

羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层材料的理化性质及生物相容性

李丛丛¹, 吾凡别克·巴合提^{1,2}, 赵莉¹, 陈晓涛¹, 孔垂范¹, 俞敏¹

<https://doi.org/10.12307/2025.584>

投稿日期: 2024-09-12

采用日期: 2024-11-22

修回日期: 2025-01-13

在线日期: 2025-01-23

中图分类号:

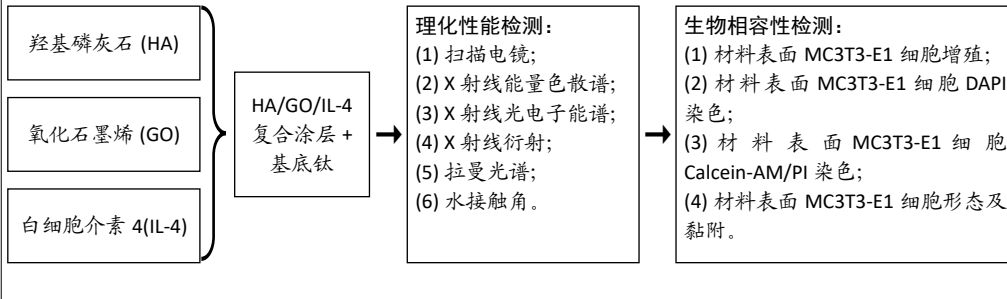
R459.9; R318.08; R783.4

文章编号:

2095-4344(2026)02-00404-10

文献标识码: B

文章快速阅读: 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 复合涂层的生物学性能



文题释义:

氧化石墨烯: 是石墨烯的一种含氧衍生物, 具有优异的物理化学性能及生物相容性, 能够与生物分子相互作用。氧化石墨烯存在 π - π 共轭结构特征和高比表面积, 从而具有输送蛋白质和化学药物载体的潜力。

白细胞介素4: 是一种主要由活化T淋巴细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞等产生的多效性细胞因子。白细胞介素4可抑制损伤的初始炎症反应, 并且可调节细胞外基质如何被修饰、分解和重建以进行有效修复, 因此, 负载白细胞介素4的植入物在局部环境控制方面具有巨大的优势和潜力。

摘要

背景: 纯钛及钛合金种植体因良好的生物相容性及弹性模量被广泛应用于种植修复领域, 但钛基种植体表面的生物惰性导致其与周围骨组织的整合性较差, 需要进行表面修饰提高钛基种植体的骨整合能力。

目的: 在纯钛片表面制备羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4涂层材料, 探究涂层材料的理化性能与生物相容性。

方法: 通过电化学沉积法及浸泡冻干法在钛片表面制备负载羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4涂层, 同时制备负载白细胞介素4的钛片与负载羟基磷灰石/氧化石墨烯涂层的钛片, 表征纯钛片及上述3种钛片的理化性能。将MC3T3-E1细胞分别接种于纯钛片及上述3种钛片的表面, 通过CCK-8、DAPI染色检测细胞增殖, Calcein-AM/PI染色检测细胞活性, 扫描电镜观察细胞形态与黏附。

结果与结论: ①扫描电镜、X射线能量色散谱、X射线光电子能谱、X射线衍射谱、拉曼光谱检测显示, 在钛片表面成功制备了羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4涂层。羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组水接触角大于纯钛组、羟基磷灰石/氧化石墨烯组, 小于白细胞介素4组。②CCK-8、DAPI染色结果显示, 羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4涂层可促进MC3T3-E1细胞增殖。Calcein-AM/PI染色结果显示, 羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4涂层组MC3T3-E1细胞活性较高, 较少见死细胞。扫描电镜下可见MC3T3-E1细胞黏附于4组材料表面, 细胞形态良好, 相较于纯钛组, 白细胞介素4组MC3T3-E1细胞伸出伪足更多, 细胞间联系更加紧密, 黏附面积更大; 相较于羟基磷灰石/氧化石墨烯组, 羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组MC3T3-E1细胞伸出伪足更多, 细胞间联系更加紧密, 黏附面积更大。③结果表明, 羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4涂层具有良好的理化性能及生物学性能。

关键词: 氧化石墨烯; 羟基磷灰石; 白细胞介素4; 种植体复合涂层; MC3T3-E1细胞; 生物相容性; 工程化材料

Physicochemical properties and biocompatibility of hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 composite coating materials

Li Congcong¹, Wufanbieke-Baheti^{1,2}, Zhao Li¹, Chen Xiaotao¹, Kong Chuifan¹, Yu Min¹

¹Department of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Affiliated Hospital of Stomatology, School of Stomatology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310000, Zhejiang Province, China
Li Congcong, Master candidate, Department of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Wufanbieke-Baheti, MD, Department of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; Affiliated Hospital of Stomatology, School of Stomatology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310000, Zhejiang Province, China

¹新疆维吾尔自治区人民医院口腔科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000; ²浙江大学医学院口腔医学院附属口腔医院, 浙江省杭州市 310000

第一作者: 李丛丛, 女, 1999年生, 辽宁省葫芦岛市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事口腔生物材料及组织工程基础研究。

通讯作者: 吾凡别克·巴合提, 医学博士, 新疆维吾尔自治区人民医院口腔科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000; 浙江大学医学院口腔医学院附属口腔医院, 浙江省杭州市 310000

<https://orcid.org/0009-0003-2245-5647> (李丛丛)

基金资助: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2023D01C78), 项目负责人: 吾凡别克·巴合提

引用本文: 李丛丛, 吾凡别克·巴合提, 赵莉, 陈晓涛, 孔垂范, 俞敏. 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层材料的理化性质及生物相容性 [J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(2):404-413.



Abstract

BACKGROUND: Pure titanium and titanium alloy implants are widely used in the field of implant restoration due to their excellent biocompatibility and elastic modulus. However, the biological inertness of the surface of titanium-based implants leads to poor integration with surrounding bone tissues, and surface modification is required to improve the bone integration ability of titanium-based implants.

OBJECTIVE: To fabricate hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 composite coatings on pure titanium substrates, and to investigate their physicochemical properties and biocompatibility of the coating materials.

METHODS: Hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 composite coatings were prepared on pure titanium substrates by electrochemical deposition and freeze-drying. Titanium sheets loaded with interleukin-4 and titanium sheets loaded with hydroxyapatite/graphene oxide coatings were prepared at the same time, and the physicochemical properties of pure titanium sheets and the above three titanium sheets were characterized. MC3T3-E1 cells were inoculated on the surfaces of pure titanium sheets and the above three titanium sheets, respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay and DAPI staining. Cell activity was detected by Calcein-AM/PI staining. Cell morphology and adhesion were observed by scanning electron microscopy.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Scanning electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction, and Raman spectroscopy confirmed the successful fabrication of the hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 composite coating on the titanium surface. The water contact angle of hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 group was larger than that of pure titanium group and hydroxyapatite/graphene oxide group, and smaller than that of interleukin-4 group. (2) CCK-8 assay and DAPI staining results showed that hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 coating could promote the proliferation of MC3T3-E1 cells. Calcein-AM/PI staining results showed that MC3T3-E1 cells in hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 coating group had higher activity and fewer dead cells. Scanning electron microscopy showed that MC3T3-E1 cells adhered to the surfaces of the four groups of materials with good cell morphology. Compared with the pure titanium group, the MC3T3-E1 cells in the interleukin-4 group extended more pseudopodia, the cell-cell connections were closer, and the adhesion area was larger; compared with the hydroxyapatite/graphene oxide group, the MC3T3-E1 cells in the hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 group extended more pseudopodia, the cell-cell connections were closer, and the adhesion area was larger. (3) These findings indicate that the hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 composite coating possesses favorable physicochemical and biological properties.

