

负载柚皮苷壳聚糖/ β -磷酸三钙支架的表征及生物学性能

袁茜, 张昊, 庞杰

<https://doi.org/10.12307/2025.583>

投稿日期: 2024-09-19

采用日期: 2024-11-14

修回日期: 2025-01-12

在线日期: 2025-01-23

中图分类号:

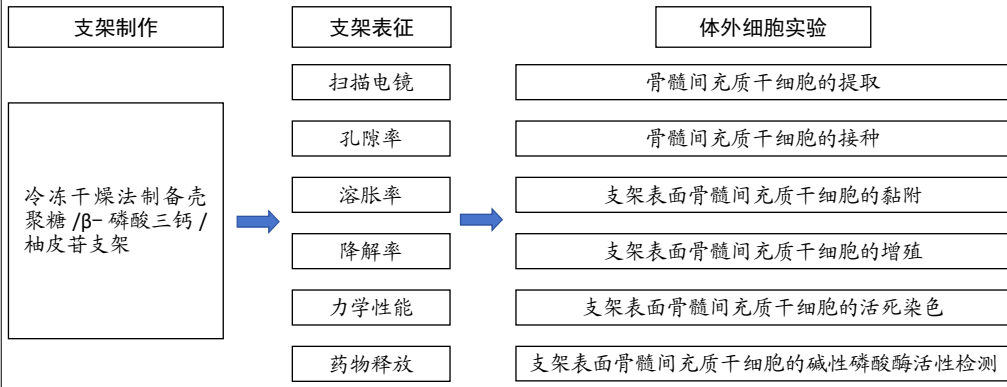
R459.9; R318.08; R-331

文章编号:

2095-4344(2026)02-00424-09

文献标识码: B

文章快速阅读: 制备壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷复合支架



文题释义:

柚皮苷: 是一种天然来源的双氢黄酮类化合物, 主要存在于柑橘类水果的果皮和果肉中, 具有促进骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的能力, 主要用于补肾强骨、治疗骨质疏松及促进骨折愈合。

β -磷酸三钙: 具有良好的生物相容性、降解性及骨传导性, 易被新的骨基质取代, 通过溶解和吸收过程促进成骨, 是一种良好的骨修复材料。

摘要

背景: 柚皮苷具有促进骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的能力, 可用于治疗骨质疏松及促进骨折愈合, 然而其生物利用率低, 临床应用受限。

目的: 制备负载柚皮苷的壳聚糖/ β -磷酸三钙支架, 表征其生物学性能。

方法: 采用冷冻干燥和化学交联法制备壳聚糖/ β -磷酸三钙支架, 将壳聚糖/ β -磷酸三钙支架浸泡于含柚皮苷的无水乙醇溶液中3 h, 真空冷冻干燥后得到壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架, 表征支架的孔径、孔隙率、溶胀率、降解率、机械性能及柚皮苷的体外释放能力。将大鼠骨髓间充质干细胞分别接种于壳聚糖/ β -磷酸三钙支架与壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架表面, 检测细胞增殖、黏附、活性及成骨诱导分化后的碱性磷酸酶活性。

结果与结论: ①扫描电镜下可见壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架具有多孔网状结构, 平均孔径为(106.82±25.22) μ m, 孔隙率为(76.26±4.81)%, 24 h溶胀率为(796.17±31.76)%, 4周时体外降解率为7.71%, 体外可释放柚皮苷长达9 d, 壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架的平均孔径、孔隙率、24 h溶胀率、4周时体外降解率、压缩强度、压缩模量与壳聚糖/ β -磷酸三钙支架比较差异均无显著性意义($P > 0.05$);

②大鼠骨髓间充质干细胞在两种支架表面黏附良好, 并具有良好的活性, 相较于壳聚糖/ β -磷酸三钙支架, 壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架可促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖($P < 0.05$), 提高成骨诱导分化后的骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶活性($P < 0.05$); ③结果表明, 壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架具有良好的物理性能, 可促进骨髓间充质干细胞的增殖及成骨分化。

关键词: 柚皮苷; 壳聚糖; β -磷酸三钙; 支架; 骨缺损修复; 骨组织工程; 工程化骨材料

Characterization and biological properties of naringin-loaded chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffold

Yuan Qian, Zhang Hao, Pang Jie

Department of Stomatology, Shiyan Renmin Hospital (Affiliated Renmin Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China
Yuan Qian, Master candidate, Physician, Department of Stomatology, Shiyan Renmin Hospital (Affiliated Renmin Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China

Corresponding author: Pang Jie, MS, Chief physician, Department of Stomatology, Shiyan Renmin Hospital (Affiliated Renmin Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China

十堰市人民医院(湖北医药学院附属人民医院)口腔科, 湖北省十堰市 442000

第一作者: 袁茜, 女, 1999年生, 湖北省随州市人, 汉族, 在读硕士, 医师, 主要从事口腔修复学研究。

通讯作者: 庞杰, 医学硕士, 主任医师, 十堰市人民医院(湖北医药学院附属人民医院)口腔科, 湖北省十堰市 442000

<https://orcid.org/0009-0007-4675-291X> (袁茜)

基金资助: 湖北医药学院研究生科技创新项目(YC2023058), 项目负责人: 庞杰

引用本文: 袁茜, 张昊, 庞杰. 负载柚皮苷壳聚糖/ β -磷酸三钙支架的表征及生物学性能[J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(2):424-432.



Abstract

BACKGROUND: Naringin has been shown to promote the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells, making it a potential candidate for treating osteoporosis and enhancing fracture healing. However, its clinical application is limited by its low bioavailability.

OBJECTIVE: To prepare chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffolds loaded with naringin and characterize their biological properties.

