

特约专栏

珍珠层，一种具有潜力的天然骨修复材料

黄千里，刘渊声，冯庆玲

(清华大学材料学院 先进材料教育部重点实验室，北京 100084)

摘要：由于骨质疏松、骨折、骨肿瘤等原因导致的骨缺损困扰着世界上成千上万的人。近年来，关于骨缺损修复材料的研究已得到了国内外科研工作者的广泛关注。珍珠层是组成许多软体动物贝壳的结构单元之一。与骨组织类似，珍珠层也是一种由无机相矿物与有机基质组成的复合材料。虽然珍珠层与骨组织具有非同源性，但是，其部分的形成机理可能具有类似性。介绍了近年来国内外关于珍珠层研究的大量体外与体内试验，试验结果表明了珍珠层具有良好的生物相容性与成骨特性，有可能成为一种具有潜力的天然骨修复材料。珍珠层的成骨特性很有可能来源于其有机基质中的未知信号因子。同时也指出了珍珠层用作天然骨修复材料在今后研究中的机遇与挑战。

关键词：珍珠层；成骨特性；骨缺损；骨修复材料

中图分类号：R318.08 **文献标识码：**A **文章编号：**1674-3962(2013)10-0591-08

Nacre, a Potential Natural Biomaterial for Bone Regeneration

HUANG Qianli, LIU Yuansheng, FENG Qingling

(Key Laboratory of Advanced Materials of Ministry of Education of China, School of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

Abstract: Bone loss due to osteoporosis, bone fracture, bone tumor and trauma affects hundreds of millions of people all over the world. Materials for the purpose of repairing bone defects have received extensive attention from many researchers at home and abroad in recent years. Nacre, which forms the inner layer of many mollusk shells, is also a composite of inorganic minerals and organic matrix similar to the structure of bone. Although nacre and bone are not homologous, parts of the complex machinery that directs their formation might be. Plenty of evidences of experiments about nacre both in vivo and in vitro in recent years are reviewed in this paper. The results present that nacre with its biocompatibility and osteogenic property might be a potential natural biomaterial for bone regeneration. The osteogenic property of nacre might probably be profited from some unknown signaling molecules within the organic matrix of nacre. Future perspectives and challenges for nacre to be applied as a natural biomaterial for bone regeneration are also proposed finally.

Key words: nacre; osteogenic property; bone loss; bone regeneration biomaterial

1 前言

脊椎动物的骨组织是一种由无机相与有机物质共同组成的天然复合材料。其中无机相为羟基磷灰石，约占骨组织质量的65%；主要的有机物质为I型胶原^[1]。由于骨质疏松、骨折、骨肿瘤等原因导致的骨缺损困扰着

世界上成千上万的人。

近年来，关于骨缺损修复材料的研究已得到了国内外科研工作者的广泛关注。目前，骨移植材料主要分为两大类，天然骨移植材料与合成骨移植材料。主要的天然骨移植材料包括自体骨，同种异体骨以及异种骨。目前，这两类材料已广泛应用于骨移植领域。天然材料具有良好的生物相容性，并且往往具有骨传导性与骨诱导性，是理想的骨移植材料。然而，自体骨由于材料来源有限以及二次手术等问题，使其在临床上的广泛应用受到了限制。异体骨和异种骨则具有免疫排斥反应和疾病传播等问题，同样受到了限制^[2-3]。合成骨移植材料，

收稿日期：2013-06-12

基金项目：国家自然科学基金(51072090)

第一作者：黄千里，男，1990年生，博士研究生

通信作者：冯庆玲，女，1950年生，教授，博士生导师

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2013.10.03

如钛合金^[4-5]、骨修复陶瓷^[6-7]，等，虽然来源广泛，但是在生物相容性、骨诱导性等方面的效果不够理想^[3]。

珍珠层是组成许多软体动物贝壳的结构单元之一。与骨组织类似，珍珠层是一种由无机相矿物与有机基质组成的复合材料。其中，无机相为文石晶体结构的碳酸钙，含量约为珍珠层质量的 95%。有机基质由多种大分子构成，如 Lustrin A、N16 族与 Perlulin，含量约为珍珠层质量的 0.1% ~ 5%^[8-10]。虽然珍珠层与骨组织具有非同源性，但是其部分的形成机理可能具有类似性^[11]。

珍珠层来源广泛，其有机基质中存在着能够促进细胞成骨分化的信号因子，这些信号因子能够激活细胞碱性磷酸酶(ALP)活性，促进细胞成骨分化过程中某些特异性蛋白与基因的表达，诱导细胞体外矿化等。因而珍珠层在体内环境中表现出良好的生物相容性及成骨特

性，有望作为一种能够应用于骨整形外科领域的天然骨修复材料。

2 珍珠层的体外实验

早在 1992 年，Lopez 等人便推测珍珠层的成骨作用可能与其有机基质中的某些信号分子有关^[12]。随后，国内外科研工作者们针对珍珠层的成骨特性，开展了大量广泛而深入的研究。其中大量体外实验结果表明，珍珠层中的有机基质具有促进细胞成骨分化的作用，能够激活细胞 ALP 活性，促进某些成骨特异性蛋白以及基因的表达，诱导成骨细胞的体外矿化等。在促进细胞成骨分化的同时，珍珠层中的有机基质还能够抑制破骨细胞的破骨作用(表 1)。这些实验结果表明，珍珠层有机基质中可能存在多种能够发挥不同功能的信号因子，具有生长因子的作用。

