

水凝胶在软骨组织工程中的应用

王玺玉 赵俊杰 张兆坤 黄鹏飞 赵宇昊 赵海燕

摘要 软骨损伤是一种骨科常见病。由于软骨组织本身不含血管、神经和淋巴,且软骨细胞的迁移能力极为有限,因此在受损时其细胞和基质会出现一系列病理改变,使其再生能力大幅降低,从而无法恢复原有功能。水凝胶是一种结构复杂的新型生物材料,已成为软骨组织工程(CTE)的理想材料之一。近年来,随着CTE技术不断改进,水凝胶经过改性修饰,性能更为出色,可以为损伤区域提供临时的机械支持,从而更好地促进软骨细胞的黏附、增殖和存活。该文就近年来水凝胶在CTE中的应用进行综述。

关键词 水凝胶;干细胞;软骨支架;软骨再生

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2024.04.010

软骨是一种高度特化的人体固态结缔组织,受损后很难被其他组织所取代。软骨损伤可由多种因素引起,包括外伤、手术或创伤等外部因素以及自身免疫疾病、肥胖和代谢异常等内部因素^[1]。轻微的软骨损伤可以通过采取制动、药物等早期干预措施来避免进一步损伤,并在一定程度上实现自我修复。严重的软骨损伤则会导致关节间隙狭窄,进而引起创伤性关节炎,必要时需采取微骨折手术、软骨移植术、细胞移植术或关节表面置换术等手术治疗^[2-3]。然而,上述方法均无法根治关节退化导致的软骨损伤,且软骨移植术还存在供区相关并发症、移植有效活性无法保证及软骨不愈合等风险^[4-5],故其临床应用范围受到一定的限制。对于软骨损伤患者来说,开发安全、可持续的新型软骨组织修复方法具有重要意义。

水凝胶是一种具有高度多孔性和可逆凝胶特性的材料,主要由以水构成的分散相组成。适合的聚合物可以用于制备具有特定功能的水凝胶。通过聚合物链的物理缠结或化学交联形成三维网络结构是水凝胶的形成机制,而网络结构的优势在于能够捕获和保持大量水分。物理缠结的形式包括聚合物链的热致缠结、离子凝胶、静电相互作用和分子自组装等,而化学交联的形式包括互补

官能团化学反应交联、辐射聚合、自由基聚合、酶交联和微流控技术等^[6-7]。水凝胶的用途:①用作组织填充材料;②负载小分子药物、蛋白质、细胞或细胞因子时用于治疗局部病变;③用于组织工程支架的构建;④用于组织修复、纳米载体、药物递送和生物传感器等多个领域^[8]。近年来,为推动软骨修复技术的创新与发展,学者们在生物医学领域对水凝胶进行了广泛的研究,并取得了显著的成果^[9]。

1 促进细胞生物学行为

1.1 促进间充质干细胞成软骨分化

间充质干细胞(MSC)作为生命的种子细胞,不仅有助于软骨组织修复,而且具有免疫调节和抗炎作用,对于软骨损伤治疗至关重要^[10-11]。水凝胶能够为MSC提供适宜的微环境,从而维持MSC的存活,特定水凝胶材料还可以有效促进MSC向软骨细胞分化。Cao等^[12]研究了多种由不同相对分子质量的巯基透明质酸和I型胶原组成的复合水凝胶,他们通过体外3D-兔骨髓间充质干细胞(BMSC)与水凝胶共培养实验发现,随着培养时间增加,各组水凝胶中的兔BMSC逐渐从椭圆形转变为圆形,表明其逐步向软骨细胞分化。此外,I型胶原不但能够与人体软骨组织相融合,减轻免疫排斥反应,而且在体内降解后可以被新生的软骨组织取代,有助于维持软骨组织的长期稳定性。因此,基于胶原的水凝胶在诱导MSC软骨分化方面具有良好的应用潜力。Yao等^[13]将葡萄糖胺修饰的聚乙二醇水凝胶作为细胞培养基质,对

基金项目:国家自然科学基金(82060394)、兰州市人才创新创业项目(2020-RC-45)、兰州大学第一医院院内基金(1dyynn2022-73)

