B@PH/GM-V水凝胶微球的制备及其抗氧化和促成骨作用研究

冯焱坤[1] 刘元荣[1] 申蜜[1] 孙焌砾[1] 刘滨玮[1] 林珍珍[1] 卢灿灿[1] 郭锦材[1,2,3]
1.湖南中医药大学口腔医学院，长沙 410006；
2.长沙市口腔医院药剂科，长沙 410006；
3.湖南中医药大学药学院，长沙 410006

[摘要] **目的** 构建负载骨形态发生蛋白-2的聚多巴胺肝素纳米颗粒（B@PH NPs），并与接枝甲基丙烯酸香兰素（VMA）的GelMA复合，制备B@PH/GM-V水凝胶微球，评价其理化性能及在氧化应激微环境中对成骨分化的调控作用。**方法** 采用氧化自聚合法制备B@PH NPs，微流控法制备B@PH/GM-V水凝胶微球；通过扫描电镜、傅里叶变换红外光谱（FTIR）、能谱分析（EDS）进行材料表征；检测溶胀、降解及体外释药行为。以MC3T3-E1细胞为模型，采用CCK-8法、活/死细胞染色评价生物相容性；2’,7’-二氯二氢荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）荧光探针检测细胞内活性氧（ROS）水平；碱性磷酸酶与茜素红S染色评估成骨分化能力。**结果** B@PH NPs平均粒径为288.2 nm，B@PH/GM-V微球平均直径为499.1 μm。FTIR与EDS结果证实肝素与VMA成功修饰。B@PH NPs具有良好缓释效果。细胞实验显示，B@PH/GM-V生物相容性优良，可显著降低脂多糖和H_2O_2诱导的ROS水平，并促进MC3T3-E1细胞分化与矿化。**结论** B@PH/GM-V水凝胶微球具有良好生物相容性、抗氧化能力与促成骨效应，在牙周炎相关牙槽骨再生修复中具有潜在应用价值。

[关键词] 水凝胶微球； 骨形态发生蛋白-2； 香兰素； 氧化应激； 成骨分化； 牙槽骨再生
[中图分类号] R781.05 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2026139

本文链接 开放科学标识码

Preparation of B@PH/GM-V hydrogel microspheres and their antioxidant and osteogenesis-promoting effects

Feng Yankun[1], Liu Yuanrong[1], Shen Mi[1], Sun Junli[1], Liu Binwei[1], Lin Zhenzhen[1], Lu Cancan[1], Guo Jincai[1,2,3]
1. School of Stomatology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410006, China; 2. Dept. of Pharmacy, Changsha Stomatological Hospital, Changsha 410006, China; 3. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Supported by: High-level Talents in Health and Wellness under the "Furong Plan" in Hunan Province (20241226150); Hunan Provincial Natural Science Foundation (2024JJ9532); Clinical Pharmacology Research Fund of Hunan Provincial Medical Association (HMA202502017); Hunan Provincial College Student Innovation Training Program Project (S202510541118X); Changsha Natural Science Foundation (kq2403178); School/College Joint Funding for Teaching Reform at Hunan University of Chinese Medicine (2025-LHJ020)

Correspondence: Guo Jincai, E-mail: 540009728@qq.com

[Abstract] **Objective** This study constructed bone morphogenetic protein 2-loaded polydopamine heparin nanoparticles (B@PH NPs) and vanillin methacrylate (VMA)-grafted GelMA hydrogel microspheres (B@PH/GM-V) and evaluated their physicochemical properties

[收稿日期] 2026-04-15
[基金项目] 湖南省芙蓉计划卫生健康高层次人才（20241226150）；湖南省自然科学基金（2024JJ9532）；湖南省医学会临床药学科研基金（HMA202502017）；湖南省大学生创新训练计划项目（S202510541118X）；长沙市自然科学基金（kq2403178）；湖南中医药大学教学改革校院联合资助（2025-LHJ020）
[第一作者] 冯焱坤，学士，E-mail：1476528842@qq.com
[通信作者] 郭锦材，副主任药师、副教授，博士，E-mail：540009728@qq.com

and regulatory effects on osteogenic differentiation under oxidative stress. **Methods** B@PH NPs were prepared through oxidative self-polymerization, and B@PH/GM-V microspheres were fabricated via microfluidic technology. The materials were characterized by using scanning electron microscope, Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Swelling, degradation, and drug release behaviors were evaluated. Biocompatibility was assessed through the CCK-8 assay and live/dead staining by using MC3T3-E1 cells. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were detected with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probes, and osteogenic differentiation capacity was evaluated through alkaline phosphatase and alizarin red S staining. **Results** The average diameters of B@PH NPs and B@PH/GM-V microspheres were approximately 288.2 nm and 499.1 μm, respectively. FTIR and EDS confirmed successful modification with heparin and VMA. B@PH NPs showed favorable sustained release performance. B@PH/GM-V exhibited good biocompatibility, significantly reduced the ROS levels induced by lipopolysaccharide and H_2O_2, and promoted the differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells. **Conclusion** B@PH/GM-V hydrogel microspheres possess good biocompatibility, antioxidant activity, and osteogenic effects, showing promising potential for periodontitis-related alveolar bone regeneration.

[Key words] hydrogel microspheres; bone morphogenetic protein-2; vanillin; oxidative stress; osteogenic differentiation; alveolar bone regeneration

牙周炎是以菌斑生物膜为始动因子、宿主免疫炎症反应参与的慢性感染性疾病，可引发进行性牙周附着丧失与牙槽骨吸收，是我国成年人群牙齿缺失的首要原因[1]。炎症微环境中过量活性氧（reactive oxygen species，ROS）蓄积会打破氧化还原平衡，激活破骨细胞并抑制成骨细胞功能，严重阻碍牙槽骨再生修复[2]。临床常规清创与抗炎治疗难以逆转已发生的骨缺损，氧化应激微环境持续存在会进一步制约组织再生效果[3]。现有局部递药系统（如纤维支架、凝胶等）仍存在患者不适、依从性不佳、操作烦琐或功能设计较为单一等不足，同时实现抗氧化、抗炎、促成骨的协同效应的多功能系统仍较少见[4]。因此，构建兼具抗氧化、抗炎与促成骨功能的局部递送系统，对实现牙周炎相关牙槽骨精准修复具有重要意义[5]。

骨形态发生蛋白-2（bone morphogenetic protein 2，BMP-2）是诱导成骨分化的核心生长因子，可激活Smad通路，促进骨基质形成与矿化，但体内半衰期短、易失活，临床应用受限[6]。肝素作为天然糖胺聚糖，可通过静电作用稳定结合BMP-2，延长其作用时间并提高生物利用度[7]。聚多巴胺纳米颗粒（polydopamine nanoparticles，PDA NPs）表面富含儿茶酚与氨基基团，载药效率高，生物相容性好，是理想的生长因子递送载体[8]。将肝素修饰于PDA NPs表面后，不仅能增强BMP-2的结合能力，还可通过空间位阻效应调控PDA NPs粒径，提高载药效率并优化释放行为。然而，过量ROS蓄积微环境未被改变，仍难有效成骨，需引入外在抗氧化组分。

