

含铜介孔生物活性玻璃的体外成血管及成骨性能

曾玉^{1,2}, 谢成伟³, 洪苑琪^{2,4}, 苏盛辉², 董谢平²<https://doi.org/10.12307/2025.472>

投稿日期: 2024-05-29

采用日期: 2024-07-26

修回日期: 2024-09-04

在线日期: 2024-09-28

中图分类号:

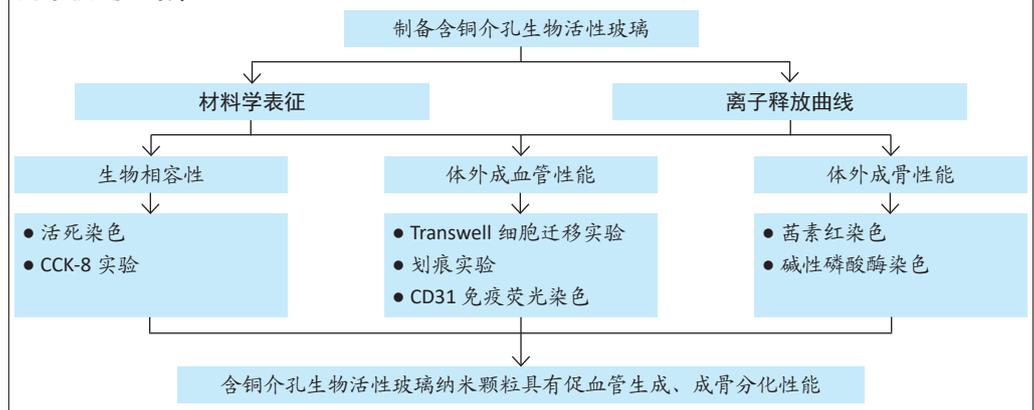
R459.9; R318.08; R683

文章编号:

2095-4344(2025)28-05941-09

文献标识码: A

文章快速阅读: 含铜介孔生物活性玻璃对体外血管形成及骨再生的影响



文题释义:

无机生长因子: 为生物材料中释放出来的一类无机物质, 通常为金属离子或化合物。常见的无机生长因子包括锶、铜、锌等微量元素, 它们在骨代谢和组织修复中扮演着重要角色。将这些无机物质与生物材料结合, 通过缓慢释放离子促进骨组织周围血管生成并促进骨再生, 有望用于骨缺损修复等组织工程领域。

介孔生物活性玻璃: 为一种具有特殊结构和功能的生物材料, 主要由氧化硅、氧化钙和五氧化二磷等成分组成, 主要特点是具有高度有序的互连介孔通道结构, 孔径在5-20 nm范围。介孔生物活性玻璃具有较大的比表面积、优越的生物活性和药物输送功能, 因良好的生物相容性和促进骨再生特性在骨组织工程领域得到广泛应用。

摘要

背景: 介孔生物活性玻璃因优异的生物相容性、骨诱导活性在骨修复方面具有巨大的应用潜力, 将治疗性离子融入介孔生物活性玻璃颗粒中可赋予材料更加理想的生物学特性。

目的: 合成含铜介孔生物活性玻璃, 探讨其体外促血管形成及成骨分化性能。

方法: 采用微乳液辅助溶胶-凝胶法合成介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃, 通过扫描电镜、透射电镜、能谱分析和X射线衍射等手段表征材料的形貌、结构和成分及离子缓释性能。将介孔生物活性玻璃浸提液、含铜介孔生物活性玻璃浸提液分别与小鼠成纤维细胞L929共培养, 通过活死染色、CCK-8实验评价材料的生物相容性。将两种材料浸提液分别与人脐静脉内皮细胞共培养, 通过Transwell实验、划痕实验和CD31免疫荧光染色评价材料的促血管形成性能。将两种材料浸提液分别与小鼠骨髓间充质干细胞共培养, 通过碱性磷酸酶染色(未加入成骨诱导液)、茜素红染色(加入成骨诱导液)评估材料的促成骨性能。

结果与结论: ①表征结果显示, 介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃均呈现紧密排列的颗粒状形貌, 内部介孔结构相似, 含铜介孔生物活性玻璃可持续释放铜离子; ②活死染色与CCK-8实验结果显示, 相较于介孔生物活性玻璃, 含铜介孔生物活性玻璃可促进L929细胞的增殖, 具有良好的生物相容性; ③Transwell实验、划痕实验和CD31免疫荧光染色结果显示, 相较于介孔生物活性玻璃, 含铜介孔生物活性玻璃可促进人脐静脉内皮细胞的迁移与CD31蛋白表达, 促进血管形成; ④碱性磷酸酶染色与茜素红染色结果显示, 含铜介孔生物活性玻璃的促成骨性能强于介孔生物活性玻璃。结果表明: 含铜介孔生物活性玻璃具有优异的生物相容性和促血管形成及骨再生潜力。

关键词: 介孔生物活性玻璃; 铜; 成血管; 成骨; 无机生长因子; 组织工程学; 生物材料; 生物活性; 工程化骨材料

In vitro angiogenesis and osteogenesis properties of copper-doped mesoporous bioactive glassZeng Yu^{1,2}, Xie Chengwei³, Hong Yuanqi^{2,4}, Su Shenghui², Dong Xieping²

¹Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi Province, China; ²Jiangxi Provincial People's Hospital (First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Key Laboratory of Digital Orthopedics of Jiangxi Provincial Health Commission, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China; ³Department of Orthopedics II, Anxi County Hospital, Quanzhou 362400, Fujian Province, China; ⁴Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China

¹江西中医药大学, 江西省南昌市 330004; ²江西省人民医院(南昌医学院第一附属医院), 江西省卫生健康数字骨科重点实验室, 江西省南昌市 330006; ³福建省泉州市安溪县医院骨二科, 福建省泉州市 362400; ⁴陕西科技大学, 陕西省西安市 710021

第一作者: 曾玉, 女, 1999年生, 安徽省合肥市人, 汉族, 江西中医药大学在读硕士, 主要从事骨组织工程研究。

并列第一作者: 谢成伟, 男, 1983年生, 福建省泉州市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事骨组织工程研究及骨科临床研究。

通讯作者: 董谢平, 博士生导师, 主任医师, 教授, 江西省人民医院(南昌医学院第一附属医院), 江西省卫生健康数字骨科重点实验室, 江西省南昌市 330006

通讯作者: 苏盛辉, 博士后, 江西省人民医院(南昌医学院第一附属医院), 江西省卫生健康数字骨科重点实验室, 江西省南昌市 330006

<https://orcid.org/0009-0006-3416-9973>(曾玉); <https://orcid.org/0009-0005-1981-8544>(谢成伟)

引用本文: 曾玉, 谢成伟, 洪苑琪, 苏盛辉, 董谢平. 含铜介孔生物活性玻璃的体外成血管及成骨性能 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(28):5941-5949.



Zeng Yu, Master candidate, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi Province, China; Jiangxi Provincial People's Hospital (First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Key Laboratory of Digital Orthopedics of Jiangxi Provincial Health Commission, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Xie Chengwei, Associate chief physician, Department of Orthopedics II, Anxi County Hospital, Quanzhou 362400, Fujian Province, China

Zeng Yu and Xie Chengwei contributed equally to this article.

