

羟基磷灰石球形颗粒表面微形貌构建及其对 干细胞生物学行为的调控

智 伟¹, 匙 峰¹, 李金雨¹, 周 腾¹, 屈树新¹, 汪建新¹, 张 聪², 翁 杰¹

(1. 西南交通大学 材料科学与工程学院, 材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031; 2. 中国人民解放军第 309 医院, 北京 100091)

摘 要: 通过调节溶胶-凝胶体系中羟基磷灰石(HA)粉末和甲壳素(Chitin)的质量比, 制备具有不同表面微形貌的 HA 球形颗粒。扫描电子显微镜(SEM)表征结果显示: 随着 HA/Chitin 质量比从 4/1 增加到 35/1, 球形颗粒的表面微形貌发生了明显变化, 由粗糙渐趋平滑, 微米级皱褶逐渐减少至消失, 微孔隙率从(35%±0.8%)减少到(10.4%±0.7%)。体外细胞培养的结果表明具有微米级皱褶, 微孔隙率较高的粗糙表面具有引导干细胞铺展和增殖的作用, 微孔隙率低的平滑表面则具有引导干细胞轴向延伸及骨向分化的趋势。同时, HA 球形颗粒表面微形貌对干细胞表面特征性抗原标志物的表达具有调控作用。

关 键 词: 羟基磷灰石; 表面微形貌; 干细胞; 生物学行为

中图分类号: R318; TQ174 文献标识码: A

Surface Microstructure on Hydroxyapatite Spherules and Its Regulation on Stem Cells

ZHI Wei¹, SHI Feng¹, LI Jing-Yu¹, ZHOU Teng¹, QU Shu-Xin¹, WANG Jian-Xin¹, ZHANG Cong², WENG Jie¹

(1. Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials (Ministry of Education), School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. The 309st Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: HA spheres with different surface microstructures were prepared by a Sol-Gel route with various hydroxyapatite (HA)/chitin ratios. The surface morphologies, phase compositions, and biomimetic mineralization ability of samples were respectively analyzed with scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), and biomimetic mineralization test. Furthermore, the influences of the surface microstructure on biological behavior of bone marrow-derived mesenchymal stem cells were examined by Alamar blue, SEM, alkaline phosphatase assay and flow cytometry. When the mass ratio of HA/Chitin was increased from 4/1 to 35/1, the surface microstructure of HA spheres changed substantially, as showed by a reduction of micro-porosity from (35%±0.8%) to (10.4%±0.7%), decrease of surface roughness, and gradual disappearance of micro-creases. The result of biomimetic mineralization test showed that the surface microstructure had important influence to the ability of biomimetic mineralization for HA spheres. *In vitro* culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrated

收稿日期: 2016-04-18; 收到修改稿日期: 2016-07-07

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1102000, 2016YFB0700800); 国家自然科学基金(31400809); 中央高校基本科研业务费专项资金(2682015CX006)

National Key Research and Development Program of China (2016YFC110200, 2016YFB0700800); National Natural Science Foundation of China (31400809); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2682015CX006)

作者简介: 智 伟(1977-), 女, 工程师. E-mail: zhiwei@home.swjtu.edu.cn

通讯作者: 翁 杰, 教授. E-mail: jweng@swjtu.edu.cn

that the rougher sphere surface, with abundant micro-creases and micro-pores, supported cell spreading and proliferation. In comparison, the smoother sphere surface with fewer micro-pores effectively induced cell elongation and up-regulated ALP expression, which suggested stem cells osteogenic differentiation. Meanwhile, the surface micro-structure of spherules also modulated the expression of characteristic antigen makers on the surface of stem cells.

Key words: hydroxyapatite; surface microstructure; stem cell; biological behavior

羟基磷灰石(HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)作为自然骨的主要无机成分,具有优良的生物相容性和骨传导性^[1-2]。研究结果显示具有一定孔隙结构的 HA 支架还具有骨诱导性^[3-5]。多孔 HA 支架的孔隙结构、化学成分和表面形貌是其具有骨诱导活性的关键因素^[6-12]。其中,支架表面微形貌通过空间尺度效应对细胞的粘附、铺展、迁徙、增殖、分化及凋亡等功能产生直接影响^[13-15]。

