

DOI: 10.3969/j.issn.1001-0505.2018.01.025



纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 对牙髓干细胞 增殖及骨向分化和矿化能力的影响

夏 阳^{1,2} 陈慧敏² 胡姝颖² 孙剑飞¹ 章非敏^{2,3} 顾 宁^{1,3}

(¹ 东南大学江苏省生物材料与器件重点实验室, 南京 210009)

(² 南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京 210029)

(³ 苏州纳米科技协同创新中心, 苏州 215123)

摘要: 对纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 进行二巯基丁二酸表面修饰, 采用透射电子显微镜(TEM) 观察其形貌, 利用振动样品磁强计(VSM) 检测其磁学性能. 配置含纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的培养基培养牙髓干细胞, 以不添加纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 的培养基为对照组. 采用荧光显微镜观察纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 组与常规培养基组的细胞形态, 以 CCK-8 检测细胞增殖情况, 碱性磷酸酶(ALP) 试剂盒检测细胞 ALP 活性, 并进行茜素红染色以检验其矿化能力. 结果表明, 所用纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 为棒状, 尺寸约 $10 \text{ nm} \times 90 \text{ nm}$, VSM 结果显示其没有磁性. 纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 培养基中牙髓干细胞的形态和增殖情况与常规培养基中情况没有差异, 但是碱性磷酸酶活性和矿化能力则显著提高($p < 0.05$). 由此说明, 纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 对牙髓干细胞的形态和增殖没有影响, 但却会促进其向成骨方向分化.

关键词: 纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$; 牙髓干细胞; 增殖; 骨向分化

中图分类号: R780.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-0505(2018)01-0165-05

Effects of nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ on proliferation, osteogenic differentiation and mineral synthesis of dental pulp stem cells

Xia Yang^{1,2} Chen Huimin² Hu Shuying² Sun Jianfei¹ Zhang Feimin^{2,3} Gu Ning^{1,3}

(¹Jiangsu Key Laboratory for Biomaterials and Devices, Southeast University, Nanjing 210096, China)

(²Jiangsu Key Laboratory of Oral Disease, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

(³Collaborative Innovation Center of Suzhou Nano Science and Technology, Suzhou 215123, China)

Abstract: Nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ is surface modified with dimercaptosuccinic acid (DMSA). Its morphology is observed by transmission electronic microscopy (TEM), and its magnetic property is detected by vibration sample magnetometer (VSM). The media with $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ is used to culture dental pulp stem cells (DPSCs) by using the media without nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ as the control. The morphology of DPSCs in the nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ group and the control group is detected by fluorescent stain. The cell proliferation is detected by CCK-8, and the cell alkaline phosphatase activity (ALP) is measured by a ALP kit. Alizarin red staining (ARS) is used to detect the mineral synthesis. The results show that nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ is spindle with about $10 \text{ nm} \times 90 \text{ nm}$ in dimension. The VSM results prove that nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ is nonmagnetic. No significant difference in cell morphology and proliferation between the nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ group and the normal media group is detected. However, both ALP activity and mineralization formation of cells are significantly increased ($p < 0.05$). Therefore, nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ does not affect the cell morphology and proliferation, but promotes the osteogenic differentiation of DPSCs.

Key words: nano $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$; dental pulp stem cells; proliferation; osteogenic differentiation

收稿日期: 2017-07-04. 作者简介: 夏阳(1981—),女,博士,副教授;顾宁(联系人),男,博士,教授,博士生导师,guning@seu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81771044)、中国博士后基金资助项目(2015M571647)、江苏省博士后基金资助项目(1402044B)、江苏高校优势学科建设工程资助项目(2014-37)、江苏省青年医学人才资助项目(QNRC2016853).

引用本文: 夏阳,陈慧敏,胡姝颖,等. 纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 对牙髓干细胞增殖及骨向分化和矿化能力的影响[J]. 东南大学学报(自然科学版), 2018, 48(1): 165-169. DOI: 10.3969/j.issn.1001-0505.2018.01.025.