METHODS: Chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffolds were prepared by freeze-drying and chemical crosslinking. The chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffolds were immersed in anhydrous ethanol solution containing naringin for 3 hours. After vacuum cold drying, chitosan/ β -tricalcium phosphate/naringin scaffolds were obtained. The pore size, porosity, swelling rate, degradation rate, mechanical properties, and *in vitro* release capacity of naringin of the scaffolds were characterized. Rat bone marrow mesenchymal stem cells were inoculated on the surface of chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffolds and chitosan/ β -tricalcium phosphate/naringin scaffolds, respectively, and cell proliferation, adhesion, activity and alkaline phosphatase activity after osteogenic differentiation were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The results of scanning electron microscopy showed that the naringin-chitosan/ β -tricalcium phosphate composite scaffold had a porous mesh structure. The average pore diameter was $(106.82 \pm 25.22) \mu\text{m}$; the porosity was $(76.26 \pm 4.81)\%$; 24-hour swelling rate was $(796.17 \pm 31.76)\%$; *in vitro* degradation rate of 7.71% at 4 weeks, and naringin could be slowly released *in vitro* for 9 days. There was no significant difference in the average pore size, porosity, 24-hour swelling rate, *in vitro* degradation rate, compression strength and compression modulus at 4 weeks between the chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffold and the chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffold ($P > 0.05$). (2) Rat bone marrow mesenchymal stem cells adhered well to the surfaces of the two scaffolds and had good activity. Compared with the chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffold, the chitosan/ β -tricalcium phosphate/naringin scaffold promoted the proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells ($P < 0.05$), and increased the alkaline phosphatase activity of bone marrow mesenchymal stem cells after osteogenic differentiation ($P < 0.05$). (3) The results show that the chitosan/ β -tricalcium phosphate/naringin scaffolds exhibit favorable physical properties and can effectively promote the adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Key words: naringin; chitosan; β -tricalcium phosphate; scaffold; bone defect repair; bone tissue engineering; engineered bone materials

Funding: Graduate Science and Technology Innovation Project of Hubei University of Medicine, No. YC2023058 (to PJ)

How to cite this article: YUAN Q, ZHANG H, PANG J. Characterization and biological properties of naringin-loaded chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffold. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2026;30(2):424-432.

0 引言 Introduction

创伤、骨肿瘤、骨髓炎、骨坏死等原因均可引起不同程度的骨缺损^[1-2]，小范围的骨缺损常可以自愈，而较大范围缺损（如临界骨缺损）则无法实现自我修复，进而影响患者的心理及生理功能^[3]，因此，骨缺损的修复与重建一直是临床研究的重点。自体骨移植被认为是骨缺损修复的金标准^[4-5]，但会给患者带来额外的手术创伤，增加感染风险，并且骨组织来源有限，限制了其应用^[6]。在此背景下，骨组织工程逐渐成为骨缺损修复重建的研究热点。

骨组织工程包括种子细胞、支架载体、生长因子^[7]。骨髓间充质干细胞具有较高的增殖能力和多向分化潜能，成骨分化能力优良，作为种子细胞被广泛应用于骨组织工程^[8]。多孔支架用于骨缺损区可以为新骨的形成提供空间，便于血管长入，有利于气体交换^[9-10]。在支架材料中，天然聚合物具有良好的生物相容性、可降解性等优点，有较高的研究前景^[11-12]。壳聚糖来源于甲壳类动物的壳，与细胞外基质结构相似，能够促进细胞的黏附与增殖，具有亲水表面、生物降解性和无毒性，成为一种理想的生物材料^[13-14]，但机械性能不足限制了壳聚糖的应用。交联剂可以改善生物聚合物的机械性能、孔隙率及降解性等^[15-17]。京尼平作为一种天然来源的交联剂，具有很低的细胞毒性^[18]，与壳聚糖交联可以提高支架的机械性能，进而提高支架的稳定性^[19-20]。然而，单纯的壳聚糖支架不足以模拟天然的细胞外基质环境。

磷酸钙基生物陶瓷具有与骨组织相同的化学成分，被广泛用作骨替代材料^[21-22]。 β -磷酸三钙是目前研究最多的磷酸钙之一，具有良好的骨传导性和生物相容性，相较于羟基磷灰

石具有更快的降解速率和高吸收率，易被新的骨基质取代，能够通过溶解和吸收过程促进成骨^[23-24]。尽管 β -磷酸三钙具有较高的机械强度，但脆性大且缺乏弹性^[25]，难以单独作为支架材料使用。将 β -磷酸三钙与壳聚糖联用既具有足够的机械强度，又能弥补单独材料应用时脆性大的缺点，同时模拟了天然骨组织有机-无机相结合的特点。

生物活性分子是骨组织工程的关键因素之一，可以增强支架材料的功能，促进成骨细胞的聚集和分化。目前最常用的生长因子如骨形态发生蛋白（骨形态发生蛋白2），因高成本和潜在的不良反应限制了其应用^[26-27]。相比之下，一些天然来源的中药物质，因可用性高、生产成本低及优异的生物活性受到越来越多的关注。柚皮苷是一种天然来源的双氢黄酮类化合物，主要存在于柑橘类水果的果皮和果肉中^[28]，具有广泛的生物学效应，包括抗炎、抗氧化、抗癌、抗菌等^[29-32]。近来的研究表明，柚皮苷具有促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖和诱导成骨分化的能力^[33]，可通过多种信号通路对骨骼系统产生积极作用，具有补肾强骨、治疗骨质疏松、促进骨折愈合等功效^[34-35]，目前在骨组织工程领域中具有较高的研究价值。

此次实验制备壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架，表征该支架的物理性能与生物学性能，验证柚皮苷的成骨诱导潜力。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料制备、表征及生物学性能检测，两组间采用独立样本 *t* 检验，多组间采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 9 月至 2024 年 8 月在湖北医药学院附属人民医院口腔研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 试剂与仪器 壳聚糖 (脱乙酰度 $\geq 95\%$, 阿拉丁); β -磷酸三钙 (生物医用级, $\geq 98\%$, 阿拉丁); 柚皮苷 (分析标准品, $\geq 98\%$, 阿拉丁); 京尼平 (分析标准品, $\geq 98\%$, 源叶生物); 溶菌酶 (索莱宝); 大鼠间充质干细胞成脂诱导分化培养试剂盒 (美仑生物, 中国); DMEM/F12 培养液 (GIBCO, 美国); 胎牛血清 (Biological Industries, 以色列); 1% 青霉素-链霉素溶液 (Hyclone, 美国); Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒 (索莱宝, 中国); BCIP/NBT 碱性磷酸酶活性检测试剂盒 (Beyotime, 中国); CCK-8 液 (Beyotime, 中国); 倒置荧光显微镜 (奥林巴斯 IX53+DP73, 阿富汗); 冷冻干燥机 (Labconco, 美国); 酶标仪 (Thermo, 美国); 磁力搅拌器 (安徽中科中佳科学仪器有限公司, 中国); 扫描电子显微镜 (ThermoFisher, 美国); 万能试验机 (深圳三思 UTM5105, 中国); 紫外可见分光光度计 (北京普析 TU-1901, 中国)。

1.3.2 实验动物 10 只雄性 SD 大鼠, 三四周龄, 体质量 80-100 g, 购自湖北医药学院实验动物中心, 合格证号: 8NO.42000900001441, 用于提取骨髓间充质干细胞。实验已通过湖北医药学院伦理委员会批准, 审查批号: 第 2024-实 003 号。

