

生物源性钙磷灰石尺寸引发的骨仿生层级演变及其骨凝血免疫效应

许洁芸 赵原 刘浩州 尹靖元 陈泽涛

中山大学附属口腔医院, 广东省口腔医学重点实验室, 广州 510055

[摘要] 生物源性钙磷灰石 (BHA) 因良好的生物相容性和骨传导性, 广泛应用于临床骨缺损的治疗中。基于临床应用中的骨缺损区适配原则, BHA 具有尺寸多元性设计, 然而不同尺寸对应着不同的骨仿生层级, 随着尺寸变化, 其具备的骨仿生层级随之演变, 并通过骨凝血免疫调控影响骨修复再生进程, 导致植骨结局不稳定。本文对 BHA 的尺寸效应进行回顾, 通过分析天然骨多级结构, 提出 BHA 尺寸引发骨仿生层级演变, 仿生层级介导凝血免疫效应, 并基于骨仿生层级及其骨凝血免疫效应, 提出对不同尺寸 BHA 材料生物学效应的新认识及其生物学原理, 为不同尺寸 BHA 材料的基础研究和临床应用提供理论基础。

[关键词] 生物源性钙磷灰石; 仿生层级演变; 骨凝血免疫; 材料尺寸效应

[中图分类号] R318.08 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2024315



本文链接 开放科学标识码

Hierarchical evolution of bone biomimicry and osteo-coagulo-immunomodulation induced by the size of biological hydroxyapatite

Xu Jieyun, Zhao Yuan, Liu Haozhou, Yin Jingyuan, Chen Zetao

Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University & Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Supported by: Guangdong Province Scientific and Technological Funds (2023A0505050138); National Natural Science Foundation of China (82071167); Science and Technology Program of Guangzhou (2024A04J6323); Postdoctoral Fellowship Program of China Postdoctoral Science Foundation (GZC20233280)

Correspondence: Chen Zetao, E-mail: chenzet3@mail.sysu.edu.cn

[Abstract] Biological hydroxyapatite (BHA) is widely used in the treatment of clinical bone defects due to its good biocompatibility and osteoconductivity. The clinical application of material size is based on the principle of bone defect area adaptation, which contributes to diversity of BHA sizes. However, different sizes correspond to different hierarchical levels of bone biomimicry. As the size changes, the bone biomimicry hierarchy evolves accordingly and influences the process of bone repair and regeneration through osteo-coagulo-immunomodulation, leading to unstable bone graft outcomes. Therefore, this paper reviews the size effect of clinical BHA, analyzes the multilevel structure of natural bone, proposes the evolution of bone biomimetic hierarchy triggered by the size of BHA, and further analyzes the size-mediated osteo-coagulo-immunomodulation. Based on the hierarchical levels of bone and its osteo-coagulo-immunomodulation

effect, we provide a new understanding of the biological principle of the size effect of biomaterials and a theoretical basis for the basic research and clinical application of different size BHA materials.

[Key words] biological hydroxyapatite; biomimetic hierarchical evolution; osteo-coagulo-immunomodulation; material size effect

[收稿日期] 2024-08-26; **[修回日期]** 2024-09-30

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2023A0505050138); 国家自然科学基金面上项目 (82071167); 广州市科技计划项目 (2024A04-J6323); 国家资助博士后研究人员计划 (GZC20233280)

[作者简介] 许洁芸, 助理研究员, 博士, E-mail: xujy273@mail.sysu.edu.cn; 赵原, 硕士, E-mail: zhaoy585@mail2.sysu.edu.cn

[通信作者] 陈泽涛, 主任医师, 研究员, 博士, E-mail: chenzet3@mail.sysu.edu.cn

生物源性钙磷灰石 (biological hydroxyapatite, BHA) 是由生物骨去除有机物制备的骨替代材料, 其具有良好的生物相容性和骨诱导特性, 并能够与二氧化钛 (titanium dioxide, TiO₂) 相互作用产生一定抗菌性能^[1], 因此在临床牙槽骨缺损的修复和再生中应用较为广泛。但在临床应用中可观察到 BHA 引发异物反应, 组织学检查发现材料周围形成纤维包膜^[2], 其中浸润大量异物巨细胞, 干扰骨再生, 从而植骨效果不如预期, 甚至植骨失败^[3]。植骨结局与异物反应程度息息相关, 而异物反应程度受到材料仿生层级的影响。BHA 仿生层级来自生物骨的结构和无机成分。仿生层级与尺寸高度相关, 然而尺寸与植骨结局相关背后的生物学原理常被忽视, 导致植骨结局的不稳定。

临床应用的 BHA 尺寸从 0.25~2 mm 不等, BHA 尺寸多元性设计主要基于其临床应用场景, 然而不同尺寸 BHA 对应着不同的骨仿生层级。Reznikov 等^[4]提出骨组织九级结构的概念, 认为骨骼尺寸增加的同时, 其仿生层级也增加。BHA 来源为生物骨, 保留了骨的无机支架结构。BHA 尺寸增加时, 其保留的无机支架结构更为复杂完整, 仿生层级相应提高。认识 BHA 尺寸效应引发的仿生层级演变, 有利于精准调控异物反应, 提升骨再生效果。仿生层级不同的 BHA 诱发不同的免疫反应。研究^[2,5-6]发现, 大尺寸 BHA 颗粒植入能够促进组织再生微环境; 而小尺寸的 BHA 通过核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体、白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 以及其他细胞因子的分泌或代谢重编程, 激活单核细胞炎症反应, 干扰骨再生。本课题组^[7-9]研究发现, 不同尺寸 BHA 通过骨仿生层级演变影响凝血通路激活、凝血因子吸附、纤维蛋白原编织等血凝块形成过程, 管控不同厚度、孔隙率、纤维直径的纤维蛋白网形成, 通过纤维蛋白网—巨噬细胞互作调控免疫反应。根据这些研究, 笔者认为 BHA 尺寸改变引发的骨仿生层级演变通过血凝块调控免疫反应影响成骨结局。本文回顾天然骨的多级结构, 解析继承天然骨结构 BHA 尺寸引发的骨仿生层级的演变, 探讨 BHA 骨仿生层级的骨凝血免疫效应, 并基于此提出对生物材料尺寸的新分类, 以及尺寸效应对应的仿生层级演变及其引发骨凝血免疫效应的新理论, 为研发高效成骨的组织工程材料提供了新思路。

