

硼硅酸盐对成骨细胞体外生物活性的影响

程中华, 薛威, 王李琴, 黄清芳, 吴成欢, 桂凯红, 黄林, 蔡莹, 韩艳芳, 蒋彩霞(黄冈市中心医院骨科, 湖北省黄冈市 438000)

文章亮点:

实验观察新型硼硅酸盐生物玻璃 13-93B3 对成骨细胞行为的影响, 发现硼硅酸盐生物玻璃具有良好的细胞相容性, 对成骨细胞增殖有一定的良性调节作用。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 硼硅酸盐; 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞; 碱性磷酸酶; 增殖

主题词:

硅酸盐类; 成骨细胞; 细胞增殖; 组织工程

基金资助:

黄冈市科学技术研究与开发计划项目(s2015-01-0130084)

摘要

背景: 硼硅酸盐不仅可通过矿化作用形成羟基碳酸盐磷灰石层, 而且具有强化学反应活性, 可促进骨细胞再生。

目的: 通过体外培养实验观察硼硅酸盐生物玻璃对兔成骨细胞生长行为的影响。

方法: 根据 ISO10993-12: 2007 的要求制备硼硅酸盐生物玻璃初次浸提液与二次浸提液。分离培养兔骨髓间充质干细胞, 取第 2 代细胞诱导生成成骨细胞。取第 5-15 代成骨细胞, 分别以硼硅酸盐生物玻璃初次浸提液、硼硅酸盐生物玻璃二次浸提液与 α -MEM 培养基培养, 观察硼硅酸盐生物活性玻璃对成骨细胞增殖、蛋白合成、碱性磷酸酶活性、细胞凋亡及细胞横向与纵向迁移的影响。

结果与结论: 初次浸提液组与二次浸提液组成骨细胞增殖优于 α -MEM 培养基组 ($P < 0.05$), 且初次浸提液组成骨细胞增殖优于二次浸提液组 ($P < 0.05$)。初次浸提液组成骨细胞总蛋白含量高于二次浸提液组与 α -MEM 培养基组 ($P < 0.05$)。3 组间成骨细胞碱性磷酸酶活性、凋亡率、横向迁移距离及 Transwell 中穿膜细胞数比较差异均无显著性意义。表明硼硅酸盐生物玻璃具有良好的细胞相容性, 对成骨细胞增殖有一定的良性调节作用。

程中华, 薛威, 王李琴, 黄清芳, 吴成欢, 桂凯红, 黄林, 蔡莹, 韩艳芳, 蒋彩霞. 硼硅酸盐对成骨细胞体外生物活性的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(52):8401-8405.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.52.007

Borosilicate effect on *in vitro* biological activity of osteoblasts

Cheng Zhong-hua, Xue Wei, Wang Li-qin, Huang Qing-fang, Wu Cheng-huan, Gui Kai-hong, Huang Lin, Cai Ying, Han Yan-fang, Jiang Cai-xia (Department of Orthopedics, Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, Hubei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Borosilicate cannot only be mineralized to form hydroxy carbonate apatite layer, but also have strong chemical reactivity to promote bone cell regeneration.

OBJECTIVE: To investigate the effect of the borosilicate bioglass on the growth behavior of rabbit osteoblasts through *in vitro* culture experiment.

METHODS: The initial and secondary extracts of borosilicate bioglass were prepared according to the requirement of ISO10993-12: 2007. The bone marrow mesenchymal stem cells of rabbits were isolated and cultured. The second generation bone marrow mesenchymal stem cells were induced to differentiate into osteoblasts. The osteoblasts of the 5th-15th generations were obtained and cultured with the initial and secondary extracts of borosilicate bioglass and α -MEM medium, respectively. The effects of borosilicate bioglass on the osteoblasts proliferation, protein synthesis, alkaline phosphatase activity, cell apoptosis, and cell migration in horizontal and vertical direction were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: The osteoblasts proliferation in the initial extract and secondary extract groups was better than that in the α -MEM medium group ($P < 0.05$). The osteoblasts proliferation in the initial extract group was better than that in the secondary extract group ($P < 0.05$). The total protein content of osteoblasts in the initial extract group was higher than that in the secondary extract and α -MEM medium group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the alkaline phosphatase activity, apoptosis rate, horizontal migration distance of osteoblast and transmembrane cell number in Transwell between these three groups. These results demonstrate that borosilicate bioglass has good biocompatibility and has a certain benign regulatory role in

