

安徽医科大学学报
Acta Universitatis Medicinalis Anhui
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目： 负载表没食子儿茶素没食子酸酯的水凝胶支架用于牙周炎治疗的实验研究
作者： 刘龙阁，毛静，郑慧敏，李为
收稿日期： 2025-12-25
网络首发日期： 2026-05-20
引用格式： 刘龙阁，毛静，郑慧敏，李为. 负载表没食子儿茶素没食子酸酯的水凝胶支架用于牙周炎治疗的实验研究[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20260519.1526.004>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

负载表没食子儿茶素没食子酸酯的水凝胶支架用于牙周炎治疗的实验研究

刘龙阁, 毛 静, 郑慧敏, 李 为

(安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032)

摘要 **目的** 探讨负载表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 的透明质酸 (HA) /丝素蛋白 (SF) 复合水凝胶支架的结构特性、生物相容性及抗炎抗氧化性能, 为牙周炎的治疗提供新的材料基础。**方法** 通过交联 HA 与 SF 构建复合水凝胶支架, 并负载 EGCG。检测材料吸水率、降解性及采用扫描电镜表征材料特性, 通过体外实验评估其细胞相容性及抗炎抗氧化性能。**结果** 负载 EGCG 的支架呈现多孔网状结构, 具备良好溶胀性能; 体外实验显示该支架具有良好的生物相容性, 同时抑制炎症因子表达并清除活性氧。**结论** 基于 HA/SF-EGCG 的复合支架兼具优良生物相容性和抗炎抗氧化双重功能活性, 为提升牙周炎临床治疗效果提供新策略。

关键词 透明质酸; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 水凝胶支架; 牙周炎; 抗炎; 抗氧化

中图分类号 R 781.4+2

文献标志码 A

Experimental study of EGCG-loaded hydrogel scaffold for the treatment of periodontitis

Liu Longge, Mao Jing, Zheng Huimin, Li Wei

(College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Disease Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To explore the structural characteristics, biocompatibility, anti-inflammatory and antioxidant properties of hyaluronic acid (HA)/silk fibroin (SF) composite hydrogel scaffolds loaded with epigallocatechin gallate (EGCG), and to provide a new material basis for the treatment of periodontitis. **Methods** The composite hydrogel scaffolds were constructed by cross-linking HA and SF and loaded with EGCG. The water absorption rate, degradation property and material characteristics were detected by scanning electron microscopy.

2025-12-25 接收

基金项目: 安徽省卫生健康科研项目 (编号: AHWJ2023A20332)

作者简介: 刘龙阁, 男, 硕士研究生

李 为, 男, 副教授, 硕士生导师, 通讯作者, E-mail: kqyy2004001@fy.ahmu.edu.cn

The cytocompatibility and anti-inflammatory and antioxidant properties were evaluated by in vitro experiments. **Results** The EGCG-loaded scaffolds exhibited a porous network structure and desirable swelling properties. In vitro experiments demonstrated that the scaffolds possessed good biocompatibility, along with the ability to inhibit the expression of inflammatory factors and scavenge reactive oxygen species. **Conclusion** The HA/SF-EGCG composite scaffolds have excellent biocompatibility and dual functional activities of anti-inflammatory and antioxidant, providing a new strategy for improving the clinical treatment effect of periodontitis.

Key words hyaluronic acid; epigallocatechin gallate; hydrogel scaffold; periodontitis; anti-inflammatory; antioxidant

Fund programs Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2023A20332)

