

新型含 Mn 生物陶瓷粉体减轻软骨细胞的氧化应激损伤

张梓宁¹, 邓荣辉¹, 余家阔^{1, 2}<https://doi.org/10.12307/2025.434>

投稿日期: 2024-03-25

采用日期: 2024-05-11

修回日期: 2024-06-26

在线日期: 2024-07-15

中图分类号:

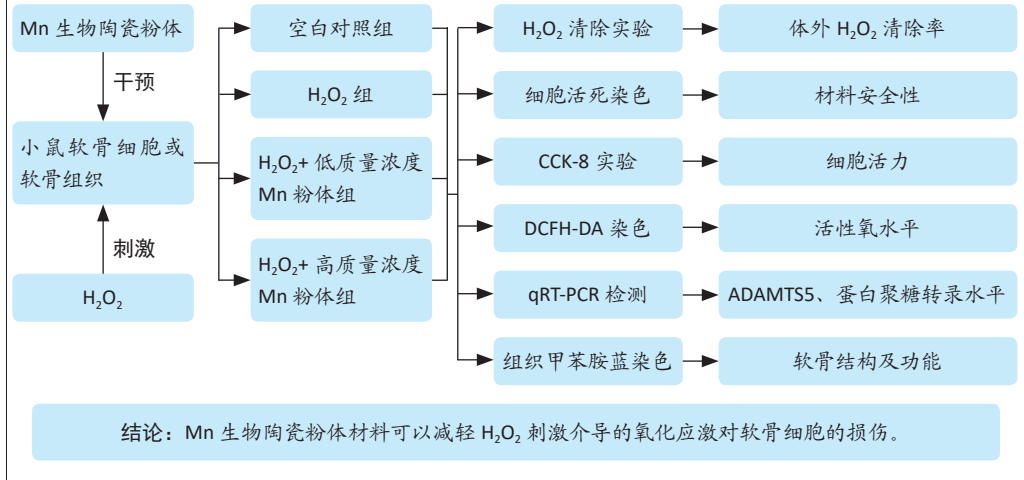
R459.9; R318.08; R684.3

文章编号:

2095-4344(2025)16-03335-08

文献标识码: A

文章快速阅读: Mn 生物陶瓷粉体对软骨细胞氧化应激损伤的影响



文题释义:

生物陶瓷: 是指一类稳定性较强且具有良好生物相容性的陶瓷材料。由于生物陶瓷能与组织亲和, 较少产生免疫排斥, 并且无毒副作用, 因此常用于医学修复组织工程领域中。

氧化应激: 是指在应激源作用下机体出现氧化/抗氧化失衡状态, 过量产生活性氧, 并且抗氧化系统不足以代偿, 进而引发机体炎症等病理改变。

摘要

背景: Mn可参与到多种生物体内氧化还原反应中, 比如作为超氧化物歧化酶2中的金属辅助基团发挥辅助清除活性氧的作用, 因此近些年开发含Mn的新型抗氧化应激材料成为研究的热点。

目的: 探讨含Mn生物陶瓷粉体通过降低活性氧途径对软骨细胞氧化应激损伤的保护作用。

方法: 采用熔盐法制备含Mn生物陶瓷粉体。分离培养小鼠原代软骨细胞。在H₂O₂溶液中分别加入含0, 0.15, 0.30 mg/mL Mn生物陶瓷粉体, 避光孵育后检测H₂O₂清除率。将第2-4代软骨细胞分别与含不同质量浓度(0, 0.15, 0.30 mg/mL)含Mn生物陶瓷粉体的完全培养基共培养, 采用细胞活死染色检测细胞活性。将第2-4代软骨细胞(或软骨组织)分4组干预: 空白对照组加入完全培养基培养, H₂O₂组加入用含H₂O₂的完全培养基培养, H₂O₂+低质量浓度Mn粉体组加入含H₂O₂+0.15 mg/mL含Mn生物陶瓷粉体的完全培养基培养, H₂O₂+高质量浓度Mn粉体组加入含H₂O₂+0.30 mg/mL含Mn生物陶瓷粉体的完全培养基, 采用CCK-8法检测软骨细胞活力, 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯探针检测软骨细胞活性氧生成, qRT-PCR检测软骨细胞相关因子表达, 甲苯胺蓝染色检测软骨组织结构与功能。

结果与结论: ①两种剂量的含Mn生物陶瓷粉体均可以于体外显著清除H₂O₂, 并且具有质量浓度依赖性; 细胞活死染色结果显示, 0.15 mg/mL含Mn生物陶瓷粉体具有软骨细胞安全性, 0.30 mg/mL含Mn生物陶瓷粉体存在软骨细胞毒性; ②CCK-8检测结果显示, 两种质量浓度的含Mn生物陶瓷粉体均可以显著减轻H₂O₂对软骨细胞活力的抑制作用, 并可抑制H₂O₂诱导的软骨细胞活性氧生成, 并且具有质量浓度依赖性; 两种质量浓度的含Mn生物陶瓷粉体均可逆转H₂O₂诱导的软骨细胞血小板反应蛋白解整合素金属蛋白酶5 mRNA表达升高与蛋白聚糖mRNA表达降低; ③甲苯胺蓝染色结果显示, 两种质量浓度的含Mn生物陶瓷粉体均可保护氧化应激下软骨组织结构的完整, 其中0.30 mg/mL含Mn生物陶瓷粉体还可以减轻软骨组织的功能损伤; ④结果表明, 含Mn生物陶瓷粉体可以通过清除活性氧途径维持软骨细胞外基质稳态, 从而对氧化应激下的软骨细胞发挥保护作用, 但0.30 mg/mL含Mn生物陶瓷粉体具有一定的软骨细胞毒性, 因此更倾向使用0.15 mg/mL含Mn生物陶瓷粉体进行后续研究。

关键词: 生物陶瓷; Mn粉体材料; 软骨损伤; 氧化应激; 活性氧; 骨关节炎; 细胞外基质; 生物安全性

Alleviation of oxidative stress damage in chondrocytes by a new Mn-containing bioceramic powder

Zhang Zining¹, Deng Ronghui¹, Yu Jiakuo^{1, 2}

¹ 北京大学第三医院运动医学科, 北京市 100191; ² 北京清华长庚医院骨科与运动医学中心, 清华大学医学中心, 北京市 102218

第一作者: 张梓宁, 男, 1998年生, 北京市人, 汉族, 2024年北京中医药大学毕业, 博士, 主要从事骨关节炎及滑膜炎方面的研究。

通讯作者: 余家阔, 主任医师, 北京大学第三医院运动医学科, 北京市 100191; 北京清华长庚医院骨科与运动医学中心, 清华大学医学中心, 北京市 102218

<https://orcid.org/0000-0003-4151-6516> (张梓宁)

基金资助: 国家自然科学基金-北京市自然科学基金区域新联合发展基金项目(U22A20283), 项目负责人: 余家阔

引用本文: 张梓宁, 邓荣辉, 余家阔. 新型含 Mn 生物陶瓷粉体减轻软骨细胞的氧化应激损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(16):3335-3342.



