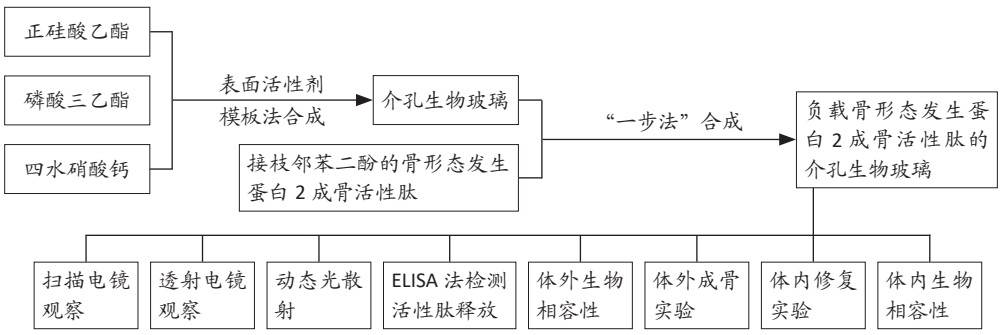
贻贝启发接枝骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽的介孔生物玻璃修复股骨髁缺损

俞 磊，张 巍，秦 毅，葛高然，柏家祥，耿德春

https://doi.org/10.12307/2025.463
投稿日期：2024-04-23
采用日期：2024-06-11
修回日期：2024-07-28
在线日期：2024-08-23
中图分类号：
R459.9；R336；R684
文章编号：
2095-4344(2025)22-04629-10
文献标识码：A

文章快速阅读： 载药介孔生物玻璃修复骨缺损



文题释义：

介孔生物玻璃：是一种具有规整有序介孔孔道、较高比表面积与孔隙率、良好生物相容性及生物可降解的生物材料。使用表面活性剂模板法合成的介孔生物玻璃表现出优异的药物递送能力。

贻贝启发的接枝骨形态发生蛋白2成骨活性肽：骨形态生成蛋白2成骨活性肽是73−92号氨基酸残基对应的肽段，氨基酸序列为LYLTSIASLETPVSSAKPIK(L20)，是骨形态生成蛋白2发挥成骨作用的功能结构域。受自然界贻贝黏附现象的启发，以多巴胺邻苯二酚为桥梁，合成出具有黏附性能的成骨活性肽，应用在组织工程中实现活性药物的缓慢释放。

摘要

背景：骨形态发生蛋白2在胚胎发育、骨骼形成和再生修复中具有重要作用，但高剂量应用与癌症发病密切相关。骨形态发生蛋白2成骨活性段L20能够有效减少癌症等不良反应，并可显著促进骨组织再生。

目的：将骨形态发生蛋白2活性肽段以贻贝衍生肽模拟策略接枝在介孔生物玻璃表面，探究其对组织工程成骨性能的影响。

方法：①采用模板法合成介孔生物玻璃纳米颗粒，采用一步法合成负载骨形态发生蛋白2成骨活性肽L20的介孔生物玻璃纳米颗粒，表征负载骨形态发生蛋白2成骨活性肽L20介孔活性玻璃纳米颗粒的形貌与体外缓释性能。②分离提取SD大鼠骨髓间充质干细胞，传2代后分别与PBS(空白组)、介孔生物玻璃纳米颗粒(对照组)、负载骨形态发生蛋白2成骨活性肽L20介孔生物玻璃纳米颗粒(实验组)共培养，采用细胞活死荧光染色和CCK-8法检测细胞毒性和细胞增殖，扫描电镜观察细胞黏附；成骨诱导分化后，进行碱性磷酸酶染色、茜素红S染色与成骨相关基因表达检测。③取15只SD大鼠，建立双侧股骨髁缺损模型，采用随机数字表法分为3组：空白组(n=5)不植入任何材料，对照组(n=5)植入介孔生物玻璃纳米颗粒，实验组(n=5)植入负载骨形态发生蛋白2成骨活性肽L20介孔生物玻璃纳米颗粒。术后8周，进行股骨Micro-CT扫描与组织形态观察。

结果与结论：①扫描电镜下可见负载骨形态发生蛋白2成骨活性肽L20介孔生物玻璃纳米颗粒为球形、单分散颗粒，透射电镜下可见其具有多孔结构，平均粒径为(268.10±0.58) nm，体外可缓释L20。②负载骨形态发生蛋白2成骨活性肽L20介孔生物玻璃纳米颗粒无细胞毒性，并且可促进骨髓间充质干细胞的增殖与黏附；与空白组、对照组相比，实验组碱性磷酸酶活性与细胞外基质矿化能力均升高(P < 0.05)，碱性磷酸酶、Runx2、骨钙素mRNA表达升高(P < 0.05)。③股骨Micro-CT扫描结果显示，与空白组、对照组相比，实验组新生骨量与骨密度均升高(P < 0.05)；苏木精−伊红与Masson染色结果显示，与空白组、对照组相比，实验组新骨生成与胶原纤维均增加。④结果表明，负载骨形态发生蛋白2活性肽L20介孔生物玻璃纳米颗粒具有良好的生物相容性及体内外促成骨性能，可促进SD大鼠股骨髁缺损的再生修复。

关键词：骨形态发生蛋白2成骨活性肽；介孔生物玻璃；纳米颗粒；邻苯二酚；成骨细胞分化；股骨髁缺损；骨组织工程；生物材料

Repair of femoral condyle defects using mesoporous bioactive glass grafted with bone morphogenetic protein 2 osteogenic peptide inspired by mussel

Yu Lei, Zhang Wei, Qin Yi, Ge Gaoran, Bai Jiaxiang, Geng Dechun
Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
Yu Lei, MS, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
Corresponding author: Geng Dechun, Researcher, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

苏州大学附属第一医院骨科，江苏省苏州市 215006
第一作者：俞磊，男，1998 年生，安徽省六安市人，汉族，医学硕士，主要从事骨关节外科及相关生物材料研究。
通讯作者：耿德春，研究员，苏州大学附属第一医院骨科，江苏省苏州市 215006
https://orcid.org/0000-0002-7288-2458 (俞磊)
基金资助：国家自然科学基金项目 (82272567)，项目负责人：耿德春
引用本文：俞磊，张巍，秦毅，葛高然，柏家祥，耿德春 . 贻贝启发接枝骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽的介孔生物玻璃修复股骨髁缺损 [J]. 中国组织工程研究，2025，29(22):4629-4638.

Abstract

BACKGROUND: Bone morphogenetic protein 2 is vital in embryonic development, bone formation, and regeneration, but its high-dose application is linked to cancer. Bone morphogenetic protein 2 osteogenic peptide L20 reduces adverse effects like cancer and boosts bone tissue regeneration.

OBJECTIVE: To graft bone morphogenetic protein 2 active peptide segments onto mesopores and surfaces through a peptide mimicry strategy inspired by oysters, and explore its impact on osteogenic properties of tissue-engineered bone.

METHODS: (1) Mesoporous bioactive glass was synthesized using a template method. Bone morphogenetic protein 2 osteogenic peptide L20 was loaded onto mesoporous bioactive glass using a one-step synthesis method to characterize the morphology and *in vitro* sustained release properties of mesoporous active glass nanoparticles loaded with bone morphogenetic protein 2 osteogenic active peptide L20. (2) Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and extracted from SD rats. After two generations, they were co-cultured with PBS (blank group), mesoporous bioactive glass nanoparticles (control group), and mesoporous bioactive glass nanoparticles loaded with bone morphogenetic protein 2 osteogenic active peptide L20 (experimental group). Cell live/dead fluorescence staining and CCK-8 assay were used to detect cytotoxicity and cell proliferation. Scanning electron microscopy was used to observe cell adhesion. After osteogenic induction and differentiation, alkaline phosphatase staining, Alizarin red S staining, and osteogenesis-related gene expression were detected. (3) Fifteen SD rats were selected to establish bilateral femoral condyle defect models and divided into three groups using a random number table method: the blank group (n=5) was not implanted with any material; the control group (n=5) was implanted with mesoporous bioactive glass nanoparticles, and the experimental group (n=5) was implanted with mesoporous bioactive glass nanoparticles loaded with bone morphogenetic protein 2 osteogenic active peptide L20. Eight weeks after surgery, femoral Micro-CT scanning and tissue morphology observation were performed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Scanning electron microscopy showed that the mesoporous bioactive glass nanoparticles loaded with bone morphogenetic protein 2 osteogenic active peptide L20 were spherical and monodisperse particles. Transmission electron microscopy showed their porous structure with an average particle size of (268.10±0.58) nm, which could release L20 *in vitro*. (2) Mesoporous bioglass nanoparticles loaded with bone morphogenetic protein 2 osteogenic active peptide L20 were non-cytotoxic and could promote the proliferation and adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells. Compared with the blank group and the control group, the alkaline phosphatase activity and extracellular matrix mineralization capacity of the experimental group were increased (P < 0.05), and the mRNA expression levels of alkaline phosphatase, Runx2, and osteocalcin were increased (P < 0.05). (3) The results of femoral Micro-CT scanning showed that compared with the blank group and the control group, the new bone mass and bone density of the experimental group were increased (P < 0.05). The results of hematoxylin-eosin and Masson staining showed that compared with the blank group and the control group, the new bone formation and collagen fibers of the experimental group were increased. (4) These findings indicate that mesoporous bioactive glass loaded with bone morphogenetic protein 2 active peptide L20 exhibits excellent biocompatibility and *in vitro* and *in vivo* osteogenic properties, promoting regeneration and repair of SD rat femoral condyle defects.

