



同濟大學

TONGJI UNIVERSITY

博士学位论文

磷酸钙复合材料的制备/功能改性及其促进  
骨修复的机制研究

姓 名：侯孝东

学 号：1810947

学 院：医学院

学科门类：医学

学科名称：外科学（骨科学）

指导教师：郑龙坡 教授

副指导教师：陈峰 教授

二〇二二年五月

## 摘要

**目的:** 由创伤、肿瘤及感染等原因引起的骨缺损是临床中常见的疾病, 为患者和社会造成了巨大的负担, 因此良好的人工骨修复材料有望成为自体或异体骨移植的替代方案。此外, 体外物理热疗是一种传统的治疗手段, 常用于皮肤和软组织等浅表组织的修复, 制备新型的光热骨修复材料, 有望将这种非侵入性的治疗手段延伸至深部骨组织的治疗, 为骨再生修复提供一种新的治疗方法和思路。在众多人工骨修复材料中, 磷酸钙 (CaP) 材料由于与人体骨骼和牙齿的主要无机成分相同具有独特的优势, 被广泛应用于骨组织修复。因此, 本研究选取 CaP 材料, 聚焦于微观的结构和性质, 通过对 CaP 材料制备的调控, 探究更适于骨缺损修复治疗的磷酸钙修复材料。本研究主要分为两部分, 第一部分为调控制备具有特殊结构的 CaP 材料, 结合有机高分子材料制备新型骨修复复合支架用于骨缺损的治疗, 探究这种基于 CaP 材料特殊结构的复合支架在骨再生中的作用。第二部分是利用天然小分子化合物修饰 CaP 材料, 以制备光热 CaP 材料, 然后将传统物理热疗引入深部骨组织的修复中, 并探究这种新型光热 CaP 材料与光热治疗措施的安全性和有效性。

**方法:** (1) 磷酸钙材料的制备及改性: ①通过水热溶剂法制备高结晶度、均一分散的羟基磷灰石微米管 (HAMT) 材料。②通过微波辅助法制备多维的羟基磷灰石 (HA) 材料, 包括一维纳米颗粒 (HANP), 二维纳米线 (HANW), 并使用没食子酸 (GA) 通过微波辅助对不同维度的 HA 材料进行修饰, 以制备制备具有光热性能的 HA 材料, 包括光热 HANP (GNP), 光热 HANW (GNW) 和光热脱钙骨基质 (GBM)。

(2) 磷酸钙材料的理化性质表征: 通过扫描电子显微镜、透射电子显微镜、选区电子衍射、能量色散谱、X 射线衍射、傅里叶变换红外光谱、紫外-可见光谱分析等方法对所制备的 HAMT、HANP、HANW、GNP、GNW、脱钙骨基质 (BM) 和 GBM 等材料进行理化性质的表征。

(3) GH/H 复合支架的制备及其表征: 基于 HAMT 特殊的中空管道结构, 结合 GeIMA 水凝胶制备具有管道框架结构的 GeIMA/HAMT 复合支架 (GH/H), 并通过扫描电子显微镜、能量色散谱、X 射线衍射和傅里叶变换红外光谱对 GH/H 复合支架的孔径大小、表面粗糙度和化学组分等性质进行表征。通过应力-应变测试和抗疲劳压缩测试对 GH/H 复合支架的力学性能进行表征。

(4) 光热 HA 材料的光热性能评估: 通过热成像仪对 GNP、GNW 和 GBM 在不同条件下的光热性能进行检测, 包括近红外光 (NIR) 的功率、光热 HA 材料的浓

度、所处环境（干燥和潮湿）、动物体内环境等，并对 GBM 的光热稳定性进行评估。

(5) 磷酸钙材料的生物相容性检测：使用骨髓间充质干细胞（BMSCs）对所制备的磷酸钙材料进行生物相容性的评估，通过 CCK8 或 MTT 法检测 HAMT、GH/H 复合支架、GNP、GNW 和 GBM 与 BMSCs 共培养后的细胞毒性。使用活死细胞染色观察 BMSCs 在 GH/H 复合支架以及 GBM 支架上的生长情况。使用细胞骨架染色，并通过激光共聚焦显微镜观察 BMSCs 在 GH/H 复合支架上的生长形态。通过扫描电子显微镜观察 BMSCs 在 BM 和 GBM 支架上的生长状态。

(6) HAMT 及 GH/H 复合支架的生物活性检测：通过 CCK8 法检测 BMSCs 与 HAMT 共培养的增殖作用，以及 BMSCs 在 GH/H 复合支架上的增殖情况。使用 RT-qPCR 和 WB 检测 HAMT 对 BMSCs 的促成骨分化作用。

(7) 低热刺激对 BMSCs 的作用：通过 CCK8 法评估在低热刺激（40℃）下 BMSCs 的增殖效果，并使用茜素红染色和 WB 评价低热刺激对 BMSCs 成骨分化的影响。

(8) GH/H 复合支架的体内动物学研究：构建大鼠颅骨缺损模型，将 GH 和 GH/H 复制支架植入，然后在第 4 周、8 周和 12 周时收集大鼠颅骨标本，通过 Micro-CT 和组织切片染色评价颅骨缺损的修复效果及新生血管生成情况。

(9) 近红外光结合光热 GBM 探究低热刺激的体内骨修复作用：构建大鼠颅骨缺损模型，植入 BM 和 GBM 支架，然后使用 808 nm 的近红外光照射实现颅骨缺损区域的低热环境，在 4 周和 12 周时收集颅骨样本，通过 Micro-CT 检测对骨缺损修复的效果进行评估。

**结果：**(1)通过水热溶剂法可一步制备具有特殊中空管道结构的长约 30  $\mu\text{m}$ ，直径约 500 nm 的形貌均一的 HAMT。

(2) HAMT 生物相容性良好，且具有良好的促成骨分化能力。

(3) GH/H 复合支架是一种具有多孔结构的三维支架，孔径约 100-200 nm，内部表面粗糙，且具有良好的力学和抗疲劳性能，同时具有良好的生物相容性和生物活性。

(4) GH/H 复合支架具有原位固化塑形的能力，且由于其粗糙的内表面和优异的机械性能等，植入体内后具有良好的促骨再生和血管形成能力。

(5) 通过微波辅助法可实现没食子酸对不同维度的 HA 材料的修饰改性，将白色 HA 材料转变为具有光热响应性能黑色光热 HA 材料。

(6) 光热 HA 材料对 808 nm 的近红外光具有良好的光热响应性能，且其光热性能与 HA 材料的浓度、近红外光的功率呈正相关。

(7) 光热三维 GBM 支架具有良好的光热响应性能和光热稳定性，植入体内

后在低功率 ( $1\text{W cm}^{-2}$ ) 的近红外光照射下可使骨缺损区域处于低热刺激 ( $40^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) 状态。

(8)  $40^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  的低热刺激可以促进 BMSCs 增殖与成骨分化, 且成骨分化程度与低热刺激的持续时间呈正相关。同时, 体内低热刺激也有利于骨再生。

**结论:** (1) 本研究基于 HMT 的中空管道结构所构建的管道框架 GH/H 复合支架具有良好的机械性能、生物相容性、生物活性和促骨修复能力。

(2) 通过没食子酸 (GA) 可以对多维度的 HA 材料进行修饰改性, 赋予 HA 材料光热性能, 所制备的光热 HA 材料具有良好的光热性能和光热稳定性, 通过光热 HA 材料和  $808\text{ nm}$  近红外光的结合可以实现体内精准控温, 从而实现  $40^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  的低热刺激环境。

(3) 低热刺激可以促进 BMSCs 的增殖和成骨分化, 且成骨分化程度与刺激时间呈正相关, 并且对于大鼠颅骨缺损具有促进骨修复的作用。

综上所述, 基于 HA 材料的特殊结构和性质从而制备新型骨修复生物材料有望为骨缺损修复治疗提供新的研究思路和治疗策略。

**关键词:** 骨再生, 磷酸钙, 水凝胶支架, 光热磷酸钙材料, 低热刺激



## ABSTRACT

**Objective:** Bone defects caused by trauma, tumor or infection are common diseases in the clinic, and lead to a huge burden on patients and society. And new artificial bone repair materials with advanced properties have the potential to become a viable alternative to autologous and allogeneic bone transplantation. In addition, extracorporeal physical hyperthermia is a traditional and common treatment method for superficial tissues regeneration such as skin and soft tissues. Preparing photothermal bone regeneration materials will allow this noninvasive technique to be extended to deep bone tissue therapy, and will provide a new strategy to repair bone tissue. Calcium phosphate (CaP) materials have unique superiority among the artificial bone repair materials owing to the similarity with the main inorganic components of human bones and teeth. Based on this, this study aims to the CaP materials and focus on its microstructure and properties, via regulating and modifying the CaP materials to explore an advanced CaP artificial bone repair material. The research contains two mainly parts. The first part is adjusting the condition of reaction system to prepare the CaP materials with special structures, then utilizing the property of the special structure of CaP materials to construct a composite scaffold based on the CaP and organic polymer materials, and exploring the effect of this new composite scaffold in bone regeneration. The second part is using natural small molecule drugs to modify CaP materials for the photothermal CaP materials preparation, and introducing the traditional physical hyperthermia therapy into the deep bone tissue repair, then evaluating the safety and effectiveness of this new type material and treatment method.

**Methods:** (1) Preparation and modification of calcium phosphate materials. (A). Hydroxyapatite microtubes (HAMT) with high crystallinity and uniformly dispersed property were prepared by hydrothermal solvent method. (B). The multi-dimensional hydroxyapatite (HA) materials including one-dimensional nanoparticles (HANP) and two-dimensional nanowires (HANW) were obtained via the microwave-assisted method, and different dimensions HA materials were modified by gallic acid (GA) using the microwave assistance that resulting in the photothermal HA materials with photothermal property were prepared, which named photothermal HANP (GNP), photothermal HANW (GNW) and photothermal demineralized bone matrix (GBM).

(2) Characterization of the as-prepared calcium phosphate materials. The as-

prepared HANT, HANP, HANW, GNP, GNW, demineralized bone matrix (BM) and GBM were characterized by the scanning electron microscope, transmission electron microscope, selected area electron diffraction, energy dispersive spectroscopy, X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, and ultraviolet-visible spectroscopy to evaluate the physical and chemical properties of these materials.

(3) Preparation and characterization of the GH/H composite scaffold. Based on the special microtube structure of HANT, the GelMA/HAMT composite scaffolds (GH/H) were constructed by combination of the HAMT and GelMA hydrogels. Then the scanning electron microscope, energy dispersive spectroscopy, X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy were used to characterize the pore size, porosity, surface roughness and chemical composition of the GH/H composite scaffold. Besides, the mechanical properties of the GH/H composite scaffold were evaluated by the stress-strain and anti-fatigue compression experiment.

(4) Photothermal performance evaluation of photothermal HA materials. The thermal imager was used to study the photothermal performance of GNP, GNW and GBM under different conditions, including the power of near-infrared (NIR), the concentration of photothermal HA materials, the environment (dry and liquid) and *in vivo* photothermal performance. In addition, the photothermal stability of GBM is tested also.

(5) The biocompatibility of calcium phosphate materials. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were used to evaluate the biocompatibility of the calcium phosphate materials. After cocultured with the HAMT, GH/H composite scaffolds, GNP, GNW and GBM, the cell viability were tested by CCK8 or MTT method. The live-dead cell staining was used to observe the growth of BMSCs on GH/H composite scaffolds and GBM. And the morphology of BMSCs on the GH/H composite scaffolds was observed by the cytoskeleton staining through the confocal laser microscope.

(6) The bioactivity of HAMT and GH/H composite scaffolds. The proliferation assay was performed by the BMSCs cocultured with HAMT and GH/H composites and the results were detected by CCK8 method. And the expression of the indicators associated with osteogenic differentiation of BMSCs including osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN) and type I collagen (Col I) caused by the HAMT was studied through the RT-qPCR and WB assay.

(7) The effect of hypothermia stimulation for BMSCs. The CCK8 assay was used

to evaluate the proliferation effect of BMSCs under 40°C hypothermia stimulation. And the level of osteogenic differentiation of BMSCs led by the hypothermia stimulation was assessed by the alkaline phosphatase staining and WB.

(8) The performance of the GH/H composites for *in vivo* bone regeneration. The critical rat calvarial bone defect model was constructed and the as-prepared GelMA hydrogels (GH) and GH/H composite scaffolds were implanted. Then, at the 4, 8 and 12 weeks after implantation, the calvarias were collected and fixed by the paraformaldehyde. Finally, the calvarias were scanned and analyzed by the Micro-CT and stained by HE, Masson and immunohistochemistry to evaluate the *in vivo* bone regeneration of the GH/H composites.

(9) Photothermal GBM combined with near-infrared to explore the effect of the hypothermia stimulation for *in vivo* bone repair. The BM and GBM materials were implanted into the rat critical bone defect area, and then the 808 nm NIR was used to achieve the *in vivo* hypothermia stimulation environment around the bone defect area. The effect of bone repair was evaluated by Micro-CT scanning at 4- and 12-weeks post operation.

**Results:** (1) The HAMT with a length of ~30  $\mu\text{m}$  and a diameter of ~500 nm with a special microtube structure are obtained by the one-step hydrothermal solvent method.

(2) The HAMT has advanced biocompatibility and promoting osteogenic differentiation property of BMSCs.

(3) The GH/H composite scaffolds are three-dimensional porous scaffolds with apore diameter of 100-200 nm, rougher internal surface, and excellent mechanical and anti-fatigue properties. Besides, the GH/H composites has good biocompatibility and bioactivity.

(4) The GH/H scaffolds can be molded and subsequently cured *in situ* at the defect site which enables the used scaffolds to self-fill the defect sites. And the GH/H composites have good bone regeneration and new vessel formation ability which are attributed to the excellent mechanical property and rough surface of the GH/H composites.

(5) The modification of HA materials of different dimensions by gallic acid can be completed via the microwave-assisted method, then, the white HA materials is transformed into black HA materials with photothermal properties.

(6) The photothermal HA materials have good photothermal response to 808 nm NIR. In addition, the photothermal performance of materials is positively correlated

with the concentration of HA materials and the power of NIR.

(7) The photothermal three-dimensional GBM scaffold has excellent photothermal property and stability. And the GBM combined the low-power ( $1\text{ W cm}^{-2}$ ) NIR can achieve the *in vivo* hypothermia simulation ( $40^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ ) around the bone defect area.

(8) The hypothermia stimulation at  $40^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  can promote the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs. Besides, the degree of osteogenic differentiation of BMSCs is positively correlated with the hypothermia stimulating time. At the same time, the *in vivo* promoting bone regeneration ability of hypothermia stimulation is confirmed by the rat calvarial bone defect model.

**Conclusions:** (1) In this study, the pipe framework GH/H composite scaffolds constructed based on the HMT have good mechanical properties, biocompatibility, bioactivity and bone repair ability.

(2) Multi-dimensional HA materials can be modified and modified by GA and lead to the photothermal properties for HA materials. The modified photothermal HA materials have good photothermal performance and stability. The combination of photothermal HA materials and 808 nm NIR can achieve precise temperature control *in vivo* which resulting in the hypothermia stimulation of  $40^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  for bone defect area.

(3) The hypothermia stimulation can promote the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs and bone repair *in vivo*. Interestingly, the degree of osteogenic differentiation is positively correlated with the stimulation time. In summary, the preparation of new bone repair biomaterials based on the special structure and modification of HA materials is expected to provide new research ideas and treatment strategies for bone defect regeneration.

**Key Words:** bone regeneration, calcium phosphate, hydrogel scaffolds, photothermal HA materials, hypothermia stimulation

# 目 录

第 1 章 引言.....	1
1.1 骨缺损的概况及治疗现状 .....	1
1.1.1 骨缺损的概况.....	1
1.1.2 骨的生物学结构及生理愈合过程.....	1
1.1.3 骨缺损的治疗现状.....	2
1.2 磷酸钙生物材料在骨缺损修复应用中的研究进展 .....	11
1.2.1 磷酸钙骨修复生物材料的种类及其在骨修复中的应用 .....	11
1.2.2 不同结构的磷酸钙生物材料在骨修复中的应用研究 .....	17
1.3 磷酸钙复合生物材料在骨修复中的应用研究 .....	19
1.4 研究课题的提出及研究意义 .....	21
第 2 章 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的制备及其促骨修复的研究.....	22
2.1 羟基磷灰石微米管的制备及其理化性能表征 .....	22
2.1.1 实验材料.....	22
2.1.2 实验方法.....	23
2.1.3 实验结果与讨论.....	24
2.1.4 结论.....	25
2.2 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的制备及其理化性能表征 .....	25
2.2.1 实验材料.....	25
2.2.2 实验方法.....	26
2.2.3 实验结果与讨论.....	28
2.2.4 结论.....	35
2.3 羟基磷灰石微米管及其 GelMA 水凝胶复合支架的体外研究 .....	35
2.3.1 实验材料.....	35
2.3.2 实验方法.....	38
2.3.3 实验结果与讨论.....	50
2.3.4 结论.....	54
2.4 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的体内促骨修复研究 .....	54
2.4.1 实验材料.....	54
2.4.2 实验方法.....	56
2.4.3 实验结果与讨论.....	60
2.4.4 结论.....	64

2.5 本章小结.....	64
第3章 没食子酸改性多维度钙基生物材料及其促骨修复的研究....	66
3.1 羟基磷灰石纳米颗粒/纳米线的制备及其没食子酸改性生物材 料的理化性质表征 .....	66
3.1.1 实验材料.....	66
3.1.2 实验方法.....	67
3.1.3 实验结果与讨论.....	68
3.1.4 结论.....	73
3.2 没食子酸改性多维羟基磷灰石钙基材料的光热性能研究 .....	74
3.2.1 实验材料.....	74
3.2.2 实验方法.....	74
3.2.3 实验结果与讨论.....	75
3.2.4 结论.....	80
3.3 没食子酸改性羟基磷灰石材料的体外细胞学研究 .....	80
3.3.1 实验材料.....	80
3.3.2 实验方法.....	82
3.3.3 实验结果与讨论.....	84
3.3.4 结论.....	86
3.4 低热刺激促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的研究 .....	86
3.4.1 实验材料.....	86
3.4.2 实验方法.....	88
3.4.3 实验结果与讨论.....	89
3.4.4 结论.....	92
3.5 没食子酸改性三维生物支架的体内促骨缺损修复的研究 .....	92
3.5.1 实验材料.....	92
3.5.2 实验方法.....	94
3.5.3 实验结果与讨论.....	95
3.5.4 结论.....	101
3.6 本章小结.....	102
第4章 结论与展望 .....	103
4.1 结论.....	103
4.2 展望.....	103
参考文献.....	105

## 英文缩写对照表

### Abbreviation Index

缩写	英文全称	中文全称
ACP	Amorphous calcium phosphate	无定形磷酸钙
BM	Deminealze bone matrix	脱钙骨基质
BMP	Bone morphogenetic	骨形态发生蛋白
BMSCs	Bone marrow mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
BV	Bone volume	骨体积
BV/TV	Bone volume/total volume	骨体积分数
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
GA	Gallic acid	没食子酸
CaP	Calcium phosphate	磷酸钙
CCK8	Cell counting kit-8	细胞计数试剂盒
CDHA	Calcium deficient hydroxyapatite	缺钙羟基磷灰石
Col I	Type I Collagen	I 型胶原
DCPA	Dicalcium phosphate anhydrous	磷酸氢钙
DCPD	Dibasic calcium phosphate dehydrate	二水合磷酸氢钙
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	DMEM 细胞培养基
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
EDS	Energy dispersive spectrometer	能量色散谱
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FGF	Fibroblast growth factor	成纤维细胞生长因子
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	傅里叶变换红外光谱
GBM	Gallic acid modified deminealze bone matrix	没食子酸改性脱钙骨基质
GelMA	Gelatin methacryloyl	甲基丙烯酸酐化明胶
GNP	Gallic acid modified hydroxyapatite nanoparticles	没食子酸改性 HA 纳米颗粒
GNW	Gallic acid modified hydroxyapatite nanowires	没食子酸改性 HA 纳米线
HA	Hydroxyapatite	羟基磷灰石

HAMT	Hydroxyapatite microtubes	羟基磷灰石微米管
HANP	Hydroxyapatite nanoparticles	羟基磷灰石纳米颗粒
HANW	Hydroxyapatite nanowires	羟基磷灰石纳米线
HE	Hematoxylin & Eosin	苏木精&伊红
IGF	Insulin-like growth factor	血管内皮生长因子
MCPM	Monobasic calcium phosphate monohydrate	一水合磷酸二氢钙
Micro-CT	Micro computer tomography	微计算机断层扫描
NB	Newborn bone	新生骨
NIR	Near-infrared	近红外光
OCN	Osteocalcin	骨钙蛋白
OCP	Octacalcium phosphate	磷酸八钙
OPN	Osteopontin	骨桥蛋白
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PI	Propidium iodide	碘化丙啶
PS	Penicillin/streptomycin	青链霉素（双抗）
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量聚合酶链反应
SAED	Selected area electron diffraction	选区电子衍射
SEM	Scanning electron microscopy	扫描电子显微镜
Tb.N	Trabecular number	骨小梁数量
Tb.Sp	Trabecular separation	骨小梁分离度
TEM	Transmission electron microscopy	透射电子显微镜
TGF- $\beta$	Transforming growth factor	转化生长因子- $\beta$
TTCP	Tetracalcium phosphate	磷酸四钙
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
WB	Western blot	蛋白免疫印迹
$\alpha$ -TCP	$\alpha$ -tricalcium phosphate	$\alpha$ -磷酸三钙
$\beta$ -TCP	$\beta$ -tricalcium phosphate	$\beta$ -磷酸三钙



## 第1章 引言

### 1.1 骨缺损的概况及治疗现状

#### 1.1.1 骨缺损的概况

骨缺损是指由先天或后天原因造成,骨结构的完整性被破坏的疾病。常见的原因包括创伤、炎症、肿瘤的外科治疗等等<sup>[1]</sup>,而因其所致的骨缺损,特别是长段骨缺损,是除骨折所致的骨不连引起的患者功能丧失,严重影响生活质量的另一重要原因。学术上常使用“临界骨缺损”或“大段骨缺损”来描述长度超过2 cm或深度超过50%骨周径的骨缺损<sup>[2,3]</sup>。目前随着社会老龄化的加剧,意外创伤的增加,由于意外创伤、骨科疾病等多种原因所致的骨缺损也越来越多。有研究报道,约有0.4%的外伤骨折患者伴有临界骨缺损,主要为粉碎性骨折和开放性骨折<sup>[4]</sup>。在全球范围内,每年有超过100万例由于颅面部临界骨缺损而进行的骨移植手术<sup>[5]</sup>,给社会造成巨大的经济负担。另一方面,骨缺损还容易继发感染、骨不连、创伤性骨化甚至休克等并发症<sup>[6,7]</sup>,导致患者功能不良甚至丧失致残,严重影响患者及家属的生活质量,危害患者的健康甚至生存,因此是临床亟待解决的重点和难点问题。

#### 1.1.2 骨的生物学结构及生理愈合过程

骨是人体主要的硬组织器官,由柔软的胶原和坚硬的羟基磷灰石矿物组成,具有显著的层次结构,起到支撑和保护各种器官的作用<sup>[8]</sup>。不同物种的骨骼结构在宏观层面上具有多样性,然而其基本构成单位均是由胶原分子连接并通过羟基磷灰石晶体矿化形成的矿化胶原纤维组成,两者的比例决定了骨骼的刚度从而影响其功能<sup>[9,10]</sup>。例如,耳部的骨骼,如听小骨和内耳等的矿物质含量超过80%,这有利于声波的振动从而高保真的传递声音信息,但韧性较差,无法吸收能量<sup>[11]</sup>。相反的,鹿角中的胶原占比非常高,这可以让鹿角受到能量冲击时通过形变来吸收能量,然而无法承重<sup>[12]</sup>。而维持运动所必须的长骨的矿物质含量占比超过20%,从而可以兼顾承重与轻便能力,允许灵活的运动,同时,还能一定程度的吸收能量<sup>[13]</sup>。因此,在进行骨缺损修复时需兼顾胶原纤维的再生和矿化两方面问题。

骨的修复愈合与其它组织不同,其愈合过程被认为是骨骼胚胎发育过程的重演,可以修复至损伤前相同的结构和功能<sup>[14]</sup>。生理骨愈合过程分为原发性骨愈合

和继发性骨愈合两类。原发性骨愈合又称为直接骨愈合，主要发生于间隙小于 0.1 mm 且骨折固定牢固时。有学者认为，直接骨愈合是通过连续骨化和哈佛式小管重塑直接填充修复的，无软骨或结缔组织的参与<sup>[15,16]</sup>。然而，此观点由于缺乏组织学和临床证据仍存在争议<sup>[15,16]</sup>。继发性骨愈合也叫间接骨愈合，是更为常见的骨愈合形式，涉及多种生理过程，如凝血、炎症反应、纤维组织愈合、膜内或软骨内成骨以及骨重建<sup>[17]</sup>，常被分为四个复杂连续的阶段：血肿机化期、骨痂形成期、骨性愈合期和骨折改造塑形期。此过程中主要的生理事件和活动如图 1.1 所示，在初期以合成代谢活动为主，通过招募干细胞分化和延迟软骨细胞凋亡从而增加骨量<sup>[18,19]</sup>，而后期则以分解代谢活动为主，以减少纤维愈合组织和骨性重建，需要注意的是，合成代谢活动在后期依然会进行<sup>[14,20]</sup>。

大段骨缺损或临界骨缺损是骨修复中的一种极端情况，由于大量的骨丢失，其血运重建和组织分化会受到严重影响，最终导致自发性骨折，若不加干预则易演变为骨折不愈合<sup>[16,21]</sup>。

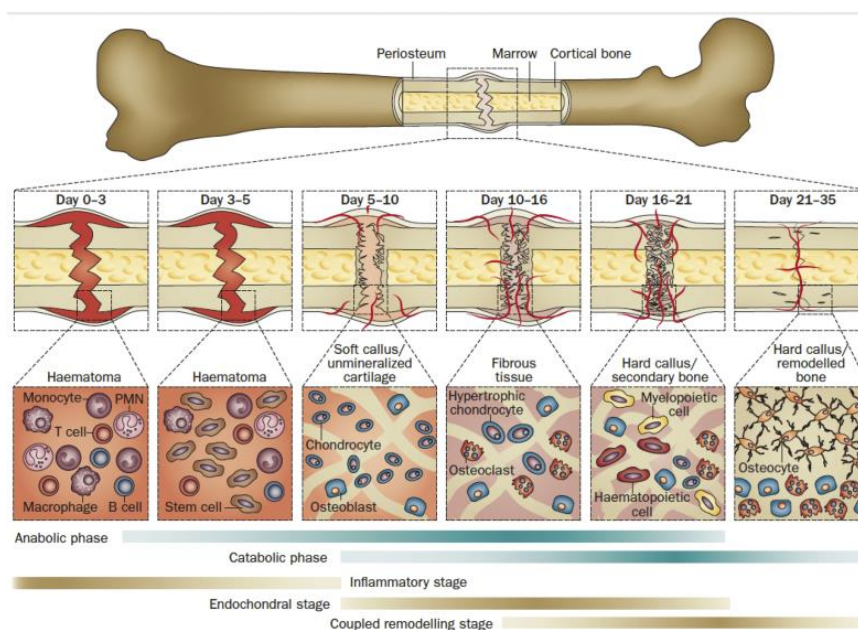


图 1.1 经典骨折愈合过程和生理事件图示。下方棕色长条为生理骨折愈合阶段，

蓝色长条为与愈合相重叠的主要代谢阶段<sup>[14]</sup>

### 1.1.3 骨缺损的治疗现状

对于骨缺损的治疗，目前临床常用的治疗方式有骨移植、膜引导再生技术、Ilizarov 技术以及骨组织工程再生技术等<sup>[6,17,22,23]</sup>，然而，随着经济的发展、科技的进步以及医疗水平的不断提高，人们对于医疗质量的追求也在不断增长，因此，尽管有众多的治疗方式可供选择，仍旧存在不少缺陷，难以满足临床应用中对于

骨缺损治疗的实际要求<sup>[3]</sup>。近来,许多学者聚焦于组织工程策略的研究,这些研究表明骨传导支架、骨诱导生长因子和具有成骨潜力的细胞是骨愈合必不可少的三个因素<sup>[22]</sup>。

### 1.1.3.1 骨移植

用于骨缺损治疗的骨移植物需要具备机械支撑和促骨再生的综合功能<sup>[24]</sup>,包括三个重要的生物学特性:骨传导性、骨诱导性和骨生成性<sup>[25]</sup>。骨传导性指支持骨祖细胞和成骨细胞附着,并允许细胞在其三维结构内部迁移和内向生长的能力。骨诱导性为具备诱导未分化的多能干细胞定向分化为成骨细胞,促进骨再生的能力。骨生成性指宿主或移植物来源的供体细胞进行骨分化从而形成新生骨<sup>[26]</sup>。此外,骨整合性也是评价骨缺损修复材料的一个重要标准,具体是指骨移植物与其周边新生骨组织在骨移植物-骨界面的锚定能力<sup>[25]</sup>。骨移植物根据来源可以分为自体骨移植、异体/异种骨移植和人工骨移植物。部分常见的骨移植物及其特性和缺点见表 1.1。

表 1.1 常见骨移植物及其特性和缺点<sup>[27]</sup>

骨移植物		骨传 导性	骨诱 导性	骨生 成性	骨整 合性	结构支 撑性	缺点
自体骨 移植物	松质骨	+++	+++	+++	+++	-	来源受限; 供体并发症多
	皮质骨	+	+	+	+	+++	
异体/异 种骨移 植物	松质骨	+	+	-	++	-	疾病和病毒传播风险; 免疫排斥反应
	皮质骨	+	-	-	+	+++	
	BM	+	++	-	++	-	
人工骨 移植物	硫酸钙	+	-	-	++	+	降解过快, 且仅有骨传导性
	羟基磷 灰石	+	-	-	-	++	降解较差, 仅有骨传导性
	磷酸钙 陶瓷	+	-	-	+	++	仅有骨传导性
	生物活 性玻璃	+	-	-	-	-	仅有生物活性和骨传导性

注释: “+”表示具有该性质, 数量表示程度; “-”表示不具有该性质。

(1) 自体骨移植。自体骨移植是将同一个体采集的骨移植物移植至另一部位的方法<sup>[26]</sup>。自体骨移植物具有良好的骨传导性、骨诱导性和骨生成性, 可以更

快、更完整的与周围骨组织融合，因此也被认为是骨缺损治疗的金标准以及评估其余骨移植物的基准<sup>[28,29]</sup>。常见的自体骨来源部位有髌骨、股骨、胫骨近端和腓骨，包括松质骨移植物和皮质骨移植物<sup>[29]</sup>。松质骨移植物含有大量的成骨细胞、间充质干细胞、成骨活性因子如骨形态发生蛋白（BMP）、生长因子等，因此具有良好的骨诱导性和骨生成性，移植时可以充分填充骨缺损部位，为血管和细胞的浸润和内向生长提供了良好的基质<sup>[30]</sup>。但松质骨移植物缺乏足够的机械支撑，常作为内固定或外固定的辅助手段。相较于此，皮质骨移植物则主要作为骨传导性移植物，具有良好的骨传导性，可以提供出色的机械支撑，但由于皮质骨移植物所含的骨祖细胞数量和活性因子较少，导致其骨诱导性能较差<sup>[26,29]</sup>。此外，已有许多研究报道了自体骨移植物的缺点，包括疼痛、二次手术风险、失血增加、手术时间增加、采集部位感染以及可用移植物有限等<sup>[24,31]</sup>，有报道表明这些并发症的发病率为 8.6%<sup>[32]</sup>。

铰刀-冲洗器-抽吸器（RIA）系统的发展为自体骨移植物的收集提供了一种新的方法，一定程度上解决了自体骨移植物获取的限制，降低了自体骨移植并发症的发生率<sup>[33,34]</sup>，且所获自体骨移植物中的生物活性成分，如干细胞和生长因子含量更好<sup>[35,36]</sup>。然而，RIA 系统仍存在医源性骨折、皮质穿孔、失血和异位骨化等并发症<sup>[34,37]</sup>。

（2）异体/异种骨移植。异体/异种骨移植物来自于同种异体或异种异体的供体，是自体骨移植良好的替代方案，尤其是同种异体移植物，由于其来源相对丰富、无供体部位并发症和即用型的特点<sup>[38]</sup>，因而受到患者和外科医生的青睐，在北美地区，约占所有骨移植物的三分之一<sup>[29]</sup>。然而，由于免疫相容性不匹配，导致主要组织相容性复合体（MHC）抗原被激活，异体/异种骨移植相较于自体移植表现出更高的失败率<sup>[39]</sup>。另一方面，新鲜的移植物存在着疾病和病毒传播的风险，而随着现代组织库的发展和加工技术的改进，这些风险有所改善，但由于受到储存和灭菌技术的限制，异体/异种移植物的骨诱导功效也受到了影响<sup>[40,41]</sup>。

脱钙骨基质（Demineralized bone matrix, BM）是一种经高度加工后的异种/异体骨移植衍生物，通常使用弱酸将骨基质中至少 40%的矿物质去除，保留胶原蛋白、非胶原蛋白和生长因子<sup>[42]</sup>。BM 的骨传导性主要源于为细胞增殖和新骨生成提供的组织框架结构<sup>[24]</sup>。其骨诱导性则由脱钙后残余的生长因子决定<sup>[17]</sup>。然而脱钙会破坏其结构的完整性和机械性能，导致 BM 主要用于骨缺损的填充<sup>[28]</sup>。

（3）人工骨移植。人工骨移植物是指可以替代天然来源的骨移植物进行骨缺损修复的人工骨修复材料，是基于细胞生物学和材料科学的原理及技术，在体外构建替代材料，修复缺损组织。良好的人工骨修复材料具有材料来源广泛、价格低廉易获取、可根据不同临床要求进行设计，且具有与生物骨组织相近的机械

性能和生物特性等优点,具有非常良好的发展前景<sup>[43]</sup>。基于上述骨的生物学结构和骨愈合的生理过程,理想的人工骨修复材料便需要具备以下几点特性<sup>[44]</sup>:①优异的生物相容性。这是人工骨修复材料在宿主体内发挥作用的前提条件,植入物应尽量降低与宿主产生的免疫排斥反应,减少过激的炎症反应发生。②优异的生物活性。理想的人工骨生物材料还需要具备良好的骨传导性、骨诱导性和骨生成性能,从而促进成骨细胞和骨祖细胞的黏附、增殖和分化,这是促进骨愈合非常重要的三个因素。③优异的生物降解性。植入的人工骨修复材料需要在早期提供细胞附着生长的支架,然后在修复过程中逐步被降解以替换新生骨<sup>[45]</sup>。④优异的机械性能。自然骨组织由皮质骨和松质骨组成,两者因组分和结构的不同而表现出不同的力学性能。植入人工骨修复材料应具有良好的生物力学性能从而匹配天然组织的机械性能,以便在骨再生的过程中提供有效的支持,良好的机械性能有利于细胞的黏附、迁移、增殖和分化<sup>[46-48]</sup>。

因此,想要设计赶超自然骨结构功能的理想骨移植材料是一个巨大的挑战。自20世纪60年代开始,第1代人工骨修复材料便进行研发应用,这代骨修复材料主要追求材料的理化特性和宿主相匹配,且要求毒性反应最小,因而被称为生物惰性材料<sup>[49]</sup>。第1代人工骨修复材料主要包括金属材料、聚合物材料和陶瓷材料。但这些骨修复材料存在耐磨性和骨整合性能较差的问题<sup>[50]</sup>。Kulkarni则提出了生物活性材料,即第2代人工骨修复材料,主要以可生物降解的人工合成和天然衍生的聚合物材料为主。这类材料的主要特点为能在体内经过化学分解,并根据应用目的调整其机械性能和降解的动力学特征,因而被广泛应用于生物材料领域<sup>[51]</sup>。至1969年,Hench教授制备了生物活性玻璃,也是第1种人工生物活性骨修复材料<sup>[52,53]</sup>。此后,关于第2代人工骨修复材料的研究蓬勃发展,出现了人工合成聚合物、磷酸钙陶瓷、复合金属元素材料等生物活性材料。然而,前两代生物材料在进一步的研究和改进上受到了一定程度的限制,生物体组织可以针对不断变化的生理负荷或生化刺激做出反应,而合成的生物材料却不能,这限制了人工生物材料的寿命<sup>[49]</sup>。随后,Hench教授提出了既具有生物活性,同时又可降解的第3代生物材料。第3代生物材料是在分子水平上刺激进而产生特定的细胞反应,主要通过特定的方法和技术手段对材料进行修饰,从而提高材料的生物活性,改善材料对细胞的定向诱导分化能力,促进组织的修复<sup>[54]</sup>。

目前,人工骨修复材料获得了飞速发展,主要可分为无机材料、有机高分子材料和复合材料。

无机材料具有较好的骨传导性和力学支撑性能,早期使用的生物惰性材料便以无机材料为主,主要包括金属材料和非金属材料。金属材料中以钛、金、镁和不锈钢材料使用较多<sup>[29]</sup>。Branemark教授耗时6年推出了钛合金植入物,在不影

响机械性能的情况下又大大降低了骨移植物的排斥反应<sup>[55]</sup>。同时,钛金属及其合金具有良好的骨整合性,目前在临床应用较多<sup>[56,57]</sup>。镁的机械性能更接近自然骨组织,可以降低应力遮挡效应<sup>[58]</sup>。此外,镁离子是人体内第四丰富的阳离子,超过 60%的镁在骨骼和牙齿中聚集<sup>[59,60]</sup>。许多研究表明,适当的镁离子刺激可以促进成骨细胞的附着、增殖以及间充质干细胞的成骨分化<sup>[61,62]</sup>,甚至促进磷酸钙的结晶从而增加细胞外基质的生物矿化<sup>[63]</sup>。无机非金属材料又被称为陶瓷材料,通常需经过高温定型处理,其中,以磷酸钙类材料和生物活性玻璃的研究及应用较多<sup>[64]</sup>。磷酸钙是脊柱动物骨与牙齿的主要无机成分,临床应用的许多植入物,包括髋关节假体、牙科植入物等,表面均涂覆有磷酸钙材料<sup>[65]</sup>。此外,磷酸钙骨水泥具有高微孔率、生物相容性和机械支撑能力<sup>[66]</sup>,被广泛应用于椎体成形术<sup>[67]</sup>。生物活性玻璃是一组以硅酸盐为主的合成陶瓷,其中硅酸盐约占 45%-52%,其余成分包括二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )、氧化钠( $\text{Na}_2\text{O}$ )、氧化钙( $\text{CaO}$ )、氧化镁( $\text{MgO}$ )和氧化硼等( $\text{B}_2\text{O}$ )<sup>[27,68]</sup>。生物活性玻璃与宿主骨界面的结合能力较强,具有良好的骨整合性<sup>[69]</sup>。然而,无机材料仍存在韧性较差,易脆易断,且降解性能较差的缺点。

有机高分子材料包括天然高分子材料、人工合成高分子材料和脱细胞细胞外基质(decellularized extracellular matrix, dECM)。天然高分子材料由于出色的生物相容性和生物降解性,且与细胞外基质相似,引起了广泛关注<sup>[70]</sup>。主要分为基于多糖的海藻酸盐、透明质酸和壳聚糖等<sup>[71]</sup>,以及基于蛋白质的胶原蛋白、纤维蛋白、明胶和丝素蛋白等<sup>[72]</sup>。然而,天然高分子材料相对较差的机械性能限制了其在骨组织修复中的应用,通常需要经过改性或复合其它材料以提高其力学性能<sup>[73]</sup>。人工合成高分子材料可以通过对其结构和组分的修饰调控,从而制备具有更加良好的理化性质、机械性能、生物降解性及微观孔隙结构的材料<sup>[74,75]</sup>。目前研究较多的合成高分子材料是以脂肪族聚酯为主的合成聚合物,包括聚乳酸(poly(lactic acid), PLA)、聚羟基乙酸(poly(glycolic acid), PGA)、聚己内酯(poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL)和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactide-co-glycolide), PLGA)。然而,这些聚合物由于缺乏功能基团,导致其与细胞活性基团结合的能力较差,降低了其细胞亲和性<sup>[76]</sup>。dECM是一种来源于生物组织,经过系列处理后将细胞脱去的天然生物支架。dECM是最接近天然组织的支架,在脱细胞处理过程中,保留了ECM独特的微观和宏观的结构组成和生物活性成分,具有良好的生物相容性和生物活性<sup>[77,78]</sup>。研究表明,dECM植入宿主后可以对内源性的干细胞和祖细胞进行招募,并对宿主免疫反应进行调节,从而刺激组织修复并产生原位重塑效应<sup>[79,80]</sup>。然而,dECM同样存在供体短缺,来源较少的缺点<sup>[70]</sup>。

综上所述,不论是无机材料还是有机材料都有各自较为明显的缺点,无法单

一应用进行骨缺损修复的治疗,因此便出现了以两种或多种不同材料为主的复合材料,进而利用各自的优点弥补存在的缺陷,有的甚至还能获得单一组分所不具备的额外性能<sup>[81]</sup>。复合材料包括无机-无机复合材料、有机-有机复合材料和有机-无机复合材料,其中有机-无机复合材料能更好的优势互补,因而更受青睐<sup>[82]</sup>。然而,复合材料通过增加无机材料从而改善机械性能或增强生物活性仍存在的问题,由于复合支架中有机高分子材料部分较无机材料部分降解更快,当有机材料支架部分降解后便只剩下了脆性的无机支架<sup>[83]</sup>。

基于上述讨论,目前人工骨修复材料仍存在许多问题,故此,解决这些问题并寻找合适优良、安全有效的人工骨修复材料便成为近年来医用材料的研究重点与热点。在2006-2020年国家中长期科学和技术发展规划纲要中,也已将生物医用材料作为重点领域及优先主题,其中骨组织修复材料是需要攻克的关键技术之一。<sup>[84, 85]</sup>

### 1.1.3.2 膜引导再生技术

膜引导再生技术是一种用于长骨节段性骨缺损的治疗手段,由Masquelet教授于2000年提出,因此又称为Masquelet技术<sup>[86]</sup>。该技术是一个临时骨水泥间隔引导纤维膜生成和骨移植物填充引导骨缺损修复的两阶段修复技术<sup>[87]</sup>。第一阶段手术需要彻底清除骨缺损部位坏死的软组织和骨组织,然后将聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)骨水泥间隔植入,并使用钢板或髓内钉进行固定。由于免疫排斥反应的发生,骨水泥间隔的周围会生成纤维膜。待6-8周后实行第二阶段手术,将骨水泥替换为自体骨移植物,若骨缺损体积过大而自体骨移植物的量不足,则可以混合部分同种异体骨移植物<sup>[88]</sup>。

PMMA骨水泥的植入具有多方面的优势,包括结构支撑和生物活性等方面。首先,植入的PMMA骨水泥可以有效的防止缺损部位的血肿形成和纤维组织生长,为后续骨植入物和骨生长保留空间,并提供一定的骨支撑和软组织张力。其次,植入的骨水泥通过预先抗生素浸泡处理,可以将抗生素输送至缺损部位,提高局部有效浓度,为后续自体骨移植创造良好的植骨条件。最后,诱导生物活性膜在骨水泥周边形成<sup>[3]</sup>。已有研究证明,生物活性膜具有高度的血管化且包含各种成骨诱导因子,如骨形态发生蛋白2(Bone morphogenetic protein 2, BMP-2)、血管化内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、转录生长因子- $\beta$ (Transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ )及一型胶原蛋白(Type I collagen, Col-I)等<sup>[89, 90]</sup>。此外,该生物活性膜还含有间充质干细胞,具有成骨特性<sup>[91, 92]</sup>,而在皮下或肌肉部位诱导形成的纤维膜则不包含间充质干细胞<sup>[93, 94]</sup>。

目前,膜引导再生技术已被成功应用于由骨髓炎、骨肿瘤切除术后、感染性骨不愈合和创伤性骨不连等所引起的临界骨缺损的临床治疗<sup>[95-97]</sup>。然而,关于膜

引导再生技术的研究较少且缺乏与其它方法的对比,因而其有效性和适用性还需要进一步的评估与确定<sup>[22]</sup>。此外,关于骨移植物以及内固定的选择还存在较大争议。新鲜的自体松质骨移植是金标准,然而在临床运用中常常会因为采集的数量不足需要添加异体或异种骨,但具体添加何种移植骨仍需要进一步研究。而对于内固定物来说,使用不同的内固定物,如钢板、螺钉、髓内钉和外固定架等的疗效也不一致<sup>[22]</sup>。另一个需要进一步探究的问题是第二阶段手术实施的最佳时间。Masquelet 教授最初建议的是 6-8 周<sup>[86]</sup>,然而,有研究报道生物活性膜中的 BMP-2 在 4 周时达到最高水平<sup>[90]</sup>,且在 4 周时发现了最高水平的血管和细胞分布<sup>[89, 91]</sup>,这些研究提示纤维膜生物活性最佳的时候是骨水泥植入的第 4 周,因此也有学者主张提前进行骨移植<sup>[98]</sup>。

膜引导再生技术的并发症包括感染、畸形愈合、骨折和骨不连等。其中,感染是最常见的并发症,两阶段的手术也会进一步加大患者感染的风险及痛苦<sup>[99]</sup>。尽管如此,膜引导再生技术仍是大段骨缺损的治疗中具有良好发展和应用前景的新型骨修复技术, Masquelet 教授认为应针对发挥诱导生物活性膜与骨移植物的协同效应做进一步的研究<sup>[100]</sup>。

#### 1.1.3.3 Ilizarov 技术

Ilizarov 技术又称为牵引成骨技术或骨搬运术,是利用骨在张力下自然再生能力实现的,由 Ilizarov 教授于 1950 年首次报道<sup>[101]</sup>。骨组织具有非常强的修复和重塑能力,有研究表明,骨细胞在合适的张力或应力刺激下会上调部分调控骨生长的基因<sup>[102]</sup>,并刺激骨细胞的增生<sup>[103]</sup>。Ilizarov 技术通常在骨缺损部位的远端干骺端行骨皮质切开术,以制造一个活骨的游离骨块,然后将游离骨块通过环形外固定架向骨缺损区域进行牵引,在牵引过程中,新生骨通过类似膜内成骨的方式在两侧骨皮质表面形成<sup>[101, 104, 105]</sup>。

Ilizarov 技术在体内所有长骨骨缺损应用中均取得了良好的治疗效果,在下肢骨缺损的治疗中,整体愈合率可以达到 95%<sup>[106]</sup>。然而,Ilizarov 方法的治疗周期较长,有的甚至长达数年,随着治疗周期的延长,牵引针部位感染、断裂,以及外固定环形架给患者造成的行动不便和经济负担也逐渐加重<sup>[106-108]</sup>。此外,由于长时间的牵拉,缺损部位的软组织包括肌肉和神经会出现显著的疼痛感<sup>[109]</sup>。最后,通过骨搬运术获得良好疗效最关键的部分是患者的配合。

#### 1.1.3.4 骨组织工程技术

骨组织工程技术是运用材料工程学和细胞生物学的原理与技术,在体外构建具有生理功能的骨修复替代材料,然后植入缺损区域后进行骨修复的技术<sup>[110]</sup>。组织工程最初起源于加利福尼亚州的国家科学基金会研讨会,后于 1988 年被



Skalak 教授正式报道<sup>[111]</sup>。对于应用于骨组织修复的组织工程支架，应主要考虑其表面粗糙度、孔径大小和孔隙率、孔洞互连性、生物降解性、生物相容性和机械性能<sup>[112]</sup>。骨组织工程技术的关键在于生物支架的选择和改进，以及种子细胞的复合。其构建组织工程支架的策略包括直接收集细胞种植于多孔支架上<sup>[113]</sup>；先构建包含细胞和生物活性因子的基本组建单元，然后再组装为复杂的功能单元，例如微孔水凝胶包封细胞<sup>[114]</sup>、自组装细胞集合体<sup>[115]</sup>、3D 细胞打印等方法<sup>[116]</sup>。然而，这些方法受限于种子细胞的体外扩增、植入支架后的存活、迁移、增殖和分化以及运输和储存等问题，致使其临床可行性较差<sup>[117,118]</sup>。因此，近年来提出了一种新的理念，即原位组织工程。原位组织工程是利用人体自身的再生能力进行组织修复<sup>[119]</sup>，通过制备特殊的组织特异性支架，从而控制局部微环境，募集宿主的干/祖细胞然后刺激它们进行增殖和分化<sup>[117]</sup>。这种策略去除了体外细胞操作，减少了构建再生组织支架所需的时间和资源<sup>[120]</sup>。相较于传统组织工程技术，原位组织工程技术更侧重于制备目标特异性的生物支架，辅助以生长因子，从而募集干细胞或特异性宿主祖细胞<sup>[121]</sup>。

综上所述，传统组织工程受限于种子细胞的选择和体外操作，而原位组织工程则需要非常优秀的募集宿主细胞再生的能力，尽管这种方式更接近与天然组织及修复环境，但仍需进一步探究和验证。