作者单位:730000,兰州大学第一临床医学院、兰州大学第一医院骨科

通信作者:赵海燕 E-mail:zhaohaiyan8606@163.com

人 BMSC 进行软骨分化培养,发现这种改性后的水凝胶能够促进人 BMSC 的软骨基质合成和软骨相关基因表达,在移植到体内后则有助于形成功能性的软骨组织,上述结果提示该水凝胶可以为入 BMSC 的分化提供良好的生长环境。MSC 与水凝胶相互作用可以实现更有效、更持久、更安全的治疗效果,为软骨再生和修复提供了重要途径。但是,由于水凝胶的长期稳定性问题、MSC 分化可控性不佳及临床个体差异等限制, MSC 与水凝胶联合应用在软骨损伤治疗中仍处于研究阶段。这一领域有待深入挖掘和探索,以进一步提升治疗效果。

1.2 促进软骨细胞增殖

软骨组织的分子和细胞环境非常复杂,其中胶原蛋白、糖胺聚糖和胶原原纤维等成分的动态平衡对于维持软骨健康至关重要。一旦软骨受到损伤,这种平衡即被打破。软骨由于本身缺乏血供和有效的再生途径,加之修复组织的退化,故其修复能力非常有限^[14]。水凝胶能够提供类似天然软骨组织的环境,有助于细胞黏附和增殖,因此成为治疗软骨缺损的前沿方向之一。Liu 等^[15]将由苯硼酸和甲基丙烯酸酐改性的透明质酸水凝胶与软骨细胞共培养 24 h,发现软骨细胞在培养期间出现大量丝状伪足且逐渐形成球形细胞簇,同时其 II 型胶原、AGG 和 SOX9 基因表达均上调,提示该水凝胶具备优异的软骨细胞亲和力。Zhao 等^[16]开发了一种由褐藻糖胶和精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)功能肽序列组成的糖肽水凝胶,并将兔源性软骨细胞分别与低或高浓度糖肽水凝胶共培养,发现与高浓度水凝胶共培养的软骨细胞 II 型胶原表达显著提高;将上述水凝胶用于兔软骨缺损模型后发现,与对照组相比,治疗组软骨再生面积增加了 1.65 倍,提示该水凝胶具有巨大应用潜力。这种可以模拟软骨结构的水凝胶在激活软骨细胞生物活性方面具有显著优势,为软骨修复指明了新的方向。

2 作为支架材料

支架是对机体细胞外基质结构和功能的仿生,力学性能良好的支架可以在缺损部位为细胞提供附着表面以及便于增殖分化的三维空间^[17]。水凝胶支架的结构、尺寸和孔隙均可控,能够为细胞的增殖分化提供合适的微环境,进而实现组织的高效修复和再生^[18]。

2.1 智能化水凝胶支架

智能化水凝胶支架是一种先进的生物材料,它具有高度的可调性和响应性,能够根据温度、pH 值、机械应力等外部刺激变化而改变自身性质,上述特性使智能化水凝胶支架在生物医学领域具有广泛的应用潜力^[19]。Wu 等^[20]将活性氧(ROS)响应性水凝胶填充到聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)中,从而得到内部孔道定向排列的杂化支架,该响应性支架在力学性能、细胞渗透性、压缩模量、ROS 清除能力和细胞相容性等方面均表现良好,不但可以在氧化应激下更好地发挥对软骨细胞的保护作用,而且能够调控炎症反应,从而实现软骨缺损修复。

2.2 3D 打印水凝胶支架

近年来,3D 生物打印技术的出现为软骨组织工程(CTE)领域带来了创新性变革。利用生物墨水进行逐层堆积,可以构建具有复杂形状和梯度形态的支撑结构。同时,将生物相容性良好的水凝胶材料与空间分布精确定位的细胞等生物材料相结合,在组织和器官的仿生构建中具有显著优势^[21]。另有研究发现,3D 生物打印材料用于软骨再生时免疫原性较弱,这为结合特定病情与基因信息来定制个性化治疗方案提供了可能^[22]。