Key words: graphene oxide; hydroxyapatite; interleukin-4; implant composite coating; MC3T3-E1 cell; biocompatibility; engineered materials

Funding: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2023D01C78 (to WB)

How to cite this article: LI CC, BAHETI W, ZHAO L, CHEN XT, KONG CF, YU M. Physicochemical properties and biocompatibility of hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 composite coating materials. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2026;30(2):404-413.

0 引言 Introduction

牙列缺损和缺失是口腔医学的重要疾病^[1], 通过种植牙进行修复是现阶段较好的治疗方式^[2], 但是目前纯钛种植体有骨整合不足等缺点^[3], 需要进行表面修饰提高其骨整合能力^[4]。在生物活性涂层中, 羟基磷灰石因优异的化学组成和晶体结构可作为缓释载体, 从而促进成骨细胞的分化。羟基磷灰石常应用于修饰种植体表面^[5], 是目前最常用的一种骨再生材料^[6]。有研究显示, 通过改变羟基磷灰石的组成、形态和表面特性可增强材料的机械强度、控制药物释放能力并提高生物降解性, 使羟基磷灰石能够在药物递送系统、生物传感器、组织工程支架和再生医学中得到应用^[7]。石墨烯基材料由于独特的物理化学性能及良好的生物相容性, 被广泛应用于各种生物领域^[8]。氧化石墨烯可促进骨髓间充质干细胞和成骨细胞的增殖^[9], 以及骨髓间充质干细胞的成骨分化^[10]。氧化石墨烯具有较大的表面积和高孔隙率, 使它成为极具吸引力和发展前景的纳米级增强填料, 同时也是一种吸附蛋白或药物的理想载体, 因此, 越来越多的研究者致力于羟基磷灰石/石墨烯复合材料的制备研究^[11-13]。近年来, 生物材料领域的科学家们探索了氧化石墨烯与羟基磷灰石的复合制备方法, 其中电化学方法尤为受到关注^[14-15], 例如: AKRAM 等^[16]通过电化学方法成功制备了具有良好相容性、无毒和抗菌性的医用级羟基磷灰石/氧化锌纳米复合涂层, WU 等^[17]通过电化学法制备出兼具优异机械性能、卓越抗菌能力和骨诱导特性的利奈唑胺/锶包裹羟基磷灰石/氧化石墨烯纳米复合材料。前期研究通过电化学方法将羟基磷灰

石/氧化石墨烯复合材料成功涂覆在钛种植体上, 发现复合材料中氧化石墨烯含量为 2% 时骨髓间充质干细胞的成骨分化显著增强^[13]。尽管前期研究取得了良好的成骨效果, 但在种植体使用上仍存在不足, 例如与种植体“异物”特性相关的无菌性炎症反应导致的骨整合不良, 甚至骨破坏, 对种植体的存活造成极大威胁。种植体周围炎是种植牙失败的主要原因^[18], 因此, 种植体植入后的免疫反应在预后中起着关键作用, 对种植体及其免疫调节效应的相关研究将为种植体表面设计提供理论基础。

白细胞介素 4 是一种抗炎细胞因子, 可触发巨噬细胞的 M2 表型极化^[19]。近期研究发现, 将白细胞介素 4 加载到生物材料表面可明显促进干细胞的成骨分化和组织愈合^[20], 并且白细胞介素 4 对多种炎症疾病模型有治疗作用^[21-22]。因此, 负载白细胞介素 4 的植入物可诱导巨噬细胞极化实现相关免疫应答, 从而调节局部骨免疫微环境, 在促进成骨中具有极大的优势和潜力。此次研究将白细胞介素 4 通过浸泡冻干法负载在羟基磷灰石/氧化石墨烯复合涂层上, 系统研究其理化性能以及对小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E 的生物相容性, 为选择具有生物活性的功能型材料提供参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料制备与表征, 体外细胞学实验, 组间比较采用单因素方差分析, 事后比较采用 Bonferroni 法或 Tamhane'T2 法。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 12 月至 2024 年 8 月在新疆

维吾尔自治区人民医院医技楼医学研究与转化中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 主要材料与试剂 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1(CL0813, 丰晖生物科技有限公司, 湖南); TA1 级商用纯钛片 (TA1, 海源科研金属有限公司, 广东); 纳米羟基磷灰石 (TX21249, 颖心实验室设备有限公司, 上海); 氧化石墨烯水溶液 (XF224-1, 苏州先丰纳米有限公司, 江苏); 重组小鼠白细胞介素 4(abs04697, 爱必信生物科技有限公司, 上海); α -MEM(C12571500BT, Gibco, 美国); 0.25% 胰蛋白酶 (C25200-056, Gibco, 美国); 特级胎牛血清 (13011-8611, 杭州四季青生物工程材料有限公司, 浙江); PBS(BL302A, Biosharp, 安徽白鲨生物科技有限公司); 青霉素-链霉素混合液 (P7630, 北京索莱宝科技有限公司, 北京); CCK-8 试剂盒 (CA1210, 北京索莱宝科技有限公司, 北京); Calcein-AM/PI 双染试剂盒 (CA1630, 北京索莱宝科技有限公司, 北京); DAPI 溶液 (28718-90-3, Biosharp, 安徽白鲨生物科技有限公司)。

1.3.2 主要仪器 电子分析天平 (Sartorius, 德国); 超声波清洗器 (SK5200LH, 上海科导超声仪器有限公司); 磁力加热搅拌器 (上海科兴仪器有限公司, 上海); 超净工作台; CO₂ 恒温培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 倒置荧光显微镜透射电镜 (Nikon, 日本); 扫描电镜 (Zeiss Supra55 VP, 德国蔡司); X 射线能量色散谱仪 (Bruker X-Flash SDD 5010, 德国布鲁克公司); 阳极氧化电源 (MATSUSADA, 日本); 酶标仪 (SuPerMax 3100 型多功能酶标仪, 上海闪普生物科技有限公司); X 射线衍射仪 (D8 ADVANCE Plus, 德国); X 射线光电子能谱仪 (PHI 5000VersaProbe, 美国); 拉曼光谱仪 (Horiba LabRAM HR Evolution, 日本); 接触角测量仪 (SZ-CAMC32, 上海轩准仪器有限公司, 上海)。

1.4 实验方法

1.4.1 钛片表面涂层的制备 用 #600-#1 200 水砂纸逐号抛光 $\Phi 1\text{ cm} \times 0.1\text{ cm}$ 大小的圆形钛片并打磨边缘, 随后在丙酮中超声 (40 kHz) 清洗 30 min, 无水乙醇中超声 (40 kHz) 清洗 30 min, 去离子水中超声 (40 kHz) 清洗 15 min, 最终保存在无水乙醇中。

电解液的制备: 将 200 mg 纳米级羟基磷灰石粉末加入 50 mL 无水乙醇中, 置于磁力搅拌器 (37 °C, 搅拌速率为 180 r/min) 中持续搅拌 3 h, 之后缓慢滴加 0.8 mL 氧化石墨烯溶液 (5 mg/mL)^[13], 继续磁力搅拌 3 h, 最后用硝酸 (HNO₃) 调节电解液 pH 值 =3.0-4.0。

