

· 组织工程与细胞培养 ·

# 负载淫羊藿苷的壳聚糖基仿生支架的促软骨形成和炎症缓解作用

李慧娟, 王先流, 沈炎冰, 唐寒, 汤晓涵, 张彦中

东华大学 化学化工与生物工程学院, 上海 201620

李慧娟, 王先流, 沈炎冰, 唐寒, 汤晓涵, 张彦中. 负载淫羊藿苷的壳聚糖基仿生支架的促软骨形成和炎症缓解作用. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2308-2321.

LI HJ, WANG XL, SHEN YB, TANG H, TANG XH, ZHANG YZ. Chondrogenic and ameliorated inflammatory effects of chitosan-based biomimetic scaffold loaded with icariin. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2308-2321.

**摘要:** 淫羊藿苷 (icariin, ICA) 是具有促软骨修复和抗炎作用的小分子药物, 将 ICA 负载到软骨组织工程支架将能增强支架的生物功能性。本研究将聚 L-丙交酯-己内酯 (poly(L-lactide-co-caprolactone, PLCL) 电纺纤维经聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 涂覆处理后制备成的短纤维与柠檬酸/壳聚糖溶液 (citric acid/chitosan solution, CC) 混合, 通过冻-融和冷冻干燥方法制备成短纤维增强的壳聚糖水凝胶 (PDA@PLCL/CC); 然后通过物理吸附方法负载 ICA 构建新型工程软骨仿生支架 (ICA-PDA@PLCL/CC); 最后通过体外兔软骨细胞培养试验, 研究 ICA 介导的软骨仿生支架对软骨细胞功能及炎症反应的影响。结果表明, PDA@PLCL/CC 具有适当的孔径和孔隙率 (>80%), 具有较高的吸水率和力学性能, 能够促进软骨细胞增殖和黏附。ICA-PDA@PLCL/CC 支架利于维持软骨细胞形态, 且能促进软骨生成性基因 (*sox-9*)、糖胺聚糖 (*gag*) 和 II 型胶原 (*col II*) 基因的表达和软骨基质的合成。在模拟炎症存在的情形下, ICA-PDA@PLCL/CC 仿生支架可降低软骨细胞纤维化, 有效下调软骨细胞促炎症因子白介素-6 (*il-6*)、白介素-1 $\beta$  (*il-1\beta*) 和诱导型一氧化氮合成酶 (*inos*) 的表达, 减少基质金属蛋白酶-3 (*mmp-3*) 的表达, 提高软骨胞外基质糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 和 II 型胶原 (type II collagen, Col II) 的合成。该研究发展的 ICA-PDA@PLCL/CC 工程软骨仿生支架在软骨损伤的再生修复中具有应用潜力。

**关键词:** 壳聚糖水凝胶; 淫羊藿苷; 炎症缓解; 电纺丝; 软骨再生

**Received:** November 11, 2021; **Accepted:** January 21, 2022; **Published online:** February 15, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (32071345, 31771050); National Key Research and Development Program of China (2016YFC1100203); Fundamental Research Funds for the Central Universities of Donghua University, China (2232019A3-09)

**Corresponding author:** ZHANG Yanzhong. E-mail: yzzhang@dhu.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金 (32071345, 31771050); 国家重点研究发展计划 (2016YFC1100203); 东华大学中央高校基本科研业务费学科交叉 (理工科) 重点计划项目 (2232019A3-09)

# Chondrogenic and ameliorated inflammatory effects of chitosan-based biomimetic scaffold loaded with icariin

LI Huijuan, WANG Xianliu, SHEN Yanbing, TANG Han, TANG Xiaohan, ZHANG Yanzhong

College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China

**Abstract:** Icariin (ICA) is a small molecule drug capable of promoting cartilage repair and ameliorating inflammation. Loading ICA into a biomaterial scaffold for cartilage tissue engineering will thus potentially enhance the biological functionality of the engineered scaffold. In this study, short fibers processed from electrospun poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLCL) fibers which were prior coated with polydopamine (PDA), were mixed with citric acid doped chitosan solution (CC) for preparing short fibers reinforced chitosan hydrogel (PDA@PLCL/CC) by a freeze-thawing combined freeze-drying method. Thereafter, ICA was loaded into the PDA@PLCL/CC scaffold through physical adsorption to generate a newly engineered biomimetic cartilage scaffold (ICA-PDA@PLCL/CC). Finally, ICA-mediated chondrogenic and ameliorated inflammatory effects of the ICA-PDA@PLCL/CC scaffold were examined *in vitro* using rabbit chondrocytes. The results showed that the ICA-free PDA@PLCL/CC scaffold possessed appropriate pore size and porosity (>80%), high water absorbance capacity and improved mechanical performance, and also promoted chondrocyte proliferation and adhesion. The ICA-laden ICA-PDA@PLCL/CC scaffold was evidenced to maintain cytomorphology, upregulate the expression of chondrogenic gene (*sox-9*), glycosaminoglycan gene (*gag*), and type II collagen gene (*col II*) as well as the synthesis of the cartilage matrix. In the presence of a simulated inflammation, the ICA-PDA@PLCL/CC scaffold was found to reduce chondrocyte fibrosis, effectively downregulate the expression of proinflammatory factors interleukin-6 (*il-6*), interleukin-1 (*il-1*), and inducible nitric oxide synthase (*inos*) in chondrocytes. It can also reduce matrix metalloproteinase-3 (*mmp-3*) expression and promote the synthesis of the extracellular matrix glycosaminoglycan (GAG) and type II collagen (Col II). The newly developed ICA-PDA@PLCL/CC scaffold may find applications in the regeneration and repair of cartilage defects.

**Keywords:** chitosan hydrogel; icariin; amelioration of inflammation; electrospinning; cartilage regeneration

软骨组织工程 (cartilage tissue engineering, CTE) 为关节软骨损伤的再生性修复提供无限前景<sup>[1]</sup>。然而, CTE 的再生功效在很大程度上与植入的生物材料支架的促软骨形成能力<sup>[2]</sup>以及因支架植入带来的移植位点炎症反应的程度有关<sup>[3-4]</sup>。因此, 理性构建具有合适的物理和化学信号的仿生 CTE 支架以促进软骨形成和减轻软骨再生中的炎症反应至关重要。

壳聚糖 (chitosan, CS) 是一类天然多糖聚合物, 其化学结构与天然软骨细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中的糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 结构相似<sup>[5-7]</sup>, 因而常被用来制备具有高含水率和类似软骨三维网络结构的水凝胶支架用于软骨组织工程。近年来, 一些研究将可降解的电纺纤维制成短纤维复合到水凝胶中<sup>[8-9]</sup>, 这在增强壳聚糖水凝胶基

体力学性能的同时还进一步提高了对天然软骨微结构的仿生程度<sup>[10-11]</sup>,表现出良好的临床应用转化潜力<sup>[9]</sup>。为进一步提高壳聚糖基 CTE 支架的生物功能性,除了在 CTE 支架上负载具有生物活性的表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)<sup>[12]</sup>、蛋白类转化生长因子 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)<sup>[13]</sup>或者抗炎因子 (interleukin 4, IL-4)<sup>[14]</sup>等活性成分以外,寻找一种合适的兼具促软骨形成和抗炎作用的非蛋白生长因子替代物 (如小分子药物),将不仅有利于改进 CTE 支架的生物功能性,而且克服了传统蛋白生长因子存在的成本高、不稳定以及引起不必要的免疫反应等问题<sup>[15-16]</sup>。