表 1 珍珠层的体外实验
Table 1 In vitro experiments on nacre

Cell type	Performance form	Key Results	Reference
Human osteoblasts	Nacre	Induced different types of mineralization	[12]
MRC-5 fibroblasts	WSM	Increased ALP activity	[13]
Bone marrow cells of rats	WSM	Increased ALP activity	[14]
MC3T3-E1 cells	WSM	Induced mineralization	[15]
MCR-5 fibroblasts	SE ₁ -SE ₄ of WSM	SE ₁ increased ALP activity SE ₄ decreased ALP activity	[16]
MC3T3-E1 cells	ESM <8000	Induced mineralization Increased the expression of Runx2, OPN Accelerated the expression of collagen I	[17]
MC3T3-E1 cells	Pinctada fucata mantle gene 3 protein(PFMG3)	Increased ALP activity and cell viability Increased the expression of OCN, OPN Induced mineralization	[18]
MC3T3-E1 cells	Pinctada fucata mantle gene 5 protein(PFMG5)	Decreased ALP activity Decreased the expression of OCN, OPN, Runx2 and BMP-2	[19]
Pre-steoblasts from mice	WSM	Increased ALP activity Increased the expression of Runx2, Fra-1 Induced mineralization	[20]
Osteoclasts of mice	Nacre	Suppressed osteoclast function	[21]
Osteoclasts of mice	WSM	Suppressed osteoclast function Inhibited osteoclast maturation	[20]

Note: WSM represents for water-soluble organic substrate from nacreous layer

2.1 激活细胞 ALP 活性

碱性磷酸酶(ALP)是一种用于成骨细胞活性表征的常用生化指标，它与磷酸根离子的释放有关，碱性磷酸酶的活性直接影响骨矿物的形成^[22]。大量体外实验结果证明，珍珠层有机基质中的信号因子能够有效激活细胞的 ALP 活性。

珍珠层水溶性有机基质(WSM)能够显著增加成骨

细胞前体细胞的 ALP 蛋白表达量(图 1)，却不影响其 ALP 信使 RNA 的含量，这表明 WSM 在成骨细胞分化过程中对于 ALP 活性的激活主要是作用于细胞转录后的水平^[20]。同时，WSM 还能够激活 MRC-5 成纤维细胞、骨髓基质细胞、软体动物细胞的 ALP 活性^[13-14, 23]。

为了更精确的识别珍珠层有机基质中的有效信号分子，Mouries 等人将 WSM 按分子量分成四段，命名为

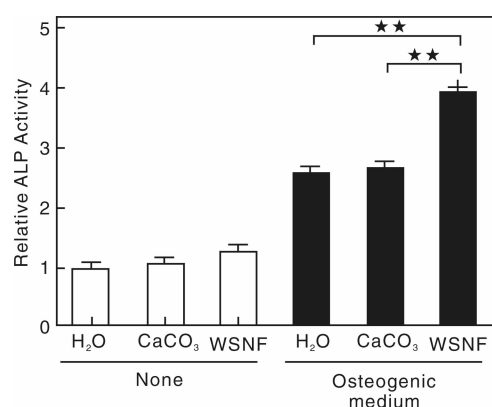


图 1 细胞分别在成骨培养基及普通培养基中培养的 ALP 活性 (其中 WSNF 表示水可溶珍珠层因子)^[20]

Fig. 1 Cells cultured in osteogenic or normal medium were assayed for ALP activity. WSNF represents for water-soluble nacreous factors^[20]

SE₁-SE₄, 分子量分别为 115 ~ 150, 80, 65, 35 ~ 45 KDa。实验结果表明, 相对分子量较小的 SE4 量段能够明显激活 MCR5 细胞的 ALP 活性, 而相对分子量较大的 SE1 量段则表现出对 ALP 活性的抑制作用^[16]。实验结果表明, 珍珠层有机基质中的信号因子可能存在于分子量较小的分子中。

有人研究了珍珠层有机基质中的不同蛋白质对于细胞 ALP 活性的作用, 实验结果表明珍珠层中的异种蛋白质对于细胞 ALP 活性表达的作用不同。Wang 等人报道了合浦珠母贝外套膜组织基因 3 蛋白 (PFMG3 蛋白) 对于成骨细胞 ALP 活性表达具有激活作用^[18], 而合浦珠母贝外套膜组织基因 5 蛋白 (PFMG5 蛋白) 却表现出对成骨细胞 ALP 活性的抑制作用^[19]。这表明珍珠层中

的蛋白质具有不同的功能, 某些蛋白质在矿化过程中具有促进作用, 而另一些蛋白质具有抑制矿物形成的功能。

2.2 促进成骨特异性蛋白及基因表达

间充质干细胞在成骨分化过程中会表达一系列特异性的蛋白与基因, 这些蛋白与基因表达的变化情况可以作为衡量细胞分化的指标(图 2)。珍珠层有机基质中的信号因子能够促进细胞某些成骨特异性蛋白及基因的表达, 表明珍珠层有机基质中的信号因子能够诱导细胞的成骨分化, 具有潜在的骨诱导性。

