

纳米生物活性玻璃的制备及其对人成纤维细胞增殖性能的影响

胡庆¹ 李玉莉^{2*} 林才³ 张娟娟³ 苗国厚⁴

(¹景德镇陶瓷大学材料科学与工程学院, 景德镇 333403; ²潍坊医学院整形外科研究所, 潍坊 2261053; ³温州医科大学附属第一医院烧伤-伤口中心, 温州 325000; ⁴广州医科大学附属口腔医院, 广州 510140)

摘要 采用溶胶-凝胶结合碱性共沉淀法和冷冻干燥技术制备纳米生物活性玻璃(NBG), 通过SEM、TEM、激光粒度考察NBG的形貌、分散性和粒径, 并通过四唑盐比色法(MTT)研究其浸提液对人成纤维细胞(HDF)增殖性能的影响。结果显示, NBG颗粒粒径小于50 nm, 激光粒度仪检测到的平均粒径为491.8 nm, 相比于溶胶-凝胶生物活性玻璃(SGBG), NBG平均粒径更小, 分散性更好。NBG与SGBG浸提液在5倍、10倍和15倍稀释的浓度下均有利于HDF的增殖, 但SGBG在早期稍有利于细胞增殖但作用不明显, 而NBG则在后期对细胞增殖作用更显著, 因此NBG在创面修复方面更具有应用前景。

关键词 生物活性玻璃; 溶胶-凝胶; 纳米; 成纤维细胞; 细胞增殖

Preparation of Nanoscale Bioactive Glass and the Effect on Proliferation of Fibroblast

Hu Qing¹, Li Yuli^{2*}, Lin Cai³, Zhang Juanjuan³, Miao Guohou⁴

(¹School of Materials Science and Engineering, Jingdezhen Ceramic Institute, Jingdezhen 333403, China; ²Plastic Surgery Institute of Weifang Medical University, Weifang 261053, China; ³Burn-Wound Center, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ⁴Guangzhou Institute of Oral Disease, Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China)

Abstract Nanoscale bioactive glass (NBG) was prepared using the sol-gel co-precipitation and freeze-drying methods in this study. Their morphology, dispersibility and average size were investigated by using SEM, TEM and laser particle analyzer, and the effects of their extract on the proliferation of human dermal fibroblasts (HDF) were studied by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The results showed that the NBG particle size was less than 50 nm, while the average particle size of NBG was 491.8 nm detected by Laser particle size analyzer which was less than that of sol-gel bioactive glass (SGBG), and the dispersibility of NBG was better than that of SGBG. Furthermore, MTT assay results showed that both SGBG and NBG extracts could stimulate the proliferation of HDF in appropriate concentration at 5, 10 and 15 times dilution. However, SGBG had better stimulating effect at the early culture time, while the NBG had more obvious effect at the late stage of the culture time. Therefore, NBG is more promising in wound repair.

Keywords bioactive glass; sol-gel; nanoscale; fibroblasts; proliferation

收稿日期: 2019-01-24 接受日期: 2019-03-12

国家自然科学基金(批准号: 51602136、51602225、51702060)、江西省自然科学基金(批准号: 20171BAB216010)、山东省高等学校科技计划项目(批准号: J17KA253)和江西省教育厅科技项目(批准号: GJJ180710)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0536-2602279, E-mail: liyuli@wfmc.edu.cn

Received: January 24, 2019 Accepted: March 12, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.51602136, 51602225, 51702060), Natural Science Foundation of Jiangxi Province (Grant No.20171BAB216010), the Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program (Grant No.J17KA253) and the Science Foundation of Jiangxi Provincial Department of Education (Grant No.GJJ180710)

*Corresponding author. Tel: +86-536-2602279, E-mail: liyuli@wfmc.edu.cn

网络出版时间: 2019-07-16 15:58:50 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1558.004.html>

