

锰掺杂纳米羟基磷灰石的体外抗菌-促成骨性能研究

李承瑜, 丁自友, 韩颖超

(武汉理工大学 材料复合新技术国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 羟基磷灰石(HAP)作为一种常见的骨修复材料, 在治疗感染性骨缺损时仍面临着细菌感染的风险, 有限的骨诱导能力也阻碍了其进一步应用。本研究采用共沉淀法制备了一种锰掺杂羟基磷灰石纳米棒(MnHAP), 该纳米材料兼具优良的细胞生物相容性, 高抗菌效率和骨诱导能力。抗菌实验表明, MnHAP10($n(\text{Mn})/n(\text{Ca}+\text{Mn})=10\%$)对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制率可分别达到 77.85% 和 75.92%, 并且在 808 nm 近红外光照射下, 对大肠杆菌的抗菌效率得到了进一步增强(97.63%)。细胞增殖以及相关成骨基因实验表明, MnHAP 有利于成骨细胞的增殖分化, 提高了对蛋白质的吸附能力和成骨活性, 促进了相关成骨基因的表达, 且具有良好的生物相容性。MnHAP 纳米棒有望为感染性骨缺损治疗提供一种新的思路。

关键词: 羟基磷灰石; 锰; 抗菌; 感染性骨缺损; 光热

中图分类号: TQ174 文献标志码: A 文章编号: 1000-324X(2024)03-0313-08

In vitro Antibacterial and Osteogenic Properties of Manganese Doped Nano Hydroxyapatite

LI Chengyu, DING Ziyou, HAN Yingchao

(State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: Hydroxyapatite (HAP), as a common bone repair material, still faces the risk of bacterial infection in the treatment of infectious bone defects, whose limited osteogenic properties also hinders its further application. This study used a coprecipitation method to prepare the manganese doped hydroxyapatite nanorod (MnHAP), which exhibited excellent cell biocompatibility, high antibacterial efficiency and osteogenic properties. Antibacterial experiments showed that the inhibition rates of MnHAP10($n(\text{Mn})/n(\text{Ca}+\text{Mn})=10\%$) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* can reach 77.85% and 75.92%, respectively. Moreover, the antibacterial efficiency of MnHAP10 against *Escherichia coli* can be further enhanced (97.63%) under 808 nm near-infrared light irradiation. Cell proliferation and related osteogenic gene experiments display that MnHAP is beneficial for the proliferation and differentiation of osteoblasts, which improves protein adsorption capacity, stimulates osteogenic activity, and promotes the expression of related osteogenic genes, demonstrating its good biocompatibility. Therefore, MnHAP nanorods are expected to provide a new approach in the treatment of infectious bone defects.

Key words: hydroxyapatite; manganese; antibacterial; infectious bone defect; photothermal

收稿日期: 2023-09-24; 收到修改稿日期: 2023-10-15; 网络出版日期: 2023-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(51672206) National Natural Science Foundation of China (51672206)

作者简介: 李承瑜(1995-), 男, 博士研究生. E-mail: lcy9524@foxmail.com

LI Chengyu(1995-), male, PhD candidate. E-mail: lcy9524@foxmail.com

通信作者: 韩颖超, 研究员. E-mail: hanyingchao@whut.edu.cn

HAN Yingchao, professor. E-mail: hanyingchao@whut.edu.cn

感染性骨缺损是一种慢性疾病,可通过开放性骨折或植入物邻近部位的血液传播和加重,引起的炎症反应会阻止骨组织再生,极大地破坏骨愈合过程^[1]。此外,感染性骨缺损造成的细菌感染可通过多种细胞外和细胞内途径破坏细胞外基质(ECM),抑制成骨细胞的成骨分化和功能,促进破骨细胞的产生,导致过度骨吸收和成骨功能受损,甚至可能导致骨折愈合延迟和不愈合^[2]。因此,针对治疗感染性骨缺损疾病研发具有抗菌与骨修复功能的材料成为生物医学的热门研究方向之一^[3]。

Mn 是一种必需的微量元素,可通过诱导整合素等介质影响细胞黏附,并通过增强骨钙素刺激、增加碱性磷酸酶活性和提高 I 型胶原的产生,在重塑骨细胞外基质方面发挥着重要作用^[4-6]。目前 Ag、Fe、Cu 等已被广泛应用于医疗抗菌领域,其中 Fe 基化合物还具有一定的光热转换能力^[7-9]。近年来研究发现, Mn 基材料同样具有良好的抗菌能力和光热转化效率,可实现(光热)抗菌与促成骨的联合应用^[10-12]。在自然界中,生物体可以通过自然生物矿化过程形成羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAP)^[13]。作为生物硬组织(如骨骼和牙齿)的主要无机成分, HAP 具有生物相容性和生物可降解性,在生物体内降解产物为 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} ,可以促进新骨的发育形成^[14]。HAP 中的 Ca^{2+} 可以被多种金属离子通过离子交换反应所替代,形成对应金属离子的 MHAP(M 代表取代 Ca^{2+} 的金属离子)。因此,将 Mn 掺杂到 HAP 中可有效提高生物材料的生物相容性、促成骨和光热抗菌等性能^[15-16]。Zhu 等^[12]通过在空气中简单的热处理策略,在羟基磷灰石中引入微量 Mn^{3+} 和 H 空位,提高了对大肠杆菌的抗菌活性(90.8%),并为控制 HA 中 Mn 元素的氧化状态提供了可行的方法。Krishnakumar 等^[14]在没有任何热处理情况下合成出结晶度较低的 HAP 纳米晶体,并证明了 Mn 掺杂的 HAP 以剂量依赖的方式增强成骨细胞的黏附、迁移和增殖。截至目前,将 Mn 掺杂 HAP(光热)抗菌与促成骨结合并应用于治疗感染性骨缺损的研究尚未见报道。此外,尽管 Mn 在生命体系中很重要,但其仅为一种必需的微量元素, Mn 掺杂量过高仍可能产生毒性。如何在控制 Mn 掺杂量的基础上实现(光热)抗菌与促成骨性能的最优化也是亟待解决的问题。

