 2 倍系列稀释, 获得稀释 4 倍到 64 倍的质量浓度在 3.125~50.000 mg/mL 范围内的浸提液, 同时配制稀释 100 倍质量浓度为 2 mg/mL 的玻璃浸提液, 利用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)检测 B 浓度(美国 Agilent 公司 720 型), 并应用于后续的细胞培养。

1.3 细胞及其培养方法

人骨髓间充质干细胞(hBMSCs) (广州赛业, HUXMF-01001)培养于含 10% (体积分数)胎牛血清(FBS)和 1% (体积分数)抗生素的 α -MEM。分别向 α -MEM 和稀释后的浸提液中添加 50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 10 nmol/L 地塞米松配制成骨诱导培养基。细胞置于 37 °C 恒温、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱内培养, 隔天换液诱导成骨分化。

1.4 细胞增殖活性与毒性检测

将 hBMSCs 按 1 600 个细胞 / 孔接种于 96 孔板 ($n=6$), 每孔加入 100 μL 培养基, 细胞稳定后更换为不同稀释浓度的材料浸提液培养基, 以无浸提液的基础培养基为对照组; 培养 1、3 d 和 5 d 后, 取出孔板弃原培养基, 更换含有 10% (体积分数)细胞活性检测试剂 CCK-8 (上海碧云天 C0038)的新鲜培养基, 孵育 2 h, 放入酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。

在检测材料浸提液对细胞的毒性时, 将 hBMSCs 按 10 000 个细胞/孔接种至 24 孔板, 细胞稳定后添加稀释 32 倍的材料浸提液, 同时以无浸提液的基础培养基作为对照, 培养 5 d 后进行 Calcein-AM/PI (上海 Yesen40274ES60)细胞活死染色, 用荧光显微镜观察并拍照。

1.5 碱性磷酸酶(ALP)染色与定量检测

将 hBMSCs 按 10 000 个细胞/孔接种至 24 孔板, 待细胞稳定后更换为成骨诱导培养基(32 倍稀释的材料浸提液添加成骨诱导因子配制而成), 诱导 7 d 和 14 d 后进行 ALP 活性染色(上海碧云天 C3206)及显

显微镜观察拍照。同时利用 RIPA 裂解培养 7 d 和 14 d 的细胞,离心取上清应用于 ALP 的定量检测(上海碧云天 P0321S)计算单位质量总蛋白(mg)内 ALP 的摩尔浓度($n=3$)。

1.6 茜素红染色与半定量实验

将 hBMSCs 按 10 000 个细胞/孔接种至 24 孔板,待细胞稳定后更换成骨诱导培养基(材料浸提液稀释 32 倍后添加成骨诱导因子配制而成),培养 14 d 和 21 d 后,使用 1% (质量分数)茜素红(Tris-HCL 溶配制, $\text{pH}=4.1\sim 4.3$)进行染色并拍照记录,然后加入 10% (体积分数)的氯化十六烷基吡啶(CPC) PBS 溶液,摇晃洗脱 1 h 于 562 nm 处检测洗脱液的吸光度。

1.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)

将 hBMSCs 按 10 000 个细胞/孔种至 24 孔板,待细胞稳定后更换为成骨诱导培养基(材料浸提液稀释 32 倍后添加成骨诱导因子配制而成),培养 3 d 和 7 d 后用试剂盒(上海 Magen R4114-03)提取总 RNA,利用超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Nanodrop 2000)评估 RNA 纯度:每个 RNA 样本的 A260:A280 比率大于 1.8,且 A260:A230 大于 1.0。利用反转试剂盒(日本 Takara RR037A)将 mRNA 反转合成 cDNA,利用 qPCR 检测成骨相关基因 *Col1a1*、 *β -catenin*、*Alpl* 和 *Runx2* 的转录水平。记录每个基因的扩增循环数,以基因 *Gapdh* 为内参,采用 ddCT 法计算目的基因的相对表达($2^{-\text{ddCT}}$)。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

Gene	Primer sequences	
<i>Gapdh</i>	Forward	GGCTCTCCAGAACATCATCC
	Reverse	TTTCTAGACGGCAGGTCAGG
<i>Col1a1</i>	Forward	CTGGATGCCATCAAAGTCTTC
	Reverse	AATCCATCGGTCATGCTCTC
<i>Alpl</i>	Forward	CCACGTCTTCACATTGGTG
	Reverse	CAGACTGCGCCTGGTAGTTG
<i>Runx2</i>	Forward	TGCACTGGGTCATGTGTTTG
	Reverse	TGGCTGCATTGAAAAGACTG
<i>β-catenin</i>	Forward	GGTCCTCTGTGAACTTGC
	Reverse	GTAATCCTGTGGCTGTGCC

1.8 免疫印迹(WB)

与 1.7 相同的方法诱导 hBMSCs 成骨分化,7 d 和 14 d 后利用 RIPA 将细胞裂解、离心取上清进行 WB 实验,检测成骨分化标记蛋白 COL1A1、OPN、OCN、 *β -catenin* 在不同时间点的表达水平。

1.9 鼠股骨缺损与骨水泥材料移植

选取 8~10 周的雄性大鼠(购于广东维通利华公

司),麻醉后暴露股骨髁端,钻出直径 2 mm 的空洞构建股骨缺损模型(动物伦理编号:SIAT-IACUC-20230216-YYX-TXXZX-PHB-A2149-01)。将手术后的大鼠随机分为 4 组,分别填入利用样品 0B、样品 1.5B、样品 3B 生物玻璃和 TCP 4 种材料新鲜配制的骨水泥($n=4$),缝合伤口并消毒处理,于不同时间点观察骨修复效果。

