

不同 3D 打印精度制作的生物材料表面形貌对表皮葡萄球菌生物膜形成影响

杨政鸿¹⁾, 宁明杰¹⁾, 何大千¹⁾, 杨猛哲¹⁾, 黄永平²⁾, 黄云超¹⁾

(1)云南省肿瘤医院, 昆明医科大学第三附属医院胸外一科, 云南昆明 650108; 2)成都市第三人民医院急诊科, 四川成都 610031)

[摘要] 目的 探讨不同 3D 打印精度制作的生物材料表面形貌对表皮葡萄球菌生物膜形成的影响。方法 以医用 3D 打印原材料光敏树脂 MED610 为材料, 使用光固化成型技术分别按照 16 μm 、30 μm 、100 μm 层厚制作样本。测量样本表面粗糙轮廓的算术平均偏差 R_a 、轮廓的最大高度 R_z , 静态角接触法检测样本疏水性。与表皮葡萄球菌标准株 RP62A 于振荡器上共培养, 分别在 2 h、6 h、12 h、24 h、30 h 时取出材料表面, 激光共聚焦显微镜测量单位视野细菌群落数量, 扫描电镜观察材料表面生物膜形成情况。结果 16 μm 层厚制作生物材料表面 R_a 、 R_z 值较 30 μm 层厚与 60 μm 制作样本较小, 不同层厚制作材料表面疏水性无明显差异 ($P > 0.05$)。与表皮葡萄球菌共培养 2 h、6 h 时, 16 μm 组材料表面少量表皮葡萄球菌分散在材料表面, 无细菌聚集现象出现, 单位视野细菌群落数量明显低于 30 μm 组与 100 μm 组 ($P < 0.05$)。培养 12 h、24 h、30 h 时, 各组材料表面均可观察到生物膜形成, 单位视野细菌群落数量无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 在 3D 打印中以不同层厚制作出的材料表面粗糙度影响大, 但对材料疏水性无明显影响。层厚越薄制作出的材料在感染早期不利于表皮葡萄球菌黏附。

[关键词] 3D 打印技术; 生物材料; 表面形貌; 表皮葡萄球菌; 生物膜

[中图分类号] R318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X(2022)02 - 0012 - 06

Effect of Surface Topography on Staphylococcus Epidermidis Biofilm Formation by Different 3D Printing Thickness of Biomaterials

YANG Zhenghong¹⁾, NING Mingjie¹⁾, HE Daqian¹⁾, YANG Mengzhe¹⁾,
HUANG Yongping²⁾, HUANG Yunchao¹⁾

(1) Dept. of Thoracic Surgery I, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Cancer Hospital, Kunming Yunnan 650118; 2) Emergency Treatment, The Third People's Hospital Chengdu Chengdu Sichuan 610031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of surface topography on staphylococcus epidermidis biofilm formation by different 3D printing Thickness of biomaterials. **Methods** Medical 3D printing raw material, photosensitive resin MED610 was used as the material and samples were made according to 16 μm , 30 μm and 100 μm layer thicknesses using light-curing molding technology, respectively. Measure the sample surface roughness contour arithmetic mean deviation R_a , contour maximum height R_z , static angular contact method to detect sample hydrophobicity. The samples were co-cultured with Staphylococcus epidermidis standard strain RP62A on an oscillator, and the material surface was removed at 2 h, 6 h, 12 h, 24 h and 30 h, respectively. The number of bacterial communities per field of view was measured by laser confocal microscopy and the biofilm

[收稿日期] 2022 - 01 - 18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81960335); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2019Y0362)

[作者简介] 杨政鸿(1997~), 男, 云南曲靖市人, 在读硕士研究生, 主要从事胸部肿瘤和生物材料感染相关研究。

[通信作者] 黄云超, E-mail: huangych2001@aliyun.com

formation on the material surface was observed by scanning electron microscopy. **Results** The R_a and R_z values on the surface of the 16- μm layer thickness fabricated biomaterial were smaller than those of the 30- μm layer thickness and 60- μm fabricated samples, and there was no significant difference in the hydrophobicity of the surface of the fabricated materials with different layer thicknesses. When co-cultured with *Staphylococcus epidermidis* for 2 h and 6 h, a small amount of *Staphylococcus epidermidis* was scattered on the surface of the material in the 16 μm group without bacterial aggregation, and the number of bacterial communities per unit field of view was significantly lower than that in the 30 μm and 100 μm groups ($P < 0.05$). Biofilm formation could be observed on the material surface of each group at 12 h, 24 h and 30 h of incubation and there was no significant difference in the number of bacterial communities per unit field of view ($P > 0.05$). **Conclusions** Different precision fabrication has a large effect on the surface roughness of 3D printing materials, but has no significant effect on hydrophobicity. The 16- μm layer thickness fabrication material is less favorable for *Staphylococcus epidermidis* adhesion in the early stage of infection than the 30- μm and 100- μm layer thickness fabrication materials.

