

微纳米结构生物材料在骨组织再生修复中的研究进展

赵睿^{1,2}, 毛飞¹, 钱晖¹, 杨晓², 朱向东², 张兴栋²

(1. 江苏大学 医学院 检验系, 镇江 212013; 2. 四川大学 国家生物医学材料工程技术研究中心, 成都 610064)

摘要: 天然骨组织由有机纳米材料胶原纤维和无机纳米材料羟基磷灰石组成, 具有独特的微纳米结构以及传统人工合成材料无法比拟的生物功能和力学性能优势。在组织工程和再生医学的研究中, 模拟天然骨组织层次特征的微纳米结构生物材料是研究热点之一。近年来, 研究人员发现微纳米结构生物材料能有效调节细胞增殖、分化和迁移, 促进细胞成骨分化, 进而促进体内骨组织再生。本文综述了利用天然骨组织层次特征指导材料分层设计的研究进展以及微纳米结构生物材料的细胞相互作用特性和在骨组织工程中的应用, 以期为生物材料的设计提供新思路。

关键词: 微纳米结构; 骨再生; 生物材料; 综述

中图分类号: TB33 文献标志码: A

Micro-/Nano-structured Biomaterials for Bone Regeneration: New Progress

ZHAO Rui^{1,2}, MAO Fei¹, QIAN Hui¹, YANG Xiao², ZHU Xiangdong², ZHANG Xingdong²

(1. Department of Inspection, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Natural bone has a unique micro-/nano-structure, which is composed of organic nanomaterials (collagen fibers) and inorganic nanomaterials (hydroxyapatite). Thus, compared with traditional synthetic materials, natural bone has incomparable advantages in biological, functional and mechanical properties. In the research of tissue engineering and regenerative medicine, biomaterial scaffold with micro-/nano-structures simulating the characteristics of natural bone tissue are one of the research focuses. In recent years, researchers have found that micro-/nano-structured biomaterials can effectively regulate cell proliferation, differentiation and migration, and have a strong ability to promote cell osteogenic differentiation, so as to promote bone tissue regeneration *in vivo*. In this article, we focus on reviewing recent research progress of biomaterial design on simulating the hierarchical characteristics of natural bone, analyzing the complicated interaction between micro-/nano-structured biomaterials and cells, and summarizing their applications in bone tissue engineering to provide new ideas for the design of biomaterials.

Key words: micro-/nano-structure; bone regeneration; biomaterial; review

天然骨组织是一种高度动态、复杂的血管化组织, 能在整个生命过程中不断重塑^[1]。尽管骨组织具有一定程度的自愈能力, 但诸如创伤、感染、肿瘤切除和关节翻修等都可能造成超出自身愈合能力

收稿日期: 2022-09-30; 收到修改稿日期: 2022-10-27; 网络出版日期: 2023-03-06

基金项目: 国家自然科学基金(82202332); 江苏省双创博士基金(JSSCBS20221249)

National Natural Science Foundation of China (82202332); Innovation and Entrepreneurship Doctor of Jiangsu Province (JSSCBS20221249)

作者简介: 赵睿(1995-), 女, 博士, 讲师. E-mail: 1000005729@ujs.edu.cn

ZHAO Rui (1995-), female, PhD, lecturer. E-mail: 1000005729@ujs.edu.cn

通信作者: 钱晖, 教授. E-mail: 1000007341@ujs.edu.cn

QIAN Hui, professor. E-mail: 1000007341@ujs.edu.cn

的骨缺损,并延长骨愈合和功能恢复所需时间^[2]。在这些情况下,通常需要介入性手术治疗,即使用骨移植物来固定和促进骨再生。临床常用的骨修复材料包括自体骨、同种异体骨、人工骨材料等^[3-4]。“自体骨”是骨修复的金标准材料,但患者供骨数量有限,且易导致取骨区各种并发症^[5]。同种异体骨虽能解决骨源有限的问题,但存在疾病传播、免疫反应及骨吸收风险^[6]。生物材料(如骨水泥、金属、生物活性陶瓷等)广泛应用于临床骨组织修复。其中,金属植入物具有较好的稳定性,主要用作固定装置^[7]。聚合物材料如 PMMA 骨水泥既可作为惰性骨填充材料单独使用,亦可对金属植入物进行加固^[8]。生物活性陶瓷,如磷酸钙陶瓷和生物活性玻璃等,主要以块体、涂层和粉体形态用于骨组织修复,临床常用于非承力部位如上肢骨的修复、骨移植和骨增强的空隙填充^[9]。这些生物材料虽然克服了自体骨和同种异体骨的不足,但其修复效率和修复质量仍显不足。

在骨组织再生过程中,相关细胞的快速启动、定向分化以及微环境下营养物质输送是决定骨组织再生修复速度的重要因素^[10]。因此,开发具有快速调控细胞/组织生物学响应、高骨再生速率的生物材料是缩短临床治疗时间、降低治疗费用、加速大面积和难愈合骨缺损修复的关键,也是国内外学者致力研究的方向。天然骨组织具有从微观纳米尺度到宏观尺度的复杂层次结构,能够产生高机械强度和独特生物学特性^[11](图 1)。有鉴于此,研究人员通过模拟天然骨组织微纳米结构特征构建了新型仿生微纳米结构材料,以促进细胞对特异性蛋白分子的募集、引导细胞取向,并促进细胞的黏附、增殖及成骨分化,进而加速骨组织的再生修复效率^[12-13]。亦有研究指出通过优化生物材料表面微纳米结构的形状和尺寸,能够进一步调控微环境下材料吸附蛋白的种类和浓度,为细胞提供类似天然组织的微环境,从而提高微纳米结构生物材料的成骨性能^[14]。此外,研究人员还对微纳米形貌特征调控细胞命运的分子机制进行了深入研究,阐述了微纳米特征结构作用下生物材料调节细胞行为(如黏附、迁移、增殖和分化)的作用途径以及分子机制,并取得了一定进展^[15]。因此,本文围绕医用骨组织再生修复生物材料,分别从微纳米结构金属、聚合物和生物活性陶瓷三个方面的研究进展进行综述,并探讨相关的成骨作用机制,从而为骨组织再生修复提供新的研究方向,探寻新的骨缺损再生修复途径。

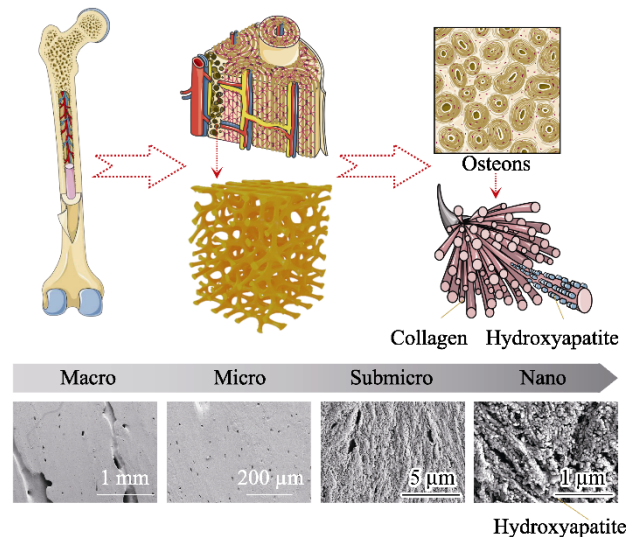


图1 天然骨组织的层次结构模式图和人股骨骨干部皮质骨扫描电镜照片^[1,11]

Fig. 1 Schematic diagram of bone hierarchical structural organization (up part) and scanning electron microscope images (bottom part) of the cortical bone specimens located at human femoral diaphysis^[1,11]

In bone tissue, macroscale arrangements involve both compact/ cortical bone at the surface and spongy/trabecular bone in the interior. Compact bone is composed of osteons and Haversian canals, which surrounded by blood vessels. Osteons have a lamellar structure, with individual lamella consisting of fibers arranged in geometrical patterns. The fibers comprise several mineralized collagen fibrils, composed of collagen protein molecules formed from three chains of amino acids and nanocrystals of hydroxyapatite, and linked by an organic phase to form fibril arrays

1 微纳米结构骨修复材料的作用机制

研究表明将微纳米层次结构引入植入物表面后,能更好地模拟天然骨组织的结构,从而实现快速骨融合。在不添加药物和生长因子的情况下,这种分层微纳米结构能够刺激细胞浸润增殖、营养/废物运输、骨骼向内生长以及血管形成^[16]。微纳米分级结构可以通过调控诸多生物化学信号通路如 Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)、蛋白激酶 B(AKT)、血管动蛋白 130/Yes 相关蛋白(AMOT130/YAP)等,以及骨免疫微环境协同刺激细胞向骨细胞系分化,进而促进新骨形成^[17-19]。另有研究发现微纳米结构不仅能够显著抑制破骨细胞的形成和活性^[20],还能够调控巨噬细胞黏附状态,促进巨噬细胞从表型 M1 向 M2 极化,从而构建促进愈合的免疫环境,进一步促进成骨和血管生成的相关基因表达^[21]。这些研究表明,特定的微纳米层次结构不仅能够通过调节免疫微环境促进成骨和血管生成,同时还能抑制破骨细胞形成和功能。以此为基础,深入探索材料表面微纳米结构调控细胞功能及其体内成骨性能的作用机制,将可为新

