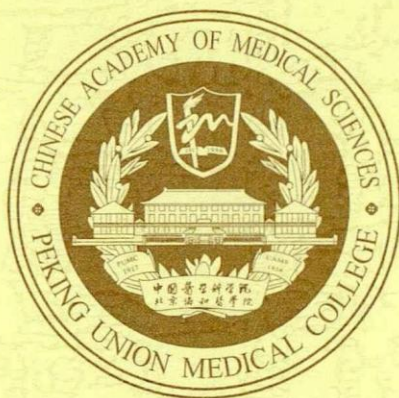


北京協和醫學院
中國醫藥科學院

碩士研究生學位論文



北京協和醫學院研究生院

硕 士 学 位 论 文

改性柑橘果胶在关节软骨修复中的作用机制及其 应用基础研究

所 院 : 生物医学工程研究所

姓 名 : 何嘉越

指导教师: 李学敏 研究员

导师小组: 李学敏 研究员

刘玲蓉 研究员

张明明 研究员

学科专业: 生物医学工程

研究方向: 生物医学材料

完成日期: 2024 年 5 月

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 改性柑橘果胶的来源.....	1
1.2 改性柑橘果胶的结构.....	3
1.3 MCP 的作用机制	4
1.4 MCP 的生物活性	5
1.4.1 免疫调节.....	5
1.4.2 抗肿瘤.....	6
1.4.3 抗纤维化.....	7
1.4.4 抗炎.....	8
1.4.5 吸附重金属.....	8
1.4.6 抗氧化.....	9
1.4.7 其他.....	9
1.5 课题提出与主要研究内容	9
第二章 MCP 在关节软骨组织和细胞内的分布及其作用机制的研究	11
2.1 前言	11
2.2 试剂与仪器.....	12
2.2.1 试剂与耗材.....	12
2.2.2 仪器设备.....	13
2.3 实验方法.....	14
2.3.1 荧光标记 MCP 的制备与表征	14
2.3.2 MCP 的关节内注射和清除	17
2.3.3 含 MCP 培养液的配制	18
2.3.4 关节软骨外植体的培养.....	18
2.3.5 关节软骨细胞的培养.....	20
2.3.6 转录组学数据分析.....	22
2.3.7 MCP 对软骨细胞自噬相关基因表达的影响	22
2.3.8 软骨细胞的 RNA 提取	23
2.3.9 实时反转录 PCR (RT-qPCR).....	23
2.3.10 数据处理与分析.....	23
2.4 实验结果.....	24
2.4.1 MCP 荧光标记物的表征	24
2.4.2 荧光标记 MCP 在关节内的保留	28
2.4.3 荧光标记 MCP 的生物相容性	29

2.4.4 荧光标记 MCP 的外植体渗透	31
2.4.5 荧光标记 MCP 对软骨细胞的作用	34
2.4.6 KEGG 数据分析	37
2.4.7 MCP 对软骨细胞自噬相关基因表达的影响	39
2.5 讨论	41
2.6 本章小结	45
第三章 MCP 对关节软骨细胞糖酵解代谢的影响	46
3.1 前言	46
3.2 试剂和仪器	47
3.2.1 试剂	47
3.2.2 仪器设备	48
3.3 实验方法	48
3.3.1 转录组学数据分析	49
3.3.2 软骨细胞的提取与培养	49
3.3.3 含 MCP 的细胞培养液的配制	49
3.3.4 MCP 对软骨细胞的糖酵解的影响	49
3.3.5 MCP 对连续传代软骨细胞的糖酵解的影响	49
3.3.6 MCP 对 IL-1 β 诱导后的软骨细胞的糖酵解的影响	49
3.3.7 MCP 对阻断糖酵解途径的软骨细胞糖酵解的影响	50
3.3.8 CCK-8 实验	50
3.3.9 乳酸生成量及葡萄糖摄取量检测	51
3.3.10 RT-qPCR	52
3.3.11 II型胶原的免疫荧光染色	53
3.3.12 统计学分析	53
3.4 结果	53
3.4.1 KEGG 数据分析	53
3.4.2 软骨细胞数—吸光度标准曲线	55
3.4.3 乳酸和葡萄糖浓度标准曲线	56
3.4.4 MCP 对关节软骨细胞糖酵解的影响	56
3.4.5 MCP 对连续传代过程中关节软骨细胞糖酵解的影响	57
3.4.6 MCP 对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞糖酵解的影响	60
3.4.7 阻断糖酵解后 MCP 对关节软骨细胞糖酵解的影响	61
3.5 讨论	63
3.6 本章小结	66
第四章 复合 MCP 的可德兰水凝胶的制备及表征	67
4.1 前言	67
4.2 试剂仪器	69
4.2.1 试剂与耗材	69

4.2.2 仪器设备.....	69
4.3 实验方法.....	69
4.3.1 Curdlan-MCP 水凝胶的制备	69
4.3.2 Curdlan-MCP 水凝胶的表征	70
4.3.3 统计学分析	72
4.4 结果	72
4.4.1 Curdlan-MCP 的成凝胶作用	72
4.4.2 Curdlan-MCP 水凝胶的可注射性	74
4.4.3 Curdlan-MCP 水凝胶的 FT-IR	74
4.4.4 Curdlan-MCP 水凝胶的弹性模量	75
4.4.5 Curdlan-MCP 水凝胶的扫描电镜观察	76
4.4.6 Curdlan-MCP 水凝胶的含水量及溶胀性能	76
4.4.7 Curdlan-MCP 水凝胶对 MCP 的释放	71
4.4.8 Curdlan-MCP 水凝胶的降解	79
4.4.9 Curdlan-MCP 水凝胶的葡萄糖生成	80
4.5 讨论	80
4.6 本章小结	83
全文总结	84
参考文献	85

摘要

改性柑橘果胶 (Modified Citrus Pectin, MCP) 是柑橘果胶经物理、化学和生物改性得到的富含 β -半乳糖的可溶性天然多糖。MCP 具有低分子量和低酯化度的特点, 可以被小肠上皮吸收进入血液循环发挥多效性作用。MCP 除了作为可溶性膳食纤维, 改善肠道微生物群发挥免疫调节作用外, 还能与半乳糖苷凝集素-3 (Galectin-3, Gal-3) 结合发挥抗癌、抗炎、抗氧化和抗组织纤维化等作用。课题组前期研究发现, MCP 具有促进软骨细胞增殖、维持软骨细胞表型的作用; 在体内, MCP 可以通过调控炎症反应和组织代谢等过程, 保护关节软骨缺损周围组织、细胞活性, 减轻或延缓轻、中重度骨关节炎 (Osteoarthritis, OA) 的进展, 在 OA 治疗中具有良好的应用前景。但 MCP 在软骨损伤修复及 OA 治疗过程中发挥的多效性作用的具体机制仍未完全明了。基于此, 为优化 MCP 在关节软骨损伤和 OA 治疗中的应用, 本文拟对 MCP 在关节软骨修复中的具体机制展开研究, 并在此基础上, 设计并构建用于关节软骨修复的新型 MCP 复合材料。主要研究内容及结论如下:

(1) MCP 在关节软骨组织和细胞内的分布及其作用机制

通过荧光标记技术将荧光染料 5-氨基荧光素和 Cy5 酰肼与 MCP 偶联结合, 制备具有荧光特性的 MCP, 并对其进行表征; 进一步通过荧光示踪、活体成像技术和免疫荧光染色等方法, 考察 MCP 在关节内、软骨组织和软骨细胞内的分布和定位情况; 最后, 结合对课题组前期研究数据的重分析基础上, 探讨 MCP 在软骨修复中的具体作用的机制。研究发现, MCP 可以穿透软骨组织并进入软骨细胞; MCP 被软骨细胞摄取后, 通过与溶酶体膜上的 Gal-3 结合而富集于溶酶体; MCP 可能通过调控软骨细胞的自噬途径, 进而发挥其维持软骨细胞稳态等的作用。

(2) MCP 对关节软骨细胞糖酵解代谢的影响

以含 MCP 的培养基培养关节软骨细胞, 通过检测软骨细胞的葡萄糖摄取、乳酸生成、糖酵解和细胞外基质合成相关基因表达等的情况, 考察 MCP 对软骨细胞、连续传代的软骨细胞以及经白介素-1 β 和 2-D-脱氧-葡萄糖诱导的软骨细胞的糖酵解代谢的影响。研究发现, MCP 可以通过促进葡萄糖摄取及激活缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α) 通路等, 调节软骨细胞糖酵解途径的作用, 进而发挥促进软骨细胞的增殖、上调细胞外基质合成、维持软骨细胞表型和减缓软骨细胞衰老的作用。

(3) 复合 MCP 的可德兰水凝胶的制备和表征

将不同浓度的 MCP 和可德兰 (Curdlan) 复合, 制备 Curdlan-MCP 复合水凝胶,

进一步对其流变学、红外、抗压强度、形貌结构、含水量、溶胀率、体外释放和降解等理化性能进行表征,探讨可德兰用于 MCP 长期递送的可行性。研究发现, MCP 与 Curdlan 可以通过简单的方法复合制备成水凝胶材料,所制备的 Curdlan-MCP 水凝胶具有良好的可注射性和可降解性,并对 MCP 具有可调控的缓释作用。

综上所述,本文研究了 MCP 在关节软骨损伤修复中的具体机制。结果发现: MCP 能够穿透软骨组织进入软骨细胞,并富集于溶酶体,调控软骨细胞的自噬途径;同时, MCP 还可以促进葡萄糖摄取和激活 HIF-1 α 通路,调节软骨细胞的糖酵解途径,最终发挥其促进软骨细胞增殖、维持软骨细胞表型、上调软骨细胞外基质合成等作用;另外,研究也发现可德兰可以与 MCP 复合构建成具有良好可注射性的新型 MCP 递送系统。总之,本研究丰富了 MCP 对关节软骨修复的作用机制的认识,为其在关节软骨修复中的优化递送奠定了基础。

关键词: 改性柑橘果胶; 关节软骨; 半乳糖苷凝集素-3; 糖酵解; 水凝胶

Abstract

Modified Citrus Pectin (MCP), a soluble natural polysaccharide rich in β -galactose, is derived from citrus pectin through physical, chemical, and biological modifications. MCP has the characteristics of low molecular weight and low esterification degree, and it can be absorbed from the small intestinal epithelium into circulation, where it exerts pleiotropic effects. MCP not only plays an immunomodulatory role as a soluble dietary fiber and improving intestinal microbiota, but also binds with galectin-3 (Gal-3) to exert effects including anti-cancer, anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-tissue fibrosis. Our previous studies have demonstrated that MCP has the effect of promoting chondrocyte proliferation and maintaining phenotype; Additionally, in vivo studies show that MCP can protect the activity of tissues and cells around articular cartilage defects, alleviate or delay the progression of mild, moderate and severe osteoarthritis (OA) by regulating the processes of inflammation and tissue metabolism. The above evidence indicates that MCP has a good prospect for application in the treatment of OA. However, the specific mechanism by which MCP plays a pleiotropic role in the repair of cartilage injury and the treatment of OA is still not fully understood. Therefore, to optimize the application of MCP in treating articular cartilage injury and OA, we intends to further research the specific mechanism of MCP in articular cartilage repair, further design and construct a novel MCP composite material for articular cartilage repair. The main research contents and conclusions are as follows:

(1) The distribution and mechanism of MCP in articular cartilage explant and cell

Fluorescently labeled MCP was prepared by conjugating the fluorescent dyes 5-aminofluorescein and Cy5 hydrazide with MCP by fluorescent labeling technology, and its fluorescent properties were characterized. Furthermore, the distribution and localization of MCP in articular cartilage, cartilage explant and chondrocyte were investigated by fluorescence tracing technology, in vivo imaging technology and immunofluorescence staining. Finally, by combining these findings with the previous data from our research group, we explored the potential mechanism of MCP pleiotropic effects. Studies have found that MCP can penetrate cartilage tissue and enter chondrocytes; After uptaken by chondrocytes, MCP enriched in lysosomes by binding with Gal-3 on lysosomal membranes; MCP plays a role in maintaining chondrocyte homeostasis by regulating the autophagy

pathway of chondrocyte.

(2) Effect of MCP on glycolytic metabolism of articular chondrocytes

Normal articular chondrocytes, chondrocytes in continuous passage, and chondrocytes induced by interleukin-1 β and 2-Deoxy-D-glucose were cultured with MCP medium. The effects of MCP on glycolytic metabolism of chondrocytes were investigated by detecting the glucose uptake activity, lactate production, the expression of glycolysis-related and extracellular matrix synthesis-related genes in chondrocytes. The findings revealed that MCP can regulate the glycolytic pathway; MCP promotes chondrocyte proliferation, upregulates extracellular matrix synthesis, maintains chondrocyte phenotype, and decelerates chondrocyte senescence by enhancing glucose uptake and activating the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α) pathway.

(3) Preparation and characterization of Curdlan hydrogels compounded with MCP

Curdlan-MCP hydrogels were prepared by combining different concentrations of MCP with Curdlan. Their physical and chemical properties such as rheology, infrared, compressive strength, morphology and structure, water content, swelling rate, in vitro release and degradation were characterized, and to explore the feasibility of long-term targeted delivery of MCP. The results demonstrated that MCP and Curdlan could be easily composited into hydrogels; Curdlan-MCP hydrogels are injectable and degradable; Curdlan-MCP hydrogel has a tunable sustained-release effect on MCP.

In summary, this research investigates the specific mechanism of MCP in the repair of articular cartilage injury. These results reveal that MCP could penetrate cartilage tissue into chondrocytes, where it accumulates in lysosomes and regulates autophagy of chondrocytes. At the same time, MCP can promote glucose uptake, activate the HIF-1 α pathway and modulates the glycolytic metabolism of chondrocytes, finally plays a role in promoting chondrocyte proliferation, maintaining chondrocyte and upregulating chondrocyte extracellular matrix synthesis. In addition, it has been found that Curdlan can be combined with MCP to form an injectable MCP delivery system. Our research not only enriches the mechanism of MCP, but lays a foundation for its optimal delivery in articular cartilage repair.

Keywords: Modified citrus pectin; Articular cartilage; Galectin-3; Glycolysis; Hydrogel

第一章 绪论

改性柑橘果胶 (Modified Citrus Pectin, MCP), 又称低分子柑橘果胶 (Low Molecular Citrus Pectin, LCP), 是从柑橘、橙和柠檬等柑橘属果皮提取出的一种富含 β -半乳糖的可溶性天然多糖^[1]。MCP 的分子量 (Weight Average Molecular Weight, M_w) 低于 15 KDa, 酯化度 (Degree of Esterification, DE) 小于 50%, 可以被小肠上皮吸收进入血液循环, 进而发挥其多效性^[2]。

因 MCP 具有优良的生物可降解性和生物相容性, 被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 归类为公认安全 GRAS (Generally Recognized As Safe, GRAS) 的食品添加剂^[3]。MCP 除用作膳食纤维外, 还能与半乳糖凝集素-3 (Galectin-3, Gal-3) 结合而发挥抗癌、抗炎和抗组织纤维化等作用^[4]。越来越多的研究发现, MCP 在免疫调节、抗肿瘤、抗组织纤维化、抗炎、抗氧化以及吸附重金属等多个领域都具有明确的应用前景^[5-8]。

本部分在简要介绍改性柑橘果胶的来源和结构的基础上, 对其作用机制和生物活性进行详细论述。

1.1 改性柑橘果胶的来源

改性柑橘果胶是柑橘果胶 (Citrus Pectin, CP) 改性后得到的小分子果胶多糖, 具有比天然果胶更好的物理化学性质和生物活性^[9]。CP 是柑橘类水果中发现的一种可溶性膳食纤维, 主要从柑橘、橙、柠檬和柚等柑橘属果皮和果肉中提取^[10-17]。CP 可生物降解且无毒^[18], 它作为增稠剂、胶凝剂、稳定剂和乳化剂在食品工业中发挥重要作用^[19-22]。CP 的分子量高达 60-300 KDa, 具有较高的酯化程度 ($\sim 70\%$), 在人体消化过程中不会降解, 并且由于较大的分子尺寸会阻碍其被肠道吸收^[2, 23]。将天然果胶通过化学、物理和生物方法改性, 可以得到分子量低于 15 KDa 且酯化度低于 50% 的改性柑橘果胶。

化学改性是一种应用广泛的果胶改性方法, 通过甲酯化、乙酰化、磺化和硒化等修饰向果胶引入新的官能团^[24]。此外, 化学改性还可以通过酸、碱、氧化降解等方式改变天然果胶的分子量、单糖组成和分子结构等特性。虽然化学改性使用最为广泛, 但制备工艺较为复杂且反应过程需要使用大量的有机溶剂, 对防腐设备要求

较高,并且会对环境造成负面影响^[25]。物理改性方法主要有超声法、高压法、亚临界法、辐照法和低温等离子体法。与化学改性方法相比,物理改性的反应过程简单快速且反应条件易于控制,但难以实现柑橘果胶的选择性改性^[26-28]。与化学改性和物理改性相比,酶(生物)改性的反应条件温和,且具有特异性和降解效率高等优点,可以有效避免改性过程中的果胶大量降解。然而,经酶法脱脂得到的改性柑橘果胶的凝胶强度低,且改性方式仅限于断开果胶的糖苷键和甲酯键^[29,30]。组合改性是指采用两种或两种以上的方法对 CP 进行改性。组合改性在保留单一改性优势的同时弥补了不足,可以满足多种改性需求^[31-33]。不同的改性方法导致果胶的理化性质和生物活性不同。果胶的改性方式如图 1-1 所示^[34]。

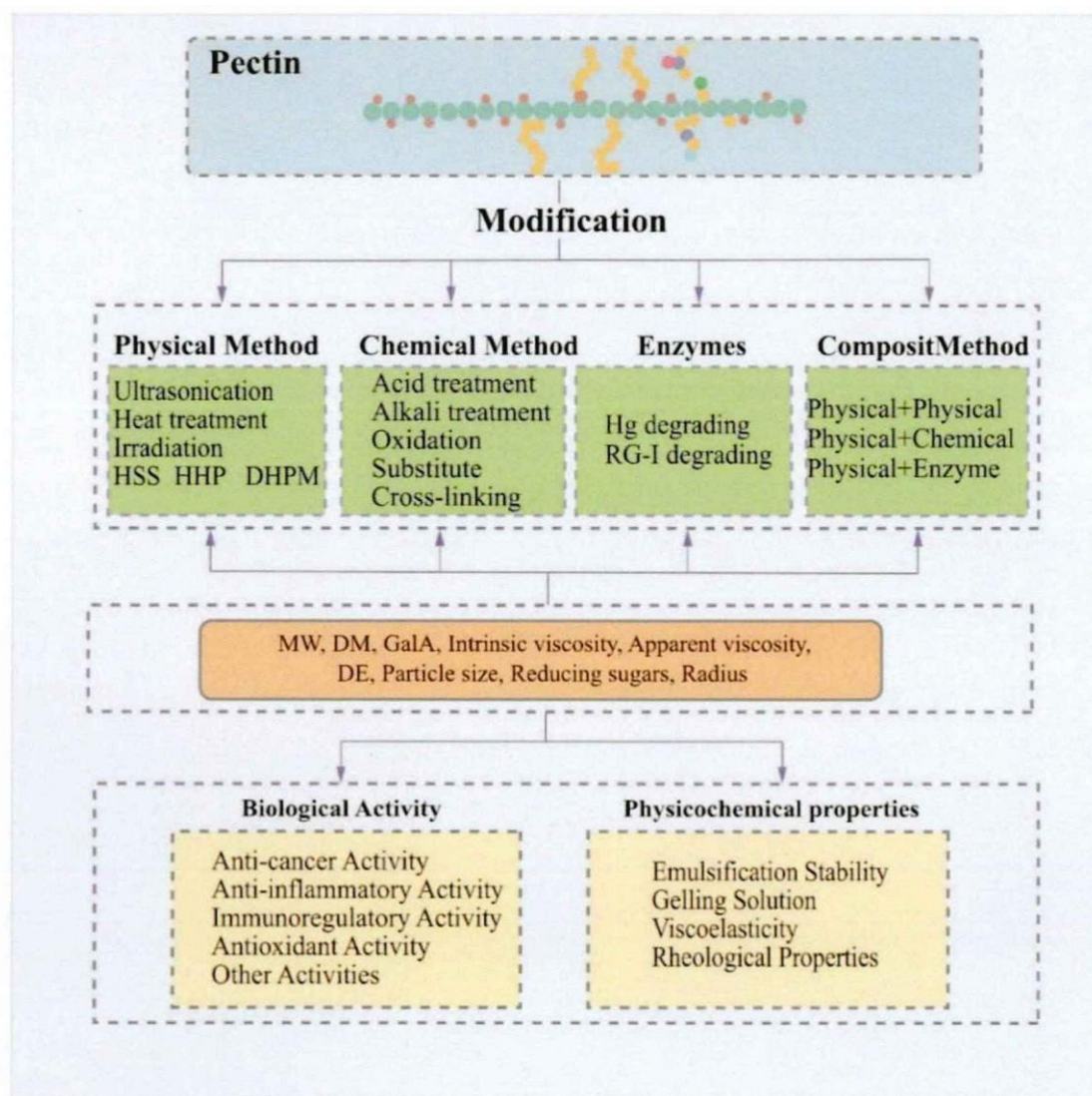


图 1-1 果胶改性方式^[34]

Fig 1-1 Pectin modification methods^[34].

1.2 改性柑橘果胶的结构

柑橘果胶是共价连接的富含半乳糖醛酸的聚合物，主要包括三个多糖区域：半乳糖醛酸聚糖（Galacturonans, GS）、鼠李糖半乳糖醛酸聚糖-I（Rhamnogalacturonan-I, RG-I）和同型半乳糖醛酸聚糖（Homogalacturonan, HG）^[35]。柑橘果胶的结构式如图 1-2 所示^[36]。

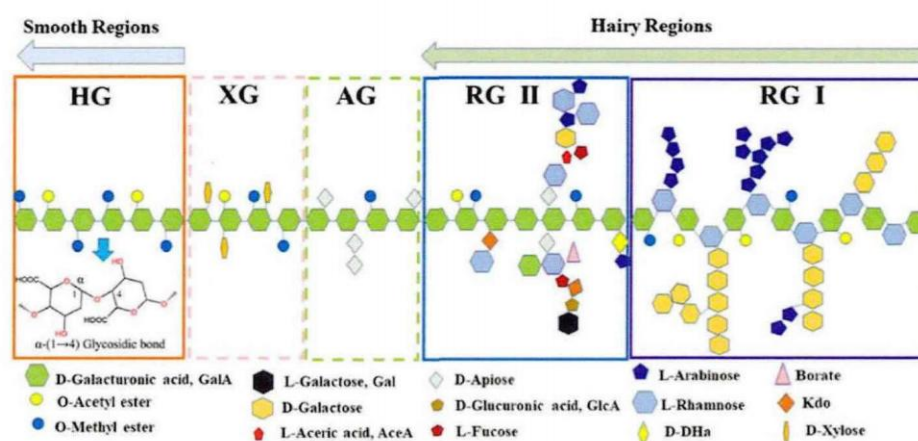


图 1-2 柑橘果胶的结构^[36]
Fig 1-2 Structure of citrus pectin.^[36]

虽然水解切断了 CP 的直链，使果胶的长链分解成小片段，但并不影响 MCP 的结构组成。改性修饰 CP 分子的结构，如 HG 残基会在 C-6 羧基上发生甲酯化，也可以在 O-2 和 O-3 羧基上被乙酰化^[37, 38]；与 HG 一样，RG-I 可以被甲基化和乙酰化^[39]；GS 中的鼠李糖半乳糖醛酸聚糖-II（Rhamnogalacturonan-II, RG-II）可以被乙酰化^[40]。另外，CP 分子的半乳糖醛酸单元上含有甲酯基团，而经脱酯等改性后的 MCP 的甲酯基团减少。改性柑橘果胶的结构式如图 1-3 所示^[36]。

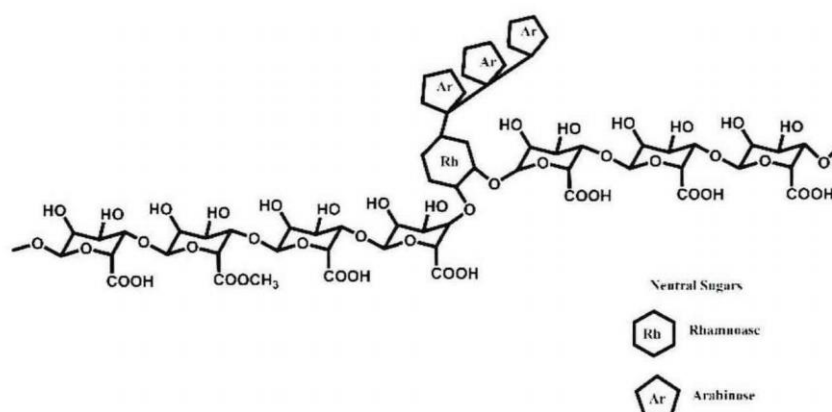


图 1-3 改性柑橘果胶的结构式^[36]
Fig 1-3 Structure of Modified Citrus Pectin^[36].

1.3 MCP 的作用机制

改性柑橘果胶除用作膳食纤维外，还能与半乳糖凝集素-3（Galectin-3, Gal-3）结合发挥抗癌、抗炎和抗组织纤维化等作用^[4]。Gal-3 是 β -半乳糖苷结合凝集素家族中唯一的嵌合蛋白，由人类 14 号染色体的 LGALS3 基因编码，分子量为 29-35 KDa^[41]。Gal-3 具有 1 个糖结构识别域（Carbohydrate recognition domain, CRD）和 1 个特有的富含甘氨酸、酪氨酸和脯氨酸的 N 端非凝集素结构域（N-terminal non-lectin domain, NTD）^[30, 42-45]。CRD 和 NTD 结构由约 100 个氨基酸组成的胶原样序列（Collagen-like sequence CLS）结构域连接^[46]。Gal-3 能够通过其 CRD 结构域与细胞表面和基质糖蛋白的 β 半乳糖苷残基相互作用，也可以通过其 NTD 区域与整合素和细胞外基质的蛋白质结合^[46-50]，介导蛋白质和蛋白质之间的相互作用^[47]。这些特性使 Gal-3 具有调节细胞黏附，调控细胞周期和与晚期糖基化终末产物（Advanced glycation end products, AGEs）高亲和力结合等多种生物学功能^[51, 52]。Gal-3 的结构式如图 1-4 所示^[9]。

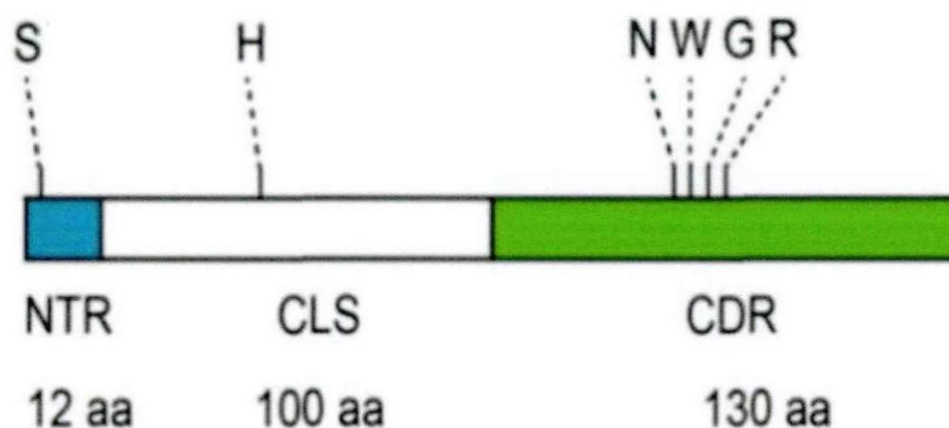
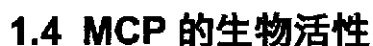


图 1-4 Gal-3 的结构式^[9]

Fig 1-4 Structure of Gal-3^[9].

Gal-3 在各种类型组织和细胞中都有表达，广泛分布在心、肾、肝、肺及肠道等组织器官中。Gal-3 是在细胞质合成的蛋白，但可以在细胞质和细胞核之间穿梭，甚至可以转运至细胞膜并分泌到细胞外^[53, 54]，这使得 Gal-3 参与多种细胞内和细胞外功能^[55]。在细胞内，Gal-3 在防止细胞凋亡和调节细胞周期基因表达方面发挥重要作用^[56]，且其生物学的功能与细胞内定位有关，静止期细胞的 Gal-3 主要分布在细胞质；增殖期细胞的 Gal-3 主要分布在细胞核^[57]。细胞外的 Gal-3 作为各种炎症细胞的趋化因子，可以促进内皮细胞的分化和血管生成^[58]，加剧肿瘤、动脉粥样硬化和糖尿病等疾病的发生发展^[59]。大量研究证实，Gal-3 与多种疾病的临床表现的严

MCP 作为一种膳食纤维,可以直接与肠细胞和粘膜免疫细胞相互作用^[69],通过改变肠道微生物群,发挥免疫调节作用^[70,71],如图 1-6^[36]所示。MCP 具有体外益生元活性^[72],可以抑制产毒大肠杆菌的粘附,降低志贺毒素(Shiga toxin, Stx)的毒性^[73]。此外, MCP 与活益生菌嗜酸乳杆菌补充剂共同给药后,有助于改善肠道微生物群的完整性和丰度^[74]。从柑橘果皮中纯化的果胶多糖可刺激派尔集合淋巴结(Peyer's patch)细胞产生白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6),进一步增强骨髓细胞增殖^[75, 76]。Gal-3 在多种免疫细胞中均有表达,包括巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞^[77]。Ramachandran 等^[78]发现 MCP 具有免疫刺激特性,能以剂量依赖性方式激活 T 细胞和 B 细胞,并活化自然杀伤(Natural Killer, NK)细胞,进一步诱导 K562



MCP 作为一种膳食纤维,可以直接与肠细胞和粘膜免疫细胞相互作用^[69],通过改变肠道微生物群,发挥免疫调节作用^[70,71],如图 1-6^[36]所示。MCP 具有体外益生元活性^[72],可以抑制产毒大肠杆菌的粘附,降低志贺毒素(Shiga toxin, Stx)的毒性^[73]。此外, MCP 与活益生菌嗜酸乳杆菌补充剂共同给药后,有助于改善肠道微生物群的完整性和丰度^[74]。从柑橘果皮中纯化的果胶多糖可刺激派尔集合淋巴结(Peyer's patch)细胞产生白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6),进一步增强骨髓细胞增殖^[75, 76]。Gal-3 在多种免疫细胞中均有表达,包括巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞^[77]。Ramachandran 等^[78]发现 MCP 具有免疫刺激特性,能以剂量依赖性方式激活 T 细胞和 B 细胞,并活化自然杀伤(Natural Killer, NK)细胞,进一步诱导 K562

Fig 1-5 The schematic diagram of Gal-3-induced organ fibrosis [65].

白血病细胞死亡。一种可注射的负载 MCP 的药物能够消除 CD45 细胞表面的 Gal-3，诱导急性髓系白血病细胞凋亡^[79]。

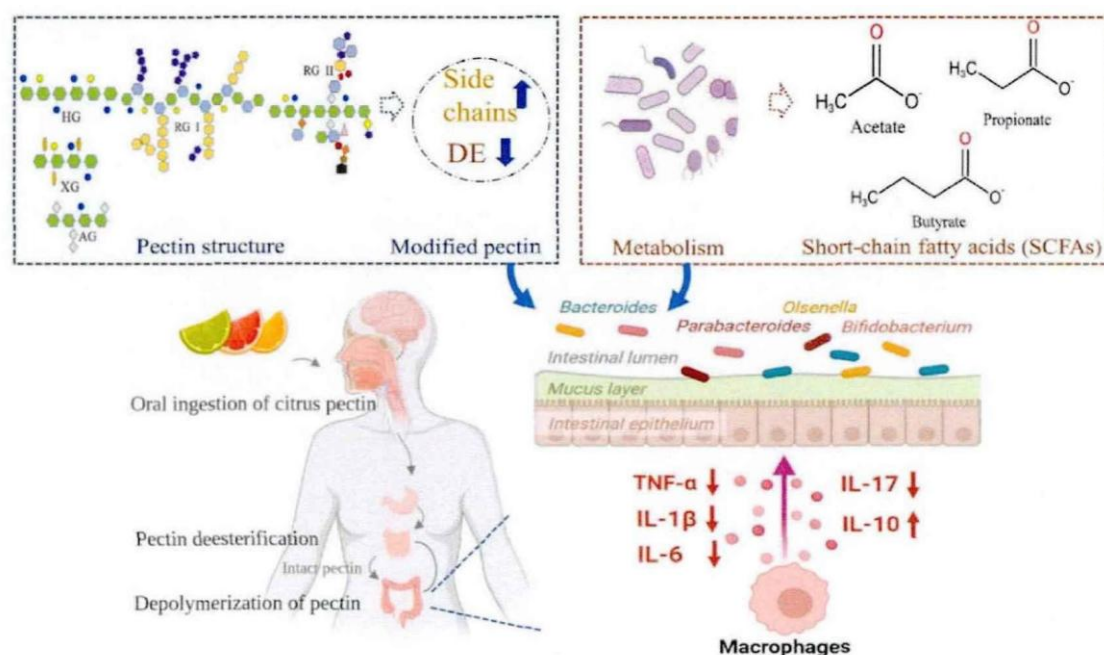


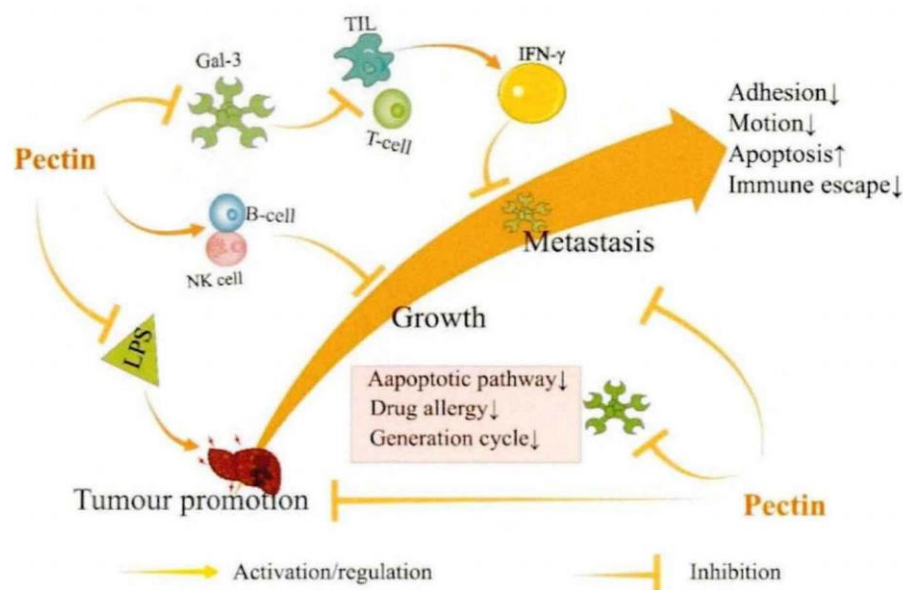
图 1-6 MCP 通过改变肠道微生物群，发挥免疫调节作用的示意图^[36]

Fig 1-6 The schematic diagram of MCP exerting an immunomodulatory role by altering the gut microbiota ^[36].

1.4.2 抗肿瘤

越来越多的研究表明，MCP 可以有效抑制多种恶性肿瘤的发生和扩散，在抗肿瘤转移治疗中具有明确的应用前景。与健康细胞相比，Gal-3 在转移性癌细胞中高表达，是某些类型癌症的潜在诊断和预后标志物^[80]。与 CP 相比，MCP 的 RG-I 片段中富含更多的 β -半乳糖苷^[81]，使其更易与 Gal-3 结合，进而抑制癌细胞粘附、同型聚集、侵袭、克隆生存和血管生成等步骤，发挥抗肿瘤发生和转移的作用^[4, 82-89]。CP 发挥抗癌作用的机制示意图如图 1-7 所示^[34]。

MCP 具有诱导癌细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖的作用。Yan 等^[90]发现 MCP 对雄激素依赖性和非雄激素依赖性前列腺癌细胞具有毒性作用。Wang 等^[91]研究表明 MCP 通过拮抗 Gal-3，降低凋亡抑制蛋白 Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) 和存活素 (Survivin) 的表达，促进肿瘤细胞凋亡。Fang 等^[6]指出 MCP 可以通过抑制 Gal-3 诱导膀胱癌细胞 G2/M 细胞周期停滞，促进肿瘤细胞凋亡，抑制膀胱癌发生发展。Yan 等^[90]发现 MCP 通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinase, MAPK) 的激活，促进下游促凋亡蛋白 Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death) 表达，诱导前列腺癌细胞凋亡。

图 1-7 果胶的抗癌作用^[34]Fig 1-7 Anticancer effect of pectin^[34].

肿瘤转移是导致癌症发展和致死的重要因素。MCP 可减缓癌细胞早期转移,减少肿瘤细胞栓塞形成^[92]。Rahman 等^[93]发现 Gal-3 是 MCP 抑制乳腺癌和前列腺癌细胞粘附、迁移和侵袭的一个潜在介质。Hsieh 等^[94]研究发现, MCP 能够下调人前列腺 JCA-1 的细胞周期蛋白 B 和 *adc2* 蛋白, 抑制肿瘤转移。Slivad 等^[95]研究显示, MCP 可以抑制乳腺癌和前列腺癌细胞中尿激酶型纤溶酶原激活物(Urokinase-type plasminogen activator, uPA)的合成, 削弱癌细胞侵袭能力。MCP 还可能通过减少血管生成来抑制肿瘤转移。Nangia-Makker 等^[96]发现 MCP 以剂量依赖的方式抑制人内皮细胞对 Gal-3 的趋化, 抑制内皮细胞在体外形成毛细血管。MCP 具有更低的酯化度和低分子量, 能够在肠道消化过程中释放果胶分子碎片, 由小肠上皮吸收进入血液循环, 发挥抗肿瘤活性的作用^[97]。研究发现, 口服可溶性果胶片段可抑制小鼠移植肿瘤的生长和转移^[92, 98, 99]。一项临床研究评估了服用 MCP 粉末胶囊对前列腺癌患者的治疗作用, 发现 MCP 能显著增强前列腺特异性抗原的倍增时间 (Prostate-specific antigen doubling time, PSADT), 减缓癌症进展, 延长患者寿命^[3, 100]。

1.4.3 抗纤维化

纤维化相关疾病包括脑纤维化、肺纤维化、心脏纤维化、肝纤维化、肾纤维化和腹膜纤维化等^[101]。组织纤维化会导致器官功能障碍甚至器官衰竭。在多种器官纤维化模型中发现, Gal-3 具有促纤维化和调节成纤维细胞和巨噬细胞活性的作用^[102]。研究发现, Gal-3 可以与醛固酮相互作用, 促进巨噬细胞浸润和血管纤维化^[103]; 另外, Gal-3 能够刺激 I 型胶原蛋白合成, 从而导致肝硬化、肺纤维化和心脏纤维化等

多种器官纤维化^[104]。Gal-3 在肝、肾和特发性肺纤维化组织中表达上调^[105, 106]；而且 Gal-3 已被认为是导致心脏纤维化和心力衰竭（HF）的危险因素^[47, 107-109]。因此，抑制 Gal-3 是改善组织纤维化的有效方式^[109-112]。

既往研究报道 MCP 通过阻断 Gal-3，减轻由醛固酮诱导的心脏和肾脏纤维化^[113-115]。Ibarrola 等^[116]在压力超载诱导的模型中，发现 MCP 通过阻断 Gal-3 表达，改善主动脉瓣钙化的介质厚度、纤维化和炎症进展。Li 等^[117]研究发现 MCP 可以通过下调 Gal-3 表达，减轻心肌纤维化，改善缺血性心力衰竭。MCP 还可通过抑制小鼠 Gal-3 的表达减缓心肌营养因子-1 的促纤维化和促炎作用^[118]。Martínez 等^[115]发现，MCP 可通过减少肾纤维化、上皮-间质转化和炎症等途径减轻自发性高血压大鼠的早期肾损伤。MCP 除了可预防肾脏发生纤维化、炎症和损伤外^[113]，还可抑制脂肪组织纤维化以及脂肪细胞分化标志物的增加^[119]。且 MCP 可能通过抗氧化作用可减缓肝纤维化，促进肝再生^[120]。

1.4.4 抗炎

低分子改性果胶可通过阻断 Gal-3，上调抗炎因子白细胞介素-10（Interleukin-10, IL-1 β ）的表达而发挥抗炎作用^[121]；低酯化度的改性果胶可以通过与 Toll 样受体 2（Toll-like receptors 2, TLR 2）结合阻断促炎反应^[71, 122]。CP 可通过抑制炎症相关细胞因子 IL-6、肿瘤坏死因子- α （Tumor necrosis factor- α , TNF- α ）和 IL-1 β 的表达、调控炎症相关信号通路 NF-KB 等途径，发挥抗炎活性^[123]。大量研究表明，具有低分子量和低酯化度特点的 MCP 能够更有效地发挥抗炎活性。Ramachandran 等^[124]发现 MCP 和厚朴酚协同发挥抗炎作用，对 TNF- α 的抑制效果显著高于单一化合物。Sun 等^[125]研究表明 MCP 可以抑制胰腺产生 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎细胞因子，恢复肠道屏障完整性。Zhang 等^[126]发现，MCP 通过下调 Gal-3 和 IL-1 β 和等促炎因子的表达发挥抗炎作用，表现出抑制软骨细胞退化的作用。

1.4.5 吸附重金属

MCP 除了与 Gal-3 结合发挥抗癌、抗组织纤维化、免疫调节和抗炎作用外，还具有吸附重金属的能力。汞、铅、铬、镉和砷等重金属会在急性和慢性毒性的作用下导致肾脏、肝脏、神经系统和免疫系统失调^[127]。MCP 上带有负电荷的游离羧基能够与金属离子结合形成稳定的共价键，从而发挥清除血液中重金属的作用^[128]。临床研究报告，MCP 可以增加健康志愿者尿中铅、砷和镉的排泄，且没有副作用^[129]。在一项针对 5 名患者的病例研究中发现，单独使用 MCP 或 MCP/海藻酸患者的血液中铅或汞的含量平均减少 74%，且无副作用^[130, 131]。MCP 治疗可以显著降低因铅中毒住院的儿童患者的血铅水平，并增加尿铅水平^[100, 132, 133]。

1.4.6 抗氧化

MCP 的半乳糖苷残基, 可以通过清除体内的自由基发挥抗氧化作用^[134, 135]。甲基酯化程度、分子量和中性侧链是影响 MCP 发挥抗氧化活性的重要因素。低分子量的 MCP 在降解过程中产生了更多羟基, 使其增强了对自由基的清除能力。Wang 等^[31]发现, 与 CP 相比, 低分子量的 MCP 对 1,6-二(二苯基膦基)己烷(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical, DPPH) 自由基的清除能力和对 Fe^{3+} 的还原能力增强。除此之外, 通过引入新的官能团修饰可以增强 MCP 的抗氧化活性。Huang 等^[136]发现, 经硫酸酸化改性的 MCP 可以通过提高超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性和降低丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量保护细胞免受氧化应激。

1.4.7 其他

MCP 除发挥上述生物活性外, 还具有降低胆固醇、抗糖尿病和预防肥胖的作用。据报道, MCP 可降低人体低密度脂蛋白胆固醇水平^[137]。Marounek 等^[138]发现经酰胺化改性的柑橘果胶可降低血液和肝脏中的胆固醇含量。此外, Nishikawa 等^[139]在小鼠模型中发现, MCP 可以抑制 Gal-3 表达预防蛛网膜下腔出血后的血脑屏障破坏。Cui 等^[140]发现 MCP 可以通过阻断 Gal-3 在缺血性脑卒中的炎症因子表达, 发挥神经保护作用。

1.5 课题提出与主要研究内容

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种最常见的致残性关节退行性疾病, 常见于膝关节^[141]。随着全球人口老龄化加重, 骨关节炎患者的数量逐年增多, 据估计, 全球超过 3.6 亿人患有 OA^[142-148]。OA 的在临床上主要表现为关节软骨(Articular cartilage, AC)退化、骨刺形成、骨过度生长和关节间隙变窄等, 同时伴随关节疼痛、肿胀和僵硬等症状, 最后甚至发展为残疾^[149, 150], 严重影响患者的身体和心理健康。

越来越多的证据表明, 炎症是导致 OA 发生发展的关键因素^[151, 152]。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 Gal-3 等炎症因子在 OA 的发生和发展过程中发挥了重要的作用^[153, 154]。Gal-3 作为一种前沿性炎症因子, 不仅会诱导软骨细胞的炎症反应, 甚至会加剧软骨细胞的凋亡^[155, 156]。临床研究发现, OA 患者血清和滑液中 Gal-3 水平显著升高^[157], 而敲除小鼠 Gal-3 可减轻炎症, 改善 OA 进展^[156, 158, 159]。因此, 抑制 Gal-3 被认为是治疗 OA 的有效方式。

MCP 作为 Gal-3 的抑制剂, 已被证明可以改善与 Gal-3 相关的癌症和组织纤维化等疾病进展^[114]。本课题组前期的研究发现, MCP 可以直接上调软骨细胞中多种生长因子的基因表达, 下调炎症因子的基因表达, 发挥促进软骨细胞增殖及维持其

表型的作用^[160, 161]；通过胶原基递送系统局部递送的 MCP 可以保护浅层和全层的关节软骨缺损周围的软骨细胞，使其免于变性或死亡^[126, 161, 162]；体外构建的 MCP 复合水凝胶组织工程软骨具有良好的软骨组织结构^[161]；MCP-透明质酸复合水凝胶可以缓解轻度和中重度 OA 的关节肿胀，延缓 OA 进展。综上所述，MCP 在 OA 治疗中具有良好的应用前景。为进一步构建新型 MCP 递送体系，使 MCP 在关节软骨损伤修复和 OA 治疗中发挥多效性作用，本研究拟对 MCP 在软骨组织和软骨细胞发挥作用的具体机制进行研究，并在此基础上，设计并构建新型的 MCP 复合材料。具体研究内容如下：

1、MCP 在关节软骨组织和细胞内的分布及其作用机制

课题组前期研究发现，MCP 能够在软骨损伤修复的过程中发挥多效性的作用。然而，MCP 在 AC 修复中的详细机制仍有待进一步阐明。本部分首先通过荧光标记技术，将可见荧光染料 5-氨基荧光素（5-Aminofluorescein, 5-AF）和近红外荧光染料 Cy5 酰肼（Cy5 hydrazide）分别标记 MCP，制备和表征具有荧光特性的 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP；进一步，通过关节腔注射、体外软骨外植体和软骨细胞的培养，利用荧光示踪、活体成像技术和免疫荧光染色等方法，考察 MCP 在关节内、软骨组织以及软骨细胞内的分布和定位情况；最后，在对课题组前期研究获得数据的再分析的基础上，结合 MCP 在软骨组织和软骨细胞的定位情况，探讨 MCP 在软骨组织和细胞中发挥作用的潜在机制。

2、MCP 对关节软骨细胞糖酵解代谢的影响

第二章研究发现，MCP 会引起缺氧诱导因子-1（Hypoxia inducible factor-1, HIF-1）途径的相关基因和蛋白表达水平的改变，且 HIF-1 α 是调控关节软骨细胞能量代谢的关键基因。因此，本部分考察 MCP 对关节软骨细胞糖酵解代谢的影响。首先在对课题组前期研究获得数据再分析的基础上，分析 MCP 对软骨细胞的作用与糖酵解代谢的相关性；进一步通过检测体外培养的兔关节软骨细胞的葡萄糖摄取、乳酸生成及相关基因表达，分析 MCP 对连续传代和经 IL-1 β 诱导的软骨细胞糖酵解代谢的影响；最后，研究阻断糖酵解代谢途径后，MCP 对关节软骨细胞糖酵解代谢和细胞外基质合成的影响。

3、复合 MCP 的可德兰水凝胶的制备和表征

为实现 MCP 在软骨缺损区的长期、靶向递送，发挥其促进软骨细胞增殖、表型维持及上调生长因子、抑制炎症因子等作用，本部分考察可德兰（Curdlan）与 MCP 复合构建新型 MCP 递送体系的可能性。首先，通过简单的共混复合和热致成胶的方法制备 Curdlan-MCP 水凝胶；进一步，对 Curdlan-MCP 水凝胶的理化、形貌、可注射性及机械强度和可降解性等性能进行表征；最后，通过荧光标记等手段，考察 Curdlan-MCP 对 MCP 的释放行为，为其应用于关节软骨损伤修复提供基础。

第二章 MCP 在关节软骨组织和细胞内的分布及其作用机制的研究

2.1 前言

改性柑橘果胶 (Modified citrus pectin, MCP) 是半乳糖苷凝集素-3 (Galectin-3, Gal-3) 的天然拮抗剂^[163-165], 能够与细胞内和细胞外的 Gal-3 结合, 并通过竞争性抑制降低 Gal-3 的表达水平, 发挥抗炎、抗肿瘤和抗组织纤维化及免疫调节作用^[126, 163-165], 已被证明可以改善与 Gal-3 相关的癌症和组织纤维化等疾病进展^[166-168]。已有研究发现, Gal-3 在关节软骨损伤和骨关节炎发展中起重要作用^[126, 163-165]; 而本课题组前期研究发现, MCP 可以促进软骨细胞的增殖并维持其表型, 并直接上调软骨细胞的多种生长因子的基因表达, 下调炎症因子的基因表达^[126, 160, 161]; 另外, 也发现 MCP 可以保护浅层和全层的关节软骨 (Articular cartilage, AC) 缺损周围的软骨细胞, 使其免于变性或死亡; 尤其是通过胶原基局部递送系统, MCP 可以促进全层 AC 的修复^[126, 160, 161]。已有研究结果显示, MCP 可能通过发挥多种生物活性作用促进关节软骨的损伤修复, 但是 MCP 在 AC 修复中的具体机制仍未完全明了。

本部分拟在考察 MCP 的组织 and 细胞分布情况的基础上, 结合课题组前期研究发现, 对 MCP 的具体作用机制进行研究。MCP 是一种富含 β -半乳糖的可溶性天然多糖^[1], 结构式如图 2-1 所示^[36]。由于多糖分子的结构复杂且分子量大, 没有光吸收和光发色基团, 无法对其进行可视化和定量检测^[169, 170]。荧光标记技术具有较高的灵敏度、选择性以及安全性等优势^[171], 能够检测细胞、组织甚至体内的分子分布情况^[172], 已被广泛用于研究多糖的转运和吸收^[173, 174]。因此, 本部分将通过荧光标记技术标记 MCP, 进一步观测其在组织内和软骨细胞内的分布情况。

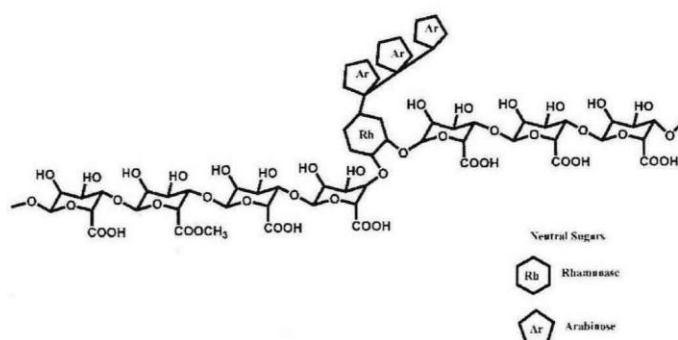


图 1-3 改性柑橘果胶的结构式^[36]

Fig 1-3 Structure of Modified Citrus Pectin^[36].

