[文章编号] 1671-587X(2026)04-0921-11 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260405

基于F127-DA水凝胶的外泌体缓释系统对大鼠软骨再生的促进作用及其机制

姜 洋[1], 王波元[2], 宋艾倬[1], 李明贺[2]
（1. 吉林大学口腔医院口腔颌面外科，吉林 长春 130021；2. 吉林大学第二医院口腔科，吉林 长春 130021）

[摘 要] **目的：**评估基于Pluronic F127-二丙烯酸酯（F127-DA）的热敏-光敏双响应水凝胶作为外泌体（Exos）递送体系在关节软骨（AC）修复中的作用，并阐明其作用机制。**方法：**采用超速离心法从骨髓间充质干细胞（BMSCs）提取Exos，同时对其进行鉴定。采用透射电子显微镜（TEM）检测各组Exos形态表现，纳米粒子追踪分析（NTA）法检测各组Exos粒径分布，Western blotting法检测各组Exos中标志物蛋白CD9、CD81和TSG101表达水平，Exos吞噬实验检测各组Exos分布情况，扫描电子显微镜（SEM）检测水凝胶孔隙情况，Western blotting法检测2组BMSCs中Ⅱ型胶原（COL Ⅱ）和蛋白聚糖（ACAN）蛋白表达水平，划痕愈合实验检测2组BMSCs划痕愈合能力，Transwell小室实验检测各组BMSCs迁移情况。取24只6周龄大鼠，随机分为对照组、F127-DA组、Exos组和F127-DA＋Exos组，每组6只，在膝关节滑车沟处制备直径2 mm、深度1 mm的软骨缺损；对照组大鼠不进行处理，其余3组大鼠分别将F127-DA水凝胶、Exos和F127-DA水凝胶＋Exos填充于软骨缺损部位。术后8周取大鼠膝关节组织，HE染色和番红O-固绿（SOFG）染色检测各组大鼠膝关节滑车沟缺损部位的软骨修复情况。**结果：**TEM和NTA分析，Exos呈球形，粒径集中在80 nm附近。Western blotting法检测，Exos表面生物标志物CD9、CD81和Tsg101蛋白均呈高水平表达，不表达Calnexin蛋白，由此判定为Exos。与对照组比较，Exos组BMSCs中COL Ⅱ和ACAN蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。Exos吞噬实验，BMSCs充分摄取Exos。划痕愈合实验和Transwell小室实验，与对照组比较，Exos组BMSCs的划痕愈合能力和迁移能力提高。SEM分析，F127-DA水凝胶表面呈疏松多孔状结构。HE染色和SOFG染色，对照组大鼠在滑车沟缺损部位形成纤维性组织，F127-DA组大鼠主要在滑车沟缺损部位呈现轻度修复，Exos组大鼠在滑车沟缺损部位可见新生软骨样组织，而F127-DA＋Exos组大鼠在滑车沟缺损部位被大量透明软骨样组织填充，细胞排列及基质生成均最接近正常软骨，呈现最优的修复效果。**结论：**F127-DA水凝胶负载Exos可实现其持续、可控释放，显著促进软骨再生，本研究结果为Exos治疗的精准递送及软骨损伤的多阶段修复提供了有效策略。

[关键词] 外泌体；水凝胶；软骨修复；骨关节炎；可控释放
[中图分类号] R782.6；R318.08 [文献标志码] A

[收稿日期] 2026-01-20 [录用日期] 2026-03-17
[基金项目] 吉林省科技厅省部级科研项目（YDZJ202501ZYTS704）
[作者简介] 姜 洋（2000－），男，吉林省辽源市人，在读硕士研究生，主要从事口腔颌面部软骨修复方面的研究。
[通信作者] 李明贺，副教授，硕士研究生导师（E-mail：liminghe@jlu.edu.cn）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Promotive effect of exosome sustained-release system based on F127-DA hydrogel on cartilage regeneration in rats and its mechanism

JIANG Yang[1], WANG Boyuan[2], SONG Aizhuo[1], LI Minghe[2]
(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Stomatology, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the role of a thermo- and photo-responsive dual-stimuli hydrogel based on Pluronic F127 diacrylate (F127-DA) as an exosomes (Exos) delivery system in articular cartilage repair, and to clarify its mechanism of action. Methods: The Exos were isolated from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) by ultracentrifugation and characterized. Transmission electron microscope (TEM) was used to observe the morphology of Exos in various groups; nanoparticle tracking analysis (NTA) was used to detect the particle size distribution of Exos in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of the marker proteins CD9, CD81, and TSG101 in the Exos in various groups; Exos uptake assay was used to detect the distribution of Exos taken up by the BMSCs in various groups; Western blotting method was used to detect the protein expression levels of type Ⅱ collagen (COL Ⅱ) and aggrecan (ACAN) in the BMSCs in two groups; scratch wound healing assay was used to detect the wound healing ability of the BMSCs in two groups; Transwell chamber assay was used to detect the migration ability of the BMSCs in various groups; scanning electron microscope (SEM) was used to observe the pore structure of the hydrogel. Twenty-four 6-week-old rats were randomly divided into control group, F127-DA group, Exos group, and F127-DA+Exos group, with 6 rats in each group. A cartilage defect (2 mm in diameter, 1 mm in depth) was created in trochlear groove of the knee joint; the rats in control group received no treatment, while the rats in the other three groups were treated with F127-DA hydrogel, Exos, or F127-DA hydrogel +Exos filling the cartilage defect site, respectively. At 8 weeks after operation, the rat knee joint tissues were collected for HE staining and safranin O and fast green (SOFG) staining to evaluate cartilage repair at the defect site in trochlear groove of the knee joint of the rats in various groups. Results: The TEM and NTA results showed that the Exos were spherical in shape with a particle size concentrated around 80 nm. The Western blotting results showed that the exosomal surface biomarkers CD9, CD81, and Tsg101 were all highly expressed, while Calnexin was not expressed, confirming that the isolated vesicles were Exos. Compared with control group, the expression levels of COL Ⅱ and ACAN proteins in the BMSCs in Exos group were increased ($P<0.05$). The Exos uptake assay results showed that the BMSCs efficiently internalized Exos. The scratch wound healing assay and Transwell chamber assay results showed that compared with control group, the migration ability of the BMSCs in Exos group was increased. The SEM results showed that the F127-DA hydrogel exhibited a loose and porous structure. The HE and SOFG staining results showed that in control group, fibrous tissue formed at the defect site in the trochlear groove; in F127-DA group, mild repair was observed at the defect site; in Exos group, neocartilage-like tissue was visible at the defect site; while in F127-DA+Exos group, the defect site was filled with abundant hyaline cartilage-like tissue, with cell arrangement and matrix formation most closely resembling normal cartilage, showing the optimal repair effect. Conclusion: The F127-DA hydrogel loaded with Exos can achieve sustained and controlled release of Exos, and significantly promote cartilage regeneration; the results of this study provide an effective

strategy for precise delivery of Exos therapy and multi-stage repair of cartilage injury.

