

# 原位递送槲皮素的PECT温敏水凝胶 对大鼠脊髓损伤的修复作用

孙明明<sup>1,2,3,4</sup>, 张双悦<sup>1,2,3,4</sup>, 王秋颖<sup>1,2,3,4</sup>, 荆瀛黎<sup>1,2,3,4</sup>, 白帆<sup>1,2,3,4</sup>, 于艳<sup>1,2,3,4</sup>

**摘要** 目的:探讨负载槲皮素(quercetin, QR)的含环醚侧基聚己内酯-聚乙二醇三嵌段共聚物(PECT)温敏水凝胶对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的修复作用。方法:制备负载QR且37 °C条件下自动成胶的温敏水凝胶(QR-polycaprolactone-polyglycol triblock, QR-PECT);表征水凝胶的温敏及流变特性;通过CCK-8实验评价水凝胶的细胞相容性;通过1,1-二苯基-2-吡啶并肼基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)自由基清除实验来评估水凝胶清除自由基的能力;通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒评价水凝胶清除细胞内ROS的能力;制备大鼠SCI全切模型,分为Sham组、SCI组、QR治疗组及QR-PECT水凝胶治疗组,应用BBB评分评估大鼠运动功能的恢复,应用尼氏染色观察神经元迁移浸润情况,通过HE染色评价水凝胶生物相容性。结果:制备的QR-PECT聚合物在37 °C条件下形成水凝胶,并持续释放QR;CCK-8实验定量结果显示QR-PECT水凝胶治疗组与SCI组的细胞活力相当;DPPH清除实验显示,QR-PECT水凝胶治疗组的DPPH清除率达到60%,与QR治疗组相当;通过测量HT22细胞内的ROS荧光值,发现QR-PECT水凝胶治疗组的HT22细胞内荧光强度显著降低;SCI后8周,QR-PECT水凝胶治疗组大鼠运动功能明显恢复,尼氏染色显示QR-PECT水凝胶治疗组存在大量神经元浸润,HE染色结果显示QR-PECT水凝胶治疗组心、肝、脾、肺、肾与正常大鼠没有明显的差异。结论:QR-PECT水凝胶具有良好的生物相容性和抗氧化性,并能够促进大鼠SCI后神经元的再生和运动功能恢复。

**关键词** 脊髓损伤;槲皮素;QR-PECT水凝胶;氧化性

中图分类号 R741;R741.02;R744 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20240003

本文引用格式:孙明明,张双悦,王秋颖,荆瀛黎,白帆,于艳.原位递送槲皮素的PECT温敏水凝胶对大鼠脊髓损伤的修复作用[J].神经损伤与功能重建,2024,19(7):373-378.

## Repair Efficacy of PECT Thermosensitive Hydrogel for *in Situ* Delivery of Quercetin on Spinal

**Cord Injury in Rats** SUN Mingming<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Shuangyue<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Qiuying<sup>1,2,3,4</sup>, JING Yingli<sup>1,2,3,4</sup>, BAI Fan<sup>1,2,3,4</sup>, YU Yan<sup>1,2,3,4</sup>. 1. China Rehabilitation Science Institute, Beijing 100068, China; 2. School of Rehabilitation Medicine, Capital Medical University, Beijing 100068, China; 3. Institute of Neurological Injury and Repair, Beijing Institute of Brain Disorders, Beijing 100068, China; 4. Beijing Key Laboratory of Neurological Injury and Rehabilitation, Beijing 100068, China

**Abstract Objective:** To investigate the therapeutic effects of quercetin (QR)-loaded polycaprolactone-polyglycol triblock (PECT) thermosensitive hydrogel in a rat model of spinal cord injury (SCI). **Methods:** The thermosensitive hydrogel with QR-PECT was prepared to release quercetin at 37 °C. The thermosensitive and rheological properties of the hydrogel were characterized. Cell compatibility of the hydrogel was assessed using the CCK-8 assay. The free radical scavenging ability of the hydrogel was evaluated using the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging assay. The ability of the hydrogel to scavenge intracellular reactive oxygen species (ROS) was evaluated using a ROS detection kit. A rat model of SCI was established and divided into four groups: sham, SCI, QR, and QR-PECT hydrogel. The BBB score was used to evaluate the recovery of motor function in the rats. Neuronal migration and infiltration were examined using Nissl staining, and biocompatibility of the hydrogel was assessed by H&E staining. **Results:** The prepared QR-PECT polymer formed a hydrogel at 37 °C and continuously released QR. CCK-8 assay results showed that the cell viability in the QR-PECT hydrogel group was comparable to that of the SCI group. DPPH clearance assays revealed a 60% scavenging rate in the QR-PECT hydrogel group, which was comparable to that of the QR group. ROS fluorescence intensity in HT22 cells indicated a significant reduction after treatment with the QR-PECT hydrogel. Eight weeks after SCI, significant motor function recovery was observed in the QR-PECT hydrogel group, with substantial neuronal infiltration confirmed by Nissl staining. H&E staining revealed no significant differences among heart, liver, spleen, lung, and kidney samples from the normal and QR-PECT hydrogel groups. **Conclusion:** The QR-PECT hydrogel demonstrated superior biocompatibility and antioxidant characteristics, promoting neuronal regeneration and enhancing motor function recovery in SCI rats.