赤铁矿型氧化铁($\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$)是最简单的铁氧化物,广泛存在于自然界中。它是室温下最稳定的铁氧化物,不易腐蚀,不会被氧化或还原,具有无毒、价格低廉、耐候性良好、抗腐蚀能力强等特点,在气体传感、催化、医药等领域应用广泛。此外,它还是一种重要的半导体材料,在光催化降解环境污染物、光解水制氢以及锂离子电池领域有广泛的应用。

近年来,随着对 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 纳米材料应用研究的深入,其相关的生物学性质研究也引起了广泛关注。例如 Zhang 等^[1]研究了不同粒径纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 对 Ca-co-2 细胞的吸附和毒性效应,发现粒径对纳米颗粒与细胞之间的吸附行为具有显著影响。Bhattacharya 等^[2]研究了纳米级和微米级 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 颗粒对人肺细胞的毒性。目前,笔者尚未查阅到关于纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 对多潜能分化干细胞增殖和成骨分化影响的研究报道。相关研究大都围绕着氧化铁的另一种晶型——磁赤铁矿($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$)展开。 $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ 因其独特的磁学性质能在磁共振成像检测、生物医学、组织工程等领域应用广泛。文献[3-4]指出,一定浓度的纳米 $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ 对骨髓基质干细胞和牙髓干细胞无毒性,不影响其存活、增殖及成骨分化能力。因此,需要研究纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 对多潜能分化干细胞的作用,以比较不同晶型和磁学性质的纳米铁对细胞的作用效果,探索其对细胞的作用机制,以更好地开发纳米铁在生物医学和组织工程领域内的应用。

本文制备了二巯基丁二酸(DMSA)包裹的纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$,采用透射电镜(TEM)观察其形貌,利用振动样品磁强计(VSM)检测其磁学性质,并研究了纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 对人牙髓干细胞活力、增殖和成骨分化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人牙髓间充质干细胞(humane dental pulp stem cells hDPSCs)由美国马里兰牙学院 Pro Xu Hockin 惠赠; $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 和二巯基丁二酸(DMSA)购自中国阿拉丁公司;DMEM 培养基、胎牛血清以及质量分数为 0.25% 的胰酶购自美国 GBICO 公司;CCK-8 购自美国恩佐生化公司;碱性磷酸酶(ALP)试剂盒购自日本和光纯药工业株式会社;蛋白定量试剂盒 Pierce BCA Protein Assay Kit 购自美国赛默飞世尔公司;细胞荧光染料购自美国英杰生命技术有限公司;青/链霉素、二甲基亚砜(DMSO)、 β -甘油磷酸钠、胰蛋白酶、地塞米松、抗坏血酸、茜素红购自美国 Sigma 公司。使用仪器包

括日本电子株式会社的 JSM-840 型扫描电镜、美国 MolecularDevices 公司的 SpectraMax M5 型酶标仪、日本电子株式会社的 JEOL-7100 型透射电子显微镜以及美国 Lake Shore Cryotronics 公司的 Lakeshore 7470 型振动样品磁强计。

1.2 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 的表面处理和形貌表征

将纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 稀释至约 1 g/L,调节 pH 值为 2.7,加入反应瓶中。称取铁质量 1/4 的 DMSA,超声溶解于 DMSO 溶液中,然后加入 Fe_2O_3 溶液中搅拌反应 5 h。反应结束后离心洗涤样品,将溶液装入透析袋中,用透析夹夹住袋口,放入装有双蒸水的烧杯中,搅拌 24 h。透析后即可得到稳定的 DM-SA/ $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 胶体水溶液。利用 TEM 观察其形貌,采用振动样品磁强计测量其磁性。

1.3 实验分组

细胞培养采用完全培养基和骨向诱导培养基。细胞形貌和增殖实验中采用完全培养基,配方为 DMEM 培养基 + 体积分数 10% 的血清 + 体积分数 1% 的青霉素/链霉素;细胞分化实验中采用骨向诱导培养基,即在完全培养基中添加地塞米松、抗坏血酸、维生素 D、 β -甘油磷酸钠。细胞培养时将培养基作为对照组, $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 培养基作为实验组,其中 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 在培养基中的浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.4 细胞增殖测定

细胞以每孔 5 000 个接种于 96 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 包含体积分数为 5% CO_2 的孵育箱内培养。在接种后的第 1, 4, 7, 14 d, 每孔加入包含体积分数 10% CCK-8 的培养基孵育。培养箱内孵育 2 h 后,从各孔中吸取液体滴入 96 孔板中,于酶标仪上波长 450 nm 处检测其吸光度值。

1.5 细胞形态检测

细胞接种 4 d 后,将细胞浸没于荧光染料中后,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中孵育 15 min,然后用荧光显微镜检测死活细胞情况和细胞铺展状况。

1.6 碱性磷酸酶活性检测

在 2 种培养基中细胞培养 14 d 后,进行 ALP 检测。从孵育箱中取出 96 孔板,采用 PBS 漂洗 3 遍,每孔加入 50 μL 体积分数为 0.25% 的 TritonX-100,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中 2 h。然后加入 100 μL 反应底物,再置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中 2 h,利用酶标仪于波长 405 nm 处测量吸光度。将测得的吸光度值除以蛋白定量检测值后进行统计分析,以排除不同细胞数对 ALP 值的影响。

