

基于声动力和类酶活性的铌基涂层： 抗菌及促进细胞增殖与分化

张淑敏¹, 奚晓雯¹, 孙磊¹, 孙平^{1,2}, 王德强¹, 魏杰¹

(1. 华东理工大学 材料科学与工程学院, 超细材料制备与应用教育部重点实验室, 上海 200237; 2. 上海市第八人民医院 骨科, 上海 200235)

摘 要: 目前感染性骨缺损修复仍然是临床难题。本研究采用微弧氧化结合水热合成方法在纯铌表面原位构建氧化铌/硫化铁异质结涂层 MN@FS。结果表明, 该异质结不仅具有类酶活性, 而且在超声作用下具有声动力性能。在模拟细菌感染的酸性条件下, 超声可触发异质结声动力, 并增强类氧化酶活性, 产生多种活性氧以协同抗菌/清除细菌生物膜, 其抑菌率和清除率分别为 98.57%和 91.43%。在模拟生理条件下, 超声可触发异质结, 增强其类抗氧化酶活性, 清除活性氧, 缓解氧化应激, 促进骨髓间充质干细胞(rBMSCs)的增殖与成骨分化。综上, 该涂层材料在感染性骨修复方面具有广阔的应用前景。

关 键 词: 异质结; 声动力治疗; 类酶活性; 抗菌; 成骨分化

中图分类号: TG174 文献标志码: A 文章编号: 1000-324X(2024)10-1125-10

Sonodynamic and Enzyme-like Activities of Niobium-based Coatings: Antimicrobial, Cell Proliferation and Cell Differentiation

ZHANG Shumin¹, XI Xiaowen¹, SUN Lei¹, SUN Ping^{1,2}, WANG Deqiang¹, WEI Jie¹

(1. Key Laboratory of Preparation and Application of Ultrafine Materials, Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Department of Orthopedics, Shanghai Eighth People's Hospital, Shanghai 200235, China)

Abstract: Currently, repair of infectious bone defects is still a clinical serious challenge. Here, a heterojunction coating of niobium oxide on pure niobium surface by using microarc oxidation and hydrothermal treatment was prepared. The results showed that the obtained heterogeneous junctions exhibited synchronously enzyme-like and ultrasonic dynamic properties triggered by ultrasound treatment, especially in acidic microenvironment of mimic bacterial infection. Under these key conditions, oxidase-like activity of the heterogeneous junctions was enhanced, generating several reactive oxygen species which can kill bacteria and remove their biofilm, with inhibition and clearance rates were 98.57% and 91.43%, respectively. Under simulated physiological conditions, ultrasound enhanced antioxidant-like enzyme activity of this kind heterogeneous junction, thereby scavenging reactive oxygen species, alleviating oxidative stress, and promoting proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal

收稿日期: 2024-03-31; 收到修改稿日期: 2024-05-09; 网络出版日期: 2024-05-31

基金项目: 国家自然科学基金(32171340) National Natural Science Foundation of China (32171340)

作者简介: 张淑敏(1999-), 女, 硕士研究生. E-mail: zsm1935979279@163.com

ZHANG Shumin (1999-), female, Master candidate. E-mail: zsm1935979279@163.com

通信作者: 魏杰, 教授. E-mail: jiewei7860@sina.com; 王德强, 副教授. E-mail: Derek_wang@ecust.edu.cn

WEI Jie, professor. E-mail: jiewei7860@sina.com;

WANG Deqiang, associate professor. E-mail: Derek_wang@ecust.edu.cn

stem cells (rBMSCs). In conclusion, the obtained niobium-based coatings with sonodynamic and enzyme-like activities have profound potential application prospects in infectious bone repair.

Key words: heterojunction; sonodynamic therapy; enzyme-like activity; antibacterial; osteogenic differentiation

目前细菌感染导致的植入物松动仍然是人工骨植入失败的主要原因^[1]。金属材料由于具有优良的力学性能和生物相容性而被广泛用于骨科植入物,但其在体内电化学腐蚀析出的金属离子会引起炎症和过敏反应,容易导致人工骨植入失败^[2];另外,金属是生物惰性材料,难以与肌体形成骨整合,这也会导致植入物松动等^[3]。金属材料的表面特性可直接影响其在体内的生物学性能,对植入物在体内正常行使生物功能十分重要,对临床植入是否成功起关键作用^[4]。因此,研究者采用多种方法对植入物表面进行改性,促进其骨再生/骨整合能力,使其在体内长期稳定地发挥作用^[3-5]。

声动力治疗是基于超声波(US)触发声敏剂产生活性氧(ROS),导致细菌死亡的非侵入性治疗策略^[6];声动力具有组织穿透力深,无创以及产生的 ROS 不会引起耐药性等优点,在治疗细菌感染性疾病方面引起了广泛关注^[7]。在 US 作用下,声敏剂产生的电子-空穴对与 O_2 和 H_2O 发生氧化还原反应,生成 ROS(如 1O_2 、 $\cdot O_2^-$ 和 $\cdot OH$),ROS 可杀死细菌或清除细菌形成的生物膜^[8]。然而,目前大多数文献^[9]报道的声敏剂由于电子-空穴对分离后会快速复合,导致 ROS 产率降低,声动力治疗效果不佳。

纳米酶是一类蕴含类酶活性的纳米材料,具有和天然酶类似的催化活性和酶促反应动力学,在抗菌、抗癌和组织修复等生物医学领域拥有巨大的应用潜力^[10]。具有过氧化氢酶(CAT)类酶活性的纳米酶可以清除体内病损区域过量的 ROS,缓解细胞氧化应激,避免过度炎症反应,可用于促进组织修复;具有过氧化物酶(POD)类酶活性的纳米酶可以产生 ROS,杀死细菌,可用于治疗耐药性细菌感染^[11]。硫化铁(Fe_2S_3)是一种 pH 响应型纳米酶,Fe 的多价态转变使其在碱性条件下具有 CAT 类酶活性,在酸性条件下具有 POD 类酶活性^[12]。

铌及铌合金具有优良的生物相容性和力学性能,作为一种新型骨修复材料,近来引起了研究者的兴趣^[13]。但单用铌及铌合金的声动力或纳米酶的抗菌效果往往不佳,难以及时且彻底清除细菌/生物膜感染。因此,本研究采用微弧氧化结合水热合成技术在纯铌表面原位制备 $Nb_2O_5@Fe_2S_3$ 异质结涂层(MN@FS)。通过超声增强异质结的 CAT 类酶活性,清除 ROS,促进成骨细胞响应;通过超声触发声动

力和增强 POD 类酶活性,产生多种 ROS 协同杀死细菌和清除生物膜。

1 实验方法

1.1 试剂

无水磷酸钠(Na_3PO_4)、氯化铁($FeCl_3$)、硫脲(CH_4N_2S)、5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(DMPO)购自上海阿拉丁生化科技有限公司;纯铌片购自顺港金属材料有限公司;罗丹明 B(RhB)、亚甲基蓝(MB)、1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)、BCA 蛋白检测试剂盒、氯化十六烷基吡啶溶液、碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒和检测试剂盒、茜素红(ARS)染色液购自上海碧云天生物技术股份有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.2 异质结涂层的制备

以 Na_3PO_4 (20 g/L)和 $NaOH$ (4 g/L)的混合溶液为电解液,以纯铌片($\phi 12\text{ mm} \times 2\text{ mm}$)作阳极、不锈钢片作阴极,采用优化后的电解参数(电流密度 $4\text{ mm}^2/\text{h}$, 占空比 30%, 频率 1000 Hz, 处理时间 10 min)对铌片进行微弧氧化(MAO)处理,以在纯铌表面制备 Nb_2O_5 涂层(MN);将 MN 样品置于水热釜中,MAO 涂层朝上,加入 $FeCl_3$ (3.2 g/L)和 CH_4N_2S (9.2 g/L)的混合溶液(50 mL),于 $180\text{ }^\circ\text{C}$ 水热反应 12 h;随后取出样品,分别用去离子水和无水乙醇交替洗涤三次,在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥备用,得到 MN@FS 样品。

