



骨碎补总黄酮/贻贝粘蛋白复合骨水泥的制备及其促骨缺损修复作用研究

孙悦婷, 江国华

(浙江理工大学材料科学与工程学院, 杭州 310018)

摘要: 为克服传统骨水泥生物活性不足、载药易流失的问题, 制备了负载骨碎补总黄酮(TFRD)与贻贝粘蛋白(MAP)的生物活性复合骨水泥。采用 SEM、FTIR 表征其物理化学性能, 结合体外细胞实验与大鼠股骨缺损模型, 通过 Micro-CT 与骨计量学分析(如骨体积分数 BV/TV、骨小梁数量 Tb. N、骨小梁分离度 Tb. Sp), 以及苏木精-伊红(H&E)、Masson 三色染色和番红-O/固绿(S-O/FG)组织学观察, 综合评价其骨修复效果。结果表明: 各组骨水泥的细胞存活率均高于 80%, 表现出良好的生物相容性。其中, 高剂量药物和蛋白联用组(TFRD15@PM)显著增强了细胞迁移能力(划痕面积率达 67%); 体内实验也证实该组修复效果最佳, Micro-CT 与组织学评估显示其 BV/TV (57%) 及 Tb. N 等骨计量学指标显著优于其他组($P < 0.05$), 缺损区可见大量新生骨与成熟胶原纤维, 界面结合紧密。研究表明, TFRD 与 MAP 的引入将生物惰性骨水泥成功转变为具有生物活性和生物整合能力的骨再生平台, 显著提升了其对骨缺损的修复效能, 为新型骨缺损修复材料研究提供了实验依据。

关键词: 骨缺损; 骨再生; 骨碎补总黄酮; 骨水泥; 贻贝粘蛋白

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2026)09-0605-11

引文格式: 孙悦婷, 江国华. 骨碎补总黄酮/贻贝粘蛋白复合骨水泥的制备及其促骨缺损修复作用研究[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2026, 55(5): 605-615.

Reference Format: SUN Yueting, JIANG Guohua. Accelerating bone defect repair with total flavonoids of *Rhizoma Drynariae* and mussel adhesive protein-composite bone cement[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(5): 605-615.

Accelerating bone defect repair with total flavonoids of *Rhizoma Drynariae* and mussel adhesive protein-composite bone cement

SUN Yueting, JIANG Guohua

(School of Materials Science & Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To overcome the problems of insufficient bioactivity and easy drug loss of traditional bone cement, a bioactive composite bone cement loaded with total flavonoids of *Rhizoma Drynariae* (TFRD) and Mussel Adhesive Protein (MAP) was prepared. Its physicochemical properties were characterized by SEM and FTIR, and combined with *in vitro* cell experiments and the establishment of a rat femoral defect model, its bone repair effect was comprehensively evaluated through Micro-CT and bone morphometry analysis (such as bone volume fraction BV/TV, trabecular number Tb. N, trabecular separation Tb. Sp), Hematoxylin-Eosin (H&E), Masson's trichrome staining, and Safranin O/Fast green staining (S-O/FG) histological observation. The results showed that the cell survival rate of all groups of bone cement was higher than 80%, showing good biocompatibility. Among them, the TFRD15@PM group significantly enhanced cell migration ability (scratch area rate reached 67%). The *in vivo* experiments also confirmed

收稿日期: 2025-11-19 网络出版日期: 2026-04-29

作者简介: 孙悦婷(2001—), 女, 陕西铜川人, 硕士研究生, 主要从事生物医用材料方面的研究。

通信作者: 江国华, E-mail: ghjiang_cn@zstu.edu.cn

that this group had the best repair effect; Micro-CT and histological evaluations showed that its BV/TV (57%) and Tb. N and other bone morphometric indicators were significantly better than those of other groups ($P<0.05$), and a large amount of new bone and mature collagen fibers were observed in the defect area with a close interface. The study indicated that the introduction of TFRD and MAP successfully transformed bioinert bone cement into a bone regeneration platform with bioactivity and biointegration capability, significantly improving its repair efficiency for bone defects and providing experimental evidence for the research of new bone defect repair materials.

Key words: bone defect; bone regeneration; total flavonoids of *Rhizoma Drynariae*; bone cement; mussel adhesive protein

0 引 言

骨缺损修复是骨科临床面临的重大挑战。对于无法自行愈合的临界尺寸骨缺损,通常需要植入骨修复材料进行干预^[1-2]。理想的骨修复材料应兼具 3 个核心特性,即良好的生物相容性、与原生骨组织相匹配的力学支撑性能以及主动诱导新骨形成的生物活性^[3]。目前常用的骨缺损修复方法主要有自体骨移植、同种异体骨移植以及合成骨填充。自体骨移植被视为修复骨缺损的“金标准”,但其来源有限,易造成供区二次损伤,且存在术后疼痛等并发症风险^[4];异体骨移植则面临免疫排斥和疾病传播的潜在威胁^[5]。在此背景下,合成骨修复材料逐渐成为人们关注的热点。其中,聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥(Polymethylmethacrylate, PMMA)因其可注射性、术中可塑性和卓越的即时机械强度,在椎体成形术和关节置换固定等领域被广泛应用^[6]。然而,传统的 PMMA 存在固有缺陷:一方面,其聚合反应释放的热量及残留单体可导致周围组织坏死^[7];另一方面,材料的生物惰性使植入物与宿主骨之间仅形成纤维包裹,而非骨性整合,这可能造成远期无菌性松动或植入的失败^[8-9]。因此,如何赋予 PMMA 以生物活性,打破其生物惰性的壁垒,是提升其临床疗效的关键。

将具有成骨活性的生物活性分子与骨水泥复合,是赋予其生物功能的有效策略之一^[10]。中医药在促进骨折愈合方面积累了丰富的经验;骨碎补作为一种传统接骨续筋药材,其有效成分——骨碎补总黄酮(Total flavonoids of *Rhizoma Drynariae*, TFRD),已被现代药理学研究证实具有促进成骨细胞增殖、分化和抑制破骨细胞活性的多重作用^[11-12]。大量体外研究表明,TFRD 不仅能够显著促进大鼠成骨细胞和骨髓间充质干细胞的增殖与分化,还能通过调控骨形态发生蛋白 2(Bone morphogenetic protein 2, BMP-2)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)和血小板内皮细

胞黏附分子(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)的表达,加速大鼠骨折模型的愈合进程^[13-15]。也有研究表明,贻贝粘蛋白(Mussel adhesive protein, MAP)带有的 3,4-二羟苯基丙氨酸(3,4-Dihydroxyphenylalanine, DOPA)基团可以赋予材料更强的黏附能力,将其与骨水泥联用,有望改变传统骨水泥因生物惰性导致的仅为“机械镶嵌”的弊端,实现紧密的黏附,还能改善骨水泥的细胞相容性,促进细胞黏附和增殖^[16-17]。然而,目前关于 TFRD、MAP 与 PMMA 三者协同构建骨修复材料的研究尚未见报道,这种三元复合体系能否在保持基体机械强度的前提下,通过 TFRD 的局部缓释有效激活成骨潜能,克服 PMMA 的生物惰性,是一个值得深入探究的科学问题。