¹Department of Sports Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; ²Department of Orthopedic and Sports Medicine Center, Beijing Tsinghua Changgung Hospital Medical Center, Medical Center of Tsinghua University, Beijing 102218, China
Zhang Zining, MD, Department of Sports Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Corresponding author: Yu Jiakuo, Chief physician, Department of Sports Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; Department of Orthopedic and Sports Medicine Center, Beijing Tsinghua Changgung Hospital Medical Center, Medical Center of Tsinghua University, Beijing 102218, China

Abstract

BACKGROUND: Mn can participate in oxidation-reduction reactions in various organisms. For example, as a metal-assisted group in superoxide dismutase 2, Mn plays a role in helping to remove reactive oxygen species. Therefore, the development of novel anti-oxidative stress materials containing Mn has become a research focus in recent years.

OBJECTIVE: To investigate the protective effect of Mn bioceramic powder material on oxidative stress damage to chondrocytes by reducing the reactive oxygen species pathway.

METHODS: Bioceramic powders containing Mn were prepared by molten salt method. Primary mouse chondrocytes were isolated and cultured. Bioceramic powder containing 0, 0.15, and 0.30 mg/mL of Mn was added into H₂O₂ solution. The H₂O₂ clearance rate was detected after incubation without light. The passage 2 to passage 4 chondrocytes were co-cultured with complete media containing Mn-containing bioceramic powder with different mass concentrations (0, 0.15, and 0.30 mg/mL). Cell viability was detected by cell live/dead staining. The passage 2–4 chondrocytes (or cartilage tissue) were divided into four groups for intervention: Complete culture medium was added to the blank control group. The H₂O₂ group was added and cultured with complete medium containing H₂O₂. H₂O₂+low mass concentration Mn powder group was cultured by adding H₂O₂+0.15 mg/mL Mn-containing bioceramic powder. The complete medium containing H₂O₂+0.30 mg/mL Mn-containing bioceramic powder was added to the H₂O₂+high mass concentration Mn powder group. Viability of chondrocytes was detected by CCK-8 assay. Generation of reactive oxygen species of chondrocytes was detected by 2,7-dichlorofluorescein diacetate probe. Expression of chondrocyte-related factors was detected by qRT-PCR. The tissue structure and function of cartilage were detected by toluidine blue staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Both doses of Mn-containing bioceramic powders could significantly remove H₂O₂ *in vitro*, and they were concentration dependent. The results of cell live/death staining showed that 0.15 mg/mL bioceramic powder containing Mn had chondrocyte safety, and 0.30 mg/mL bioceramic powder containing Mn had chondrocytotoxicity. (2) The results of CCK-8 assay showed that the two mass concentrations of Mn-containing bioceramic powders could significantly reduce the inhibitory effect of H₂O₂ on chondrocyte viability, and inhibit the generation of reactive oxygen species induced by H₂O₂ in chondrocytes in a mass concentration dependent manner. Both kinds of Mn-containing bioceramic powders could reverse the H₂O₂-induced increase of mRNA expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 and decrease of proteoglycan mRNA expression in chondrocytes. (3) Toluidine blue staining results showed that both concentrations of Mn-containing bioceramic powder could protect the integrity of cartilage tissue structure under oxidative stress, and 0.30 mg/mL of Mn-containing bioceramic powder could also reduce the functional damage of cartilage tissue. (4) The results indicate that the Mn-containing bioceramic powder can protect chondrocytes under oxidative stress by clearing reactive oxygen species, maintaining the extracellular matrix homeostasis. However, 0.30 mg/mL Mn-containing bioceramic powder has certain chondrocytotoxicity, so 0.15 mg/mL Mn-containing bioceramic powder is preferred for follow-up studies.

Key words: bioceramic; Mn powder material; cartilage injury; oxidative stress; reactive oxygen species; osteoarthritis; extracellular matrix; biosafety

Funding: National Natural Science Foundation of China-Beijing Natural Science Foundation Regional New Joint Development Fund Project, No. U22A20283 (to YJK)

How to cite this article: ZHANG ZN, DENG RH, YU JK. Alleviation of oxidative stress damage in chondrocytes by a new Mn-containing bioceramic powder. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(16):3335-3342.

0 引言 Introduction

骨关节炎是最常见的慢性关节炎，软骨损伤是其 主要病理表现，并且伴随滑膜炎、软骨下骨重塑、骨赘 形成、滑液因子改变等病理变化^[1]。研究表明，骨关节炎 与包括年龄、超重、关节创伤、遗传因素等在内的多种 危险因素相关^[2]。对骨关节炎最好的管理方式是改变或延 缓其病程，预防病程长期进展后患者出现疼痛、关节破坏、 功能紊乱甚至致残等严重临床症状，以减轻疾病带来的 经济、生活负担^[3]。然而，目前临床上的非手术治疗仅能 缓解疼痛和炎症，尚无可以逆转软骨损伤的药物^[4]。因此， 针对不同靶点研制新型临床治疗药物是解决骨关节炎疾 病负担的重要研究目标。

虽然骨关节炎的发病机制尚未被探明，但研究显示 氧化应激在其发生进展过程中起到了重要作用。病理条件 下，软骨细胞受到应激原刺激，表现为活性氧的产出过量， 进而引发炎症聚集，导致软骨不可逆损伤^[5]，除此之外， 活性氧还可通过增加线粒体损伤、促进软骨细胞外基质 降解、引起软骨细胞凋亡等方式加重骨关节炎中的软骨 损伤^[6]。因此，能起到清除活性氧作用的维生素 C、维生 素 E、植物多酚等药物常被用于研究治疗骨关节炎，但此 类天然抗氧化剂生物利用度和稳定性较差，并且极易在关 节腔内被自身清除，无法起到长期抗氧化应激的治疗作

用^[7-9]。因而研究人员开发并表征了多种具有活性氧清除 酶样能力的自由基清除剂，将其局部注射至关节腔内来 减轻氧化应激，从而达到保护软骨细胞的功效^[10]。目前 已开发出多种具有类酶活性的纳米材料来治疗骨关节炎， 一项研究表明，具有纳米酶活性的氧化铈微粒不仅可在 体外清除活性氧，在关节炎动物模型中也能减轻氧化应 激对软骨细胞的损伤^[11]；另一研究团队则开发了具有活 性氧清除能力的黑磷纳米片，具有保护软骨基质合成及 分解代谢稳态的功效^[12]。然而这些材料也面临着长期安 全性及疗效的挑战，尚未应用到临床治疗中。

