

掺硅羟基磷灰石微球的微流控制备 及其体外生物活性研究

万健羽^{1,2}, 崔金婕², 董少杰², 林开利²

(1. 上海理工大学 材料与化工学院, 上海 200093; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011)

摘要: 可注射生物活性陶瓷不仅具有良好的生物相容性, 而且能够促进成骨分化和血管生成。羟基磷灰石($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA)是人骨的主要成分。采用微流控技术, 成功制备出粒径 $480\text{ }\mu\text{m}$ 的均一硅酸钙(CaSiO_3 , CS)微球, 并以其为前驱体, 在磷酸三钠(Na_3PO_4)水溶液中进行 24 h 水热转化处理, 得到具有纳米线结构的含硅羟基磷灰石微球(Si-nHA)。该纳米线直径约 $100\sim 200\text{ nm}$, 长度约 $1\sim 2\text{ }\mu\text{m}$ 。Si-nHA 微球比表面积为 $7.78\text{ m}^2/\text{g}$, 远高于纯 HA 微球的比表面积($0.08\text{ m}^2/\text{g}$), 高比表面积使得 Si-nHA 微球具有更加优异的蛋白负载和缓释性能。同时, Si-nHA 微球释放的硅(Si)离子能显著促进大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)的增殖, 以及相关成骨(OPN, OCN)和成血管基因(ANG-1)的表达。研究表明, Si-nHA 微球在微创骨修复领域有良好的应用前景。

关键词: 微流控; 水热转化; 纳米结构; 可注射微球; 药物载体; 骨修复

中图分类号: TQ 174 **文献标志码:** A

Preparation and in vitro biological activity of silicon-doped hydroxyapatite microspheres based on microfluidic

WAN Jianyu^{1,2}, CUI Jinjie², DONG Shaojie², LIN Kaile²

(1. School of Materials and Chemistry, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: Injectable bioactive ceramics not only have good biocompatibility, but also promote osteogenic differentiation and angiogenesis. Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) is the main component of human bone. Uniform calcium silicate (CaSiO_3 , CS) microspheres with a diameter of about $480\text{ }\mu\text{m}$ were successfully prepared using microfluidic technology, and they were used as precursors to prepare silicon-containing hydroxyapatite microspheres (Si-nHA) with nanowire structures in an aqueous solution of trisodium phosphate (Na_3PO_4) by hydrothermal treatment for 24 h. The nanowire had a diameter of about $100\sim 200\text{ nm}$ and a length of about $1\sim 2\text{ }\mu\text{m}$. The specific surface area of Si-nHA microspheres was $7.78\text{ m}^2/\text{g}$, which was much higher than that of pure HA microspheres

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82072396, 81871490)

第一作者: 万健羽(1996-), 男, 硕士研究生。研究方向: 生物材料。E-mail: 15382182639@163.com

通信作者: 林开利(1975-), 男, 教授。研究方向: 生物医用材料。E-mail: linkaili@sjtu.edu.cn

(0.08 m²/g). The high specific surface area resulted in more excellent protein loading and sustained release performance of Si-nHA microspheres. At the same time, Si ions released by Si-nHA could significantly promote the proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) and the expression of related osteogenic (OPN, OCN) and angiogenic genes (ANG-1). The results show that Si-nHA microspheres have good application prospects in the field of minimally invasive bone repair.

Keywords: *microfluidic; hydrothermal conversion; nano-structure; injectable microspheres; drug carrier; bone repair*

骨缺损是一种常见的临床表现，常由于各种外伤、肿瘤或先天性畸形等原因引起。目前，传统的骨缺损治疗方法包括自体骨移植和异体骨移植，前者供体有限且容易造成二次损伤，后者则容易引起宿主免疫排斥反应^[1]。在过去的几十年中，研究人员开发了大量的骨生物材料，如钛金属及其复合材料、陶瓷材料、天然高分子材料和人工合成聚合物材料等。其中，陶瓷材料主要分为生物惰性材料^[2]和生物活性材料，前者以氧化铝和氧化锆等金属氧化物为主，后者以钙-磷基生物陶瓷和生物玻璃为主^[3-4]。

羟基磷灰石(Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, HA)作为钙-磷基生物陶瓷中的一种，与天然骨的无机成分类似，具有良好的生物相容性能，是一种较理想的骨修复材料，但传统的人工合成HA骨诱导活性较弱^[5-8]。近年来，具有高比表面积的纳米HA(nHA)在药物负载和骨组织再生等方面展现出广阔的应用前景。研究表明，nHA具有与天然骨类似的多级结构和高比表面积，可以用于药物负载和控释，并且能够促进细胞黏附、增殖和成骨分化，进而加速骨愈合^[9-12]。Lin等^[13]在不添加任何表面活性剂和模板导向试剂的条件下，以CS粉末为前驱体，在磷酸盐溶液中进行水热处理，合成了具有可控纳米形貌的HA材料。

此外，在骨缺损修复过程中，新血管的生成有着重要的作用，它能为成骨细胞和组织提供血液和营养物质，进而加速骨愈合^[14-16]。而传统的由人工合成HA粉末煅烧后获得的HA支架表面光滑，晶粒尺寸为微米尺寸，其成骨和成血管能力弱。为弥补这个缺陷，研究人员发展了多种方法，如负载生物活性因子或干细胞^[17]、HA表面微纳结构改性^[18]、功能元素掺杂^[19]等。Elrayah等^[20]将多孔HA支架浸入到含铜离子(Cu²⁺)的溶液中进行水热反应，成功制备出具有微纳结构表面的多孔Cu-

