

湖南大学《Advanced Functional Materials》| 软骨细胞膜囊泡 生物墨水用于组织工程治疗

湖南大学刘海蓉教授、周征团队在《Advanced Functional Materials》期刊上发表文章 *“Cellular Capsule Delivery Bioink with Punicalagin-Loaded Chondrocyte Membrane Vesicles for Tissue Engineering Therapy”*。关节损伤软骨的修复是临床治疗的主要挑战，因为病理条件阻碍了与炎症相关的细胞因子和活性氧(ROS)积累引起的软骨再生。为解决这一难题，该研究研发了一种“细胞胶囊”递送生物墨水，可持续释放载有多重活性成分的膜小泡，实现 ROS 清除与软骨修复双重功能。具体而言，将富含多羟基的石榴甙 (PUN) 通过丙烯酸酯-聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯修饰，封装于软骨细胞膜小泡 (CMVs) 中，形成细胞胶囊；同时，与甲基丙烯酰化蚕丝蛋白 (SerMA) 混合，作为可光固化的生物墨水前体。该复合墨水具有优异的抗氧化性、显著的抗菌活性及强效的软骨保护作用。利用数字光处理 (DLP) 3D 生物打印技术，所有打印结构均展现出高保形性和良好细胞存活率。体外与体内动物实验均证明，PUN@SerMA-修饰 CMV 生物墨水通过细胞胶囊被细胞摄取后，显著促进软骨组织再生。由此，这一“细胞胶囊”递送策略成功将 ROS 清除与软骨修复功能集成于 3D 打印平台，为再生医学中组织工程应用提供了有力创新思路。

RESEARCH ARTICLE

ADVANCED
FUNCTIONAL
MATERIALS

www.afm-journal.de

Cellular Capsule Delivery Bioink with Punicalagin-Loaded Chondrocyte Membrane Vesicles for Tissue Engineering Therapy

Mengyi Yu, Zheng Zhou,* Wenxiang Zhu, Xin Chen, Shuai Zhu, Jingjing Sun, Mengni Yang, You Zuo, Jiaqian He, Jingyi Pei, Lingxiu Yang, Wenxin Wang, Xiaoxiao Han, and Hairong Liu*

WHAT-什么是“细胞胶囊”递送生物墨水？

在该研究中，“细胞胶囊”递送生物墨水是一种将改性细胞膜囊泡与可光固化水凝胶基质相结合的创新配方。具体做法是：先用 AC-PEG-NHS 将软骨细胞膜囊泡表面引入活性丙烯酸酯基团，封装抗氧化物质石榴甙形成 PUN@mCMVs；再将这些胞囊分散到含有光引发剂的 SerMA 溶液中，通过 405 nm 蓝光照射，实现水凝胶快速固化。这种墨水在打印或注射后，SerMA 基质逐渐降解，持久热效释放 PUN@mCMVs，被周围细胞通过吞噬摄取，从而在体内实现抗氧化、抗菌和组织修复的协同作用。**相比传统药物负载方式，该策略不仅延长了药物半衰期，还提高了墨水的生物相容性与可打印性，为病理性氧化应激微环境下的三维生物打印与组织工程应用提供了新思路。**

WHY-为什么 PUN8@SerMA-mCMV 生物墨水能显著促进软骨再生并抑制氧化应激？

PUN8@SerMA-mCMV 生物墨水将抗氧化剂 PUN 封装于软骨细胞膜囊泡中，其 17 个酚羟基可有效中和自由基，终止链式反应，减轻氧化应激对细胞增殖和基质降解的抑制。此外，CMVs 保留软骨膜表面受体（如 CD44、整合素、E-钙粘蛋白），增强囊泡被软骨细胞内吞的特异性，使 PUN 高效到达靶细胞。SerMA 水凝胶支架为细胞提供三维支撑，良好孔隙结构兼顾力学性能与营养交换。PUN 释放还具抗菌特性，减少病原体干扰。在体内软骨缺损模型中，该墨水组的新生软骨覆盖缺损、组织结构连续，软骨特征基因大幅上调、MMP-13 下调，有效促进透明软骨形成。

