

研究论文

DOI: 10.15541/jim20250433

葛根素/介孔生物活性玻璃复合材料的制备及 体外协同促成骨作用研究

徐 铭^{1,2}, 王元非³, 吴 桐^{1,2}

(1. 青岛大学纺织服装学院 山东省医疗健康纺织材料重点实验室, 青岛 266071; 2. 青岛大学 青岛大学附属医院医学研究中心, 青岛 266000; 3. 青岛大学附属青岛市口腔医院, 青岛 266001)

摘 要: 由创伤、感染或骨质疏松引起的骨缺损是临床重大挑战, 开发能够有效促进骨组织再生的生物活性材料尤为重要。而骨组织再生是一个极为复杂、受多因素影响的过程, 现有骨生物材料均只关注有限因素的作用, 迫切需要创制能协同促成骨作用的新形复合材料。本研究通过溶胶-凝胶法制备了介孔生物活性玻璃 (MBG), 并通过物理吸附方法构建了负载葛根素 (Pue) 的 Pue/MBG 复合材料。研究发现, 所制备的 MBG 具有较高的比表面积和有序介孔结构, 成功实现了 Pue 的负载和缓释。体外实验结果表明, Pue/MBG 复合材料能有效促进小鼠胚胎前成骨细胞和大鼠骨髓间充质干细胞的增殖, 同时增强其成骨分化能力, 具体表现为, 早期碱性磷酸酶活性的提高和晚期矿化结节形成的增强, 并显示介孔生物活性玻璃与葛根素对成骨分化的协同作用。综上, 本研究成功制备了一种基于 Pue 与 MBG 协同作用的高效骨修复复合材料, 其良好的成骨能力在骨组织工程中具有良好应用前景。

关 键 词: 介孔生物活性玻璃; 葛根素; 成骨分化; 缓释; 生物相容性

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

Puerarin/Mesoporous Bioactive Glass Composites: Preparation and *In Vitro* Synergistic Osteogenic-promotion

XU Ming^{1,2}, WANG Yuanfei³, WU Tong^{1,2}

(1. Shandong Key Laboratory of Medical and Health Textile Materials, College of Textiles and Clothing, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. Medical Research Center, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao University, Qingdao 266000, China; 3. Qingdao Stomatological Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266001, China)

Abstract: Bone defects caused by trauma, infection, or osteoporosis pose significant clinical challenges. Developing bioactive materials to effectively promote bone regeneration is particularly important. However, osteogenesis is a complex process influenced by multiple factors. Existing bone biomaterials only focus on the effects of limited factors, leading to an urgent need to develop novel composite materials that can synergistically promote osteogenesis. In this study, mesoporous bioactive glass (MBG) was prepared *via* sol-gel method, and puerarin (Pue)-loaded MBG composites (Pue/MBG) were constructed through physical adsorption. The results show that the prepared MBG exhibits high specific surface area and ordered mesoporous structure, successfully achieving Pue loading and sustained release. *In vitro* experiments demonstrate that Pue/MBG composites effectively promote the proliferation of mouse embryonic osteoblast precursor cells and bone mesenchymal stem cells, while enhancing their osteogenic differentiation capabilities. This is evidenced by increased early-stage alkaline phosphatase activity and enhanced late-stage mineralization nodule formation, showing synergistic effect of Pue and MBG. In conclusion, this study successfully develops an efficient bone-repair composite material based on the synergistic effect of Pue and MBG, exhibiting excellent osteogenic capacity and promising applications in bone tissue engineering.

收稿日期: 2025-10-30; 收到修改稿日期: 2025-11-24; 网上出版日期: 2026-xx-xx

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2024MH163), “纺织之光”中国纺织工业联合会应用基础研究项目 (J202404)

Natural Science Foundation of Shandong (ZR2024MH163), “Textile Light” of China Textile Industry Federation Applied Basic Research Project (J202404)

作者简介: 徐 铭(1998-), 男, 博士研究生. E-mail: xumingmed@163.com

XU Ming (1998-), Male, PhD candidate. E-mail: xumingmed@163.com

通信作者: 吴 桐, 教授. E-mail: tongwu24@163.com

WU Tong, Professor. E-mail: tongwu24@163.com

Key words: mesoporous bioactive glass; puerarin; osteogenic differentiation; sustained-release; biocompatibility

由创伤、肿瘤或骨质疏松等原因导致的骨缺损是临床面临的重大挑战,严重影响患者生活质量并带来沉重的社会经济负担^[1,2]。自体骨移植虽被视为临床治疗的“金标准”,但来源有限且存在二次手术等问题;而异体骨移植存在免疫排斥和疾病传播等风险^[3]。因此,开发生物活性骨修复材料是骨组织工程领域的核心研究方向之一。

在众多生物材料中,介孔生物活性玻璃(Mesoporous Bioactive Glass, MBG)具有高度有序的纳米介孔结构,这使其成为药物/生长因子的理想控释载体;同时,其自身还具备显著的成骨生物活性^[4]。研究表明,MBG在生理环境中可降解并持续释放硅、钙、磷等生物活性离子,这些离子被证实能有效激活成骨相关信号通路,刺激骨髓间充质干细胞(Mouse Bone Mesenchymal Stem Cells, mBMSCs)的成骨分化^[5-6]。然而,单一MBG材料的生物活性相对有限,其在修复复杂骨缺损时难以满足高效成骨的需求。为此,研究人员尝试将具有明确生物学功能的活性分子与MBG相结合以构建功能化的复合材料^[7]。其中,从传统中药葛根中提取的葛根素(Puerarin, Pue)作为一种天然异黄酮苷^[8],被证实能通过调控多条信号通路,显著促进小鼠胚胎前成骨细胞(Mouse Embryonic Osteoblast Precursor Cells, MC3T3-E1)的增殖、分化和矿化^[9]。已有多项研究证实Pue既可以抑制mBMSCs的成脂分化,又可以促进其增殖,并向成骨细胞分化,在平衡骨代谢和维持骨结构稳定中可发挥重要作用^[10-13]。尽管其应用前景广阔,但Pue的水溶性差、体内半衰期短等问题限制了其直接应用于骨修复^[14,15]。因此,需要合适的载体才能充分发挥其促进骨修复潜力,并使其与载体材料的生物活性产生协同增强效应。