本章中, 分别使用 5-氨基荧光素 (5-Aminofluorescein, 5-AF) 和近红外荧光染料 Cy5 酰肼 (Cy5 hydrazide) 标记 MCP, 制备具有荧光特性的 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP。通过检测荧光标记 MCP 在关节内、软骨外植体以及软骨细胞内的定位和分布情况, 探讨 MCP 对软骨组织和细胞的作用及其机制。

2.2 试剂与仪器

2.2.1 试剂与耗材

表 2-1 试剂和耗材
Table 2-1 Reagents and materials

试剂名称	生产厂家
改性柑橘果胶 (MCP)	浙江果源康品生物科技有限公司
5-氨基荧光素 (5-AF)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
Cy5 酰肼 (Cy5 hydrazide)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
1-乙基- (3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 盐酸盐 (EDC·HCl)	北京索莱宝科技有限公司
二甲基亚砷 (DMSO)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
葡聚糖凝胶 G100 (Sephadex G100)	北京索莱宝科技有限公司
高糖培养基 (DMEM)	美国 Thermo scientific 公司
胎牛血清 (FBS)	美国 Invitrogen 公司
胰蛋白酶-EDTA (TE)	美国 Thermo scientific 公司
青霉素-链霉素溶液	北京索莱宝科技有限公司
II 型胶原酶	北京索莱宝科技有限公司
4% 多聚甲醛	北京索莱宝科技有限公司
氘代水 (D ₂ O)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
磷酸盐缓冲液 (PBS)	北京索莱宝科技有限公司
不含钙镁磷酸盐缓冲液 (D-PBS)	北京索莱宝科技有限公司
琼脂糖	上海源叶生物科技有限公司
苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
冷冻切片包埋剂 (OCT)	美国 Sakura 公司

续表 2-1 试剂和耗材

Continued Table 2-1 Reagents and materials

试剂名称	生产厂家
内质网红色荧光探针 (ER-Tracker)	上海碧云天生物技术股份有限公司
线粒体红色荧光探针 (Mito-Tracker)	上海碧云天生物技术股份有限公司
溶酶体绿色荧光探针 (Lyso-Tracker)	上海碧云天生物技术股份有限公司
微丝红色荧光探针 (Actin-Tracker)	上海碧云天生物技术股份有限公司
细胞活/死染色 (Live/Dead) 试剂盒	美国 Thermo scientific 公司
Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒	美国 MCE 公司
4',6-二脒基-2 苯基吲哚 (DAPI)	上海碧云天生物技术股份有限公司
Alexa Fluor 350 标记的半乳糖苷凝集素	北京博奥森生物技术有限公司
-3 (Gal-3) 单克隆抗体	
重组人白介素-1 β (IL-1 β)	美国 PeproTech 公司
PrimeScript TM RT reagent Kit 试剂盒	日本 TaKaRa 公司
SYBR [®] Premix Ex Taq TM II 试剂盒	日本 TaKaRa 公司
PCR 基因引物	上海生工生物工程有限公司
溴化钾 (KBr)	天津市光复科技发展有限公司
75% 酒精	天津江天化工技术有限公司
离心管、细胞培养板	美国 Corning 公司
透析袋 (Mw: 3.5 KDa)	北京索莱宝科技有限公司

2.2.2 仪器设备

表 2-2 仪器设备

Table 2-2 Instruments

仪器名称	生产厂家
傅立叶变换红外 (FI-TR) 光谱仪	美国 Thermo 公司
¹ H 核磁共振波谱 (¹ H-NMR) 仪	德国 Bruker 公司
紫外-可见 (UV-Vis) 分光光度计	德国 Perkinelmer 公司
荧光分光光度仪	美国 HORIBA 公司
动态光散射粒度仪 (DLS)	英国 Malvern Panalytical 公司

续表 2-2 仪器设备

Continued Table 2-2 Instruments

仪器名称	生产厂家
Nano Vue Plus 超微量分光光度计	英国 Biochrom 公司
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
多功能全波长酶标仪	芬兰 Thermo 公司
CO ₂ 恒温培养箱	日本 SANYO 公司
冰冻切片机	德国 Leica 公司
生物显微镜	日本 Olympus 公司
电子天平	德国 Mettler Toledo 公司
涡旋混合仪	德国 IKA 公司
超净工作台	苏州净化设备有限公司
冷冻干燥机	美国 LABCONNCO 公司
多功能全波长酶标仪	芬兰 Thermo 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
小动物活体成像系统	美国 CRi 公司
激光共聚焦显微镜 (CLSM)	德国 ZEISS 公司
多功能全波长酶标仪	芬兰 Thermo 公司

2.3 实验方法

2.3.1 荧光标记 MCP 的制备与表征

2.3.1.1 MCP 的荧光标记

MCP 的荧光标记参考文献进行^[175], 并做了一些修改。将 200 mg MCP 溶于 10 mL H₂O 中, 随后加入 10 mL DMSO、70 mg EDC 和 10 mg 5-AF, 室温、避光条件下反应 24 小时, 收集反应产物, 转移至透析袋 (Mw: 3.5 KDa), 在去离子水中透析 96 小时, 除去未反应的荧光素, 产物进一步冷冻干燥。得到的黄色产物溶解后经 Sephadex G-100 柱纯化, 产物冷冻干燥。纯化产物命名为 5-AF-MCP。采用相同过程进行 MCP 的 Cy5 酰肼标记, 纯化、收集到的蓝色产物命名为 Cy5-MCP。

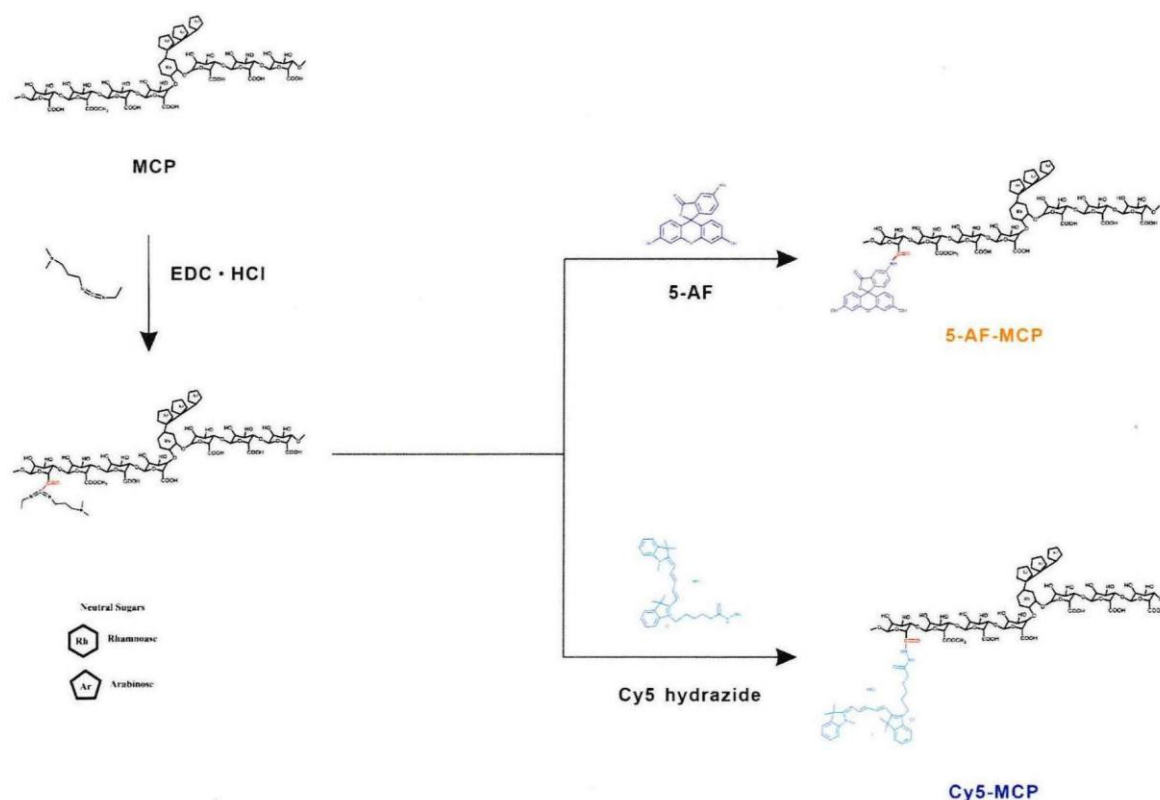


图 2-2 MCP 的荧光标记示意图。

Fig 2-2 Schematic diagram of the synthesis of fluorescently labeled MCP.

2.3.1.2 傅立叶变换红外光谱 (FT-IR) 表征

将 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 样品研磨成粉末，与 KBr (1: 100) 混合后压入圆盘，通过傅立叶变换红外光谱 (Fourier Transform Infrared Spectrometer, FT-IR) 在 $4000-400\text{ cm}^{-1}$ 的波数范围内进行扫描，表征 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP。

2.3.1.3 ^1H 磁共振波谱 (^1H -NMR) 表征

将 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 溶于 D_2O 中后，通过 ^1H 核磁共振波谱 (^1H -Nuclear Magnetic Resonance, ^1H -NMR)，在 600 MHz 下扫描记录 ^1H -NMR 波谱，表征 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP。

2.3.1.4 紫外-可见光谱 (UV-Vis) 表征

将 5-AF 用 DMSO 溶解成 1 mg/mL 的溶液，随后使用 H_2O 稀释成 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 5-AF 溶液；将 5-AF-MCP 用 H_2O 配制成 1 mg/mL 的溶液；用紫外-可见分光光度计 (UV-Visible Spectrophotometer, UV-Vis) 在 300-700 nm 波长范围内扫描，记录 5-AF 和 5-AF-MCP 的紫外图谱。

将 Cy5 酰肼用 DMSO 溶解成 1 mg/mL 的溶液，随后使用 H_2O 稀释成 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$

的 Cy5 酰肼溶液；将 Cy5-MCP 使用 H₂O 配制成 1 mg/mL 的溶液；用紫外-可见分光光度计在 500-800 nm 波长范围内，扫描记录 Cy5 酰肼和 Cy5-MCP 的紫外图谱。

2.3.1.5 荧光光谱表征

通过荧光分光光度计测试 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的荧光光谱，以验证其荧光特性，并确定其最佳激发和发射波长。

将 5-AF 用 DMSO 溶解后用 H₂O 稀释成 10 µg/mL 的 5-AF 溶液；将 5-AF-MCP 用 H₂O 配制成 100 µg/mL 的溶液；随后采用 494 nm 的激发光，检测 5-AF 和 5-AF-MCP 在 510-700 nm 间的荧光发射光谱；

将 Cy5 酰肼用 DMSO 溶解后用 H₂O 稀释成 10 µg/mL 的 Cy5 酰肼溶液；将 Cy5-MCP 用 H₂O 配制成 100 µg/mL 的溶液；随后采用 645 nm 的激发光，检测 Cy5 酰肼和 Cy5-MCP 在 650-800 nm 间的荧光发射光谱。

2.3.1.6 荧光标记取代度

5-AF 的标准曲线：用 DMSO 配制 1 mg/mL 的 5-AF 母液，随后用 H₂O 稀释成浓度依次为 1.25、0.625、0.3125、0.15625 和 0.078125 µg/mL 的 5-AF 溶液，以 H₂O 为空白对照，使用荧光分光光度计在激发波长（Excitation Wavelength, Ex）为 494 nm、发射波长（Emission wavelength, EM）为 520 nm 的条件下，测量 5-AF 溶液的荧光强度。以 5-AF 的浓度为横坐标，以测得的荧光强度-空白对照的荧光值为纵坐标，用加权最小二乘法进行回归运算，得到线性回归方程即 5-AF 的标准曲线。

Cy5 酰肼的标准曲线：用 DMSO 配制成 1 mg/mL 的 Cy5 酰肼母液后，用 H₂O 稀释成浓度依次为 0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005 µg/mL 的 Cy5 酰肼溶液，以 H₂O 为空白对照，使用荧光分光光度计在 Ex = 645 nm、Em = 663 nm 的条件下，测量 Cy5 酰肼溶液的荧光强度。以 Cy5 酰肼的浓度为横坐标，以测得的荧光强度-空白对照的荧光值为纵坐标，用加权最小二乘法进行回归运算，所得的线性回归方程即为 Cy5 酰肼的标准曲线。

5-AF-MCP 的取代度：精确称取 5-AF-MCP，用 H₂O 配制成 1 mg/mL 的母液，进一步稀释成浓度依次为 6.25、12.5 和 25 µg/mL 的 5-AF-MCP 溶液，以 H₂O 为空白对照。在 Ex = 494 nm，Em = 520 nm 的波长下测量其荧光强度，并代入 5-AF 标准曲线方程中。根据公式^[176]： $R_L\% = (C_F / C_0) \times 100\%$ ，计算 5-AF-MCP 中 5-AF 取代度，其中，C_F 为样品中 5-AF 的浓度（µg/mL），C₀ 为样品的初始浓度（µg/mL）。

Cy5-MCP 的取代度：精确称取 Cy5-MCP，用 H₂O 配制成浓度依次为 12.5、25 和 50 µg/mL 的 Cy5-MCP 溶液，以 H₂O 为空白对照。在 Ex = 645 nm，Em = 663 nm 的波长下测量其荧光强度，并代入 Cy5 酰肼标准曲线方程中。最后，根据以下公式

[176]: $R_L\% = (C_F / C_0) \times 100\%$, 计算 Cy5-MCP 中 Cy5 酰肼的荧光取代度, 其中, C_F 为样品中 Cy5 酰肼的浓度 ($\mu\text{g/mL}$), C_0 为样品的初始浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。

2.3.1.7 Zeta 电位表征

用水配制浓度为 1 mg/mL 的 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 溶液, 随后使用动态光散射粒度仪 (Dynamic Light Scattering, DLS) 检测其 Zeta 电位。

2.3.2 MCP 的关节内注射和清除

2.3.2.1 关节内注射、活体成像观察及 MCP 的清除率

健康 8 周龄雄性 BALB/c 小鼠 ($20 \pm 2\text{ g}$), 购自于中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心, 饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物房。动物房昼夜 12 小时光暗交替, 环境温度控制在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 50%-70%, 3 只/笼饲养, 食水自由摄取, 动物适应环境一周后开始实验。动物实验经天津市实验动物伦理委员会批准 (IRM-DWLL-2019006), 按照 ARRIVE 和天津市动物委员会相关指南进行。

小鼠用 4% 水合氯醛 ($0.1\text{ mL} / 10\text{ g}$) 麻醉后, 剔除左右后肢毛发, 75% 酒精消毒。用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 微量注射器将 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 Cy5-MCP (1 mg/mL , 溶于生理盐水) 或 Cy5 酰肼 (通过 R_L 计算剂量) 注射到小鼠的左右膝关节内, 随后充分被动活动小鼠膝关节。于注射后第 1、3、7、14 和 28 天, 处死小鼠, 通过小动物活体成像系统 (In vivo imaging system, IVIS) 对小鼠膝关节进行成像。进一步截取小鼠左右后肢, 暴露关节软骨组织, 用生理盐水洗涤 3 次后, 通过 IVIS 进行观察、成像, 所有图像均使用相同的激发强度和曝光时间拍摄。最后, 根据各时间点每个关节内检测到的荧光强度, 计算并绘制 Cy5-MCP 和 Cy5 酰肼在小鼠关节内的清除率。

2.3.2.2 MCP 的全身毒性

将 2.3.2.1 中经 Cy5-MCP 处理 28 天的小鼠, 称量体重后处死, 以不经任何处理的同样条件下饲养 28 天的小鼠为对照组。处死小鼠后摘取并称重其心 (Heart)、肝 (Liver)、脾 (Spleen)、肺 (Lung) 和肾 (Kidney) 脏。按照以下公式: 脏器系数 = 脏器质量 (g) / 体重 (g) $\times 100\%$, 计算小鼠的脏器系数。

称量小鼠脏器后, 将各脏器在 4% 多聚甲醛中固定 48 小时后, 用 15% 和 30% 蔗糖溶液梯度脱水, 直至组织沉至离心管底。随后使用 OCT 包埋剂包埋组织, 使用冰冻切片机进行切片, 厚度为 $9\text{ }\mu\text{m}$, 经苏木素-伊红 (HE) 染色后, 显微镜下观察经 Cy5-MCP 膝关节注射后小鼠的脏器病理变化。具体操作步骤如下:

- (1) 将载玻片浸没于含苏木素染液的染缸中染色 5 min 后, 自来水冲洗 10 s,

以除去多余的苏木素染液;

- (2) 转移载玻片至含有 0.5% 盐酸乙醇的分化液中, 分化 3 s;
- (3) 自来水浸泡 15 min;
- (4) 将载玻片浸没于含伊红染液的染缸中染色 3 min 后, 自来水冲洗 10 s, 以除去多余的伊红染液;
- (5) 将载玻片依次置于 95% 乙醇, 100% 乙醇, 二甲苯中 1 min;
- (6) 使用中性树胶封片, 在显微镜下拍照观察。

2.3.3 含 MCP 培养液的配制

称取 100 mg MCP 粉末于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL D-PBS, 经 0.22 μm 无菌过滤器过滤除菌后得到浓度为 10 mg/mL 的 MCP 母液。按照 1 mL FBS、0.5 mL 10 mg/mL 的 MCP 母液、0.5 mL D-PBS、100 μL 青霉素-链霉素溶液和 8 mL DMEM 的比例混匀, 得到终浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ MCP 的培养液, 记为 MCP 500 培养基; 将 MCP 母液替换为 0.5 mL D-PBS 得到 MCP 0 培养基。按相同方法, 配制浓度为 200、400、600、800 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cy5-MCP 或 5-AF-MCP 的培养基。

2.3.4 关节软骨外植体的培养

2.3.4.1 关节软骨外植体的分离、培养

从当地屠宰场取回新鲜小牛的膝关节, 用无菌 PBS 清洗后, 于无菌环境中使用直径 4 mm 的活检打孔器从关节表面分离外植体, 使用 PBS 清洗 3 次后, 转移至无菌培养皿中, 加入含 10% FBS 和 1% 青-链霉素双抗的 DMEM 培养基, 置于细胞培养箱 (相对湿度 95%、37°C 和 5% CO_2) 中培养 2 天后, 用于后续实验。

2.3.4.2 Cy5-MCP 对外植体软骨细胞活性的影响

使用 Cy5-MCP 测试 MCP 的软骨外植体生物相容性。PBS 洗涤外植体 3 次后转移到无菌 48 孔板中, 加入 1 mL 含有 10% FBS 的 DMEM 培养基孵育 2 天; 更换为含 Cy5-MCP 的培养基 (1000 $\mu\text{g/mL}$), 继续培养 24 h。随后, 弃去培养基, 每孔加入 500 μL 10% CCK-8 溶液, 避光孵育 2 h, 以不经 Cy5-MCP 孵育的组为对照组 (Control 组)。孵育完毕后, 吸取 100 μL 孵育液转移到新的 96 孔板, 使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度。根据公式: 细胞相对存活率 (%) = $(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{Blank}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{Blank}}) \times 100\%$, 计算软骨外植体中软骨细胞的生物活性。OD_{Blank} 为仅加入 10% CCK-8 溶液孔的吸光度值。

进一步使用 Live/Dead 染液检测 Cy5-MCP 对软骨外植体的生物相容性。将软骨

外植体在 Cy5-MCP 溶液 (1000 $\mu\text{g/mL}$) 中孵育 24 小时后, 用 PBS 清洗 3 次后, 加入 Live/Dead 染液染色 30 min, 染色结束后, 弃去染液并用 PBS 清洗 3 次, 手术刀矢状面切割外植体后, 激光共聚焦显微镜 (CLSM) 下在 Cy5 通道和 DAPI 通道观察、成像, 所有图像均使用相同的激发强度和曝光时间拍摄。

2.3.4.3 软骨外植体的浸润培养及 MCP 的分布

将外植体浸入 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cy5-MCP 或游离的 Cy5 酰肼 (浓度以 R_L 计算) 溶液中共培养 3、6、12 和 24 小时后, PBS 洗涤三次, 4% 多聚甲醛固定, 冰冻切片机矢状面切片, 厚度为 100 μm 。用 DAPI 对细胞核染色 5 分钟。最后, 使用 CLSM 在 Cy5 通道和 DAPI 通道观察、成像, 所有图像均使用相同的激发强度和曝光时间拍摄。软骨外植体的培养示意图如图 2-3 所示。

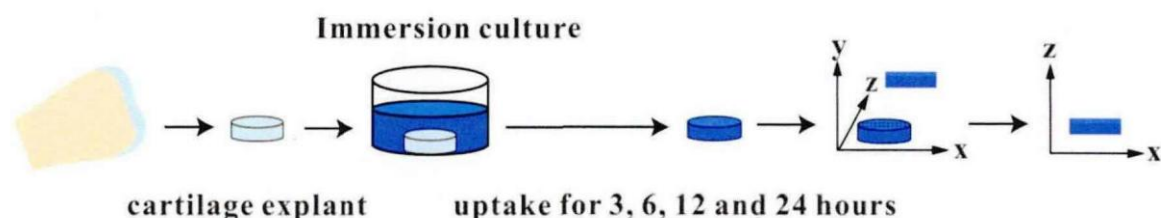


图 2-3 软骨外植体在含有 Cy5-MCP 培养基中的浸润培养示意图

Fig 2-3 The schematic diagram of immersion culture of the cartilage explants in medium containing Cy5-MCP.

2.3.4.4 软骨外植体的接触培养及 MCP 的分布

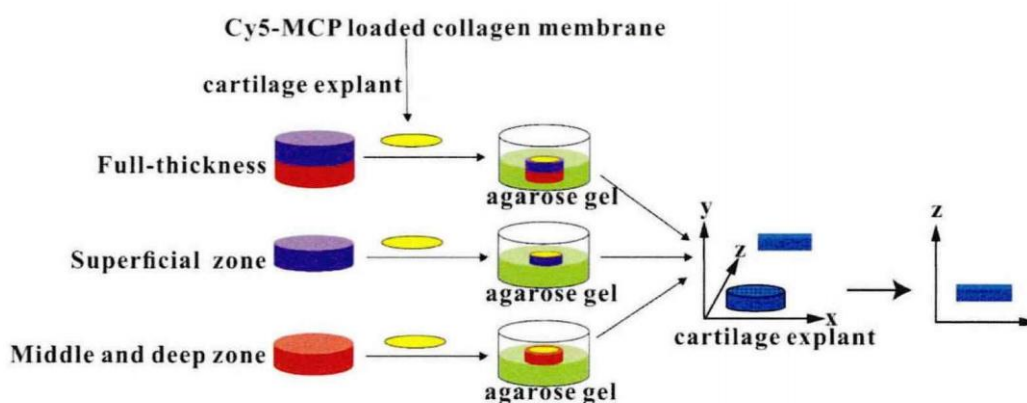


图 2-4 软骨外植体与 Cy5-MCP 的接触培养示意图

Fig 2-4 The schematic diagram of contact culture of cartilage explants with Cy5-MCP.

软骨外植体与 Cy5-MCP 的接触培养如图 2-4 所示。按照软骨厚度的 20% 为浅

层、80%为中深层的比例，用手术刀沿水平面切割软骨外植体，获得浅层和中深层的软骨样本^[177]。将琼脂糖溶于 DMEM 中并通过高压灭菌处理，以获得无菌的 1% 琼脂糖凝胶，并趁热加入到 24 孔板中，使其凝固成凝胶。随后，使用活检打孔器在琼脂糖凝胶上钻取 4 mm 的腔室，然后将软骨样本嵌入腔室中，并在软骨样本上覆盖载有 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cy5-MCP 的胶原膜（负载 Cy5-MCP 的胶原膜参考课题组之前的方法构建），37°C 培养箱中孵育 24 小时。从凝胶中取出软骨外植体，PBS 冲洗 3 次，除去未渗透到组织内的游离 Cy5-MCP；接着，沿软骨外植体中心矢状面切片（厚度 $\sim 100\ \mu\text{m}$ ），然后用 DAPI 染色 5 min。最后，使用 CLSM 在 Cy5 通道和 DAPI 通道下观察成像，所有图像均使用相同的激发强度和曝光时间拍摄。

2.3.4.5 MCP 和 Gal-3 在软骨外植体的共定位

将外植体与 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cy5-MCP 培养液共培养 24 小时后，PBS 洗涤 3 次，4% 多聚甲醛固定，冰冻切片机矢状面切片，厚度 10 μm 。随后加入 Alexa Fluor 350 标记的 Gal-3 单克隆抗体，37°C 染色 3 h，PBS 洗涤 3 次，除去未标记的染料，随后用 CLSM 在 Cy5 通道和 405 通道下观察样品、采集图像。最后，采用 Image J 软件对采集图像进行 MCP 和 Gal-3 的共定位分析。

2.3.5 关节软骨细胞的培养

2.3.5.1 关节软骨细胞的分离、培养

采用课题组已建立的方法分离培养软骨细胞。健康 4 周龄日本大耳白兔购自于中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心，动物使用许可证号：SYXK（津）2019-002；质量合格证号：No120906231100035165；伦理审批号：IRM-DWLL-2019006。

过量麻醉处死日本大耳白兔后，截取双后肢并置于 75% 乙醇中浸泡 15 min。在无菌环境下，暴露膝关节的关节面，随后使用手术刀分离软骨组织，将软骨组织置于 PBS 中并修剪成约 1 mm^3 的块状颗粒，转移至离心管，加入 2 倍体积的 0.25% 胰酶，37°C 恒温箱内振荡消化 1 h，离心去除胰酶溶液，加入 5 mL 0.2% 的 II 型胶原酶溶液，37°C 消化 6 h 至软骨组织颗粒被充分消化、悬液变混浊。悬浊液经 70 μm 的细胞筛过滤，收集滤液，滤液离心后收集下层沉淀，获得软骨细胞。将软骨细胞转移至 PBS 中，离心 5 min 后弃上清，收集下层细胞沉淀，随后加入 1 mL 完全培养基（含 10% FBS 和 1% 青-链霉素双抗、90% DMEM），吹打为单细胞悬液后接种于培养皿中，于细胞培养箱（相对湿度 95%、37°C、5% CO_2 ）中培养 2 天后，换液以去除未贴壁细胞，之后每 3 天更换一次培养液。待细胞融合到 80%，使用 TE

消化 2 min 后, 加入完全培养基以终止消化, 并按 1:2 的比例传代培养。

2.3.5.2 MCP 的关节软骨细胞相容性

关节软骨细胞以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种在 96 孔板, 待细胞贴壁后更换为含 5-AF-MCP 或 Cy5-MCP (浓度为 0、200、400、600、800 和 1000 $\mu\text{g/mL}$) 的培养基, 共培养一天后, 弃去培养液。随后加入 100 μL 含 10% CCK-8 溶液共孵育 2 小时后, 置于酶标仪中并在 450 nm 处测量吸光度。根据 2.3.4.2 中所列公式计算各组软骨细胞的存活率。

2.3.5.3 软骨细胞对 MCP 的摄取

为了检测软骨细胞对荧光标记 MCP 的摄取情况, 将软骨细胞接种于共聚焦显微镜专用培养皿, 当细胞融合度达到 80% 时, 更换为含 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-AF-MCP 或游离 5-AF 的培养液 (根据 R_L 计算剂量), 孵育 0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 小时。随后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 以除去未被细胞摄取的 5-AF-MCP 和 5-AF, 然后用 4% 多聚甲醛固定 15 min。除去固定液后, PBS 清洗 3 次, 用 DAPI 复染细胞核 5 min, PBS 冲洗 3 次后, 使用激光共聚焦显微镜在 FITC 通道、DAPI 通道下观察和采集图像, 所有图像均使用相同的激发强度和曝光时间拍摄。

为了定量分析软骨细胞对 MCP 的摄取, 将软骨细胞接种在 12 孔板中, 并分为 Control 组、游离 5-AF 组和 5-AF-MCP 组。Control 组为不经任何处理的细胞; 游离 5-AF 组为经 5-AF 培养液培养 (浓度由 R_L 计算) 48 h 的细胞; 5-AF-MCP 组为经 5-AF-MCP (1000 $\mu\text{g/mL}$) 培养液培养 0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 h 的细胞。在孵育一定时间后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 使用胰蛋白酶-EDTA 消化离心并收集细胞, 使用流式细胞仪在 488 nm 通道检测 1×10^4 个细胞的荧光强度。

2.3.5.4 MCP 在软骨细胞中的亚细胞定位

同上, 将软骨细胞在含 5-AF-MCP (1000 $\mu\text{g/mL}$) 的培养基中培养 24 h 后, PBS 洗涤细胞 3 次, 随后按照说明书方法, 分别加入线粒体、内质网、微丝和溶酶体亚细胞器染色液, 随后分别孵育 20、20、45 和 30 min, 除去染色液, PBS 清洗 3 次, DAPI 复染细胞核, CLSM 观察和采集图像。

2.3.5.5 MCP 和 Gal-3 在软骨细胞中的共定位

为了检测软骨细胞中 MCP 和 Gal-3 的共定位情况, 按上述方法, 将软骨细胞与 Cy5-MCP (1000 $\mu\text{g/mL}$) 培养 24 h 后, PBS 洗涤 3 次, 加入荧光标记 Gal-3 抗体, 37°C 条件下对软骨细胞染色 3 h, PBS 除去未标记的染料, 随后用 CLSM 观察样品

并成像。最后,采用 Image J 软件对软骨细胞中 MCP 和 Gal-3 的共定位进行分析。

2.3.6 转录组学数据分析

本部分在考察了软骨细胞对 MCP 的摄取及其在软骨细胞内的分布情况的基础上,进一步对课题组前期获取的差异表达基因和差异蛋白组数据进行分析,以期深入研究 MCP 对软骨细胞的作用机制。首先,对 MCP 培养 3 天的软骨细胞的差异表达基因进行 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析^[162];接着,对课题组前期体外构建的 MCP 复合水凝胶基组织工程软骨的差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析^[161];最后,对课题组前期 MCP-透明质酸(Sodium Hyaluronate, HA)复合水凝胶治疗轻度骨关节炎的研究中所获关节液的差异表达蛋白进行 KEGG 通路富集分析。

2.3.7 MCP 对软骨细胞自噬相关基因表达的影响

2.3.7.1 MCP 对软骨细胞自噬相关基因表达的影响

将第三代(P3)软骨细胞接种于 24 孔板(3×10^4 /孔),加入 500 μ L MCP 0 培养基(Control 组)和 MCP 500 培养基(MCP 500 组)培养软骨细胞,每组 3 个复孔。于培养第 3 天,收集细胞提取总 RNA,用于后续逆转录实时定量聚合酶链式反应(Quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)。

2.3.7.2 MCP 对连续传代软骨细胞自噬相关基因表达的影响

将原代软骨细胞分别使用 MCP 0 培养基(Control 组)和 MCP 500 培养基(MCP 500 组)进行培养,待细胞融合到 80% 后,将 Control 组与 MCP 500 组的细胞分别按照 1:2 的比例传代培养,并重复以上操作,直至细胞传至第 7 代。培养过程中,同时收集 P3-P7 代软骨细胞,接种于 24 孔板(3×10^4 /孔)中,加入 500 μ L MCP 0 和 MCP 500 培养基继续培养 3 天,然后收集细胞提取总 RNA,用于后续 RT-qPCR。

2.3.7.3 MCP 对 IL-1 β 诱导软骨细胞的自噬相关基因表达的影响

体外研究中常用白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)处理正常软骨细胞以模拟炎症状态。本部分通过 IL-1 β 诱导正常细胞,以检测 MCP 对 OA 样软骨细胞自噬相关基因表达的影响。具体操作为:将 P3 软骨细胞以 3×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中,加入 500 μ L 含 10 μ g/L IL-1 β 的培养基中诱导 24 h,随后分别更换为 MCP 0 培养基(IL-1 β 组)和 MCP 500 (IL-1 β +MCP500 组)培养基,继续培养 3 天,以未经处理的软骨细胞作为正常对照(Control 组),每组 3 个复孔。于培养的第三天,收集细

胞提取总 RNA，用于后续 RT-qPCR。

2.3.8 软骨细胞的 RNA 提取

培养的软骨细胞，弃去培养基，加入 PBS 洗涤 2 次后，加入 400 μ L 细胞裂解液（异硫氰酸胍： β -巯基乙醇 = 50:1）。在去除 gDNA 后加入适量无酶 DEPC 水，得到总 RNA。使用 Nano Vue Plus 对 RNA 进行检测，A260/A280 的吸光度比值在 1.8-2.0 的 RNA 用于后续 RT-qPCR。

2.3.9 实时反转录 PCR (RT-qPCR)

通过 RT-qPCR 检测软骨细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3) 和 苊氯素-1 (Beclin-1, BECN1) 等自噬相关基因的表达情况。具体操作为：

(1) 反转录：以 2.3.8 提取的总 RNA 为模板，反转录为 cDNA。

(2) 按照 1.6 μ L 引物、1.6 μ L cDNA、6.8 μ L RNase Free dH₂O 和 10 μ L SYBR 与 ROX II 混合液的反应体系进行 qPCR 反应。引物序列见表 2-3。

(3) Step one plus Real-time PCR System: 预变性：1 个循环，95 $^{\circ}$ C 30 s；扩增：40 个循环，95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 30 s。

反应结束后，以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理数据。

表 2-3 引物序列

Table 2-3 Primer sequences

目的基因	引物序列
GAPDH	F: 5'-CCACTTTGTGAAGCTCATTCCT-3'
	R: 5'-TCGTCCTCCTCTGGTGCTCT-3'
MAP1LC3	F: 5'-TTTAACCAGTTCGCTCATGTTGAC-3'
	R: 5'-CTTTGCCGACCGTTGTAAGG-3'
BECN1	F: 5'-GGTCAAACCTTGTTGTCCCAGAAA-3'
	R: 5'-GCCCTATGGAAATCACTCGTATCT-3'

注：GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶；MAP1LC3，微管相关蛋白 1 轻链 3；BECN1，苊氯素-1。

2.3.10 数据处理与分析

所有数据以 Mean $\pm$ SD 或 Mean $\pm$ SEM 表示，使用 Graphpad Prism、Origin 或 IBM SPSS 25 软件进行统计分析。P < 0.05 为有统计学意义。

2.4 实验结果

2.4.1 MCP 荧光标记物的表征

2.4.1.1 FT-IR

图 2-5 为 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 红外光谱, 可见 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 具有几乎相同的典型吸收峰。3410 cm^{-1} 处强而宽的吸收峰与 O-H 的伸缩振动有关; 2942 cm^{-1} 处的微弱吸收峰是 C-H 伸缩振动峰; 1607 cm^{-1} 和 1416 cm^{-1} 处的吸收峰分别表明存在 C=O 和 C-H 弯曲; 上述四个吸收峰是多糖的特征峰^[170, 178, 179]。5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的 FT-IR 谱图均呈现有上述 4 个吸收峰, 表明荧光标记反应未影响 MCP 多糖骨架。FT-IR 的指纹区 (1250-400 cm^{-1}) 对分子结构的变化高度敏感, 能够用于区分不同化合物结构上的微小差异^[180]。5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的指纹区范围内, 可见 1239 cm^{-1} 处有弱的吸收峰, 为仲酰胺第三波段的 C-N 伸缩振动, 提示 5-AF 和 Cy5 酰肼被成功接枝于 MCP 上。

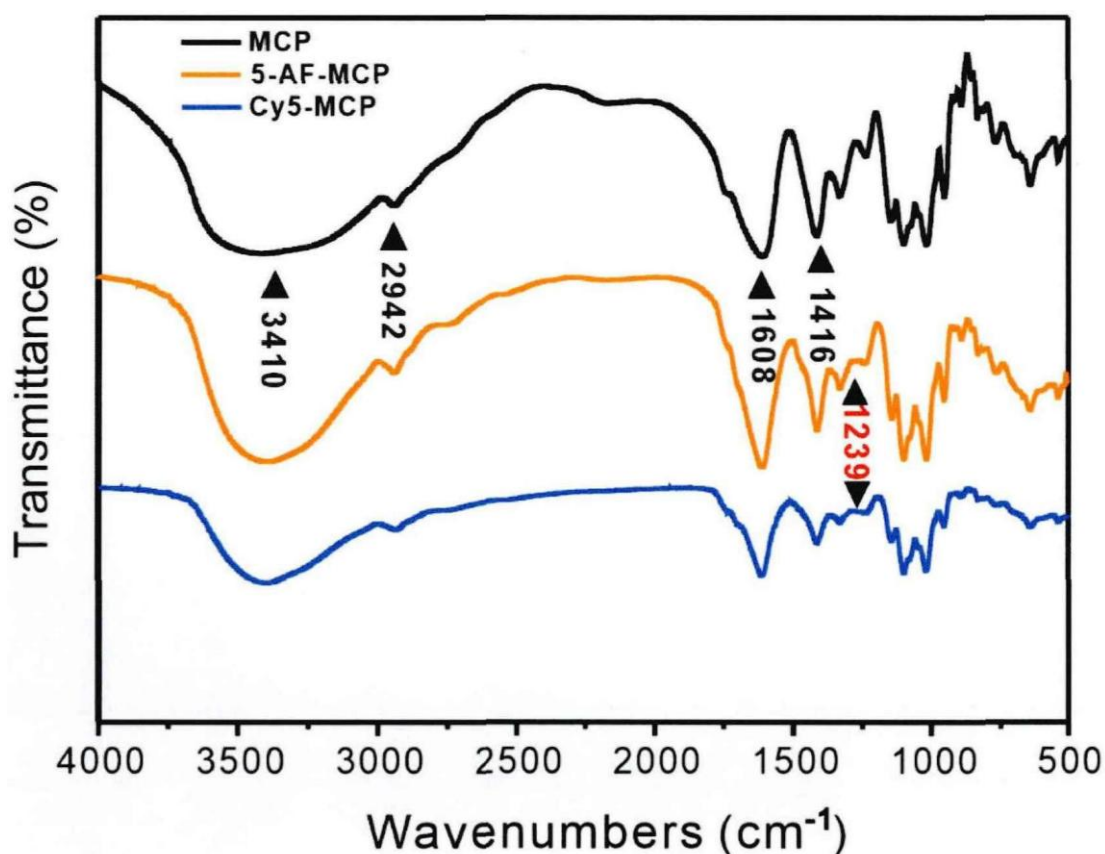


图 2-5 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的红外光谱图
Fig 2-5 Infrared spectra of MCP, 5-AF-MCP and Cy5-MCP.

