

磁刺激下 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒影响骨髓间充质干细胞的成骨分化陈品毅^{1,2}, 薛轶元^{1,3}, 裴锡波^{1,2}<https://doi.org/10.12307/2025.091>

投稿日期: 2023-12-02

采用日期: 2024-02-22

修回日期: 2024-05-20

在线日期: 2024-06-19

中图分类号:

R459.9; R318.4; R781

文章编号:

2095-4344(2025)23-04841-10

文献标识码: A

文章快速阅读: 磁刺激下 Fe₃O₄@ZIF-8 对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

文题释义:

Fe₃O₄@ZIF-8: 是一种以沸石咪唑酯骨架(ZIF-8)为载体且搭载超顺磁性氧化铁纳米颗粒(Fe₃O₄)的载药微粒系统, 该载药体系具有优异的生物相容性, 能够在体液环境中缓慢释放出 Zn²⁺, 并且能够响应外部磁场, 展现出良好的成骨活性。

磁刺激: 可以直接作用于细胞表面的受体或通过细胞内信号通路来影响成骨细胞的生物活性, 通过结合磁性纳米材料还可实现对骨组织工程构建体的定向生长和修复。

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞在组织工程和骨再生中具有重要作用, 然而如何促进骨髓间充质干细胞的成骨分化仍然是一个挑战。

目的: 探讨磁刺激下 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响。

方法: 采用水热法合成沸石咪唑酯骨架(ZIF-8), 采用一锅法合成具有磁性的 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒(材料制备中分别加入 2.5, 5, 10, 20 μg 的 Fe₃O₄), 通过扫描电镜、X 射线光电子能谱、X 射线衍射、振动样品磁强计检测等对 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒进行表征, 筛选出合适的材料进行后续实验。提取 4 周龄 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 分别与不同质量浓度(25, 50, 75, 100, 125 μg/mL)的 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒溶液共培养, CCK-8 法检测细胞增殖, 筛选出最佳的材料溶液质量浓度; 筛选出材料溶液质量浓度后, 施加磁刺激(磁场强度分别为 0, 50, 100, 150 MT), CCK-8 法检测细胞增殖, 筛选出最佳的磁场强度与 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒, 用于骨髓间充质干细胞诱导分化实验。将 SD 大鼠骨髓间充质干细胞分别与 ZIF-8、Fe₃O₄@ZIF-8、Fe₃O₄@ZIF-8(磁场干预)纳米颗粒溶液共培养, 以单独培养的细胞为空白对照, 成脂诱导后进行油红 O 染色, 成骨诱导后进行碱性磷酸酶、茜素红染色与 Runx2 蛋白质量浓度检测。

结果与结论: ①扫描电镜下可见 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒呈现十二面体结构, 随着材料中 Fe₃O₄ 含量的增加, 纳米颗粒的粒径增大, 选择粒径约 250 nm(该粒径下的纳米颗粒功能性及生物安全性较稳定)的 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒(材料制备中分别加入 5, 10 μg 的 Fe₃O₄)进行后续实验。②CCK-8 检测结果显示, 在 100 MT 磁场作用下, 50 μg/mL 的 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒(材料制备中加入 10 μg 的 Fe₃O₄)能够显著促进骨髓间充质干细胞的增殖, 选择该条件下的纳米颗粒进行骨髓间充质干细胞成骨诱导分化实验。③成骨诱导后, Fe₃O₄@ZIF-8(磁场干预)组骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶活性、细胞外基质矿化程度与 Runx2 蛋白质量浓度均高于其他 3 组(P < 0.05); 成脂诱导后, Fe₃O₄@ZIF-8(磁场干预)组骨髓间充质干细胞的脂滴形成少于其他 3 组(P < 0.05)。④结果表明, 在特定的磁场条件下 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒可以促进骨髓间充质干细胞的成骨分化。

关键词: Fe₃O₄@ZIF-8; 磁性纳米颗粒; 磁刺激; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

缩略语: 沸石咪唑酯骨架: zeolitic imidazolate framework-8, ZIF-8

Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles affect osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under magnetic stimulationChen Pinrui^{1,2}, Xue Yiyuan^{1,3}, Pei Xibo^{1,2}

¹ 四川大学华西口腔医院口腔医学 + 前沿医学创新中心, 四川省成都市 610041; ² 四川大学华西口腔医院华西院区修复科, 四川省成都市 610041;

³ 四川大学华西口腔医院锦江门诊修复科, 四川省成都市 610041

第一作者: 陈品毅, 男, 1998 年生, 中国台湾省台中市人, 汉族, 四川大学华西口腔医学院在读硕士, 主要从事磁性纳米颗粒组织工程学方向的研究。

通讯作者: 裴锡波, 副教授, 硕士生导师, 四川大学华西口腔医院口腔医学 + 前沿医学创新中心, 四川省成都市 610041; 四川大学华西口腔医院华西院区修复科, 四川省成都市 610041

<https://orcid.org/0000-0002-5496-8338> (陈品毅)

基金资助: 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC1364), 项目负责人: 薛轶元; 国家自然科学基金-青年基金项目(82301150),

项目负责人: 薛轶元; 国家自然科学基金项目(82271016), 项目负责人: 裴锡波; 中央引导地方-自由探索项目(2023ZYD0109),

项目负责人: 裴锡波

引用本文: 陈品毅, 薛轶元, 裴锡波. 磁刺激下 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒影响骨髓间充质干细胞的成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(23):4841-4850.



¹Stomatology and Frontier Medical Innovation Center, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²Department of Prosthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ³Department of Prosthodontics, Jinjiang Outpatient Department, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Chen Pinrui, Master candidate, Stomatology and Frontier Medical Innovation Center, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; Department of Prosthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Corresponding author: Pei Xibo, Associate professor, Master's supervisor, Stomatology and Frontier Medical Innovation Center, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; Department of Prosthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells play a pivotal role in tissue engineering and bone regeneration. However, promoting the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells poses a significant challenge.

OBJECTIVE: To examine the influence of Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under magnetic stimulation.

METHODS: Zeolite imidazolate skeleton (ZIF-8) was synthesized by hydrothermal method, and magnetic Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles were synthesized by one-pot method (2.5, 5, 10, and 20 μg Fe₃O₄ were added to the preparation materials, respectively). The Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction, and vibration sample magnetometer detection, and suitable materials were selected for subsequent experiments. Bone marrow mesenchymal stem cells of 4-week-old SD rats were extracted and co-cultured with Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticle solution with different mass concentrations (25, 50, 75, 100, and 125 μg/mL), respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay, and the optimal material solution mass concentration was selected. After the mass concentration of the material solution was screened, magnetic stimulation was applied (magnetic field intensity was 0, 50, 100, and 150 MT, respectively). Cell proliferation was detected by CCK-8 assay, and the best magnetic field intensity and Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles were selected for the experiment of induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. SD rat bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured with ZIF-8, Fe₃O₄@ZIF-8, and Fe₃O₄@ZIF-8 (magnetic field intervention) nanoparticle solution, respectively. The single cultured cells were used as blank controls. Lipid induction was followed by oil red O staining. After osteogenesis induction, alkaline phosphatase, alizarin red staining and Runx2 protein concentration were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Under scanning electron microscopy, Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles showed a dodecahedral structure. With the increase of Fe₃O₄ content in the material, the particle size of the nanoparticles increased. Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles (5 and 10 μg Fe₃O₄ was added to the material preparation) with a particle size of about 250 nm (stable functional and biosafety of nanoparticles at this particle size) were selected. (2) The results of CCK-8 assay showed that 50 μg/mL Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles (with 10 μg Fe₃O₄ added to the preparation of the material) could significantly promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells under a 100 MT magnetic field. The nanoparticles under this condition were selected for the osteogenic induction differentiation experiment of bone marrow mesenchymal stem cells. (3) After osteogenic induction, the alkaline phosphatase activity, extracellular matrix mineralization degree, and Runx2 protein mass concentration of bone marrow mesenchymal stem cells in Fe₃O₄@ZIF-8 (magnetic field intervention) group were higher than those in other three groups ($P < 0.05$). After adipogenic induction, the lipid droplet formation of bone marrow mesenchymal stem cells in Fe₃O₄@ZIF-8 (magnetic field intervention) group was lower than that in the other three groups ($P < 0.05$). (4) The results show that Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles can promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under specific magnetic field conditions.