生物活性玻璃(bioactive glass, BG)由Hench教授于1969年通过熔融法研制而成,具有良好的生物活性和生物相容性,是重要的无机类生物医用材料。研究表明, BG可以通过溶出活性离子对成骨细胞起到基因激活的作用,促进成骨细胞的增殖与分化,还可以与骨组织形成键合,诱导骨组织再生,达到骨、齿修复的作用,是理想的硬组织修复材料^[1-3]。除了良好的硬组织修复作用,另有研究发现, BG在皮肤等软组织修复上也具有积极的作用。如: BG能够促进上皮细胞的增殖与分化,从而促进伤口的愈合^[4-6]; BG可在体内和体外诱导成纤维细胞分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),进而刺激血管生成^[7-8];也有文献报道, BG在植入初期不仅能够对VEGF的传输进行应答,还可对促进血管生成的相关基因进行应答^[9];基因芯片研究发现, BG能激活CD44造血抗原形成前体、纤维连接蛋白受体 β 亚基、成纤维母细胞生长因子受体和血管细胞粘附蛋白等对创面修复起关键作用的基因^[10]。此外, BG还有一定的抗菌功能^[11]。因此, BG也是一类有前景的创面修复材料。目前国内外已有应用于临床皮肤等软组织损伤修复的BG产品,多为传统熔融法制备的45S5 BG^[5-6],如具有较高有效性和安全性的外用医用敷料肌肤生、德莫林等均以45S5 BG为主要活性成分^[12-16]。

然而,传统的熔融法BG作为第一代BG存在致密无孔、比表面积低、颗粒形貌不规则且易引入杂质等问题而限制其在皮肤软组织修复上的应用;而随后发展出的第二代溶胶-凝胶BG,虽然具有较丰富的孔结构、较大的比表面积,但依然为微米级团聚块体,需后续研磨导致颗粒形貌仍然不规则、粒度不均匀。为了增大BG材料在皮肤软组织修复上的应用潜能,本文在溶胶-凝胶技术的基础上,结合碱性共沉淀法以及冷冻干燥技术,制备一种新型的纳米生物活性玻璃(nanoscale bioactive glass, NBG),并对其材料性能及其浸提液对人成纤维细胞增殖性能的影响进行系统研究,为开发治疗新型皮肤创面外用药物提供新思路和新材料。

1 实验方法

1.1 主要原料

本实验所用到的主要原料,正硅酸乙酯、磷酸氢二铵、硝酸钙、氨水和盐酸等均购自广州试剂有限公司。

1.2 纳米生物活性玻璃的制备

NBG的化学组成为60 mol% SiO₂、36 mol% CaO、4 mol% P₂O₅,制备工艺过程如下:将一定量的正硅酸乙酯、四水硝酸钙按顺序加至水与乙醇的溶液中,用盐酸将溶液的pH值调至1~2,充分搅拌均匀一段时间后获得透明稳定的生物玻璃溶胶;其次,将一定量的磷酸氢二铵溶于去离子水中,充分搅拌均匀至溶解完全得到磷酸氢二铵溶液;随后,将该磷酸氢二铵溶液缓慢滴加至生物玻璃溶胶中,搅拌均匀后,向其中缓慢滴加氨水,有白色沉淀出现,离心得到白色沉淀物,冷冻干燥后得到白色粉体,再经600 °C热处理,得到无需研磨的白色NBG粉末。另外,将相同化学组成的传统酸催化溶胶-凝胶生物活性玻璃(sol-gel bioactive glass, SGBG)^[17]作为NBG的对照组。

1.3 纳米生物活性玻璃的表征

利用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM, JEM-2000扫描电子显微镜,日本日立公司)和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, H-7650型透射电子显微镜,日本日立公司)对样品的分散性、颗粒形貌以及粒径进行观察分析。利用Zetaplus激光粒度仪(英国马尔文公司)表征样品的平均粒径。