程中华, 男, 1969 年生, 湖北省武汉市人, 汉族, 2003 年湖北中医学院毕业, 硕士, 主任医师, 现任黄冈市骨科学会主委, 长江大学医学院附属黄冈市中心医院骨科主任, 主要从事骨与关节研究。

通讯作者: 黄林, 硕士, 黄冈市中心医院骨科, 湖北省黄冈市 438000

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)52-08401-05

稿件接受: 2015-09-21

http://www.crter.org

Cheng Zhong-hua, Master, Chief physician, Department of Orthopedics, Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, Hubei Province, China

Corresponding author: Huang Lin, Master, Department of Orthopedics, Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, Hubei Province, China

Accepted: 2015-09-21

osteoblast proliferation.

Subject headings: Silicates; Osteoblasts; Cell Proliferation; Tissue Engineering

Funding: the Science and Technology Research and Development Program of Huanggang City of China, No. s2015-01-0130084

Cheng ZH, Xue W, Wang LQ, Huang QF, Wu CH, Gui KH, Huang L, Cai Y, Han YF, Jiang CX. Borosilicate effect on in vitro biological activity of osteoblasts. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(52):8401-8405.

0 引言 Introduction

骨缺损或各类骨科疾病常伴成骨细胞丢失或功能失调,影响了患者的恢复^[1],目前骨科研究的热点之一就是实现骨缺损或骨的再生重建。随着再生医学的兴起和发展,越来越多的研究集中于种子细胞、支架材料及诱导因子方面,其中支架材料的发展日新月异,但除了CaSO₄、羟基磷灰石等材料外,真正在临床应用的新型材料非常罕见^[2-3]。理想的骨移植材料需要具有良好的生物相容性与生物降解性、连通的多孔结构、一定的可塑性和机械强度及材料表面微环境可调控性,可诱导骨的发生,而且还应具有骨传导和骨诱导作用^[4-5]。相关研究表明,在骨组织重建和生长过程中起着重要作用的是支架材料的结构,多孔结构可为细胞生长提供营养物质和代谢产物的传输通道,引导种子细胞的生长、增殖和分化,而且伴随着材料的降解,新生骨组织逐步长入并取代骨移植材料。相关研究表明作为一种新型生物材料,硼酸盐不仅可以通过矿化作用形成羟基碳酸盐磷灰石层^[6],而且具有强化学反应活性,可以促进骨细胞再生^[7]。本实验对同济大学研发的一种新型硼硅酸盐生物玻璃进行研究,探讨其对体外培养兔成骨细胞行为的影响,为其下一步应用于体内实验和临床应用提供理论基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 完全随机分组设计,细胞观察性实验。

1.2 时间及地点 于2014年4月至2015年4月在黄冈市中心医院实验室与南华大学转化医学实验室完成。

1.3 材料 新型硼硅酸盐生物玻璃13-93B1(同济大学材料科学与工程学院生物工程与信息技术材料研究所)。

实验动物: 成年大雄性白兔,体质量1.5 kg,由南华大学实验室提供,许可证号:SCXK(湘)2015-0002。

1.4 实验方法

材料浸提液的制备: 根据 ISO10993-12:2007的要求,将无菌硼硅酸盐颗粒与α-MEM基础培养基按3 cm²:1 mL的比例混合,制备材料浸提液,37 °C下浸提24 h,得初次浸提液;再加入同比例的α-MEM基础培养基,相同条件下再次浸提24 h,得到二次浸提液。补加胎牛血清至合适浓度备用。

兔骨髓间充质干细胞的培养: 无菌条件下从大白兔股骨骨髓腔抽取大量骨髓悬液,以1 000 r/min离心10 min,弃上清、脂肪及杂质,重新悬浮后缓慢加入等体积密度为

