

甲基丙烯酸酯化硫酸软骨素/脱细胞华通胶/姜黄素复合水凝胶调控巨噬细胞极化与 BMSCs 成软骨分化的研究

郭莉婷^{1,2,3}, 吴建豪², 张知行², 龙传阳², 张智超², 丁振罡², 吴 江², 付力伟², 田 玥², 郭全义², 雷永红^{1,3}

¹内蒙古医科大学, 内蒙古呼和浩特 010110; ²解放军总医院第四医学中心骨科研究所, 国家骨科与运动康复临床医学研究中心, 骨科再生医学北京市重点实验室, 全军骨科战创伤重点实验室, 北京 100048; ³解放军总医院第一医学中心整形修复科, 北京 100853

摘要:背景 关节软骨损伤后自我修复能力有限, 易进展为骨关节炎。传统修复方法存在局限, 而组织工程为软骨再生提供了新策略。目的 构建并评估一种负载姜黄素的甲基丙烯酸酯化硫酸软骨素/脱细胞华通胶(methacrylated chondroitin sulfate/Wharton's jelly/Curcumin, CSMA/Wharton/Curcumin, CWC)复合仿生水凝胶, 系统探究其理化性能、生物相容性、免疫调节能力及在炎症条件下促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成软骨分化的潜能。方法 采用405 nm紫外光交联技术制备CWC复合水凝胶, 通过扫描电镜、溶胀实验对其形貌与性能进行表征。采用CCK-8法、活/死细胞染色及鬼笔环肽染色, 评价CSMA、CW(CSMA/Wharton)及CWC三组水凝胶浸提液对大鼠BMSCs的生物相容性及增殖的影响。通过qRT-PCR和免疫荧光实验检测巨噬细胞M1/M2表型相关基因(*CD86*, *CD206*等)表达, 评估材料的免疫调节作用。在白细胞介素1 β (interleukin-1 beta, IL1 β)诱导的炎症环境中, 通过qRT-PCR检测BMSCs成软骨分化关键基因(*Sox9*, *Col2*, *Acan*, *Col1*)的表达, 评估不同水凝胶对干细胞的成软骨分化的影响。结果 CWC水凝胶呈现稳定、均匀且相互连通的三维多孔结构, 姜黄素成功负载, 且华通胶的加入使网络结构更为致密。生物学评价表明, 三组材料均无明显细胞毒性, 并能支持细胞增殖与铺展。在免疫调节方面, CWC水凝胶可显著下调巨噬细胞M1型标志物(*IL1 β* 、*CD86*)、上调M2型标志物(*Arg1*、*CD206*)的mRNA表达, 有效诱导其向抗炎表型极化。在炎症条件下, CWC水凝胶能够显著逆转IL1 β 对成软骨分化的抑制, 提升软骨特异性基因(*Sox9*、*Col2*、*Acan*)的表达, 并同时抑制*Col1*的表达, 其保护与促成软骨分化的效果优于CSMA及CW组。结论 本研究成功构建了负载姜黄素的CSMA/Wharton光交联复合水凝胶。该材料具有良好的生物相容性与显著的免疫调节能力, 并在炎症环境中可有效保护并促进BMSCs的成软骨分化。姜黄素的负载赋予了材料明确的抗炎与促成软骨活性, 结合华通胶提供的仿生微环境, 实现了“抗炎-促再生”的协同作用, 为软骨修复提供了一种新型的功能化支架策略。

关键词:硫酸软骨素; 水凝胶; 姜黄素; 华通胶; 软骨损伤; 骨髓间充质干细胞

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2026)05-0463-10

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.26031303

引用本文: 郭莉婷, 吴建豪, 张知行, 等. 甲基丙烯酸酯化硫酸软骨素/脱细胞华通胶/姜黄素复合水凝胶调控巨噬细胞极化与 BMSCs 成软骨分化的研究 [J]. 解放军医学院学报, 2026, 47 (5): 463-472.

Methylacrylated chondroitin sulfate/decellularized Wharton's jelly/curcumin composite hydrogel regulating macrophage polarization and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

GUO Liting^{1,2,3}, WU Jianhao², ZHANG Zhixing², LONG Chuanyang², ZHANG Zhichao², DING Zhengang², WU Jiang², FU Liwei², TIAN Yue², GUO Quanyi², LEI Yonghong^{1,3}

¹Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Institute of Orthopedics, the Fourth Medical Center of PLA General Hospital, National Clinical Research Center for Orthopedics and Sports Rehabilitation, Beijing Key Laboratory of Orthopedic Regenerative Medicine, Key Laboratory of Musculoskeletal Trauma & War Injuries, Beijing 100048, China; ³Department of Plastic and Reconstructive Surgery, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LEI Yonghong. Email: lyhhlx@126.com

收稿日期: 2026-03-13

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(L234024)

第一作者: 郭莉婷, 在读硕士。Email: glt0104@163.com

通信作者: 雷永红, 博士。副主任医师。Email: lyhhlx@126.com

Abstract: Background Articular cartilage exhibits limited self-repair capability after injury and is prone to progressing toward osteoarthritis. Conventional repair approaches face inherent limitations, while tissue engineering offers a novel strategy for cartilage regeneration. **Objective** To construct a curcumin-loaded CSMA/Wharton's jelly composite hydrogel and systematically elucidate its physicochemical characteristics, biocompatibility, and immunomodulatory effects, as well as its capacity to enhance chondrogenesis of BMSCs in an inflammatory microenvironment. **Methods** The CWC composite hydrogel was fabricated via 405 nm ultraviolet light-induced crosslinking. Its morphology and physicochemical properties were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and swelling experiments. The biocompatibility and proliferative effects of hydrogel extracts from the three groups—CSMA, CW (CSMA/Wharton's jelly), and CWC—on rat BMSCs were evaluated using the CCK-8 assay, live/dead staining, and phalloidin staining. The immunomodulatory function of the materials was assessed by detecting the expression of M1/M2 macrophage phenotype-related markers (e.g., *CD86*, *CD206*) through quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunofluorescence staining. Under an inflammatory microenvironment induced by interleukin 1 β (IL1 β), the chondrogenic differentiation capacity of BMSCs was evaluated by measuring the expression levels of key chondrogenic genes, including *Sox9*, *Col2*, *Acan*, and *Col1*, via qRT-PCR. **Results** The CWC hydrogel exhibited a stable, homogeneous, and interconnected three-dimensional porous structure. Curcumin was successfully loaded, and the incorporation of Wharton's jelly resulted in a more compact network architecture. Biological evaluation indicated that all three groups of materials showed no obvious cytotoxicity and supported cell proliferation and spreading. In terms of immunomodulation, the CWC hydrogel significantly downregulated the mRNA expression of M1 macrophage markers (*IL-1 β* , *CD86*) and upregulated that of M2 markers (*Arg1*, *CD206*), effectively polarizing macrophages toward an anti-inflammatory phenotype. Under inflammatory conditions, the CWC hydrogel markedly reversed the IL-1 β -induced suppression of chondrogenic differentiation, enhanced the expression of cartilage-specific genes (*Sox9*, *Col2*, *Acan*), and concurrently suppressed *Col1* expression. Its protective and pro-chondrogenic effects were superior to those of the CSMA and CW groups. **Conclusion** A curcumin-loaded, photocrosslinked CSMA/Wharton's jelly composite hydrogel has been successfully fabricated. The material demonstrates favorable biocompatibility and significant immunomodulatory capacity, and effectively protects against inflammatory damage while promoting the chondrogenic differentiation of BMSCs. The incorporation of curcumin endows the scaffold with distinct anti-inflammatory and pro-chondrogenic activities. Combined with the biomimetic microenvironment provided by Wharton's jelly, the system achieves a synergistic "anti-inflammatory and pro-regenerative" effect, offering a novel functionalized scaffold strategy for cartilage repair.

