

3D 打印 HA 微球支架的制备与表征

吴重草^{1,2,3}, 郇志广^{2,3}, 朱钰方^{2,3}, 吴成铁^{2,3}

(1. 上海大学 材料科学与工程学院, 上海 200444; 2. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 高性能陶瓷与超微结构国家重点实验室, 上海 200050; 3. 中国科学院大学 材料科学与光电工程研究中心, 北京 100049)

摘要: 生物材料表面微结构对于成骨具有重要的影响, 该研究以不同粒径($< 60 \mu\text{m}$)的羟基磷灰石(HA)微球状粉体为原料, 通过 3D 打印技术制备了一系列(HA0、HA10、HA30、HA50)生物陶瓷支架。不同支架具有相似的理化性能, 由于微球粒径不同形成了不同的微结构, 对其生物学性能造成不同的影响。相比传统非微球颗粒打印的支架(HA0), HA 微球构成的支架能够提供更多细胞粘附和生长位点, 24 h 的粘附实验显示 HA30 支架能显著促进骨髓间充质干细胞的伪足伸长; 培养 5 d 的细胞增殖实验显示, 微球支架上的细胞数量与 HA0 支架出现显著性差异, 表面微球结构与细胞尺度相当的 HA30 支架具有最好的促增殖效果。因此, 3D 打印技术在可控制备 HA 支架宏观结构的同时, 还可以通过控制生物陶瓷粉体的颗粒形貌, 调控 3D 打印支架的表面微结构, 从而优化其生物学效应, 在骨组织工程领域具有良好的应用前景。

关键词: HA 微球; 3D 打印; 支架; 骨组织工程

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

3D Printing and Characterization of Microsphere Hydroxyapatite Scaffolds

WU Zhongcao^{1,2,3}, HUAN Zhiguang^{2,3}, ZHU Yufang^{2,3}, WU Chengtie^{2,3}

(1. School of Materials Science and Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. State Key Lab of High Performance Ceramics and Superfine Microstructure, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; 3. Center of Materials Science and Optoelectronics Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Surface microstructure of biomaterials plays an important role in osteogenesis. In this study, we prepared a series of hydroxyapatite (HA) scaffolds (HA0, HA10, HA30, HA50) by 3D printing microspheres with different particle sizes ($< 60 \mu\text{m}$). These scaffolds have similar physical and chemical properties, but form different microstructures due to their different particle size of microspheres, which result in certain impact on their biological properties. Compared with the traditional scaffolds without micro-sphere structure (HA0), the microsphere-based hydroxyapatite scaffolds provide improved adhesion and growth sites for bone mesenchymal stem cells (BMSCs) after 24 h culture, among which HA30 scaffold significantly promotes the pseudopodia elongation of BMSCs. After 5 d of cell culture on the scaffolds, the micro-sphere based HA scaffolds significantly stimulate proliferation of the BMSCs in contrast to the HA0 group. HA30 scaffolds with microsphere at similar size to the cell size have the best promoting effect on cell proliferation. Therefore, 3D printing technology can not only control the macrostructure of HA scaffolds,

收稿日期: 2020-08-28; 收到修改稿日期: 2020-10-03; 网络出版日期: 2020-10-23

基金项目: 国家自然科学基金(51761135103) National Natural Science Foundation of China (51761135103)

作者简介: 吴重草(1995-), 女, 硕士研究生. E-mail: wuzhongcao@student.sic.ac.cn

WU Zhongcao(1995-), female, Master candidate. E-mail: wuzhongcao@student.sic.ac.cn

通信作者: 吴成铁, 研究员. E-mail: chengtiewu@mail.sic.ac.cn

WU Chengtie, professor. E-mail: chengtiewu@mail.sic.ac.cn

but also construct the microstructure on the surface of HA scaffolds by controlling the particle sizes of bioceramic powders to optimize the biological effects, which shows great potential application in the field of bone tissue engineering.

Key words: hydroxyapatite microspheres; 3D printing; scaffolds; bone tissue engineering

骨缺损是一种常见的骨科疾病,较小的骨缺损可以通过机体的自我修复解决,而较大的缺损则需要合适的骨修复材料辅助修复愈合^[1-3]。骨修复材料不但需要具有合适的机械性能和理化性能,还需要有优良的生物相容性,避免植入机体后的排斥反应^[4-6]。羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)作为骨组织的重要组成部分,具有良好的生物相容性、生物活性及骨传导性,常作为原料应用于人工骨制备^[7-8]。