Key words: Fe₃O₄@ZIF-8; magnetic nanoparticle; magnetic stimulation; bone marrow mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation

Funding: Sichuan Natural Science Foundation of China, No. 2022NSFSC1364 (to XYY); National Natural Science Foundation of China-Youth Fund Project, No. 82301150 (to XYY); National Natural Science Foundation of China, No. 82271016 (to PXB); Central Guidance Local - Free Exploration Project, No. 2023ZYD0109 (to PXB)

How to cite this article: CHEN PR, XUE YY, PEI XB. Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles affect osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under magnetic stimulation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(23):4841-4850.

0 引言 Introduction

磁场在细胞行为调控中起着极其重要的作用，可以对细胞的黏附、增殖及分化产生影响。当细胞暴露在磁场中时，磁场可通过调节钙离子通道的变化影响成骨细胞的增殖和分化^[1]。另外，磁场能够调控细胞内信号传导和细胞骨架的重组，影响成骨细胞的形态和运动能力，进而影响其成骨效果。研究表明，磁性纳米颗粒在磁场的作用下能够缓慢沉积在细胞膜表面并通过内吞作用进入细胞，影响细胞的生理功能，从而使得控制细胞的命运成为可能^[2]。其中，超顺磁性氧化铁是一种以纳米级 Fe₃O₄ 或 γ-Fe₂O₃ 晶体为核心的磁性纳米材料，具有优异的生物安全性及高磁敏感性，能够被生物体代谢，目前已被广泛应用于细胞分离纯化、药物靶向运输、核磁共振成像、磁热治疗等生物医学领域^[3-4]。研究发现在磁场的作用下，超顺磁性氧化铁纳米颗粒在促进细胞的黏附、增强碱性磷酸酶活性和提高成骨相关基因的表达方面具有显著优势^[5]。值得注意的是，超顺磁氧化铁纳米颗粒在施加磁场时极易团聚且产生热量^[6]，显著影响其稳定性和长期应用的可行性，因此，需要一种稳定性好、负载能力强的载

体对超顺磁氧化铁纳米颗粒进行有效保护、递送和有序释放。

金属-有机骨架是一种通过金属离子与有机配体桥接形成的多孔有机-无机杂化晶体类材料，因具有极高比表面积、孔径可调性和极高孔隙率而被广泛应用于药物运输领域^[7]。以锌(Zn)为配位中心的沸石咪唑酯骨架(zeolitic imidazolate framework-8, ZIF-8)，不仅具有金属-有机骨架的基本特性，还具有 pH 值响应性、良好的热稳定性、化学稳定性等特性^[8]，因此 ZIF-8 在药物负载、递送、控释等领域具有广阔的应用前景。课题组前期在引导骨再生膜表面成功制备了纳米 ZIF-8 涂层，其在体液环境中能够缓慢释放出锌离子，并且显示出良好的细胞相容性、生物降解性和成骨活性^[9]。此次研究以磁场对细胞的行为调控为切入点，构建了一种高效的纳米载药复合体——Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒，ZIF-8 作为一种稳定性好、负载能力强的载体对 Fe₃O₄ 进行有效保护和递送，探讨 Fe₃O₄@ZIF-8 载药体系在磁刺激下对骨髓间充质干细胞增殖及成骨、成脂分化的影响，通过调控外加磁场的磁力和改变载药体系的机械负载，旨在为骨缺损修复提供一种磁性

纳米颗粒与金属-有机骨架材料相结合的新型治疗手段,为丰富后期促成骨材料的研究和发展提供实验基础和理论指导。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 纳米颗粒制备与表征实验,体外细胞实验,组间比较进行双因素方差分析(Two-Way ANOVA)、Dunnett' Multiple comparisons test 检验。

1.2 时间及地点 实验于2023-01-01/12-31在四川省双流区成都前沿医学中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 4周龄雄性SD大鼠4只,体质量(100±10)g,购自成都达硕实验动物公司,许可证号:SCXK(川)2020-0030。实验方案获得四川大学华西口腔医院医学伦理委员会批准(WCHSIRB-D-2023-669)。

1.3.2 原料、试剂与仪器 二甲基咪唑、无水乙醇、10%氯化十六烷基吡啶(阿拉丁,中国);六水合硝酸锌(百灵威,中国); α -MEM培养基、胎牛血清、胰酶、PBS(pH=7.2)缓冲液和青霉素/链霉素购于Gibco试剂公司(美国);50 nm Fe_3O_4 超顺磁性氧化铁纳米颗粒溶液(瑞禧生物,中国);手持数字高斯计(天恒TD8620,中国);各种型号圆形磁铁片(12 mm×3 mm、15 mm×3 mm、18 mm×3 mm,斐帝星,中国);CCK-8试剂盒(APE×BIO,中国); β -甘油磷酸钠(索莱宝,中国);抗坏血酸、地塞米松、0.2%茜素红染液(pH=4.2)(西格玛奥德里奇,美国);活死细胞染色试剂盒、碱性磷酸酶显色试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒、BCA试剂盒(碧云天,中国);X射线衍射仪(日本岛津6100);纳米粒径分析仪(美国布鲁克海文);振动样品磁强计(美国Lakeshore7404);扫描电子显微镜(中国凯奇)。

1.4 方法

1.4.1 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的合成

ZIF-8 纳米颗粒的合成:采用水热法合成ZIF-8纳米颗粒。称量384 mg二甲基咪唑、38.4 mg六水合硝酸锌,分别溶于1.2, 1 mL纯水中,得到均质透明溶液。取150 μL 二甲基咪唑溶液逐滴缓慢加入125 μL 六水合硝酸锌溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 超声水浴下混合30 min,用无水乙醇充分洗涤并重复3次,10 000 r/min离心2 min,弃上清后收集沉淀,真空干燥得到ZIF-8白色粉末。

Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的合成:采用一锅法合成 Fe_3O_4 @ZIF-8纳米颗粒。称量384 mg二甲基咪唑、38.4 mg六水合硝酸锌,分别溶于1.2, 1 mL纯水中,得到均质透明溶液。取不同体积(10, 20, 40, 80 μL)的2.5 mg/mL Fe_3O_4 溶液与二甲基咪唑溶液(140, 130, 110, 70 μL)混合得到150 μL 总溶液,逐滴缓慢加入125 μL 六水合硝酸

锌溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 超声水浴下混合30 min,用无水乙醇充分洗涤并重复3次,10 000 r/min离心2 min,弃上清后收集沉淀,真空干燥得到 Fe_3O_4 @ZIF-8棕色强磁性粉末,分别记为 Fe_3O_4 @ZIF-8(10)、 Fe_3O_4 @ZIF-8(20)、 Fe_3O_4 @ZIF-8(40)、 Fe_3O_4 @ZIF-8(80)。

1.4.2 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的表征 将ZIF-8粉末和 Fe_3O_4 @ZIF-8粉末分散在无水乙醇溶液中超声振荡2 min,干燥固定,使用扫描电子显微镜观察表面的晶体形貌。使用X射线衍射仪进行X射线衍射检测,表征ZIF-8和 Fe_3O_4 @ZIF-8粉末的晶格、结晶取向及结晶度,初步证明材料的成功合成,相关参数(2 θ 范围:5 $^{\circ}$ -80 $^{\circ}$;扫描模式:连续)。在26.85 $^{\circ}\text{C}$ 、1 989.4-2 387.3 A/m快扫条件下,使用振动样品磁强计检测 Fe_3O_4 @ZIF-8纳米颗粒的磁特性。将粉末样品分散在纯水溶液中进行超声振荡,使用纳米粒径分析仪评估ZIF-8和 Fe_3O_4 @ZIF-8纳米颗粒的粒径分布范围和稳定性。

