铜掺杂生物活性玻璃的生物医学应用

韩雅卉^{1,2}, 刘晨光^{1,2}, 王士斌^{1,2}, 陈爱政^{1,2*}

1. 华侨大学生物材料与组织工程研究所, 厦门 361021;

2. 华侨大学化工学院, 福建省生物化工技术重点实验室, 厦门 361021

* 联系人, E-mail: azchen@hqu.edu.cn

2020-07-05 收稿, 2020-08-12 修回, 2020-08-21 接受, 2020-08-25 网络版发表

国家自然科学基金(81971734, U1605225, 31800794)和福建省科技创新团队发展计划资助

摘要 生物活性玻璃作为一种既能与骨组织键合又能与软组织连接的活性材料, 可通过降解过程实现对活性离子的控制释放, 在临床生物医学方面得到长足发展. 本文综述了近年来合成的铜掺杂生物活性玻璃的基本特征, 并对相关生物医学应用研究进展进行介绍, 对研究中存在的问题和面临的挑战进行深入剖析. 其中, 基本特征内容包括结构及分类, 具体细分为45S5型、1393型、70S型和1393 B3型等; 生物医学应用进展内容涵盖抗菌、抗癌、骨/软骨修复再生及血管生成.

关键词 铜掺杂生物活性玻璃, 抗菌, 癌症治疗, 成骨, 成血管

人类对玻璃的改造可追溯至数千年前, 从用于工具制造的天然玻璃(如一种火山玻璃——黑曜石)的发现, 到中东地区早期人造玻璃弹珠和酒器的出现, 这种材料的设计和利用一直备受关注. 随着时代的发展, 玻璃已被广泛用于工艺品、光学、化学和电信产业等领域^[1]. 与传统玻璃相比, 生物活性玻璃作为一种相对新颖的材料, 形状和尺寸特殊, 可作为有效体内植入物, 引发特定生物活性反应, 与人体组织界面相互作用, 可降解程度高, 保证活性离子的控制释放, 实现机体组织、器官的自我修复和再生, 规避传统替代手段所引发的异物排斥反应. 近年来, 由于形貌尺寸特殊、细胞摄取和降解性能良好、生物矿化能力优异及安全性高等优势, 生物活性玻璃也在生物成像、基因递送和创口愈合等方面发挥关键效用^[2]. 然而, 未经修饰的单分散生物活性玻璃存在易聚集等问题, 相关体内外活性也有待提高. 本文对铜掺杂生物活性玻璃及其生物医学应用研究进行综述, 其中包括结构及分类2个层面,

相关生物医学应用将从抗菌、抗癌、成骨和成血管4个方面进行总结(图1).

1 铜掺杂生物活性玻璃

生物活性玻璃由硅网络结构、氧化物和修饰成分组成, 是一种生物相容性良好、机械稳定性强的活性材料. 其降解释放的离子产物能够在体内外产生响应, 发挥特定治疗功能和相关生物医学作用. 因此, 通过选定活性离子特别是金属离子作为化学组分掺杂硅酸盐玻璃, 可适当调整生物活性玻璃的性质. 人体生理液中普遍存在的多种金属元素, 如锌、镁、钴、铜、锶、锂和硼^[3-6]等, 已被添加至生物活性玻璃化学结构中. 对于铜掺杂生物活性玻璃而言, 暴露于生理环境后, 铜离子从中释放, 可诱导成骨细胞分化, 刺激相关基因表达, 在体内外加速血管生成, 发挥一定抗菌消炎作用; 同时, 铜离子的添加也会对生物活性玻璃的结晶度、溶解度、稳定性和形态等要素产生影响^[6].

引用格式: 韩雅卉, 刘晨光, 王士斌, 等. 铜掺杂生物活性玻璃的生物医学应用. 科学通报, 2020, 65: 4262–4271

Han Y H, Liu C G, Wang S B, et al. Biomedical applications of copper-impregnated bioactive glass (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 4262–4271, doi: 10.1360/TB-2020-0837

图1 (网络版彩色)铜掺杂生物活性玻璃的生物医学应用示意图
Figure 1 (Color online) Illustrating biomedical applications of copper-impregnated bioactive glass

1.1 铜掺杂生物活性玻璃的结构

传统硅酸盐玻璃由四面体 SiO_4 共价基团组成, 每2个Si共享1个桥接氧(bridging oxygen, BO), 相邻四面体基团由BO相连。通常可将碱金属或碱土金属阳离子作为修饰剂, 破坏完全连续的 SiO_2 三维(three dimensional, 3D)网络, 建立硅-非桥接氧(nonbridging oxygen, NBO)与改性离子间的相互作用, 保证局部电荷平衡(图2)。生物活性玻璃的硅酸盐网络既包含链又包含环^[7], 可通过网络连通性(network connectivity, NC)模型估算玻璃结构:

$$\text{NC}_{\text{Si}} = \frac{4 \times \text{SiO}_2 + 6 \times \text{P}_2\text{O}_5 - 2 \times (\text{M}_2\text{O} + \text{M}'\text{O})}{\text{SiO}_2}, \quad (1)$$

