

特约专栏

微纳米生物活性玻璃的细胞基因激活性能研究

胡庆^{1,2,3}, 陈晓峰^{1,2,3}, 董艳梅⁴, 宫玮玉⁴

(1. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东 广州 510640)

(2. 国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 广东 广州 510006)

(3. 广东省生物医学工程重点实验室, 广东 广州 510006)

(4. 北京大学口腔医学院, 北京 100081)

摘要: 微纳米生物材料目前已成为生物医用材料领域一个研究热点和难点。大量研究表明具有微纳米结构特征的生物材料表现出了积极的生物学响应。生物活性玻璃(BG)具有较高的生物活性、生物相容性, 是一类重要的骨修复材料。而微纳米生物活性玻璃(MNBG)因其具有特殊的形态结构和理化性能, 引起众多研究者的关注。但是目前对MNBG的研究还主要集中在制备、表征以及其表面类骨羟基磷灰石矿物在SBF溶液中的形成活性等方面, 关于MNBG的细胞相容性以及基因激活性能方面的研究还鲜有报道。通过溶胶-凝胶法结合模板仿生技术合成了具有特殊微纳米结构和形态的MNBG, 并将其浸提液与MG-63细胞共培养, 研究生物玻璃溶出物对细胞增殖, 成骨相关基因和蛋白表达的影响, 结果证明相比于传统的熔融法制备的生物玻璃(45S5)浸提液, MNBG浸提液能够明显促进细胞增殖, 激活细胞成骨相关基因, 上调相关蛋白的表达, 为设计和制备具有基因介导作用的新型生物活性玻璃骨修复材料提供了理论依据。

关键词: 微纳米生物活性玻璃; 溶胶-凝胶技术; 模板仿生; 基因激活

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2013)10-0577-06

Biocompatibility and Gene Activation of Micro/Nano-Bioactive Glasses

HU Qing^{1,2,3}, CHEN Xiaofeng^{1,2,3}, DONG Yanmei⁴, GONG Weiyu⁴

(1. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2. National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, Guangzhou 510006, China)

(3. Guangdong Province Key Laboratory of Biomedical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(4. School of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China)

Abstract: Micro/nano biological material has become the research hotspot and difficulty in the field of biomedical materials. A number of studies have shown that micro/nano structure of biological material can show a positive biological response. Bioactive glass (BG) has the high apatite-forming bioactivity and biocompatibility. BG is the ideal biomaterial for bone tissue regeneration. Micro/nano-bioactive glass (MNBG) caused much attention because of the special morphology and physicochemical properties, but the research about MNBG only focused on preparation and the in vitro apatite-forming bioactivity, few papers have focused on the biocompatibility and gene activation. This study used sol-gel method combining biological organic templates to design micro/nano structure of bioactive glasses. The effects of MNBG and traditional melt 45S5 ionic dissolution products on proliferation, expression of osteogenic genes, proteins were investigated. The results showed that MNBG promoted cell-proliferation, up-regulated the expression of osteogenic genes and proteins. This work will provide a reference for design of specific morphology of the bioactive bone repair materials in the future.

Key words: bioactive glass; sol-gel method; biomimetic template; gene activation

收稿日期: 2013-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(90816024); 科技部973计划项目(2006CB601206)