1.3 材料表征

使用场发射扫描电镜(FESEM, Hitachi S-4800, 日本)观察样品表面微观形貌,并对元素分布进行面扫描分析(EDS, Hitachi S-4800, 日本)。使用 X 射线衍射仪(XRD, D/max2550VB/PC, 日本)和 X 射线光电子能谱仪(XPS, Thermo Scientific K-Alpha, 美国)分别分析样品表面晶体结构和特定元素组成及价态。

1.4 类酶活性检测

采用 MB 溶液检测样品的 POD 类酶活性(pH 5.5);以 DMPO 为捕获剂,采用电子顺磁共振波谱仪(ESR, EMX-8/2.7, 德国)检测样品产生 $\cdot OH$ 的效率。使用 $Ti_2(SO_4)_3$ 溶液评价样品的 CAT 类酶活性(pH 7.4),

并使用便携式溶氧仪(JPB-607A)检测 O_2 产生量。使用不同功率(0, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 W/cm²)超声处理样品, 研究类酶活性(POD 和 CAT)与超声功率的关系。

1.5 声动力性能检测

超声(pH 5.5、1 MHz、1.5 W/cm²、5 min)处理样品, 通过 RhB、MB 和 DPBF 分别检测样品在声动力(SDT)过程中总 ROS、 $\cdot OH$ 和 $\cdot O_2^-$ 的生成量, 并使用 RhB 评价样品的 SDT 与超声时间的关系; 以 DMPO 为捕获剂, 检测样品在 SDT 过程中产生 $\cdot OH$ 和 $\cdot O_2^-$ 的效率。

1.6 异质结构机理及电化学分析

使用紫外-可见漫反射光谱仪(UV-Vis-DRS, Lambda 950, 美国)和价带 X 射线光电子能谱仪(VB-XPS, Thermo Scientific K-Alpha, 美国)分析 Fe₂S₃ 和 Nb₂O₅ 的价带和带隙。使用稳态/瞬态荧光光谱仪(Edinburgh FS5, 英国)、电化学工作站(CHI660E, 上海辰华)分别测试样品的光致发光、交流阻抗和瞬态超声响应电流。

1.7 抗菌性能测试

采用结晶紫染色评价样品抗菌/清除生物膜的效果^[14]。在 24 孔板中加入金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)菌液, 培养 24 h 形成生物膜, 随后加入不同样品共培养 24 h, 其中超声组采用 1.5 W/cm² 功率超声处理 10 min; 将细菌固定并加入结晶紫染色液, 染色结束后, 使用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗多余的染料并拍照。将染色的生物膜干燥, 加入冰醋酸溶液溶解结晶紫, 使用酶标仪检测溶液在 590 nm 处的吸光度, 并计算生物膜残留率(R), $R(\%) = B/B_0 \times 100\%$, 其中, B 和 B_0 分别为样品组和空白对照组的吸光度。

将样品与金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)共培养 24 h, 通过菌落计数评估样品的抑菌率(Q), $Q(\%) = (M-N)/M \times 100\%$, 其中, N 和 M 分别为样品组和空白对照组的菌落数。利用 SEM 观察细菌形态。通过 BCA 蛋白检测试剂盒检测细菌培养液中蛋白泄漏浓度。通过 DCFH-DA 荧光标记细菌内 ROS, 使用激光共聚焦显微镜(CLSM, Nikon, 日本)观察并拍照, 检测细菌内 ROS 水平。

1.8 体外细胞实验

1.8.1 细胞形貌和增殖

将样品与大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)共培养不同时间, 通过 SEM 观察细胞形态; 通过异硫氰酸荧光素鬼笔环肽和 4',6-二脒基-2-苯吡啶盐酸对细胞肌动蛋白和细胞核进行荧光染色, 采用 CLSM 观察细胞形貌; 采用 CCK-8 法定量测试细胞

增殖。采用 200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 溶液预处理细胞 24 h, 构建氧化应激模型, 加入样品共培养 24 h, 其中超声组采用 0.5 W/cm² 功率超声处理 30 s(每天 3 次); 采用 CCK-8 法检测细胞活力; 采用 DCFH-DA 荧光标记细胞内 ROS, 采用倒置荧光显微镜观察细胞内 ROS 水平。

1.8.2 细胞成骨分化

将样品与 rBMSCs 共培养不同时间, 待细胞固定后, 采用 ALP 染色试剂盒对细胞进行染色(避光), 使用倒置荧光显微镜观察并拍照。在孔板中加入 NP-40 溶液裂解细胞, 将裂解液离心后吸取上清液, 使用 ALP 检测试剂盒检测反应液在 405 nm 处的吸光度(OD); 采用 BCA 蛋白检测试剂盒测试总蛋白质含量; 用测量的吸光度(IU)除以总蛋白质含量(g)表示 ALP 活性(IU/g)。采用 ARS 染色试剂盒对细胞进行茜素红染色, 待细胞固定后, 孔板中加入 ARS 染色液, 染色 30 min 后, 采用倒置荧光显微镜观察钙结节形成情况; 加入氯化十六烷基氯吡啶缓冲液溶解钙结节, 通过检测反应液在 620 nm 处的吸光度定量分析钙结节生成量。

1.9 统计学分析

每组样品均独立进行 3 次实验, 所得数据采用 OriginPro 2021(OriginLab)软件处理, 以平均值±标准差的形式展示。统计学分析判定方法为单因素方差法。*为 $p < 0.05$, **为 $p < 0.01$, ***为 $p < 0.001$, ****为 $p < 0.0001$, 均表明差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 MN@FS 的制备与表征

各组样品照片(图 1(a))显示, 铌片经微弧氧化变成 MN, 在进一步水热处理后转变成黑褐色的 MN@FS。SEM 照片(图 1(b~g))显示, 与 MN 相比, MN@FS 的多孔表面及孔内表面有很多的球状颗粒, 这是 Nb₂O₅ 表面沉积了较多 Fe₂S₃ 颗粒。EDS 谱图(图 1(h))显示, Nb、O、Fe、S 元素均匀分布在涂层表面。图 1(i)中, MN@FS 表面沉积的 Fe₂S₃ 颗粒的粒径为 (208.29 ± 22.47) nm。

XRD 图谱(图 2(a))显示, MN 和 MN@FS 都有 Nb₂O₅ 的特征峰($2\theta = 22.5^\circ$ 、 28.6° 、 36.8° 和 55.2°)^[15], 而 MN@FS 还有 Fe₂S₃ 的特征峰($2\theta = 38.5^\circ$ 和 69.7°)^[16]。XPS 图谱(图 2(b))显示, MN@FS 表面存在 Fe、S、Nb、O 等元素; 高分辨率 XPS 图谱显示, 209.6 和 206.9 eV 的两个峰分别归属于 Nb₂O₅ 的 Nb 3d_{3/2} 和 Nb 3d_{5/2}(图 2(c)); 而 531 eV