[**Key words**] 3D Printing Technology; Biomaterials; Surface Topography; *Staphylococcus Epidermidis*; Biofilm

医用生物材料(Biomedical Material)是一类特殊生物材料, 主要对机体、组织和器官进行诊治、诱导再生、修复或替换其缺损人体组织、器官或者增进其特殊功能^[1]。优良的生物材料不仅应具有有良好的理化性能、良好的生物体的相容性、抗钙化能力、抗细菌黏附能力等, 而且适应生物原结构和生物功能也应是研究重点。

近年来随着3D打印技术的兴起, 医用生物材料可使用3D打印技术按照“分层制造、逐层叠加”的基本原理制作, 能按照个性化患者需要, 快速、精确制备各种结构复杂的生物材料, 以获得较理想的组织修复效果^[2-3]。现阶段临床所使用的医用生物材料大多都是按照传统的制造技术如注塑法、挤出成型法、模铸法制造, 与3D技术制作相比存在精度差、结构简单, 材料较单一等多种缺陷^[4]。

在医用生物材料植入人体内时, 病原体也更易趁虚而入, 造成感染炎症。细菌在感染早期粘附在医用生物材料表面增殖, 在中期细菌群体之间调控并分泌生物膜需要的物质, 最终在材料表面形成稳固的生物膜(Biofilm, BF)。由于生物膜的保护作用, 抗生素难以突破生物膜和对膜内细菌有效性杀伤。同时, 稳固于材料表面的生物膜内部细菌会不断繁殖, 向机体环境释放出浮游细菌, 造成植入部位感染的反复发作和形成生物材料植入感染(Biomaterial Centered Infection, BCI), BCI是造成机体植入生物材料后感染难治的主要原因。一旦发生感染, 在多数情况下, 需被迫取出生物材料, 后续由于机体功能的需要不得不再次植入生物材料^[5]。

医用3D打印技术可使用不同的层厚精度制

作生物材料, 其生物相容性、抗钙化能力、力学性能、抗细菌黏附等性能有待进一步研究。本研究以光敏树脂MED610为基本材料, 使用3D打印技术中光固化成型技术, 按照不同的层厚精度制作生物材料样本, 观察临床常见植入感染病原菌表皮葡萄球菌在样本表面的生物膜形成过程。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器

光敏树脂材料MED610, 使用Poly Jet machine (Connex 500, Objet ltd)打印成 $X = 5 \text{ mm}$, $Y = 5 \text{ mm}$, $Z = 10 \text{ mm}$ 竖条立方体, Z 轴精度分别(16 μm , 30 μm , 100 μm), 由美国Stratasys公司制作, 钴60照射备用。

Puregene Yeast/Bact Kit (Qiagen 公司, 美国); Live/Dead®Baclight™Bacterial Viability Kit (Invitrogen 公司, 美国); MRC-1024ES型激光共聚焦显微镜、Blast软件(Bio-Rad公司, 美国); XL30ESEM型扫描电镜(Philips公司, 荷兰); Ramé-hart Model 400接触角测定仪(美国)

1.2 医用3D打印生物材料表面形貌检测

1.2.1 材料表面粗糙度检测 样本的表面粗糙度按照国家标准(GB/T 3505-2009)、以XZ面为观察面, 用精密粗糙度测试仪, 随机选择样本表面5段长度为2 mm区域检测其粗糙度 R_a 、 R_z 平均值。

1.2.2 材料表面疏水性检测 采用Ramé-Hart(USA)接触角测试仪对试样进行静态接触角测试, 实验所用的液体为蒸馏水和甘油, 检测试样五个不同位置的静态接触角平均值。

