

促骨再生-抗肿瘤双功能钛合金植入体的生物实验研究

邹宇锦^{1,2}, 万熠^{1,2}, 纪振冰^{1,2}, 梁西昌^{1,2}

(1.山东大学高效洁净机械制造教育部重点实验室,山东 济南 250061; 2.山东大学机械工程学院,山东 济南 250061)

摘要:目的 探讨如何在3D打印钛合金植入体表面构建具有时序调控功能的涂层体系,该涂层体系能够依次发挥抗肿瘤和促成骨的双重作用,以用于骨肉瘤术后缺损的治疗与修复。方法 采用选择性激光熔融技术制备多孔Ti-6Al-4V样品,首先对样品进行流动酸蚀处理(AE组)。随后,将纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, nHA)与琼脂糖溶液混合形成内层水凝胶,并通过机械互锁方式填充到多孔结构中(AN组)。将AN组样品浸泡在CaCl₂溶液中,利用水凝胶的溶胀作用吸附Ca²⁺。最后,将海藻酸钠、明胶和阿霉素(doxorubicin, DOX)的混合溶液(外层水凝胶)通过层层交联法包覆在AN组样品表面(AG组)。采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、三维共聚焦激光显微镜、接触角测量仪、电化学工作站和ME50型电子万能试验机对各组样品的表面形貌、表面粗糙度、润湿性、耐腐蚀性及力学性能进行表征。通过浸泡法测定内层和外层水凝胶的溶胀率和降解速率,并评估DOX的体外释放动力学。在AE组和AN组表面培养大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs),检测其黏附、增殖及分化能力;在AE组和AG组表面培养人骨肉瘤细胞(human osteosarcoma, HOS)及大鼠骨髓间充质干细胞,评估其抗肿瘤效果及细胞毒性;在BALB/c小鼠腋下造肿瘤模型,在肿瘤组织底部植入AE和AG两种植入体,评估其体内抗肿瘤效果和生物安全性。结果 SEM分析结果显示,AE组样品表面呈现均匀分布的微米级凹坑结构;AN组样品中可清晰观察到填充于多孔结构中的琼脂糖和纳米羟基磷灰石,其内部形成了数百微米尺度的大孔网络;AG组样品表面呈现较大的微孔结构,孔内可见由阿霉素药物负载引起的褶皱特征,且内部形成了大量毫米级的孔隙结构。表面粗糙度分析表明,AE组和AN组的表面粗糙度维持在4~5 μm范围内,而AG组的表面粗糙度降低至2.180 μm。接触角测试结果显示,内层水凝胶的负载显著提升了AE组样品的亲水性,而外层水凝胶的负载则使其亲水性略有下降。电化学测试表明,随着双层水凝胶的依次负载,样品的耐腐蚀性能得到提升。溶胀和降解实验表明,内层水凝胶相较于外层水凝胶表现出更低的溶胀比和更缓慢的降解速率。体外药物释放动力学研究显示,DOX的释放呈现初期爆发式释放特征,其可持续释放超过10 d。细胞实验结果表明,与AE组相比,AN组显著促进了大鼠骨髓间充质干细胞的黏附、增殖($P<0.001$)和分化(碱性磷酸酶、骨形态发生蛋白2和骨桥蛋白; $P<0.01$;骨钙素; $P<0.05$)能力;与AE组相比,AG组对人骨肉瘤细胞表现出显著的杀伤作用($P<0.0001$),同时对大鼠骨髓间充质干细胞仅表现出轻微的细胞毒性。荷瘤动物实验表明,AG组在保证生物安全性的前提下有良好的抗肿瘤效果。结论 双层水凝胶以空间有序的方式负载于3D打印多孔Ti-6Al-4V植入体中,并基于时间序列协同发挥抗肿瘤与促成骨的双重功能。

关键词:3D打印多孔Ti-6Al-4V植入体;双层水凝胶;时间序列;促成骨作用;抗肿瘤作用

中图分类号:R738.1

文献标志码:A

Biological experimental study on a dual-functional titanium alloy implant for promoting bone regeneration and antitumor therapy

ZOU Yujin^{1,2}, WAN Yi^{1,2}, JI Zhenbing^{1,2}, LIANG Xichang^{1,2}

(1. Key Laboratory of High-Efficiency and Clean Mechanical Manufacture of Ministry of Education, Shandong University, Jinan 250061, Shandong, China; 2. School of Mechanical Engineering, Shandong University, Jinan 250061, Shandong, China)

Abstract: Objective To explore the construction of a time-sequential coating system on the surface of 3D-printed titanium alloy implants, which can sequentially deliver dual functions of anti-tumor and osteogenic promotion for the treatment and repair of bone defects following osteosarcoma surgery. **Methods** Porous Ti-6Al-4V samples were fabricated using selective laser melting (SLM), and the samples were first subjected to flow acid etching treatment (AE group). Subsequently, nano-hydroxyapatite (nHA) was mixed with agarose solution to form an internal hydrogel, which was then infiltrated into the porous structure through mechanical interlocking mechanisms (AN group). Subsequently, the AN group samples were then immersed in a calcium chloride solution to facilitate calcium ion adsorption through hydrogel swelling. Finally, a composite solution of sodium alginate, gelatin, and doxorubicin (DOX) (outer hydrogel) was applied to the surface of the AN group samples *via* a layer-by-layer crosslinking method (AG group). The surface morphology, roughness, wettability, corrosion resistance and mechanical properties of each group were characterized using scanning electron microscopy (SEM), three-dimensional confocal laser microscopy, contact angle measurement, electrochemical workstation and ME50 electronic universal testing machine. The swelling ratio and degradation rate of the inner and outer hydrogels were determined by the immersion method, and the *in vitro* release kinetics of DOX were evaluated. Rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured on the surfaces of the AE and AN groups to evaluate their adhesion, proliferation, and differentiation capabilities. In order to evaluate the antitumor efficacy and toxicity of the samples, human osteosarcoma cells (HOS) and rat bone marrow mesenchymal stem cells were cultured on the surfaces of the AE and AG groups. Tumor-bearing models were established in the subcutaneous tissue of BALB/c mice. In these models, AE and AG implants were surgically positioned at the tumor tissue base. This approach was used to systematically evaluate the *in vivo* antitumor efficacy and biosafety profiles of the implants. **Results** SEM analysis revealed the presence of micron-scale pit structures on the surface of the AE group samples, exhibiting uniform distribution. In the AN group samples, agarose and nanohydroxyapatite were clearly observed to be present within the porous structure, forming a large-pore network on the scale of hundreds of micrometers. The AG group samples exhibited a surface with larger micropores, showing wrinkle-like features caused by the loading of DOX, while the interior exhibited a significant number of millimeter-scale porous structures. Surface roughness analysis revealed that the roughness of the AE and AN groups remained within the range of 4-5 μm , while the roughness of the AG group decreased to 2.180 μm . Contact angle measurements demonstrated that the loading of the inner hydrogel significantly enhanced the hydrophilicity of the AE group samples, whereas the loading of the outer hydrogel slightly reduced their hydrophilicity. Electrochemical tests demonstrated that the sequential loading of the double-layer hydrogel led to a substantial enhancement in the corrosion resistance of the samples. Swelling and degradation experiments revealed that the inner hydrogel exhibited a lower swelling ratio and slower degradation rate compared to the outer hydrogel. *In vitro* drug release kinetics studies indicated that DOX release exhibited an initial burst release profile, with sustained release lasting over 10 days. Cellular experiments demonstrated that, compared to the AE group, the AN group significantly promoted the adhesion, proliferation ($P < 0.001$), and differentiation (alkaline phosphatase, bone morphogenetic protein 2 and osteopontin; $P < 0.01$; osteocalcin; $P < 0.05$) capabilities of rat bone marrow mesenchymal stem cells. In contrast, the AG group exhibited significant killing effects on human osteosarcoma cells (HOS) compared to the AE group ($P < 0.0001$), while showing only mild toxicity toward BMSCs. Tumor-bearing animal experiments confirmed that the AG group achieved effective antitumor efficacy while maintaining biosafety. **Conclusion**

The double-layer hydrogel is methodically loaded into the 3D-printed porous Ti-6Al-4V implant, and it synergistically delivers dual functions of anti-tumor and osteogenic promotion based on a temporal sequence.

Key words: 3D-printed porous Ti-6Al-4V implant; Double layer hydrogel; Time-sequential; Contributory bone function; Antitumor function

骨肉瘤是一种多发于青少年群体的常见原发性恶性骨肿瘤^[1],其标准治疗方案为手术切除联合新辅助化疗虽提高了生存率^[2],但存在肿瘤切除导致的骨缺损^[3]、不完全切除及化疗全身毒性、肿瘤复发风险^[4]。因此,亟需开发兼具关键骨缺损修复和防止肿瘤复发的新型功能化支架。3D

打印多孔钛合金以其优异的物理化学性能、生物相容性及可个性化定制复杂结构的优势,成为骨缺损修复的理想载体^[5]。多孔结构可以有效降低应力屏蔽现象,提高与宿主骨组织的相容性,并有利于骨骼向内生长^[6-7]。然而,3D打印多孔钛植入体本身骨整合能力不足仍是制约其在骨肿瘤术

后修复中应用的一大困难。为提高多孔钛植入体的成骨能力,需要对多孔钛合金植入体进行改性处理。纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, nHA)涂层虽能增强成骨^[8-10],但单一的羟基磷灰石涂层脆性较大,在受到外力作用时容易产生裂纹并扩展,最终导致涂层脱落,失去其良好的促成骨能力^[11]。基于此,研究者探索有机/无机复合涂层的构建策略。同时,赋予支架局部高效抗肿瘤功能以降低复发是关键需求。