Corresponding author Li Wei, E-mail: kqyy2004001@fy.ahmu.edu.cn

牙周翻瓣术是重度牙周炎常用的治疗手段，虽能在可视条件下彻底清除根面病灶，但术后创面局部高浓度活性氧、促炎因子会持续破坏牙周膜干细胞（periodontal ligament stem cells, PDLCs）的增殖分化，造成组织修复效率降低^[1]。因此，需要研发出兼具抗炎与抗氧化作用的生物材料，来打破“炎症-氧化应激”的恶性循环，提高翻瓣术的疗效。透明质酸（hyaluronic Acid, HA）生物相容性好、非免疫原性强，被广泛应用于组织损伤修复领域，但其存在体内降解速度过快及细胞黏附支持不足的缺点^[2]，且虽能抑制巨噬细胞的活化而减少局部炎症^[3]，但其对氧化应激损伤的对抗能力较弱。丝素蛋白（silk fibroin, SF）体内降解代谢缓慢，同时具有良好的生物相容性、机械性能等，在生物医学和组织工程领域拥有巨大的应用潜力^[4]。表没食子儿茶素没食子酸酯（epigallocatechin gallate, EGCG）是一种具有抗炎、抗氧化作用的天然产物，将 EGCG 整合到水凝胶中，可增强水凝胶的抗氧化和抗炎性能，同时可促进细胞的增殖和分化^[5]。本研究旨在将 HA 与 SF 交联合成 HA/SF 水凝胶支架，负载 EGCG 构成复合涂层结构。系统评估该支架的细胞相容性及其对“炎症-氧化应激”的双重效果，为牙周炎治疗提供更好的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验所用材料包括透明质酸、表没食子儿茶素没食子酸酯（美国 Sigma-Aldrich 公司，货号：53747-1G、E4268-100MG）；CCK-8 试剂盒、LPS 脂多糖（北京索莱宝科技有限公

司, 货号: CA1210-100T、L8880); α -基础必需培养基 (α -minimum essential medium, α -MEM)、杜尔贝科改良伊格尔培养基 (dulbecco modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 货号: 12561-049、11965-118、10099-141C); 胰酶消化液 (苏州新赛美科技有限公司, 货号: C100C1); 青-链霉素溶液、钙黄绿素乙酰氧基甲酯 / 碘化丙啶 (Calcein-AM/PI) 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒、一氧化氮检测试剂盒 (Griess 法)、ABTS 抗氧化试剂盒、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: C0222、C2015S、S0021S、S0121、C02212A); 小鼠成纤维细胞 (L929 细胞)、小鼠单核巨噬细胞白细胞 (RAW264.7 细胞) (美国 ATCC, 货号: CCL-1、TIB-71)。实验设备包括场发射扫描电子显微镜 (日本日立公司, 型号: HitachiS-4800)、冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司, 型号: Free Zone 2.5 Plus)、酶标仪 (Bio-tek 公司, 型号: MQX200)、精密电子天平 (德国 Sartorius 公司, 型号: BT25S) 荧光显微镜 (日本尼康公司, 型号: NIKON ECLIPSE C1)。

1.2 制备复合水凝胶支架

1.2.1 制备 HA/SF 水凝胶支架

计算浓度为 3% (W/V) 的 HA 溶液所需去离子水与 HA 的量, 先在去离子水中均匀溶解 HA, 然后使用磁力搅拌使之完全混合。用同样方法制备 3% SF 溶液。将透明质酸与丝素蛋白溶液按照体积比为 8:2、6:4、5:5、4:6、2:8 的方式混合^[6], 然后依次添加 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC] 偶联剂和 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) 活化剂, 充分搅拌制备成共混溶液。去除气泡, -20 °C 中冷冻保存 12 h 后, 通过 -70 °C 冻干机进行冷冻干燥 3 天, 冻干结束后放置于干燥箱中储存备用。

1.2.2 制备 EGCG 涂层的 HA/SF 支架

将 EGCG 溶解于 Tris-HCl 溶液中配制成 6.35 mmol/L 溶液, 将上述制备的水凝胶支架浸泡于溶液中避光摇晃 24 h 后用纯水清洗, 在 -80 °C 条件下冷冻 12 h 后转移至冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h, 得到 HA/SF/EGCG 水凝胶支架, 存放于干燥箱中。

1.2.3 样品表征

为分析凝胶支架的微观构造差异, 通过对制备的 HA/SF 水凝胶支架和 HA/SF/EGCG 复合水凝胶支架进行速冻干燥和喷金处理, 使用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察不同样品的表面形貌, 并采集对应的结构图像用于后续分析。

