

光固化水凝胶装载外泌体促进成骨的实验研究

刘付伟贵¹ 陈沛雄¹ 周继辉¹ 通讯作者 曲彦隆² 李逸光¹

1. 茂名市人民医院 (广东医科大学茂名临床医学院)

2. 哈尔滨医科大学附属第一医院骨科

DOI:10.32629/bmtr.v8i3.20427

[摘要] 目的：验证甲基丙烯酸酐化明胶装载外泌体结合骨折内固定物促进成骨可行性。方法：制备装载外泌体的甲基丙烯酸酐化明胶涂层，进行基本性能测试，根据性能要求改良制备技术，检测其装载及释放外泌体的效能。检测涂层的细胞相容性、促进骨髓基质干细胞成骨的效果，使用 SPSS16.0 软件进行统计分析，计量资料以均数±标准差表示，组间比较采用组间方差分析。结果：载外泌体水凝胶涂层的光固化性能，粘附力及细胞相容性良好，装载及释放外泌体效能稳定，促成骨效果良好。结论：新型外泌体水凝胶缓释涂层能够增加局部的成骨效果，通过其结合于内固定表面促进成骨的思路是可行的，可为进一步深入研究奠定基础。

[关键词] 甲基丙烯酸酐化明胶；诱导成骨；外泌体

中图分类号：R687.3 文献标识码：A

Experimental Study on the Promotion of Osteogenesis by Exosome-Loaded Photocurable Hydrogel

Fuweigui Liu¹, Peixiong Chen¹, Jihui Zhou¹ ¹Corresponding Author, Yanlong Qu², Yiguang Li¹

1 Maoming People's Hospital (Maoming Clinical Medical College of Guangdong Medical University)

2 Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University

[Abstract] Objective: To verify the feasibility of promoting osteogenesis by gelatin methacryloyl loaded with exosomes which may be coated on fracture internal fixation devices. Methods: A gelatin methacryloyl coating loaded with exosomes was prepared, its basic performance was tested, and its loading efficiency of exosomes was optimized based on performance requirements. The coating's cytocompatibility and its effects of promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells were evaluated. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 software, with quantitative data expressed as mean ± standard deviation, and intergroup comparisons were conducted via one-way ANOVA. Results: The exosome-loaded hydrogel coating exhibited favorable photopolymerization performance, adhesion strength, and cytocompatibility, with stable exosome loading and release efficiency and excellent osteogenic effects. Conclusion: The novel exosome-hydrogel coating can enhance localized osteogenic effects, and the approach of promoting osteogenesis through its combination with internal fixation surfaces is feasible, laying the foundation for further in-depth research.

[Key words] methyl acryloyl hyaluronic acid; induced osteogenesis; exosomes

引言

骨折局部的成骨效果是决定预后的关键因素，BMSCs (骨髓间充质干细胞) 在骨折愈合过程中发挥重要的促进作用，其外泌体在此过程中传递促进成骨的信息已被诸多研究所认可，在骨折局部创造富含外泌体的微环境可能促进骨折愈合，设计一种可有效装载骨髓间充质干细胞源性外泌体水凝胶材料，术前根据需要涂布于内置物表面，在骨折局部限定范围内发挥诱导成骨的作用可能提高骨折的疗效，本研究

旨在探索具有光固化性能的甲基丙烯酸酐化明胶装载外泌体，具备结合内固定物到达骨折局部的性能，在局部创建促成骨微环境的可行性，通过性能检测，细胞学实验进行验证，为进一步的研究奠定基础。

1 材料及方法

1.1 骨髓间充质干细胞培养及鉴定

原代培养骨髓间充质干细胞 (购自 Sigma 公司)，培养条件为含 15% 胎牛血清的杜氏低糖改良培养基、37℃、

5%CO₂, 培养细胞当细胞达到 80%-90%融合时进行传代, 取 3、4 代细胞进行实验。以 CD44、CD34、CD105 或 CD90 抗体, 采用流式染色检测鉴定。

1.2 骨髓间充质干细胞源性外泌体 (MSCs-Exos) 的制备及检测

收集骨髓间充质干细胞培养液, 4℃、3000g 条件下离心 15min。取上清液, 加入 1/5 体积的外泌体沉淀液, 充分混匀并在 4℃条件下静置过夜; 再次以 4℃、1500g 离心 15min, 加入 PBS 充分洗涤; 最后以 1500g 离心 15min, 弃上清, 加入适量 PBS 制成外泌体悬液。将外泌体悬液滴加于铜网上, 静置 5min, 醋酸铀避光染色 5min, 双蒸水洗涤后滤纸吸干, 电镜观察拍照; 采用 Westernblot 法检测外泌体悬液中 CD63、CD81 和 TSG101 表达情况。

