

含钼的硅酸盐生物陶瓷释放的化学离子对肌腱-骨相关的多细胞调控*

杜琳^{a,b} 薛健民^a 郇志广^{a,b} 吴成铁^{*,a,b}

(^a中国科学院上海硅酸盐研究所 高性能陶瓷和超微结构国家重点实验室 上海 200050)

(^b中国科学院大学 北京 100049)

摘要 研究生物材料所产生的化学信号与细胞行为之间的作用关系,对于高性能组织工程材料的设计与制备具有重要的指导意义.本工作中,采用化学共沉淀法成功地合成了含钼(Mo)的硅酸盐(MS)生物活性陶瓷粉体,并探究其降解产生的活性离子化学信号对肌腱-骨相关细胞(肌腱干/祖细胞(TSPCs)和骨髓间充质干细胞(BMSCs))的调控作用.所合成的MS生物陶瓷颗粒大小均一,其降解后的浸提液中含有Mo、钙(Ca)、硅(Si)三种生物活性离子.特定浓度范围的MS浸提液可以同时促进TSPCs和BMSCs的增殖和迁移活性.更重要的是,MS浸提液可以同时刺激TSPCs和BMSCs的特异性分化,说明MS生物陶瓷释放的化学离子所构建的微环境,能够同时协调TSPCs和BMSCs的细胞行为.因此,MS生物陶瓷有望作为一种有效的“生物活性因子”用于肌腱-骨损伤修复.

关键词 含钼的硅酸盐; 化学信号; 多细胞; 细胞行为

Regulation of Tendon-bone Related Multiple Cells by Chemical Ions Released from Mo-containing Silicate Bioceramics*

Du, Lin^{a,b} Xue, Jianmin^a Huan, Zhiguang^{a,b} Wu, Chengtie^{*,a,b}

(^a State Key Laboratory of High Performance Ceramics and Superfine Microstructure, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050)

(^b University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract Understanding the relationship between the chemical signals generated by biological materials and cellular behaviors has great significance for the design and preparation of high-performance tissue engineering biomaterials. In the past several decades, silicate bioceramics have been widely used in tissue engineering. Bioactive ions released from silicate bioceramics can act as chemical signals to regulate cellular behaviors and promote the tissue regeneration. Moreover, by regulating the components of silicate bioceramics, silicate bioceramics can generate specific chemical signals to regulate cellular behaviors of multiple cells. Here, by introducing molybdenum (Mo) element into silicate bioceramics, we have successfully developed Mo-containing silicate (MS) bioceramics which are able to regulate cellular behaviors of tendon stem/progenitor cells (TSPCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) simultaneously. Using ammonium molybdate as a source of Mo element, MS bioceramics were prepared by chemical coprecipitation method. The synthesized MS bioceramics were mostly below 10 μm in size and had uniform distribution of Mo elements. Moreover, MS bioceramics were composed of high-purity CaMoO_4 and CaSiO_3 . To explore the effect of chemical signals generated from MS bioceramics on TSPCs and BMSCs, we prepared MS extracts for cell culture. MS bioceramics supported the survival of TSPCs and BMSCs and maintained a better cellular state during the culture period of 5 d. Due to the released Ca, Si and Mo ions from MS bioceramics, TSPCs and BMSCs cultured with MS extracts exhibited excellent proliferation and migration activities. Interestingly, after cultured with MS extracts in the appropriate concentration, the expression of osteogenic genes and protein of BMSCs and the expression of tenogenic genes and protein of TSPCs were significantly enhanced, suggesting that chemical signals generated by MS bioceramics simultaneously promoted the specific differentiation of TSPCs and BMSCs. Such MS bioceramics are believed to be an effective “bioactive factor” for repairing injury at the tendon-bone interfaces.

Keywords Mo-containing silicate; chemical signals; multiple cells; cellular behaviors

* Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

* E-mail: Chengtiewu@mail.sic.ac.cn; Tel.: 021-52412249

Received April 7, 2023; published July 17, 2023.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32225028).

* 庆祝《化学学报》创刊 90 周年.

项目受国家自然科学基金(No. 32225028)资助.

1 引言

硅酸盐生物陶瓷是一种能够用于修复和重建人体病变或受损部位的陶瓷材料^[1-2], 具有出色的生物相容性和生物活性, 在再生医学领域具有重要的应用前景^[3-4]. 硅酸盐生物陶瓷在溶液或人体体液介导的溶解过程中会释放出多种离子溶解产物, 其可以作为化学信号作用于体细胞或干细胞, 通过细胞内信号传导来指导细胞功能, 从而刺激损伤组织再生^[5-7]. 例如, 在先前的研究中, 我们发现锂掺杂介孔硅酸盐生物玻璃降解产生的离子产物可以通过刺激 Wnt 信号通路促进骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化, 同时可以通过激活自噬保护软骨细胞^[8]. 更为重要的是, 越来越多的研究表明, 生物陶瓷材料所产生的化学信号能够调节不同类型细胞的细胞行为^[9-15]. Lin 等^[16]发现锶掺杂的硅酸钙陶瓷降解产生的锶(Sr)、钙(Ca)、硅(Si)化学信号能够促进人脐静脉内皮细胞的成血管分化, 同时能够通过刺激骨髓间充质干细胞的细胞外信号相关激酶和 p38 信号通路促进成骨分化. 此外, Zhang 等^[17]发现硅酸锌纳米颗粒降解产生的锌(Zn)和 Si 化学信号能够诱导人脐静脉内皮细胞的成血管分化并同时促进雪旺细胞表达更多神经营养因子相关基因. 因此, 通过调节硅酸盐生物陶瓷的组分以使其产生特定的化学信号, 是一种能够实现多细胞行为调控的有效方法.

