

## 氧化镁纳米粒调控成骨与血管生成相关基因表达促进骨缺损愈合

吴妍廷, 李宇, 廖金凤

<https://doi.org/10.12307/2026.030>

投稿日期: 2024-11-22

采用日期: 2025-02-07

修回日期: 2025-04-14

在线日期: 2025-05-13

中图分类号:

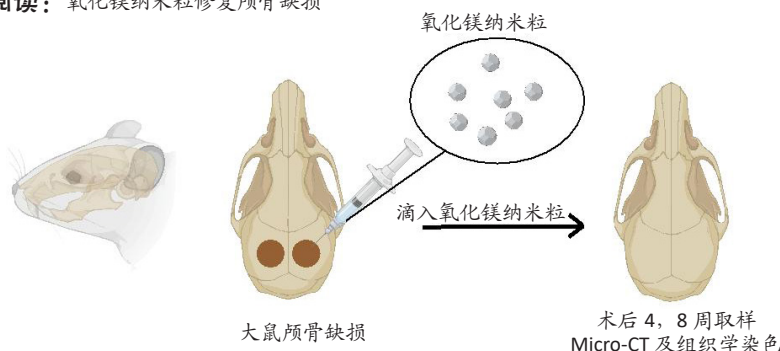
R459.9; R318.08; Q81

文章编号:

2095-4344(2026)00-00000-11

文献标识码: A

## 文章快速阅读: 氧化镁纳米粒修复颅骨缺损



## 文题释义:

**纳米粒:**是指直径在1–100 nm之间的微观颗粒物质, 由于具有小尺寸、高比表面积、量子尺寸效应等特殊性质, 在许多方面表现出与传统宏观材料截然不同的行为和性能。

**磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路:**为细胞内重要的信号转导通路, 调控多种生物学过程, 包括细胞增殖、分化、存活和血管生成。

## 摘要

**背景:**氧化镁纳米粒具有优异的生物相容性、生物可降解性及抗菌性能, 被认为是骨再生材料的潜在候选物。然而, 目前的研究主要集中于氧化镁纳米粒对单一细胞类型的影响, 其对多细胞协同作用的调控机制尚不清楚。

**目的:**探讨氧化镁纳米粒对骨髓间充质干细胞成骨分化和人脐静脉内皮细胞血管生成的调控作用, 验证其在体内骨缺损修复中的实际效果。

**方法:**①采用均匀沉淀法制备氧化镁纳米粒, 表征其粒径、电位、不同储存条件下的稳定性、细胞毒性、血液相容性和大鼠体内急性毒性反应; ②将不同质量浓度(0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )的氧化镁纳米粒分别与大鼠骨髓间充质干细胞共培养, 成骨诱导后进行碱性磷酸酶活性、矿化结节形成、成骨相关基因与磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路表达检测; 利用基质胶实验, 将不同质量浓度(0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )的氧化镁纳米粒分别与人脐静脉内皮细胞共培养, 检测血管生成与血管生成因子表达; ③在24只SD大鼠颅骨两侧各制作1个直径5 mm的圆形骨缺损, 随机分4组干预, 将质量浓度[0(对照), 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ]的氧化镁纳米粒悬液直接注射到骨缺损部位, 每组6只, 术后4, 8周进行骨缺损部位Micro-CT检测, 术后8周进行骨缺损部位苏木精-伊红与Masson染色。

**结果与结论:**①氧化镁纳米粒水合粒径为 $(80\pm 20)$  nm, 多分散指数为0.129, 表面电位为 $(30.29\pm 2.10)$  mV, 在室温条件下储存于PBS中具有良好的粒径与电位稳定性; 氧化镁纳米粒具有良好的细胞相容性与血液相容性, 在大鼠体内急性毒性实验中未见明显组织毒性损伤。②随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加, 大鼠骨髓间充质干细胞内碱性磷酸酶活性、矿化结节形成、成骨相关基因与磷脂酰肌醇3-激酶、磷酸化蛋白激酶B的表达均升高; 随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加, 人脐静脉内皮细胞的血管形成、血管生成因子表达均增加。③Micro-CT检测结果显示, 氧化镁纳米粒处理组骨缺损区域新骨形成显著高于对照组, 并且新骨密度随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加而提高; 苏木精-伊红与Masson染色显示, 随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加, 骨缺损部位骨组织再生、胶原纤维重建及血管生成逐渐改善。④结果表明, 氧化镁纳米粒可能通过调控磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路促进骨髓间充质干细胞的成骨分化和血管生成, 有效促进骨缺损的愈合。

**关键词:**氧化镁纳米粒; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 血管生成; 骨缺损修复; 工程化骨材料

**缩略语:**磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B: phosphoinositide-3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt

## Magnesium oxide nanoparticles regulate osteogenesis- and angiogenesis-related gene expressions to promote bone defect healing

Wu Yanting, Li Yu, Liao Jinfeng

West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Wu Yanting, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

**Corresponding author:** Li Yu, Professor, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China**Corresponding author:** Liao Jinfeng, Professor, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

四川大学华西口腔医院, 四川省成都市 610041

第一作者: 吴妍廷, 女, 1999年生, 四川省成都市人, 汉族, 主要从事生物材料在颅颌面修复方面的研究。

通讯作者: 李宇, 教授, 四川大学华西口腔医院, 四川省成都市 610041

通讯作者: 廖金凤, 教授, 四川大学华西口腔医院, 四川省成都市 610041

<https://orcid.org/0000-0002-2223-1630> (吴妍廷)

**基金资助:**国家自然科学基金项目(32171354), 项目名称: 具有温和磁热效应的磁性纳米粒交联复合水凝胶的构建及其在颅骨缺损修复中的应用基础研究, 项目负责人: 廖金凤

**引用本文:**吴妍廷, 李宇, 廖金凤. 氧化镁纳米粒调控成骨与血管生成相关基因表达促进骨缺损愈合 [J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(00):000-000.



## Abstract

**BACKGROUND:** Magnesium oxide nanoparticles have excellent biocompatibility, biodegradability, and antibacterial properties and are considered to be potential candidates for bone regeneration materials. However, current research mainly focuses on the effects of magnesium oxide nanoparticles on single cell types, and its regulatory mechanism for multi-cell synergy is still unclear.

**OBJECTIVE:** To explore the regulatory effect of magnesium oxide nanoparticles on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells, and to verify its actual effect on bone defect repair in vivo.

**METHODS:** (1) Magnesium oxide nanoparticles were prepared by uniform precipitation method, and their particle size, potential, stability under different storage conditions, cytotoxicity, blood compatibility and acute toxicity in rats were characterized. (2) Magnesium oxide nanoparticles with different mass concentrations (0, 25, 50, and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) were co-cultured with rat bone marrow mesenchymal stem cells. Alkaline phosphatase activity, mineral nodule formation, and expression of osteogenic-related genes and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway were detected after osteogenic induction. Magnesium oxide nanoparticles with different mass concentrations (0, 25, 50, and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) were co-cultured with human umbilical vein endothelial cells using matrigel experiment to detect angiogenesis and expression of angiogenic factors. (3) A circular bone defect with a diameter of 5 mm was made on both sides of the skull of 24 SD rats, and the rats were randomly divided into 4 intervention groups. Magnesium oxide nanoparticle suspensions with mass concentrations of [0 (control), 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ] were directly injected into the bone defect site, with 6 rats in each group. Micro-CT examination of the bone defect site was performed 4 and 8 weeks after surgery. Hematoxylin-eosin staining and Masson staining were performed at the bone defect site 8 weeks after surgery.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The hydrated particle size of magnesium oxide nanoparticles was  $(80\pm 20)$  nm, the polydispersity index was 0.129, and the surface potential was  $(30.29\pm 2.10)$  mV. They had good particle size and potential stability when stored in PBS at room temperature. Magnesium oxide nanoparticles had good cell compatibility and blood compatibility, and no obvious tissue toxicity damage was observed in the acute toxicity experiment in rats. (2) With the increase of the mass concentration of magnesium oxide nanoparticles, the activity of alkaline phosphatase, mineralized nodule formation, the expression of osteogenesis-related genes, phosphatidylinositol 3-kinase, and phosphorylated protein kinase B in rat bone marrow mesenchymal stem cells increased. With the increase of the mass concentration of magnesium oxide nanoparticles, the angiogenesis and angiogenic factor expression of human umbilical vein endothelial cells increased. (3) Micro-CT test results showed that the new bone formation in the bone defect area of the magnesium oxide nanoparticle treatment group was significantly higher than that of the control group, and the new bone density increased with the increase of magnesium oxide nanoparticle mass concentration. Hematoxylin-eosin staining and Masson staining showed that with the increase of magnesium oxide nanoparticle mass concentration, bone tissue regeneration, collagen fiber reconstruction and angiogenesis in the bone defect site gradually improved. (4) The results show that magnesium oxide nanoparticles may promote the osteogenic differentiation and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells by regulating the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B signaling pathway, and effectively promote the healing of bone defects.

**Key words:** magnesium oxide nanoparticles; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; angiogenesis; bone defect repair; engineered bone material

**Funding:** National Natural Science Foundation of China, No. 32171354 (to LJF)

**How to cite this article:** WU YT, LI Y, LIAO JF. Magnesium oxide nanoparticles regulate osteogenesis- and angiogenesis-related gene expressions to promote bone defect healing. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2026;30(00):0000-0000.