基于共沉淀法,本研究制备了一种具有(光热)抗菌与促成骨功能的锰掺杂 HAP 纳米棒(MnHAP),表征了其形貌、结构、锰离子释放能力和价态等,研究了该纳米棒的(光热)抗菌性能。然后将 MnHAP 与体外成骨细胞共培养,通过染色实验与相关基因

表达检测评估了其成骨细胞的成骨作用,筛选了 Mn 的最优掺杂量。

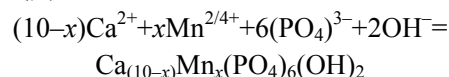
1 实验方法

1.1 实验试剂

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 购自国药化学试剂北京有限公司。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌种购自武汉维克赛思科技有限公司。营养琼脂购自青岛海博生物技术有限公司。胎牛血清(FBS)、 α -MEM 培养基(DMEM)购自 Sigma-Aldrich。CCK-8 试剂盒购自碧云天公司。实验中所用试剂均为分析纯。

1.2 材料制备

采用共沉淀法制备锰掺杂纳米羟基磷灰石。反应方程式为



通过控制 Mn 添加量制备不同掺杂比例的锰掺杂纳米 HAP。以锰占(锰+钙)总摩尔量的摩尔比表示锰的不同含量, $\text{Mn}/(\text{Ca}+\text{Mn})$ 的摩尔比为 1%、5%、10%、20% 分别标记为 MnHAP1、MnHAP5、MnHAP10、MnHAP20。

以制备 MnHAP10 为例:

(1)首先配置 $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 储存液,配置时需加一定量的稀盐酸以防止锰水解;

(2)按照 $\text{Mn}/(\text{Ca}+\text{Mn})$ 的摩尔比为 10%、 $\text{Ca}+\text{Mn}$ 的浓度为 0.0668 mol/L,称取一定质量的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于水并加入适量的 $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 储存液;

(3)按照磷酸根离子浓度为 0.02 mol/L 称取一定质量 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于水;

(4)将 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液在室温条件下倒入 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 混合溶液中,加入氢氧化钠溶液调整混合溶液 pH 为 12, 80 °C 水浴加热 3 h 后静置 24 h;

(5)除去上清液,将白色沉淀倒入离心管中,加入去离子水,使用离心机(转速 3000 r/min, 5 min)用去离子水洗涤 4 次,冷冻干燥 24 h 后,得到 MnHAP10 粉末。

1.3 材料表征

采用 X 射线衍射仪(XRD, Rigaku, 日本)分析样品的成分和晶相。通过扫描电子显微镜(SEM, Carl Zeiss, 德国)和透射电子显微镜(TEM, FEI Tecnai F20)观察所得的纳米材料的形貌。采用 X 射线光电谱(XPS, Thermo Scientific, 美国)表征样

品中各元素的化学价态。采用紫外-可见-近红外分光光度计(UV-visible near infrared spectrophotometer, UV-Vis-NIR UV7, 瑞士)测试不同材料样品的吸收光谱。采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(Malvern Zetasizer Nano ZS90)分析样品的 Zeta 电位。使用全自动比表面及孔隙度分析仪(Micromeritics ASAP 2460)计算样品的比表面积。

1.4 离子释放实验

称取制备的不同 MnHAP 加入到 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 浓度为 10 mg/mL。将缓冲液置入恒温振荡器中, 温度保持在 37 °C, 振荡 1、3、6、9、12、24 和 48 h 后离心取上清液 5 mL, 平行实验 3 次。用全谱直读等离子体发射光谱仪(PerkinElmer 8300)测定上清液中的锰离子浓度。

1.5 蛋白吸附性能

牛血清白蛋白(BSA, Sigma)是血清中含量最高的蛋白质, 通常被用作评估生物材料吸附的标准蛋白质。将 0.01g MnHAP 粉末分散在 1 mL BSA 蛋白溶液(0.5 mg/mL)中, 并置于 37 °C 培养箱中培养 4 h。然后, 离心悬浮液, 并通过 BCA 法(Sigma)测定上清液中的蛋白质含量。每个实验组设置 6 个复孔, 上清液的吸光度在微孔板读取器上用 562 nm 的波长检测(Bio-Tek ELx800)。通过吸附前后测量的蛋白质质量之间的差值来计算 MnHAP 的蛋白质吸附量^[17]。

1.6 抗菌性能实验

采用细菌菌落计数法研究材料对革兰氏阴性大肠杆菌(*E. coli*, ATCC25922)和革兰氏阳性金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC25923)的抗菌性能^[18]。首先, 将已灭菌的 MnHAP 样品加入 24 孔细菌培养板, 表面分别接种 200 μ L 浓度为 10^7 CFU/mL 的细菌, 并置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h。然后用振荡器震荡离心管, 将一定量的细菌悬液按比例稀释 100 倍, 取 100 μ L 稀释菌液滴加于营养琼脂培养皿, 用推棒涂匀, 倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养 18 h。采用数码相机与 ImageJ 软件对培养后的细菌琼脂培养皿拍照、计数细菌菌落数。研究材料的光热抗菌性能时, 将灭菌样品加入 24 孔细菌培养板, 表面分别接种 200 μ L 浓度为 10^7 CFU/mL 的细菌后, 使用 808 nm 近红外激光器对孔板照射 10 min (1 W/cm^2), 其余操作与上述过程一致。

1.7 细胞培养

将大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)培养在添加 10%胎牛血清(FBS, Gibco, USA)和 1%青霉素/链霉素混合液(Hyclone, USA)的 α -MEM 基础培养液

(Gibco, USA)至对数生长期, 外界环境为 37 °C 的含有 5% CO₂ 的恒温培养箱。

1.8 细胞增殖

以大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)为模型, 采用 CCK-8 法对制备的材料作细胞增殖实验。简言之, 将 BMSCs(第 3 代)置于 96 孔板(10^5 cell/well)中, 每个实验组设置 6 个复孔, 并在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h, 然后分别与 HAP、MnHAP1、MnHAP5、MnHAP10 和 MnHAP20 纳米颗粒(500 μ g/mL)共同孵育 24 和 72 h, 最后加入 CCK-8 溶液, 通过酶标仪测量 450 nm 处的吸光度(OD)。