1.10 微计算机断层扫描(Micro-CT)

取大鼠股骨样本利用质量分数 4%多聚甲醛(PFA)固定后进行 Micro-CT 扫描(瑞士 SCANCO 公司,UCT100,设定电压为 70 kV、电流 200 μA 、分辨率 9 μm 、曝光 230 ms),将扫描所得的图像数据用 SkyScan 软件分析处理。

1.11 样品石蜡切片免疫组化染色实验

将骨组织样品用质量分数为 4%的多聚甲醛固定 24 h 后,利用质量分数为 10%的乙二胺四乙酸脱钙处理,待组织软化后使用梯度体积分数的酒精(75%、85%、90%、100%)进行脱水、石蜡包埋及切片。将切片脱蜡至水后进行 COL1A1、OCN 和 OPN 等蛋白的免疫组化染色,将染色后的样品于正置显微镜(日本尼康,NIKON ECLIPSE CI)下观察拍照定性比较,并利用 Image J 软件对不同材料移植后的新骨生成和骨整合情况进行定量比较。

1.12 统计学方法

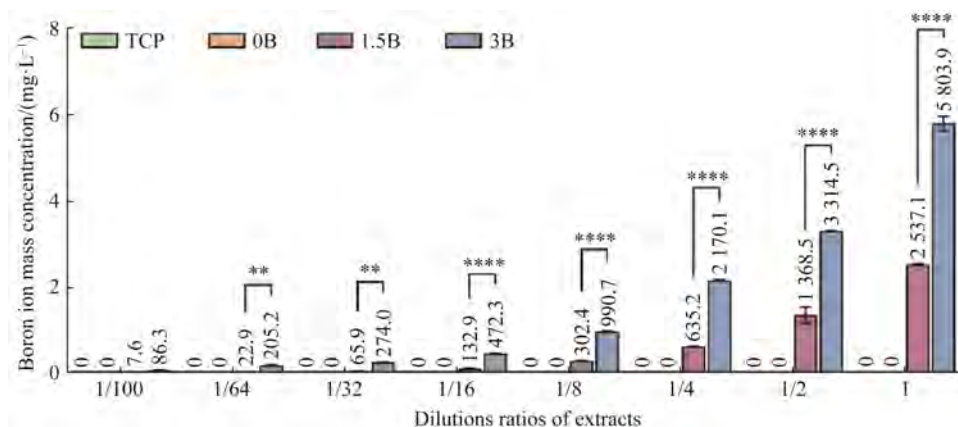
采用 Graphpad Prism 8 软件进行统计分析,数据采用(均数 $\pm$ 标准差)表示,多组之间比较采用单因素方差分析; $p<0.05$ 视为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 材料浸提液梯度稀释后 B 离子浓度差异及对 hBMSCs 增殖活性的影响

ICP-OES 结果表明,不同浸提液稀释液中 B 离子的含量具有显著性差异,其中,3B 玻璃骨水泥浸提液中 B 离子含量最高,显著高于样品 TCP、样品 0B 和样品 1.5B 组(图 1)。

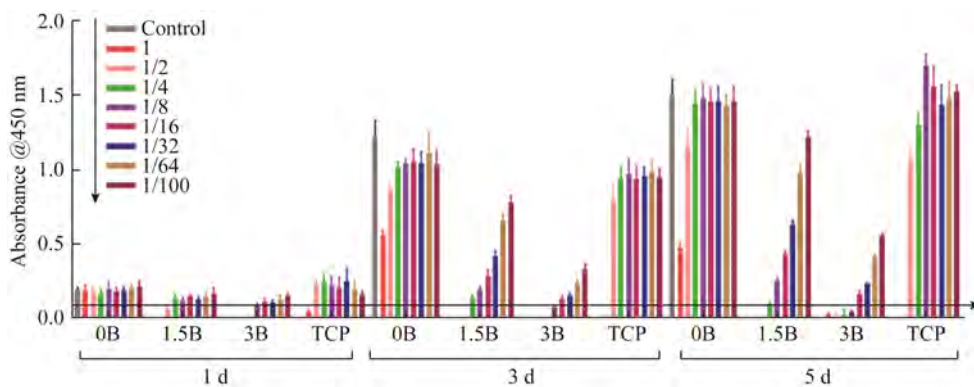
CCK-8 检测结果表明,与对照组相比,样品 0B 和样品 TCP 骨水泥浸提液原液对 hBMSCs 的增殖具有显著抑制作用,而稀释后的浸提液对细胞增殖无显著影响;样品 1.5B 浸提液原液及稀释 2 倍后,导致细胞全部死亡;样品 3B 浸提液稀释 1~4 倍后仍造成细胞全部死亡;样品 1.5B 和样品 3B 浸提液稀释 8~100 倍后仍对 hBMSC 的增殖具有显著抑制作用。所有浓度玻璃浸提液对 hBMSCs 增殖均无显著促进效果(图 2a)。



