

甲基丙烯酰化明胶/ β -磷酸三钙/黑色素纳米颗粒复合水凝胶对小鼠胚胎成骨细胞促成骨和抗活性氧作用的影响

张鲁岳^{1,2}, 黄 萌³, 张 敏⁴, 王朝祥^{1,2}, 刘醒钊^{1,2}, 刘天驰^{1,2}, 王碧莹², 曹均凯²

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心口腔科, 北京 100853; ³解放军总医院第六医学中心口腔科, 北京 100048; ⁴解放军总医院第八医学中心口腔科, 北京 100091

摘要: **背景** 通过组织工程技术将甲基丙烯酰化明胶(gelatin methacryloyl, GelMA)与具有良好骨传导性的 β -磷酸三钙(β -tricalcium phosphate, β -TCP)复合, 开发可植入骨缺损区域的材料, 有望解决骨缺损的修复与功能重建难题。**目的** 合成GelMA/ β -TCP/黑色素纳米颗粒(melanin nanoparticles, MNPs)复合水凝胶, 并探究其对MC3T3-E1细胞的生物相容性、抗活性氧活性、生物学特性和促成骨分化作用。**方法** 采用5% GelMA、1% β -TCP和1 mg/mL MNPs, 在0.25% 苯基-2, 4, 6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂(光引发剂)和405 nm 光下合成单纯GelMA、GelMA/ β -TCP(GT)、GelMA/MNPs(GM)和GelMA/ β -TCP/MNPs(GTM)4组材料, 对其进行扫描电镜表征其微观结构。提取4组材料浸提液, 并以普通培养基作为空白对照组, 检测各组材料的生物相容性(CCK-8法、活死细胞染色、TUNEL染色)、抗活性氧活性(DCFH-DA荧光染色)、生物学特性(鬼笔环肽染色、Ki-67免疫荧光染色、划痕实验)及成骨作用(RUNX2和OCN免疫荧光染色、碱性磷酸酶染色、茜素红染色及实时荧光定量PCR检测成骨相关基因表达)。**结果** GTM水凝胶冻干后呈现出粗糙的三维孔隙结构, 孔径大小为 $(103.61 \pm 16.90) \mu\text{m}$, 有利于细胞的黏附和增殖。GTM水凝胶有良好的生物相容性, CCK-8法、活死细胞染色、TUNEL染色检测结果显示各组水凝胶均未见明显细胞毒性。细胞内DCFH-DA染色结果表明, 在GelMA中加入MNPs, 可提高材料的抗细胞内活性氧能力($P < 0.05$)。鬼笔环肽染色显示GTM水凝胶可提高细胞黏附性能; 划痕实验表明其相较于对照组可以有效促进细胞迁移($P < 0.001$), Ki-67免疫荧光染色显示其相较于对照组和其他材料组可以促进细胞增殖($P < 0.05$)。ALP染色结果显示, 诱导7 d后GTM水凝胶组的ALP活性高于对照组及其他材料组; 诱导14 d后, GTM水凝胶组诱导形成的钙结节数量多于其他组, 覆盖面积也更大。RUNX2和OCN免疫荧光和qRT-PCR结果显示, 相较于对照组和其他材料组, GTM水凝胶具有最强的成骨诱导能力($P < 0.001$)。**结论** GTM水凝胶具有良好的生物相容性和抗活性氧性能, 可增强细胞增殖、迁移和黏附, 促进MC3T3-E1细胞成骨分化, 在骨组织工程领域具有应用前景。

关键词: β -磷酸三钙; 黑色素; 水凝胶; 活性氧; 成骨

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2026)05-0473-11

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25122301

引用本文: 张鲁岳, 黄萌, 张敏, 等. 甲基丙烯酰化明胶/ β -磷酸三钙/黑色素纳米颗粒复合水凝胶对小鼠胚胎成骨细胞促成骨和抗活性氧的影响 [J]. 解放军医学院学报, 2026, 47 (5): 473-483.

Effects of GelMA/ β -tricalcium-phosphate/melanin nanoparticle composite hydrogel on osteogenesis promotion and reactive oxygen species scavenging in mouse embryonic osteoblasts

ZHANG Luyue^{1,2}, HUANG Meng³, ZHANG Min⁴, WANG Zhaoxiang^{1,2}, LIU Xingzhao^{1,2}, LIU Tianchi^{1,2}, WANG Biying², CAO Junkai²

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Stomatology, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Department of Stomatology, the Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ⁴Department of Stomatology, the Eighth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100091, China

Corresponding author: CAO Junkai. Email: jkcao301@163.com

Abstract: Background By integrating gelatin methacryloyl (GelMA) with osteoconductive β -tricalcium phosphate (β -TCP) via tissue engineering strategies, we developed an implantable scaffold designed for bone defect regions. This composite material holds promise for addressing the challenges associated with bone repair and functional reconstruction. **Objective** To synthesize a GelMA/ β -TCP/melanin nanoparticle (MNP) composite hydrogel and investigate its biocompatibility, reactive oxygen species (ROS)-scavenging capacity, biological properties, and osteogenic differentiation potential in MC3T3-E1 cells. **Methods** Four types of hydrogels were prepared under 0.25% LAP (photoinitiator) and 405 nm light: GelMA, GelMA/ β -TCP, GelMA/MNPs, and GelMA/

收稿日期: 2025-12-23

第一作者: 张鲁岳, 在读硕士, 医师. Email: 2583232270@qq.com

通信作者: 曹均凯, 博士, 主任医师. Email: jkcao301@163.com

β -TCP/MNPs, using 5% GelMA, 1% β -TCP, and 1 mg/mL MNPs. The microstructures of freeze-dried samples were characterized by scanning electron microscopy. Extracts from the four hydrogel groups were collected, with complete culture medium serving as a blank control. Biocompatibility was assessed using CCK-8 assay, live/dead staining, and TUNEL staining; anti-ROS activity was evaluated with DCFH-DA staining; biological property regulation was determined *via* phalloidin staining, Ki-67 immunofluorescence, and scratch wound assay; and osteogenic potential was assessed by RUNX2 and OCN immunofluorescence staining. **Results** Freeze-dried GelMA/ β -TCP/MNP hydrogel exhibited a rough, three-dimensional porous structure with an average pore size of $(103.61 \pm 16.90) \mu\text{m}$, favorable for cell adhesion and proliferation. Biocompatibility assays indicated no obvious cytotoxicity in any group. Incorporation of MNPs into GelMA significantly enhanced intracellular ROS-scavenging activity. Biological property evaluations showed increased cell adhesion (phalloidin staining), promoted cell migration (scratch assay), and enhanced cell proliferation (Ki-67) in the GelMA/ β -TCP/MNP group. Osteogenesis-related staining revealed that GelMA/ β -TCP/MNP hydrogel exhibited the strongest osteoinductive ability compared with the control and other material groups. **Conclusion** GelMA/ β -TCP/MNP hydrogel demonstrates excellent biocompatibility and effective ROS-scavenging activity, and enhances cell adhesion, migration, and proliferation, promote osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells, indicating promising potential for bone tissue engineering applications.

Keywords: β -tricalcium phosphate; melanin nanoparticles; hydrogel; reactive oxygen species; osteogenesis

Cited as: Zhang LY, Huang M, Zhang M, et al. Effects of GelMA/ β -tricalcium-phosphate/melanin nanoparticle composite hydrogel on osteogenesis promotion and reactive oxygen species scavenging in mouse embryonic osteoblasts[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2026, 47(5): 473-483.