2.4.1.2 ^1H -NMR

为了进一步证实 5-AF 和 Cy5 标记 MCP 的成功合成,对合成产物进行了核磁共振氢谱分析(图 2-6)。由图可见, $\delta 4.70$ ppm 处的峰为 D_2O 溶剂峰,从 $\delta 3.32$ ppm 到 $\delta 6$ ppm 的化学位移是多糖的特征信号峰^[181],与 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的红外结果一致。此外,在 5-AF-MCP 的 ^1H NMR 谱中, $\delta 2.2$ - 3.0 ppm 区为 5-AF 的甲基质子和亚甲基质子的特征峰^[182],表明 5-AF 从游离化合物变为共轭形式时,存在新形成的信号;Cy5-MCP 也存在类似的表征,在 Cy5-MCP 的 ^1H -NMR 谱图中,也可见 Cy5 酰肼的甲基质子和亚甲基质子对应的特征峰(2.2 - 3.0 ppm)。因此,由 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的 ^1H 核磁图谱可以推测 5-AF 和 Cy5 酰肼可以成功标记 MCP,同时标记未改变 MCP 的多糖结构。

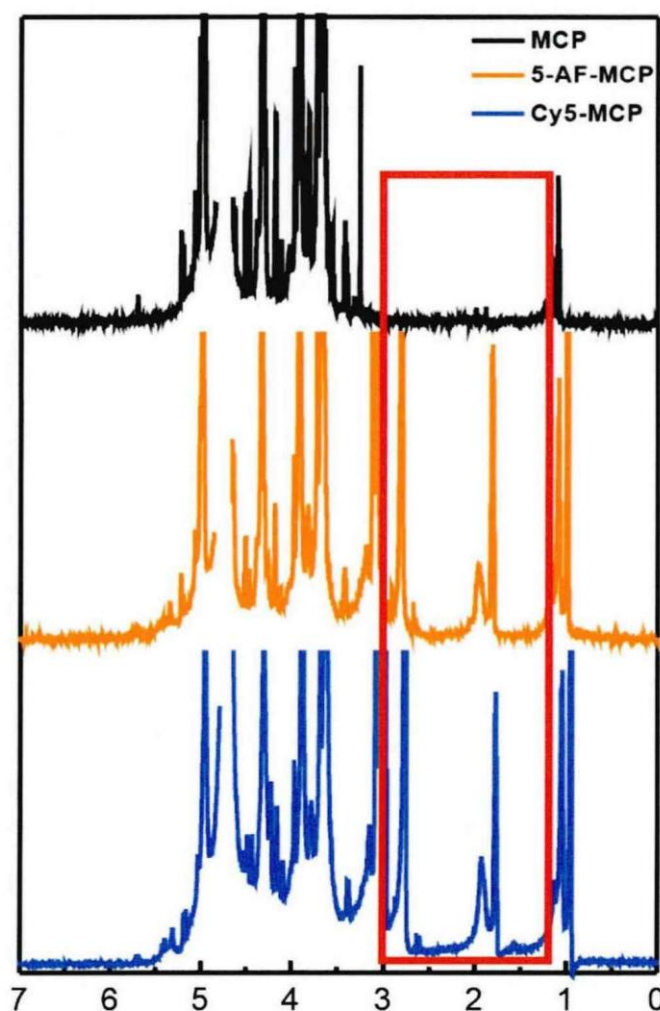


图 2-6 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的 ^1H 核磁共振波谱。

Fig 2-6 ^1H -NMR spectra of MCP, 5-AF-MCP and Cy5-MCP.

2.4.1.3 UV-Vis 光谱

对 5-AF 和 5-AF-MCP 进行了 UV-Vis 光谱检测, 结果见图 2-7。由 5-AF 及 5-AF-MCP 的紫外可见光谱可见, 二者均显示有两个紫外吸收峰, 这是由于在溶液中存在单体 5-AF 和 H 聚集的 5-AF^[183]; 值得注意的是, 5-AF-MCP 的紫外-可见吸收峰 (492 nm) 不同于 5-AF (474 nm) 的吸收峰, 提示 5-AF-MCP 的紫外-可见吸收峰发生了红移。从 Cy5 酰肼和 Cy5-MCP 的 UV-Vis 光谱图可见, Cy5-MCP 的特征吸收峰 (641 nm) 相较于 Cy5 酰肼 (640 nm) 也有轻微红移。

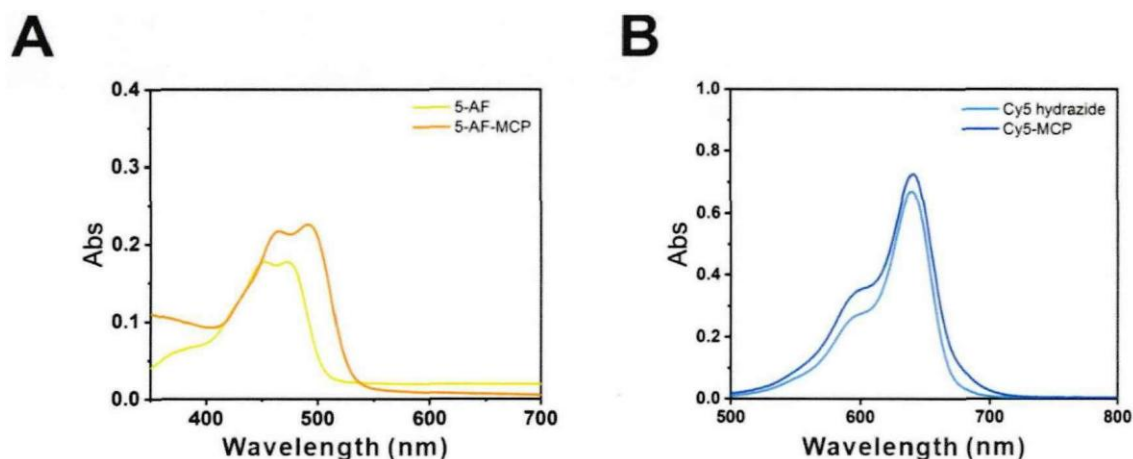


图 2-7 5-AF、5-AF-MCP、Cy5 酰肼和 Cy5-MCP 的紫外-可见光谱图。(A) 5-AF 和 5-AF-MCP 的紫外-可见光谱; (B) Cy5 酰肼和 Cy5-MCP 的紫外-可见光谱。

Fig 2-7 UV-Vis spectra of 5-AF, 5-AF-MCP, Cy5-hydrazide and Cy5-MCP. (A) UV-Vis spectra of 5-AF and 5-AF-MCP; (B) UV-Vis spectra of Cy5 hydrazide and Cy5-MCP.

2.4.1.4 荧光光谱表征

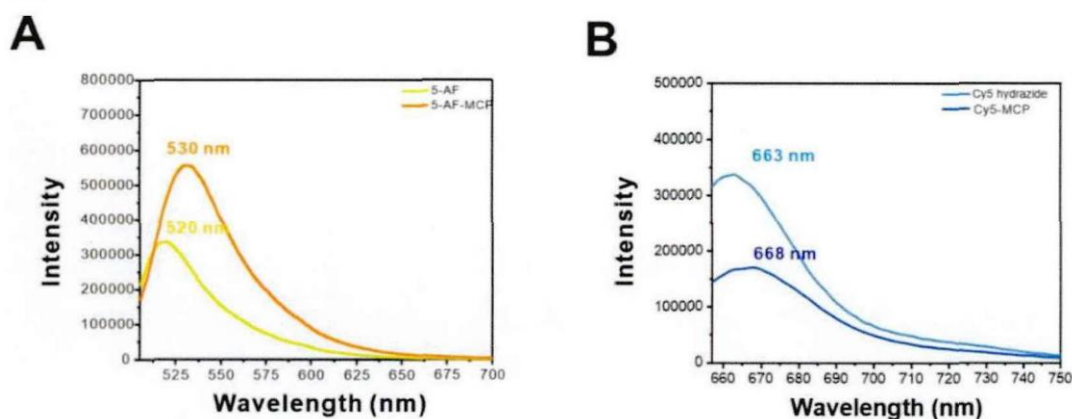


图 2-8 5-AF、5-AF-MCP、Cy5 酰肼和 Cy5-MCP 的荧光光谱

Fig 2-8 Fluorescence spectra of 5-AF, 5-AF-MCP, Cy5 hydrazide and Cy5-MCP.

图 2-8A 为 5-AF-MCP 和 5-AF 的荧光图谱。由图可见, 在 494 nm 激发波下 (Ex

= 494 nm), 5-AF 的最大发射波长为 520 nm, 而 5-AF-MCP 的最大发射波长为 530 nm, 说明 5-AF-MCP 的最大发射波长发生轻微红移, 提示荧光素与多糖分子发生了共轭作用, 进一步表明 5-AF-MCP 已成功结合^[184]。

图 2-8B 为 Cy5-MCP 和 Cy5 酰肼荧光图谱。由图可见, 在 645 nm 的激发波长下 ($E_x = 645\text{nm}$), Cy5 酰肼的最大发射波长为 663 nm, 而 Cy5-MCP 的发射波长为 668 nm, 与 Cy5 酰肼相比, Cy5-MCP 的发射波长发生微弱红移, 提示 Cy5 酰肼和 MCP 之间发生了化学键合, 证实了 Cy5-MCP 的成功结合^[184]。

2.4.1.5 MCP 的荧光标记率

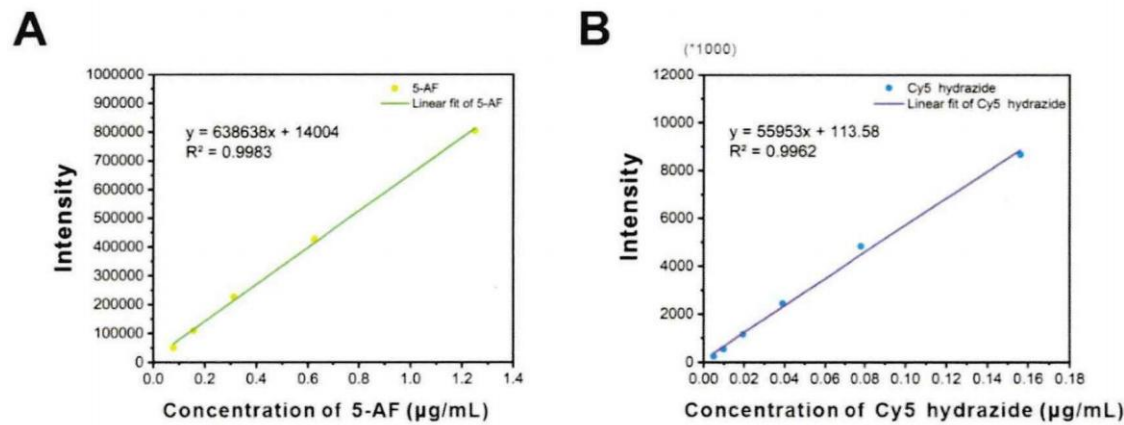


图 2-9 5-AF 和 Cy5 酰肼的标准曲线。(A) 5-AF 的标准曲线方程; (B) Cy5 酰肼的标准曲线方程。

Fig 2-9 Standard curves of 5-AF and Cy5 hydrazide. (A) The standard curve equation for 5-AF; (B) The standard curve equation for Cy5 hydrazide.

为了检测 5-AF 和 Cy5 酰肼在 MCP 上的荧光标记率, 通过荧光分光光度计计算其荧光取代度。如图 2-9 所示, 5-AF 标准曲线的线性回归方程为 $y = 638638x + 14004$, $R^2 = 0.9983$; Cy5 酰肼的线性回归方程为 $y = 55953x + 113.58$, $R^2 = 0.9962$ 。进一步, 将测得的 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的荧光强度代入标准曲线方程, 计算结果见表 2-4 和表 2-5, 可见 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 中 5-AF 和 Cy5 酰肼的平均取代度分别为 4.3% (w/w) 和 0.0425% (w/w)。

表 2-4 5-AF-MCP 的荧光标记率
Table 2-4 The R_L (%) of 5-AF-MCP

$C_0(\mu\text{g/mL})$	Fluorescence Intensity	$C_F(\mu\text{g/mL})$	$R_L\% = C_F/C_0 \times 100\%$	Calculated mean of R_L (%)
6.25	175890	0.253486	4.055781	
12.5	368203.3	0.554617	4.436934	
25	713742.2	1.095673	4.382691	4.291802

表 2-5 Cy5-MCP 的荧光标记率
Table2-5 The R_L (%) of Cy5-MCP

C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	Fluorescence Intensity	C_F ($\mu\text{g/mL}$)	$R_L\% = C_F/C_0 \times 100\%$	Calculated mean of R_L (%)
12.5	412322.2	0.005339	0.042713	
25	713585.6	0.010723	0.042894	
50	1286220	0.020958	0.041915	0.0425

2.4.1.6 Zeta 电位表征

图 2-10 显示了 MCP 在水溶液中的 Zeta 电位。可见, MCP 为负电位, 而与 MCP 相比, 经 5-AF 和 Cy5 酰肼标记得到的 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的 Zeta 电位的负电势虽然有一定降低, 但 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 依旧呈负电位。

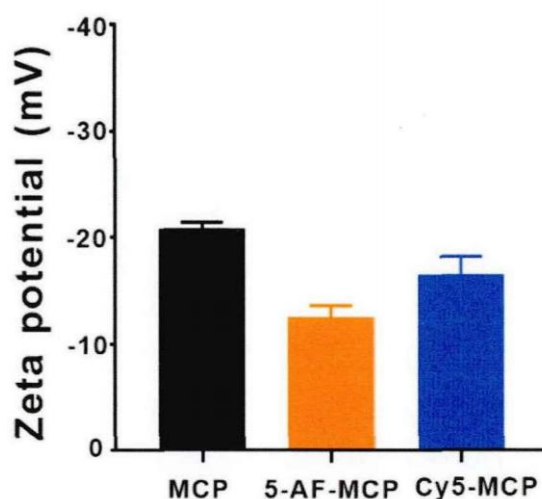


图 2-10 MCP、5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的 Zeta 电位
Fig 2-10 Zeta potential of MCP, 5-AF-MCP and Cy5-MCP.

2.4.2 荧光标记 MCP 在关节内的保留

将 Cy5-MCP 和游离 Cy5 酰肼注射到小鼠膝关节后, 通过活体成像观察 28 天内小鼠关节荧光强度的变化。由图 2-11 可见, Cy5-MCP 和游离 Cy5 酰肼在关节中的保留和清除过程不同。由图 2-11B 可见, Cy5-MCP 和 Cy5 酰肼的相对荧光强度在前 7 天内均有快速下降, 提示二者在注射早期可被快速清除; 但与 Cy5 酰肼相比, Cy5-MCP 的相对荧光强度下降较慢; 且二者在 14 天时都接近了基线。由图 2-10C 可见, 在注射 7 天后, 右后肢关节内 Cy5 酰肼荧光信号明显减弱; 而左后肢关节内仍能观察到较强的 Cy5-MCP 的荧光信号, 且 28 天内都可以持续观察到荧光信号。以上的结果提示, Cy5-MCP 能够在小鼠关节内至少可以持续保留 2 周。

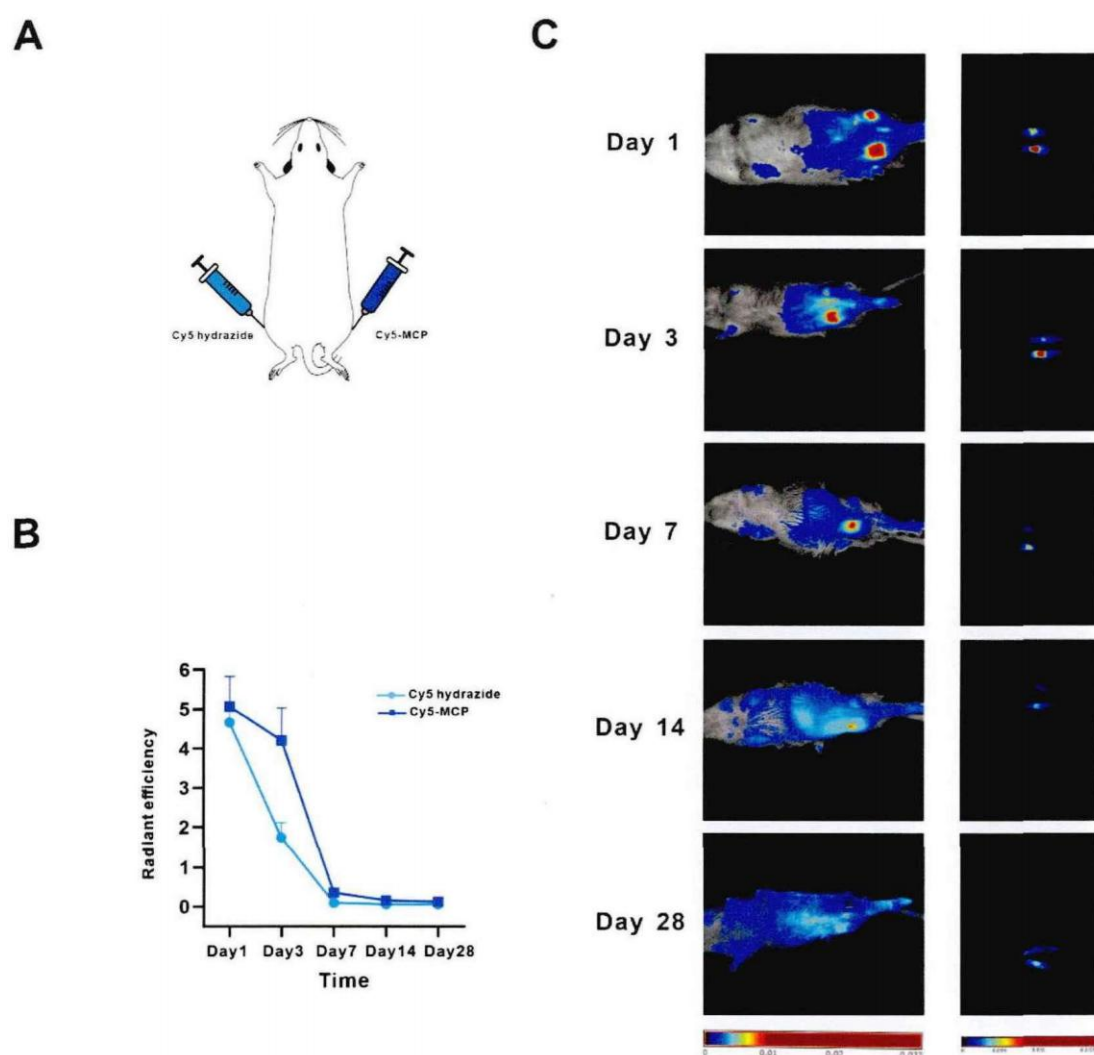


图 2-11 Cy5-MCP 在小鼠关节内的活体成像。(A) 关节内注射示意图；(B) 清除率；(C) 活体成像。(mean $\pm$ SD, n=3)

Fig 2-11 Imaging of Cy5-MCP in mouse joints. (A) Schematic diagram of intra-articular injection; (B) The clearance; (C) The in vivo imaging images. (mean $\pm$ SD, n=3)

2.4.3 荧光标记 MCP 的生物相容性

2.4.3.1 荧光标记 MCP 的全身毒性

通过检测经 Cy5-MCP 处理 28 天的小鼠的体重、脏器指数、脏器形态及脏器 HE 染色考察荧光标记 MCP 的全身毒性。可见对照组和 Cy5-MCP 处理组小鼠的体重 (图 2-12A) 和脏器指数 (图 2-12B) 数值之间无明显差异。对两组间小鼠的心、肝、脾、肺、肾脏进行解剖时发现, 各脏器均未发生黏连; 进一步对两组间小鼠脏器外观形态进行比较, 由图 2-12C 可见, 各脏器组织结构完整、无变色、萎缩; 由脏器的活体成像图 (图 2-12D) 可见, Cy5-MCP 处理组的小鼠脏器荧光信号与对照组相比无明显差异。有意思的是, 两组的肺脏组织在活体成像中均呈现有强荧光信

号,这可能是由于肺是由复杂异质性细胞组成的组织^[185],在相同的激发照射下具有高自发荧光背景^[186]。

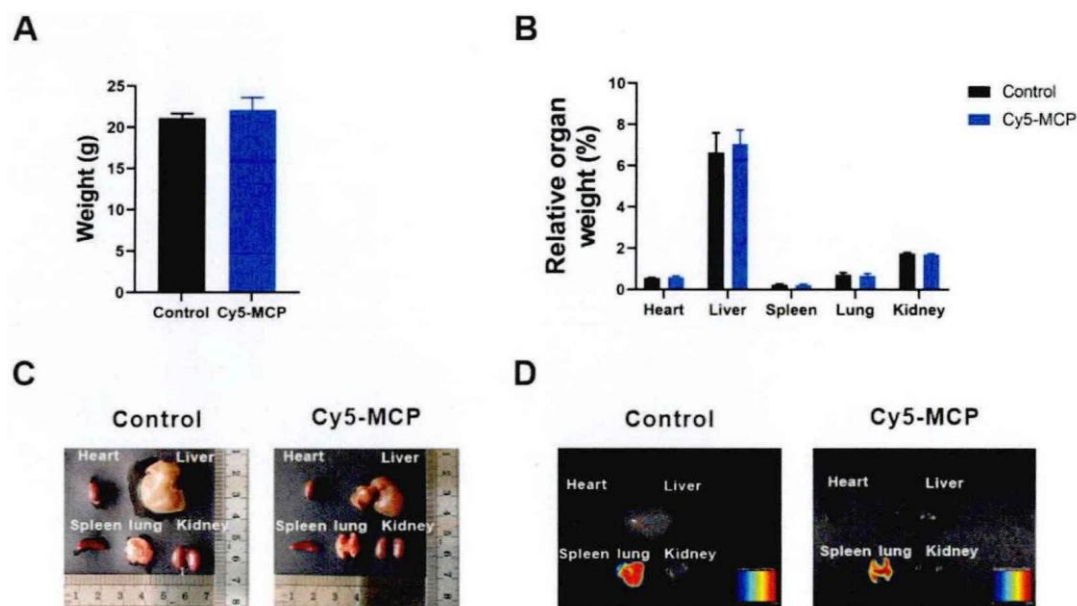


图 2-12 Cy5-MCP 的全身毒性。(A) 体重; (B) 脏器指数; (C) 脏器外观形态图; (D) 活体成像图 (mean $\pm$ SD, n=3)

Fig 2-12 Systemic toxicity of Cy5-MCP. (A) Weight; (B) Organ index; (C) Morphological images; (D) In vivo imaging images. (mean $\pm$ SD, n=3)

对两组小鼠脏器进行 HE 染色, 结果见图 2-13。可见, Cy5-MCP 注射 28 天后, 与对照组相比, 主要脏器无明显组织学改变, 心肌纤维排列规则、整齐其无变性坏死; 肝细胞形态完整, 且以中央静脉为中心点呈放射状排布; 脾脏红髓白髓清晰可见; 肺部可见大量网眼状的肺泡和肺泡囊; 肾脏肾皮质区可见正常的肾小球。以上数据提示, 关节内注射 Cy5-MCP 对小鼠主要脏器无明显的毒性, 关节内注射浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cy5-MCP 具有良好的生物相容性。

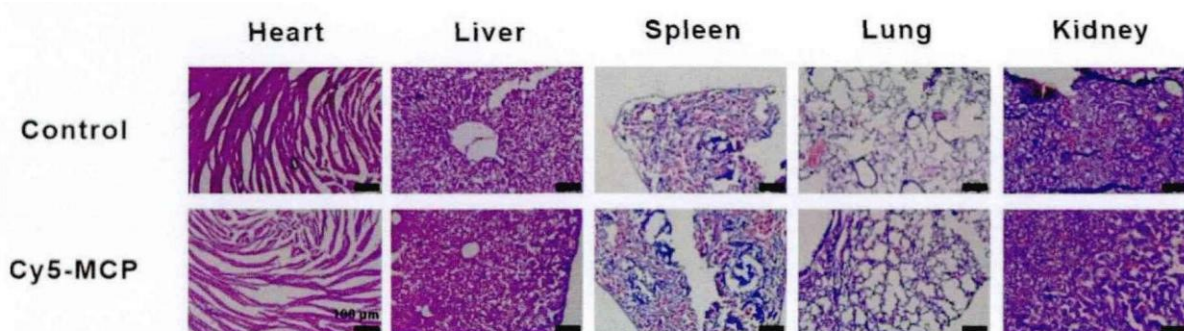


图 2-13 对照组和 Cy5-MCP 组小鼠的心、肝、脾、肺和肾的 HE 染色图, 标尺: 100 μm 。

Fig 2-13 HE staining images of heart, liver, spleen, lung and kidney of mice in the control and Cy5-MCP groups, scale bar: 100 μm .

2.4.3.2 荧光标记 MCP 的外植体相容性

通过 CCK-8 和活/死染色检测 Cy5-MCP 对关节软骨外植体的生物相容性, 结果见图 2-14。可见, Cy5-MCP (1000 $\mu\text{g/mL}$) 对软骨外植体中的软骨细胞活力无明显影响。同时, 由外植体的细胞活/死染色图像 (图 2-14B) 可见, 通过 Cy5-MCP 孵育 24 小时的软骨外植体中死骨细胞数量较对照组少, 这可能是由于体外分离和培养过程中, 外植体内软骨细胞会发生凋亡, 而 MCP 可以进入外植体内, 发挥其软骨细胞保护作用, 减少了软骨细胞的凋亡, 但具体机制需要进一步研究。

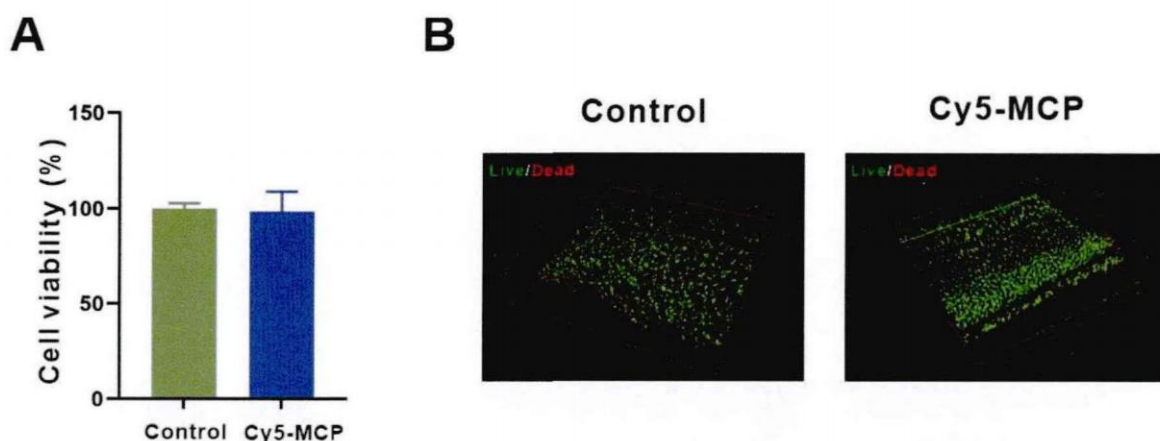


图 2-14 Cy5-MCP 的外植体相容性。(A) Cy5-MCP 的细胞存活率; (B) 活/死染色, 标尺: 100 μm 。(mean $\pm$ SD, $n=3$)

Fig 2-14 Explant compatibility of Cy5-MCP. (A) Cell viability of Cy5-MCP; (B) Live /dead staining, scale bar: 100 μm . (mean $\pm$ SD, $n=3$)

2.4.4 荧光标记 MCP 的外植体渗透

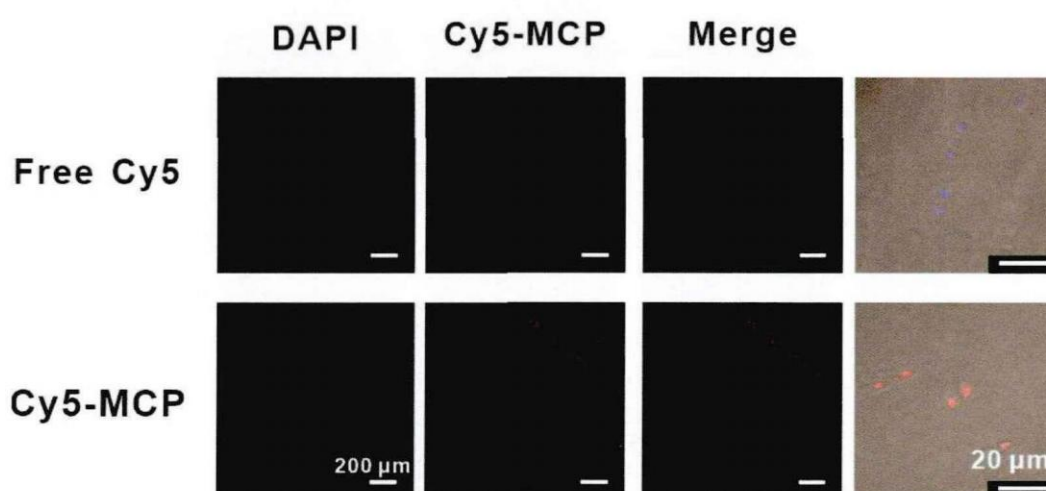


图 2-15 Cy5 酰肼和 Cy5-MCP 在软骨外植体的分布。标尺: 左图 200 μm , 右图 20 μm 。

Fig 2-15 The distribution of Cy5 hydrazide and Cy5-MCP in cartilage explants. Scale bar: 200 μm on the left, 20 μm on the right.

为了进一步考察 MCP 穿透软骨外植体的作用, 将软骨外植体浸入含有 Cy5-MCP 和单纯的 Cy5 酞肼的培养基中孵育 24 h。通过对外植体组织的 CLSM 观察(图 2-15) 可见, Cy5-MCP 主要可以渗透进入软骨外植体内, 并分布于软骨细胞的细胞质内, 而在相同的拍摄条件下, 未在游离 Cy5 酞肼处理组中观察到荧光信号; 结果提示 Cy5-MCP 的荧光信号不是由游离 Cy5-酞肼产生, 且 Cy5-MCP 可以穿透软骨组织进入软骨细胞。

进一步, 将牛软骨外植体浸入含有 Cy5-MCP 的培养基中孵育 3、6、12 和 24 小时发现, 随着孵育时间的延长, Cy5-MCP 逐渐进入软骨外植体, 并可以在 24 小时几乎穿透整个外植体(图 2-16)。

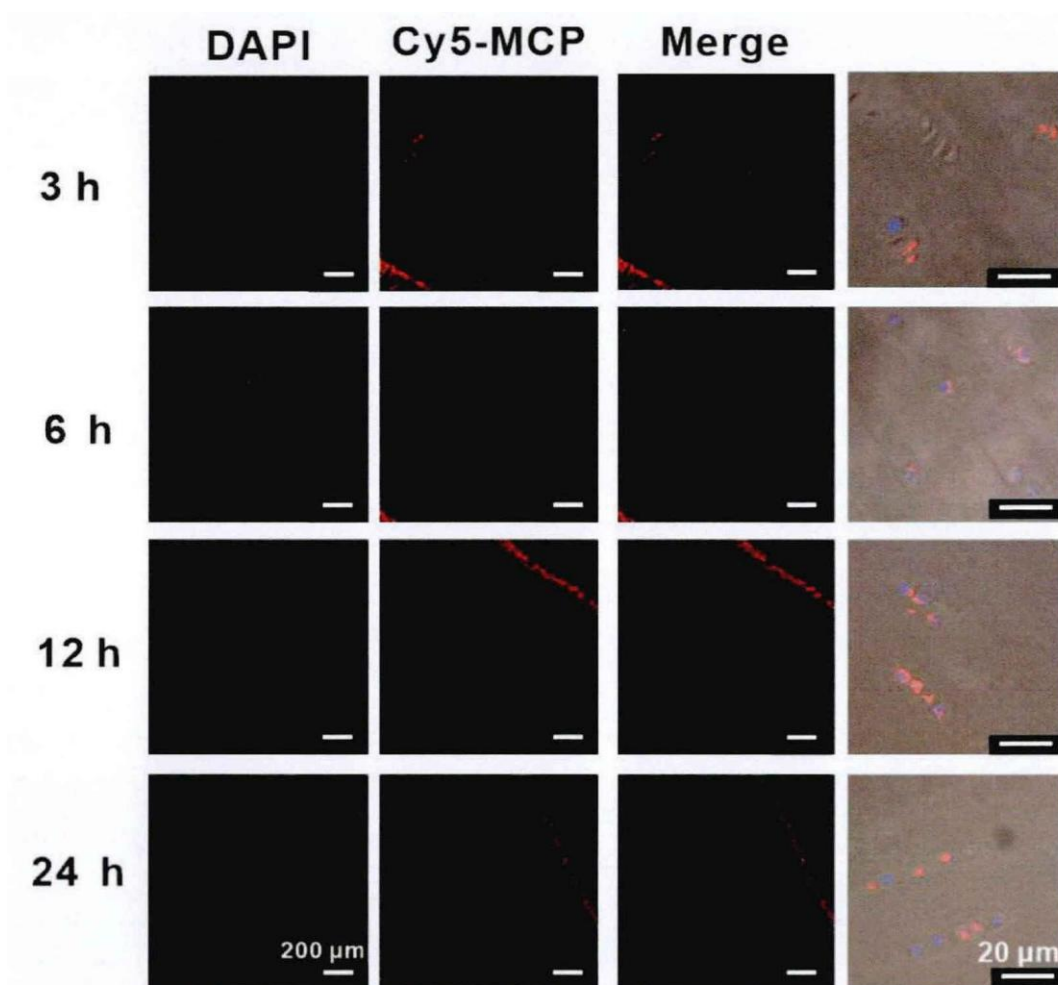


图 2-16 Cy5-MCP 在软骨外植体的分布。标尺: 左图 200 μm , 右图 20 μm 。

Fig 2-16 The distribution of Cy5-MCP in cartilage explants. Scale bar: 200 μm on the left, 20 μm on the right.

进一步, 本研究又通过接触培养方式考察了 MCP 的软骨表面渗透作用。将外植体包埋在琼脂糖凝胶中, 并用负载 Cy5-MCP 的胶原膜覆盖软骨表面, 以达到使 Cy5-MCP 仅能从外植体表层向下单向运输的目的。由图 2-17 可见, Cy5-MCP 可以

在 24 小时内穿透外植体的完整浅表区域, 进入软骨细胞。研究结果提示 MCP 具有较强的软骨组织渗透作用, 甚至可以穿透无损伤的软骨表层进入软骨组织内, 并进入软骨细胞。

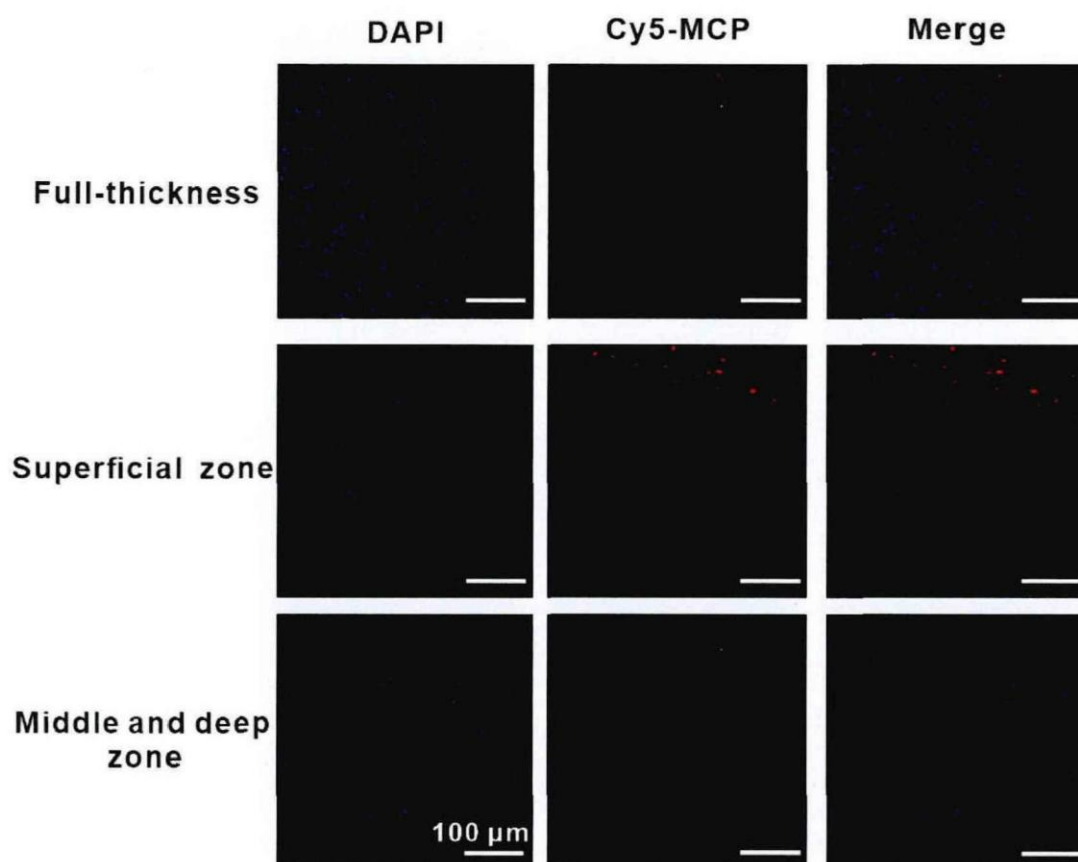


图 2-17 Cy5-MCP 在关节软骨外植体的单向渗透, 标尺: 100 μm 。

Fig 2-17 Unidirectional penetration of Cy5-MCP in articular cartilage explants, scale bar: 100 μm .

进一步, 本研究又通过共聚焦荧光显微镜检测了 MCP 和 Gal-3 在软骨外植体的分布情况, 并通过荧光信号分析了二者的共定位情况。图 2-18 显示了 Gal-3 与 MCP 在软骨组织的分布和共定位, 可见外植体软骨组织内 Gal-3 与 MCP 主要共定位在外植体的软骨细胞质中, 且共定位指数 (Pearson 相关系数, PCC) 为 0.514。

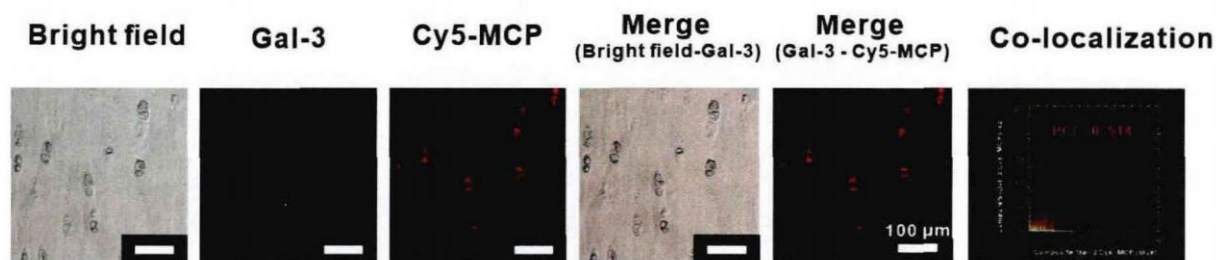


图 2-18 关节软骨外植体中 Cy5-MCP 和 Gal-3 的共定位, 标尺: 100 μm 。

Fig 2-18 Colocalization of Cy5-MCP and Gal-3 in articular cartilage explants, scale bar: 100 μm .

2.4.5 荧光标记 MCP 对软骨细胞的作用

2.4.5.1 荧光标记 MCP 的细胞相容性

通过 CCK-8 检测了 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 对关节软骨细胞的生物相容性。由图 2-19 可见, 在 200-1000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内的 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 对软骨细胞的活性均无明显影响。提示上述浓度的 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 具有较好的细胞相容性, 可用于后续细胞摄取研究。

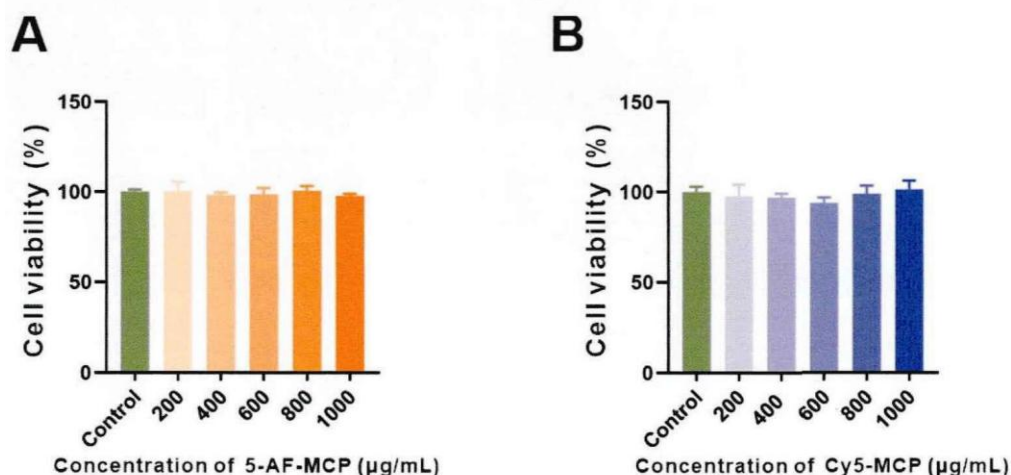


图 2-19 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的细胞相容性。(A) 5-AF-MCP 的细胞存活率; (B) Cy5-MCP 的细胞存活率。(mean $\pm$ SD, $n=3$)

Fig 2-19 Cytocompatibility of 5-AF-MCP and Cy5-MCP. (A) Cell viability of 5-AF-MCP; (B) Cell viability of Cy5-MCP. (mean $\pm$ SD, $n=3$)

2.4.5.2 软骨细胞对荧光标记 MCP 的摄取

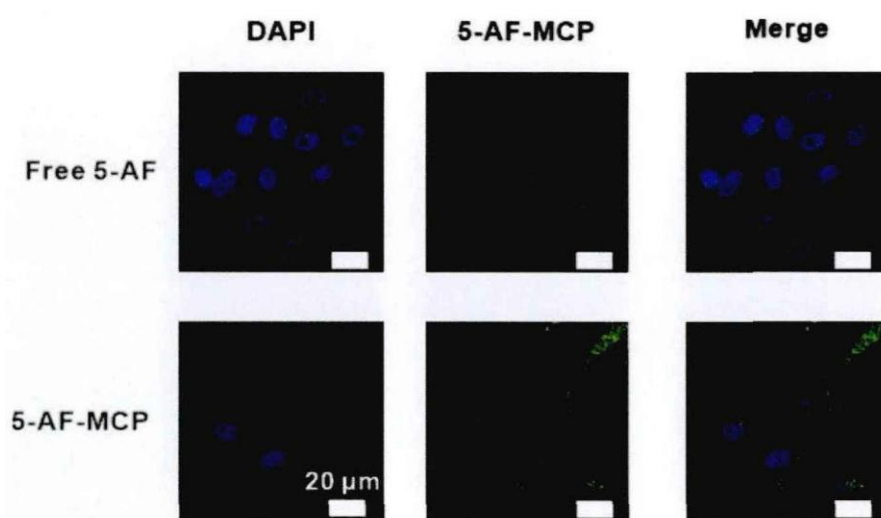


图 2-20 软骨细胞对 5-AF 和 5-AF-MCP 的摄取, 标尺: 20 μm 。(mean $\pm$ SD, $n=3$)

Fig 2-20 Uptake of 5-AF and 5-AF-MCP by chondrocytes, scale bar: 20 μm .

