

多级微管结构骨支架载体促进成骨成血管作用及机制

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2377>

叶海民¹, 丁凌华², 孔维豪², 黄祖泰³, 熊龙¹

2095-4344.2377

投稿日期: 2020-03-07

送审日期: 2020-03-12

采用日期: 2020-04-15

在线日期: 2020-08-20

中图分类号:

R459.9; R-331; R318.08

文章编号:

2095-4344(2021)04-00621-05

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章描述—
多级微管结构
成骨及成血管

多级微管
结构成骨

多级微管
结构成血
管

小尺度微管(直径 <10 μm)为调控间充质干细胞成骨分化提供更多的场所,提供更多的化学刺激物质。

中尺度微管(直径 20–40 μm)有利于原始巨噬细胞向 M2 型极化,上调抗炎基因表达,抑制宿主对移植物的免疫反应,利于间充质干细胞定植。

大尺度微管(直径 >100 μm)有利于细胞定植、着床、归巢,为形成细胞集落提供了场所。

多级微结构使黏附的巨噬细胞发生相应的形变,促使原始巨噬细胞向 M2 型转化极化,激活间充质干细胞与血管内皮细胞的血管内皮生长因子信号通路,促进血管生成。

多级微管结构募集定植的间充质干细胞与内皮细胞(或内皮祖细胞)相互作用,促进血管形成,并可根据需要向血管内皮细胞分化。

多级微管结构可抑制免疫排斥反应,减少炎症因子生成,提供促进血管生成的微环境。

文题释义:

血管衍生:主要是指从原有的毛细后微血管网上芽生、套叠或被横跨的内皮细胞桥分隔(搭桥),分化出新生的、不具有完整中膜结构的毛细血管网过程,此过程是多环节作用的结果,包括某些特定的酶对原有血管基膜的降解、内皮细胞的增殖、迁移、有序排列以及新生血管的重构和成熟。

巨噬细胞极化:从未定性的原始巨噬细胞向具有特定功能(即成熟巨噬细胞如M1或M2)的巨噬细胞分化过程。

摘要

背景:如何募集内源性种子细胞促进成骨,为细胞提供适宜的骨再生微环境并保证新生骨血管化进程,是骨组织工程研究的难点。

目的:综述多级微管结构骨支架载体促进成骨、成血管的作用。

方法:由第一作者检索中国知网、万方、PubMed、Web of Science数据库1950至2020年有关多级微管结构骨支架载体促进成骨、成血管作用的文献,检索词为“多级微管结构、骨形成、血管生成; Hierarchical microchanneled scaffolds、osteogenesis、angiogenesis”。最终选取符合纳入标准的文献共计52篇。

结果与结论:多级微管结构骨支架载体有良好的促进成骨、成血管作用,在骨组织工程中有较好的应用前景。目前多级微管结构骨支架载体在骨组织工程理论上比较成熟,体外实验证实了多级微管结构能较好地促进间充质干细胞黏附并可分化为成骨细胞系,但是体内实验成骨效果仍然欠佳,在成骨效果上仍然具有进一步提高的可能。将来的研究重点可能应该放在构建多级微管结构复合物,如载趋化因子或细胞因子可进一步提高体内实验的成骨效率。

关键词:骨; 支架; 材料; 多级微管; 成骨分化; 新生血管; 骨组织修复; 巨噬细胞; 免疫

Role and mechanism of hierarchical microchanneled bone scaffolds in promoting osteogenesis and angiogenesis

Ye Haimin¹, Ding Linghua², Kong Weihao², Huang Zutai³, Xiong Long¹

¹Department of Orthopedics, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China; ²People's Hospital Affiliated to Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China; ³Department of Orthopedics, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

Ye Haimin, Master candidate, Physician, Department of Orthopedics, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China

Corresponding author: Xiong Long, Chief physician, Department of Orthopedics, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: How to recruit endogenous seed cells to promote osteogenesis, provide appropriate bone regeneration microenvironment for cells and ensure the vascularization process of new bone are the difficulties of bone tissue engineering research.

OBJECTIVE: To review the osteogenesis and vasculogenesis from the aspects of hierarchical microchanneled bone scaffold.