骨缺损通常由严重外伤、外科切除、退行性病变或先天性畸形引起,其修复与功能重建依旧是临床领域亟待解决的难题^[1]。目前,自体骨移植和同种异体骨移植被认为是治疗此类缺损的“金标准”^[2]。然而,此类方法受到多方面限制,包括供骨来源不足、供区组织坏死、免疫排斥反应以及供体带来的感染风险等^[3]。因此,通过组织工程技术开发可植入骨缺损区域的材料是一种有前景的替代策略^[4]。本研究拟将甲基丙烯酸酐化明胶(gelatin methacryloyl, GelMA)与具有良好骨传导性的 β -磷酸三钙(β -tricalcium-phosphate, β -TCP)及具备自由基清除能力的黑色素纳米颗粒(melanin nanoparticles, MNPs)进行复合,以期制备出孔隙率高、材料结构稳定、适合成骨细胞生长且具有较好骨诱导性的水凝胶材料。通过对其理化性质、生物相容性和生物学特性调控和成骨作用的相关研究,探索一种具有良好抗活性氧能力的促成骨材料,为骨缺损修复提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GelMA冻干粉(上普生物);苯基双(2, 4, 6-三甲基苯甲酰基)氧化膦[phenylbis(2, 4, 6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide, LAP](上普生物); β -磷酸三钙(生物医用级, β 相磷酸三钙 $\geq 98\%$, 美国Sigma公司); β -甘油磷酸钠(纯度 $\geq 99.0\%$, 美国Sigma公司);电热恒温水浴锅(HWS-12, 上海一恒科学仪器有限公司);精密电子天平(MS603S, 上海天能科技有限公司);二氧化碳培

养孵育箱(德国GMBH公司);光学显微镜(日本Olympus公司);倒置显微镜及照相系统(日本Nikon公司);超净工作台(苏州净化设备有限公司);移液器(德国Eppendorf公司);细胞培养皿(美国Corning公司); α -MEM培养基、胎牛血清、双抗、胰酶(美国Sigma公司);OriCell细胞成骨诱导分化培养基试剂盒(中国, OriCell公司)。

1.2 黑色素纳米颗粒的提取与表征

取新鲜的墨鱼解剖并获得墨囊,从解剖的墨囊中提取墨汁,以2 000转/min离心5 min,弃去上清液以去除大颗粒杂质,在4℃下以12 000转/min的转速离心10 min,收集沉淀以获得MNPs。将MNPs用去离子水洗涤3次,悬浮于去离子水中以备使用。取5 μL 稀释后的MNPs悬浮液,滴加至超薄碳膜铜网上,在室温下自然干燥。使用透射电子显微镜在100 kV加速电压下观察MNPs的形貌。另取适量稀释后的MNPs悬浮液,超声处理30 min以确保分散均匀。使用一次性注射器吸取适量分散液,经0.45 μm 水系滤膜过滤后注入洁净的比色皿中。实验在25℃恒温条件下进行,使用动态光散射仪,选择波长为633 nm激光光源,检测角度为90°,每个样品平行测量3次。

1.3 水凝胶的制备和浸提液的制备

向0.5 g GelMA中加入9 mL PBS溶液,75℃溶解后,加入1 mL LAP溶液,配制成GelMA工作液(5% GelMA, 0.25% LAP)。分别向工作液中加入1% β -TCP纳米颗粒得到GT组溶液;加入MNPs使其终浓度为1 mg/mL,得到GM组溶液;同时加入上述两种组分,得到GTM组溶液;将各组溶液

充分涡旋后, 超声处理 1 h。将 GelMA、GT、GM、GTM 溶液在 405 nm 紫外光下交联, 得到 4 组水凝胶材料。按 1 : 5 的比例用培养基浸提各组水凝胶材料 24 h, 得到 4 组浸提液。

1.4 扫描电子显微镜观察水凝胶的形态

采用扫描电子显微镜对 GelMA、GT、GM 和 GTM 水凝胶的微观多孔结构进行观察。首先, 将溶胀平衡后的水凝胶样品进行冷冻干燥。随后, 将干燥的样品切开以暴露其内部截面, 并用导电胶固定在样品台上。使用离子溅射仪在样品表面喷镀一层厚度约为 10 nm 的金膜。最后, 用 ZEISS Sigma 300 型场发射扫描电子显微镜, 在 30 kV 的加速电压下, 观察样品的形貌并采集图像。

1.5 水凝胶材料的生物相容性检测

1.5.1 活死细胞染色检测细胞毒性 MC3T3 细胞以每孔 2×10^4 个的密度接种于 24 孔板内, 待细胞贴壁后, 4 组分别加入相应的浸提液, 以完全培养基作为对照组, 培养 1 d 后进行活死细胞染色: 将 2.5 μ L Calcein-AM 原液和 12.5 μ L PI 原液加入 5 mL PBS; 在每个样品孔内加入 300 μ L 工作液, 置于 37°C 下避光孵育 30 min, 经 PBS 清洗后, 在荧光倒置显微镜下观察并记录各组细胞的染色情况。

1.5.2 CCK-8 检测细胞增殖 MC3T3 以每孔 1×10^3 密度接种 96 孔板内, 待细胞贴壁, 4 组实验组分别加入相应的浸提液并用完全培养基设置对照组, 在 1 d、3 d、5 d、7 d 时间点进行 CCK-8 检测; 每孔加入 10 μ L CCK-8 工作液, 置于 37°C 下避光孵育 1 h, 用酶标仪测定各组细胞在 450 nm 处的吸光度。

1.5.3 TUNEL 染色检测细胞凋亡 将 MC3T3 细胞以每孔 8×10^3 个的密度接种 48 孔板内, 待细胞贴壁, 向 4 组实验组分别加入相应的浸提液, 以完全培养基作为对照组。培养 3 d 后, 采用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒进行检测: PBS 清洗 1 次, 加入适量 4% 多聚甲醛, 4°C 固定 30 min; PBS 清洗 2 次, 加入适量 0.2% TritonX-100, 室温通透 30 min, PBS 清洗 2 次; 按说明书配制 TUNEL 工作液, 每孔加入 10 μ L TUNEL 反应液, 使反应液均匀覆盖样本。37°C 避光孵育 1 h; 弃去 TUNEL 反应液, PBS 清洗 2 次后, 再用 0.1% TritonX-100 (含 5 mg/mL BSA) 清洗 3 次, 每次 5 min。每个样本加入适量浓度为 5 μ g/mL 的 DAPI 染液, 室温避光孵育 5 min。染色完成后, 弃去 DAPI 染液, PBS 清洗 2 次, 每次 5 min; 向样本区域加 100 μ L PBS 以保持样本湿

润, 立即在荧光显微镜下观察并记录各组细胞的染色情况。

1.5.4 Ki67 免疫荧光染色检测细胞增殖 24 孔板内置爬片, MC3T3 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种, 待细胞贴壁后, 向 4 组实验组分别加入相应的浸提液, 并以完全培养基设置对照组。培养 1 d 后吸除培养基, PBS 清洗 3 次; 加入适量 4% 多聚甲醛, 室温固定 20 min, PBS 清洗 3 次; 加入适量 0.2% TritonX-100, 室温通透 30 min, PBS 清洗 3 次; 5% 牛血清白蛋白于 37°C 封闭 30 min 后, 滴加稀释的 Ki67 一抗, 4°C 孵育过夜; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加对应荧光二抗, 室温避光孵育 1 h; DAPI 复染细胞核, 封片, 倒置荧光显微镜下观察并记录各组细胞的染色情况。

1.6 水凝胶材料的生物学作用

1.6.1 划痕实验检测细胞迁移 MC3T3 细胞以 1×10^6 /孔的密度接种于 6 孔板, 培养至 90% 融合度后, 用 200 μ L 无菌枪头垂直划痕, PBS 清洗去除脱落细胞, 向 4 组实验组分别加入相应的无血清浸提液, 用无血清培养基设置对照组。于 0 h、6、12、24 h 在倒置显微镜下拍摄各组的划痕区域。使用 ImageJ 软件测量划痕面积, 细胞迁移率计算公式为: $[(\text{初始面积} - t \text{ 时间面积}) / \text{初始面积}] \times 100\%$ 。

1.6.2 DCFH-DA 检测水凝胶材料抗活性氧性能 MC3T3 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于 24 孔板, 待细胞贴壁后加入 200 μ mol/L H_2O_2 溶液刺激 6 h; 吸除培养基, 向 4 个实验组分别加入相应的浸提液; 对照组加入完全培养基。培养 1 d 后吸除培养基, PBS 清洗 1 次; 用无血清培养基将 DCFH-DA 探针按 1 : 1 000 稀释, 每孔加入 300 μ L 工作液, 于 37°C 细胞培养箱内孵育 20 min; 用无血清培养基清洗 3 次, 加入 Hoechst 染液标记细胞核, 于荧光显微镜下观察并记录各组细胞的染色情况。

