DOI:10.16016/j.2097-0927.202111169

负载抗炎肽的锆-金属有机框架封装于水凝胶促进软骨细胞外基质生成

秦晓平[1],李 涛[1],陈 诚[2],杨 柳[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院关节外科[1];400016 重庆,重庆医科大学医学信息学院[2]

[摘要] **目的** 制备一种可用于修复伴有骨关节炎的软骨缺损的兼具软骨再生和炎性微环境调控的水凝胶支架。**方法** 通过溶剂热法制备锆金属有机框架(Zr MOF),并负载抗炎肽 KAFAK,用紫外光交联法制备普鲁兰多糖/聚乙二醇复合水凝胶,将 Zr MOF 封装于水凝胶内部,通过扫描电镜、溶胀平衡、降解实验和流变力学表征水凝胶的理化性能。以兔骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)作为种子细胞,用活/死细胞染色验证水凝胶的生物活性,测定软骨细胞外基质糖胺聚糖的含量和成软骨标志基因 COL2A1 和 ACAN 及肥大化基因 COL10A1 的表达。**结果** 成功将抗炎肽 KAFAK 负载到 Zr MOF,水合粒径为 352.5 nm,粒径分布(PDI)为 0.29,Zeta 电位为(18.27±0.55)mV。普鲁兰多糖/聚乙二醇复合水凝胶封装 Zr MOF 后,随着 Zr MOF 含量的增加,扫描电镜观察到孔壁上的小孔越多;溶胀时间缩短,降解速度增加,流变性能改善。抗炎肽 KAFAK 负载到 Zr MOF 后再用水凝胶封装,到第 21 天,有(84.1±5.0)%的释放,显示出对抗炎肽 KAFAK 较好的缓释作用。活细胞在 Gel、Gel-100 Zr MOF 和 Gel-100 Zr MOF@KAFAK 组的存活比率分别为(90.7±5.4)%、(93.5±4.3)%和(91.9±3.1)%,均显示出良好的生物相容性。以兔 BMSCs 为种子细胞,在成软骨诱导培养 7 d 和 14 d 后,Gel-100 Zr MOF@KAFAK 组相较于 Gel 和 Gel-100 Zr MOF 组糖胺聚糖含量有显著提高($P<0.05$),成软骨标志基因 COL2A1、ACAN 表达显著升高($P<0.05$),而肥大化基因 COL10A1 表达显著降低($P<0.05$)。**结论** 成功将负载抗炎肽的 Zr MOF 封装于水凝胶内部,通过对抗炎肽 KAFAK 的持续释放控制炎性微环境,产生更多的软骨细胞外基质,有利于维持成软骨表型。

[关键词] 水凝胶;细胞外基质;炎性微环境;抗炎肽 KAFAK;金属有机框架
[中图法分类号] R318.08; R322.72; R977.6 [文献标志码] A

Promotion of cartilage extracellular matrix by anti-inflammatory peptides-loaded zirconium metal-organic frameworks encapsulated in hydrogels

QIN Xiaoping[1], LI Tao[1], CHEN Cheng[2], YANG Liu[1] [1]Center for Joint Surgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]College of Medical Informatics, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] Objective To prepare a hydrogel scaffold with cartilage regeneration and inflammatory microenvironment control capacity for chondrodefects treatment in osteoarthritis. Methods The zirconium metal-organic framework (Zr MOF) was prepared by solvothermal synthesis and then loaded with anti-inflammatory peptide KAFAK. The pullulan/polyethylene glycol composite hydrogel was prepared by UV crosslinking. Then the obtained Zr MOF was encapsulated in the hydrogel. Then the physicochemical properties of the hydrogel were characterized by scanning electron microscopy (SEM), swelling equilibrium, degradation experiments and rheological and mechanical studies. Rabbit bone mesenchymal stem cells (BMSCs) were used as seed cells. The bioactivity of the hydrogel and the content of glycosaminoglycans in the

[通信作者] 杨 柳,E-mail:jointsurgery@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

extracellular matrix were tested by live/dead staining. The expression of chondrogenic genes COL2A1 and ACAN, and hypertrophic gene COL10A1 was measured with RT-PCR. **Results** After being loaded with anti-inflammatory peptide KAFAK to Zr MOF, the hydrated particle exhibits a size of 352.5 nm, a particle size distribution (PDI) of 0.29, and a zeta potential of 18.27±0.55 mV. After the encapsulation of Zr MOF, when the content of Zr MOF was increased, there were more small holes in the scaffold observed by SEM, the swelling time was shortened, the degradation rate was increased and the rheological property was improved. In 21 d after KAFAK was loaded onto the Zr MOF and then encapsulated with hydrogel, the release of the peptide was (84.1±5.0)%, indicating a good sustained release. In Gel, Gel-100 Zr MOF, and Gel-100 Zr MOF@KAFAK groups, the cell survival rates was (90.7±5.4)%, (93.5±4.3)% and (91.9±3.1)%, respectively. With rabbit BMSCs as seed cells, after 7 and 14 d of chondrogenic induction, the glycosaminoglycan in Gel-100 Zr MOF @KAFAK group was significantly higher than that in Gel and Gel-100 Zr MOF group ($P<0.05$). The results of RT-PCR indicated that the expression levels of COL2A1 and ACAN were increased, whereas that of COL10A1 was decreased ($P<0.05$). **Conclusion** KAFAK-loaded Zr MOF is successfully encapsulated in hydrogels. The hydrogels control the inflammatory microenvironment through the sustained release of KAFAK, and result in more cartilage extracellular matrix and better maintenance of chondrogenic phenotype.

[**Key words**] hydrogels; extracellular matrix; inflammatory microenvironment; anti-inflammatory peptide KAFAK; metal-organic frameworks

Corresponding author: YANG Liu, E-mail: jointsurgery@163.com

关节软骨缺损可导致继发性骨关节炎,引起关节疼痛,严重影响患者生活质量[1-2]。由于缺乏血管、神经、淋巴的支配,关节软骨在破坏后的自我修复能力有限,现有的临床治疗策略均存在一定缺陷[3-5]。组织工程为关节软骨的修复提供了新的方向。水凝胶作为支架材料已经被广泛应用于软骨组织工程中,它不仅具有三维网络结构、含水率高、高渗透率等特点,而且力学性能、溶胀率以及良好的润滑性能等都与天然的关节软骨相类似[6-7]。

炎性因子,如白细胞介素1(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、干扰素γ在关节软骨缺损后会迅速升高,进而会导致软骨细胞死亡,加速软骨基质降解[8-9]。在软骨再生过程中,炎性因子会抑制细胞成软骨分化并减缓软骨相关基质的合成速度,从而导致软骨再生失败[10-11]。因而,在水凝胶支架材料用于关节软骨缺损修复时应控制局部炎性微环境,以达到更好的修复效果。

抗炎肽(KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA,KAFAK)是一种细胞穿透肽,通过抑制丝裂原活化蛋白激酶活化蛋白激酶2(MK2),能减少炎性因子IL-6和TNF-α的分泌[12]。因此,将KAFAK引入水凝胶内部能改善炎性微环境。但KAFAK作为一种阳离子多肽,存在酶降解性、解离性和构象变化等缺陷,导致半衰期短,生物利用度低[13]。一系列研究采用纳米颗粒对KAFAK进行包裹,以延长KAFAK的抗炎周期[13-17]。本课题组前期也将KAFAK负载到乙二醇壳聚糖-岩藻多糖纳米凝胶内以达到延缓骨关节炎进展的目的[18],但这些材料对KAFAK的控释时间都偏短,而软骨再生的整个过程都要对炎症进行有效控制才能实现软骨再生,故需要找到更有效的控释手段。