目前对支架表面微形貌的研究主要集中在支架表面微观几何结构,包括晶粒尺寸、微纳尺度孔隙、表面粗糙度及特殊的表面区域等。通过对材料表面微米、纳米及微纳米多级结构的研究,发现增大比表面积、改进表面形貌或调节表面电性等手段,可以影响材料的溶解与再沉积、材料与蛋白质的相互作用,引导细胞粘附、增殖和分化,调控植入体组织周围免疫反应,从而在骨诱导中起着重要作用^[16-18]。但对磷酸钙生物陶瓷表面微形貌的研究主要集中在通过微加工技术在二维陶瓷平面上制备微纳图案(如沟槽、台阶、凹坑、凸柱等)来观察细胞效应,很少针对三维支架本身开展研究,其主要原因是很难用常规的微加工技术在硬而脆的陶瓷支架表面制作微结构。此外,目前主要通过改变原料晶粒尺寸、烧结温度来调控生物陶瓷支架材料的表面微形貌。随着烧结温度的降低,生物陶瓷的微孔数量(孔径小于 10 μm)增加,当烧结温度分别为 1150℃ 和 1250℃ 时,HA 的微形貌由微孔数量和晶粒尺寸共同决定。但上述方法对同一制备体系中的生物陶瓷支架表面微形貌的调控有限。

利用 HA/Chitin 溶胶-凝胶体系制备 HA 球形颗粒可使 HA 粉体均匀分布于溶胶体系,制备的球形颗粒一般具有微米或亚微米结构^[19]。通过改变体系中 HA/Chitin 质量比有可能调控所制备 HA 球形颗粒的表面微形貌,如粗糙度和微孔隙率等。因此,本研究通过制备具有不同表面微形貌的 HA 球形颗粒,采用前期工作中使用的颗粒堆积支架体系^[4, 6, 20-21],考察表面微形貌对 HA 球形颗粒支架磷灰石矿化层形成性能及对骨髓来源间充质干细胞增殖、骨向分化及表面特征性标志物表达的影响,探索 HA 表面微形貌的生物调控机理。

1 实验方法

1.1 原料及试剂

液体石蜡、甲壳素、N,N-二甲基乙酰胺(DMAC)、氯化锂、4-硝基苯磷酸二钠盐(4-NPP)均为分析纯,由成都科龙化工试剂厂出品。直径 20 μm 的球状 HA 粉体由四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心制备。 α -MEM、胰蛋白酶为美国 Gibco 公司生产,Alamar Blue 为美国 Sigma 公司生产;小牛血清由杭州四季青公司生产;碱性磷酸酶试剂盒由南京建成生物技术有限公司生产。

1.2 HA 球形颗粒表面微形貌的构建

将 5 g 无水氯化锂加入 100 mL DMAC 中,加入 0.7 g 甲壳素,溶解后形成溶胶。按照 HA/Chitin 质量比为 4/1、10/1、20/1、30/1 和 35/1 分别向溶胶体系中加入 HA 粉末,搅拌均匀,密封静置 24 h 后,在机械搅拌下放入装有液体石蜡的烧杯中(转速均为 400 r/min),2 h 后加入去离子水得到凝胶化的 HA 球形颗粒。用去离子水将五组样品充分洗涤后干燥,1200℃ 常压烧结(升温速率为 2.5℃/min)即得到具有不同表面微形貌的 HA 球形颗粒,分别用 HA₄、HA₁₀、HA₂₀、HA₃₀ 和 HA₃₅ 表示。

1.3 HA 球形颗粒表面微形貌表征

采用密度法测定 HA 球形颗粒的微孔隙率,Brunauer-Emmett-Teller (BET)法计算球形颗粒的比表面积。利用扫描电子显微镜(FEI Quanta 200)观察分析球形颗粒的表面微形貌,用 X 射线衍射仪(XRD, XD1000, 中国)分析表面微形貌的相组成。

密度法测定孔隙率的公式如下:

$$P = 1 - \frac{V_0}{V_1} = 1 - \frac{m/\rho_0}{\frac{4}{3}\pi R^3} = 1 - \frac{6m}{\pi\rho_0 D^3} \quad (1)$$

ρ_0 为 HA 理论密度(3.16 g/cm³); m 为单颗 HA 球形颗粒的质量; V_0 为致密的 HA 球形颗粒的体积; V_1 为实测 HA 球形颗粒的体积。