### 1.1.3.5 辅助促进骨愈合的治疗手段

除了上述对于大段骨缺损的治疗方式之外，还出现了许多辅助促进骨愈合的治疗手段。如对于人工骨修复材料，尤其是无机非金属材料，虽然具有良好的骨传导性，但是其骨诱导性较差甚至没有，因此辅以生长因子从而增强其骨诱导性的生物材料被制备。部分生长因子直接参与骨愈合过程，已被广泛研究，且证明其具有促骨再生的能力，包括 BMP、TGF- $\beta$ 、成纤维细胞生长因子（Fibroblast growth factor, FGF）、胰岛素样生长因子（Insulin-like growth factor, IGF）和血小板衍生生长因子（Platelet-derived growth factor, PDGF）等<sup>[17,122]</sup>。生长因子通过吸附、涂层、包封或化学结合等方法使其与不同的载体材料相结合，从而更有效的传递至局部缺损部位<sup>[123]</sup>。吸附是最简单的递送方法，但生长因子的释放不够持续，往往在植入后短时间内快速释放<sup>[124]</sup>。通过化学结合，如共价键反应的方式能较持久的将生长因子固定于载体上，从而延长释放时间，然而这种方式存在生长因子无法在环境中自由扩散的问题。包封是较为被接受的递送系统，可以同时解决快速释放和固定过度的问题，然而由于制备过程容易导致蛋白质变性，影响生长因子活性，需进一步研究更有效的载体制备方法<sup>[125]</sup>。所用于递送生长因子的载体要求不仅具备良好的生物相容性、生物降解性和力学支撑性能，还需要具有理想的孔隙率，这不仅能提高生长因子的搭载效率，同时也为细胞浸润和

血管生成提供了结构基础<sup>[125,126]</sup>。目前所使用的载体包括天然高分子材料、合成高分子材料、磷酸钙陶瓷以及有机-无机复合材料等。

基因治疗是一种促骨愈合的新兴治疗方法,通过将成骨相关的遗传物质引入细胞中,在分子水平上改变细胞的功能或结构,从而促进骨再生<sup>[127]</sup>。基因治疗主要分为体内和体外两种方法<sup>[128]</sup>。体内基因治疗是通过载体携带治疗基因进入受体内,然后在体内进行基因转移并翻译表达相关蛋白质,这种方法难以靶向特定的细胞群,常常影响周围组织细胞甚至全身,特异性较差。体外基因治疗则是通过先在体外转染特定细胞群,然后将细胞群植入受体,这种方法特异性较高,但需要较多的时间和经济成本。用于传递基因的载体分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体比非病毒载体的基因转移效率更高,部分可以将目的基因整合至宿主细胞的基因组中,从而表现出长程的转基因表达<sup>[129]</sup>。然而,由于需要保留病毒载体的感染性和基因整合能力,不可避免的会出现安全问题,如免疫反应、致癌风险等<sup>[130]</sup>。非病毒载体则是通过物理或化学的方法促进细胞对基因的吸收,如超声波刺激、电脉冲刺激或者通过化学结合的方式进行基因转移,然而非病毒载体的基因转移效率和持续时间较差<sup>[91]</sup>。总的来说,基因治疗是一种新颖的、靶向性高的治疗策略,但仍需进一步确定其安全性和有效性,根据具体的临床情况探究适合的治疗方式和基因转移载体。

除了上述方法以外,近年来人们逐步认识到适宜的生物物理刺激也能促进骨再生<sup>[131]</sup>。生物物理刺激是一门跨学科科学,通过物理刺激促进骨修复,可单独使用以促进骨修复和增强细胞合成代谢活性,或联合药物使用,从而增强药物活性并减少副反应。目前已被证明对骨或软骨修复有效的物理刺激有电刺激、电磁脉冲刺激、超声刺激、机械应力刺激和热刺激<sup>[132-136]</sup>。其中,电刺激、电磁脉冲刺激和超声刺激研究较为广泛。电刺激在  $0.1-10 \text{ mV cm}^{-1}$  时可以刺激大鼠颅骨骨细胞的增殖<sup>[137]</sup>。电磁脉冲刺激则与暴露的时间和强度有关系<sup>[138]</sup>。超声刺激对于人骨膜细胞的活性、增殖、骨钙蛋白和 VEGF 的表达呈显著的剂量依赖性效应,在暴露 20 分钟时具有最好效应<sup>[139]</sup>。而热刺激是较为普遍的物理刺激,恒温动物发热时体温仅升高  $1-2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,此时为生理性的低热刺激调节细胞的生长和代谢活动<sup>[140]</sup>。在骨折后,骨折局部区域皮温也较高,推测低热刺激对于骨组织修复也具有积极作用。目前已有研究表明低热刺激可以促进体外和体内组织再生修复,包括皮肤<sup>[141]</sup>、肌肉<sup>[142]</sup>,局部的物理热疗也对于骨吸收和骨形成具有积极作用<sup>[143]</sup>。血管重建对于骨再生至关重要,重复的低热刺激可以增强人微血管 HMEC-1 细胞系的体外血管形成倾向<sup>[144]</sup>。此外,重复低热刺激对于骨再生也表现出了积极的影响。低热刺激可以诱导人骨髓间充质干细胞和 MG-63 细胞增殖和体外成骨分化<sup>[145]</sup>。另外一项研究使用低热培养成骨细胞后的条件培养基,对骨髓间充质

干细胞进行培养,结果显示该骨髓间充质干细胞的骨钙素(OCN)表达和矿化增强<sup>[146]</sup>。然而,由于组织覆盖,将热能传递至特定局部区域进行刺激成为较大的难题,尽管已有研究提出使用直接热刺激、微波热刺激和光热刺激等<sup>[147,148]</sup>方式,但体内应用结果仍不尽满意。综上所述,生物物理刺激由于是一种非侵袭性的疗法,具有良好的应用前景,然而其物理能量传递、刺激时间、频率、功率大小等等均有待进一步研究。

## 1.2 磷酸钙生物材料在骨缺损修复应用中的研究进展

目前应用于骨缺损修复的人工骨修复生物材料种类繁多,详情参照 1.1.3.1 人工骨移植部分,而在如此众多的骨修复材料中,磷酸钙类材料因与天然骨组织的主要成分和化学结构相似,且具有良好的生物相容性、骨传导和骨诱导性能而占有不可或缺的一席之地。磷酸钙是一类广泛分布于天然矿物中的物质,最早发现的是磷灰石,由德国矿物学家 Werner 教授于 1788 年报道<sup>[149]</sup>,至 1926 年 Jong 教授发现骨骼中无机矿物质与羟基磷灰石的密切关系<sup>[150]</sup>,然后在上世纪 20 年代有学者提出了磷酸钙生物材料用于骨再生的治疗策略<sup>[151]</sup>。随后,随着科技的进步,关于磷酸钙类材料的基础与临床应用研究被广泛开展。通过不同的方法,如湿法、仿生法、溶胶-凝胶法等方法对磷酸钙材料的成核、结晶和生长过程进行调控,可以合成具有各种尺寸与形貌的磷酸钙材料,从而满足不同的应用需求<sup>[152-154]</sup>。同时,CaP 材料与不同有机高分子材料结合能制备具有更好机械性能、生物相容性和生物活性的复合材料,或辅以装载药物、生长因子等方式提高复合材料的骨修复能力<sup>[155,156]</sup>。

### 1.2.1 磷酸钙骨修复生物材料的种类及其在骨修复中的应用

磷酸钙是人体骨骼和牙齿中主要的无机成分,已被广泛应用于骨再生的研究<sup>[157]</sup>。研究发现,磷酸钙生物材料的生物活性与其种类有关,如不同种类的磷酸钙材料具有不同的 Ca/P 比,这会导致钙离子和磷酸根离子的释放不同,从而影响局部环境的 pH 不一致,且对成骨和破骨细胞的调节不一致<sup>[158-160]</sup>。而磷酸钙材料的孔隙率和表面性质如粗糙度、亲水性等通过影响细胞的生长和蛋白质的吸附从而调控生物矿化过程<sup>[161-163]</sup>。此外,磷酸钙材料的溶解度、稳定性以及机械强度等性质对其骨传导性和骨诱导性都有着重要影响<sup>[157]</sup>。因此,掌握不同磷酸钙材料的特性并选择合适的磷酸钙材料尤为重要,目前常用于生物学研究和应用的磷酸钙材料包括一水磷酸二氢钙(MCPM),磷酸氢钙(DCPA)、二水磷酸氢钙(DCPD)、磷酸三钙(TCP)、磷酸四钙(TTCP)、磷酸八钙(OCP)、羟基磷

灰石 (HA)、缺钙羟基磷灰石 (CDHA) 和无定形磷酸钙 (ACP), 其具体信息如表 1.2 所示。

表 1.2 常见磷酸钙材料的种类及其化学式、钙磷比、稳定性和溶解度<sup>[164]</sup>

名称	化学式	Ca/P	pH 稳定范围	25°C溶解度 (g L <sup>-1</sup> )
一水合磷酸二氢钙 (MCPM)	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.5	0.0-2.0	~18
磷酸氢钙 (DCPA)	CaHPO <sub>4</sub>	1.0	2.0-5.5(> 80°C)	~0.048
二水合磷酸氢钙 (DCPD)	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0	2.0-6.0	~0.088
α-磷酸三钙 (α-TCP)	α-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.5	温度 > 1125°C 时沉淀	~0.0025
β-磷酸三钙 (β-TCP)	β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.5	温度 > 800°C 时沉淀	~0.0005
磷酸四钙 (TTCP)	Ca <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O	2.0	温度 > 1300°C 时沉淀	~0.0007
磷酸八钙 (OCP)	Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.33	5.5-7.0	~0.0081
羟基磷灰石 (HA)	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	1.67	9.5-12.0	~0.0003
缺钙羟基磷灰石 (CDHA)	Ca <sub>10-x</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6-x</sub> (OH) <sub>2-x</sub> (0<x<1)	1.5- 1.67	6.5-9.5	~0.0094
无定形磷酸钙 (ACP)	Ca <sub>x</sub> H <sub>y</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>z</sub> ·nH <sub>2</sub> O, n=3-4.5, 15%-20% H <sub>2</sub> O	1.2- 2.0	5-12	- <sup>1</sup>

注释：无定型磷酸钙的溶解度无法精确测量。然而，部分 pH 下的溶解度测量如下：pH= 7.4: 25.7 ± 0.1、pH= 6: 29.9±0.1、pH= 5.28: 32.7±0.1。在酸性环境中，各种磷酸钙材料的相对溶解度排序如下：ACP > α-TCP > β-TCP > CDHA > HAP<sup>[164]</sup>。

### 一水磷酸二氢钙 (MCPM)

MCPM 是水溶性和酸性最强的磷酸钙类材料，通常不会在生物体中形成。MCPM 可以通过 Ca(OH)<sub>2</sub> 与 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 反应，然后在酸性环境中低温蒸发来制备<sup>[165]</sup>。MCPM 常用作食品添加剂及制备牙膏，然而由于其酸性过强，单纯的 MCPM 在骨修复方面的生物相容性较差，因而常与其它磷酸钙材料混合使用<sup>[166]</sup>，如与 β-TCP 混合制备骨水泥应用于骨缺损修复<sup>[167]</sup>。

### 磷酸氢钙 (DCPA)

DCPA 是酸性磷酸钙材料中具有第二酸度的材料。一般由 Ca(OH)<sub>2</sub> 中和 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 中的两个 H<sup>+</sup> 产生，具有两种结晶态：DCPA 和 DCPD。DCPA 是 DCPD 的

无水结晶态，由于不存在水合分子，所以 DCPA 较 DCPD 的水溶性低。两者在 100 °C 时均可以从水溶液中析出，不同的是 DCPA 不会在生物体内形成，正常钙化或病理性钙化中均无 DCPA 存在<sup>[164]</sup>。DCPA 与 MCPM 相同，常与其它磷酸钙材料混合制备骨水泥，也用作食品和牙膏中的钙磷来源<sup>[168-170]</sup>。

### 二水合磷酸氢钙 (DCPD)

DCPD 又被矿物学家称作透磷钙石，是 DCPA 的二水合结晶态。DCPD 是最容易合成的磷酸钙化合物<sup>[168]</sup>，在室温下调节 pH 在 3-4 范围，然后通过  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  和  $\text{H}_3\text{PO}_4$  的中和反应可得。也可以使用含钙磷酸盐在微酸环境中通过复分解反应制备，或者使用钙盐，如碳酸钙在酸性的正磷酸盐溶液中反应合成<sup>[169]</sup>。然而，DCPD 较不稳定，在不同 pH 环境中易转化为其它磷酸钙化合物，在 pH 小于 6 时转化为 DCPA，6-7 时转化为 OCP，当 pH 大于 7 时则转化为 CDHA<sup>[164]</sup>。DCPD 由于具有一定的生物相容性、生物可降解性和骨传导性，而被用做骨水泥和牙膏组分，以促进骨和牙齿矿化<sup>[168, 171]</sup>。值得注意的是，DCPD 被发现在体内会转化为 CDHA<sup>[172]</sup>，而当大量 DCPD 植入体内发生此转化过程时会释放大量酸性物质，从而引起严重的炎症反应<sup>[173]</sup>。

### 磷酸三钙 (TCP)

TCP 是目前研究最多的磷酸钙材料之一，分为  $\alpha$ -TCP 和  $\beta$ -TCP 两种结晶相。实际上存在几个组成接近 TCP 的 CaP 相，但常规所说的 TCP 仅限于化学组成为  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ，且 Ca/P 为 1.5 的 CaP 相。TCP 的溶解度非常低，然而无法通过水介质沉淀获得纯的结晶态 TCP<sup>[174]</sup>。结晶态 TCP 通常需在高温下制备。 $\alpha$ -TCP 由  $\beta$ -TCP 在 1125 °C 以上经过淬火完成相转变而制备，因此， $\alpha$ -TCP 也被认为是  $\beta$ -TCP 的高温相<sup>[175]</sup>。 $\beta$ -TCP 的制备则仅需 800 °C 以上，可以通过 CDHA 的热分解或酸性 CaP（如 DCPA）和碱（如 CaO）的固态相互作用生成<sup>[164]</sup>。然而，浙江大学唐睿康教授通过乙二醇等有机溶剂在相对较低的温度中（150 °C）制备了  $\beta$ -TCP<sup>[176]</sup>。TCP 的稳定性较好，可以长期保存于室温干燥的环境中，且  $\beta$ -TCP 较  $\alpha$ -TCP 更稳定<sup>[177]</sup>， $\alpha$ -TCP 较  $\beta$ -TCP 在水溶液中则具有更强的反应活性和比能，可水解为 CDHA<sup>[178, 179]</sup>。TCP 主要应用于骨水泥和生物陶瓷中，在临床应用中也表现出较好的骨传导性和骨诱导性<sup>[180, 181]</sup>。值得注意的是，单纯  $\alpha$ -TCP 的吸收速度较骨形成的速度快，难以匹配，因此常与其它 CaP 材料混合使用<sup>[164]</sup>。相反， $\beta$ -TCP 的吸收速度相对较慢，此外，与 HA 相比时， $\beta$ -TCP 具有更好的生物降解性和吸收率，且能促进细胞的粘附和增殖<sup>[182-184]</sup>。

### 磷酸四钙 (TTCP)

TTCP 是最基本的 CaP 相，呈亚稳定状态，在潮湿环境或水溶液中会逐渐水解为 HA 和  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ <sup>[175]</sup>。TTCP 常以 HA 等离子涂层的副产物出现，此副产物是

一种由高温相的  $\alpha$ -TCP、TTCP 和 CaO 的混合物<sup>[185]</sup>。TTCP 的化学合成过程仅可以在干燥空气或真空环境中进行，通过超 1300°C 的固相反应合成，若存在水蒸气，TTCP 则会分解为 HA<sup>[169,175]</sup>。在生物学应用中，TTCP 很少单独使用，常与 DCPA 或 DCPD 混合以制备自固化骨水泥<sup>[186]</sup>、生物复合材料<sup>[187]</sup>或根管封闭剂<sup>[188]</sup>。

### 磷酸八钙 (OCP)

OCP 与 ACP 和 DCPD 被认为是 HA 晶体形成的前驱体<sup>[189]</sup>，在骨形成和生物矿化过程中具有重要的生物学意义<sup>[190]</sup>。OCP 与 HA 的结构非常相似，且较 HA 更不稳定，同行在 6 小时内会完全水解为 CDHA<sup>[191]</sup>。此外，OCP 可能是非化学计量的，其结构中可能存是钙缺乏的 (Ca/P=1.26) 或钙过量的 (Ca/P=1.48)<sup>[192]</sup>。OCP 具有良好的骨诱导性，被广泛用于骨修复的研究，包括金属移植物的涂层、CaP 骨水泥以及复合骨修复支架材料等<sup>[193-195]</sup>。使用 OCP 颗粒与胶原蛋白构建的 OCP/Col 复合支架较单独的 OCP 具有更好的骨传导性，且其骨传导性与 OCP 的剂量呈正相关<sup>[196, 197]</sup>。有学者认为其促进骨形成的机制可能与 OCP 提供了可作为初始骨沉积的核结构，以及 OCP 向 HA 转化的过程对促进骨形成起到关键作用<sup>[198-200]</sup>。研究发现<sup>[198, 201]</sup>，在小鼠颅骨骨膜下区域植入 HA 的前驱体，包括 OCP、ACP 和 DCPA，以及 HA 颗粒，发现植入 OCP 出现骨组织的时间最短，约 1 周，ACP 和 DCPA 均约 3 周出现骨组织，最晚的为 HA 颗粒，从第 5 周开始出现骨组织，进一步表明了 OCP 良好的促骨形成能力。此外，在 OCP 组中，成骨细胞定位于 OCP 颗粒表面启动骨沉积，进一步的超微结构 SEM 检测也表明成骨细胞是直接附着于 OCP 表面从而形成骨基质，并且，围绕 OCP 周围形成的丝状和颗粒状复合物与膜内成骨最初形成的骨结节成分高度相似。因此，基于 OCP 良好的骨传导性和骨诱导性，OCP 在骨移植材料学以及骨缺损修复方面的研究及应用发展前景良好。而探究和理解 OCP 良好骨诱导性的生物学机制，以及 OCP 的钙磷化学计量比和微观结构对于其内在生物学活性的影响至关重要<sup>[202, 203]</sup>。

### 羟基磷灰石 (HA)

HA 是人体骨骼中占比最多的矿物质，约 70%<sup>[204]</sup>。在所有 CaP 材料中，HA 的稳定性和难溶度仅次于氟磷灰石 (FAP)。按照化学计量学，HA 的化学式应为  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ，然而，通常使用  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  来表示 HA，说明 HA 的六方晶胞是由两个 HA 分子构成<sup>[166]</sup>。HA 可以自然形成或人工合成，自然形成的 HA 六方晶体结构存在缺陷，这些缺陷通常被空位取代或离子填补，因此，研究中常用的 HA 为人工合成的无结构缺陷 HA<sup>[205]</sup>。人工合成的 HA 具有单斜晶体和六方晶体两种物相，在温度高于 250°C 时会由单斜晶体相转变为六方晶体相。六方晶体相的 HA 更加稳定，因此生物环境中的 HA 常呈现六方晶体相<sup>[206]</sup>。HA 是最稳定

的 CaP 材料, 被认为是骨骼中最终矿物质相, 其它所有 CaP 相均被认为是前驱体或次前驱体, 在较高的 pH 下会转变为热力学更稳定的 HA<sup>[157, 164]</sup>, 不同 CaP 物相的转变如图 1.2 所示<sup>[207]</sup>。此外, 由于 HA 晶胞结构的特性, 导致其 Ca/P 比也可能会发生显著的变化, 从而引起 HA 的理化性质发生改变。如 HA 的力学性能随着 Ca/P 比的增加而增加, 当 Ca/P 达到 1.67 时, 即 HA 的化学计量比时达到最大, 有趣的是, 当 Ca/P 比超过 1.67 时 HA 的强度又突然下降<sup>[208]</sup>。此外, 可根据需要替换如 F<sup>-</sup>、Cl<sup>-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>或 Mg<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>等, 如替换 F<sup>-</sup>可以增加 HA 的稳定性, 而替换 Mg<sup>2+</sup>可以增加 HA 的生物活性<sup>[206]</sup>。

HA 在骨再生方面的临床应用研究可追溯至上世纪 80 年代, 早期以种植体涂层和种植材料为主<sup>[166, 209]</sup>。HA 具有良好的生物相容性、生物活性和骨传导性, 在 Ca<sup>2+</sup>和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>离子饱和的培养基或体液中, HA 表面可以为生物矿化提供成核位点<sup>[210]</sup>。因此, HA 的临床应用范围极广, 包括牙科植入材料、牙科手术、长骨缺损修复、骨折不愈合、椎体融合术以及颌面修复术等等<sup>[211]</sup>。通过 HA 对金属植入物表面进行涂层, 可以提高金属植入物的生物相容性、骨整合性和生物活性, 提高移植物的骨接触面积和细胞粘附<sup>[212, 213]</sup>。此外, HA 可以促进生物矿化, 研究发现 HA 纳米颗粒可以渗透至牙本质脱矿胶原支架中, 然后胶原支架为牙本质再矿化提供结构基质, 渗透的 HA 纳米颗粒则作为基质中的种子, 促进牙本质再矿化的发生<sup>[214]</sup>。此外, HA 支架和纳米颗粒也可以被用于药物递送<sup>[215, 216]</sup>。然而, HA 仍存在较脆易碎以及无骨诱导性的缺点。完美的 HA 晶体的应力应变行为表现为巨大的各向异性, 然而, HA 晶体对于沿 z 轴方向的应力表现出易脆性<sup>[217]</sup>。值得一提的是, 致密 HA 的耐磨性、摩擦系数以及硬度方面与牙釉质相近<sup>[218]</sup>, 且致密 HA 的抗疲劳性较多孔 HA 更优异<sup>[208]</sup>。HA 被认为仅有骨传导性, 但无骨诱导性<sup>[210]</sup>, 而 TCP 具有优异的骨诱导性, 因此为了同时利用 HA 和 TCP 的特性, 有学者开发了双相 CaP (BCP) 材料<sup>[219]</sup>, BCP 的每个组分在亚微米水平上均质且紧密的混合<sup>[220]</sup>。HA/TCP 的 BCP 材料较 HA 或 TCP 单一组分具有更好的生物活性、生物降解性、骨诱导性和机械性能<sup>[221]</sup>, 可以刺激 BMSCs 的粘附和成骨分化<sup>[222]</sup>, 被用于制备骨移植物和牙科材料<sup>[220]</sup>。Ramay 教授以  $\beta$ -TCP 为基质与 HA 纳米纤维构建了一种可降解性的 BCP 多孔支架, 这种  $\beta$ -TCP/HA 支架有望被应用于负重骨组织工程研究中以提供力学支撑<sup>[223]</sup>。综上所述, 对于 HA 仍需进一步探究其在骨再生方面的应用, 如通过复合高分子材料以弥补各自的缺点, 或使用阳离子替换以增加 HA 的生物活性, 以及本身性质, 如孔隙率、尺寸、结构等方面对于骨再生的影响。

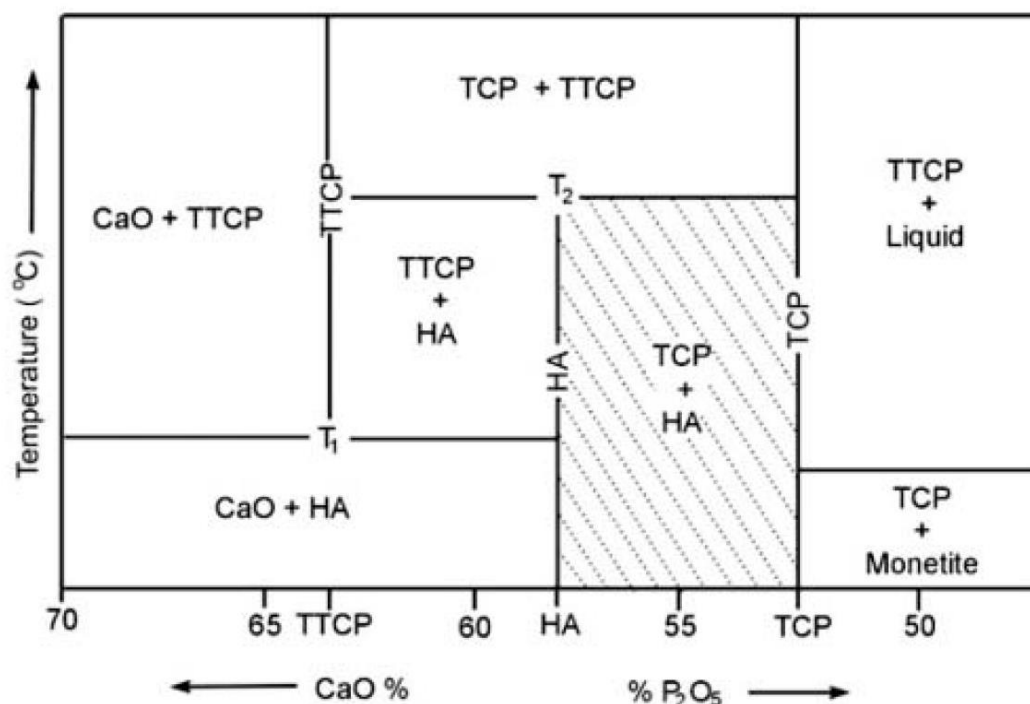


图 1.2 不同条件下个 CaP 物相的转换平衡图，阴影部分为双相磷酸钙（BCP），  
T<sub>1</sub>=1360 °C，T<sub>2</sub>=1475 °C<sup>[207]</sup>

### 缺钙羟基磷灰石(CDHA)

CDHA 是非化学计量形式的，分子式为  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ，有趣的是，牙体和骨骼中的天然 HA 也是非化学计量形式的<sup>[166]</sup>，由于  $\text{Ca}^{2+}$  的缺乏导致 CDHA 晶体结构中具有空点  $\text{Ca}^{2+}$  位点，这给 CDHA 提供了离子吸附和交换能力<sup>[166, 224]</sup>。将含钙离子和正磷酸盐的溶液加入至沸水中继续煮沸几个小时便能制备 CDHA，在此过程中首先沉淀的是 ACP，继续加热后使 ACP 重组转化为 CDHA，因此，CDHA 与在  $\text{pH} > 8$  的碱性溶液中沉淀制备的 ACP 在结构、理化性质和应用等方面非常相似<sup>[166, 175]</sup>。如前所述， $\alpha$ -TCP 在水中反应活性较高，水解后会转化为 CDHA，是制备 CDHA 的另一种方法<sup>[178]</sup>。此外，CDHA 还可以转化为其它 CaP 相，当温度超过 700°C 时，Ca/P 为 1.5 时则会转变为  $\beta$ -TCP，而当 Ca/P 在 1.5-1.67 范围内时则会转化为 HA 和  $\beta$ -TCP 的混合物，即双相 CaP (BCP)<sup>[175, 225]</sup>。CDHA 主要用作 CaP 骨水泥制备的成分<sup>[226]</sup>。此外，由于其晶体结构的离子取代特性，取代不同离子的 CDHA 被用于骨修复的研究，通过这些离子的取代加入可以提高 CDHA 的生物活性，而这些被离子取代的 CDHA 也被叫做生物磷灰石，广泛存在与生物体内的正常和病理矿化组织中<sup>[227, 228]</sup>。

### 无定形磷酸钙 (ACP)

ACP 是一种特殊的 CaP 相，具有可变的化学构成但与玻璃相似的物理性质，微观结构为长程有序而短程无序的<sup>[164]</sup>。ACP 最初在体外合成 HA 时发现的，



被认为是 HA 的前体<sup>[229]</sup>, 至 1972 年研究表明在体外合成 HA 时首先形成的相是 ACP, 随后转化为 OCP, 最后转化为热力学最稳定的 HA<sup>[230]</sup>。Glimcher 教授认为 ACP 可能是骨形成的前体阶段, 有研究发现体外的 ACP 胶原矿化可以产生均一的胶原内矿化颗粒<sup>[231, 232]</sup>。ACP 根据制备温度分为低温 ACP 和高温 ACP 两种。低温 ACP 常在其它 CaP 沉淀时作为前驱体出现, 由于其表面能较 OCP 和 HA 的低, 因此认为在沉淀开始时形成的是 ACP<sup>[233]</sup>。ACP 的非晶化程度和化学成分与溶液的 pH 值和钙磷离子浓度具有密切关系。随着  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度的增加, ACP 的结晶程度也升高, 此外, 若在连续温和搅拌的体系中制备 ACP, 尤其是在提高反应温度的时候, ACP 会缓慢重结晶甚至形成结晶程度更好的 CaP 材料, 例如 CDHA<sup>[234, 235]</sup>。此外, 随着反应体系的 pH 值变化, ACP 的钙磷比会发生改变, 有研究发现 pH 值从 6.6 升高至 11.7 时, ACP 的钙磷比也从 1.18 变至 1.53, 最高可升高 2.5<sup>[235, 236]</sup>。对于 ACP 的结构目前还不是很清楚, 有人认为, ACP 的基本结构单元为  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ , 是一个直径 0.95 nm 的球形团簇结构<sup>[237, 238]</sup>。SEM 观察到新沉淀的 ACP 为直径在 20-200 nm 之间的类球形结构。

ACP 由于具有特殊的物理性质和结构, 且作为 HA 沉淀的初始相, 被认为在骨再生和骨矿化过程中至关重要的组分<sup>[239, 240]</sup>。ACP 较 TCP 和 HA 具有更好的骨传导性和生物降解性被广泛用于 CaP 骨水泥、生物组织工程支架、骨修复生物材料和牙科植入物的制备和应用<sup>[241, 242]</sup>。此外, 由于 ACP 的纳米尺寸团簇结构, 具有较大的比表面积和 pH 响应降解等特性, 从而被用于负载和控释药物的研究, 是良好的药物递送载体<sup>[243, 244]</sup>。

## 1.2.2 不同结构的磷酸钙生物材料在骨修复中的应用研究

骨骼是脊椎动物主要的承重器官, 随着研究的深入, 人们发现骨骼是一个由从纳米至微米级的多级别多尺寸的基本构建单元通过精确且复杂的排列组成(如图 1.3<sup>[245]</sup>)。同时, 天然 CaP 的形状和尺寸也表现出多样性来, 随着物种、年龄和疾病状态发生改变。在生物体内骨矿化过程中, 晶体的平均尺寸在形成初时最小, 然后随着成熟逐渐增加, 形成一系列粒径和形状的晶体<sup>[246]</sup>。此外, 以往认为纳米颗粒形状的 CaP 具有更好的性能, 然而, 一些研究在骨矿化胶原中发现了针状和棒状的矿物晶体<sup>[247, 248]</sup>, 从而引发了对于矿物晶体形状的争论。

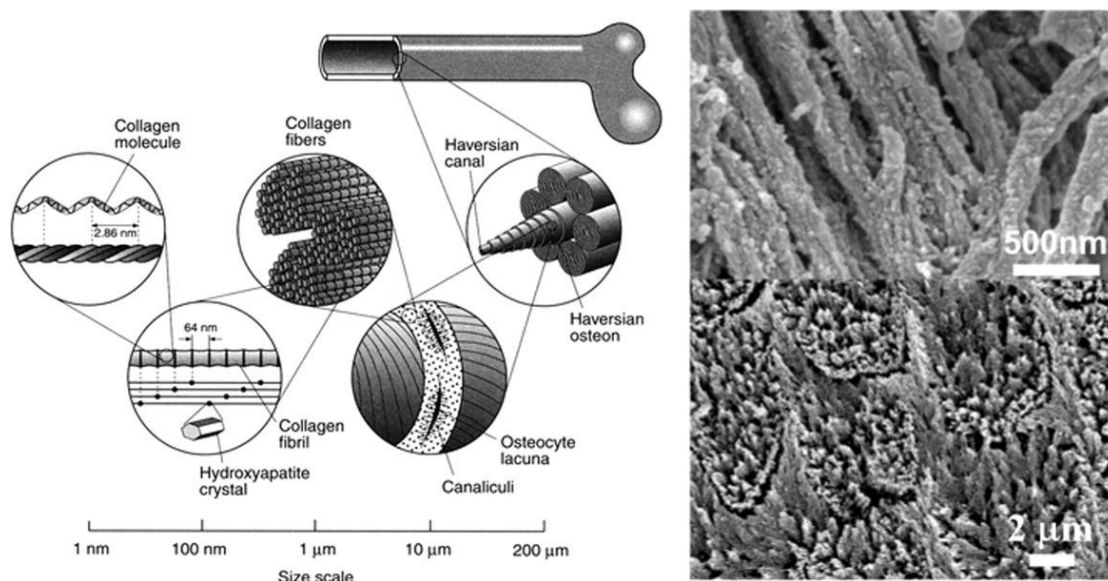


图 1.3 左侧为由不同尺寸结构精确排列构建的骨骼。右上图为骨骼中矿化胶原纤维中的纳米矿物，显示 HA 纳米颗粒结合在有机基质中；右下图为牙釉质的微观结构图，几乎全部由 HA 纳米纤维束组成<sup>[245]</sup>

随着对 CaP 形成的机制和制备技术的发展，人们可以经过体外调控制备具有不同尺寸和形状的 CaP。目前常用的 CaP 制备方法包括共沉淀法，乳液法，水热法，微波辅助法，水解法和溶胶-凝胶法等<sup>[178, 249-252]</sup>，此外，通过对反应体系的 pH 值、离子强度、温度、有机添加剂、Ca/P 以及溶液离子饱和度等参数的调控，可以制备不同尺寸和形状的 CaP 材料<sup>[245, 253]</sup>。pH 主要通过调节游离羟基和磷酸盐的平衡来影响 HA 的沉淀和结晶<sup>[254]</sup>。温度大致分为高温和低温两类，如需在高温下才能制备 TCP，然而这种高温固相反应法无法产生均一的 CaP 纳米颗粒<sup>[245]</sup>。而有机添加剂对于调控 CaP 的形貌和尺寸非常敏感，常用的添加剂有溴化十六烷基三甲基铵<sup>[255]</sup>、聚丙烯酸<sup>[256]</sup>和聚丙烯胺盐酸盐<sup>[257]</sup>等。有机添加剂主要通过无机晶体颗粒与添加剂的静电相互作用以及调控胶体粒子的  $\zeta$  电势影响 CaP 晶体的粒径和形貌<sup>[258, 259]</sup>，如添加聚(L-赖氨酸)可以获得细长的 HA 颗粒，而使用带更多电荷的聚(L-谷氨酸)则可以制备粒径更小的 HA 纳米颗粒<sup>[260]</sup>。此外，钙磷比和反应时间对 CaP 材料的形貌和尺寸的影响至关重要<sup>[253, 261]</sup>。例如 Zhang 等通过控制 Ca/P 和反应时间制备了羟基磷灰石微米管，而在其它的 Ca/P 和反应时间下，所获得的则是 HA 纳米线<sup>[262]</sup>。

目前可成功制备的 HA 结构包括：分级纳米结构介孔微球、介孔菱形 HA、中空微球和纳米棒等，而在使用有机添加剂后，可以获得纳米颗粒、纳米线、纳米棒、纳米管以及花丝状结构的 HA 材料（如图 1.4）<sup>[245, 263-265]</sup>，不同尺寸和结构的 CaP 材料具有不同的机械性能、比表面积，有的还具有空心或管道等结构，从而导致 CaP 材料表现出不同理化性质<sup>[245, 266]</sup>，针对这些理化性质，可以利用其

优点设计出更好的骨修复材料。例如 Ca/P 小于 1 的 CaP 材料由于机械性能较差且溶解度过高而不适合用作生物植入物,可通过调控钙磷比制备具有更好力学性能的 CaP 材料以设计有足够力学强度的骨植入材料<sup>[245]</sup>。此外, CaP 材料还可开发为细胞、药物或基因递送载体。有研究表明,尺寸为 50 nm 左右的 CaP 材料相较于小于 15 nm 或超过 200 nm 的 CaP 材料更容易穿过细胞膜,提示在使用 CaP 材料作为药物或基因载体时,并不是越小越好,而应根据不同的目的需要选择不同的粒径大小<sup>[267, 268]</sup>。综上所述, CaP 材料的基本性质,包括尺寸、结构形貌、比表面积及表面电荷等对于其在骨缺损修复的研究和应用中同样重要,针对不同的情况和目的,应选择更合适的 CaP 材料。

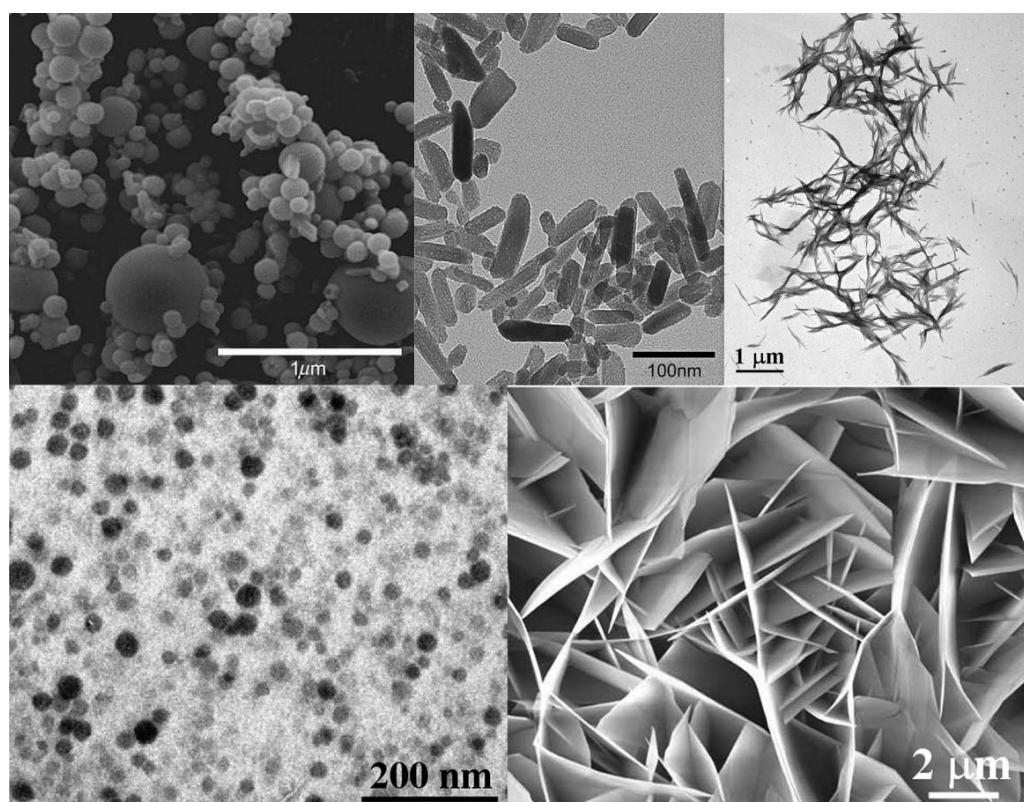


图 1.4 通过反应体系参数调控和使用有机添加剂可制备不同结构的 HA 材料<sup>[249, 264]</sup>

### 1.3 磷酸钙复合生物材料在骨修复中的应用研究

随着科技和医疗水平的发展,对于磷酸钙骨修复材料在骨再生应用中的认知已经发生了巨大的变化。上世纪 50 年代,磷酸钙材料开始被引入骨缺损的治疗,然而人们仅关注于材料本身的物理性质,制备人体可耐受、无免疫排斥反应的惰性材料,通过简单的物理替代缺损部位的方式来治疗骨缺损,而忽略了生物学性能及效应。由于其骨整合性及生物活性差的问题,人们的观念逐渐向生物活性方向转变,从而催生了生物活性材料。到了 21 世纪初, Hench 教授提出了可降解

且具有生物活性的第三代人工骨生物材料,兼顾了材料和生物两方面问题<sup>[54]</sup>。因此,单一的磷酸钙材料常常无法满足目前人们对于人工骨再生材料的要求,往往通过复合材料来整合各组分的优势,从而制备出具有良好骨传导性、骨诱导性、骨再生性以及骨整合性的人工骨再生材料。有机-无机磷酸钙复合生物材料因具有磷酸钙材料的骨传导性及机械性能,和有机高分子材料的生物相容性及生物可降解性备受关注。常用于制备复合材料的有机高分子材料包括天然高分子材料和人工合成高分子材料。其中,天然高分子材料由于来源于生物体,与天然细胞外基质非常相似,具有良好的生物相容性和生物降解性被广泛应用<sup>[74]</sup>。天然高分子-磷酸钙复合材料多以复合支架的形式应用于骨缺损修复,天然高分子材料作为支架基底,提供结构支撑,供细胞粘附、迁移和增殖,而磷酸钙材料则用以增强复合支架的力学性能,同时发挥其骨传导性和骨诱导性以促进骨再生<sup>[81]</sup>。良好的骨修复复合支架应具备以下性质:①良好的生物相容性,减少植入后宿主的免疫排斥反应;②良好的生物降解性,最佳为与骨再生速度相匹配,从而促进骨骼的重塑;③适宜的孔隙率,以促进血管和骨再生<sup>[269]</sup>。

目前常用于天然高分子-磷酸钙复合生物材料制备的包括壳聚糖、透明质酸、丝素蛋白、明胶等<sup>[71,72]</sup>,此外,天然高分子材料可通过接枝或改性以增加其力学性能、生物活性以及细胞亲和性。甲基丙烯酸酐化明胶(Gelatin Methacryloyl, GelMA)是一种接枝甲基丙烯酸酐的改性明胶。GelMA 是通过甲基丙烯酸酐和明胶在 50°C的磷酸盐缓冲液中制备,此外,通过调控反应体系中的甲基丙烯酸酐的剂量可以制备具有不同机械性能的 GelMA<sup>[270,271]</sup>。改性后的 GelMA 比明胶具有更高的溶解度和更低的免疫原性<sup>[272,273]</sup>。此外, GelMA 保留了明胶中的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列和基质金属蛋白酶的靶序列, RGD 序列有利于细胞黏附<sup>[274]</sup>,而通过基质金属蛋白酶靶序列则可以促进细胞的重塑<sup>[275]</sup>。在特定波长条件下, GelMA 中的光引发剂通过吸收光能产生自由基,然后使 GelMA 分子间的甲基丙烯酸酐成键,引发固化,形成固相凝胶。GelMA 水凝胶具有良好的生物相容性,有研究表明 GelMA 水凝胶的基本性质和细胞外基质(ECM)非常相似,几乎无细胞毒性,此外,不同细胞系在 GelMA 水凝胶中的黏附和增殖性能也得到了广泛的验证<sup>[271]</sup>。光固化后的 GelMA 水凝胶通过冷冻干燥后形成具有多孔结构的三维支架,通过调控甲基丙烯酸酐的取代率以及 GelMA 水凝胶的浓度,可以调控 GelMA 水凝胶支架的孔径和孔隙率,适宜的孔径和孔隙率大小有利于细胞的黏附增殖以及新生血管的内生长<sup>[271,276]</sup>。此外,由于 GelMA 水凝胶含有大量的生物活性肽序列,可用于细胞的二维或三维培养,构建组织工程支架<sup>[276,277]</sup>。GelMA 水凝胶由于良好的生物相容性、生物可降解性和几乎无细胞毒性及免疫原性等优点,被广泛用于组织修复的研究中<sup>[271]</sup>。然而,由于 GelMA 水凝

胶的力学性能较弱限制了其在骨缺损修复中的应用,常常通过复合无机材料以增强其力学性能<sup>[278]</sup>。

## 1.4 研究课题的提出及研究意义

综上所述,随着人口增长和社会老龄化进程的加快,以及交通事故的增多,由骨肿瘤、创伤和感染等因素所致的骨缺损越来越多,从而给患者的身体健康和生活质量带来了巨大的痛苦和不便,同时也给社会造成了较大的经济负担,因此,对于骨缺损的治疗具有重大的意义。目前针对骨缺损的治疗手段有很多,然而都存在相应的局限性,如自体骨移植虽然作为骨缺损治疗的首选方案,但受限于供体和可采集的数量,不足以满足临床需要。而人工骨移植物是一种良好的替代方案,据不完全统计,2017年我国骨科生物材料市场为225亿元,2018年增长超过16.4%,约262亿元。因此,人工骨修复材料的研制具有巨大的市场需求和转化潜力,此外,由于我国所使用的人工骨修复材料以进口为主,亟需研制具有我国自主知识产权的人工骨修复材料以打破技术壁垒。基于第三代人工生物材料的理念,理想的人工骨修复材料应具有良好的生物相容性、生物降解性、骨传导性和骨诱导性能。通过上述对不同骨修复材料的进展回顾,CaP材料具有良好的骨传导性和生物相容性,故本研究拟基于CaP材料制备新型骨修复材料并对其生物学效应及机制进行研究。研究内容主要分为以下两部分。(1)通过反应体系参数的调控,制备具有良好生物性能的HA材料,并对其理化性质和生物学效应进行表征,然后基于GelMA水凝胶良好的生物相容性和生物可降解性,制备GelMA水凝胶/HA复合支架用于骨缺损修复的研究。(2)通过多酚类物质对HA进行修饰改性,从而制备具有光热响应的HA骨移植材料,然后结合近红外光以实现体内精准温度调控,以探究物理热疗与HA骨移植材料相结合的新型骨缺损修复治疗策略。本研究有望为设计和制备新型骨缺损修复材料提出新的研究思路,并为生物活性材料结合物理刺激应用于骨缺损的治疗提供一种新思路。

## 第 2 章 羟基磷灰石微米管/GeIMA 水凝胶复合支架的制备及其促骨修复的研究

### 2.1 羟基磷灰石微米管的制备及其理化性能表征

#### 2.1.1 实验材料

##### 2.1.1.1 实验主要设备及仪器

表 2.1 羟基磷灰石微米管制备及表征所用设备与仪器

设备与仪器名称	生产公司
恒温磁力搅拌器 (B11-3)	上海司乐仪器有限公司 (中国)
电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9076A)	上海精宏实验设备有限公司 (中国)
台式高速离心机 (TG1650-WS)	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 (中国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
场发射扫描电子显微镜	Hitachi S-4800 (日本)
场发射透射电子显微镜	JEOL JEM 2100F (日本)
能量色散谱分析	Oxford Xplore (中国)
X 射线衍射	Rigaku D/max 2550V (日本)
FTIR	VERTEX70 (德国)
粉末压片机 (HY-15)	天津天光新光学仪器科技有限公司 (中国)

##### 2.1.1.2 实验主要试剂及耗材

表 2.2 羟基磷灰石微米管制备及表征所用试剂与耗材

试剂与耗材名称	供应商
氢氧化钠, NaOH, 分析纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
无水氯化钙, CaCl <sub>2</sub> , 分析纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
油酸, 分析纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
六偏磷酸钠, (NaPO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> , 化学纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
无水乙醇, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, 分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司 (中国)
溴化钾, KBr	天津博天胜达科技发展有限公司 (中国)

## 2.1.2 实验方法

### 2.1.2.1 羟基磷灰石微米管的制备

羟基磷灰石微米管 (Hydroxyapatite microtubes, HAMT) 的制备方法如下: 4.5 mL 去离子水, 8.5 mL 无水乙醇和 7 mL 油酸在磁力搅拌下搅拌 5 分钟, 得到混匀的三元溶剂。然后将 10 mL  $\text{CaCl}_2$  ( $0.198 \text{ mol L}^{-1}$ ) 溶液逐滴加入上述三元溶剂中, 磁力搅拌 10 分钟。接着将 10 mL  $\text{NaOH}$  ( $1.650 \text{ mol L}^{-1}$ ) 溶液逐滴加入上述混合液中, 继续搅拌 20 分钟。最后逐滴加入 10 mL  $(\text{NaPO}_3)_6$  ( $0.032 \text{ mol L}^{-1}$ ) 溶液并搅拌 10 分钟。随后将上述溶液转移至 100 mL 的聚四氟乙烯反应釜中, 放入预热至  $180^\circ\text{C}$  的烘箱中反应 25 小时。反应完成后自然冷却至室温, 离心收集反应产物, 使用无水乙醇和去离子水分别洗涤 3 次, 放至  $60^\circ\text{C}$  烘箱中干燥以备后续使用。

### 2.1.2.2 羟基磷灰石微米管的理化性质表征

所制备的羟基磷灰石微米管通过场发射扫描电子显微镜 (Field-emission scanning electron microscope, SEM)、场发射透射电子显微镜 (Field-emission Transmission electron microscope, TEM) 分析对其形貌、尺寸及结构进行表征; 通过选区电子衍射 (Selected area electron diffraction, SAED)、能量色散谱 (Energy dispersive spectrometer, EDS)、X 射线衍射 (X-ray diffraction) 及傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析对其物象及化学特性进行表征。具体表征方法如下:

- (1) SEM 分析: 将适量待测 HAMT 样品用无水乙醇分散, 利用超声使其分散均匀, 取一滴分散均匀的液滴加至样品台上后自然干燥, 待样品彻底干燥后喷金, 然后进行扫描电镜检测观察样品形貌并拍照。
- (2) TEM 分析: 将适量待测 HAMT 样品用无水乙醇分散, 利用超声使其分散均匀, 取一滴分散均匀的液滴加至铜网上后自然干燥, 待样品彻底干燥后进行透射电镜检测观察样品形貌并拍照, 同时进行选区电子衍射 (SEAD) 分析和能量色散谱 (EDS) 分析。
- (3) XRD 分析: 取适量干燥后的待测 HAMT 样品置于样品台上, 表面压平后进行 X 射线衍射分析。
- (4) FTIR 分析: 取适量干燥的待测 HAMT 样品与干燥的溴化钾 (KBr) 晶体混合研磨, 然后将混合的研磨后粉末转移至压片机模具中, 进行压片从而制成圆形薄片, 所获圆形薄片置入红外光谱分析仪进行检测。