**Keywords** spinal cord injury; quercetin; QR-PECT hydrogel; oxidative properties

## 作者单位

1. 中国康复科学所  
北京 100068

2. 首都医科大学康  
复医学院

北京 100068

3. 北京脑重大疾病  
研究院神经损伤与  
修复研究所

北京 100068

4. 神经损伤与康  
复北京市重点实验  
室

北京 100068

## 基金项目

中央级公益性科研  
院所基本科研业务  
费专项资金项目  
(2021CZ-9)

## 收稿日期

2024-01-03

## 通讯作者

于艳

yanyu\_crrc@163.  
com

创伤性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)不可避免引发急性炎症,随后发生多种病理事件,如广泛的细胞死亡、轴突脱髓鞘和胶质纤维化的发展,封闭充满液体的囊腔,这使SCI治疗极其困难<sup>[1-3]</sup>。因此损伤后微环境的调节对SCI修复具有重要意义。槲皮素(quercetin, QR)是一类黄酮类化合物,以其抗氧化和抗炎药理活性而闻名<sup>[4]</sup>。据报道,QR能够促进SCI后运动和电生理功能的恢复,减少空洞形成,此外还能增加脑源性神经营养因子,减轻组织损伤并促进轴突再生<sup>[5,6]</sup>。利用生物材料为内源性细胞和再生轴突提供基质支持,是一种很有前途的策略<sup>[7]</sup>。鉴于脊髓是一种高度水化的软材料,具有力学性质类似于天然细胞外基质的水凝胶,比刚性支架显示出显著的优势<sup>[1,8,9]</sup>,例如,可以很好地避免机械错配导致组织损伤的风险<sup>[10,11]</sup>。

因此本研究构建了一种以温敏性水凝胶含环醚侧基聚己内酯-聚乙二醇三嵌段共聚物(polycaprolactone-polyglycol triblock, PECT)为载体,负载QR的缓释水凝胶支架(QR-PECT),植入大鼠SCI模型损伤区以桥接组织,持续释放QR,清除创伤部位ROS,调控SCI区免疫微环境,从而促进SCI区组织修复及运动功能恢复。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 8周雌性SD大鼠20只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006],饲养于中国康复科学所SPF级动物饲养屏障内[SYXK(京)2021-0021]。饲养环境温度为20℃~26℃,相对湿度为40%~70%,环境噪声≤60 dB(A);动物自由饮食饮水,昼夜12 h更替。所有动物实验操作均经首都医科大学动物实验及实验动物福利委员会审核批准(AEEI-2021-185)。实验动物随机分为假手术(Sham)组、SCI组、QR治疗组及QR-PECT水凝胶治疗组,每组大鼠5只。

1.1.2 主要试剂与设备 聚乙二醇、己内酯、辛酸亚锡,购于美国Thermo Fisher Scientific公司;二氯甲烷、乙醚、异氟烷、多聚甲醛,购于深圳市瑞沃德生命科技有限公司;注射用青霉素,购于华北制药有限责任公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl DPPH)、CCK-8试剂盒、活性氧检测试剂盒、尼氏染色、H&E染色试剂盒,购于碧云天生物技术有限公司;QR,购于美国Sigma公司;DMEM培养基、0.25%胰酶、胎牛血清,购于美国Gibco公司。