1 不同尺寸 BHA 在口腔骨缺损修复中的应用现状

BHA 属于异种骨替代材料, 主要由生物骨脱脂蛋白获得, 继承了生物骨的无机成分, 主要为钙磷灰石 (hydroxyapatite), 是一种广泛用于修复各类骨缺损的仿生材料^[10]。BHA 与骨组织形成牢固的化学结合, 引导骨再生, 是临床最常用的骨替代材料之一。

临床使用的商品 BHA 多为颗粒或粉末状, 常见市售 BHA 尺寸见表 1。不同的颗粒尺寸适应不同的临床需求。以 Bio-Oss 为例, 在售的 BHA 颗粒有 2 种, 分别是尺寸为 0.25~1 mm 的较小颗粒和 1~2 mm 的较大颗粒。其中 0.25~1 mm 的颗粒通常应用于拔牙后骨萎缩的预防及拔牙窝内牙槽嵴的保存; 1~2 mm 的颗粒通常应用于牙种植前为再生牙槽嵴而进行的骨再生手术, 上颌骨骨量不足而进行的上颌窦底提升术, 种植体周围炎的骨缺损修复和牙周治疗等。

BHA 应用于引导骨再生时成功率大约为 90%^[11], 临床并发症与 BHA 尺寸息息相关。BHA 材料内及材料间的多孔结构有助于吞噬、吸收、血管形成以及骨再生。然而, 当 BHA 尺寸较小时, 材料内孔隙结构较少, 材料间互相堆叠嵌合, 加上较大的钙磷比和结晶度, 降低了巨噬细胞迁移进入和吸收 BHA 的速度^[12], 导致材料植入后吸收较慢, 长期保留在体内, 阻碍骨骼的重塑, 延长组织修复时间, 引发软组织裂开、BHA 暴露、术后感染、骨增量不足等并发症^[13]。当 BHA 尺寸较大时, 材料内及材料间孔径增大, 为营养输入和废物排出提供良好的通道, 可促进细胞迁移和血管新生, 缩短组织修复时间^[14]。Tay 等^[15]研究证实, 小尺寸的材料会导致并发症发生率增加, 其发生原因与血运重建率降低相关, 移植物出现感染或坏死。

2 BHA 尺寸引发的骨仿生层级演变

近年来, Reznikov 等^[4]基于 Weiner 和 Wagner 等的工作, 利用三维结构测定、扫描电子显微镜观察和切片视图方法将有序和无序骨组织纳入分级考虑, 提出骨骼的九级生物结构 (表 2)。

第一级结构为骨骼的基本成分 (major components), 即矿物、有机物和水。矿物相主要为 BHA 晶体, 占 60%~70%, 基本结构为板状晶体, 长

30~50 nm, 宽 20~25 nm, 厚 1.5~4 nm, 是已知最小的生物晶体之一。有机物占 20%, 其中 90% 为 I 型胶原蛋白, 具有独特的三螺旋结构, 在骨骼中进一步组装成二维的薄片, 沿着纤维的方向, 一张薄片的末端和另一张薄片的顶端的三螺旋分

子之间有一个间隙, 结合薄片的交错排列, 使得所有间隙都沿着同一方向形成窄凹槽, 这一结构构成原纤维 (fibril), 通常直径为 80~120 nm, 原纤维可进一步组装形成长度更长、排列更有序的纤维, 为高级结构的编制奠定基础。

表 1 市售 BHA 颗粒尺寸

Tab 1 Sizes of commercially available BHA particles

品牌名称	产地	材料来源	颗粒尺寸
Bio-Oss®	美国	牛骨	0.25~1 mm; 1~2 mm
THE Graft™	中国	猪骨	0.25~1 mm; 1~2 mm
Gen-Os®	英国	猪骨或马骨	0.25~1 mm
Cerabone®	瑞士	牛骨	0.5~1 mm; 1~2 mm
Endobon®	法国	牛骨	0.5~1 mm; 1~2 mm
OsteoGraf®	美国	牛骨	0.25~0.42 mm; 0.42~1 mm
SYMBIOS®	美国	海藻	0.2~1 mm; 1~2 mm
Bio Osteo®	中国	牛骨	0.25~1 mm; 0.4~1 mm; 1~2 mm
Adbone®	葡萄牙	异种骨	0.1~0.5 mm; 1~2 mm
BioBase a-pore®	德国	牛骨	0.25~0.5 mm; 0.5~1.4 mm; 1.4~3.2 mm
Genoss®	韩国	猪骨	0.2~0.5 mm; 0.5~1 mm; 1~2 mm
ChronOS®	美国	异种骨	0.5~0.7 mm; 0.7~1.4 mm; 1.4~2.8 mm
BioResorb®	德国	异种骨	0.2~0.5 mm; 0.5~1 mm; 1~2 mm
Frios Aligipore®	美国	海藻	0.3~0.5 mm; 0.5~1 mm

表 2 骨骼的九级生物结构

Tab 2 Nine biological hierarchy of biological bone

分级	名称	结构特征	基本结构尺寸
一级	骨骼基本成分	单纯 BHA 晶体或胶原纤维	BHA 晶体长 30~50 nm, 宽 20~25 nm, 厚 1.5~4 nm
二级	骨骼基础结构	BHA 晶体和矿化胶原纤维组成	胶原纤维尺寸 0.1 μm 左右
三级	纤维阵列	I 型胶原蛋白组成的三维螺旋结构的纤维阵列	阵列结构尺寸处于小于一个微米到数个微米之间
四级	阵列模式	纤维阵列组成阵列模式, 分为平行/扇形模式	板层骨和平行纤维骨尺寸约为 1 μm
五级	超结构	分为有序骨中的单向胶原纤维束和无序骨中的骨陷窝-骨小管网络	纤维束直径 1~3 μm, 相邻纤维束相距 67 nm
六级	骨组织	构成骨骼的组织包括编织骨、平行纤维骨和板层骨	骨组织直径 10 μm 左右, 板层间厚度 3~7 μm
七级	组织结构基序	4 种类型, 环形板层基序、板层束、骨单位和纤维层状骨	哈弗系统由直径 100~200 μm 的圆柱状结构和 30~40 μm 的中央管形成
八级	组织	密质骨或松质骨	密质骨尺寸约 1 mm, 松质骨直径 0.1~3.5 mm
九级	组织	密质骨和松质骨	密质骨、松质骨尺寸都为毫米级别