本文针对传统骨水泥生物活性低、载药易流失的问题,受贻贝启发,以 MAP 为桥梁,构建了负载 TFRD 的复合骨水泥修复体系(TFRD@PM)。通过 SEM 和 FTIR 分析 TFRD@P 和 TFRD@PM 的物理化学特性,借助 MTT 和细胞活死染色技术评价细胞毒性,并结合体外细胞迁移实验评估其促细胞迁移能力,建立大鼠股骨缺损模型评价其在体内的骨修复效果。本文融合中医药与仿生材料学,克服了传统骨水泥的生物学缺陷,所制备的 TFRD@PM 不仅可以加速骨缺损功能性重建,同时为高性能骨修复材料的研发与转化提供了理论与实验基础。

1 实验部分

1.1 实验材料

PMMA 骨水泥(上海洁祥医疗器械有限公司);贻贝粘蛋白(MAP, AR, 广东方信生物科技有限公司);骨碎补总黄酮(TFRD, 西安天光源生物科技有限公司);胰酶细胞消化液(浓度 0.25%)、四甲基偶氮唑蓝(MTT, 质量浓度 5 mg/mL)、Calcein/PI 细胞活性和细胞毒性测试试剂盒和青霉素-链霉素(100×)(上海碧云天生物技术有限公司);胎牛血清

(优级)和细胞培养基(α -MEM)均购自赛默飞世尔科技公司;小鼠胚胎成骨细胞(MC3T3-E1,中国科学院细胞库)和成年雄性斯普拉格-道利大鼠(SD,约 250 g,浙江壹分生物科技有限公司)。

1.2 骨修复材料的制备

商用 PMMA(P)骨水泥材料按照厂商推荐的粉液比(粉剂包括:丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸甲酯聚合物、二氧化锆、过氧化苯甲酰及叶绿素铜;液剂包括:甲基丙烯酸甲酯、N,N-二甲基对甲苯胺及对苯二酚)称取粉剂于搅拌容器中,将量取的液剂一次性快速加入到盛有粉剂的搅拌容器中,快速搅拌直至不再黏稠。将不同质量的 TFRD 按表 1 的比例分别加入已制备好的商用 PMMA 骨水泥(P)中,待完全溶解后,快速连续搅拌 1 min 形成复合骨水泥,将 3 份样品分别命名为 TFRD5@P、TFRD10@P 和 TFRD15@P。将不同质量的 TFRD 和 MAP 按表 1 的比例分别加入已制备好的商用 PMMA 骨水泥(P)中,待完全溶解后,快速连续搅拌 1 min 形成复合骨水泥,将 3 份样品分别命名为 TFRD5@PM、TFRD10@PM 和 TFRD15@PM。不同组分 PMMA(P)、TFRD@P 和 TFRD@PM 的制备比例见表 1。

表 1 PMMA、TFRD@P 和 TFRD@PM 的合成组分				
分组	组分含量			
	粉剂/g	液剂/ μ L	TFRD/g	MAP/g
PMMA(P)	0.25	100	0	0
TFRD5@P	0.25	100	0.0125	0
TFRD10@P	0.25	120	0.0250	0
TFRD15@P	0.25	140	0.0375	0
TFRD5@PM	0.25	100	0.0125	0.0125
TFRD10@PM	0.25	120	0.0250	0.0125
TFRD15@PM	0.25	140	0.0375	0.0125

1.3 测试与表征

1.3.1 形貌观察

采用扫描电子显微镜(FE-SEM, Ultra55, 德国 Carl Zeiss SMT 公司)观察 P、TFRD@P 和 TFRD@PM 的表面形貌。将样品均匀地铺展在导电胶上,再用离子溅射仪进行喷金处理,在 3 kV 的加速电压下进行观察。

1.3.2 化学结构表征

将 P、TFRD@P 和 TFRD@PM 样品与 KBr 混合研磨并压成薄片,采用傅里叶红外光谱仪(Nicolet iS20, 美国赛默飞世尔科技公司)分析样品的官能团信息,光谱扫描范围为 500~4000 cm^{-1} 。

1.3.3 体外细胞毒性评价

MC3T3-E1 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 α -MEM 培养基中,环境条件设定为 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。采用 MTT 法评估各组骨水泥样品的细胞毒性,具体操作如下:将细胞以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 96 孔微孔板;经 24 h 贴壁,将培养基分别替换为含不同质量浓度骨水泥样品的提取物培养基(25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$),继续培养 24 h;使用微孔板分光光度计测量 570 nm 波长下的吸光度,并计算细胞存活率。细胞存活率计算公式为:

$$X/\% = \frac{OD_2 - OD_1}{OD_1 - OD_0} \times 100 \tag{1}$$

其中: X 为细胞存活率; OD_0 为不含细胞和材料的空白对照组吸光度值; OD_1 为仅含有细胞的对照组吸光度值; OD_2 为含有细胞和材料的实验组的吸光度值。

为了进一步评估复合骨水泥的体外细胞毒性,通过活死细胞染色法进一步验证细胞的存活情况。取 1 mL 密度为 1×10^5 个/mL 的 MC3T3-E1 细胞悬液接种于玻底培养皿中,待充分贴壁生长后将 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的复合骨水泥提取液加入,再与细胞共培养 24 h,经 Calcein/PI 细胞活性和细胞毒性测试试剂盒染色 15 min 后,采用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM, C2, 日本 Nikon 公司)观察并记录活细胞(呈现绿色荧光)与非活细胞(呈现红色荧光)的分布情况。

1.3.4 体外细胞迁移实验

通过 MC3T3-E1 细胞划痕试验来评估载药复合骨水泥对细胞迁移的影响。MC3T3-E1 细胞以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 后弃去上清液,分别添加含质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 P、TFRD5@P、TFRD10@P、TFRD15@P、TFRD5@PM、TFRD10@PM 以及 TFRD15@PM 的新鲜 α -MEM 培养基,以仅添加新鲜培养基为对照,继续培养 24 h;用无菌塑料移液管尖端轻刮细胞层形成划痕,0 h 和 24 h 在光学显微镜下观察细胞迁移情况。

1.3.5 股骨骨缺损修复实验

选取 48 只体重在 280~300 g 的健康成年雄性斯普拉格-道利(SD)大鼠用于体内骨缺损修复实验,所有动物实验均获得浙江理工大学动物伦理委员会批准(批准号:20250926-03)。经适应期(标准环境条件下 1 周)后,各组均建立大鼠股骨缺损模