Keywords: chondroitin sulfate; hydrogel; curcumin; Wharton's jelly; cartilage injury; bone marrow mesenchymal stem cells

Cited as: Guo LT, Wu JH, Zhang ZHX, et al. Methylacrylated chondroitin sulfate/decellularized Wharton's jelly/curcumin composite hydrogel regulating macrophage polarization and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2026, 47(5): 463-472.

由创伤、炎症、退行性病变或肿瘤切除等多种因素造成的负重关节(如膝关节、髋关节)的大面积或全层软骨缺损, 受限于其内源性再生修复能力, 若未获得及时有效的干预, 几乎不可避免地进展为骨关节炎(osteoarthritis, OA)^[1-3]。该类缺损常伴随持续性疼痛、关节功能障碍及进行性结构破坏, 严重影响患者的生活质量, 并带来沉重的社会经济负担^[4]。传统上, 针对软骨缺损的临床修复策略主要包括微骨折术、自体软骨细胞移植以及自体或异体骨软骨移植, 但这些方法存在力学性能差、操作复杂、免疫排斥等局限, 故临床亟需一种高质量、功能稳定且来源可靠的新型修复方案^[1,5-6]。

组织工程技术为软骨再生提供了创新途径^[7-8]。水凝胶因其高含水率、与天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM)高度相似的多孔网络结构、优异的生物相容性与可调的理化性质, 被视为软骨组织工程最具前景的支架材料之一^[2,9-10]。硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)作为天然软骨ECM中含量最为丰富的糖胺聚糖之一, 因其独特

的生物学功能而备受关注^[11-12]。然而, 纯硫酸软骨素水凝胶存在降解速率难以精确控制、诱导干细胞高效成软骨分化能力有限等缺点, 为了克服单一材料的不足, 基于复合细胞外基质材料的研究应运而生, 并迅速成为构建仿生支架的前沿方向^[10,13]。其中, 人脐带华通胶(Wharton's jelly)作为一种独特的天然ECM来源, 展现出显著优势, 其天然细胞含量极低, 富含II型胶原、透明质酸及多种硫酸化糖胺聚糖等类软骨ECM成分^[14]。更关键的是, 其天然负载高浓度的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等多种促再生生长因子^[15]。这些因子与ECM物理结合, 可实现更接近生理、更持久的缓释效应, 协同调控细胞的增殖、迁移及成软骨分化^[16-17]。

软骨损伤后局部存在持续性慢性炎症与氧化应激^[18-19]。在OA等病理状态下, 促炎因子水平升高, 激活NF- κ B等信号通路, 加剧软骨细胞凋亡

和基质降解^[20]。同时,过量产生的活性氧导致氧化应激,并激活一种铁依赖性的新型程序性细胞死亡——铁死亡,其在软骨退变中也扮演了重要角色^[21]。姜黄素(Curcumin)是一种从姜黄中提取的天然多酚化合物,因其具有抗炎^[22]、抗氧化^[23]及抗铁死亡^[24-25]等多重药理作用而成为理想候选药物。研究表明,姜黄素能有效抑制NF- κ B通路,降低炎症介质水平,并通过调节ACSL4、SLC7A11等关键蛋白表达抵抗软骨细胞的铁死亡^[26-27]。本研究构建了一种负载姜黄素的紫外光交联甲基丙烯酸酯化硫酸软骨素(methacrylated chondroitin sulfate, CSMA)复合水凝胶,旨在为软骨组织工程提供新型的功能化支架策略参考。

1 材料与方法

1.1 人脐带与实验动物

本研究所采用的正常足月妊娠新生儿脐带取自于解放军总医院第一医学中心妇产科,并获取产妇及家属知情同意(伦理批号:S2018-133-01)。

实验选用4周龄雄性SD大鼠6只,体质量60~100 g,所有动物均购自解放军总医院实验动物中心。本研究遵守动物伦理规范,遵守《中国实验动物管理条例》及相关动物伦理规范,所有操作均在麻醉或处死后进行,并已通过解放军总医院伦理委员会的审查批准(批号:EAC-IACUC-2025F21-050)。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/F-12培养基、MEM培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗(Gibco,美国);0.25%胰蛋白酶(Sigma,美国);大鼠骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化试剂盒、大鼠骨髓间充质干细胞(赛业生物科技有限公司,中国,RASMX-01001);DAPI溶液、40 g/L多聚甲醛(Solarbio,中国);Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒、Actin微丝红色荧光探针(上海碧云天生物技术有限公司,中国);预混qRT-PCR反应体系(GenStar,加拿大);姜黄素(TargetMol,美国);CCK-8试剂盒(同仁公司,日本);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS; Abmole,美国);EPOCH TAKE3酶标仪(BioTek,美国);苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂(苏州永沁泉智能设备有限公司,中国);CSMA(领就医疗,中国);重组大鼠巨噬细胞集落刺激因子(Novoprotein,中国)。

1.3 脱细胞华通胶的制备

华通胶的脱细胞处理参照本课题组已建立的方法并进行改进^[28]。在超净工作台中,将脐带浸泡于无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中,使用齿镊剥离动脉与静脉,收集华通胶组织。采用10次冻融循环对组织进行脱细胞处理,随后将其重悬于无菌PBS中清洗3次。组织经机械粉碎与匀浆处理,形成均匀悬浮液。依次在2 000、3 000、6 000转/min条件下离心20 min,保留上清液;再于9 500转/min条件下离心35 min,弃上清液,保留沉淀。所得沉淀再次以9 500转/min离心,最终获得的沉淀物,即脱细胞华通胶,保存于无菌玻璃器皿中冷藏备用。