第一作者: 胡庆, 男, 1987年出生, 博士研究生

通信作者: 陈晓峰, 男, 1956年出生, 教授, 博士生导师

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2013.10.01

1 前言

自1972年Hench教授研制出熔融法制备生物活性玻璃45S5以来^[1], 生物活性玻璃作为生物活性材料中的重要组成部分, 近年来越来越多地受到国际生物材料

学界关注。生物活性玻璃在骨缺损处与骨组织紧密结合而对人体不产生不良反应,并能与骨组织发生键合^[2]。鉴于生物活性玻璃在临床治疗中所取得的良好骨修复效果,从而引起生物医学材料研究界的广泛关注^[3-4]。目前,对生物活性玻璃的微观结构、形貌、理化及生物学性能研究仍在不断深入,特别是近年来在生物玻璃的细胞学研究方面取得一些突破性进展,证明生物活性玻璃所具有的良好骨修复特性一方面源于其良好的生物矿化活性,另一方面,其成分中 Si, Ca 等元素的释放起到基因激活的作用,对于其促进新骨形成起到至关重要的作用^[5]。以 45S5 为代表的第一代生物活性玻璃及其临床应用的产品都是通过熔融法制备的。其工艺流程包括粉体原料混合,然后将混合后的配合料在 1 300 ~ 1 500 °C 高温下熔融、淬冷,再进行机械研磨和筛分制得。熔融法制备生物玻璃要求条件高,能耗大;制得的是致密的粉体颗粒,其比表面积小,不利于离子释放和体内降解;材料的成分和粒度也不易控制,在粉体加工过程中易引入杂质。溶胶-凝胶法是一种室温下制备无机材料的新方法,20 世纪 90 年代被引入到制备生物玻璃材料的方法中来,由于其制备过程主要在室温下进行,后续的热处理过程一般在 700 °C 以下即可完成,特别是该方法制备的生物玻璃具有大量的微纳米孔隙,从而具有高比表面积和高生物活性。但单纯利用溶胶-凝胶法制备的生物玻璃颗粒仍处于粘结状态,难以分散开,通过研磨筛分后得到的是形貌不规则的微米级颗粒,难以获得形貌可控、颗粒尺寸均匀的微纳米级生物玻璃(MNBG)^[6-8]。通过模板调控合成微纳米生物材料是当今材料和医药研究领域的一个重要组成部分和发展方向,微纳米材料将可能成为 21 世纪生物医学材料的核心^[8]。关于 MNBG 的研究近年来才刚刚开始,目前对其研究还主要集中在制备、表征以及磷灰石形成活性方面,关于 MNBG 的细胞相容性以及基因激活性能方面的研究还鲜有报道。

本文采用溶胶-凝胶技术结合有机模板调控技术,制备了一种具有球形形貌的规则微纳米生物活性玻璃,并对其细胞学性能进行了研究。细胞模型选择 MG-63 细胞株,该细胞是从人骨肉瘤组织中分离出来的成骨样细胞株,具备一系列未分化成骨细胞表型的典型特点,作为一种理想的成骨细胞模型被广泛应用于成骨相关实验的研究^[9-11]。通过观察 MNBG 与 MG-63 细胞的相互作用,深入研究 MNBG 激活成骨相关基因的作用。

2 材料与方法

2.1 微纳米生物活性玻璃(MNBG)的制备

MNBG 材料的化学组成为 60% SiO₂, 36% CaO,

4% P₂O₅(摩尔分数)。制备工艺过程主要分为以下几步:以柠檬酸(CA)为催化剂;将一定量的前驱体原料正硅酸乙酯(TEOS)、磷酸三乙酯(TEP)、四水硝酸钙以及模板剂聚乙二醇(PEG)按顺序加至无水乙醇的水溶液中,并继续搅拌 4 h,以使生物玻璃的前驱体充分水解以及 PEG 分子成形组装;随后于 60 °C 水热老化 24 h 形成湿凝胶,60 °C 干燥 24 h 后置入高温炉中以 10 °C/min 升至 600 °C 热处理 2 h,研磨无需过筛即可得到分散良好的微纳米生物活性玻璃球形颗粒。样品的微纳米结构形貌采用日本 JSM6330F 高分辨场发射扫描电镜进行观察。

2.2 MG-63 细胞的培养

MG-63 细胞冻存于液氮,复苏接种于低糖培养基(L-DMEM, GIBCO)中,在 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂ 及饱和湿度条件下培养,2~3 d 换一次培养液。细胞生长至 80%~90% 融合时,按 1:6 比例传代扩增。消化离心以每孔 3 × 10³ 个细胞,分别在成骨诱导液、L-DMEM 中,将两种生物玻璃与细胞共培养,考察其成骨性能。

2.3 生物活性玻璃浸提液制备

将 MNBG 粉末 180 °C 高温干热 4 h 灭菌后,以 1 mg/ml 浓度在 DMEM 中 37 °C, 150 rpm 摇动浸提 24 h, 0.22 μm 孔径滤膜过滤,制备 MNBG 浸提液。用同样的方法制备 45S5 生物玻璃浸提液作为对照。采用等离子发射光谱法(Inductively Coupled Plasma Analysis, ICP)检测 MNBG 和 45S5 浸提液及 DMEM 细胞培养基中 Si, Ca, P 离子的浓度。