1.4 纳米生物活性玻璃浸提液的制备

首先,将SGBG和NBG粉体进行高温高压灭菌,并置于120 °C恒温干燥箱中干燥4 h,再以1 mg/mL的浓度加入至培养基中,在37 °C、150 r/min的恒温恒速摇床中摇动浸提24 h;随后将悬浮液离心再经0.22 μ m滤膜过滤除菌制备成SGBG和NBG浸提液。并用培养基将两种浸提液分别制成5个浓度: N1、N2、N3、N4和N5。其中, N1浓度为1 mg/mL,即为浸提液原液, N2、N3、N4、N5分别为将浸提液原液稀释5倍、10倍、15倍和20倍后的浓度。另外,将不含BG的培养基作为空白对照组,即为0 mg/mL,用N0表示。采用美国Leeman公司的PS1000-AT型电感耦合等离子发射光谱仪(inductive coupled plasma, ICP)测定各浸提液中Si和Ca的离子浓度。

1.5 人成纤维细胞的提取和鉴定

人成纤维细胞(human dermal fibroblasts, HDF)的提取:此次实验所用包皮主要来源于温州医科大学附属第一医院无尿路感染等疾病儿童患者,且均经知情同意。在超净台下将新鲜包皮制作成1.0 cm \times 0.5 cm皮片,再经历12~13 h Dispase II液(1 μ mL, 4 °C恒温)浸泡消化获取的真皮组织,置于0.25%胰蛋白酶:0.02% EDTA

为1:1的混合液不间断振荡30 min。终止消化,尼龙滤网(200目)过滤,离心管收集细胞悬液,弃去上清液。重复2~3次后,新鲜KFSM培养基重悬细胞,6孔板上按 2×10^5 个/mL细胞密度接种培养。细胞贴壁并汇合成单层后,细胞生长至约80%~90%的融合度,按1:2进行扩增,继续培养。每3~4天传代一次,收集第3~7代细胞用于本实验。

HDF的鉴定: 将 10^6 个/mL的细胞悬液(10代以内)铺片到已灭菌的玻璃片上,在5% CO₂培养箱37 °C培养24 h。取出玻片后用PBS轻柔的漂洗3次,4%多聚甲醛固定30 min,之后用0.5% Txiton X-100处理20 min用3% H₂O₂处理15 min,期间用PBS漂洗反复漂洗干净,之后进行免疫组化实验。37 °C血清封闭20 min,加入一抗(1:200, PBS稀释),阴性对照组以PBS替代一抗,4 °C过夜后加入二抗在37 °C下孵育20 min, SABC在37 °C孵育20 min后以DAB试剂盒显色2~10 min,苏木素复染后进行封片镜下观察。所用试剂具体型号如下,角蛋白: AE1/AE3(M3515, DakoCytomation); S100: Polyclonal Rabbit Anti-(Z0311, DakoCytomation); 波形蛋白: Vimentin(M0725, DakoCytomation); HMB45: Monoclonal(M0634, DakoCytomation)。

1.6 生物活性玻璃浸提液对人成纤维细胞生长影响

为观察不同浓度的SGBG和NBG浸提液对HDF

生长的影响,将上述N0到N5组两种BG浸提液直接与HDF共培养不同时间。以 1×10^4 个/mL密度接种于96孔细胞培养板中培养,每孔200 μ L,每种浓度进行5个复孔,重复两次。按常规要求培养7天,并于第1天、3天、5天和7天,用四唑盐(MTT)比色法表征细胞增殖能力。MTT能被活细胞中的琥珀酸脱氢酶还原成蓝紫色甲臞结晶产物,用二甲基亚砷溶解后采用酶标仪检测溶液的吸光度 D 值,而活细胞数目与 D 值呈正比。