Corresponding author: Dong Xieping, Doctoral supervisor, Chief physician, Professor, Jiangxi Provincial People's Hospital (First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Key Laboratory of Digital Orthopedics of Jiangxi Provincial Health Commission, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Corresponding author: Su Shenghui, MD, Jiangxi Provincial People's Hospital (First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Key Laboratory of Digital Orthopedics of Jiangxi Provincial Health Commission, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: Mesoporous bioactive glass has great application potential in bone repair due to its excellent biocompatibility and osteoinductive activity. Incorporating therapeutic ions into mesoporous bioactive glass particles can give the material more ideal biological properties.

OBJECTIVE: To synthesize copper-doped mesoporous bioactive glass and investigate its *in vitro* angiogenesis and osteogenic differentiation properties.

METHODS: Mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass were synthesized by microemulsion-assisted sol-gel method. The morphology, structure, composition, and ion release performance of the materials were characterized by scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, energy dispersive spectroscopy, and X-ray diffraction. The extracts of mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass were co-cultured with mouse fibroblasts L929. Biocompatibility of the materials was evaluated by live/dead staining and CCK-8 assay. The extracts of the two materials were co-cultured with human umbilical vein endothelial cells. The angiogenesis-promoting properties of the materials were evaluated by Transwell assay, scratch assay, and CD31 immunofluorescence staining. The extracts of the two materials were co-cultured with mouse bone marrow mesenchymal stem cells. The osteogenic properties of the materials were evaluated by alkaline phosphatase staining (without osteogenic induction solution) and Alizarin red staining (with osteogenic induction solution).

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The characterization results exhibited that both mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass presented a tightly packed granular morphology with similar internal mesoporous structures, and copper-doped mesoporous bioactive glass could continuously release copper ions. (2) The live/dead staining and CCK-8 assay results showed that compared with mesoporous bioactive glass, copper-doped mesoporous bioactive glass could promote the proliferation of L929 cells and had good biocompatibility. (3) The results of Transwell assay, scratch assay, and CD31 immunofluorescence staining exhibited that compared with mesoporous bioactive glass, copper-doped mesoporous bioactive glass could promote the migration of human umbilical vein endothelial cells and the expression of CD31 protein, and promote angiogenesis. (4) The results of alkaline phosphatase staining and alizarin red staining demonstrated that the osteogenic performance of copper-doped mesoporous bioactive glass was stronger than that of mesoporous bioactive glass. The results indicate that copper-doped mesoporous bioactive glass has excellent biocompatibility and the potential to promote angiogenesis and bone regeneration.

Key words: mesoporous bioactive glass; copper; angiogenesis; osteogenesis; inorganic growth factor; tissue engineering; biomaterial; bioactivity; engineered bone material

How to cite this article: ZENG Y, XIE CW, HONG YQ, SU SH, DONG XP. *In vitro* angiogenesis and osteogenesis properties of copper-doped mesoporous bioactive glass. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(28):5941-5949.

0 引言 Introduction

骨缺损的治疗,尤其是由创伤、感染、肿瘤或遗传畸形等所导致的大段骨缺损,无疑是临床医生所面临的一项重大挑战^[1-2]。现有的骨缺损治疗方法有自体移植、同种异体移植和异种移植等,虽然自体骨移植是骨再生的金标准,但可获取的骨量有限限制了其在临床中的实际应用,而同种异体骨移植和异种骨移植具有病原体传播和免疫排斥反应等风险^[3-4]。为克服这些限制,骨组织工程应运而生,骨组织工程旨在使用生物材料和生长因子来增强细胞成骨分化、改善成骨活性并促进骨修复^[5-7],因此,许多类型的天然和合成生物材料被提议作为骨替代品修复骨缺损^[8]。

在不同的生物材料中,生物活性玻璃因具有骨诱导和骨传导性能在骨组织工程应用中受到广泛关注^[2, 9-11]。近年来,研究人员开发出一种新型第三代介孔生物活性玻璃,该材料展现出独特的结构特征和良好的生物活性^[12]。2004年, YAN 等^[13-14]采用溶胶-凝胶法制备了介孔生物活性玻璃。与非介孔生物活性玻璃相比,介孔生物活性玻璃具有较大的比表面积、优越的生物活性和药物输送能力^[15]。为了进一步提高介孔生物活性玻璃的功能,研究者们常在其中添加不同的生长因子,如血管生长因子等^[16-19],但是生长因子的使用也存在一些缺点,如成本高、不良

反应多以及在生理条件下容易丧失生物活性等^[20-21]。为此,研究者们关注到无机生长因子(如金属离子)从生物材料中释放的现象^[22],与生长因子相比,无机离子具有潜在的优势,如成本低、稳定性高和安全性好等^[2, 4, 23]。这些金属离子从生物材料中释放出来后能够发挥治疗性作用,促进骨组织周围血管生成、骨组织生长及矿化过程^[24-26]。在这些治疗性离子中,铜离子可以加强缺氧诱导因子的表达进而模拟缺氧环境,对成血管细胞的募集、分化起到关键作用^[27]。Li 等^[24]的研究证明了含铜钛合金可通过释放铜离子促进血管形成,进而促进骨整合。

在此背景下,此次实验深入探究了含铜介孔生物活性玻璃的体外促血管形成和成骨分化性能,为骨缺损的治疗提供一定的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料制备及其材料学、细胞学表征,使用单因素方差分析和 Tukey 多重比较检验确定组间差异。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 9 月至 2024 年 2 月在江西省人民医院完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 人脐静脉内皮细胞(赛业生物科技有限公司,广州,中国);小鼠成纤维细胞 L929(IM-M021,逸漠生

物科技有限公司, 厦门, 中国); 小鼠骨髓间充质干细胞 (CRL-12424, ATCC, 美国)。

1.3.2 主要试剂 乙酸乙酯、磷酸三乙酯、四水硝酸钙、正硅酸乙酯、氯化铜、氨水 (国家集团化学试剂有限公司, 上海, 中国); 曲拉通 X-100、十六烷基三甲基溴化铵 (阿拉丁生化科技股份有限公司, 上海, 中国); PBS、高糖培养基 (GIBCO, 美国); CD31 一抗 (Abcam 公司, 英国); CCK-8 试剂盒、山羊抗兔二抗 (碧云天生物技术有限公司, 上海, 中国); 内皮细胞培养基 (ScienCell, 美国); Calcein-AM/PI 活细胞 / 死细胞双染试剂盒 (40747ES76, 翌圣生物科技有限公司, 上海, 中国); 多聚甲醛溶液 (雷根生物科技有限公司, 北京, 中国); 茜素红染色液、氯化十六烷基吡啶 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒、喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒 (C3206, P0321S, P0012, 碧云天生物技术有限公司, 上海, 中国)。