为了研究关节软骨细胞对 MCP 的摄取情况, 在使用 DAPI 对关节软骨细胞的细胞核进行染色, 以定位细胞核位置后, 使用激光共聚焦显微镜观察了 MCP 在细胞内的定位。由图 2-20 可见, 游离 5-AF 处理的细胞中几乎没有荧光信号, 而 5-AF-MCP 处理组有较强的绿色荧光信号, 提示 5-AF-MCP 的细胞摄取实验中的荧光信号不是来自游离 5-AF。另外, 由图 2-21A 可见, 5-AF-MCP 的摄取是一个时间依赖性过程, 且 5-AF-MCP 的大部分绿色荧光位于细胞质; 流式细胞术检测也发现软骨细胞对 5-AF-MCP 的摄取呈时间依赖性 (图 2-21B)。

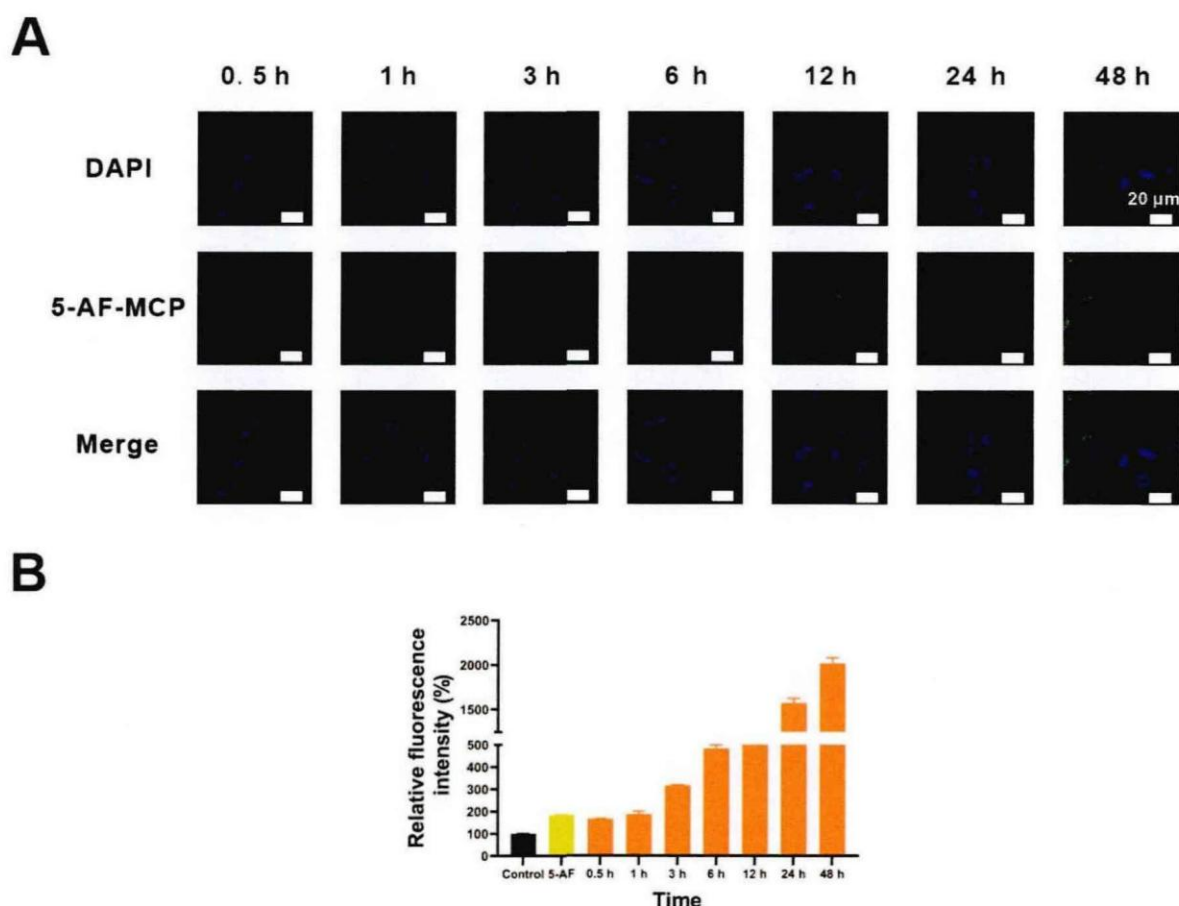


图 2-21 软骨细胞对 5-AF-MCP 的摄取。(A) 培养 48 小时内 5-AF-MCP 在软骨细胞中的分布; (B) 流式细胞分析培养 48 小时内软骨细胞对 5-AF-MCP 的摄取。标尺: 20 μm 。
(mean $\pm$ SD, n=3)

Fig 2-21 Uptake of 5-AF-MCP by chondrocytes. (A) The distribution of 5-AF-MCP in chondrocytes within 48 hours of culture; (B) Flow cytometry analysis of chondrocytes uptake of 5-AF-MCP within 48 hours of culture. Scal bar: 20 μm . (mean $\pm$ SD, n=3)

2.4.5.3 亚细胞定位

为了进一步确定软骨细胞中 MCP 的亚细胞分布, 使用 5-AF-MCP 或 Cy5-MCP 处理软骨细胞, 随后采用内质网 (Endoplasmic reticulum, ER)、微丝 (Actin)、线粒

体 (Mitochondrion, Mito) 和溶酶体 (Lysosome, Lyso) 四种细胞器染液孵育, 最后用共聚焦显微镜观察成像, 结果如图 2-22。可见, Cy5-MCP (红色荧光) 主要与溶酶体 (绿色荧光) 重叠, 呈橙色荧光。表明 MCP 在被软骨细胞摄取后 24 h 主要分布在溶酶体中。

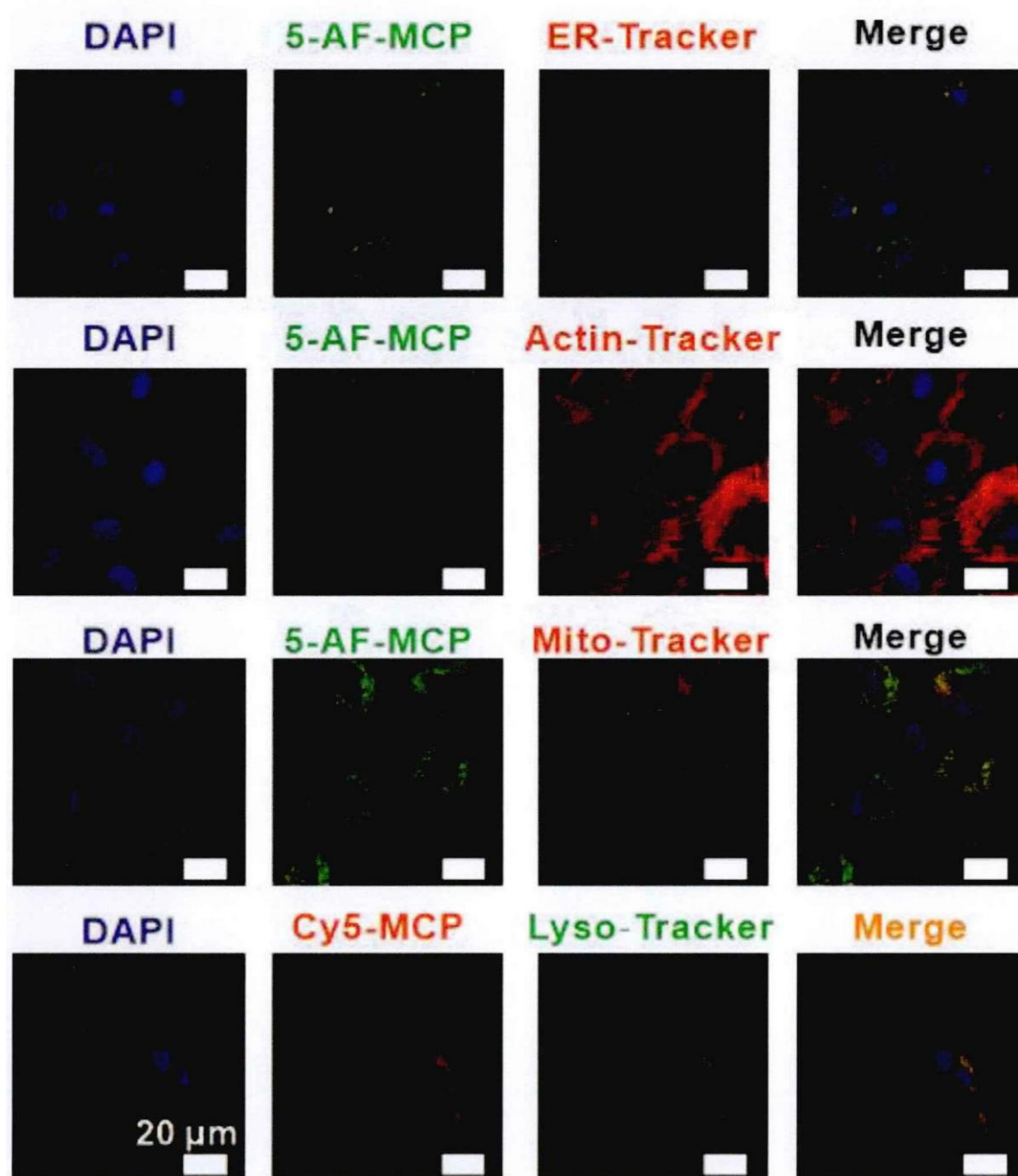


图 2-22 荧光标记 MCP 在软骨细胞中的亚细胞定位, 标尺: 20 μm。

Fig 2-22 Subcellular localization of fluorescently labeled MCP (5-AF-MCP and Cy5-MCP) in chondrocytes, scale bar: 20 μm.

2.4.5.4 MCP 与 Gal-3 在软骨细胞中的共定位

进一步，本研究通过共聚焦荧光显微镜检测 MCP 和 Gal-3 在软骨细胞内的共定位情况，结果见图 2-23。由图可见，Gal-3 与 MCP 在软骨细胞的溶酶体中共定位，且共定位指数达到 0.74。

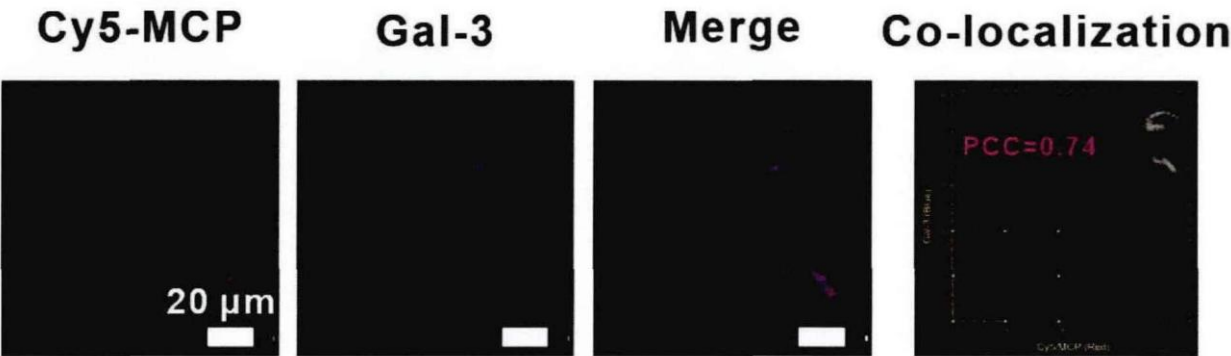


图 2-23 关节软骨细胞中 Cy5-MCP 和 Gal-3 的共定位，标尺：20 μm。
Fig 2-23 Colocalization of Cy5-MCP and Gal-3 in articular chondrocytes, scale bar: 20 μm.

2.4.6 KEGG 数据分析

图 2-24 显示了经 MCP 培养 3 天的软骨细胞与对照组软骨细胞转录组数据中差异基因的 KEGG 再分析结果。由图可见，MCP 500 vs Control 上调的差异基因在溶酶体（Lysosome）和转化生长因子-β（Transforming growth factor-β, TGF-β）等与自噬相关的通路富集。

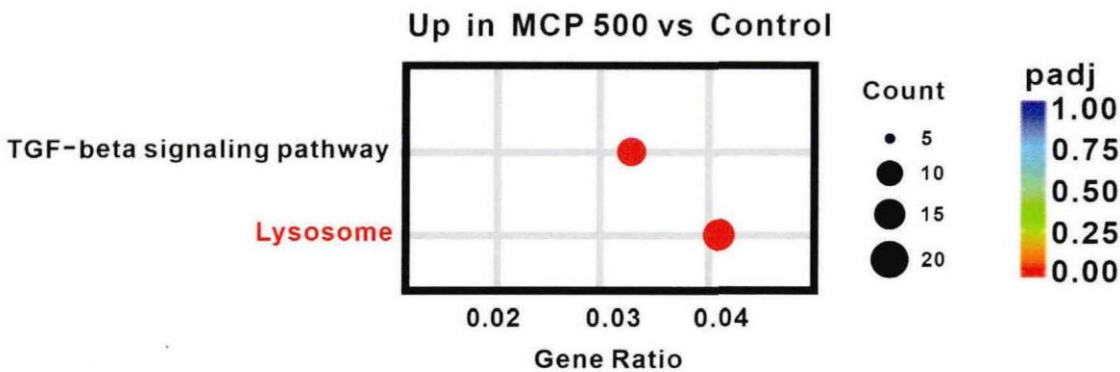


图 2-24 MCP 处理 3 天的关节软骨细胞的上调差异基因 KEGG 富集分析。Control，MCP 浓度 0 μg/mL；MCP500，MCP 浓度 500 μg/mL。
Fig 2-24 KEGG enrichment analysis of up-regulated of differentially expressed genes in articular chondrocytes after 3 days of MCP treatment. Control, the concentration of MCP with 0 μg/mL; MCP 500, the concentration of MCP with 500 μg/mL

图 2-25 显示了复合 MCP 水凝胶支架组织工程软骨差异基因的 KEGG 再分析

结果。可见, 0.1% MCP vs Control 和 0.5% MCP vs Control 上调差异基因均富集在自噬 (Autophagy-animal)、缺氧诱导因子-1 (Hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 和溶酶体以及自噬相关的通路; 1% MCP vs Control 上调差异基因富集在自噬和溶酶体等与自噬相关的通路。

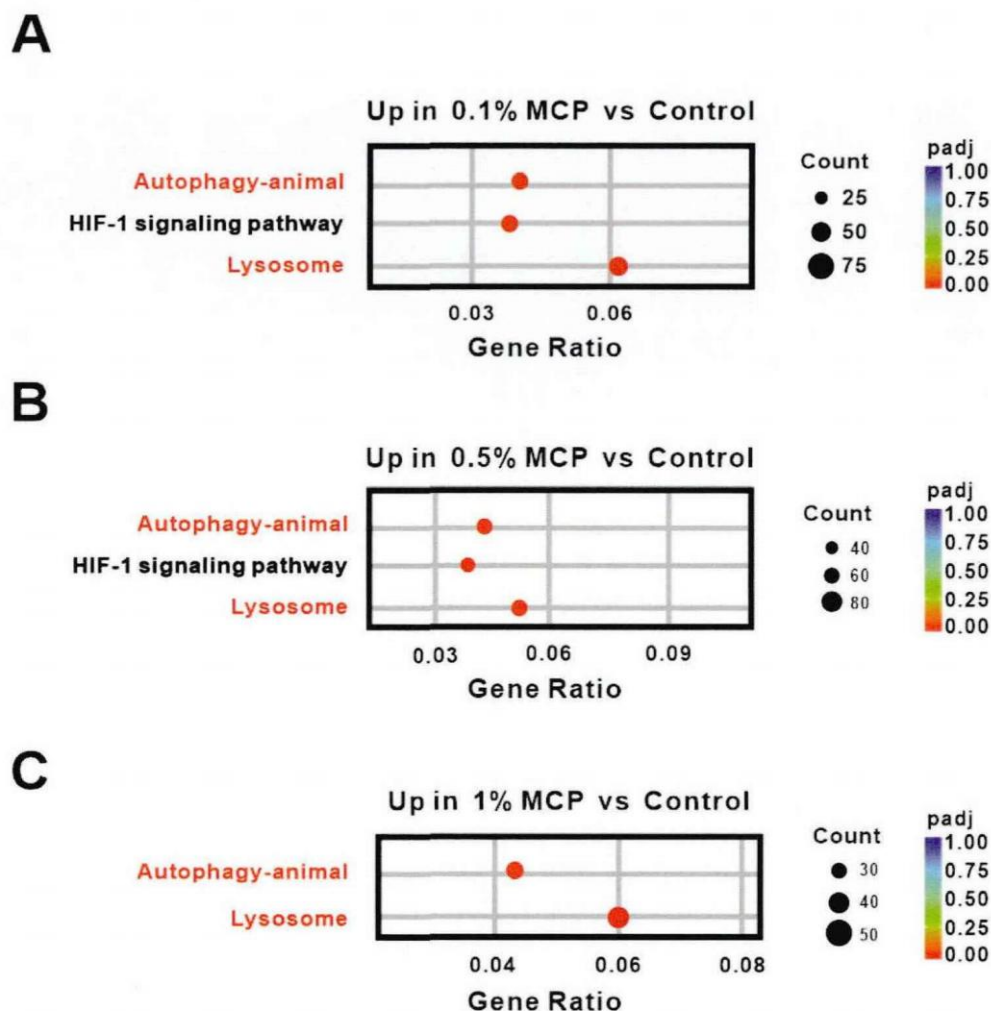


图 2-25 MCP 复合水凝胶支架组织工程软骨的上调差异基因 KEGG 富集分析。Control, 不含 MCP 的组织工程软骨; 0.1% MCP, 含 0.1% MCP 的组织工程软骨; 0.5% MCP, 含 0.5% MCP 的组织工程软骨; 1% MCP, 含 1% MCP 的组织工程软骨。

Fig 2-25 KEGG enrichment analysis of up-regulated of differentially express genes in tissue engineering cartilage of MCP composite hydrogel scaffolds. Control, tissue-engineered cartilage without MCP; 0.1% MCP, tissue-engineered cartilage with 0.1% MCP; 0.5% MCP, tissue-engineered cartilage with 0.5% MCP; 1% MCP, tissue-engineered cartilage with 1% MCP.

图 2-26 显示了 MCP-透明质酸复合水凝胶治疗轻度骨关节炎后, 关节液中差异蛋白的 KEGG 再分析结果, 可见, HA-MCP 500 vs HA 上调差异蛋白富集于 AMP 依赖的蛋白激酶 (Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK) 和 HIF-1 等与自噬调控相关的通路。

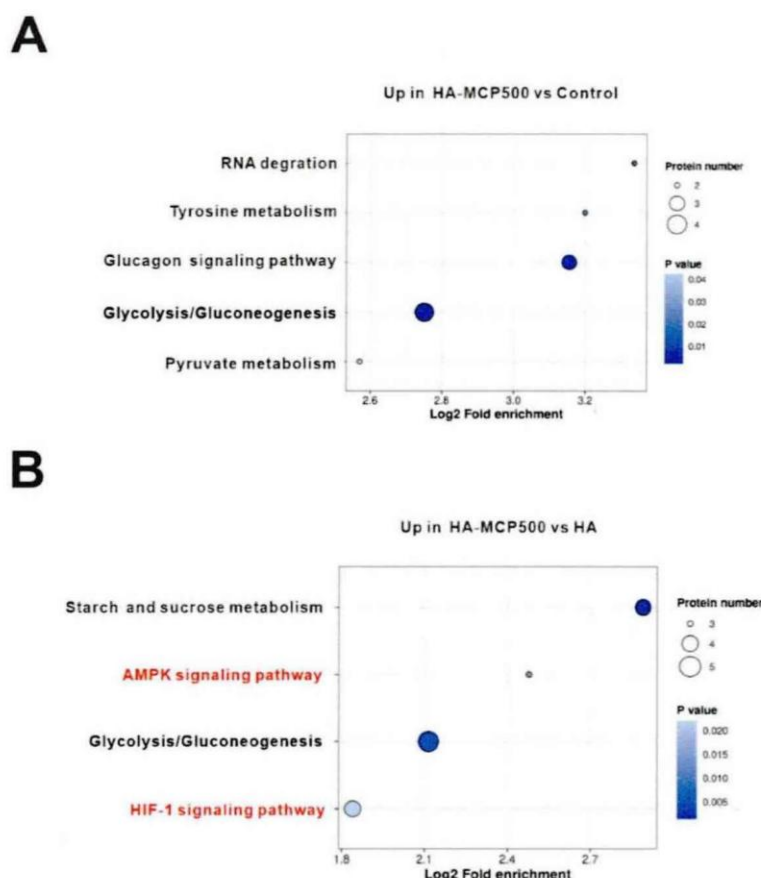


图 2-26 复合 MCP 的透明质酸水凝胶治疗的轻度骨关节炎的关节液的上调差异蛋白 KEGG 富集分析。Control, 造模组; HA-MCP 500, 关节腔注射复合 500 $\mu\text{g/mL}$ MCP 的透明质酸水凝胶组; HA, 关节腔注射透明质酸水凝胶组。

Fig 2-26 KEGG enrichment analysis of up-regulated of differentially express protein of synovial fluid in mild osteoarthritis treated by hyaluronic acid hydrogel with MCP. Control, without treatment, HA-MCP 500, treated by hyaluronic acid hydrogel with MCP concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$; HA, treated by hyaluronic acid hydrogel.

2.4.7 MCP 对软骨细胞自噬相关基因表达的影响

2.4.7.1 MCP 对软骨细胞自噬相关基因表达的影响

上述的研究发现 MCP 能够穿透软骨组织进入软骨细胞, 并于溶酶体富集; 同时, 对前期研究中获得的差异基因表达和差异蛋白组学数据进一步再分析发现, MCP 处理后软骨细胞及 OA 模型关节液的差异表达基因或差异表达蛋白主要富集于溶酶体以及自噬途径相关或自噬调控相关通路, 这些结果提示自噬途径可能与 MCP 的作用相关, 基于此, 本部分考察 MCP 处理对软骨细胞自噬相关基因表达的影响。图 2-27 显示了软骨细胞中与自噬相关的 MAP1LC3 和 BECN1 的 mRNA 相对表达水平。由图可见, 与正常对照组相比, 经 MCP 处理 3 天的软骨细胞的 MAP1LC3 和 BECN1 的基因表达水平显著升高。

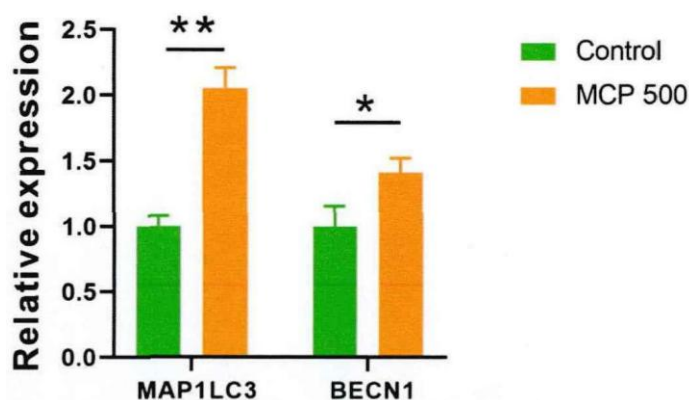


图 2-27 MCP 对正常软骨细胞自噬的影响。Control 组为加入 MCP 0 培养基, MCP 500 组为加入 MCP 500 培养基。(mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 2-27 Effect of MCP on autophagy of normal chondrocytes. The control group was supplemented with MCP 0 medium and the MCP 500 group was supplemented with MCP 500 medium. (mean $\pm$ SEM, n=3)

2.4.7.2 MCP 对连续传代过程中软骨细胞自噬相关基因表达的影响

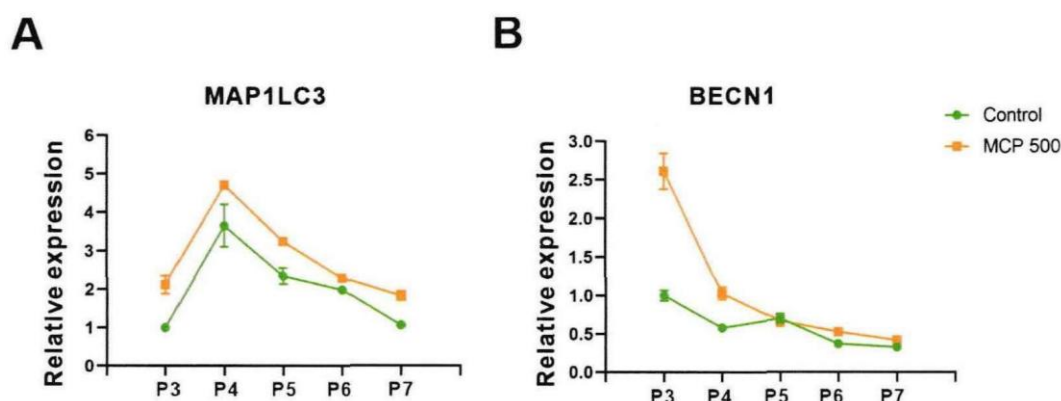


图 2-28 MCP 对连续传代过程中软骨细胞自噬的影响。(A) 连续传代过程中, 软骨细胞 MAP1LC3 基因的表达; (B) 连续传代过程中, 软骨细胞 BECN1 基因的表达。图注同图 2-24。(mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 2-28 Effect of MCP on chondrocyte autophagy during continuous passaging. (A) The expression of MAP1LC3 gene during continuous passaging; (B) The expression of BECN1 gene in chondrocytes during continuous passaging. The annotations are same as that of Fig 2-24. (mean $\pm$ SEM, n=3)

为了进一步研究自噬途径与 MCP 对软骨细胞的作用的相关性, 本部分又考察了 MCP 对连续传代培养软骨细胞的自噬途径相关基因表达的影响。图 2-28 显示了连续传代 (P3-P7) 过程中, 软骨细胞 MAP1LC3 和 BECN1 的 mRNA 相对表达情况。由图可见, 对照组和 MCP 处理组的软骨细胞连续传代的过程中显示相同的 MAP1LC3 的 mRNA 表达趋势, 即随着传代次数的增加, MAP1LC3 的 mRNA 先升

高后下降；BECN1 的 mRNA 表达随传代次数的增加而持续下降。值得注意的是，与对照组相比，MCP 的处理可以持续上调传代软骨细胞的 MAP1LC3 和 BECN1 的 mRNA 表达水平。

2.4.7.3 MCP 对经 IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬相关基因表达的影响

最后，本部分又考察了 MCP 对经 IL-1 β 诱导软骨细胞的自噬相关基因表达的影响，结果见图 2-29。与正常对照组相比，IL-1 β 诱导软骨细胞的 MAP1LC3 和 BECN1 的 mRNA 表达水平显著上调；进一步与 IL-1 β 诱导软骨细胞相比，MCP 处理显著上调了 IL-1 β 诱导软骨细胞的 MAP1LC3 和 BECN1 的基因表达水平。

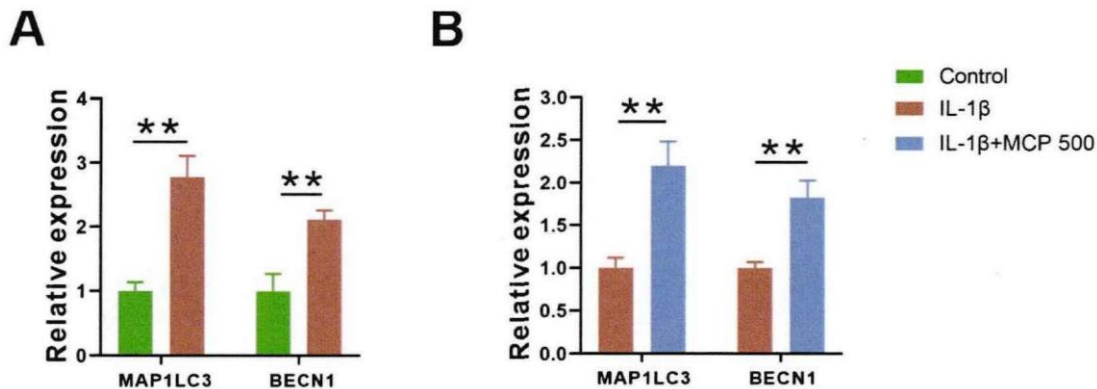


图 2-29 MCP 对经 IL-1 β 诱导的软骨细胞自噬的影响。(A) 正常组和 IL-1 β 诱导组 MAP1LC3 和 BECN1 的基因表达情况；(B) IL-1 β 组和 IL-1 β + MCP 500 组软骨细胞 MAP1LC3 和 BECN1 的基因表达情况。对照组，MCP 0 培养基；IL-1 β 组，IL-1 β 诱导后，更换为 MCP 0 培养基；IL-1 β + MCP 500，IL-1 β 诱导后，更换为 MCP 500 培养基。

(mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 2-29 Effect of MCP on autophagy of chondrocytes induced IL-1 β . (A) Gene expression of chondrocytes MAP1LC3 and BECN1 in the normal group and IL-1 β -induced group; (B) Gene expression of chondrocytes MAP1LC3 and BECN1 in IL-1 β group and IL-1 β +MCP 500 group.

Control group, MCP 0 medium; IL-1 β group, after induced by IL-1 β , replaced to MCP 0 medium; IL-1 β +MCP 500, after induced by IL-1 β , replaced to MCP 500 medium.

(mean $\pm$ SEM, n=3)

2.5 讨论

课题组前期研究发现，MCP 具有保护软骨、促进关节软骨损伤修复的作用^[126, 160, 161]，但其在软骨组织和细胞中发挥作用的机制尚未完全明了，本章对 MCP 在软骨细胞的作用机制进行研究。

荧光标记技术是生物活性分子、药物等体内和细胞内定位的常用研究方法。本研究通过荧光标记 MCP 衍生物考察了 MCP 在软骨组织和软骨细胞内的分布情况，

以期为阐明 MCP 的作用机制提供基础。目前,对多糖荧光标记的主要方式是基于其还原端,采用还原胺化法将多糖与荧光染料结合^[187]。然而,大量关于多糖构效关系的报道显示,侧链作为果胶多糖的功能结构元素,在生物活性和药代动力学中发挥着关键作用^[188-190]。因此,为了避免荧光标记干扰 MCP 的生物活性和药代动力学性能,本研究以 MCP 主链中丰富的羧基为荧光标记位点,使用两种常用的含有胺基的荧光分子 5-AF (可见荧光染料)和 Cy5-酰肼(近红外荧光染料)作为荧光染料与 MCP 结合,制备具有荧光特性的 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP。对 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) (图 2-5)、¹H 核磁共振波谱 (¹H-NMR) (图 2-6)、紫外-可见光谱 (UV-Vis) (图 2-7)、荧光光谱 (图 2-8) 和 Zeta 电位 (图 2-10) 等进行表征的结果显示, MCP 被成功标记。FT-IR 图谱 (图 2-5) 显示, 5-AF 和 Cy5 酰肼的标记并没有改变 MCP 的主链结构,且在 1239 cm⁻¹ 处发现的吸收峰,为仲酰胺第三波段的 C-N 伸缩振动,表明 5-AF 和 Cy5 酰肼的氨基与 MCP 主链的羧基结合,生成 C=O-N-H 基团。¹H-NMR 波谱 (图 2-6) 显示,与 MCP 相比, 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 在 2.2-3.0 ppm 区域出现 5-AF 和 Cy5 酰肼的甲基质子和亚甲基质子特征峰^[182]。UV-Vis 光谱 (图 2-7) 显示, 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 分别相较于 5-AF 和 Cy5 酰肼的特征峰发生红移。荧光光谱 (图 2-8) 显示在 Ex = 494 nm 的条件下, 5-AF-MCP 的发射波长为 530 nm,相较于 5-AF (Em = 520 nm) 发生红移, Cy5-MCP 在 Ex = 645 nm 的条件下,发射波长为 668 nm,相较于 Cy5 酰肼 (Em = 663 nm) 发生轻微红移。除此之外, 5-AF-MCP 中 5-AF 的取代度为 4.3% (w/w), Cy5-MCP 中 Cy5 酰肼的取代度为 0.0425% (w/w), 较低的取代度减少了 5-AF 和 Cy5 酰肼对 MCP 生物活性的改变。Zeta 电位 (图 2-10) 显示, 5-AF 和 Cy5 酰肼的标记并没有显著影响 MCP 的负电荷,但由于 5-AF 和 Cy5 酰肼的氨基与 MCP 的羧基结合,相较于 MCP, 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的负电荷减少。以上研究结果提示,荧光标记的 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 被成功合成。

进一步检测 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 的体内、外生物相容性。将 Cy5-MCP 注射进入小鼠关节 2 周后发现,与正常对照组小鼠相比,经 Cy5-MCP 处理的小鼠主要脏器的大体和病理结果均无明显差异。以关节软骨外植体和软骨细胞为研究对象,发现 Cy5-MCP 不影响外植体中软骨细胞的活性;且 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 在 0-1000 µg/mL 的浓度范围内,不会对软骨细胞产生明显的毒性作用。以上结果表明,荧光标记的 MCP 无明显的全身毒性,具有良好的组织和细胞相容性。

本研究进一步通过 5-AF-MCP 和 Cy5-MCP 研究了 MCP 在软骨组织和软骨细胞内的分布情况及其可能的机制。研究发现, Cy5-MCP 可以在关节中保留 2 周以上,这可能有利于为软骨再生创造有利的体内微环境。除此之外, Cy5-MCP 不仅可以通过受损软骨的一侧渗透到软骨外植体和软骨细胞中,还可以在 24 小时内穿透

无损伤的软骨外植体表层进入软骨细胞,结果表明 MCP 具有良好的软骨穿透作用,并与软骨细胞之间存在相互作用。MCP 在软骨细胞内的分布结果显示,5-AF-MCP 主要分布在软骨细胞的细胞质中并且随时间积累。更重要的是, MCP 进入软骨细胞后主要在溶酶体中积累,并与 Gal-3 共定位于溶酶体。既往研究报道,当溶酶体发生损伤时, Gal-3 可以从细胞质转移到溶酶体膜^[191, 192],并参与 OA 的发生^[193-195]。溶酶体膜损伤可能发生在软骨细胞去分化过程中^[196],因此,本研究推测 MCP 可能在被软骨细胞摄取后通过与溶酶体膜上的 Gal-3 特异性结合,进而发挥作用。

溶酶体参与各种生物过程,如细胞外物质的内吞、降解和自噬^[197]。自噬有助于维持关节软骨微环境稳态,自噬通过调节细胞凋亡和修复受损软骨细胞来发挥软骨保护作用^[198]。本研究通过对前期研究数据进行再 KEGG 功能路径分析后发现, MCP 培养软骨细胞基因上调特异基因富集在溶酶体和 TGF- β 通路。有研究显示, TGF- β 通过叉头框蛋白 (Forkhead box O1, FoxO1) 激活软骨细胞自噬^[199, 200];另外,通过对含 MCP 水凝胶构建组织工程软骨的转录组数据以及复合 MCP 的透明质酸水凝胶治疗 OA 后的关节液蛋白质进行 KEGG 数据再分析结果显示, MCP 上调的差异基因富集在溶酶体、自噬和 HIF-1 信号通路,而差异蛋白富集在 AMPK 和 HIF-1 信号通路。AMPK 是调控自噬的关键信号通路,通过特异性磷酸化自噬相关蛋白复合物^[201, 202],如哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 和 III 类磷脂酰肌醇-3 激酶 (Phosphatidylinositol-3-kinase, PtdIns3K)^[203],在多个自噬调节水平上促进自噬^[204]。HIF-1 与软骨细胞自噬密切相关, HIF-1 α 调节炎症应激下的自噬失活^[205],且 HIF-1 可能通过调节 AMPK/mTOR 信号通路,发挥保护关节软骨的作用^[206]。这些结果提示,在溶酶体富集后, MCP 可能进一步调控溶酶体自噬途径,进而发挥其对软骨组织和软骨细胞的作用。

进一步,为了考察 MCP 调控软骨细胞自噬途径的作用,本部分又检测了 MCP 对软骨细胞自噬相关的关键基因表达的影响。MAP1LC3 (LC3) 和 BECN1 是自噬相关的关键基因,在自噬的激活和发展中发挥重要作用^[207, 208]。成熟软骨细胞高表达 MAP1LC3^[209];而 BECN1 是自噬体形成过程中所必需的蛋白质,通过组成 PtdIns3KC3 复合体诱导细胞自噬^[210, 211]。本研究发现, MCP 能够上调软骨细胞的 MAP1LC3 和 BECN1 的基因表达。自噬活性与软骨细胞增殖、分化以及软骨细胞稳态呈正相关^[212],衰老关节软骨细胞的自噬活性降低^[198, 213],而软骨细胞在体外传代培养至第四代之后发生去分化^[214-216]。在考察 MCP 对体外连续传代培养软骨细胞的作用时发现,随着连续传代代数的增加,对照组软骨细胞在 P4 代之后的 MAP1LC3 和 BECN1 的 mRNA 表达持续降低;与对应对照组相比, MCP 可以上调每代软骨细胞的 MAP1LC3 和 BECN1 的基因表达。这些研究结果进一步说明 MCP 可以上调软骨细胞自噬相关关键基因的表达,进而通过调控软骨细胞的自噬途径,进而发挥

软骨保护和维持软骨细胞表型的作用。已有的研究发现,在 OA 早期阶段,为避免软骨细胞凋亡,修复软骨损伤,软骨细胞的自噬标志物表达增加^[217-219]。IL-1 β 是诱发 OA 的关键促炎介质,体外研究中常用 IL-1 β 处理正常软骨细胞以模拟炎症状态^[220-222]。因此,本研究进一步考察了 MCP 对 IL-1 β 诱导软骨细胞的自噬关键基因表达的影响,研究发现,与正常对照组相比,IL-1 β 诱导 OA 软骨细胞的 MAP1LC3 和 BECN1 基因表达升高;而经 IL-1 β 诱导后, MCP 的处理可以显著上调 IL-1 β 诱导 OA 软骨细胞的 MAP1LC3 和 BECN1 的基因表达。课题组前期研究发现, MCP 具有上调软骨细胞外基质的合成,维持软骨细胞表型,改变由 IL-1 β 所致的软骨细胞骨关节炎样表型的作用^[126, 160, 161]。以上研究结果提示, MCP 可能通过调控软骨细胞自噬途径、维持软骨细胞的稳态,进而发挥其软骨保护和软骨细胞表型维持的作用。

综上所述,本研究发现, MCP 能够穿透软骨组织进入软骨细胞,并与软骨细胞溶酶体膜上的 Gal-3 蛋白结合而富集于溶酶体,从而调控软骨细胞的自噬作用,进而发挥其对软骨细胞的作用。MCP 在关节软骨组织和细胞内的分布及其发挥作用的示意图如图 2-30 所示。

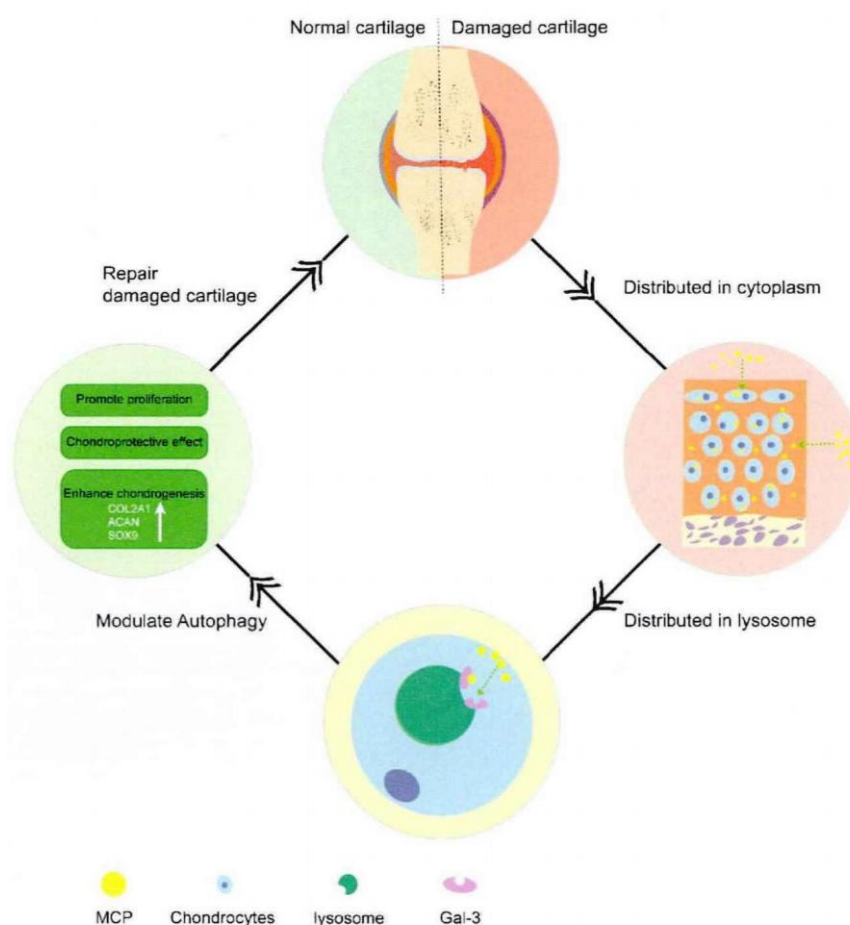


图 2-30 MCP 作用机制示意图

Fig 2-30 The schematic diagram of the mechanism of MCP.

2.6 本章小结

- (1) MCP 具有软骨渗透作用，可以穿透软骨组织并进入软骨细胞；
- (2) MCP 被软骨细胞摄取后，通过与溶酶体膜上的 Gal-3 结合而富集于溶酶体；
- (3) MCP 能够调控软骨细胞自噬途径，进而发挥其维持软骨细胞稳态的作用。

第三章 MCP 对关节软骨细胞糖酵解代谢的影响

3.1 前言

软骨细胞是关节软骨中唯一存在的细胞，具有合成和分泌细胞外基质（Extracellular matrix, ECM）的作用^[223, 224]，维持软骨细胞表型稳定以及避免去分化是治疗软骨损伤和骨关节炎（Osteoarthritis, OA）的重要基础^[225, 226]。本课题组前期研究发现，改性柑橘果胶（Modified citrus pectin, MCP）对体外培养的软骨细胞具有促进增殖、维持表型、减缓软骨细胞退变的作用^[126, 160, 161]，在软骨的损伤修复、组织工程及骨关节炎治疗等方面具有潜在应用价值。

第二章研究表明，MCP 可以穿透软骨组织进入软骨细胞并定位在溶酶体，进一步激活溶酶体依赖性自噬途径发挥其软骨保护作用。既往研究报道，自噬途径具有调节组织稳态和平衡细胞能量代谢的作用^[227, 228]；同时，自噬调控相关信号通路及关键活性分子在多种细胞生物过程中具有重要的调节作用。第二章研究发现，MCP 会引起溶酶体和自噬通路及相关信号调控通路，如缺氧诱导因子-1（Hypoxia inducible factor-1, HIF-1）等途径中的有关基因或蛋白表达水平的改变。HIF-1 α 是调控软骨细胞自噬的关键因子^[229, 230]，同时也是调控关节软骨细胞葡萄糖代谢的关键基因^[231]，在缺氧细胞中，HIF-1 α 诱导葡萄糖从氧化磷酸化到糖酵解代谢的转换^[232, 233]。因此，本部分推测 MCP 对软骨细胞的作用与其调控葡萄糖代谢相关。

糖酵解是软骨细胞的葡萄糖代谢主要途径，在软骨细胞生长发育过程中，约 75% 的三磷酸腺苷（Adenosine triphosphate, ATP）来自糖酵解。葡萄糖被转运至软骨细胞后，经过糖酵解途径被分解成丙酮酸，在有氧条件下，丙酮酸穿梭进入线粒体，参与氧化磷酸化^[234]；在无氧条件下，丙酮酸在胞质中通过无氧糖酵解途径转化为乳酸^[235]。由于关节软骨细胞生活在缺氧环境中，主要从关节滑液和软骨下骨中获得有限的葡萄糖和氧气^[236]，无氧糖酵解是软骨细胞在缺氧条件下产生 ATP 的首选途径^[236, 237]，同时，当氧气供应充足能够支持线粒体进行有氧呼吸时，软骨细胞依旧倾向于通过糖酵解途径而不是氧化磷酸化途径获取能量，表现出有氧糖酵解的代谢模式，即软骨细胞具有瓦尔堡（Warburg）效应^[238-240]。除了产生 ATP 外，糖酵解途径中间产物还可以进入氨基酸和核苷酸等生物合成途径^[241]，为软骨细胞外基质的合成提供大分子前体^[224, 234, 242]。葡萄糖在软骨细胞的代谢示意图如图 3-1 所示。基于以上推测，本研究进一步考察了在体外培养环境下，MCP 对膝关节软骨细胞的糖酵解代谢的影响。

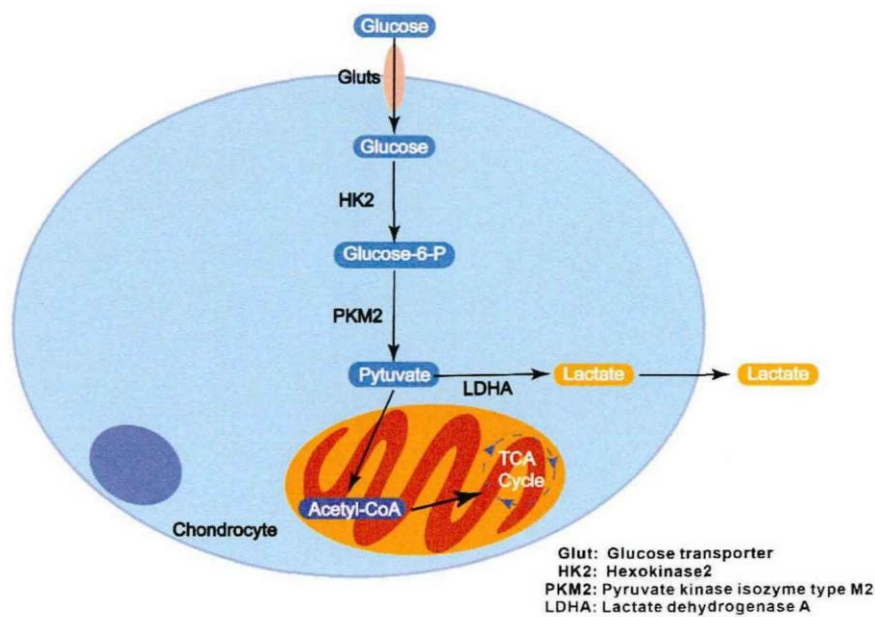


图 3-1 糖酵解代谢示意图

Fig 3-1 Schematic diagram of glycolytic metabolism.

3.2 试剂和仪器

3.2.1 试剂

表 3-1 试剂和耗材

Table 3-1 Reagents and materials.

试剂名称	生产厂家
改性柑橘果胶（MCP）	浙江果源康品生物科技有限公司
高糖培养基（DMEM）	美国 Thermo scientific 公司
胎牛血清（FBS）	美国 Invitrogen 公司
胰蛋白酶-EDTA（TE）	美国 Thermo scientific 公司
青霉素-链霉素溶液	北京索莱宝科技有限公司
II 型胶原酶	北京索莱宝科技有限公司
磷酸盐缓冲液（PBS）	北京索莱宝科技有限公司
不含钙镁磷酸盐缓冲液（D-PBS）	北京索莱宝科技有限公司
Cell Counting Kit-8（CCK-8）试剂盒	美国 MCE 公司
2-脱氧-D-葡萄糖（2DG）	美国 MCE 公司
Prime Script TM RT reagent Kit 试剂盒	日本 TaKaRa 公司

续表 3-1 试剂和耗材

Continued Table 3-1 Reagents and materials.

试剂名称	生产厂家
SYBR [®] Premix Ex Taq TM II试剂盒	日本 TaKaRa 公司
PCR 基因引物	上海生工生物工程有限公司
乳酸检测试剂盒	亚科因生物技术有限公司
4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染液	上海碧云天生物技术有限公司
葡萄糖检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗兔 抗原的二抗	美国 Abcam 公司
重组人白介素-1 β (IL-1 β)	美国 PeproTech 公司
II 型胶原一抗	北京博奥森生物技术有限公司
曲拉通 X-100 (TritonX-100)	美国 Amresco 公司

3.2.2 仪器设备

表 3-2 仪器设备

Table 3-2 Instruments.

