

双离子掺杂羟基磷灰石材料及其在硬组织工程中的应用

钟振宇^{1,2,3}, 徐 军^{1,2,3}, 孙泽宇^{1,2,3}, 范奕波^{1,2,3}, 杜莹莹^{1,2,3}, 张胜民^{1,2,3}

(1. 华中科技大学先进生物材料与组织工程研究中心, 武汉 430074; 2. 华中科技大学医疗器械监管科学研究院, 武汉 430074;
3. 国家药品监督管理局医疗器械监管科学研究基地, 武汉 430074)

摘 要: 羟基磷灰石(HA)是人体硬组织的主要无机组分, 具有良好的生物活性及生物相容性, 能够有效促进硬组织缺损的修复再生。研究表明: 单一离子掺杂是一种有效提升 HA 材料生物活性的途径。而双离子掺杂不仅可实现对天然骨成分上的进一步仿生, 还可以协同赋予 HA 材料更多功能特性, 例如抗肿瘤、抗菌、促血管生成、免疫调节、医学成像等, 拓展了 HA 材料在骨组织工程中的应用。对双离子掺杂 HA 材料的制备方法 & 原理进行了总结, 并综述了双离子掺杂 HA 材料在硬组织工程中的潜在应用, 最后对双离子掺杂 HA 材料的未来研究重点提出了建议和展望。

关键词: 双离子掺杂; 羟基磷灰石; 硬组织工程; 微量元素

中图分类号: R318.08 文献标志码: A 文章编号: 0454-5648(2023)10-2566-13

网络出版时间: 2023-08-07



Dual-Ions Substituted Hydroxyapatite Materials and Their Application in Hard Tissue Engineering

ZHONG Zhenyu^{1,2,3}, XU Jun^{1,2,3}, SUN Zeyu^{1,2,3}, FAN Yibo^{1,2,3}, DU Yingying^{1,2,3}, ZHANG Shengmin^{1,2,3}

(1. Advanced Biomaterials and Tissue Engineering Center, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;
2. Institute of Regulatory Science for Medical Devices, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;
3. NMPA Research Base of Regulatory Science for Medical Devices, Wuhan 430074, China)

Abstract: Hydroxyapatite (HA) is the main inorganic constituent of human hard tissue. It can effectively accelerate the repair process of hard tissue defects due to its high bioactivity and biocompatibility. Ion doping is an effective approach to enhance the bioactivity of HA materials. On this basis, dual-ion substitution can make HA materials have a higher simulation to nature bone in composition and some functional features (*i.e.*, antitumor ability, antibacterial activity, pro-angiogenic capacity, immunoregulatory and medical imaging capability). Dual-ion substitution greatly extends the applications of HA materials in bone tissue engineering. This review summarized the synthesis methods and their principles of dual-ion substituted HA (DIHA) materials, represented the applications of DIHA materials in hard tissue engineering, and finally proposed the future development direction of DIHA materials.

Keywords: dual-ion substitution; hydroxyapatite; hard tissue engineering; trace element

骨在运动、支持和保护机体等方面起着关键作用, 骨缺损特别是大段骨缺损严重影响了患者的生活质量。近年来, 人口老龄化、意外事故及肿瘤等疾病导致的骨损伤不断增加, 临床上对骨替代材料

的需求与日俱增。骨移植的“金标准”材料是自体骨, 但供体不足、需额外进行二次手术及存在并发症风险, 一定程度上限制了其应用。同种异体骨也是骨移植材料的重要选项, 然而病原体传播、免疫排斥、

收稿日期: 2023-03-20。 修订日期: 2023-05-14。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC2405701); 国家自然科学基金(82130061, 32171331, 31870960); 中国科协青年人才托举工程(YESS20200077); 湖北省自然科学基金(2021CFB609)。

第一作者: 钟振宇(1991—), 男, 博士研究生。

通信作者: 张胜民(1962—), 男, 博士, 教授;

杜莹莹(1989—), 女, 博士, 副教授。

Received date: 2023-03-20. Revised date: 2023-05-14.

First author: ZHONG Zhenyu (1991—), male, Doctoral candidate.

E-mail: zyzsmallmail@hust.edu.cn

Correspondent author: ZHANG Shengmin (1962—), male, Ph.D., Professor;
DU Yingying (1989—), female, Ph.D., Associate Professor.

E-mail: smzhang@hust.edu.cn; yingyingdu@hust.edu.cn

骨诱导效果低等问题影响了其临床使用^[1]。人工骨修复材料具有来源广泛、性能可控的优点, 加上其良好的生物相容性和促骨再生能力, 在临床骨修复中发挥着越来越重要的作用, 羟基磷灰石(HA)便是其中的代表^[2]。

HA 是骨中的主要无机组分, 约占骨质量的 70%。研究表明, 人工合成的 HA 生物相容性和骨传导性优良, 在骨组织工程中应用广泛^[3]。例如, 武汉亚洲生物材料有限公司研发的具有多级结构的 HA 高活性人工骨修复材料经多中心临床试验证明, 24 周内植骨融合率达 100%^[4]。此外, HA 的其它生物学性能可通过不同的方法予以改进。国内常江教授实验室和张胜民教授团队等进行了较系统的研究。通过模板介导材料的形貌设计, 可以优选出促成骨、成血管作用良好的纳米 HA^[5-8]; 利用 HA 构建具有微-纳米结构的表面图案, 可以上调骨形态发生蛋白(BMP2)表达, 实现成骨活性的提升^[9]。研究发现, 离子掺杂也能增强 HA 特定的生物学性能^[10-12], 并受到了广泛关注^[13-15]。

HA 每个晶胞中含有 10 个 Ca^{2+} , 6 个 PO_4^{3-} 和 2 个 OH^- 。不同类型的阳离子和阴离子可以取代 HA 的不同离子位点^[16-17]。目前已经有大量工作通过水热法、沉淀法、溶胶凝胶法等实现了 HA 的单离子掺杂, 在不同程度上提升了其理化性能及骨诱导性等生物学性能^[18]。然而骨中的磷灰石并非只含有单一微量元素, Zn^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 等多种离子的存在, 使骨作为矿物质库在机体代谢活动中发挥着重要作用。因此, 越来越多的研究者逐步转向双离子掺杂 HA 的研究, 致力于合成更仿生的类骨 HA,

提升 HA 在骨缺损修复中的潜能。

本文在讨论双离子掺杂 HA 材料常见制备技术原理及特征的基础上, 对其在硬组织工程中的应用进行了综述, 最后对双离子掺杂 HA 材料的未来研究方向提出了建议和展望, 为进一步提升其理化性能和生物活性提供了新思路。

1 双离子掺杂 HA 的合成方法

1.1 离子取代 HA 的合成原理

HA 分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 其晶体属于六方晶系(图 1)^[19]。在离子掺杂 HA 中, 通常 Ca^{2+} 位点被阳离子取代, OH^- 和 PO_4^{3-} 被阴离子取代。离子取代会导致 HA 的微观结构、热稳定性、晶粒尺寸和结晶度等发生变化, 掺杂离子的种类及掺杂量是引起这些变化的关键因素^[20]。离子掺杂 HA 持续释放具有不同生物学功能的离子, 直接或者间接地影响骨代谢相关细胞活动, 从而调节骨代谢进程^[20-21]。合适的离子浓度能显著促进骨的再生, 而高于阈值浓度的离子通常会对细胞产生不利影响, 阻碍骨生成^[22]。离子掺杂 HA 的物化特征影响其降解速率和离子释放动力学, 因此需要合理选择掺杂离子的种类及控制掺杂量。相较于单离子掺杂 HA, 双离子掺杂 HA 引入离子增多, 功能设计性更强, 其系统也更复杂, 合成可控性也相对更难实现。

1.2 双离子掺杂 HA 的合成方法

已经有较多方法能够实现单离子掺杂 HA 的合成, 如干法(如固态合成法)、湿法(如化学沉淀法和水热法)和模板仿生法^[22-23]。随着研究的不断深入, 部分方法已被用于双离子掺杂 HA 材料的合成。目

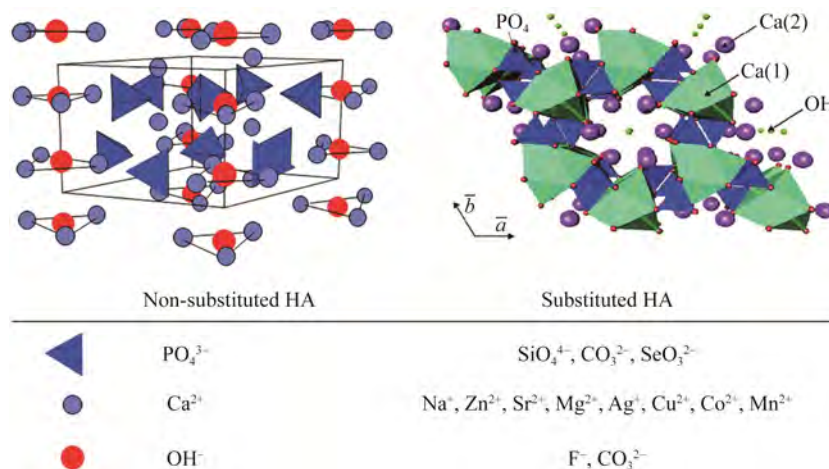


图 1 HA 的晶胞在 a 轴(左)和 c 轴(右)方向上的 Ca(1)、Ca(2)、 PO_4^{3-} 和 OH^- 位点; 常见离子掺杂的种类(底部)^[19]

