·基础研究·

氧化微环境中普鲁士蓝纳米酶促进MC3T3-E1细胞成骨分化

陈 露[1,2,3],唐诗佳[1,2,3],钟彩英[4],胡 克[4],章非敏[1,2,3*]

[1]南京医科大学附属口腔医院口腔修复科,[2]江苏省口腔疾病研究重点实验室,[3]江苏省口腔转化医学工程研究中心,江苏 南京 210029;[4]南京医科大学生物医学工程与信息学院,临床医学工程校重点实验室,江苏 南京 211166

[摘 要] **目的:**探索氧化微环境中普鲁士蓝纳米酶对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响。**方法:**CCK-8法和流式细胞仪检测不同浓度普鲁士蓝纳米酶的生物相容性;使用二甲酚橙法、WST-8法检测不同浓度普鲁士蓝纳米酶的模拟酶活性,DCFH-DA探针免疫荧光法检测普鲁士蓝纳米酶对细胞内活性氧的清除能力;通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)染色及活性检测、茜素红染色、实时荧光定量逆转录PCR评估其氧化微环境下对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响。**结果:**CCK-8和流式凋亡结果显示,0~100 μg/mL普鲁士蓝纳米酶具有良好的生物相容性;二甲酚橙法、WST-8法结果显示,普鲁士蓝具有良好的模拟酶活性并且呈时间和剂量依赖性;DCFH-DA探针免疫荧光结果显示,普鲁士蓝纳米酶对细胞内活性氧也有较好的清除能力;ALP染色及活性检测、茜素红染色、实时荧光定量逆转录PCR结果显示,氧化微环境中普鲁士蓝纳米酶对MC3T3-E1细胞的成骨分化能力具有显著增强作用。**结论:**普鲁士蓝纳米酶可以增强MC3T3-E1细胞的抗氧化活性,促进氧化环境中细胞的成骨分化能力。

[关键词] 普鲁士蓝纳米酶;活性氧;抗氧化;成骨分化;骨组织工程

[中图分类号] R318.08 [文献标志码] A [文章编号] 1007-4368(2023)05-669-09

doi:10.7655/NYDXBNS20230512

Prussian blue nanozyme promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells in an oxidative microenvironment

CHEN Lu[1,2,3],TANG Shijia[1,2,3],ZHONG Caiying[4],HU Ke[4],ZHANG Feimin[1,2,3*]

[1]Department of Prosthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, [2]Jiangsu Province Key Laboratory of Oral Diseases, [3]Jiangsu Province Engineering Research Center of Stomatological Translational Medicine, Nanjing 210029; [4]Key Laboratory of Clinical Engineering, School of Biomedical Engineering and Informatics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[**Abstract**] **Objective:** This study aims to explore the effect of Prussian blue nanozyme on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells in an oxidative microenvironment. **Methods:** Biocompatibility of different concentrations of Prussian blue nanozymes was detected by CCK-8 assay and flow cytometry; mimetic enzyme activity of Prussian blue nanozymes at different concentrations was measured by xylenol orange assay and WST-8 assay, and intracellular reactive oxygen species scavenging activity of Prussian blue nanozymes was detected by DCFH-DA probe immunofluorescence assay; and the osteogenesis differentiation of MC3T3-E1 cells under oxidative microenvironment was evaluated by alkaline phosphatase (ALP) staining and activity assay, alizarin red staining and real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR. **Results:** CCK-8 and flow cytometry showed good biocompatibility of Prussian blue nanozyme between 0-100 μg/mL concentrations; xylenol orange assay and WST-8 assay showed good mimetic enzymatic activity of Prussian blue nanozyme in a concentration and time-dependent manner; DCFH-DA probe immunofluorescence showed that Prussian blue nanozyme also had good ability to scavenge intracellular reactive oxygen species; ALP staining and activity assay, alizarin red staining and real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR showed that Prussian blue nanozyme can significantly enhance osteogenesis differentiation of MC3T3-E1 cells in oxidative microenvironment. **Conclusion:** Prussian blue nanozyme can

[基金项目] 国家重点研发计划纳米科技重点专项(2021YFA1201302/2021YFA1201300);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2018-87)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:fmzhang@njmu.edu.cn

enhance the antioxidant activity of MC3T3-E1 cells and promotes the osteogenic differentiation of cells in an oxidative environment.

[Key words]　Prussian blue nanozyme; reactive oxygen species; antioxidant; osteogenesis differentiation; bone tissue engineering

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(05): 669-677]

组织工程的引入使骨组织修复技术得到了发展，其中关键要素包括支架、细胞和生物活性因子[1]，以细胞为基础的颌骨再生技术已经逐步走向了临床[2]。MC3T3-E1是小鼠颅骨成骨细胞的前体细胞，主要功能是产生骨基质、分泌Ⅰ型胶原、调节骨基质的矿化和破骨细胞的骨吸收等，各种因素导致的成骨细胞活性下降均可引起骨质减少和骨质疏松症的发生[3]，因此，增加成骨细胞活性是预防和治疗骨缺损疾病的关键之一[4]。

活性氧(reactive oxygen species，ROS)是正常氧代谢中氧气反应生成水过程的中间产物，在生物体中起到细胞传导和保持机体氧化平衡的作用。但高水平的ROS会诱导细胞中包括核酸和蛋白质在内的生物分子氧化，导致细胞功能障碍甚至细胞死亡[5]。此外，过量产生的H_2O_2会加剧损伤部位的炎症反应，减缓骨缺损的愈合。已有研究发现，ROS水平升高会抑制间充质干细胞的成骨分化[6]。因此，需要激活抗氧化酶以防止ROS的过度积累。