## 0 引言 Introduction

骨缺损的修复是骨科和再生医学领域面临的一个重大临床挑战,无论是由于创伤、感染、肿瘤切除还是先天性缺陷所导致的骨缺损,均需要及时、有效的治疗以恢复骨组织的完整性和功能<sup>[1]</sup>。目前,自体骨移植被认为是骨缺损修复的“金标准”,自体骨来源于患者自身,具有良好的生物相容性和骨诱导能力,然而,自体骨移植的应用受到供体来源有限、二次手术创伤及术后并发症(如供体部位疼痛和感染)等问题的限制<sup>[2]</sup>。同种异体骨移植作为另一种选择虽然避免了供体不足的困境,但由于免疫排斥反应和疾病传播的潜在风险临床应用同样受到限制。人工合成骨移植材料尽管在机械性能和稳定性方面表现出优势,但大多数材料缺乏足够的生物活性,难以满足骨组织再生的复杂需求<sup>[3]</sup>。因此,寻找一种具有良好生物相容性、生物活性和骨修复能力的替代材料,成为当前骨组织工程领域的研究热点。

近年来,纳米材料因独特的理化性质和生物学效应在骨组织工程领域展现出巨大的应用潜力<sup>[4-7]</sup>,尤其是金属氧化物纳米粒,作为一种新型的生物活性材料受到了广泛关注<sup>[8-11]</sup>。氧化镁纳米粒具有优异

的生物相容性、生物可降解性及抗菌性能,被认为是骨再生材料的潜在候选物<sup>[12-15]</sup>。研究表明,氧化镁纳米粒可通过释放镁离子发挥作用,而镁离子已被证实能够促进成骨细胞的增殖和分化,从而加速骨再生过程<sup>[16]</sup>;此外,镁离子还可以通过调节细胞内信号通路进一步促进成骨和组织修复<sup>[17-21]</sup>。然而,目前的研究主要集中于氧化镁纳米粒对单一细胞类型的影响,其对多细胞协同作用的调控机制尚不清楚。骨再生是一个高度复杂且动态的过程,涉及多种细胞类型的协同作用。骨髓间充质干细胞是骨再生中最重要的细胞之一,它能够分化为成骨细胞并通过分泌多种生长因子促进骨形成<sup>[22-23]</sup>。另外,血管生成也是骨再生过程中不可或缺的一部分,新生血管不仅为骨组织提供氧气和营养物质,还通过分泌信号分子调控成骨细胞的功能和行为<sup>[24-27]</sup>。人脐静脉内皮细胞是研究血管生成的经典模型,它能够在体外形成管状结构,是评估血管生成能力的重要手段。因此,理想的骨再生策略应同时促进成骨分化和血管生成,以实现骨组织缺损的全面修复<sup>[28]</sup>。

目前,关于氧化镁纳米粒是否能够同时调控骨髓间充质干细胞的成骨分化与人脐静脉内皮细胞的血管生成,以及这种双重调控作用在体内骨缺损修

复中的协同效应,尚缺乏系统研究。此次研究旨在系统探讨氧化镁纳米粒对骨髓间充质干细胞成骨分化和人脐静脉内皮细胞血管生成的调控作用,并验证其在体内骨缺损修复中的实际效果,以期氧化镁纳米粒作为一种新型、多功能骨再生材料的临床应用提供理论依据和实验支持,为骨缺损修复提供了一种新的解决方案。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料的制备与表征,体外细胞观察实验,体内动物实验,组间差异比较采用 *t* 检验或单因素方差分析 (ANOVA)。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 1 月至 2024 年 9 月在四川大学华西口腔医学院口腔疾病与研究全国重点实验室完成。

### 1.3 材料

1.3.1 主要试剂 硝酸镁、氢氧化钠及十二烷基硫酸钠 (阿拉丁);胎牛血清 (Gibco, 货号: 10099141C);  $\alpha$ -MEM 培养基 (Gibco, 货号: C12571500BT);青霉素-链霉素 (Gibco, 货号: 15140122); CD44、CD73、CD34 和 CD45 抗体 (Huabio Biosciences); DMEM 培养基 (ScienCell, 货号: 0401); CCK-8 试剂 (Dojindo, 货号: CK04); 碱性磷酸酶试剂盒 (Beyotime, 货号: P0321S); 茜素红 S 染色定量检测试剂盒 (尚宝生物); 酶联免疫吸附实验试剂盒 (Proteintech, Rosemont, USA); RIPA 裂解液 (Beyotime, 货号: P0013B); BCA 蛋白定量试剂盒 (Beyotime, 货号: P0012); Runx2 抗体 (Abcam, 货号: ab23981); CD31 抗体 (1 : 1 000, Proteintech, 货号: 66828-1-Ig); 血管生成素 1 抗体 (Proteintech, 货号: 26781-1-AP); 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体 (CST, 货号: #4691); p-Akt 抗体 (CST, 货号: #4060); GAPDH 抗体 (Proteintech, 货号: 60004-1-Ig); 茜素红染色试剂 (Sigma-Aldrich, 货号: A5533); Trizol 试剂 (Invitrogen, 货号: 15596026); 苏木精-伊红染色试剂盒 (Beyotime, 货号: C0105S); Masson 染色试剂盒 (Solarbio, 货号: G1340)。

1.3.2 主要仪器 马弗炉 (Thermo Fisher Scientific, 型号: KSL 1700X); 透射电子显微镜 (FEI, 型号: Tecnai G2 F20); 动态光散射仪 (Malvern, 型号 Zetasizer Nano ZS); Zeta 电位分析仪 (Malvern, 型号:

Zetasizer Nano ZS); 酶标仪 (BioTek, 型号: Synergy H1); 流式细胞仪 (BD FACSCanto II); Micro-CT (SCANCO Medical, 型号:  $\mu$ CT 100); 光学显微镜 (Olympus, 型号: BX53)。

1.3.3 实验动物 10 d 龄健康雄性 SD 大鼠 2 只,用于提取骨髓间充质干细胞; 6 周龄雄性 SD 大鼠 15 只, SPF 级, 体质量 180–220 g, 其中 12 只用于氧化镁纳米粒的急性全身毒性实验, 3 只用于血液相容性实验; 6–8 周龄雌性 SD 大鼠 24 只, SPF 级, 体质量约 200 g, 用于氧化镁纳米粒体内骨缺损修复实验。大鼠均购自成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(川)2020-030。动物实验已通过四川大学华西口腔医学院伦理委员会审查 (伦理审查编号: WCHSIRB-D-2024-465)。

### 1.4 方法

1.4.1 氧化镁纳米粒的制备与表征 采用均匀沉淀法制备氧化镁纳米粒。以 20% 硝酸镁溶液作为原料、氢氧化钠作为沉淀剂、十二烷基硫酸钠作为分散剂, 在 pH=13 和 25  $^{\circ}$ C 条件下磁力搅拌反应 2 h, 制备氧化镁沉淀。沉淀完成后, 用去离子水和无水乙醇分别离心洗涤 3 次, 在 60  $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 12 h, 得到氧化镁前驱体。将前驱体在 500  $^{\circ}$ C 马弗炉中煅烧 2 h, 得到氧化镁纳米粒。

材料表征: 使用透射电子显微镜观察氧化镁纳米粒的形貌和微观结构。采用动态光散射仪测量纳米粒子的水合直径、粒径分布与多分散指数。利用 Zeta 电位分析仪检测氧化镁纳米粒的表面电荷。室温条件下将氧化镁纳米粒浸泡在 PBS 中, 在 0, 1, 2, 4 周分别取出 2 mL 混悬液, 检测粒径与 Zeta 电位, 以此评估样品的稳定性。

1.4.2 大鼠骨髓间充质干细胞的提取与培养 从 10 d 龄 SD 大鼠的股骨和胫骨中分离骨髓间充质干细胞, 进行细胞的分离和纯化<sup>[29]</sup>。腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉后处死大鼠, 无菌采集股骨和胫骨, 将骨髓腔中的细胞悬浮于 PBS 中, 通过多次吹打充分混合, 将细胞悬液接种于培养瓶中, 利用贴壁法富集骨髓间充质干细胞, 在含体积分数 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的  $\alpha$ -MEM 培养基 (完全培养基) 中进行培养。将细胞接种于培养瓶中, 放置在 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中, 保证细胞生长所需的恒定温度和湿度。在培养过程中定期更换培养基, 以除去非贴壁细胞和代谢废物, 确保培养环



境的清洁和适宜。传至第3代，获得高纯度和高活力的骨髓间充质干细胞，用于后续实验。

**骨髓间充质干细胞的鉴定：**将第3代骨髓间充质干细胞经0.25%胰蛋白酶-EDTA消化，1 200 r/min离心5 min后弃上清，用PBS重悬细胞，细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ；分别加入含有荧光标记抗体的试管中，包括CD44、CD73、CD34和CD45抗体，以未加抗体的细胞作为阴性对照，混匀后室温避光孵育30 min；用PBS洗涤细胞2次，1 200 r/min离心5 min后弃上清，重悬于500  $\mu\text{L}$  PBS中，采用流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达，使用FlowJo软件进行数据分析，阳性细胞比例超过90%视为阳性标志物高表达。