Fig. 1 Ca(1), Ca(2), PO_4^{3-} , and OH^- sites of the crystal cell of hydroxyapatite (HA) in the a -axis (left) and c -axis (right) directions; the types of commonly used ion in doped HA (bottom)^[19]

前, 绝大多数研究采用湿法合成双离子掺杂 HA, 其中化学沉淀法和水热法运用最为广泛。下面对各种方法的原理和优缺点作简要概述。

1.2.1 干法 干法主要包括固态合成法和机械化学法, 它们具有无需使用溶剂以及适合大规模生产的优点^[24]。固态合成法通过球磨混合前体物料, 经高温(约 1 000 °C)处理得到结晶良好的产物。然而, 该法存在产物化学异质性高和尺寸分布不均等问题。机械化学法是改进的固态合成法, 通过产生压力来增强固体间的反应, 能化学计量地合成产物, 且能实现纳米晶粉末的大规模生产^[25]。Kheradmandfarid 等^[26]利用机械化学法制备了 Mg^{2+} 、F 共掺杂的 HA, 且通过精确控制 Mg^{2+} 的掺入量有效提升了 HA 的生物活性。

1.2.2 湿法 湿法在制备纳米尺寸颗粒及体外研究 HA 的形成过程等方面, 比干法更具优势。湿法工艺相对简单, 条件温和, 但产物结晶度一般较低。此外, 水溶液中的各种离子可能结合到晶体结构中, 导致产物不纯。在有机溶剂氛围中进行反应, 可以在一定程度上避免水中离子的污染问题。湿法是目前双离子掺杂 HA 合成中最为关键的手段。

化学沉淀法是制备离子掺杂 HA 的常见湿法之一。在合成过程中, 含钙、磷的试剂以滴加的方式混合, 同时保持搅拌。反应完成后, 经过洗涤、过滤和干燥等步骤, 最终得到产物。这种方法所得产物的组成不是化学计量的, 且结晶度通常较低, 因此需要进行高温烧结处理以提高结晶度。此外, 该法可以通过精确控制反应条件提高产物纯度。例如 Szurkowska 等^[27]利用沉淀法成功制备出 Mn^{2+} 和 Si^{4+} 双掺杂的 HA。该 MnSi-HA 为一种低结晶度的针状纳米颗粒, 纯度高且没有明显细胞毒性。

溶胶-凝胶法可以在相对较低的合成温度下制备不同粒径的 HA, 主要涉及 3 个步骤: 1) 混合前体物质并转化为溶胶; 2) 凝胶化和干燥; 3) 煅烧。该法可以实现前体物质在分子水平上的混合, 因而产物的化学均一性较高。

Mariappan 等^[28]采用溶胶-凝胶法制备了 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 双掺杂的 HA。通过控制 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 掺杂量, 可以改变产物 HA 的晶格参数, 且其晶粒尺寸随着掺杂量的增加而增加。Kaygili 等^[29]也利用溶胶凝胶法合成了一系列双离子掺杂的 HA, 包括 MgSr-HA 、 MgZn-HA 和 SrZn-HA , 在不同的离子种类和掺杂量条件下, 产物中 HA 的摩尔分数均高于 93%, 且产物粒径均一, 表明该法能高效制备高纯度的双离

子掺杂 HA。因此, 溶胶-凝胶法在双离子掺杂 HA 的制备中具有较大的应用前景。

水热法是一种高温高压下进行的化学沉淀法。该法制备的 HA 通常具有良好的结晶度和化学计量比, 粒径分布均一且不易发生团聚。水热法省去了后期高温煅烧过程, 能在一定程度上避免产物结构缺陷。

Matić 等^[30]利用水热法合成了 Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 掺杂的单、双离子 HA, 均具有良好的结晶度。需要注意的是, 由于双离子掺杂体系引入了更多离子, 在反应过程中更易产生杂相, 主要为 β -磷酸三钙 (β -TCP)。但 Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 的共掺杂通过抑制 α -TCP 相的生成, 促进 β -TCP 的形成, 提升了产物在高热环境下的稳定性, 且 Mg^{2+} 掺杂将 Sr-HA 硬度提高了 40%, 达到 5.02 GPa。此外, Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 共掺杂量也可调节 HAP 亚粒子的形态, 当共掺杂量高于 9% (摩尔分数) 时, HAP 亚粒子从棒状颗粒转变为球状形貌。Li 等^[31]也采用水热法合成了 Ag^{+} 和 Sr^{2+} 双掺杂的高结晶度 HA 纳米棒, 其粒径随着 Sr^{2+} 掺杂量的增加而不断变小。此外, AgSr-HA 还具有良好的生物相容性与优异的抗菌性。尽管水热法对设备要求较高, 但该方法简单易行, 能制备粒径均一、结晶度较高的双离子掺杂 HA, 具有广阔的应用前景。

此外, 微波法和超声辅助沉淀法等新型湿法合成技术也为双离子掺杂 HA 的制备提供了有效的补充手段^[32]。

1.2.3 模板仿生法 自然界中广泛存在磷灰石和方解石等不同类型的矿物, 它们以蛋白质或其他分子为模板逐步矿化成型。模板仿生法便是模拟该过程提出的一种创新方法, 用于制备具有特定微/纳米结构的 HA 杂化材料。作为模板的有机分子在合成过程中为 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 等无机离子提供成核位点, 并调节晶体生长方向和形态, 使得产物在结构上与骨矿物质相似且具有高度生物相容性, 同时具备更好的成骨和成血管能力^[5, 8]。

Jia 等^[33]系统研究了胶原模板诱导过渡金属离子掺杂的 HA 合成。结果表明, Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 等人体必需的微量元素易于掺杂到 HAP/胶原复合物中, 而有害元素 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 则不易与胶原结合。Zhong 等^[34]采用胶原模板仿生矿化法合成了 Sr^{2+} 、 Zn^{2+} 共掺杂的 HA (SrZn-Col-HA)。该研究表明模板法合成的 SrZn-Col-HA 具有合适的结晶度, Sr^{2+} 、 Zn^{2+} 可以稳定持续的从 HA 中释放, 能有效促进大鼠颅骨缺损修复, 在骨组织工程中具

有良好前景。总之,通过选择合适的矿化模板和掺杂离子类型,控制掺杂量及反应条件,模板仿生法可以得到促成骨、成血管等生物学性能优异的类骨双离子掺杂 HA。

1.2.4 其他方法 在金属植入物表面涂覆生物活性涂层是提升其骨整合能力的常用策略。离子掺杂的 HA 涂层制备中,通常采用等离子辅助喷涂技术。相对于湿法合成,等离子辅助技术具有沉积速率高、工业可扩展性强等优点,同时可对薄膜化学计量和成分进行精细控制^[21]。Sullivan 等^[35]利用低温等离子喷涂技术在 Ti 表面制备了 Ag^+ 、 Sr^{2+} 掺杂的 HA 涂层,其厚度约为 $10\text{ }\mu\text{m}$,能够缓慢释放 Ag^+ 、 Sr^{2+} 且释放时间超过 30 d,具有医学应用前景。低温等离子喷涂技术克服了 HA 高温分解问题,有望在制备双离子掺杂 HA 涂层方面得到应用。

综上,双离子掺杂 HA 的制备已经能通过多种方法实现。但需要注意的是,目前其产物性能和产量仍有待进一步提升,未来还需要更多研究工作投入其中。

2 双离子掺杂 HA 在硬组织修复中的应用

人工合成的 HA 具有优异的生物相容性与骨传导性,在硬组织工程中的应用形式主要是作为非承重部位的填充物或合金材料的表面涂层^[32, 36]。离子掺杂能赋予 HA 各种性能,例如 Ag^+ 的掺杂赋予了 HA 良好的抗菌能力,能降低手术后的感染风险; Sr^{2+} 掺杂 HA 具有更强的成骨活性,加速了骨缺损的修复再生。然而高度复杂的缺损环境下,单离子掺杂 HA 并不能完全满足需求。双离子掺杂进一步提升了 HA 的生物学性能及综合修复能力,下面分别从成骨、抗肿瘤、抗菌等方面对双离子掺杂 HA 在硬组织修复中的潜在应用进行综述。

2.1 双离子掺杂 HA 增强的成骨作用

人体多种微量元素在骨再生过程中具有十分重要的作用。阳离子中, Zn^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 已经被充分证明能够提升 HA 成骨活性^[37-38]; SiO_4^{4-} 、 CO_3^{2-} 也能通过不同方式影响 HA 的促骨再生进程^[37, 39]。 Cu^{2+} 掺杂的 HA 能够更好地促进血管化骨的再生^[40]。不同离子的双掺杂能赋予 HA 更强大的功能,从而更好地在骨组织工程中发挥作用。

Lin 等^[41]采用水热法,以 Sr^{2+} 取代的 $\text{Ca}(\text{SiO}_3)_2$ 为前驱体合成了 SiSr-HA。与纯 HA 相比, Si-HA 能促进 MC3T3-E1 细胞的生长和分化,适量的 Sr^{2+}