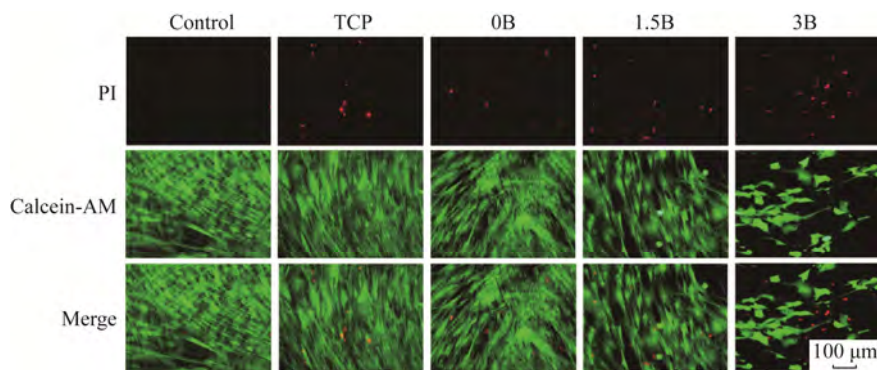
Statistical differences are expressed as ** ($p<0.01$), and **** ($p<0.0001$), respectively; TCP is tricalcium phosphate.

图 1 不同材料浸提液梯度稀释后 B 离子浓度的 ICP-OES 检测

Fig. 1 Boron ions concentrations in the diluted material extracts detected by inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES)



(a) CCK-8 assay of hBMSCs cultured in the diluted materials extracts for 1, 3 d and 5 d



(b) Live & dead stained images of hBMSCs cultured in the 32-folds diluted material extracts for 5 d

图 2 不同浓度浸提液对 hBMSCs 增殖及活性的影响

Fig. 2 Proliferation and viability tests of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) cultured in the diluted materials extracts

基于玻璃浸提液对细胞的毒性作用, 将其稀释 32 倍用于培养 hBMSCs, 5 d 后进行活死染色, 结果显示对照组中 hBMSCs 生长状态良好, 排布紧密无细胞死亡; 样品 TCP 组有少许死亡细胞, 细胞状态相对较好, 排列较为紧密。样品 0B、样品 1.5B 和样品 3B 生物活性玻璃浸提液中死亡细胞的数目随 B 含量的增高而依次增加(图 2b), 这与 CCK-8

检测结果一致, 推测是浸提液中 B 元素含量过高导致的细胞毒性增加^[14]。

2.2 玻璃浸提液稀释液对 hBMSCs 成骨分化和基质矿化的影响及分析

为了探究不同玻璃浸提液对成骨分化的效果, 将浸提液稀释 32 倍后配制成骨诱导培养基应用于 hBMSCs 的培养。诱导分化 7 d 后, ALP 染色尚不

明显, 其中, 样品 0B 和样品 TCP 组 ALP 染色阳性(蓝紫色)细胞数量最多, 略多于对照组, 而样品 1.5B 和样品 3B 组阳性染色细胞数量最少。成骨诱导 14 d 后, ALP 阳性区域显著增多, 整体趋势与第 7 d 染色结果相近, 即样品 0B、样品 1.5B 和样品 3B 组中 ALP 阳性区域随玻璃中 B 含量的增加而减少(图 3a)。ALP 定量结果进一步表明样品 1.5B 和样品 3B 玻璃浸提液在稀释 32 倍后, 仍对 ALP 活性具有较强的抑制作用(图 3b)。ALP 为成骨分化早期的标记分子^[15], 这说明硼基玻璃浸提液在稀释 32 倍后仍对 hBMSCs 成骨分化具有抑制效果。

hBMSCs 在不同成骨诱导培养基中培养 14 d 后, 茜素红染色阴性表明细胞尚未产生钙结节; 21 d 后, 茜素红染色阳性区域(橘红色)显著增加, 其中, 样品 TCP 组和对照组细胞所形成的阳性染色面积最大, 样品 0B 组次之, 然后是样品 1.5B 组, 而样品 3B 组细胞未形成明显的钙结节(图 4a)。

对染色样品进行提取和吸光度检测发现其结果与茜素红染色结果一致(图 4b)。图 3 和图 4 结果表明, 相对于样品 TCP 浸提液, BBG 浸提液对 hBMSCs 的体外成骨分化和钙结节形成均具有显著抑制作用, 并且该抑制效果与 B 浓度正相关, 即抑制效果由高到低依次为样品 3B、样品 1.5B、样品 0B。