### 1.2 方法

1.2.1 QR-PECT水凝胶的制备 ①PECT的合成<sup>[12]</sup>:将聚乙二醇加入到250 mL三口瓶中,将己内酯与TOSUO完全除水,之后加入辛酸亚锡,在130℃下反应12 h。加入二氯甲烷溶解粗产物,最后将其缓慢滴加到冷乙醚中,沉淀,过滤,干燥,得到最终产物PECT。②QR-PECT水凝胶的制备:采用共组装的方法制备QR-PECT纳米粒子。将3.5 mg槲皮素和500 mg PECT聚合物溶解在10 mL四氢呋喃中,然后将其缓慢滴加到200 mL蒸馏水中。使四氢呋喃缓慢挥发,最终得到QR-PECT纳米溶液。并且测定载药量和包封率,通过动态光散射(DLS)测定纳米粒子的尺寸,通过TEM观察纳米粒的形貌。

1.2.2 QR-PECT水凝胶的温敏及流变学研究 ①QR-PECT水凝胶的温敏性研究:首先在室温下将QR-PECT冻干粉溶解到水中,将QR-PECT水溶液置于水浴锅中,设定温度为37℃,当温度达到37℃时,将小瓶拿出,翻转,观察溶液的流动性。②QR-PECT水凝胶的流变学研究:通过AR 2000ex流变仪对水凝胶的流变性能进行表征。温度扫描是测试温度从20℃~50℃,记录储能模量和损耗模量的变化。应变扫描是从0.1%~100%,固定扫描频率为6.28 rad/s,记录储能模量和损耗模量的变化。

1.2.3 药物释放 将QR-PECT置于小瓶中,在37℃下维持12 h。随后加入5 mL PBS(pH=7.4),并以100 rpm震荡小瓶。在预设时间点,取出适量的上清液,并加入等体积的PBS。采用紫外-可见分光光度计测定374 nm处的吸光度,根据吸光度值计算QR累积释放量。

1.2.4 细胞培养 将HT22/SH-SY5Y细胞株培养于含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM完全培养基中,当培养瓶中细胞密度达到70%~80%则可进行传代。

1.2.5 细胞活力测定 将HT22/SH-SY5Y细胞(每孔 $1 \times 10^4$ )接种在96孔板上,将完全培养基与QR-PECT水凝胶以9:1的比例配置成混悬液,每孔100 μL加入到96孔板中,培养1、2和3 d后,采用CCK-8试剂盒检测细胞活力。

1.2.6 1,1-二苯基-2-吡啶并肼基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)自由基清除 将20 μL的QR-PECT水凝胶加入2 mL的DPPH溶液中,充分混匀,在黑暗处孵育30 min。随后,使用紫外-可见分光光度计测试混合物在520 nm处的吸光度,计算自由基的清除率。

1.2.7 细胞内ROS水平的表征 HT22细胞以每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞的密度接种到96孔板中。每组分别用

200 μmol/L 的过氧化氢、QR 和 QR-PECT 处理后,加入 DCFH-DA,在 37 °C 培养箱中孵育 30 min。在 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长条件下使用荧光分光光度计测量荧光值。

**1.2.8 SCI 大鼠模型制备** 用异氟烷与 30% 氧气和 70% 氮气的气体混合物麻醉大鼠:4% 异氟烷诱导麻醉,2% ~ 3% 异氟烷维持麻醉。以 T<sub>9</sub> ~ T<sub>10</sub> 棘突为中心在背部切口,逐层剥离,暴露 T<sub>9</sub> ~ T<sub>10</sub> 棘突和椎板,咬除棘突和椎板,显露 T<sub>9</sub> ~ T<sub>10</sub> 节段待损伤脊髓。用锋利的无菌刀片横断脊髓并切除 1.5 mm。Sham 组仅行椎板切除术。QR 治疗组造模后即刻将 20 μL QR 溶液注射至损伤部位,QR-PECT 水凝胶治疗组造模后即刻将 20 μL 水凝胶支架植入脊髓横断处。SCI 组造模成功后不做处理。各组术后皮下注射青霉素 2 × 10<sup>4</sup> U,连续 7 d。每天给予下腹部按摩,挤压膀胱 2 ~ 4 次以帮助排尿,直至反射性排尿建立。

**1.2.9 尼氏染色** 术后 8 周时麻醉实验大鼠,用 4% 多聚甲醛灌注,按照原切口暴露损伤段脊髓,取出损伤脊髓节段上、下各 1 cm 的脊髓组织,置于 4% 多聚甲醛 48 h,依次经脱水、浸蜡、石蜡包埋后,10 μm 切片,甲苯胺蓝染色,光镜下拍照观察。

**1.2.10 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分** 术后 8 周,每周采用 BBB 评分表评估各组大鼠行为学变化。

**1.2.11 HE 染色** 术后 8 周时麻醉实验大鼠,用 4% 多聚甲醛灌注,依次取出大鼠心、肝、脾、肺、肾置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h,依次经脱水、浸蜡、石蜡包埋后,10 μm 切片,HE 染色,光镜下拍照观察。