硼硅酸盐影响成骨细胞生物活性实验的试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
胎牛血清	杭州四季青公司
碱性磷酸酶试剂盒	南京建成公司
矿化诱导因子	美国西格玛公司
DMEM-LG 培养基	美国 Gibco 公司
α-MEM 培养基、FBS、D-Hank's	Hy-Clone 公司, 美国
地塞米松注射液	吉林精优长白山药业有限公司
β-甘油磷酸钠	上海研域生物科技有限公司
CO ₂ 培养箱	英国 RS Biotech 公司
荧光倒置显微镜	日本 Nikon 公司
MTT、DMSO、胰蛋白酶	Sigma 公司, 美国
Bradford 蛋白检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒	上海贝博生物试剂公司
Transwell 小室	BD 公司, 美国
酶联免疫反应检测仪	Leica 公司, 德国
Image Pro Plus 6.0 软件	Media Cybernetics 公司, 美国

1.07 g/mL的淋巴细胞分离液,避免两种液体混合^[8]。2 000 r/min离心20 min后,可见离心管内分为3层,取中间云雾状细胞层置于另一离心管中,用磷酸盐缓冲液冲洗2次,得到骨髓有核细胞后进行培养。调整细胞浓度为1×10⁹ L⁻¹,加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM-LG培养基,置于37 °C、体积分数5%的CO₂饱和湿度孵箱内培养,接种24 h后首次换液去除未贴壁细胞,以后每隔3 d换液1次^[8]。

采用密度梯度离心联合贴壁筛选法体外分离纯化原代骨髓间充质干细胞,汇合后用2.5 g/L的胰蛋白酶消化细胞,按1:3比例进行传代接种培养^[8]。在显微镜下观测形态学上为梭形、纤维样贴壁细胞即为干细胞,见图1。

诱导骨髓间充质干细胞生成成骨细胞: 取生长良好的第2代兔骨髓间充质干细胞,消化后调整细胞浓度为1×10⁷ L⁻¹,加入成骨诱导液(含0.5 mmol/L β-甘油磷酸钠、0.1 μmol/L地塞米松、50 mg/L抗坏血酸、体积分数10%胎牛血清的DMEM-LG培养基^[8])进行培养,置于37 °C、体积分数5%的CO₂饱和湿度孵箱内培养,每2 d换液1次,待生长至80%~90%融合时,用0.25%胰蛋白酶消化传代^[8],取第5~15代细胞备用。以显微镜下可见透明钙化结节形成,证实为成骨细胞,见图2。

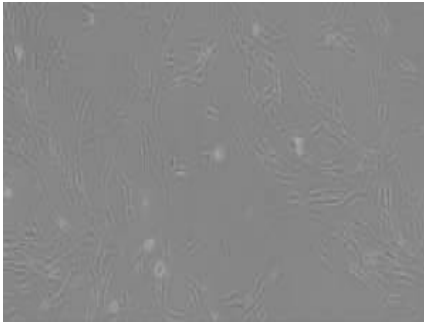


图 1 兔骨髓间充质干细胞($\times 200$)
Figure 1 Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 200$)



图 2 兔成骨细胞(茜素红染色, $\times 200$)
Figure 2 Rabbit osteoblasts (alizarin red staining, $\times 200$)

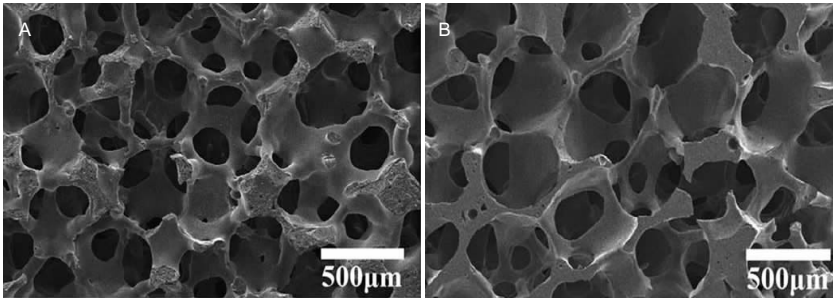


图 3 硼硅酸盐生物玻璃 13-93 与 13-93B1
Figure 3 Borosilicate bioglass 13-93 and 13-93B1

图注: 图中 A 为硼硅酸盐生物玻璃 13-93; B 为硼硅酸盐生物玻璃 13-93B1。

表 1 各组成骨细胞增殖、碱性磷酸酶活性、蛋白总量及凋亡等指标的比较结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of osteoblast proliferation, alkaline phosphatase activity, total protein content and apoptosis between groups