HA支架。结果表明，与多孔HA支架相比，具有纳米花状表面的Cu-HA支架具有更强的促血管生成能力。另有研究表明，Si离子能够有效促进内皮细胞(VECs)分泌促血管生成因子。Dashnyam等^[21]利用溶胶凝胶法制备了介孔二氧化硅(SiO₂)微球，其释放的Si离子可以通过阻断HIF-脯氨酰羟化酶-2(PHD-2)的表达来上调缺氧诱导因子(HIF-1α)的表达，进而激活促血管生成因子如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管内皮生长因子(VEGF)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的表达。

微球是一类常见的骨缺损填充物和药物载体。与传统的支架材料相比，微球体积小，几何形状规则，有利于流动的曲面表面^[22-24]。通过调控微球结构，如多孔、核壳及微纳结构^[25-26]等，可以有效提高药物的载药量并控制药物释放行为，在可注射载药性骨缺损修复领域应用前景广阔^[27-28]。传统的生物陶瓷微球制备方法有喷雾干燥法^[29-30]、溶剂挥发法^[31]和溶胶-凝胶法等。但这类方法得到的微球粒径分布范围广，在骨缺损位置填充时会出现小尺寸球与大尺寸球紧密堆积的现象，导致微球之间孔隙减少，进而导致细胞、血管和新生骨组织难以长入。微流控法能够制备出粒径均匀、单分散性好的微球。在微流控芯片通道上，控制溶液浓度、连续相和分散相流速比等参数能够有效调控微球直径大小^[32-33]。

综上，本研究采用微流控法，以海藻酸钠水溶液为水相，二甲基硅油为油相，将CS超细粉末分散在水相中，通过调整水相和油相的流速，成功制备出CS微球。以其为前驱体，Na₃PO₄水溶液为磷源，经过24 h水热成功制备出直径均一的Si-nHA微球。同时，进一步研究了Si-nHA微球在水热转化过程中表面形貌和成分结构的变化、在磷酸盐缓冲液中Si离子的释放行为，以及Si-nHA微球浸提液对大鼠骨髓间充质干细胞

(rBMSCs)的增殖和成骨分化的影响。最后, 以BSA蛋白为药物模型, 研究了Si-nHA微球蛋白负载和释放行为。

1 实验方法

1.1 材料

海藻酸钠 [$(C_6H_7NaO_6)_n$, SA]、二甲基硅油 [$(OSi(CH_3)_2)_n$]、冰乙酸($C_2H_4O_2$, >99.8%)、乙二胺四乙酸二钠钙盐(Ca-EDTA, 97%)购自中国国药化学试剂有限公司(中国上海)。硅酸钙($CaSiO_3$, CS)和羟基磷灰石 [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, HA] 购自江苏省昆山华侨科技有限公司。牛血清白蛋白(BSA)购自德国BioFroxx公司。所有化学药品均未经进一步提纯。

1.2 制备方法

1.2.1 CS和HA微球的制备

CS微球的制备流程如图1所示。首先, 将2 g

的SA粉末加入到100 mL去离子水中配置成 0.02 g/cm^3 的SA水溶液, 再加入1.87 g的Ca-EDTA粉末搅拌溶解, 最后将15 g的CS粉末加入到上述溶液中, 过夜搅拌形成CS/SA溶液。以内径0.42 mm、外径1.49 mm的同轴针头作为微流控芯片, 聚四氟乙烯管为管道, 将CS/SA溶液作为水相, 流动速率为 0.06 mL/min , 二甲基硅油为油相, 流动速率为 0.3 mL/min 。在同轴针头出口管道上外接一个管道, 接入乙酸和二甲基硅油混合溶液(二者溶液体积比为1:100)。当微球液滴所含的Ca-EDTA遇到乙酸后会释放钙(Ca)离子, Ca 离子能使SA立刻交联固化形成微球。收集交联后的CS/SA微球, 用石油醚和无水乙醇交替清洗去除该微球表面的二甲基硅油, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干得到微球素胚。为了去除微球素胚内的SA, 对微球进行热处理, 以 $2\text{ }^\circ\text{C/min}$ 的升温速率加热至 $1100\text{ }^\circ\text{C}$, 保温3 h后随炉冷却, 去离子水离心清洗微球3次, 烘干保存。HA微球的制备与上述制备方法一致。

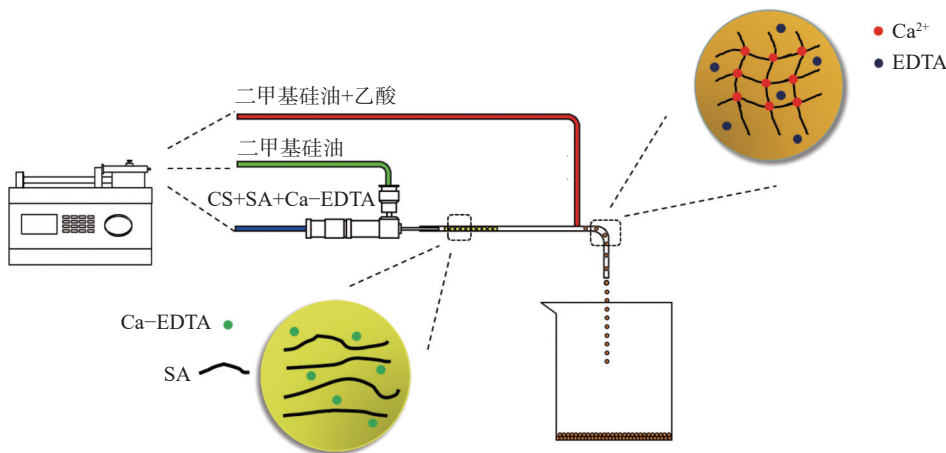


图1 硅酸钙微球的制备流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of preparation process of calcium silicate microspheres