本研究旨在构建一种负载葛根素的介孔生物活性玻璃(Pue/MBG)复合材料(图1)。首先通过溶胶-凝胶法合成MBG,并采用物理吸附法制备Pue/MBG复合材料;随后系统地表征其理化性质、药物负载与释放性能;最后通过一系列体外细胞实验,综合评价了该复合材料对MC3T3-E1和mBMSCs的生物学效应。证实Pue/MBG复合材料不仅具备良好的药物缓释性能,还能够通过“材料诱导+药物调控”的双重协同作用实现高效成骨,为开发新一代开发新型高效骨修复材料提供了一种新的治疗策略。

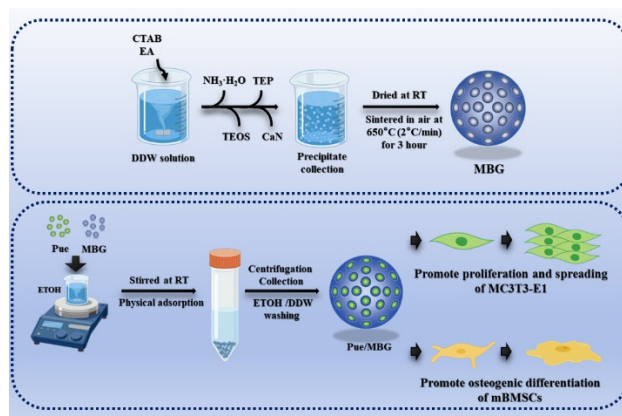


图1 Pue/MBG复合材料的制备及促成骨作用示意图

Fig.1 Preparation and osteogenic-promoting mechanism of Pue/MBG composites. DDW: Double distilled water; MBG: Mesoporous bioactive glass; Pue: Puerarin

1 实验方法

1.1 材料的合成与制备

1.1.1 MBG的制备

如前报道^[16],MBG采用改良溶胶-凝胶法制备,以十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethylammonium Bromide, CTAB, $\geq 99.99\%$,阿拉丁生化科技股份有限公司)为模板剂。具体合成步骤如下:将0.7 g CTAB溶于33 mL去离子水中持续搅拌,随后以点滴方式加入10 mL乙酸乙酯(Ethyl Acetate, EA, $\geq 99.0\%$,国药集团化学试剂有限公司)。搅拌30 min后,加入7 mL浓度为1 mol/L氨水(Ammonia solution, 16.0%~18.0%,阿拉丁生化科技股份有限公司)溶液并继续搅拌15 min。随后每隔30 min依次加入3.6 mL正硅酸乙酯(Tetraethoxysilane, TEOS, 98.0%,麦克林生化科技股份有限公司),0.36 mL磷酸三乙酯(Triethyl Phosphate, TEP, 99.5%,麦克林生化科技股份有限公司)和2.2 g硝酸钙(Calcium Nitrate, CaN, $\geq 98.5\%$,国药集团化学试剂有限公司)。持续磁力搅拌4 h后,离心收集白色沉淀,用双蒸水和无水乙醇(Anhydrous Ethanol, ETOH, $\geq 99.7\%$,国药集团化学试剂有限公司)进行洗涤。将白色沉淀60 °C干燥过夜后,置于马弗炉中煅烧(650 °C,升温速率2 °C/min)3 h去除模板剂得到MBG。

1.1.2 Pue/MBG的制备

采用物理吸附方法制备Pue/MBG复合材料,具体步骤如下:将300 mg Pue($\geq 98\%$,阿拉丁生化科

技股份有限公司)溶于6 mL ETOH中,后与80 mg MBG混合,利用磁力搅拌器剧烈搅拌24 h。通过离心获得Pue/MBG沉淀,并利用ETOH和双蒸水洗涤,去除吸附在材料外表面的过量Pue。

1.2 表征分析

1.2.1 性能表征

利用扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM, S4800, Hitach, 日本)对材料微观形貌进行观察,用能谱仪(Energy Dispersive Spectrometer, EDS)分析材料元素成分。通过透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM, HT7700, Hitach, 日本)对样品的孔道结构进行分析。采用粒径分析仪(Nicolet 6700, Thermo Scientific, 美国)对材料粒径进行分析。采用比表面积及孔隙度分析仪(ASAP 2460, Micromeritics, 美国)对样品的平均孔径、孔径分布和比表面积进行表征。采用傅里叶变换红外分光光度计(Fourier Transform Infrared Spectrometer, FTIR, Nicolet 6700, Thermo Scientific, 美国)对样品化学结构进行测试表征。通过X射线衍射仪(X-ray Diffractometer, XRD, D8 Advance, Bruker, 德国)分析材料表面物相组成。

1.2.2 药物负载和释放分析

Pue/MBG复合材料的载药能力与包封效率通过紫外-可见分光光度法测定,具体方法如下:将1 mg Pue/MBG浸泡于2 mL ETOH中,37 °C下磁力搅拌24 h后以2000 r/min离心5 min,使用紫外可见分光光度计(Varioskan LUX, Thermo Scientific, 美国)在305 nm波长处测定上清液吸光值,同时配制不同浓度的Pue/ETOH溶液在相同波长下测定吸光度以绘制标准曲线,最终通过公式计算载药量(Drug Loading Capacity, DLC)、载药率(Drug Loading Rate, DLR)和包封率(Encapsulation Efficiency, EE)。