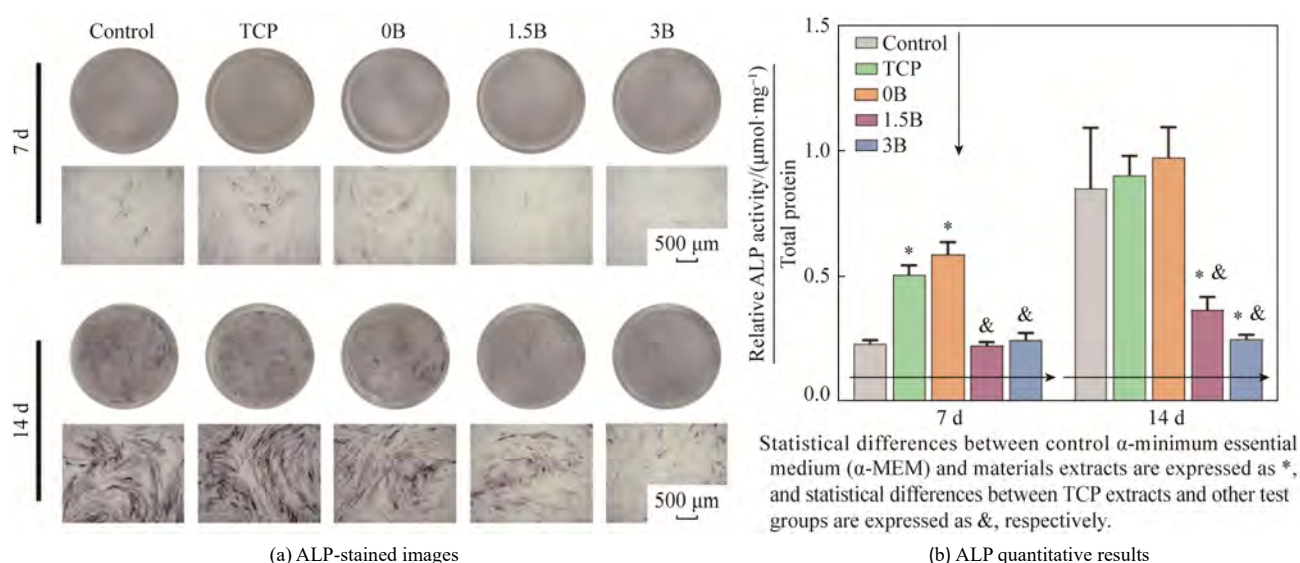


图 3 hBMSCs 在不同材料浸提液中成骨诱导培养 7、14 d ALP 染色与定量分析

Fig. 3 Alkaline phosphatase (ALP) staining and quantitative results of hBMSCs cultured in osteogenic media with different material extracts for 7 d and 14 d, respectively

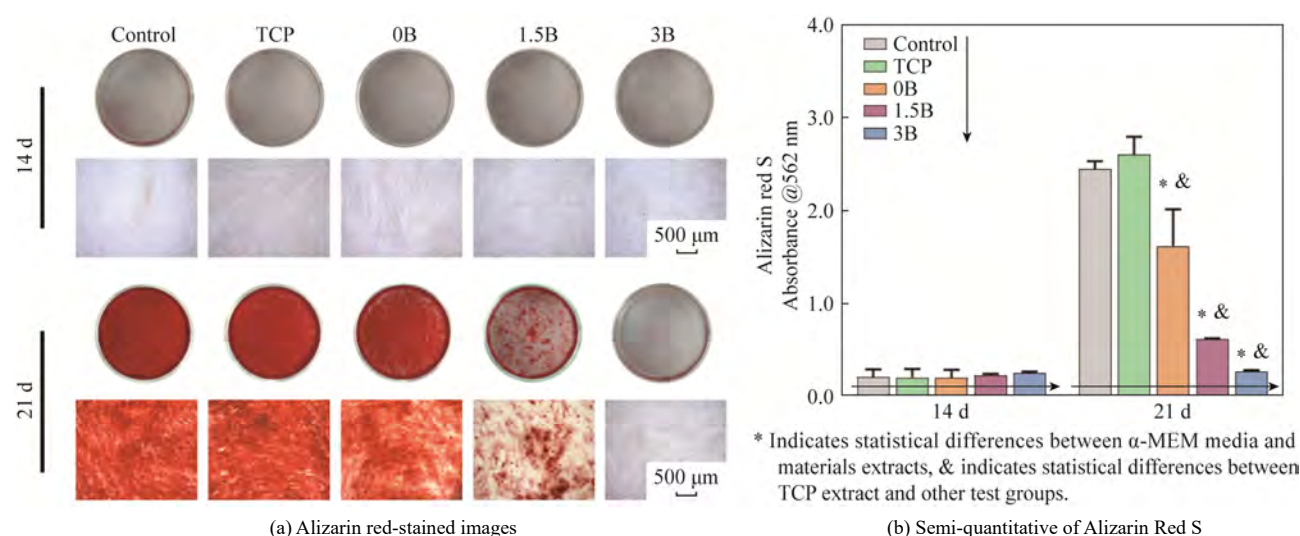
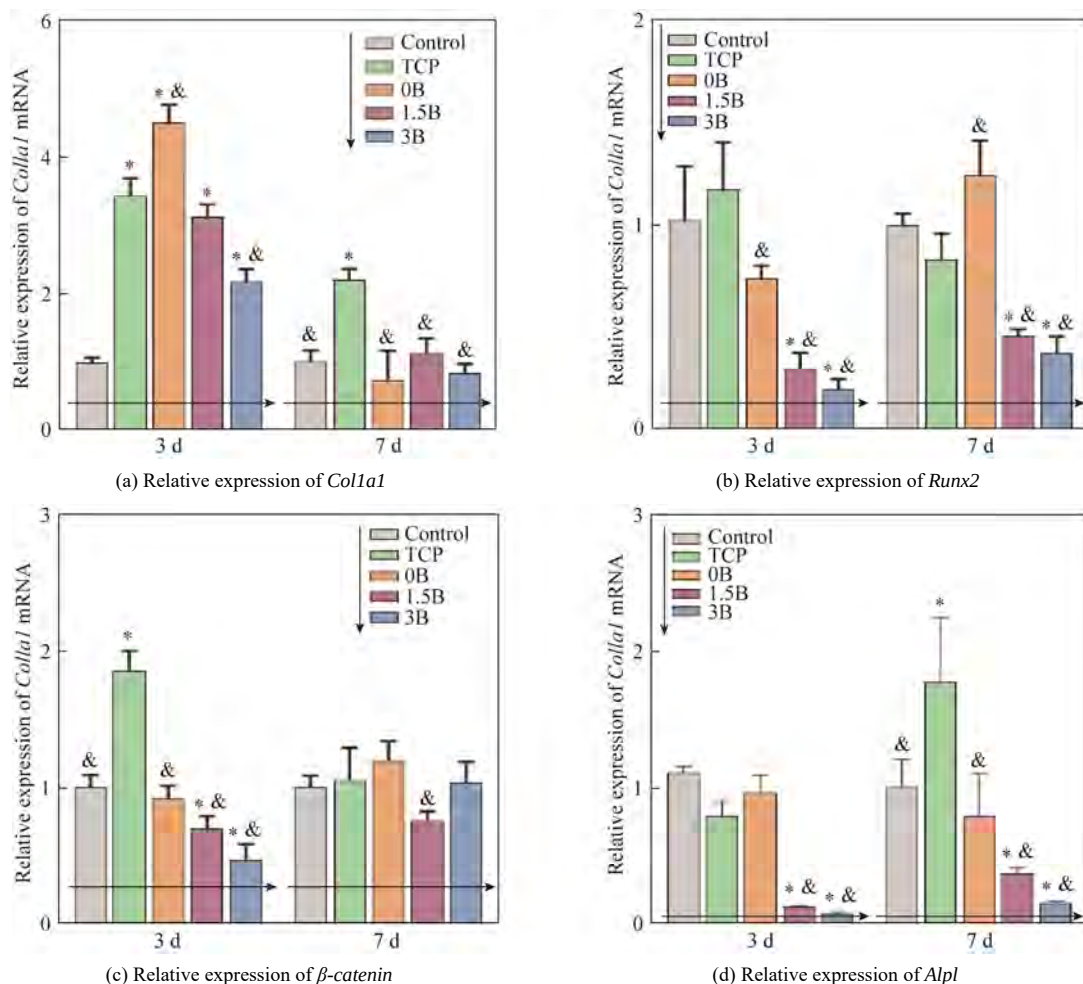