1.6.3 鬼笔环肽染色检测细胞骨架 24 孔板内置爬片, MC3T3 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种, 向 4 组实验组分别加入相应的浸提液, 用完全培养基设置对照组。培养 3 d 后吸除培养基, PBS 清洗 3 次; 加入适量 4% 多聚甲醛, 室温固定 20 min, PBS 清洗 3 次; 加入适量 0.2% TritonX-100, 室温通透 10 min, PBS 清洗 3 次; 按照说明书配制鬼笔环肽工作液, 每孔加入 300 μ L 工作液, 室温孵育 20 min, PBS 清洗 3 次; 爬片封片, 倒置荧光显微镜下观察并记录各组细胞的染色情况。

1.6.4 免疫荧光染色检测成骨相关因子表达 24

孔板内置爬片, MC3T3 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种, 待细胞贴壁后, 向 4 个实验组分别加入相应的成骨诱导浸提液, 以普通成骨诱导培养基作为对照组。培养 7 d 后吸除培养基, PBS 清洗 3 次; 加入适量 4% 多聚甲醛, 室温固定 20 min, PBS 清洗 3 次; 加入适量 0.2% TritonX-100, 室温通透 30 min, PBS 清洗 3 次; 5% 牛血清白蛋白 37°C 封闭 5 min; 滴加稀释的 RUNX2 和 OCN 一抗, 4°C 孵育过夜; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 与对应荧光二抗室温避光孵育 1 h; DAPI 复染标记细胞核, 爬片封片, 倒置荧光显微镜下观察并记录各组细胞的染色情况。

1.6.5 碱性磷酸酶染色检测碱性磷酸酶表达 MC3T3 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于 24 孔板, 待细胞贴壁后, 向 4 个实验组分别加入相应的成骨诱导浸提液, 以普通成骨诱导培养基作为对照组, 培养 7 d 后吸除培养基, PBS 清洗 3 次, 加入适量 4% 多聚甲醛室温固定 20 min; PBS 清洗 3 次, 加入适量 BCIP/NBT 染液避光孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 倒置显微镜下观察并记录各组细胞的染色情况。

1.6.6 茜素红染色检测钙结节形成 MC3T3 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 向 4 个实验组分别加入相应的成骨诱导浸提液, 以普通成骨诱导培养基作为对照组。培养 14 d 后吸除培养基, PBS 清洗 3 次, 加入适量 4% 多聚甲醛室温固定 20 min; PBS 清洗 3 次, 加入适量茜素红染液孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 倒置显微镜下观察并记录各组细胞的染色情况。

1.6.7 qRT-PCR 检测成骨相关基因的表达 MC3T3 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 向 4 个实验组分别加入相应的成骨诱导浸提液, 以普通成骨诱导培养基作为对照组, 培养 7 d 后吸除培养基, PBS 清洗 3 次, 按照试剂盒说明书使用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA, 并通过 NanoDrop 2000 微量分光光度计进行定量。取 1 μ g 总 RNA, 利用 Toyobo 转录酶试剂盒逆转录生成互补 DNA(cDNA), 并以所得 cDNA 作为模板, 使用 Toyobo SYBR Green 试剂进行 qRT-PCR 检测目标基因表达。所有 mRNA 相对表达量均以内参 β -肌动蛋白进行归一化, 并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算实验组相对于对照组的表达倍数变化。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析。所有实

验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有实验均独立重复至少 3 次, 样本测量顺序随机以保证独立性。数据正态性采用 Shapiro-Wilk 检验验证。方差齐性采用 Levene 检验验证。满足上述假设后, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Tukey's 事后检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 材料表征

扫描电镜观察 GelMA 组表面相对光滑, 呈现松散多孔结构, 孔径大小为 $(330.88 \pm 104.76) \mu\text{m}$; 单纯加入 β -TCP 后, 水凝胶表面更加粗糙, 孔隙尺寸减小, 孔径为 $(169.73 \pm 32.93) \mu\text{m}$; 单纯加入 MNPs 后, 水凝胶表面更加粗糙, 孔隙尺寸变化不大, 孔径大小为 $(327.55 \pm 90.53) \mu\text{m}$; 同时加入 β -TCP 和 MNPs 后, 水凝胶孔径进一步缩小, 孔径大小为 $(103.61 \pm 16.90) \mu\text{m}$, 显著小于其他组($P < 0.001$)。冻干后的 GTM 水凝胶呈现出粗糙的三维孔隙结构(图 1A)。

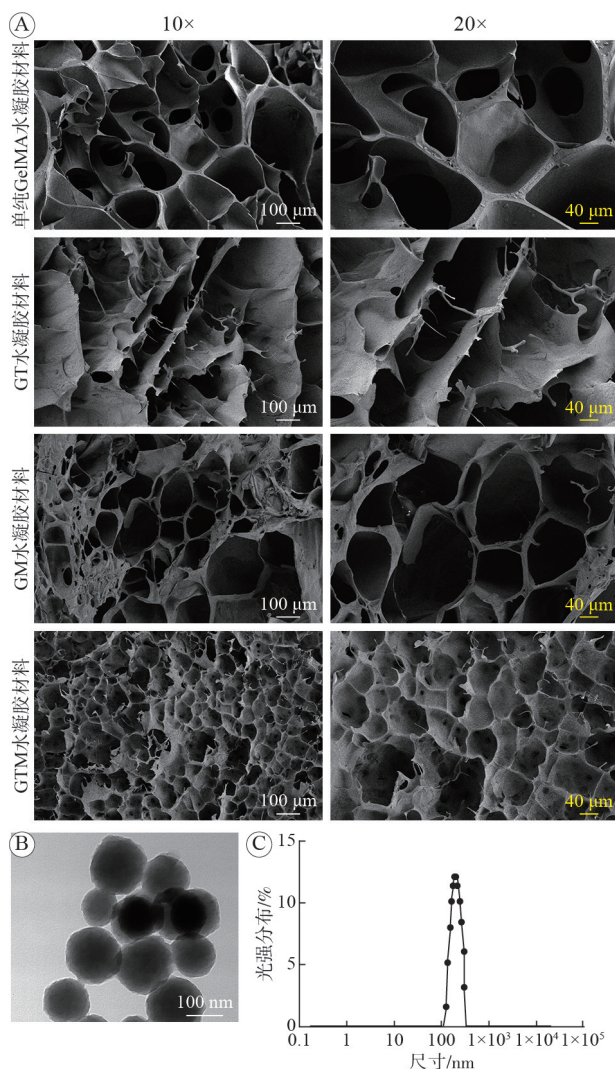
透射电镜观察结果显示, 所制备的 MNPs 呈近似球形, 颗粒边界清晰、分散均匀, 无明显团聚现象(图 1B)。颗粒表面较为致密, 局部可见微细纹理, 推测与黑色素聚合时的芳香结构堆叠有关。粒径分析结果(图 1C)显示, 曲线呈单峰分布, 峰形窄且平滑, 多分散指数(PDI) < 0.2 , 表面 MNPs 尺寸均匀、分散性良好, 在液体分散体系中稳定且均一, MNPs 的平均物理粒径约为 $(117.68 \pm 13.38) \text{nm}$ 。综合透射电镜与粒径分析结果可知, 所制备的 MNPs 粒径适中、形貌规整、分散性能优异, 为后续在水凝胶或生物体系中的应用提供了良好基础。

2.2 活死细胞染色法检测细胞毒性

图 2 展示了 MC3T3 细胞在各组浸提液中培养 1 d 后的活死细胞染色结果, 其中, 活细胞被钙黄绿素染为绿色, 死细胞被碘化丙啶染为红色。荧光图像显示, 在所有实验组中, 大部分细胞均呈现明亮的绿色荧光, 并保持铺展形态, 仅观察到少量红色荧光斑点。与对照组相比, 各材料组的细胞密度和细胞形态无明显差异。

2.3 Ki-67 免疫荧光染色检测细胞增殖

通过 Ki-67 免疫荧光染色对培养第 5 d 的细胞增殖状态进行了检测(图 3A)。Ki-67 是一种与细胞增殖相关的核抗原, 其阳性信号(绿色荧光)可直观



A: 各组水凝胶扫描电镜图像; B: MNPs透射电镜图像(放大倍数: 100 000×); C: MNPs粒径分布

图 1 四组水凝胶及黑色素纳米颗粒的表征

Fig. 1 Characterization of four groups of hydrogels and melanin nanoparticles

反映处于增殖周期的细胞比例;细胞核由DAPI(蓝色)标记。与对照组相比,GTM组的Ki-67荧光强度更高。使用ImageJ软件对Ki-67阳性细胞率进行定量分析,统计结果显示,GTM组的Ki-67阳性细胞率显著高于对照组($P<0.05$)。