淫羊藿苷 (icarin, ICA) 是从植物干燥的茎叶中提取的天然小分子药物,具有促进软骨形成、抗炎及抗肿瘤等多种功效<sup>[17]</sup>。有研究表明,将 ICA

直接加入培养基中培养软骨细胞,能够促进软骨细胞的增殖和软骨生成相关基因 (如 *gag*、*col II* 和 *sox-9* 等) 的表达,减少细胞外基质的降解<sup>[18-19]</sup>。另外,也有研究证明向含有肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的培养基中加入 ICA 后,能够通过下调软骨细胞中的 NF- $\kappa$ B/HIF-2 $\alpha$  信号通路抑制 TNF- $\alpha$  刺激引起的炎症反应<sup>[20]</sup>。因此,将 ICA 作为蛋白因子替代物与纤维增强的壳聚糖水凝胶仿生支架结合,构建具有炎症缓解特性的工程软骨仿生支架,不仅能够实现药物局部递送到软骨缺损部位,还可能赋予支架促进软骨形成和缓解炎症的双重作用,将是一种有潜力的改进壳聚糖基 CTE 支架生物功能性的策略。

本研究的主要目的是将 ICA 负载到短纤维增强的壳聚糖水凝胶中以增强该仿生 CTE 支架的促软骨形成和缓解炎症的能力。如图 1 所示,

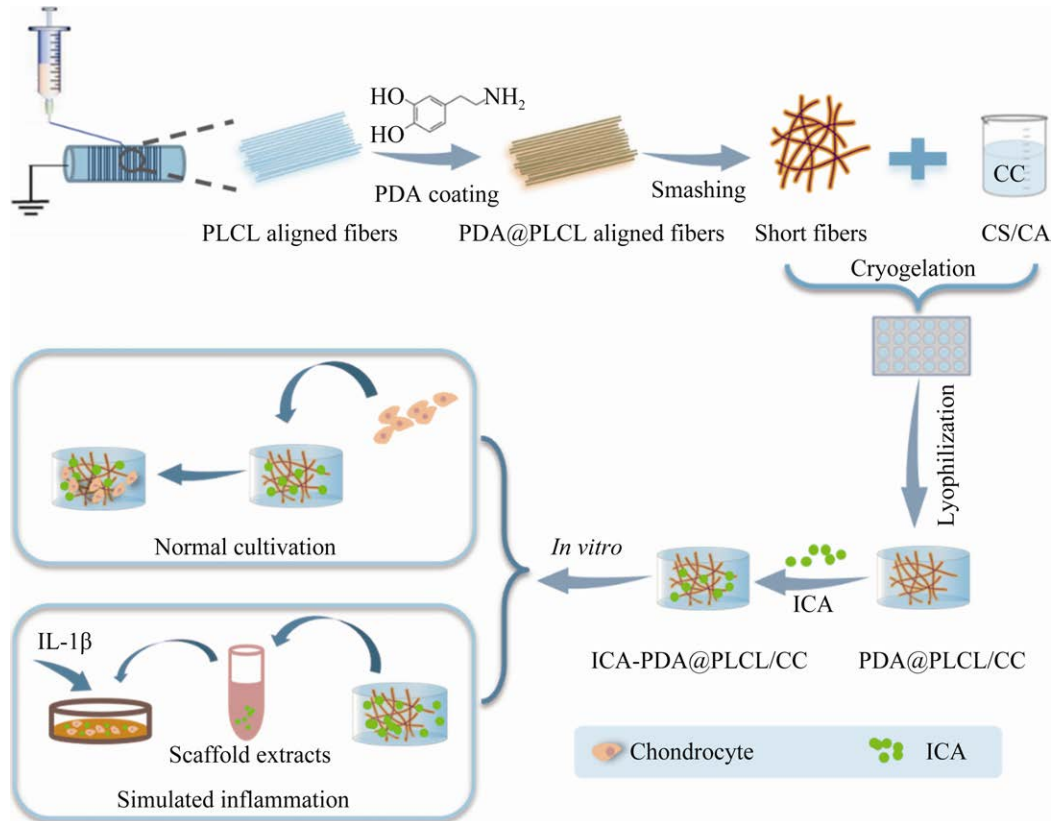


图 1 实验设计示意图

Figure 1 Schematic of engineering a chitosan-based biomimetic scaffold loaded with ICA for promoting chondrogenesis and ameliorating inflammation related to cartilage regeneration.

首先通过冻-融和冷冻干燥方法制备 PDA@PLCL 短纤维增强的壳聚糖基支架 (PDA@PLCL/CC), 然后将 ICA 通过物理吸附方法负载到 PDA@PLCL/CC 上, 制备成载药的 ICA-PDA@PLCL/CC 仿生软骨支架。最后, 通过体外兔软骨细胞培养实验, 验证 ICA 作为一种多功能生物活性成分在促进软骨形成和减弱软骨细胞的炎症反应中的作用功效。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料、试剂和仪器

材料及试剂: 聚 L-丙交酯-己内酯(PLCL, 粘度 3.6 dL/g, 共聚比 75 : 25, 济南岱罡生物材料); 聚乙烯 (PEO,  $M_w > 500$  万, Alfa Aesar 公司); 六氟异丙醇 (HFIP, 上海达瑞); 壳聚糖 (CS, 脱乙酰度为 86.32%,  $M_w = 90$  万, 浙江金壳生物化学有限公司); 柠檬酸 (CA, 国药集团化学试剂有限公司); 淫羊藿苷 (ICA, 成都格利普生物科技有限公司); 多巴胺盐酸盐 (DA, 美国 Sigma); 高糖 DMEM 培养基 (HyClone 公司); 胎牛血清 (FBS, Gibco 公司); 青霉素-链霉素 (P/S, Gibco 公司); CCK-8 试剂 (上海碧云天生物有限公司); 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI 染料, Invitrogen 公司)、鬼笔环肽染料 (Phalloidin, Invitrogen 公司); 活/死细胞染色试剂盒 (赛默飞世尔科技公司); BIOZOL 全 RNA 提取试剂盒 (新赛美生物科技有限公司); 反转录和定量试剂盒 (天根生化科技); 糖胺聚糖 (GAG)、II 型胶原 (Col II) ELISA 试剂盒 (上海 Korain Biotech 公司); 白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , PeproTech 公司); 甲苯胺蓝染液 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 兔软骨细胞 (上海市第九人民医院)。

仪器: 磁力搅拌器 (H05-1, 上海梅颖浦仪器科技有限公司)、PB100 型手持式匀浆机

(PB100, 英国 Prima 公司)、冷冻干燥机 (Lab-1C-80, 北京博医康实验仪器有限公司)、扫描电子显微镜 (JSM-5600, JEOL 公司)、力学测试机 (HY-940FS, 上海恒驭仪器有限公司)、紫外分光光度计 (TU-1810, 北京普析通用仪器有限责任公司)、酶标仪 (MK3 型, Thermo 公司)、倒置荧光显微镜 (Eclipse Ti-S, 日本 Nikon 公司)、金相显微镜 (Nikon 80i, 尼康公司)、PCR 仪 (9700 型, Life 公司)、实时荧光定量 PCR 仪 (ABI Prism 7500, Applied Biosystems 公司)。