通过材料表征实验结果,筛选出合适的 Fe_3O_4 @ZIF-8纳米颗粒用于后续实验。

1.4.3 骨髓间充质干细胞的分离培养与鉴定 取4周龄SD大鼠4只,乙醚吸入性麻醉后颈椎脱位处死,无菌条件下取股骨、胫骨,剔除附着于骨上的其他组织,在含1%双抗(青霉素/链霉素)的PBS中冲洗3遍,剪开骨骺端露出骨髓腔,用5 mL注射器吸取含体积分数为10%胎牛血清和1%双抗的 α -MEM(完全培养基)冲出骨髓腔中的骨髓,接种到T25培养瓶中,期间每2 d换1次液,直至细胞融合80%-90%时开始传代^[10]。

将骨髓间充质干细胞传至第三四代,用流式缓冲液洗涤3次,按照流式抗体说明书的标准步骤处理细胞并转移至专用流式管中,采用流式细胞仪分析细胞表面抗原CD45、CD11b、CD29、CD90的表达。

1.4.4 磁场设置 将若干块圆形钕铁硼磁铁片(12 mm×3 mm、15 mm×3 mm、18 mm×3 mm)分别固定在12, 24, 48孔板中,置于培养细胞孔板下,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱中建立静磁场。利用高斯计测量出50, 100, 150 MT磁场强度大小,以确保细胞培养层面都受到相同的静磁场刺激,筛选出最佳磁场强度进行后续体外实验。另外,采用数字化3D打印技术制作磁铁嵌入式的树脂壳,解决不同磁场强度间圆形磁铁片高度不一出现相吸相斥的问题。在筛选出准确数值后,后续实验装置在孔板内进行即可。

1.4.5 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞活性的影响

CCK-8法检测细胞增殖:称取10 mg ZIF-8粉末、10 mg Fe_3O_4 @ZIF-8粉末,分别溶于1 mL完全培养基中,超声振荡后得到10 mg/mL的材料原液,此时每1 μL 材料原

液可得 10 μg 粉末, 按照浓度梯度 25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 配置成终体积 1 mL 的完全培养基。将生长状况良好的骨髓间充质干细胞接种于 48 孔板中, 细胞密度 $1 \times 10^4/\text{孔}$, 分组培养: ZIF-8 组加入含不同质量浓度 (25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ZIF-8 的完全培养基 1 mL, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 组加入含不同质量浓度 (25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 的完全培养基 1 mL, 以空白对照组 (加入单纯的完全培养基 1 mL) 为参照。每组 4 个复孔。培养 1, 3, 5 d 后, 每孔加入 200 μL 含 10% CCK-8 的培养基, 置于培养箱中孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 光波下测定吸光度值, 筛选出最佳的材料溶液质量浓度。

筛选出材料溶液质量浓度后, 将生长状况良好的骨髓间充质干细胞接种于 48 孔板中, 细胞密度 $1 \times 10^4/\text{孔}$, 分组培养: ZIF-8 组加入含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZIF-8 的完全培养基 1 mL 并暴露在静磁场下 (磁场强度分别为 0, 50, 100, 150 MT), $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 组加入含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 的完全培养基 1 mL 并暴露在静磁场下 (磁场强度分别为 0, 50, 100, 150 MT), 以空白对照组 (加入单纯的完全培养基 1 mL) 为参照。每组 4 个复孔。培养 1, 3, 5 d 后, 弃去上清液, 每孔加入 200 μL 含 10% CCK-8 的培养基, 置于培养箱中孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 光波下测定吸光度值。筛选出最佳的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 纳米颗粒与磁场强度, 进行骨髓间充质干细胞活死细胞染色与诱导分化实验。

活死细胞染色: 将生长状况良好的骨髓间充质干细胞接种于 48 孔板中, 细胞密度 $1 \times 10^4/\text{孔}$, 分组培养: ZIF-8 组加入含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZIF-8 的完全培养基 1 mL, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 组加入含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 的完全培养基 1 mL, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8+$ 磁场组加入含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 的完全培养基 1 mL 并暴露在 100 MT 静磁场下, 以空白对照组 (加入单纯的完全培养基 1 mL) 为参照。每组 4 个复孔。培养 1, 3, 5 d 后, 将 5 μL 钙黄绿素 (Calcein-AM) 和 15 μL 碘化丙啶 (PI) 加入 5 mL PBS 中充分混合, 取 200 μL 混合溶液加入孔板内, 置于培育箱中避光孵育 20 min, 使用 490 nm 激发波长来观察活细胞荧光, 542 nm 激发波长观察死细胞荧光。

1.4.6 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞分化的影响

(1) 成骨诱导分化: 将第 3 代骨髓间充质干细胞接种于 6 孔板内, 细胞密度 $5 \times 10^4/\text{孔}$, 待细胞融合至 70% 时分组培养: 空白对照组更换为成骨诱导培养基 (α -MEM 培养基中加入 10 mmol/L 的 β -甘油磷酸钠、0.25 mmol/L 的抗坏血酸和 10 nmol/L 地塞米松), ZIF-8 组更换为含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZIF-8 的成骨诱导培养基, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 组更换为含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8(40)$ 的成骨诱导培养基, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$

ZIF-8+ 磁场组更换为含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8(40)$ 的成骨诱导培养基并暴露在 100 MT 静磁场下。每 2 d 更新 1 次成骨诱导分化培养基 (含材料)。培养 7 d 后进行碱性磷酸酶染色、Runx2 蛋白质量浓度检测, 培养 14 d 后进行茜素红染色。

碱性磷酸酶染色: 将细胞在 40 g/L 多聚甲醛中固定 15 min, 用 PBS 清洗, 按照碱性磷酸酶显色试剂盒内 BCIP/NBT 工作液进行染色, 30 min 后体式显微镜下观察结果。然后根据碱性磷酸酶检测试剂盒说明书的标准步骤对样本进行处理, 使用酶标仪测定波长为 405 nm 时的吸光度值, 随后结合 BCA 试剂盒测得的总蛋白量, 计算出各组的碱性磷酸酶活性。

Runx2 蛋白质量浓度检测: 1 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 采用 Elisa 试剂盒检测 Runx2 蛋白质量浓度。步骤按照试剂盒说明书操作。

茜素红染色: 将细胞固定在 40 g/L 多聚甲醛中 30 min, 用 0.2% 茜素红溶液染色 5 min, 用 PBS 彻底清洗染色样品以去除多余的染料, 在体视显微镜下检查底物, 将 10% 氯化十六烷基吡啶添加到每孔中以溶解染料, 摇床缓慢振荡 30 min, 使用酶标仪测量 542 nm 处的吸光度值。

(2) 成脂诱导分化: 将第 3 代骨髓间充质干细胞接种于 6 孔板内, 细胞密度 $5 \times 10^4/\text{孔}$, 待细胞融合至 70%–80% 时分组培养: 空白对照组更换为成脂诱导培养基 (α -MEM 培养基中加入 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 吡哆美辛、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素和 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松), ZIF-8 组更换为含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZIF-8 的成脂诱导培养基, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 组更换为含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8(40)$ 的成脂诱导培养基, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8+$ 磁场组更换为含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8(40)$ 的成脂诱导培养基并暴露在 100 MT 静磁场下。每 2 d 更新 1 次成脂诱导分化培养基 (含材料)。培养 7 d 后进行油红 O 染色。

油红 O 染色: 将细胞在 40 g/L 多聚甲醛中固定 15 min, 用 PBS 清洗, 按照油红 O 染色试剂盒说明书的标准步骤进行处理, 比色定量结果用 60% 异丙醇处理染色样品 30 min, 使用酶标仪测量 510 nm 处的吸光度值。

1.5 主要观察指标 磁刺激下 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ZIF-8$ 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞增殖与成脂、成骨分化的影响。