利用钛支架多孔结构进行局部药物递送是解决化疗全身毒性的有效途径。阿霉素(doxorubicin, DOX)是应用最广泛的抗肿瘤药物之一^[12],已有研究表明DOX通过抑制拓扑异构酶II导致DNA断裂以及产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导肿瘤细胞凋亡^[13]。但它仍存在几个问题:心脏毒性、耐药问题和癌变部位药物浓度低^[14]。虽有胶原蛋白、纳米颗粒等多种载体用于化疗药物递送^[2],然而普遍存在载药率低、释放周期短的问题。水凝胶是高度水合的3D聚合物结构,可模拟天然细胞外基质及其物理化学性质^[15]。尽管水凝胶支架支持组织快速再生,但它们的机械性能较低。琼脂糖(agarose, AG)是从红藻中提取的天然生物聚合物,因其凝胶化行为、模拟骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和促进细胞增殖的能力而在组织工程领域引起关注,其产生的支架显示高骨传导性并诱导新的骨形成^[16]。

进一步加入矿物相后表现出增强的机械刚度、细胞黏附、增殖和生物降解能力^[17],在组织工程领域具有广阔的应用前景。明胶是一种可生物降解的蛋白质,是通过胶原蛋白的物理和化学降解或热变性获得的,没有毒性,但其在体温下的难以成胶和其流动性限制了其应用^[18]。海藻酸钠可以有效提高其成胶能力,但仅通过掺入二价阳离子交联的海藻酸钠水凝胶在细胞培养液中孵育后会迅速降解^[19],难以实现其长效控释治疗效果。为了克服此类限制,利用明胶的额外共价交联可以延长水凝胶的降解速度,增强化疗药物在水凝胶体系中的缓释效果。这种复合水凝胶不但可以拥有更高的载药量,还有可控的药物释放速率以及更长的药物释放时间,此外与多孔钛合金植入体联用,以产生可以增加靶位药物浓度的材料。

目前的研究多集中在构建同时发挥抗肿瘤和促

成骨功能的植入体,然而杀伤肿瘤细胞和骨形成是两个不同的阶段,两者具有一定的时序性^[20],因此这些植入体存在一定的局限性。本研究提出了一种新型的双层药物释放多孔钛植入物,可以实现先由外层成分发挥抗肿瘤作用,清除肿瘤细胞后,再由内层成分发挥促成骨作用,这种植入体可以控制不同功能成分发挥作用的时间次序。基于此,本研究使用琼脂糖负载nHA填充到多孔钛植入体内部,并将其在氯化钙溶液中浸泡,通过其溶胀性能,使内层负载 Ca^{2+} ,并使负载DOX的海藻酸钠/明胶复合水凝胶在外层自发交联。对植入体的表面粗糙度、亲水性、耐腐蚀性进行表征,并进一步评估了植入物对间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖、形态和成骨分化的影响以及植入物的抗肿瘤效果和生物安全性,最后通过动物实验验证了植入体的抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象

10只BALB/c免疫缺陷小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,大鼠骨髓间充质干细胞由山东大学齐鲁医学院捐赠,人骨肉瘤细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。动物伦理由山东大学齐鲁医院伦理委员会审批通过(批号:DWLL-202500106)。

1.1.2 主要试剂

胎牛血清购于武汉普诺赛生命科技有限公司;DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养液购自美国赛默飞公司;Calcein/PI(Calcein-ace-toxymethyl ester/Propidium Iodide)细胞活性与细胞毒性检测试剂盒购自碧云天生物公司;阿霉素、海藻酸钠购自阿拉丁试剂有限公司;明胶购自上海麦克林生化有限公司;琼脂糖购自翌圣生物科技公司;纳米羟基磷灰石购自上海华蓝化学科技有限公司;罗丹明标记鬼笔环肽和DAPI(4',6-Diamidino-2-Phenylindole)溶液购自北京索莱宝科技有限公司;增强型CCK-8试剂盒购自兰杰柯科技有限公司。

1.1.3 主要仪器

3D打印机(ProX DMP 320,3D Systems公司,美国);扫描电子显微镜(JSM-7610F,JEOL公司,日本);三维激光共聚焦显微镜(VK-X200K,Keyence

公司,日本);接触角测角仪(SL200KS,美国科诺,美国);电化学工作站(CS310,科思特仪器,中国);冷冻干燥机(LGJ-60E,上海豫明仪器有限公司,中国);多模式微孔板检测系统(EnSight,PerkinElmer公司,新加坡);高速转盘共聚焦显微镜(Dragonfly 200,Andor公司,英国);分光光度计(Nanodrop One,Thermo Fisher Scientific,美国);实时PCR仪(LightCycler 96,Roche公司,瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

Ti-6Al-4V 多孔件由 ProX DMP 320 激光打印机通过选择性激光熔融(selective laser melting, SLM)技术制备。打印使用粒径范围为 10~53 μm 的钛合金粉末,工艺参数设置为激光功率 88 W,扫描速度 620 mm/s。样品的每个表面都用硝酸和氢氟酸的混合酸溶液($\text{HNO}_3/\text{HF}/\text{H}_2\text{O} = 10:1:39$)酸蚀 15 s。所得样品称为 AE。向 2 w/v% 琼脂糖溶液中混入 5 w/v% 的 nHA,加热到 90 $^\circ\text{C}$,将 AE 组样品放置在定制的凝胶室中,将加热后的溶液注入凝胶室中冷却至室温,获得的样品称为 AN。将样品 AN 在 2.5 mol/L 的氯化钙溶液中浸泡 15 min 后取出,将其放置在定制的凝胶室中,将 10 w/v% 明胶和海藻酸钠混合溶液注入凝胶室中交联,明胶与海藻酸钠的质量比为 4:1。该溶液中混有 1.25 mg/mL DOX,获得的样品称为 AG。

1.2.2 样品表面表征

为了确定两种载药水凝胶加载前后多孔植入体的微观结构和组成的变化,通过扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)对样品进行检测。所有样品在-80 $^\circ\text{C}$ 下冷冻,并在冷冻干燥机中过夜。此后,通过 SEM 确定表面形态,分析前对样品进行喷金处理。使用 3D 激光共聚焦显微镜对样品的 3D 形貌进行表征,分析样品的平均表面粗糙度(surface average roughness, Sa)。通过接触角测角仪测量样品表面的接触角以表征其亲水性。样品的耐腐蚀性通过电化学工作站测量。测量前,将样品放置在 0.9% NaCl 溶液中稳定以获得稳定的开路电位。电化学工作体系置于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温的电解液中,设置初始电位为-0.8 V,终止电位为+2 V,扫描速率为 2 mV/s。

1.2.3 内、外层水凝胶表征

用称重法测定两种冻干水凝胶在 37 $^\circ\text{C}$ 的磷酸

盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)(pH=5.5)中浸泡 24 h 的溶胀率。先对两种冻干水凝胶进行称重并记录结果,随后将其放入 PBS 中,每隔 1 h 取出水凝胶,用滤纸吸去表面多余的水分后,立即用高精度天平称重。水凝胶的平衡膨胀比(equilibrium swelling ratio, ESR)计算公式如下, $\text{ESR} = (W_s - W_d)/W_d \times 100\%$,其中, W_s 为膨胀后的水凝胶重量, W_d 为冷冻干燥后的水凝胶重量。

为了表征水凝胶降解的过程,将两种水凝胶在 37 $^\circ\text{C}$ 下浸入 250 mL PBS(pH=5.5)中,每天进行准确称重。计算随时间变化的剩余水凝胶质量百分比。

复合水凝胶的 DOX 释放在 PBS 中进行测定。将分别含有 1.5 mg/mL 和 0.5 mg/mL DOX 的样品放入 3 mL PBS(pH=5.5)中,用恒温摇床在 37 $^\circ\text{C}$ 下摇晃。每天取 2 mL 释放溶液,并在反应混合物中加入等量的新鲜缓冲液。使用紫外-可见光谱法评估水凝胶释放的 DOX 含量。累积释放百分比根据负载的总 DOX 计算。

水凝胶及 3 组植入体样品的机械性能测试在 ME50 型电子万能试验机上进行。弹性模量、断裂韧性都可以从应力-应变曲线中获得,弹性模量为曲线斜率,断裂韧性由积分应力-应变曲线面积得到。

1.2.4 负载外层水凝胶的多孔植入体的体外抗肿瘤效果和生物安全性

为了直观监测 HOS 和 BMSCs 在 AE 和 AG 上的存活状态,根据制造商的说明进行了活/死染色。将 HOS 或 BMSCs 与 AE 及 AG 在 24 孔板中培养 48 h,用钙黄绿素和碘化丙啶染色后去除染色液,用 PBS 洗涤,使用高速转盘共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察样品。绿色代表活细胞,红色代表死细胞。通过 ImageJ 进行荧光强度分析。

将 HOS 接种在 24 孔板中的 AE 和 AG 上。培养 2 d 后,用 PBS 洗涤两组植入体,将黏附在植入体上的细胞用 4% 多聚甲醛在 4 $^\circ\text{C}$ 下固定 25 min。PBS 洗涤 3 次,并用 0.2% TritonX-100 对细胞透化 10 min。

为了用 SEM 观察细胞形态,首先用梯度乙醇对细胞进行脱水处理。干燥后,用金喷涂样品,并通过 SEM 表征细胞形态。

对于荧光染色观察,首先用罗丹明标记鬼笔环

肽对细胞骨架染色处理 60 min,接着在黑暗中用 DAPI 对细胞核染色 15 min。两种染色均在黑暗条件下进行。最后,使用 CLSM 表征细胞形态。

1.2.5 负载外层水凝胶的多孔植入体的体内抗肿瘤效果和生物安全性

在小鼠腋下注射 HOS 细胞悬液,当肿瘤体积达到 60 mm^3 左右时开始治疗。对小鼠称重并随机分为两组(每组 5 只),每只小鼠在肿瘤边缘的皮肤组织中做一个切口,然后在肿瘤组织底部植入 AE 和 AG 两种植入体,手术缝合伤口。每隔 1 h 记录所有治疗组小鼠的肿瘤体积和质量。收集所有治疗组小鼠的代表性肿瘤,进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin staining, H&E)、末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)和 Ki-67 抗体染色分析。