1.7 茜素红染色

细胞培养 21 d 后,进行钙结节茜素红染色和定量检测。hDPSC 经成骨诱导 21 d, PBS 清洗后,

采用体积分数为 1% 的福尔马林固定 30 min, 质量分数为 2% 的茜素红染色 30 min, PBS 清洗后拍照. 然后, 采用质量分数为 10% 的氯化十六烷基吡啶溶液溶解矿化物, 利用酶标仪于 550 nm 波长下检测吸光度.

1.8 统计学分析

所有定量数据均采用统计分析软件 SPSS13.0 进行独立样本 t 检验. 每种细胞实验重复 4 次, 结果以“均数 \pm 标准差”的形式表示, 以 $p < 0.05$ 表示存在统计学差异.

2 结果与分析

透射电子显微镜结果显示, 制备的 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 呈棒状, 尺寸约 $10\text{ nm} \times 90\text{ nm}$, 颗粒之间单分散(见图 1). $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 的形貌有纳米棒、颗粒、多面体以及由多面体组装的立方体, 不同的制备方法和制备条件会产生不同形貌的 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ [5]. 由此, 可实现对纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 尺寸和形貌的可控合成 [6-7]. 材料的尺寸、结构、组成、孔隙度和形貌对其性能产生不同的影响. 在对细胞的作用上, 材料尺寸、表面电荷和组成成分都会影响纳米粒子的细胞摄取 [8-9].



图 1 TEM 照片

室温下通过 VSM 测得样品的磁滞回线, 结果见图 2. 由图可知, 制备的 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 没有磁性, 因此, 可以排除磁性作用导致其产生的细胞效应. 来自于磁性材料的剩磁作用可影响细胞的增殖和分化 [10].

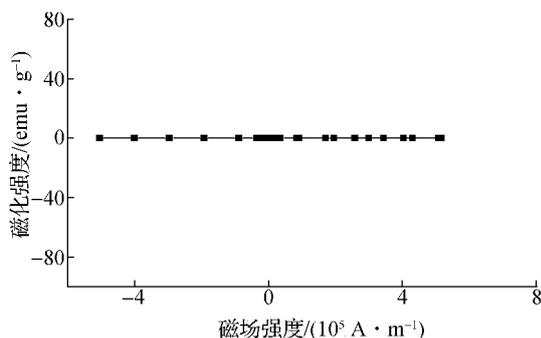
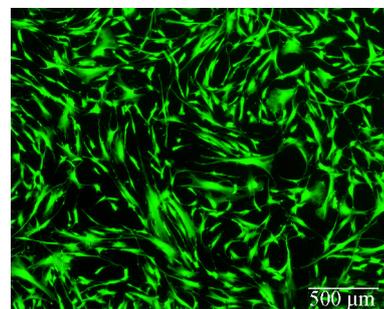
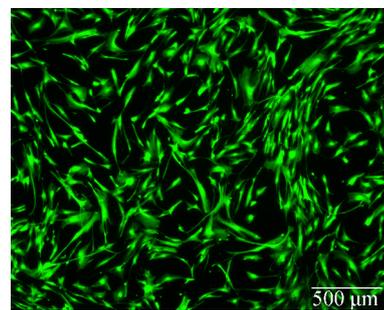


图 2 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 颗粒的 VSM 检测结果

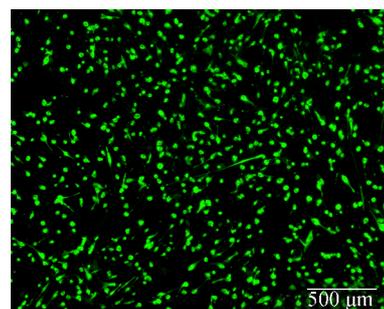
选用含纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 的完全培养基与牙髓干细胞共培养, 纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 的浓度为 10 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 细胞在 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 培养基中培养 4 d 后, 没有检测到表示死细胞的红色荧光影像. 表示活细胞的绿色荧光图片显示, 在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 培养基和正常培养基对照组中, 大量活细胞都已经完全铺展, 呈现出典型的长梭状, 细胞形貌与细胞密度无显著差异(见图 3(a) 和 (b)). 但是在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 的培养基中, 培养的细胞形态发生了显著变化(见图 3(c)). 如图 4 所示, 在 4 个检测时间点处, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 培养基组与正常培养基对照组的细胞增殖结果之间均没有显著差异 ($p > 0.05$). 但当纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 在培养基中的浓度达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞增殖受到显著抑制, 这与图 3(c) 显示的该浓度 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 培养基对细胞形态的影响一致. 当浓度为 5, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 则没有检测到这种不良作用. 究其原因在于, 高浓度下暴露出的铁颗粒内核可以催化产生 ROS, 激活氧化还原敏