### 2.1.3 实验结果与讨论

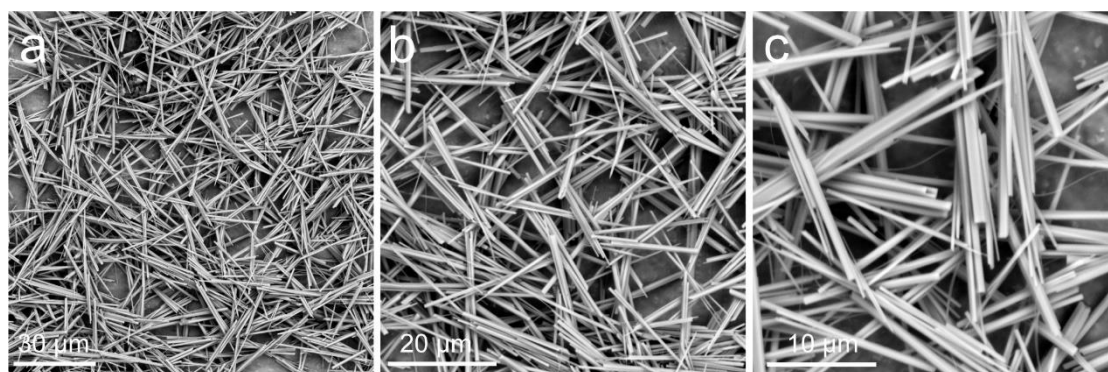


图 2.1 羟基磷灰石微米管的 SEM 表征

如图 2.1 a 所示,按上述方法可制备的形貌、尺寸均一的羟基磷灰石微米管,高倍镜 SEM 结果显示该样品为长约 30  $\mu\text{m}$  的管状结构(图 2.1 b-c)。该结果证实了通过此方法可合成具有均一形貌的管状结构材料。TEM(图 2.2 a-b)结果进一步证实了所制备的 HAMA 为中空管状结构,直径约 500 nm。由于其特殊的管状结构存在, HAMA 在细胞间信号传递、营养物质的输送方面可能具有一定的应用<sup>[279]</sup>。SAED(图 2.2 c)显示规则六边形的晶像衍射峰,提示所制备样品为晶体。

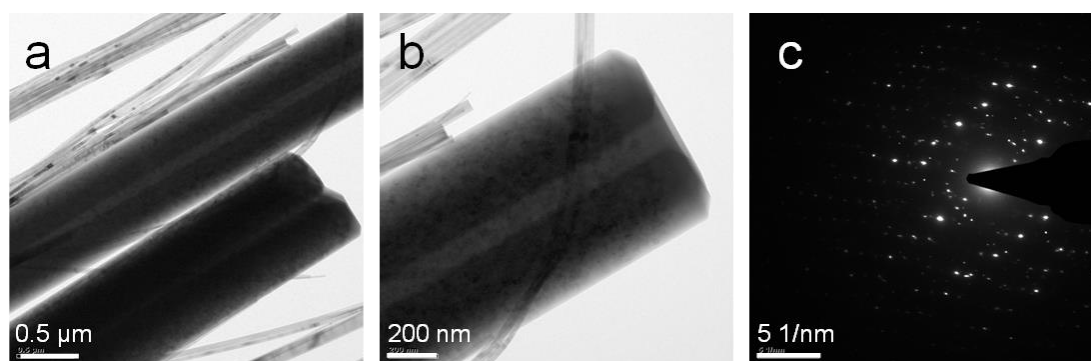


图 2.2 羟基磷灰石微米管的 TEM 及 SAED 表征

为进一步研究 HAMA 样品的理化性质,通过 EDS(图 2.3 a)分析显示了所制备的 HAMA 主要元素组成为 C、Ca、P、O 和 Cu 元素,但由于 C 及 Cu 元素为样品台的背景元素,故提示了样品主要组分与羟基磷灰石组分一致,主要为 Ca、P 和 O 元素。图 2.3 b 为 HAMA 的 XRD 图谱,结果显示其具有明显的衍射峰,这些特征衍射峰与羟基磷灰石的六方结构相  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)(\text{OH})$ (JCPDS No. 09-0432)相对应。综合上述检测结构分析提示经该方法可获得尺寸、形貌均一的



HAMT 材料。

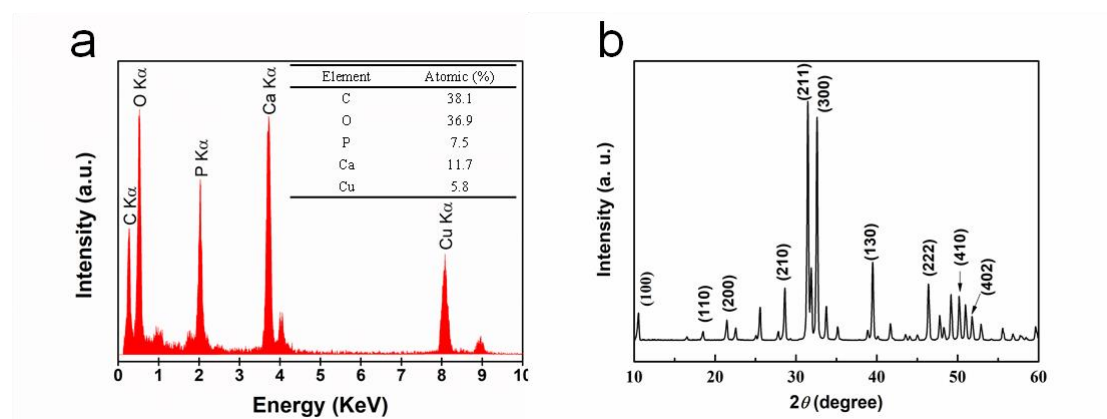


图 2.3 羟基磷灰石微米管的理化表征。(a) HAMT 的 EDS 图谱及元素半定量图谱；(b) HAMT 的 XRD 图谱

## 2.1.4 结论

综上所述，通过该方法可以一步制备长约 30  $\mu\text{m}$ ，直径约 500 nm 的尺寸、形貌均一的 HAMT，此微米结构的羟基磷灰石具有特殊的中空管状结构，基于此管状结构，HAMT 可能具有促进营养物质的传输，细胞间信号的传递，从而增强细胞间的联系。

## 2.2 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的制备及其理化性能表征

### 2.2.1 实验材料

#### 2.2.1.1 实验主要设备及仪器

表 2.3 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的制备及表征主要设备与仪器

设备与仪器名称	生产公司
电热恒温水槽 (DK-8D)	上海精宏实验设备有限公司 (中国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
涡旋振荡器 (Vortex, QL-901)	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
台式高速离心机 (TG1650-WS)	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 (中国)

冷冻干燥机 (SCIENTZ-10N)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
场发射扫描电子显微镜	Hitachi S-4800 (日本)
场发射透射电子显微镜	JEOL JEM 2100F (日本)
X 射线衍射	Rigaku D/max 2550V (日本)
FTIR	VERTEX70 (德国)
粉末压片机 (HY-15)	天津天光新光学仪器科技有限公司 (中国)
电脑式拉压力试验机 (HY-940FS)	上海恒驭仪器有限公司 (中国)

### 2.2.1.2 实验主要试剂及耗材

表 2.4 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的制备及表征主要设备与仪器

试剂与耗材名称	供应商
氢氧化钠, NaOH, 分析纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
无水氯化钙, CaCl <sub>2</sub> , 分析纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
油酸, 分析纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
六偏磷酸钠, (NaPO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> , 化学纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
无水乙醇, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, 分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司 (中国)
溴化钾, KBr	天津博天胜达科技发展有限公司 (中国)
甲基丙烯酸酐化明胶 (Gelatin Methacryloyl, GelMA)	苏州永沁泉智能设备有限公司 (中国)
磷酸盐缓冲液, PBS	Hyclone 公司 (美国)

## 2.2.2 实验方法

### 2.2.2.1 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的制备



图 2.4 聚四氟乙烯复合支架制备模具, 为圆柱体模具, 直径 1 cm, 深度 1 cm

将购买的商品化甲基丙烯酸酐化明胶 (GelMA) 按使用说明进行溶解, 具体如下: 一, 取 20 mL PBS 溶液, 在 50°C 水浴加热中溶解 LAP 光引发剂 15 分钟, 配制为 0.25% (w/v) 的光引发剂标准液; 二, 根据使用需求配制不同浓度的 GelMA 水凝胶 (GH), 具体用量如表 2.5, 本实验中所用 GelMA 浓度为 5% 和 10% (w/v)。用于细胞实验的 GH 溶液使用 0.22  $\mu\text{m}$  的无菌滤器进行过滤, 做灭菌处理。

表 2.5 不同浓度的 GelMA 水凝胶配制比例

GelMA 浓度 (%)	光引发剂标准液 (mL)	GelMA 质量 (g)
5	20	1
10	10	1

取适量 2.1.2.1 方法制备的 HAMT, 按照公式 (2.1) 计算羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶 (GH/H) 复合支架的比例。以 50%HAMT/10%GelMA 复合支架为例, 具体为取 100 mg 干燥的 HAMT, 转移至 1 mL 37°C 预热的 10% 的 GelMA 水凝胶中, 涡旋混匀, 然后将混匀的液体根据不同实验目的转移至 EP 管或聚四氟乙烯模具中 (如图 2.4 所示), 使用 405 nm 波长的紫外光照射 30 秒进行自体交联固化从而形成复合支架。同时增设一组单纯 GelMA 水凝胶支架组作为对照。复合支架浓度和命名如表 2.6 所示, 已有研究表明 10%GelMA 水凝胶具有适宜的孔洞大小, 良好的生物相容性<sup>[280, 281]</sup>, 因此后续实验主要使用 10%GelMA 水凝胶进行, 此表中 GelMA 水凝胶浓度均为 10%, 如使用其它浓度, 则于前面加上浓度特指。

$$HAMT\% = \frac{M(HAMT)}{M(HAMT) + (GelMA)} \times 100\% \quad (2.1)$$

表 2.6 不同浓度的羟基磷灰石微米管/GelMA 复合支架的命名

样品名称	HAMT 占比 (% , w/w)
GH	0
GH/H-L	10
GH/H-M	30
GH/H-H	50

#### 2.2.2.2 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的理化性质表征

使用场发射扫描电子显微镜 (Field-emission scanning electron microscope, SEM) 对所制备的羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的形貌、尺寸及结构进行表征; 使用 X 射线衍射 (X-ray diffraction) 及傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析对复合支架的组分和理化特性进行表

征。表征方法详情如下：

- (1) SEM 分析：按照表 2.6 配制不同 HMT 浓度的复合支架样品，固化成型使用聚四氟乙烯模具（图 2.4），待光照交联固化后，将复合支架样品进行冷冻干燥 48 小时。然后小心切开样品选取样品纵切面固定于样品台上，喷金处理，然后进行扫描电镜检测观察样品形貌并拍照。
- (2) XRD 分析：取适量充分冷冻干燥后的复合支架样品放入液氮中 5 秒，增加其脆性，使用研钵充分研磨混匀，将研磨充分的粉末置于样品台上，表面压平后进行 X 射线衍射分析。
- (3) FTIR 分析：取适量充分冷冻干燥后的复合支架样品放入液氮中 5 秒，增加其脆性，然后与干燥的溴化钾（KBr）晶体混合，使用研钵充分研磨混匀，然后将混合粉末转移至压片机模具中，进行压片以制成圆形薄片，然后进行红外光谱分析仪检测。

#### 2.2.2.3 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的力学性能表征

参照 2.2.2.1 方法配制不同浓度的 GH/H 复合支架，然后使用图 2.4 所示模具进行固化制备 GH、GH/H-L、GH/H-M 和 GH/H-H 复合支架。然后通过电脑式拉压力试验机（HY-940FS）进行复合支架的力学性能测试，具体如下：

- (1) 复合支架的应力（Stress）-应变（Strain）性能：将制备好的复合支架样品放置在压力探头中心，测量样品具体的高度和直径数据并记录，然后设置测试终止点为特定的应变程度，30%、50% 和 70%，调整压力机速率为  $10 \text{ mm min}^{-1}$ 。每组性能试验包含 3 个平行样。
- (2) 复合支架的压缩模量：复合支架的压缩杨氏模量根据上述应力-应变测试曲线进行计算，取所测应力-应变曲线中 5%-15% 的线性区间，计算该线性区域的斜率作为杨氏压缩模量<sup>[282]</sup>。
- (3) 复合支架的抗疲劳性能：将制备好的复合支架样品放置在压力探头中心，测量样品具体的高度和直径数据并记录，调整测试速率为  $10 \text{ mm min}^{-1}$ ，最大应变为 50%，循环次数为 10 次进行测试。

#### 2.2.2.4 统计学方法和分析

使用平均值±标准差（Mean±SD）对实验数据中的定量数据进行表示，统计学分析通过 IBM SPSS Statistics 16.0 软件进行统计分析，图表制作采用 GraphPad Prism 8 和 OriginPro 9.0 软件。使用 *t* 检验或方差分析进行差异性分析，当 *p* 值 <0.05 时，认为组间差异具有统计学意义。

### 2.2.3 实验结果与讨论

## 2.2.3.1 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的成功制备及理化性质表征

使用 2.1 所制备的 HAMT 进一步制备 GH/H 复合支架。图 2.5 显示了 GH 和三种不同的 GH/H 复合支架的形态，四种支架均呈现为尺寸均一的多孔三维支架结构。

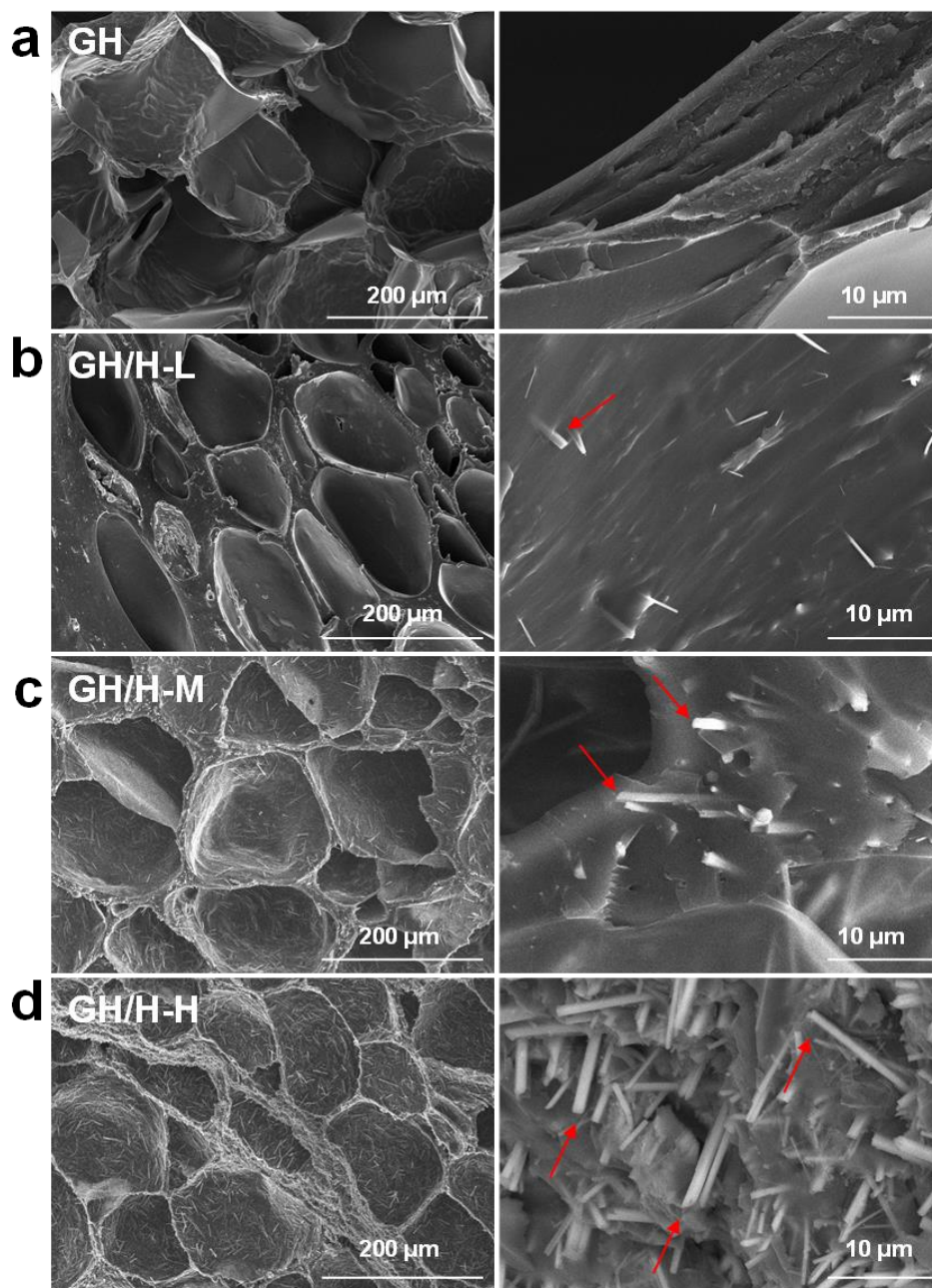


图 2.5 (a) GH、(b) GH/H-L、(c) GH/H-M 和 (d) GH/H-H 复合支架的 SEM 表征结果。红色箭头表示水凝胶复合支架中的 HAMT。

图 2.5 a 示 GH 支架的孔径直径为 100-200  $\mu\text{m}$ 。而与 GH 相比，GH/H 复合支架保留了 GH 的多孔三维支架结构，且孔径直径未产生较大变化。高倍镜图

像显示 GH 支架的孔壁非常光滑平整，而在加入了 HAMA 后，GH/H 复合支架则呈现出较为粗糙的孔壁表面。同时，不同 HAMA 浓度所制备的 GH/H 复合支架的孔壁粗糙程度也具有差异性，图 2.5 b-d 可以观察到，随着 HAMA 的比例增加，复合支架的孔壁越粗糙。尤其是 GH/H-H 支架的表面，HAMA 嵌入水凝胶内，在高倍镜下观察犹如刺猬的皮肤一样。此外，在 GH/H 复合支架中，HAMA 可均匀的分布在支架孔洞内部（图 2.5 b-d），而不随 HAMA 的比例改变。引入 HAMA 至 GelMA 水凝胶制备复合支架，HAMA 就像建筑物中的管道系统一样，可嵌入水凝胶内部，或者贯穿支架相邻的孔洞，从而通过其特殊的管状结构，可以促进位于相邻孔中的细胞之间的信号和营养物的传递。

为了进一步验证 GH/H 复合支架的成功制备，使用 XRD 和 FTIR 检测进行分析。图 2.6 a 为 GH 和 GH/H 复合支架的 XRD 图谱，结果显示单纯 GelMA 水凝胶在  $2\theta = 22^\circ$  附近具有较宽的衍射峰，这个宽大的衍射峰也称“馒头峰”，是无定型聚合物的特殊衍射峰<sup>[283]</sup>。而在复合 HAMA 之后，GH/H 复合支架的 XRD 图谱中包含了 HAMA 和 GH 的特殊衍射峰，提示 HAMA 和 GelMA 水凝胶的成功复合。

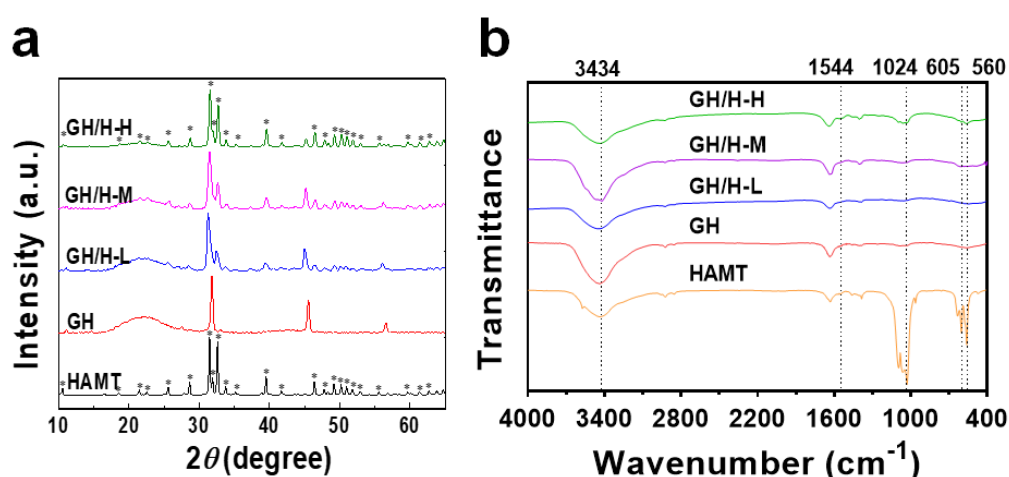


图 2.6 HAMA、GH 和 GH/H 复合支架的 XRD (a) 和 FTIR (b) 图谱

GH/H 复合支架的 FTIR 结果如图 2.6 b 所示，GH 和 GH/H 复合支架在  $1544 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰均来自 GelMA 水凝胶。而三个不同浓度的 GH/H 复合支架样品则在  $560$ 、 $605$  和  $1024 \text{ cm}^{-1}$  附近出现吸收峰，这些吸收峰是由于羟基磷灰石中的  $\text{PO}_4^{3-}$  基团的对称和不对称伸缩振动呈现的，提示了 HAMA 成功被复合至 GelMA 水凝胶支架中。

### 2.2.3.2 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架力学性能增强

GelMA 水凝胶虽然具有优越的生物相容性和生物降解性，但较差的机械强



度限制了其在骨修复领域的广泛应用<sup>[284, 285]</sup>。目前用来增强 GelMA 水凝胶的机械性能较多的方法是与无机材料进行复合, 如羟基磷灰石 (HA) 和  $\beta$ -磷酸三钙 ( $\beta$ -TCP)<sup>[286, 287]</sup>。然而, 现有研究的 HA 主要为微米/纳米棒、线或颗粒的结构, 这些结构的 HA 引入 GelMA 水凝胶进行复合, 会导致复合支架的开放孔隙率降低<sup>[283, 288-290]</sup>, 而 GelMA 水凝胶支架的开放孔隙率在其生物活性中起着非常重要的作用, 有研究显示, GelMA 水凝胶支架的孔洞互连率, 即开放孔隙率与 GelMA 的含量呈负相关。在 GelMA 水凝胶支架中, 最理想的营养传递支架环境是开孔率 ( $\epsilon_{MIP}$ ) 在 70% 以上, 这要求水凝胶支架中 GelMA 的含量低于 10%<sup>[291, 292]</sup>。所制备的 HAMT 因具有特殊的中空管状结构, 有望在解决 GelMA 水凝胶支架力学性能差的同时提高复合支架的孔洞互连情况。为进一步探究 GH/H 复合材料的力学性能, 采用如图 2.4 所示模具进行复合支架的制备, 所制备复合支架为直径 1 cm、高 1 cm 的圆柱形支架。

表 2.7 GH 和 GH/H 复合支架力学性能测试结果

样品	30%应变		50%应变		70%应变	
	最大力 (N)	最大应力 (kPa)	最大力 (N)	最大应力 (kPa)	最大力 (N)	最大应力 (kPa)
GH-1	0.207	2.631	0.875	11.138	3.4459	43.874
GH-2	0.332	5.570	0.865	11.019	1.485	22.487
GH-3	0.212	2.703	0.851	10.834	3.239	41.241
GH/H-L-1	0.304	4.099	1.260	17.013	2.845	45.834
GH/H-L-2	0.313	4.227	0.856	13.789	4.104	55.427
GH/H-L-3	0.275	4.424	1.211	16.356	2.677	43.132
GH/H-M-1	0.674	8.895	2.100	30.524	5.839	78.361
GH/H-M-2	0.591	8.595	1.380	18.520	4.566	66.353
GH/H-M-3	0.414	6.019	2.052	29.821	5.3828	72.243
GH/H-H-1	0.630	10.131	2.408	37.098	5.323	82.052
GH/H-H-2	0.674	10.379	2.283	36.692	5.104	74.173
GH/H-H-3	0.649	10.436	2.441	26.091	5.805	89.655

图 2.7 a-c 所示为 GH 和 GH/H 复合支架在不同应变程度 (a, 30%; b, 50%; c, 70%) 的应力-应变曲线, 测试结果如表 2.7 所示。所有支架在压缩到 30%、50% 和 70% 的应变后都没有明显的损坏。而随着复合支架中 HAMT 含量的增加, 达到同一应变时需要更高的应力, 呈正相关趋势。相较于同一应变的 GH、GH/H-L 和 GH/H-M 复合支架, GH/H-H 具有最高的应力, 分别为 10.436 kPa (30%应变), 37.098 kPa (50%应变) 和 89.66 kPa (70%应变)。此外, 当 HAMT 占 50%

(w/w) 含量时, 压缩模量则从  $8.96 \pm 0.54$  kPa (GH) 增加到  $24.28 \pm 1.41$  kPa (GH/H-H), 是 GH 的 2.7 倍 (图 2.7 d,  $p < 0.001$ )。压缩模量数据如表 2.8 所示。通过 GH/H 复合支架与 GH 的力学性能比较可以得出 HMT 可以显著提高 GelMA 水凝胶支架的力学性能。

表 2.8 GH 和 GH/H 复合支架压缩模量结果

样品	压缩模量 (kPa)
GH-1	9.57
GH-2	8.57
GH-3	8.73
GH/H-L-1	9.62
GH/H-L-2	11.22
GH/H-L-3	10.95
GH/H-M-1	16.18
GH/H-M-2	18.64
GH/H-M-3	15.99
GH/H-H-1	22.67
GH/H-H-2	25.31
GH/H-H-3	24.86



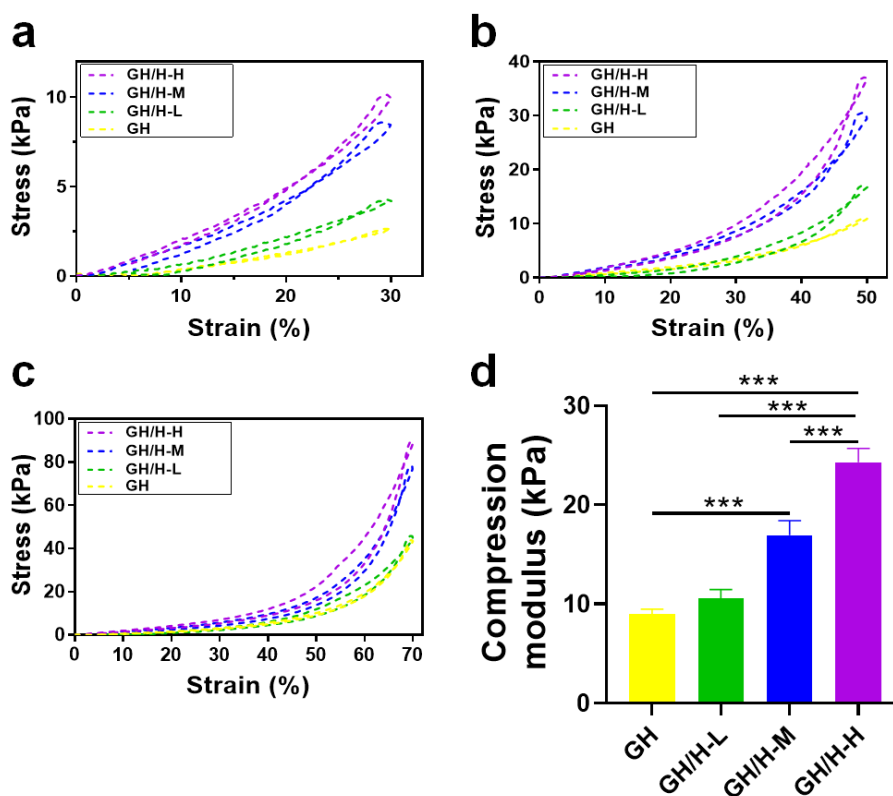


图 2.7 GH 和 GH/H 复合支架的压力测试表征结果。(a) 应变 30%、(b) 应变 50%和 (c) 应变 70%的应力-应变曲线；(d) GH 和 GH/H 复合支架的压缩模量。其中，结果表示为平均值 $\pm$ 标准差 (Mean  $\pm$  SD)，\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ， $p < 0.05$  认为具有显著性差异，组间比较为 GH/H-H 和 GH 相比较。

此外，GH/H 复合支架除了提高其刚度之外，还保留有水凝胶的韧性。由图 2.7 c 所示，即是应变达到 70%，GH/H 复合支架仍具有较好的弹性恢复能力。为进一步检测复合支架的抗疲劳能力，通过 10 次，应变为 50%的压缩循环进行表征。图 2.8 所示为经历 10 次循环过后的复合支架光学照片，可以看出不论是 GH 水凝胶支架，还是 GH/H 复合支架，其形状仍保持完整，未出现破损。GH 和 GH/H 复合支架的抗疲劳应力 (Strain)-应变 (Stress) 曲线图如图 2.9 所示，结果显示经过 10 次 50%的压缩循环后，其应力-应变曲线仍保持完整，几乎无应力损失，提示 GH/H 复合支架，即是在 HAMA 含量为 50% (GH/H-H) 时，仍保留 GelMA 水凝胶良好的抗疲劳性能。

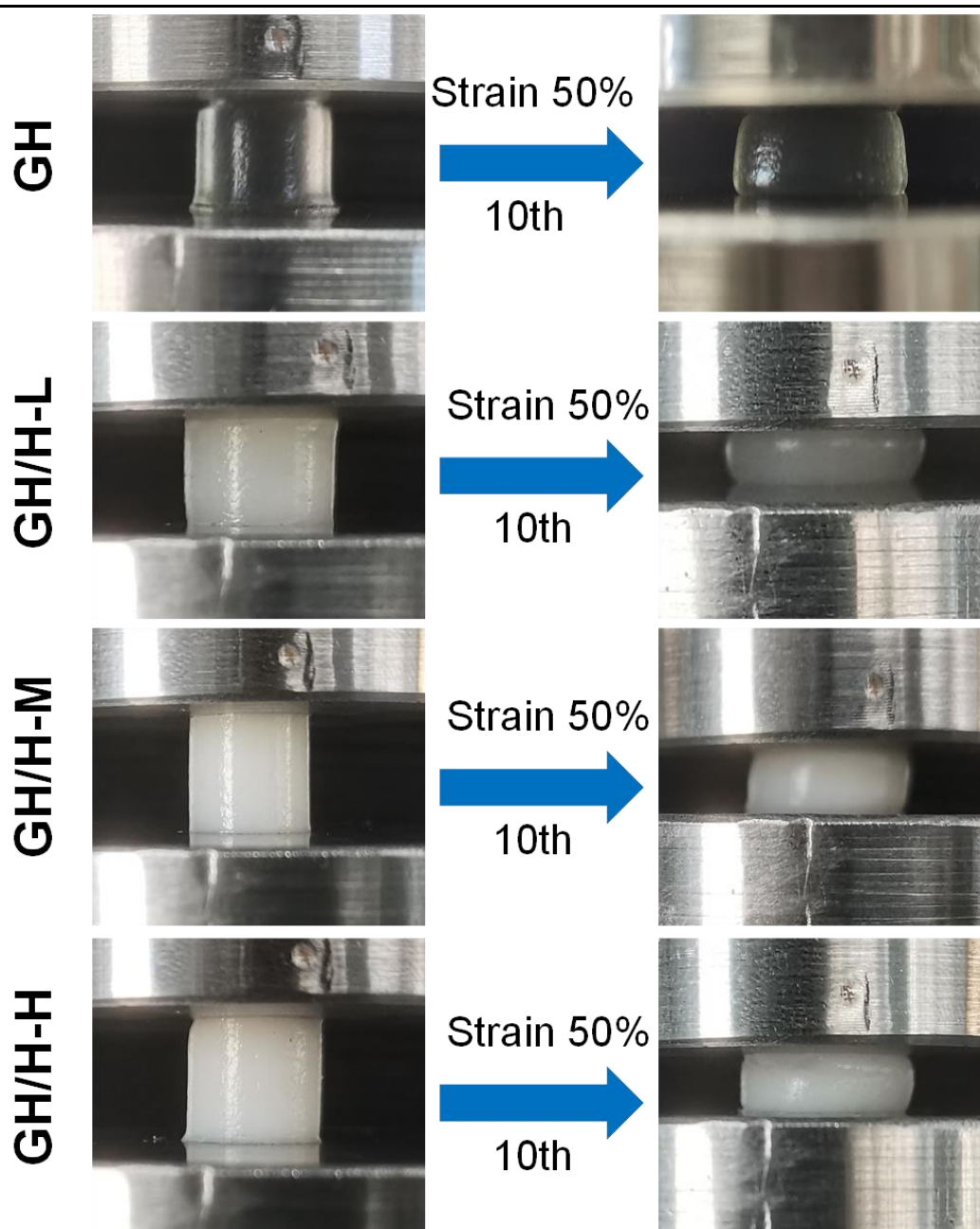


图 2.8 GH 和 GH/H 复合支架抗疲劳表征，左侧为初始光学照片，右侧为经历 10 次应变为 50%的循环后的光学照片。

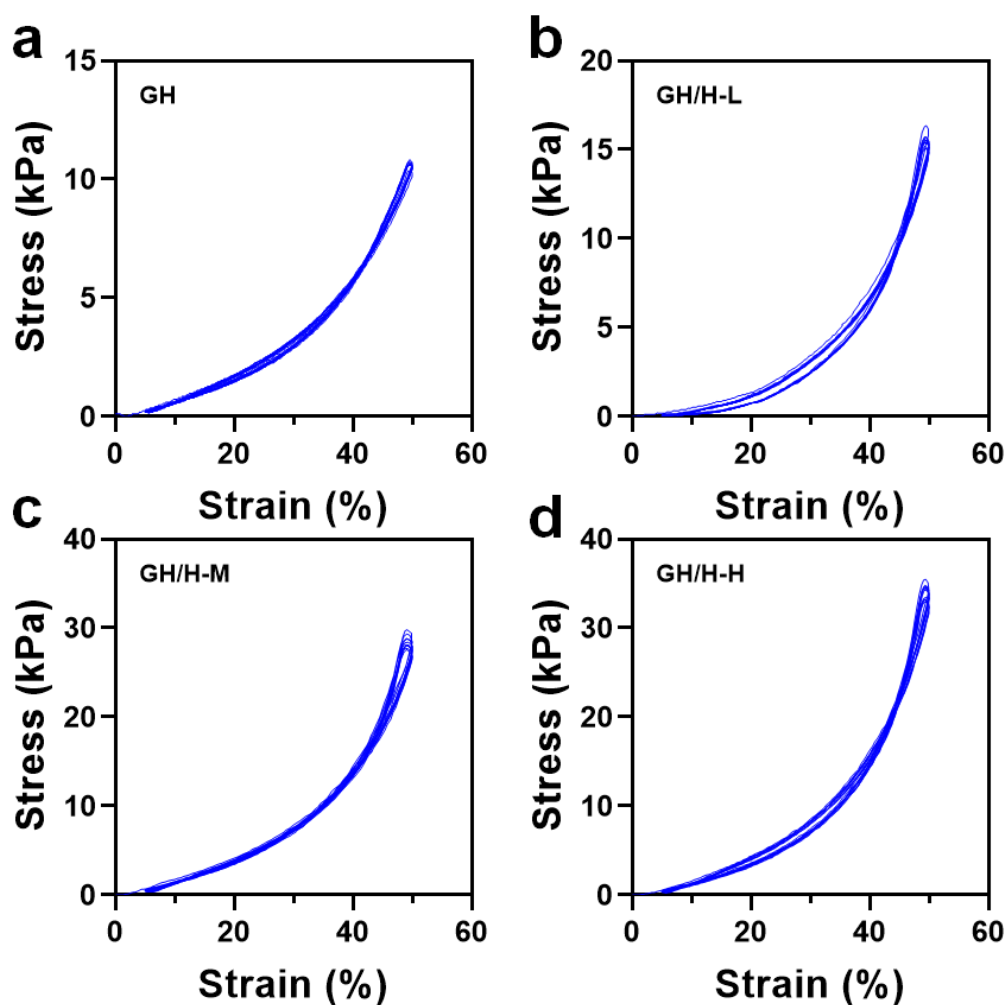


图 2.9 GH 和 GH/H 复合支架的抗疲劳测试的应力-应变曲线，其中应变为 50%，循环次数为 10 次，a 为单纯 GH 支架，b-d 分别为 GH/H-L，GH/H-M 和 GH/H-H 复合支架。

#### 2.2.4 结论

综上所述，通过该方法可以成功制备孔洞直径在 100-200 nm，孔壁粗糙，内部具有嵌插和联通相连孔洞的 HMT，且具备良好的力学和抗疲劳性能的复合支架。这些性能在骨修复方面具有较有利的影响，如粗糙的表面可以促进细胞的增殖<sup>[293]</sup>，高机械强度和抗疲劳能力也非常有利于骨缺损的修复<sup>[294, 295]</sup>。

### 2.3 羟基磷灰石微米管及其 GelMA 水凝胶复合支架的体外研究

#### 2.3.1 实验材料

### 2.3.1.1 实验主要设备及仪器

表 2.9 HAMT 及 GH/H 水凝胶复合支架体外细胞学研究主要设备和仪器

设备与仪器名称	生产公司
电热恒温水槽 (DK-8D)	上海精宏实验设备有限公司 (中国)
电热恒温水浴锅	Fisher Scientific (德国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
涡旋振荡器 (Vortex, QL-901)	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
生物安全柜 (HR40- II A2)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
医用离心机 (L500)	湖南湘仪实验室仪器开放有限公司 (中国)
二氧化碳培养箱 (311)	Thermo Fisher (美国)
移液枪套装	Eppendorf 公司 (德国)
小动物气体麻醉剂	上海玉研科学仪器有限公司 (中国)
小动物手术器械	上海金钟手术器械厂 (中国)
高压蒸汽灭菌器 (MLS-3780)	SANYO 公司 (日本)
液氮罐 (Locator JR)	Thermo Fisher (美国)
制冰机 (XB-130)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
高速冷冻离心机 (5424R)	Eppendorf 公司 (德国)
多功能酶标仪	Bio Tek Synergyz (美国)
Nano Drop (2000)	Thermo Fisher (美国)
PCR 核酸检测仪	Bio-Rad 公司 (新加坡)
荧光定量 PCR 仪 (CFX96™)	Bio-Rad 公司 (新加坡)
金属干浴仪器 (LS-D202)	Fisher Scientific (德国)
Western-Blot 电泳仪	Bio-Rad 公司 (新加坡)
Western-Blot 电转仪	Bio-Rad 公司 (新加坡)
蛋白分析成像系统	LICoR Odyssey (美国)
倒置荧光相差显微图像系统	LEICA DMI6000B (德国)
共聚焦激光扫描显微镜	ZEISS LSM710 (德国)

### 2.3.1.2 实验主要试剂及耗材

表 2.10 HAMT 及 GH/H 水凝胶复合支架体外细胞学研究主要试剂和耗材

试剂与耗材名称	供应商
DMEM 低糖细胞培养基	HyClone 公司 (美国)
胎牛血清	Gibco 公司 (美国)

青链霉素	Gibco 公司 (美国)
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco 公司 (美国)
PBS (1X)	HyClone 公司 (美国)
细胞冻存液	北京博奥龙免疫技术有限公司 (中国)
异氟烷	瑞普 (天津) 生物药业有限公司
Cell Counting Kit-8 试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
PBS (20X)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
4%多聚甲醛固定液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
75%乙醇消毒液	上海利康消毒高科技有限公司 (中国)
无水乙醇, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, 分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司 (中国)
Calcien AM (钙黄绿素) 染色液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
Propidium Iodide (碘化丙啶) 染色液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
Actin-Tracker Red-Rhodamine (微丝红色荧光探针)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
DAPI 染色液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
10%Triton X-100	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
1M Tris-HCl, pH=6.8	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
1M Tris-HCl, pH=8.8	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
30% Acr-Bis (29:1)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
10%SDS	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
10%AP	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
TEMED	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
电泳缓冲液 (10X)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
转膜缓冲液 (10X)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
丽春红染色液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
6×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
蛋白 marker (26616)	Thermo Fisher (美国)
硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose membrane, NC 膜)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
脱脂奶粉	上海生工生物科技公司 (中国)
牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)	上海钰森生物科技公司 (中国)
RIPA 裂解液	Gibco 公司 (美国)
PMSF (蛋白酶抑制剂)	Gibco 公司 (美国)

BCA 蛋白浓度测定试剂盒（增强型）	上海碧云天生物技术有限公司（中国）
Rabbit anti-osteopontin	Abcam 公司（美国）
Mouse anti-osteocalcin	Abcam 公司（美国）
Mouse anti-actin	Abcam 公司（美国）
Western-Blot 二抗（兔）	Cell Signaling Technology（美国）
Western-Blot 二抗（鼠）	Cell Signaling Technology（美国）
Trizol 提取试剂	上海生工生物科技公司（中国）
氯仿	国药集团化学试剂有限公司（中国）
异丙醇	阿拉丁试剂（上海）有限公司（中国）
无菌无酶水（DEPC · H <sub>2</sub> O）	上海碧云天生物技术有限公司（中国）
RT-qPCR 引物	上海捷瑞生物工程有限公司（中国）
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA	TaKaRa 公司（日本）
Eraser 试剂盒	
TB Green Premix Ex Taq™ II 试剂盒	TaKaRa 公司（日本）
细胞培养瓶（25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> ）	JET BIOFIL®（中国）
细胞培养板（6 孔, 12 孔, 96 孔）	JET BIOFIL®（中国）
离心管（1.5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL）	JET BIOFIL®（中国）
EP 管（1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL）	上海贝晶生物技术有限公司（中国）
共聚焦培养皿	JET BIOFIL®（中国）
细胞刮刀	JET BIOFIL®（中国）
细胞冻存管	JET BIOFIL®（中国）
细胞冻存盒	Thermo Fisher（美国）
细胞计数板	Marienfrld 公司（德国）

## 2.3.2 实验方法

### 2.3.2.1 骨髓间充质干细胞的提取

本研究选取大鼠骨髓间充质干细胞（Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs）作为体外细胞学研究的细胞, BMSCs 是一种具有多分化潜能的干细胞, 具有分化为成纤维细胞、成骨细胞、软骨细胞和骨细胞等定向分化潜能, 是骨组织修复工程理想的研究细胞之一<sup>[296]</sup>。BMSCs 按照经典方法<sup>[297]</sup>从新生大鼠的股骨骨髓中进行提取, 具体方法如下:

- (1) 使用 1 周龄的新生 SD 大鼠（Sprague-Dawley, 上海斯莱克实验动物有限公司, 中国）进行 BMSCs 的提取, 通过过度吸入异氟烷麻醉处死大鼠,

处死后将大鼠放入 75%乙醇中浸泡 15 分钟进行消毒，消毒完成后转移至生物安全柜中操作，彻底分离肌肉、筋膜等软组织，取出股骨和胫骨并将其浸入含有双抗（青链霉素）的无菌 PBS 中。

- (2) 将股骨和胫骨两侧的干骺端使用无菌器械剪断，开放双侧骨髓腔，然后使用含有双抗的 DMEM 低糖培养基，通过一次性无菌注射器反复冲洗骨髓腔，收集冲洗液，将冲洗液 1500 rpm，离心 3 分钟，弃去上清液，使用含有血清的完全培养基（DMEM 低糖培养基+10%胎牛血清+1%双抗）重悬细胞并转移至 25 cm<sup>2</sup> 的细胞培养瓶中，置于 37°C，5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。
- (3) 定时观察细胞生长状态，每 12 小时更换培养基，待几乎清除未贴壁生长的细胞后改为每 2-3 天更换培养基，观察培养瓶内细胞密度达 80%-90% 后进行细胞传代（具体操作方法如 2.3.2.2），经过 3 代纯化筛选后即为 BMSCs，此时的细胞为 P2 代（Passage 2）干细胞，后续细胞根据实验目的进行冻存、传代和铺板操作，使用 P3-P7 代细胞进行成骨分化实验，使用 P8-P10 代细胞进行增殖和生物相容性研究。

#### 2.3.2.2 细胞培养基本技术

- (1) 细胞培养：将 DMEM 低糖基础培养基，胎牛血清（Fetal bovine serum, FBS），双抗（青链霉素，Penicillin/streptomycin, PS）按 100: 10: 1 的比例（v/v/v）配制成完全细胞培养基，其中青霉素和链霉素的浓度分别为 100 U mL<sup>-1</sup> 和 100 μg mL<sup>-1</sup>。细胞培养在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中。
- (2) 细胞传代：当细胞密度生长至约 80%-90% 时则需进行细胞传代。以 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶为例，具体操作如下：①移除培养瓶内的旧培养基，加入含双抗的无菌 PBS，轻轻摇晃培养瓶，弃去 PBS，重复 3 遍；②加入 1 mL 0.25% Trypsin-EDTA 溶液，轻轻摇晃培养瓶使 Trypsin-EDTA 溶液将瓶底完全覆盖，然后将培养瓶置于培养箱中孵育 3-5 分钟；③取出培养瓶后在显微镜下观察，待镜下观察到细胞形态变为圆形时，提示贴壁细胞已被消化脱落下来，然后转移至生物安全柜中进行操作，加入与 Trypsin-EDTA 同等体积的完全培养基以终止消化反应，然后使用移液枪或无菌塑料滴管充分吹打培养瓶，收集吹打后的细胞悬液至 15 mL 离心管中；④将细胞悬液进行离心，1000 rpm，3 分钟，弃上清后加入 3 mL 完全培养基重悬，然后根据实验需求和安排进行传代，如 1:2，1:3 传至新的培养瓶中。⑤补足新鲜的完全培养基，25 cm<sup>2</sup> 培养瓶为 5 mL，75 cm<sup>2</sup> 加入 15 mL 培养基，轻轻摇晃使细胞悬液分散均匀，然后放置在细胞培养箱中进行培养。
- (3) 细胞冻存：细胞的冻存和复苏遵循“慢冻快融”原则进行。具体操作如下：

①-④步同细胞传代步骤，待弃去上清液后，根据细胞数量加入一定体积的冻存液，如 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶通常可获得 2×10<sup>7</sup> 个细胞，则加入 2-3 mL 冻存液，以使冻存密度达到 5-10×10<sup>6</sup> 个/mL，常见细胞培养器皿可获细胞估计数量如表 2.11，精确数量仍需进行细胞计数计算。⑤充分重悬，将细胞悬液平均转移至 3 个细胞冻存管内，标记好后转移至细胞冻存盒内，然后放置在 -80°C 内，1 天后转移至液氮内长期冻存。

表 2.11 常用细胞培养器皿基本信息

培养器皿	底面积 (cm <sup>2</sup> )	培养液量 (mL)	估计可获细胞量
96 孔板	0.32	0.1	10 <sup>5</sup>
24 孔板	2.0	1.0	5×10 <sup>5</sup>
12 孔板	4.5	2.0	10 <sup>6</sup>
6 孔板	9.6	2.5	2.5×10 <sup>6</sup>
10 cm 培养皿	55	10	13.7×10 <sup>6</sup>
25 cm 塑料培养瓶	25	5.0	5×10 <sup>6</sup>
75 cm 塑料培养瓶	75	15	2×10 <sup>7</sup>

- (4) 细胞复苏：细胞的冻存和复苏遵循“慢冻快融”原则进行。具体操作如下：  
 ①从液氮罐中取出冻存的细胞，放置在 37°C 水浴锅中快速融化，约 1 分钟。  
 ②将细胞悬液转移至 15 mL 离心管内，加入 9 mL 预热好的新鲜培养基（冻存液：培养基=1:9），混匀后 1000 rpm，离心 3 分钟，弃上清。  
 ③加入 1 mL 新鲜培养基进行重悬，然后将细胞悬液转移至培养瓶或培养皿中，补足培养基后置于细胞培养箱中进行培养。
- (5) 细胞计数：①使用无水乙醇擦洗细胞计数板和盖玻片，然后用棉球轻轻擦干，晾干后备用。②同细胞传代①-④步制备单细胞悬液，要求细胞密度不得低于 10<sup>4</sup> 个/mL，若细胞数过少则进行离心重悬，若细胞数过度则进行稀释。③使用移液枪吸取 10 μL 细胞悬液，然后在计数板上盖玻片的一侧加入细胞悬液。④转移细胞计数板至显微镜下观察计数，记录计数板四个象限中的细胞数目，对于压线细胞则按照“计上不计下，计左不计右”的原则计数。⑤根据记录的细胞数目进行细胞悬液细胞数目的计算，计算方法如公式 (2.2)。

$$\text{细胞悬液浓度(个/mL)} = \frac{N \text{ (四各象限细胞之和)}}{4} \times 10^4 \times \text{稀释倍数} \quad (2.2)$$

### 2.3.2.3 生物材料的准备及灭菌处理

- (1) 羟基磷灰石微米管的准备及灭菌处理：参照 2.1.2.1 方法合成羟基磷灰石



微米管后，使用 75%乙醇和灭菌 PBS 洗涤 3 遍后，通过紫外线照射 4 小时进行灭菌处理。待灭菌后密封保存以备制备 GH/H 复合支架或使用完全 DMEM 低糖培养基配制 HAMT 母液，浓度为  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ， $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  和  $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ，然后用封口膜密封试管，超声 30 分钟使其均匀分散， $4^\circ\text{C}$  保存备用。每次使用前均通过紫外照射 30 分钟再次灭菌。

