

# 可注射 RGD 功能化的透明质酸果胶水凝胶促进体外成软骨的研究

刘威 俞牧雨 于晓巍

**【摘要】 目的** 研究基于透明质酸(HA)-己二酸二酰肼(ADH)/RGD寡肽功能化果胶(PAD)的可注射 HA-ADH/PAD-RGD水凝胶体系的软骨形成作用。**方法** 采用脲交联法合成水凝胶。通过分析 HA-ADH 与 PAD-RGD 不同质量比(8:2、6:4、4:6)HA-ADH/PAD-RGD水凝胶的形态学、凝胶时间、力学强度、降解时间、细胞增殖和软骨作用等因素,综合评价该水凝胶的特性。**结果** 质量比从8:2减小到6:4和4:6时,水凝胶时间从(132.8±4.8)s分别增加到(188.7±10.1)s和(328.9±12.6)s( $P<0.01$ ),平衡溶胀比(ESR)从32.8±1.5分别依次增大到34.8±2.3和36.4±1.9( $P<0.01$ )。经过49d降解后,8:2、6:4、4:6质量比组水凝胶的剩余质量比依次为85.3%、73.5%和55.9%。另外,随着质量比减小,水凝胶的力学强度不断减小。培养1d后8:2、6:4、4:6质量比组水凝胶的dsDNA含量分别为(0.7±0.1)μg、(0.6±0.1)μg、(0.6±0.1)μg( $P>0.05$ )。培养21d后,6:4组水凝胶dsDNA含量为(1.9±0.2)μg明显高于8:2组[(1.6±0.1)μg, $P<0.05$ ]和4:6组[(1.5±0.1)μg, $P<0.05$ ]。6:4组水凝胶Ⅱ型胶原基因的表达为2.3±0.2明显高于8:2组(1.3±0.2, $P<0.05$ )和4:6组(1.0±0.1, $P<0.05$ )。6:4组糖胺聚糖(GAG)产生量为(16.5±1.4)μg明显高于8:2组[(9.1±1.4)μg, $P<0.05$ ]和4:6组[(8.8±1.0)μg, $P<0.05$ ]。包裹在6:4组水凝胶中软骨细胞胶原Ⅱ型免疫着色的细胞百分比为(83.7±15.7)%,明显高于8:2组[(53.3±9.2)%, $P<0.05$ ]和4:6组[(43.9±7.8)%, $P<0.05$ ]。**结论** HA-ADH/PAD-RGD水凝胶具有适宜的凝胶时间,力学强度,良好的组织相容性和细胞相容性,并能增强软骨细胞增殖,维持软骨细胞表型。不同质量比 HA-ADH/PAD-RGD水凝胶具有不同性质,6:4质量比水凝胶具有最好的物理化学和生物学性质。

**【关键词】** 可注射水凝胶;组织工程;软骨再生

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-7083.2018.03.012

**Chondrogenic effect of injectable hydrogel based on hyaluronic acid-adipic dihydrazide/G<sub>4</sub>RGDS-aldehyde pectin in vitro** LIU Wei<sup>1</sup>, YU Muyu<sup>2</sup>, YU Xiaowei<sup>1</sup>.

Department of Orthopaedic Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University<sup>1</sup>, Shanghai 200233, China; Department of Endocrinology and Metabolism, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University<sup>2</sup>, Shanghai 200233, China

Corresponding author: YU Xiaowei E-mail: yuxw@sjtu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the chondrogenic effect of injectable hydrogel system based on hyaluronic acid-adipicdihydrazide (HA-ADH)/G<sub>4</sub>RGDS-aldehyde pectin (PAD-RGD) in vitro. **Methods** We synthesized the hydrogel byhydrazine cross-linking method. We evaluated the characteristics of hydrogel by analyzing the different properties such as morphology, gelation time, mechanical strength, degradation time,the proliferation of cells and chondrogenic effect of different weight ratios (8:2, 6:4, 4:6) of HA-ADH/PAD-RGD. **Results** When the weight ratio decreased from 8:2 to 4:6, the hydrogel time increased from (132.8±4.8)s to (188.7±10.1)s and (328.9±12.6)s, respectively ( $P<0.01$ ), and the equilibrium swelling ratio (ESR) increased from 32.8±1.5 to 34.8±2.3 and 36.4±1.9, respectively ( $P<0.01$ ). After 49 days of degradation, the weight retention rate of the three kinds of hydrogel was 85.3%, 73.5%, and 55.9%, respectively. In addition, as the weight ratio decreased, the mechanical strength of the hydrogel decreased. After 1 day of culture, the dsDNA content of various gels was similar, and the values in the three groups were 0.7±0.1 μg, 0.6±0.1 μg and 0.6±0.1 μg, respectively ( $P>0.05$ ). After 21 days of culture, the dsDNA content in the 6:4 group was significantly higher than that in the 8:2 and 4:6 groups (1.9±0.2, 1.6±0.1 and 1.5±0.1) ( $P<0.05$ ). The expression of type Ⅱ collagen gene in the 6:4 group was 2.3±0.2, which was