### 1.2 PDA@PLCL 纤维增强 CS 基复合水凝胶的制备与表征

将 PLCL 溶解于六氟异丙醇 (hexafluoroisopropanol, HFIP) 溶剂中, 按 PLCL 和 PEO 质量比为 19 : 1 配制成质量体积比为 12% 的纺丝液进行电纺丝, 得到 PLCL 取向电纺纤维膜。将多巴胺盐酸盐溶于 10 mmol/L 的 Tris-缓冲液 (pH 8.5) 中, 配制成 2 mg/mL 的 DA 溶液。将纤维膜剪成适当大小浸泡在 DA 溶液中, 室温振荡 12 h, 得到 PDA 涂覆的 PLCL 纤维膜 (PDA@PLCL)。将 PDA@PLCL 纤维膜剪成 2 mm $\times$ 2 mm 大小的碎片后在去离子水中通过匀浆机做匀浆处理, 冻干后得到 PDA@PLCL 短纤维。然后将一定量的短纤维 (wt=50% CS) 加入到柠檬酸交联的壳聚糖溶液 ( $W_{CS} : W_{CA} = 7 : 3$ ) 中, 搅拌均匀后倒入 48 孔板冷冻干燥 3 d, 之后用 0.5 mol/L NaOH 溶液解冻 4 h, 得到 PDA@PLCL/CC 水凝胶 (图 1), 去离子水浸泡 3 d 后冻干。

通过扫描电子显微镜 (SEM) 对 CC、PLCL/CC 和 PDA@PLCL/CC 支架的内部微观结构进行形貌观察。利用 Image-J 软件分析孔径大小。通过无水乙醇置换法检测支架孔隙率<sup>[21]</sup>。通过测量支架在 PBS (37  $^{\circ}$ C) 中浸泡不同时间的重量变化分析其吸水率。为确定各支

架的压缩力学性能,将干态的 CC、PLCL/CC 及 PDA@PLCL/CC 支架 (直径 11 mm×高 5.5 mm) 以 3 mm/min 的速度在力学测试机上垂直压缩 60%应变,通过应力-应变曲线计算干态下各组支架的杨氏模量。

### 1.3 负载 ICA 的 PDA@PLCL/CC 水凝胶的药物释放行为

将 ICA 溶于二甲基亚砜,配制成浓度为 10 mmol/L 的 ICA 母液,然后用乙醇稀释成 3 种不同浓度的 ICA 药物溶液 (10、50、100 μmol/L 分别命名为 ic1、ic2、ic3)。将 PDA@PLCL/CC 支架浸泡在 3 种不同浓度的 ICA 溶液中,37 °C 恒温水浴中 100 r/min 振荡 12 h 进行药物吸附,得到 ic1-PDA@PLCL/CC、ic2-PDA@PLCL/CC、ic3-PDA@PLCL/CC 载药支架。然后取出支架,保留载药支架负载后溶液,用紫外分光光度计检测 360 nm 处吸光值<sup>[22]</sup>,根据标准曲线计算溶液中药物的剩余量,利用公式 (1) 计算支架对 ICA 的负载效率:

$$\text{负载效率(\%)} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中,  $W_0$  和  $W_1$  分别是溶液中 ICA 加入的总量和负载后溶液中 ICA 的余量。

为检测载药支架在 PBS 中的释放情况,将载药支架浸泡在 5 mL 的 PBS 溶液中,37 °C、90 r/min 摇动。在不同时间点,取出 3 mL 的药物释放液,再加入等量的新鲜 PBS。用紫外分光光度计测量所收集的 PBS 在 360 nm 处的吸光值,根据标准曲线计算 ICA 的释放量并绘制释放动力学曲线。

### 1.4 细胞种板和支架浸提液的提取

将冻存的兔软骨细胞 ( $P_2$ ) 在含 10% FBS 和 1% P/S 的高糖 DMEM 培养基中进行复苏后培养。细胞种板前,将各组支架材料在紫外下照射 24 h,75%的乙醇浸泡 2 h,PBS 清洗后加入培养基在 37 °C 预培养过夜。最后,按照一定

细胞密度接种到支架上,2 d 更换一次培养基。

将各组支架分别浸泡在无血清的培养基中,37 °C 振荡 24 h 后,收集支架浸提液,用 0.22 μm 无菌过滤器进行无菌过滤,然后加入 10%的 FBS 和 1%的 P/S 配制成浸提液条件培养基<sup>[23]</sup>。

### 1.5 细胞毒性评价

通过 CCK-8 检测负载不同 ICA 浓度(ic1、ic2、ic3)的支架对细胞增殖的影响。将密度为  $5 \times 10^5$  个/孔的软骨细胞接种在 PDA@PLCL/CC、ic1-PDA@PLCL/CC、ic2-PDA@PLCL/CC 和 ic3-PDA@PLCL/CC 四组支架上,加入 500 μL 培养基,利用 CCK-8 试剂盒检测培养 1、4、7 d 后的细胞增殖情况。

通过活/死细胞染色检测支架的细胞活力。将密度为  $5 \times 10^5$  个/孔的软骨细胞接种在 CC、PLCL/CC、PDA@PLCL/CC 和 ic1-PDA@PLCL/CC (即 ICA-PDA@PLCL/CC) 四组支架上,加入 500 μL 培养基,培养 48 h 后每孔加入 300 μL 活/死染色试剂孵育 15 min,孵育完成后用 PBS 清洗,最后在倒置荧光显微镜下观察细胞的存活情况。

### 1.6 软骨细胞形貌观察

将密度为  $5 \times 10^5$  个/孔的软骨细胞接种在 CC、PLCL/CC、PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC 四组支架上,每孔加 500 μL 培养基,放入细胞培养箱中培养 4 d 后,用 2.5%的戊二醛固定细胞 4 h 以上,然后进行乙醇梯度脱水,脱水结束后冻干,通过 SEM 观察支架上细胞的形貌并拍照。

将密度为  $5 \times 10^5$  个/孔的软骨细胞接种在 24 孔细胞培养板中,先通过含 IL-1β (1 μg/mL) 培养基诱导培养软骨细胞 24 h,随后加入 500 μL 的 PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC 支架浸提液条件培养基,培养 24 h 后用 Phalloidin 和 DAPI 分别对细胞骨架和细胞核进行染色,

观察支架释放的 ICA 对炎症软骨细胞形貌变化的影响。

### 1.7 基因表达

将软骨细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种到 6 孔细胞培养板, 随后加入 2 mL 的 CC、PLCL/CC、PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC 四组支架浸提液条件培养基培养 4 d 后, 按照 BIOZOL 试剂盒说明提取 RNA, 然后按照 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒的方法, 将提取到的 RNA 反转录成 cDNA, 最后按照 Super Real PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒, 加样结束后进行 qRT-PCR 实验, 检测软骨相关基因 *sox-9*、*gag*、*col I* 和 *col II* 的表达。

另外, 将软骨细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种到 6 孔细胞培养板, 用含 IL-1 $\beta$  培养基诱导培养 24 h, 随后加入 2 mL 的 PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC 支架的浸提液条件培养基培养 24 h 后, 检测炎症软骨细胞促炎症基因 (*il-1 $\beta$* 、*il-6*、*inos*)、金属基质降解酶 (*mmp-3*) 及软骨相关功能基因 (*sox-9*、*gag*、*col II*)。管家基因 *GAPDH* 设置为内参, 软骨细胞功能表达基因及炎症相关基因引物序列见表 1。

### 1.8 蛋白含量测定 (ELISA)

将软骨细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种到 CC、PLCL/CC、PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC 四组支架上, 每孔加入 500  $\mu$ L 培养基,