1.4 CSMA/Wharton/Curcumin水凝胶的制备

参考既往文献,配制质量体积分数为6%(w/v)的CSMA溶液^[29]:精确称取0.6 g CSMA粉末,加入9.78 mL PBS,于50℃恒温水浴中磁力搅拌30 min,至完全溶解,得到澄清均一的CSMA浓缩液。将0.2 mL(占总体积2%)经预处理的脱细胞华通胶溶液以约0.5 mL/min的速率缓慢滴加至上述浓缩液中,持续搅拌至混合均匀。向混合液中加入0.025 g光引发剂苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂,使其在终体系(10 mL)中的浓度为0.25%(w/v)。将混合液置于50℃水浴中避光搅拌3 h,以实现充分混匀与预交联,获得均质的前驱体溶液。向前驱体溶液中加入0.02 mL浓度为10 mmol/L的姜黄素溶液,使其终浓度为20 μ mol/L,于50℃水浴中避光振荡15 min以确保药物均匀分散。使用0.22 μ m无菌针头式滤器对含药前驱体溶液进行过滤除菌。将溶液转移至指定模具,置于波长405 nm的固化灯下照射30 s引发光交联反应,最终制备得到CSMA/Wharton/姜黄素复合水凝胶。

1.5 不同支架的理化性质评估

大体观和微观结构:观察CSMA、CSMA/Wharton及CSMA/Wharton/Curcumin水凝胶的大体形态,将三种水凝胶样品经过冷冻干燥及真空喷金处理后,使用Quanta FEG250扫描电子显微镜采集SEM图像。

溶胀性能测试:采用经典的溶胀平衡称重法测水凝胶的溶胀能力。分别将CSMA、CSMA/Wharton和CSMA/Wharton/Curcumin三组水凝胶样品冷冻干燥后,精确称取其干重(记为 m_0)。将冻干样品浸没于37℃的平衡盐溶液中,在设定的时

间点(1、2、4、6、10、24 h)取出样品,用滤纸轻轻吸除表面游离的水分后立即称重(记为mt)。依据公式 $\lambda=(mt-m_0)/m_0$ 计算各时间点的溶胀比。每组实验设置3个平行样本。

1.6 细胞培养

骨髓来源的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDMs)的获取方法如下。取4周龄SD大鼠,处死后在无菌条件下分离双侧股骨与胫骨,使用PBS冲洗骨髓腔。收集骨髓腔内容物,所得细胞悬液经100 μm 无菌滤膜过滤。为去除红细胞,使用红细胞裂解缓冲液处理细胞,离心收集沉淀。将细胞重悬于含10%灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素-链霉素及35 ng/mL巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)的DMEM完全培养基中。在37℃、5% CO₂条件下持续培养7 d,获得成熟的贴壁BMDMs,用于后续实验。从液氮中取出BMSCs冻存管,迅速置于37℃水浴中,轻轻晃动至完全融化。用75%乙醇擦拭冻存管外壁,在超净工作台中将细胞悬液转移至含5 mL完全培养基的15 mL离心管中,轻柔吹打混匀。1 500 转/min离心5 min,弃上清。用适量预热的完全培养基重悬细胞沉淀,转入T75培养瓶中,补充培养基至总体积20 mL,轻柔晃动培养瓶使细胞分布均匀。将培养瓶置于37℃、5% CO₂培养箱中静置培养。待细胞生长至培养瓶80%左右融合度时使用胰酶进行消化并传代,培养至P3代备用。

1.7 制备CSMA/Wharton/Curcumin支架浸提液

依据国家ISO10993-12(2019)标准,制备两种不同培养基的浸提液。分别将支架材料按100 mg/mL的比例浸入含有1%胎牛血清的成软骨诱导培养基和含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基中,于培养箱内孵育72 h,收集所得浸提液。

1.8 不同支架的生物相容性

1.8.1 细胞活死染色 将第3代大鼠BMSCs以适宜密度接种于预置盖玻片的24孔板中,待细胞完全贴壁后,弃去原培养基,分别更换为由DMEM培养基制备的CSMA浸提液、CSMA/Wharton浸提液及CSMA/Wharton/Curcumin(CWC)浸提液进行培养。培养3 d后,弃去各孔中的培养基,用PBS清洗3遍,加入死/活细胞染色剂,置于细胞培养箱内避光孵育30 min,置于荧光倒置显微镜下观察和拍照,获得图像采用Image J软件进行处理。

1.8.2 免疫荧光检测不同支架对细胞骨架的影响

为评估支架对BMSCs细胞骨架的影响,将细胞以 $4\times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于放置有14 mm细胞爬片的24孔板中,每孔加入500 μL 细胞悬液(约 2×10^4 个细胞),于培养箱中过夜培养。待细胞贴壁后,以PBS清洗,并更换为DMEM培养基制备的CSMA浸提液、CSMA/Wharton浸提液及CWC浸提液培养基继续培养3 d。细胞经4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS清洗后,在避光条件下以鬼笔环肽染色细胞骨架,室温孵育30 min,再次清洗后以DAPI染核10 min。染色完成后于荧光倒置显微镜下观察并采集图像,所得图像采用Image J软件进行分析处理。

1.8.3 CCK-8法检测细胞活力 体外细胞毒性本研究旨在评价不同水凝胶浸提液对大鼠BMSCs增殖的影响。对培养的大鼠骨髓间充质干细胞进行CCK-8染色。准备2个96孔板,设计孔板位置,设置Control组(DMEM培养基)、CSMA浸提液组、CW浸提液组和CWC浸提液组(均由DMEM培养基制备),每组设3个复孔。将 1×10^3 个细胞接种于96孔板中,待细胞贴壁后,加入各组对应培养基,分别培养1 d、4 d、7 d。向各孔中加入含10% CCK-8溶液的新鲜培养液,37℃细胞孵育2 h,用酶标仪测定波长450 nm波长处的吸光度值(A),评估水凝胶的细胞毒性。

1.9 不同支架对巨噬细胞的免疫调节作用

1.9.1 qRT-PCR检测不同支架对巨噬细胞极化的影响 为评估不同支架浸提液对巨噬细胞极化表型的影响,本研究进行了体外抗炎基因表达检测。将巨噬细胞以适宜密度接种于培养板中,待其完全贴壁后,每孔加入35 ng/mL LPS预处理24 h;随后分别更换为DMEM培养基、DMEM培养基浸提的CSMA浸提液、CW浸提液及CWC浸提液继续培养。

细胞在相应条件下培养至预定时间后,采用Trizol法提取总RNA,经反转录制备cDNA,进而使用SYBR Premix Ex Taq进行实时荧光定量PCR反应。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因mRNA的相对表达量,并以GAPDH作为内参基因。本研究通过检测巨噬细胞M1型标志物(如CD86、IL-1 β)与M2型标志物(如Arg1、CD206)的mRNA表达水平,综合评价各水凝胶浸提液对巨噬细胞极化的调节作用。