型,大鼠随机分为 8 组(每组 $n=6$):对照组(存在骨缺损且未处理)、P 组(存在骨缺损并使用 PMMA 处理)、TFRD5@P 组(存在骨缺损并使用 TFRD5@P 处理)、TFRD10@P 组(存在骨缺损并使用 TFRD10@P 处理)、TFRD15@P 组(存在骨缺损并使用 TFRD15@P 处理)、TFRD5@PM 组(存在骨缺损并使用 TFRD5@PM 处理)、TFRD10@PM 组(存在骨缺损并使用 TFRD10@PM 处理)和 TFRD15@PM 组(存在骨缺损并使用 TFRD15@PM 处理)。大鼠股骨缺损模型的操作流程如下:在无菌条件下,通过吸入异氟烷对大鼠实施麻醉;在右股骨骨干中部创建关键尺寸骨缺损(直径 3 mm×深度 2 mm),经 0.9%生理盐水冲洗后,根据分组方案将上述 8 个组别植入缺损区。随后逐层缝合肌肉与皮肤,并用无菌纱布覆盖术区。建模完成后,大鼠单独饲养并密切监测其恢复情况。术后第 4 周和第 8 周,分别从每组随机选取 3 只大鼠,通过麻醉实施安乐死。取完整右股骨标本,经完整切除后置于 4%多聚甲醛溶液中,于 4℃固定 48 h,以备后续组织学及影像学分析。

1.3.6 Micro-CT 成像

每组随机选取 3 只大鼠,经 10%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙处理后,通过 Micro-CT 成像仪对骨缺损区域进行可视化观察,同时在术后第 4 周和第 8 周对缺损区内的骨体积与组织体积的比值(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)及骨小梁分离度(Tb. Sp)进行定量分析。Micro-CT 成像仪的参数设置如下:分辨率为 9.99 μm;管电压设定为 85 kV,管电流为 100 μA;每次扫描旋转角度 0.5°;总扫描旋转角度 360°。

1.3.7 组织病理学和免疫组化

每组于第 8 周处死 3 只大鼠,从愈合伤口处获取组织标本,组织标本经固定、包埋、切片处理后,采

用苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-Eosin staining, H&E)、马森染色法(Masson)以及番红固绿染色法(Safranin O/Fast green staining, S-O/FG)进行染色,并通过生物显微镜进行检测。此外,通过对血小板内皮细胞黏附因子(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)及骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)抗体进行免疫组化染色,以评估组织中不同蛋白的表达分布情况,并使用数字定量分析软件 Image J 对 8 周治疗后的免疫组化切片中的不同因子进行统计分析。

1.3.8 统计学处理

使用 Origin Paired Comparison Plot 进行配对比较分析,计算组间显著性差异,其中:n. s. 表示不存在显著性差异, $P>0.05$ (不着重标出);* 表示存在显著差异, $P<0.05$;**表示存在高度显著差异, $P<0.01$ ***表示存在极高显著性差异, $P<0.001$ 。

2 结果与讨论

2.1 P、TFRD@P、TFRD@PM 的表面形貌分析

图 1 为不同组分骨水泥的 SEM 显微照片。P 表面由规则的类球形颗粒堆积而成,球形颗粒清晰、边界分明,颗粒之间主要是物理堆积,这是常规骨水泥非常典型的形貌特征(见图 1(a))。掺入 TFRD 后,仍可见大量球形骨水泥颗粒,但边缘不再像纯骨水泥那样锐利,材料表面粗糙度增加,且颗粒间隙中出现不规则填充相,但整体仍以离散颗粒结构为主(见图 1(b))。进一步引入 MAP 后,颗粒表面被连续相包覆,颗粒间形成明显的桥联结构,孔隙显著减少,材料整体结构更加致密均一(见图 1(c)),表明 TFRD 与 MAP 在骨水泥基体中具有良好的协同界面调控作用。

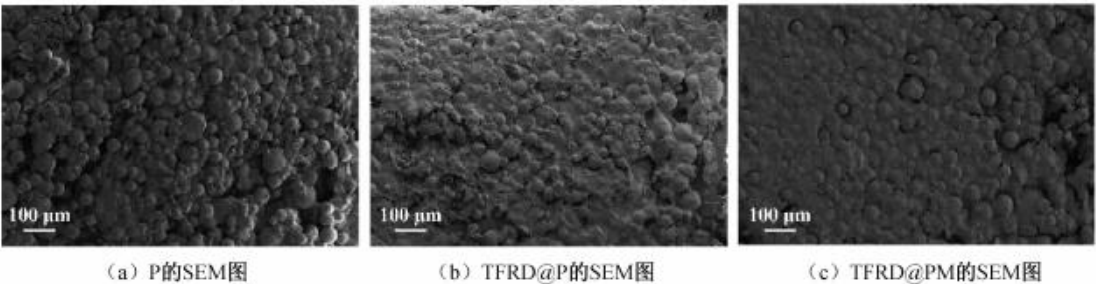


图 1 不同组分骨水泥的 SEM 显微照片

2.2 P、TFRD@P、TFRD@PM 的官能团分析

图 2 为 TFRD@P 和 TFRD@PM 的红外光谱

图。从图 2 可以看出:在 P 的谱图中,1725 cm^{-1} 处出现的强而尖锐的吸收峰归属于其特征酯羰基

(C=O)的伸缩振动;TFRD 在 3300 cm^{-1} 附近表现出宽阔的酚羟基(—OH)吸收带,并在 1030 cm^{-1} 区域伴有显著的 C—O 伸缩振动峰;MAP 的光谱在 1650 cm^{-1} 和 1540 cm^{-1} 附近分别展示了蛋白质特有的酰胺 I 带(C=O 伸缩)和酰胺 II 带(N—H 弯曲

与 C—N 伸缩)特征峰;在 1030 cm^{-1} 附近的吸收强度较纯 PMMA 显著增强,说明骨碎补总黄酮在 PMMA 中的成功包埋;在 1580 cm^{-1} 区域,TFRD@PM 出现了原本 PMMA 所不具备的酰胺 II 带特征峰,直接证明了 MAP 的引入。

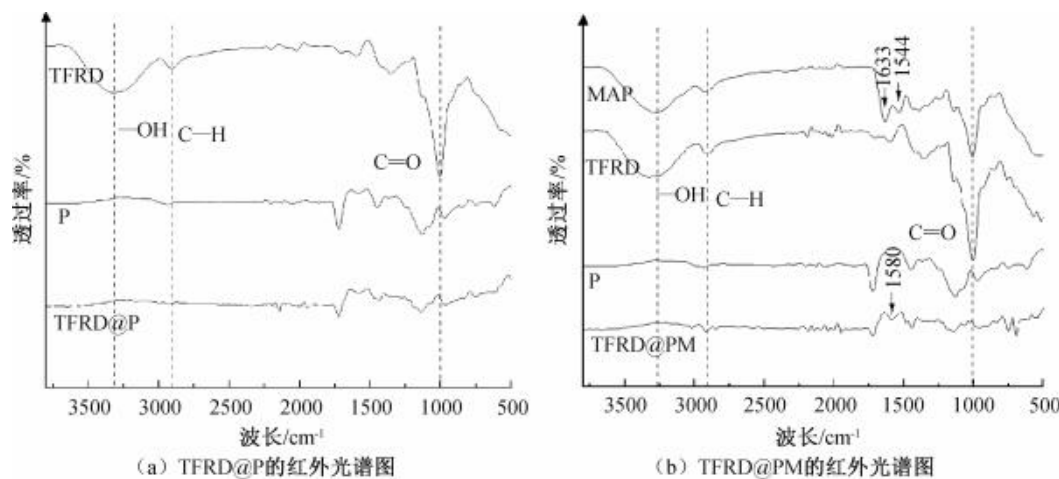


图 2 TFRD@P 和 TFRD@PM 的红外光谱图

2.3 体外细胞相容性分析

通过 MTT 法评估了不同组分骨水泥以及不同质量浓度的 TFRD15@P 和 TFRD15@PM 的 MC3T3-E1 细胞活力,结果见图 3。图 3 表明:不同组分骨水泥的细胞活力均高于 80%;选取不同质量