即形成每个网络的硅元素的平均BO数^[1]。以计算 SiO_2 - P_2O_5 - M_2O - $\text{M}'\text{O}$ 生物活性玻璃为例, 各组分按摩尔百分比代入, 假设每个Si最多有4个BO, 减去改性所形成的NBO, P_2O_5 使BO数增加, 改性阳离子M可平衡 PO_4^{3-} 的负电荷; 亦可通过电导率推测生物活性、结晶趋势和玻璃化转变温度等性质。金属掺杂对生物活性玻璃结构的改变也赋予其不同生物性质, 与传统硅酸盐玻璃相比, 最初的离子交换并非由细胞介导, 改性后的半开放硅酸盐网络允许更深度的溶液渗透, 减少 SiO_2 保护性表面膜的形成, 改性剂阳离子充当路易斯酸, 触发水分解为氢氧根离子^[8], 促进改性离子和硅酸盐、磷酸盐离子从玻璃中连续释放, 在生物材料与流体边界处形成磷灰石层, 但这种作用在BO与溶液之间并不显著。

图2 (网络版彩色)桥接氧和非桥接氧结构示意图
Figure 2 (Color online) Structural illustration of BO and NBO

基于Zachariasen提出的氧化物玻璃形成规则, 铜掺杂的生物活性玻璃中, 铜离子嵌入原本完全互连的3D SiO_2 网络, 致使致密结构遭到破坏, Si-NBO取代Si-BO-Si, 铜离子与NBO间建立离子相互作用, 使整体呈电中性, 且1个氧原子与不超过2个阳离子之间连接, 铜离子周围的氧原子数不大于5个, 氧多面体间仅存在共用角而不存在共用边或面, 保持相对较低的 SiO_2 含量水平^[6,9]。根据Wers和Oudadesse^[9]及Hoppe等人^[10]的研究, 铜离子的添加会导致原本坚固的玻璃网络变得脆弱, 玻璃化转变温度也随之降低, 羟基磷灰石层的形成不会被阻断, 但其形态和晶体尺寸会受到一定影响, 且这些变化与铜的掺杂量无明显关系。

1.2 铜掺杂生物活性玻璃的分类

生物活性玻璃是由 SiO_2 、 CaO 、 Na_2O 、 P_2O_5 、 K_2O 和 B_2O_3 等其中几种基本成分组成的活性材料。根据玻璃基质的不同, 主要分为硅酸盐型、硼酸盐型和磷酸盐型, 而硅酸盐和硼酸盐系常作为众多铜掺杂生物活性玻璃的研究对象, 其详细基本特征及相关应用领域如表S1所示。

(i) 45S5型。1969年, Hench首次合成四元生物活性玻璃成分, 称为45S5型(45wt% SiO_2 、24.5wt% CaO 、24.5wt% Na_2O 和6wt% P_2O_5 , 重量百分比)^[11]。1985年, 45S5型生物活性玻璃获得美国食品药品监督管理局(Food and drug administration, FDA)批准, 可作为中耳假体, 并于1986年被批准为骨内维持植入物。45S5型生物活性玻璃能够与宿主之间形成牢固的化学键, 但也存在一定缺陷。首先, 反应物所需的熔化温度极高(>1300°C); 其次, 其生物活性很大程度上取决于孔结构或 SiO_2 含量, SiO_2 含量越高意味着孔结构缺乏, 硅酸盐网络相对更稳定, 浸入模拟体液(simulated body fluid, SBF)环境后不易释放所含离子, 无法形成羟基磷灰石层, 进而无法与宿主形成绑定^[12]。铜掺杂45S5型生物活性玻璃的傅里叶变换红外特征光谱与非掺杂生物活性

玻璃基本一致, 622、575和530 cm^{-1} 处的弯曲振动带可归因于结晶磷灰石样磷酸钙的存在^[13]. Gönen等人^[14]在45S5型生物活性玻璃中用CuO替代约8.2wt% CaO, 经1350°C多次熔化淬火过程后得到组成为45wt% SiO_2 、22.5wt% CaO、24.5wt% Na_2O 、6wt% P_2O_5 和2wt% CuO的铜掺杂生物活性玻璃, 铜元素的引入并未改变原有玻璃结构的非晶状态, 玻璃化转变温度和结晶温度均略低于同等条件下制备的锶掺杂生物活性玻璃. 根据Weng等人^[15]的研究结果, 与钙离子相比, 铜离子的极限当量离子电导率更高^[16], 与无铜45S5型玻璃纤维相比, 可以在电纺过程中产生更低的电流, 因此, 尽管铜掺杂浓度较低, 最终仍可使铜掺杂生物活性玻璃纳米纤维直径增加^[15].

(ii) 1393型. 1393型(53wt% SiO_2 、6wt% Na_2O 、12wt% K_2O 、5wt% MgO 、20wt% CaO和4wt% P_2O_5)是首个为避免烧结晶析而设计的硅酸盐生物活性玻璃. 与45S5型相比, 1393型具有更高的黏性流动特性, 但在烧结过程中结晶趋势变小, 不能轻易转变为多晶形式, 且更容易形成颗粒或拉伸成纤维且不发生脱玻化, 生物活性更高^[17]. Ali等人^[17]通过熔融淬火法合成生物活性玻璃, 并利用聚氨酯泡沫材料复制三维多孔1393型((54.65- X)mol% SiO_2 、6mol% Na_2O 、7.9mol% K_2O 、7.7mol% MgO 、22mol% CaO、1.74mol% P_2O_5 和 X mol% CuO, 其中 $X = 0, 1, 2$ 或3, 摩尔百分比)玻璃结构改善机械性能, 平均表观孔隙率45.8%~47.3%, CuO含量的增加导致支架抗压强度、弯曲强度和弹性模量增加, 较高浓度下能够引起人鳞状癌细胞中等程度凋亡且对人红细胞耐受, 可作为骨组织工程应用的新型潜在生物材料.