型生物功能材料的设计提供更精确的指导。

1.1 微纳米结构生物材料对成骨的作用

越来越多的研究表明,微纳米结构生物材料在骨组织工程中具有巨大的潜力,能为骨组织修复提供有利的微环境,引导细胞取向,促进细胞增殖、黏附和成骨分化,进而增强骨再生^[12]。并且与单个微纳米形貌相比,分层微纳米形貌具有综合优势,即微尺度结构能加强骨与植入物之间的连锁(Interlocking),而纳米尺度结构能促进蛋白质吸附、细胞黏附和最终的骨整合^[22]。例如,研究发现相较于原始选择性激光熔化钛表面,由阳极氧化产生微管/纳米管(TNT)和由碱热处理形成微管/纳米网(TNN)钛表面的粗糙度降低,亲水性增加,碱性磷酸酶(ALP)活性和成骨相关基因的表达提高^[23]。Li等^[24]采用溶剂流延和静电纺丝法制备了由聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和微纳米生物活性玻璃(MNBG)组成的新型双层膜(MNBG/PLGA),并发现该双层膜能够促进成骨相关基因 RUNX2、骨桥蛋白的表达,进而增强骨再生。Zhang等^[17]利用数字光处理(DLP)打印与原位晶体生长技术构建微纳米结构 β -磷酸三钙支架,其能够促进大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的黏附和增殖,并通过靶向丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、信号传导及转录激活子(STAT)和 AKT 信号通路显著促进 BMSCs 的成骨分化。体内实验结果进一步表明微纳米拓扑结构支架能够有效调节缺损部位的微环境,加速修复骨缺损。

其次,研究发现微纳米形貌(Micro/nano-topography, MNT)能够影响肌动蛋白细胞骨架,并且在肌动蛋白细胞骨架动力学中起关键作用的 RhoGTPases 家族成员 Rac1 还可通过调控 MAPK 通路活性在 MNT 的成骨分化调控中发挥重要作用^[25]。进一步,Long等^[26]研究发现在金属钛上结合分级的宏-微-纳米粗糙度能够使成熟成骨细胞/骨细胞呈现典型的星状形态,快速随机迁移,并促进间充质干细胞的成骨分化。另外,表/界面纳米结构可以通过调节生长因子的构象来提高生物活性,从而提高促成骨分化能力,促进骨再生^[27]。Li等^[28]研究了微纳米羟基磷灰石生物陶瓷对骨形态发生蛋白 2(BMP2)结构的影响以及对骨髓基质细胞反应的影响,结果发现,与亚微米级结晶颗粒的材料相比,微纳米结构羟基磷灰石生物陶瓷表现出较高的粗糙度、良好的亲水性和较强的机械性能,并能够维持 BMP2 的构象,促进细胞的黏附和成骨分化。体内实验进一步表明该微纳米结构陶瓷具有更为优异的骨诱导性^[29]。同样地,Zhao等^[30]通过水热法和模板法制备了微纳米结构

羟基磷灰石生物陶瓷,并研究了表面结构对整合素表达、BMP2 信号通路和细胞间通讯的影响。结果发现微纳米结构羟基磷灰石生物陶瓷诱导的成骨分化首先通过激活整合素来调节,然后进一步激活 BMP2 信号通路和细胞通讯。而激活的 BMP2 反过来可以激活整合素和间隙连接 Cx43 相关的细胞通讯,由此推断微纳米结构的不同激活机制可导致整合素激活和成骨的协同刺激效应^[30]。

此外,生物材料的力学性能也是影响成骨的重要因素。理想的骨组织再生生物材料应在力学性能上与天然骨相匹配,以便在骨再生的初始阶段发挥支持作用,进而实现骨缺损的完全再生。Xia等^[31]通过水热处理构建了微纳米结构磷酸钙生物陶瓷,发现该微纳米结构磷酸钙陶瓷材料的力学性能得以显著增强,并能够促进间充质干细胞向骨细胞系分化。本实验室在前期研究中发现,对多孔磷酸钙陶瓷进行水热处理后,陶瓷表面能够生长羟基磷灰石晶须,通过将磷酸钙纳米粒子引入晶须化陶瓷表面,成功构建了力学增强的微纳米结构磷酸钙(nwCaP)陶瓷^[32]。植入比格犬股骨节段性骨缺损后,其不仅能与宿主骨形成良好的骨整合,而且在材料内部有大量的新骨生成。进一步将其应用于骨质疏松大鼠骨缺损修复,发现 nwCaP 陶瓷材料不仅具备初始力学稳定性,植入该材料的动物也表现出更低的骨折率、优异的成骨效果和新骨取代率^[33](图 2)。基

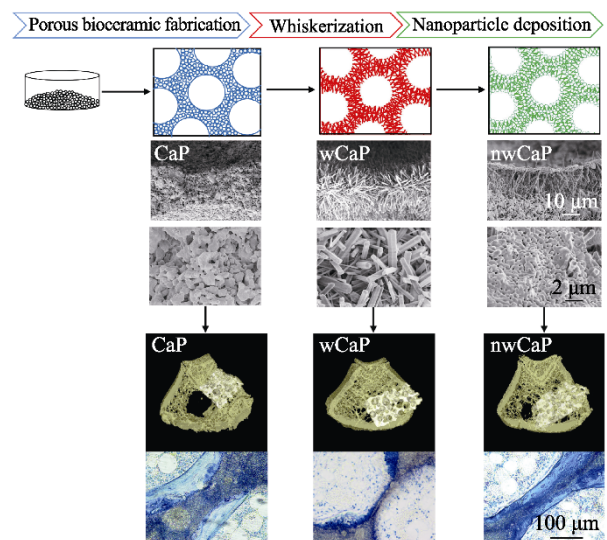


图 2 不同表面形貌的传统磷酸钙(CaP)、晶须化磷酸钙(wCaP)和微纳米结构磷酸钙(nwCaP)生物陶瓷制备流程图和成骨效果^[33]

Fig. 2 Schematic diagram of preparation process and bone forming ability of traditional calcium phosphate (CaP), whiskered calcium phosphate (wCaP) and micro-/nano-structured calcium phosphate (nwCaP) bioceramics with different surface morphologies^[33]

因芯片分析结果表明, 该复合陶瓷通过 JAK2 信号通路选择性上调成纤维细胞生长因子 23(FGF23)促进骨形成(图 3)。同时研究发现, 在微纳米形貌诱导间充质干细胞分化过程中, 相关物理因素的信号通路被启动, 并参与调控细胞的成骨分化过程。机械应力是物理因素中的重要组成, 启动力学信号通路能调控干细胞的分化、增殖、迁移等生命活动^[34]。例如, Liu 等^[18]以不同孔径的二氧化钛纳米管为基底, 探讨力学信号在微纳米形貌诱导 BMSCs 成骨分化中的作用, 发现作为力学信号通路的潜在参与者, AMOT130/YAP 是介导微纳米形貌诱导 BMSCs 成骨分化的重要途径。另有研究设计了压电纳米纤维支架, 并基于干细胞与材料之间的动态机械相互

作用, 借助细胞迁移力引起压电纤维的机械形变, 产生压电电信号反作用于细胞, 从而调控干细胞命运与组织再生, 证实细胞不仅被动地响应细胞外基质传递的生化 and 生物物理信号, 也能主动改变周围微环境以满足其需要^[35]。

1.2 微纳米结构生物材料对破骨的作用

最近的研究不仅集中于微纳米结构生物材料对间充质干细胞的影响, 还致力于阐明这类材料对破骨细胞和破骨前体细胞的作用, 因为破骨细胞不仅能促进生物材料的再吸收, 还能触发成骨细胞的响应^[36]。众多研究指出相较于原材料, 微纳米结构生物材料不仅能够显著降低破骨细胞标志物抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)和破骨细胞生成标志物的基因