(a) 正常培养基



(b) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 培养基



(c) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米 $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ 培养基

图 3 接种细胞 4 d 后的细胞荧光染色图片

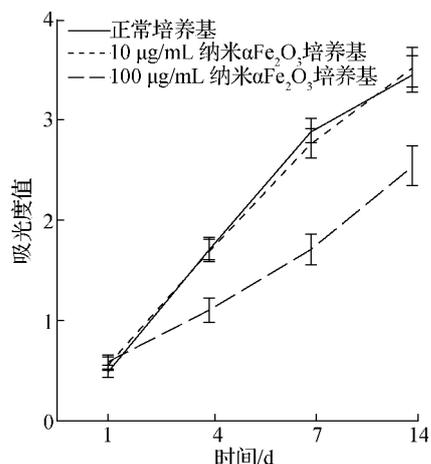
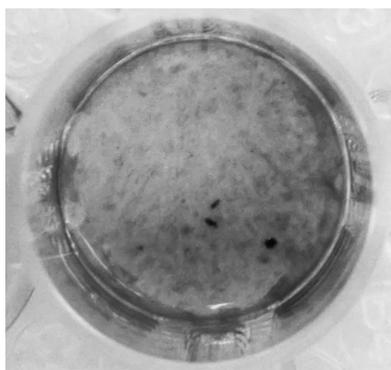


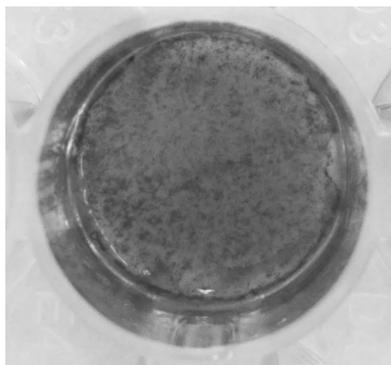
图 4 CCK-8 检测细胞增殖结果

感性 JNK 信号通路^[11], 从而促进细胞凋亡^[12]. 因此, 选用质量浓度为 10 μg/mL 的纳米 αFe₂O₃ 培养基进行后续的细胞成骨分化检测.

本研究主要检测了 ALP 活性和矿化物形成量这 2 个细胞成骨分化指标. 骨向诱导 10 d 后, 2 组细胞的 ALP 活性分别为 (0.89 ± 0.15) 和 (1.68 ± 0.20) mU/mg 蛋白. 由结果可知, 第 2 组细胞的 ALP 活性较对照组明显提高 ($p < 0.01$). 骨向诱导 21 d 后, 检测 2 组中细胞的矿化物形成量, 结果见图 5. 由图可知, 第 2 组细胞染色更深, 矿化结节更



(a) 培养基



(b) 10 μg/mL 纳米 αFe₂O₃ 培养基

图 5 茜素红染色结果

厚. 定量检测结果显示, 2 组细胞的矿化物相对形成量分别为 1.0 ± 0.11 和 3.45 ± 0.29 , 即第 2 组细胞的矿化物形成量较对照组明显提高 ($p < 0.01$).

纳米材料对干细胞成骨分化的作用受纳米材料种类和浓度影响. 文献 [13-15] 指出, 不同种类和浓度的超顺磁性氧化铁纳米材料与骨髓间充质干细胞共培养, 所得结果各不相同. 关于 αFe₂O₃ 对牙髓干细胞这种多潜能分化干细胞成骨分化影响的研究较少. 文献 [13] 指出, 纳米 γFe₂O₃ 对骨髓干细胞成骨分化的促进作用与 MAPK 通路有关. 本研究中的体外成骨分化实验结果表明, 10 μg/mL 的纳米 αFe₂O₃ 对牙髓干细胞成骨分化有促进作用.