1.4 实验方法

1.4.1 支架制备 称取 1 g 壳聚糖粉末溶解于 49 mL 去离子水中, 得到 20 g/L 壳聚糖溶液; 向壳聚糖溶液中缓慢滴加 1 mL 冰乙酸, 磁力搅拌器搅拌 2 h 至壳聚糖溶液澄清。称取 1 g β -磷酸三钙粉末加入壳聚糖溶液中, 超声波分散后磁力搅拌均匀。称取 5 mg 京尼平粉末溶于 100 μ L 无水乙醇后, 加入壳聚糖与 β -磷酸三钙混合溶液中, 其中壳聚糖与京尼平的质量比为 200 : 1, 搅拌均匀后将混合溶液注入 24 孔板内, 室温下交联 24 h 后移入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 4 h, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻过夜后, 移入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空冷冻干燥机中干燥 24 h, 得到壳聚糖/ β -磷酸三钙支架。

将冻干的壳聚糖/ β -磷酸三钙支架浸泡于 1 mol/L NaOH 中 2 h, 去除多余的酸, 去离子水反复洗涤至支架 pH 值呈中性, 将支架于含饱和柚皮苷的无水乙醇溶液中浸泡 3 h (柚皮苷质量分数为 0.5%)^[33], 捞出后再次置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空冷冻干燥机干燥 24 h, 得到壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架。将支架置于超净工作台紫外照射 8 h 消毒, 真空包装, 常温保存备用。

1.4.2 支架物理性质表征实验

扫描电镜观察: 使用液氮淬断冻干的壳聚糖/ β -磷酸三钙支架、壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架后喷金, 利用扫

描电子显微镜扫描支架内部的结构和形态, 使用 Image J 软件分析样本平均孔径。

支架的孔隙率: 采用比重瓶液体置换法测量壳聚糖/ β -磷酸三钙支架、壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架的孔隙率。将支架的干质量记为 m_0 , 比重瓶装满无水乙醇后的质量记为 m_1 。将支架浸入比重瓶中, 超声振荡 10 min, 待支架完全浸透后加满无水乙醇, 此时瓶内总质量记为 m_2 。将浸满无水乙醇的支架取出, 比重瓶及剩余无水乙醇的质量记为 m_3 。支架孔隙率 $= (m_2 - m_3 - m_0) / (m_1 - m_3) \times 100\%$ 。

支架的溶胀率: 将壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架 (或壳聚糖/ β -磷酸三钙支架) 的干质量记为 m_0 。将支架完全浸入 PBS 中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中 24 h 后取出, 用稍浸湿的滤纸吸去支架表面多余水分后称质量, 记为 m_t 。

支架溶胀率 $= (m_t - m_0) / m_0 \times 100\%$ 。

支架的降解率: 将壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架 (或壳聚糖/ β -磷酸三钙支架) 的干质量记为 m_0 。将支架完全浸入含 10 U/g 溶菌酶的 PBS 中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中, 隔天换液。浸泡在第 1, 2, 3, 4 周分别取出支架, 用去离子水洗涤 3 次以去除杂质, 冷冻干燥后称质量, 记为 m_t 。

支架降解率 $= (m_0 - m_t) / m_0 \times 100\%$ 。

支架的机械性能: 通过万能试验机测试壳聚糖/ β -磷酸三钙支架、壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架的压缩性能。将样品制备为直径 12 mm、高 7 mm 的圆柱体, 以 1 mm/min 的十字头速度进行加压, 每组 3 个样品, 测试压缩强度, 绘制应力-应变曲线。

支架的缓释性能: 首先将柚皮苷溶于无水乙醇中制备 1 mg/mL 柚皮苷溶液, 将溶液分别稀释至 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 μ g/mL, 使用紫外可见分光光度计测量各质量浓度溶液在 282 nm 波长处的吸光度值, 绘制柚皮苷标准曲线。采用 PBS 为释放介质, 将干燥的壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架浸泡于盛有适量 PBS 的离心管中, 置于恒温振荡器中 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 r/min) 恒定摇动, 于设定的时间点取出 1.5 mL PBS (同时补回 1.5 mL 新鲜 PBS), 使用紫外可见分光光度计在 282 nm 波长处测量吸光度值, 根据柚皮苷标准曲线回归方程计算柚皮苷的累计释放率。

1.4.3 大鼠骨髓间充质干细胞培养及鉴定 取 SD 大鼠, 腹腔注射 3% 戊巴比妥 (50 mg/kg) 麻醉后颈椎脱臼法处死, 置于体积分数 75% 乙醇中浸泡 10 min 消毒, 转移至超净工作台, 分离股骨和胫骨, 用含 1% 双抗的无菌 PBS 反复冲洗, 剪去两端的骨骺端, 暴露骨髓腔, 用注射器吸取完全培养基 (含 1% 青霉素-链霉素溶液、体积分数 10% 胎牛血清、89% DMEM/F12) 反复冲洗至骨髓腔发白, 收集培养基于离心管内,

1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 重悬并接种于培养皿中进行培养。待原代细胞融合至 80% 后进行传代, 传至第 3 代时接种至 6 孔板, 细胞密度为 3×10^5 /孔, 培养 24 h 后分别更换为成骨诱导液 (1% 青霉素-链霉素溶液、体积分数 10% 胎牛血清、88% DMEM/F12 培养液、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素 C、 10^{-2} mol/L β -甘油磷酸钠、 10^{-8} mol/L 地塞米松)、成脂诱导液, 培养 21 d 后分别进行茜素红及油红 O 染色, 鉴定干细胞的多向分化潜能。

1.4.4 细胞接种 使用无菌手术刀片将壳聚糖/ β -磷酸三钙支架、壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架切削为厚度 2 mm 的圆片, 使用体积分数 75% 乙醇浸泡 2 h 消毒, 用无菌 PBS 洗涤 3 次。将支架浸泡于完全培养基中于培养箱中预培养过夜, 取出后置于 24 孔板内。将消化下的 P3 代骨髓间充质干细胞悬液缓慢滴加至支架中心, 培养 1 h 后翻转支架, 缓慢加入完全培养基至稍没过支架表面。

1.4.5 支架的生物相容性

细胞黏附: 细胞接种方法同 1.4.4, 细胞密度为 1×10^5 /孔, 每组 5 复孔。接种后第 2 和 8 小时分别取出支架材料, 用 0.25% 胰酶消化孔板内未黏附的细胞并计数, 计算细胞黏附率。

黏附率 = 黏附细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

细胞增殖: 细胞接种方法同 1.4.4, 细胞密度为 2×10^4 /孔, 同时设置单独培养的骨髓间充质干细胞组 (空白对照组), 每组 5 复孔。培养第 1, 3, 7 天时更换含 10% CCK-8 液的完全培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 1.5 h, 将孔板置于摇床上振荡 5 min 使溶液均匀, 每孔各取 100 μL 溶液加入 96 孔板中, 在 450 nm 波长处检测吸光度值。