1.3.3 主要仪器 激光扫描共聚焦显微镜 (TCS-SP8, 徕卡, 德国); 酶标仪 (ELx800, BioTek Instruments, Highland Park, USA); 扫描电镜 (Merlin, 卡尔蔡司股份公司, 德国); 透射电镜 (JEM-2100HR, 日本); 电子散射能谱仪 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, 美国); X 射线衍射能谱仪 (X'pert PRO, 帕纳科, 荷兰); 电感耦合等离子体发射光谱仪 (PS1000-AT, Leeman, 美国); 物理吸附仪 (Micromeritics 仪器有限公司, 美国); Transwell 小室 (Corning, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 介孔生物活性玻璃的制备 多项研究表明, 含铜介孔生物活性玻璃纳米颗粒中铜摩尔百分比为 5% 时显示出良好的效果^[28-30]。采用微乳液辅助溶胶-凝胶法合成介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃纳米颗粒, 所有化学试剂均为分析纯级。使用乙酸乙酯-十六烷基三甲基溴化铵-水微乳液作为软模板, 分别以磷酸三乙酯、四水硝酸钙、正硅酸乙酯和氯化铜作为磷源、钙源、硅源和铜源。首先将 0.56 g 十六烷基三甲基溴化铵溶解于 33 mL 去离子水中, 以 300 r/min 磁力搅拌 15 min; 然后向该溶液中加入 8 mL 乙酸乙酯搅拌 30 min, 形成微乳液, 随后添加 5.6 mL 28% 氨水, 继续搅拌 15 min; 在每 30 min 时间间隔内向上述混合物中依次加入 3 g 正硅酸乙酯、0.29 g 磷酸三乙酯和 0.4 g 四水硝酸钙, 继续搅拌 30 min; 最后加入 0.14 g 氯化铜溶解在混合物中, 反应 4 h 后, 将混合物以 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 得到凝胶沉淀物, 用无水乙醇和去离子水洗涤 3 次; 将沉淀物在 -20 °C 真空冷冻干燥机中冻干 24 h, 以 5 °C/min 的速率加热到 650 °C 并保温煅烧沉淀物 3 h, 去除有机物和硝酸盐, 得到含铜介孔生物活性玻璃。采用相同方法合成介孔生物

活性玻璃, 不添加氯化铜。

1.4.2 介孔生物活性玻璃的表征 使用扫描电镜对介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃的表面形貌进行观察; 使用透射电镜对介孔生物活性玻璃纳米颗粒和含铜介孔生物活性玻璃内部介孔微观结构进行观察; 采用能谱仪分析介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃的元素组成; 通过 X 射线衍射分析测试介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃的结构, 2 θ 范围为 10°-80°, 步长为 0.010°; 通过氮气吸附-脱附实验检测介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃的比表面积, 各取材料 0.5 g, 在真空脱气 6 h, 装置内温度为 200-220 °C, 随后吸附介质选用液氮, 在 -195.5 °C 下进行测试。

1.4.3 介孔生物活性玻璃的离子释放性能实验 分别准确称取介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃粉体 10 mg, 浸泡在装有 10 mL 模拟体液溶液的离心管中, 将装有材料和模拟体液的离心管密封后放入恒温恒速摇床中, 设定温度为 37 °C、转速为 120 r/min。反应 1, 3, 5, 7 d 后, 将离心管以 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 mL 放入新离心管中, 采用电感耦合等离子体发射光谱仪检测两种降解后释放的铜离子和钙离子浓度。

1.4.4 制备介孔生物活性玻璃浸提液 根据 ISO 10993-5 标准制备材料浸提液^[31]。将灭菌后的介孔生物活性玻璃 (或含铜介孔生物活性玻璃) 粉体以 0.1 g/mL 浸提比例浸泡在高糖培养基中, 以 120 r/min 在 37 °C 恒温摇床中孵育 24 h; 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 再加入体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗及 1% L-谷氨酰胺制备成浸提液, 用于后续细胞实验。两种材料浸提液用于后续细胞实验, 培养内皮细胞时采用 20 倍的完全培养基 (含体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗及 1% L-谷氨酰胺) 稀释, 培养骨髓间充质干细胞时采用 50 倍的完全培养基稀释。

1.4.5 介孔生物活性玻璃的生物相容性评估

实验分组: 将 L929 细胞以 2×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 分 3 组培养: 对照组加入 200 μ L 完全培养基, 介孔生物活性玻璃组、含铜介孔生物活性玻璃组分别加入 200 μ L 介孔生物活性玻璃浸提液、含铜介孔生物活性玻璃浸提液, 置于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养箱中培养。

活死染色实验: 培养 1, 3, 7 d, 分别用钙黄蛋白乙酞氧基甲酯和碘化丙啶标记活 / 死细胞, 置于激光扫描共聚焦显微镜下观察。

CCK-8 实验: 培养 1, 3, 7 d, 每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液孵育 3 h, 吸取 100 μ L 上清液转移至 96 孔板中, 使用酶标仪读取 450 nm 处的吸光度值。

1.4.6 介孔生物活性玻璃体外促血管形成评价 通过 Transwell 细胞迁移实验、划痕实验和 CD31 免疫荧光染色来评估两种材料的促血管形成性能。

Transwell 细胞迁移实验: 将 Transwell 小室放入 24 孔板中。将 1.0×10^5 个人脐静脉内皮细胞悬浮于 100 μL 内皮细胞培养基中, 接种到 Transwell 小室的上室中, 对照组底部室加入 600 μL 完全培养基, 介孔生物活性玻璃组、含铜介孔生物活性玻璃组底部室分别加入 600 μL 介孔生物活性玻璃浸提液或含铜介孔生物活性玻璃浸提液。培养 24 h 后, 将上室用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 30 min, 加入 0.1% 结晶紫染色 10 min, 用棉签擦去上膜上的细胞, 置于光学显微镜下对迁移穿过聚碳酸酯膜的细胞进行计数。

划痕实验: 将人脐静脉内皮细胞以 1.5×10^5 / 孔的密度接种至 24 孔板中, 观察细胞刚好铺满整个孔板底部时去除培养基, 使用 200 μL 长枪头在孔板上划出一道相对笔直的划痕, 对照组添加 400 μL 完全培养基, 介孔生物活性玻璃组、含铜介孔生物活性玻璃组分别添加 400 μL 介孔生物活性玻璃浸提液或含铜介孔生物活性玻璃浸提液。培养 24 h 后, 置于光学显微镜下观察划痕愈合情况, 使用 Image J 软件对划痕宽度进行定量分析。

CD31 免疫荧光染色: 将人脐静脉内皮细胞以 2×10^4 / 孔的密度接种于共聚焦皿中, 对照组添加 1 mL 完全培养基, 介孔生物活性玻璃组、含铜介孔生物活性玻璃组分别添加 1 mL 介孔生物活性玻璃浸提液或含铜介孔生物活性玻璃浸提液。培养 72 h 后, 使用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 用 PBS 清洗 3 次; 用 1% 曲拉通 X-100 渗透 15 min, 再次用 PBS 洗涤 3 次; 用 3% 牛血清蛋白封闭 1 h, 用 PBS 清洗 3 次; 加入 CD31 一抗 (1 : 100 稀释) 过夜孵育, 用 PBS 洗涤 3 次; 加入用山羊抗兔二抗 (1 : 500 稀释) 避光孵育 2 h, 用 PBS 洗涤 3 次; 加入 DAPI 工作液进行核染色 10 min, 用 PBS 洗涤 3 次; 置于共聚焦显微镜下观察荧光情况, 使用 Image J 软件分析荧光染色吸光度值。

1.4.7 介孔生物活性玻璃体外促成骨性能评价

实验分组: 将小鼠骨髓间充质干细胞以 5×10^4 / 孔的密度接种于 24 孔板中, 对照组加入 2 mL 完全培养基, 介孔生物活性玻璃组、含铜介孔生物活性玻璃组分别加入 2 mL 介孔生物活性玻璃浸提液或含铜介孔生物活性玻璃浸提液。用于茜素红染色时, 培养基与材料浸提液中均添加成骨诱导液 (50 ng/mL 抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、10 nmol/L 地塞米松); 用于碱性磷酸酶染色时, 培养基与材料浸提液中不添加成骨诱导液。

茜素红染色和定量分析: 培养 14 d 后, 用 40 g/L 多聚甲醛溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 30 min, 每孔加入 200 μL 茜素红染色 5 min, 用去离子水冲洗茜素红染液, 置于显微镜观察染色情况。对于茜素红染色定量分析, 加入 500 μL 10% 氯化十六烷基吡啶 30 min, 样品完全溶解后测定 562 nm 处的吸光度值。