METHODS: The first author searched relevant literature on the promoting effect of hierarchical microchanneled bone scaffold on osteogenesis and angiogenesis

¹江西省人民医院骨科, 江西省南昌市 330000; ²南昌大学附属人民医院, 江西省南昌市 330000; ³赣南医学院骨科, 江西省赣州市 341000

第一作者: 叶海民, 男, 1994年生, 江西省德兴市人, 汉族, 南昌大学骨外科在读硕士, 医师, 主要从事骨缺损修复方面的研究。

通讯作者: 熊龙, 主任医师, 江西省人民医院骨科, 江西省南昌市 330000

<https://orcid.org/0000-0002-4670-173X> (叶海民)

基金资助: 国家自然科学基金(81560355), 项目负责人: 熊龙

引用本文: 叶海民, 丁凌华, 孔维豪, 黄祖泰, 熊龙. 多级微管结构骨支架载体促进成骨成血管作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(4):621-625.



from China National Knowledge Infrastructure, Wanfang, PubMed and Web of Science databases from 1950 to 2020. The key words were “hierarchical microchanneled scaffolds, osteogenesis, and angiogenesis” in Chinese and English. Finally, a total of 52 articles meeting the inclusion criteria were selected. **RESULTS AND CONCLUSION:** Hierarchical microchanneled bone scaffold has a good role in promoting osteogenesis and vascularization, and has a good application prospect in bone tissue engineering. At present, hierarchical microchanneled bone scaffold is mature in the theory of bone tissue engineering. *In vitro* experiments have confirmed that the hierarchical microchanneled bone scaffold can promote the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts, but the osteogenic effect *in vivo* is still poor, and it is still possible to further improve the osteogenic effect. In the future, we should focus on the construction of hierarchical microchanneled bone scaffold complexes, such as chemokines or cytokines, which can further improve the osteogenic efficiency *in vivo*.

Key words: bone; scaffold; material; hierarchical microchanneled; osteogenic differentiation; neovascularization; bone tissue repair; macrophage; immunity

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81560355 (to XL)

How to cite this article: YE HM, DING LH, KONG WH, HUANG ZT, XIONG L. Role and mechanism of hierarchical microchanneled bone scaffolds in promoting osteogenesis and angiogenesis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(4):621-625.

0 引言 Introduction

肿瘤切除、病理畸形、先天畸形、严重创伤和感染等导致的大段骨缺损修复是骨科临床常见难题，全世界每年有超过 300 万例患者因骨缺损而接受手术，其经济花费高达 15 亿美元^[1]。目前常用外科处理方式可归纳为 2 种：无骨移植或有骨移植。无骨移植是采用 Ilizarov 技术即截骨术后缓慢骨牵引激活机体骨再生潜能达到骨修复目的，但长时间的缓慢骨牵引为患者带来很大不适与不便^[2]；另一种就是通过植入天然骨来加速和简化愈合过程：包括使用自体骨移植、同种或异种骨移植（异种移植），但自体骨来源有限，且会给患者带来新的创伤、供骨区感染、疼痛等并发症；异体骨来源也不充足，且可能导致艾滋病、梅毒等感染性疾病的传播；异种骨可能引起动物源性病毒传播性疾病，因此在很大程度上限制了其在临床的广泛应用^[3-4]。随着骨组织工程领域的兴起和快速发展，为解决骨组织修复过程的诸多难题带来了新的希望，因此组织工程骨的研发越来越得到重视^[5-6]。文章在大量查阅文献的基础上就近年来多级微管结构骨支架载体促进成骨、成血管作用进行综述，通过对这些文献的归纳、整理和总结，为骨组织工程载体构建提供参考，旨在为组织工程学领域从事骨缺损修复和重建研究的科研人员提供一定的参考。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 文章第一作者以“多级微管结构、骨形成、血管生成；Hierarchical microchanneled scaffolds、osteogenesis、angiogenesis”等作为关键词，在 CNKI、万方数据学库、PubMed、Web of Science 数据库进行检索，文献的语种限定为中文和英文，检索时间为 1950 至 2020 年。同时对文章中参考文献进行人工检索。共检索到文献 900 余篇，最终纳入 52 篇符合标准的文献进行综述。