浓度的 TFRD15@P 组和 TFRD15@PM 组对细胞活力进行评估,随着质量浓度的增加,TFRD15@P 组和 TFRD15@PM 组细胞活力先升后降,但数值始终维持在 80% 以上。上述结果说明了各组均具有较低的细胞毒性。

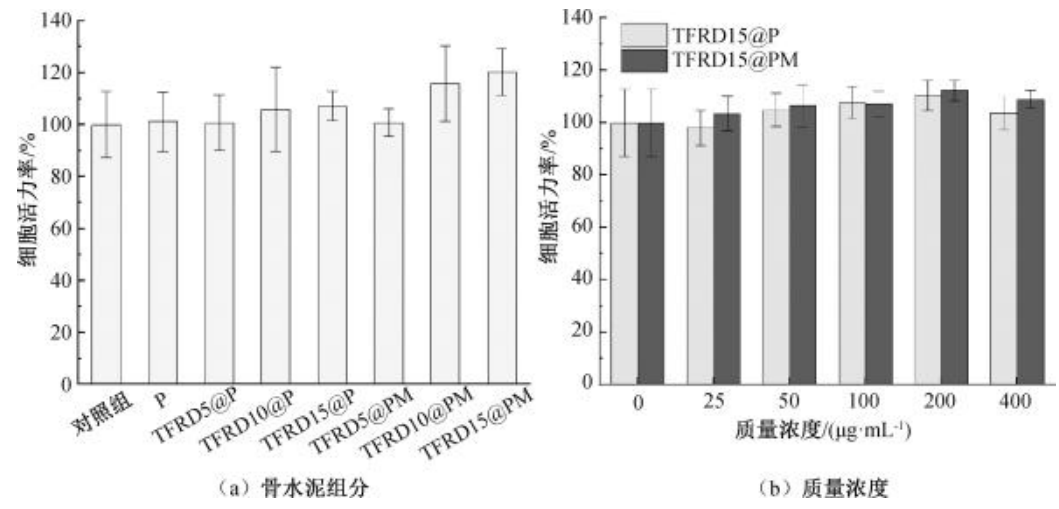


图 3 不同组分骨水泥与不同质量浓度骨水泥的细胞活力率柱状图

通过激光共聚焦对经过 Calcein/PI 细胞活性和细胞毒性测试试剂盒处理的 MC3T3-E1 细胞进行可视化评估(绿色代表活细胞,红色代表死细胞),结果如图 4 所示。从图 4 可知:无论是对照组,还是经不同材料处理的 MC3T3-E1 细胞均可观察到明显的绿色荧光信号,说明 TFRD@P 和 TFRD@PM 对细胞活力没有显著影响,进一步证实不同组分的骨水泥具有较低细胞毒性。

2.4 体外细胞迁移分析

细胞划痕实验结果如图 5 所示,从图 5 可以看出:划痕后 0 h,各组划痕宽度相当;而 24 h 后,对照组与 P 组的划痕宽度几乎保持不变,而 TFRD5@P、TFRD10@P 和 TFRD15@P 组以及 TFRD5@PM、TFRD10@PM 和 TFRD15@PM 组的划痕宽度已明显缩短,并且随着 TFRD 质量浓度的升高而逐渐变窄。此差异源于 TFRD 可以促进 MC3T3-E1 细胞的迁移。