1.9 成骨诱导实验

通过成骨诱导检测复合材料在分化成骨时对 BMSCs 的影响。BMSCs 分布在 6 孔板中, 将 5×10^4 细胞加入每个孔中, 加入完全培养基并在 24 h 后用成骨诱导溶液(50 μ mol/L 抗坏血酸\10 mmol/L β -磷酸甘油\100 nmol/L 地塞米松、10%FBS 和 α -MEM 培养基)替换。通过含有不同掺杂比例的 MnHAP 材料的成骨分化培养基培养细胞, 并每隔 3 d 更换培养基。碱性磷酸酶(ALP)在第 7 天和第 14 天染色。取出细胞, 在 4%多聚甲醛中固定 30 min, 并用碱性磷酸酶试剂盒进行染色。染色后, 用 PBS 清洗细胞, 并在显微镜和相机上观察。ALP 活性也用定量 ALP 测定试剂盒及酶标仪测量 405 nm 波长处的吸光度。诱导 14 和 21 d 后进行茜素红 S 染色, 将细胞固定在 4% (w/v)多聚甲醛中 30 min, 并用 PBS 洗涤 3 次, 每孔使用 1 mL 新鲜制备的 3% (w/v)茜素红 S 溶液处理, 并在黑暗中培养 30 min, 使用荧光显微镜对钙结节进行定性分析。

1.10 成骨相关基因分析

定量实时荧光 PCR 用于检测成骨相关基因的表达。将 BMSCs 与 MnHAP10 共同孵育一定时间后, 通过 Trizol 试剂(Sigma)提取总 RNA。在不同时间点用 PCR 试剂盒(Takara, 中国)将 1 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA。最后, 对 TGF- β 1 及成骨基因 Runx2、OPN、BMP-2、Col-I 和 ALP 作 RT-PCR 检测。所有样品重复 3 次实验。甘油二磷酸脱氢酶(GAPDH)作为管家基因, 用作对照。所用的基因引物根据参考文献确定^[19]。

For GAPDH:

F: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3';

R: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'.

For BMP-2:

F: 5'-TGGCCCATTTAGAGGAGAACC-3';

R: 5'-CTGTGTTTCATCTTGGTGCAAA-3'.

For Col-I:
F: 5'-TGACCTTCCTGCGCCTAATG-3';
R: 5'-CTGCCAGAAGGCTAAACCAGA-3'.
For TGF-beta1:
F: 5'-CGGCAGCTGTACATTGACTT-3';
R: 5'-AAGCTTCCCATCTCTCCCTAC-3'.
For Runx2:
F: 5'-AACGATCTGAGATTTGTGGGC-3';
R: 5'-CCTGCGTGGGATTTCTTGGTT-3'.
For OPN:
F: 5'-AACGATCTGAGATTTGTGGGC-3';
R: 5'-CCTGCGTGGGATTTCTTGGTT-3'.

1.11 统计分析

所有实验数据均以均值±标准差(SD)表示, 统计分析采用单因素方差分析(ANOVA)。p<0.05 表示数据存在统计学意义的显著性差异并在统计图上标记为*; p<0.01 为更显著差异, 标记为**; p<0.001 为极显著差异, 标记为***。

2 结果与讨论

2.1 材料的形貌结构

通过 XRD 分析可知(图 1(a)), HAP 样品的各衍射峰与标准卡片(PDF#09-0432)一致, 在 $2\theta=25.8^\circ$ 和 31.7° 处的衍射峰分别对应于 HAP 标准卡片(PDF#09-0432)的(002)和(211)晶面, 表明本研究成功合成 HAP 纳米颗粒^[20-21]。MnHAP 样品的晶粒尺寸和晶胞体积小于制备的 HAP 样品(表 1)。随着锰离子的掺杂浓度增加, MnHAP 位于 $2\theta=25.8^\circ$ 和 31.7° 的峰位置向右移动, 这是因为 MnHAP 中部分 Mn^{2+} 取代了 Ca^{2+} 。由于 Mn^{2+} 的半径(0.08 nm)小于 Ca^{2+} 的半径(0.100 nm), 因此锰离子掺杂会导致晶格收缩, 晶格参数变小, 且晶面之间的间隔也减小, 该现象证明锰离子成功掺杂进 HAP 晶格中^[22-23]。此外, MnHAP 的结晶度随着锰离子含量的增加而降低, 这也有利于 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 的体内释放, 促进新骨的形成。由样品 SEM 照片可知, HAP 呈现出典型的短棒状结构(图 1(b)), 其粒径长度为 80~150 nm。将锰离子掺杂入 HAP, 随着锰离子浓度的升高, MnHAP 的棒状长度呈现略微降低的趋势(图 1(c~f)), 说明掺杂锰离子会影响 HAP 沿 c 轴的择优生长, 这一结果与前述 XRD 的分析结果一致^[24]。本实验还对 MnHAP 进行了 TEM 观察, 其分析结果与 SEM 观察一致(图 1(g~k))。根据 SAED(图 1(l~p))中斑点和环状图案可知, 羟基磷灰石呈多晶性。然而, 由于颗粒的团聚, 也显示出随机取向。MnHAP 在 SAED 图谱