1.9.2 免疫荧光检测不同支架对巨噬细胞极化的影响 将巨噬细胞以适宜密度接种于放置有14 mm细胞爬片的24孔板中,待其完全贴壁后,每孔加

入 35 ng/mL LPS 预处理 24 h 后，随后分别更换为 DMEM 培养基、CSMA 浸提液、CSMA/Wharton 浸提液或 CWC 浸提液进行培养。细胞经 PBS 润洗 2 次，加入 4% 多聚甲醛固定 20 ~ 30 min，PBS 清洗 3 次。加入 0.5% TritonX 100 或 0.5% Tween 20 室温处理 30 min，PBS 清洗 1 次。在覆盖封口膜的孔板盖表面滴加 20 ~ 40 μ L 封闭液，将细胞爬片扣置于封闭液上，于湿盒内室温封闭 30 min。更换封口膜，滴加按一定比例稀释的一抗(CD86, CD206)，湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。回收一抗后，将爬片置于孔板内，PBS 清洗 3 次。在封口膜表面滴加荧光二抗(1 : 200)后反扣爬片，室温避光孵育 30 min。再次更换封口膜，滴加 DAPI 染液(1 : 200)，湿盒避光孵育 5 min。将爬片在孔板内以 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。用水性封片剂将爬片扣置于载玻片上封片，于荧光倒置显微镜下观察并采集图像，所得图像采用 Image J 软件进行分析处理。

1.10 qRT-PCR 检测不同支架对干细胞成软骨分化的影响

为评价不同支架浸提液对 BMSCs 在炎症条件下成软骨分化性能的影响，本研究设置了 5 组处理：Control 组(成软骨诱导培养基)、IL1 β 组(炎症诱导阳性对照)、CSMA+IL1 β 组、CW+IL1 β 组及 CWC+IL1 β 组。将大鼠 BMSCs 以每孔 1×10^4 个的密度接种于 6 孔板，使用含 10% 胎牛血清的 MEM 完全培养基常规培养至细胞完全贴壁且融合度达 100% 后，更换为相应各组的培养基继续诱导培养 3 d。培养 3 d 后，采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。使用 PrimeScript[™] RT Reagent Kit 将 RNA 反转录为 cDNA。采用 SYBR Premix Ex Taq 进行实时荧光定量 PCR 反应，以 GAPDH 作为内参基因，通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因 mRNA 的相对表达量。检测的成软骨分化相关基因包括 *Acan*、*Sox9*、*Col1* 及

Col2。见表 1。

1.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.3 软件进行统计学分析。实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组数据间比较采用 *t* 检验，多组样本数据比较采用方差分析(ANOVA)进行分析；以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同支架的制备及表征

水凝胶在 405 nm 紫外光下的原位交联。光照前，前驱液保持流动性(图 1A 固化前)；仅经 20 s 辐照，材料即迅速固化并丧失流动特征(图 1A 固化后)，姜黄素的引入使水凝胶颜色偏黄(图 1B)。SEM 进一步揭示，固化水凝胶呈三维海绵状大孔结构，孔道均匀贯通，为营养/氧气扩散和细胞迁移提供理想通道；同时，随机取向的纤维相互缠结，形成多级孔隙(图 1B)。CSMA 平均孔径为 $(250.86 \pm 52.04) \mu\text{m}$ ，CW 平均孔径为 $(161.70 \pm 32.62) \mu\text{m}$ ，CWC 平均孔径为 $(167.15 \pm 31.07) \mu\text{m}$ (图 1C)，提示华通胶的加入提升了交联密度，使微观结构更为致密，而姜黄素的掺入不影响支架的孔径大小。

2.2 不同支架的溶胀性能

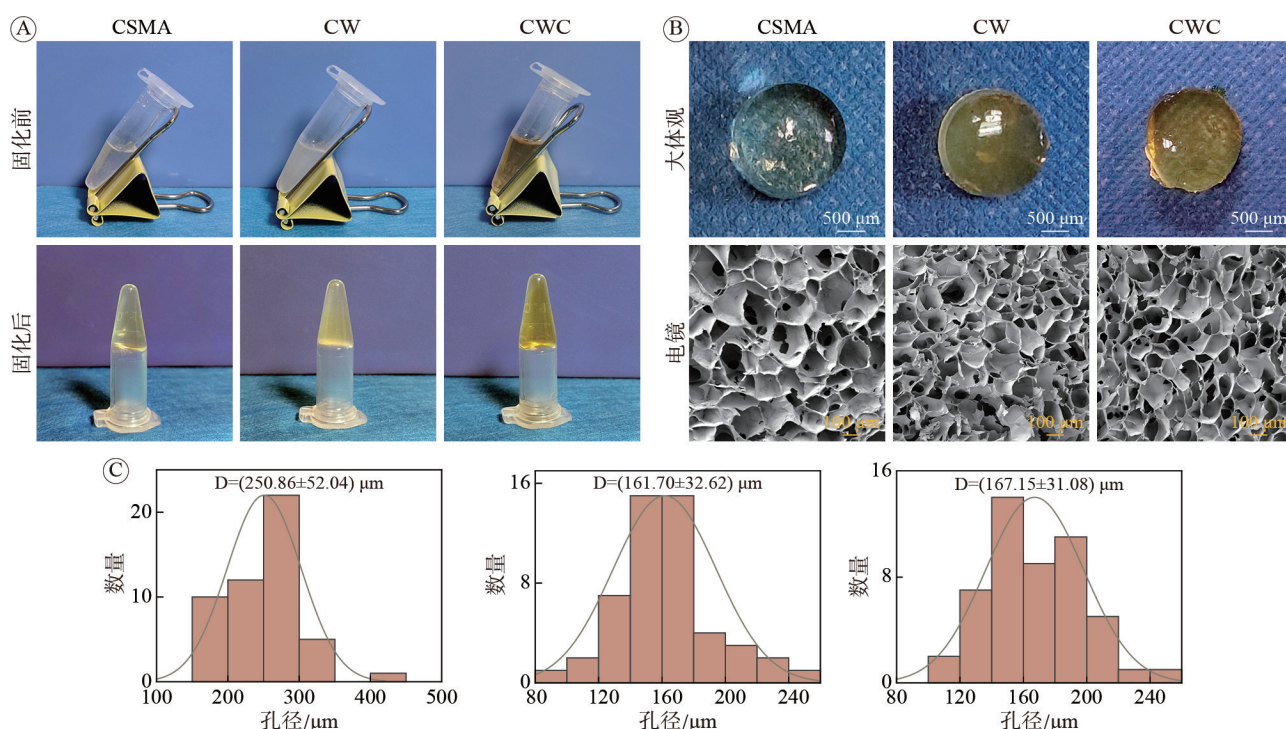
在初始 2 h 内，各组支架均能迅速吸水并增重，4 h 时溶胀达到最高点，6 h 后基本趋于稳定。结果显示，CW 支架的平衡溶胀比低于 CSMA 水凝胶支架。华通胶的加入显著降低了水凝胶的最终溶胀比(图 2)。姜黄素的负载未进一步显著影响由华通胶主导的溶胀性能。