指标	α -MEM 培养基组	初次浸提液组	二次浸提液组
细胞增殖(A 值)	0.198 \pm 0.014	0.361 \pm 0.016 ^a	0.329 \pm 0.023 ^b
蛋白合成(U)	219.312 \pm 7.976	379.793 \pm 9.497 ^a	227.101 \pm 6.173
碱性磷酸酶活性(U/mg)	0.013 02 \pm 0.000 41	0.012 98 \pm 0.000 36	0.012 89 \pm 0.000 39
凋亡(%)	6.33 \pm 1.97	7.01 \pm 2.05	6.64 \pm 2.76
横向迁移(μ m)	137.50 \pm 11.43	134.98 \pm 10.50	135.21 \pm 8.66
纵向迁移(个/视野)	10.92 \pm 4.99	10.07 \pm 2.50	9.81 \pm 2.64

表注: 与其余两组比较, ^a $P < 0.05$; 与 α -MEM 培养基组比较, ^b $P < 0.05$ 。

硼硅酸盐对成骨细胞增殖的影响: 取第5-15代兔成骨细胞, 以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于96孔板, 37°C 孵育4 h后, 更换低血清新鲜 α -MEM培养基(含体积分数0.5%胎牛血清)同步化8-12 h, 分3组继续培养, 分别添加硼硅酸盐生物玻璃初次浸提液、硼硅酸盐生物玻璃二次浸提液及 α -MEM培养基(含体积分数10%胎牛血清), 每组设12个平行孔, 重复操作3次。 37°C 孵育24 h后, 每孔添加20 μL MTT溶液, 继续孵育4 h, 吸弃培养液, 加DMSO溶解甲瓊, 室温振荡10 min后, 以对照组调零, 在490 nm处测吸光度(A值)。

硼硅酸盐对成骨细胞蛋白合成及碱性磷酸酶活性的影响: 细胞分组及培养方法同上, 培养24 h后, 将细胞以0.2% Triton X-100裂解, 收集各组细胞裂解液检测总蛋白含量。同样收集各组细胞裂解液, 以1400 $\times g$ 离心5 min, 取上清液行碱性磷酸酶活性检测。

硼硅酸盐对成骨细胞凋亡的影响: 取第5-15代兔成骨细胞, 以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种在无菌盖玻片上, 分别

添加硼硅酸盐生物玻璃初次浸提液(含体积分数10%胎牛血清)、硼硅酸盐生物玻璃二次浸提液(含体积分数10%胎牛血清)及 α -MEM培养基(含体积分数10%胎牛血清), 37°C 孵育24 h后, 吸弃原培养液, D-Hank's冲洗2次。加入 Annexin V-FITC、碘化丙啶, 避光反应5 min后, 倒置荧光显微镜观察(激发波长488 nm, 发射波长530 nm)细胞凋亡情况, 每个盖玻片随机取30个视野对凋亡细胞进行计数, 每组设6个平行样本。

硼硅酸盐对成骨细胞迁移的影响: 取第5-15代兔成骨细胞, 以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于6孔板上, 至90%融合时, 用无菌枪头制作划痕, D-Hank's冲洗除去细胞碎片, 分别添加硼硅酸盐生物玻璃初次浸提液(含体积分数0.5%胎牛血清)、硼硅酸盐生物玻璃二次浸提液(含体积分数0.5%胎牛血清)及 α -MEM培养基(含体积分数0.5%胎牛血清), 37°C 孵育18 h, 每组设6个平行样本。各组均在倒置相差显微镜下随机选择100个视野进行观察, 采用ImagePro Plus 6.0软件测量划痕两侧细胞间距离(划痕宽度), 计算细胞迁移距离: 细胞迁移距离=迁移前划痕宽度-迁移后划痕宽度, 取平均值, 用迁移距离反映迁移速度, 迁移距离越大表示迁移速度越快。