基金项目: 国家自然科学基金(81572155)

作者单位: 200233, 上海交通大学附属第六人民医院骨科(刘威、于晓巍);200233, 上海交通大学附属第六人民医院内分泌科(俞牧雨)

通信作者: 于晓巍 E-mail: yuxw@sjtu.edu.cn

significantly higher than that of the 8 : 2 and 4 : 6 groups ( $1.3 \pm 0.2$  and  $1 \pm 0.1$ ) ( $P < 0.05$ ). The production of Glycosaminoglycan (GAG) in the 6 : 4 group was  $16.5 \pm 1.4 \mu\text{g}$ , which was significantly higher than that in the 8 : 2 and 4 : 6 groups ( $9.1 \pm 1.4 \mu\text{g}$ ,  $8.8 \pm 1.0 \mu\text{g}$ ) ( $P < 0.05$ ). The percentage of collagen type II immunostaining of chondrocytes encapsulated in the 6 : 4 hydrogel was  $83.7 \pm 15.7$ , which was significantly higher than that of the 8 : 2 and 4 : 6 groups ( $53.3 \pm 9.2$ ,  $43.9 \pm 7.8$ ) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Our research showed that the hydrogel had the proper gelation time, mechanical strength and good histocompatibility and cytocompatibility. Moreover, it could enhance the proliferation and maintain the phenotype of chondrocytes. Different weight ratios of hydrogel exhibited different properties. Among the three weight ratios, HA-ADH/PAD-RGD at the 6 : 4 had the best physiochemical and biological properties.

**【Key words】** Injectable hydrogel; Tissue engineering; Cartilage regeneration

软骨细胞生长于高度水化的细胞外基质 (ECM) 中, 通过分化簇抗原 44 (CD 44) 和整合素等细胞表面受体与 ECM 不断相互作用。在软骨修复工程中, 使用类似于 ECM 的仿生支架对促进软骨细胞增殖和分化非常重要。

可注射水凝胶具有以下优点: ①具微创性, 可通过关节镜技术将液态水凝胶注射到软骨缺损部位; ②液态的水凝胶完全填充不规则缺损后, 通过交联可变为固态, 增强力学性能。透明质酸 (HA) 是软骨 ECM 中糖胺聚糖 (GAG) 的重要成分, 可用于制作可注射水凝胶。但是, HA 可注射水凝胶在交联时可引入一些潜在的细胞毒性分子, 如光敏剂和催化剂, 引起细胞损害。因此, 开发无潜在细胞毒性的 HA 可注射水凝胶, 仍然是软骨缺损修复中亟待解决的问题。

以脲为主, 主要利用酰肼和醛官能团的交联方法近年来受到极大关注。该交联方法不使用任何有潜在毒性的试剂, 效率高, 无副产物, 反应条件温和, 细胞相容性良好<sup>[1]</sup>。但是, 由于缺乏必要的功能基团, 纯 HA 水凝胶无法完全模仿软骨 ECM 微环境。果胶是植物细胞壁中提取的天然多糖, 廉价且无免疫原性, 适合进行功能化<sup>[2]</sup>, RGD 寡肽则是 ECM 蛋白中细胞膜整合素识别的最小序列<sup>[3]</sup>。引入果胶和 RGD 寡肽可提高 HA 水凝胶的性能, 更有利于软骨再生。

我们发现了一种具有良好性质的仿生可注射 HA / 果胶水凝胶支架。这种支架由 HA-己二酸二酰肼 (HA-ADH) 与 RGD 寡肽功能化果胶二醛 (PAD) 发生凝胶化反应形成。终产物 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶成胶速度快, 具有可调节的力学性能、可控的降解行为、优异的细胞相容性和组织耐受性。总的来说, 枝接一定比例的 RGD 寡肽到 HA/果胶类水凝胶能够提供一种模拟机体组织的微环境, 有利于维持软骨细胞表

型, 促进间充质干细胞的成软骨分化, 为软骨再生提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

主要试剂: 透明质酸钠 (上海阿拉丁公司), 柑橘果胶 (Fluck 公司, 美国)。高碘酸钠 ( $\text{NaIO}_4$ )、ADH、4-吗啉代乙磺酸 (MES)、氯胺-T、对二甲基氨基苯甲醛、软骨素酶 ABC、蛋白酶 K ( $\geq 30$  单位每 mg 蛋白质)、透明质酸酶 (HAse) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。RGD 寡肽序列 ( $\text{G}_4\text{RGDS}$ ) (上海 GL 肽公司)。1-羟基苯并三唑水合物 (HOBt) (上海梯希爱公司)。N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDAC) (Adamas 公司, 美国)。所有其他试剂均购自国药化学试剂公司, PicoGreen dsDNA 试剂盒 (Life Technologies 公司, 中国)。