3 结论

- 1) 一定浓度的纳米 αFe₂O₃ 对牙髓干细胞的形态和增殖没有影响.
- 2) 纳米 αFe₂O₃ 可以对牙髓干细胞的成骨方向分化起到促进作用.
- 3) 本研究结果将为纳米 αFe₂O₃ 在生物医学、骨组织工程等领域内的应用提供理论依据并奠定基础.
- 4) 下一步工作是使用普鲁士蓝染色, 同时利用 TEM 检测细胞对纳米 αFe₂O₃ 的摄入及纳米 αFe₂O₃ 在细胞内的分布情况, 并在基因和蛋白水平进一步验证纳米 αFe₂O₃ 对牙髓干细胞成骨分化的影响.

参考文献 (References)

- [1] Zhang W, Kalive M, Capco D G, et al. Adsorption of hematite nanoparticles onto Caco-2 cells and the cellular impairments: Effect of particle size [J]. *Nanotechnology*, 2010, **21** (35): 355103. DOI: 10.1088/0957-4484/21/35/355103.
- [2] Bhattacharya K, Hoffmann E, Schins R F, et al. Comparison of micro- and nanoscale Fe³⁺-containing (Hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells in vitro [J]. *Toxicol Sci*, 2012, **126** (1): 173-182. DOI: 10.1093/toxsci/kfs014.
- [3] 陈小伍, 方驰华, 刘胜军, 等. 超顺磁性纳米铁粒子标记骨髓基质干细胞及其分化能力的影响 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, **5** (3): 253-257. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2006.03.009.
Chen Xiaowu, Fang Chihua, Liu Shengjun, et al. Effect of superparamagnetic iron nanoparticle labeling on bone marrow stem cells' abilities to survive, proliferate and differentiate into hepatocytes [J]. *Chin J Neu-*

- romed, 2006, 5(3): 253-257. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2006.03.009. (in Chinese)
- [4] 马亮,白玉,李明伟,等. 超顺磁氧化铁纳米颗粒对牙髓干细胞生物学影响的体内外研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2016, 26(7): 387-395. DOI: 10.15956/j.cnki.chin.j.conserv.dent.2016.07.001.
Ma Liang, Bai Yu, Li Mingwei, et al. The effects of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on the biological activity of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo [J]. *China J Conserv Dent*, 2016, 26(7): 387-395. DOI: 10.15956/j.cnki.chin.j.conserv.dent.2016.07.001. (in Chinese)
- [5] Supattarasakda K, Petcharoen K, Permpool T, et al. Control of hematite nanoparticle size and shape by the chemical precipitation method [J]. *Powder Technology*, 2013, 249(11): 353-359.
- [6] Lü B, Liu Z, Tian H, et al. Single-crystalline dodecahedral and octodecahedral $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles synthesized by a fluoride anion-assisted hydrothermal method [J]. *Advanced Functional Materials*, 2010, 20(22): 3987-3996. DOI: 10.1002/adfm.201001021.
- [7] Yang S, Xu Y, Sun Y, et al. Size-controlled synthesis, magnetic property, and photocatalytic property of uniform $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles via a facile additive-free hydrothermal route [J]. *Cryst Eng Comm*, 2012, 14(23): 7915-7921. DOI: 10.1039/c2ce25929j.
- [8] Agarwal R, Singh V, Journey P, et al. Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods and use shape-specific uptake mechanisms [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17247-17252. DOI: 10.1073/pnas.1305000110.
- [9] Li Y, Kröger M, Liu W K. Shape effect in cellular uptake of PEGylated nanoparticles: Comparison between sphere, rod, cube and disk [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(40): 16631-16646. DOI: 10.1039/c5nr02970h.
- [10] Liu X, Zhang J, Tang S, et al. Growth enhancing effect of LBL-assembled magnetic nanoparticles on primary bone marrow cells [J]. *Science China Materials*, 2016, 59(11): 901-910. DOI: 10.1007/s40843-016-5104-9.
- [11] Temkin V, Karin M. From death receptor to reactive oxygen species and c-Jun N-terminal protein kinase: The receptor-interacting protein 1 odyssey [J]. *Immunol Rev*, 2007, 220: 8-21. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00560.x.
- [12] Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: Breaking the brake on apoptosis [J]. *BioEssays*, 2002, 25(1): 17-24. DOI: 10.1002/bies.10204.
- [13] Wang Q, Chen B, Cao M, et al. Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs [J]. *Biomaterials*, 2016, 86: 11-20. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.004.
- [14] Chen Y C, Hsiao J K, Liu H M, et al. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 245(2): 272-279. DOI: 10.1016/j.taap.2010.03.011.
- [15] Kostura L, Kraitchman D L, Mackay A M, et al. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis [J]. *NMR Biomed*, 2004, 17(7): 513-517. DOI: 10.1002/nbm.925.