天然骨优异的生物和力学性能得益于其高度复杂的多级有序结构。因此,为了制备功能完善的 HA 人工骨则需要对生物陶瓷支架的结构与形貌进行设计^[9-11]。3D 打印具有定制程度高、成型迅速、精度较高的优点,通过 3D 打印技术设计、制备生物陶瓷支架的应用前景广阔。在现有的技术中,挤出式 3D 打印是一种常用的、高效的成型技术,它采用陶瓷粉体与粘结剂混合制备的浆料挤出成型^[12-13],海藻酸钠能被二价钙离子快速交联,常与其它粘结剂联合使用,如聚乙烯醇(PVA)、泊洛沙姆(F-127)等,使支架达到足够的机械强度以维持三维稳定结构,同时具备骨组织工程支架所需的生物性能^[14]。

Dalby 等^[15]发现在石英基底上利用光刻技术制备的有序微米化沟槽结构上,细胞能够沿着沟槽方向取向生长,证明了材料表面的微纳结构会影响细胞行为。大量研究发现,材料表面形貌影响其亲水性、蛋白吸附等。Fu 等^[16]发现 HA 表面微纳结构对蛋白质具有选择性吸附作用。Zhao 等^[17-18]研究证明,同样以 HA 作为原料,相比光滑平板结构,以尼龙网筛为模板设计的微米结构和水热生成的纳米棒结构在成骨过程中起到协同调节干细胞行为的作用。微米图案化的材料表面能够诱导细胞生长,从而影响细胞的增殖、分化与成骨性能^[19],然而支架的微纳表面结构的设计和制备通常程序复杂且依赖于模板,个性化程度低,不利于其潜在应用。

本研究以不同粒径($<60\ \mu\text{m}$)HA 微球为原料,通过 3D 打印技术制备一系列具有微米尺度精细表面结构的 HA 支架,同时实现宏观和微观结构,并进一步探索不同粒径 HA 微球构成的支架对骨髓间充质干细胞粘附与增殖的影响,筛选出最佳支架结构。

1 实验方法

1.1 实验材料

用于 3D 打印的 HA 粉体为商业化粉体,购自昆山华侨科技新材料有限公司,系化学沉淀法合成的产物。HA 微球采用喷雾干燥法制备。粒径为 $0\sim 80\ \mu\text{m}$ 的 HA 微球手动逐级用 80、50、28 μm (180、300、500 目)筛筛选,根据粒径将其分为 3 组,分别命名为 HA10 (粒径 $< 20\ \mu\text{m}$), HA30(粒径 $20\sim 40\ \mu\text{m}$), HA50(粒径 $40\sim 60\ \mu\text{m}$)。非微球形貌的普通 HA 粉体(粒径 $< 1\ \mu\text{m}$)制备的光滑表面支架作为对照,命名为 HA0。

HA 支架 3D 打印过程中采用泊洛沙姆(Poloxamer, F-127, 20wt%)作为粉体粘接剂,并添加海藻酸钠(Sodium alginate, Alfa Aesar)增加浆料的流动性。

1.2 HA 生物陶瓷支架的制备

准确称取 3 g HA 粉体和 0.166 g 海藻酸钠,边搅拌边加入约 2.2 g F127 溶液配制浆料。充分搅拌至浆料混合均匀且粘度适当,填入 3D 打印机入料针筒内并排出气泡。

通过计算机程序设定具体打印参数:直径 10 mm,层高 0.4 mm,共 8 层,层间偏转 45° ;打印速率 $7\sim 13\ \text{mm/s}$,工作气压 $250\sim 300\ \text{kPa}$,通过计算机连接的挤出式 3D 打印机(GESIM BioScaffolder 3.1)完成支架打印。

打印完成后在室温下静置过夜,支架完全干燥后以 $2\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 $1150\ ^\circ\text{C}$ 进行高温烧结(快速升温节能箱式电炉 SSJ-14 型,洛阳神佳窑业有限公司),保温 3 h,随炉降温至室温。

1.3 HA 粉体及生物陶瓷支架的理化性能表征

通过光学显微镜测量并计数了不同粒径粉体;采用扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM, S-4800, Hitachi, Japan)表征粉体及支架烧结前后的表面形貌与微结构。采用 X 射线衍射仪(XRD, Rigaku, Japan)分析 HA 粉体的物相组成。支架经过高温烧结后,将其粉碎研磨并同样采用 XRD 分析物相组成,同时采用能谱仪(Energy disperse spectroscopy, EDS)分析元素组成及比例。

支架的离子释放通过电感耦合等离子光谱发生仪(ICP-AES, Varian Co.)测定。将 HA 生物陶瓷支架

以 200 mg/L 的比例浸泡在 Tris-HCl(三羧甲基氨基甲烷-盐酸, pH = 7.4)中, 每组 6 个平行样。浸泡 1、3、7 d 后分别换液并测定 Ca 和 P 离子浓度。

1.4 HA 生物陶瓷支架的生物学性能表征

采用兔骨髓间充质干细胞(rBMSCs)评价 HA 支架的生物学性能。rBMSCs 采用添加 10%胎牛血清(FBS, Gibco)及 1%双抗(Penicillin /Streptomycin, P/S)的 rBMSCs 完全培养液培养, 在 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育。