然而，天然的抗氧化酶具有制备和提纯工艺复杂、不稳定、易变性、对环境条件要求严苛等缺点，因此人们提出了“人工酶”的概念。2007年，Gao等[7]发现四氧化三铁纳米颗粒内在的类过氧化物酶(peroxidase，POD)活性，首次提出了纳米粒子模拟酶的概念。近几年，普鲁士蓝纳米酶(Prussian blue nanozyme，PB)由于其出色的模拟酶活性和良好的生物安全性，受到了广泛关注。研究发现，PB具有POD、过氧化氢酶(catalase，CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)、抗坏血酸氧化镁(ascorbic acid oxidase，AAO)等多种模拟酶活性[8]。已经有研究把PB作为天然辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase，HRP)的替代品，应用于纸基比色葡萄糖传感，有效节省了成本，展现出巨大的临床应用价值[9]。还有研究者利用PB的多酶活性治疗小鼠结肠炎[10]和促进皮肤伤口愈合[11]，均取得了不错的疗效。

本研究在细胞层面初步验证了氧化微环境下PB的抗氧化促进成骨分化作用，即可以利用PB模拟CAT活性和模拟SOD活性，调节细胞培养微环境中和细胞内的ROS浓度，进而调节细胞成骨分化能力，使受到H_2O_2阳性刺激的细胞的成骨分化能力维持在正常细胞水平，这一理论可以给PB在骨组织工程领域中的应用提供支持。

1　材料和方法

1.1　材料

PVP包裹的PB(南京东纳生物科技有限公司)；透射电子显微镜(transmission electron microscopy，TEM，FEI Tecnai G2 F30，美国)；扫描电子显微镜(scanning electron microscope，SEM，TESCAN MAIA3公司，捷克)；纳米粒度及Zeta电位分析仪(ZS90 NANO公司，英国)；傅里叶红外光谱仪(Fourier transformed infrared，FTIR，Thermo Scientific公司，美国)；倒置荧光显微镜(Leica公司，德国)；Spectra Max 190酶标仪(Molecular device公司，美国)；小鼠颅骨成骨细胞系MC3T3-E1(上海中国科学院细胞库)；胎牛血清(上海Cyagen公司)；α-MEM基础培养基(Gibco公司，美国)；MC3T3-E1细胞成骨诱导分化培养基(上海Cyagen公司)；0.25%胰酶(Gibco公司，美国)；磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution，PBS，武汉Servicebio公司)；CCK-8试剂盒(合肥Biosharp公司)；H_2O_2检测试剂盒(上海碧云天)；总SOD活性检测试剂盒(WST-8法，上海碧云天)；DCFH-DA探针(北京Solarbio公司)；ROS试剂盒(北京Solarbio公司)；碱性磷酸酶(ALP)测试盒(上海碧云天)；BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天)；茜素红染色液(上海Cyagen公司)；RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)；RT-PCR逆转录试剂盒、SYBR Green Premix Ex TaqⅡ(TaKaRa公司，日本)；QuantStudio7荧光定量PCR仪(ABI公司，美国)；细胞培养箱(Heraeus公司，德国)。

1.2　方法

1.2.1　PB的表征

通过透射电子显微镜观察PB的形态和大小，并通过高分辨率透射电子显微镜观察PB表面晶格；通过扫描电子显微镜观察PB粒径和表面形貌。收集和PB溶液一起培养24 h的MC3T3-E1细胞沉淀，2.5%戊二醛固定制样后透射电镜下观察细胞内结构和PB胞吞情况。

测量PB的紫外-可见光吸收光谱(UV-VIS)，确

定PB最大吸收波长;通过纳米粒度及Zeta电位分析仪分析PB的表面电荷和水动力尺寸;傅里叶红外光谱仪获得PB红外吸收光谱(FTIR)。

1.2.2 PB的体外生物相容性

将MC3T3-E1细胞以每孔5×10^3个的密度接种于96孔板中,培养24 h后,加入PB溶液分别使各孔PB终浓度为0、10、20、50、100、150 μg/mL,其中,含0 μg/mL PB的完全培养基培养的细胞组设置为空白对照组。培养24 h和48 h后,弃原培养液,每孔加入100 μL的工作液(CCK-8与完全培养基按1∶10混合所得),37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中孵育2 h,每孔吸出80 μL液体至另一块96孔板中,Spectra Max 190酶标仪测450 nm波长处的吸光度。

将MC3T3-E1细胞以每孔1×10^4个的密度接种于12孔板中,24 h后换含0~150 μg/mL不同浓度PB的培养基继续培养24 h,胰酶消化,收集细胞,用荧光素(FITC、Alexa Fluor488等)标记的Annexin-V和碘化丙啶(propidine iodide,PI)作为探针,流式细胞仪检测细胞凋亡的发生。

1.2.3 PB的体外抗氧化活性

1.2.3.1 PB模拟CAT活性

使用专门的H_2O_2检测试剂盒,通过测定反应混合物中剩余H_2O_2的浓度来检测PB的模拟CAT活性。5个1.5 mL的离心管中,加入800 μL 100 μmol/L浓度的H_2O_2液,再分别加入不同量的PB溶液(250 μg/mL),使终浓度分别为0、10、20、50、100 μg/mL(n=3)。混匀后,在37 ℃振荡孵育(100 r/min)。每隔一定时间(15、30 、60 、90 、120 min),从反应混合物中取出溶液50 μL,按试剂盒说明书使用二甲酚橙法测定剩余H_2O_2浓度。即将50 μL的样品溶液与100 μL的H_2O_2检测液混合,在室温下孵育30 min,然后用Spectra Max 190酶标仪测560 nm处的吸光度(D)值。根据先前制作的H_2O_2浓度标准曲线,将D值转换为H_2O_2浓度。

1.2.3.2 PB模拟SOD活性

使用WST-8法,根据总SOD活性检测试剂盒使用说明书,分析PB纳米颗粒的超氧化物清除活性。该测定中,由黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应系统产生的超氧阴离子,可与WST-8试剂反应产生黄色的甲赞产物,使用Spectra Max 190酶标仪在450 nm处测量该黄色甲赞产物的D值。