肌腱-骨“附丽点”是一种典型的复杂组织, 由肌腱、骨和纤维软骨三种组织构成^[18-19], 其界面的多组织构成导致传统的单一肌腱组织修复的效果有限^[20-21]. 众所周知, 调控特定的细胞行为对于组织损伤修复具有重大的意义^[22-24]. 特别是对于天然的复杂组织, 能够同时协调多种组织相关细胞的细胞过程是其损伤修复的关键^[25].

钼(Mo)元素是大多数生物体所必需的微量元素, 参与了生物体内多种有关氧化还原酶的组成^[26-27]. 已有研究证明, 含有 Mo 的支架降解所产生的化学信号可以保护细胞的线粒体功能和促进有氧呼吸的占比^[28]. 此外, 促进肌腱相关的细胞的氧化还原反应可以促进其向成肌腱方向分化^[29]. 同时, Mo 离子可以促进细胞分泌肌腱的主要细胞外基质——I 型胶原^[30]. 在前期的工作中, 根据硅酸盐陶瓷和 Mo 离子的生物学效应, 我们开发了基于含 Mo 元素的硅酸盐生物陶瓷的多细胞支架, 该支架在体内促进了肌腱-骨多组织一体化再生, 但其促进多组织再生的机制仍未知^[31]. 因此, 在本工作中, 我们对含有 Mo 元素的硅酸盐陶瓷降解所产生的化学信号对肌腱-骨相关双细胞的行为调控影响进行探索.

在本研究中, 我们成功合成了含 Mo 的硅酸盐(MS)生物陶瓷, 并探索其降解的化学信号产物对于骨髓间充质干细胞(BMSCs)和肌腱干/祖细胞(TSPCs)的影响. 采用简单快捷的共沉淀法成功在硅酸盐陶瓷中引入了 Mo 元素, 从而得到了 MS 生物陶瓷. 将 MS 生物陶瓷浸泡在 MEM- α 培养基中制得了含有化学信号的 MS 浸提液

用于体外细胞实验. MS 浸提液增强了 BMSCs 和 TSPCs 的增殖和迁移活性. 有趣的是, MS 浸提液具有同时诱导 BMSCs 成骨分化和 TSPCs 成肌腱分化的突出能力, 进一步证明了 MS 生物陶瓷降解所产生的化学离子信号能够有效调控多种细胞向有利于肌腱-骨组织修复的方向发展. 由此, MS 生物陶瓷有望作为一种有效的“生物活性因子”用于肌腱-骨损伤修复.

2 结果与讨论

2.1 含钼(Mo)的硅酸盐(MS)生物陶瓷粉体的表征

本工作利用 $\text{H}_2\text{MoO}_7 \cdot \text{N}_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 作为 Mo 源, 采用化学共沉淀法合成了 MS 生物陶瓷粉末. 采用 X 射线衍射仪(XRD)对煅烧后的 MS 生物陶瓷的物相进行表征(图 1A). 所合成的 MS 生物陶瓷的部分衍射峰的位置和相对强度与 CaSiO_3 (PDF No.27-0088)相同, 另一部分衍射峰的位置和相对强度与 CaMoO_4 (PDF No.29-0351)一致, 并且峰型尖锐, 其结晶度和纯度较高, 由此表明了 Mo 元素的存在形式为 CaMoO_4 . 扫描电镜(SEM)显示 MS 生物陶瓷颗粒呈不规则形态(图 1B). 同时, 根据 SEM 图, 观察到 MS 生物陶瓷颗粒存在部分团聚现象. 粒度分析结果表明, MS 生物陶瓷颗粒的尺寸大多在 10 μm 以下(图 1C). 此外, 能谱分析(EDS)图谱显示, Ca、Si、Mo 和 O 同时存在于单个粒子中, 进一步证实了 MS 生物陶瓷的成功制备(图 1D).

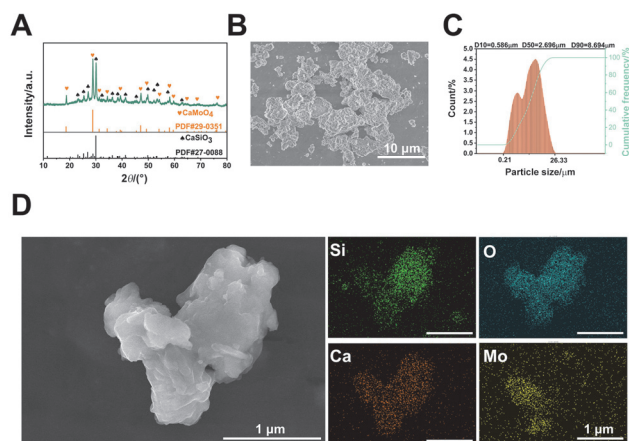


图1 含钼(Mo)的硅酸盐(MS)生物陶瓷粉体的表征. (A) MS 颗粒的 X 射线衍射(XRD)图谱. (B) MS 颗粒的扫描电镜图(SEM). (C) MS 颗粒的粒径分布图. (D) MS 颗粒的元素分布图(EDS). 具有均匀粒度尺寸和均匀 Mo 元素分布的 MS 生物陶瓷颗粒被成功制备

Figure 1 Characterization of Mo-containing silicate (MS) bioceramic powders. (A) XRD pattern of MS particles. (B) SEM image of MS particles. (C) Particle size distribution of MS particles. (D) EDS elemental mapping of MS particles. MS bioceramics were successfully prepared with uniform particle size and homogeneous distribution of Mo element