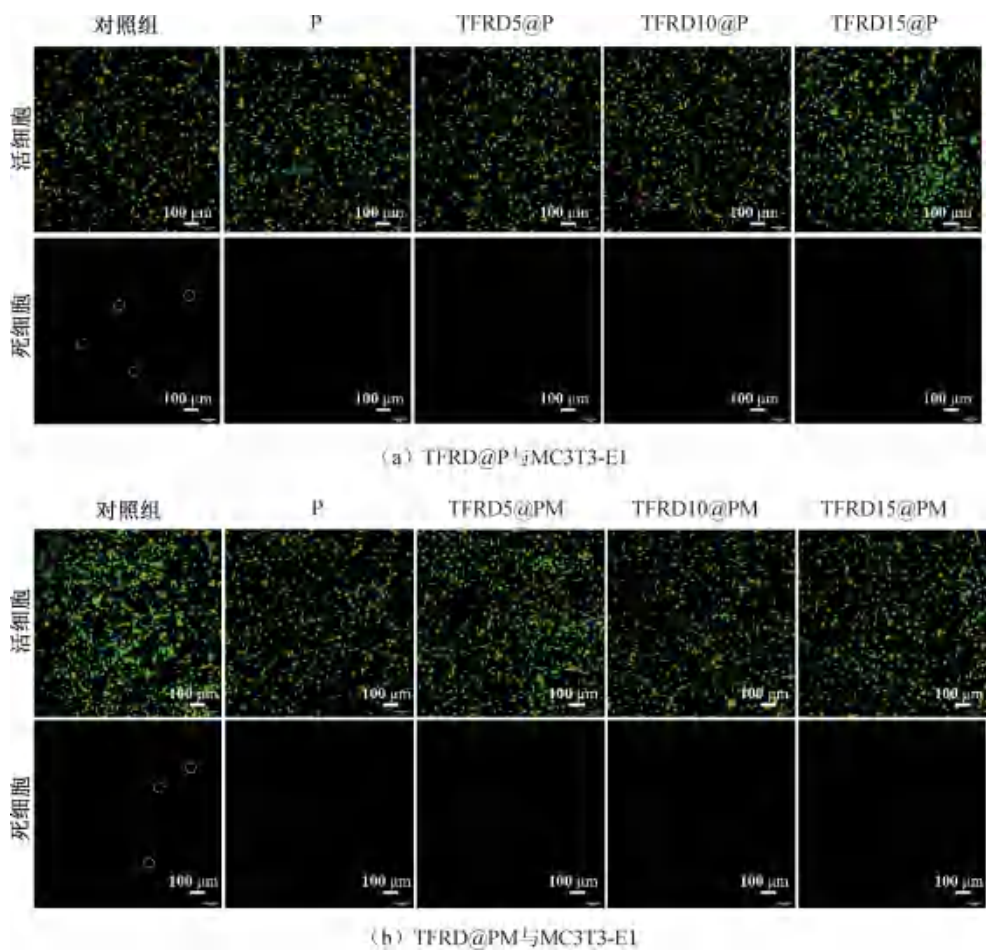


图 4 不同组分骨水泥与 MC3T3-E1 的活死染色照片

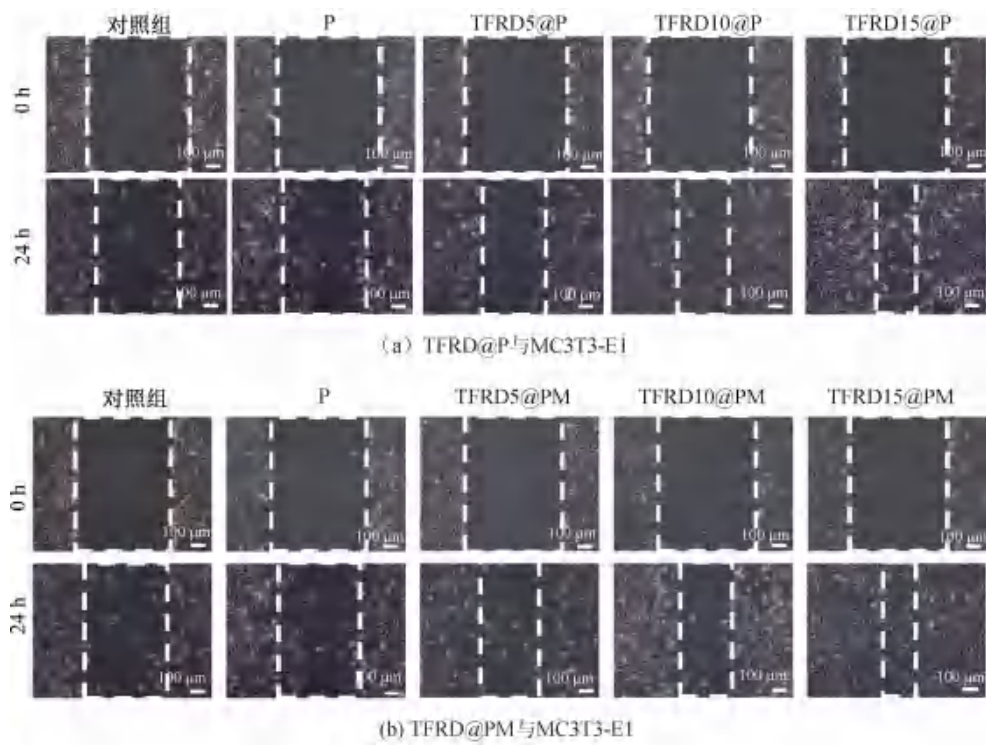


图 5 不同组分 TFRD@P、TFRD@PM 分别与 MC3T3-E1 细胞共培养 24 h 后的细胞迁移图

细胞划痕面积率结果如图 6 所示,从图 6 可知:经 24 h 培养后,对照组划痕面积率仅为 19%,TFRD15@P 处理组达到 61%,而 TFRD15@PM 组划痕面积率最高,达到 67%。这表明 TFRD 可以调控相关生长因子的分泌而影响细胞的迁移,且 MAP 的加入进一步改善了骨水泥的细胞相容性,

促进了细胞的黏附与增殖。结合图 5 的结果可知,各组细胞在迁移过程中均保持良好的形态特征,未出现异常的形态变化,同时也未观察到明显的细胞凋亡或坏死现象,证实 TFRD@PM 能通过协同增效机制显著提升细胞迁移动力学特性与生存稳态,为后续骨修复体内实验提供关键理论支撑。

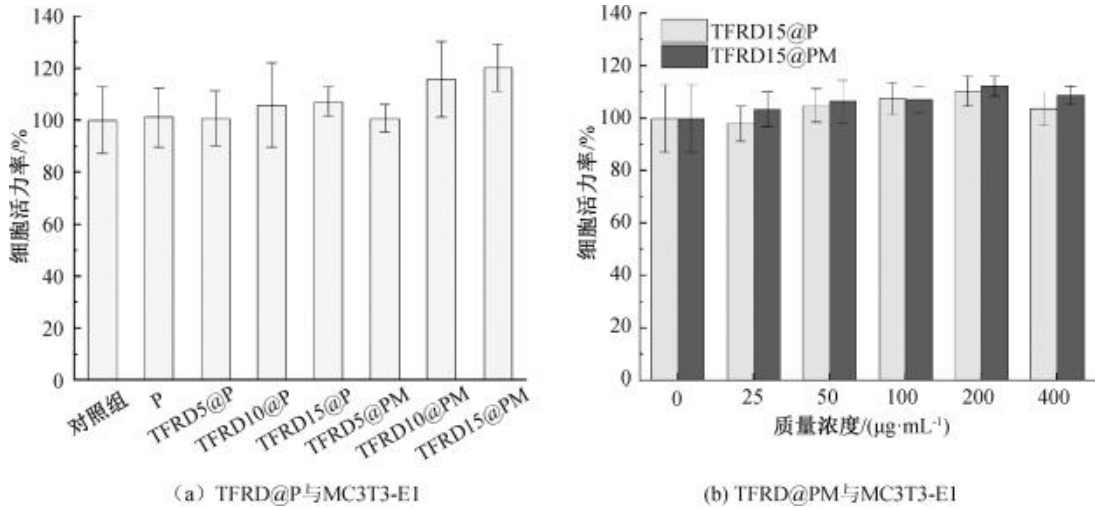


图 6 TFRD@P、TFRD@PM 分别与 MC3T3-E1 细胞共培养 24 h 后的细胞划痕面积率

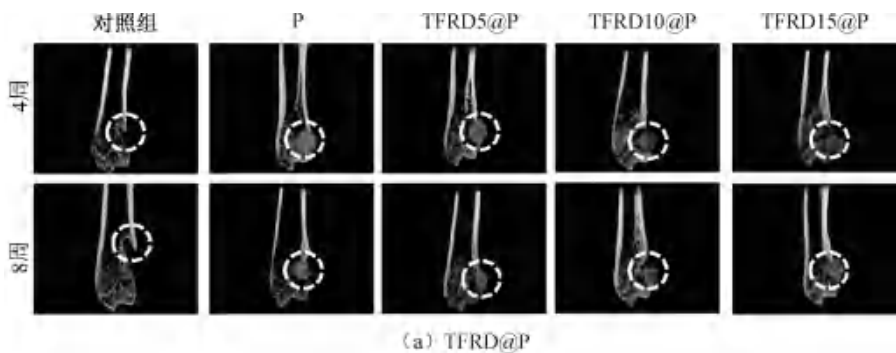
2.5 Micro-CT 分析

图 7 与图 8 分别为骨缺损建模流程图和大鼠术后第 4 周与第 8 周的 Micro-CT 结果与骨计量学分析。在术后第 4 周,TFRD@P 组与 TFRD@PM 组的骨缺损面积与对照组及 P 组相比均未见显著差异;随着 TFRD 的加入以及质量浓度的升高,2 组骨缺损区域中的骨小梁数量均呈现明显增多趋势。术后第 8 周,TFRD15@P 组和 TFRD15@PM 组的骨缺损范围较对照组及 P 组明显缩小,且周围新生骨量显著增加

