

3D 打印制备镁黄长石生物陶瓷骨组织工程支架及其性能

施哲^{1,2}, 刘伟业^{2,3}, 翟东², 谢建军¹, 朱钰方²

(1. 上海大学 材料科学与工程学院, 上海 200444; 2. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 上海 200050; 3. 上海理工大学 材料与化学学院, 上海 200093)

摘要: 具备良好成骨性能和降解速率的生物陶瓷骨组织工程支架在骨修复领域极具应用潜力。镁黄长石($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$)因其具有良好的力学性能、生物降解能力以及促成骨性能而备受关注。本研究以硅树脂为聚合物先驱体、碳酸钙与氧化镁为活性填料制备打印浆料, 采用挤出式 3D 打印技术在室温条件下制备支架素坯, 并在惰性气氛下高温烧结制备了镁黄长石生物陶瓷支架, 并对比研究了镁黄长石支架与斜硅钙石(Ca_2SiO_4)、镁橄榄石(Mg_2SiO_4)支架在结构、抗压强度、体外降解能力以及体外生物学性能等方面的差异。结果表明: 镁黄长石支架与斜硅钙石、镁橄榄石支架具有相似的三维多孔结构, 抗压强度、降解速率介于镁橄榄石和斜硅钙石之间, 但促进骨髓间充质干细胞的成骨基因表达能力显著强于镁橄榄石和斜硅钙石支架。本研究证实采用 3D 打印制备的镁黄长石支架有望作为骨组织工程较理想的支架。

关键词: 聚合物先驱体; 3D 打印; 生物陶瓷; 镁黄长石

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

Akermanite Scaffolds for Bone Tissue Engineering: 3D Printing Using Polymer Precursor and Scaffold Properties

SHI Zhe^{1,2}, LIU Weiye^{2,3}, ZHAI Dong², XIE Jianjun¹, ZHU Yufang²

(1. School of Materials Science and Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; 3. School of Materials and Chemistry, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Bioceramic scaffolds with excellent osteogenesis ability and degradation rate exhibit great potential in bone tissue engineering. Akermanite ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) has attracted much attention due to its good mechanical property, biodegradability and enhanced bone repair ability. Here, akermanite ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) scaffolds were fabricated by an extrusion-type 3D printing at room temperature and sintering under an inert atmosphere using printing slurry composed of a silicon resin as polymer precursor, and CaCO_3 and MgO as active fillers. Furthermore, the differences in structure, compressive strength, *in vitro* degradation, and biological properties among akermanite, larnite (Ca_2SiO_4) and forsterite (Mg_2SiO_4) scaffolds were investigated. The results showed that the akermanite scaffold is similar to those of larnite and forsterite in 3D porous structure, and its compressive strength and degradation rate were between those of the larnite and forsterite scaffolds, but it showed a greater ability to stimulate osteogenic gene expression of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) than both larnite and

收稿日期: 2022-10-27; 收到修改稿日期: 2022-11-23; 网络出版日期: 2023-12-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51872185) National Natural Science Foundation of China(51872185)

作者简介: 施哲(1998-), 男, 硕士研究生. E-mail: zheshi1998@163.com

SHI Zhe (1998-), male, Master candidate. E-mail: zheshi1998@163.com

通信作者: 谢建军, 副教授. E-mail: xiejianjun@shu.edu.cn; 朱钰方, 研究员. E-mail: zjf2412@163.com

XIE Jianjun, associate professor. E-mail: xiejianjun@shu.edu.cn; ZHU Yufang, professor. E-mail: zjf2412@163.com

forsterite scaffolds. Hence, such 3D printed akermanite scaffold possesses great potential for bone tissue engineering.

Key words: polymer precursor; 3D printing; bioceramics; akermanite

骨骼是一种保护内器官,并提供身体支撑的特殊组织,尽管其具有一定的自我修复与再生能力,但因先天性缺陷、退行性疾病、创伤性损伤或肿瘤切除等原因造成的严重骨缺损难以实现自行修复,临床干预是实现其功能恢复和完全修复的最佳手段^[1-2]。目前临床上严重骨缺损的治疗通常使用生物惰性金属装置进行骨固定,或采用自体、异体骨移植。然而,金属骨固定装置往往需要二次手术取出,而自体骨移植来源有限且会导致供体部位创伤,异体骨移植还会存在供体疾病传播与产生免疫排斥的风险等^[3]。近年来,骨组织工程技术的发展为促进骨缺损修复提供了新的策略,而组织工程支架在骨组织修复中发挥着重要作用,可为细胞提供合适的生长环境,并为骨缺损处提供有效的机械支撑^[4-6]。

硅酸盐生物陶瓷支架可以为骨缺损处提供有效的力学支撑,其释放的活性无机离子可促进骨组织与血管的再生,同时支架逐步降解有利于新骨逐步填充骨缺损处,实现骨缺损的完全愈合^[7-9]。因此,硅酸盐生物陶瓷支架在骨组织工程领域备受关注。目前,硅酸钙(CaSiO_3)、斜硅钙石(Ca_2SiO_4)、镁黄长石($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$)、镁橄榄石(Mg_2SiO_4)、锌黄长石($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$)等硅酸盐生物陶瓷支架被开发用于骨缺损修复^[10-12]。然而,不同种类硅酸盐生物陶瓷支架的机械强度、降解速率以及生物学性能都存在差异,造成其骨修复性能也各不相同,因而需要探索制备具有良好物理、化学性能与有效促进骨缺损修复的硅酸盐生物陶瓷支架。