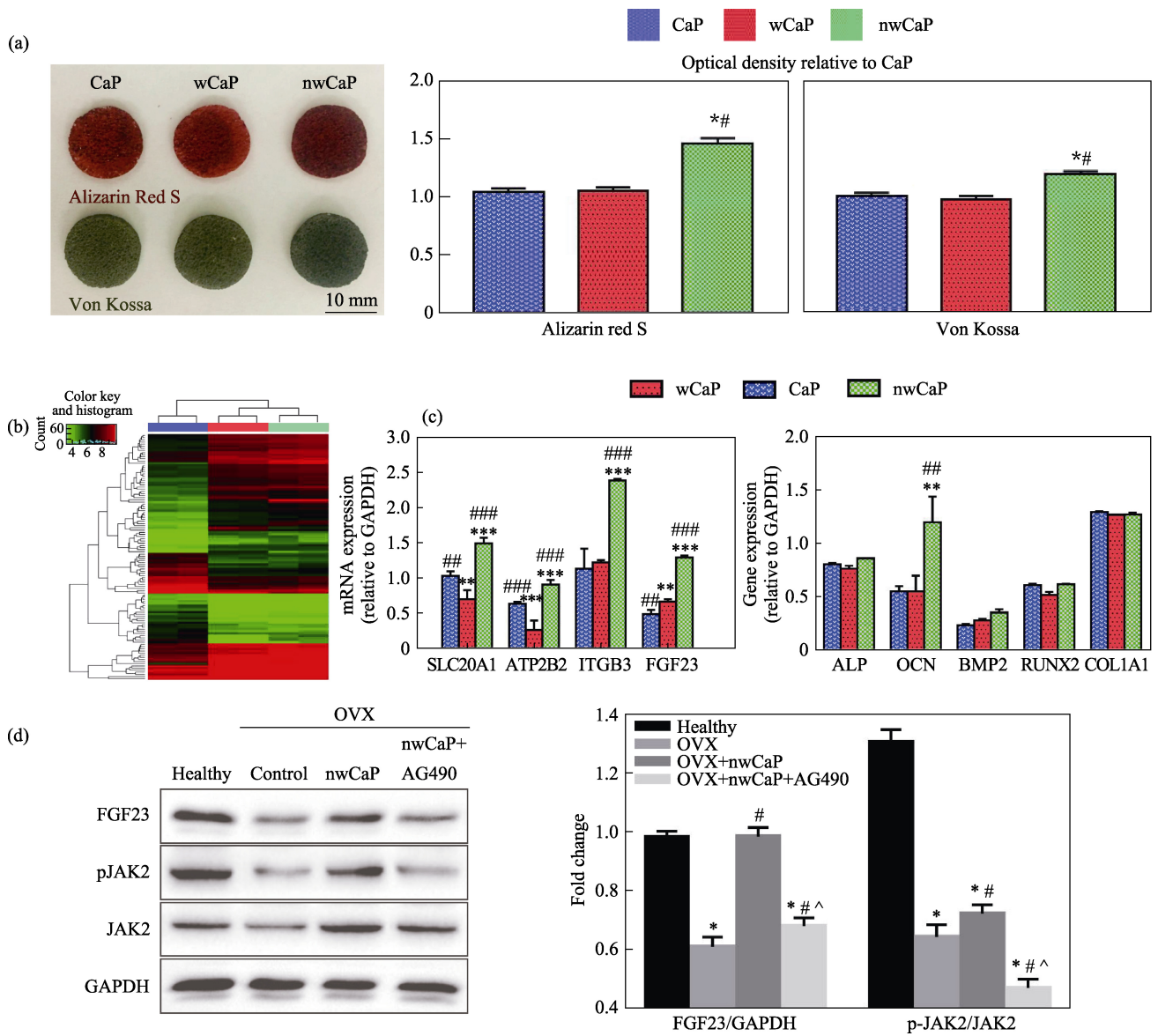


图 3 微纳米结构磷酸钙(nwCaP)生物陶瓷诱导成骨所涉及的分子机制研究^[33]

Fig. 3 Illustration of the possible molecular mechanism involved in nwCaP bioceramics induced osteogenic effect^[33]

(a) Photos of Alizarin Red S and von Kossa stainings; (b) Cluster analysis of genes and quantitative qRT-PCR analysis expressions; (c) Osteogenesis-related gene expression; (d) Representative western blot analysis; OVX: Ovariectomized

表达,还能阻碍破骨细胞的融合和骨吸收活性,进而促进成骨^[36-37]。例如,与羟基磷灰石材料相比,微纳米结构羟基磷灰石材料虽不影响破骨前体细胞的黏附,但能够阻碍破骨前体细胞的融合和再吸收活性,证明微纳米表面形貌对破骨细胞形成和活性有显著抑制作用^[20]。Bai 等^[21]在钛金属种植体表面构建的微纳米结构二氧化钛纤维样仿生结构网络(Micro/nano-scale, MNS),能够下调 TRAP 和组织蛋白酶 K(CTSK)的表达。Yu 等^[23]对比研究了钛表面微管/纳米管(TNT)和微管/纳米网(TNN)的成骨性能,二者与钛表面(SLM)组相比,TNT 组成骨相关基因表达最高,TNN 组次之,而在破骨细胞生成方面,TNN 的 TRAP 活性和破骨细胞生成相关基因表达最低,TNT 低于 SLM,但高于 TNN。植入体内 4 w 后,TNT 组种植体周围骨百分比(BV/TV)最高,且其周围的成骨细胞和破骨细胞活性均高于 TNN,表明 TNT 组骨转换率较高。Chen 等^[38]通过肌内植入模型研究羟基磷灰石材料诱导的骨形成与非骨部位破骨细胞出现之间的潜在关系,发现与亚微米尺度羟基磷灰石材料相比,微纳米结构羟基磷灰石材料能够显著抑制破骨细胞的形成和功能,表现为细胞融合受到抑制、凋亡增加、特异性基因和蛋白质表达受到抑制、TRAP 阳性细胞减少等,该研究表明生物活性陶瓷的表面结构对破骨细胞的形成具有很大影响,并且破骨细胞形成可能与其骨诱导能力有关。以上研究证实微纳米结构生物材料在抑制破骨方面的功效,然而目前对其内含分子机理仍需要进一步探索。

1.3 微纳米结构生物材料对血管再生的作用

在组织修复过程中,骨生成与血管生成紧密相伴^[39]。其中,促进血管再生的策略包括靶向血管前体细胞、增强内皮化和生物活性材料诱导等^[40]。据报道,微纳米结构生物材料一方面能够促进内皮细胞黏附、增殖,另一方面还能促进内皮细胞血管生成基因的表达,进而促进血管生成^[41-42]。例如,研究发现钛种植体表面微纳米尺度的二氧化钛纤维样仿生结构网络能够促进骨髓基质细胞的成骨分化和内皮细胞的血管分化^[21]。Yang 等^[43]发现微纳米网状结构钛金属具有较高的亲水性和中等的粗糙度,能够通过 Src-ROCK 信号引导细长巨噬细胞黏附状态,将巨噬细胞转换为 M2 表型,并促进内皮细胞 bEnd.3 血管生成相关因子(如 PDGF、IGF、FGF 等)的表达,体内研究也显示其血管生成和骨形成加快。Tian 等^[44]研究发现 PLGA 和 MNBG 复合多孔支架能促进人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)的黏

附和增殖,并显著增强 HUVECs 血管生成标记物 CD31 的表达。Liu 等^[45]在复合陶瓷 β -TCP/CaSiO₃ 上原位构建了微纳米棒杂化羟基磷灰石表面层,其能够促进小鼠 BMSCs 的成骨分化和 HUVECs 血管生成相关基因 CD31 和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,异位皮下移植的研究结果进一步表明其在植入 4 w 后促进毛细血管形成和骨再生,8 w 后在远离骨-植入物界面的部位诱导新骨基质形成。还有研究通过光刻结合水热法制备由不同纳米形貌(纳米针、纳米片和纳米棒)和尺寸(4、12 和 36 μ m)微图案组成的不同微纳米结构羟基磷灰石生物陶瓷,其中具有适当图案尺寸的微纳米分级结构可以促进巨噬细胞向 M1 或 M2 极化,进而改善骨再生^[41]。本研究团队曾发现负载适量纳米羟基磷灰石的微纳米结构羟基磷灰石生物陶瓷不仅能够促进骨质疏松区域成骨细胞的增殖和黏附,还可上调成骨相关因子(ATP2A2 和 FGF23)的表达,当植入骨质疏松大鼠临界骨缺损后,与成骨相关的标志物 CD31、EMCN 均呈阳性的毛细血管细胞数量也会更多,骨形成显著增强^[16](图 4)。

1.4 微纳米结构生物材料对骨免疫调节的作用

骨免疫调节是指对巨噬细胞向促炎症 M1 和抑炎症 M2 方向极化免疫反应的操纵,以产生有害或

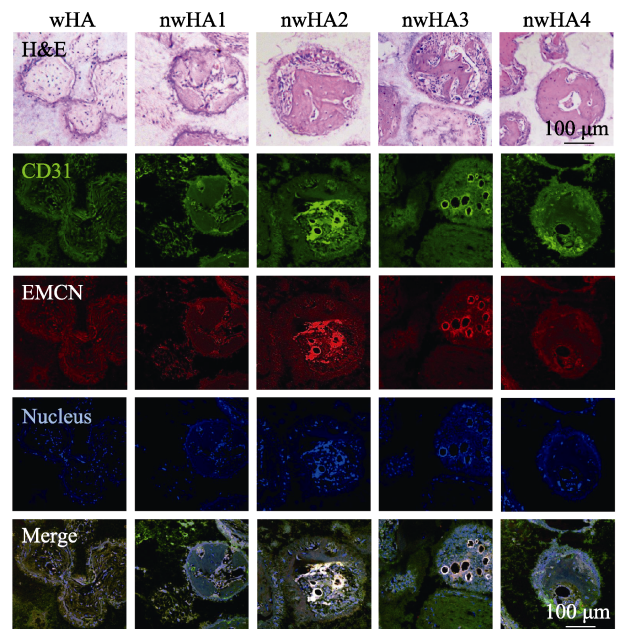


图 4 免疫荧光染色评估微纳米结构羟基磷灰石生物陶瓷内部的血管生成^[16]

Fig. 4 CD31 and EMCN staining of histological sections from the micro-/nano-structured hydroxyapatite bioceramic groups^[16]

Green fluorescence: CD31; Red fluorescence: EMCN; Blue fluorescence: Nucleus of the cells