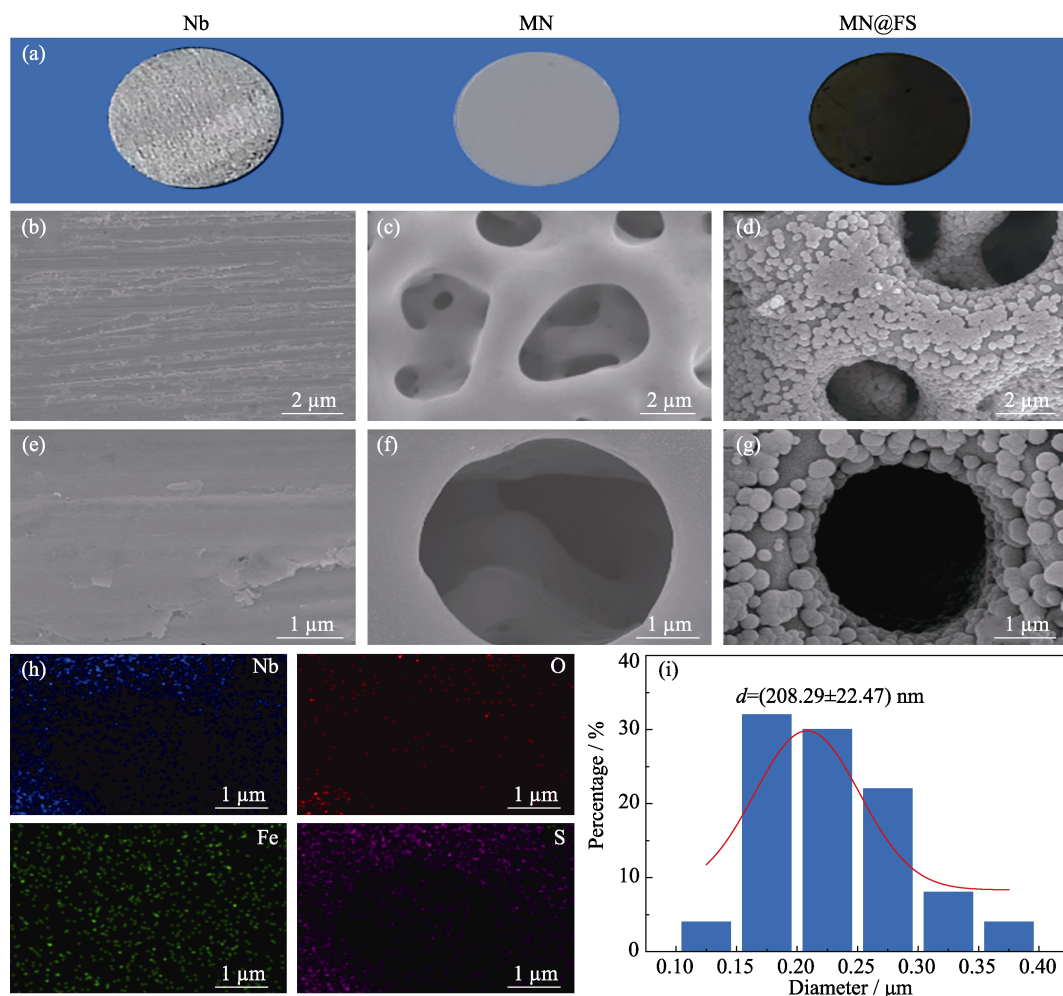


图 1 Nb、MN 和 MN@FS 样品的形貌表征

Fig. 1 Morphologies of Nb, MN and MN@FS

(a) Photographs of Nb, MN and MN@FS; (b-g) SEM images of Nb (b, e), MN (c, f) and MN@FS (d, g); (h) EDS mappings of MN@FS;

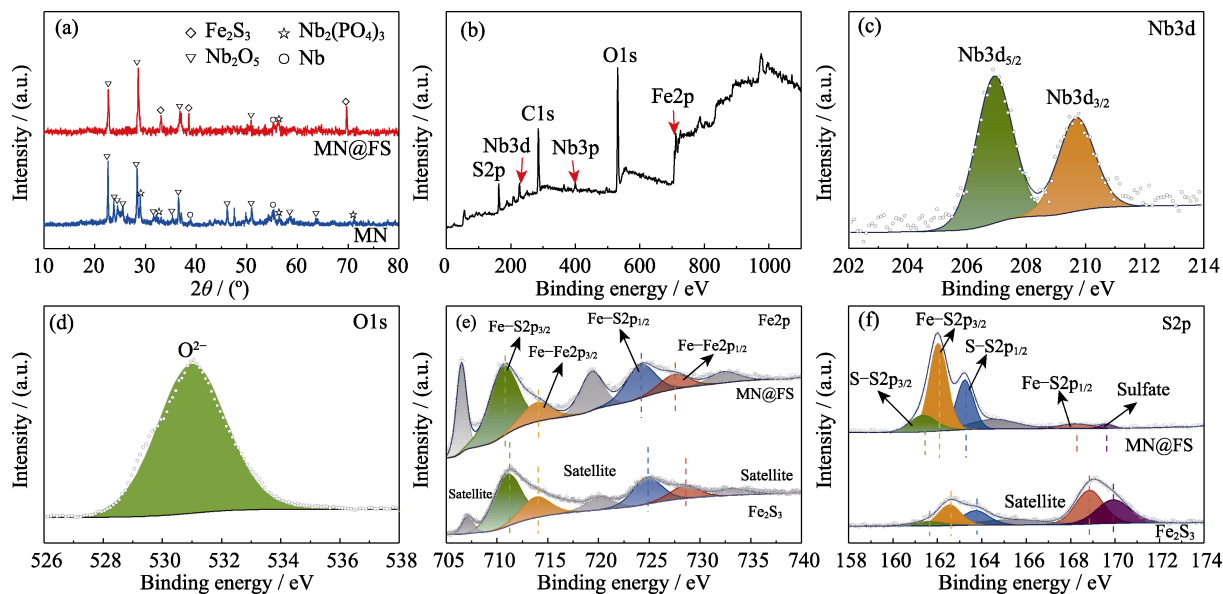
(i) Particle size distribution of Fe_2S_3 on the surface of MN@FS(MN: Nb_2O_5 coatings on pure niobium surfaces prepared by microarc oxidation treatment; FS: Fe_2S_3)

图 2 MN 和 MN@FS 的 XRD (a) 和 XPS (b-f) 图谱

Fig. 2 XRD patterns (a) and XPS spectra (b-f) of MN and MN@FS

(a) XRD patterns of MN and MN@FS; (b) Total XPS spectra of MN@FS; (c, d) High-resolution XPS spectra of Nb3d (c) and O1s (d) of MN@FS; (e, f) High-resolution XPS spectra of Fe2p (e) and S2p (f) of MN@FS and Fe_2S_3

对应于 Nb_2O_5 的 $\text{O}1\text{s}$ 特征峰(图 2(d))^[17]。高分辨率 XPS 图谱显示, 与 Fe_2S_3 比较, MN@FS 位于 727.57、724.21、714.08 和 710.8 eV 的特征峰分别对应于 $\text{Fe}-\text{Fe}2\text{p}_{1/2}$ 、 $\text{Fe}-\text{S}2\text{p}_{1/2}$ 、 $\text{Fe}-\text{Fe}2\text{p}_{3/2}$ 和 $\text{Fe}-\text{S}2\text{p}_{3/2}$, 这些峰向低结合能方向略有移动(图 2(e))。而位于 169.64、168.27、163.29、162.09 和 161.46 eV 的特征峰分别归属于硫酸盐、 $\text{Fe}-\text{S}2\text{p}_{1/2}$ 、 $\text{S}-\text{S}2\text{p}_{1/2}$ 、 $\text{Fe}-\text{S}2\text{p}_{3/2}$ 和 $\text{S}-\text{S}2\text{p}_{3/2}$, 这些峰也向低结合能方向略有移动(图 2(f))。 MN@FS 中 $\text{Fe}2\text{p}$ 和 $\text{S}2\text{p}$ 特征峰向低结合能方向移动归因于 Nb_2O_5 和 Fe_2S_3 之间的相互作用^[16]。

2.2 类酶活性

通过检测样品催化 H_2O_2 产生 $\cdot\text{OH}$ 降解 MB 的效果来评价其 POD 类酶活性^[18]。图 3(a)显示, 在 pH 5.5 环境中, 与 MN 相比, MN@FS 降解 MB 的效果更明显, 这表明 MN@FS 具有 POD 类酶活性。ESR 图谱(图 3(b))显示, MN@FS 出现 $\cdot\text{OH}$ 四重峰^[19], 证实了 $\cdot\text{OH}$ 的存在。图 3(c)显示, 随着 pH 降低, MN@FS

降解 MB 的效率逐渐提高, 表明其 POD 类酶活性随酸性增加而增强, 这是由于酸性条件可增强 Fe^{2+} 催化 H_2O_2 , 产生更多的 $\cdot\text{OH}$ ^[20]。通过检测样品产生 O_2 的量来评价其 CAT 类酶活性^[21]。图 3(d)显示, 与 MN 相比, MN@FS 的吸光度降低, 说明其具有 CAT 类酶活性, 能清除 H_2O_2 。图 3(e)显示, 在 pH 7.4 时, MN@FS 的产氧量最高, 进一步表明 MN@FS 具有优良的 CAT 类酶活性, 这是由于 Fe^{3+} 催化 H_2O_2 不断产生 O_2 ^[22]。随着 US 功率增加, 声动力性能增强(图 3(f))。图 3(g)显示, 在 pH 5.5 时, 随着 US 功率增加, MN@FS 降解 MB 能力提高, 表明 US 增强了 POD 类酶活性。ESR 图谱(图 3(h))显示, 在 US 作用下, MN@FS 没有产生 ROS, 说明无声动力性能, 但超声可提高 POD 类酶活性。图 3(i)显示, 当 US 功率 $\leq 0.5 \text{ W/cm}^2$ 时, MN@FS 无声动力性, 但超声提高了 CAT 类酶活性; 当 US 功率 $> 0.5 \text{ W/cm}^2$ 时, MN@FS 具有声动力性能(消耗 O_2 产生 ROS)。