将灭菌干燥后的 HA 支架预先置于 48 孔培养板中, 每孔接种等量 rBMSCs 细胞进行培养(10⁴ cells/well, 完全培养液 500 μL/well), 在 37 °C、含 5%CO₂ 的细胞培养箱中孵育 24 h。通过 4%多聚甲醛固定细胞并用乙醇分级脱水干燥后使用 SEM 观察。

将灭菌干燥后的 HA 支架预先置于 48 孔培养板中, 每孔放入一枚支架并接种等量 rBMSCs(2×10⁴ cells/well, 完全培养液 500 μL/well), 在 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育, 隔天换液。其中, 浸泡第 1、3、5 d, 取出支架后用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI, Sigma-Aldrich, USA)染色并使用荧光显微镜观察荧光强度, 用以定性观察支架上细胞增殖过程。同时, 使用 CCK-8 试剂盒(Cell counting Kit-8)定量检测支架上增殖的细胞活性, 将长有细胞的支架取出换用完全细胞培养液稀释的 CCK-8(10vol%, 300 μL/well)避光孵育 1.5 h, 再通过酶联免疫检测仪(ELx8000, BIO-Tek, USA)测定 450 nm 处 OD 值, 用以定量表征细胞增殖。以细胞存活率近似表示细胞数量变化, 其按下式进行计算:

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times [A_E - A_{CCK}] / [A_{Ctrl} - A_{CCK}] \quad (1)$$

其中, A_E、A_{CCK} 和 A_{Ctrl} 分别表示实验组、无细胞的 10% CCK8 溶液和空白对照组的吸光度。为排除培养过程中孔板底部和壁上生长的细胞对结果的影响, 定性观察和定量表征均将支架从培养所用孔板中取

出后置于新的 48 孔板中进行。

2 结果与讨论

2.1 HA 粉体的粒径测定

分别在光学显微镜和扫描电镜下观察 HA50、HA30 和 HA10 粉体形貌, 结果如图 1(a,b)所示, 制备的 HA 微球具有较为规则的球状结构、良好的颗粒分散性、较好的流动性。为精确标定各组平均粒径, 每组粉体随机选取 20 枚颗粒, 用 ImageJ 软件测定粒径并计算平均值和标准误差。结果如图 1(c)所示, 三组粉体粒径依次为 HA10: (13.7±3.3) μm, HA30: (28.1±3.1) μm, HA50: (47.2±5.9) μm。对照组采用非微球形貌的 HA 粉体 HA0 (< 1 μm)。

2.2 不同粉体 HA 烧结后的晶相及元素分析

微球和非球形的 HA 粉体的 XRD 图谱(图 2(a))与 HA 标准谱(JCPDS: 09-0432)一致, 未发现明显杂质峰。虽然合成方法有所区别以及普通粉体的结晶度低于微球的结晶度, 但两种形貌的粉体均为纯相 HA。

3D 打印成型并在 1150 °C 下高温烧结后将支架粉碎再次进行 XRD 表征(图 2(a)), 表明引入的有机组分在高温烧结后无明显残留, 且陶瓷烧结后未发生明显相变。

烧结后的支架粉碎研磨后进行 EDS 分析(图 2(b)), 结果显示其成分主要为 Ca、P、O 元素, 原子比为 23.0 : 15.0 : 61.3, 与 HA 的原子组成 5 : 3 : 13 相近。

2.3 3D 打印不同粒径 HA 微球的支架微观结构

使用不同粒径的 HA 粉体为原料打印出宏观结构相同的圆柱形支架。交错的支架墙体形成了均匀有序的大孔结构, 能够提供一定的力学强度; 同时这种结构具有相对较大的比表面积和孔隙, 有利于新生血管和骨组织长入, 方便物质交换和代谢废物排出。