超氧化物清除活性=$[(D_{对照组}-D_{样本组})/D_{对照组}]\times100\%$。

取5个15 mL离心管,按1∶8的比例分别加入不同浓度PB溶液(0、10、20、50、100 μg/mL)和WST-8/酶工作液。混匀后,在37℃振荡(100 r/min)孵育。每隔一定时间(30、60、90、120 min),从反应混合物中取出溶液180 μL和20 μL稀释后的反应启动工作液混匀,37 ℃孵育30 min,用Spectra Max 190酶标仪测定450 nm处的D值(n=3)。

1.2.3.3 PB对细胞内ROS的清除效率

使用DCFH-DA荧光探针标记MC3T3-E1细胞,倒置荧光显微镜下观察细胞内ROS水平。分组:对照组、PB组、Rosup阳性对照组、Rosup+PB组。将MC3T3-E1细胞以1×10^5个/孔接种于12孔板内,24 h后,更换无血清的培养基继续培养,其中PB组和Rosup+PB组加入终浓度为20 μg/mL的PB。24 h后,Rosup组和Rosup+PB组加入阳性Rosup试剂刺激细胞15 min,PBS洗3遍,每组细胞均加入预先用无血清培养基配好的DCFH-DA探针(20 nmol/L),37 ℃避光孵育30 min,倒置荧光显微镜下观察。

MC3T3-E1细胞以5×10^4个/孔接种于24孔板内,24 h后加入配好的20 nmol/L浓度的DCFH-DA探针,37 ℃避光孵育30 min,用PBS洗3遍。随后每孔加入不同浓度的H_2O_2(0、10、25、50、100、200 μmol/L)刺激细胞。各组分别加入终浓度为20 μg/mL的PB,混匀,避光孵育4 h,测荧光强度(EX=504 nm)。

将MC3T3-E1细胞以每孔1×10^4个的密度接种于12孔板中,24 h后一组用不含PB的培养基继续培养,另一组用含20 μg/mL PB的培养基继续培养,24 h后弃原培养基,PBS洗3遍,4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS冲洗,0.5% Triton X-100孵育10 min,PBS漂洗5次。加入鬼笔环肽室温条件下染色20 min,PBS冲洗5次后加入DAPI室温染30 s,倒置荧光显微镜观察细胞形态。

1.2.4 氧化微环境下PB颗粒对MC3T3-E1细胞的促成骨分化作用

1.2.4.1 ALP染色及活性检测

MC3T3-E1细胞以1×10^5个/孔的密度接种于12孔板中,待其融合至60%~70%,弃原培养基,加入成骨诱导培养基成骨诱导7 d,2~3 d换液,每次换液都重新加入H_2O_2和PB。分组:对照组、H_2O_2组(200 μmol/L)、H_2O_2+PB(20 μg/mL)组。按ALP显色试剂盒说明书配好染液后,每孔加入1 mL染液,室温避光孵育30 min,PBS轻洗2遍,扫描仪拍照,倒置显微镜下观察。

另取同样成骨诱导7 d后的细胞,每孔加入120 μL 0.5% TritonX-100冰上裂解20 min,超声后离

心，收集上清液，分别按照BCA总蛋白检测盒和ALP检测试剂盒的说明书检测总蛋白浓度和ALP活性。

1.2.4.2　茜素红染色

细胞分组和成骨诱导方法同前。成骨诱导21 d后，吸去原培养基，超纯水轻柔洗涤3次，用4%多聚甲醛在室温下固定细胞30 min。去除固定液，超纯水轻轻洗涤3次，每孔加入茜素红S染液1 mL，室温下染色20~30 min。扫描仪拍照，倒置显微镜下观察。

每孔加入10%氯化十六烷吡啶（cetyl pyridinium chloride，CPC）溶液，待茜素红溶解后，Spectra Max 190酶标仪测560 nm处D值。

1.2.4.3　实时荧光定量PCR

细胞分组和成骨诱导方法同1.2.4.1。成骨诱导至第7天时，弃原培养基，收集细胞，使用RNA提取试剂盒分离总RNA，将其逆转录为cDNA。采用TaKaRa SYBR Premix Ex TaqⅡ试剂盒配成10 μL反应体系在QuantStudio7荧光定量PCR仪上进行实时荧光定量PCR，检测成骨分化基因Runt相关转录因子2（Runt-related transcription factor 2，Runx-2）、Ⅰ型胶原蛋白（collagen type-Ⅰ，Col-Ⅰ）、ALP、骨钙素（osteocalcin，OCN）的表达。引物由上海生工生物工程有限公司合成（引物序列见表1）。靶基因的相对表达量根据方程式$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算。

1.3　统计学方法

所有定量数据均采用SPSS 22.0进行统计分析，Graphpad Prism 7进行作图，结果以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用最小显著性差异法（least-significant difference，LSD）检验，$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　PB的表征

尺寸和结晶度是纳米材料性能的关键因素。TEM图像显示，PB为立方体形态的纳米颗粒，直径约为100 nm（图1A）；高分辨率透射电镜图像清晰显示了PB表面晶格条纹（图1B），表明PB具有较好的结晶度；SEM图像显示PB粒径均一，表面呈“颗粒状”，为表面包覆剂PVP的存在（图1C）；MC3T3-E1细胞的透射电镜图证实了PB可以被胞吞进入细胞质（图1D），这有利于PB更好地发挥其功能学作用。

表1　qPCR的引物序列

Table 1　Primer sequences of qPCR

基因名称	上游序列（5′→3′）	下游序列（5′→3′）
β-actin	CATCCGTAAAGACCTCTAGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA
Runx-2	TGCAAGCAGTATTTACAACAGAGG	GGCTCACGTCGCTCATCTT
Col-Ⅰ	GACATGTTCAGCTTTGTGGACCTC	GGGACCCTTAGGCCATTGTGTA
ALP	GCAGTATGAATTGAATCGGAACAAC	ATGGCCTGGTCCATCTCCAC
OCN	AGCAGCTTGGCCCAGACCTA	TAGCGCCGGAGTCTGTTCACTAC