金属-有机框架(metal-organic frameworks,MOFs)是由有机配体和金属离子或团簇通过配位键自组装形成的具有分子内孔隙的有机-无机杂化材料[19]。MOFs材料具有高的药物负载量、良好的生物相容性以及功能多样性,已经成为广泛应用的药物载体[20-21]。有研究将MOFs材料修饰的介孔聚多巴胺(mesoporous polydopamine, MPDA)为载体,将雷帕霉素负载于介孔内,胆红素负载于MOFs材料的壳层上,然后将Ⅱ型胶原靶向多肽(WYRGRL)偶联到载体表面,形成软骨靶向双药给药纳米平台并用于骨关节炎治疗[22]。研究表明pH响应和透明质酸功能化的MOFs将负载具有抗炎活性的儿茶酸用于骨关节炎的治疗[23]。另有研究证明MOFs在骨关节炎的治疗中具有潜在应用价值[24-26]。基于封装MOFs的支架材料也可用于促成骨形成[27-31],但在软骨再生应用方面鲜有报道。

本课题组前期研究显示:普鲁兰多糖-聚乙二醇复合水凝胶具有良好的力学性能和可调控降解速度,是适合的软骨再生支架材料[32]。因此,本研究拟将MOFs材料作为药物载体先对抗炎肽KAFAK进行负

载,然后将其封装于普鲁兰多糖/聚乙二醇复合水凝胶内部。通过 MOFs 材料的含量变化调控水凝胶的理化性质,同时通过对 KAFAK 的持续释放控制组织修复区域的炎性微环境,从而达到更好的软骨再生效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 氯氧化锆($ZrOCl_2$)、内消旋-四(4-羧基苯基)卟吩(TCPP)、苯甲酸、无水 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、乙醇均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,抗炎肽 KAFAK 委托上海生工合成,苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP,Sigma 公司),普鲁兰多糖(Pullulan)购自西安瑞禧生物,DMEM/F12 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,成软骨诱导培养基(江苏赛业生物),活/死细胞染色试剂盒(Calcein-AM/PI 双染,上海贝博),总糖胺聚糖测定试剂盒(Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay,英国 Biocolor 公司),DNA 含量测定试剂盒(AccuGreen High Sensitivity dsDNA Quantitation Kits,美国 Biotium 公司)。

1.1.2 实验仪器 超声清洗器(洁盟公司),磁力搅拌仪(IKA 公司),高速离心机(Thermo Fisher 公司),IS-RDD3 台式恒温振荡器(Crystal 公司),扫描电镜(日本 Hitachi 公司),透射电镜(Thermo Fisher 公司),粒径分析仪(Malvern 公司),红外光谱仪(PerkinElmer 公司),冷冻干燥机(Labconco 公司),DHR-1 流变仪(TA Instruments 公司),荧光显微镜(Olympus 公司),多功能酶标仪(Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 纳米锆-金属有机框架(Zr MOF)材料的制备 纳米 Zr MOF 材料的制备方法参考文献[33]。称取 $ZrOCl_2$ 150 mg、TCPP 50 mg 和苯甲酸 1.4 g 分别置于 50 mL 离心管中,对应加入 20、20 mL 和 10 mL 无水 DMF,超声 5 min 进行溶解,然后分别将溶液倒入 100 mL 圆底烧瓶中,置于事先预热到 90 ℃的油浴锅中,调整磁力搅拌的转速为 1 200 r/min,安装上回流装置,反应持续搅拌 5 h,关闭反应,待反应液冷却至常温后,将反应液清液转移至 50 mL 的圆底高速离心管中,常温,15 000×g、10 min 条件离心,并用 DMF 和乙醇溶液分别洗 3 次(常温,15 000×g、10 min),最后将沉淀分散于乙醇溶液中备用。

1.2.2 纳米 Zr MOF 材料对抗炎肽 KAFAK 的负载 取 1 mg/mL 的纳米 Zr MOF 材料溶液 3 mL,离心(常温,15 000×g、5 min),加入 3 mL 去离子水分散。称取 15 mg 抗炎肽 KAFAK,加入到纳米 Zr MOF 材料水溶液中,置于摇床中,4 ℃条件震摇 24 h,然后离心(4 ℃,15 000×g、5 min),去离子水洗 3 次(4 ℃,15 000×g、5 min),最后将沉淀分散于去离子溶液中并置于 4 ℃冰箱备用。

1.2.3 纳米 Zr MOF 材料的表征 将制备好的纳米 Zr MOF 材料溶液滴加到薄的铜网碳支持膜上,待样品自然干燥后,于透射电镜下观察结构形貌。将制备好的纳米 Zr MOF 材料溶液滴加到硅片上,待干燥后喷金,于扫描电镜下观察结构形貌。取 1 mL 的纳米 Zr MOF 材料溶液加入到样品池中,用马尔文粒径分析仪进行粒径分析和 Zeta 点位测试。

1.2.4 普鲁兰多糖/聚乙二醇复合水凝胶对纳米 Zr MOF 材料的封装 水凝胶制备方法参照课题组已发表的研究[32]。称取 100 mg 甲基丙烯酸普鲁兰多糖加入到 10 mL 浓度为 15%(w/v)的聚乙二醇二丙烯酸酯溶液中,取 2 mL 上述溶液加入 200 mg 的纳米 Zr MOF 材料混匀,加入 2 μL 浓度为 100 mg/mL 的光交联剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,将溶液置于圆柱形模具中,紫外光(365 nm、5 W)照射 1 min 得到复合水凝胶。调整纳米 Zr MOF 材料的浓度分别得到 Gel、Gel-10 Zr MOF、Gel-100 Zr MOF 和 Gel-500 Zr MOF 水凝胶。将被封装物换为 Zr MOF@KAFAK 时得 Gel-100 Zr MOF@KAFAK 水凝胶。

1.2.5 水凝胶的形貌观察 制备好的水凝胶用液氮进行快速冷冻,置于冷冻干燥机中进行冷冻干燥,待样品干燥后取出,用刀片切开,将样品粘于样品台上,喷金,扫描电镜下对凝胶的切面进行观察拍照。

1.2.6 水凝胶的溶胀平衡 制备好的水凝胶用液氮进行快速冷冻,置于冷冻干燥机中进行冷冻干燥,待样品干燥后取出,称取质量记为 M_0,将样品置于 24 孔板中,加入 2 mL 的 PBS 溶液,置于 37 ℃孵箱中,于 1、3、7、12、24 h 取出样品,快速用滤纸吸干水凝胶表面水分,再次称取质量记为 M_1,水凝胶的吸水能力=(M_1-M_0)/M_0×100%。

1.2.7 水凝胶的降解 制备好的水凝胶称取质量记为 M_a,将样品置于 24 孔板中,加入 2 mL 的 PBS 溶液,置于 37 ℃孵箱中,于 1、5、9、14、28 d 取出样品,快速用滤纸吸干水凝胶表面水分,再次称取质量记为 M_b,水凝胶降解率=(M_a-M_b)/M_a×100%。

1.2.8 水凝胶的流变测试 用 DHR-1 型流变仪对水凝胶的流变性能进行表征。在测试过程中,选用 20 mm 的平板,板间距保持在 500 nm。振荡模式下进行测试,设定扫描频率为 0.1~10.0 Hz,应力应变恒定为 1%。

1.2.9 抗炎肽 KAFAK 释放曲线 将含有抗炎肽 KAFAK 的水凝胶和含有 Zr MOF@KAFAK 材料的水凝胶分别置于 PBS 溶液中,然后分别在 1、3、7、14、21 d 对溶液的 KAFAK 含量采用 fluoraldehydeo-phthalaldehyde(OPA)法测定[13]。在不透明的 96 孔板中加入样品和 fluoraldehyde OPA(体积比为 1∶10)的混合液,在荧光酶标仪上进行读数,设置激发波长为 360 nm,吸收波长为 455 nm,通过 KAFAK 的标准曲线计算含量。