**1.3 统计学处理**

使用 GraphPad Prism 9 软件进行数据分析和做图。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,2 组间的比较采用 t 检验,3 组间的比较采用 two-way ANOVA, P < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

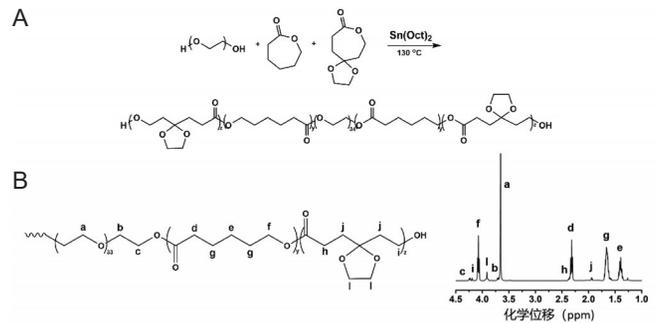
**2.1 PECT 的合成**

以 PEG 为引发剂,PCL 和 TOSUO 为原料,辛酸亚锡为催化剂,130 °C 反应 10 h,制备 PECT 聚合物。通过 Bruker Avance III 400 M Hz 仪器得到聚合物的核磁氢谱,见图 1。

**2.2 QR-PECT 纳米粒子的制备**

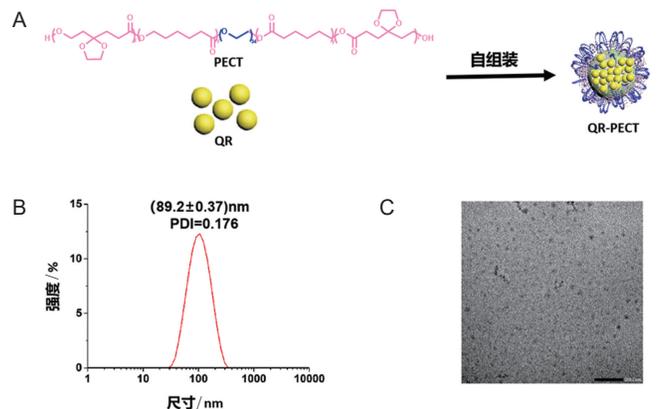
通过自组装的方法制备了 QR-PECT 纳米粒子,并通过动态光散射仪测试了纳米粒子尺寸 [(89.2 ± 0.37) nm, PDI=0.178],尺寸分布范围较窄。通过透射

电子显微镜 (TEM) 观察纳米粒子的形态,粒子大小分布均匀,见图 2,说明该方法制备了合适的 QR-PECT 纳米粒子。



注:A:嵌段共聚物 PECT 的合成过程;B:PECT 共聚物的核磁共振氢谱图。

图1 PECT 合成过程及其核磁共振氢谱图



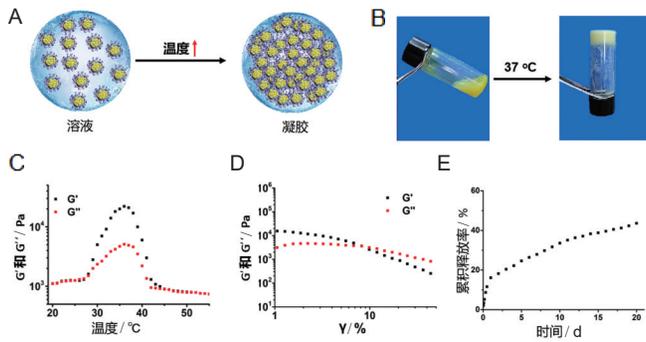
注:A:QR-PECT 的制备示意图;B:QR-PECT 纳米粒子的粒径尺寸;C:QR-PECT 纳米粒子的 TEM 图,标尺为 200 nm。

图2 QR-PECT 的合成路线及表征结果

**2.3 温敏及流变**

之前的研究已经证明,随着温度的升高,水溶液中的 PECT 胶束可以组装成水凝胶。水凝胶形成的潜在机制为疏水作用诱导的胶束聚集。这种热敏性质为水凝胶的形成提供突出优势,包括以下几点:①水凝胶的可注射性,PECT 胶束溶液可通过注射器进行注射;②形状适应力,在体内注射时,溶液将覆盖注射位置周围的组织并迅速变成不流动的水凝胶。因此,水凝胶将覆盖注射部位的创伤组织;③负载在水凝胶中的药物可以缓慢释放。此外,PECT 水凝胶还具有良好的生物相容性。由于 QR-PECT 纳米粒子的聚集,QR-PECT 随着温度的升高形成水凝胶,见图 3A。纳米溶液在 25 °C 时呈现流动溶液状态,当温度升高到 37 °C 时,变成半固态凝胶状态,见图 3B。流变学性能表明,当温度升高到 30 °C 时,G' 急剧增加,并且大于 G'',表明此温度是溶液-凝胶的转变点,见图 3C。在 36 °C 时,G' 值最大,如果温度进一步升高,达到 40 °C 以上时,凝胶