第二级结构为矿化胶原纤维, BHA 晶体结晶、充满并填平原纤维之间的凹陷。晶体的 c 晶轴和胶原纤维的轴向相互平行, 形成类似层状马赛克地

第三级结构为基于 I 型胶原蛋白自发组装三螺旋结构的纤维阵列, 这些阵列直径从小于一个微米到数个微米之间, 择优晶向与胶原轴向平行。有序纤维阵列仅存在于有序骨组织中; 在无序骨组织中, 大部分纤维为单个矿化纤维, 形成无序纤维阵列, 晶体结构极少具有择优晶向。

第四级结构是指纤维阵列以不同方式形成不

同的组合图案, 称为阵列模式。阵列模式分为 2 种。1) 平行模式 (unidirectional pattern): 最简单且最具各向异性的模式, 将原有的纤维阵列扩展, 形成更大纬度上单一方向的阵列模式, 常见于板层骨和平行纤维骨。2) 扇形模式 (fanning pattern): 胶原纤维阵列的方向以渐变方式变化, 常见于板层骨。无序骨组织不具备阵列模式, 胶原纤维以单个矿化纤维形式存在, 无特定晶向, 称为无序模式 (disordered pattern), 纤维之间由基质充填, 常见于平行阵列模式之间或相对较厚的骨层。

第五级结构是骨的超结构 (super structure), 分为2种。1) 单向胶原纤维束 (bundles): 见于有序骨组织中, 纤维束直径通常为1~3 μm , 纤维束内相邻的原纤维在67 nm重复结构中排列基本一致, 因此形成具有各向异性而又具有一定共同方向的纤维束。不同方向的纤维束以每隔一组平行束片方向相似的方式堆叠在一起, 相邻纤维束角度偏移为40°~80°。纤维束内仅含有少量骨基质。人类骨骼纤维束由薄层无序骨基质包裹, 这些薄层骨基质常见骨细胞突起。2) 骨陷窝-骨小管网络 (lacuno-canalicular network): 见于无序骨组织中, 超结构由矿化胶原纤维与嵌入的骨陷窝-骨小管组成, 骨陷窝-骨小管网络内含骨细胞及其突起, 是骨细胞网络与胶原基质的紧密结构。

第六级结构是指构成骨骼的组织, 即骨组织 (material pattern)。骨组织是细胞活动的产物, 部分还包括细胞成分。构成骨骼的组织有3种模式。1) 编织骨 (woven bone): 由矿化胶原纤维束组成, 纤维束无明显的优先方向, 是一种过渡性组织类型, 常在发育期间或骨折修复过程中沉积。2) 平行纤维骨 (parallel fibered bone): 也称为丛状骨, 矿化纤维束方向互相平行, 被薄层无序骨基质隔开。体内平行纤维骨被板层骨包绕。3) 板层骨 (lamellar bone): 最常见的骨组织, 由一系列板层组成, 每层厚度3~7 μm 不等, 包含不同方向的矿化纤维束和扇形模式阵列, 不同束之间由无序骨基质填充, 骨小管穿行其中并垂直于无序骨基质边缘穿出。

第七级结构为板层骨的组织结构基序 (tissue elements), 在骨重塑过程中, 板层骨逐渐取代编织骨和纤维板层骨。根据骨形成的时间和位置, 分为4种类型。1) 环形板层基序 (circumferential lamellar motif): 由一系列具有大曲率半径的板层组成, 板层与密质骨和松质骨的形成表面平行, 主要来自骨表面的成骨细胞沉积, 此类初级骨结构会被骨单位替代。2) 板层束 (lamellar packets): 一种由略微不同方向的板层系列组成的集合, 这种结构特征性地出现在松质骨中。相邻的板层系列以小角度彼此截断。这种模式的形成是由于部分板层骨的去掉, 随后通过沉积新的板层骨填补由此所产生的吸收缺陷。3) 骨单位 (osteons): 分为初级骨单位和次级骨单位。初级骨单位具有相同的同心板层结构, 但没有次级骨单位的外层——沉积线, 在血管周围原位形成, 在预先存在的腔隙向心填充板层骨, 常见于纤维板层骨,

以及大型动物皮质骨和松质骨的界面。次级骨单位是骨重塑的产物, 又称为哈弗系统, 为直径100~200 μm 的圆柱状结构, 中央管直径30~40 μm , 次级骨单位被沉积线包绕, 沉积线形成于吸收停止和新板层开始沉积的地方。4) 纤维层状骨 (fibro-lamellar bone): 由顺序形成的重复骨单元组成。在血管系统形成后, 首先沉积的材料是初级高钙化层, 包含无优先取向的矿化胶原纤维束、大量的基质物质和许多小孔, 其次是在初级高钙化层的两侧沉积厚层平行纤维骨, 最后剩余空隙被板层骨填充。

第八级结构为密质骨或松质骨。在结构上, 密质骨和松质骨都是由板层骨组成的, 两者区别之一是密质骨中重复的单向纤维束组显示出各种交替的方向, 而松质骨中两个单向纤维束组之一大致地与单个松质骨小梁的长轴对齐, 松质骨形成的多孔结构孔隙直径分布于0.1~3.5 mm^[6]; 区别之二是密质骨比松质骨含有更多的矿物质。