掺杂进一步强化了这一作用并显著促进了骨再生进程。此外,双离子掺杂 HA 还可以作为合金材料的涂层,促进骨整合。Wang 等^[42]通过沉淀法制备了 Sr^{2+} 和 Mg^{2+} 掺杂的 HA,并利用火焰喷涂技术在钛基植入物表面制备 MgSr-HA 涂层。该涂层在体外能上调人胚胎腭间充质前成骨细胞中 *Runx-2*、*OCN* 和 *OPN* 等成骨基因的表达。同时,在比格犬前磨牙缺损模型中也能显著促进植入材料与植入部位的骨整合,加速新骨生成(图 2)。

此外,多项研究工作已经实现了 Mg-Si、Mg-Co、Fe-Sr 等双离子在 HA 中的共掺杂。这些双离子掺杂 HA 在促进钙沉积,提升成骨细胞分化能力,增强成骨相关基因表达等方面均有良好的表现^[43-45]。随着研究的不断深入,未来的研究方向将包括尝试更多不同种类的双离子掺杂组合,以及联合优化表面形貌、粒径等多种性能,从而提升双离子掺杂 HA 的促成骨能力;此外,深入研究成骨分子机制和进行更全面的安全性评价,也是实现双离子掺杂 HA 临床转化的关键方向。

2.2 双离子掺杂 HA 的抗肿瘤作用

恶性骨肿瘤严重威胁患者生命健康,且肿瘤切除术后复发风险高。目前放疗、化疗等主要治疗手段面临副作用明显和耐药性等问题,因而开发抗肿瘤材料刻不容缓。特定离子掺杂的羟基磷灰石兼具成骨能力和抗肿瘤能力,是极具应用前景的骨肿瘤切除术后治疗新材料。

研究表明, SeO_3^{2-} 、 SeO_4^{2-} 、 Hf^{4+} 、 Mn^{2+} 等离子掺杂的 HA 能通过不同方式促进细胞凋亡和阻滞细胞周期,从而抑制肿瘤细胞的增殖和生长,发挥抗肿瘤作用^[46-49]。 CO_3^{2-} 在 HA 中的含量也能影响肿瘤细胞的活性和致瘤因子的表达,从而影响癌症进程^[50]。

国内张胜民教授团队在硒掺杂 HA 领域开展了系列工作,不仅从方法学上较为清晰地阐述了多种硒掺杂磷灰石的制备原理,而且从分子机制角度解析了其抗肿瘤作用机制^[11, 51-54]。其研究工作证明硒掺杂 HA 能够有效激活 Caspase 信号通路,同时促进活性氧(ROS)的表达,协同诱导肿瘤细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用(图 3)。此外,通过设计硒掺杂 HA 的形貌,能够提升其被肿瘤细胞内吞的效率,从而有效降低全身毒性^[49, 51, 54]。因此硒掺杂 HA 有望成为骨肿瘤术后治疗的重要材料。此外, Park 等^[47]的工作证明, Mn^{2+} 掺杂的 HA 能够显著提升细胞的 ROS 表达,协同提升光动力疗法对肿瘤的杀伤作用。

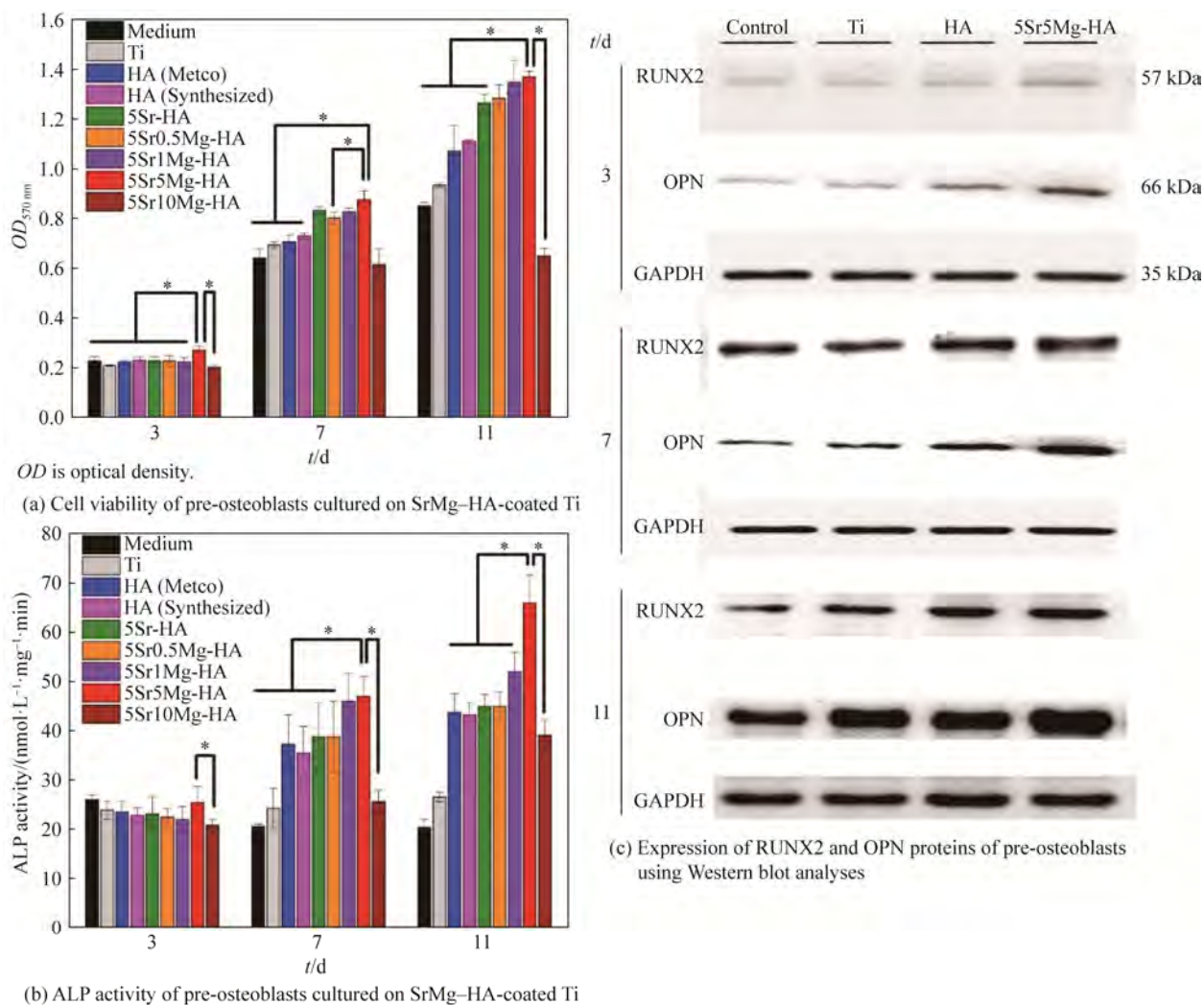


图2 MgSr-HA 涂层提升成骨细胞的成骨活性^[42]
Fig. 2 MgSr-HA coating enhances osteogenic activity of osteoblasts^[42]

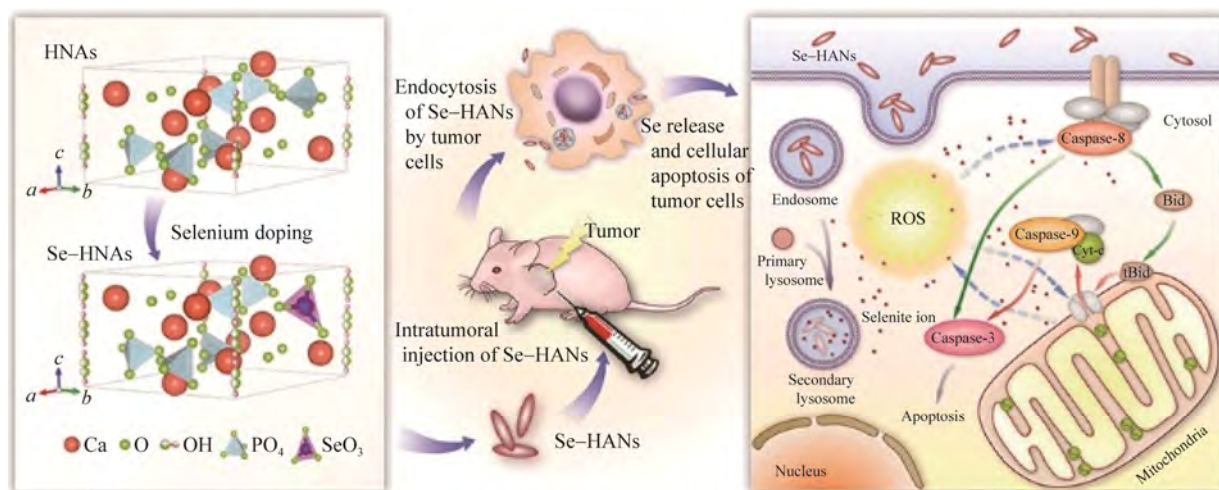


图3 硒掺杂 HA 通过激活 caspase 依赖的细胞凋亡途径实现抗肿瘤作用^[54]
Fig. 3 Se-HA exerts an anti-tumor effect by activating the caspase-dependent apoptotic pathway^[54]