图 4 hBMSCs 在不同材料浸提液中成骨诱导培养 14、21 d 后茜素红染色与半定量结果

Fig. 4 Alizarin red-stained images and semi-quantitative results of the stained hBMSCs cultured in osteogenic media with different material extracts for 14 d and 21 d, respectively

成骨诱导 3 d 后, 所有材料浸提液对 *Col1a1* mRNA 的表达具有促进作用; 7 d 后, 样品 TCP 组 *Col1a1* 的表达水平显著高于样品 0B、样品 1.5B 和样品 3B 组(图 5a)。Runx2 的 mRNA 水平在不同培养条件中随时间上调, 第 7 天时样品 0B 组显著高于对照组, 而样品 1.5B 和样品 3B 组仍低于对照组和样品 TCP 组(图 5b)。TCP 组 β -catenin 的 mRNA 水平

在第 3 天时最高并显著高于其他组, 而在第 7 天时与其他组无显著差异(图 5c)。样品 1.5B 和样品 3B 组中 *Alpl* 的 mRNA 水平在第 3 和第 7 天均显著低于 control 组和样品 TCP 组(图 5d)。综上, 样品 1.5B 和样品 3B 玻璃浸提液组对 hBMSCs 成骨分化标记基因 *Col1a1*、*Runx2*、 β -catenin 和 *Alpl* 的转录水平具有显著抑制效果, 并且样品 3B 的抑制效果最显著。



* indicates statistical differences between α -MEM media and materials extracts; & indicates statistical differences between TCP extracts and other test group.

图 5 hBMSCs 在不同材料浸提液中成骨诱导培养 3、7 d 后成骨相关基因转录水平

Fig. 5 Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) examination the relative expression levels of osteogenic genes in hBMSCs cultured in osteogenic media with different material extracts for 3 d and 7 d, respectively

成骨诱导 7 d 后, COL1A1 和 OPN 蛋白表达在各组间无显著差异, OCN 蛋白表达水平在样品 1.5B 组最高, β -catenin 蛋白在玻璃浸提液组相对较低。而诱导分化 14 d 后, hBMSCs 中各类蛋白表达量相对增加, 其中 OPN 蛋白上调最显著, 并且样品 0B 和样品 1.5B 组显著高于对照组、TCP 组和 3B 组; 样品 0B、样品 TCP 和对照组 OCN 蛋白表达水平显著高于样品 1.5B 和样品 3B 组; 样品 0B 和样品 1.5B 组 β -catenin 和 COL1A1 的表达显著高于其他各组

(图 6)。综上, 成骨分化标记蛋白 OPN 和 OCN 的表达水平由高到低均为样品 0B 组、样品 1.5B 组、样品 3B 组。

2.3 材料体内移植的骨修复效果、体内外成骨效应的差异分析与思考建议

CT 扫描结果显示材料移植 4 周后, 样品 0B、样品 1.5B、样品 3B 无明显降解, 而样品 TCP 降解明显并分散于骨缺损部位, 此外, 在样品 1.5B、样品 3B、样品 TCP 周围观察到明显的新骨生成。8 周