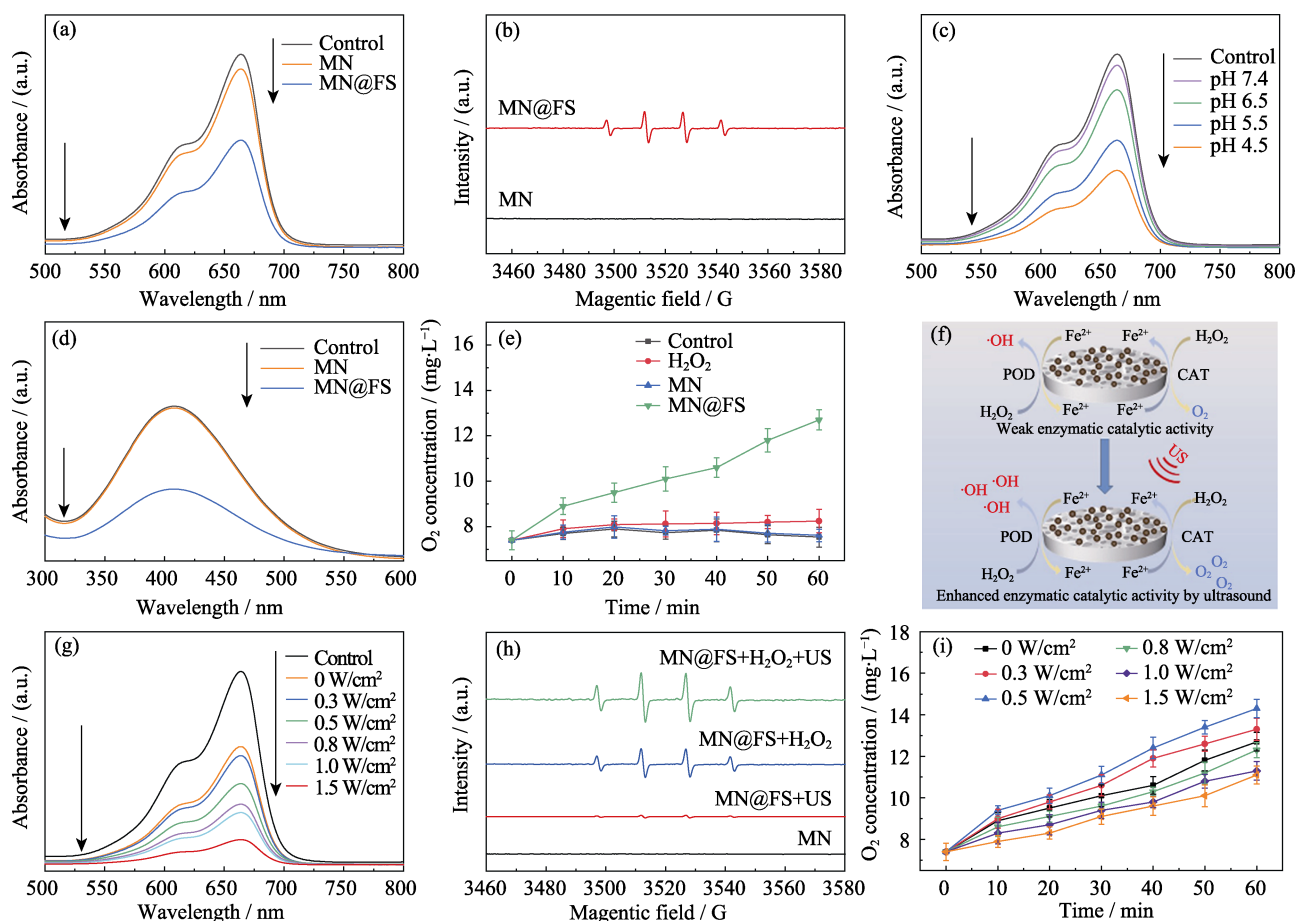


图 3 不同样品的类酶活性

Fig. 3 Enzyme-like activity of the samples

- (a) MB degradation by different samples (pH 5.5); (b) ESR of $\cdot\text{OH}$ production by MN@FS ; (c) MB degradation by MN@FS versus pH; (d) $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ degradation by different samples (pH 7.4); (e) Oxygen production curves of different samples (pH 7.4, 10 mmol/L H_2O_2); (f) Mechanism of enzymatic catalytic activity; (g) MB degradation by MN@FS versus US power (pH 5.5, 10 mmol/L H_2O_2); (h) ESR of $\cdot\text{OH}$ production by MN@FS at different conditions (pH 5.5, 10 mmol/L H_2O_2 , 0.5 W/cm^2 US); (i) Oxygen production curves of MN@FS versus US power (pH 7.4, 10 mmol/L H_2O_2)