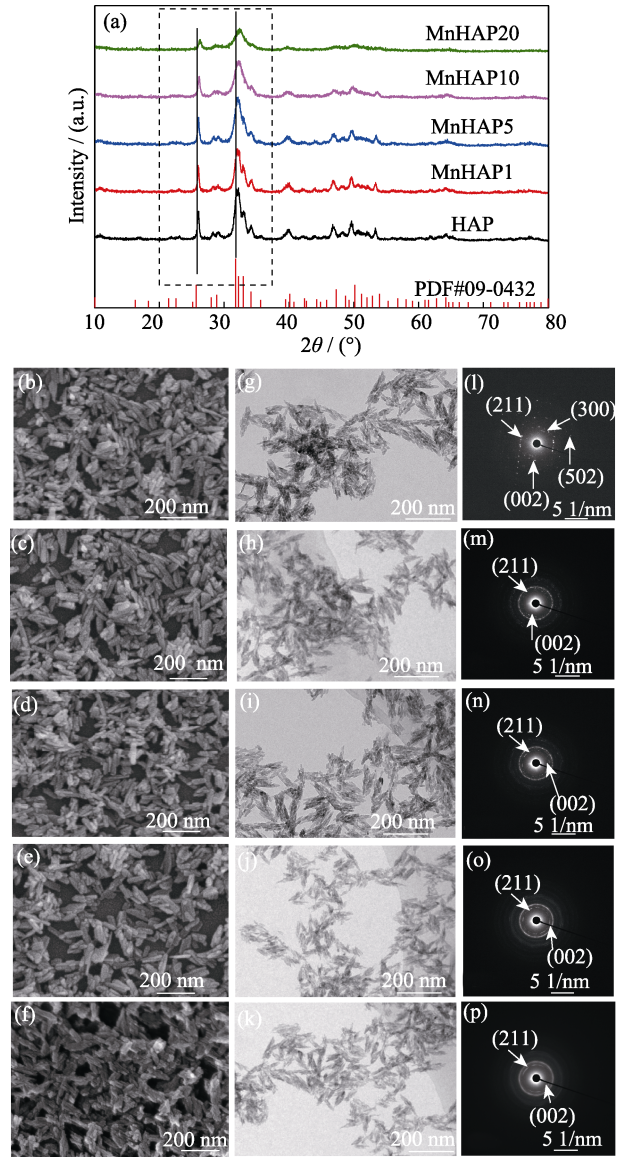


图 1 MnHAP 的微观形貌和结构分析
Fig. 1 Morphologies and structures of MnHAP
(a) XRD patterns of MnHAP and HAP; (b-f) SEM images of HAP (b), MnHAP1 (c), MnHAP5 (d), MnHAP10 (e), and MnHAP20 (f); (g-k) TEM images of HAP (g), MnHAP1 (h), MnHAP5 (i), MnHAP10 (j) and MnHAP20 (k); (l-p) Selected area diffraction pattern of HAP (l), MnHAP1 (m), MnHAP5 (n), MnHAP10 (o), and MnHAP20 (p)

表 1 MnHAP 和 HAP 的晶格参数, 晶胞体积和结晶度
Table 1 Lattice parameters, volume, and crystallinity of MnHAP and HAP

Sample	<i>a</i> -axis/Å	<i>c</i> -axis/Å	Volume/Å ³	Crystallinity/%
HAP	9.41129	6.88743	528.31	61.77
MnHAP1	9.41083	6.88255	528.78	62.92
MnHAP5	9.40699	6.88027	527.74	61.72
MnHAP10	9.40415	6.87068	527.4	55.98
MnHAP20	9.40065	6.86074	527.11	50.36

中也显示出明显的(002)和(221)衍射, 这与 XRD 图谱一致(图 1(a)), 证实了纳米 MnHAP 的成功合成。

2.2 离子释放

图 2 为 MnHAP 在不同时间点锰离子的释放曲线。由图可知, 12 h 内, MnHAP 锰离子的释放量持续上升。12 h 时, 释放量基本达到峰值, MnHAP1、MnHAP 5、MnHAP10、MnHAP20 样品的释放量分别为 0.46、2.6、4.3 和 6.2 $\mu\text{g/mL}$ 。在之后的时间段内, MnHAP 中锰离子基本保持稳定释放。

2.3 抗菌性能

本研究对 MnHAP10 样品进行了 XPS 价态分析(图 3(a)), 结果显示, 样品在 $\text{Mn}2\text{p}_{3/2}$ 轨道可劈裂为两个峰, 其中, 在 641.42 eV 处的峰可归属于 Mn^{2+}

(42.84%), 而在 642.81 eV 的峰可归属于 Mn^{4+} (57.16%); $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{2+}$ 的峰面积比约为 1.33 : 1。这些结果表明, MnHAP10 中的 Mn 是以 Mn^{4+} 和 Mn^{2+} 组成的混合价态存在, 其中 Mn^{4+} 是主要物种^[15, 25]。已知 Mn^{2+} 具有良好的抗菌能力, 且根据相关文献^[26-27]报道 Mn^{4+} 具有较高的光热转换效率, 这说明 MnHAP 在(光热)抗菌领域的具有较大的潜力。UV-Vis-NIR DRS 结果(图 3(b))表明, 与未掺杂锰离子的 HAP 样品相比, 所有 MnHAP 样品在 200~1000 nm 的吸收值得到明显提升, 说明掺杂锰离子使得 HAP 具有较强的光吸收能力, 可为光热抗菌的进一步应用提供理论基础^[28]。此外, 随着锰离子掺杂量的增加, MnHAP 样品的吸收值呈现出正相关的趋势。就 MnHAP 的光热转换效率来说, 以 MnHAP10 为例, 通过计算的升温-降温曲线以及冷却时间与冷却阶段温度驱动力的负自然对数曲线可知(图 3(c)), 光热转换效率约为 28%, 与相关文献报道的转换效率基本一致。

本研究采用菌落计数法评价了 MnHAP 样品的抗菌性能^[29]。与 HAP 相比(图 3(d-e)), MnHAP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 展现出良好的抗菌性能, 说明锰离子掺杂可以实现材料抗菌效果, 且从定量分析可知, MnHAP 的抗菌效率与锰离子的掺杂量呈正相关趋势, 这与相关文献报道一致^[6]。其中, MnHAP10 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑制率分别达到 77.85% 和 75.92%。进一步地, 采用同样的方法研究了 MnHAP