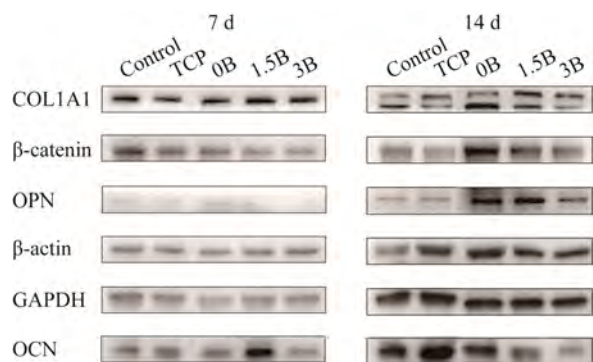


图 6 hBMSCs 在不同材料浸提液中成骨诱导培养 7、14 d 后 COL1A1、 β -catenin、OPN 和 OCN 蛋白的免疫印迹分析

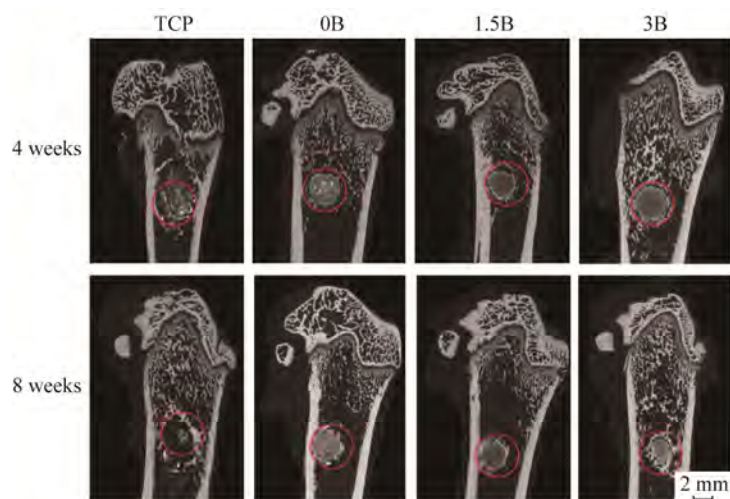
Fig. 6 Western blotting (WB) examination of COL1A1, β -catenin, OPN, and OCN proteins levels in hBMSCs cultured in osteogenic media with different material extracts for 7 d and 14 d, respectively

时, TCP 材料几乎全部降解, 且材料周围的新骨生成相对 4 周时显著增加; 而样品 0B 和样品 1.5B 无明显降解迹象, 材料周围的新骨生成相对 4 周时无明显增加; 样品 3B 组显著降解, 且其周围新骨生成相对 4 周时显著增加(图 7a)。对 CT 扫描结果进行定量分析发现, 材料移植 4 周后, TCP 组大鼠的骨体积分数(BV/TV 值)显著高于样品 0B、样品 1.5B 和样品 3B 组; 材料移植 8 周后, 样品 3B 组大鼠的 BV/TV 值相比于 4 周时有显著增加, 高于样品 TCP 组但无统计学差异, 并且样品 3B 组与 TCP 组大鼠的 BV/TV 值显著高于样品 0B 与样品 1.5B 组(图 7b)。

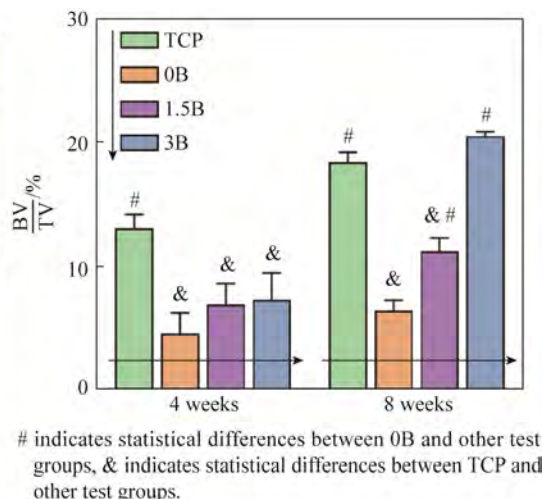
免疫组化染色及定量结果显示, 材料移植 4 周后, 样品 TCP 组 COL1A1 的表达显著高于样品 0B 组, 样品 3B 组 OPN 的表达显著高于样品 0B 组。8 周时, 样品 TCP 组与样品 3B 组 COL1A1 的表达水平接近并都显著高于样品 0B 和样品 1.5B 组; 样品 3B 组 OPN 的表达显著高于样品 TCP 和样品 0B 组。OCN 的表达在 4 和 8 周时各组间无显著性差异(图 8)。综上, 样品 3B 在 8 周时更有效促进 COL1A1 和 OPN 蛋白的表达, 具有良好的骨修复与再生性能。

BBG 是一类新型可时序调控细胞功能并促进骨再生的可降解生物活性材料^[16]。本研究发现不同硼硅比的 BBG 在体外对 hBMSC 细胞成骨分化的影响与其在体内的骨修复效果不一致。其原因可能在于传统细胞毒性检测方法未考虑材料在体内降解和代谢的动态平衡及该过程对细胞功能的时序调控; 同时, 可降解生物材料浸提液中各种离子成分的累积放大了材料的细胞毒性并制约了其临床转化; 此外, 材料植入体内所形成的微环境过于复杂, 体外单一细胞的二维培养难以全面展现材料对参与骨修复过程多种组织与细胞的协同作用及机制。

针对 BBG 在体内外成骨效应的显著差异, 本工作对其未来的研究应用提出 2 点建议: 首先, 需要进一步研究不同组织细胞在体外对硼酸根的耐受浓度和细胞学反应, 根据结果优化 BBG 中硼酸根的掺入浓度, 同时通过改变制备工艺或掺入其他材料等调控硼酸根的释放速率以期在降低细胞毒性的同时实现对细胞功能的调控。其次, 建议在体外利用类