Key words: bone morphogenetic protein 2 osteogenic peptide; mesoporous bioactive glass; nanoparticle; catechol; osteoblast differentiation; femoral condyle defect; bone tissue engineering; biomaterials

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 82272567 (to GDC)*

How to cite this article: *YU L, ZHANG W, QIN Y, GE GR, BAI JX, GENG DC. Repair of femoral condyle defects using mesoporous bioactive glass grafted with bone morphogenetic protein 2 osteogenic peptide inspired by mussel. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2025;29(22):4629-4638.*

0 引言 Introduction

在骨科手术中，由创伤、严重感染或肿瘤切除等因素导致的骨缺损是一项重大挑战。目前，自体骨移植和同种异体骨移植被视为骨缺损治疗的金标准，然而这两种方法同样存在明显不足：自体骨移植通常伴随着额外的疼痛，而同种异体骨移植可能会产生免疫原性或疾病传播的风险 [1]。

生物材料是一种可行的骨缺损修复方案，但传统生物材料常受限于成骨能力的不足，因此，引入成骨因子是改善骨再生的有效方法。在众多具有诱导成骨分化和促进骨形成功能的成骨因子中，骨形态发生蛋白 2 被公认为骨骼生长与修复的关键因子 [2-3]。自从 2007 年美国食品药品监督管理局 FDA 批准重组人骨形态发生蛋白 2 产品的应用后，其在骨修复方面取得了一定的临床效果 [4]。然而，重组人骨形态发生蛋白 2 的临床应用受限于较短的蛋白质半衰期，为维持有效生理浓度，常需使用高剂量的骨形态发生蛋白 2，而这又会增加恶性肿瘤的发生风险 [5-6]。因此，当前的研究焦点在于开发一种既能模拟骨形态发生蛋白 2 的强效成骨活性，又能避免潜在致癌风险的新型因子，同时结合缓释技术来延长其半衰期，这对于骨组织修复具有重要的理论和实践意义 [7]。

骨组织工程致力于通过设计制备出负载生物活性因子、具有诱导成骨的离子或多向分化潜能干细胞的生物材料，用于指导骨组织再生过程 [8]。其中，药物递送与缓释技术在组织工程中扮演重要角色，递送载体应用较为广泛的是羟基磷灰石、磷酸钙和生物活性玻璃 [9]。介孔生物玻璃是由 SiO_2、CaO 和 P_2O_5 等基本成分组成的硅酸盐玻璃，由于出色的生物相容性、可调孔径和体积以及良好的有机功能被广泛用于药物的高效装载与输送 [10]。植入体内后，介孔生物玻璃与骨骼通过生成碳酸羟基磷灰石而紧密结合，同时降解产物刺激成骨分化，促进骨组织修复再生。因此，国内外研究者们积极开发表面改性的介孔生物玻璃，旨在提高其促成骨性能 [11-12]。通过掺杂具有生物活性的元素离子 (如锶、锂等) 或装载生物分子和药物赋予介孔生物玻璃诸如血管生成、抗菌、抗癌和促成骨等生物学功能。

海洋生物贻贝能在恶劣和湍流的潮湿条件下与各种淹没底物紧密结合的特性，引起了科学家们的广泛关注 [13]。自 1981 年 WAITE 和 TANZER 从贻贝足蛋白中鉴定出邻苯二酚以来，发现邻苯二酚对贻贝在水下的牢固附着力起着重要作用。富含邻苯二酚官能团的聚多巴胺在不同表面均具有优异的附着力，可通过多巴胺自组装的氧化自聚合反应以及随后的分子间迈克尔加成反应来形成交联的聚多巴胺涂层，这一发现为材料表面的生物功能化修饰提供了新的思路 [14-15]。此次实验开发了一种既具有骨形态发生蛋白 2 强效成骨活性，又无致癌风险的骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 (L20)，基于贻贝衍生的肽模拟策略合成了由 L20 和邻苯二酚序列组成的含邻苯二酚的

肽，用于对介孔生物玻璃的生物功能化修饰，旨在探究骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 L20 的体外释放特性，探究负载骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 L20 介孔生物玻璃对骨组织工程成骨性能的影响，以期为后续体内缺损骨再生效果提供实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验和体内动物实验，两组间均数比较采用 student *t* 检验，多组间均数比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 2 月至 2024 年 2 月在苏州大学附属第一医院骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 主要材料和试剂 十六烷基三甲基溴化铵、磷酸三乙酯、正硅酸乙酯、四水合硝酸钙、戊巴比妥钠 (Sigma 公司)；三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Aladin 公司)；骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 L20 冻干粉 (上海强耀生物科技有限公司)；α-MEM 培养基、胎牛血清和双抗 (美国 Thermo Fisher 公司)；表面标记检测试剂盒 (赛业 Oricell 生物，广州)；碱性磷酸酶试剂盒、茜素红染色试剂盒 (上海碧云天公司)；细胞活 / 死染色试剂 (Yeasen 公司)；40 g/L 多聚甲醛固定液、总 RNA 试剂提取剂 (苏州新赛美生物科技公司)；乙二胺四乙酸 (源叶公司)；氢氧化钠 (索莱宝公司)；苏木精 – 伊红染液、二甲苯 (上海麦克林生化)。

1.3.2 主要仪器 电子分析天平 (上海花潮实业公司)；真空冷冻干燥机 (上海舜制公司)；扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司)；透射电子显微镜 (美国 FEI 公司)；纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (Malvern Zetasizer Nano ZS90，英国)；Barnstead 超纯水仪 (美国 Millipore 公司)；倒置荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司)；超低温冰箱 (中国海尔公司)；SkyScan Micro-CT 扫描仪 (德国 Bruker 公司)；石蜡包埋机 (美国 Bio-Tek 公司)；石蜡切片机 (美国 Thermo Fisher 公司)；FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司)。

1.3.3 实验动物 16 只雄性 SD 大鼠，6–8 周龄，体质量 200–250 g，SPF 级，购自苏州大学动物中心，许可证号：SYXK(苏)2021-0074。实验大鼠饲养于标准环境中 (室温 26 ℃，湿度约 55%，每天光照 12 h，自由活动，自主进食)。实验方案已通过苏州大学伦理委员会批准 (批准号：SUDA20230327A04)。

1.4 实验方法

1.4.1 负载骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 L20 介孔生物生物玻璃的制备 利用表面活性剂模板法合成介孔生物玻璃。在 60 ℃下将 7.092 g 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐粉末溶于 250 mL 去离子水中，然后将 1.5 g 十六烷基三甲基溴化铵加入溶液中，搅拌至澄清后，向溶液中滴加 10.8 mL 正硅酸乙酯、0.9 mL 磷酸三乙酯、2.45 g 四水合硝酸钙，200 r/min 温和搅拌 30 min，800 r/min 猛烈搅拌 16 h，直到溶液变成乳白色；用无水乙醇和去离子水轮流洗涤 3 次，5 000 r/min 离心 30 min，弃上清液，收集沉淀在 60 ℃烘箱中干燥 24 h，将固体研碎并在 650 ℃空气中煅烧 3 h。制得介孔生物玻璃纳米颗粒。

骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 L20 由苏州强耀生物科技有限公司采用 Fmoc 策略的固相肽合成方法合成。无菌条件下取 5 mg 骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 L20 冻干粉溶于 5 mL PBS(pH=7.4) 中，加入 10 mg 介孔生物玻璃纳米颗粒后常温下 500 r/min 搅拌 2 h，2 000 r/min 离心 5 min，去除上清液，使用去离子水清洗干净未黏附的游离多肽，冷冻干燥过夜后即可获得介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒。