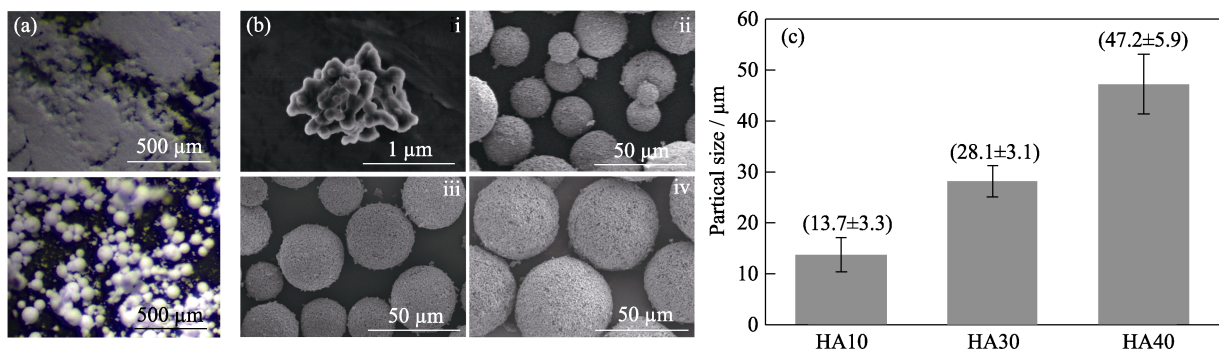


图 1 HA 普通粉体与微球粉体(< 60 μm)的(a)光学显微镜照片和(b)扫描电镜照片((i) HA0, (ii) HA10, (iii) HA30, (iv) HA50)及其(c)逐级过筛后的 HA 微球粒径统计

Fig. 1 (a) Optical micrographs and (b) SEM images of HA powders with and without microsphere structure (< 60 μm) ((i) HA0, (ii) HA10, (iii) HA30, (iv) HA50), and their (c) particle size statistics after successive sieving

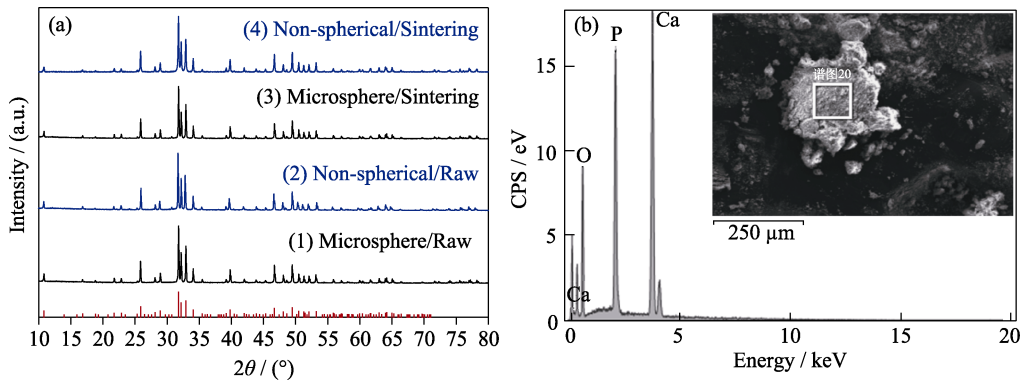


图 2 (a)两种形貌的 HA 粉体在 1150 °C 烧结前后的 XRD 图谱和(b)烧结后的支架再粉碎后的 SEM 照片及其 EDS 图谱
Fig. 2 (a) XRD characterization of HA powder with two morphologies before and after sintered at 1150 °C, and (b) SEM image with EDS pattern of scaffolds after sintering and grinding.

1150 °C 下的高温烧结可以除去 3D 打印过程中引入的有机组分。海藻酸钠、F127 占浆料质量约 19.8%，烧结除去有机组分后支架仍具有较高致密度，且形貌未发生明显改变。但可以看出，以相同参数打印出的四种支架烧结后的宏观尺寸呈现 HA0 < HA10 < HA30 < HA50(图 3(a))，其烧结收缩率分别为 22.12%、14.07%、13.25%、11.94%。原料粉体粒径较小时，具有更高的堆积密度，在相同的打印、烧结工艺下收缩更显著。

用 SEM 表征支架的微观形貌(图 3(b~e))发现，HA0 组的 HA 粉体粒径较小，不形成明显的表面微结构，且其堆积孔隙更小，烧结后具有更高的致密

度，表现为支架表面相对光滑。微球状 HA 粉体打印出的支架具有明显的表面微结构，这种结构由微球堆积形成，其尺度可用粒径差异加以区分，HA10、HA30 及 HA50 支架烧结后 HA 粉体的形态未遭到破坏，维持着良好的球粒堆积结构。

SEM 照片显示，HA 普通粉体为粒径小于 1 μm 的粉体(HA0)，HA10、HA30 和 HA50 微球的粉体具有疏松孔状结构的微球，其粒径分别为 <20、20~40 和 40~60 μm。对比粉体与支架的结构可知，粉体结构在 3D 打印、高温烧结后得以保留并转移到支架上，使支架具有多级的微结构。