(见图 8),该形态学观察结果与进一步得到的骨微结构定量参数相一致。由图 9(a)—(c)可以看出:与对照组相比,TFRD15@P 组与 TFRD15@PM 组的 BV/TV 和 Tb. N 均显著提高,Tb. Sp 则显著降低;在相同 TFRD 质量浓度下,TFRD15@PM 组的骨修复效果优于 TFRD15@P 组,表现为更高的 BV/TV 与 Tb. N 值、更低的 Tb. Sp 值。以上结果表明,TFRD 的加入可促进骨修复,MAP 的引入进一步增强了该修复效果,两者具有协同促进作用。



图 7 骨缺损建模流程图



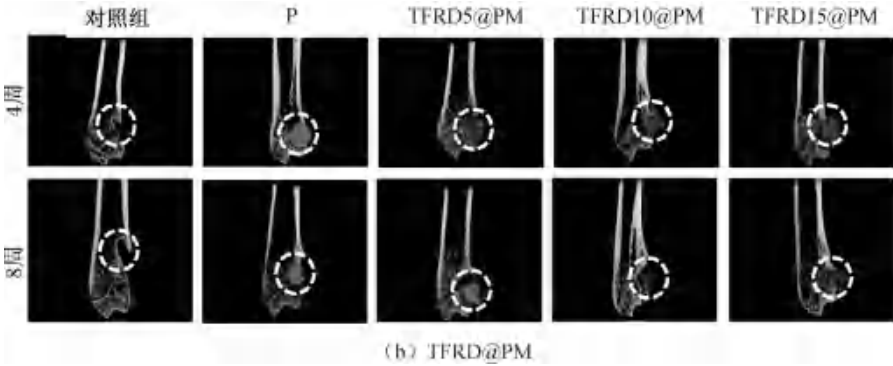


图 8 不同组分骨水泥的 Micro-CT 图

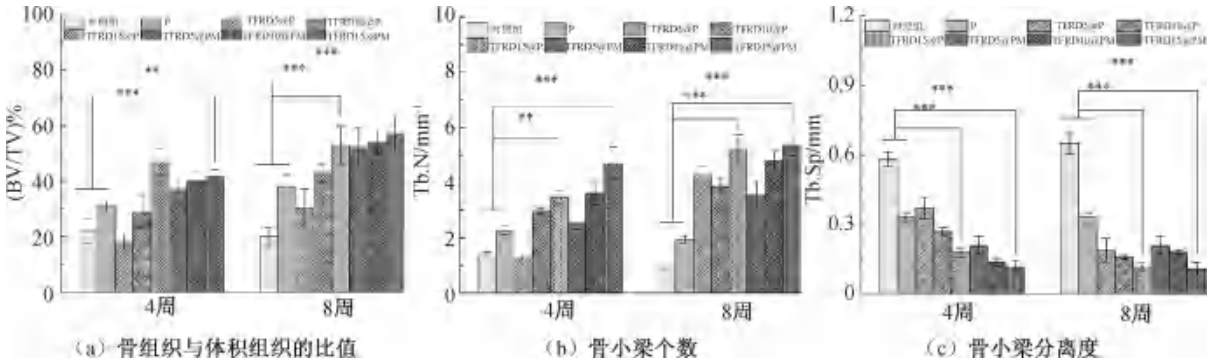


图 9 不同组分骨水泥的指标

2.6 组织病理学分析

为评估 TFRD@P 和 TFRD@PM 对骨形成的影响,进一步开展了组织学评价,结果如图 10 所示。从图 10 可知:TFRD@P 组和 TFRD@PM 组的骨修复效果显著优于对照组和 P 组,TFRD@P 组和 TFRD@PM 组骨矿化水平更高,软骨细胞数量显著增加,且存在大量结构完整的骨组织;TFRD@P 组和 TFRD@PM 组缺损区成熟骨组织密度显著高于对照

组和 P 组,且其成熟骨组织内含有大量致密胶原纤维,表明 TFRD 促进了胶原沉积;对照组和 P 组仍存在大量未矿化骨样组织,表明其骨再生过程尚未完成。随着 TFRD 质量浓度的增加,TFRD@P 组和 TFRD@PM 组中成熟骨组织填充比例显著提升,在 TFRD15@PM 组中,软骨细胞数量显著高于对照组和 P 组,且该组呈现更明显的骨小梁形成^[18],说明了 TFRD@P 和 TFRD@PM 均具有卓越的骨修复效能。