培养 4 d 后, 取上清液。按照说明书配制不同浓度的标准品, 加入标准品样品, 随后加入抗 GAG 或 Col II 抗体, 再加入酶链亲和素-HRP, 盖上封板膜, 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后进行洗涤。然后向每孔依次加入显色剂 A、显色剂 B, 振荡混匀, 37  $^{\circ}$ C 避光显色 10 min。最后加入终止液终止反应。用酶标仪在 450 nm 处测量吸光值, 通过标准样品的浓度和对应吸光值作标准曲线, 并计算 GAG 和 Col II 含量。

### 1.9 甲苯胺蓝染色

为研究炎症作用下 ICA-PDA@PLCL/CC 对炎症软骨细胞分泌 GAG 的影响, 将软骨细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种到 24 孔细胞培养板, 用含 IL-1 $\beta$  培养基诱导培养 24 h, 再加入 500  $\mu$ L 的 PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC 支架的浸提液条件培养基培养 4、7 d 后, 使用甲苯胺蓝染料进行染色。步骤为: 吸出培养液, 每孔加入 500  $\mu$ L 甲苯胺蓝染料, 静置 10 min。然后吸去染料, PBS 洗 3 次后, 用金相显微镜对 4 d、7 d 的 GAG 分泌情况进行观察和拍摄。

### 1.10 免疫荧光染色

为研究 ICA-PDA@PLCL/CC 支架释放的 ICA 对炎症软骨细胞分泌 Col II 的影响, 将软骨细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种到 24 孔细胞培养板, 用含 IL-1 $\beta$  培养基诱导培养 24 h, 然后加入 500  $\mu$ L 的 PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@

表 1 qRT-PCR 检测相关引物序列

Table 1 Primers used for qRT-PCR

Genes	Forward primer sequences (5'→3')	Reverse primer sequences (5'→3')
<i>GAPDH</i>	CACCCACTCCTCCACCTT	TCCACCACCCTGTTGCT
<i>sox-9</i>	GAGGACGCATTTGGTAAGC	AAGGCAGGAGGAATCGC
<i>gag</i>	CTGCATCTGGCCTGGAG	CTGCTTCCCATCCTGTCTG
<i>col II</i>	CCACGCTCAAGTCCCTCA	TCACCGCTCTTCCACTCG
<i>col I</i>	TGCCATCAAGGTCTTCTGC	AGCCATCGGTCATGCTCT
<i>il-1<math>\beta</math></i>	CCCAAGGCCACAGGTAT	GGCACGTATGAGCTGAAAG
<i>il-6</i>	GTGGTGGCTACCGCTTTC	AGTGCCTCCTTTCTGTTCAT
<i>inos</i>	AAGAGCCCAGCGAACAGC	CTGTAGTCATCCCAGGTGT
<i>mmp3</i>	ATGGAGCCTCAAGGGATG	AAGCCAAGGAACTTCTGC

PLCL/CC 支架的浸提液条件培养基培养 24 h 后,通过免疫荧光染色检测软骨细胞 Col II 的表达情况。步骤为:用 4%的多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗后加入 0.1%的 Triton X-100 通透 15 min;然后用 10%的山羊血清封闭 30 min,用 PBS 将一抗稀释 200 倍,每孔加 300  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;PBS 清洗后加入 300  $\mu\text{L}$  荧光物质标记的二抗,避光孵育 90 min, PBS 洗涤后用 DAPI 染料对细胞核染色,最后用倒置荧光显微镜进行观察和拍照。

### 1.11 统计分析

所有实验数据以平均值 $\pm$ 标准差形式表示,采用 Origin 8.0 软件对相关数据进行统计分析(单因素方差分析 one way ANOVA),分析实验各组之间是否存在显著性差异。\*:  $P < 0.05$  时为有显著性差异; \*\*:  $P < 0.01$  时为有极显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 PDA@PLCL/CC 水凝胶的制备及其对 ICA 的负载和释放

通过 SEM 观察支架的截面形貌,从图 2A 可以看出,3 组支架均具有连通的多孔结构。对孔径大小进行统计分析(图 2B)发现,CC、PLCL/CC 和 PDA@PLCL/CC 支架的孔径分别是  $(121 \pm 39) \mu\text{m}$ 、 $(129 \pm 29) \mu\text{m}$  和  $(119 \pm 25) \mu\text{m}$ ,组间无显著性差异。孔隙率检测结果(图 2C)显示,相比 CC 的孔隙率  $(86.7 \pm 2.2)\%$ , PLCL/CC 和 PDA@PLCL/CC 的孔隙率略有降低,分别是  $(84.3 \pm 2.0)\%$  和  $(84.2 \pm 2.3)\%$ ,但无显著性差异,这可能与短纤维的引入有关。3 组支架均具有较合适的孔径  $(100\text{--}300 \mu\text{m})$  和孔隙率  $(>80\%)$ ,满足细胞生长的空间要求<sup>[24-26]</sup>。

CC、PLCL/CC 和 PDA@PLCL/CC 三组支架均具有快速吸水能力(图 2D),在 1 min 内基

本均达到最大吸水率,之后处于稳定状态。相对于 CC 组,PLCL/CC 组的吸水率明显下降,而 PDA@PLCL/CC 组的吸水率要高于 PLCL/CC 组,这可能与 PDA 含有的大量亲水基团 ( $-\text{NH}_2$  和  $-\text{OH}$ ) 有关。高吸水率有利于为细胞的生长提供合适的营养和代谢产物的交换能力。

引入短纤维可以显著增强 CC 支架的力学性能(图 2E-F)。与 CC 组相比,PLCL/CC 组和 PDA@PLCL/CC 组的压缩应力分别提高了 0.7 倍和 2.3 倍,杨氏模量则分别提高了 1.3 倍和 2.6 倍。就增强效率来看,PDA@PLCL 短纤维的增强效果最明显,这可能是 PDA@PLCL 与水凝胶 CC 基质之间的界面相互作用更强所致。支架较高的力学性能有利于为软骨组织再生提供合适的结构支撑。

在对 ICA 的负载方面,从图 2G 可以看出,支架对 ic1、ic2 和 ic3 浓度下的负载率分别达到了  $(48.5 \pm 1.7)\%$ 、 $(52.7 \pm 0.5)\%$  和  $(43.7 \pm 0.3)\%$ 。从释放动力学(图 2H)结果看,负载 3 种不同浓度 ICA 药物的支架,在前 18 h 均有突释现象,之后呈现缓慢释放状态。在 18 h 时,ic1、ic2 和 ic3 浓度下支架的 ICA 释放率分别为 69.3%、17.7% 和 12.4%。这可能由于 ICA 难溶于水,在 PBS 中溶解度有限,导致 ic1 浓度下支架的释放率高于其他两组。

### 2.2 ICA-PDA@PLCL/CC 仿生支架对软骨细胞功能的影响

作为一种促软骨再生和抗炎的小分子药物,有研究表明 ICA 的安全浓度阈值很低,浓度超过  $10 \mu\text{mol/L}$  时可观察到细胞毒性<sup>[18,27-28]</sup>。从细胞增殖结果(图 3A)看,负载 3 种浓度的支架均能促进细胞增殖,但在第 7 天时,ic1-PDA@PLCL/CC 对软骨细胞的增殖能力显著高于其他组,显示出更好的促软骨细胞增殖