KEYWORDS　Exosomes；Hydrogel；Cartilage repair；Osteoarthritis；Controlled release

骨关节炎（osteoarthritis，OA）是全球老年人群中最常见的退行性骨关节病之一，其核心病理特征为关节软骨（articular cartilage，AC）的持续性退变[1]。由于AC缺乏血管和神经供应，且软骨细胞再生能力有限，软骨损伤难以实现有效自我修复，这使其成为临床治疗中的重要难题[2-3]。目前临床治疗主要依赖非甾体抗炎药（nonsteroidal anti-inflammatory drugs，NSAIDs）缓解症状，但该类药物难以逆转疾病进程或促进结构性软骨再生[4-5]。随着疾病进展，部分患者最终仍需接受关节置换手术。近年来，细胞治疗被认为是OA治疗的重要研究方向，但其临床应用仍面临供区损伤风险、支架依赖性强以及再生软骨力学性能不足等问题[6-7]。

外泌体（exosomes，Exos）因其独特的生物学属性逐渐成为再生医学和药物递送领域的重要研究焦点。Exos来源于细胞分泌的纳米级囊泡结构，因而在体内呈现出极低的免疫原性和良好的靶向性，被视为新一代高效递送载体的理想候选者[8-10]。在软骨修复相关研究[11-12]中，Exos还能通过趋化信号招募骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）并促进其向软骨分化。研究[11]显示：与其他来源的Exos比较，BMSCs来源的Exos（BMSCs-Exos）在促进细胞迁移、增殖及软骨表型形成方面表现更为出色。与BMSCs比较，BMSCs-Exos更具安全性和稳定性，且在保存、运输和操作方面更为便利[12]。研究[13-14]已证实BMSCs-Exos能加速退变软骨修复，增强细胞外基质（extracellular matrix，ECM）与Ⅱ型胶原（type Ⅱ collagen，COL Ⅱ）的生成。

为满足对靶向性与控释能力的双重需求，本研究设计了一种同时具备热敏注射性与光交联能力的Pluronic F127-二丙烯酸酯（F127 diacrylate，F127-DA）水凝胶体系。该材料在体温下能够迅速由溶胶转变为凝胶，并在紫外光照射下形成稳定的交联网络，从而在注射后实现原位固化、力学性能可控和结构稳定性强化[15-18]。此外，水凝胶的多孔结构不仅能够为Exos提供保护环境，还可在一定程度上调控其释放行为，从而为局部组织再生提供稳定的微环境。

基于上述研究背景，本研究构建了一种以F127-DA为载体的热敏-光敏双响应水凝胶Exos递送体系，并系统评价其理化性质、体外生物学行为和体内软骨修复效果。与既往仅应用Exos或单一水凝胶材料的研究比较，本研究构建双响应水凝胶递送平台，旨在提高Exos在软骨缺损区域的滞留时间并实现稳定递送，从而增强其在关节软骨再生中的治疗潜力，并为Exos在OA及软骨损伤治疗中的精准递送提供依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物、主要试剂和仪器　24只SD雄性大鼠，6～8周龄，由长春市丰隆生物技术有限公司提供，实验动物生产许可证号：SYXK（吉）2023-0010。胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（以色列BI公司），蛋白Marker、BCA蛋白定量试剂盒和蛋白裂解液（美国Thermo Fisher公司），磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS）和TBST洗液（武汉赛维尔生物科技有限公司），十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）蛋白上样缓冲液、ECL化学发光试剂盒、Western blotting一抗稀释液和二抗稀释液（上海碧云天生物技术有限公司），Transwell小室（8 μm，美国Corning公司），HiFiScript gDNA Removal^{RT} MasterMix（北京康为世纪生物科技有限公司），TB Green Premix Ex Taq（Tli RNase H Plus）、TRIzol试剂和DL2000 DNA Marker（北京宝日医生物技术有限公司），Giemsa染液和鬼笔环肽（美国Sigma公司），NaCl等常用化学试剂（国药集团化学试剂沈阳有限公司），吐温20（德国BIOFROXX公司），1%青-链霉素双抗和0.25%胰蛋白酶（美国Gibco公司），0.22 μm微孔滤膜（澳睿赛生物科技有限公司），聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜（美国Millipore公司），Anti-CD9、Anti-CD63和Anti-TSG101抗体（武汉赛维尔生物科技有限公司），光引发剂（苏州先觉生物科技有限公司），多聚甲醛固定液、EDTA脱钙液、HE染色染料和番红O-固绿染色染料（北京索莱宝科技有限公司）。

1.2　F127-DA的制备　将10 g F127溶解于100 mL无水二氯甲烷中，搅拌直至完全溶解。在4 ℃氮气环境下，加入相对于F127摩尔量10倍的三乙胺，

并通入氮气15 min。随后，将相对于F127摩尔量10倍的丙烯酰氯缓慢滴入反应体系（滴速为每秒1～2滴）。4 ℃条件下反应1 h，随后在室温下继续反应24 h。反应结束后，过滤去除沉淀的三乙胺盐酸盐，滤液经旋蒸浓缩后滴入大量预冷无水乙醚中沉淀，得到白色蜡状固体。收集沉淀并在30 ℃真空干燥箱中干燥，获得F127-DA，并置于－20 ℃保存备用。

1.3 F127-DA水凝胶表面形貌观察 使用扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）观察F127-DA水凝胶的表面微结构。将F127-DA前驱溶液注入圆柱模具并光固化30 s形成水凝胶。随后，将水凝胶先在－20 ℃预冷4～5 h，再在－80 ℃过夜预冷，最后在真空冷冻干燥机中冻干。冻干后的水凝胶切成约1 mm厚片，固定在导电胶上并喷金处理，然后用SEM观察并拍摄其截面微观结构。