20、50、250 μg/mL的PB紫外-可见光吸收光谱（UV-VIS）均呈现PB的典型光谱，即由于Fe（Ⅱ）和Fe（Ⅲ）之间存在价态电荷转移，峰值在700 nm左右（图1E）；Zeta电位平均为-21.8 mV，表面带负电荷（图1F）；水动力平均粒径为130.9 nm（图1G）；FTIR光谱图显示了PB的结构组成（图1H），处于2 086 cm^{-1}的主吸收峰归属于PB中Fe（Ⅱ）-CN-Fe（Ⅲ）中C≡N键的伸缩振动，1 639 cm^{-1}处的吸收峰归属于PVP中酰胺基团的C＝O伸缩振动，表明PVP成功包覆于纳米粒子表面，3 443 cm^{-1}处的宽吸收峰归属于羟基（O-H），表明PB结构中存在间隙水。

2.2　PB的体外生物相容性

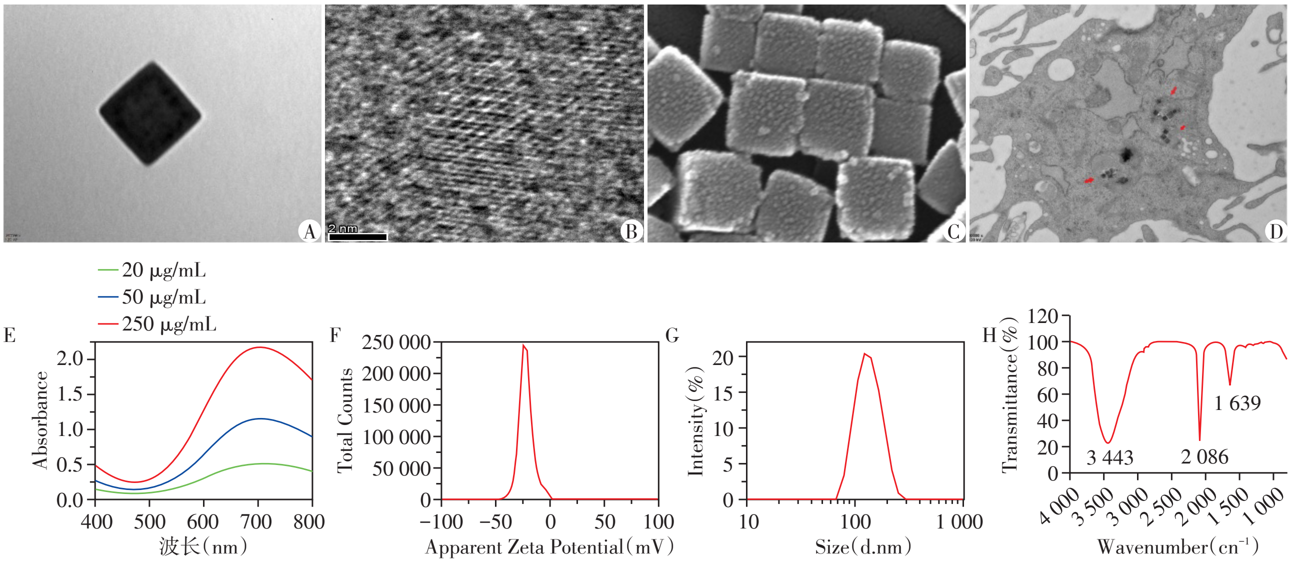
将不同浓度的PB溶液（0、10、20、50、100、150 μg/mL）与MC3T3-E1细胞共培养。CCK-8结果显示，浓度大于20 μg/mL之后，细胞活性随着PB浓度的增加而减小（图2A）。流式细胞仪检测不同浓度PB（0、10、20、50、100、150 μg/mL）对MC3T3-E1细胞凋亡的影响，也出现相似的趋势，浓度增加到150 μg/mL时，正常活性细胞降低到76%，早期凋亡细胞增加到20.7%（图2B）。故后续抗氧化活性实验采用0~100 μg/mL浓度的PB。

2.3　PB在细胞内外的ROS清除活性

2.3.1　PB对细胞外ROS的清除活性

H_2O_2和超氧阴离子是创伤期间细胞中产生的最丰富的活性氧类。通过二甲酚橙法测定分析了PB的总H_2O_2降解能力。结果表明，PB对H_2O_2的降解具有时间和浓度依赖性（图3A），并且20 μg/mL PB在作用120 min时，超过50%的H_2O_2已经被降解。

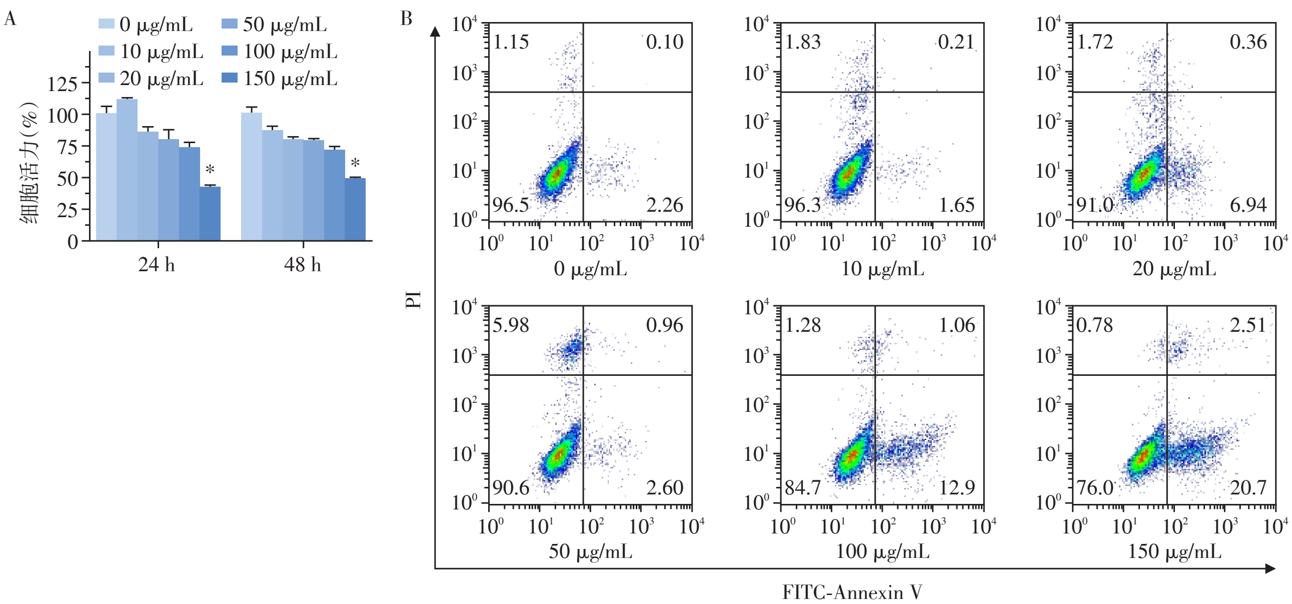
通过测量黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应系统产生