- (2) GH 及 GH/H 复合支架浸提液的制备及灭菌处理：使用经灭菌处理后的 HAMT 和 GelMA 水凝胶参照 2.2.2.1 制备 GH 和 GH/H 复合支架，然后根据“国标 GBT 1688612-2017 医疗器械生物学评价标准”制备复合支架浸提液，具体方法为，将 1g GH 或 GH/H 复合支架浸泡在 10 mL 的完全 DMEM 低糖培养基中，放置在  $37^\circ\text{C}$  中 24 小时以获得浸提液，然后使用  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$  无菌滤器进行过滤做灭菌处理，密封保存在  $4^\circ\text{C}$  中以备使用。
- (3) 细胞培养板中 GH 和 GH/H 复合支架的制备及灭菌处理：以 12 孔细胞培养板为例。使用经灭菌处理后的 HAMT 和 GelMA 水凝胶参照 2.2.2.1 配制支架溶液，然后取 1 mL 溶液至细胞培养板中，轻轻摇晃细胞培养板，使溶液完全覆盖培养孔板底，然后洗除 0.9 mL 水凝胶液体，使用紫外光照射 30 秒进行光固化交联，从而制备 GH 和 GH/H 复合薄膜支架。96 孔板则为取  $50 \text{ }\mu\text{L}$  覆盖，移除  $40 \text{ }\mu\text{L}$  后光固化。

#### 2.3.2.4 CCK8 法 (Cell counting kit-8) 细胞毒性实验

- (1) 细胞铺板：使用生长良好的 P8-P10 代 BMSCs 按照  $1 \times 10^4$  个/孔的浓度接种于 96 孔细胞培养板中，每组 3 个副孔，接种后轻轻拍打细胞培养板以使 BMSCs 均匀的分布在孔内，然后将细胞培养板置于细胞培养箱内培养。分组设置为 HAMT 组和支架浸提液组，检测时间点为 24 小时和 48 小时，共计 4 块 96 孔板。
- (2) 培养 24 小时待细胞贴壁生长后，移除培养板中的旧培养基，然后取  $100 \text{ }\mu\text{L}$  上述准备好的 HAMT 材料溶液或支架浸提液按不同浓度、不同分组加入 96 孔板中。HAMT 材料浓度梯度为： $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ， $30 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ， $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ， $70 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  和  $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 。支架浸提液分组为：5%GH，10%GH，5%GH/H-L，5%GH/H-M，5%GH/H-H，10%GH，10%GH/H-L，10%GH/H-M，10%GH/H-H。单纯完全 DMEM 低糖培养基作为空白对照组。
- (3) 待与材料或浸提液共培养至设定时间时，移除孔中的旧培养基和材料，使用无菌 PBS 洗 3 次，然后加入  $110 \text{ }\mu\text{L}$  预先配制的 CCK8 工作液 ( $100 \text{ }\mu\text{L}$  新鲜完全培养基+ $10 \text{ }\mu\text{L}$  CCK8 试剂)，将 96 孔培养板转移至培养箱中孵育 2 小时。
- (4) 使用移液枪吸取  $80 \text{ }\mu\text{L}$  孵育后的上清液至新的 96 孔板中，通过酶标仪检

测 450 nm 处的 OD 值 (Optical density)。

### 2.3.2.5 CCK8 法 (Cell counting kit-8) 细胞增殖实验

- (1) HMT 材料的细胞增殖实验步骤同 2.3.2.4, 细胞铺板密度为  $1 \times 10^3$  个/孔, 每组 3 个副孔, 浓度梯度同毒性检测实验, 时间设置为 1, 3, 5, 7 天, 共 4 块 96 孔细胞培养板。
- (2) 参照 2.3.2.3 中 (3) 方法进行 GH 和 GH/H 复合薄膜支架的制备, 准备完后使用紫外光照射 30 分钟进行灭菌处理。
- (3) 细胞铺板: 使用生长良好的 P8-P10 代 BMSCs 消化计数后按  $1 \times 10^3$  个/孔的浓度接种于 (1) 中含有薄膜支架的 96 孔细胞培养板中, 接种后轻轻拍打细胞培养板以使 BMSCs 均匀的分布在孔内, 然后将细胞培养板置于细胞培养箱内培养。GH 组为实验对照组, 检测时间点 1, 3, 5, 7 天, 共 4 块 96 孔细胞培养板。
- (4) 待与材料或浸提液共培养至设定时间时, 移除孔中的旧培养基和材料, 使用无菌 PBS 洗 3 次, 然后加入 110  $\mu\text{L}$  预先配制的 CCK8 工作液 (100  $\mu\text{L}$  新鲜完全培养基+10  $\mu\text{L}$  CCK8 试剂), 将 96 孔培养板转移至培养箱中孵育 2 小时。
- (5) 使用移液枪吸取 80  $\mu\text{L}$  孵育后的上清液至新的 96 孔板中, 通过酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值 (Optical density)。

### 2.3.2.6 细胞活死染色实验

- (1) 参照 2.3.2.3 中 (3) 方法进行 GH 和 GH/H-H 复合薄膜支架的制备, 准备完后使用紫外光照射 30 分钟进行灭菌处理。
- (2) 细胞铺板: 使用增殖良好的 P8-P10 代 BMSCs 按照  $1 \times 10^5$  个/孔的浓度接种上述含有薄膜支架的 12 孔培养板中, 接种后轻轻拍打细胞培养板以使 BMSCs 均匀的分布在支架内, 转移至细胞培养箱中培养。GH 组为实验对照组。
- (3) 待细胞与薄膜支架共培养至 24 小时后, 吸去旧培养基, 使用无菌 PBS 洗 3 次。
- (4) 按照说明书配制含有 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  钙黄绿素 AM 和 8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  PI 的活死细胞染色工作液, 然后每孔加入 250  $\mu\text{L}$  染色工作液进行染色, 摇晃培养板使染色液充分覆盖培养板底, 将培养板置于培养箱内孵育 30 分钟。
- (5) 孵育结束后更换新鲜的完全培养基, 再次放置在培养箱内孵育 30 分钟以充分水解钙黄绿素从而产生带绿色荧光的 Calcein。
- (6) 最后, 移除培养基后加入少量无菌 PBS, 将培养板放置于荧光显微镜下观

察并采集图像。绿光为活细胞，红光为死细胞。

### 2.3.2.7 细胞形态及粘附实验

- (1) 参照 2.3.2.3 中 (3) 方法进行 GH 和 GH/H-H 复合薄膜支架的制备，准备完后使用紫外光照射 30 分钟进行灭菌处理。
- (2) 细胞铺板：将生长状态良好的 P8-P10 代 BMSCs 以  $3 \times 10^3$  个/孔的密度接种于上述含有薄膜支架的共聚焦玻璃培养皿中，接种后轻轻拍打细胞培养板以使 BMSCs 均匀的分布在支架内，转移至细胞培养箱中培养。GH 组为实验对照组。
- (3) 配制染色洗涤液和染色工作液：①染色洗涤液：使用无菌 PBS 溶液稀释 10% Triton X-100 溶液，稀释 100 倍配制为 0.1% Triton X-100 溶液。②染色工作液：将 BSA 溶解于 0.1% Triton X-100 溶液中以配制 3% BSA 溶液，再将微丝红丝荧光探针按 1:100 的比例稀释，即为染色工作液。
- (4) 待细胞与薄膜支架共培养至 24 小时，吸去旧培养基，使用无菌 PBS 洗 3 次，然后加入 4% 多聚甲醛溶液，室温固定 20 分钟。
- (5) 固定完成后，移除多聚甲醛，用 0.1% Triton X-100 洗涤液洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- (6) 取 200  $\mu\text{L}$  的染色工作液加入共聚焦培养皿，轻轻摇晃以均匀覆盖皿底，然后室温避光孵育 1 小时。孵育结束后使用 0.1% Triton X-100 洗涤液洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- (7) 加入 200  $\mu\text{L}$  的 DAPI 染色试剂，室温避光孵育 10 分钟，孵育完成后使用染色洗涤液洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- (8) 最后，加入少量无菌 PBS，使用激光共聚焦显微镜观察并采集图像。红光为细胞骨架，蓝光为细胞核。

### 2.3.2.8 RT-qPCR 检测成骨分化相关基因的表达

OPN (Osteopontin)、OCN (Osteocalcin) 和 Col I (Type I collagen) 是成骨分化相关的标志基因<sup>[298-300]</sup>，本研究通过 RT-qPCR 实验检测其表达量，从而验证生物材料的促成骨分化性能。具体的实验操作如下：

#### a. 细胞样品的准备和 RNA 提取

- (1) 使用 P3-P7 代生长状态良好的 BMSCs，待细胞密度为 80%-90% 时，将细胞消化、计数后按  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔细胞培养板中，接种后轻轻摇晃培养板以使细胞均匀分布，置于细胞培养箱内培养 24 小时。
- (2) 待细胞贴壁后，将旧培养基更换为含有灭菌处理的 HAMT ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) 新鲜完全培养基，不添加材料的完全培养基设置为空白对照组。然后将培

养板转移至细胞培养箱培养，每 2-3 天更换一次相应的新鲜培养基。

- (3) 待 BMSCs 与材料共培养 7 天和 14 天后，移除培养板内的旧培养基和生物材料，灭菌 PBS 洗涤 3 遍，然后使用细胞刮刀轻柔地将细胞刮下，加入 1 mL 灭菌 PBS，轻轻吹打后转移至无 RNase 的 EP 管中，12000 rpm，离心 1 分钟，小心弃去上清液。
- (4) 加入 1 mL Trizol 试剂，充分吹打细胞沉淀，使其溶解形成细胞匀浆，室温放置 5 分钟。
- (5) 加入 200  $\mu$ L 氯仿（氯仿：Trizol=1:5），使用涡旋仪剧烈涡旋振荡 15 秒，使其充分混匀，室温静置 5 分钟，然后 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟，转速为 12000 rpm。离心后的溶液分为 3 层液相，上层为含有 RNA 的水相，将其转移至新的无 RNase 的 EP 管中，加入等体积的异丙醇，颠倒混匀 5 次，室温静置 10 分钟，4 $^{\circ}$ C 下 12000 rpm 离心 10 分钟后可得 RNA 沉淀。
- (6) 小心弃上清，加入 1 mL 无水乙醇（无水乙醇：Trizol=1:1），涡旋振荡混匀后 4 $^{\circ}$ C，7500 rpm 离心 5 分钟，然后小心弃上清，室温开盖干燥，直至 RNA 沉淀变透明。
- (7) 加入 30  $\mu$ L DEPC  $\cdot$  H<sub>2</sub>O 溶解 RNA，然后通过 Nano Drop（2000）对 RNA 浓度定量，当 A260/A280 位于 1.80-2.00 之间时认为所测 RNA 浓度可信，所获样品 RNA 浓度及 A260/A280 值见表 2.12。提取的 RNA 样品放于 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

表 2.12 RNA 浓度及 A260/A280 值

样品	RNA 浓度 ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ )	A260/A280
Blank 14d	672.9	1.9
HAMT 7d	415.4	1.88
HAMT 14d	471.4	1.99

#### b. RNA 逆转录

使用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行 RNA 的逆转录。为防止加样误差，在配制反应混合液时，均按照反应数+2 来进行配制。

- (1) 去除基因组 DNA：所有 RNA 样品设定为 500 ng，去除基因组 DNA 反应体系为 10  $\mu$ L，反应混合液参照表 2.13 进行配制，混合后室温静置 5 分钟以去除基因组 DNA，然后置于冰上暂存。

表 2.13 去除基因组 DNA 反应液

试剂	剂量
5 $\times$ gDNA Eraser Buffer	2.0 $\mu$ L

gDNA Eraser	1.0 $\mu\text{L}$
RNA 样品 (500 ng)	500 ng/RNA 样品浓度 ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ )
无 RNase 灭菌水	补足至 10 $\mu\text{L}$

- (2) RNA 的逆转录: 使用上述去除基因组 DNA 的样品进行逆转录, 参照表 2.14 预先配制逆转录 Mix 溶液, 逆转录反应总体系为 20  $\mu\text{L}$ , 逆转录反应程序如表 2.15, 逆转录后的 cDNA 样品置于 4 $^{\circ}\text{C}$  暂存或 -20 $^{\circ}\text{C}$  短期保存备用。

表 2.14 逆转录反应体系

试剂	剂量
去除基因组 DNA 的 RNA 样品	10.0 $\mu\text{L}$
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 $\mu\text{L}$
RT Primer Mix	1.0 $\mu\text{L}$
5 $\times$ PrimeScript Buffer 2	4.0 $\mu\text{L}$
无 RNase 灭菌水	4.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

表 2.15 逆转录反应程序

温度	时间
37 $^{\circ}\text{C}$	15 分钟
85 $^{\circ}\text{C}$	5 秒
4 $^{\circ}\text{C}$	无限

### c. RT-qPCR

成骨相关基因的表达量检测使用 TB Green Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒。GAPDH 作为内参基因, 目标基因包括 OPN、OCN 和 Col I, 各基因引物序列如表 2.16 所示<sup>[301]</sup>。具体实验步骤如下:

表 2.16 RT-qPCR 中所使用引物序列

基因名称	引物序列 (F: Forward Primer; R: Reverse Primer)
GAPDH	F: 5'-GGCAAGTTCAACGGCACAGT-3'
	R: 5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'
OPN	F: 5'-AGCAAGAACTCTTCCAAGCAA-3'
	R: 5'-GTGAGATTCGTCAGATTCATCCG-3'
OCN	F: 5'-CAGTAAGGTGGTGAATAGACTCCG-3'
	R: 5'-GGTGCCATAGATGCGCTTG-3'
Col I	F: 5'-GCAACAGTCGCTTCACCTACA-3'

R:5'-CAATGTCCAAGGGAGCCACAT-3'

- (1) RT-qPCR 反应总体系为 25  $\mu$ L, 然后参照表 2.17 配制 PCR 反应 Mix 溶液, 其中 DNA 模板为上述 RNA 逆转录所获的 cDNA, 每组每个基因指标重复 3 次, 所有操作均在冰上进行。

表 2.17 RT-qPCR 反应 Mix 溶液的配制

试剂	剂量
TB Green Premix Ex Taq™ II	12.5 $\mu$ L
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
DNA 模板	1.0 $\mu$ L
无 RNase 灭菌水	9.5 $\mu$ L
总体积	25.0 $\mu$ L

- (2) 配制好 RT-qPCR 反应 Mix 溶液后, 按照表 2.18 所示的反应程序进行 RT-qPCR 检测。

表 2.18 RT-qPCR 反应程序

反应步骤	反应条件
第 1 步	95°C, 30 秒
第 2 步	95°C, 5 秒
第 3 步	60°C, 30 秒
第 4 步	返回至第 2 步, 重复 39 次循环
第 5 步	95°C, 10 秒
第 6 步	65°C-95°C, 无限时

- (3) 计算目标基因的相对表达量, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算,  $-\Delta\Delta Ct$  具体计算方法如公式 (2.3) 所示。

$$-\Delta\Delta Ct = \left[ \left( Ct_{\text{实验组目的基因}} - Ct_{\text{实验组内参基因}} \right) - \left( Ct_{\text{对照组目的基因}} - Ct_{\text{对照组内参基因}} \right) \right] \quad (2.3)$$

### 2.3.2.9 Western-Blot 检测成骨分化相关基因的表达

本研究利用 Western-Blot 实验检测成骨分化相关蛋白的表达量, 包括骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 和骨钙蛋白 (Osteocalcin, OCN), 具体实验步骤如下:

#### a. 细胞样品的准备及蛋白提取

- (1) 使用 P3-P7 代生长状态良好的 BMSCs, 待细胞密度为 80%-90%时, 将细胞消化、计数后按  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 接种后轻

轻摇晃培养板以使细胞均匀分布，置于细胞培养箱内培养 24 小时。

- (2) 待细胞贴壁后，将旧培养基更换为含有灭菌处理的 HAMT ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) 新鲜完全培养基，不添加材料的完全培养基设置为空白对照组。然后将培养板转移至细胞培养箱培养，每 2-3 天更换一次相应的新鲜培养基。
- (3) 待 BMSCs 与材料共培养 7 天和 14 天后，移除培养板内的旧培养基和生物材料，无菌 PBS 洗涤 3 遍，然后使用细胞刮刀轻柔的将细胞刮下，加入 1 mL 无菌 PBS，轻轻吹打后转移至 1.5 mL 的 EP 管中， $4^{\circ}\text{C}$ ，12000 rpm，离心 1 分钟，小心弃去上清液，置于冰上暂存。
- (4) 取 150  $\mu\text{L}$  细胞裂解液加入，细胞裂解液为 RIPA 裂解液与 PMSF (蛋白酶抑制剂) 配制，体积比为 100:1，然后使用移液枪吹打混匀，直至溶液澄清，置于冰上裂解 30 分钟，期间每隔 10 分钟振荡一次 EP 管以使裂解充分，裂解完全后  $4^{\circ}\text{C}$  下离心 30 分钟，转速 12000 rpm，小心转移上清液至新的 EP 管内， $4^{\circ}\text{C}$  暂存或  $-20^{\circ}\text{C}$  短期保存备用，若需长期保存则需放于  $-80^{\circ}\text{C}$  中。

#### b. 蛋白浓度的测定及电泳样品准备

使用 BCA 试剂盒 (增强型) 测定样品的总蛋白浓度。具体实验步骤如下:

- (1) 配制蛋白标准品: 将 20 mg BSA 溶解于 0.8 mL 的蛋白标准配制液中以获得浓度为  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  的蛋白标准溶液母液。然后取 10  $\mu\text{L}$  蛋白标准溶液母液至 490  $\mu\text{L}$  PBS 溶液中，以获得终浓度为  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  的蛋白标准溶液，可放于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中长期保存。
- (2) 制作蛋白标准曲线及样品加样: 使用 96 孔板按照表 2.19 加样制作蛋白标准曲线，然后将上述提取的蛋白样品加入 2  $\mu\text{L}$  至新孔中，并加入标准品稀释液以补足至 20  $\mu\text{L}$ 。

表 2.19 BSA 蛋白标准曲线加样

浓度 ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蛋白标准溶液体积 ( $\mu\text{L}$ )	0	1	2	4	8	12	16	20
标准品稀释液体积 ( $\mu\text{L}$ )	20	19	18	16	12	8	4	0

- (3) 配制 BCA 工作液: 计算所用 BCA 工作液体积，每孔需加入 200  $\mu\text{L}$  工作液，配制时按待测孔数+2 配制以减少加样误差，然后将 BCA 试剂 A 与试剂 B 按体积比 50:1 混合均匀，即为 BCA 工作液，该工作液需现配现用。
- (4) 将上述工作液加至 (2) 中的待测样品孔，每孔加入 200  $\mu\text{L}$ ，然后放置在  $37^{\circ}\text{C}$  中孵育 30 分钟。
- (5) 通过酶标仪测定在 590 nm 处的 OD 值。
- (6) 根据标准样品的浓度和其对应的 OD 值绘制标准曲线，并通过标准曲线计

算各待测样品的蛋白浓度。

- (7) 电泳样品的准备：在电泳时，由于每孔蛋白上样量需一致，故使用 RIPA 裂解液将高浓度样品溶液稀释，从而使蛋白浓度一致。一般电泳上样体积为 10-15  $\mu\text{L}$ ，故本研究将蛋白浓度统一  $5 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ 。加入 6 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液稀释，蛋白样品溶液与缓冲液体积比为 5:1。然后置于预热好的  $100^\circ\text{C}$  金属干浴仪器中煮 30 分钟，使蛋白彻底变性。长期保存可放于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中。每次进行电泳前需  $100^\circ\text{C}$  煮 10 分钟，然后 12000 rpm 离心 3 分钟后取上清上样。

### c. 试剂准备及电泳胶的制备

- (1) 制备电泳凝胶：本研究采用 1.5 mm，10 孔，10% 分离胶进行蛋白电泳实验。具体制胶操作如下：①将 1.5 mm 的胶板、玻璃板和 10 孔的上样梳洗净吹干后备用。②按照表 2.20 所示配制分离胶混合液，然后将混合液加至胶板和玻璃板之间，待胶面升至绿带下沿附近时即可，然后加入异丙醇液封胶面。③约 30 分钟后胶面与异丙醇之间出现一条折线时，说明分离胶已充分凝固，彻底去除异丙醇，按表 2.20 所示配制浓缩胶并灌胶，然后插入上样梳。④约 30 分钟左右，待浓缩胶凝固后即可。

表 2.20 SDS-PAGE 电泳凝胶配制方法

试剂	分离胶 (10%)	浓缩胶 (5%)
30% Acr-Bis (29:1)	3.3 mL	0.5 mL
超纯水	4.0 mL	2.1 mL
1M Tris · HCl	2.5 mL (pH=8.8)	0.38 mL (pH=6.8)
10%SDS	100 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
10%AP	100 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
TEMED	4.0 $\mu\text{L}$	3.0 $\mu\text{L}$

- (2) 配制电泳缓冲液：将碧云天购买的电泳缓冲液 (10 $\times$ ) 用超纯水稀释至 1 $\times$  即可。
- (3) 配制转膜缓冲液：取 100 mL 碧云天购买的转膜缓冲液 (10 $\times$ ) 溶于 700 mL 超纯水中，然后加入 200 mL 无水乙醇即可，使用前应放置  $4^\circ\text{C}$  冰箱中预冷。
- (4) 配制 PBST 缓冲液：取 100 mL 碧云天购买的 PBS 缓冲液 (10 $\times$ ) 溶于 900 mL 超纯水中，稀释为 1 $\times$  PBS 缓冲液，然后加入 500  $\mu\text{L}$  吐温-80 (Tween)，混合均匀后常温保存。
- (5) 配制 7% 牛奶封闭液：将 0.7 g 脱脂奶粉溶于 10 mL PBS 溶液， $4^\circ\text{C}$  暂存。
- (6) 配制 3% BSA 抗体稀释液：称取 0.3 g 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin,



BSA), 溶于 10 mL PBST 缓冲液中, 4°C 暂存使用。

d. Western-Blot 分析

- (1) 电泳: 将上述配制好的电泳胶放置在电泳槽中, 加入电泳缓冲液, 缓慢取出加样梳, 然后取上述准备好的蛋白样品 10  $\mu$ L 加至电泳胶的泳道内, 最左侧加入 5  $\mu$ L 蛋白 marker。电泳设置参数为: 恒压 80V, 30-40 分钟 (待 marker 条带分开后), 恒压 120V, 1.5 小时。期间注意观察样品电泳情况, 若蓝色条带已至分离胶的下缘时应提前停止, 若未至则可增加电泳时间。跑胶完成后小心取出电泳胶, 裁弃浓缩胶部分, 将剩余电泳胶部分放置在预冷的转膜缓冲液中备用。
- (2) 转膜: 将 NC 膜、滤纸、海绵垫和转膜用夹子放入盛有预冷的转膜缓冲液的盘子中, 然后从下至上按照转膜用夹子黑面-海绵垫-滤纸 (三层)-分离胶-NC 膜-滤纸 (三层)-海绵垫-转膜用夹子白面的顺序放置并固定好, 过程中注意避免产生气泡。固定好后将此“三明治”夹板放入转膜槽中, 注意夹板黑面对转膜槽黑面, 白面对转膜槽红面。然后置于冰中进行转膜, 参数设置为: 恒压 80V, 时间 80 分钟。
- (3) 丽春红染色: 待转膜结束后, 取出 NC 膜, 将其正面 (与胶接触面) 朝上放置于孵育盒中, 加入适量丽春红染色液, 轻轻摇晃后观察蛋白条带, 然后根据实验目的裁去多余部分。
- (4) 封闭: 将 NC 膜转移至新的孵育盒中, 然后加入 7% 牛奶封闭液, 室温摇床上慢速摇晃, 封闭 2 小时。
- (5) 一抗孵育: 将目标蛋白的一抗工作液按说明书的稀释比例稀释到 3% BSA 溶液中配制一抗孵育工作液, 稀释比例为: Actin: 1: 1000; OPN: 1: 1000; OCN: 1: 1000。然后将封闭好的 NC 膜转移至黑色避光孵育盒中, 加入上述一抗孵育工作液, 工作液需完全覆盖 NC 膜, 然后 4°C 孵育过夜或室温孵育 2-3 小时。
- (6) 洗膜: 一抗孵育完成后, 回收一抗孵育工作液 -20°C 保存以备下次使用, 不重复使用超过 3 次。然后加入适量 PBST 缓冲液, 摇床快速摇晃 10 分钟, 重复 3 次。
- (7) 二抗孵育: 根据所使用的一抗来源选择相应的带荧光二抗。然后使用 3% BSA 溶液按照 1: 2000 的比例稀释二抗, 配制为二抗孵育工作液。将二抗孵育工作液加入加入至黑色避光孵育盒中, 放置摇床上缓慢摇晃进行孵育, 室温孵育 2 小时。
- (8) 洗膜和扫膜: 待二抗孵育结束后, 吸去二抗孵育工作液, 加入适量 PBST 缓冲液, 摇床快速摇晃 10 分钟, 重复 3 次以洗涤多余未结合的二抗。最

后使用 Odyssey 蛋白分析成像系统进行扫膜。

### 2.3.2.10 统计学方法和分析

使用平均值±标准差 (Mean±SD) 对实验数据中的定量数据进行表示, 统计学分析通过 IBM SPSS Statistics 16.0 软件进行统计分析, 图表制作采用 GraphPad Prism 8 和 OriginPro 9.0 软件。使用 Image J 软件对荧光染色图片进行分析及定量。组间比较使用 *t* 检验或方差分析进行差异性分析, 当 *p* 值<0.05 时, 认为组间差异具有统计学意义。

## 2.3.3 实验结果与讨论

### 2.3.3.1 羟基磷灰石微米管及其 GelMA 水凝胶复合支架的生物相容性检测

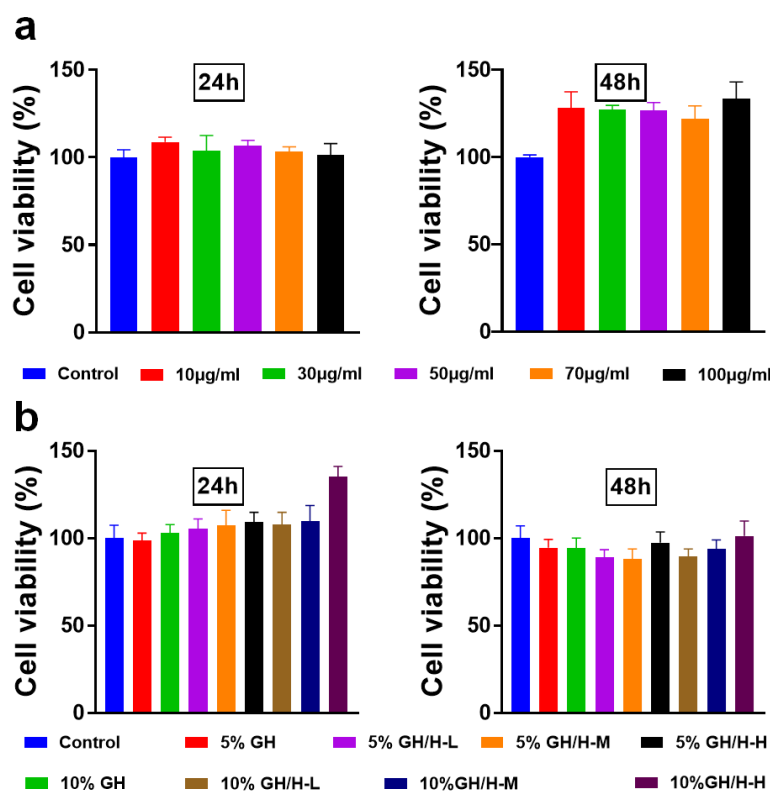


图 2.10 细胞毒性检测。(a) 浓度梯度的 HAMT 细胞活性检测。(b) 不同浓度的 GH 及其与不同占比的 HAMT 所构建的复合支架的细胞活性检测。

生物相容性是评价生物材料性能的一个重要指标, 本研究针对 HAMT 及 GH/H 复合支架的生物相容性通过体外的 CCK8 实验和免疫荧光染色实验进行检测。如图 2.10 所示, 在 BMSCs 与 HAMT 或复合支架共培养 24 小时和 48 小时后, 未见明显的细胞活性降低。单纯 HAMT 的浓度梯度设置为  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、30

$\mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $70 \mu\text{g mL}^{-1}$  和  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ，以正常完全培养基培养的 BMSCs 作为对照，可以看出，即是在 HAMT 浓度达到  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  时，仍未见细胞活性的降低（图 2.10 a），提示所制备的 HAMT 生物材料具有良好的生物相容性。而 HAMT 在与 GelMA 水凝胶复合构建三维复合支架后，我们探究了不同 GelMA 水凝胶浓度（5%和 10%GH）以及不同 HAMT 占比的复合支架生物相容性，结果表明，不论是低浓度还是高浓度的 GelMA 水凝胶支架，还是不同 HAMT 占比所制备的 GH/H 复合支架，都未表现出明显的细胞毒性（图 2.10 b），提示其具有良好的生物相容性，这也与之前对于 GelMA 水凝胶的研究一致<sup>[302, 303]</sup>。

此外，由于所构建的 GH/H 复合支架为三维多孔支架，为进一步探究细胞在支架上的生长形态，本研究采用了 Actin-Tracker Red-Rhodamine（微丝红色荧光探针）免疫荧光染色实验。Actin-Tracker Red-Rhodamine 是一种标记 Actin 的荧光探针，可特异性的结构细胞骨架，即肌动蛋白（F-Actin），通过共聚焦显微镜的高倍镜观察，可清楚的观察到细胞在复合支架上的生长形态。如图 2.11 所示，红色荧光为微丝荧光探针标记的 F-Actin，蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核，结果显示 BMSCs 在 GH 和 GH/H-H 复合支架上呈现纺锤形、正常铺展以及多突触的形态，提示细胞在该三维支架上生长良好，具有较好的细胞粘附能力，进一步证明了所构建的 GH/H-H 复合支架良好的生物相容性。

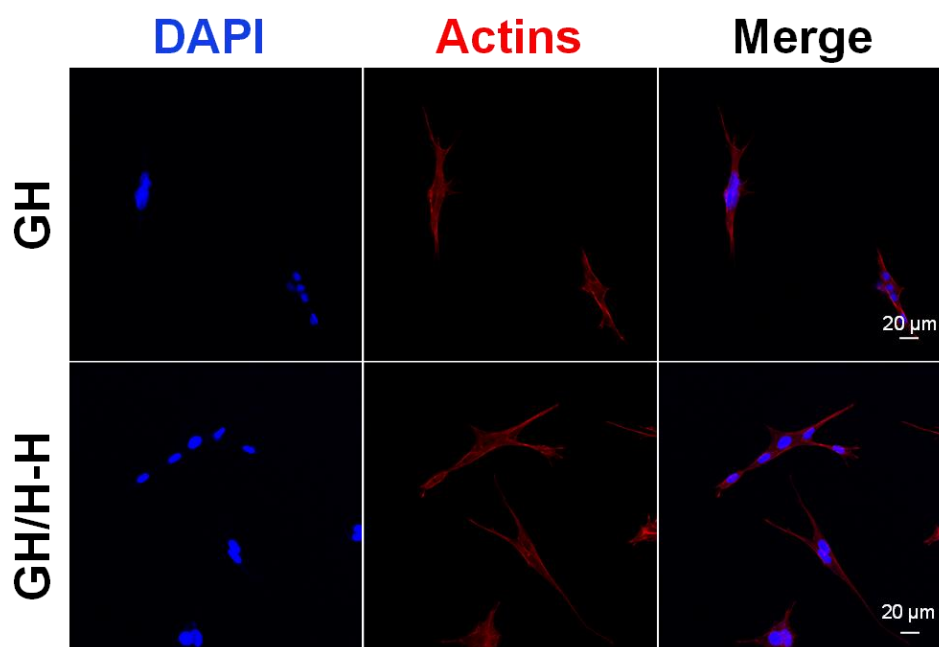


图 2.11 BMSCs 在 GH 和 GH/H-H 复合支架中生长的 Actin/DAPI 染色共聚焦结果。红色为细胞骨架 Actin，蓝色为细胞核。

### 2.3.3.2 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的生物活性检测

前文已证明了 GH/H 复合支架具有良好的生物相容性，然而在进行骨缺损修

复时，所植入的复合支架还需具备良好的生物活性，从而促进骨缺损的修复。为进一步探究 GH/H 复合支架的生物活性，本研究采用了 CCK8 法和活死细胞染色法来定量和定性分析了 GH/H 复合支架的生物活性性能。图 2.12 a 所示为单纯 HAMT 的增殖结果图，在 BMSCs 与不同浓度的 HAMT 进行共培养 1、3、5 和 7 天后，未见明显的促增殖效果。然而在复合 GelMA 水凝胶构建为 GH/H 复合支架后，GH/H 复合支架的促增殖效果显著，尤其是在 HAMT 占比 50% 的 GH/H-H 复合支架中，BMSCs 的细胞活力相较于空白组在 1、3、5 和 7 天时分别为 122%、132%、178% 和 262%，结果如图 2.12 b 所示。这可能与 HAMT 加入后导致 GH/H 复合支架的粗糙表面有关。许多研究表明，粗糙的表面可以促进细胞的增殖<sup>[293]</sup>。此外，GH/H 复合支架具有多孔结构且表面粗糙的特点，这对细胞的粘附和生长具有积极的影响作用<sup>[304]</sup>。基于 GH/H-H 表现出更好的生物活性，后续实验便重点探究此复合支架，不再做不同浓度配比构建复合支架的探讨。

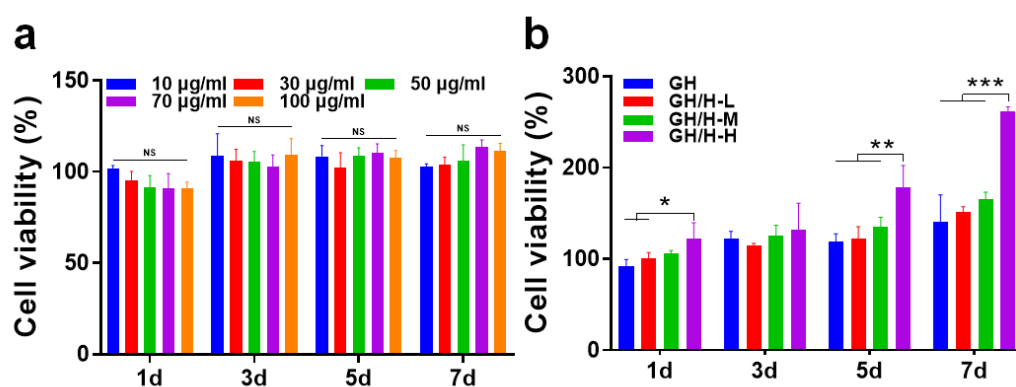


图 2.12 HAMT 和 GH/H 复合支架的细胞增殖 CCK8 结果图。结果表示为平均值±标准差 (Mean ± SD)，\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ， $p < 0.05$  认为具有显著性差异，组间比较为 GH/H-H 与 GH 组。

图 2.13 所示为 BMSCs 在 GH 和 GH/H-H 支架上生长的活死细胞染色结果。绿色荧光为提示活细胞的钙黄绿素 (Calcien-AM)，红色荧光为提示死细胞的碘化丙啶 (PI)，由图可以看出 GH 和 GH/H-H 复合支架上几乎没有红色荧光显示，即死细胞产生，进一步验证了此骨修复支架良好的生物相容性。对于显示活细胞的绿色荧光来说，在 GH/H-H 复合支架上可以观察到更多的活细胞生长，表明具有粗糙表面的 GH/H-H 复合支架具有更好的生物相容性。使用 Image J 软件定量分析的结果也证实了这一点 (表 2.21)。这与上述 CCK8 增殖实验的结果一致。

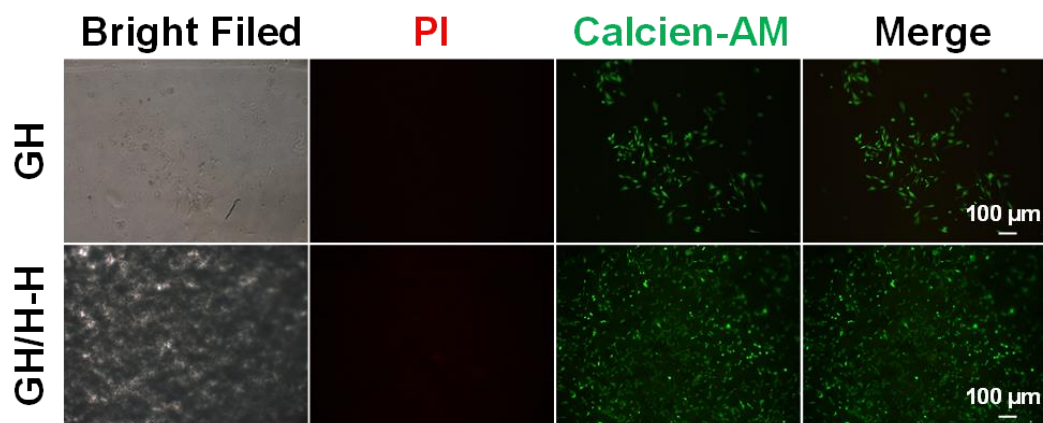


图 2.13 GH 和 GH/H-H 复合支架上的 BMSCs 的活/死细胞染色结果图。红色表示 PI 标记的死细胞，绿色表示 Calcien-AM 标记的活细胞。

表 2.21 Image J 分析统计的活/死细胞染色定量结果

样品	活细胞数	死细胞数	总细胞数
GH	201	0	201
GH/H-H	1177	1	1178

### 2.3.3.2 羟基磷灰石微米管的促成骨分化能力检测

上述实验结果证实了 HMT 和 GH/H 复合具有良好的生物相容性和生物活性，然而，应用于骨缺损修复的生物材料还需具备良好的促成骨分化和骨生成的作用。由于提取生长在复合支架的 BMSCs 的 RNA 和蛋白质较为困难，且结合之前的研究来看，GH/H 复合支架中起促成骨分化作用的主要是 HMT，故本研究使用 BMSCs 与 HMT 共培养来验证其促成骨分化能力。OCN、OPN 和 Col I 等是成骨分化的标志因子，在 BMSCs 向成骨细胞分化的过程中，其 mRNA 和蛋白的表达量会相应地上调。基于此，本研究通过 RT-qPCR 和 Western-Blot 实验分别在 mRNA 水平和蛋白质水平来验证 HMT 的促成骨分化能力。

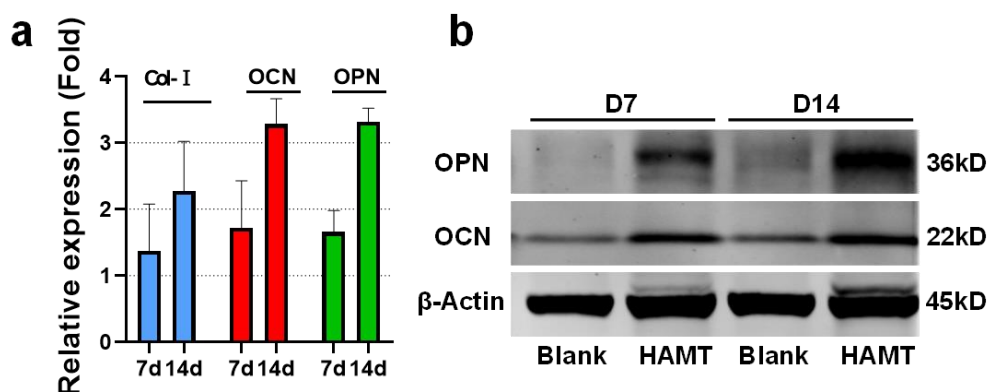


图 2.14 HMT 促进 BMSCs 成骨分化。(a) HMT 处理 7 天和 14 天的 BMSCs 后的

OCN、OPN 和 Col-I 基因的相对表达量。第 14 天 GAPDH 的相对表达设置为 1。(b) 第 7 天和第 14 天的 OPN 和 OCN 的 Western-Blot 结果。

图 2.14 a 为 RT-qPCR 实验所得目的基因的相对表达量结果，数据通过公式 (2.3) 计算目的基因的相对表达量。如图所示，成骨分化相关因子 OCN、OPN 和 ColI 均表现为表达上调，在共培养 7 天后，其表达量分别为 Blank 组的 1.72、1.66 和 1.37 倍；而在共培养 14 天后，HAMT 组的 OCN、OPN 和 ColI 的表达量则为 Blank 组的 3.28、3.32 和 2.27 倍。在 Western-Blot 实验中也获得了相同的趋势，如图 2.14 b 所示，BMSCs 在与 HAMT 共培养 7 天和 14 天后，OPN 和 OCN 的表达量均高于 Blank 组。这种促成骨分化的能力可能与 HAMT 的降解有关，在降解过程中，HAMT 为 BMSCs 的成骨分化和矿化提供了  $Ca^{2+}$  和磷酸盐原料<sup>[305]</sup>。由于在 BMSCs 向成骨细胞分化的过程中，其成果标志因子的 mRNA 和蛋白质表达量并不是一个同步统一发生的过程，而是一个有序调控的过程，其中 OPN 为早期成骨分化的标志<sup>[306]</sup>，OCN 为晚期成骨的标志<sup>[307]</sup>，而 ColI 则为成骨过程生物矿化所不可缺少的细胞外基质重要组成部分<sup>[308]</sup>。通过上述实验结果表明 HAMT 可以影响整个成骨过程中的成骨标志物表达上调，且这种影响呈现时间依赖性：作用时间越长，差异越明显。

### 2.3.4 结论

综上所述，本研究所构建的 GH/H 复合支架结合了 GelMA 水凝胶良好的生物相容性特点与 HAMT 的促成骨分化性能，同时，由于 HAMT 的引入，改善了 GelMA 水凝胶力学性能弱的缺点，为进一步应用于骨缺损修复提供了力学基础。此外，HAMT 的引入还改变了复合支架的表面特性，使复合支架内表面变为更适合细胞粘附与生长的粗糙表面，提高 GH/H 复合支架的生物活性。

## 2.4 羟基磷灰石微米管/GelMA 水凝胶复合支架的体内促骨修复研究

### 2.4.1 实验材料

#### 2.4.1.1 实验主要设备及仪器

表 2.22 GH/H-H 复合支架体内促骨缺损修复研究的主要设备和仪器

设备与仪器名称	生产公司
---------	------

电热恒温水浴锅	Fisher Scientific (德国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
涡旋振荡器 (Vortex, QL-901)	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
高压蒸汽灭菌器 (MLS-3780)	SANYO 公司 (日本)
倒置荧光相差显微图像系统	LEICA DMI6000B (德国)
世新牙科打磨机 (Strong 90)	上海仁沃医疗科技有限公司 (中国)
小动物手术器械	上海金钟手术器械厂 (中国)
小动物体重称	深圳德玛医疗器械有限公司 (中国)
离心机	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
组织脱水机 (JJ-12J)	武汉俊杰电子有限公司 (中国)
组织包埋机 (JB-P5)	武汉俊杰电子有限公司 (中国)
组织切片机	LEICA 公司 (德国)
组织摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司 (中国)
冻台 (JB-L5)	武汉俊杰电子有限公司 (中国)
载玻片	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司 (中国)
烤箱	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司 (中国)
微波炉	格兰仕公司 (中国)
组化笔	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
脱色摇床	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
超净工作台	新华医疗器械股份有限公司 (中国)
Hiscan XM Micro-CT 扫描仪	苏州海斯菲德信息科技有限公司 (中国)
全自动正置荧光显微镜	LEICA DM6 (德国)
切片数字扫描仪	3D HISTECH 公司 (匈牙利)

#### 2.4.1.2 实验主要试剂及耗材

表 2.23 GH/H-H 复合支架体内促骨缺损修复研究的主要设备和仪器

试剂与耗材名称	供应商
75%乙醇	上海利康消毒高科技有限公司 (中国)
安尔碘消毒液	上海利康消毒高科技有限公司 (中国)
4%多聚甲醛固定液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
3%双氧水	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司 (中国)

二甲苯	国药集团化学试剂有限公司（中国）
中性树脂	国药集团化学试剂有限公司（中国）
正丁醇	国药集团化学试剂有限公司（中国）
石蜡	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
EDTA 脱钙液	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
EDTA 抗原修复液（pH=8.0）	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
柠檬酸抗原修复液（pH=6.0）	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
PBS 缓冲液	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
BSA	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
苏木精/伊红（HE）染液套装	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
Masson 染液套装	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
组化试剂盒 DAB 显色剂	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
抗荧光淬灭封片剂	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
自发荧光淬灭剂	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
一抗（CD31+ $\alpha$ -SMA）	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
荧光二抗	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
DAPI 染色液	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
戊巴比妥钠	上海市第十人民医院动物实验中心（中国）

## 2.4.2 实验方法

### 2.4.2.1 实验动物的管理

本研究所有实验动物的操作流程均由上海市第十人民医院动物实验伦理委员会审批批准，本着实验动物伦理和福利原则，严格控制实验动物数量，优化设计方案，经安乐处死后的大鼠尸体最后经动物房进行统一焚毁。实验动物选取 SPF 级，6 周龄（约 200g）的雄性 SD（Sprague-Dawley）大鼠，购买自上海斯莱克实验动物有限责任公司，饲养环境为 20°C-22°C，湿度为 70%，昼夜交替时间为 12 小时，饲养地为同济大学沪北实验动物中心，由实验中心进行日常饮水和饮食的提供，并定时更换垫料。

### 2.4.2.2 大鼠颅骨缺损模型的构建及支架植入

- (1) 植入支架的准备：参照 2.2.2.1 配制 GH/H-H 复合支架的液体混合液，同时设置 GH 组为实验对照组，不植入任何材料的组为空白对照组，然后将复合支架预混合液和单纯 GelMA 水凝胶液体密封放置 37°C 水浴保温瓶中暂存，以防止低温凝固。



## (2) SD 大鼠颅骨缺损模型的构建:

- ① 分组: 所用实验大鼠共计 18 只, 造模前随机将其分为 2 组, 每组 9 只。
- ② 麻醉: 称重并记录每只大鼠的体重, 然后使用 1% 的戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉, 计量为 0.4 mL/100 g。
- ③ 备皮及消毒: 待大鼠充分麻醉后, 判断标准为呼吸平缓均匀, 巩膜反射阴性即可, 使用剃毛器进行备皮, 充分暴露手术区域。手术区域备皮完成后, 将大鼠俯卧位放置在操作台上, 然后使用安尔碘和 75% 的乙醇进行操作区域的消毒、铺一次性无菌洞巾, 遵循外科无菌原则进行。
- ④ 颅骨暴露: 沿大鼠头颅中线做长约 1-1.5 cm 的纵行皮肤切口, 钝性分离皮下软组织, 充分显露颅骨, 然后于颅骨表面骨膜做“十”字切口, 钝性分离骨膜以保护骨膜, 显露矢状缝、双侧顶骨、额骨后缘及部分枕骨。
- ⑤ 钻孔: 使用 5 mm 的取骨环钻于双侧顶骨靠近枕骨侧, 钻两个圆形的全层骨缺损, 以矢状缝为中线, 左右对称, 骨缺损直径为 5 mm, 在钻孔的过程中需要持续滴注生理盐水, 以防止局部过热从而损伤骨缺损周边组织和细胞。
- ⑥ 植入支架材料: 将上述预混的 GH 或 GH/H-H 支架混合液, 使用移液枪注射至缺损区域, 每孔 200  $\mu$ L, 然后采用紫外光照射 30 秒进行原位光固化 (如图 2.15 所示)。由于每只大鼠可钻取左右两个骨缺损区域, 左右两侧缺损区域使用不同处理组以做自身对照。
- ⑦ 关闭切口及术后管理: 使用无菌丝线全层缝合皮下组织和皮肤, 切口区域使用 75% 乙醇进行再次消毒, 待大鼠苏醒后放回饲养笼饲养, 正常提供饮食饮水。术后连续 3 天腹腔注射 10 万 U/只青霉素以防感染。

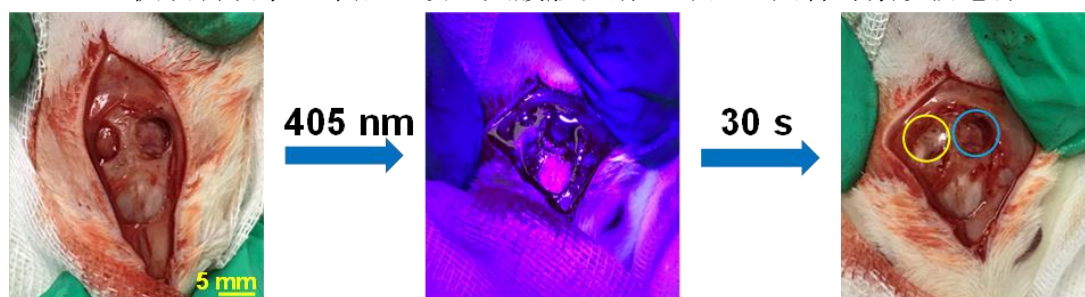


图 2.15 SD 大鼠颅骨缺损模型构建及支架植入过程

## 2.4.2.3 骨缺损修复动物样本的收集和处理

于植入材料后的第 4 周、8 周和 12 周安乐处死老鼠, 每个时间点 6 只, 然后显露颅骨并小心、完整地将颅骨标本取出, 尽量去除颅骨上附着的软组织, 然后浸泡于 4% 多聚甲醛中进行固定, 并保存于 4°C 冰箱内。