2.4 CCK-8法检测细胞增殖

CCK-8检测结果(图3B)显示了材料对细胞增殖的影响。在培养前期(1~3 d),各材料组与对照组的细胞增殖速率相近;但在培养5 d和7 d时,GTM组的细胞增殖活性显著高于对照组($P<0.05$)。

2.5 TUNEL染色检测细胞凋亡

为评估材料对细胞凋亡的影响,本研究通过TUNEL染色检测了MC3T3细胞在各组浸提液中培养3 d后的凋亡情况(图4)。绿色荧光(FITC标记)指示TUNEL阳性细胞,即细胞凋亡;蓝色荧光(DAPI染色)指示所有细胞的细胞核。荧光图像显示,在对照组与各材料实验组仅能观察到少量的TUNEL阳性细胞(绿色荧光),且呈零星分布,其数量在各组间均处于极低水平。与对照组相比,材料实验组的TUNEL阳性细胞数量未增加,绝大多数细胞核形态完整、染色均匀,未见凋亡特征(如核固缩、核碎裂)。

2.6 划痕实验检测细胞迁移能力

划痕实验检测了材料对细胞迁移能力的影响(图5)。划痕后0 h,各实验组与对照组的初始划痕宽度基本一致。培养24 h后,各材料组的划痕闭合速度均快于对照组。通过ImageJ软件对划痕面积进行量化分析显示,24 h后,对照组的划痕愈合率约为 $21\pm 5\%$,而GTM组的愈合率为 $50\pm 3\%$,显著高于对照组($P<0.001$)。

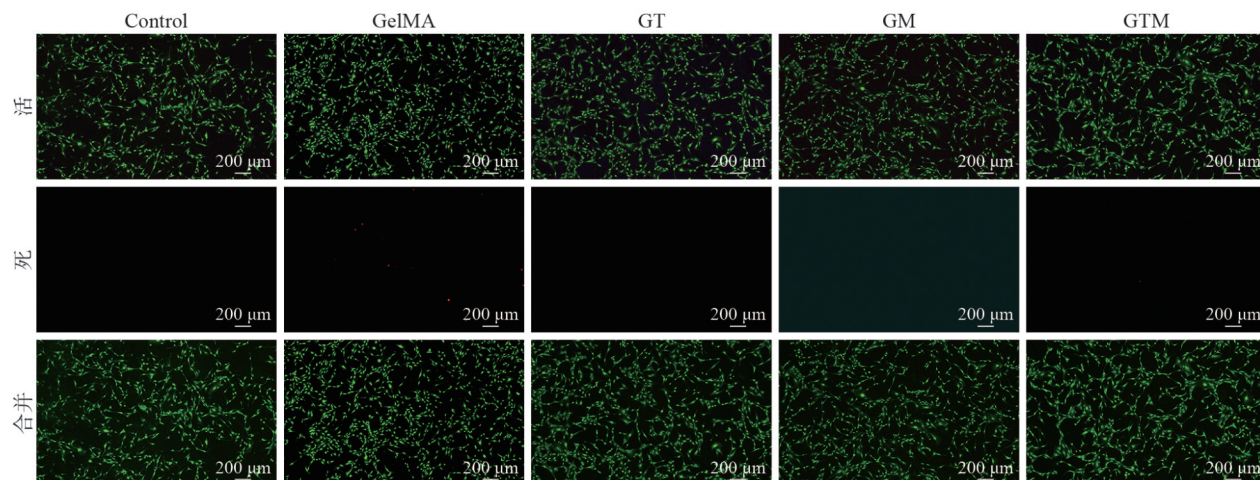
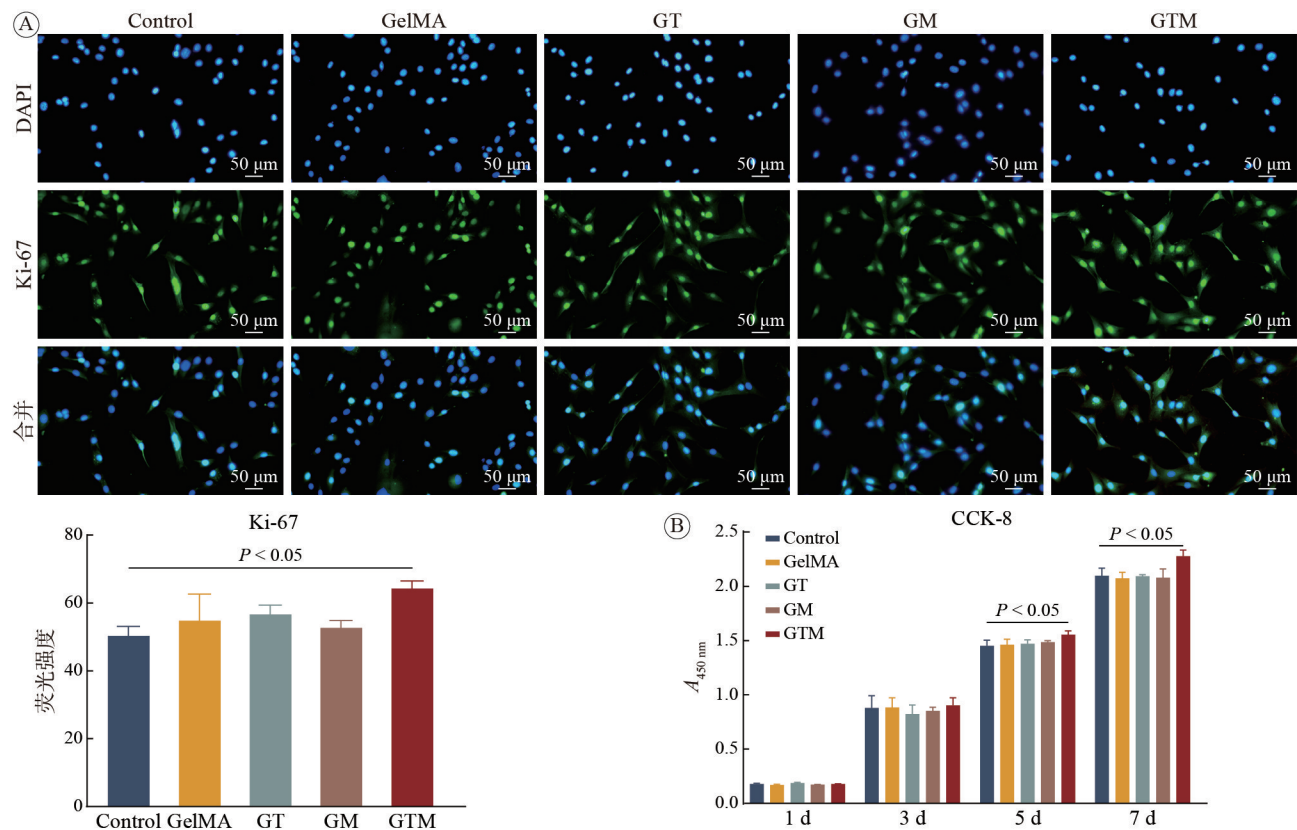


图 2 活死细胞染色检测细胞毒性(放大倍数: 4×)

Fig. 2 Cytotoxicity assessment by live/dead cell staining (4×)



A: Ki-67免疫荧光染色检测细胞增殖(放大倍数: 20×); B: CCK-8法检测细胞活性

图 3 Ki-67免疫荧光染色和CCK-8法检测细胞增殖

Fig. 3 Detection of cell proliferation by Ki-67 immunofluorescence staining and CCK-8 assay