第九级结构是指完整骨骼组织, 包括密质骨和松质骨。

基于上述骨组织的多级结构, 尺寸影响骨仿生层级的完整程度, 从而引发仿生层级演变。类推至BHA材料, BHA成分参与维持骨骼的微观阵列和宏观孔隙, 随着尺寸增加, BHA仿生层级增加, 因此笔者提出尺寸改变引发BHA仿生层级演变。基于骨骼九级结构特征及市售常见尺寸分类, 将BHA尺寸分为3种类型 (表3)。1) 直径小于0.2 mm: 无法保留完整骨单位, 仅保留生物骨的第一至第六级结构, 因其制备过程产生更多断面, 增加了材料比表面积, 因此具有占比最多的纳米至微米级微孔; 2) 直径介于0.2~1 mm: 保留完整骨单位, 保留尺寸小于等于1 mm松质骨结构, 即保留生物骨的第一至第七级结构和部分第八级结构, 其比表面积和微孔占比居中; 3) 直径大于1 mm: 保留尺寸大于1 mm的松质骨结构, 即保留生物骨的第一至第七级结构和大部分第八级结构, 其比表面积和微孔占比最低^[9]。

值得注意的是, BHA的仿生层级影响免疫反应, 从而影响成骨结局。本课题组前期研究发现, 不同仿生层级BHA通过与凝血系统相互作用, 进而调控免疫反应, 影响成骨结局, 因此提出“骨凝血免疫”调控效应 (osteo-coagulo-immunomodulation effect)^[9], 下文将浅析BHA仿生层级介导的骨凝血免疫效应。

表 3 BHA 尺寸与骨骼结构的关系

Tab 3 Relationship between BHA size and bone structure

尺寸	骨仿生层级
<0.2 mm	仅保留生物骨的第一至第六级结构, 其比表面积和纳米至微米级微孔比例最高
0.2~1 mm	保留生物骨的第一至第七级结构和部分第八级结构 (尺寸小于等于 1 mm 松质骨结构), 其比表面积和微孔占比居中
>1 mm	保留生物骨的第一至第七级结构和大部分第八级结构 (尺寸大于 1 mm 的松质骨结构), 其比表面积和微孔占比最低

3 BHA 仿生层级介导的骨凝血免疫效应

材料植入体内后与血液接触, 材料的形态、化学组成、物理性质和其他属性通过影响凝血成分的组织, 如纤维蛋白网、血小板、红细胞和补体, 形成不同的材料-血凝块复合体。BHA 保留了骨结构和微孔结构, 能够吸收纤维蛋白原和凝血因子^[17-22]。本团队前期研究证实, 材料尺寸的大小和形状可以影响材料吸附的纤维蛋白原的构象, 为纤维蛋白原和纤维蛋白吸附提供位置, 从而影响凝血过程; 纤维蛋白网能够对生物矿化胶原基质 (biomineralized collagen matrix, BCM) 产生的关键免疫调节因子羧甲基壳聚糖/无定形磷酸钙纳米复合物产生吸附作用并为之提供物理屏障, 在 BCM 材料植入后快速形成 BCM-血凝块复合体^[8]。然而, 具有微孔结构的 BHA 材料容易释放 Ca^{2+} 并吸收凝血因子, 导致凝血时间延长和纤维蛋白网络稀疏。较小的孔径可以显著加速水的吸收, 促进血小板黏附和活化、血浆蛋白黏附, 从而在凝血级联接触激活途径中起重要作用^[23-24]。另外, 当孔径较小时, 由于对纤维蛋白原的吸附能力较差, 纤维蛋白无法吸附新的蛋白引导纤维蛋白网延长^[7]。Ferrza 等^[23]在尺寸为 20 nm 的材料上发现血小板激活迹象, 表现为扩散形态和突出的丝状伪足, 以及血小板活化依赖性颗粒表面膜蛋白的表达。BHA 可以改变血液成分以及血液与材料表面之间的相互作用, 从而影响红细胞形态、蛋白质吸附和凝血酶生成等关键步骤。Han 等^[25]发现, 当 BHA 尺寸达到纳米级别时, 能够黏附在红细胞膜上, 导致细胞膜表面形成凹陷, 显著提高材料对红细胞吸附能力。较大的孔径会导致红细胞局部膜强烈变形, 出现孔形成、颗粒内化, 最终导致溶血^[26]。孔隙增加了支架表面更多功能基团的暴露, 从而增强一级结构固有的凝血信号。Rouahi 等^[27]测试了微孔钙磷灰石和非微孔钙磷灰石对补体蛋白的吸附, 结果表明, 吸附在微孔钙磷灰石上的蛋白质比非微孔钙磷灰石上的蛋白质多 10 倍, 微孔级 BHA 表面可以调节蛋白质的吸附, 并促进

人体骨细胞的黏附和增殖。在纳米结构表面的补体激活研究中, Ferraz 等^[28]发现, 材料的尺寸可影响补体的级联识别。在孔径为 20 nm 的表面上血液的活化明显低于孔径为 200 nm 的表面上活化。其原因是当全血与更大孔径的材料接触后, 补体可溶性成分的值更高, 蛋白质更容易吸附。

材料接触血液后激活血小板、纤维蛋白网等形成的材料-血凝块复合物, 能够与免疫系统相互作用, 通过调节免疫细胞黏附、趋化因子分泌来影响局部免疫微环境。控制 BHA 材料的尺寸可以影响凝血要素, 如纤维蛋白、血小板、红细胞、补体的形成状态, 从而调节随后的免疫反应。凝血因子是可溶性纤维蛋白原转化为不溶性纤维蛋白的关键催化剂, 可通过调节血凝块纤维蛋白膜调控生物材料介导的免疫反应^[29-31]。对于血凝块支架成分纤维蛋白网, 本课题组^[9]研究发现, 小尺寸 BHA (直径 <0.2 mm) 能够吸附较多的凝血因子, 形成更薄的纤维蛋白膜, 从而在黏附-细胞骨架-自噬的潜在信号通路影响下提升巨噬细胞促炎症和纤维化, 体内实验结果进一步证实, 小尺寸 BHA 形成的纤维蛋白网络会导致更强的局部炎症反应和纤维包裹形成。Garg 等^[32]研究发现, 大尺寸材料能够促进巨噬细胞向 M2 型分化, 继而 M2 型巨噬细胞释放成骨细胞因子, 促进新骨形成。BCM 材料植入体内后能够通过屏障以及血液浸润形成 BCM-血凝块复合体, 从而减轻异物反应和炎症浸润, 优化其生物相容性和血管化^[8]。当材料孔隙大于 9 nm 时, 游离纤维蛋白原能够聚集形成链状纤维, 通过细胞黏附-细胞骨架组装-炎症反应的潜在信号通路抑制巨噬细胞 M1 的极化, 减少巨噬细胞引发的炎症^[7]。Ooi 等^[33]研究发现, BHA 植入引发的炎症反应, 始于血浆蛋白在生物材料表面上的吸附, 引发血液凝固及血小板和免疫细胞到达该部位。纳米级多孔钙磷灰石的溶血率低于 5%, 在黏附于钙磷灰石的血小板上未观察到活化和形态变化, 具有高度血液相容性。Wang 等^[34]研究表明, BHA 纳米颗粒容易与蛋白质结合形成蛋白质-颗粒复合物, 与红细胞相互作用, 并被巨噬细胞或成纤维细胞吞噬沉积在局部组织中, 导致纤维状局