1.2.10 兔骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)提取 新西兰大白兔(约 2.5 kg)用耳缘静脉注射 1%的戊巴比妥溶液全身麻醉,于右胫骨上端内侧用锐性穿刺椎于骨皮质上开出直径 2~3 mm 的孔,使通达髓腔。用 18 号硬膜穿刺针接含有肝素的 5 mL 注射器,抽出骨髓约 2 mL。抽出的骨髓液用平衡液洗涤 2 次后,离心 1 000×g、5 min。去除上清液后,加入红细胞裂解缓冲液,破坏骨髓组织中的红细胞,离心 1 000×g、5 min。将沉淀物培养在 37 ℃孵箱中,1 d 后更换培养液,去除未贴壁细胞。每 3 天更换 1 次培养基,本实验中使用细胞为第 3 代。

1.2.11 BMSCs 的三维培养及细胞活/死细胞染色

采用紫外光交联法制备含 BMSCs 的水凝胶。将 BMSCs 以 1×10^6/mL 的密度悬浮于含有 Zr MOF@KAFAK 的成水凝胶前混合液中(见复合水凝胶制备部分),加入光交联剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(1 mg/mL,体积比 1∶100)。取混合溶液(200 μL)加入 48 孔板,紫外光照射(365 nm、5 W)1 min 形成水凝胶每孔加入 1 mL 培养基,置于 37 ℃孵箱中培养。用活/死细胞染色检测 BMSCs 在水凝胶中的活性。将含有 MSCs 的水凝胶培养至 3 d 时,用 PBS 洗涤 3 次,用 2 mmol/L 钙黄绿素(Calcein-AM)在 37 ℃孵育 30 min,然后用 1.5 mmol/L 碘丙烷(PI)在 37℃孵育 5 min,用荧光显微镜观察、标记细胞。用 Image J 图像分析软件计数细胞数,计算活细胞比例。

1.2.12 总糖胺聚糖含量测定 用 Blyscan™ 硫酸化糖胺多糖测定法测定水凝胶中 BMSCs 的总糖胺聚糖产生量。水凝胶用含有 IL-1β(10 ng/mL)培养基处理 1 d,然后换成成软骨诱导培养基培养 7 d 和 14 d 后,取出含 BMSCs 的水凝胶,液氮研磨,60 ℃条件下用木瓜蛋白酶溶液消化 6 h,将 200 μL 染料溶液转移到 96 孔板上,用酶标仪于 656 nm 处测量光密度值。采用 AccuGreen 高灵敏度 dsDNA 定量试剂盒检测各样品的 DNA 含量。将总糖胺聚糖含量用 DNA 含量进行均化处理。

1.2.13 基因表达含量测定 水凝胶用含有 IL-1β(10 ng/mL)培养基处理 1 d,然后换成成软骨诱导培养基培养 7 d 和 14 d 后,取出含 BMSCs 的水凝胶,液氮研磨,加入 TRIzol 进行裂解,紫外可见分光光度计测定 RNA 浓度。然后将 RNA 逆转录为 cDNA,进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。对软骨标志物Ⅱ型胶原(COL2A1)、聚蛋白多糖(ACAN)、肥大标志物 X 型胶原(COL10A1)基因进行定量测定。所得结果根据 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 公式进行计算,GAPDH 基因作为内参。引物序列:COL2A1 上游引物:5′-CAACAACCAGATCGAGA-GCA-3′,下游引物:5′-CCAGTAGTCACCGCTCTTCC-3′;ACAN 上游引物:5′-CGACATCAGTGGAGACCTCA-3′,下游引物:5′-AGACTGCCAGAGTCCAGCTC-3′;COL10A1 上游引物:5′-GAATGGCACGCCTGTAATGT-3′,下游引物:5′-CCATTGGACTCAGCGTTAGG-3′;GAPDH 上游引物:5′-CGACATCAAGAAGGTGGTGA-3′,下游引物:5′-ATCGAAGGTGGAGGAGTGG-3′。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间采用单因素方差分析,两组间用 Student-t 检验,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

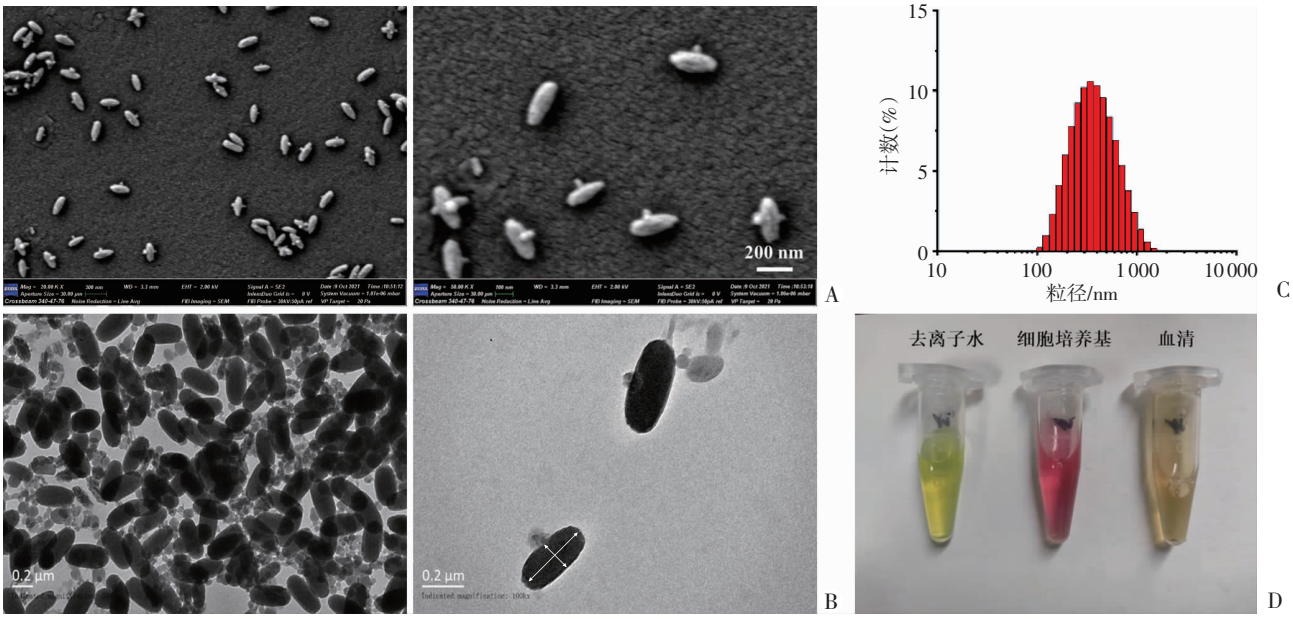
2 结果

2.1 纳米 Zr MOF 材料的形态结构表征

通过热溶法成功制备出纳米 Zr MOF 材料,通过扫描电镜及透射电镜观察材料为长梭形,结构规整,大小均一,宽处约 150 nm,长处约 350 nm(图 1A、B)。通过粒径分析仪测出纳米 Zr MOF 材料的水合粒径为 328.8 nm,粒径分布(PDI)为 0.20,Zeta 电位为(−23.77±3.33)mV(图 1C),同扫描电镜及透射电镜观察结果一致。纳米 Zr MOF 材料在去离子水、细胞培养基和血清中都显示出良好的分散性(图 1D)。