#### 2.4.2.4 骨缺损修复动物样本的 Micro-CT 扫描及数据分析

所收集的颅骨样本通过 Micro-CT 扫描 (Hiscan XM Micro-CT, 苏州海斯菲德信息科技有限公司) 进行分析, 扫描条件: 60 kV, 133 $\mu$ A, 单次曝光时间 50 ms, 扫描分辨率 50  $\mu$ m, 扫描角度间隔 0.5 度。然后使用 NRecon 重建软件进行三维重建, 和 CTAn 1.8 软件进行数据分析, 通过骨体积 (Bone volume, BV)、骨体积分数 (Bone volume/Total volume, BV/TV) 和骨小梁数 (Trabecular number, Tb. N) 对骨修复效果进行定量评价。

#### 2.4.2.5 骨缺损修复动物样本的脱钙、包埋和组织切片

将样品放入包埋框中, 标记好后置于盛有 EDTA 脱钙液的容器中, 密封后放入 30 $^{\circ}$ C, 转速 120 转/分的恒温摇床内进行脱钙处理, 每 2-3 天更换一次脱钙液, 共脱钙 30 天。待脱钙结束后, 取出样本流水轻柔冲洗 3-6 小时, 然后进行梯度脱水和石蜡包埋, 具体实验步骤如表 2.24 所示。包埋结束后进行组织切片, 切片厚度为 4  $\mu$ m, 组织切片取下后放入摊片机温水 (40 $^{\circ}$ C) 中铺平后用载玻片捞起, 然后置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱内烘干, 干燥后常温保存。

表 2.24 组织切片及石蜡包埋步骤

试剂	处理时间
① 75%乙醇	2 小时
② 85%乙醇	2 小时
③ 90%乙醇	1.5 小时
④ 95%乙醇	2 小时
⑤ 无水乙醇 a	2 小时
⑥ 无水乙醇 b	2 小时
⑦ 醇苯	40 分钟
⑧ 二甲苯 a	40 分钟
⑨ 二甲苯 b	40 分钟
⑩ 65 $^{\circ}$ C 融化石蜡 a	30 分钟
⑪ 65 $^{\circ}$ C 融化石蜡 b	1 小时
⑫ 65 $^{\circ}$ C 融化石蜡 c	2 小时 45 分钟

#### 2.4.2.6 组织切片的 HE 染色

- (1) 将上述所制石蜡切片使用二甲苯① (20 分钟), 二甲苯② (20 分钟), 无水乙醇① (5 分钟), 无水乙醇② (5 分钟) 和 75%乙醇 (5 分钟) 依次处理, 然后使用流动水柔和冲洗 10 分钟。

- (2) 然后使用苏木精染液染色 3-5 分钟，流动水冲洗后加入分化液分化，再次流动水冲洗，然后通过返蓝液返蓝，再次流动水冲洗。
- (3) 将上述处理后的切片放入 85%乙醇（5 分钟）和 95%乙醇（5 分钟）进行脱水，然后使用伊红染液染色 5 分钟。
- (4) 待染色完成后，将切片依次放入无水乙醇①、无水乙醇②、无水乙醇③、二甲苯①和二甲苯②中，每步 5 分钟，最后使用中性树脂封片，显微镜下观察采集图像或使用切片扫描仪扫描。

#### 2.4.2.7 组织切片的 Masson 染色

- (1) 同 2.4.2.6 (1)。
- (2) 将组织切片浸于 Masson A 液中过夜，然后流动水冲洗；然后浸于 Masson B 液与 C 液等体积混合后的混合液中染色 1 分钟，流动水冲洗后放入 1% 盐酸酒精中浸泡 5 分钟，再次流动水冲洗。然后将切片浸入 Masson D 液中 6 分钟，流动水冲洗后浸入 Masson E 液中 1 分钟，取出后室温放置，待稍干燥后放入 Masson F 液中 30 秒。
- (3) 染色完成后将切片浸入 1%冰醋酸中 5 分钟，然后使用无水乙醇①、无水乙醇②和二甲苯溶液中各 5 分钟，最后使用中性树脂封片，显微镜下观察采集图像或使用切片扫描仪扫描。

#### 2.4.2.8 组织切片的免疫荧光染色

- (1) 石蜡切片脱蜡：将切片依次浸入二甲苯①(15 分钟)，二甲苯②(15 分钟)，无水乙醇①（5 分钟），无水乙醇②（5 分钟），85%乙醇（5 分钟）和 75%乙醇（5 分钟）中，最后使用蒸馏水冲洗。
- (2) 抗原修复：使用 EDTA 抗原修复缓冲液(pH=8.0)中，然后放入微波炉内，中火 8 分钟至沸，停火 8 分钟保温，再转中低火 7 分钟进行抗原修复，待自然冷却后将玻片放入 PBS 中摇晃洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- (3) 阻止内源性过氧化物酶：将切片放入 3%双氧水溶液中避光室温孵育 25 分钟，然后 PBS 进行洗涤 3 次，每次 5 分钟。
- (4) 封闭：用免疫组化笔将组织圈出，然后在圈内滴入适量 3%BSA 溶液以覆盖组织，室温避光孵育 30 分钟。
- (5) 一抗孵育：轻轻甩掉封闭液后，滴加使用 PBS 配制的一抗(CD31+ $\alpha$ SMA)，然后置于湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，湿盒内应加少量水以防止抗体蒸发。
- (6) 二抗孵育：待一抗孵育完成后，将玻片放入 PBS 中，摇床晃动洗涤 3 次，每次 5 分钟，然后轻轻甩干玻片后滴加二抗覆盖组织，室温孵育 50 分钟。
- (7) DAPI 复染细胞核：将玻片稍甩干后滴加适量 DAPI 染色，室温避光孵育

10 分钟。

- (8) 自发荧光淬灭: PBS 洗涤 3 次, 每次 5 分钟, 将玻片稍甩干后滴加自发荧光淬灭剂孵育 5 分钟, 然后流水冲洗 10 分钟。
- (9) 封片及结果采集: 将上述所获切片稍甩干后滴加抗荧光淬灭封片剂进行封片, 然后在荧光显微镜下观察并采集图像。

#### 2.4.2.9 统计学方法和分析

使用平均值±标准差 (Mean±SD) 对实验数据中的定量数据进行表示, 统计学分析通过 IBM SPSS Statistics 16.0 软件进行统计分析, 图表制作采用 GraphPad Prism 8 和 OriginPro 9.0 软件。组间比较使用 *t* 检验或方差分析进行差异性分析, 当 *p* 值<0.05 时, 认为组间差异具有统计学意义。

#### 2.4.3 实验结果与讨论

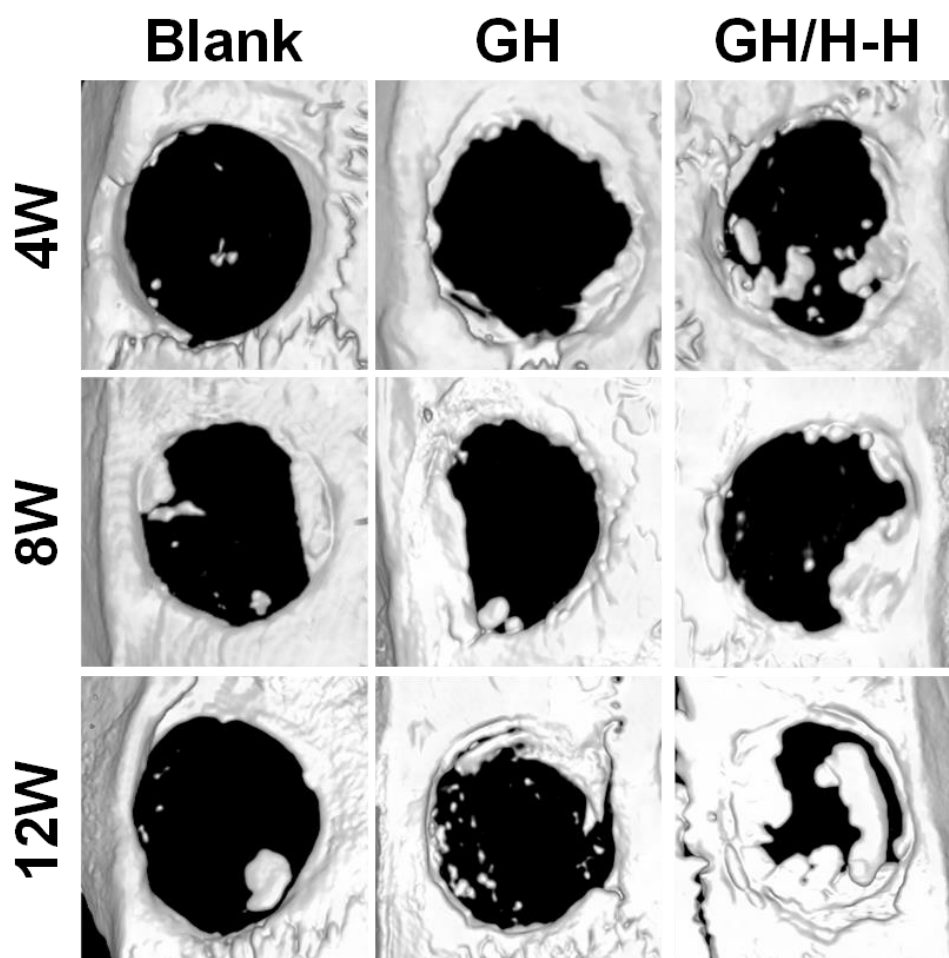


图 2.16 植入 GH 或 GH/H-H 支架 4、8 和 12 周后颅骨的三维重建 Micro-CT 图像

使用 Micro-CT 和组织切片染色来进行骨缺损修复的评价。如图 2.16 Micro-CT 扫描结果所示, GH/H-H 复合支架较单纯 GH 和空白对照组来看, 在每个时间点均能有效地促进骨缺损的修复。随着修复时间的延长, 修复的效果也越来越明显。

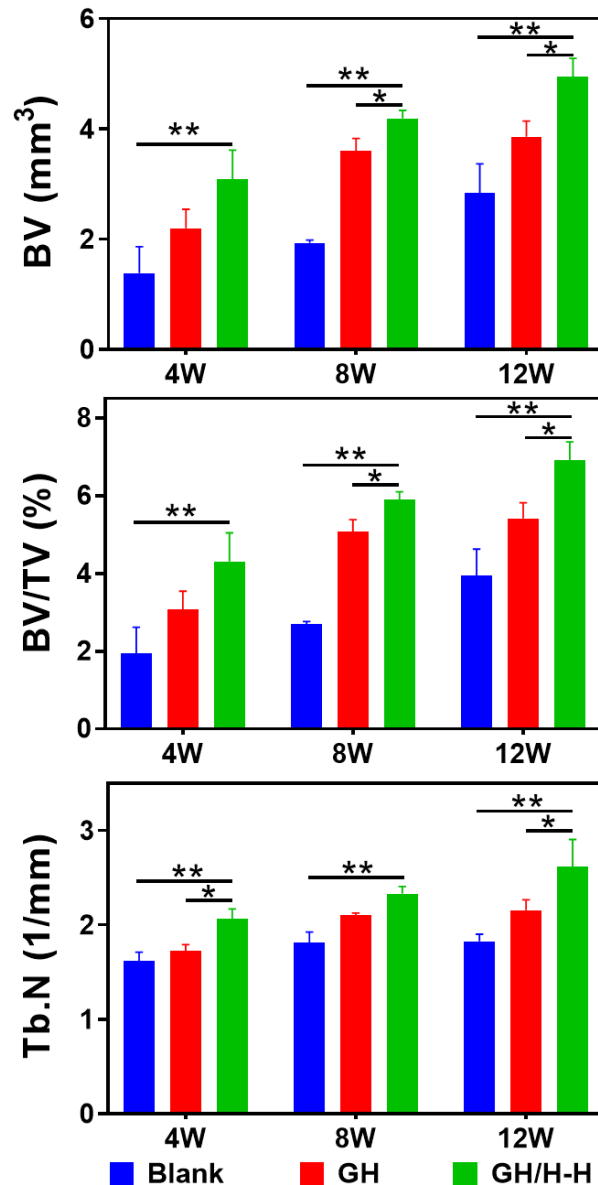


图 2.17 骨缺损修复 Micro-ct 的新生骨相关指标的定量分析结果, 包含骨体积 (BV)、骨体积分数 (BV/TV) 和骨小梁数量 (Tb.N)。结果表示为平均值±标准差 (Mean ± SD), 其中 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  表示组间具有统计学差异。组间比较为 GH/H-H 复合支架组与 GH 组或 Blank 组

为了进一步定量评价新生骨的形成, 通过对缺损区域的新生骨, 包括骨体积 (BV)、骨体积分数 (BV/TV) 和骨小梁数量 (Tb.N) 进行了分析统计, 结果如

图 2.17 所示。在整个愈合过程中，新生骨形成指标 BV、BV/TV 和 Tb.N 在所有组中均有显著增加的趋势。而与其它组相比，GH/H-H 组显示出了更好的修复效果。尤其是在骨愈合后期（12W），BV 和 BV/TV 约为 Blank 组的 1.7 倍，Tb.N 为对照的 1.4 倍，而作为实验对照组的 GH 组来看，则分别为 Blank 组的 1.3 和 1.2 倍。

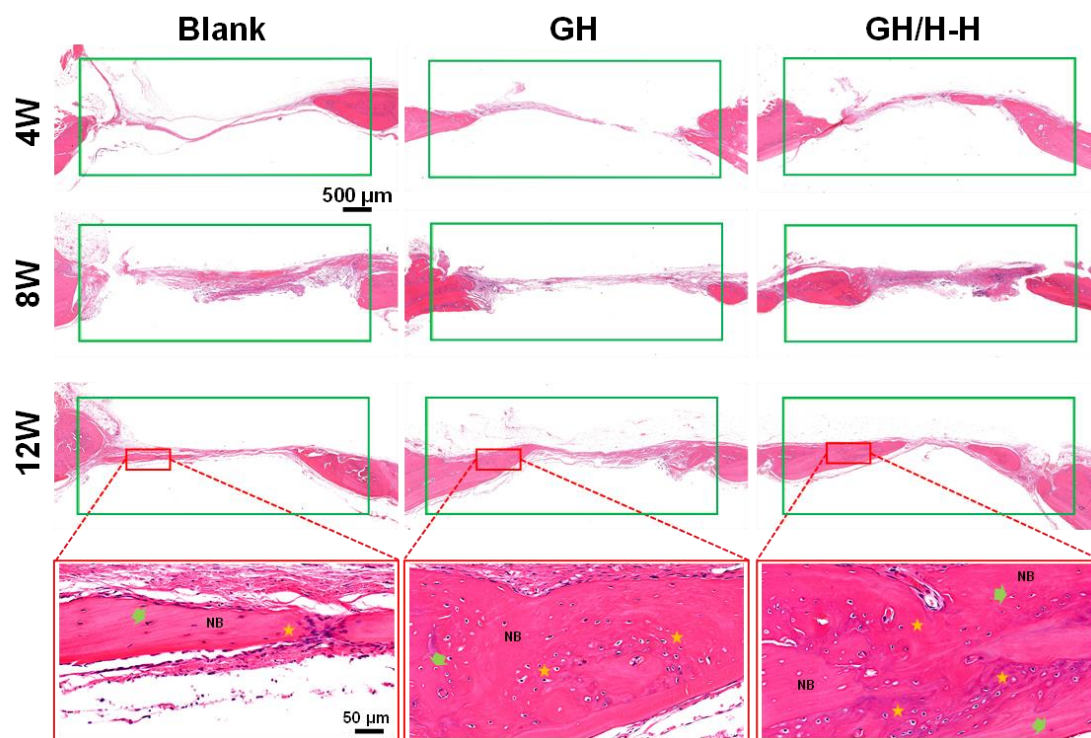


图 2.18 植入 GH 或 GH/H-H 支架 4、8 和 12 周后颅骨样本的 HE 染色结果。NB (Newborn Bone): 新生骨，黄色五角星: 新生胶原，绿色箭头: 成骨细胞。

组织切片染色也进一步证实了复合支架的骨缺损修复效果。HE 染色结果如图 2.18 所示，其中，NB (Newborn bone) 表示新生骨，黄色五角星表示新生胶原，绿色箭头表示成骨细胞。结果显示，随着修复时间的增加，缺损区域慢慢被新生组织填充，其中，GH/H-H 组的缺损区域较 GH 组和 Blank 组形成了更多的新生胶原和新生骨。此外，在高倍镜下观察可见 GH/H-H 复合支架组具有更多的成骨细胞生成。在 Masson 染色结果（图 2.19）中也获得了同样的趋势。

此外，骨缺损区域的血管生成情况对于骨缺损的修复具有重要影响，更多的新生血管可以为骨修复提供丰富的营养物质，本研究采用了 CD31+ $\alpha$ -SMA 免疫荧光双标染色来观察缺损区域的新生血管情况。其中，CD31 可以标记血管内皮细胞， $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白) 则标记动脉血管平滑肌，通过两者共定位，可以观察到新生血管的情况，结果如图 2.20 所示。



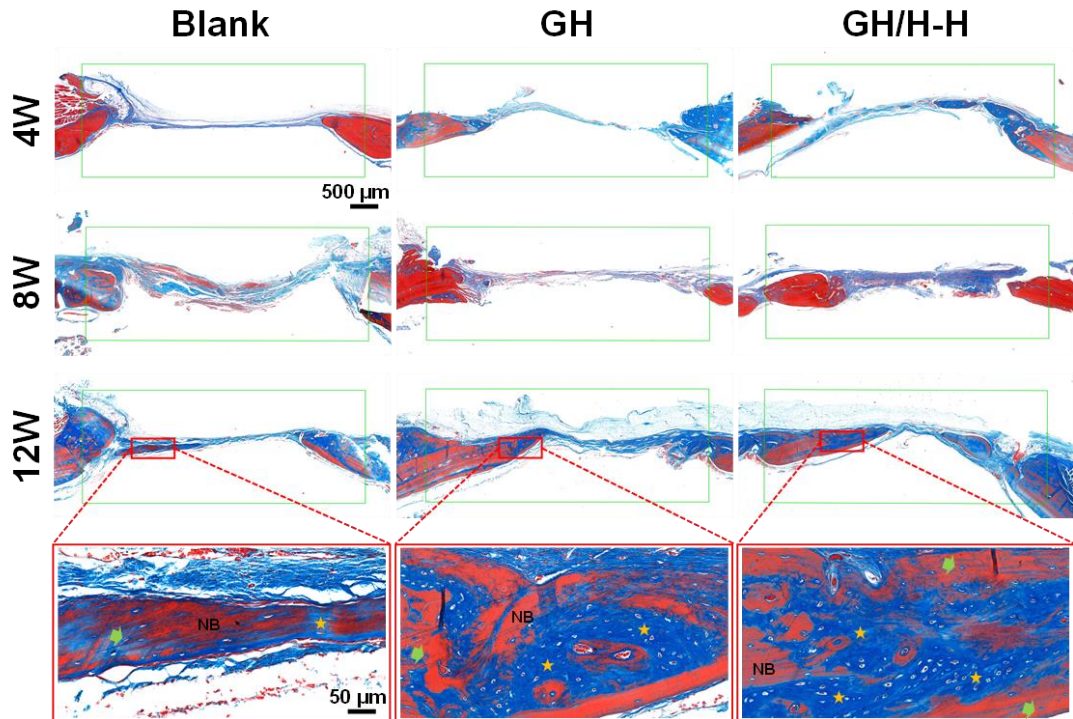


图 2.19 植入 GH 或 GH/H-H 支架 4、8 和 12 周后颅骨样本的 Masson 染色结果。NB (Newborn Bone): 新生骨, 黄色五角星: 新生胶原, 绿色箭头: 成骨细胞。

在 GH/H-H 复合支架组中, 被 CD31+ $\alpha$ -SMA 所标记的新生血管较另外两组更多, 提示 GH/H-H 具有一定的促血管生成作用, 这进一步表明了 GH/H-H 复合支架具有更好的促骨修复性能。

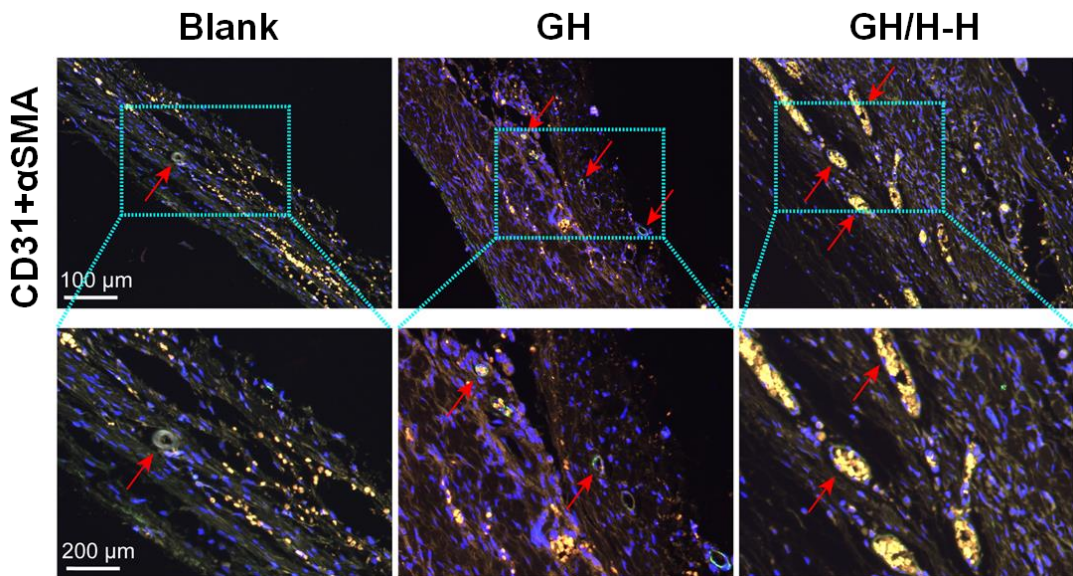


图 2.20 植入 GH 或 GH/H-H 支架 12 周的 CD31+ $\alpha$ -SMA 染色结果。蓝色荧光为 DAPI, 标记细胞核; 绿色荧光为 FITC, 标记 CD31, 红色荧光为 CY3, 标记  $\alpha$ -SMA, 红色箭头表示新生血, 标记黄色圆圈为 CD31+ $\alpha$ -SMA 染色的阳性结果

通过上述体内动物学实验可以看出, GH/H-H 复合支架具有良好的促骨缺损修复能力, 这可能 GH/H-H 复合支架的以下几个性能有关。①GH/H-H 复合支架优异的机械性能。有研究表明, 高机械强度的基质在培养干细胞时对于其成骨分化至关重要<sup>[309,310]</sup>, GH/H-H 复合支架在引入 HAMT 后机械强度较 GH 支架提高了 2.7 倍, 这对于细胞的增殖和 BMSCs 的成骨分化具有更积极的影响, 这也与本研究的结果一致(参见 2.3.3 和 2.4.3)。②GH/H-H 复合支架的多孔结构及 HAMT 所带来的高透气性和管道框架结构。多孔结构有利于细胞的浸润和血管侵袭生长<sup>[309]</sup>, 本研究的细胞学研究结果和体内动物学 CD31+ $\alpha$ -SMA 结果也揭示了 GH/H-H 复合支架具有更好的生物活性和更多的新生血管形成。同时, 有研究报道 BMSCs 的成骨分化受支架孔径的影响, 在 200  $\mu\text{m}$  直径的孔径时更为明显<sup>[311]</sup>。在本研究中, GH/H-H 复合支架的具有均匀分布的直径在 100~200  $\mu\text{m}$  孔洞。此外, 由于 HAMT 特殊的管状结构, 在 GH/H-H 复合支架中可以形成管道框架的内部微观结构, 从而可以连接支架中的相邻孔洞, 为多孔结构中的细胞之间的信号传导和营养物质传递提供了结构基础, 这有利于细胞的增殖、成熟和分化<sup>[312]</sup>。③HAMT 在成骨分化和骨组织矿化形成发挥着重要作用<sup>[313, 314]</sup>。HAMT 降解产生的钙离子和磷酸根离子可能参与细胞外 Ca/P 离子库的调节。局部钙离子和磷酸根离子浓度的增加将模拟离子的再沉淀和与基质的结合<sup>[315]</sup>, 这个过程与天然骨矿物质活动相似, 可以增加生物矿化, 从而加速骨修复。

另一方面, GH/H-H 复合支架由于其特殊的光固化塑形性能, 具有良好的骨缺损应用前景。由于临床上的骨缺损大多不规则形状的, 而通过模型塑形制备的支架往往不匹配临床实际情况<sup>[316-318]</sup>。3D 打印近年来被广泛关注和研究用以解决这一问题, 然而其对生物墨水和设备的严格要求而限制了其应用推广<sup>[319, 320]</sup>。基于此, GH/H-H 复合支架可以良好地解决原位塑形的问题, 通过将预热混匀制备的液体混合液注射至缺损部位, 然后进行原位光固化, 便能使复合支架自填充缺陷部位从而匹配不规则的缺损形状。

#### 2.4.4 结论

通过构建大鼠颅骨临界骨缺损模型, 原位固化塑形植入 GH/H-H 复合支架, 验证了 GH/H-H 复合支架的体内骨缺损修复能力。所制备的 GH/H-H 复合支架具有优异的机械性能、粗糙的内表面、高透气性能和孔洞相连率, 具有优异的促骨缺损修复的能力。

### 2.5 本章小结



在本研究中，通过将 HMT 引入 GH 中从而制备用于骨缺损修复的管道框架复合支架。HMT 大大提高了水凝胶的机械性能，同时保留了柔韧性和抗疲劳能力，弥补了 GH 机械强度差的缺点。此外，由于 HMT 的管状结构和自组装性能，从而在支架内部形成了内部管道框架结构，使得 GH/H 支架具有良好的透气性和信号、营养物质的传递能力。此外，由于 HMT 的引入，GH/H 复合支架的表面更加粗糙，更容易让细胞粘附生长。另一方面，由于 GH/H 复合支架的光固化和原位塑型性能，可以为不规则的骨缺陷区域提供更加匹配的植入支架而无需额外的设备辅助。在体外 BMSCs 的研究和体内骨缺损修复的实验证实了 GH/H 复合支架的高生物相容性、生物活性和促骨修复的性能。综上所述，所构建的管道框架 GH/H 复合支架具有优异的机械性能、透气性、生物相容性、生物活性和促骨修复能力（图 2.21），为其在骨缺损修复应用方面提供了良好的应用前景和研究策略。

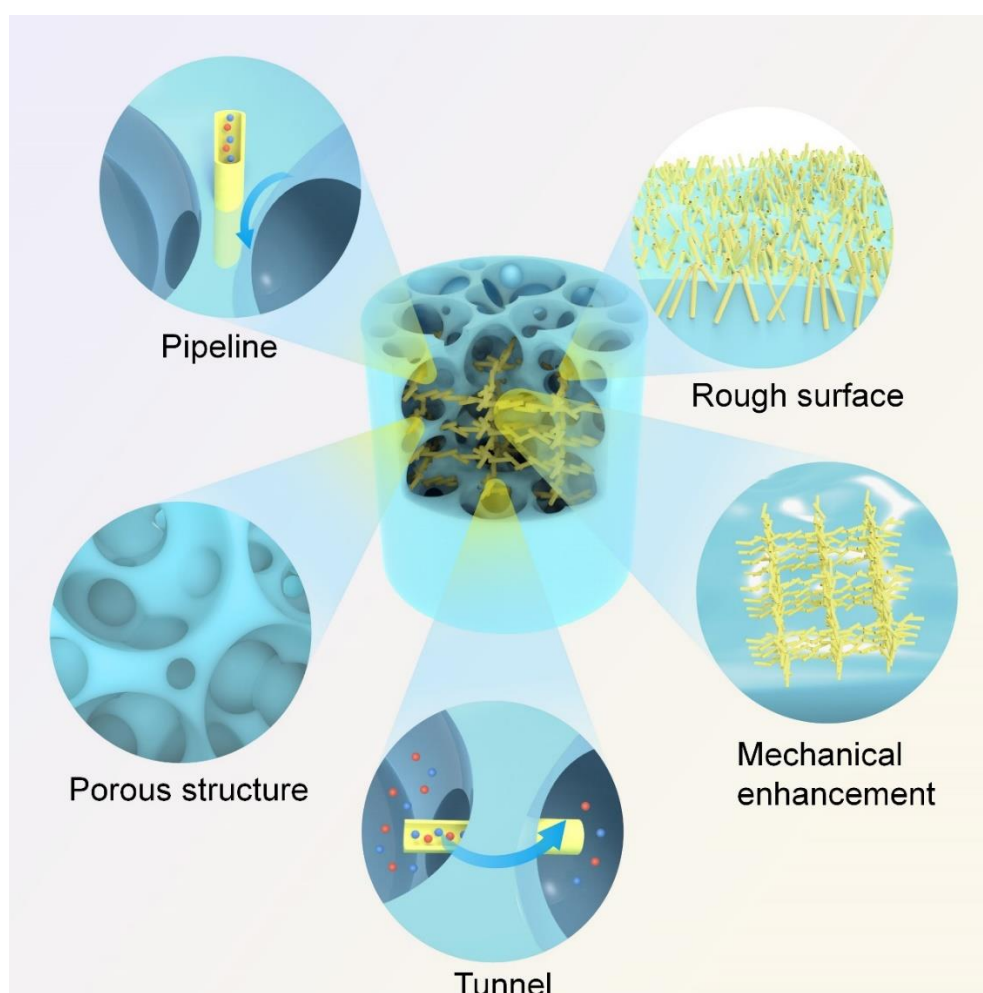


图 2.21 GH/H 复合支架的管道框架支架模式图。GelMA 水凝胶提供多孔结构，HMT 构成内部管道框架结构。GH/H 复合支架的特性包含：管道框架结构、粗糙的内表面，多孔结构，力学增强以及营养物质和信号传递。

## 第3章 没食子酸改性多维度钙基生物材料及其促骨修复的研究

### 3.1 羟基磷灰石纳米颗粒/纳米线的制备及其没食子酸改性生物材料的理化性质表征

#### 3.1.1 实验材料

##### 3.1.1.1 实验主要设备及仪器

表 3.1 羟基磷灰石纳米颗粒/纳米线的制备及其没食子酸修饰改性所用的设备与仪器

设备与仪器名称	生产公司
恒温磁力搅拌器 (B11-3)	上海司乐仪器有限公司 (中国)
电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9076A)	上海精宏实验设备有限公司 (中国)
台式高速离心机 (TG1650-WS)	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 (中国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
pH/mV 计 (MP512-03Meter)	上海三信有限公司 (中国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
多通量密闭微波化学工作站 (MDS-6G)	上海新仪微波化学科技有限公司
场发射扫描电子显微镜	Hitachi S-4800 (日本)
场发射透射电子显微镜	JEOL JEM 2100F (日本)
X 射线衍射	Rigaku D/max 2550V (日本)
FTIR	VERTEX70 (德国)
粉末压片机 (HY-15)	天津天光新光学仪器科技有限公司 (中国)

##### 3.1.1.2 实验主要试剂及耗材

表 3.2 羟基磷灰石纳米颗粒/纳米线的制备及其没食子酸修饰改性所用的耗材与试剂

试剂与耗材名称	供应商
氢氧化钠, NaOH, 分析纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
无水氯化钙, CaCl <sub>2</sub> , 分析纯	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)

二水合磷酸二氢钠, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 分析纯	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
乙二醇, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , 分析纯	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)
油酸钠, 分析纯	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)
一水合没食子酸, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6$ , 分析纯	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)
无水乙醇, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , 分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司 (中国)
医用诱导骨基质 (硬型, 条状)	上海骁博科技发展有限公司 (中国)
溴化钾, $\text{KBr}$	天津博天胜达科技发展有限公司 (中国)

### 3.1.2 实验方法

#### 3.1.2.1 羟基磷灰石纳米颗粒的制备

羟基磷灰石纳米颗粒 (Hydroxyapatite nanoparticles, HANP) 的制备方法具体如下: 将 24 mL  $\text{CaCl}_2$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) 溶液、24 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0.05 \text{ mol L}^{-1}$ ) 溶液、50 mL 去离子水和 50 mL 乙二醇溶液依次倒入 200 mL 烧杯中, 磁力搅拌混匀, 然后使用  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  的  $\text{NaOH}$  溶液调 pH 至 6.7, 然后将混合液转移至聚四氟乙烯微波反应釜中, 放入微波化学工作站中,  $110^\circ\text{C}$  中反应 30 分钟。反应完成后自然冷却至室温, 离心收集反应产物, 无水乙醇和去离子水分别洗涤 3 次, 根据实验需求冷冻干燥或烘箱烘干备用。

#### 3.1.2.2 羟基磷灰石纳米线的制备

羟基磷灰石纳米线 (Hydroxyapatite nanowires, HANW) 的制备方法具体如下: 将 8 mmol 油酸钠溶于  $70^\circ\text{C}$  下的 25 mL 去离子水中, 充分溶解并自然冷却至室温。在剧烈磁力搅拌下滴加 25 mL 含有 2 mmol 氯化钙的水溶液。连续搅拌 30 分钟, 然后将所获悬浮液与 25 mL 含有 1.8 mmol 二水合磷酸二氢钠的水溶液混合, 随即将反应混合物转移到 100 mL 聚四氟乙烯不锈钢高压釜中密封,  $200^\circ\text{C}$  的烘箱加热 36 小时。所获水热产物使用去离子水和无水乙醇洗涤三次, 然后根据实验需求冷冻干燥或烘箱烘干备用。

#### 3.1.2.3 多维结构羟基磷灰石生物材料的没食子酸修饰改性

称量 100 mg  $\text{NaOH}$  溶于 50 mL 去离子水中, 配制为  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  的  $\text{NaOH}$  溶液, 然后称取一定质量的没食子酸 (Gallic acid, GA) 溶于  $\text{NaOH}$  溶液中, 浓度梯度为:  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0.4 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $6 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $8 \text{ mg mL}^{-1}$  和  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , 磁力搅拌 10 分钟使其充分溶解, 然后将 50 mg 上述所制备的羟基磷灰石纳米颗粒或纳米线, 或所购买的医用诱导骨基质 (Bone

matrix, BM) 放入没食子酸溶液中, 磁力搅拌 5 分钟后转移至聚四氟乙烯反应釜中, 80°C 反应 60 分钟, 所获产物使用去离子水和无水乙醇分别洗涤 2 次, 60°C 烘箱烘干备用。

### 3.1.2.4 羟基磷灰石纳米颗粒/纳米线及其没食子酸修饰改性生物材料的理化性质表征

通过场发射透射电子显微镜 (Field-emission Transmission electron microscope, TEM)、场发射扫描电子显微镜 (Field-emission scanning electron microscope, SEM)、选区电子衍射 (SEAD) 分析、X 射线衍射 (X-ray diffraction) 及傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 对所获样品进行形貌、尺寸及理化性质进行表征。具体表征方法如下:

- (1) SEM 分析: 将厚约 0.1 mm 的医用诱导骨基质 (BM) 或没食子酸修饰后的医用诱导骨基质 (GBM) 烘箱烘干, 然后放样品台上喷金, 然后进行扫描电镜检测观察样品形貌并拍照。
- (2) TEM 分析: 将适量待测 HANP 或 HANW 样品用无水乙醇分散, 利用超声使其分散均匀, 取一滴分散均匀的液滴滴加至铜网上后自然干燥, 待样品彻底干燥后进行透射电镜检测观察样品形貌并采集图像, 同时进行选区电子衍射 (SEAD) 分析。
- (3) XRD 分析: 取适量干燥后的 HANP 或 HANW 样品置于样品台上, 表面压平后进行 X 射线衍射分析。对于骨基质样品, 取适量的样品放入液氮中, 然后迅速转移至玛瑙研钵中将其研磨为粉末, 再进行 XRD 测试。
- (4) FTIR 分析: 取适量干燥的待测 HANP 或 HANW 样品与干燥的溴化钾 (KBr) 晶体混合研磨, 而对于 BM 或 GBM, 则先将其放入液氮中数秒, 再与 KBr 混合研磨, 然后将研磨后的混合粉末转移至压片机模具中, 进行压片从而制成圆形薄片, 所获圆形薄片置入红外光谱分析仪进行检测。
- (5) 吸光光谱检测: 取 200  $\mu\text{L}$  浓度为 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  的 HANP 或 GNP 溶液加至微量分光光度计中, 然后使用紫外光谱吸光仪检测。

## 3.1.3 实验结果与讨论

### 3.1.3.1 羟基磷灰石钙基材料的最佳没食子酸修饰浓度探究

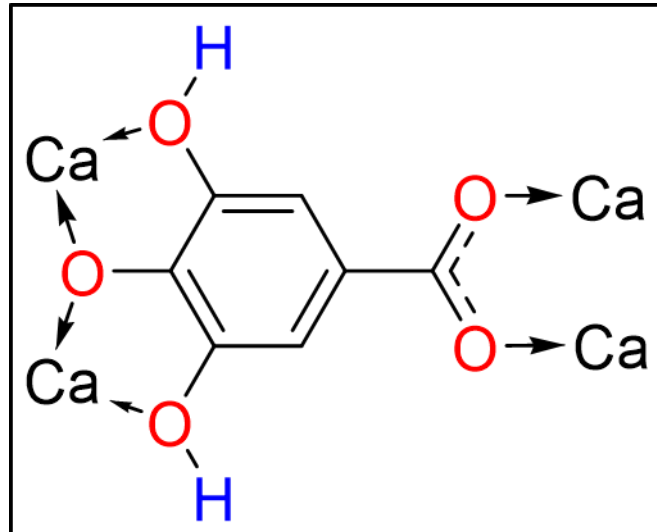
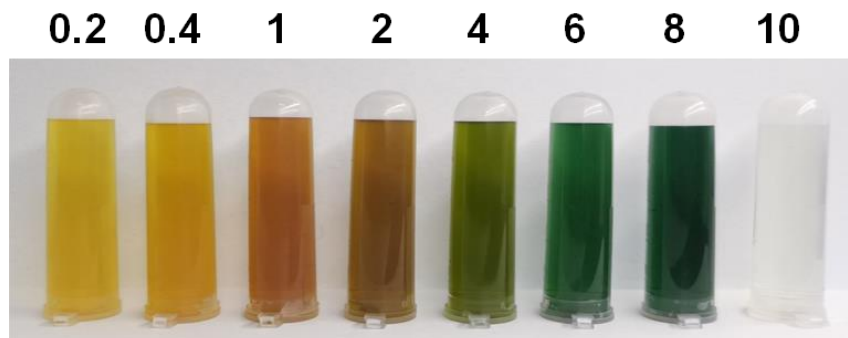
图 3.1 没食子酸与  $\text{Ca}^{2+}$  反应原理模式图

图 3.1 所示为没食子酸与  $\text{Ca}^{2+}$  的配位反应原理模式图， $\text{Ca}^{2+}$  取代了没食子酸上羧基中的 H 原子，然后与 O 原子相连。在羟基磷灰石类材料中，由羟基磷灰石晶胞作为反应基底，通过上述反应，没食子酸可以结合至其表面，从而形成羟基磷灰石类材料的表面修饰。

图 3.2 不同浓度的没食子酸 NaOH 溶液的光学照片，单位为  $\text{mg mL}^{-1}$ 

为了探究最佳的没食子酸修饰改性浓度，本研究设置了浓度梯度的没食子酸溶液来进行羟基磷灰石材料的表面修饰。如图 3.1 所示为不同浓度的没食子酸 NaOH 溶液光学照片，随着没食子酸的浓度增大，其溶液颜色逐渐由黄色向墨绿色转变，然而有趣的是，当 GA 的浓度达到  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  的时候，其颜色又转变为无色透明液体。在加入 HANW 进行改性修饰后，所获没食子酸修饰羟基磷灰石纳米线，简称为 GNW，其溶液光学照片如图 3.3 所示。如结果所示，所获的 GNW 颜色和 GA 浓度呈相同趋势，从低浓度的白色逐渐转变为深黄色，然后再转变为黑色。有趣的是，当 GA 浓度达到  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  时，GNW 呈现的颜色最深，近乎纯黑色，而随着 GA 浓度再升高时，GNW 的颜色则逐渐由黑色转变为灰色，提示最佳 GA 修饰浓度为  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ，在此浓度修饰下制备的光热 CaP 材料可能具有

最好的光热性能。

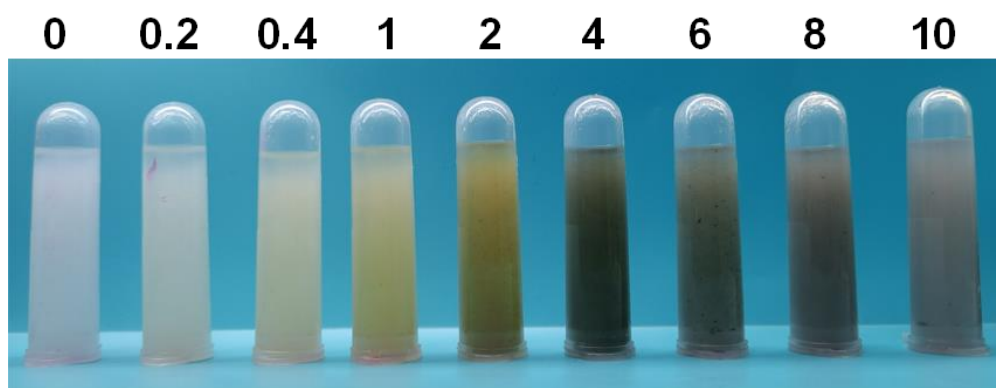


图 3.3 不同没食子酸浓度 ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) 修饰的 GNW 溶液光学照片

不同浓度的 GA 对于 HANP 的修饰也出现了相似的趋势，结果如图 3.4 所示，无论是 GNP 还是 GNW，在  $0\text{--}4 \text{ mg mL}^{-1}$  的 GA 浓度修饰后，其颜色均逐渐变深，尤其 GNP 更加明显。然而当 GA 浓度达到  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  以上时，GNW 的颜色则开始慢慢变浅， $10 \text{ mg mL}^{-1}$  时则呈现淡灰色，相反 GNP 则是自 GA 浓度为  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  时就基本变为黑色，不再加深。这可能与 HANP 和 HANW 的尺寸相貌有关系，HANP 尺寸更小，表面暴露的与 GA 分子反应结合的  $\text{Ca}^{2+}$  更多。由于有研究证明了过高的 GA 浓度具有一定的生物毒性<sup>[321]</sup>，结合本研究所获结果，故后续研究均采用  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  的 GA 溶液进行羟基磷灰石材料的修饰反应。

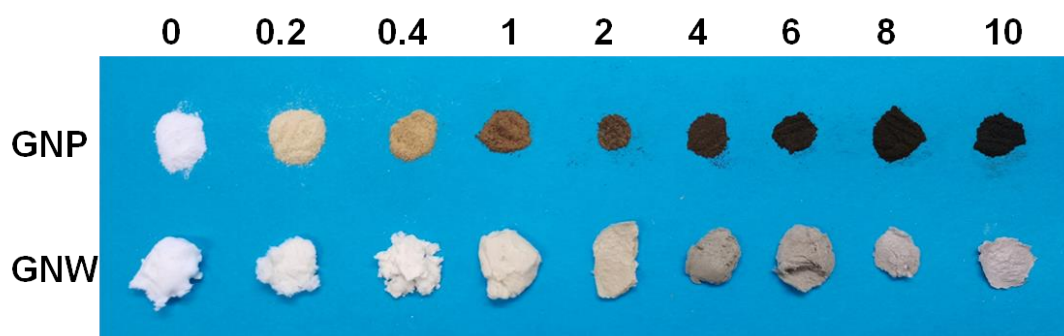


图 3.4 不同浓度的 GA ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) 修饰后的羟基磷灰石纳米颗粒 (GNP) 或纳米线 (GNW) 的干燥样品光学图

### 3.1.3.2 多维度羟基磷灰石材料及其没食子酸修饰改性后材料的理化性质表征

上述结果表明经没食子酸修饰后的羟基磷灰石纳米颗粒或纳米线的直观下的颜色发生了改变，为了进一步探究修饰前后的羟基磷灰石材料的理化性质变化情况，本研究使用了 SEM、TEM、SEAD、XRD 和 FTIR 实验对其进行表征。图 3.5 所示为 HANP 和 GNP 的 TEM 结果，显示所制备的 HANP 为长约  $100 \text{ nm}$  左



右, 直径约 3-5 nm 的短棒状材料, 形貌均一, 分散均匀, SEAD 结果则显示其为晶体像材料。而经过 GA 的修饰后, 所获 GNP 与 HANP 无较大形貌差距, 且仍为晶体结构。

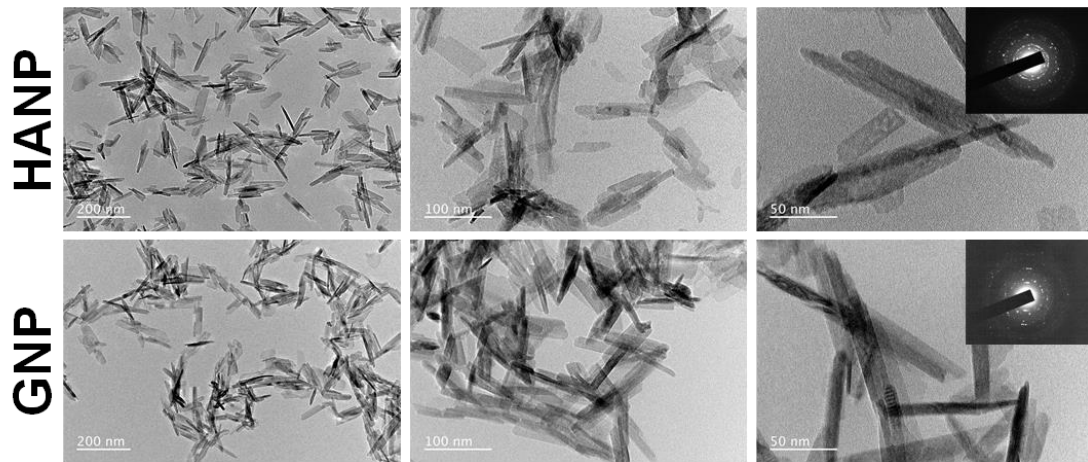


图 3.5 HANP 和 GNP 的 TEM 结果图

所制备的 HANW 和经没食子酸修饰后的 GNW 的透射电镜结果如图 3.6 所示, 结果显示修饰前后与 HANP 相似, 未发生形貌或性质的变化。HANW 和 GNW 均为直径约 10 nm 的长纳米线。SEAD 结果显示修饰前后均为晶像结构。

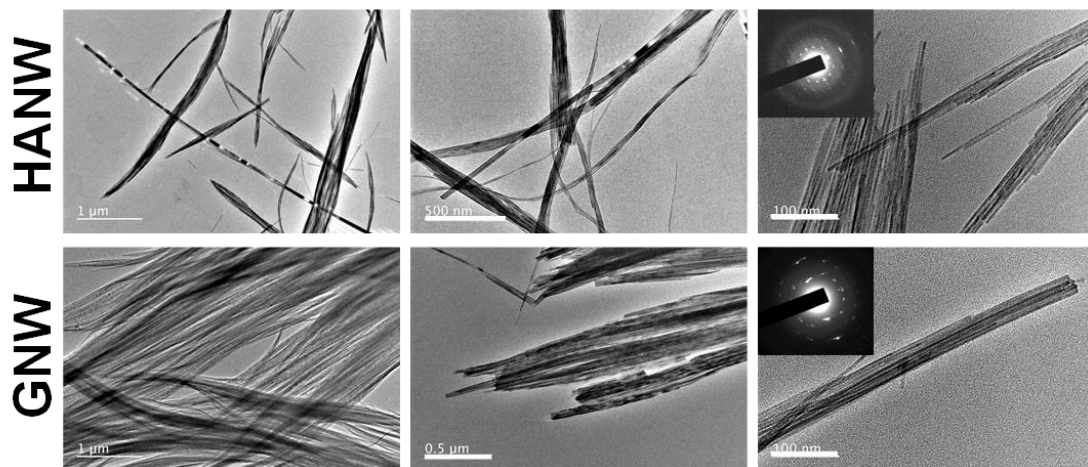


图 3.6 HANW 和 GNW 的 TEM 结果图

上述结果验证了没食子酸可以与一维(纳米颗粒)和二维(纳米线)的羟基磷灰石材料反应从而进行表面修饰, 从而使其改性为黑色材料。为了进一步探究该方法的普适性, 本研究采用了临床使用的医用诱导骨基质来进行修饰研究。医用诱导骨基质是一种猪源的异种移植骨, 其分为脱钙型(软型)和部分脱钙型(硬型), 由于硬型骨基质未完全脱钙, 其本身仍具有一部分 CaP 成分, 故可以被没食子酸修饰改性, 反应前后的产物如图 3.7 a 所示。未经修饰的 BM 为白色多孔支架固体, 而经 GA 修饰反应后的骨基质 (GBM) 则与上述的 GNP 和 GNW 一