1.2 文献的入选标准

纳入标准：文献所述内容与多级微管结构骨支架载体促进成骨、成血管作用相关，且针对性强、具有代表性的文章。

排除标准：①内容重复的文献；②与主题相关性不高的文献；③证据等级不高、质量较低的文献。

1.3 质量评估与数据的提取 计算机初检得到 900 余篇文献，阅读文题和摘要后进行初步筛选，按排除标准排除文献，共纳入符合标准文献 52 篇进行综述，见图 1。

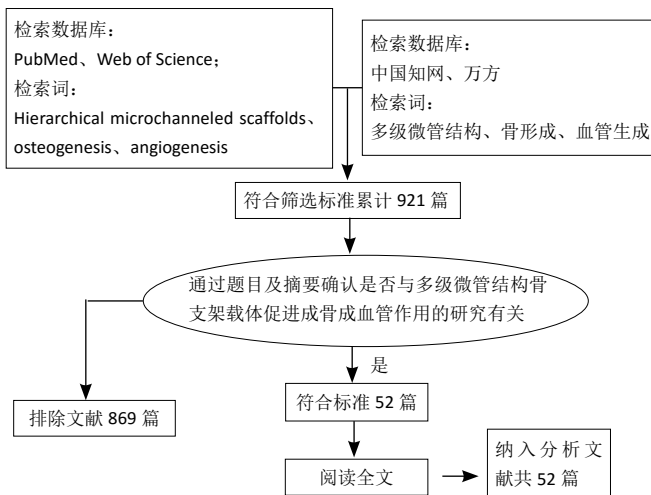


图 1 | 文献检索流程图

2 结果 Results

2.1 多级微管结构骨支架载体促进成骨 骨生长支架是骨组织工程构成的重要因素，它在调控种子细胞募集、血管再生及成骨微环境中发挥重要作用。作者在国家自然科学基金课题(81560355)资助下，将重组人骨形态发生蛋白 2 负载于中空羟基磷灰石微球中用于非负重区域兔挠骨缺损修复，发现其控释性、生物相容性、生物因子活性均良好，可激活多种信号通路参与成骨^[7-9]，并可保持生物活性因子活性，发挥良好成骨分化作用^[8-11]，但中空羟基磷灰石微球难于成形，作为骨生长支架载体有待优化。为此，在国家自然科学基金课题(81560377)资助下，成功制备了可注射中空羟基磷灰石微球/壳聚糖温敏水凝胶，该材料具有海绵状多孔结构(图 2)，它可以很好地同时负载趋化因子 13、重组人骨形态发生蛋白 2 两种生物活性因子并显现出趋化因子 13/重组人骨形态发生蛋白 2 两种生长因子释放时序、生物活性保持、募集效应、成骨分化诱导性能时空藕合^[12]，因此可用作生物因子的潜在载体；然而，中空羟基磷灰石微球/壳聚糖复合材料作为骨支架仍存在诸多缺点，如其孔隙与天然骨仍有较大差距，孔隙大小和孔隙互连仍不可控制等^[8-9, 13]，这些性能将直接影响到内源性间充质干细胞的归巢、定植等。骨修复材料的孔隙不通或孔隙互连率低对早期血管长入有明显阻碍。这些缺点严重阻碍了该材料成骨能力的更大化发挥^[13]。因此，如何构建理想支架促进骨缺损修复是亟待解决的问题，而模仿天然骨结构构建支架已成普遍认识。

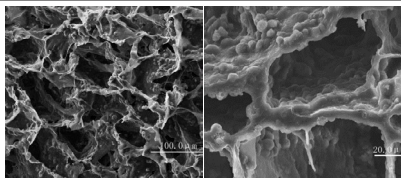


图2 | 中空羟基磷灰石聚糖复合材料的电子显微镜图

鉴于目前3D打印技术空间分辨率有限且价格昂贵,打印后的支架需保持一定的生物相容性,完全模仿出与天然骨内在微细结构完全一样的骨生长支架目前还不能实现,选择某些特定关键结构在现有技术下进行模仿,是骨生长支架的研究焦点。支架内部微结构包括孔径、孔隙互连、孔隙率、孔隙形状、孔隙空间分布、微通道等会影响细胞的黏附、归巢、定植、增殖、分化、表型、基因表达等生物学行为^[13-15]。瞄准天然骨上述相关的关键结构进行仿制是骨支架材料研发的一种方式。