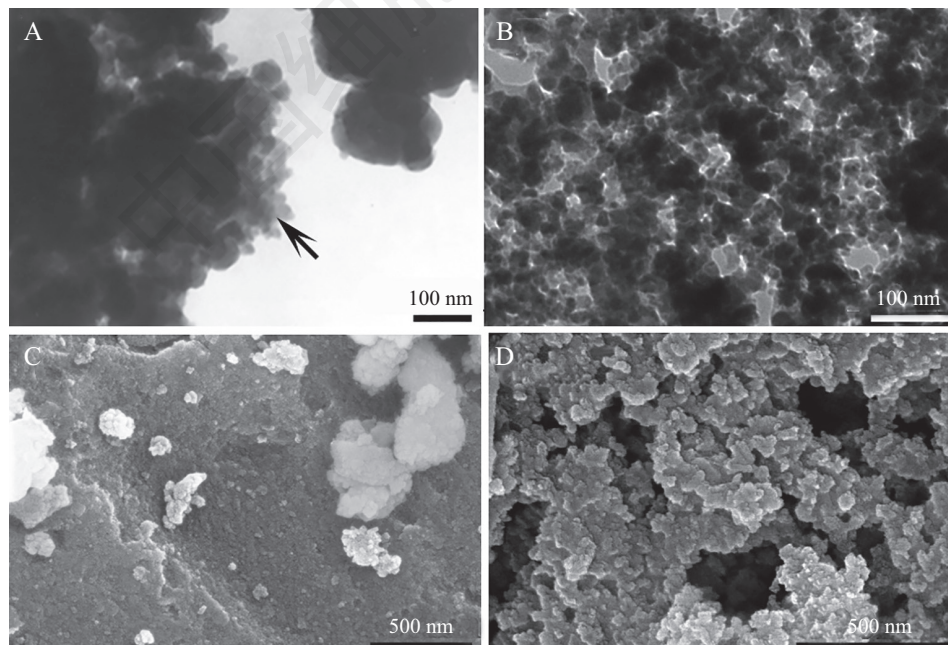
1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0软件对实验数据进行统计分析。实验数据以均值 \pm 标准偏差表示,并采用单因素方差分析及 t 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 生物活性玻璃的粒径及形貌分析

图1A和图1B分别为SGBG和NBG的TEM图,从图1A可以看出,样品SGBG为由粒径为几十个纳米的颗粒(黑色箭头处)组成的团聚块体。图1B可以看出NBG颗粒呈现为类球形,尺度小于50 nm,且相比SGBG, NBG的分散性大大提高。SEM观察到的结果与TEM一致,从图1C可以看出SGBG为块体材料,是由纳米级颗粒硬团聚而成;而图1D显示NBG为类



A: SGBG的TEM图; B: NBG的TEM图; C: SGBG的SEM图; D: NBG的SEM图; 箭头表示SGBG由纳米颗粒堆积而成。

A: TEM image of SGBG; B: TEM image of NBG; C: SEM image of SGBG; D: SEM image of NBG; The arrow indicated that SGBG composed by nano-sized particles.

图1 SGBG和NBG的形貌观察

Fig.1 Morphological observation of SGBG and NBG

球形颗粒相互堆积而成, 颗粒之间有大量的孔洞存在, 是一种软团聚。进一步通过激光粒度仪对两种材料的粒径进行分析, 如表1所示, SGBG经过机械球磨和过筛后的平均粒径为9546.4 nm, 而无需球磨的NBG的平均粒径只有491.8 nm, 平均粒径比SGBG减小20倍。

2.2 人成纤维细胞鉴定

从人包皮分离的HDF细胞可能含有色素上皮细胞和黑色素细胞, 为了保证实验的准确性我们首先对分离得到的HDF细胞进行鉴定。

HDF细胞中间丝的结构蛋白为波形蛋白, 不同于上皮细胞的角蛋白, 也不同于黑色素细胞的S100蛋白以及HMB45抗原, 成为不同种类细胞分类鉴定的相对特异性标志。上皮细胞HMB45呈阴性表达, 角蛋白、S100蛋白和波形蛋白呈阳性表达。黑色素细胞S100蛋白、HMB45和波形蛋白均呈阳性表达, 角蛋白为阴性。成纤维细胞HMB45、角蛋白和S100蛋白均呈阴性表达, 波形蛋白呈阳性表达。

细胞鉴定采用免疫化学染色ABC法, 观察HMB45、S100、波形蛋白和角蛋白的不同表达来确定我们得到的细胞是否为纯的成纤维细胞。免疫组化通过细胞特异性标记染色显示, 阳性结果为在抗原定位处呈棕黄色或棕褐色, 细胞核为蓝紫色, 阴性表达则只有细胞核为蓝色, 胞浆无色。鉴定结果显示, HDF细胞波形蛋白呈阳性表达(图2D), HMB45、S100蛋白和角蛋白均呈阴性表达(图2B、图2C和图2E), 阴性对照为阴性表达(图2A), 说明我们分离的细胞经过传代纯化在第3代已经得到了较纯的成纤维细胞。