香兰素（vanillin）是天然抗氧化小分子，可清除ROS，抑制核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）等炎症通路，并直接促进成骨分化[9-10]。将香兰素改性为甲基丙烯酸香兰素（vanillin methacrylate，VMA），可与甲基丙烯酸化明胶（gelatin methacryloyl，GelMA，GM）共价接枝，赋予水凝胶稳定的抗氧化性能[11]。为实现VMA抗氧化与BMP-2促成骨的协同递送，需构建适宜的局部递药载体。

水凝胶微球是由水凝胶基质液滴固化形成的微米级球形结构，在保留了可注射水凝胶给药微创、灵活特性的同时，其高比表面积与均匀多孔结构的优势，可模拟细胞外基质微环境，实现药物可控释放，有利于细胞附着及增殖分化，是牙周组织工程的理想载体[12-13]。

本研究将负载BMP-2的聚多巴胺肝素纳米颗粒（BMP-2@PDAH NPs，B@PH NPs）与VMA接枝GM结合，采用微流控技术构建B@PH/GM-V多功能水凝胶微球，系统评价其理化性能、生物相容性、抗氧化及促成骨效应，为牙周炎患者牙槽骨再生提供新的生物材料策略。

1 材料和方法

1.1 细胞株、实验试剂和仪器

1.1.1 细胞株

小鼠前成骨细胞MC3T3-E1（iCel m050，赛百慷上海生物技术股份有限公司），实验采用第5~10代生长状态良好的细胞。

1.1.2　主要试剂

盐酸多巴胺、肝素钠盐、氨水、无水乙醇（上海源叶生物科技有限公司）；GM（苏州永沁泉智能设备有限公司）；苯基2,4,6三甲基苯甲酰亚磷酸酯锂（lithium phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinate, LAP）、VMA（广州镇宇生物科技有限公司）；重组人BMP-2（北京义翘神州科技股份有限公司）；微滴生成油、破乳剂（上海澎赞生物科技有限公司）；α-MEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素（Gibco公司，美国）；脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）（Sigma公司，美国）；过氧化氢（H_2O_2，长沙华康消毒剂有限公司）；CCK-8试剂盒（DOJINDO公司，日本）；BCA蛋白定量试剂盒、活/死细胞染色试剂盒、ROS检测试剂盒、BCIP/NBT碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）显色试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；成骨诱导培养基、茜素红（alizarin red S，ARS）染色液（苏州海星生物科技有限公司）。

1.1.3　主要仪器

微流控芯片（Luxue PD wo，露雪微控深圳科技有限公司）；扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）、倒置荧光显微镜（ZEISS公司，德国）；真空冷冻干燥机、高速离心机、恒温水浴振荡器、傅里叶变换红外光谱仪（Fourier transform infrared spectrometer，FTIR）（Thermo公司，美国）；多功能酶标仪（TECAN公司，瑞士）。

1.2　材料的制备

1.2.1　B@PH NPs的制备

室温下将0.8 mL氨水、40 mL乙醇与90 mL去离子水混合，磁力搅拌10 min；加入含0.5 g盐酸多巴胺与0.1 g肝素钠盐的10 mL水溶液，避光搅拌30 h，使多巴胺氧化自聚合并与肝素交联。反应液以14 000 r/min离心10 min，无水乙醇洗涤3次，干燥后获得聚多巴胺肝素纳米颗粒（polydopamine heparin nanoparticles，PDAH NPs，PH NPs）。其余条件相同，在不添加肝素钠盐的条件下制备PDA NPs。

取10 mg PH NPs分散于PBS，加入10 μg BMP-2，室温搅拌24 h；12 000 r/min离心10 min，−80 ℃冷冻干燥8 h，获得B@PH NPs。

1.2.2　B@PH/GM-V微球的制备

将100 mg GM溶于1 mL 0.05% LAP溶液，60 ℃避光加热溶解；加入1 mg B@PH NPs和1 mg VMA，超声分散混匀10 min，获得B@PH/GM-V前聚液（分散相）。

以2%微滴生成油为连续相，通过微流控芯片制备微球。分别使用5 mL无菌注射器吸取1 mL分散相溶液与1.5 mL连续相溶液，安装于注射泵上，通过毛细软管与微流控芯片连接。设置分散相流速96 μL/min，连续相流速120 μL/min；405 nm紫外光固化30 s。微球经破乳剂、去离子水、乙醇、PBS洗涤，−80 ℃冷冻干燥，4 ℃避光保存。

1.2.3　B@PH/GM-V微球浸取液的制备

参照GB/T 16886.12—ISO 10993 12:2021，按200 mg/mL将微球加入无血清α-MEM，37 ℃振荡浸提72 h；3 000 r/min离心5 min，0.22 μm滤膜过滤；加入10%胎牛血清与1%双抗，配制成200 mg/mL浸提液，梯度稀释为200、150、100、50 mg/mL，24 h内用于细胞实验。

1.3　材料表征

1.3.1　形貌与粒径分析

B@PH NPs与B@PH/GM-V微球经喷金处理，SEM下观察形貌。随机选取3个视野，ImageJ分析粒径分布情况。

1.3.2　能谱分析（energy-dispersive X-ray spectroscopy，EDS）与FTIR

采用EDS能谱仪对PDA NPs与PH NPs分别进行元素面扫分析；将DH、Hep、PH NPs、GM微球和GM-V微球分别与KBr按1∶100的质量比混合、研磨并压片，在400~4 000 cm^{-1}范围内进行FTIR扫描。

1.3.3　体外释药实验

以牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）为模型蛋白，制备BSA@PH NPs；PBS中37 ℃振荡释药72 h，于2、8、12、24、36、48、60、72 h取样，BCA法测定蛋白浓度，计算累积释放率。

1.3.4　溶胀与降解实验

称取GM冻干微球初始质量，37 ℃ PBS浸泡，分别于1、24、48 h称重，计算平衡溶胀率。

将GM与B@PH/GM-V微球分别置于PBS与人工唾液中72 h，冻干后称取残余质量，计算质量残留率与降解率。

1.4　细胞实验

1.4.1　细胞培养

MC3T3-E1细胞用含10%胎牛血清、1%青-链霉素的α-MEM培养，37 ℃、5%CO_2下常规传代。

1.4.2　生物相容性评价

MC3T3-E1细胞以密度为每孔1×10^4个接种于

96孔板，分别加入不同浓度浸提液培养24 h；CCK-8法检测细胞活性；活/死染色荧光观察，ImageJ定量活细胞率。

1.4.3　氧化应激与炎症模型构建

采用1 μg/mL LPS处理MC3T3-E1细胞24 h构建炎症相关氧化应激模型；采用梯度H_2O_2（400~800 μmol/L）处理MC3T3-E1细胞24 h构建非炎症依赖型ROS升高模型，CCK-8筛选最佳氧化应激浓度。