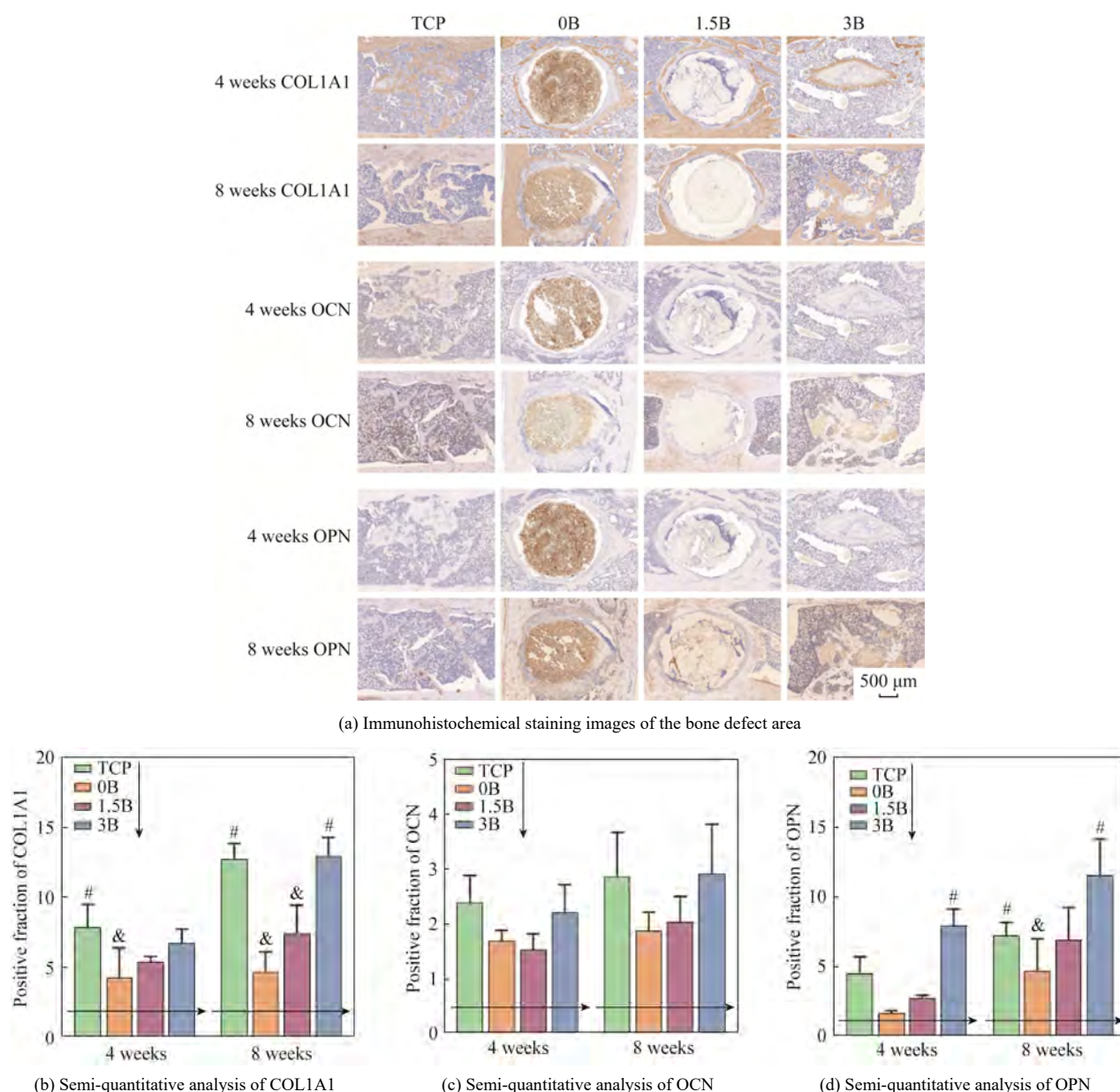
(a) Micro-CT scanning images of the bone defect area



(b) Semi-quantitative analysis of bone volume/tissue volume (BV/TV) based on the micro-CT images

图 7 材料植入大鼠股骨缺损 4、8 周后 Micro-CT 扫描与新生骨体积分数分析

Fig. 7 Micro-CT scanning images of the bone defect area and oseogenesis volume fraction analysis after material implantation for 4 weeks and 8 weeks



indicates statistical differences between 0B and other test groups, & indicates statistical differences between TCP and other test groups.

图 8 材料移植大鼠股骨缺损部位 4、8 周后免疫组化染色与定量分析

Fig. 8 Immunohistochemistry staining and semi-quantitative analysis after material implantation for 4 weeks and 8 weeks

器官芯片和微流控技术搭建一种新型的生物活性材料评价体系, 其中, 类器官芯片可模拟体内的器官系统, 体外生理关联体系的构建在药物筛选、组织发育和个性化医疗方案的开发等再生医学领域具有重要的应用潜力; 基于微流控技术开发动态细胞培养体系可为细胞生长过程的新陈代谢提供优渥的环境^[17], 有助于避免材料降解产物积累过多的问题。因此, 利用动态三维细胞培养体系可以更好地模拟材料在体内的降解过程、及降解产物对细胞功能的调控等, 也为取代动物实验进行临床前研究提供了可能^[18]。