HOW-软骨细胞膜囊泡生物墨水用于组织工程治疗

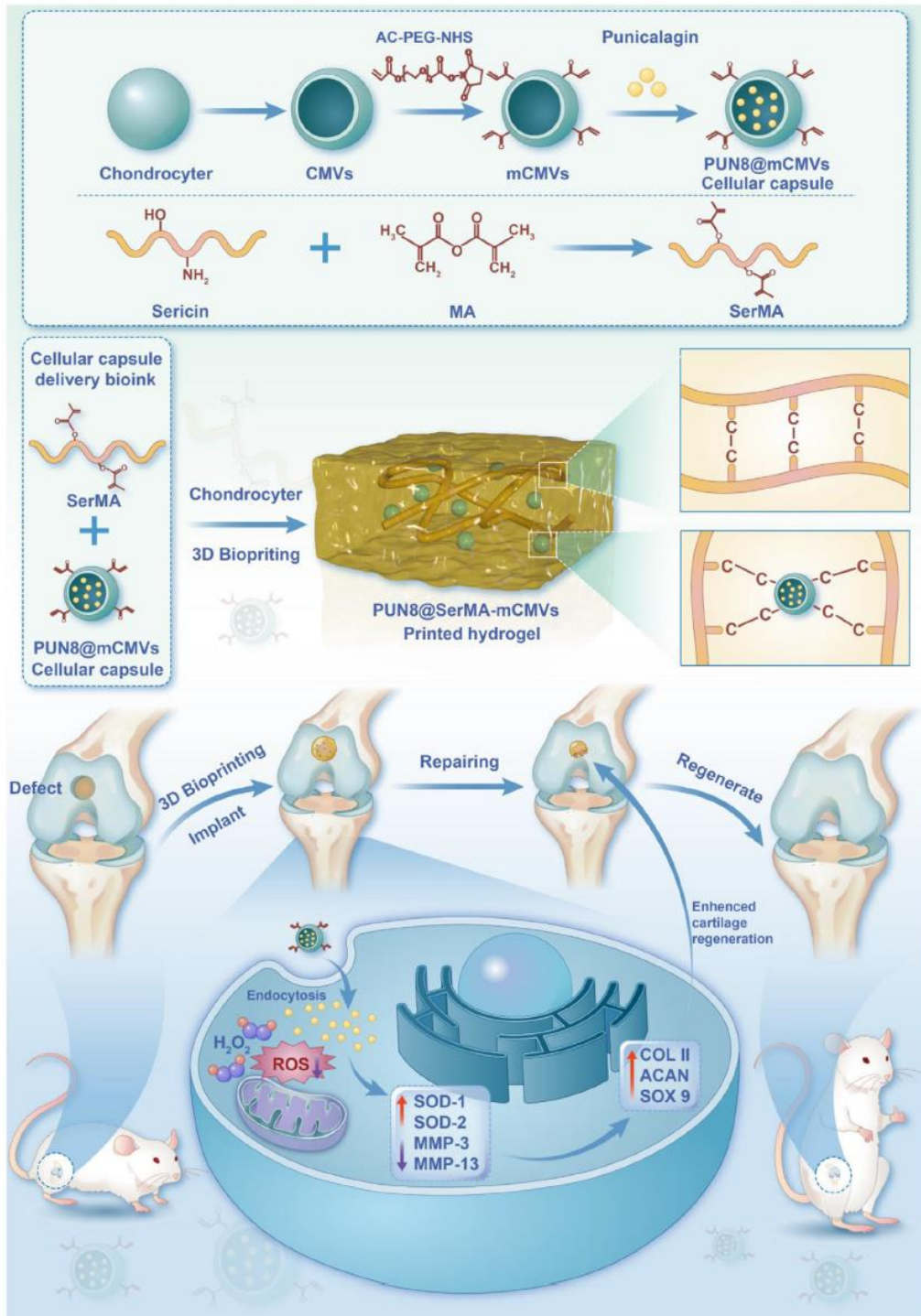


图 1 细胞胶囊递送生物墨水的制备和应用示意图

该研究提出了一种“细胞胶囊”生物墨水系统，用于病理性条件下的组织工程（图 1）。该系统将改性为 AC-PEG-NHS 的软骨细胞膜小泡（CMVs）装载 PUN，并通过共价键与 SerMA 结合，形成可光固化的生物墨水前体。印刷后，

生物墨水在降解过程中持续释放含活性分子的 CMV 胶囊，被周围细胞内吞，发挥清除 ROS、抗菌和促进软骨再生的多重功能。体外和体内实验均表明，该策略显著提升了软骨缺损修复效率，证明了“细胞胶囊”递送系统在 3D 打印组织工程中的应用潜力。