碱性磷酸酶染色和定量分析: 培养 14 d 后, 用 40 g/L 多聚甲醛溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 30 min, 每孔加入 200 μL 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸 / 硝基蓝四唑染色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 置于激光共聚焦显微镜在视野中观察染色情况。使用裂解液裂解细胞, 将裂解的细胞溶液 8 000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 检测细胞内的碱性磷酸酶值和二喹啉甲酸总蛋白浓度, 最后通过公式计算得到各组样品的碱性磷酸酶定量结果。碱性磷酸酶活性定量结果 = 碱性磷酸酶活性检测结果 \div (总蛋白浓度 \times 碱性磷酸酶活性检测孵育时间)。

1.5 主要观察指标 介孔生物活性玻璃纳米颗粒和含铜介孔生物活性玻璃的表征结果、生物相容性及体外促血管形成、成骨性能。

1.6 统计学分析 实验数据采用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析和 Tukey 多重比较检验确定组间差异, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经江西省人民医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 介孔生物活性玻璃材料学表征结果 扫描电镜下可见介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃粉体均为紧密堆积的纳米球形颗粒, 无明显差别, 二者粒径为 75 μm 左右, 粒径分布在 50–100 μm 范围内, 见图 1A, B; 透射电镜下可见介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃的介孔孔道清晰可辨, 排列高度有序, 孔道均匀一致, 并且介孔生物活性玻璃中铜离子的掺杂对介孔的影响并不明显, 见图 1C, D。氮气吸附-脱附实验等温线计算介孔生物活性玻璃的比表面积为 289.79 m^2/g , 含铜介孔生物活性玻璃的比表面积为 307.65 m^2/g 。能谱仪检测结果显示含铜介孔生物活性玻璃粉末中成功加入铜元素, 见图 1E。X 射线衍射分析结果显示, 介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃均无明显结晶衍射峰, 见图 1F。

2.2 介孔生物活性玻璃离子释放性能检测结果 实验结果显示, 含铜介孔生物活性玻璃中铜离子的释放具有持续性, 铜离子浓度表现出逐步上升的趋势 (图 2A)。与此同时, 随着时间的延长, 含铜介孔生物活性玻璃中钙离子的释放量持续增大, 在 5 d 时趋于平缓 (图 2B)。

2.3 介孔生物活性玻璃的生物相容性评估结果 激光共聚焦显微镜下活死染色图像显示, 随着培养时间的延长, 3 组细胞逐渐增多, 培养第 1 天, 3 组细胞均存活, 未见红色的死细胞; 培养 3 d 后, 3 组细胞均存活, 仍未见红色的死细胞, 含铜介孔生物活性玻璃组细胞数量多于其他两组; 培养第 7 天, 3 组仍未见红色的死细胞, 均为绿色的活细胞, 含铜介孔生物活性玻璃组细胞数量多于其他

两组, 见图 3A。

CCK-8 实验结果显示, 随着培养时间的延长, 3 组细胞数量增多, 培养 3, 7 d 时, 含铜介孔生物活性玻璃组细胞数多于介孔生物活性玻璃组 ($P < 0.001$), 介孔生物活性玻璃组细胞数多于对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 见图 3B。

以上结果提示, 介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃均具有良好的生物相容性。

2.4 介孔生物活性玻璃促人脐静脉内皮细胞血管生成实验结果 Transwell 细胞迁移实验结晶紫染色定性图像显示, 含铜介孔生物活性玻璃组染色面积最大, 介孔生物活性玻璃组次之, 但仍高于对照组 (图 4A)。定性分析结果显示, 含铜介孔生物活性玻璃组募集到的人脐静脉内皮细胞数目最多, 显著性高于介孔生物活性玻璃组 (图 4B)。

为了进一步评估介孔生物活性玻璃对人脐静脉内皮细胞迁移能力的影响, 进行了划痕实验, 结果显示: 含铜介孔生物活性玻璃组划痕闭合程度显著高于对照组和介孔生物活性玻璃组, 见图 4C, D。

为了评估各组材料对人脐静脉内皮细胞促血管生成方面的潜力, 进行了 CD31 免疫荧光染色实验。CD31 是内皮细胞的特异性标志物, 通过 CD31 免疫荧光染色可以直观地观察内皮细胞的分布和形态。免疫荧光染色结果显示, 对照组人脐静脉内皮细胞 CD31 阳性染色较为稀疏, 荧光信号强度较低, 表明在没有生物材料干预的情况下, 内皮细胞的血管生成活性较低; 与对照组和介孔生物活性玻璃组对比, 含铜介孔生物活性玻璃组人脐静脉内皮细胞 CD31 阳性染色最为显著, 荧光信号强度最高, CD31 阳性细胞数量最多, 见图 5, 表明含铜介孔生物活性玻璃在促进内皮细胞血管生成方面具有显著优势。

2.5 介孔生物活性玻璃促小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化实验结果 培养 14 d 后茜素红染色图像显示, 3 组均出现钙沉积, 与对照组和介孔生物活性玻璃组相比, 含铜介孔生物活性玻璃组钙结节染色数量最多, 茜素红染色面积最大、最深 (图 6A)。茜素红染色定量分析表现出与定性分析相同的趋势 (图 6B)。

培养 14 d 后碱性磷酸酶染色图像显示, 含铜介孔生物活性玻璃组碱性磷酸酶染色较对照组、介孔生物活性玻璃组明显增强, 介孔生物活性玻璃组碱性磷酸酶染色强于对照组 (图 6C)。碱性磷酸酶染色定量分析表现出与定性分析相同的趋势 (图 6D)。

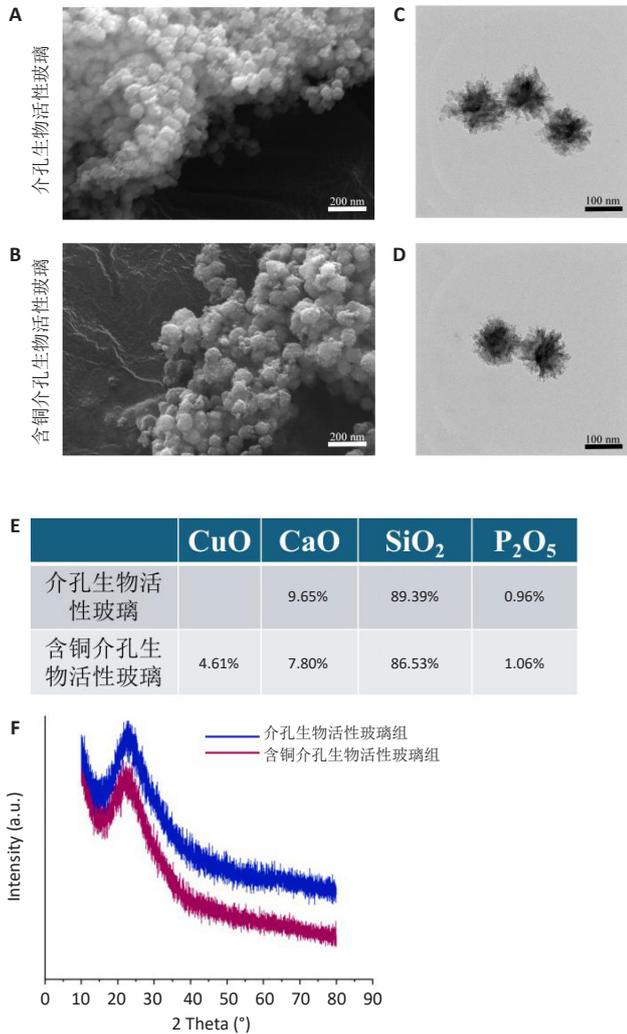
3 讨论 Discussion

在当前的骨组织工程研究领域中, 如何进一步提升骨替代物的修复能力是一个引人瞩目的研究焦点。介孔生物活性玻璃因优异的生物相容性、骨诱导活性在骨修复

方面具有巨大的应用潜力^[32], 而将治疗性离子以氧化物的形态巧妙地融入介孔生物活性玻璃颗粒中已经成为介孔生物活性玻璃改性中较为成熟的技术。将不同的离子纳入 $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ 系统中可以赋予材料血管生成、抗菌、抗炎及促成骨的特性^[33], 为未来的骨修复治疗开辟更为广阔的前景。