3 结论

通过制备不同硼硅比的生物活性玻璃, 探究其在体内外成骨性能的差异。在体外, 不同玻璃浸提液对 hBMSCs 的增殖活性, 对成骨分化相关基因、蛋白的表达及生物矿化等过程具有抑制作用, 并且 B 含量越高抑制作用越强, 即由高到低为样品 3B、样品 1.5B、样品 0B; 而在体内, 不同玻璃对大鼠股骨缺损修复与骨再生性能与 B 含量负相关, 即由低到高为样品 0B、样品 1.5B、样品 3B, 这表明 B 元素的掺入显著提高了硼硅酸盐生物玻璃体内的成

骨性能。本研究体内外实验结果的对比分析为生物活性玻璃成分的优化设计及其体外评价体系的完善提供了理论指导。

参考文献:

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317–318.
Chinese Society of Osteoporosis and Bone Mineral Research. Chin J Osteoporosis Bone Miner Res (in Chinese), 2019, 12(4): 317–318.
- [2] 林贤灿, 吴建军, 黄宏兴, 等. 我国基层骨质疏松症防治的问题及策略[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(11): 1678–1682.
LIN Xiancan, WU Jianjun, HUANG Hongxing, et al. Chin J Osteoporosis (in Chinese), 2022, 28(11): 1678–1682.
- [3] SI L, WINZENBERG T M, JIANG Q, et al. Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010–2050[J]. Osteoporosis Int, 2015, 26(7): 1929–1937.
- [4] WANG X H, AO Q, TIAN X H, et al. 3D bioprinting technologies for hard tissue and organ engineering[J]. Materials, 2016, 9(10): 802.
- [5] MARIN E, BOSCHETTO F, PEZZOTTI G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview[J]. J Biomed Mater Res A, 2020, 108(8): 1617–1633.
- [6] HENCH L L, SPLINTER R J, ALLEN W C, et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials[J]. J Biomed Mater Res, 1971, 5(6): 117–141.
- [7] 丁晶鑫, 王会, 崔旭, 等. 硼硅酸盐生物活性玻璃的研究现状与发展趋势[J]. 硅酸盐学报, 2022, 50(4): 1074–1084.
DING Jingxin, WANG Hui, CUI Xu, et al. J Chin Ceram Soc, 2022, 50(4): 1074–1084.
- [8] FU H L, FU Q, ZHOU N, et al. *In vitro* evaluation of borate-based bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication method[J]. Mater Sci Eng C, 2009, 29(7): 2275–2281.
- [9] MARION N W, LIANG W, LIANG W, et al. Borate glass supports the *in vitro* osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Mech Adv Mater Struct, 2005, 12(3): 239–246.
- [10] LI S J, ZHANG L Y, LIU C Y, et al. Spontaneous immunomodulation and regulation of angiogenesis and osteogenesis by Sr/Cu-borosilicate glass (BSG) bone cement to repair critical bone defects[J]. Bioact Mater, 2023, 23: 101–117.
- [11] HUANG W H, LI Y D, RAHAMAN M, et al. Mechanisms for converting bioactive silicate, borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solution[J]. Phys Chem Glasses Eur J Glass Sci Technol Part B, 2006, 47: 647–658.
- [12] ZHANG W, ZHAO F J, HUANG D Q, et al. Strontium-substituted submicrometer bioactive glasses modulate macrophage responses for improved bone regeneration[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(45): 30747–30758.
- [13] DECKER S, ARANGO-OSPINA M, REHDER F, et al. *In vitro* and *in ovo* impact of the ionic dissolution products of boron-doped bioactive silicate glasses on cell viability, osteogenesis and angiogenesis[J]. Sci Rep, 2022, 12: 8510.
- [14] BROWN R F, RAHAMAN M N, DWILEWICZ A B, et al. Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells[J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 88(2): 392–400.
- [15] AN J, YANG H, ZHANG Q, et al. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation[J]. Life Sci, 2016, 147: 46–58.
- [16] PANG L B, TIAN P F, CUI X, et al. *In situ* photo-cross-linking hydrogel accelerates diabetic wound healing through restored hypoxia-inducible factor 1- α pathway and regulated inflammation[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(25): 29363–29379.
- [17] LIN C Y, SONG X, SEAMAN K, et al. Microfluidic co-culture platforms for studying osteocyte regulation of other cell types under dynamic mechanical stimulation[J]. Curr Osteoporosis Rep, 2022, 20(6): 478–492.
- [18] WADMAN M. FDA no longer has to require animal testing for new drugs[J]. Science, 2023, 379(6628): 127–128.

※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※



潘浩波, 博士, 研究员, 博士生导师, 国际先进材料协会会员, 中国科学院深圳先进技术研究院医药所副所长, 深圳理工大学药学院院长聘科研杰出教授, 科技部“十四五”重点研发计划重点专项首席科学家, 人体组织与器官退化性研究中心主任, 广东省生物医用材料国际联合研究中心主任, 连续两年入选全球前 2% 顶尖科学家榜单。兼任中国医疗保健促进会理事, 骨科生物材料学部主任委员; 中国生物材料学会理事, 海洋生物材料侯任主任委员和生物陶瓷分会副主任委员等。先后主持国家重点研发计划, 国家自然科学基金委联合重点, 面上项目等三十余项, 发表论文 180 余篇, 主要研究方向为生物活性材料与材料生物学。



陈亨利, 中国科学院大学生物与医药硕士研究生, 研究方向为生物材料的生物学效应。所在课题组研究项目包括: 生物活性玻璃骨修复性能研究; 3D 打印生物活性玻璃调控骨免疫与骨稳态机制研究; 不同组分生物活性玻璃复合材料抗菌性能与抗肿瘤性能研究等。