取第5-15代兔成骨细胞, 加入 α -MEM培养基(含体积分数0.5%胎牛血清)中制备细胞悬液。取 1×10^5 个细胞接种于Transwell小室(8 μm)上层, 下层分别加入硼硅酸盐生物玻璃初次浸提液(含体积分数0.5%FBS)、硼硅酸盐生物玻璃二次浸提液(含体积分数0.5%胎牛血清)及 α -MEM培养基(含体积分数0.5%胎牛血清), 每组设6个平行样本, 37°C 孵育12 h。取出小室, 用湿润棉棒擦去内层细胞, 冷乙醇固定30 s后, 结晶紫染色, 随机选择30个视野对红染细胞(即穿膜细胞)进行计数。

1.5 主要观察指标 各组成骨细胞增殖、蛋白合成、碱性

磷酸酶活性、细胞凋亡及细胞横向与纵向迁移。

1.6 统计学分析 采用SPSS 9.0统计软件包进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用SNK检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 硼硅酸盐对成骨细胞增殖的影响 初次浸提液组、二次浸提液组细胞A值高于 α -MEM培养基组($P < 0.05$), 初次浸提液组细胞A值高于二次浸提液组($P < 0.05$), 见表1。

2.2 硼硅酸盐对成骨细胞蛋白合成及碱性磷酸酶活性的影响 初次浸提液组总蛋白含量高于 α -MEM培养基组、二次浸提液组($P < 0.05$), 二次浸提液组总蛋白含量与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 3组间碱性磷酸酶活性比较差异均无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

2.3 硼硅酸盐对成骨细胞凋亡的影响 3组间细胞凋亡率比较差异均无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

2.4 硼硅酸盐对成骨细胞迁移的影响 3组间细胞迁移距离及穿膜细胞数比较差异均无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

3 讨论 Discussion

由于生物活性玻璃与周围组织的结合能力强, 并可在体内自由转化为羟基磷灰石和定形磷酸钙, 从而修复骨组织, 成为骨组织工程中研究的热点^[18-20]。Hench等^[21-22]还报道生物活性玻璃在体内代谢后还可以释放一些离子, 这些离子可以促进骨细胞的分化与增殖, 早在1971年, 由45% SiO₂、24.5% Na₂O、24.5% CaO和6% P₂O₅混合配合而成的硅酸盐生物活性玻璃45S5, 就已被广泛应用于生物医学的研究。最近由53% SiO₂、6% Na₂O、12% K₂O、5% MgO、20% CaO和4% P₂O₅按质量比例配合而成的生物活性玻璃13-93(图3A), 掀起了生物医学新的浪潮^[23-25]。生物活性玻璃45S5和13-93可以作为骨组织修复与再生的支架材料, 但45S5和13-93玻璃在体内转换缓慢^[26-27]; 硼酸能加快生物活性玻璃在体内转化为羟基磷灰石和定形磷酸钙的速度, 因此一种新的以硼酸为基础的生物活性玻璃被广泛应用与研究^[29-30]。有学者以B₂O₃部分或完全取代两种玻璃中的SiO₂, 从其粒子转化为羟基磷灰石的动力学机制进行研究, 发现, 玻璃的转化率随B₂O₃含量增加而显著提升。

硅酸盐的生物可降解性和诱导骨的再生能力早有相关报道^[9], 在硅酸盐生物玻璃中引入硼, 能同时调节生物活性和生物降解性, 其中生物降解性是限制硅酸盐在临床应用的关键问题^[10]。以45S5玻璃为基础, 用B₂O₃取代部分SiO₂后, 会明显提高羟基磷灰石的形成速度, 碳酸羟基磷灰石的多孔网状结构与硼的含量密切相关^[14-15]。-B-O-B-的存在使得硼硅酸盐出现层状结构, 层与层之间以弱的分子键相连接, 从而具有低化学稳定性^[17]。所以, 含硼玻璃在同样条件下矿化速度比传统玻璃快, 形成的碳酸羟基磷灰石堆积更为密集、结构更加完整^[16]。宁佳等^[10]研究还发

现硼和硅的比例也影响生物玻璃的降解速度, 通过调整可使其与骨细胞生长速度相一致。最新一项研究试图将B₂O₃全部替换SiO₂, 成为一种新的生物活性玻璃13-93B3, 并与13-93B1、13-93玻璃对比研究发现, 羟基磷灰石形成的速度随B₂O₃的增加而显著增快, 并且培养液的pH也随其增大。无论是其生物活性还是降解率都随SiO₂的含量明显提升。本实验选择一种新型硼硅酸盐生物玻璃13-93B1(图3B), 其成分为6% Na₂O、7.9% K₂O、7.7% MgO、22.1% CaO、54.6% P₂O₅和1.7% P₂O₅, 研究其对兔成骨细胞的行为学影响, 为其临床应用的安全性和有效性评价提供依据。