活死细胞染色: 细胞接种与分组同细胞增殖检测。培养第 1, 3, 7 天时, 使用 Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒进行染色, 在倒置荧光显微镜下观察活细胞和死细胞的分布及细胞形态。

1.4.6 支架的成骨诱导能力 细胞接种方法同 1.4.4, 细胞密度为 2×10^4 /孔, 每组 5 复孔。培养 1 d 后更换成骨诱导液进行成骨诱导, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养, 隔天换液。成骨诱导第 7, 14 天提取蛋白, 使用 BCIP/NBT 碱性磷酸酶活性检测试剂盒检测碱性磷酸酶活性, 同时使用碱性磷酸酶染色试剂盒进行染色, 置于显微镜下观察并拍照。

1.5 主要观察指标 壳聚糖/ β -磷酸三钙支架与壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架的物理性能、生物相容性以及成骨诱导能力。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件对实验数据进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异

有显著性意义。该文统计学方法已经湖北医药学院学校生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 支架大体外观 冷冻干燥后的支架呈淡蓝色、疏松多孔的海绵状圆柱体, 负载柚皮苷后变为淡黄绿色, 表面光滑, 形态规则, 有一定弹性, 见图 1。

2.2 支架扫描电镜观察 扫描电镜下可见复合支架呈现出多孔的网状结构, 孔间相互连通, 孔隙大小均匀, β -磷酸三钙颗粒均匀地镶嵌在壳聚糖网状支架中, 见图 2。壳聚糖/ β -磷酸三钙支架组平均孔径为 $(105.04 \pm 27.28) \mu\text{m}$, 壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架组平均孔径为 $(106.82 \pm 25.22) \mu\text{m}$, 两组间孔径比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 表明柚皮苷的载入并没有改变复合支架的空间结构, 并且两组支架均具有良好的孔径, 可为细胞的增殖及迁移提供良好的空间。

2.3 支架的孔隙率检测结果 壳聚糖/ β -磷酸三钙支架的平均孔隙率为 $(78.77 \pm 4.21)\%$, 壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架的平均孔隙率为 $(76.26 \pm 4.81)\%$, 两组支架孔隙率比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 3A。

2.4 支架的溶胀率检测结果 溶胀率可反映支架材料的亲水性。壳聚糖/ β -磷酸三钙支架的溶胀率为 $(803.09 \pm 28.76)\%$, 壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架的溶胀率为 $(796.17 \pm 31.76)\%$, 两组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 3B。

2.5 支架的降解率检测结果 如图 4 所示, 壳聚糖/ β -磷酸三钙支架和壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架均具有良好的生物可降解性, 在最初 1 周缓慢开始降解, 在 4 周时分别降解 7.67% 和 7.71%, 两组支架缓慢的降解速率足以匹配新骨的形成速率。

2.6 支架的机械性能检测结果 图 5A 所示为两组支架的应力-应变曲线, 在早期阶段具有弹性变形区域, 此时应力随应变线性增加, 当应力达到一定值时支架材料发生塑性形变。壳聚糖/ β -磷酸三钙支架和壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架的压缩强度分别为 14.58, 14.73 MPa, 压缩模量分别为 229.07, 223.99 MPa, 两组支架的压缩强度、压缩模量比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 5B, C。

2.7 支架的缓释性能检测结果 由图 6 可见, 壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架内的柚皮苷在 4 h 内呈快速释放, 累计释放率达 65.98%, 36 h 后开始平稳释放, 最终使柚皮苷释放长达 9 d。

2.8 大鼠骨髓间充质干细胞培养及鉴定 培养至 P3 代时, 镜下见骨髓间充质干细胞呈长梭形, 以漩涡状排列, 成骨诱导 21 d 后茜素红染色可观察到明显的钙结节, 成脂诱导 21 d 后

油红 O 染色可观察到明显的脂滴, 见图 7, 验证了干细胞的多向分化潜能。

2.9 支架的生物相容性

2.9.1 细胞黏附 接种第 2 小时, 壳聚糖 / β - 磷酸三钙支架组、壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架组细胞黏附率分别为 (51.55±3.71)%, (49.06±5.81)%, 组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 接种第 8 小时, 两组细胞黏附率分别为 (75.00±3.39)%, (70.94±2.77)%, 组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 8, 表明柚皮苷的载入并未影响细胞的黏附。

2.9.2 细胞增殖 CCK-8 检测结果显示, 培养第 1 天, 各组细胞增殖吸光度值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 培养第 3, 7 天, 壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架组细胞增殖吸光度值显著高于壳聚糖 / β - 磷酸三钙支架组、空白对照组 ($P < 0.05$), 壳聚糖 / β - 磷酸三钙支架组和空白对照组细胞增殖吸光度值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 9, 提示两组支架均具有良好的生物相容性, 并且支架释放的柚皮苷可促进骨髓间充质干细胞的增殖。

2.9.3 活死细胞染色 如图 10 所示, 培养第 1, 3, 7 天, 3 组的活细胞被染为绿色, 均匀地分布在视野中, 随着时间的增加, 活细胞数量逐渐增多, 被染为红色的死细胞较少见, 表明细胞在支架上具有很高的存活率, 支架具有良好的生物相容性; 并且两组支架上的骨髓间充质干细胞呈现三维不同层次的生长, 多孔支架可为细胞提供良好的黏附和增殖空间。

2.10 支架的成骨诱导能力检测结果 成骨诱导培养后的碱性磷酸酶染色结果显示, 随着培养时间的延长, 两组碱性磷酸酶染色程度加深, 并且相同时间点的壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架组染色程度强于壳聚糖 / β - 磷酸三钙支架组, 见图 11。

碱性磷酸酶活性定量分析结果显示, 同时间点壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架组碱性磷酸酶活性显著高于壳聚糖 / β - 磷酸三钙支架组 ($P < 0.05$), 见图 12, 表明柚皮苷的载入能持续促进骨髓间充质干细胞的成骨分化。

