

天冬氨酸修饰的纳米硒 (PEG2000-ASP@Se) 对间充质干细胞增殖与分化能力的影响

郑楚萍, 陶涛, 张依, 李凌剑, 季红, 陈法江*

(广州医科大学, 广州 511436)

摘要: 采用天冬氨酸 (ASP) 加以聚乙二醇 (PEG2000) 修饰制备纳米硒 (PEG2000-ASP@Se) 并评价其对间充质干细胞 (hMSCs) 的增殖与分化的影响。实验制备所得 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子通过投射电子显微镜观察其外貌特征, 并采用马尔文粒度仪检测其水合粒径。表征结果显示, 该纳米粒子具有较好的分散性, 其水溶液稳定性较好, 水合粒径约为 (154±2) nm。根据 MTT 实验数据, PEG2000-ASP@Se 纳米对干细胞增殖能力影响较小。此外, 借助流式细胞术, 使用 Annexin V-FITC/PI 双染探针检查纳米是否会导致干细胞凋亡。并检测纳米作用下干细胞内活性氧水平变化情况, 从而进一步证实该纳米粒子具有较小的毒副作用。为探究该纳米粒子对干细胞分化潜能的影响作用, 使用茜素红染色定性分析干细胞成骨分化过程中产生的矿化结节。上述实验表明, PEG2000-ASP@Se 是一个具有良好细胞相容性, 毒性较小的促进干细胞成骨分化的纳米药物。

关键词: 硒纳米粒子; 间充质干细胞; 成骨分化

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)06-1107-05

Osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cell on the aspartic acid functional selenium nanoparticles

ZHENG Chuping, TAO Tao, ZHANG Yi, LI Lingjian, JI Hong, CHEN Fajiang

(Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436)

Abstract: In this study, aspartic acid (ASP) and PEG2000 functional selenium nanoparticles (PEG2000-ASP@Se) were used for stem cell research to identify their effects on mesenchymal stem cells (hMSCs) multiplication and differentiation. The morphology and surface state of PEG2000-ASP@Se were characterized by transmission electron microscope (TEM). The spherical PEG2000-ASP@Se presented monodisperse and homogeneous spherical structure with an average diameter of (154±2) nm. Before determining the role of PEG2000-ASP@Se in hMSCs osteogenic and differentiation, its cytotoxicity was assessed via MTT assay. In addition, the Annexin-V-FITC / propidium iodide double labeling kit was used to investigate if PEG2000-ASP@Se could induce apoptotic cell death with flow cytometry. The generation of ROS had been shown to cause cell apoptosis and drug-induced cytotoxicity. Therefore, the intracellular levels of ROS in PEG2000-ASP@Se treated hMSCs were measured by using dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Alizarin Red staining results suggested that PEG2000-ASP@Se nanoparticles can enhance the osteogenic differentiation of MSC. These results showed that the PEG2000-ASP@Se is a nano-drug with good cell compatibility.

Key words: Se-nanoparticles; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是多能细胞, 能分化成许多细胞类型。在适宜的环

境中可定向分化为心肌细胞、成骨细胞、软骨细胞及脂肪细胞等。大量实验研究表明, 间充质干细胞

收稿日期: 2018-03-19

基金项目: 广东省创新训练项目 (201710570096), 广州市教育科学规划课题 (201811666) 和广州医科大学大学生科技创新项目 (2017A001) 共同资助。

作者简介: 郑楚萍, 助理实验师。E-mail: chupingzh@163.com

* 通信作者: 陈法江, 讲师。E-mail: 810566937@qq.com

成骨细胞分化和成脂肪细胞分化两个过程之间存在着较大程度的可塑性,并且两者转化是相互^[1-2]。研究表明通过增强间充质干细胞成骨细胞分化并抑制其成脂肪细胞分化,是防止或治疗骨质疏松症等骨疾病的一个治疗机会^[3-4]。

与传统的分子药物相比,纳米药物的最大优点在于:纳米药物的小尺寸效应,易于细胞吸收而实现高药物效应;纳米药物的比表面积大,可负载更多的功能团或活性基团;纳米颗粒所具有的多孔、多层等结构特性,有利于实现药物的缓控释放等功能^[5]。利用纳米药物的小尺寸效应,易于干细胞吸收而实现高效促进干细胞成骨分化,可为利用MSCs治疗骨疾病奠定良好的基础^[6]。