部假包膜的形成。

基于以上研究结果,笔者认为BHA尺寸引发的仿生层级演变,通过与血凝块纤维蛋白网、血小板、红细胞、补体系统等成分互作,形成不同材料-血凝块复合体,介导免疫细胞激活、分化及细胞因子释放等免疫功能,调控功能细胞修复进程,进而影响骨修复效果。

4 基于骨凝血免疫效应的BHA仿生层级演变总结

参考天然骨的九级结构,结合BHA骨仿生层级及其骨凝血免疫效应,笔者进一步解析BHA不同仿生层级介导的骨凝血免疫效应,诠释生物尺寸的内涵(图1)。

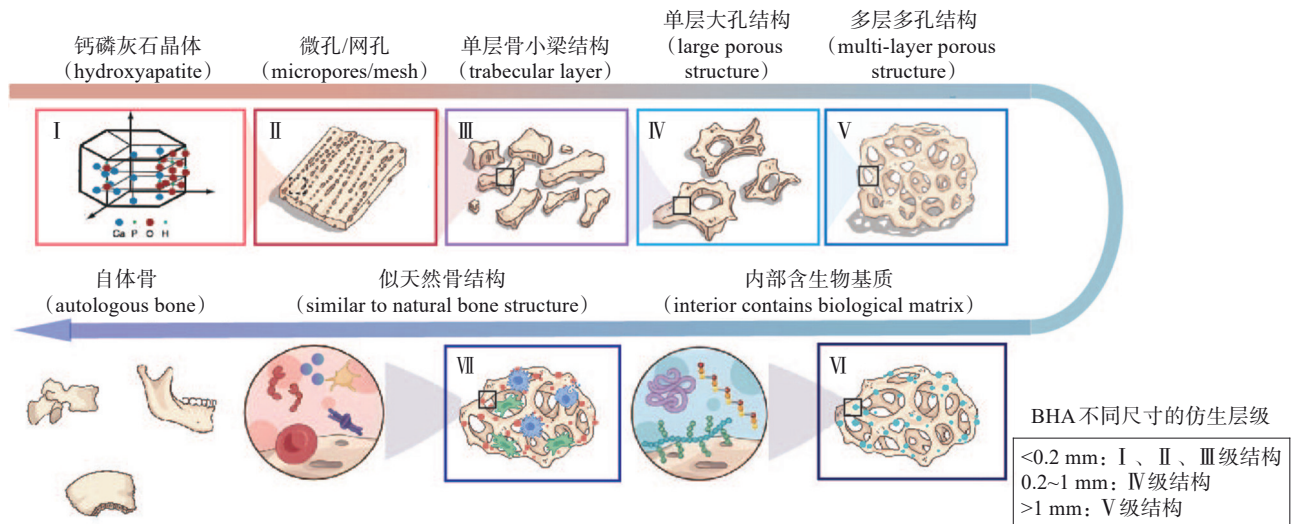


图1 BHA尺寸引起的仿生层级演变

Fig 1 Biomimetic hierarchical evolution induced by the size of BHA

一级结构是钙磷灰石晶体(图2)。其晶体结构、堆积面和离子活性都会影响凝血系统的活性。纤维状和板状钙磷灰石单晶的(100)面选择性地吸附酸性蛋白质,而(001)面选择性地吸附碱性蛋白质^[35-36]。研究^[33,37-38]表明,仅有一级结构的钙磷灰石不引起红细胞溶解,也不引起血小板活化,

不同长径比的钙磷灰石纳米颗粒对红细胞溶解、血小板活化的影响均无差异,对内外源性凝血系统的影响也无差异。此外,当BHA在组织中聚集时,晶体表面会形成水合层,水合层中含有可置换的离子和蛋白质^[39-42],进而调控血浆凝血相关离子和蛋白质的浓度,影响材料-血凝块复合体。

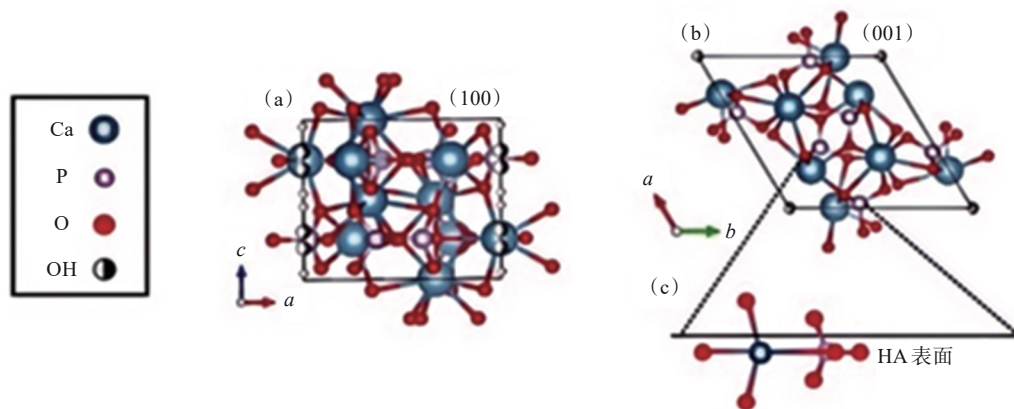


图2 钙磷灰石晶体结构

Fig 2 Crystal structure of hydroxyapatite

二级结构是指去除胶原纤维后剩余的孔隙,这些孔隙通常较小,可称为微孔,具有物质传输扩散效率高、表面积大、活性位点分散等特点^[43],可提高支架的通透性,提供更多的蛋白质吸附位