研究表明,镁黄长石(Akermanite, AKT)生物陶瓷具有与人体骨相近的抗压强度(约 176 MPa)以及适中的降解速率^[13-14]。相比于传统的钙磷基(Ca-P)生物陶瓷,钙镁硅酸盐基(Ca-Mg-Si)生物陶瓷展现出力学性能可调和活性离子释放能力更为适中的性能,使其成为骨修复材料的潜在选择^[15]。Castilho 等^[16]采用 3D 打印制备 40%孔隙率的致密 β -磷酸三钙支架只有不足 6 MPa 的抗压强度,而 Zhang 与 Feng 等^[17-18]制备的 AKT 支架当孔隙率接近 40%时均能获得 >20 MPa 的抗压强度。另一方面, Ca-Mg-Si 生物陶瓷的降解速率可通过镁含量进行一定程度的调控。Wu 等^[19]通过热压烧结制备白硅钙石($\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$)、AKT 与透辉石($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$)硅酸盐陶瓷材料,发现其离子释放速率随镁含量的提升而显著降低,即白硅钙石 > AKT > 透辉石。因此,镁黄

长石生物陶瓷支架受到越来越多的研究。

目前,已报道的 AKT 支架制备方法主要通过溶胶-凝胶等方法制得 AKT 粉体后结合不同的成型工艺制备高孔隙率生物陶瓷支架^[20]。例如, Han 等^[21]使用溶胶-凝胶法合成的 AKT 粉体通过选择性激光烧结 3D 打印制备了孔隙率为 57.9%的生物陶瓷支架。Wu 等^[22]将 AKT 粉体与传统的牺牲模板法相结合,通过控制 AKT 浆料涂覆的厚度获得了 63.5%~90.3%孔隙率的生物陶瓷支架。Chen 等^[23]将聚乙二醇作为造孔剂,通过调节其与 AKT 粉体的比例得到了不同孔隙率和抗压强度的镁黄长石泡沫陶瓷。Aliakbar 等^[24]则通过固相反应合成 AKT 粉体后结合空间夹持技术制备了孔隙率为 82%的镁黄长石陶瓷支架。以上 AKT 支架的制备方法都包括了 AKT 粉体制备、支架成型、高温烧结等工艺过程,存在制备周期长、制备效率较低等问题。

聚合物前驱体法制备硅酸盐陶瓷是通过将含硅聚合物前驱体与活性填料混合成型,经高温热解促发原位反应得到硅酸盐陶瓷材料^[25]。已有研究表明:聚合物前驱体法与传统的造孔剂法、牺牲模板法、冷冻干燥法、发泡法等工艺结合能够成功制备出高孔隙率的生物陶瓷支架,这极大简化了生物陶瓷支架的制备流程^[26-28]。但是,结合传统制备工艺得到的生物陶瓷支架难以与不规则骨缺损的形状匹配,且不易调控支架结构及内部孔道^[29]。

相比传统的支架制备工艺,3D 打印技术能够快速高效地制备复杂形状的三维多孔支架,并且能够从微米尺度精确调控孔隙结构。因此,已有研究者开始探索 3D 打印结合聚合物前驱体法制备硅酸盐生物陶瓷支架。例如, Fu 等^[30]以硅树脂和碳酸钙为原料,经 3D 打印和高温烧结制备了斜硅钙石(Ca_2SiO_4 , C2S)生物陶瓷支架。该支架具有诱导新骨生成的能力,但其过快的降解速率导致周围微环境呈现较高碱性而不利于细胞行为。Zhu 等^[31]以硅树脂和氧化镁粉末为原料,同样采用 3D 打印成型并高温烧结制备了镁橄榄石(Mg_2SiO_4 , M2S)生物陶瓷支架。虽然支架的抗压强度可达到 30 MPa,但由于其较难降解和生物活性较低,限制了支架的骨修复能力。如果 3D 打印结合聚合物前驱体法能够制备含 Ca-Mg-Si 的 AKT 支架,则有望得到理化性能和成骨性能更好的骨修复材料。但目前尚无 3D 打印聚合物前驱体法制备镁黄长石生物陶瓷支架的报道。

本研究以硅树脂、碳酸钙和氧化镁为原料,采用3D打印结合聚合物前驱体法制备镁黄长石生物陶瓷支架,详细对比研究其与相同方法制备的斜硅钙石和镁橄榄石生物陶瓷支架在结构、抗压强度、体外降解性以及体外生物学性能等方面的差异以评估其用作骨修复材料的潜力。

1 实验方法

1.1 材料及试剂

实验采用的碳酸钙(CaCO_3 , $\geq 99.5\%$)、氧化镁(MgO , $\geq 98.5\%$)、异丙醇($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, $\geq 98\%$)均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。商用硅树脂(Polysilsesquioxane, Silres[®]MK)购自德国Wacker-Chemie公司。

1.2 镁黄长石生物陶瓷支架的制备

将 CaCO_3 与 MgO 粉末用行星磨(QM-3SP2, 南京大学仪器厂)球磨12 h,然后过400目(38 μm)筛网备用。支架制备过程如下:首先将 CaCO_3 粉末、 MgO 粉末和MK硅树脂以 $\text{Ca}:\text{Mg}:\text{Si}$ 为2:1:2的化学计量比加入一定量的异丙醇中,充分搅拌至形成均匀的糊状浆料。然后,将浆料转移至打印料仓中,并固定在3D打印机(BioScaffolder 3.1, Fraunhofer IWS, Germany)上;通过导入预先设计的三维支架模型,在电脑软件控制下打印挤出一排排杆状纤维组成栅格状的圆形二维平面($\phi 9$ mm),相邻平面的纤维以 60° 夹角排列,层层堆叠形成三维(3D)多孔支架生坯。其中注射泵的气体压力为350~550 kPa,打印速度为2~5 mm/s,针头尺寸为400 μm 。最后,室温下干燥48 h后的支架生坯在氮气(N_2)气氛炉中以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升温至 1400°C 并保温3 h,自然冷却至室温后得到AKT生物陶瓷支架。