2.4 检测项目和方法

2.4.1 细胞增殖能力测定

以每孔 100 μl (3 × 10³ 个细胞) MG-63 细胞悬液接种于 96 孔培养板,37 °C、5% CO₂ 孵育过夜待其贴壁,记为第 0 天。换液分别加入 45S5、MNBG 浸提液以及 DMEM 培养基共培养,培养后的第 1, 3, 5, 7 d 通过 MTT 法测定细胞的光密度值(Optical Density, OD 值),每个检测时间点设置 6 个复孔。按照各测量时间点,于培养孔内换新鲜 DMEM 培养液 180 μl/孔,加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,继续培养 4 h。4 h 后,缓慢吸净孔内液体后每孔加入 150 μl 二甲基亚砷(DMSO),置 37 °C 摇床上 100 rpm 振荡 10 min 至结晶物充分溶解。通过酶标仪,以波长 490 nm 测定每孔 OD 值,记录结果。

2.4.2 成骨相关基因检测

RNA 的提取 将与浸提液复合培养 2, 4, 7 d 的细胞抽提 RNA。每孔加入 1 ml Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 反复吹打,按照说明书上的步骤抽提

RNA, 将干燥后的 RNA 溶于 20 μl 的 DEPC 水中, 在 NanoDrop2000 (Thermo Scientific) 上检测 RNA 浓度, 并立即进行逆转录。

RNA 的逆转录 取 500 ng 总 RNA, 采用 Fermentas Life Sciences 公司的逆转录试剂盒, 在 PCR 仪 (TC-412, TECHNE 公司) 上进行逆转录, 逆转录完成后, cDNA 立即进行 Real-time PCR (qRT-PCR)。

Real-time PCR (qRT-PCR) 检测 根据 GenBank 基因库公布的 GAPDH、ALP、Col I、OCN 及 Runx 2 基因的 mRNA 序列, 以 GAPDH 为内参基因, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增引物。引物由上海生工生物技术公司合成。引物序列见表 1。

表 1 成骨相关基因引物序列

Table 1 Primer sequences of correlative genes for osteogen

Genes	Primer sequences
ALP	F: 5' - AGCACTCCCACTTCATCTGGAA - 3' R: 5' - GAGACCCAATAGGTAGTCCACATTG - 3'
Col I	F: 5' - CGAAGACATCCACCAATCAC - 3' R: 5' - TGTGCGCAGACGAGAT - 3'
OCN	F: 5' - AGGGCAGCGAGGTAGTGA - 3' R: 5' - CCTGAAAGCCGATGTGGT - 3'
Runx 2	F: 5' - ACCCAGAAGGCACAGACAAGGA - 3' R: 5' - AGGAATGCGCCCTAAATCACT - 3'
GAPDH	F: 5' - CAACGGATTGCTCGTATTGG - 3' R: 5' - GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA - 3'

2.4.3 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测

蛋白提取 细胞与浸提液在 12 孔板中培养 7, 14 d 时, 用冰冷的 PBS 洗两次, 每孔加入 0.1% Triton X-100 液 100 μl , 转移至 EP 管中, 冰上裂解数分钟。用超声细胞破碎仪超声裂解。然后转移到冰冻离心机中, 13 000 rpm 离心 2 min, 将上清液分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存。

碱性磷酸酶 (ALP 测定) 将 200 μl 浓度 5 mmol/L 的对硝基苯酚 (p-Nitrophenol, BIO BASIC INC) 加入到 1.5 ml 的 EP 管中, 再将解冻的样品吸取 20 μl 加入, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min。再加入 0.5 ml 浓度 0.1 mol/L 的 NaOH 终止反应, 用酶标仪读取 410 nm 处的读数。