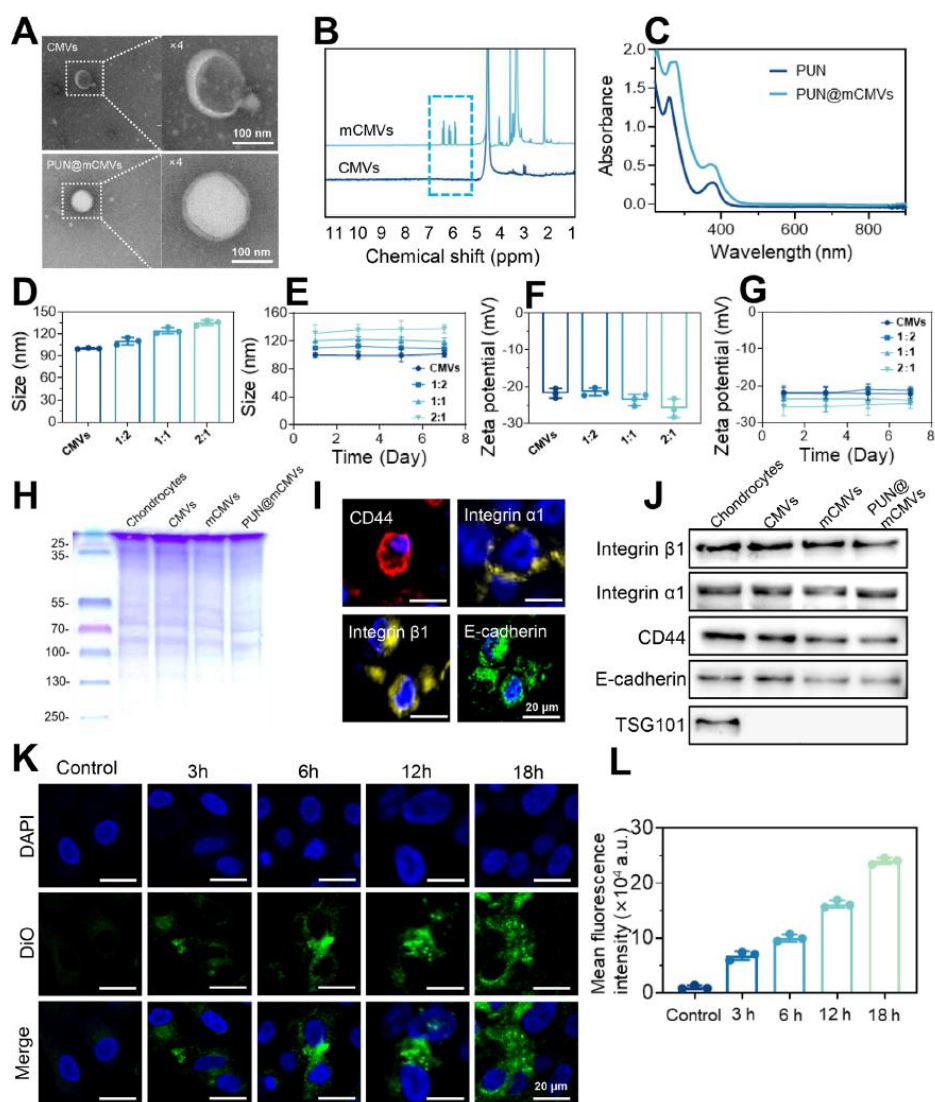


图 2 PUN@mCMV 的制备和表征

首先从兔软骨细胞中通过密度梯度超速离心获得 CMVs，并在透射电镜下以 1% 尿素负染显示其典型双层杯状结构，平均直径约 100 nm，与动态光散射结果一致 (图 2A)。随后，将 CMVs 表面与 AC-PEG-NHS 反应，保留丙烯酸酯基团形成 mCMVs， ^1H NMR 谱结果表明修饰成功 (图 2B)。通过向 mCMVs 与

PUN 混悬液重复挤出, 制备 PUN@mCMVs, TEM 显示其球状杯体被封闭并包载了 PUN (图 2A); UV-vis 光谱在 260 nm 处出现 PUN 特征吸收峰, 进一步确认了封载 (图 2C), 封装率约 67.8%。随着 PUN 与 mCMVs 比例增加, 颗粒粒径由约 125.7 nm 逐渐增至 136.7 nm (图 2D), 结合 DLS 和纳米颗粒追踪分析验证最佳配比为 1:1。PUN@mCMVs 在 PBS 中 7 天内粒径与 ζ 电位保持稳定 (图 2E-G); 考马斯亮蓝染色显示其蛋白质分子量分布与 CMVs 类似, 说明制剂纯度良好 (图 2H)。免疫荧光检测了 CMVs 表面 CD44、整合素 $\alpha 1/\beta 1$ 与 E-钙粘蛋白等黏附受体在软骨细胞上的分布 (图 2I), 而 Western blot 结果表明这些特异性蛋白较好保留于 CMVs 与 PUN@mCMVs 中, 且 TSG101 仅在细胞组出现, 证明膜小泡纯度高 (图 2J)。最后, 通过共聚焦显微镜观察, 发现 PUN@mCMVs (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在 3、6、12 和 18 h 的细胞内吞过程中, 绿色荧光随着孵育时间延长而不断增强, 并在胞质中共定位 (图 2K-L), 证实了载药胞囊的成功制备及有效细胞摄取。