1.4 HA 球形颗粒体外生物学评价

取直径约 0.5 mm 的三组 HA 球形颗粒(HA₄、HA₂₀、HA₃₅)各 3 g,超声清洗后堆积于多孔不锈钢

管中,浸入快速矿化液(ACS)置于 37℃ 进行仿生矿化实验,每 24 h 更换一次 ACS,共矿化 3 d。

将培养到第五代的 SD 大鼠乳鼠骨髓来源间充质干细胞(BM-MSCs)用 0.25%胰蛋白酶-0.1%EDTA 消化液消化后,加入含 10%胎牛血清的 L-DMEM 培养基制成细胞悬液,调节细胞密度为 1×10^5 个/mL。将具有不同表面微形貌的三组 HA 球形颗粒(HA₄、HA₂₀、HA₃₅)堆积于 24 孔细胞培养板中,每组设 5 个平行样。每个样品接种 1 mL 细胞悬液,置于 37℃ 的 CO₂ 培养箱中培养。隔日更换一次培养基。

在培养的第 1、3、5、7 d 进行细胞增殖检测,并绘制增殖曲线,具体步骤如下:按 Alamar Blue: 无酚红培养基:胎牛血清=8/1/1 的体积比配制 Alamar Blue 工作液,弃去旧培养基后用磷酸缓冲液(PBS)冲洗 2 次,每孔加入 1 mL Alamar Blue 工作液,在 CO₂ 培养箱中培养 3 h,每孔取 200 μ L 置于 96 孔培养板中,酶标仪在 570~600 nm 波长处测吸光度值。

在培养 3 d 后各组取样品用 PBS 冲洗 3 次,梯度脱水脱醇处理后临界点干燥,喷金后用 SEM 观察 HA 球形颗粒表面上细胞的状态。

收集 BM-MSCs 与各组 HA 球形颗粒共培养 7 d 后的样品,加入 0.25%胰蛋白酶-0.1%EDTA 消化液消化,离心处理,收集样品上的细胞,加入 BM-MSCs 表面特异性抗原标志物抗体(CD90、CD44、CD29、CD45、CD11b)室温避光孵育 30 min, PBS 清洗后流式细胞仪(FACS Calibur, 美国 BD 公司)检测各组样品细胞上干细胞表面特异性抗原表达情况。

培养 7 d 后进行碱性磷酸酶活性检测:取各组样品用 PBS 冲洗 2 次,每组样品加入 1 mL 0.1%的 Triton X-100,在 -20℃ 反复冻融 3 次以便完全裂解细胞,将细胞裂解液按 100 μ L/孔转入 96 孔酶标板

中,每孔加入 100 μ L4-NPP,混匀,孵育 20 min 后,在酶标仪 405~510 nm 波长处测吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 成分分析

图 1 为 1200℃ 烧结后各组 HA 球形颗粒的 XRD 图谱,由图可见,在 $2\theta=26^\circ$ 、 32° 、 40° 、 47° 、 50° 的位置均出现了明显的 HA 特征峰,与 HA 的标准图谱完全吻合(JCPDS 09-0432),且未出现其他杂相,说明在制备和烧结过程中没有引入杂质,可见利用 HA:Chitin 质量比调控 HA 球形颗粒的表面微形貌不会对 HA 球形颗粒本身的相成分产生影响。

2.2 HA 球形颗粒表面微形貌观察

图 2 为不同 HA/Chitin 比例制备 HA 球形颗粒表面 SEM 形貌,在 HA/Chitin 比例小于 30/1 时,球形颗粒表面存在微孔,且尺寸分布在 10 μ m 以下,部分微孔尺寸小于 1 μ m,尤其在 HA/Chitin 低比例(4/1