虽然目前还没有研究报道双离子掺杂 HA 在抗肿瘤领域的作用, 但将抗肿瘤功能离子与其他功能离子联合掺杂至 HA 是一个极具前景的研究方向^[34, 55]。

例如, 硒酸根与银离子的共掺杂可能赋予 HA 抗肿瘤和抗菌能力, 用于防止肿瘤切除术后的肿瘤复发和伤口感染。此外, 将 2 种具有抗肿瘤功能的离子

联合掺杂至 HA 中,也是一种有望增强骨肿瘤治疗效果的策略。随着研究的深入,双离子掺杂 HA 将在骨肿瘤治疗领域扮演越来越重要的角色。

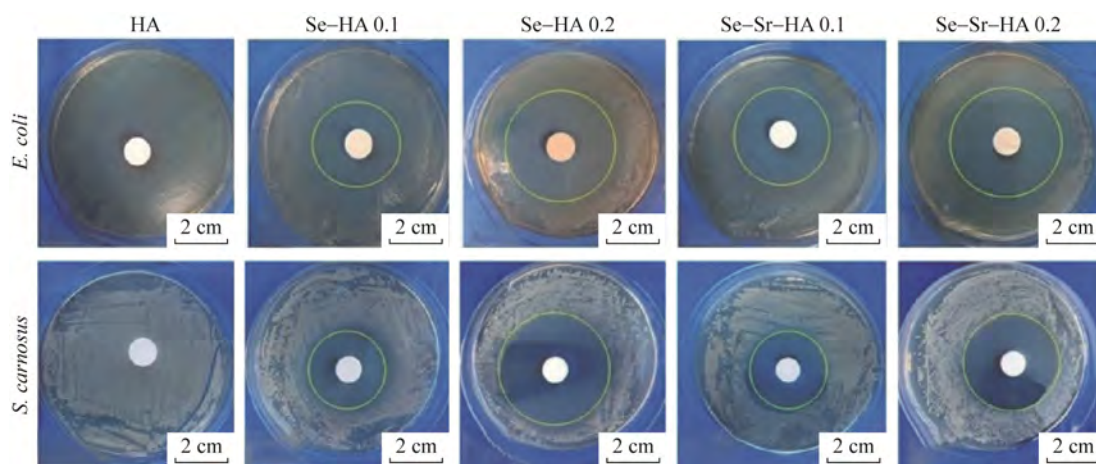
2.3 双离子掺杂 HA 的抗菌作用

在骨科或牙科手术中,外源器械污染或操作不当都可能引起细菌感染,从而诱发炎症,影响细胞的生长与增殖,延误新骨生成。 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 SeO_3^{2-} 等离子可赋予 HA 优异的抗菌活性,这些离子在溶出后可造成细菌的膜电位紊乱,也可进入细菌破坏其 DNA,同时催化细菌内产生 ROS,引起脂质过氧化反应和蛋白质氧化,从而加速细菌死亡。

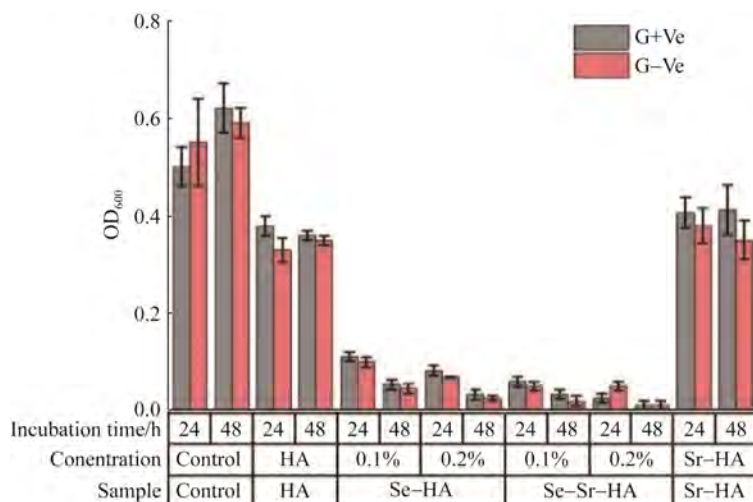
联合掺杂 2 种离子能够赋予 HA 材料更强的抗菌活性。Kolmas 等^[56]使用共沉淀法分别合成了 Ag^+ 掺杂和 Ag^+ 与 CO_3^{2-} 共掺杂的 HA。与单一 Ag^+ 掺杂 HA 相比, Ag/CO_3 -HA 具有更强的抑菌作用,可引起金黄色葡萄球菌的数量锐减。 CO_3^{2-} 的掺入使 HA

的结晶度下降,加速了 Ag^+ 的释放;同时也能加快 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 等离子的溶出,参与骨代谢过程,促进骨缺损修复。此外,在 HA 中联合掺入抗菌与成骨活性离子,可以使其具备双重功能,从而提高促骨修复的效果。Lim 等^[57]在 HA 中掺入了 Ag^+ 和 Si^{4+} ,产物 AgSi -HA 支持 BMSCs 在其表面优先黏附,且能立即杀死表面的绿脓杆菌,抑菌作用长达 28 d。Li 等^[31]通过水热法合成了 Ag^+ 、 Sr^{2+} 双掺杂的 HA,实验结果表明,5% (质量分数) 的 Ag^+ 能够赋予 AgSr -HA 良好的抗菌能力,同时 Sr^{2+} 的存在显著提升了 HA 的成骨作用,并呈现明显的浓度依赖特性。

值得注意的是,离子掺杂量会显著影响 HA 的抗菌能力,较高的掺杂量能够增强其抗菌性能,但也可能会对细胞的生长和增殖产生不良影响。双离子掺杂可在一定程度上解决这一问题。例如,掺杂 SeO_3^{2-} 的 HA 可在涂有大肠杆菌或肉葡萄球菌的琼脂平板上形成较大的抑菌圈(图 4),但与 MG63 细胞



(a) Zone of inhibition test, using disc diffusion assay against Gram-negative (*E. coli*) and Gram-positive (*S. carnosus*) bacteria



(b) Bacterial density assay

图 4 SeSr-HA 抑制细菌生长^[58]

Fig. 4 SeSr-HA inhibits bacterial growth^[58]

共培养时, 细胞存活率低于 70%。而 SeO_3^{2-} 和 Sr^{2+} 共掺杂的 HA 不仅保持了优异的抗菌活性, 还具备良好的细胞相容性, 这是因为共掺杂的 Sr^{2+} 削弱了 SeO_3^{2-} 的毒性作用, 使其对细胞的影响降至最低^[58]。虽然关于双离子掺杂 HA 材料的成骨、抗菌作用的研究工作已经有所进展, 但其内在机理研究和全面的生物相容性评价还需要进一步开展。为了推进其临床转化, 未来需要更系统的方法学验证其安全性和功能, 同时利用监管科学手段正确引导该领域安全高速发展。

2.4 双离子掺杂 HA 的促血管生成作用

骨是高度血管化的组织, 血管网络的重建对于骨缺损的再生至关重要。研究表明, 多种离子如 Sr^{2+} 、 Si^{4+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 等均能促进血管生成因子

VEGF 等的表达^[59–61]。因此, 离子掺杂的 HA 可以通过释放特定离子来诱导成血管因子的表达, 从而刺激血管生成, 加速骨再生进程。相较于单一离子掺杂, 双离子掺杂 HA 材料对血管生成具有更优的协同促进作用。

Yu 等^[62]研究发现, MgSr-HA 能够持续释放 Sr^{2+} 和 Mg^{2+} , 显著上调血管生长因子 VEGF、eNOS 和 Ang-1 的表达, 因而具有更强的促血管生成能力。此外, MgSr-HA 还可以提升成骨细胞的成骨活性, 具有强大的促骨再生潜力(图 5)。Kulanthavel 等^[44]的研究表明, Co^{2+} 和 Mg^{2+} 能协同促进缺氧诱导因子 (HIF-1 α) 的转录表达, 有效启动血管内皮生长因子 (VEGF) 依赖的促血管生成通路, 促进血管系统重建, 加速组织再生。

