

基于活性 Se/Ti-MOF 的 pH 响应性水凝胶支架用于骨肉瘤 协同治疗与机制解析

符光戌¹ 王勇¹ 郭钟义¹ 谭登武² 张珍² (通讯作者)

1.利川市人民医院骨科 湖北 利川 445400

2.利川市人民医院麻醉科 湖北 利川 445400

【摘要】：目的：针对骨肉瘤术后局部复发与骨缺损问题，构建一种新型硒/钛金属有机框架（Se/Ti-MOF）复合水凝胶支架，以实现从“载体”到“活性治疗剂”的转变，避免传统载药系统对化疗药物的依赖。方法：采用水热法合成 Se/Ti-MOF 纳米颗粒，并通过物理共混-交联技术将其固载于明胶/壳聚糖基质中，制备 Se/Ti-MOF@Gel/CS 复合支架。利用 SEM、XRD、FT-IR 表征结构；测试力学、溶胀及降解性能；采用 ICP-MS 分析离子释放动力学；通过 CCK-8、流式细胞术与 Western Blot 评估体外抗肿瘤活性及机制。结果：成功制备 Se/Ti-MOF 纳米颗粒（ 112.5 ± 16.3 nm）及贯通多孔复合支架（孔径 $25.6 \pm 8.7 \mu\text{m}$ ）。Se/Ti-MOF 使支架压缩模量由 18.4 ± 2.1 kPa 提升至 36.8 ± 3.5 kPa。在 pH 5.5 条件下，支架溶胀与降解增强，Se/Ti 离子协同释放加快。支架浸提液对 143B 和 HOS 细胞具有选择性毒性（IC₅₀ 分别为 4.197 和 $5.624 \mu\text{g/mL}$ ），其机制涉及 G2/M 期阻滞、ROS 爆发及线粒体凋亡通路激活。结论：Se/Ti-MOF@Gel/CS 复合支架兼具良好力学性能、pH 响应性及选择性抗肿瘤活性，通过调控细胞周期与 ROS-线粒体凋亡通路发挥作用，为骨肉瘤术后“抗肿瘤-骨修复”一体化治疗提供了新平台。

【关键词】：硒/钛金属有机框架；水凝胶支架；骨肉瘤；细胞凋亡；活性氧

DOI:10.12417/2705-098X.26.05.025

骨肉瘤是青少年常见的高侵袭性、易转移恶性骨肿瘤，目前标准治疗方案为新辅助化疗联合保肢手术，但术后局部复发与骨缺损问题依然突出^[1]。手术难以彻底清除微小残留灶，而全身化疗靶向性差、系统毒性大，局部药物浓度常不足^[2]。因此，亟需开发可原位植入、同步实现抑瘤与骨修复的智能生物材料。

水凝胶局部递药系统因其三维结构可模拟细胞外基质，既能支撑骨再生，又可作为控释载体，是理想的策略之一^[3]。智能响应型水凝胶能依据肿瘤微环境特征实现精准释药，在增效同时降低毒性^[4]。但现有体系多依赖化疗药物，易损伤正常细胞，且存在突释与载药效率低等问题。金属有机框架（MOF）具有高比表面积、可调孔径和良好生物降解性，在生物医学中应用广泛。“活性 MOF”概念推动了其从载体向内源性治疗剂的转变。其中，钛与硒的组合潜力显著：钛具有良好生物相容性、成骨活性与力学性能，适于骨修复^[5]；而特定形态的硒可在肿瘤细胞内诱发氧化应激，实现选择性杀伤^[6]。

然而，现有研究多聚焦材料递送功能或表型效应，对 Se 与 Ti 协同整合于同一 MOF 骨架，并通过干预细胞周期与调控凋亡通路实现选择性抗肿瘤的深层机制，尚缺乏系统阐明。为此，本研究构建新型 Se/Ti-MOF 复合水凝胶支架，从细胞周期阻滞、ROS 生成及线粒体凋亡通路等角度系统揭示其分子机

制，为发展非化疗依赖的骨肉瘤局部治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用化学试剂（六水合硝酸锌、2-甲基咪唑、无水乙醇、1,3,5-均苯三甲酸等）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。143B、HOS 及 hFOB1.19 由中国科学院细胞库提供。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶-EDTA 及 CCK-8 试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 Se/Ti-MOF 纳米颗粒的合成与表征