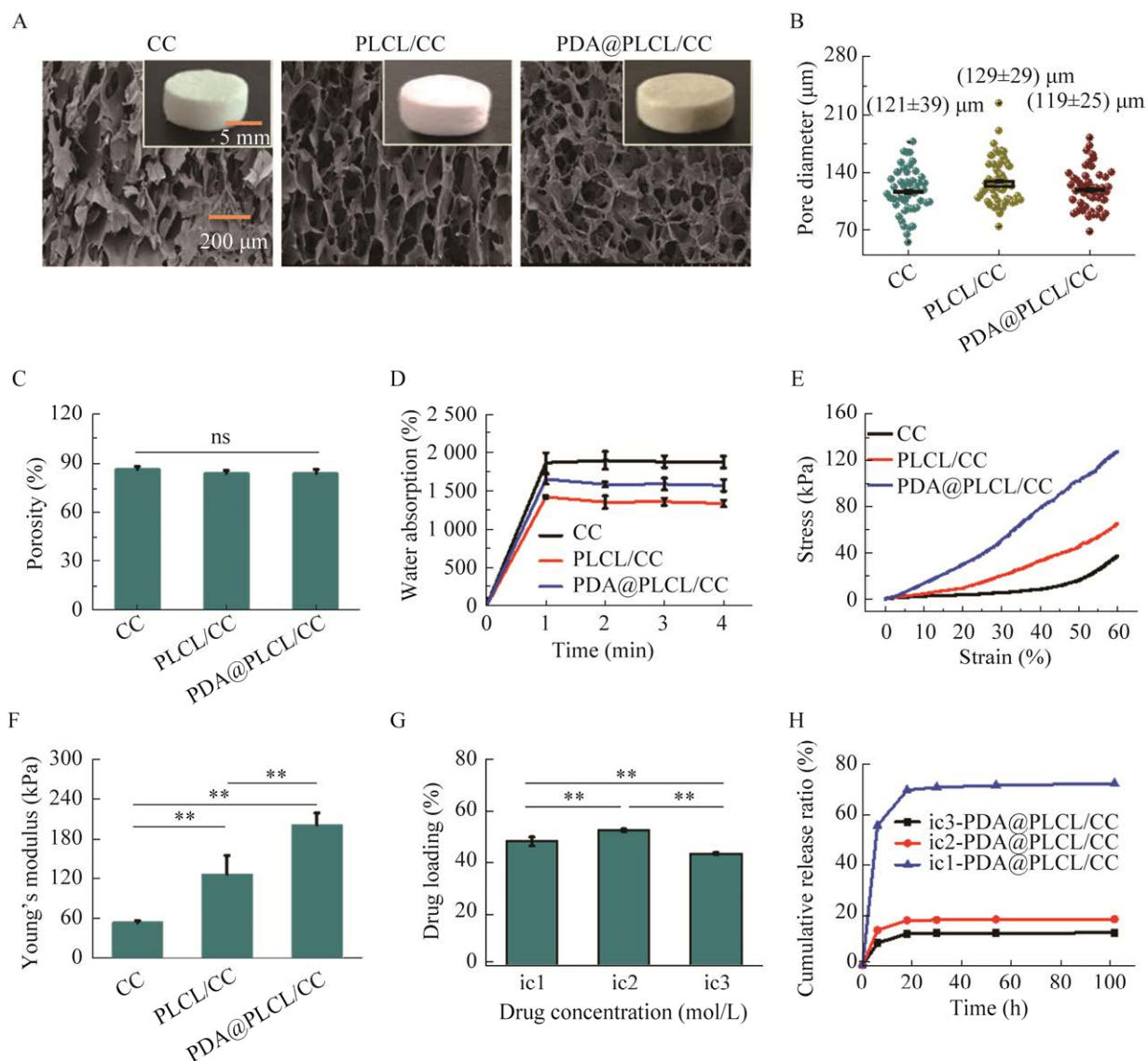


图2 PDA@PLCL/CC 的制备及其对 ICA 的负载和释放能力

Figure 2 Preparation of the PDA@PLCL/CC scaffold for loading of ICA for controlled release. (A) SEM images of the different scaffolds (insets showing the macroscopic photos). (B) Pore size. (C) Porosity. (D) Water absorption kinetics. (E) Compressive stress-strain curves. (F) Young's modulus. (G) Drug loading percentages. (H) Drug release kinetics. \*\*:  $P < 0.01$ .

能力。因此,后续实验使用 ic1 浓度的药物负载支架进行研究(统一命名为 ICA-PDA@PLCL/CC)。进一步的活/死细胞染色结果(图 3B)显示,CC 和 PLCL/CC 支架上存在一些死细胞(红色),而 PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC (即 ic1-PDA@PLCL/CC)上基本都是活细胞(绿

色),这说明 ICA-PDA@PLCL/CC 支架对软骨无细胞毒性。

通过 SEM 观察软骨细胞在支架上的黏附和形貌结果(图 3C)看出,软骨细胞在 CC 上呈球形,而在 PLCL/CC、PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC 支架上的细胞则展示更好