1.4.2 纳米颗粒的表征

扫描电镜观察：将介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒均匀地添加到导电胶上并固定于扫描电镜样品台，吹掉多余的粉末。在真空干燥条件下使用离子溅射仪器对材料表面进行镀金处理，将镀金后的样品放入扫描电镜样品仓，在真空状态下调整合适的电压在 10–12.5 kV，观察材料表面的形貌并拍摄图像。

透射电镜观察：将介孔生物玻璃纳米颗粒、介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒干燥后置于铜网上，采用美国 FEI Tecnai F20 透射电子显微镜对待测样本进行微观结构观察。

粒径分析：将介孔生物玻璃纳米颗粒、介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒分别悬浮于水溶液中，调整仪器的参数，如激光功率、检测角度等，将样品注入纳米粒度仪测量室中，分析测试结果并生成颗粒粒径分布图。

体外药物释放实验：将介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒浸泡在 5 mL PBS(pH=7.4) 中，置于摇床上匀速 (100 r/min) 摇动。每天更新 1 次 PBS。浸泡第 1，3，5，7，9，11，13，15 天，分别取出 0.5 mL PBS(并补充 0.5 mL PBS)，采用高效液相色谱检测 L20 的浓度，使用 Origin 软件绘制累计释放曲线。

1.4.3 骨髓间充质干细胞提取及鉴定 取 1 只 SD 大鼠，腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (150 mg/kg) 麻醉后处死，置入体积分数 75% 乙醇中消毒 5 min；分离股骨、胫骨，消毒后暴露骨髓腔，注射器抽吸 α-MEM 培养基反复冲洗；将冲洗液置入离心管内，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清；加入 2 mL 红细胞裂解液裂解 5 min，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，用含体积分数 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养基混匀，接种至培养皿标记为 P0，置于 37 ℃、体积分数 5%CO_2 培养箱中培养，48 h 全量换液 [16]。细胞融合达到 80% 可传代，选取第 2 代间充质干细胞 (P2) 用于后续实验。

使用间大鼠充质干细胞表面标记检测试剂盒鉴定提取的细胞。胰酶消化后收集细胞并制成细胞悬液，加入特异性荧光抗体 4 ℃避光孵育 30 min，用 PBS 洗涤，用 PBS 重悬，通过流式细胞仪对抗体标记的细胞表面标志物 CD34、CD44 和 CD90 进行分析。

1.4.4 纳米颗粒的生物相容性

细胞活死荧光染色：将大鼠骨髓间充质干细胞接种于 24 孔板内，每孔加入 1 mL α-MEM 完全培养基 (含有体积分数 10% 胎牛血清 +1% 双抗)，细胞密度为 2×10^4/ 孔，待 24 h 细胞贴壁后分 3 组培养：空白组加入 10 μL PBS，对照组加入 10 μL 介孔生物玻璃纳米颗粒溶液 (5 mg/mL)，实验组加入 10 μL 介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒溶液，每组 3 重复，置于细胞培养箱中培养。培养 3 d 后，吸出培养基，用 PBS 清洗 3 遍，每次 5 min；每孔加入 300 μL 活 / 死荧光染色液，置于正置显微镜下进行观察、拍照。

CCK-8 法检测细胞增殖：将大鼠骨髓间充质干细胞接种于 96 孔板内，每孔加入 100 μL α-MEM 完全培养基 (含有体积分数 10% 胎牛血清 +1% 双抗)，细胞密度为 8×10^3/ 孔，分 3 组培养：空白组加入 1 μL PBS，对照组加入 1 μL 介孔生物玻璃纳米颗粒溶液 (5 mg/mL)，实验组加入 1 μL 介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒溶液，每组 4 重复，置于细胞培养箱中培养。培养 1，3，5 d 后，吸去孔板中的培养基，加入 200 μL 含 10%CCK-8 的培养基 37 ℃下避光孵育 1 h，避光下每孔取 100 μL 培养基转移到新的 96 孔板中，使用酶标仪检测各个孔在 450 nm 波长的吸光度值。

扫描电镜观察细胞形态：将大鼠骨髓间充质干细胞接种于 24 孔板内，每孔加入 1 mL α-MEM 完全培养基 (含有体积分数 10% 胎牛血清 +1% 双抗)，细胞密度为 2×10^4/ 孔，待 24 h 细胞贴壁后分 3 组培养：空白组加入 10 μL PBS，对照组加入 10 μL 介孔生物玻璃纳米颗粒溶液 (5 mg/mL)，实验组加入 10 μL 介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒溶液，每组 3 重复，置于细胞培养箱中培养。培养 3 d 后，吸出培养基，用 PBS 清洗 3 遍，每次 5 min；冰上 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 15 min，用 PBS 清洗 3 次，梯度脱水后经过临界点干燥，离子溅射仪对细胞表面喷金，导电胶固定于载物台，置于扫描电镜下观察细胞形态并拍照。

1.4.5 纳米颗粒的体外促成骨性能

实验分组培养：将大鼠骨髓间充质干细胞接种于 24 孔板内，细胞密度为 2×10^4/ 孔，待 24 h 细胞贴壁后弃原培养基，分 3 组培养：空白组加入 10 μL PBS+1 mL 成骨诱导培养基，对照组加入 10 μL 介孔生物玻璃纳米颗粒溶液 (5 mg/mL)+1 mL 成骨诱导培养基，实验组加入 10 μL 介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒溶液 +1 mL 成骨诱导培养基。成骨诱导培养基的成分：含有体积分数 10% 胎牛血清、10 mmol/L β− 磷酸甘油、50 μmol/L 抗坏血酸和 100 nmol/L 地塞米松的 α-MEM 培养基。

碱性磷酸酶染色及定量分析：成骨诱导分化 7 d 后，使用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 15 min，每孔加入 300 μL BCIP/NBT 染色工作液避光孵育 30 min，置于光学显微镜下观察。同时，用胰蛋白酶消化离心收集细胞，加入 RIPA 裂解液 4 ℃条件下裂解 30 min，4 ℃条件下 13 000 r/min 离心 20 min，收集上清，使用碱性磷酸酶检测试剂盒在碱性条件下水解底物，在 400 nm 处检测吸光度值，定量分析碱性磷酸酶的相对活性。

茜素红 S 染色及定量分析：成骨诱导分化 21 d 后，用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 15 min，每孔加入 300 μL 茜素红 S 染液避光孵育 30 min；吸除茜素红 S 染液，用 PBS 清洗 3 次，置于光学显微镜下观察拍照。将染色后的细胞浸润在 10% 氯化十六烷基吡啶中孵育 15 min，使用酶标仪测 600 nm 处光吸收值，定量分析细胞外基质矿化情况。

RT-qPCR 检测成骨相关基因表达：成骨诱导分化 7 d 后，通过 RT-qPCR 进一步评估碱性磷酸酶、Runx2 和骨钙素的 mRNA 表达。收集细胞后加入 Trizol 裂解液静置 5 min，加入 200 μL 氯仿，上下剧烈摇晃使其混合，冰上静置 10 min；4 ℃下 12 000 r/min 离心 15 min，转移上层水相加入等量异丙醇，上下颠倒混匀后冰上静置 10 min；12 000 r/min 离心 15 min，吸去上清，干燥后加入 1 mL 含体积分数 75% 乙醇的 DEPC 溶液重悬；12 000 r/min 离心 15 min，吸去上清，通风橱内干燥；加入 20 μL DEPC 水溶解沉淀，置入 58 ℃金属浴中加热 8 min；使用 NanoDrop 2000 分光光度计对总 RNA 进行浓度定量，配平 RNA 总量浓度为 1 μg/μL，加入 4 μL 5X All-In-One RT MasterMix，使用 DEPC 水配平到 20 μL 后混匀，反转录至 cDNA；根据 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 说明书配置 20 μL 反应体系，在 PCR 专用的 96 孔定量板中完成加样后进行 qPCR 反应，反应条件为：预变性 95 ℃ 3 min；变性 95 ℃ 30 s；退火 60 ℃ 30 s；延伸 72 ℃ 30 s；循环数为 40。最终根据仪器检测的 CT 值和扩增曲线进行相对定量，使用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 方法计算基因表达的相对定量。引物序列见**表 1**。

表 1 | RT-qPCR 检测引物序列
Table 1 | **RT-qPCR primer sequences**

基因	前导引物序列 (5′-3′)	反向引物序列 (3′-5′)	产物长度 (bp)
碱性磷酸酶	CTG GTA CTC AGA CAA CGA GAT G	GTC AAT GTC CCT GAT GTT ATG C	94
Runx2	TCC GCC ACC ACT CAC TAC CAC	GGA ACT GAT AGG ACG CTG ACG AAG	133
骨钙素	GGA CCC TCT CTC TGC TCA CTC TG	ACC TTA CTG CCC TCC TGC TTG G	124
β-actin	AAC ACA GTG CTG TCT GGT G	GTA ACA GTC CGC CTA GAA GC	255

