

双膦酸盐介导Mg²⁺缓释的双网络功能性水凝胶体外骨缺损修复的研究

赵人杰, 高倩倩, 王元银*

安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 安徽 合肥

收稿日期: 2026年3月13日; 录用日期: 2026年4月6日; 发布日期: 2026年4月14日

摘要

目的: 探究负载双膦酸盐(BP)与镁离子(Mg²⁺)的复合水凝胶在促进骨形成、诱导血管新生方面的综合效能, 为骨缺损修复提供新型材料策略。方法: 以海藻酸钠(SA)与明胶(Gel)为基质, 通过接枝BP并引入Mg²⁺, 经化学交联构建多功能复合水凝胶。采用扫描电子显微镜与傅里叶变换红外光谱对支架进行系统表征, 并通过体外实验从生物相容性、促血管生成、成骨诱导三个维度全面评估材料性能。结果: 复合水凝胶的微观形貌与化学结构均优于单一水凝胶, 具有优良的生物相容性, 可有效促进新生血管形成与骨组织再生。结论: 该复合水凝胶兼具多重生物活性功能, 能够在骨重塑调控的多个关键环节协同发挥作用, 有望为骨缺损的精准修复提供新的治疗思路与技术参考。

关键词

骨缺损, 双膦酸盐, 镁离子, 水凝胶, 血管生成, 骨生成

Bisphosphonate-Mediated Mg²⁺ Sustained Release Dual-Network Functional Hydrogels for *in Vitro* Bone Defect Repair

Renjie Zhao, Qianqian Gao, Yuanyin Wang*

College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Anhui Provincial Key Laboratory of Oral Diseases Research, Hefei Anhui

Received: March 13, 2026; accepted: April 6, 2026; published: April 14, 2026

*通讯作者。

文章引用: 赵人杰, 高倩倩, 王元银. 双膦酸盐介导 Mg²⁺缓释的双网络功能性水凝胶体外骨缺损修复的研究[J]. 临床医学进展, 2026, 16(4): 2851-2861. DOI: 10.12677/acm.2026.1641540

Abstract

Objective: To investigate the combined efficacy of bisphosphonate (BP)-loaded and magnesium ion (Mg^{2+})-loaded composite hydrogels in promoting bone formation and inducing angiogenesis, providing a novel material strategy for bone defect repair. **Methods:** A multifunctional composite hydrogel was constructed by chemically crosslinking sodium alginate (SA) and gelatin (Gel) as the matrix, grafting BP, and introducing Mg^{2+} . The scaffolds were systematically characterized using scanning electron microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. Material performance was comprehensively evaluated through *in vitro* experiments across three dimensions: biocompatibility, proangiogenicity, and osteogenic induction. **Results:** The composite hydrogel exhibited superior microstructure and chemical composition compared to monocomponent hydrogels, demonstrating excellent biocompatibility and effectively promoting neovascularization and bone tissue regeneration. **Conclusion:** This composite hydrogel possesses multiple bioactive functions and can synergistically act on several key stages of bone remodeling regulation. It holds promise as a novel therapeutic approach and technical reference for the precise repair of bone defects.

Keywords

Bone Defect, Bisphosphonate, Magnesium Ion, Hydrogel, Angiogenesis, Osteogenesis

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

骨缺损的临床修复目前面临多重核心挑战：缺损局部微环境再生能力受限，单纯依赖材料骨传导作用难以实现高效骨组织重建；血管新生不足进一步制约新骨的形成与成熟[1]。现有骨修复材料功能单一，力学性能与生物活性难以兼顾，活性因子/离子的精准控释缺乏有效手段，无法满足骨修复过程中结构支撑与生物学调控的双重需求[2]。因此，开发兼具优良力学性能、骨传导性、骨诱导性与促血管生成功能的新型仿生支架，是推动骨组织工程材料发展的重要方向。

明胶(Gel)源自天然胶原蛋白，海藻酸钠(SA)提取自天然海藻，二者生物相容性优异、降解行为[3]。将两者复合制备水凝胶支架可实现性能互补：明胶富含细胞黏附位点，利于细胞黏附与增殖；海藻酸钠赋予支架良好的可成型性与三维多孔结构，二者协同可构建与骨组织微环境相适配的多孔支架体系[4]。然而，单纯明胶-海藻酸钠水凝胶普遍存在力学强度不足、结构稳定性欠佳及活性物质难以可控释放等问题，制约了其在骨修复领域的深入应用。

双膦酸盐(BP)具有独特的分子结构与优异的化学稳定性，可通过化学接枝与水凝胶基体形成稳定共价结合，显著提升支架力学强度与结构稳定性[5]，同时为金属离子提供高效的螯合与负载位点，实现离子的持续缓慢释放[6]。镁离子(Mg^{2+})是调控骨组织再生的关键生物活性离子，既可促进骨髓间充质干细胞的成骨分化，又能诱导局部血管新生，为骨组织重建提供充足的营养供应与代谢支撑[7]。以BP接枝明胶-海藻酸钠水凝胶为载体负载 Mg^{2+} ，可在强化支架力学性能的同时实现 Mg^{2+} 的长效可控缓释，将结构支撑与生物活性调控有机整合。

基于上述,本研究构建了双膦酸盐接枝改性、负载镁离子的明胶-海藻酸钠多功能仿生水凝胶支架(SA-BP-Gel-MgO),系统表征其微观结构与化学组成,并从生物相容性、成骨诱导活性及促血管生成能力等方面全面评价其体外生物学性能。同时,初步探讨BP与Mg²⁺在调控血管生成和骨形成过程中的作用规律,并在基因表达层面初步揭示关键信号通路的激活模式,旨在为骨缺损的高效修复提供新型材料策略与实验依据,为后续深入的机制研究奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验主要试剂及仪器