人体组织中存在大量尺度各异的微纳米分级结构,如骨、肌腱等,这些结构在组织的生长和发育过程中发挥着重要的作用^[16]。研究表明,微纳米分级结构材料可以有效调控细胞的黏附、迁移、增殖和分化等行为^[17]。这是因为活体细胞对胞外基质的微观结构特性非常敏感,细胞会随着材料表面微米拓扑结构的变化发生结构重排,此时细胞在基质表面的黏附行为是通过许多受体分子相互聚集的方式实现^[16, 18];细胞在纳米拓扑结构表面的响应行为更为复杂,即细胞可能通过单个受体分子(而非相互聚集的受体分子)驱动的途径来控制细胞对纳米拓扑结构的行为响应,因此在组织工程支架表面仿生构建微纳米分级结构调控细胞行为和功能引起了极大的关注。WEINER等^[19]研究认为骨是由羟基磷灰石/胶原仿生复合纤维组成的具有高度复杂结构的复合材料,他们从7个等级的组织级别来描述骨组织的结构:第一级分别来自骨的独立晶体和部分未矿化的骨胶原纤维,第二级为羟基磷灰石/胶原仿生复合体原纤维,第三级为羟基磷灰石/胶原仿生复合体原纤维阵列,第四级为羟基磷灰石/胶原仿生复合体原纤维阵列堆积类型,第五级为人骨的基本单元,第六级为松质骨与密质骨,最后是宏观尺度的第七级别整块骨组织结构^[20-22]。为模拟天然骨的内部结构,理想支架应具有互相连通的梯度孔隙结构,允许蛋白吸附、细胞扩散和营养物质、氧气、生长因子和废物等的有效运输,促进新生骨组织在支架内部的生长,直至支架完全降解并建立新骨以达到修复骨缺损的终极目标。

有研究表明,从微米到毫米梯度渐变、尺度各异的多级微管结构在骨组织再生中发挥了重要作用^[17, 23-24]。人们已经认识到内源性间充质干细胞的募集对修复过程非常有利,因为它们可以释放细胞因子和生长因子,促进细胞修复组织的功能,重塑受损的微环境^[25-28]。已知干细胞归巢趋化因子如趋化因子12主要由炎症细胞分泌,以启动参与组织修复和重塑的细胞(如间充质干细胞)的迁移^[29]。因此,多级微管结构支架的炎症反应明显移向解决期(即细胞极化向M2期),可能有利于其分泌趋化因子12,通过诱使间充质

干细胞到达损伤部位加速组织愈合。体外实验证明,多级微管结构支架能更好地刺激骨髓间充质干细胞黏附和分化为成骨细胞系^[23]。骨支架材料不同尺度的孔、管径结构有不同功能。小尺度微管(尺寸 $<10\mu\text{m}$)更容易被组织液浸渍,提供细胞更多的吸附位点及更大的表面积和更高的离子溶解度,支持甚至引导间充质干细胞成骨^[30],为调控间充质干细胞成骨分化提供更多场所与更多的化学刺激物质;此外,表面积大可促进巨噬细胞黏附,加速细胞由表面向支架内部的迁移和增殖。中等尺度 $20\text{--}40\mu\text{m}$ 微管有利于原始巨噬细胞向M2型极化,并且能上调抗炎基因表达抑制宿主对移植物的免疫反应,这对于宿主细胞特别是间充质干细胞长入至关重要。大尺度微管(管径 $>100\mu\text{m}$)为细胞黏附、新血管形成和骨内生长提供了空间和通道^[31],有利于细胞定植、着床、归巢,为形成细胞集落提供了场所。因此,无论大尺度还是小尺度微管对于骨支架都很重要^[30],一方面,相互连通的大孔是连接支架表面和中心的通道,使组织和生物液可以进入整个支架有利于细胞的迁移、血管化和骨生长,例如:骨髓间充质干细胞会进入并定居在支架的大孔内^[32-35]。另一方面,合适的微孔在新骨形成方面显示出特定的功能^[36-37]。正如文献记载的那样,只有同时具有大孔和微孔的支架才能诱导骨形成^[38-40]。理想的骨组织工程支架应具有分级孔隙率,以提供不同的生物物理和生物化学效应。多级微管结构理论上可调控间充质干细胞的归巢,为间充质干细胞提供适宜的生长微环境,对于骨生长支架的结构优化起到重要作用,可为良好成骨效应带来重要保障。