主要仪器: 氨基酸分析仪 (L-8900, Hitachi, 日本), 扫描电子显微镜 (SEM) (S-4800, Hitachi, 日本),  $^1\text{H}$  NMR 仪 (400 MHz, 美国), 实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 仪 (Roche 公司, 美国), 酶标仪 (BioTek 公司, 美国)。

实验动物: 新西兰兔 2 只, 雄性, 3 月龄, 体质量  $2 \sim 2.5 \text{ kg}$ 。

### 1.2 水凝胶的制备和检测

#### 1.2.1 HA-ADH 的制备和修饰

HA-ADH 按照文献报道方法进行修饰<sup>[4]</sup>。室温下, HA 和 ADH 以 1 : 30 (摩尔比) 溶于 MES 缓冲溶液 ( $0.1 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH} = 6.5$ ) 中, 同时加入 EDAC 和 HOBt, 使 EDAC : HOBt : HA = 1.5 : 1 : 1 (摩尔比), 溶液体系  $\text{pH} = 6.8$ 。48h 后将反应溶液彻底透析后冻干。以  $^1\text{H}$  NMR 仪测定 HA-ADH 的取代度 (DS), 凝胶渗透色谱 (GPC) 法测定其重均分子量 ( $M_w$ )。

### 1.2.2 果胶的生物功能化

PAD按照文献报道方法进行修饰<sup>[5]</sup>。室温下,黑暗环境中加入一定量的 $\text{NaIO}_4$ 后,将果胶溶液混合。12 h后加入乙二醇停止反应,以减少过量的 $\text{NaIO}_4$ 。将溶液透析后冷冻干燥得到产物。取6份样品,通过羟胺盐酸盐法测定PAD的氧化度<sup>[5]</sup>。随后,通过碳二亚胺化学反应,用 $\text{G}_4\text{RGDS}$ 共价修饰PAD<sup>[2]</sup>。将PAD溶于MES缓冲液(0.1 mol/L, 0.3 mol/L NaCl)中。然后,以每克PAD中加入17.4 mg NHS、58.0 mg EDAC和30.0 mg寡肽制备混合液,pH始终保持约6.5,并使混合溶液在恒定搅拌下反应48 h。将溶液透析并冻干,所得产物为PAD-RGD。另外,取3份样品,通过氨基酸分析仪评价与PAD结合的 $\text{G}_4\text{RGDS}$ 的量。通过GPC法测定PAD和PAD-RGD的 $M_w$ 。

### 1.2.3 HA-ADH/PAD-RGD水凝胶形成

在37℃,将HA-ADH和PAD-RGD溶于去离子水中形成3%(w/v)溶液,然后将HA-ADH溶液与PAD-RGD溶液以不同质量比(8:2、6:4、4:6)混合,涡旋形成透明凝胶,分别为8:2、6:4、4:6质量比HA-ADH/PAD-RGD水凝胶。

### 1.2.4 水凝胶的形态学研究

将3种质量比HA-ADH/PAD-RGD水凝胶冷冻干燥处理,放入液氮中1~2 min。然后快速用薄片纵向切水凝胶样品形成横断面,粘到导电胶上,喷金,装样。在扫描电子显微镜下观察各质量比水凝胶横断面孔径大小及分布。

### 1.2.5 凝胶时间和平衡溶胀比

从HA-ADH与PAD-RGD溶液混合时开始计时,采用小瓶倒置1 min内不流动作为凝胶终点,记录时间。另外,精确称取冷冻干燥的HA-ADH/PAD-RGD水凝胶的质量( $W_0$ ),37℃下浸入PBS液(pH 7.4, 0.01 mol/L)中48 h,直至达到溶胀平衡。取出溶胀的水凝胶,用滤纸吸去表面多余水分后立即称取质量( $W_e$ )。平衡溶胀比( $\text{ESR}$ )= $(W_0-W_e)/W_0$ 。

### 1.2.6 压缩模量

HA-ADH/PAD-RGD水凝胶制备后放置6 h,取3种质量比水凝胶样品(直径2 cm,高2 cm)用质构仪测试压缩模量。测试参数为压力0.49 N/ $\text{m}^2$ ,下压速率0.5 mm/s。以压强为纵坐标,应变为横坐标,画出曲线图。由于样品上下表面不平,则取应变5%~30%范围,曲线斜率为压缩模量值,进行4次

平行实验,取均值。

### 1.2.7 体外降解

将3种质量比HA-ADH/PAD-RGD水凝胶冻干并准确记录初始质量( $W_1$ ),37℃下于振荡水浴(约50 r/min)中与特定降解溶液温育。3种质量比水凝胶各分为两组,每组6个样本。对照组在PBS液(pH=7.4, 0.01 mol/L)中温育,实验组在含有HAse(100 U/mL凝胶)的酶缓冲液中温育。间隔一定时间,除去水凝胶,冻干并称取质量( $W_2$ ),然后向每个样本中加入新鲜培养基,计算剩余质量比( $\%$ )= $W_2/W_1 \times 100\%$ 。