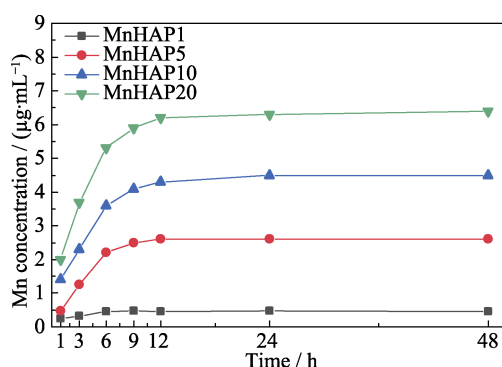


图2 MnHAP 的锰离子释放曲线

Fig. 2 Manganese ion release curves of MnHAP

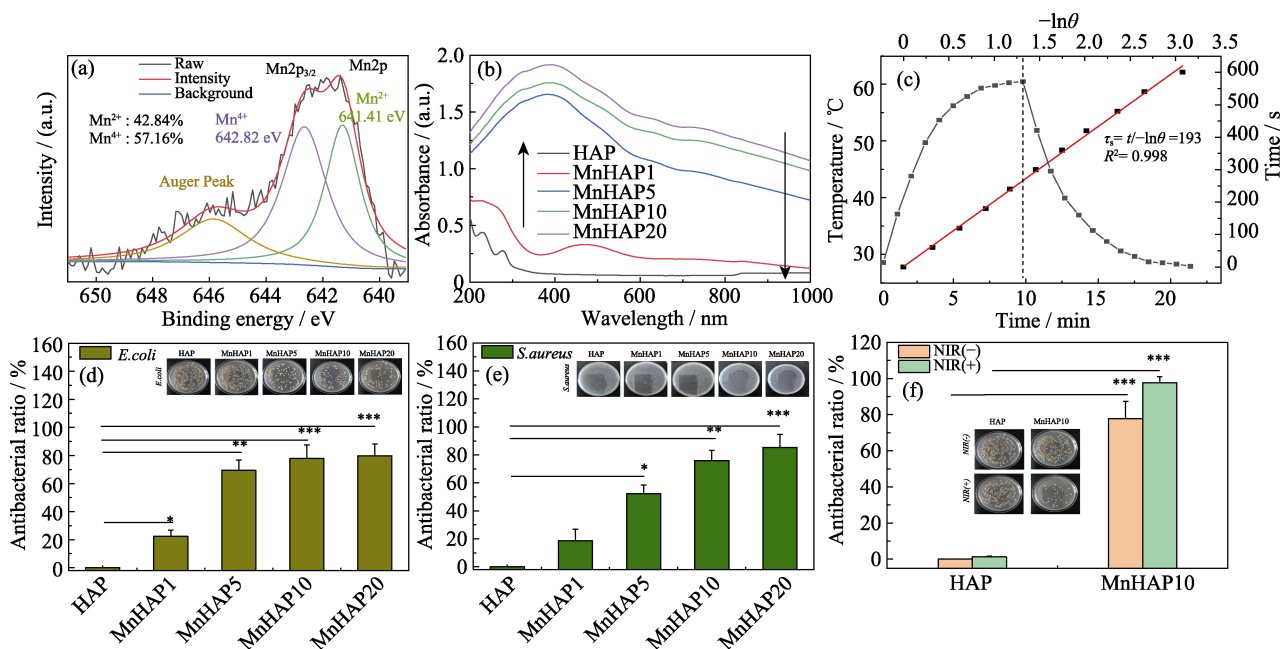


图3 MnHAP10 的 Mn 元素价态(a)、MnHAP 光吸收(b)、MnHAP10 光热转换效率(c)、MnHAP 单纯抗菌作用(d-e)和 MnHAP10 光热抗菌作用(f)

Fig. 3 Mn element valence in MnHAP10 (a), photoabsorption of MnHAP (b), photothermal conversion efficiency of MnHAP10 (c), pure antibacterial effect MnHAP (d-e) and photothermal antibacterial MnHAP10 (f)

的光热抗菌性能(图 3(f))。近红外激光照射 10 min 后, MnHAP10 对于 *E. coli* 的抗菌性能有了显著提升, 光热抗菌效率达到 97.63%。这一结果优于多数相关文献^[26]报道的锰掺杂 HAP 的抗菌能力, 说明 MnHAP 优良的光热抗菌性可有助于解决 HAP 植入材料治疗感染性骨缺损面临的抗菌难题。

2.4 促成骨性能

比表面积(BET)物理吸附仪可以分析材料的比表面积与孔结构, 由图 4(a~c)可知, MnHAP 和 HAP 的吸附等温线可归类为 IV 型, 其 BET 随着锰离子掺杂量的提高呈现出正相关的趋势。这些孔道和表面的电荷状况如何影响材料的生物学性质, 需要检测其 Zeta 电位。除 MnHAP20 的 Zeta 电位约为 -7.77 mV 外, 其余 MnHAP 的 Zeta 电位基本与 HAP 一致(图 4(b))。推测这是由于 MnHAP20 表面存在大量的 Mn^{4+} , 靠近表面区域积聚了抗衡离子, 屏蔽了表面电荷, 因而降低了 Zeta 电位。表面 Zeta 电位降低将影响表面对蛋白质的吸附性能。牛血清白蛋白(BSA)是血清中最丰富的蛋白质, 可用于保护酶的位点和活性, 通常被用作评估生物材料吸附的标准蛋白质的能力。随着 Mn 掺杂量增大, 吸附在 MnHAP 上蛋白质的量也增加(图 4(c)), 其中, MnHAP20 纳米棒的蛋白吸附性能达到 $18.66 \mu\text{g}/\text{mg}$, 分析其单位面积蛋白吸附量可以看出, MnHAP 的单位面积蛋白吸附量随着锰离子的掺杂量升高而呈现出先升高后降低的趋势。这一现象可能是随着锰离子的掺杂量提升, MnHAP 的比表面积也随之增大, 导致前一阶段单位面积蛋白吸附量升高; 但随着锰离子进一步掺入, MnHAP 的结晶度降低的趋势更加明显, 因此单位面积蛋白吸附量也随之降低。