生物陶瓷是一类具有良好生物相容性、稳定性和安 全性的材料，常作为一种优质载体应用于骨和软骨组织 工程修复领域^[13]。既往已有研究将镁黄长石生物陶瓷材 料与抗氧化纳米颗粒结合，研制成具有抗氧化和多模酶 样清除能力的新型材料来修复软骨损伤^[14]。此次实验制 备了一种具有类酶催化作用的新型含 Mn 生物陶瓷粉体， 研究其抗软骨细胞氧化应激损伤的功效，进而为该材料 应用于骨关节炎的治疗奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外软骨细胞及软骨组织干预实验，采用单因 素方差分析 (AVOVA) 及 Tukey's 事后检验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 7 月至 2023 年 4 月在北京大学第三医院运动医学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性 BalB/c 小鼠 12 只, SPF 级, 6 周龄, 体质量 16–18 g, 购于北京维通利华公司, 许可证号: SCXK(京)2022-0052, 单笼饲养于北京大学医学部毒理系 SPF 实验室, 环境温度控制在 20–26 °C, 相对湿度为 40%, 环境噪声 ≤ 60 dB。实验方案已通过北京大学第三医院伦理委员会批准, 伦理批准号: LA2019357。

1.3.2 主要实验器械 电子分析天平购于德国 Sartorius; 医用手术器械购于上海普伦科技有限公司; Variokan Flash 多功能酶标仪购于美国 ThermoFisher; 倒置显微镜、LSM900 共聚焦激光扫描显微镜购于德国 ZEISS; 实时荧光定量 PCR 仪购于美国 Axygen; 数字病理切片扫描仪购于日本 Hamamatsu。

1.3.3 主要实验试剂 氯化锂 (LiCl)、氯化钾 (KCl)、氯化锰 (MnCl₂) 购于中国医药集团有限公司; 镁黄长石 (Ca₂Mg-Si₂O₇) 购于昆山华侨科技新材料有限公司; II 型胶原酶、含 EDTA 胰蛋白酶、高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液购于美国 Gibco; PBS、甲苯胺蓝染色液 (1%, 磷酸盐法) 购于北京索莱宝科技有限公司; 体积分数 3% H₂O₂ 购于美国 Sigma-Aldrich; 40 g/L 多聚甲醛固定液、H₂O₂ 检测试剂盒、细胞活性与细胞毒性检测试剂盒、活性氧检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒、Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 购于翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; RevertAid RT 反转录试剂盒购于美国 ThermoFisher; 引物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成。

1.4 实验方法

1.4.1 新型含 Mn 生物陶瓷粉体制备 称取 1.1 g KCl、0.9 g LiCl、1.0 g 镁黄长石和 10.0 mg MnCl₂ 置于研钵内研磨均匀。转移混合物至坩埚中, 于氩气氛环境下在 350 °C 气氛烧结炉内加热至熔融态反应 1 h。待温度降至室温后, 用超纯水清洗反应物 5 次以清除残余的可溶性盐, 然后置于 60 °C 恒温箱内烘干, 得到含 Mn 生物陶瓷粉体。

1.4.2 小鼠原代软骨细胞及软骨组织提取 使用异氟烷吸入麻醉小鼠, 维持有效浓度 1%, 于麻醉状态下处死小鼠 12 只, 浸泡于体积分数 75% 乙醇内消毒 5 min。将小鼠固定于操作台面, 使用消毒过的手术器械分离小鼠后肢皮肤及软组织。①取 6 只小鼠小心地将棕色的骨组织剔除, 分离出股骨头、股骨髁及胫骨平台处透明的关节软骨, 将其剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织碎片, 用无菌 PBS 清洗 2 次。将软骨组织转移至放有 10 mL 0.25% 胰蛋白酶的离心管内, 置于 37 °C 摇床内振荡 20 min, 振荡速率 20 次/min。1 000 r/min 离心 3 min 后弃去上清液, 用无

菌 PBS 清洗 2 次。使用高糖 DMEM 培养基配置 0.2% II 型胶原酶溶液。在离心管内加入 10 mL 0.2% II 型胶原酶溶液, 置于 37 °C 摇床内振荡 6 h。1 000 r/min 离心 3 min 后弃去上清液, 用无菌 PBS 清洗 2 次, 保留软骨细胞沉淀。向离心管内加入 10 mL 完全培养基 (由 445 mL 高糖 DEME 培养基、50 mL 胎牛血清及 5 mL 青霉素-链霉素溶液配制) 重悬软骨细胞, 过无菌细胞筛网后接种于培养皿内, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。于显微镜下观察软骨细胞形态, 细胞为不规则多边形, 呈铺路石样聚集。使用 P2–P4 代软骨细胞进行后续实验。②分离剩余 6 只小鼠的髌骨与股骨头, 沿股骨颈剪下覆盖软骨的股骨头, 用无菌 PBS 清洗 2 次, 转移至含完全培养基的 6 孔板内, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。

1.4.3 含 Mn 生物陶瓷粉体体外 H₂O₂ 清除率实验 按照 H₂O₂ 检测试剂盒说明书所示, 将 H₂O₂ 标准溶液稀释至 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 μmol/L, 使用酶标仪测定 A₅₆₀ 值, 减去超纯水对照组 A₅₆₀ 值后, 绘制吸光度值与浓度的标准曲线。在 100 μmol/L H₂O₂ 溶液中分别加入 0, 0.15, 0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体, 振荡均匀后于室温避光下孵育 8 h; 4 °C 下 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液测定 A₅₆₀ 值, 减去超纯水对照的 A₅₆₀ 值, 根据标准曲线可得 H₂O₂ 浓度并计算其清除率。每组样本重复 6 次。

1.4.4 含 Mn 生物陶瓷粉体对软骨细胞活性的影响 在共聚焦培养皿内接种软骨细胞, 细胞密度为 1 × 10⁴/皿, 分 3 组培养, 分别加入含 0, 0.15, 0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体的完全培养基 1 mL, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。培养 24 h 后, 用 PBS 清洗 3 次, 加入配置的 Calcein AM/PI 工作染液避光孵育 1 h, 用 PBS 清洗 3 次, 置于共聚焦激光扫描显微镜下观察细胞荧光染色情况, 活细胞用绿色荧光的 Calcein AM 标记, E_v/E_m=494/517; 死细胞用红色荧光的 PI 标记, E_v/E_m=535/617。每组样本重复 4 次。

1.4.5 实验分组与干预 取软骨细胞或软骨组织, 分 4 组干预: 空白对照组加入完全培养基, H₂O₂ 组加入含 200 μmol/L H₂O₂ 的完全培养基^[15–17], H₂O₂+ 低质量浓度粉体组加入含 200 μmol/L H₂O₂+0.15 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体的完全培养基, H₂O₂+ 高质量浓度粉体组加入含 200 μmol/L H₂O₂+0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体的完全培养基。置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内, 达实验周期后行进一步操作。