1.3 水凝胶支架理化性能检测

1.3.1 吸水性

采用将支架浸泡在磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffered saline, PBS）中比较前后质量变化的方法检测支架的吸水性能。浸泡前用电子秤称取各组水凝胶支架的干重记录为 W_1 ，然后在 37 °C 条件下 PBS 中浸泡 24 h，取出目标支架，吸去其表面附着的多余水分，对吸水后的支架进行质量检测，最终将检测得到的数值记录为 W_2 。每组检测 3 个样本，测量后取其平均值。吸水率= W_2/W_1 。

1.3.2 可降解性

使用电子秤测量每组凝胶支架在干燥状态下的重量，并将该初始重量记录为 W_1 ，随后，将支架分别浸泡在 PBS 和 0.05% 胰酶溶液中，期间 2 种溶液定时更换，以确保环境稳定，后续分别在第 1、7、14 天三个预设时间点采集对应样品，每个样品经纯水洗涤 3 次后，再次进行冷冻干燥处理。干燥完成后样品称重并记录数据为 W_2 。每组测量 3 个样本，测量后取其平均值。降解剩余率= $W_2/W_1 \times 100\%$ 。

1.3.3 抗氧化性能检测

将材料浸泡于 PBS 溶液中 24 h，取浸提液于离心管中备用。实验方法：于 5 mL 离心管中加入 1 mL 样品溶液和 1 mL 浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液，充分混合后，把离心管置于 37 °C 避光环境中静置反应 30 min；反应结束后，测定混合液在 517 nm 波长下的吸光度（absorbance, A ），测定结果记为 $A_{\text{样品}}$ 。相同反应条件下，用 1 mL 样品溶液和 1 mL 上述 DPPH 溶液混合测得吸光度值为 $A_{\text{空白}}$ ，将 1 mL 纯水和 1 mL 上述 DPPH 溶液混合测得吸光度值为 $A_{\text{对照}}$ 。每个样品做 3 组重复。自由基清除率 R_{DPPH} 的计算如下： $R_{\text{DPPH}}=1-(A_{\text{样品}}-A_{\text{空白}})/A_{\text{对照}} \times 100\%$ ^[7]。

2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]试剂盒可用于检测阳离子自由基清除率。第一步为 ABTS 母液制备，取试剂盒中的 ABTS 试剂，与等体积过硫酸钾溶液充分混匀，随后置于无光照条件下反应 12~16 h，反应结束后留存待用。下一步对 ABTS 母液进行稀释操作，通过添加去离子水调整其浓度，参照 734 nm 波长下吸光度值需满足 0.7 ± 0.02 的要求，配制得到 ABTS 工作液。之后开展吸光度检测，取 3 mL ABTS 工作液，加入 1 mL 样品溶液，充分混合后置于避光环境反应 6 min，最后用酶标仪检测混合溶液在 734 nm 波长处吸光度，结果记录为 $A_{\text{样品}}$ 。同时设置空白对照组，以 1 mL 等体积蒸馏水替换样品溶液，与 3 mL ABTS 工作液混合，在相同反应

条件下测定吸光度并记为 $A_{\text{空白}}$ 。最后依据公式 $(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$ ，计算得出阳离子自由基清除率^[8]。

1.4 水凝胶支架的体外生物学检测

1.4.1 细胞存活率和增殖

小鼠成纤维细胞 (L929 细胞) 被广泛应用于细胞毒性检测, 本研究采用两种方法评估材料对 L929 细胞的存活率和增殖的影响。将各组水凝胶支架在无菌条件下与细胞共同培养 1、3、5 天 3 个时间点, 按照设计在对应时间更换含有 10% CCK-8 染色工作液的培养基, 培养箱内继续培养 3 h。之后取各组培养基转移至 96 孔板, 每孔 100 μL , 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 A 值。以单纯的完全培养基设置为对照组。依据公式“细胞存活率 = $(A_{\text{试验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ ”来计算细胞存活率。