有益的免疫微环境,进一步影响骨再生和血管生成^[46]。如前所述,微纳米结构生物材料能够通过调节免疫反应进而驱动血管生成和骨再生。例如,Chen等^[47]研究发现纳米结构可为蛋白质吸附以及促进成骨提供较大的表面积,并且表面纳米孔结构可提供不同的免疫环境,从而改变巨噬细胞的形状,诱导骨免疫反应,进而促进早期骨再生中成骨细胞系的招募和分化。因此,控制纳米孔的大小或能调节免疫细胞的行为。研究发现与较小孔径(20 nm)相比,大孔径(200 nm)的巨噬细胞附着较少,然而其附着的巨噬细胞高度活化,释放的促炎细胞因子较多,体内实验结果进一步表明与孔径20 nm的氧化铝相比,孔径200 nm的氧化铝引起了更强的炎症反应,原因在于孔径200 nm的氧化铝周围有更多的细胞募集和促炎细胞因子的产生^[48-49]。随后的研究表明纳米孔的结构和孔径能够影响免疫细胞的扩散和形状变化,从而调节自噬通路因子(LC3A/B、Beclin-1、Atg3、ATG7、p62等)的表达和激活,从而调节免疫细胞的生长和增殖^[50]。

研究发现,钛种植体表面微纳米尺度的二氧化钛纤维样仿生结构网络(Micro/nano-scale, MNS)能够调控巨噬细胞向抑制炎症的M2极化,抑制促炎症的M1极化,从而导致炎症相关细胞信号通路下调^[21]。另外,在MNS上也发现了自噬相关基因(ATG5、LC3A/B、P62)上调,因此该研究证实MNS能够通过调控骨免疫微环境进一步促进骨/血管的生成。Zhang等^[46]通过研制光滑钛和微纳米钛金属植入物探讨了巨噬细胞RAW264.7作用下免疫微环境对成骨细胞MC3T3-E1的分化和自噬的影响,结果发现微纳米钛金属植入物可刺激RAW264.7细胞分化为M2型,形成抗炎免疫微环境,以促进成骨细胞的增殖和分化。另外,抗炎免疫环境能够激活成骨细胞自噬水平,抑制自噬后成骨标志物表达下调。该研究表明抗炎免疫微环境可以促进成骨细胞增殖和分化,自噬在这一过程中起重要作用。同样,Yang等^[41]通过光刻结合水热法制备微纳米结构羟基磷灰石生物陶瓷,结果发现适当图案大小的微纳米分级结构能够调节炎症反应,进而影响人骨髓基质细胞的成骨分化和HUVECs的血管生成能力。

2 微纳米结构生物材料对体内骨组织再生的影响

为满足骨缺损重建的临床需要,研究人员开发探索了多种人工骨移植替代物,包括金属植入物、

聚合物和生物陶瓷等^[51]。其中,金属植入物如316L不锈钢、钛合金、钴基合金、铌和形状记忆合金等具有较好稳定性、高强度、高断裂韧性、高硬度以及能够通过标准加工程序加工出复杂形状等优点^[52]。尽管金属材料具有优异的机械性能,但其刚度过高、生物活性较差常引发应力屏蔽效应,并且由于其与骨结合能力弱,易导致种植体松动^[53]。聚合物如聚醚醚酮(PEEK)、聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)等被广泛应用于骨组织再生修复,由于它们具有生物力学适配性好、加工性能优良等特点,能够较好满足骨组织工程支架材料的需求^[54]。然而聚合物生物活性较差,难以有效实现骨再生,长期效果欠佳。另外一些合成聚合物的体内降解产物易引发炎症反应,从而影响其生物相容性和组织修复进程^[55]。生物活性陶瓷如磷酸钙生物陶瓷、生物活性玻璃及其相关化合物等具有良好的骨传导性和骨诱导性,能与周围骨组织形成无纤维组织的直接接触,引导周围细胞浸润以及组织生长到缺损部位,与周围组织发生反应,逐渐形成牢固的化学键合^[56]。然而其低断裂韧性、拉伸强度和耐磨性以及脆性严重限制了其在承重部位的应用,目前主要以块体、涂层和粉体的形式用于临床^[57]。因此需要深入了解材料理化性质与其生物学性能之间的构效关系,并不断优化材料设计以增强植入材料的生物活性及其组织适配性,改善组织反应,恢复植入物的早期功能,并增强长期稳定性。

2.1 微纳米结构金属植入物对骨再生的影响

研究人员发现微纳米结构金属植入物一方面能够增加种植体与周围宿主骨之间的摩擦,有效避免骨愈合过程中的微移动,从而提高种植体的初始稳定性,另一方面能够在一定程度上模拟自然骨的层状结构特征,调控细胞行为,改善植入物与宿主骨的整合^[58-59]。例如,Zhao等^[60]采用酸蚀和阳极氧化方法制备了微纳米结构钛金属,结果发现其具有更大的比表面积,在植入体内后能够募集特异性蛋白,促进蛋白质的吸附。进一步研究发现,金属钛表面的分级宏-微-纳米粗糙度不仅使成熟成骨细胞/骨细胞呈现出典型的星状形态,还显著改善了共培养间充质干细胞的成骨分化^[26]。Ueno等^[61]通过碱热处理在钛表面构建了簇状、板状和结节状结构的纳米形貌特征,体内实验结果表明添加纳米形态特征后,钛种植体固定效果以及种植体的骨接触百分率显著提高。Brånemark等^[58]进一步研究发现,通过拓扑激光改性,钛种植体表面微纳米形貌和表面氧化物增加,从而促进了骨-种植体界面的骨形成。此

外, Chen 等^[27]通过选择性激光熔化的方式将纳米孔特征引入到钛表面, 其微细粗糙表面可以作为微一级基底, 进而形成微纳米纹理表面, 从而促进骨再生, 体内研究结果证实与纳米管的无序排列仿生特征相比, 纳米网的骨诱导效果更为优异。也有研究指出经过抛光和酸处理能够分别构建纳米、亚微米和微米表面形貌的生物可吸收锌金属, 其中亚微米和微纹理锌金属表面粗糙度增加有助于迅速减少巨噬细胞的炎症极化和血小板的黏附, 并促进细胞的成骨分化^[62]。

对微纳米结构金属植入物的研究, 不只局限于金属材料本身的改性研究, 还包括对其表面涂层材料的结构研究。例如, Wang 等^[63]在钛合金表面等离子体喷涂碳酸钙材料, 进一步通过水热法将其转化为纳米花簇结构硅酸钙涂层。结果发现该纳米结构不仅降低了硅酸钙的降解速度, 还增强了其表面磷灰石的矿化能力, 从而促进了细胞黏附、增殖和成骨分化。Zhou 等^[64]通过水热处理制备了锶掺杂微纳米粗糙钛表面(MNT-Sr), 并发现 MNT-Sr 可通过诱导干细胞迁移和成骨分化, 实现更好的骨整合。另有研究发现在钛植入体表面构建数十纳米的微孔(直径范围为 30~50 nm)交错自组装 TiO₂ 纳米管不仅能够赋予材料更大的表面能和粗糙度, 更优异的亲水性和更适配的机械性能, 还能够更好地促进成骨细胞附着和生长^[65]。Ding 等^[66]采用阳极氧化结合大气等离子喷涂的方法将直径约为 15 nm 的钽氧化物沉积在等离子喷涂的微孔钽涂层上, 制备了微纳米结构钽(MNT)涂层, 体外实验结果表明与微孔钽涂层相比, MNT 涂层的耐腐蚀性提高了大约一个数量级, 并能够减少释放腐蚀金属离子, 而且 MNT 涂层能够有效增殖和分化 BMSCs。

2.2 微纳米结构聚合物对骨再生的影响

在微纳米尺度下, 松质骨和密质骨均由矿化胶原纤维以纤维束状的形式进行不同排列而组成^[67]。聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)和聚己内酯(PCL)或它们的共聚物(如 PLGA、PLLA 或 PCLL)具有良好的静电纺丝性能、仿细胞外基质的能力以及细胞相容性和生物降解性, 是组织工程中最常用的合成聚合物^[68]。因此, 关于微纳米结构聚合物的研究主要聚焦于仿生自然骨组织结构的微纳米纤维支架。例如, Santos 等^[69]研究了淀粉和聚己内酯复合微纳米纤维支架对人内皮细胞(ECs)的影响, 并发现微纤维网状结构上的纳米网络不仅维持了 ECs 的结构完整性及细胞间接触, 还能够促进血管生成。另有研究通过双挤出静电纺丝技术将聚乳酸-羟基乙酸共

聚物(PLGA)微纤维网状物与胶原(Col)、羟基磷灰石混合制备出微纳米纤维 PLGA-Col-HA 三维支架^[70]。结果发现与未修饰的微纤维 PLGA 支架和微纳米纤维 PLGA/Col 支架相比, 微纳米纤维 PLGA-Col-HA 支架具有较高的生物活性。此外, Gong 等^[71]将中药淫羊藿苷和抗菌药物盐酸莫西沙星分别引入聚己内酯核和明胶壳中, 通过同轴静电纺丝法制备了兼具成骨和抗菌作用的微纳米骨膜。实验结果表明通过核壳结构和 PCL 及明胶的降解率不同, 药物释放曲线可以逐步控制, 盐酸莫西沙星的快速释放和淫羊藿苷的持续释放可以有效抑制细菌定植, 同时促进兔桡骨缺损再生。

