

# 早期短暂 M1 巨噬细胞在骨组织工程中的作用及应用

杨雨晴, 陈志宇

<https://doi.org/10.12307/2023.849>

投稿日期: 2022-11-25

采用日期: 2022-12-29

修回日期: 2023-01-18

在线日期: 2023-01-30

中图分类号:

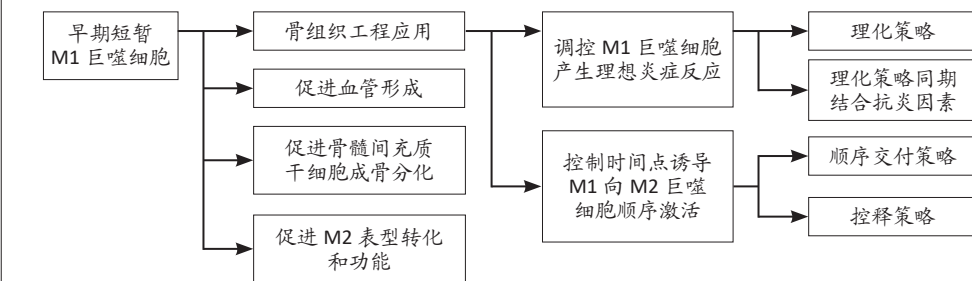
R459.9; R392; R78

文章编号:

2095-4344(2024)04-00594-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 早期短暂 M1 巨噬细胞的作用及在骨组织工程中应用



文题释义:

**M1巨噬细胞:** 是巨噬细胞表型之一。由损伤、细菌内毒素、脂多糖或促炎细胞因子如 $\gamma$ -干扰素、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $1\beta$ 等诱导激活而成。M1巨噬细胞参与宿主的防御过程, 吞噬并清除微生物、坏死组织和临时的纤维蛋白基质, 并通过释放促炎细胞因子和趋化因子放大炎症, 通常在生物材料植入体内后72 h开始减少并逐渐消失。

**骨组织工程:** 在具有足够三维空间和细胞因子等营养物质的支架材料或细胞外基质上负载种子细胞, 并能够促进种子细胞增殖、成骨分化或血管形成, 然后将这一复合材料植入骨缺损部位, 可以促进骨再生或骨骼血管化, 达到修复缺损骨组织的目的。

摘要

**背景:** 早期短暂存在的M1巨噬细胞在骨组织工程材料植入后可以发挥有益作用, 调控M1巨噬细胞产生早期适度炎症反应的策略研究逐渐广泛, 在骨组织工程材料的设计中取得了许多研究进展。

**目的:** 综述早期短暂存在的M1巨噬细胞在骨组织工程中的作用, 以及近年诱导激活早期短暂M1巨噬细胞策略在骨组织工程领域的应用研究进展。

**方法:** 检索收录在PubMed、万方数据库、CNKI中国期刊全文数据库2012年1月至2022年10月的相关文献, 以“M1, 巨噬细胞, 骨免疫学, 骨免疫调节, 骨缺损, 骨再生, 炎症反应, 血管生成, 组织工程, 生物材料”为中文检索词, 以“M1, macrophage, bone, osteogenesis, osteoimmunology, angiogenesis”等为英文检索词, 筛选排除与研究目的无关与重复的文献, 最终选取符合标准的63篇文献进行综述。

**结果与结论:** 早期短暂存在的M1巨噬细胞在骨组织工程中具有促进血管形成、促进骨髓间充质干细胞成骨分化以及促进M2表型转化的重要作用。诱导激活早期短暂M1巨噬细胞策略能够以符合早期自然骨愈合规律的方式调控局部免疫微环境进而促进骨缺损修复, 策略包括通过改变骨组织工程材料的理化性质促进M1巨噬细胞产生适当炎症反应, 递送细胞因子、微小RNA或生物活性离子实现M1向M2巨噬细胞顺序极化, 控释抗炎物质实现M1巨噬细胞介导的早期炎症反应的保持。

**关键词:** 巨噬细胞; M1; 炎症反应; 骨缺损; 骨再生; 组织工程; 顺序极化; 血管生成

## Role and application of early transient presence of M1 macrophages in bone tissue engineering

Yang Yuqing, Chen Zhiyu

Department of Prosthodontics, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Clinical Research Center for Oral Diseases, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Yang Yuqing, Master candidate, Department of Prosthodontics, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Clinical Research Center for Oral Diseases, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

**Corresponding author:** Chen Zhiyu, MD, Associate chief physician, Associate professor, Department of Prosthodontics, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Clinical Research Center for Oral Diseases, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Abstract

**BACKGROUND:** Early transient presence of M1 macrophages can play a beneficial role after the implantation of bone tissue engineering materials. Recently, strategies for manipulating M1 macrophages to produce an early moderate inflammatory response have been extensively studied and many research advances have been made in the design of bone tissue engineering materials.

河北医科大学口腔医学院·口腔医院修复科, 河北省口腔医学重点实验室, 河北省口腔疾病临床医学研究中心, 河北省石家庄市 050017

第一作者: 杨雨晴, 女, 1998年生, 河北医科大学口腔医院在读硕士研究生, 主要从事骨组织工程的研究。

通讯作者: 陈志宇, 博士, 副主任医师, 副教授, 河北医科大学口腔医学院·口腔医院修复科, 河北省口腔医学重点实验室, 河北省口腔疾病临床医学研究中心, 河北省石家庄市 050017

<https://orcid.org/0000-0002-3226-7055>(杨雨晴)

基金资助: 河北省“三三三人才工程”资助项目(A202102010), 项目负责人: 陈志宇; 河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(361029), 项目负责人: 陈志宇

引用本文: 杨雨晴, 陈志宇. 早期短暂 M1 巨噬细胞在骨组织工程中的作用及应用 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(4): 594-601.



**OBJECTIVE:** To review the role of early transient presence of M1 macrophages in bone tissue engineering and recent research advances in the strategy for activating early transient presence of M1 macrophages in the field of bone tissue engineering.

**METHODS:** Relevant literature included in PubMed, WanFang database, and CNKI Database from January 2012 to October 2022 was searched. Search terms were “M1, macrophage, bone immunoregulation, bone defect, osteogenesis, osteoimmunology, angiogenesis” in English and Chinese. After excluding articles irrelevant to the research purpose and repetitive articles, 63 papers were finally included for review.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The early transient presence of M1 macrophages play a key role in bone tissue engineering by promoting angiogenesis, facilitating osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and promoting an M2 macrophage phenotype. Strategies for inducing and activating early transient presence of M1 macrophages can modulate the local immune microenvironment for bone defect repair in a manner consistent with early natural bone healing, including modulation of the physicochemical properties of bone tissue engineering materials to promote appropriate M1 macrophage-mediated inflammatory responses, sequential delivery of cytokines, microRNAs or bioactive ions to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages, and controlled release of anti-inflammatory substances to achieve the maintenance of early inflammatory responses.

**Key words:** macrophage; M1; inflammatory response; bone defect; bone regeneration; tissue engineering; sequential activation; angiogenesis

**Funding:** Hebei Provincial Talents Project, No. A202102010 (to CZY); Hebei Provincial Government Funded Clinical Medical Talents Training Project, No. 361029 (to CZY)

**How to cite this article:** YANG YQ, CHEN ZY. Role and application of early transient presence of M1 macrophages in bone tissue engineering. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(4):594-601.

## 0 引言 Introduction

创伤、牙周炎、肿瘤切除等引起的牙槽骨及颌骨缺损，给后期修复重建带来很大限制。自体骨移植是目前修复骨缺损的“金标准”，但因术区自体骨获取有限和供区二次创伤等问题，该治疗方案具有许多局限性<sup>[1]</sup>。在疗效与微创的临床需求背景下，骨组织工程技术为骨再生提供了新的治疗思路。

骨缺损区域早期适度的炎症反应是骨组织工程材料促进骨再生和血管生成的重要条件。作为参与炎症反应的重要免疫细胞，巨噬细胞在骨损伤修复过程中可塑性地顺序极化为促炎性 M1 和抗炎性 M2 表型，参与了骨免疫调节过程<sup>[2]</sup>。其中，M1 巨噬细胞在免疫反应早期进程中的短暂出现必不可少。忽略 M1 巨噬细胞的积极作用，或者由于 M1 表型持续存在产生慢性炎症的风险而对其过度抑制，都将影响骨再生的效果<sup>[3]</sup>。过去 5 年，越来越多的学者聚焦巨噬细胞的极化过程，开展了具有免疫调控作用的骨组织工程材料的研究，但如何实现 M1 巨噬细胞在骨组织工程的早期发挥有利的炎症反应作用，并对该作用进行动态调控，以符合生物学要求，仍是当前面临的巨大挑战。

因此，该综述的目的是阐释早期短暂存在的 M1 巨噬细胞在骨组织工程中的作用，总结近年诱导激活早期短暂 M1 巨噬细胞策略在骨组织工程领域的应用研究，并分析各策略的优点及局限性。希望通过明确早期短暂 M1 巨噬细胞介导的温和炎症反应对骨修复再生的不可或缺作用，为骨缺损的临床治疗和基础研究提供新的思路和启发。