## 1.3 细胞培养与鉴定

### 1.3.1 细胞培养

全麻后于新西兰兔双侧髂后上棘处骨髓穿刺,取骨髓液4 mL。以全血培养法培养纯化原代自体骨髓间质干细胞(BMSC)。待细胞长至铺满90%瓶底时,用0.25%胰蛋白酶消化,按1:3的比例传代培养。以后各代均以此密度传代扩增,使用第3代细胞进行实验。

### 1.3.2 细胞诱导

将第3次传代后的细胞悬液以细胞浓度 $10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ 接种于预先置入盖玻片的6孔培养板中,各孔加入2 mL高糖DMEM成软骨诱导培养液(含50 mg/L维生素C、0.272 g/L L-谷氨酰胺、6.25 mg/L胰岛素、6.25 mg/L亚硒酸、1.25 g/L牛血清白蛋白、1 mmol/L丙酮酸盐、5.35 mg/L亚油酸、10 mg/L转化生长因子- $\beta 1$ 、 $10^{-7}$  mol/L地塞米松),诱导至少3周,诱导成功的细胞可称为软骨细胞。

### 1.3.3 细胞包裹

软骨细胞包裹前,所有材料均通过钴-60照射灭菌。取不同质量比HA-ADH/PAD-RGD水凝胶(8:2、6:4、4:6)的聚合物溶液,然后每组将软骨细胞包裹,并分别编号为A、B、C,置于特异性完全培养基中培养。随后,将软骨细胞以细胞密度 $6.0 \times 10^6$ 个/mL混合进水凝胶中。凝胶化后,将其置于37℃含 $\text{CO}_2$ 培养箱中,每3 d换液1次,培养21 d。

### 1.3.4 细胞活性与增殖测定

取1 mL试剂C加9 mL无菌去离子水稀释为1 mL/L染色缓冲液。每10 mL稀释染色缓冲液C(1 mL/L)加入10  $\mu\text{L}$ 染色液A和3~10  $\mu\text{L}$ 染色液B,充分混匀,即成染色工作液D。收集样本细胞,细胞数量在 $1 \times 10^6$ 个以内。用PBS洗涤细胞2次。

用 200  $\mu\text{L}$  染色工作液 D 将细胞重悬。在  $-4^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15~30 min, PBS 洗涤细胞, 适量 PBS 重悬细胞, 用荧光显微镜或流式细胞仪检测结果。荧光显微镜下, 使用  $(490\pm 10)$  nm 波长激发, 存活细胞为黄绿色, 凋亡细胞为红色。用 Image J 软件进行存活细胞计数。

1.3.5 GAG 测定

收集分化后的水凝胶, 用 PBS 洗涤, 并用木瓜蛋白酶消化溶液消化( $57^{\circ}\text{C}$ , 反应 16 h)。以硫酸软骨素为标准, 使用 1,9-二甲基亚甲基蓝(DMB)染料分光光度法在 530 nm 处测量吸光度, 计算每个样品(每组  $n=6$ )的总 GAG 含量, 并通过试剂盒定量测定每个样品裂解物中的 DNA 量, 对 GAG 含量进行标准化, 标准化 GAG 含量=GAG 含量/DNA 含量。

1.3.6 免疫荧光染色

将软骨细胞包裹于水凝胶中培养 21 d, 取出后用 PBS 清洗, 放置于包埋盒中。10%多聚甲醛液  $4^{\circ}\text{C}$  固定, 过夜。然后酒精脱水, 制作石蜡组织切片(厚度 10  $\mu\text{m}$ ), 并储存于室温, 用于后期的免疫荧光染色。

II 型胶原为软骨细胞的特异性蛋白, 我们对该蛋白进行免疫荧光染色。主要步骤: ①对已制成的组织切片脱蜡, 酒精脱水, 于 3%过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )中孵育 20 min, 反复洗涤, 以减弱外源性 HRP 带来的非特异性染色; ②进行抗原修复, 30 min, 反复洗涤; ③分别滴加鼠抗人 II 型胶原单克隆一抗和兔抗人蛋白聚糖多克隆一抗, 放入  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜, 反复洗涤; ④滴加山羊抗鼠二抗, 室温避光孵育 2h, 反复洗涤, 并用 DAPI 在避光条件下染细胞核 10 min, 反复洗涤, 滴加防荧光淬灭剂, 封片, 在激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.7 RT-PCR 法测定相关基因表达

包裹软骨细胞的水凝胶在培养 21 d 后收集样

品, 根据 Thermo 试剂盒说明书, 用 Trizol 提取 RNA, 所提取的总 RNA 进行逆转录为 cRNA, 然后进行 RT-PCR 反应。以  $\beta$ -actin 为内参基因, I 型胶原(*Col I*)和 II 型胶原(*Col II*)为目标基因。反应程序设定如下:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 循环数 45,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,  $60^{\circ}\text{C}$  下退火延伸 60 s; 末段延伸  $60^{\circ}\text{C}$  5 min; 溶解曲线  $75^{\circ}\text{C}$  至  $95^{\circ}\text{C}$  中, 每 20 s 升温  $1^{\circ}\text{C}$ , 每轮循环结束后采集荧光信号, 待全部循环完成后, 对溶解曲线进行分析以确保产物的特异性。数据处理采用  $\Delta\Delta\text{CT}$  算法。所使用引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