1.6 统计学分析 所有实验数据至少进行了 3 个独立实验 ($n \geq 3$)。数据采用 Origin pro 2022 软件进行双因素方差分析 (Two-Way ANOVA) 与 Dunnett' Multiple comparisons test 检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经四川大学华西公共卫生学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 ZIF-8 和 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的形貌及粒径分析结果 实验采用水热法合成 ZIF-8 纳米颗粒, 扫描电镜观察其形态, ZIF-8 纳米颗粒呈 220 nm 的十二面体结构, 见图 1A 所示。采用一锅法合成不同比例的 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒, 随着 Fe_3O_4 纳米颗粒负载量的增加, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的粒径不断变大, 见图 1B-E 所示, 这可能与 Fe_3O_4 纳米颗粒本身容易团聚的特性相关。根据纳米粒径分析测试结果, Fe_3O_4 @ZIF-8(10) 和 (80) 纳米颗粒的粒径分布在 190 nm 和 591 nm 左右, 而 Fe_3O_4 @ZIF-8(20) 和 (40) 纳米颗粒的粒径分布分别在 220 nm 和 264 nm 左右, 见图 1F 所示, 研究发现纳米颗粒的功能性及生物安全性在 250 nm 处较为稳定^[11], 因此初步筛选出 Fe_3O_4 @ZIF-8(20) 和 (40) 纳米颗粒作为后续实验的对象。

2.2 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的理化特性表征结果 X 射线衍射分析结果显示, ZIF-8 纳米颗粒符合 (011)(002)(112)(022)(013) 和 (222) 的 ZIF-8 晶胞结构, 说明样品为纯 ZIF-8 相, 结晶度较高; Fe_3O_4 @ZIF-8 与 Fe_3O_4 晶体 (PDF#19-0629) 的晶胞结构匹配, 18.1°, 29.7°, 35.5°, 42.5°, 52.7°, 56.2° 和 61.7° 的衍射峰分别对应于磁铁矿的 (111)(220)(311)(400)(422)(511) 和 (440) 晶面, 说明 Fe_3O_4 纳米颗粒负载成功, 然而 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒各组间无明显差异, 这可能是负载量较少导致, 见图 2A。

使用振动样品磁强计检测 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的磁性, 测量了磁化强度与外加磁场强度的关系曲线, 见图 2B 所示, 随着 Fe_3O_4 负载量的增加, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒饱和磁化强度更高; 曲线穿过零点, 说明没有任何的矫顽力或剩余磁化强度, 即 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒具有超顺磁性。上述检测验证了超顺磁性 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的成功合成。

2.3 骨髓间充质干细胞的流式细胞鉴定结果 流式细胞仪测定骨髓间充质干细胞表面抗原 CD45、CD11b、CD29、CD90 的阳性表达率分别为 0.40%, 0.37%, 99.2%, 99.7%, 见图 3, 证明了骨髓间充质干细胞的纯度可满足实验要求。

2.4 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞活性的影响 CCK-8 检测结果显示, 培养 1, 3, 5 d, 在 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, ZIF-8 组、 Fe_3O_4 @ZIF-8(20) 组、 Fe_3O_4 @ZIF-8(40) 组骨髓间充质干细胞都有较好的细胞活性, 并且培养 3, 5 d 的 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞吸光度值高于同组内的其他质量浓度组, 因此选择 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度进行后续检测; 值得注意的是, 在第 5 天 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fe_3O_4 @ZIF-8 组的细胞吸光度值高于对应质量浓度的 ZIF-8 组, 见图 4A-C, 说明 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的细胞相容性优于 ZIF-8 纳米颗粒, 表明 Fe_3O_4 纳米颗粒对细胞增殖有促进作用, 为后续进一

步成骨分化检测提供了支撑。

CCK-8 检测结果显示, 相较于空白对照组, Fe_3O_4 @ZIF-8(20) 组、 Fe_3O_4 @ZIF-8(40) 组暴露在 50, 100 MT 磁场下的细胞吸光度值升高 ($P < 0.001$), 说明低强度静磁场对成骨细胞的增殖具有促进作用; 并且暴露在相同磁场强度下, 随着纳米颗粒中 Fe_3O_4 负载量的增加, 细胞吸光度值升高, 见图 4D-F, 说明更高的 Fe_3O_4 纳米颗粒负载量对外部磁场的敏感性更强。

考虑到成骨诱导分化实验中细胞培养周期所需时间较长, 而细胞长期暴露在磁场条件下可能存在潜在的负向作用, 有研究发现 200 MT 以上的磁场对成骨有抑制作用^[12], 尽管 150 MT 磁场下也能促进骨髓间充质干细胞的增殖活性, 但最终筛选出更加安全的 100 MT 磁刺激作用于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Fe_3O_4 @ZIF-8(40) 纳米颗粒和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ZIF-8 纳米颗粒, 作为最适的体外成骨实验条件。

见图 5 所示, 培养 1, 3 d 的活死细胞染色显示, 各组纳米颗粒具有较好的细胞相容性, 未见明显的死细胞; 培养 5 d, Fe_3O_4 @ZIF-8+ 磁场组开始出现少量的死细胞, 说明磁力刺激对细胞有潜在的毒性危害。

2.5 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞成脂与成骨分化的影响 见图 6。

成骨诱导第 7 天的碱性磷酸酶染色结果见图 6A 所示, Fe_3O_4 @ZIF-8+ 磁场组阳性染色最深, Fe_3O_4 @ZIF-8 组阳性染色深度强于 ZIF-8 组, 说明 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞的成骨分化具有更好的促进作用, 特别是在 100 MT 磁场作用下进一步加速了骨髓间充质干细胞的成骨分化。成骨诱导第 14 天, 利用茜素红染色评估成骨分化后期的细胞外基质矿化程度, 见图 6B 所示, Fe_3O_4 @ZIF-8+ 磁场组表现出最大的矿化程度, 其次是 Fe_3O_4 @ZIF-8 组。

骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶活性水平越高, 成骨分化越明显, 见图 6D 所示, Fe_3O_4 @ZIF-8+ 磁场组与其他 3 组相比表现出最好的成骨细胞分化和功能状态。茜素红定量分析结果也显示 Fe_3O_4 @ZIF-8+ 磁场组表现出最高的细胞外基质矿化程度, 其次是 Fe_3O_4 @ZIF-8 组, 见图 6E, 与碱性磷酸酶活性检测结果一致。

成骨诱导第 7 天, Fe_3O_4 @ZIF-8+ 磁场组 Runx2 蛋白质质量浓度高于其他 3 组, 如图 6F 所示。

成脂诱导第 7 天的油红 O 染色结果显示, Fe_3O_4 @ZIF-8+ 磁场组脂滴形成最少, 其次是 Fe_3O_4 @ZIF-8 组, 空白对照组脂滴形成最多, 比色定量结果也显示出相同的趋势, 见图 6C, G, 可能提示磁场条件对成脂分化产生了抑制作用。

综合以上结果, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒能够促进骨髓间充质干细胞的成骨分化, 并在 100 MT 磁场作用下成骨效果更加显著。