## 1 资料和方法 Data and methods

### 1.1 资料来源

1.1.1 检索人及检索时间 第一作者在 2022 年 10 月进行检索。

1.1.2 检索文献时限 2012 年 1 月至 2022 年 10 月。

1.1.3 检索数据库 PubMed 数据库 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)、万方中华医学会数字化期刊 (<https://www.wanfangdata.com.cn/>) 及 CNKI 中国期刊全文数据库 (<https://www.cnki.net/>)。

1.1.4 检索途径 主题词检索、关键词检索、摘要检索。

1.1.5 检索词 以“M1, 巨噬细胞, 骨免疫学, 骨免疫调节, 骨缺损, 骨再生, 炎症反应, 血管生成, 组织工程, 生物材料”为中文检索词, 以“M1, macrophage, bone, osteogenesis, osteoimmunology, angiogenesis”等为英文检索词。

1.1.6 检索文献类型 研究原著和综述。

1.1.7 手工检索情况 手工检索纳入文献中少数年代久远的经典参考文献。

1.1.8 检索策略 以 PubMed 数据库文献检索策略为例, 见图 1。

1.1.9 检索文献量 共检索到文献 781 篇, 其中英文 654 篇、中文 127 篇。

### 1.2 入选标准

1.2.1 纳入标准 与研究主题相关的文献; 论据详实且论点可靠的文献; 优先选择近 5 年发表或在权威杂志上发表的文献。

1.2.2 排除标准 观点陈旧, 非时效性文章; 研究目的与课题内容不一致的文献; 重复性研究, 质量低或证据等级不够的文章。

1.3 数据的提取和质量评估 查阅全文, 进一步判断与纳入标准一致的文章并进行质量评估, 最终排除文献 718 篇, 保留 63 篇文献进行深入分析和总结, 其中英文文献 59 篇、中文文献 4 篇, 见图 2。

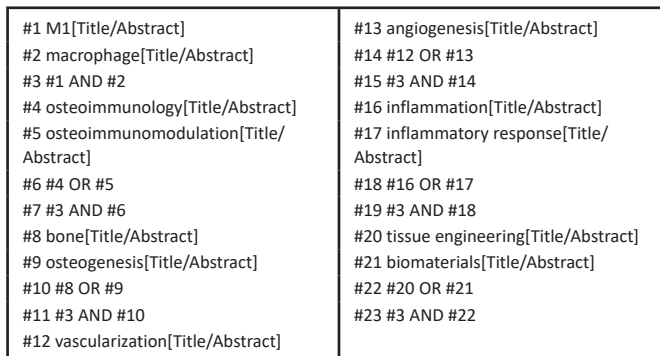


图 1 | PubMed 数据库检索策略

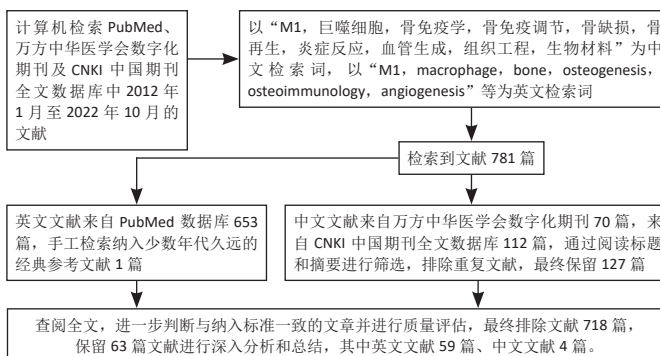
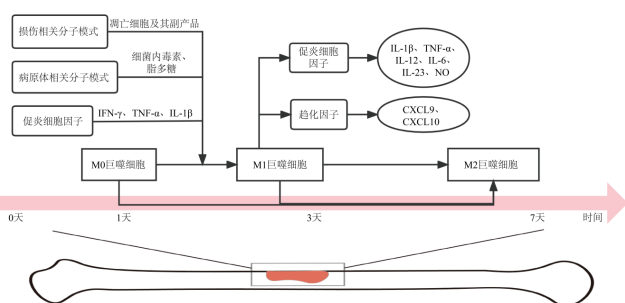


图 2 | 文献筛选流程图

## 2 结果 Results

2.1 早期短暂 M1 巨噬细胞概述 巨噬细胞是一类可塑的固有免疫细胞, 根据不同的骨局部微环境可极化为不同的表型。过去几十年以来, 不同的术语被学者描述出来用于研究巨噬细胞的不同极化状态, 目前最多以镜像“Th1/Th2”二分法的细胞命名方式<sup>[4]</sup>, 命名为“M1/M2 型”巨噬细胞进行相关研究。

20 世纪 60 年代, MACKANESS<sup>[5]</sup> 提出“促炎 M1 表型巨噬细胞”的概念, 用来描述巨噬细胞在抵抗微生物感染方面的重要作用。骨自然愈合环境时, M1 巨噬细胞短暂存在于早期阶段, 通常在骨损伤发生后的第一天, 在损伤相关分子模式 (例如凋亡细胞及其副产品)、病原体相关分子模式 (如细菌内毒素、脂多糖) 和促炎细胞因子 (如  $\gamma$ -干扰素、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$ ) 诱导下, 由未极化的 M0 巨噬细胞极化而成, 并在 72 h 内开始减少并逐渐消失, 而后白细胞介素 4、白细胞介素 10 等抗炎作用细胞因子对 M2 表型诱导, 进入骨组织修复阶段<sup>[6]</sup>。早期短暂存在的 M1 巨噬细胞发挥着清除微生物、坏死组织和临时的纤维蛋白基质的宿主防御作用, 并释放促炎细胞因子 (白细胞介素  $1\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 12、白细胞介素 6、白细胞介素 23、一氧化氮等) 和趋化因子 (趋化因子配体 9、趋化因子配体 10 等) 以启动早期的炎症反应<sup>[7]</sup>。图 3 总结了 M1 巨噬细胞的诱导激活过程及其分泌的细胞因子。以往研究表明, M1 巨噬细胞介导的骨再生早期炎症反应的持



图注: IFN- $\gamma$  为  $\gamma$ -干扰素; TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; IL-1 $\beta$  为白细胞介素 1 $\beta$ ; IL-12 为白细胞介素 12; IL-6 为白细胞介素 6; IL-23 为白细胞介素 23; NO 为一氧化氮; CXCL9 为趋化因子配体 9; CXCL10 为趋化因子配体 10

图 3 | M1 巨噬细胞的诱导激活过程及其分泌的细胞因子

续会减少骨组织生成。近年来,越来越多的研究发现 M1 巨噬细胞的早期短暂存在对骨再生过程具有启动作用,是必要条件。

## 2.2 早期短暂 M1 巨噬细胞在骨组织工程中的作用

### 2.2.1 促进血管生成

血管生成对于细胞的氧气和营养供应、废物清除、内皮细胞及干细胞归巢、成骨因子的释放起着关键作用<sup>[8]</sup>。骨组织工程需要形成稳定的功能性血管网络。M1 巨噬细胞可以通过分泌细胞因子刺激血管的初始形成,包括白细胞介素 6、白细胞介素 1 $\beta$ 、 $\gamma$ -干扰素、抑瘤素、肿瘤坏死因子  $\alpha$  等促炎细胞因子以及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)<sup>[9-10]</sup>。其中  $\gamma$ -干扰素可以增强体内植入支架的血管化而被广泛研究。VEGF 不仅可以促进内皮细胞尖端发芽和 H 型血管的发育,介导血管生成的启动,也直接调节着成骨过程<sup>[11]</sup>。

血管形成是一个极其复杂的过程,需要内皮细胞的迁移和增殖、周细胞维护血管稳定性等多个步骤。GRANEY 等<sup>[12]</sup>利用单细胞 RNA 测序技术,发现 M1 巨噬细胞条件培养基培养的内皮细胞富含促进周细胞招募的标志物,并显著上调了内皮细胞的 VEGF 受体以及尖端细胞表面标志物 VEGFR2(KDR) 等在内的多个基因的表达。研究表明这些受体可以与相应配体结合,通过激活下游 PI3K/AKT、MAPK、PLC $\gamma$ /ERK/MERK 等多种信号通路促进血管内皮细胞的增殖和血管生成<sup>[13-14]</sup>。同时发现,巨噬细胞超过 3 d 的持续存在将显著减少血管数量及总长度<sup>[12]</sup>,表明血管生成是骨缺损愈合过程中顺序级联的结果,需要 M1 和 M2 巨噬细胞在有序的时间内共同参与,从而促进新生血管的成熟和吻合。目前 M1 巨噬细胞如何在基因组和转录组水平上同时调节血管重建和骨组织再生的理解仍然有限,需要进一步探索 M1 巨噬细胞、内皮细胞和骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 之间的相互作用和涉及的信号通路,提供更佳的骨组织工程材料设计思路,以加强血管生成和骨再生。

### 2.2.2 促进 BMSCs 成骨分化

BMSCs 作为主要的骨形成细胞,极大影响着骨再生。几项体外培养模型用于研究 M1 巨噬细胞对 BMSCs 的行为和功能的影响,包括二维直接共培养模型、巨噬细胞条件培养基间接共培养模型,表明了低炎症 M1 巨噬细胞状态可以通过直接接触和分泌肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、抑瘤素、骨形态发生蛋白 2 和骨形态发生蛋白 6 等细胞因子促进 BMSCs 的迁移和成骨分化<sup>[15-16]</sup>。GOODMAN 团队最近设计了新型体外三维培养模型, M1 巨噬细胞在该模型中显著促进了 BMSCs 的成骨作用<sup>[17]</sup>。