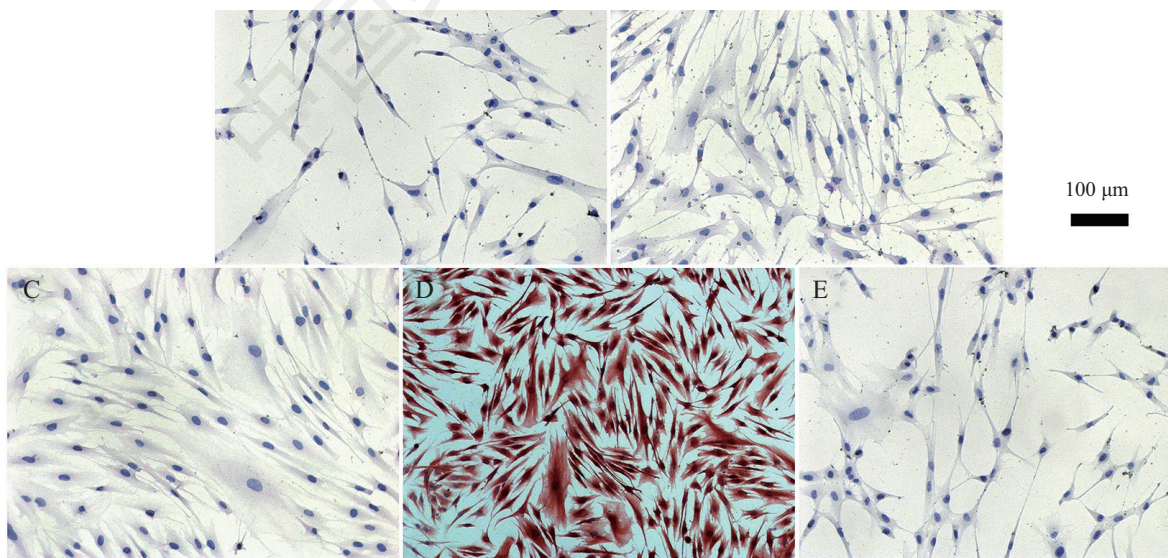
2.3 生物活性玻璃浸提液对人成纤维细胞增殖影响

两种不同浓度的BG浸提液与HDF培养1、3、5和7天后, 通过MTT法检测不同浸提液对HDF细胞增殖的影响。如图3和图4所示, 在与不同浓度的两种BG浸提液共培养一定时间后, HDF细胞实现增殖, 且两种BG浸提液均在N2、N3和N4条件下(即稀释5倍、10倍和15倍)更有利于HDF细胞的增殖。因此, 我们选取稀释5倍、10倍和15倍不同BG浸提液来做