粉体粒度对烧结程度具有一定的影响，细而均

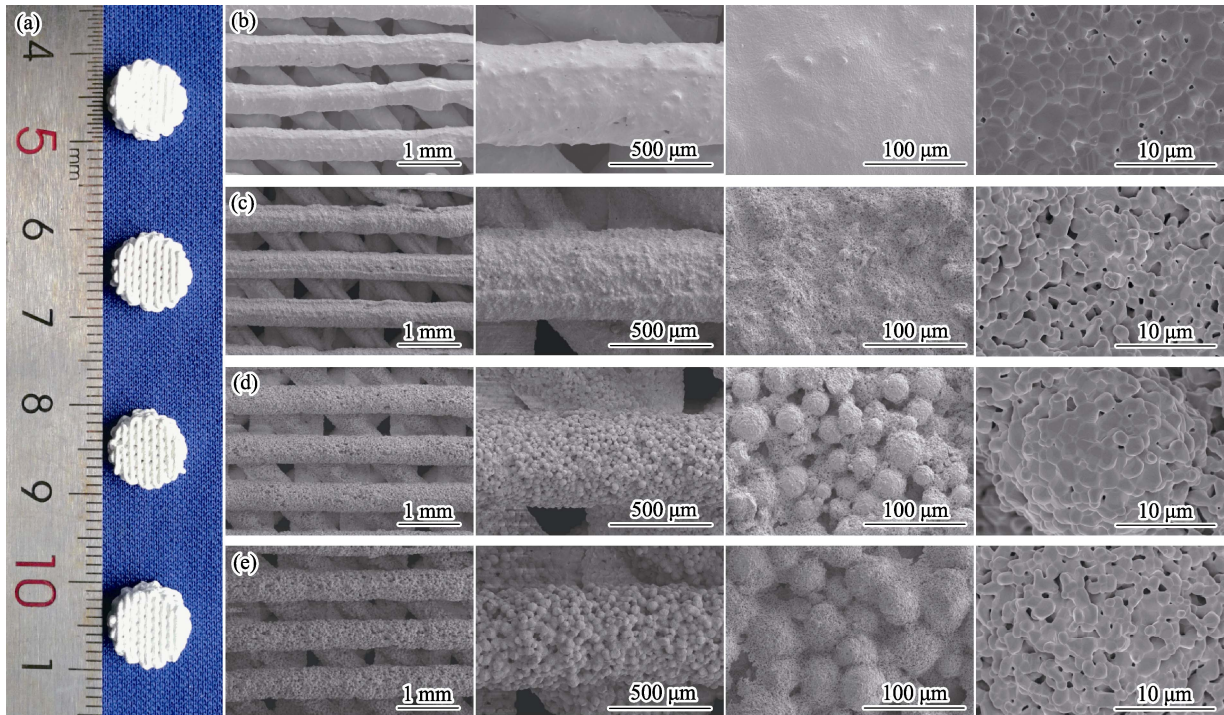


图 3 (a)不同粒径 3D 打印 HA 微球支架及 (b) HA0、(c) HA10、(d) HA30 和(e) HA50 的微观结构
Fig. 3 (a) 3D printing HA microsphere scaffolds with different particle sizes and microstructure of (b) HA0, (c) HA10, (d) HA30, and (e) HA50 scaffolds

匀的粉体具有更高的致密度和烧结收缩率, 这也解释了四种支架烧结后的宏观尺寸差异。在毫米尺度上可以观察到微球间孔隙随着粒径增大而增大, 支架疏松程度也随之上升; 在微米尺度上可看出各组的晶粒大小基本相同, 尺寸约为 2~5 μm ; 对照组 HA0 晶粒间孔隙较小, 而 HA10、HA30 和 HA50 的晶粒间隙基本一致, 尺寸约 1 μm 。这种差异是因为原始粉体的差异而造成的。

2.4 3D 打印不同粒径 HA 微球支架的离子释放

将各支架浸泡在 Tris-HCl 溶液 1、3、7 d 后的 Ca 和 P 离子浓度如图 4 所示。在 HA 支架的离子释放过程中, HA10、HA30、HA50 支架的 Ca 离子释放速率在 1、3、7 d 时均较 HA0 低 30% 左右, 而 P 离子在早期释放速率较高, 但到第 7 d 时基本相同。而使用不同粒径 HA 微球打印的支架 HA10、HA30、HA50 在离子释放上无显著性差异。即微球支架的粉体粒径对支架的离子释放并没有明显影响, 影响其释放水平的主要因素是打印原料粉体的选择。有研究^[20]表明 HA 粉体的离子释放受其结晶程度影响, 结晶度越高, 离子释放越慢。本研究的粉体表征结果显示, 微球粉体在结晶度上高于普通 HA 粉体(图 2), 所以微球粉体较高的结晶度影响了支架的结晶程度, 进而抑制支架的离子释放。