变成沉淀。应变扫描表明,当应变增加到3%时, $G'$ 急剧下降,表现出剪切变稀特性,当达到7%时, $G'$ 值低于 $G''$ 值,表明水凝胶网络崩塌,见图3D。药物释放研究表明,QR逐渐释放,20 d时,药物累积释放量约为45%,见图3E。这些数据表明,水溶液中的纳米药物可在高温触发下自组装形成水凝胶,从而可以作为纳米药物持续递送支架。



注:A:QR-PECT水凝胶的温敏性研究示意图;B:37 °C条件下溶胶-凝胶转变的小瓶翻转照片;(C~D)储能模量( $G'$ )与损耗模量( $G''$ )随着温度和剪切应变的变化曲线;E:QR-PECT纳米粒子从水凝胶中累积释放量。

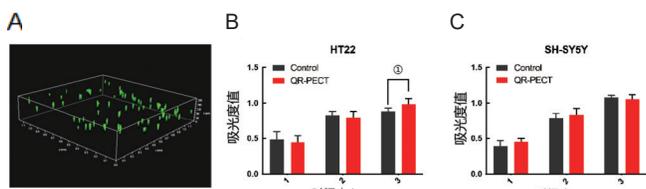
图3 QR-PECT水凝胶的自组装和表征

### 2.4 QR-PECT水凝胶的细胞相容性

选择HT22细胞作为模型细胞系。将细胞培养在水凝胶中,通过激光扫描共聚焦显微镜对染色的活细胞(绿色)进行3D重建。活细胞的3D重建结果显示,大量的活细胞均匀分布在QR-PECT水凝胶体系中。同时通过CCK8定量检测细胞的增殖速率。结果显示,水凝胶中的HT22细胞在培养的3 d内,其OD值不断增加,分别约为0.44、0.79和0.98。并且在培养的第3天,水凝胶中HT22细胞数量要明显高于对照组( $P < 0.05$ )。此外,SH-SY5Y细胞表现出与HT22细胞相似的增长趋势,两种细胞均保持了良好的增殖活性,见图4,以上结果表明,构建的QR-PECT水凝胶表现出良好的细胞相容性。

### 2.5 QR-PECT水凝胶的抗氧化性

水凝胶清除自由基的活性通过DPPH来检测,

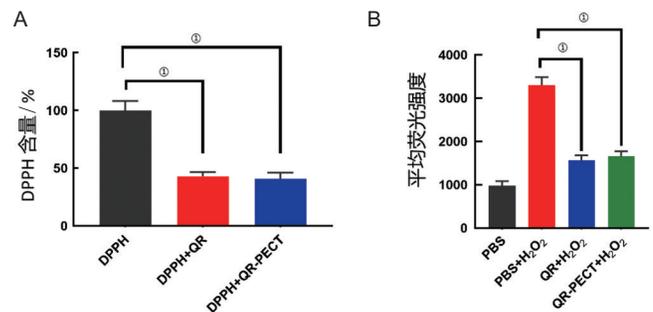


注:水凝胶中HT22细胞的CLSM三维图像(A)。通过CCK-8评估HT22细胞(B)、SH-SY5Y细胞(C)在QR-PECT水凝胶中培养1、2、3 d的的细胞增殖情况。 $^{\textcircled{1}}P < 0.05$ 。

图4 QR-PECT水凝胶的细胞相容性

QR治疗组和QR-PECT水凝胶治疗组DPPH清除率均达到60%,2组差异无统计学意义,见图5。证明QR-PECT水凝胶可有效清除DPPH自由基。

水凝胶对于细胞内ROS的清除能力通过ROS检测试剂盒来验证。结果显示,HT22细胞经 $H_2O_2$ 处理后,平均荧光强度明显增加,这表明 $H_2O_2$ 引起了HT22细胞内的氧化应激,产生了大量的ROS。而损伤细胞经QR和QR-PECT水凝胶处理后,其细胞的平均荧光强度显著降低( $P < 0.0001$ ),见图5。证明HT22细胞内的ROS可被QR-PECT水凝胶有效清除。