仪器名称	生产厂家
电子天平	德国 Metter Toledo 公司
涡旋混合仪	德国 IKA 公司
超净工作台	苏州净化设备有限公司
Nano Vue Plus 超微量分光光度计	英国 Biochrom 公司
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
多功能全波长酶标仪	芬兰 Thermo 公司
CO ₂ 恒温培养箱	日本 SANYO 公司
高内涵活细胞图像分析系统	美国 GE Healthcare 公司
恒温震荡水浴	德国 JULABO 公司

3.3 实验方法

3.3.1 转录组学数据分析

为了研究 MCP 对软骨细胞的作用与其调控糖代谢的相关性,本部分对课题组前期体外构建的 MCP 复合水凝胶支架的组织工程软骨的差异表达基因进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路富集分析^[16];同时对前期复合 MCP 的透明质酸 (Sodium Hyaluronate, HA) 水凝胶治疗的轻度骨关节炎的关节液的差异表达蛋白进行 KEGG 通路富集分析。

3.3.2 软骨细胞的提取与培养

同第二章 2.3.5.1 方法提取兔膝关节软骨细胞,用于后续细胞实验。

3.3.3 含 MCP 的细胞培养液的配制

同第二章 2.3.7.1 方法配制不含 MCP 的 MCP 0 培养基和终浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 MCP 500 培养基。

3.3.4 MCP 对软骨细胞的糖酵解的影响

将第三代(P3)软骨细胞接种于 96 孔板 ($3 \times 10^3/\text{孔}$),待细胞贴壁后弃培养基,分别加入 100 μL MCP 0 培养基 (Control 组) 和 MCP 500 培养基 (MCP 500 组) 培养软骨细胞。于培养的第 3 天,加入 CCK-8 试剂测定软骨细胞的增殖活性;同时,收集上清液,以 100 μL MCP 0 和 MCP 500 培养液作为乳酸产量和葡萄糖摄取量的对照,按照说明书操作测定上清液中的乳酸和葡萄糖含量。另外,将 P3 软骨细胞接种于 24 孔板 ($3 \times 10^4/\text{孔}$),加入 500 μL MCP 0 和 MCP 500 培养基培养软骨细胞。于培养第 3 天,收集细胞提取总 RNA,用于后续逆转录实时定量聚合酶链式反应 (Quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 实验。

3.3.5 MCP 对连续传代软骨细胞的糖酵解的影响

同 2.3.7.2 方法培养连续传代的软骨细胞。于第二代开始按照 3.3.4 的方法接种细胞,并分别于接种培养第 3 天按上述方法进行 CCK-8 实验、葡萄糖摄取量检测、乳酸生成量检测和 RT-qPCR 实验。另外,于第二代开始,将每代软骨细胞接种于 96 孔板 ($3 \times 10^3/\text{孔}$),待细胞贴壁后弃培养基,分别加入 100 μL MCP 0 培养基 (Control 组) 和 MCP 500 培养基 (MCP 500 组) 培养软骨细胞,于培养的第 3 天,通过免疫荧光染色方法检测连续传代软骨细胞的 II 型胶原表达量。

3.3.6 MCP 对 IL-1 β 诱导后的软骨细胞的糖酵解的影响

将 P3 软骨细胞接种于 96 孔板 ($3 \times 10^3/\text{孔}$),待贴壁后加入 100 μL 含 10 $\mu\text{g/L}$ 白

介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 的培养基诱导培养 24 h 后, 分别更换为 MCP 0 和 MCP 500 培养基继续培养, 以未经处理的软骨细胞作为正常对照。于培养的第 3 天, 收集上清液, 按上述方法进行 CCK-8 实验、葡萄糖摄取量和乳酸生成量检测。另外, 将软骨细胞接种于 24 孔板中 (3×10^4 /孔), 加入 500 μ L 含 10 μ g/L IL-1 β 的培养基诱导 24 h 后, 随后分别加入 500 μ L MCP 0 和 MCP 500 培养基继续培养, 以未经处理的软骨细胞作为正常对照。于培养的第 3 天, 收集细胞提取总 RNA, 用于后续 RT-qPCR 实验。

3.3.7 MCP 对阻断糖酵解途径的软骨细胞糖酵解的影响

将 P3 软骨细胞接种于 96 孔板中 (3×10^3 /孔), 首先在 100 μ L 含 5 mM 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-Deoxy-D-glucose, 2DG) 的培养基中诱导 24 h, 随后分别转移至 100 μ L 的 MCP 0 培养基和 MCP 500 培养基中继续培养, 以未经处理的软骨细胞作为正常对照。于培养的第 3 天, 收集上清液按上述方法进行 CCK-8 实验、葡萄糖摄取量和乳酸生成量检测。

将 P3 软骨细胞接种于 24 孔板 (3×10^4 /孔), 在 500 μ L 含 5 mM 2DG 的培养基中诱导 24 h 后, 分别转移至 500 μ L MCP 0 和 MCP 500 培养基继续培养, 以未经处理的软骨细胞作为正常对照。于培养的第 3 天, 收集细胞提取总 RNA, 用于后续 RT-qPCR 实验。

3.3.8 CCK-8 实验

3.3.8.1 细胞相对存活率

各实验条件下, 于软骨细胞培养第 3 天, 加入 100 μ L 10% CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1.5 h 后置于酶标仪中, 在 450 nm 处测定吸光度值 (Optical density, OD)。分别以每一代的对照组平均 OD 值进行归一化处理, 根据公式: 细胞相对存活率(%) = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白孔}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白孔}}) \times 100\%$, 计算各组软骨细胞的相对存活率, 空白孔为仅加 10% CCK-8 试剂的完全培养基。

3.3.8.2 软骨细胞数-吸光度标准曲线

将 P3 软骨细胞用培养基稀释成系列浓度梯度的细胞悬液后接种于 96 孔板中并孵育 12 h, 待贴壁后弃培养基, 加入 100 μ L 10% CCK-8 溶液, 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1.5 h 后, 取出 96 孔板置于酶标仪中, 在 450 nm 处测定吸光度值 (OD), 以 10% CCK-8 溶液为空白对照。以细胞数为横坐标, 以测得的吸光度 - 空白对照的吸光度值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 得到线性回归方程即为软骨细胞数

-吸光度的标准曲线。

3.3.9 乳酸生成量及葡萄糖摄取量检测

3.3.9.1 葡萄糖浓度—吸光度标准曲线

将 2000 mg/dL 的葡萄糖标准品用 H₂O 稀释成浓度依次为 1000、500、250、125、62.5、31.25 和 15.625 mg/dL 的标准溶液，以 H₂O 为空白对照。取 10 μL 不同浓度的葡萄糖标准品加入 180 μL 邻甲苯胺检测试剂，涡旋混合后，5000 g 离心 10 s，随后在 95°C 金属浴加热 8 min，待其降温至 4°C 后，吸出 180 μL 液体转移至 96 孔板中，用酶标仪在 630 nm 条件下测定吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标，以测得的各浓度标准品吸光度 - 空白对照的吸光度值为纵坐标，用加权最小二乘法进行回归运算，得到线性回归方程即为葡萄糖浓度-吸光度标准曲线。

3.3.9.2 乳酸浓度—吸光度标准曲线

用 Lactate Assay Buffer 将 2 mM 的乳酸标准品稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625 和 0.0313 mM 的标准溶液。按照每孔含 31 μL Lactate Assay Buffer，8 μL Lactate Dehydrogenase Cofactor，5 μL WST-8，1 μL Enhancer 和 10 μL Lactate Dehydrogenase 的比例配制乳酸检测液。取 50 μL 不同浓度的乳酸标准品溶液，加入 50 μL 乳酸检测液，立即使用酶标仪在 450 nm 处测吸光度 (OD₀)，随后于 37°C 避光孵育 30 min 后，再次使用酶标仪在 450 nm 处测吸光度 (OD₃₀)，OD₃₀ - OD₀ 为测得乳酸吸光度值。以乳酸浓度为横坐标，以测得的各浓度标准品吸光度 - 空白对照的吸光度值为纵坐标，用加权最小二乘法进行回归运算，得到线性回归方程即为乳酸浓度-吸光度标准曲线。

3.3.9.3 乳酸生成量及葡萄糖摄取量检测

(1) 葡萄糖摄取量检测：于培养的第 3 天，收集上清液并按照 3.3.9.1 进行葡萄糖含量的检测。将测得吸光度值代入葡萄糖标准曲线方程，计算得到培养液中的葡萄糖含量。进一步根据公式：单个细胞的葡萄糖摄取 = $(G_0 - G) / \text{细胞数}$ ，计算各组单个软骨细胞的葡萄糖摄取量，其中，G 表示与细胞共培养 3 天后，培养液中的葡萄糖浓度；G₀ 表示单纯培养液中的葡萄糖浓度。

(2) 乳酸生成量检测：于培养的第 3 天，收集上清液并按照 3.3.9.2 进行乳酸含量的检测。将测得的吸光度值代入乳酸标准曲线方程，计算得到培养液中的乳酸含量。进一步根据公式：单个细胞的乳酸生成 = $(L - L_0) / \text{细胞数}$ ，计算各组单个软骨细胞的乳酸生成量，其中，L 表示与细胞共培养 3 天后，培养液中乳酸浓

度; L_0 表示单纯培养液中的乳酸浓度。

3.3.10 RT-qPCR

同 2.3.8 方法提取软骨细胞的 RNA。通过 RT-qPCR 检测缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor 1- α , HIF-1 α)、葡萄糖转运蛋白-1 (Glucose transporter-1, Glut-1)、丙酮酸激酶 M2 (Pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2)、乳酸脱氢酶 A (Lactate dehydrogenase A, LDHA) 和葡萄糖转运蛋白-3 (Glucose transporter-1, Glut-3) 等糖酵解相关基因以及 II 型胶原 (Collagen type II α -1, COL2A1)、性别决定区域 Y (Sex-determination Region on Y, SRY) 相关的高迁移率族框 9 (SRY-box transcription factor 9, SOX9) 和蛋白聚糖 (Aggrecan, ACAN) 等软骨细胞特异性相关基因的表达情况, 引物序列见表 3-3。具体操作同 2.3.9。

表 3-3 引物序列

Table 3-3 Primer sequences.

目的基因	引物序列
GAPDH	F: 5'-CCACTTTGTGAAGCTCATTCCT-3' R: 5'-TCGTCCTCCTCTGGTGCTCT-3'
SOX9	F: 5'-GCTCCGACACCGAGAATACAC-3' R: 5'-CTTGTCCTCTTCGCTCTCCTTC-3'
Glut-1	F: 5'-TCTTCTATTACTCCACGAGCATCTTC-3' R: 5'-CACCACGAACAGCGATACGA-3'
Glut-3	F: 5'-ATGGCAGTGGCTGGTTGTTC-3' R: 5'-ATAAAGAAGGCGACGAGGAAGAC-3'
PKM2	F: 5'-CACCTGTACCGTGGGATCTTC-3' R: 5'-GGTGAGCACAATGACCACATCT-3'
COL2A1	F: 5'-ACGCTCAAGTCCCTCAACAAC-3' R: 5'-ATCCAGTAGTCACCGCTCTTCC-3'
ACAN	F: 5'-CTCCAATGACTCCGGGATCTAC-3' R: 5'-CCTTTCACCACCACCTCCA-3'

续表 3-3 引物序列
Continued Table 3-3 Primer sequences.

目的基因	引物序列
LDHA	F: 5'-CTGGCAGAGAGCATAATGAAGAATC-3' R: 5'-CCAAGACGCAAGGAACACTAAG-3'
HIF-1 α	F: 5'-GAATGCCCGAGAGAAAGCGGAA-3' R: 5'-TGCTCCATTCCATTCTGTTCAC-3'

注: GAPDH—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Glut-1—葡萄糖转运蛋白-1; Glut-3—葡萄糖转运蛋白-3; PKM2—丙酮酸激酶 M2; LDHA—乳酸脱氢酶; HIF-1 α —缺氧诱导因子-1 α ; COL2A1—II型胶原; SOX9—性别决定区域 Y 相关的高迁移率族框 9; ACAN—蛋白聚糖。

3.3.11 II型胶原的免疫荧光染色

通过免疫荧光染色的方法检测连续传代软骨细胞的 II 型胶原合成情况, 考察 MCP 对软骨细胞 II 型胶原合成的影响。具体操作为: 将各培养条件下的软骨细胞加入 100 μ L 4% 多聚甲醛固定 20 min 后, 加入 20 μ L PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 随后使用 0.1% TritonX-100 室温通透 5 min, PBS 洗 2 次; 加入 20 μ L 10% 山羊血清于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 30 min; 随后加入 20 μ L 抗 II 型胶原一抗, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入 20 μ L FITC 标记的二抗, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后, PBS 洗 3 次; 最后加入细胞核染色液 (DAPI) 复染细胞核 5 min, PBS 清洗后置于高内涵显微镜, 在 FITC 和 DAPI 通道检测 II 型胶原的表达情况。以单个细胞荧光强度 = 总荧光强度/细胞数的公式计算单个细胞的相对荧光强度。进一步以对照组中单个软骨细胞的平均荧光强度值为参照进行数据归一化处理, 计算连续传代培养过程中的软骨细胞的相对平均荧光强度。

3.3.12 统计学分析

实验数据均通过 GraphPad Prism 7 和 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。所有数据都以 Mean $\pm$ SEM 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3.4 结果

3.4.1 KEGG 数据分析

图 3-2 显示了含 MCP 的组织工程支架和不含 MCP 的组织工程支架的软骨细胞

的差异基因 KEGG 富集分析结果，可见 MCP 显著上调的差异表达基因富集在溶酶体 (Lysosome)、自噬 (Autophagy)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR, mTOR) 和缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 的信号通路

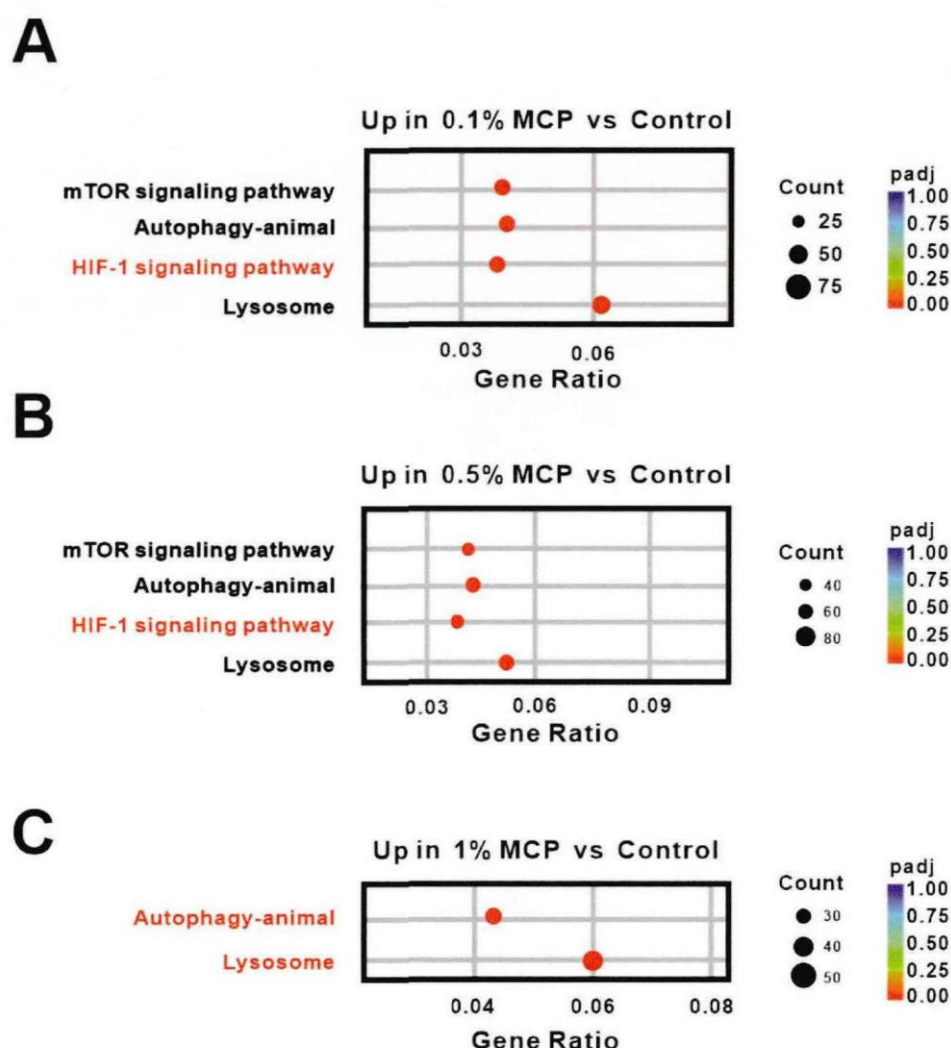


图 3-2 MCP 复合水凝胶支架组织工程软骨的上调差异基因 KEGG 富集分析。Control，不含 MCP 的组织工程软骨；0.1% MCP，含 0.1% MCP 的组织工程软骨；0.5% MCP，含 0.5% MCP 的组织工程软骨；1% MCP，含 1% MCP 的组织工程软骨。

Fig 3-2 KEGG enrichment analysis of up-regulated of differentially express genes in tissue engineering cartilage of MCP composite hydrogel scaffolds. Control, tissue-engineered cartilage without MCP; 0.1% MCP, tissue-engineered cartilage with 0.1% MCP; 0.5% MCP, tissue-engineered cartilage with 0.5% MCP; 1% MCP, tissue-engineered cartilage with 1% MCP.

图 3-3 显示，经 MCP-HA 水凝胶治疗组 (HA-MCP 500)、造模组 (Control) 及经 HA 水凝胶治疗组 (HA) 的轻度关节炎的关节液的差异蛋白 KEGG 富集分析，相对于 Control 组，HA-MCP 500 组上调的差异蛋白主要与糖酵解/糖异生通路 (Glycolysis/ Gluconeogenesis) 相关，与 HA 组相比，HA-MCP 500 组上调的差异蛋

白主要富集在 AMP 活化蛋白激酶（Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK）、缺氧诱导因子-1（HIF-1）及糖酵解/糖异生通路。

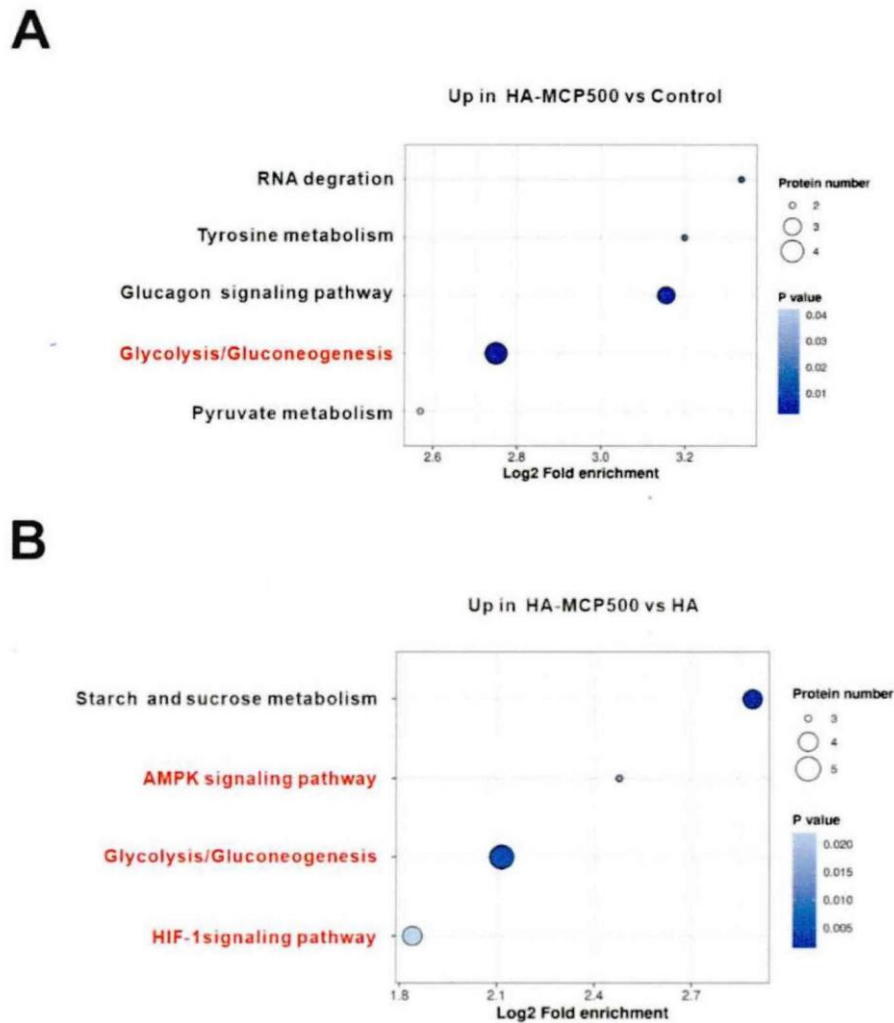


图 3-3 复合 MCP 的透明质酸水凝胶治疗的轻度骨关节炎的关节液的上调差异蛋白 KEGG 富集分析。Control，造模组；HA-MCP 500，关节腔注射复合 500 $\mu\text{g/mL}$ MCP 的透明质酸水凝胶组；HA，关节腔注射透明质酸水凝胶组。

Fig 3-3 KEGG enrichment analysis of up-regulated of differentially express protein of synovial fluid in mild osteoarthritis treated by hyaluronic acid hydrogel with MCP. Control, without treatment; HA-MCP 500, treated by hyaluronic acid hydrogel with MCP concentration at 500 $\mu\text{g/mL}$; HA, treated by hyaluronic acid hydrogel.

3.4.2 软骨细胞数—吸光度标准曲线

如图 3-4 所示，软骨细胞数-吸光度标准曲线的线性回归方程为 $y = 0.0033x - 0.0021$ ， $R^2 = 0.9992$ 。

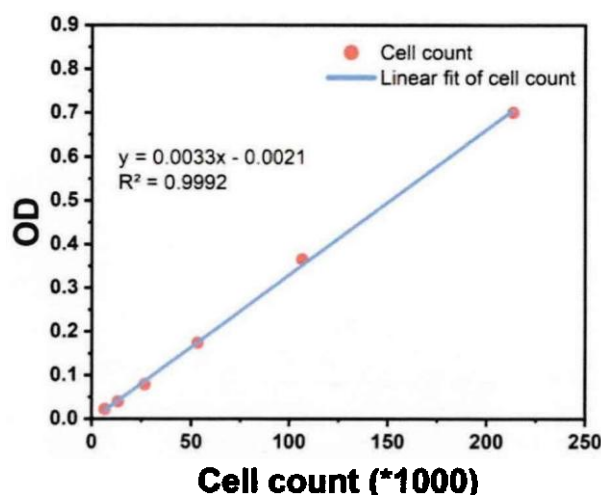


图 3-4 软骨细胞数-吸光度标准曲线

Fig 3-4 Standard curve of chondrocyte count-absorbance.

3.4.3 乳酸和葡萄糖浓度标准曲线

图 3-5 为乳酸和葡萄糖浓度标准曲线方程。可见，葡萄糖浓度-吸光度标准曲线的线性回归方程为 $y = 0.0033x + 0.034$, $R^2 = 0.9993$ 。乳酸浓度-吸光度标准曲线的线性回归方程为 $y = 1.7026x + 0.1558$, $R^2 = 0.9943$ 。

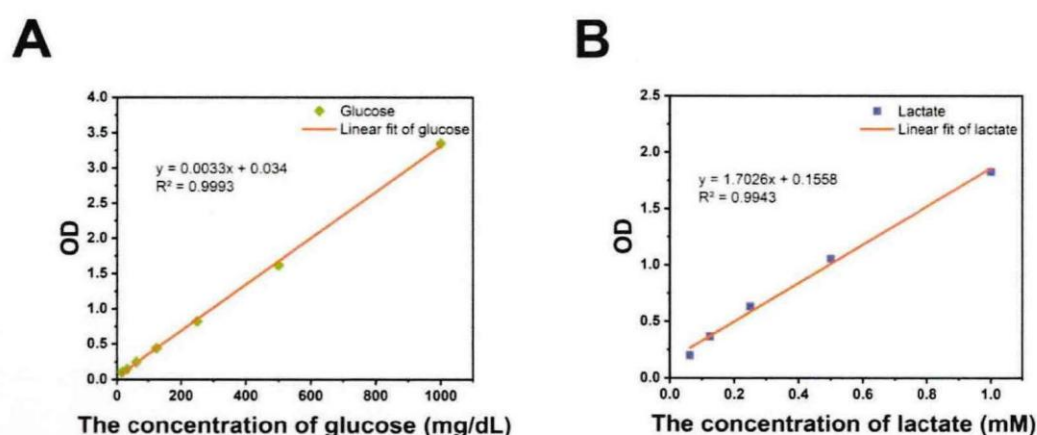


图 3-5 乳酸和葡萄糖浓度标准曲线。(A) 葡萄糖浓度-吸光度标准曲线；(B) 乳酸浓度-吸光度标准曲线。

Fig 3-5 The standard curve of glucose and lactate concentration. The Standard curve of glucose concentration-absorbance; (B) The Standard curve of lactate concentration-absorbance.

3.4.4 MCP 对关节软骨细胞糖酵解的影响

由图 3-6 可以看出，与对照组相比，经 MCP 处理后，单个软骨细胞的葡萄糖摄取量和乳酸产生量增加。进一步通过 RT-qPCR 检测与糖酵解代谢途径的基因的表

达情况, 结果显示 HIF-1 α 、Glut-1 和 PKM2 等糖酵解相关基因均在 MCP 的作用下显著上调, 且与对照组相比, ACAN 的表达水平显著升高。

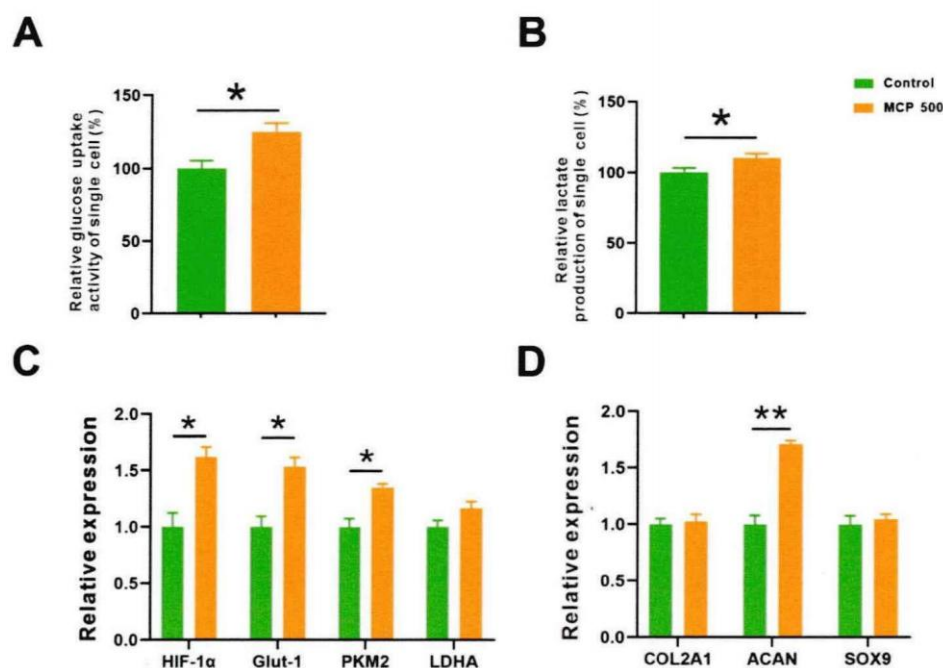


图 3-6 MCP 对软骨细胞糖酵解的影响。(A) 葡萄糖相对摄取量; (B) 乳酸相对生成量; (C) 糖酵解相关基因表达; (D) 细胞外基质合成相关基因表达。Control 组, 加入 MCP 0 培养基; MCP 500 组, 加入 MCP 500 培养基。(Mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 3-6 Effect of MCP on glycolysis of chondrocytes. (A) Relative glucose uptake activity; (B) Relative lactate production; (C) The expression of glycolysis-related genes; (D) The expression of extracellular matrix synthesis-related genes. Control group, MCP 0 medium; MCP 500 group, MCP 500 medium. (Mean $\pm$ SEM, n=3)

3.4.5 MCP 对连续传代过程中关节软骨细胞糖酵解的影响

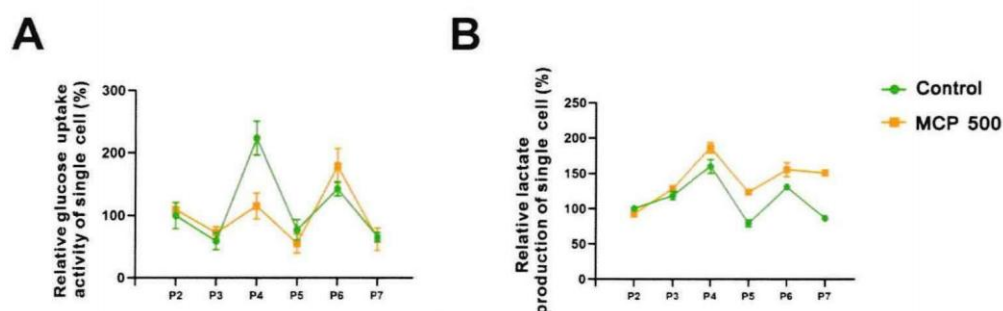


图 3-7 MCP 对连续传代过程 (P2-P7) 中软骨细胞葡萄糖摄取和乳酸生成的影响。(A) 葡萄糖相对摄取量; (B) 乳酸相对生成量。图注同 3-6。(Mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 3-7 Effect of MCP on glucose uptake and lactate production in chondrocytes during sequential passaging (P2-P7). (A) Relative glucose uptake activity; (B) Relative lactate production. The annotations are same as that of Fig 3-6. (Mean $\pm$ SEM, n=3)

图 3-7 显示连续传代 (P2-P7) 的单个软骨细胞的葡萄糖摄取量和乳酸生成量的变化情况。可见, 与对照组相比, MCP 增强 P6 软骨细胞的葡萄糖摄取, 且显著增强 P3-P7 软骨细胞的乳酸生成量。

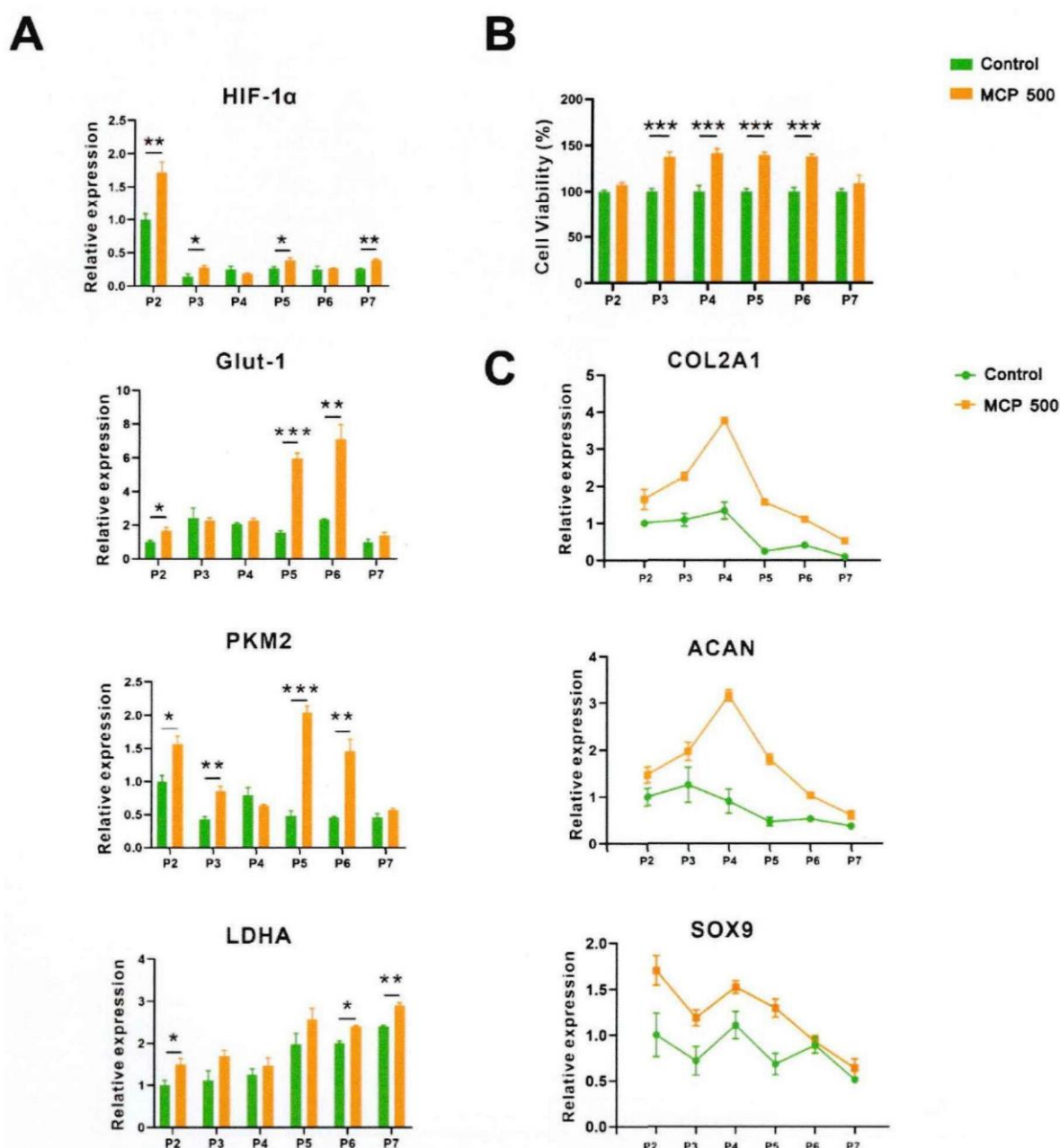


图 3-8 MCP 对连续传代 (P2-P7) 过程中软骨细胞基因表达和增殖活性的影响。(A) 糖酵解相关基因表达; (B) 软骨细胞增殖活性; (C) 细胞外基质合成相关基因。图注同 3-6。

(Mean $\pm$ SEM, $n=3$)

Fig3-8 Effect of MCP on gene expression and proliferative activity of chondrocytes during continuous passage (P2-P7). (A) The expression glycolysis-related genes; (B) The proliferation of chondrocytes; (C) The expression of extracellular matrix synthesis-related genes. The annotations are same as that of Fig 3-6. (Mean $\pm$ SEM, $n=3$)

图 3-8 显示连续传代 (P2-P7) 的软骨细胞的糖酵解相关基因的表达情况, 可以看出经 MCP 处理过的软骨细胞的糖酵解通路相关基因 (Glut-1、HIF-1 α 、PKM2 和 LDHA) 表达均相较于对照组升高; 另外, HIF-1 α 在 P3、P5 和 P7 时相较于对照组表达升高; PKM2 在 P5 和 P6, Glut-1 在 P3、P5 和 P6 时与对照组的基因表达差异最为显著; P2 和 P7 软骨细胞的 LDHA 相较于对照组显著升高。与对照组相比, MCP 显著提高了软骨细胞的增殖活性, 特别是 P3-P6 代, 与对照组相比具有明显差异。与对照组相比, MCP 显著上调 P2-P7 软骨细胞的 COL2A1、ACAN 和 SOX9 的基因表达水平。

图 3-9 显示 MCP 对 P2-P7 软骨细胞的 II 型胶原蛋白的表达情况。可见, 在 P2-P3 中, MCP 处理组与正常对照组的单个软骨细胞的平均荧光强度值无显著差异, 但在第四代开始, MCP 组的单个细胞的平均荧光强度值均显著高于对照组。II 型胶原蛋白免疫荧光染色 (图 3-9B) 显示, 随着传代次数的增加, 对照组中的软骨细胞逐渐从不规则形转变为长梭形, 而 MCP 组中软骨细胞基本保持了不规则形。以上数据提示, MCP 促进连续传代过程中 II 型胶原蛋白的合成。

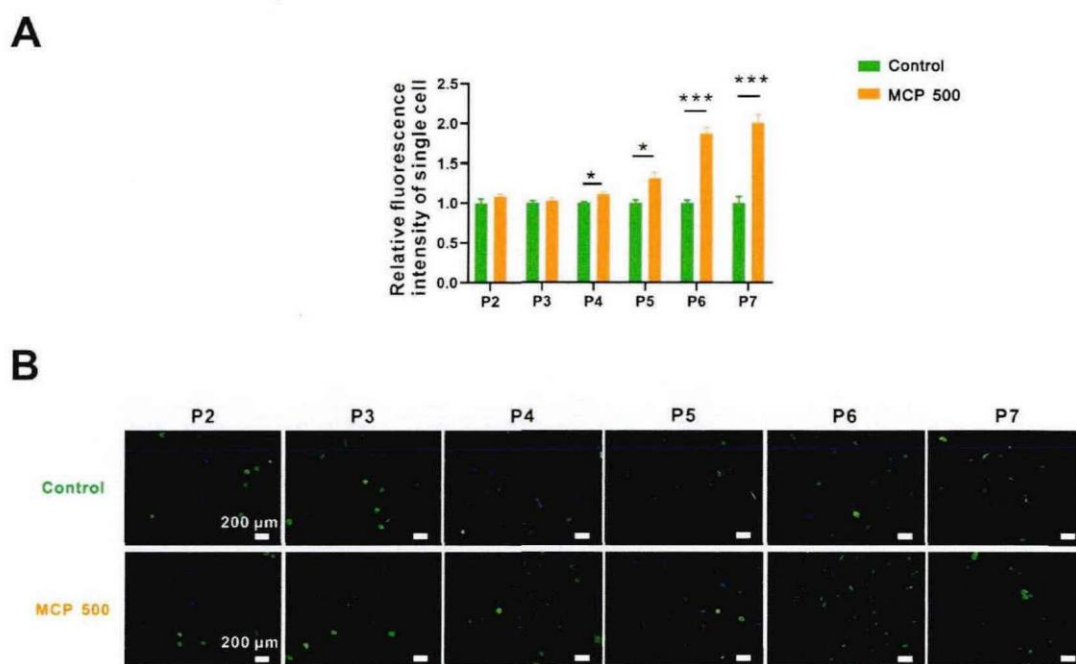


图 3-9 MCP 对连续传代过程中软骨细胞 II 型胶原蛋白合成的影响。(A) 单个细胞的 II 型胶原免疫荧光染色的荧光强度值; (B) P2-P7 软骨细胞 II 型胶原免疫荧光染色图像, 标尺: 200 μ m。图注同 3-6。(Mean $\pm$ SEM, n=6)

Fig 3-9 Effect of MCP on type II collagen synthesis in chondrocytes during sequential passaging. (A) Fluorescence intensity values for immunofluorescence staining of type II collagen from single cell; (B) Immunofluorescence staining image of type II collagen in P2-P7, Scale bar: 200 μ m. The annotations are same as that of Fig 3-6. (Mean $\pm$ SEM, n=6)

3.4.6 MCP 对 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞糖酵解的影响

IL-1 β 是诱导 OA 的关键因子,本研究为进一步探讨 MCP 对 OA 样软骨细胞糖酵解代谢影响,使用 IL-1 β 诱导正常软骨细胞以模拟炎症状态。图 3-10 显示,与正常对照组相比,经 IL-1 β 诱导的 OA 样软骨细胞的糖酵解代谢情况。可以看出,与正常对照组相比,经 IL-1 β 诱导后,单个软骨细胞的相对葡萄糖摄取量(图 3-10A)和相对乳酸生成量(图 3-10B)显著增强;相对应的, HIF-1 α 、Glut-1、PKM2 和 LDHA 等与糖酵解相关的基因表达水平显著上调(图 3-11C);除此之外,与正常对照组相比,单纯 IL-1 β 处理组的 COL2A1 和 ACAN 等与软骨细胞外基质相关的基因表达水平显著降低(图 3-10D)。

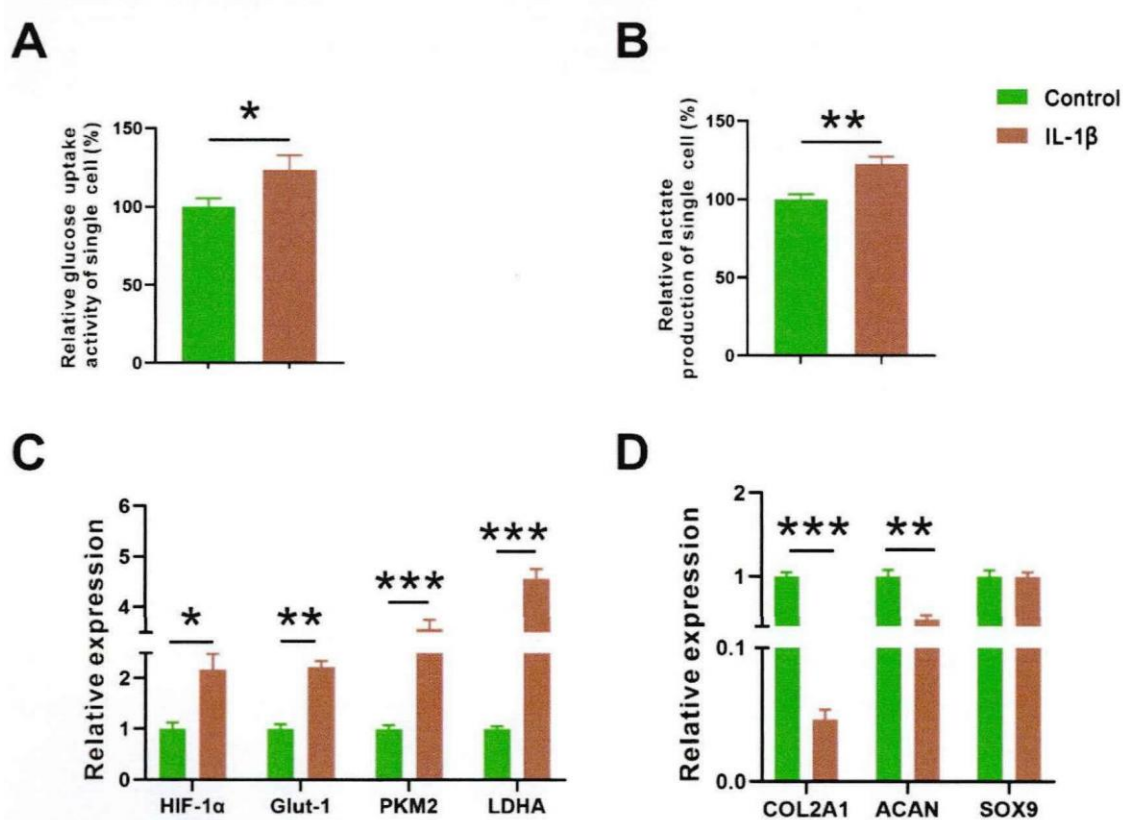


图 3-10 对照组和对 IL-1 β 诱导组软骨细胞糖酵解代谢。(A) 葡萄糖相对摄取量; (B) 乳酸相对生成量; (C) 软骨细胞糖酵解相关基因的表达; (D) 细胞外基质合成相关基因的表达。对照组, MCP 0 培养基; IL-1 β 组, IL-1 β 诱导后, 更换为 MCP 0 培养基。

(Mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 3-10 Glycolytic metabolism of chondrocytes in the control and IL-1 β -induced groups. (A) Relative glucose uptake activity; (B) Relative lactate production of single chondrocyte; (C) The expression of glycolysis-related genes; (D) The expression of extracellular matrix synthesis-related genes. Control group, MCP 0 medium; IL-1 β group, after induced by IL-1 β , replaced with MCP 0 medium. (Mean $\pm$ SEM, n=3)

MCP 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞糖酵解的影响如图 3-11 所示。可见, 与单纯 IL-1 β 处理组比较, IL-1 β +MCP 处理组的单个软骨细胞的葡萄糖摄取量显著升高 (图 3-11A), 但乳酸生成量无明显变化 (图 3-11B); 图 3-11C 显示, 经 MCP 处理的软骨细胞的 HIF-1 α 和 Glut-1 的基因表达水平显著上调, LDHA 的基因表达水平无明显变化。图 3-11D 显示, MCP 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞与 IL-1 β 处理组相比, 经 MCP 处理的软骨细胞的 ACAN 和 SOX9 的基因显著升高。