不仅如此, 众多研究小组还试图通过引入纳米结构(如在聚合物基质中加入纳米颗粒或纳米纤维增强物)来模拟骨的天然纳米复合结构, 从而操纵支架的机械性能(如刚度、强度和韧性等)。例如, Cui 等^[72]采用熔融纺丝法制备了羟基磷灰石/聚丙烯交酯-乙交酯复合支架, 结果发现该支架的抗压强度可达 6.27 MPa, 接近于人类小梁骨, 而且该微纳米纤维支架还可上调成骨相关基因 BMP2 和 I 型胶原的表达, 进而促进兔桡骨缺损修复。Xu 等^[73]研制了碳纤维增强的聚醚醚酮-纳米羟基磷灰石(PEEK/n-HA/CF)微纳米复合材料, 结果发现该微纳米结构复合材料在体外能显著促进成骨细胞 MG-63 的增殖和分化, 在体内能促进种植体与宿主骨之间的结合。Li 等^[74]利用聚多巴胺(PDA)修饰三维打印技术制备的聚己内酯支架表面, 从而实现纳米银(nAg)的富集。研究结果表明与纯 PCL 支架相比, 制备的微纳米自组装 PDA 和 nAg 颗粒的 nAg/PDA/PCL 复合支架不仅具有减少细菌黏附和抑制细菌增殖的作用, 还表现出更好的矿化骨组织聚集性能。Wu 等^[75]将氮化硅(SiN)微粒与聚乙二醇化 PEEK 共混后, 利用飞秒激光处理 SiN/PEKK 复合材料(SPC), 构建了表面微纳米结构的 SiN/PEKK 植入物(FSPC)。结果发现与 SPC 和 PEKK 相比, FSPC 诱导的微纳米结构表面促进了 BMSCs 黏附、存活和成骨分化, 表现出更强的抑菌活性。进一步植入兔股骨缺损后发现, 与 SPC 和 PEKK 相比, FSPC 表现出最大的骨-种植体接触和最大的推出力, 证实微纳米结构表面能够显著促进骨整合。Li 等^[24]采用溶剂流延和静电纺丝法制备了由聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和微纳米生物活性玻璃(MNBG)组成的粗糙多孔双层膜。结果发现该复合膜具有稳定的力学性能、良好的生物相容性, 并且 MNBG 还能够促进 BMSCs 的成骨分化。

2.3 微纳米结构生物活性陶瓷对骨再生的影响

骨组织具有矿化的大孔结构,其纳米级成分决定其强度,无机羟基磷灰石(HA)是矿化组分的主要组成部分。由于以HA为主的生物陶瓷的固有脆性和低断裂韧性,构建多级分层微纳米结构并在纳米尺度上控制其表面形貌仍是一个巨大的挑战。Lin等^[76]以(α -磷酸三钙) α -TCP陶瓷作为前驱体,通过水热反应制备微纳米结构羟基磷灰石陶瓷。结果发现纳米片、纳米棒和微纳米棒状组合三种结构都能够提高材料表面对蛋白质的选择性吸附,促进细胞黏附、增殖和分化,而微纳米棒状组合结构的性能优于两种单级纳米结构。Elrayah等^[77]通过在水热条件下调节铜离子(Cu^{2+})的浓度制备了不同微纳米表面的羟基磷灰石支架,且随着 Cu^{2+} 浓度增大,支架的表面由球状转变为花状,最终形成纳米结构。体外实验结果进一步表明羟基磷灰石支架表面的微纳米结构能够影响内皮细胞的增殖,其中与花状形态支架共培养的细胞增殖显著增强。体内实验进一步表明羟基磷灰石支架表面的微纳米结构显著影响血管的形成,而花状支架对血管形成的促进作用最明显。Zhang等^[17]将数字光处理(DLP)打印技术与原位晶体生长技术相结合构建了微纳米结构多孔 β -磷酸三钙(β -TCP)支架,结果发现微纳米结构 β -TCP支架不仅能够促进BMSCs的黏附和增殖,还能够促进BMSCs的成骨分化,其中氢氧化钠处理组的促进作用最强。体内实验结果表明该微纳米结构支架能够通过调节骨微环境促进大鼠颅骨缺损再生修复。本研究团队前期通过调节真空灌注工艺参数控制晶须化羟基磷灰石陶瓷表面羟基磷灰石纳米粒子的负载量,从而显著提升微纳米结构羟基磷灰石陶瓷的成骨性能^[16]。另外,通过序列荧光标记技术发现在生物陶瓷孔内部存在两种类型(I型和II型)的新骨形成方式,在I型成骨中新骨形成方向朝向邻近的孔壁,而在II型成骨中新骨形成方向远离邻近的孔壁,并且在具有较强成骨能力的微纳米结构羟基磷灰石生物陶瓷中主要发生I型成骨,表明其对新骨形成的促进作用较大(图5)。

其次,Moorthi等^[78]报道了纳米生物玻璃陶瓷(nBGC)颗粒的生物活性及促成骨作用,证实了nBGC颗粒可促进大鼠骨原细胞增殖,刺激细胞内ERK信号通路及细胞周期蛋白表达,并能通过成骨相关转录因子RUNX2介导骨原细胞的成骨分化。Lin等^[79]研究发现硅酸钙纳米纤维在体外可以刺激BMSCs的成骨分化,在体内可促进骨再生。Feng等^[80]采用3D打印结合水热处理制备了具有中空通道和

微纳米表面的硅酸盐基生物陶瓷(AKT-H-N)。除了提高支架的机械强度,微纳米结构还有利于BMSCs黏附和增殖,体内实验结果表明空心通道和微纳米结构对骨再生具有协同效应,植入12w后能够促进兔股骨缺损处形成新骨。Tang等^[81]以介孔生物活性玻璃(MBG)为基体,采用“黏度控制”和“均匀颗粒增强”多模板工艺制备了负载重组人骨形成蛋白-2(rhBMP-2)的宏微纳米三模态多孔支架(Trimodal MBG scaffold, TMS)。结果发现该支架不仅具有良好的结构稳定性和机械强度,还具有良好的骨传导性、骨诱导性、rhBMP-2缓释性以及生物降解性。Hu等^[82]采用溶胶-凝胶法结合模板法制备的微纳米结构生物活性玻璃(MNBG),不仅表现出较高的磷灰石形成能力和良好的生物相容性,还能促进人牙髓细胞(HDPC)的增殖与分化。

3 结论与展望

在组织工程中,生物材料能够为细胞的黏附、增殖和分化以及组织的形成和生长提供机械支撑和内部空间^[83]。当生物材料植入体内后,首先发生的是细胞/组织表面受体与材料表面的相互识别和作用,进而引发特异性生物学反应、激活相关基因表达,最终影响组织再生^[84]。这一过程同生物材料的表面形貌密切相关,其中材料表面形态对细胞骨架结构的影响也是调节干细胞向特定细胞谱系分化的最重要的因素之一^[85]。研究证实相较于单一结构,微纳米结构能够实现多级结构的协同调控,共同促进组织再生:一方面微米结构可以为成骨细胞系的生长、增殖、成骨分化、矿化和最终骨形成提供空间;另一方面纳米结构可以调节成骨相关细胞的活性,产生有利于成骨的微环境,以增强成骨^[11,86]。如前所述,微纳米结构可以通过多种方式促进组织再生,包括诱导间充质干细胞的成骨分化,抑制破骨细胞生成,促进血管内皮细胞的血管分化以及参与骨免疫调节等(表1)。后续还需要更多的研究以深入阐明生物材料与骨缺损部位微环境之间的相互作用机制,从而探索参与骨修复和重建的各种生物和物理微环境因素与生物材料之间的交互作用以及内在作用机制。

另有研究指出微纳米结构能够赋予部分金属植入物如钛、钽、钪和锆及其氧化物抗菌性能,从而实现细菌感染的局部治疗^[88]。另外,由于聚合物基复合材料具有高拉伸强度、刚度、断裂韧性、耐磨性和耐腐蚀性,进一步与微纳米结构生物活性陶瓷结