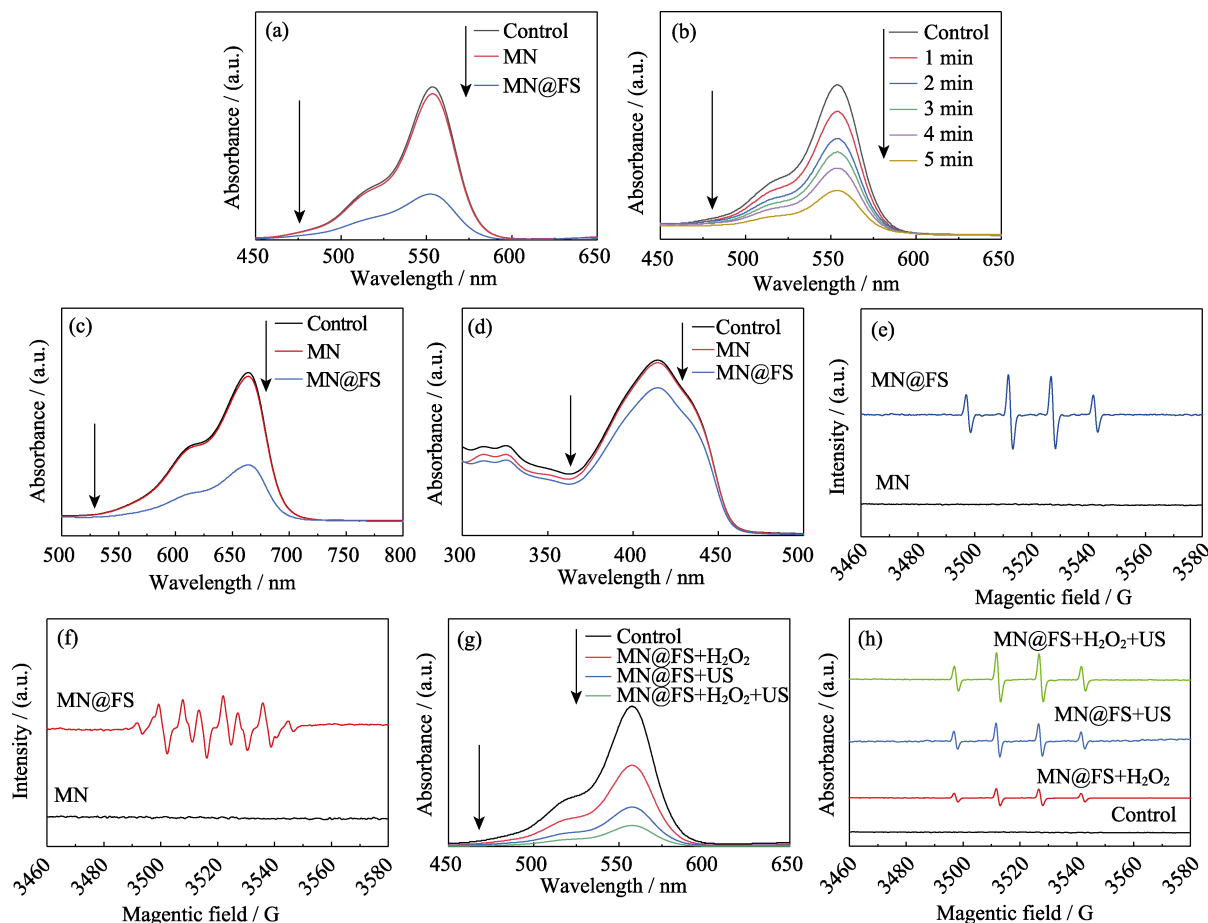


图 4 不同样品的声动力性能

Fig. 4 Sonodynamic performance of the samples

(a, c, d) Degradation of RhB (a), MB (c) and DPBF (d) by MN and MN@FS; (b) Degradation of RhB by MN@FS *versus* time; (e, f) ESR of $\cdot\text{OH}$ (e) and $\cdot\text{O}_2^-$ (f) production by MN and MN@FS with US; (g, h) Degradation of RhB (g) and ESR of $\cdot\text{OH}$ production (h) by MN@FS under different conditions. The conditions for all ultrasound stimuli were 1.5 W/cm², 1 MHz and 5 min, under pH 5.5 and 10 mmol/L H₂O₂ environment

2.3 声动力性能

一般通过检测声敏剂产生 ROS 降解 RhB($\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$)、MB($\cdot\text{OH}$)和 DPBF($\cdot\text{O}_2^-$)的效果来评价声动力性能^[23-25]。如图 4(a~d)所示, MN@FS 能明显降解 RhB、MB 和 DPBF, 表明其能产生 ROS($\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$)、 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 。而且 ESR 图谱(图 4(e, f))中 MN@FS 具有明显的 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 特征峰。因此, MN@FS 的声动力性能优良, 且随超声时间延长而增强(图 4(b))。图 4(g)显示, 在 pH 5.5 并且存在 H₂O₂ 时, MN@FS 可产生少量 ROS, 表明其具有 POD 类酶活性。在 US 作用下, MN@FS 产生的 ROS 量增加, 表明其具有声动力性能。在 US 和 H₂O₂ 都存在时, MN@FS 产生 ROS 量最多, 表明其兼具声动力性能和 POD 类酶活性, 可产生大量 ROS。ESR 图谱(图 4(h))显示, MN@FS 在不同条件下出现的 $\cdot\text{OH}$ 特征峰与图 4(g)各组对应, 证实了图 4(g)各组的功效。

2.4 MN@FS 异质结机理及电化学分析

根据价带 XPS 图谱(图 5(a, b))和 Tauc 曲线(图 5(c, d))

可知, Nb₂O₅ 和 Fe₂S₃ 的价带(E_{VB})分别为 2.69 和 0.53 eV, 带隙(E_{g})分别为 3.07 和 1.05 eV。根据 E_{VB} 和 E_{g} 得到 Nb₂O₅ 和 Fe₂S₃ 的导带(E_{CB})分别为 -0.38 和 -0.52 eV。材料的电子-空穴(e^-h^+)对的分离效率可以通过 EIS 的 Nyquist 曲率半径大小表征^[26]。图 5(e)显示 MN@FS 的曲率半径明显小于 Fe₂S₃ 和 MN, 表明其促进了 e^-h^+ 的分离。声电流密度-时间依赖图(图 5(f))显示: 在 US 作用下, 与其它样品相比, MN@FS 的声电流强度最高, 表明其能促进载流子的分离和迁移^[27]。光致发光光谱(图 5(g))显示, MN@FS 峰值强度显著低于 MN, 表明其能抑制载流子的复合^[28]。基于上述结果, 推测异质结产生声动力的机理(图 5(h))为: 在 US 激发下, Fe₂S₃ 与 Nb₂O₅ 产生 e^-h^+ 对, Fe₂S₃ 导带上的 e^- 与 Nb₂O₅ 价带上的 h^+ 结合, 从而抑制了 e^-h^+ 复合, 提高了 e^-h^+ 的分离效率^[29]; Fe₂S₃ 导带的 e^- 与 O₂ 反应生成 $\cdot\text{O}_2^-$, 这是因为 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成反应发生在比 O₂/ $\cdot\text{O}_2^-$ 氧化还原电位 (-0.33 eV)更负的 CB 电位 (-0.53 eV)^[30]; Nb₂O₅ 价带

的 h^+ 可以与 H_2O 反应生成 $\cdot OH$, 这是因为 $\cdot OH$ 生成反应发生在比 $\cdot OH/H_2O$ 氧化还原电位(2.1 eV)更正的 VB 电位(2.69 eV)^[31]。

2.5 抗菌性能

细菌(*S. aureus*)与 MN@FS 异质结共培养一定时间后, 结晶紫染色(图 6(a))和菌落(图 6(b))照片显

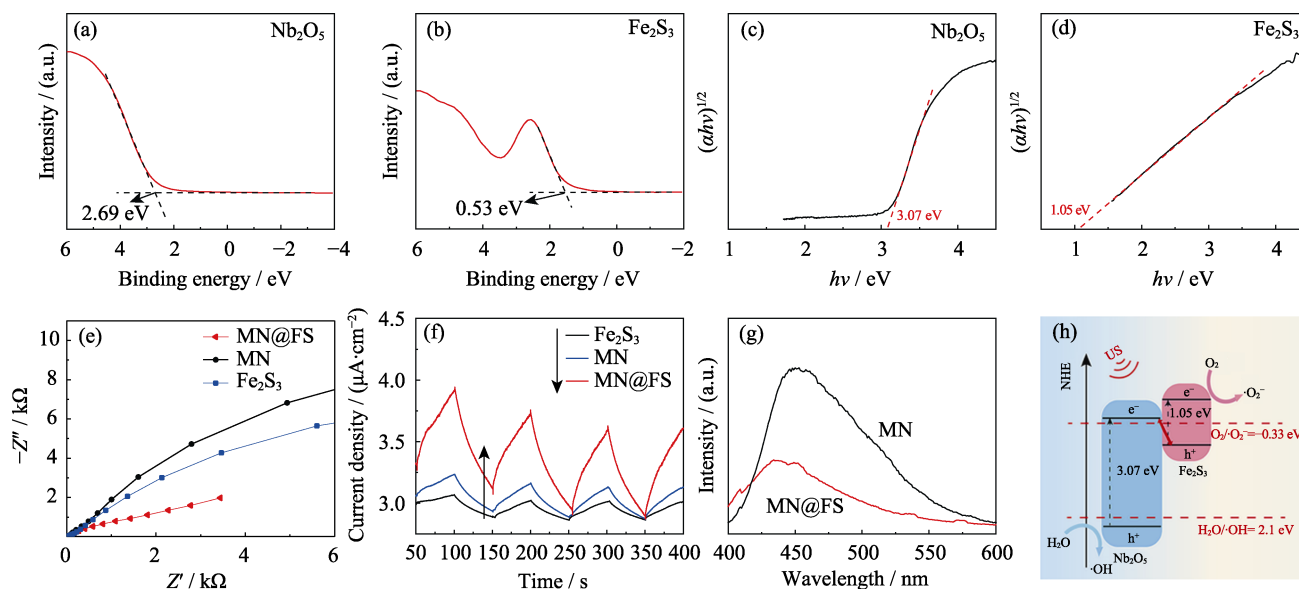


图 5 MN@FS 异质结机理及电化学分析

Fig. 5 Mechanism and electrochemical analysis of the MN@FS heterojunction

(a, b) Valence band XPS spectra of Nb_2O_5 (a) and Fe_2S_3 (b); (c, d) Tauc plots of Nb_2O_5 (c) and Fe_2S_3 (d); (e, f) EIS spectra (e) and transient acoustic-current responses (f) of Fe_2S_3 , MN, and MN@FS; (g) PL spectra of MN and MN@FS; (h) Diagram of the ultrasonic dynamic mechanism of the heterogeneous junction