2.2 细胞增殖和迁移实验

为了评价 MS 生物陶瓷降解所产生的生物活性离子对于肌腱-骨相关的多种细胞的影响, 我们配置了用细胞培养基稀释梯度倍数的 MS 浸提液用于体外细胞培

养, 分别为(1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256)。肌腱干/祖细胞(TSPCs)是肌腱组织的前体细胞, 具有优异的多分化潜能, 在肌腱愈合过程中表现出潜力^[32]。在本文中, 我们选用 TSPCs 和骨髓间充质干细胞(BMSCs)作为肌腱和骨组织的代表细胞, 研究 MS 生物陶瓷降解产生的化学信号对于这两种细胞的功能调节效果。

首先, 我们对所制备的 MS 浸提液的成分进行分析。将 MS 生物陶瓷按照一定的比例用细胞培养基浸泡, 在 37 °C 恒温下浸泡一天, 我们采用电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP)测定 MS 生物陶瓷的降解产物。与 Control 组相比, 不同稀释倍数的浸提液组中的 Ca、Si、Mo 离子浓度呈现出差异, 这证明 MS 浸提液中的化学信号为 Ca、Si、Mo 离子(表 1)。其中, Si 和 Mo 离子浓度均随着稀释倍数的增加而逐渐降低。Ca 离子的浓度随着稀释倍数的增加为先略有升高后降低(1/2~1/4 组升高, 1/4~1/32 组逐渐降低, 1/64~1/256 组由于稀释倍数过大与 Control 组浓度趋于一致), 这可能归结于大量 Ca 离子的释放产生了磷酸钙的沉淀, 从而导致低稀释倍数组的 Ca 离子降低^[25]。此外, 1/128 组中 Ca 离子浓度略高于 1/64 组, 通过统计学分析发现二者并未存在显著性差异, 因此推测二者的浓度差异可能是由于仪器测试内在误差、培养基原液内离子浓度浮动等原因造成, 属于正常的实验误差。

表 1 不同稀释倍数的 MS 浸提液中的化学信号含量

Table 1 The concentration of chemical signals generated from different concentrations of MS extracts

Ionic conc./($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ca	Si	Mo
Control	71.85 $\pm$ 2.58	2.45 $\pm$ 1.13	0 $\pm$ 0
1/2	83.77 $\pm$ 4.34	136.06 $\pm$ 7.61	14.29 $\pm$ 0.94
1/4	96.18 $\pm$ 6.39	73.19 $\pm$ 4.80	7.67 $\pm$ 0.62
1/8	85.99 $\pm$ 2.43	39.29 $\pm$ 0.85	3.92 $\pm$ 0.31
1/16	79.29 $\pm$ 4.85	21.09 $\pm$ 0.89	1.95 $\pm$ 0.07
1/32	76.39 $\pm$ 2.83	11.75 $\pm$ 0.20	1.27 $\pm$ 0.08
1/64	70.53 $\pm$ 1.67	6.96 $\pm$ 0.35	0.43 $\pm$ 0.26
1/128	72.99 $\pm$ 0.36	4.86 $\pm$ 0.21	0.37 $\pm$ 0.13
1/256	70.92 $\pm$ 1.82	3.40 $\pm$ 0.94	0.18 $\pm$ 0.22

我们分别进行了 TSPCs 和 BMSCs 的体外增殖和迁移实验, 用于评价 MS 浸提液的生物相容性和生物活性。不同稀释倍数(1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256)的 MS 浸提液对 TSPCs 增殖的影响如图 2A 所示。稀释 2 倍和 4 倍的 MS 浸提液在第 3 天和第 5 天显著抑制 TSPCs 的增殖活性, 而其他稀释倍数的 MS 浸提液在第 5 天显著促进 TSPCs 的增殖。如图 2B 所示, 与 TSPCs 类似, 稀释 2 倍和 4 倍的 MS 浸提液培养后, BMSCs 的增殖活性被抑制, 但是稀释倍数为 8、16 和 32 的 MS 浸提液培养后, BMSCs 的增殖活性被提高。由此, 我们发

现在特定的浓度范围内, MS 浸提液对 BMSCs 和 TSPCs 的增殖活性均具有一定的促进作用。基于两种细胞的增殖活性考虑, 我们选择 1/16 和 1/32 组别的 MS 浸提液进行进一步的研究。之后, 为了评估 MS 浸提液对 TSPCs 和 BMSCs 的细胞状态的影响, 我们进行了 live/dead 染色实验。如图 2C 和 2D 所示, 用稀释了 16 倍和 32 倍的 MS 浸提液培养 5 d 后, TSPCs 和 BMSCs 的细胞数目明显增加, 这也验证了细胞增殖实验的结果。此外, 更高倍数的 live/dead 染色的结果显示经过 1/16 和 1/32 组的 MS 浸提液培养后, TSPCs 和 BMSCs 细胞铺展面积更大, 互相接触, 形成了大面积的细胞网络。由此, 我们发现适当浓度范围的 MS 浸提液能够调节 TSPCs 和 BMSCs, 保持更好的细胞状态。

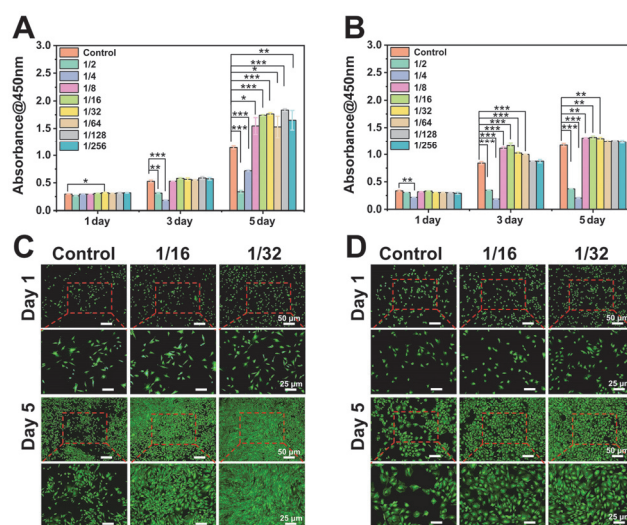


图 2 用不同稀释倍数的 MS 浸提液培养后的肌腱干/祖细胞(TSPCs)和骨髓间充质干细胞(BMSCs)的增殖活性及存活情况。TSPCs (A)和 BMSCs (B)用不同稀释倍数的 MS 浸提液培养后的增殖活性($n=3$) * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。用 MS 浸提液培养 1 d 和 5 d 后的 TSPCs (C)和 BMSCs (D)的 live/dead 染色图