Pue的体外药物释放在120 r/min的振荡条件下进行。将1 mg Pue/MBG在3 mL磷酸缓冲盐溶液(Phosphate Buffered Saline, PBS)中浸泡,在预设时间点取样后以2000 r/min离心5 min,随后取1 mL上清液测定波长305 nm处的吸光度并补充等体积PBS,通过测定不同浓度Pue PBS溶液在305 nm处的吸光度绘制标准曲线,该标准曲线用于计算Pue的累积释放浓度。此外,对体外释放数据进行了数学模型拟合分析。

1.3 体外生物学性能评价

1.3.1 细胞培养

本实验所用的MC3T3-E1由青岛大学附属医院口腔修复科提供,mBMSCs从4-6周龄SD大鼠的胫骨与股骨分离与提取。MC3T3-E1在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素抗生素的Dulbecco改良型Eagle完全培养基中培养,mBMSCs在大鼠骨髓间充质干细胞完全培养基中培养,以上培养环境均为37 °C、5%CO₂、70-80%RH。

1.3.2 细胞增殖检测

将处于对数生长期的MC3T3-E1和mBMSCs以 5×10^3 cells/well的浓度均匀接种于96孔板中培养过夜,随后,将细胞随机分为四组进行干预:Control组(仅含完全培养基)、Pue组(含200 μmol/L Pue的完全培养基)、MBG组(含0.25 mg/mL MBG的完全培养基)以及Pue/MBG组(含0.25 mg/mL Pue/MBG复合物的完全培养基),分别与细胞共培养1、3、5 d。按照CCK-8试剂盒(碧云天生物技术股份有限公司,中国上海)的说明进行孵育,在450 nm波长处检测细胞活力。

1.3.3 细胞形态染色

将处于对数生长期的MC3T3-E1和mBMSCs按 5×10^3 cells/well的浓度均匀接种到24孔板中,与上述不同分组的培养基共培养3 d。用4%多聚甲醛固定细胞15 min,PBS冲洗。随后,室温下用0.1% Triton X-100破膜10 min,再用PBS冲洗。用稀释后的Alexa Fluor 488™鬼笔环肽染色液,避光孵育1 h,PBS清洗3次;滴加4',6-二脒基-2-苯基吡啶(Dilactate, DAPI)避光孵育10 min。荧光显微镜下采集图像。

1.3.4 成骨分化检测

将适量浓度的mBMSCs均匀接种在24孔板中,待细胞生长至80%~90%,弃去旧的培养基。随后,将细胞随机分为四组进行干预:Control组(仅含成骨诱导培养基)、Pue组(含200 μmol/L Pue的成骨诱导培养基)、MBG组(含0.25 mg/mL MBG的成骨诱导培养基)以及Pue/MBG组(含0.25 mg/mL Pue/MBG复合物的成骨诱导培养基)。每2 d更换培养液,孵育7 d。弃去培养基,用PBS清洗3次,用4%多聚甲醛固定。采用ALP显色试剂盒(碧云天生物技术股份有限公司,中国上海)对细胞进行染色,双蒸水清洗多余的染色溶液,利用数码相机和显微镜进行观察。使用ALP检测试剂盒(普利莱基因技术有限公司,中国北京)定量ALP活性,

在 405 nm 波长处测定吸光度值并通过标准曲线计算 ALP 活性。

1.3.5 体外矿化检测

细胞接种、培养分组同 1.3.4, 孵育 14 d。弃去培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定。采用茜素红 S (Alizarin Red S, ARS, 海星生物科技有限公司, 中国苏州) 溶液对细胞进行染色, 双蒸水清洗多余的染色溶液, 利用数码照相机和显微镜进行观察。随后, 采用 1% 十六烷基吡啶 (索莱宝科技有限公司, 中国北京) 洗脱红色复合物, 在 560 nm 波长下测定洗脱液的吸光度值。

1.4 统计分析

所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm\text{SD}$) 表示, 并使用 GraphPad Prism 9.0 软件对实验进行统计分析。使用 Student's *t* 检验比较两组之间的差异, 使用单因素方差分析方法分析 3 个及 3 个以上平行样品数据的差异, 使用双因素方差分析成骨相关数据, 以检验不同组别的交互作用。误差条表示每组 3 次以上测量数据的标准差, 采用 Turkey 检验作为事后分析方法。*为 $p < 0.05$, **为 $p < 0.01$, ***为 $p < 0.001$, 均表明差异具有显著、极显著和极极显著差异的统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 MBG 和 Pue/MBG 的制备与表征

本研究首先对 MBG 及 Pue/MBG 的粉体形貌与结构进行系统表征。数码照片显示二者均呈白色, 外观无明显差异 (图 2(a, d))。SEM 照片表明, MBG 为形貌均一的球形或近球形结构, 表面分布有均匀孔隙 (图 2(b)); 负载葛根素后, Pue/MBG 仍保持原有形貌与分散性, 未见结构坍塌或药物表面团聚, 但孔隙明显被填充 (图 2(e))。TEM 进一步显示, MBG 具有高度有序的介孔结构 (图 2(c)), 而 Pue/MBG 的孔道衬度减弱、边界模糊 (图 2(f))。以上结果表明 Pue 已成功进入并填充于孔道内部。此外, 粒径分析结果显示 MBG 与 Pue/MBG 的粒径分别为 $126.12\pm 62.87\text{ nm}$ 与 $126.74\pm 62.13\text{ nm}$, 负载前后形貌未发生显著变化 (图 2(g, h))。