(iii) 70S型. 在传统的溶胶-凝胶过程中添加各类铜盐作为前体, 可能会中断颗粒的生长并形成不规则形状^[18], 通过控制浓度及添加时间, 形成分散良好且化学均质的铜掺杂生物活性玻璃. Zheng等人^[18]使用新型铜/L-抗坏血酸络合物作为前体, 报道了一种微乳液辅助溶胶-凝胶法制备的高度可调70S型(70mol% SiO_2 、25mol% CaO和5mol% CuO)铜掺杂生物活性玻璃, 最大程度减弱颗粒聚集现象, 降低高浓度铜基晶体形成风险. 铜离子浓度水平差异有利于生物活性玻璃作为潜在活性填料、涂层或药物递送载体, 用于抗菌、成血管、骨骼再生或伤口愈合等各种生物医学应用. Moses等人^[19]选择溶胶-凝胶衍生的铜掺杂70S型(70wt% SiO_2 、22wt% CaO、5wt% P_2O_5 和3wt% CuO)

生物活性玻璃功能化丝素微纤维, 可稳定上调缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)-1 α 表达, 结合生物活性玻璃涂层有助于减少残余应力, 合理增加弹性形变, 压缩模量显著提高(最大约增加2.45倍), 丝素抗张强度(0.3~0.6 GPa)远远优于大鼠尾部胶原蛋白(0.9~7.4 MPa, 骨骼支架基质中的常用聚合物), 提供足够的机械支撑, 通过拓扑结构和化学信号调节细胞通路, 支持成骨细胞重塑.

(iv) 1393 B3及1605型. 基于硅酸盐的生物活性玻璃配方成熟, 其临床应用颇为广泛, 但仍存在降解缓慢及羟基磷灰石转化不完全^[20]等问题. 在45S5型硅酸盐基玻璃的基础上, 用 B_2O_3 全部或部分取代 SiO_2 , 可得到硼酸盐或硼硅酸盐系生物活性玻璃^[21]. 据报道, 硼酸盐基纤维比硅酸盐基纤维的离子释放和玻璃转化更迅速^[22], 尽管由于降解太快而无法用于结构性骨修复, 但羟基磷灰石的形成速度更快, 这些过程与原始硼含量和周围流变条件相关. 铜离子被引入硼酸盐生物活性玻璃及其衍生支架中, 能发挥凝聚作用, 平衡玻璃网络中团聚体的电荷, 增加980 cm^{-1} 处 BO_4 基团的B-O键, 减少1440~1470 cm^{-1} 处 BO_2O^- 的B-O键, 即 BO_3 显著转变为 BO_4 基团^[23]. Brown等人^[20]在动态培养条件下对原位硼剂量进行研究, 探究硼酸盐基1393 B3型(5.5wt% Na_2O 、11.1wt% K_2O 、4.6wt% MgO 、18.5wt% CaO、3.7wt% P_2O_5 和56.6wt% B_2O_3)和1605型(6wt% Na_2O 、12wt% K_2O 、5wt% MgO 、20wt% CaO、4wt% P_2O_5 、51.6wt% B_2O_3 、0.4wt% CuO和1wt% ZnO)对人成纤维皮肤细胞的生物活性作用. 结果表明, 硼基纤维表面更加光滑, 浸入无血清培养基后纤维芯腐蚀度更高, 水力作用使纤维最外层变得粗糙, 硼酸盐基中离子含量达到峰值的速度远快于硅酸盐基生物活性玻璃, 细胞活力更高, 羟基磷灰石的转化率与 B_2O_3 量正相关. 释放的硼能够改善表面元素沉积, 适度的动态培养能够潜在逆转降解过程中pH升高对细胞迁移的负面影响. 含铜硼基生物活性玻璃可借助高扩散能力、改善伤口愈合和诱导血管生成潜力等作用, 规避半衰期短等问题, 成为生长因子的替代选择^[24].

(v) 其他. 溶胶-凝胶法是最常用的生物活性玻璃制备途径, Varmette等人^[25]对58S型生物活性玻璃(64mol% SiO_2 、31mol% CaO和5mol% P_2O_5)进行铜离子掺杂, 对比改性前后在脂多糖刺激巨噬细胞前预防及刺激后治疗上的炎症反应情况, 发现玻璃溶解释放的铜离子能够显著降低肿瘤坏死因子(tumor necrosis

factor, TNF)- α 的表达,有效抑制炎症. Miola等人^[5]通过传统熔融淬火途径制备了含硼硅酸盐基生物活性玻璃,并利用离子交换过程掺杂铜,产物比表面积大,为抗菌作用和药物功能化提供可能,并在多种样品间进行比较,为更复杂的生物学测定打下基础.已报道基于藻酸钠、直链淀粉和氧化铜的生物活性 $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ 玻璃胶囊,可确保成纤维细胞及成骨细胞稳定增殖,SBF中浸泡后呈玉米片状,在体内接种后保持球形,形成针状羟基磷灰石,未被宿主组织排斥,证明用于骨修复再生的可能性^[26]. Mishra等人^[27]着重研究磷酸盐生物活性玻璃添加CuO成分后与S53P4型生物活性玻璃的对比,结果发现铜的掺杂不仅可以有效实现细胞附着和增殖,还具有更高的抗菌性能,甚至可以完全消除细菌.