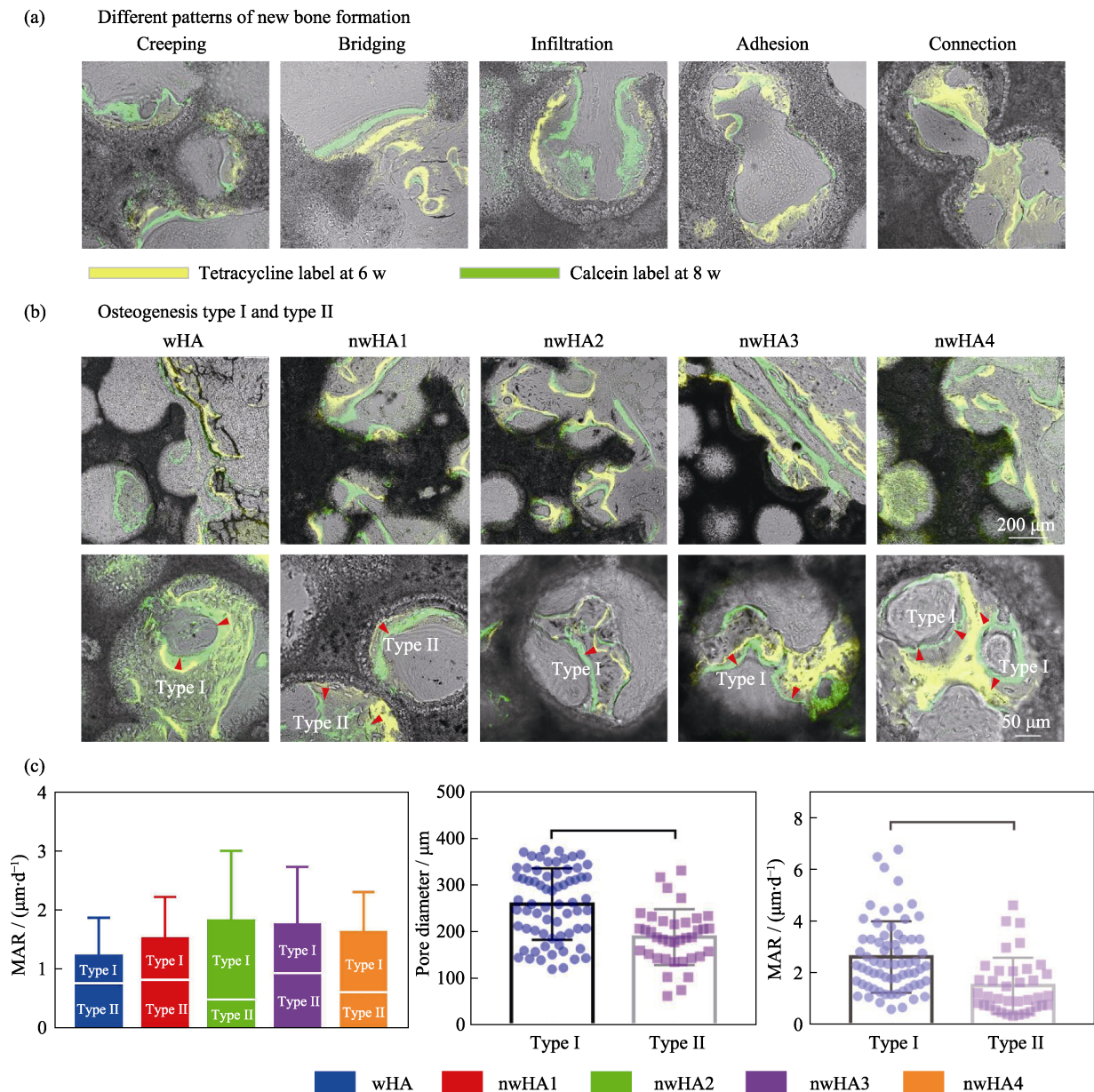


图 5 连续荧光标记评估动态骨形成^[16]

Fig. 5 *In vivo* sequential fluorescence labeling of new bone formation inside porous nwHA bioceramics^[16]

(a) Observed patterns of new bone formation (yellow: tetracycline label; green: calcein label); (b) Two types of osteogenesis discovered inside the pore structure of nwHA bioceramics (green indicating CD 31, Red indicating EMCN, and blue indicating nucleus); (c) Comparison of mineral apposition rate (MAR) between different nwHA groups, with statistical analysis of the relationship between osteogenesis type and pore diameter of the bioceramics, and the relationship between osteogenesis type and MAR

合以模拟天然骨组织的结构和组成特性, 展现出良好的应用前景^[89]。值得关注的是, 微纳米结构不仅能够增强生物活性陶瓷的生物学特性, 如骨诱导、骨整合和血管生成等, 还能够显著改善其机械性能, 为术后的骨组织再生系统提供足够的强度支持^[45]。并且生物矿化材料如骨骼和牙齿等由于具有多尺度纳米结构和有序自组装特性, 展现出优异的机械性能如硬度、韧性、强度, 以及抗折性能^[90-91]。且骨质疏松性骨晶体的结晶度低于正常骨^[92]。受此启发, 在微纳米结构研究的基础上实现高结晶度且有序组

装或能进一步提高生物活性陶瓷的力学性能和生物学性能。然而, 目前关于微纳米结构生物材料的研究还受到各种制备方法的限制, 合成出具有高生物活性和良好机械性能的生物材料仍有一定难度。另外, 深入了解微纳米结构生物材料在体内的降解速率和机制对于设计新的治疗方法也具有重要意义^[93]。以上研究表明未来需要不断开发新技术以制备出具有从纳米尺度到宏观尺度的复杂层次结构且高度有序的新型骨组织工程生物材料以满足临床患者的需求。

表 1 微纳米结构生物材料用于成骨研究的文献总结

Table 1 Summary of previous work on bone formation in the micro-/nano-structured biomaterials

Material	Synthesis method	<i>In vitro</i> results	Animal model	<i>In vivo</i> results	Ref.
β -TCP scaffolds with micro/nano surface topography	DLP printing and <i>in situ</i> growth crystal process	Promote osteogenic differentiation of stem cells	Rat skull defects	Improve the bone regeneration	[17]
Micro/nano-scale titania fiber-like network on the surface of Ti implants	One-step alkaline treatment in NaOH solution	Facilitate osteogenic and angiogenic differentiation of BMSCs and endothelial cells; Suppress M1 macrophages and stimulate M2 phenotype	Rabbit femur defects	Induce ameliorative osseointegration	[21]
MNBG/PLGA bi-layered membranes	Electrospinning	Promote osteogenesis			[24]
Micro-nano rough Ti ₆ Al ₄ V	Acid etch process	Improve osteogenic differentiation of MSCs			[26]
HA bioceramics with submicron- to nano-topographies	Sintering	Maintain the conformation of BMP-2, activate the osteogenic differentiation of BMSCs	Canine intramuscular implantation	Process excellent bone-like apatite forming ability and outstanding osteoinductivity	[28]
HA with micro/nano hierarchical structures	Photolithography and hydrothermal techniques	Promote osteogenic differentiation of hBMSCs and angiogenic activity of HUVECs			[41]
β -TCP/CaSiO ₃ composite ceramics with micro/nano-HAp the surface layer	3D bioplotting and hydrothermal treatment	Upregulate the cellular differentiation of mBMSCs and gene expression of HUVECs	Ectopic subcutaneous implantation at the back of rats	Promote capillary formation and bone augmentation	[45]
PEEK/CF/n-HA ternary biocomposite with micro/nano-topographical surface	Oxygen plasma and sandblasting	Promote the proliferation and differentiation of MG-63 cells	Dog mandibles	Boost the osseointegration between implant and bone	[73]
Micro/nano structural silicon nitride and PEKK composite	Femtosecond laser ablation	Promote osteogenic differentiation of rBMSCs; Exhibit a greater bacteriostatic activity	Rabbit femur cavity defect	Promote osseointegration and bone repair	[75]
Silicate-based bioceramic with micro-nano surfaces and hollow channels	3D printing and hydrothermal treatment	Facilitate the attachment and proliferation of BMSCs	Rabbit femur defects	Boost the newly bone formation	[80]
PLLA/CS composite scaffold with micro/nano-fiber hierarchical structure	3D printing and thermally induced phase separation technology	Promote cell adhesion and proliferation			[87]

参考文献:

- [1] HOSEINPOUR V, SHARIATINIA Z. Applications of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) in bone tissue engineering: a review. *Tissue Cell*, 2021, **72**: 101588.
- [2] BUSCH A, JÄGER M, MAYER C, *et al.* Functionalization of synthetic bone substitutes. *International Journal of Molecular Science*, 2021, **22(9)**: 4412.
- [3] HUANG X, CHEN Q, LUO W, *et al.* SATB2: a versatile transcriptional regulator of craniofacial and skeleton development, neurogenesis and tumorigenesis, and its applications in regenerative medicine. *Genes Disease*, 2022, **9(1)**: 95.
- [4] GOHIL S V, ADAMS D J, MAYE P, *et al.* Evaluation of rhBMP-2 and bone marrow derived stromal cell mediated bone regeneration using transgenic fluorescent protein reporter mice. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 2014, **102(12)**: 4568.
- [5] GRAYSON W L, BUNNELL B A, MARTIN E, *et al.* Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature Reviews: Endocrinology*, 2015, **11(3)**: 140.
- [6] SI L, WINZENBERG T M, JIANG Q, *et al.* Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010-2050. *Osteoporosis International*, 2015, **26(7)**: 1929.
- [7] AGARWAL R, GONZÁLEZ-GARCÍA C, TORSTRICK B, *et al.* Simple coating with fibronectin fragment enhances stainless steel screw osseointegration in healthy and osteoporotic rats. *Biomaterials*, 2015, **63**: 137.
- [8] ARCOS D, BOCCACCINI A R, BOHNER M, *et al.* The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis. opinion paper. *Acta Biomaterialia*, 2014, **10(5)**: 1793.
- [9] GIACOMINI D, TORRICELLI P, GENTILOMI G A, *et al.* Monocyclic β -lactams loaded on hydroxyapatite: new biomaterials with enhanced antibacterial activity against resistant strains. *Scientific Reports*, 2017, **7(1)**: 2712.
- [10] E L, LU R, SUN J, *et al.* Microenvironment influences on human umbilical cord mesenchymal stem cell-based bone regeneration.