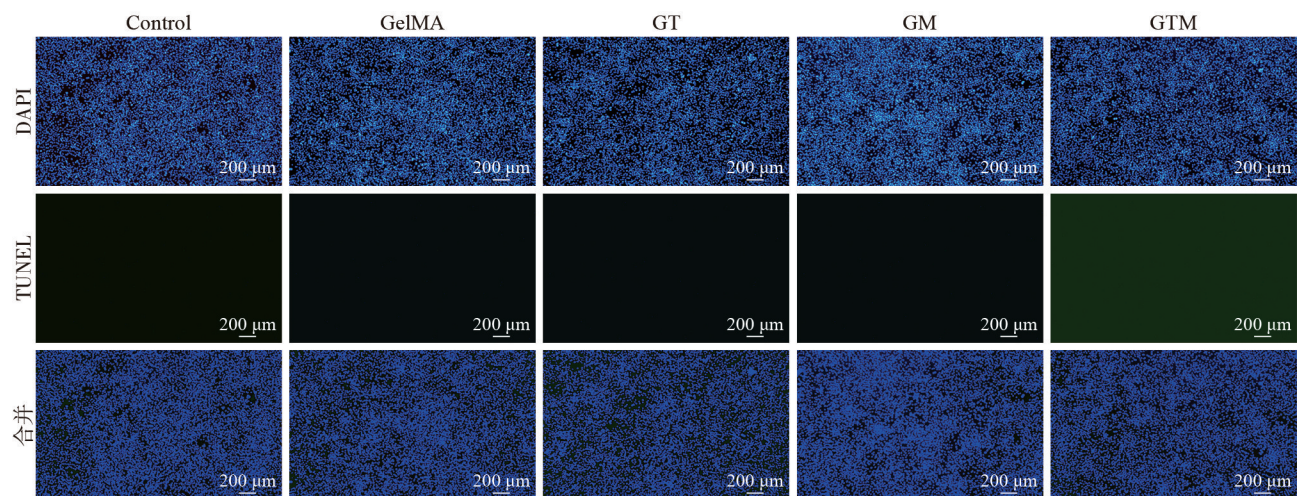


图 4 TUNEL染色检测细胞凋亡(放大倍数: 4×)

Fig. 4 Detection of cell apoptosis by TUNEL staining (4×)

2.7 DCFH-DA法检测水凝胶材料抗活性氧性能

采用DCFH-DA荧光探针法检测了材料对 H_2O_2 诱导的细胞内活性氧的清除效果(图6)。经 H_2O_2 诱导后,对照组细胞内绿色荧光强度增强,提示细胞内活性氧水平升高。与对照组相比,GM组和GTM组细胞的绿色荧光强度显著减弱($P < 0.01$)。

2.8 鬼笔环肽染色检测细胞骨架

图7 GTM组的F-actin骨架结构较对照组增强。GTM组细胞中可见粗大且排列有序的应力纤维,沿细胞长轴定向延伸,并形成密集的周边束;相比之下,对照组细胞的F-actin纤维较细,排列松散,部分细胞呈现不规则的团块状分布。此外,

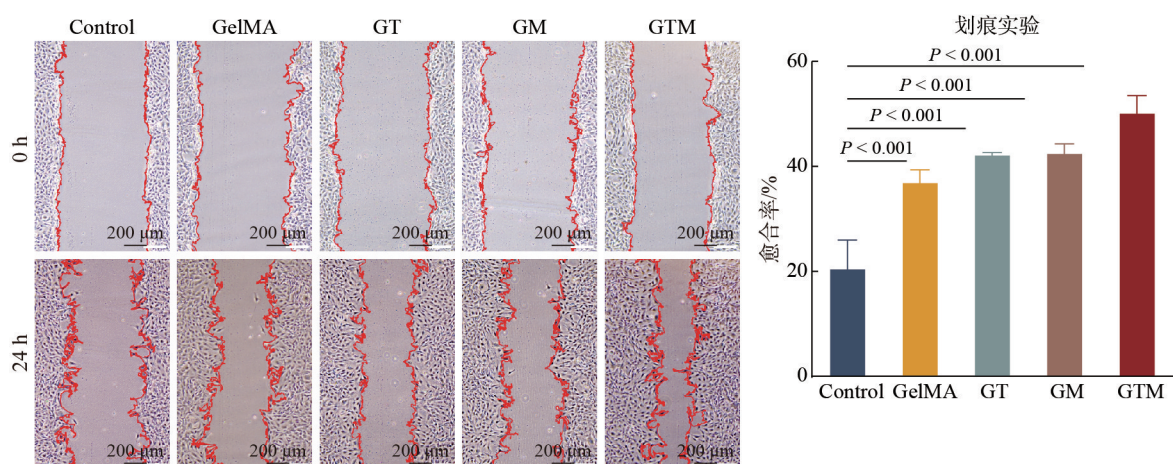


图5 划痕实验检测细胞迁移能力(放大倍数: 4×)

Fig. 5 Detection of cell migration by wound healing assay (4×)

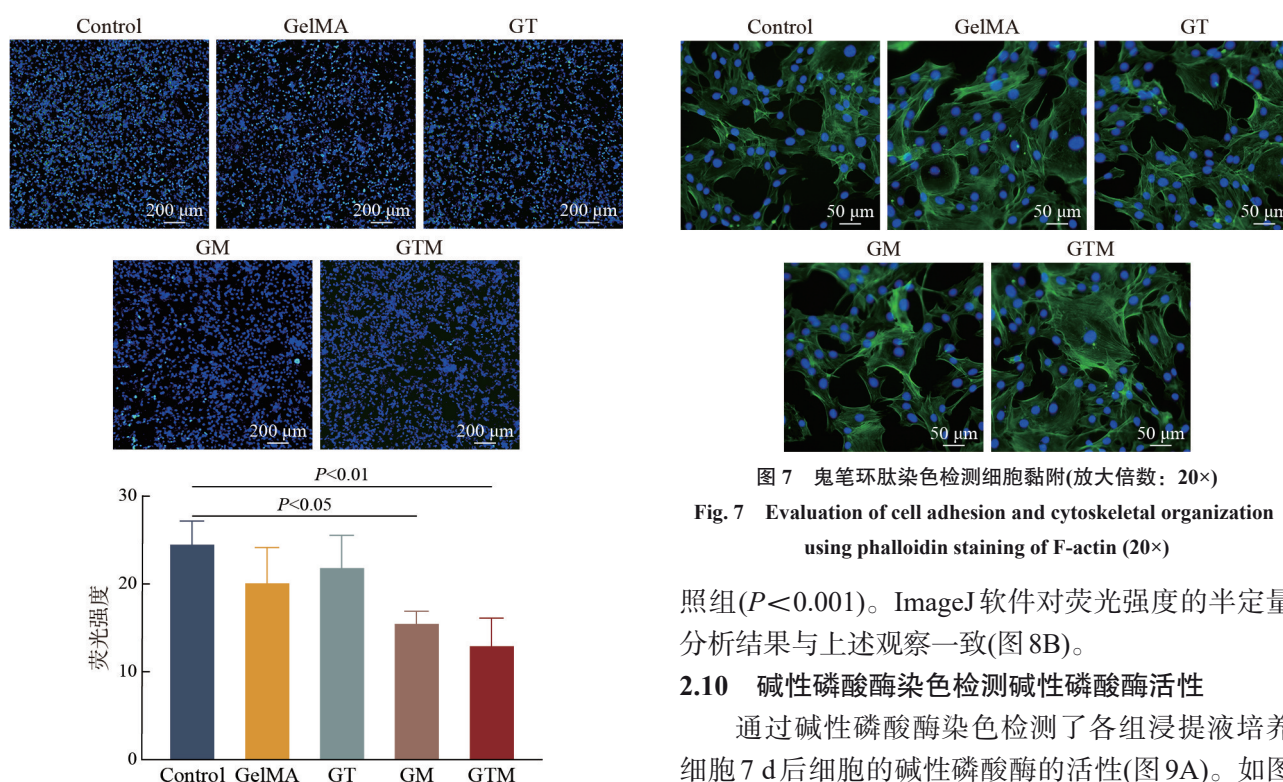


图6 DCFH-DA法检测活性氧清除能力(放大倍数: 4×)

Fig. 6 Detection of ROS scavenging activity by DCFH-DA staining (4×)

GTM组细胞的铺展面积增大, 提示细胞黏附能力可能增强。

2.9 成骨蛋白免疫荧光染色检测成骨相关因子的表达

通过免疫荧光染色检测了各组细胞在浸提液中培养细胞7 d后RUNX2和OCN的表达情况(图8A)。其中, RUNX2和OCN阳性信号呈绿色荧光, 细胞核经DAPI染为蓝色。培养7 d后, GTM组细胞的RUNX2与OCN绿色荧光信号强度均强于对