2 铜掺杂生物活性玻璃的生物医学应用

铜是参与代谢的必需微量营养元素,嵌入生物活性玻璃后,通过与周围液体环境进行离子交换,作为改性元素精准释放于需要部位,将副作用降至最小,发挥最佳治疗效果.铜作为改变生物活性玻璃网络的中间离子,可抑制破骨细胞活性,刺激胶原蛋白生成和聚集,在骨、软骨的形成和愈合中发挥至关重要的作用^[28];可增强成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor-2, FGF-2)的能力,上调HIF-1 α 、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和内皮型一氧化氮合酶的表达,从而促进人内皮细胞增殖和迁移^[6];可与巯基、咪唑、羧基和胺等成键,从而造成膜结构变化,通透性增强,导致膜转运功能障碍,显示出强大的抗菌特性^[29];可在近红外光照射下产生局部过热引发光热效应,亦可在肿瘤酸性环境条件下参与类芬顿反应(Fenton-like reaction),将谷胱甘肽转化为氧化型谷胱甘肽,催化过氧化氢生成活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)^[30],造成线粒体损伤和膜通透性变化,引发癌细胞凋亡(图3).

2.1 抗菌

在骨/软骨的重建与再生过程中,除了关注材料与骨之间形成良好且牢固的化学键,还要防止定植所引发的细菌感染,减少抗生素的使用,避免二次手术的发生^[6].大量研究表明,80%以上的微生物感染与生物膜系统的形成有密切关系^[13],甚至出现持久的耐药性.针对性地通过激活细胞密度依赖型机制-群体感应、控制黏附机制和毒性因子的表达、添加特定的元素为材

图3 (网络版彩色)铜掺杂生物活性玻璃活性离子体外作用机制示意图

Figure 3 (Color online) Schematic illustration of active ions efficacy in vitro

料提供抗菌特性、降低机体对材料的敏感性并限制感染,成为了生物活性玻璃研究的关键环节.银是最常用的抗菌剂^[31],锌等^[32]无机元素也能够对枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌菌株产生良好的抗菌活性;而铜掺入生物活性玻璃结构中较为容易,并可在溶解的过程中逐渐释放出来,从而确保其作为抗菌成分的控制释放,具备更优异的长期抗菌性能.同时,降解过程中阳离子的释放可引起局部pH升高^[33],保证杀死细菌. Rau等人^[13]利用铜离子的抗菌特性,向4S5型生物活性玻璃中添加5wt% CuO,作为脉冲激光沉积目标涂层材料(图4),并对细胞行为进行研究,发现铜的存在能通过成骨细胞表型诱导人间充质干细胞的早期分化,促进抗炎性白细胞介素(interleukin, IL)-10的表达,抑制促炎性IL-1 β 表达.抗菌研究表明,该材料对革兰氏阴性细菌(铜绿假单胞菌、大肠杆菌和肠炎沙氏门菌)的抑制效果远大于革兰氏阳性细菌(金黄色葡萄球菌). Bari等人^[34]利用铜掺杂的生物活性玻璃纳米颗粒加速生物膜分散,干扰生物膜形成,有效抑制细菌生长.传统溶胶-凝胶法可掺入高达10mol%的铜, Miola和Verne^[35]首次在水溶液中利用离子交换技术将不同铜源(硝酸铜、氯化铜、醋酸铜和硫酸铜等)更大程度地引入硅基生物活性玻璃外层,显示出良好的金黄色葡萄球菌

图 4 (网络版彩色)铜掺杂生物活性玻璃作为脉冲激光沉积目标涂层材料过程示意图(a)、花椰菜形磷灰石扫描电子显微镜(SEM)图(b)及抗菌效果对比图(c)^[13]

Figure 4 (Color online) Illustration of Cu-containing bioactive glass as the target material for the pulsed laser deposition (PLD) of bioactive thin films (a), SEM image collected for cauliflower apatite morphology (b) and the comparison of antibacterial effect (c)^[13]

抑制效果, 后续可进一步探究刺激血管生成性能, 实现抗菌与成血管的结合。

2.2 癌症治疗

为治疗骨肿瘤和骨缺损疾病, 临床上术后常采用化学疗法或放射疗法处理残余肿瘤细胞, 对患者的副作用不可忽视, 理想的生物材料应具有消融肿瘤细胞同时再生骨的能力^[36], 但是长期毒性和低降解性限制了这类双功能生物材料的应用。尽管已将生物活性元素(如锶和钴等)掺入生物材料中改善其成骨活性^[3,37], 但鲜有元素诱导的用于肿瘤治疗的功能性活性材料被报道。介孔生物活性玻璃孔体积高、比表面积大, 使其成为小分子或药物靶向递送的潜在候选者, 对化学组分的微小调整即可引起性能的极大转变。从掺杂元素的生物活性玻璃中释放的离子能够与信号级联或与炎症相关基因转录相互作用, 增加TNF- α 和IL-1的分泌。Liu等人^[38]通过3D打印技术制造了铜掺杂生物活性玻璃支架, 发现其具有独特的光热性能, 且产生的光热效应远高于等量铁、锰等元素, 与传统纳米级光热剂相比亦具备更好的生物安全性和生物活性, 是光热肿瘤治疗和骨再生双重应用的典型代表。Garg等人^[39]以十六烷基三甲基溴化铵为结构导向剂, 探究了铜掺杂生物活性玻璃的药物加载动力学。结果表明, 随着铜掺杂量的下降, 抗癌药物阿霉素(doxorubicin, DOX)的负载量

逐渐减小, 而抗菌药物万古霉素几乎一直维持满载水平。浓度的高低也对载药量产生一定影响, 当Cu₈Zn₂浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 负载量可达90.50%; 当相同玻璃样品浓度达到80 $\mu\text{g/mL}$ 时, 负载量降至39.67%; 而当DOX浓度增加时, 负载量随之增大。根据体外研究结果, 铜掺杂生物活性玻璃在癌症治疗方面具有光明的前景, 但研究仍处于初步阶段, 需要进一步探究利弊及有效性。