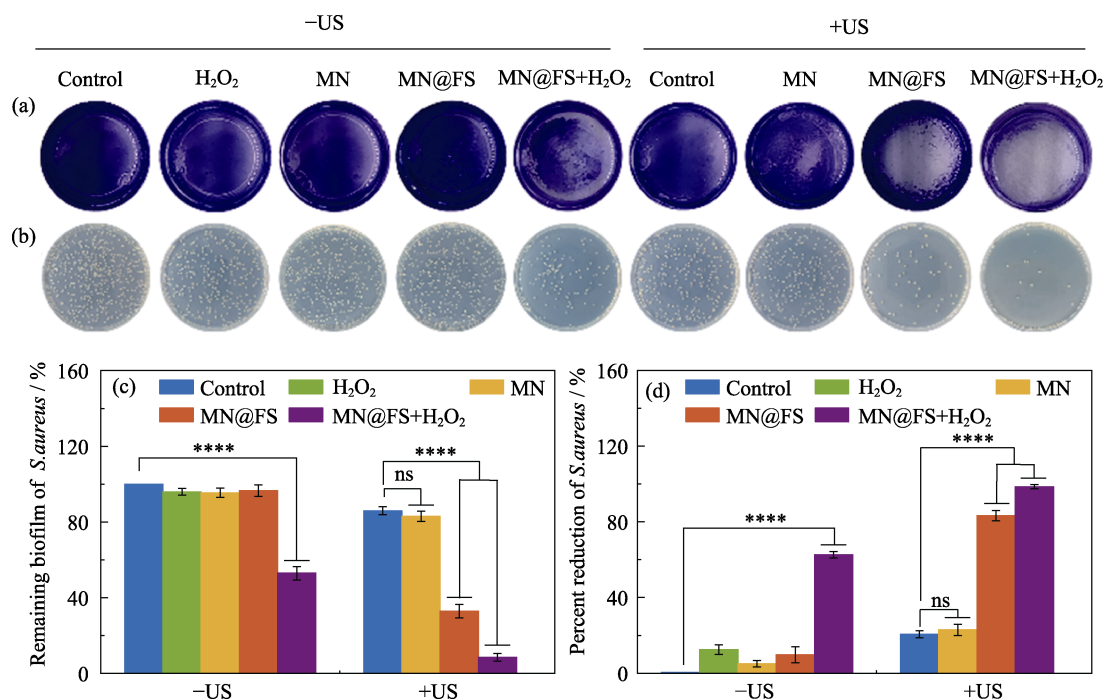


图 6 MN@FS 异质结的抗菌性能

Fig. 6 Antimicrobial properties of the MN@FS heterojunction

(a) Photographs of crystal violet staining; (b) Photographs of colonies; (c) Biofilm residual rate; (d) Antimicrobial rate of *S. aureus* (****: $p < 0.0001$, $n=3$)

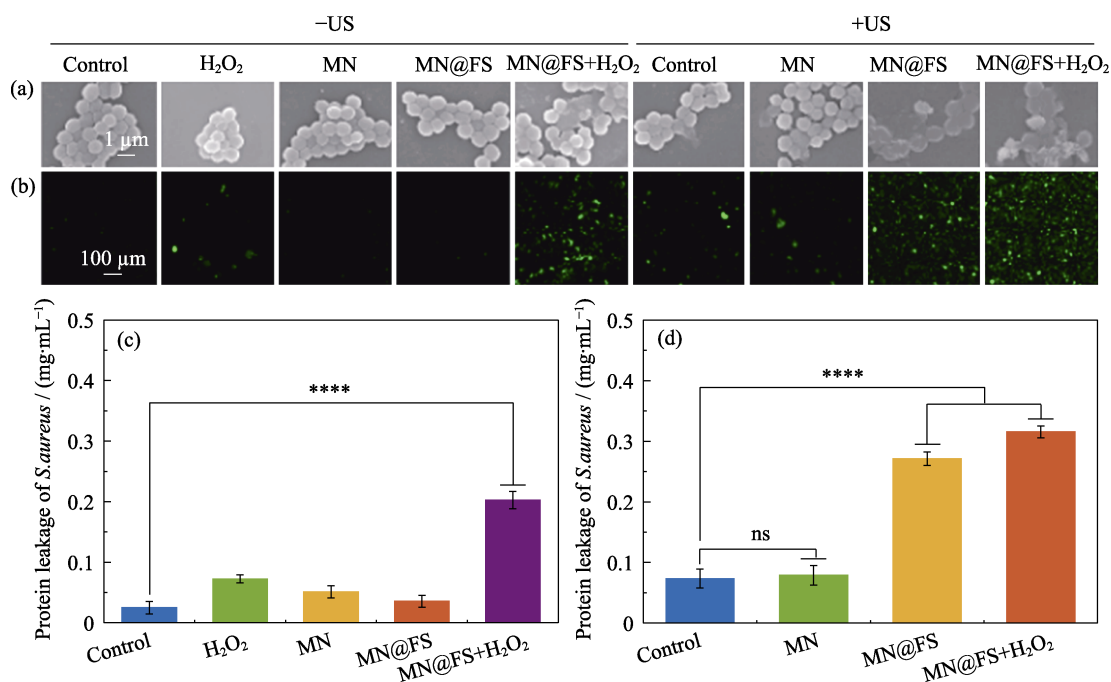


图 7 MN@FS 杀菌和清除生物膜机理分析

Fig. 7 Analysis of the mechanism of sterilization and biofilm clearance by MN@FS

(a, b) SEM (a) and ROS fluorescence staining (b) images of *S. aureus*; (c, d) Protein leakage without US (c) and with US (d) (****: $p < 0.0001$, $n=3$)

示, 与 H₂O₂、MN 和 MN@FS 等对照组相比, MN@FS+H₂O₂ 组在没有 US 作用下即可明显清除生物膜和杀死细菌, 表明其具有 POD 类酶活性, 催化 H₂O₂ 产生 ROS 杀菌(图 6(c, d))。在 US 作用下, MN@FS 清除生物膜和杀死细菌效果也较明显(图 6(c, d)), 说明其具有声动力性能, 可产生 ROS 杀菌。在 US 和 H₂O₂ 都存在时, MN@FS 的生物膜清除率为 91.43%(图 6(c)), 抑菌率为 98.57%(图 6(d)), 表明 US 驱动声动力, 并增强 POD 类酶活性, 产生多种 ROS, 协同清除生物膜和杀死细菌, 效果最优。

细菌(*S. aureus*)与 MN@FS 异质结共培养一定时间后, SEM 照片(图 7(a))显示, 在 H₂O₂ 存在时, MN@FS 组的细菌形态发生了明显变化, 细菌膜起皱、相互黏附; 在 US 作用下, MN@FS 组的细菌膜明显破坏; 在 US 和 H₂O₂ 都存在时, MN@FS 组的细菌膜破坏最为严重。图 7(b)显示, 在 H₂O₂ 存在时, MN@FS 组的细菌内绿色荧光最亮, 说明产生的 ROS 量更多。在 US 作用下, MN@FS 产生 ROS 明显; 在 US 和 H₂O₂ 都存在时, MN@FS 产生更多 ROS。在 H₂O₂ 存在时, MN@FS 导致细菌蛋白质泄漏, 表明其具有 POD 类酶活性, 催化 H₂O₂ 产生 ROS 杀死细菌(图 7(c))。在 US 作用下, MN@FS 也导致蛋白质泄漏, 表明声动力产生 ROS, 起到杀菌作用(图 7(d)); 在 US 和 H₂O₂ 都存在时, MN@FS 导致更多蛋白质泄漏,