涂层的制备: 采用电化学沉积法制备羟基磷灰石 / 氧化石墨烯涂层。将羟基磷灰石 / 氧化石墨烯电解液置于 37 °C

电解槽中, 将石墨棒当作阳极、钛片当作阴极, 磁力搅拌器持续搅拌, 搅拌速度为 180 r/min, 在 30 V、0.8 mA/cm² 恒定电压电流下沉积 2 min, 室温自然干燥 24 h, 得到羟基磷灰石 / 氧化石墨烯涂层。

细胞因子的吸附: 重组小鼠白细胞介素 4 溶解于去离子水中, 得到 2 $\mu\text{g/mL}$ 白细胞介素 4 溶液^[23]。将负载羟基磷灰石 / 氧化石墨烯涂层的钛片浸泡在白细胞介素 4 溶液中 24 h, 全程避光; 随后置于 -20 °C 条件下冷冻过夜后冻干 1 d, 用 PBS 洗去未吸附的白细胞介素 4, 获得负载羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层钛片。同理制备负载白细胞介素 4 的钛片。

1.4.2 各组钛片理化性能的检测与表征 采用单反相机及扫描电镜观察纯钛片、负载白细胞介素 4 钛片、负载羟基磷灰石 / 氧化石墨烯涂层钛片与负载羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层钛片的表面形貌特征。采用 X 射线能量色散谱分析负载羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层钛片表面的元素及种类。采用 X 射线光电子能谱仪对上述 4 组样品表面元素定量分析。采用 X 射线衍射仪确定上述 4 组样品的物相组成。采用拉曼光谱测定上述 4 组样品的化学基团。采用接触角测量仪测量去离子水滴在上述 4 组样品表面 1 s 和 30 s 的静态接触角, 评估材料表面亲水性能。

1.4.3 细胞培养 用完全培养基 (含体积分数 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 α -MEM 培养基) 培养 MC3T3-E1 细胞, 置于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 饱和湿度培养箱内, 隔天更换一次培养基。待细胞融合度达 85% 以上时传代。选用第 3 代细胞进行后续实验。

1.4.4 各组钛片的生物相容性检测

实验分组: 将 4 组样品在超净工作台中紫外线消毒 2 h, 用 PBS 润洗后放入细胞培养箱中平衡 10 min。将 MC3T3-E1 细胞悬液接种于 4 组样品表面, 细胞密度为 5×10^4 / 孔, 置于恒温培养箱中 10 min 后补加完全培养基至 1 mL, 隔天换液。

细胞增殖: 培养 4, 7 d 后, 每孔加入 10% CCK-8 溶液继续孵育 1 h, 利用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值。每组重复检测 3 次。

DAPI 染色: 培养 4, 7 d 后进行 DAPI 染色, 在荧光倒置显微镜下观察细胞增殖情况。

Calcein-AM/PI 染色: 培养 1, 4 d 后进行 Calcein-AM/PI 染色, 使用荧光倒置显微镜拍摄荧光图像。利用 Image J 软件对活细胞和死细胞数量进行定量分析。

扫描电镜观察: 培养 4, 7 d 后, 用 PBS 润洗 1 次, 置于预冷的 2.5% 戊二醛固定液中于 4 °C 条件下过夜; 用 PBS 浸洗 2 次, 每次 10 min; 在不同体积分数乙醇溶液中梯度脱

水 15 min, 保存在叔丁醇溶液中 4 °C 冷藏过夜; 置于 -88 °C 条件下冻干样品, 通过扫描电镜观察材料表面细胞形态及黏附情况。

1.5 主要观察指标 4 组钛片的理化性能表征结果, 以及与 MC3T3-E1 细胞的生物相容性。

1.6 统计学分析 采用统计学软件 SPSS 27.0 对数据进行统计分析, 使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件和 Origin 2021 进行图形化分析, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示定量数据。组间比较采用单因素方差分析, 事后比较采用 Bonferroni 法或 Tamhane' T2 法。双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。以上所有实验均重复 3 次。该文统计学方法经新疆医科大学基础医学院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 各组钛片的表面形貌 大体观察显示, 纯钛组经水砂纸逐号抛光后表面光滑, 反射出特有的金属光泽; 白细胞介素 4 组钛片表面依旧如“镜面”般光滑, 外观同纯钛组; 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组钛片表面呈低饱和度的乳白色, 边缘接触电极夹处可见未沉积涂层, 显露金属基底; 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组钛片表面呈高饱和度的乳白色, 涂层材料涂覆均匀, 见图 1。

扫描电镜下观察 4 组钛片的微观形貌, 见图 2。低倍镜下, 纯钛组和白细胞介素 4 组可见抛光打磨时留下的条状磨损; 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组和羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组涂层完全覆盖钛基底, 未见条状磨损, 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组表面可见褶皱状颗粒, 颗粒大小较为均匀, 氧化石墨烯和羟基磷灰石材料涂覆均匀, 无裂痕, 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组表面无褶皱状颗粒, 较羟基磷灰石 / 氧化石墨烯涂层组更加光滑致密, 表面可见细小裂纹。高倍镜下, 纯钛组和白细胞介素 4 组表面可见放大的条状磨损及打磨留下的凹坑; 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组表面覆盖“珊瑚”状涂层材料, 可见底层为块状覆盖的氧化石墨烯, 上层为“盐晶”状的羟基磷灰石结晶结构; 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组表面可见明显裂纹, 呈多层大块“珊瑚”状, 这可能是冻干过程中白细胞介素 4 溶液中的去离子水迅速升华导致下部氧化石墨烯的断裂产生, 并且相较于羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组, 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组表面可见许多成簇的圆形蛋白样结构, 表明羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组成功吸附白细胞介素 4。

2.2 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组钛片表面 X 射线能量色散谱检测结果 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白

细胞介素 4 组含有 O、C、P、Ca 元素且分布均匀, 见图 3。由于空气中含有油脂等有机物, 很容易吸附到样品表面, 并且氧化石墨烯主要由具有碳-碳双键芳香环组成的石墨烯基底与氧原子基团结合而成, 因此 O 和 C 元素质量分数合计达 81.09%; 羟基磷灰石的晶体结构是由 Ca^{2+} 离子和 PO_4^{3-} 离子排列组成的, 因此涂层中含有 P 和 Ca 元素; 未检测到钛元素含量, 说明羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层的涂覆具有较高的致密度, 见表 1。

表 1 | 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层中的各元素质量分数 (%)

Table 1 | Mass fraction of each element in hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin-4 composite coating

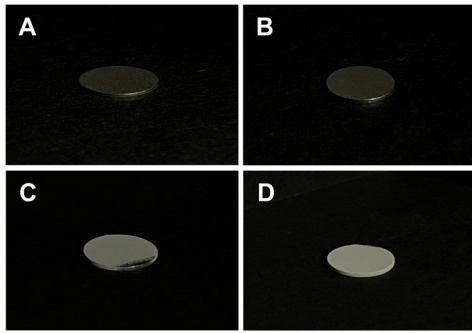
元素	质量分数	原子结构
O	45.15	61.68
C	35.94	19.60
P	14.09	9.95
Ca	4.82	8.78
合计	100	100

2.3 各组钛片表面的 X 射线光电子能谱分析结果 各组钛片表面的 X 射线光电子能谱图, 见图 4。与纯钛组和白细胞介素 4 组相比, 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组和羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组钛片表面出现了 Ca2p、P2p 等元素波峰, 这些元素均为羟基磷灰石中的组成成分, 但该两组未检测到 Ti2p 波峰, 说明涂层材料完全涂覆在钛基底表面, 这与 X 射线能量色散谱分析结果一致。