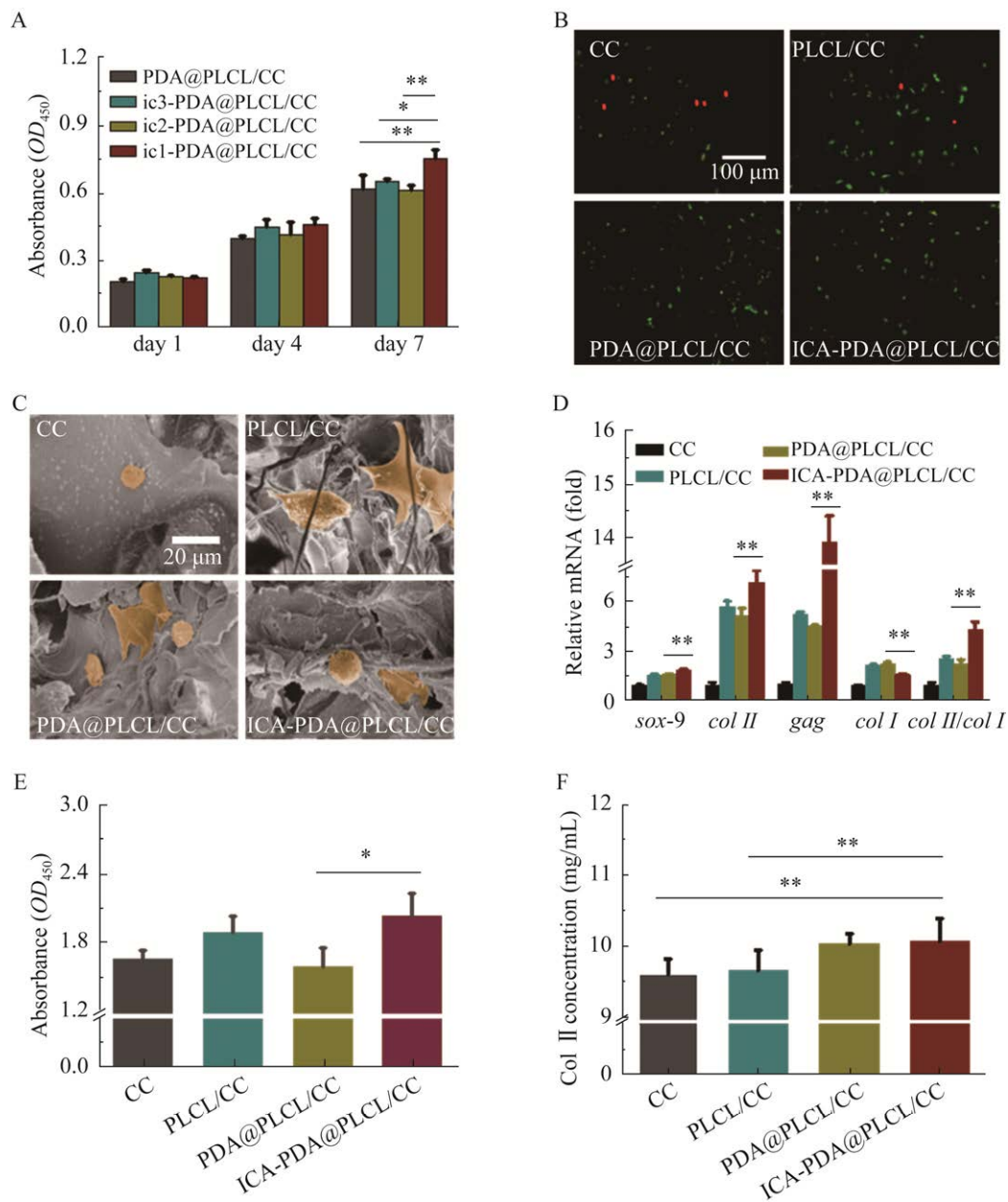


图3 ICA-PDA@PLCL/CC 支架对软骨细胞行为和功能表达的影响

Figure 3 Effects of the ICA-PDA@PLCL/CC scaffold on chondrocyte behavior and function. (A) Proliferation of chondrocytes on different scaffolds after 1, 4 and 7 days of culture. (B) Live/dead staining of chondrocytes (live cells in green and dead cells in red) cultured on different scaffolds for 48 h, scale bar=100  $\mu$ m. (C) SEM images of chondrocytes on different scaffolds after 4 days of culture, scale bar=20  $\mu$ m. (D) Expression of chondrocytes related genes (*sox-9*, *col II*, *gag*, *col I*, *col II/col I*) after 4 days of culture. (E-F) expression of GAG and Col II assayed by ELISA on different scaffolds after 7 days of culture. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

的黏附和铺展。但相比于 PLCL/CC 和 PDA@PLCL/CC 组, ICA-PDA@PLCL/CC 支架上软骨

细胞有利于维持原有形态, 这说明 ICA-PDA@PLCL/CC 能更好地模拟软骨细胞的生存环境、

促进软骨细胞黏附、维持软骨细胞形态。

Sox-9 是激活 *gag* 和 *col II* 的早期软骨生成的特异性因子,在软骨形成中起着关键作用<sup>[29-30]</sup>, Col I 由肥大软骨细胞产生,不利于软骨形成<sup>[31]</sup>, *col II/col I* 的比值通常用来评估软骨细胞的分化状态,其比值小于 1 被认为是软骨细胞处于去分化状态<sup>[32-33]</sup>。从基因检测结果 (图 3D) 可以看出,相比 CC 组,含有短纤维引入的 PLCL/CC、PDA@PLCL/CC 和 ICA-PDA@PLCL/CC 组中的基因 *sox-9*、*gag*、*col II* 表达明显增加,而 ICA-PDA@PLCL/CC 组 *sox-9*、*gag*、*col II* 基因的表达要高于 PLCL/CC 和 PDA@PLCL/CC 组。相比于 PLCL/CC 和 PDA@PLCL/CC 组,ICA-PDA@PLCL/CC 组基因 *col I* 的表达降低。从 *col II/col I* 比值可以看出,4 组支架 *col II/col I* 的比值均大于 1,说明软骨细胞处于正常分化状态;而 ICA-PDA@PLCL/CC 组 *col II/col I* 的比值为 4.37,明显高于其他组,说明具有较高的促软骨形成能力。因此,可以得出 ICA-PDA@PLCL/CC 能够提高 *sox-9*、*gag* 和 *col II* 基因的表达,降低 *col I* 基因的表达,*col II/col I* 高比值说明 ICA-PDA@PLCL/CC 更有利于维持软骨细胞表型和促进软骨生成。

进一步通过细胞外基质成分 (GAG 和 Col II) 的分泌情况评价 ICA-PDA@PLCL/CC 的促软骨形成作用。从 ELISA 结果 (图 3E-F) 可以看出,与 CC 组相比,ICA-PDA@PLCL/CC 组软骨细胞分泌的 GAG 和 Col II 的量更高。这说明 ICA-PDA@PLCL/CC 仿生支架具有促进软骨细胞软骨相关基因的表达和相关蛋白的生成,利于维持软骨细胞表型。软骨细胞分泌的软骨特异性基质成分是软骨细胞维持其表型的重要条件,对软骨细胞形貌的维持具有正反馈作用<sup>[34-35]</sup>,这可能是 ICA-PDA@PLCL/CC 支架维持软骨细胞球形状态的重要原因。

### 2.3 ICA 对炎症软骨细胞功能的影响

正常软骨细胞呈圆形或椭圆形,其所处基质微环境的改变会导致软骨细胞呈成纤维细胞表型<sup>[36]</sup>。IL-1 $\beta$  是一种促炎症细胞因子,在骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 中发挥重要作用<sup>[37]</sup>,可诱导基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的生成。因此,IL-1 $\beta$  可被用于模拟 OA 的炎症微环境,用于软骨细胞体外炎症响应行为研究。从 DAPI-phalloidin 染色图 (图 4A) 中可以看出,无 IL-1 $\beta$  刺激组 (PDA 组) 软骨细胞接近球型,加入 IL-1 $\beta$  后 (PDA/IL-1 $\beta$  组),软骨细胞呈成纤维细胞形态,但当用含有 ICA 的支架浸提液条件培养基 (ICA/IL-1 $\beta$  组) 处理后软骨细胞纤维化细胞表型减弱,呈椭圆形态。从细胞伸长率结果 (图 4B) 可以进一步定量印证,含 IL-1 $\beta$  组细胞的伸长率均增加,而 ICA/IL-1 $\beta$  组细胞伸长率比 PDA/IL-1 $\beta$  组降低了 25%。这些结果表明,ICA-PDA@PLCL/CC 支架释放的 ICA 能够缓解软骨细胞在炎症环境中发生的软骨细胞纤维化病变。

从炎症相关基因检测结果 (图 4C) 可以看出,相比于 PDA 组,PDA/IL-1 $\beta$  组促炎症基因 (*il-1 $\beta$* 、*il-6*、*inos*) 的表达明显增加,而 ICA/IL-1 $\beta$  组促炎症基因 *il-1 $\beta$* 、*il-6* 和 *inos* 比 PDA/IL-1 $\beta$  组分别降低了 13.4%、15.4% 和 30.0%,具有显著性差异。这些结果表明,ICA-PDA@PLCL/CC 支架上的 ICA 在炎症环境下能够下调促炎症基因的表达,有利于缓解炎症反应。

从软骨基质代谢基因检测结果 (图 4D) 可以看出,相比于 PDA 组,PDA/IL-1 $\beta$  组软骨相关功能基因 *sox-9*、*gag* 和 *col II* 的表达明显降低。与 PDA/IL-1 $\beta$  组相比,ICA/IL-1 $\beta$  组基因 *sox-9*、*gag* 和 *col II* 的表达分别增加了 1.3 倍、2.0 倍和 4.8 倍,具有极显著性差异。从 *mmp3* 的表达可以看出,相比于 PDA 组,PDA/IL-1 $\beta$  组 *mmp3* 的表达明显增加,而 ICA/IL-1 $\beta$  组由