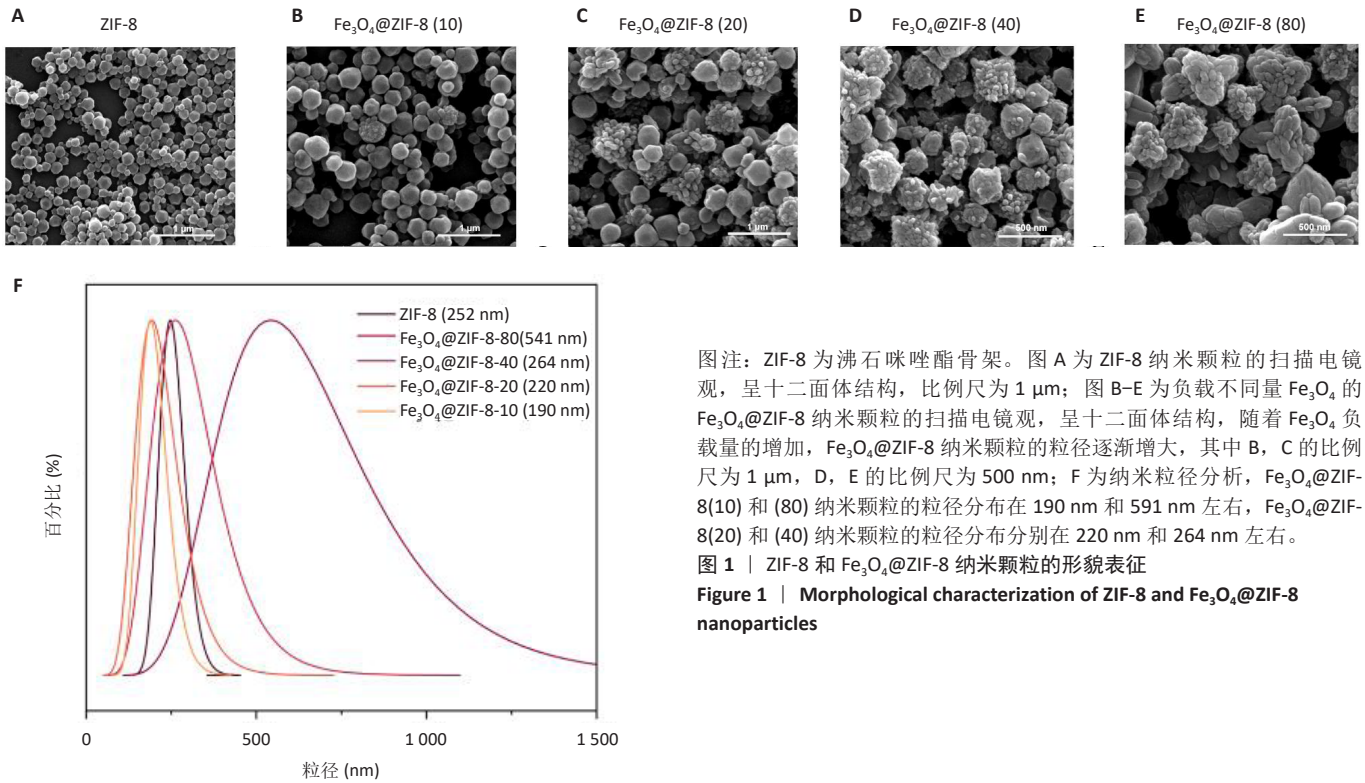


Figure 1 | Morphological characterization of ZIF-8 and Fe_3O_4 @ZIF-8 nanoparticles

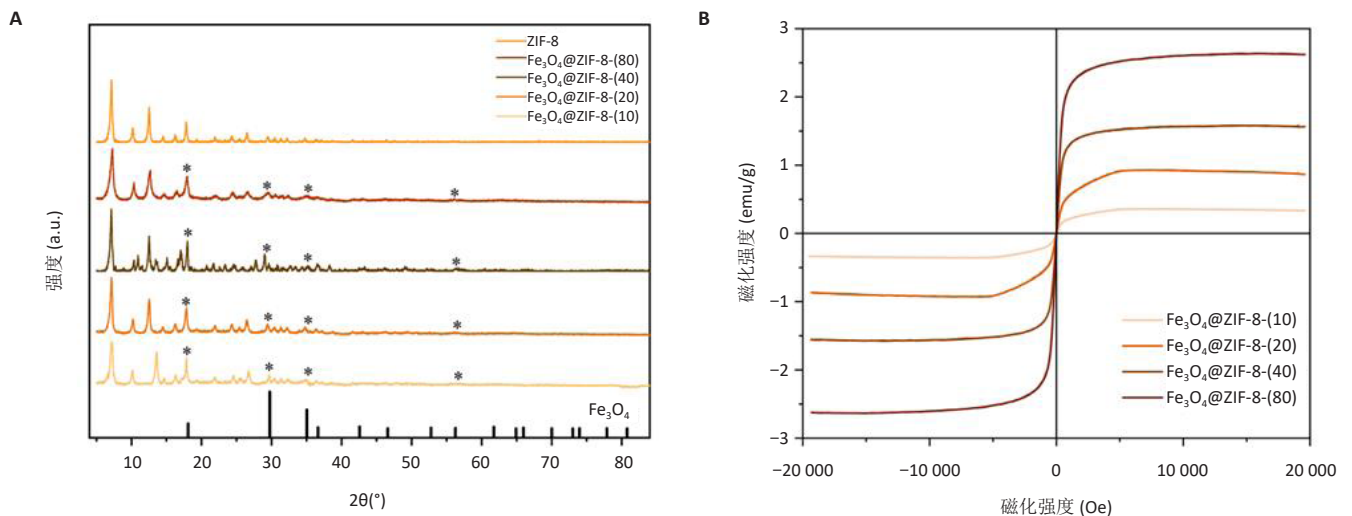


Figure 2 | Validation of successful synthesis of ZIF-8 and Fe_3O_4 @ZIF-8 nanoparticles

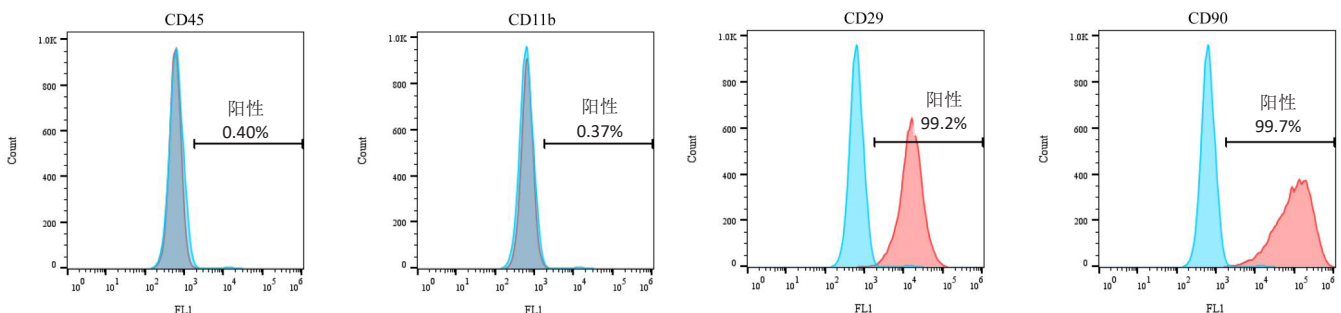
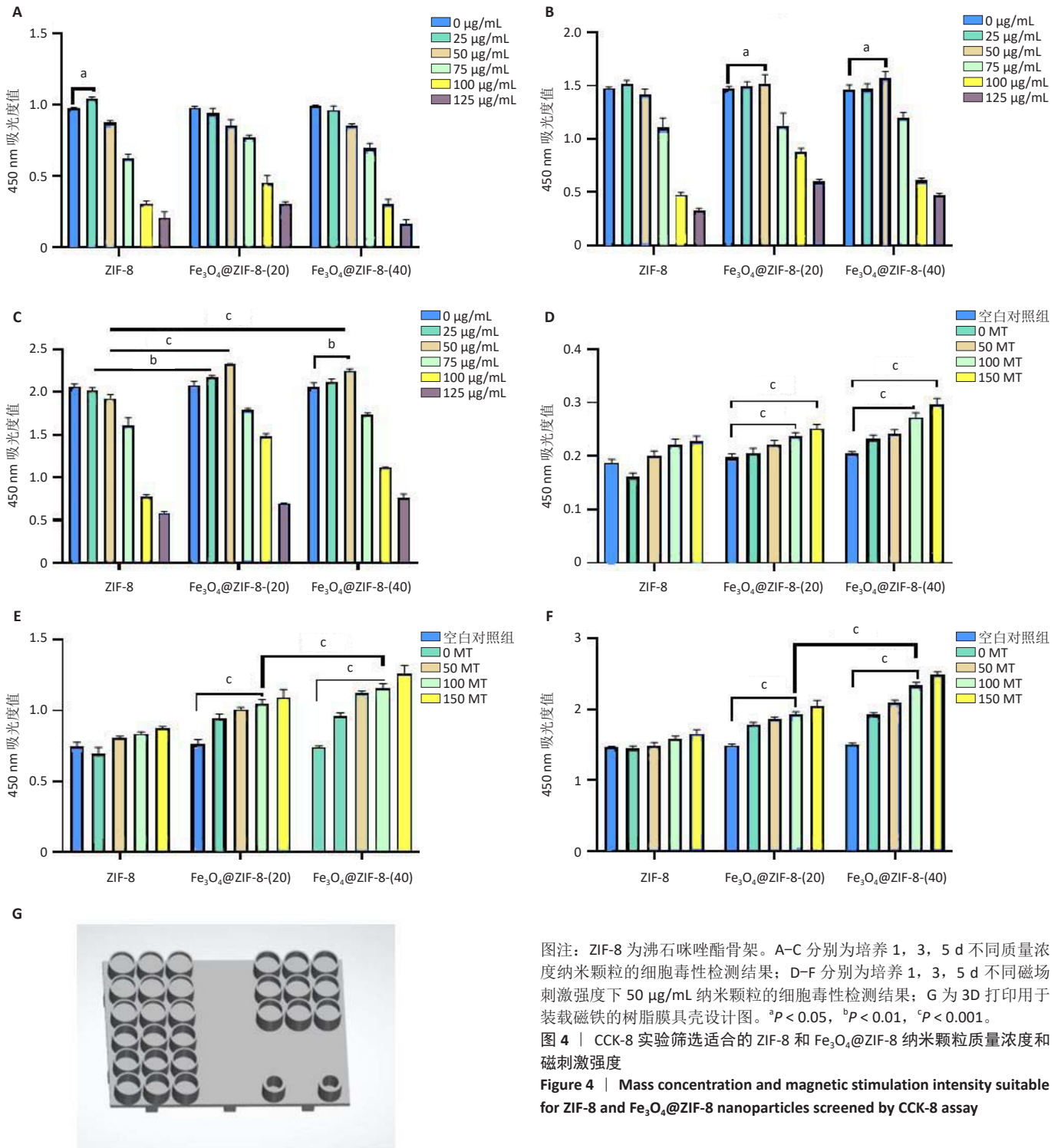