2.3 不同支架的死活染色、细胞骨架染色

在活/死细胞染色结果中，活细胞(绿色荧光)与死细胞(红色荧光)被清晰区分。如图 3A 所示，各

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>Sox9</i>	CCAGCAAGAACAAGCCACAC	CTTGCCCAGAGTCTTGCTGA
<i>Acan</i>	GCAGCACAGACACTTCAGGA	CCCACTTTCTACAGGCAAGC
<i>Col2</i>	GCAGCACAGACACTTCAGGA3	CCCACTTTCTACAGGCAAGC
<i>GAPDH</i>	GGTCGGTGTAACGGATTG	ATGAGCCCTTCCACAATG
<i>Col1</i>	GTGCTAAAGGTGCCAATGGT	ACCAGGTTACCCGCTGTTAC
<i>IL1β</i>	CCAGGATGAGGACCCAAGCA	TCCCGACCAATTGCTGTTTCC
<i>CD86</i>	AGGACACGGGCTTGATGATTG	GGTTTCGGGTATCCTTGCTTAG
<i>CD206</i>	TGTTTTGGCTGGGACTGACCTA	CGGGTGTAGGCTCGGGTAGTAG
<i>Arg1</i>	CATATCTGCCAAGGACATCGT	TCCATCACTTGCCAATTCCC



A: 3组水凝胶固化前/后图片; B: 3组水凝胶的大体观及电镜图(放大倍数: 40 $\times$); C: 3组水凝胶的孔径分析

图1 不同支架的大体观、电镜及孔径图

Fig. 1 Comparative images of gross appearance, scanning electron microscopy, and pore structure of different scaffolds

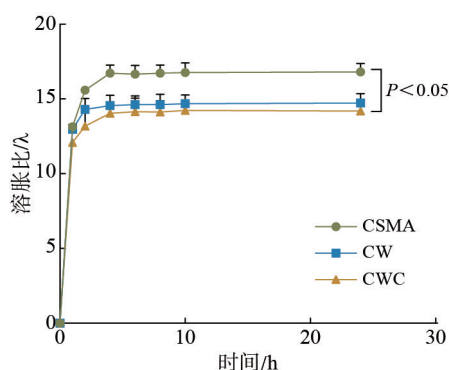


图2 不同支架的溶胀比

Fig. 2 Swelling ratios of different scaffolds

组大鼠 BMSCs 均生长良好、形态正常, 视野中未见明显死细胞, 表明 CSMA、CW 及 CWC 三组支架材料均具有良好的生物相容性与较低的细胞毒性。其中, CW 组与 CWC 组的细胞密度较 CSMA 组更高, 提示华通胶与姜黄素的引入进一步促进了细胞的黏附与增殖。鬼笔环肽染色结果进一步显示(图 3B), 各组细胞骨架结构完整、伸展良好, 进一步印证了水凝胶材料对细胞生长的支持作用。

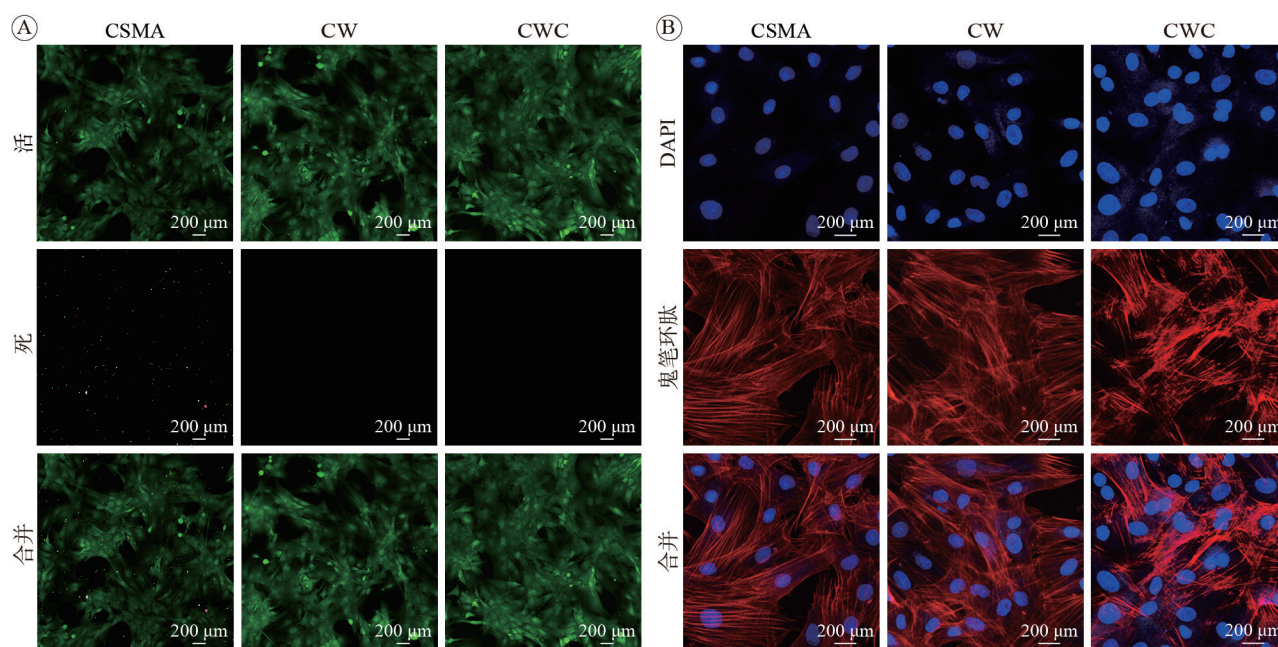
2.4 不同支架的细胞增殖情况

采用 CCK-8 法检测不同支架浸提液对 BMSCs 增殖的影响。结果显示(图 4), 在培养第 1、4、7

天, 对照组、CSMA 组、CW 组及 CWC 组的细胞 $A_{450\text{nm}}$ 值均随培养时间延长而显著增加。与对照组相比, CSMA 组与 CW 组在第 4 天和第 7 天的 $A_{450\text{nm}}$ 值均显著更高 ($P < 0.05$), 表明两种水凝胶支架均能有效促进细胞增殖。值得注意的是, 在相同时间点, CWC 组的 $A_{450\text{nm}}$ 值亦显著高于 CW 组 ($P < 0.05$), 提示在水凝胶中引入姜黄素可进一步促进细胞增殖。上述结果证明, 三组支架浸提液均具有良好的生物相容性, 能够释放适宜的活性成分, 从而有效促进大鼠 BMSCs 的增殖, 其中以 CWC 复合支架的促增殖效果最为显著。

2.5 不同支架对巨噬细胞的免疫调节作用

体外抗炎基因表达检测结果表明(图 5A), 本研究制备的 CWC 复合水凝胶能够显著调节巨噬细胞的极化表型。具体表现为, 与对照组、CSMA 组及 CW 组相比, CWC 组显著下调巨噬细胞 M1 型(促炎)标志物 $IL-1\beta$ 与 $CD86$ 的 mRNA 表达水平, 同时显著上调 M2 型(抗炎、促修复)标志物 $Arg1$ 与 $CD206$ 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。免疫荧光结果也证实了这一点(图 5B)。上述结果表明, 负载姜黄素的复合水凝胶具有引导巨噬细胞由促炎的 M1 表型向抗炎、促组织修复的 M2 表型极化的潜力, 提示其能够通过调节免疫微环境辅助软骨再生。



A: 光镜下培养3 d后的细胞死活染色(放大倍数: 10×); B: 光镜下培养3 d后的细胞骨架染色(放大倍数: 20×)