2.3 骨/软骨修复再生

骨关节炎是一种退行性疾病, 引发软骨磨损、骨变性及损伤, 难以自我修复。利用原生骨骼进行治疗是骨缺损临床实践的黄金准则^[40], 目前, 自体骨移植十分有限, 深受供体部位限制, 同种异体移植和异种移植存在骨诱导能力弱、免疫原性反应低等问题, 且存在感染等潜在风险。因此, 迫切需要设计能够模拟骨骼向内生长速率及胞外基质结构组成的生物活性材料, 以克服自体骨和同种异体骨的局限性。临床实践上通常在合成生物材料中添加成骨生长因子以诱导健壮的骨形成, 实现可靠的骨骼重建、修复与再生, 但这些因子(如骨形态发生蛋白)仅在超生理剂量时才有效, 易引发更大程度的不良生物学效应。为规避上述风险, 骨组织再生替代疗法成为研究的焦点, 一系列模仿骨骼化学成分的有机-无机材料被开发出来, 这些材料机械稳定性高且生物相容性良好。其中, 能够负载各种药物和

生物分子的胶体凝胶常被用作功能化组分,并通过功能性的生物活性分子修饰有机颗粒或结合生物活性无机颗粒两种方式,显著增强机械强度和生物活性,而生物活性玻璃由于极强的生物活性和可降解性,可作为连接的无机组件。生物活性对于骨骼形成来说必不可少,生物活性玻璃作为一种有效的替代材料,其生物活性可通过SBF中羟基磷灰石晶体的生物矿化而实现^[15]。磷灰石是人体骨骼、牙本质和牙釉质等组织矿化的主要成分,当生物活性玻璃与溶液(如体液等)接触时,开始降解并释放离子(钙离子和磷酸根离子等),形成磷灰石表面层,是具备生物活性并提供骨骼再生能力的关键^[41]。研究表明,铜掺杂45S5型生物活性玻璃可以通过上调相关基因刺激细胞增殖,加速成骨细胞周转,在较短时间内生成矿化组织成熟细胞群。尽管成骨细胞分化结果受底物及细胞类型等因素影响,但培养过程中不需要额外补充生长因子,这一点与其他生物陶瓷相比具有更大优势^[1]。体外细胞培养实验通常在静态或封闭体系中进行,易存在离子浓度大量累积等局限问题,因此体内测试成为生物活性玻璃临床应用预测的必要环节。体内研究表明,当铜离子浓度低于1 mmol/L时,与羟基磷灰石相比,生物活性玻璃骨生成速度更快,Sharifi等人^[42]利用冷冻干燥技术和静电纺丝法构建生物玻璃-明胶/胶原蛋白复合多孔纤维支架,允许细胞迁移和营养物质及代谢废物转运,与不含铜水凝胶或玻璃纤维-水凝胶相比,结构黏附了更多成骨细胞,生存能力更强,生物相容性更高,具有足够的生物力学性能。Lin等人^[43]采用3D打印技术制备铜掺杂生物活性玻璃陶瓷,铜离子通过激活HIF信号通路和抑制软骨组织中的炎症反应,触发软骨免疫反应,大大促进软骨细胞的成熟和增殖,显著改善软骨再生,并提高了软骨-软骨界面的恢复。Zhang等人^[28]在骨切片上培养日本白兔破骨细胞,发现铜离子浓度对破骨细胞性骨吸收陷窝的影响较为明显,当铜离子浓度为 $1.00 \times 10^{-7} \sim 1.00 \times 10^{-6}$ mol/L时,破骨细胞活性被抑制,陷窝的数目和表面积呈浓度依赖型下降;而当铜离子浓度为 1.00×10^{-8} mol/L时,破骨细胞的吸收功能显著增强,陷窝的数目和表面积也有所升高。在探索应用过程中,也有研究选取各类聚合物,紧密模拟骨骼的细胞外环境,有助于干细胞和内皮细胞谱系归巢,诱导骨形成^[19]。

2.4 血管生成

血管生成对于骨骼形成和生长来说必不可少,并

且在骨缺损修复过程中发挥关键作用。细胞增殖取决于氧气和营养成分的供应,血管可将这些物质输送到所需部位,尽管已有相关研究证实了血管生成因子添加至植入物策略的可行性,但仍存在成本高以及超生理剂量使用所带来的潜在安全风险等不足。大量研究表明,生物活性玻璃可通过低氧压途径,即稳定HIF-1 α 的表达,刺激血管生成^[44]。血管化是组织再生过程中的关键环节,在有效治疗浓度范围内的铜离子可作为新型低氧模拟材料,进入硅酸盐网络,从而诱导血管生成。铜离子在组织血管化的形成中发挥重要作用,能够刺激内皮细胞和间充质干细胞的分化,在生物活性玻璃材料中掺入铜,可以通过增加VEGF和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 的表达改善基质上毛细血管样内皮细胞网络的作用(图5)^[45]。Rath等人^[46]用骨髓来源的间充质干细胞和人皮肤微血管内皮细胞共同测试了铜掺杂生物活性玻璃衍生支架,观测到VEGF表达增加,且这种支架对间充质干细胞没有毒

图5 (网络版彩色)铜掺杂生物活性玻璃诱导体内血管生成皮下观察、H&E染色及针对VEGF和vWF的IHC染色^[45]