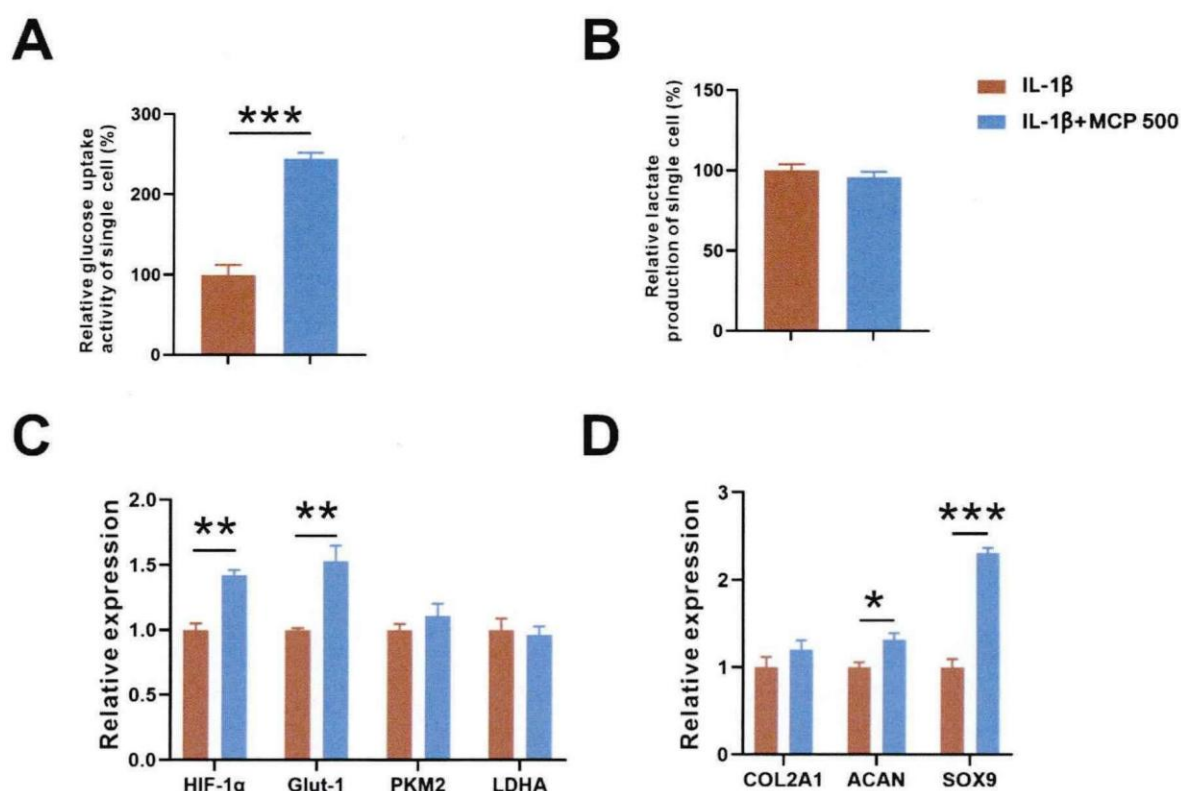


图 3-11 MCP 对 IL-1 β 诱导软骨细胞糖酵解的影响。(A) 葡萄糖相对摄取量; (B) 葡萄糖相对摄取量; (C) 软骨细胞糖酵解相关基因表达; (D) 细胞外基质合成相关基因的表达。IL-1 β 组, IL-1 β 诱导后, 更换为 MCP 0 培养基; IL-1 β +MCP 500, IL-1 β 诱导后, 更换为 MCP 500 培养基。(Mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 3-11 Effect of MCP on glycolysis of chondrocytes induced by IL-1 β . (A) Relative glucose uptake activity; (B) Relative lactate production; (C) The expression of glycolysis-related genes; (D) The expression of glycolysis-related genes. IL-1 β group, after induced by IL-1 β , replaced with MCP 0 medium; IL-1 β +MCP 500, after induced by IL-1 β , replaced with MCP 500 medium. (Mean $\pm$ SEM, n=3)

3.4.7 阻断糖酵解后 MCP 对关节软骨细胞糖酵解的影响

图 3-12 显示, 2DG 阻断糖酵解途径后, 与正常对照组相比, 2DG 显著降低软骨细胞对葡萄糖摄取和乳酸生成能力, 且显著下调 LDHA、Glut-3 和 ACAN 的基因表达水平, 但对 HIF-1 α 和 Glut-1 的基因表达水平无明显差异。

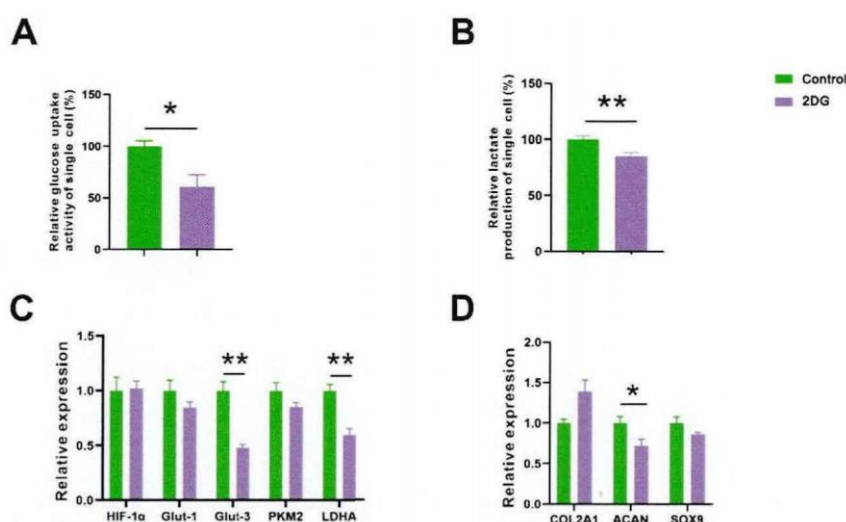


图 3-12 阻断糖酵解后关节软骨细胞糖酵解代谢。(A) 葡萄糖相对摄取量；(B) 乳酸相对生成量；(C) 糖酵解相关基因的表达；(D) 细胞外基质合成相关基因的表达。对照组，MCP 0 培养基；2DG 组，2DG 诱导后，更换为 MCP 0 培养基。(Mean ± SEM, n=3)

Fig 3-12 Glycolytic metabolism of articular chondrocytes after blocking glycolysis. (A) Relative glucose uptake activity; (B) Relative lactate production; (C) The expression of glycolysis-related genes; (D) The expression of extracellular matrix synthesis-related genes. Control group, MCP 0 medium; 2DG group, after induced by 2DG, replaced with MCP 0 medium. (Mean ± SEM, n=3)

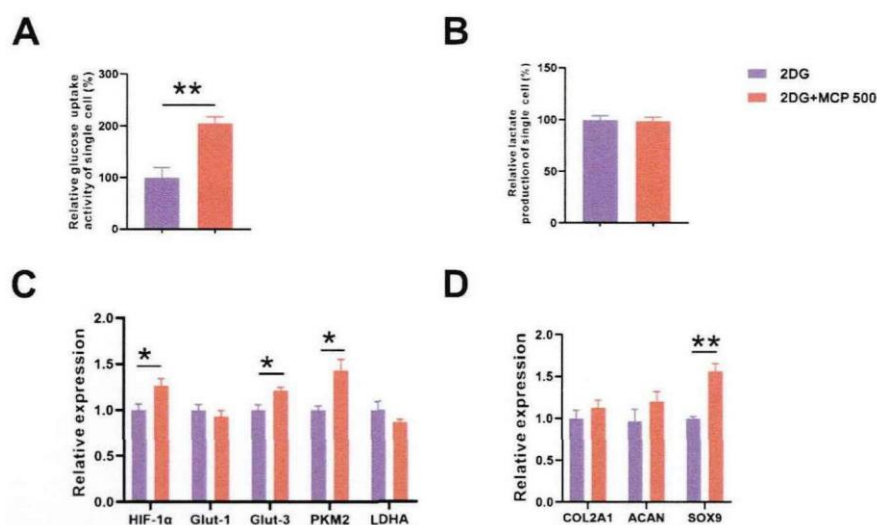


图 3-13 阻断糖酵解后 MCP 对关节软骨细胞糖酵解的影响。(A) 葡萄糖相对摄取量；(B) 乳酸相对生成量；(C) 糖酵解相关基因的表达；(D) 细胞外基质合成相关基因的表达。2DG 组，2DG 诱导一天后，更换为 MCP 0 培养基；2DG+MCP 500 组，2DG 诱导一天后，更换为 MCP 500 培养基。(Mean ± SEM, n=3)

Fig 3-13 Effect of MCP on glycolysis metabolism of chondrocytes induced by 2DG. (A) Relative glucose uptake activity; (B) Relative lactate production; (C) The expression of glycolysis-related genes; (D) The expression of extracellular matrix synthesis-related genes. 2DG group, after induced by 2DG, replaced with MCP 0 medium; 2DG+MCP 500, after induced by 2DG, replaced with MCP 500 medium. (Mean ± SEM, n=3)

图 3-13 显示,与单纯的 2DG 处理组相比, MCP 显著增强软骨细胞对葡萄糖的摄取量,但不影响乳酸生成量;另外, MCP 显著增强了 HIF-1 α 、PKM2 和 Glut-3 的表达,不影响 Glut-1 和 LDHA 的基因表达水平。另外, MCP 显著上调了经 2DG 诱导的软骨细胞的 SOX9 的基因表达水平。

3.5 讨论

葡萄糖是软骨细胞生长发育的关键物质,在维持软骨正常功能和防止软骨变性方面发挥着重要作用^[243, 244],且糖酵解是软骨细胞进行葡萄糖代谢的主要途径。在软骨细胞的生长发育过程中,约 75% ATP 来自糖酵解途径^[245],且糖酵解途径的中间产物是合成糖胺聚糖和糖蛋白等软骨基质成分的前体物质^[224, 234, 242]。因此,为了进一步探讨 MCP 对软骨细胞的作用及机制,本文以兔膝关节软骨细胞为研究对象,初步考察 MCP 对软骨细胞的糖酵解代谢的影响。

本研究对含 MCP 水凝胶构建组织工程软骨的转录组数据和 MCP-HA 水凝胶治疗 OA 后的关节液蛋白组学数据的 KEGG 分析发现, MCP 上调的差异基因富集在 mTOR 和 HIF-1 信号通路,差异蛋白富集在 AMPK 和 HIF-1 信号通路。HIF-1、mTOR 和 AMPK 等多条途径参与自噬过程,维持或影响软骨细胞的生物活性^[246]。其中, HIF-1 α 是调节自噬的关键信号通路,可以通过介导线粒体自噬来抑制关节软骨的细胞外基质降解以及抑制软骨细胞的成纤维细胞样标志物形成^[247],进而缓解 OA 进展^[248];同时, HIF-1 α 具有调控与葡萄糖转运和代谢相关基因的作用^[231, 249],在软骨细胞的生长发育中发挥重要功能,能够维持软骨细胞表型,促进软骨细胞增殖并维持细胞外基质的稳定性^[246]。以上结果提示, MCP 可能是通过调控软骨细胞的糖酵解代谢途径而发挥其对软骨细胞的作用。

在软骨细胞的有氧糖酵解途径中,葡萄糖转运是第一个限速步骤,细胞主要通过 Glut-1 摄取葡萄糖并转运至细胞内^[250],进入细胞后葡萄糖最终生成乳酸,在这个过程中, PKM2 和 LDHA 是重要限速酶, PKM2 催化糖酵解过程的最后一步,通常在增殖细胞和肿瘤细胞中过表达,能够调节糖酵解进程和瓦尔堡效应^[251]; LDHA 与有氧糖酵解途径密切相关,对乳酸生成起正向调控作用; HIF-1 α 能够通过提高糖酵解酶和葡萄糖转运蛋白的表达水平,增加葡萄糖摄取量,影响软骨细胞的糖酵解代谢过程^[231]。最近的研究表明,葡萄糖摄入对关节软骨细胞的合成代谢基因的表达至关重要^[224, 252],可以为软骨细胞的细胞外基质的合成提供大分子前体^[224, 234, 242]。本研究发现,与对照组相比, MCP 能显著提高软骨细胞的葡萄糖摄取及乳酸生成能力,而且 MCP 可以显著上调 Glut-1、HIF-1 α 、PKM2 和 LDHA 的基因表达水平。以上结果提示 MCP 能够通过调控糖酵解途径相关限速酶等基因的表达,进而调节

软骨细胞的糖酵解途径。

大量研究表明糖酵解代谢与软骨细胞功能相关^[243, 244]。本研究发现, MCP 能显著提高软骨细胞的葡萄糖摄取及乳酸生成能力, 而且可以显著上调 ACAN 的表达。进一步, 在考察 MCP 对体外连续传代培养软骨细胞的糖酵解途径的影响时发现, 对照组中, P4 比 P2 软骨细胞的 Glut-1 和 LDHA 的表达增强, 且第四代之后的 LDHA 表达持续升高, 而 P2-P7 软骨细胞的 PKM2 持续下调; 与之相对应, P4 软骨细胞的葡萄糖摄取量和乳酸生成量相较于 P2 软骨细胞显著升高, 但第四代之后的葡萄糖摄取量和乳酸生成量相较于 P4 明显降低; 同时, 虽然 P4 比 P2 软骨细胞的 COL2A1 和 SOX9 的表达有显著的升高, 但传代至 P7 时, 软骨细胞的 COL2A1、ACAN 和 SOX9 的表达都显著下调。这可能与软骨细胞从第四代之后发生衰老或去分化有关^[214-216]。衰老的软骨细胞生物功能下降^[253], 增殖能力减弱, ACAN 的降解加速^[254]; 同时, 研究发现衰老软骨细胞的 PKM2 表达降低^[216]。以上结果提示, 连续传代过程中的软骨细胞发生的去分化和糖酵解代谢途径的改变有关^[255]。与之对比, MCP 的加入可以提高软骨细胞的增殖活性。同时, MCP 会上调 Glut-1、PKM2 和 LDHA 的表达, 且对应的软骨细胞葡萄糖摄取量以及乳酸生成量均高于对照组; 经 MCP 处理的 P2-P6 软骨细胞的 COL2A1、ACAN、SOX9 的基因表达均高于对照组, 与之相一致的是 MCP 处理组软骨细胞的单个细胞的 II 型胶原蛋白相对平均荧光强度值均显著高于对照组。II 型胶原和蛋白聚糖是关节软骨细胞外基质的主要成分^[256, 257], 而 SOX9 是调控 COL2A1 和 ACAN 的关键转录因子^[258, 259]。以上结果提示, MCP 可以通过调节软骨细胞的糖酵解途径, 进而促进软骨细胞的增殖活性、上调软骨基质合成相关基因的表达水平、维持软骨细胞表型、减缓软骨细胞的衰老或去分化。

正常情况下, 软骨细胞的氧化磷酸化与无氧糖酵解水平处于平衡状态^[260, 261], 但是由糖酵解产生 ATP 的效率远低于氧化磷酸化^[262]。但 OA 软骨细胞的线粒体活性失调^[243], 摄取的葡萄糖更大程度依赖有氧糖酵解途径以产生足够的 ATP 用于维持细胞功能^[263-265]。IL-1 β 在 OA 的发生和发展过程中发挥了重要的作用, 体外研究中常用 IL-1 β 处理正常软骨细胞以模拟炎症状态^[220, 222]。研究发现, 高糖条件下, IL-1 β 刺激的软骨细胞的葡萄糖摄取量和乳酸生成量增加^[264]。与已有研究结果一致, 本研究发现 IL-1 β 刺激的软骨细胞的葡萄糖摄取量和乳酸生成量显著升高, 且可以显著上调 HIF-1 α 、Glut1、PKM2 及 LDHA 表达水平, 显著下调 COL2A1 和 ACAN 表达, 这与我们之前的结果相似^[126, 160]。本研究发现, MCP 可以显著增强 IL-1 β 诱导的 OA 样软骨细胞的 COL2A1、ACAN 和 SOX9 的表达水平, 这与课题组前期研究发现相一致, MCP 可以上调 IL-1 β 诱导的 OA 软骨细胞基质基因的表达^[126, 160]。最近的研究表明, OA 软骨细胞需要摄取更多的葡萄糖以减缓其细胞基质降解^[252, 266]。HIF-1 α 和 Glut-1 是影响软骨细胞摄取葡萄糖的关键因子^[231, 267-269]。本研究还发现,

MCP 可以显著上调 IL-1 β 诱导的 OA 样软骨细胞的 HIF-1 α 和 Glut-1 的表达水平以及葡萄糖摄取量。以上结果说明, MCP 能够促进 IL-1 β 诱导的 OA 样软骨细胞对葡萄糖的摄取, 并调控 HIF-1 α 和 Glut-1 通路, 促进软骨细胞外基质合成以发挥保护软骨细胞的作用。

2DG 是一种葡萄糖类似物, 能够竞争性抑制己糖激酶, 通过阻断葡萄糖生成葡萄糖-6-磷酸的途径发挥糖酵解阻断作用^[270]。本研究发现, 2DG 可以下调 Glut-3 基因的表达, 抑制软骨细胞对葡萄糖的摄取; 下调糖酵解下游通路的 PKM2 和 LDHA 的基因表达, 进而显著降低乳酸的生成; 另外, 2DG 在抑制糖酵解通路后, 可以下调 ACAN 和 SOX9 的基因表达水平。而进一步经 MCP 处理后, 软骨细胞的葡萄糖摄取量显著提高, 但其乳酸生成量和 LDHA 的表达无显著变化, 提示 MCP 可能未直接减弱 2DG 的糖酵解阻断作用。葡萄糖摄取量的增高可能与 Glut-3 的表达升高有关。Glut-3 是葡萄糖的重要转运蛋白之一^[271, 272], 也是 HIF-1 α 的下游靶点^[250, 273], 而 MCP 处理的软骨细胞 HIF-1 α 的表达升高; 另外, HIF-1 α 也能够激活 PKM2 表达^[274, 275], 而 MCP 处理的软骨细胞 PKM2 的表达升高。研究发现, PKM2 与 COL2A1 和 SOX9 的表达调控相关^[263]。本研究中, 经 MCP 进一步处理的软骨细胞 SOX9 的基因表达显著增强。因此, 可以推测 MCP 并不是仅仅通过调节糖酵解途径而促进软骨细胞的增殖和上调细胞外基质的合成, 其中, MCP 对 HIF-1 α 通路的激活发挥了重要的作用, 可能的调控机制如图 3-14 所示, 但其具体机制仍需要深入的研究。

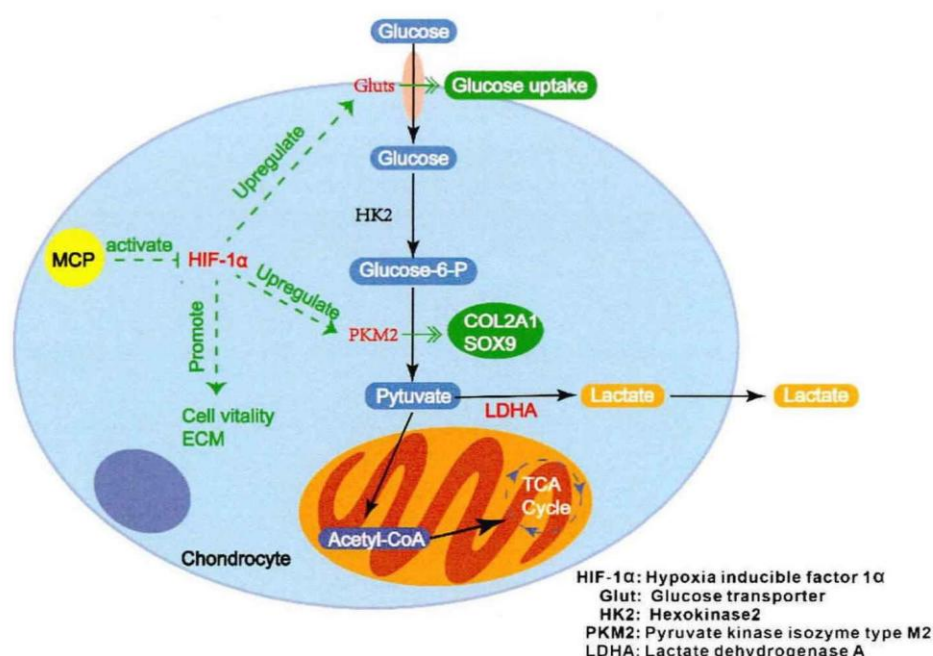


图 3-14 改性柑橘果胶调控软骨细胞葡萄糖代谢的可能作用机制

Fig 3-14 Hypothetical mechanism model of MCP on glucose metabolism of chondrocyte.

3.6 本章小结

(1) MCP 可以调节软骨细胞的糖酵解途径;

(2) MCP 能够促进软骨细胞对葡萄糖的摄取, 通过上调软骨细胞外基质合成发挥维持软骨细胞表型、减缓软骨细胞的衰老或去分化的软骨保护作用;

(3) MCP 可能通过激活 HIF-1 α 通路发挥促进软骨细胞的增殖和上调细胞外基质的合成的作用。

第四章 复合 MCP 的可德兰水凝胶的制备及表征

4.1 前言

课题组前期研究发现, 改性柑橘果胶 (Modified citrus pectin, MCP) 可以促进软骨细胞的增殖并维持其表型, 并直接上调软骨细胞的多种生长因子的基因表达, 下调炎症因子的基因表达^[126, 160, 161]。虽然在第二章的研究中发现关节腔注射的 MCP 可以在关节内存留约 2 周时间, 但单纯通过关节注射难以实现 MCP 靶向作用和分布于软骨损伤区域。另外, 前期我们构建了负载 MCP 的胶原基局部递送系统, 研究发现局部递送的 MCP 可以保护浅层和全层的关节软骨 (Articular cartilage, AC) 缺损周围的软骨细胞, 使其免于变性或死亡; 尤其是发现局部递送的 MCP 可以促进全层 AC 的修复^[126, 160, 161]。但是, 由于复合材料主要通过物理吸附方式构建, 所构建的复合材料对 MCP 的释放时间较短 (约 1 天), 难以满足关节软骨损伤修复的需求。因此, 有必要构建新型负载 MCP 的递送体系, 实现 MCP 在软骨缺损区的长周期、靶向递送, 进而穿透软骨组织进入软骨细胞, 发挥其对软骨细胞的保护和基因表达调控作用。

值得注意的是, 关节软骨细胞生活在缺氧环境中, 主要从关节滑液和软骨下骨中获得葡萄糖和氧气^[276]。50% 以上的葡萄糖、氧气和水是由软骨下血管的灌注提供^[277-279]。当软骨发生损伤, 从软骨下骨到关节软骨的营养物质和氧气供应将从缺血区域减少, 导致软骨细胞的营养物质供应不足, 细胞外基质合成功能下降, 影响软骨细胞的活性和关节软骨完整性^[280-282], 加剧骨关节炎 (Osteoarthritis, OA) 进展。因此, 向 OA 软骨细胞提供充足的葡萄糖是修复关节软骨损伤的有效方式^[224, 283-285]。同时, 我们在第三章中发现, MCP 能够增强关节软骨细胞对葡萄糖的摄取能力, 尤其是在葡萄糖供应充足时可以有效发挥其对软骨细胞的生物效应。因此, 局部递送 MCP 的同时, 补充局部的葡萄糖可能更有利于新型 MCP 复合材料促进关节软骨损伤修复的作用。

由葡萄糖组成的多糖基材料, 如纤维素和淀粉等, 因其良好的生物相容性, 已被发展成为组织再生的功能性生物材料^[286-289]。虽然这些天然多糖材料可通过断裂糖苷键生成葡萄糖, 但人体缺乏纤维素酶用以降解纤维素^[290], 而水解淀粉生成葡萄糖的淀粉酶仅存在于消化道^[291], 难以满足局部植入后降解生成葡萄糖的需求。可得然胶, 又称可德兰 (Curdlan), 具有与纤维素和淀粉相似的结构, 是一种由非致病性的农杆菌产生的 1, 3- β -D 葡聚糖^[292], 分子量为 $2.06 \times 10^4 - 5.0 \times 10^6$ Da, 结构式

如图 4-1 所示^[293]。因其高热稳定性、无毒和生物相容性等优良特点, Curdlan 已被美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准为食品添加剂^[294-296], 并被韩国和日本认可为膳食纤维^[296]。因其独特的凝胶特性和优良生物相容性等特点, Curdlan 在药物和生物活性物质的递送、伤口敷料、植入材料及组织工程支架等方面具有明确的应用前景^[297-301]。尤其是, Curdlan 在较低的温度 (55°C) 时呈现为可逆的单螺旋和松散缠绕的三螺旋的混合物凝胶, 而在较高温度 (80°C) 时不可逆地组装形成棒状三螺旋结构的凝胶^[302, 303]。由于其良好的热至凝胶性^[304], Curdlan 也被用于骨软骨损伤修复材料和软骨组织工程支架的构建^[305], 展示了其在关节软骨损伤中的应用潜力。特别是, 既往研究报道 Curdlan 除了通过被葡聚糖酶和葡萄糖苷酶降解外, 还可以通过酸性水解产生葡萄糖^[292, 296, 306]。研究发现, Curdlan 能够在破骨细胞介导的酸性环境中生成葡萄糖^[307]。另一方面, 关节软骨受损导致微环境稳态失调, OA 患者的滑液和关节软骨 pH 值降低, 呈弱酸性^[308, 309], 由此, 可以推测 Curdlan 可能在关节内通过酸水解途径生成葡萄糖, 一定程度地为损伤关节软骨补充葡萄糖, 在关节软骨的损伤修复中具有潜在的应用可能。

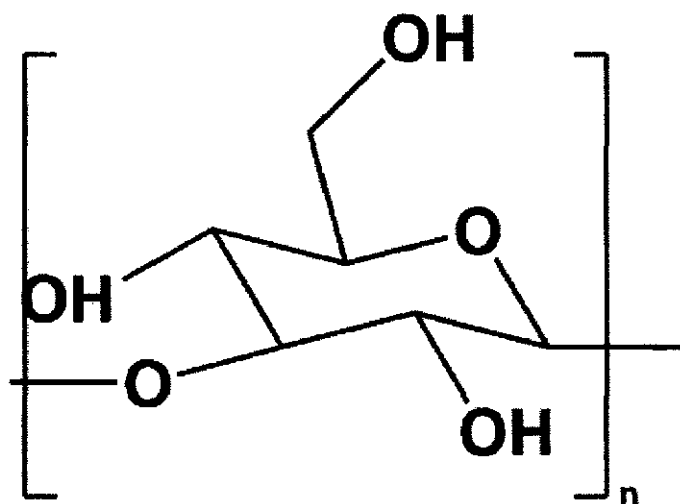


图 4-1 Curdlan 结构式^[293]

Fig 4-1 Structure of Curdlan

基于以上分析, 我们推测通过 MCP 与可德兰的复合, 可以构建新型 MCP 递送体系, 实现 MCP 的缓控释; 同时, 在酸性条件下可德兰降解生成葡萄糖, 为 MCP 生物活性的发挥补充一定的葡萄糖来源。本部分对此进行初步的考察, 通过 Curdlan 与 MCP 复合构建 Curdlan-MCP 水凝胶, 进一步对其理化和降解等性能进行表征, 进而分析 Curdlan 与 MCP 复合构建新型 MCP 局部递送体系的可行性, 以期用于关节软骨修复的新型 MCP 复合材料的构建提供依据和参考。

4.2 试剂仪器

4.2.1 试剂与耗材

表 4-1 试剂和耗材
Table 4-1 Reagents and material

试剂名称	生产厂家
改性柑橘果胶 (MCP)	浙江果源康品生物科技有限公司
柯德兰 (Curdlan)	上海麦克林生化科技股份有限公司
磷酸盐缓冲液 (PBS)	北京索莱宝科技有限公司
不含钙镁磷酸盐缓冲液 (D-PBS)	北京索莱宝科技有限公司
葡萄糖检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
乳酸	上海麦克林生化科技股份有限公司

4.2.2 仪器设备

表 4-2 仪器设备
Table 4-2 Instruments

仪器名称	生产厂家
电子天平	德国 Metter Toledo 公司
涡旋混合仪	德国 IKA 公司
万能材料试验机	美国 Instron 公司
恒温震荡水浴	德国 JULABO 公司
高级旋转流变仪	奥地利 Anton paar 公司
真空冷冻干燥机	美国 LABCONCO 公司
傅立叶变换红外 (FT-IR) 光谱仪	美国 Thermo 公司
荧光分光光度仪	美国 HORIBA 公司

4.3 实验方法

4.3.1 Curdlan-MCP 水凝胶的制备

称取适量 Curdlan 粉末加入 D-PBS 配制成浓度为 100 mg/mL 的 Curdlan 混悬液。将 MCP 溶于适量 D-PBS 中, 配制成浓度分别为 0、1、5 和 10 mg/mL 的 MCP

溶液。将 Curdlan 混悬液和 MCP 溶液按照体积比 1:1 混合,随后于 80℃ 加热 3 min,得到 Curdlan 终浓度为 50 mg/mL、MCP 终浓度分别为 0、0.5、2.5 和 5 mg/mL 的 Curdlan、Curdlan-0.05% MCP、Curdlan-0.25% MCP 和 Curdlan-0.5% MCP 水凝胶。

4.3.2 Curdlan-MCP 水凝胶的表征

4.3.2.1 流变性能表征

(1) 角频率扫描

取 200 μL Curdlan 及复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶转移至流变仪测试台上,将流变仪转子下落至距离测试台 1 mm 处。设定剪切应变参数为 1%,检测角频率 (ω) 为 0.1-100 rad/s 范围内样品的储能模量 (Storage modulus, G') 与损耗模量 (Loss modulus, G'') 的变化趋势。

(2) 黏度测试

取 200 μL Curdlan 及复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶转移至流变仪测试台上,将流变仪转子下落至距离测试台 1 mm 处。检测水凝胶样品在 0.01/s-100/s 剪切速率 (Shear rate) 范围内的粘度 (Viscosity) 变化。

4.3.2.2 傅立叶变换红外光谱 (FT-IR) 表征

MCP、冻干的 Curdlan 及 Curdlan-MCP 水凝胶样品研磨成粉末,与溴化钾 (1:100) 混合压成透明片状后,通过傅立叶变换红外光谱仪 (Fourier Transform Infrared Spectrometer, FT-IR) 在 4000-400 cm^{-1} 的波数范围内进行扫描,表征 MCP、Curdlan、Curdlan-0.05% MCP、Curdlan-0.25% MCP 和 Curdlan-0.5% MCP 的分子结构。

4.3.2.3 弹性模量表征

使用万能材料试验机对其进行抗压强度测试,以研究 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶的机械性能。具体操作为,将 Curdlan 及 Curdlan-MCP 水凝胶制备成底面积为 2 cm^2 ,厚度为 5 mm 的圆柱形样品后,放置于万能材料试验机上,设置压缩速率为 1 mm/min 进行测试,以检测水凝胶的弹性模量。

4.3.2.4 扫描电镜 (SEM) 表征

将 Curdlan 和含不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶冻干后,使用导电粘合剂将样品粘在铜片上,喷金处理 5 min,加速电压为 10 kV,使用扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 观察水凝胶表面形貌。

4.3.2.5 含水量表征

凝胶样品的含水量通过干燥法测定。取 500 μL Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶样品,记录初始重量为 W_0 ,然后将水凝胶样品在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温鼓风干燥箱中干燥至恒重,记录为 W 。按照 $\text{Humidity ratio} = (W_0 - W) / W_0 \times 100\%$ 的公式计算 Curdlan 和 Curdlan-MCP 水凝胶的含水量。

4.3.2.6 溶胀性表征

通过测量 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶在 PBS 溶液中温育之前和之后的质量差来表征其溶胀性^[310]。具体操作为,将制备好的水凝胶样品在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温鼓风干燥箱中干燥至恒重后,称重并记录初始重量为 W_0 。随后将其浸泡于 PBS 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温空气浴中震荡。于浸泡的第 1、2、4、6 和 8 h 取出,吸去表面水分后进行称重,并记录重量为 W_1 。按照 $\text{Swelling ratio} = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100\%$ 的公式计算水凝胶的溶胀性能。

4.3.2.7 Curdlan-MCP 水凝胶中 MCP 的释放

采用第二章 2.3.1.1 制备的 Cy5 酰肼标记的 Cy5-MCP 制备 Curdlan-MCP 水凝胶以检测 MCP 在 Curdlan-MCP 水凝胶中的释放情况。具体操作如下:

(1) 体外定性释放:

为直观观察 MCP 从 Curdlan-MCP 水凝胶中释放行为,按照 4.3.1 方法将浓度分别为 0、0.5、1、1.5 mg/mL 的 Cy5-MCP 制备成底面积为 1 cm^2 ,厚度为 5 mm 圆柱形的 Curdlan、Curdlan-0.025% MCP、Curdlan-0.05% MCP 和 Curdlan-0.075% MCP 水凝胶。随后将其放置于加入 1 mL D-PBS 的 1.5 mL 离心管中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温空气震荡箱震荡孵育,分别于第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12 和 14 天从各组中吸取 500 μL 释放液,再补充 500 μL 新的 D-PBS。并于初始日到第 14 天,从离心管中取出 Curdlan-MCP 水凝胶,在活体成像仪中检测 MCP 的释放情况。

(2) 体外定量释放:

本部分通过荧光分光光度计检测释放液中 Cy5-MCP 的荧光强度,以定量检测 Curdlan-MCP 水凝胶中 MCP 的释放。

Cy5-MCP 的标准曲线:用 D-PBS 配制成 1 mg/mL 的 Cy5-MCP 母液后,用 D-PBS 稀释成浓度依次为 50、25、12.5、6.25、3.125 和 1.5625 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cy5-MCP 溶液,以 D-PBS 为空白对照,使用荧光分光光度计在激发波长 (Excitation wavelength, Ex) 为 645 nm 和发射波长 (Emission wavelength, Em) 为 663 nm 的条件下,测量 Cy5-MCP 溶液的荧光强度。以 Cy5-MCP 的浓度为横坐标,以测得的样品荧光值-空

白对照的荧光值为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归运算,所得的线性回归方程即为 Cy5-MCP 的标准曲线。

按照 4.3.1 方法将浓度分别为 0、1、5 和 10 mg/mL 的 Cy5-MCP 溶液与 Curdlan 复合的 Curdlan-MCP 水凝胶放入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL D-PBS,放置于 37°C 恒温空气震荡箱中震荡孵育,分别于第 1、3、5、7、11、14 和 21 天,从各组中吸取 500 μ L 液体,再补充 500 μ L 新的 D-PBS。以 D-PBS 为空白对照。在 $E_x = 645$ nm, $E_m = 663$ nm 的波长下测量其荧光强度,代入 Cy5-MCP 标准曲线方程中,得到 MCP 的释放量。在本研究中,将各时间点 MCP 释放量/水凝胶中存在 MCP 总量百分比绘制 MCP 从 Curdlan-MCP 水凝胶中释放的释放曲线^[311]。

4.3.2.8 Curdlan-MCP 水凝胶的降解

按照 4.3.1 方法制备 Curdlan、Curdlan-0.05% MCP、Curdlan-0.25% MCP 和 Curdlan-0.5% MCP 水凝胶,于 50°C 烘箱重干燥至恒重后,称量其初始重量 (W_i)。随后将其放置于 D-PBS 中,待其达到溶胀平衡后,除去 D-PBS。随后将其放置于加入 1 mL D-PBS 的 1.5 mL 离心管中,分别于第 1、3、5 和 7 天,烘干样品,并精准称量并记录温育预定时间的水凝胶质量 (W_d)。根据公式 $\text{Degradation ratio (\%)} = (W_i - W_d) / W_i \times 100\%$ 计算 Curdlan-MCP 水凝胶在 PBS 缓冲液中的降解失重比。

4.3.2.9 Curdlan-MCP 水凝胶的葡萄糖生成

取 100 μ L Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶置于 500 μ L 的乳酸溶液 (pH=6) 中,以 PBS 为对照组。于 37°C 恒温水浴中孵育的第 1、3 和 5 天收集 10 μ L 乳酸降解液或 PBS。随后,使用葡萄糖检测试剂盒按照第三章 3.3.9.3 方法检测收集液中的葡萄糖浓度。

4.3.3 统计学分析

实验数据均通过 GraphPad Prism 7 和 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。数据以 Mean $\pm$ SD 或 Mean $\pm$ SEM 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

4.4 结果

4.4.1 Curdlan-MCP 的成凝胶作用

在常温状态下, Curdlan 不溶于水和乙醇,但当 Curdlan 混悬液被加热到 80°C 时,会形成固态的凝胶状态^[303,312,313]。图 4-2A 显示了 Curdlan 和复合不同浓度 MCP

的 Curdlan-MCP 水凝胶的热成胶过程,可见,常温下的 Curdlan 和 Curdlan-MCP 均为可流动的混悬液;而在 80°C 加热 3 min 后,所有样品都从流动状态变为固态;结果说明, Curdlan 和 Curdlan-MCP 复合物都具有良好的热致成胶特点。

进一步,检测动态角频率为 0.1-100 rad/s 的范围内的 Curdlan 及复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 的粘弹性行为,表征其凝胶特性。如图 4-2B 所示, Curdlan 及复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶在低频率扫描 (0.1-40 rad/s) 时,储能模量 (Storage modulus, G') 均大于损耗模量 (Loss modulus, G''), 且 G' 大于 200 Pa; 而当角频率大于 40 rad/s 后 G' 急速下降, G'' 急速上升。通常, G' 代表凝胶材料粘弹性行为的弹性部分,用以表征样品的固态特性; G'' 描述凝胶材料粘弹性行为的黏性部分,用以表征样品的液态特性^[314,315]。Curdlan 和 Curdlan-MCP 凝胶在高频率时出现的 G' 急速下降、 G'' 急速上升现象,可能是由于高频率扫描会造成 Curdlan 水凝胶固态结构的破坏,结果提示 Curdlan 水凝胶可能具有剪切变稀的特点^[316]。

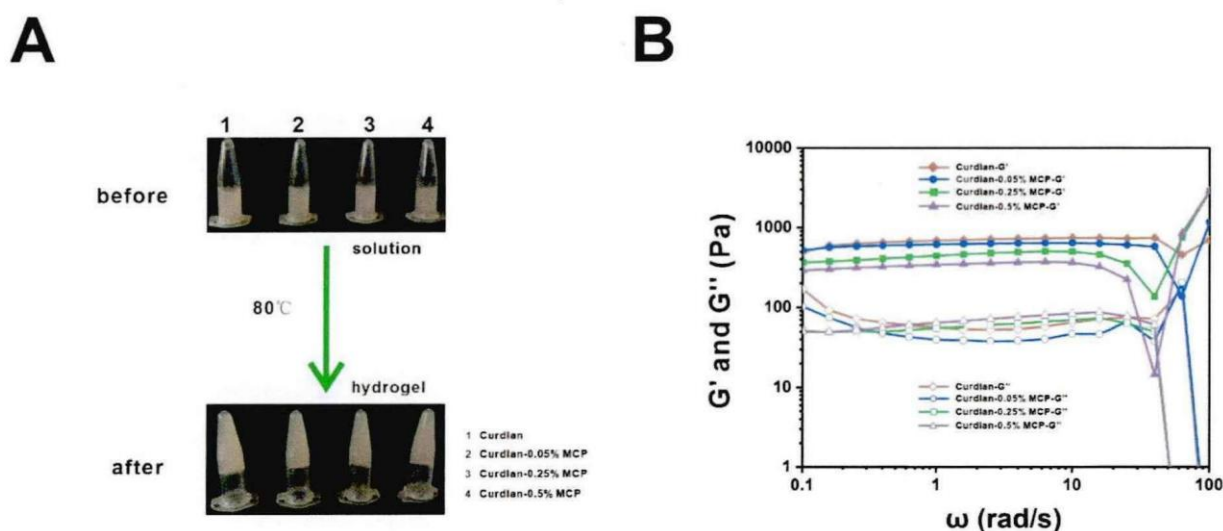


图 4-2 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 的成凝胶及角频率扫描。(A) 成凝胶。(B) 角频率扫描, G' : 储能模量, G'' : 损耗模量。Curdlan, 不含 MCP 的 Curdlan 水凝胶; Curdlan-0.05% MCP、Curdlan-0.25% MCP、Curdlan-0.5% MCP, 分别为含 MCP 终浓度为 0.5、2.5 和 5 mg/mL 的 Curdlan 水凝胶。

Fig 4-2 Gel formation and angular frequency scanning of Curdlan hydrogel and Curdlan-MCP hydrogels compounded with different concentrations of MCP. (A) Gel formation; (B) Angular frequency scan, G' : storage modulus, G'' : loss modulus. Curdlan, Curdlan hydrogel without MCP; Curdlan-0.05% MCP, Curdlan-0.25% MCP, and Curdlan-0.5% MCP, Curdlan hydrogels containing MCP at final concentrations of 0.5, 2.5 and 5 mg/mL, respectively.

4.4.2 Curdlan-MCP 水凝胶的可注射性

图 4-3A 显示了 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶的剪切速率—粘度曲线。可见，四种水凝胶的粘度均随剪切速率的增加而降低，即表现出剪切变稀的性质。有趣的是，所有 Curdlan-MCP 水凝胶的黏度均高于 Curdlan 水凝胶，这可能是由于 MCP 与 Curdlan 之间存在一定的相互作用造成的。从图 4-3B 直观的观察得到 Curdlan 及 Curdlan-MCP 水凝胶可顺利挤出，无堵塞。以上结果提示，Curdlan-MCP 水凝胶具有良好的可注射性。

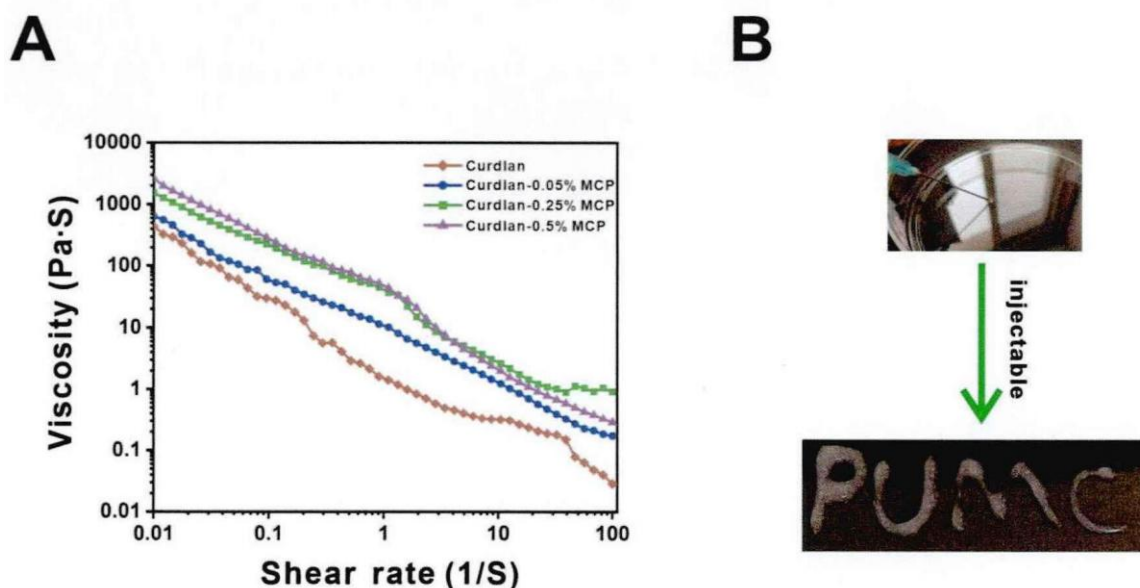


图 4-3 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶黏度扫描及可注射性。(A) 黏度扫描；(B) 可注射性。图注同 4-2。

Fig 4-3 Viscosity scanning and injectability of Curdlan hydrogel and Curdlan-MCP hydrogels compounded with different concentrations of MCP. (A) Viscosity scanning; (B) Injectability. The annotations are same as that of Fig 4-2.

4.4.3 Curdlan-MCP 水凝胶的 FT-IR

MCP、Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 的 FT-IR 图谱如图 4-4 所示。可见，在 3410 cm^{-1} 处的吸收峰与 O-H 的伸缩振动有关，在 2942 cm^{-1} 处的微弱吸收峰由 C-H 伸缩振动产生，在 1608 cm^{-1} 和 1416 cm^{-1} 处的吸收带表明存在 C=O 和 C-H 弯曲振动， 1016 cm^{-1} 处的吸收峰是 C-O 的伸缩振动，上述五个吸收峰是多糖骨架的特征峰^[170, 178, 179, 316, 317]。从图中可以看出，Curdlan 和 Curdlan-MCP 水凝胶的吸收峰没有明显变化，提示 Curdlan 和 MCP 之间没有发生化学反应或生成新的化学键。但根据 Curdlan 和 MCP 的分子结构，推测 MCP 与 Curdlan 之间存在静电和氢键相互作用。

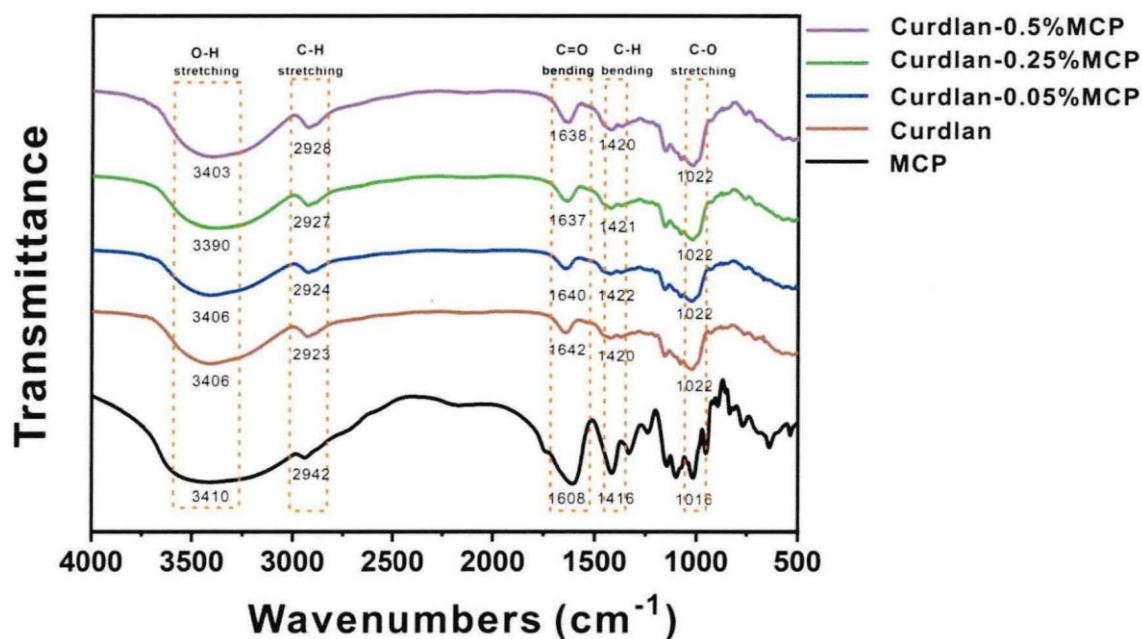


图 4-4 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶的 FT-IR 图谱。图注同 4-2。

Fig 4-4 FT-IR Spectra of Curdlan hydrogel and Curdlan-MCP hydrogels compounded with different concentrations of MCP. The annotations are same as that of Fig 4-2.