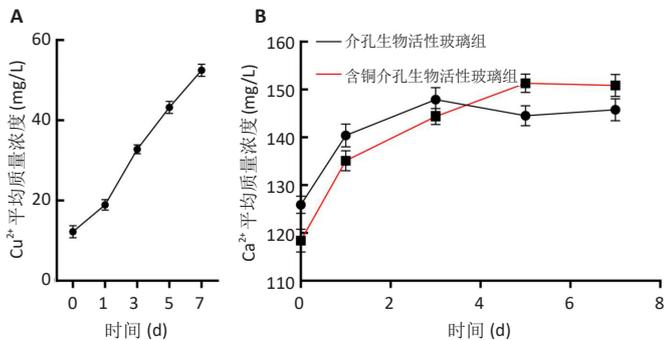
此次实验采用微乳液辅助溶胶-凝胶法成功制备了含铜介孔生物活性玻璃, 并进行了全面的表征和生物相容性评价, 探索了其在体外对血管形成和骨再生的影响。微乳液辅助溶胶-凝胶法是一种简单、有效的纳米材料合成方法, 该方法的优势在于能够实现材料形貌、结构和功能的精确控制, 在制备介孔材料方面具有广泛的应用前景, 尤其是在生物医学领域^[34]。铜元素以 CuO 的形式被引入到介孔生物活性玻璃中, 取代了介孔生物活性玻璃结构中的部分钙元素, 扫描电镜和透射电镜图像显示, 介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃展现出一种紧密堆积的纳米球形颗粒形态, 而它们内部的介孔结构则呈现出井然有序、均匀分布的孔道排列, 说明 Cu^{2+} 的掺入既没有改变材料的形貌, 也没有改变介孔结构, 这与 HAN 等^[35]的研究相符。这种有序介孔结构的形成主要是由纳米范围内胶束的规则堆积 (自组装) 以及有机-无机物质的均匀分布所致^[31, 36]。对于介孔生物活性玻璃而言, 较高的比表面积有利于生物流体与玻璃表面进行更好的相互作用, 从而增加了周围介质中治疗离子的溶出^[37-39]。从能谱仪分析结果可以看到 Cu^{2+} 被成功引入到介孔生物活性玻璃中, 但从元素相对含量来看, 在介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃合成过程中, 实际合成的组分比例与预期存在细微差异, 这种差异可能源于合成初期的溶剂挥发自组装阶段, 此时混合溶液中的离子可能因团聚和相分离而导致分布不均。除此之外, 虽然能谱仪的扫描技术可以对各组样品进行元素原子数量分析, 但此技术仅为半定量检测, 精度有限, 因此所得结果可能存在一定偏差^[40]。

铜作为人体内的微量元素具有促血管生成的作用^[41]。已有研究证实, 含铜介孔生物活性玻璃中的 Cu^{2+} 通过激活缺氧诱导因子 1α 信号通路促进血管生成因子表达, 从而促进人脐静脉内皮细胞的生长、迁移^[26, 42]。ALASVAND 等^[43]通过结合 3D 打印和静电纺丝技术成功制备了含铜生物活性玻璃的组织工程小直径血管移植物, 体内血管生成分析、苏木精-伊红染色和 CD31 免疫荧光染色结果显示, 含铜血管移植物在植入后均可促进新血管的形成。此次实验结果显示, 与介孔生物活性玻璃相比, 含铜介孔生物活性玻璃具有更强的血管生成能力, 类似的结果在 HAN 团队^[35]的研究中得到证实。血管生成和成骨之间



图注：图 A, B 分别为介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃的扫描电镜图像，均为紧密堆积的纳米球形颗粒，无明显差别，比例尺 = 200 nm；C, D 分别为介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃的透射电镜图像，介孔孔道清晰可辨，排列高度有序，比例尺 = 100 nm；E 为能谱仪分析结果，显示铜元素被成功加入介孔生物活性玻璃中；F 为 X 射线衍射分析结果，显示含铜介孔生物活性玻璃铜掺杂后未形成结晶。

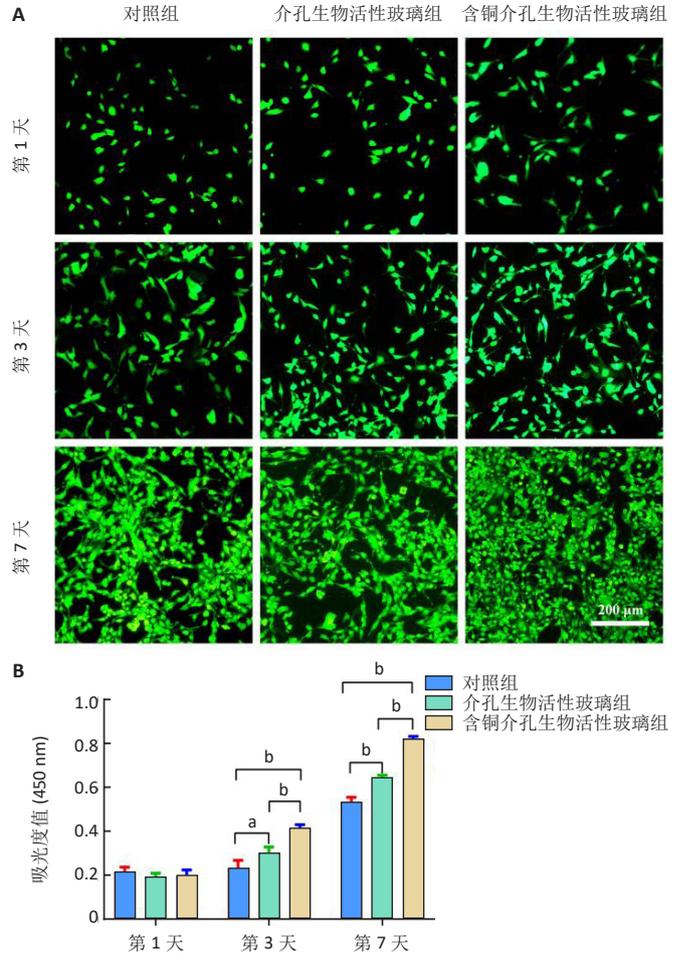
图 1 | 介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃的材料学表征
Figure 1 | Material characterization of mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles



图注：图 A 为含铜介孔生物活性玻璃中铜离子的释放，具有持续性，呈现浓度逐步上升的趋势；B 为介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃中钙离子逐步释放，5 d 时趋于平稳。

图 2 | 介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃在模拟体液中浸泡后的离子释放

Figure 2 | Ion release of mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass after immersion in simulated body fluid