Figure 5 (Color online) General observation of the subcutaneous implants showed that the constructs containing the Cu-MBG material induced blood vessels formation *in situ*. This observation was confirmed by H&E staining and IHC staining against VEGF and vWF^[45]

性,证明了铜离子在组织血管形成40 h内即可达到有效浓度,并能够稳定持续4周,自发改善新骨形成过程中血管的生成。Lin等人^[47]研究了从1393型生物活性玻璃支架中释放铜离子对血管生成的影响,当体外浸入SBF中时,铜掺杂支架以剂量依赖性方式将铜离子释放到介质中,渗透到支架内的纤维组织中的新血管面积随着玻璃中CuO含量的增加而增加。

2.5 其他

生物活性玻璃最早被用为骨替代材料,植入受损组织,完成中耳假体和眶底重建^[1]。Jun等人^[48]设计了一种新型掺铜生物活性玻璃纳米颗粒,并将其掺入树脂-牙本质胶黏剂系统,通过调节酶介导的基质降解,造成基质金属蛋白酶失活,抑制牙本质基质降解,促进牙本质再矿化,为树脂-牙本质杂化界面寿命延长提供了一种有效策略。Yang等人^[22]利用体外流变模块密切模拟体内利基环境,证明基于硼酸盐的玻璃纤维具有改善伤口愈合的效果,为生物活性玻璃的应用提供参考。

3 总结和展望

本综述总结了铜离子掺杂对生物活性玻璃材料理化性质和生物学特性的影响,阐述了相关生物医学应用进展。铜离子作为修饰剂,可破坏连续的BO网络,建立与Si-NBO间的相互作用,使改性结构中既包含环又包含链,保证局部电荷平衡,使整体呈电中性。通过建立具体的实验测试,可监测铜离子释放动力学和生理环境下受控的生物反应;在不改变组成的情况下,通过调整工艺参数,可改变形貌、结晶度和孔隙率等微观结构,进而更好地控制生物活性。在抗菌应用方面,热

过程产生的铜氧化物比纯铜更易与蛋白质结合,对细胞具有高度亲和力,可产生大量ROS,带来更显著的抗菌效果;掺入铜的生物活性玻璃可作为抗菌剂以代替抗生素等物质,最大程度上克服细菌耐药性,有效抵抗耐药菌株。在癌症治疗应用方面,铜掺杂生物活性玻璃可作为小分子及药物的递送及控释平台,减轻高剂量所导致的高成本及全身毒、副作用。在骨/软骨修复再生应用方面,铜离子代谢能够刺激炎症细胞因子和HIF-1 α 的合成,增加铜蓝蛋白的合成和分泌,促进胶原交联,加速软骨形成,提升骨骼强度,降低骨关节炎发生率;玻璃表面形成的羟基磷灰石层可与骨骼牢固结合而非简单替代。在血管生成应用方面,铜掺杂生物活性玻璃作为各类血管生成因子的替代物,可避免高成本、易丧失生物活性等问题,可强烈刺激相关基因表达,且具有更好的临床安全性,从而诱导血管化与骨组织修复再生相辅相成。

铜掺杂生物活性玻璃在生物医学领域显示出极大发展潜力,但仍存在高温烧结过程中施加的热量和有机溶剂所造成的药物或生物分子降解及变性等问题,且相关药物及小分子的嵌入机制还需进一步探索。同时,类磷灰石物质可能会对小分子及药物的释放造成干扰,故应依赖可靠手段有效控制释放并降低羟基磷灰石的不利影响。此外,生物活性玻璃在癌症领域的运用尚处于起步阶段,实现临床转化将是今后的重点发展方向。相信在未来的研究中,借助日益更新、完善的研究方法,我们可以更加深入地揭示网络结构和作用机制间的关系,并促进临床治疗策略的施用。总之,铜掺杂生物活性玻璃将为生物医学领域提供一个安全、高效的创新型活性平台。

参考文献

- 1 Brauer D S. Bioactive glasses-structure and properties. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 4160–4181
- 2 Guo Y, Xue Y, Ge J, et al. Monodispersed β -glycerophosphate-decorated bioactive glass nanoparticles reinforce osteogenic differentiation of adipose stem cells and bone regeneration *in vivo*. *Part Part Syst Charact*, 2020, 37: 1900462
- 3 Hoppe A, Jokic B, Janackovic D, et al. Cobalt-releasing 1393 bioactive glass-derived scaffolds for bone tissue engineering applications. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 2865–2877
- 4 Han P, Wu C, Chang J, et al. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/ β -catenin signalling pathway by Li^+ ions released from bioactive scaffolds. *Biomaterials*, 2012, 33: 6370–6379
- 5 Miola M, Bertone E, Vernè E. *In situ* chemical and physical reduction of copper on bioactive glass surface. *Appl Surf Sci*, 2019, 495: 143559
- 6 Cacciotti I. Bivalent cationic ions doped bioactive glasses: The influence of magnesium, zinc, strontium and copper on the physical and biological properties. *J Mater Sci*, 2017, 52: 8812–8831
- 7 Xiang Y, Du J. Effect of strontium substitution on the structure of 45S5 bioglasses. *Chem Mater*, 2011, 23: 2703–2717
- 8 Tilocca A, Cormack A N. The initial stages of bioglass dissolution: A car-parrinello molecular-dynamics study of the glass-water interface. *Proc R Soc A Math Phys Eng Sci*, 2011, 467: 2102–2111