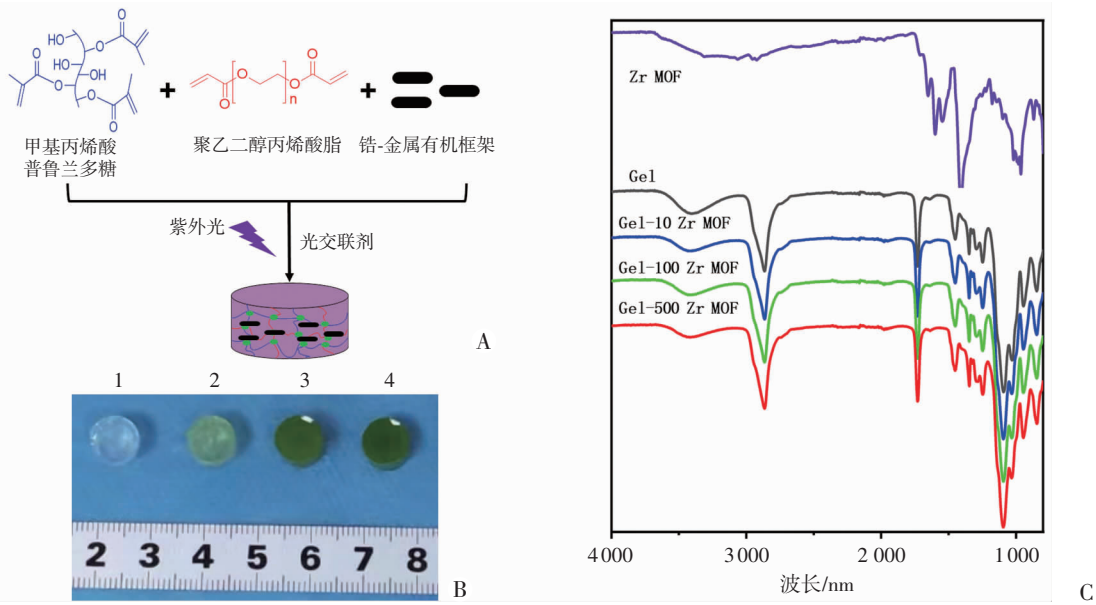
2.2 水凝胶对纳米 Zr MOF 材料的封装及红外表征

水凝胶对纳米 Zr MOF 材料封装的制备路线图如图 2A 所示,在课题组已经发表的普鲁兰多糖/聚乙二醇复合水凝胶基础之上引入纳米 Zr MOF 材料到水凝胶内部,在紫外光照射 1 min 就能得到水凝胶,制备方法简单。通过调整纳米 Zr MOF 材料的含量可以得到一系列水凝胶,如图 2B 所示:随着纳米 Zr MOF 材料含量提高,水凝胶的颜色逐渐变深。红外图谱结果表明纳米 Zr MOF 材料的引入对水凝胶原有的结构没有明显改变(图 2C),由此推测水凝胶对纳米 Zr MOF 材料只是简单的物理封装,没有新的化学键的形成。



A:扫描电镜下的纳米 Zr MOF 材料;B:透射电镜下的纳米 Zr MOF 材料;C:纳米 Zr MOF 材料的粒径分析和 Zeta 电位;D:纳米 Zr MOF 材料在去离子水、细胞培养基和血清中的分散性

图 1 纳米 Zr MOF 材料的基本理化性质表征结果

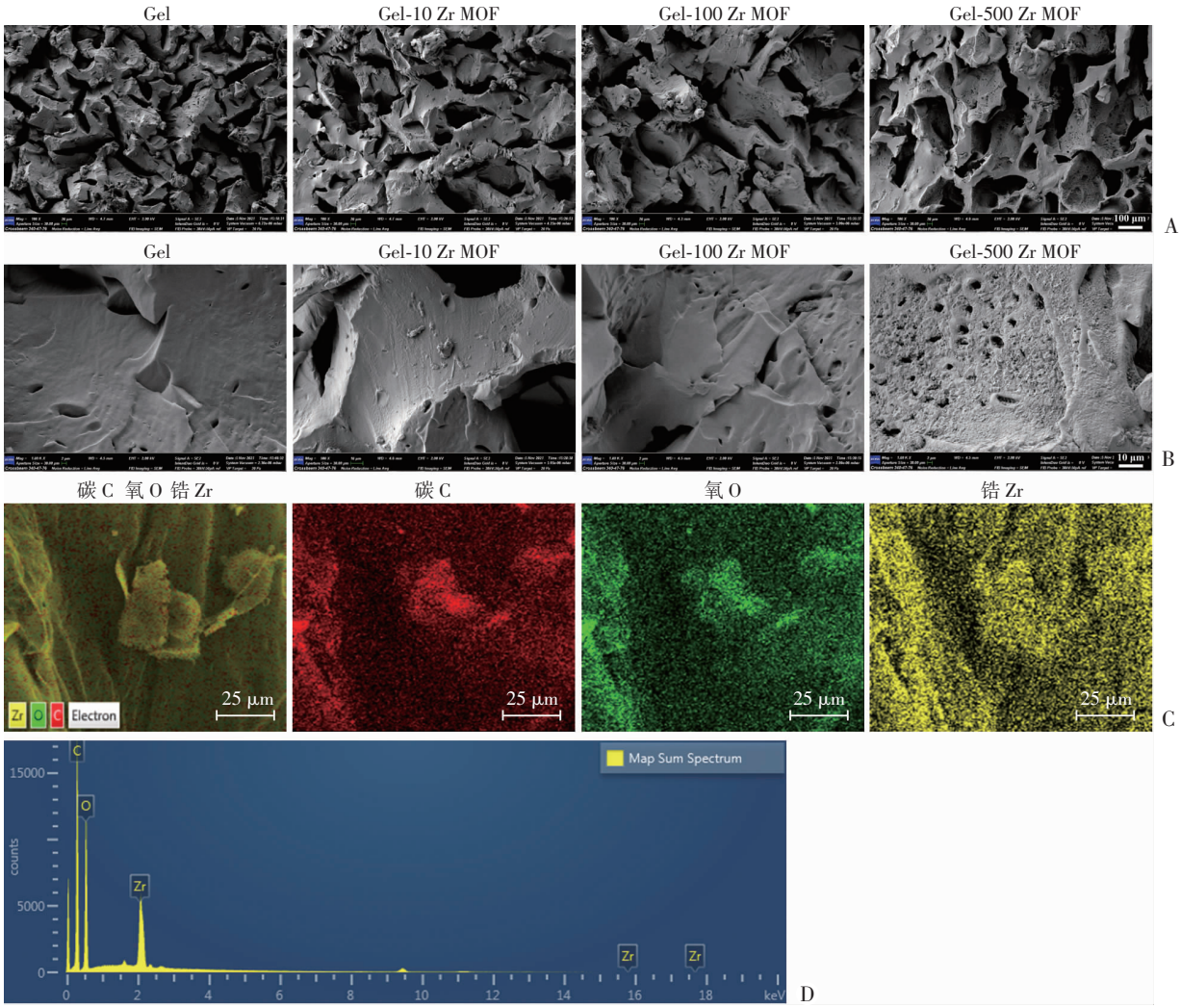


A:水凝胶对纳米 Zr MOF 材料封装的制备路线图;B:不同纳米 Zr MOF 材料含量(0、10、100、500 μg/mL)的水凝胶实物图 1:Gel;2:Gel-10 Zr MOF;3:Gel-100 Zr MOF;4:Gel-500 Zr MOF;C:不同纳米 Zr MOF 材料含量水凝胶的红外图谱

图 2 纳米 Zr MOF 材料封装于普鲁兰多糖/聚乙二醇复合水凝胶内部的制备过程及红外图谱表征

2.3 水凝胶的内部结构观察

通过扫描电镜对水凝胶的内部结构进行观察(图 3A),可以看出随着纳米 Zr MOF 材料的引入,水凝胶的内部孔径分布更均匀。通过局部放大图可以看到随着纳米 Zr MOF 材料含量的增加,孔壁粗糙度增加且具有更多的小孔(图 3B)。这是因为纳米 Zr MOF 材料作为填充物引入,使得水凝胶的孔壁致密性降低,从而导致孔壁粗糙度增加,同时会让孔壁出现明显的小孔。作为组织工程支架材料,这有利于种子细胞的粘附,以及水分和营养物质的运输,有利于细胞的生长。对 Gel-500 Zr MOF 水凝胶进行元素能谱分析,证明锆-金属有机框架材料封装于水凝胶内部(图 3C、D)。