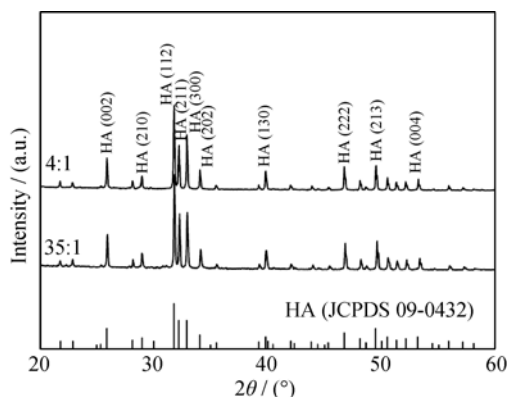


图 1 HA₄ 和 HA₃₅ 球形颗粒烧结后的 XRD 图谱

Fig. 1 XRD patterns of HA₄ spherules and HA₃₅ spherules

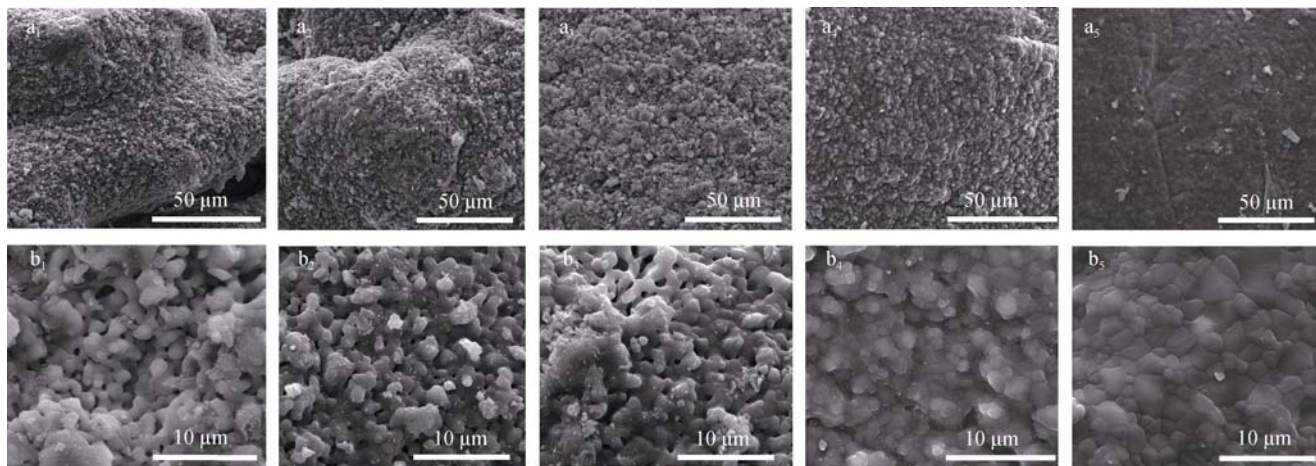


图 2 不同 HA/Chitin 比例制备 HA 球形颗粒表面 SEM 照片

Fig. 2 SEM images of surface HA spheres with different initial ratios of Chitin/HA

a₁, b₁: HA₄; a₂, b₂: HA₁₀; a₃, b₃: HA₂₀; a₄, b₄: HA₃₀; a₅, b₅: HA₃₅

和 10/1)时,球形颗粒表面出现了微米级的皱褶,这增大了球形颗粒表面的比表面积和粗糙度。随着 HA/Chitin 比例的提高,球形颗粒表面的微米级褶皱消失,微孔数量逐渐减少。当 HA/Chitin 比例 $\geq 30/1$ 时,颗粒表面变得光滑且致密,在 HA₃₅ 的表面仅有少数微孔。这说明通过采用改变 HA/Chitin 质量比来调控 HA 球形颗粒表面微形貌的方法是有效的。

2.3 HA 球形颗粒微孔隙率和比表面积

微孔隙率能增大磷酸钙生物陶瓷的比表面积,有利于蛋白吸附、钙离子的释放和再沉积,对磷酸钙生物陶瓷的骨诱导性能有重要的作用^[22-24]。研究报道具有较高微孔隙率(17%)的 BCP 陶瓷在植入动物肌内后能诱导骨形成,而较低微孔隙率(4%)的 BCP 陶瓷则未见骨形成^[11]。

表 1 给出了不同 HA/Chitin 质量比的 HA 球形颗粒的微孔隙率和比表面积。随着 HA 粉体比例的提高,颗粒微孔隙率逐渐下降,HA/Chitin 比例为 4/1 时,球形颗粒微孔隙率高达(35% \pm 0.8%),比表面积为 152.49 m²/g;而在 HA/Chitin 比例为 35/1 时,球形颗粒微孔隙率只有(10.4% \pm 0.7%),比表面积为 17.25 m²/g。这是因为实验中甲壳素作为微孔造孔剂的唯一原料,在相同的粉体与烧结条件下,其含量越高,HA 球形颗粒的微孔数量越多,微孔隙率和比表面积越高。而体系中 HA 比例会影响到球形颗粒的收缩率,因此当 HA 比例低到一定程度时,球形颗粒表面因为