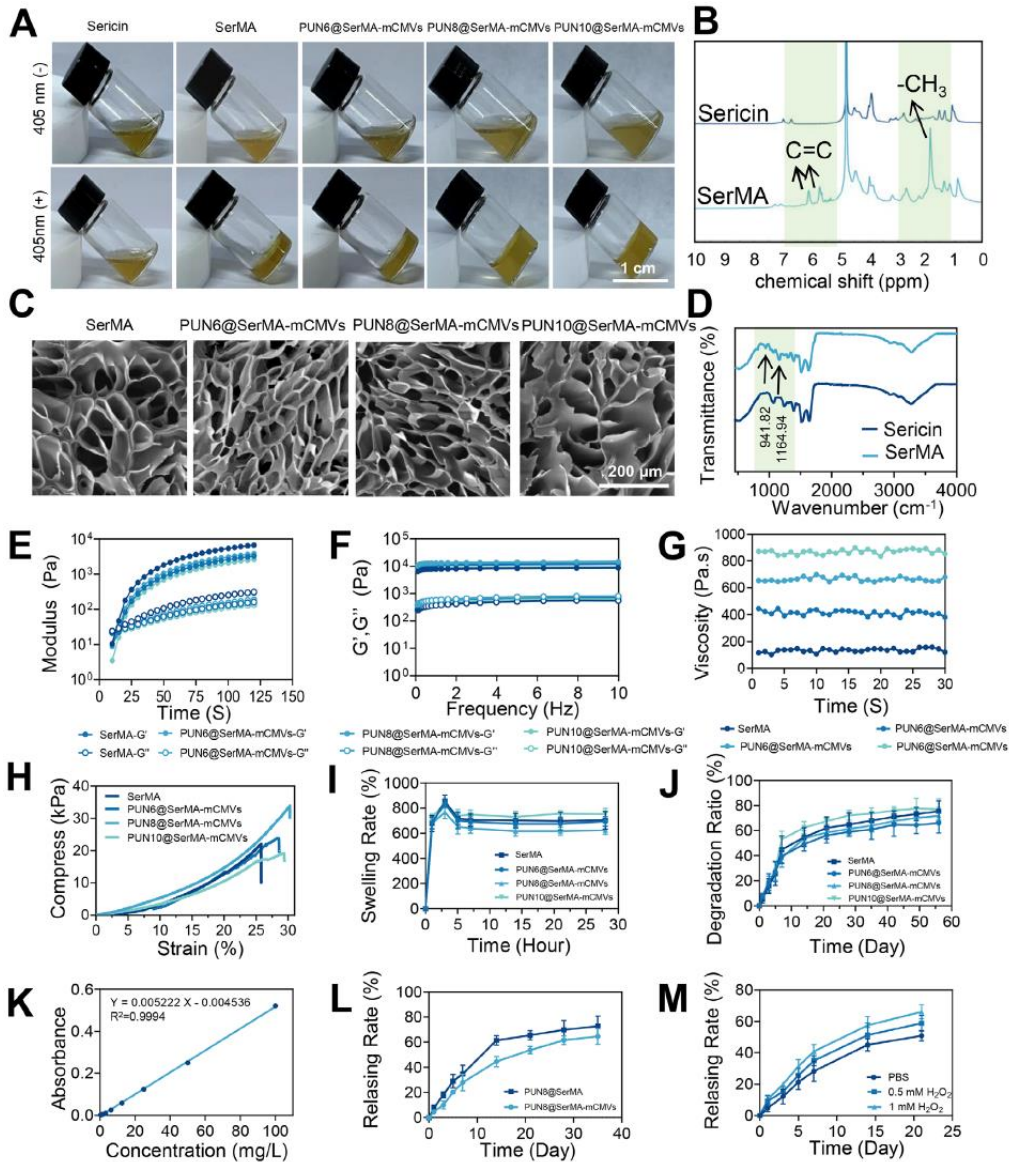


图 3 SerMA 和 PUN@SerMA-mCMV 的制备和表征

接着，通过将 SerMA 与光引发剂 LAP 混合，并添加不同浓度的 PUN@mCMV，利用 405 nm 蓝光在 30 s 内快速光固化，制备出多孔、可光敏成型的水凝胶（图 3A）。¹H NMR 与 FTIR 结果（图 3B、3D）证实了 SerMA 中丙烯酸酯基团的成功引入。SEM 观察显示，SerMA 与 PUN@SerMA-mCMV 水凝胶呈 100–150 μm 孔径的互连孔结构（图 3C），且孔隙率均高于 70%。流变测试（图 3E-F）表明所有配方均在曝光 15 s 后快速固化，储能模量 G' 始终大于损耗模量 G'' ，表现为弹性固体；黏度随时间稳定（图 3G）。在压缩测试中，

当 PUN 与 mCMV 比例为 1:1 时，水凝胶的压缩模量达到 ≈ 40 kPa (图 3H)，表明 PUN@mCMV 的掺入通过丙烯酸酯与 SerMA 交联显著增强了力学性能。吸胀与降解实验 (图 3I-J) 显示，其具有相似的平衡吸胀率与缓慢降解特性。紫外光谱与释放曲线 (图 3K-L) 显示，PUN@SerMA-mCMV 水凝胶比 PUN@SerMA 释放更平缓，避免突释，且在 H_2O_2 环境中释放加快，体现了其氧化响应型控释能力 (图 3M)，满足智能药物释放与组织工程应用需求。