除了直接接触和间接细胞因子分泌作用机制外, M1 巨噬细胞也可以通过外泌体等旁分泌形式促进 BMSCs 成骨分化。外泌体是直径介于 30-200 nm 的细胞外囊泡,其内部富含微小 RNA (microRNA, miR) 和蛋白质等多种物质,作为巨噬细胞和成骨相关细胞间通信的新机制,巨噬细胞外泌体可释放至环境中并作用于远端的 BMSCs,以调控其成骨作用<sup>[18]</sup>。LIU 等<sup>[19]</sup>发现 miR-21a-5p 在 M1 巨噬细胞分泌的外泌体中高度富集,并且可以转移到 BMSCs,在体外诱导了成骨分化。更多的研究开始探索其中的分子机制,发现 M1 巨噬细胞可以通过释放肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、外泌体、白细胞介素 1 等抑制 Notch 通路,诱导 Wnt 信号通路,促进了早期 BMSCs 的成骨分化<sup>[20]</sup>。鉴于上述原理,外泌体结合于骨组织工程中的应用很有希望。但是也有研究显示 M1 巨噬细胞外泌体抑制骨修复,

减少了 BMSCs 的成骨分化<sup>[21]</sup>。这些矛盾的结论可能是由于巨噬细胞来源、外泌体提取技术、共培养条件以及作用持续时间等差异所致。另外,体内的生理环境和极化刺激更加复杂, M1 巨噬细胞衍生外泌体影响 BMSCs 成骨分化的机制仍需要更多体内动物实验建模的参考。

近年研究发现,自噬作为真核细胞中一种高度保守的利用溶酶体发生的自身降解过程,除了在维持细胞稳态方面发挥重要作用外,也参与了巨噬细胞和 BMSCs 的交叉串扰过程<sup>[22]</sup>。首先,促进 BMSCs 成骨作用依赖于 M1 巨噬细胞发生的自噬机制。LUO 等<sup>[23]</sup>发现硅酸钙诱导 M1 巨噬细胞产生的早期短暂促炎环境促进了 BMSCs 的成骨分化,而该材料可以通过上调巨噬细胞内活性氧的产生和钙离子的过载诱导线粒体功能障碍,为了减少炎性体激活物如活性氧和受损线粒体的累积,巨噬细胞内自噬相关蛋白质 Beclin 1 和 LC3-II 的表达发生了上调,同时线粒体功能障碍和自噬共同诱导了巨噬细胞炎症反应,促炎细胞因子包括肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 6 的表达增加,这种早期短暂促炎微环境赋予了硅酸钙的成骨潜能。另外,低炎症条件下 M1 巨噬细胞促 BMSCs 的迁移和成骨分化作用也依赖于 BMSCs 自噬相关基因 ATG5、ATG7 和 Beclin 1 以及 LC3-II 蛋白表达<sup>[24]</sup>。以上研究表明,自噬与炎症和成骨之间有着错综复杂的关系,巨噬细胞和 BMSCs 的自噬发生,参与了二者的交叉串扰。目前,骨组织工程材料和药物诱导 M1 巨噬细胞内线粒体功能障碍和自噬的确切分子机制,以及如何将其应用于骨组织工程领域以达到诊断或治疗的目的,仍有待进一步研究。

### 2.2.3 促进巨噬细胞 M2 表型的转化和功能

巨噬细胞 M2 表型介导骨再生过程中的建设性重塑, M1 巨噬细胞的早期激活对后续 M2 表型极化具有重要的调节作用。白细胞介素 4 是促进 M0 或 M1 表型向 M2 表型极化的关键细胞因子。O'BRIEN 等<sup>[25]</sup>研究发现, M1 巨噬细胞较 M0 未极化状态向上调节了白细胞介素 4 受体的表达,包括白细胞介素 4 受体复合物 IL4Ra、IL13RA1、IL2RG 及其相应 Janus 激酶 JAK1、JAK2、JAK3,加速了受体 STAT6 磷酸化过程,表明 M1 巨噬细胞对白细胞介素 4 配体具有相对更高的敏感性。另外,研究表明 M1 巨噬细胞分泌细胞因子可诱导 M2 表型的分化,例如白细胞介素 6 可诱导 M2 表型中 M2b 和 M2d 亚群<sup>[26-27]</sup>。肿瘤坏死因子  $\alpha$  是 M1 巨噬细胞分泌的主要产物,同时也是潜在的 M2 表型诱导剂。最近研究表明,肿瘤坏死因子  $\alpha$  增加了 CD73 基因在牙龈组织源性间充质干细胞分泌外泌体的表达,介导间充质干细胞的免疫抑制作用,间接性地显著促进了 M2 极化<sup>[28]</sup>。

另外, M1 衍生的 M2 巨噬细胞较直接从 M0 制备的 M2 巨噬细胞具有更高的成血管能力。一项 RNA 测序证实,二者互为不同的表型,有 2 000 多个基因表达差异<sup>[29]</sup>。两者的基因差异也使前者表现出 M2 相关蛋白质的分泌增加,特别是趋化因子配体和血小板生长因子,促进了人脐静脉血管内皮细胞的迁移和新生血管的稳定<sup>[25]</sup>。然而,许多研究只评估了少数 M1 和 M2 表型相关基因的表达,尽管研究证实了这些基因表达的结果具有意义,同时这些基因的差异是否表现为对其他骨组织细胞如 BMSCs 行为及功能的改变,仍需更关注骨组织工程材料的细胞和分子间的调控机制。但总体而言, M1 表型的增强是促进 M2 巨噬细胞介导的血管生成和骨生成的潜在策略之一。

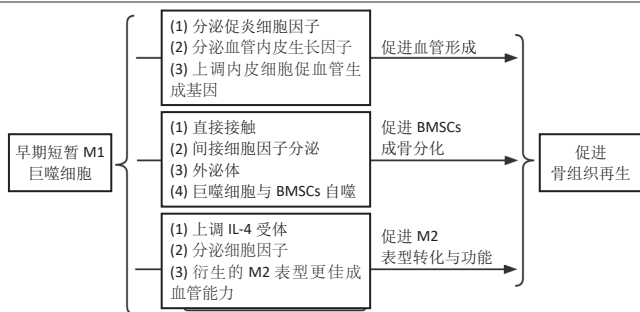
综上所述,早期短暂存在的 M1 巨噬细胞作为参与炎症反应的重要因素,促进了血管生成、BMSCs 成骨分化和 M2 表型巨噬细胞的转化,在骨组织工程中发挥着重要作用,如图 4 所示。然而, M1 巨噬细胞的持久激活将导致炎症的长期持续和纤维封装,不利于后续的骨再生过程。因此,早期短暂地诱导激活 M1 巨噬细胞并产生温和的炎症反应,成为了骨组织工程的关键方向。

## 2.3 早期短暂 M1 巨噬细胞激活策略在骨组织工程的应用

近年来,骨组织工程材料正在从“免疫惰性”向“免疫调节”这一新兴阶段过渡。为了产生温和的炎症反应以较早地启动骨修复,许多学者采取了早期短暂地诱导激活 M1 巨噬细胞策略。由于巨噬细胞的 M1/M2 极化具有时间顺序性,下面根据 M1/M2 极化时间分离方式的不同,分别从调控 M1 巨噬细胞产生理想炎症反应策略和控制时间点诱导 M1 向 M2 巨噬细胞顺序激活策略进行讨论,如图 5 所示,旨在未来设计更优化的骨组织工程材料,开发临床应用潜力用于骨再生。

### 2.3.1 调控 M1 巨噬细胞产生理想炎症反应策略

(1) 化学策略: 骨组织工程材料的表面化学性质是决定其与免疫微



图注: BMSCs 为骨髓来源间充质干细胞; IL-4 为白细胞介素 4  
图 4 | 早期短暂 M1 巨噬细胞在骨组织工程中的作用

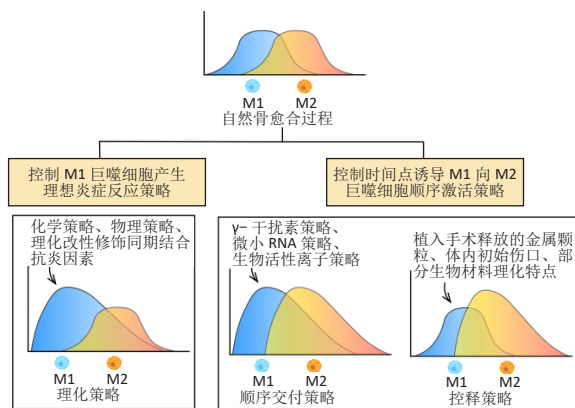


图 5 | 骨组织工程中早期短暂地诱导激活 M1 巨噬细胞策略示意图

环境相互作用的一个重要方面。多项研究通过对生物材料进行不同的化学修饰改性, 调控 M1 巨噬细胞产生温和的炎症反应, 在骨组织工程中实现了最佳的成骨效果。表 1 总结了近年促进 M1 巨噬细胞产生理想炎症反应的化学策略。