3 讨论 Discussion

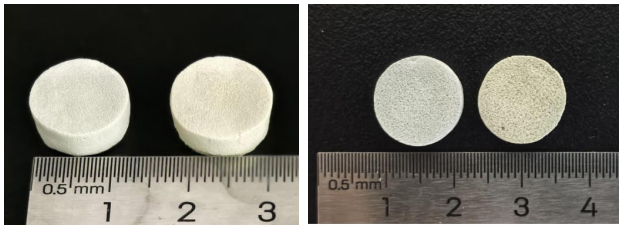
较大范围骨缺损的修复与重建一直是临床研究的重点。近年来骨组织工程逐渐成为研究热点。生长因子是骨组织工程的关键因素之一, 主要是通过调控细胞的增殖、迁移和分化来发挥骨诱导活性^[36-37]。有研究表明, 柚皮苷可以通过上调 microRNA-20a 并下调 PPARgamma 的表达来促进骨髓间充质干细胞的成骨分化^[38], 还可促进破骨细胞的凋亡, 防止卵巢切除术后引起的骨质疏松^[39]。但由于柚皮苷难溶于水及肠道的首过效应等, 导致其生物利用率低^[40-41], 而与支架载体

联用可在骨缺损局部实现缓释^[42], 充分发挥柚皮苷的优势。

常用的支架材料如壳聚糖具有良好的生物相容性、可降解性等, 但单纯应用时机械性能不足^[43], 而与 β - 磷酸三钙联合用作支架载体, 既具有了一定的机械性能, 也弥补了 β - 磷酸三钙脆性大、缺乏弹性等缺点, 还能较好地模拟细胞外基质结构。有研究将壳聚糖 / β - 磷酸三钙支架植入比格犬骨缺损处, 在 12 周时观察到明显的新骨及血管形成, 证明了壳聚糖 / β - 磷酸三钙支架具有促进骨缺损修复的能力^[44]。但单纯的支架材料缺乏骨诱导性, 因此, 此次研究通过冷冻干燥法制备了壳聚糖 / β - 磷酸三钙支架并负载生物活性分子柚皮苷, 通过化学交联实现柚皮苷的缓慢释放, 以增强其成骨性能。

支架通过充当临时细胞外基质来支持骨组织再生, 从而发挥关键作用。理想的支架材料需要良好的孔径和孔隙率^[45-46], 此次研究制备的壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架具有疏松多孔的结构, 孔间连通性好, 可为细胞提供良好的黏附增殖空间, 维持细胞生长的营养运输通道, 基本满足骨组织工程支架材料的要求。支架良好的溶胀性能有利于维持周围环境的湿润, 利于细胞生长^[47-48], 但过高的溶胀率可能会损害支架的机械稳定性。壳聚糖基支架主要的缺点是溶胀率高, 而此次研究通过化学交联以及掺入 β - 磷酸三钙显著改善了其溶胀性能, 有利于细胞的生长。骨组织工程支架材料还要求有足够的机械强度和适当的降解速率, 在植入初期, 支架应具有足够的强度来支持骨组织向支架内部生长; 在骨组织修复后期, 支架适当降解可以为新骨的形成提供空间^[49-50]。研究表明人体松质骨的抗压强度在 2-11.61 MPa 之间^[51], 此次研究制备的壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架足以满足松质骨缺损修复的力学要求, 并且该复合支架在 4 周内具有理想的降解速率, 降解时释放的钙磷离子等可发挥骨传导性。生物活性因子的缓释可以在骨缺损局部提供一个持续的高浓度成骨诱导作用。在体外释放实验中, 检测到复合支架上的柚皮苷缓释可达 9 d, 可持续发挥骨诱导性。壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架具有良好的空间结构、理想的溶胀性能、生物降解性和机械性能, 并能在局部缓释柚皮苷, 有利于骨缺损的修复, 这些特性增加了该复合支架的临床应用潜力。

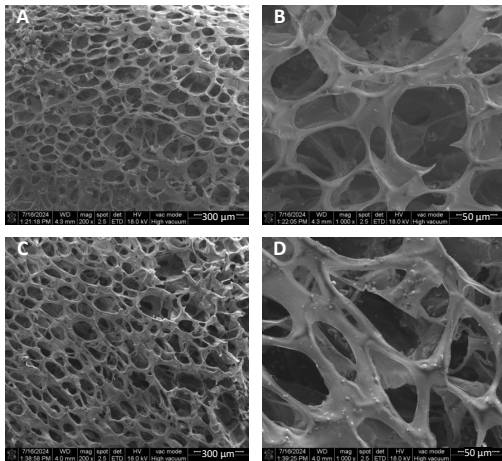
通过检测大鼠骨髓间充质干细胞对壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架的黏附作用, 验证了支架具有良好的生物相容性, 网状多孔结构足以容纳细胞的黏附。CCK-8 实验结果显示壳聚糖 / β - 磷酸三钙 / 柚皮苷支架可促进骨髓间充质干细胞的增殖, 活死细胞染色显示骨髓间充质干细胞在支架上具有较高的存活率, 验证了支架具有良好的生物相容性。碱性磷酸酶是早期成骨分化的一种标志性酶。成骨诱导 7, 14 d 后, 碱



图注：每个图中左侧为壳聚糖/ β -磷酸三钙支架，右侧为壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架。

图 1 | 两组支架大体观

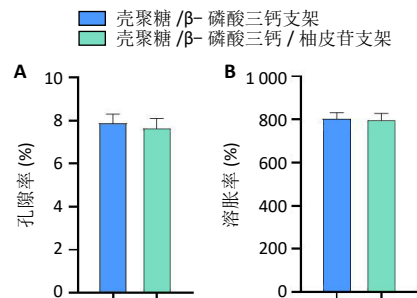
Figure 1 | General view of the two groups of scaffolds



图注：图 A, B 为壳聚糖/ β -磷酸三钙支架微观形貌；C, D 为壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架微观形貌。两组支架均呈现出多孔的网状结构，孔间相互连通，孔隙大小均匀， β -磷酸三钙颗粒均匀地镶嵌在壳聚糖网状支架中。

图 2 | 支架的扫描电镜图像

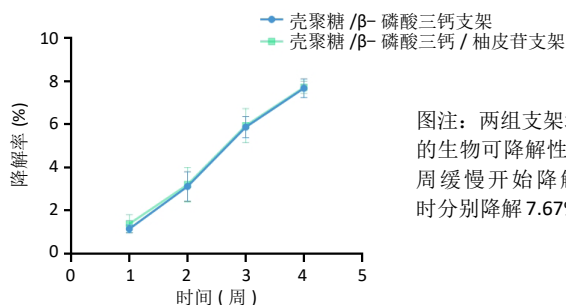
Figure 2 | Scanning electron microscopic images of scaffolds