1.2.6 BMSCs 在负载内层水凝胶的多孔植入体表面黏附、增殖和分化能力的检测

将 BMSCs 与 AE 及 AN 在 24 孔板中培养 48 h,活/死染色、细胞形态观察均采用与 1.2.4 相同的方法。

为了定量观察细胞活性,按照制造商描述的标准方案使用 CCK-8。将 BMSCs 与 AE、AN 在 24 孔板中共培养 1、4、7 d。到达指定时间点后,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液和 1 mL 培养基,在 37°C 条件下培养 1 h,吸取孵育后溶液到 96 孔板中,用多模式微孔板检测系统在 450 nm 波长下检测吸光度。

采用实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)分析 BMSCs 成骨基因的表达。细胞培养 7 d,用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。使用分光光度计在 260/280 nm 处测量每个样品组的 RNA 浓度。随后,根据制造商的说明,使用逆转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。选择成骨相关基因 *ALP*、*BMP2*、*OCN*、*OPN* 作为靶基因进行分析,以 *GAPDH* 作为内参基因规范靶基因的表达。实验在实时 PCR 仪上进行。结果采用相对定量比较法($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)计算,每个数据点进行 3 次重复。所用引物序列如下:

ALP:

F:ACAACACCAACGCTCAGGTC

R:GTGACCTCGTTCCTGAGT

BMP2:

F:AACACAAGTCAGTGGGAGAGC

R:AACCCATGGTTGGTGTGTCC

OCN:

F:ACTGCATTCTGCCTCTCTGAC

R:GTAGCGCCGGAGTCTATTCA

OPN:

F:GAGACCATGCAGAGAGCGAG

R:TTGACCTCAGTCCGTAAGCC

GAPDH:

F:GGTGAAGGTCGGTGTGAACG

R:CTCGCTCTGGAAGATGGTG

1.3 统计学处理

采用 GraphPadPrism10 进行处理,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用独立样本 *t* 检验,三组及以上组间差异比较采用单因素方差分析,对正态分布重复测量资料采用重复测量方差分析。检验标准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 样品表面表征

图 1 展示了通过 SEM 表征的多孔钛合金植入体内层与外层水凝胶的表面形貌特征。在低倍镜下,图 1A、B 可观察到裸露的钛合金基体,呈现出高度规则排列的多孔结构;图 1C 展示了内层水凝胶的内部结构,冻干样品显示出数百微米尺度的大孔网络,并伴有明显开裂,这可能是由 nHA 团聚所致;在高倍镜下,AE 组表面可见均匀分布的微米级凹坑结构(图 1A),AN 组可清晰观察到负载 nHA/水凝胶的植入体孔隙中存在水凝胶及嵌入的 nHA 颗粒(图 1B),且内层水凝胶内部也观察到 nHA,表明 nHA 成功负载于植入体孔隙内的水凝胶中(图 1C)。图 1D 显示 AG 组复合材料表面存在较大的微孔结构,孔内可见由 DOX 负载引起的褶皱特征以及凹坑结构,这可能是由于阿霉素(带正电荷)与海藻酸钠(带负电荷)的静电结合使局部增强交联,导致凝胶网络收缩;而未被中和的区域可能因电荷排斥而膨胀,形成非均匀应力,最终表现为表面皱褶。DOX 负载后,水凝胶呈现红色(图 2)。在外层水凝胶内部,可观察到大量毫米级孔隙结构,其厚度为纳米级(图 1E)。

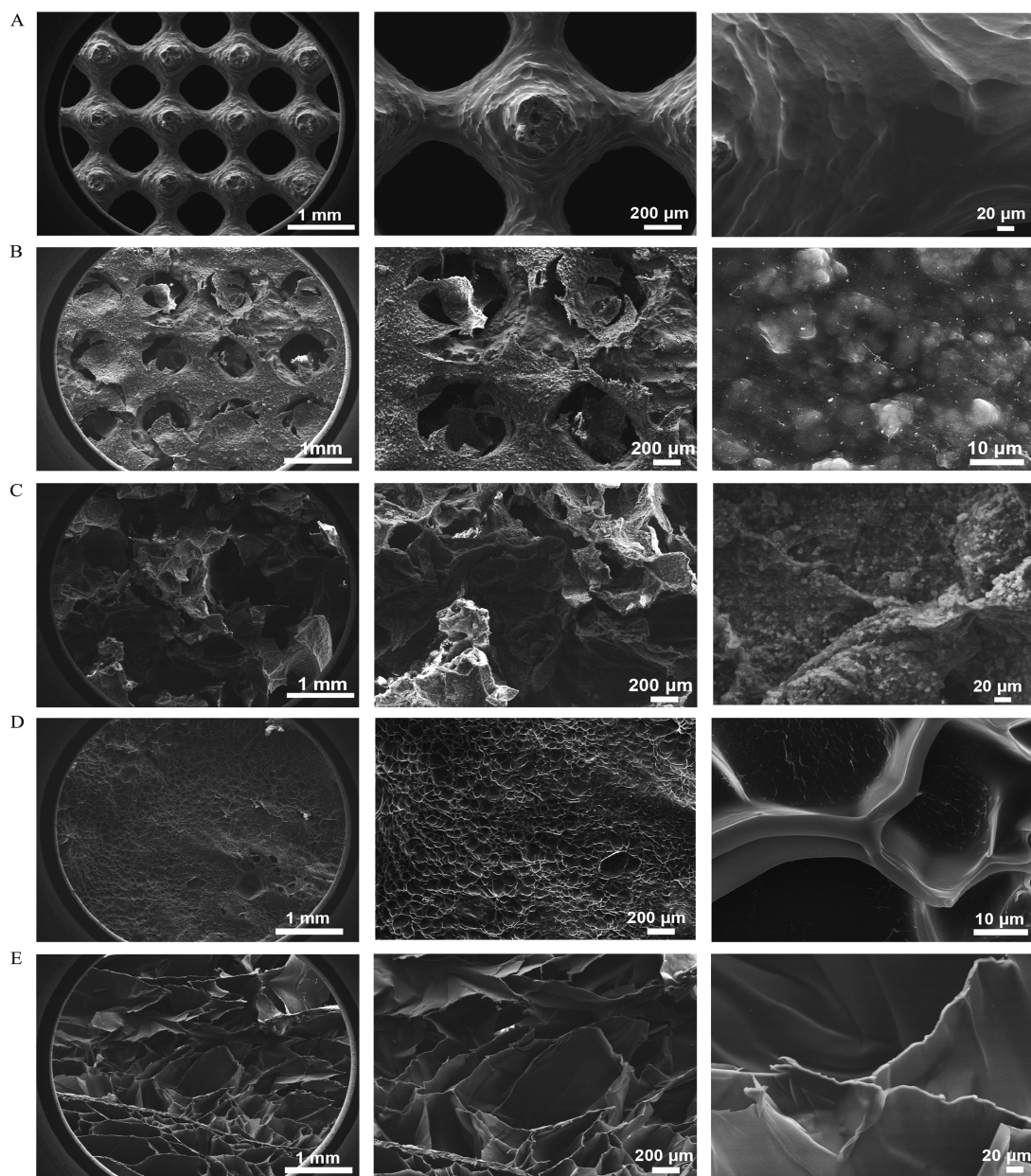


图1 各组样品的扫描电镜图

A: AE组;B: AN组;C: 内层水凝胶;D: AG组;E: 外层水凝胶。

Figure 1 SEM images of each group of samples

A: AE group; B: AN group; C: Inner layer hydrogel; D: AG group; E: Outer layer hydrogel.

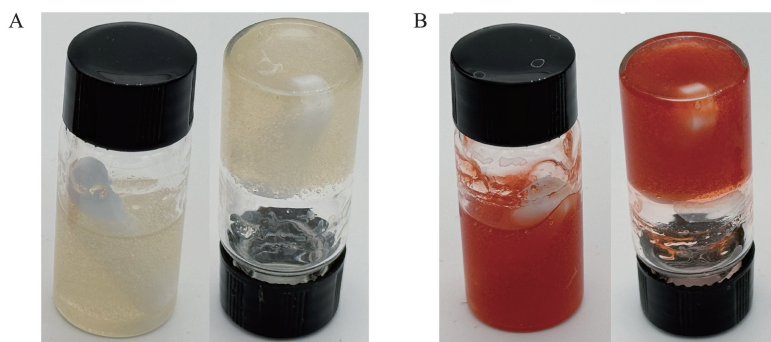


图2 有无 DOX 负载的外层水凝胶

A: 不负载 DOX 的外层水凝胶;B: 负载 DOX 的外层水凝胶。

Figure 2 Outer hydrogels with or without DOX loading

A: Outer hydrogels without DOX; B: Outer hydrogel with DOX.

通过观察样品的表面形态和表面粗糙度(图3A),AE组表面可以观察到3D打印过程中激光熔融的痕迹,表面粗糙度为 $4.897\ \mu\text{m}$ 。AN组由于含nHA水凝胶的涂覆,其表面有nHA形成的颗粒,表面粗糙度降低为 $4.006\ \mu\text{m}$,植入体表面仍能维持对细胞黏附有利的表面粗糙度,从而促进间充质干细胞的黏附。AG组表面同样出现SEM显示的褶皱,其表面粗糙度大幅降低到 $2.180\ \mu\text{m}$,从而抑制肿瘤细胞的黏附。

各组样品表面接触角测试结果如图3B所示。AE组的接触角为 $(59.49^\circ \pm 2.38^\circ)$ 。AN组在引入琼脂糖和nHA后,接触角降低至 $(26.13^\circ \pm 2.18^\circ)$ ($P < 0.0001$),这归因于羟基磷灰石中的羟基和 PO_4^{3-} 基团能够与水分子发生相互作用,从而赋予材料较强的亲水性。AG组由于疏水性药物阿霉素的加入,接触角上升至 $(42.39^\circ \pm 1.34^\circ)$,其亲水性较AN组下降($P < 0.001$)。

各组的动电位极化曲线如图3C所示。相比AE组来说,AN组腐蚀电位逐渐增大,腐蚀倾向减小。另外,AN组腐蚀电流较小,说明其腐蚀效率较低,耐腐蚀性高。AG组随着水凝胶涂层的进一步形成,其耐腐蚀性得到进一步提高。