1.3 医用 3D 打印生物材料表面表皮葡萄球菌生物膜形成观察

选择取临床 BCI 常见致病菌表皮葡萄球菌株 RP62A, 采用平板菌落计数法将 SE 浓度调整为 1×10^6 CFU/mL。按制作层厚组分为 16 μm 、30 μm 、100 μm 组。每组分别加入 SE 悬液 0.3 ml 和 LB 培养基 3.7 mL 与打印材料; 置于在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 50 ~ 60 r/min 振荡器上培养。分别于 2 h、6 h、12 h、24 h、30 h 取出材料, 激光共聚焦显微镜观察材料表面细菌群落数以及生物膜厚度; 扫描电镜检测材料表面生物膜形成情况。

1.3.1 激光共聚焦显微镜观察材料表面细菌群落数以及生物膜厚度 按照 Live/Dead@Baclight TMBacterial Viability-Kit 说明书配制活/死细菌荧光染色剂。将 3D 打印材料用蒸馏水冲洗 3 次, 加入活/死细菌荧光染色剂, 于常温下染色 20 min。激光共聚焦显微镜观察条件为氩激光 (514 nm/488 nm)。每组材料片中随机取 5 个视野观察单位视野细菌群落数量。

1.3.2 扫描电镜观察细菌生物膜表面结构 用羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液 (pH7) 将不同层厚制作的生物材料冲洗 3 次, 固定于扫描电镜载物台上, CO_2 临界干燥, 离子溅射表面固定镀膜致材料表面呈金黄色, 镜下观察细菌生物膜表面结构。

1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件包进行分析。数据计量资料服从正态分布, 以均数 \pm 标准差表示, 组间两两比较采用单因素方差分析; 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 样本表面粗糙度 R_a 、 R_z 值检测结果

16 μm 组料表面粗糙度 R_a 、 R_z 值最小, 较 30 μm 组、100 μm 组差异具有统计学意义, 组间

两两比较差异存在统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 静态角法检测样本表面疏水性结果

16 μm 、30 μm 、100 μm 组, 材料表面与蒸馏水和甘油的接触角检测结果接近, 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 激光共聚焦显微镜观察

激光共聚焦显微镜观察示, 培养 2 h、6 h 时 16 μm 组材料表面单位视野细菌群落数量, 明显低于 30 μm 组与 100 μm 组 ($P < 0.05$)。培养 12 h、24 h、30 h 时, 各组材料表面单位视野细菌群落数量无明显统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 3。

2.4 描电镜观察

扫描电镜观察提示, 在共培养 2 h、6 h 时, 16 μm 组材料表面, 仅存在个别表皮葡萄球菌散在分布于材料表面, 无细菌聚集现象出现, 无明显生物膜形成。30 μm 、100 μm 组材料表面可观

表 1 不同层厚制作材料表面粗糙度 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Surface roughness of materials of different thickness ($\bar{x} \pm s$)

组别	R_a 值	R_z 值
16 μm	0.12 ± 0.03	0.51 ± 0.24
30 μm	0.19 ± 0.02	1.29 ± 0.36
100 μm	0.33 ± 0.03	2.32 ± 0.33
统计量	92.978	41.241
P 值	< 0.001	< 0.001

表 2 不同层厚制作对材料疏水性影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Influence of different thickness on hydrophobicity of materials ($\bar{x} \pm s$)

组别	蒸馏水	甘油
16 μm	86.3 ± 1.6	76.8 ± 1.3
30 μm	84.5 ± 0.9	78.3 ± 1.6
100 μm	85.6 ± 1.3	78.9 ± 1.5
统计量	2.273	2.701
P 值	0.146	0.108

表 3 同层厚制作材料表面单位视野表皮葡萄球菌群落数量 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Number of Staphylococcus epidermidis community per field of vision on the surface of the same thickness material ($\bar{x} \pm s$)

组别	2 h	6 h	12 h	24 h	30 h
16 μm	1.12 ± 0.72	4.71 ± 1.25	12.96 ± 1.95	18.62 ± 1.75	16.15 ± 2.03
30 μm	$4.51 \pm 1.04^{\Delta}$	$8.95 \pm 1.09^{\Delta}$	11.64 ± 1.56	19.39 ± 2.07	15.38 ± 1.85
100 μm	$6.82 \pm 1.25^{\Delta}$	$10.86 \pm 0.76^{\Delta}$	13.77 ± 2.05	20.44 ± 2.21	15.71 ± 2.15
统计量	38.965	44.891	1.676	1.016	0.180
P 值	< 0.001	< 0.001	0.228	0.391	0.837