1.4.6 纳米颗粒的体内促成骨性能 按照随机数字表法将 15 只 SD 大鼠随机分为空白组、对照组、实验组，每组 5 只。

建立大鼠股骨髁缺损模型：腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉 3 组大鼠，无菌条件下暴露双侧股骨外侧髁，采用中速钻头制备直径 3 mm、深度 5 mm 的骨缺损，用无菌生理盐水冲洗缺损部位 [17]，空白组缺损部位不进行任何处理，对照组缺损部位植入无菌介孔生物玻璃纳米颗粒，实验组植入介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒，逐层缝合切口，见**图 1**。术后 3 d 预防性肌注青霉素 8×10^4 U/d，监测大鼠术后感染情况，切口部位未见发红或渗出。术后 8 周行过量麻醉处死大鼠，收集股骨和内脏组织，生理盐水洗净后置于体积分数 10% 中性甲醛中固定。

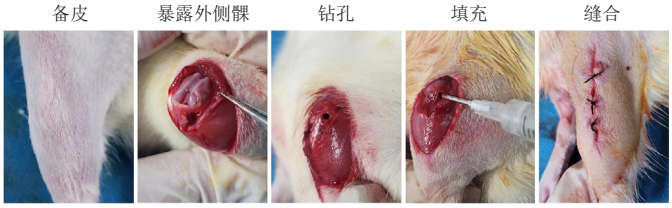


图 1 | SD 大鼠股骨髁缺损模型建立过程
Figure 1 | Process of establishing the defect model of femoral condyle in SD rats

Micro-CT 断层扫描：股骨标本置于体积分数 10% 中性甲醛中固定 48 h 后，进行 MicroCT 扫描，参数设置为：分辨率 18 μm，电压 50 kV，电流 500 μA，每次曝光时间为 100 ms，0.9°/8 images。选取大鼠股骨髁缺损处为感兴趣区域，应用 Micro-CT 图像分析软件对图像进行三维重建及分析，记录感兴趣区域股骨头的骨密度、骨体积与组织体积比值和骨小梁厚度。

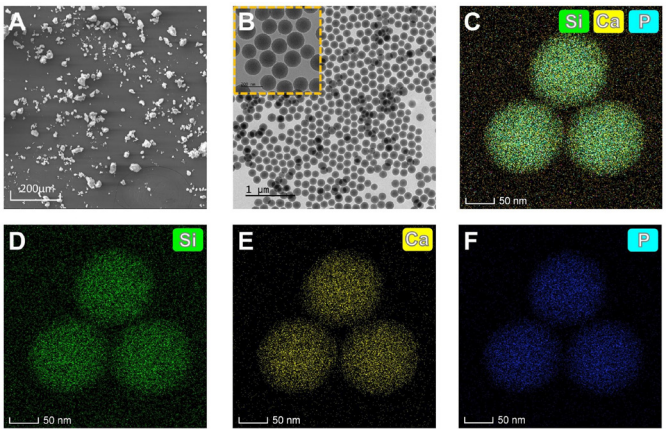
组织学染色：置于体积分数 10% 中性甲醛中固定 48 h 后，使用 10%EDTA 脱钙 4 周，将完全软化的标本修剪整齐，尽量去除多余组织，冲洗干净后置于包埋盒中进行乙醇梯度脱水；将脱水后的股骨依次置于二甲苯溶液 3 h、70 ℃石蜡 8 h，将标本置于模具中，注满石蜡后置于 −20 ℃冷却台上冷却 1 h，取下凝固的组织蜡块室温保存或切片染色，切片厚度为 6 μm；复水后行苏木精 − 伊红和 Masson 染色，常规脱水、透明、封固，置于光学显微镜镜下观察股骨形态学变化。内脏组织置于体积分数 10% 中性甲醛中固定 48 h 后，进行苏木精 − 伊红染色。

1.5 主要观察指标 介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的表面形貌、粒径、体外缓释性能、生物相容性，以及体内外促成骨性能。

1.6 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验所有结果进行分析，使用 $\bar{x}\pm s$ 表示结果数据。选择 Kruskal-Wallis 单因子方差分析来比较多组之间的差异。$P < 0.05$ 为组间差异有显著性意义。该文统计学方法已经由苏州大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的表面形貌及粒径分析结果 扫描电下可见介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒为球形、单分散颗粒，透射电子显微镜下可见介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒表面的多孔结构；此外，高分辨 Mapping 图谱显示 Si、Ca、P 均匀分布在介孔生物玻璃表面，见**图 2**。介孔生物玻璃纳米颗粒的平均粒径为 (257.5±0.489) nm，介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的平均粒径为 (268.1±0.58) nm，见**图 3A，B**，这表明 L20 已成功接枝到介孔生物玻璃表面。



图注：L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。A 为纳米颗粒扫描电镜图像，为球形、单分散颗粒；B 为纳米颗粒透射电镜图像，可见多孔结构；C−F 为纳米颗粒高倍透射 Mapping 结果，显示 Si、Ca、P 元素的分布。

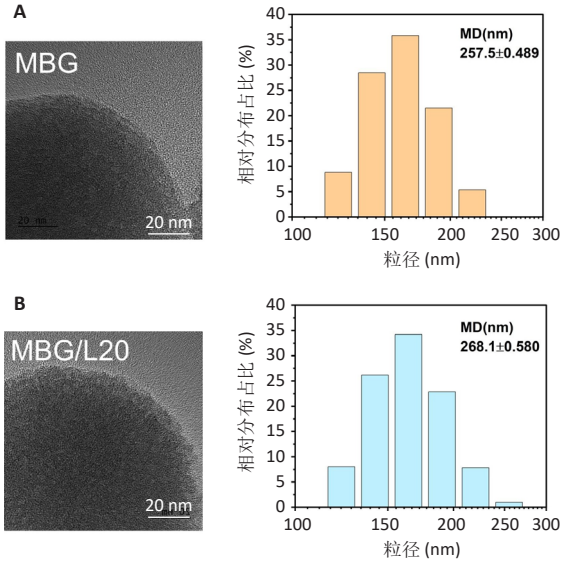
图 2 | 介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的表征结果
Figure 2 | Characterization results of mesoporous bioactive glass/L20 nanoparticles

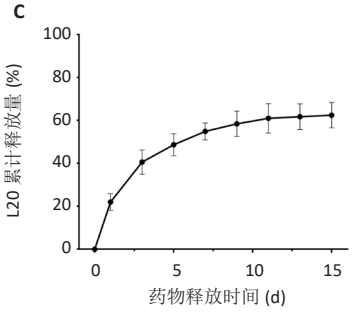
2.2 介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的体外缓释性能验证 介孔生物玻璃 /L20 的药物释放曲线可分为 3 个阶段：第一阶段 (0−3 d)L20 快速释放，这归因于介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒表面吸附的 L20 迅速扩散到溶液中；第二阶段 (3−9 d)L20 缓慢释放，这是接枝邻苯二酚 L20 的缓扩散，也与药物释放进入介孔通道有关；第三阶段 (9−15 d)L20 释放速率衰减至几乎为 0，这意味着此时药物扩散和药物吸附动态平衡，见**图 3C**。药物释放曲线结果表明介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒具有良好的缓释性能。

2.3 大鼠骨髓间充质干细胞的鉴定 通过流式细胞术对大鼠骨髓间充质干细胞表面标志物进行鉴定，见**图 4**。大鼠骨髓间充质干细胞表面标志物 CD90、CD44 表达阳性，CD34 表达阴性，表明间充质干细胞提取成功。

2.4 纳米颗粒的体外生物相容性评估结果

2.4.1 CCK-8 检测结果 培养不同时间后各组大鼠骨髓间充质干细胞增殖检测结果，见**图 5**。随着培养时间的增加，各组细胞均表现出稳定的增殖能力，培养 1 d 后，各组细胞增殖能力比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；培养 3，5 d 后，实验组细胞增殖能力强于空白组、对照组 ($P < 0.05$)。