图注：两组支架的孔隙率与溶胀率比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)。

图 3 | 两组支架的孔隙率 (A) 与溶胀率 (B) 比较

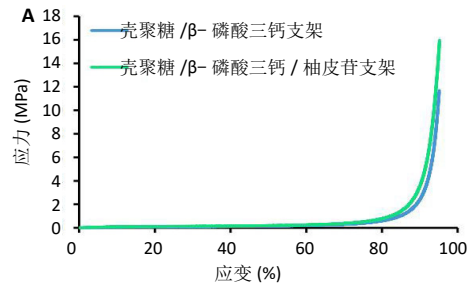
Figure 3 | Comparison of porosity and swelling rate between two groups of scaffolds



图注：两组支架均具有良好的生物可降解性，在最初 1 周缓慢开始降解，在 4 周时分别降解 7.67% 和 7.71%。

图 4 | 两组支架的降解率

Figure 4 | Degradation rate of two groups of scaffolds



图注：图 A 为两组支架的应力-应变曲线；B 为两组支架压缩强度，组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)；C 为两组支架的压缩模量，组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

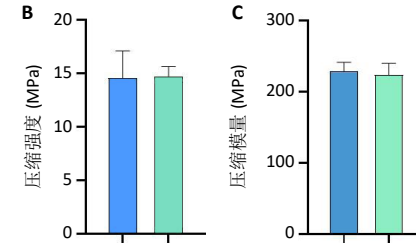
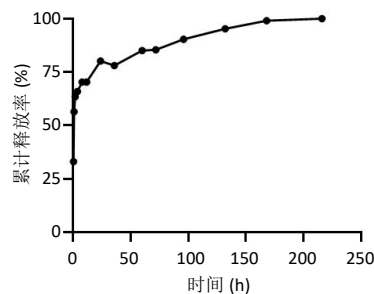


图 5 | 两组支架的机械性能

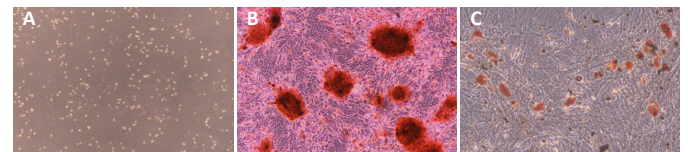
Figure 5 | Mechanical properties of two groups of scaffolds



图注：壳聚糖/ β -磷酸三钙/柚皮苷支架内的柚皮苷在 4 h 内呈快速释放，累计释放率达 65.98%，36 h 后开始平稳释放，最终使柚皮苷释放长达 9 d。

图 6 | 壳聚糖/ β -磷酸三钙支架内柚皮苷的累计释放率

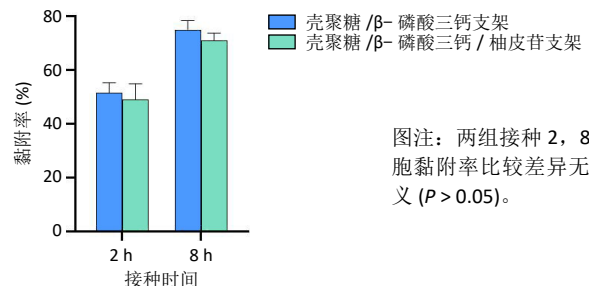
Figure 6 | Cumulative release rate of naringin in chitosan/ β -tricalcium phosphate scaffolds



图注：图 A 为 P3 代骨髓间充质干细胞镜下观 ($\times 40$)；B 为成骨诱导 21 d 后的茜素红染色 ($\times 100$)；C 为成脂诱导 21 d 后的油红 O 染色 ($\times 100$)。

图 7 | 大鼠骨髓间充质干细胞培养及鉴定

Figure 7 | Culture and identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells



图注：两组接种 2, 8 h 时的细胞黏附率比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

图 8 | 两组支架表面的骨髓间充质干细胞黏附率

Figure 8 | Bone marrow mesenchymal stem cell adhesion rate on the surface of two groups of scaffolds

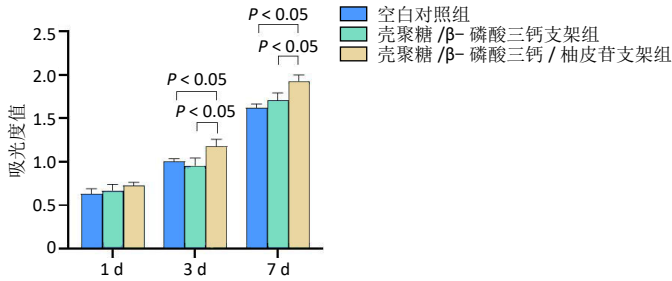
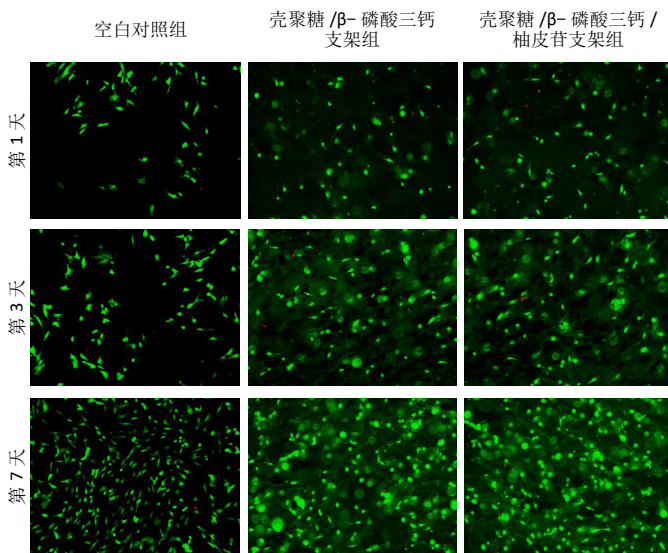


图9 | 各组骨髓间充质干细胞增殖的比较
Figure 9 | Comparison of bone marrow mesenchymal stem cell proliferation in each group



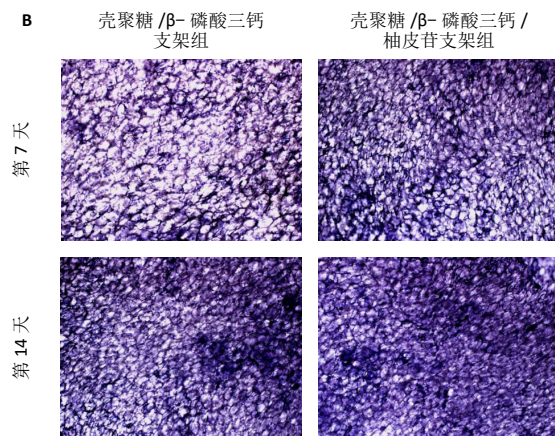
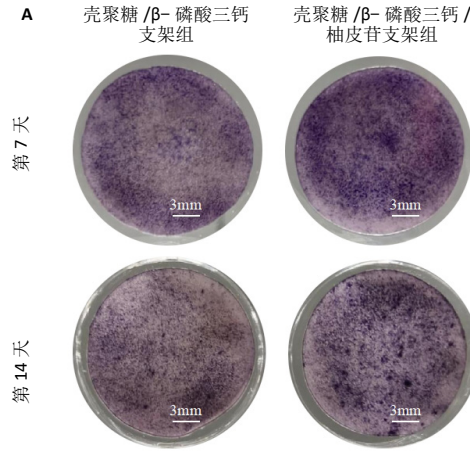
图注: 绿色代表活细胞, 红色代表死细胞。各组均可见大量的活细胞, 较少见死细胞。