表1 生物活性玻璃的平均粒径

Table 1 Average particle size of bioactive glass

样品	平均粒径(nm)
Sample	Average size (nm)
NBG	491.8
SGBG	9 546.4



A: 阴性对照(只加二抗)呈阴性表达; B: HMB45阴性表达; C: S100阴性表达; D: 波形蛋白阳性表达; E: 角蛋白阴性表达。

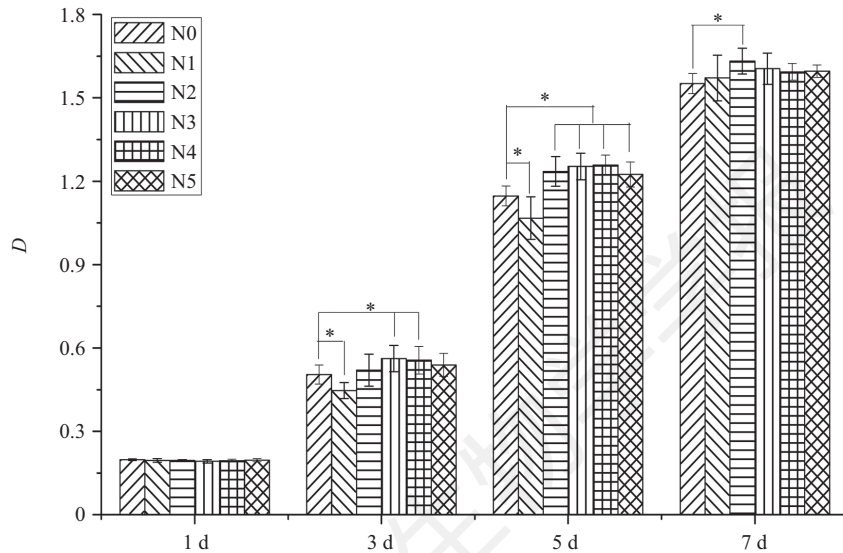
A: negative expression of negative control (secondary antibodies only); B: negative expression of HMB45; C: negative expression of S100; D: positive expression of vimentin; E: negative expression of keratin.

图2 HDF细胞的免疫组化鉴定结果

Fig.2 Immunochemical staining results of HDF cells

组间比较。在第1天时, SGBG和NBG对HDF细胞的增殖性能影响不大, 所有浓度都无显著性差异。第3天时, SGBG的原液对HDF细胞增殖有稍微抑制作用, 而5倍稀释液和10倍稀释液对HDF细胞增殖有明显促进作用; NBG在3天时在这两个浓度并未表现出明显的促进细胞增殖性能。第5天时, NBG开始有明显的优势, 与对照组N0相比稀释5倍、10倍和15倍的

浸提液促进作用提高到几乎1.5倍, 明显优于SGBG。第7天时, NBG呈现的趋势与5天是相似, 对人成纤维细胞的促进作用远高于SGBG。总的来说, 通过7天的培养, 两种BG浸提液从开始就有利于促进成纤维细胞的增殖。SGBG浸提液初期较好, 但后期促进细胞增殖的能力不如NBG浸提液, NBG在5天和7天时表现出明显的优势。

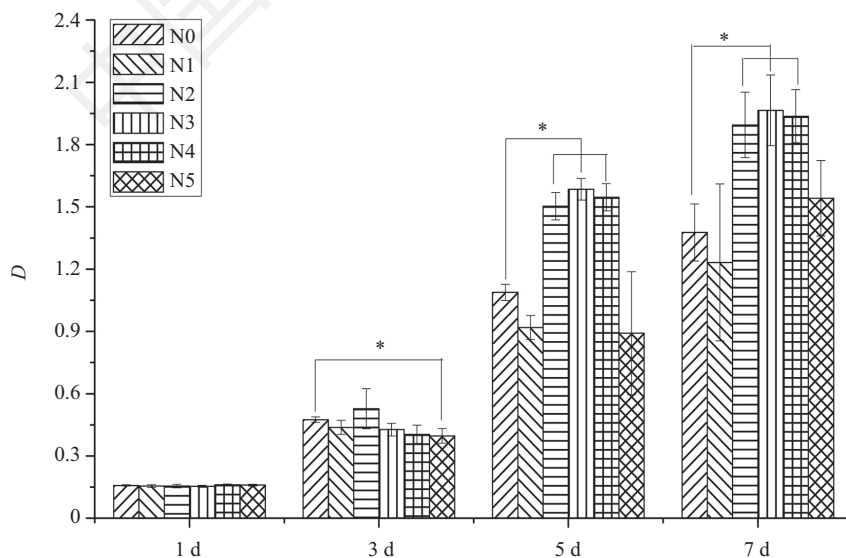


SGBG浸提液与HDF培养不同时间后的细胞增殖情况。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

The Proliferation of HDF cultured with SGBG extract for different times. * $P < 0.05$ compared with control group.

图3 SGBG浸提液对成纤维细胞的增殖影响

Fig.3 Effect of SGBG extract on proliferation of fibroblasts



NBG浸提液与HDF培养不同时间后的细胞增殖情况。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

The Proliferation of HDF cultured with NBG extract for different times. * $P < 0.05$ compared with control group.