天冬氨酸寡肽作为骨靶向载体或骨靶向功能基团,已应用于多种骨疾病药物的研究研发。最早于2000年,Kasugai等^[7]发现(Asp)₆是一个有效的骨靶向药物载体分子。后续大量研究均证实了天冬氨酸寡肽的骨靶向性,表明天冬氨酸分子具有亲骨性^[8-11]。聚乙二醇(PEG2000)涂覆纳米颗粒,有助于提高纳米的稳定性及其细胞相容性。纳米药物是当下药物基础研究的热点之一,目前较少研究其对干细胞成骨分化过程的影响。本研究中采用天冬氨酸修饰纳米硒,所得的纳米粒子是一款新颖的纳米药物,目前还鲜见研究报道,此外将其用于促进间充质干细胞的成骨分化,更是一个创新的研究。基于以上研究背景,本研究合成天冬氨酸(ASP)加以聚乙二醇(PEG2000)修饰的纳米硒(PEG2000-ASP@Se)并探讨其对间充质干细胞(hMSCs)的增殖与分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

亚硒酸钠(Na_2SeO_3)、天冬氨酸、硼氢化钠、茜素红染料等(分析纯,阿拉丁试剂公司),间充质干细胞培养基(Cyagen Biosciences Inc.), β -甘油磷酸酯、地塞米松等(分析纯, Sigma)。

Nano-ZS型纳米粒度仪(英国马尔文公司),HT7700日立透射电子显微镜,流式细胞仪(BD FACS Aria流式细胞仪)

1.2 方法

1.2.1 天冬氨酸修饰的纳米硒(PEG2000-ASP@Se)的合成与表征 反应流程(图1)显示,亚硒酸钠(Na_2SeO_3)配制成 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备溶液,并储存在 4°C 备用。常温下,分别取 $1\text{ mL Na}_2\text{SeO}_3$ 溶液、 1 mL NaBH 溶液($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 10 mL 超纯水混

合,在磁力搅拌作用下,将 2 mL 天冬氨酸溶液($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)缓慢滴加到以上混合溶液中;常温下搅拌 30 min 后,将 1 mL PEG2000 储备液滴加到反应体系中,继续搅拌 2 h ,得红色纳米溶胶(PEG2000-ASP@Se)。 4°C 储存液体溶胶;或室温放置 24 h ,离心,弃上清液,洗涤,干燥,得红色天冬氨酸修饰的纳米硒(PEG2000-ASP@Se)纳米颗粒。

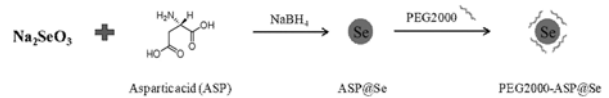


图1 天冬氨酸(ASP)加以聚乙二醇(PEG2000)修饰纳米硒(PEG2000-ASP@Se)的反应示意图

Figure 1 Flow diagram for synthesis of the aspartic acid and PEG2000 functional selenium nanoparticles (PEG2000-ASP@Se)

PEG2000-ASP@Se 纳米颗粒的尺寸分布通过 Nano-ZS 型纳米粒度进行测量。移取 $20\text{ }\mu\text{L PEG2000-ASP@Se}$ 纳米溶胶滴在铜网上,自然风干,使用透射电子显微镜(TEM)观察纳米粒子的形貌。

1.2.2 MTT 检测纳米粒子对干细胞增殖能力的影响 间充质干细胞(hMSCs)分别以药物浓度为 0 、 2 、 5 、 10 、 20 、 40 、 80 、 120 和 $160\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PEG2000-ASP@Se纳米溶液,孵育时间为 48 h 后,每个培养孔分别加入 $20\text{ }\mu\text{L MTT}$ ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),继续培养 4 h 后终止培养,弃去孔内培养液,分别加入 $150\text{ }\mu\text{L DMSO}$ (二甲基亚砷)并振荡 10 min 。而后使用酶标仪在 490 nm 的波长下测定各培养孔的吸光值。