基因	引物序列(5'-3')	长度
CoL II	正向序列 TGGGCAGAGGTATAATGATAAGGA	101
	反向序列 CTTCACAGATTATGTCGTCGACG	
CoL I	正向序列 GAAGACATCCCACCAGTCACT	154
	反向序列 CGCTGGGACAGTTCTTGATTTC	
$\beta$ actin	正向序列 CATCGTCCACCGCAAATGCTTCT	217
	反向序列 CGACTGCTGTACCTTCACCGTTC	

1.4 统计学分析

以 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均值  $\pm$  标准差表示, 采用两样本  $t$  检验。以  $P<0.05$  为具有统计学差异。

2 结果

2.2 材料的表征

扫描电子显微镜下观察可见, HA-ADH/PAD-RGD水凝胶横断面呈非均一的连续多孔结构, 主要为凝胶内部水分子升华致孔(图 1)。8:2 和 4:6 组水凝胶的孔径尺寸为  $200\sim 300\ \mu\text{m}$ , 6:4 组为  $100\sim 200\ \mu\text{m}$ 。孔径尺寸  $70\sim 120\ \mu\text{m}$  适合软骨细胞生长和发挥正常生理功能。

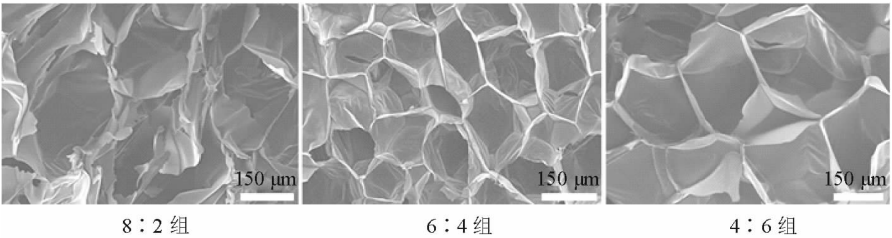


图 1 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶横断面扫描电镜图像

HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶质量比 8:2、6:4、4:6 组的凝胶时间逐渐增加, 平均凝胶时间分别为  $(132.8\pm 4.8)$  s、 $(188.7\pm 10.1)$  s 和  $(328.9\pm$

$12.6)$  s, 8:2 组与 6:4 组比较有统计学差异( $P<0.0001$ ), 6:4 组与 4:6 组比较有统计学差异( $P<0.0001$ ), 8:2 组与 4:6 组比较有统计学差异( $P<$

0.000 1),凝胶时间在合理的时间范围内(图 2a)。HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶 8:2、6:4、4:6 组的 ESR 值逐渐增加,分别为  $32.8 \pm 1.5$ 、 $34.8 \pm 2.3$  和  $36.4 \pm 1.9$ ,其中 8:2 组与 4:6 组比较有统计学差异( $P < 0.01$ ),其余组间比较无差异( $P > 0.05$ ) (图 2b)。HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶 8:2、6:4、4:6 组的压缩模量分别为  $(5.6 \pm 0.7)$  kPa、

$(4.8 \pm 0.4)$  kPa 和  $(3.4 \pm 0.4)$  kPa,其中 8:2 组与 6:4 组比较有统计学差异( $P < 0.05$ ),6:4 与 4:6 组比较有统计学差异( $P < 0.01$ ),8:2 与 4:6 组比较有统计学差异( $P < 0.000 1$ ),随着质量比减小其力学强度减小(图 2c)。经历 49d 降解后,HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶 8:2、6:4、4:6 组的剩余质量比分别为 85.3%、73.5% 和 55.9% (图 2d)。

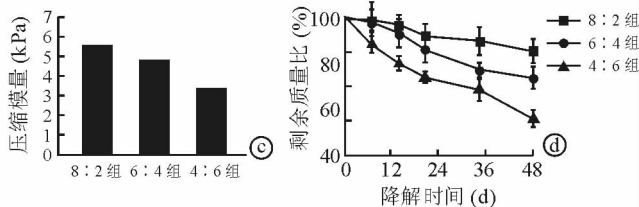
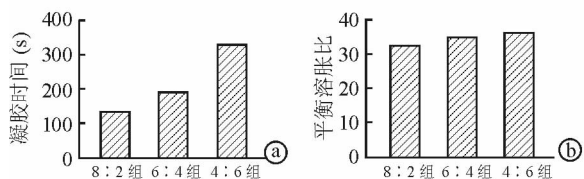


图2 不同质量比 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶特性测定 a. 凝胶时间 b. 平衡溶胀比 c. 力学强度 d. 体外降解