2.2 多级微管结构骨支架载体成血管作用 具有良好成骨效应的骨再生材料为实现优异的骨修复疗效,必须有快速血管化功能支撑。血管新生是原有血管芽生新血管的过程,包括内皮细胞增生和迁移、蛋白溶解酶表达调控、细胞外基质破裂重建和内皮管腔形成,涉及一系列信号转导途径的激活。血管生成取决于内皮细胞周围血管生成促进因子和血管生成抑制因子的动态平衡,在血管生成促进因子的作用下产生对内皮细胞的刺激,随后蛋白水解酶对细胞外基质的降解,继而内皮细胞向细胞外基质的浸润、迁移、增殖,形成新的毛细血管,最后内皮外周细胞向局部的聚集使血管网得以稳定。根据血管再生生理机制的不同分为3种模式,即血管衍生、血管发生及动脉生成,它们在缺血后血运重建过程中均起着重要的作用^[41-42]。血管衍生主要是指从原有的毛细后微血管网上芽生、套叠或被横跨的内皮细胞桥分隔(搭桥),分化出新生的、不具有完整中膜结构的毛细血管网过程,此过程是多环节作用的结果,包括某些特定的酶对原有血管基膜的降解、内皮细胞的增殖、迁移、有序排列及新生血管的重构和成熟。血管发生主要由特异的血管内皮祖细胞经过分裂、增殖,产生大量成熟的内皮细胞,再经过有序排列生成新的血管。血管内皮生长因子作为一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,对血管生成的速度、血管的再内皮化有着重要作用。

多级微管结构可以促进血管再生,它可使黏附的巨噬细胞发生相应的形变,导致细胞骨架张力的增加,这种张力的变化会使得原始巨噬细胞向M2型转化极化,M2型巨噬细胞可上调血管内皮生长因子基因的表达,分泌血管内皮生长因子^[43]。有一项里程碑式的研究证明了通道支架中的微孔大小对血管生成的影响^[44-45]。血管生成在修复过程中对细胞生存和组织生长至关重要,它是由极化的巨噬细胞和招募的间充质干细胞分泌的生物活性分子刺激的严格协调生物反应^[46]。极化的巨噬细胞可分别激活间充质干细胞和血管内皮细胞的血管内皮生长因子信号通路,促进血管生成^[43]。募集的间充质干细胞受多级微管结构的刺激可分泌血管生成因子^[23],通过血小板衍生生长因子BB促进内皮祖细胞的迁移,并通过胰岛素样生长因子1和基质衍生因子1(SDF1/CXCL-12)促进血管形成^[47-48]。不同的通道大小在体内诱导不同的血管化行为,大小为250 μm的通道可表达具有代表性的血管生成因子HIF1α、PLGF1和迁移因子CXCR4,有利于小血管的形成;而500 μm的通道可增强血管内皮生长因子的表达,有利于大血管的发育^[49]。多级微管结构可以抑制免疫排斥反应,减少炎症因子生成,进而提供了促进血管生成的微环境。研究表明,募集定植的间充质干细胞能够与内皮细胞(或内皮祖细胞)相互作用促进血管形成,并且可以根据需要向血管内皮细胞分化^[28, 50]。多级微管内30-40 μm微通道最适合新生毛细血管长入^[23],而对于更大的血管或骨骼内其他血液运输结构如滋养孔的构建,目前多级微管结构不能实现,因此在引入多级微管结构基础上继续创建更大尺度的空间管道网络结构,对实现骨修复材料的再血管化很重要^[51]。对于更大尺度的空间管道网络结构特别是400 μm以上的多孔结构的构建,3D打印有其明显优势,采用3D打印技术构建多级微管3D打印多孔结构,实现骨组织再生过程中的血管生成理论上是可行的。多级微管结构不仅可实现间充质干细胞表面黏附,内部归巢、定植促进成骨,还可实现骨支架材料的血管化^[23, 47]。