1.4 F127-DA水凝胶降解性能评估 将制备好的水凝胶样品置于含PBS的离心管中，于37 ℃恒温培养箱中进行体外降解实验。定期更换PBS缓冲液，并在预设时间点取出样品，记录水凝胶的形态变化并进行拍照观察，以评估水凝胶在体外环境中的降解过程及稳定性。通过观察水凝胶在不同时间点的结构完整性变化，对其降解行为进行初步评价。

1.5 Exos在F127-DA水凝胶中的释放行为 将Exos与F127-DA前驱溶液充分混匀后，在紫外光照射条件下进行光交联，制备负载Exos的F127-DA水凝胶（F127DA-Exos）。随后将制备好的水凝胶样品置于含PBS缓冲液（pH7.4）的离心管中，在37 ℃恒温培养箱中进行体外释放实验。

在预设时间点收集释放液，并补充等体积新鲜PBS缓冲液以维持体系总体积恒定。收集的释放液用于检测其中Exos的释放量。采用BCA蛋白定量试剂盒检测Exos含量，并根据蛋白浓度计算不同时间点Exos的释放量。

通过累加各时间点释放液中的Exos含量，计算累计释放量，并绘制累计释放曲线，以评价F127-DA水凝胶对Exos的缓释行为。实验重复3次，以确保结果的可靠性。

1.6 BMSCs的分离和培养 取健康SD大鼠，在无菌条件下分离股骨和胫骨，剪去两端骨骺后用含10%FBS的α-MEM培养基反复冲洗骨髓腔，以获取骨髓细胞悬液。将细胞悬液经200目细胞筛过滤后接种于培养瓶中，置于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中培养。

培养24 h后弃去未贴壁细胞，更换新鲜培养基继续培养。之后每2～3 d更换1次培养基，当细胞融合度达80%～90%时，采用0.25%胰蛋白酶进行消化传代。选取第3～5代BMSCs用于后续实验。

1.7 Exos的提取、鉴定和保存 将BMSCs培养至约80%融合度后，更换为去除血清的培养基继续培养48 h，收集细胞上清液。采用差速超速离心法提取Exos：首先以300 g离心10 min去除细胞，随后2 000 g离心20 min去除细胞碎片，再经10 000 g离心30 min去除较大囊泡。最终将上清液在100 000 g条件下超速离心70 min沉淀Exos，并用PBS缓冲液重悬后再次进行100 000 g离心以进一步纯化。

采用透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM）观察获得Exos的形态结构，采用纳米颗粒追踪分析（nanoparticle tracking analysis，NTA）法检测粒径分布，并采用Western blotting法检测Exos中CD9、CD63及TSG101等Exos标志蛋白以进行鉴定。纯化后的Exos分装后于－80 ℃条件下保存备用。

SEM观察所得复合水凝胶三维多孔结构，并评估Exos在水凝胶中的分布情况。

1.8 Exos摄取实验观察BMSCs中Exos的分布情况 首先分离、鉴定并用PKH26染料标记Exos，然后与BMSCs共孵育24 h。随后固定细胞，采用鬼笔环肽和4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′,6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）分别染色细胞骨架及细胞核。最后采用荧光显微镜观察细胞中Exos分布情况，可见蓝色的细胞核、绿色的细胞骨架和分布在细胞骨架内部的红色Exos。

1.9 Western blotting法分析BMSCs中目的蛋白表达水平 收集细胞并加入含蛋白酶及磷酸酶抑制剂的放射性免疫沉淀分析（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液裂解。使用10% SDS-PAGE分离蛋白，并转膜至0.45 μm PVDF膜，然后用5%脱脂奶粉封闭，并在4 ℃下一抗孵育过夜，一抗为蛋白聚糖（aggrecan，ACAN）（1∶500）、COL Ⅱ（1∶500）和甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）（1∶10 000）。清洗膜后，加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗，室温孵育

2 h，再次清洗膜后，加入发光液曝光。实验分为对照组和Exos组。使用化学发光试剂检测蛋白，并用Image J图像分析系统分析蛋白条带灰度值，以GAPDH为内参，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/GAPDH条带灰度值。

1.10　细胞划痕实验检测划痕愈合情况和细胞划痕愈合率　在24孔细胞培养板底部划线，将2腔室划痕专用插件超净工作台紫外灯照射灭菌处理后用镊子垂直放入孔板内，垂直于孔板底部线条。选取对数生长期的BMSCs，用1% FBS-DMEM/H重悬细胞，插件每腔室加入100 μL细胞悬液，使得插件每腔室细胞数为1×10^5个，待细胞完全贴壁后，取出插件，弃去培养液，用PBS缓冲液洗涤细胞，分别加入以1% FBS-DMEM/H配制Exos（20 μg），实验分为对照组和Exos组，对照组加入相同体积低血清培养液，拍照记录24 h，每组实验重复3次，计算细胞划痕愈合率，划痕愈合率＝（初始宽度－当前宽度）/初始宽度×100%。

1.11　Transwell小室实验检测细胞迁移情况　在24孔细胞培养板中加入500 μL用1% FBS-DMEM/H配制的Exos（20 μg），实验分为对照组和Exos组。对照组加入500 μL 1% FBS-DMEM/H。选取对数生长期的BMSCs，用1% FBS-DMEM/H重悬细胞，向上室垂直加入200 μL细胞悬液，控制细胞数为每200 μL含1.5×10^5个细胞，小室缓慢移动到加药孔，防止产生气泡影响趋化，培养24 h后终止迁移，弃去培养液，固定好的细胞采用吉姆萨染色法，随机选取不同视野观察细胞迁移情况。

1.12　BMSCs体外成软骨分化能力评估　将第3～5代BMSCs接种于6孔细胞培养板中，待细胞融合度达70%～80%后开始处理。实验分为对照组和Exos组。各组细胞均更换为成软骨诱导培养基进行诱导培养；Exos组在诱导培养基基础上加入Exos，对照组加入等体积PBS缓冲液。细胞在37 ℃、5% CO_2条件下共培养，培养基每2～3 d更换1次，并同步补加Exos以维持处理浓度。分别于诱导培养第14天收集细胞样本，每组实验重复3次，提取总蛋白并通过Westem blotting法检测COL Ⅱ和ACN蛋白表达水平。

1.13　大鼠软骨缺损模型的制备和分组　选用24只雄性SD大鼠构建软骨缺损模型以评估Exos@F127-DA的修复效果。在无菌条件下，于大鼠股骨远端髁间滑车沟处建立全层关节软骨缺损模型（直径2.0 mm、深度1.0 mm）。每只大鼠仅在单侧膝关节建立软骨缺损模型，左右膝关节随机选择一侧进行手术，以减少个体差异对实验结果的影响。