图10 | 各组骨髓间充质干细胞的活死染色图像 (×100)
Figure 10 | Live-dead staining images of bone marrow mesenchymal stem cells in each group (×100)

性磷酸酶染色以及定量分析结果显示, 壳聚糖/β-磷酸三钙/柚皮苷支架组较壳聚糖/β-磷酸三钙支架组具有更高的碱性磷酸酶活性, 考虑是复合支架释放的柚皮苷促进了骨髓间充质干细胞的成骨分化。

该实验也存在一定的局限性: 仅验证了载柚皮苷支架在细胞层面上的成骨诱导作用, 缺乏检测复合支架骨缺损修复能力的体内动物实验, 将在下一阶段进行研究; 虽然支架中的柚皮苷短期缓释效果较为明确, 但是成骨是一个长期的过程, 是否能使药物缓释恰好匹配新骨的形成速率, 后续仍有待研究; 实验验证了柚皮苷具有成骨诱导活性, 但是具体的作用机制尚未明确。

综上所述, 壳聚糖/β-磷酸三钙/柚皮苷支架具有良好的理化性能, 能基本满足骨组织工程的要求, 药物的缓慢释放可以发挥持续的成骨诱导作用, 并且可以促进骨髓间充质干细胞的增殖及成骨分化, 具有一定的研究前景。



图注: 图A为碱性磷酸酶染色大体观, 同时时间点下壳聚糖/β-磷酸三钙/柚皮苷支架组染色程度强于壳聚糖/β-磷酸三钙支架组; B为碱性磷酸酶染色镜下观, 同时时间点下壳聚糖/β-磷酸三钙/柚皮苷支架组染色程度强于壳聚糖/β-磷酸三钙支架组 (×40)。

图11 | 两组支架表面骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶染色图像
Figure 11 | Alkaline phosphatase staining images of bone marrow mesenchymal stem cells on the surface of two groups of scaffolds

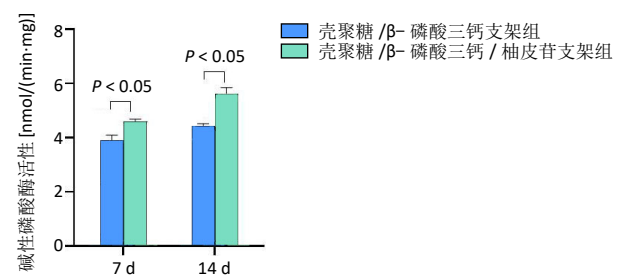


图12 | 两组支架表面骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶活性定量分析
Figure 12 | Quantitative analysis of alkaline phosphatase activity of bone marrow mesenchymal stem cells on the surface of two groups of scaffolds

作者贡献: 袁茜进行实验设计, 实验实施为袁茜, 实验评估为张昊, 资料收集为袁茜, 袁茜成文, 庞杰审核。

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] ZHOU S, XIAO C, FAN L, et al. Injectable ultrasound-powered bone-adhesive nanocomposite hydrogel for electrically accelerated irregular bone defect healing. *J Nanobiotechnology*. 2024;22(1):54.
- [2] TAN B, TANG Q, ZHONG Y, et al. Biomaterial-based strategies for maxillofacial tumour therapy and bone defect regeneration. *Int J Oral Sci*. 2021;13(1):9.
- [3] CLAES L, AUGAT P, SUGER G, et al. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res*. 1997;15(4):577-584.
- [4] GILLMAN CE, JAYASURIYA AC. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;130:112466.
- [5] ZUFIA J, ABELLA SF. Applications of maxillary tuberosity block autograft. *J Esthet Restor Dent*. 2022;34(7):1015-1028.
- [6] ZHAO R, YANG R, COOPER PR, et al. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules*. 2021;26(10):3007.
- [7] QU H, FU H, HAN Z, et al. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Adv*. 2019;9(45):26252-26262.
- [8] 康坤龙, 王新涛, 生物支架材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的研究热点 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(4):597-603.
- [9] AZIZIAN S, HADJIZADEH A, NIKNEJAD H. Chitosan-gelatin porous scaffold incorporated with Chitosan nanoparticles for growth factor delivery in tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2018;202:315-322.
- [10] YAZDIMAMAGHANI M, RAZAVI M, VASHAEE D, et al. Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:1253-1266.
- [11] BHARADWAZ A, JAYASURIYA AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;110:110698.
- [12] FARZAMFAR S, RICHER M, RAHMANI M, et al. Biological Macromolecule-Based Scaffolds for Urethra Reconstruction. *Biomolecules*. 2023; 13(8):1167.
- [13] SHI W, ZHANG X, BIAN L, et al. Alendronate crosslinked chitosan/polycaprolactone scaffold for bone defects repairing. *Int J Biol Macromol*. 2022;204:441-456.
- [14] ZHOU T, ZHOU H, WANG F, et al. An injectable carboxymethyl chitosan hydrogel scaffold formed via coordination bond for antibacterial and osteogenesis in osteomyelitis. *Carbohydr Polym*. 2024;324:121466.
- [15] MUZZARELLI RA, EL MEHTEDI M, BOTTEGONI C, et al. Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. *Int J Biol Macromol*. 2016;93(Pt B):1366-1381.
- [16] SANCHEZ-SALVADOR JL, BALEA A, MONTE MC, et al. Chitosan grafted/cross-linked with biodegradable polymers: A review. *Int J Biol Macromol*. 2021;178:325-343.
- [17] INDURKAR A, PANDIT A, JAIN R, et al. Plant based cross-linkers for tissue engineering applications. *J Biomater Appl*. 2021;36(1):76-94.
- [18] MUZZARELLI RA, EL MM, BOTTEGONI C, et al. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Mar Drugs*. 2015;13(12):7314-7338.
- [19] ZAFEIRIS K, BRASINIKI D, KARATZA A, et al. Additive manufacturing of hydroxyapatite-chitosan-genipin composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;119:111639.
- [20] ZHANG L, LI X, SHI C, et al. Biocompatibility and Angiogenic Effect of Chitosan/Graphene Oxide Hydrogel Scaffolds on EPCs. *Stem Cells Int*. 2021;2021:5594370.
- [21] BOUWMAN WF, BRAVENBOER N, TEN BC, et al. Tissue Level Changes after Maxillary Sinus Floor Elevation with Three Types of Calcium Phosphate Ceramics: A Radiological Study with a 5-Year Follow-Up. *Materials (Basel)*. 2021;14(6):1471.
- [22] GUO W, LI B, LI P, et al. Review on vat photopolymerization additive manufacturing of bioactive ceramic bone scaffolds. *J Mater Chem B*. 2023;11(40):9572-9596.
- [23] SERRA IR, FRADIQUE R, VALLEJO MC, et al. Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015; 55:592-604.
- [24] SUN T, FENG Z, HE W, et al. Novel 3D-printing bilayer GelMA-based hydrogel containing BP, β -TCP and exosomes for cartilage-bone integrated repair. *Biofabrication*. 2023;16(1):015008.
- [25] UMRATH F, SCHMITT L, KLIESCH SM, et al. Mechanical and Functional Improvement of β -TCP Scaffolds for Use in Bone Tissue Engineering. *J Funct Biomater*. 2023;14(8):427.
- [26] TAN J, ZHANG M, HAI Z, et al. Sustained Release of Two Bioactive Factors from Supramolecular Hydrogel Promotes Periodontal Bone Regeneration. *ACS Nano*. 2019;13(5):5616-5622.
- [27] FAN J, ZHANG X, KANG M, et al. Complementary modulation of BMP signaling improves bone healing efficiency. *Biomaterials*. 2023;302:122335.
- [28] 张敏, 张晓明, 刘童斌. 柚皮苷在骨组织再生领域的应用潜力 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(5):787-792.
- [29] STABRAUSKIENE J, KOPUSTINSKIENE DM, LAZAUSKAS R, et al. Naringin and Naringenin: Their Mechanisms of Action and the Potential Anticancer Activities. *Biomedicines*. 2022;10(7):1686.
- [30] MILES EA, CALDER PC. Effects of Citrus Fruit Juices and Their Bioactive Components on Inflammation and Immunity: A Narrative Review. *Front Immunol*. 2021;12:712608.
- [31] PENG Y, QU R, XU S, et al. Regulatory mechanism and therapeutic potentials of naringin against inflammatory disorders. *Heliyon*. 2024; 10(3):e24619.
- [32] HAN G, LEE DG. Naringin generates three types of reactive oxygen species contributing differently to apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *Life Sci*. 2022;304:120700.