A:透射电镜观察PB形态(×300 000);B:高分辨率透射电镜观察PB结晶度(标尺:2 nm);C:扫描电镜观察PB形态和表面形貌(×500 000);D:透射电镜观察PB的胞吞情况(×20 000,红色箭头即为PB所在位置);E:PB的紫外吸收光谱图;F、G:纳米粒度及Zeta电位分析仪分析PB的表面电荷(F)、水动力尺寸(G);H:傅里叶红外光谱仪测量PB分子结构。

图1　PB的表征

Figure 1　Characterizations of PB nanozyme



A:CCK-8检测不同浓度PB对MC3T3-E1细胞增殖的影响;B:流式细胞仪检测不同浓度PB对MC3T3-E1细胞凋亡的影响(24 h)。与0 μmol/L比较,$^*P < 0.001$(n=3)。

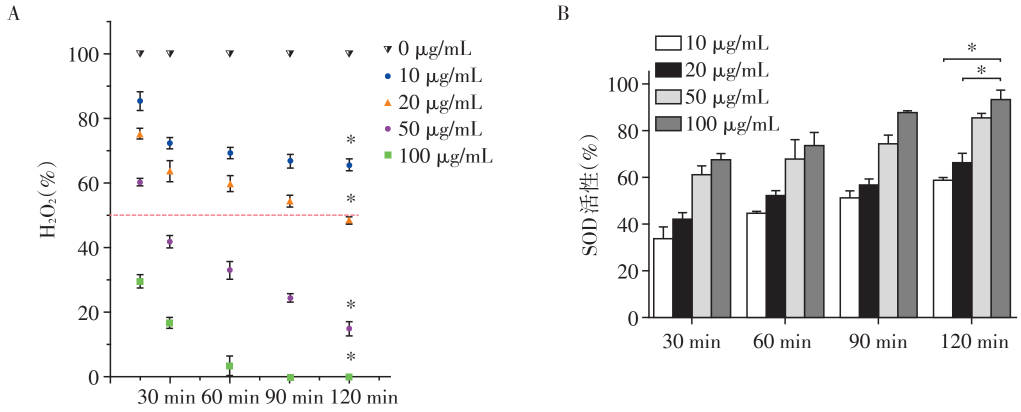
图2　PB的生物相容性

Figure 2　Biocompatibility of PB nanozyme

的超氧阴离子来定量PB的超氧化物清除活性。与H_2O_2降解类似,PB的超氧物清除能力也呈剂量和时间依赖性(图3B),并且20 μg/mL PB在作用120 min时,也有超过50%的超氧化物被清除。因此,之后的抗氧化成骨实验,采取20 μg/mL浓度的PB进行。

2.3.2　PB对细胞内ROS的清除活性

使用DCFH-DA荧光探针标记MC3T3-E1细胞,倒置荧光显微镜下观察细胞内ROS水平,FTIR荧光越强,代表细胞内ROS水平越高。可以看到,正常MC3T3-E1活细胞内的ROS水平很低,加入Rosup阳性刺激的组,FITC荧光强度显著增强,即细胞内ROS水平显著提高。而加入20 μg/mL PB不会使细胞内的ROS出现显著上升,相反,PB的存在可以使受到阳性刺激的MC3T3-E1细胞内的ROS水平降低



A:不同浓度PB的模拟CAT活性,与0 μg/mL比较,$^*P < 0.001$(n=3);B:不同浓度PB的模拟SOD活性,两组比较,$^*P < 0.001$(n=3)。

图3　普鲁士蓝纳米酶对细胞外ROS的清除效率

Figure 3　Extracellular ROS scavenging activity of PB

(图4A)。

通过酶标仪定量检测了细胞内ROS水平,不同浓度的H_2O_2(0、10、25、50、100、200 μmol/L)刺激MC3T3-E1细胞后,DCF荧光强度随着H_2O_2浓度的上升而增高,而PB的存在可以明显降低细胞内的DCF荧光强度即ROS水平,表明PB对细胞内的ROS也有较好的清除活性(图4B)。

此外,通过鬼笔环肽染色,倒置显微镜下进一步观察了20 μg/mL PB对细胞骨架和结构的影响,荧光图显示20 μg/mL PB的加入对MC3T3-E1细胞的骨架和形态无明显改变(图4C)。故采取20 μg/mL浓度的PB进行抗氧化成骨部分的实验。

2.4　氧化微环境下PB对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响

2.4.1　PB对MC3T3-E1细胞ALP活性的影响

为了研究PB在氧化微环境下对MC3T3-E1细胞早期成骨分化的影响,对成骨诱导7 d后的MC3T3-E1细胞分别做了ALP染色(图5A)和ALP活性定量检测(图5B)。结果显示,在200 μmol/L H_2O_2的阳性刺激下,MC3T3-E1细胞的成骨分化能力显著降低,而PB的存在可以增强细胞抗氧化能力,调节氧化微环境,使细胞的成骨分化能力维持正常水平。