1.2.3 流式细胞术检测纳米硒作用下干细胞的凋亡及细胞内活性氧(ROS)水平 hMSCs以 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PEG2000-ASP@Se纳米药物孵育 48 h 后,收集细胞并重新分散在含 $200\text{ }\mu\text{L Buffer}$ 缓冲溶液的 1.5 mL 离心管中。使用日本TOYOBO公司生产的Annexin V-FITC/PI双染试剂盒,按说明进行操作,并使用BD FACS Aria流式细胞仪检测干细胞的凋亡情况。

使用二氯二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针试剂盒检测 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PEG2000-ASP@Se纳米药物孵育 48 h 后干细胞内ROS含量。DCFH-DA的激发波为 488 nm 。

1.2.4 投射电子显微镜观察干细胞对纳米硒的吸收 hMSCs以 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PEG2000-ASP@Se纳米药物孵育 48 h 后,干细胞样品经 4% 多聚甲醛固定,梯度脱水,石蜡包埋,临界点干燥,切片等程序后,置于铜网上,使用投射电子显微镜(TEM)观察干

细胞内纳米的吸收情况。

1.2.5 茜素红染色 成骨诱导液(OS)的配制方法: DMEM (H) + 10% FBS + 10 mmol·L⁻¹ β-甘油磷酸酯 + 0.1 μmol·L⁻¹ 地塞米松 + 50 mg·L⁻¹ 维 C^[12]。

未给药干细胞作为正常对照样品, 1 μmol·L⁻¹ NaF 刺激的干细胞设为阳性对照^[12]。实验组 A、B 分别进行成骨诱导及成脂肪诱导。诱导过程中, 每 2~3 d 换 1 次诱导液并进行给药 1 次。实验组 A 诱导 7 d 后, 采用茜素红(ARS)染色矿化结节 hMSCs 先通过 4% 多聚甲醛固定 30 min 并用 PBS 缓冲溶液清洗 3 次, 接着使用 40 mmol·L⁻¹ 的 ARS 染液 (pH=4.2) 染色 30 min。染色后用 PBS 缓冲液洗去多余的染料, 将细胞置于光学显微镜下观察获取图片。

2 结果与分析

2.1 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子的形貌及尺寸分布

用投射电子显微镜 (TEM) 对 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子的形貌进行表征, 冬氨酸 (ASP) 加以聚乙二醇 (PEG2000) 修饰的纳米硒 (PEG2000-ASP@Se) 以球状存在, 分散性较好 (图 2A)。通过马尔文粒度仪检测纳米溶胶的粒径分布, 结果 (图 2B) 表明 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子的水合粒径约为 (154±2) nm。说明 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子的分散性较好、溶胶的稳定性较佳。

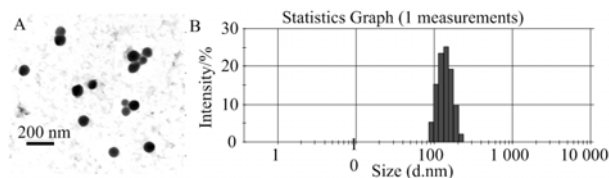


图 2 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子的 TEM 形貌图 (A), PEG2000-ASP@Se 纳米的粒径分布图 (B)

Figure 2 A and B is the TEM image and corresponding size distributions of PEG2000-ASP@Se, respectively

2.2 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子对干细胞增殖能力的影响

实验组分别以药物浓度为 0、2、5、10、20、40、80、120 和 160 μg·mL⁻¹ 的 PEG2000-ASP@Se 纳米溶液对干细胞进行药物作用 48 h。MTT 检测实验结果显示 PEG2000-ASP@Se 纳米对干细胞增殖能力的影响具有浓度依赖作用, 但总体的毒性较小 (图 3)。说明 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子与干细胞具有良好的细胞相容性。