取对数生长期的 L929 细胞, 将其密度调整至 2×10^4 个/mL 后接种于 24 孔培养板, 与材料共同培养, 培养时间分别为 1、3、5 天。培养至预定时间后, 按试剂盒说明书配制 Calcein-AM 和 PI 工作液。去除 24 孔板内的旧培养基, 用 PBS 洗涤孔板 2 次后, 随后在避光条件下每孔加入 250 μL Calcein-AM 工作液, 室温避光孵育 15 min。孵育完成后弃去染液并用 PBS 洗涤 2 次, 每孔再加入 250 μL 的 PI 工作液, 在室温避光条件下孵育 2 min 后吸除孔板内染液再用 PBS 洗涤 2 次, 最终采用荧光显微镜对各组细胞的染色结果进行显微观察与效果评估, 并采集图像, 以此来评估细胞存活能力。

1.4.2 体外抗炎实验

经 LPS 诱导小鼠巨噬细胞分化形成的 M1 亚型具有促炎作用。于 6 孔板中接种 1×10^5 个/mL 的 RAW264.7 细胞。培养 12 h, 细胞贴壁后将培养基换为含有 0.2% FBS 的 DMEM 培养基饥饿处理 24 h, 完全培养基调整 LPS 浓度为 6.67×10^{-6} mmol/L 构建炎症模型。将 HA/SF 组、HA/SF/EGCG 组水凝胶支架在无菌条件下加入孔板中, 共同培养诱导 RAW264.7 细胞 24 h, 对照组不加材料。24 h 后取 50 μL 细胞培养液于 96 孔板中, 加入 50 μL NO 检测试剂盒中的 Griess 试剂 A (磺胺溶液) 混合, 室温下反应 5 min, 再加入 50 μL Griess 试剂 B (N-1-萘基乙二胺溶液), 避光反应 10 min。最后使用酶标仪测 540 nm 波长处的 A 值, 同时以 NaNO_2 绘制标准曲线, 计算上清液中 NO 的浓度。

1.4.3 qRT-PCR 检测炎症相关基因的表达

收集炎症模型组与对照组细胞, 采用实时荧光定量 PCR 方法, 通过计算 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值, 检测与炎症相关的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶

(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 基因的表达量, 为确保数据准确性, 目标基因的表达水平以管家基因 GAPDH 进行标准化校正, 具体引物序列参考下表。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG R: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT
<i>TNF-α</i>	F: CCCTCACACTCACAAACCACC R: CTTTGAGATCCATGCCGTTG
<i>iNOS</i>	F: CAACAGGAACCTACCAGCTCACT R: AGCCTGAAGTCATGTTTGCCG
<i>IL-6</i>	F: CCCCAATTTCCAATGCTCTCC R: CGCACTAGGTTTGCCGAGTA

1.5 统计学处理

所有实验均进行至少 3 次实验, 所得数据采用 SPSS 27.0 统计软件分析实验数据。组间两两比较采用 *t* 检验, 多组数据间比较采用单因素或双因素方差分析, 采用 Dunnett's *t* 多重比较检验分别与其余各组进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2.结果

2.1 水凝胶支架的制备

本研究通过 EDC/NHS 催化交联法成功制备 HA/SF 水凝胶支架, 图 1 展示了不同比例组 HA/SF 支架的大致外观。各组支架虽然比例不同, 但是外观上很相似。