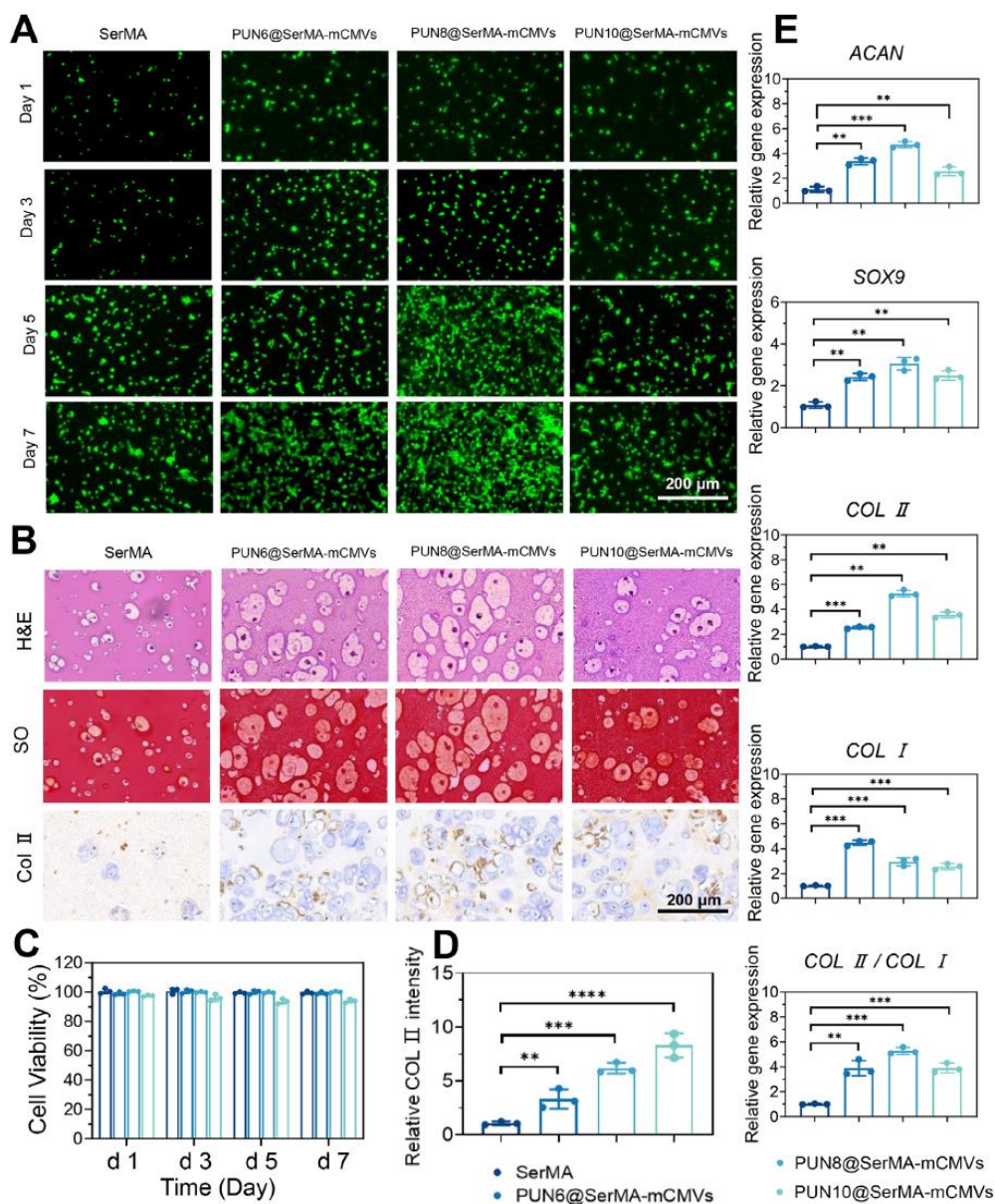


图 4 PUN@SerMA-mCMV 的生物相容性

通过 FDA 活细胞染色 (图 4A) 和 CCK-8 增殖实验 (图 4C), 评估了不同浓度 PUN@mCMV 胞囊对软骨细胞增殖的影响。结果表明, 随着 PUN@mCMV 浓度从 600 提升至 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 细胞存活率和增殖能力显著增强, 但当浓度进一步提高至 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 增殖促进作用有所下降, 因此选定 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为最佳配比。随后使用 RT-qPCR 检测 7 天培养后软骨细胞中的基因表达 (图 4E), 发现 PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶组 SOX9 和 ACAN 转录水平均显著高于 SerMA 对照组; 同时, COL II 基因表达明显上调, 而 COL I 表达显著下调, 导致 COL II/COL I 比值显著升高, **表明该配方最有利于软骨细胞向透明软骨方向分化**。为进一步验证体外软骨组织形成能力, 研究将软骨细胞负载于不同浓度 PUN@mCMV 的 SerMA 水凝胶中, 进行 4 周培养, 并采用 HE、Safranin-O 与 COL II 免疫组织化学染色 (图 4B) 评估基质生成。结果显示, PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶组具有更典型的软骨空腔结构和更丰富的细胞外基质; Safranin-O 染色呈现最深的蛋白多糖沉积, 而 COL II 染色强度最大且分布最广, 进一步佐证其对软骨微组织再生的优越促进作用。 **综上, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PUN@mCMV 胞囊显著提升了软骨细胞活性与成软骨分化能力, 并在体外模型中增强了软骨微组织构建, 被确认为最佳配方。**