2.4.2　PB对MC3T3-E1细胞外基质矿化活性的影响

为了研究PB在氧化微环境下对MC3T3-E1细胞晚期成骨分化的影响,对成骨诱导21 d后的MC3T3-E1细胞进行了茜素红染色和茜素红半定量检测。结果显示,成骨诱导21 d后对照组和PB组均有矿化物沉积,茜素红染色较深,而200 μmol/L H_2O_2阳性刺激组仅可见少量散在红色钙结节,染色也较浅(图6A)。半定量检测结果与染色结果相同(图6B),表明PB对MC3T3-E1细胞的抗氧化作用可以持续至成骨分化晚期。

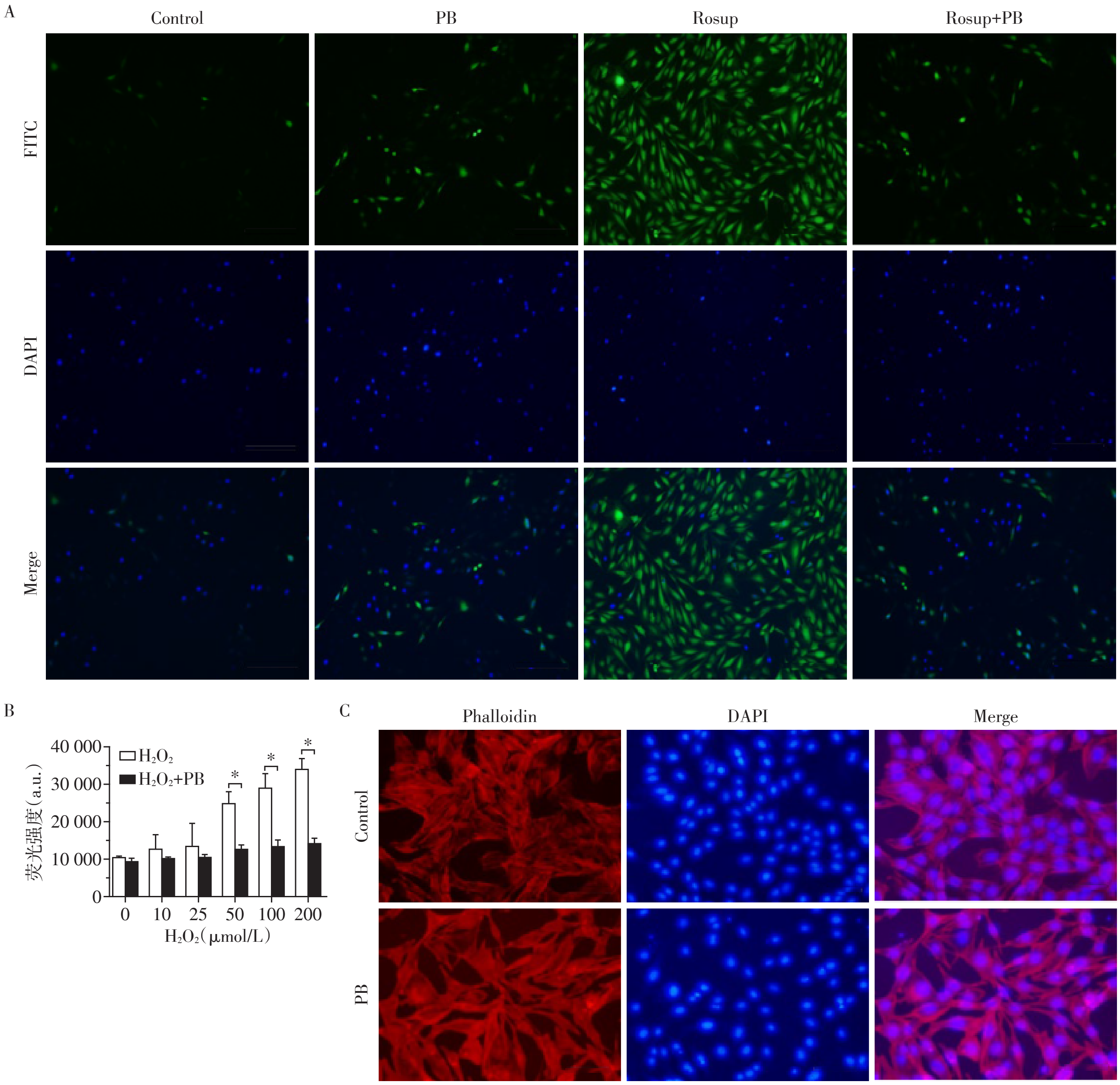
2.4.3　PB对MC3T3-E1细胞成骨相关基因表达的影响

为了进一步验证氧化微环境下PB对MC3T3-E1细胞成骨的影响,将3组MC3T3-E1细胞成骨诱导7 d后,运用实时荧光定量PCR分别分析成骨分化基因Runx-2(图7A)、ALP(图7B)、Col-Ⅰ(图7C)、OCN(图7D)的表达。结果显示,除了OCN基因,其余成骨分化相关基因中,H_2O_2组的表达水平明显降低,而PB组的表达水平均高于对照组,差异有统计学意义。OCN基因的表达水平在3组中并未出现显著性变化,可能是该基因在成骨早期表达还不明显。

3　讨　论

本研究使用PVP包裹的PB进行实验,首先对PB进行表征,结果显示PB为直径约100 nm、表面带负电荷、呈典型立方体形状的纳米颗粒。PVP作为聚合物保护剂可以降低表面能,抑制团聚,并增加纳米颗粒的溶解度。扫描电镜图中可以看到,PB粒径均一,分散性好,未发生团聚。PB的面心立方单元由三价铁离子、亚铁离子和氰化物离子组成,铁离子与氰化物的氮原子相连,而亚铁离子则由氰化物的碳原子相连,交替协调形成一个立方单元[12]。FTIR光谱验证了PB中碳氮键的存在。

生物安全性实验显示,浓度在150 μg/mL以下的PB生物相容性较好,因此后续抗氧化性实验使用浓度0~100 μg/mL的PB进行。细胞TEM结果显示PB可以进入细胞内,这有利于PB直接作用于细胞内的ROS,更好发挥其作用。