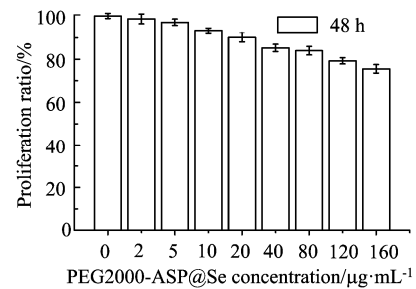
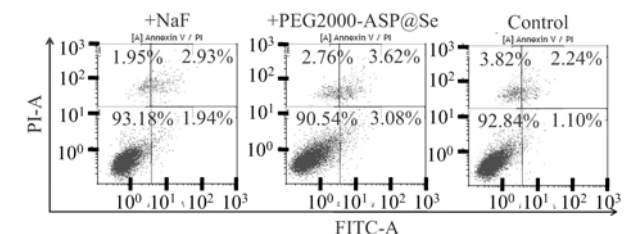


图 3 MTT 检测不同浓度的 PEG2000-ASP@Se 作用下, 干细胞的活性变化

Figure 3 Cytotoxicity in hMSCs exposed to PEG2000-ASP@Se for 48 h. The cytotoxicity was determined by MTT reduction method

2.3 流式细胞术检测 PEG2000-ASP@Se 对干细胞生长状态的影响

为了进一步检测 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子对干细胞生长状态的影响情况, 采用流式细胞术检测 PEG2000-ASP@Se 纳米药物作用下, hMSCs 细胞内活性氧 (ROS) 水平及细胞的凋亡情况。氟化物, 是具有明显疗效的一种骨形成促进剂, 是迄今临床上作用最强的骨同化物, 它能促进成骨细胞株的有丝分裂, 从而促进骨细胞的增生。常用的氟化物有 NaF、Na₂PO₃F 和肠衣片氟化钠 (EC-NaF) 等。其中氟化钠可以促进间充质干细胞的成骨分化, 常作为干细胞成骨分化阳性对照^[13]。实验细胞组以 NaF 药物作为阳性对照, 并设置空白对照组。

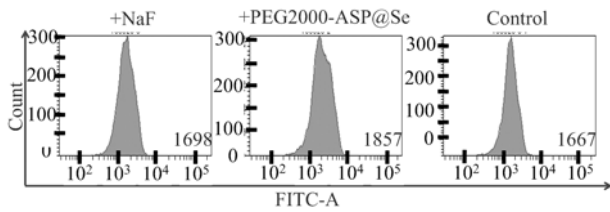


hMSCs as assessed by annexin V-FITC/PI fluorescent intensity, hMSCs were treated with 10 μg·mL⁻¹ PEG2000-ASP@Se for 48 h, and 1 mmol·L⁻¹ NaF-treatment was the positive control

图 4 流式细胞术检测 PEG2000-ASP@Se 作用下干细胞凋亡 Figure 4 Flow cytometry of stem cell apoptosis treated with PEG 2000 ASP@Se

细胞凋亡实验检测结果显示 (图 4), PEG2000-ASP@Se 纳米药物作用 48 h 后, 干细胞的凋亡或坏死比率比空白对照组分别增加了 1.39% 和 1.98%, 说明该纳米对干细胞的刺激较小。此外, 实验采用二氯二乙酸酯 (DCFH-DA) 测量了 PEG2000-ASP@Se 纳米作用下干细胞内的活性氧水平 (图 5)。与空白对照、NaF 实验组相比, PEG2000-ASP@Se 纳米作用下干细胞内的活性氧

水平并没有显著性增加。



In the tests, hMSCs were treated with $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PEG2000-ASP@Se for 48 h, and $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF-treatment was the positive control

图 5 流式细胞术检测 PEG2000-ASP@Se 作用下干细胞内活性氧水平

Figure 5 Effect on the endogenous ROS level of hMSCs by flow cytometry.

此外, 实验探究还采用了 TEM 观察 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子在干细胞内的定位(图 6)。干细胞经 PEG2000-ASP@Se 纳米药物孵育 48 h 后, 将 hMSCs 细胞制成细胞切片样品并通过透射电子显微镜观察干细胞内纳米粒子的定位情况。TEM 数据显示 PEG2000-ASP@Se 纳米主要存在 hMSCs 细胞质。