#### 1.4.3 氧化镁纳米粒的生物安全性评价

**血液相容性实验：**采用分光光度计法评估氧化镁纳米粒的血液相容性。取6周龄SD大鼠3只，腹腔注射1%戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉后心脏采血，加入抗凝剂并稀释，分别与不同质量浓度(0.5, 1.0, 2.0 mg/mL)的氧化镁纳米粒悬浮液(溶剂为生理盐水)等体积混合，与等体积生理盐水混合作为阴性对照组，与等体积去离子水混合设为阳性对照，置于37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 3 000 r/min离心10 min后取上清液，检测545 nm波长下的吸光度值，按照ASTM F756-17标准计算溶血率。溶血率(%)=(实验组吸光度值-阴性对照组吸光度值)/(阳性对照组吸光度值-阴性对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。溶血率<5%为合格，即材料在该实验条件下不具有明显的溶血风险。

**细胞毒性实验：**通过CCK-8法评估氧化镁纳米粒的细胞毒性。将对数生长期的骨髓间充质干细胞接种于96孔板内，细胞密度 $5 \times 10^3/\text{孔}$ ，每孔加入100  $\mu\text{L}$ 完全培养基。培养24 h后，使用含不同质量浓度[0(对照), 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL]氧化镁纳米粒的新鲜培养基替换原培养基。培养24, 48, 72 h后，每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8试剂在37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下继续孵育2 h，使用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度值。

**急性全身毒性实验：**取6周龄SD大鼠12只，采用随机数字表法随机分为对照组与实验组，每组6只。对照组大鼠尾静脉注射1 mL生理盐水，实验组尾静脉注射1 mL氧化镁纳米粒混悬液(100 mg/kg, 溶剂为生理盐水)，观察大鼠注射后14 d内的生理状态，包括精神状态、活动度、饮食饮水情况等。注射第14天，腹腔注射1%戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉后处死大鼠，取主要器官(心、肝、脾、肺、肾)

进行大体观察和称质量，置入40 g/L多聚甲醛溶液中固定，进行苏木精-伊红染色。

**1.4.4 氧化镁纳米粒的体外促成骨作用** 将第3代骨髓间充质干细胞接种于6孔板中，每孔1 mL细胞悬液，细胞密度 $1 \times 10^5/\text{孔}$ ，置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% $\text{CO}_2$ 培养箱中培养。当细胞生长融合达80%时，分别加入不同质量浓度[0(对照), 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]的氧化镁纳米粒，加入含成骨诱导剂(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、10 nmol/L地塞米松)的完全培养基共同培养。成骨诱导培养3, 7 d，采用碱性磷酸酶试剂盒检测细胞碱性磷酸酶活性；成骨诱导培养14, 21 d，采用茜素红染色法检测矿化结节形成，使用茜素红S染色定量检测试剂盒进行定量分析。

**RT-qPCR检测：**成骨诱导培养第7天，提取各组骨髓间充质干细胞总RNA，使用Trizol试剂操作，通过NanoDrop 2000分光光度计测定RNA的浓度和纯度。随后，利用PrimeScript<sup>TM</sup> RT试剂盒将1  $\mu\text{g}$ 总RNA反转录为cDNA。以GAPDH为内参基因，采用SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II作为荧光染料，在StepOnePlus<sup>TM</sup>实时荧光定量PCR系统上检测Runx2、骨钙素、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)催化亚基 $\alpha$ 的mRNA表达，以GAPDH为内参。引物序列见表1。

表1 | RT-qPCR检测引物序列  
Table 1 | RT-qPCR detection primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
GAPDH	正义链: CAG TGC CAG CCT CGT CTC AT	120
	反义链: GGT GAT GGG TTT CCC GTT GA	120
Runx2	正义链: CAT GGC CGG GAA TGA TGA G	140
	反义链: TGT GAA GAC CGT TAT GGT CAA AGT G	140
骨钙素	正义链: TCT GAG TCT GAC AAA GCC TTC AT	110
	反义链: AAG TCC ATT GTT GAG GTA GCG	110
磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 $\alpha$	正义链: ACC ATC ATA CCA CTG CCG AT	135
	反义链: CTG TCG TTC GCT CAT CAT CAC	135

**Western blot检测：**成骨诱导第3天，使用RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白，通过BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜上。PVDF膜用5%脱脂牛奶室温封闭1 h，然后与一抗在4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜：Runx2(1 : 1 000)、p-Akt(1 : 2 000)、Akt(1 : 1 000)和GAPDH(1 : 5 000)；用HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1 : 5 000)在室温下孵育1 h，采用ECL化学发光试剂盒显影，利用Image J软件对条带灰度值定量分析Runx2、p-Akt与Akt蛋白表达。

### 1.4.5 氧化镁纳米粒的体外促血管生成作用

**细胞培养:** 使用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素的 DMEM 培养基培养人脐静脉内皮细胞 (ScienCell, 货号: 8000), 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% $\text{CO}_2$  培养箱中。

**血管形成实验:** 将第 3 代人脐静脉内皮细胞接种于预先铺有基质胶的 24 孔板中, 每孔基质胶 50  $\mu\text{L}$ , 细胞密度  $2 \times 10^4/\text{孔}$ , 分别添加不同质量浓度 (0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的氧化镁纳米粒溶液 50  $\mu\text{L}$  (溶剂为 PBS)。培养 6 h 后, 加入活细胞染料 (Yeasten) 拍摄成管情况, 通过 Image J 软件进行定量分析; 采用酶联免疫吸附实验试剂盒检测各组细胞培养上清液中血管内皮生长因子与血管生成素 1 水平。Western blot 检测 CD31 和血管生成素 1 蛋白表达, 检测方法同上, CD31 和血管生成素 1 蛋白抗体的稀释比例均为 1 : 1 000。

### 1.4.6 氧化镁纳米粒修复大鼠颅骨缺损实验

**骨缺损模型的建立与分组干预:** 取 SD 大鼠 24 只, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉后固定在手术台上, 暴露颅骨区域并进行无菌操作, 使用手术刀切开皮肤和软组织, 暴露骨面, 使用牙科环钻在颅骨两侧各制作一个标准化的圆形骨缺损 (直径 5 mm、深度 2 mm), 随机分 4 组干预, 使用微量注射器向骨缺损区域分别注射不同质量浓度 (0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的氧化镁纳米粒悬液 50  $\mu\text{L}$  (溶剂为 PBS), 每组 6 只。注射完氧化镁纳米粒悬液后, 使用 4-0 可吸收线间断缝合切口。术后将动物放置在温暖、干燥的环境中, 密切观察大鼠恢复情况, 提供必要的护理和饲养条件。

**骨缺损愈合评估:** 术后 4, 8 周, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉后使用 Micro-CT 技术对骨缺损部位进行三维成像, 扫描参数为: 70 kV, 200  $\mu\text{A}$ , 分辨率 18  $\mu\text{m}$ 。扫描完成后, 使用 CTAn 软件进行三维重建和数据分析。术后 8 周, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉后取骨缺损部位组织样本, 置入 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 24 h, 用 10%EDTA 脱钙 8 周, 进行石蜡包埋和切片 (5  $\mu\text{m}$  厚), 分别进行苏木精-伊红和 Masson 染色, 置于光学显微镜下观察。

**1.5 主要观察指标** 氧化镁纳米粒的生物完全性、体外促成骨与促血管生成作用以及体内促骨生成作用。

**1.6 统计学分析** 使用 GraphPad Prism 9.5.0 进行数据分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异比较采用  $t$  检验

或单因素方差分析 (ANOVA),  $P < 0.05$  认为差异有显著性意义。数据绘图和结果展示使用 GraphPad Prism 软件。该文统计学方法已经四川大学华西口腔医院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 氧化镁纳米粒的表征结果** 氧化镁纳米粒的水合粒径为  $(80 \pm 20) \text{ nm}$  (图 1A), 多分散指数为 0.129, 表明氧化镁纳米粒的粒径分布均匀。Zeta 电位测试结果显示氧化镁纳米粒表面电位为  $(30.29 \pm 2.10) \text{ mV}$  (图 1B), Zeta 电位绝对值在 30 mV 以上为纳米粒在水溶液中具有稳定的稳定性, 结果表明氧化镁纳米粒在水溶液中具有稳定的稳定性。进一步检测发现, 在室温条件下储存 1 个月后, 氧化镁纳米粒的粒径和 Zeta 电位均未出现显著变化 (图 1C, D), 表现出良好的储存稳定性。透射电镜图像显示氧化镁纳米粒呈类球形, 粒径分布在 50–100 nm 范围内, 颗粒分散性良好, 与动态光散射仪检测数据基本一致; 元素分布图像显示 Mg 和 O 元素均匀分布 (图 2), 证实该纳米粒的化学成分为氧化镁且纯度较高。综上, 制备的氧化镁纳米粒具备均一的粒径分布、优异的稳定性和高纯度。

**2.2 氧化镁纳米粒的生物安全性评价结果** CCK-8 检测结果显示, 不同质量浓度 (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL) 氧化镁纳米粒对骨髓间充质干细胞的细胞增殖影响较小 (图 3A), 表明氧化镁纳米粒具有良好的细胞相容性。溶血实验显示, 不同质量浓度氧化镁纳米粒的溶血率均小于 5% (图 3B), 符合国际标准, 表明氧化镁纳米粒具有优异的血液相容性。大鼠体内急性毒性实验结果显示, 经静脉注射氧化镁纳米粒后大鼠的生理状态和体质量无异常变化, 主要器官的病理切片也未发现毒性损伤 (图 4)。综合以上结果, 氧化镁纳米粒在体外和体内实验中均表现出良好的生物相容性, 为其在生物医学应用中提供了安全性保障。