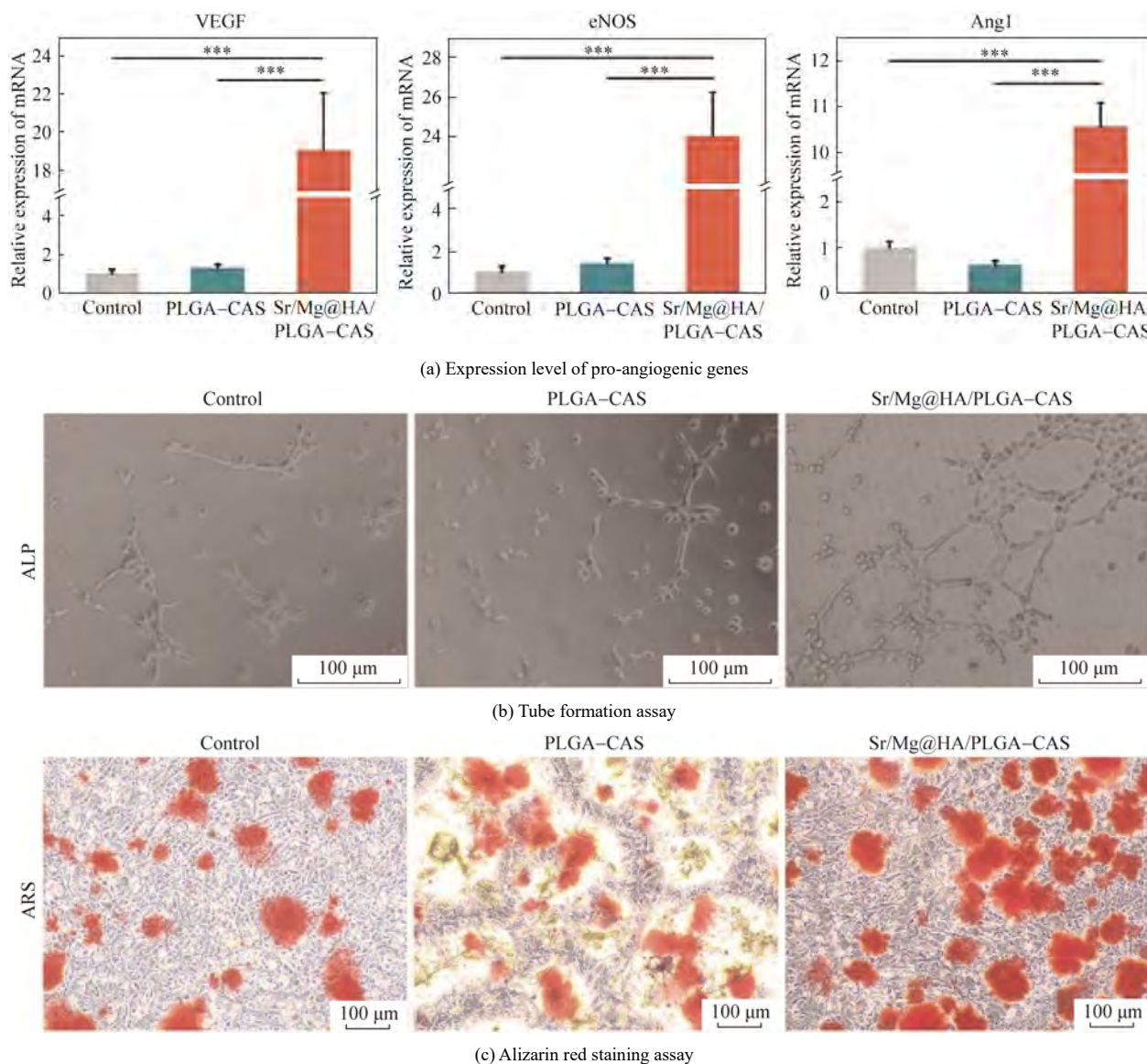


图 5 MgSr-HA 促进血管生成和提升成骨细胞成骨活性^[62]

Fig. 5 MgSr-HA promotes angiogenesis and enhances osteogenic activity of osteoblasts^[62]

由此可见, 双离子掺杂 HA 通过促血管生成可以显著促进骨缺损的再生。然而, 目前大多数研究仅验证了 VEGF 信号通路在促血管生成方面的作用, 双离子掺杂 HA 促血管生成的分子机制尚未被完全阐明。另外, 联合双离子掺杂 HA 与多种促血管再生因素共同增强血管重建也是一个极具前景的策略, 例如以双离子掺杂 HA 为基材负载促血管生成因子或者构建多级孔结构支架加速诱导血管再生等。

2.5 双离子掺杂 HA 的免疫调节作用

免疫系统是生物材料植入后最先响应的系统之一。在骨修复过程中, 生物材料可以通过诱导合适的免疫反应, 塑造良好的骨免疫微环境, 从而促进血管和新骨生成。大量研究已经证实, HA 基材料能够通过募集免疫细胞、调控巨噬细胞 M2 型极化、抑制炎症因子表达等多种免疫调节机制加速骨再生进程^[63-65]。

离子掺杂技术可进一步增强 HA 的免疫调节作用。 Sr^{2+} 、 La^{3+} 、 Si^{4+} 等掺杂离子可通过影响不同信

号通路表达, 增强 HA 的免疫调节作用。例如, Sr^{2+} 可以下调 NF- κB 通路, 同时刺激中性粒细胞向 N2 型极化, 有效降低炎症, 进而促进血管生成和骨再生^[66]。 Si^{4+} 则可以通过促进骨髓源性树突状细胞分化, 增加细胞因子分泌等方式, 增强 HA 的免疫活性, 从而加速骨修复进程^[67]。

具有免疫调节作用的双离子掺杂 HA 能够协同诱导多种促再生进程, 在促骨再生应用中具有更明显的优势。目前已有部分研究报道, 例如 Yang 等^[68]制备了 $\text{Sr}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 共掺杂的 HA, 其释放的 Fe^{3+} 可以迅速募集大量巨噬细胞并诱导其向 M1 方向极化, 从而启动血管重建过程, 随后 Sr^{2+} 与 Fe^{3+} 协同作用, 诱导巨噬细胞完成 M1-M2 转化, 加速骨再生进程。此外, Zhong 等^[34]使用仿生模板法得到了 Zn^{2+} 和 Sr^{2+} 双掺的 HA (图 6), 在修复早期能通过释放的 Zn^{2+} 和 Sr^{2+} 协同刺激巨噬细胞, 诱导形成良好的成骨免疫微环境, 从而提升骨修复效果。

值得注意的是, 具有免疫调节作用的双离子掺杂 HA 相关研究目前还比较有限, 因此设计不同掺

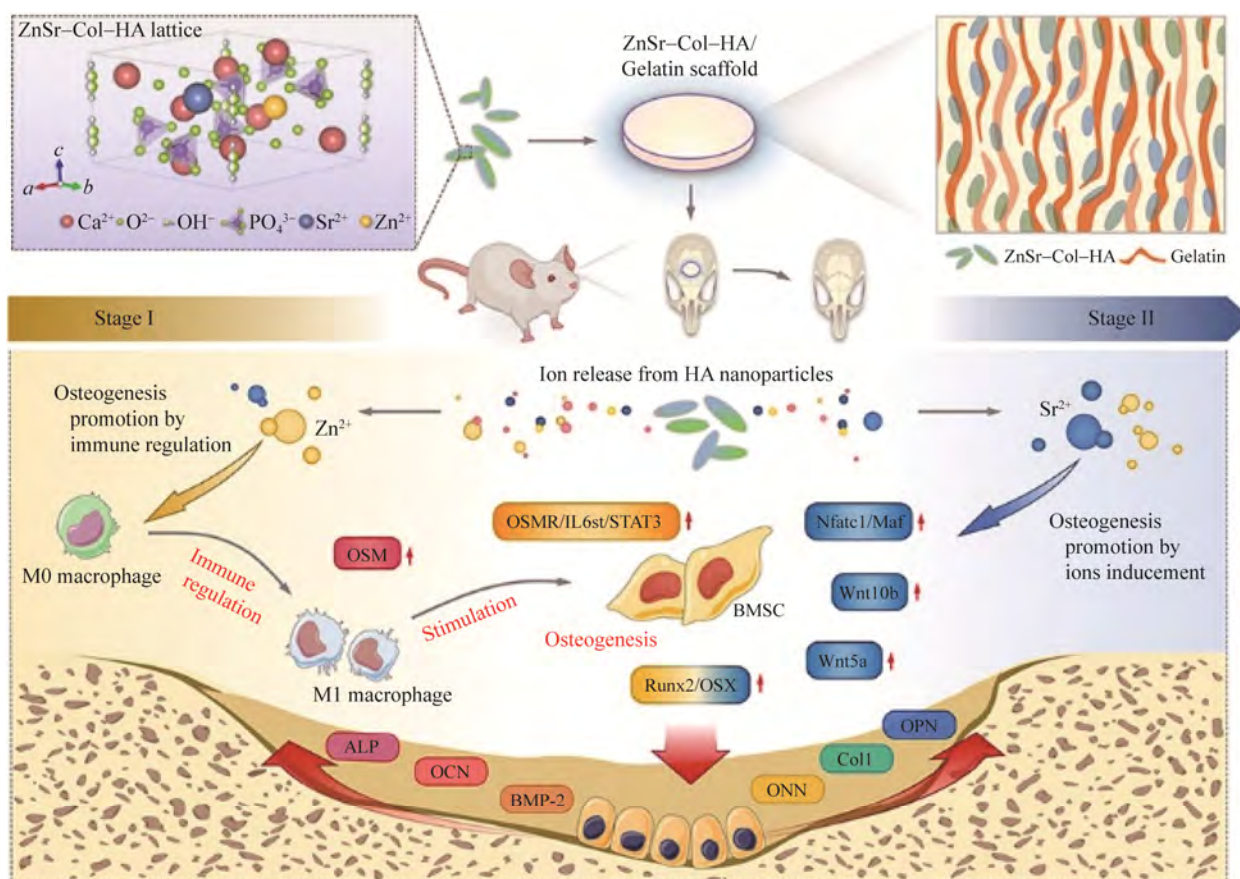


图 6 ZnSr-Col-HA 通过程序性骨免疫调节和成骨作用促进骨再生^[34]

Fig. 6 Schematic diagram of ZnSr-Col-HA promoting bone regeneration through procedural osteo-immunomodulation and osteogenesis^[34]

