

冰晶重结晶法改善衰老软骨细胞浸润促进软骨缺损修复的研究

曹富铭^{1,2,3,4}, 张皓博^{1,2,3,4}, 张明铭^{1,2,3}, 葛思良^{1,2,3}, 高建朋^{1,2,3}, 尹鹏滨^{1,2,3}, 王虎飞^{1,2,3}, 范庆瑞⁵, 张里程^{1,2,3,4}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院骨科医学部, 北京 100048; ³国家骨科与运动康复临床医学研究中心, 北京 100048; ⁴解放军总医院第六医学中心骨科, 北京 100048; ⁵中国科学院理化技术研究所, 北京 100190

摘要: **背景** 软骨缺损常诱发软骨细胞衰老。现有相关研究多聚焦于正常软骨细胞在组织工程支架中的浸润, 对于衰老软骨细胞浸润的研究尚不充分。**目的** 探究衰老软骨细胞的浸润能力改变, 通过冰晶重结晶技术优化支架结构, 改善衰老软骨细胞在支架内的浸润。**方法** 采用共聚焦显微镜扫描重建法检测衰老软骨细胞与正常软骨细胞在常规冰模板明胶支架中的细胞浸润差异, 扫描电镜测量支架的孔径与孔隙率, 单轴压缩实验方法检测支架材料的压缩模量, 活/死染色方法检测支架材料对衰老软骨细胞的细胞存活率影响, CCK-8法和EdU染色法检测支架材料对衰老软骨细胞的增殖活力影响, 细胞骨架/细胞核染色方法检测衰老软骨细胞在两类支架中的细胞形态与浸润行为。通过大鼠软骨缺损模型实验评估支架材料在体内促软骨缺损修复的效果。**结果** 与正常软骨细胞比较, 衰老软骨细胞在常规冰模板法明胶支架内的浸润能力减弱($P < 0.01$)。冰晶重结晶法明胶支架的孔径大于常规冰模板支架 [(21.1±2.7) μm vs (8.0±1.6) μm, $P < 0.001$], 且拥有更高的孔隙率 ($P < 0.05$)。冰晶重结晶支架的压缩模量高于常规冰模板法 [(16.5±4.5) kPa vs (6.2±1.5) kPa, $P < 0.05$]。活/死染色、CCK-8实验与EdU染色结果均显示, 支架浸提液对细胞活性未产生抑制作用($P > 0.05$)。观察细胞形态发现冰晶重结晶明胶支架增强了衰老软骨细胞的黏附。培养4天与14天后, 衰老软骨细胞在冰晶重结晶明胶支架内的浸润深度高于常规冰模板法明胶支架[4天:(132±13.7) μm vs (41±6.2) μm, $P < 0.001$; 14天:(1 336.1±80.0) μm vs (929.3±105.0) μm, $P < 0.01$]。大鼠软骨缺损模型显示, 冰晶重结晶明胶支架促进了大鼠软骨修复($P < 0.001$)。**结论** 衰老软骨细胞在明胶支架内浸润能力减弱。冰晶重结晶法制备的新型明胶支架, 能够改善衰老软骨细胞的支架浸润, 促进软骨缺损修复愈合。

关键词: 软骨; 细胞衰老; 组织工程; 明胶; 冷冻凝胶

中图分类号: R681

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2026)01-0001-08

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25110601

引用本文: 曹富铭, 张皓博, 张明铭, 等. 冰晶重结晶法改善衰老软骨细胞浸润促进软骨缺损修复的研究 [J]. 解放军医学院学报, 2026, 47 (1): 1-8.

Ice crystal recrystallization promotes cartilage defect repair by enhancing infiltration of aged chondrocytes

CAO Fuming^{1,2,3,4}, ZHANG Haobo^{1,2,3,4}, ZHANG Mingming^{1,2,3}, GE Siliang^{1,2,3}, GAO Jianpeng^{1,2,3}, YIN Pengbin^{1,2,3}, WANG Hufei^{1,2,3}, FAN Qingrui⁵, ZHANG Licheng^{1,2,3,4}

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Senior Department of Orthopedic, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ³National Orthopedics and Sports Rehabilitation Clinical Research Center, Beijing 100048, China; ⁴Department of Orthopedics, the Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ⁵Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Corresponding author: ZHANG Licheng. Email: zhanglicheng218@126.com

Abstract: Background Cartilage defects often induce chondrocyte senescence. Current research primarily focuses on the infiltration of normal chondrocytes within tissue-engineered scaffolds, with studies on the infiltration of senescent chondrocytes remaining insufficient. **Objective** To investigate the altered infiltration capacity of senescent chondrocytes and to enhance their infiltration within scaffolds by optimizing scaffold structure via an ice recrystallization technology. **Methods** The differences in cell infiltration between senescent chondrocytes and normal chondrocytes within conventional ice-templated gelatin scaffolds were

收稿日期: 2025-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(92468017; 52573355)