致，变为黑色多孔支架。同时，修饰后的 GBM 内部改变也与 GNP 和 GNW 一致，如图 3.7 b-c 所示，未见明显变化。

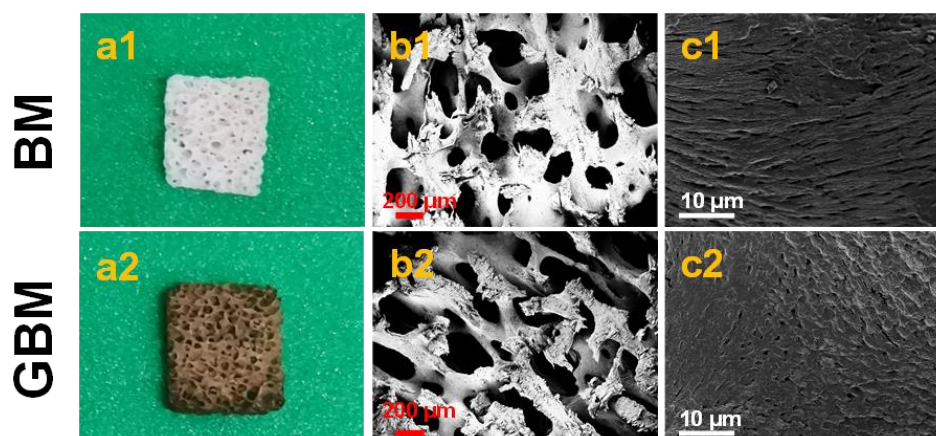


图 3.7 (a) 没食子酸修饰前后的医用诱导骨基质大体光学图；(b, c) 没食子酸修饰前后的医用诱导骨基质 SEM 结果图。BM：医用诱导骨基质，GBM：没食子酸修饰后的医用诱导骨基质

为了进一步分析修饰前后材料的理化性质，本研究采用了 XRD 和 FTIR 检测进行分析。结果如图 3.8 和图 3.9 所示。XRD 结果显示 HANP、HANW 和 BM 均包含典型的羟基磷灰石衍射峰（JCPDS No.09-0432），在经 GA 修饰后，其衍射峰与修饰前无明显差异。相同的情况也出现在 FTIR 结果中（图 3.9），GA 中特殊的 O-H 键在  $3280\text{ cm}^{-1}$  和  $3495\text{ cm}^{-1}$  处具有吸收峰，而 C=O 键则在  $1540\text{ cm}^{-1}$  出现吸收峰<sup>[322]</sup>，这些吸收峰也相应的出现在羟基磷灰石中，然而由于 GA 与  $\text{Ca}^{2+}$  配位形成的 Ca=O 键同样存在于羟基磷灰石中，故修饰前后未见吸收峰出现明显差异。

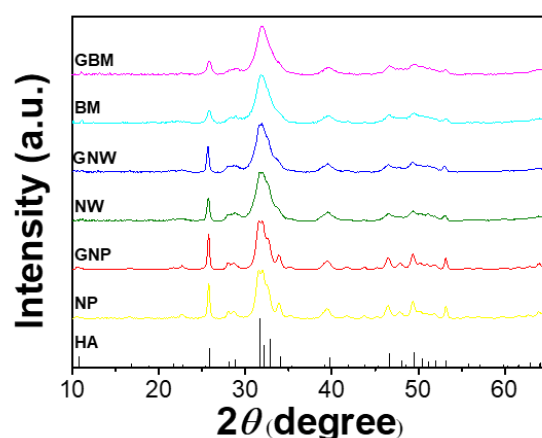


图 3.8 没食子酸修饰前后的多维磷酸钙类材料的 XRD 图谱。HA：羟基磷灰石



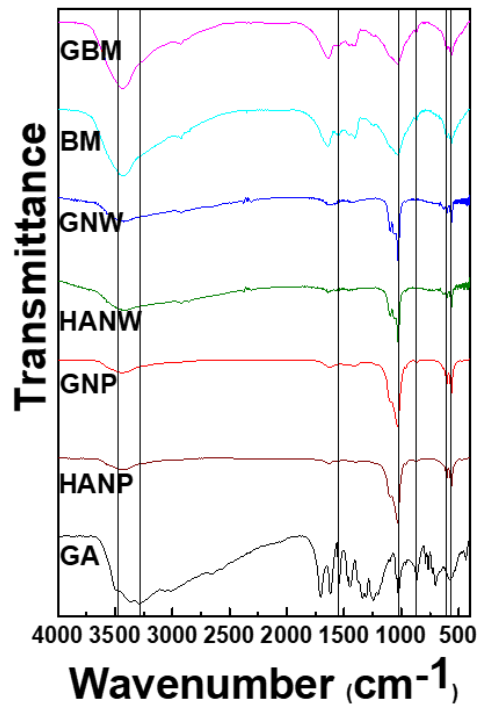


图 3.9 没食子酸修饰前后的多维磷酸钙类材料的 FTIR 图谱。GA: 没食子酸

基于经 GA 修饰后的材料由白色转变为黑色,本研究检测了修饰前后材料的光谱吸收变化情况,结果如图 3.10 所示。经 GA 修饰后的 HANP 对 250-900 nm 范围内光的吸收值均增强了,且波长越短吸收越强,提示羟基磷灰石材料经 GA 修饰后提升了其对光的吸收转换能力,有助于其应用的扩展。

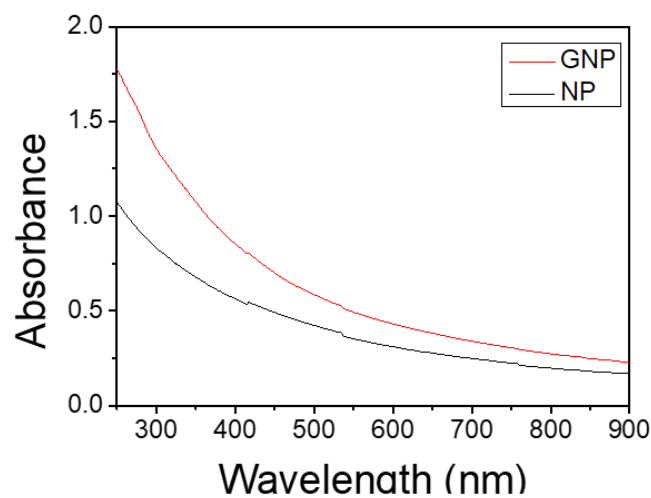


图 3.10 没食子酸修饰前后的羟基磷灰石纳米颗粒的吸收光谱

### 3.1.4 结论

综上所述, 没食子酸与  $\text{Ca}^{2+}$  可以进行配位反应, 其最佳的修饰浓度为  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $0.05 \text{ M NaOH}$  溶液), 在不改变羟基磷灰石材料原本的形貌和性质下完成对材料的表面修饰, 修饰后的材料变为黑色的羟基磷灰石生物材料, 提升了其对光的吸收能力, 从而可扩展应用于光热治疗领域。

## 3.2 没食子酸改性多维羟基磷灰石钙基材料的光热性能研究

### 3.2.1 实验材料

#### 3.2.1.1 实验主要设备及仪器

表 3.3 没食子酸改性多维羟基磷灰石钙基材料光热性能研究所用主要设备和仪器

设备与仪器名称	生产公司
科研三合一热像仪 (Fotric 225s)	上海飞础科智慧科技有限公司 (中国)
808 nm 激光器	上海熙隆光电科技有限公司 (中国)
电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9076A)	上海精宏实验设备有限公司 (中国)
涡旋振荡器 (Vortex, QL-901)	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
冷冻干燥机 (SCIENTZ-10N)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
紫外可见分光光度计 (UV-1900i)	SHIMADZU (日本)

#### 3.2.1.2 实验主要试剂及耗材

表 3.4 没食子酸改性多维羟基磷灰石钙基材料光热性能研究所用主要试剂和耗材

试剂与耗材名称	供应商
无水乙醇, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , 分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司 (中国)
磷酸盐缓冲液, PBS	Hyclone 公司 (美国)
96 孔细胞培养板	JET BIOFIL® (中国)

### 3.2.2 实验方法

#### 3.2.2.1 GNP 的浓度-光谱吸收曲线测定

取  $200 \mu\text{L}$  不同浓度的 GNP 溶液加至微量分光光度计中, 浓度梯度为:  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 然后使用紫外可见分光光度计检测。

## 3.2.2.2 没食子酸修饰前后的羟基磷灰石材料光热性能检测

使用光热成像仪检测 GA 修饰前后的羟基磷灰石材料的光热性能。以 GNW 为例，具体操作如下：

- (1) 不同 GA 浓度修饰后的 GNW 在功率为  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  时的光热曲线：将  $100 \mu\text{L}$  参照 3.1.2.3 修饰改性后的 GNW ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) 溶液加至 96 孔板中，固定光热成像仪并调整焦距，然后将  $808 \text{ nm}$  激光器放置在含材料的孔洞上方，参照表 3.5 调整功率为  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  照射材料，开始照射时通过光热成像仪记录其温度情况，记录 10 分钟。
- (2) 不同浓度的 GNW ( $4 \text{ mg mL}^{-1}$  GA 修饰) 在功率为  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  时的光热曲线：检测方法同 (1)，GNW 浓度梯度为： $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ， $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ， $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ， $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ， $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ， $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ， $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。
- (3)  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  GA 修饰的同一浓度 GNW 在不同功率下的光热曲线：取  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  的 GNW 按 (1) 方法进行检测，功率调整参照表 3.5。

表 3.5  $808 \text{ nm}$  激光器的电流-输出功率对应表

电流 (A)	输出功率 ( $\text{W cm}^{-2}$ )
1.5	0.5
2	1
2.5	1.5
3	2
3.5	2.5

- (4) GBM 的光热性能检测：将直径约  $0.5 \text{ cm}$ ，厚约  $0.2 \text{ cm}$  的 BM 或 GBM 放置于 96 孔板中，参照上述方法检测其在不同功率下的光热性能。GBM 的光热性能检测分为湿润和干燥两种状态，湿润状态则在检测前使用 PBS 浸泡 30 分钟，然后进行检测。干燥状态为检测前将材料放入  $60^\circ\text{C}$  烘箱中烘干 1 小时，然后检测。

## 3.2.2.3 GBM 的光热稳定性检测

将直径约  $0.5 \text{ cm}$ ，厚约  $0.2 \text{ cm}$  的 GBM 放入 PBS 中浸泡 30 分钟，然后转移至 96 孔板中，使用  $808 \text{ nm}$  激光器在功率  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  下照射，待其升至最高温度时，关闭激光器，然后自然冷却至室温，重复 5 个循环。

## 3.2.3 实验结果与讨论

3.2.3.1 GNP 在  $808 \text{ nm}$  处的吸收率与浓度呈正比

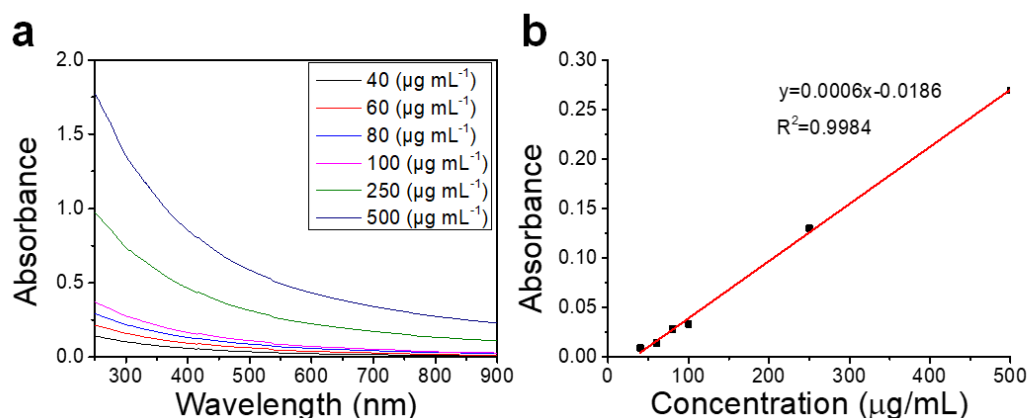


图 3.11 (a) 不同浓度的 GNP 光谱吸收曲线; (b) GNP 在 808 nm 处的浓度-吸光度值曲线

表 3.6 GNP 在 808 nm 处的浓度-吸光度值

浓度 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	吸光度值
40	0.009
60	0.014
80	0.028
100	0.033
250	0.13
500	0.269

通过紫外可见分光光度计检测 GNP 对光谱的吸收情况,结果如图 3.11 所示。GNP 对于波长越短的光,吸收值越高,且其浓度越高,吸光度值也越高(图 3.11a)。然而由于紫外光 ( $<400\text{ nm}$ ) 对于人体具有一定的损伤,长时间照射会对人体造成一定的损伤,尤其是 DNA 的损伤,故不适用于做光热治疗。且由于紫外光波长较短,穿透能力不足,无法抵达深部组织,故常选用近红外光 (Near infrared, NIR) 进行光热治疗。常用来进行 NIR 治疗的波长有 808 nm 和 1064 nm,808 nm 具有更高的吸收值,故相应的光热转换效率也会更好,而 1064 nm 则由于波长更长,其穿透性能也更强。本研究测定了 GNP 在 808 nm 处的吸光度值,结果如表 3.6 所示,其浓度-吸光度相关曲线如图 3.11b 所示,呈线性正相关,提示其在 808 nm 处具有良好的光热吸收和光热转换能力。

### 3.2.3.2 经 GA 的改性修饰增强了羟基磷灰石材料的光热性能

上述结果表明了经 GA 修饰后的羟基磷灰石材料在 808 nm 处具有较好的吸收性能,故进一步通过光热成像仪和 808 nm 波长的激光器对修饰改性后的羟基磷灰石材料的光热性能进行探究。如图 3.12 所示为 HANW 经不同浓度的 GA 修

饰后的光热升温曲线,结果与 GA 修饰后的材料颜色呈现相同的趋势,  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  至  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  的 GA 修饰后的 GNW 在激光照射后最高温度逐渐呈上升趋势, 最高为  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  修饰的 GNW, 可至  $46.9^\circ\text{C}$ , 而在修饰的 GA 浓度升高后, 所获的 GNW 最高温度则逐渐降低。进一步提示了 GA 修饰改性羟基磷灰石材料的最佳修饰浓度为  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ , 故后续所使用的修饰材料均采用  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  的 GA 修饰改性。

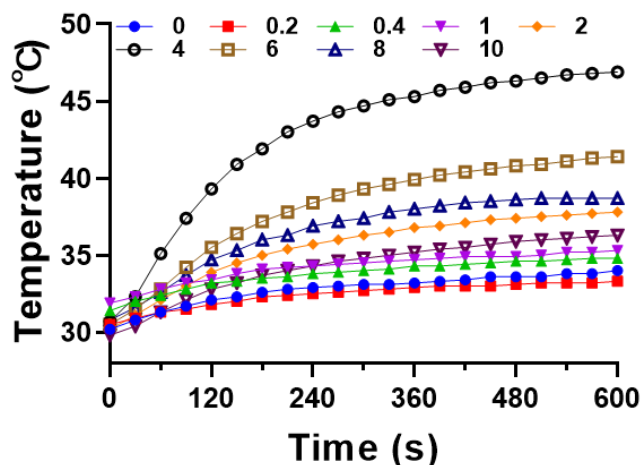


图 3.12 不同 GA 浓度修饰的 GNW 的光热升温曲线

图 3.13 所示为同一功率 ( $1.5 \text{ W cm}^{-2}$ ) 下不同浓度的 GNW 升温曲线, 以及同一浓度 ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) 下不同功率的 GNW 升温曲线。图 3.13 a 结果显示, GNW 的升温性能与浓度呈正比, 浓度越高, 其可达到的最高温度也越高, 在  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  时, 最高温度为  $46.9^\circ\text{C}$ 。同时, 在固定浓度时, GNW 的升温性能与  $808 \text{ nm}$  激光器的功率呈正相关 (图 3.13 b), 在功率为  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$ ,  $2 \text{ W cm}^{-2}$  和  $2.5 \text{ W cm}^{-2}$  时, 其最高温度分别为  $46.9^\circ\text{C}$ ,  $50.4^\circ\text{C}$  和  $53.8^\circ\text{C}$ 。

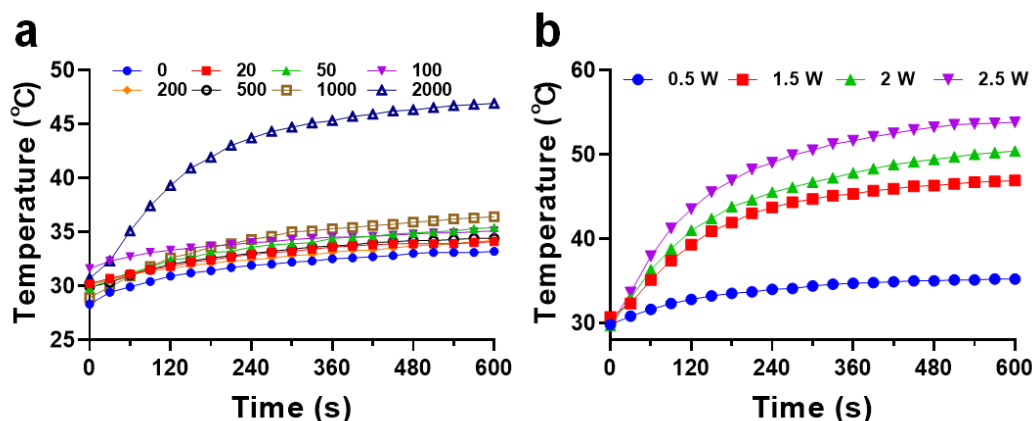


图 3.13 (a) 不同浓度的 GNW 在  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  功率时的升温曲线; (b)  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  的 GNW

上述结果表明对于较小尺寸结构的羟基磷灰石材料,经没食子酸修饰改性后可以获得良好的光热性能,而对于较大尺寸的医用诱导骨基质(BM)来说,在经GA修饰改性后,直观颜色由白色变为了深棕色(图3.7 a),故进一步探究了经GA修饰后的BM(GBM)的光热性能,结果如图3.14所示。

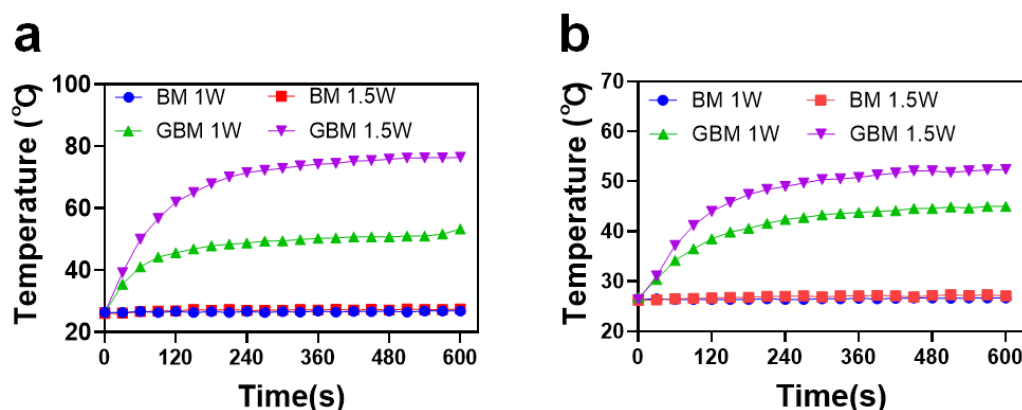


图 3.14 不同环境中 (a: 空气; b: PBS) 的 BM 和 GBM 在不同激光功率下的升温曲线

图 3.14 分别显示了 GBM 在不同环境中(空气和液体)和不同功率下的升温曲线。(a) 为在空气干燥的环境中,结果表明未经 GA 修饰后,其光热性能无明显改变,在激光器功率增强时仍未见明显温度变化,相反的,GBM 则表现出了较好的光热性能,在低功率下 ( $1 \text{ W cm}^{-2}$ ) 时便可升温至  $53.3^\circ\text{C}$ ,随着功率上调至  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  后,其最高温度可升至  $76.4^\circ\text{C}$ 。在液体 (PBS) 环境中也检测到了相同的趋势,单纯的 BM 经光照后温度无明显变化,而 GBM 在  $1 \text{ W cm}^{-2}$  和  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  激光照射 10 分钟后,可分别达到  $45^\circ\text{C}$  和  $52.5^\circ\text{C}$ ,大大地提高了材料的光热转换性能。由于 PBS 的吸热能力,故 GBM 在 PBS 中的最高温度较空气中略低。其光热成像图如图 3.15 所示,不论是在空气还是 PBS 中,GBM 均能在 4 分钟左右升至较高的温度,而 4-10 分钟升温速率趋于平缓。

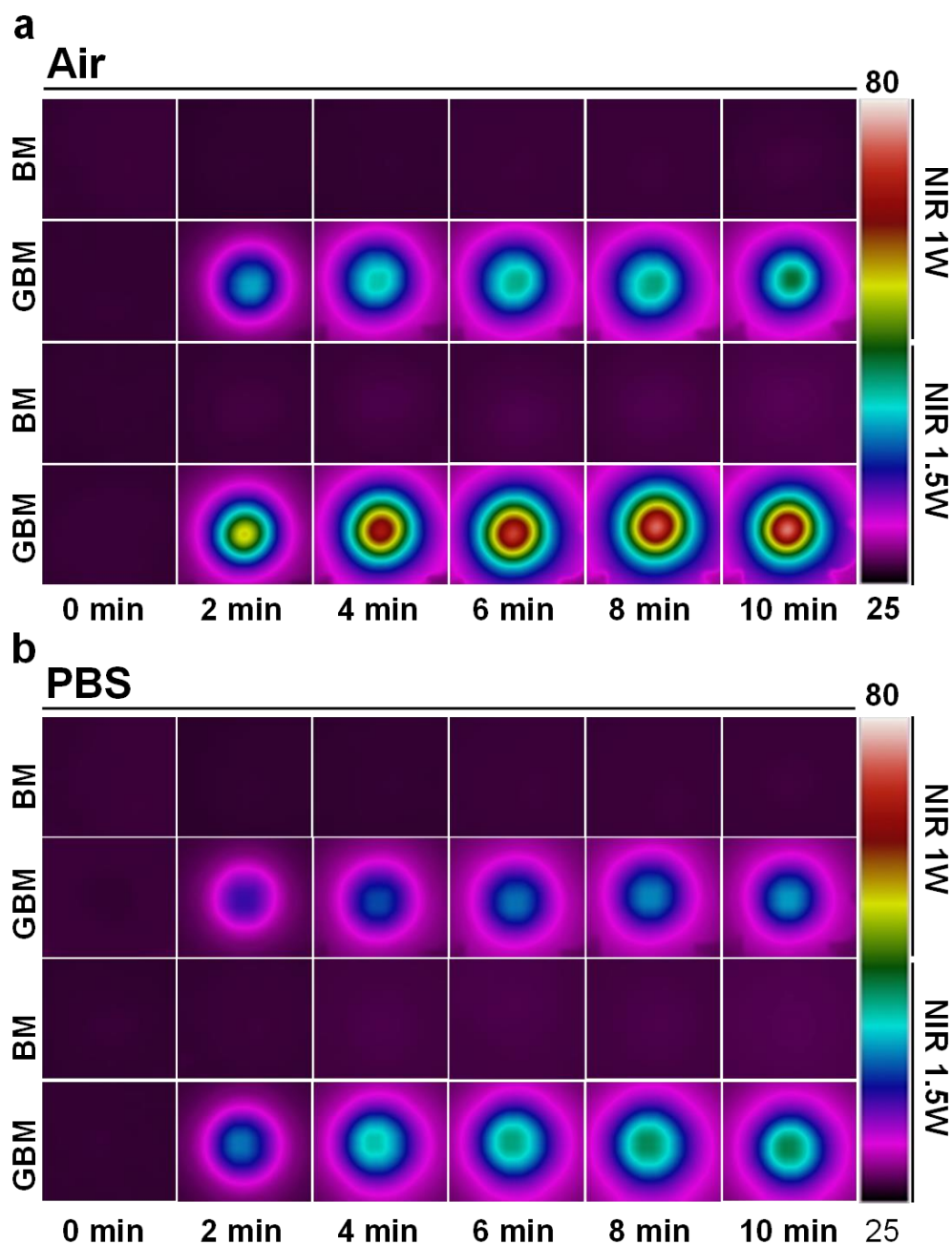


图 3.15 不同环境中 (a: 空气; b: PBS) 的 BM 和 GBM 在不同激光功率下光热成像图

### 3.2.3.3 GBM 具有稳定的光热转换性能

由于光热治疗常需要多次干预,故稳定的光热转换性能在光热治疗中是一个很重要的性质。本研究通过升温-冷却检测来评估 GBM 的光热稳定性。简单来说,在  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  的激光照射下,待 GBM 达到平缓升温阶段时,关闭激光器,然后进行自然冷却,待温度降低至室温后,继续开启激光器,进行升温,如此进行 5 次循环,结果如图 3.16 所示。图 3.16 a 为 GBM 的升温-冷却曲线,显示 GBM 在  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  的光照下,约 100 秒时开始,其升温速率下降,在 100-150 秒之间



升温曲线趋于平缓, 到 150 秒末温度可以达到 51°C。关闭激光器后, GBM 的温度迅速下降, 在 50 秒内约下降 15°C, 然后再持续约 200 秒, GBM 的温度冷却至室温。根据此升温-冷却曲线所对应的时间-温度信息, 对 GBM 进行了循环升温测试以表征其光热稳定性。如图 3.16 b 所示, GBM 的循环升温-冷却曲线拟合良好, 在经历多次升温-冷却过程后, 仍能升至最高温度, 保持升温-冷却一致性。

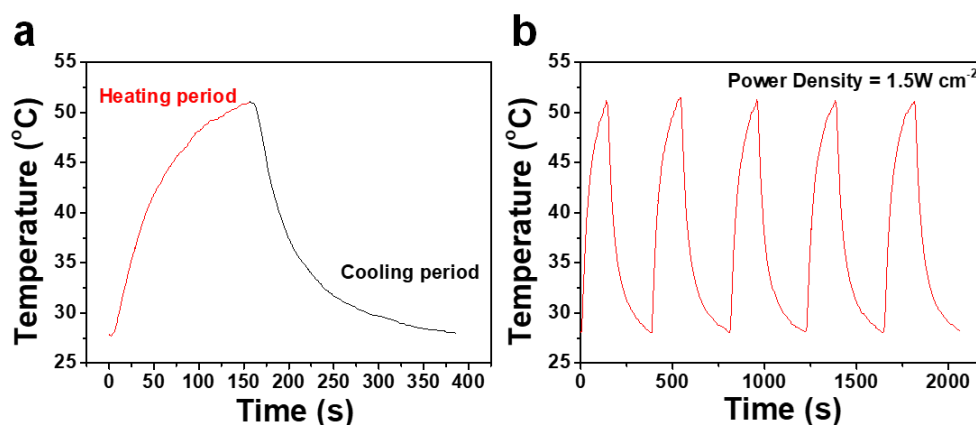


图 3.16 (a) GBM 在  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  功率下的升温-冷却曲线; (b) GBM 在  $1.5 \text{ W cm}^{-2}$  下的循环升温-冷却曲线

### 3.2.4 结论

综上所述, 经 GA 修饰改性后的羟基磷灰石材料可由无光热转换性能的白色材料, 转变为光热性能良好的黑色磷酸钙类材料。此外, 修饰后材料的光热性能与浓度、照射时间和激光功率呈正相关, 并且还具有良好的光热稳定性。

## 3.3 没食子酸改性羟基磷灰石材料的体外细胞学研究

### 3.3.1 实验材料

#### 3.3.1.1 实验主要设备及仪器

表 3.7 没食子酸改性羟基磷灰石材料体外细胞学研究所用主要设备和仪器

设备与仪器名称	生产公司
电热恒温水槽 (DK-8D)	上海精宏实验设备有限公司 (中国)
电热恒温水浴锅	Fisher Scientific (德国)
超声波处理机 (1500F-DZ)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
涡旋振荡器 (Vortex, QL-901)	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)



称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
生物安全柜 (HR40-II A2)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
医用离心机 (L500)	湖南湘仪实验室仪器开放有限公司 (中国)
二氧化碳培养箱 (311)	Thermo Fisher (美国)
移液枪套装	Eppendorf 公司 (德国)
高压蒸汽灭菌器 (MLS-3780)	SANYO 公司 (日本)
液氮罐 (Locator JR)	Thermo Fisher (美国)
多功能酶标仪	Bio Tek Synergyz (美国)
倒置荧光相差显微图像系统	LEICA DMI6000B (德国)
场发射扫描电子显微镜	ZEISS Gemini 300 (德国)

### 3.3.1.2 实验主要试剂及耗材

表 3.8 没食子酸改性羟基磷灰石材料体外细胞学研究所用主要试剂和耗材

试剂与耗材名称	供应商
$\alpha$ -MEM GlutaMAX 细胞培养基	Gibco 公司 (美国)
胎牛血清	Gibco 公司 (美国)
青链霉素	Gibco 公司 (美国)
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco 公司 (美国)
PBS (1X)	HyClone 公司 (美国)
细胞冻存液	北京博奥龙免疫技术有限公司 (中国)
Cell Counting Kit-8 试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
MTT	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
二甲基亚砜 (DMSO), $C_2H_6SO$	阿拉丁试剂 (上海) 有限公司 (中国)
PBS (1X)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
4%多聚甲醛固定液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
75%乙醇消毒液	上海利康消毒高科技技术有限公司 (中国)
无水乙醇, $C_2H_5OH$ , 分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司 (中国)
Calcein AM (钙黄绿素) 染色液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
Propidium Iodide (碘化丙啶) 染色液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
细胞培养瓶 (25 $cm^2$ , 75 $cm^2$ )	JET BIOFIL® (中国)
细胞培养板 (48 孔, 96 孔)	JET BIOFIL® (中国)
离心管 (15mL, 50 mL)	JET BIOFIL® (中国)
EP 管 (1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL)	上海贝晶生物技术有限公司 (中国)
细胞冻存管	JET BIOFIL® (中国)

细胞冻存盒	Thermo Fisher (美国)
细胞计数板	Marienfrld 公司 (德国)

### 3.3.2 实验方法

此部分所使用的细胞为 SD 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs), 购买于中国科学院典型培养物保藏委员会干细胞库, 目录号为 SCSP-402, 所获细胞为第二代。该部分所涉及到的基础细胞实验操作技术, 如细胞培养、传代、冻存、复苏和计数等参照 2.3.2.2, 在此不做赘述。

#### 3.3.2.1 生物材料的准备及灭菌处理

- (1) MTT 工作液的准备: 将所购买 MTT 粉末使用灭菌水配制为  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  工作浓度的工作液, 分装后封口膜密封置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。
- (2) GNP 和 GNW 的准备及灭菌处理: 将制备的 GNP 和 GNW 使用 75%乙醇和灭菌 PBS 洗涤 3 遍后, 通过紫外线照射 4 小时进行灭菌处理。待灭菌使用完全  $\alpha$ -MEM GlutaMAX 细胞培养基配制 GNP 或 GNW 的实验母液, 浓度为  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  和  $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , 然后用封口膜密封试管, 超声 30 分钟使其均匀分散,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。每次使用前均通过紫外照射 30 分钟再次灭菌。
- (3) BM 和 GBM 的准备及灭菌处理: 将 BG 和制备的 GBG 剪切为  $5 \text{ mm}\times 5 \text{ mm}\times 1 \text{ mm}$  的薄片支架, 然后使用 75%乙醇和灭菌 PBS 洗涤 3 遍后, 通过紫外线照射 4 小时进行灭菌处理, 然后用封口膜密封试管,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。每次使用前均通过紫外照射 30 分钟再次灭菌。

#### 3.3.2.2 CCK8 法细胞毒性实验

- (1) 细胞铺板: 将增殖良好的 P8-P10 代 BMSCs 以  $1\times 10^4$  个/孔的浓度接种于 96 孔细胞培养板中, 或按浓度为  $1\times 10^5$  个/孔接种于 48 孔板中, 每组设置 4 个副孔, 接种后轻轻拍打细胞培养板以使 BMSCs 均匀的分布在孔内, 然后置于细胞培养箱内培养。
- (2) 24 小时后待细胞贴壁生长, 移除培养板中的旧培养基, 然后按浓度梯度在 96 孔板中加入含 GNP 或 GNW 的培养基  $100 \text{ }\mu\text{L}$ , 材料浓度梯度为:  $25 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $250 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  和  $500 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 。或移除 48 孔板中的旧培养基, 然后将灭菌后的 BM 和 GBM 放入培养孔中与 BMSCs 共培养。单纯完全培养基作为空白对照组。
- (3) 待与材料共培养 24 小时后, 移除孔中的旧培养基和材料, 使用无菌 PBS

洗3次,然后在96孔板中加入100  $\mu\text{L}$  新鲜完全培养基和10  $\mu\text{L}$  CCK8试剂(48孔板为:200  $\mu\text{L}$  新鲜完全培养基+20  $\mu\text{L}$  CCK8试剂),将细胞培养板转移至培养箱中孵育2小时。

- (4) 使用移液枪吸取80  $\mu\text{L}$  孵育后的上清液至新的96孔板中,通过酶标仪检测450 nm处的OD值。

### 3.3.2.3 MTT 法细胞增殖实验

- (1) 细胞铺板:将灭菌后的BM和GBM放入48孔板中,紫外照射30分钟,然后使用生长形态良好的P8-P10代BMSCs消化计数后按 $1 \times 10^4$ 个/孔的浓度接种,每组3个平行副孔,然后将细胞培养板置于细胞培养箱内培养。
- (2) 待BMSCs与材料共培养1,3,5和7天时,移除孔中的旧培养基和材料,使用无菌PBS洗3次,然后加入220  $\mu\text{L}$  预先配制的MTT工作液(200  $\mu\text{L}$  新鲜完全培养基+20  $\mu\text{L}$  MTT工作液),然后将培养板转移至37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育4小时。
- (3) 孵育完成后移除反应液体,然后每孔加入300  $\mu\text{L}$  DMSO溶解MTT反应结晶物,将培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中振荡10分钟,待结晶物完全溶解后转移100  $\mu\text{L}$  上清液至新的96孔板中,通过酶标仪检测490 nm处的OD值(Optical density)。

### 3.3.2.4 活/死细胞染色实验

- (1) 细胞铺板:将增殖良好的BMSCs以 $1 \times 10^5$ 个/孔的浓度接种于灭菌后的BM或GBM上,然后轻拍细胞培养板以使BMSCs均匀地分布在支架内,转移至细胞培养箱中培养。无任何材料组为空白对照组。
- (2) 待细胞与支架共培养至24小时后,移除旧培养基,无菌PBS洗3次。
- (3) 后续参照2.3.2.6(4)-(6)步进行染色,然后于荧光显微镜下观察并采集图像。绿色为Calicien标记的活细胞,红色为PI标记的死细胞。

### 3.3.2.5 细胞形态检测

- (1) 参照3.3.2.3(1)进行细胞铺板,待共培养24小时后,取出BM和GBM,然后使用2.5%的戊二醛4 $^{\circ}\text{C}$ 固定1小时。
- (2) 按照下述顺序进行梯度脱水:20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、95%乙醇和无水乙醇,每次10分钟。
- (3) 脱水结束后室温风干,固定于扫描电镜样品台上,喷金后进行SEM检测,观察细胞在支架上的生长形态并采集图像。

### 3.3.2.6 分析软件及统计学方法

使用平均值±标准差 (Mean ± SD) 对实验数据中的定量数据进行表示, 统计学分析通过 IBM SPSS Statistics 16.0 软件进行统计分析, 图表制作采用 GraphPad Prism 8 和 OriginPro 9.0 软件。组间比较使用 *t* 检验或方差分析进行差异性分析, 当 *p* 值 < 0.05 时, 认为组间差异具有统计学意义。

### 3.3.3 实验结果与讨论

没食子酸由于具有优异的抗炎和抗氧化活性<sup>[323]</sup>, 常常被用于抗肿瘤、抗微生物的治疗<sup>[324]</sup>。许多研究表明, 没食子酸具有一定的细胞毒性, 当浓度超过 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  时, RAW 264.7 和 HEPA1-6 细胞便表现出显著的细胞毒性<sup>[325]</sup>。然而, 也有研究表明没食子酸在 5-50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  时对大多数细胞是安全的, 当高于 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  时则出现较明显细胞毒性<sup>[326-328]</sup>。因此, 本研究针对经没食子酸修饰改性的羟基磷灰石材料的生物相容性进行评价, 结果如下所示。图 3.17 显示了没食子酸改性羟基磷灰石纳米颗粒 (GNP) 和纳米线 (GNW) 与 BMSCs 共培养 24 小时后的生物活性, 结果表明, GNP 与 GNW 均无明显的细胞毒性。同时, 经没食子酸改性的三维医用诱导骨基质 (GBM) 对 BMSCs 也无明显的细胞毒性, 结果如图 3.17 (b) 所示。提示以 4  $\text{mg mL}^{-1}$  浓度的没食子酸对羟基磷灰石材料进行修饰改性, 所制备的新材料无明显的细胞毒性, 生物相容性良好。

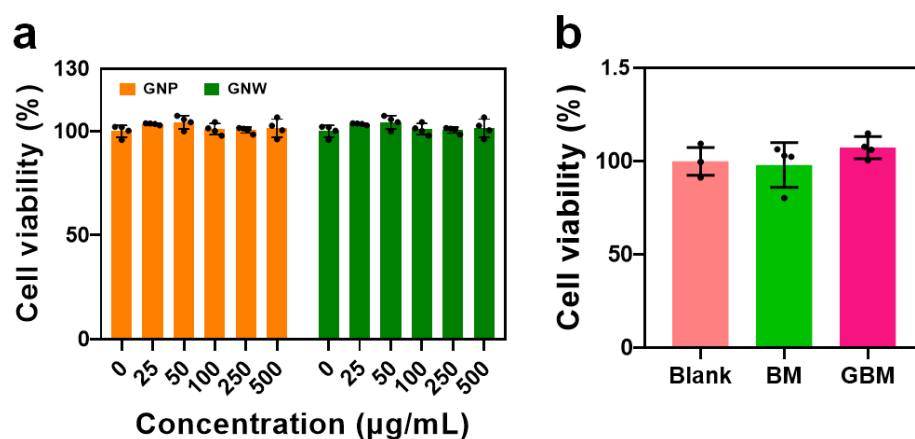


图 3.17 GNP、GNW (a) 和 GBM (b) 与 BMSCs 共培养 24 小时后的细胞活性。

为了进一步评价 BMSCs 在三维医用诱导骨基质上的生长情况, 本研究使用了活死细胞染色和 SEM 进行分析。图 3.18 所示为 BMSCs 种植于 BM 和 GBM 上的钙黄绿素染色结果, 由图可得 BMSCs 在 BM 和 GBM 上生长状态良好, 呈现多触角、伸展良好的细胞形态, 表明经没食子酸改性后依然具有良好的生物相容性。

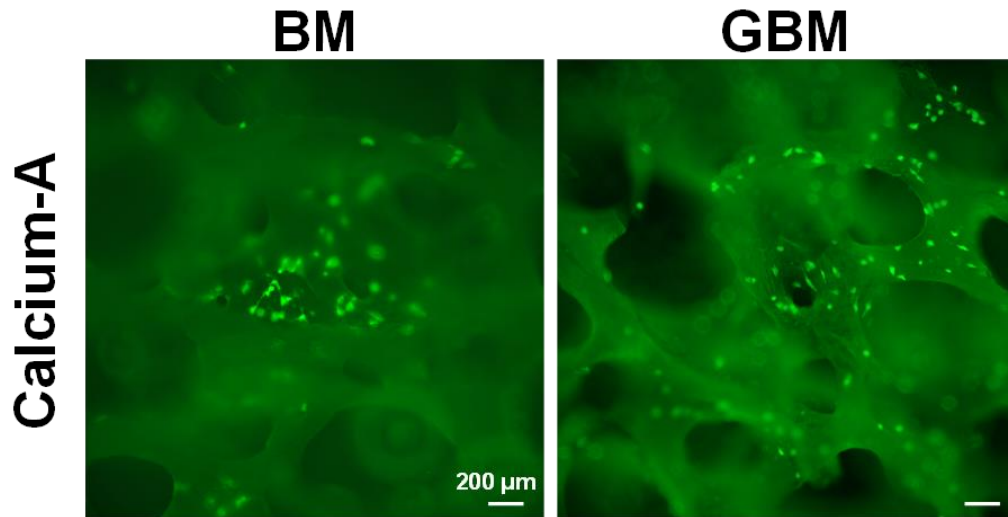


图 3.18 钙黄绿素染色的高倍镜下 BMSCs 在 BM 和 GBM 上的生长状态

为进一步评价 BMSCs 在 GBM 上的生长情况,本研究使用了 SEM 对其进行观察和评价,结果如图 3.19 所示。在支架较为平整的区域, BMSCs 呈现平铺、多触角的良好生长状态,而在不规则区域,细胞则为触角延伸,附着于支架上,提示 BMSCs 可能在支架不平整区域进行迁移运动。进一步证明了 GBM 良好的生物相容性。

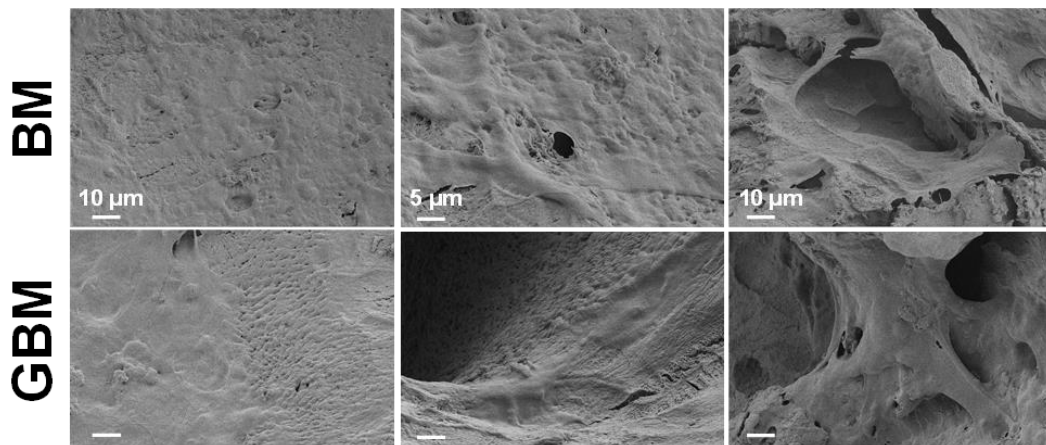


图 3.19 BMSCs 在 BM 和 GBM 上生长状态的 SEM 分析

图 3.20 所示为 BMSCs 在 BM 和 GBM 上生长 7 天的增殖情况,结果提示 BM 和 GBM 对 BMSCs 的增殖影响无差异,表明没食子酸的加入不会对改性前的医用诱导骨基质材料生物学效应产生不良影响。

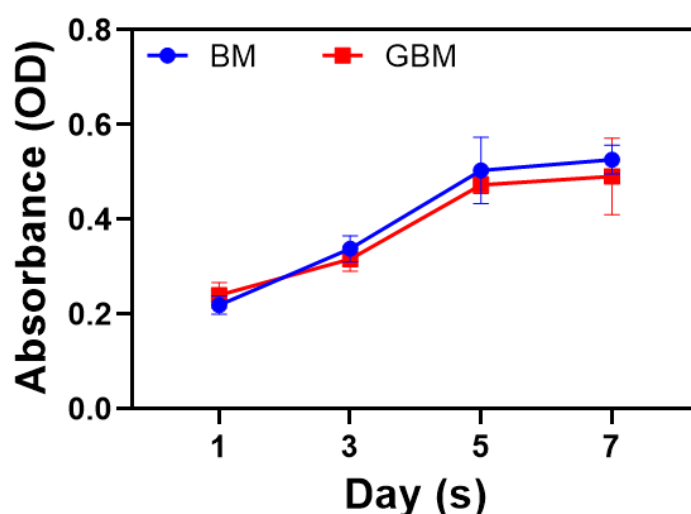


图 3.20 BMSCs 在 BM 和 GBM 支架上生长的增殖曲线

### 3.3.4 结论

综上所述， $4 \text{ mg mL}^{-1}$  浓度的没食子酸修饰改性后的羟基磷灰石材料无明显的细胞毒性，同时，BMSCs 在改性后的医用诱导骨基质上生长良好，证明了 GBM 良好的生物相容性，为进一步的体内研究提供了生物学基础。

## 3.4 低热刺激促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的研究

### 3.4.1 实验材料

#### 3.4.1.1 实验主要设备及仪器

表 3.9 低热刺激促进 BMSCs 的增殖和成骨分化所使用的主要设备和仪器

设备与仪器名称	生产公司
电热恒温水槽 (DK-8D)	上海精宏实验设备有限公司 (中国)
电热恒温水浴锅	Fisher Scientific (德国)
涡旋振荡器 (Vortex, QL-901)	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司 (中国)
称重天平 (BSA124S-CW)	北京赛多利斯科学仪器有限公司 (中国)
生物安全柜 (HR40-II A2)	青岛海尔生物医疗股份有限公司 (中国)
医用离心机 (L500)	湖南湘仪实验室仪器开放有限公司 (中国)
二氧化碳培养箱 (311)	Thermo Fisher (美国)

移液枪套装	Eppendorf 公司 (德国)
高压蒸汽灭菌器 (MLS-3780)	SANYO 公司 (日本)
液氮罐 (Locator JR)	Thermo Fisher (美国)
制冰机 (XB-130)	宁波新芝生物科技股份有限公司 (中国)
高速冷冻离心机 (5424R)	Eppendorf 公司 (德国)
多功能酶标仪	Bio Tek Synergyz (美国)
金属干浴仪器 (LS-D202)	Fisher Scientific (德国)
Western-Blot 电泳仪	Bio-Rad 公司 (新加坡)
Western-Blot 电转仪	Bio-Rad 公司 (新加坡)
蛋白分析成像系统	LICoR Odyssey (美国)
倒置荧光相差显微图像系统	LEICA DMI6000B (德国)

### 3.4.1.2 实验主要试剂及耗材

表 3.10 低热刺激促进 BMSCs 的增殖和成骨分化所使用的主要试剂和耗材

试剂与耗材名称	供应商
$\alpha$ -MEM GlutaMAX 细胞培养基	Gibco 公司 (美国)
胎牛血清	Gibco 公司 (美国)
青链霉素	Gibco 公司 (美国)
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco 公司 (美国)
PBS (1X)	HyClone 公司 (美国)
细胞冻存液	北京博奥龙免疫技术有限公司 (中国)
Cell Counting Kit-8 试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
PBS (20X)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
4%多聚甲醛固定液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
75%乙醇消毒液	上海利康消毒高科技有限公司 (中国)
无水乙醇, $C_2H_5OH$ , 分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司 (中国)
茜素红 S 染色液	北京索莱宝科技有限公司 (中国)
10%Triton X-100	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
1M Tris-HCl, pH=6.8	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
1M Tris-HCl, pH=8.8	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
30% Acr-Bis (29:1)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
10%SDS	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
10%AP	国药集团化学试剂有限公司 (中国)
TEMED	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)

电泳缓冲液 (10X)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
转膜缓冲液 (10X)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
丽春红染色液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
6×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
蛋白 marker (26616)	Thermo Fisher (美国)
RIPA 裂解液	Gibco 公司 (美国)
PMSF (蛋白酶抑制剂)	Gibco 公司 (美国)
BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)	上海碧云天生物技术有限公司 (中国)
Rabbit anti-osteopontin	Abcam 公司 (美国)
Mouse anti-osteocalcin	Abcam 公司 (美国)
Mouse anti-actin	Abcam 公司 (美国)
Western-Blot 二抗 (兔)	Cell Signaling Technology (美国)
Western-Blot 二抗 (鼠)	Cell Signaling Technology (美国)
细胞培养瓶 (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	JET BIOFIL® (中国)
细胞培养板 (6 孔, 12 孔, 96 孔)	JET BIOFIL® (中国)
离心管 (1.5 mL, 2 mL, 15mL, 50 mL)	JET BIOFIL® (中国)
EP 管 (1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL)	上海贝晶生物技术有限公司 (中国)
共聚焦培养皿	JET BIOFIL® (中国)
细胞刮刀	JET BIOFIL® (中国)
细胞冻存管	JET BIOFIL® (中国)
细胞冻存盒	Thermo Fisher (美国)
细胞计数板	Marienfrld 公司 (德国)

### 3.4.2 实验方法

该部分所使用 SD 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 购买于中国科学院典型培养物保藏委员会干细胞库, 目录号为 SCSP-402, 所获细胞为第二代。该部分所涉及到的基础细胞实验操作技术, 如细胞培养、传代、冻存、复苏和计数等参照 2.3.2.2。

#### 3.4.2.1 CCK8 法评价细胞增殖实验

- (1) 细胞铺板: 将生长良好的 P8-P10 代 BMSCs 以  $1 \times 10^3$  个/孔的浓度接种于 96 孔细胞培养板中, 然后置于 37°C 细胞培养箱内培养。
- (2) 24 小时后待细胞贴壁生长, 更换新的培养基, 然后将培养板移至预先升温好的 40°C 培养箱中进行培养, 空白对照组则继续放置在 37°C 培养箱中。



- (3) 在培养 1、3、5 和 7 天时，去除旧培养基并使用无菌 PBS 洗 3 次，然后在 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$  新鲜完全培养基和 10  $\mu\text{L}$  CCK8 试剂，将细胞培养板转移至 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 2 小时。
- (4) 吸取 80  $\mu\text{L}$  反应上清液至新的 96 孔板中，然后酶标仪测其在 450 nm 处的 OD 值。