1.2.2 Si-nHA微球的制备

以CS微球为前驱体, 通过水热转热法制备掺Si的CS微球^[10]。将1 g的CS微球浸入85 mL的 Na_3PO_4 (0.2 mol/L)溶液中, 在 $180\text{ }^\circ\text{C}$ 下水热处理0.5, 2, 12, 24 h, 产物分别命名为Si-0.5, Si-2, Si-12和Si-24。之后, 用去离子水反复清洗并离心分离。清洗完毕后, 放入 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干24 h。用扫描电子显微镜(SEM, Zeiss SIGMA300)观察HA微球和CS微球不同水热时间后产物的表面形貌。用X射线衍射仪(XRD, D8 ADVANCE)和傅里叶红外光谱仪(FT-IR, SPE CTRUM 100)对HA

微球和CS微球不同水热时间后的产物进行物相分析和分子结构分析。

1.3 Si离子的释放

将HA和Si-nHA微球以6 mg/mL的比例浸泡在PBS溶液中, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡仪振荡1, 4, 7, 10, 14 d。在每个时间点, 将含有微球的溶液离心, 然后吸取4 mL溶液并补充等量新鲜的PBS溶液, 通过ICP-OES来测试溶液中硅离子的质量浓度。

1.4 BSA的负载与释放

为研究HA和Si-nHA微球蛋白负载和释放行

为,以BSA为蛋白模型,将100 mg微球浸泡在1 mL的BSA水溶液(10 mg/mL)中,并在37 ℃恒温振荡仪中振荡24 h。24 h后离心取上清液,用BSA检测盒测定上清液中的BSA含量,每组3个平行样,通过绘制BSA标准曲线,计算上清液中的BSA蛋白负载量,进而得到HA和Si-nHA微球中负载的BSA蛋白量。

将100 mg载药微球浸泡在1 mL的PBS中,置于37 ℃恒温振荡仪中振荡1,4,7,24,48,72 h,在每个时间点取50 μL上清液测定微球BSA的释放量,并添加新鲜等量的PBS,每组3个平行样,绘制BSA释放曲线。

1.5 体外细胞实验

本实验所选用细胞为第2~4代的rBMSCs细胞。用含10%的胎牛血清(FBS, Gibco, USA)和1%青霉素-链霉素(Gibco, USA)的α-MEM培养基,在37 ℃、5% CO₂恒温培养箱中培养,培养基每两天一换。本实验采用离子浸提法进行体外实验。先将HA和Si-nHA微球浸泡在75 %乙醇中进行灭菌,PBS清洗。之后将1 g灭菌后的微球浸泡在5 mL无血清和双抗的α-MEM培养基中,置于37 ℃恒温振荡仪中振荡24 h,离心后用0.22 μm滤膜过滤并收集上清液(200 mg/mL),4 ℃保存。用含10 %胎牛血清和1 %青霉素-链霉素的α-MEM培养基稀释上清液,得到质量浓度为6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL的微球浸提液。不同浓度的浸提液保存在4 ℃冰箱内,用于后续实验。

1.5.1 Si-nHA微球对rBMSCs细胞增殖的影响

本实验采用CCK-8法来检测细胞增殖情况。将500个细胞重悬于100 μL含10 %血清和1 %双抗的α-MEM培养基中,并接种到96孔细胞培养板中,置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中,培养24h。待细胞成功黏附在培养板上,吸去原有的培养基并用PBS清洗,更换为不同离子浓度的浸提液继续培养细胞,分别培养1,3,5 d,每隔两天更换一次浸提液。在每个时间点,采用CCK-8试剂盒检测细胞活性。

1.5.2 Si-nHA微球对rBMSCs细胞成骨分化的影响

根据CCK-8细胞增殖的实验结果,本实验选取12.5, 25, 50 mg/mL的浸提液进行实时荧光定量PCR检测。将5×10⁴个细胞接种到6孔细胞培养板中,加入3 mL含10 %血清和1 %双抗的α-MEM培养基。待细胞贴壁后,更换为不同浓度的浸提液培养。培养到4 d时,用Trizol试剂(TAKARA,

Japan)收集细胞并提取RNA,再利用TAKARA试剂盒通过反转录合成互补DNA(cDNA)。采用Bio-Rad real-time PCR系统(Roche, Switzerland)进行实时PCR分析。

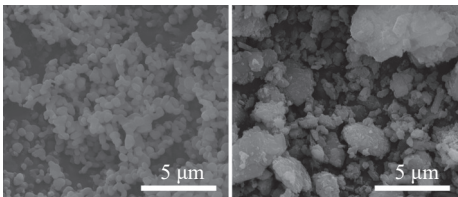
1.6 统计学分析

数据采用Image统计分析软件得到。通过单因素方差分析(OneWay ANOVA)对数据进行统计学分析。*p*<0.05时,差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