图3 不同支架的骨髓间充质干细胞的细胞骨架和死活染色

Fig. 3 Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cells in different scaffolds

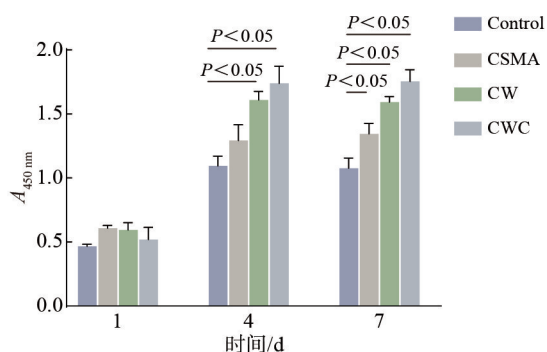


图4 CCK8法测定不同支架对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响

Fig. 4 CCK-8 assay for evaluating the effects of different scaffolds on the proliferation activity of bone marrow mesenchymal stem cells

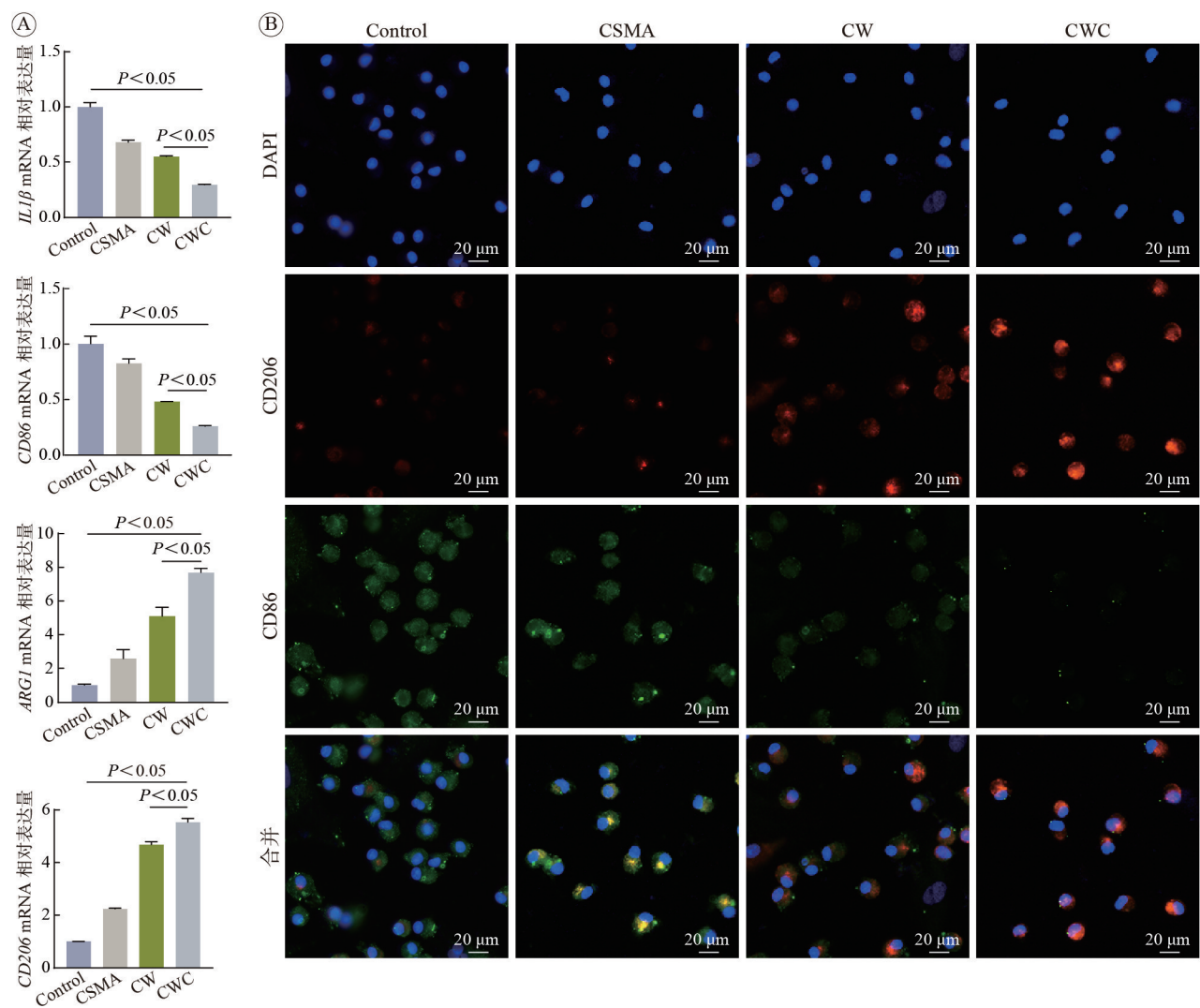
2.6 不同支架在炎症条件下对BMSCs的成软骨分化的影响

在体外炎症(IL-1 β)刺激模型中,通过qRT-PCR检测成软骨分化相关基因表达水平,评估了3组支架浸提液对BMSCs的促成软骨作用。结果表明(图6),在成软骨诱导条件下,CSMA、CW及CWC三组水凝胶均能显著提升Sox9、Col2及Acan的mRNA表达,并显著下调Col1的表达($P < 0.05$),证明其可有效促进BMSCs向软骨方向分化并抑制其向成纤维或肥大方向分化。其中,CWC复合水凝胶对上述基因的调控作用最为显著,证实其在炎症条件下不仅能有效抵抗炎症因子对干细胞成软骨潜能的抑制,从而提供保护作用,而且与前期发现的其可诱导巨噬细胞向抗炎M2表型极化的

免疫调节功能相结合,共同验证了该材料通过“免疫调节-促成软骨分化”的协同机制实现“抗炎-促再生”的双重调控的策略。

3 讨论

水凝胶具有与细胞外基质相似的结构、高保水性和生物相容性,被认为是软骨组织工程中极具潜力的支架材料之一^[30]。本研究旨在构建一种兼具结构仿生、生物活性与病理微环境调控功能的多功能复合水凝胶,用于软骨组织工程。本研究选择CSMA作为基础材料,因其组分硫酸软骨素是天然软骨细胞外基质的关键糖胺聚糖成分,具有良好的亲水性、生物相容性及促进软骨生成的潜力^[31]。为进一步提升支架的仿生特性,本研究引入了脱细胞华通胶。华通胶作为一种独特的天然细胞外基质来源,细胞含量低、免疫原性风险小,同时富含胶原、透明质酸、硫酸蛋白聚糖以及多种内源性促软骨生长因子(如TGF- β 、bFGF),能够为细胞提供更接近生理状态的黏附、增殖与分化微环境^[16,32-33]。此外,针对软骨损伤区域普遍存在的慢性炎症与氧化应激等病理特征,本研究创新性地将天然多酚化合物姜黄素负载于水凝胶网络中^[34]。姜黄素虽具有明确的抗炎、抗氧化及抗铁死亡潜力,但其水溶性差、生物利用度低等缺陷限制了其应用;将其整合入华通胶水