与 16 μm 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

观察到少量表皮葡萄球菌聚集, 但无明显生物膜形成。随着共培养时间延长, 各组材料表面细菌群落逐渐增多被黏液样物包裹, 生物膜增大变厚,

30 h 体积趋于稳定。但 12 h、24 h、30 h 时间点观察各组材料表面的细菌生物膜并不存在差异(图 1)。

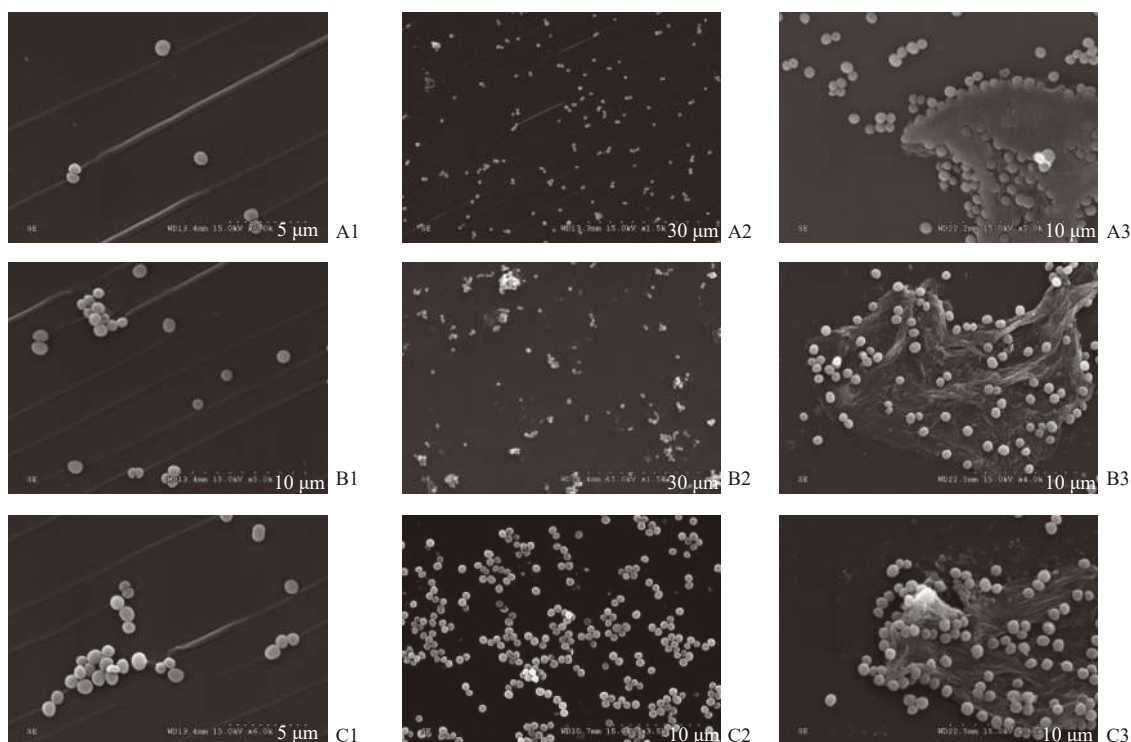


图 1 扫描电子显微镜(SEM)图像显示表皮葡萄球菌在不同层厚的材料表面不同时间形成的生物膜(10 μm)

Fig. 1 Scanning electron microscopy (SEM) images of biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* occur at different thicknesses and different times. Scale bar represented (10 μm)

A1: 16 μm 组 2 h; A2: 16 μm 组 6 h; A3: 16 μm 组 30 h; B1: 30 μm 组 2 h; B2: 30 μm 组 6 h; B3: 30 μm 组 30 h; C1: 100 μm 组 2 h; C2: 100 μm 组 6 h; C3: 100 μm 组 30 h。

3 讨论

3D 打印技术的精进和材料学的拓展, 3D 打印技术在小规模制作, 高度精细化定制的生物医学领域引起的广泛重视。在外科临床工作中如骨科、心血管外科、口腔颌面、烧伤外科等患者在疾病诊疗过程经常需要非永久或永久植入生物材料(Biomaterial), 以修复代替病损或缺失的组织和器官, 常见如: 3D 牙科植入物, 3D 打印头盖骨, 3D 打印关节, 3D 生物血管, 3D 冠脉支架, 3D 生物皮肤等。医用 3D 打印技术制作精度可达 0.016 ~ 1.500 mm, 甚至可达纳米级, 并且可根据植入部位不同而具体调整精度, 制作各种形态结构和生物功能的生物材料^[2,6]。而传统方法制作医用植入材料精度控制性差, 在制造结构复杂的生物材料难度高、耗时长, 其成品效果并不理想^[7]。而 3D 打印技术的快速、准确、可个体化定制的