第一作者: 曹富铭, 在读硕士。Email: cfm20000314@163.com

通信作者: 张里程, 博士, 主任医师。Email: zhanglicheng218@126.com

examined using confocal microscopy scanning and reconstruction. The pore size and porosity of the scaffolds were measured by scanning electron microscopy. The compressive modulus of the scaffold material was evaluated using a uniaxial compression test. The effect of the scaffold material on the survival rate of senescent chondrocytes was assessed by live/dead staining. The proliferative activity of senescent chondrocytes on the scaffold material was measured using the CCK-8 assay and EdU staining. Cell morphology and infiltration behavior of senescent chondrocytes in the two types of scaffolds were observed via cytoskeleton/nucleus staining. The in vivo effect of the scaffold material on promoting cartilage defect repair was evaluated using a rat cartilage defect model. **Results** Compared to normal chondrocytes, senescent chondrocytes exhibited a significantly weakened infiltration capacity within conventional ice-templated gelatin scaffolds ($P < 0.01$). The pore size of the gelatin scaffold prepared by the ice crystal recrystallization method was significantly larger than that of the conventional ice-templated scaffold ($21.1 \pm 2.7 \mu\text{m}$ vs $8.0 \pm 1.6 \mu\text{m}$, $P < 0.001$), while also exhibiting higher porosity ($P < 0.05$). The compressive modulus of ice recrystallized scaffolds was significantly higher than that of conventional ice-templated scaffolds ($16.5 \pm 4.5 \text{ kPa}$ vs $6.2 \pm 1.5 \text{ kPa}$, $P < 0.05$). Live/Dead staining, CCK-8 assay, and EdU staining indicated that scaffold extracts did not significantly inhibit cell viability ($P > 0.05$). Cell morphology observations showed that the ice recrystallized gelatin scaffold enhanced the adhesion of senescent chondrocytes. After 4 and 14 days of culture, the infiltration depth of senescent chondrocytes was significantly greater in ice recrystallized scaffolds compared to conventional ones (Day 4: $132 \pm 13.7 \mu\text{m}$ vs $41 \pm 6.2 \mu\text{m}$, $P < 0.001$; Day 14: $1336.1 \pm 80.0 \mu\text{m}$ vs $929.3 \pm 105.0 \mu\text{m}$, $P < 0.01$). The rat cartilage defect model demonstrated that the ice recrystallized gelatin scaffold significantly promoted cartilage repair ($P < 0.001$). **Conclusion** The infiltration capacity of senescent chondrocytes within gelatin scaffolds is diminished. A novel gelatin scaffold fabricated by the ice recrystallization method can enhance the infiltration of senescent chondrocytes and promote the repair and healing of cartilage defects.

Keywords: cartilage; cellular senescence; tissue engineering; gelatin; cryogels

Cited as: Cao FM, Zhang HB, Zhang MM, et al. Ice crystal recrystallization promotes cartilage defect repair by enhancing infiltration of aged chondrocytes[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2026, 47(1): 1-8.

软骨缺损多继发于关节创伤或退行性病变。由于软骨组织缺乏血管,其自我修复能力有限,缺损易进展为骨关节炎^[1-4]。常规临床治疗方法(如微骨折术)往往形成力学性能较差的纤维软骨,难以实现理想的透明软骨修复^[5-6]。组织工程技术为软骨修复提供了新途径,其中无细胞支架可引导内源性细胞迁移、浸润,并促进透明软骨再生^[7-8]。软骨细胞作为软骨中唯一的细胞类型,其在支架内的有效浸润是实现再生的关键环节^[9-10]。然而,软骨缺损常伴随软骨细胞的衰老,而衰老软骨细胞在支架中的浸润能力尚不明确^[11]。明胶具有良好生物相容性与可降解性,已被广泛用作组织工程支架材料^[12-14]。支架孔径是调控细胞浸润的关键物理因素之一^[15];大孔结构更有利于细胞迁移、营养物质交换,从而促进组织修复^[16]。冰模板法可制备具有良好生物安全性的大孔支架,在组织工程领域已有广泛应用^[17-23]。冰晶重结晶是指在温度或离子浓度变化时,已形成的冰晶再次生长、合并,形成更大尺寸冰晶的现象。利用重结晶的冰晶作为模板,经冷冻干燥后可制备出具有更大孔径的支架材料^[24-26]。基于此,本研究旨在明确衰老软骨细胞在明胶支架内的浸润能力,并进一步采用冰晶重结晶方法调控、优化支架孔径,以改善衰老软骨细胞的浸润效果,从而为软骨再生材料的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

明胶(北京,中国),戊二醛(麦克林,中国),75%乙醇(利尔康,中国),DMEM培养基(赛默飞,美国),1%青霉素-链霉素、胎牛血清(白鲨,中国),0.25% EDTA胰蛋白酶消化液(赛默飞,美国),鬼笔环肽(碧云天,中国),CCK-8试剂、活/死染色试剂盒(碧云天,中国),12孔板、T25细胞培养瓶(赛默飞,美国)。

1.2 主要实验设备

冷冻泵(Huber,德国),冷台(淘宝平台定制,中国),万能测试机(Instron,美国),扫描电子显微镜(JSM-6700F,日本),细胞培养箱、超速离心机(Thermo,美国),酶标仪(Tecan,德国),激光共聚焦显微镜(蔡司,德国)。

1.3 原代软骨细胞提取及多次传代法构建衰老软骨细胞模型

对2只5日龄SD大鼠实施安乐死后,分离其膝关节软骨组织并剪碎。采用0.25%Ⅱ型胶原酶消化组织2h以提取原代软骨细胞。为评估细胞衰老程度,分两组培养细胞至第2代(passage2, P2)与第15代(passage15, P15),通过 β -半乳糖苷酶染色试剂盒分别进行染色分析。动物实验部分已通过北京钰犴生物有限公司实验动物伦理委员会批准(批号:YM-25-008K02)。

1.4 常规冰模板法与冰晶重结晶法制备明胶支架

(1)常规冰模板法:将明胶经超声溶解于纯水中,配制成浓度为20 mg/mL的溶液。向该溶液中滴加戊二醛,使其终浓度为0.025% (v/v)。液氮速冻后,将样品在真空环境中冷冻干燥,形成支架。

(2)冰晶重结晶法:经液氮速冻后,将样品转入冷冻泵中升至预定温度(仍低于0°C),并在此条件下持续静置24 h,在真空环境中进行冷冻干燥,形成支架。

1.5 共聚焦显微镜扫描重建法检测软骨细胞的支架浸润性

将数量为 1×10^5 的衰老软骨细胞接种于培养基溶胀后的明胶支架表面,静置15 min待细胞附着后,补充完全培养基,并移入培养箱中进行常规培养。培养至第4天,采用4%多聚甲醛固定细胞,分别使用鬼笔环肽与DAPI对细胞骨架与细胞核进行染色。样品最终通过共聚焦显微镜进行扫描成像,并进一步通过三维重建技术分析细胞在支架内的渗透深度。共聚焦显微镜自上而下扫描,每间隔3 μm 采集一层图像,将细胞骨架荧光信号仍可辨识的最深层位置定义为细胞浸润深度。