主要试剂:明胶(美国Sigma-Aldrich公司)、海藻酸钠(美国Sigma-Aldrich公司)、纳米氧化镁(上海先锋纳米公司)、CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)、基质胶(美国Corning公司)、ALP染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)等。主要仪器:场发射扫描电子显微镜(德国ZEISS, GeminiSEM 300)、接触角测量仪(上海中晨, JC2000D1)、冷冻干燥机(美国LABCONCO)、酶标仪(瑞士Tecan)、PCR仪9700(美国ABI)、实时荧光定量PCR Mx3000P(美国安捷伦)等。

2.2. 复合水凝胶的制备

2.2.1. 明胶(Gel)水凝胶的制备

配制10%明胶溶液,向其中加入40 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和20 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的交联剂溶液混合,恒温反应6 h。经无水乙醇与去离子水交替清洗3 d、75%乙醇浸泡及紫外灭菌后,制得Gel水凝胶。

2.2.2. 海藻酸钠-双膦酸盐-明胶(SA-BP-Gel)复合水凝胶的制备

将海藻酸钠溶于去离子水,依次加入MES、EDC、NHS及阿仑膦酸钠,恒温反应24 h,制得SA-BP反应液。将反应液转入截留分子量12,000的透析袋,透析3 d(每12 h更换去离子水),浓缩至300~400 mL后冷冻干燥,得到SA-BP冻干粉末。取50 mg SA-BP粉末溶于1 mL去离子水,经EDC活化30 min;另取50 mg明胶溶于1 mL去离子水,加入NHS混匀,将两种溶液混合后恒温反应6 h,经清洗、灭菌后制得SA-BP-Gel复合水凝胶。

2.2.3. 海藻酸钠-双膦酸盐-明胶-氧化镁(SA-BP-Gel-MgO)复合水凝胶的制备

在SA-BP-Gel制备基础上,于明胶溶液中加入10 mg纳米氧化镁并超声分散,再与活化后的SA-BP溶液混合反应6 h,经清洗、灭菌后得到SA-BP-Gel-MgO复合水凝胶。

2.3. 复合水凝胶材料表征

取各组冻干水凝胶样品经离子溅射喷金处理后,采用场发射扫描电子显微镜(SEM)观察并记录材料表面形貌与内部微观结构;另将各组水凝胶样品预处理后真空压片,利用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)分析材料化学键及功能基团变化;同时取未冻干的完整水凝胶置于接触角测量仪载台,控制水滴体积与滴落高度,待液滴稳定附着后测量水接触角,依据接触角数值评价材料亲疏水性,完成材料多项理化性能表征。

2.4. 实验细胞与培养

大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)分离自4周龄SD大鼠股骨及胫骨并常规培养;人脐静脉内皮细胞(HUVECs)购自中国科学院细胞研究所(上海),鉴定合格后使用。

2.5. 水凝胶体外生物学检测

2.5.1. 细胞增殖能力检测

采用 CCK-8 法检测 rBMSCs 和 HUVECs 增殖能力: 细胞与水凝胶共培养, 第 1、3、5 天弃培养基, 每孔加 100 μ L 10% CCK-8 工作液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h 后, 于 450 nm 波长测定 OD 值。细胞存活率(%) = (实验孔 OD 值 - 空白孔 OD 值)/(对照孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) \times 100%。

2.5.2. 体外成血管能力检测

基质胶 4 $^{\circ}$ C 过夜解冻, 24 孔板每孔加 30 μ L 铺展均匀, 4 $^{\circ}$ C 过夜后 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 至凝固。HUVECs 以 1×10^5 个/孔接种于基质胶上, 用材料浸提液培养, 3、6 h 时倒置荧光显微镜观察血管形成, ImageJ 软件统计血管分支数、节点数及总长度。

2.5.3. qRT-PCR 检测成血管相关基因的表达

将 HUVECs 以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 贴壁后, 更换为水凝胶材料浸提液, 每 2 d 更换一次浸提液, 连续培养 4 d 后提取细胞总 RNA。采用实时荧光定量 PCR 检测 KDR、ANG、VEGF 等成血管相关基因表达, 以 ACTIN 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因相对表达水平, 引物序列如表 1。

Table 1. Primer sequences for angiogenesis genes

表 1. 成血管基因引物序列

Gene	5' Forward 3'	5' Reverse 3'
ACTIN	CTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG	CTGTCACCTTCACCGTTCAGTTT
KDR	AGCAGGATGGCAAAGACTAC	TACTTCCTCCTCCATACAG
ANG	GCTGTCACGTGCCCTAAGA	GTTAGGCAAAGGCTGAAGCT
VEGF	CAGGACATTGCTGTGCTTG	CTCAGAAGCAGGTGAGAGTAAG

2.5.4. 体外成骨诱导实验

选取 Gel、SA-BP-Gel、SA-BP-Gel-MgO 水凝胶, 浸泡于常规成骨诱导液中备用。rBMSCs 以 3×10^4 个/孔接种于 12 孔板(每组 3 复孔), 贴壁后换用材料浸提成骨诱导液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 避光孵育, 7 d 后 ALP 染色。

2.5.5. qRT-PCR 检测成骨相关基因的表达

将 rBMSCs 以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 贴壁后, 更换为水凝胶材料浸提液, 每 2 d 换液一次, 连续培养 7 d 后提取细胞总 RNA。采用实时荧光定量 PCR 检测 BSP、COL1、RUNX2、ALP 等成骨相关基因表达, 以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因相对表达水平, 引物序列如表 2。