A: 不同支架的炎症相关基因表达的定量分析; B: 不同支架的免疫荧光染色(放大倍数: 20×)

图 5 不同支架对大鼠巨噬细胞的炎症相关基因表达的影响

Fig. 5 Effects of different scaffolds on the expression of inflammation-related genes in rat macrophages

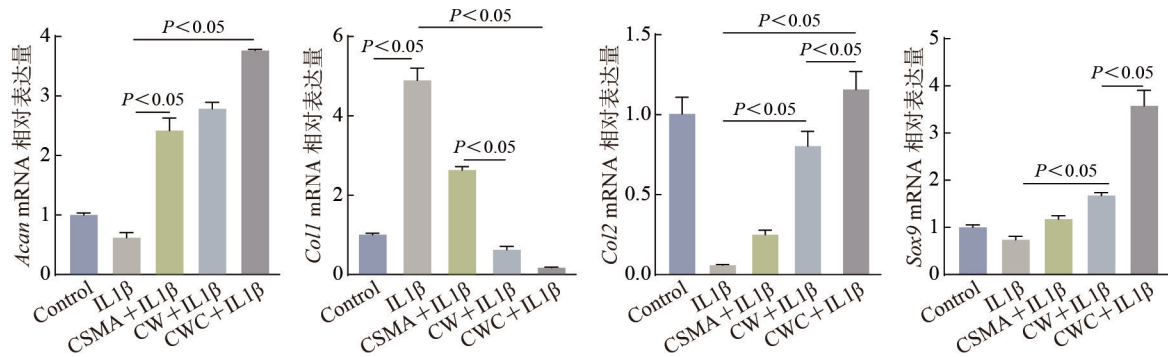


图 6 不同支架对大鼠骨髓间充质干细胞的成软骨分化相关基因表达的影响
Fig. 6 Chondrogenic gene expression of BMSCs in different scaffold groups

凝胶中,有望借助细胞外基质的亲和力实现有效负载,从而达到“抗炎-促再生”的协同调控的目的^[35-36]。

实验结果表明,本研究成功制备了紫外光交联的CWC复合水凝胶。扫描电镜观察显示,该水

凝胶形成了稳定、均匀且相互连通的三维多孔网络结构。华通胶的引入有效增加了孔隙密度,使支架微观结构更为致密。同时,姜黄素能够稳定且均匀地分散于水凝胶三维网络中,为其后续的持续释放奠定了基础。体外生物学评价进一步证

实了该复合支架具有良好的生物相容性与促成软骨活性。CCK-8检测与活死细胞染色结果表明,CSMA、CW及CWC三组水凝胶的浸提液均未表现出明显细胞毒性,且均能促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖。值得注意的是,负载姜黄素的复合水凝胶组对细胞增殖的促进作用最为显著,提示姜黄素的引入可能通过其固有的生物活性改善了细胞的局部生长微环境。细胞骨架染色结果也显示,各组细胞均保持良好的铺展形态,表明材料具有良好的细胞相容性。

此外,本研究证实了该复合水凝胶具备关键的免疫微环境调控能力。体外基因表达检测表明,CWC复合水凝胶能够有效引导巨噬细胞向具有抗炎和组织修复功能的M2表型极化。这一发现意味着,本研究所构建的材料能够通过主动调节早期宿主免疫反应,减轻不利的炎性环境,从而为组织再生构建更为有利的局部修复微环境。同时,在促进软骨分化方面,该水凝胶也展现出优异性能。qRT-PCR检测结果显示,在炎症(IL-1 β)刺激条件下,与单纯的CSMA组及CW组相比,CWC组对软骨特异性标志物(*Sox9*、*Col2*、*Acan*)的表达上调作用最为显著,并能最大程度抑制*Col1*的表达。这表明,姜黄素的抗炎与细胞保护作用与脱细胞华通胶的仿生微环境及内源性生长因子产生了协同增强效应,从而在不利的炎症条件下更有效地促进了骨髓间充质干细胞向软骨细胞的定向分化。这种集“免疫调节”与“促软骨分化”于一体的双重功能,正是本研究所构建复合水凝胶区别于传统惰性支架材料的关键创新点,验证了其在“抗炎-促再生”双重调控策略中的协同作用。

综上所述,本研究成功研发了一种基于硫酸软骨素、脱细胞华通胶与姜黄素的光固化复合水凝胶。该体系将硫酸软骨素的基质特性、脱细胞华通胶的仿生微环境与内源性活性因子,以及姜黄素的抗炎药理作用进行了有机整合,在体外实验中展现出良好的生物相容性、优异的促成软骨分化能力以及优良的免疫调节功能。本研究为软骨缺损的修复提供了一种新型的功能化组织工程支架策略。然而,当前研究结论均基于体外细胞实验,该复合水凝胶在体内的降解行为、药物缓释动力学、长期生物安全性,以及其在活体动物模型中促进软骨缺损修复的实际效能,仍有待通过系统的动物实验予以深入验证。后续研究工作应聚焦于体内移植研究,并进一步优化材料的力

学性能与药物释放曲线,以期推动该新型支架向临床转化。

作者贡献 郭莉婷:实验设计与实施,论文撰写;吴江、张智超、吴建豪、张知行、龙传阳、丁振罡、田玥:实验实施;付力伟:数据收集与整理;雷永红:实验设计与指导,论文修订;郭全义:实验设计与指导,论文修订,获取研究经费。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: glt0104@163.com。

参考文献

- 1 Gao XQ, Wright N, Huard M, et al. Comparison of 5 BMPs for their chondrogenic potentials and microfracture-mediated cartilage repair using heparin/PEAD coacervate sustained release polymer [J]. *Bioact Mater*, 2025, 52: 588-603.
- 2 Dou XY, Wang HF, Yang F, et al. One-step soaking strategy toward anti-swelling hydrogels with a stiff “armor” [J]. *Adv Sci*, 2023, 10 (9): 2206242.
- 3 Larijani L, Rancourt D, et al. Teratoma-free cartilage regeneration using p21^{-/-} iPSCs engineered with iCasp9 [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2025, 14 (11): szaf056.
- 4 Xu JT, Zheng ZH, Xin F, et al. RICTOR-mediated GPX4 downregulation regulates chondrocyte ferroptosis in osteoarthritis progression [J]. *Int Immunopharmacol*, 2026, 173: 116274.
- 5 Luk J, Bozynski CC, Williams J, et al. Cell-mediated immune responses may play roles in osteochondral allograft transplantation osteointegration failures [J]. *J Knee Surg*, 2024, 37 (11): 812-819.
- 6 Du JH, Zhu ZQ, Liu J, et al. 3D-printed gradient scaffolds for osteochondral defects: Current status and perspectives [J]. *Int J Bioprinting*, 2023, 9 (4): 724.
- 7 Niu XL, Li N, Du ZP, et al. Integrated gradient tissue-engineered osteochondral scaffolds: Challenges, current efforts and future perspectives [J]. *Bioact Mater*, 2023, 20: 574-597.
- 8 Guo XL, Ma Y, Min Y, et al. Progress and prospect of technical and regulatory challenges on tissue-engineered cartilage as therapeutic combination product [J]. *Bioact Mater*, 2023, 20: 501-518.
- 9 Chen Y, Wang X, Tao S, et al. Research advances in smart responsive-hydrogel dressings with potential clinical diabetic wound healing properties [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10 (1): 37.
- 10 Qiu C, Tang YH, Zhang YZ, et al. *In vitro* phenotypically stable cartilage regeneration with mechanically adaptable microenvironment using a hydrostatic pressure bioreactor [J]. *Bioact Mater*, 2026, 60: 626-639.
- 11 Chen CH, Chang CJ, Kuo CY, et al. Chondroitin sulfate/hyaluronic acid/carboxymethylcellulose macroporous cryogels for controlled delivery of TGF- β 1 and IGF-1 to induce chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in cartilage tissue engineering [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 317: 144756.
- 12 Yang F, Li YG, Wang L, et al. Full-thickness osteochondral defect repair using a biodegradable bilayered scaffold of porous zinc and chondroitin sulfate hydrogel [J]. *Bioact Mater*, 2024, 32: 400-414.
- 13 Yu TY, Sun X, Liu Y, et al. Bioinspired scaffold recapitulating chondrogenic ontogeny and microenvironment for functional