1.4.6 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞活力的影响 在 96 孔板内接种软骨细胞, 细胞密度为 1 × 10³/孔, 按照 1.4.5 分组干预。干预 24 h 后, 用 PBS 清洗 3 次, 加入配置好的 CCK-8 工作溶液避光孵育 2 h, 注意此步骤不应在孔中产生气泡, 否则将干扰测定结果。使用酶标仪

测定 A_{450} 值，并与空白对照相比计算细胞活力。每组样本重复 6 次。

1.4.7 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞活性氧生成的影响 在共聚焦培养皿内接种软骨细胞，细胞密度为 1×10^4 /皿，按照 1.4.5 分组干预。干预 4 h 后，用 PBS 清洗 3 次，加入 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯工作溶液避光孵育 20 min。用 PBS 清洗 3 次，置于共聚焦激光扫描显微镜下观察细胞荧光染色情况。活性氧用绿色荧光的 DCF 标记， $E_x/E_m=488/525$ 。使用 Image J 软件统计平均荧光强度。每组样本重复 4 次。

1.4.8 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞基因表达的影响 在培养皿内接种软骨细胞，细胞密度为 1×10^4 /皿，按照 1.4.5 分组干预。干预 24 h 后，用 PBS 清洗 3 次，加入 TRIzol 以裂解细胞提取 RNA。使用 RevertAid RT 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。按以下方法 qRT-PCR 反应体系 (共 20 μ L): 10 μ L Hieff qPCR SYBR Green Master Mix、0.4 μ L 前引物、0.4 μ L 后引物、1 μ L cDNA 模板及 8.2 μ L 无酶无菌水。引物序列如表 1 所示。设置反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次扩增反应; 记录熔解曲线。以 β -actin 为内参基因，使用 Livak 法计算即为 mRNA 相对表达量。每组技术重复 3 次，样本重复 3 次。

表 1 | qRT-PCR 检测引物序列
Table 1 | Primer sequences of qRT-PCR

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
β -actin	F: TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC T R: CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T	104
血小板反应蛋白解整合素金属蛋白酶 5	F: CCC AGG ATA AAA CCA GGC AG R: CGG CCA AGG GTT GTA AAT GG	105
蛋白聚糖	F: GTG GAG CCG TGT TTC CAA G R: AGA TGC TGT TGA CTC GAA CCT	77

1.4.9 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨组织结构与功能的影响 将软骨组织按照 1.4.5 分组干预 7 d，每隔 2 d 更换培养基。干预结束后，用 PBS 清洗 3 次，室温固定于 40 g/L 多聚甲醛 5 d，使用 EDTA 脱钙液室温脱钙 7 d，第 4 天更换 1 次脱钙液。用 PBS 清洗 3 次，后续使用组织脱水包埋一体机对组织样本脱水、透明、浸蜡、包埋，在切片机上将石蜡块切成 4 μ m 厚度切片，置于载玻片上烤干 4 h。切片脱蜡至水，滴加甲苯胺蓝染液染色 5 min，置于 PBS 缸内浸泡 5 min。浸入体积分数 95% 乙醇缸内 3 s 后迅速捞出，重复此操作 5 次以分化染液。后续脱水、透明、中性树脂封固，使用数字病理切片扫描系统扫描后观察。使用 Image J 软件统计甲苯胺蓝平均染色强度。每组样本重复 3 次。

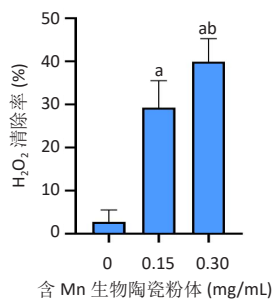
1.5 主要观察指标 含 Mn 生物陶瓷粉体的体外 H_2O_2 清除率及对软骨细胞活性的影响，以及对氧化应激下软骨细胞

活力、活性氧生成与血小板反应蛋白解整合素金属蛋白酶 5、蛋白聚糖 mRNA 表达的影响; 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨组织结构与功能的影响。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析及绘图。结果数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析 (ANOVA) 及 Tukey's 事后检验， $P < 0.05$ 视为差异有显著性意义。该文统计学方法已经北京大学第三医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 含 Mn 生物陶瓷粉体的体外 H_2O_2 清除率 如图 1 所示，0, 0.15, 0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组 H_2O_2 清除率分别为 (2.7 \pm 0.8)%，(29.3 \pm 6.8)%，(39.9 \pm 2.2)%。0.15, 0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组 H_2O_2 清除率高于 0 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组 ($P < 0.01$)，0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组 H_2O_2 清除率高于 0.15 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组 ($P < 0.01$)。

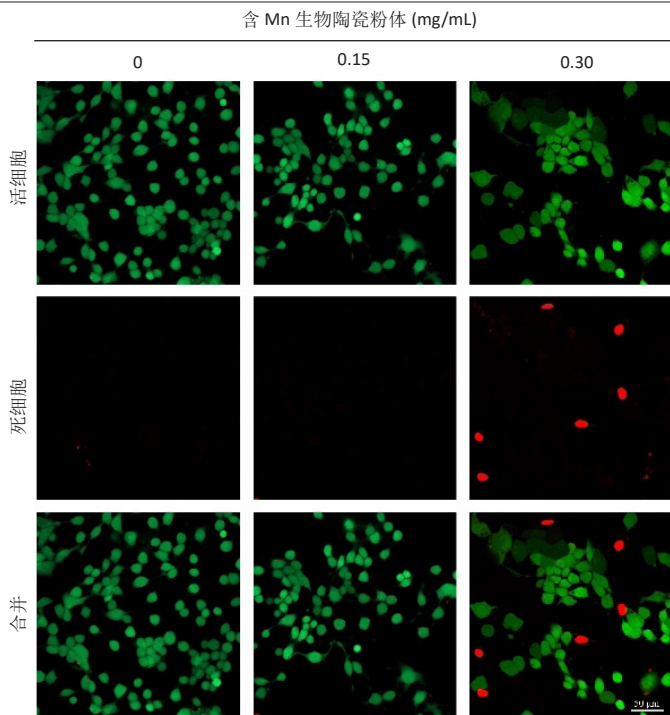


图注: 与 0 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组比较, $^aP < 0.01$; 与 0.15 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组比较, $^bP < 0.01$ 。

图 1 | 不同质量浓度含 Mn 生物陶瓷粉体的体外 H_2O_2 清除率
Figure 1 | H_2O_2 clearance of Mn-containing bioceramic powder at different mass concentrations *in vitro*