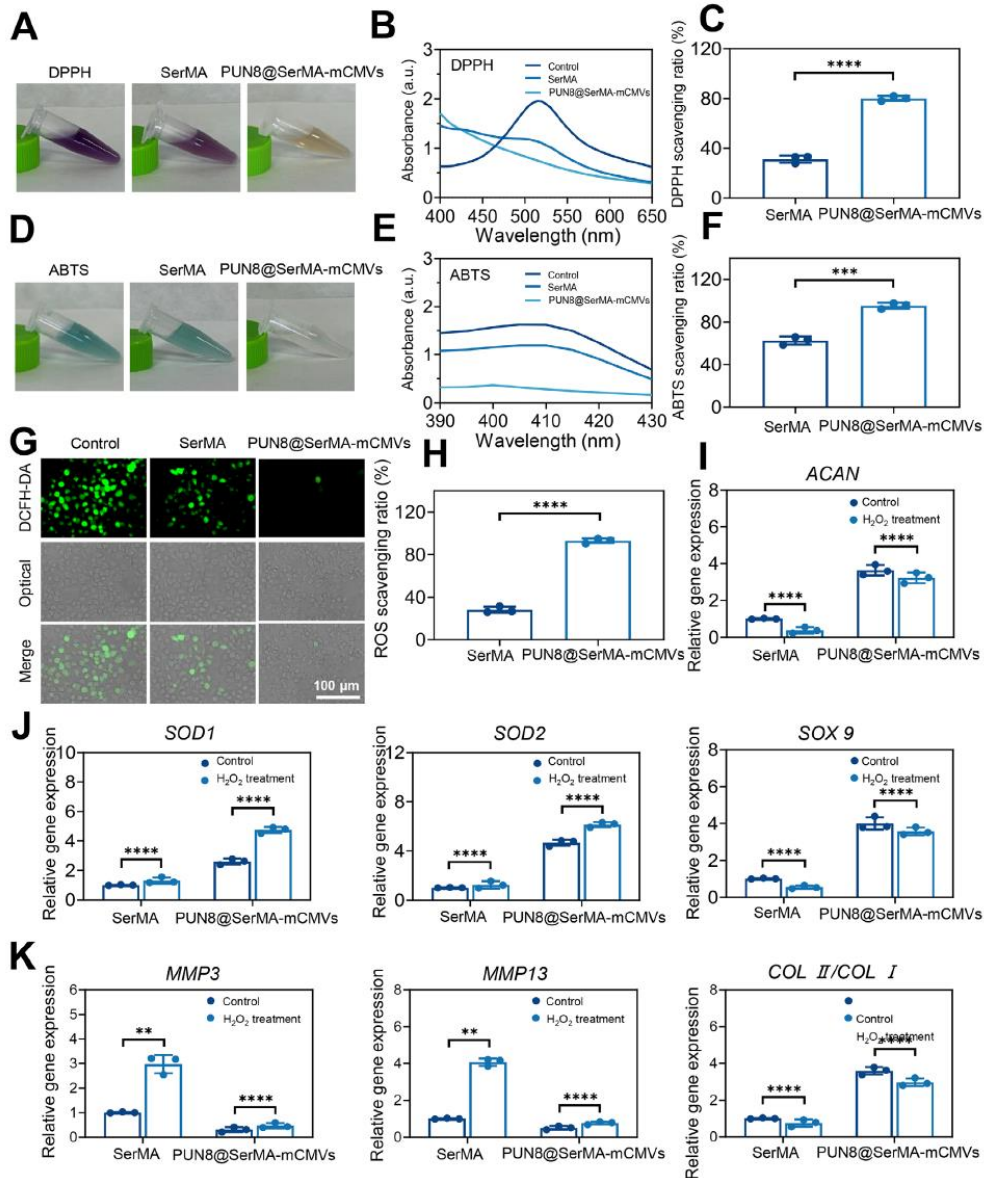


图 5 PUN@ SerMA-mCMV 的抗氧化活性

PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶通过 PUN 的 17 个酚羟基显著清除自由基：在 DPPH 实验中，PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶使溶液由紫色变浅棕(图 5A)，清除率达 $\approx 79.82\%$ ，远高于 SerMA 对照组 $\approx 29.99\%$ (图 5B-C)；在 ABTS 实验中，PUN8@SerMA-mCMV 组将蓝色 ABTS 溶液褪色 (图 5D)，清除率为 $\approx 94.28\%$ ，而 SerMA 组仅为 $\approx 65.99\%$ (图 5E-F)。利用 DCFH-DA 染料检测细胞内 ROS 时，PUN8@SerMA-mCMV 组的绿色荧光明显减少 (图 5G)，量化显示其 ROS 清除率达 93.0% ，远高于 SerMA 组 28.1% (图 5H)。RT-qPCR 结

果表明, PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶显著上调 SOD1 和 SOD2 基因表达, 增强抗氧化能力 (图 5J), 并下调 MMP-3 和 MMP-13 转录, 减少基质降解 (图 5K)。综上, PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶通过促进抗氧化基因表达和抑制基质金属蛋白酶, 有效缓解软骨细胞的氧化应激与炎症, 利于软骨再生。

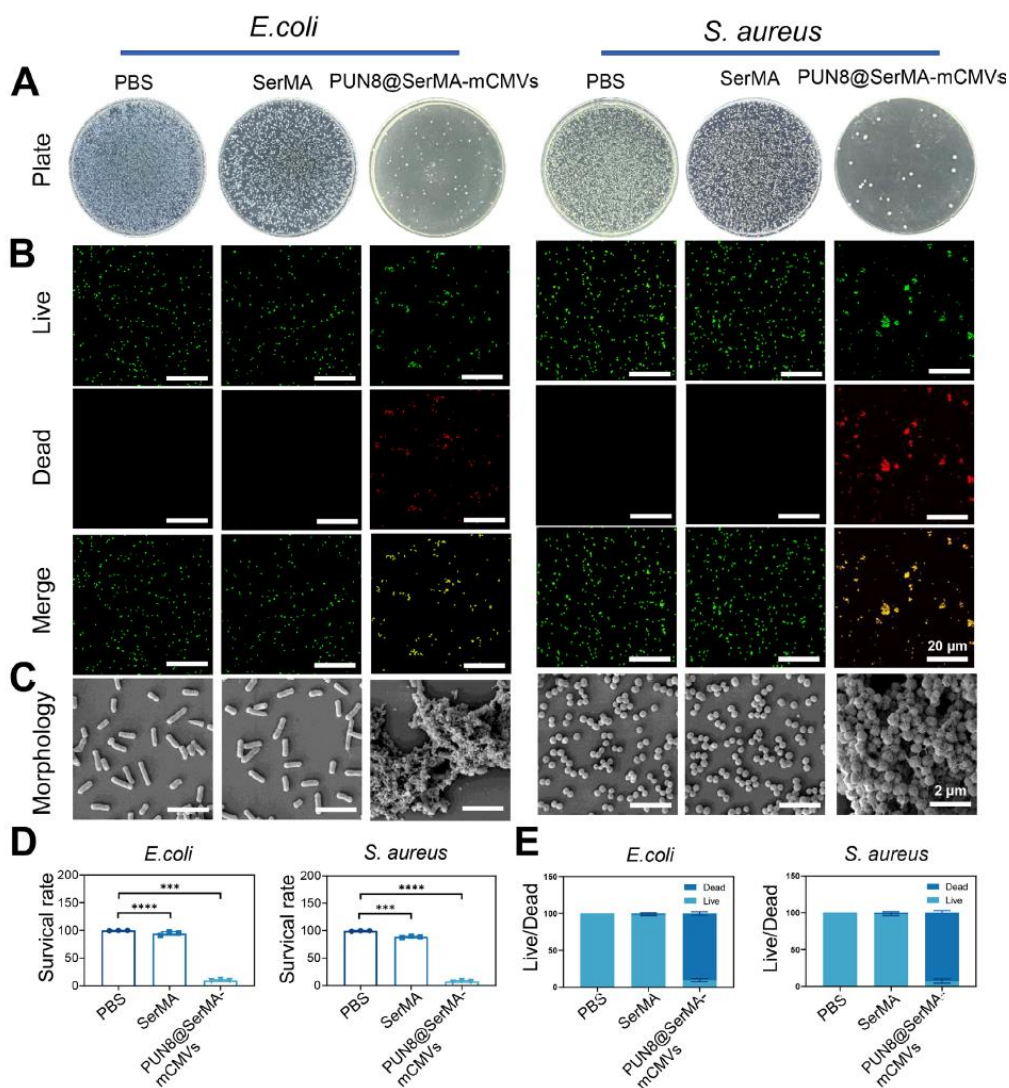


图 6 抗菌特性的表征

PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶通过持续释放 PUN 展现出明显的抗菌性能: 板式菌落计数结果 (图 6A) 显示, 与 PBS 对照和 SerMA 水凝胶组相比, PUN8@SerMA-mCMV 组对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有显著抑制作用; 定量分析 (图 6D) 显示, 两种细菌在该水凝胶中的存活率分别降至 9.7% 和 7.4%。