表明其具有声动力性能并增强 POD 类酶活性, 产生大量 ROS, 协同破坏细菌膜, 使蛋白质泄漏, 杀菌效果最优。

2.6 细胞增殖与成骨分化

与 Nb 和 MN 两组相比, MN@FS 组的细胞最多(图 8(a, b)), 表明其促进了细胞黏附和生长。细胞增殖结果显示 MN@FS 组的 OD 最高(图 8(c)), 说明其能促进细胞增殖。在 H₂O₂ 存在下, 与 Nb 和 MN 相比, MN@FS 的细胞活力最强(图 8(d)), 说明其具有 CAT 类酶活性, 可清除细胞内 ROS(H₂O₂), 降低氧化应激水平; 在 US 和 H₂O₂ 共同存在时, MN@FS 的细胞活力进一步提高, 说明 US 可增强 MN@FS 的 CAT 类酶活性, 清除更多 ROS。在 H₂O₂ 存在时, 与 Nb 和 MN 相比, MN@FS 的荧光强度最弱(ROS 明显减少, 图 8(e)), 表明它具有 CAT 类酶活性, 清除 ROS; 在 US 和 H₂O₂ 共同存在时, MN@FS 几乎没有 ROS, 说明 US 可增强 CAT 类酶活性, 清除更多 ROS。

ALP 和钙结节分别是骨髓干细胞成骨分化早期和晚期的重要标志^[32]。ALP 染色(图 9(a)) and 定量分析(图 9(c))显示, Nb、MN 和 MN@FS 的细胞 ALP 活性依次增强; 而茜素红染色(图 9(b))和定量分析(图 9(d))显示, Nb、MN 和 MN@FS 的细胞钙结节生成量也依次增多。因此, 与 Nb 相比, MN 促进了细胞成骨分化, 而 MN@FS 则能更进一步促进成骨分化。

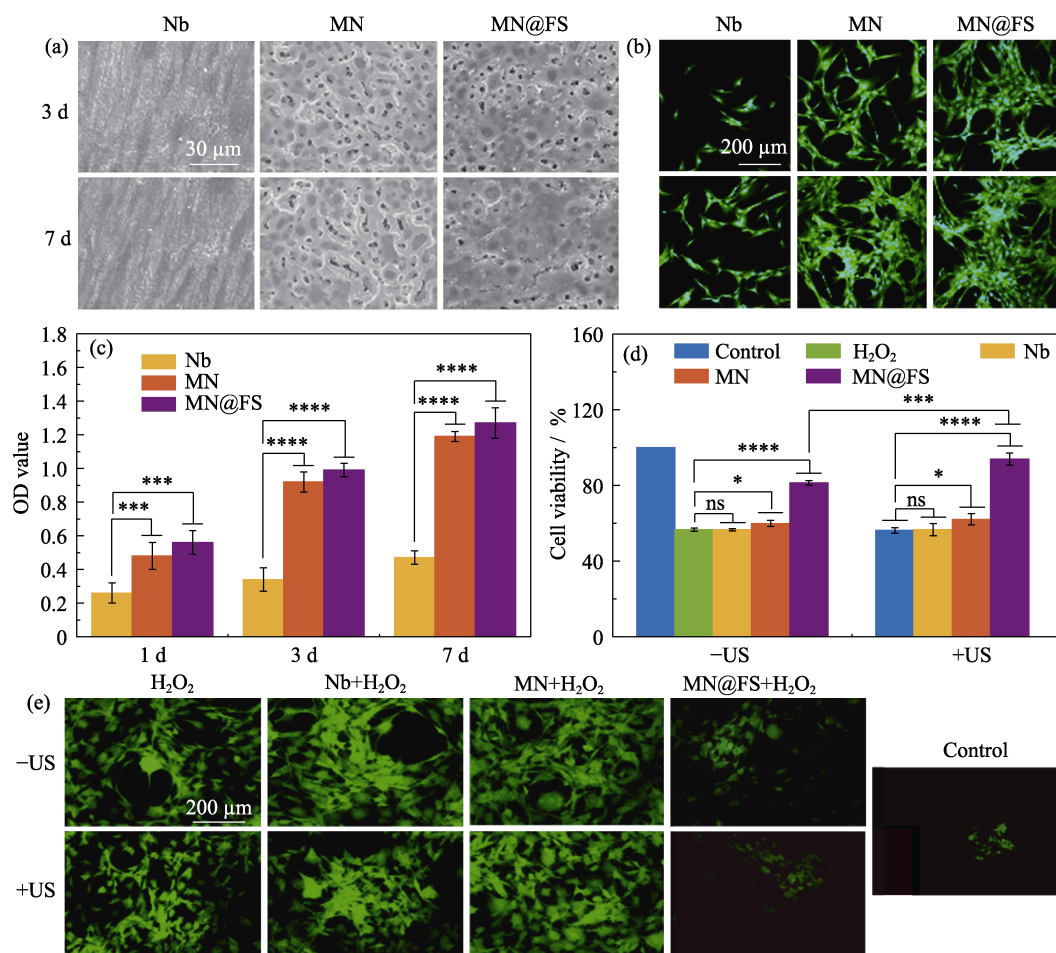
图 8 在氧化应激(200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)条件下 MN@FS 促进 rBMSCs 增殖

Fig. 8 Promotion effect of MN@FS on rBMSCs proliferation under oxidative stress conditions (200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)
 (a, b) SEM (a) and CLSM (b) images of rBMSCs after incubation for different days; (c) Cell proliferation; (d) Cell viability;
 (e) CLSM images of ROS in cells (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$, $n=3$)

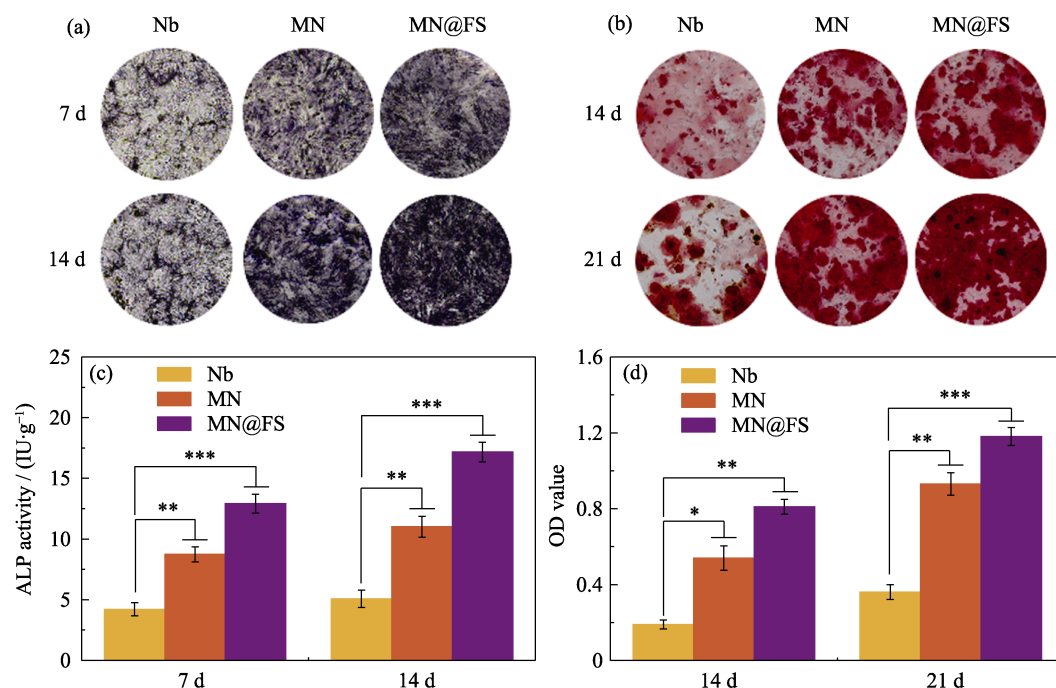
图 9 在氧化应激(200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)条件下 MN@FS 促进 rBMSCs 成骨分化

Fig. 9 Promotion effect of MN@FS on rBMSCs osteogenic differentiation under oxidative stress conditions (200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)
 (a, b) ALP (a) and alizarin red (b) staining images; (c, d) ALP activity (c) and calcium module formation (d)
 of rBMSCs at different days after culturing for different days (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, $n=3$)