表 1 | 促进 M1 巨噬细胞产生理想炎症反应的化学策略

研究者 / 发表年份	支架材料	化学策略	化学修饰成分	主要结论
HE 等 <sup>[30]</sup> , 2019	钛	表面涂层	肽 LL-37	体外促进 M1 巨噬细胞和成骨细胞招募并分泌促炎和抗炎因子; 体内促进 M1 巨噬细胞激活和抗炎反应并成骨
SU 等 <sup>[31]</sup> , 2020	钛	表面涂层	氧化石墨	体外生理条件下激活 M1 巨噬细胞诱发轻度炎症和促成骨细胞分化; 模拟急性炎症条件下减弱炎症和促成骨
WANG 等 <sup>[32]</sup> , 2021	钛	表面涂层	葡甘露聚糖	体外刺激 M1 巨噬细胞诱导温和炎症并及时诱导凋亡, 诱导成骨及成血管因子; 体外促成骨成血管
ZHU 等 <sup>[33]</sup> , 2022	聚偏氟乙烯-三氟乙烯膜	表面化学改性	正电荷改性	体外诱导 M1 巨噬细胞低炎症状态和轻度促成骨矿化
许晴 <sup>[34]</sup> , 2021	介孔二氧化硅复合纳米颗粒	负载生物活性离子	铜离子	体外诱导 M1 巨噬细胞低炎症状态和促进新生血管形成
BAI 等 <sup>[35]</sup> , 2021	生物活性微晶玻璃	负载生物活性离子	锌离子	体外诱导 M1 巨噬细胞极化诱发轻度炎症并向 M2 表型转化和促成骨细胞分化; 体内早期诱导 M1 表型并后期诱导 M2 表型和促成骨
LIANG 等 <sup>[36]</sup> , 2022	钛	负载生物活性离子	镁离子	体外早期诱导 M1 巨噬细胞诱发温和炎症反应并向 M2 表型转化和促成骨细胞成熟矿化; 体内后期未观察到炎症反应且促成骨

**表面涂层:** 利用涂层技术对植入物表面进行化学成分修饰可以用于产生温和的炎症反应。例如, SU 等<sup>[31]</sup> 在钛表面建立氧化石墨涂层, 生理条件下激活 M1 巨噬细胞, 诱发了轻度炎症和促成骨环境, 而在模拟急性炎症条件下减弱了炎症反应。研究表明多肽 LL-37 能够刺激和调节巨噬细胞分泌促炎因子, 同时可以与微环境中其他细胞因子协同起到抗炎作用<sup>[37]</sup>。但是有关多肽活性的保持和持续释放问题依然是难点。HE 等<sup>[30]</sup>

在钛表面构建了肽 LL-37 负载的丝纤维蛋白纳米颗粒, 早期促进了较高 M1 标记表达, 后期协同发挥抗炎作用, 最终促进了骨形成。WANG 等<sup>[32]</sup> 提出了诱导 M1 巨噬细胞的早期极化并及时凋亡的内部刺激响应创新涂层策略, 该涂层能够招募和诱导巨噬细胞 M1 表型, 诱导成骨细胞分化并产生碱性磷酸酶, 对涂层化学键进行切割, 实现了涂层在钛表面释放和巨噬细胞凋亡, 导致炎症的消失。

**表面化学改性:** 骨组织工程研究仍致力于通过对引导骨再生技术膜材料进行表面固有化学改性以调节局部免疫环境, 增强骨再生效果。压电生物材料的表面电荷极性作为最近研究的热点, 可以通过提供局部电刺激精确调节骨骼再生<sup>[38]</sup>。ZHU 等<sup>[33]</sup> 发现带负电荷和带正电荷的聚偏氟乙烯-三氟乙烯膜分别诱导了巨噬细胞的抗炎和促炎反应, 其中正电荷极性诱导的是一种低炎症 M1 巨噬细胞状态, 能轻度促进体外成骨矿化。尽管如此, 目前研究仍存在许多空白: ①专注于带电电压活性材料对介导适度炎症反应的研究仍然较少; ②压电物质通过影响巨噬细胞调节免疫成骨微环境的作用及确切机制并不十分明确; ③鉴于体内微环境具有多样性, 电荷极性的体内免疫效果仍有待深入研究。

**生物活性离子:** 生物活性离子对炎症反应的调节程度及作用机制的研究仍不充分, 但将其纳入生物材料的策略仍为介导理想炎症反应提供了新的努力方向。一些生物活性离子可以将巨噬细胞极化为 M1 表型。许晴<sup>[34]</sup> 制作掺杂铜离子的介孔二氧化硅纳米颗粒, 在体外诱导 M1 表型并促进了新生血管的形成。但是这种策略要求纳米载体具有规避离子泄露至超过生理浓度风险的性质, 而极大限制了其临床应用。

另外一些生物活性离子对巨噬细胞的极化影响在很大程度上取决于环境的离子浓度和 pH 效应。BAI 等<sup>[35]</sup> 制作了含锌离子的生物活性微晶玻璃, 早期低浓度锌离子造成急性应激反应诱导了 M1 巨噬细胞极化, 介导了早期适度炎症反应, 后期随着离子局部滞留, 浓度增加的锌离子将巨噬细胞极化为 M2 表型。最近, LIANG 等<sup>[36]</sup> 制作了钛-镁合金, 镁离子的释放导致了局部碱性微环境, 由于短时间内 pH 值对 M1 表型的极化效应超过了镁离子的 M2 极化效应, 诱导了早期一过性 M1 巨噬细胞增加, 与后期镁离子长期释放诱导的抗炎反应联合促进了骨形成。然而, 骨组织工程材料中生物活性离子的释放剂量、速率的控制以及生物材料的降解过程仍然是当前骨组织工程材料设计面临的主要难题。能否刺激 M1 巨噬细胞介导理想骨免疫微环境效果, 需取决于这些因素协同作用的结果。

(2) 物理策略: 除了化学改性修饰外, 骨组织工程材料不同物理特征也会对巨噬细胞的极化产生巨大影响。例如, 与平坦表面相比, 双相磷酸钙陶瓷微图案表面可以调控巨噬细胞向 M1 极化并促进了体外成骨分化<sup>[39]</sup>。SRIDHARAN 等<sup>[40]</sup> 制作了包含不同大小和形状羟基磷灰石颗粒的胶原支架, 5 μm 针状羟基磷灰石胶原支架同时促进了 M1 和 M2 型巨噬细胞促炎和抗炎因子的分泌和基因表达并促进了体外成骨。

以上研究表明, 巨噬细胞的极化状态可以通过改善材料的物理特征进行调节, 开发具有一定物理特征的材料-骨界面微环境, 进而诱导适度的炎症反应的新型材料可能有利于增强骨再生和早期血管形成潜力, 但是仅仅考虑这种单向 M1 极化调节可能产生不足的巨噬细胞极化水平, 或者持续激活 M1 巨噬细胞而产生潜在促炎作用, 难以实现抗炎表型的及时转换以及 M1 和 M2 二者之间的平衡协调, 甚至不利于骨组织再生。因此, 物理策略需要全面分析生物材料的免疫调节能力, 特别是对 M1 表型极化的持续时间及强度的评价。目前物理特性对巨噬细胞极化的影响的基础研究和材料设计方面的发现仍处于起步阶段, 需要进行更多的实验研究。

(3) 理化改性修饰同期结合抗炎因素: 尽管上述研究证明了对材料进行物理化学改性修饰可以作为促进体内成骨的潜在策略, 但是这些研究往往着眼于材料的固有属性而非仿生设计, 导致了 M1 巨噬细胞的非生理性诱导而产生较低的巨噬细胞极化强度和效率, 不利于理想的成骨修复。生物材料同期结合其他抗炎因素是最常见的优化材料骨免疫调节性能的策略之一。例如, ZHENG 等<sup>[41]</sup> 在氧化石墨烯涂层中负载了富含镁离子的纳米颗粒, 与单一氧化石墨烯涂层通过诱导激活低极化水平的 M1 巨噬细胞所产生的成骨作用相比, 由于镁离子的释放促进了后期 M2 表型转变, 更促进了大鼠颅骨缺损的血管化骨再生, 保持氧化石墨烯促炎作用的同时提高了成骨效果。

另外，材料的物理固有属性容易导致 M1 巨噬细胞的持续激活而无法及时向 M2 表型转化，需要同期结合其他抗炎因素以减轻慢性炎症反应的风险。例如临床上用于引导骨再生的 BioGide® 胶原屏障膜的粗糙表面可以促进巨噬细胞 M1 表型极化以及成骨因子表达，但具有潜在促炎作用，将纳米生物活性玻璃 Ca<sub>2</sub>ZnSi<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 修饰胶原膜后调节了局部炎症并显著促进了成骨矿化<sup>[42]</sup>。类似的，研究表明高基质刚度的物理特性倾向于长期诱导 M1 表型<sup>[43]</sup>。HE 等<sup>[44]</sup> 在高刚度水凝胶中加入白细胞介素 4 和基质细胞衍生因子，通过综合产生了更理想的炎症反应，促进了大鼠牙周骨再生。

一些生物活性离子可以通过促进巨噬细胞极化为 M1 表型而引发强烈甚至过度的炎症反应，结合具有抗炎作用的表面改性可以引发温和的炎症反应以促进成骨。例如，黄千里<sup>[45]</sup> 制作含铜的微/纳米形生物陶瓷表面，相对比直接外源性铜离子所引发的强烈 M1 表型极化刺激，由于该改性表面的抗炎作用，最终引发了较低的炎症反应，促进了良好的骨形成。以上这些理化改性修饰同期结合抗炎因素策略为生物材料的设计提供了一定的指导意义。