1.4.4　ROS水平检测

造模后在96孔板中加入200 mg/mL浸提液干预24 h；10 μmol/L 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯（2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate，DCFH-DA）避光孵育20 min，荧光显微镜观察，ImageJ定量平均荧光强度。

1.4.5　成骨分化评价（ALP、ARS染色）

细胞以密度为每孔3×10⁴个接种于24孔板，浸提液预处理24 h，然后成骨诱导培养3 d后进行ALP染色；4%多聚甲醛固定，BCIP/NBT避光染色，成骨诱导培养7 d后进行ARS染色，显微镜观察并半定量分析。

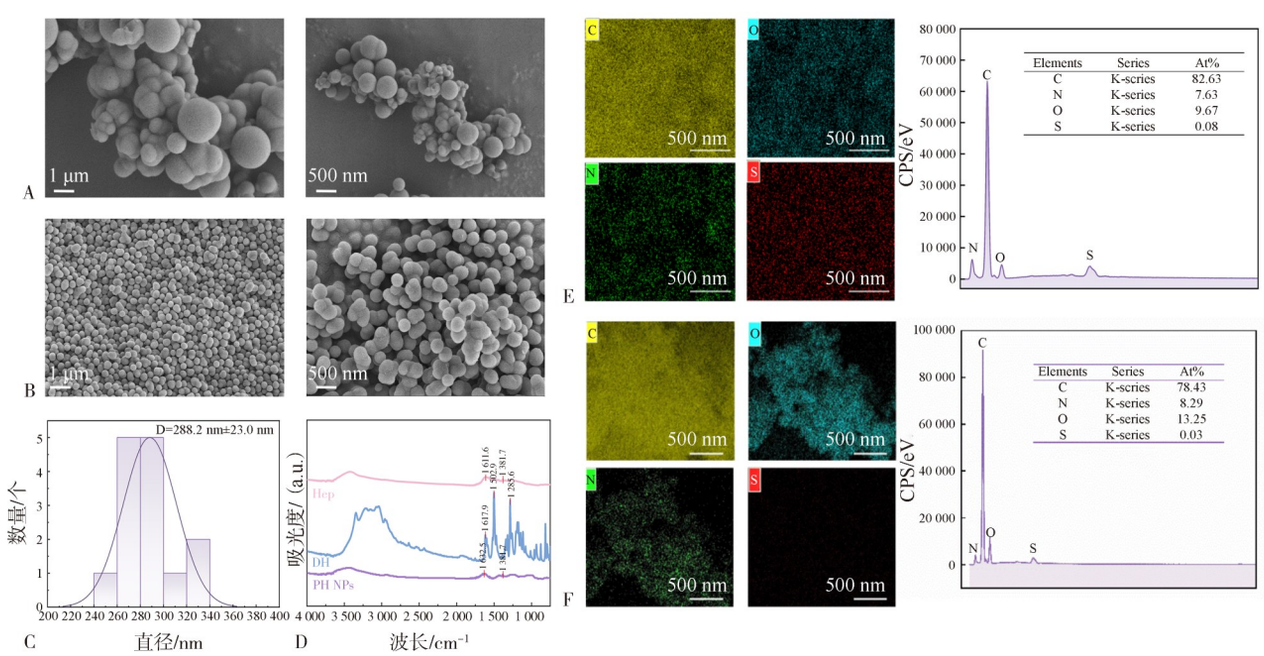
1.5　统计学方法

采用GraphPad Prism 10.1.2软件对数据进行分析，数据以$\bar{x}\pm s$表示；多组比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Tukey检验；$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　B@PH NPs表征

SEM结果显示，与未修饰的PDA NPs（图1A）相比，PH NPs粒径更小、更均一，呈单分散球形结构（图1B），平均直径为288.2 nm（图1C）。FTIR在1 350 cm^{-1}与1 600 cm^{-1}处出现肝素-SO_4^-与-COO^-特征峰（图1D）。EDS显示，PH NPs主要由C（82.63%）、O（9.67%）、N（7.63%）和S（0.08%）组成（图1E）。与PDA NPs（图1F）相比，PH NPs中S元素含量明显升高，且分布均匀，证实肝素成功修饰。



A：PDA NPs的SEM图像；B：PH NPs的SEM图像；C：PH NPs的SEM图像粒径分析；D：PH NPs的FTIR谱图；E：PH NPs的EDS图谱及元素组成分析；F：PDA NPs的EDS图谱及元素组成分析。

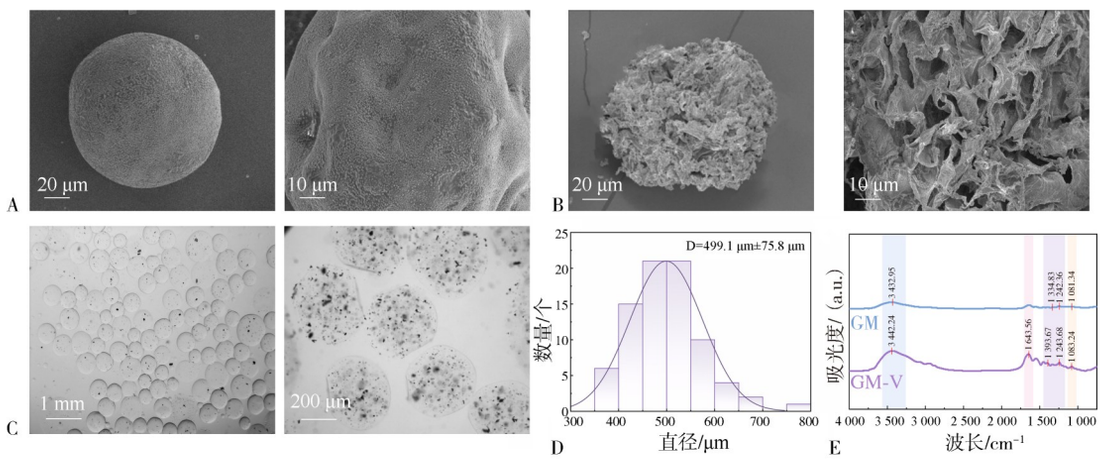
图 1　纳米颗粒的表征

Fig 1　Physicochemical characterization of the nanoparticles

2.2　B@PH/GM-V微球表征

SEM结果显示，未改性的GM呈现表面光滑的圆球状结构（图2A）；B@PH/GM-V呈多孔网络结构，表面粗糙利于细胞黏附（图2B）。B@PH/GM-V微球形态规整、粒径均一（图2C），平均直径499.1 μm，内部可见均匀分布的B@PH NPs（图2D）。FTIR显示，GM-V在1 643.56、1 393.67、1 243.68 cm^{-1}出现新吸收峰，证实VMA成功接枝