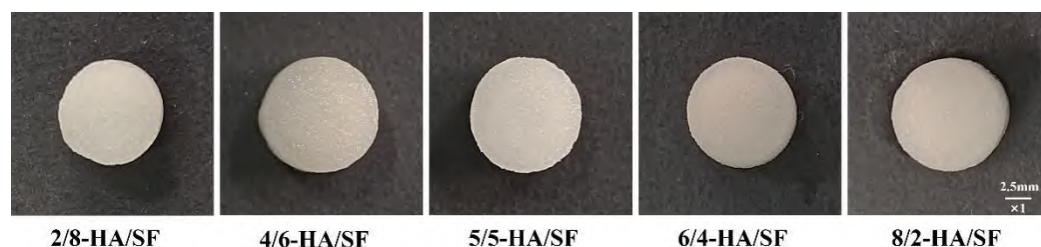


图 1 水凝胶支架的外观

Fig.1 Macroscopic appearance of hydrogel scaffolds in each group

2.2 生物相容性检测结果

通过 CCK-8 试剂盒检测 L929 细胞在各组水凝胶支架浸提液中的存活率（图 2A）和增殖情况（图 2B），结果显示，培养第 5 天时细胞存活率范围为 $83.44\% \pm 3.58\%$ 至 $105.8\% \pm 7.97\%$ ，所有组别细胞存活率均 $>80\%$ ，提示无明显细胞毒性；不同组间细胞存活率整体差异具有统计学意义（ $F=14.40, P<0.01$ ）。第 5 天细胞存活率 Dunnett's t 事后检验显示，与 6/4-HA/SF 组相比，2/8-HA/SF、4/6-HA/SF、5/5-HA/SF 及 8/2-HA/SF 组细胞存活率均显著降低（ $q=14.84、11.70、4.31、13.28, P<0.05$ ）。细胞增殖情况，随着培养时间延长，各组细胞的 A 值（反映细胞数量）均呈持续上升趋势，说明细胞可正常增殖生长，整体差异具有统计学意义（ $F=53.51, P<0.05$ ）。第 5 天细胞增殖情况 Dunnett 事后检验显示，与 6/4-HA/SF 组比较，2/8-HA/SF、4/6-HA/SF、5/5-HA/SF 及 8/2-HA/SF 组的细胞增殖情况均显著降低（ $q=18.33、14.32、2.69、23.17, P<0.05$ ）。上述结果表明，各组水凝胶支架均具有良好的生物相容性，其中 6/4-HA/SF 组水凝胶支架的细胞存活率与增殖活性显著优于其他组。

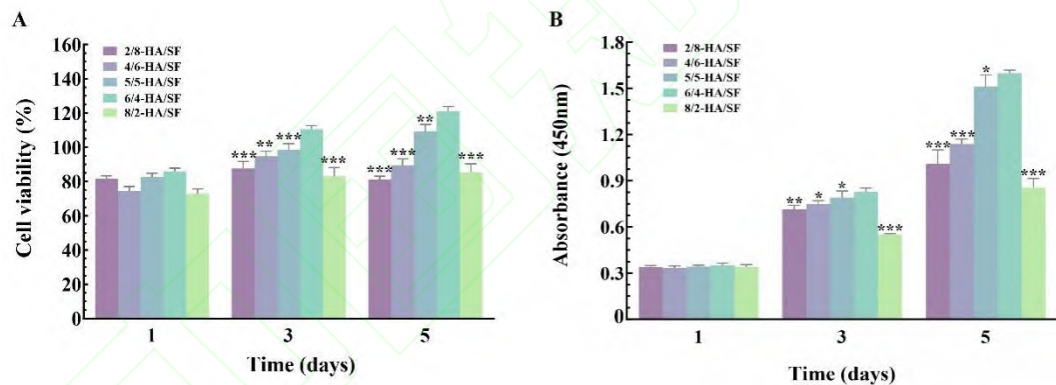


图 2 L929 细胞在不同比例 HA/SF 水凝胶支架中的存活率 (A) 和增殖情况 (B)

Fig. 2 Survival rate (A) and proliferation status (B) of L929 cells in hydrogel scaffolds with different HA/SF proportion

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs 6/4-HA/SF group.