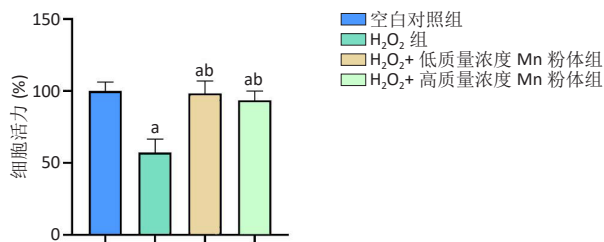
2.2 含 Mn 生物陶瓷粉体对软骨细胞活性的影响 各组软骨细胞活死染色结果如图 2 所示。在共聚焦显微镜下 3 组均可以观察到绿色荧光标记的活细胞，0, 0.15 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组未观察到红色荧光标记的死细胞，0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组可观察到被红色荧光所标记的死细胞，说明 0.15 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体具有软骨细胞安全性，而 0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体存在软骨细胞毒性。

2.3 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞活力的影响 各组软骨细胞活力 CCK-8 检测结果如图 3 所示。空白对照组、 H_2O_2 组、 H_2O_2 + 低质量浓度 Mn 粉体组、 H_2O_2 + 高质量浓度 Mn 粉体组的细胞活力分别为 (100.0 \pm 6.3)%，(57.2 \pm 9.3)%，(98.3 \pm 8.7)%，(93.6 \pm 6.5)%。与空白对照组比较， H_2O_2 组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$)；与 H_2O_2 组比较， H_2O_2 + 低质量浓度 Mn 粉体组、 H_2O_2 + 高质量浓度 Mn 粉体组细胞活力升高 ($P < 0.01$)； H_2O_2 + 低质量浓度 Mn 粉体组与 H_2O_2 + 高质量浓度 Mn 粉体组细胞活力比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。



图注：0, 0.15 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组未观察到红色荧光标记的死细胞, 0.30 mg/mL 含 Mn 生物陶瓷粉体组可观察到被红色荧光标记的死细胞。比例尺为 50 μm。

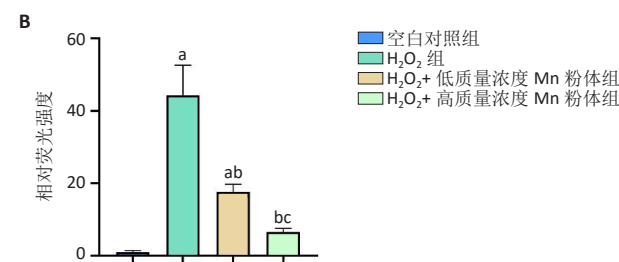
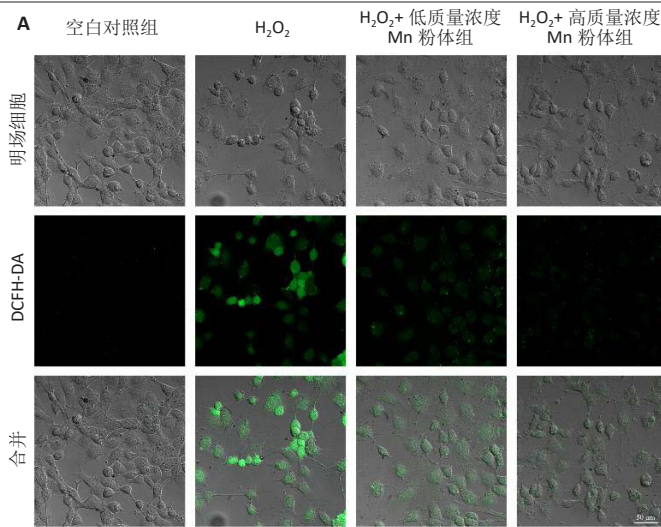
图 2 | 不同质量浓度含 Mn 生物陶瓷粉体对软骨细胞活性的影响
Figure 2 | Effect of Mn-containing bioceramic powder at different mass concentrations on chondrocyte activity



图注：与空白对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与 H₂O₂ 组比较, ^b*P* < 0.01。

图 3 | 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞活力的影响
Figure 3 | Effect of Mn-containing bioceramic powder on chondrocyte activity under oxidative stress

2.4 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞活性氧产生的影响 各组软骨细胞 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯探针检测活性氧生成, 见图 4 所示。共聚焦显微镜下可见空白对照组细胞无活性氧生成 (活性氧呈绿色荧光), H₂O₂ 组软骨细胞均表达大量绿色荧光, 两种质量浓度 Mn 粉体组绿色荧光较 H₂O₂ 组降低, 并且具有 Mn 粉体质量浓度依赖性。活性氧相对荧光强度定量分析结果显示, 空白对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组、H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组分别为 1.0±0.4, 44.4±8.2, 17.6±2.1, 6.5±1.0, 组间活性氧相对荧光强度两两比较差异均有显著性意义 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。



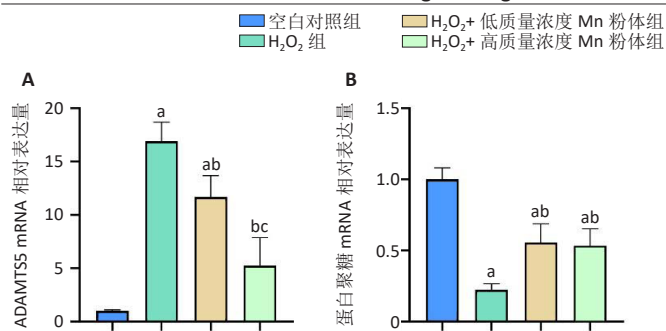
图注：DCFH-DA 为 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯。图 A 为共聚焦显微镜下软骨细胞 DCFH-DA 染色, 绿色荧光为活性氧表达, 空白对照组无活性氧产生, H₂O₂ 组活性氧产生最多, 比例尺为 50 μm; B 为活性氧相对荧光强度, 与空白对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与 H₂O₂ 组比较, ^b*P* < 0.01; 与 H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组比较, ^c*P* < 0.05。

图 4 | 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞活性氧产生的影响
Figure 4 | Effect of Mn-containing bioceramic powder on the production of reactive oxygen species in chondrocytes under oxidative stress

结果表明, H₂O₂ 介导的氧化应激可以显著增加软骨细胞内活性氧水平, 而含 Mn 生物陶瓷粉体可以显著降低氧化应激产生的活性氧水平, 并且其清除活性氧能力随粉体质量浓度的增加而提高。

2.5 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞相关因子表达的影响 qRT-PCR 检测各组软骨细胞相关因子 mRNA 表达结果, 见图 5 所示。空白对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组、H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组血小板反应蛋白解整合素金属蛋白酶 5 mRNA 相对表达分别为 1.0±0.1, 16.9±1.8, 11.7±2.0, 5.2±2.6, 组间血小板反应蛋白解整合素金属蛋白酶 5 mRNA 相对表达两两比较差异有显著性意义 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