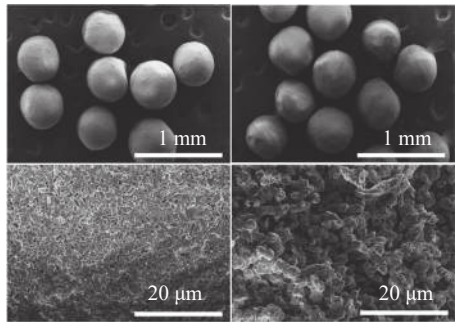
2.1 微球表征

制备HA和CS微球的原材料粉末如图2所示,HA粉末直径在0.1~2.0 μm,CS粉末直径在0.5~6.0 μm。微流控法制备的HA和CS微球煅烧后的表面形貌如图3所示。煅烧后的HA微球平均直径约为477 μm,CS微球平均直径约为480 μm;低倍镜下两组微球分散性和成球度良好,且微球间无粘连;高倍镜下HA微球结构相对致密,表面存在微孔结构,孔径约0.1~0.3 μm,CS微球表面孔径约0.2~0.6 μm。微孔是由于SA煅烧后留下的空隙而形成的。图4的直径分布图表明,采用微流控技术得到的微球均一性良好,直径分布狭窄。



(a) HA粉末 (b) CS粉末

图2 HA和CS粉末的SEM
Fig. 2 SEM of HA and CS powders



(a) HA微球 (b) CS微球

图3 煅烧后微球的表面形貌SEM: 低倍图和高倍图
Fig. 3 SEM of the surface morphology of the sintered microspheres: low magnification images and high magnification images

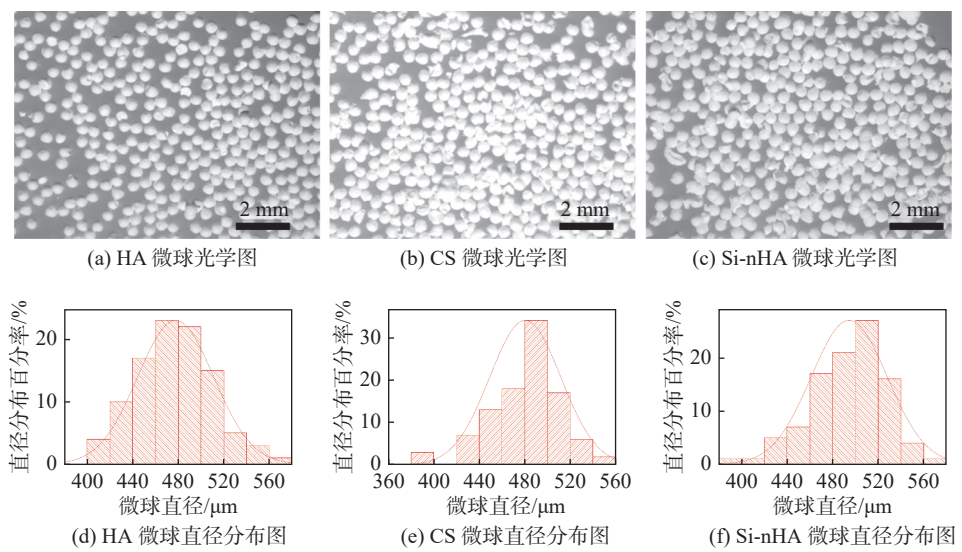


图 4 微球煅烧后的光学图和直径分布图

Fig.4 Optical image and particle size distribution diagram of calcined microspheres

CS 微球在 Na_3PO_4 水溶液经过不同水热时间处理后表面形貌如图 5 所示。水热处理 0.5 h 后, CS 微球表面出现纳米线结构。随着水热时间的增加, 纳米线数量逐渐增加。水热处理 24 h 后微球表面颗粒全部消失, 并被纳米线取代。该纳米线长度约 $1\sim 2\text{ }\mu\text{m}$, 直径约 $100\sim 200\text{ nm}$ 。BET 测试结果显示: HA 和 Si-nHA 微球的比表面积分别为 $0.08\text{ m}^2/\text{g}$ 和 $7.78\text{ m}^2/\text{g}$, 可见采用水热转化法能够获得由纳米线构筑的高比表面积微球材料(见图 6)。

PBS 浸泡实验表明 Si-nHA 微球能够持续性释放 Si 离子(见图 7)。研究表明: 数十微克每毫升的 Si 离子持续释放两周(对应是每天几微克每毫升)被认为是在 Si 离子的治疗范围之内, 可以刺激血管生成, 同时允许细胞存活和增殖^[21]。不同水热时间后产物的 XRD 图谱如图 8(a)所示。水热处理 0.5 h 后, 在 $2\theta=32^\circ$ 和 33° 处出现了两个不属于 CS 的特征峰; 水热处理 2 h 后, 在 $2\theta=31.9^\circ$, 32.3° 和 33.1° 出现了 HA 特有的三强峰, 同时属于 CS 的特征峰强度变弱; 水热处理 12 h 后, 属于 CS 的特征峰基本消失不见; 而水热处理 24 h 后的产物与纯 HA(JCPDS: 090432)基本吻合。另外发现随着水热时间的增加, 产物的结晶度先上升后下降, 可能是由于 Si 离子半径和 P 离子半径接近, 因此 Si 元素可以部分取代 HA 晶格中的 P 元素。由于 Si—O 键长比 P—O 键长长, 所以少量取代时会使晶粒尺寸增加, 从而使结晶度上升。但当过量

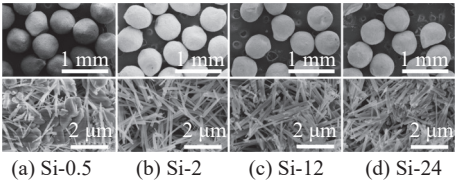


图 5 不同水热时间后产物的表面形貌 SEM: 低倍图和高倍图
Fig.5 SEM of the surface morphology of the product after different hydrothermal time: low magnification images and high magnification images