活/死菌染色 (图 6B) 进一步证实, PUN8@SerMA-mCMV 组中死菌 (红色) 大量聚集成团, 而对照组几乎未见红色荧光, 说明石榴甙可破坏细菌细胞膜。扫描电镜观察 (图 6C) 发现, 暴露在 PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶中的死菌外表被聚合物包裹并聚集, 符合石榴甙介导的抗菌机制。活死菌比例统计 (图 6E) 同样表明, PUN8@SerMA-mCMV 水凝胶的抑菌效果明显优于 SerMA 组。综上所述, 这种载有石榴甙的胞囊递送系统不仅在 3D 生物打印过程中提供了内在的抗菌保护, 还为后续组织工程应用减少感染风险提供了有力保障。

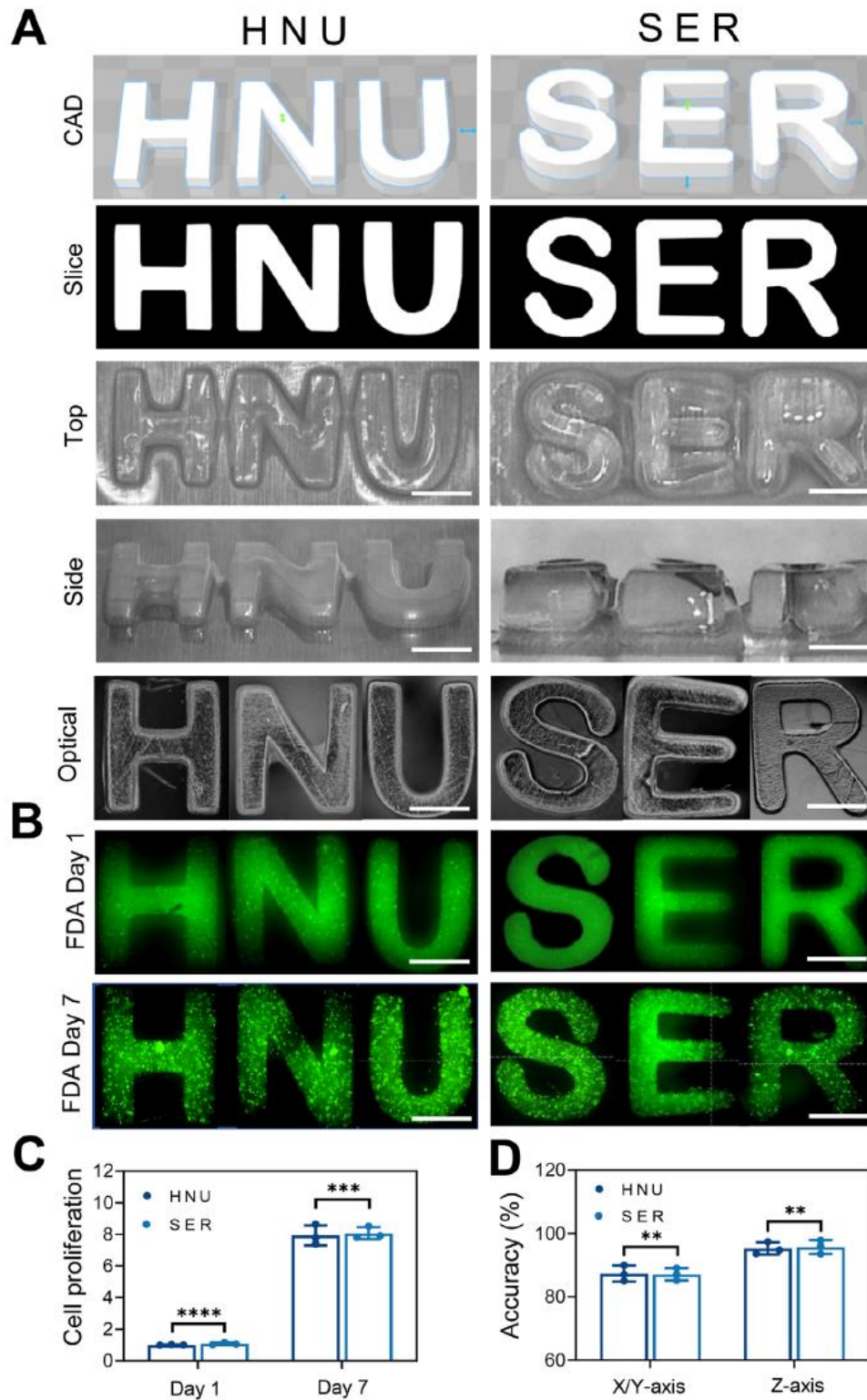


图 7 PUN@ SerMA-mCMV 生物墨水的 DLP 生物打印

利用可光固化的 PUN8@SerMA-mCMV 生物墨水在下沉式 DLP 3D 生物打印机上验证了其打印性能与生物相容性。根据 CAD 设计模型，所打印的水凝

胶制品精准还原了预设形状，展现出优异的打印性与成型保真度 (图 7A、7D)。打印后，通过 FDA 活细胞染色观察，嵌入水凝胶的软骨细胞存活且活性良好，7 天培养后细胞存活率依然很高 (图 7B-C)，表明该墨水在光固化与细胞包埋过程中对细胞无害。此外，PUN8@SerMA-mCMV 墨水所携带的胞囊具有抗菌作用，可在打印和体外培养期间有效减少细菌污染风险。综上，PUN8@SerMA-mCMV 胞囊递送生物墨水兼具出色的打印性、高细胞活性与抗菌性能，适用于 3D 生物打印和软骨组织工程等生物医学应用。