2.2 内、外层水凝胶表征

如图3D所示,外层水凝胶和内层水凝胶在PBS中浸泡12h后,琼脂糖组显示出比明胶/海藻酸钠组更低的溶胀率。如图3E所示,外层水凝胶的降解速度快于内层水凝胶。外层载药水凝胶在植入初期(0~2周)主要承担抗肿瘤功能,其降解动力学数据显示第二周残余量已低于20%。此时内层骨修复水凝胶开始暴露并启动成骨作用,已有研究表明在第3~4周为骨再生的增殖阶段^[21],在此阶段间充质干细胞向成骨分化^[22],其作用时间与骨再生关键事件形成精准匹配。值得注意的是,图3F揭示内层水凝胶具有更长的降解时间,至第12周仍维持20%以上的残余量,这种缓释特性使其能够持续作用于骨修复的增殖期并延伸至骨重塑阶段^[23],与正常成骨修复形成时间上的配合。这种时序递送机制既保证了抗肿瘤治疗的时效性需求,又满足了骨组织再生所需的持续性生物刺激。

通过检测模拟肿瘤细胞外酸性微环境中DOX

浓度来评估DOX的体外释放动力学。负载 $1.5\ \text{mg/mL}$ DOX的组在释放百分比方面表现出较低的初始爆发效应和较慢的释放速率(图3G)。然而,在释放质量方面,它在第1天内表现出更高的初始爆发和更高的释放速率(图3H)。随着DOX负载的增加,浓度梯度增加,因此释放的DOX质量增加。

通过力学性能测试来评估植入体的机械性能。目前,水凝胶材料已应用于临床,临床上使用的聚丙烯酰胺(polyacrylamide, PAAm)水凝胶的断裂应力只有 $77.3\ \text{kPa}$ ^[24],本研究使用的外层水凝胶的断裂应力可达 $690\ \text{kPa}$ (图3I),比PAAm水凝胶的断裂应力提高了大约8.9倍,有相对较好的机械性能。另外,PPAm水凝胶的断裂韧性只有 $0.22\ \text{MJ/m}^3$,外层水凝胶的断裂韧性可达 $1.52\ \text{MJ/m}^3$,提升了约6.9倍,尽管该层无需承担结构性载荷(主要功能为局部抗肿瘤),但其优异的韧性已满足植入初期防凝胶碎裂的临床需求。相比于外层水凝胶来说,内层水凝胶的断裂应力较低,只有 $350\ \text{kPa}$,断裂韧性为 $0.22\ \text{MJ/m}^3$,然而由于其在多孔植入体内部,其所受力可忽略不计。图3J为各组样品的应力-应变曲线。经过酸蚀后,AE组样品的弹性模量为 $2.838\ \text{GPa}$ 。当加入内层水凝胶后,AN组的弹性模量提高为 $3.283\ \text{GPa}$ 。再加入外层水凝胶后,AG组弹性模量未发生明显变化,为 $3.219\ \text{GPa}$ 。与实心Ti-6Al-4V植入体($113.8\ \text{GPa}$)相比,改性后的多孔Ti-6Al-4V样品的弹性模量明显降低,这可以有效减少植入后的应力屏蔽现象。

2.3 负载外层水凝胶的多孔植入体的体外抗肿瘤效果和生物安全性

如图4A所示,活死荧光染色表明,AG组对HOS具有选择性杀伤效应。具体来说,AG组HOS细胞黏附少,死细胞所占比例高,定量分析表明可以有效杀伤HOS达到50%以上(图4C),并且有比较高的BMSCs的存活率(图4B),细胞存活率在80%以上(图4D)。进一步形态学分析表明(图4E),AG组肿瘤细胞呈现黏附抑制特征:与对照组相比,HOS细胞伪足数量减少,细胞铺展面积缩小,提示其表面特性(疏水性表面以及低粗糙度)可能通过影响整合素介导的黏着斑形成,进而抑制肿瘤细胞黏附行为。

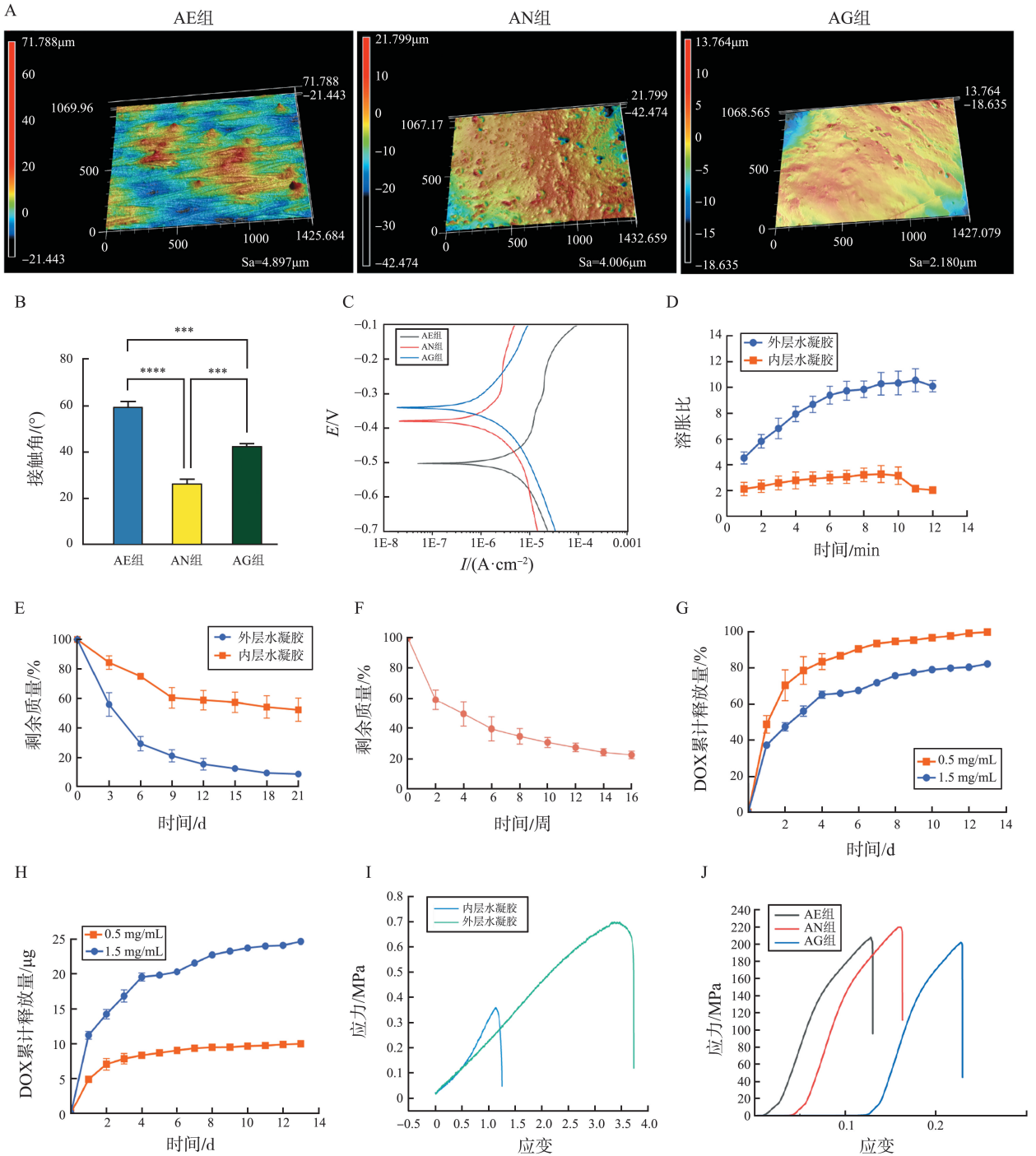


图3 各组表面的物理化学性质以及水凝胶的性能

A: 各组的表面粗糙度及三维形貌; B: 各组的表面接触角; C: 各组样品在 0.9% NaCl 溶液中的动电位极化曲线; D: 内外层水凝胶的溶胀比; E: 内外层水凝胶的降解曲线; F: 内层水凝胶长期降解曲线; G: 外层水凝胶 DOX 的释放曲线,以释放百分比为单位; H: 外层水凝胶 DOX 的释放曲线,以释放质量为单位; I: 内外层水凝胶的拉应力-应变曲线; J: 三组样品的压缩应力-应变曲线。

Figure 3 The physical and chemical properties of each group's surface and the properties of hydrogels

A: Surface roughness and three-dimensional morphology of each group; B: Surface contact angle of different samples; C: Potentiodynamic polarization curves for each group of samples in 0.9% NaCl solution; D: Swelling ratio of inner and outer layer hydrogel; E: Degradation curve of inner and outer layer hydrogel; F: Long-term degradation profile of the inner hydrogel layer; G: Release curve of the outer hydrogel DOX, expressed in percentage release; H: Release curve of the outer hydrogel DOX, in units of release mass; I: Tensile stress-strain curves of inner/outer hydrogel layers; J: Compressive stress-strain curves of three experimental groups.