### 2.3.2 控制时间点诱导 M1 向 M2 巨噬细胞顺序激活策略

(1) 顺序交付策略：M1 和 M2 巨噬细胞在骨再生过程中按时间进程介导着炎症反应向修复状态的切换，顺序和协同发挥着许多功能。与单独早期诱导激活 M1 巨噬细胞产生炎症反应相比，依次促进 M1 和 M2 表型的激活将是促进骨再生另一有希望的策略。已经探索了一些顺序交付技术，以调节巨噬细胞表型的顺序极化。在此，以激活早期 M1 巨噬细胞极化的材料为分类依据，讨论诱导 M1 和 M2 型巨噬细胞依次极化的顺序交付策略的最新研究进展，包括  $\gamma$ -干扰素策略、微小 RNA 策略和生物活性离子策略。总结见表 2。

$\gamma$ -干扰素策略：鉴于促炎细胞因子  $\gamma$ -干扰素出色地诱导巨噬细胞向 M1 表型极化的能力，研究最多的是  $\gamma$ -干扰素和其他抗炎物质的顺序递送，并表现了相当的骨再生以及血管形成潜力。为了诱导激活初期短暂的 M1 巨噬细胞，早期交付  $\gamma$ -干扰素的常用方法包括物理吸附至材料表面并通过扩散驱使初始的爆发释放，以及物理封装至水凝胶中或分散到 3D 打印支架基质中，通过物理扩散结合基质的膨胀或降解实现快速释放。

最近许多研究关注受控于纳米管特定空间分布的  $\gamma$ -干扰素和抗炎

细胞因子白细胞介素 4 的顺序交付策略。CHEN 等<sup>[47]</sup> 通过在钛纳米管表面构建双壳聚糖水凝胶涂层，实现  $\gamma$ -干扰素和吸附于纳米管内部的白细胞介素 4 分隔交付，体外调节了巨噬细胞顺序极化。YANG 等<sup>[48]</sup> 提出了基于双层基质封装细胞因子的羟基磷灰石纳米管控释技术，将封装  $\gamma$ -干扰素的聚乳酸-羟基乙酸共聚物和封装白细胞介素 4 的透明质酸分别加载到纳米管底部和顶部，介导因子的顺序递送，是促进成骨修复的可行方法。但释放动力学是一个复杂的过程，需要在大量的体内实验中评估该策略的免疫调节和骨再生效果。

除了白细胞介素 4， $\gamma$ -干扰素与其他抗炎物质的双递送策略也被引入研究： $\gamma$ -干扰素与辛伐他汀、 $\gamma$ -干扰素与促进巨噬细胞 M2 表型极化的生物活性离子，如锶离子、硅离子。ALHAMDI 等<sup>[49]</sup> 设计了仿生磷酸钙涂层，实现了  $\gamma$ -干扰素的早期释放和辛伐他汀的延迟交付，促进了老年人骨祖细胞的成骨分化。另外， $\gamma$ -干扰素与化学共轭在支架材料中的金属活性离子的双重交付，作为最近研究的一种简便策略，避免了多种物质理化性质相似时的递送难题。虽然体内实验证明了良好的骨再生以及血管形成，但是该策略往往伴随着特别是 3D 打印材料中的金属活性离子的过早释放<sup>[50-51]</sup>，与  $\gamma$ -干扰素的释放时间极大重叠，这对初始 M1 巨噬细胞活性可能产生某些适得其反的作用<sup>[52-53]</sup>。因此，仍需要探索组合优化的交付方式，控制并分离生物活性离子的释放时间，以实现更优的顺序极化和骨再生效果。

微小 RNA 策略：虽然细胞因子对巨噬细胞表型的调节有良好的影响，但它们的应用仍面临着易失活、价格昂贵、释放剂量难以控制导致不良反应等多种挑战。微小 RNA 已被证明通过调节巨噬细胞极化促进成骨和血管形成，可以作为一种替代策略。其中，miR-155 诱导 M1 巨噬细胞极化的作用已得到了广泛研究。LI 等<sup>[54]</sup> 开发了负载 miR-155 和 miR-21 的纳米颗粒，体外分别调节了巨噬细胞 M1 和 M2 极化。XUE 等<sup>[55]</sup> 以牛血清白蛋白为模型蛋白，将能够负载 miR-155 和 miR-21 的纳米颗粒分别通过物理嵌入和化学键合在基质金属蛋白酶敏感水凝胶中，实现了二者的顺序递送，表明在精确的时间点上控制巨噬细胞 M1 和 M2 表型极化的潜能。但是微小 RNA 策略的顺序递送研究目前仍处于起步阶段，需要体内成骨实验的验证。另外，由于暴露在循环系统中的微小 RNA 会被迅速酶解的特性，基因治疗仍需要探索合适的基因载体，特别是关于载体的颗粒尺寸和电化学性能考虑，尽可能高效转移至巨噬细胞内部以

表 2 | 诱导 M1 和 M2 型巨噬细胞依次极化的顺序交付策略

研究者 / 发表年份	策略分类	顺序交付材料	材料载体	顺序交付技术	交付结果	主要结论
GAO 等 <sup>[46]</sup> , 2018	$\gamma$ -干扰素策略	IFN- $\gamma$ /IL-4	羧甲基壳聚糖水凝胶 / 钛纳米管	表面吸附 / 物理吸附 + 凝胶封装	IFN- $\gamma$ 在 3 d 内快速释放，IL-4 推迟至第 2 d 释放	体外调节巨噬细胞顺序极化，成骨细胞活性未受影响
CHEN 等 <sup>[47]</sup> , 2018	$\gamma$ -干扰素策略	IFN- $\gamma$ /IL-4	双层壳聚糖水凝胶 / 钛纳米管	物理吸附 + 凝胶封装 / 物理吸附 + 凝胶封装	IFN- $\gamma$ 在 1 d 内爆发释放，IL-4 持续释放 7 d	体外调节巨噬细胞顺序极化，成骨细胞活性未受影响
YANG 等 <sup>[48]</sup> , 2020	$\gamma$ -干扰素策略	IFN- $\gamma$ /IL-4	透明质酸钠 / 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 + 羟基磷灰石纳米管	物理封装 / 物理封装	IFN- $\gamma$ 在 1 d 内爆发释放，IL-4 前 3 d 较少且稳定释放，随后迅速释放至第 5 天	具有调节巨噬细胞顺序极化的潜力
ALHAMDI 等 <sup>[49]</sup> , 2018	$\gamma$ -干扰素策略	IFN- $\gamma$ /辛伐他汀	仿生磷酸钙涂层 / 磷酸三钙支架	表面吸附 / 表面吸附 + 物理逐层	IFN- $\gamma$ 早期快速释放，辛伐他汀第 3 天起始释放，并持续释放至第 6 天	体外调节人外周血巨噬细胞、年轻和老年小鼠骨髓来源巨噬细胞顺序极化；延迟交付辛伐他汀促进老年人骨祖细胞成骨
YANG 等 <sup>[50]</sup> , 2021	$\gamma$ -干扰素策略	IFN- $\gamma$ /锶离子	小肠黏膜下层	表面吸附 / 化学共轭	IFN- $\gamma$ 在 1 d 内爆发释放，锶离子持续释放 7 d	调节巨噬细胞顺序极化、促血管形成和骨再生
LUO 等 <sup>[51]</sup> , 2021	$\gamma$ -干扰素策略	IFN- $\gamma$ /锶离子	生物活性玻璃	表面吸附 / 化学共轭	IFN- $\gamma$ 在 1 d 内爆发释放，锶离子 1 d 内爆发释放	体外调节巨噬细胞顺序极化和促成骨分化；体内促进骨再生
LI 等 <sup>[52]</sup> , 2018	$\gamma$ -干扰素策略	IFN- $\gamma$ /硅离子	基于硅酸钙- $\beta$ -磷酸三钙的多孔支架	表面吸附 / 化学共轭于 3D 打印支架	IFN- $\gamma$ 在 5 d 内连续释放，硅离子持续释放 7 d	体外调节巨噬细胞顺序极化、促血管化，体内调节巨噬细胞顺序极化和促进皮下血管形成
MA 等 <sup>[53]</sup> , 2022	$\gamma$ -干扰素策略	IFN- $\gamma$ /锶离子 + 镁离子	基于锂皂石的甲基丙烯酸酯化明胶-海藻酸盐-聚乙二醇水凝胶	物理分散至基质 / 化学共轭于 3D 打印支架	IFN- $\gamma$ 持续释放 7 d，锶离子和镁离子持续释放 7 d 后缓释至 21 d	体外诱导巨噬细胞顺序极化和血管生成；体内诱导巨噬细胞顺序极化和血管化骨再生
LI 等 <sup>[54]</sup> , 2022; XUE 等 <sup>[55]</sup> , 2021	微小 RNA 策略	miR-155/ miR-21	基于纳米载体的基质金属蛋白酶敏感水凝胶	纳米载体物理封装于水凝胶 / 纳米载体化学共轭于水凝胶	用于 miR-155 纳米载体 96 h 内大部分释放，用于 miR-21 纳米载体于 96 h 基质金属蛋白酶加入后呈爆发释放	含 miR-155 和 miR-21 纳米颗粒体外分别调节了巨噬细胞 M1 和 M2 极化；加入酶敏感水凝胶系统具有调节巨噬细胞顺序极化的潜力
GUO 等 <sup>[56]</sup> , 2021	生物活性离子策略	铜离子 / 锌离子	双层纳米纤维膜	化学共轭 / 化学共轭	铜离子早期快速释放，锌离子 2 d 后浓度高于铜离子并持续释放	调节巨噬细胞顺序极化；体内促进新骨形成
ZHAO 等 <sup>[57]</sup> , 2021	生物活性离子策略	锌、钙和锶 / IL-4	钛	化学共轭 / 局部注射	锌、钙、锶离子持续释放 2 周，IL-4 第 3-7 天局部给药	体外促进巨噬细胞顺序极化和成骨分化；减少植入物周围纤维层形成、促进骨形成和骨整合