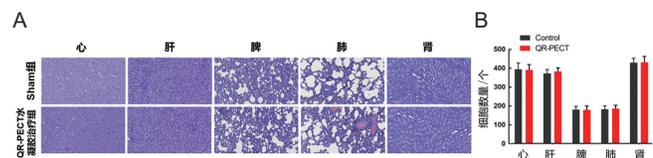


注:A:DPPH自由基含量, $^{\textcircled{1}}P < 0.0001$ ;B:HT22细胞内ROS的平均荧光强度, $^{\textcircled{1}}P < 0.0001$ 。

图5 QR-PECT水凝胶的抗氧化能力

### 2.6 体内生物相容性评价

在体内治疗研究之前,首先对QR-PECT水凝胶在体内的生物相容性进行评估。取经QR-PECT水凝胶治疗8周的SCI大鼠心、肝、脾、肺和肾脏进行HE染色。染色结果显示QR-PECT水凝胶治疗组大鼠脏器并没有显示出明显的细胞炎症和水肿,同时定量分析心、肝、脾、肺和肾脏的细胞数量结果显示,QR-PECT水凝胶治疗组各脏器细胞数量与Sham组相比差异无统计学意义,见图6。这说明QR-PECT水凝胶在大鼠中没有引起显著的局部或全身毒性。



注:A:QR-PECT水凝胶移植8周后主要器官的组织切片(HE染色, $\times 400$ );B:心、肝、脾、肺和肾脏的细胞数量定量结果。

图6 QR-PECT的体内生物相容性

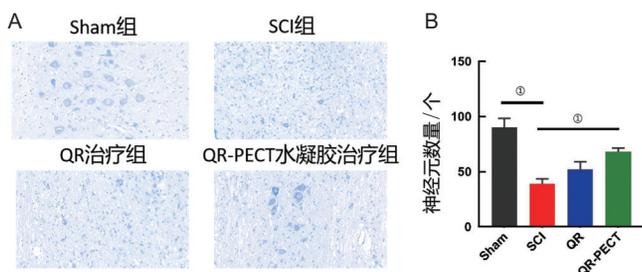
### 2.7 尼氏染色

采用尼氏染色法观察神经元的损伤情况。染色结果显示损伤后8周,SCI组尼氏小体数量明显变少,而QR-PECT水凝胶治疗组和QR治疗组尼氏小体数量要明显多于SCI组( $P < 0.001$ ),其中QR-PECT水凝胶治疗组的尼氏小体数量最多,见图7。这表明QR-PECT

水凝胶明显促进了SCI区神经元的再生,并且对神经的保护作用优于单纯的QR治疗组。

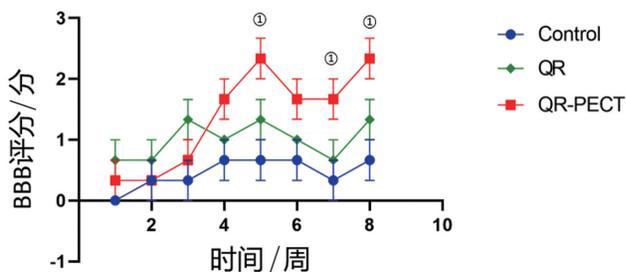
## 2.8 BBB评分

在术后3周,QR治疗组和QR-PECT水凝胶治疗组均显示出运动功能恢复的趋势,但与SCI组相比并没有显著差异。但术后5、7、8周,QR-PECT水凝胶治疗组BBB评分结果显著高于SCI组和QR治疗组( $P<0.05$ ),见图8。以上结果表明与单纯接受QR治疗相比,QR-PECT水凝胶治疗更有利于大鼠的运动功能恢复。



注:A:大鼠SCI后8周,材料植入区脊髓前角组织切片(尼氏染色, $\times 400$ )。B:各组神经元尼氏染色阳性细胞数,<sup>①</sup> $P<0.001$

图7 SCI区尼氏染色结果



注:<sup>①</sup> $P<0.01$

图8 3组大鼠各时间点BBB评分变化趋势

## 3 讨论

SCI是指各种原因导致的椎管内神经结构及其功能的损害,出现损伤平面或以下的脊髓功能紊乱<sup>[3]</sup>。SCI的病因分为创伤性和非创伤性两种,其中创伤性SCI所占比例高达90%,以青壮年居多,不仅会给患者本人带来身体和心理的严重伤害,还会对整个社会造成巨大的经济负担<sup>[13]</sup>。