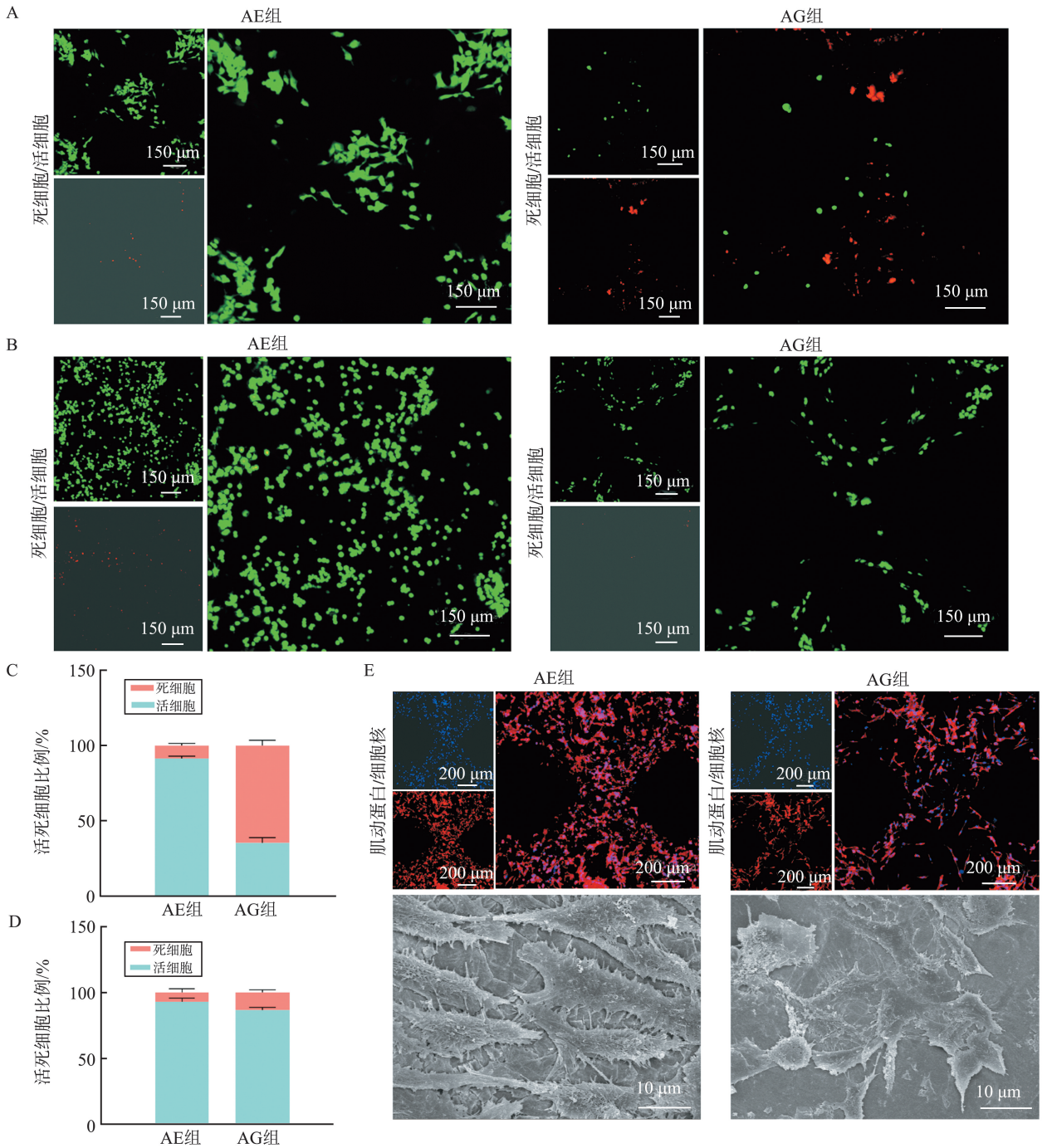


图4 AG组表现出对HOS增强的杀伤作用以及对BMSCs较小的细胞毒性

A: HOS在两组样品上的活死荧光染色; B: BMSCs在两组样品上的活死荧光染色; C: A中活死细胞比例; D: B中活死细胞比例; E: HOS细胞形态的SEM和CLSM图像。

Figure 4 AG group exhibited enhanced killing effects on HOS cells while demonstrating minimal cytotoxicity toward BMSCs

A: Live and dead fluorescence staining of HOS on two groups of samples; B: Live and dead fluorescence staining of BMSCs on two groups of samples; C: Proportion of living and dead cells in A; D: Proportion of living and dead cells in B; E: SEM and CLSM images of HOS cell morphologies.

2.4 负载外层水凝胶的多孔植入体的体内抗肿瘤效果和生物安全性

通过荷瘤动物实验进一步验证了植入体的抗肿瘤效果。如图5A所示,使用AE组治疗的动物的肿瘤体积迅速增加。相比之下,使用负载水凝

胶和阿霉素的AG组治疗的动物显示出较好的抗肿瘤作用,显著抑制肿瘤生长。在实验终点,解剖和称重骨肉瘤肿瘤肿块,肿瘤称重的结果(图5B、C)与肿瘤体积的结果一致,显示载有阿霉素/水凝胶的植入物具有良好的抗肿瘤效果。此外,在AE

和 AG 两组中,没有观察到小鼠明显的体质量减轻,这表明植入体对小鼠的不良作用可以忽略不计(图 5D)。对肿瘤切片进行病理分析,H&E 和 TUNEL 染色图像显示,与 AE 组相比,AG 组的细胞凋亡/坏死更严重,验证了负载 DOX 水凝胶的钛合金植入体的高效治疗效果(图 5E)。此外,用 Ki-67 抗体标记来自不同治疗组的小鼠的代表性

肿瘤切片,以评估其增殖性能。AE 组肿瘤切片的 Ki-67 染色图像显示明显的肿瘤细胞增殖,而 AG 组的 Ki-67 染色图像监测到可忽略不计的增殖活性(图 5E)。因此,负载 DOX 水凝胶的钛合金植入体能够以高生物安全性实现实质性的抗肿瘤效果。

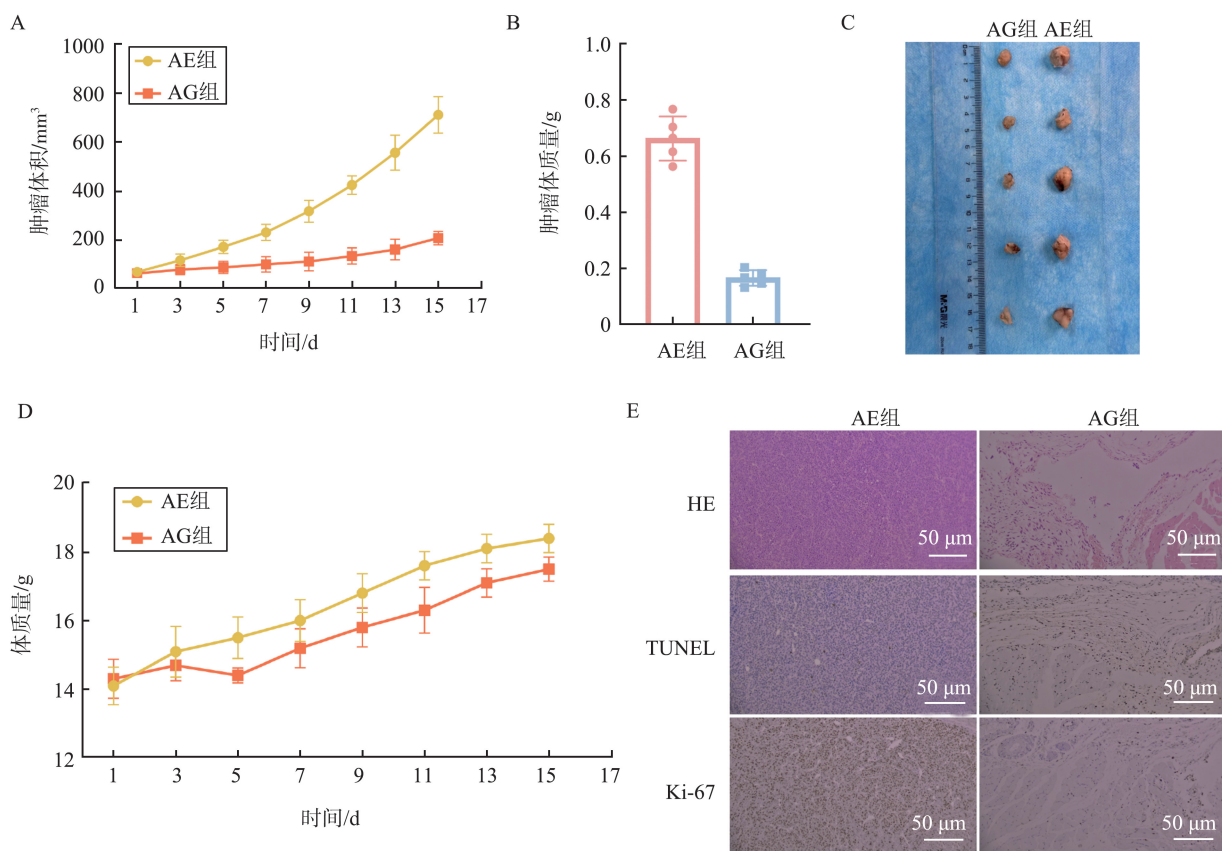


图 5 AG 组对骨肉瘤模型的体内抗肿瘤作用

A: AE 和 AG 治疗组中小鼠的肿瘤体积; B: AE 和 AG 治疗组中小鼠的肿瘤质量; C: 切除肿瘤的照片; D: AE 和 AG 治疗组中小鼠体质量; E: AE 和 AG 治疗组中肿瘤切片的 H&E、TUNEL 和 Ki-67 染色图像。

Figure 5 *In vivo* antitumor effect of AG group towards the osteosarcoma model

A: Tumor volume in mice treated with AE and AG; B: Tumor mass in mice treated with AE and AG; C: Photographs of excised tumors; D: The body weight of mice in the AE and AG treatment groups; E: H&E, TUNEL and Ki-67 stained images of tumor sections in the AE and AG treatment groups.