Figure 3 | Flow cytometry identification of bone marrow mesenchymal stem cells



图注：ZIF-8 为沸石咪唑酯骨架。A-C 分别为培养 1, 3, 5 d 不同质量浓度纳米颗粒的细胞毒性检测结果；D-F 分别为培养 1, 3, 5 d 不同磁场刺激强度下 50 µg/mL 纳米颗粒的细胞毒性检测结果；G 为 3D 打印用于装载磁铁的树脂膜具壳设计图。^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001。

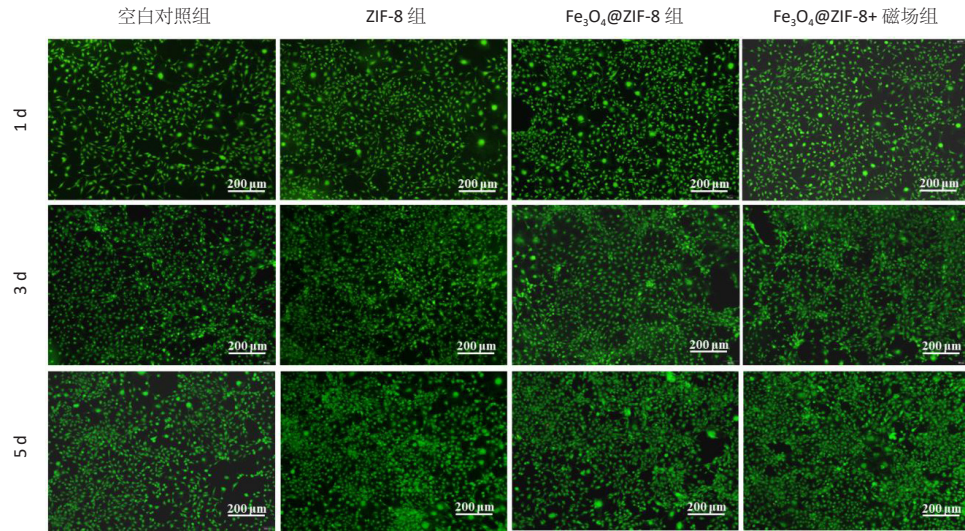
图 4 | CCK-8 实验筛选适合的 ZIF-8 和 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒质量浓度和磁刺激强度

Figure 4 | Mass concentration and magnetic stimulation intensity suitable for ZIF-8 and Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles screened by CCK-8 assay

3 讨论 Discussion

有研究发现，细胞将持续作用的弱磁力转化为内部生化信号的过程是促进骨再生的主要机制^[13-14]。YUN 等^[15]发现在静磁场的作用下，骨髓间充质干细胞表面镁离子通道蛋白的活性通过磁扭矩效应得到增强，进而促进骨髓间充质干细胞捕获镁离子，诱导新骨生成。Fe₃O₄ 纳米颗粒作为一种具有超顺磁性、低毒性和高纯度的磁性纳米材料，能够快速响应外部磁场，在骨组织工程的应用

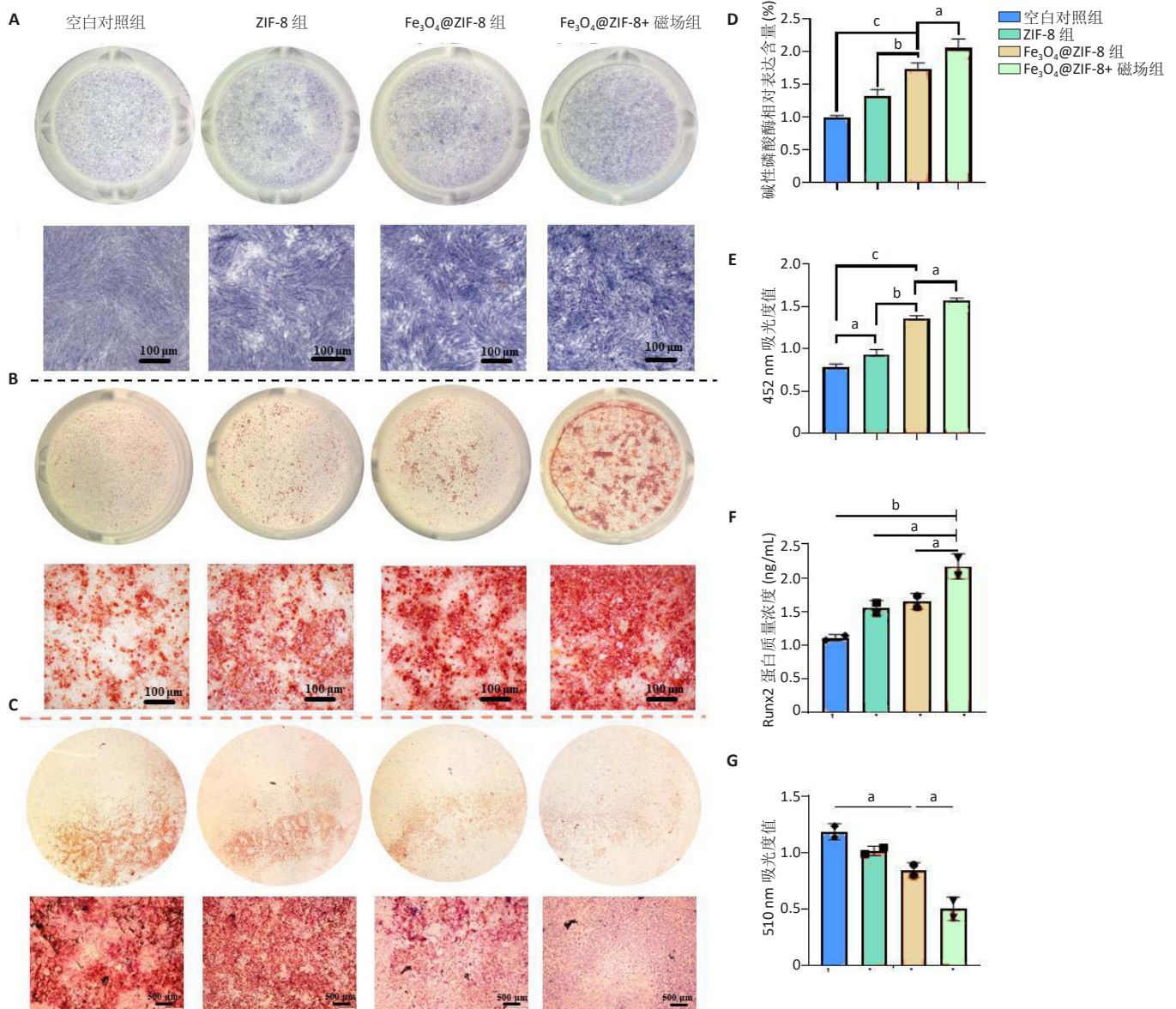
中具有较大的潜力^[16-17]。此次实验结果表明，负载 Fe₃O₄ 纳米颗粒确实可以有效提高骨髓间充质干细胞的增殖活性和成骨能力，并且在磁场作用下的成骨效果更加明显。WU 等^[18]同样发现 Fe₃O₄ 纳米颗粒在 100 MT 静磁场作用下能够促进骨髓间充质干细胞的成骨分化，这可能归因于机械转导的作用机制。整合素被认为是参与机械转导的重要促进因素，它是细胞外基质蛋白的受体，在细胞迁移、黏附、增殖和存活中起着至关重要的作用，能够启动与成