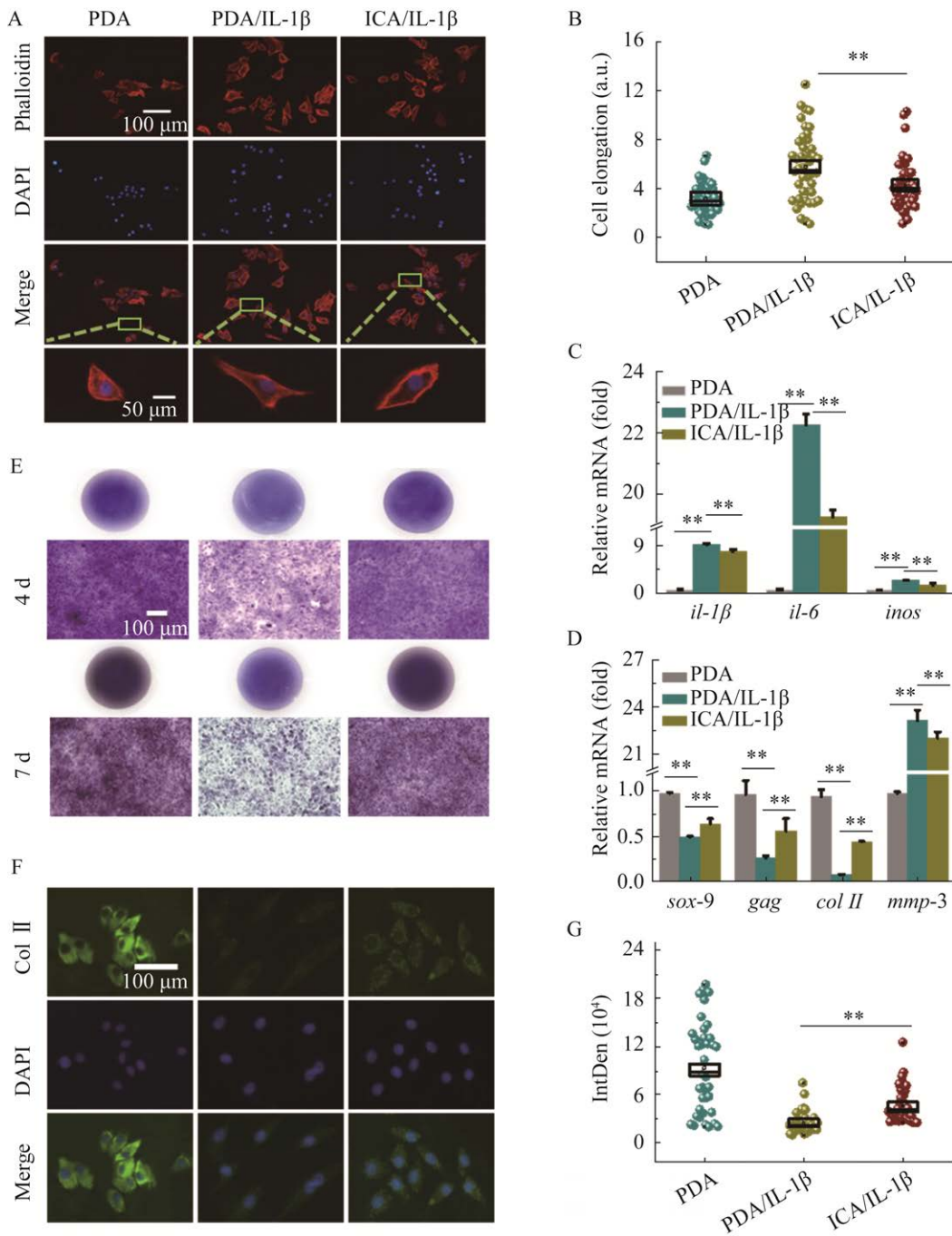


图4 ICA-PDA@PLCL/CC 支架释放的 ICA 对炎症软骨细胞功能表达的影响

Figure 4 Effects of presence of ICA on the functional expression of inflammatory chondrocytes. (A) DAPI-phalloidin staining of chondrocytes cultured in conditioned medium for 24 h, cytoskeleton (red) and nucleus (blue), scale bar=100  $\mu$ m. (B) Quantitative analysis of cell elongation. (C) Pro-inflammatory gene expression of chondrocytes after 24 h of culture in conditioned medium. (D) Functional gene expression of the chondrocytes after 4 days of culture in conditioned medium. (E) Toluidine blue staining of chondrocytes after 4 and 7 days of culture in conditioned medium, scale bar=100  $\mu$ m. (F) Col II immunofluorescence staining of chondrocytes after 24 h of culture in conditioned medium, Col II (green) and nucleus (blue), scale bar=100  $\mu$ m. (G) Immunofluorescence intensity analysis. \*\*:  $P < 0.01$ .

于 ICA 的存在, *mmp3* 的表达比 PDA/IL-1 $\beta$  组降低了 5.2%, 具有显著性差异。这些结果表明, ICA-PDA@PLCL/CC 支架上的 ICA 能够提高软骨细胞基质合成基因的表达, 减缓基质的降解, 从而加速软骨基质的形成。

甲苯胺蓝是一种碱性染料, 细胞产生的酸性物质能与之结合而被染色, 因此可以反映软骨细胞中酸性 GAG 的合成情况。从图 4E 结果可以看出, 软骨细胞基质经染色后呈蓝紫色, 与培养 4 d 相比, 培养 7 d 后的各实验组中的 GAG 合成明显增加。相比于 PDA 组, PDA/IL-1 $\beta$  组的颜色较浅, 而 ICA/IL-1 $\beta$  组颜色变深。这些结果表明, 在炎症因子的刺激下, GAG 的合成受到抑制, 而 ICA 的存在能够减缓炎症的抑制作用, 提高软骨细胞外基质的合成。

免疫荧光染色利用带有荧光标记的二抗与待测蛋白的一抗结合, 通过荧光强度来定量相关蛋白的合成情况。从图 4F 可以看出, 与 PDA 组相比, PDA/IL-1 $\beta$  和 ICA/IL-1 $\beta$  组中 Col II 的表达明显减弱, 但相比于 PDA/IL-1 $\beta$  组, ICA/IL-1 $\beta$  组由于 ICA 的作用使 Col II 的表达增加。从荧光定量分析 (图 4G) 可以得出, ICA/IL-1 $\beta$  组的荧光强度比 PDA/IL-1 $\beta$  组提高了 1.8 倍。这些结果表明, ICA-PDA@PLCL/CC 支架释放的 ICA 能够有效促进炎症作用下 Col II 的合成, 减缓对细胞外基质的降解。

### 3 结论

本研究设计了一种具有促软骨形成和炎症缓解双重作用的壳聚糖基工程软骨仿生支架 (即 ICA-PDA@PLCL/CC)。PDA@PLCL 短纤维的加入不仅提高了壳聚糖基支架的力学性能, 而且能够促进软骨细胞增殖和粘附; 而负载的 ICA 有利于增强壳聚糖基 CTE 支架的促软骨形成能力。在模拟炎症存在的情况下,