2.5 负载内层水凝胶的多孔植入体促进 BMSCs 黏附、增殖和分化

活细胞/死细胞染色观察到大量活细胞和少数死细胞(图 6A),在两组中存活的 BMSCs 百分比均大于 90%(图 6B),没有观察到存活率的显著差异,从而证实了 nHA/琼脂糖具有良好的细胞相容性,且观察到有明显的细胞增殖。SEM 和 CLSM 的观察结果显示(图 6C),AN 组有比 AE 组更强的细胞黏附,AN 组细胞表现出更强的表面黏附能力,具体表现为有更大的铺展面积,大

的细胞铺展面积有利于间充质干细胞的成骨分化,另外其伪足数量多,表明其对 AN 组表面有更强的响应。使用 CCK-8 测定法评估了两种植入物对 BMSCs 增殖的影响(图 6D)。培养 1 d 后,两组间差异无统计学意义,而培养 4 d 后,AN 组促细胞增殖能力强于 AE 组($P < 0.05$)。培养 7 d 后,两组进一步促进细胞增殖,加入 HA 组的细胞增殖能力对比 AE 组进一步增强($P < 0.001$)。

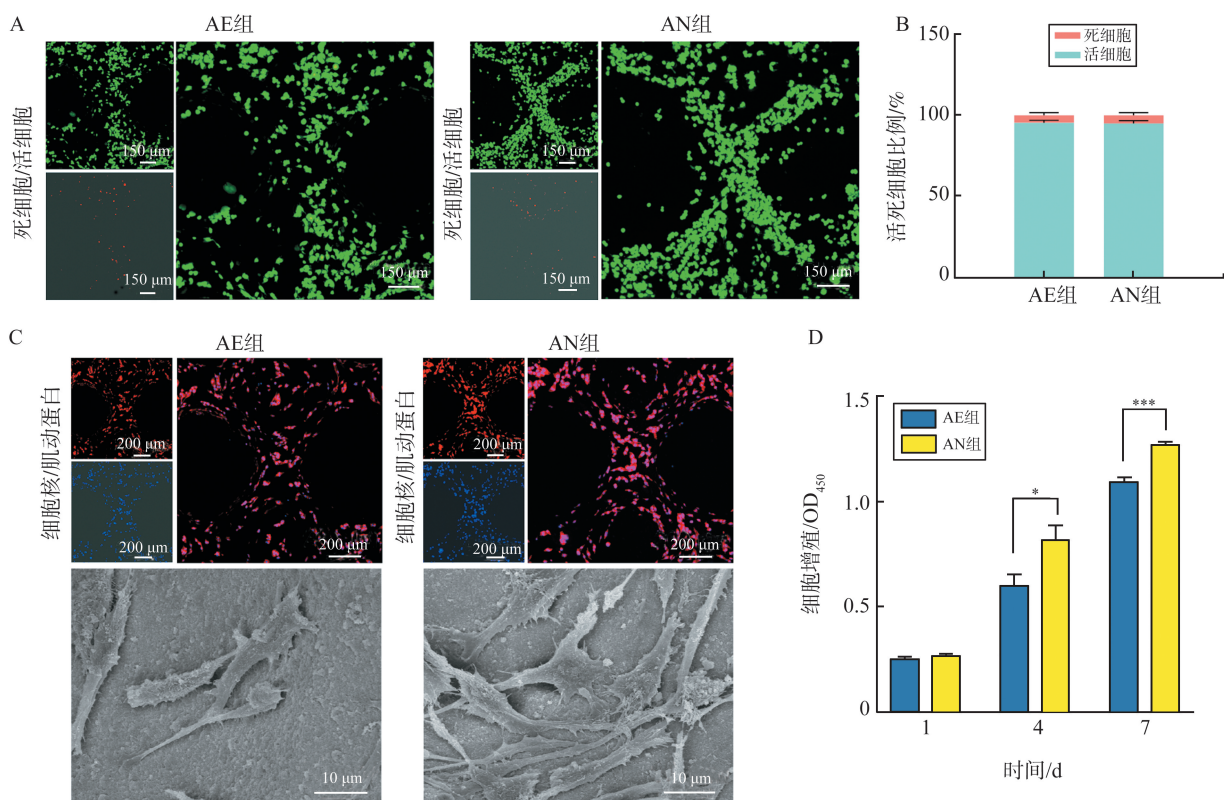


图6 AN组促进BMSCs黏附、增殖且有良好的生物相容性

A: BMSCs在两组样品上的活死荧光染色; B: A中活死细胞比例; C: BMSCs细胞形态的SEM和CLSM图像; D: 培养1、4、7d后BMSCs在各组表面的细胞增殖情况。* $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

Figure 6 AN group promoted the adhesion and proliferation of BMSCs and had good biocompatibility

A: Live and dead fluorescence staining of BMSCs on two groups of samples; B: Proportion of living and dead cells in A; C: SEM and CLSM images of BMSCs cell morphologies; D: Cell proliferation of BMSCs on the surface of each group after 1, 4 and 7 days of culture. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

RT-qPCR 分析结果如图7所示, AN组的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在第7天的基因表达均高

于AE组($P<0.01$)。AN组的骨钙素(Osteocalcin, OCN)在第7天的基因表达对比AE组也有提升($P<0.05$)。体外实验的综合结果表明, AN组有效促进了BMSCs的黏附、增殖和成骨分化。

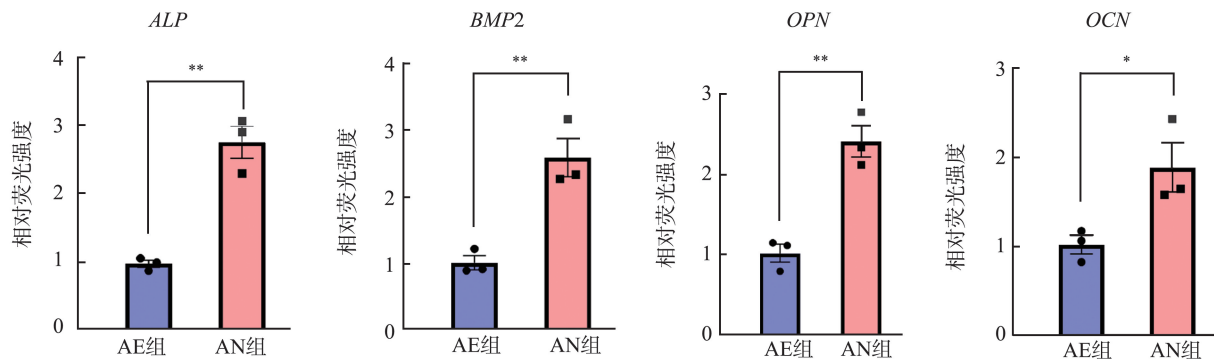


图7 AN组促进BMSCs分化(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 7 AN group promoted BMSCs differentiation(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

3 讨论

预防肿瘤复发和修复关键骨缺损是骨肿瘤术后

面临的两大核心挑战。多孔钛合金植入体因其骨整合能力及抗肿瘤能力不足, 严重限制了其在骨肿瘤切除术后修复中的应用。目前研究多聚焦于单一功能或同时发挥抗肿瘤与促成骨作用的植入体^[25-27],

但忽略了时序性治疗需求^[20],且存在药物负载量低、释放周期短等问题,所以设计亟须优化。本研究开发了一种空间有序的双层水凝胶钛合金植入体以解决抗肿瘤和成骨这两个不同阶段的时序问题,方案整合了 DOX、nHA 以及金属支架在抗骨肉瘤、促进骨整合和机械性能方面的优势。具体表现为,通过 3D 打印技术实现植入体孔隙结构与骨缺损形态的适配,显著提升力学性能;在肿瘤治疗关键期,外层载药水凝胶系统的 DOX 局部控释特性在保证肿瘤细胞清除效率的同时,大幅降低全身化疗导致的剂量依赖性不良反应,降低局部复发风险;在骨修复中后期,内层水凝胶包覆的 nHA 与钛合金基体的复合设计不仅增强骨整合能力,持续激活成骨细胞活性,其表面生物活性还可抑制纤维包裹形成。这些优势使得该植入体适用于骨肉瘤切除后的治疗,为个性化精准治疗提供了新的技术路径,成功规避了化疗药物长期释放对骨再生的抑制作用。相较于传统单一功能植入物,实现了“抗肿瘤-促成骨”的时空协同作用。这一发现为骨肿瘤切除术后“抗复发-促修复”的临床矛盾提供了解决方案。

本研究首先针对 3D 打印 Ti-6Al-4V 植入体进行流动酸蚀处理,SEM 观察显示颗粒被有效去除并形成微米级凹坑结构。在此基础上将 nHA 负载于琼脂糖中构建仿生骨组织结构,通过机械互锁机制将其填充至多孔结构中。SEM 结果显示,复合体系成功实现了微纳米多级结构的构建,这种数百微米级的大孔结构有利于促进骨形成^[28],而表面形成的微纳米结构则有助于实现快速成骨和骨整合^[29]。Wnt/ β -catenin 和整合素连接的激酶/ β -catenin 通路已被证明通过改变植入物表面地形在增强成骨细胞的行为方面具有重要作用^[30]。此外,整合素被认为在细胞黏附、增殖、迁移和分化中起重要作用^[31]。纳米结构已被证实可促进整合素聚集并为整合素配体提供结合位点^[32]。一项相关研究表明,微结构可以显著刺激整合素 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 亚基的表达,而微结构和纳米结构都可以上调整合素 αv 亚基的表达,提供协同地形刺激^[33]。BMP-2 作为影响成骨的重要蛋白,不仅诱导成骨分化,还对细胞黏附和迁移产生影响。多尺度复合结构已被证明通过上调整合素的表达来激活 BMP-2 信号通路,从而促进 BMP-2 的分泌和成骨相关基因的表达^[34]。基因表达结果证实了这一观点。

材料表面的理化性质是调控细胞行为及骨整合

效果的关键。目前大多研究关注的表面粗糙度的影响问题,在本研究中得到体现并验证,相较于光滑表面,粗糙度在 3~5 μm 范围内的表面更有利于促进细胞黏附、矿化以及成骨相关基因的表达^[35];且接触角分析显示,内层水凝胶由于羟基磷灰石中的羟基和 PO_4^{3-} 能够与水分子产生相互作用,因而表现出较强的亲水性,具有较强亲水性的表面能够显著促进细胞的黏附、增殖和分化^[36]。内层琼脂糖/nHA 复合水凝胶的低溶胀性也是其优势之一,琼脂糖通过氢键与水分子结合,其分子链排列紧密,限制了水分子的渗透,使其有较低的溶胀性能,低溶胀性材料的缓慢降解速率恰好与新骨形成的速度相匹配^[37]。进一步的体外细胞实验验证了植入体的促成骨能力,负载内层水凝胶的 AN 组显著促进了间充质干细胞的黏附、增殖和分化能力,其内纳米羟基磷灰石发挥了重要作用。在成骨分化过程中,nHA 结构与细胞间的相互作用涉及多种信号通路的调控,包括 ERK、p38、Wnt/ β -catenin 和 BMP 通路。nHA 通过激活 ERK 通路促进细胞黏附和血管钙化^[38];p38 通路是细胞成骨分化所必需的,可被 nHA 激活并导致成骨相关基因表达上调^[39];HA 通过激活 Wnt 通路,特别是 Wnt/ β -catenin 信号传导,显著促进成骨细胞分化和相关基因表达^[40];在众多通路中,BMP 信号通路可能是调控成骨分化最重要且关键的通路^[41],其通常参与 nHA 诱导的成骨分化过程^[42]。综上所述,nHA 通过激活与成骨分化相关的多条信号通路,显著增强了成骨相关基因的表达。