斜硅钙石和镁橄榄石支架的制备方法除了打印浆料组成不同外,其它制备过程与镁黄长石支架制备相同,即斜硅钙石支架的打印浆料组成中 $\text{Ca}:\text{Mg}:\text{Si}$ 的化学计量比为4:0:2,镁橄榄石支架的打印浆料组成中 $\text{Ca}:\text{Mg}:\text{Si}$ 的化学计量比为0:3:2。

1.3 支架的理化性能表征

采用X射线衍射(X-ray diffraction, XRD, Bruker D8Advance, Germany)分析生物陶瓷支架的物相组成。采用场发射电子扫描显微镜(Scanning electron microscope, SEM, S-4800, Hitachi, Japan)表征支架的表面与断面形貌。使用X射线断层扫描(Micro-CT, SKYSCAN1172, Bruker, Germany)对支架进行断层

扫描,重构后计算支架的孔隙率。通过万能材料试验机(Instron-5566, American)以2 mm/min的位移速度测定支架的抗压强度。

支架体外降解性能评价方法如下:将支架浸泡在 37°C 的Tris-HCl缓冲溶液中,浸泡1、3、5、7、14和21 d分别取出、洗涤、烘干,称量支架剩余重量。控制Tris-HCl缓冲溶液体积与支架原始质量比例为200 mL/g,并且在每次称重后重新加入相应比例的Tris-HCl缓冲液。此外,将支架置于 37°C 的Tris-HCl缓冲溶液中,使用精密pH计追踪测定支架持续21 d的降解过程对溶液pH的影响,控制Tris-HCl体积与支架原始质量的比例为200 mL/g。

1.4 细胞实验

采用兔源骨髓间充质干细胞(rBMSCs)评价支架的细胞增殖、碱性磷酸酶活性以及细胞的相关成骨基因表达情况。细胞实验所用支架都经灭菌锅灭菌(121°C , 30 min)处理。

采用CCK-8(Cell counting Kit-8)方法评估细胞在支架表面的增殖。每组4个支架放入24孔板中,每个支架上接种 1×10^5 个rBMSCs,随后转移至 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的气氛培养箱内培养。培养1、3和7 d后,向每个孔内加入400 μL 工作液(由CCK-8溶液和培养基按体积比1:9混合得到),继续孵育2 h后每孔吸取100 μL 溶液转移至96孔板中,并通过多功能酶标仪(SpectraFluor Plus, Tecan, Crailsheim, Germany)在 $\lambda=450$ nm处测量吸光度,以评估rBMSCs在支架表面的增殖情况。

rBMSCs在支架上的早期成骨分化能力通过碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase activity, ALP)活性进行评估:每个支架上接种 1×10^5 个rBMSCs后,置于24孔板内培养,并保持隔天更换一次培养基。培养7 d后,小心吸取培养基并使用磷酸缓冲液(PBS)清洗3次,接着加入200 μL 辛基酚聚氧乙烯醚(Triton X-100)溶液裂解细胞并超声分散。然后,将细胞裂解液于 4°C 、14000 r/min转速下离心,吸取50 μL 的上层清液并与150 μL 的ALP标准试剂混合;再使用多功能酶标仪测定混合溶液在405 nm处的吸光度值。另一方面,根据ALP检测试剂盒的说明,采用BCA法对蛋白进行定量检测。即先吸取25 μL 的细胞裂解液与200 μL 的蛋白定量试剂混合,在 37°C 下反应30 min,用酶标仪检测其在562 nm处的吸光度值。通过蛋白的标准曲线,吸光度值转化为蛋白浓度。然后将数据归一,得到细胞内的总蛋白量。相对ALP活性即为吸光度数值(405 nm处)与100 μL 细胞裂解上清液中的总蛋白量的比值。

利用 RT-PCR 进一步测定 rBMSCs 在支架上的成骨分化能力, 包括骨钙蛋白(OCN)、骨桥蛋白(OPN)、I 型胶原(Col-I)、骨唾液酸蛋白(BSP)和 Runt 相关转录因子(Runx2)的成骨基因表达情况。首先在每个支架上接种 1×10^5 rBMSCs, 在细胞培养箱内培养 7 d。接着, 采用 PBS 清洗支架 3 次, 通过 Trizol 试剂裂解细胞并提取 RNA, 再利用 PrimeScript 试剂盒(TOYOBO, Japan)反转录 DNA 成 cDNA, 然后使用 SYBR Green 检测试剂(TaKaRa, Japan)进行 RT-PCR 分析, 每个组分都进行 4 组平行实验, 取平均值。最后, 利用 Ct(2- Δ Ct)法计算基因表达状况。

2 结果与讨论

2.1 不同钙镁硅比例支架的成分分析

图 1 为不同钙镁硅比例的支架生坯在 1400 °C 烧结所得的 XRD 图谱。从图中可以看出, 随着支架生坯中镁含量减少与钙含量增多, 支架的相组成由镁元素主导的硅酸盐相向钙元素主导的硅酸盐相转变。进一步可以看出, 当支架生坯中 Ca : Mg : Si 化学计量比分别为 0 : 3 : 2, 2 : 1 : 2 与 4 : 0 : 2 时得到了镁橄榄石(M2S, JCPDS 85-1361), 镁黄长石(AKT, JCPDS 87-0050)和斜硅钙石(C2S, JCPDS 70-0388)的高纯相, 而其它化学计量比的条件下都得到两种或三种混合物相的陶瓷支架材料^[32]。其中, 镁黄长石与斜硅钙石支架中各元素的化学计量比与支架生坯的化学组成比例相同, 而镁橄榄石支架则存在较大的差异, 这可能由于高温烧结过程中, 硅树脂裂解生成的硅与镁的挥发程度差异所致。Bernado 等^[32] 研究报道了以 MgO 和硅树脂为原料且镁硅化学计量比为 4 : 2 时, 高温烧结产物除了镁橄榄石相之外会形成 MgO 与顽灰石(MgSiO₃)杂相。