2.4 各组钛片的 X 射线衍射分析结果 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组和羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组具有特征性羟基磷灰石和氧化石墨烯衍射峰以及基底钛衍射峰, 白细胞介素 4 组和纯钛组仅检测到钛衍射峰, 见图 5。此次分析进一步证明了通过电化学方法成功沉积羟基磷灰石 / 氧化石墨烯涂层在钛基底表面。

2.5 各组钛片的拉曼光谱分析结果 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组、羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组可见明显的 G 峰和 D 峰, 其中 G 峰为氧化石墨烯特征性的 Sp^2 结构, D 峰为氧化石墨烯无序振动引起的特征峰; 纯钛组和白细胞介素 4 组光谱未出现任何峰值, 见图 6, 这些具有代表性信号的 D 波段和 G 波段, 有力地证明了氧化石墨烯已成功共轭至涂层表面。

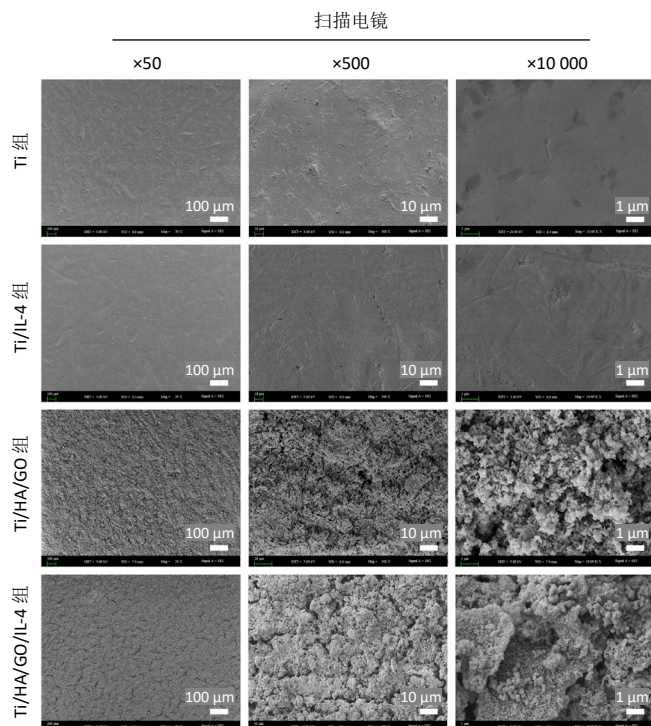
2.6 各组样品表面接触角测试结果 各组钛片表面的水接触角图像, 见图 7。定量分析结果显示, 去离子水滴于材料表面 1 s 时, 白细胞介素 4 组、羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组水接触角大于纯钛组、羟基磷灰石 / 氧化石墨



图注：图中 A-D 分别为纯钛组、白细胞介素 4 组、羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组和羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组。

图 1 | 各组钛片表面大体观

Figure 1 | Macroscopic surface morphology of surface of titanium sheets of the four sample groups

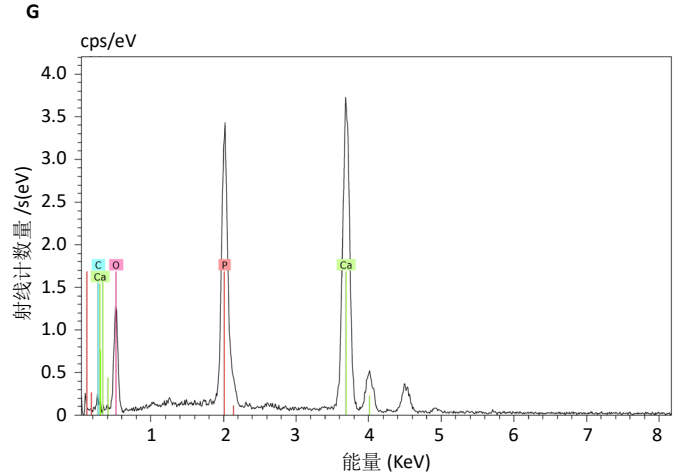
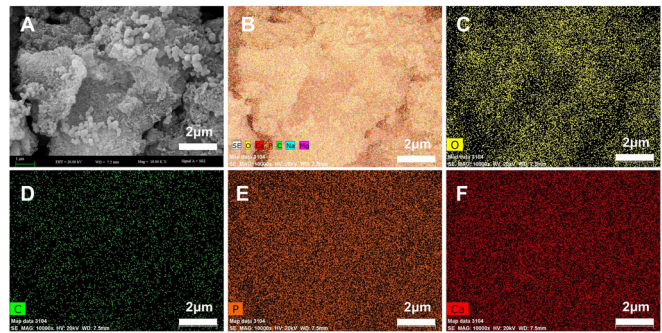


图注：Ti 为纯钛，IL-4 为白细胞介素 4，HA 为羟基磷灰石，GO 为氧化石墨烯。Ti 组和 Ti/IL-4 组表面可见条状磨损及打磨留下的凹坑；Ti/HA/GO 组、Ti/HA/GO/IL-4 组表面覆盖呈“珊瑚”状涂层材料，并且羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组表面可见明显裂纹及大量成簇的圆形蛋白样结构。

图 2 | 各组钛片表面的微观形貌

Figure 2 | Microscopic morphology of the titanium sheet surface in each group

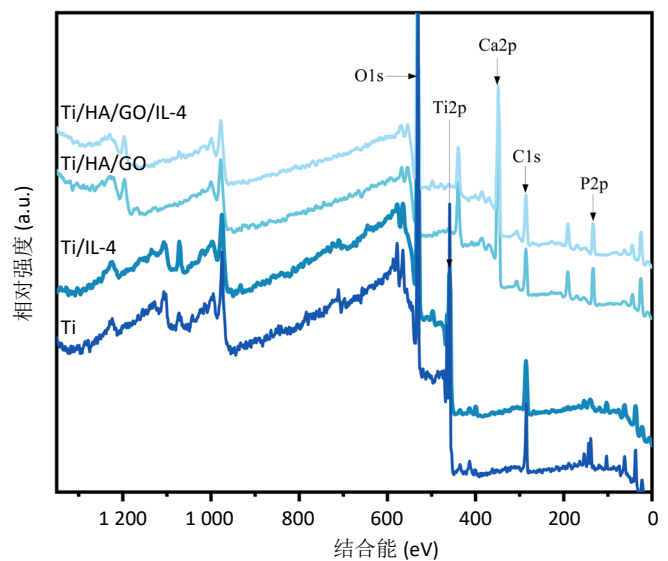
烯组 ($P < 0.001$)，纯钛组水接触角大于羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组 ($P < 0.001$)，白细胞介素 4 组水接触角大于羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组 ($P < 0.001$)；去离子水滴于材料表面 30 s 时，白细胞介素 4 组水接触角大于其他 3 组 ($P < 0.001$)，纯钛组、羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组水接触角大于羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组 ($P < 0.001$)，见图 8。



图注：图 A 为扫描电镜图；B 为 Merge 图；C-F 分别为 O、C、P、Ca 元素分布图；G 为 X 射线能量色散图谱，可见涂层中含有 O、C、P 和 Ca 元素。