备注：IFN- $\gamma$  为  $\gamma$ -干扰素；IL-4 为白细胞介素 4

实现预期的疗效。

**生物活性离子策略：**鉴于一些生物活性离子可以诱导巨噬细胞向 M1 表型极化，最近研究了这些生物活性离子和其他抗炎物质的顺序交付策略。GUO 等<sup>[56]</sup>构建了双层纳米纤维膜，铜离子早期快速释放及后期锌离子的持续释放，诱导了巨噬细胞由 M1 向 M2 表型转化，加速了体内新骨形成。ZHAO 等<sup>[57]</sup>在钛种植体表面制备了新型钙锶锌磷酸盐涂层，诱导了巨噬细胞 M1 极化，3 d 后白介素 4 以注射方式的局部输送引发了更多促愈合的 M2 表型，在大鼠股骨缺损模型中促进了骨再生和骨整合。但是，生物活性离子往往以化学共轭形式存在于生物材料中，导致在局部环境中持续释放，巨噬细胞 M1 表型极化诱导时间被延长，与 M2 表型重叠而无法匹配骨组织的自然愈合过程，因此生物活性离子在骨组织工程顺序极化策略的应用仍需探索。

(2) 控释策略：顺序激活策略中递送的各组分之间的复杂代谢动力学和生物学分布特点使其协同免疫调节效应复杂化。除了主动递送促炎物质外，植入手术过程中释放的金属颗粒可以促进巨噬细胞向 M1 表型极化，释放肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  等促炎细胞因子诱发炎症反应<sup>[58]</sup>。体内初始伤口以及部分生物材料理化特点，也可以直接引发中度的炎症反应。由于炎症细胞因子水平开始下降的时间是在骨组织工程材料植入后 3 d，因此提出了植入 3 d 内单独交付抗炎物质的免疫调节策略。白细胞介素 4 是促进 M2 表型极化的关键细胞因子之一，单独控制白细胞介素 4 的交付与释放时间，可以维持部分生物材料植入后早期适度炎症反应，而后及时调节 M2 表型转换改变局部免疫微环境，促进成血管反应和骨再生。表 3 总结了近年控制白细胞介素 4 释放的骨组织工程策略。

表 3 | 控制白细胞介素 4 释放的骨组织工程策略

研究者 / 发表年份	IL-4 载体	控释策略	IL-4 交付结果	主要结论
ZHAO 等 <sup>[59]</sup> , 2021	3D 打印钛	局部注射	IL-4 于第 3-7 天局部给药	调节 M1 巨噬细胞向 M2 转化，促进体外成骨分化和体内新骨形成
YIN 等 <sup>[60]</sup> , 2019	钛纳米管	双壳聚糖水凝胶封装于钛纳米管	IL-4 在 3 d 内少量释放并持续释放 10 d	调节 M1 巨噬细胞向 M2 转化，促进体外成骨分化和生物矿化、体内新骨形成
HACHIM 等 <sup>[61]</sup> , 2019	聚丙烯网	物理逐层	MCP-1 持续释放至少 8 d, IL-4 持续释放至少 12 d	体内促进老年小鼠骨髓来源巨噬细胞顺序极化效果更优于年轻小鼠
XU 等 <sup>[62]</sup> , 2023	仿生骨膜	电纺纤维物理封装和壳聚糖水凝胶封装	IL-4 在 3 d 内少量释放，而后大量释放持续 14 d	调节 M1 巨噬细胞向 M2 转化、刺激体外血管化和成骨，体内新血管形成和骨再生

表注：IL-4 为白细胞介素 4；MCP-1 为单核细胞趋化蛋白 1

粗糙的表面特征可以在植入早期诱发持续的 M1 表型极化，ZHAO 等<sup>[59]</sup>通过 3D 打印技术制作了钛植入物，3 d 后在大鼠皮下植入物周围组织人为主动注射白介素 4，促进了巨噬细胞的表型转换和新骨形成。此外，白细胞介素 4 可以沉积在钛纳米管内，并通过在表面建立了海藻酸钠与壳聚糖复合膜实现被动控释，体内外实验均表明了早期温和炎症反应的保持以及良好的骨生成效果<sup>[60]</sup>。近期，将白介素 4 引入仿生人工骨膜的研究正在展开。XU 等<sup>[62]</sup>建立电纺纤维膜封装白介素 4，并在表面附着混合水凝胶层以实现早期控释，维持了早期 M1 巨噬细胞成骨和成血管作用，而后白介素 4 随着凝胶降解发生大量释放，促进了 M2 表型极化。

此外，HACHIM 等<sup>[61]</sup>利用逐层技术在聚丙烯网上加载了单核细胞趋化蛋白 1 和白介素 4，二者顺序释放实现了对 M1 巨噬细胞向 M2 表型极化的调节。但是单核细胞趋化蛋白 1 只促进了老龄小鼠体内巨噬细胞招募行为，M1 巨噬细胞的极化增强主要由于生物材料的植入过程引发的炎症反应，而老年因素也将促进局部炎症环境形成<sup>[63]</sup>。同时体内实验表明年轻小鼠顺序递送细胞因子在极化为促愈合 M2 表型方面不如单独递送白介素 4 有效，说明骨组织工程材料的设计需要正确理解局部环境依赖性的生物反应和适用场景。关于老龄和年轻骨髓源性巨噬细胞和成骨相关细胞之间相互作用的机制和区别比较，仍需要进行更全面的。

### 3 讨论与展望 Discussion and prospects

**3.1 综述结果分析** M1 巨噬细胞是巨噬细胞表型之一，可通过释放促炎细胞因子和趋化因子参与炎症反应的启动过程。HOZAIN 等<sup>[3]</sup>将小鼠体内 M1 巨噬细胞耗尽，改变了早期细胞因子表达谱，损害了骨折愈合，可见早期短暂存在的 M1 巨噬细胞在骨自然愈合环境中发挥着不可或缺的作用。M1 巨噬细胞与血管化、成骨能力和骨组织重塑之间的密切相互作用是决定骨修复再生的重要因素。在血管形成过程中，GRANEY 等<sup>[12]</sup>发现 M1 的短暂存在刺激了血管的初始形成，而持续长期存在超过 3 d 将导致血管生成退化，揭示了研究时间变量的差异可能造成不同的研究结论；在与 BMSCs 交叉串扰中，M1 巨噬细胞提供的早期短暂促炎环境促进了 BMSCs 的迁移和成骨分化，但其中的分子联系和自噬机制仍有待进一步研究；在与 M2 表型联系中，M1 巨噬细胞上调了白细胞介素 4 受体的表达，并促进了随后的 M2 表型转化和功能。所以，早期短暂地诱导激活 M1 巨噬细胞，进而发展促进骨组织生长和血管形成的温和炎性微环境，是骨组织工程材料设计的重要方向。

巨噬细胞的可塑性，即可以随着局部环境的改变而发生表型转换的能力，是实现早期短暂诱导激活 M1 巨噬细胞策略的基础。一种策略是通过生物材料进行理化表面改性修饰或同期结合抗炎因素，组合诱导早期适当的炎症反应微环境，并富含促成骨细胞因子，实现免疫调节并诱导成骨。另一种策略与上述策略的主要区别是巨噬细胞表型的时间分离方式，即更强调在适当的时间点顺序交付外源性免疫调节物质，实现巨噬细胞表型在特定时间上依次调节，以更佳地匹配骨组织自然愈合过程。已有许多研究实现了诱导 M1 表型极化的物质如  $\gamma$ -干扰素、微小 RNA 以及一些生物活性离子联合其他抗炎因素的顺序递送，促进了骨组织生长和血管形成。此外，植入手术过程、损伤以及部分生物材料理化特点也可以诱导中度的炎症反应，在适当的时间点控制 M2 极化调节因子如白细胞介素 4 的适当剂量释放，可以实现早期炎症的保持以及后期 M2 表型的及时转换，具有类似的精确免疫调节作用。总而言之，以上这些策略均诱导激活了巨噬细胞 M1 表型，实现了早期适当免疫微环境的建立，但是距离真正在临床上的应用仍有许多局限性，如表 4 所示。如何进一步优化并分离 M1 和 M2 极化的强度和以符合自然骨愈合过程仍是今后研究的热点，也是骨组织工程材料实现临床应用的关键。