1.3 载外泌体水凝胶涂层的制备

取一定质量的苯基 (2,4,6-三甲基苯甲酰基) 亚膦酸钠 (NAP) 配制成浓度为 0.2wt% 的溶液, 避光保存; 取所需质量的甲基丙烯酸酐化明胶 (GelMA) 放入离心管, 并取引发剂标准溶液加入到上述离心管中, 涡旋使 GelMA 充分浸润, 在 37℃摇床内避光振荡, 直至完全溶解, 按 25%浓度梯度加入 MSCs-Exos 溶液, 涡旋或振荡数次至完全混匀。

1.4 缓释涂层的基本性能测试

应用扫描电镜及透射电镜观察含外泌体水凝胶涂层的表面特征, 表面细胞贴附情况及装载外泌体的情况; 观察水凝胶涂层常温及紫外光照射下的固化过程, 分析其见光及常温下的固化时间及具体过程; 将做好的凝胶溶液取两滴, 刮涂在提前准备好的金属板上, 将金属板光在紫外灯下等待凝胶固化后, 用划刀在凝胶表面十字划线, 通过十字划格法测试粘附力等级, 判断涂层与内固定物表面结合的稳定性。

1.5 涂层的细胞相容性检测

间充质干细胞与载外泌体水凝胶 (薄的钛片表面) 共培养, 通过细胞活性检测及电镜观察细胞相容性, 将薄金属片 (每组 6 个) 置于 24 孔培养板或培养瓶中, 每个钛片上接种骨髓基质干细胞悬液 1ml 细胞浓度 $1 \times 10^8/l$, 共培养第 3 及第 7 天后, 以多功能酶标仪在 450nm 波长下记录各组吸光度值, 分析细胞相容性及细胞增殖情况, 以流式细胞技术分析细胞增殖周期及凋亡变化。在涂层表面培养细胞 1 周后电镜观察细胞黏附伸展形态, 细胞增殖情况及细胞迁移能力。

1.6 涂层对外泌体装载能力检测: 对外泌体进行荧光标记后与水凝胶混合, 以扫描电镜观察外泌体在涂层表面的分布情况, 以透射电镜观察涂层内部外泌体分布情况, 洗脱表面细胞后以聚焦显微镜观察外泌体被细胞摄取的情况。

1.7 免疫组化检测细胞的成骨变化: 细胞共培养 1 周后洗脱, 通过碱性磷酸酶及茜素红染色观察共培养后细胞的成

骨情况。

1.8 基因检测: 提取共培养 1 周后的骨髓间充质干细胞 RNA, 采用 qRT-PCR 法检测材料表面细胞 Wnt1、 β -catenin 等成骨相关基因的 mRNA 表达量。

2 结果

2.1 细胞的培养及鉴定: 贴壁前的骨髓间充质干细胞呈圆型, 大小不一, 悬浮于培养液中。24h 后部分细胞开始贴壁, 呈圆形、梭形或多角形。换液后可见短梭形及星形细胞分散贴壁生长, 3-4 天可见放射状排列的细胞集落, 伸出长短不一、粗细不均的突起, 以梭形细胞为主, 胞浆丰富, 胞核大、核仁清晰。6-7 天后细胞融合可达 80%-90%, 呈漩涡状, 同向排列, 9-10 天细胞逐渐融合成片。消化传代的细胞 24h 完全贴壁生长, 细胞形态较均一, 呈梭形生长, 细胞生长旺盛。四至五天可传代 1 次。可稳定连续传代 5 代以上, 以 3-4 代细胞生长最为旺盛。鉴定结果显示, BMSCs 均一表达 CD44, CD90, CD105, 阳性率分别为 99.24%, 99.30%, 99.26%; 而 CD34, CD45 呈阴性, 阳性率分别为 1.50%, 1.42%。

2.2 外泌体的提取、鉴定: 扫描电镜下观察到的外泌体为半透明杯状或圆球形结构, 其粒径大小平均分布在 121.6nm, 通过蛋白印迹实验测得外泌体标记蛋白 CD81 和 CD9 表达阳性, 但钙连蛋白 Calnexin 表达阴性。扫描电镜下见水凝胶表面水凝胶呈相互连接的多孔结构, 孔隙尺寸范围在 10-25nm 之间, 表面及水凝胶内部可见散在分布的外泌体, 呈半透明杯状或圆球形, 其粒径大小平均分布在 121.6nm。