**2.3 氧化镁纳米粒对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响** 流式细胞术检测结果显示, 分离培养的细胞高表达骨髓间充质干细胞的典型阳性标志物 CD44(95.3%) 和 CD73(94.3%), 而低表达造血细胞特异的阴性标志物 CD34(4.02%) 和 CD45(3.97%), 见图 5, 表明所分离的细胞符合骨髓间充质干细胞的表型特征, 具有较高的纯度和特异性。



碱性磷酸酶染色结果显示,成骨诱导培养第 3, 7 天,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,骨髓间充质干细胞内碱性磷酸酶染色加深(图 6A);定量分析结果显示,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,骨髓间充质干细胞内碱性磷酸酶活性升高(图 6B)。茜素红染色结果显示,成骨诱导培养第 14, 21 天,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,骨髓间充质干细胞矿化结节形成数量和大小增加(图 7A);定量分析结果显示,成骨诱导培养第 14, 21 天,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,骨髓间充质干细胞的矿化结节形成增加(图 7B)。这些结果表明,氧化镁纳米粒促进了骨髓间充质干细胞的成骨分化和矿化能力。

RT-qPCR 检测结果显示,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,骨髓间充质干细胞内 Runx2、骨钙素、PI3K 催化亚基  $\alpha$  的 mRNA 表达均升高(图 8),表明氧化镁纳米粒可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路调控成骨相关基因的表达,进而促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化,为其成骨机制提供了重要分子依据。

Western blot 检测结果显示,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,骨髓间充质干细胞内 p-Akt/Akt 比值及下游 Runx2 蛋白表达升高(图 9),表明氧化镁纳米粒可能通过激活骨髓间充质干细胞中的 PI3K/Akt 信号通路促进成骨分化。

**2.4 氧化镁纳米粒对血管生成的影响** 人脐静脉内皮细胞 6 h 成管实验结果显示,不同质量浓度氧化镁纳米粒促进了人脐静脉内皮细胞的管状结构形成,特别是在 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度下管状结构最为完整、分支点数量最多(图 10)。酶联免疫吸附实验结果显示,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,人脐静脉内皮细胞内血管内皮生长因子和血管生成素 1 水平升高(图 11A, B)。Western blot 检测结果显示,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,人脐静脉内皮细胞内 CD31 和血管生成素 1 蛋白表达升高(图 11C-E)。结果表明,氧化镁纳米粒可通过上调血管生成相关因子的表达显著增强内皮细胞的血管生成能力。

**2.5 氧化镁纳米粒修复大鼠颅骨缺损实验结果** 为了评估氧化镁纳米粒在体内的促骨再生效果,此次实验建立了大鼠颅骨临界骨缺损模型(直径 5 mm)<sup>[11]</sup>,然后将不同质量浓度的氧化镁纳米粒悬浮液注射到

骨缺损部位。

**2.5.1 实验动物数量分析** 24 只大鼠全部进入结果分析。

**2.5.2 骨缺损部位 Micro-CT 检测** 术后 4, 8 周,氧化镁纳米粒处理组骨缺损区域新骨形成显著高于对照组,并且新骨密度随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加而逐渐提高(图 12A)。定量分析结果显示,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,骨缺损部位的新骨体积分数和骨小梁厚度升高,骨小梁结构模型指数降低(图 12B)。表明氧化镁纳米粒可通过增强骨小梁质量促进新骨形成。

**2.5.3 骨缺损部位组织学分析** 术后 8 周,苏木精-伊红染色结果显示,0  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组骨缺损区域主要被纤维结缔组织填充,未见新骨形成;25  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组可见新骨生成,主要为结构松散的编织骨;50  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组可见明显的新骨形成,编织骨逐渐转变为更加成熟的板层骨;100  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组新骨生成最为明显,骨缺损区域几乎被板层骨完全填充,骨组织排列规则,修复效果最佳,见图 13。

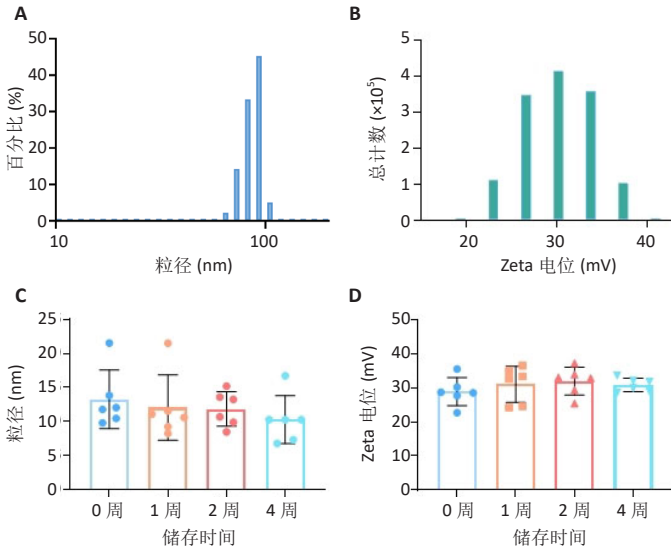
术后 8 周,Masson 染色结果显示,0  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组胶原纤维稀疏且无序,缺乏新骨结构特征;25  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组胶原纤维稍显增加,但排列仍较为松散;50  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组胶原纤维显著增多,呈现出较为有序的排列,同时血管生成明显;100  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组胶原纤维排列最为致密有序,并伴随大量血管生成,见图 13,为骨再生提供了理想的环境。

结果表明,随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加,骨缺损部位骨组织再生、胶原纤维重建及血管生成均显著改善,最终在 100  $\mu\text{g/mL}$  氧化镁纳米粒组达到最佳修复效果。

### 3 讨论 Discussion

此次研究系统评估了氧化镁纳米粒在体外对骨髓间充质干细胞成骨分化和人脐静脉内皮细胞血管生成的调控作用,在大鼠颅骨缺损模型中验证了其促进骨缺损修复的有效性,结果表明氧化镁纳米粒能显著促进成骨分化与血管生成,可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路加速骨缺损的修复。

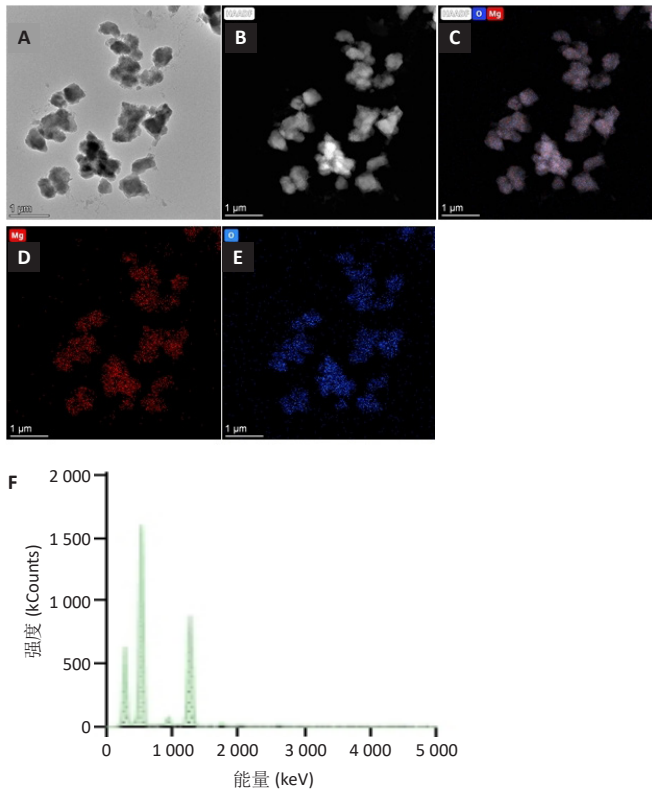
此次研究成功制备了粒径为 50–100 nm、水合粒径约为 80 nm、Zeta 电位为 30.29 mV 的氧化镁纳



图注：图 A 为氧化镁纳米颗粒粒径分布的动态光散射仪检测结果；B 为氧化镁纳米颗粒的 Zeta 电位；C 为室温条件下氧化镁纳米颗粒在 PBS 中储存不同时间的粒径变化，4 周内粒径无明显变化；D 为室温条件下氧化镁纳米颗粒在 PBS 中储存不同时间的 Zeta 电位变化，4 周内 Zeta 电位无明显变化。

图 1 | 氧化镁纳米颗粒的粒径及电位表征

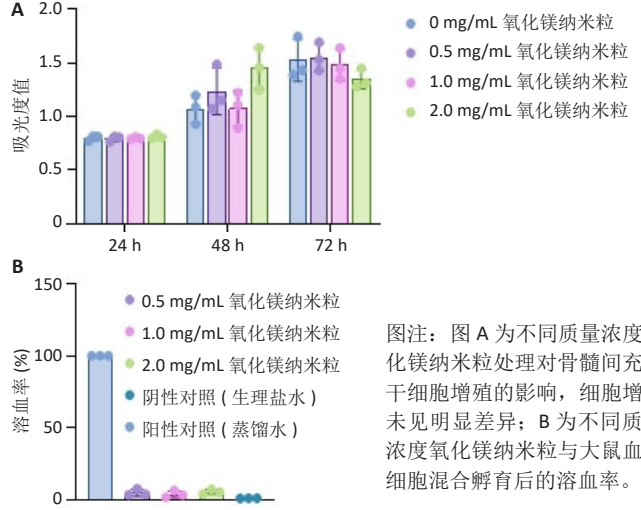
Figure 1 | Characterization of the size and zeta potential of magnesium oxide nanoparticles