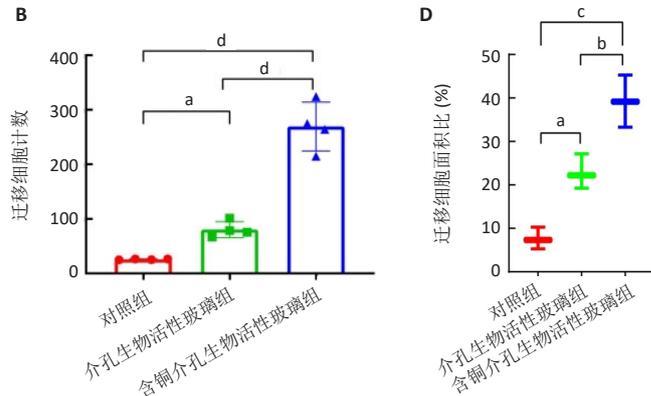
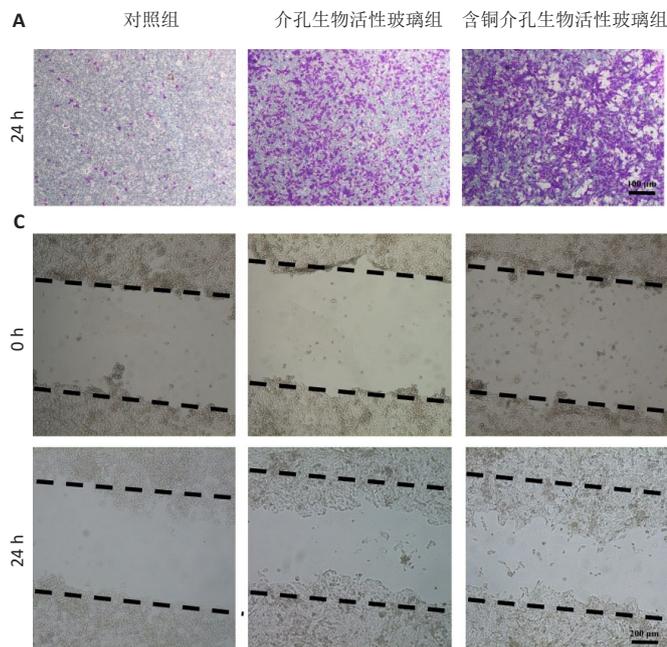


图注：图 A 为各组 L929 细胞培养不同时间点的活 / 死染色图像，均未见明显的死细胞，比例尺 = 200 μm；B 为各组 L929 细胞 CCK-8 实验检测结果，^a*P* < 0.01, ^b*P* < 0.001。

图 3 | 介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃的生物相容性
Figure 3 | Biocompatibility of mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass

的关系已经得到了很好证实^[44-46]，血管不仅是营养扩散、细胞增殖和新骨组织生长的营养输送器官，而且在调节参与骨再生的细胞和信号分子方面发挥着关键作用^[18-19]，因此，铜的促血管生成作用是其促骨生成的重要因素之一。

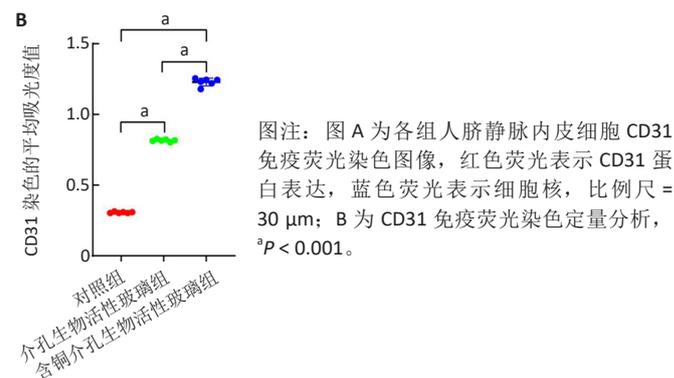
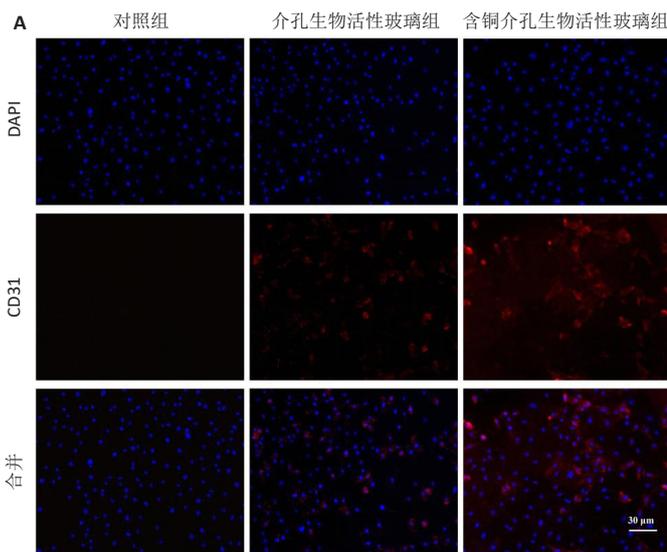
关于铜的促骨生成作用，许多研究表明，铜通过增强成骨相关基因表达和增强细胞外基质矿化来促进成骨分化^[47-49]。FIEHN 及其研究团队^[50]研究显示，与未掺杂铜的生物活性玻璃相比，铜掺杂的生物活性玻璃对骨髓间充质干细胞晚期成骨分化具有明显的促进作用，表现为骨钙素在 mRNA 水平、骨桥蛋白在蛋白水平升高。QIU 等^[49]的研究显示，与未经处理的硅藻相比，负载铜的硅藻促进牙周膜干细胞中碱性磷酸酶、RunX 相关转录因子 2、骨钙素和骨桥蛋白等成骨相关因子的表达；此外，还表现出更好的碱性磷酸酶活性和更多的茜素红染色暗红色矿化结节。研究表明，铜离子可通过经典的 Wnt 信号通路影响间充质干细胞的成骨分化以及破骨细胞的骨吸收，从而促进骨整合，在维持骨稳态中发挥重要作用^[51]。Wnt



图注：图 A 为 Transwell 小室实验中人脐静脉内皮细胞结晶紫染色定性图像，比例尺 =100 μm；B 为结晶紫染色定量分析结果；C 为划痕实验中人脐静脉内皮细胞迁移定性图像，比例尺 =200 μm；D 为划痕实验中人脐静脉内皮细胞迁移面积定量分析结果。^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001, ^d*P* < 0.000 1。