1.6 扫描电镜法观察明胶支架的孔径与孔隙率

采用常规冰模板法与冰晶重结晶法分别制备明胶支架,于液氮中横断以暴露内部结构。使用导电胶将断面样品快速固定于样品台,经溅射镀金法对样品表面进行120 s金属涂层处理,增强导电性,利用电镜观察真空条件下样品微观形貌。

1.7 单轴压缩试验法检测明胶支架的压缩模量

使用数字卡尺测量并记录圆柱体样品的直径与高度。将样品置于万能试验机压缩平台中心,确保轴向载荷均匀分布。以恒定速率执行破坏性压缩程序,实时记录应力与应变数据,直至样品破坏。

1.8 活/死染色法检测明胶支架的细胞毒性

弃去培养板中的旧培养基,使用预冷PBS轻柔润洗细胞两次。用含有钙黄绿素与碘化丙啶的染色工作液覆盖细胞,于37°C培养箱避光孵育30 min。弃去染色液,PBS再次润洗,立即置于荧光或共聚焦显微镜下观察:488 nm激发光下活细胞呈绿色荧光,535 nm激发光下死细胞呈红色荧光。

1.9 EdU染色与CCK8实验检测明胶支架的增殖毒性

对数生长期细胞与含10 μM EdU的完全培养基于37°C、5% CO_2 条件下共孵育2 h。弃去培养基,PBS清洗细胞,4%多聚甲醛室温固定15 min。

经0.5% Triton X-100溶液室温通透化处理15 min后,PBS清洗3次。加入新鲜配制的Click反应混合液,室温避光反应30 min。彻底清洗去除未结合染料,Hoechst 33342复染细胞核,封片后于荧光显微镜下观察。通过计数随机视野中EdU阳性细胞(绿色荧光)占总细胞数(蓝色荧光)的比例计算细胞增殖率。

CCK-8实验,检测时,向每孔培养物中加入相当于总体积10%的CCK-8溶液。轻微振荡混匀后,将培养板送回培养箱继续避光孵育2 h。孵育结束后,立即使用多功能酶标仪于450 nm波长下测量各孔的吸光度值。细胞的相对活力通过实验组(冰晶重结晶法)、对照组(常规冰模板法)与空白对照组的OD值进行计算。

1.10 细胞骨架及细胞核染色观察细胞黏附

将 1×10^5 衰老软骨细胞接种于明胶支架表面,静置15 min后加入细胞培养基,放入培养箱内培养。培养至第4天,多聚甲醛固定后,使用鬼笔环肽和DAPI分别对细胞骨架及细胞核进行染色,置于共聚焦显微镜下进行扫描。

1.11 股骨滑车沟钻孔法构建大鼠软骨缺损模型

将SD大鼠麻醉,膝关节区域剃毛消毒。在髌骨内侧切开皮肤与皮下组织,使髌骨脱位,暴露滑车关节面。使用直径2 mm环钻垂直钻取,制备全层软骨缺损,随后植入支架。复位髌骨后逐层缝合伤口。

1.12 统计学分析

所有实验每组条件至少设置3个独立重复。采用GraphPad Prism 9.0软件进行数据分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 连续多次传代导致软骨细胞形态改变

光镜下未染色图像显示,第15代软骨细胞相较于第2代软骨细胞,细胞体积增大,形态不规则,表现出细胞衰老的特征(图1A)。

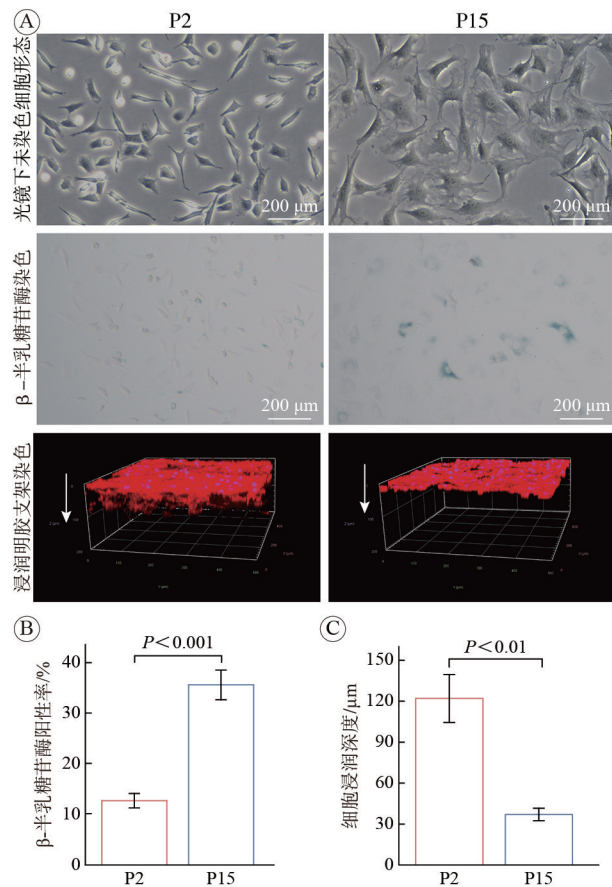
2.2 通过连续多次传代构建衰老软骨细胞模型

β -半乳糖苷酶染色结果表明,第15代软骨细胞中阳性染色细胞比例较第2代升高($12.7\% \pm 1.4\%$ vs $35.6\% \pm 2.9\%$, $P < 0.001$),证实通过连续传代可成功构建衰老软骨细胞模型。见图1。

2.3 衰老软骨细胞在明胶支架内浸润减弱

将年轻与衰老软骨细胞分别接种于常规冰模板

法支架表面。培养4 d后,对细胞骨架与细胞核进行染色,通过共聚焦显微镜扫描并进行3D重建(图1A)。结果显示衰老软骨细胞在支架内的浸润深度低于年轻细胞[(37.0 ± 4.6) μm vs (122.0 ± 17.6) μm, $P < 0.01$](图1C)。