（图2E）。



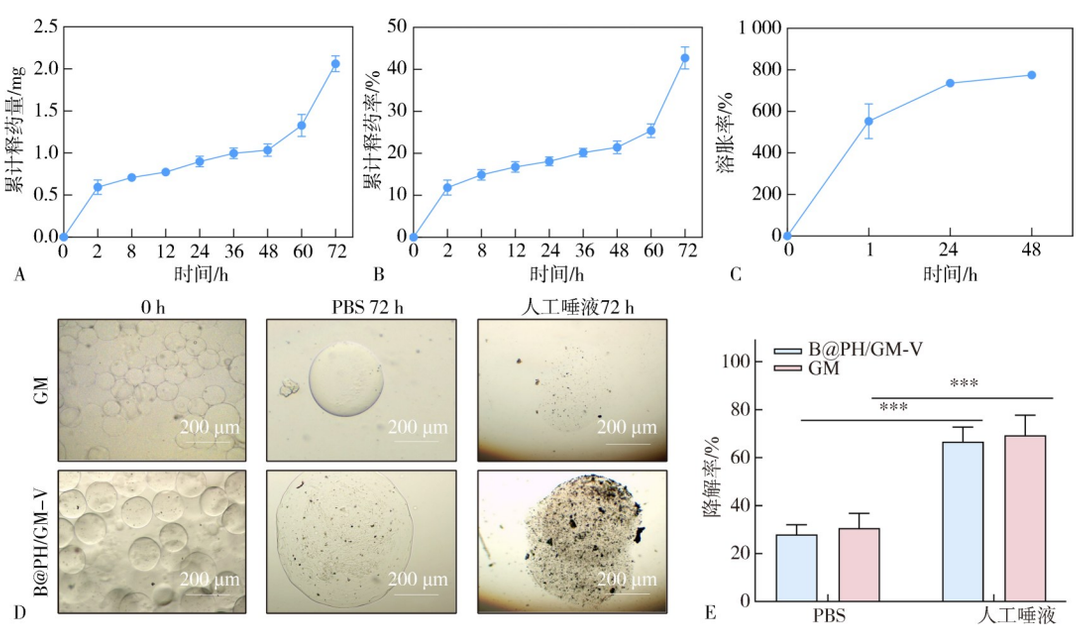
A：GM的SEM图像；B：B@PH/GM-V的SEM图像；C：B@PH/GM-V的光学显微镜图像；D：B@PH/GM-V光学显微镜下的粒径分析；E：GM-V的FTIR谱图。

图 2　微球的表征

Fig 2　Physicochemical characterization of the microspheres

2.3　释药、溶胀与降解性能

BSA体外释放显示，2 h突释11.54%，随后缓慢释放，72 h累积释放40.09%，表现为“早期突释后期缓释”模式。微球24 h达溶胀平衡，平衡溶胀率775.75%。在PBS中微球结构保持完整，人工唾液中72 h降解率达66.8%，具有口腔环境响应性降解特征（图3）。



A：BSA@PH NPs的累计释药量；B：BSA@PH NPs的累计释药率；C：GM的溶胀曲线；D：GM和B@PH/GM-V在降解过程中的光镜形貌变化；E：GM和B@PH/GM-V在72 h内的降解率。***P<0.001。

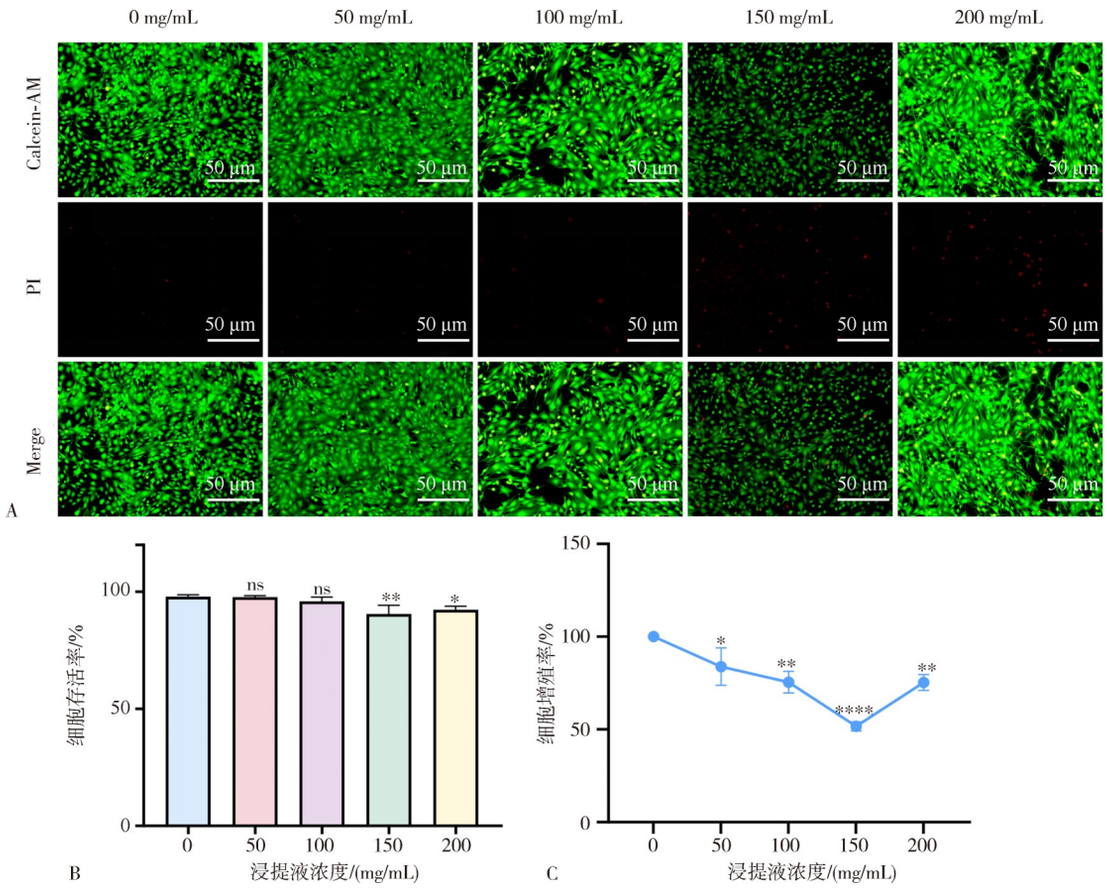
图 3　体外释药、溶胀及降解性能

Fig 3　*In vitro* drug release behavior, swelling properties, and degradation profiles