由于几种支架的离子释放析出情况类似, 故它们的生物学行为差异主要由其微结构决定。

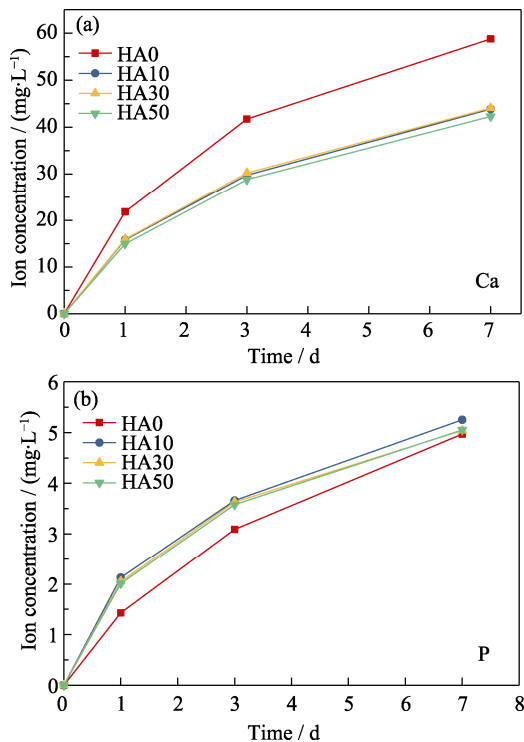


图4 HA 支架的离子累积释放量

Fig. 4 Accumulative ion release of HA scaffolds

2.5 3D 打印不同粒径 HA 微球支架的生物学性能

将 rBMSCs 直接种在支架表面, 培养 24 h 后脱水固定, 定性观察细胞在支架上的粘附状态。细胞在支架上固定后的扫描电子显微镜照片显示, 在 HA0 支架光滑表面的细胞贴壁铺展, 未见明显伪足; 而细胞在微球形态的支架(HA10、HA30、HA50)表面上粘附时, 有较多的伪足伸长并横跨在微米球形成的类台阶结构上, 利于其铺展和相互连接, 从而达到更高的粘附密度。rBMSCs 的直径约 30 μm , 与 HA30 支架表面微球形成的凹凸结构尺度相当。可见, HA 微球在支架表面构建出的微结构能促进细胞的伸长和粘附(图 5), 而且 HA30 更有利于 rBMSCs 在支架表面上的粘附(箭头所指处)。

本研究通过 CCK-8 法检测和 DAPI 染色法对 rBMSCs 在支架表面的增殖分别作了定量和定性分析。支架接种细胞悬液后, 因重力的作用大量细胞掉落至培养板底部并优先在细胞培养板上生长。培养 1 d 后, 细胞主要在培养板底部生长, 支架上统计所得细胞数量极少(图 6(a)); 培养至第 3 d, 细胞开始迅速增殖, 培养的第 3~5 d 为细胞在支架上快速增殖的阶段。HA10、HA30、HA50 三种支架虽使用同源的 HA 微球 3D 打印成型, 但 H30 支架上细胞增殖最快。这可能是由于这个尺度的微米结构最有利于细胞伪足伸出、因此提高了迁移速度; 培养至第 5 d 时, 具有微球结构的三组支架上的细胞密度均超过了表面较光滑的 HA0 支架, 其中 HA30 上生长的细胞数量最多。相比常规非微球表面的支架, 微球 HA 支架大量的孔隙和球形表面能够给细胞提供更多的附着位点, 因此细胞接触抑制发生较迟, 能够持续增殖达到较高的水平。DAPI 染色后在荧光显微镜下观察的细胞数量和形态如图 6(b)所示。与定量检测结论一致, 即在微球粒径~30 μm 时, 球间孔隙大小及形成的台阶高度最有利于细胞的生长。

由细胞在支架上的增殖及粘附情况可知, 微球结构的支架相比光滑表面的支架为细胞提供了更多的生长位点, 微球形成的台阶结构有助于细胞伪足伸长, 更多的孔隙和更大的比表面积降低了细胞接触抑制, 有效促进了间充质干细胞的粘附和增殖, 其中微结构尺度和细胞尺度相当的 HA30 支架作用最为显著。

已有的研究证实, 表面微纳结构对生物材料的生物学效应(如诱导细胞分化等)具有关键作用^[16]。而采用不规则的粉体为原料的 3D 打印生物陶瓷支架, 经热处理烧结成型后, 缺乏表面微纳结构。因此, 为