### 3.2 细胞活性和增殖试验

软骨细胞在 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶中培养 21 d 后,呈均匀分布,均保持高达 95% 的存活率,表明 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶具有良好的细胞相容性,适合软骨细胞长时间培养。此外,所有凝胶内部都具有较高的细胞密度,表明细胞在凝胶内部能够增殖(图 3)。以上发现可通过测定每 mg 干凝胶中 dsDNA 含量进一步获得证实。培养 1 d 后,

HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶 8:2、6:4、4:6 组的 dsDNA 含量分别为  $(0.7 \pm 0.1) \mu\text{g}$ 、 $(0.6 \pm 0.1) \mu\text{g}$  和  $(0.6 \pm 0.1) \mu\text{g}$ ,3 组间无统计学差异( $P > 0.05$ )。培养 21 d 后,6:4 组 dsDNA 含量为  $(1.9 \pm 0.2) \mu\text{g}$  高于 8:2 组 [ $(1.6 \pm 0.1) \mu\text{g}$ ,  $P < 0.000 1$ ] 和 4:6 组 [ $(1.5 \pm 0.1) \mu\text{g}$ ,  $P < 0.000 1$ ] (图 4)。以上结果进一步证明了这种凝胶系统适合长时间培养软骨细胞,凝胶组成可显著促进软骨细胞的增殖。

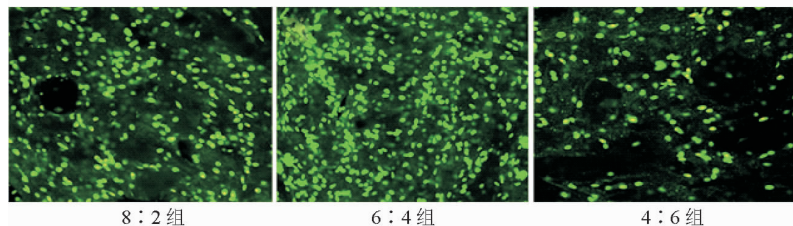


图3 HA-ADH/PAD-RGD水凝胶中的软骨细胞活性和增殖试验荧光显微镜影像(40倍)

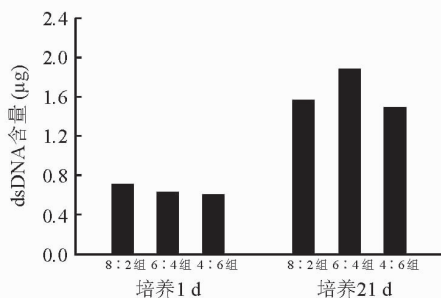


图4 HA-ADH/PAD-RGD水凝胶中的软骨细胞 dsDNA 含量测定

### 3.3 成软骨分化

RT-PCR 法检测 *Col II* (软骨形成标志基因) 和 *Col I* (软骨去分化标志基因) 表达的结果显示,培养 21 d 后,8:2 组、6:4 组和 4:6 组水凝胶 *Col II* 基因表达分别为  $(1.3 \pm 0.2)$ 、 $(2.3 \pm 0.2)$  和  $(1 \pm 0.1)$ ,6:4 组高于 8:2 组( $P < 0.000 1$ )和 4:6 组( $P < 0.000 1$ ),8:2 组高于 4:6 组( $P < 0.000 1$ );8:2 组、6:4 组和 4:6 组水凝胶 *Col I* 基因表达分别为  $(1.5 \pm 0.1)$ 、 $(1.0 \pm 0.1)$  和  $(1.7 \pm 0.3)$ ,6:4 组低于 8:2 组( $P < 0.000 1$ )和 4:6 组( $P < 0.000 1$ ),8:2 与 4:6 组比较无统计学差异( $P >$

0.05),见图 5。

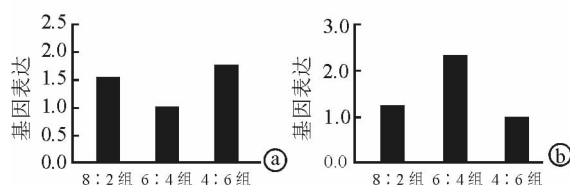


图5 RT-PCR 法测定的相关基因表达 a. *Col I* b. *Col II*

培养 21 d 后,8:2 组、6:4 组和 4:6 组水凝胶中 GAG 产生量分别为  $(9.1 \pm 1.4) \mu\text{g}$ 、 $(16.5 \pm 1.4) \mu\text{g}$  和  $(8.8 \pm 1.0) \mu\text{g}$ ,6:4 组明显高于 8:2 组( $P < 0.000 1$ )和 4:6 组( $P < 0.000 1$ ),8:2 组

与 4 : 6 组间无差异 ( $P>0.05$ ) (图 6a)。标准化后 GAG 含量依次为  $(6.0 \pm 0.6) \mu\text{g}$ 、 $(10.0 \pm 1.2) \mu\text{g}$ 、 $(6.0 \pm 0.5) \mu\text{g}$ ，6 : 4 组明显高于 8 : 2 组 ( $P<0.0001$ ) 和 4 : 6 组 ( $P<0.0001$ )，而 8 : 2 组与 4 : 6 组间无差异 ( $P>0.05$ ) (图 6b)。以上结果表明，HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶为软骨细胞提供的微环境能够促进细胞的成软骨分化，保持软骨细胞的表型。