Wang 等^[23]用 3D 打印技术制备了具有促进软骨再生功能的聚癸二酸甘油酯(PGS)生物活性支架。他们将明胶和硫酸软骨素填充到 3D 打印的 PGS 支架内部的微孔里,由此实现药物的负载和释放。这种经过功能化处理的支架可以弥补 PGS 生物活性差和降解速度快的缺点,在用于修复软骨损伤时,可以保证再生软骨量和软骨样组织量均显著增加,且软骨再生速率与支架降解速率相匹配。Xia 等^[24]制备了 3D 打印光交联甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA)/甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA)水凝胶的冻干支架。该支架不仅机械强度高,而且降解缓慢。使用该支架培养的软骨细胞在体内外都能逐步成熟,并且可以形成具有典型软骨特性的组织。3D 打印技术可以精确控制支架的外形和内部孔隙结构,从而实现复杂形状支架的制备。3D 打印技术还可以将纳米纤维、银纳米线、DNA 和 miRNA 等材料制成促进软骨缺损修复的复合水凝胶支架。上述研究均证实,3D 打印生物材料不仅疗效明确,而且尺寸精确,为精准医疗提供了新思路和新方法。

3 作为生物活性分子载体

在CTE中有一种损伤修复方式,即先将细胞因子、药物、生长因子、激素等生物活性分子包裹在水凝胶中,再以特定方式将水凝胶输送到软骨缺损部位,由此实现生物活性分子对软骨细胞行为的调控,从而加速损伤部位的修复。上述方式为软骨损伤的再生性修复提供了无限前景。

Liu等^[25]向甲基丙烯酸酯化明胶加入含有细胞调节蛋白(CM)-10和小分子药物 kartogenin(KGN)的脂质体,从而设计出一种药物载荷效率及均匀性均有提升的新型水凝胶;在三维培养环境中,该水凝胶不但可以有效促进BMSC向软骨细胞分化,上调II型胶原的表达水平,并增强细胞集聚能力,而且可以利用CM-10和KGN的联合作用,避免成骨标志物I型胶原和X型胶原的表达,提示其具有特异性的软骨修复作用。Xiao等^[26]设计了负载4-辛基衣康酸(4-OI)的氧化海藻酸钠/明胶水凝胶,并发现该水凝胶可以显著促进软骨再生和软骨重建,这是因为4-OI可以清除ROS并调节巨噬细胞的极化状态,故该复合凝胶具有良好的抗氧化和抗炎作用,而靶向治疗有助于维持炎症微环境的平衡,促进软骨缺损的再生。Li等^[27]将姜黄素负载到GelMA水凝胶中,局部释放的姜黄素可赋予水凝胶强大的抗炎能力,从而构建促进软骨再生的微环境。上述研究均证实,负载药物的水凝胶不仅可以实现药物的缓释,延长药物在体内的有效作用时间,而且可以减少药物在非靶向部位的分布,提高治疗效果。此外,水凝胶作为药物载体的应用可拓展至治疗骨关节炎、骨肉瘤、骨坏死、植入物感染等多种骨科疾病,为临床治疗提供了新的思路^[28]。然而,水凝胶作为载体,通常仅适用于负载单一药物或细胞因子,难以实现多种药物或细胞因子的联合治疗,且组织相容性及水凝胶降解产物对细胞和周围组织的影响依然是需要克服的难题。

4 调控软骨血管微环境

调控软骨血管微环境是CTE和再生医学领域中的重要研究方向。血管生成与软骨形成之间的动态平衡至关重要。研究发现,过度的血管生成可能会导致不适当的血管侵入,干扰软骨组织的结构和功能^[29-30]。水凝胶不但可以促进细胞间的相互作用,而且可以基于特定的医疗需求进行定制化设计,从而影响血管功能的正常运作。Chen