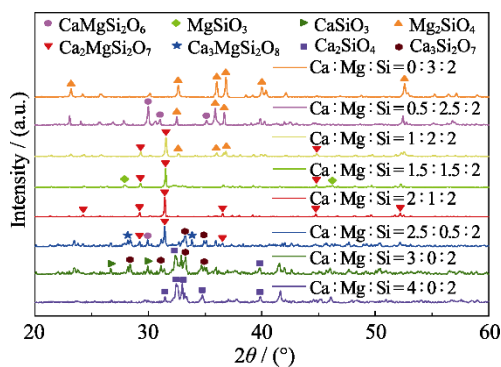


图 1 1400 °C 烧结不同钙镁硅比例支架的 XRD 图谱
Fig. 1 XRD patterns of the scaffolds with different Ca : Mg : Si ratio sintered at 1400 °C

2.2 生物陶瓷支架的微观形貌

图 2 为 C2S、AKT 和 M2S 三种支架的表面 SEM 照片。从图中可以看出, 三种生物陶瓷支架均具有规则的三维连通大孔结构, 层与层之间的角度为 60°, 与打印模型设计一致。进一步可以看出, C2S 支架筋条表面存在大量的微米级小孔, 筋条内致密化程度较低。而 M2S 支架筋条表面几乎看不到存在微米级小孔, 其筋条内瓷体致密化程度最高。相比之下, AKT 支架筋条表面也存在少量微米级小孔, 但其筋条内致密化程度明显增强。

图 3 为 C2S、AKT 和 M2S 三种支架的断面 SEM 照片。与三种支架筋条的表面致密化情况相似, C2S 支架筋条内部同样存在大量气孔, 可能是活性填料 CaCO₃ 在升温过程中分解产生 CO₂ 所致。而 M2S 支架筋条内部几乎无气孔, 致密化程度高。相比之下, AKT 支架筋条内部虽然也存在气孔, 但是其气孔量明显下降。从支架断面形貌判断, C2S 与 AKT 支架的断裂方式主要为穿晶断裂和沿弱结合的晶面

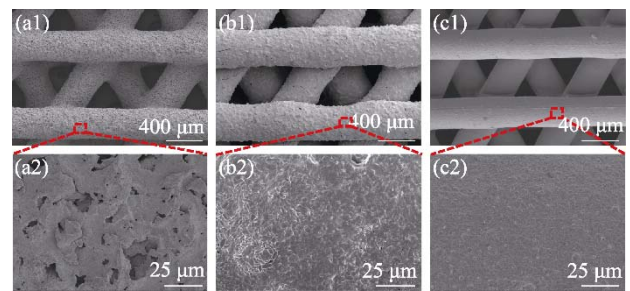


图 2 (a1, a2)C2S、(b1, b2)AKT 和(c1, c2)M2S 生物陶瓷支架的表面 SEM 照片
Fig. 2 SEM images of the surfaces of bioceramic scaffolds (a1, a2) C2S, (b1, b2) AKT and (c1, c2) M2S

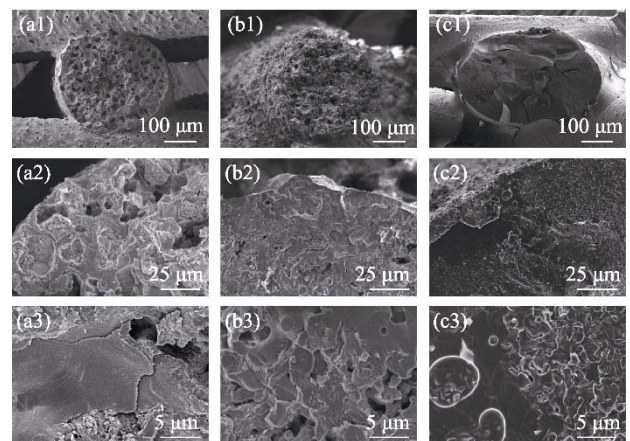


图 3 (a1~a3)C2S、(b1~b3)AKT 和(c1~c3)M2S 生物陶瓷支架的断面 SEM 照片
Fig. 3 SEM images of the fracture surfaces of bioceramic scaffolds (a1-a3) C2S, (b1-b3) AKT and (c1-c3) M2S

解离断裂, 而 M2S 支架则主要以沿晶断裂的方式发生断裂。以上结果也表明: AKT 支架筋条的致密化程度介于 C2S 支架和 M2S 支架之间, 即 C2S 支架 < AKT 支架 < M2S 支架。一方面, 可能是由于 CaCO_3 活性填料减少可以降低陶瓷烧结过程中因产生 CO_2 气体而造成的气孔量^[33]; 另一方面, Mg 元素有助于提升硅酸盐陶瓷烧结驱动力, 使支架在烧结过程中有效消除孔隙并提高致密化程度^[34]。

2.3 生物陶瓷支架的孔隙率和抗压强度

本研究中 C2S、AKT 和 M2S 支架的孔隙率通过 Micro-CT 扫描支架后计算得到。如图 4(a)所示, C2S、AKT 和 M2S 三种支架的孔隙率分别为 $(35.01 \pm 3.21)\%$ 、 $(44.89 \pm 3.34)\%$ 和 $(43.98 \pm 7.64)\%$ 。可见 AKT 与 M2S 支架的孔隙率无明显差异, 而略高于 C2S 支架的孔隙率, 这是由于 C2S 支架配方中 CaCO_3 含量高, CaCO_3 分解后质量损失大, 筋条体缩聚大, 仔细对比图 3(a1, b1, c1)可知, 尽管 C2S 筋条内有大量微米级小孔存在, 但仍造成筋条径向收缩, 进而使得筋条间网格空间缩聚, 造成 C2S 支架的孔隙率降低, 使得 AKT 的略高。