3 结论

本研究采用微弧氧化与水热反应在纯铌表面原位制备了 $\text{Nb}_2\text{O}_5@\text{Fe}_2\text{S}_3$ 异质结涂层, 赋予了铌基骨修复材料兼具声动力性能和类酶活性的双重功能。在模拟细菌感染的环境中, 超声可触发异质结声动力, 增强 POD 类酶活性, 产生多种 ROS, 协同杀死细菌/清除生物膜; 在模拟生理环境中, 超声可触发异质结增强 CAT 类酶活性, 清除 ROS, 降低氧化应激水平, 促进 rBMSCs 的增殖与成骨分化。该铌基骨修复材料在感染性骨修复方面具有潜在的应用前景。

参考文献:

- [1] DONG J Y, CHEN F M, YAO Y Y, *et al.* Bioactive mesoporous silica nanoparticle-functionalized titanium implants with controllable antimicrobial peptide release potentiate the regulation of inflammation and osseointegration. *Biomaterials*, 2024, **305**: 122465.
- [2] ANTONIAC I, MANESCU V, ANTONIAC A, *et al.* Magnesium-based alloys with adapted interfaces for bone implants and tissue engineering. *Regenerative Biomaterials*, 2023, **10**: rbad095.
- [3] BAI L, CHEN P R, ZHAO Y, *et al.* A micro/nano-biomimetic coating on titanium orchestrates osteo/angio-genesis and osteoimmunomodulation for advanced osseointegration. *Biomaterials*, 2021, **278**: 121162.
- [4] XU X J, ZUO J H, ZENG H J, *et al.* Improving osseointegration potential of 3D printed PEEK implants with biomimetic periodontal ligament fiber hydrogel surface modifications. *Advanced Functional Materials*, 2023, **34**: 2308811.
- [5] XIU P, JIA Z J, LV J, *et al.* Tailored surface treatment of 3D printed porous $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ by microarc oxidation for enhanced osseointegration via optimized bone in-growth patterns and interlocked bone/implant interface. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**(28): 17964.
- [6] CHENG Y J, ZHANG Y F, ZHAO Z, *et al.* Guanidinium-decorated nanostructure for precision sonodynamic-catalytic therapy of MRSA-infected osteomyelitis. *Advanced Materials*, 2022, **34**(50): 2206646.
- [7] XU P Y, KANKALA R K, WANG S B, *et al.* Sonodynamic therapy-based nanoplatforams for combating bacterial infections. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, **100**: 106617.
- [8] FENG X B, LEI J, MA L, *et al.* Ultrasonic interfacial engineering of MoS_2 -modified Zn single-atom catalysts for efficient osteomyelitis sonodynamic ion therapy. *Small*, 2022, **18**(8): 2105775.
- [9] ZHAO Y C, HUANG T, ZHANG X D, *et al.* Piezotronic and piezo-phototronic effects on sonodynamic disease therapy. *Biomedical Engineering Materials*, 2023, **1**(1): e12006.
- [10] WANG Z R, ZHANG R F, YAN X Y, *et al.* Structure and activity of nanozymes: inspirations for *de novo* design of nanozymes. *Materials Today*, 2020, **41**: 81.
- [11] MOU X Z, WU Q Y, ZHANG Z, *et al.* Nanozymes for regenerative medicine. *Small Methods*, 2022, **6**(11): 2200997.
- [12] XU Z B, ZHU Y F, XIE M K, *et al.* Mackinawite nanozymes as reactive oxygen species scavengers for acute kidney injury alleviation. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, **21**(1): 281.
- [13] ZHONG C X, LIANG D S, WAN T, *et al.* Ultrafine-grained Nb-Cu immiscible alloy implants for hard tissue repair: fabrication, characterization, and *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Materials Science & Technology*, 2022, **127**: 214.
- [14] SONG Y P, SUN Q, LUO J Q, *et al.* Cationic and anionic antimicrobial agents Co-templated mesostructured silica nanocomposites with a spiky nanotopology and enhanced biofilm inhibition performance. *Nano-Micro Letters*, 2022, **14**(1): 83.
- [15] SATHASIVAM S, WILLIAMSON B A D, ALTHABAITI S A, *et al.* Chemical vapor deposition synthesis and optical properties of Nb_2O_5 thin films with hybrid functional theoretical insight into the band structure and band gaps. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, **9**(21): 18031.
- [16] CHU Y, WANG P, DING Y H, *et al.* High-capacity Sb/ Fe_2S_3 sodium-ion battery anodes fabricated by a one-step redox reaction, followed by ball milling with graphite. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, **15**(20): 24354.
- [17] RAJAN S T, SENTHILNATHAN J, AROCKIARAJAN A. Sputter-coated N-enriched mixed metal oxides ($\text{Ta}_2\text{O}_5\text{-Nb}_2\text{O}_5\text{-N}$) composite: a resilient solar driven photocatalyst for water purification. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, **452**: 131283.
- [18] TIAN F, WANG S Y, SHI K D, *et al.* Dual-depletion of intratumoral lactate and ATP with radicals generation for cascade metabolic-chemodynamic therapy. *Advanced Science*, 2021, **8**(24): 2102595.
- [19] ZHANG S X, WANG L R, XU T L, *et al.* Luminescent MOF-based nanofibers with visual monitoring and antibacterial properties for diabetic wound healing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, **15**(7): 9110.
- [20] WANG X A, LIU T, CHEN M X, *et al.* An erythrocyte-templated iron single-atom nanozyme for wound healing. *Advanced Science*, 2024, **11**(6): 2307844.
- [21] GAO Z G, LI Y J, ZHANG Y, *et al.* Biomimetic platinum nanozyme immobilized on 2D metal-organic frameworks for mitochondrion-targeting and oxygen self-supply photodynamic therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, **12**(2): 1963.
- [22] WANG Z Q, LI G L, GAO Y, *et al.* Trienzyme-like iron phosphates-based (FePO_4) nanozyme for enhanced anti-tumor efficiency with minimal side effects. *Chemical Engineering Journal*, 2021, **404**: 125574.
- [23] HE D C, WANG W J, FENG N, *et al.* Defect-modified nano- BaTiO_3 as a sonosensitizer for rapid and high-efficiency sonodynamic sterilization. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, **15**(12): 15140.
- [24] LIANG S, XIAO X, BAI L X, *et al.* Conferring Ti-based MOFs with defects for enhanced sonodynamic cancer therapy. *Advanced Materials*, 2021, **33**(18): 2100333.
- [25] GENG B J, HU J Y, LI Y, *et al.* Near-infrared phosphorescent carbon dots for sonodynamic precision tumor therapy. *Nature Communications*, 2022, **13**: 5735.
- [26] BOOTLUCK W, CHITTRAKARN T, TECHATO K, *et al.* S-Scheme $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ photocatalyst with Pd cocatalyst for enhanced photocatalytic H_2 production activity and stability. *Catalysis Letters*, 2022, **152**(9): 2590.
- [27] WANG Y W, HU X S, SONG H R, *et al.* Oxygen vacancies in actiniae-like $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{Nb}_2\text{C}$ MXene heterojunction boosting visible light photocatalytic NO removal. *Applied Catalysis B-Environmental*, 2021, **299**: 120677.
- [28] TAYYAB M, LIU Y J, LIU Z G, *et al.* One-pot *in-situ* hydrothermal synthesis of ternary $\text{In}_2\text{S}_3/\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{Nb}_2\text{C}$ Schottky/S-scheme integrated heterojunction for efficient photocatalytic hydrogen production. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, **628**: 500.
- [29] XING F Y, WANG C Z, LIU S Q, *et al.* Interfacial chemical bond engineering in a direct Z-scheme $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{MoS}_2$ heterojunction. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, **15**(9): 11731.
- [30] YANG L, TIAN B S, XIE Y, *et al.* Oxygen-vacancy-rich piezoelectric BiO_{2-x} nanosheets for augmented piezocatalytic, sonothermal, and enzymatic therapies. *Advanced Materials*, 2023, **35**(29): 2300648.
- [31] DENG R X, ZHOU H, QIN Q X, *et al.* Palladium-catalyzed hydrogenation of black barium titanate for multienzyme- piezoelectric synergetic tumor therapy. *Advanced Materials*, 2024, **36**: 2307568.
- [32] RONG Q, LI S Y, ZHOU Y, *et al.* A novel method to improve the osteogenesis capacity of hUCMSCs with dual-directional pre-induction under screened co-culture conditions. *Cell Proliferation*, 2020, **53**(2): e12740.