点^[44-46],从而增强表面凝血因子、纤维蛋白原、血小板和其他凝血启动信号。与此同时,微孔诱导的毛细管力也可以将细胞锚定在材料表面,使细胞变形并将其吸入互连微孔中,即使微孔小于细

胞^[47]。细胞还通过膜受体在其表面吸附更多的成骨相关蛋白，从而与微孔支架相互作用，以改善成骨相关功能（如附着、增殖、分化、生物矿化等）^[27,48-50]。孔隙可增加支架表面更多官能团的暴露，进一步增强初级结构固有的凝血信号^[51]。

三级结构是指二级结构按一定顺序排列形成的单层骨小梁结构。三级结构继承了二级结构的凝血活性，结合大孔结构，进一步增加血小板分散活性和凝血因子吸附面积，促进凝血效果。此外，当作为填充材料时，彼此之间接触紧密使其可以很好地适配不同形态的骨缺损。然而，由于材料之间非稳定连接，在受到外力挤压或牵拉时会发生位移，无法保证稳定的成骨空间支持作用。

四级结构是指由三级结构形成的单层大孔结构。在生物材料中，直径大于100 μm的孔隙被称为大孔，其是BHA在骨传导和骨诱导中发挥作用的关键^[52]。这种大孔材料模拟了骨小梁结构，进而引导了类似骨松质的形成过程^[53]。同时，大孔也确保了细胞渗透、血管向内生长和营养扩散，进而促进骨再生以及组织向内生长^[54]，并将营养物质输送到再生组织的中心。大孔径能够创造有利的局部条件，促进碳酸盐磷灰石成核和生长。另外，相互贯通的孔径越大，其骨传导性能越强。大孔还能确保血凝块与材料之间的嵌合，通过表面大孔为血凝块提供基本支架，形成机械嵌合，进一步稳定血凝块。

五级结构为类似于天然骨组织的多层级多孔结构，不仅可以作为骨缺损的支撑，还可以作为运输通道。多孔结构为间质流体的流动提供了足够的空间，有利于血浆蛋白的循环，并为骨细胞的黏附、增殖、分化提供了机械支持和适宜的环境，表现出良好的骨诱导性^[55]。血液渗入五级结构后凝固，结合血凝块收缩产生机械锁力，使内部血肿难以脱离材料，从而提高血凝块的稳定性，为细胞附着提供了更大的比表面积，促进了成骨细胞的黏附以及血液和营养物质的交换。同时，不同孔隙的多层结构还能进一步调节局部血凝块

结构。例如，直径较大的孔隙可以富集纤维蛋白原形成外源性细胞核，并通过减少横向聚集程度产生更细的纤维，促进细胞骨架组装、抑制炎症反应和快速激活凝血途径^[7]。

在生理凝血过程中，组织因子、胶原蛋白和细胞碎片等内在有机物质会激活内源性和外源性凝血途径，单纯BHA成分无法替代有机物的骨凝血免疫效应，因此引入六级结构的概念，即在BHA支架内部或表面引入具有凝结活性的生物基质成分，以实现BHA在仿生层级的跃迁。生物骨中最常见的基质成分包括胶原蛋白、透明质酸、弹性蛋白等，因此常见的生物源性基质化合物，如壳聚糖、胶原蛋白、明胶、合成生物大分子、脱细胞基质材料、丝蛋白等，是实现BHA六级结构构建的优良备选材料。将生物基质添加于材料表面，能够实现细胞黏附，促进细胞增殖，维持细胞的分化功能，改良BHA机械和物理化学性能，使其在临床应用中能够维持并模拟天然骨组织的独特环境和结构。

仅有BHA和有机基质的六级结构与天然骨仍有差距，单纯BHA支架由于缺少生物活性因子而不具有骨诱导性。材料的骨诱导特性源自细胞外基质中的蛋白质，如胶原蛋白、骨黏连蛋白、骨桥蛋白、骨唾液酸蛋白和骨形态发生蛋白。天然骨富含红细胞、血小板、补体、间充质干细胞、免疫细胞、囊泡、细胞因子、凝血因子等生物活性组分，为其骨凝血免疫效应提供直接参与组分，因此基于六级结构，七级结构还应具有生物活性组分，主动参与凝血免疫功能。

基于此BHA生物尺寸与仿生层级新认识，单纯BHA尺寸演变仅能恢复一至五级结构，通过自身晶体特征、微观阵列和宏观结构调控骨凝血免疫效应，通过有机物和生物活性因子引入，才能进一步提升BHA仿生层级，丰富其生物尺寸，实现主动的骨凝血免疫调控效应。本文将BHA尺寸与仿生层级及凝血免疫之间的关系进行了总结（表4）。

表 4 常见的商用BHA材料仿生层级与骨凝血免疫调控潜能

Tab 4 Biomimetic hierarchy and osteo-coagulo-immunomodulation potential of common commercial BHA materials

尺寸	层级	结构	骨凝血免疫调控潜能
<0.2 mm	一级	钙磷灰石晶体	其晶体、堆积面和离子活性影响凝血系统的活性
	二级	微孔/网孔	提供吸附位点，增加凝血启动信号和官能团暴露，促进凝血因子与周围物质进行离子交换
	三级	单层骨小梁结构	增加血小板分散活性、凝血因子吸附面积，材料支架无法提供稳定的空间支持
0.2~1 mm	四级	单层大孔结构	提供血凝块基本支架，确保血凝块与材料机械嵌合，促进血管生长及细胞渗透，提升骨再生能力
>1 mm	五级	多层多孔结构	促进血浆蛋白循环，为成骨细胞黏附、增殖提供环境

5 结论

作为临床应用最成熟的骨替代材料之一, BHA具有尺寸多元性以应对临床应用场景。本文通过剖析天然骨尺寸介导的仿生层级演变, 类推至多元尺寸BHA携带不同仿生层级信息, 结合材料与血凝块互作影响免疫反应的基本原理, 提出了基于骨凝血免疫效应的BHA生物尺寸新认识, 并阐述了其尺寸引发的仿生层级演变及其介导的骨凝血免疫效应, 为BHA材料研发促进骨再生提供了新思路, 为骨组织工程材料构建提供了指引。未来仍需进一步深入研究BHA的尺寸效应, 平衡临床应用与成骨机理, 探索实现最佳成骨效果的“黄金尺寸”。

致谢: 感谢中山大学附属口腔医院韩宗蒲、郭心瑜、杨睿涵、梁龄予、苏钰承担资料收集工作, 邹阳、武诗语、单正杰、苏梦溪承担文献整理工作!