- 9 Wers E, Oudadesse H. Thermal behaviour and excess entropy of bioactive glasses and Zn-doped glasses. *J Therm Anal Calorim*, 2014, 115: 2137–2144
- 10 Hoppe A, Meszaros R, Stähli C, et al. *In vitro* reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass® derived scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B*, 2013, 1: 5659–5674
- 11 Hench L L. Bioceramics. *J Am Ceram Soc*, 1998, 81: 1705–1728
- 12 Kong C H, Steffi C, Shi Z, et al. Development of mesoporous bioactive glass nanoparticles and its use in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*, 2018, 106: 2878–2887
- 13 Rau J V, Curcio M, Raucci M G, et al. Cu-releasing bioactive glass coatings and their *in vitro* properties. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 5812–5820
- 14 Gönen S Ö, Erol T M, Küçükbayrak S. Fabrication of bioactive glass containing nanocomposite fiber mats for bone tissue engineering applications. *Compos Struct*, 2016, 138: 96–106
- 15 Weng L, Boda S K, Teusink M J, et al. Binary doping of strontium and copper enhancing osteogenesis and angiogenesis of bioactive glass nanofibers while suppressing osteoclast activity. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 24484–24496
- 16 Fridrikh S V, Yu J H, Brenner M P, et al. Controlling the fiber diameter during electrospinning. *Phys Rev Lett*, 2003, 90: 144502
- 17 Ali A, Ershad M, Vyas V K, et al. Studies on effect of CuO addition on mechanical properties and *in vitro* cytocompatibility in 1393 bioactive glass scaffold. *Mater Sci Eng-C*, 2018, 93: 341–355
- 18 Zheng K, Kang J, Rutkowski B, et al. Toward highly dispersed mesoporous bioactive glass nanoparticles with high Cu concentration using Cu/ascorbic acid complex as precursor. *Front Chem*, 2019, 7: 497
- 19 Moses J C, Nandi S K, Mandal B B. Multifunctional cell instructive silk-bioactive glass composite reinforced scaffolds toward osteoinductive, proangiogenic, and resorbable bone grafts. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7: e1701418
- 20 Brown R F, Rahaman M N, Dwilewicz A B, et al. Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Biomed Mater Res*, 2009, 88A: 392–400
- 21 Huang W, Day D E, Kittiratanapiboon K, et al. Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *J Mater Sci-Mater Med*, 2006, 17: 583–596
- 22 Yang Q, Chen S, Shi H, et al. *In vitro* study of improved wound-healing effect of bioactive borate-based glass nano-/micro-fibers. *Mater Sci Eng-C*, 2015, 55: 105–117
- 23 Wang H, Zhao S, Xiao W, et al. Influence of Cu doping in borosilicate bioactive glass and the properties of its derived scaffolds. *Mater Sci Eng-C*, 2016, 58: 194–203
- 24 Bennett S P, Griffiths G D, Schor A M, et al. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg*, 2003, 90: 133–146
- 25 Varmette E A, Nowalk J R, Flick L M, et al. Abrogation of the inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages by Zn- and Cu-doped bioactive sol-gel glasses. *J Biomed Mater Res*, 2009, 90A: 317–325
- 26 Popescu R A, Magyari K, Taulescu M, et al. New alginate-pullulan-bioactive glass composites with copper oxide for bone tissue regeneration trials. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12: 2112–2121
- 27 Mishra A, Petit L, Pihl M, et al. Thermal, structural and *in vitro* dissolution of antimicrobial copper-doped and slow resorbable iron-doped phosphate glasses. *J Mater Sci*, 2017, 52: 8957–8972
- 28 Zhang J C, Huang J A, Xu S J, et al. Effects of Cu²⁺ and pH on osteoclastic bone resorption *in vitro*. *Prog Nat Sci-Mater*, 2003, 13: 266–270
- 29 Stanić V, Dimitrijević S, Antić-Stanković J, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Appl Surf Sci*, 2010, 256: 6083–6089
- 30 Liu C G, Han Y H, Zhang J T, et al. Rerouting engineered metal-dependent shapes of mesoporous silica nanocontainers to biodegradable Janus-type (sphero-ellipsoid) nanoreactors for chemodynamic therapy. *Chem Eng J*, 2019, 370: 1188–1199
- 31 Ur Rehman M A, Ferraris S, Goldmann W H, et al. Antibacterial and bioactive coatings based on radio frequency co-sputtering of silver nanocluster-silica coatings on PEEK/bioactive glass layers obtained by electrophoretic deposition. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 32489–32497
- 32 Taale M, Schütt F, Zheng K, et al. Bioactive carbon-based hybrid 3D scaffolds for osteoblast growth. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 43874–43886
- 33 Stoor P, Söderling E, Salonen J I. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scand*, 1998, 56: 161–165
- 34 Bari A, Bloise N, Fiorilli S, et al. Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration. *Acta Biomater*, 2017, 55: 493–504
- 35 Miola M, Verné E. Bioactive and antibacterial glass powders doped with copper by ion-exchange in aqueous solutions. *Materials*, 2016, 9: 405
- 36 Dang W, Li T, Li B, et al. A bifunctional scaffold with CuFeSe₂ nanocrystals for tumor therapy and bone reconstruction. *Biomaterials*, 2018, 160: 92–106