空白对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组、H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组蛋白聚糖 mRNA 相对表达分别为 1.00±0.08, 0.22±0.04, 0.56±0.13, 0.53±0.12, 除 H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组与 H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组蛋白聚糖 mRNA 相对表达比较差异无显著性意义 (*P* > 0.05) 外, 其余组间两两比较差异均有显著性意义 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

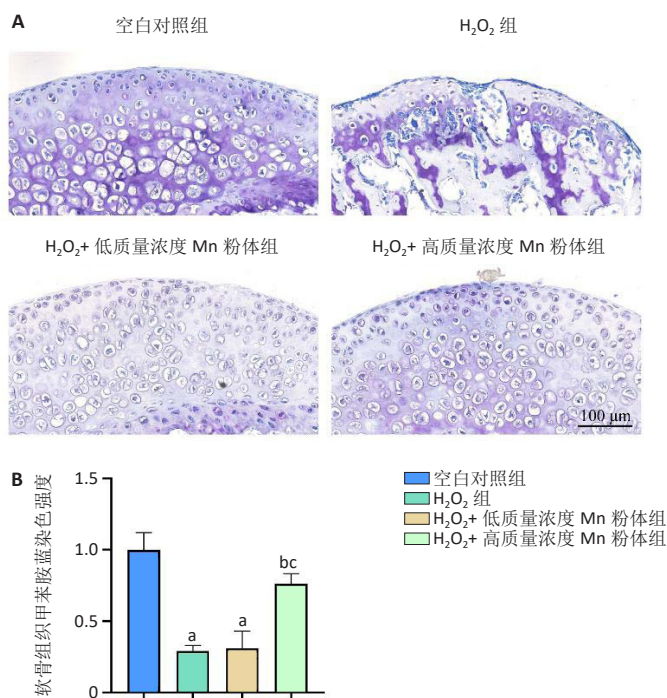


图注：ADAMT5 为血小板反应蛋白整合素金属蛋白酶 5。A 为 ADAMT5 mRNA 相对表达量；B 为蛋白聚糖 mRNA 相对表达量。与空白对照组比较，^a $P < 0.01$ ；与 H₂O₂ 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组比较，^c $P < 0.05$ 。

图 5 | 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨细胞相关因子表达的影响
Figure 5 | Effect of Mn-containing bioceramic powder on chondrocyte-related factors expression under oxidative stress

2.6 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨组织结构与功能的影响

各组软骨组织甲苯胺蓝染色结果如图 6 所示。空白对照组软骨组织结构正常，甲苯胺蓝染色较深；H₂O₂ 组软骨结构被破坏，部分软骨细胞崩解，残余的软骨甲苯胺蓝染色非常浅；H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组软骨结构正常，但甲苯胺蓝染色非常浅；H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组软骨结构正常，甲苯胺蓝染色较前两组加深。



图注：图 A 为软骨组织甲苯胺蓝染色，H₂O₂ 组软骨结构被破坏，部分软骨细胞崩解，软骨甲苯胺蓝染色非常浅；H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组软骨结构正常，甲苯胺蓝染色较浅；H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组软骨结构正常，甲苯胺蓝染色较深，比例尺为 100 μm。B 为软骨组织甲苯胺蓝染色相对强度，与空白对照组比较，^a $P < 0.01$ ；与 H₂O₂ 组比较，^b $P < 0.01$ ；与 H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组比较，^c $P < 0.01$ 。

图 6 | 含 Mn 生物陶瓷粉体对氧化应激下软骨组织结构与功能的影响
Figure 6 | Effects of Mn-containing bioceramic powder on the structure and function of cartilage tissue under oxidative stress

定量统计软骨区域甲苯胺蓝相对染色强度，空白对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组、H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组分别为 1.00±0.12, 0.29±0.04, 0.31±0.12, 0.76±0.07。与空白对照组比较，H₂O₂ 组甲苯胺蓝相对染色强度降低 ($P < 0.01$)；与 H₂O₂ 组比较，H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组甲苯胺蓝相对染色强度升高 ($P < 0.01$)；与 H₂O₂+ 低质量浓度 Mn 粉体组比较，H₂O₂+ 高质量浓度 Mn 粉体组甲苯胺蓝相对染色强度升高 ($P < 0.01$)。

以上结果显示，两种质量浓度的 Mn 生物陶瓷粉体均可以保护软骨结构的完整性，并且高质量浓度的含 Mn 生物陶瓷粉体还可以显著提升甲苯胺蓝染色强度，表明高质量浓度 Mn 生物陶瓷粉体可以减轻氧化应激对软骨功能的影响。

3 讨论 Discussion

骨关节炎的发病及进展和诸多环境因素及遗传基因相关，病因学研究显示氧化应激和活性氧的过量表达是其中重要的一环^[18]。静息的软骨细胞处于低氧状态，自身较少表达活性氧；而在应激条件下机体的氧化/抗氧化平衡被打破，活性氧过量表达，进而导致后续软骨病理损伤^[19]。活性氧包括过氧化氢、羟基自由基及超氧阴离子等基团，它们主要是在线粒体内产生，相互之间可转化^[20-21]。当活性氧产生增加时抗氧化系统被激活，过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶等酶类物质可以催化过量的活性氧分解为无害的水及氧气，以此来维持内循环稳态^[22]。生理条件下活性氧可以直接介导巨噬细胞清除病原体，也可以作为信号分子参与到细胞通路的激活中。在创伤、缺血或异常应力等病理环境下，软骨细胞氧化应激水平提高，过量的活性氧无法被抗氧化剂清除，便会激活炎症通路，进而促进炎症因子的表达和聚集，抑制软骨细胞外基质的合成并促进其降解，损伤线粒体正常功能，诱导软骨细胞的衰老和凋亡^[23]。因此针对氧化/抗氧化失衡，对应清除活性氧或补充抗氧化剂是减轻骨关节炎进展的重要治疗策略。

既往研究表明，通过药物治疗清除过量产生的活性氧可以减轻软骨细胞的损伤及凋亡。关节腔内注射重组超氧化物歧化酶在动物模型上可以有效抑制骨关节炎的进展，但由于其免疫原性、半衰期短及生产成本较高的原因，并未在临床中应用^[24]。一项有关大鼠骨关节炎模型的研究显示，使用超氧化物歧化酶模拟化合物可以显著降低氧化应激及活性氧水平，防止组织病理上的改变，但相应化合物仅能清除对应的超氧阴离子，而对其余类别的活性氧如过氧化氢、羟自由基无显著作用^[25]。天然酶类抗氧化物如维生素 C、褪黑素、天然植物提取物等也被广泛研究应用于清除氧化应激对骨关节的影响，细胞水平