Kim 等人报道了 WSM 能够促进成骨细胞前驱体中 Runx2 与 Fra-1 的基因表达, 但是对 BMP-2、骨粘连蛋白、骨钙蛋白基因表达影响不大^[20]。Runx2(也称为 Cbfa1)是成骨细胞系的初始分化标志, 控制其他成骨细胞特异性基因的表达, 在参与成骨细胞分化过程的多个信号中处于核心地位^[24-25]。Wang 等人报道了合浦珠母贝外套膜组织基因 3 蛋白能够促进骨桥蛋白与骨钙蛋白的基因表达^[18]。骨桥蛋白是骨组织中的一种主要非胶原蛋白, 在细胞与细胞外基质相互作用中起着重要的作用^[26]。骨钙蛋白也是骨组织中一种主要的非胶原蛋白, 与羟基磷灰石有着紧密的联系^[27]。Rousseau 等人报道了关于珍珠层低分子量分子的重要研究, 他们通过透析的方法从 WSM 中提取了分子量小于 8 000 Da 的醇可溶蛋白 (ESM), ESM < 8 000 具有增强成骨细胞 Runx2、骨桥蛋白基因表达, 以及加快 I 型胶原基因表达的功能^[17]。

以上实验结果表明, 珍珠层有机基质中的确含有能够促进细胞成骨分化的信号因子, 并且这些信号因子有可能存在于分子量小于 8 000 Da 的分子中。同时有研究

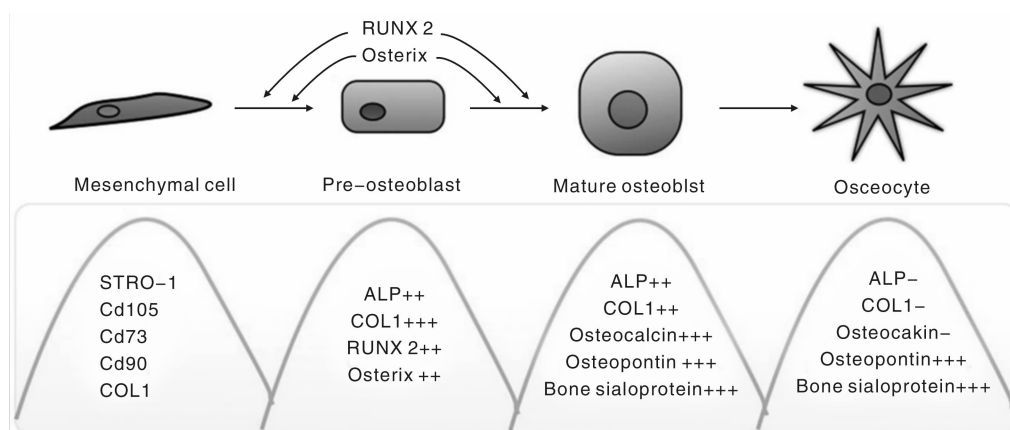


图 2 间充质干细胞分化为成骨细胞、骨细胞过程中间充质干细胞、前成骨细胞、成骨细胞、骨细胞的分化指标^[28]

Fig. 2 Differentiation markers for MSCs, pre-osteoblasts, osteoblasts, and osteocytes during MSC differentiation to osteoblasts and osteocytes^[28]

表明,小分子(分子量小于 1 000)是 WSM 的主要组成部分,约占初始 WSM 提取物总质量的 80%,而处于 1 000~8 000 Da 之间的分子量段仅占 4% 左右^[29]。因此,珍珠层有机基质中的信号因子很可能存在于分子量小于 1 000 Da 的分子中。分子量小于 1 000 Da 的小分子可以通过扩散穿过细胞膜而进入细胞^[30]。这些小分子信号因子能够快速进入细胞发挥作用,并且避免机体的免疫排斥反应。

2.3 诱导细胞体外矿化及生物活性

珍珠层有机基质中的信号因子能够诱导成骨细胞的体外矿化。Silve 等人开展了一项研究,将珍珠层与骨组织置于人体成骨细胞上培养,发现珍珠层与骨组织共同存在时,能够诱导不同类型的矿物生成^[12]。Kim 与 Rousseau 分别报道了 WSM 促进小鼠成骨细胞体外矿化的作用^[15, 20]。Rousseau 与 Wang 则分别报道了分子量小于 8000 Da 的醇可溶基质与合浦珠母贝外套膜组织基因 3 蛋白对 MC3T3-E1 成骨细胞的体外矿化均具有促进作用(图 3)^[17-18]。

珍珠层表面能够在模拟体液(SBF)及磷酸盐缓冲溶液(PBS)中通过溶解-生核-沉淀析出而转变为羟基磷灰石(图 4)^[31-32]。其中,SBF 是一种有效的预测