表 4 | 各早期短暂 M1 巨噬细胞激活策略的主要优点及局限性

激活策略	优点	局限性
理化修饰改性	促进 M1 巨噬细胞产生适当炎症反应	(1) 较低 M1 巨噬细胞极化强度或效率； (2) 较高 M1 巨噬细胞极化强度或效率，具有潜在炎症作用的风险； (3) 持续诱导激活 M1 巨噬细胞，无法及时向 M2 表型转化，M1/M2 表型诱导时间重叠而不符合自然骨愈合过程； (4) 化学策略中，生物活性离子的早期释放剂量、速率和生物材料的降解过程难以控制
理化修饰改性同期结合抗炎因素	综合调控了 M1 巨噬细胞产生理想炎症反应	抗炎物质早期释放导致 M2 表型提前激活，巨噬细胞 M1/M2 表型诱导时间重叠而不符合自然骨愈合过程
顺序交付策略	诱导巨噬细胞由 M1 向 M2 表型顺序激活，更注重仿生设计	(1) 多种物质交付时，各组分释放动力学和生物学分布特点往往不一致，尤其多种物质理化性质相似时，需要充分体外内外实验评估； (2) 细胞因子作为诱导激活 M1 和 M2 巨噬细胞的物质时，具有易失活、价格昂贵和释放剂量难以控制导致副作用的特性； (3) 将微小 RNA 作为诱导激活 M1 和 M2 巨噬细胞的物质时，仍需探索合适的基因载体； (4) 生物活性离子的释放剂量、速率和生物材料的降解过程难以控制。作为诱导激活 M1 表型极化的材料时，往往共轭于生物材料中而发生持续释放，或者作为抗炎物质时，往往在材料中过早释放，这些均导致巨噬细胞 M1/M2 表型诱导时间重叠而不符合自然骨愈合过程
控释策略	实现 M1 巨噬细胞的早反应并保持向 M2 表型的及时转变	(1) 需要分析早期生物材料属性、植入过程所引起的细胞介导的早反应和适用人群及场景，保证适当的 M1 巨噬细胞极化强度和效率； (2) 通过控制细胞因子的释放维持早期 M1 巨噬细胞的诱导激活时，需要考虑细胞因子的稳定性、生产成本以及释放剂量的控制问题

**3.2 既往他人在该领域研究的贡献和存在的问题** 随着骨组织工程技术的研究不断深入,人们对骨免疫学的理解不断演变,逐渐认识到骨愈合的过程都是以循序渐近和时间依赖的方式发生的。所有植入的生物材料都会激发宿主免疫系统的反应。虽然宿主炎症反应曾经被认为是一种需要避免的有害力量,但近年来越来越多研究证明,在成骨的早期阶段,M1巨噬细胞介导的早期炎症微环境是有利的,具有促进骨组织再生的功能。目前仅有少数文章关注M1巨噬细胞的早期短暂存在对骨缺损再生的促进作用,并应用于骨组织工程领域。并且尚无文章系统地总结在骨组织工程中早期短暂诱导激活M1巨噬细胞的策略及应用研究进展。因此,文章从该角度切入,对此话题进行了综述。

**3.3 作者综述区别于他人他篇的特点** 本文重点综述了早期短暂存在的M1巨噬细胞在骨组织工程中促进血管形成、促进BMSCs成骨分化以及促进M2表型转化的特性。同时,理想的生物材料应将在相对较低的水平上控制炎症,而不是完全“关闭”炎症,允许调控M1巨噬细胞产生适度的炎症反应,积极开发通过控制时间点诱导M1向M2表型巨噬细胞顺序激活策略或通过控制抗炎因素的释放实现早期适度炎症状态的保持。本文同时指出了当前研究的一些局限性,以引导深入研究,提高骨组织工程材料成功率,并扩大其在骨组织相关领域的应用。

**3.4 综述的局限性** 首先,目前关于早期短暂M1巨噬细胞对骨再生的影响还未建立统一的认识,需要进一步研究明确其机制,因此综述未能对该机制的表述进行充分阐明。其次,在调控巨噬细胞顺序极化的过程中,恰当的激活时间是决定性因素。目前的研究对于早期炎症阶段和后期修复阶段的临界时间点仍存有争议,很难定义M1到M2过渡的准确转折点以及M1和M2表型在不同阶段的峰值。最后,外源性免疫调节物质往往具有易变性、生产成本高和释放动力学难以控制等局限性,基于外部物理刺激智能按需响应的巨噬细胞极化调节策略越来越受到重视,但是目前研究多仅止步于材料表征阶段和巨噬细胞极化的检测,未进行成骨作用的相关实验验证,因此这部分研究未纳入综述。

**3.5 综述的重要意义** 基于早期短暂M1巨噬细胞促进骨再生和血管生成的作用,其在骨组织工程支架上具有良好的应用前景。从远期来看,骨组织工程领域可能朝着如下方向继续发展:①更专注于仿生材料的设计,通过引入包括细胞因子在内的生物活性分子,以维持早期适当的炎症反应过程或促进巨噬细胞顺序极化协同促进骨再生;②应用新型智能响应材料以远程操纵宿主巨噬细胞促进骨组织血管化和骨再生的策略研究具有很大发展潜力;③高级骨组织工程材料的设计应更注意严格准确地设计顺序交付策略,符合骨组织自然愈合期间的表型转换过程。未来将逐渐形成种类丰富、体系完整的材料及相关技术,诱导独立、分割的M1和M2表型并实现顺序极化。

**作者贡献:** 杨雨晴收集文献资料并撰写;陈志宇副教授是项目的负责人,参与论文写作的指导与审核。

**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。

**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。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 文章撰写遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA声明)。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。

## 4 参考文献 References

[1] RANALLETTA M, TANOIRA I, BERTONA A, et al. Autologous Tricortical Iliac Bone Graft for Failed Latarjet Procedures. *Arthrosc Tech.* 2019;8(3): e283-e289.

[2] JAMALPOOR Z, ASGARI A, LASHKARI MH, et al. Modulation of Macrophage Polarization for Bone Tissue Engineering Applications. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2018;17(5):398-408.

[3] HOZAIN S, COTTRELL J. CD11b+ targeted depletion of macrophages negatively affects bone fracture healing. *Bone.* 2020;138:115479.

[4] MICHALSKI MN, MCCAULEY LK. Macrophages and skeletal health. *Pharmacol Ther.* 2017;174:43-54.

[5] MACKANESS GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med.* 1964;120(1):105-120.

[6] ALHAMDJI JR, PENG T, AL-NAGGAR IM, et al. Controlled M1-to-M2 transition of aged macrophages by calcium phosphate coatings. *Biomaterials.* 2019; 196:90-99.

[7] CHEN M, ZHANG Y, ZHOU P, et al. Substrate stiffness modulates bone marrow-derived macrophage polarization through NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Bioact Mater.* 2020;5(4):880-890.

[8] HE S, HOU T, ZHOU J, et al. Endothelial Cells Promote Migration of Mesenchymal Stem Cells via PDGF-BB/PDGFR $\beta$ -Src-Akt in the Context of Inflammatory Microenvironment upon Bone Defect. *Stem Cells Int.* 2022; 2022:1-15.

[9] SPILLER KL, NASSIRI S, WITHEREL CE, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials.* 2015;37:194-207.

[10] XUE D, CHEN E, ZHONG H, et al. Immunomodulatory properties of graphene oxide for osteogenesis and angiogenesis. *Int J Nanomed.* 2018;Volume 13: 5799-5810.

[11] TANG W, YU Y, WANG J, et al. Enhancement and orchestration of osteogenesis and angiogenesis by a dual-modular design of growth factors delivery scaffolds and 26SCS decoration. *Biomaterials.* 2020;232:119645.

[12] GRANEY PL, BEN-SHAUL S, LANDAU S, et al. Macrophages of diverse phenotypes drive vascularization of engineered tissues. *Sci Adv.* 2020;6(18):eaay6391.

[13] LIU C, HE L, WANG J, et al. Anti-angiogenic effect of Shikonin in rheumatoid arthritis by downregulating PI3K/AKT and MAPKs signaling pathways. *J Ethnopharmacol.* 2020;260:113039.

[14] CHENG WX, LIU YZ, MENG XB, et al. PLGA/ $\beta$ -TCP composite scaffold incorporating cucurbitacin B promotes bone regeneration by inducing angiogenesis. *J Orthop Transl.* 2021;31:41-51.

[15] NATHAN K, LU LY, LIN T, et al. Precise immunomodulation of the M1 to M2 macrophage transition enhances mesenchymal stem cell osteogenesis and differs by sex. *Bone Joint Res.* 2019;8(10):481-488.

[16] VALLÉS G, BENSAMAR F, MAESTRO-PARAMIO L, et al. Influence of inflammatory conditions provided by macrophages on osteogenic ability of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):57.

[17] ROMERO-LÓPEZ M, LI Z, RHEE C, et al. Macrophage Effects on Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis in a Three-Dimensional In Vitro Bone Model. *Tissue Eng Part A.* 2020;26(19-20):1099-1111.

[18] XIA Y, HE XT, XU XY, et al. Exosomes derived from M0, M1 and M2 macrophages exert distinct influences on the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PeerJ.* 2020;8:e8970.

[19] LIU K, LUO X, LV ZY, et al. Macrophage-Derived Exosomes Promote Bone Mesenchymal Stem Cells Towards Osteoblastic Fate Through microRNA-21a-5p. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;9:801432.