收缩较大会出现微米级皱褶,将进一步增大球粒的比表面积。这与图 2 的 SEM 结果相一致。

2.4 HA 球形颗粒的仿生矿化研究

三组不同表面微形貌的 HA 球形颗粒(HA₄、HA₂₀、HA₃₅)在 37℃,ACS 中矿化 3d 后,表面矿化情况如图 3 所示,在 HA₄ 球形颗粒和 HA₂₀ 球形颗粒表面均可见有大量均匀矿化层覆盖。图 3(b₁, b₂)显示该矿化层都是由大量片状的晶片交叉聚集而成,每一晶片垂直于基底表面垂直生长。且覆盖于 HA₄ 球形颗粒表面的晶片尺寸普遍大于覆盖于 HA₂₀ 球形颗粒表面的晶片尺寸。而在致密光滑的球形颗粒表面(HA₃₅)局部区域也观察到少量絮状矿化物覆盖(图 3b₃, c 所示),说明具有更高微孔隙率和粗糙度的 HA 球形颗粒表面(HA₄、HA₂₀)比光滑致密且微孔隙率低的 HA 球形颗粒表面(HA₃₅)具有更好的形成类骨磷灰石层的能力。这是由于前两者具有更大的比表面积,能提供更多的磷灰石晶体的成核位点,更容易促进钙磷矿化层的成核生长。并且更高的微孔隙率使得更多来自于材料的 Ca²⁺、PO₄³⁻、HPO₄²⁻扩散到周围,从而使得钙磷再沉积更容易发生。实验结果表明表面微形貌对 HA 球形颗粒的仿生矿化能力有重要影响。

2.5 HA 球形颗粒细胞培养

骨髓来源间充质干细胞(BM-MSCs)与三组不同表面微形貌的 HA 球形颗粒堆积共培养 3 d 后的 SEM 照片(图 4)显示, BM-MSCs 在 HA₄ 和 HA₂₀ 球形颗粒表面的增殖、粘附及铺展情况明显优于在 HA₃₅ 球形颗粒表面的情况。图 4(a, d)显示细胞连接成片,呈扁平状铺展于球形颗粒表面,并伸出大量板状伪足,球形颗粒的褶皱区域可见细胞立体爬行生长。图 4(b, e)显示细胞大部分呈扁平状铺展于球形颗粒表面,伪足多为板状,部分为丝状(图 4d)。图 4(c, f)显示细胞散在粘附于球形颗粒表面,呈梭形生长,伸出的伪足多为丝状伪足。上述现象说明细

表 1 不同表面微形貌的 HA 球形颗粒的微孔隙率

Table 1 Microporosity and specific surface area of HA spheres with different ratios of HA/Chitin

HA/Chitin	Micro-porosity/%	BET/(m ² ·g ⁻¹)
4/1	35 \pm 0.8	152.49
10/1	30.1 \pm 0.9	/
20/1	25.7 \pm 0.4	86.39
30/1	19.6 \pm 0.5	/
35/1	10.4 \pm 0.7	17.25