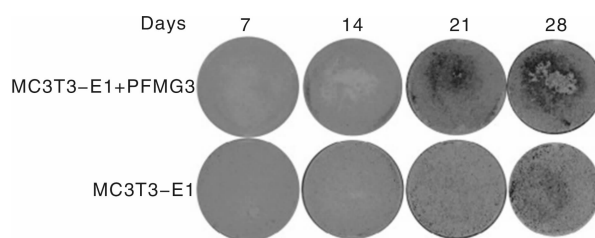


图 3 合浦珠母贝上囊皮组织基因 3 蛋白对于 MC3T3-E1 细胞体外矿化的作用。其中,体外矿化通过茜素红染色检测^[18]

Fig. 3 Effect of PFMG3 on MC3T3-E1 cell in vitro mineralization. The in vitro mineralization was detected by Alizarin Red staining^[18]

植入材料在体内环境的生物活性的方法^[33]。这项体外实验结果可以预测珍珠层植入宿主体内后,表面是否可转变为羟基磷灰石。羟基磷灰石具有骨传导性,并且具有促进细胞在其表面贴附与生长的作用^[34]。其中,骨传导性是指材料能够支持骨组织在其表面的生长,或者支持骨组织长入其孔隙或管道结构中^[35]。珍珠层在生理环境中表面转变为羟基磷灰石,能够增强珍珠层表面的骨传导性,珍珠层有希望作为一种兼具骨传导性与骨诱导性的天然材料用于骨替代与骨再生领域。

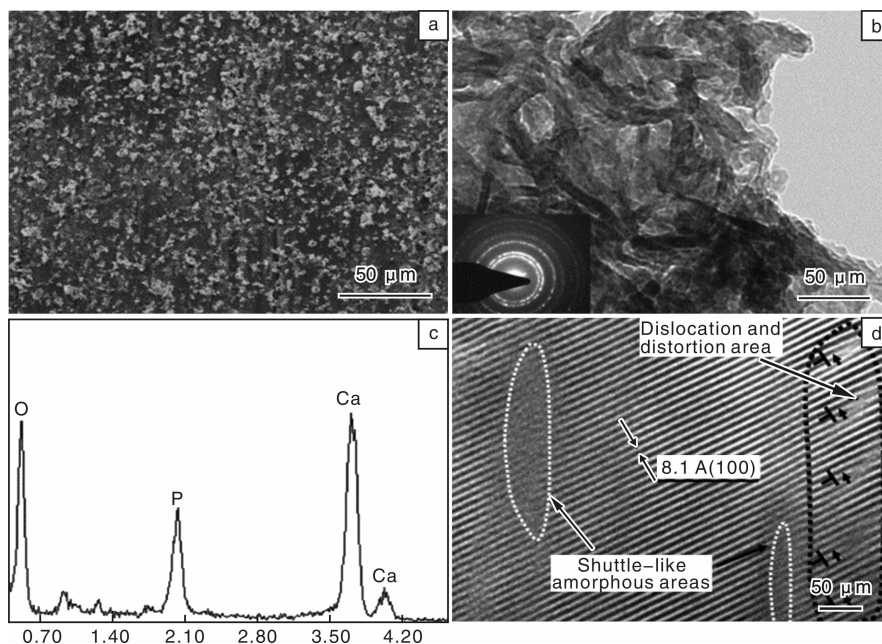


图 4 (a) 珍珠片浸于 SBF 一周后表面颗粒沉积的 SEM 形貌; (b) 沉积颗粒微观结构的 TEM 照片, 插图为相关选区电子衍射照片, 证明了沉积颗粒为 HA 晶体; (c) 沉积颗粒的 EDS 分析表明 HA 晶体中钙元素过量; (d) HA 颗粒晶格照片表明 HA 非完全结晶, 晶格中含有许多位错(箭头)与梭形无定形区(白色阴影线)^[31]

Fig. 4 (a) SEM morphology of the particles deposited on the surface of pearl plate after SBF soaking for a week. (b) TEM micrograph showing the microstructure of the deposited particles, inset of (b) is the corresponding SADP revealing the deposited particles are HA crystals. (c) EDS analysis of the deposited particles indicating calcium surplus in HA crystals. (d) Lattice image of the HA particle showing incomplete crystallization of HA with so many dislocations (arrowheads) and shuttle-like amorphous areas (white dashed areas)^[31]

2.4 抑制破骨细胞作用

珍珠层有机基质中存在多种信号因子，不仅能够促进细胞的成骨分化，同时还能够抑制破骨细胞的作用。破骨细胞的作用是参与骨重建，骨重建即一个位置上旧骨组织被新骨组织替代的过程^[36]。骨组织的无机相能够被破骨细胞存在处的酸性环境溶解，而有机基质则被破骨细胞分泌的基质金属蛋白酶和组织蛋白酶 K, B, L 所降解。Duplat 等人报道了 WSM 能够抑制组织蛋白酶 K 的活性，并且分子量在 500 ~ 1 000 Da 范围内的小分子对组织蛋白酶 K 活性的抑制作用明显^[37-38]，表明珍珠层有机基质中对于组织蛋白酶 K 起抑制作用的信号因子可能存在于分子量为 500 ~ 1 000 Da 的分子中。Duplat 等人将破骨细胞培养于珍珠层表面，发现破骨细胞对于珍珠层的重吸收效率低于其破骨效率，并且珍珠层能够抑制破骨细胞的迁移^[21]，这可能也与珍珠层有机基质中的小分子信号因子有关。Kim 则进一步证实了 WSM 能够通过扰乱肌动蛋白环来抑制破骨细胞对于骨组织的重吸收作用^[21]。