杂离子的组合以实现更好的成骨免疫调节作用是近年来有价值的研究方向。此外 HA 的尺寸、形貌、结晶度等因素也会影响其骨免疫调节作用,优化这些参数以充分发挥双离子掺杂 HA 的免疫调节作用也是研究重点之一。虽然研究已证明双离子掺杂 HA 能通过影响巨噬细胞行为促进骨再生进程,但免疫系统中细胞种类繁多,未来的研究需要关注双离子掺杂 HA 与多种类型免疫细胞之间的相互作用,为设计具有更好成骨免疫调节能力的离子掺杂 HA 奠定理论基础。

2.6 双离子掺杂 HA 的生物标记和医学成像功能

钪(Gd^{3+})、铕(Eu^{3+})、铽(Tb^{3+})、钐(Sm^{3+})等稀土元素离子具有光致发光特性,其发光谱带窄、发射波长分布区域宽。这些离子掺入 HA 后将赋予 HA 材料荧光特性,可用于生物标记或医学成像。

Liu 等^[69]在碱性条件下,以 CTAB 为模板,采用共沉淀法制备了 Tb^{3+} 和 Gd^{3+} 共掺杂的 HA 纳米颗粒,该纳米颗粒在 544 nm 处发光强度高,并表现出良好的顺磁性,具有用于生物标记的潜力。

在临床中,如何观察骨组织工程材料植入后在体内的分布情况一直是一个难题。而将 2 种分别具有成骨作用或射线屏蔽作用的离子联合掺杂至 HA 有望解决这一问题。Liu 等^[70]通过水热法制备了 Ba^{2+} 和 Mg^{2+} 共掺杂的 HA,并将其与聚乳酸-羟基乙酸共聚物复合成支架(图 7)。该支架可显著加快大鼠胫骨缺损的愈合, Mg^{2+} 在其中发挥了关键作用。另外, Ba 良好的 X 射线屏蔽作用使支架在植入后能通过 X 射线或 CT 来观察,显示出良好的应用前景。双离子掺杂 HA 在医学成像中的应用尚处于起步阶段,相信随着研究工作的不断深入,这种新颖的双功能 HA 材料将逐步在临床中发挥作用。

2.7 双离子掺杂 HA 的载药缓释作用

HA 材料作为植入物在促进骨修复的同时,还可以通过负载药物或活性物质来进一步增强治疗效果。例如联合抗生素以降低细菌感染风险^[71];或负载促骨生成因子增强骨修复效果等^[72]。在这些应用中,活性成分的控释是关键。而 HA 降解速率缓慢,在一定程度上限制了其载药应用。双离子掺杂可以改变 HA 的结晶度、比表面积等性质,从而调节 HA 的降解速率。

Szurkowska 等^[43]通过沉淀法合成了 Mg 和 Si 掺杂的 HA,并将其与海藻酸钠、硫酸软骨素钠盐和羊毛角蛋白复合后制成微珠。该微珠系统具有较

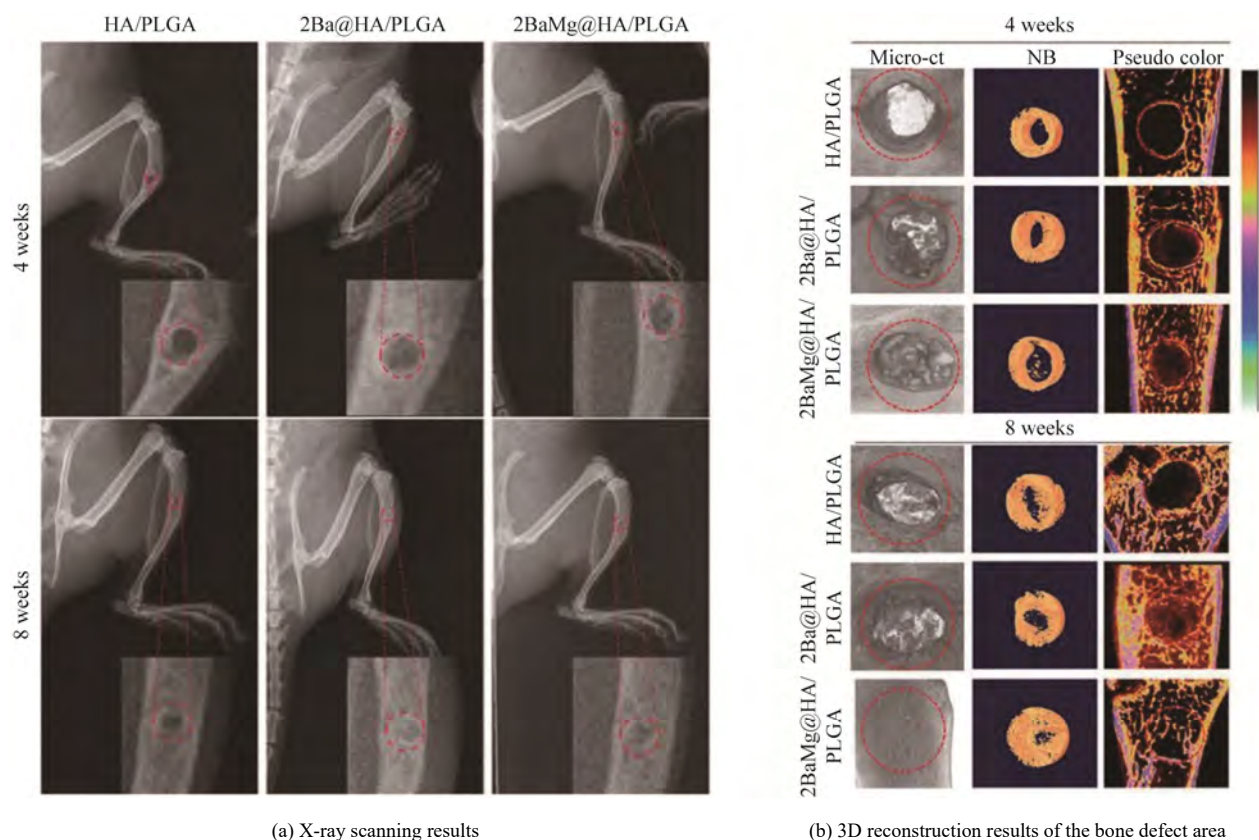
强的负载能力,通过 Mg^{2+} 与药物雷洛昔芬形成交联网络,从而持续稳定地释放盐酸雷洛昔芬,同时 Mg^{2+} 的溶出也能有效促进骨再生进程。Ullah 等^[73]也采用超声辅助的沉淀法将 Sr^{2+} 和 Fe^{3+} 掺入 HA 中。 Fe^{3+} 、 Sr^{2+} 双离子掺杂后,HA 表面的活性官能团增加,载药能力提升。 Fe^{3+} 的掺入使 HA 的结晶度降低,有利于药物负载与 Sr^{2+} 在体内的释放。

2.8 双离子掺杂 HA 的其它功能

除了应用于骨组织修复,HA 也是牙釉质修复中常用的材料之一,但纯 HA 材料在酸性环境下会逐步溶解。具有抗酸作用的 HA 能够在复杂的口腔环境中保持长期稳定,更好地发挥保护牙本质的作用。双离子掺杂可赋予 HA 抗酸作用,从而抵御细菌等产生的酸性侵蚀。例如, F^- 对 OH^- 的替代可以提升 HA 的晶格能,进而增强其耐酸性; La^{3+} 对 Ca^{2+} 的替代也能提高 HA 对酸侵蚀的抵抗能力,同时也能提升 HA 材料的机械强度^[74]。Erdem 等^[75]采用沉淀法合成了 La^{3+} 和 F^- 掺杂的 HA。尽管 La^{3+} 的掺杂会使 HA 的密度逐步降低并产生少量的 β -TCP 杂相,但其晶粒为纳米尺寸,烧结后的 F-La-HA 粉体变形小,颗粒形状规则且分布均匀,具有很强的稳定性。考虑到 La^{3+} 和 F^- 的抗酸作用,F-La-HA 在辅助牙齿抗酸治疗中具有较大潜力。目前的研究主要关注双离子掺杂 HA 在掺杂后的物化性质变化,其作为牙科植入物的可行性仍需要进一步的细胞和动物实验来证实,但其在这一领域的应用潜力值得期待。

双离子掺杂 HA 材料还具有可设计的降解性。离子掺杂 HA 的功能行使与其降解行为密切相关,单一的离子掺杂难以实现 HA 在理想的溶解度与功能发挥上的兼顾,而双离子掺杂可以有效地解决这一问题。例如 Sr^{2+} 掺杂的 HA 产物一般具有较高的结晶度,其 Sr^{2+} 释放较慢,而 CO_3^{2-} 的掺杂能够显著降低 HA 的结晶度,提升其溶解性,从而加速 Sr^{2+} 的释放^[76]。一般而言, F^- 、 Cl^- 、 Sr^{2+} 等离子的取代,可以提升 HA 的结晶度,而 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等与 Ca^{2+} 原子半径相差较大的离子则会显著降低 HA 的结晶度。因此,可以通过调控溶解度更好地发挥双离子掺杂 HA 的生物学功能。

总之,双离子掺杂能够赋予 HA 材料不同的生物学特性和功能,拓展了其在硬组织工程中的应用。但随着掺杂离子种类的增加,体系的复杂性也随之升高,阐明其作用机理也面临更大挑战。



BV is bone volume; TV is tissue volume.