Figure 2 Proliferation and live/dead assay of TSPCs (tendon stem/progenitor cells) and BMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells) cultured with different concentrations of MS extracts. Proliferative activity of (A) TSPCs and (B) BMSCs after cultured with different dilution of MS extracts ($n=3$) * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Live/dead assay of TSPCs (C) and BMSCs (D) after cultured with MS extracts for 1 and 5 d

引导组织细胞/干细胞到损伤部位对组织愈合至关重要^[33], 因此 MS 浸提液对两种细胞的迁移活性的影响值得探讨。采用 Transwell 法探讨 MS 浸提液对 TSPCs 和 BMSCs 迁移的影响(图 3A 和 3B)。结果显示, 稀释 16 倍和 32 倍的 MS 浸提液诱导的 TSPCs 和 BMSCs 发生迁移的细胞数量高于对照组。之后为了更好地分析结果, 我们进行了细胞计数对结果进行定量分析(图 3C 和 3D), 结果表明 16 倍和 32 倍 MS 浸提液诱导下的发生迁移的 TSPCs 和 BMSCs 数目均远高于空白组, 且存在显著性差异。由此可见, MS 浸提液在特定的浓度范围内可以同时提高 TSPCs 和 BMSCs 的增殖活性和迁移能力,

证明其 MS 生物陶瓷降解产生的离子产物对于 TSPCs 和 BMSCs 的增殖和迁移能力具有促进作用。

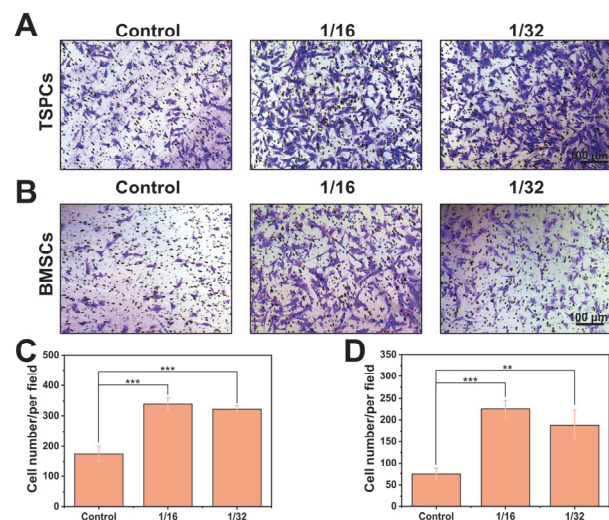


图3 不同稀释倍数的MS浸提液对TSPCs和BMSCs的迁移影响。MS浸提液诱导后发生迁移的TSPCs (A)和BMSCs (B)的结晶紫染色图。发生迁移的TSPCs (C)和BMSCs (D)的细胞数目统计($n=4$)。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Figure 3 The effect of different dilution of MS extracts on migration of TSPCs and BMSCs. After induced with MS extracts, crystalline violet staining images of the migration of TSPCs (A) and BMSCs (B). Quantification of TSPCs (C) and BMSCs (D) induced to migrate ($n=4$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

2.3 体外成肌腱分化和成骨分化实验

我们进一步使用稀释了16倍和32倍的MS浸提液对TSPCs和BMSCs进行5天的细胞培养,之后利用实时定量聚合酶链反应(PCR)和免疫荧光染色技术检测其细胞分化情况。TSPCs的成肌腱相关基因表达情况如图4A、4B、4C所示,与对照组相比,1/16和1/32组的MS浸提液均能显著提高TSPCs的成肌腱分化相关基因(BGN、DCN、TNC)的表达。此外,与1/32组相比,1/16组培养后的TSPCs的DCN和BGN基因的表达明显上调。Tenomodulin (TNMD)蛋白是肌腱组织的标志物,可以调节肌腱和韧带细胞的增殖和粘连^[34]。为了进一步判断TSPCs在MS浸提液培养下的特异性分化的情况,我们进行免疫荧光染色实验检测典型的肌腱相关蛋白—TNMD的表达情况。如图4D所示,1/16和1/32组的MS浸提液处理后的TSPCs的TNMD蛋白表达均高于对照组。半定量分析也证实,1/32组的TSPCs的TNMD蛋白的表达水平明显高于Control组(图6A)。接着,用PCR检测BMSCs在不同的稀释倍数的MS浸提液培养后成骨分化相关基因的表达情况。如图5A、5B、5C、5D所示,稀释16倍的MS浸提液培养的BMSCs,ALP、BMP2、Runx2的表达较对照组显著增加。此外,稀释32倍的MS浸提液显著刺激了BMSCs表达更高的ALP、BMP2、OPN。Bone sialoprotein (BSP)蛋白在骨骼