Table 2. Primer sequences for osteogenesis genes

表 2. 成骨基因引物序列

Gene	5' Forward 3'	5' Reverse 3'
GAPDH	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT
BSP	CTGACGCTGGAAAGTTGGAG	CGTTGACGACCTGCTCATTT
COL1	CCCAGCCGCAAAGAGTCTACA	TGTCTTCTGGCCATGCGTC
Runx2	TCCGCCACCACTCACTACCAC	GGAAGTATAGGACGCTGACGAAG
ALP	GCTGCTGCAGATGTACTACG	CTGCAGGCCTCTCATTCAAC

3. 数据分析

所有实验数据均采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义(*代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$)。所有统计图均使用 GraphPad Prism 9.5 软件绘制完成。

4. 结果

4.1. 复合水凝胶的制备

通过化学交联的方式制备出纯明胶水凝胶(Gel), 使其性质更加稳定。之后通过海藻酸钠接枝双磷酸盐类药物, 成功得到 SA-BP, 将 SA-BP 与 Gel 混合并且交联得到以海藻酸钠和明胶为基底负载双磷酸盐类药物的复合水凝胶 SA-BP-Gel, 向明胶溶液中混合纳米氧化镁, 并且超声震荡, 将 SA-BP 与 Gel-MgO 混合并且交联得到以海藻酸钠和明胶为基底负载双磷酸盐类药物及镁离子的复合水凝胶 SA-BP-Gel-MgO, 图 1 为复合水凝胶形态。

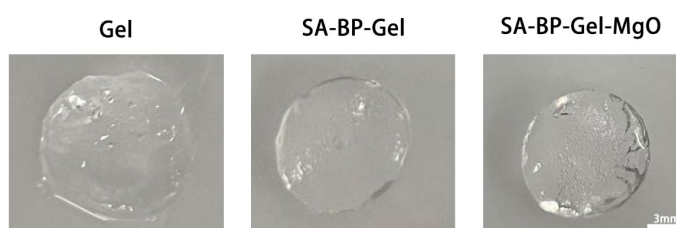


Figure 1. Morphology of composite hydrogels. The scale bars: 3 mm
图 1. 复合水凝胶形态。比例尺: 3 mm

4.2. 复合水凝胶表面微观形态

扫描电子显微镜结果显示, Gel 组支架表面孔隙稀少, 三维网络结构发育不完善, 局部呈现光滑平坦形貌(图 2(A))。相较之下, SA-BP-Gel 组与 SA-BP-Gel-MgO 组(图 2(B)、图 2(C))的微观形貌发生了显著改变: 两组支架均呈现出丰富、规则的多孔三维网络结构, 孔隙数量明显增多, 孔道相互连通, 形成了有利于物质交换与细胞黏附迁移的贯通网络体系。

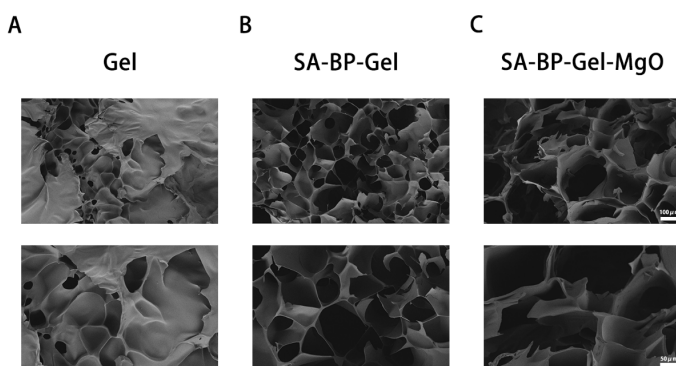


Figure 2. Scanning electron microscope images of composite hydrogels. (A) Gelatin (Gel); (B) Bisphosphonate-loaded composite hydrogel (SA-BP-Gel); (C) Bisphosphonate-loaded composite hydrogel with nano-MgO (SA-BP-Gel-MgO). The scale bars are 100 μm and 50 μm from top to bottom

图 2. 复合水凝胶扫描电镜图像。(A) 明胶(Gel); (B) 负载双磷酸盐类药物复合水凝胶(SA-BP-Gel); (C) 负载双磷酸盐类药物及纳米 MgO 复合水凝胶(SA-BP-Gel-MgO)。比例尺从上到下为 100 μm , 50 μm

4.3. 复合水凝胶化学键及功能基团分析

为验证双磷酸盐(BP)与海藻酸钠(SA)的共价接枝效果,对 SA 及接枝产物 SA-BP 进行傅里叶变换红外光谱(FTIR)表征(图 3)。相较于 SA 原始谱图,SA-BP 在 1727 cm^{-1} 处出现明显新增吸收峰,归属于酯键($-\text{C}=\text{O}$)伸缩振动,直接证明 SA 侧链羧基($-\text{COO}^-$)与 BP 羟基发生酯化反应,形成共价键连接。同时,SA-BP 在 1286 、 1086 、 1027 、 493 cm^{-1} 处出现系列新特征峰,分别对应 $\text{P}=\text{O}$ 、 $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ 、 $\text{P}-\text{O}-\text{P}$ 及 $\text{O}-\text{P}-\text{O}$ 的伸缩与弯曲振动,为磷官能团成功引入提供了直接光谱学依据。官能团特征峰的位移与强度变化进一步佐证接枝反应:SA-BP 中羧酸根不对称伸缩振动峰由 SA 的 1614 cm^{-1} 红移至 1600 cm^{-1} ,峰强度显著降低,提示部分羧基参与酯化反应被消耗;O-H 伸缩振动峰由 3402 cm^{-1} 蓝移至 3301 cm^{-1} 且峰形宽化,说明接枝反应改变了分子间氢键网络与微环境。此外, $1000\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ 糖环 C-O-C 特征振动区,SA-BP 峰形与相对强度明显改变,推测为 P-O-C 磷酸酯键峰叠加所致。