图 3 | 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层的 X 射线能量色散检测结果

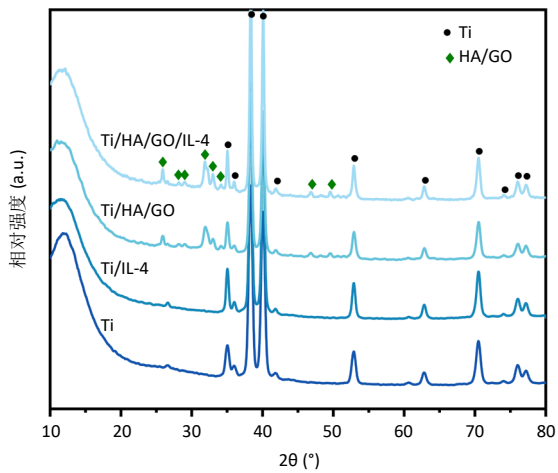
Figure 3 | X-ray energy dispersion test results of hydroxyapatite/graphene oxide/interleukin 4 coating



图注：Ti 为纯钛，IL-4 为白细胞介素 4，HA 为羟基磷灰石，GO 为氧化石墨烯。

图 4 | 各组钛片表面的 X 射线光电子能谱图

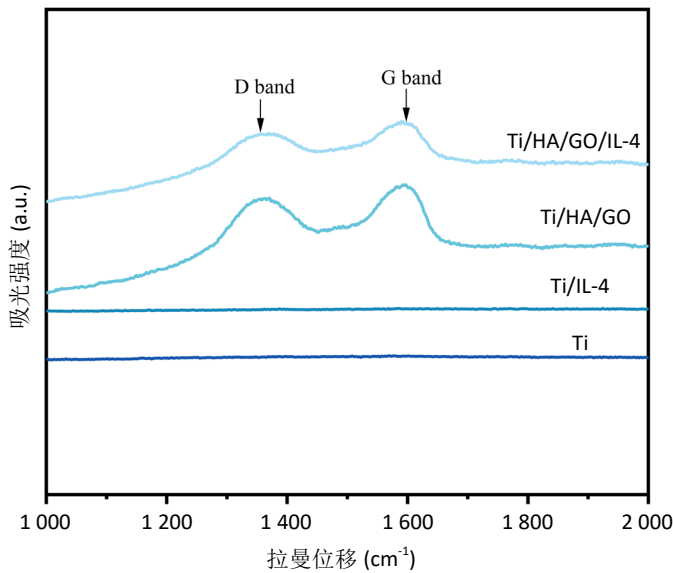
Figure 4 | X-ray photoelectron spectra of the titanium sheet surfaces of each group



图注: Ti 为纯钛, IL-4 为白细胞介素 4, HA 为羟基磷灰石, GO 为氧化石墨烯。

图 5 | 各组钛片的 X 射线衍射能谱图

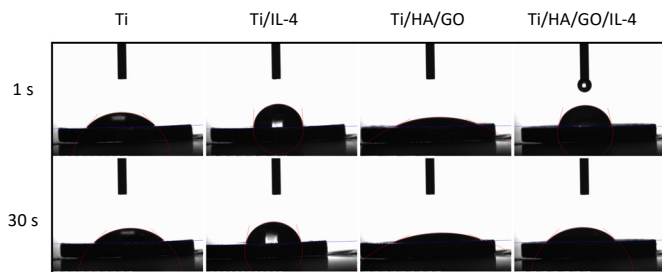
Figure 5 | X-ray diffraction spectra of each group of titanium sheets



图注: 与 Ti 为纯钛, IL-4 为白细胞介素 4, HA 为羟基磷灰石, GO 为氧化石墨烯。

图 6 | 各组钛片的拉曼光谱图

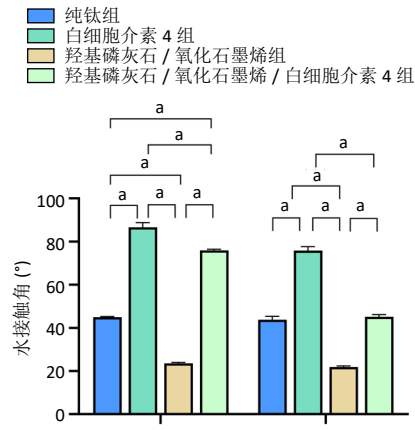
Figure 6 | Raman spectra of four groups of titanium sheets



图注: Ti 为纯钛, IL-4 为白细胞介素 4, HA 为羟基磷灰石, GO 为氧化石墨烯。

图 7 | 各组钛片表面静态水接触角图像

Figure 7 | Static water contact angle images of titanium sheet surfaces in each group



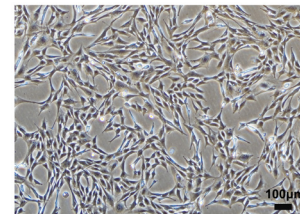
图注: ^a $P < 0.001$ 。

图 8 | 各组钛片表面静态水接触角检测结果

Figure 8 | Test results of static water contact angle on titanium sheet surfaces of each group

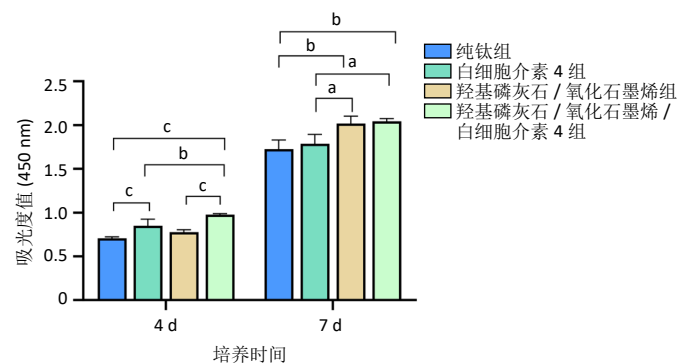
2.7 各组钛片的生物相容性检测结果

2.7.1 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞增殖和 DAPI 染色 培养至第 3 代的 MC3T3-E1 细胞生长状态良好, 呈纺锤形、梭形密集成网状, 见图 9。CCK-8 检测结果显示, 随着培养时间的延长, 各组细胞数量增加, 培养 4 d 后, 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组吸光度值高于其他 3 组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 白细胞介素 4 组吸光度值高于纯钛组 ($P < 0.001$); 培养 7 d 后, 羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组、羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组吸光度值高于白细胞介素 4 组、纯钛组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 10。



图注: 显微镜下可见细胞形态呈梭形, 密集成网状。

图 9 | 第 3 代 MC3T3-E1 细胞形态
Figure 9 | Morphology of passage 3 MC3T3-E1 cells

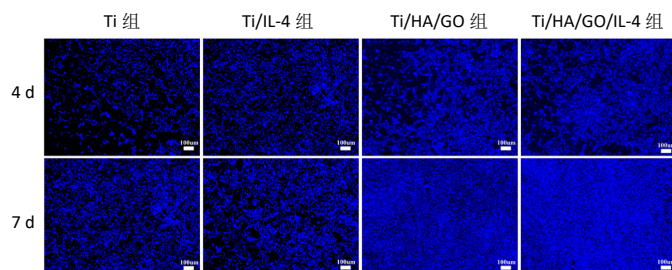


图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ 。

图 10 | 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞增殖比较

Figure 10 | Comparison of MC3T3-E1 cell proliferation on titanium sheet surfaces in each group