大鼠随机分为对照组、F127-DA组、Exos组和F127-DA-Exos组，每组6只。对照组大鼠缺损部位不进行任何处理，其余各组大鼠分别在缺损部位填充F127-DA水凝胶、Exos或F127DA-Exos复合材料。术后常规饲养8周后，采用CO_2吸入法对大鼠实施安乐死，取大鼠膝关节组织用于分析。

1.14　大鼠软骨缺损组织的石蜡切片准备　软骨标本经10%多聚甲醛固定24 h后、10%乙二胺四乙酸脱钙4周后，将标本依次浸入梯度乙醇中脱水。70%乙醇脱水30 min、80%乙醇脱水30 min、90%乙醇脱水30 min、95%乙醇脱水20 min、95%乙醇脱水20 min、100%乙醇脱水20 min、100%乙醇脱水20 min；脱水结束后，将样本浸入由等体积100%乙醇与二甲苯配制的混合溶液中处理15 min，随后分别使用二甲苯进行2次各15 min的透明化处理，最终实现标本组织的透明效果。将标本转移至二甲苯、石蜡各半的混合溶液中处理20 min，随后分别进行2次石蜡浸渍处理，每次持续60 min，去除组织中的二甲苯，完成透蜡处理。冰上包埋组织标本，放入蜡中凝固后4 ℃冷却，固定石蜡块于切片机上，以5 μm的厚度进行切片，切片沥干后标记以备后续使用。

1.15　各组大鼠软骨缺损组织切片的HE和番红O-固绿（safranin O and fast green，SOFG）染色　大鼠膝关节切片HE染色：将切片置入60 ℃烤箱中烤片1 h，以增强附着力。随后，将切片依次放入二甲苯Ⅰ和Ⅱ中进行脱蜡处理，每次10 min，以去除切片中的石蜡成分。将切片依次转移至梯度乙醇（100%、95%、85%和75%）中进行复水，每个浓度处理3 min，最后用蒸馏水冲洗。沥干切片上的蒸馏水后，苏木素染液染色5 min。随后，用蒸馏水缓慢冲洗切片，去除多余的染液和浮色。再次沥干切片上的水分，将切片放入盐酸乙醇中进行分化处理，持续30 s，以调节苏木素的染色效果。将切片置入蒸馏水中浸泡20 min，随后再次沥干，去除残留的分化液。沥干后，加入伊红染色液对切片进行染色，染色时间为2 min，然后用蒸馏水缓慢冲洗，以赋予细胞质和基质以对比色。将切片依次

放入梯度乙醇（80%、95%、100% 和 100%）中进行脱水，随后用二甲苯Ⅰ和Ⅱ进行透明化处理。切片经中性树胶封固后，于显微镜下进行样本检测及图像采集。

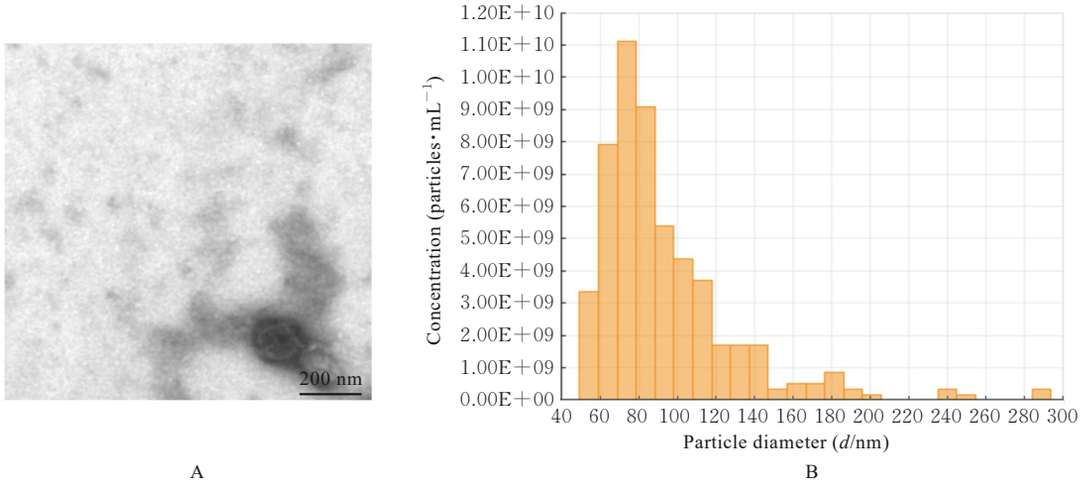
大鼠膝关节切片 SOFG 染色：切片置入 60 ℃烤箱中烤片 1 h，以增强附着力。随后，将切片依次放入二甲苯Ⅰ和Ⅱ中进行脱蜡处理，每次 10 min，以去除切片中的石蜡成分。将切片依次转移至梯度乙醇（100%、95%、85% 和 75%）中进行复水，每个浓度处理 3 min，最后用蒸馏水冲洗。沥干切片上的蒸馏水后，加入新鲜配制的 Weigert 染色液，染色 5 min，随后用蒸馏水缓慢冲洗切片，去除多余的染液和浮色。再次沥干切片上的水分，将切片置入酸性分化液中进行分化处理，持续 30 s，以调节 Weigert 染色的效果。分化完成后，将切片浸入固绿染色液中染色 5 min，随后转移至弱酸溶液中，浸泡 10 s 后沥干，以增强细胞核的对比度。将切片浸入番红 O 染色液中染色 5 min，然后用蒸馏水缓慢冲洗，以赋予细胞质和基质以对比色。将切片依次放入梯度乙醇（80%、95%、100% 和 100%）中进行脱水，随后用二甲苯Ⅰ和二甲苯Ⅱ进行透明化处理。切片经中性树胶封固后，于显微镜下进行样本检测及图像采集。

1.16　统计学分析　采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。各组 BMSCs 中 COL Ⅱ和 ACAN 蛋白表达水平符合正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用 SNK-q 检验。所有体外实验均重复 3 次。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　Exos 的提取、鉴定和吞噬　TEM 观察结果显示：从 BMSCs 条件培养基中分离获得的囊泡呈现典型 Exos 样形态，多数为边界清晰的类杯状膜性结构，囊泡轮廓完整、膜结构连续，整体形态均一，符合 Exos 的形态学特征。见图 1A。

进一步对 Exos 的粒径分布特征进行定量分析，NTA 检测结果显示：样本的粒径分布以单峰为主，峰值粒径约为 80 nm，整体粒径主要集中在 Exos 常见范围内。NTA 结果与 TEM 观察到的形态及尺度信息相互印证，从粒径分布层面进一步支持所提取囊泡为 Exos。见图 1B。

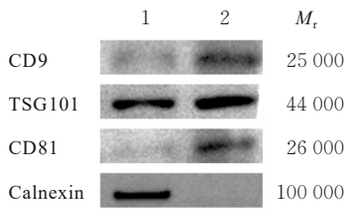


A：TEM result；B：NTA result.