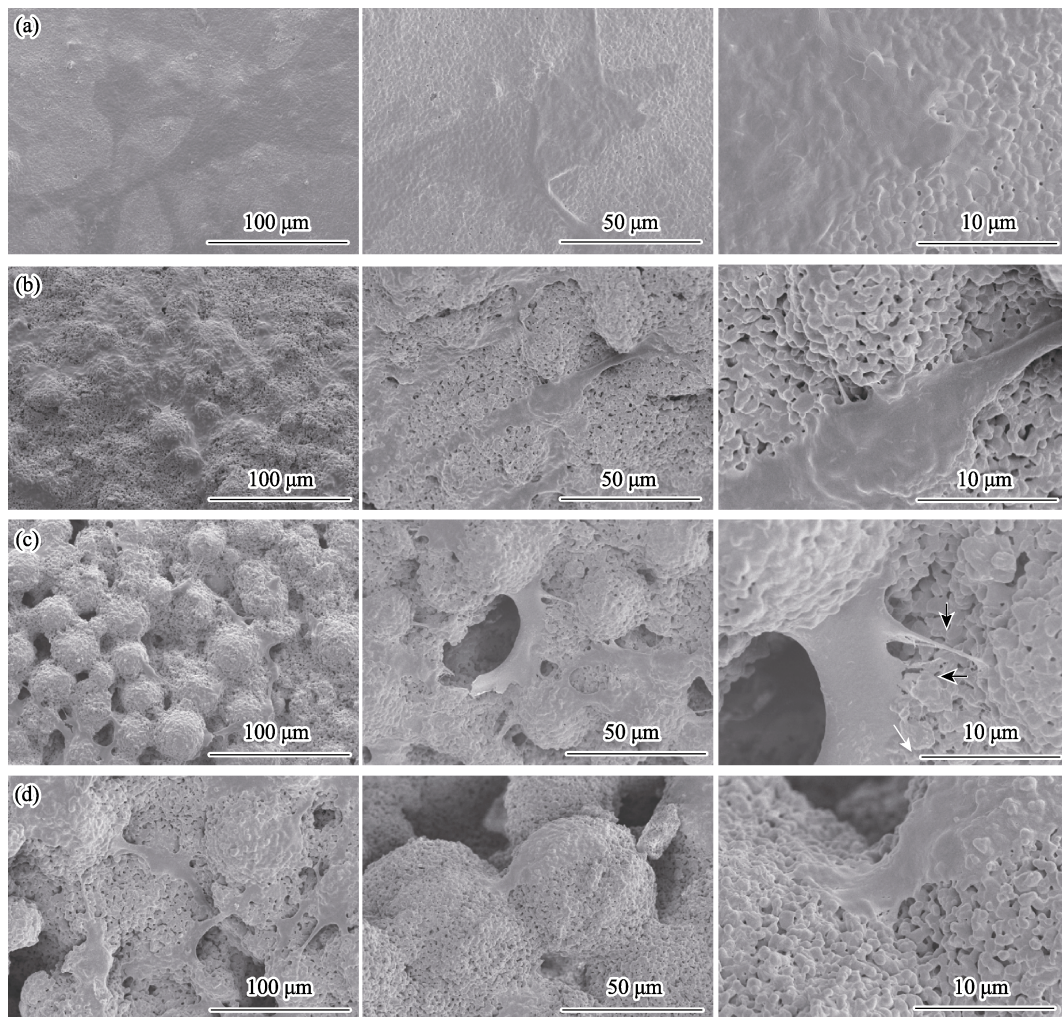


图 5 rBMSCs 在(a) HA0、(b) HA10、(c) HA30 和(d) HA50 支架上的生长状态(箭头所指为细胞伪足)
Fig. 5 Growth states of rBMSCs on (a) HA0, (b) HA10, (c) HA30 and (d) HA50 scaffolds with arrows pointing to the cell pseudopodia

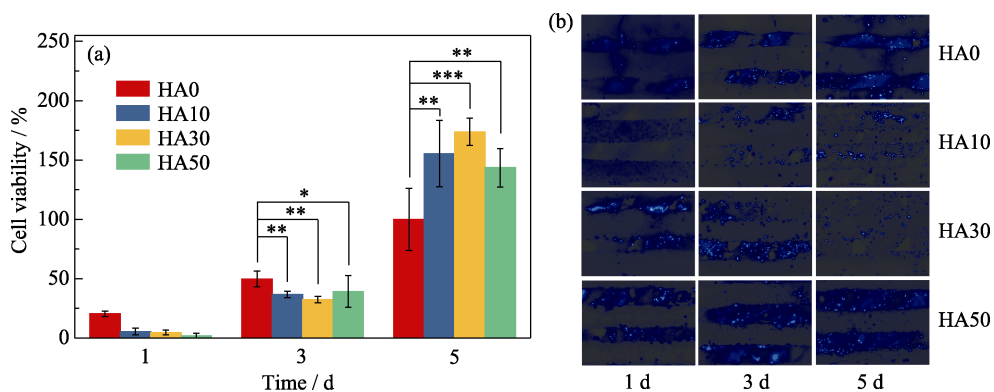


图 6 rBMSC 细胞在各支架上增殖的结果
Fig. 6 Proliferation of rBMSCs on scaffolds

(a) Quantitative statistics of cell proliferation, and (b) fluorescence photographs of cell proliferation with DAPI staining

了获得 3D 打印生物陶瓷支架表面微纳结构, 通常还需要进一步的表面处理(如水热等方法)^[18]。虽然这类方法能在支架表面构建出微纳结构, 但其对材料基体以及表面处理试剂和条件等要求较高, 且可