BCA 测定总蛋白 按照 BCA 试剂盒 (BCATM Protein Assay Kit, Thermo) 的说明, 吸取每一份待测液 25 μl 注入 96 孔板中, 加 200 μl 的 BCA 工作液到每一个孔中, 在摇床上摇晃 30 s 使液体充分的混匀, 再盖上孔板 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 30 min。结束后将孔板取出, 冷却至室温, 用酶标仪测量 562 nm 处的吸光度。

碱性磷酸酶 (ALP) 活性等于 ALP 测定的观测值与总蛋白测定的观测值之比。

2.4.4 Runx 2 和 OCN 的免疫细胞化学染色

细胞爬片 实验采用细胞爬片进行免疫细胞化学染

色。取 1 cm 直径圆形盖玻片高温高压灭菌后备用。将灭菌后的盖玻片放入 24 孔板板底, 以每孔 1 ml (5×10^3 个细胞) MG-63 细胞悬液接种于 24 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育过夜待其贴片, 记为第 0 天。换液分别加入 45S5 组、MNBG 组浸提液以及对照组 DMEM 培养基共培养, 此后隔 1 d 换各组培养液 1 次。于第 4 d 进行 Runx 2 和 OCN 的免疫细胞化学染色。

检测 吸净待测孔培养基, PBS 清洗后加 4% 中性多聚甲醛固定, 室温 20 ~ 30 min, PBS 清洗; 将盖玻片取出, 0.1% Triton X-100 室温孵育 10 min 进行细胞打孔, PBS 清洗; 3% H_2O_2 去离子水室温孵育 10 min, 去除内源性过氧化物酶, PBS 清洗; 滴加 5% 封闭用羊血清, 室温孵育 20 min 进行抗原封闭; 沿玻片边缘吸干封闭液, 滴加 Runx 2/OCN 一抗工作液 (用 PBS 以 1:300 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜后, PBS 清洗; 滴加 PV-9003/PV-9000 二步法免疫组化检测试剂盒中的试剂 1, 室温孵育 30 min, PBS 清洗; 滴加 PV-9003/PV-9000 二步法免疫组化检测试剂盒中的试剂 2, 室温孵育 30 min, PBS 清洗; 滴加 DAB 工作液 (50 μl 浓缩 DAB 液 + 950 μl DAB 底物液), 显色 1 min, 显微镜下观察, 自来水中轻柔漂洗终止显色反应; 苏木精复染, 镜下观察 15 s; 1% 盐酸酒精分化, 自来水冲洗返蓝 5 min; 梯度酒精, 二甲苯 I, 二甲苯 II 各 5 min 脱水; 中性树胶封片, 静下观察。

2.5 数据统计分析

采用 SPSS18.0 对实验结果进行统计分析, 其中组间比较采用 One-Way ANOVA 法分析, 方差齐时采用 S-N-K 法分析统计显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 微纳米生物活性玻璃球形颗粒形成机制

图 1 为溶胶-凝胶技术结合有机模板 PEG 制备得到的球形生物玻璃的扫描电镜照片, 研究发现: PEG 制备得到直径为 5 μm 左右的规则微米球, 球体表面具有明显的微纳米裂纹 (图 1a, b)。球形生物玻璃形成机制可以用模板分子的自组装机制来解释^[7]。在溶胶-凝胶工艺过程中, 采用柠檬酸 CA 作为酸催化剂和溶胶稳定剂, PEG 为模板剂制备球形生物玻璃。首先, 生物玻璃的前驱体 TEOS/TEP/CN 等在柠檬酸溶液催化下水解形成透明的稳定溶胶, 在此溶胶中, CA 分子通过其分子结构中的羟基-羧基容易发生的氢键相互作用吸附到生物活性玻璃溶胶颗粒表面。另外一个过程就是模板分子的自组装过程, PEG 分子在磁力搅拌下的乙醇-水溶液中自组装成球形的形态结构, 并且逐渐长大成为一定大

小的球体。最后,当将模板剂的溶液缓慢加入到生物活性玻璃溶胶中的时候,模板剂分子在酸性溶液中,以分散剂的作用形式吸附到生物活性玻璃溶胶颗粒的表面,最后通过热处理,CA 和模板剂分子被去除,即形成球形的生物活性玻璃。