及动物模型的研究均显示,通过补充抗氧化剂减少活性氧的过量产生可以有效缓解骨关节炎的进展^[26-28]。这些药物部分仅停留在体外实验水平,部分在长期临床随访中的治疗效果不尽如人意,这可能与药物生物稳定性较低、半衰期较短有关^[29]。因而,具有类酶活性且能长期起效的纳米酶成为骨关节炎潜在的治疗药物。

Mn可参与到多种生物体内氧化还原反应中,比如作为超氧化物歧化酶2中的金属辅助基团发挥辅助清除活性氧的作用^[30],因此近些年有部分含Mn的新型抗氧化应激材料被陆续开发出来。目前金属基纳米酶研究中的Mn主要是以MnO₂、Mn₃O₄等氧化物形态在医药领域进行表征实验^[31-32]。此次实验参照XIAO等^[33]的研究,通过熔盐法形成液态环境,使得镁黄长石微粒上均匀分散Mn²⁺。熔盐法常应用于化工领域中新型催化剂、陶瓷材料及光电材料的制备中^[34-35],但较少应用于生物医学工程领域内。在材料合成过程中,液态的熔融盐内反应物扩散速率较快,产生的强极化力使得镁黄长石表面形成较强的Mn-O键,有效防止金属原子聚集成团,从而减少活性氧的催化效率,保护镁黄长石结构免于破坏。单原子形式的金属材料表面积较高,其单位体积催化效率也随之升高。与先前的文献类似,新型含Mn生物陶瓷粉体在体外水平同样具有活性氧清除酶样能力;在软骨细胞实验中,也同样证实该材料可以清除软骨细胞产生的过量活性氧,对氧化应激下软骨细胞活性起到保护作用,并且该保护作用与材料的质量浓度呈正相关。既往的部分关于含Mn的抗氧化应激材料仅验证了其清除活性氧的能力以及抗炎能力,并未进一步探明确这些材料在骨关节炎中对软骨细胞的保护能力^[36-37],此次实验进一步完善新型含Mn生物陶瓷粉体对软骨细胞外基质的保护作用。蛋白聚糖作为软骨细胞外基质的重要组成部分,起到了软骨结构支撑和保护的作用^[38]。而在氧化应激条件下,血小板反应蛋白整合素金属肽酶5等因子表达增加,降解蛋白聚糖并减少其生成,破坏软骨细胞外基质的稳态,从而加重软骨损伤^[39]。此次实验使用含Mn生物陶瓷粉体干预氧化应激下的软骨细胞,结果显示该材料可以显著减轻血小板反应蛋白整合素金属肽酶5基因的表达,同时促进蛋白聚糖基因的表达,这表明含Mn生物陶瓷粉体削弱了氧化应激对软骨细胞外基质稳态的影响。软骨组织甲苯胺蓝染色进一步说明含Mn生物陶瓷粉体可以保护软骨组织的结构和功能,并且高质量浓度含Mn生物陶瓷粉体的效果优于低质量浓度含Mn生物陶瓷粉体,说明该粉体材料能有效减轻氧化应激所导致的软骨损伤。此外,既往的抗骨关节炎纳米材料需要较为复杂的结构组装才可实现其治疗效果,而这阻碍了相关材料的扩大生产及应用^[40],材料的粒径、电荷

及药物负载量也易在扩大生产中发生变化^[41]。而熔盐法制备的材料由于其工艺流程、均一性较强且生物陶瓷稳定性较强,不易被机体清除,可长期发挥治疗作用。

在聚焦于含Mn生物陶瓷粉体治疗效果的同时,新型材料的安全性也值得被关注。生物陶瓷本身具有良好的生物相容性,同时此次实验使用的镁黄长石载体也在既往研究中被验证具有安全性。金属Mn高浓度暴露下据报道具有神经毒性^[42],但用Mn制成的金属基纳米酶在适当浓度下无细胞毒性^[43]。此次实验使用细胞活死染色评估不同质量浓度含Mn生物陶瓷粉体对软骨细胞的安全性,较为遗憾的是,结果显示保护效果较好的高质量浓度含Mn生物陶瓷粉体有可能对软骨细胞存在毒性,而保护效果较弱的低质量浓度含Mn生物陶瓷粉体则无明显软骨细胞毒性。因此,结合粉体材料治疗效果及细胞安全性的综合考量,作者更倾向于使用0.15 mg/mL的含Mn生物陶瓷粉体进行后续研究及治疗效果验证。在后续实验中将进一步在骨关节炎动物模型中研究含Mn生物陶瓷粉体的软骨保护效果,深入挖掘该材料清除活性氧治疗骨关节炎的分子机制,完成其生物代谢过程及安全性评估,寻找到治疗效果与生物安全的最佳平衡点。

综上所述,此次实验使用熔盐法制备了一种新型含Mn生物陶瓷粉体,通过化学材料与生物医学应用领域之间的交叉融合,探索更广泛的组织工程材料的制备方法。新型含Mn生物陶瓷粉体可以通过清除活性氧途径维持软骨细胞外基质稳态,从而对氧化应激下的软骨细胞发挥保护作用,同时为后续探寻临床治疗骨关节炎潜在应用奠定了研究基础。

作者贡献: 邓荣辉、张梓宁进行实验设计,实验实施为张梓宁,实验评估为余家阔、邓荣辉,资料收集为张梓宁,张梓宁成文,余家阔审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] GIORGINO R, ALBANO D, FUSCO S, et al. Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):6405.
- [2] ALLEN KD, THOMA LM, GOLIGHTLY YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2022;30(2):184-195.