图4 SGBG浸提液对成纤维细胞的增殖影响

Fig.4 Effect of SGBG extract on proliferation of fibroblasts

表2 不同浓度下SGBG和NBG浸提液中Si和Ca的离子浓度

组别 Group	SGBG	NBG
N0 Ca (mg/L)	71.21	71.210
N0 Si ($\mu\text{g/L}$)	3.40	3.400
N1 Ca (mg/L)	85.59	106.600
N1 Si (mg/L)	42.30	41.690
N2 Ca (mg/L)	74.98	80.780
N2 Si (mg/L)	8.14	7.912
N3 Ca (mg/L)	73.49	76.390
N3 Si (mg/L)	4.07	3.960
N4 Ca (mg/L)	72.99	74.920
N4 Si (mg/L)	2.71	2.640
N5 Ca (mg/L)	72.75	72.400
N5 Si (mg/L)	2.04	1.980

3 讨论

NBG平均粒径的减小和分散性的提高主要取决于两个作用: 碱性共沉淀和冷冻干燥。传统的溶胶-凝胶BG在制备过程中, 由于BG溶胶颗粒表面存在大量的羟基, 导致在干燥和煅烧的过程中极易引起BG溶胶颗粒的硬团聚, 最后制备出的BG为细小纳米颗粒的团聚块体^[18]。而溶胶-凝胶结合碱性共沉淀法是将碱性溶液缓慢滴加至BG溶胶中, 产生凝胶沉淀, 在搅拌过程中沉淀颗粒快速移动, 避免后续的硬团聚发生^[19]。

传统溶胶-凝胶BG采用普通加热干燥, 而凝胶粒子间存在汽-液界面, 因此在界面张力作用下, 在粒子之间和粒子内的空隙中会形成弯月面, 导致较大的拉力产生, 致使粒子骨架塌陷和紧密接触, 造成粒子紧密团聚在一起, 分散性差^[18]。而NBG采用真空冷冻干燥, 当一定量的水冷冻成冰时, 其体积膨胀变大, 膨胀力使得原先相互靠近的凝胶粒子适当地分开, 而且固态的形成阻止了凝胶的重新聚集。同时, 由于固态水分子与颗粒之间的界面张力远小于液态水分子与颗粒之间的界面张力^[20], 所以采用冷冻干燥得到的NBG分散性较好。因此, 相比于传统溶胶-凝胶法, 采用溶胶-凝胶技术结合碱性共沉淀法和冷冻干燥技术能得到分散性更好的纳米生物活性玻璃。

为分析两种浸提液对HDF细胞增殖作用不同的原因, 进一步通过ICP考察不同浓度下两种BG浸提液中Si和Ca的离子浓度, 如表2所示。从表中可以

看出, 对于不同浓度的两种BG浸提液(N1~N5), Si离子浓度都相差不大, 而对于Ca离子浓度, 除了稀释20倍的N5组外, 其余稀释浓度下NBG浸提液均明显高于SGBG浸提液。生物活性玻璃浸提液中Si及Ca离子基团溶出形成的局部化学微环境, 有利于进入细胞内部激活细胞, 浸提液中Si、Ca离子浓度不同, 对细胞增殖影响不同, Ca离子作为一个非常重要的细胞内信使, 在传递信号、调节细胞的各种功能, 比如增殖、分化等^[21], 这可能是NBG浸提液在共培养后期对HDF细胞增殖促进作用更为显著的主要原因。

以上研究表明, 利用溶胶-凝胶共沉淀方法结合冷冻干燥技术可制备出分散性较好的颗粒粒径小于50 nm的NBG, 不同浓度的NBG和SGBG浸提液与从人包皮中成功提取的成纤维细胞共培养后, 两种浸提液在稀释5倍、10倍和15倍条件下均有利于成纤维细胞的增殖, SGBG在早期稍微有利于细胞增殖但作用不是非常明显, 而NBG则在后期对细胞的增殖作用非常显著, 几乎提高1.5倍, 因此NBG在创面修复方面更具有应用前景。