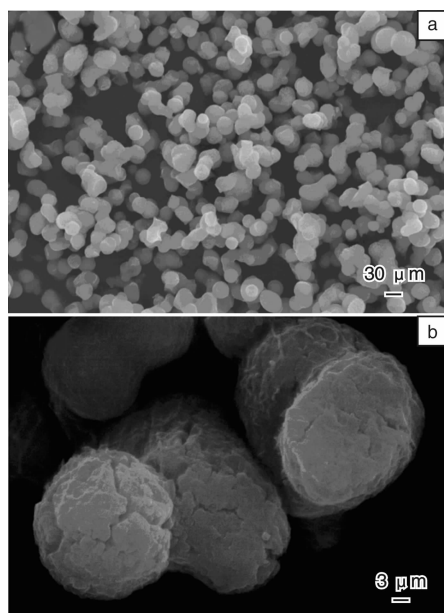


图 1 生物活性玻璃微球的 SEM 照片

Fig. 1 SEM micrographs of bioactive glasses microsphere

3.2 生物玻璃浸提液的离子释放情况

将 MNBG 和 45S5 以 1 mg/ml 的浓度在 DMEM 细胞培养液中浸提 24 h,用 ICP 检测其中 Si, Ca, P 离子的浓度,见表 2,结果表明:其中 Si, Ca 离子浓度明显升高,而 P 离子浓度明显降低;其中 MNBG 浸提液中的 Si, Ca 离子浓度最高,明显高于 45S5 浸提液,而 P 离子浓度最低。

表 2 生物玻璃浸提液的离子释放情况

Table 2 Ion release of bioactive glass extract

Samples	Si/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Ca/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	P/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
Blank control (DMEM)	0.57	75.33	29.18
MNBG extract	71	154.5	1.72
45S5 extract	44.23	88.88	13.34

3.3 MNBG 浸提液对 MG-63 细胞增殖的作用

图 2 为用 MTT 法检查 MG-63 细胞在对照组、45S5 组、MNBG 组的增殖情况。从图 2 中可见,各组细胞增殖状况良好,OD 值均呈升高趋势,MNBG 组和 45S5 组中细胞 OD 值与对照组相比无明显下降。第 3, 5 d 时生物玻璃组 OD 值显著高于对照组($P < 0.05$)。MNBG 组和 45S5 组在各时间点 OD 值均无统计学差异($P > 0.05$)。

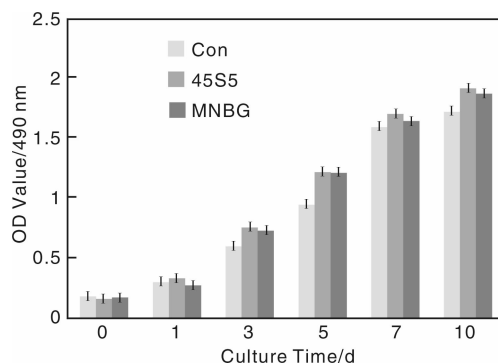


图 2 生物玻璃浸提液对 MG-63 细胞增殖的作用

Fig. 2 Proliferation of MG-63 cultured with bioactive glass extract

3.4 基因水平考察 MNBG 浸提液对 MG-63 细胞分化的作用

选取细胞分化早期标志物碱性磷酸酶 (ALP)、成骨关键转录因子 Runx 2、成骨分化晚期及矿化早期标志物骨钙素 (OCN) 和细胞外主要的胶原成分 I 型胶原 (COL I) 作为目的基因^[12-14]。实验通过 qRT-PCR 的方法,测定这些成骨相关基因的表达,通过持家基因 GAPDH 对相关基因进行均一化。

图 3 是将 MG-63 细胞在不同组浸提液中培养 2, 4, 7 d 后 ALP、Col I、Runx 2 和 OCN 基因的表达情况。从图 3 中可见,MNBG 浸提液组在各个时间点都表现出了对成骨分化相关基因的上调作用,并且相比于对照组,能够将 Runx 2 和 OCN 的基因表达提前。45S5 浸提液组也表现出一定的基因激活特性,但均低于 MNBG 浸提液组。