图 7 BaMg-HA 加速大鼠胫骨缺损愈合^[70]
Fig. 7 BaMg-HA accelerated rat tibia defect healing^[70]

3 结论与展望

羟基磷灰石(HA)作为自然骨的主要无机成分,被广泛应用于骨组织工程中。离子掺杂是有效提升HA材料生物活性的重要途径之一。骨缺损的复杂性及患者对康复质量的追求使得临床对HA的性能提出了更高的要求。双离子掺杂HA材料为满足此需求提供了可能性。本文讨论了双离子掺杂HA材料的制备方法及其原理特征,并综述了双掺杂HA材料在硬组织工程中的作用。

目前制备方法学上,双离子掺杂HA多以沉淀法和水热法实现,但其结晶度往往高于天然磷灰石。以细胞外基质成分为模板仿生制备双掺杂类骨磷灰石,可实现更优的成骨和成血管能力。研究证明,双离子掺杂HA材料的生物活性与其离子含量密切相关。因此,如能实现HA的双离子可控性掺杂,将有利于其临床转化进程。另一方面,掺杂离子的释放与材料的生物学性能也密切相关,HA的掺杂元素种类、结晶度、比表面积,特别是其精细结构等均能影响其降解释放,需要更多的研究来阐述双离子掺杂HA释放和降解动力学。值得注意的是,虽然单离子掺杂磷灰石的生物学功能及其相关信号通路已经被大量报道,但离子间的相互作用使得双离子掺杂磷灰石的相关分子机制变得更加复杂和多元,目前对双离子掺杂HA材料的生物相容性研究仍不够深入。未来还需要更多工作从体外细胞和分子水平、体内动物实验甚至临床试验层面来进一步验证其生物安全性及有效性,需要更系统的监管科学新工具、新方法和新标准的介入,推进其临床转化进程。

参考文献:

- [1] ZHU G Y, ZHANG T X, CHEN M, et al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(11): 4110–4140.
- [2] IELO I, CALABRESE G, DE LUCA G, et al. Recent advances in hydroxyapatite-based biocomposites for bone tissue regeneration in orthopedics[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9721.
- [3] 张静, 李泓, 高海明, 等. 水热法制备方糖状 CaCO_3 @HA 颗粒药物控释载体[J]. *硅酸盐学报*, 2019, 47(12): 1792–1800.
ZHANG Jing, LI Hong, GAO Haiming, et al. *J Chin Ceram Soc*, 2019, 47(12): 1792–1800.
- [4] 国家药品监督管理局. 人工修复材料[S]. 国械注准 20223131500, 2022–11–09.
- [5] YANG G J, LIU H M, HU X X, et al. Bio-inspired hybrid nanoparticles promote vascularized bone regeneration in a morphology-dependent manner[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(18): 5794–5805.
- [6] MA J, WANG J L, AI X, et al. Biomimetic self-assembly of apatite hybrid materials: From a single molecular template to Bi-/multi-molecular templates[J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(4): 744–760.
- [7] LI Y, HAO H, ZHONG Z Y, et al. Assembly mechanism of highly crystalline selenium-doped hydroxyapatite nanorods via particle attachment and their effect on the fate of stem cells[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5(12): 6703–6714.
- [8] WANG J L, YANG G J, WANG Y F, et al. Chimeric protein template-induced shape control of bone mineral nanoparticles and its impact on mesenchymal stem cell fate[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(7): 1987–1996.
- [9] ZHAO C C, WANG X Y, GAO L, et al. The role of the micro-pattern and nano-topography of hydroxyapatite bioceramics on stimulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Acta Biomater*, 2018, 73: 509–521.
- [10] TITE T, POPA A C, BALESCU L M, et al. Cationic substitutions in hydroxyapatite: Current status of the derived biofunctional effects and their *in vitro* interrogation methods[J]. *Materials*, 2018, 11(11): 2081.
- [11] WANG Y H, MA J, ZHOU L, et al. Dual functional selenium-substituted hydroxyapatite[J]. *Interface Focus*, 2012, 2(3): 378–386.
- [12] CUI W, SUN G F, QU Y Z, et al. Repair of rat calvarial defects using Si-doped hydroxyapatite scaffolds loaded with a bone morphogenetic protein-2-related peptide[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(11): 1874–1882.
- [13] QIU Z Y, NOH I S, ZHANG S M. Silicate-doped hydroxyapatite and its promotive effect on bone mineralization[J]. *Front Mater Sci*, 2013, 7(1): 40–50.
- [14] YANG Q, DU Y Y, WANG Y F, et al. Si-doping bone composite based on protein template-mediated assembly for enhancing bone regeneration[J]. *Front Mater Sci*, 2017, 11(2): 106–119.
- [15] HU W, MA J, WANG J L, et al. Fine structure study on low concentration zinc substituted hydroxyapatite nanoparticles[J]. *Mater Sci Eng C*, 2012, 32(8): 2404–2410.
- [16] HUANG H Y, PAN W Y, WANG Y F, et al. Nanoparticulate cell-free DNA scavenger for treating inflammatory bone loss in periodontitis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5925.
- [17] 朱庆霞, 韩丹, 李亚明. 氟和碳酸根复合掺杂制备磷灰石[J]. *硅酸盐学报*, 2016, 44(12): 1768–1774.
ZHU Qingxia, HAN Dan, LI Yaming. *J Chin Ceram Soc*, 2016, 44(12): 1768–1774.
- [18] EVIS Z, WEBSTER T J. Nanosize hydroxyapatite: Doping with various ions[J]. *Adv Appl Ceram*, 2011, 110(5): 311–321.
- [19] ARCOS D, VALLET-REGÍ M. Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants[J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(9): 1781–1800.
- [20] RATNAYAKE J T B, MUCALO M, DIAS G J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends[J]. *J Biomed Mater Res*, 2017, 105(5): 1285–1299.
- [21] GRAZIANI G, BOI M, BIANCHI M. A review on ionic substitutions in hydroxyapatite thin films: Towards complete biomimetism[J]. *Coatings*, 2018, 8(8): 269.
- [22] BASU S, BASU B. Unravelling doped biphasic calcium phosphate: Synthesis to application[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2019, 2(12): 5263–5297.
- [23] KUMAR R, MOHANTY S. Hydroxyapatite: A versatile bioceramic for tissue engineering application[J]. *J Inorg Organomet Polym Mater*, 2022, 32(12): 4461–4477.
- [24] BASU S, BASU B. Doped biphasic calcium phosphate: Synthesis and structure[J]. *J Asian Ceram Soc*, 2019, 7(3): 265–283.