为赋予植入体抗肿瘤能力,本研究选用临床抗肿瘤药物阿霉素^[43],通过明胶与海藻酸钠的共价交联,构建了具有良好成胶能力和缓释性能的外层复合水凝胶体系。将 AN 组样品浸泡于 CaCl_2 溶液后, Ca^{2+} 的吸附及其浓度梯度驱动的释放过程促使外层水凝胶发生层层交联。SEM 观察显示,与 AN 组相比,AG 组形成了更为平整的新凝胶层,且水凝胶内部呈现出高度互联的不规则多孔结构,孔径分布相对均匀,这种结构有利于 DOX 的持续释放。从分子作用机制分析,DOX 的高效负载和缓释性能主要依赖于三重相互作用:在制备过程中被包裹在凝胶的孔隙或微结构中,阿霉素(带正电荷的氨基糖苷结构)与海藻酸钠(含负电荷的羧酸根)通过静电吸引结合,阿霉素的羟基(-OH)、氨基(- NH_2)与明胶/海藻酸钠的羧基(-COOH)、羟基(-OH)形成

氢键^[44]。值得关注的是,DOX 负载后凝胶表面呈现的特征性褶皱结构可能源于药物-载体分子间作用引起的局部交联度差异。在 DOX 富集区域,阿霉素(带正电荷)与海藻酸钠(带负电荷)的静电结合使局部增强交联^[45],导致凝胶网络收缩;而未被中和的区域可能因电荷排斥而膨胀,形成非均匀应力,最终表现为表面皱褶。外层水凝胶因疏水性药物阿霉素的加入,其亲水性有所降低,不利于肿瘤细胞的黏附。疏水表面对细胞外基质蛋白的吸附能力较弱,肿瘤细胞通过整合素受体依赖的黏附被显著抑制^[46]。整合素-配体结合的缺失阻碍下游信号通路(如 FAK 通路),抑制细胞骨架重组和粘着斑形成^[47]。细胞的早期黏附对后续功能发挥至关重要。研究表明,贴壁生长的细胞只有在完全黏附和充分伸展的状态下才能有效执行其生理功能^[48]。这种时序性表面功能设计完美契合临床需求,在植入初期优先抑制肿瘤复发,待肿瘤细胞得到有效控制后,再逐步发挥促成骨功能,启动骨修复过程。

植入体的长期稳定性依赖其耐腐蚀性及力学性能。金属植入物在人体环境中易发生腐蚀,导致材料脱落。一旦发生腐蚀,金属离子就会从表面释放,引发多种并发症^[49]。本研究中采用的双层水凝胶及 HA 涂层能够形成致密的物理屏障,有效隔离腐蚀介质与基体材料的接触,可以有效提高钝化层的电阻,降低电解液中的腐蚀电流密度;同时,它们还能够吸附环境中的腐蚀性离子,从而减缓腐蚀过程。外层水凝胶表现出良好的韧性,其断裂韧性可达 1.52 MJ/m^3 ,这可以避免植入初期在植入部位周围形成碎片,其原因可能为明胶-海藻酸钠复合水凝胶的双网络结构的协同增强机制,裂纹扩展需同时破坏海藻酸钠的刚性离子交联网络和明胶的柔性物理交联网络,显著提高断裂能^[50]。经改性后植入体的弹性模量达到 3.283 GPa ,能够有效匹配人体骨,有效避免出现应力屏蔽现象导致的骨质疏松。此外,双层水凝胶的溶胀、降解及药物释放特性是植入体按时间序列发挥功能的关键。外层水凝胶海藻酸钠分子链上带负电荷的羧基产生静电排斥作用,使分子链伸展形成更开放的网络结构,同时羧基与水分子形成水化层,促进材料溶胀^[51]。高溶胀性材料在水中溶胀后形成的多孔结构为药物负载和释放提供了理想条件。DOX 的释放遵循 Fick 扩散原理,即由浓度梯度驱动的扩散过程^[52]。在局部药物递送系统中,初始的爆发式释放可有效杀伤残留肿瘤

细胞,随后水凝胶系统实现药物的缓释。随着水凝胶的持续降解,药物得以在 10 d 以上的时间内持续释放,从而实现对肿瘤细胞的有效杀伤。随着外层水凝胶逐步降解失效,其功能过渡到内层水凝胶的促成骨作用。进一步的体外细胞和体内动物实验验证了植入体的抗肿瘤能力。负载外层水凝胶的 AG 组对 HOS 表现出显著的杀伤作用,同时对 BMSCs 仅表现出轻微的细胞毒性。肿瘤细胞通常处于快速分裂状态,所以 DOX 对其抑制性较强。相反,间充质干细胞的增殖速率通常较慢,并且其增殖周期可能不像肿瘤细胞那样频繁,因此 DOX 的作用可能不如对肿瘤细胞那么强烈。另一方面,BMSCs 具有较强的 DNA 修复能力和抗药性机制,从而阿霉素对其的杀伤作用减弱。荷瘤动物实验证实了这一观点,在具有高生物安全性的前提下,具有良好的抗肿瘤效果。当外层水凝胶降解失效后,内层水凝胶的羟基磷灰石发挥更长效的抗肿瘤效果,其通过下调 FAK/PI3K/AKT 信号通路,有效抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移,并诱导其凋亡^[53],为骨肉瘤治疗提供了双重保障。

综上所述,双层载药多孔钛合金植入体在增强骨整合和抑制肿瘤复发方面具有潜在作用。尽管本研究证实了植入体的双功能协同效应,其分子作用机制仍需深入探究,将是后续研究的重点方向。这些结果有望促进 3D 打印 Ti-6Al-4V 植入物在骨肉瘤切除术后的临床应用。

参考文献:

- [1] Li SZ, Zhang H, Liu JX, et al. Targeted therapy for osteosarcoma: a review [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(9): 6785-6797.
- [2] Jing ZH, Ni RH, Wang JD, et al. Practical strategy to construct anti-osteosarcoma bone substitutes by loading cisplatin into 3D-printed titanium alloy implants using a thermosensitive hydrogel [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(12): 4542-4557.
- [3] Wang ZL, Geest ICV, Leeuwenburgh SC, et al. Bifunctional bone substitute materials for bone defect treatment after bone tumor resection [J]. *Mater Today Bio*, 2023, 23: 100889. doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100889
- [4] Wu ZZ, Tian QQ, Wang JN, et al. A bone implant with NIR-responsiveness for eliminating osteosarcoma cells and promoting osteogenic differentiation of BMSCs [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 211: 112296. doi:

- 10.1016/j.colsurfb.2021.112296
- [5] Kelly CN, Wang T, Crowley J, et al. High-strength, porous additively manufactured implants with optimized mechanical osseointegration [J]. *Biomaterials*, 2021, 279: 121206. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121206
- [6] Wu KM, Liu MY, Li N, et al. Chitosan-miRNA functionalized microporous titanium oxide surfaces via a layer-by-layer approach with a sustained release profile for enhanced osteogenic activity [J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18 (1): 127. doi: 10.1186/s12951-020-00674-7
- [7] Zheng YH, Han Q, Wang JC, et al. Promotion of osseointegration between implant and bone interface by titanium alloy porous scaffolds prepared by 3D printing [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(9): 5181-5190.
- [8] Bordea IR, Candrea S, Alexescu GT, et al. Nano-hydroxyapatite use in dentistry: a systematic review [J]. *Drug Metab Rev*, 2020, 52(2): 319-332.
- [9] Duan HY, Cao CL, Wang XL, et al. Magnesium-alloy rods reinforced bioglass bone cement composite scaffolds with cortical bone-matching mechanical properties and excellent osteoconductivity for load-bearing bone *in vivo* regeneration [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18193. doi: 10.1038/s41598-020-75328-7
- [10] Huang Y, Zhang YX, Li MY, et al. Physicochemical, osteogenic and antimicrobial properties of graphene oxide reinforced silver/strontium-doped hydroxyapatite on titanium for potential orthopedic applications [J]. *Surf Coat Technol*, 2022, 446: 128788. doi: 10.1016/j.surfcoat.2022.128788
- [11] Sarraf M, Rezvani Ghomi E, Alipour S, et al. A state-of-the-art review of the fabrication and characteristics of titanium and its alloys for biomedical applications [J]. *Biodes Manuf*, 2022, 5(2): 371-395.
- [12] Smrke A, Anderson PM, Gulia A, et al. Future directions in the treatment of osteosarcoma [J]. *Cells*, 2021, 10(1): 172. doi: 10.3390/cells10010172
- [13] Lee J, Choi MK, Song IS. Recent advances in doxorubicin formulation to enhance pharmacokinetics and tumor targeting [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(6): 802. doi: 10.3390/ph16060802
- [14] Abdel-Megeed RM, Ghanem HZ, Kadry MO. Alleviation of doxorubicin adverse effects via loading into various drug-delivery systems: a comparative study [J]. *Ther Deliv*, 2024, 15(6): 413-426.
- [15] Kong XL, Chen L, Li B, et al. Applications of oxidized alginate in regenerative medicine [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(12): 2785-2801.
- [16] Zanolli A, Baldino L, Cardea S, et al. Production of agarose-hydroxyapatite composites via supercritical gel drying, for bone tissue engineering [J]. *Molecules*, 2024, 29(11): 2498. doi: 10.3390/molecules29112498
- [17] Stojkowska J, Zvicer J, Andrejevic M, et al. Novel composite scaffolds based on alginate and Mg-doped calcium phosphate fillers: enhanced hydroxyapatite formation under biomimetic conditions [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2021, 109(12): 2079-2090.
- [18] Reakasame S, Dranseikiene D, Schrüfer S, et al. Development of alginate dialdehyde-gelatin based bioink with methylcellulose for improving printability [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 128: 112336. doi: 10.1016/j.msec.2021.112336
- [19] Ghorbani F, Kim M, Monavari M, et al. Mussel-inspired polydopamine decorated alginate dialdehyde-gelatin 3D printed scaffolds for bone tissue engineering application [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 940070. doi: 10.3389/fbioe.2022.940070
- [20] Li CR, Zhang W, Nie YY, et al. Time-sequential and multi-functional 3D printed MgO₂/PLGA scaffold developed as a novel biodegradable and bioactive bone substitute for challenging postsurgical osteosarcoma treatment [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(34): e2308875. doi: 10.1002/adma.202308875
- [21] Zhou W, Liu Y, Nie X, et al. Peptide-based inflammation-responsive implant coating sequentially regulates bone regeneration to enhance interfacial osseointegration [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 3283. doi: 10.1038/s41467-025-58444-8
- [22] Wu MH, Liu HF, Li D, et al. Smart-responsive multi-functional therapeutic system for improved regenerative microenvironment and accelerated bone regeneration *via* mild photothermal therapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(2): e2304641. doi: 10.1002/advs.202304641
- [23] Kondi S, Gowda SR. Principles of bone healing [J]. *Surg Oxf*, 2023, 41(10): 625-631.
- [24] 宁方栋, 付美婷, 张慧莹, 等. 聚合物纳米微球增韧水凝胶的制备与表征 [J]. *高分子通报*, 2023(1): 91-98. NING Fangdong, FU Meiting, ZHANG Huiying, et al. Preparation and characterization of tough hydrogels reinforced by polymeric nanospheres [J]. *Polymer Bulletin*, 2023(1): 91-98.
- [25] Jing ZH, Yuan WQ, Wang JD, et al. Simvastatin/hydrogel-loaded 3D-printed titanium alloy scaffolds suppress osteosarcoma via TF/NOX2-associated ferroptosis while repairing bone defects [J]. *Bioact Mater*, 2023, 33: 223-241. doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.11.001
- [26] Chu FC, Wang ZX, Zhang DZ, et al. Research on the osteogenic properties of 3D-printed porous titanium alloy scaffolds loaded with Gelma/PAAM-ZOL composite hydrogels [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 276(2): 134050. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.134050