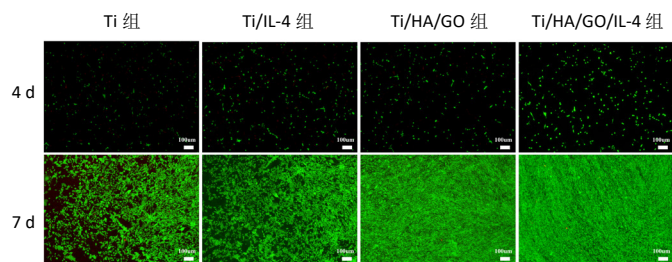
各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞 DAPI 染色结果，见图 11。随着培养时间的延长，4 组钛片表面的 MC3T3-E1 细胞数量明显增加并呈簇状聚集生长，其中羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组细胞核呈现的蓝色荧光面积最大，与 CCK-8 检测结果一致。



图注：Ti 为纯钛，IL-4 为白细胞介素 4，HA 为羟基磷灰石，GO 为氧化石墨烯。培养 4，7 d 后，Ti/HA/GO/IL-4 组细胞数量最多，比例尺 = 100 μm。

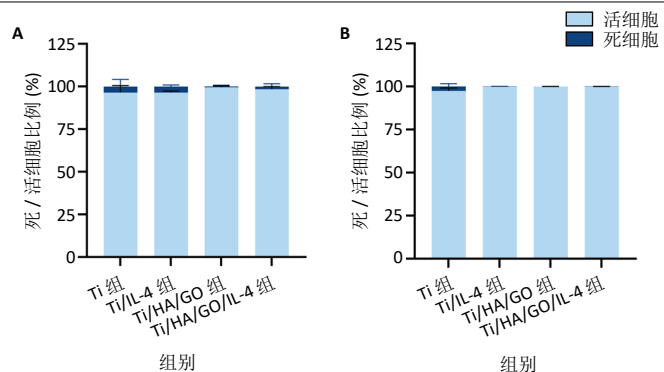
图 11 | 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞 DAPI 染色图像
Figure 11 | DAPI staining images of MC3T3-E1 cells on the titanium sheet surfaces of each group

2.7.2 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞 Calcein-AM/PI 染色 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞 Calcein-AM/PI 染色图像，见图 12。各组钛片表面显示出大面积的绿色荧光，仅有少量显示红色荧光，表明 MC3T3-E1 细胞在各组钛片表面上具有良好的生物相容性。Calcein-AM/PI 染色定量分析结果显示，与纯钛组相比，羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组活细胞比例较高，见图 13，进一步证明了羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 涂层具有促进细胞增殖的潜力，与 CCK-8 检测结果一致。



图注：Ti 为纯钛，IL-4 为白细胞介素 4，HA 为羟基磷灰石，GO 为氧化石墨烯。共培养 1，4 d 后，与 Ti 组相比，Ti/HA/GO/IL-4 组活细胞比例较高，未见明显的死细胞，比例尺 = 100 μm。

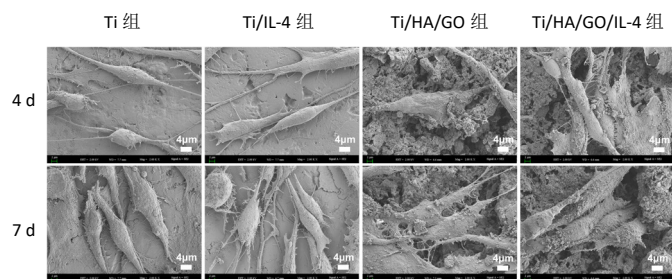
图 12 | 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞 Calcein-AM/PI 染色图像
Figure 12 | Calcein-AM/PI staining images of MC3T3-E1 cells on the titanium sheet surfaces of each group



图注：Ti 为纯钛，IL-4 为白细胞介素 4，HA 为羟基磷灰石，GO 为氧化石墨烯。图 A，B 分别为培养 1，4 d 后的分析结果。培养 1，4 d 后，与 Ti 组相比，Ti/HA/GO/IL-4 组活细胞比例较高。

图 13 | 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞 Calcein-AM/PI 染色分析结果
Figure 13 | Calcein-AM/PI staining analysis results of MC3T3-E1 cells on the titanium sheet surface of each group

2.7.3 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞形态及黏附 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞的形态及黏附，见图 14。培养 4 d 后，纯钛组 MC3T3-E1 细胞黏附在纯钛表面；白细胞介素 4 组相比纯钛组细胞伸出更多伪足，胞体黏附面积更大；羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组可见细胞嵌入材料中并与材料相互黏附，胞体黏附面积相较于纯钛组、白细胞介素 4 组更大；羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组可见细胞间、细胞与涂层间通过多而细小的伪足相互紧密黏附，伪足数量最多。培养 7 d 后，纯钛组相较于培养 4 d 后细胞黏附面积增大，细胞呈现扁平状；白细胞介素 4 组、羟基磷灰石 / 氧化石墨烯组相较于培养 4 d 后细胞间伪足数量增多，胞体表面粗糙；羟基磷灰石 / 氧化石墨烯 / 白细胞介素 4 组细胞贴和更加紧密，细胞间伪足互相粘连，一些伪足伸入涂层表面微纳级别的结构空隙中并牢固地锚合于涂层表面。



图注：Ti 为纯钛，IL-4 为白细胞介素 4，HA 为羟基磷灰石，GO 为氧化石墨烯。随着培养时间的延长，4 组材料表面黏附的 MC3T3-E1 细胞数量增加，细胞形态良好，其中 Ti/HA/GO/IL-4 组细胞贴和最紧密，细胞间伪足互相粘连，一些伪足伸入涂层表面微纳级别的结构空隙中并牢固地锚合于涂层表面，比例尺 = 4 μm。

图 14 | 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞黏附 (扫描电镜)
Figure 14 | MC3T3-E1 cell adhesion on the titanium sheet surface of each group (Scanning electron microscopy)

3 讨论 Discussion

在过去几十年中,钛由于出色的生物相容性、机械性能、耐腐蚀性和骨整合能力,一直是生物医学领域的首选材料^[24]。但是,钛的生物惰性导致其骨结合能力相对较差,植入人体后需要3-6个月的骨结合才能负重使用,同时骨结合较差会引起种植体周围炎、松动、脱落等现象^[25],因此,种植体治疗成功的关键是种植体与牙槽骨之间形成良好的骨结合。

此次研究通过电化学沉积法及浸泡冻干法制备载有生物活性蛋白的多功能生物材料,该材料具有良好的表面粗糙结构,亲水能力强,可促进细胞增殖、黏附,具有较优的体外生物相容性。通过扫描电镜观察发现,羟基磷灰石/氧化石墨烯组和羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组基底部表面出现了氧化石墨烯特有的纳米级褶皱结构,这与既往研究所观察到的相同^[26],这种纳米级褶皱结构可增大细胞接触的表面积,促进细胞黏附等生物行为^[27];此外,高倍电镜下羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组表面可见明显裂纹,呈多层大块“珊瑚”状,该结构可能是由于白细胞介素4溶液中的去离子水在冻干过程中迅速升华,导致下部氧化石墨烯断裂产生^[28];并且相较于羟基磷灰石/氧化石墨烯组,羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组表面可见许多成簇的圆形蛋白样结构,间接说明白细胞介素4的成功吸附。X射线能量色散谱分析结果显示,羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组涂层中含有O、C、P、Ca元素,并且这些元素在该微型区域中均匀分布,未检测到钛元素含量;X射线衍射图谱显示,纯钛组和白细胞介素4组表面检测到C、O和Ti,而在羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组表面未检测到钛元素,两种结果均证明了羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4涂层的涂覆是全方位且较为致密的。此次研究在X射线光电子能谱显示,羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组中检测出Ca2p、P2p等元素波峰,均为羟基磷灰石中的组成元素^[29],并且在拉曼光谱图中看到了氧化石墨烯的特征峰,证明了氧化石墨烯的沉积^[30]。