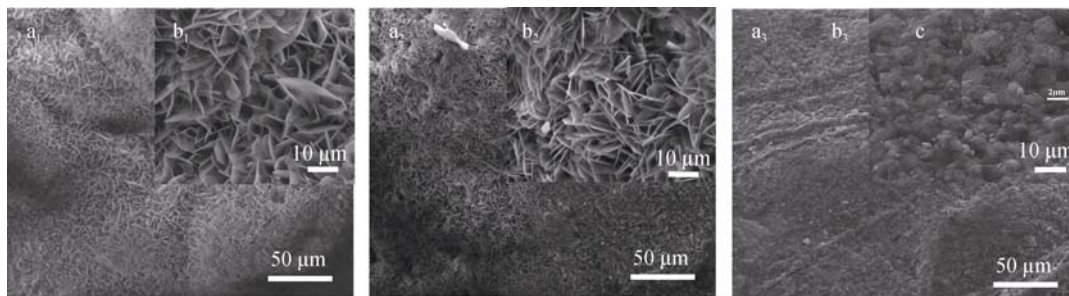


图 3 矿化 3 d 后 HA 球形颗粒表面的 SEM 照片

Fig. 3 SEM images of the surface of HA spheres (a, b) mineralized for 3 d

a₁, b₁: HA₄; a₂, b₂: HA₂₀; a₃, b₃: HA₃₅

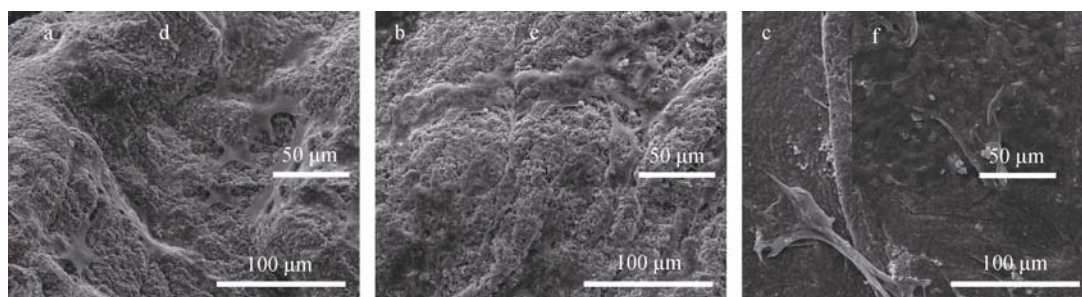


图4 骨髓来源间充质干细胞与不同表面微形貌的HA球形颗粒共培养3d后的粘附和生长情况

Fig. 4 SEM images of BM-MSCs cultured on HA spheres with different surface microstructures after 3 d
a, d: HA₄; b, e: HA₂₀; c, f: HA₃₅

胞在材料表面生长情况与其表面微结构有很大相关性,粗糙表面为细胞粘附提供更多位点,更大的比表面积则为细胞提供了更多的铺展生长空间。而在致密光滑表面,细胞的粘附和铺展都受到限制。

三组HA球形颗粒堆积支架与BM-MSCs共培养1、3、5、7d后,细胞的增殖情况如图5所示。实验所用的Alamar Blue具有氧化还原指示剂的作用,可以进入细胞内部并对细胞无毒副作用,细胞新陈代谢后变成粉红色化合物,该化合物生成量与细胞数量及活性呈正比,通过测定该化合物的吸光度值变化可以得到细胞增殖活性^[25]。该方法对细胞增殖和活性检测等同于传统的MTT检测,但更为简单直观。样品组细胞增殖的变化趋势与空白组一致,说明虽然在材料制备中引入了Li²⁺,但其并未影响HA材料的生物学性能。这是因为HA球粒在烧结前已经经过充分浸洗溶出了绝大部分Li²⁺,余下痕量已不足以对材料的生物学性能产生作用了。图5结果表明各组HA球形颗粒无细胞毒性,具有良好的细胞相容性。同时,从第3d开始,相比HA₃₅

(* represents statistical difference, $P < 0.05$)

组,HA₄组和HA₂₀组细胞增殖活性更高,且HA₄组在各时间点均显著高于其他组,说明各组HA球形颗粒的表面微形貌对于MSCs增殖的影响各不相同,即粗糙多孔的表面微结构通过促进细胞铺展^[26, 27]而更有利于细胞的增殖,该结果与SEM观察情况相一致。

BM-MSCs是一类存在于骨髓中的具有多向分化潜能的干细胞,细胞表面会表达特异性抗原。目前主要通过对其特征性的阳性表面抗原标志物CD29、CD90、CD44和阴性表面抗原标志物CD11b、CD31、CD45的检测来进行鉴定^[28]。流式检测结果显示实验所用的第五代SD大鼠BM-MSCs的CD29阳性细胞比率99.2%,CD90的阳性细胞比率98.9%,CD44的阳性细胞比率93%,CD11b的阳性细胞比率1.9%,CD31的阳性细胞比率4.2%,CD45的阳性细胞比率3.4%,与文献报道SD大鼠BM-MSCs表面特异性抗原标志物表达相符,证明实验所用的MSCs是高纯度的均质干细胞群。表2显示BM-MSCs与不同表面微形貌的HA球形颗粒共培养7d后表面特异性抗原标志物的表达情况。BM-MSCs与3组HA球形颗粒共培养后,其表面特异性抗原标志物的表达均发生了变化,尤其HA₂₀组和HA₃₅组,三个表面阳性特异性抗原标志物较之对照组均有明显下降,说明不同表面微形貌对干细胞的均质性影响不同,也间接说明不同表面微形貌对干细胞分化程度的影响明显不同。BM-MSCs的特异性表面抗原标志物表达在致密平滑、微孔隙率低、比表面积小的表面下降更为显著,这可能与细胞在其表面的粘附及铺展受到限制,细胞轴向伸长与其所处的钙磷环境使细胞更易骨向分化有关。在随后的研究中,将进一步对细胞粘附蛋白、特征性成骨蛋白及基因表达进行检测,以期深入认识HA表面微形貌对干细胞行为和功能的影响和机制。