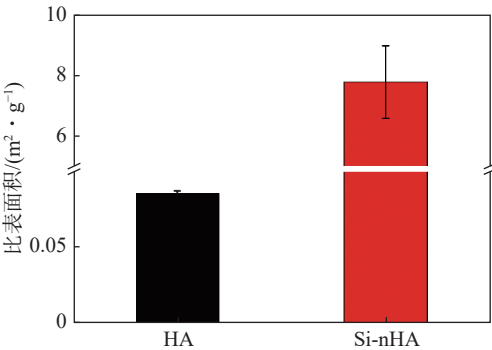


图 6 微球的比表面积

Fig.6 Specific surface area of microspheres

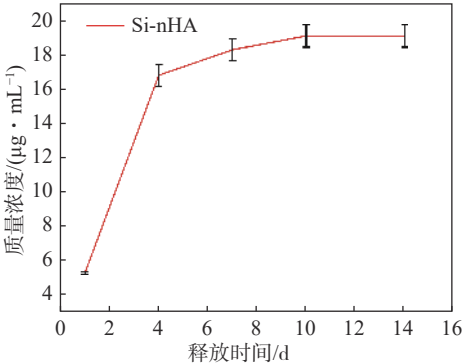


图 7 Si-nHA 微球的 Si 离子释放

Fig.7 Si-ion release of Si-nHA microspheres

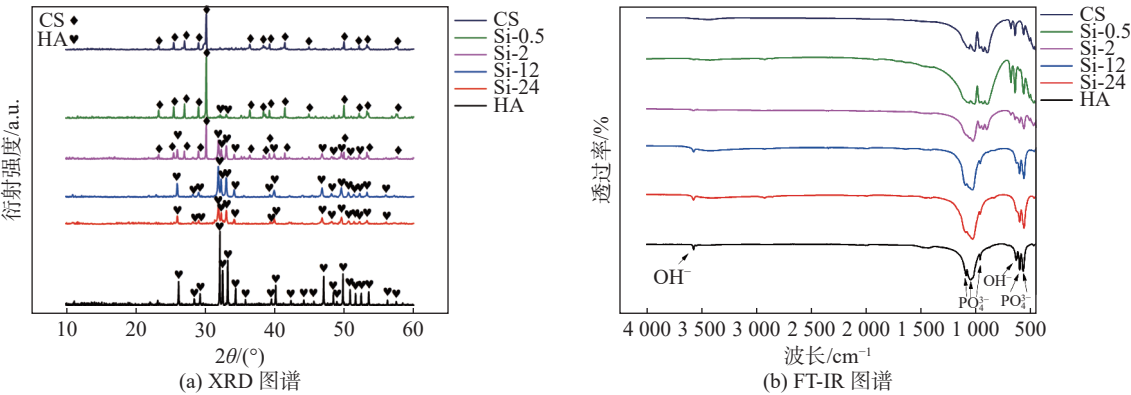


图 8 HA 和 CS 微球在不同水热时间(0, 0.5, 2, 12, 24 h)的 XRD 和 FT-IR 图谱

Fig.8 XRD and FT-IR spectra of HA and CS microspheres at different hydrothermal time (0, 0.5, 2, 12, 24 h)

Si 取代时，会导致羟基(OH⁻)空位的增加，进而使结晶度下降^[5, 34-35]。从图 8(b)的 FT-IR 图谱中可以发现：随着水热时间的增加，在 632 cm⁻¹ 和 3571 cm⁻¹ 处出现 OH⁻ 的伸缩振动吸收峰，在 563, 601, 964, 1034, 1092 cm⁻¹ 处出现 PO₄³⁻ 的特征吸收峰。这进一步证实 CS 在 Na₃PO₄ 水溶液中水热后，CS 物相会转化为 HA 物相。水热处理 24 h 后得到的 Si-nHA 微球吸收峰与 HA 吸收峰基本吻合，但在 632, 964, 3571 cm⁻¹ 处峰的强度不如 HA，这是由于 SiO₄⁴⁻ 基团取代 PO₄³⁻ 时会造成 OH⁻ 空位，降低了吸收峰的强度^[33, 35]。

2.2 BSA 蛋白负载和释放

本文选择 BSA 为蛋白模型进行蛋白负载和释放行为研究。图 9 结果表明，经过 24 h 浸泡后，Si-nHA 微球的载药量为 13.55 μg/mg，而 HA 微球的载药量只有 7.20 μg/mg，这说明具有高比表面积的 Si-nHA 微球拥有更好的药物装载能力。从 SEM 图中可以看出，Si-nHA 微球由 HA 纳米线构成，该纳米结构使得 BSA 不仅可以被吸附在具有较高比表面积的纳米线上，还可以通过纳米线间的孔

隙进入到微球内部，进一步提高载药量。药物释放结果表明：两组微球在前期快速释放 BSA，12 h 后释放变得缓慢；72 h 后，相较于 Si-nHA 微球而言，HA 微球 BSA 释放已经趋近于稳定，可能是部分 BSA 能通过 Si-nHA 纳米线间的孔隙进入到微球内部，延缓其释放。这表明具有纳米结构的 Si-nHA 微球释放蛋白行为更加持久。