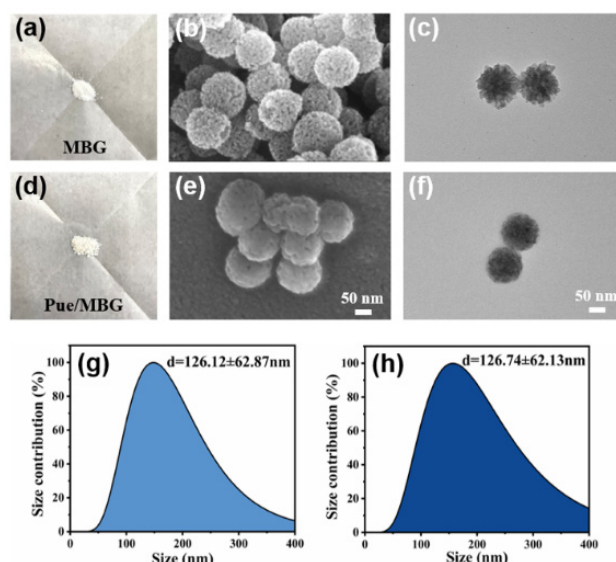


图 2 MBG 和 Pue/MBG 的表面形貌和粒径分析

Fig.2 Surface morphology and particle size analysis of MBG and Pue/MBG

(a, d) Digital photos; (b, e) SEM; (c, f) TEM; (g, h) Particle size distribution diagram

为明确材料的孔结构特性, 采用 N_2 吸附-脱附测试进行分析。结果显示, MBG 的等温线呈现典型的 IV 型特征, 并伴有 H1 型滞后环, 表明其具有规整的介孔结构 (图 3(a))。负载 Pue 后, Pue/MBG 的等温线整体下移, N_2 吸附量显著降低, 但其形状与位置仍与 MBG 基本一致。上述结果表明, Pue 成功填充于 MBG 孔道内部, 介孔骨架结构未发生坍塌。BJH 孔径分布曲线显示, MBG 在约 4.5 nm 处呈现尖锐的窄分布峰, 表明其具有高度均一的介孔结构。负载 Pue 后, Pue/MBG 的分布峰整体左移, 最可几孔径减小, 且在小于 3 nm 范围内的孔比例增加, 进一步证实了 Pue 成功负载于介孔孔道 (图 3(b))。表 1 数据为阐明 Pue 的成功负载与缓释机制提供了依据。首先, MBG 载体高达 $373.28\text{ m}^2/\text{g}$ 的比表面积, 奠定了其优异载药能力的基础^[17-18]。负载后比表面积急剧下降至 $151.02\text{ m}^2/\text{g}$, 有力证实 Pue 分子已大量进入并覆盖于介孔内部。其次, BJH 分析进一步揭示了孔道被填充的细节: 负载后最可几孔径的减小与孔体积的下降表明, Pue 不仅限于表面吸附, 而是深度填充于孔道内部。这些结果共同证明, 我们成功构建了一种基于介孔限域效应的药物递送系统, 其结构特性为后续观察到的可持续药物释放行为提供了基础。

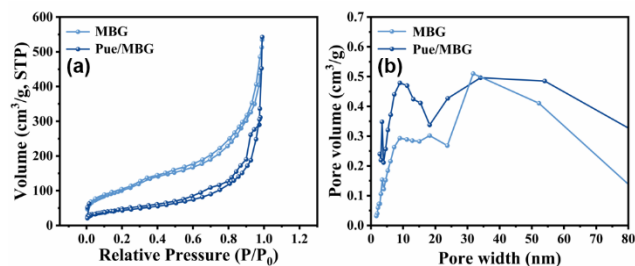


图3 MBG 和 Pue/MBG 的 N_2 吸附-脱附等温线以及对应的孔径分布

Fig.3 N_2 adsorption-desorption isotherms and corresponding pore size distribution of MBG and Pue/MBG

(a) N_2 adsorption-desorption isotherms; (b) Pore size distributions

表1 MBG 和 Pue/MBG 的比表面积与介孔分析

Table 1 Specific surface area and mesoporous analysis of MBG and Pue/MBG

Sample	BET surface area/($m^2 \cdot g^{-1}$)	Pore volume/($cm^3 \cdot g^{-1}$)	BJH pore Size/nm
MBG	373.28	0.70	12.93
Pue/MBG	151.02	0.45	8.84

采用 XRD 对材料晶体结构进行分析。广角 XRD 显示 MBG 在 $15\sim 35^\circ$ 范围内呈现宽泛弥散峰, 表明其为非晶玻璃相 (图 4(a)) [6]。小角 XRD 图谱中, MBG 在约 0.64° 处出现对应于 (100) 晶面的强衍射峰, 证实其具有高度有序的二维六方介孔结构 [19]。负载 Pue 后, Pue/MBG 的衍射峰形基本保持不变, 但整体散射强度降低 (图 4(b, c)), 说明 Pue 主要填充于介孔内部, 降低了孔壁与孔道间的电子密度对比, 未破坏材料的基本介观结构, 进一步证明其为物理填充机制。

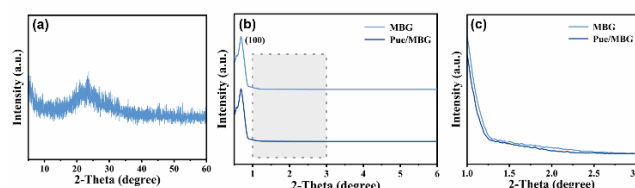


图4 MBG 和 Pue/MBG 的 XRD 谱图

Fig.4 XRD patterns of MBG and Pue/MBG

(a) Wide-angle XRD spectrum of MBG; (b, c) Small-angle XRD patterns of MBG and Pue/MBG, along with their enlarged views