等^[31]以GelMA水凝胶作为携带基质封装脂质纳米粒子,从而实现血管内皮生长因子A小干扰RNA(VEGF-A siRNA)的连续和控制释放。该设计不但可以有效阻止血管生成以及血管过度侵入,而且可以促进脂肪干细胞向软骨细胞的分化和软骨细胞外基质的形成,并拓宽基因沉默技术在CTE中的应用,为基因治疗提供了新策略。虽然在这项研究中脂质纳米粒子可以作为有前景的siRNA载体,但要实现更加高效的基因沉默,其转染效率仍有待提高。Yang等^[32]开发了一种基于明胶的双层支架,用于调控软骨和骨骼修复中的血管生成。该支架上层富含姜黄素,能够抑制血管生成,而下层含有丹参,可以促进血管生成。这种设计可以通过调控血管生成微环境来同时促进软骨和骨骼生成,为促进骨软骨再生提供了新思路。

5 结语

水凝胶作为一种多功能材料,为软骨损伤的修复提供了新的治疗策略。当传统的药物治疗和外科手术难以激发软骨的自我修复能力时,水凝胶的独特优势就显现出来了。它不仅能够为细胞提供三维生长支架,而且可以通过定制设计来模拟天然软骨的物理和化学环境。然而,水凝胶技术仍然面临一些挑战。这些挑战包括但不限于提高水凝胶的力学性能以承受关节负荷,优化生物降解性能以匹配天然软骨组织更新的速度,以及增强水凝胶与细胞间的物质交换效率,以确保细胞能够接收到养分并排出废物。随着材料科学和生物工程学的发展,学者们正在通过调整不同材料的组合、比例和交联方法来优化水凝胶的性质。此外,3D打印技术能够精确控制水凝胶的形状和孔隙结构,从而更好地模拟人体软骨的构造,为生产与人体软骨结构和功能更为相近的水凝胶提供了新的可能性。随着研究的深入和技术的优化,未来水凝胶很可能成为临床治疗中的一种重要工具,给软骨损伤患者带来更为有效的治疗选择,从而提高患者的生活质量。

参考文献

- [1] Wei W, Ma Y, Yao X, et al. Advanced hydrogels for the repair of cartilage defects and regeneration[J]. *Bioact Mater*, 2020, 6(4): 998-1011.
- [2] Moradi M, Parvizpour F, Arabpour Z, et al. Articular cartilage injury; current status and future direction[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2024, 19(5): 653-661.