C2S、AKT 和 M2S 支架的抗压强度分别为 (10.15 ± 2.07) 、 (17.36 ± 2.70) 和 (33.64 ± 8.78) MPa, 如

图 4(b)所示。虽然 C2S 支架孔隙率略低于 AKT 和 M2S 支架, 但是三种支架的抗压强度依然呈现 AKT 支架居中, 即 C2S 支架 < AKT 支架 < M2S 支架, 这与三种支架筋条的致密化程度结果相一致。

2.4 生物陶瓷支架的降解及 pH 变化

图 5(a)是 C2S、AKT 和 M2S 三种支架在 Tris-HCl 溶液中浸泡 21 d 的剩余质量曲线, 由图可知, 经过 21 d 的 Tris-HCl 浸泡, C2S、AKT 和 M2S 支架的降解率分别为 65.62%、44.42% 和 1.55%, 可见 AKT 居于其余两者之间。图 5(b)是 C2S、AKT 和 M2S 三种支架在 Tris-HCl 溶液中浸泡 21 d 的 pH 变化曲线, 由图可见, 各组支架浸泡后溶液的 pH 整体呈上升趋势, C2S、AKT 和 M2S 支架浸泡 21 d 后的 Tris-HCl 溶液的 pH 分别为 9.05、8.24 和 7.3, 即 AKT 的居于其余二者之间, C2S 支架筋条的致密度最低, 内部微米级小孔多, 内部输运扩散阻力相对较小, 降解速率最快。一方面快速降解释放 Ca^{2+} 使得周围微环境碱性偏高, 不利于细胞行为^[35]; 另一方面, 过快的降解速率极易导致支架的力学支撑在新骨与血管长入前失效^[36]。M2S 支架降解非常缓慢, 虽然能较好稳定支架周围的 pH 微环境, 但是会造成类似惰性植入物的问题^[37]。相比之下, AKT 支架

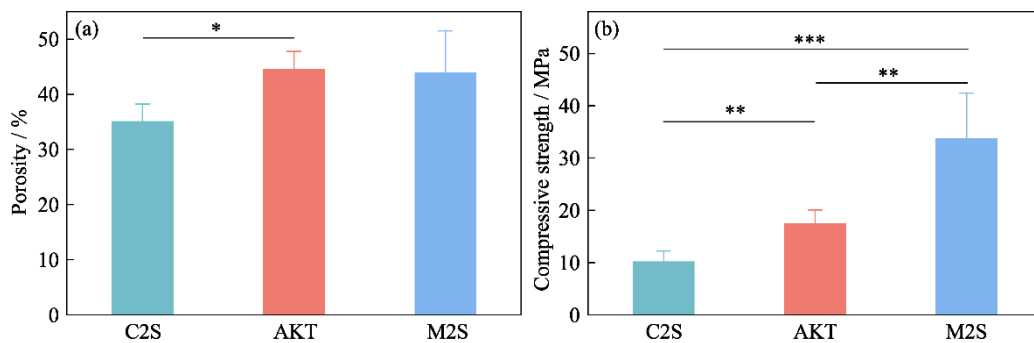


图 4 C2S、AKT 和 M2S 生物陶瓷支架的(a)孔隙率和(b)抗压强度

Fig. 4 (a) Porosities and (b) compressive strengths of C2S, AKT and M2S bioceramic scaffolds

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

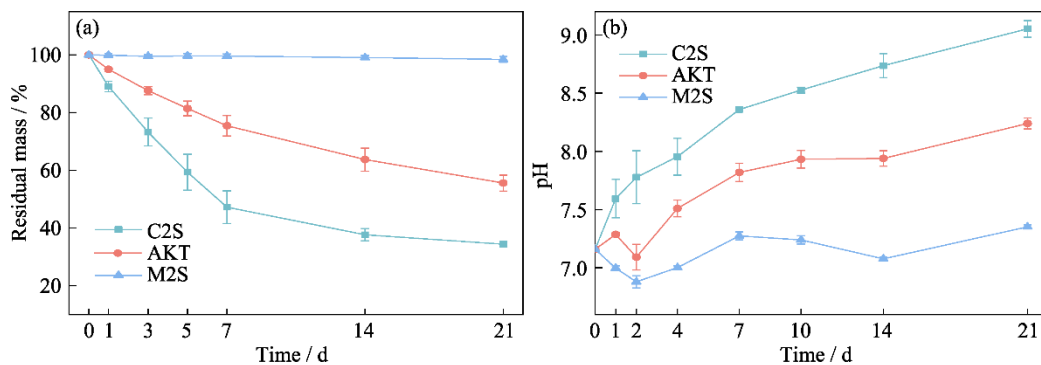


图 5 (a) C2S、AKT 和 M2S 支架在 Tris-HCl 溶液中浸泡 21 d 的降解剩余质量和 (b) 溶液的 pH 变化曲线

Fig. 5 (a) Residual mass curves and (b) pH changes of C2S, AKT and M2S bioceramic scaffolds after soaking in Tris-HCl buffer for 21 d

具有生物降解性能,且降解速率缓慢,这一方面能较好稳定支架周围微环境的 pH 变化,形成的弱碱性微环境也有利于新骨生成^[38];另一方面,缓慢降解也有助于维持 AKT 支架的力学支撑作用^[39]。例如,Zhang 等^[17]的研究发现 AKT 支架植入兔子股骨内 8 w 后,支架内部长入大量新骨组织与血管,展现出良好的骨修复潜力。因此,AKT 支架相较于 C2S 和 M2S 支架具有更优的降解性能。