采用水热法合成 Se/Ti-MOF：将 1 mmol 亚硒酸钠（溶于 20 mL 超纯水）与 1 mmol 钛酸四丁酯（溶于 20 mL 无水乙醇）混合，加入 2 mmol 1,3,5-均苯三甲酸，用 0.1 M NaOH 调 pH 至 3.5。持续搅拌 30 min 后，转移至 50 mL 聚四氟乙烯反应釜，150°C 反应 18 h。反应产物经超纯水与乙醇交替离心洗涤（12000 rpm, 10 min, 3 次），预冻并冷冻干燥，获得 Se/Ti-MOF 纳米粉末。纳米颗粒表征包括：动态光散射与 Zeta 电位分析（粒径、PDI 及表面电位，pH 3.0-10.0 缓冲体系）；X 射线衍射（范围 5°-80°，速率 5°/min，Scherrer 方程计算晶粒尺寸）；傅里叶变换红外光谱（400-4000/cm）；场发射扫描电镜及能量色散 X 射线光谱。

作者简介：符光戌，男（1988-），土家族，湖北省利川市人，博士研究生，利川市人民医院，主治医师，脊柱退行性疾病及骨肿瘤相关研究。

基金项目：湖北省恩施土家族苗族自治州“启航专项”科技计划项目（ESQH20240044）。

1.3 Se/Ti-MOF 复合水凝胶支架的制备与表征

采用物理共混-交联法制备复合支架：将 4%明胶与 2%壳聚糖溶液等体积混合，加入 Se/Ti-MOF 纳米粉末至终浓度 3 mg/mL，冰浴超声分散 (300 W, 2 s/3 s, 共 5 min)。加入 0.1% 京尼平交联，注入模具，4°C 静置交联 24 h，PBS 洗涤后保存。支架性能表征包括：压缩测试 (样品 8 mm×5 mm，速率 1 mm/min，计算压缩模量)；溶胀实验 (冻干圆片浸于 PBS, 37°C，定时称重)；降解实验 (浸于含溶菌酶的 PBS, 37°C，定期测定质量残留率)；离子释放动力学 (ICP-MS 测定 pH 7.4 及 5.5 条件下 Se、Ti 离子的累积释放)。

1.4 体外细胞实验

细胞常规培养于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。细胞毒性采用 CCK-8 法检测：细胞以 5×10^3 /孔接种 96 孔板，分别用不同浓度支架浸提液 (0–100 μg/mL Se/Ti-MOF) 处理 48 h。凋亡与周期分析：IC50 浓度浸提液处理 24 h 后，分别以 Annexin V-FITC/PI 及 PI/RNase A 染色，流式细胞仪检测。细胞内 ROS 水平采用 DCFH-DA 探针法检测。蛋白质印迹分析检测 Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 等蛋白表达。

1.5 统计分析

所有实验独立重复 3 次，数据以均值±标准差表示。采用 GraphPad Prism 9.0 进行单因素方差分析， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Se/Ti-MOF 纳米颗粒及复合支架的表征

Se/Ti-MOF 纳米颗粒的流体动力学直径为 165.3 ± 12.7 nm，PDI 为 0.15 (图 1A)。Zeta 电位在 pH 5.5 时降至 $+12.5 \pm 2.1$ mV，显著低于 pH 7.4 条件 ($p < 0.001$)，表明其具有明显的 pH 响应性 (图 1B)。SEM 显示纳米颗粒为规整立方体结构，平均粒径 112.5 ± 16.3 nm (图 1C-E)。XRD 与 FT-IR 结果证实成功合成结晶良好的纯相 MOF (图 1F,G)。复合支架断面呈贯通多孔网络，平均孔径 $25.6 \pm 8.7 \mu\text{m}$ (图 1E)。元素面分析显示 Se 与 Ti 均匀分布且高度共定位，原子比约 1.05:1，C、N、O 连续分布勾勒出支架完整形貌 (图 1H)。

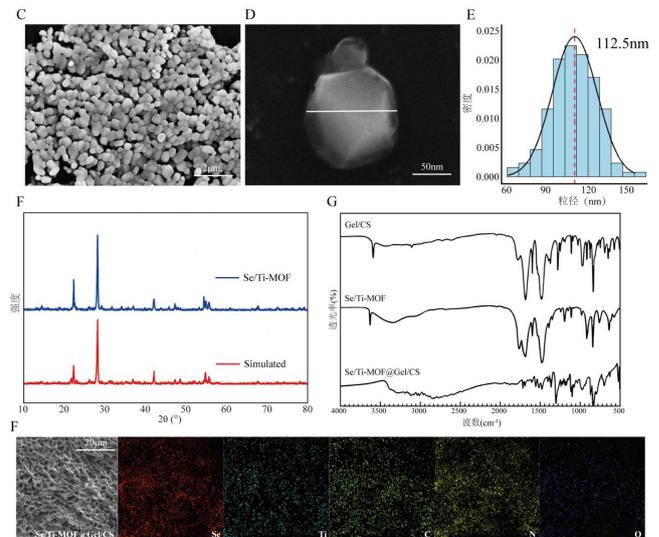
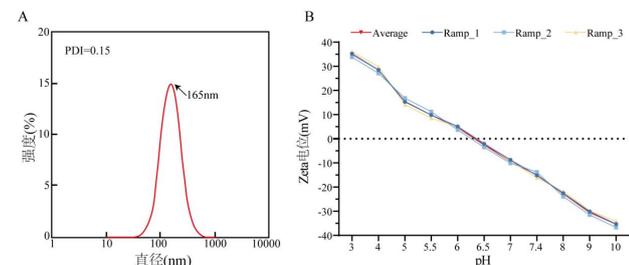