ALP 基因表达第 2 d 和第 4 d 在 MNBG 组和 45S5 组均显著高于对照组($P < 0.05$),其中第 4 d MNBG 组显著高于 45S5 组($P < 0.05$),在第 7 d 各组间无显著差异;MNBG 组第 4 d 和第 7 d 的 Col I mRNA 水平相对对照组,基因表达显著上调($P < 0.01$),并显著高于 45S5 组($P < 0.05$);第 2, 4, 7 d, MNBG 组 Runx 2 的表达同样显著高于对照组($P < 0.01$),并显著高于 45S5 组($P < 0.05$);OCN 在第 4 d 和第 7 d, MNBG 组基因表达显著高于对照组($P < 0.05$),并显著高于 45S5 组($P < 0.05$)。

3.5 蛋白水平考察 MNBG 浸提液对 MG-63 细胞分化的作用

在观察到成骨分化相关基因的激活后,下游相应的蛋白产物的产生通过 ALP 活性、Runx 2 和 OCN 的免疫细胞化学进行了观察,对基因激活进行了蛋白水平的验证。

3.5.1 碱性磷酸酶 (ALP) 活性

碱性磷酸酶 (ALP) 在成骨诱导初期由成骨细胞分泌,是骨前体细胞成骨分化的标志之一,常用碱性磷酸

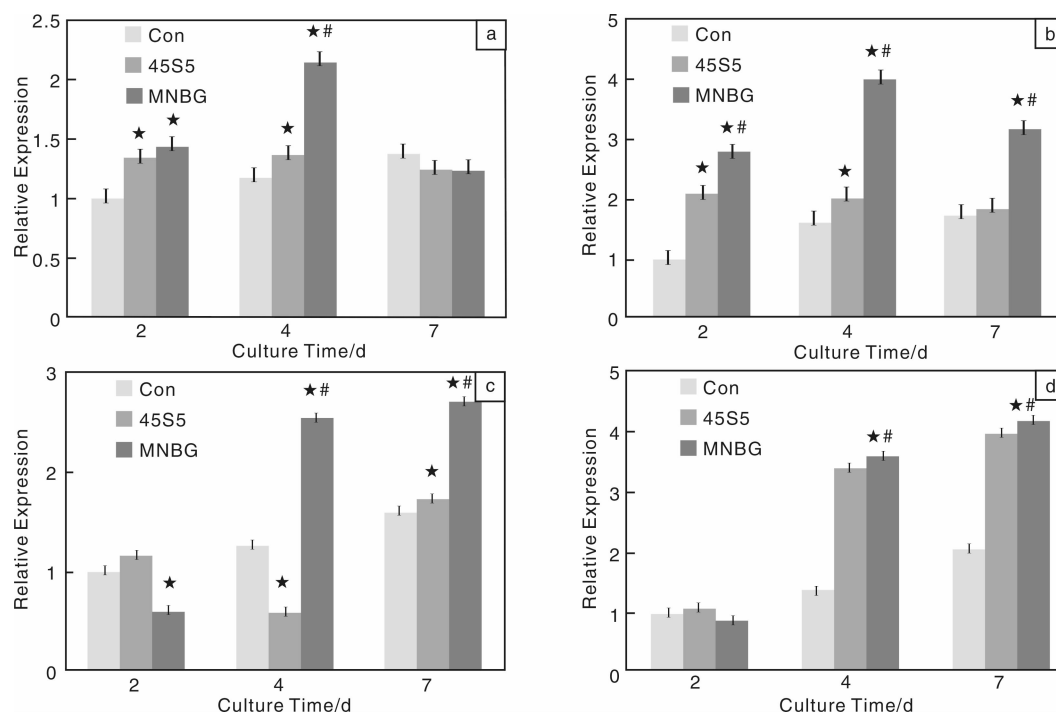


图 3 成骨相关基因的表达: (a)ALP, (b)Runx 2, (c)Col- I, (d)OCN

Fig. 3 Gene expression levels of osteogenic markers: (a)ALP, (b)Runx 2, (c)Col- I, and (d) OCN