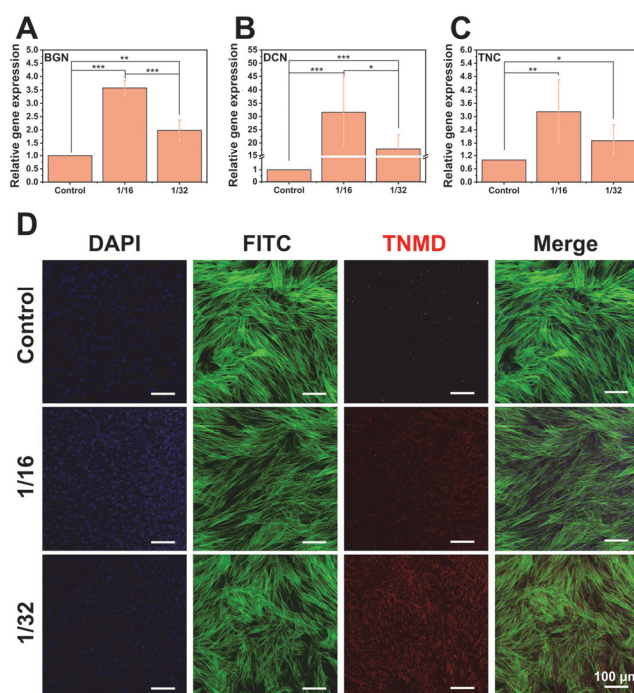


图4 MS浸提液培养后的TSPCs的成肌腱相关基因和Tenomodulin (TNMD)蛋白表达情况。不同稀释倍数的MS浸提液培养后的TSPCs的BGN (A)、DCN (B)和TNC (C)的表达情况($n=6$)。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。(D)不同稀释倍数的MS浸提液培养后的TSPCs的TNMD蛋白的免疫荧光染色图片

Figure 4 The expression of tenogenic differentiation-related genes and Tenomodulin (TNMD) of TSPCs cultured with different dilutions of MS extracts (1/16 and 1/32). The expression of (A) BGN, (B) DCN and (C) TNC of TSPCs incubated with different dilutions of MS extracts after 5 days of culture ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (D) Immunofluorescence staining images of TNMD protein of TSPCs cultured with different concentrations MS extracts

矿化中具有重要作用,是典型的成骨特异性蛋白^[35]。随后,采用免疫荧光染色法研究MS稀释浸提液培养后BMSCs的BSP蛋白的表达情况。如图5E所示,1/16和1/32组的MS稀释液培养的BMSCs分泌的BSP蛋白含量更高。通过半定量分析,确定了1/16和1/32组的MS浸提液能够显著促进BMSCs的BSP蛋白的表达(图6B)。

根据上述实验结果,我们发现与Control组相比,1/16和1/32组的MS生物陶瓷浸提液能促进TSPCs的成肌腱分化和BMSCs的成骨分化。ICP检测结果显示,1/16组的Ca、Si、Mo离子浓度分别为(79.29±4.85)、(21.09±0.89)、(1.95±0.07) mg/L, 1/32组的三种离子浓度分别为(76.39±2.83)、(11.75±0.20)、(1.27±0.08) mg/L,而Control组三种离子浓度分别为(71.85±2.58)、(2.45±1.13)、(0±0) mg/L。因此,与Control组相比,1/16和1/32组存在特有的Mo离子且Si和Ca离子浓度均高于空白组,这种离子微环境可能是MS生物陶瓷浸提液能促进TSPCs和BMSCs特异性分化的原因。对于TSPCs来说,先前研究表明,钼酸钙降解产生的化学信号Mo离子可以保护细胞线粒体功能,促进有氧呼吸的

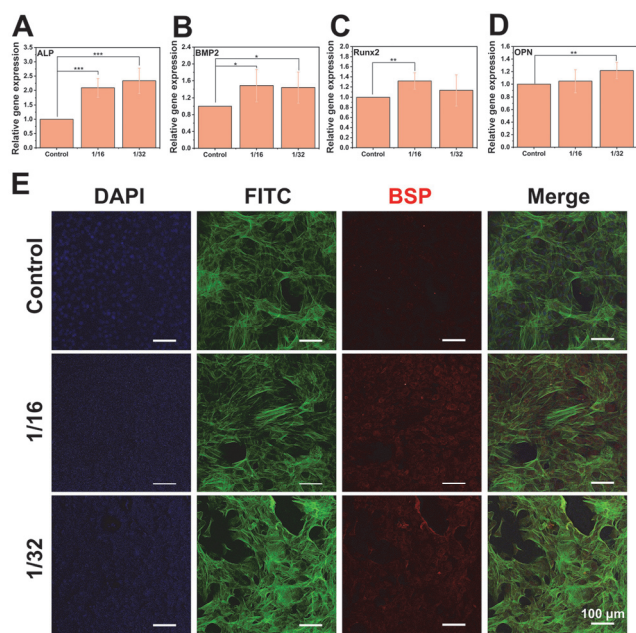


图5 MS浸提液培养后的BMSCs的成骨相关基因和Bone sialoprotein (BSP)蛋白表达情况. 不同稀释倍数的MS浸提液培养后的BMSCs的ALP (A)、BMP2 (B)、Run×2 (C)和OPN (D)的表达情况($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (E)不同浓度的MS浸提液培养后的BMSCs表达的BSP蛋白的免疫荧光染色图片

Figure 5 The expression of osteogenic differentiation-related genes and Bone sialoprotein (BSP) of BMSCs cultured with different dilutions of MS extracts. (A) The expression of ALP, (B) BMP2, (C) Run×2 and (D) OPN of BMSCs incubated with different dilution of MS extracts after 5 days of culture ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (E) Immunofluorescence staining images of BSP protein of BMSCs cultured with different concentrations of MS extracts