图 1 Se/Ti-MOF 纳米颗粒的基本表征

(A) 粒径分布 (DLS)；(B) 不同 pH 下的 Zeta 电位；(C-D) SEM 图像；(E) 粒径分布图；(F) XRD 谱图与模拟谱对比；(G) FT-IR 光谱；(H) Se/Ti-MOF@Gel/CS 微观结构与元素分布图。

2.2 复合水凝胶支架的物理性能与离子释放行为

负载 Se/Ti-MOF 后，支架压缩模量由 18.4 ± 2.1 kPa 升至 36.8 ± 3.5 kPa ($p < 0.01$) (图 2A)。溶胀实验显示，Se/Ti-MOF@Gel/CS 在 6 h 达平衡，最大溶胀率 ($579 \pm 7.0\%$) 低于纯凝胶组 ($652 \pm 7.8\%$) (图 2B)。降解 28 天后，复合支架质量残留率 ($63.1 \pm 1.2\%$) 显著高于对照组 ($46.8 \pm 1.3\%$) ($p < 0.01$) (图 2C)。离子释放在 pH 5.5 条件下显著加速，96 h 时 Se、Ti 释放率分别达 85% 与 79%，而在 pH 7.4 下释放缓慢 (图 2D)。

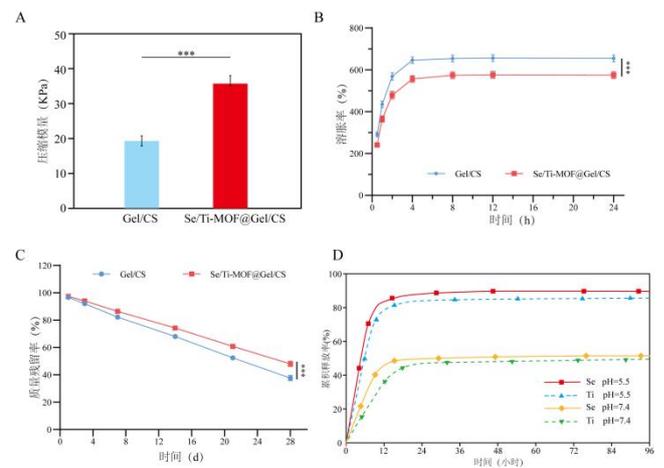


图 2 复合水凝胶支架的物理性能与离子释放行为

(A) 压缩模量比较；(B) 溶胀曲线；(C) 体外降解曲线；(D) Se/Ti 离子在 pH 7.4 和 pH 5.5 下的累积释放。

2.3 Se/Ti-MOF 复合水凝胶支架的体外抗肿瘤效果

CCK-8 结果显示，Se/Ti-MOF@Gel/CS 浸提液对 143B 和

HOS 细胞具有剂量依赖性抑制，IC50 分别为 4.197 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 5.624 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 3A)。在 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下，143B 细胞存活率降至 50.5%，而 hFOB1.19 仍保持 90.8% 存活，选择性指数分别为 1.80 与 1.84 (图 3B)。流式细胞术分析表明，处理后的细胞主要阻滞于 G2/M 期 (图 3C)。