- Stem Cells International*, 2021, **2021**: 4465022.
- [11] DU Y, GUO J L, WANG J, *et al.* Hierarchically designed bone scaffolds: from internal cues to external stimuli. *Biomaterials*, 2019, **218**: 119334.
- [12] TANG Z, LI X, TAN Y, *et al.* The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regenerative Biomaterials*, 2018, **5(1)**: 43.
- [13] ZHOU P, WU J, XIA Y, *et al.* Loading BMP-2 on nanostructured hydroxyapatite microspheres for rapid bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, **13**: 4083.
- [14] CUI F Z, MIKOS A G. Important topics in the future of tissue engineering: comments from the participants of the 5th International Conference on Tissue Engineering at Kos, Greece. *Regenerative Biomaterials*, 2014, **1(1)**: 103.
- [15] LIU H, ZHANG Z, SEONG TOH W, *et al.* Stem cells: microenvironment, micro/nanotechnology, and application. *Stem Cells International*, 2015, **2015**: 398510.
- [16] ZHAO R, SHANG T, YUAN B, *et al.* Osteoporotic bone recovery by a bamboo-structured bioceramic with controlled release of hydroxyapatite nanoparticles. *Bioactive Materials*, 2022, **17**: 379.
- [17] ZHANG H, ZHANG H, XIONG Y, *et al.* Development of hierarchical porous bioceramic scaffolds with controlled micro/nano surface topography for accelerating bone regeneration. *Material Science and Engineering C: Materials Biological Application*, 2021, **130**: 112437.
- [18] LIU X, HOU W, HE L, *et al.* AMOT130/YAP pathway in topography-induced BMSC osteoblastic differentiation. *Colloids Surface B: Biointerfaces*, 2019, **182**: 110332.
- [19] ZHANG Y, WANG X, LI Y, *et al.* Cell osteogenic bioactivity mediated precisely by varying scaled micro-pits on ordered micro/nano hierarchical structures of titanium. *Regeneration Biomaterials*, 2022, **9**: rbac046.
- [20] CIAPETTI G, DI POMPO G, AVNET S, *et al.* Osteoclast differentiation from human blood precursors on biomimetic calcium-phosphate substrates. *Acta Biomaterialia*, 2017, **50**: 102.
- [21] BAI L, CHEN P, ZHAO Y, *et al.* A micro/nano-biomimetic coating on titanium orchestrates osteo/angio-genesis and osteoimmunomodulation for advanced osseointegration. *Biomaterials*, 2021, **278**: 121162.
- [22] GAO Q, HOU Y, LI Z, *et al.* mTORC2 regulates hierarchical micro/nano topography-induced osteogenic differentiation via promoting cell adhesion and cytoskeletal polymerization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, **25(14)**: 6695.
- [23] YU X, XU R, ZHANG Z, *et al.* Different cell and tissue behavior of micro/nano-tubes and micro/nano-nets topographies on selective laser melting titanium to enhance osseointegration. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, **16**: 3329.
- [24] LI P, LI Y, KWOK T, *et al.* A bi-layered membrane with micro-nano bioactive glass for guided bone regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, **205**: 111886.
- [25] WEI W, LI G, WANG J, *et al.* Involvement of Rac1 in the micro/nano-topography sensing and osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Materials & Design*, 2018, **157**: 402.
- [26] LONG E G, BULUK M, GALLAGHER M B, *et al.* Human mesenchymal stem cell morphology, migration, and differentiation on micro and nano-textured titanium. *Bioactive Materials*, 2019, **4**: 249.
- [27] LI Y, LIU C. Nanomaterial-based bone regeneration. *Nanoscale*, 2017, **9(15)**: 4862.
- [28] LI X, LIU M, CHEN F, *et al.* Design of hydroxyapatite bioceramics with micro-/nano-topographies to regulate the osteogenic activities of bone morphogenetic protein-2 and bone marrow stromal cells. *Nanoscale*, 2020, **12(13)**: 7284.
- [29] LI X, ZHOU Q, WU Y, *et al.* Enhanced bone regenerative properties of calcium phosphate ceramic granules in rabbit posterolateral spinal fusion through a reduction of grain size. *Bioactive Materials*, 2022, **11**: 90.
- [30] ZHAO C, WANG X, 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.
- [31] XIA L, LIN K, JIANG X, *et al.* Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Biomaterials*, 2014, **35(30)**: 8514.
- [32] ZHU Y, ZHANG K, ZHAO R, *et al.* Bone regeneration with micro/nano hybrid-structured biphasic calcium phosphate bioceramics at segmental bone defect and the induced immunoregulation of MSCs. *Biomaterials*, 2017: 133.
- [33] ZHAO R, CHEN S, YUAN B, *et al.* Healing of osteoporotic bone defects by micro-/nano-structured calcium phosphate bioceramics. *Nanoscale*, 2019, **11(6)**: 2721.
- [34] CHENG B, LIU Y, ZHAO Y, *et al.* The role of anthrax toxin protein receptor 1 as a new mechanosensor molecule and its mechanotransduction in BMSCs under hydrostatic pressure. *Scientific Reports*, 2019, **9(1)**: 12642.
- [35] LIU Z, CAI M, ZHANG X, *et al.* Cell-traction-triggered on-demand electrical stimulation for neuron-like differentiation. *Advanced Materials*, 2021, **33(51)**: 2106317.
- [36] DIAZ-RODRIGUEZ P, SÁNCHEZ M, LANDIN M. Drug-loaded biomimetic ceramics for tissue engineering. *Pharmaceutics*, 2018, **10(4)**: 272.
- [37] HE Y, LI Z, DING X, *et al.* Nanoporous titanium implant surface promotes osteogenesis by suppressing osteoclastogenesis via integrin β 1/FAKpY397/MAPK pathway. *Bioactive Materials*, 2022, **8**: 109.
- [38] CHEN F, WANG M, WANG J, *et al.* Effects of hydroxyapatite surface nano/micro-structure on osteoclast formation and activity. *Journal of Material Chemistry B*, 2019, **7(47)**: 7574.
- [39] ZHANG X, HUANG P, JIANG G, *et al.* A novel magnesium ion-incorporating dual-crosslinked hydrogel to improve bone scaffold-mediated osteogenesis and angiogenesis. *Material Science and Engineering C: Materials in Biological Application*, 2021, **121**: 111868.
- [40] CHEN W, XIAO W, LIU X, *et al.* Pharmacological manipulation of macrophage autophagy effectively rejuvenates the regenerative potential of biodegrading vascular graft in aging body. *Bioactive Materials*, 2022, **11**: 283.
- [41] YANG C, ZHAO C, WANG X, *et al.* Stimulation of osteogenesis and angiogenesis by micro/nano hierarchical hydroxyapatite via macrophage immunomodulation. *Nanoscale*, 2019, **11(38)**: 17699.
- [42] LIU W, ZHANG G, WU J, *et al.* Insights into the angiogenic effects of nanomaterials: mechanisms involved and potential applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, **18(1)**: 9.
- [43] YANG Y, LIN Y, ZHANG Z, *et al.* Micro/nano-net guides M2-pattern macrophage cytoskeleton distribution via Src-ROCK signalling for enhanced angiogenesis. *Biomaterials Science*, 2021, **9(9)**: 3334.
- [44] TIAN T, XIE W, GAO W, *et al.* Micro-nano bioactive glass particles incorporated porous scaffold for promoting osteogenesis and angiogenesis *in vitro*. *Frontier in Chemistry*, 2019, **7**: 186.
- [45] LIU X, MIAO Y, LIANG H, *et al.* 3D-printed bioactive ceramic scaffolds with biomimetic micro/nano-HAp surfaces mediated cell fate and promoted bone augmentation of the bone-implant interface *in vivo*. *Bioactive Materials*, 2022, **12**: 120.
- [46] ZHANG T, JIANG M, YIN X, *et al.* The role of autophagy in the