过去几十年里,人们致力于开发有效的神经修复手段,其中基于细胞的再生医学是一种合理且有前途的治疗SCI的方法,通过补充新的神经细胞促进神经修复<sup>[14]</sup>。但移植细胞在恶劣环境中存活率较低,使其难以发挥作用<sup>[15]</sup>。目前已采用局部给予抗炎药物和神经保护因子的方法来改善损伤区域的恶劣环境。然而,由于脑脊液快速消除和生物活性受损,这些方法的疗效仍然有限<sup>[16,17]</sup>。因此,构建具有理想功能的生物

相容性支架来局部持续给药,是一个非常值得关注的领域。

QR是一类黄酮类化合物,广泛存在于多种中草药中,具有抗炎、抗氧化、抗癌、神经保护、免疫保护、抗病毒和抗菌等广泛的药理学作用<sup>[4,18-20]</sup>。但是直接用药作用时间较短,需要持续给药;因此,本研究采用温敏性水凝胶PECT包裹QR,形成QR-PECT复合水凝胶,以实现QR的局部持续给药。

良好的生物相容性是组织工程中水凝胶支架的基本要求<sup>[21,22]</sup>,因此本研究首先对QR-PECT水凝胶体内外生物相容性进行评价。体外研究结果显示,QR-PECT水凝胶与HT22细胞共培养3 d后,QR-PECT水凝胶治疗组吸光度要明显高于对照组,这表明QR-PECT水凝胶促进了HT22细胞的增殖。此外QR-PECT水凝胶与SH-SY5Y共培养后吸光度差异无统计学意义。HE染色结果显示,QR-PECT水凝胶植入大鼠脊髓8周后,主要脏器心、肝、脾、肺、肾没有明显的病理变化,说明QR-PECT水凝胶具有良好的生物相容性。

SCI后导致微环境产生一系列的生理病理变化,损害再生过程<sup>[23]</sup>。氧化应激是细胞中活性氧或活性氮积累的结果,是SCI后局部微环境恶劣的主要因素之一<sup>[24]</sup>。自由基的过量产生可导致大分子,如DNA、蛋白质和脂质的改变,导致严重的细胞损伤甚至死亡<sup>[25,26]</sup>。因此,氧化应激的增加和炎症反应的加重是SCI后神经修复困难的主要因素<sup>[27]</sup>。这些因素会导致轴突变性和脱髓鞘,同时诱导神经细胞的坏死和凋亡,如神经元和少突胶质细胞<sup>[28]</sup>。这些生理病理改变也有利于损伤部位瘢痕的形成,严重阻碍轴突生长和组织再生<sup>[29-31]</sup>。因此,清除自由基,减少氧化应激的发生,重建一个有利的微环境至关重要。本研究结果显示,QR-PECT水凝胶对于DPPH自由基和细胞内ROS都具有良好的清除效果,与QR治疗组并无显著差别。这表明QR经PECT包裹后,并没有影响到QR本身的抗氧化作用。另外通过尼氏染色和BBB评分观察到,QR-PECT水凝胶治疗SCI大鼠后,其神经元再生数量和运动功能恢复情况都要优于QR治疗组。这可能是由于QR-PECT水凝胶实现了QR的局部持续给药,降低了炎症反应与氧化应激,改善了损伤区恶劣的环境,长时程的治疗使SCI大鼠实现了更好的神经恢复,更好地发挥了QR的神经保护作用。

综上所述,本研究构建了原位递送QR的PECT温敏水凝胶,证实了其优异的生物相容性、抗氧化性,同

时将QR-PECT水凝胶应用到SCI大鼠后,发现水凝胶促进了损伤区神经元的再生和大鼠运动功能的恢复。缓释QR的PECT温敏水凝胶能有效修复大鼠SCI,并具有良好的临床转化前景。