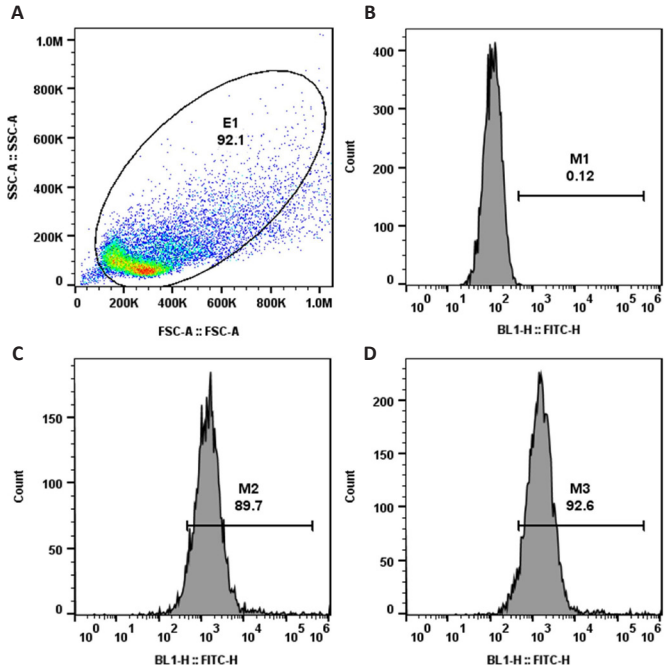




图注：L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。A 为介孔生物玻璃 (MBG) 纳米颗粒的透射电镜图像和粒径分析；B 为介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒 (MBG/L20) 的透射电镜图像和粒径分析；C 为介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的 L20 释放曲线，结果显示介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒具有良好的缓释性能。

图 3 ｜介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的高倍率透射电镜图像和药物释放

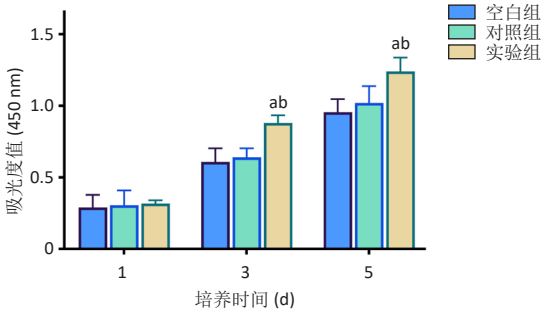
Figure 3 ｜ High power transmission electron microscope images and drug release of mesoporous bioactive glass/L20 nanoparticles



图注：A 为细胞的 FSC-SSC 散点图及圈门；B–D 分别为细胞表面标志物 CD34、CD90、CD44 表达，CD90、CD44 表达阳性，CD34 表达阴性。

图 4 ｜大鼠骨髓间充质干细胞的细胞流式鉴定

Figure 4 ｜ Flow cytometry identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells

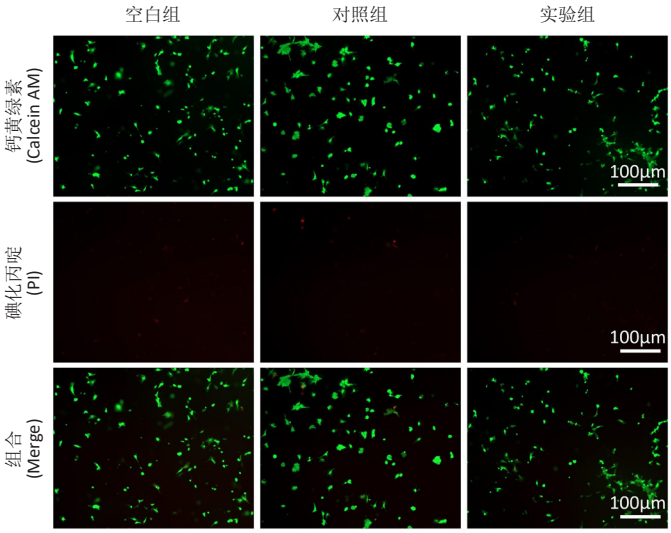


图注：空白组为单纯的细胞培养组，对照组为细胞与介孔生物玻璃纳米颗粒共培养，实验组为细胞与介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒共培养，其中 L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。与空白组比较，$^{a}P < 0.05$；与对照组比较，$^{b}P < 0.05$。

图 5 ｜培养不同时间点各组大鼠骨髓间充质干细胞的增殖

Figure 5 ｜ Proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in each group at different culture time points

2.4.2　细胞活死荧光染色结果　各组细胞活死荧光染色结果，见**图 6**。各组细胞存活良好 (绿色荧光)，仅有少量死亡细胞 (红色荧光)，结果表明两种纳米颗粒对大鼠骨髓间充质干细胞几乎无毒，具有良好的生物相容性。



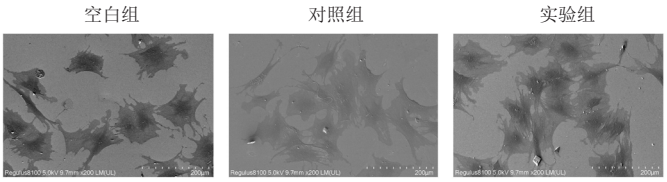
图注：空白组为单纯的细胞培养组，对照组为细胞与介孔生物玻璃纳米颗粒共培养，实验组为细胞与介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒共培养，其中 L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。钙黄绿素和碘化丙啶分别标记活细胞、死细胞，染色结果显示各组均未见明显的死细胞 (红色荧光)。

图 6 ｜各组大鼠骨髓间充质干细胞的活死荧光染色结果

Figure 6 ｜ Live-dead fluorescence staining results of rat bone marrow mesenchymal stem cells in each group

2.4.3　扫描电镜观察结果　各组细胞附着情况和骨架形貌，见**图 7**。扫描电镜高倍率图像显示大鼠骨髓间充质干细胞均已贴壁，实验组和对照组细胞数量多于空白组，相较于空白组、对照组，实验组大鼠骨髓间充质干细胞具有更分散的形态，细胞形态呈纤维状或星状，向各方向延伸，表明 L20 显著促进大鼠骨髓间充质干细胞的贴壁和铺展。

2.5　纳米颗粒璃的体外促成骨分化潜能　骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 L20 具有良好的骨诱导性，可促进细胞的成骨分化。碱性磷酸酶染色和茜素红 S 染色分别检测成骨分化早期标志物碱性磷酸酶和晚期标志物矿化结节。

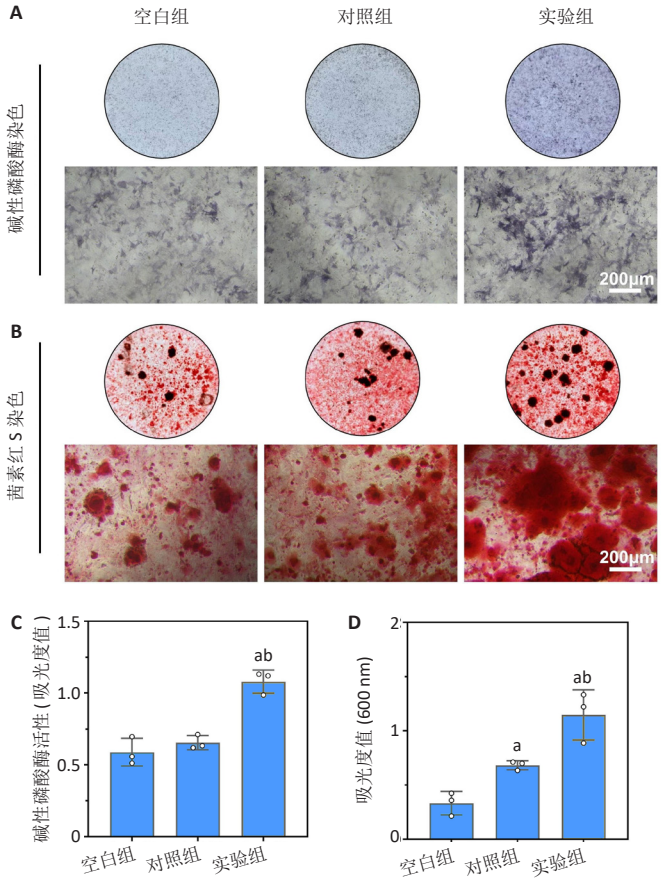


图注：空白组为单纯的细胞培养组，对照组为细胞与介孔生物玻璃纳米颗粒共培养，实验组为细胞与介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒共培养，其中 L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。空白组和对照组细胞仍见部分呈梭形，实验组细胞呈纤维状或星状且密集生长，向各方向延伸面积更大。标尺 =200 μm。

图 7 ｜扫描电镜观察各组大鼠骨髓间充质干细胞的黏附与形态

Figure 7 ｜ Adhesion and morphology of rat bone marrow mesenchymal stem cells in each group (scanning electron microscopy)

各组大鼠骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶染色及定量分析，见**图 8**。成骨诱导培养 7 d 后的碱性磷酸酶染色结果显示，实验组细胞表达的碱性磷酸酶高于空白组、对照组，说明介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒可促进大鼠骨髓间充质干细胞的早期成骨分化；碱性磷酸酶染色定量分析结果显示，实验组细胞碱性磷酸酶活性高于空白组、对照组 ($P < 0.05$)。