2.4　生物相容性

生物相容性评价结果见图4。CCK-8检测显示，除150 mg/mL组外，其余实验组细胞存活率均高于70%。活/死细胞染色结果可见，与对照组相比，各实验组均可观察到大量绿色荧光（活细胞），且细胞分布较为均匀，随着浸提液浓度升高，红色荧光（死细胞）数量略有增加。荧光图像定量分析结果显示，各实验组细胞存活率均高于85%。其中，50 mg/mL组和100 mg/mL组与对照组相比差异无统计学意义（P>0.05），表明

B@PH/GM-V具有良好生物相容性。



A：活/死细胞染色观察不同浓度B@PH/GM-V浸提液对MC3T3-E1细胞存活情况的影响；B：MC3T3-E1细胞活/死细胞染色结果的统计分析；C：CCK-8法检测不同浓度B@PH/GM-V浸提液对MC3T3-E1细胞增殖的影响。*P<0.05，**P<0.01，****P<0.000 1，ns无统计学意义。

图 4　细胞相容性评价

Fig 4　Evaluation of cytocompatibility

2.5　抗氧化效应

抗氧化效应结果见图5。CCK-8检测显示，600 μmol/L H_2O_2处理24 h后细胞存活率为70%，适用于H_2O_2组模型建立。荧光成像结果显示，与对照组相比，LPS及H_2O_2处理组细胞内出现大量绿色荧光信号，表明LPS和H_2O_2刺激显著诱导细胞内ROS生成。与模型组相比，B@PH/GM-V组细胞内绿色荧光强度减弱。对荧光强度进行ImageJ定量分析显示，LPS及H_2O_2组ROS水平显著高于对照组（P<0.001、P<0.01）。经B@PH/GM-V干预后，ROS水平显著下降，接近正常对照组，表明材料可有效清除过量ROS、缓解氧化应激损伤。

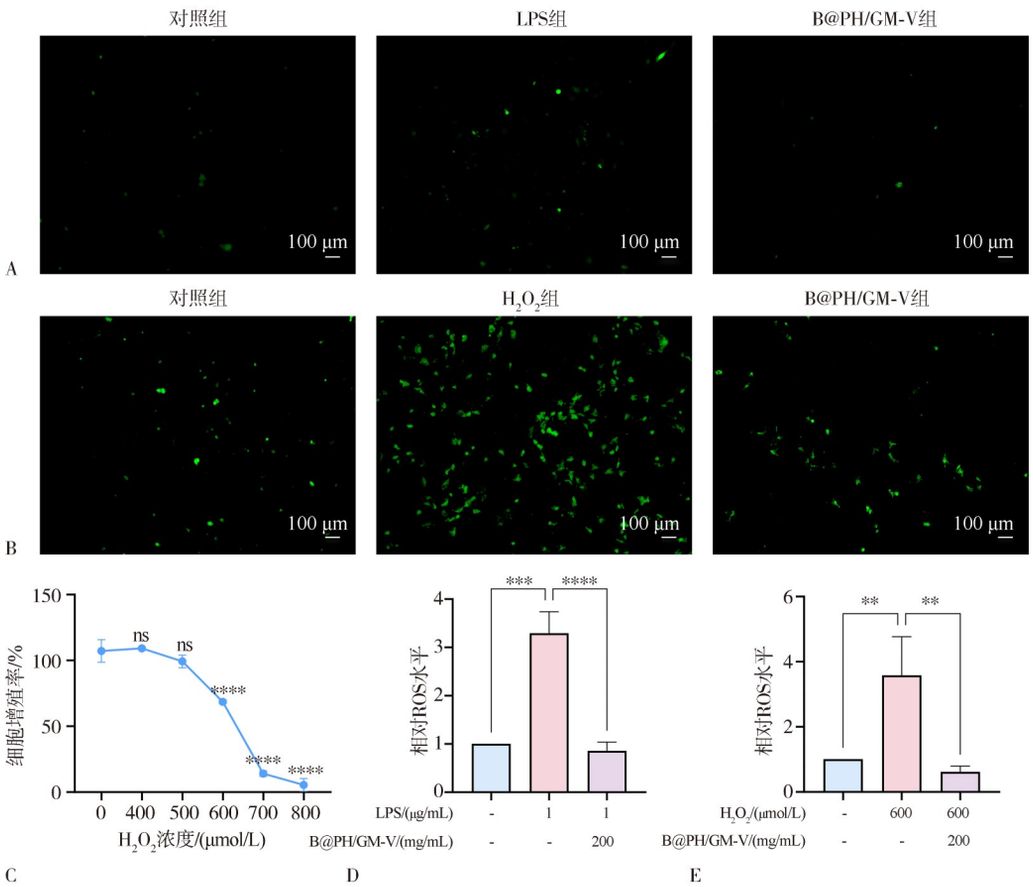
2.6　促成骨分化效应

ALP染色结果显示（图6A），与成骨诱导组相比，B@PH/GM-V组细胞呈现更深的紫蓝色染色，表明ALP表达水平升高。定量分析结果显示（图6B），B@PH/GM-V组ALP活性显著高于成骨诱导组（P<0.01）。ARS染色结果显示（图6C、D），经B@PH/GM-V浸提液处理后，矿化结节数量增加、染色加深，表明材料可促进MC3T3-E1细胞成骨分化与矿化。

3　讨论

牙周炎是由菌斑生物膜介导、宿主免疫失衡共同参与的慢性炎症性疾病，其核心病理特征为持续性炎症反应引发的牙周支持组织进行性破坏及牙槽骨吸收，严重时可导致牙列缺损甚至缺失，影响口腔功能与全身健康。近年来研究[14]证实，炎症微环境中高反应性外周血中性多形核白细胞异常活化，产生过量ROS，是牙周炎局部氧化应激的主要潜在来源。氧化应激作为牙周炎病理进展的关键调控因素，其作用机制具有多维度性：

不仅可直接诱导细胞外基质降解，造成线粒体DNA氧化损伤，进一步放大炎症反应并促进牙周膜细胞凋亡[15]；还能通过增强基质金属蛋白酶活性，间接上调炎症与凋亡相关信号通路，加速牙槽骨吸收进程[16]。此外，氧化应激还可损伤辅助性T细胞及B细胞的免疫功能，削弱机体对病原体的清除能力，阻碍骨组织再生修复[17]。因此，在牙周再生治疗中，有效抑制局部氧化应激、构建有利于成骨细胞增殖分化的微环境是改善治疗效果、促进牙周组织修复的关键环节。