植入体的骨整合过程涉及骨组织细胞、免疫细胞等多种细胞,其中成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化^[31],因此,此次研究体外细胞实验选用第3代小鼠胚胎成骨细胞(MC3T3-E1)。此次研究CCK-8检测结果显示,培养4d后,白细胞介素4组吸光度值高于纯钛组($P < 0.001$),羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组吸光度值高于其他2组($P < 0.01$),既往研究表明白细胞介素4的负载可以促进小鼠骨髓间充质干细胞的增殖与迁移^[23],与此次研究基本一致。接触角测试结果显示,白细胞介素4组1s和30s时的水接触角大于纯钛组($P < 0.001$),羟基磷灰石/

氧化石墨烯/白细胞介素4组1s和30s时的水接触角大于羟基磷灰石/氧化石墨烯组($P < 0.001$),显示了白细胞介素4的负载会影响材料本身的亲水性,这可能由于白细胞介素4溶液冷冻干燥后基底表面形成吸附蛋白的薄膜,从而影响材料的接触面积,进而影响亲水性。负载白细胞介素4涂层材料前后的拉曼光谱无显著变化,主要是由于白细胞介素4与材料表面结合的方式是物理吸附而非化学结合,因此白细胞介素4与基底材料之间的相互作用比较弱,并且负载浓度较低,使得白细胞介素4的存在不会显著影响材料的拉曼特征。有研究显示,提高材料的亲水性不仅抑制炎症反应,对骨形成也有积极作用^[32]。此次研究结果显示,材料中白细胞介素4的负载虽然牺牲了一部分亲水性,但是促细胞增殖作用远远大于纯钛组、羟基磷灰石/氧化石墨烯组,因此,白细胞介素4对亲水性的影响是否会降低成骨活性需进一步实验证明。未来将通过提升技术手段,改善白细胞介素4的负载方法,有望提高亲水性,降低不良反应。羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组1s和30s时的水接触角均小于白细胞介素4组($P < 0.001$),说明羟基磷灰石/氧化石墨烯复合材料的加入显著增加了材料的亲水性^[33]。材料的亲水表面在体外和体内均能促进成骨细胞和骨髓间充质干细胞的成骨向分化。有学者通过体外共培养小鼠骨髓间充质干细胞与RAW264.7巨噬细胞^[34-35],验证了羟基磷灰石/氧化石墨烯涂层可促进骨髓间充质干细胞和RAW264.7细胞的增殖、黏附。此次研究同样发现,培养至第7天,羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组吸光度值高于纯钛组($P < 0.01$)和白细胞介素4组($P < 0.05$),说明羟基磷灰石/氧化石墨烯复合材料的加入促进了成骨细胞的增殖。此次研究采用细胞核染色和Calcein-AM/PI染色更直观地显示各组涂层的细胞黏附数量及生存状态,结果显示羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4涂层可促进MC3T3-E1细胞的增殖,并保持细胞活性。扫描电镜观察结果显示,白细胞介素4组相较于纯钛组,羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素4组相较于羟基磷灰石/氧化石墨烯组,MC3T3-E1细胞伸出伪足更多,细胞间联系更加紧密,黏附面积更大。有研究表明,白细胞介素4可通过白细胞介素4R α 信号传导到细胞,从而促进细胞生长黏附,有抗炎和促创面愈合等作用^[36]。后续将从分子生物学层面进一步探索白细胞介素4的作用机制。

近年来,纳米羟基磷灰石和氧化石墨烯由于独特的结构、优异的理化性能和生物相容性被广泛应用于各种生物领域。相关研究对钛基底表面进行羟基磷灰石/氧化石墨烯改性^[12-13],证实羟基磷灰石/氧化石墨烯复合材料具有更佳的机械性能、生物活性以及促成骨能力^[37]。为了改善种植体

植入的治疗效果, 研究者致力于将有效的治疗剂(抗炎药、蛋白质和生长因子等)输送到局部受损部位, 从而减少不良反应, 最大限度地减少毒性、缩短愈合时间, 以达到更高的疗效。有研究证实, 白细胞介素 4 可抑制损伤的初始炎症反应, 并且可调节细胞外基质如何被修饰、分解和重建进行有效修复^[36]。因此, 负载白细胞介素 4 的植入物在相关免疫反应的局部控制方面具有巨大的优势和潜力。氧化石墨烯的高表面积特性使其具有出色的缓释能力, 而羟基磷灰石具有良好的生物相容性^[38-39], 二者常作为缓释载体被应用于种植体表面修饰^[39-40]。因此, 羟基磷灰石/氧化石墨烯复合材料的表面改性可以为承载不同生物活性分子的多种杂化材料提供合适的平台, 从而实现各种治疗条件下的化学功能。

功能性生物材料的应用在很大程度上取决于调节细胞反应的能力, 包括细胞黏附、分化和免疫过程等。为此, 此次研究的目的是设计一种载有生物活性蛋白的多功能生物材料, 系统研究其理化性能和对 MC3T3-E1 细胞增殖、黏附及生长的影响, 为早期成骨创造最佳的局部微环境。研究结果提示白细胞介素 4 在复合涂层应用前景广阔, 可能有助于解决临床中免疫相关无菌性炎症导致的骨整合不良, 提高种植体的初始稳定性。但羟基磷灰石/氧化石墨烯/白细胞介素 4 涂层中的白细胞介素 4 是否有缓释作用, 能否对免疫细胞起到正向调节作用从而促进骨免疫达到骨整合, 还需进一步探索。

作者贡献: 李丛丛、吾凡别克·巴合提进行实验设计, 实验实施为李丛丛, 实验评估为吾凡别克·巴合提、陈晓涛、赵莉, 资料收集为孔垂范、俞敏, 李丛丛成文, 吾凡别克·巴合提审核。