图 1　TEM 和 NTA 观察 Exos 形态及粒径分布

Fig. 1　Morphology and distribution of particle diameter of Exos observed by TEM and NTA

在蛋白水平上，为验证所分离囊泡是否表达 Exos 典型标志蛋白，采用 Western blotting 法对 Exos 进行鉴定结果显示：Exos 样本中 CD9、CD81 及 TSG101 均呈明显条带表达，提示其富含 Exos 相关标志蛋白；不表达 Calnexin 蛋白。结合 TEM 形态学观察与 NTA 粒径分布结果和上述蛋白表达谱证明本研究成功分离获得了来源于 BMSCs 的 Exos。见图 2。此外，为验证 BMSCs 对 Exos 的摄取能力并观察其在细胞内的分布情况，采用 PKH26 荧光染料对 Exos 进行标记后与 BMSCs 共培养 24 h。荧光显微镜下可见：细胞核呈 DAPI 染色的蓝色荧光信号，细胞骨架在 Phalloidin 染色后呈绿色荧光，而 PKH26 标记的 Exos



Lane 1: BMSCs group; Lane 2: Exos group.

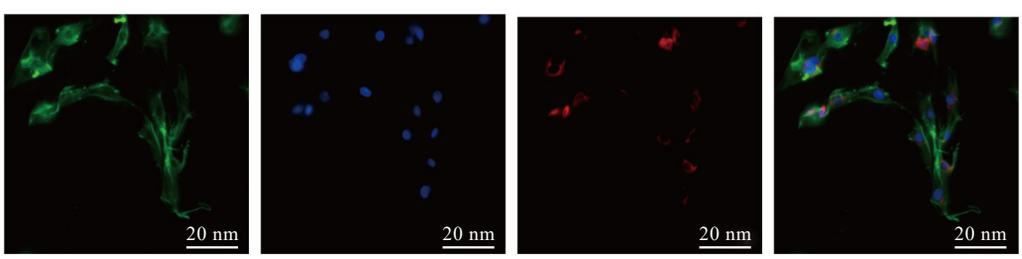
图2　Western blotting法检测2组样本中BMSCs来源Exos标志蛋白表达电泳图

Fig. 2　Electrophoregram of expressions of Exos-derived Exos marker proteins in samples in two groups detected by Western blotting method

呈红色荧光信号，主要分布于细胞质区域，部分呈点状或团簇状聚集，且多位于细胞核周围区域。见图3。

2.2　水凝胶性能评估　F127-DA水凝胶呈现不规则多孔结构。此外，水凝胶具有良好的黏附性，可附着于多种界面材料。在软骨再生过程中，新生的肉芽组织需要足够的空间来生长，并逐渐替代植入的支架结构。见图4。

2.3　水凝胶降解与Exos释放行为评估　F127-DA水凝胶质量随时间逐渐降低，表现出持续且稳定的降解趋势。在23 d观察周期内，水凝胶逐步发生降解。与此同时，Exos在F127-DA水凝胶中呈现明显的时间依赖性释放特征。释放曲线显示：初期存在一定程度的快速释放，随后释放速率逐渐减缓并进入稳定释放阶段，累计释放量随时间持续增加。见图5。



A: Phalloidin; B: DAPI; C: PKH26; D: Merge.

图3　荧光显微镜观察BMSCs中Exos分布

Fig. 3　Distrubution of Exos in BMSCs observed by fluorescence microscope

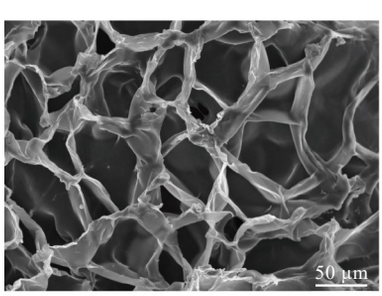


图4　SEM观察F127-DA水凝胶的微观结构

Fig. 4　Microstructure of F127-DA hydrogel observed by SEM

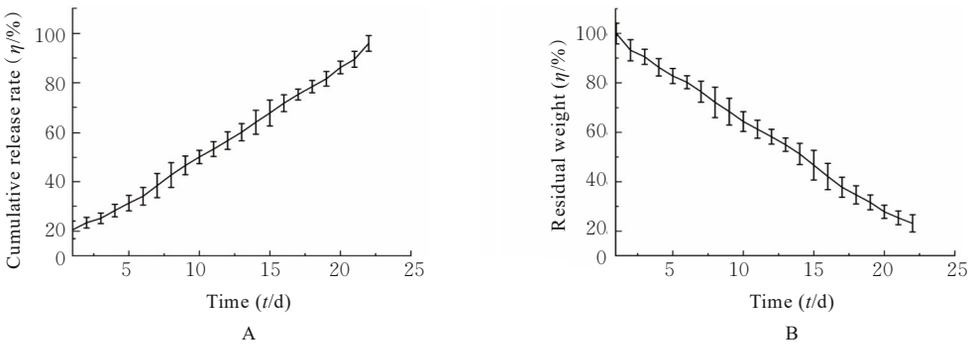
2.4　2组BMSCs中软骨特异性标志蛋白ACAN和COL Ⅱ蛋白表达水平　Western blotting法检测结果表明：与对照组比较，Exos组BMSCs中软骨特异性标志蛋白ACAN和COL Ⅱ蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）。见图6。

2.5　2组BMSCs划痕愈合率　与对照组比较，12和24 h时Exos组BMSCs划痕愈合率明显升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。见图7。

2.6　2组BMSCs迁移情况　与对照组比较，Exos组穿膜迁移的BMSCs数增加。见图8。

2.7　各组大鼠体内软骨修复情况　对照组大鼠膝关节滑车沟缺损处主要由无序的新生组织填充。F127-DA组大鼠膝关节滑车沟缺损区域基本被新生组织填满，但与周围软骨的结构融合仍不理想。Exos组大鼠膝关节滑车沟缺损亦被再生组织填充，但其与周围软骨的融合程度较差。F127-DA＋Exos组大鼠膝关节滑车沟缺损区域的新生组织与周围软骨实现了有效融合。