- process of osseointegration around titanium implants with micro-nano topography promoted by osteoimmunity. *Scientific Reports*, 2021, **11(1)**: 18418.
- [47] CHEN Z, BACHHUKA A, WEI F, *et al.* Nanotopography-based strategy for the precise manipulation of osteoimmunomodulation in bone regeneration. *Nanoscale*, 2017, **9(46)**: 18129.
- [48] FERRAZ N, HONG J, SANTIN M, *et al.* Nanoporosity of alumina surfaces induces different patterns of activation in adhering monocytes/macrophages. *International Journal of Biomaterials*, 2010, **2010**: 402715.
- [49] PUJARI S, HOESS A, SHEN J, *et al.* Effects of nanoporous alumina on inflammatory cell response. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2014, **102(11)**: 3773.
- [50] CHEN Z, NI S, HAN S, *et al.* Nanoporous microstructures mediate osteogenesis by modulating the osteo-immune response of macrophages. *Nanoscale*, 2016, **9(2)**: 706.
- [51] SUN X, SU W, MA X, *et al.* Comparison of the osteogenic capability of rat bone mesenchymal stem cells on collagen, collagen/hydroxyapatite, hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate. *Regenerative Biomaterials*, 2018, **5(2)**: 93.
- [52] LIAO C, LI Y, TJONG S C. Polyetheretherketone and its composites for bone replacement and regeneration. *Polymers (Basel)*, 2020, **12(12)**: 2858.
- [53] KAZIMIERCZAK P, PRZEKORA A. Bioengineered living bone grafts—a concise review on bioreactors and production techniques *in vitro*. *International Journal of Molecular Science*, 2022, **23(3)**: 1765.
- [54] CUI N, DAI C Y, MAO X, *et al.* Poloxamer-based scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Gels*, 2022, **8(6)**: 360.
- [55] WEI S, MA J X, XU L, *et al.* Biodegradable materials for bone defect repair. *Military Medical Research*, 2020, **7(1)**: 54.
- [56] RAMÍREZ C, BELMONTE M, MIRANZO P, *et al.* Applications of ceramic/graphene composites and hybrids. *Materials (Basel)*, 2021, **14(8)**: 2071.
- [57] LI M, XIONG P, YAN F, *et al.* An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications. *Bioactive Materials*, 2018, **3(1)**: 1.
- [58] BRÅNEMARK R, EMANUELSSON L, PALMQUIST A, *et al.* Bone response to laser-induced micro- and nano-size titanium surface features. *Nanomedicine*, 2011, **7(2)**: 220.
- [59] HUANG L, CAI B, HUANG Y, *et al.* Comparative study on 3D printed Ti₆Al₄V scaffolds with surface modifications using hydrothermal treatment and microarc oxidation to enhance osteogenic activity. *ACS Omega*, 2021, **6(2)**: 1465.
- [60] ZHAO L, MEI S, CHU P K, *et al.* The influence of hierarchical hybrid micro/nano-textured titanium surface with titania nanotubes on osteoblast functions. *Biomaterials*, 2010, **31(19)**: 5072.
- [61] UENO T, TSUKIMURA N, YAMADA M, *et al.* Enhanced bone-integration capability of alkali- and heat-treated nanopolymorphic titanium in micro-to-nanoscale hierarchy. *Biomaterials*, 2011, **32(30)**: 7297.
- [62] COCKERILL I, SU Y, LEE J H, *et al.* Micro-/nanotopography on bioresorbable zinc dictates cytocompatibility, bone cell differentiation, and macrophage polarization. *Nano Letter*, 2020, **20(6)**: 4594.
- [63] WANG X, ZHOU Y, XIA L, *et al.* Fabrication of nano-structured calcium silicate coatings with enhanced stability, bioactivity and osteogenic and angiogenic activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, **126**: 358.
- [64] ZHOU C, XU A T, WANG D D, *et al.* The effects of Sr-incorporated micro/nano rough titanium surface on rBMSC migration and osteogenic differentiation for rapid osseointegration. *Biomaterials Science*, 2018, **6(7)**: 1946.
- [65] WANG F, SHI L, HE W X, *et al.* Bioinspired micro/nano fabrication on dental implant–bone interface. *Applied Surface Science*, 2013, **265**: 480.
- [66] DING D, XIE Y, LI K, *et al.* Micro/nano structural tantalum coating for enhanced osteogenic differentiation of human bone marrow stem cells. *Materials (Basel)*, 2018, **11(4)**: 546.
- [67] RODRIGUEZ-FLOREZ N, GARCIA-TUNON E, MUKADAM Q, *et al.* An investigation of the mineral in ductile and brittle cortical mouse bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2015, **30(5)**: 786.
- [68] PEREZ-PUYANA V, JIMÉNEZ-ROSADO M, ROMERO A, *et al.* Polymer-based scaffolds for soft-tissue engineering. *Polymers (Basel)*, 2020, **12(7)**: 1566.
- [69] SANTOS M I, TUZLAKOGLU K, FUCHS S, *et al.* Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2008, **29(32)**: 4306.
- [70] KWAK S, HAIDER A, GUPTA K C, *et al.* Micro/nano multilayered scaffolds of plga and collagen by alternately electrospinning for bone tissue engineering. *Nanoscale Research Letters*, 2016, **11(1)**: 323.
- [71] GONG M, HUANG C, HUANG Y, *et al.* Core-sheath micro/ nano fiber membrane with antibacterial and osteogenic dual functions as biomimetic artificial periosteum for bone regeneration applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, **17**: 124.
- [72] CUI L, ZHANG N, CUI W, *et al.* A novel nano/micro-fibrous scaffold by melt-spinning method for bone tissue engineering. *Journal of Bionic Engineering*, 2015, **12(1)**: 117.
- [73] XU A, LIU X, GAO X, *et al.* Enhancement of osteogenesis on micro/nano-topographical carbon fiber-reinforced polyetheretherketone-nanohydroxyapatite biocomposite. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, **48**: 592.
- [74] LI J, LI L, ZHOU J, *et al.* 3D printed dual-functional biomaterial with self-assembly micro-nano surface and enriched nano argentum for antibacterial and bone regeneration. *Applied Materials Today*, 2019, **17**: 206.
- [75] WU H, LIU T, XU Z, *et al.* Enhanced bacteriostatic activity, osteogenesis and osseointegration of silicon nitride/ polyetheretherketone composites with femtosecond laser induced micro/ nano structural surface. *Applied Materials Today*, 2020, **18**: 100523.
- [76] LIN K, XIA L, GAN J, *et al.* Tailoring the nanostructured surfaces of hydroxyapatite bioceramics to promote protein adsorption, osteoblast growth, and osteogenic differentiation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013, **5(16)**: 8008.
- [77] ELRAYAH A, ZHI W, FENG S, *et al.* Preparation of micro/nano-structure copper-substituted hydroxyapatite scaffolds with improved angiogenesis capacity for bone regeneration. *Materials*, 2018, **11(9)**: 1516.
- [78] MOORTHY A, SARAVANAN S, SRINIVASAN N, *et al.* Synthesis, characterization and biological action of nano-bioglass ceramic particles for bone formation. *Journal of Biomaterials & Tissue Engineering*, 2012, **2(3)**: 197.
- [79] LIN K, WU C, CHANG J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. *Acta Biomaterialia*, 2014, **10(10)**: 4071.
- [80] FENG C, MA B, XU M, *et al.* Three-dimensional printing of scaffolds with synergistic effects of micro-nano surfaces and hollow channels for bone regeneration. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2021, **7(3)**: 872.
- [81] TANG W, LIN D, YU Y, *et al.* Bioinspired trimodal macro/ micro/nano-porous scaffolds loading rhBMP-2 for complete regeneration of critical size bone defect. *Acta Biomaterialia*,

- 2016, **32**: 309.
- [82] HU Q, JIANG W, LI Y, *et al.* The effects of morphology on physicochemical properties, bioactivity and biocompatibility of micro-/nano-bioactive glasses. *Advanced Powder Technology*, 2018, **29(8)**: 1812.
- [83] ZHANG M, DU H, GUAN Y, *et al.* Study on the effect of PDA-PLGA scaffold loaded with islet cells for skeletal muscle transplantation in the treatment of diabetes. *Front Bioengineering and Biotechnology*, 2022, **10**: 927348.
- [84] GEHRKE S A, CAVALCANTI DE LIMA J H, RODRIGUEZ F, *et al.* Microgrooves and microrugosities in titanium implant surfaces: an *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Materials*, 2019, **12(8)**: 1287.
- [85] ZHAO W, LI X, LIU X, *et al.* Effects of substrate stiffness on adipogenic and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, **40**: 316.
- [86] ZHAO Y, BAI L, ZHANG Y, *et al.* Type I collagen decorated nanoporous network on titanium implant surface promotes osseointegration through mediating immunomodulation, angiogenesis, and osteogenesis. *Biomaterials*, 2022, **288**: 121684.
- [87] ZHU L, CHEN S, LIU K, *et al.* 3D poly (*L*-lactide)/chitosan micro/nano fibrous scaffolds functionalized with quercetin-polydopamine for enhanced osteogenic and anti-inflammatory activities. *Chemical Engineering Journal*, 2020, **391**: 123524.
- [88] PEKARKOVA J, GABLECH I, FIALOVA T, *et al.* Modifications of parylene by microstructures and selenium nanoparticles: evaluation of bacterial and mesenchymal stem cell viability. *Front Bioengineering and Biotechnology*, 2021, **9**: 782799.
- [89] ZHANG Y, YU W, BA Z, *et al.* 3D-printed scaffolds of mesoporous bioglass/gliadin/polycaprolactone ternary composite for enhancement of compressive strength, degradability, cell responses and new bone tissue ingrowth. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, **13**: 5433.
- [90] JIAO Y, HUANG L J, DUAN T B, *et al.* Controllable two-scale network architecture and enhanced mechanical properties of (Ti₅Si₃+TiB_w)/Ti₆Al₄V composites. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 32991.
- [91] WANG S, YANG Y, WANG R, *et al.* Mineralization of calcium phosphate controlled by biomimetic self-assembled peptide monolayers *via* surface electrostatic potentials. *Bioactive Materials*, 2020, **5(2)**: 387.
- [92] ZHAO R, XIE P, ZHANG K, *et al.* Selective effect of hydroxyapatite nanoparticles on osteoporotic and healthy bone formation correlates with intracellular calcium homeostasis regulation. *Acta Biomaterialia*, 2017, **1(59)**: 338.
- [93] YU C, SCHIMELMAN J, WANG P, *et al.* Photopolymerizable biomaterials and light-based 3d printing strategies for biomedical applications. *Chemical Reviews*, 2020, **120(19)**: 10695.