图注：图 A 为氧化镁纳米颗粒的透射电镜图像；B 为氧化镁纳米颗粒的高角环形暗场图像 (HAADF 图像)；C 为氧化镁纳米颗粒的 HAADF 及镁元素、氧元素分布图像的重叠图；D 为镁元素分布图像；E 为氧元素分布图像；F 为基于能量散射谱分析的元素相对含量分布直方图，展示样品中各元素的浓度比例。

图 2 | 氧化镁纳米颗粒的透射电镜 -Mapping 元素分布

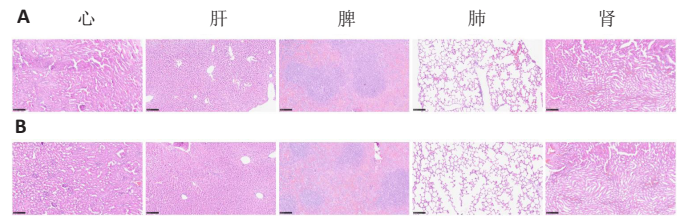
Figure 2 | Transmission electron microscopy-mapping element distribution of magnesium oxide nanoparticles



图注：图 A 为不同质量浓度氧化镁纳米颗粒处理对骨髓间充质干细胞增殖的影响，细胞增殖未见明显差异；B 为不同质量浓度氧化镁纳米颗粒与小鼠红细胞混合孵育后的溶血率。

图 3 | 氧化镁纳米颗粒的体外生物毒性验证

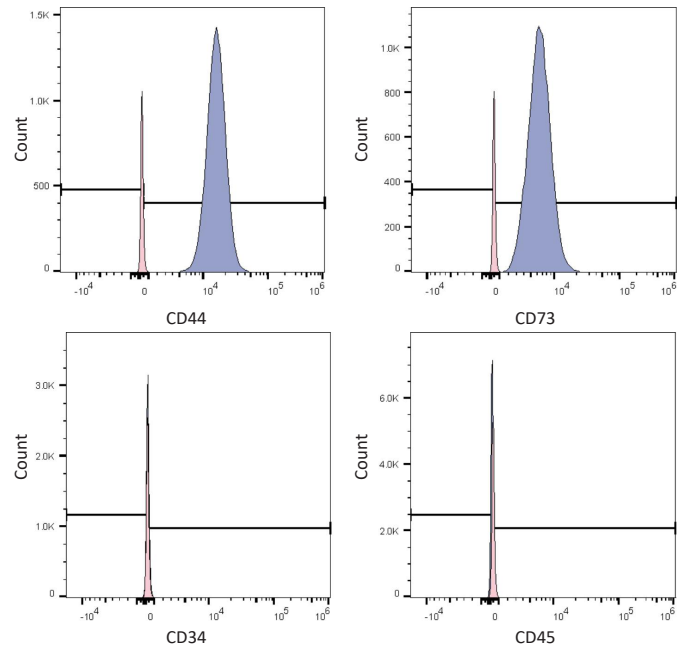
Figure 3 | In vitro biological toxicity verification of magnesium oxide nanoparticles



图注：图 A 为对照组大鼠主要脏器 (心、肝、脾、肺、肾) 的苏木精 - 伊红染色切片；B 为氧化镁纳米颗粒组大鼠主要脏器 (心、肝、脾、肺、肾) 的苏木精 - 伊红染色切片，未发现毒性损伤。标尺：100  $\mu$ m。

图 4 | 氧化镁纳米颗粒尾静脉注射对大鼠主要脏器的影响

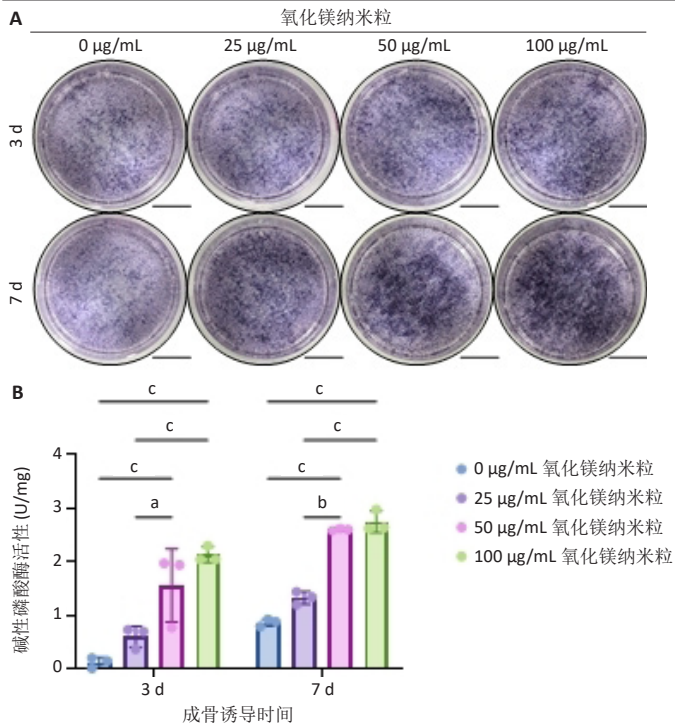
Figure 4 | Effects of tail vein injection of magnesium oxide nanoparticles on the main organs of rats



图注：高表达骨髓间充质干细胞的典型阳性标志物 CD44(95.3%) 和 CD73(94.3%)，而低表达造血细胞特异的阴性标志物 CD34(4.02%) 和 CD45(3.97%)。

图 5 | 骨髓间充质干细胞表面标志物的流式细胞检测结果

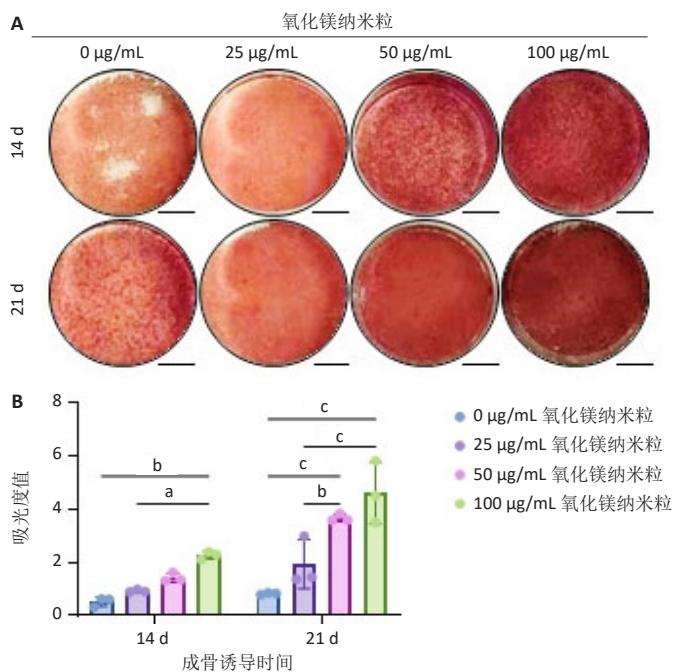
Figure 5 | Flow cytometry results of surface markers of bone marrow mesenchymal stem cells



图注：图 A 为不同质量浓度氧化镁纳米颗粒与骨髓间充质干细胞成骨诱导后 3, 7 d 的碱性磷酸酶染色图像 (标尺: 500 µm); B 为碱性磷酸酶染色定量分析结果, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ , <sup>c</sup> $P < 0.0001$ 。

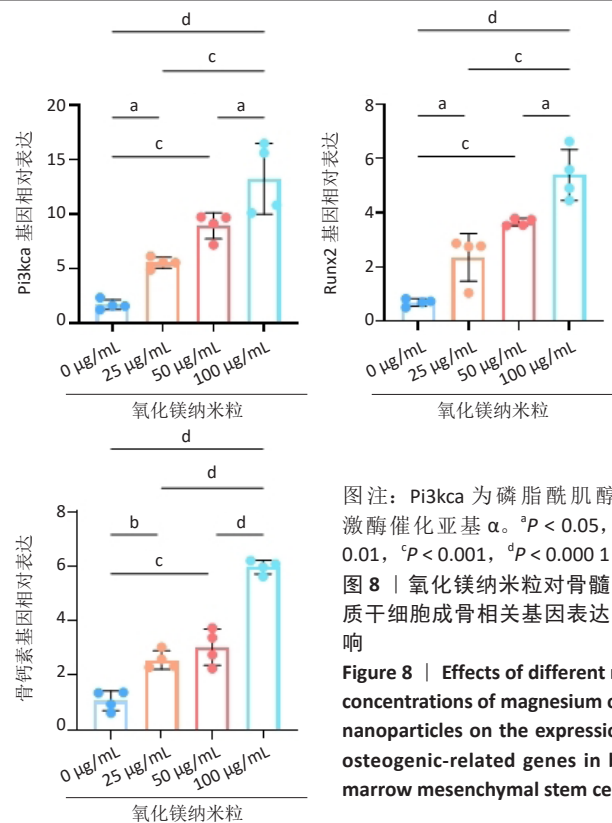
图 6 | 氧化镁纳米粒对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 (碱性磷酸酶染色)