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Zubieta-Otero LF, Londoño-Restrepo SM, Lopez-Chavez G, et al. Comparative study of physicochemical properties of bio-hydroxyapatite with commercial samples [J]. Mater Chem Phys, 2021, 259: 124201.
- [2] Lebre F, Sridharan R, Sawkins MJ, et al. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2922.
- [3] Gao Y, Gao S, Yao Y, et al. Hard tissue stability outside the buccal bone arch contour after guided bone regeneration in the anterior maxilla: a retrospective cohort radiographic study[J]. Clin Oral Implants Res, 2023, 34(12): 1373-1384.
- [4] Reznikov N, Shahar R, Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions[J]. Acta Biomater, 2014, 10(9): 3815-3826.
- [5] Wu S, Shan Z, Xie L, et al. Mesopore controls the responses of blood clot-immune complex via modulating fibrin network[J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(3): e2103608.
- [6] Lange T, Schilling AF, Peters F, et al. Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells *in vitro*[J]. Biomaterials, 2009, 30(29): 5312-5318.
- [7] Shanley LC, Mahon OR, O'Rourke SA, et al. Macrophage metabolic profile is altered by hydroxyapatite particle size[J]. Acta Biomater, 2023, 160: 311-321.
- [8] Su M, Li C, Deng S, et al. Balance between the CMC/ACP nano complex and blood assimilation orchestrates immunomodulation of the biomineralized collagen matrix[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2023, 15(50): 58166-58180.
- [9] Zou Y, Shan Z, Han Z, et al. Regulating blood clot fibrin films to manipulate biomaterial-mediated foreign body responses[J]. Research (Wash D C), 2023, 6: 0225.
- [10] Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior[J]. Acta Biomater, 2013, 9(9): 8037-8045.
- [11] Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells[J]. Nature, 1998, 391(6667): 591-594.
- [12] Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review[J]. Bioact Mater, 2017, 2(4): 224-247.
- [13] Sanz-Sánchez I, Sanz-Martín I, Ortiz-Vigón A, et al. Complications in bone-grafting procedures: classification and management[J]. Periodontol 2000, 2022, 88(1): 86-102.
- [14] Sohn HS, Oh JK. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries[J]. Biomater Res, 2019, 23: 9.
- [15] Tay JRH, Lu XJ, Lai WMC, et al. Clinical and histological sequelae of surgical complications in horizontal guided bone regeneration: a systematic review and proposal for management[J]. Int J Implant Dent, 2020, 6(1): 76.
- [16] Wongin S, Narkbunnam R, Waikakul S, et al. Construction and evaluation of osteochondral-like tissue using chondrocyte sheet and cancellous bone[J]. Tissue Eng Part A, 2021, 27(3/4): 282-295.
- [17] Nagasaki T, Nagata F, Sakurai M, et al. Effects of pore distribution of hydroxyapatite particles on their protein adsorption behavior[J]. J Asian Ceram Soc, 2017, 5(2): 88-93.
- [18] Yang Q, Zhang Y, Liu M, et al. Study of fibrinogen adsorption on hydroxyapatite and TiO₂ surfaces by electrochemical piezoelectric quartz crystal impedance and FT-IR-ATR spectroscopy[J]. Anal Chim Acta, 2007, 597(1):

- 58-66.
- [19] Arimura S, Kawahara K, Biswas KK, et al. Hydroxyapatite formed on/in agarose gel induces activation of blood coagulation and platelets aggregation[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 81(2): 456-461.
- [20] Liu Q, Chen Z, Gu H, et al. Preparation and characterization of fluorinated porcine hydroxyapatite[J]. *Dent Mater J*, 2012, 31(5): 742-750.
- [21] Qiao W, Liu R, Li Z, et al. Contribution of the in situ release of endogenous cations from xenograft bone driven by fluoride incorporation toward enhanced bone regeneration[J]. *Biomater Sci*, 2018, 6(11): 2951-2964.
- [22] Liu R, Qiao W, Huang B, et al. Fluorination enhances the osteogenic capacity of porcine hydroxyapatite[J]. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(15/16): 1207-1217.
- [23] Ferraz N, Carlsson J, Hong J, et al. Influence of nanoporesize on platelet adhesion and activation[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(9): 3115-3121.
- [24] Zhou H, Wang C, Niu H, et al. A novel droplet-fabricated mesoporous silica-based nanohybrid granules for hemorrhage control[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(4): 649-661.
- [25] Han YC, Wang XY, Dai HL, et al. Nanosize and surface charge effects of hydroxyapatite nanoparticles on red blood cell suspensions[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012, 4(9): 4616-4622.
- [26] Zhao Y, Sun X, Zhang G, et al. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(2): 1366-1375.
- [27] Rouahi M, Gallet O, Champion E, et al. Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 78(2): 222-235.
- [28] Ferraz N, Ott MK, Hong J. Time sequence of blood activation by nanoporous alumina: studies on platelets and complement system[J]. *Microsc Res Tech*, 2010, 73(12): 1101-1109.
- [29] Macrae FL, Duval C, Papareddy P, et al. A fibrin biofilm covers blood clots and protects from microbial invasion [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(8): 3356-3368.
- [30] Weisel JW, Litvinov RI. Keeping it clean: clot biofilm to wall out bacterial invasion[J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(12): 2359-2361.
- [31] Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties[M]//Parry DAD, Squire JM. *Fibrous proteins: structures and mechanisms*. Berlin: Springer, 2017: 405-456.
- [32] Garg K, Pullen NA, Oskertizian CA, et al. Macrophage functional polarization (M1/M2) in response to varying fiber and pore dimensions of electrospun scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(18): 4439-4451.
- [33] Ooi CH, Ling YP, Abdullah WZ, et al. Physicochemical evaluation and *in vitro* hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2019, 30(4): 44.
- [34] Wang J, Wang L, Fan Y. Adverse biological effect of TiO₂ and hydroxyapatite nanoparticles used in bone repair and replacement[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): E798.
- [35] Kandori K, Fudo A, Ishikawa T. Study on the particle texture dependence of protein adsorption by using synthetic micrometer-sized calcium hydroxyapatite particles [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2002, 24(2): 145-153.
- [36] Kawachi G, Sasaki S, Nakahara K, et al. Porous apatite carrier prepared by hydrothermal method[J]. *Key Eng Mater*, 2006, 309-311(2): 935-938.
- [37] Aslam Khan MU, Haider A, Abd Razak SI, et al. Arabinoxylan/graphene-oxide/nHAp-NPs/PVA bionano composite scaffolds for fractured bone healing[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2021, 15(4): 322-335.
- [38] Santos C, Turiel S, Sousa Gomes P, et al. Vascular biosafety of commercial hydroxyapatite particles: discrepancy between blood compatibility assays and endothelial cell behavior[J]. *J Nanobiotechnol*, 2018, 16(1): 27.
- [39] Cazalbou S, Combes C, Eichert D, et al. Adaptive physico-chemistry of bio-related calcium phosphates[J]. *J Mater Chem*, 2004, 14(14): 2148-53.
- [40] Rey C, Combes C. What bridges mineral platelets of bone[J]. *Bonekey Rep*, 2014, 3: 586.
- [41] Habraken W, Habibovic P, Epple M, et al. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future[J]. *Mater Today*, 2016, 19(2): 69-87.
- [42] Beniash E, Metzler RA, Lam RS, et al. Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel[J]. *J Struct Biol*, 2009, 166(2): 133-143.
- [43] Lyu Y, Asoh TA, Uyama H. Facile synthesis of a three-dimensional hydroxyapatite monolith for protein adsorption[J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(47): 9711-9719.
- [44] Perez RA, Mestres G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 61: 922-939.