图注: ZIF-8 为沸石咪唑酯骨架, 两种纳米颗粒的质量浓度均为 50 μg/mL, 磁场刺激强度为 100 MT。培养 1, 3 d, 各组纳米颗粒具有较好的细胞相容性, 未见明显的死细胞; 培养 5 d, Fe₃O₄@ZIF-8+ 磁场组开始出现少量的死细胞, 比例尺为 200 μm。

图 5 | ZIF-8 和 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞活性的影响 (活死细胞染色)

Figure 5 | Effect of ZIF-8 and Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles on the activity of bone marrow mesenchymal stem cells (living/dead cell staining)



图注: ZIF-8 为沸石咪唑酯骨架, 两种纳米颗粒的质量浓度均为 50 μg/mL, 磁场刺激强度为 100 MT。A 为成骨诱导 7 d 的碱性磷酸酶染色图; B 为成骨诱导 14 d 的茜素红染色图; C 为成骨诱导 7 d 的油红 O 染色图; D 为碱性磷酸酶定量检测结果; E 为茜素红染色定量检测结果; F 为成骨诱导 7 d 的 Runx2 蛋白质量浓度检测结果; G 为成脂诱导 7 d 的油红 O 染色定量检测结果。^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.001。

图 6 | ZIF-8 和 Fe₃O₄@ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞成骨与成脂分化的影响

Figure 6 | Effects of ZIF-8 and Fe₃O₄@ZIF-8 nanoparticles on osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

骨分化相关的细胞内信号级联反应^[19]。研究表明, Fe_3O_4 纳米颗粒在磁场的作用下显著上调了整合素 $\alpha 3$ 和整合素 $\alpha 5$ 的表达^[20-22], 因此, 作者推测 Fe_3O_4 纳米颗粒与磁场的交互作用会激活细胞内信号网络, 促进整合素表达上调, 导致成骨分化增强。

尽管 Fe_3O_4 纳米颗粒已获得美国食品药品监督管理局的临床批准^[23], 但其具有较高的比表面积, 往往会发生自身团聚, 通常用聚乙二醇进行修饰增强其胶体稳定性^[24]。然而, 聚乙二醇化系统在重复给药后往往会迅速从循环中消除, 这种现象被称为加速血液清除效应, 阻碍了聚乙二醇化纳米药物的生物利用度^[25]。此外研究发现, 聚乙二醇化纳米颗粒会引起免疫反应, 治疗诱导的抗聚乙二醇抗体的产生通过激活加速血液清除效应来降低聚乙二醇化纳米药物的治疗效果^[26]。

为了解决上述问题, 课题将超顺磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒引入 ZIF-8 骨架中从而构建内源性磁性微环境, 尽可能地减少磁性材料的含量和调控所需磁辐射的强度, 从而降低潜在的磁性相关毒性。ZIF-8 由二甲咪唑连接的四面体锌离子构成, 具有可调的孔径和高的孔隙率, 在生物医学领域广泛应用于药物传递^[27]、吸附和催化等方面^[28-29]。ZIF-8 作为金属有机骨架中最重要的亚类之一, 不仅具有持续释放负载物的能力, 并且能通过 pH 值响应性释放锌离子来促进成骨^[30]。课题组前期在引导骨再生膜表面成功制备了纳米 ZIF-8 涂层, 该材料在体液环境中能够缓慢释放出锌离子, 并且显示出良好的细胞相容性、生物降解性和成骨活性。来自 ZIF-8 的 Zn^{2+} 已被证明通过 Wnt/ β -catenin 途径促进成骨细胞的分化和增殖, 从而刺激骨形成, 抑制骨吸收^[31]。综合以上结果, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒被认为是一种有潜力的纳米载体, 具有调控药物释放和磁刺激促进骨再生的双重功能, 将 ZIF-8 和 Fe_3O_4 结合不仅可以充分利用 ZIF-8 的药物释放能力和 pH 值响应性, 还能发挥 Fe_3O_4 的磁性特性; 另外, 通过控制纳米复合材料的制备方法和组成可以调整其物理化学性质, 以满足骨修复的需求。

课题设计了一种基于磁场调控的新型高效纳米载药复合体—— Fe_3O_4 @ZIF-8, 对于促进骨缺损区骨再生具有重要的临床意义, 然而该研究仍存在一些局限性^[32-34]: 首先, 磁场对骨髓间充质干细胞的成骨分化效果可能取决于多个参数, 包括磁场的强度、方向、频率和持续时间, 因此未来需要对这些参数进一步优化以实现更理想的效果; 其次, 不同来源骨髓间充质干细胞对磁场的反应可能存在差异, 这可能受到细胞的器官来源、健康状态及个体差异等因素的影响; 此外, 磁场在生物体内的渗透深度存在一定限制, 因此未来在应用磁场时需要考虑到如何确保其影响到目标区域的骨髓间充质干细胞。尽管

实验结果表明 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞的成骨分化具有明显的促进作用, 但将这些结果成功转化为临床应用仍然有很长的路要走, 未来需要更深入的体内研究来确保其在人体内骨髓间充质干细胞的成骨分化中同样有效且安全。

此次实验结果证明, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒具有超顺磁性和优异的生物相容性, 相较于传统的 ZIF-8 骨架, 在磁场微环境作用下 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒能够显著增强骨髓间充质干细胞的增殖活性。当外部施加 100 MT 的静磁场时, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒进一步诱导了骨髓间充质干细胞的成骨分化。油红 O 染色结果提示, 在磁场条件下 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒对骨髓间充质干细胞的成脂分化产生了抑制作用, 可能与其磁性质和表面特性有关, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒在外加磁场下影响细胞信号传导和细胞内钙离子浓度等细胞生理过程, 进而影响脂肪生成, 这种抑制作用可能导致细胞分化方向的转变, 进而促进成骨过程。然而, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒在磁场条件下对脂肪生成的抑制作用和对成骨的促进作用可能是复杂的, 受到多种因素的综合影响, 例如: Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的性质、浓度、处理时间和磁场等因素都可能影响其对细胞的作用方式和效果, 因此在研究中需要对这些因素进行深入探讨, 以更全面地理解 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒在磁场条件下对脂肪生成和成骨的影响机制。