### 参考文献

- [1] Luo J, Shi X, Li L, et al. An injectable and self-healing hydrogel with controlled release of curcumin to repair spinal cord injury[J]. *Bioactive Materials*, 2021, 6: 4816-4829.
- [2] Ackery A, Tator C, Krassioukov A. A global perspective on spinal cord injury epidemiology[J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21: 1355-1370.
- [3] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration[J]. *Neurosurgery*, 2017, 80: S9-s22.
- [4] Alizadeh SR, Ebrahimzadeh MA. Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review[J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 229: 1140-1168.
- [5] Fideles SOM, Decassia OA, Buchaim DV, et al. Influence of the Neuroprotective Properties of Quercetin on Regeneration and Functional Recovery of the Nervous System[J]. *Antioxidants*, 2023, 12: 149.
- [6] Andres S, Pevny S, Ziegenha R, et al. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement[J]. *Mole Nutri Food Res*, 2018, 62: 1700447.
- [7] Liu H, Xu X, Tu Y, et al. Engineering Microenvironment for Endogenous Neural Regeneration after Spinal Cord Injury by Reassembling Extracellular Matrix[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 17207-17219.
- [8] Assuncao RC, Gomesed ED, Sousa N, et al. Hydrogels and Cell Based Therapies in Spinal Cord Injury Regeneration[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 948040.
- [9] Tu Y, Chen N, Li C, et al. Advances in injectable self-healing biomedical hydrogels[J]. *Acta Biomater*, 2019, 90: 1-20.
- [10] Qiao Z, Lv X, He S, et al. A mussel-inspired supramolecular hydrogel with robust tissue anchor for rapid hemostasis of arterial and visceral bleedings[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6: 2829-2840.
- [11] Sousaj JPM, Stratakis E, Mano J, et al. Anisotropic 3D scaffolds for spinal cord guided repair: Current concepts[J]. *Biomater Adv*, 2023, 148: 2133-2153.
- [12] Lin Z, Xu S, Gao W, et al. A comparative investigation between paclitaxel nanoparticle- and nanocrystal-loaded thermosensitive PECT hydrogels for peri-tumoural administration[J]. *Nanoscale*, 2016, 8: 18782-18791.
- [13] Eli I, Lerner DP, Ghogawala Z. Acute Traumatic Spinal Cord Injury[J]. *Neurol Clin*, 2021, 39: 471-488.
- [14] Lu P, Wang Y, Grahml L, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury[J]. *Cell*, 2012, 150: 1264-1273.
- [15] Assinck P, Duncan GJ, Hilton BJ, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 637-647.
- [16] Thompson CD, Zurko JC, Hanna BF, et al. The therapeutic role of interleukin-10 after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2013, 30: 1311-1324.
- [17] Duncan GJ, Manesh SB, Hilton BJ, et al. The fate and function of oligodendrocyte progenitor cells after traumatic spinal cord injury[J]. *Glia*, 2020, 68: 227-245.
- [18] Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents[J]. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69: 273-278.
- [19] Crasci L, Basille L, Panico A, et al. Correlating In Vitro Target-Oriented Screening and Docking: Inhibition of Matrix Metalloproteinases Activities by Flavonoids [J]. *Planta Med*, 2017, 83: 901-911.
- [20] Shen P, Lin W, Deng X, et al. Potential Implications of Quercetin in Autoimmune Diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 689-744.
- [21] Walish CM, Wychowanlic JK, Costello L, et al. An *In Vitro* and *Ex Vivo* Analysis of the Potential of GelMA Hydrogels as a Therapeutic Platform for Preclinical Spinal Cord Injury[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12: 230-251.
- [22] Wu W, Jia S, Xu H, et al. Supramolecular Hydrogel Microspheres of Platelet-Derived Growth Factor Mimetic Peptide Promote Recovery from Spinal Cord Injury[J]. *ACS Nano*, 2023, 17: 3818-3837.
- [23] Grewal AK, Singh TG, Sharma D, et al. Mechanistic insights and perspectives involved in neuroprotective action of quercetin[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 1117-1129.
- [24] Khan H, Ullah H, Aschner M, et al. Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer's Disease[J]. *Biomolecules*, 2019, 10: 59.
- [25] Perfeito R, Cunha OT, Rego AC. Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62: 186-201.
- [26] Rangel LE, Clin AL, Pazloyola AL, et al. Cannabinoid receptor agonists reduce the short-term mitochondrial dysfunction and oxidative stress linked to excitotoxicity in the rat brain[J]. *Neuroscience*, 2015, 285: 97-106.
- [27] Fan B, Wei Z, Yao X, et al. Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27: 853-866.
- [28] Deepika, Maurya PK. Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases[J]. *Molecules*, 2022, 27: 2498.
- [29] Zhang Y, Yang S, Liu C, et al. Deciphering glial scar after spinal cord injury[J]. *Burns Trauma*, 2021, 9: tkab035.
- [30] Bellver-landete V, Bretheau F, Mailhot B, et al. Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury[J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 518.
- [31] Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, et al. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury[J]. *Nat Med*, 2017, 23: 818-828.

(本文编辑:王晶)