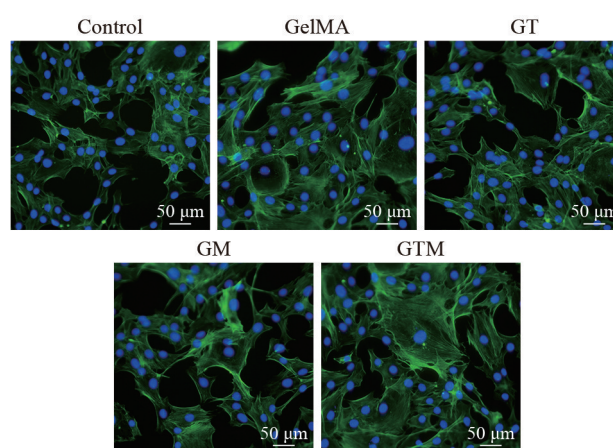


图7 鬼笔环肽染色检测细胞黏附(放大倍数: 20×)

Fig. 7 Evaluation of cell adhesion and cytoskeletal organization using phalloidin staining of F-actin (20×)

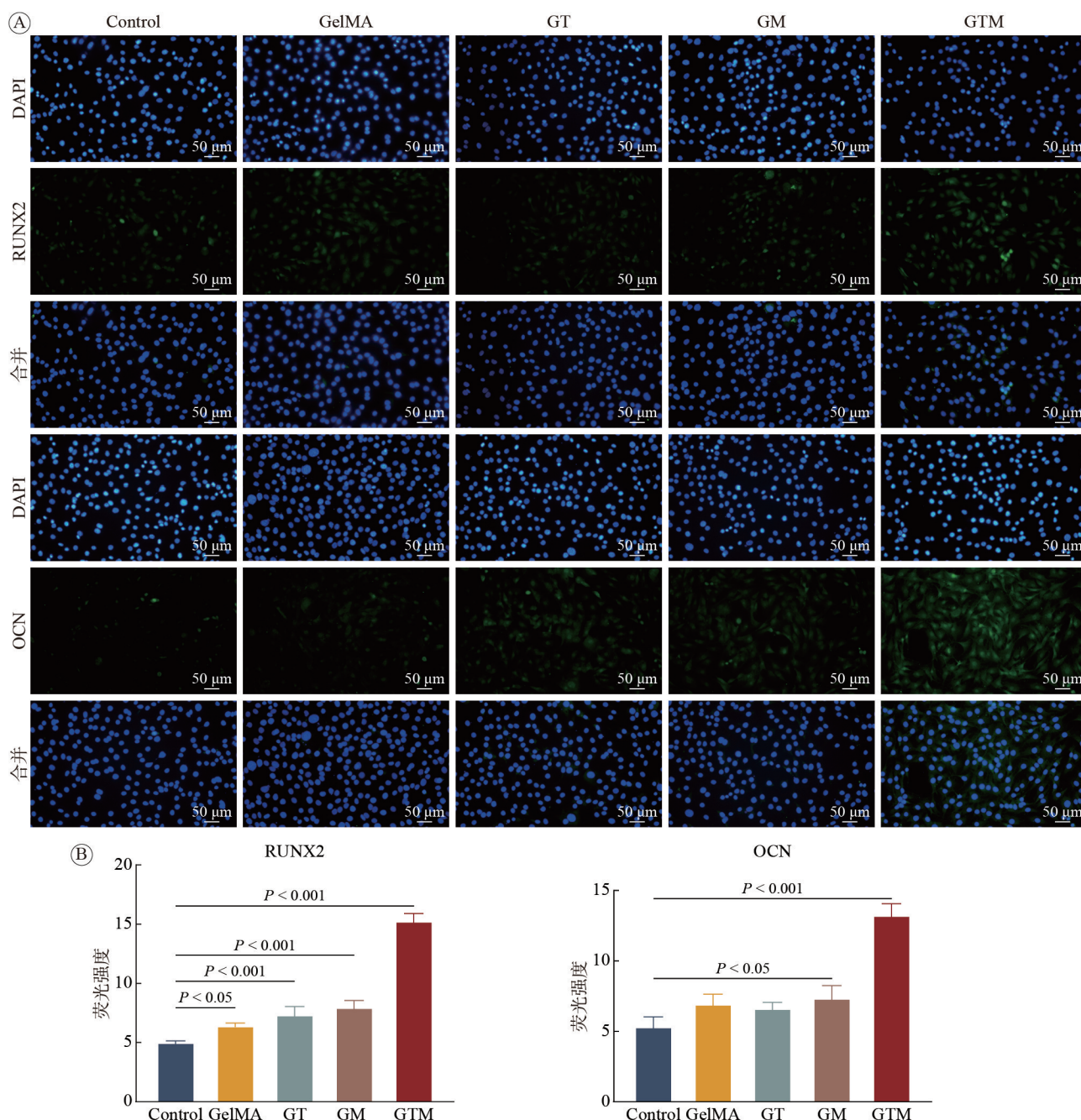
照组($P < 0.001$)。ImageJ软件对荧光强度的半定量分析结果与上述观察一致(图8B)。

2.10 碱性磷酸酶染色检测碱性磷酸酶活性

通过碱性磷酸酶染色检测了各组浸提液培养细胞7 d后细胞的碱性磷酸酶的活性(图9A)。如图所示, 成骨诱导7 d后, GTM组ALP染色颜色较对照组和其他材料组更深, 显示出更高的碱性磷酸酶活性。

2.11 茜素红染色检测钙结节形成

茜素红染色对细胞矿化能力进行评估, 结果显示(图9A), 所有实验组在培养14 d后均形成了钙结节。其中, GTM组钙盐沉积呈深红色且致密, 结节数量最多、覆盖面积最大, 提示其促成骨分化与矿化效能最强。GT组与GM组虽呈现明确的阳性染色, 但染色深度与结节密度均低于GTM组。GelMA组与对照组虽可见钙结节, 但染色较浅、分布更为稀疏。



A: RUNX2与OCN免疫荧光染色(放大倍数: 20×); B: RUNX2和OCN免疫荧光染色半定量分析

图8 免疫荧光染色检测成骨相关因子表达

Fig. 8 Detection of osteogenic-related factor expression by immunofluorescence staining