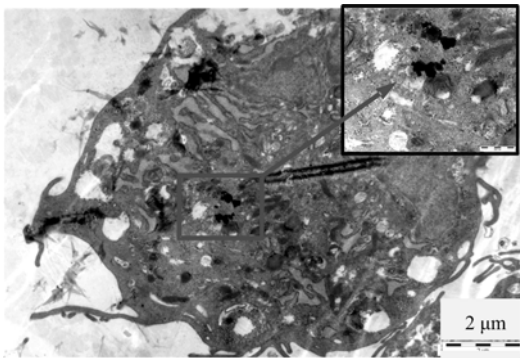


图 6 干细胞吸收 PEG2000-ASP@Se 纳米的细胞切片 TEM 图

Figure 6 TEM analysis of cellular uptake of PEG2000-ASP@Se ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) into hMSCs

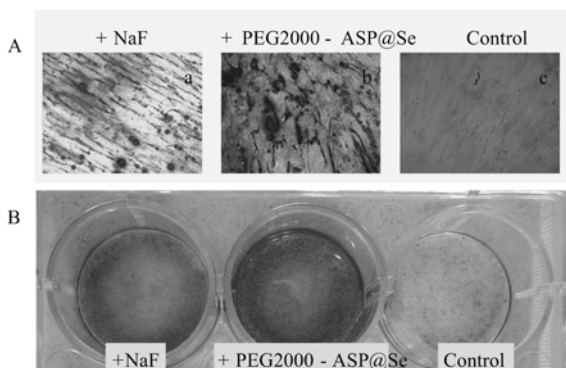


图 7 干细胞成骨分化染色图

Figure 7 Images of osteogenic differentiation visualized by Alizarin Red staining after 7 days of incubation

2.4 PEG2000-ASP@Se 对干细胞成骨分化能力影响

干细胞的成骨分化是骨形成的重要步骤。骨基质成熟及矿化是干细胞分化为成骨细胞的一个重要标志, 干细胞成骨分化过程中产生的矿化结节通常茜素红染料进行定性分析。在干细胞成骨诱导实验中, 间充质干细胞的培养采用添加成骨诱导剂(OS)的培养液, 并加以 PEG2000-ASP@Se 纳米进行药物作用。实验结果(图 7)显示 PEG2000-ASP@Se 纳米作用下干细胞的矿化程度显著提高, 说明该纳米粒子具有增强干细胞成骨分化的作用。

3 讨论与结论

实验中采用天冬氨酸加以 PEG2000 作为修饰剂, 在硼氢化钠的还原作用下, 合成了纳米硒粒子(PEG2000-ASP@Se)。为了观察纳米粒子的形貌, 取适量 PEG2000-ASP@Se 纳米溶胶稀释液, 滴在覆有碳膜的铜网上, 制成 TEM 样品。通过投射电子显微镜所获得的结果, 可观察到 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子具有球形的外貌特征, 在铜网上的分散性较好。采用马尔文粒度仪检测数据同样证明了该纳米的尺寸分布比较集中。说明实验合成的 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子尺寸较为均一, 在水溶液中的分散性好, 稳定性佳。

应用药物前, 非常有必要探讨研究其对细胞活性的影响。因此, 在研究过程中, 通过 MTT 细胞毒性来检测所制备的 PEG2000-ASP@Se 的细胞毒性。如图 3 所示, 随着纳米浓度的增加, 干细胞的存活率有所降低, 但在低浓度情况下, PEG2000-ASP@Se 具有较低的细胞毒性。因此, 在随后进行的细胞实验中主要采用 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的小剂量。采用 TEM 观察 PEG2000-ASP@Se 纳米作用后的干细胞切片, 可以清晰的观察到细胞吸收纳米后, 纳米粒子在细胞内的分布定位。从图 6 中可看到 PEG2000-ASP@Se 主要存在干细胞的细胞质中。由此可推测, PEG2000-ASP@Se 纳米粒子在干细胞内的活动主要在细胞质进行。

细胞凋亡坏死情况分析及其 ROS 产生水平的测量可用于评价药物的细胞毒副作用^[14]。实验过程中, 如细胞过度消化、吹打, 离心速度过快等不当的实验操作也可能引起细胞坏死、活性氧数据增加。为了更进一步研究 PEG2000-ASP@Se 纳米粒子对干细胞生长过程的影响, 采用流式细胞术分别检测了在纳米药物作用 48 h 后, 干细胞的凋亡坏死情况及生长过程中细胞内活性氧水平的变化情况。从实验结果可知(图 4), 纳米作用 48 h 后, 干细胞的凋