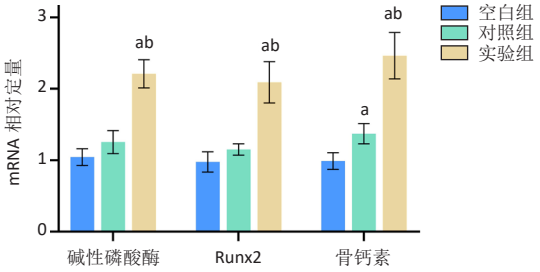
图注：空白组为单纯的细胞培养组，对照组为细胞与介孔生物玻璃纳米颗粒共培养，实验组为细胞与介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒共培养，其中 L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。A，C 分别为成骨诱导养 7 d 后的碱性磷酸酶染色及定量分析；B，D 分别为成骨诱导培养 21 d 后的茜素红 S 染色及定量分析。对空白组比较，$^{a}P < 0.05$；与对照组比较，$^{b}P < 0.05$。

图 8 ｜成骨诱导培养后各组大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化情况

Figure 8 ｜ Osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in each group after osteogenic induction culture

成骨诱导培养 21 d 后的茜素红 S 染色结果显示，实验组镜下可见大量同心圆结构的橘红色钙化结节，明显多于空白组和对照组；茜素红 S 染色定量分析结果显示，对照组、实验组细胞外基质矿化程度高于空白组 ($P < 0.05$)，实验组细胞外基质矿化程度高于对照组 ($P < 0.05$)，见图 8。

RT-qPCR 检测结果显示，对照组细胞内骨钙素 mRNA 表达高于空白组 ($P < 0.05$)，这可能与其形成的羟基磷灰石晚期促成骨作用有关；实验组细胞内碱性磷酸酶、Runx2 和骨钙素 mRNA 表达均高于空白组、对照组 ($P < 0.05$)，见**图 9**。



图注：空白组为单纯的细胞培养组，对照组为细胞与介孔生物玻璃纳米颗粒共培养，实验组为细胞与介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒共培养，其中 L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。对空白组比较，$^{a}P < 0.05$；与对照组比较，$^{b}P < 0.05$。

图 9 ｜成骨诱导培养后各组大鼠骨髓间充质干细胞的成骨相关基因表达

Figure 9 ｜ Expression of osteogenic-related genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells in each group after osteogenic induction culture

2.6 纳米颗粒的体内促成骨性能

2.6.1 实验动物数量分析　15 只 SD 大鼠全部进入结果分析。

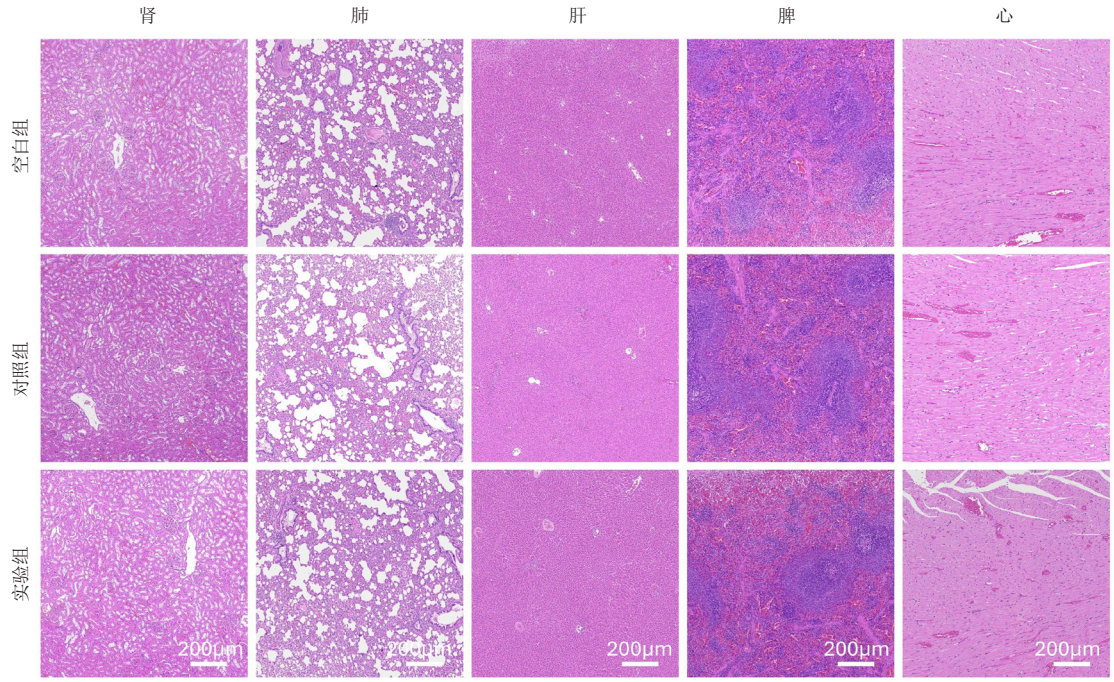
2.6.2 各组大鼠内脏组织病理观察　苏木精－伊红染色结果显示，各组大鼠内脏组织均未见明显的病理形态变化，表明两种纳米颗粒具有良好的组织相容性，见**图 10**。

2.6.3 各组大鼠股骨 Micro-CT 三维重建分析　股骨 Micro-CT 三维重建分析结果显示，实验组大鼠骨密度、骨体积与组织体积比值和骨小梁厚度均高于对照组、空白组 ($P < 0.05$)，见**图 11A，B**，证实了介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒可促进骨再生。

2.6.4 各组大鼠股骨组织苏木精－伊红和 Masson 染色结果　苏木精－伊红与 Masson 染色结果显示，空白组骨缺损部位可见大量纤维细胞及少量新骨形成，胶原纤维数量较少；对照组骨缺损部位可见少量纤维细胞及部分新骨形成，新生骨小梁较薄弱，胶原纤维数量多于空白组；实验组骨缺损部位可见极少量纤维细胞与大量新骨形成，新生骨小梁粗大，胶原纤维数量明显多于对照组，见**图 11C**，说明介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒可以促进体内成骨。

3 讨论 Discussion

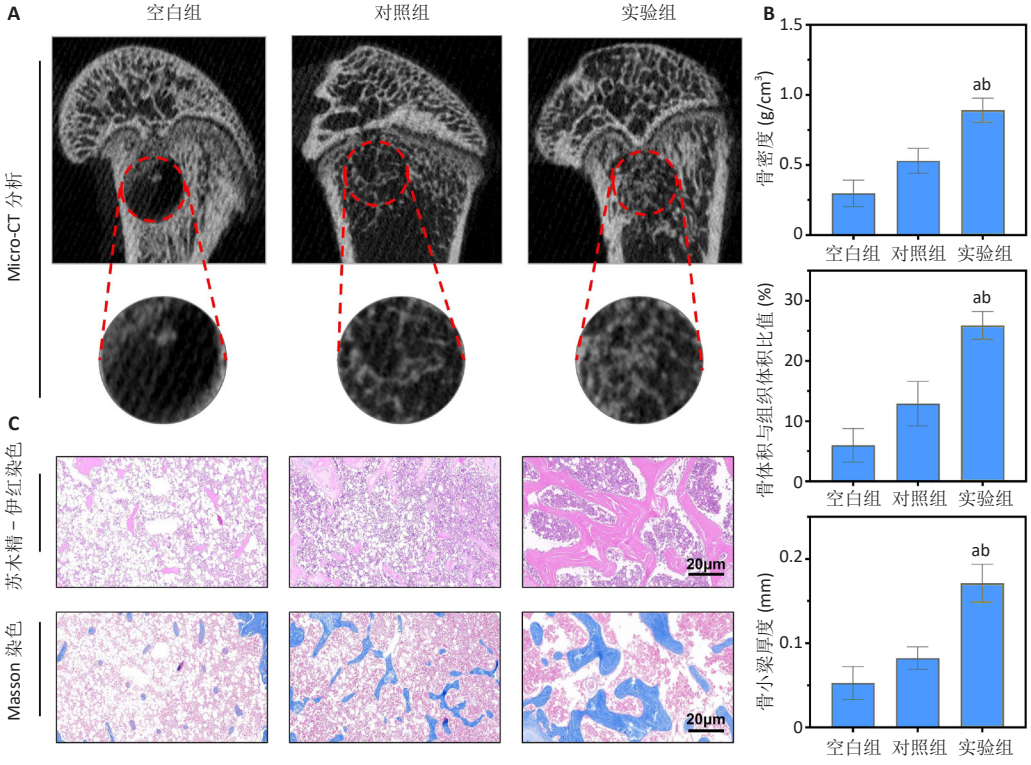
纳米科学、纳米医学和材料科学的进步推动了新型组织工程材料的设计与制造，特别是用于骨缺损愈合的材