为分析材料化学组成, 本实验对材料进行了 EDS 元素分析。结果显示, MBG 主要由 Si、O、Ca 和 P 元素组成 (图 5(a, b)), 其中 Si 和 O 构成介孔骨架, Ca 与 P 的掺入赋予其生物活性 [20]。此外检测到微量 C 元素, 可能来源于残留模板剂或环境吸附。负载葛根素后, Pue/MBG 中 C 元素的信号强度与原子百分比显著增强, 而 Si、Ca 和 P 的原子百分比相对下降 (图 5(c, d))。该变化由 Pue 分子 ($C_{21}H_{20}O_9$) 引入大量 C 元素所产生的“稀释效应”导致, 表明

Pue 已成功负载并均匀分布于 MBG 介孔材料上。

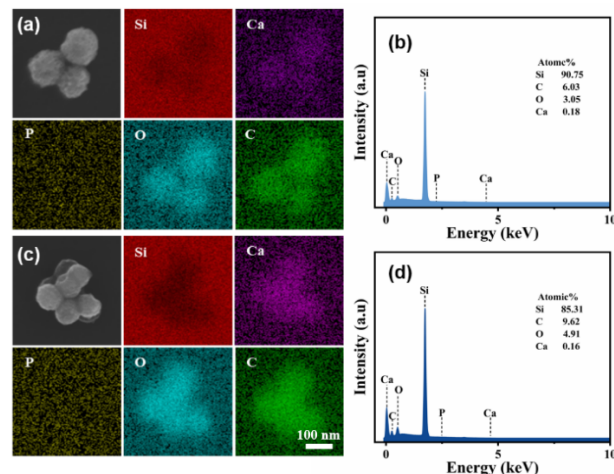


图5 MBG 和 Pue/MBG 的 EDS 分析

Fig.5 EDS analysis of MBG and Pue/MBG

(a, c) EDS elemental mapping; (b, d) EDS point scan

本实验通过 FTIR 分析了 Pue、MBG 及 Pue/MBG 的分子结构与表面官能团 (图 6)。Pue 在 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 和 $1000\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 处分别出现 $C=O/C=C$ 芳香骨架振动和 $C-O-C$ 糖苷键特征吸收峰, 符合其黄酮类结构特征 [21]。MBG 在 $1000\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ 处呈现 $Si-O-Si$ 宽强吸收带, 800 cm^{-1} 和 450 cm^{-1} 附近分别为 $Si-O$ 对称伸缩与弯曲振动, 表明其具有完整硅酸盐网络结构 [22]。Pue/MBG 的红外光谱呈现两组分特征峰的叠加, 其中 Pue 部分特征峰发生轻微位移或强度变化, 提示其与 MBG 表面存在物理吸附或弱相互作用; 而 MBG 的 $Si-O-Si$ 主吸收带未发生明显变化, 说明其骨架在负载过程中保持稳定。未检测到新生成的特征吸收峰, 进一步证明 Pue 主要以物理吸附形式存在于 MBG 孔道中。

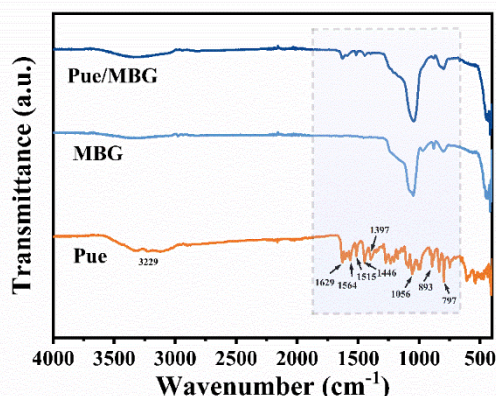


图6 Pue、MBG 和 Pue/MBG 的 FTIR 图

Fig.6 FTIR spectra of Pue, MBG and Pue/MBG

为了评价 MBG 作为 Pue 载体的性能, 我们对其 DLC、DLR 和 EE 进行了测定, 并进一步研究了其在体外环境中的药物释放行为。如表 2 所示,

Pue/MBG 复合材料具有优异的载药能力, DLC 达 $(338.38 \pm 16.05) \mu\text{g}$, DLR 为 $(33.84 \pm 1.61)\%$ 。然而, 其 EE 为 $(9.02 \pm 0.43)\%$, 相对较低。其可能导致的因素主要如下: 一是与吸附-解吸动态平衡有关。物理吸附是一个可逆的动态过程^[23]。在载药时, Pue 分子在 MBG 孔道内的吸附与外溶液中的溶解达到平衡。洗涤 MBG 外表面药物的过程会导致一部分已吸附的 Pue 脱离载体。二是与孔道的可负载药物最大空间有关。Pue/MBG 复合材料较高的载药率表明孔道内已填充了大量药物, 但 MBG 孔道的有效容积是有限的。初始加入的 Pue 总量可能远超 MBG 本身的最大吸附量, 从而在计算过程中导致了较低的包封率。

Pue/MBG 的体外药物释放曲线如图 7 所示: 初始 24 h 内呈现快速释放, 随后转为平稳持续释放阶段, 可持续达 10 d。根据体外释放数据, 进行了数学模型拟合。综合来说, Pue/MBG 复合材料的释放行为最符合 Higuchi 模型。这表明, MBG 的有序介孔结构是实现 Pue 缓释行为的决定性因素, Pue 的释放主要由 Fickian 扩散机制所主导, 这与 MBG 释放药物相关文献所报道的相一致^[24-27]。此外, 我们还推测随着时间的推移, Pue 从孔道中扩散的同时, MBG 骨架在液体中的缓慢溶蚀也起到了协同促进药物释放的作用^[28-29]。