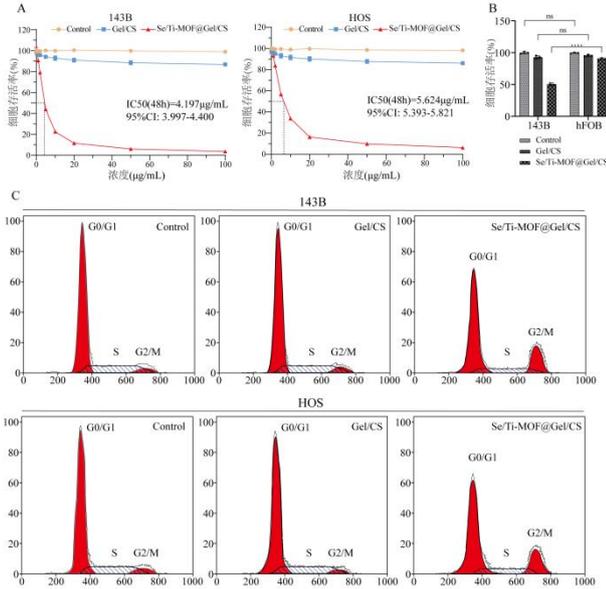


图 3 Se/Ti-MOF 复合水凝胶支架的体外抗肿瘤活性与选择性。

(A) 不同浓度浸提液对 143B 与 HOS 细胞活力的影响；
(B) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理下 143B 与 hFOB 细胞存活率比较；
(C) 流式细胞术。

2.4 Se/Ti-MOF 复合水凝胶支架诱导细胞凋亡及其分子机制

Annexin V-FITC/PI 染色显示，Se/Ti-MOF@Gel/CS 处理 24 h 后，143B 细胞凋亡率由 5.1% 显著升高至 28.6% ($p < 0.001$) (图 4A)。该处理同时引起细胞内 ROS 显著上升 (图 4B)，并伴随 Bax 表达上调、Bcl-2 表达下调，以及 Cleaved Caspase-3 的激活 (图 4C)。结果表明，该支架主要通过 ROS 介导的线粒体凋亡通路发挥抗肿瘤作用。

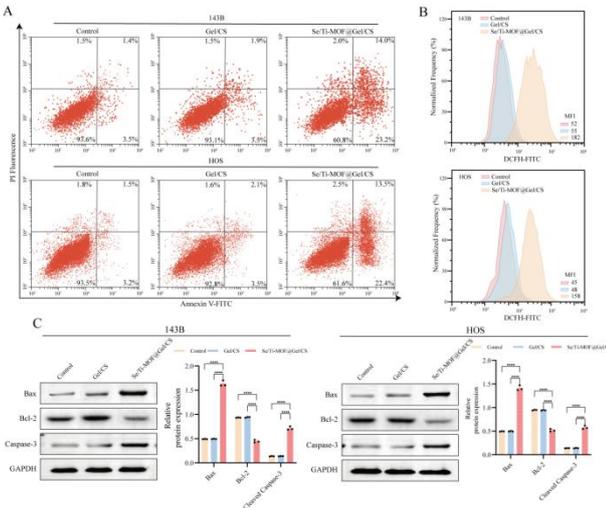


图 4 Se/Ti-MOF@Gel/CS 诱导细胞凋亡的分子机制

(A) 细胞凋亡检测 (Annexin V/PI 染色)；(B) DCFH-DA 法检测细胞内 ROS 水平；(C) 凋亡相关蛋白表达 (Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3)。

3 讨论

骨肉瘤术后治疗需清除残余肿瘤并促进骨再生^[7]。传统局部给药系统依赖化疗药物，存在靶向性差、毒性大及突释等问题^[8]。本研究构建的 Se/Ti-MOF@Gel/CS 复合支架不依赖外源药物，而是通过材料组分在肿瘤微酸环境中被特异性激活产生协同抗肿瘤效应，并从材料响应性与分子机制两方面提供了实验依据。

多数 MOF 材料可在酸性条件下质子化降解，实现靶向释放^[9]。Se/Ti-MOF 在 pH 5.5 时 Zeta 电位显著降低，表明其表面化学特性改变，与 MOF 酸解离行为一致^[10]。该特性触发了“双路径响应”：酸性环境同时促进 MOF 纳米颗粒解离与水凝胶网络溶胀降解，形成级联响应的释放系统，使 Se/Ti 离子在肿瘤区域高效释放，而在生理环境中保持稳定，为选择性抗肿瘤奠定了基础。相较于光催化 TiO₂ 植入体^[11]，本体系首次实现了不依赖外源药物或外部能量的自主靶向治疗。

在机制层面，Se/Ti-MOF 可诱导骨肉瘤细胞 G2/M 期阻滞，与金属离子引起 DNA 损伤或干扰微管功能的机制相符^[12]。更重要的是，ROS 爆发在细胞死亡过程中起核心作用。骨肉瘤细胞代谢活跃、基础 ROS 水平高，对氧化应激更敏感^[13]。Se/Ti-MOF 处理引发强烈 ROS 生成，导致线粒体膜损伤，促使 Bax/Bcl-2 平衡向促凋亡方向偏移，最终激活 Caspase-3 依赖性凋亡，该“ROS-线粒体-Caspase”通路与硒基纳米材料的凋亡机制一致^[14]。