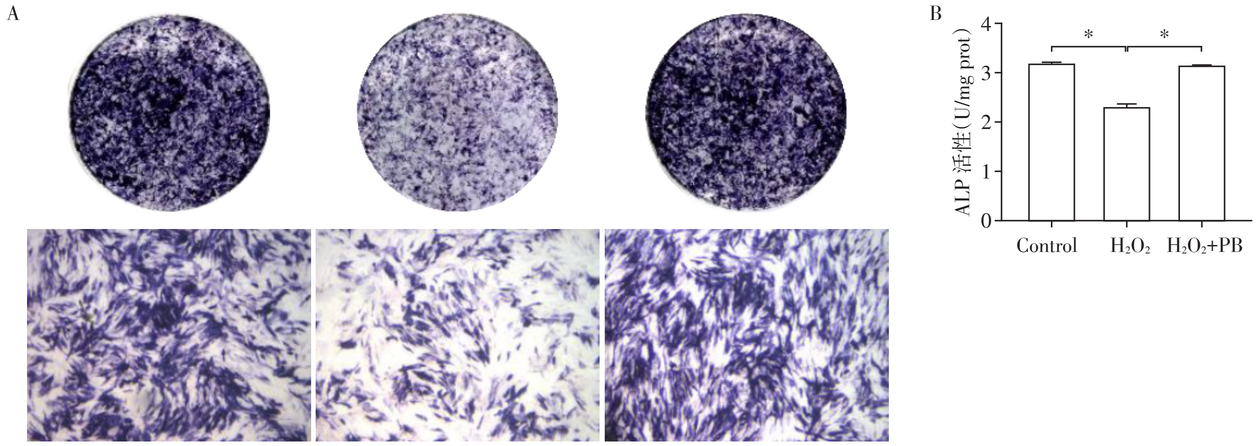
A:倒置荧光显微镜观察MC3T3-E1细胞内ROS水平(×10);B:酶标仪定量检测细胞内ROS水平(两组比较,$^*P < 0.001$,n=3);C:鬼笔环肽染色,倒置显微镜观察细胞形态(×20)。

图4 普鲁士蓝纳米酶对细胞内ROS的清除效率

Figure 4 Intracellular ROS scavenging activity of PB

抗氧化模拟酶实验表明,PB无论对细胞外还是细胞内的ROS都有较好的清除活性,并呈浓度和时间依赖性的方式发挥作用。生物体内最常见的ROS包括H_2O_2、$O_2^{\cdot-}$和·OH,它们是一种细胞内信号分子,当这些ROS水平升高,影响细胞信号转导系统,ROS生成与清除失衡,发生氧化应激,生物体各项机能将受到损害[13]。大多数疾病部位的抗氧化酶水平低于正常组织,ROS水平较高[14-17]。因此,维持体内ROS的动态平衡是机体生存和维持正常代谢活动所必须的[18]。

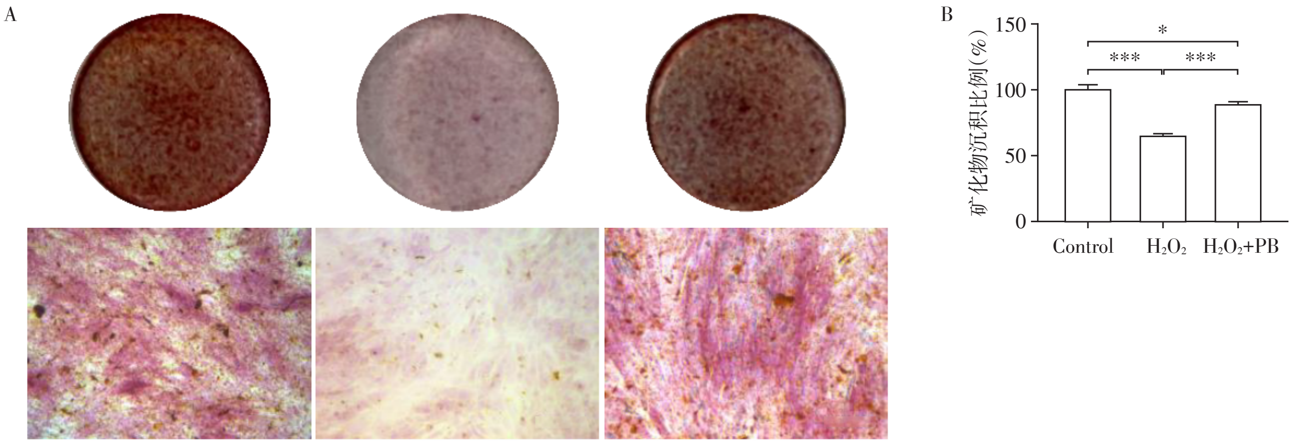
由于120 min时20 μg/mL PB对过氧化物和超氧化物的清除率均超过50%,后续的细胞成骨分化功能实验采用20 μg/mL浓度的PB进行验证。MC3T3-E1细胞成骨分化实验结果显示,氧化微环境下,无论在成骨的早期和晚期,PB对细胞的成骨分化均有促进作用。PB抗氧化性的潜在分子机制可能是通过上调磷酸化的核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2),以



成骨诱导7 d ALP染色图(A,上排为实场拍摄图,下排放大4倍)及ALP活性定量检测(B)。两组比较,*$P < 0.001$(n=3)。

图5　MC3T3-E1细胞ALP活性的检测

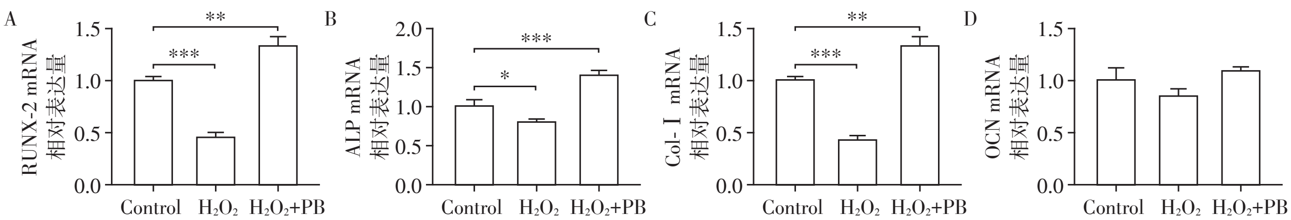
Figure 5　ALP activity of MC3T3-E1 cells



成骨诱导21 d茜素红染色图(A,上排为实场拍摄图,下排放大4倍)及茜素红半定量检测(B)。两组比较,*$P < 0.05$,***$P < 0.001$(n=3)。