- [27] Cai BY, Huang LZ, Zhou XK, et al. Black phosphorus-incorporated novel Ti-12Mo-10Zr implant for multimodal treatment of osteosarcoma [J]. *Biometals*, 2024, 37(1): 131-142.
- [28] Safari B, Aghazadeh M, Roshangar L, et al. A bioactive porous scaffold containing collagen/phosphorous-modified polycaprolactone for osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Eur Polym J*, 2022, 171: 111220. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111220
- [29] Li NB, Sun SJ, Bai HY, et al. Micro/nanoscale multi-structures of oxide layers on Ti6Al4V achieved by acid etching and induction heating for high osteogenic activity *in vitro* [J]. *Surf Coat Technol*, 2020, 393: 125816. doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.125816
- [30] Liu JQ, Xiao Q, Xiao JN, et al. Wnt/ β -catenin signaling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3. doi: 10.1038/s41392-021-00762-6
- [31] Chastney MR, Kaivola J, Leppänen VM, et al. The role and regulation of integrins in cell migration and invasion [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2025, 26(2): 147-167.
- [32] Pang XC, He X, Qiu ZW, et al. Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 1. doi: 10.1038/s41392-022-01259-6
- [33] Nour S, Shabani S, Swiderski K, et al. Engineering nanoclusters of cell adhesive ligands on biomaterial surfaces: superior cell proliferation and myotube formation for skeletal muscle tissue regeneration [J]. *Adv Healthc Mater*, 2025, 14(2): e2402991. doi: 10.1002/adhm.202402991
- [34] Ji ZB, Wan Y, Zhao ZH, et al. Polydopamine and magnesium ions loaded 3D-printed Ti-6Al-4V implants coating with enhanced osteogenesis and antibacterial abilities [J]. *Adv Mater Technol*, 2022, 7(12): 2200598. doi: 10.1002/admt.202200598
- [35] 纪振冰, 万熠, 赵梓贺, 等. 水热温度和时间对 3D 打印 Ti-6Al-4V 植入体表面理化性能的影响 [J]. *表面技术*, 2022, 51(9): 288-299.
- Ji Zhenbing, WAN Yi, ZHAO Zihe, et al. Effects of hydrothermal temperature and time on surface physical and chemical properties of 3D printed Ti-6Al-4V implants [J]. *Surface Technology*, 2022, 51(9): 288-299.
- [36] Sirdeshmukh N, Dongre G. Achieving controlled topography and wettability through laser surface texturing of Ti6Al4V for bioengineering applications [J]. *Results Eng*, 2023, 17: 100898. doi: 10.1016/j.rineng.2023.100898
- [37] Mu at V, Anghel EM, Zaharia A, et al. A chitosan-agarose polysaccharide-based hydrogel for biomimetic remineralization of dental enamel [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1137. doi: 10.3390/biom11081137
- [38] Hoveidaei AH, Sadat-Shojai M, Mosalamiaghili S, et al. Nano-hydroxyapatite structures for bone regenerative medicine: cell-material interaction [J]. *Bone*, 2024, 179: 116956. doi: 10.1016/j.bone.2023.116956
- [39] Zhu YS, Gu Y, Jiang C, et al. Osteonectin regulates the extracellular matrix mineralization of osteoblasts through P38 signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(3): 2220-2231.
- [40] Aglan HA, Ahmed HH, Mahmoud NS, et al. Nanotechnological applications hold a pivotal position in boosting stem cells osteogenic activity: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 190(2): 551-573.
- [41] Park SC, Yang WS, Ahn JY, et al. Improved osteogenesis of human adipose-derived stromal cells on hydroxyapatite-mineralized graphene film [J]. *2D Mater*, 2021, 8(3): 035012. doi: 10.1088/2053-1583/abe924
- [42] Khotib J, Gani MA, Budiati AS, et al. Signaling pathway and transcriptional regulation in osteoblasts during bone healing: direct involvement of hydroxyapatite as a biomaterial [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(7): 615. doi: 10.3390/ph14070615
- [43] Bao YH, Guo ZF, Li JT, et al. Combination antitumor therapy based on codelivery nanosystems of doxorubicin [J]. *Prog Chem*, 2023, 35(8): 1123-1135.
- [44] Bardajee GR, Jafari R. Synthesis of interpenetrating networks nanogels based on sodium alginate and 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate and application as drug release of the anticancer doxorubicin (DOX) [J]. *J Polym Res*, 2023, 30(10): 395. doi: 10.1007/s10965-023-03769-5
- [45] Tzankova V, Tosheva A, Stefanova D, et al. Double encapsulation of doxorubicin and quercetin in nanoparticles enhances cytotoxicity in lymphoma cells and reduces doxorubicin cardiotoxicity [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2024, 102: 106421. doi: 10.1016/j.jddst.2024.106421
- [46] Yayan J, Franke KJ, Berger M, et al. Adhesion, metastasis, and inhibition of cancer cells: a comprehensive review [J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 165. doi: 10.1007/s11033-023-08920-5
- [47] Pang XC, He X, Qiu ZW, et al. Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 1. doi: 10.1038/s41392-022-01259-6
- [48] 张锋, 戴杰, 任灵飞, 等. 纯钛钛片表面不同生物大分子涂层的比较研究 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2015, 53(8): 38-43.
- ZHANG Feng, DAI Jie, REN Lingfei, et al. Compar-

tive study of different biomolecule coatings on the surface of pure titanium disc[J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2015, 53(8): 38-43.

- [49] Niu JZ, Guo YH, Li K, et al. Improved mechanical, bio-corrosion properties and *in vitro* cell responses of Ti-Fe alloys as candidate dental implants[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 122: 111917. doi: 10.1016/j.msec.2021.111917
- [50] Hafezi M, Nouri Khorasani S, Khalili S, et al. Shear thinning and self-healing behavior of an IPN nanocomposite based on gelatin methacryloyl/alginate/nano-clay for cartilage tissue engineering application [J]. Eur Polym J, 2025, 226: 113761. doi: 10.1016/j.eur-

polymj.2025.113761

- [51] Wang H, Yang L, Yang YN. A review of sodium alginate-based hydrogels: structure, mechanisms, applications, and perspectives[J]. Int J Biol Macromol, 2025, 292: 139151. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.139151
- [52] Peers S, Montebault A, Ladavière C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery[J]. J Control Release, 2020, 326: 150-163. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.06.012
- [53] Wang RX, Liu WF, Wang Q, et al. Anti-osteosarcoma effect of hydroxyapatite nanoparticles both *in vitro* and *in vivo* by downregulating the FAK/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Biomater Sci, 2020, 8(16): 4426-4437.

(编辑:李伟)

(上接第 43 页)

- [37] Cho JS, Cho YS, Moon SB, et al. Scoliosis screening through a machine learning based gait analysis test[J]. Int J Precis Eng Manuf, 2018, 19(12): 1861-1872.
- [38] Zeng W, Ismail SA, Pappas E. Detecting the presence of anterior cruciate ligament injury based on gait dynamics disparity and neural networks [J]. Artif Intell Rev, 2020, 53(5): 3153-3176.
- [39] Ricciardi C, Ponsiglione AM, Scala A, et al. Machine learning and regression analysis to model the length of hospital stay in patients with femur fracture[J]. Bioengineering, 2022, 9(4): 172. doi: 10.3390/bioengineering9040172

- [40] Kothurkar R, Gad M, Padate A, et al. Prediction of joint moments from kinematics using machine learning in children with congenital talipes equino Varus and typically developing peers[J]. J Orthop, 2024, 57: 83-89. doi: 10.1016/j.jor.2024.06.016
- [41] Lai DTH, Levinger P, Begg RK, et al. Automatic recognition of gait patterns exhibiting patellofemoral pain syndrome using a support vector machine approach[J]. IEEE Trans Inf Technol Biomed, 2009, 13(5): 810-817.

(编辑:房红娟)