4.4.4 Curdlan-MCP 水凝胶的弹性模量

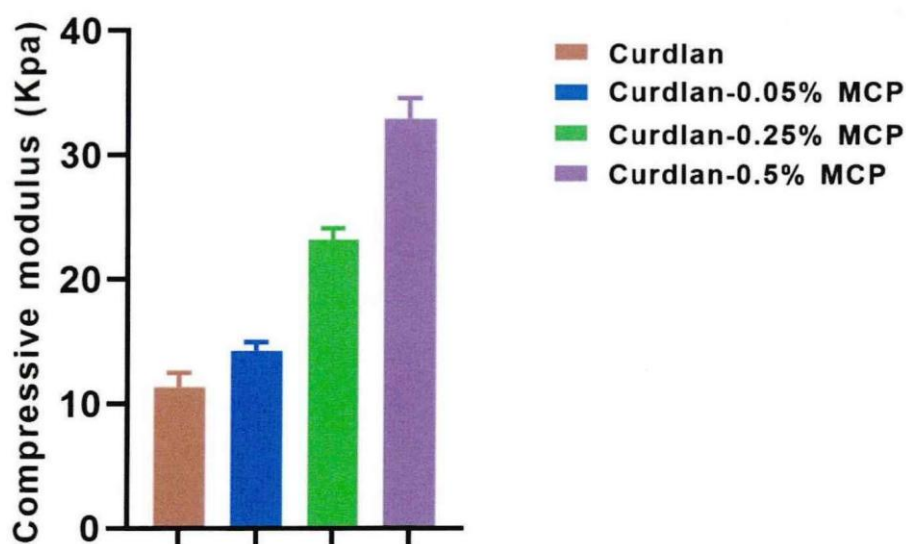


图 4-5 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶的弹性模量。图注同 4-2。
(Mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 4-5 Compressive modulus of Curdlan hydrogel and Curdlan-MCP hydrogels compounded with different concentrations of MCP. The annotations are same as that of Fig 4-2.
(Mean $\pm$ SEM, n=3)

对 Curdlan 及 Curdlan-MCP 水凝胶进行了抗压强度测试, 以检测 Curdlan-MCP 水凝胶的机械性能。从图 4-5 可见, Curdlan 水凝胶的弹性模量为 11.3484 ± 1.96 Kpa, Curdlan-0.05% MCP 水凝胶的弹性模量为 14.2394 ± 1.22 Kpa, Curdlan-0.25% MCP 水凝胶的弹性模量为 23.2241 ± 1.57 Kpa, Curdlan-0.5% MCP 水凝胶的弹性模量为 32.9552 ± 2.80 Kpa。可见, MCP 的加入可以增强 Curdlan 水凝胶的压缩模量, 且弹性模量随着水凝胶中 MCP 含量的升高而增加。

4.4.5 Curdlan-MCP 水凝胶的扫描电镜观察

通过 SEM (图 4-6) 观察, 可见冻干的 Curdlan 和 Curdlan-MCP 水凝胶均具有互连多孔的结构, 无明显的分层、分相, 表明 MCP 的加入并不影响 Curdlan 的微观结构, 且二者具有较好的相容性。

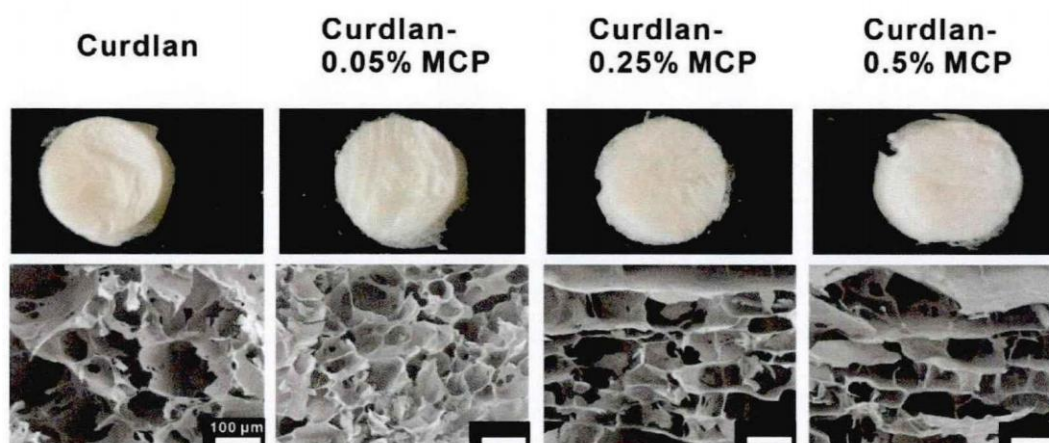


图 4-6 冻干 Curdlan 及复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 的 SEM 图, 标尺: 100 μ m。
图注同 4-2。

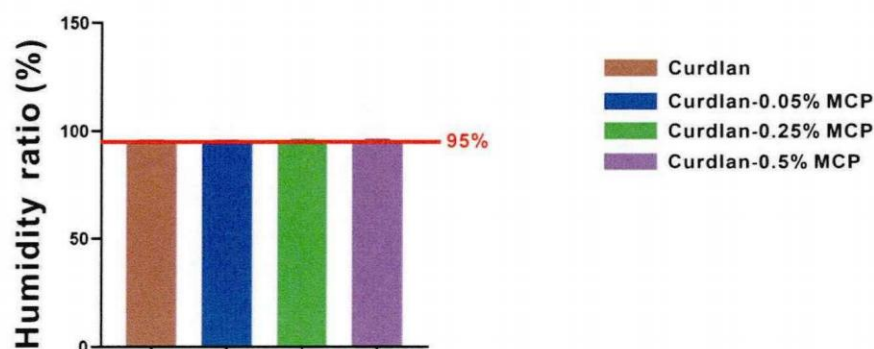
Fig 4-6 SEM of Curdlan and Curdlan-MCP compounded with different concentrations of MCP.
Scale bar: 100 μ m. The annotations are same as that of Fig 4-2.

4.4.6 Curdlan-MCP 水凝胶的含水量及溶胀性能

含水量和溶胀性是反映水凝胶功能的基本性质^[318]。Curdlan 及复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶的含水量结果如图 4-7A 所示, 所有水凝胶的平均含水量均达到约 95%, 各组间无明显差异。图 4-7B 显示了 Curdlan 及复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶在 PBS 缓冲液中的溶胀能力。可见, 在第 1 小时内所有冻干水凝胶都显示出了较快的吸水速率, 在 2 h 后达到溶胀平衡状态。12 h 时, Curdlan、Curdlan-0.05% MCP、Curdlan-0.1% MCP 和 Curdlan-0.25% MCP 水凝胶的溶胀率分别为 $1156.781 \pm 111.06\%$ 、 $1160.513 \pm 26.54\%$ 、 $1163.14 \pm 36.43\%$ 和 $1154.771 \pm 51.72\%$,

各组间无明显差异。以上数据提示, Curdlan-MCP 具有高含水量和快速溶胀的特点, 且 MCP 的加入不影响 Curdlan 水凝胶的含水量和溶胀率。

A



B

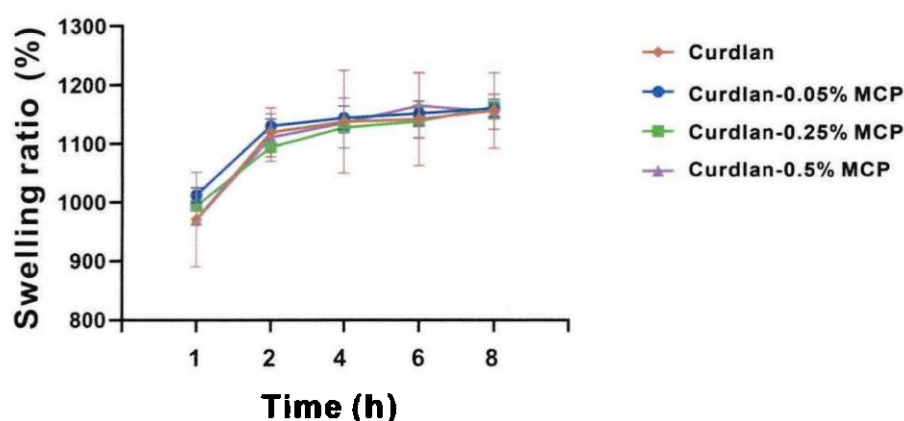


图 4-7 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶的溶胀率及含水量。(A) 溶胀率; (B) 含水量。图注同 4-2。(Mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 4-7 Swelling ration and humidity ratio of Curdlan hydrogel and Curdlan-MCP hydrogels compounded with different concentrations of MCP. (A) Swelling ratio; (B) Humidity ratio. The annotations are same as that of Fig 4-2. (Mean $\pm$ SEM, n=3)

4.4.7 Curdlan-MCP 水凝胶对 MCP 的释放

图 4-8 展示了活体成像直观观察到的 MCP 从 Curdlan-MCP 复合水凝胶的释放行为。从图中左侧部分复合不同浓度 Cy5-MCP 的 Curdlan 水凝胶的图像可观察到, 随着 MCP 含量的增加, Curdlan-MCP 水凝胶的颜色(蓝色)加深; 同时, 由第 0 天的水凝胶的荧光图像可见, Curdlan-MCP 水凝胶的荧光信号强度随着 MCP 的含量的增加而变强; 从图中也可以看出, 随着释放时间的延长, 各组 Curdlan-MCP 水凝

胶的荧光信号强度逐渐减弱, 这些结果提示, Curdlan-MCP 水凝胶对 MCP 具有缓释作用。另外, 随着释放时间的延长, Curdlan-MCP 水凝胶依旧保持原有的圆柱状, 但形态发生变化, 提示 Curdlan-MCP 水凝胶在 PBS 缓冲液中发生了降解。

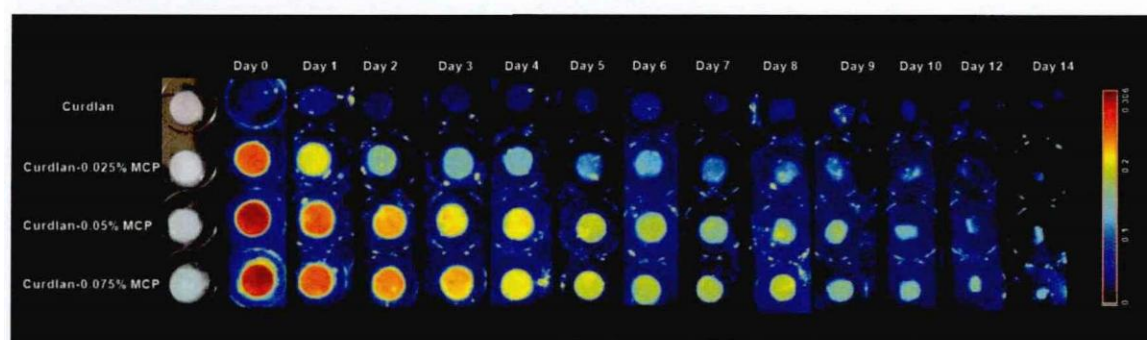


图 4-8 Curdlan-MCP 水凝胶中 MCP 的荧光成像图。Curdlan-0.025% MCP、Curdlan-0.05% MCP、Curdlan-0.075% MCP, 分别为含 MCP 终浓度为 0.25、0.5 和 0.75 mg/mL 的 Curdlan 水凝胶。

Fig 4-8 The fluorescence images of MCP release in Curdlan-MCP hydrogels. Curdlan-0.025% MCP、Curdlan-0.05% MCP、Curdlan-0.075% MCP, Curdlan hydrogels containing MCP at final concentrations of 0.25, 0.5 and 0.75 mg/mL, respectively.

进一步, 使用 Cy5 酰肼标记的 MCP (Cy5-MCP) 定量检测 MCP 从 Curdlan-MCP 复合水凝胶的释放情况。图 4-9 为 Cy5-MCP 标准曲线, 其线性回归方程为 $y = 89102x + 58368$, $R^2 = 0.9983$ 。

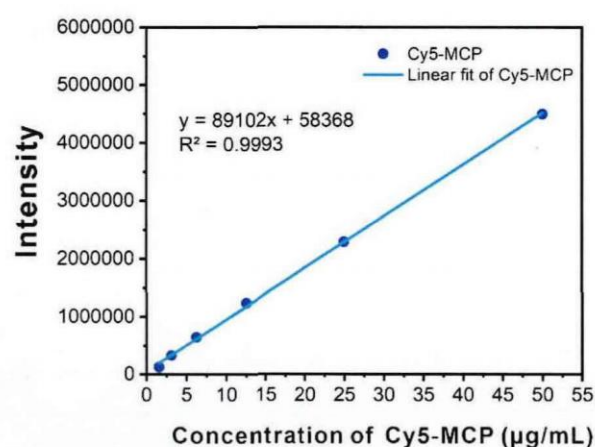


图 4-9 Cy5-MCP 的标准曲线

Fig 4-9 Standard curve of Cy5-MCP

图 4-10 展示了通过释放量与 MCP 负载量计算绘制得到的 MCP 释放率和释放量曲线。可见, 14 天内负载不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶对 MCP 均具有缓慢释放的作用, 且对 MCP 的释放行为几乎一致近似于线性释放。第一天的 Curdlan-0.05% MCP 的释放率达到 $19.903 \pm 1.24\%$, 释放量达到 $19.904 \pm 1.24 \mu\text{g}$,

Curdlan-0.25% MCP 的释放率达到 $23.128 \pm 1.35\%$ ；释放量达到 $115.643 \pm 6.75\mu\text{g}$ ，Curdlan-0.5% MCP 的释放率 $23.389 \pm 0.67\%$ ，释放量达到 $223.888 \pm 6.69\mu\text{g}$ 。以上数据表明，Curdlan-MCP 水凝胶对 MCP 具有良好的缓释作用，并且可以通过调整 MCP 的负载量调控 Curdlan-MCP 对 MCP 的释放。

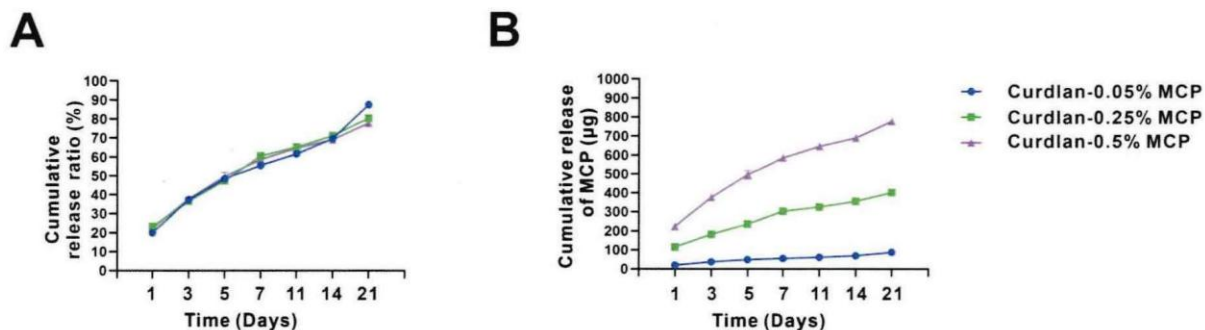


图 4-10 MCP 从 Curdlan-MCP 水凝胶的释放。(A) 累计释放率；(B) 累计释放量。图注同 4-2。(Mean $\pm$ SEM, $n=3$)

Fig4-10 The release of MCP from Curdlan-MCP hydrogels. (A) Cumulative release ratio; (B) Cumulative release amount. The annotations are same as that of Fig 4-2. (Mean $\pm$ SEM, $n=3$)

4.4.8 Curdlan-MCP 水凝胶的降解

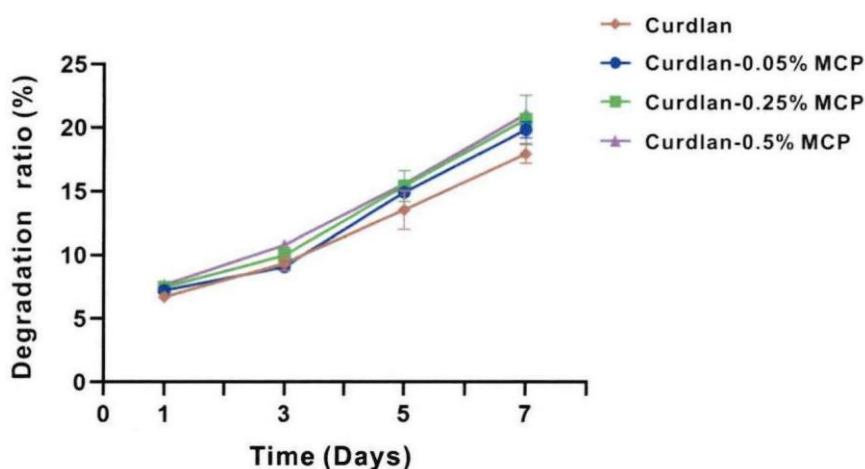


图 4-11 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶的降解率。图注同 4-2。(Mean $\pm$ SD, $n=3$)

Fig 4-11 The degradation ratio of Curdlan hydrogel and Curdlan-MCP hydrogels. The annotations are same as that of Fig 4-2. (Mean $\pm$ SD, $n=3$)

从图 4-8 发现，Curdlan-MCP 水凝胶在 PBS 缓冲液中会发生结构变化。进一步通过体外降解实验，初步检测 Curdlan 和负载不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶的降解性能。由图 4-11 可见，Curdlan 和 Curdlan-MCP 具有可降解性，且与单纯的 Curdlan 水凝胶相比，Curdlan-MCP 水凝胶的降解率提高，这可能是由于 MCP 的释放在一定程度上影响了 Curdlan 的结构。

4.4.9 Curdlan-MCP 水凝胶的葡萄糖生成

已有的研究发现, 由于炎症和软骨组织代谢的特点, OA 关节内的酸性产物增多, 其 pH 值在 6.2-5.5 之间; 而 Curdlan 在酸性条件下可以发生酸水解生成葡萄糖。基于此, 本研究利用 pH=6 的乳酸溶液, 考察了 Curdlan 和 Curdlan-MCP 水凝胶的葡萄糖(降解产物)生成作用。由图 4-12 可见, Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶在 pH=6 的乳酸溶液中, 随着降解时间的延长均有葡萄糖的生成; 其中, Curdlan 水凝胶在第五天降解产生的葡萄糖浓度达到 6.422 ± 0.24 mg/dL (64.22 ± 2.4 μ g/mL); 虽然在前三天各组 Curdlan-MCP 水凝胶的葡萄糖浓度显著低于 Curdlan 水凝胶, 但在第五天时, 复合水凝胶生成的葡萄糖也达到了与 Curdlan 水凝胶相似的浓度。具体的, Curdlan-0.05% MCP、Curdlan-0.1% MCP 和 Curdlan-0.25% MCP 水凝胶在第五天生成的葡萄糖的浓度分别为 5.935 ± 0.72 、 5.563 ± 0.137 和 5.894 ± 1.03 mg/dL。这些结果说明, Curdlan 水凝胶和 Curdlan-MCP 水凝胶都能够在乳酸条件下降解产生葡萄糖。

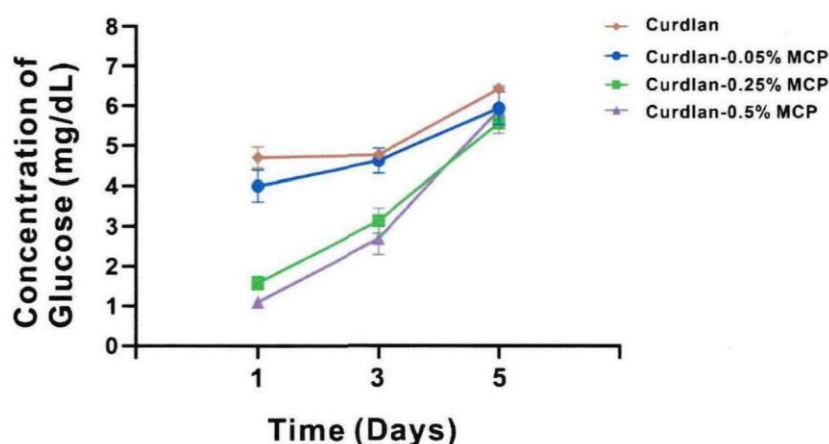


图 4-12 Curdlan 和复合不同浓度 MCP 的 Curdlan-MCP 水凝胶在乳酸溶液 (pH = 6) 中降解产生的葡萄糖浓度。图注同 4-2。(Mean $\pm$ SEM, n=3)

Fig 4-12 Glucose concentration produced by the degradation of Curdlan hydrogel and Curdlan-MCP hydrogels compounded with different concentrations of MCP in lactate solution (pH = 6). The annotations are same as that of Fig 4-2. (Mean $\pm$ SEM, n=3)

4.5 讨论

本章初步考察了 MCP 与 Curdlan 复合制备新型 MCP 递送体系的可行性。研究显示, Curdlan 与 MCP 可以通过简单的复合方法制备成复合材料, 所制备的复合材料为水凝胶, 具有良好的可注射性。

Curdlan 是一种由 β -1, 3-糖苷键组成的线性聚合物, 在常温条件不溶于水。当

Curdlan 混悬液在加热至 80°C 时,能够形成不可逆的热稳定凝胶,即 Curdlan 具有热致凝胶的特性^[303, 312, 313]。进一步,本研究发现,MCP 的加入并不影响 Curdlan 的热成胶能力。将 MCP 溶液和 Curdlan 溶液通过简单的物理共混和加热即可制备成 Curdlan-MCP 水凝胶。近年来,水凝胶因具有良好的生物相容性和天然软骨仿生特性已被广泛地应用于构建软骨损伤修复材料或组织工程软骨^[319, 320]。尤其是,Curdlan-MCP 水凝胶具有剪切变稀的性质,表明 Curdlan-MCP 具有良好的可注射性,并且具有局部可成型的特点,可以通过微创等方式植入关节软骨的损伤区,避免因植入手术可能造成的对损伤组织修复的影响。

虽然有研究报道,在热稳定的不可逆凝胶中引入多糖后,多糖的羟基与 Curdlan 之间的相互作用可以增强水凝胶的机械稳定性^[321];但本部分的研究发现,Curdlan 和 MCP 之间无明显的特异性相互作用,也未形成新的官能团,仅通过二者间的静电和氢键相互作用,不能有效提高水凝胶的机械性能。特别是,虽然复合 MCP 会提高 Curdlan 水凝胶的机械性能,但本研究中所有的水凝胶的压缩弹性模量都明显低于天然软骨。显然,在将 Curdlan-MCP 复合水凝胶材料用于关节软骨修复前,所制备的水凝胶需要进一步的优化,如通过加入合适的交联剂或对 Curdlan 分子进行化学改性等提高分子间的相互作用。

骨关节炎及关节软骨损伤往往伴随有慢性炎症反应,课题组前期的研究发现,MCP 具有抗炎等作用,但所构建的 MCP 递送体系难以满足关节软骨损伤修复中较长时间的炎性微环境调控的需求;通过构建新型负载 MCP 的递送体系,实现 MCP 长周期递送,持续协同调控炎性微环境,将有利于关节软骨再生修复的有效促进和长期再生修复效果的改善。本研究发现 Curdlan-MCP 水凝胶对 MCP 具有良好的缓释作用,其释放行为接近线性释放,释放周期可达 21 天以上;结合第二章中的发现,关节内注射的 MCP 在关节内可以存留达到 2 周以上,提示所构建的 Curdlan-MCP 水凝胶可能满足关节软骨损伤修复中较长时间的炎性微环境调控的需求。但值得注意的是,本研究中负载终浓度为 5 mg/mL 的 Curdlan-0.5% MCP 水凝胶在第一天的释放率为 $23.389 \pm 0.67\%$,释放量仅达到 $223.888 \pm 6.69 \mu\text{g/mL}$ 。与课题组前期研究相比,MCP 的释放量未能在短期内达到 MCP 发挥有效作用的浓度,因此,在用于关节软骨修复前,所制备的水凝胶需要优化 MCP 的负载量和负载方式,提高 MCP 的局部作用浓度。

由于缺少血管和淋巴系统,软骨的营养物质主要依靠从滑膜和软骨下骨扩散获得。其中,足够的葡萄糖对于维持关节软骨细胞的代谢至关重要,同时也是软骨细胞合成 ECM 的重要前体^[224, 234, 242]。因此,OA 软骨损伤和其他炎症条件下,软骨对葡萄糖的需求会更高。研究发现,提高葡萄糖水平可挽救 OA 等相关的炎症条件下的软骨细胞的葡萄糖摄取和基质生成活性,维持并增强软骨细胞的抗炎活性^{[224, 283-}

285]。通过注射高渗葡萄糖，能够向关节局部递送充足的葡萄糖，且已有研究表明，高渗葡萄糖增生疗法（Hypertonic Dextrose Prolotherapy, HDP）能够减缓 OA 进展^[322]，但高渗的葡萄糖溶液会导致细胞破裂，诱发炎症反应^[323]，且直接注射溶液的方式，无法使葡萄糖在关节腔长期停留。因此，如何在局部递送葡萄糖仍然存在极大的挑战。Chang 等^[324]发现吸附葡萄糖的壳聚糖膜材料具有促进人软骨细胞增殖活性的作用。但是吸附法可能存在负载量和释放行为难以满足体内需求的问题。在本研究中，我们利用了热凝胶化的 Curdlan 水凝胶能够在酸性环境中产生葡萄糖的特点^[292, 296, 306]，并结合 OA 关节软骨的 pH 在 6.2-5.5 之间的现象^[308]，考察了 Curdlan-MCP 水凝胶在 pH = 6 的乳酸溶液中生成葡萄糖的能力，结果发现 Curdlan-MCP 能够在乳酸条件下生成葡萄糖。由此可见，本研究为体内递送和补充软骨损伤修复的葡萄糖提供了一种新的途径；另外，在第三章中，我们发现，MCP 在糖供应充分条件下，可以有效发挥其对软骨细胞的作用，因此，将 MCP 与 Curdlan 复合也为增强 MCP 的作用提供了可能。

综上所述，本研究考察了 MCP 与 Curdlan 复合构建新型 MCP 递送体系的可能性。初步的研究结果显示，所构建的 MCP-可德兰水凝胶具有良好的可注射性和生物可降解性，并对 MCP 具有可调控的缓慢释放作用，而且 Curdlan-MCP 水凝胶能在酸性条件下生成葡萄糖，可以为软骨损伤局部的葡萄糖提供一定的补充，同时也为增强 MCP 的作用提供了基础。但是，显然在用于关节软骨损伤修复前，对于 Curdlan-MCP 水凝胶对软骨细胞的作用及机制等还需要进一步的深入研究。Curdlan-MCP 水凝胶应用于修复关节软骨损伤的示意图如图 4-13 所示。

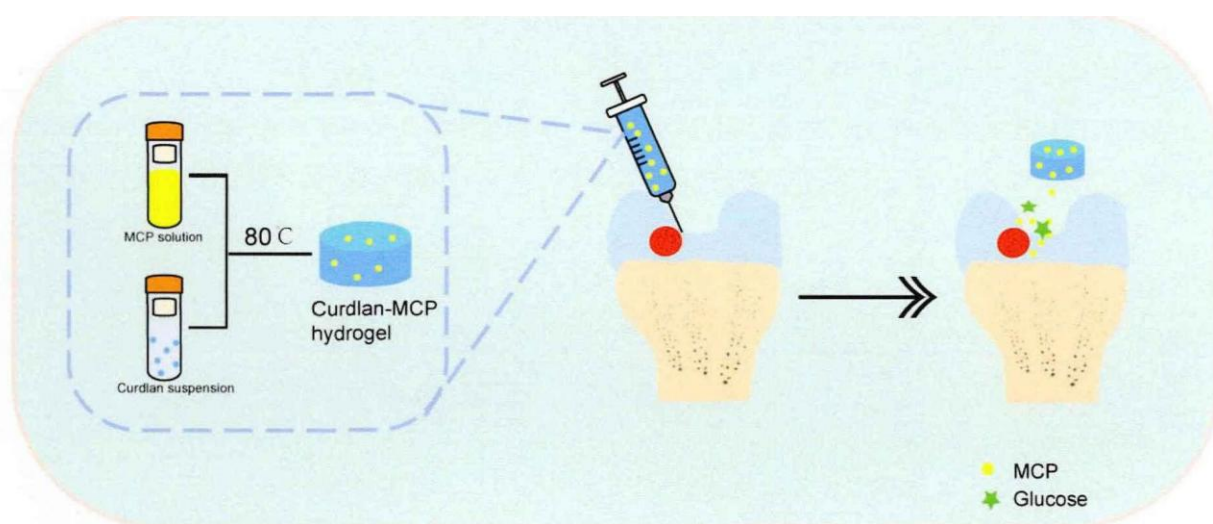


图 4-13 Curdlan-MCP 水凝胶应用于修复关节软骨损伤的示意图

Fig 4-13 Schematic diagram of the application of Curdlan-MCP hydrogel to repair articular cartilage injury.

4.6 本章小结

(1) MCP 与 Curdlan 可以通过简单的复合方法制备成具有良好的可注射性的新型 MCP 递送系统;

(2) Curdlan-MCP 水凝胶具有可降解性, 且对 MCP 具有缓释作用, 可用于 MCP 的局部递送;

(3) Curdlan-MCP 水凝胶在酸性条件下可以生成葡萄糖, 为 MCP 作用的增强和软骨损伤局部葡萄糖的补充提供了可能。

全文总结

本文在考察了 MCP 在关节软骨修复中发挥作用的详细机制的基础上,设计并构建用于关节软骨修复的新型 MCP 复合材料。首先,通过荧光标记技术示踪 MCP 在软骨组织和软骨细胞的分布和定位并结合前期数据探讨 MCP 发挥作用的潜在机制;进一步研究 MCP 对关节软骨细胞糖酵解代谢的影响;最后考察可德兰与 MCP 复合构建新型 MCP 递送体系的可行性。全文研究内容和研究结果总结如下:

1. MCP 在关节软骨组织和细胞内的分布及其作用机制:通过荧光标记技术制备具有荧光性能的 MCP,并示踪 MCP 在软骨组织和软骨细胞的分布和定位,发现 MCP 具有软骨渗透作用,可以穿透软骨组织并进入软骨细胞后,富集于溶酶体。结合课题组前期数据进行再分析,发现 MCP 能够通过调控软骨细胞自噬途径,发挥维持软骨细胞稳态的作用。

2. MCP 对关节软骨细胞糖酵解代谢的影响:通过检测体外培养的软骨细胞、连续传代的软骨细胞以及经白介素-1 β 和 2-D-脱氧-葡萄糖诱导的软骨细胞的葡萄糖摄取、乳酸生成、糖酵解和细胞外基质合成相关基因表达,发现 MCP 可以通过促进葡萄糖摄取及激活 HIF-1 α 通路等途径调节软骨细胞糖酵解代谢,进而发挥促进软骨细胞增殖、上调细胞外基质合成、维持软骨细胞表型和减缓细胞衰老的作用。

3. 复合 MCP 的可德兰水凝胶的制备和表征:通过将 MCP 和可德兰(Curdlan)复合制备 Curdlan-MCP 水凝胶,并对其进行理化性能表征发现, Curdlan-MCP 水凝胶的制备方法简单,且具有良好的可注射性和降解性,并对 MCP 具有可调控的缓释作用,可用于局部递送 MCP。

综上所述,本研究发现, MCP 能够穿透软骨组织进入软骨细胞,并富集于溶酶体,调控软骨细胞自噬途径;同时, MCP 能够通过调控糖酵解途径,发挥促进软骨细胞增殖、上调细胞外基质合成、维持表型和减缓细胞衰老的作用; Curdlan 和 MCP 可复合构建成具有良好可注射性和可调控缓释性的新型 MCP 递送系统,且在应用于关节软骨损伤修复方面具有可行性。本研究深入探讨了 MCP 在软骨损伤修复中发挥多效性作用的潜在机制,为进一步构建 MCP 在修复关节软骨损伤和骨关节炎治疗中的复合材料提供基础。

参考文献

- [1] Eliaz I, Guardino J, Hughes K. The Health Benefits of Modified Citrus Pectin. 2006.936: p. 199-10
- [2] Courts FL. Profiling of modified citrus pectin oligosaccharide transport across Caco-2 cell monolayers. *PharmaNutrition*, 2013. 1: p. 22-31.
- [3] Keizman D, Frenkel M, Peer A, et al. Modified Citrus Pectin Treatment in Non-Metastatic Biochemically Relapsed Prostate Cancer: Long-Term Results of a Prospective Phase II Study. *Nutrients*, 2023. 15(16): p. 3533.
- [4] Glinsky VV, Raz A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydr Res*, 2009. 344(14): p. 1788-91.
- [5] Conti S, Vexler A, Hagoel L, et al. Modified Citrus Pectin as a Potential Sensitizer for Radiotherapy in Prostate Cancer. *Integr Cancer Ther*, 2018. 17(4): p. 1225-34.
- [6] Fang T, Liu DD, Ning HM, et al. Modified citrus pectin inhibited bladder tumor growth through downregulation of galectin-3. *Acta Pharmacol Sin*, 2018. 39(12): p. 1885-93.
- [7] Xu GR, Zhang C, Yang HX, et al. Modified citrus pectin ameliorates myocardial fibrosis and inflammation via suppressing galectin-3 and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 2020. 126: p. 110071.
- [8] 苏丹丹. 柑橘低分子果胶研究进展. *食品安全导刊*, 2018(36): p. 167-70.
- [9] Eliaz I, Raz A. Pleiotropic Effects of Modified Citrus Pectin. *Nutrients*, 2019. 11(11): p. 2619.
- [10] Tavker N, Yadav VK, Yadav KK, et al. Removal of Cadmium and Chromium by Mixture of Silver Nanoparticles and Nano-Fibrillated Cellulose Isolated from Waste Peels of Citrus Sinensis. *Polymers (Basel)*, 2021. 13(2): p. 234-48.
- [11] Tamaki Y, Konishi T, Tako M. Isolation and characterization of pectin from peel of Citrus tankan. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008. 72(3): p. 896-9.
- [12] Methacanon P, Kongsin J, Gamonpilas C. Pomelo (*Citrus maxima*) pectin: Effects of extraction parameters and its properties. *Food Hydrocolloids*, 2014. 35: p. 383-91.
- [13] Dananjaya SHS, Chandrarathna HPSU, Nayanaransi LAU, et al. Pectin purified from pomelo (*Citrus maxima*) peel as a natural hatching agent for fish embryos. *Aquaculture Research*, 2020.
- [14] Kamal MM, Kumar JIN, Mamun MAH, et al. Extraction and Characterization of Pectin from Citrus sinensis Peel. *Journal of Biosystems Engineering*, 2021. 46: p. 16-25.
- [15] Salma MS, Jahan N, Islam M, et al. Extraction of Pectin from lemon peel: Technology development. *Journal of Chemical Engineering*, 2014. 27: p. 25-30.
- [16] Norziah MH, Fang E, Karim AA. Extraction and characterisation of pectin from pomelo fruit peels. 2000: p. 27-36.
- [17] Shaha RK, Nayagi Y, Afandi A. Optimized Extraction Condition and Characterization of Pectin from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*). 2013.1(2): p. 1-11.

- [18] Yadav VK, Gupta N, Kumar P, et al. Recent Advances in Synthesis and Degradation of Lignin and Lignin Nanoparticles and Their Emerging Applications in Nanotechnology. *Materials* (Basel), 2022. 15(3): p. 953-81.
- [19] Koubala BB, Kansci G, Mbome LI, et al. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from "Améliorée" and "Mango" mango peels. *Food Hydrocolloids*, 2008. 22: p. 1345-51.
- [20] Tsoga A, Richardson RK, Morris ER. Role of cosolutes in gelation of high-methoxy pectin. Part 1. Comparison of sugars and polyols. *Food Hydrocolloids*, 2004. 18: p. 907-19.
- [21] Güzel M, Akpinar O. Valorisation of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels. *Food and Bioprocess Processing*, 2019. 115: p. 126-33.
- [22] Sun SJ, Deng P, Peng CE, et al. Extraction, Structure and Immunoregulatory Activity of Low Molecular Weight Polysaccharide from *Dendrobium officinale*. *Polymers* (Basel), 2022. 14(14): p. 2899.
- [23] Niture S, Refai LA. Plant Pectin: A Potential Source for Cancer Suppression. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2013. 8: p. 9-19.
- [24] Zhang S, Hu H, Wang L, et al. Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food Chem*, 2018. 244: p. 232-37.
- [25] Basak S, Annapure US. Trends in "green" and novel methods of pectin modification - A review. *Carbohydr Polym*, 2022. 278: p. 118967.
- [26] Chen T-t, Zhang Z, Wang Z-W, et al. Effects of ultrasound modification at different frequency modes on physicochemical, structural, functional, and biological properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 2021. 113: p. 106484.
- [27] Gamonpilas C, Buathongjan C, Sangwan W, et al. Production of low molecular weight pectins via electron beam irradiation and their potential prebiotic functionality. *Food Hydrocolloids*, 2021. 113: p. 106551.
- [28] Mudugamuwa Arachchige MP, Mu T, Ma M. Effect of high hydrostatic pressure-assisted pectinase modification on the Pb(2+) adsorption capacity of pectin isolated from sweet potato residue. *Chemosphere*, 2021. 262: p. 128102.
- [29] Ma X, Wang D, Chen W, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymolysis of pectin: Kinetic study, structural characteristics and anti-cancer activity of the hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 2018. 79: p. 90-99.
- [30] Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski EO, et al. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 138-27.
- [31] Wang W, Feng Y, Chen W, et al. Citrus pectin modified by microfluidization and ultrasonication: Improved emulsifying and encapsulation properties. *Ultrason Sonochem*, 2021. 70: p. 105322.
- [32] Marounek M, Volek Z, Skřivanová E, et al. Comparative effect of amidated pectin and psyllium on cholesterol homeostasis in rats. *Central European Journal of Biology*, 2010. 5: p. 299-303.
- [33] Ma X, Zhang L, Wang W, et al. Synergistic Effect and Mechanisms of Combining Ultrasound and Pectinase on Pectin Hydrolysis. *Food and Bioprocess Technology*, 2016. 9: p. 1249-57.

- [34] Yue Y, Wang B, Xi W, et al. Modification methods, biological activities and applications of pectin: A review. *Int J Biol Macromol*, 2023. 253(Pt 8): p. 127523.
- [35] Zdunek A, Pieczywek PM, Cybulska J. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2021. 20(1): p. 1101-17.
- [36] Liu Y, Weng P, Liu Y, et al. Citrus pectin research advances: Derived as a biomaterial in the construction and applications of micro/nano-delivery systems. *Food Hydrocolloids*, 2022.133: p.107910.
- [37] Cao J, Yang J, Wang Z, et al. Modified citrus pectins by UV/H₂O₂ oxidation at acidic and basic conditions: Structures and in vitro anti-inflammatory, anti-proliferative activities. *Carbohydr Polym*, 2020. 247: p. 116742.
- [38] Leclerc L, Fransolet M, Cote F, et al. Heat-modified citrus pectin induces apoptosis-like cell death and autophagy in HepG2 and A549 cancer cells. *PLoS One*, 2015. 10(3): p. e0115831.
- [39] Mao G, Wu D, Wei C, et al. Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: Targeting rhamnogalacturonan I. *Trends in Food Science and Technology*, 2019. 94: p. 65-78.
- [40] 张学杰, 郭科, 苏艳玲. 果胶研究新进展. *中国食品学报*, 2010. 10(01): p. 167-74.
- [41] Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev*, 2009. 230(1): p. 160-71.
- [42] Seropian IM, Cassaglia P, Miksztowicz V, et al. Unraveling the role of galectin-3 in cardiac pathology and physiology. *Front Physiol*, 2023. 14: p. 1304735.
- [43] Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, et al. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology*, 2002. 12(5): p. 329-37.
- [44] Song L, Tang J-w, Owusu L, et al. Galectin-3 in cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2014. 431: p. 185-91.
- [45] Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(2): p.379-38.
- [46] Clementy N, Piver E, Bisson A, et al. Galectin-3 in Atrial Fibrillation: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(4): p.976-90.
- [47] Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1760(4): p. 616-35.
- [48] Harazono Y, Nakajima K, Raz A. Why anti-Bcl-2 clinical trials fail: a solution. *Cancer Metastasis Rev*, 2014. 33(1): p. 285-94.
- [49] Suthahar N, Meijers WC, Silljé HHW, et al. Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. *Theranostics*, 2018. 8(3): p. 593-609.
- [50] Filipová M, Bojarová P, Rodrigues Tavares M, et al. Glycopolymers for Efficient Inhibition of Galectin-3: In Vitro Proof of Efficacy Using Suppression of T Lymphocyte Apoptosis and Tumor Cell Migration. *Biomacromolecules*, 2020. 21(8): p. 3122-33.
- [51] Bhat R, Lerea KM, Peng H, et al. A regulatory network of two galectins mediates the earliest steps of avian limb skeletal morphogenesis. *BMC Dev Biol*, 2011. 11: p. 6-26.

- [52] Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell*, 2014. 156(4): p. 744-58.
- [53] Cao ZQ, Yu X, Leng P. Research progress on the role of gal-3 in cardio/cerebrovascular diseases. *Biomed Pharmacother*, 2021. 133: p. 111066.
- [54] Pally D, Bhat R. N-terminal tail prolines of Gal-3 mediate its oligomerization/phase separation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. 118(25): p. e2107023118.
- [55] Barake F, Soza A, González A. Galectins in the brain: advances in neuroinflammation, neuroprotection and therapeutic opportunities. *Curr Opin Neurol*, 2020. 33(3): p. 381-90.
- [56] Lin HM, Pestell RG, Raz A, et al. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*, 2002. 21(52): p. 8001-10.
- [57] 张跃华, 李树仁. 半乳糖凝集素 3 与心力衰竭关系的研究进展. *中国心血管杂志*, 2017. 22(04): p. 308-11.
- [58] Zhang M, Cheng K, Chen H, et al. Galectin-3 knock down inhibits cardiac ischemia-reperfusion injury through interacting with bcl-2 and modulating cell apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 2020. 694: p. 108602.
- [59] Funasaka T, Raz A, Nangia-Makker P. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology*, 2014. 24(10): p. 886-91.
- [60] Dong R, Zhang M, Hu Q, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med*, 2018. 41(2): p. 599-614.
- [61] Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*, 2004. 110(19): p. 3121-8.
- [62] I. Lala R, Puschiță M, Darabantiu D, et al. Galectin-3 in heart failure pathology – “another brick in the wall”? *Acta Cardiologica*, 2015. 70: p. 323 - 31.
- [63] Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1855(2): p. 235-47.
- [64] Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Galectin-3 in osteoarthritis: when the fountain of youth doesn't deliver its promises. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. 16(5): p. 595-8.
- [65] Slack RJ, Mills R, Mackinnon AC. The therapeutic potential of galectin-3 inhibition in fibrotic disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021. 130: p. 105881.
- [66] do Prado SBR, Shiga TM, Harazono Y, et al. Migration and proliferation of cancer cells in culture are differentially affected by molecular size of modified citrus pectin. *Carbohydr Polym*, 2019. 211: p. 141-51.
- [67] Lau ES, Liu E, Paniagua SM, et al. Galectin-3 Inhibition With Modified Citrus Pectin in Hypertension. *JACC Basic Transl Sci*, 2021. 6(1): p. 12-21.
- [68] Xue H, Zhao Z, Lin Z, et al. Selective effects of ginseng pectins on galectin-3-mediated T cell activation and apoptosis. *Carbohydr Polym*, 2019. 219: p. 121-29.
- [69] Beukema M, Faas MM, de Vos P. The effects of different dietary fiber pectin structures on the

- gastrointestinal immune barrier: impact via gut microbiota and direct effects on immune cells. *Exp Mol Med*, 2020. 52(9): p. 1364-76.
- [70] Prado SBR, Beukema M, Jermendi E, et al. Pectin Interaction with Immune Receptors is Modulated by Ripening Process in Papayas. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 1690.
- [71] Sahasrabudhe NM, Beukema M, Tian L, et al. Dietary Fiber Pectin Directly Blocks Toll-Like Receptor 2-1 and Prevents Doxorubicin-Induced Ileitis. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 383.
- [72] Pascale N, Gu F, Larsen N, et al. The Potential of Pectins to Modulate the Human Gut Microbiota Evaluated by In Vitro Fermentation: A Systematic Review. *Nutrients*, 2022. 14(17).
- [73] Di R, Vakkalanka MS, Onumpai C, et al. Pectic oligosaccharide structure-function relationships: Prebiotics, inhibitors of *Escherichia coli* O157:H7 adhesion and reduction of Shiga toxin cytotoxicity in HT29 cells. *Food Chem*, 2017. 227: p. 245-54.
- [74] Odun-Ayo F, Mellem JJ, Reddy L. The effect of modified citrus pectin-probiotic on faecal lactobacilli in Balb/c mice. *Food Science and Technology International*, 2017. 37: p. 478-82.
- [75] Tian C, Xu H, Li J, et al. Characteristics and intestinal immunomodulating activities of water-soluble pectic polysaccharides from Chenpi with different storage periods. *J Sci Food Agric*, 2018. 98(10): p. 3752-57.
- [76] Matsumoto T, Moriya M, Sakurai MH, et al. Stimulatory effect of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L., on G-CSF secretion from intestinal epithelial cells. *Int Immunopharmacol*, 2008. 8(4): p. 581-8.
- [77] Ma Y, Mouton AJ, Lindsey ML. Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl Res*, 2018. 191: p. 15-28.
- [78] Ramachandran C, Wilk BJ, Hotchkiss A, et al. Activation of human T-helper/inducer cell, T-cytotoxic cell, B-cell, and natural killer (NK)-cells and induction of natural killer cell activity against K562 chronic myeloid leukemia cells with modified citrus pectin. *BMC Complement Altern Med*, 2011. 11: p. 59-68.
- [79] Ruvolo PP, Ruvolo VR, Benton CB, et al. Combination of galectin inhibitor GCS-100 and BH3 mimetics eliminates both p53 wild type and p53 null AML cells. *Biochim Biophys Acta*, 2016. 1863(4): p. 562-71.
- [80] Iurisci I, Tinari N, Natoli C, et al. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(4): p. 1389-93.
- [81] Zhang W, Xu P, Zhang H-q. Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 2015. 44: p. 258-71.
- [82] Streetly MJ, Maharaj L, Joel S, et al. GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. *Blood*, 2010. 115(19): p. 3939-48.
- [83] Inohara H, Raz A. Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconj J*, 1994. 11(6): p. 527-32.
- [84] Demotte N, Wieërs G, Van Der Smissen P, et al. A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. *Cancer Res*, 2010. 70(19): p. 7476-88.