Figure 6 | Effect of magnesium oxide nanoparticles on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (alkaline phosphatase staining)



图注：图 A 为不同质量浓度氧化镁纳米颗粒与骨髓间充质干细胞成骨诱导培养 14, 21 d 后的茜素红染色图像 (标尺: 500 µm); B 为茜素红染色定量分析结果, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.0001$ 。

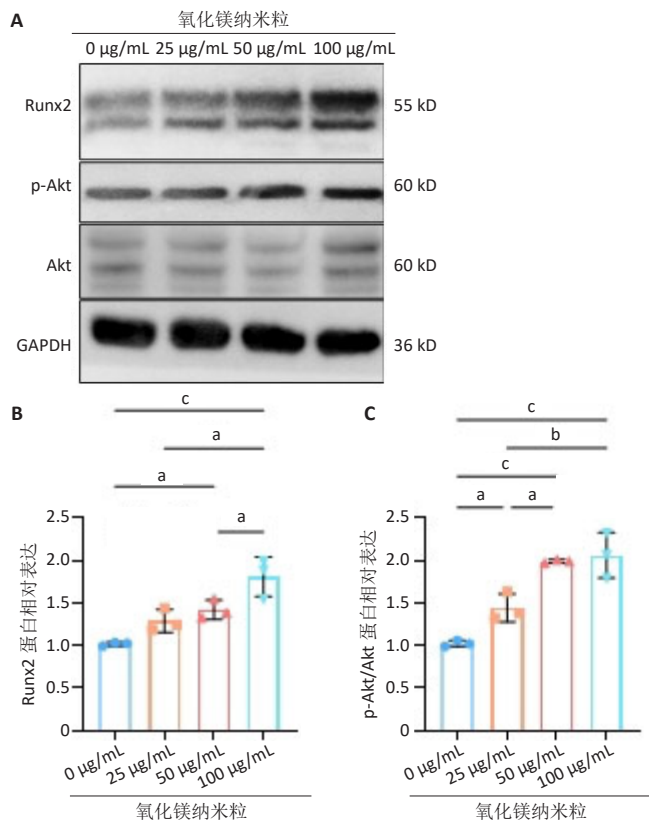
图 7 | 氧化镁纳米粒对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 (茜素红染色)  
Figure 7 | Effect of magnesium oxide nanoparticles on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (Alizarin red staining)



图注：Pi3kca 为磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基  $\alpha$ 。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ , <sup>d</sup> $P < 0.0001$ 。

图 8 | 氧化镁纳米粒对骨髓间充质干细胞成骨相关基因表达的影响

Figure 8 | Effects of different mass concentrations of magnesium oxide nanoparticles on the expression of osteogenic-related genes in bone marrow mesenchymal stem cells

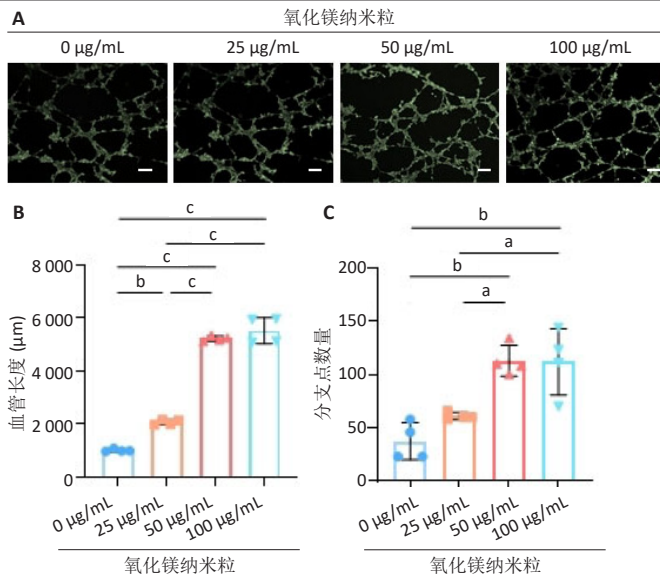


图注：图 A 为不同质量浓度氧化镁纳米颗粒与骨髓间充质干细胞成骨诱导培养 7 d 后的 p-Akt、Akt 和 Runx2 蛋白表达免疫印迹图; B, C 为 Runx2、p-Akt/Akt 比值的定量分析结果, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ 。

图 9 | 氧化镁纳米粒对骨髓间充质干细胞中磷脂酰肌醇-3-激酶 / 蛋白激酶 B(Akt) 信号通路的影响

Figure 9 | Effects of magnesium oxide nanoparticles on the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B signaling pathway in bone marrow mesenchymal stem cells

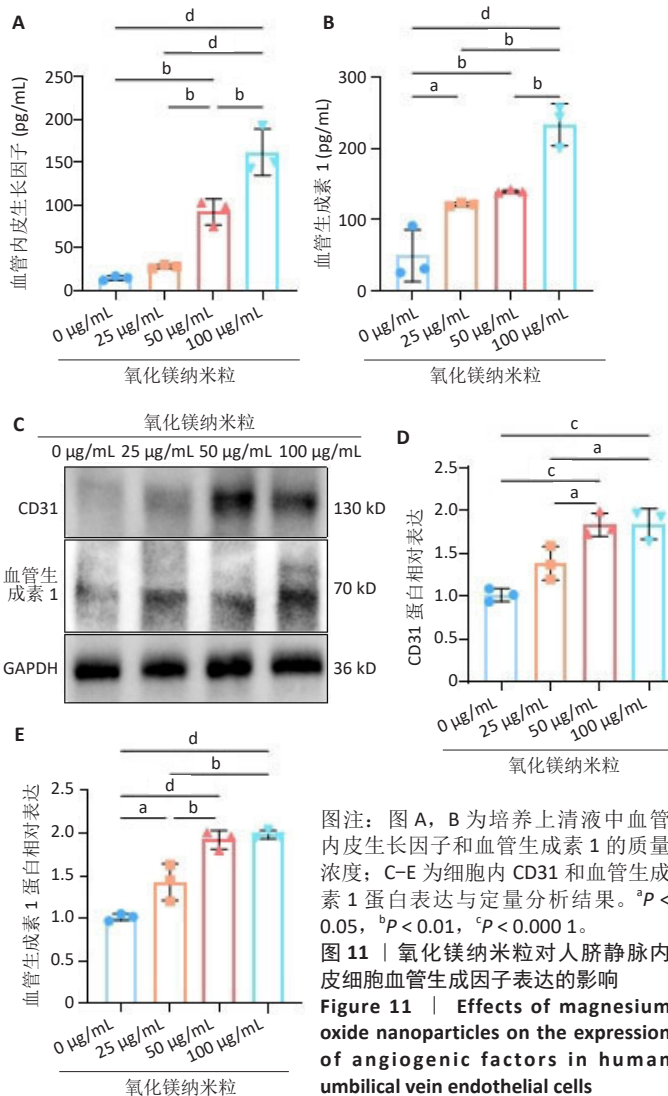




图注：图 A 为不同质量浓度氧化镁纳米粒处理人脐静脉内皮细胞 6 h 后的血管生成图像，标尺：250 µm；B 为血管生成管长定量分析结果；C 为血管生成分支点数量定量分析结果。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ , <sup>c</sup> $P < 0.0001$ 。

图 10 | 氧化镁纳米粒对人脐静脉内皮细胞血管生成的影响

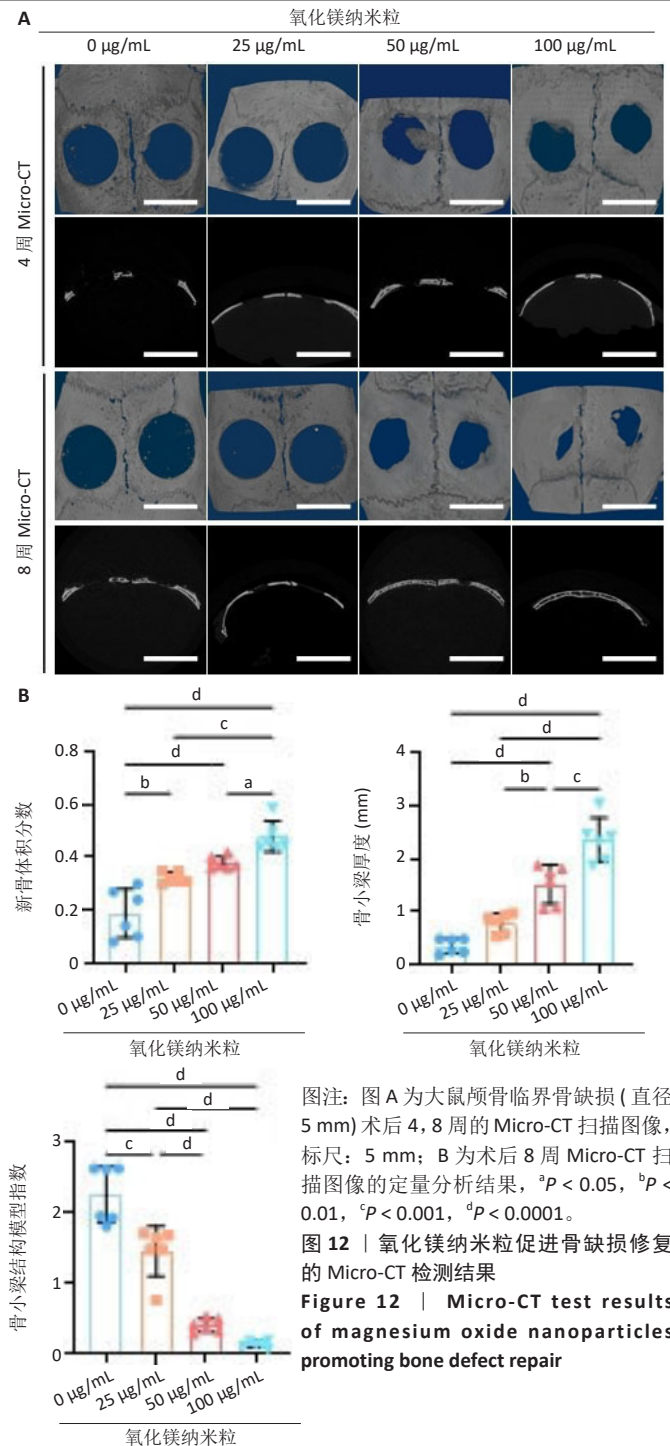
Figure 10 | Effects of different mass concentrations of magnesium oxide nanoparticles on angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells