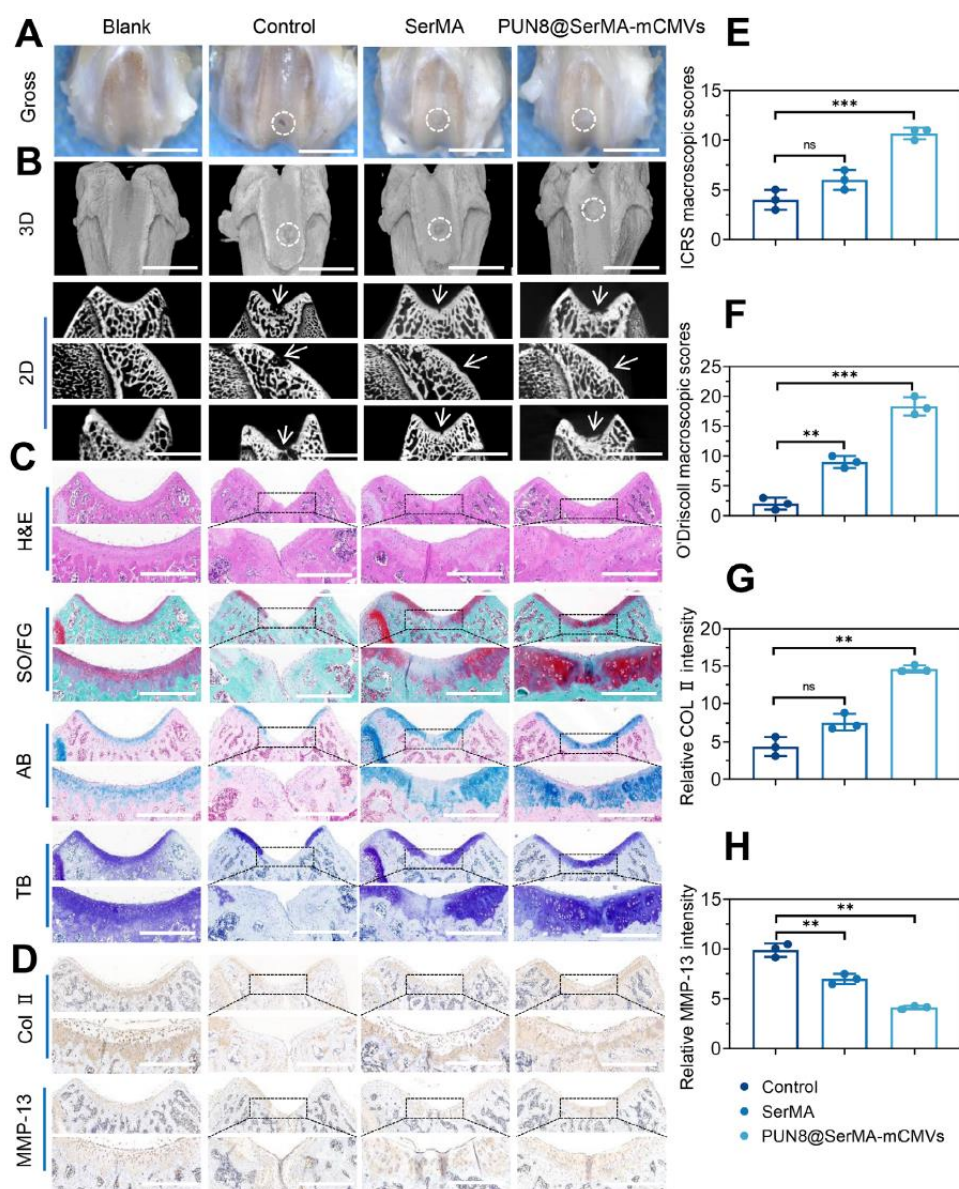


图 8 软骨修复的肉眼、组织学和免疫组织化学评估

在体内兔膝关节软骨缺损模型中, 未经处理组修复组织不规则、表面凹陷(图 8A), 而 SerMA 水凝胶组虽形成乳白色新组织, 但仍有凹陷; PUN8@SerMA-mCMV 组的新软骨完全覆盖缺损区并与周围软骨高度融合, 修复效果最佳, ICRS 评分显著高于其他组(图 8E)。Micro-CT 三维重建显示, PUN8@SerMA-mCMV 组缺损区新生软骨填充饱满、表面平整(图 8B)。组织学分析(图 8C)中, H&E 染色显示该组新软骨呈典型软骨小腔和层板结构, 边缘与正常软骨无明显界限; Safranin-O/Fast Green 染色则呈现深红且连续的蛋白多糖沉积和完整潮线; Alizarin Blue 染色显示深蓝色软骨基质; Toluidine Blue 染色表明其细胞外基质均质丰富。免疫组织化学(图 8D)揭示 PUN8@SerMA-mCMV 组 II 型胶原表达最强, 而 MMP-13 表达最低(图 8G-H), 说明其在抑制氧化应激和炎症方面更优, 从而促进了软骨再生。综上, PUN8@SerMA-mCMV 生物墨水在形态学、结构及分子水平均展现出卓越的软骨修复潜力。

结论: 该研究构建了一种“细胞胶囊”递送生物墨水——PUN8@SerMA-mCMV, 通过将光敏 SerMA 与负载抗氧化剂 PUN 的改性软骨细胞膜囊泡(mCMVs)复合, 形成可三维打印、可持续释药的生物墨水。与传统负载方式相比, 该策略延长了药物半衰期, 并显著提升了生物相容性与打印适应性。在 SD 大鼠软骨缺损模型中, PUN8@SerMA-mCMV 生物墨水相比单纯 SerMA 或空白对照, 实现了最佳的组织再生效果。鉴于其强大的抗氧化和抗菌性能, 该生物墨水在未来组织工程领域, 尤其是病理性氧化应激微环境下的应用前景广阔。

文章来源: <https://doi.org/10.1002/adfm.202504180>