A:水凝胶的切面观察;B:水凝胶孔壁的空隙分布观察;C:Gel-500 Zr MOF 水凝胶的元素(碳 C、氧 O、锆 Zr)能谱分布检测;D:Gel-500 Zr MOF 水凝胶的元素(碳 C、氧 O、锆 Zr)能谱点检测结果

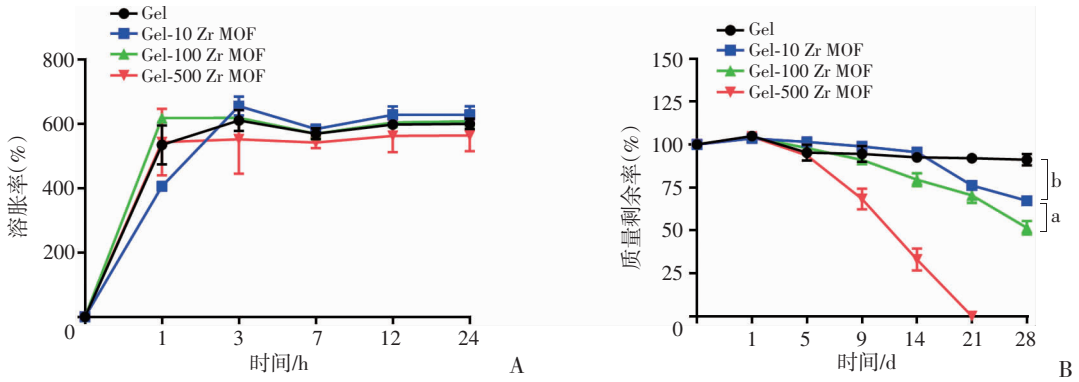
图 3 扫描电镜观察水凝胶的内部结构和元素图谱分析

2.4 水凝胶的溶胀和降解性能

水凝胶的溶胀平衡结果显示:随着纳米 Zr MOF 材料含量的增加,越快达到溶胀平衡(图 4A)。Gel-100 Zr MOF 和 Gel-500 Zr MOF 组能在 1 h 内就达到溶胀平衡,溶胀率分别为(618.2±4.3)%和(551.5±106.5)%。Gel 和 Gel-10 Zr MOF 组则在 3 h 内能达到溶胀平衡,溶胀率分别为(610.1±32.8)%和(654.7±29.9)%。所有水凝胶显示出较好的溶胀能力,但是纳米 Zr MOF 材料的引入能缩短溶胀的时间,可以为细胞提供更充足的营养物质。水凝胶的降解实验结果显示:随着纳米 Zr MOF 材料含量的增加,降解速度加快(图 4B)。Gel-500 Zr MOF 组在 21 d 就完全降解,而 Gel、Gel-10 Zr MOF 和 Gel-100 Zr MOF 在 28 d 的质量剩余率分别为(91.2±3.2)%、(67.3±2.7)%和(51.6±3.9)%。纳米 Zr MOF 材料的引入会缩短水凝胶的溶胀时间及水凝胶的降解时间,通过 TEM 结果可见:纳米 Zr MOF 材料的引入能使水凝胶孔壁上出现更多的小孔,有利于水分的渗透。表明纳米 Zr MOF 材料的引入能缩短溶胀的时间,同时孔的增多导致水凝胶内部结构稳定性降低,降解速度加快。

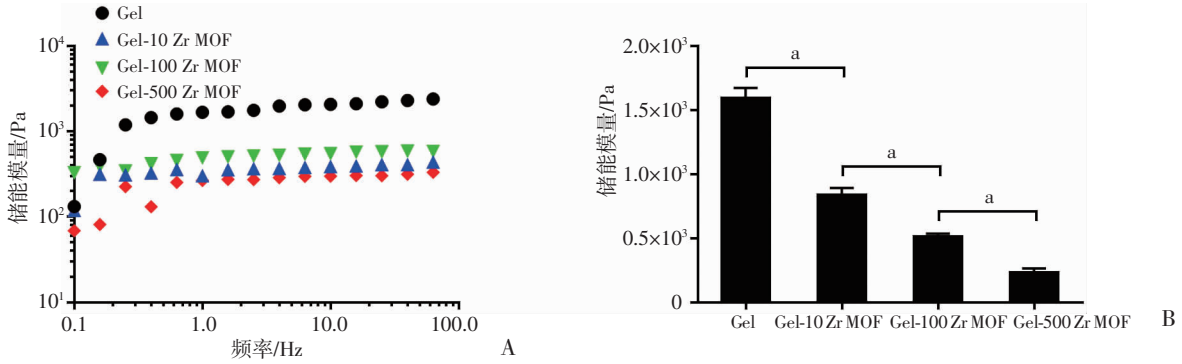
2.5 水凝胶的流变力学性能

水凝胶的储能模量(G′)随着纳米 Zr MOF 材料含量增加而减低(图 5A)。在 1.0 Hz 频率时,对 Gel、Gel-10 Zr MOF、Gel-100 Zr MOF 和 Gel-500 Zr MOF 各组的储能模量分别进行计算(图 5B),当频率从 0.1 到 100.0 Hz 变化时,只有 Gel-100 Zr MOF 组的储能模量值没有出现明显的波动,证明 Gel-100 Zr MOF 水凝胶具有较稳定的内部结构。结合前面的水凝胶内部结构、溶胀平衡和降解实验结果,综合考虑选取 Gel-100 Zr MOF 水凝胶进行后期细胞实验。



A:不同纳米 Zr MOF 材料含量水凝胶的溶胀平衡随时间的变化曲线;B:不同纳米 Zr MOF 材料含量水凝胶的质量剩余随时间的变化曲线 a:$P<0.05$, b:$P<0.01$

图 4 水凝胶的溶胀和降解性能表征结果



A:不同纳米 Zr MOF 材料含量水凝胶在 0.1~100.0 Hz 频率间储能模量变化;B:在 1.0 Hz 频率时不同纳米 Zr MOF 材料含量水凝胶的储能模量值 a:$P<0.01$

图 5 水凝胶的流变力学性能

2.6 纳米 Zr MOF 材料对抗炎肽 KAFAK 的包裹及释放结果

纳米 Zr MOF 材料对抗炎肽 KAFAK 负载后水合粒径为 352.5 nm,粒径分布(PDI)为 0.29,Zeta 电位为 18.9 mV(图 6A)。和单独的纳米 Zr MOF 材料相比,水合粒径有所增加,Zeta 电位从(-23.77±3.33)mV 变为(18.27±0.55)mV(图 6B),这是因为抗炎肽 KAFAK 是阳离子多肽,成功被负载到纳米 Zr MOF 材料上,从而使 Zr MOF@KAFAK 材料显示出正电荷。红外图谱结果显示(图 6C):Zr MOF@KAFAK 包含了 KAFAK 和 Zr MOF 的特征吸收峰,证明 Zr MOF 材料成功对抗炎肽 KAFAK 进行包裹。对抗炎肽 KAFAK 从水凝胶中的释放速率进行表征,结果显示(图 6D):单独封装于水凝胶内的抗炎肽 KAFAK 会快速地从水凝胶中释放,到第 3 天已经释放(67.3±10.9)%,而到第 7 天时已经基本完全释放[(94.4±2.6)%]。抗炎肽 KAFAK 负载到 Zr MOF 后再用水凝胶进行封装,到第 3 天只有(32.2±4.3)%的释放,直到第 21 天时才有(84.1±5.0)%的释放,显示出对抗炎肽 KAFAK 较好的缓释作用。