2.5 生物陶瓷支架的细胞实验

图 6(a)为 rBMSCs 在 C2S、AKT 和 M2S 支架上培养 1、3 和 7 d 后的增殖情况,可以看出,三组支架上的 rBMSCs 都随细胞培养时间的增加而出现明显增殖。培养 3 和 7 d 后,AKT 与 C2S 支架上的细胞增长率之间没有显著性差异,但显著高于 M2S 支架,这表明 rBMSCs 在 AKT 与 C2S 支架上具有更好的增殖能力。

rBMSCs 在 C2S、AKT 和 M2S 支架上培养 7 d 的碱性磷酸酶(ALP)活性表达水平如图 6(b)所示。ALP 是一种糖蛋白,作为一种骨形成生物化学标志物,能够用于评估早期成骨活性^[40]。可以看出,rBMSCs 在三组支架上培养,其 ALP 活性水平明显高于孔板对照组,而且 rBMSCs 在 AKT 支架上的培养物,其 ALP 活性水平高于在 C2S 和 M2S 支架上的培养物,这表明 C2S、AKT 和 M2S 支架都能够促进 rBMSCs 的 ALP 活性,但 AKT 支架的促进作用最为明显。

为了进一步评估 C2S、AKT 和 M2S 支架对 rBMSCs 的成骨分化作用,本研究利用 RT-PCR 技术测定了 rBMSCs 在支架上培养 7 d 后相关成骨基因(OCN、Runx-2、OPN、BSP 和 Col- I)的表达水平(图 7)。可以看出,相比孔板对照组,rBMSCs 在

C2S、AKT 和 M2S 支架上培养都显著促进相关成骨基因表达。进一步地,除了在 BSP 基因表达水平上三种支架无显著性差异外,AKT 支架对其余的 Runx-2、OPN、Col- I 和 OCN 成骨基因表达水平的促进均显著高于 C2S 与 M2S 支架。这表明相比于 C2S 和 M2S 支架,AKT 支架可以更好地促进成骨分化。一方面,AKT 支架适中的降解速率可以得到较稳定的弱碱性微环境,有利于细胞行为;另一方面,AKT 支架降解释放的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 SiO_4^{2-} 离子对促进细胞成骨分化发挥积极作用。

Daniel 与 Jung 等^[41-42]报道, Ca^{2+} 的释放可以有效抑制破骨细胞的形成与吸收,并通过 L 型钙通道与钙调素依赖性蛋白激酶介导激活骨相关蛋白基因的表达,从而促进成骨细胞分化。Zhang 与 Qiao 等^[43-44]发现 Mg^{2+} 可以有效激活 TRPM7/PI3K 信号通路进而上调 Runx2 和 ALP 活性,使成骨细胞活性显著增强。Yan 等^[45]研究表明,硅离子通过提高成骨细胞膜的流动性,促进了成骨细胞的活性,显著提高了 ALP 和 Col- I 基因的表达。因此,AKT 支架作为骨缺损修复材料具有极大的应用潜力。

3 结论

本研究采用挤出式 3D 打印由硅树脂、活性填料(碳酸钙和氧化镁)组成的浆料,结合惰性气氛下高温烧结方法制备了镁黄长石生物陶瓷支架。其孔隙率和抗压强度分别为 $(44.89 \pm 3.34)\%$ 和 (17.36 ± 2.70) MPa。对比斜硅钙石和镁橄榄石生物陶瓷支架,镁黄长石支架具有相似的三维多孔结构,但支架抗压强度和降解速率则介于斜硅钙石和镁橄榄石支架之间。细胞实验证实,镁黄长石支架与斜硅钙石、镁橄榄石

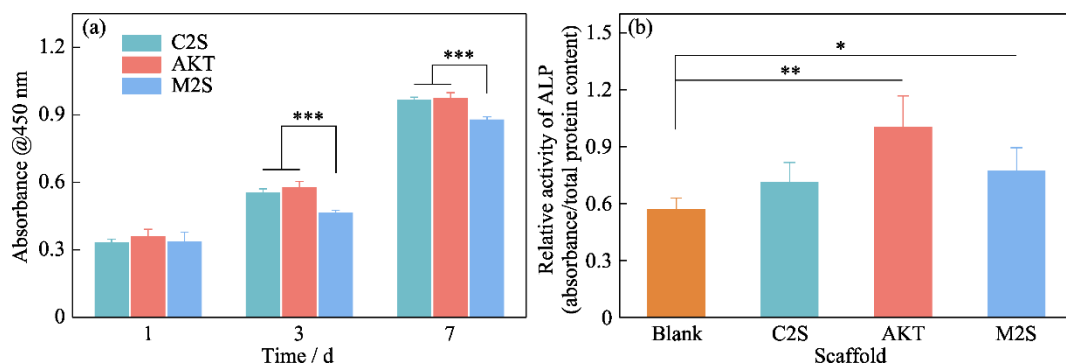


图 6 rBMSCs 在 C2S、AKT 和 M2S 支架上(a)培养 1、3 和 7 d 的细胞增殖情况和 (b)培养 7 d 的碱性磷酸酶(ALP)相对活性表达

Fig. 6 (a) Cell proliferation of culturing for 1, 3 and 7 d and (b) relative activity of alkaline phosphatase of rBMSCs culturing for 7 d on C2S, AKT and M2S bioceramic scaffolds, respectively