A: P2与P15软骨细胞光镜下未染色、β-半乳糖苷酶染色及浸润明胶支架染色图($\times 10$); B: β-半乳糖苷酶染色定量分析; C: P2与P15软骨细胞在明胶支架内浸润深度分析。

图1 衰老软骨细胞模型构建与其在支架内浸润性

Fig. 1 Construction of the senescent chondrocyte model and their infiltration within scaffolds

2.4 冰晶重结晶明胶支架的外观

常规冰模板法与冰晶重结晶法制备的两种明胶支架,在真空冷冻干燥后均呈现乳白色、规则圆柱体形态,且表面可见细微褶皱。冰晶重结晶法制得的明胶支架略微泛黄,可能归因于其内部更高的戊二醛交联(图2A)。

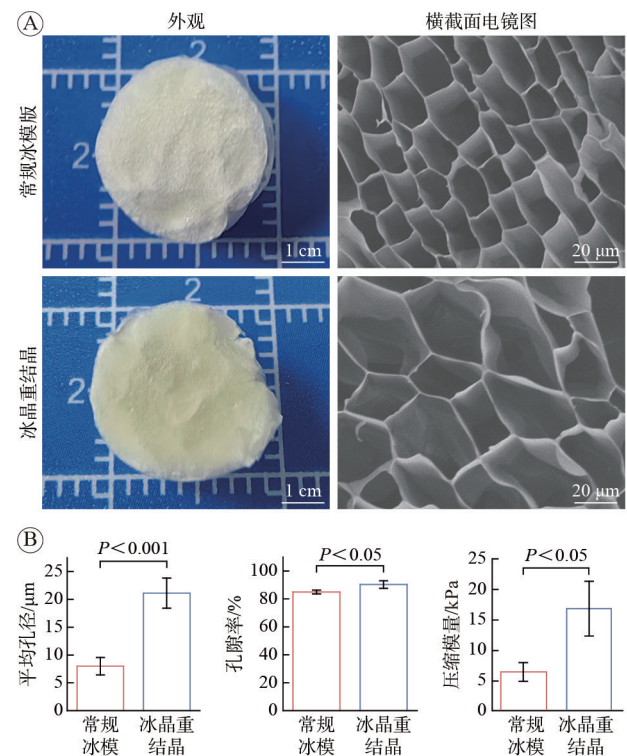
2.5 冰晶重结晶法增大明胶支架的孔径及孔隙率

将支架样品横断后,采用扫描电子显微镜观察其微观形貌。结果显示,常规冰模板法与冰晶重结晶法制备的明胶支架,呈现出均匀分布的大孔结构(图2A)。通过图像分析测量孔径发现,冰晶重结晶法制备的明胶水凝胶平均孔径约为常规

冰模板法制备样品孔径的2.5倍[(21.1 ± 2.7) μm vs (8.0 ± 1.6) μm, $P < 0.001$](图2B)。对电镜图像进行分割计算,发现冰晶重结晶法制备的明胶支架的孔隙率高于常规冰模板法[90.3% ± 2.6% vs 84.9% ± 1.4%, $P < 0.05$]。该结果提示,冰晶重结晶法能够增大明胶支架的孔径与孔隙率。

2.6 冰晶重结晶法增强明胶支架的力学性能

对各组样品进行的破坏性压缩测试结果显示,两种方法制备的明胶水凝胶在力学性能上存在显著差异。冰晶重结晶法所得样品的压缩模量为(16.5 ± 4.5) kPa,约为液氮速冻法样品(6.2 ± 1.5 kPa)的2.7倍。这一结果表明,冰晶重结晶法处理可增强明胶支架的力学强度($P < 0.05$)(图2B)。



A: 常规冰模板与冰晶重结晶明胶支架的外观及横截面电镜图($\times 1000$);

B: 常规冰模板与冰晶重结晶明胶支架的平均孔径、孔隙率、压缩模量分析。

图2 常规冰模板与冰晶重结晶明胶支架的表征

Fig. 2 Characterization of conventional ice-templated and ice recrystallized gelatin scaffolds

2.7 冰晶重结晶明胶支架的生物安全性良好

将各组支架以100 mg/mL浓度浸没于细胞培养基中,于72 h后收集浸提液,评估材料生物相容性。使用100%浓度浸提液培养衰老软骨细胞24 h,并通过活/死染色检测细胞活性(图3A)。结果显示,常规冰模板组与冰晶重结晶组的细胞存活率均接近100%($P > 0.05$),表明冰晶重结晶法制备的明胶