2.3 吸水性检测结果

图 3 显示各组水凝胶支架均具有较好的吸水性，变化范围为 6.5 ± 0.30 至 18.37 ± 0.38 倍，各组间吸水性存在显著统计学差异（ $F=171.0, P<0.05$ ）。Dunnett's t 事后多重比较检验显示，与 6/4-HA/SF 组相比，2/8-HA/SF、4/6-HA/SF、5/5-HA/SF 及 8/2-HA/SF 组的吸水性显著降

低 ($q=27.63$ 、 11.64 、 3.57 、 6.75 , $P<0.05$)。综合考虑水凝胶支架的吸水性与生物相容性, 本研究选择 6/4-HA/SF 组作为最优载体用于后续 EGCG 的负载及性能评价。

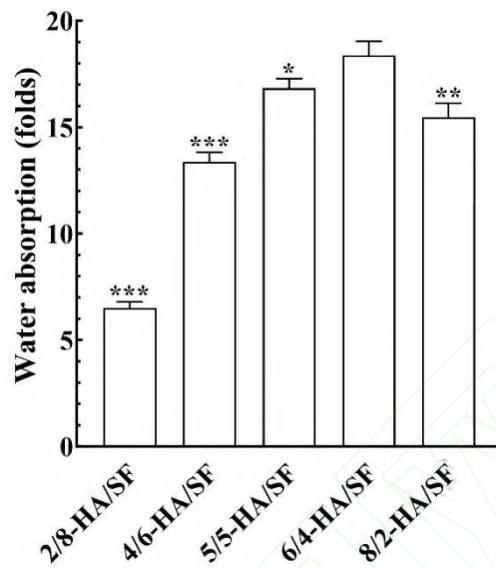


图 3 水凝胶支架的吸水性

Fig. 3 Water absorption of hydrogel scaffolds

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs 6/4-HA/SF group.

2.4 形貌结构

扫描电镜 (图 4) 显示, 各组的凝胶支架均构建出相互连接的网状多孔结构。这种结构具备两个关键特征: 一是支架表面粗糙; 二是孔径大小合适。这两个特征为细胞物质交换, 以及细胞黏附增殖提供了有利的环境。

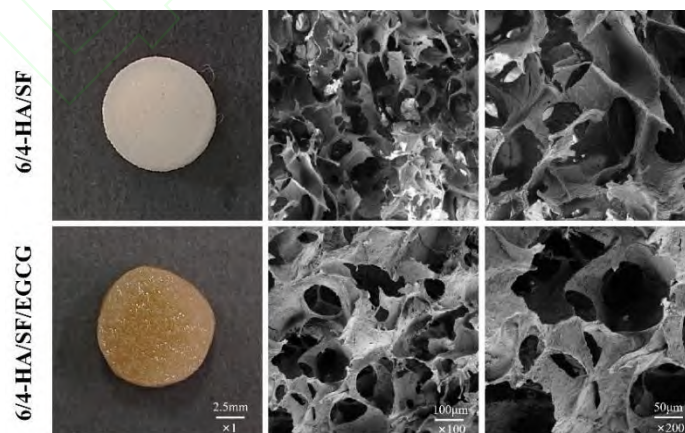


图 4 6/4 组及负载 EGCG 组的水凝胶支架外观和扫描电镜结构

Fig.4 Macroscopic appearance and morphology under scanning electron microscope of the hydrogel scaffolds in the 6/4 group and the EGCG-loaded group

2.5 水凝胶支架的降解性能

结果显示水凝胶支架在 PBS (图 5A) 溶液中保持较高的结构稳定性, 在第 14 天各组水凝胶支架降解剩余率在 $92.47\% \pm 0.39\%$ 至 $94.65\% \pm 0.63\%$ 之间, 降解率均小于 10%; 其中, 第 7 天和第 14 天时, 6/4-HA/SF/EGCG 组的降解剩余率显著高于 6/4-HA/SF 组 ($q=6.25$ 、 6.23 , $P<0.01$)。在 0.05% 胰蛋白酶 (图 5B) 溶液中表现出较好的生物降解性, 在第 14 天两组水凝胶支架降解剩余率在 $62.78\% \pm 2.27\%$ 至 $64.97\% \pm 1.69\%$ 之间, 两组差异不明显, 表明 EGCG 的存在不显著影响降解动力学; 而在无酶的 PBS 环境中, EGCG 可一定程度上延缓支架的降解过程。