3 关于珍珠层的体内实验

珍珠层的体外实验结果证实了 Lopez 推测的正确性，其有机基质中确实存在着诱导细胞成骨分化的信号因子。同时，国内外科研工作者们关于珍珠层的生物相容性与成骨特性开展了大量的体内实验。其中，生物相容性是指材料植入宿主体内后，机体对于植入物发生的反应^[39]。研究成果表明珍珠层具有良好的生物相容性、成骨特性与骨整合作用，并且珍珠层还有可能具有潜在的软骨诱导性(表 2)。

Altan 等人将珍珠层粉末与自体血液的混合物填入八名女性患者的上颌骨缺损部位，术后 6 个月的活检结果显示珍珠层已牢固地与新生的骨组织结合，并且整个过程中均未发现炎症反应^[40]。珍珠层也可用于脊柱治疗，有报道将珍珠层粉与自体血液的混合物通过关节固定术植入兔的腰椎，也有报道将珍珠层粉与自体血液的混合物通过皮下注射至羊的脊柱(图 5)，实验结果均证实了珍珠层能够促进新生骨组织生成^[41-42]。实验结

表 2 关于珍珠层的动物实验

Table 2 In vivo experiments on nacre

Animal model	Method	Key Results	Reference
Human	Injected to contact with the alveolar bone	No evidence of inflammation reaction Stimulated osteogenesis	[40]
Sheep	Implanted in the cancellous bone in the epiphysis of the femur	No inflammation Stimulated osteogenesis Osserintegration	[43]
Rabbit	Arthrodesis of the transverse processes	No inflammation Induced of spinal fusion	[42]
Sheep	Injected percutaneously into the vertebrae of sheep	No evidence of inflammation reaction Stimulated of bone-forming cells Resulted in new bone formation	[41]
Sheep	Implanted into sheep femurs	Limited biodegradability	[45]
Human	Taken orally	Increased bone mineral density to some extent	[53]
Rat	Taken orally	Anti-osteoporosis	[20]
Sheep	Implanted in sheep trochlea	Stimulated of osteochondral repair	[46]

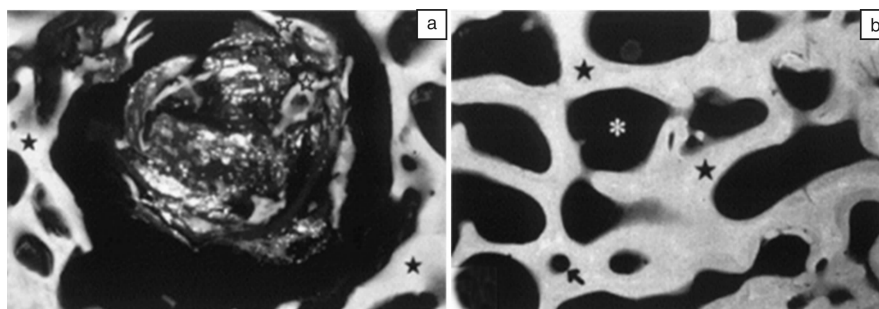


图 5 (a) 腔内新生成板层骨(☆)与珍珠层的接触 X 射线显微照片，骨小梁(★)(放大倍数 ×25)；(b) 腔空间周围结合良好的骨小梁(★)的接触 X 射线显微照片，骨重建(BMU)现象(→)(×放大倍数 25)^[41]

Fig. 5 (a) contact microradiograph showing newly formed lamellar bone (☆) and nacre inside the cavity. Trabecular bone (★) (Magnification × 25). (b) contact microradiograph showing well-anastomosed trabeculae (★) adjacent to the cavity spaces, bone remodeling (BMU) is also present (→) (Magnification × 25)^[41]

果证实了珍珠层良好的生物相容性与成骨特性。

珍珠层还具有良好的骨整合作用。骨整合是指植入物与其周围新生骨组织的直接结合,而不会引起骨组织与植入物界面的纤维组织生成^[35]。Atlan 等人研究了珍珠层与骨组织之间的界面,珍珠层块体被植入羊股骨骨端的松质骨处长达九个月,实验结果显示珍珠层周围有新的骨组织生成,而没有纤维组织的干预,珍珠层与新生成骨组织之间形成了牢固的结合^[43]。这种结合直接证明了珍珠层的骨整合作用。Kim 等人推测珍珠层与骨组织之间的界面主要受到珍珠层内有机基质的影响^[44]。珍珠层块体在生理环境中表现出非常缓慢的降解速率^[45],块体的珍珠层有可能用作长期的骨替代植入物。

关于珍珠层的软骨诱导性,Rousseau 等人近期报道了一项研究成果,他们将珍珠层块体植入羊膝关节的滑车处,术后六个月,珍珠层块体表面覆盖有新生成的软骨组织,该项研究表明珍珠层可能具有潜在的软骨诱导作用^[46]。但目前珍珠层对于软骨生成的激活机制尚不明确。

除了成骨特性,珍珠层还具有其他生物学作用,如,活化成纤维细胞的功能^[47-49],减少脂肪含量等^[50-52]。关于珍珠层的其他生物学作用,本篇综述不作重点介绍。