综上,酯键特征峰、BP 专属磷官能团峰的新增,以及 SA 原有特征峰的频移与强度变化,多重证实 BP 已通过酯化反应共价接枝至 SA 分子链,产物化学结构明确。

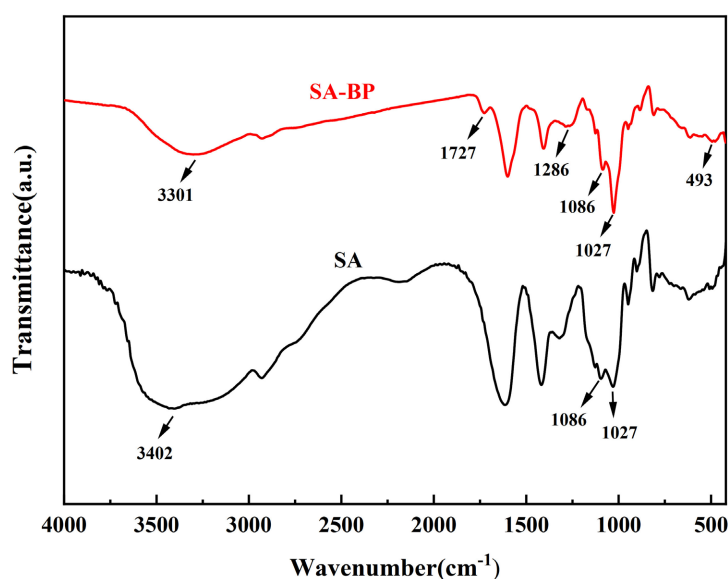


Figure 3. Fourier transform infrared spectroscopy analysis

图 3. 傅立叶红外光谱分析

4.4. 亲水性检测

水接触角的大小代表材料的亲水性能,接触角越小表示亲水性越好(图 4),明胶基质水接触角较小,表现出较强的亲水性,在经过 SA-BP 改性之后同样展现出良好的亲水性,进一步添加纳米 MgO 后,液滴与材料所形成的接触角依然较小,具有良好的亲水性,改性之后并不会改变材料的亲水性能。



Figure 4. Water contact angle measurements of composite hydrogels. The scale bars: 1 mm

图 4. 复合水凝胶水接触角测量。比例尺: 1 mm

4.5. 生物相容性检测

采用 CCK-8 法检测复合水凝胶对大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖活性及细胞活力的影响(图 5(A)、图 5(B)),两种细胞在各实验组的 OD 值均随培养时间延长持续上升。各实验组细胞增殖水平与相对活力均保持在较高水平,组间无明显差异。该复合水凝胶对 rBMSCs 和 HUVECs 的增殖与活力无不良影响,具有良好的细胞相容性,可为后续体内外功能性实验提供安全性支撑。

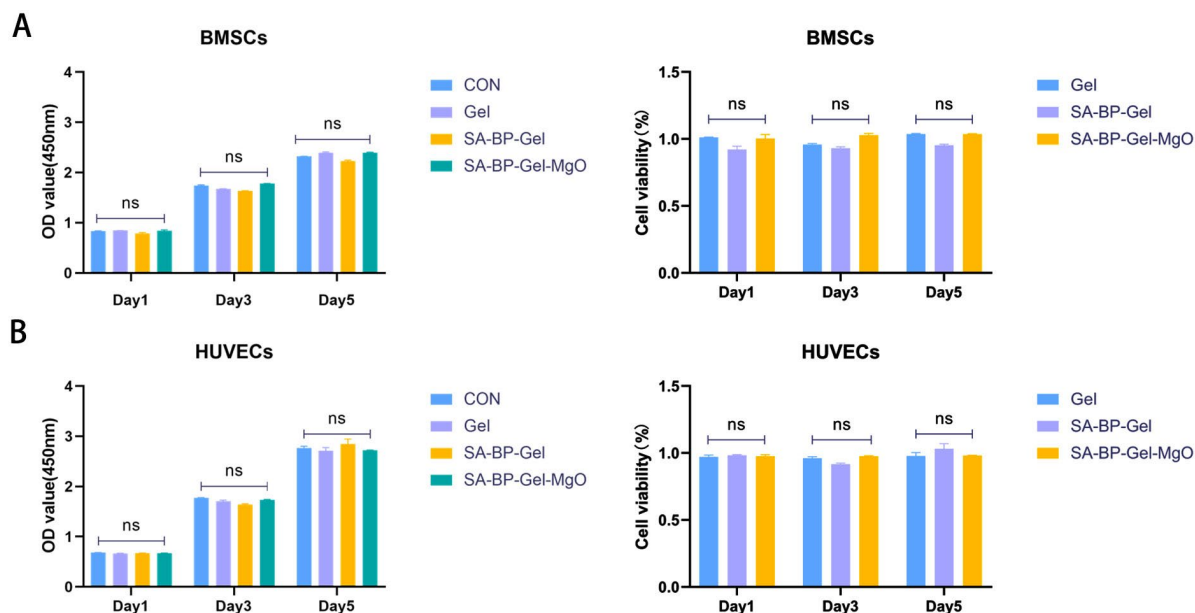


Figure 5. Cytotoxicity assessment of composite hydrogels. (A) Cell proliferation and viability assessed via CCK-8 assay after co-culture with rBMSCs for 1, 3, and 5 days; (B) Cell proliferation and viability assessed via CCK-8 assay after co-culture with HUVECs for 1, 3, and 5 days