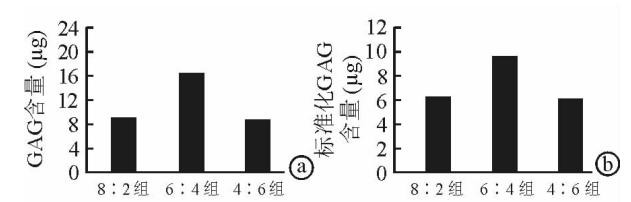


图 6 不同质量比 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶 GAG 产生量 a. GAG 产生量 b. 标准化 GAG 含量

在免疫荧光染色中，细胞核用 DIPA 染色定位呈现蓝色荧光，CoL II 发绿色荧光。培养 21 d 后，HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶 8 : 2 和 4 : 6 组中许多软骨细胞未被 CoL II 免疫着色，且着色只在细胞周围，细胞之间区域免疫着色很少，呈现出有限的软骨形成蛋白免疫着色。然而 6 : 4 组水凝胶中软骨细胞展现了较强的 CoL II 免疫着色 (图 7)。这些结果显示，包裹在 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶中的软骨细胞有能力维持原有表型和分泌软骨细胞特异性蛋白。进一步对免疫荧光图片进行半定量分析，8 : 2 组、6 : 4 组和 4 : 6 组 CoL II 免疫着色的细胞百分比分别为  $(53.3 \pm 9.2)\%$ 、 $(83.7 \pm 15.7)\%$  和  $(43.9 \pm 7.8)\%$ ，6 : 4 组明显高于 8 : 2 组 ( $P<0.0001$ ) 和 4 : 6 组 ( $P<0.0001$ )，8 : 2 组与 4 : 6 组比较无统计学差异 ( $P>0.05$ ) (图 8)。

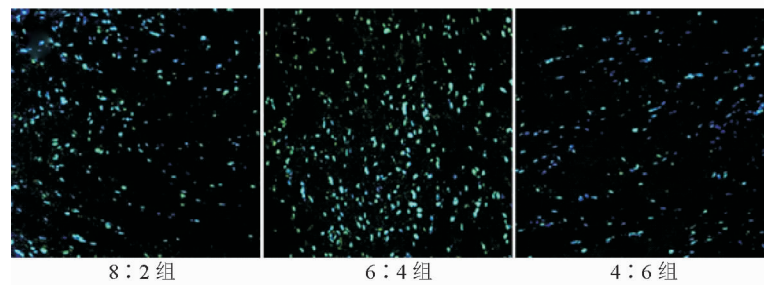


图 7 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶中软骨细胞 CoL II 免疫荧光染色 (40 倍)

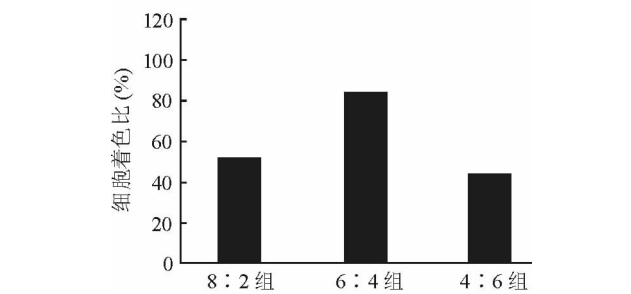


图 8 不同质量比 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶中软骨细胞 CoL II 着色情况

### 3 讨论

在软骨组织工程中，我们设想设计能够模拟软骨微环境的软骨 ECM，使其可促使生物特异性细胞黏附，调控细胞功能，促进新生组织形成，并将其制作为可注射水凝胶。我们利用天然多糖骨架的特性模拟软骨 ECM 的功能，研制了可注射水凝胶系统。步骤如下：第一，将 HA 和果胶分别进行化学修饰以枝接酰肼和醛官能团。第二，通过碳二亚胺化学合成  $G_4\text{RGDS}$  进一步修饰 PAD，以促进整合素介导的细胞黏附。PAD-RGD 不仅可以在生理条件下

加速果胶的生物降解，并可在原位形成水凝胶，进而共价结合软骨组织胶原纤维上的氨基，更好地促进软骨细胞与周围天然组织的结合<sup>[4]</sup>。不同于传统的交联方式，脲交联化学法不需要外来的催化剂或引发剂，可在生理条件下几秒内完成交联反应，不存在潜在毒性<sup>[6]</sup>。且水作为反应的唯一副产物，也不会带来副作用。

本研究中对不同质量比的 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶的研究发现，随着 PAD-RGD 含量增加，水凝胶的凝胶化时间显著增加。快速凝胶化可防止前体扩散，对软骨缺损的填充是必需的，且较低浓度的水凝胶前体易于处理并能均匀地混合细胞和/或生物活性分子。