图6　MC3T3-E1细胞外基质矿化的检测

Figure 6　Extracellular matrix mineralization of MC3T3-E1 cells



成骨诱导7 d,Runx-2基因(A)、ALP基因(B)、Col-Ⅰ基因(C)及OCN基因(D)表达情况。两组比较,*$P < 0.05$,**$P < 0.01$,***$P < 0.001$(n=3)。

图7　qRT-PCR检测成骨相关指标的基因表达

Figure 7　Gene expression of osteogenesis-related markers evaluated by qRT-PCR

清除ROS并抑制核因子κB(nuclear factor kappa-B,NF-κB)信号通路[19]。而NF-κB信号通路途径中各种成分的缺失均可导致骨骼发育异常,研究也已经证实,NF-κB信号转导介导的RANK配体可以诱导破骨细胞生成[20]。另外,细胞内ROS水平升高可刺激细胞凋亡信号,增加脂肪分化,减少骨髓间充质干细胞的成骨分化。研究报道,细胞内ROS通过激活丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和磷酸肌醇-3-激酶/Akt(phosphoinositide-3-kinase/Akt,PI3K/Akt)途径增加间充质干细胞中的胰岛素样生长因子结合蛋白表达,从而降低细胞成骨标志基因如Runx-2、OCN的表达[21]。

综上所述,本研究初步验证了氧化微环境下PB的抗氧化作用和促进MC3T3-E1细胞成骨分化作用,但仅仅在细胞层面,PB更深层面的应用还有待研究。此外,PB的抗氧化和成骨机制也未得到验证。因此,在后续研究中将进一步开发PB的应用价值,如跟骨组织工程支架或者合适的药物缓释体系相结合更好地发挥作用,进行动物实验进一步探讨体内生物安全性以及促成骨作用,并进行机制研究探讨PB作用的相关分子机制,进一步推动PB在骨组织工程中的应用。

[参考文献]

[1] QI J, YU T, HU B, et al. Current biomaterial-based bone tissue engineering and translational medicine[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10233
[2] MOSADDAD S A, RASOOLZADE B, NAMANLOO R A, et al. Stem cells and common biomaterials in dentistry: a review study[J]. J Mater Sci Mater Med, 2022, 33(7): 55
[3] MIZOGUCHI T, ONO N. The diverse origin of bone-forming osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2021, 36(8): 1432-1447
[4] DIRCKX N, MOORER M C, CLEMENS T L, et al. The role of osteoblasts in energy homeostasis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(11): 651-665
[5] PRAVDA J. Hydrogen peroxide and disease: towards a unified system of pathogenesis and therapeutics[J]. Mol Med, 2020, 26(1): 41
[6] LI X, LI B, SHI Y, et al. Targeting reactive oxygen species in stem cells for bone therapy[J]. Drug Discov Today, 2021, 26(5): 1226-1244
[7] GAO L, ZHUANG J, NIE L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. Nat Nanotechnol, 2007, 2(9): 577-583
[8] ESTELRICH J, BUSQUETS M A. Prussian blue: a nanozyme with versatile catalytic properties[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5993
[9] TONG L, WU L, GU N, et al. Paper-based colorimetric glucose sensor using Prussian blue nanoparticles as mimic peroxidase[J]. Biosens Bioelectron, 2022, 219: 114787
[10] ZHAO J, GAO W, CAI X, et al. Nanozyme-mediated catalytic nanotherapy for inflammatory bowel disease[J]. Theranostics, 2019, 9(10): 2843-2855
[11] SAHU A, JEON J, LEE M S, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Prussian blue nanozyme promotes full-thickness skin wound healing[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 119: 111596
[12] KONG B, SELOMULYA C, ZHENG G, et al. New faces of porous Prussian blue: interfacial assembly of integrated hetero-structures for sensing applications[J]. Chem Soc Rev, 2015, 44(22): 7997-8018
[13] BURDON R H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation[J]. Free Radic Biol Med, 1995, 18(4): 775-794
[14] DAT N Q, THUY L T T, HIEU V N, et al. Hexa histidine-tagged recombinant human cytoglobin deactivates hepatic stellate cells and inhibits liver fibrosis by scavenging reactive oxygen species[J]. Hepatology, 2021, 73(6): 2527-2545
[15] CHEIGNON C, TOMAS M, BONNEFONT-ROUSSELOT D, et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease[J]. Redox Biol, 2018, 14: 450-464
[16] KAUSHAL G P, CHANDRASHEKAR K, JUNCOS L A. Molecular interactions between reactive oxygen species and autophagy in kidney disease[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(15): 3791
[17] 焦国庆,李明秋,吴 莹,等. PI3K/Akt调控糖尿病冠状动脉平滑肌细胞BK通道的作用机制[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2022,42(2):166-170
[18] YANG B, CHEN Y, SHI J. Reactive oxygen species(ROS)-based nanomedicine[J]. Chem Rev, 2019, 119(8): 4881-4985
[19] TIAN Y, LI Y, LIU J, et al. Photothermal therapy with regulated Nrf2/NF-κB signaling pathway for treating bacteria-induced periodontitis[J]. Bioact Mater, 2021, 9: 428-445
[20] ABU-AMER Y. NF-κB signaling and bone resorption[J]. Osteoporos Int, 2013, 24(9): 2377-2386
[21] KIM J H, YOON S M, SONG S U, et al. Hypoxia suppresses spontaneous mineralization and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via IGFBP3 Up-regulation[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1389

[收稿日期] 2023-02-03
(本文编辑:唐 震)