亡坏死比例并没有出现显著增加。此外图 5 显示, 干细胞内活性氧数值并没有受 PEG2000-ASP@Se 的作用而剧增。在排除不当操作引起的数据误差后, 实验中 PEG2000-ASP@Se 纳米作用下干细胞的生长状态并没有受到显著性的影响, 说明该纳米粒子适用于干细胞治疗。

为了验证 PEG2000-ASP@Se 纳米颗粒对干细胞分化潜能是否存在影响, 对纳米作用下的干细胞进行成骨分化诱导。成骨分化诱导结果使用茜素红进行染色定性分析。实验结果显示, 在 PEG2000-ASP@Se 纳米作用下, 干细胞的成骨分化效果较为显著, 跟阳性对照 NaF 实验组效果近似。由此可推测该纳米粒子可以促进干细胞成骨分化作用。

干细胞具有多项分化潜能, 其分化机制多样且复杂。设计并制备了天冬氨酸 (ASP) 加以聚乙二醇 (PEG2000) 修饰的纳米硒 (PEG2000-ASP@Se), 研究了该纳米粒子对干细胞活性、生长及成骨分化的影响, 为进一步探索该纳米粒子促进干细胞成骨分化的细胞机制提供了实验基础。在后续工作中, 将进一步考察 PEG2000-ASP@Se 纳米作用下干细胞成骨分化特异性基因的表达, 以及相关细胞信号通路的靶基因蛋白活性和转录水平变化情况。

参考文献:

- [1] QIAN W Y, GONG L Q, CUI X, et al. Nanotopographic regulation of human mesenchymal stem cell osteogenesis[J]. ACS Appl Mater Inter, 2017, 9(48): 41794-41806.
- [2] SYAMA S, ABY C P, MAEKAWA T, et al. Nano-bio compatibility of PEGylated reduced graphene oxide on mesenchymal stem cells[J]. 2D Materials, 2017, 4(2): 025066.
- [3] KIM T, LEE N, ARIFIN D R, et al. In vivo micro-CT imaging of human mesenchymal stem cells labeled with gold-poly-L-lysine nanocomplexes[J]. Adv Funct Mater, 2017, 27(3): 1604213.
- [4] 彭红菊. 仿生纳米纤维 HAp/CTS 对间充质干细胞的成骨分化作用研究 [D]. 上海: 东华大学, 2012.
- [5] 郑楚萍. 功能化纳米粒子对间充质干细胞分化的影响及细胞成像的应用[D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [6] ZHENG C P, WANG J S, LIU Y N, et al. Functional selenium nanoparticles enhanced stem cell osteoblastic differentiation through BMP signaling pathways[J]. Adv Funct Mater, 2014, 24(43): 6872-6883.
- [7] KASUGAI S, FUJISAWA R, WAKI Y, et al. Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)₆ conjugation[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(5): 936-943.
- [8] GUAN M, YAO W, LIU R W, et al. Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass[J]. Nat Med, 2012, 18(3): 456-462.
- [9] ZHANG G, GUO B S, WU H, et al. A delivery system targeting bone formation surfaces to facilitate RNAi-based anabolic therapy[J]. Nat Med, 2012, 18(2): 307-314.
- [10] WANG D, MILLER S C, SHLYAKHTENKO L S, et al. Osteotropic peptide that differentiates functional domains of the skeleton[J]. Bioconjugate Chem, 2007, 18(5): 1375-1378.
- [11] YARBROUGH D K, HAGERMAN E, ECKERT R, et al. Specific binding and mineralization of calcified surfaces by small peptides[J]. Calcified Tissue Int, 2010, 86(1): 58-66.
- [12] LEE W C, LIM C H Y X, SHI H, et al. Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide[J]. ACS Nano, 2011, 5(9): 7334-7341.
- [13] LIU D D, YI C Q, ZHANG D W, et al. Inhibition of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells by carboxylated carbon nanotubes[J]. ACS Nano, 2010, 4(4): 2185-2195.
- [14] NEL A E, MÄDLER L, VELEGOL D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface[J]. Nat Mater, 2009, 8(7): 543-557.