HA 通过与受体结合介导细胞的行为。CD 44 为软骨形成过程中的主要 HA 受体，软骨细胞中高度表达可控制软骨细胞代谢、ECM 重塑和软骨再生的 CD 44 表面抗原<sup>[7]</sup>。本实验中对不同质量比的 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶的研究发现，6 : 4 组水凝胶对软骨细胞增殖、软骨形成标记基因的表达



和软骨 ECM 标志物的合成更有利。原因可能为, 该水凝胶具有适当的组成和交联密度, 可形成更为优异的包裹软骨细胞的微环境。

含有 RGD 序列的寡肽是研究最广泛的细胞黏附成分之一。软骨细胞通过细胞表面受体和/或整合素与其周围的 ECM 相互作用。许多 ECM 蛋白都存在 RGD 短肽, 如软骨低聚基质蛋白和纤连蛋白<sup>[8]</sup>, 这些蛋白通过 RGD 和整合蛋白受体结合于软骨细胞。整合素结合能够激活细胞内信号转导通路并介导细胞的锚定、迁移、分化和 ECM 重塑<sup>[9]</sup>。另外, RGD 肽序列共价结合的水凝胶可以产生丰富的 GAG 以及胶原蛋白<sup>[10-12]</sup>。因此, 将 RGD 加入到 ECM 修饰的水凝胶中可以促进 ECM 微环境中生物特异性细胞的黏附。

此外, 本研究中细胞增殖、q-PCR 分析、CoL II 和聚集蛋白聚糖的免疫荧光染色和 GAG 生物合成的结果表明, 6 : 4 组 HA-ADH/PAD-RGD 水凝胶更有利于维持软骨细胞表型并促进软骨形成。

#### 4 结论

采用脲交联的可注射水凝胶, 无毒、无害, 生物相容性良好, 且反应产物为水, 不会对机体带来不良影响。可以根据需要调节多糖的质量比来改变仿生可注射水凝胶的成胶时间、力学性能和降解时间。包裹在水凝胶中的软骨细胞受到水凝胶的影响, 能够更好地保持软骨细胞表型, 尤其是 HA-ADH/PAD-RGD 质量比为 6 : 4 的水凝胶促进软骨形成更佳, 是维持软骨表型的最佳比例水凝胶。脲交联的多糖水凝胶是软骨组织工程中极具潜力的材料。

#### 参 考 文 献

- [1] Yan S, Wang T, Feng L, et al. Injectable in situ self-cross-linking hydrogels based on poly (L-glutamic acid) and alginate for cartilage tissue engineering [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(12): 4495-4508.
- [2] Neves SC, Gomes DB, Sousa A, et al. Correction: biofunctionalized pectin hydrogels as 3D cellular microenvironments [J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3(42): 2096-2108.
- [3] Re'em T, Tsur-Gang O, Cohen S. The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGFβ<sub>1</sub>-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(26): 6746-6755.
- [4] Balakrishnan B, Joshi N, Jayakrishnan A, et al. Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(8): 3650-3663.
- [5] Chen F, Ni Y, Liu B, et al. Self-crosslinking and injectable hyaluronic acid/RGD-functionalized pectin hydrogel for cartilage tissue engineering[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 166: 31-44.
- [6] Oommen OP, Wang S, Kisiel M, et al. Smart design of stable extracellular matrix mimetic hydrogel: synthesis, characterization, and In vitro and in vivo evaluation for tissue engineering[J]. *Adv Funct Mater*, 2013, 23(10): 1273-1280.
- [7] Unterman SA, Gibson M, Lee JH, et al. Hyaluronic acid-binding scaffold for articular cartilage repair[J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(23-24): 2497-2506.
- [8] Smith Callahan LA, Childers EP, Bernard SL, et al. Maximizing phenotype constraint and extracellular matrix production in primary human chondrocytes using arginine-glycine-aspartate concentration gradient hydrogels[J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(7): 7420-7428.
- [9] Kim HD, Heo J, Hwang Y, et al. Extracellular-matrix-based and Arg-Gly-Asp-modified photopolymerizing hydrogels for cartilage tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(3-4): 757-766.
- [10] Lynch B, Crawford K, Baruti O, et al. The effect of hypoxia on thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam) hydrogels with tunable mechanical integrity for cartilage tissue engineering [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2017, 105(7): 1863-1873.
- [11] Mouser VH, Abbadessa A, Levato R, et al. Development of a thermosensitive HAMA-containing bio-ink for the fabrication of composite cartilage repair constructs [J]. *Biofabrication*, 2017, 9(1): 015026.
- [12] Donnelly PE, Chen T, Finch A, et al. Photocrosslinked tyramine-substituted hyaluronate hydrogels with tunable mechanical properties improve immediate tissue-hydrogel interfacial strength in articular cartilage[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2017, 28(6): 582-600.

(收稿: 2017-11-14)

(本文编辑: 杨晓娟)