2.7 细胞毒性实验

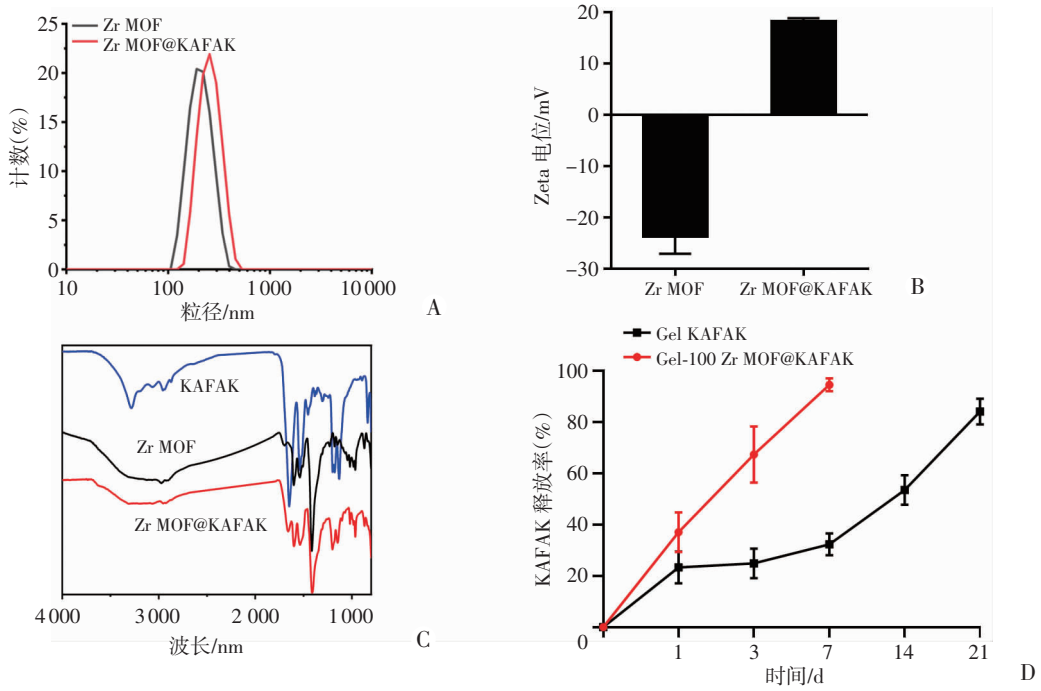
将兔 BMSCs 细胞作为种子细胞培养在水凝胶内,在培养 3 d 后,通过活/死细胞染色观察细胞生长状态。活细胞在 Gel、Gel-100 Zr MOF 和 Gel-100 Zr MOF@KAFAK 组的存活比率都大于 90%,显示出较好的细胞相容性,各组间差异无统计学意义,证明普鲁兰多糖/聚乙二醇复合水凝胶封装纳米 Zr MOF 和 Zr MOF@KAFAK 材料后不会增加水凝胶的毒性(图 7)。

2.8 总糖胺聚糖及软骨相关基因含量

总糖胺聚糖作为软骨细胞外基质的重要组成部分,是成软骨能力的关键指标。通过对水凝胶的总糖胺聚糖量用 DNA 含量进行平均(图 8A),培养 7 d 后,相较于 Gel 和 Gel-100 Zr MOF 组,Gel-100 Zr MOF@KAFAK 组糖胺聚糖含量显著提高($P<0.05$)。培养

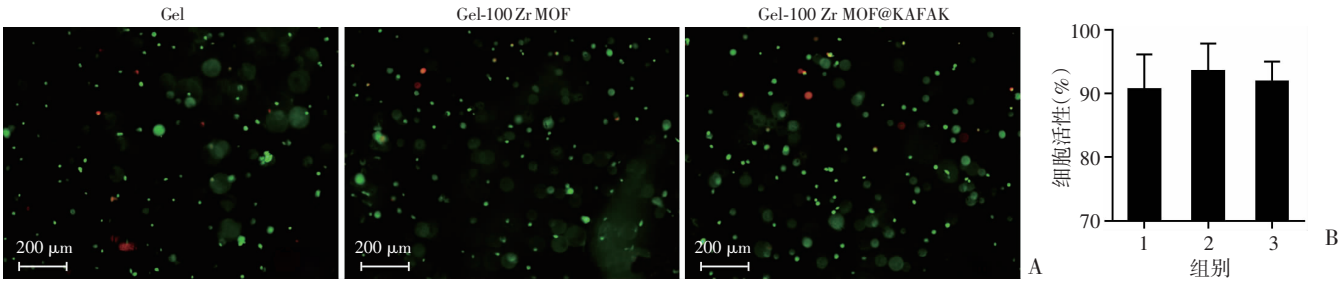
14 d 后,Gel-100 Zr MOF@ KAFAK 组糖胺聚糖含量进一步提高,较 Gel 组和 Gel-100 Zr MOF 组糖胺聚糖含量仍具有显著优势($P<0.01$)。结果表明:水凝胶封装负载抗炎肽 KAFAK 的纳米 Zr MOF 材料后能提高水凝胶中的 BMSCs 成软骨细胞外基质产生能力。

为了验证水凝胶封装负载抗炎肽 KAFAK 的纳米 Zr MOF 材料后维持软骨细胞表型的能力,对软骨特异性标志物 COL2A1 和 ACAN 以及肥大化标志物 COL10A1 分别进行 RT-PCR 定量测定。如图 8B 所示,在培养 14 d 后,Gel-100 Zr MOF@ KAFAK 组中 COL2A1 的表达显著高于 Gel 和 Gel-100 Zr MOF 组($P<0.05$)。同时,培养第 7、14 天,Gel-100 Zr MOF@ KAFAK 组水凝胶的 COL2A1 表达显著升高($P<0.05$)。ACAN 的表达和 COL2A1 的表达具有一致性(图 8C)。肥大化标志物 COL10A1 的表达 Gel-100 Zr MOF@ KAFAK 组显著低于 Gel 和 Gel-100 Zr MOF 组($P<0.05$,图 8D)。证明水凝胶通过缓慢释放抗炎肽 KAFAK 有利于维持软骨细胞表型和抑制 BMSCs 肥大化。