2.3 涂层的基本性能

电镜观察可见水凝胶表面呈类似细胞基底膜的三维拓扑结构, 表面可见外泌体颗粒分布, 透射电镜观察可见泌体颗粒较均匀分布于水凝胶内部。水凝胶涂层自然凝胶固化时间平均为 20.36 秒, 以紫外光照射后固化时间为 15.62 秒, 加入外泌体后固化时间无显著差异。待凝胶在金属表面完全固化后, 用划刀在凝胶表面十字划线, 涂层沿切割边缘部分有部分剥落, 面积平均为 20%, 得出粘附力等级为 3 级, 属较强结合力; 加入外泌体后涂层的粘附力无明显改变, 二者对比无显著差异。

2.4 细胞共培养及相容性

细胞在凝胶表面贴附良好, 显微镜及电镜观察发现细胞 24 小时左右完全贴附于涂层表面, 6-7 天后细胞呈集落生长, 融合 80%-90%, 呈漩涡状, 同向排列。9-10 天细胞排列紧密, 逐渐融合成片。与培养瓶中生长情况类似, 在共培养 3、7 天进行 MTT 实验与正常培养细胞的 OD 值无明显差异, 经流式细胞技术检测未加入外泌体涂层表面细胞凋亡率及细胞周期与正常细胞无明显差异, 加入外泌体涂层表面细胞凋

亡率明显降低，处于增殖期的细胞率明显增高。共聚焦显微镜观察见水凝胶表面培养的骨髓间充质干细胞内见较多荧光颗粒，形态及大小符合外泌体特征。

2.5 细胞成骨情况观察：通过正常培养细胞，未加入外泌体涂层表面细胞及外泌体涂层表面细胞进行碱性磷酸酶染色发现外泌体涂层表面细胞成骨现象明显，呈大面积阳性表现，正常培养细胞的成骨现象不明显。

2.6 Rt-PCR 结果：与正常培养细胞及未装载外泌体水凝胶表面培养的细胞相比，载外泌体水凝胶表面的细胞的 Wnt1 及 β -catenin 的表达水平明显增高，差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。验证了 Wnt1/ β -catenin 信号通路关键蛋白的表达情况，载外泌体水凝胶通过激活 Wnt1/ β -catenin 通路增强 BMSCs 成骨分化能力。

3 讨论

切实提高疗效，最大程度恢复伤者的功能是骨折的治疗目标，然而骨折愈合不良、异位骨化^[1-3]是创伤骨科医生必须面对的难题，骨折局部的微环境往往为骨折的预后奠定了坚实的基础^[4]，手术过程中为骨折愈合创造的良好条件往往成为避免上述并发症的决定性因素，在骨折局部可控范围内创建促进成骨微环境是创伤骨科学者不断探索并努力达到的理想境界。骨折是骨科的基础疾病，涉及全身多个部位，形态及治疗方式各不相同，在损伤区域创建促进成骨微环境是当前的研究热点，传统的局部的植骨技术是创建促进骨折愈合微环境的有效手段，却受到严峻的挑战，手术器械的改良及进步为骨折的治疗带来许多突破性的进展，同时使骨折的手术技巧不断提升，在体外定位系统的辅助下，开放式手术逐渐被微创方式取代，骨固定手术时可无需显露骨折端，通过植骨技术改善骨折局部微环境的手段往往难以实施^[5]，需要新的技术有效替代。通过有效方式实现在有效可控范围内建立促进成骨，抑菌的良好环境将有效提高骨折的治疗效果。

近年来，水凝胶作为一种可模拟 ECM (细胞基底膜) 的新型生物材料已受到广泛关注，作为由亲水性聚合物链交联所形成的三维网络结构，通过改善凝胶的理化性质和生物学特性，可对体外细胞培养微环境进行精确设计，可作为蛋白，细胞，外泌体的优质载体，在病灶区域发挥调控微环境的关键作用，对过性能改善保护并缓释蛋白成分，在表面或内部运载种子细胞，通过细胞产生或直接装载外泌体，实验多维立体化的微环境构建。骨折治疗需要根据其多样性制定相应的手术方案，选定内置物后在所需部位进行水凝胶涂层处理将极大地提高手术效果，实现术中即用并与内置物牢固结合需要在涂层中加入新的关键成分，涂层即需要将促成骨成分有效结合并实现有效装载，同时必须具备特殊的性能，