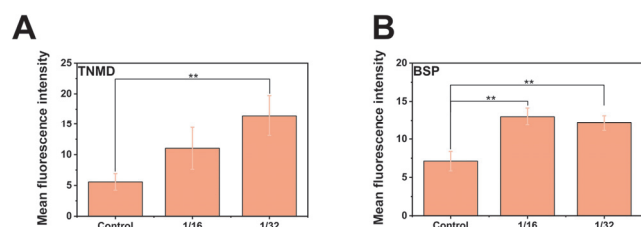


图6 TNMD (A)和BSP (B)免疫荧光染色图的半定量分析($n=3$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Figure 6 Semi-quantitative analysis of immunofluorescence staining images of TNMD (A) and BSP (B) expression ($n=3$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

占比^[26,28]. 其他相关研究也发现肌腱相关细胞的线粒体功能与其细胞自身行为密切相关. 例如, 相关研究表明抑制肌腱成纤维细胞的线粒体能量代谢会破坏细胞的稳态, 从而导致细胞的增殖能力降低^[36-37]. 此外, 控制结缔组织祖细胞的自身的糖代谢水平可控制其向成肌腱方向分化^[37]. 由此, 我们推测Mo离子在促进TSPCs的成肌腱分化方面有积极的作用, 可能是通过作用于细胞线粒体实现的. 此外, 胶原纤维是肌腱组织的主要组成部分. 相关报道证实含Mo的生物材料和含CaSiO₃的

支架对胶原纤维生成具有积极作用^[21], 这可能由于Mo离子、Ca离子和Si离子的释放. 总而言之, Mo离子可能通过调控线粒体和促进胶原分泌两个方向促进成肌腱分化, Si和Ca离子则通过胶原分泌辅助成肌腱分化活性表达, 所以Mo离子在肌腱分化方向可能起到主要作用.

在促进BMSCs的成骨分化方向来看, 相关研究表明增加培养基中Ca离子的浓度可以显著提高原代小鼠成骨细胞中的骨钙素的表达^[38]. 已被证实Ca离子可以激活ERK1/2和FOS/JUN信号通路上调BMP-2表达, 从而促进成骨分化^[6]. 此外, 根据之前的研究结果显示低于120 mg/L的Si离子浓度能够刺激成骨分化^[39-40]. 硅酸盐生物陶瓷降解产生的Si离子可以激活了成骨细胞SMAD依赖的BMP信号通路, 并诱导BMP下游级联(OCN、OPN和Run×2)的激活^[41]. 同时, 一些研究显示10 mg/L以内的Mo离子在体外可以强烈刺激BMSCs的成骨分化, 同时Mo离子可抑制破骨细胞线粒体功能, 在体内调节成骨和破骨比例, 实现骨组织再生^[28]. 总之, MS生物陶瓷降解所产生的多种离子产物, 可以作为一种化学信号, 同时诱导TSPCs的成肌腱分化和BMSCs的成骨分化, 有利于同时促进肌腱-骨附丽点的多组织再生.

3 结论

在本工作中, 我们成功合成了含钼(Mo)的硅酸盐(MS)生物陶瓷粉体, 并证明了其产生的化学离子信号对于肌腱-骨相关的细胞的调控作用. 所制备的MS生物陶瓷Mo元素分布均匀, 粒径分布在10 μm以下. MS生物陶瓷所释放的化学信号——生物活性离子对肌腱干/祖细胞(TSPCs)和骨髓间充质干细胞(BMSCs)展示出良好的增殖和迁移活性. 更重要的是, MS所释放的生物活性离子可以同时促进TSPCs的成肌腱分化和刺激BMSCs的成骨分化. 因此, MS生物陶瓷所释放的化学信号能够同时调节TSPCs和BMSCs的细胞行为, 为后续开发肌腱-骨附丽点修复材料提供了良好的材料和生物学基础.

4 实验部分

4.1 含钼(Mo)的硅酸盐(MS)生物陶瓷粉体的合成与表征

采用化学共沉淀法合成了MS生物陶瓷. 简单地讲, 将28.42 g的Na₂SiO₃·9H₂O粉末和23.62 g的Ca(NO₃)₂·4H₂O粉末分别加入两个装满500 mL的去离子水的烧杯中. 然后将H₂₄Mo₇N₆O₂₄·4H₂O粉末 [$n(\text{Mo}) : n(\text{Ca}) = 1 : 10$]与上述的Ca(NO₃)₂·4H₂O溶液混合. 接着, 边搅拌边逐滴向Ca(NO₃)₂·4H₂O溶液中加入上述的Na₂SiO₃·9H₂O溶液. 搅拌24 h后, 对样品进行过

滤后得到白色沉淀. 然后依次分别用去离子水和无水乙醇洗涤3次, 在60 °C下干燥24 h. 最后对沉淀进行研磨和过筛, 煅烧以2 °C/min升温速度升温至800 °C并保温3 h, 最终得到MS生物陶瓷.

4.2 细胞提取

从3周龄的新西兰大白兔的骨头中分离骨髓间充质干细胞(BMSCs). 从新西兰大白兔的肌腱中分离出肌腱干/祖细胞(TSPCs). BMSCs和TSPCs均使用含有10%胎牛血清(FBS, Gibco, USA)和1% (w)青霉素-链霉素(P/S, Gibco, USA)的MEM- α 培养基(MEM- α , Gibco, USA)培养. 以上细胞提取步骤均按照南京医科大学附属南京医院动物护理和使用委员会所批准的准则进行(动物实验伦理审批号: DWSY-210466).

4.3 含钼的硅酸盐陶瓷(MS)浸提液的制备

MS细胞培养基浸提液根据国际标准组织(ISO 10993-5)进行制备. 首先, 将8 g MS陶瓷浸泡在40 mL MEM- α 中, 在37 °C恒温摇床下放置24 h. 然后, MS细胞培养基稀释液在800转下离心10 min, 上清液经0.22 μ m滤膜过滤得到MS浸提液原液. 然后将原液稀释成梯度浓度的MS稀释液(1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256).