4 结 语

迄今为止,关于珍珠层的研究成果证实了珍珠层中的确存在类似生长因子的信号因子存在,这类信号因子可能存在于分子量小于 1 000 Da 的分子中,并且可能为多肽类物质。这类小分子能够通过扩散作用穿过细胞膜进入细胞,快速发生作用,促进细胞的成骨分化,同时避免机体的免疫排斥反应。这类小分子有望作为一种具有潜力的多肽类药物用于骨科疾病的治疗。

需要指出的是,珍珠层有机基质中分子量小于 1 000 Da 的分子超过一百种^[29],其分离与识别具有很大的难度,尚有大量工作亟待完成。同时,珍珠层中信号因子与细胞作用的相关信号通路仍不清楚,需要开展更多关于珍珠层中信号因子与细胞、机体相互作用的研究。这些研究也将为软体动物与脊椎动物这两类物种的相关研究提供依据。

通过组织工程策略,将珍珠层或提取的有机基质引入三维多孔支架中,可以制备出具有良好成骨特性的骨组织工程支架材料。三维多孔支架常用作生长因子与细胞的载体,珍珠层粉可以通过冷冻干燥法^[34, 54]、三维打印^[55]或者表面涂层^[2, 56]方法引入支架,而从珍珠层

中提取的有机基质可通过非共价键或接枝方法引入三维多孔支架^[57]。水凝胶是一种适于生长因子缓释的体系。珍珠层有机基质能够通过物理包容的方法引入到水凝胶网络结构中。水凝胶体系,如海藻酸盐^[58-59]、透明质酸^[60-61]等,有希望作为引入珍珠层有机基质的体系。Minggen 等人通过低温沉积技术成功制备了 PLGA/珍珠层粉多孔复合支架^[62]。Zhu 等人将钛合金基体置入淡水蚌体内得到了具有珍珠层涂层的钛合金基体^[56, 63]。如何更好的将珍珠层引入骨修复领域还有待进一步的探索。

参考文献 References

- [1] Vallet-Regi M, Gonzalez-Calbet J M. Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues [J]. *Prog Solid State Chem*, 2004, 32(1-2): 1-31.
- [2] Liu Y L, Wu G, De Groot K. Biomimetic Coatings for Bone Tissue Engineering of Critical-Sized Defects [J]. *J R Soc Interface*, 2010, 7(S631-S47).
- [3] Habibovic P, De Groot K. Osteoinductive Biomaterials-Properties and Relevance in Bone Repair [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007, 1(1): 25-32.
- [4] Li Y H, Liang X J, Fan T. Research Development of Biomedical Titanium Alloy [M]//LUO Q. *Recent Trends in Materials and Mechanical Engineering Materials, Mechatronics and Automation*, Pts 1-3. Stafa-Zurich: Trans Tech Publications Ltd. 2011: 2009-12.
- [5] Chakraborty A, Kundu B, Basu D, et al. In Vivo Bone Response and Interfacial Properties of Titanium-Alloy Implant with Different Designs in Rabbit Model with Time [J]. *Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 2011, 22(2): 277-84.
- [6] Vallet-Regi M. Ceramics for Medical Applications [J]. *J Chem Soc-Dalton Trans*, 2001, (2): 97-108.
- [7] Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous Bone Marrow Stromal Cells Loaded onto Porous Hydroxyapatite Ceramic Accelerate Bone Repair in Critical-Size Defects of Sheep Long Bones [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 49(3): 328-37.
- [8] Espinosa H D, Rim J E, Barthelat F, et al. Merger of Structure and Material in Nacre and Bone-Perspectives on De Novo Biomimetic Materials [J]. *Prog Mater Sci*, 2009, 54(8): 1 059-100.
- [9] Jackson A P, Vincent J F V, Turner R M. Comparison of Nacre with Other Ceramic Composites [J]. *J Mater Sci*, 1990, 25(7): 3 173-8.
- [10] Zhang C, Zhang R Q. Matrix Proteins in the Outer Shells of Molluscs [J]. *Mar Biotechnol*, 2006, 8(6): 572-86.
- [11] Westbroek P, Marin F. A Marriage of Bone and Nacre [J]. *Nature*, 1998, 392(6 679): 861-2.