目前多级微管结构可靠、稳定、重复性好的制备方法为WON等^[23]所提出,该方法选用的材料成分为聚己内酯,聚己内酯因其良好的力学性能、生物相容性较好、熔点较低(55℃)、可低温成型、可在体内缓慢降解、易于3D打印成孔隙互连的多孔结构等优点在医药领域广泛应用^[52],但聚己内酯存在亲水性差、降解过程中pH值变化过大,易影响生物因子的活性等缺点。大量研究表明,通过与无机纳米粒子复合,聚己内酯材料的力学性能、热稳定性、气体阻隔性和生物降解性等均可获得显著改善。相信随着对聚己内酯性能及应用的深入研究,聚己内酯将在医药领域得到更广泛的应用。

3 讨论 Discussion

综上所述,多级微管结构骨支架载体有良好的促进成骨、成血管作用,在骨组织工程中有较好的应用前景。目前多级

微管结构骨支架载体在骨组织工程理论上比较成熟,体外实验证实了多级微管结构能较好地促进间充质干细胞黏附并可分化为成骨细胞系^[23],但是体内实验的成骨效果仍然欠佳,在成骨效果上仍然具有进一步提高的可能。将来的研究重点可能应该放在构建多级微管结构复合物,如载趋化因子或细胞因子可进一步提高体内实验的成骨效率。在体外,人骨髓间充质干细胞的成骨分化主要是通过培养基中添加外源性成骨生长因子来实现的,这种传统的方法价格昂贵,生长因子难以保存(即半衰期短,对pH值和温度敏感),这使得这种方法不足以诱导有效的分化。到目前为止,很少有关于间充质干细胞在体外没有任何外源可溶性生长因子的情况下分化为成骨细胞的。多级微管结构骨支架打开了一类新的微结构支架的大门,这种支架即使在药物或细胞的帮助下也具有特定的治疗作用,用于组织修复和再生。

致谢: 文章凝聚着全体作者的辛勤付出。

作者贡献: 文章构思与设计由第一作者和通讯作者完成;第一作者负责文献检索,完成初稿;通讯作者负责审阅修改定稿;第二、三、四作者参与文献检索及讨论。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81560355)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] LIU M, LV Y. Reconstructing Bone with Natural Bone Graft: A Review of In Vivo Studies in Bone Defect Animal Model. *Nanomaterials* (Basel). 2018;8(12).pii:E999.doi: 10.3390/nano8120999.
- [2] BALDWIN P, LI DJ, AUSTON DA, et al. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma*. 2019;33(4):203-213.
- [3] GRIGORIAN SHAMAGIAN L, MADONNA R, TAYLOR D, et al. Perspectives on Directions and Priorities for Future Preclinical Studies in Regenerative Medicine. *Circ Res*. 2019;124(6):938-951.
- [4] ORYAN A, ALIDADI S, MOSHIRI A, et al. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(2):213-232.
- [5] WANG SJ, JIANG D, ZHANG ZZ, et al. Biomimetic Nanosilica-Collagen Scaffolds for In Situ Bone Regeneration: Toward a Cell-Free, One-Step Surgery. *Adv Mater*. 2019;31(49):e1904341.
- [6] FILARDO G, ROFFI A, FEY T, et al. Vegetable hierarchical structures as template for bone regeneration: New bio-ceramicization process for the development of a bone scaffold applied to an experimental sheep model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(3):600-611.