本研究揭示了 Ti 与 Se 的协同增敏效应，使体系在低 IC50 浓度下实现高效肿瘤杀伤。我们推测，Ti 离子通过干扰细胞代谢增强肿瘤细胞对 Se 诱导氧化应激的敏感性；而正常成骨细胞凭借更强的抗氧化防御能力可抵抗同等损伤^[15]。这一机制为发展高选择性、低毒性的局部治疗策略提供了新思路。

综上，本研究系统阐明了 Se/Ti-MOF 复合支架“结构-响应-效应”的内在联系，证实其作为局部治疗平台的潜力，揭示了其通过 pH 响应性离子释放诱导周期阻滞与线粒体凋亡的机制，为发展非化疗依赖的骨肉瘤治疗策略提供了理论与实验基础。本研究结论基于体外实验，其在体内的疗效与安全性有待动物实验进一步验证。后续将重点验证该支架的“抗肿瘤-促修复”双重功效，并探索与免疫调控策略联用，构建骨肉瘤术后修复一体化平台。

参考文献:

- [1] Reinecke JB, Jimenez Garcia L, Saraf AJ, et al. Metastasis-initiating osteosarcoma subpopulations establish paracrine interactions with lung and tumor cells to create a metastatic niche. *Cancer Res* 2025.
- [2] Yuan J, Yuan X, Wu K, et al. A local and low-dose chemotherapy/autophagy-enhancing regimen treatment markedly inhibited the growth of established solid tumors through a systemic antitumor immune response. *Front Oncol* 2021;11:658254.
- [3] Zhang J, Lin X, Liu J, et al. Sequential thermo-induced self-gelation and acid-triggered self-release process of drug-conjugated nanoparticles: A strategy for the sustained and controlled drug delivery to tumors. *J Mater Chem B* 2013;1:4667–77.
- [4] Gou S, Xie D, Ma Y, et al. Injectable, thixotropic, and multiresponsive silk fibroin hydrogel for localized and synergistic tumor therapy. *ACS Biomater Sci Eng* 2020;6:1052–63.
- [5] Seemann A, Akbaba S, Buchholz J, et al. RGD-modified titanium as an improved osteoinductive biomaterial for use in dental and orthopedic implants. *Bioconjugate Chem* 2022;33:294–300.
- [6] Maleczek M, Reszeć-Giełażyn J, Szymulewska-Konopko K. Beneficial effects of selenium and its supplementation on carcinogenesis and the use of nanoselenium in the treatment of malignant tumors. *Int J Mol Sci* 2024;25:11285.
- [7] Zhou J, Huo T, Miu J, et al. Bone-adhesive peptide hydrogel loaded with cisplatin for postoperative treatment of osteosarcoma. *ACS Appl Mater Interfaces* 2025;17:11073–84.
- [8] Wolinsky JB, Colson YL, Grinstaff MW. Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *J Control Release* 2012;159:14–26.
- [9] Wang Y, Zeng M, Fan T, et al. Biomimetic ZIF-8 nanoparticles: A novel approach for biomimetic drug delivery systems. *Int J Nanomed* 2024;19:5523–44.
- [10] Li H, Shi W, Zhao K, et al. Enhanced hydrostability in ni-doped MOF-5. *Inorg Chem* 2012;51:9200–7.
- [11] Zhang M, Cheng H, Gong Z, et al. Fabrication of chitosan-18 β -glycyrrhetic acid modified titanium implants with nanorod arrays for suppression of osteosarcoma growth and improvement of osteoblasts activity. *Adv Funct Mater* 2017;27:1703932.
- [12] Bakhom SF, Kabeche L, Murnane JP, et al. DNA-damage response during mitosis induces whole-chromosome missegregation. *Cancer Discov* 2014;4:1281–9.
- [13] Fanelli G, Alloisio G, Lelli V, et al. Mechano-induced cell metabolism disrupts the oxidative stress homeostasis of SAOS-2 osteosarcoma cells. *Front Mol Biosci* 2023;10:1297826.
- [14] Shi X, Li M, Huang Q, et al. Monacolin K induces apoptosis of human glioma U251 cells by triggering ROS-mediated oxidative damage and regulating MAPKs and NF- κ B pathways. *ACS Chem Neurosci* 2023;14:1331–41.
- [15] Leonhardt G. LIPG supports adaption to oxidative stress. *EXCLI J* 2019;18:499–500.