控性相对较低。本研究的优势在于通过改变 3D 打印生物陶瓷粉体原料的形貌和尺度大小, 即可实现支架表面的微结构, 同时证明使用微球作为原料打印的支架, 表面微结构能够有效调控细胞的生物学

响应, 因此在粉体合成时即实现了对支架微结构的精确调控, 进而实现所需的生物效应, 具有简单、高效的优点。

3 结论

本研究以 HA 微米球为原料, 采用 3D 打印的方法, 构建出既有宏观有序结构又有微观有序结构的骨组织工程支架, 较非微球原料制备的支架具有更大的表面积, 而且操作简单, 可满足骨组织工程对支架多级结构调控的需求。

制备 HA 支架的微球粒径影响支架烧结后的收缩率, 但基本不影响支架的物相与离子释放速度。具有微球结构的支架相比于非微球结构的支架, 可为细胞提供更多的粘附和伸长位点, 对间充质干细胞的粘附和增殖具有显著促进作用, 其中微球结构尺度和细胞尺度相当的 HA30 支架的促进作用最强。因此, 通过生物陶瓷粉体的形貌和尺度大小可以实现 3D 打印支架表面的微结构调控, 优化最适合组织修复所需的组织工程支架, 为支架微结构设计提供新的策略。

参考文献:

- [1] WEINER S, WAGNER H D. The material bone: structure-mechanical dunction relations. *Annual Review of Materials Science*, 2003, **28(1)**: 271–298.
- [2] WILSON C E, BRUIJN J D D, BLITTERSWIJK C A V, *et al.* Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, **68a(1)**: 123–132.
- [3] MALAFAYA P B, PEDRO A J, PETERBAUER A, *et al.* Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2005, **16(12)**: 1077–1085.
- [4] COX S C, THORNBY J A, GIBBONS G J, *et al.* 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. *Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications*, 2015, **47**: 237–247.
- [5] LIU A, XUE G H, SUN M, *et al.* 3D Printing surgical implants at the clinic: a experimental study on anterior cruciate ligament reconstruction. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 21704
- [6] SHIMOMURA K, MORIGUCHI Y, MURAWSKI C D, *et al.* Osteochondral tissue engineering with biphasic scaffold: current strategies and techniques. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2014, **20(5)**: 468–476.
- [7] WEI G, MA P X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2004, **25(19)**: 4749–4757.
- [8] LEUKERS B, GÜLKAN H, IRSEN S H, *et al.* Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 2005, **16(12)**: 1121–1124.
- [9] WOODARD J R, HILLDORE A J, LAN S K, *et al.* The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*, 2007, **28(1)**: 45–54.
- [10] LI S H, DE WIJN J R, LAYROLLE P, *et al.* Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2010, **61(1)**: 109–120.
- [11] SILVA M L A, CRAWFORD A, MUNDY J M, *et al.* Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: assessment of extracellular matrix formation. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6(3)**: 1149–1157.
- [12] FENG C, ZHANG W, DENG C, *et al.* 3D printing of lotus root-like biomimetic materials for cell delivery and tissue regeneration. *Advanced Science*, 2017, **4(12)**: 1700401.
- [13] LUO Y, LODE A, WU C, *et al.* Alginate/nanohydroxyapatite scaffolds with designed core/shell structures fabricated by 3D plotting and *in situ* mineralization for bone tissue engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, **7(12)**: 6541–6549.
- [14] DENG C J, YANG Q, SUN X L, *et al.* Bioactive scaffolds with Li and Si ions-synergistic effects for osteochondral defects regeneration. *Applied Materials Today*, 2018, **10**: 203–216.
- [15] DALBY M J, RIEHLE M O, YARWOOD S J, *et al.* Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography. *Experimental Cell Research*, 2003, **284(2)**: 274–282.
- [16] FU YA-KANG, ZHOU XUE, XIAO DONG-QIN, *et al.* Influence of micro-nano structure of haydroxyapatite particles on protein adsorption. *Journal of Inorganic Materials*, 2015, **30(5)**: 523–528.
- [17] ZHAO C C, WANG X Y, GAO L, *et al.* The role of the micro-pattern and nano-topography of hydroxyapatite bioceramics on stimulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 2018, **73**: 509
- [18] ZHAO C C, XIA L G, ZHAI D, *et al.* Designing ordered micropatterned hydroxyapatite bioceramics to promote the growth and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, **3(6)**: 968–976.
- [19] ZHOU P Y, WU J H, XIA Y, *et al.* Loading BMP-2 on nanostructured hydroxyapatite microspheres for rapid bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, **13**: 4083–4092.
- [20] SHI Z L, HUANG X, CAI Y R, *et al.* Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomaterialia*, 2009, **5(1)**: 338–345.