2.3 Si-nHA 微球对 rBMSCs 细胞增殖的影响

CCK8 法检测细胞活性的结果如图 10 所示，与空白组(blank)相比，高浓度的 HA 和 Si-nHA 组浸提液能促进细胞增殖。微球浸提液培养的第 1 天，各组细胞活性没有显著差异。细胞培养时间至第 3 天时，实验组的细胞活性明显高于空白组，具有显著差异，且细胞活性与实验组浸提液的浓度呈正相关，但 50 mg/mL 的 Si-nHA 组活性略有下降。25 mg/mL 的 Si-nHA 组与同浓度 HA 组相比，更有利于促进 rBMSCs 的增殖。培养至第 5 天时，12.5, 25 mg/mL 浓度的 Si-nHA 微球浸提液组与同浓度的 HA 微球浸提液组相比，细胞显示出更高的活性。上述结果表明，Si-nHA 微球释放

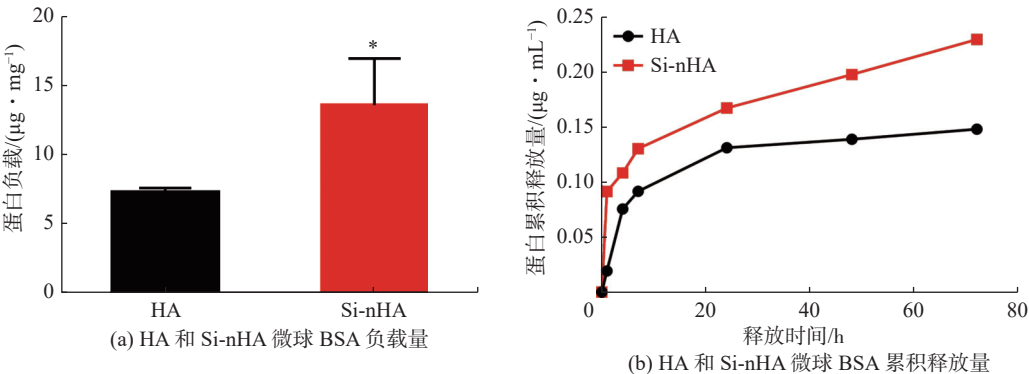
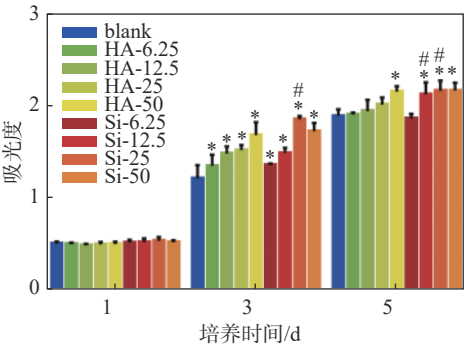


图 9 HA 和 Si-nHA 微球的药物装载和释放行为

Fig.9 Drug loading and release behavior of HA and Si-nHA microspheres



* 表示实验组与空白组的对比结果；#表示 Si-nHA 组与同浓度 HA 组的对比结果 ($p<0.05$)

图 10 rBMSCs 在 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL 浓度组的 HA 和 Si-nHA 微球浸提液中培养 1, 3, 5 d 后的增殖情况

Fig. 10 Proliferation of rBMSCs in the extract of HA and Si-nHA microspheres at the concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL for 1, 3, 5 days

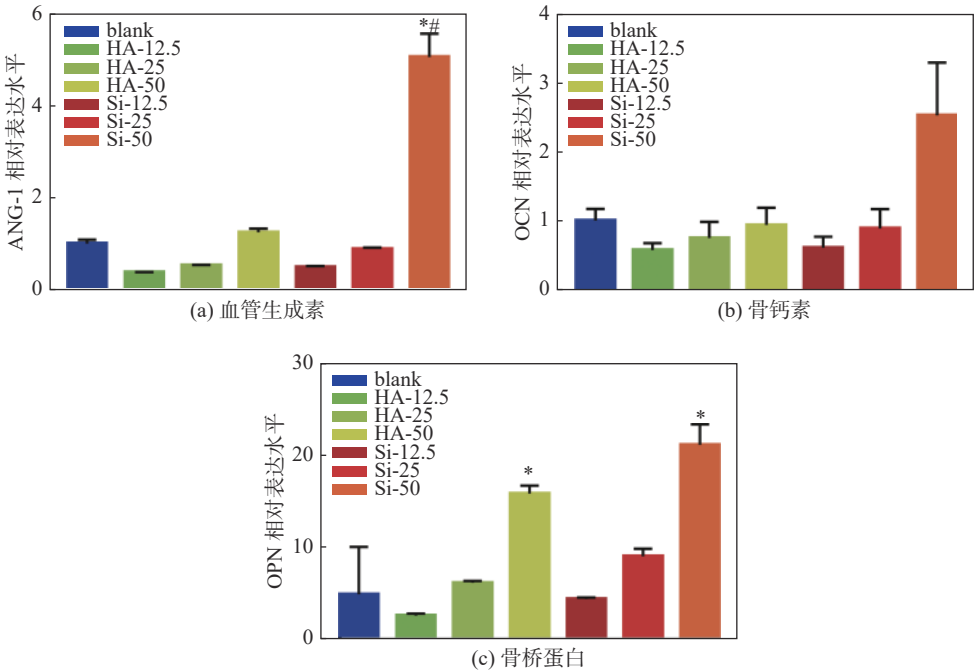
的 Si 离子能够促进 rBMSCs 的增殖。由于浸提液是用不含 Ca, Si 的培养基按一定倍数稀释的, 所以可以从某一浓度的 Si 和 Ca 离子质量浓度推断出其他浓度浸提液的离子浓度。ICP-OES 离子检测结果显示, 12.5 mg/mL 的 Si-nHA 微球浸提液中 Si 离子浓度为 9.6 $\mu\text{g/mL}$ 、Ca 离子浓度为 67.2 $\mu\text{g/mL}$, 而 12.5 mg/mL 的 HA 微球浸提液中 Ca 离子浓度为 72.1 $\mu\text{g/mL}$, 两者 Ca 离子浓度接近。所以先前的研究表明, Si 离子对成骨细胞的影响与浓度相关,