- [12] Silve C, Lopez E, Vidal B, *et al.* Nacre Initiates Biomineralization by Human Osteoblasts Maintained In Vitro [J]. *Calcif Tissue Int*, 1992, 51(5): 363–9.
- [13] Almeida M J, Pereira L, Milet C, *et al.* Comparative Effects of Nacre Water-Soluble Matrix and Dexamethasone on the Alkaline Phosphatase Activity of MRC–5 Fibroblasts [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 57(2): 306–12.
- [14] Lamghari M, Almeida M J, Berland S, *et al.* Stimulation of Bone Marrow Cells and Bone Formation by Nacre: In Vivo and In Vitro Studies [J]. *Bone*, 1999, 25(2): 91S–4S.
- [15] Rousseau M, Pereira-Mouries L, Almeida M J, *et al.* The Water-Soluble Matrix Fraction from the Nacre of *Pinctada Maxima* Produces Earlier Mineralization of MC3T3–E1 Mouse Pre-Osteoblasts [J]. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol*, 2003, 135(1): 1–7.
- [16] Mouries L P, Almeida M J, Milet C, *et al.* Bioactivity of Nacre Water-Soluble Organic Matrix from the Bivalve Mollusk *Pinctada Maxima* in Three Mammalian Cell Types: Fibroblasts, Bone Marrow Stromal Cells and Osteoblasts [J]. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol*, 2002, 132(1): 217–29.
- [17] Rousseau M, Boulzaguet H, Biagianti J, *et al.* Low Molecular Weight Molecules of Oyster Nacre Induce Mineralization of the MC3T3–E1 Cells [J]. *J Biomed Mater Res Part A*, 2008, 85A(2): 487–97.
- [18] Wang X Y, Liu S F, Xie L P, *et al.* *Pinctada Fucata* Mantle Gene 3 (PFMG3) Promotes Differentiation in Mouse Osteoblasts (MC3T3–E1) [J]. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol*, 2011, 158(2): 173–80.
- [19] Wang X Y, Hinshaw S, Liu S F, *et al.* *Pinctada Fucata* Mantle Gene 5 (PFMG5) from Pearl Oyster Mantle Inhibits Osteoblast Differentiation [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(5): 991–3.
- [20] Kim H, Lee K, Ko C Y, *et al.* The Role of Nacreous Factors in Preventing Osteoporotic Bone Loss through both Osteoblast Activation and Osteoclast Inactivation [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(30): 7489–96.
- [21] Duplat D, Chabadel A, Gallet M, *et al.* The In Vitro Osteoclastic Degradation of Nacre [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(12): 2155–62.
- [22] Burstone M S. Histochemical Observations on Enzymatic Processes in Bones and Teeth [J]. *Anny Acadsci*, 1960, 85(1): 431–44.
- [23] Sud D, Doumenc D, Lopez E, *et al.* Role of Water-Soluble Matrix Fraction, Extracted from the Nacre of *Pinctada Maxima*, in the Regulation of Cell Activity in Abalone Mantle Cell Culture (*Haliotis Tuberculata*) [J]. *Tissue Cell*, 2001, 33(2): 154–60.
- [24] Huang W, Yang S Y, Shao J Z, *et al.* Signaling and Transcriptional Regulation in Osteoblast Commitment and Differentiation [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 3068–92.
- [25] Franceschi R T, Xiao G Z, Jiang D, *et al.* Multiple Signaling Pathways Converge on the Cbfa1/Runx2 Transcription Factor to Regulate Osteoblast Differentiation [J]. *Connect Tissue Res*, 2003, 44: 109–16.
- [26] Standal T, Borset M, Sundan A. Role of Osteopontin in Adhesion, Migration, Cell Survival and Bone Remodeling [J]. *Exp Oncol*, 2004, 26(3): 179–84.
- [27] Hauschka P V, Wians F H. Osteocalcin-Hydroxyapatite Interaction in the Extracellular Organic Matrix of Bone [J]. *Anat Rec*, 1989, 224(2): 180–8.
- [28] Miron R J, Zhang Y F. Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards [J]. *J Dent Res*, 2012, 91(8): 736–44.
- [29] Bedouet L, Rusconi F, Rousseau M, *et al.* Identification of Low Molecular Weight Molecules as New Components of the Nacre Organic Matrix [J]. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol*, 2006, 144(4): 532–43.
- [30] Lo K W H, Ashe K M, Kan H M, *et al.* The Role of Small Molecules in Musculoskeletal Regeneration [J]. *Regen Med*, 2012, 7(4): 535–49.
- [31] Shen Y T, Zhu J, Zhang H B, *et al.* In Vitro Osteogenic Activity of Pearl [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(2): 281–7.
- [32] Ni M, Ratner B D. Nacre Surface Transformation to Hydroxyapatite in A Phosphate Buffer Solution [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(23): 4323–31.
- [33] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, *et al.* Solutions Able to Reproduce In Vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3 [J]. *J Biomed Mater Res*, 1990, 24(6): 721–34.
- [34] Zhang R Y, Ma P X. Poly(Alpha-Hydroxyl Acids) Hydroxyapatite Porous Composites for Bone-Tissue Engineering. I. Preparation and Morphology [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44(4): 446–55.
- [35] Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, Osteoconduction and Osseointegration [J]. *Eur Spine J*, 2001, 10: S96–S101.
- [36] Frost H M. Tetracycline-Based Histological Analysis of Bone Remodeling [J]. *Calcified Tissue Research*, 1969, 3(3): 211–&.
- [37] Bedouet L, Duplat D, Marie A, *et al.* Heterogeneity of Proteinase Inhibitors in the Water-Soluble Organic Matrix from the Oyster Nacre [J]. *Mar Biotechnol*, 2007, 9(4): 437–49.
- [38] Duplat D, Gallet M, Berland S, *et al.* The Effect of Molecules in Mother-of-Pearl on the Decrease in Bone Resorption through the Inhibition of Osteoclast Cathepsin K [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(32): 4769–78.
- [39] Williams D. Revisiting the Definition of Biocompatibility [J]. *Medical Device Technology*, 2003, 14(8): 10–3.