综合以上结果, 在特定的磁场条件下, Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒可以调控骨髓间充质干细胞的生物活性和分化行为, 为骨组织工程和再生医学领域的应用提供了潜在的新途径。未来应深入探究 Fe_3O_4 @ZIF-8 纳米颗粒的促成骨机制, 为骨缺损治疗提供新的解决方案。

致谢: 感谢四川大学华西口腔医院-成都前沿医学中心对课题研究的贡献, 感谢课题组成员对课题提出的宝贵意见和无私帮助, 由衷感谢国家自然科学基金-青年基金(82301150, 题目: 自噬介导年轻 BMSCs-EVs@ZIF-8 促进老年性骨质疏松颌骨缺损修复的机制研究)对课题实验的支持。

作者贡献: 陈品毅进行实验以及数据整理及成文, 薛轶元负责进行实验设计指导和审校修改, 裴锡波负责项目指导和最终审校。

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] LEW WZ, FENG SW, LEE SY, et al. The Review of Bioeffects of Static Magnetic Fields on the Oral Tissue-Derived Cells and Its Application in Regenerative Medicine. *Cells*. 2021;10(10):2662.
- [2] LIU C, LUO JW, LIANG T, et al. Matrix stiffness regulates the differentiation of tendon-derived stem cells through FAK-ERK1/2 activation. *Exp Cell Res*. 2018;373(1-2):62-70.
- [3] ZHAO YZ, CHEN R, XUE PP, et al. Magnetic PLGA microspheres loaded with SPIONs promoted the reconstruction of bone defects through regulating the bone mesenchymal stem cells under an external magnetic field. *Mater Sci Eng C*. 2021;122:111877.
- [4] SHOKROLLAHI H. Structure, synthetic methods, magnetic properties and biomedical applications of ferrofluids. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(5):2476-2487.
- [5] FERNANDES MM, CORREIA DM, RIBEIRO C, et al. Bioinspired Three-Dimensional Magnetoactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interface*. 2019;11(48):45265-45275.
- [6] HAO L, LI L, WANG P, et al. Synergistic osteogenesis promoted by magnetically actuated nano-mechanical stimuli. *Nanoscale*. 2019;11(48):23423-23437.
- [7] REN N, LIANG N, DONG M, et al. Stem Cell Membrane-Encapsulated Zeolitic Imidazolate Framework-8: A Targeted Nano-Platform for Osteogenic Differentiation. *Small*. 2022;18(26):e2202485.
- [8] XUE Y, ZHU Z, ZHANG X, et al. Accelerated Bone Regeneration by MOF Modified Multifunctional Membranes through Enhancement of Osteogenic and Angiogenic Performance. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(6):e2001369.
- [9] LIU Y, ZHU Z, PEI X, et al. ZIF-8-Modified Multifunctional Bone-Adhesive Hydrogels Promoting Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(33):36978-36995.
- [10] OBEID M, SABER SEL D, ISMAEL AEL D, et al. Mesenchymal stem cells promote hard-tissue repair after direct pulp capping. *J Endod*. 2013;39(5):626-631.
- [11] ULLRICH SJ, FREDMAN-WEISS M, AHLE S, et al. Nanoparticles for delivery of agents to fetal lungs. *Acta Biomater*. 2021;123:346-353.
- [12] CHEN G, ZHUO Y, TAO B, et al. Moderate SMFs attenuate bone loss in mice by promoting directional osteogenic differentiation of BMSCs. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):487.
- [13] MARYCZ K, ALICKA M, KORNICKA-GARBOWSKA K, et al. Promotion through external magnetic field of osteogenic differentiation potential in adipose-derived mesenchymal stem cells: Design of polyurethane/poly(lactic) acid sponges doped with iron oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(4):1398-1411.
- [14] ABDEEN AA, LEE J, BHARADWAJ NA, et al. Temporal Modulation of Stem Cell Activity Using Magnetoactive Hydrogels. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(19):2536-2544.
- [15] YAN Z, SUN T, TAN W, et al. Magnetic Field Boosts the Transmembrane Transport Efficiency of Magnesium Ions from PLLA Bone Scaffold. *Small*. 2023;19(40):e2301426.
- [16] HUANG Z, HE Y, CHANG X, et al. A Magnetic Iron Oxide/Polydopamine Coating Can Improve Osteogenesis of 3D-Printed Porous Titanium Scaffolds with a Static Magnetic Field by Upregulating the TGFbeta-Smads Pathway. *Adv Healthc Mater*. 2020;9(14):e2000318.
- [17] XIA Y, SUN J, ZHAO L, et al. Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials*. 2018;183:151-170.
- [18] WU D, CHANG X, TIAN J, et al. Bone mesenchymal stem cells stimulation by magnetic nanoparticles and a static magnetic field: release of exosomal miR-1260a improves osteogenesis and angiogenesis. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):209.
- [19] FOWLKES JL, BUNN RC, THRAILKILL KM. Contributions of the Insulin/Insulin-Like Growth Factor-1 Axis to Diabetic Osteopathy. *J Diabetes Metab*. 2011;1(3):S1-003.
- [20] WU C, CHUNG AE, MCDONALD JA. A novel role for alpha 3 beta 1 integrins in extracellular matrix assembly. *J Cell Sci*. 1995;108(Pt 6):2511-2523.
- [21] WANG H, LI J, ZHANG X, et al. Priming integrin alpha 5 promotes the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells due to cytoskeleton and cell cycle changes. *J Proteomics*. 2018;179:122-130.
- [22] SHAO PL, WU SC, LIN ZY, et al. Alpha-5 Integrin Mediates Simvastatin-Induced Osteogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):506.
- [23] VENTOLA CL. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P T*. 2017;42(12):742-755.
- [24] CHEN X, ZHUANG Y, RAMPAL N, et al. Formulation of Metal-Organic Framework-Based Drug Carriers by Controlled Coordination of Methoxy PEG Phosphate: Boosting Colloidal Stability and Redispersibility. *J Am Chem Soc*. 2021;143(34):13557-13572.
- [25] ABU LA, KIWADA H, ISHIDA T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. *J Control Release*. 2013;172(1):38-47.
- [26] LONGO N, HARDING CO, BURTON BK, et al. Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2014;384(9937):37-44.
- [27] LI S, ZHANG L, LIANG X, et al. Tailored synthesis of hollow MOF/polydopamine Janus nanoparticles for synergistic multi-drug chemophotothermal therapy. *Chem Eng J*. 2019;378:122175.
- [28] LI L, DUAN Y, LIAO S, et al. Adsorption and separation of propane/propylene on various ZIF-8 polymorphs: Insights from GCMC simulations and the ideal adsorbed solution theory (IAST). *Chem Eng J*. 2020;386:123945.
- [29] NASSER ABDELHAMID H, MATHEW AP. Cellulose-zeolitic imidazolate frameworks (CelloZIFs) for multifunctional environmental remediation: Adsorption and catalytic degradation. *Chem Eng J*. 2021;426:131733.
- [30] TAO B, ZHAO W, LIN C, et al. Surface modification of titanium implants by ZIF-8@Levo/LBL coating for inhibition of bacterial-associated infection and enhancement of in vivo osseointegration. *Chem Eng J*. 2020;390:124621.
- [31] ZHANG Z, JIA B, YANG H, et al. Zn0.8Li0.1Sr-a biodegradable metal with high mechanical strength comparable to pure Ti for the treatment of osteoporotic bone fractures: In vitro and in vivo studies. *Biomaterials*. 2021;275:120905.
- [32] 王姗姗, 舒晴, 田峻. 物理因子促进干细胞的成骨分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(7):1083-1090.
- [33] 汪文妮, 陈超群, 顾新华. 磁性纳米粒子复合支架及外加磁场影响成骨作用的研究进展 [J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2022,51(1):102-107.
- [34] 卓祥龙, 胡建中. 脉冲电磁场成骨生物学效应的研究进展 [J]. *医学综述*, 2014(23):4239-4241.

(责任编辑: GW, ZN, QY, LWJ)