图 4 | 介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃对人脐静脉内皮细胞迁移的影响

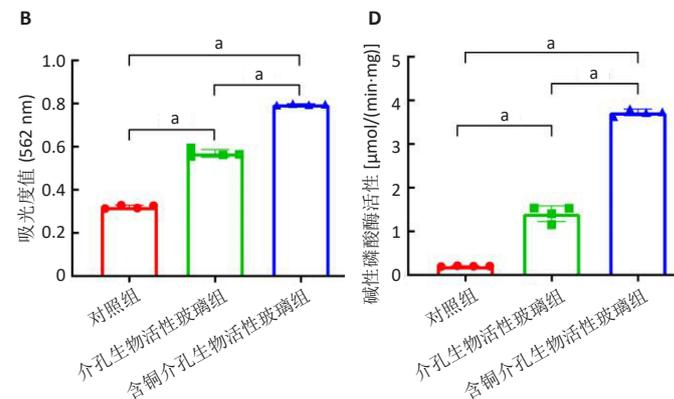
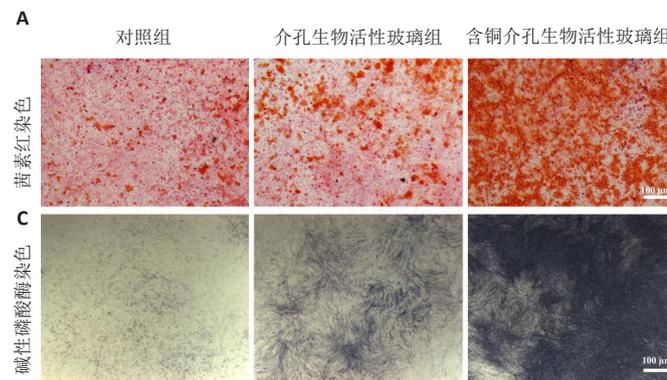
Figure 4 | Effects of mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass on the migration of human umbilical vein endothelial cells



图注：图 A 为各组人脐静脉内皮细胞 CD31 免疫荧光染色图像，红色荧光表示 CD31 蛋白表达，蓝色荧光表示细胞核，比例尺 = 30 μm；B 为 CD31 免疫荧光染色定量分析，^a*P* < 0.001。

图 5 | 介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃对人脐静脉内皮细胞 CD31 蛋白表达的影响

Figure 5 | Effects of mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass on the expression of CD31 protein in human umbilical vein endothelial cells



图注：图 A, B 分别为茜素红染色的定性与定量分析，含铜介孔生物活性玻璃组矿化程度最高，成骨分化最明显，比例尺 =100 μm；C, D 分别为碱性磷酸酶染色的定性、定量分析，含铜介孔生物活性玻璃组碱性磷酸酶活性最高，成骨分化最明显，比例尺 =100 μm。^a*P* < 0.000 1。

图 6 | 介孔生物活性玻璃与含铜介孔生物活性玻璃对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

Figure 6 | Effects of mesoporous bioactive glass and copper-doped mesoporous bioactive glass on osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells

信号通路下游的 c-Myc、蛋白激酶 B 等蛋白的表达可以上调缺氧诱导因子 1 α 的表达,促进血管生成^[52],而缺氧诱导因子 1 α 信号通路的激活可以促进干细胞向成骨方向分化,通过与基因启动子区 HRE 等转录启动子结合促进成骨相关基因的表达^[53]。

值得注意的是, CCK-8 实验结果提示铜具有促进细胞增殖的作用,可能的原因是铜促进成血管相关生长因子的表达,通过旁分泌和外泌体的合成来促进细胞间通讯,从而促进细胞增殖。铜离子还可以模拟低氧微环境诱导细胞的自噬来提升细胞代谢水平,从而促进细胞增殖。此次实验活死染色和 CCK-8 检测结果均提示, 3 组细胞数都随着培养时间的延长而增多,其中含铜介孔生物活性玻璃组细胞数量最多,提示含铜介孔生物活性玻璃具有良好的生物相容性。

此次研究的创新点在于将铜离子引入介孔生物活性玻璃结构中,成功制备出一种含有无机生长因子的生物活性成血管成骨材料,相较于传统依赖生长因子促进血管生成的方法,此次研究利用铜离子的稳定性高、成本低和安全性高等优势,制备了更具有临床应用前景的生物材料。此次研究采用了多种先进实验手段,全面系统地评估了材料的结构特征、表面形貌、生物相容性及促血管生成、成骨分化方面的性能,结果表明含铜介孔生物活性玻璃在体外表现出良好的生物相容性和优异的促血管形成及成骨分化能力,为骨缺损治疗提供了一种更为高效、安全且具备广泛应用潜力的新策略,展示了在临床转化中的良好前景。

综上所述,实验成功合成了介孔生物活性玻璃和含铜介孔生物活性玻璃,并对其形貌、结构、生物相容性、促成血管及成骨分化性能进行了全面评价,结果表明含铜介孔生物活性玻璃纳米颗粒具有良好的生物相容性并具有促血管生成、骨再生潜力,为其在骨修复领域的应用提供了重要的理论基础。

作者贡献: 曾玉负责实验设计,曾玉、谢成伟进行实验实施,苏盛辉进行实验评估,洪苑琪进行资料收集,董谢平、苏盛辉负责审核,所有作者均参与撰写与修改文章。

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: 该文章撰写遵守了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] HENCH LL, THOMPSON I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J R Soc Interface*. 2010;7 Suppl 4(Suppl 4):S379-391.
- [2] ALDHAHER A, SHAHABIPOUR F, SHAITO A, et al. 3D hydrogel/bioactive glass scaffolds in bone tissue engineering: Status and future opportunities. *Heliyon*. 2023;9(7):e17050.
- [3] LI W, WU Y, ZHANG X, et al. Self-healing hydrogels for bone defect repair. *RSC Adv*. 2023;13(25):16773-16788.
- [4] ABODUNRIN OD, EL MABROUK K, BRICHA M. A review on borate bioactive glasses (BBG): effect of doping elements, degradation, and applications. *J Mater Chem B*. 2023;11(5):955-973.
- [5] O'KEEFE RJ, MAO J. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic--an overview. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17(6):389-392.
- [6] KOUSHIK TM, MILLER CM, ANTUNES E. Bone Tissue Engineering Scaffolds: Function of Multi-Material Hierarchically Structured Scaffolds. *Adv Healthc Mater*. 2023;12(9):e2202766.
- [7] HENG BC, BAI Y, LI X, et al. Electroactive Biomaterials for Facilitating Bone Defect Repair under Pathological Conditions. *Adv Sci (Weihn)*. 2023;10(2):e2204502.
- [8] BARRETO MEV, MEDEIROS RP, SHEARER A, et al. Gelatin and Bioactive Glass Composites for Tissue Engineering: A Review. *J Funct Biomater*. 2022;14(1):23.
- [9] ERIKSSON E, BJÖRKENHEIM R, STRÖMBERG G, et al. S53P4 bioactive glass scaffolds induce BMP expression and integrative bone formation in a critical-sized diaphysis defect treated with a single-staged induced membrane technique. *Acta Biomater*. 2021;126:463-476.
- [10] HE L, YIN J, GAO X. Additive Manufacturing of Bioactive Glass and Its Polymer Composites as Bone Tissue Engineering Scaffolds: A Review. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(6):672.
- [11] BIGHETTI-TREVISAN RL, SOUZA ATP, TOSIN IW, et al. Bioactive glass-ceramic for bone tissue engineering: an in vitro and in vivo study focusing on osteoclasts. *Braz Oral Res*. 2022;36:e022.
- [12] VALLET-REGÍ M. Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. *J Intern Med*. 2010;267(1):22-43.
- [13] YAN X, YU C, ZHOU X, et al. Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004;43(44):5980-5984.
- [14] YAN X, HUANG X, YU C, et al. The in-vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses. *Biomaterials*. 2006;27(18):3396-3403.
- [15] VALLET-REGÍ M, COLILLA M, IZQUIERDO-BARBA I, et al. Achievements in Mesoporous Bioactive Glasses for Biomedical Applications. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2636.
- [16] MENGER MM, LASCHKE MW, NUSSLER AK, et al. The vascularization paradox of non-union formation. *Angiogenesis*. 2022;25(3):279-290.
- [17] FANG TD, SALIM A, XIA W, et al. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res*. 2005;20(7):1114-1124.
- [18] HUANG J, HAN Q, CAI M, et al. Effect of Angiogenesis in Bone Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng*. 2022;50(8):898-913.
- [19] XU Z, KUSUMBE AP, CAI H, et al. Type H blood vessels in coupling angiogenesis-osteogenesis and its application in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2023;111(7):1434-1446.
- [20] CHEN L, LIU J, GUAN M, et al. Growth Factor and Its Polymer Scaffold-Based Delivery System for Cartilage Tissue Engineering. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6097-6111.