图 5. 复合水凝胶细胞毒性检测。(A) 与 rBMSCs 共培 1、3、5 天通过 CCK8 评估细胞增殖能力及细胞活力; (B) 与 HUVECs 共培 1、3、5 天通过 CCK8 评估细胞增殖能力及细胞活力

4.6. 体外成血管实验

为评价复合水凝胶的体外促血管生成能力,采用基质胶管腔形成实验观察 HUVECs 成管行为。随培养时间由 3 h 延长至 6 h,各组管腔结构逐渐完善,且组间差异更加明显。与 CON 组、Gel 组及 SA-BP-Gel 组相比,SA-BP-Gel-MgO 组在 3 h 和 6 h 均形成了更加完整、连接更紧密的管腔网络,网络复杂度明显更高;其余各组仅形成较为稀疏、简单的管腔结构(图 6(A))。定量分析显示,3 h 和 6 h 时,SA-BP-Gel-MgO 组的血管连接数、分支数及总管长均显著高于 CON 组、Gel 组及 SA-BP-Gel 组,而 CON 组、Gel 组与 SA-BP-Gel 组间上述指标差异均无统计学意义(图 6(B)、图 6(C))。结果表明,MgO 的引入显著增强了复合水凝胶促进内皮细胞成管的能力。

血管新生相关基因表达结果(图 7)与成管实验结果一致。SA-BP-Gel-MgO 组中 KDR、ANG 及 VEGF 的 mRNA 表达水平平均显著升高。其中,KDR 和 ANG 表达均显著高于 CON 组和 SA-BP-Gel 组,提示 MgO 纳米颗粒有助于增强材料对血管生成启动及血管成熟相关过程的调控作用;VEGF 表达在 SA-BP-Gel-MgO 组中亦显著高于 CON 组和 SA-BP-Gel 组,表明 MgO 是促进 VEGF 上调的重要因素。综上,MgO 的引入是 SA-BP-Gel-MgO 复合水凝胶发挥体外促血管生成作用的关键,Mg²⁺释放可能通过促进

HUVECs 迁移、增殖及血管新生相关基因表达，从而增强血管生成能力。

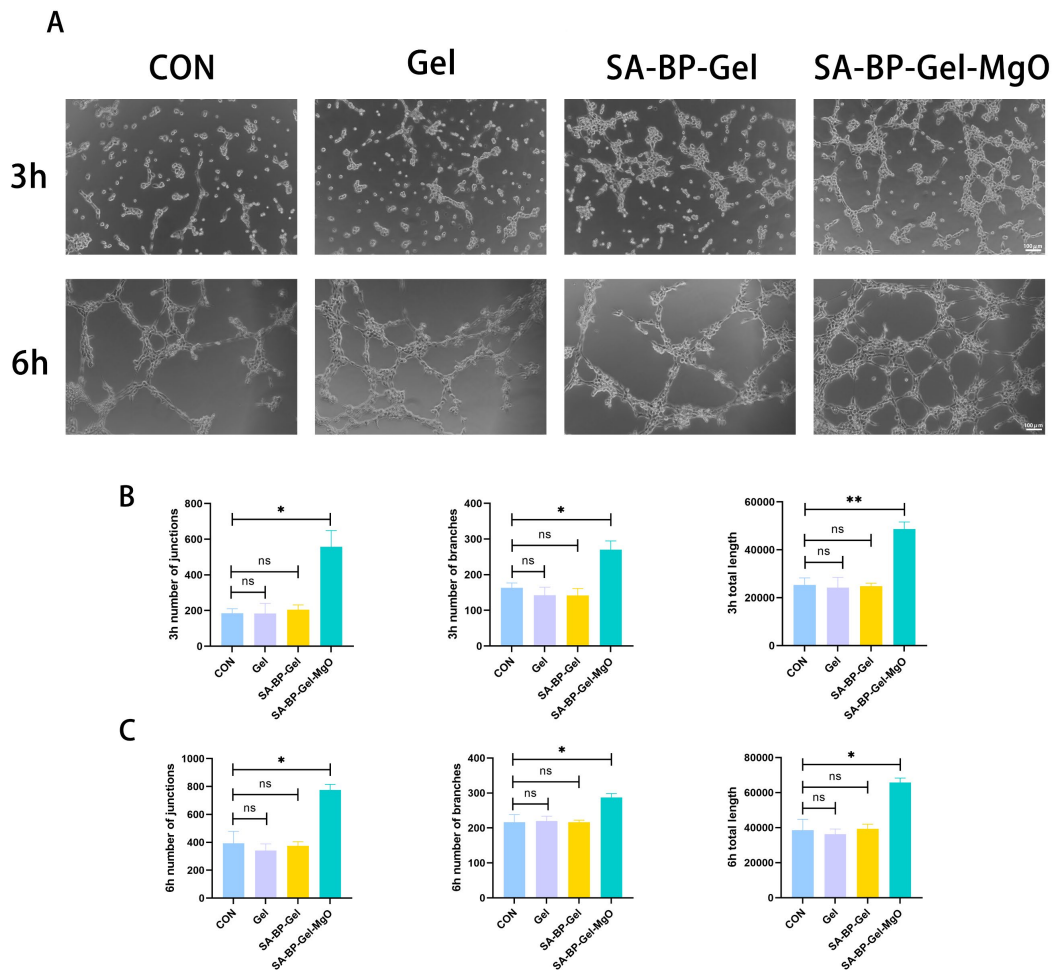


Figure 6. *In vitro* angiogenesis assay. (A) Angiogenesis status after co-culture with HUVECs for 3 and 6 hours; (B) Quantitative analysis of angiogenesis at 3 hours; (C) Quantitative analysis of angiogenesis at 6 hours. The scale bars: 100 μ m
图 6. 体外成血管实验。(A) 与 HUVECs 共培 3、6 h 成血管状况; (B) 3 h 成血管定量分析; (C) 6 h 成血管定量分析。比例尺: 100 μ m