#### 3.4.2.2 茜素红染色

- (1) 使用生长良好的 P2-P6 代 BMSCs 以  $1 \times 10^4$  个/孔的浓度接种于 12 孔细胞培养板中，加入适量培养基后置于 37 $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱内培养 24 小时。
- (2) 待细胞贴壁生长后更换培养基，并将培养板板移至预先升温好的 40 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中进行培养，空白对照组为 37 $^{\circ}\text{C}$  培养。每 3 天更换一次新的培养基。
- (3) 待培养 14 天后，移除旧培养基并使用无菌 PBS 清洗 3 遍。
- (4) 吸弃 PBS 后，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  多聚甲醛（4%）进行固定，4 $^{\circ}\text{C}$  固定 20 分钟。然后移除多聚甲醛液体，并加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 放置于摇床上清洗 3 次，每次 5 分钟。
- (5) 待细胞固定完成后，移除 PBS 溶液，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的茜素红 S 染色液，室温避光孵育 30 分钟后移除染色液，超纯水洗涤 2 次终止反应，显微镜下观察并采集图像。

#### 3.4.2.3 Western Blot 检测成骨分化蛋白的表达

- (1) 细胞培养同 3.4.2.3 中（1）和（2）步。
- (2) 待低热刺激培养后 3、7 和 14 天时，参照 2.3.2.9 中的方法进行蛋白提取、浓度测定和 Western blot 实验。

#### 3.4.2.4 统计学方法和分析

实验定量数据以平均值 $\pm$ 标准差（Mean $\pm$ SD）的方式进行表示，统计学分析使用 IBM SPSS Statistics 16.0 软件，图表制作使用 GraphPad Prism 8 和 OriginPro 9.0 软件。使用 Image J 软件对荧光染色图片进行分析及定量。组间比较使用 *t* 检验或方差分析进行差异性分析，当 *p* 值 $<0.05$  时，认为组间差异具有统计学意义。

### 3.4.3 实验结果与讨论

骨缺损的修复过程是一个复杂的生理过程，受到许多因素的影响，包括细胞间相互调节作用、炎症反应、局部免疫微环境等内源性的因素<sup>[329]</sup>，同时也有研究表明生理性的外部刺激因素也能影响骨生长，如物理压力、氧化应激、剪切力和热刺激等<sup>[132,330,331]</sup>。其中，温度是常见的物理刺激，低热刺激作为生理调节

因素影响细胞受到热刺激后的生长过程,恒温动物在发热时体温仅升高 1-2°C<sup>[140]</sup>,同时,在骨折后,骨折区域皮温长较周边区域升高,推测低热刺激对于骨组织修复具有积极作用。

低热刺激相较于传统的生物疗法或药物疗法更加的简单和可调控。有研究表明低热刺激可以促进体外和体内组织再生修复,包括皮肤<sup>[141]</sup>、肌肉<sup>[142]</sup>,局部的物理热疗也对于骨吸收和骨形成具有积极作用<sup>[143]</sup>。血管重建对于骨再生至关重要,有研究表明重复的低热刺激可以增强人微血管 HMEC-1 细胞系的体外血管形成倾向<sup>[144]</sup>。此外,重复低热刺激对于骨再生也表现出了积极的影响。低热刺激可以诱导人骨髓间充质干细胞和 MG-63 细胞增殖和体外成骨分化<sup>[145]</sup>。另外一项研究使用低热培养成骨细胞后的条件培养基,对骨髓间充质干细胞进行培养,结果显示该骨髓间充质干细胞的骨钙素(OCN)表达和矿化增强<sup>[146]</sup>。综上所述,本研究探究了在 40°C 低热环境下的 BMSCs 的增殖和成骨分化情况。

### 3.4.3.1 低热促进 BMSCs 的增殖

图 3.21 所示为 BMSCs 在正常 37°C 下和低热环境 40°C 下进行培养的 BMSCs 的细胞增殖情况,结果可见,自第 3 天开始,在低热刺激下的 BMSCs 的 OD 值均高于正常 37°C 中培养的,提示低热具有一定的促增殖效果。这也与前述研究一致<sup>[145]</sup>。

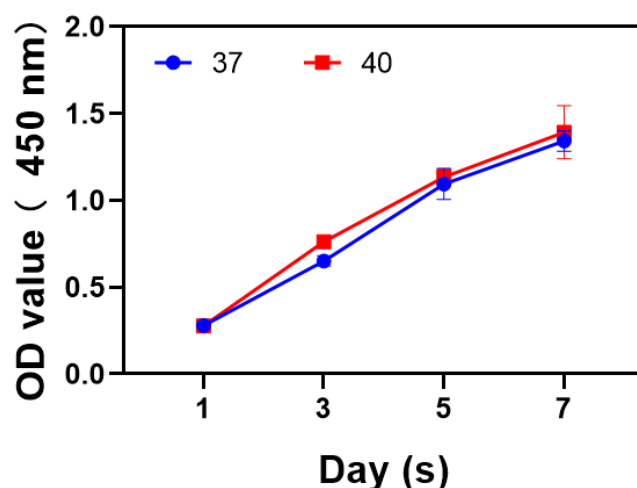


图 3.21 37°C 和低热 (40°C) 培养 BMSCs 的细胞增殖曲线

### 3.4.3.2 低热促进 BMSCs 的成骨分化

对于骨缺损的修复,促进成骨分化和骨生成作用至关重要。本研究采用茜素红染色、检测成骨相关基因和蛋白的表达来进一步探究低热对 BMSCs 的促骨生成作用。然而对于低热刺激的条件,如温度、处理时间等均未有明确的定论, Tong

liping 等<sup>[332]</sup>制备了聚乳酸-羟基乙酸共聚物与黑磷纳米片制备的复合支架, 然后结合近红外光使局部环境达到  $40.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 刺激 BMSCs 30 秒或 60 秒, 体外和体内结果表明低热刺激促进骨再生。Li ming 等<sup>[132]</sup>通过  $41^\circ\text{C}$ , 每次刺激 1h, 每周两次处理原代成骨细胞, 结果表明丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、白介素 6 (IL-6) 和骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 的基因相对表达量增加。另一项研究则使用  $39^\circ\text{C}$  持续低热刺激 BMSCs, 结果表明该参数大大增强了 BMSCs 的体外矿化能力, 而当温度高于  $43^\circ\text{C}$  时, BMSCs 的细胞活性便大大降低了<sup>[145]</sup>。结合上述研究结果发现, 在温度处于  $39^\circ\text{C}$ - $41^\circ\text{C}$  的低热刺激时, 可以促进 BMSCs 的成骨分化, 因此本研究选择了  $40^\circ\text{C}$  作为低热刺激的温度条件。而处理时间则长短不一, 从 30 秒至持续刺激均表现为良好的影响。本研究则设定了短时长处理(15 分钟)、中等时长处理(1 小时)和持续刺激三个组从而来探究最佳的刺激时长, 其中短时长和中等时长处理组为细胞每天置于  $40^\circ\text{C}$  培养箱中刺激 15 分钟和 1 小时, 直至收样时间点。

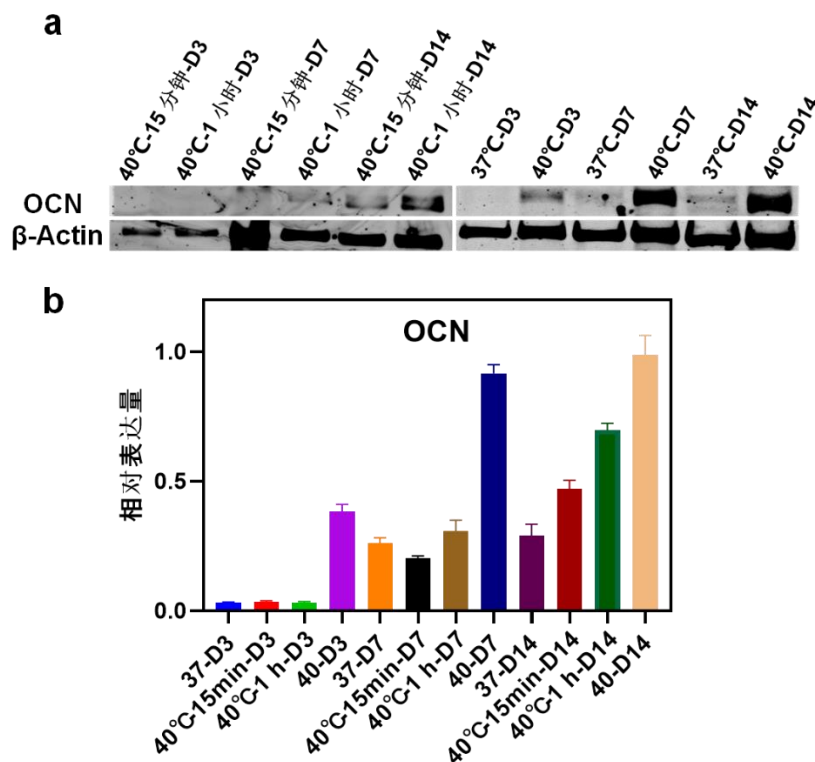


图 3.22 BMSCs 受低热刺激不同时间的成骨相关蛋白的表达, (a) WB 显影结果, (b) 定量结果; 其中相对表达量为目标蛋白的灰度值与其内参蛋白 ( $\beta$ -Actin) 灰度值的比值。

如图 3.22 所示为, BMSCs 在不同时长刺激组的 3、7 和 14 天刺激的成骨分化相关蛋白表达 WB 结果, 结果表明, 正常  $37^\circ\text{C}$  培养的 BMSCs 在第 7 天出现微量的 OCN 表达, 同时, 15 分钟短时长处理组和正常培养在 7 天时无明显差异,

而至 14 天时，则较正常培养的 OCN 表达量增加。对于 1 小时的中等时长刺激和持续刺激来说，则在每个时间点均呈现促成骨分化的效应，尤其是持续刺激组，在刺激第 3 天开始就出现了明显的 OCN 表达，至 7 天和 14 天后表达量较正常培养组明显增多。在低热刺激组中，促成骨分化效应也与刺激时间呈正相关趋势，因此，本研究后续体外细胞学研究便采用持续低热刺激进行。

然后，在低热刺激 BMSCs 21 天后的茜素红染色结果证明了低热持续刺激有利于 BMSCs 的体外矿化。结果如图 3.23 所示，BMSCs 在低热持续刺激后出现了更多的钙结节，进一步证明了低热刺激的促成骨分化作用。

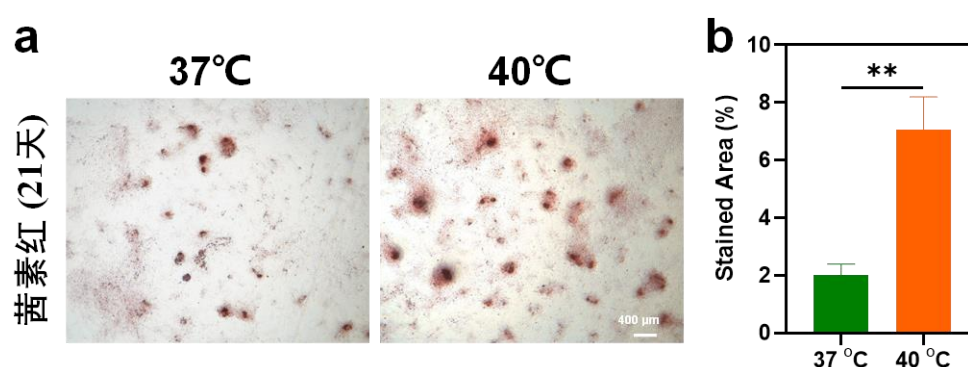


图 3.23 BMSCs 在 37°C 和 40°C 中培养 21 天后的茜素红染色 (a) 和定量结果 (b)

### 3.4.4 结论

基于上述结果，体外的低热刺激对于 BMSCs 具有促增殖和成骨分化的作用，且促成骨分化作用与刺激持续时间呈正相关，因此，本研究在接下来将利用没食子酸改性医用诱导骨基质的光热性能结合体外近红外光，从而实现体内骨缺损局部的温度调控，达到局部低热刺激，以进一步探究低热刺激对骨缺损修复的体内效应。

## 3.5 没食子酸改性三维生物支架的体内促骨缺损修复的研究

### 3.5.1 实验材料

#### 3.5.1.1 实验主要设备及仪器

表 3.11 没食子酸改性三维生物支架的体内促骨缺损修复研究所用主要设备和仪器

设备与仪器名称	生产公司
---------	------

高压蒸汽灭菌器 (MLS-3780)	SANYO 公司 (日本)
倒置荧光相差显微图像系统	LEICA DMI6000B (德国)
小动物气体麻醉剂	上海玉研科学仪器有限公司 (中国)
世新牙科打磨机 (Strong 90)	上海仁沃医疗科技有限公司 (中国)
808 nm 激光器	上海熙隆光电科技有限公司 (中国)
科研三合一热像仪 (Fotric 225s)	上海飞础科智慧科技有限公司 (中国)
小动物手术器械	上海金钟手术器械厂 (中国)
小动物体重称	深圳德玛医疗器械有限公司 (中国)
离心机	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
涡旋混合器	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
全自动生化分析仪	深圳雷社生命科学股份有限公司 (中国)
组织脱水机 (JJ-12J)	武汉俊杰电子有限公司 (中国)
组织包埋机 (JB-P5)	武汉俊杰电子有限公司 (中国)
组织切片机	LEICA 公司 (德国)
组织摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司 (中国)
冻台 (JB-L5)	武汉俊杰电子有限公司 (中国)
载玻片	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司 (中国)
烤箱	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司 (中国)
微波炉	格兰仕公司 (中国)
组化笔	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
脱色摇床	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
超净工作台	新华医疗器械股份有限公司 (中国)
Micro-CT 扫描仪 (SkyScan 1275)	Bruker 公司 (德国)
全自动正置荧光显微镜	LEICA DM6 (德国)
切片数字扫描仪	3D HISTECH 公司 (匈牙利)

### 3.5.1.2 实验主要试剂及耗材

试剂与耗材名称	供应商
异氟烷	瑞普 (天津) 生物药业有限公司
75%乙醇	上海利康消毒高科技有限公司 (中国)
安尔碘消毒液	上海利康消毒高科技有限公司 (中国)
ALT 测定试剂盒	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)
BUN 测定试剂盒	武汉塞维尔生物科技有限公司 (中国)

肌酐测定试剂盒	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
4%多聚甲醛固定液	上海碧云天生物技术有限公司（中国）
3%双氧水	国药集团化学试剂有限公司（中国）
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司（中国）
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司（中国）
中性树脂	国药集团化学试剂有限公司（中国）
正丁醇	国药集团化学试剂有限公司（中国）
石蜡	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
EDTA 脱钙液	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
EDTA 抗原修复液（pH=8.0）	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
柠檬酸抗原修复液（pH=6.0）	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
PBS 缓冲液	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
BSA	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
苏木精/伊红（HE）染液套装	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
Masson 染液套装	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
组化试剂盒 DAB 显色剂	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
抗荧光淬灭封片剂	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
自发荧光淬灭剂	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
一抗（CD31+ $\alpha$ -SMA）	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
荧光二抗	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）
DAPI 染色液	武汉塞维尔生物科技有限公司（中国）

### 3.5.2 实验方法

此部分所涉及的实验动物管理、大鼠颅骨缺损模型、颅骨样品的收集、组织切片免疫组化染色以及统计学分析等具体实验步骤参照 2.4.2，在此不再赘述。

此部分实验大鼠共计 30 只，造模前随机分为 3 组，每组 10 只。具体分组为空白对照组：不植入任何材料；实验对照组：植入单纯的 BM；实验组：植入 GBM，然后每只老鼠的左右两边孔洞作为自身对照，左边不使用近红外光（NIR）照射，右边使用 NIR 照射，照射功率为  $1\text{W cm}^{-2}$ ，每次持续 10 分钟，每三天照射一次，共计 10 次。如图 3.26。

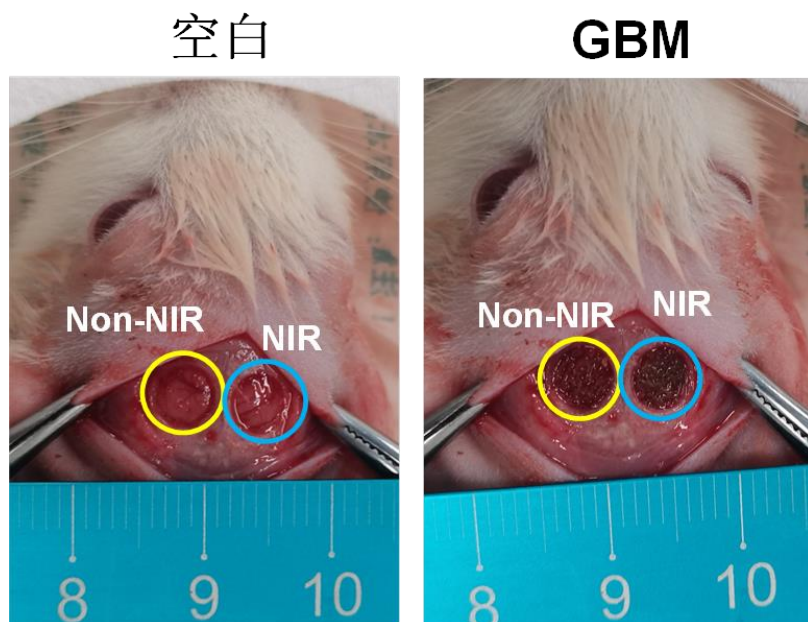


图 3.24 大鼠颅骨缺损模型植入 GBM+NIR 实验示意图

植入材料后第 28 天，使用加入肝素的抗凝管采集大鼠血液，每组至少收集 3 只大鼠血液样本，然后 3000 rpm 4℃离心 15 分钟，取上清使用全自动生化仪检测。

植入材料后的 4W 和 12W 分别收取颅骨样品，然后使用 SkyScan 1275 扫描仪进行 Micro-CT 扫描，然后采用 NRecon 进行三维重建，最后通过 CTvox 和 CTAn 软件进行新生骨相关指标的定量分析，包括骨体积（Bone volume, BV）、骨体积分数（Bone volume/Total volume, BV/TV）、骨小梁数（Trabecular number, Tb.N）和骨小梁分离度（Trabecular separation, Tb.Sp）。

### 3.5.3 实验结果与讨论

#### 3.5.3.1 没食子酸改性医用诱导骨基质结合近红外光实现体内局部光热刺激

自古以来，物理热疗常被用于促进躯体疾病的治疗，且已经有研究发现热刺激有利于骨缺损的修复<sup>[332]</sup>。相较于内源性刺激，如 pH、氧化应激等，热刺激更好进行控制，然而由于组织覆盖，将热传递至特定局部区域进行刺激便成为较大的难题，尽管已有研究提出使用直接热刺激、微波热刺激和光热刺激等<sup>[147, 148]</sup>方式，但体内应用仍缺乏可喜的效果。对此，近红外光（Near-infrared, NIR）由于具有良好的生物组织穿透率和时空精确度，可利用外源性物质，如骨缺损植入材料精确的进行局部辐射升温，从而达到体内局部精准控制热刺激<sup>[333]</sup>。因此，设计制备可精准调控骨折局部区域温度从而实现局部热刺激的生物活性材料便至



关重要。本研究所制备的没食子酸改性医用诱导骨基质 (GBM) 已在体外验证了具有良好的光热性能, 在干燥和湿润环境中经  $1\text{W cm}^{-2}$  功率的  $808\text{ nm}$  激光照射 10 分钟可达  $45^\circ\text{C}$  和  $52.5^\circ\text{C}$  (图 3.14 和 3.15)。而在植入大鼠体内的光热性能依然可以实现  $40^\circ\text{C}$  左右的局部低热环境, 结果如图 3.25 所示。相较于空白对照和实验对照组 (BM) 来说, GBM 可在较低功率,  $1\text{W cm}^{-2}$  时经 2 分钟左右便能升至  $40^\circ\text{C}$  左右, 后续便持续维持在  $40^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 从而实现骨缺损区域的局部低热刺激。而单纯置入 GBM, 不使用 NIR 照射的区域 (GBM 中左侧区域) 则未见明显温度变化。此外, 空白对照和未经没食子酸改性的 BM 在使用 NIR 照射后, 局部温度出现轻微的上升, 从  $35^\circ\text{C}$  上升至  $37^\circ\text{C}$ , 与体外完全不上升略有不同, 这可能为动物皮肤对近红外光的吸收有关, 但仍未能达到低热刺激的效果。因此, 通过 GBM 结合 NIR 的方法, 可以解决热能的传递, 从而实现局部精准调控温度, 达到骨缺损区域低热刺激的目的。

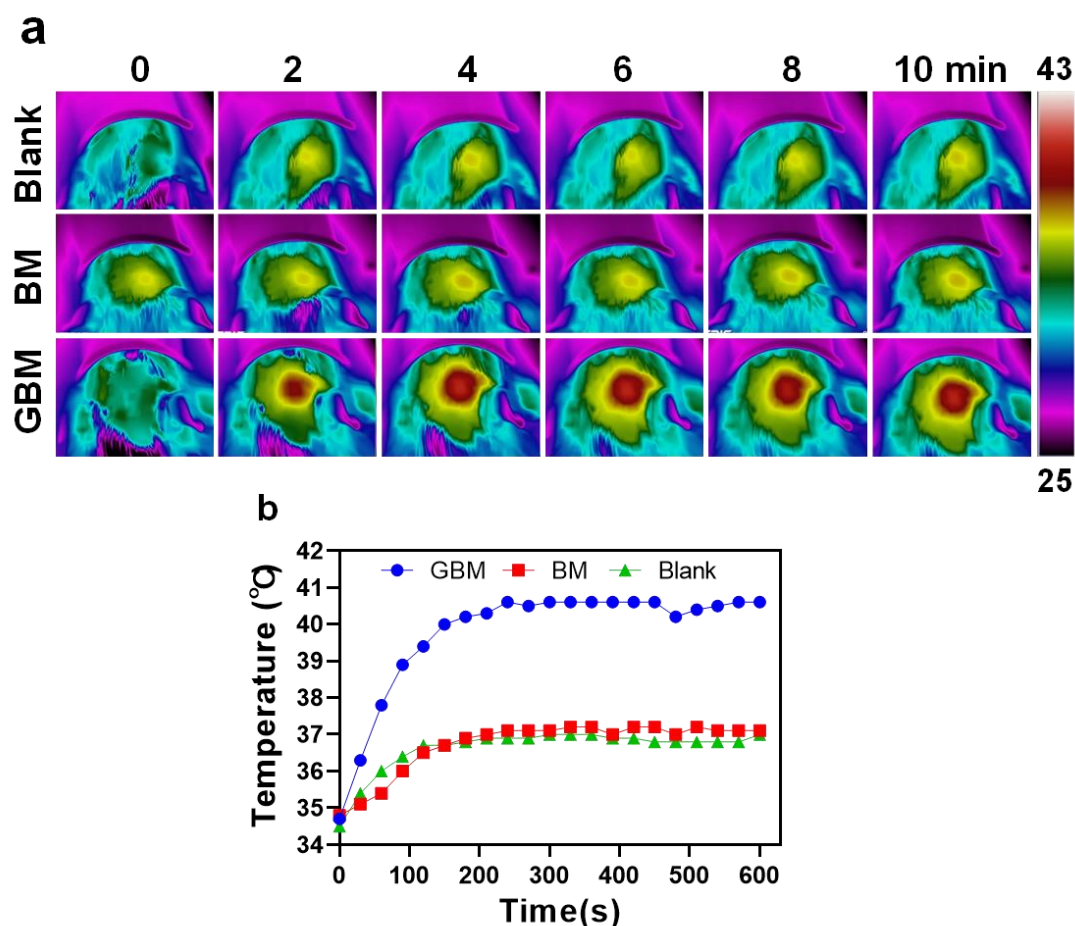


图 3.25 空白对照, BM 和 GBM 在大鼠颅骨缺损区域的光热升温结果

### 3.5.3.2 GBM 体内生物安全性良好

没食子酸 (GA) 的代谢和排出主要是通过肾脏和肝脏实现的<sup>[334, 335]</sup>, 因此,



本研究通过测定 GBM 植入大鼠体内后第 28 天的 ALT、BUN 和 CR 来评价 GBM 的生物安全性。如图 3.26 所示，植入 GBM 大鼠的 ALT 和 CR 相较于空白组和 BM 组略有下降，但三组无统计学差异，而 BUN 则无明显变化，提示 GBM 植入后释放或者降解产生的 GA 对动物无明显损伤，安全性良好，这与已有的研究一致，GA 在体内的毒性相对较弱<sup>[336, 337]</sup>。

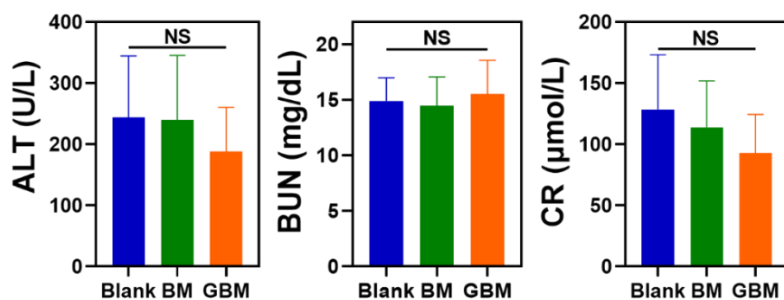


图 3.26 GBM 植入体内 4W 的大鼠肝肾功能。ALT：谷丙转氨酶；BUN：尿素氮；CR：肌酐。结果以平均值±标准差（Mean ± SD）表示，NS 为无统计学差异。

### 3.5.3.3 体内验证低热刺激促进骨缺损修复

体外细胞实验已经验证了 GBM 以及低热刺激促进 BMSCs 增殖和成骨分化的作用，然而由于实验操作的限制，无法做到持续给予低热刺激，故采用间断循环刺激的方式，来验证体内 GBM+低热刺激的促骨再生作用，结果如下所示。Micro-CT 扫描结果（图 3.27）表明，GBM+NIR 组相较于空白组（NIR 或 Non-NIR）、BM 组（NIR 或 Non-NIR）和 GBM 组的修复效果最好，提示体内低热刺激有利于骨修复。而对于空白对照和 BM 组来说，加 NIR 照射干预与不加 NIR 的修复效果相差不大，这是由于单纯空白和 BM 组在 NIR 照射下，仅能达到 37°C 的局部温度，无法实现局部的低热刺激，故加或不加 NIR 照射对于骨再生无明显影响。定量数据的统计分析结果也呈现了相同的趋势，如图 3.28 所示。新生骨体积（BV）在第 4 周时，GBM+NIR 组为空白组的 1.46 倍，第 12 周时则达到了 2.45 倍，而相较于无低热刺激的 GBM 组，GBM+NIR 则升高了 0.51 倍。骨体积分数是新生骨与总缺损体积的比，更为科学的评价了促骨再生的效果。单纯空白组在第 4 周时，骨体积分数为 19.56%，到第 12 周时增长到 33.9%，增长了 14.34%。而 GBM+NIR 的低热刺激组，在第 4 周时便达到了 40.12%，是空白组的 2.05 倍，到第 12 周时则为 60.31%，增长了 20.19%。在骨小梁数量和骨小梁分离度上，均出现相同的趋势，进一步说明了 GBM+NIR 可以通过光热生物材料结合局部低热刺激促进骨修复。另一方面，BM 和 GBM 对于骨缺损的修复效果均较单纯空白组好，且 GBM 较 BM 更好，这可能与没食子酸（GA）的抗炎和抗氧化应激作用有关。骨再生修复需要经历三个连续且重叠的阶段：炎症期、再生期和重塑期

[338], 在最初的短暂炎症阶段对于骨愈合至关重要, 而过度的急性炎症或者持续的慢性炎症, 导致炎症因子的升高或者降低从而出现炎症失调会阻碍骨再生[339-341]。而几乎所有的骨修复生物材料在植入后都会引发异物反应, 此外材料的降解

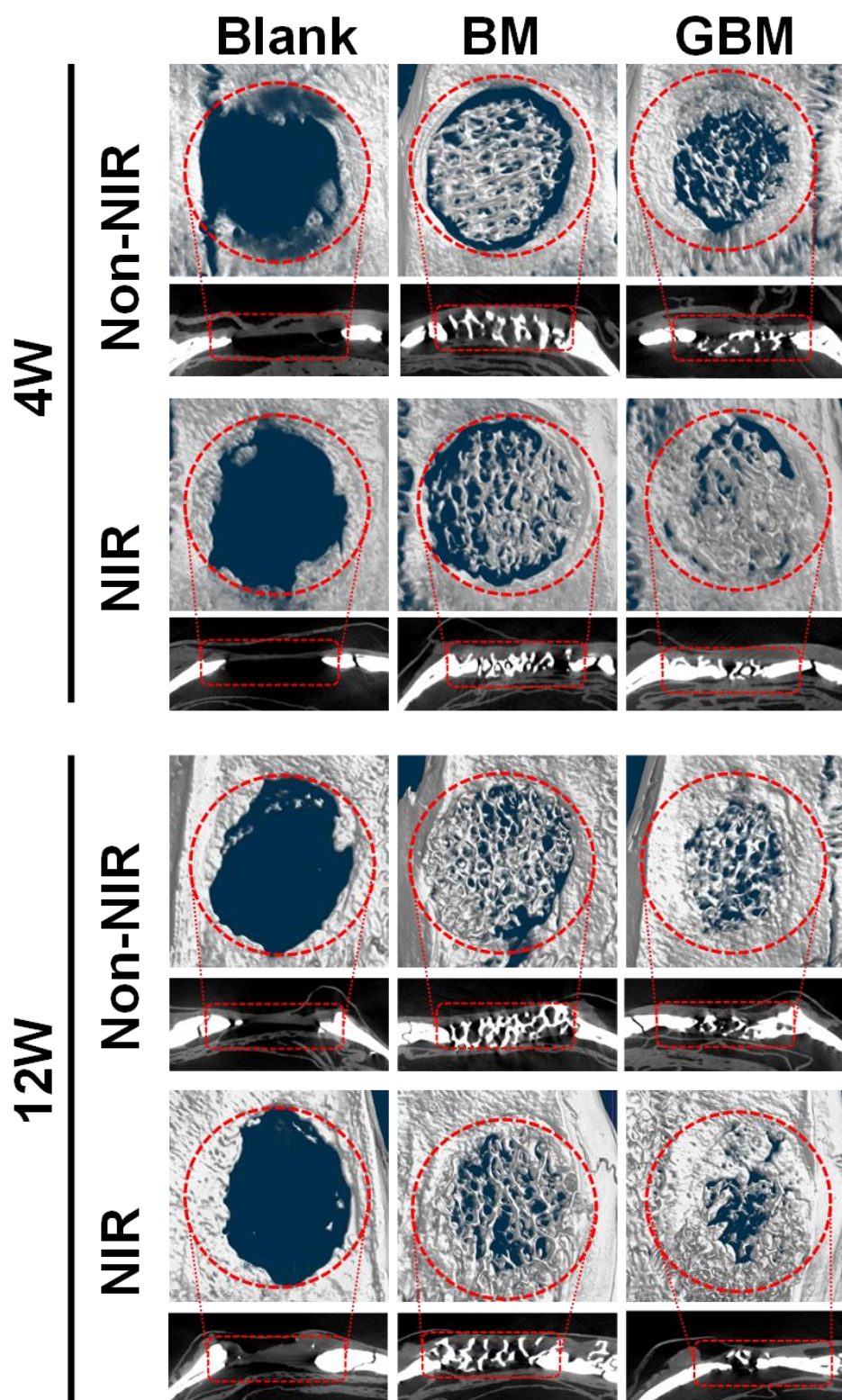


图 3.27 GBM+NIR 低热刺激颅骨缺损修复的 Micro-CT 扫描结果

产物也会导致炎症反应，从而影响骨愈合<sup>[341]</sup>。没食子酸是一种多酚类化合物，具有优异的抗炎和抗氧化活性<sup>[323]</sup>，已被证明可以在神经退行性疾病、代谢性疾病包括2型糖尿病和心血管疾病、肠胃炎、肝炎以及类风湿性关节炎等疾病中发挥抗炎作用<sup>[325,336,342-344]</sup>。因此，推测GBM良好的修复效果是由于GA的抗炎性能，降低了体内对于植入生物材料的异物炎症反应，从而帮助骨愈合。值得一提的是，在统计分析结果中，GBM组在修复晚期（12W）和早期（4W）的差距不大，如骨体积分数从第4周（35.38%）至第12周（41.64%）仅增长了6.27%，这可能与我们的推测相印证，由于GBM在植入的早期释放更多的GA，起到早期抗炎的作用，且骨愈合的早期正常炎症反应更为重要，因此GBM组在4周的时候促骨再生效果明显，而在第4-12周时表现为骨修复速率减缓。

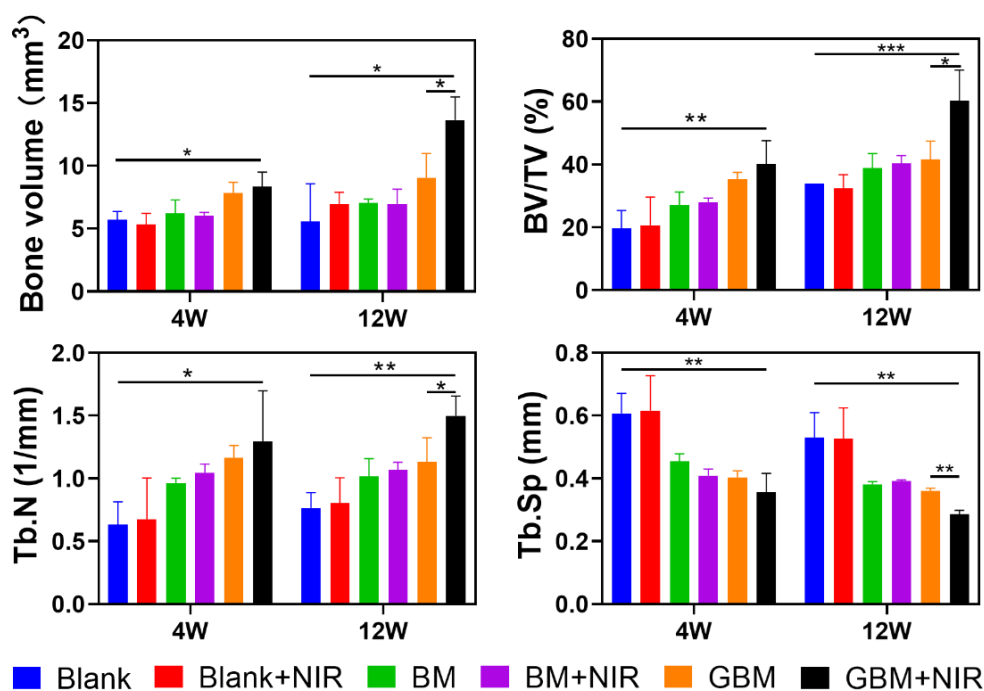


图 3.28 GBM+NIR 低热刺激颅骨缺损修复的 Micro-CT 定量数据统计分析结果。Bone volume: 新生骨体积; BV/TV: 骨体积分数; Tb.N: 骨小梁数量; Tb.Sp: 骨小梁分离度; 结果以平均值±标准差 (Mean ± SD) 表示, 其中 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  表示组间具有统计学差异。组间比较为 GBM+NIR 组与 GBM 组或 Blank 组

HE 和番红固绿染色结果如图 3.29 (4W) 和图 3.30 (12W) 所示。其中 NB 为新生骨, 绿色五角星为新生胶原, 黑色箭头所指为成骨细胞, 黄色箭头表示新生血管。由图可以看出, 植入支架后骨缺损的修复效果更好, 不论支架为 BM 还是 GBM, 同时, 由于 GBM 在 NIR 的照射下可以形成局部低热刺激环境, 进一步促进骨组织再生, 在 12W 时缺损区域几乎修复完全。组织学结果也与上述



micro-CT 结果具有良好的一致性。

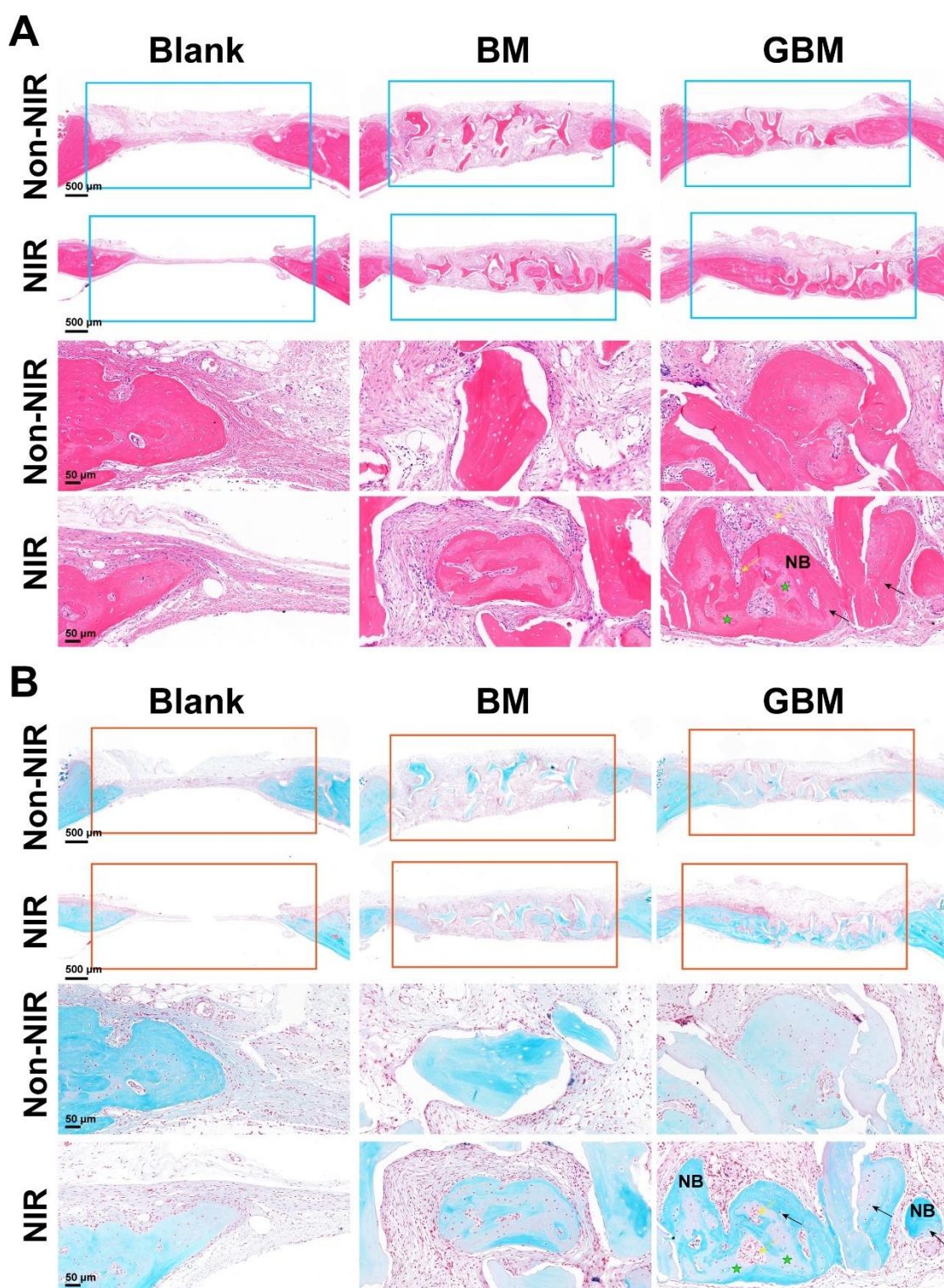


图 3.29 植入 BM 或 GBM 支架后，分别进行 NIR 照射 4 周后的颅骨样本的 HE 染色和番红固绿染色结果。NB (Newborn Bone): 新生骨，绿色五角星: 新生胶原，黑色箭头: 成骨细胞，黄色箭头: 新生血管。



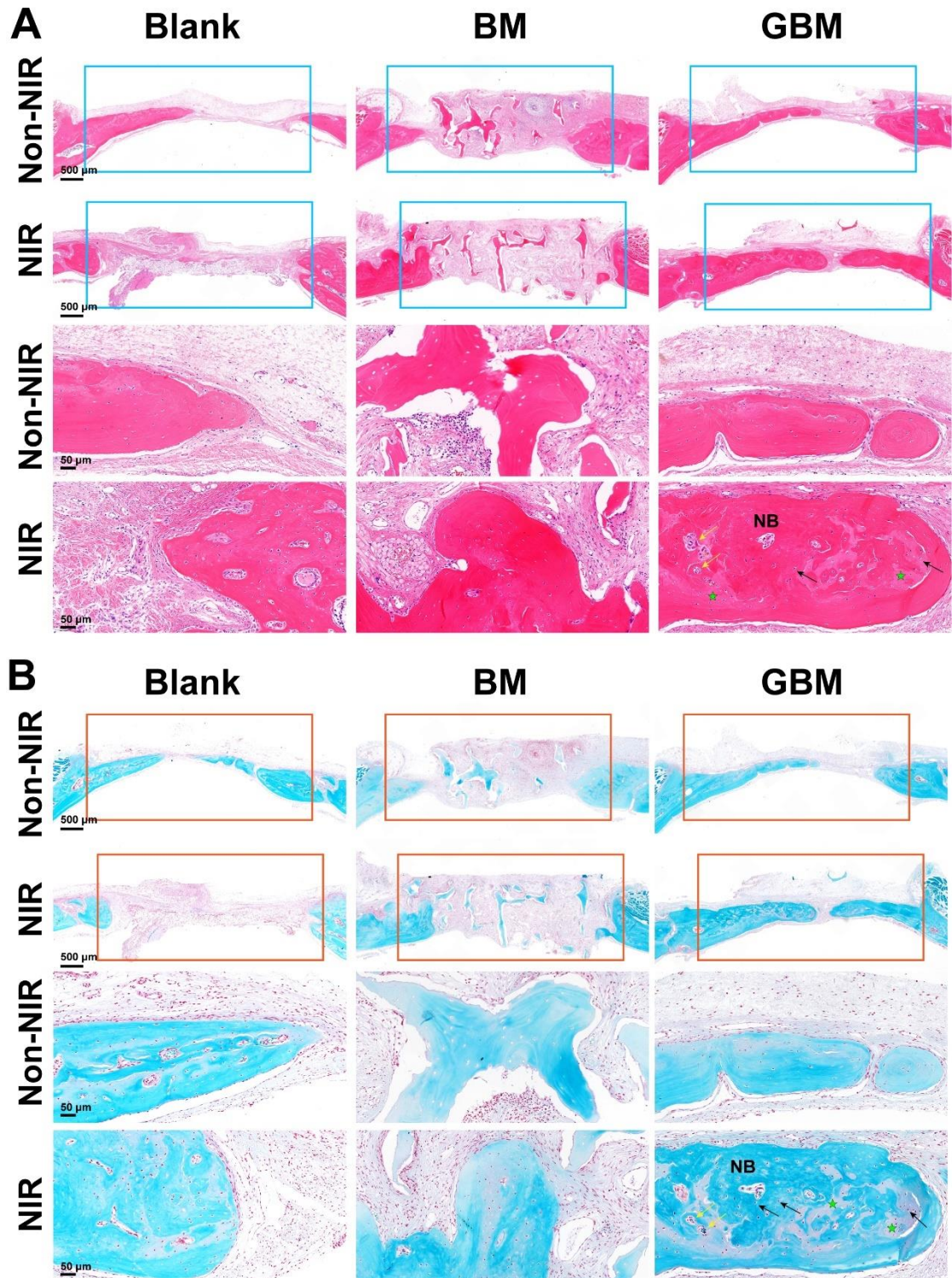


图 3.30 植入 BM 或 GBM 支架后，分别进行 NIR 照射 12 周后的颅骨样本的 HE 染色和番红固绿染色结果。NB (Newborn Bone): 新生骨，绿色五角星: 新生胶原，黑色箭头: 成骨细胞，黄色箭头: 新生血管

### 3.5.4 结论

通过没食子酸改性医用诱导骨基质可以获得具有光热性能的三维支架 (GBM), 在植入大鼠颅骨缺损部位后, 结合近红外光 (NIR) 可以达到精准调控局部温度的效果, 从而实现体内温度可控的低热刺激 ( $40^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ )。颅骨缺损修复实验证明了局部的低热刺激有利于骨再生, 与体外细胞实验结果一致。此外, 由于没食子酸优异的抗炎性能, 单纯的 GBM 也具有良好的促骨修复作用, 尤其在修复早期 (4W)。

### 3.6 本章小结

在本研究中, 采用了天然有机物没食子酸 (GA) 对传统的羟基磷灰石生物材料进行修饰改性, 在不改变其本身的理化性质和生物学性能的同时, 使其附加有额外的光热响应性能。改性后的光热羟基磷灰石 (HA) 材料的光热性能与材料的浓度、激光照射时间和功率呈正相关, 且具有良好的光热稳定性。同时, 将光热医用诱导骨支架 (GBM) 植入大鼠体内, 结合 808 nm 的近红外光照射可以实现精准调控局部温度的目的, 从而形成缺损部位的低热刺激环境, 这为解决传统的物理热疗无法精准传递热能至体内的问题提供了一种良好的策略。此外, 改性后的 HA 材料相较于传统 HA 材料依然具有良好的生物相容性, 不会因为 GA 的加入造成过大的生物毒性。另一方面, 基于传统热疗促进组织修复的理念, 本研究探究了低热刺激对于骨再生的影响, 结果表明, 在  $40^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  的低热刺激下, 可以促进 BMSCs 的增殖和成骨分化, 同时其促成骨分化性能与刺激时间呈正相关, 而体内大鼠颅骨缺损模型验证了 GBM 结合低热刺激对于骨缺损修复的效果良好。综上所述, 本研究提出了一种新的骨再生的研究思路, 有别于传统的骨再生生物活性材料, 聚焦于物理热疗和生物材料的结合, 通过低热刺激骨再生, 有望为骨缺损修复治疗提供新的治疗方法和思路。

## 第4章 结论与展望

### 4.1 结论

本研究通过高温水热溶剂法制备了具有中空管道的羟基磷灰石微米管 (HAMT), 然后利用 HAMT 特殊的管道结构, 与 GH 复合制备了具有良好机械性能的管道框架复合支架(GH/H)用于骨缺损的修复。GH/H 复合支架由于 HAMT 的引入, 大大增加了复合支架的机械性能, 同时保留了 GH 的柔韧性和抗疲劳能力。此外, 由于 HAMT 特殊的管状结构和自组装性能, 制备的复合支架可以在支架内部形成内部管道框架结构, 增强了 GH/H 复合支架的透气性和信号、营养物质的传递能力。同时, 基于 GH/H 复合支架的原位光固化塑型能力, 可以良好的应用于不规则的骨缺陷区域并提供更加匹配的植入支架。研究结果表明所构建的管道框架 GH/H 复合支架具有良好的机械性能、生物相容性、生物活性和促骨修复能力。此外, 通过天然有机物没食子酸 (GA) 对 HA 的修饰制备了具有近红外光热响应的新型光热 HA 材料。研究结果表明, 光热 HA 材料的光热性能具有良好的光热稳定性, 且与材料的浓度、激光照射时间和功率呈正相关。此外, 通过光热 HA 材料和 808 nm 近红外光的结合可以实现体内精准控温, 从而将传统的体外物理热刺激转变为体内的精准低热刺激, 为解决传统的物理热疗无法精准传递热能至体内的问题提供了一种良好的策略。同时, 我们发现在  $40^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  的低热刺激下, 可以促进 BMSCs 的增殖和成骨分化, 且成骨分化程度与刺激时间呈正相关, 并且对于大鼠颅骨缺损具有促进骨修复的作用。综上所述, 本研究提供了一种新的基于 HA 特殊结构制备骨修复材料的思路, 同时有别于传统的骨再生生物活性材料的研究策略, 将物理热刺激与骨修复材料结合, 通过低热刺激骨再生, 提出了一种新的骨修复材料研制方向, 有望为骨缺损修复治疗提供新的研究思路和治疗策略。

### 4.2 展望

本研究制备了新型的管道框架骨修复材料以及光热 HA 骨修复材料并应用于骨缺损修复, 虽然取得了初步的成功, 但依然任重道远, 尚有许多工作需进一步深入进行探究, 这里择其要者简要讨论如下:

(1) 本研究制备的管道框架骨修复材料利用了 HAMT 特殊的中空管道结

构,以增加 GH/H 复合支架的理化性质,包括机械性能、生物活性和生物相容性,然而这种管道框架复合支架是否可以利用 HMT 的特殊结构在药物或基因递送方面具有更加良好的性能,后续的研究将进一步对此进行探究。

(2) 本研究使用没食子酸对 HA 材料进行改性修饰并成功制备了光热 HA 材料,然而没食子酸具有良好的抗炎、抗氧化应激的作用,在光热 HA 材料促进骨再生的过程中,没食子酸是否表现出了抗炎和抗氧化应激能力,且这种抗炎抗氧化应激作用是否影响了骨缺损的修复。接下来将对光热 HA 材料的没食子酸释放水平进行评估,并探究其在骨再生过程中是否发生了抗炎、抗氧化的作用。