- [3] MAHMOUDIAN A, LOHMANDER LS, MOBASHERI A, et al. Early-stage symptomatic osteoarthritis of the knee- time for action. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(10):621-632.
- [4] HERMANN W, LAMBOVA S, MULLER-LADNER U. Current Treatment Options for Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rev*. 2018;14(2):108-116.
- [5] HAN S. Osteoarthritis year in review 2022: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(12):1575-1582.
- [6] ANSARI MY, AHMAD N, HAQQI TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110452.
- [7] DUNLAP B, PATTERSON GT, KUMAR S, et al. Vitamin C supplementation for the treatment of osteoarthritis: perspectives on the past, present, and future. *Ther Adv Chronic Dis*. 2021;12:20406223211047026.
- [8] MATHIEU S, SOUBRIER M, PEIRS C, et al. A Meta-Analysis of the Impact of Nutritional Supplementation on Osteoarthritis Symptoms. *Nutrients*. 2022;14(8):1607.
- [9] LINDLER BN, LONG KE, TAYLOR NA, et al. Use of Herbal Medications for Treatment of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Medicines (Basel)*. 2020;7(11):67.
- [10] YUDOH K, SHISHIDO K, MURAYAMA H, et al. Water-soluble C60 fullerene prevents degeneration of articular cartilage in osteoarthritis via down-regulation of chondrocyte catabolic activity and inhibition of cartilage degeneration during disease development. *Arthritis Rheum*. 2007;56(10):3307-3318.
- [11] KIM J, KIM HY, SONG SY, et al. Synergistic Oxygen Generation and Reactive Oxygen Species Scavenging by Manganese Ferrite/Ceria Co-decorated Nanoparticles for Rheumatoid Arthritis Treatment. *ACS Nano*. 2019;13(3):3206-3217.
- [12] HU X, WANG Y, TAN Y, et al. A Difunctional Regeneration Scaffold for Knee Repair based on Aptamer-Directed Cell Recruitment. *Adv Mater*. 2017;29(15). doi: 10.1002/adma.201605235
- [13] KUMAR M, SHARMA V. 3D printed bio-ceramic loaded PEGDA/vitreous carbon composite: Fabrication, characterization, and life cycle assessment. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2023;143:105904.
- [14] DENG C, ZHOU Q, ZHANG M, et al. Bioceramic Scaffolds with Antioxidative Functions for ROS Scavenging and Osteochondral Regeneration. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(12):e2105727.
- [15] KUWAHARA M, AKASAKI Y, KURAKAZU I, et al. C10orf10/DEPP activates mitochondrial autophagy and maintains chondrocyte viability in the pathogenesis of osteoarthritis. *FASEB J*. 2022;36(2):e22145.
- [16] CAI J, LIU L F, QIN Z, et al. Natural Morin-Based Metal Organic Framework Nanoenzymes Modulate Articular Cavity Microenvironment to Alleviate Osteoarthritis. *Research (Wash D C)*. 2023;6:0068.
- [17] CHEN J, XU W, DAI T, et al. Pioglitazone-Loaded Cartilage-Targeted Nanomicelles (Pio@C-HA-DOs) for Osteoarthritis Treatment. *Int J Nanomedicine*. 2023;18:5871-5890.
- [18] DING DF, XUE Y, WU XC, et al. Recent Advances in Reactive Oxygen Species (ROS)-Responsive Polyfunctional Nanosystems 3.0 for the Treatment of Osteoarthritis. *J Inflamm Res*. 2022;15:5009-5026.
- [19] ZAHAN OM, SERBAN O, GHERMAN C, et al. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Med Pharm Rep*. 2020;93(1):12-22.
- [20] ADAM-VIZI V, CHINOPOULOS C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(12):639-645.
- [21] SQUADRITO GL, PRYOR WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(4-5):392-403.
- [22] LIU L, LUO P, YANG M, et al. The role of oxidative stress in the development of knee osteoarthritis: A comprehensive research review. *Front Mol Biosci*. 2022;9:1001212.
- [23] LEPETSOS P, PAPAVALASSILIOU AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(4):576-591.
- [24] MCCORD JM, EDEAS MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(4): 139-142.
- [25] GUI T, LUO L, CHHAY B, et al. Superoxide dismutase-loaded porous polymersomes as highly efficient antioxidant nanoparticles targeting synovium for osteoarthritis therapy. *Biomaterials*. 2022;283:121437.
- [26] WANG BW, JIANG Y, YAO ZL, et al. Aucubin Protects Chondrocytes Against IL-1 β -Induced Apoptosis In Vitro And Inhibits Osteoarthritis In Mice Model. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:3529-3538.
- [27] FENG K, CHEN Z, PENGCHENG L, et al. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):18192-18205.
- [28] ZHANG Y, LIU T, YANG H, et al. Melatonin: A novel candidate for the treatment of osteoarthritis. *Ageing Res Rev*. 2022;78:101635.
- [29] CANTER PH, WIDER B, ERNST E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(8):1223-1233.
- [30] ZELKO IN, MARIANI TJ, FOLZ RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337-349.
- [31] SHENG J, WU Y, DING H, et al. Multienzyme-Like Nanozymes: Regulation, Rational Design, and Application. *Adv Mater*. 2024;36(10):e2211210.
- [32] O'NEAL SL, ZHENG W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Curr Environ Health Rep*. 2015;2(3):315-328.
- [33] XIAO M, ZHANG L, LUO B, et al. Molten-Salt-Mediated Synthesis of an Atomic Nickel Co-catalyst on TiO₂ for Improved Photocatalytic H₂ Evolution. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2020;59(18):7230-7234.
- [34] WANG Y, LI L, SHEN M, et al. Simple One-Step Molten Salt Method for Synthesizing Highly Efficient MXene-Supported Pt Nanoalloy Electrocatalysts. *Adv Sci (Weinh)*. 2023;10(33):e2303693.
- [35] QIN Z, ZHANG Y, LUO W, et al. A Universal Molten Salt Method for Direct Upcycling of Spent Ni-rich Cathode towards Single-crystalline Li-rich Cathode. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2023;62(25):e202218672.
- [36] JIANG X, GRAY P, PATEL M, et al. Crossover between anti- and pro-oxidant activities of different manganese oxide nanoparticles and their biological implications. *J Mater Chem B*. 2020;8(6):1191-1201.
- [37] YAO J, CHENG Y, ZHOU M, et al. ROS scavenging Mn₃O₄ nanozymes for in vivo anti-inflammation. *Chem Sci*. 2018;9(11):2927-2933.
- [38] HORVÁTH E, SÓLYOM Á, SZÉKELY J, et al. Inflammatory and Metabolic Signaling Interfaces of the Hypertrophic and Senescent Chondrocyte Phenotypes Associated with Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(22):16468.
- [39] JIANG L, LIN J, ZHAO S, et al. ADAMTSS in Osteoarthritis: Biological Functions, Regulatory Network, and Potential Targeting Therapies. *Front Mol Biosci*. 2021;8:703110.
- [40] WONG XY, SENA-TORRALBA A, ÁLVAREZ-DIDUK R, et al. Nanomaterials for Nanotheranostics: Tuning Their Properties According to Disease Needs. *ACS Nano*. 2020;14(3):2585-2627.
- [41] ZHANG S, WANG L, KANG Y, et al. Nanomaterial-based reactive oxygen species scavengers for osteoarthritis therapy. *Acta Biomater*. 2023;162:1-19.
- [42] REINERT JP, FORBES LD. Manganese Toxicity Associated With Total Parenteral Nutrition: A Review. *J Pharm Technol*. 2021;37(5):260-266.
- [43] LI W, LIU Z, LIU C, et al. Manganese Dioxide Nanozymes as Responsive Cytoprotective Shells for Individual Living Cell Encapsulation. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2017;56(44):13661-13665.

(责任编辑: GW, ZN, QY, LWJ)