- [3] Du D, Hsu P, Zhu Z, et al. Current surgical options and innovation for repairing articular cartilage defects in the femoral head[J]. *J Orthop Translat*, 2019, 21: 122-128.
- [4] Redondo ML, Naveen NB, Liu JN, et al. Preservation of knee articular cartilage[J]. *Sports Med Arthrosc Rev*, 2018, 26(4): e23-e30.
- [5] Wixted CM, Dekker TJ, Adams SB. Particulated juvenile articular cartilage allograft transplantation for osteochondral lesions of the knee and ankle[J]. *Expert Rev Med Devices*, 2020, 17(3): 235-244.
- [6] Volova LT, Kotelnikov GP, Shishkovsky I, et al. 3D bioprinting of hyaline articular cartilage: biopolymers, hydrogels, and bioinks[J]. *Polymers (Basel)*, 2023, 15(12): 2695.
- [7] Norioka C, Inamoto Y, Hajime C, et al. A universal method to easily design tough and stretchable hydrogels[J]. *NPG Asia Mater*, 2021, 13: 34.
- [8] Aswathy SH, Narendrakumar U, Manjubala I. Commercial hydrogels for biomedical applications[J]. *Heliyon*, 2020, 6(4): e03719.
- [9] Wu J, Chen Q, Deng C, et al. Exquisite design of injectable hydrogels in cartilage repair[J]. *Theranostics*, 2020, 10(21): 9843-9864.
- [10] Gao F, Mao X, Wu X. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis: the need for translation into clinical therapy[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2023, 199: 199-225.
- [11] Cho WJ, Ahn J, Lee M, et al. Combinatorial effect of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles in a hydrogel on cartilage regeneration[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2023, 20(1): 143-154.
- [12] Cao H, Li Z, Chen Y, et al. Viscoelasticity microenvironment constructed by self-crosslinking hyaluronan hybrid hydrogels regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Compos Part B Eng*, 2023, 263(15): 110871.1-110871.11.
- [13] Yao H, Xue J, Wang Q, et al. Glucosamine-modified polyethylene glycol hydrogel-mediated chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 79: 661-670.
- [14] Li M, Yin H, Yan Z, et al. The immune microenvironment in cartilage injury and repair[J]. *Acta Biomater*, 2022, 140: 23-42.
- [15] Liu Y, Yuan Z, Liu S, et al. Bioactive phenylboronic acid-functionalized hyaluronic acid hydrogels induce chondro-aggregates and promote chondrocyte phenotype[J]. *Macromol Biosci*, 2023, 23(11): e2300153.
- [16] Zhao Z, Xia X, Liu J, et al. Cartilage-inspired self-assembly glycopeptide hydrogels for cartilage regeneration via ROS scavenging[J]. *Bioact Mater*, 2023, 32: 319-332.
- [17] Radulescu DM, Neacsu IA, Grumezescu AM, et al. New insights of scaffolds based on hydrogels in tissue engineering[J]. *Polymers (Basel)*, 2022, 14(4): 799.
- [18] Amiryaghoubi N, Fathi M, Barar J, et al. Hydrogel-based scaffolds for bone and cartilage tissue engineering and regeneration[J]. *React Funct Polym*, 2022, 177: 1-16.
- [19] Zhuang L, Jie W, Yousef F, et al. Smart hydrogels: network design and emerging applications[J]. *Can J Chem Eng*, 2018, 96(10): 2100-2114.
- [20] Wu X, Ding J, Xu P, et al. A cell-free ROS-responsive hydrogel/oriented poly(lactide-co-glycolide) hybrid scaffold for reducing inflammation and restoring full-thickness cartilage defects in vivo[J]. *Biomed Mater*, 2021, 16(6): 064101.
- [21] Wu X, Cheng X, Kang M, et al. Natural polysaccharide-based hydrogel bioprinting for articular cartilage repair[J]. *Front in Mater*, 2023, 10: 1204318.
- [22] Krishnamoorthi MK, Sarig U, Baruch L, et al. Robust fabrication of composite 3D scaffolds with tissue-specific bioactivity: a proof-of-concept study[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3(8): 4974-4986.
- [23] Wang S, Luo B, Bai B, et al. 3D Printed chondrogenic functionalized PGS bioactive scaffold for cartilage regeneration[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(27): e2301006.
- [24] Xia H, Zhao D, Zhu H, et al. Lyophilized scaffolds fabricated from 3D-printed photocurable natural hydrogel for cartilage regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(37): 31704-31715.
- [25] Liu G, Guo Q, Liu C, et al. Cytomodulin-10 modified GelMA hydrogel with kartogenin for in-situ osteochondral regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2023, 169: 317-333.
- [26] Xiao H, Dong Y, Wan D, et al. Injectable hydrogel loaded with 4-octyl itaconate enhances cartilage regeneration by regulating macrophage polarization[J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(7): 2445-2460.
- [27] Li X, He L, Li N, et al. Curcumin loaded hydrogel with anti-inflammatory activity to promote cartilage regeneration in immunocompetent animals[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2023, 34(2): 200-216.
- [28] Zhang Y, Li Z, Guan J, et al. Hydrogel: a potential therapeutic material for bone tissue engineering[J]. *Aip Advances*, 2021, 11(1): 010701.
- [29] García-Fernández L. Osteochondral angiogenesis and promoted vascularization: new therapeutic target[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1059: 315-330.
- [30] Yue D, Du L, Zhang B, et al. Time-dependently appeared microenvironmental changes and mechanism after cartilage or joint damage and the influences on cartilage regeneration[J]. *Organogenesis*, 2021, 17(3-4): 85-99.
- [31] Chen Y, Chen W, Ren Y, et al. Lipid nanoparticle-encapsulated VEGFa siRNA facilitates cartilage formation by suppressing angiogenesis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 221: 1313-1324.
- [32] Yang S, Jiang W, Hong X, et al. Subcutaneous osteochondral regeneration using a bilayer scaffold by leveraging angiogenic activities[J]. *Mater Letters*, 2022, 326 (1): 1-4.

(收稿日期 : 2024-02-18)

(本文编辑 : 富饶)