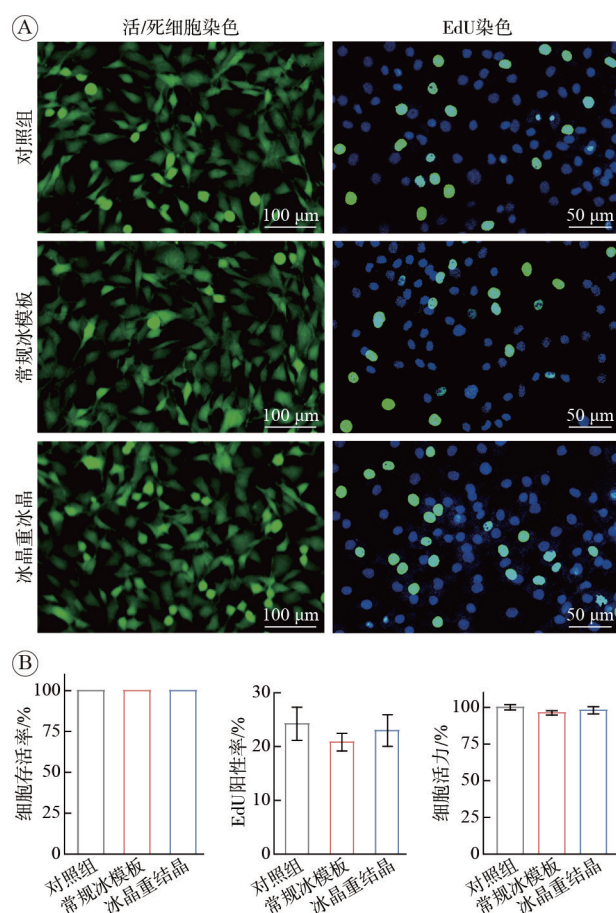
支架无细胞毒性(图3B)。

通过EdU染色直接观察了100%浸提液对衰老软骨细胞增殖的影响(图3A)。定量分析显示,冰晶重结晶法组及常规冰模板法组与对照组之间的EdU阳性细胞比率均无统计学差异($P>0.05$)(图3B)。该结果表明,冰晶重结晶法制备的明胶支架具有良好的生物相容性,不会对细胞的正常增殖活动产生抑制作用。

为评估材料对细胞增殖的影响,使用CCK-8法检测经100%支架浸提液处理24 h的衰老软骨细胞活力。结果表明,冰晶重结晶法组和常规冰模板法组与对照组的细胞活力未呈现统计学差异($P>0.05$)(图3B),提示冰晶重结晶法制备的明胶支架生物相容性良好,不会影响软骨细胞活力。

2.8 冰晶重结晶明胶支架增强衰老软骨细胞的黏附

对接种于支架上的衰老软骨细胞进行染色,



A: 光镜下各组浸提液培养后的活/死细胞染色图($\times 4$)和EdU染色图($\times 10$); B: 各组浸提液培养后的活/死细胞染色细胞存活率、EdU阳性率及CCK-8实验细胞活力分析。

图3 常规冰模板与冰晶重结晶明胶支架的生物安全性

Fig. 3 Biocompatibility of conventional ice-templated and ice recrystallized gelatin scaffolds

并通过共聚焦显微镜观察其形态。结果显示,相较于常规冰模板法支架,冰晶重结晶支架上的细胞展现出更为丰富的丝状伪足,且细胞体伸展更充分,提示其在该材料内具有更佳的黏附状态(图4A)。

2.9 冰晶重结晶明胶支架促进衰老软骨细胞浸润

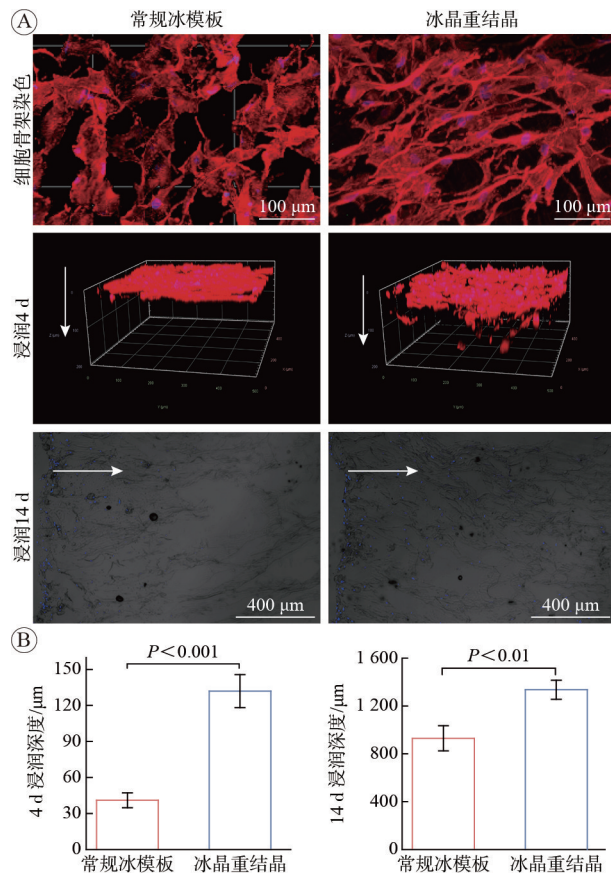
将衰老软骨细胞分别接种于两种支架表面,培养4 d后,通过细胞骨架/细胞核荧光染色及共聚焦显微镜三维重建分析细胞的渗透行为(图4A)。定量结果显示,细胞在冰晶重结晶法支架中的渗透深度大于在常规冰模板法支架中的深度[(132 ± 13.7) μm vs (41 ± 6.2) μm , $P<0.001$],表明冰晶重结晶策略有效提升了衰老软骨细胞向支架内部的迁移浸润能力(图4B)。将衰老软骨细胞分别接种于两种支架表面并培养14 d。固定后对支架进行纵向切片及细胞核染色,通过共聚焦显微镜观察细胞的空间分布(图4A)。结果显示细胞在冰晶重结晶明胶支架中的浸润深度大于常规冰模板支架[(1336.1 ± 80.0) μm vs (929.3 ± 105.0) μm , $P<0.01$],表明冰晶重结晶法能够促进衰老软骨细胞的长期浸润(图4B)。

2.10 冰晶重结晶明胶支架促进软骨缺损的修复

光镜下图片显示,对照组缺损区域底部仅有少量新生组织形成,关节软骨表面仍可见较大的未愈合缺损区域。常规冰模板组,缺损区域被灰白色纤维组织部分填充,修复组织表面不平整,且低于软骨面。冰晶重结晶组,缺损区域被白色透明的类软骨组织填充,修复组织表面较为平滑,与周围正常软骨整合良好(图5A)。根据缺损处的大体图进行评分,结果显示冰晶重结晶组的ICRS评分高于常规冰模板组与对照组($P<0.01$)(图5B),表明其具有良好的促软骨缺损修复能力。

HE染色结果显示,对照组缺损区域表面不连续,深层与软骨下骨界限不清,未形成正常的软骨结构。常规冰模板组,缺损区域被细胞外基质和细胞填充,但纤维排列紊乱,且与正常软骨整合不佳。冰晶重结晶组,软骨下骨结构恢复较好,软骨组织修复较平滑,与周围正常软骨面高度较一致,进一步证明其促软骨缺损修复能力(图5A)。