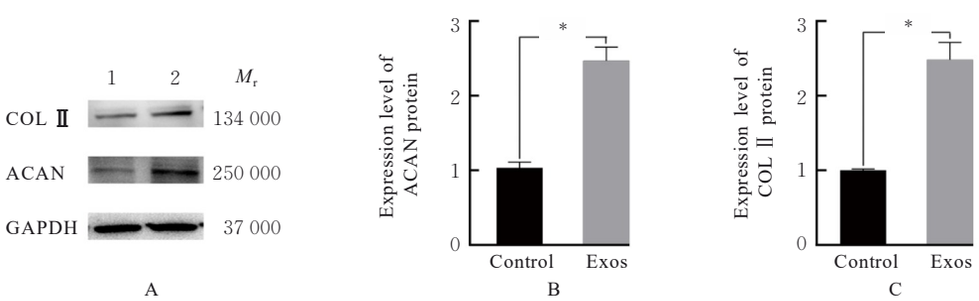
HE和SOFG染色结果显示：对照组大鼠软骨表面褶皱粗糙，结构不规则，边缘骨赘形成，软骨损伤修复效果较差；F127-DA组大鼠软骨表面不平，局部可见软骨细胞增生；Exos组软骨表面部分区域平滑，软骨细胞增生明显，缺损修复较好；F127-DA＋Exos组大鼠软骨缺损处表面光滑，与周围软骨结合较好，细胞排列整齐，缺损处修复效果明显，单独使用F127-DA或Exos均未达到该效



A：Cumulative release curve of Exos；B：*In vitro* degradation profile of F127-DA hydrogel.

图 5 F127-DA 水凝胶体外 Exos 释放曲线及剩余重量

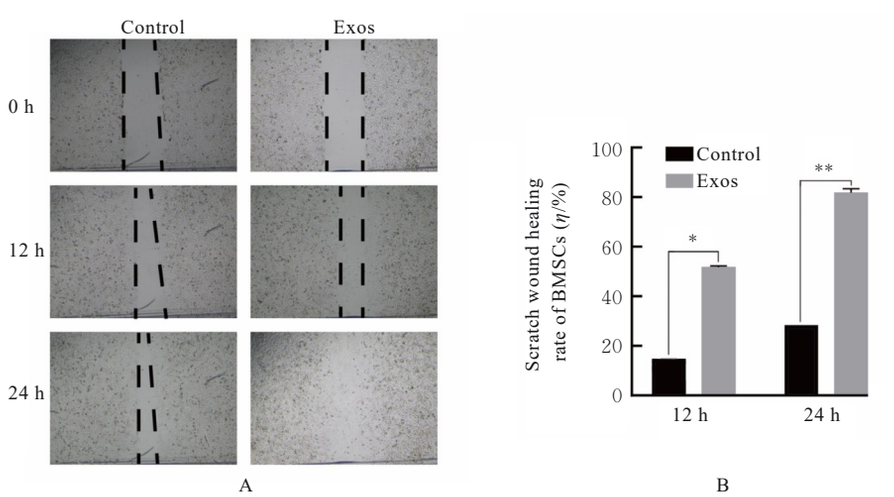
Fig. 5 *In vitro* Exos release curves and residual weights of F127-DA hydrogel



A：Electrophoregram (Lane 1：Control group；Lane 2：Exos group)；B，C：Histograms ($^*P<0.05$ compared with control group)；B：ACAN；C：COL Ⅱ.

图 6 Western blotting 法检测 2 组 BMSCs 中 ACAN 和 COL Ⅱ 蛋白表达情况

Fig. 6 Expressions of ACAN and COL Ⅱ proteins in BMSCs in two groups detected by Western blotting method



A：Morphology；B：Histogram ($^*P<0.05$，$^*P<0.01$ compared with control group).

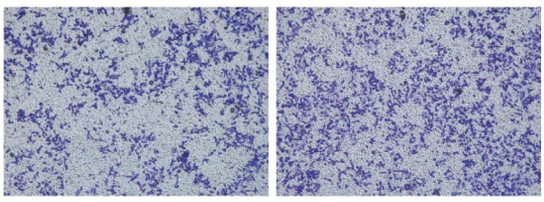
图 7 划痕愈合实验检测 2 组 BMSCs 划痕愈合情况

Fig. 7 Scratch wound healing of BMSCs in two groups detected by scratch wound healing assay

果。见图 9。

3 讨 论

既往研究[19]显示：软骨损伤发生后，在止血期和炎症期若持续受到外部物理刺激，如异常机械负荷或不稳定的局部微环境，将显著干扰软骨修复的正常进程。这种不利刺激可导致炎症反应持续激活，促炎因子长期高表达，进而诱发软骨细胞凋亡



A：Control group；B：Exos group.

图8　Transwell小室实验检测2组BMSCs迁移情况

Fig. 8　Migration of BMSCs in two groups detected by Transwell chamber assay

增加和ECM降解加速，最终使缺损区域以纤维组织替代性修复为主，而难以形成具有良好力学性能和耐久性的透明软骨组织。上述过程被认为是软骨修复失败及OA持续进展的重要病理基础之一。

针对这一关键问题，本研究采用一种以F127-DA为基质的热敏-光敏双响应水凝胶递送系统，该体系兼具良好的注射性与原位成胶特性，可在体温条件下迅速完成溶胶-凝胶转变，并通过光交联进一步增强结构稳定性，使水凝胶在注射后能够牢固滞留于软骨缺损区域，从而在修复早期阶段有效减少外界机械干扰，为组织再生提供相对稳定的生物学微环境。同时，水凝胶作为递送载体显著延长了Exos在局部组织中的滞留时间，实现了其在缺损区域内的可控、持续释放，避免了Exos因快速扩散或清除而导致的治疗效应衰减[20]。

本研究通过体外降解实验观察到F127-DA水凝胶在PBS缓冲液环境中能够在约23 d内逐渐发生降解，表现出相对稳定且持续的降解行为。AC损伤后的再生过程通常需要数周至数月时间，其中软骨细胞增殖、ECM沉积和组织重塑是一个逐步进行的动态过程。因此，从时间角度看，水凝胶在数周内逐渐降解的特性在理论上能够与软骨修复的早期阶段相匹配：在修复初期为缺损区域提供必要的结构支撑和稳定的局部微环境，而随着新生软骨组织逐渐形成，材料逐步降解并被新生组织替代，从而实现材料与再生组织之间的动态协调。然而，本研究尚未对水凝胶在体内环境中的实际降解行为进行长期系统评价，未来仍需通过体内降解实验及更长周期的随访研究进一步验证水凝胶降解速率与软骨再生进程之间的匹配关系。