酶活性来定量表达细胞成骨分化的水平^[15]。提取生物玻璃浸提液培养了 7, 14 d 的 MG63 细胞蛋白进行 ALP 活性检测, 如图 4。结果显示, 第 7 d MNBG 组和 45S5 组的碱性磷酸酶活性均明显高于对照组 ($p < 0.05$), 两种生物玻璃组间无统计学差异; 第 14 d 时, MNBG 和 45S5 组碱性磷酸酶水平仍保持在较高水平, 对照组碱性磷酸酶活性开始升高, 各组间无统计学差异。

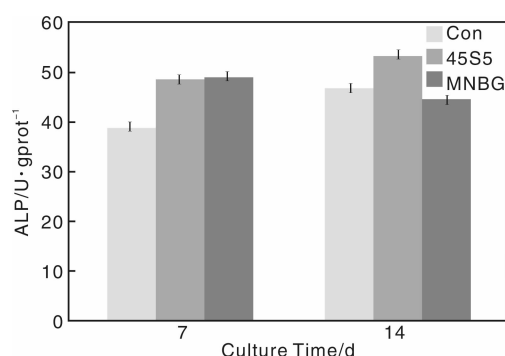


图 4 碱性磷酸酶 (ALP) 活性表达

Fig. 4 Expression levels of alkaline phosphatase (ALP) activity

3.5.2 Runx 2 和 OCN 蛋白的表达

免疫细胞化学法是利用抗原与抗体特异性结合的原理, 通过化学反应使标记抗体的显色剂 (荧光素、酶、金属离子、同位素) 显色来确定细胞内抗原的成分 (主要是多肽和蛋白质), 对其进行定位、定性及定量的研究^[16]。

分组培养 4 d 后, 免疫细胞化学染色如图 5 所示, 第 4 d 时, 对照组的 Runx 2 和 OCN 染色为阴性, 而 45S5 组和 MNBG 组细胞的细胞质内已经可以见到阳性染色的棕黄色颗粒, 且 MNBG 组与 45S5 组相比呈现强阳性染色。

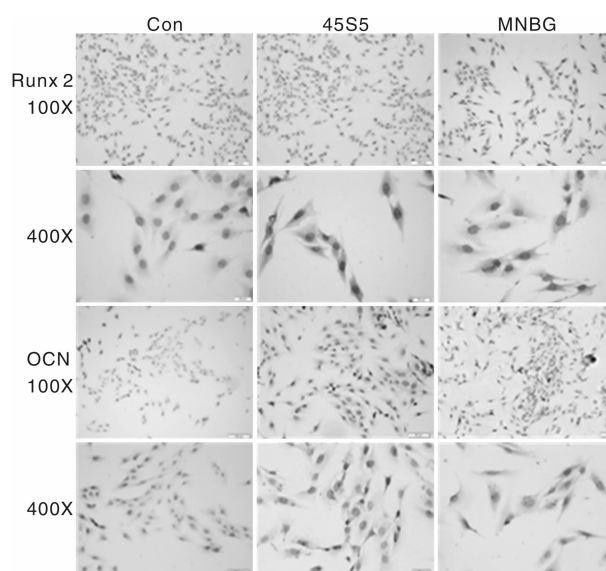


图 5 Runx 2 和 OCN 的免疫细胞化学染色 (第 4 d)

Fig. 5 Immunocytochemical staining of Runx2 and OCN at day 4

蛋白水平考查可见, 微纳米生物玻璃激活了成骨相关基因的表达, 并且可以观察到相应的蛋白产物的增

加,反映了细胞分化的提前和增加,证明了微纳米生物玻璃促进 MG63 细胞成骨分化的生物活性。

本研究通过细胞增殖、成骨相关基因以及下游相应蛋白水平的检测,证明微纳米生物玻璃 MNBG 浸提液(主要含有水化后的 Si, Ca 等离子)能够促进 MG-63 细胞增殖,激活 MG-63 细胞成骨相关基因,上调 ALP, OCN 等分化矿化相关蛋白和成骨相关转录因子 Runx 2 的表达。浸提液中的相关离子与细胞膜上的相关受体作用后,刺激信号传递进入细胞质,诱导生成 Runx 2 等成骨相关基因的表达和相关蛋白,同时 Runx 2 转录因子产物的表达升高也能够促进 ALP 和 OCN 的表达,而这些蛋白和因子表达的升高也证明了 MNBG 新型生物活性玻璃具有诱导 MG-63 细胞成骨分化的能力。