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

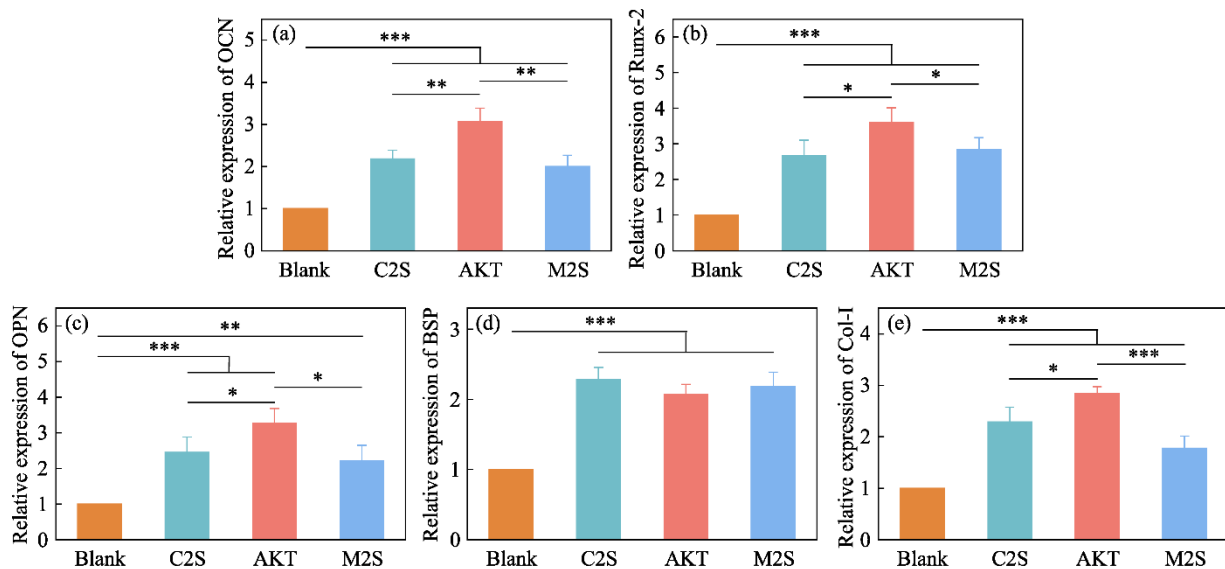


图7 rBMSCs在C2S、AKT和M2S支架上培养7d的相关成骨基因的表达

Fig. 7 Related osteogenic gene expression of rBMSCs on C2S, AKT and M2S scaffolds after culturing for 7 d

(a) OCN; (b) Runx-2; (c) OPN; (d) BSP; (e) Col-1

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

支架均能促进 rBMSCs 增殖, 但镁黄长石支架促进 rBMSCs 的成骨基因表达能力显著强于镁橄榄石和斜硅钙石支架。因此, 通过 3D 打印聚合物前驱体法制备的镁黄长石支架是一种具有应用潜力的骨组织工程支架。

参考文献:

- [1] YAO Y X, QIN W, XING B H, *et al.* High performance hydroxyapatite ceramics and a triply periodic minimum surface structure fabricated by digital processing 3D printing. *Journal of Advanced Ceramics*, 2021, **10(1)**: 39.
- [2] PAN M Z, HUA S B, WU J M, *et al.* Preparation and properties of T-ZnO_w enhanced BCP scaffolds with double-layer structure by digital light processing. *Journal of Advanced Ceramics*, 2022, **11(4)**: 570.
- [3] HAUGEN H J, LYGSTADAAS S P, ROSSI F, *et al.* Bone grafts: which is the ideal biomaterial. *J. Clin. Periodontology*, 2019, **46(Suppl 21)**: 92.
- [4] WANG C, HUANG W, ZHOU Y, *et al.* 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials*, 2020, **5(1)**: 82.
- [5] KOONS G L, DIBA M, MIKOS A G. Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, 2020, **5(8)**: 584.
- [6] ZHANG Y, LIU X, ZENG L, *et al.* Polymer fiber scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Functional Materials*, 2019, **29(36)**: 1903279.
- [7] XU C, WU F, YANG J, *et al.* 3D printed long-term structurally stable bioceramic dome scaffolds with controllable biodegradation favorable for guided bone regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 2022, **450**: 138003.
- [8] WANG J, PENG Y, CHEN M, *et al.* Next-generation finely controlled graded porous antibacterial bioceramics for high-efficiency vascularization in orbital reconstruction. *Bioactive Materials*, 2022, **16**: 334.
- [9] TURNBULL G, CLARKE J, PICARD F, *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 2018, **3(3)**: 278.
- [10] MA H S, FENG C, CHANG J, *et al.* 3D-printed bioceramic scaffolds: from bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomaterialia*, 2018, **79**: 37.
- [11] ELIAZ N, METOKI N. Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials*, 2017, **10(4)**: 334.
- [12] YU X, WU C. Recent development on function improvements of 3D printed bioceramics. *Journal of the Chinese Ceramic Society*, 2021, **49(5)**: 829.
- [13] LI T, ZHAI D, MA B, *et al.* 3D printing of hot dog-like biomaterials with hierarchical architecture and distinct bioactivity. *Advanced Science*, 2019, **6(19)**: 1901146.
- [14] WU C T, CHANG J. A novel akermanite bioceramic: preparation and characteristics. *Journal of Biomaterials Applications*, 2006, **21(2)**: 119.
- [15] LIU Q H, CEN L, YIN S, *et al.* A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and beta-TCP ceramics. *Biomaterials*, 2008, **29(36)**: 4792.
- [16] CASTILHO M, RODRIGUES J, PIRES I, *et al.* Fabrication of individual alginate-TCP scaffolds for bone tissue engineering by means of powder printing. *Biofabrication*, 2015, **7(1)**: 015004.
- [17] ZHANG M, LIN R C, WANG X, *et al.* 3D printing of Haversian bone-mimicking scaffolds for multicellular delivery in bone regeneration. *Science Advances*, 2020, **6(12)**: eaaz6725.
- [18] FENG C, ZHANG W J, DENG C J, *et al.* 3D printing of lotus root-like biomimetic materials for cell delivery and tissue regeneration. *Advanced Science*, 2017, **4(12)**: 1700401.
- [19] WU C, CHANG J. Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 2007, **83B(1)**: 153.
- [20] YU W, SUN X, MENG H Y, *et al.* 3D printed porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering: a review. *Biomaterials*