BM-MSCs分化初期会伴随碱性磷酸酶(ALP)的上升,碱性磷酸酶是骨髓来源间充质干细胞分化的

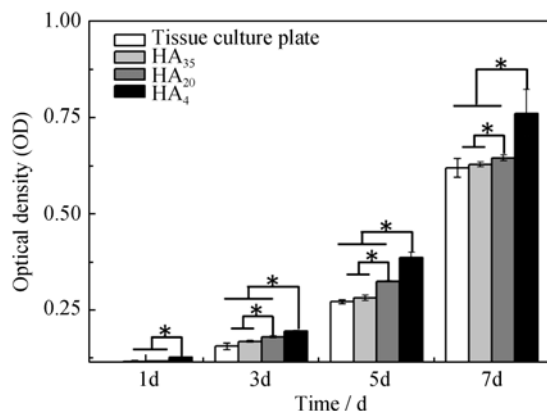


图5 不同表面微形貌对细胞增殖的影响

Fig. 5 Proliferation of BM-MSCs cultured on tissue culture plates and HA spheres with different surface microstructures at 1, 3, 5 and 7 d

表 2 BM-MSCs 与不同表面微形貌的 HA 球形颗粒共培养 7 d 后表面特异性抗原标志物表达

Table 2 Surface characteristic markers expression of BM-MSCs cultured on HA spheres with different surface microstructures after 7 d

	CD29	CD44	CD90
Control	99.2%	93%	98.9%
HA ₄	89.4%	67%	90.9%
HA ₂₀	74.6%	56%	76.0%
HA ₃₅	66.9%	40%	59.7%

重要标志。图 6 显示 BM-MSCs 与不同表面微形貌的 HA 球形颗粒共培养 7 d 后的 ALP 表达情况。HA₃₅ 组和 HA₂₀ 组的 ALP 表达显著高于 HA₄ 组, 这说明 HA₃₅ 组(致密平滑表面, 低微孔隙率)的 BM-MSCs 具有更好的分化趋势, 而 HA₄ 组(粗糙表面, 高微孔隙率)的 BM-MSCs 分化程度低, 主要可能是由于具有粗糙表面和较高微孔隙率的球形颗粒上的细胞具有更高的增殖速率和更长的增殖期, 共培养 7 d 时仍处于细胞增殖高峰期, 从而细胞分化情况相对较低。这与文献报道的细胞增殖、分化的反比关系一致^[29]。

3 结论

本研究尝试利用溶胶-凝胶体系, 通过调节 HA/Chitin 质量比, 成功地在 HA 球形颗粒表面构建了不同的微观形貌。这种方法可以在较大范围内不受制备体系中 HA 比例的调整范围限制, 既可以单独考察磷酸钙生物陶瓷表面微观结构对细胞生物行为的影响, 又为在体外考察三维支架状态下多尺度结构对细胞行为的调控提供了可能。

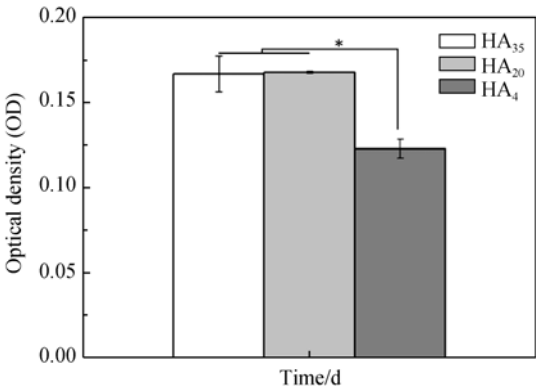


图 6 不同表面微形貌对细胞分化的影响
Fig. 6 Expression of ALP of BM-MSCs cultured on HA spheres with different surface microstructures at 7 d (* represents statistical difference, $P<0.05$)

体外细胞实验结果证实材料表面微形貌对 BM-MSCs 的生物行为有很大影响, 多孔粗糙表面更有利于细胞的增殖。而致密光滑表面则更有利于 BM-MSCs 的骨向分化。并且, 每种表面都具有良好的细胞相容性。

参考文献:

[1] ROY D M, LINNEHAN S K. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*, 1974, **247(438)**: 220–222.

[2] LI Y, TJANDRA W, TAM K C. Synthesis and characterization of nanoporous hydroxyapatite using cation surfactants as templates. *Mater. Res. Bull.*, 2008, **43(8/9)**: 2318–2326.

[3] YANG Z, YUAN H, TONG W, *et al.* Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*, 1996, **17(22)**: 2131–2137.

[4] ZHI W, ZHANG C, DUAN K, *et al.* A novel porous bioceramics scaffold by accumulating hydroxyapatite spherulites for large bone tissue engineering in vivo. II. Construct large volume of bone grafts. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2014, **108(8)**: 2491–2501.