- [7] LI JT, XIONG SL, DING LH, et al. The mechanism research of non-Smad dependent TAK1 signaling pathway in the treatment of bone defects by recombination BMP-2-loaded hollow hydroxyapatite microspheres/chitosan composite. *J Mater Sci Mater Med*.2019;30(12):130.
- [8] YAO AH, LI XD, XIONG L, et al. Hollow hydroxyapatite microspheres/chitosan composite as a sustained delivery vehicle for rhBMP-2 in the treatment of bone defects. *J Mater Sci Mater Med*.2015;26(1):5336.
- [9] XIONG L, ZENG JH, YAO AH, et al. BMP2-loaded hollow hydroxyapatite microspheres exhibit enhanced osteoinduction and osteogenicity in large bone defects. *Int J Nanomedicine* 2015;10:517-526.
- [10] XIAO W, BAL BS, RAHAMAN MN. Preparation of resorbable carbonate-substituted hollow hydroxyapatite microspheres and their evaluation in osseous defects in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*.2016;60:324-332.
- [11] TANAKA T, TAKAI Y, NAGASE A, et al. Protein adsorption characteristics of nanoparticle-assembled hollow microspheres of hydroxyapatite and their composites with PLLA microporous membranes. *Heliyon*. 2019;5(4):e01490.
- [12] ZENG JH, XIONG SL, DING LH, et al. Study of bone repair mediated by recombination BMP-2/ recombination CXCL12 chemokine Ligand-13-loaded hollow hydroxyapatite microspheres/chitosan composite. *Life Sci*.2019;234:116743.
- [13] ZENG JH, LIU SW, XIONG L, et al. Scaffolds for the repair of bone defects in clinical studies: a systematic review. *J Orthop Surg Res*. 2018; 13(1):33.
- [14] LEE JH, KIM HW. Emerging properties of hydrogels in tissue engineering. *J Tissue Eng*. 2018;9:2041731418768285.
- [15] WANG K, WANG X, HAN C, et al. From Micro to Macro: The Hierarchical Design in a Micropatterned Scaffold for Cell Assembling and Transplantation. *Adv Mater*.2017;29(2).doi: 10.1002/adma.201604600.
- [16] ZHANG C, YUAN HH, LIU HH, et al. Well-aligned chitosan-based ultrafine fibers committed teno-lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells for Achilles tendon regeneration. *Biomaterials*.2015;53:716-730.
- [17] HOLTHAUS MG, STOLLE J, TRECCANI L, et al. Orientation of human osteoblasts on hydroxyapatite-based microchannels. *Acta Biomater*. 2012;8(1):394-403.
- [18] RIVELINE D, ZAMIR E, BALABAN NQ, et al. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*.2001;153(6):1175-1186.
- [19] WEINER S, WAGNER D. The Material Bone: Structure-Mechanical Function Relations. *Annu Rev Mater Res*.2003;28:271-298.
- [20] LIU Y, LUO D, WANG T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small*.2016;12(34):4611-4632.
- [21] REZNIKOV N, SHAHAR R, WEINER S. Three-dimensional structure of human lamellar bone: The presence of two different materials and new insights into the hierarchical organization. *Bone*.2014;59:93-104.
- [22] RHO JY, KUHN L, ZIOUPOS P. Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone. *Med Eng Phys*.1998;20(2):92-102.
- [23] WON JE, LEE YS, PARK JH, et al. Hierarchical microchanneled scaffolds modulate multiple tissue-regenerative processes of immune-responses, angiogenesis, and stem cell homing. *Biomaterials*. 2020; 227:119548.
- [24] YANG H, ZHANG D, PENG WK, et al. Facile synthesis of copper doping hierarchical hollow porous hydroxyapatite beads by rapid gelling strategy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;109:110531.
- [25] SU N, GAO PL, WANG K, et al. Fibrous scaffolds potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells: A new dimension in cell-material interaction. *Biomaterials*. 2017;141:74-85.
- [26] GNECCHI M, ZHANG ZP, NI AG, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*.2008;103(11):1204-1219.
- [27] SINGER NG, CAPLAN AL. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. *Annu Rev Pathol*.2011;6:457-478.
- [28] THEVENOT PT, NAIR AM, SHEN J, et al. The effect of incorporation of SDF-1 α into PLGA scaffolds on stem cell recruitment and the inflammatory response. *Biomaterials*. 2010;31(14):3997-4008.