有效浓度在 11.2~179.8 $\mu\text{g/mL}$ ^[35-36]。而 6.25 mg/mL 浓度组的 Si-nHA 浸提液组中 Si 离子浓度仅为 4.8 $\mu\text{g/mL}$, 故对细胞增殖无明显促进作用。

2.4 Si-nHA 微球对 rBMSCs 细胞成骨分化的影响

根据 CCK8 检测结果, 12.5, 25, 50 mg/mL 的 HA 组和 Si-nHA 组浸提液具有较好的促进细胞增殖的性能, 因此, 选择该浓度进行后续的相关成骨和成血管基因水平检测。众所周知: OPN 是参与骨基质形成相关的重要基因; OCN 是成骨细胞骨形成的晚期标志物, 在骨基质中起着重要的矿化调节作用; ANG-1 在一定程度上通过降低由 VEGF 诱导的血管通透性来刺激血管化。由图 11 结果可知, 50 mg/mL 的 Si-nHA 浸提液培养的细胞, 其 OCN, OPN 和 ANG-1 基因表达水平与其他组相比具有显著差异, 说明降解释放的 Si 离子能够促进 rBMSCs 成骨和成血管基因的表达, 且与 Si 离子浓度呈正相关。ICP-OES 离子检测结果显示: 本实验 50 mg/mL 的 Si-nHA 浸提液中 Si 离子浓度约为 38.4 $\mu\text{g/mL}$, 在有效浓度 11.2~179.8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 与先前的研究报道一致^[37]。

研究表明, 在传统的羟基磷灰石基础上掺入硅元素不仅能促进成骨分化, 还能提高血管生成因子的表达水平, 这对于设计具有良好血管再生



* 表示实验组与空白组的对比结果；#表示 Si-nHA 组与 HA 组的对比结果 ($p<0.05$)

图 11 rBMSCs 在 HA 和 Si-nHA 浸提液中培养 4 d 后, 成骨和成血管相关基因的表达情况

Fig.11 Expression of related osteogenic and angiogenic genes after rBMSCs cultured in HA and Si-nHA extracts for 4 days

和成骨功能的骨再生生物材料具有重要意义。

3 结 论

活性离子掺杂是调控生物陶瓷材料成骨活性的重要方法之一。本研究采用微流控技术,以SA水溶液为分散相、二甲基硅油为连续相、Ca-EDTA为钙源、乙酸为引发剂,制备出直径均一的CS微球,平均直径为480 μm。同时,以其为前驱体,在Na₃PO₄水溶液中进行水热转化处理,制备了具有纳米线结构的掺硅HA微球(Si-nHA)。与传统的纯HA微球相比,高比表面积Si-nHA微球具有更加优异的BSA蛋白负载和缓释性能。体外细胞实验表明:Si-nHA微球降解释放的Si组分能促进rBMSCs的增殖和成骨分化,且与Si组分的浓度呈正相关。此外,Si-nHA微球降解释放的Si组分还能促进血管生成,这对于修复骨缺损具有重要意义。本研究为载药型可注射生物活性骨修复材料的制备与应用提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 朱敏, 黄婷, 杜晓宇, 等. 生物材料的3D打印研究进展[J]. 上海理工大学学报, 2017, 39(5): 473–483, 489.
- [2] 代钊, 王铭, 王双, 等. 氧化锆基微量元素共掺杂羟基磷灰石增韧涂层研究[J]. 无机材料学报, 2020, 35(2): 179–186.
- [3] WANG W H, YEUNG K W K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review[J]. *Bioactive Materials*, 2017, 2(4): 224–247.
- [4] 常宇辰, 林子扬, 谢昕, 等. 基于介孔硼硅酸盐生物活性玻璃微球的可注射复合骨水泥[J]. *无机材料学报*, 2020, 35(12): 1398–1406.
- [5] TANG X L, XIAO X F, LIU R F. Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method[J]. *Materials Letters*, 2005, 59(29/30): 3841–3846.
- [6] 吴重草, 郇志广, 朱钰方, 等. 3D打印HA微球支架的制备与表征[J]. *无机材料学报*, 2021, 36(6): 601–607.
- [7] 王硕硕, 何星. 羟基磷灰石的合成及其应用的研究进展[J]. *有色金属材料与工程*, 2020, 41(6): 48–54.
- [8] 陈小波, 何星. 羟基磷灰石基生物材料培养破骨细胞研究现状[J]. *有色金属材料与工程*, 2020, 41(5): 54–60.
- [9] LEE M C, SEONWOO H, JANG K J, et al. Development of novel gene carrier using modified nano hydroxyapatite derived from equine bone for osteogenic differentiation of dental pulp stem cells[J]. *Bioactive Materials*, 2021, 6(9):

2742–2751.