由于细胞增殖与新骨的形成密切相关, 本实验采用 BMSCs 评价 MnHAP 对于成骨过程中细胞增殖的影响。由图 5(a)可知, 以 HAP 组作为对照, MnHAP 组在培养 24 h 后表现出对成骨细胞的增殖促进作用, 培养 72 h 后, MnHAP10 实验组对于 BMSCs 细胞增殖促进达到最大。值得注意的是, 相对比 MnHAP10, MnHAP20 实验组对于 BMSCs 细胞增殖的影响呈降低的趋势, 这可能是由于过多的锰离子会产生一定的细胞毒性, 进而影响 BMSCs 增殖^[30]。

ALP 通常被用作细胞成骨分化的早期典型标记, 本研究采用 ALP 染色和茜素红染色表征了 MnHAP 对体外成骨分化的影响(图 5(b))。与对照组(Control)相比, 在第 7 天和第 14 天, MnHAP 上 BMSC 的 ALP 染色明显增强, 且优于 HAP 组。此外, 茜素红染色显示, 在整个培养期内, 特别是在第 21 天,

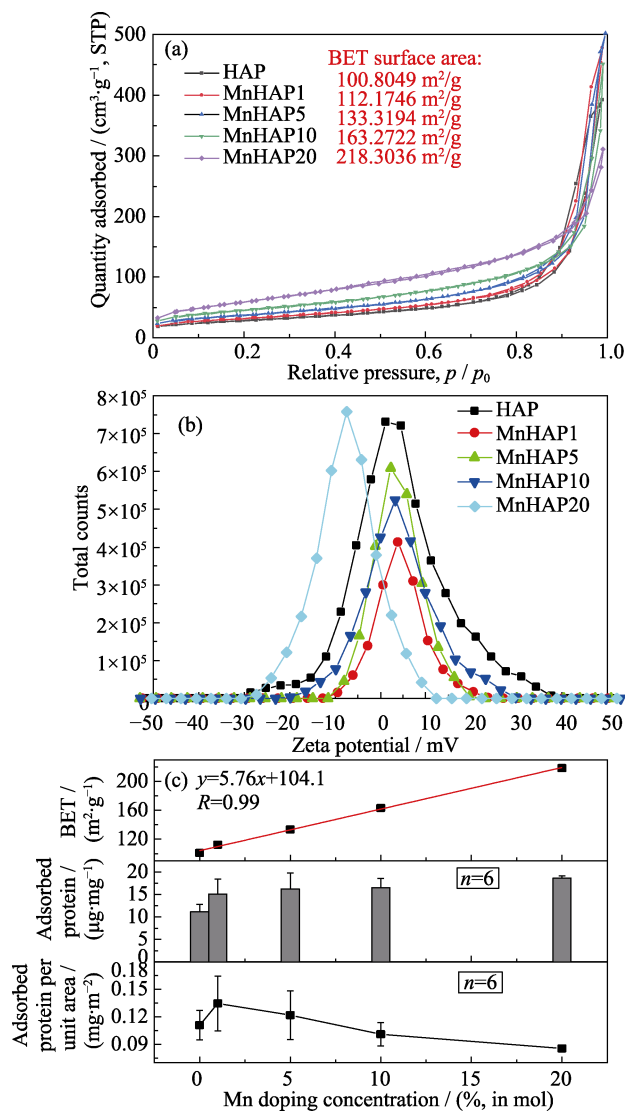


图 4 MnHAP 的比表面积与孔结构(a)、Zeta 电位(b)与蛋白质吸附量(c)

Fig. 4 Specific surface area and pore structure (a), Zeta potential (b) and protein adsorption amount (c) of MnHAP

MnHAP 上 BMSC 的矿化显著增强。使用 imageJ 软件对染色图片提取出单一通道半定量分析发现, MnHAP10 实验组的 ALP 染色和茜素红染色平均荧光强度相比 HAP 实验组分别增强了 51% 和 64%, 这与相关文献^[14, 17]报道的锰掺杂 HAP 促成骨能力相当。根据 ALP 染色和茜素红染色结果可推测: MnHAP 可促进成骨相关细胞的 ALP 活性, 进而加速早期成骨和增强后期矿化^[31]。最后, 通过适时荧光定量 PCR 检测分析证实了这一推测。BMSCs 与 MnHAP 或 HAP 共培养一定时间后, 成骨相关基因的表达量均有上升(图 5(c~f))。总体上来看, MnHAP 样品对于转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、Runt 相关转录因子 2 (Runx2)、骨桥蛋白(OPN)、骨形成蛋白-2 (BMP-2)、I 型胶原(Col-I)和碱性磷酸酶(ALP)基