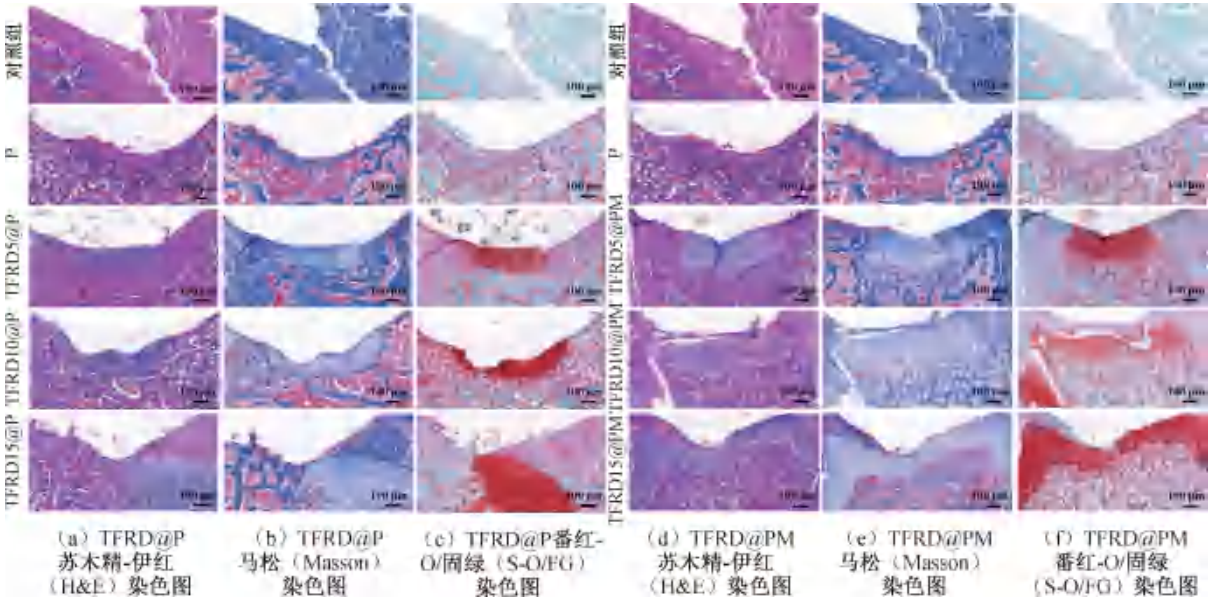


图 10 TFRD@P 和 TFRD@PM 治疗 8 周后体内治疗效果评估图

CD31 作为内皮细胞的特异性标志物,是评估新生毛细血管形成的关键依据^[19];VEGF 则被广泛认为是体内最重要的促血管生成因子之一^[20]。通过检测 CD31 与 VEGF 的表达水平,评估了骨缺损区域的血管生成情况,结果如图 11 所示。从图 11(a)–(d)可知:CD31 和 VEGF 均在组织中呈现棕黄色或棕灰色的染色表达,与对照组相比,P 组、TFRD@P 组及 TFRD@PM 组的新生血管数量显著增加,且该效应表现出明显的 TFRD 浓度依赖性,其中 TFRD15@PM 组的诱导能力最强。这表明 TFRD 具有显著的促血管生成作用,可有效促进骨缺损修复。CD31 和 VEGF 的定量分析结果进一步验证了上述结果,进一步表明 TFRD 药物具有显

著的促血管生成作用,从而有效促进骨缺损修复(图 12(a)–(b))。

此外,在成骨能力方面,BMP-2 被公认为是最强效的成骨诱导因子之一^[21],染色结果如图 11(e)–(f)所示。从图 11(e)–(f)可知:TFRD@P 和 TFRD@PM 组的表达均显著强于 P 组,且随 TFRD 浓度升高而增强,表明 TFRD 在促进骨再生方面具备优异潜力(图 12(c))。值得注意的是,MAP 的引入可作为“分子桥梁”,凭借其强大的黏附性将负载药物锚定于骨水泥表面,有效防止药物在植入初期被体液快速清除,实现了更持久、受控的药物释放,从而赋予材料优异的促骨再生潜力。

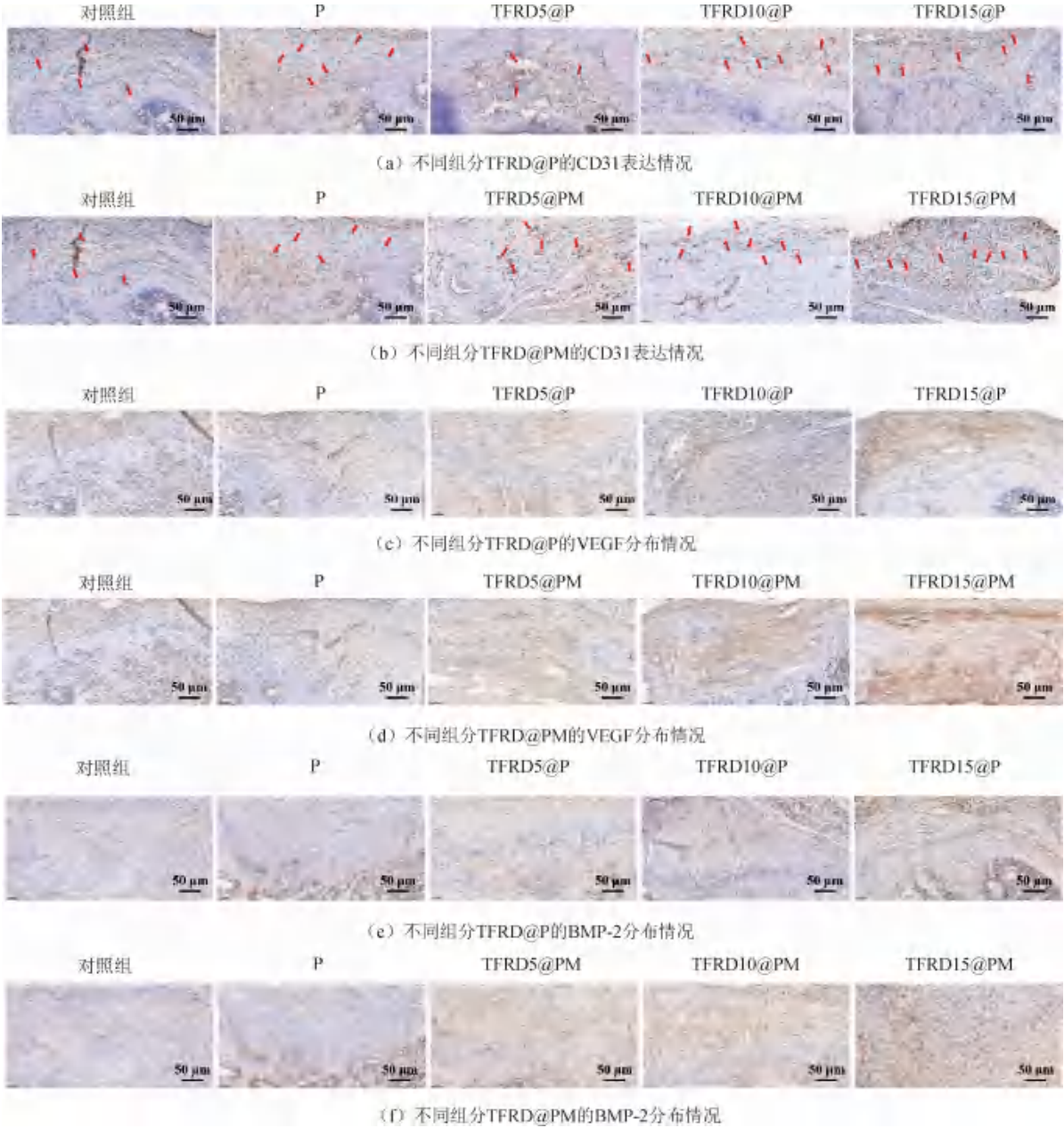


图 11 治疗 8 周后免疫组化切片照片

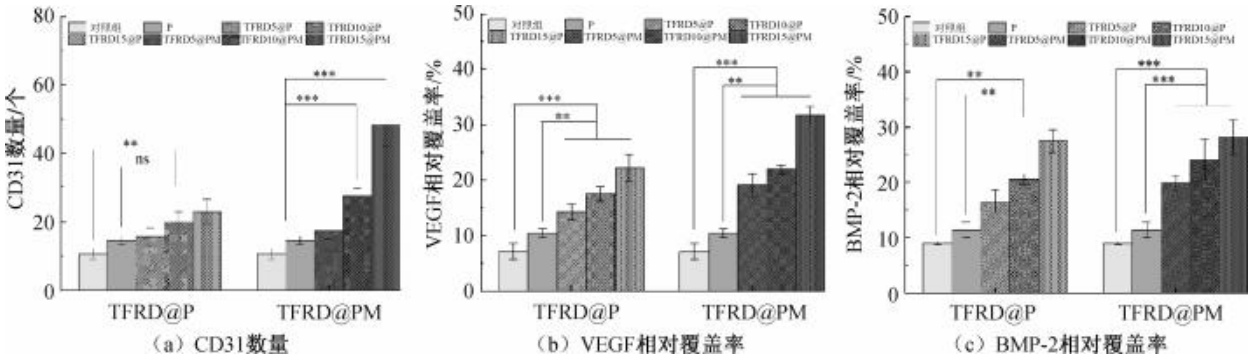


图 12 治疗 8 周后的免疫组化指标

3 结 论

本文通过在 PMMA 中负载 TFRD 与 MAP,成功制备了具有促成骨活性的复合骨水泥(TFRD@P 和 TFRD@PM)。在维持 PMMA 基本性能的前提下,系统评价了该复合材料的生物安全性(生物相容性与细胞毒性)、细胞迁移性能及体内骨修复效能,主要结论如下:

a)MAP 和 TFRD 不影响细胞活力,不同组分的 TFRD@P 和 TFRD@PM 的细胞活力均大于 80%,具有良好的细胞相容性。

b)TFRD@P 和 TFRD@PM 具有一定的促细胞迁移能力, TFRD15 @ P 处理组达到 61%, TFRD15@PM 组划痕闭合率最高,达到 67%。

c)与对照组相比,骨组织显著增加,血管生成能力提升,TFRD15@PM 的 BV/TV、Tb. N 等参数显著优于其他各组,CD31 数量为 48 个,是 TFRD10@PM 的 1.78 倍,骨修复效果最明显。

本文制备的 TFRD@PM 复合骨水泥生物相容性良好,具有优异的促细胞迁移与促血管生成能力,在骨修复临床治疗领域具有潜在的参考价值。

参考文献:

[1] Wei S, Ma J X, Xu L, et al. Biodegradable materials for bone defect repair[J]. Military Medical Research, 2020, 7(1): 54.

[2] Xue N N, Ding X F, Huang R Z, et al. Bone tissue engineering in the treatment of bone defects[J]. Pharmaceuticals, 2022, 15 (7): 879.

[3] Zhou B X, Jiang X L, Zhou X X, et al. GelMA-based bioactive hydrogel scaffolds with multiple bone defect repair functions: therapeutic strategies and recent advances [J]. Biomaterials Research, 2023, 27(1):86.

[4] He P, Zhao Y B, Wang B, et al. A biodegradable magnesium phosphate cement incorporating chitosan and rhBMP-2 designed for bone defect repair[J]. Journal of Orthopaedic Translation,

2024, 49: 167-180.

[5] Santoro A, Voto A, Fortino L, et al. Bone defect treatment in regenerative medicine: exploring natural and synthetic bone substitutes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(7): 3085.

[6] Mounika C, Tadge T, Keerthana M, et al. Advancements in poly (methyl Methacrylate) bone cement for enhanced osteoconductivity and mechanical properties in vertebroplasty: a comprehensive review [J]. Medical Engineering & Physics, 2023, 120: 104049.

[7] Ghasemi F, Jahani A, Moradi A, et al. Different modification methods of poly methyl methacrylate (PMMA) bone cement for orthopedic surgery applications[J]. The Archives of Bone and Joint Surgery, 2023, 11(8): 485-492.

[8] Huo S C, Wang F, Lyu Z C, et al. Dual-functional polyetheretherketone surface modification for regulating immunity and bone metabolism [J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 426: 130806.

[9] Du M Z, Li Q, Chen J D, et al. Design and characterization of injectable abalone shell/calcium sulfate bone cement scaffold for bone defect repair[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 420: 129866.

[10] Zhao X M, Gao J, Han H, et al. Bioactive strong biodegradable bone cement for rapid osteointegration and osteogenesis[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 474: 145609.

[11] Li S Y, Li Y, Jiang Z X, et al. Efficacy of total flavonoids of Rhizoma drynariae on the blood vessels and the bone graft in the induced membrane[J]. Phytomedicine, 2022, 99: 153995.

[12] Tan C, Cong S B, Xie Y M, et al. Mechanistic integration of network pharmacology and in vivo validation: TFRD combat osteoporosis via PI3K/AKT pathway activation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26 (8): 3650.

[13] Huang X H, Li C, Lau Y, et al. The sustained-release agent of total flavonoids of Rhizoma drynariae prepared by nanomesoporous silica can still promote osteogenesis and angiogenesis in vitro[J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 5045.

[14] Lin L X, Fu P F, Chen N M, et al. Total flavonoids of

Rhizoma Drynariae protect hepatocytes against aflatoxin B1-induced oxidative stress and apoptosis in broiler chickens[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 230: 113148.

[15] Lin H X, Wang X T, Li Z G, et al. Total flavonoids of Rhizoma drynariae promote angiogenesis and osteogenesis in bone defects[J]. *Phytotherapy Research*, 2022, 36(9): 3584-3600.

[16] Du J H, Zhou Y, Bao X G, et al. Surface polydopamine modification of bone defect repair materials: Characteristics and applications [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 974533.

[17] Degen G D, Stevens C A, Cárcamo-Oyarce G, et al. Mussel-inspired cross-linking mechanisms enhance gelation and adhesion of multifunctional mucin-derived hydrogels [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2025, 122(8): e2415927122.

[18] Lin H X, Li Z G, Xie Z Z, et al. An anti-infection and biodegradable TFRD-loaded porous scaffold promotes bone regeneration in segmental bone defects: Experimental studies [J]. *International Journal of Surgery*, 2024, 110(6): 3269-3284.

[19] Fu T, Sullivan D P, Gonzalez A M, et al. Mechanotransduction via endothelial adhesion molecule CD31 initiates transmigration and reveals a role for VEGFR2 in diapedesis[J]. *Immunity*, 2023, 56(10): 2311-2324. e6.

[20] Yuan Y H, Xu Y, Mao Y Y, et al. Three birds, one stone: An osteo-microenvironment stage-regulative scaffold for bone defect repair through modulating early osteo-immunomodulation, middle neovascularization, and later osteogenesis[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(6): 2306428.

[21] Liu Q, Peng X L, Liu X J, et al. Advances in the application of bone morphogenetic proteins and their derived peptides in bone defect repair[J]. *Composites Part B: Engineering*, 2023, 262: 110805.

团队介绍

江国华教授团队长期从事组织修复材料制备及修复机制研究,专注于利用多糖、丝素蛋白等天然高分子材料固有的结构与性能特性,通过多重动态交联、超分子组装以及纳米复合等策略,仿生制备组织修复材料,阐明其微结构环境对仿细胞外基质结构和功能的调控机制以及在皮肤、骨组织、心肌组织等再生修复过程中的细胞生物导向作用机制。江国华教授,2006年3月毕业于浙江大学,获理学博士学位;2006年8月至2008年7月先后在新加坡南洋理工大学、美国密歇根大学从事博士后研究;以第一/通信作者在*Chem. Eng. J.*、*Acta Biomater*、*Biomaterials*、*J. Mater. Chem. A*、*ACS Appl. Mater. Interfaces*等学术期刊发表SCI论文170余篇,获授权发明专利20余项。

(责任编辑:张会巍)