- [45] Mehmani A, Prodanovic M. The effect of microporosity on transport properties in porous media[J]. *Adv Water Resour*, 2014, 63: 104-119.
- [46] Pérez RA, Won JE, Knowles JC, et al. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(4): 471-496.
- [47] Oh DS, Kim YJ, Hong MH, et al. Effect of capillary action on bone regeneration in micro-channeled ceramic scaffolds[J]. *Ceram Int*, 2014, 40(7): 9583-9589.
- [48] Li X, van Blitterswijk CA, Feng Q, et al. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells *in vitro*[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(23): 3306-3316.
- [49] Wang Y, Zhang X, Shao J, et al. Adiponectin regulates BMSC osteogenic differentiation and osteogenesis through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3652.
- [50] Cicuéndez M, Malmsten M, Doadrio JC, et al. Tailoring hierarchical meso-macroporous 3D scaffolds: from nano to macro[J]. *J Mater Chem B*, 2014, 2(1): 49-58.
- [51] Ain QU, Zeeshan M, Mazhar D, et al. QbD-based fabrication of biomimetic hydroxyapatite embedded gelatin nanoparticles for localized drug delivery against deteriorated arthritic joint architecture[J]. *Macromol Biosci*, 2024, 24(2): e2300336.
- [52] Ravichandran R, Gandhi S, Sundaramurthi D, et al. Hierarchical mesoporous silica nanofibers as multifunctional scaffolds for bone tissue regeneration[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2013, 24(17): 1988-2005.
- [53] Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, et al. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses[J]. *J Biomed Mater Res*, 1970, 4(3): 433-456.
- [54] Roseti L, Parisi V, Petretta M, et al. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 78: 1246-1262.
- [55] O'brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering[J]. *Mater Today*, 2011, 14(3): 88-95.

· 专家简介 ·



陈泽涛, 中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院, 主任医师, 研究员, 博士生导师。现任中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院副院长, 广东省牙颌系统修复重建技术与材料工程技术研究中心主任, 广东省口腔医学重点实验室副主任, 曾任中山大学科学研究院基地处副处长。入选国家海外高层次人才计划、广东省高层次人才计划青年拔尖项目。担任中华口腔医学会口腔生物医学专业委员会常务委员, 中国生物材料学会青年委员会委员, 中华口腔医学会口腔医学科研管理分会委员, 广东省口腔医学会口腔种植专业委员会常务委员等。担任 *Engineered Regeneration*、*Smart Materials in Medicine*、*BMEMat*, 《中华口腔医学研究杂志(电子版)》《华西口腔医学杂志》《口腔疾病防治》等杂志编委。开展单一术区精准“贝壳”骨增量技术, 基于“数字化序贯式种植义齿”的美学区种植周软组织动态加压技术等临床新技术, 入选国家卫生健康技术推广信息平台技术备选库及广东省卫生健康适宜技术推广项目; 提出模拟临床医生的认知机理, 运用人工智能的方法实现种植决策的智能化, 2024年获评广州好医生。聚焦口腔种植软硬组织免疫再生修复, 成果发表于 *Advanced Science*、*Advanced Functional Materials*、*ACS Nano*、*Materials Today*、*Biomaterials*、*Journal of Dental Research* 等, 共发表SCI学术论文77篇(含第一/通讯作者52篇), 论文入选ESI高被引论文和2020年中国口腔医学领域高价值论文TOP100(60/100), 全国口腔医学领域学者论文学术影响力TOP100(77/100), 获批发明专利8项。学术成果获广东省医院协会医院管理与科技创新奖一等奖等奖励。担任全国高等学校五年制本科口腔医学专业《口腔材料学》第七版编委, 主编人民卫生出版社《口腔基础研究导论》并推行口腔基础研究教学改革, 获得12项校级省级教学项目及5项校级省级教育成果奖, 2023年获广东省一流本科线上线下课程认定。主持ITI Research Grant(2项)、The Osteology Foundation Grant(2项)、国家重点研发计划(课题负责人)、国家自然科学基金(面上、青年)、广东省自然科学基金、广州市重点研发计划等项目。

(本文编辑 李彩)