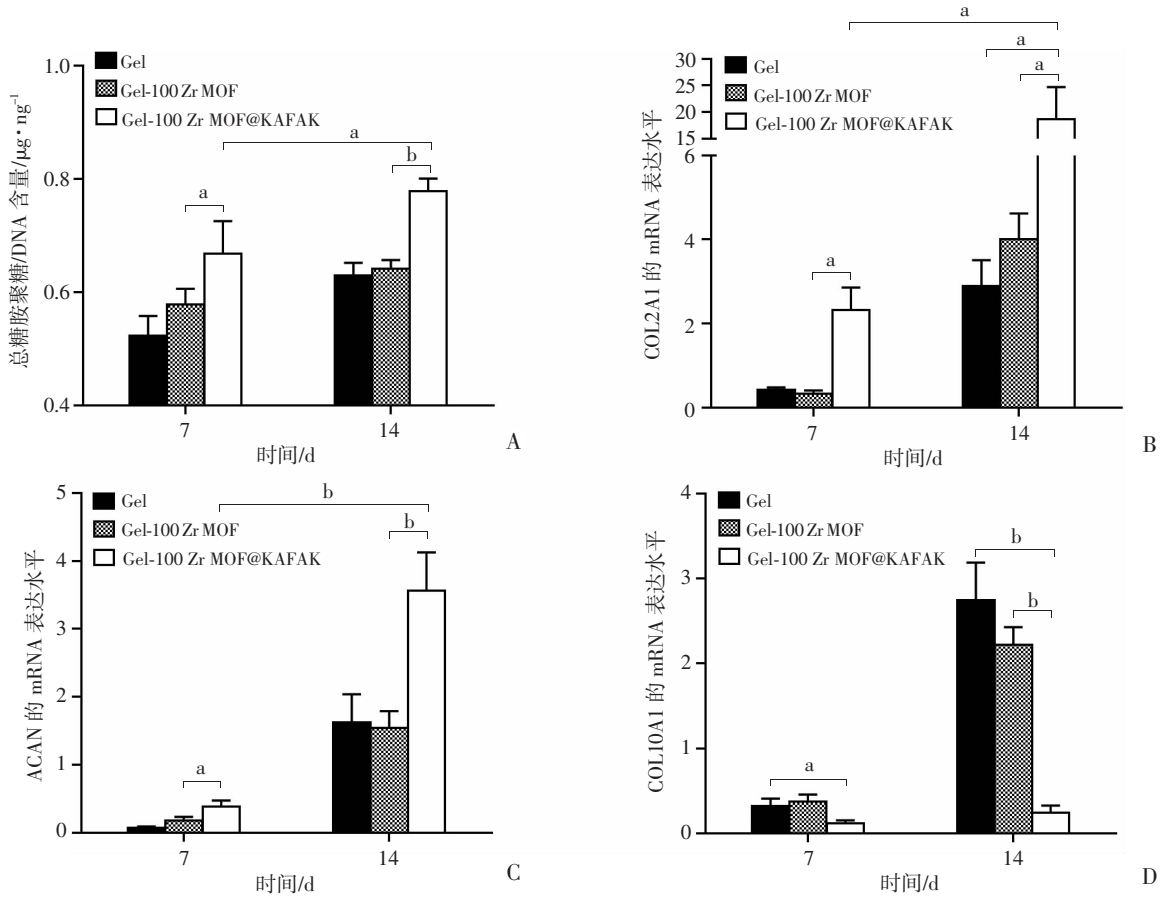
A:纳米 Zr MOF 材料负载抗炎肽 KAFAK 后的粒径分布;B:Zeta 电位;C:红外图谱;D:负载抗炎肽 KAFAK 的锆-金属有机框架封装于水凝胶后对抗炎肽 KAFAK 的释放曲线

图 6 纳米 Zr MOF 材料对抗炎肽 KAFAK 的包裹及释放



A:荧光显微镜观察各组活细胞和死细胞 绿色:活细胞;红色:死细胞;B:各组活细胞所占比例 1:Gel;2:Gel-100 Zr MOF;3:Gel-100 Zr MOF@ KAFAK

图 7 活/死细胞染色观察兔 BMSCs 作为种子细胞在水凝胶中培养 3 d 时的细胞活性



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

A:总糖胺聚糖含量用 DNA 含量进行平均后的结果;B~D:分别为 RT-PCR 检测 COL2A1、ACAN 和 COL10A1 的表达

图 8 含兔 BMSCs 的水凝胶在成软骨诱导培养基培养 7 d 和 14 d 总糖胺聚糖含量和成软骨标志物基因的表达

3 讨论

关节软骨缺乏血管、神经和淋巴,自我修复能力有限,伴随有骨关节炎的情况下就更难自我修复[34]。软骨再生过程中,炎性因子会抑制软骨细胞维持软骨表型,导致干细胞凋亡或降低其成软骨分化能力,从而减少软骨相关基质的合成,同时炎性因子还能诱导软骨基质降解酶的释放进而加速软骨缺损和骨关节炎进程[35-37]。因此,在软骨再生过程中有必要控制软骨缺损部位的炎性微环境。软骨再生组织在考虑支架材料、种子细胞和生长因子的同时应加入抗炎因子。

本研究选用普鲁兰多糖/聚乙二醇水凝胶作为支架材料,BMSCs 作为种子细胞,水凝胶封装负载有抗炎肽 KAFAK 的纳米 Zr MOF 材料达到控制炎性微环境的目的。成功制备了纳米 Zr MOF 材料,通过透射电镜和扫描电镜表征呈长梭形,分布均一,水合粒径为 328.8 nm,Zeta 电位为(-23.77±3.33)mV。纳米 Zr MOF 材料负载抗炎肽 KAFAK 后水合粒径为 352.5 nm,Zeta 电位为(18.27±0.55)mV。KAFAK 是阳性肽,负载后整个纳米金属有机框架带正电荷,软骨基质糖胺聚糖是负电荷,从水凝胶中释放的 Zr MOF@ KAFAK 会通过电荷相互作用和糖胺聚糖结合,起到更持久的炎性控制作用。水凝胶封装 Zr MOF@ KAFAK 后能延长抗炎肽 KAFAK 的释放时间达到 21 d,保证持续控制炎性微环境的能力。可通过控制封装纳米 Zr MOF 材料的含量对水凝胶的理化性质进行调控,扫描电镜观察纳米 Zr MOF 材料(100 μg/mL)高含量组水凝胶孔壁上有更多的小孔,达到溶胀平衡时间更短(1 h),降解速度更快,以及具有更稳定的流变性能,这些特性有利于营养物质的转运和代谢废物的排出和软骨再生。

本研究通过对成软骨能力的关键指标糖胺聚糖含量进行测定,结果显示:水凝胶封装 Zr MOF@ KAFAK 材料后能显著提高水凝胶中的 BMSCs 分泌软骨细胞外基质的能力。同时对软骨特异性标志物 COL2A1 和

ACAN 以及肥大化标志物 COL10A1 基因的表达进行了定量测定,结果表明:水凝胶封装 Zr MOF@KAFAK 材料后能通过缓慢释放抗炎肽 KAFAK 进而有利于维持软骨细胞表型和抑制 BMSCs 肥大化。证明在具有炎性条件下的软骨再生过程中,通过控制炎性微环境能达到更好的软骨再生效果。该结果对于组织工程修复软骨缺损具有一定指导意义。

综上,本研究选择具有良好生物活性的普鲁兰多糖/聚乙二醇复合水凝胶作为支架材料,封装负载有抗炎肽 KAFAK 的纳米 Zr MOF 材料,成功构建具有抗炎活性的软骨组织工程支架,并证明其良好的生物相容性和细胞外软骨基质产生能力,为构建兼具软骨再生和炎性微环境调控的支架材料提供一种新策略。

参考文献:

[1] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: areview[J]. JAMA, 2021, 325(6): 568-578. DOI: 10.1001/jama.2020.22171.

[2] MARTEL-PELLETIER J, BARR A J, CICUTTINI F M, *et al*. Osteoarthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16072. DOI: 10.1038/nrdp.2016.72.

[3] KWON H, BROWN W E, LEE C A, *et al*. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair[J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(9): 550-570. DOI:10.1038/s41584-019-0255-1.

[4] ARMIENTO A R, ALINI M, STODDART M J. Articular fibrocartilage: why does hyaline cartilage fail to repair? [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019, 146: 289-305. DOI:10.1016/j.addr.2018.12.015.

[5] MAKRIS E A, GOMOLL A H, MALIZOS K N, *et al*. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(1): 21-34. DOI:10.1038/nrrheum.2014.157.

[6] BALAKRISHNAN B, BANERJEE R. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering[J]. Chem Rev, 2011, 111(8): 4453-4474. DOI:10.1021/cr100123h.

[7] HUA Y J, XIA H T, JIA L T, *et al*. Ultrafast, tough, and adhesive hydrogel based on hybrid photocrosslinking for articular cartilage repair in water-filled arthroscopy[J]. Sci Adv, 2021, 7(35): eabg0628. DOI: 10.1126/sciadv.abg0628.

[8] XIE Y L, ZINKLE A, CHEN L, *et al*. Fibroblast growth factor signalling in osteoarthritis and cartilage repair[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(10): 547-564. DOI:10.1038/s41584-020-0469-2.