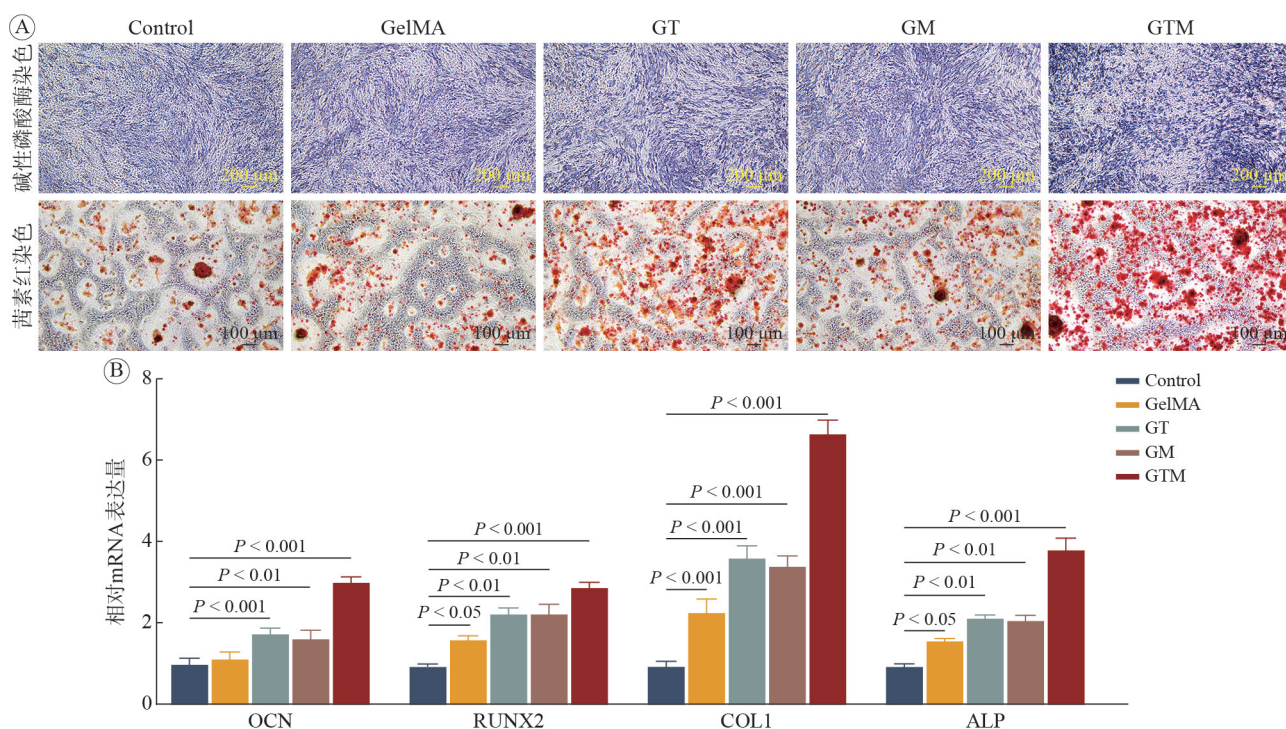
2.12 qRT-PCR检测成骨相关基因的表达

在7 d的培养周期中, qRT-PCR检测结果显示(图9B), 各组材料均能促进成骨相关基因的表达, 但诱导效能存在差异。GTM组的COL1、RUNX2、ALP和OCN表达水平最高, GT组与GM组多数基因的表达水平介于GTM组与GelMA组之间。

3 讨论

GelMA是一种由明胶衍生的光交联水凝胶,

具有良好的生物相容性、可调控的物理化学性质和细胞相互作用能力^[5]。单纯的GelMA基质功能单一^[6], 将GelMA与不同生物活性成分复合可获得相应的生物学性能, 因此已广泛用于成骨修复^[7]、伤口愈合^[8]和神经修复^[9]等领域的研究。在成骨领域, 通过负载细胞^[2]、骨传导因子^[10]或抗菌剂^[11]等生物活性成分, GelMA基质不仅促进了骨细胞的增殖与分化, 还增强了新骨的形成与整合。其中, 生物陶瓷多指磷酸钙陶瓷, 包括羟基磷灰



A: 碱性磷酸酶染色(放大倍数: 4×)与茜素红染色(放大倍数: 10×); B: 成骨相关因子 7 d 时 qPCR 检测结果

图 9 4组水凝胶的体外生物学功能评价

Fig. 9 *In vitro* biological function evaluation of four groups of hydrogels

石和 β -TCP等,其化学组成类似于天然钙化组织的矿物相。由于具有优异的骨传导性和可吸收性,这些材料被用于临床骨缺损修复^[12]。其中,羟基磷灰石具备极高的生物相容性和长期稳定性, β -TCP则具有更好的生物降解性和吸收性^[13-14]。将生物陶瓷材料与GelMA复合,可增强水凝胶的促成骨能力。

黑色素是存在于生物体中的一类聚合色素,具有色素沉着、自由基清除、辐射防护和热调节等多种功能^[15]。MNP兼具黑色素与纳米材料的优良特性^[16]。Zhang等^[17]研究表明MNP具有清除DPPH自由基的能力;Hu等^[18]指出生物合成的MNP具有高自由基清除率和电催化活性,提示其作为天然抗氧化剂的潜力。因此,基于黑色素的抗氧化特性,其在抗辐射^[19]、伤口愈合^[20]、骨关节炎药物载体^[21]及帕金森病治疗^[22]等领域均有研究报道。在骨再生微环境中,过量活性氧可抑制成骨细胞分化并增强破骨细胞活性,从而阻碍骨组织再生。因此,具备抗氧化特性的骨修复材料能够维持细胞的氧化还原平衡,促进成骨微环境的稳定,对提高骨修复效果至关重要^[23]。

MC3T3-E1细胞是一种来源于小鼠颅骨的成骨前体细胞系^[24],能在适宜的成骨诱导条件下表现

出与成骨细胞相似的生物学行为^[25],在骨组织工程研究中被广泛用于评估材料的生物相容性和成骨诱导潜力^[26-27]。在适宜的成骨诱导条件下,该细胞可以依次完成增殖、分化和成熟矿化等阶段,表现出ALP、OCN以及关键转录因子Runx2等成骨标志分子的时序性表达^[28]。MC3T3-E1细胞对材料所提供的外部微环境(包括力学性能、表面形态和化学组成)高度敏感,能够通过整合素介导的信号通路调节增殖与分化。因此,将其作为体外评价模型,不仅可以反映材料在细胞水平的成骨潜力,也能为后续的动物实验提供理论依据。

扫描电镜结果显示, β -TCP的引入改变了表面粗糙度和孔径;MNP均匀包覆在GelMA骨架中,形成粗糙且连通的三维孔结构。这一结构有助于细胞黏附和铺展,为成骨分化提供物理支撑^[29]。在材料处理过程中可定性地观察到,含 β -TCP的复合材料表现出更高的抗变形能力,这间接支持了其硬度增加的推断。在本研究的后续工作中,压缩模量测试已被列为最优先的补充实验之一。我们将通过万能试验机精确测量并比较各组材料的压缩应力-应变曲线,以获得压缩模量、屈服强度等关键力学参数,为上述推断提供实证依据。

材料的生物学活性是评价其成骨潜力的重要

指标。Ki-67蛋白在细胞分裂各阶段均有表达,可作为判断细胞增殖状态的可靠标志。CCK-8与Ki-67免疫荧光结果显示,GTM组细胞增殖活性在5 d时显著高于对照组($P<0.05$),且Ki-67荧光强度升高,提示GTM水凝胶具备良好的生物相容性与促增殖能力,为后续分化与矿化奠定基础。 β -磷酸三钙作为可降解生物陶瓷材料,能够持续释放 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 离子^[30]。在适度溶解速率下,这些离子可调节微环境离子浓度,为成骨过程中的矿化提供原料并参与调控成骨相关信号通路^[31-32]。MNP s含有丰富的酚羟基和羧基官能团,具有良好的自由基清除能力,可直接降低细胞内活性氧水平^[33]。DCFH-DA检测结果显示,含MNP s组(GM组与GTM组)活性氧水平低于对照组、GelMA组及GT组,提示材料可缓解氧化应激,这一作用可能与MNP s的加入有关;划痕实验与鬼笔环肽染色结果进一步显示,上述各组细胞迁移能力及骨架伸展状态均较好,提示低活性氧水平可能有助于维持细胞活性与形态完整。

对比各组材料,GTM组中Runx2、ALP、COL1及OCN等成骨关键基因的表达量高于其他组;免疫荧光结果显示,GTM组RUNX2和OCN蛋白表达水平平均高于对照组;ALP染色和茜素红染色结果也显示,GTM组的ALP活性和钙结节形成均优于其他组。上述结果提示GTM水凝胶具有较好的促成骨分化作用。RUNX2是成骨分化的关键调控因子,受BMP/Smad、Wnt/ β -catenin及MAPK等信号通路调控^[34]。 β -TCP释放的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 离子可通过CaSR介导的PI3K/AKT和Wnt信号通路增强RUNX2转录活性^[35];与此同时,MNP s通过降低氧化应激维持低活性氧环境,有助于上述信号通路的持续激活。已有研究报道,过量活性氧会抑制Wnt/ β -catenin信号通路并削弱成骨分化,而抗氧化微环境可能会恢复该通路活性^[36]。因此,GTM体系可能通过离子刺激与抗氧化保护的协同作用激活Wnt信号通路,从而促进成骨分化和矿化。后续可进一步检测关键磷酸化蛋白(如 β -catenin、FAK及AKT等)以验证这一推测。

综上所述,本研究制备并表征了GTM复合水凝胶。 β -TCP和MNP s的掺入增强了GelMA水凝胶的力学性能和活性氧清除性能。GTM水凝胶表现出良好的细胞相容性,可促进MC3T3-E1细胞的增殖、黏附和迁移。此外,在GelMA水凝胶中掺入