A：B@PH/GM-V浸提液对LPS诱导的MC3T3-E1细胞内ROS水平的影响；B：B@PH/GM-V浸提液对H_2O_2诱导的MC3T3-E1细胞内ROS水平的影响；C：CCK-8法检测不同浓度H_2O_2处理后MC3T3-E1细胞的增殖率；D：LPS诱导的MC3T3-E1细胞ROS水平的统计分析；E：H_2O_2诱导的MC3T3-E1细胞ROS水平的统计分析。**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1，ns无统计学意义。

图 5　抗氧化效应

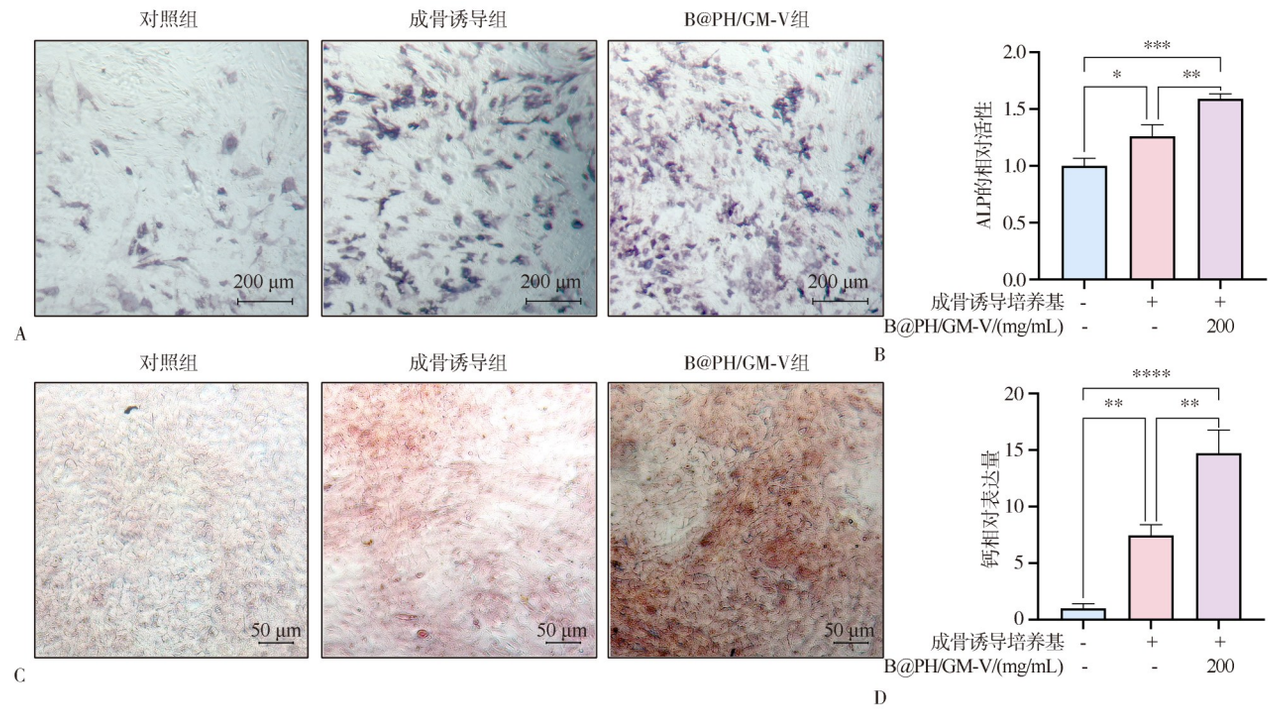
Fig 5　Antioxidant effect

局部药物递送系统可实现病灶部位的精准、高效给药，有效避免全身用药的不良反应，在牙周炎治疗中展现出独特优势。其中，水凝胶微球作为新型药物递送载体及生物活性支架，可通过微创注射方式精准填充牙周袋，凭借其程序化释药特性与三维多孔支架结构，为药物持续递送与牙周组织再生提供了全新策略，在牙周组织工程领域具有广阔的应用前景[18-19]。本实验成功完成了B@PH/GM-V水凝胶微球的制备、结构表征及相关细胞实验，以下将从水凝胶微球的结构特性与功能基础、对MC3T3-E1细胞生物学行为的影响及该体系的应用前景与局限性等方面展开深入讨论。

3.1　材料的结构特性与功能基础

本研究采用氧化自聚合原理制备BMP-2负载的B@PH NPs，并结合微流控技术构建B@PH/GM-V复合水凝胶微球，实现了纳米载药单元与水凝胶支架的有机整合。实验结果显示，与未修饰的PDA NPs相比，PH NPs粒径显著减小且单分散性明显提升，推测其原因在于肝素分子与PDA之间形成的氢键及静电相互作用，显著增强了颗粒表面的电负性，从而有效抑制颗粒间的聚集现象。FTIR检测中出现的-SO_4^-和-COO^-特征吸收峰，以及EDS检测中S元素含量的显著增加，进一步从分子层面证实肝素已成功修饰于PDA颗粒表面。肝素分子富含阴离子基团，其成功修饰不仅改善

了纳米颗粒的分散性，更为后续成骨生长因子BMP-2的特异性结合提供了充足的阴离子结合位点，为实现BMP-2的高效负载与可控释放奠定了结构基础[20]。



A：各组MC3T3-E1成骨诱导培养3 d后的ALP染色结果；B：ALP活性的半定量分析；C：各组MC3T3-E1成骨诱导培养7 d后的ARS染色结果；D：ARS染色的半定量分析。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1。

图 6　MC3T3-E1细胞成骨分化评价

Fig 6　Evaluation of osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells

微流控技术构建的B@PH/GM-V复合水凝胶微球呈疏松多孔结构，该结构特征有利于细胞的黏附、增殖及营养物质的交换，符合骨组织工程支架的基本要求。光镜观察结果显示，B@PH NPs均匀分布于水凝胶微球内部，未出现明显团聚现象。需指出的是，B@PH NPs在4 ℃单独存放1周后，存在一定聚集现象，但在制备微球前聚液时通过超声分散可使其重新均匀分散，从而保证后续微球内部纳米颗粒分布的均一性。FTIR检测结果显示，在1 643.56 cm^{-1}处出现新的吸收峰，推测其归因于VMA引入后芳香族不饱和C=C结构的伸缩振动增强；而1 393.67 cm^{-1}和1 343.68 cm^{-1}附近出现的特征吸收峰，可能与VMA接枝后GM分子链上甲基环境的复杂化所引起的摇摆振动相关。上述特征峰的变化共同证实，VMA已成功接枝至GM分子链上，实现了水凝胶支架的功能化修饰。

溶胀性能评价结果显示，B@PH/GM-V复合水凝胶微球在24 h内即可达到溶胀平衡，且平衡溶胀率较高，表明该材料具有良好的亲水性。良好的亲水性不仅可提高材料与细胞的相容性，还有利于促进细胞黏附、增殖及成骨分化，为其在骨组织工程领域的应用奠定了坚实的结构基础[21]。