本实验结果显示, 体外培养的兔成骨细胞均能显著增殖, 但初次浸提液的作用明显高于二次浸提液, 表明初次浸提液中的硼元素对成骨细胞增殖有促进作用, 其机制可能是硼的引入使硅酸盐增加了三面体结构, 使网络空间连接程度降低, 从而使构成网络的离子易被侵蚀, 即玻璃的溶解速度增加, 生物降解性增加, 与之同时, 钙、磷等离子溶出速度增加, 加速了羟基磷灰石的沉积, 使玻璃的生物活性有一定程度提高^[10], 这与前人研究结果基本相一致。碱性磷酸酶活性是成骨细胞功能的特征性指标, 含硼硅酸盐的两种培养液均可一定程度提高成骨细胞的碱性磷酸酶活性, 但效果并不显著, 表明硼硅酸盐虽然可以促进成骨细胞的代谢或增殖, 但对成骨活性却无明显影响, 这也正是多数生物支架材料普遍面临的问题之一, 需要大量深入的基础实验使支架材料真正应用于临床成为可能。实验发现, 引入含硼硅酸盐的培养液后, 处于凋亡早期的成骨细胞数量稍有增加, 表明硼酸盐中的硼离子对成骨细胞的凋亡有促进作用, 这与前人的多数研究结果也几乎相一致^[11], 此外硼硅酸盐对细胞增殖和代谢也有一定的促进作用。但是, 对后者的促进作用远大于前者, 提示该材料中的硼离子对成骨细胞既有正向调节又有负向调节。生理学普遍认为细胞代谢功能强弱是由蛋白分泌活动来体现的, 引入含硼硅酸盐的培养液后, 成骨细胞的蛋白合成量均升高, 但初次浸提液对蛋白分泌的作用高于二次浸提液, 表明新型硼硅酸盐中某些成分对成骨细胞代谢和蛋白分泌活性的作用强度随时间延长而明显减弱, 这可能与培养液中硼离子浓度高低有关。研究表明, 硼在局部区域累积后对细胞增殖产生了一定抑制作用, 但支架浸提液经适当稀释后生物相容性明显改善^[12]; 若能有效控制其降解速度, 则更有助于其促进成骨作用。最后, 新型硼酸盐生物玻璃浸提液对成骨细胞的纵向迁移生长也有一定促进作用, 但差异不显著, 表明该新型材料作为骨修复支架材料, 在一定程度上可动员或募集相关细胞通过纵向迁移向缺损区聚集, 这一结论对支架制备时的方向顺应性设计具有一定指导意义^[13]。

因此, 新型硼酸盐生物玻璃作为一种新型骨修复材料, 虽然对成骨细胞的增殖、代谢、迁移及功能活性的维持和提高均有一定正调节作用, 但其对成骨细胞凋亡的也有一定的促进负调节作用。

致谢: 感谢黄冈市中心医院骨科全科医护人员本课题中提供宝贵意见与帮助, 同时感谢南华大学转化医学实验室提供宝贵的资源。

作者贡献: 程中华进行实验设计, 实验实施为薛威、黄林, 实验评估为薛威黄林, 资料收集为李季琴、黄清芳、吴成欢、桂凯红、蔡莹、韩艳芳、蒋彩霞, 黄林成文。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 该课题得到黄冈市中心医院伦理委员会认证。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

学术术语: 硼硅酸盐生物玻璃的生物活性? 硅酸盐的生物可降解性和诱导骨的再生能力早有相关报道, 在硅酸盐生物玻璃中引入硼, 能同时调节生物活性和生物降解性, 其中生物降解性是限制硅酸盐在临床应用的关键问题。以 45S5 玻璃为基础, 用 B_2O_3 取代部分 SiO_2 后, 会明显提高羟基磷灰石的形成速度, 碳酸羟基磷灰石的多孔网状结构与硼的含量密切相关。