在材料性能方面，F127-DA适中的三维多孔网络不仅为Exos的扩散与持续释放提供了高效通道，同时也为BMSCs的迁移、黏附与驻留创造了有利条件[21-22]。多孔结构有助于细胞在材料内部及其表面实现有效附着与扩展，从而增强细胞与材料之间的相互作用。此外，该网络结构还显著改善了

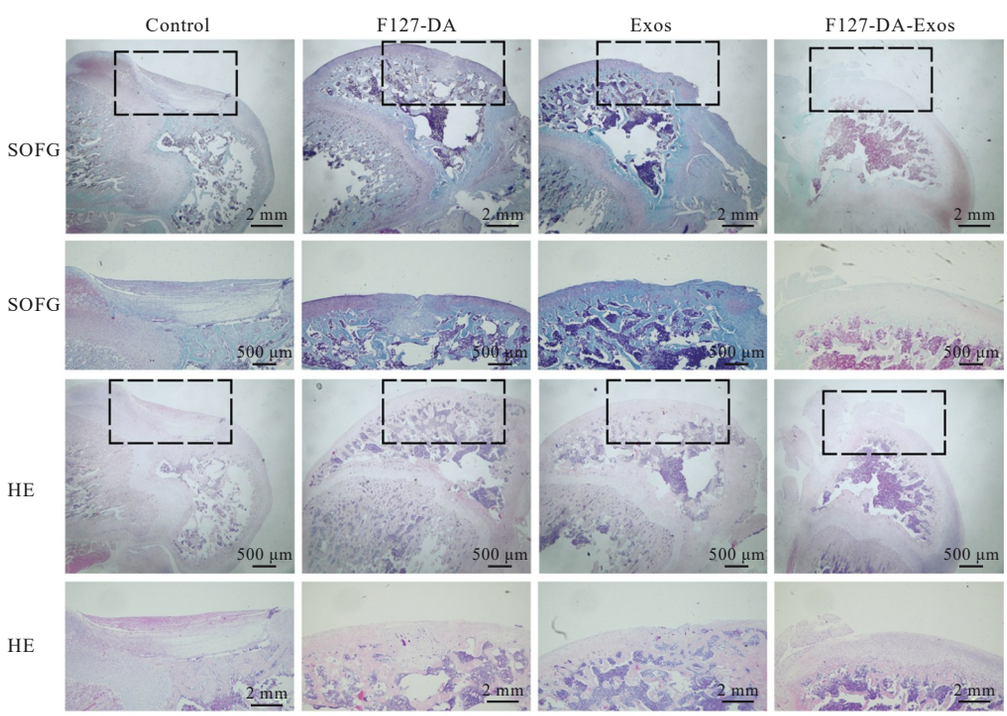


图9　各组大鼠体内软骨修复情况

Fig. 9　Cartilage repairment status *in vivo* of rats in various groups

局部微环境中的营养物质交换和代谢废物清除效率，降低缺氧与代谢应激对软骨细胞的不利影响[23]。上述因素协同作用，在一定程度上抑制了软骨细胞凋亡，保护了缺损区域内有限的功能性软骨细胞群体，为后续再生过程奠定了重要的细胞学基础。

体内实验结果进一步验证了该递送系统在促进软骨再生方面的显著优势。对照组大鼠软骨缺损区域主要被排列紊乱、染色浅淡的纤维性组织所填充，几乎未观察到典型透明软骨结构，提示单纯依赖机体自发修复难以实现功能性软骨再生。而在F127-DA＋Exos组中，术后8周大鼠软骨缺损区域被大量透明软骨样组织填充，细胞呈现类软骨细胞形态,排列较为规则,ECM中富含ACAN和COL Ⅱ，其组织学特征与正常AC高度相似。随着水凝胶在体内逐步降解，Exos得以持续、稳定释放，其生物效应在整个修复过程中不断累积，从而显著提升了再生软骨的成熟度和整体修复质量[24]。

光交联过程在F127-DA水凝胶结构形成中发挥重要作用。SEM观察结果显示：光交联后的水凝胶呈现出均一的三维多孔网络结构，该结构有助于维持材料的整体形态，并为细胞黏附及Exos释放提供稳定的微环境。已有研究[25]表明：光交联形成的交联网络能够提高水凝胶的结构完整性和抗溶胀能力，从而在一定程度上增强材料的稳定性。因此，F127-DA水凝胶在本研究中能够在软骨缺损区域保持较好的空间结构，为Exos的持续作用提供有利条件。未来研究仍可通过流变学或力学测试进一步评估其力学性能，以更全面地阐明光交联对材料结构稳定性的影响。

与传统仅负载生物活性分子或生长因子的水凝胶体系不同，本研究以Exos作为核心治疗因子，充分发挥其在细胞间信息传递中的独特优势。Exos所携带的微小RNA（microRNA，miRNA）、蛋白质和脂质分子能够协同调控BMSCs的迁移、增殖与向软骨表型分化过程，显著增强其在缺损区域内的驻留能力和再生潜能[25]。这种以“信号递送”为核心的治疗模式，更接近生理状态下细胞间调控网络的真实形式，相较于单一外源生长因子的短期刺激，更有利于诱导稳定、可持续的软骨再生，同时在一定程度上避免了高剂量生长因子可能带来的异位成骨或炎症反应增强等潜在风险[26]。F127-DA水凝胶所构建的递送平台本身具备良好的可扩展性与功能整合潜力。通过对水凝胶组成、交联方式及Exos来源的进一步优化，未来有望实现多类型功能性Exos或其他调控因子的协同递送，从而在不同修复阶段分别调控炎症反应、干细胞募集及软骨成熟过程，构建多阶段、多通路协同调控的软骨再生策略[27]。在临床转化层面，F127-DA水凝胶在组织整合性、可控降解性和力学性能可调性等方面均表现出显著优势；其注射成胶与原位光交联的特性使材料能够良好贴合不规则缺损区域，并在关节腔复杂力学环境中维持结构稳定性。同时，水凝胶的逐步降解过程与新生软骨组织的形成相匹配，有助于实现“材料-组织”之间的平滑过渡，减少界面失效风险[28]。