特点独具优势, 正逐步代替传统制作方法。但生物医用相关材料制备领域仍处于初始阶段, 主要原因 3D 打印原材料必须在人体内环境中需要保持长期稳定, 具备优良的生物相容性, 材料及降解产物在面对的内环境不产生化学毒副作用, 同时材料也不受机体环境影响发生大规模破坏而诊疗效果大打折扣。因此 3D 打印医用生物材料的研究主要集中开发具有较好生物相容性、生物响应性、机械力学的打印原材料。而对于 3D 打印生物材料植入机体后, 导致的植入材料感染研究未见报道。

由于 3D 打印生物材料表面形貌、力学性能、化学成分等特征与传统方式制作的生物材料相比差异较大, 这些特征可能影响植入材料和细菌等微生物的相互作用, 从而导致其植入机体后细菌等微生物生物膜形成有所不同。

本研究使用精度较高的医用 3D 打印技术光固化成型(stereolithography apparatus, SLA), 以具

有生物相容性的光敏树脂 MED610 为主要材料,按照现有技术能达到的最薄层厚 16 μm 和常规 30 μm 、100 μm 层厚制作样本,检测样品材料的表面形貌,并与临床中常见植入材料感染菌种—表皮葡萄球菌^[8]共培养观察材料表面生物膜形成。

本研究发现 16 μm 层厚材料的表面粗糙度 R_a 、 R_z 较 30 μm 与 100 μm 层厚材料小,但不同层厚的材料与蒸馏水和甘油静态接触角变化不大。制作层厚越薄其材料表面越光滑但并未发现类似荷叶效应^[9]出现,提示 3D 打印生物材料的疏水性主要与材料本身的疏水基团相关,在以微米级层厚制作下的生物材料对其疏水性影响不大。

在与表皮葡萄球菌共培养 2 h、6 h 时,激光共聚焦显微镜以及扫描电镜观察提示,16 μm 组材料表面仅少量细菌黏附,单位视野细菌群落数量明显低于 30 μm 组与 100 μm 组,提示在细菌生物膜的可逆黏附期,细菌最先黏附在材料表面不平整的地方,如裂沟、刻痕、摩擦缺陷等优势部位,再由这些优势部位扩展开来。粗糙的材料表面相较光滑的材料表面可增加微生物的接触面积,为细菌黏附提供更多有利的优势部位,细菌更加容易在较厚材料表面的定植和早期生长。当共培养 12 h、24 h、30 h 时,不同层厚的材料表面均可见生物膜形成,单位视野细菌群落数量无明显差异,提示随着时间的推移,当细菌与材料表面间的相互作用,进入不可逆黏附时,附着在材料表面的细菌快速繁殖,当细菌数量达到适当浓度,细菌生物膜通过群体感应进行调控,细菌并开始分泌生物膜“支架”如胞外多糖, eDNA 等^[10],使细菌可以牢固的粘附在材料表面,进入不可逆的细菌生物膜成熟阶段,此时生物材料的层厚、表面粗糙度,疏水性对细菌生物膜形成已无影响。

相关研究证明不同生物材料表面附着的细菌菌种以及附着量差异明显;同种材料表面,不同细菌的附着量也有明显差异^[11-12]。这不仅与材料表面拓扑结构(粗糙度 R_a 、 R_z 值、表面疏水性、平滑度),材料表面形貌(结构域),吸附力(对各种离子,氨基酸,蛋白质,不同细菌的吸附作用),化学性质(表面电荷,活性基团,极性,表面 PH 值)和物理性质(微孔的比率)相关,而且也与细菌的种属、细菌的自身特性(如有无鞭毛、分泌聚合物、致病力等)相关^[13-15]。细菌黏附并植入材料表面形成细菌生物膜,导致的生物材料植

入感染经久不愈是 3D 打印生物材料应用于临床实际必须面对的主要问题之一。生物材料的选择,复合材料以不同的成分比例,材料表面的拓扑结构、表面粗糙度、生物相容性,物理性质和化学性质,增加抗菌涂层等都是影响材料与细菌相互作用的因素。