[20] WANG S, XIAO L, PRASADAM I, et al. Inflammatory macrophages interrupt osteocyte maturation and mineralization via regulating the Notch signaling pathway. *Mol Med.* 2022;28(1):102.

[21] KANG M, HUANG CC, LU Y, et al. Bone regeneration is mediated by macrophage extracellular vesicles. *Bone.* 2020;141:115627.

[22] WU MY, LU JH. Autophagy and Macrophage Functions: Inflammatory Response and Phagocytosis. *Cells.* 2019;9(1):70.

[23] LUO Q, LI X, ZHONG W, et al. Dicalcium silicate-induced mitochondrial dysfunction and autophagy-mediated macrophagic inflammation promotes osteogenic differentiation of BMSCs. *Regen Biomater.* 2022;9:rbab075.

[24] YANG L, XIAO L, GAO W, et al. Macrophages at Low-Inflammatory Status Improved Osteogenesis via Autophagy Regulation. *Tissue Eng Part A.* 2021. doi: 10.1089/ten.TEA.2021.0015.

- [25] O'BRIEN EM, SPILLER KL. Pro-inflammatory polarization primes macrophages to transition into a distinct M2-like phenotype in response to IL-4. *J Leukoc Biol.* 2022;111(5):989-1000.
- [26] PHILIPP D, SUHR L, WAHLERS T, et al. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells highly strengthens their potential to promote IL-6-dependent M2b polarization. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1):286.
- [27] RÓSZER T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:1-16.
- [28] NAKAO Y, FUKUDA T, ZHANG Q, et al. Exosomes from TNF- $\alpha$ -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss. *Acta Biomater.* 2021;122:306-324.
- [29] LIU SX, GUSTAFSON HH, JACKSON DL, et al. Trajectory analysis quantifies transcriptional plasticity during macrophage polarization. *Sci Rep.* 2020; 10(1):1-9.
- [30] HE Y, YANG X, YUAN Z, et al. Regulation of MSC and macrophage functions in bone healing by peptide LL-37-loaded silk fibroin nanoparticles on a titanium surface. *Biomater Sci.* 2019;7(12):5492-5505.
- [31] SU J, DU Z, XIAO L, et al. Graphene oxide coated Titanium Surfaces with Osteoimmunomodulatory Role to Enhance Osteogenesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;113:110983.
- [32] WANG Z, NIU Y, TIAN X, et al. Switching on and off macrophages by a "bridge-burning" coating improves bone-implant integration under osteoporosis. *Adv Funct Mater.* 2021; 31(7):2007408.
- [33] ZHU P, LAI C, CHENG M, et al. Differently charged P (VDF-TrFE) membranes influence osteogenesis through differential immunomodulatory function of macrophages. *Front Mater.* 2022;8:790753.
- [34] 许晴. 生物活性陶瓷复合材料制备及其抗菌和再生修复研究 [D]. 上海: 中国科学院大学 (中国科学院上海硅酸盐研究所), 2021.
- [35] BAI X, LIU W, XU L, et al. Sequential macrophage transition facilitates endogenous bone regeneration induced by Zn-doped porous microcrystalline bioactive glass. *J Mat Chem B.* 2021;9(12):2885-2898.
- [36] LIANG L, SONG D, WU K, et al. Sequential activation of M1 and M2 phenotypes in macrophages by Mg degradation from Ti-Mg alloy for enhanced osteogenesis. *Biomater Res.* 2022;26(1):17.
- [37] CHINIPARDAZ Z, ZHONG JM, YANG S. Regulation of LL-37 in Bone and Periodontium Regeneration. *Life (Basel).* 2022;12(10):1533.
- [38] 何逸恒, 程鸣威, 朱培君, 等. 电活性生物膜促进大鼠的体内成骨 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(28):4446-4451.
- [39] CHE H, SELIG M, ROLAUFFS B. Micro-patterned cell populations as advanced pharmaceutical drugs with precise functional control. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022;184:114169.
- [40] SRIDHARAN R, GENOUD KJ, KELLY DJ, et al. Hydroxyapatite Particle Shape and Size Influence MSC Osteogenesis by Directing the Macrophage Phenotype in Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds. *ACS Appl Bio Mater.* 2020;3(11):7562-7574.
- [41] ZHENG Z, CHEN Y, HONG H, et al. The "Yin and Yang" of Immunomodulatory Magnesium-Enriched Graphene Oxide Nanoscrolls Decorated Biomimetic Scaffolds in Promoting Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(2):2000631.
- [42] CHEN Z, CHEN L, LIU R, et al. The osteoimmunomodulatory property of a barrier collagen membrane and its manipulation via coating nanometer-sized bioactive glass to improve guided bone regeneration. *Biomater Sci.* 2018;6(5):1007-1019.
- [43] 刘真真. 仿生基质的两种物理性质对巨噬细胞表型的影响及机制的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2021.
- [44] HE XT, LI X, XIA Y, et al. Building capacity for macrophage modulation and stem cell recruitment in high-stiffness hydrogels for complex periodontal regeneration: Experimental studies in vitro and in rats. *Acta Biomater.* 2019;88:162-180.
- [45] 黄千里. 医用钛合金的选择性激光熔化成型与钛表面电化学改性 [D]. 北京: 清华大学, 2017.
- [46] GAO L, LI M, YIN L, et al. Dual-inflammatory cytokines on TiO<sub>2</sub> nanotube-coated surfaces used for regulating macrophage polarization in bone implants. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106(7):1878-1886.
- [47] CHEN J, LI M, YANG C, et al. Macrophage phenotype switch by sequential action of immunomodulatory cytokines from hydrogel layers on titania nanotubes. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018;163:336-345.
- [48] YANG PM, MU HZ, ZHANG YS, et al. Sequential release of immunomodulatory cytokines binding on nano-hydroxyapatite coated titanium surface for regulating macrophage polarization and bone regeneration. *Med Hypotheses.* 2020;144:110241.
- [49] ALHAMDJI J. Modulating Aged Macrophages and Osteoprogenitors with a Calcium Phosphate Drug Delivery System. University of Connecticut. 2018.
- [50] YANG L, ZHOU J, YU K, et al. Surface modified small intestinal submucosa membrane manipulates sequential immunomodulation coupled with enhanced angio- and osteogenesis towards ameliorative guided bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;119:111641.
- [51] LUO M, ZHAO F, LIU L, et al. IFN- $\gamma$ /SrBG composite scaffolds promote osteogenesis by sequential regulation of macrophages from M1 to M2. *J Mater Chem B.* 2021;9(7):1867-1876.
- [52] LI T, PENG M, YANG Z, et al. 3D-printed IFN- $\gamma$ -loading calcium silicate- $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold sequentially activates M1 and M2 polarization of macrophages to promote vascularization of tissue engineering bone. *Acta Biomater.* 2018;71:96-107.
- [53] MA Z, HE H, DENG C, et al. 3D bioprinting of proangiogenic constructs with induced immunomodulatory microenvironments through a dual cross-linking procedure using laponite incorporated bioink. *Compos B Eng.* 2022; 229:109399.
- [54] LI X, XUE S, ZHAN Q, et al. Sequential Delivery of Different MicroRNA Nanocarriers Facilitates the M1-to-M2 Transition of Macrophages. *ACS Omega.* 2022;7(9):8174-8183.
- [55] XUE S, LI X, LI S, et al. Bone fracture microenvironment responsive hydrogel for timing sequential release of cargoes. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2021;629:127413.
- [56] GUO G, XU Q, ZHU C, et al. Dual-temporal bidirectional immunomodulation of Cu-Zn Bi-layer nanofibrous membranes for sequentially enhancing antibacterial activity and osteogenesis. *Appl Mater Today.* 2021;22:100888.
- [57] ZHAO DW, ZUO KQ, WANG K, et al. Interleukin-4 assisted calcium-strontium-zinc-phosphate coating induces controllable macrophage polarization and promotes osseointegration on titanium implant. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;118:111512.
- [58] TOLEDANO-SERRABONA J, BOSCH BM, DÍEZ-TERCERO L, et al. Evaluation of the inflammatory and osteogenic response induced by titanium particles released during implantoplasty of dental implants. *Sci Rep.* 2022; 12(1):15790.
- [59] ZHAO DW, REN B, WANG HW, et al. 3D-printed titanium implant combined with interleukin 4 regulates ordered macrophage polarization to promote bone regeneration and angiogenesis. *Bone Joint Res.* 2021;10(7):411-424.
- [60] YIN X, LI Y, YANG C, et al. Alginate/chitosan multilayer films coated on IL-4-loaded TiO<sub>2</sub> nanotubes for modulation of macrophage phenotype. *Int J Biol Macromol.* 2019; 133:503-513.
- [61] HACHIM D, IFTIKHAR A, LOPRESTI ST, et al. Distinct release strategies are required to modulate macrophage phenotype in young versus aged animals. *J Control Release.* 2019;305:65-74.
- [62] XU Z, WU L, TANG Y, et al. Spatiotemporal Regulation of the Bone Immune Microenvironment via Dam-Like Biphasic Bionic Periosteum for Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2023;12(1):e2201661.
- [63] BARRETT JP, COSTELLO DA, O'SULLIVAN J, et al. Bone marrow-derived macrophages from aged rats are more responsive to inflammatory stimuli. *J Neuroinflammation.* 2015;12(1):67.

(责任编辑: ZN, WL, LWJ)