表2 Pue/MBG 的载药量、载药率和包封率分析

Table 2 Drug loading capacity, drug loading rate and encapsulation efficiency of Pue/MBG

Sample	DLC/ μg	DLR/%	EE/%
Pue/MBG	338.38 ± 16.05	33.84 ± 1.61	9.02 ± 0.43

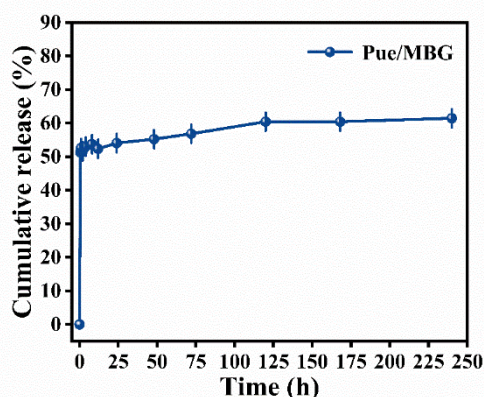


图 7 Pue/MBG 的药物释放曲线

Fig.7 Drug release curve of Pue/MBG

2.2 体外生物学性能评价

为了评估 Pue/MBG 的生物安全性, 我们分别使

用 MC3T3-E1 和 mBMSCs 作了细胞毒性和细胞形态学分析。CCK-8 实验显示, 相较于 Control 组, MBG 显著促进了 MC3T3-E1 细胞的增殖活性 (图 8(a))。细胞形态学观察进一步显示, Pue/MBG 组细胞骨架形态与 Control 组相似, 细胞铺展良好, 呈多角形或纺锤形, 伪足丰富且相互连接形成密集网络, 表明材料具有良好的细胞相容性并促进早期细胞黏附 (图 8(b))。在 mBMSCs 中的实验结果进一步验证了 Pue/MBG 的生物学效应。CCK-8 检测表明, 相较于 Control 组, Pue/MBG 显著促进了 mBMSCs 的增殖, 且效果优于 MBG 单独处理 (图 8(c))。细胞形态观察显示, 各组 mBMSCs 均保持良好的黏附与伸展形态, 呈纺锤形或多角状规则排列, 表明 Pue/MBG 可促进干细胞早期黏附与扩展, 可能更有利于 mBMSCs 的后续生物学行为 (图 8(d))。

为了评估 Pue/MBG 对 mBMSCs 成骨分化的诱导能力, 我们检测了成骨分化早期和晚期的关键标志物。ALP 活性是成骨细胞早期分化 and 功能活性的重要标志^[30]。第 7 天时 ALP 活性分析显示, Pue 组活性显著高于 Control 组, 证实其促成骨潜力; 而 MBG 组与 Control 组无统计学差异。值得注意的是, Pue/MBG 组的 ALP 活性显著优于 Control 及 MBG 组, 表明葛根素在早期的持续释放可能在促成骨分化过程中发挥了协同促进作用 (图 9(a, b))。细胞外基质的矿化是成骨分化成熟的最终标志^[31]。第 14 天时 ARS 染色结果显示 (图 9(c, d)), Control 组仅见零星矿化结节, 而 Pue 组与 MBG 组结节数量与面积均显著增加。其中 Pue/MBG 组表现最为突出, 可见大量致密分布的矿化结节, 其定量吸光度值亦显著高于其他各组, 表明 Pue/MBG 表现出最优的晚期成骨诱导能力。

以上结果系统地证实了 Pue/MBG 作为一种生物活性材料, 可协同促进成骨细胞的增殖与分化。其协同机制主要源于: 一是离子快速释放与早期协同: 研究表明, MBG 中的 Ca^{2+} 和 SiO_4^{4-} 离子在接触体液初期会有一个相对快速的释放过程^[6]。这与我们观察到的 Pue 在早期的 24 h 内也存在一个快速释放阶段相吻合。MBG 离子的早期释放为成骨细胞提供了有利的碱性微环境^[32-34], 与此同时, Pue 的释放对此状态下的细胞进行协同调控, 促进成骨细胞的增殖与早期分化。二是长期同步释放与持续作用: MBG 的离子释放是一个持续数天甚至数周的长期过程^[6], 这与 Pue 可持续释放达 10 天相匹配。这种释放动力学的同步性, 为整个成骨分化周期中产生协同作用提供了可能性。二者在成骨分化各阶段(激