MNP s可以降低细胞内的活性氧水平。最后,细胞成骨能力检测结果表明,GTM水凝胶可以增强MC3T3-E1细胞的成骨分化能力。因此,本研究结果有力地支持了GTM水凝胶在骨缺损修复中的应用潜力。基于MNP s的抗活性氧特性,未来可进一步探究GTM材料在糖尿病骨缺损等高活性氧环境下的成骨作用。

作者贡献 张鲁岳:实验的设计与实施,论文撰写;黄萌、张敏:实验技术指导,数据分析;王朝祥、刘醒钊、刘天驰:实验问题分析,数据记录;曹均凯、王碧莹:实验设计,结果分析,论文修订。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: 2583232270@qq.com。

参考文献

- Guo JX, Yao H, Li X, et al. Advanced Hydrogel systems for mandibular reconstruction [J]. Bioact Mater, 2023, 21: 175-193.
- Gehlen J, Qiu WW, Schädli GN, et al. Tomographic volumetric bioprinting of heterocellular bone-like tissues in seconds [J]. Acta Biomater, 2023, 156: 49-60.
- Collon K, Gallo MC, Lieberman JR. Musculoskeletal tissue engineering: Regional gene therapy for bone repair [J]. Biomaterials, 2021, 275: 120901.
- Borciari G, Montalbano G, Baldini N, et al. Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating *in vitro* bone remodeling in regenerative approaches [J]. Acta Biomater, 2020, 108: 22-45.
- Van Den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N, et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels [J]. Biomacromolecules, 2000, 1 (1): 31-38.
- Zhou BX, Jiang XL, Zhou XX, et al. GelMA-based bioactive hydrogel scaffolds with multiple bone defect repair functions: therapeutic strategies and recent advances [J]. Biomater Res, 2023, 27 (1): 86.
- Mamidi N, Ijadi F, Norahan MH. Leveraging the recent advancements in GelMA scaffolds for bone tissue engineering: an assessment of challenges and opportunities [J]. Biomacromolecules, 2024, 25 (4): 2075-2113.
- Zhang JL, Liu CL, Li XJ, et al. Application of photocrosslinkable gelatin methacryloyl in wound healing [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1303709.
- Vickram AS, Infant SS, Manikandan S, et al. 3D bio-printed scaffolds and smart implants: evaluating functional performance in animal surgery models [J]. Ann Med Surg, 2025, 87 (6): 3618-3634.
- Sun T, Feng ZQ, He WP, et al. Novel 3D-printing bilayer GelMA-based hydrogel containing BP, β -TCP and exosomes for cartilage-bone integrated repair [J]. Biofabrication, 2024, 16 (1): 015008.
- Lu GH, Zhao G, Wang S, et al. Injectable nano-micro composites with anti-bacterial and osteogenic capabilities for minimally invasive treatment of osteomyelitis [J]. Adv Sci, 2024, 11 (12): 2306964.

- 12 Patrawalla NY, Kajave NS, Kishore V. A comparative study of bone bioactivity and osteogenic potential of different bioceramics in methacrylated collagen hydrogels [J]. *J Biomedical Materials Res*, 2023, 111 (2): 224-233.
- 13 Hoveidaei AH, Sadat-Shojai M, Mosalamiaghili S, et al. Nano-hydroxyapatite structures for bone regenerative medicine: Cell-material interaction [J]. *Bone*, 2024, 179: 116956.
- 14 Ni XW, Feng J, Liang MX, et al. Enhancing bone repair with β -TCP-based composite scaffolds: a review of design strategies and biological mechanisms [J]. *Orthop Res Rev*, 2025, 17: 313-340.
- 15 Cao W, Zhou XH, McCallum NC, et al. Unraveling the structure and function of melanin through synthesis [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143 (7): 2622-2637.
- 16 黄萌, 刘伟, 张鲁岳, 等. 黑色素纳米颗粒在M1/M2巨噬细胞极化中的作用研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2024, 45 (10): 1091-1095.
- 17 Zhang D, Chen XR, Bu NT, et al. Biosynthesis of quercetin-loaded melanin nanoparticles for improved antioxidant activity, photothermal antimicrobial, and NIR/pH dual-responsive drug release [J]. *Foods*, 2023, 12 (23): 4232.
- 18 Hu SS, Zhang JW, Shi MY, et al. Natural melanin: from biological functions to biofunctionalized nanoparticles in advanced biomedicine [J]. *Biomater Adv*, 2025, 176: 214368.
- 19 Bayram S, Aygün B, Karadayi M, et al. Determination of toxicity and radioprotective properties of bacterial and fungal eumelanin pigments [J]. *Int J Radiat Biol*, 2023, 99 (11): 1785-1793.
- 20 O' Connor NA, Syed A, Wong M, et al. Polydopamine antioxidant hydrogels for wound healing applications [J]. *Gels*, 2020, 6 (4): 39.
- 21 Wu CX, Cheng JL, Li W, et al. Programmable polymeric microneedles for combined chemotherapy and antioxidative treatment of rheumatoid arthritis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13 (46): 55559-55568.
- 22 Wang W, Zheng JY, Zhou H, et al. Polydopamine-based nanocomposite as a biomimetic antioxidant with a variety of enzymatic activities for Parkinson's disease [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14 (29): 32901-32913.
- 23 Huang LT, Su W, Wu ZQ, et al. Glucosamine suppresses oxidative stress and induces protective autophagy in osteoblasts by blocking the ROS/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46 (5): 829-839.
- 24 Yoon H, Park SG, Shin HR, et al. Unraveling the dynamics of osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells: Transcriptomic insights into matrix mineralization and cell proliferation [J]. *Bone*, 2025, 194: 117442.
- 25 Yu H, Wei XX, Jiang H, et al. Tensile force promotes osteogenic differentiation *via* ephrinB2-EphB4 signaling pathway in orthodontic tooth movement [J]. *BMC Oral Health*, 2025, 25 (1): 118.
- 26 Luchman NA, Megat Abdul Wahab R, Zainal Ariffin SH, et al. Comparison between hydroxyapatite and polycaprolactone in inducing osteogenic differentiation and augmenting maxillary bone regeneration in rats [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13356.
- 27 Cao ZS, Yuan HB, Li N, et al. The preparation of biomaterialized PIC/HA hybrid composites with strain-stiffening and the effect on MC3T3-E1 cells [J]. *Macromol Rapid Commun*, 2022, 43 (11): 2200135.
- 28 Xing L, Li YQ, Li WH, et al. Expression of RUNX2/LAPTM5 in the induction of MC3T3-e1 mineralization and its possible relationship with autophagy [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2022, 19 (6): 1223-1235.
- 29 Bektas C, Mao Y. Hydrogel microparticles for bone regeneration [J]. *Gels*, 2024, 10 (1): 28.
- 30 Garimella A, Ghosh SB, Bandyopadhyay-Ghosh S. Biomaterials for bone tissue engineering: achievements to date and future directions [J]. *Biomed Mater*, 2025, 20 (1): 012001.
- 31 Liang XZ, Yuan S, Zhang N, et al. Modulating the crystallinity of biphasic calcium phosphate composites balances surface and ionic cues to enhance osteogenesis *via* integrin-mediated cytoskeletal signaling [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 35: 102429.
- 32 Luo J, Li Z, Zhang BW, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of biodegradation and osteoinductive properties of tantalum and zinc Co-doped β -TCP porous bioceramic scaffolds [J]. *Adv Healthc Mater*, 2026, 15 (2): e03406.
- 33 Song CH, Wu XY, Wang Y, et al. Cuttlefish-inspired photo-responsive antibacterial microparticles with natural melanin nanoparticles spray [J]. *Small*, 2024, 20 (19): 2310444.
- 34 Zhu SY, Chen W, Masson A, et al. Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis [J]. *Cell Discov*, 2024, 10: 71.
- 35 Tian L, Andrews C, Yan QY, et al. Molecular regulation of calcium-sensing receptor (CaSR)-mediated signaling [J]. *Chronic Dis Transl Med*, 2024, 10 (3): 167-194.
- 36 Staehlke S, Haack F, Waldner AC, et al. ROS dependent Wnt/ β -catenin pathway and its regulation on defined micro-pillars: a combined *in vitro* and *in silico* study [J]. *Cells*, 2020, 9 (8): 1784.

(责任编辑:孟晓彤)