[5] TRIPATHI G, BASU B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International*, 2012, **38(1)**: 341–349.

[6] WANG H, ZHI W, LU X, *et al.* Comparative studies on ectopic bone formation in porous hydroxyapatite scaffolds with complementary pore structures. *Acta Biomaterialia*, 2013, **9(9)**: 8413–8421.

[7] TEIXEIRA S, RODRIGUEZ M A, PENA P, *et al.* Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 2009, **29(5)**: 1510–1514.

[8] BARRADAS A, YUAN H, BLITTERSWIJK C A, *et al.* Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European Cells and Materials*, 2011, **21**: 407–429.

[9] ZHOU H, WU T, DONG X, *et al.* Adsorption mechanism of BMP-7 on hydroxyapatite (001) surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, **361(1)**: 91–96.

[10] WOODARD J R, HILLDORE A J, LAN S K, *et al.* The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*, 2007, **28(1)**: 45–54.

[11] HABIBOVIC P, YUAN H, VAN DER VALK C M, *et al.* 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 2005, **26(17)**: 3565–3575.

[12] YAMASAKI H, SAKAI H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials*, 1992, **13(5)**: 308–312.

[13] ZHANG J, LUO X, BARBIERI D, *et al.* The size of surface mi-

- crostructures as an osteogenic factor in calcium phosphate ceramics. *Acta Biomaterialia*, 2014, **10**(7): 3254–3263.
- [14] PONADER S, VAIRAKTARIS E, HEINL P, *et al.* Effects of topographical surface modifications of electron beam melted Ti-6Al-4V titanium on human fetal osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2008, **84A**(4): 1111–1119.
- [15] NATH S, TRIPATHI R, BASU B. Understanding phase stability, microstructure development and biocompatibility in calcium phosphate-titania composites, synthesized from hydroxyapatite and titanium powder mix. *Mater. Sci. Eng. C*, 2009, **29**(1): 97–107.
- [16] ZHOU H, LEE J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.*, 2011, **7**(7): 2769–2781.
- [17] LI D, LU X, LIN H, *et al.* Chitosan/bovine serum albumin co-micropatterns on functionalized titanium surfaces and their effects on osteoblasts. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2013, **24**(2): 489–502.
- [18] ZHANG J, BARBIERI D, TEN HOOPEN H, *et al.* Microporous calcium phosphate ceramics driving osteogenesis through surface architecture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015, **103**(3): 1188–1199.
- [19] 翁 杰, 彭 谦, 屈树新, 等. 一种制备多孔结构球形颗粒无机材料制品的方法. 中国发明专利, ZL200410081377.7. 2006.
- [20] PENG Q, JIANG F, HUANG P, *et al.* A novel porous bioceramics scaffold by accumulating hydroxyapatite spherulites for large bone tissue engineering *in vivo*. I: preparation and characterization of scaffold. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2010, **93**(3): 920–929.
- [21] GUO LAI-YANG, ZHANG JING-WEI, ZHAO JING, *et al.* Preparation and characterization of porous scaffolds with favourable interpore connecting. *Journal of Inorganic Materials*, 2011, **26**(1): 17–21.
- [22] YUAN H, FERNANDES H, HABIBOVIC P, *et al.* Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2010, **107**(31): 13614–13619.
- [23] GALLI C, PIEMONTESE M, LUMETTI S, *et al.* The importance of WNT pathways for bone metabolism and their regulation by implant topography. *European Cells and Materials*. 2012, **24**: 46–59.
- [24] HABIBOVIC P, SEES T M, VAN DEN DOEL M A, *et al.* Osteoinduction by biomaterials-physicochemical and structural influences. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, **77**(4): 747–762.
- [25] NAKAYAMA G R, CATON M C, NOVA M P, *et al.* Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *J. Immunol. Methods*, 1997, **204**(2): 205–208.
- [26] CHOU L, FIRTH J D, UITTO V J, *et al.* Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *Journal of Cell Science*. 1995, **108**(4): 1563–1573.
- [27] PERIZZOLO D, LACEFIELD W R, BRUNETTE D M. Interaction between topography and coating in the formation of bone nodules in culture for hydroxyapatite-and titanium-coated micromachined surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, **56**(4): 494–503.
- [28] HARTING M T, JIMENEZ F, PATI S, *et al.* Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 2008, **10**(3): 243–253.
- [29] OH S, BRAMMER K S, LI Y S J, *et al.* Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2009, **106**(7): 2130–2135.