- 37 Leite Á J, Gonçalves A I, Rodrigues M T, et al. Strontium-doped bioactive glass nanoparticles in osteogenic commitment. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 23311–23320
- 38 Liu Y, Li T, Ma H, et al. 3D-printed scaffolds with bioactive elements-induced photothermal effect for bone tumor therapy. *Acta Biomater*, 2018, 73: 531–546
- 39 Garg S, Thakur S, Gupta A, et al. Antibacterial and anticancerous drug loading kinetics for $(10-x)\text{CuO}-x\text{ZnO}-20\text{CaO}-60\text{SiO}_2-10\text{P}_2\text{O}_5$ ($2 \leq x \leq 8$) mesoporous bioactive glasses. *J Mater Sci-Mater Med*, 2017, 28: 11
- 40 Pape H C, Evans A, Kobbe P. Autologous bone graft: Properties and techniques. *J Orthop Trauma*, 2010, 24: S36–S40
- 41 Bohner M, Lemaire J. Can bioactivity be tested *in vitro* with SBF solution? *Biomaterials*, 2009, 30: 2175–2179
- 42 Sharifi E, Azami M, Kajbafzadeh A M, et al. Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng-C*, 2016, 59: 533–541
- 43 Lin R, Deng C, Li X, et al. Copper-incorporated bioactive glass-ceramics inducing anti-inflammatory phenotype and regeneration of cartilage/bone interface. *Theranostics*, 2019, 9: 6300–6313
- 44 Azevedo M M, Jell G, O'Donnell M D, et al. Synthesis and characterization of hypoxia-mimicking bioactive glasses for skeletal regeneration. *J Mater Chem*, 2010, 20: 8854–8864
- 45 Zhou Y, Han S, Xiao L, et al. Accelerated host angiogenesis and immune responses by ion release from mesoporous bioactive glass. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 3274–3284
- 46 Rath S N, Brandl A, Hiller D, et al. Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 2014, 9: e113319
- 47 Lin Y, Xiao W, Bal B S, et al. Effect of copper-doped silicate 13–93 bioactive glass scaffolds on the response of MC3T3-E1 cells *in vitro* and on bone regeneration and angiogenesis in rat calvarial defects *in vivo*. *Mater Sci Eng-C*, 2016, 67: 440–452
- 48 Jun S K, Yang S A, Kim Y J, et al. Multi-functional nano-adhesive releasing therapeutic ions for MMP-deactivation and remineralization. *Sci Rep*, 2018, 8: 5663

补充材料

表S1 铜掺杂生物活性玻璃分类及相关生物医学应用

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “铜掺杂生物活性玻璃的生物医学应用”

Biomedical applications of copper-impregnated bioactive glass

Yahui Han^{1,2}, Chenguang Liu^{1,2}, Shibin Wang^{1,2} & Aizheng Chen^{1,2*}

¹ Institute of Biomaterials and Tissue Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

² Fujian Provincial Key Laboratory of Biochemical Technology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

* Corresponding author, E-mail: azchen@hqu.edu.cn

Bioactive glass (BG) is generally reckoned as an active constituent that both bonds with skeleton and connects with cartilage. This active material often releases the active ions in a controlled fashion via degradation, which is of particular interest in clinical medicine. However, monodispersed bioactive glass without modification still exists limitations, e.g., aggregation or lower activities both *in vitro* and *in vivo*. Owing to its unique morphology, distinctive cell uptake process, excellent degradation and biomineralization ability, as well as certain high biosafety, functionalized bioactive glass plays a key role in diverse biomedical applications such as bioimaging, gene/drug delivery and wound healing, facilitating the self-repair and regeneration of tissues.

The interesting physicochemical properties of bioactive glass can be adjusted by appropriately selecting active ions, especially metal ions, as impregnated components to alter original bridging oxygen (BO) network to non-bridging oxygen (NBO) structure. In terms of the difference in matrix, bioactive glass is generally divided into three types, i.e., silicate, borate, and phosphate-based architectures. As a universal element in human physiological fluids, copper ions can also be impregnated in the structure of bioactive glass, in which these species not only affect the signal pathway and metabolic activity, but also serve as essential cofactors for many enzymes. After the ion exchange with the surrounding fluidic environment, copper ions can be precisely released at the desired site, minimizing the adverse effects.

On the one hand, the impregnated copper ions inhibit the activity of osteoclast and stimulate the generation and aggregation of collagens, which significantly impact on the formation and healing of skeleton and cartilage. On the other hand, these copper species not only upregulate the expression of fibroblast growth factor (FGF)-2 and hypoxia inducible factor (HIF)-1 α , but also enhance the production of endothelial nitric oxide synthase, subsequently promoting the proliferation and migration of human endothelial cells. In addition, the doped copper species are capable of bonding with mercapto, imidazole, carboxyl and amine, among others, to make changes in the membrane structure, including permeability augmentation and membrane transport dysfunction, indicating efficient antibacterial ability. Besides, hyperthermia process appears due to the photothermal effect after the irradiation of near-infrared. In another case, copper ions participate in Fenton-like reaction under the acidic microenvironment of tumors, converting glutathione to oxidized glutathione, catalyzing the generation of reactive oxygen species (ROS), thus leading to the damage of mitochondria, ultimately inducing the apoptosis of cancer cells.

Currently, it is required to achieve clinical translation from laboratory outcomes. Despite of a series of advantageous features, the biomedical applications of copper-impregnated bioactive glass are still facing great challenges. To further facilitate the superiority of this prospective field, the developmental proposals are systemically discussed in this review. Further, critical discussions on effectively solving the aggregation caused by high-temperature sintering process and the denaturation induced by organic solvent utilization are emphasized. Moreover, the encapsulation mechanisms of certain molecules and compensate for the deficient exertion in cancer therapeutics are elaborated, providing an innovative and uninvase platform in the field of prosperous biomedicine.

copper-impregnated bioactive glass, antibacterial, cancer therapeutics, osteogenesis, angiogenesis

doi: [10.1360/TB-2020-0837](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0837)