图注：图 A, B 为培养上清液中血管内皮生长因子和血管生成素 1 的质量浓度；C-E 为细胞内 CD31 和血管生成素 1 蛋白表达与定量分析结果。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.0001$ 。

图 11 | 氧化镁纳米粒对人脐静脉内皮细胞血管生成因子表达的影响

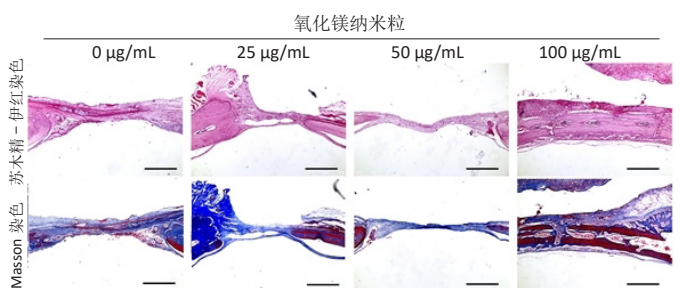
Figure 11 | Effects of magnesium oxide nanoparticles on the expression of angiogenic factors in human umbilical vein endothelial cells



图注：图 A 为大鼠颅骨临界骨缺损 (直径 5 mm) 术后 4, 8 周的 Micro-CT 扫描图像，标尺：5 mm；B 为术后 8 周 Micro-CT 扫描图像的定量分析结果。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ , <sup>d</sup> $P < 0.0001$ 。

图 12 | 氧化镁纳米粒促进骨缺损修复的 Micro-CT 检测结果

Figure 12 | Micro-CT test results of magnesium oxide nanoparticles promoting bone defect repair



图注：随着氧化镁纳米粒质量浓度的增加，骨缺损部位骨组织再生、胶原纤维重建及血管生成均显著改善，最终在 100 µg/mL 氧化镁纳米粒组达到最佳修复效果。标尺：100 µm。

图 13 | 氧化镁纳米粒促进骨缺损修复的组织学染色结果

Figure 13 | Histological staining results of magnesium oxide nanoparticles with different mass concentrations promoting bone defect repair

米粒, 该纳米粒良好的分散性和稳定性确保了其在生物系统中的功能发挥。已有研究指出, 粒径较小且表面带正电荷的纳米粒更容易与细胞膜发生相互作用, 从而增强细胞内吞效率并提高生物活性<sup>[30-33]</sup>, 此次研究结果与此一致, 证实了氧化镁纳米粒的理化特性直接促进了细胞内成骨和血管生成信号的激活。在生物安全性方面, 此次研究发现氧化镁纳米粒在 0–2.0 mg/mL 质量浓度范围内对骨髓间充质干细胞无显著毒性作用, 并且体内急性毒性实验中未见明显组织毒性损伤。与此前研究报道的镁基材料相比, 氧化镁纳米粒具备更优异的生物相容性, 同时避免了镁合金在降解过程中可能引起的局部 pH 值显著升高不利影响<sup>[34-37]</sup>。在功能评价方面, 氧化镁纳米粒显著增强了骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶活性和矿化能力, 上调了关键成骨基因的表达, 这与先前研究中镁离子在促进成骨分化的作用相一致<sup>[38-40]</sup>。进一步的研究表明, 氧化镁纳米粒还能促进人脐静脉内皮细胞的成管能力, 通过上调血管内皮生长因子和血管生成素 1 的表达增强血管生成。血管生成对骨修复至关重要, 不仅为骨组织提供营养和氧气, 还通过血管–骨耦合作用调控成骨过程<sup>[41-44]</sup>。与以往研究相比, 此次研究的亮点在于揭示了氧化镁纳米粒在成骨和血管生成双重调控中的协同作用。在大鼠颅骨临界骨缺损模型中, 氧化镁纳米粒显著提高了新骨形成速度和骨密度, 并且在术后 8 周表现出浓度依赖性效果, 进一步验证了纳米材料在骨再生中的潜在价值<sup>[45-46]</sup>。结合体内实验和分子机制探讨, 此次研究发现氧化镁纳米粒的促骨效应可能主要通过激活 PI3K/Akt 信号通路实现。PI3K/Akt 信号通路是调控成骨分化和血管生成的关键信号网络<sup>[47-50]</sup>。此次研究证明氧化镁纳米粒能提高 p-Akt 的蛋白表达比例, 从而调控下游成骨基因和血管生成因子的表达, 这一结果不仅扩展了对氧化镁纳米粒的分子机制理解, 还为其临床应用提供了理论支持。

该研究仍存在一些局限性: 机制研究主要通过观察 PI3K/Akt 信号通路的激活来推测其作用, 未来研究需结合通路抑制剂 (如 LY294002) 进一步验证其因果关系; 研究仅限于短期实验观察, 尚未系统评估氧化镁纳米粒在体内长期存在对组织的潜在影响; 仅以颅骨缺损模型为基础的研究未能全面覆盖其他类型骨缺损的应用场景, 例如长骨骨折或关节骨修

复, 未来研究可在更复杂的骨损伤模型中进一步验证氧化镁纳米粒的适用性。

综上所述, 此次研究全面揭示了氧化镁纳米粒在成骨和血管生成中的双重调控作用, 验证了其在体内加速骨缺损修复的有效性。与现有研究相比, 此次研究系统验证了氧化镁纳米粒的多功能性及其潜在临床价值, 未来工作将致力于优化制备工艺, 探索其在复杂骨修复中的应用潜力, 并评估其长期安全性, 为氧化镁纳米粒向临床转化奠定基础。

此次研究结果表明, 氧化镁纳米粒可能通过 PI3K/Akt 信号通路显著促进骨髓间充质干细胞的成骨分化和血管内皮细胞的血管生成, 加速骨缺损修复。氧化镁纳米粒具备良好的生物相容性和显著的生物活性, 在体内外均表现出促进成骨和血管生成的双重作用, 为它作为新型骨修复材料的开发提供了有力支持, 为骨缺损治疗提供了新策略, 同时奠定了氧化镁纳米粒在骨组织工程领域中的理论和实验基础。

**作者贡献:** 廖金凤进行实验设计, 实验实施为吴妍廷, 实验评估为吴妍廷, 资料收集为吴妍廷, 吴妍廷成文, 李宇、廖金凤审核。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名–非商业性使用–相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

- [1] WU Y, ZHANG X, ZHAO Q, et al. Role of Hydrogels in Bone Tissue Engineering: How Properties Shape Regeneration. *J Biomed Nanotechnol.* 2020;16(12):1667-1686.
- [2] YANG Y, CHU L, YANG S, et al. Dual-functional 3D-printed composite scaffold for inhibiting bacterial infection and promoting bone regeneration in infected bone defect models. *Acta Biomater.* 2018;79:265-275.
- [3] PENG Z, WANG C, LIU C, et al. 3D printed polycaprolactone/beta-tricalcium phosphate/magnesium peroxide oxygen releasing scaffold enhances osteogenesis and implanted BMSCs survival in repairing the large bone defect. *J Mater Chem B.* 2021;9(28):5698-5710.
- [4] FAN J, PARK H, LEE MK, et al. Adipose-Derived Stem Cells and BMP-2 Delivery in Chitosan-Based 3D Constructs to Enhance Bone Regeneration in a Rat Mandibular Defect Model. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(15–16):2169-2179.
- [5] YAO H, ZOU Y, YANG K, et al. TGFβ1 induces bone formation from BMP9-activated Bone Mesenchymal Stem Cells, with possible involvement of non-canonical pathways. *Int J Med Sci.* 2020;17(12):1692-1703.
- [6] XIAO X, XU M, YU H, et al. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):354.