4.4 细胞增殖实验

采用CCK-8检测试剂盒(Cell counting Kit-8, Dojindo, Japan)分析不同稀释倍数MS浸提液培养的TSPCs和BMSCs的增殖活性. 用不同浓度的MS浸提液配置BMSCs和TSPCs悬液. 然后将细胞悬液按100 μ L (2000个细胞)接种于96孔板上, 分别培养1、3、5 d. 最后, 在每孔中加入100 μ L 10% CCK-8培养基, 在37 °C恒温, 体积分数为5%的CO₂条件下培养1 h, 并用酶标仪检测在450 nm处的吸光度.

4.5 Live/dead 染色实验

采用Calcein-AM/PI双染色试剂盒分析不同稀释倍数的MS浸提液培养后的TSPCs和BMSCs的存活情况. 简单来说, 首先在黑暗条件下, 将配置好的染料[m(AM):m(PI):m(PBS)=1:1:1000]加入24孔板中后, 在摇床上放置20 min. 之后, 采用荧光显微镜(DMi8S, Leica Microsystems, Germany)进行观察.

4.6 细胞迁移实验

Transwell法检测MS浸提液对TSPCs和BMSCs的迁移活性的影响. 首先在24孔板的上腔内接种细胞(每孔1万个). 然后, 在下腔中加入不同浓度的MS浸提液的基础培养基. 培养6 h后, 用4% (w)多聚甲醛固定BMSCs和TSPCs, 并用棉签擦拭上方细胞. 之后, 将下表面细胞用1% (w)结晶紫溶液染色10 min, 最后用倒置显微镜(DMi8S, Leica Microsystems, Germany)观察细胞.

4.7 细胞基因表达

为探讨MS浸提液对BMSCs和TSPCs特异性分化的作用, 采用实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测二者的相关基因表达情况. 首先, 用不同浓度的MS浸提液培养BMSCs或TSPCs. 在第五天用Trizol试剂(Invitrogen, USA)处理细胞, 并提取RNA. 然后, 按照PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO, Japan)使用说明书进行cDNA合成. 最后, RT-qPCR过程由StepOnePlus实时系统(Applied Biosystems, USA)进行. 相关基因引物序列见Supporting Information.

4.8 免疫荧光染色实验

简单地来说, 在用MS浸提液培养5 d后, 用4% (w)多聚甲醛固定BMSCs和TSPCs 30 min. 所有的换液步骤后, 除特殊说明均用PBS冲洗细胞三次. 然后, 用0.1% (w) Triton-100处理细胞5 min, 接着用5% (w) BSA处理细胞30 min. 随后, 将一抗加入孔板并在4 °C冰箱中放置12 h, 不需要PBS清洗. 第二天, 去除一抗, 将二抗加入孔板并在37 °C孵育1 h. 然后, 用二氨基苯唑(DAPI, Sigma-Aldrich)和Alex Fluor 488 phalloidin (Molecular Probes, USA)依次进行细胞核和细胞骨架的染色. 最后, 采用共聚焦激光扫描显微镜(TCS SP8, Leica, Germany)对免疫荧光染色图像进行拍照.

4.9 统计学分析

所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用Origin 2018软件进行单因素方差分析. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, 认为差异显著.

References

- [1] Zhou, Y.; Wu, C.; Chang, J. *Mater. Today* **2019**, *24*, 41.
- [2] Zhang, H.; Ma, W.; Ma, H.; Qin, C.; Chen, J.; Wu, C. *Adv. Healthcare Mater.* **2022**, *11*, e2102359.
- [3] Wu, C. T.; Chang, J. *Biomed. Mater.* **2013**, *8*, 032001.
- [4] Srinath, P.; Azeem, P. A.; Reddy, K. V. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2020**, *17*, 2450.
- [5] Yu, Q.; Chang, J.; Wu, C. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 5449.
- [6] Brokesh, A. M.; Gaharwar, A. K. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 5319.
- [7] Qin, C.; Wu, C. *View* **2022**, 20210018.
- [8] Wu, Y.; Zhu, S. A.; Wu, C. T.; Lu, P.; Hu, C. C.; Xiong, S.; Chang, J.; Heng, B. C.; Xiao, Y.; Ouyang, H. W. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 4473.
- [9] Deng, C. J.; Chang, J.; Wu, C. T. *J. Orthop. Translat.* **2019**, *17*, 15.
- [10] Fan, C.; Xu, Q.; Hao, R. Q.; Wang, C.; Que, Y. M.; Chen, Y. X.; Yang, C.; Chang, J. *Biomaterials* **2022**, *287*, 121652.
- [11] Wu, C. T.; Chang, J. *J. Controlled Release* **2014**, *193*, 282.
- [12] Hoppe, A.; Guldal, N. S.; Boccaccini, A. R. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2757.
- [13] Chen, X.; Shuai, D.; Jiang, Z.; Yang, H.; Luo, D.; Ni, H.; Wang, L.; Chen, B. *Acta Chim. Sinica* **2022**, *80*, 116 (in Chinese). (陈祥松, 帅蝶, 姜泽东, 杨晗, 罗丹, 倪辉, 王力, 陈丙年, 化学学报, **2022**, *80*, 116.)
- [14] Hu, Z.; Sun, Z.; Zhang, Y.; Wu, R.; Zou, H. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 2059 (in Chinese). (胡争艳, 孙珍, 张轶, 吴仁安, 邹汉法, 化学学报, **2012**, *70*, 2059.)
- [15] Li, J.; Li, B.; Wang, J.; He, L.; Zhao, Y. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 238 (in Chinese). (李佳欣, 李蓓, 王纪康, 何蕾, 赵宇飞, 化学学报, **2021**, *79*, 238.)
- [16] Lin, K. L.; Xia, L. G.; Li, H. Y.; Jiang, X. Q.; Pan, H. B.; Xu, Y. J.;