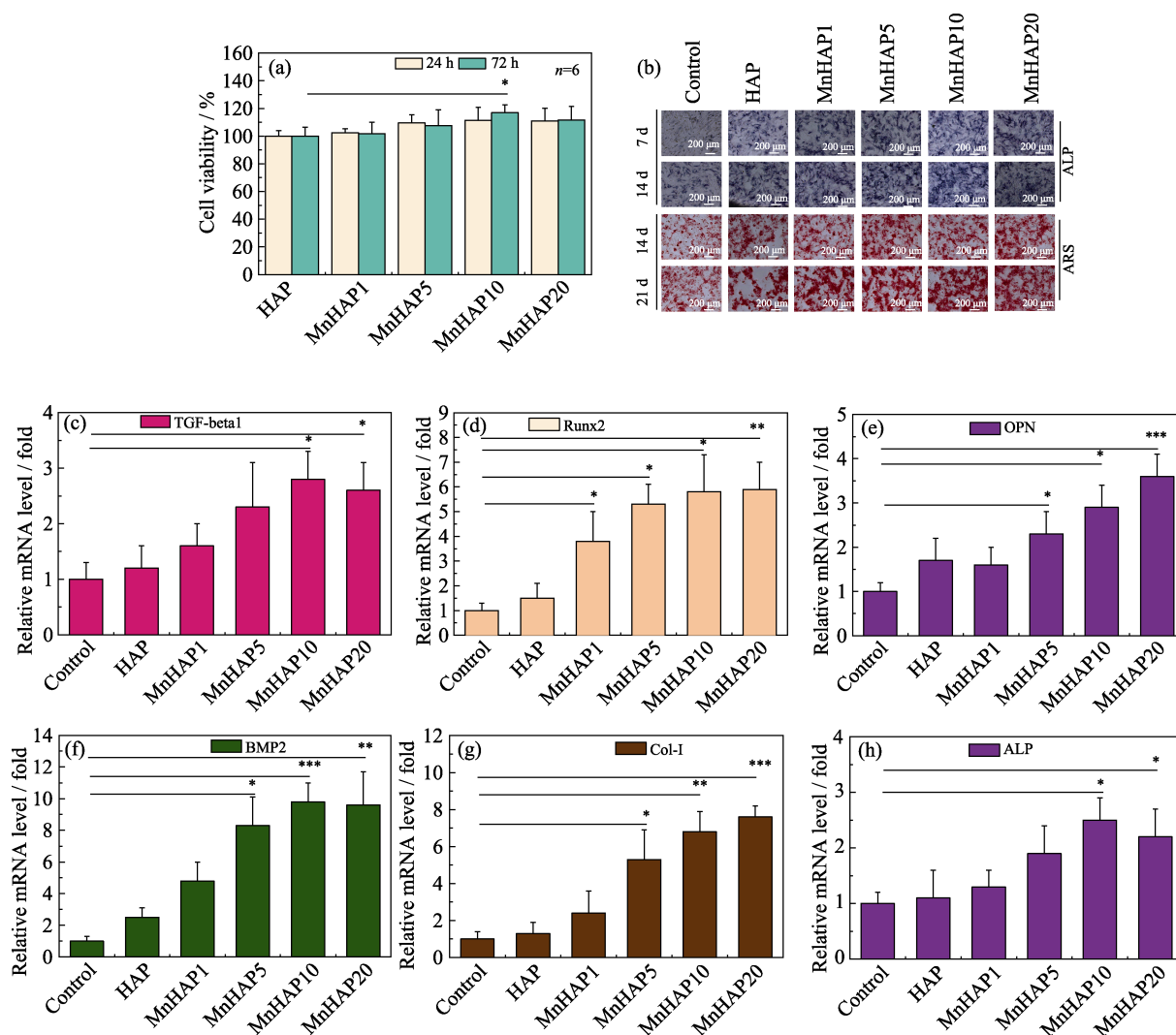


图5 MnHAP的细胞相容性(a)、成骨前期特征酶活性(b)以及特征蛋白和成骨相关基因表达(c~h)

Fig. 5 Cell compatibility (a), osteogenic marker (ALP/ARS) (b), and gene expression of protein marker and osteogenesis-related genes (c-h) of MnHAP

因的表达量比 Control 组有显著提升, 且高于 HAP 组。表明锰离子掺杂 HAP 有利于促进成骨基因的适时表达和高表达^[32]。综上可知, MnHAP 可显著提高蛋白质的吸附能力和成骨活性, 以及成骨相关基因的表达, 显示出良好的生物相容性。

通过抗菌、细胞增殖与成骨等性能的综合分析, 不难看出, 锰离子在 HAP 中的最大掺杂量(摩尔分数)不能超过 20%。

3 结论

本研究基于共沉淀法研制了一种锰掺杂羟基磷灰石纳米棒(MnHAP), 并将其应用于(光热)抗菌与促成骨体外研究。相较于 HAP 组, MnHAP 的抗菌能力提升明显, 且在 808 nm 近红外光照射下, 光热抗菌能力可达 97.63%。MnHAP 不仅具有良好的细胞相容性, 其促成骨早期标志物 ALP 活性能力也提

升了 50% 以上, 成骨相关基因表达也证实了 MnHAP 促进成骨后期的矿化作用。综合上述结果可见, 锰离子在 HAP 中的最大掺杂量不能超过 20%。在此掺杂范围内, MnHAP 纳米棒有望在感染性骨缺损治疗方面展示出广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] WAN Y, FANG J, WANG Y, *et al.* Antibacterial zeolite imidazole frameworks with manganese doping for immunomodulation to accelerate infected wound healing. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, **10**(22): 2101515.
- [2] SIMON A T, DUTTA D, CHATTOPADHYAY A, *et al.* Copper nanocluster-doped luminescent hydroxyapatite nanoparticles for antibacterial and antibiofilm applications. *ACS Omega*, 2019, **4**(3): 4697.
- [3] LV Y, CHEN Y, ZHENG Y, *et al.* Evaluation of the antibacterial properties and *in-vitro* cell compatibilities of doped copper oxide/hydroxyapatite composites. *Colloids Surface B Biointerfaces*, 2022, **209**(2): 112194.