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: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。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] SCHWENDICKE F, NITSCHKE I, STARK H, et al. Epidemiological trends, predictive factors, and projection of tooth loss in Germany 1997-2030: part II. Edentulism in seniors. *Clin Oral Investig*. 2020;24(11):3997-4003.
- [2] ZHANG J, ZHUANG Y, SHENG R, et al. Smart stimuli-responsive strategies for titanium implant functionalization in bone regeneration and therapeutics. *Mater Horiz*. 2024;11(1):12-36.
- [3] STICH T, ALAGBOSO F, KRENEK T, et al. Implant-bone-interface: Reviewing the impact of titanium surface modifications on osteogenic processes in vitro and in vivo. *Bioeng Transl Med*. 2022;7(1):e10239.
- [4] ALBREKTSSON T, TENGVALL P, AMENGUAL L, et al. Osteoimmune regulation underlies oral implant osseointegration and its perturbation. *Front Immunol*. 2022;13:1056914.
- [5] MUNIR MU, SALMAN S, JAVED I, et al. Nano-hydroxyapatite as a delivery system: overview and advancements. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2021;49(1):717-727.
- [6] ZHANG D, LIU H, XUE X, et al. Enhancing immune modulation and bone regeneration on titanium implants by alleviating the hypoxic microenvironment and releasing bioactive ions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2024;236:113805.
- [7] MONDAL S, PARK S, CHOI J, et al. Hydroxyapatite: A journey from biomaterials to advanced functional materials. *Adv Colloid Interface Sci*. 2023;321:103013.
- [8] GUNGORDU ER S, EDIRISINGHE M, TABISH TA. Graphene-Based Nanocomposites as Antibacterial, Antiviral and Antifungal Agents. *Adv Healthc Mater*. 2023;12(6):e2201523.
- [9] PAPI M. Graphene-Based Materials: Biological and Biomedical Applications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):672.
- [10] HUNG HS, KUNG ML, CHEN FC, et al. Nanogold-Carried Graphene Oxide: Anti-Inflammation and Increased Differentiation Capacity of Mesenchymal Stem Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(8):2046.
- [11] YUAN B, CHEN H, ZHAO R, et al. Construction of a magnesium hydroxide/graphene oxide/hydroxyapatite composite coating on Mg-Ca-Zn-Ag alloy to inhibit bacterial infection and promote bone regeneration. *Bioact Mater*. 2022;18:354-367.
- [12] BAHETI W, LV S, MILA, et al. Graphene/hydroxyapatite coating deposit on titanium alloys for implant application. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2023;21:22808000221148104.
- [13] BAHETI W, CHEN X, LA M, et al. Biomimetic HA-GO implant coating for enhanced osseointegration via macrophage M2 polarization-induced osteo-immunomodulation. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2024;22:22808000241266665.
- [14] GAAFAR MS, YAKOUT SM, BARAKAT YF, et al. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite/chitosan nanocomposites: the effect of dispersing agents on the coating properties. *RSC Adv*. 2022;12(42):27564-27581.
- [15] SARPAL S, SINGH AK, BHARDWAJ H, et al. Graphene oxide-Mn3O4 nanocomposites for advanced electrochemical biosensor for fumonisins B1 detection. *Nanotechnology*. 2023;34(46).doi: 10.1088/1361-6528/aceaff.
- [16] AKRAM W, ZAHID R, USAMA RM, et al. Enhancement of Antibacterial Properties, Surface Morphology and In Vitro Bioactivity of Hydroxyapatite-Zinc Oxide Nanocomposite Coating by Electrophoretic Deposition Technique. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(6):693.
- [17] WU S, LAI Y, ZHENG X, et al. Facile fabrication of linezolid/strontium coated hydroxyapatite/graphene oxide nanocomposite for osteoporotic bone defect. *Heliyon*. 2024;10(11): e31638.

- [18] CHIANG CC, XIA X, CRACIUN V, et al. Enhancing the Hydrophobicity and Antibacterial Properties of SiCN-Coated Surfaces with Quaternization to Address Peri-Implantitis. *Materials (Basel)*. 2023; 16(17):5751.
- [19] KWON D, CHA BG, CHO Y, et al. Extra-Large Pore Mesoporous Silica Nanoparticles for Directing in Vivo M2 Macrophage Polarization by Delivering IL-4. *Nano Lett*. 2017;17(5):2747-2756.
- [20] SCHLUNDT C, FISCHER H, BUCHER CH, et al. The multifaceted roles of macrophages in bone regeneration: A story of polarization, activation and time. *Acta Biomater*. 2021;133:46-57.
- [21] IWASZKO M, BIALY S, BOGUNIA-KUBIK K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells*. 2021;10(11):3000.
- [22] ZHOU T, YANG Z, NI B, et al. IL-4 induces reparative phenotype of RPE cells and protects against retinal neurodegeneration via Nrf2 activation. *Cell Death Dis*. 2022; 13(12):1056.
- [23] LI Q, LIANG B, WANG F, et al. Delivery of Interleukin 4 from a Titanium Substrate Coated with Graphene Oxide for Enhanced Osseointegration by Regulating Macrophage Polarization. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020; 6(9):5215-5229.
- [24] XU J, ZHANG J, SHI Y, et al. Surface Modification of Biomedical Ti and Ti Alloys: A Review on Current Advances. *Materials (Basel)*. 2022; 15(5):1749.
- [25] GALINDO-MORENO P, CATENA A, PEREZ-SAYANS M, et al. Early marginal bone loss around dental implants to define success in implant dentistry: A retrospective study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2022;24(5):630-642.
- [26] JIA Z, SHI Y, XIONG P, et al. From Solution to Biointerface: Graphene Self-Assemblies of Varying Lateral Sizes and Surface Properties for Biofilm Control and Osteodifferentiation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(27):17151-17165.
- [27] MAJUMDER P, GANGOPADHYAY R. Evolution of graphene oxide (GO)-based nanohybrid materials with diverse compositions: an overview. *RSC Adv*. 2022;12(9):5686-5719.
- [28] 吾凡别克·巴合提. 羟基磷灰石-氧化石墨烯纳米涂层促进成骨分化及调节巨噬细胞极化的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2023.
- [29] YAO D, ZHAO Z, WU Z, et al. Characterization of PA12/HA composite scaffolds based on selective laser sintering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2023;145:106000.
- [30] OZTURK GUNDUZ E, TASASIZ B, GEDIK ME, et al. NI-BODIPY-GO Nanocomposites for Targeted PDT. *ACS Omega*. 2023;8(9):8320-8331.
- [31] ZHOU M, GRAVES DT. Impact of the host response and osteoblast lineage cells on periodontal disease. *Front Immunol*. 2022;13:998244.
- [32] LIU H, CHENG J, CHEN F, et al. Biomimetic and cell-mediated mineralization of hydroxyapatite by carrageenan functionalized graphene oxide. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(5):3132-3140.
- [33] SOUZA AP, NEVES JG, NAVARRO DA ROCHA D, et al. Chitosan/Xanthan/Hydroxyapatite-graphene oxide porous scaffold associated with mesenchymal stem cells for dentin-pulp complex regeneration. *J Biomater Appl*. 2023;37(9):1605-1616.
- [34] 吕尚毅, 何惠宇, 吾凡别克·巴合提, 等. 氧化石墨烯-羟基磷灰石复合涂层材料的理化性质及生物相容性 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(10):1477-1483.
- [35] 马丽莎, 何惠宇, 吾凡别克·巴合提, 等. 氧化石墨烯/羟基磷灰石复合涂层对 RAW264.7 巨噬细胞免疫活性的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2025,29(10):2023-2029.
- [36] ALLEN JE. IL-4 and IL-13: Regulators and Effectors of Wound Repair. *Annu Rev Immunol*. 2023;41:229-254.
- [37] 都曼别克·阿曼台, 何惠宇, 韩祥祯. 羟基磷灰石-氧化石墨烯复合涂层促进大鼠骨缺损的修复 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(10):2030-2037.
- [38] ASLAM KHAN MU, ABD RAZAK SI, AL ARJAN WS, et al. Recent Advances in Biopolymeric Composite Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicines: A Review. *Molecules*. 2021;26(3):619.
- [39] LI M, LIU J, CUI X, et al. Osteogenesis effects of magnetic nanoparticles modified-porous scaffolds for the reconstruction of bone defect after bone tumor resection. *Regen Biomater*. 2019;6(6):373-381.
- [40] SHI C, GAO J, WANG M, et al. Functional hydroxyapatite bioceramics with excellent osteoconductivity and stern-interface induced antibacterial ability. *Biomater Sci*. 2016;4(4):699-710.

(责任编辑: 关伟, 邱杨, 张楠)