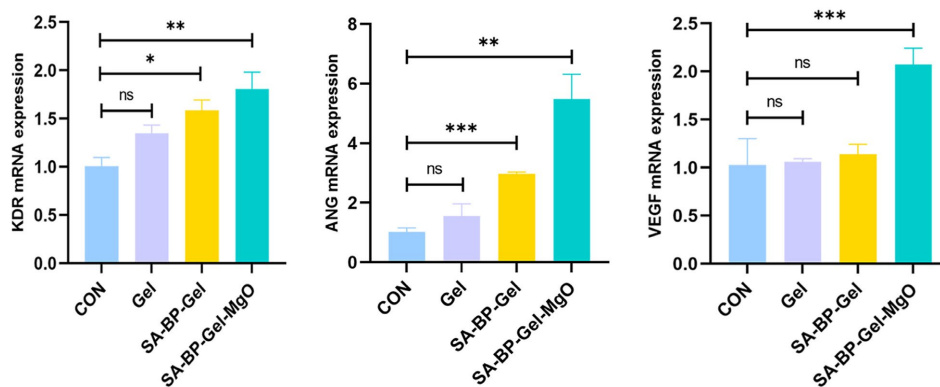


Figure 7. Angiogenic gene detection (KDR, ANG, VEGF) after four days of co-culture in composite hydrogels
图 7. 复合水凝胶共培四天后成血管基因检测(KDR, ANG, VEGF)

4.7. 体外成骨实验

碱性磷酸酶(ALP)染色作为成骨早期分化的重要功能性标志,其染色深度与分布密度可直观反映各组细胞的成骨分化活跃程度。如图8所示,CON组与Gel组染色强度相近,整体较浅且分布稀疏,提示单纯明胶水凝胶对细胞早期成骨分化促进作用有限。与之相比,SA-BP-Gel组染色强度明显增强,阳性区域增多,表明SA-BP功能化修饰可促进细胞早期成骨分化。SA-BP-Gel-MgO组呈现最强的染色强度和最高的阳性分布密度,提示MgO纳米颗粒与SA-BP修饰具有协同促成骨作用,可进一步增强水凝胶的早期成骨诱导能力。

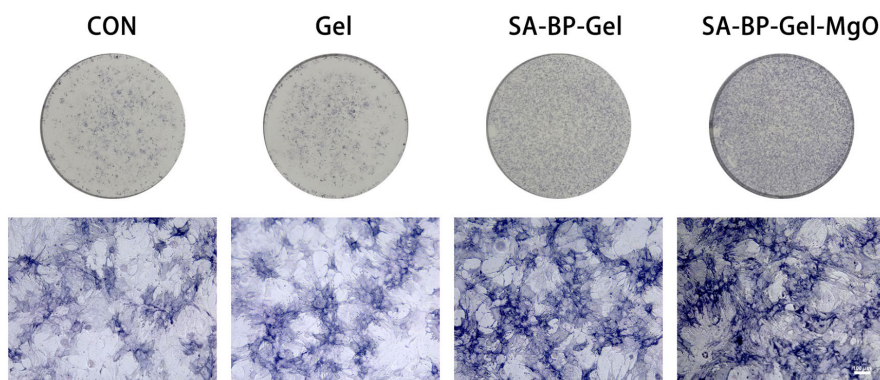


Figure 8. Alkaline phosphatase (ALP) staining after 7 days of co-culture of composite hydrogel with rBMSCs. The scale bars:100 μ m

图8. 复合水凝胶与 rBMSCs 共培 7 天后碱性磷酸酶(ALP)染色。比例尺: 100 μ m

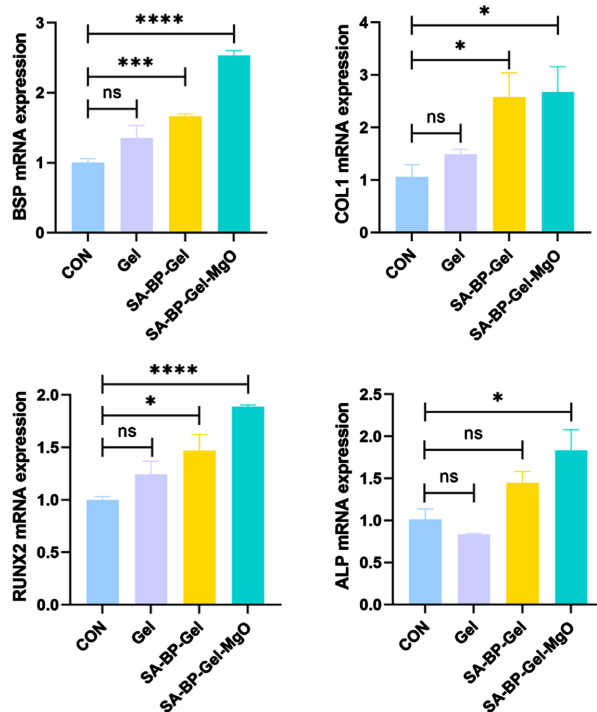


Figure 9. Osteogenic gene expression analysis (BSP, COL1, RUNX2, ALP) after seven days of co-culture with composite hydrogels