参考文献 (References)

- 1 Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; 19(16): 1419-23.
- 2 Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* 1971; 5(6): 117-41.
- 3 Hench LL, Paschall HA. Histochemical responses at a biomaterial's interface. *J Biomed Mater Res* 1974; 8(3): 49-64.
- 4 Gatti AM, Valdre G, Andersson OH. Analysis of the *in vivo* reac-

- tions of a bioactive glass in soft and hard tissue. *Biomaterials* 1994; 15(3): 208-12.
- 5 Verrier S, Blaker JJ, Maquet V, Hench LL, Boccaccini AR. PDL-LA/Bioglass composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an *in vitro* cell biology assessment. *Biomaterials* 2004; 25(15): 3013-21.
- 6 Zhang K, Ma Y, Francis LF. Porous polymer/bioactive glass composites for soft-to-hard tissue interfaces. *J Biomed Mater Res* 2002; 61(4): 551-63.
- 7 Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, *et al.* Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25(27): 5857-66.
- 8 Keshaw H, Forbes A, Day RM. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials* 2005; 26(19): 4171-9.
- 9 Leach KJ, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 2006; 27(17): 3249-55.
- 10 Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276(2): 461-5.
- 11 Eberhard J, Reimers N, Dommish H, Hacker J, Freitag S, Acil Y, Alber HK, *et al.* The effect of the topical administration of bioactive glass on inflammatory markers of human experimental gingivitis. *Biomaterials* 2005; 26(13): 1545-51.
- 12 罗自通. 德莫林治疗糖尿病足部溃疡创面疗效观察. *重庆医学* (Luo Zitong. Observation on curative effect of demulin on diabetic foot ulcer. *Chongqing Med J*) 2006; 35(9): 770.
- 13 吕均香, 渠鹏程, 翟学英. 皮肤生治疗麻风溃疡疗效观察. *中国麻风皮肤病杂志* (Lü Junxiang, Qu Pengcheng, Zhai Xueying. Observation on curative effect of skin hygiene on leprosy ulcer. *Chin J Lepr Skin Dis*) 2005; 21(4): 319.
- 14 胡晓燕, 王光毅, 程大胜, 肖仕初, 夏照帆. 生物活性修复材料—康倍治疗烧伤的疗效观察. *中国修复重建外科杂志* (Hu Xiaoyan, Wang Guangyi, Cheng Dasheng, Xiao sichu, Xia zhaofan. Study on efficacy and safety of bioactive material-combust in treating burn. *Chin J Reparative Reconstructive Surg*) 2007; 21(11): 1216-8.
- 15 Moosvi SR, Day RM. Bioactive glass modulation of intestinal epithelial cell restitution. *Acta Biomater* 2009; 5(1): 76-83.
- 16 Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis *in vitro*. *Tissue Eng* 2005; 11(5-6): 768-77.
- 17 陈晓峰, 李玉莉, 赵娜如. 溶胶—凝胶生物活性玻璃的纳米结构分析研究. *硅酸盐通报* (Chen xiaofeng, Li Yuli, Zhao Naru. Nano-structure analysis of the sol-gel derived bioactive glasses. *B Chin ceram soc*) 2007; 26(2): 247-51.
- 18 Pawlik, J, Ziabka M, Lach R, Laczka M, Katarzyna CK. Tailoring the porosity, mechanical and bioactive properties of sol-gel bioactive glasses, hydroxyapatite and titanium dioxide porous composites. *J Mech Behav Biomed* 2018; 87:40-9.
- 19 Chen XF, Lei B, Wang YJ, Zhao NR. Morphological control and *in vitro*, bioactivity of nanoscale bioactive glasses. *J Non-Cryst Solids* 2009; 355(13): 791-6.
- 20 Liu B, You Y, Zhang H, Wu H. Synthesis of ZnO nano-powders via a novel PVA-assisted freeze-drying process. *Rsc Adv* 2016; 6(111): 110349-55.
- 21 Hoppe A, Guldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011; 32(11):2757-74.