- [4] CHLALA D, GIRAUDON J M, LABAKI M, *et al.* Formaldehyde total oxidation on manganese-doped hydroxyapatite: the effect of Mn content. *Catalysts*, 2020, **10**(12): 1422.
- [5] ROSTICHER C, VIANA B, MALDINEY T, *et al.* Persistent luminescence of Eu, Mn, Dy doped calcium phosphates for *in-vivo* optical imaging. *Journal of Luminescence*, 2016, **170**: 460.
- [6] KANDORI K, MURATA R, YAMAGUCHI Y, *et al.* Protein adsorption behaviors onto Mn(II)-doped calcium hydroxyapatite particles with different morphologies. *Colloids Surface B Biointerfaces*, 2018, **167**: 36.
- [7] JIN J, YANG L, CHEN F, *et al.* Drug delivery system based on nanobubbles. *Interdisciplinary Materials*, 2022, **1**(4): 471.
- [8] TURK S, ALTINSOY I, EFE G C, *et al.* Biomimetic synthesis of Ag, Zn or Co doped HA and coating of Ag, Zn or Co doped HA/fMWCNT composite on functionalized Ti. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Application*, 2019, **99**: 986.
- [9] IBRAHIM M, LABAKI M, NUNS N, *et al.* Cu-Mn hydroxyapatite materials for toluene total oxidation. *ChemCatChem*, 2019, **12**(2): 550.
- [10] VAN H N, HOAN B T, NGUYEN K T, *et al.* Controlling blue and red light emissions from europium (Eu²⁺)/manganese (Mn²⁺)-codoped beta-tricalcium phosphate [β -Ca₃(PO₄)₂ (TCP)] phosphors. *Journal of Electronic Materials*, 2018, **47**(5): 2964.
- [11] ATEŞ T, DOROZHKIN S V, KAYGILI O, *et al.* The effects of Mn and/or Ni dopants on the *in vitro/in vivo* performance, structural and magnetic properties of β -tricalcium phosphate bioceramics. *Ceramics International*, 2019, **45**(17): 22752.
- [12] WANG M, LI M, WANG Y, *et al.* Efficient antibacterial activity of hydroxyapatite through ROS generation motivated by trace Mn(III) coupled H vacancies. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, **9**(15): 3401.
- [13] BHATTACHARJEE A, HASSAN R, GUPTA A, *et al.* Effect of Zn and Co doping on antibacterial efficacy and cytocompatibility of spark plasma sintered hydroxyapatite. *Journal of the American Ceramic Society*, 2020, **103**(8): 4090.
- [14] MUTHUSAMY S, MAHENDIRAN B, SAMPATH S, *et al.* Hydroxyapatite nanophases augmented with selenium and manganese ions for bone regeneration: physiochemical, microstructural and biological characterization. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Application*, 2021, **126**: 112149.
- [15] RAVICHANDRAN K, SATHISH P, MURALIDHARAN B, *et al.* Influence of a novel triple doping (Ag+Mn+F) on the magnetic and antibacterial properties of ZnO nanopowders. *Ceramics International*, 2016, **42**(2): 2349.
- [16] LALA S, GHOSH M, DAS P K, *et al.* Mechanical preparation of nanocrystalline biocompatible single-phase Mn-doped A-type carbonated hydroxyapatite (A-cHAp): effect of Mn doping on microstructure. *Dalton Transactions*, 2015, **44**(46): 20087.
- [17] LIN Z, CAO Y, ZOU J, *et al.* Improved osteogenesis and angiogenesis of a novel copper ions doped calcium phosphate cement. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Application*, 2020, **114**: 111032.
- [18] BEHERA D R, NAYAK P, RAUTRAY T R. Phosphatidylethanolamine impregnated Zn-HA coated on titanium for enhanced bone growth with antibacterial properties. *Journal of King Saud University - Science*, 2020, **32**(1): 848.
- [19] JACOBS A, RENAUDIN G, FORESTIER C, *et al.* Biological properties of copper-doped biomaterials for orthopedic applications: a review of antibacterial, angiogenic and osteogenic aspects. *Acta Biomaterialia*, 2020, **117**: 21.
- [20] LUO H, XIE J, XIONG L, *et al.* Engineering photoluminescent and magnetic lamellar hydroxyapatite by facile one-step Se/Gd dual-doping. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, **6**(21): 3515.
- [21] VAN H N, TAM P D, KIEN N D T, *et al.* Enhancing the luminescence of Eu³⁺/Eu²⁺ ion-doped hydroxyapatite by fluoridation and thermal annealing. *Luminescence*, 2017, **32**(5): 817.
- [22] SINUSAITE L, POPOV A, RAUDONYTE-SVIRBUTAVICIENE E, *et al.* Effect of Mn doping on hydrolysis of low-temperature synthesized metastable alpha-tricalcium phosphate. *Ceramics International*, 2021, **47**(9): 12078.
- [23] CHLALA D, GRIBOVAL-CONSTANT A, NUNS N, *et al.* Effect of Mn loading onto hydroxyapatite supported Mn catalysts for toluene removal: contribution of PCA assisted ToF-SIMS. *Catalysis Today*, 2018, **307**: 41.
- [24] DUAN K, WENG J, YANG A, *et al.* Hydrothermal preparation and characterization of Zn, Si, Mg, Fe doped hydroxyapatite. *Journal of Inorganic Materials*, 2021, **36**(10): 1091.
- [25] ZHOU Q, DOLGOV L, SRIVASTAVA A M, *et al.* Mn²⁺ and Mn⁴⁺ red phosphors: synthesis, luminescence and applications in WLEDs. A review. *Journal of Materials Chemistry C*, 2018, **6**(11): 2652.
- [26] DING B, ZHENG P, MA P, *et al.* Manganese oxide nanomaterials: synthesis, properties, and theranostic applications. *Advanced Materials*, 2020, **32**(10): 1905823.
- [27] CHEN Z, LI Z, LI C, *et al.* Manganese-containing polydopamine nanoparticles as theranostic agents for magnetic resonance imaging and photothermal/chemodynamic combined ferroptosis therapy treating gastric cancer. *Drug Delivery*, 2022, **29**(1): 1201.
- [28] HE T, JIANG C, HE J, *et al.* Manganese-dioxide-coating-instructed plasmonic modulation of gold nanorods for activatable duplex-imaging-guided NIR-II photothermal-chemodynamic therapy. *Advanced Materials*, 2021, **33**(13): 2008540.
- [29] TORRES P M, VIEIRA S I, CERQUEIRA A R, *et al.* Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of beta-tricalcium phosphate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, **136**: 57.
- [30] TAO Q, HE G, YE S, *et al.* Mn doped Prussian blue nanoparticles for T1/T2 MR imaging, PA imaging and Fenton reaction enhanced mild temperature photothermal therapy of tumor. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, **20**(1): 18.
- [31] SPRIO S, PRETI L, MONTESI M, *et al.* Surface phenomena enhancing the antibacterial and osteogenic ability of nanocrystalline hydroxyapatite, activated by multiple-ion doping. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, **5**(11): 5947.
- [32] YANG C, REN Q, LIU X, *et al.* Porous agarose/Gd-hydroxyapatite composite bone fillers with promoted osteogenesis and antibacterial activity. *Ceramics International*, 2022, **48**(7): 9413.