- [25] MOHAMMADI ZAHIRANI E, FATHI M H. The effect of high-energy ball milling parameters on the preparation and characterization of fluorapatite nanocrystalline powder[J]. *Ceram Int*, 2009, 35(6): 2311–2323.
- [26] KHERADMANDFARD M, FATHI M H, ANSARI F, et al. Effect of Mg content on the bioactivity and biocompatibility of Mg-substituted fluorapatite nanopowders fabricated via mechanical activation[J]. *Mater Sci Eng C*, 2016, 68: 136–142.
- [27] SZURKOWSKA K, DROBNIĘWSKA A, KOLMAS J. Dual doping of silicon and manganese in hydroxyapatites: Physicochemical properties and preliminary biological studies[J]. *Materials*, 2019, 12(16): 2566.
- [28] MARIAPPAN A, PANDI P, BEULA RANI K R, et al. Study of the photocatalytic and antibacterial effect of Zn and Cu doped hydroxyapatite[J]. *Inorg Chem Commun*, 2022, 136: 109128.
- [29] KAYGILI O, KESER S. Sol–gel synthesis and characterization of Sr/Mg, Mg/Zn and Sr/Zn co-doped hydroxyapatites[J]. *Mater Lett*, 2015, 141: 161–164.
- [30] MATIĆ T, ZEBIĆ M L, MILETIĆ V, et al. Sr, Mg co-doping of calcium hydroxyapatite: Hydrothermal synthesis, processing, characterization and possible application as dentin substitutes[J]. *Ceram Int*, 2022, 48(8): 11155–11165.
- [31] LI Y F, WANG W Y, HAN J, et al. Synthesis of silver- and strontium-substituted hydroxyapatite with combined osteogenic and antibacterial activities[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200(2): 931–942.
- [32] ULLAH I, GLORIA A, ZHANG W C, et al. Synthesis and characterization of sintered Sr/Fe-modified hydroxyapatite bioceramics for bone tissue engineering applications[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(1): 375–388.
- [33] JIA M F, HONG Y P, DUAN S Y, et al. The influence of transition metal ions on collagen mineralization[J]. *Mater Sci Eng C*, 2013, 33(4): 2399–2406.
- [34] ZHONG Z Y, WU X D, WANG Y F, et al. Zn/Sr dual ions-collagen co-assembly hydroxyapatite enhances bone regeneration through procedural osteo-immunomodulation and osteogenesis[J]. *Bioact Mater*, 2021, 10: 195–206.
- [35] SULLIVAN C O, NEILL L O, et al. Osteointegration, antimicrobial and antibiofilm activity of orthopaedic titanium surfaces coated with silver and strontium-doped hydroxyapatite using a novel blasting process[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2021, 11(2): 702–716.
- [36] DITTLER M L, UNALAN I, GRÜNEWALD A, et al. Bioactive glass (45S5)-based 3D scaffolds coated with magnesium and zinc-loaded hydroxyapatite nanoparticles for tissue engineering applications[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 182: 110346.
- [37] GARBO C, LOCS J, D'ESTE M, et al. Advanced Mg, Zn, Sr, Si multi-substituted hydroxyapatites for bone regeneration[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 1037–1058.
- [38] TAN S L, WANG Y F, DU Y Y, et al. Injectable bone cement with magnesium-containing microspheres enhances osteogenesis via anti-inflammatory immunoregulation[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(10): 3411–3423.
- [39] HAYASHI K, KISHIDA R, TSUCHIYA A, et al. Honeycomb blocks composed of carbonate apatite, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite for bone regeneration: Effects of composition on biological responses[J]. *Mater Today Bio*, 2019, 4: 100031.
- [40] LI B H, LEI Y, HU Q S, et al. Porous copper- and lithium-doped nano-hydroxyapatite composite scaffold promotes angiogenesis and bone regeneration in the repair of glucocorticoids-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biomed Mater*, 2021, 16(6): 065012.
- [41] LIN K L, WANG X H, ZHANG N, et al. Strontium (Sr) strengthens the silicon (Si) upon osteoblast proliferation, osteogenic differentiation and angiogenic factor expression[J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4(21): 3632–3638.
- [42] WANG J Y, LIU Y C, LIN G S, et al. Flame-sprayed strontium- and magnesium-doped hydroxyapatite on titanium implants for osseointegration enhancement[J]. *Surf Coat Technol*, 2020, 386: 125452.
- [43] SZURKOWSKA K, KAZIMIERCZAK P, KOLMAS J. Mg, Si—co-substituted hydroxyapatite/alginate composite beads loaded with raloxifene for potential use in bone tissue regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2933.
- [44] KULANTHAIVEL S, MISHRA U, AGARWAL T, et al. Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion[J]. *Ceram Int*, 2015, 41(9): 11323–11333.
- [45] CUI W, YANG L, ULLAH I, et al. Biomimetic porous scaffolds containing decellularized small intestinal submucosa and $\text{Sr}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ co-doped hydroxyapatite accelerate angiogenesis/osteogenesis for bone regeneration[J]. *Biomed Mater*, 2022, 17(2): 025008.
- [46] BARBANENTE A, NADAR R A, ESPOSTI L D, et al. Platinum-loaded, selenium-doped hydroxyapatite nanoparticles selectively reduce proliferation of prostate and breast cancer cells co-cultured in the presence of stem cells[J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(14): 2792–2804.
- [47] PARK S, CHOI J, DOAN V H M, et al. Biodegradable manganese-doped hydroxyapatite antitumor adjuvant as a promising photo-therapeutic for cancer treatment[J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 1085458.
- [48] CHEN M H, HANAGATA N, IKOMA T, et al. Hafnium-doped hydroxyapatite nanoparticles with ionizing radiation for lung cancer treatment[J]. *Acta Biomater*, 2016, 37: 165–173.
- [49] SUN J P, ZHENG X Y, LI H, et al. Monodisperse selenium-substituted hydroxyapatite: Controllable synthesis and biocompatibility[J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, 73: 596–602.
- [50] CHOI S, COONROD S, ESTROFF L, et al. Chemical and physical properties of carbonated hydroxyapatite affect breast cancer cell behavior[J]. *Acta Biomater*, 2015, 24: 333–342.
- [51] LI X, WANG Y F, CHEN Y, et al. Hierarchically constructed selenium-doped bone-mimetic nanoparticles promote ROS-mediated autophagy and apoptosis for bone tumor inhibition[J]. *Biomaterials*, 2020, 257: 120253.
- [52] WANG Y H, HAO H, ZHANG S M. Biomimetic coprecipitation of silk fibrin and calcium phosphate: Influence of selenite ions[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 178(2): 338–347.
- [53] WANG Y H, HAO H, LIU H M, et al. Selenite-releasing bone mineral nanoparticles retard bone tumor growth and improve healthy tissue functions *in vivo*[J]. *Adv Healthc Mater*, 2015, 4(12): 1813–1818.
- [54] WANG Y F, WANG J L, HAO H, et al. *In vitro* and *in vivo* mechanism of bone tumor inhibition by selenium-doped bone mineral nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(11): 9927–9937.
- [55] LI S H, HE Y, LI J, et al. Titanium scaffold loaded with strontium and copper double-doped hydroxyapatite can inhibit bacterial growth and enhance osteogenesis[J]. *J Biomater Appl*, 2022, 37(2): 195–203.
- [56] KOLMAS J, PIOTROWSKA U, KURAS M, et al. Effect of carbonate

- substitution on physicochemical and biological properties of silver containing hydroxyapatites[J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, 74: 124–130.
- [57] LIM P N, WANG Z Y, TONG S Y, et al. Silver, silicon co-substituted hydroxyapatite modulates bacteria-cell competition for enhanced osteogenic function[J]. *Biomed Mater*, 2021, 16(5): 055018.
- [58] MAQBOOL M, NAWAZ Q, ATIQ UR REHMAN M, et al. Synthesis, characterization, antibacterial properties, and *in vitro* studies of selenium and strontium co-substituted hydroxyapatite[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4246.
- [59] GRITSCH L, MAQBOOL M, MOURIÑO V, et al. Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: Copper and strontium[J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(40): 6109–6124.
- [60] DASHNYAM K, BUITRAGO J O, BOLD T, et al. Angiogenesis-promoted bone repair with silicate-shelled hydrogel fiber scaffolds[J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(12): 5221–5231.
- [61] CHENG D W, DING R Y, JIN X, et al. Strontium ion-functionalized nano-hydroxyapatite/chitosan composite microspheres promote osteogenesis and angiogenesis for bone regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(16): 19951–19965.
- [62] YU S K, SUN T, LIU W, et al. PLGA cage-like structures loaded with Sr/Mg-doped hydroxyapatite for repairing osteoporotic bone defects[J]. *Macromol Biosci*, 2022, 22(8): 2270023.
- [63] ZHAO D W, YU M Z, ZHAO Y X, et al. Improvement of bone formation by bionic hydroxyapatite nanorod *via* the regulation of macrophage polarization[J]. *J Mater Sci Technol*, 2023, 136: 109–120.
- [64] JIANG J W, LIU W B, XIONG Z X, et al. Effects of biomimetic hydroxyapatite coatings on osteoimmunomodulation[J]. *Biomater Adv*, 2022, 134: 112640.
- [65] ZHANG L, LIANG Z H, CHEN C, et al. Engineered hydroxyapatite nanoadjuvants with controlled shape and aspect ratios reveal their immunomodulatory potentials[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(50): 59662–59672.
- [66] LI T, HE H T, YANG Z Z, et al. Strontium-doped gelatin scaffolds promote M2 macrophage switch and angiogenesis through modulating the polarization of neutrophils[J]. *Biomater Sci*, 2021, 9(8): 2931–2946.
- [67] WANG X P, IHARA S, LI X, et al. Si-doping increases the adjuvant activity of hydroxyapatite nanorods[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 174: 300–307.
- [68] YANG L, ULLAH I, YU K D, et al. Bioactive $\text{Sr}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ co-substituted hydroxyapatite in cryogenically 3D printed porous scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Biofabrication*, 2021, 13(3): 035007.
- [69] LIU Z G, WANG Q, YAO S W, et al. Synthesis and characterization of $\text{Tb}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ dual-doped multifunctional hydroxyapatite nanoparticles[J]. *Ceram Int*, 2014, 40(2): 2613–2617.
- [70] LIU X J, MA Y H, CHEN M J, et al. Ba/Mg co-doped hydroxyapatite/PLGA composites enhance X-ray imaging and bone defect regeneration[J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(33): 6691–6702.
- [71] GEULI O, METOKI N, ZADA T, et al. Synthesis, coating, and drug-release of hydroxyapatite nanoparticles loaded with antibiotics[J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(38): 7819–7830.
- [72] UDOMLUCK N, LEE H, HONG S, et al. Surface functionalization of dual growth factor on hydroxyapatite-coated nanofibers for bone tissue engineering[J]. *Appl Surf Sci*, 2020, 520: 146311.
- [73] ULLAH I, ZHANG W C, YANG L, et al. Impact of structural features of Sr/Fe co-doped HAp on the osteoblast proliferation and osteogenic differentiation for its application as a bone substitute[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 110: 110633.
- [74] JODATI H, GÜNER B, EVIS Z, et al. Synthesis and characterization of magnesium-lanthanum dual doped bioactive glasses[J]. *Ceram Int*, 2020, 46(8): 10503–10511.
- [75] ERDEM U, TURKOZ M B. La^{3+} and F^{-} dual-doped multifunctional hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis and characterization[J]. *Microsc Res Tech*, 2021, 84(12): 3211–3220.
- [76] ZHANG L L, LI H J, LI K Z, et al. Preparation and characterization of carbon/SiC nanowire/Na-doped carbonated hydroxyapatite multilayer coating for carbon/carbon composites[J]. *Appl Surf Sci*, 2014, 313: 85–92.