即避光时以液体形态存在，常温见光后短时间可固化于内植物表面，似于油漆的性能。虽然水凝胶的超亲水性、润滑性、生物相容性和多孔载体功能等许多优点越来越受到重视，可作为细胞，活性因子，外泌体等多种有效成分的载体，被广泛应用于医学美容，载药释药，生物工程等领域，但作为涂层使用时需要克服其结合力不足，置入过程中易损耗的缺点。甲基丙烯酸酐化明胶 (GelMA) 由甲基丙烯酸酐 (MA) 与明胶 (Gelatin) 通过生物技术制备获得，具有良好的生物相容性，加入光引发剂后避光时处于液态，是光敏性的水凝胶生物材料，可由紫外光或可见光激发固化反应，即由液态逐渐转化为固态并结合于物体表面，其固化时间可根据需要调节。固化后表面形成类似细胞外基质的三维拓扑结构，与细胞相容性良好，有利于细胞的粘附及增殖^[6-7]。光引发剂的可控性应用可以使 GelMA 成为“GelMA 漆”，具备与普通油漆的使用模式类似的“水凝胶漆”功能，此 GelMA 漆在室温下通过可见光激发固化作用，能够与金属，玻璃，陶瓷等多种富含羟基的材料表面实现强力结合，使用时根据需要在金属等表面均匀刷涂水凝胶涂层，之后使用可见光照射激发固化作用，使 GelMA 漆载荷成分在所需部位牢固结合，是制备即用型涂层材料的良好选择^[8]。水凝胶孔隙率很高，其丰富的间隙可以根据需要随着对理化性质的调节而改变，有良好的装载性能。405nm 波长的光是接近于紫外光的可见光，但其在 9 小时以内的照射不会影响装载物的生物活性，通过降解释放其内的洗发成分并在局部发挥效能。通过对水凝胶的改良可制备出理想的涂层原料，其内可装载细胞，外泌体成分，细胞可预先培养的凝胶的内部或表面，外泌体可直接与凝胶混合。骨折愈合是一个动态平衡的过程，成骨作用必须在可控范围内进行，超过应有的范围即造成异位骨化，不利于患者康复，造成软组织硬化，骨游离体形成，关节骨性关节炎等负面影响^[9]。光固化水凝胶可在术中根据需要精准涂布于内固定物的表面，随内固定物到达所需区域，在骨折部位形成持续促进成骨微环境，防止成骨范围过大造成异位骨化，将为骨折的康复带来实质性促进作用。

骨微环境的稳态依赖于细胞及其胞外基质以及相关信号分子的协同调控，包括促成骨活性因子，成骨细胞，外泌体等多种因素。BMSCs (骨髓间充质干细胞) 能够促进骨折缺损的愈合，不仅仅因为其自身的成骨分化，还通过其外泌体传递信息促进成骨。外泌体是一种纳米级脂质双层膜结构的微小囊泡，其内可装载细胞特异的蛋白、脂质和核酸等信息因子，能够作为信号分子传递给微环境中的细胞，使细胞向所需方向转化，BMSCs 来源的外泌体能够通过信息传递上调相关细胞的成骨基因的表达水平，如其内容物中的 miR-125b 可通过调控 Runx2/Osx 而促进 BMSCs 的成骨分化，

可能在骨折愈合、骨不连、骨缺损中发挥促进作用,在骨折局部创建富含外泌体的微环境可达到促进骨折愈合的效果。研究结果已证实外泌体在细胞成骨分化中发挥重要的促进作用^[10],BMSC来源的外泌体促进成骨细胞(osteoblast,OB)及BMSC的增殖和分化,提示它在骨修复过程中创建成骨微环境的潜能,研究同时发现在外泌体的促进下,BMSCs可分化成OB,细胞miRNAs的表达水平有显著的变化,而这些变化体现了Wnt信号通路被激活从而促进成骨分化,经外泌体作用后BMSC碱性磷酸酶(ALP)的活性增高,Runx2表达水平升高,其传递的骨分化作用信息包括大量与成骨分化相关的基因和蛋白,包括多种miRNA参与调控BMSC的成骨分化功能,miR-30d-5p等43个miRNA在外泌体中高表达,这种变化导致成骨细胞分化和功能改变。外泌体的促成骨作用已被证实,如何使外泌体作为促骨因子在骨折局部持续发挥作用是本研究要解决的关键问题,通过光固化水凝胶装载并随内固定物到达病灶部位发挥作用的思路在本项研究中得到了初步验证。