- Science*, 2017, **5(9)**: 1690.
- [21] HAN Z K, FENG P, GAO C D, *et al.* Microstructure, mechanical properties and *in vitro* bioactivity of akermanite scaffolds fabricated by laser sintering. *Biomedical Materials and Engineering*, 2014, **24(6)**: 2073.
- [22] WU C T, CHANG J A, ZHAI W Y, *et al.* Porous akermanite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and *in vitro* studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 2006, **78B(1)**: 47.
- [23] CHEN L, ZHAI D, WU C T, *et al.* Poly(D, L-lactic)-reinforced akermanite bioceramic scaffolds: preparation and characterization. *Ceramics International*, 2014, **40(8)**: 12765.
- [24] NAJAFINEZHAD A, ABDELLAHI M, NASIRI-HARCHEGANI S, *et al.* On the synthesis of nanostructured akermanite scaffolds via space holder method: the effect of the spacer size on the porosity and mechanical properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2017, **69**: 242.
- [25] FU S Y, ZHU M, ZHU Y F. Organosilicon polymer-derived ceramics: an overview. *Journal of Advanced Ceramics*, 2019, **8(4)**: 457.
- [26] ZOCCA A, ELSAYED H, BERNARDO E, *et al.* 3D-printed silicate porous bioceramics using a non-sacrificial preceramic polymer binder. *Biofabrication*, 2015, **7(2)**: 025008.
- [27] FIOCCO L, LI S, STEVENS M M, *et al.* Biocompatibility and bioactivity of porous polymer-derived Ca-Mg silicate ceramics. *Acta Biomaterialia*, 2017, **50**: 56.
- [28] FIOCCO L, ELSAYED H, FERRONI L, *et al.* Bioactive wollastonite-diopside foams from preceramic polymers and reactive oxide fillers. *Materials*, 2015, **8(5)**: 2480.
- [29] ELSAYED H, ZOCCA A, BERNARDO E, *et al.* Development of bioactive silicate-based glass-ceramics from preceramic polymer and fillers. *Journal of the European Ceramic Society*, 2015, **35(2)**: 731.
- [30] FU S Y, HU H R, CHEN J J, *et al.* Silicone resin derived larnite/C scaffolds via 3D printing for potential tumor therapy and bone regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 2020, **382**: 122928.
- [31] LIU W Y, ZUO R T, ZHU T L, *et al.* Forsterite-hydroxyapatite composite scaffolds with photothermal antibacterial activity for bone repair. *Journal of Advanced Ceramics*, 2021, **10(5)**: 1095.
- [32] BERNARDO E, FIOCCO L, GIFFIN G A, *et al.* Microstructure development and dielectric characterization of forsterite-based ceramics from silicone resins and oxide fillers. *Advanced Engineering Materials*, 2014, **16(6)**: 806.
- [33] ELSAYED H, CARRARO F, AGNOLI S, *et al.* Direct ink writing of silica-carbon-calcite composite scaffolds from a silicone resin and fillers. *Journal of the European Ceramic Society*, 2018, **38(15)**: 5200.
- [34] ANDRIANOV N T, ABDEL-GAVAD S R, ZENKOVA N V. Synthesis and sintering of cordierite sol-gel powders based on different magnesium salts. *Glass and Ceramics*, 2006, **63(11/12)**: 415.
- [35] LIU W, WANG T, YANG C, *et al.* Alkaline biodegradable implants for osteoporotic bone defects-importance of microenvironment pH. *Osteoporosis International*, 2016, **27(1)**: 93.
- [36] WANG C, XUE Y, LIN K, *et al.* The enhancement of bone regeneration by a combination of osteoconductivity and osteostimulation using β -CaSiO₃/ β -Ca₃(PO₄)₂ composite bioceramics. *Acta Biomaterialia*, 2012, **8(1)**: 350.
- [37] LI M, BAI J, TAO H, *et al.* Rational integration of defense and repair synergy on PEEK osteoimplants via biomimetic peptide clicking strategy. *Bioactive Materials*, 2022, **8**: 309.
- [38] CHEN M W, HU Y, HOU Y H, *et al.* Magnesium/gallium-layered nanosheets on titanium implants mediate osteogenic differentiation of MSCs and osseointegration under osteoporotic condition. *Chemical Engineering Journal*, 2022, **427**: 130982.
- [39] LANGER R, VACANTI J P. Tissue engineering. *Science*, 1993, **260(5110)**: 920.
- [40] JO S, HAN J, LEE Y L, *et al.* Regulation of osteoblasts by alkaline phosphatase in ankylosing spondylitis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 2019, **22(2)**: 252.
- [41] PEREIRA D D, DAVISON N, HABIBOVIC P. Human osteoclast formation and resorptive function on biomineralized collagen. *Bioactive Materials*, 2022, **8**: 241.
- [42] JUNG G Y, PARK Y J, HAN J S. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2010, **21(5)**: 1649.
- [43] ZHANG X Z, ZU H Y, ZHAO D W, *et al.* Ion channel functional protein kinase TRPM7 regulates Mg ions to promote the osteoinduction of human osteoblast via PI3K pathway: *In vitro* simulation of the bone-repairing effect of Mg-based alloy implant. *Acta Biomaterialia*, 2017, **63**: 369.
- [44] QIAO W, WONG K H M, SHEN J, *et al.* TRPM7 kinase-mediated immunomodulation in macrophage plays a central role in magnesium ion-induced bone regeneration. *Nature Communications*, 2021, **12(1)**: 2885.
- [45] YAN L X, LI H Y, XIA W L. Bioglass could increase cell membrane fluidity with ion products to develop its bioactivity. *Cell Proliferation*, 2020, **53(11)**: e12906.