药物释放行为方面，PH NPs表现出典型的“前期突释-后期缓释”特征：早期突释可能与颗粒表层吸附的BMP-2快速扩散有关，该特性可使局部组织迅速达到有效治疗浓度，快速发挥生物学效应；随后释放速率趋于平缓，提示肝素的引入可能通过静电作用与BMP-2分子形成可逆结合，有效延缓了蛋白分子的扩散速率，实现了BMP-2的持续缓释，为长期促进骨再生提供了保障。

需要指出的是，本研究目前仅使用BSA作为模型药物评价了纳米颗粒层面的药物释放行为，尚未对B@PH/GM-V复合水凝胶微球整体的释药动力学进行系统分析。BSA与BMP-2在相对分子质量及等电点上存在差异，这可能影响其与肝素修饰纳米颗粒的结合亲和力及释放行为，即使有类似研究[22]以BSA为模型蛋白，评估载体对生长因子类药物的缓释潜力，但BSA的释放曲线仅能反映载体对模型蛋白的缓释趋势，不能完全等同于BMP-2的实际释药特征。考虑到水凝胶网络结构对分子扩散具有一定的阻滞作用，推测在复合体系中，BMP-2的释放过程会进一步延缓，其释

药动力学特征可能更符合牙周组织再生的长期需求。未来研究仍需通过整体释药实验，进一步明确复合微球的释药动力学机制，优化释药性能。此外，本研究的体外释放实验采用微球直接分散于释放介质中、定时离心取上清的方法，未使用透析袋装置，因此无法设置游离药物平行对照，这是本研究的局限性。在降解行为方面，人工唾液模拟口腔环境中，B@PH/GM-V微球结构出现明显破坏，表明口腔微环境可能通过离子强度变化、酶解作用或pH值波动等多种因素，加速材料网络的断裂与降解。这种口腔环境响应性降解特性，有利于材料在临床应用中逐步降解并被机体组织替代，避免了异物残留对牙周组织修复的影响。综上，B@PH/GM-V复合体系成功实现了纳米载药单元与微球支架的功能整合，具备潜在的持续释药能力与口腔环境响应性，为其在口腔骨再生中的应用提供了坚实的功能基础。

3.2　对MC3T3-E1细胞生物学行为的影响

良好的生物相容性是生物材料应用于临床的首要前提。本研究采用B@PH/GM-V复合微球浸提液培养MC3T3-E1成骨前体细胞，通过CCK-8法及活/死染色实验评价材料的细胞相容性，结果显示，不同浓度浸提液培养下，MC3T3-E1细胞存活率均维持在较高水平，表明B@PH/GM-V复合体系具有良好的细胞相容性，无明显细胞毒性。值得注意的是，随着浸提液浓度的升高，死细胞比例略有增加，推测其可能与高浓度浸提液中局部离子浓度变化、材料降解产物累积或渗透压改变有关，同时，本研究中B@PH/GM-V浸提液对MC3T3-E1细胞增殖率的影响呈现非单调的剂量效应，200 mg/mL组增殖率（80%）较150 mg/mL组（55%）有所回升，可能与BMP-2的剂量依赖性释放或材料降解产物的非特异性营养作用有关，其具体机制有待进一步研究。但即使在200 mg/mL的高浓度浸提液作用下，细胞存活率仍大于80%，整体处于临床可接受范围内，进一步证实了该材料的生物安全性。

氧化应激调控能力是该复合体系的核心功能之一。本研究分别采用LPS构建炎症相关氧化应激模型、H_2O_2构建非炎症依赖型ROS升高模型，探讨B@PH/GM-V对细胞内ROS水平的调控作用。实验结果表明，经B@PH/GM-V处理后，2种模型中细胞内的ROS水平均显著降低，提示该复合体系具有较强的抗氧化能力。其抗氧化效应可能来源于多方面协同作用：一方面，PDA分子中富含儿茶酚基团，可通过供氢或电子转移机制中和细胞内过量的ROS，直接发挥抗氧化作用[23]；另一方面，VMA的成功接枝及材料的多孔结构，可能通过调控炎症相关信号通路，间接减轻细胞的氧化应激反应，维持细胞内微环境的相对稳定，为细胞的增殖与分化创造有利条件。此外，从空间分布上看，本体系中VMA接枝于外层水凝胶微球的三维网络，能够优先接触并清除微环境中的过量ROS，从而缓解氧化应激对细胞的损伤，为内部B@PH NPs的稳定释放及BMP-2的促成骨作用创造有利的氧化还原微环境。PDA分子虽具有一定抗氧化活性，但其主要功能是作为BMP-2的递送载体，抗氧化作用主要局限在纳米颗粒局部。两者在作用空间上形成互补，协同实现抗氧化和促成骨策略。

成骨分化促进能力是评价该材料用于牙周骨再生的关键指标。本研究分别检测了早期成骨分化标志物ALP活性与晚期成骨分化标志物矿化结节。ALP检测结果表明，与成骨诱导组相比，B@PH/GM-V组的ALP表达水平显著升高；ARS染色结果显示，B@PH/GM-V组形成的矿化结节数量及染色强度均明显优于对照组。上述结果提示，该复合材料体系可在成骨诱导基础上，进一步增强MC3T3-E1细胞的早期成骨分化与晚期成骨矿化能力。综上，B@PH/GM-V复合水凝胶微球不仅能够有效调控炎症微环境中的氧化应激水平，还可通过促进成骨相关酶的表达及矿化结节的形成，增强成骨前体细胞的分化，为其在牙周骨再生治疗中的应用提供了坚实的体外实验依据。

3.3　应用前景及局限性

本研究成功构建了一种新型复合药物递送系统B@PH/GM-V，该体系由内层负载BMP-2的B@PH NPs与外层表面接枝VMA的GM水凝胶微球组成，实现了“药物-载体-支架”的一体化设计。体外实验结果证实，该复合体系具有良好的生物相容性、可控缓释性、口腔环境响应性降解能力、高效抗氧化活性及显著的促成骨效应，为氧化应激环境下的牙槽骨再生及颌骨缺损修复提供了新型生物材料与实验依据。从临床应用角度来看，B@PH/GM-V复合微球具有可注射性及可降解特征，可通过微创方式精准填充牙周袋，实现药物的持续递送与牙周组织的长期修复，在牙槽骨再生修复领域具有广阔的潜在应用价值。