活、基质成熟、矿化) 协同作用, 共同增强成骨效 果, 展现出良好的骨修复应用前景。

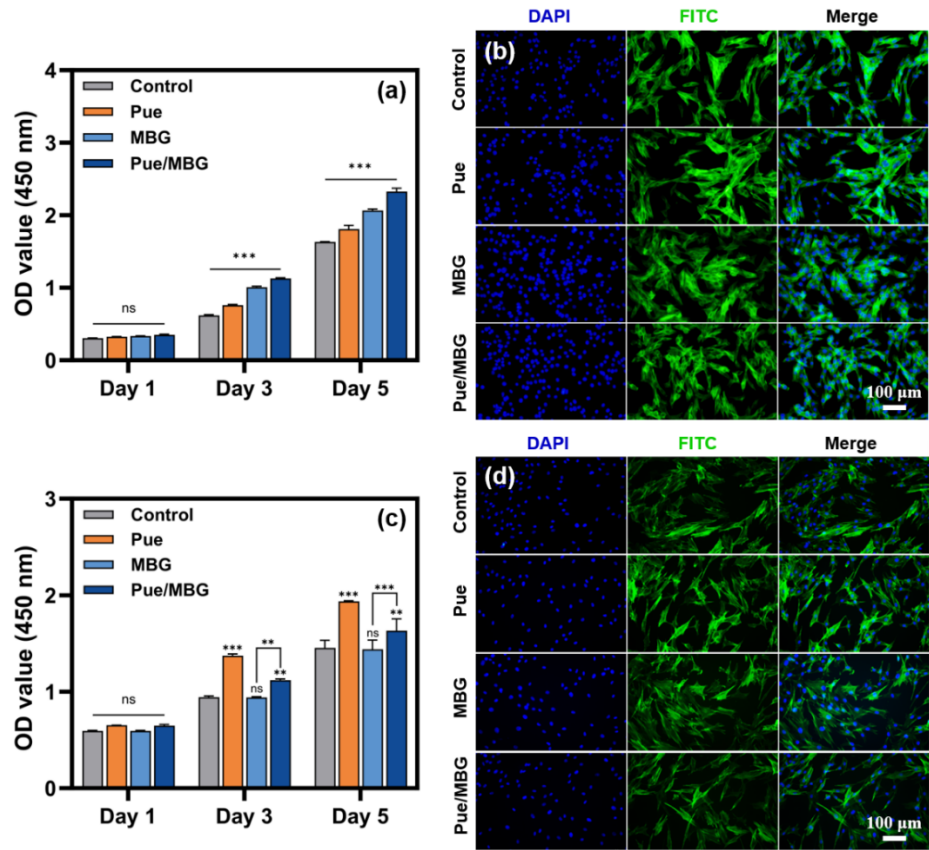


图 8 Pue/MBG 的体外生物相容性评估

Fig.8 *In vitro* biocompatibility evaluation of Pue/MBG

(a, c) Cell viability assay of MC3T3-E1(a) and mBMSCs (c) after being cultured for different periods; (b, d) Cell morphology staining of MC3T3-E1(b) and mBMSCs (d) after being cultured for 3 days

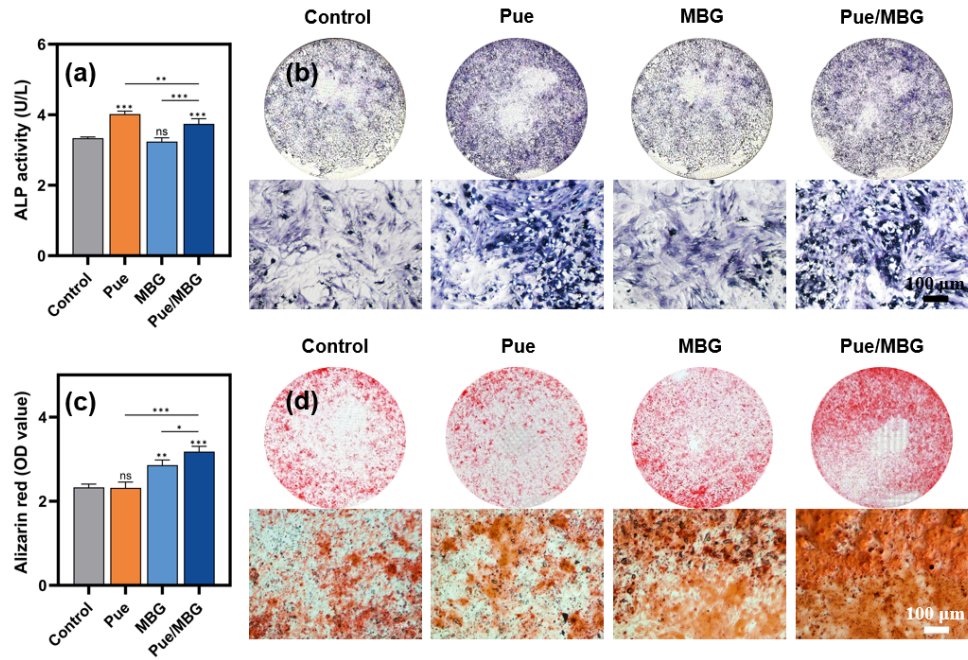


图 9 Pue/MBG 的成骨分化作用

Fig.9 Osteogenic differentiation effects of Pue/MBG

(a, b) ALP activity assay (a) and ALP staining images (b) on day 7; (c, d) ARS quantitative analysis (c) and ARS staining images on day 14 (d)

3 结论

本研究成功制备了一种兼具优异生物活性与持续药物释放功能的 Pue/MBG 复合材料。体外评价结果表明,该材料不仅具备良好的生物相容性,还能持续释放 Pue,与 MBG 释放的生物活性离子产生协同作用,显著促进相关成骨细胞的增殖与分化,并在分化后期有效诱导矿化结节形成。相较于单一组分,Pue/MBG 复合材料兼具 Pue 的缓释特性与 MBG 的生物学功能,二者共同作用于成骨过程,为骨修复提供了“药物与离子”的双重协同刺激。本工作为开发基于中药活性分子与生物活性玻璃的协同骨再生策略提供了新的思路和实验依据,具有重要的理论意义与临床应用潜力。

参考文献:

- [1] WEI Y, PAN H, YANG J, *et al.* Aligned cryogel fibers incorporated 3D printed scaffold effectively facilitates bone regeneration by enhancing cell recruitment and function. *Science Advance*, 2024, **10**(6): eadk6722.
- [2] YU C, CHEN J, WANG T, *et al.* GelMA hydrogels reinforced by PCL@GelMA nanofibers and bioactive glass induce bone regeneration in critical size cranial defects. *Journal of Nanobiotechnology*, 2024, **22**(1): 696.
- [3] MOY P K, AGHALOO T. Risk factors in bone augmentation procedures. *Periodontology 2000*, 2019, **81**(1): 76.
- [4] LALZAWMLIANA V, ANAND A, ROY M, *et al.* Mesoporous bioactive glasses for bone healing and biomolecules delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, **106**: 110180.
- [5] VALLET-REGI M, SALINAS A J. Mesoporous bioactive glasses for regenerative medicine. *Materials Today Biology*, 2021, **11**: 100121.
- [6] SCHUMACHER M, HABIBOVIC P, VAN RIJST S. Mesoporous bioactive glass composition effects on degradation and bioactivity. *Bioactive Materials*, 2021, **6**(7): 1921.
- [7] CUI Y, HONG S, JIANG W, *et al.* Engineering mesoporous bioactive glasses for emerging stimuli-responsive drug delivery and theranostic applications. *Bioactive Materials*, 2024, **34**: 436.
- [8] ZHOU Y-X, ZHANG H, PENG C. Puerarin: A review of pharmacological effects. *Phytotherapy Research*, 2014, **28**(7): 961.
- [9] ZENG X, FENG Q, ZHAO F, *et al.* Puerarin inhibits TRPM3/miR-204 to promote MC3T3-E1 cells proliferation, differentiation and mineralization. *Phytotherapy Research*, 2018, **32**(6): 996.
- [10] YANG X, YANG Y, ZHOU S, *et al.* Puerarin stimulates osteogenic differentiation and bone formation through the ERK1/2 and p38-MAPK signaling pathways. *Current Molecular Medicine*, 2018, **17**(7): 488.
- [11] YANG Y, CHEN D, LI Y, *et al.* Effect of puerarin on osteogenic differentiation *in vitro* and on new bone formation *in vivo*. *Drug Design, Development and Therapy*, 2022, **16**: 2885.
- [12] KANG S, BENNETT C N, GERIN I, *et al.* Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(19): 14515.
- [13] LI B, WANG Y, GONG S, *et al.* Puerarin improves OVX-induced osteoporosis by regulating phospholipid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids based on serum metabolomics. *Phytomedicine*, 2022, **102**: 154198.
- [14] PANG Z, WEI Y, WANG N, *et al.* Gel formation of puerarin and mechanistic study during its cooling process. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, **548**(1): 625.
- [15] ZHANG L. Pharmacokinetics and drug delivery systems for puerarin, a bioactive flavone from traditional Chinese medicine. *Drug Delivery*, 2019, **26**(1): 860.
- [16] HU Q, LI Y, ZHAO N, *et al.* Facile synthesis of hollow mesoporous bioactive glass sub-micron spheres with a tunable cavity size. *Materials Letters*, 2014, **134**: 130.
- [17] YUN H-S, KIM S-H, LEE S, *et al.* Synthesis of high surface area mesoporous bioactive glass nanospheres. *Materials Letters*, 2010, **64**(16): 1850.
- [18] HENCH L L, WILSON J. Surface-active biomaterials. *Science*, 1984, **226**(4675): 630.
- [19] YANG S-Y, HU Y, ZHAO R, *et al.* Quercetin-loaded mesoporous nano-delivery system remodels osteoimmune microenvironment to regenerate alveolar bone in periodontitis via the miR-21a-5p/PDCD4/NF- κ B pathway. *Journal of Nanobiotechnology*, 2024, **22**(1): 94.
- [20] ZHENG K, BOCCACCINI A R. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, **249**: 363.
- [21] LIGA S, VODÁ R, LUPA L, *et al.* Synthesis of Ag₂O/Ag nanoparticles using puerarin: characterization, cytotoxicity, in ovo safety profile, antioxidant, and antimicrobial potential against nosocomial pathogens. *Journal of Functional Biomaterials*, 2025, **16**(7): 258.
- [22] GARCÍA-PERDIGUERO J C, GÓMEZ-CEREZO N, GISBERT-GARZARÁN M, *et al.* Unraveling the role of calcium in the osteogenic behavior of mesoporous bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 2025, **198**: 482.
- [23] CHEN M, WANG Y, YUAN P, *et al.* Multifunctional bioactive glass nanoparticles: surface-interface decoration and biomedical applications. *Regenerative Biomaterials*, 2024, **11**: rbae110.
- [24] WANG X, WANG G, ZHANG Y. Research on the biological activity and doxorubicin release behavior *in vitro* of mesoporous

bioactive $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ glass nanospheres. *Applied Surface Science*, 2017, **419**: 531.

[25] ANAND A, DAS P, NANDI S K, *et al.* Development of antibiotic loaded mesoporous bioactive glass and its drug release kinetics. *Ceramics International*, 2020, **46(4)**: 5477.

[26] SOUNDRAPANDIAN C, MAHATO A, KUNDU B, *et al.* Development and effect of different bioactive silicate glass scaffolds: *In vitro* evaluation for use as a bone drug delivery system. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2014, **40**: 1.

[27] ZHU Y, KASKEL S. Comparison of the *in vitro* bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2009, **118(1)**: 176.

[28] ZHAO L, YAN X, ZHOU X, *et al.* Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, **109(1)**: 210.

[29] ALMASRI D, DAHMAN Y. Impact of composition and surfactant-templating on mesoporous bioactive glasses structural evolution, bioactivity, and drug delivery property. *Journal of Biomaterials Applications*, 2025, **39(9)**: 1064.

[30] VIMALRAJ S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, 2020, **754**: 144855.

[31] QUARLES L D, YOHAY D A, LEVER L W, *et al.* Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An *in vitro* model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1992, **7(6)**: 683.

[32] BROWN E M, MACLEOD R J. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiological Reviews*, 2001, **81(1)**: 239.

[33] LIU Y K, LU Q Z, PEI R, *et al.* The effect of extracellular calcium and inorganic phosphate on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro: implication for bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 2009, **4(2)**: 025004.

[34] DANOUX C B, BASSETT D C, OTHMAN Z, *et al.* Elucidating the individual effects of calcium and phosphate ions on hMSCs by using composite materials. *Acta Biomaterialia*, 2015, **17**: 1.