- [85] Clark MC, Pang M, Hsu DK, et al. Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death. *Blood*, 2012. 120(23): p. 4635-44.
- [86] Chauhan D, Li G, Podar K, et al. A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 2005. 65(18): p. 8350-8.
- [87] Wang Y, Nangia-Makker P, Balan V, et al. Calpain activation through galectin-3 inhibition sensitizes prostate cancer cells to cisplatin treatment. *Cell Death Dis*, 2010. 1(11): p. e101.
- [88] Leclère L, Cutsem PV, Michiels C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Frontiers in Pharmacology*, 2013. 4: p. 128-36.
- [89] Emran TB, Islam F, Mitra S, et al. Pectin: A Bioactive Food Polysaccharide with Cancer Preventive Potential. *Molecules*, 2022. 27(21): p. 7405-26.
- [90] Yan J, Katz A. PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and- independent prostate cancer cells. *Integr Cancer Ther*, 2010. 9(2): p. 197-203.
- [91] Wang S, Li P, Lu SM, et al. Chemoprevention of Low-Molecular-Weight Citrus Pectin (LCP) in Gastrointestinal Cancer Cells. *Int J Biol Sci*, 2016. 12(6): p. 746-56.
- [92] Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, et al. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst*, 1995. 87(5): p. 348-53.
- [93] Rahman J, Tareq AM, Hossain MM, et al. Biological Evaluation, DFT Calculations and Molecular Docking Studies on the Antidepressant and Cytotoxicity Activities of *Cycas pectinata* Buch.-Ham. Compounds. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020. 13(9): p. 232-57.
- [94] Hsieh TC, Wu JM. Changes in cell growth, cyclin/kinase, endogenous phosphoproteins and nm23 gene expression in human prostatic JCA-1 cells treated with modified citrus pectin. *Biochem Mol Biol Int*, 1995. 37(5): p. 833-41.
- [95] Sliva D. Suppression of cancer invasiveness by dietary compounds. *Mini Rev Med Chem*, 2008. 8(7): p. 677-88.
- [96] Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*, 2000. 156(3): p. 899-909.
- [97] Ramberg JE, Nelson ED, Sinnott RA. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutr J*, 2010. 9: p. 54-76.
- [98] Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(24): p. 1854-62.
- [99] Liu HY, Huang ZL, Yang GH, et al. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(48): p. 7386-91.
- [100] Guess BW, Scholz MC, Strum SB, et al. Modified citrus pectin (MCP) increases the prostate-specific antigen doubling time in men with prostate cancer: a phase II pilot study. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2003. 6(4): p. 301-4.
- [101] Gong F, Qu R, Li Y, et al. *Astragalus Mongholicus*: A review of its anti-fibrosis properties. *Front Pharmacol*, 2022. 13: p. 976561.

- [102] Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014. 351(2): p. 336-43.
- [103] Vergaro G, Prud'homme M, Fazal L, et al. Inhibition of Galectin-3 Pathway Prevents Isoproterenol-Induced Left Ventricular Dysfunction and Fibrosis in Mice. *Hypertension*, 2016. 67(3): p. 606-12.
- [104] Martínez-Martínez E, López-Ándres N, Jurado-López R, et al. Galectin-3 Participates in Cardiovascular Remodeling Associated With Obesity. *Hypertension*, 2015. 66(5): p. 961-9.
- [105] Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(13): p. 5060-5.
- [106] Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol*, 2008. 172(2): p. 288-98.
- [107] Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, et al. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol*, 2013. 10(1): p. 15-26.
- [108] Gulati A, Jabbour A, Ismail TF, et al. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Jama*, 2013. 309(9): p. 896-908.
- [109] de Boer RA, van der Velde AR, Mueller C, et al. Galectin-3: a modifiable risk factor in heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2014. 28(3): p. 237-46.
- [110] Jia W, Wang Z, Gao C, et al. Trajectory modeling of endothelial-to-mesenchymal transition reveals galectin-3 as a mediator in pulmonary fibrosis. *Cell Death Dis*, 2021. 12(4): p. 327-41.
- [111] González GE, Cassaglia P, Noli Truant S, et al. Galectin-3 is essential for early wound healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Int J Cardiol*, 2014. 176(3): p. 1423-5.
- [112] Chain MO, Paiva CAM, Maciel IO, et al. Galectin-3 mediates survival and apoptosis pathways during *Trypanosoma cruzi*-host cell interplay. *Exp Parasitol*, 2020. 216: p. 107932.
- [113] Martínez-Martínez E, Ibarrola J, Calvier L, et al. Galectin-3 Blockade Reduces Renal Fibrosis in Two Normotensive Experimental Models of Renal Damage. *PLoS One*, 2016. 11(11): p. e0166272.
- [114] Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, et al. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. *PLoS One*, 2011. 6(4): p. e18683.
- [115] Martínez-Martínez E, Ibarrola J, Fernández-Celis A, et al. Galectin-3 pharmacological inhibition attenuates early renal damage in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 2018. 36(2): p. 368-76.
- [116] Ibarrola J, Martínez-Martínez E, Sádaba JR, et al. Beneficial Effects of Galectin-3 Blockade in Vascular and Aortic Valve Alterations in an Experimental Pressure Overload Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. 18(8): p. 1664-1677.
- [117] Li S, Li S, Hao X, et al. Perindopril and a Galectin-3 Inhibitor Improve Ischemic Heart Failure in Rabbits by Reducing Gal-3 Expression and Myocardial Fibrosis. *Front Physiol*, 2019. 10: p. 267-75.

- [118] Martínez-Martínez E, Brugnolaro C, Ibarrola J, et al. CT-1 (Cardiotrophin-1)-Gal-3 (Galectin-3) Axis in Cardiac Fibrosis and Inflammation. *Hypertension*, 2019. 73(3): p. 602-11.
- [119] Martínez-Martínez E, Calvier L, Rossignol P, et al. Galectin-3 inhibition prevents adipose tissue remodelling in obesity. *Int J Obes (Lond)*, 2016. 40(6): p. 1034-8.
- [120] Abu-Elsaad NM, Elkashef W. Modified citrus pectin stops progression of liver fibrosis by inhibiting galectin-3 and inducing apoptosis of stellate cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2016. 94 5: p. 554-62.
- [121] Rajagopal HM, Manjegowda SB, Serkad C, et al. A modified pectic polysaccharide from turmeric (*Curcuma longa*) with antiulcer effects via anti-secretory, mucoprotective and IL-10 mediated anti-inflammatory mechanisms. *Int J Biol Macromol*, 2018. 118(Pt A): p. 864-80.
- [122] Yu M, Wang H, Ding A, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*, 2006. 26(2): p. 174-9.
- [123] Yeung YK, Kang Y-R, So BR, et al. Structural, antioxidant, prebiotic and anti-inflammatory properties of pectic oligosaccharides hydrolyzed from okra pectin by Fenton reaction. *Food Hydrocolloids*, 2021: p. 106779.
- [124] Ramachandran C, Wilk B, Melnick SJ, et al. Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects between Modified Citrus Pectin and Honokiol. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017. 2017: p. 8379843.
- [125] Sun Y, He Y, Wang F, et al. Low-methoxyl lemon pectin attenuates inflammatory responses and improves intestinal barrier integrity in caerulein-induced experimental acute pancreatitis. *Mol Nutr Food Res*, 2017. 61(4): p. 1600885.
- [126] Zhang Y, Su D, Wang Y, et al. Locally delivered modified citrus pectin - a galectin-3 inhibitor shows expected anti-inflammatory and unexpected regeneration-promoting effects on repair of articular cartilage defect. *Biomaterials*, 2022. 291: p. 121870.
- [127] Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, et al. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol*, 2021. 12: p. 643972.
- [128] Khotimchenko M, Kovalev V, Khotimchenko Y. Equilibrium studies of sorption of lead(II) ions by different pectin compounds. *J Hazard Mater*, 2007. 149(3): p. 693-9.
- [129] Eliaz I, Hotchkiss AT, Fishman ML, et al. The effect of modified citrus pectin on urinary excretion of toxic elements. *Phytother Res*, 2006. 20(10): p. 859-64.
- [130] Eliaz I, Weil E, Wilk B. Integrative medicine and the role of modified citrus pectin/alginate in heavy metal chelation and detoxification--five case reports. *Forsch Komplementmed*, 2007. 14(6): p. 358-64.
- [131] Eliaz I, Weil E, Schwarzbach J, et al. Modified Citrus Pectin / Alginate Dietary Supplement Increased Fecal Excretion of Uranium: A Family. *Altern Ther Health Med*, 2019. 25(4): p. 20-24.
- [132] Zhao ZY, Liang L, Fan X, et al. The role of modified citrus pectin as an effective chelator of lead in children hospitalized with toxic lead levels. *Altern Ther Health Med*, 2008. 14(4): p. 34-8.
- [133] Azemar MR, Hildenbrand B, Haering B, et al. Clinical Benefit in Patients with Advanced Solid Tumors Treated with Modified Citrus Pectin: A Prospective Pilot Study. *Clinical Medicine*

Insights: Oncology, 2007. 1.

- [134] Liu J, Wang T, Huang B, et al. Pectin modified with phenolic acids: Evaluation of their emulsification properties, antioxidation activities, and antibacterial activities. *Int J Biol Macromol*, 2021. 174: p. 485-93.
- [135] Chen Y, Wang Y, Xu L, et al. Ultrasound-assisted modified pectin from unripe fruit pomace of raspberry (*Rubus chingii* Hu): Structural characterization and antioxidant activities. *Lwt - Food Science and Technology*, 2020. 134: p. 110007.
- [136] Huang L, Huang M, Shen M, et al. Sulfated modification enhanced the antioxidant activity of *Mesona chinensis* Benth polysaccharide and its protective effect on cellular oxidative stress. *Int J Biol Macromol*, 2019. 136: p. 1000-06.
- [137] Brouns F, Theuwissen E, Adam A, et al. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *Eur J Clin Nutr*, 2012. 66(5): p. 591-9.
- [138] Marounek M, Volek Z, Synytsya A, et al. Effect of pectin and amidated pectin on cholesterol homeostasis and cecal metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiol Res*, 2007. 56(4): p. 433-42.
- [139] Nishikawa H, Liu L, Nakano F, et al. Modified Citrus Pectin Prevents Blood-Brain Barrier Disruption in Mouse Subarachnoid Hemorrhage by Inhibiting Galectin-3. *Stroke*, 2018. 49(11): p. 2743-51.
- [140] Cui Y, Zhang NN, Wang D, et al. Modified Citrus Pectin Alleviates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation via TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in Microglia. *J Inflamm Res*, 2022. 15: p. 3369-85.
- [141] Michael JW, Schlüter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int*, 2010. 107(9): p. 152-62.
- [142] Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012. 380(9859): p. 2163-96.
- [143] Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, et al. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2008. 59(9): p. 1207-13.
- [144] Ferreira GE, McLachlan AJ, Lin CC, et al. Efficacy and safety of antidepressants for the treatment of back pain and osteoarthritis: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 2021. 372: p. m4825.
- [145] Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *Jama*, 2021. 325(6): p. 568-78.
- [146] Cho Y, Jeong S, Kim H, et al. Disease-modifying therapeutic strategies in osteoarthritis: current status and future directions. *Exp Mol Med*, 2021. 53(11): p. 1689-96.
- [147] Wei Y, Luo L, Gui T, et al. Targeting cartilage EGFR pathway for osteoarthritis treatment. *Sci Transl Med*, 2021. 13(576): p. 3946-75.
- [148] Chevalier X, Eymard F. Anti-IL-1 for the treatment of OA: dead or alive? *Nat Rev Rheumatol*, 2019. 15(4): p. 191-92.
- [149] Croft AP, Campos J, Jansen K, et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage

- in arthritis. *Nature*, 2019. 570(7760): p. 246-51.
- [150] Deng Y, Lu J, Li W, et al. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF- κ B regulates osteoarthritic cartilage degradation. *Nat Commun*, 2018. 9(1): p. 4564.
- [151] Kang D, Lee J, Jung J, et al. Selenophosphate synthetase 1 deficiency exacerbates osteoarthritis by dysregulating redox homeostasis. *Nat Commun*, 2022. 13(1): p. 779-93.
- [152] Hou W, Ye C, Chen M, et al. Excavating bioactivities of nanozyme to remodel microenvironment for protecting chondrocytes and delaying osteoarthritis. *Bioact Mater*, 2021. 6(8): p. 2439-51.
- [153] Wang ZW, Chen L, Hao XR, et al. Elevated levels of interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor- α and vascular endothelial growth factor in patients with knee articular cartilage injury. *World J Clin Cases*, 2019. 7(11): p. 1262-69.
- [154] Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018. 44: p. 38-50.
- [155] Reesink HL, Nixon AJ, Su J, et al. Galectins-1 and-3 Increase in Equine Post-traumatic Osteoarthritis. *Front Vet Sci*, 2018. 5: p. 288-99.
- [156] Wang CR, Shiau AL, Chen SY, et al. Intra-articular lentivirus-mediated delivery of galectin-3 shRNA and galectin-1 gene ameliorates collagen-induced arthritis. *Gene Ther*, 2010. 17(10): p. 1225-33.
- [157] Udomsinprasert W, Ungsudechachai T, Wunthong S, et al. Effect of galectin-3 on synovial inflammation in knee osteoarthritis via stimulating phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. *Int Immunopharmacol*, 2023. 122: p. 110673.
- [158] Arad U, Madar-Balakirski N, Angel-Korman A, et al. Galectin-3 is a sensor-regulator of toll-like receptor pathways in synovial fibroblasts. *Cytokine*, 2015. 73(1): p. 30-5.
- [159] Forsman H, Islander U, Andréasson E, et al. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2011. 63(2): p. 445-54.
- [160] 张逸芸, 王自强, 任颖, et al. 改性柑橘果胶对软骨细胞的影响. *中国组织工程研究*, 2021. 25(34): p. 5465-72.
- [161] 栗丹宁. 改性柑橘果胶复合组织工程软骨的3D生物打印构建基础研究. 2024, 北京协和医学院.
- [162] 张逸芸. 改性柑橘果胶对关节软骨损伤修复作用的基础研究. 2022, 北京协和医学院.
- [163] Chou WC, Tsai KL, Hsieh PL, et al. Galectin-3 facilitates inflammation and apoptosis in chondrocytes through upregulation of the TLR-4-mediated oxidative stress pathway in TC28a2 human chondrocyte cells. *Environ Toxicol*, 2022. 37(3): p. 478-88.
- [164] Hu Y, Yéléhé-Okouma M, Ea HK, et al. Galectin-3: A key player in arthritis. *Joint Bone Spine*, 2017. 84(1): p. 15-20.
- [165] Weinmann D, Schlangen K, André S, et al. Galectin-3 Induces a Pro-degradative/inflammatory Gene Signature in Human Chondrocytes, Teaming Up with Galectin-1 in Osteoarthritis Pathogenesis. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 39112.
- [166] Merheb R, Abdel-Massih RM, Karam MC. Immunomodulatory effect of natural and modified Citrus pectin on cytokine levels in the spleen of BALB/c mice. *Int J Biol Macromol*, 2019. 121:

p. 1-5.

- [167] Abu-Elsaad NM, Elkashef WF. Modified citrus pectin stops progression of liver fibrosis by inhibiting galectin-3 and inducing apoptosis of stellate cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016. 94(5): p. 554-62.
- [168] Lu Y, Zhang M, Zhao P, et al. Modified citrus pectin inhibits galectin-3 function to reduce atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Mol Med Rep*, 2017. 16(1): p. 647-53.
- [169] Yu M, Xiao B, Hao X, et al. Pumpkin polysaccharide preparation, simulated gastrointestinal digestion, and in vivo biodistribution. *Int J Biol Macromol*, 2019. 141: p. 1293-303.
- [170] Shao YY, Zhao YN, Sun YF, et al. Investigation of the internalization and transport mechanism of Codonopsis Radix polysaccharide both in mice and Caco-2 cells. *Int J Biol Macromol*, 2022. 215: p. 23-35.
- [171] Dong X, Chen H, Qin J, et al. Thermosensitive porphyrin-incorporated hydrogel with four-arm PEG-PCL copolymer (II): doxorubicin loaded hydrogel as a dual fluorescent drug delivery system for simultaneous imaging tracking in vivo. *Drug Deliv*, 2017. 24(1): p. 641-50.
- [172] Yan H, Yalagala RS, Yan F. Fluorescently labelled glycans and their applications. *Glycoconj J*, 2015. 32(8): p. 559-74.
- [173] Glabe CG, Harty PK, Rosen SD. Preparation and properties of fluorescent polysaccharides. *Anal Biochem*, 1983. 130(2): p. 287-94.
- [174] Gordon GW, Berry G, Liang XH, et al. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J*, 1998. 74(5): p. 2702-13.
- [175] Weeks A, Subbaraman LN, Jones L, et al. The Competing Effects of Hyaluronic and Methacrylic Acid in Model Contact Lenses. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2012. 23(8): p. 1021-38.
- [176] Li F, Wei Y, Zhao J, et al. Transport mechanism and subcellular localization of a polysaccharide from Cucurbita Moschata across Caco-2 cells model. *Int J Biol Macromol*, 2021. 182: p. 1003-14.
- [177] Sun Y, Zhang K, Dong H, et al. Layered mechanical and electrical properties of porcine articular cartilage. *Med Biol Eng Comput*, 2022. 60(10): p. 3019-28.
- [178] Yu-Hao D, Chun C, Xiong F, et al. Study on the pharmacokinetics of mulberry fruit polysaccharides through fluorescence labeling. *Int J Biol Macromol*, 2021. 186: p. 462-71.
- [179] Wang K, Cheng F, Pan X, et al. Investigation of the transport and absorption of Angelica sinensis polysaccharide through gastrointestinal tract both in vitro and in vivo. *Drug Deliv*, 2017. 24(1): p. 1360-71.
- [180] 潘彦斌, 赵勇, 张福义. 红外指纹区特点及解析. *现代仪器*, 2000(1): p. 13.
- [181] Su Y, Li L. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales. *Carbohydr Polym*, 2020. 229: p. 115407.
- [182] Zhang Y, Liu J, Dou P, et al. Oral absorption characteristics and mechanisms of a pectin-type polysaccharide from Smilax china L. across the intestinal epithelium. *Carbohydr Polym*, 2021. 270: p. 118383.
- [183] Kashida H, Asanuma H, Komiyama M. Alternating hetero H aggregation of different dyes by interstrand stacking from two DNA-dye conjugates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. 43(47): p.

6522-5.

- [184] Akhter KF, Mumin MA, Lui EMK, et al. Fabrication of fluorescent labeled ginseng polysaccharide nanoparticles for bioimaging and their immunomodulatory activity on macrophage cell lines. *Int J Biol Macromol*, 2018. 109: p. 254-62.
- [185] Singer BD, Mock JR, D'Alessio FR, et al. Flow-cytometric method for simultaneous analysis of mouse lung epithelial, endothelial, and hematopoietic lineage cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016. 310(9): p. 796-801.
- [186] Wanner N, Barnhart J, Apostolakis N, et al. Using the Autofluorescence Finder on the Sony ID7000(TM) Spectral Cell Analyzer to Identify and Unmix Multiple Highly Autofluorescent Murine Lung Populations. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022. 10: p. 827987.
- [187] Zheng Z, Pan X, Xu J, et al. Advances in tracking of polysaccharides in vivo: Labeling strategies, potential factors and applications based on pharmacokinetic characteristics. *Int J Biol Macromol*, 2020. 163: p. 1403-20.
- [188] Borker S, Pokharkar V. Engineering of pectin-capped gold nanoparticles for delivery of doxorubicin to hepatocarcinoma cells: an insight into mechanism of cellular uptake. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018. 46(sup2): p. 826-35.
- [189] Gao X, Zhi Y, Sun L, et al. The inhibitory effects of a rhamnogalacturonan I (RG-I) domain from ginseng pectin on galectin-3 and its structure-activity relationship. *J Biol Chem*, 2013. 288(47): p. 33953-65.
- [190] Gunning AP, Bongaerts RJ, Morris VJ. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *Faseb j*, 2009. 23(2): p. 415-24.
- [191] Jia J, Claude-Taupin A, Gu Y, et al. Galectin-3 Coordinates a Cellular System for Lysosomal Repair and Removal. *Dev Cell*, 2020. 52(1): p. 69-87.e8.
- [192] Chen X, Yu C, Liu X, et al. Intracellular galectin-3 is a lipopolysaccharide sensor that promotes glycolysis through mTORC1 activation. *Nat Commun*, 2022. 13(1): p. 7578.
- [193] Kuwahara M, Akasaki Y, Kurakazu I, et al. C10orf10/DEPP activates mitochondrial autophagy and maintains chondrocyte viability in the pathogenesis of osteoarthritis. *Faseb j*, 2022. 36(2): p. e22145.
- [194] Boudierlique T, Vuppalapati KK, Newton PT, et al. Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2016. 75(3): p. 627-31.
- [195] Yang F, Huang R, Ma H, et al. miRNA-411 Regulates Chondrocyte Autophagy in Osteoarthritis by Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 α). *Med Sci Monit*, 2020. 26: p. e921155.
- [196] Tan JX, Finkel T. Lysosomes in senescence and aging. *EMBO Rep*, 2023. 24(11): p. e57265.
- [197] Lim CY, Zoncu R. The lysosome as a command-and-control center for cellular metabolism. *J Cell Biol*, 2016. 214(6): p. 653-64.
- [198] Kao WC, Chen JC, Liu PC, et al. The Role of Autophagy in Osteoarthritic Cartilage. *Biomolecules*, 2022. 12(10): p1357-75.
- [199] Kurakazu I, Akasaki Y, Tsushima H, et al. TGF β 1 signaling protects chondrocytes against oxidative stress via FOXO1-autophagy axis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021. 29(11): p. 1600-13.

- [200] Wang C, Shen J, Ying J, et al. FoxO1 is a crucial mediator of TGF- β /TAK1 signaling and protects against osteoarthritis by maintaining articular cartilage homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. 117(48): p. 30488-97.
- [201] Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 2011. 13(9): p. 1016-23.
- [202] Jia J, Bissa B, Brecht L, et al. AMPK, a Regulator of Metabolism and Autophagy, Is Activated by Lysosomal Damage via a Novel Galectin-Directed Ubiquitin Signal Transduction System. *Mol Cell*, 2020. 77(5): p. 951-69.
- [203] Kahn BB, Alquier T, Carling D, et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 2005. 1(1): p. 15-25.
- [204] Blagih J, Krawczyk CM, Jones RG. LKB1 and AMPK: central regulators of lymphocyte metabolism and function. *Immunol Rev*, 2012. 249(1): p. 59-71.
- [205] Malladi P, Xu Y, Chiou M, et al. Hypoxia inducible factor-1 α deficiency affects chondrogenesis of adipose-derived adult stromal cells. *Tissue Eng*, 2007. 13(6): p. 1159-71.
- [206] Qin N, Wei L, Li W, et al. Local intra-articular injection of resveratrol delays cartilage degeneration in C57BL/6 mice by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *J Pharmacol Sci*, 2017. 134(3): p. 166-74.
- [207] McKnight NC, Zhong Y, Wold MS, et al. Beclin 1 is required for neuron viability and regulates endosome pathways via the UVRAG-VPS34 complex. *PLoS Genet*, 2014. 10(10): p. e1004626.
- [208] Ruck A, Attonito J, Garces KT, et al. The Atg6/Vps30/Beclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*, 2011. 7(4): p. 386-400.
- [209] Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM. Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells Tissues Organs*, 2009. 189(1-4): p. 88-92.
- [210] Itakura E, Kishi C, Inoue K, et al. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*, 2008. 19(12): p. 5360-72.
- [211] Li X, He L, Che KH, et al. Imperfect interface of Beclin1 coiled-coil domain regulates homodimer and heterodimer formation with Atg14L and UVRAG. *Nat Commun*, 2012. 3: p. 662-73.
- [212] Vuppalapati KK, Boudierlique T, Newton PT, et al. Targeted Deletion of Autophagy Genes Atg5 or Atg7 in the Chondrocytes Promotes Caspase-Dependent Cell Death and Leads to Mild Growth Retardation. *J Bone Miner Res*, 2015. 30(12): p. 2249-61.
- [213] Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*, 2011. 146(5): p. 682-95.
- [214] Ashraf S, Cha BH, Kim JS, et al. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016. 24(2): p. 196-205.
- [215] Cha BH, Lee JS, Kim SW, et al. The modulation of the oxidative stress response in chondrocytes by Wip1 and its effect on senescence and dedifferentiation during in vitro expansion. *Biomaterials*, 2013. 34(9): p. 2380-8.
- [216] Liu B, Wang C, Weng Z, et al. Glycolytic enzyme PKM2 regulates cell senescence but not

- inflammation in the process of osteoarthritis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2023. 55(9): p. 1425-33.
- [217] Jeon H, Im GI. Autophagy in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*, 2017. 58(6): p. 497-08.
- [218] Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, et al. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(9): p. 20560-75.
- [219] Li YS, Zhang FJ, Zeng C, et al. Autophagy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 2016. 83(2): p. 143-8.
- [220] Kong X, Ning C, Liang Z, et al. Koumine inhibits IL-1 β -induced chondrocyte inflammation and ameliorates extracellular matrix degradation in osteoarthritic cartilage through activation of PINK1/Parkin-mediated mitochondrial autophagy. *Biomed Pharmacother*, 2024. 173: p. 116273.
- [221] Huang X, Xi Y, Pan Q, et al. Caffeic acid protects against IL-1 β -induced inflammatory responses and cartilage degradation in articular chondrocytes. *Biomed Pharmacother*, 2018. 107: p. 433-39.
- [222] Gao J, Li Y, Liu Z, et al. Acetaminophen changes the RNA m(6)A levels and m(6)A-related proteins expression in IL-1 β -treated chondrocyte cells. *BMC Mol Cell Biol*, 2022. 23(1): p. 45-63.
- [223] Wang C, Ying J, Niu X, et al. Deletion of Glut1 in early postnatal cartilage reprograms chondrocytes toward enhanced glutamine oxidation. *Bone Res*, 2021. 9(1): p. 38-52.
- [224] Rotter Sopasakis V, Wickelgren R, Sukonina V, et al. Elevated Glucose Levels Preserve Glucose Uptake, Hyaluronan Production, and Low Glutamate Release Following Interleukin-1 β Stimulation of Differentiated Chondrocytes. *Cartilage*, 2019. 10(4): p. 491-03.
- [225] Snelling SJ, Forster A, Mukherjee S, et al. The chondrocyte-intrinsic circadian clock is disrupted in human osteoarthritis. *Chronobiol Int*, 2016. 33(5): p. 574-9.
- [226] Maqbool M, Fekadu G, Jiang X, et al. An up to date on clinical prospects and management of osteoarthritis. *Ann Med Surg (Lond)*, 2021. 72: p. 103077.
- [227] Hou LS, Zhang YW, Li H, et al. The regulatory role and mechanism of autophagy in energy metabolism-related hepatic fibrosis. *Pharmacol Ther*, 2022. 234: p. 108117.
- [228] Yan Y, Chen X, Wang X, et al. The effects and the mechanisms of autophagy on the cancer-associated fibroblasts in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. 38(1): p. 171-83.
- [229] Lu J, Peng Y, Zou J, et al. Hypoxia Inducible Factor-1 α Is a Regulator of Autophagy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cartilage*, 2021. 13(2_suppl): p. 1030s-40s.
- [230] Zeng CY, Wang XF, Hua FZ. HIF-1 α in Osteoarthritis: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *Front Pharmacol*, 2022. 13: p. 927126.
- [231] Amarilio R, Viukov SV, Sharir A, et al. HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development*, 2007. 134(21): p. 3917-28.
- [232] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol*, 2014. 76: p. 39-56.
- [233] Warbrick I, Rabkin SW. Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) as a factor mediating the relationship between obesity and heart failure with preserved ejection fraction. *Obes Rev*, 2019.

- 20(5): p. 701-12.
- [234] Hollander JM, Zeng L. The Emerging Role of Glucose Metabolism in Cartilage Development. *Curr Osteoporos Rep*, 2019. 17(2): p. 59-69.
- [235] Dashty M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clin Biochem*, 2013. 46(15): p. 1339-52.
- [236] Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 2009. 1(6): p. 461-8.
- [237] Wu X, Liyanage C, Plan M, et al. Dysregulated energy metabolism impairs chondrocyte function in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2023. 31(5): p. 613-26.
- [238] 魏洁雅, 张德茂, 谢静, et al. 软骨细胞葡萄糖代谢研究的新进展. *四川大学学报(医学版)*, 2021. 52(06): p. 923-28.
- [239] Mobasheri A, Rayman MP, Gualillo O, et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2017. 13(5): p. 302-11.
- [240] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 2009. 324(5930): p. 1029-33.
- [241] Malla A, Gupta S, Sur R. Glycolytic enzymes in non-glycolytic web: functional analysis of the key players. *Cell Biochem Biophys*, 2024: p. 1-28.
- [242] Mobasheri A. Glucose: an energy currency and structural precursor in articular cartilage and bone with emerging roles as an extracellular signaling molecule and metabolic regulator. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. 3: p. 153-63.
- [243] Zheng L, Zhang Z, Sheng P, et al. The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis. *Ageing Res Rev*, 2021. 66: p. 101249.
- [244] Nishida T, Kubota S, Aoyama E, et al. Impaired glycolytic metabolism causes chondrocyte hypertrophy-like changes via promotion of phospho-Smad1/5/8 translocation into nucleus. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. 21(5): p. 700-9.
- [245] Lane RS, Fu Y, Matsuzaki S, et al. Mitochondrial respiration and redox coupling in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 2015. 17(1): p. 1-14.
- [246] Lv X, Zhao T, Dai Y, et al. New insights into the interplay between autophagy and cartilage degeneration in osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol*, 2022. 10: p. 1089668.
- [247] Zhang XA, Kong H. Mechanism of HIFs in osteoarthritis. *Front Immunol*, 2023. 14: p. 1168799.
- [248] Duval E, Leclercq S, Elissalde JM, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(10): p. 3038-48.
- [249] Schipani E. Hypoxia and HIF-1 alpha in chondrogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2005. 16(4-5): p. 539-46.
- [250] Li SW, Prockop DJ, Helminen H, et al. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no

- endochondral bone. *Genes Dev*, 1995. 9(22): p. 2821-30.
- [251] Kremer JC, Prudner BC, Lange SES, et al. Arginine Deprivation Inhibits the Warburg Effect and Upregulates Glutamine Anaplerosis and Serine Biosynthesis in ASS1-Deficient Cancers. *Cell Rep*, 2017. 18(4): p. 991-1004.
- [252] Qiao S, Zhao R, He S, et al. Quercitrin attenuates the progression of osteoarthritis via inhibiting NF- κ B signaling pathways and enhance glucose transport capacity. *Exp Cell Res*, 2023. 433(2): p. 113854.
- [253] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 2023. 186(2): p. 243-78.
- [254] Toh WS, Brittberg M, Farr J, et al. Cellular senescence in aging and osteoarthritis. *Acta Orthop*, 2016. 87(sup363): p. 6-14.
- [255] Chen Y, Yu Y, Wen Y, et al. A high-resolution route map reveals distinct stages of chondrocyte dedifferentiation for cartilage regeneration. *Bone Res*, 2022. 10(1): p. 38-54.
- [256] Knowlton RG, Katzenstein PL, Moskowitz RW, et al. Genetic linkage of a polymorphism in the type II procollagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia. *N Engl J Med*, 1990. 322(8): p. 526-30.
- [257] Decker RS. Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Semin Cell Dev Biol*, 2017. 62: p. 50-56.
- [258] Haseeb A, Kc R, Angelozzi M, et al. SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. 118(8): p. e2019152118.
- [259] Rim YA, Nam Y, Ju JH. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *Int J Mol Sci*, 2020. 21(7): p. 2358-73.
- [260] Wang C, Sha Y, Wang S, et al. Lysyl oxidase suppresses the inflammatory response in anterior cruciate ligament fibroblasts and promotes tissue regeneration by targeting myotrophin via the nuclear factor-kappa B pathway. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020. 14(8): p. 1063-76.
- [261] Yang X, Jiang Q, Luan T, et al. Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 inhibition mediated oxidative phosphorylation enhancement in cartilage promotes osteoarthritis progression. *BMC Musculoskelet Disord*, 2023. 24(1): p. 597-09.
- [262] Pucino V, Bombardieri M, Pitzalis C, et al. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *Eur J Immunol*, 2017. 47(1): p. 14-21.
- [263] Yang X, Chen W, Zhao X, et al. Pyruvate Kinase M2 Modulates the Glycolysis of Chondrocyte and Extracellular Matrix in Osteoarthritis. *DNA Cell Biol*, 2018. 37(3): p. 271-77.
- [264] Arra M, Swarnkar G, Ke K, et al. LDHA-mediated ROS generation in chondrocytes is a potential therapeutic target for osteoarthritis. *Nat Commun*, 2020. 11(1): p. 3427-43.
- [265] Wu X, Fan X, Crawford R, et al. The Metabolic Landscape in Osteoarthritis. *Aging Dis*, 2022. 13(4): p. 1166-82.
- [266] Li K, Ji X, Seeley R, et al. Impaired glucose metabolism underlies articular cartilage degeneration in osteoarthritis. *Faseb j*, 2022. 36(6): p. e22377.

- [267] Kong P, Chen R, Zou FQ, et al. HIF-1 α repairs degenerative chondrocyte glycolytic metabolism by the transcriptional regulation of Runx2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021. 25(3): p. 1206-14.
- [268] Zhou W, Choi M, Margineantu D, et al. HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *Embo j*, 2012. 31(9): p. 2103-16.
- [269] Lee HJ, Jung YH, Oh JY, et al. BICD1 mediates HIF1 α nuclear translocation in mesenchymal stem cells during hypoxia adaptation. *Cell Death Differ*, 2019. 26(9): p. 1716-34.
- [270] Defenouillère Q, Verraes A, Laussel C, et al. The induction of HAD-like phosphatases by multiple signaling pathways confers resistance to the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose. *Sci Signal*, 2019. 12(597): p. eaaw8000.
- [271] Rufino AT, Rosa SC, Judas F, et al. Expression and function of K(ATP) channels in normal and osteoarthritic human chondrocytes: possible role in glucose sensing. *J Cell Biochem*, 2013. 114(8): p. 1879-89.
- [272] Mobasheri A, Neama G, Bell S, et al. Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9. *Cell Biol Int*, 2002. 26(3): p. 297-300.
- [273] Liu Y, Li YM, Tian RF, et al. The expression and significance of HIF-1 α and GLUT-3 in glioma. *Brain Res*, 2009. 1304: p. 149-54.
- [274] Wang JZ, Zhu W, Han J, et al. The role of the HIF-1 α /ALYREF/PKM2 axis in glycolysis and tumorigenesis of bladder cancer. *Cancer Commun (Lond)*, 2021. 41(7): p. 560-75.
- [275] Luo W, Hu H, Chang R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 2011. 145(5): p. 732-44.
- [276] Michelacci YM, Baccarin RYA, Rodrigues NNP. Chondrocyte Homeostasis and Differentiation: Transcriptional Control and Signaling in Healthy and Osteoarthritic Conditions. *Life (Basel)*, 2023. 13(7): p. 1460.
- [277] Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, et al. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol*, 2000. 35(10): p. 581-8.
- [278] Olansen J, Dyke JP, Aaron RK. Is Osteoarthritis a Vascular Disease? *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2024. 29(3): p. 113-25.
- [279] Findlay DM. Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. 46(12): p. 1763-8.
- [280] Ying J, Wang P, Shi Z, et al. Inflammation-Mediated Aberrant Glucose Metabolism in Subchondral Bone Induces Osteoarthritis. *Stem Cells*, 2023. 41(5): p. 482-92.
- [281] Hu Y, Chen X, Wang S, et al. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Res*, 2021. 9(1): p. 20-33.
- [282] Imhof H, Breitenseher M, Kainberger F, et al. Degenerative joint disease: cartilage or vascular disease? *Skeletal Radiol*, 1997. 26(7): p. 398-403.
- [283] Goswami A. Prolotherapy. *J Pain Palliat Care Pharmacother*, 2012. 26(4): p. 376-8.
- [284] Hauser RA, Lackner JB, Steilen-Matias D, et al. A Systematic Review of Dextrose Prolotherapy for Chronic Musculoskeletal Pain. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 2016. 9: p.

139-59.

- [285] Bae G, Kim S, Lee S, et al. Prolotherapy for the patients with chronic musculoskeletal pain: systematic review and meta-analysis. *Anesth Pain Med (Seoul)*, 2021. 16(1): p. 81-95.
- [286] Falua KJ, Pokharel A, Babaei-Ghazvini A, et al. Valorization of Starch to Biobased Materials: A Review. *Polymers (Basel)*, 2022. 14(11): p.2215.
- [287] Li Q, Niu Y, Xing P, et al. Bioactive polysaccharides from natural resources including Chinese medicinal herbs on tissue repair. *Chin Med*, 2018. 13: p. 7-18.
- [288] Yin M, Zhang Y, Li H. Advances in Research on Immunoregulation of Macrophages by Plant Polysaccharides. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 145-54.
- [289] Li Z, Bratlie KM. The Influence of Polysaccharides-Based Material on Macrophage Phenotypes. *Macromol Biosci*, 2021. 21(8): p. e2100031.
- [290] Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 2015. 519(7541): p. 92-6.
- [291] Brownlee IA, Gill S, Wilcox MD, et al. Starch digestion in the upper gastrointestinal tract of humans. *Starch-starke*, 2018. 70: p. 1700111.
- [292] Chaudhari V, Buttar HS, Bagwe-Parab S, et al. Therapeutic and Industrial Applications of Curdlan With Overview on Its Recent Patents. *Front Nutr*, 2021. 8: p. 646988.
- [293] Bacelar AH, Silva-Correia J, Oliveira JM, et al. Recent progress in gellan gum hydrogels provided by functionalization strategies. *J Mater Chem B*, 2016. 4(37): p. 6164-74.
- [294] Ren Y, Huang T, Zhao X, et al. Double network hydrogel based on curdlan and flaxseed gum with photothermal antibacterial properties for accelerating infectious wound healing. *Int J Biol Macromol*, 2023. 242(Pt 1): p. 124715.
- [295] Yuan M, Fu G, Sun Y, et al. Biosynthesis and applications of curdlan. *Carbohydr Polym*, 2021. 273: p. 118597.
- [296] Cai Z, Zhang H. Recent progress on curdlan provided by functionalization strategies. *Food Hydrocolloids*, 2017. 68: p. 128-35.
- [297] Han J, Cai J, Borjihan W, et al. Preparation of novel curdlan nanoparticles for intracellular siRNA delivery. *Carbohydr Polym*, 2015. 117: p. 324-30.
- [298] Zhang M, Kim JA, Huang AY. Optimizing Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy: β -Glucan-Based Nanoparticles. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 341.
- [299] Muthuramalingam K, Choi SI, Hyun C, et al. β -Glucan-Based Wet Dressing for Cutaneous Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2019. 8(4): p. 125-35.
- [300] Wojcik M, Kazimierzak P, Benko A, et al. Superabsorbent curdlan-based foam dressings with typical hydrocolloids properties for highly exuding wound management. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021. 124: p. 112068.
- [301] Wojcik M, Kazimierzak P, Vivcharenko V, et al. Effect of Vitamin C/Hydrocortisone Immobilization within Curdlan-Based Wound Dressings on In Vitro Cellular Response in Context of the Management of Chronic and Burn Wounds. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(21): p. 11474.
- [302] Wang K, Du L, Zhang C, et al. Preparation of chitosan/curdlan/carboxymethyl cellulose blended

- film and its characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 2019. 56: p. 5396 - 404.
- [303] Zhang H, Nishinari K, Williams MA, et al. A molecular description of the gelation mechanism of curdlan. *Int J Biol Macromol*, 2002. 30(1): p. 7-16.
- [304] Nishinari K, Zhang HJ. Recent advances in the understanding of heat set gelling polysaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, 2004. 15: p. 305-12.
- [305] Klimek K, Benko A, Vandrovcova M, et al. Biomimetic biphasic curdlan-based scaffold for osteochondral tissue engineering applications - Characterization and preliminary evaluation of mesenchymal stem cell response in vitro. *Biomater Adv*, 2022. 135: p. 212724.
- [306] Zhang R, Edgar KJ. Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan. *Biomacromolecules*, 2014. 15(4): p. 1079-96.
- [307] Przekora A, Penolazzi L, Kalisz G, et al. Osteoclast-mediated acidic hydrolysis of thermally gelled curdlan component of the bone scaffolds: Is it possible? *Carbohydr Polym*, 2022. 295: p. 119914.
- [308] Konttinen YT, Mandelin J, Li TF, et al. Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(4): p. 953-60.
- [309] Lombardi AF, Ma Y, Jang H, et al. AcidoCEST-UTE MRI Reveals an Acidic Microenvironment in Knee Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*, 2022. 23(8): p. 4466.
- [310] Ahmadian Z, Correia A, Hasany M, et al. A Hydrogen-Bonded Extracellular Matrix-Mimicking Bactericidal Hydrogel with Radical Scavenging and Hemostatic Function for pH-Responsive Wound Healing Acceleration. *Adv Healthc Mater*, 2021. 10(3): p. e2001122.
- [311] Zhou Z, Xiao J, Guan S, et al. A hydrogen-bonded antibacterial curdlan-tannic acid hydrogel with an antioxidant and hemostatic function for wound healing. *Carbohydr Polym*, 2022. 285: p. 119235.
- [312] Li Q, Wang P, Miao S, et al. Curdlan enhances the structure of myosin gel model. *Food Sci Nutr*, 2019. 7(6): p. 2123-30.
- [313] Wang K, Du L, Zhang C, et al. Preparation of chitosan/curdlan/carboxymethyl cellulose blended film and its characterization. *J Food Sci Technol*, 2019. 56(12): p. 5396-404.
- [314] Klara J, Marczak A, Łatkiewicz A, et al. Lysine-functionalized chondroitin sulfate improves the biological properties of collagen/chitosan-based injectable hydrogels. *Int J Biol Macromol*, 2022. 202: p. 318-31.
- [315] Dangi N, Yadav BS. Characterization of partial acid hydrolysates of citrus pectin for their pasting, rheological and thermal properties. *J Food Sci Technol*, 2020. 57(7): p. 2681-92.
- [316] Fan Z, Cheng P, Prakash S, et al. Rheological investigation of a versatile salectan/curdlan gel matrix. *Int J Biol Macromol*, 2021. 193(Pt B): p. 2202-09.
- [317] Tang R, Hao J, Zong R, et al. Oxidation pattern of curdlan with TEMPO-mediated system. *Carbohydr Polym*, 2018. 186: p. 9-16.
- [318] Kasai RD, Radhika D, Archana S, et al. A review on hydrogels classification and recent developments in biomedical applications. *International Journal of Polymeric Materials and*

Polymeric Biomaterials, 2022. 72: p. 1059-69.

- [319] Krill M, Early N, Everhart JS, et al. Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Knee Cartilage Defects: A Review of Indications, Technique, and Outcomes. *JBJS Rev*, 2018. 6(2): p. e5.
- [320] Hua Y, Xia H, Jia L, et al. Ultrafast, tough, and adhesive hydrogel based on hybrid photocrosslinking for articular cartilage repair in water-filled arthroscopy. *Sci Adv*, 2021. 7(35).
- [321] Rofeal M, Abdelmalek F, Pietrasik J, et al. Sustainable curdlan biosynthesis by *Rahnella variigena* ICRI91 via alkaline hydrolysis of *Musa sapientum* peels and its edible, active and modified hydrogel for Quercetin controlled release. *Int J Biol Macromol*, 2023. 225: p. 416-29.
- [322] Waluyo Y, Artika SR, Insani Nanda W, et al. Efficacy of Prolotherapy for Osteoarthritis: A Systematic Review. *J Rehabil Med*, 2023. 55: p. 00372.
- [323] Imani F, Patel VB. Therapeutic Challenges for Knee Osteoarthritis. *Anesth Pain Med*, 2019. 9(3): p. e95377.
- [324] Chang SF, Huang KC, Cheng CC, et al. Glucose adsorption to chitosan membranes increases proliferation of human chondrocyte via mammalian target of rapamycin complex 1 and sterol regulatory element-binding protein-1 signaling. *J Cell Physiol*, 2017. 232(10): p. 2741-49.