与自体或异体软骨移植以及基于细胞的组织工程修复策略比较，基于Exos的无细胞治疗模式在安全性、可操作性和可重复性方面展现出明显优势[29-30]。Exos不依赖细胞在体内长期存活即可发挥生物学效应，免疫原性和肿瘤风险较低，同时在保存、运输及临床操作方面更具灵活性。本研究通过构建可靠的递送系统，进一步放大了Exos的治疗潜力，为其临床应用提供了重要支撑。

综上所述，本研究提出的双响应水凝胶递送系统在材料性能、递送策略及组织再生潜力等方面均表现出显著优势，为软骨损伤的精准治疗提供了一种新颖且高效的解决方案，并为Exos在OA等退行性骨关节病中的临床转化应用奠定了坚实的实验基础。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

姜洋参与研究设计、图像数据处理和论文撰写，王波元参与图像处理，宋艾倬参与研究设计和数据分析，李明贺参与研究设计、论文审阅和修改。

[参考文献]

[1] 康 乾，晋春阳，王若秦，等. 膝骨关节炎病因学及发病机制的研究进展[J]. 临床骨科杂志，2025，28(6)：899-904.

[2] 蔡丰伟，刘海波，贺迎花，等. 关节疼痛的MRI影像在骨性关节炎诊断中的精准度观察[J]. 现代医用影像学，2025，34(10)：1899-1902.

[3] 申延清，刘风霞，曹 红，等. 膝骨关节炎患者的临床表现及相关影响因素[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2011，15(9)：1643-1646.

[4] BEDI A，FEELEY B T，WILLIAMS R J Ⅲ.

Management of articular cartilage defects of the knee[J]. J Bone Jt Surg Am Vol, 2010, 92(4): 994-1009.
[5] GLYN-JONES S, PALMER A J R, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2015, 386(9991): 376-387.
[6] CHOI S H, LEE K, HAN H, et al. Prochondrogenic effect of decellularized extracellular matrix secreted from human induced pluripotent stem cell-derived chondrocytes[J]. Acta Biomater, 2023, 167: 234-248.
[7] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review[J]. Jama, 2021, 325(6): 568.
[8] HU H X, DONG L L, BU Z H, et al. miR-23a-3p-abundant small extracellular vesicles released from Gelma/nanoclay hydrogel for cartilage regeneration[J]. J Extracell Vesicles, 2020, 9(1): 1778883.
[9] XU X, LIANG Y J, LI X F, et al. Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration[J]. Biomaterials, 2021, 269: 120539.
[10] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 654-659.
[11] ZHANG F X, LIU P, DING W, et al. Injectable Mussel-Inspired highly adhesive hydrogel with exosomes for endogenous cell recruitment and cartilage defect regeneration[J]. Biomaterials, 2021, 278: 121169.
[12] ZHANG S P, CHUAH S J, LAI R C, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity[J]. Biomaterials, 2018, 156: 16-27.
[13] 朱　莹，郝　璐，张宁坤，等. 外泌体在炎症疾病治疗中的研究进展[J]. 中国医药导报，2025，22(26)：187-191.
[14] 肖优贞，刘富伟，李治冶，等. 间充质干细胞来源外泌体在颞下颌关节骨关节炎治疗中的应用前景[J]. 实用口腔医学杂志，2025，41(6)：841-847.
[15] 伍宁缘，韦　智译，丰　昊，等. 纳米生物医学延缓骨关节炎进程的前沿与热点[J]. 中国组织工程研究，2026，30(26)：6907-6915.
[16] CAMANA G, TAVANO M, LI M, et al. Design of functional pluronic-based precursors for tailoring hydrogel thermoresponsiveness and cell-adhesive properties[J]. Materials (Basel), 2023, 16(7): 2749.
[17] LU X Q, DAI S M, HUANG B Z, et al. Exosomes loaded a smart bilayer-hydrogel scaffold with ROS-scavenging and macrophage-reprogramming properties for repairing cartilage defect[J]. Bioact Mater, 2024, 38: 137-153.
[18] 李佳音，隋　磊，李彦静. 微小RNA-146a调节骨代谢在骨组织工程中的应用[J]. 中国组织工程研究，2026，30(18)：4702-4712.
[19] 高　琴，李佳茹，石　慧. 细胞外囊泡介导的免疫调节与靶向递送：类风湿关节炎治疗的突破与挑战[J]. 生命的化学，2025，45(11)：2146-2153.
[20] 张玖久. 粘弹性F127DA水凝胶响应动态应力刺激促进PDLSC成韧带分化及牙周膜愈合的研究[D]. 西安：中国人民解放军空军军医大学，2024.
[21] 李　诚. 载HA-BMSC-Exos的PF127水凝胶对创面愈合的影响及其机制研究[D]. 长沙：中南大学，2023.
[22] 邱静怡，袁　京. PF-127水凝胶联合骨髓间充质干细胞外泌体来源miR-132诱导成骨分化修复牙槽骨缺损[J]. 河北医学，2024，30(5)：731-737.
[23] ZHANG J J, LI X, TIAN Y, et al. Harnessing mechanical stress with viscoelastic biomaterials for periodontal ligament regeneration[J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(18): e2309562.
[24] 陈明伟，余雯莉，夏苏杭，等. 携载microRNA-140外泌体/海藻酸钠/胶原水凝胶修复关节软骨损伤[J]. 中国组织工程研究，2025，29(16)：3326-3334.
[25] SHRIKY B, KELLY A, ISREB M, et al. Pluronic F127 thermosensitive injectable smart hydrogels for controlled drug delivery system development[J]. J Colloid Interface Sci, 2020, 565: 119-130.
[26] ZHOU Y, ZHANG X L, LU S T, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 407.
[27] 王事捷，夏　英. F127包覆载药ZIF-8复合材料的制备及其应用[J]. 大连工业大学学报，2025，44(6)：433-437.
[28] 张俊丽，熊　峰，张　宇，等. F127@TPGs@HS-15混合胶束载姜黄素的制备及其药代动力学研究[J]. 中南药学，2025，23(11)：3229-3238.
[29] CAO H F, CHEN M Y, CUI X L, et al. Cell-free osteoarthritis treatment with sustained-release of chondrocyte-targeting exosomes from umbilical cord-derived mesenchymal stem cells to rejuvenate aging chondrocytes[J]. ACS Nano, 2023, 17(14): 13358-13376.
[30] NOONIN C, THONGBOONKERD V. Exosome-inflammasome crosstalk and their roles in inflammatory responses[J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4436-4451.