- Lu, W. W.; Zhang, Z. Y.; Chang, J. *Biomaterials* **2013**, *34*, 10028.
- [17] Zhang, H. J.; Ma, W. P.; Ma, H. S.; Qin, C.; Chen, J. J.; Wu, C. T. *Adv. Healthcare Mater.* **2022**, *11*, e2102359.
- [18] Dang, G. P.; Qin, W.; Wan, Q. Q.; Gu, J. T.; Wang, K. Y.; Mu, Z.; Gao, B.; Jiao, K.; Tay, F. R.; Niu, L. N. *Adv. Funct. Mater.* **2022**, 2210275.
- [19] Sun, Y.; Jung, H. W.; Kwak, J. M.; Tan, J.; Wang, Z.; Jeon, I. H. *J. Orthop. Translat.* **2020**, *24*, 175.
- [20] Lei, T.; Zhang, T.; Ju, W.; Chen, X.; Heng, B. C.; Shen, W.; Yin, Z. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 2491.
- [21] Han, F.; Li, T.; Li, M. M.; Zhang, B. J.; Wang, Y. F.; Zhu, Y. F.; Wu, C. T. *Bioact. Mater.* **2023**, *20*, 29.
- [22] Liu, Z. R.; Wan, X. Y.; Wang, Z. L.; Li, L. L. *Adv. Mater.* **2021**, *33*, 2007429.
- [23] Ridley, A. J.; Schwartz, M. A.; Burrage, K.; Firtel, R. A.; Ginsberg, M. H.; Borisy, G.; Parsons, J. T.; Horwitz, A. R. *Science* **2003**, *302*, 1704.
- [24] Martin, P. *Science* **1997**, *276*, 75.
- [25] Qin, C.; Ma, J.; Chen, L.; Ma, H.; Zhuang, H.; Zhang, M.; Huan, Z.; Chang, J.; Ma, N.; Wu, C. *Mater. Today* **2021**, *49*, 68.
- [26] Tian, B. M.; Li, X.; Zhang, J. J.; Zhang, M.; Gan, D.; Deng, D. K.; Sun, L. J.; He, X. T.; Wu, C. T.; Chen, F. M. *Int. J. Oral Sci.* **2022**, *14*, 523.
- [27] Schwarz, G.; Mendel, R. R.; Ribbe, M. W. *Nature* **2009**, *460*, 839.
- [28] He, X. T.; Li, X.; Zhang, M.; Tian, B. M.; Sun, L. J.; Bi, C. S.; Deng, D. K.; Zhou, H.; Qu, H. L.; Wu, C.; Chen, F. M. *Biomaterials* **2022**, *283*, 121439.
- [29] Wang, S. K.; Yao, Z. X.; Zhang, X. Y.; Li, J. H.; Huang, C.; Ouyang, Y. M.; Qian, Y.; Fan, C. Y. *Adv. Sci.* **2022**, *9*, 2202542.
- [30] Dang, W.; Wang, X.; Li, J.; Deng, C.; Liu, Y.; Yao, Q.; Wang, L.; Chang, J.; Wu, C. *Theranostics* **2018**, *8*, 4372.
- [31] Du, L.; Qin, C.; Zhang, H. J.; Han, F.; Xue, J.; Wang, Y.; Wu, J.; Xiao, Y.; Huan, Z.; Wu, C. *Adv. Sci.* **2023**, *10*, 2301309.
- [32] Zhang, Y.; Lei, T.; Tang, C.; Chen, Y.; Liao, Y.; Ju, W.; Zhang, H.; Zhou, B.; Liang, R.; Zhang, T.; Fan, C.; Chen, X.; Zhao, Y.; Xie, Y.; Ye, J.; Heng, B. C.; Chen, X.; Hong, Y.; Shen, W.; Yin, Z. *Biomaterials* **2021**, *271*, 120722.
- [33] Griffith, L. G.; Naughton, G. *Science* **2002**, *295*, 1009.
- [34] Alberton, P.; Dex, S.; Popov, C.; Shukunami, C.; Schieker, M.; Döcheva, D. *Stem Cells Dev.* **2015**, *24*, 597.
- [35] Zhang, H. J.; Qin, C.; Zhang, M.; Han, Y. H.; Ma, J. G.; Wu, J. F.; Yao, Q. Q.; Wu, C. T. *Nano Today* **2022**, *46*, 101584.
- [36] Patel, S. H.; Yue, F.; Saw, S. K.; Foguth, R.; Cannon, J. R.; Shanahan, J. H.; Kuang, S.; Sabbaghi, A.; Carroll, C. C. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12614.
- [37] Izumi, S.; Otsuru, S.; Adachi, N.; Akabudike, N.; Enomoto-Iwamoto, M. *PLoS One* **2019**, *14*, e0213912.
- [38] Maeno, S.; Niki, Y.; Matsumoto, H.; Morioka, H.; Yatabe, T.; Funayama, A.; Toyama, Y.; Taguchi, T.; Tanaka, J. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4847.
- [39] Shi, M.; Zhou, Y.; Shao, J.; Chen, Z.; Song, B.; Chang, J.; Wu, C.; Xiao, Y. *Acta Biomater.* **2015**, *21*, 178.
- [40] Huang, Y.; Wu, C.; Zhang, X.; Chang, J.; Dai, K. *Acta Biomater.* **2018**, *66*, 81.
- [41] Dong, X. X.; Wang, X. Y.; Xing, M.; Zhao, C. C.; Guo, B.; Cao, J. K.; Chang, J. *Regener. Biomater.* **2020**, *7*, 9.

(Cheng, F.)