- [40] Atlan G, Balmain N, Berland S, *et al.* Reconstruction of Human Maxillary Defects with Nacre Powder: Histological Evidence for Bone Regeneration [J]. *Comptes Rendus Acad Sci Ser III-Sci Vie-Life Sci*, 1997, 320(3): 253–8.
- [41] Lamghari M, Berland S, Laurent A, *et al.* Bone Reactions to Nacre Injected Percutaneously into the Vertebrae of Sheep [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(6): 555–62.
- [42] Lamghari M, Antonietti P, Berland S, *et al.* Arthrodesis of Lumbar Spine Transverse Processes Using Nacre in Rabbit [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(12): 2 232–7.
- [43] Atlan G, Delattre O, Berland S, *et al.* Interface between Bone and Nacre Implants in Sheep [J]. *Biomaterials*, 1999, 20(11): 1 017–22.
- [44] Kim Y W, Kim J J, Kim Y H, *et al.* Effects of Organic Matrix Proteins on the Interfacial Structure at the Bone-Biocompatible Nacre Interface in Vitro [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(9): 2 089–96.
- [45] Berland S, Delattre O, Borzeix S, *et al.* Nacre/Bone Interface Changes in Durable Nacre Endosseous Implants in Sheep [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2 767–73.
- [46] Rousseau M, Delattre O, Gillet P, *et al.* Subchondral Nacre Implant in the Articular Zone of the Sheep's Knee: A Pilot Study [J]. *Bio-Med Mater Eng*, 2012, 22(4): 227–34.
- [47] Lee K, Kim H, Kim J M, *et al.* Nacre-Driven Water-Soluble Factors Promote Wound Healing of the Deep Burn Porcine Skin by Recovering Angiogenesis and Fibroblast Function [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(3): 3 211–8.
- [48] Dai J P, Chen J, Bei Y F, *et al.* Effects of Pearl Powder Extract and Its Fractions on Fibroblast Function Relevant to Wound Repair [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(2): 122–7.
- [49] Lopez E, Le Faou A, Borzeix S, *et al.* Stimulation of Rat Cutaneous Fibroblasts and Their Synthetic Activity by Implants of Powdered Nacre (Mother of Pearl) [J]. *Tissue Cell*, 2000, 32(1): 95–101.
- [50] Shono M, Shimizu I, Aoyagi E, *et al.* Reducing Effect of Feeding Powdered Nacre of Pinctada Maxima on the Visceral Fat of Rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(10): 2 761–3.
- [51] Liu Y C, Satoh K, Has Y. Feeding Scallop Shell Powder Induces the Expression of Uncoupling Protein 1 (UCP1) in White Adipose Tissue of Rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(11): 2 733–8.
- [52] Liu Y C, Hasegawa Y. Reducing Effect of Feeding Powdered Scallop Shell on the Body Fat Mass of Rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(1): 86–92.
- [53] Vujasinovic-Stupar N, Novkovic S, Jezdic I. Supplementation with Bio-Calcium from Shells Pinctada Maxima in Postmenopausal Women with Decreased Mineral Bone Density-Pilot Study [J]. *Srp Ark Celok Lek*, 2009, 137(9–10): 518–23.
- [54] Ma P X, Zhang R Y, Xiao G Z, *et al.* Engineering New Bone Tissue in Vitro on Highly Porous Poly(Alpha-Hydroxyl Acids)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 54(2): 284–93.
- [55] Seitz H, Rieder W, Irsen S, *et al.* Three-Dimensional Printing of Porous Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering [J]. *J Biomed Mater Res Part B*, 2005, 74B(2): 782–8.
- [56] Zhu L Q, Wang H M, Xu J H, *et al.* Effects of Nacre-Coated Titanium Surfaces on Cell Proliferation and Osteocalcin Expression in MG-63 Osteoblast-Like Cells [J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(68): 15 387–93.
- [57] Schliephake H. Application of Bone Growth Factors—the Potential of Different Carrier Systems [J]. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 2010, 14(1): 17–22.
- [58] Gombotz W R, Wee S F. Protein Release from Alginate Matrices [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 31(3): 267–85.
- [59] Augst A D, Kong H J, Mooney D J. Alginate Hydrogels as Biomaterials [J]. *Macromol Biosci*, 2006, 6(8): 623–33.
- [60] Luo Y, Kirker K R, Prestwich G D. Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel Films: New Biomaterials for Drug Delivery [J]. *J Control Release*, 2000, 69(1): 169–84.
- [61] Prestwich G D, Marecak D M, Marecek J F, *et al.* Controlled Chemical Modification of Hyaluronic Acid: Synthesis, Applications, and Biodegradation of Hydrazide Derivatives [J]. *J Control Release*, 1998, 53(1–3): 93–103.
- [62] Mingen X, Yanlei L, Hairui S, *et al.* Fabricating A Pearl/PLGA Composite Scaffold by the Low-Temperature Deposition Manufacturing Technique for Bone Tissue Engineering [J]. *Biofabrication*, 2010, 2(2): 025 002.
- [63] Zhu L Q, Wang H M, Xu J H, *et al.* Effects of Titanium Implant Surface Coated with Natural Nacre on MC3T3E1 Cell Line in Vitro [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2008, 35(6): 671–5.