- [10] SUN W J, ZHOU Y N, ZHANG X R, et al. Injectable nano-structured silicon-containing hydroxyapatite microspheres with enhanced osteogenic differentiation and angiogenic factor expression[J]. *Ceramics International*, 2018, 44(16): 20457–20464.
- [11] WEI G, MA P X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(19): 4749–4757.
- [12] CHEN S Y, GUO R Y, XIE C L, et al. Biomimetic mineralization of nanocrystalline hydroxyapatites on aminated modified polylactic acid microspheres to develop a novel drug delivery system for alendronate[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 110: 110655.
- [13] LIN K L, CHANG J, LIU X G, et al. Synthesis of element-substituted hydroxyapatite with controllable morphology and chemical composition using calcium silicate as precursor[J]. *CrystEngComm*, 2011, 13(15): 4850–4855.
- [14] SIVARAJ K K, ADAMS R H. Blood vessel formation and function in bone[J]. *Development*, 2016, 143(15): 2706–2715.
- [15] MOHSENI-VADEGHANI E, KARIMI-SOFLOU R, KHORSHIDI S, et al. Fabrication of oxygen and calcium releasing microcarriers with different internal structures for bone tissue engineering: solid filled versus hollow microparticles[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 197: 111376.
- [16] ZHAO R, CHEN S Y, ZHAO W L, et al. A bioceramic scaffold composed of strontium-doped three-dimensional hydroxyapatite whiskers for enhanced bone regeneration in osteoporotic defects[J]. *Theranostics*, 2020, 10(4): 1572–1589.
- [17] LEE J H, KO I H, JEON S H, et al. Micro-structured hydroxyapatite microspheres for local delivery of alendronate and BMP-2 carriers[J]. *Materials Letters*, 2013, 105: 136–139.
- [18] ESPOSTI L D, ADAMIANO A, SILIQUI D, et al. The effect of chemical structure of carboxylate molecules on hydroxyapatite nanoparticles. A structural and morphological study[J]. *Bioactive Materials*, 2021, 6(8): 2360–2371.
- [19] 田键, 汤钊, 胡攀, 等. 羟基磷灰石复合及掺杂改性研究进展[J]. *有色金属材料与工程*, 2021, 42(4): 55–60.
- [20] ELRAYAH A, ZHI W, FENG S, et al. Preparation of Micro/Nano-structure copper-substituted hydroxyapatite scaffolds with improved angiogenesis capacity for bone regeneration[J]. *Materials*, 2018, 11(9): 1516.
- [21] DASHNYAM K, JIN G Z, KIM J H, et al. Promoting angiogenesis with mesoporous microcarriers through a

- synergistic action of delivered silicon ion and VEGF[J]. *Biomaterials*, 2017, 116: 145–157.
- [22] WEE C Y, YANG Z J, THIAN E S. Past, present and future development of microspheres for bone tissue regeneration: a review[J]. *Materials Technology*, 2021, 36(6): 364–374.
- [23] SEONG Y J, SONG E H, PARK C, et al. Porous calcium phosphate-collagen composite microspheres for effective growth factor delivery and bone tissue regeneration[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 109: 110480.
- [24] WEI Z J, WANG C Y, LIU H, et al. Facile fabrication of biocompatible PLGA drug-carrying microspheres by O/W pickering emulsions[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 91: 97–105.
- [25] GHOSH DASTIDAR D, SAHA S, CHOWDHURY M. Porous microspheres: synthesis, characterisation and applications in pharmaceutical & medical fields[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 548(1): 34–48.
- [26] WU J, KONG T T, YEUNG K W K, et al. Fabrication and characterization of monodisperse PLGA-alginate core-shell microspheres with monodisperse size and homogeneous shells for controlled drug release[J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(7): 7410–7419.
- [27] BEE S L, HAMID Z A A, MARIATTI M, et al. Approaches to improve therapeutic efficacy of biodegradable PLA/PLGA microspheres: a review[J]. *Polymer Reviews*, 2018, 58(3): 495–536.
- [28] 高龙, 张赵文斌, 常江. 生物玻璃/聚乳酸多孔微球的制备及其作为细胞载体的研究 [J]. *无机材料学报*, 2020, 35(10): 1163–1168.
- [29] ELTOHAMY M, SHIN U S, WON J E, et al. Electrospayed tricalcium phosphate spherical microcaps and antibiotic drug delivery[J]. *Materials Letters*, 2011, 65(13): 2043–2046.
- [30] 胡亚萍, 田正芳, 朱敏, 等. 喷雾干燥可控制备生物玻璃微球及其体外生物活性研究 [J]. *无机材料学报*, 2020, 35(11): 1268–1276.
- [31] LI B, LIU Z N, YANG J W, et al. Preparation of bioactive β -tricalcium phosphate microspheres as bone graft substitute materials[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 70(2): 1200–1205.
- [32] JO Y K, LEE D. Biopolymer microparticles prepared by microfluidics for biomedical applications[J]. *Small*, 2020, 16(9): 1903736.
- [33] DASHTIMOGHADAM E, FAHIMIPOUR F, TONGAS N, et al. Microfluidic fabrication of microcarriers with sequential delivery of VEGF and BMP-2 for bone regeneration[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 11764.
- [34] YU H G, LIU K J, ZHANG F M, et al. Microstructure and *in vitro* bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatite[J]. *Silicon*, 2017, 9(4): 543–553.
- [35] 翟倩倩, 赵士贵, 王孝海, 等. 仿生纳米含硅羟基磷灰石的合成与表征 [J]. *无机材料学报*, 2013, 28(1): 58–62.
- [36] BIANCO A, CACCIOTTI I, LOMBARDI M, et al. Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: synthesis, thermal stability and sinterability[J]. *Materials Research Bulletin*, 2009, 44(2): 345–354.
- [37] LIN K L, ZHAI D, ZHANG N, et al. Fabrication and characterization of bioactive calcium silicate microspheres for drug delivery[J]. *Ceramics International*, 2014, 40(2): 3287–3293.

(编辑: 丁红艺)