4 结 论

通过溶胶-凝胶技术结合有机模板聚乙二醇可制得具有球形形貌、颗粒尺寸比较均匀且有良好均匀度的微纳米生物活性玻璃,该材料能够促进 MG-63 细胞增殖,激活 MG-63 细胞成骨相关基因,上调 ALP, OCN 等分化矿化相关蛋白和成骨相关转录因子 Runx 2 的表达。这些表达的升高证明材料具有诱导 MG-63 细胞成骨分化的能力。此研究为进一步设计和制备具有基因介导作用的新型生物活性玻璃骨修复材料提供了理论依据。

参考文献 References

- [1] Hench L, Pantano Jr C, Buscemi P, *et al.* Analysis of Bioglass Fixation of Hip Prostheses[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1977, 11 (2): 267-282.
- [2] Hench L L. The Story of Bioglass[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2006, 17 (11): 967-978.
- [3] Hench L, Wilson J. Bioactive Glasses: Present and Future[J]. *Bioceramics*, 1998, 11: 31-36.
- [4] Hench L L. Bioceramics: from Concept to Clinic[J]. *J Am Ceram Soc*, 1991, 74 (7): 1 487-1 510.
- [5] Hench L L. Genetic Design of Bioactive Glass[J]. *Journal of the European Ceramic Society*, 2009, 29 (7): 1 257-1 265.
- [6] Bo L. Fabrication, Structure and Biological Properties of Organic Acid-Derived Sol-Gel Bioactive Glasses[J]. *Biomed Mater*, 2010, 5 (5): 054 103.
- [7] Lei B, Chen X, Han X, *et al.* Unique Physical-Chemical, Apatite-Forming Properties and Human Marrow Mesenchymal Stem Cells (HMSCs) Response of Sol-Gel Bioactive Glass Microspheres[J]. *J Mater Chem*, 2011, 21 (34): 12 725-12 734.
- [8] Lei B, Chen X, Han X, *et al.* Versatile Fabrication of Nanoscale Sol-Gel Bioactive Glass Particles for Efficient Bone Tissue Regeneration[J]. *J Mater Chem*, 2012, 22 (33): 16 906-16 913.
- [9] Clover J, Gowen M. Are MG-63 and HOS TE85 Human Osteosarcoma Cell Lines Representative Models of the Osteoblastic Phenotype[J]. *Bone*, 1994, 15 (6): 585-591.
- [10] Billiau A, Edy V, Heremans H, *et al.* Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1977, 12 (1): 11-15.
- [11] Fleury C, Petit A, Mwale F, *et al.* Effect of Cobalt and Chromium ions on Human MG-63 Osteoblasts in Vitro: Morphology, Cytotoxicity, and Oxidative Stress[J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (18): 3 351-3 360.
- [12] Stephansson S N, Byers B A, García A J. Enhanced Expression of the Osteoblastic Phenotype on Substrates that Modulate Fibronectin Conformation and Integrin Receptor Binding[J]. *Biomaterials*, 2002, 23 (12): 2 527-2 534.
- [13] Tsai S W, Hsu F Y, Chen P L. Beads of Collagen-Nanohydroxyapatite Composites Prepared by a Biomimetic Process and the Effects of their Surface Texture on Cellular Behavior in MG63 Osteoblast-Like Cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4 (5): 1 332-1 341.
- [14] Sun J, Li J, Liu X, *et al.* Proliferation and Gene Expression of Osteoblasts Cultured in DMEM Containing the Ionic Products of Dicalcium Silicate Coating[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2009, 63 (9): 650-657.
- [15] Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, *et al.* The Control of Human Mesenchymal Cell Differentiation Using Nanoscale Symmetry and Disorder[J]. *Nature Materials*, 2009, 6 (12): 997-1 003.
- [16] Pautke C, Schieker M, Tischer T, *et al.* Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts[J]. *Anticancer Research*, 2004, 24 (6): 3 743-3 748.