图9. 复合水凝胶共培七天后成骨基因检测(BSP, COL1, RUNX2, ALP)

成骨相关基因表达结果显示(图 9), SA-BP-Gel-MgO 组对成骨分化关键基因的促进作用最为显著。BSP 和 RUNX2 表达均显著高于 CON 组及 SA-BP-Gel 组; COL1 在 SA-BP-Gel 组和 SA-BP-Gel-MgO 组中均显著高于 CON 组,但两组间差异无统计学意义; ALP 仅在 SA-BP-Gel-MgO 组中显著高于 CON 组,而 Gel 组和 SA-BP-Gel 组与 CON 组相比差异均无统计学意义。结果表明, SA-BP 修饰可初步激活成骨相关基因表达,而 MgO 纳米颗粒的引入可进一步增强成骨转录调控、骨基质合成及矿化相关基因表达,是提升复合水凝胶成骨诱导活性的关键因素。

5. 讨论

骨修复是一个涉及“成血管-成骨”多环节协同调控的复杂生理过程,单一功能材料往往难以匹配骨缺损微环境的动态修复需求。本研究通过化学交联与共价接枝相结合的策略,构建了以明胶-海藻酸钠为基底、负载双膦酸盐(BP)与氧化镁(MgO)的复合水凝胶(SA-BP-Gel-MgO),并系统表征其材料学特性与生物功能,为骨修复材料的多靶点设计提供了实验依据。

在材料合成与结构表征方面,本研究首先通过酯化反应实现了双膦酸盐与海藻酸钠分子链的共价接枝。傅里叶红外光谱(FTIR)中酯键特征峰(1727.20 cm^{-1})及磷相关官能团特征峰(1286 、 1086 cm^{-1} 等)的清晰呈现,结合核磁共振氢谱($^1\text{H NMR}$)中海藻酸钠与 BP 特征质子信号的稳定叠加,共同证实了 SA-BP 接枝产物的成功合成[8]。为后续生物功能的长效发挥奠定了基础。

微观结构调控是骨修复材料设计的核心环节之一:纯明胶水凝胶(Gel)因分子间紧密交联而呈现孔隙稀少的致密形貌[9]; SA-BP 的引入借助多糖网络的协同缠结效应构建了连通多孔结构; MgO 纳米颗粒的掺入进一步丰富了孔隙层级并提升了表面粗糙度。这种梯度多孔架构不仅为细胞定植提供了充裕的三维空间,更为物质交换与 Mg^{2+} 的持续缓释建立了高效通道,构成材料生物功能跃升的结构基础[10]。此外,各组水凝胶均维持低水接触角的优良亲水性,从界面层面直接保障了细胞的高效黏附与铺展[11]。

明胶与海藻酸钠均为天然生物相容性高分子材料,其生物安全性已得到广泛验证[12]。本研究中, CCK-8 实验(各组 OD 值无显著差异)证实该复合体系对 rBMSCs 与 HUVECs 均具有优良生物相容性与低毒性, BP 与 MgO 的负载未对细胞黏附与增殖产生抑制作用,说明 BP、MgO 的引入未破坏材料生物安全性,为后续功能实验的开展奠定了基础。骨修复的核心在于重建“血管新生供能-成骨细胞主导骨形成-破骨细胞调控骨吸收”的动态稳态,而 SA-BP-Gel-MgO 复合水凝胶恰能实现多靶点协同调控。在促血管化方面, SA-BP-Gel-MgO 组体外血管网络的复杂度显著优于其余各组; Mg^{2+} 作为血管生成的关键调节因子,可通过激活 VEGF-KDR 信号通路直接驱动内皮细胞迁移与管腔形成[13]; BP 则通过诱导巨噬细胞向 M2 型极化,重塑有利于血管新生的局部免疫微环境,间接放大促成血管效应[14]。二者协同作用为骨缺损区提供了持续充沛的营养与氧气供给,形成了骨再生的血供基础。在成骨调控方面, SA-BP-Gel-MgO 组碱性磷酸酶(ALP)染色最深且分布最为密集,提示其成骨诱导能力显著增强。这一现象源于 BP 与 Mg^{2+} 的协同成骨机制: BP 可上调成骨分化关键转录因子 RUNX2 的表达[15],启动成骨分化的级联进程; Mg^{2+} 则增强 ALP 活性,促进钙盐沉积与骨基质矿化成熟[16],二者协同激活了“分化启动-基质合成-矿化成熟”的全链条成骨程序。

综上所述,本研究构建了集血管生成、骨生成于一体的复合体系,实现了骨修复多环节的协同调控,相比单一功能水凝胶材料更适配骨缺损复杂微环境的需求。但本研究仍存在一定局限性:目前通过体外实验验证了材料性能,在基因表达层面初步揭示了 Mg^{2+} 激活 VEGF-KDR 通路的可能机制,但目前尚缺乏针对 VEGF、磷酸化 VEGFR2 (p-VEGFR2)等关键信号蛋白的验证及通路抑制剂功能实验,信号通路激活的蛋白水平证据有待后续研究补充完善后续,并且需通过动物体内骨缺损模型进一步评估其体内修复效果及长期生物安全性。

伦理声明

本研究中的所有动物原代细胞提取相关实验均严格遵循动物伦理审查原则，实验方案已通过安徽医科大学动物伦理与使用委员会监督及批准(批准编号：LLSC20251639)。所有实验操作均符合动物福利相关规范，最大限度减少动物痛苦，保障动物合法权益。