- cartilage regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2026, 58: 531-549.
- 14 Hu GH, Liang Z, Fan ZL, et al. Construction of 3D-Bioprinted cartilage-mimicking substitute based on photo-crosslinkable Wharton's jelly bioinks for full-thickness articular cartilage defect repair [J]. *Mater Today Bio*, 2023, 21: 100695.
 - 15 Masjedi F, Heidari Z, Hosseini K, et al. Fabrication of 3D collagen-based decellularized biological scaffolds using human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells with differentiation potential toward chondrocytes [J/OL]. <https://doi.org/10.1155/sci/9953810>.
 - 16 Li GK, Zhu J, Sun WJ, et al. Functionalized decalcified bone matrix scaffold for cartilage and bone regeneration and repair of osteochondral composite defects [J]. *Adv Healthc Mater*, 2026, 15 (2): e01432.
 - 17 Gao FW, Su SL, Qi J, et al. Decellularized cartilage scaffolds derived from Wharton's jelly facilitate cartilage regeneration and inhibit angiogenesis [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 33: 102023.
 - 18 Ravi S, Pavithra Chokkakula LP, et al. Fabrication of hypoxia-mimicking supramolecular hydrogels for cartilage repair [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2025, 8 (2): 1261-1277.
 - 19 Deng YZ, Liu J, Bamahel AS, et al. Chondrocyte inflammatory-immune responses in osteoarthritis: From pathogenesis to therapeutic intervention [J]. *Int Immunopharmacol*, 2026, 173: 116270.
 - 20 Peng WA, Wang ZM, Zhuang ZN, et al. Synergistic targeting of senolytic and senomorphic action with dual-engineered biomimetic macrophage nanovesicles for mitigating osteoarthritis [J]. *Bioact Mater*, 2026, 60: 20-39.
 - 21 Chen YT, Fang JW, Zhou ZG, et al. Dihydrolipoic acid suppresses ferroptosis in chondrocytes to ameliorate the progression of osteoarthritis by modulating the FOXO1/TXNIP signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2026, 246: 169-180.
 - 22 Hayati F, Ghoflchi S, Sadeghi A, et al. Synthetic curcumin analogs in nephrotoxicity: Mechanisms and therapeutic advances [J]. *Food Chem Toxicol*, 2026, 209: 115921.
 - 23 Li JL, Liu WT, Wang T, et al. The mechanism of curcumin protecting against IL-1 β -induced oxidative stress and inflammation in chondrocytes *via* the Bmp2/Smad5/Runx2 pathway [J]. *Cytotechnology*, 2025, 77 (2): 71.
 - 24 Shokri-Mashhadi N, Bagherniya M, Askari G, et al. A systematic review of the clinical use of curcumin for the treatment of osteoarthritis [M] // *Studies on Biomarkers and New Targets in Aging Research in Iran: Focus on Turmeric and Curcumin*. Cham: Springer International Publishing, 2021: 265-282.
 - 25 Jin ZZ, Chang BH, Wei YL, et al. Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113092.
 - 26 Konaktchieva M, Stojchevski R, Hadzi-Petrushev N, et al. Curcumin and tetrahydrocurcumin as multi-organ modulators of the adipose tissue - gut - liver axis: mechanistic insights, therapeutic potential, and translational challenges [J]. *Pharmaceuticals*, 2025, 18 (12): 1791.
 - 27 Wu L, Dong B, Chen Q, et al. Effects of curcumin on oxidative stress and ferroptosis in acute ammonia stress-induced liver injury in Gibel Carp (*Carassius gibelio*) [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (7): 6441.
 - 28 殷瀚, 吴江, 严子能, 等. 基于低温沉积打印技术构建分级多孔脱细胞华通胶支架 [J]. *中国医药生物技术*, 2022, 17 (6): 488-496.
 - 29 Zhang JR, Li B, Zuo JL, et al. An engineered protein adhesive with properties of tissue integration and controlled release for efficient cartilage repair [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10 (12): 2100109.
 - 30 Qian YN, Wang SX, Sha YQ, et al. Hydrogel-guided p-LOX nanodrug delivery modulates metabolic microenvironment for cartilage repair in osteoarthritis [J]. *Biomaterials*, 2026, 328: 123806.
 - 31 Liu LM, Zhang M, Zhou Y, et al. An injectable ROS-responsive hydrogel comprising chondroitin sulfate@resveratrol liposome package for osteoarthritis alleviation [J]. *Biomaterials*, 2026, 327: 123766.
 - 32 Marleau AM, Pearl JR, Juarez P, et al. Critical evaluation of compositions and clinical relevance of Wharton's jelly-derived biologics [J]. *J Transl Med*, 2026, 24 (1): 189.
 - 33 Kang SM, Shi X, Chen Y, et al. Injectable decellularized Wharton's jelly hydrogel containing CD56⁺ umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes for meniscus tear healing and cartilage protection [J]. *Mater Today Bio*, 2024, 29: 101258.
 - 34 Liu L, Zhang WY, Liu TH, et al. The physiological metabolite α -ketoglutarate ameliorates osteoarthritis by regulating mitophagy and oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2023, 62: 102663.
 - 35 Li QC, Liu SY, Sun TZ, et al. Nanoparticles coated with osteoblast-like cell membranes as curcumin delivery vehicles for targeted postmenopausal osteoporosis therapy [J]. *Mater Today Bio*, 2026, 36: 102636.
 - 36 Zhou YZ, Jia Z, Wang J, et al. Curcumin reverses erastin-induced chondrocyte ferroptosis by upregulating Nrf2 [J]. *Heliyon*, 2023, 9 (10): e20163.

(责任编辑:孟晓彤)