图注：空白组股骨缺损部位未植入任何材料，对照组股骨缺损部位植入介孔生物玻璃纳米颗粒，实验组股骨缺损部位植入介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒，其中 L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。苏木精－伊红染色结果显示，各组大鼠内脏组织均未见明显的病理形态变化。

图 10 ｜术后 8 周各组大鼠内脏组织苏木精－伊红染色观察

Figure 10 ｜ Observation of hematoxylin-eosin staining of visceral tissues of rats in each group 8 weeks after surgery



图注：空白组股骨缺损部位未植入任何材料，对照组股骨缺损部位植入介孔生物玻璃纳米颗粒，实验组股骨缺损部位植入介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒，其中 L20 为骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽。A 为股骨髁 Micro-CT 重建图像，空白组骨量最少，实验组骨量最多；B 为股骨髁 Micro-CT 重建参数分析；C 为股骨髁缺损部位苏木精－伊红与 Masson 染色，相较于空白组、对照组，实验组骨缺损部位可见大量新骨形成，新生骨小梁粗大，胶原纤维数量增多。与空白组比较，$^{a}P < 0.05$；与对照组比较，$^{b}P < 0.05$。

图 11 ｜术后 8 周各组大鼠股骨髁 Micro-CT 重建分析及病理组织学观察

Figure 11 ｜ Micro-CT reconstruction analysis and pathological histological observation of femoral condyle of rats in each group 8 weeks after surgery

料 [18]。骨缺损区域的再生主要取决于生物材料的微观结构和化学成分。自然骨骼是有机－无机纳米混合复合成分，其中骨小板结构构成哈弗氏系统，其中哈弗氏管的直径为 20–100 μm，被平均厚度为 9.0 μm 的层状骨小板所环绕 [19]。受骨骼结构启发，迫切需要开发具有适当多孔结构的新型支架，其中包含生物活性元素，以促进骨组织生长和再生 [20]。

自 1969 年首次发现以来，生物玻璃因良好的生物相容性和骨传导性已被广泛用于骨组织工程材料。生物玻璃的化学组成 (SiO_2-P_2O_5-CaO) 有助于在其表面形成碳酸化羟基磷灰石层 [21]：一方面，生物玻璃的主要降解产物 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 为体内生物矿化过程中的磷灰石沉积提供原材料；另一方面，生物玻璃中的 Si-O 功能基团作为活性位点促进磷灰石的形成，形成的磷灰石层显著改善了植入物与骨组织之间的骨整合。然而，生物玻璃的成骨能力不足以有效治疗骨缺损 [22]。近年来，一种新型的生物玻璃被开发出来，其具有高度有序的介孔通道结构，孔径为 2–50 nm，称为介孔生物玻璃 [23]。相比较生物玻璃而言，介

孔生物玻璃的重要特点就是高比表面积和独特有序通道产生的载药能力，使其在骨组织工程应用中表现出巨大的潜力[24]。药物递送生长分子给发育过程新骨形成的调节带来无限可能。

蛋白质作为独特的多功能生物大分子具有丰富的来源、优异的生物相容性和生物降解性，基本结构单位是肽链 / 多肽，主要由肽键连接的氨基酸组成。内部的多肽序列往往赋予蛋白质独特的功能活性[25]。近年来在生物医学领域，基于功能多肽修饰的生物材料已被广泛开发用于药物递送应用，正逐渐成为有前途的候选材料[26]。一种有效的策略是基于黏附贻贝足蛋白启发的肽模拟，使用多巴胺接枝功能多肽对生物材料进行表面功能化[27]。目前已从贻贝黏附斑块中鉴定和表征出 8 种贻贝足蛋白，所有贻贝足蛋白均含有一个显著特征，即酪氨酸翻译后修饰为邻苯二酚，显然邻苯二酚是黏附的重要组成部分，邻苯二酚的聚合表现出巨大的黏合效应[28-29]。基于邻苯二酚的肽模拟策略已被广泛用于抗菌、成骨、抗炎等多肽在生物材料表面的黏附应用，为生物工程材料提供极具吸引力的范式[30-31]。

已知多种生长因子能够诱导骨形成，其中骨形态发生蛋白是骨诱导相关研究最多的蛋白之一。人体骨骼中的分子蛋白——骨形态发生蛋白 2 是重要的生物活性成分，具有极高的成骨活性，能加速新骨形成。经 FDA 批准上市的重组人骨形态发生蛋白 2 在临床被广泛应用[32]，然而随着时间的推移，其在临床使用中的安全性日益受到关注。有研究报道，高剂量应用重组人骨形态发生蛋白 2 可能导致异位骨形成和椎骨溶解[33]；此外，大量体内外实验结果支持了骨形态发生蛋白 2 促肿瘤发生的作用，包括乳腺癌、结肠癌、上皮卵巢癌、肺癌、胃癌、骨肉瘤等等恶性肿瘤[34]。因此，对于这些负载骨形态发生蛋白 2 生物材料的应用必须采取适当谨慎的措施。骨形态发生蛋白 2 属于转化生长因子 β 超家族中的一员，由 114 个氨基酸组成，其中真正发挥骨诱导作用的是由 20 个氨基酸组成的核心结构域 (LYLTSIASLETPVSSAKPIK，L20)[35]。因此，此次实验选择不良反应较小的骨形态发生蛋白 2 功能活性肽来进行骨再生的诱导。

此次实验中介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的构建经历了以下 2 个步骤：第一步，采用聚合物模板法合成介生物玻璃，利用表面活性剂分子十六烷基三甲基溴化铵聚集后提供材料的前驱体反应空间，待反应结束后高温烧结去除模板剂后获得粒径一致的多孔支架，Mapping 分析显示钙、磷、硅等元素均匀分布；第二步，利用贻贝足蛋白策略的固相肽合成方法合成了接枝邻苯二酚序列的骨形态发生蛋白 2 成骨活性肽 L20，再通过一步浸泡的方法将其装载到合成好的介孔生物玻璃材料中制得介孔生物玻璃 /L20 支架。

体外释放实验显示该缓释支架系统可以较平稳地缓慢释放成骨活性肽 L20，在骨缺损部位保持较长时间的作用浓度，为骨缺损修复提供良好的条件。细胞与材料之间的相互作用是实验的重点，包括对细胞增殖、黏附、分化的调控。细胞活死荧光染色结果提示，介孔生物玻璃 / L20 材料对于大鼠骨髓间充质干细胞的毒性作用较小，具有良好的生物相容性。CCK-8 检测结果显示，介孔生物玻璃 /L20 对于大鼠骨髓间充质干细胞具有促增殖效应。通过扫描电镜进一步观察与介孔生物玻璃和介孔生物玻璃 / L20 材料共培养的大鼠骨髓间充质干细胞骨架形态，结果显示介孔生物玻璃 /L20 干预下的大鼠骨髓间充质干细胞更具备延展性，促进细胞向四周铺展，这与成骨活性肽 L20 的释放密切相关。在诱导大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的实验中，对不同干预下的大鼠骨髓间充质干细胞进行碱性磷酸酶和茜素红 S 染色及定量分析，以反映体外成骨分化及矿化能力的差异，结果显示介孔生物玻璃 / L20 组碱性磷酸酶活性和细胞外基质矿化性能显著高于空白组、介孔生物玻璃组，说明成骨活性肽 L20 具有加速成骨分化的生物学特性。同时，RT-PCR 检测结果也证实介孔生物玻璃 /L20 组碱性磷酸酶、Runx2 和骨钙素等成骨相关基因表达高于空白组、介孔生物玻璃组，说明 L20 能够促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。

理想的生物材料不仅能与细胞积极相互作用，还能刺激组织再生和骨缺损修复。从新形成的骨骼到成熟骨骼的过渡是一个渐进过程，其中支架与骨细胞 / 组织的侵入之间存在动态相互作用，为此，此次实验使用 SD 大鼠构建了一个股骨髁缺损模型，分析介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒的体内骨再生修复情况。首先对于材料在动物体内的毒性进行评估，各组大鼠内脏组织切片苏木精 – 伊红染色结果显示各组未见明显病理改变，生物安全性良好。介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒植入后股骨髁缺损处 8 周后骨缺损部位形成了大量的新骨组织，明显高于介孔生物玻璃材料。组织学染色结果显示，介孔生物玻璃 /L20 实验组视野下大量新生骨小梁，而介孔生物玻璃对照组则只有微量骨小梁形成，并且存在较少的纤维组织，空白组有大量纤维组织形成，这些结果表明 L20 可以刺激体外成骨分化及矿化，体内促进骨组织再生。