[9] SWEET M B, THONAR E J, IMMELMAN A R, *et al*. Biochemical changes in progressive osteoarthrosis[J]. Ann Rheum Dis, 1977, 36(5): 387-398. DOI:10.1136/ard.36.5.387.

[10] YANG K G, SARIS D B, VERBOUT A J, *et al*. The effect of synovial fluid from injured knee joints on *in vitro* chondrogenesis[J]. Tissue Eng, 2006, 12(10): 2957-2964. DOI:10.1089/ten.2006.12.2957.

[11] LI X, LU Y, WANG Y X, *et al*. Thermo-responsive injectable naringin-loaded hydrogel polymerised sodium alginate/bioglass delivery for articular cartilage[J]. Drug Deliv, 2021, 28(1): 1290-1300. DOI: 10.1080/10717544.2021.1938752.

[12] BRUGNANO J L, CHAN B K, SEAL B L, *et al*. Cell-penetrating peptides can confer biological function: regulation of inflammatory cytokines in human monocytes by MK2 inhibitor peptides[J]. J Control Release, 2011, 155(2): 128-133. DOI:10.1016/j.jconrel.2011.05.007.

[13] POH S, LIN J B, PANITCH A. Release of anti-inflammatory peptides from thermosensitive nanoparticles with degradable cross-links suppresses pro-inflammatory cytokine production[J]. Biomacromolecules, 2015, 16(4): 1191-1200. DOI:10.1021/bm501849p.

[14] BARTLETT R L, PANITCH A. Thermosensitive nanoparticles with pH-triggered degradation and release of anti-inflammatory cell-penetrating peptides[J]. Biomacromolecules, 2012, 13(8): 2578-2584. DOI:10.1021/bm300826v.

[15] BARTLETT R L 2nd, SHARMA S, PANITCH A. Cell-penetrating peptides released from thermosensitive nanoparticles suppress pro-inflammatory cytokine response by specifically targeting inflamed cartilage explants [J]. Nanomedicine, 2013, 9(3): 419-427. DOI:10.1016/j.nano.2012.09.003.

[16] MCMASTERS J, POH S, LIN J B, *et al*. Delivery of anti-inflammatory peptides from hollow PEGylated poly(NIPAM) nanoparticles reduces inflammation in an *ex vivo* osteoarthritis model[J]. J Control Release, 2017, 258: 161-170. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.05.008.

[17] LIN J B, POH S, PANITCH A. Controlled release of anti-inflammatory peptides from reducible thermosensitive nanoparticles suppresses cartilage inflammation [J]. Nanomedicine, 2016, 12(7): 2095-2100. DOI:10.1016/j.nano.2016.05.010.

[18] LI T, YANG J J, WENG C M, *et al*. Intra-articular injection of anti-inflammatory peptide-loaded glycol chitosan/fucoidan nanogels to inhibit inflammation and attenuate osteoarthritis progression[J]. Int J Biol Macromol, 2021,

170: 469-478. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.158.

[19] DOONAN C, RICCÒ R, LIANG K, *et al*. Metal-organic frameworks at the biointerface: synthetic strategies and applications[J]. Acc Chem Res, 2017, 50(6): 1423-1432. DOI:10.1021/acs.accounts.7b00090.

[20] ZHOU Z X, VÁZQUEZ-GONZÁLEZ M, WILLNER I. Stimuli-responsive metal-organic framework nanoparticles for controlled drug delivery and medical applications[J]. Chem Soc Rev, 2021, 50(7): 4541-4563. DOI: 10.1039/d0cs01030h.

[21] DELLA ROCCA J, LIU D M, LIN W B. Nanoscale metal-organic frameworks for biomedical imaging and drug delivery[J]. Acc Chem Res, 2011, 44(10): 957-968. DOI:10.1021/ar200028a.

[22] XUE S, ZHOU X J, SANG W L, *et al*. Cartilage-targeting peptide-modified dual-drug delivery nanoplatform with NIR laser response for osteoarthritis therapy[J]. Bioact Mater, 2021, 6(8): 2372-2389. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.01.017.

[23] XIONG F, QIN Z N, CHEN H M, *et al*. pH-responsive and hyaluronic acid-functionalized metal-organic frameworks for therapy of osteoarthritis[J]. J Nanobiotechnol, 2020, 18(1): 139. DOI:10.1186/s12951-020-00694-3.

[24] LI Z, PENG Y, XIA X Y, *et al*. Sr/PTA metal organic framework as a drug delivery system for osteoarthritis treatment[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 17570. DOI: 10.1038/s41598-019-54147-5.

[25] LI Z, PENG Y, PANG X C, *et al*. Potential therapeutic effects of Mg/HCOOH metal organic framework on relieving osteoarthritis[J]. Chem Med Chem, 2020, 15(1): 13-16. DOI:10.1002/cmdc.201900546.

[26] LI Z, ZHAO S J, WANG H Z, *et al*. Functional groups influence and mechanism research of UiO-66-type metal-organic frameworks for ketoprofen delivery[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 178: 1-7. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.027.

[27] SHYNGYS M, REN J, LIANG X Q, *et al*. Metal-organic framework (MOF)-based biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 603608. DOI:10.3389/fbioe.2021.603608.

[28] TOPRAK Ö, TOPUZ B, MONSEF Y A, *et al*. BMP-6 carrying metal organic framework-embedded in bioresorbable electrospun fibers for enhanced bone regeneration[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 120: 111738. DOI:10.1016/j.msec.2020.111738.

[29] XUE Y Y, ZHU Z, ZHANG X, *et al*. Accelerated bone regeneration by MOF modified multifunctional membranes through enhancement of osteogenic and angiogenic performance[J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10(6): e2001369. DOI:10.1002/adhm.202001369.

[30] ZHONG L N, CHEN J Y, MA Z Y, *et al*. 3D printing of metal-organic framework incorporated porous scaffolds to promote osteogenic differentiation and bone regeneration[J]. Nanoscale, 2020, 12(48): 24437-24449. DOI:10.1039/d0nr06297a.

[31] TELGERD M D, SADEGHINIA M, BIRHANU G, *et al*. Enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on metal-organic framework based on copper, zinc, and imidazole coated poly-l-lactic acid nanofiber scaffolds[J]. J Biomed Mater Res A, 2019, 107(8): 1841-1848. DOI: 10.1002/jbm.a.36707.

[32] QIN X P, HE R, CHEN H, *et al*. Methacrylated pullulan/polyethylene (glycol) diacrylate composite hydrogel for cartilage tissue engineering[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2021, 32(8): 1057-1071. DOI: 10.1080/09205063.2021.1899888.

[33] ZHANG Y, WANG F M, LIU C Q, *et al*. Nanozyme decorated metal-organic frameworks for enhanced photodynamic therapy[J]. ACS Nano, 2018, 12(1): 651-661. DOI:10.1021/acsnano.7b07746.

[34] HALEEM A M, CHU C R. Advances in tissue engineering techniques for articular cartilage repair[J]. Oper Tech Orthop, 2010, 20(2): 76-89. DOI:10.1053/j.oto.2009.10.004.

[35] LOESER R F, GOLDRING S R, SCANZELLO C R, *et al*. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 1697-1707. DOI: 10.1002/art.34453.

[36] STEINERT A F, GHIVIZZANI S C, RETHWILM A, *et al*. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage[J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(3): 213. DOI:10.1186/ar2195.

[37] LIU Y Z, PENG L Q, LI L L, *et al*. 3D-bioprinted BMSC-laden biomimetic Multiphasic scaffolds for efficient repair of osteochondral defects in an osteoarthritic rat model[J]. Biomaterials, 2021, 279: 121216. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121216.

(收稿:2021-11-23;修回:2022-01-28)

(编辑 张 维)