(3) 本研究设计并制备了光热 HA 骨修复材料,从细胞和动物水平上验证了低热刺激对于促骨再生的积极作用,然而,对于物理热刺激促进 BMSCs 增殖和骨再生的具体分子机制尚不清楚,后续将进一步探究热刺激是如何传递外界物理刺激信号,如热休克蛋白是否参与低热刺激的感受,并通过哪个信号传导通路激活骨分化的,例如 mTOR 介导的 MAPK-ERK1/2-mTOR 信号通路,或 PI3K-Akt-mTOR 信号通路。



## 参考文献

- [1] Tanaka T, Hoshijima M, Sunaga J et al. Analysis of Ca(2+) response of osteocyte network by three-dimensional time-lapse imaging in living bone. *J Bone Miner Metab*, 2018, 36(5):519-528.
- [2] 洪乐, 李鑫. 基于骨细胞的骨稳态维持与骨缺损修复. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(11):2077-2081.
- [3] Nauth A, Schemitsch E, Norris B et al. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J Orthop Trauma*, 2018, 32 Suppl 1:S7-S11.
- [4] Jin ZC, Cai QB, Zeng ZK et al. Research progress on induced membrane technique for the treatment of segmental bone defect. *Zhongguo Gu Shang*, 2018, 31(5):488-492.
- [5] Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83-A Suppl 2 Pt 2:98-103.
- [6] Aktuglu K, Erol K, Vahabi A. Ilizarov bone transport and treatment of critical-sized tibial bone defects: a narrative review. *J Orthop Traumatol*, 2019, 20(1):22.
- [7] 袁冰. 骨缺损修复的研究进展. *生物骨科材料与临床研究*, 2014, 0(3).
- [8] Nair AK, Gautieri A, Chang SW et al. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nat Commun*, 2013, 4:1724.
- [9] Jager I, Fratzl P. Mineralized collagen fibrils: a mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophys J*, 2000, 79(4):1737-1746.
- [10] Gupta HS, Seto J, Wagermaier W et al. Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(47):17741-17746.
- [11] Seeman E. *Modeling and Remodeling*. 2008.
- [12] Currey JD. The relationship between the stiffness and the mineral content of bone. *J Biomech*, 1969, 2(4):477-480.
- [13] Agna JW, Knowles HC, Jr., Alverson G. The mineral content of normal human bone. *J Clin Invest*, 1958, 37(10):1357-1361.
- [14] Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(1):45-54.
- [15] DeLacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am*, 1994, 27(5):859-874.
- [16] Sela JJ, Bab IA. Healing of Bone Fracture: General Concepts. 2012, 10.1007/978-1-4614-2059-0(Chapter 1):1-8.
- [17] Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*, 2017, 2(4):224-247.
- [18] Lee FY, Choi YW, Behrens FF et al. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res*, 1998, 16(1):144-150.
- [19] Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(9):1584-1592.
- [20] Holstein JH, Karabin-Kehl B, Scheuer C et al. Endostatin inhibits Callus remodeling during

- fracture healing in mice. *J Orthop Res*, 2013, 31(10):1579-1584.
- [21] Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P. The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *Langenbecks Arch Surg*, 2003, 388(5):316-322.
- [22] Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A et al. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2018, 28(3):351-362.
- [23] Li R, Nauth A, Li C et al. Expression of VEGF gene isoforms in a rat segmental bone defect model treated with EPCs. *J Orthop Trauma*, 2012, 26(12):689-692.
- [24] Khan SN, Cammisa FP, Jr., Sandhu HS et al. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*, 2005, 13(1):77-86.
- [25] Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*, 2001, 10 Suppl 2:S96-101.
- [26] Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*, 2012, 8(4):114-124.
- [27] Bhatt RA, Rozental TD. Bone graft substitutes. *Hand Clin*, 2012, 28(4):457-468.
- [28] Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, 84(3):454-464.
- [29] Baldwin P, Li DJ, Auston DA et al. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma*, 2019, 33(4):203-213.
- [30] Nandi SK, Roy S, Mukherjee P et al. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res*, 2010, 132:15-30.
- [31] Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G et al. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res*, 2013, 25 Suppl 1:S101-103.
- [32] Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*, 1989, 3(3):192-195.
- [33] Kovar FM, Wozasek GE. Bone graft harvesting using the RIA (reaming irrigation aspirator) system - a quantitative assessment. *Wien Klin Wochenschr*, 2011, 123(9-10):285-290.
- [34] Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG et al. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*, 2011, 42 Suppl 2:S3-15.
- [35] Sagi HC, Young ML, Gerstenfeld L et al. Qualitative and quantitative differences between bone graft obtained from the medullary canal (with a Reamer/Irrigator/Aspirator) and the iliac crest of the same patient. *J Bone Joint Surg Am*, 2012, 94(23):2128-2135.
- [36] Schmidmaier G, Herrmann S, Green J et al. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone*, 2006, 39(5):1156-1163.
- [37] Qvick LM, Ritter CA, Mutty CE et al. Donor site morbidity with reamer-irrigator-aspirator (RIA) use for autogenous bone graft harvesting in a single centre 204 case series. *Injury*, 2013, 44(10):1263-1269.
- [38] Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am*, 1999, 30(4):543-552.
- [39] Stevenson S, Horowitz M. The response to bone allografts. *J Bone Joint Surg Am*, 1992, 74(6):939-950.
- [40] Laurencin CT, Khan Y, Kofron M et al. The ABJS Nicolas Andry Award: Tissue engineering of

- bone and ligament: a 15-year perspective. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 447:221-236.
- [41] Voggenreiter G, Ascherl R, Blumel G et al. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscopic study. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1994, 113(5):294-296.
- [42] Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*, 1999, 30(4):571-581.
- [43] Xianjin, Yang, Changsheng et al. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science & Engineering, R Reports: A Review Journal*, 2014.
- [44] 曹国定. 骨缺损修复材料的研究进展. *中国骨伤*, 2021, 34(4).
- [45] Zhong L, Chen J, Ma Z et al. 3D printing of metal-organic framework incorporated porous scaffolds to promote osteogenic differentiation and bone regeneration. *Nanoscale*, 2020, 12(48):24437-24449.
- [46] Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol*, 2000, 18(1):2-9.
- [47] Jung Y, Park MS, Lee JW et al. Cartilage regeneration with highly-elastic three-dimensional scaffolds prepared from biodegradable poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone). *Biomaterials*, 2008, 29(35):4630-4636.
- [48] Bhumiratana S, Grayson WL, Castaneda A et al. Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials*, 2011, 32(11):2812-2820.
- [49] Hench LL. Biomaterials. *Science*, 1980, 208(4446):826-831.
- [50] Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108(8):1617-1633.
- [51] Kulkarni RK, Pani KC, Neuman C et al. Polylactic acid for surgical implants. *Arch Surg*, 1966, 93(5):839-843.
- [52] Shirliff VJ, Hench LL. Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair. *Journal of Materials Science*, 2003, 38(23):4697-4707.
- [53] Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*, 2006, 17(11):967-978.
- [54] Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*, 2002, 295(5557):1014-1017.
- [55] Breine U, Branemark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and preformed autologous bone grafts in combination with osseointegrated implants. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1980, 14(1):23-48.
- [56] B P, U V. In Vitro bioactivity, biocompatibility and corrosion resistance of multi-ionic (Ce/Si) co-doped hydroxyapatite porous coating on Ti-6Al-4 V for bone regeneration applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 119:111620.
- [57] van de Vijfeijken S, Munker T, Spijker R et al. Autologous Bone Is Inferior to Alloplastic Cranioplasties: Safety of Autograft and Allograft Materials for Cranioplasties, a Systematic Review. *World Neurosurg*, 2018, 117:443-452 e448.
- [58] Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials*, 2006, 27(9):1728-1734.
- [59] Wolf FI, Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium. *Mol Aspects Med*, 2003, 24(1-3):3-9.
- [60] Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med*, 2003, 24(1-3):27-37.

- [61] Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A et al. Role of magnesium ions on osteogenic response in bone marrow stromal cells. *Connect Tissue Res*, 2014, 55 Suppl 1:155-159.
- [62] Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A et al. Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomater*, 2014, 10(6):2834-2842.
- [63] Lee JW, Han HS, Han KJ et al. Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(3):716-721.
- [64] Zwingenberger S, Nich C, Valladares RD et al. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *BioDrugs*, 2012, 26(4):245-256.
- [65] Molino G, Palmieri MC, Montalbano G et al. Biomimetic and mesoporous nano-hydroxyapatite for bone tissue application: a short review. *Biomed Mater*, 2020, 15(2):022001.
- [66] Alkhraisat MH, Rueda C, Jerez LB et al. Effect of silica gel on the cohesion, properties and biological performance of brushite cement. *Acta Biomater*, 2010, 6(1):257-265.
- [67] Maestretti G, Sutter P, Monnard E et al. A prospective study of percutaneous balloon kyphoplasty with calcium phosphate cement in traumatic vertebral fractures: 10-year results. *Eur Spine J*, 2014, 23(6):1354-1360.
- [68] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 5(6):-.
- [69] Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res*, 1973, 7(3):25-42.
- [70] Abdulghani S, Mitchell GR. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules*, 2019, 9(11).
- [71] Lee KY, Jeong L, Kang YO et al. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(12):1020-1032.
- [72] Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z et al. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel)*, 2015, 8(9):5744-5794.
- [73] Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F et al. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol*, 2019, 46 Suppl 21:92-102.
- [74] Iqbal N, Khan AS, Asif A et al. Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: a critical review. *International Materials Reviews*, 2019, 64(2):91-126.
- [75] Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27(18):3413-3431.
- [76] Cheng CW, Solorio LD, Alsberg E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(2):462-484.
- [77] Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*, 2015, 23 Suppl:S17-26.
- [78] Taylor DA, Sampaio LC, Ferdous Z et al. Decellularized matrices in regenerative medicine. *Acta Biomater*, 2018, 74:74-89.
- [79] Benders KE, van Weeren PR, Badylak SF et al. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(3):169-176.
- [80] Dziki J, Badylak S, Yabroudi M et al. An acellular biologic scaffold treatment for volumetric muscle loss: results of a 13-patient cohort study. *NPJ Regen Med*, 2016, 1:16008.
- [81] Tatara AM, Mikos AG. Tissue Engineering in Orthopaedics. *J Bone Joint Surg Am*, 2016,

- 98(13):1132-1139.
- [82] Aslankooi N, Mondal D, Rizkalla AS et al. Bone Repair and Regenerative Biomaterials: Towards Recapitulating the Microenvironment. *Polymers (Basel)*, 2019, 11(9).
- [83] Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater*, 2013, 9(1):4457-4486.
- [84] 国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006—2020年). 科技促进发展, 2009(04):41.
- [85] 我国前沿技术领域科技进步与未来展望(一)——兼述《国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006—2020年)》的实施情况. 科技促进发展, 2015(06):720.
- [86] Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T et al. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. *Ann Chir Plast Esthet*, 2000, 45(3):346-353.
- [87] Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am*, 2010, 41(1):27-37; table of contents.
- [88] Giannoudis PV, Faour O, Goff T et al. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury*, 2011, 42(6):591-598.
- [89] Aho OM, Lehenkari P, Ristiniemi J et al. The mechanism of action of induced membranes in bone repair. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(7):597-604.
- [90] Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R et al. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res*, 2004, 22(1):73-79.
- [91] Gouron R, Petit L, Boudot C et al. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(2):382-389.
- [92] Cuthbert RJ, Churchman SM, Tan HB et al. Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. *Bone*, 2013, 57(2):484-492.
- [93] Liu H, Hu G, Shang P et al. Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2013, 99(8):959-964.
- [94] Henrich D, Seebach C, Nau C et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J Tissue Eng Regen Med*, 2016, 10(10):E382-E396.
- [95] Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl):S239-246.
- [96] Muscolo DL. Accurate 3-dimensional preoperative planning and resection in orthopedic oncology. *Orthopedics*, 2012, 35(1):7-8.
- [97] Muramatsu K, Ihara K, Shigetomi M et al. Femoral reconstruction by single, folded or double free vascularised fibular grafts. *Br J Plast Surg*, 2004, 57(6):550-555.
- [98] Wong TM, Lau TW, Li X et al. Masquelet technique for treatment of posttraumatic bone defects. *ScientificWorldJournal*, 2014, 2014:710302.
- [99] Karger C, Kishi T, Schneider L et al. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2012, 98(1):97-102.
- [100] Masquelet AC. The Evolution of the Induced Membrane Technique: Current Status and Future Directions. *Techniques in Orthopaedics*, 2016, 31(1):3-8.
- [101] Aronson J. Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. *J Bone Joint Surg Am*, 1997, 79(8):1243-1258.

- [102] Lewinson D, Rachmiel A, Rihani-Bisharat S et al. Stimulation of Fos- and Jun-related genes during distraction osteogenesis. *J Histochem Cytochem*, 2003, 51(9):1161-1168.
- [103] Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Relat Res*, 1989(239):263-285.
- [104] Aronson J, Harrison B, Boyd CM et al. Mechanical induction of osteogenesis: the importance of pin rigidity. *J Pediatr Orthop*, 1988, 8(4):396-401.
- [105] Aronson J, Harrison B, Boyd CM et al. Mechanical induction of Osteogenesis. Preliminary studies. *Ann Clin Lab Sci*, 1988, 18(3):195-203.
- [106] Papakostidis C, Bhandari M, Giannoudis PV. Distraction osteogenesis in the treatment of long bone defects of the lower limbs: effectiveness, complications and clinical results; a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J*, 2013, 95-B(12):1673-1680.
- [107] Chaddha M, Gulati D, Singh AP et al. Management of massive posttraumatic bone defects in the lower limb with the Ilizarov technique. *Acta Orthop Belg*, 2010, 76(6):811-820.
- [108] Palatnik Y, Rozbruch SR. Femoral reconstruction using external fixation. *Adv Orthop*, 2011, 2011:967186.
- [109] Paley D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop Relat Res*, 1990(250):81-104.
- [110] Peric Kacarevic Z, Rider P, Alkildani S et al. An introduction to bone tissue engineering. *Int J Artif Organs*, 2020, 43(2):69-86.
- [111] Skalak R, Fox CF. Tissue engineering: proceedings of a workshop, held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988. 1988.
- [112] Rider P, Kacarevic ZP, Alkildani S et al. Additive Manufacturing for Guided Bone Regeneration: A Perspective for Alveolar Ridge Augmentation. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11).
- [113] Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc*, 2016, 11(10):1775-1781.
- [114] Newsom JP, Payne KA, Krebs MD. Microgels: Modular, tunable constructs for tissue regeneration. *Acta Biomater*, 2019, 88:32-41.
- [115] Fernando WA, Papantoniou I, Mendes LF et al. Limb derived cells as a paradigm for engineering self-assembling skeletal tissues. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(3):794-807.
- [116] Nagarajan N, Dupret-Bories A, Karabulut E et al. Enabling personalized implant and controllable biosystem development through 3D printing. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(2):521-533.
- [117] Whitely M, Cereceres S, Dhavalikar P et al. Improved in situ seeding of 3D printed scaffolds using cell-releasing hydrogels. *Biomaterials*, 2018, 185:194-204.
- [118] Kluin J, Talacua H, Smits AI et al. In situ heart valve tissue engineering using a bioresorbable elastomeric implant - From material design to 12 months follow-up in sheep. *Biomaterials*, 2017, 125:101-117.
- [119] Cipitria A, Boettcher K, Schoenhals S et al. In-situ tissue regeneration through SDF-1alpha driven cell recruitment and stiffness-mediated bone regeneration in a critical-sized segmental femoral defect. *Acta Biomater*, 2017, 60:50-63.
- [120] Chen FM, Wu LA, Zhang M et al. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials*, 2011, 32(12):3189-3209.
- [121] Li Q, Ma L, Gao C. Biomaterials for in situ tissue regeneration: development and perspectives.

- J Mater Chem B, 2015, 3(46):8921-8938.
- [122] Fisher DM, Wong JM, Crowley C et al. Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: a systematic review. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013, 8(3):260-268.
- [123] Begam H, Nandi SK, Kundu B et al. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 70(Pt 1):856-869.
- [124] Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2(2-3):81-96.
- [125] Lo KW, Ulery BD, Ashe KM et al. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(12):1277-1291.
- [126] Calori GM, Donati D, Di Bella C et al. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. *Injury*, 2009, 40 Suppl 3:S67-76.
- [127] Im GI. Nonviral gene transfer strategies to promote bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(10):3009-3018.
- [128] Kofron MD, Laurencin CT. Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(4):555-576.
- [129] Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 2010, 363(4):355-364.
- [130] Gamradt SC, Lieberman JR. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(1):136-147.
- [131] Massari L, Benazzo F, Falez F et al. Biophysical stimulation of bone and cartilage: state of the art and future perspectives. *Int Orthop*, 2019, 43(3):539-551.
- [132] Li M, Fuchs S, Bose T et al. Mild heat stress enhances angiogenesis in a co-culture system consisting of primary human osteoblasts and outgrowth endothelial cells. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 20(4):328-339.
- [133] Ramani-Mohan RK, Schwedhelm I, Finne-Wistrand A et al. Deformation strain is the main physical driver for skeletal precursors to undergo osteogenesis in earlier stages of osteogenic cell maturation. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(3):e1474-e1479.
- [134] Carina V, Costa V, Raimondi L et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on osteogenic human mesenchymal stem cells commitment in a new bone scaffold. *J Appl Biomater Funct Mater*, 2017, 15(3):e215-e222.
- [135] Clark CC, Wang W, Brighton CT. Up-regulation of expression of selected genes in human bone cells with specific capacitively coupled electric fields. *J Orthop Res*, 2014, 32(7):894-903.
- [136] Zhou J, Wang JQ, Ge BF et al. Different electromagnetic field waveforms have different effects on proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts in vitro. *Bioelectromagnetics*, 2014, 35(1):30-38.
- [137] Brighton CT, Okereke E, Pollack SR et al. In vitro bone-cell response to a capacitively coupled electrical field. The role of field strength, pulse pattern, and duty cycle. *Clin Orthop Relat Res*, 1992(285):255-262.
- [138] De Mattei M, Caruso A, Traina GC et al. Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro. *Bioelectromagnetics*, 1999, 20(3):177-182.
- [139] Leung KS, Cheung WH, Zhang C et al. Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(418):253-259.

- [140] Park HG, Han SI, Oh SY et al. Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(1):10-23.
- [141] Harder Y, Contaldo C, Klenk J et al. Improved skin flap survival after local heat preconditioning in pigs. *J Surg Res*, 2004, 119(1):100-105.
- [142] Riederer I, Negroni E, Bigot A et al. Heat shock treatment increases engraftment of transplanted human myoblasts into immunodeficient mice. *Transplant Proc*, 2008, 40(2):624-630.
- [143] Ogawa H. [Effects of the localized thermal enhancement on new bone formation following mechanical expansion of the rat sagittal suture]. *Nihon Kyosei Shika Gakkai Zasshi*, 1990, 49(6):485-496.
- [144] Gong B, Asimakis GK, Chen Z et al. Whole-body hyperthermia induces up-regulation of vascular endothelial growth factor accompanied by neovascularization in cardiac tissue. *Life Sci*, 2006, 79(19):1781-1788.
- [145] Shui C, Scutt A. Mild heat shock induces proliferation, alkaline phosphatase activity, and mineralization in human bone marrow stromal cells and Mg-63 cells in vitro. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(4):731-741.
- [146] Ye CP, Heng BC, Liu H et al. Culture media conditioned by heat-shocked osteoblasts enhances the osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cell Biochem Funct*, 2007, 25(3):267-276.
- [147] Serrat MA, Schlierf TJ, Efaw ML et al. Unilateral heat accelerates bone elongation and lengthens extremities of growing mice. *J Orthop Res*, 2015, 33(5):692-698.
- [148] Weber JB, Pinheiro AL, de Oliveira MG et al. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg*, 2006, 24(1):38-44.
- [149] Patrick DR, Martine C. The Etymology of The Mineral Name "Apatite": A Clarification. *Irish Journal of Earth Sciences*, 2015, 33:71-75.
- [150] de Jong WF. La Substance Minérale Dans les Os. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1926, 45(6):445-448.
- [151] Albee FH. Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. *Ann Surg*, 1920, 71(1):32-39.
- [152] Ferraz MP, Monteiro FJ, Manuel CM. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. *J Appl Biomater Biomech*, 2004, 2(2):74-80.
- [153] Bouyer E, Gitzhofer F, Boulos MI. Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. *J Mater Sci Mater Med*, 2000, 11(8):523-531.
- [154] Khalid H, Chaudhry AA: 4 - Basics of hydroxyapatite—structure, synthesis, properties, and clinical applications. In: *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites*. edn. Edited by Khan AS, Chaudhry AA: Woodhead Publishing; 2020: 85-115.
- [155] Banglmaier RF, Sander EA, VandeVord PJ. Induction and quantification of collagen fiber alignment in a three-dimensional hydroxyapatite-collagen composite scaffold. *Acta Biomater*, 2015, 17:26-35.
- [156] Ding GJ, Zhu YJ, Qi C et al. Yolk-Shell Porous Microspheres of Calcium Phosphate Prepared by Using Calcium L-Lactate and Adenosine 5'-Triphosphate Disodium Salt: Application in Protein/Drug Delivery. *Chemistry*, 2015, 21(27):9868-9876.
- [157] Jeong J, Kim JH, Shim JH et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res*, 2019, 23:4.



- [158] Liu D, Genetos DC, Shao Y et al. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca(2+)- and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone*, 2008, 42(4):644-652.
- [159] Kuroda Y, Hisatsune C, Nakamura T et al. Osteoblasts induce Ca<sup>2+</sup> oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(25):8643-8648.
- [160] Mozar A, Haren N, Chasseraud M et al. High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK-RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*, 2008, 215(1):47-54.
- [161] dos Santos EA, Farina M, Soares GA et al. Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(6):2307-2316.
- [162] Zhu XD, Zhang HJ, Fan HS et al. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. *Acta Biomater*, 2010, 6(4):1536-1541.
- [163] Lim JY, Liu X, Vogler EA et al. Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 68(3):504-512.
- [164] Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel)*, 2017, 10(4).
- [165] Prihanto A, Fitriyana DF, Muryanto S et al. Aqueous crystallization of monocalcium phosphate monohydrate with green mussel shells (*Verna piriadis*) for calcium sources. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(6):106913.
- [166] Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41(17):3130-3146.
- [167] Han B, Ma PW, Zhang LL et al. beta-TCP/MCPM-based premixed calcium phosphate cements. *Acta Biomater*, 2009, 5(8):3165-3177.
- [168] Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*, 2009, 2(2).
- [169] Rey C, Combes C, Drouet C et al. *Bioactive Ceramics: Physical Chemistry*. 2011.
- [170] Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in dentistry. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24(6):1335-1363.
- [171] Yamamoto H, Niwa S, Hori M et al. Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro. *Biomaterials*, 1998, 19(17):1587-1591.
- [172] Constantz BR, Barr BM, Ison IC et al. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res*, 1998, 43(4):451-461.
- [173] LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci*, 1991, 15:1-201.
- [174] Heughebaert JC, Zawacki SJ, Nancollas GH. The growth of octacalcium phosphate on beta tricalcium phosphate. *Journal of Crystal Growth*, 1983, 63:83-90.
- [175] Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*, 2009, 2(2):399-498.
- [176] Tao JH, Pan HH, Zhai HL et al. Controls of Tricalcium Phosphate Single-Crystal Formation from Its Amorphous Precursor by Interfacial Energy. *Crystal Growth & Design*, 2009, 9(7):3154-3160.
- [177] Yin XL, Stott MJ, Rubio A. alpha- and beta-tricalcium phosphate: A density functional study. *Physical Review B*, 2003, 68(20).

- [178] Durucan C, Brown PW. alpha-Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *J Mater Sci Mater Med*, 2000, 11(6):365-371.
- [179] TenHuisen KS, Brown PW. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite from alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 1998, 19(23):2209-2217.
- [180] Mestres G, Le Van C, Ginebra MP. Silicon-stabilized alpha-tricalcium phosphate and its use in a calcium phosphate cement: characterization and cell response. *Acta Biomater*, 2012, 8(3):1169-1179.
- [181] Honda M, Kawanobe Y, Nagata K et al. Bactericidal and Bioresorbable Calcium Phosphate Cements Fabricated by Silver-Containing Tricalcium Phosphate Microspheres. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11).
- [182] Horch HH, Sader R, Pautke C et al. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2006, 35(8):708-713.
- [183] Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl*, 2008, 23(3):197-212.
- [184] Liu HY, Cai Q, Lian PF et al. beta-tricalcium phosphate nanoparticles adhered carbon nanofibrous membrane for human osteoblasts cell culture. *Materials Letters*, 2010, 64(6):725-728.
- [185] Moseke C, Gbureck U. Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater*, 2010, 6(10):3815-3823.
- [186] Thein-Han W, Liu J, Xu HH. Calcium phosphate cement with biofunctional agents and stem cell seeding for dental and craniofacial bone repair. *Dent Mater*, 2012, 28(10):1059-1070.
- [187] Xu HH, Weir MD, Sun L. Calcium and phosphate ion releasing composite: effect of pH on release and mechanical properties. *Dent Mater*, 2009, 25(4):535-542.
- [188] Yoshikawa M, Hayami S, Tsuji I et al. Histopathological study of a newly developed root canal sealer containing tetracalcium-dicalcium phosphates and 1.0% chondroitin sulfate. *J Endod*, 1997, 23(3):162-166.
- [189] Suzuki O: 1 - Evolution of octacalcium phosphate biomaterials. In: *Octacalcium Phosphate Biomaterials*. edn. Edited by Suzuki O, Insley G: Woodhead Publishing; 2020: 1-15.
- [190] Kovrlija I, Locs J, Loca D. Octacalcium phosphate: Innovative vehicle for the local biologically active substance delivery in bone regeneration. *Acta Biomater*, 2021, 135:27-47.
- [191] Arellano-Jimenez MJ, Garcia-Garcia R, Reyes-Gasga J. Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 2009, 70(2):390-395.
- [192] Suzuki O. Octacalcium phosphate: osteoconductivity and crystal chemistry. *Acta Biomater*, 2010, 6(9):3379-3387.
- [193] Sugiura Y, Munar ML, Ishikawa K. Fabrication of octacalcium phosphate block through a dissolution-precipitation reaction using a calcium sulphate hemihydrate block as a precursor. *J Mater Sci Mater Med*, 2018, 29(10):151.
- [194] Imamura Y, Tanaka Y, Nagai A et al. Self-sealing ability of OCP-mediated cement as a deciduous root canal filling materia. *Dent Mater J*, 2010, 29(5):582-588.
- [195] Yang Y, Wang H, Yan FY et al. Bioinspired porous octacalcium phosphate/silk fibroin composite coating materials prepared by electrochemical deposition. *ACS Appl Mater Interfaces*,

- 2015, 7(10):5634-5642.
- [196] Kamakura S, Sasaki K, Honda Y et al. Octacalcium phosphate combined with collagen orthotopically enhances bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2006, 79(2):210-217.
- [197] Kawai T, Anada T, Honda Y et al. Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(1):23-32.
- [198] Suzuki O, Nakamura M, Miyasaka Y et al. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *Tohoku J Exp Med*, 1991, 164(1):37-50.
- [199] Suzuki O, Nakamura M, Miyasaka Y et al. Maclura pomifera agglutinin-binding glycoconjugates on converted apatite from synthetic octacalcium phosphate implanted into subperiosteal region of mouse calvaria. *Bone Miner*, 1993, 20(2):151-166.
- [200] Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T et al. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials*, 2006, 27(13):2671-2681.
- [201] Kikawa T, Kashimoto O, Imaizumi H et al. Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant. *Acta Biomater*, 2009, 5(5):1756-1766.
- [202] Miyatake N, Kishimoto KN, Anada T et al. Effect of partial hydrolysis of octacalcium phosphate on its osteoconductive characteristics. *Biomaterials*, 2009, 30(6):1005-1014.
- [203] Honda Y, Anada T, Kamakura S et al. The effect of microstructure of octacalcium phosphate on the bone regenerative property. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(8):1965-1973.
- [204] Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 2001, 10 Suppl 2:S86-95.
- [205] Markovic M, Fowler BO, Tung MS. Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material. *J Res Natl Inst Stand Technol*, 2004, 109(6):553-568.
- [206] White TJ, ZhiLi D. Structural derivation and crystal chemistry of apatites. *Acta Crystallogr B*, 2003, 59(Pt 1):1-16.
- [207] Manjubala I, Sastry TP, Kumar RV. Bone in-growth induced by biphasic calcium phosphate ceramic in femoral defect of dogs. *J Biomater Appl*, 2005, 19(4):341-360.
- [208] Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*, 1998, 13(1):94-117.
- [209] Weiner S. Transient precursor strategy in mineral formation of bone. *Bone*, 2006, 39(3):431-433.
- [210] Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater*, 2013, 9(9):8037-8045.
- [211] Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Compos Sci Technol*, 2005, 65(15-16):2385-2406.
- [212] Darimont GL, Cloots R, Heinen E et al. In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: a quantitative study in the rabbit. *Biomaterials*, 2002, 23(12):2569-2575.
- [213] Albrektsson T. Hydroxyapatite-coated implants: a case against their use. *J Oral Maxillofac Surg*, 1998, 56(11):1312-1326.
- [214] Besinis A, van Noort R, Martin N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dent Mater*, 2012, 28(9):1012-1023.

- [215] Palazzo B, Sidoti MC, Roveri N et al. Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: An experimental and theoretical approach. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 2005, 25(2):207-213.
- [216] Ye F, Guo H, Zhang H et al. Polymeric micelle-templated synthesis of hydroxyapatite hollow nanoparticles for a drug delivery system. *Acta Biomater*, 2010, 6(6):2212-2218.
- [217] Ching WY, Rulis P, Misra A. Ab initio elastic properties and tensile strength of crystalline hydroxyapatite. *Acta Biomater*, 2009, 5(8):3067-3075.
- [218] Calderin L, Stott MJ, Rubio A. Electronic and crystallographic structure of apatites. *Phys Rev B*, 2003, 67(13).
- [219] Ellinger RF, Nery EB, Lynch KL. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1986, 6(3):22-33.
- [220] Dorozhkin SV. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomater*, 2012, 8(3):963-977.
- [221] Bouler JM, Pilet P, Gauthier O et al. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomater*, 2017, 53:1-12.
- [222] Arinzeh TL, Tran T, McAlary J et al. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*, 2005, 26(17):3631-3638.
- [223] Ramay HR, Zhang M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2004, 25(21):5171-5180.
- [224] Liou SC, Chen SY, Lee HY et al. Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders. *Biomaterials*, 2004, 25(2):189-196.
- [225] LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R et al. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med*, 2003, 14(3):201-209.
- [226] Watering FJ, Beucken JJPvd, Lanao R et al. *Biodegradation of Calcium Phosphate Cement Composites*. Springer New York, 2012.
- [227] Rey C, Combes C, Drouet C et al. Chemical Diversity of Apatites. *Advances in Science and Technology*, 2006, 49:27-36.
- [228] Omelon SJ, Grynblas MD. Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization. *Chem Rev*, 2008, 108(11):4694-4715.
- [229] Eanes ED, Gillessen IH, Posner AS. Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. *Nature*, 1965, 208(5008):365-367.
- [230] Brecevic L, Furedi-Milhofer H. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions. II. The formation and transformation of the precipitates. *Calcif Tissue Res*, 1972, 10(1):82-90.
- [231] Glimcher MJ, Muir H. Recent Studies of the Mineral Phase in Bone and Its Possible Linkage to the Organic Matrix by Protein-Bound Phosphate Bonds [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1984, 304(1121):479-508.
- [232] Wang L, Nancollas GH. Pathways to biomineralization and biodegradation of calcium phosphates: The thermodynamic and kinetic controls. *Dalton T*, 2009(15):2665-2672.
- [233] Eanes ED, Termine JD, Nysten MU. An electron microscopic study of the formation of amorphous calcium phosphate and its transformation to crystalline apatite. *Calcified Tissue Research*, 1973, 12(1):143-158.

- [234] LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monographs in oral science, 1991, 15:1-201.
- [235] Elliott JCJSiC. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. 1994, 18:213-234.
- [236] O'Neill WC. The fallacy of the calcium-phosphorus product. *Kidney International*, 2007, 72(7):792-796.
- [237] Harper RA, Posner ASJPSEBM. Measurement of non-crystalline calcium phosphate in bone mineral. 1966, 122(1):137-142.
- [238] Posner AS, Research FBJAoC. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. 1974, 8(8):273-281.
- [239] Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 2006, 27(14):2798-2805.
- [240] Jie Z, Yu L, Sun WB et al. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chemistry Central Journal*, 2011, 5(1):40.
- [241] Composites of amorphous calcium phosphate and poly(hydroxybutyrate) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) for bone substitution: assessment of the biocompatibility %J *Journal of Materials Science*. 2006, 41(15):4806-4813.
- [242] Gbureck, Uwe, Barralet et al. Amorphous  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate: Preparation and Aqueous Setting Reaction. *Journal of the American Ceramic Society*, 2004.
- [243] Melero-Martin JM, Dowling MA, Smith M et al. Expansion of chondroprogenitor cells on macroporous microcarriers as an alternative to conventional monolayer systems. *Biomaterials*, 2006, 27(15):2970-2979.
- [244] Stéphane GL, Lim RM, Shoichet MS. Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications. *Biomaterials*, 2005, 26(35):7436-7446.
- [245] Uskokovic V, Uskokovic DP. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011, 96(1):152-191.
- [246] Betts F, Blumenthal NC, Posner AS. Bone mineralization. *Journal of Crystal Growth*, 1981, 53(1):63-73.
- [247] Barakat NAM, Khalil KA, Sheikh FA et al. Physicochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: Extraction of biologically desirable HAp. *Mat Sci Eng C-Bio S*, 2008, 28(8):1381-1387.
- [248] Arsenault AL. Crystal-collagen relationships in calcified turkey leg tendons visualized by selected-area dark field electron microscopy. *Calcif Tissue Int*, 1988, 43(4):202-212.
- [249] Li B, Chen X, Guo B et al. Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure. *Acta Biomater*, 2009, 5(1):134-143.
- [250] Zhou WY, Wang M, Cheung WL et al. Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanospheres through nanoemulsion. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(1):103-110.
- [251] Rajabi-Zamani AH, Behnamghader A, Kazemzadeh A. Synthesis of nanocrystalline carbonated hydroxyapatite powder via nonalkoxide sol-gel method. *Mat Sci Eng C-Bio S*, 2008, 28(8):1326-1329.
- [252] Lemos AF, Rocha JHG, Quaresma SSF et al. Hydroxyapatite nano-powders produced

- hydrothermally from nacreous material. *J Eur Ceram Soc*, 2006, 26(16):3639-3646.
- [253] Aizawa M, Porter AE, Best SM et al. Ultrastructural observation of single-crystal apatite fibres. *Biomaterials*, 2005, 26(17):3427-3433.
- [254] Buerlein, Edmund. Handbook of Biomineralization || Model Systems for Formation and Dissolution of Calcium Phosphate Minerals. 2007, 10.1002/9783527619443:135-157.
- [255] Cai YR, Liu YK, Yan WQ et al. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *J Mater Chem*, 2007, 17(36):3780-3787.
- [256] Perkin KK, Turner JL, Wooley KL et al. Fabrication of hybrid nanocapsules by calcium phosphate mineralization of shell cross-linked polymer micelles and nanocages. *Nano Lett*, 2005, 5(7):1457-1461.
- [257] Shchukin DG, Sukhorukov GB, Mohwald H. Biomimetic fabrication of nanoengineered hydroxyapatite/polyelectrolyte composite shell. *Chem Mater*, 2003, 15(20):3947-3950.
- [258] Huang FZ, Shen YH, Xie AJ et al. Study on synthesis and properties of hydroxyapatite nanorods and its complex containing biopolymer. *J Mater Sci*, 2007, 42(20):8599-8605.
- [259] Wang AL, Liu D, Yin HB et al. Size-controlled synthesis of hydroxyapatite nanorods by chemical precipitation in the presence of organic modifiers. *Mat Sci Eng C-Bio S*, 2007, 27(4):865-869.
- [260] Stupp SI, Braun PV. Molecular manipulation of microstructures: biomaterials, ceramics, and semiconductors. *Science*, 1997, 277(5330):1242-1248.
- [261] Chung SY, Kim YM, Kim JG et al. Multiphase transformation and Ostwald's rule of stages during crystallization of a metal phosphate. *Nat Phys*, 2009, 5(1):68-73.
- [262] Zhang YG, Zhu YJ, Chen F et al. Ultralong hydroxyapatite microtubes: solvothermal synthesis and application in drug loading and sustained drug release. *Crystengcomm*, 2017, 19(14):1965-1973.
- [263] Szczes A, Holysz L, Chibowski E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 249:321-330.
- [264] Motskin M, Wright DM, Muller K et al. Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials*, 2009, 30(19):3307-3317.
- [265] Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*, 2009, 30(4):478-483.
- [266] Bakhtiari L, Javadpour J, Rezaie HR et al. Pore size control in the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles: The effect of pore expander content and the synthesis temperature. *Ceram Int*, 2016, 42(9):11259-11264.
- [267] Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(33):11613-11618.
- [268] Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett*, 2007, 7(6):1542-1550.
- [269] Liu Y, Lim J, Teoh SH. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(5):688-705.
- [270] Van Den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*, 2000, 1(1):31-38.
- [271] Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 2015, 73:254-271.
- [272] Gorgieva S, Kokol V. Collagen-vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility:

- Review and Perspectives. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, 2011:17-52.
- [273] Maurer PH. II. Antigenicity of gelatin in rabbits and other species. *J Exp Med*, 1954, 100(5):515-523.
- [274] Liu Y, Chan-Park MB. A biomimetic hydrogel based on methacrylated dextran-graft-lysine and gelatin for 3D smooth muscle cell culture. *Biomaterials*, 2010, 31(6):1158-1170.
- [275] Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2002, 37(6):375-536.
- [276] Vlierberghe SV, Cnudde V, Dubruel P et al. Porous gelatin hydrogels: 1. Cryogenic formation and structure analysis. *Biomacromolecules*, 2007, 8(2):331-337.
- [277] Kilic Bektas C, Hasirci V. Cell loaded 3D bioprinted GelMA hydrogels for corneal stroma engineering. *Biomater Sci*, 2019, 8(1):438-449.
- [278] Gan D, Xu T, Xing W et al. Mussel-inspired dopamine oligomer intercalated tough and resilient gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels for cartilage regeneration. *J Mater Chem B*, 2019, 7(10):1716-1725.
- [279] Zhang YG, Zhu YJ, Chen F et al. Biocompatible, Ultralight, Strong Hydroxyapatite Networks Based on Hydroxyapatite Microtubes with Excellent Permeability and Ultralow Thermal Conductivity. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(9):7918-7928.
- [280] Donghyun, Lee, Eun et al. Injectable biodegradable gelatin-methacrylate/ $\beta$  - tricalcium phosphate composite for the repair of bone defects. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 365:30-39.
- [281] Lee D, Heo DN, Nah HR et al. Injectable hydrogel composite containing modified gold nanoparticles: implication in bone tissue regeneration. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13:7019-7031.
- [282] Shin H, Olsen BD, Khademhosseini A. The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials*, 2012, 33(11):3143-3152.
- [283] Zuo Y, Liu X, Wei D et al. Photo-cross-linkable methacrylated gelatin and hydroxyapatite hybrid hydrogel for modularly engineering biomimetic osteon. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(19):10386-10394.
- [284] Wang Z, Abdulla R, Parker B et al. A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks. *Biofabrication*, 2015, 7(4):045009.
- [285] Colosi C, Shin SR, Manoharan V et al. Microfluidic Bioprinting of Heterogeneous 3D Tissue Constructs Using Low-Viscosity Bioink. *Adv Mater*, 2016, 28(4):677-684.
- [286] Donghyun, Lee, Eun et al. Injectable biodegradable gelatin-methacrylate/ $\beta$  - tricalcium phosphate composite for the repair of bone defects. *Chemical Engineering Journal*, 2019.
- [287] Sun CK, Weng PW, Chang JZ et al. Metformin-Incorporated Gelatin/Hydroxyapatite Nanofiber Scaffold for Bone Regeneration. *Tissue Eng Part A*, 2021.
- [288] Gu L, Zhang J, Li L et al. Hydroxyapatite nanowire composited gelatin cryogel with improved mechanical properties and cell migration for bone regeneration. *Biomed Mater*, 2019, 14(4):045001.
- [289] Levingstone TJ, Herbaj S, Dunne NJ. Calcium Phosphate Nanoparticles for Therapeutic Applications in Bone Regeneration. *Nanomaterials (Basel)*, 2019, 9(11).
- [290] Zhao Y, Cui Z, Liu B et al. An Injectable Strong Hydrogel for Bone Reconstruction. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(17):e1900709.

- [291] Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K et al. Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:786892.
- [292] Velasco-Rodriguez B, Diaz-Vidal T, Rosales-Rivera LC et al. Hybrid Methacrylated Gelatin and Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. Preparation and Systematic Characterization for Prospective Tissue Engineering Applications. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13).
- [293] Kirsten A, Hausmann A, Weber M et al. Bioactive and thermally compatible glass coating on zirconia dental implants. *J Dent Res*, 2015, 94(2):297-303.
- [294] He M, Hou Y, Zhu C et al. 3D-Printing Biodegradable PU/PAAM/Gel Hydrogel Scaffold with High Flexibility and Self-Adaptability to Irregular Defects for Nonload-Bearing Bone Regeneration. *Bioconjug Chem*, 2021, 32(8):1915-1925.
- [295] Toledano M, Vallecillo-Rivas M, Osorio MT et al. Zn-Containing Membranes for Guided Bone Regeneration in Dentistry. *Polymers (Basel)*, 2021, 13(11).
- [296] Isobe Y, Koyama N, Nakao K et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2016, 45(1):124-131.
- [297] Reible B, Schmidmaier G, Moghaddam A et al. Insulin-Like Growth Factor-1 as a Possible Alternative to Bone Morphogenetic Protein-7 to Induce Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6).
- [298] Shih YR, Hwang Y, Phadke A et al. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(3):990-995.
- [299] Reznikov N, Hoac B, Buss DJ et al. Biological stenciling of mineralization in the skeleton: Local enzymatic removal of inhibitors in the extracellular matrix. *Bone*, 2020, 138:115447.
- [300] Amiryaghoubi N, Fathi M, Pesyan NN et al. Bioactive polymeric scaffolds for osteogenic repair and bone regenerative medicine. *Med Res Rev*, 2020, 40(5):1833-1870.
- [301] Qiao Y, Zhang W, Tian P et al. Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials. *Biomaterials*, 2014, 35(25):6882-6897.
- [302] Assmann A, Vegh A, Ghasemi-Rad M et al. A highly adhesive and naturally derived sealant. *Biomaterials*, 2017, 140:115-127.
- [303] Yang Y, Xu T, Zhang Q et al. Biomimetic, Stiff, and Adhesive Periosteum with Osteogenic-Angiogenic Coupling Effect for Bone Regeneration. *Small*, 2021, 17(14):e2006598.
- [304] Tanaka M. Design of novel 2D and 3D biointerfaces using self-organization to control cell behavior. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810(3):251-258.
- [305] Xu D, Wan Y, Li Z et al. Tailorable hierarchical structures of biomimetic hydroxyapatite micro/nano particles promoting endocytosis and osteogenic differentiation of stem cells. *Biomater Sci*, 2020, 8(12):3286-3300.
- [306] Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR et al. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(9):1706-1715.
- [307] Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 2016, 82:42-49.
- [308] Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res*, 2011, 109(5):564-577.



- [309] Gaharwar AK, Singh I, Khademhosseini A. Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. *Nature Reviews Materials*, 2020:1-20.
- [310] Schellenberg A, Jousseaume S, Moser K et al. Matrix elasticity, replicative senescence and DNA methylation patterns of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2014, 35(24):6351-6358.
- [311] Mygind T, Stiehler M, Baatrup A et al. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*, 2007, 28(6):1036-1047.
- [312] Gerdes HH, Carvalho RN. Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(4):470-475.
- [313] Curry AS, Pensa NW, Barlow AM et al. Taking cues from the extracellular matrix to design bone-mimetic regenerative scaffolds. *Matrix Biol*, 2016, 52-54:397-412.
- [314] Chai YC, Carlier A, Bolander J et al. Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. *Acta Biomater*, 2012, 8(11):3876-3887.
- [315] Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis--a review. *Acta Biomater*, 2014, 10(2):557-579.
- [316] Kane RJ, Weiss-Bilka HE, Meagher MJ et al. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. *Acta Biomater*, 2015, 17:16-25.
- [317] Peng XY, Hu M, Liao F et al. La-Doped mesoporous calcium silicate/chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomater Sci*, 2019, 7(4):1565-1573.
- [318] He J, Hu X, Cao J et al. Chitosan-coated hydroxyapatite and drug-loaded poly(trimethylene carbonate)/poly(lactic acid) scaffold for enhancing bone regeneration. *Carbohydr Polym*, 2021, 253:117198.
- [319] Qu M, Wang C, Zhou X et al. Multi-Dimensional Printing for Bone Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(11):e2001986.
- [320] Ww A, Bzb C, MI A et al. 3D printing of PLA/n-HA composite scaffolds with customized mechanical properties and biological functions for bone tissue engineering. *Composites Part B: Engineering*, 2021.
- [321] 郑雪花. 没食子酸药理作用的研究进展. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(1).
- [322] Abdou EM, Masoud MM. Gallic acid-PAMAM and gallic acid-phospholipid conjugates, physicochemical characterization and in vivo evaluation. *Pharm Dev Technol*, 2018, 23(1):55-66.
- [323] Nouri A, Heibati F, Heidarian E. Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(1):1-9.
- [324] Bai J, Zhang Y, Tang C et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133:110985.
- [325] Tanaka M, Sato A, Kishimoto Y et al. Gallic Acid Inhibits Lipid Accumulation via AMPK Pathway and Suppresses Apoptosis and Macrophage-Mediated Inflammation in Hepatocytes. *Nutrients*, 2020, 12(5).
- [326] Ahn CB, Jung WK, Park SJ et al. Gallic Acid-g-Chitosan Modulates Inflammatory Responses in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells Via NF-kappaB, AP-1, and MAPK Pathways. *Inflammation*, 2016, 39(1):366-374.
- [327] Su TR, Lin JJ, Tsai CC et al. Inhibition of melanogenesis by gallic acid: possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/beta-catenin signaling pathways in B16F10 cells. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(10):20443-20458.

- [328] Cheng Y, Li X, Tse HF et al. Gallic Acid-L-Leucine Conjugate Protects Mice against LPS-Induced Inflammation and Sepsis via Correcting Proinflammatory Lipid Mediator Profiles and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:1081287.
- [329] Jin S-S, He D-Q, Luo D et al. A Biomimetic Hierarchical Nanointerface Orchestrates Macrophage Polarization and Mesenchymal Stem Cell Recruitment To Promote Endogenous Bone Regeneration. *Acs Nano*, 2019, 13(6):6581-6595.
- [330] Wang Y, Wan C, Deng L et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*, 2007, 117(6):1616-1626.
- [331] West XZ, Malinin NL, Merkulova AA et al. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature*, 2010, 467(7318):972-976.
- [332] Tong L, Liao Q, Zhao Y et al. Near-infrared light control of bone regeneration with biodegradable photothermal osteoimplant. *Biomaterials*, 2019, 193:1-11.
- [333] Kurapati R, Kostarelos K, Prato M et al. Biomedical Uses for 2D Materials Beyond Graphene: Current Advances and Challenges Ahead. *Adv Mater*, 2017, 29(4).
- [334] Chen X, Zhu P, Liu B et al. Simultaneous determination of fourteen compounds of *Hedyotis diffusa* Willd extract in rats by UHPLC-MS/MS method: Application to pharmacokinetics and tissue distribution study. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 159:490-512.
- [335] Wei L, Zhu P, Chen X et al. An ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of thirteen components extracted from *Radix Puerariae* in rat plasma and tissues: Application to pharmacokinetic and tissue distribution study. *J Sep Sci*, 2020, 43(2):418-437.
- [336] Li Y, Yang Q, Shi ZH et al. The Anti-Inflammatory Effect of Feiyangchangweiyan Capsule and Its Main Components on Pelvic Inflammatory Disease in Rats via the Regulation of the NF-kappaB and BAX/BCL-2 Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019:9585727.
- [337] Variya BC, Bakrania AK, Madan P et al. Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2019, 101:71-78.
- [338] Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*, 2011, 42(6):551-555.
- [339] Recknagel S, Bindl R, Brochhausen C et al. Systemic inflammation induced by a thoracic trauma alters the cellular composition of the early fracture callus. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013, 74(2):531-537.
- [340] Hurtgen BJ, Ward CL, Garg K et al. Severe muscle trauma triggers heightened and prolonged local musculoskeletal inflammation and impairs adjacent tibia fracture healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2016, 16(2):122-134.
- [341] Newman H, Shih YV, Varghese S. Resolution of inflammation in bone regeneration: From understandings to therapeutic applications. *Biomaterials*, 2021, 277:121114.
- [342] Liu YL, Hsu CC, Huang HJ et al. Gallic Acid Attenuated LPS-Induced Neuroinflammation: Protein Aggregation and Necroptosis. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(1):96-104.
- [343] Yu YY, Cui SC, Zheng TN et al. Sarsasapogenin improves adipose tissue inflammation and ameliorates insulin resistance in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(2):272-281.
- [344] Jiang DX, Zhang MH, Zhang Q et al. Influence of gallic acid on porcine neutrophils phosphodiesterase 4, IL-6, TNF-alpha and rat arthritis model. *J Integr Agr*, 2015, 14(4):758-764.