然而，本研究仍存在一定的局限性，需在后续研究中进一步完善。首先，当前所有实验结果

均基于体外细胞实验，体外环境无法完全模拟体内复杂的免疫微环境、血液循环及组织代谢过程，因此该材料在体内的降解动力学特征、炎症调控效率及新骨形成质量，仍需通过动物模型实验进一步验证。其次，本研究仅通过检测细胞内ROS水平变化，初步评价了材料对炎症相关氧化应激的调控作用，尚未检测肿瘤坏死因子-α、白细胞介素-6等炎症因子的表达水平及相关炎症信号通路（如NF-κB通路）的激活状态，未来研究应结合炎症信号通路的检测，深入探讨材料抗炎抗氧化的分子机制。此外，材料促进MC3T3-E1细胞成骨分化的具体分子机制，如对Runt相关转录因子2、骨钙素等成骨相关基因表达的调控作用，仍有待进一步深入研究。

后续研究可重点开展以下工作：结合动物牙周缺损模型，系统评估B@PH/GM-V复合微球在体内的降解行为、微环境调控能力及新骨形成效果；深入解析材料抗炎抗氧化能力与成骨分化之间的协同调控机制；优化材料的制备工艺，进一步提升其释药可控性与生物学性能，最终推动该新型复合材料在个性化牙周组织再生治疗中的临床转化与应用。

综上所述，本研究成功制备了B@PH/GM-V多功能水凝胶微球，该微球粒径均一、结构稳定，具有良好的生物相容性、纳米颗粒可控缓释性、口腔环境响应性降解能力、高效抗氧化活性与显著促成骨效应，可为牙周炎相关牙槽骨再生修复提供新型生物材料与实验依据。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

[1] Zhan Y, Jiao J, Jing W, et al. Association between periodontitis and hypertension: cross-sectional survey from the Fourth National Oral Health Survey of China (2015–2016) [J]. BMJ Open, 2023, 13(3): e068724.

[2] Yan G, Guo Y, Guo J, et al. N-acetylcysteine attenuates lipopolysaccharide-induced osteolysis by restoring bone remodeling balance via reduction of reactive oxygen species formation during osteoclastogenesis[J]. Inflammation, 2020, 43(4): 1279-1292.

[3] Patil RT, Dhadse PV, Salian SS, et al. Role of oxidative stress in periodontal diseases[J]. Cureus, 2024, 16(5): e60779.

[4] 杜岚, 陈亮 . 口腔局部药物递送系统在牙周炎治疗中的研究进展[J]. 口腔医学研究, 2025, 41(6): 457-462.
Du L, Chen L. Research progress of oral local drug delivery system in treatment of periodontitis: a literature review[J]. J Oral Sci Res, 2025, 41(6): 457-462.

[5] Liu S, Wang Z, Li Y, et al. Erythropoietin-stimulated macrophage-derived extracellular vesicles in chitosan hydrogel rescue BMSCs fate by targeting EGFR to alleviate inflammatory bone loss in periodontitis[J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(23): e2500554.

[6] Fan Q, Bai J, Shan H, et al. Implantable blood clot loaded with BMP-2 for regulation of osteoimmunology and enhancement of bone repair[J]. Bioact Mater, 2021, 6 (11): 4014-4026.

[7] Kim S, Cui ZK, Kim PJ, et al. Design of hydrogels to stabilize and enhance bone morphogenetic protein activity by heparin mimetics[J]. Acta Biomater, 2018, 72: 45-54.

[8] Wu Y, Li X, Sun Y, et al. Multiscale design of stiffening and ROS scavenging hydrogels for the augmentation of mandibular bone regeneration[J]. Bioact Mater, 2022, 20: 111-125.

[9] Costantini E, Sinjari B, Falasca K, et al. Assessment of the vanillin anti-inflammatory and regenerative potentials in inflamed primary human gingival fibroblast[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 5562340.

[10] Yun HM, Kim E, Kwon YJ, et al. Vanillin promotes osteoblast differentiation, mineral apposition, and antioxidant effects in pre-osteoblasts[J]. Pharmaceutics, 2024, 16(4): 485.

[11] Zhu Z, Yu Q, Li H, et al. Vanillin-based functionalization strategy to construct multifunctional microspheres for treating inflammation and regenerating intervertebral disc[J]. Bioact Mater, 2023, 28: 167-182.

[12] Li Q, Chang B, Dong H, et al. Functional microspheres for tissue regeneration[J]. Bioact Mater, 2023, 25: 485-499.

[13] Zhang S, Lin A, Tao Z, et al. Microsphere-containing hydrogel scaffolds for tissue engineering[J]. Chem Asian J, 2022, 17(20): e202200630.

[14] 任佳宇, 任秀云 . 氧化应激及抗氧化剂辅助治疗牙周炎的研究进展[J]. 口腔医学, 2024, 44(2): 148-151.
Ren JY, Ren XY. Research progress on oxidative stress and antioxidants as adjunctive therapy for periodontitis [J]. Stomatology, 2024, 44(2): 148-151.

[15] Liu Y, Yang H, Wen Y, et al. Nrf2 inhibits periodontal

ligament stem cell apoptosis under excessive oxidative stress[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1076.

[16] Cavalla F, Osorio C, Paredes R, et al. Matrix metalloproteinases regulate extracellular levels of sdf-1/cxcl12, il-6 and vegf in hydrogen peroxide-stimulated human periodontal ligament fibroblasts[J]. Cytokine, 2015, 73(1): 114-121.

[17] Singer RE, Moss K, Kim SJ, et al. Oxidative stress and IgG antibody modify periodontitis-CRP association[J]. J Dent Res, 2015, 94(12): 1698-1705.

[18] Chen Z, Lv Z, Zhang Z, et al. Advanced microfluidic devices for fabricating multi-structural hydrogel microsphere[J]. Exploration (Beijing), 2021, 1(3): 20210036.

[19] 吴其泷, 兰文悦, 崔明杰, 等. 微球载药系统的前沿进展和临床转化[J]. 药学学报, 2024, 59(12): 3242-3250.
Wu QL, Lan WY, Cui MJ, et al. Advances and clinical transformation of microsphere drug delivery systems[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2024, 59(12): 3242-3250.

[20] Lin Y, Yang Y, Zhao Y, et al. Incorporation of heparin/BMP2 complex on GOCS-modified magnesium alloy to synergistically improve corrosion resistance, anticoagulation, and osteogenesis[J]. J Mater Sci Mater Med, 2021, 32(3): 24.

[21] Holkar K, Kale V, Ingavle G. Cell-instructive mineralized microenvironment regulates osteogenesis: a growing symbiosis of cell biology and biomaterials engineering in bone tissue regeneration[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2023, 9(8): 4867-4877.

[22] Mao L, Zhang D, Shen Z, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2-engineered piezoplatform synergistically promotes bone regeneration through bone morphogenetic protein receptor activation[J]. Biomater Transl, 2025, 6(4): 450-464.

[23] Wang W, Chen J, Li M, et al. Rebuilding postinfarcted cardiac functions by injecting TIIA@PDA nanoparticle-cross-linked ROS-sensitive hydrogels[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 11(3): 2880-2890.

（本文编辑　杜冰）