骨内置物表面的涂层技术可在手术部位形成促进成骨微环境的微环境,在创伤骨科领域尚未取得突破性进展,虽有应用于内固定物表面的涂层研究报道,仍需全长涂布,无法在术中根据情况灵活应用,未见临床应用的相关报道,未取得实质性突破^[6]。在水凝胶涂层的设计中,外泌体作为促成骨活性成分,光固化水凝胶作为其良好的载体,其性能在实验中得到了充分的验证。

在前期的实验中,课题组成功培养了骨髓间充质干细胞并提取了外泌体,与外泌体与光固化水凝胶混合后进行性能测试。结果表明水凝胶的表征符合三维拓扑样改变,与细胞基底膜结构类似,利于细胞贴附及增殖,混合外泌体后水凝胶表征无变化,可见表面有散在外泌体分布,透射电镜可见其内部外泌体较均匀分布,说明水凝胶可作为外泌体的良好载体,装载前后表征无明显变化,通过性能改良可实现与内固定物有效结合,术中随内固定物到达骨折部位。在性能测试中,水凝胶的光固化时间合理,允许其于术中涂布于内固定物相应部位,经滑痕验证其与金属结合力较好,这为后续进行动物体内实验提供了可靠依据。体外细胞实验的结果说明外泌体释放入水凝胶周围环境中并被细胞摄取,细胞相容性良好,细胞增殖及成骨分化情况良好,周围细胞的促成骨通路相关基因表达水平明显升高,说明载外泌体水凝胶涂层可创建持续促进成骨微环境。

综上所述,光固化水凝胶可作为外泌体的良好载体,能够精准结合骨科内置物创建成骨微环境,在可控范围内长期形成促进成骨环境,可为进一步的研究奠定基础。

[参考文献]

- [1]Mick P, Fischer C.Delayed Fracture Healing.Semin Musculoskelet Radiol. 2022 ,26(3):329-337.
- [2]Cao G, Pei F.Research progress of traumatic heterotopic ossification.Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.2022,36(3):386-394.
- [3]He SY, Yu B, Jiang N.Current Concepts of Fracture e-Related Infection.Int J Clin Pract. 2023:4839701.
- [4]Sun K, Wang C, Xiao J, Brodt MD, Yuan L, Yang T, Alippe Y, Hu H, Hao D, Abu-Amer Y, Silva MJ, Shen J, Mbalaviele G.Elife. Fracture healing is delayed in the absence of gasdermin-interleukin-1 signaling.2022 ,11:e75753.
- [5]Babst R, Beeres FJP, Link BC.Definitions and explanations on the topic of fracture reduction.Unfallchirurg. 2019 ,122(2):88-94.
- [6]Goto R, Nishida E, Kobayashi S, Aino M, Ohno T, Iwamura Y, Kikuchi T,Hayashi JI, Yamamoto G, Asakura M, Mitani A. GelatinMethacryloyl-Riboflavin(GelMA-RF) Hydrogels for Bone Regeneration. Int J Mol Sci. 2021 ,22(4):1635.
- [7]Barroso IA, Man K, Robinson TE, Cox SC, Ghag AK. Photocurable GelMA Adhesives for Corneal Perforations. Bioengineering (Basel).2022,9(2):53.
- [8]Kurian AG, Singh RK, Patel KD, Lee JH, Kim HW. Multifunctional GelMA platforms with nanomaterials for advanced tissue therapeutics. Bioact Mater. 2021,8:267-295.
- [9]Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions.Nat Rev Rheumatol. 2015 ,11(1):45-54.
- [10]Bohara S, Suthakorn J.Surface coating of orthopedic implant to enhance the osseointegration and reduction of bacterial colonization: a review. Biomater Res. 2022,26(1):26.

作者简介:

刘付伟贵(1998-),男,汉族,硕士研究生,茂名市人民医院,医师,骨修复与再生。

周继辉(1974-),男,汉族,博士,茂名市人民医院,主任医师,骨修复与再生,骨肉瘤的机制及靶向治疗。

基金项目:

茂名市科技计划项目(茂名市直医疗卫生机构科技计划专项,2024kjcXLX077):促成骨光固化水凝胶修复骨缺损的实验研究;茂名市科技计划项目(2024084):骨折内固定表面外泌体水凝胶促进成骨实验研究。