- [29] OGLE ME, SEGAR CE, SRIDHAR S, et al. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(10):1084-1097.
- [30] PEI X, MA L, ZHANG B, et al. Creating hierarchical porosity hydroxyapatite scaffolds with osteoinduction by three-dimensional printing and microwave sintering. *Biofabrication*.2017;9(4):045008.
- [31] WANG XJ, LOU T, ZHAO WH, et al. The effect of fiber size and pore size on cell proliferation and infiltration in PLLA scaffolds on bone tissue engineering. *J Biomater Appl*.2016;30(10):1545-1551.
- [32] BILLIET T, GEVAERT E, DE SCHRYVER T, et al. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials*. 2014;35(1):49-62.
- [33] HONG Y, HUBER A, AKANARI K, et al. Mechanical properties and in vivo behavior of a biodegradable synthetic polymer microfiber-extracellular matrix hydrogel biohybrid scaffold. *Biomaterials*. 2011;32(13):3387-3394.
- [34] LIU X, WU S, YEUNG KWK, et al. Relationship between osseointegration and superelastic biomechanics in porous NiTi scaffolds. *Biomaterials*. 2011;32(2):330-338.
- [35] XU C, SU P, CHEN X, et al. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*.2011;32(4):1051-1058.
- [36] BARBIERI D, YUAN H, LUO X, et al. Influence of polymer molecular weight in osteoinductive composites for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*.2013;9(12):9401-9413.
- [37] GROEN N, YUAN H, HEBELS DGAJ, et al. Linking the Transcriptional Landscape of Bone Induction to Biomaterial Design Parameters. *Adv Mater*.2017;29(10).doi:10.1002/adma.201603259
- [38] LEE VK, DAI GH. Printing of Three-Dimensional Tissue Analogs for Regenerative Medicine. *Ann Biomed Eng*.2017;45(1):115-131.
- [39] ZHOU C, YE X, FAN Y, et al. Biomimetic fabrication of a three-level hierarchical calcium phosphate/collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Biofabrication*.2014;6(3):035013.
- [40] LI X, DING J, WANG J, et al. Biomimetic biphasic scaffolds for osteochondral defect repair. *Regen Biomater*.2015;2(3):221-228.
- [41] BUSCHMANN I, SCHAPER W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci*.1999;14:121-125.
- [42] BUSCHMANN I, SCHAPER W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*.2000;190(3):338-342.
- [43] PAN HH, XIE YT, ZHANG ZQ, et al. Immunomodulation effect of a hierarchical macropore/nanosurface on osteogenesis and angiogenesis. *Biomed Mater*.2017;12(4):045006.
- [44] MADDEN LR, MORTISEN DJ, SUSSMAN EM, et al. Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2010;107(34):15211-15216.
- [45] YU T, LIU Q, JIANG T, et al. Channeled β -TCP Scaffolds Promoted Vascularization and Bone Augmentation in Mandible of Beagle Dogs. *Adv Funct Mater*.2016;26(37):6719-6727.
- [46] RATNER BD. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *J Control Release*. 2002;78 (1-3): 211-218.
- [47] TIAN T, ZHANG T, LIN Y, et al. Vascularization in Craniofacial Bone Tissue Engineering. *J Dent Res*.2018;97(9):969-976.
- [48] DARNELL M, YOUNG S, GU L, et al. Substrate Stress-Relaxation Regulates Scaffold Remodeling and Bone Formation In Vivo. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(1):10.1002/adhm.201601185.
- [49] YU T, DONG C, SHEN ZH, et al. Vascularization of plastic calcium phosphate cement in vivo induced by in-situ-generated hollow channels. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;68:153-162.
- [50] ARINZE TL, PETER SJ, ARCHAMBAULT MP, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85(10):1927-1935.
- [51] XING HL, WANG X, XIAO G, et al. Hierarchical assembly of nanostructured coating for siRNA-based dual therapy of bone regeneration and revascularization. *Biomaterials*. 2020;235:119784.
- [52] JANG CH, LEE J, KIM G. Synergistic effect of alginate/BMP-2/Umbilical cord serum-coated on 3D-printed PCL biocomposite for mastoid obliteration model. *J Ind Eng Chem*.2019;72:432-441.