番红固绿染色结果显示,对照组缺损区域分布杂乱的固绿色,几乎未被番红染成红色,提示较多的纤维化与较少的透明软骨形成。常规冰模板组,修复组织底部有不均匀的番红O阳性染色,提示一定程度的软骨再生,但与周围软骨的整合



A: 共聚焦显微镜下衰老软骨细胞在常规冰模板与冰晶重结晶明胶支架上的黏附及浸润图(4 d和14 d, $\times 10$); B: 4 d和14 d衰老软骨细胞在常规冰模板与冰晶重结晶明胶支架内的浸润深度分析。

图4 衰老软骨细胞在常规冰模板与冰晶重结晶明胶支架内的黏附与浸润

Fig. 4 Adhesion and infiltration of senescent chondrocytes in conventional ice-templated and ice recrystallized gelatin scaffolds

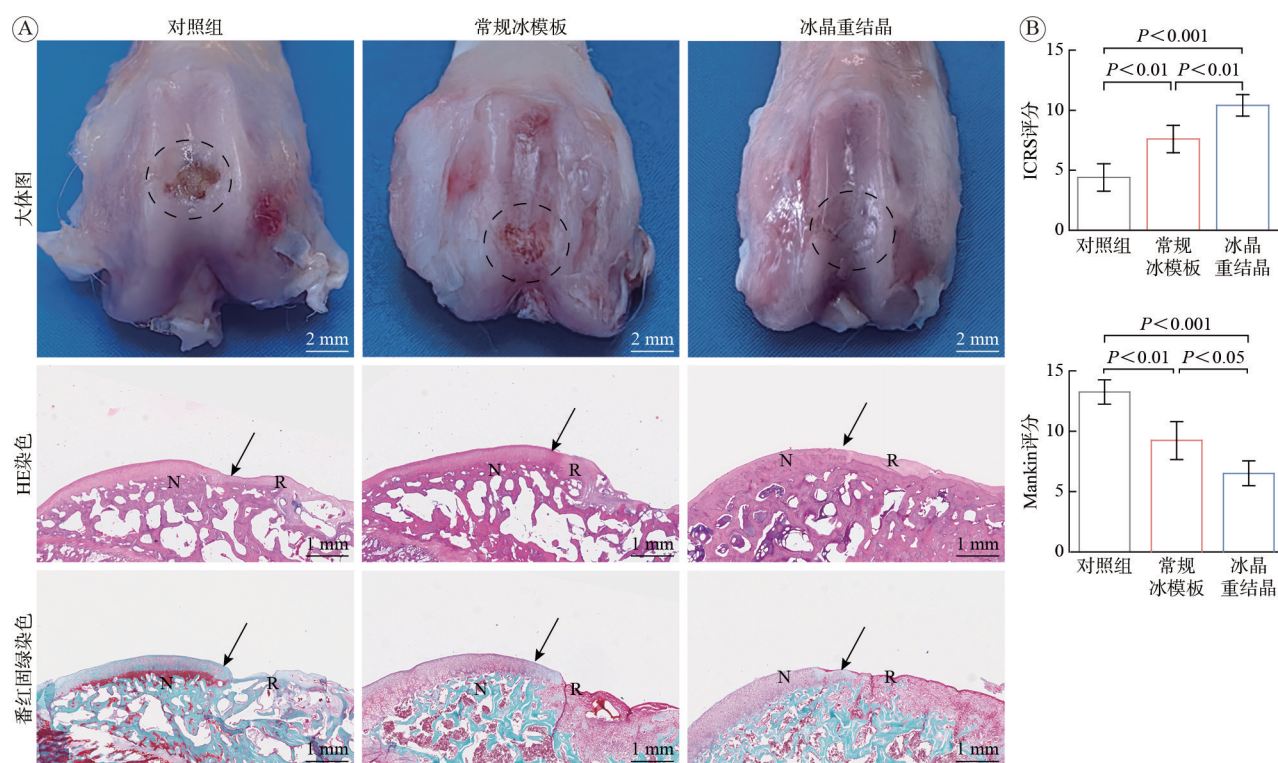
不佳。冰晶重结晶组的修复组织呈现较均匀的番红O阳性染色,染色强度与周围正常软骨区域相近,固绿染色也显示更为有序的胶原网络结构(图5A)。根据缺损区域番红固绿染色进行评分,结果显示冰晶重结晶组的Mankin评分分别低于常规冰模板组($P < 0.05$)和对照组($P < 0.001$)(图5B)。该结果提示了高质量的透明软骨再生,验证了冰晶重结晶明胶支架促进软骨缺损修复的能力。

3 讨论

关节软骨缺损的修复是临床与组织工程领域共同面临的挑战。由于软骨组织自身缺乏血管及神经支配,损伤后的自我修复能力十分有限^[27]。目前关节镜手术、微骨折及软骨移植等临床手段虽能缓解症状,但其生成的纤维软骨在性能上与透明软骨存在显著差距^[5-6]。因此,探索能够引导高质量透明软骨再生的新策略至关重要。

组织工程,特别是无细胞支架技术,通过引导宿主内源性细胞向缺损部位迁移、分化等,为软骨高质量再生提供了广阔的前景^[28]。在此过程中,作为软骨组织唯一的细胞类型^[29],软骨细胞在支架内的有效浸润是组织成功修复的先决条件^[9]。既往研究表明,关节创伤、退变等病理微环境下,软骨细胞常出现衰老表型^[11]。而衰老软骨细胞在三维支架环境中的浸润能力是否受损,目前尚不明确。因此,本研究探索了衰老软骨细胞在明胶支架内的浸润能力,研究结果表明,相较于正常软骨细胞,衰老软骨细胞对于明胶支架的浸润能力明显减弱。细胞衰老表现为不可逆的细胞周期停滞;同时有研究表明,细胞的迁移能力随细胞衰老降低^[30]。因此,衰老软骨细胞在明胶支架内浸润减弱,可能归因于其降低的增殖和迁移能力。该研究结果提示,既往关于组织工程支架细胞浸润的体外研究模型可能存在一定的局限性,未能完全模拟体内复杂的病理微环境。因此,在未来的支架设计与性能评估中,可能需要引入更具代表性的病理性细胞模型。