ICA-PDA@PLCL/CC 仿生支架释放的 ICA 还能减缓软骨细胞的炎症反应, 减弱对基质的降解。本研究因此证明了 ICA-PDA@PLCL/CC 仿生支架在促进软骨形成的同时还能缓解炎症反应, 这为未来开展应用于软骨损伤的再生修复提供了初步的实验理论基础。

### REFERENCES

- [1] Kessler MW, Ackerman G, Dines JS, et al. Emerging technologies and fourth generation issues in cartilage repair. *Sports Med Arthrosc Rev*, 2008, 16(4): 246-254.
- [2] Richter W. Mesenchymal stem cells and cartilage *in situ* regeneration. *J Intern Med*, 2009, 266(4): 390-405.
- [3] McBane JE, Battiston KG, Wadhvani A, et al. The effect of degradable polymer surfaces on co-cultures of monocytes and smooth muscle cells. *Biomaterials*, 2011, 32(14): 3584-3595.
- [4] Liu W, Cao YL. Application of scaffold materials in tissue reconstruction in immunocompetent mammals: our experience and future requirements. *Biomaterials*, 2007, 28(34): 5078-5086.
- [5] Zhang Y, Yu J, Ren K, et al. Thermosensitive hydrogels as scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2019, 20(4): 1478-1492.
- [6] Jian XL, Prudhommeaux F, Meunier A, et al. Effects of chitosan on rat knee cartilages. *Biomaterials*, 1999, 20(20): 1937-1944.
- [7] Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2589-2598.
- [8] Liu X, Song S, Huang J, et al. HBC-nanofiber hydrogel scaffolds with 3D printed internal microchannels for enhanced cartilage differentiation. *J Mater Chem B*, 2020, 8(28): 6115-6127.
- [9] Shen Y, Xu Y, Yi B, et al. Engineering a highly biomimetic chitosan-based cartilage scaffold by using short fibers and a cartilage-decellularized matrix. *Biomacromolecules*, 2021, 22(5): 2284-2297.
- [10] Mirahmadi F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, et al. Enhanced mechanical properties of

- thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng: C*, 2013, 33(8): 4786-4794.
- [11] Wright LD, McKeon-Fischer KD, Cui Z, et al. PDLA/PLLA and PDLA/PCL nanofibers with a chitosan-based hydrogel in composite scaffolds for tissue engineered cartilage. *J Tissue Eng Regen Med*, 2014, 8(12): 946-954.
- [12] Tiğli RS, Gümüşderelioğlu M. Evaluation of RGD-or EGF-immobilized chitosan scaffolds for chondrogenic activity. *Int J Biol Macromol*, 2008, 43(2): 121-128.
- [13] Kim SE, Park JH, Cho YW, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *J Control Release*, 2003, 91(3): 365-374.
- [14] Gong L, Li J, Zhang J, et al. An interleukin-4-loaded bi-layer 3D printed scaffold promotes osteochondral regeneration. *Acta Biomater*, 2020, 117: 246-260.
- [15] Lo KW, Kan HM, Ashe KM, et al. The small molecule PKA-specific cyclic AMP analogue as an inducer of osteoblast-like cells differentiation and mineralization. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(1): 40-48.
- [16] Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, et al. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(12): 1277-1291.
- [17] Li C, Li Q, Mei Q, et al. Pharmacological effects and pharmacokinetic properties of icariin, the major bioactive component in *Herba Epimedii*. *Life Sci*, 2015, 126: 57-68.
- [18] Liu MH, Sun JS, Tsai SW, et al. Icariin protects murine chondrocytes from lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and extracellular matrix degradation. *Nutr Res*, 2010, 30(1): 57-65.
- [19] Zhang L, Zhang X, Li KF, et al. Icariin promotes extracellular matrix synthesis and gene expression of chondrocytes *in vitro*. *Phytother Res*, 2012, 26(9): 1385-1392.
- [20] Wang PZ, Meng QQ, Wang W, et al. Icariin inhibits the inflammation through down-regulating NF- $\kappa$ B/HIF-2 $\alpha$  signal pathways in chondrocytes. *Biosci Rep*, 2020, 40(11): BSR20203107.
- [21] 杨上莹, 袁卉华, 易兵成, 等. 柠檬酸改性壳聚糖水凝胶的制备与性能. *功能高分子学报*, 2018, 31(3): 232-240.  
Yang SY, Yuan HH, Yi BC, et al. Fabrication and characterization of citric acid modified chitosan hydrogel. *J Funct Polym*, 2018, 31(3): 232-240 (in Chinese).
- [22] Yang J, Liu Y, He L, et al. Icariin conjugated hyaluronic acid/collagen hydrogel for osteochondral interface restoration. *Acta Biomater*, 2018, 74: 156-167.
- [23] Zhai D, Chen L, Chen Y, et al. Lithium silicate-based bioceramics promoting chondrocyte maturation by immunomodulating M2 macrophage polarization. *Biomater Sci*, 2020, 8(16): 4521-4534.
- [24] Matsiko A, Gleeson JP, O'Brien FJ. Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(3/4): 486-497.
- [25] Liu XJ, Zhang YM, Li XS. Tough biopolymer IPN hydrogel fibers by bienzymatic crosslinking approach. *Chin J Polym Sci*, 2015, 33(12): 1741-1749.
- [26] Zhou F, Zhang X, Cai D, et al. Silk fibroin-chondroitin sulfate scaffold with immuno-inhibition property for articular cartilage repair. *Acta Biomater*, 2017, 63: 64-75.
- [27] Zhang X, Xu M, Song L, et al. Effects of compatibility of deproteinized antler cancellous bone with various bioactive factors on their osteogenic potential. *Biomaterials*, 2013, 34(36): 9103-9114.
- [28] Wang ZC, Sun HJ, Li KH, et al. Icariin promotes directed chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells but not hypertrophy *in vitro*. *Exp Ther Med*, 2014, 8(5): 1528-1534.
- [29] Varghese S, Hwang NS, Canver AC, et al. Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol*, 2008, 27(1): 12-21.
- [30] Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, et al. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*,

2005, 13(1): 80-89.

- [31] Wang Y, Middleton F, Horton JA, et al. Microarray analysis of proliferative and hypertrophic growth plate zones identifies differentiation markers and signal pathways. *Bone*, 2004, 35(6): 1273-1293.
- [32] Camarero-Espinosa S, Calore A, Wilbers A, et al. Additive manufacturing of an elastic poly(ester) urethane for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*, 2020, 102: 192-204.
- [33] Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, et al. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 2004, 86(2): 286-295.
- [34] Brittberg M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med*, 2010, 38(6): 1259-1271.
- [35] Villanueva I, Weigel CA, Bryant SJ. Cell-matrix interactions and dynamic mechanical loading influence chondrocyte gene expression and bioactivity in PEG-RGD hydrogels. *Acta Biomater*, 2009, 5(8): 2832-2846.
- [36] Ren Y, Zhang H, Wang YP, et al. Hyaluronic acid hydrogel with adjustable stiffness for mesenchymal stem cell 3D culture via related molecular mechanisms to maintain stemness and induce cartilage differentiation. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, 4(3): 2601-2613.
- [37] Roman-Blas JA, Contreras-Blasco MA, Largo R, et al. Differential effects of the antioxidant n-acetylcysteine on the production of catabolic mediators in IL-1beta-stimulated human osteoarthritic synoviocytes and chondrocytes. *Eur J Pharmacol*, 2009, 623(1/2/3): 125-131.

(本文责编 郝丽芳)