3D 打印技术优点在于无需复杂的机械加工和具体模具,极大的简化了生产流程。同时,3D 打印技术可以生产出传统技术难以制造的外型,精细化要求。在面对医疗工作中不同复杂精细的要求得心应手。相较传统成型方法,3D 打印技术可提供更多的抗菌技术支持如:通过电脑辅助设计模拟天然生物表面拓扑结构,通过物理表面形貌实现杀菌作用^[16];通过 3D 打印材料制作可将不同材质的原材料及抗菌药物,按一定空间顺序排列制作成复合生物材料,具有较好的抗菌效果^[17-18];对 3D 打印原材料分析找到同时具备较高生物相容性和抗菌活性的材料^[19];对于成品 3D 材料,在材料表面增加抗菌涂层并通过调整抗菌涂层成分的比例,达到抗菌作用^[20-21]。因此,对于 3D 打印生物材料的原材料选择、制作标准、表面微观结构的控制、成品的后期处理等程序,需将抗细菌黏附作为重要考虑因素之一,仍待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Chen Y, Wang X Y, Huang Y C, et al. Study on the Structure of Candida Albicans-Staphylococcus Epidermidis Mixed Species Biofilm on Polyvinyl Chloride Biomaterial[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(2): 461-468.
- [2] Zhang J, Wehrle E, Rubert M, et al. 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3971.
- [3] 张慧, 孟桐辉, 刘琳, 等. 3D 生物打印材料在生物医学领域中的应用及研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2019, 13(02): 157-160.
- [4] Liaw C Y, Guvendiren M. Current and emerging applications of 3D printing in medicine[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(2): 024102.
- [5] 车柯达, 陈颖, 雷玉洁. 3D 打印技术在抗感染生物材料制作中的研究进展[J]. *重庆医学*, 2019, 48(19): 3359-3362.

- [6] Niklason L E, Lawson J H. Bioengineered human blood vessels[J]. *Science*, 2020, 370: e6934. doi: [10.1126/science.1220839](https://doi.org/10.1126/science.1220839).
- [7] Wang Z, Yang Y. Application of 3D Printing in Implantable Medical Devices[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6653967.
- [8] Lei Y, Xu Y, Jing P, et al. The effects of TGF- β 1 on staphylococcus epidermidis biofilm formation in a tree shrew biomaterial-centered infection model[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(1): 57.
- [9] Ensikat H J, Ditsche-Kuru P, Neinhuis C, et al. Superhydrophobicity in perfection: the outstanding properties of the lotus leaf[J]. *Beilstein J Nanotechnol*, 2011, 2: 152-161.
- [10] 陈雅, 叶联华, 黄云超. 葡萄球菌生物膜形成影响因素的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(36): 37-34.
- [11] Engel A S, Kranz H T, Schneider M, et al. Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity[J]. *BMC Oral Health*, 2020, 20(1): 162.
- [12] Montelongo-Jauregui D, Srinivasan A, Ramasubramanian A K, et al. An in vitro model for oral mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus gordonii* in synthetic saliva[J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 686.
- [13] De-La-Pinta I, Cobos M, Ibarretxe J, et al. Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2019, 30(7): 77.
- [14] Kligman S, Ren Z, Chung C H, et al. The Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration and Biofilm Formation[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(8): 1641.
- [15] Linklater D P, Baulin V A, Juodkazis S, et al. Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(1): 8-22.
- [16] Tripathy A, Sen P, Su B, et al. Natural and bioinspired nanostructured bactericidal surfaces[J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 248: 85-104.
- [17] Ismail H S, Ali A I, Abo El-Ella M A, et al. Effect of different polishing techniques on surface roughness and bacterial adhesion of three glass ionomer-based restorative materials: In vitro study[J]. *J Clin Exp Dent*, 2020, 12(7): e620-e625.
- [18] Singh T, Hook A L, Luckett J, et al. Discovery of hemocompatible bacterial biofilm-resistant copolymers[J]. *Biomaterials*, 2020, 260: 120312.
- [19] Mccarthy R R, Ullah M W, Pei E, et al. Antimicrobial Inks: The Anti-Infective Applications of Bioprinted Bacterial Polysaccharides[J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(11): 1155-1159.
- [20] Liu J, Yao X, Ye J, et al. A printing-spray-transfer process for attaching biocompatible and antibacterial coatings to the surfaces of patient-specific silicone stents[J]. *Bio-med Mater*, 2020, 15(5): 1748.
- [21] Zhang Y, Zhai D, Xu M, et al. 3D-printed bioceramic scaffolds with antibacterial and osteogenic activity[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(2): 1758-5090.