- [7] FENG Y, HAN Z, JIANG W, et al. Promotion of osteogenesis in BMSC under hypoxia by ATF4 via the PERK-eIF2 $\alpha$  signaling pathway. *Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2022;58(10):886-897.
- [8] ZHAO Y, MENG L, ZHANG K, et al. Ultra-small nanodots coated with oligopeptides providing highly negative charges to enhance osteogenic differentiation of hBMSCs better than osteogenic induction medium. *Chin Chem Lett.* 2021;32(1):266-270.
- [9] DIAS AM, DO NASCIMENTO CANHAS I, BRUZIQUESI CGO, et al. Magnesium (Mg<sup>2+</sup>), Strontium (Sr<sup>2+</sup>), and Zinc (Zn<sup>2+</sup>) Co-substituted Bone Cements Based on Nano-hydroxyapatite/Monetite for Bone Regeneration. *Biol Trace Elem Res.* 2023;201(6):2963-2981.
- [10] FU M, YANG C, SUN G. Recent advances in immunomodulatory hydrogels biomaterials for bone tissue regeneration. *Mol Immunol.* 2023;163:48-62.
- [11] LV Z, HU T, BIAN Y, et al. A MgFe-LDH Nanosheet-Incorporated Smart Thermo-Responsive Hydrogel with Controllable Growth Factor Releasing Capability for Bone Regeneration. *Adv Mater.* 2023;35(5):e2206545.
- [12] LU X, SHI S, LI H, et al. Magnesium oxide-crosslinked low-swelling citrate-based mussel-inspired tissue adhesives. *Biomaterials.* 2020;232:119719.
- [13] KANG Y, XU C, MENG L, et al. Exosome-functionalized magnesium-organic framework-based scaffolds with osteogenic, angiogenic and anti-inflammatory properties for accelerated bone regeneration. *Bioact Mater.* 2022;18:26-41.
- [14] TARAFDER S, DERNELL WS, BANDYOPADHYAY A, et al. SrO- and MgO-doped microwave sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds: mechanical properties and in vivo osteogenesis in a rabbit model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;103(3):679-690.
- [15] XIONG Y, LIN Z, BU P, et al. A Whole-Course-Repair System Based on Neurogenesis-Angiogenesis Crosstalk and Macrophage Reprogramming Promotes Diabetic Wound Healing. *Adv Mater.* 2023;35(19):e2212300.
- [16] DAI Y, WU J, WANG J, et al. Magnesium Ions Promote the Induction of Immunosuppressive Bone Microenvironment and Bone Repair through HIF-1 $\alpha$ -TGF- $\beta$  Axis in Dendritic Cells. *Small.* 2024;20(33):e2311344.
- [17] HU X, CHEN J, YANG S, et al. 3D Printed Multifunctional Biomimetic Bone Scaffold Combined with TP-Mg Nanoparticles for the Infectious Bone Defects Repair. *Small.* 2024;20(40):e2403681.
- [18] MAO J, SUN Z, WANG S, et al. Multifunctional Bionic Periosteum with Ion Sustained-Release for Bone Regeneration. *Adv Sci (Weinh).* 2024;11(39):e2403976.
- [19] LI J, WU J, LIU F, et al. Magnesium-Organic Framework-Loaded Bisphosphonate-Functionalized Gel Scaffolds for Enhanced Bone Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng.* 2023;9(12):6849-6859.
- [20] LIU L, WANG F, SONG W, et al. Magnesium promotes vascularization and osseointegration in diabetic states. *Int J Oral Sci.* 2024;16(1):10.
- [21] SHU M, WANG J, XU Z, et al. Targeting nanoplatfrom synergistic glutathione depletion-enhanced chemodynamic, microwave dynamic, and selective-microwave thermal to treat lung cancer bone metastasis. *Bioact Mater.* 2024;39:544-561.
- [22] GAO G, JIANG YW, JIA HR, et al. Near-infrared light-controllable on-demand antibiotics release using thermo-sensitive hydrogel-based drug reservoir for combating bacterial infection. *Biomaterials.* 2019;188:83-95.
- [23] FENTON OS, OLAFSON KN, PILLAI PS, et al. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Adv Mater.* 2018;30(29):1705328.
- [24] LI J, WEI G, LIU G, et al. Regulating Type H Vessel Formation and Bone Metabolism via Bone-Targeting Oral Micro/Nano-Hydrogel Microspheres to Prevent Bone Loss. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(15):e2207381.
- [25] ZOU D, ZHANG Z, HE J, et al. Blood vessel formation in the tissue-engineered bone with the constitutively active form of HIF-1 $\alpha$  mediated BMSCs. *Biomaterials.* 2012;33(7):2097-2108.
- [26] MEURY T, VERRIER S, ALINI M. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem.* 2006;98(4):992-1006.
- [27] QIN Q, LEE S, PATEL N, et al. Neurovascular coupling in bone regeneration. *Exp Mol Med.* 2022;54(11):1844-1849.
- [28] ALAIZERI ZM, ALHADLAQ HA, ALDAWOOD S, et al. Facile Synthesis, Characterization, Photocatalytic Activity, and Cytotoxicity of Ag-Doped MgO Nanoparticles. *Nanomater Basel Switz.* 2021;11(11):2915.
- [29] HE L, HE T, XING J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):276.
- [30] DZAMUKOVA M, BRUNNER TM, MIOTLA-ZAREBSKA J, et al. Mechanical forces couple bone matrix mineralization with inhibition of angiogenesis to limit adolescent bone growth. *Nat Commun.* 2022;13(1):3059.
- [31] RIBATTI D, D'AMATI A. Bone angiocrine factors. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1244372.
- [32] DARVISHI B, DINARVAND R, MOHAMMADPOUR H, et al. Dual L-Carnosine/ Aloe vera Nanophytosomes with Synergistically Enhanced Protective Effects against Methylglyoxal-Induced Angiogenesis Impairment. *Mol Pharm.* 2021;8(9):3302-3325.
- [33] VEIS A. Mineral-matrix interactions in bone and dentin. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S493-497.
- [34] ZHENG L, ZHAO S, LI Y, et al. Engineered MgO nanoparticles for cartilage-bone synergistic therapy. *Sci Adv.* 2024;10(10):eadk6084.
- [35] ZHENG G, XIE J, YAO Y, et al. MgO@polydopamine Nanoparticle-Loaded Photothermal Microneedle Patches Combined with Chitosan Gel Dressings for the Treatment of Infectious Wounds. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2024;16(10):12202-12216.
- [36] GAO Y, WANG Y, ZHANG J, et al. Advancing neural regeneration via adaptable hydrogels: Enriched with Mg<sup>2+</sup> and silk fibroin to facilitate endogenous cell infiltration and macrophage polarization. *Bioact Mater.* 2024;33:100-113.
- [37] ZHANG B, LI KY, JIANG LC, et al. Rib Composite Flap With Intercostal Nerve and Internal Thoracic Vessels for Mandibular Reconstruction. *J Craniofac Surg.* 2016;27(7):1815-1818.
- [38] XU J, HE SJ, XIA TT, et al. Targeting type H vessels in bone-related diseases. *J Cell Mol Med.* 2024;28(4):e18123.
- [39] LIU Z, HUANG L, QI L, et al. Activating Angiogenesis and Immunoregulation to Propel Bone Regeneration via Deferoxamine-Laden Mg-Mediated Tantalum Oxide Nanoplatfrom. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2024;16(19):24384-24397.
- [40] LI Q, LIU W, HOU W, et al. Micropatterned photothermal double-layer periosteum with angiogenesis-neurogenesis coupling effect for bone regeneration. *Mater Today Bio.* 2022;18:100536.
- [41] SARKER M, IZADIFAR M, SCHREYER D, et al. Influence of ionic crosslinkers (Ca<sup>2+</sup>/Ba<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>) on the mechanical and biological properties of 3D Bioploted Hydrogel Scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2018;29(10):1126-1154.
- [42] YAN C, ZHANG P, QIN Q, et al. 3D-printed bone regeneration scaffolds modulate bone metabolic homeostasis through vascularization for osteoporotic bone defects. *Biomaterials.* 2024;311:122699.
- [43] LIAO P, CHEN L, ZHOU H, et al. Osteocyte mitochondria regulate angiogenesis of transcortical vessels. *Nat Commun.* 2024;15(1):2529.
- [44] LIU M, WANG R, LIU J, et al. Incorporation of magnesium oxide nanoparticles into electrospun membranes improves pro-angiogenic activity and promotes diabetic wound healing. *Biomater Adv.* 2022;133:112609.
- [45] ASKAR MA, THABET NM, EL-SAYYAD GS, et al. Dual Hyaluronic Acid and Folic Acid Targeting pH-Sensitive Multifunctional 2DG@DCA@MgO-Nano-Core-Shell-Radiosensitizer for Breast Cancer Therapy. *Cancers.* 2021;13(21):5571.
- [46] LI X, COATES DE. Hollow channels scaffold in bone regenerative: a review. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2023;34(12):1702-1715.
- [47] LIU M, WANG R, LIU J, et al. Incorporation of magnesium oxide nanoparticles into electrospun membranes improves pro-angiogenic activity and promotes diabetic wound healing. *Biomater Adv.* 2022;133:112609.
- [48] SUN TW, YU WL, ZHU YJ, et al. Hydroxyapatite Nanowire@Magnesium Silicate Core-Shell Hierarchical Nanocomposite: Synthesis and Application in Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(19):16435-16447.
- [49] YOSHIZAWA S, BROWN A, BARCHOWSKY A, et al. Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomater.* 2014;10(6):2834-2842.
- [50] HONG X, YANG Y, LI X, et al. Enhanced anti-Escherichia coli properties of Fe-doping in MgO nanoparticles. *RSC Adv.* 2021;11(5):2892-2897.

(责任编辑: GW, ZN, QY, ZH)