支架的孔径是调控细胞浸润、营养物质传输及新组织形成的关键结构参数^[15-16]。研究表明,具有相互连通大孔结构的支架更有利于细胞迁移和组织长入^[17]。然而,传统制备大孔支架的方法常涉及化学致孔剂的使用,可能带来生物安全隐患^[18],并可能牺牲材料的力学强度^[19-20]。冰模板法是一种绿色、安全的物理成孔技术,通过调控冰晶的生长与形态来构筑支架的孔结构,在组织工程领域应用广泛^[21-24]。冰晶重结晶是指在特定物理条件下,已形成的小冰晶发生再次生长与融合,最终形成更大尺寸冰晶的现象^[25]。课题组前期研究已证实,利用重结晶冰晶作为模板,可成功获得孔径增大的支架^[26]。因此,本研究利用冰晶重结晶法制备了新型明胶支架,有效增强了衰老软骨细胞在支架内部的浸润。这一作用主要源自以下两方面机制:(1)增大的孔径。有大量研究表明,孔径是细胞能否迁移进入支架内部的决定性因素^[18,31]。本研究采用冰晶重结晶技术,直接增大了明胶支架的孔径,有效降低了材料本身对细胞迁移的物理阻碍,为细胞的深度浸润构建了结构基础。(2)增强的力学性能。支架刚度的提升,可能在培养过程中有效抵抗了细胞收缩和外部压力所导致的结构塌陷,从而维持了内部大孔的连通性,为细胞浸润提供了稳定的物理通道。同时,有文



A: 支架植入12W后, 缺损部位的大体图以及光镜下HE染色及番红固绿染色(N: 正常组织; R: 缺损修复组织; $\times 10$); B: 支架植入12W后, 缺损部位的ICRS评分、Mankin评分。

图5 冰晶重结晶明胶支架促进软骨缺损修复的效果评价

Fig. 5 Evaluation of the effect of ice crystal recrystallized gelatin scaffold on promoting cartilage defect repair

献研究表明, 适度增强的基底刚度能为细胞提供必要的机械支撑, 促进细胞骨架张力产生与黏着斑成熟, 为细胞的黏附与迁移创造有利条件^[32]。

本研究通过大鼠软骨缺损模型系统验证了冰晶重结晶明胶支架促进软骨修复的能力。大体观察、HE及番红固绿染色一致表明, 该支架能够促进高质量的软骨再生, 此结果与前期体外研究发现高度吻合。根据该结果进一步得出以下推论: 对照组中, 由于缺乏支架的桥接作用, 缺损区两侧的软骨细胞难以向中心区域有效迁移, 导致软骨再生能力不足。常规冰模板组虽然填充了缺损区域, 但其孔径较小、结构稳定性欠佳, 限制了软骨细胞向支架内部的迁移与浸润, 因而修复效果仍不理想。相比之下, 冰晶重结晶法制备的明胶支架具有更大的孔径和更强的结构稳定性, 不仅有利于软骨细胞在表面爬行, 还能促进细胞向支架内部浸润, 从而更充分地利用支架的三维空间, 有效提高缺损区域的修复效率。进一步从材料-生物界面交互的角度分析, 高质量的软骨修复需要支架材料具备相应的力学功能和生物化学特性^[33-34]。本研究中冰晶重结晶明胶支架组所表现出的更丰富的糖胺聚糖沉积和更完整的软骨样结构, 提示该支架可能通过优化细胞浸润

和空间分布, 促进了更具功能的软骨细胞外基质的合成与有序组装。这可能是由于其孔径结构与力学性能为细胞提供了更接近于天然软骨细胞外基质的三维微环境, 有利于细胞-细胞及细胞-基质间的信号传导, 进而调控细胞表型和合成代谢活动。

综上所述, 本研究发现衰老软骨细胞在明胶支架内的浸润性减弱, 为内源性细胞的调控提供了新视角。利用冰晶重结晶法制备孔径增大、力学增强的明胶支架, 促进了衰老软骨细胞在支架内的浸润, 为软骨组织工程支架的制备提供了改良方案。本研究仍存在一些局限性, 如, 我们尚未使用该支架搭载药物以进一步发挥协同抗衰老作用, 也未在大动物模型上验证该明胶支架的转化应用潜力。未来我们将尝试使用冰晶重结晶支架搭载衰老细胞治疗药物, 进一步增强软骨细胞在支架内的迁移、增殖以及分泌, 为软骨缺损的组织工程治疗提供新策略。

作者贡献 曹富铭: 实验操作, 数据分析, 文章撰写; 张皓博、张明铭、葛思良: 文献收集整理; 高建朋、尹鹏滨、王虎飞: 文章修改与校正; 范庆瑞, 张里程: 研究设计与指导。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本篇论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: cfm20000314@163.com。