尽管体内实验结果表明介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒具有促进骨再生修复的作用，但是这些推断还有待进一步的研究验证。该实验存在许多不足：实验模型有一定的局限性，尽管造模过程严格遵守模型制备标准，但股骨外侧髁缺损模型对于骨骺部位的损伤不可避免，极大影响对于骨再生效果的评价；大鼠解剖结构与人体存在较大差异，后期可选择较大型哺乳动物进行验证；对于

介孔生物玻璃 /L20 的安全性和临床实用性有待进一步阐明，对于介孔生物玻璃 /L20 的剂型、使用剂量及给药方式也需要进一步探索。总的来说，此次实验结果表明，作为生物活性材料介孔生物玻璃 /L20 纳米颗粒具有刺激组织再生的特殊生物功能，是一种潜在有效促进骨缺损再生修复的生物材料。

作者贡献：俞磊进行实验设计；耿德春进行实验审校；俞磊、张巍、秦毅共同进行实验实施，葛高然和柏家祥进行实验评估；俞磊成文。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] ZHANG M, ZHAI X, MA T, et al. Sequential Therapy for Bone Regeneration by Cerium Oxide-Reinforced 3D-Printed Bioactive Glass Scaffolds. ACS Nano. 2023;17(5):4433-444.
[2] HOWARD MT, WANG S, BERGER AG, et al. Sustained release of BMP-2 using self-assembled layer-by-layer film-coated implants enhances bone regeneration over burst release. Biomaterials. 2022;288:121721.
[3] INGWERSEN LC, FRANK M, NAUJOKAT H, et al. BMP-2 Long-Term Stimulation of Human Pre-Osteoblasts Induces Osteogenic Differentiation and Promotes Transdifferentiation and Bone Remodeling Processes. Int J Mol Sci. 2022; 23(6):3077.
[4] BANNWARTH M, SMITH JS, BESS S, et al. Use of rhBMP-2 for adult spinal deformity surgery: patterns of usage and changes over the past decade. Neurosurg Focus. 2021;50(6):E4.
[5] CARRAGEE EJ, BONO CM, SCUDERI GJ. Pseudomorbidity in iliac crest bone graft harvesting: the rise of rhBMP-2 in short-segment posterior lumbar fusion. Spine J. 2009;9(11): 873-879.
[6] CARRAGEE EJ, CHU G, ROHATGI R, et al. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. J Bone Joint Surg Am. 2013;95(17): 1537-1545.
[7] DING T, KANG W, LI J, et al. An in situ tissue engineering scaffold with growth factors combining angiogenesis and osteoimmunomodulatory functions for advanced periodontal bone regeneration. J Nanobiotechnology. 2021;19(1):247.
[8] 汪雕雕，孙雨阳，田壮，等. 不同骨组织工程支架设计与骨传导性、骨诱导性及生物降解性变化的关系 [J]. 中国组织工程研究，2022,26(21): 3435-3444.
[9] SKWIRA A, SZEWCZYK A, BARROS J, et al. Biocompatible antibiotic-loaded mesoporous silica/bioglass/collagen-based scaffolds as bone drug delivery systems. Int J Pharm. 2023;645:123408.
[10] ZHENG A, WANG X, XIN X, et al. Promoting lacunar bone regeneration with an injectable hydrogel adaptive to the microenvironment. Bioact Mater. 2023;21:403-421.
[11] 周志，陈致介，霍市城，等. 掺锶介孔生物活性玻璃负载双膦酸盐改善去卵巢小鼠骨流失 [J]. 中国组织工程研究，2024,28(17):2653-2658.
[12] GAO H, WANG L, LIN Z, et al. Bi-lineage inducible and immunoregulatory electrospun fibers scaffolds for synchronous regeneration of tendon-to-bone interface. Mater Today Bio. 2023;22:100749.
[13] WAITE JH, TANZER ML. Polyphenolic Substance of Mytilus edulis: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline. Science. 1981;212(4498): 1038-1040.
[14] WANG T, BAI J, LU M, et al. Engineering immunomodulatory and osteoinductive implant surfaces via mussel adhesion-mediated ion coordination and molecular clicking. Nat Commun. 2022;13(1):160.
[15] PAN G, LI B. A dynamic biointerface controls mussel adhesion. Science. 2023;382(6672):763-764.
[16] BAI J, GE G, WANG Q, et al. Engineering Stem Cell Recruitment and Osteoinduction via Bioadhesive Molecular Mimics to Improve Osteoporotic Bone-Implant Integration. Research (Wash D C). 2022;2022:9823784.
[17] XIAO S, WEI J, JIN S, et al. A Multifunctional Coating Strategy for Promotion of Immunomodulatory and Osteo/Angio-Genic Activity. Advanced Functional Materials. 2023;33(4):2208968.
[18] LIU Z, WAN X, WANG ZL, et al. Electroactive Biomaterials and Systems for Cell Fate Determination and Tissue Regeneration: Design and Applications. Adv Mater. 2021;33(32):e2007429.
[19] DE MELO PEREIRA D, HABIBOVIC P. Biomineralization-Inspired Material Design for Bone Regeneration. Adv Healthc Mater. 2018; 7(22):e1800700.
[20] FARBOD K, NEJADNIK MR, JANSEN JA, et al. Interactions between inorganic and organic phases in bone tissue as a source of inspiration for design of novel nanocomposites. Tissue Eng Part B Rev. 2014;20(2): 173-188.
[21] GUPTA S, MAJUMDAR S, KRISHNAMURTHY S. Bioactive glass: A multifunctional delivery system. J Control Release. 2021;335:481-497.
[22] SIVAKUMAR PM, YETISGIN AA, DEMIR E, et al. Polysaccharide-bioceramic composites for bone tissue engineering: A review. Int J Biol Macromol. 2023;250:126237.
[23] VALLET-REGI M, SALINAS AJ. Mesoporous bioactive glasses for regenerative medicine. Mater Today Bio. 2021;11:100121.
[24] XIA W, CHANG J. Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): a promising bioactive drug delivery system. J Control Release. 2006; 110(3):522-530.
[25] ROMERO ROMERO ML, RABIN A, TAWFIK DS. Functional Proteins from Short Peptides: Dayhoff’s Hypothesis Turns 50. Angew Chem Int Ed Engl. 2016;55(52):15966-159671.
[26] HAMLEY I W. Small Bioactive Peptides for Biomaterials Design and Therapeutics. Chem Rev. 2017;117(24):14015-14041.
[27] PIHL R, ZHENG Q, DAVID Y. Nature-inspired protein ligation and its applications. Nat Rev Chem. 2023;7(4):234-255.
[28] DEEPANKUMAR K, GUO Q, MOHANRAM H, et al. Liquid-Liquid Phase Separation of the Green Mussel Adhesive Protein Pvfp-5 is Regulated by the Post-Translated Dopa Amino Acid. Adv Mater. 2022;34(25):e2103828.
[29] GENG H, ZHANG P, PENG Q, et al. Principles of Cation-π Interactions for Engineering Mussel-Inspired Functional Materials. Acc Chem Res. 2022;55(8):1171-1182.
[30] LIU D, XI Y, YU S, et al. A polypeptide coating for preventing biofilm on implants by inhibiting antibiotic resistance genes. Biomaterials. 2023; 293:121957.
[31] BAI J, WANG H, CHEN H, et al. Biomimetic osteogenic peptide with mussel adhesion and osteoimmunomodulatory functions to ameliorate interfacial osseointegration under chronic inflammation. Biomaterials. 2020;255:120197.
[32] GALARRAGA-VINUEZA ME, BAROOTCHI S, NEVINS ML, et al. Twenty-five years of recombinant human growth factors rhPDGF-BB and rhBMP-2 in oral hard and soft tissue regeneration. Periodontol 2000. 2024;94(1):483-509.
[33] POBLOTH AM, DUDA GN, GIESECKE MT, et al. High-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model. J Tissue Eng Regen Med. 2017;11(5):1514-1523.
[34] SHARMA T, KAPOOR A, MANDAL CC. Duality of bone morphogenetic proteins in cancer: A comprehensive analysis. J Cell Physiol. 2022;237(8): 3127-3163.
[35] BILEM I, CHEVALLIER P, PLAWINSKI L, et al. RGD and BMP-2 mimetic peptide crosstalk enhances osteogenic commitment of human bone marrow stem cells. Acta Biomater. 2016;36:132-142.

（责任编辑：QY，GW，ZN，YJ）