作者声明: 程中华、薛威、黄林对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Takei Y, Minamizaki T, Yoshiko Y. Functional diversity of fibroblast growth factors in bone formation. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:729352.
- [2] Li Q, Zhou G, Yu X, et al. Porous deproteinized bovine bone scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using chitosan microspheres. *Biomed Eng Online*. 2015; 14(1):33.
- [3] Ashworth JC, Mehr M, Buxton PG, et al. Cell Invasion in Collagen Scaffold Architectures Characterized by Percolation Theory. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(9):1317-1321.
- [4] Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(395):44-52.
- [5] Neunzehn J, Szuwart T, Wiesmann HP. Eggshells as natural calcium carbonate source in combination with hyaluronan as beneficial additives for bone graft materials, an in vitro study. *Head Face Med*. 2015;11(1):12.
- [6] Fu Q, Rahaman MN, Fu H, Liu X. Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. I. Preparation and in vitro degradation. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 95(1): 164-171.
- [7] Zhang X, Jia WT, Gu YF, et al. Borate bioglass based drug delivery of Teicoplanin for treating osteomyelitis. *Int J Inorg Mater*. 2010;25(3):293-298.
- [8] 廖庆辉, 黄震, 蔡德鸿. 抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠和地塞米松联合诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(1):88-91.
- [9] 卢玲, 游文玮, 王迎军, 等. 生物活性玻璃的表面修饰及其细胞相容性[J]. *复合材料学报*, 2011, 28(1):114-118.
- [10] 宁佳, 姚爱华, 付海罗, 等. 硼硅酸盐生物玻璃的生物活性测试及其细胞相容性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(35): 7041-7043.
- [11] Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol*. 2010;24(4):243-250.
- [12] 张欣, 付海罗, 刘欣, 等. 生物活性硼硅酸盐多孔支架的体外活性及细胞毒性[J]. *科学通报*, 2009, 54(4):463-468.
- [13] 位晓娟, 张长青, 黄文岳, 等. 新型硼酸盐生物玻璃对成骨细胞行为影响的体外研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(5): 606-609.
- [14] 蔡玉荣, 武军, 周廉. 生物玻璃材料研究进展[J]. *材料导报*, 2002, 16(12):40-42.
- [15] 周智华, 阮建明. 生物玻璃及其复合材料的研究进展[J]. *化学通报*, 2005, 68(11):1-6.
- [16] 高春霞, 李亚东, 王锡刚. 生物活性玻璃中硼元素对其模拟矿化能力的影响[J]. *材料研究与应用*, 2009, 3(2):112-115.
- [17] Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *Aust Nz J Surg*. 2001;71(6):354-361.
- [18] Wheeler DL, Stokes KE, Park HM, et al. Evaluation of particulate bioglass in a rabbit radius osteotomy model. *J Biomed Mater Res*. 1997;35:249-254.
- [19] Wheeler DL, Stokes KE, Hoellrich RG, et al. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *J Biomed Mater Res*. 1998;41:527-533.
- [20] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res*. 1971;5:117-141.
- [21] Hench LL. *Bioceramics*. *J Am Ceram Soc*. 1998;81:1705-1727.
- [22] Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, et al. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276:461-465.
- [23] Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, et al. Gene expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass VR 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res*. 2001;55:151-157.
- [24] Leach KJ, Kaigler D, Wang Z, et al. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials*. 2006;27:3249-3255.
- [25] Leu A, Leach JK. Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharm Res*. 2008;25: 1222-1229.
- [26] Brink M, Turunen T, Happonen RP, et al. Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system $Na_2O-K_2O-MgO-CaO-B_2O_3-P_2O_5-SiO_2$. *J Biomed Mater Res*. 1997;37:114-121.
- [27] Rahaman MN, Brown RF, Bal BS, et al. Bioactive glasses for nonbearing applications in total joint replacement. *Semin Arthroplasty*. 2006;17:102-112.
- [28] Day DE, White JE, Brown RF, et al. Transformation of borate glasses into biologically useful materials. *Glass Technol*. 2003;44:75-81.
- [29] Huang W, Day DE, Kittiratanapiboon K, et al. Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17:583-596.
- [30] Yao A, Wang D, Huang W, et al. In vitro bioactive characteristics of borate-based glasses with controllable degradation behavior. *J Am Ceram Soc*. 2006;90:303-306.