参考文献

- Pang QM, Chen ZL, Li XH, et al. Cytokine-activated mesenchymal-stem-cell-derived extracellular matrix facilitates cartilage repair by enhancing chondrocyte homeostasis and chondrogenesis of recruited stem cells [J]. *Research*, 2025, 8: 700.
- Li LW, Li Z, Yue MX, et al. Mechano-iontronic hydrogels generating biomimetic endogenous bioelectricity for promoting cartilage regeneration [J]. *Adv Mater*, 2026, 38 (2): e14604.
- 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.
- Liu YX, Shah KM, Luo J. Strategies for articular cartilage repair and regeneration [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 770655.
- Chen HN, Tao X, Liu JB, et al. Inflammatory responsive hydrogels incorporated with bevacizumab-loaded infinite coordination nanoparticles for accelerating cartilage repair [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2025, 700: 138484.
- Gong TX, Zhang ZL, Liu XY, et al. Microstructurally and mechanically tunable acellular hydrogel scaffold using carboxymethyl cellulose for potential osteochondral tissue engineering [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253: 126658.
- Liu Y, Liu L, Li JW, et al. Scaffold-guided subchondral bone repair enables endogenous stem cell - driven cartilage regeneration in osteochondral defects [J/OL]. <https://doi.org/10.1002/adhm.202502394>.
- Gao JM, Ding XQ, Yu XY, et al. Cell-free bilayered porous scaffolds for osteochondral regeneration fabricated by continuous 3D-printing using nascent physical hydrogel as ink [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10 (3): 2001404.
- 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.
- Schwab A, Wesdorp MA, Xu JT, et al. Modulating design parameters to drive cell invasion into hydrogels for osteochondral tissue formation [J]. *J Orthop Transl*, 2023, 41: 42-53.
- Xu L, Ma FB, Huang J, et al. Metformin hydrochloride encapsulation by alginate strontium hydrogel for cartilage regeneration by relieving cellular senescence [J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22 (2): 671-680.
- Zhao CK, Li X, Han XW, et al. Molecular co-assembled strategy tuning protein conformation for cartilage regeneration [J]. *Nat Commun*, 2024, 15: 1488.
- Cesquim MG, Lopes LR, da Silva LD, et al. Advances in chitosan/gelatin scaffold design: Bridging manufacturing, crosslinking, and structure - Function dynamics [J]. *Carbohydr Polym*, 2026, 373: 124658.
- Anselmi C, Dal-Fabbro R, Abada H, et al. Bilayer gelatin-methacryloyl scaffold for pulp inflammation suppression and dentin-like tissue regeneration [J]. *J Control Release*, 2026, 389: 114469.
- Rodriguez-Rivera GJ, Sharma S, Maduka CV, et al. Microgel aspect ratio influences injectable granular hydrogel scaffold pore structure and cellular invasion for tissue repair [J]. *Adv Sci*, 2025, 12 (43): e11513.
- 高建朋, 朱正国, 李明, 等. 基于天然骨仿生的骨组织工程设计综述 [J]. *解放军医学院学报*, 2024, 45 (7): 789-793.
- Gonella S, Domingues MF, Miguel F, et al. Fabrication and characterization of porous PEGDA hydrogels for articular cartilage regeneration [J]. *Gels*, 2024, 10 (7): 422.
- Fan CJ, Wang DA. Macroporous hydrogel scaffolds for three-dimensional cell culture and tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 23 (5): 451-461.
- Niu LX, Chen SJ, Guo XS, et al. Mechanically robust polyvinyl alcohol/silk fibroin cryogels via freeze - thaw processing for cartilage defect repair [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 323: 147122.
- Alsaid Y, Wu SW, Wu D, et al. Tunable sponge-like hierarchically porous hydrogels with simultaneously enhanced diffusivity and mechanical properties [J]. *Adv Mater*, 2021, 33 (20): 2008235.
- Diaz F, Forsyth N, Boccaccini AR. Aligned ice templated biomaterial strategies for the musculoskeletal system [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12 (21): 2203205.
- Wang XY, Shi YD, Li XM, et al. Highly porous cryogel composed of bone matrix derived dECM and laponite for vascularized bone regeneration [J]. *Biomed Mater*, 2025, 20 (6): 065011.
- 张舒婷, 赵星, 杨伟. 双向冷冻法制备的取向多层MXene/PVA水凝胶的细菌屏蔽作用及对肠道缺损的修复 [J]. *四川大学学报*, 2024, 55 (4): 838-844.
- 毛智南, 毕雪薇, 舒雄, 等. 丝蛋白软骨支架力学特性及其对关节软骨原位再生的影响 [J]. *骨科临床与研究杂志*, 2023, 8 (5): 281-286.
- Yang WT, Liao YC, Sun ZR. Atomistic insights into the chain-length-dependent antifreeze activity of oligoprolines [J]. *Biomacromolecules*, 2025, 26 (8): 4886-4897.
- Wu SW, Zhu CQ, He ZY, et al. Ion-specific ice recrystallization provides a facile approach for the fabrication of porous materials [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15154.
- 魏祥, 魏凌飞, 徐纯峰, 等. 负载牛磺熊去氧胆酸的光交联明胶水凝胶支架在兔膝关节软骨缺损修复中的效能 [J]. *上海交通大学学报*, 2025, 45 (7): 829-837.
- Lin TH, Wang HC, Cheng WH, et al. Osteochondral tissue regeneration using a tyramine-modified bilayered PLGA scaffold combined with articular chondrocytes in a porcine model [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (2): 326.
- 运行, 魏钰, 魏民. 瘦素对骨关节炎中软骨细胞线粒体自噬状态的影响 [J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42 (5): 555-559.
- Cecchini A, Loreti M, Kaufman CD, et al. Tenascin-C from the tissue microenvironment promotes muscle stem cell maintenance and function through Annexin A2 [J]. *Commun Biol*, 2025, 8: 1709.
- Guo YQ, Mou S, Suo LT, et al. Porous granular hydrogel scaffolds biofabricated from dual-crosslinked hydrogel microparticles for breast tissue engineering [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 33: 102006.
- Jiang SM, Lyu C, Zhao P, et al. Cryoprotectant enables structural control of porous scaffolds for exploration of cellular mechano-responsiveness in 3D [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3491.
- Chen YW, Fu T, Zou ZF, et al. Biological reinforced concrete for cartilage repair with 3D printing [J]. *Adv Sci*, 2025, 12 (16): 2416734.
- Li ZA, Tang JC, Zhou L, et al. MicroSphere 3D structures delay tissue senescence through mechanotransduction [J]. *ACS Nano*, 2025, 19 (2): 2695-2714.

(责任编辑: 孟晓彤)