- [33] ZUO Y, LI Q, XIONG Q, et al. Naringin Release from a Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffold Promotes Osteogenesis and Bone Tissue Reconstruction. *Polymers (Basel)*. 2022;14(16):3260.
- [34] YU KE, ALDER KD, MORRIS MT, et al. Re-appraising the potential of naringin for natural, novel orthopedic biotherapies. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2020;12:1759720X-20966135X.
- [35] WANG W, MAO J, CHEN Y, et al. Naringin promotes osteogenesis and ameliorates osteoporosis development by targeting JAK2/STAT3 signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2022;49(1):113-121.
- [36] OLIVEIRA ÉR, NIE L, PODSTAWCZYK D, et al. Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):903.
- [37] ZHENG D, CHEN T, HAN L, et al. Synergetic integrations of bone marrow stem cells and transforming growth factor- β 1 loaded chitosan nanoparticles blended silk fibroin injectable hydrogel to enhance repair and regeneration potential in articular cartilage tissue. *Int Wound J*. 2022;19(5):1023-1038.
- [38] FAN J, LI J, FAN Q. Naringin promotes differentiation of bone marrow stem cells into osteoblasts by upregulating the expression levels of microRNA-20a and downregulating the expression levels of PPAR γ [J]. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4759-4765.
- [39] LI F, SUN X, MA J, et al. Naringin prevents ovariectomy-induced osteoporosis and promotes osteoclasts apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):629-635.
- [40] JIANG H, ZHANG M, LIN X, et al. Biological Activities and Solubilization Methodologies of Naringin. *Foods*. 2023;12(12):2327.
- [41] RIVOIRA MA, RODRIGUEZ V, TALAMONI G, et al. New Perspectives in the Pharmacological Potential of Naringin in Medicine. *Curr Med Chem*. 2021;28(10):1987-2007.
- [42] 梁健, 苏睿, 宋泉生, 等. 柚皮苷对骨细胞的作用以及负载柚皮苷的羟基磷灰石复合支架治疗骨缺损的研究 [J]. *医学研究杂志*, 2023,52(5):18-20,110.
- [43] SUKPAITA T, CHIRACHANCHAI S, PIMKHAOKHAM A, et al. Chitosan-Based Scaffold for Mineralized Tissues Regeneration. *Mar Drugs*. 2021;19(10):551.
- [44] YANG L, WANG Q, PENG L, et al. Vascularization of repaired limb bone defects using chitosan- β -tricalcium phosphate composite as a tissue engineering bone scaffold. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2343-2347.
- [45] LEKHAVADHANI S, SHANMUGAVADIVU A, SELVAMURUGAN N. Role and architectural significance of porous chitosan-based scaffolds in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2023;251:126238.
- [46] PIAIA L, SILVA SS, GOMES JM, et al. Chitosan/ β -TCP composites scaffolds coated with silk fibroin: a bone tissue engineering approach. *Biomed Mater*. 2021;17(1):015003.
- [47] KHAN M, RAZAK S, REHMAN S, et al. Bioactive scaffold (sodium alginate)-g-(nHAp@SiO₂)@GO for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2022;222(Pt A):462-472.
- [48] NARUPHONTJIRAKUL P, PANPISUT P, PATNTIRAPONG S. Zinc and Strontium-Substituted Bioactive Glass Nanoparticle/Alginate Composites Scaffold for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6150.
- [49] ZHAO ZH, MA XL, ZHAO B, et al. Naringin-inlaid silk fibroin/hydroxyapatite scaffold enhances human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-based bone regeneration. *Cell Prolif*. 2021;54(7):e13043.
- [50] BAVYA DK, LALZAWMLIANA V, SAIDIVYA M, et al. Magnesium Phosphate Bioceramics for Bone Tissue Engineering. *Chem Rec*. 2022;22(11):e202200136.
- [51] EILBAGI M, EMADI R, RAEISSI K, et al. Mechanical and cytotoxicity evaluation of nanostructured hydroxyapatite-bredigite scaffolds for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;68:603-612.

(责任编辑: 关伟, 邱杨, 张楠)