- [21] XU HL, YU WZ, LU CT, et al. Delivery of growth factor-based therapeutics in vascular diseases: Challenges and strategies. *Biotechnol J*. 2017;12(5):1600243.
- [22] KARGOZAR S, MONTAZERIAN M, HAMZEHLU S, et al. Mesoporous bioactive glasses: Promising platforms for antibacterial strategies. *Acta Biomater*. 2018;81:1-19.
- [23] JANA S, DATTA P, DAS H, et al. Copper and cobalt doped bioactive glass-fish dermal collagen electrospun mat triggers key events of diabetic wound healing in full-thickness skin defect model. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2022;134:105414.
- [24] LI Y, LUO W, LIU Y, et al. Copper-containing titanium alloys promote the coupling of osteogenesis and angiogenesis by releasing copper ions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;681:157-164.
- [25] LI S, ZHANG L, LIU C, et al. Spontaneous immunomodulation and regulation of angiogenesis and osteogenesis by Sr/Cu-borosilicate glass (BSG) bone cement to repair critical bone defects. *Bioact Mater*. 2023;23:101-117.
- [26] ZHAO Q, NI Y, WEI H, et al. Ion incorporation into bone grafting materials. *Periodontol 2000*. 2024;94(1):213-230.
- [27] SALVO J, SANDOVAL C. Role of copper nanoparticles in wound healing for chronic wounds: literature review. *Burns Trauma*. 2022;10:tkab047.
- [28] VERGNAUD F, MEKONNEN B, EL ABBASSI A, et al. Correlating the Effect of Composition and Textural Properties on Bioactivity for Pristine and Copper-Doped Binary Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles. *Materials (Basel)*. 2023;16(20):6690.
- [29] HOSSEINI M, HASSANI BESHELI N, DENG D, et al. Facile post modification synthesis of copper-doped mesoporous bioactive glass with high antibacterial performance to fight bone infection. *Biomater Adv*. 2023;144:213198.
- [30] WESTHAUSER F, WILKESMANN S, NAWAZ Q, et al. Effect of manganese, zinc, and copper on the biological and osteogenic properties of mesoporous bioactive glass nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*. 2021;109(8):1457-1467.
- [31] ANAND A, SENGUPTA S, KAŇKOVÁ H, et al. Influence of Copper-Strontium Co-Doping on Bioactivity, Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Mesoporous Bioactive Glass. *Gels*. 2022;8(11):743.
- [32] ZHANG Y, ZHANG W, ZHANG X, et al. Erbium-ytterbium containing upconversion mesoporous bioactive glass microspheres for tissue engineering: luminescence monitoring of biomineralization and drug release. *Acta Biomater*. 2023;168:628-636.
- [33] JIMÉNEZ-HOLGUÍN J, ARCOS D, LOZANO D, et al. In Vitro and In Vivo Response of Zinc-Containing Mesoporous Bioactive Glasses in a Sheep Animal Model. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22):13918.
- [34] ZARKOV A. Sol-Gel Technology Applied to Materials Science: Synthesis, Characterization and Applications. *Materials (Basel)*. 2024;17(2):462.
- [35] HAN J, HASSANI BESHELI N, DENG D, et al. Tailoring Copper-Doped Bioactive Glass/Chitosan Coatings with Angiogenic and Antibacterial Properties. *Tissue Eng Part C Methods*. 2022;28(7):314-324.
- [36] SANCHEZ C, BOISSIÈRE C, GROSSO D, et al. Design, Synthesis, and Properties of Inorganic and Hybrid Thin Films Having Periodically Organized Nanoporosity. *Chem Mater*. 2008;20(3):682-737.
- [37] DESHMUKH K, KOVÁŘÍK T, KŘENEK T, et al. Recent advances and future perspectives of sol-gel derived porous bioactive glasses: a review. *RSC Adv*. 2020;10(56):33782-33835.
- [38] ZHU Y, WU C, RAMASWAMY Y, et al. Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering. *Microporous Mesoporous Mater*. 2008;112(1-3):494-503.
- [39] ZHENG K, BIDER F, MONAVARI M, et al. Sol-gel derived B(2)O(3)-CaO borate bioactive glasses with hemostatic, antibacterial and pro-angiogenic activities. *Regen Biomater*. 2024;11:rbad105.
- [40] JONES JR, EHRENFRIED LM, HENCH LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(7):964-973.
- [41] SHEN Q, QI Y, KONG Y, et al. Advances in Copper-Based Biomaterials With Antibacterial and Osteogenic Properties for Bone Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:795425.
- [42] ZHANG Z, XUE H, XIONG Y, et al. Copper incorporated biomaterial-based technologies for multifunctional wound repair. *Theranostics*. 2024;14(2):547-570.
- [43] ALASVAND N, BEHNAMGHADER A, MILAN PB, et al. Tissue-engineered small-diameter vascular grafts containing novel copper-doped bioactive glass biomaterials to promote angiogenic activity and endothelial regeneration. *Mater Today Bio*. 2023;20:100647.
- [44] KANZLER JM, OREFFO RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008;15:100-114.
- [45] TAO J, MIAO R, LIU G, et al. Spatiotemporal correlation between HIF-1 α and bone regeneration. *FASEB J*. 2022;36(10):e22520.
- [46] VAN BRAKEL F, ZHAO Y, VAN DER EERDEN BCJ. Fueling recovery: The importance of energy coupling between angiogenesis and osteogenesis during fracture healing. *Bone Rep*. 2024;21:101757.
- [47] YANG Y, LI M, LUO H, et al. Surface-Decorated Graphene Oxide Sheets with Copper Nanoderivatives for Bone Regeneration: An In Vitro and In Vivo Study Regarding Molecular Mechanisms, Osteogenesis, and Anti-infection Potential. *ACS Infect Dis*. 2022;8(3):499-515.
- [48] KARKEHABADI H, RAHMATI A, ABBASI R, et al. Effect of copper oxide nanoparticles and light-emitting diode irradiation on the cell viability and osteogenic/odontogenic differentiation of human stem cells from the apical papilla. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):249.
- [49] QIU X, FENG C, WANG W, et al. Copper-deposited diatom-biosilica enhanced osteogenic potential in periodontal ligament stem cells and rat cranium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2023;111(6):1286-1298.
- [50] FIEHN LA, KUNISCH E, SAUR M, et al. A comparative in vitro and in vivo analysis of the impact of copper substitution on the cytocompatibility, osteogenic, and angiogenic properties of a borosilicate bioactive glass. *J Biomed Mater Res A*. 2024;112(10):1740-1759.
- [51] LIU J, XIAO Q, XIAO J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):3.
- [52] TAN Z, ZHOU B, ZHENG J, et al. Lithium and Copper Induce the Osteogenesis-Angiogenesis Coupling of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Crosstalk between Canonical Wnt and HIF-1 α Signaling Pathways. *Stem Cells Int*. 2021;2021:6662164.
- [53] ZHANG Y, HAO Z, WANG P, et al. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture. *Cell Prolif*. 2019;52(2):e12570.

(责任编辑: LWJ, GW, ZN, QY)