参考文献

- [1] Yang, Q., Liu, S., Liu, H., Liu, Y., He, Z., Zheng, Z., *et al.* (2026) A New Paradigm in Bone Tissue Biomaterials: Enhanced Osteogenesis-Angiogenic Coupling by Targeting H-Type Blood Vessels. *Biomaterials*, **324**, Article ID: 123423. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2025.123423>
- [2] Carrascal-Hernández, D.C., Martínez-Cano, J.P., Rodríguez Macías, J.D. and Grande-Tovar, C.D. (2025) Evolution in Bone Tissue Regeneration: From Grafts to Innovative Biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, **26**, Article No. 4242. <https://doi.org/10.3390/ijms26094242>
- [3] Goder Orbach, D., Roitman, I., Coster Kimhi, G. and Zilberman, M. (2024) Formulation-Property Effects in Novel Injectable and Resilient Natural Polymer-Based Hydrogels for Soft Tissue Regeneration. *Polymers*, **16**, Article No. 2879. <https://doi.org/10.3390/polym16202879>
- [4] Tomić, S.L., Nikodinović-Runić, J., Vukomanović, M., Babić, M.M. and Vuković, J.S. (2021) Novel Hydrogel Scaffolds Based on Alginate, Gelatin, 2-Hydroxyethyl Methacrylate, and Hydroxyapatite. *Polymers*, **13**, Article No. 932. <https://doi.org/10.3390/polym13060932>
- [5] Xiong, A., He, Y., Gao, L., Li, G., Liu, S., Weng, J., *et al.* (2021) The Fabrication of a Highly Efficient Hydrogel Based on a Functionalized Double Network Loaded with Magnesium Ion and BMP2 for Bone Defect Synergistic Treatment. *Materials Science and Engineering: C*, **128**, Article ID: 112347. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112347>
- [6] Alatzoglou, F.G., Vassaki, M., Nirgianaki, K., Tripodanos, E., Turhanen, P., Demadis, K.D., *et al.* (2023) Surface-modified Silica Hydrogels for the Programmable Release of Bisphosphonate Anti-Osteoporosis Drugs: The Case of Etidronate. *Materials*, **16**, Article No. 3379. <https://doi.org/10.3390/ma16093379>
- [7] Wang, Z., Xiang, P., Xu, Z., Gu, M., Zhang, R., Li, Y., *et al.* (2025) The Role of Magnesium, Zinc, and Strontium in Osteoporotic Fracture Repair. *Bioengineering*, **12**, Article No. 201. <https://doi.org/10.3390/bioengineering12020201>
- [8] Jing, C., Li, B., Tan, H., Zhang, C., Liang, H., Na, H., *et al.* (2021) Alendronate-Decorated Nanoparticles as Bone-Targeted Alendronate Carriers for Potential Osteoporosis Treatment. *ACS Applied Bio Materials*, **4**, 4907-4916. <https://doi.org/10.1021/acsbm.1c00199>
- [9] Skopinska-Wisniewska, J., Tuszynska, M. and Olewnik-Kruszkowska, E. (2021) Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents. *Materials*, **14**, Article No. 396. <https://doi.org/10.3390/ma14020396>
- [10] Liu, B., Hao, M., Chen, J., Hu, X., Zhong, J., Chen, Y., *et al.* (2025) Magnesium Oxide Nanoparticles Modulate Phase Separation to Form Trabecular-Structured Cryogels for Bone Defect Repair. *Materials Today Bio*, **31**, Article ID: 101631. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101631>
- [11] Reynolds, M., Stoy, L.M., Sun, J., Opoku Amponsah, P.E., Li, L., Soto, M., *et al.* (2024) Fabrication of Sodium Trimetaphosphate-Based PEDOT:PSS Conductive Hydrogels. *Gels*, **10**, Article No. 115. <https://doi.org/10.3390/gels10020115>
- [12] Iqbal, Y., Amin, F., Aziz, M.H., Khalid, M., Alhadlaq, H.A. and Alaizeri, Z.M. (2025) Flexible Sodium Alginate-Gelatin Hydrogel Membrane Incorporated with Green Synthesized Bimetallic ZnO:CeO₂ Nanocomposite for Antioxidant, Antibacterial and Biocompatibility Studies. *Reactive and Functional Polymers*, **212**, Article ID: 106228. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2025.106228>
- [13] Wang, L., Wang, X., Wu, J., Chen, J., He, Z., Wang, J., *et al.* (2025) Magnesium Ions Induce Endothelial Cell Differentiation into Tip Cell and Enhance Vascularized Bone Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, **14**, e2500274. <https://doi.org/10.1002/adhm.202500274>
- [14] Sagoe, P.N.K., Zink, B. and Jain, E. (2026) Bisphosphonates Loaded Nanoparticles in Microparticles: A Potential Macrophage Targeting and Repolarizing Drug Delivery System. *Drug Delivery and Translational Research*, **16**, 140-161. <https://doi.org/10.1007/s13346-025-01889-7>
- [15] Ribeiro, V., Garcia, M., Oliveira, R., Gomes, P.S., Colaço, B. and Fernandes, M.H. (2014) Bisphosphonates Induce the Osteogenic Gene Expression in Co-cultured Human Endothelial and Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **18**, 27-37. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12154>
- [16] Paiva, S.S., Ferreira, A., Pakenham, E., Kaur, K., Cavanagh, B., O'Brien, F.J., *et al.* (2025) Magnesium Ion-Mediated Regulation of Osteogenesis and Osteoclastogenesis in 2D Culture and 3D Collagen/Nano-Hydroxyapatite Scaffolds for Enhanced Bone Repair. *Journal of Functional Biomaterials*, **16**, Article No. 363. <https://doi.org/10.3390/jfb16100363>