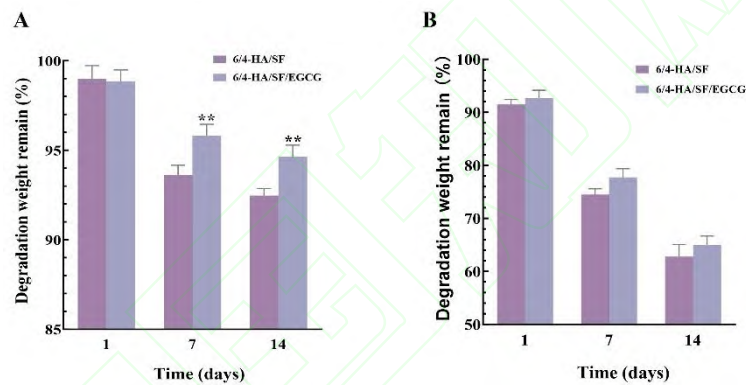


图 5 水凝胶支架在 PBS 中 (A) 和在 0.05% 胰蛋白酶溶液中 (B) 不同时间点的降解质量残留率

Fig. 5 Mass remaining ratio of hydrogel scaffolds after degradation at different time points in PBS (A) and 0.05% trypsin solution (B)

** $P<0.01$ vs 6/4-HA/SF group.

2.6 抗氧化性能检测结果

通过 ABTS (图 6A) 和 DPPH (图 6B) 方法检测材料抗氧化能力, 结果显示材料具有较好的抗氧化性。ABTS 检测 6/4 组阳离子自由基清除率为 $51.77\% \pm 2.45\%$, 加入 EGCG 后清除率提升至 $72.33\% \pm 1.80\%$, 差异有统计学意义 ($t=11.71$, $P<0.001$); DPPH 自由基清除率 6/4 组为 $62.01\% \pm 1.90\%$, 负载 EGCG 后清除率为 $76.43\% \pm 2.86\%$, 差异有统计学意义 ($t=7.27$, $P<0.01$)。因此与 6/4 组相比, 负载 EGCG 后可提高材料的抗氧化性能。

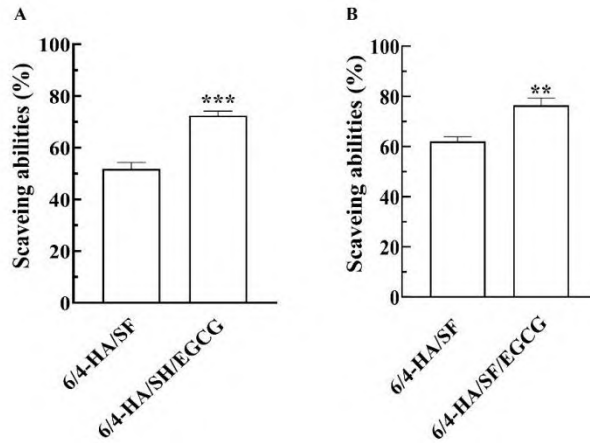


图 6 ABTS 法 (A) 和 DPPH 法 (B) 检测材料的抗氧化性

Fig.6 Antioxidant properties of the materials detected by ABTS method (A) and DPPH method (B)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 6/4-HA/SF group.

2.7 负载 EGCG 对材料生物相容性的影响

通过 CCK-8 检测 L929 细胞在 6/4-HA/SF 和 6/4-HA/SF-EGCG 水凝胶支架浸提液中的存活率 (图 7A) 和增殖情况 (图 7B), 结果显示在两组水凝胶支架中细胞均具有较好的存活和增殖, 表明 EGCG 的存在不影响水凝胶支架的生物相容性 (第 5 天各组水凝胶支架中细胞存活率为 $91.00\% \pm 2.79\%$ 至 $93.03\% \pm 2.95\%$)。通过 Calcein-AM/PI 染色 (图 8) 观察各组别水凝胶支架中 L929 细胞在第 1、3 和 5 天的分布及存活情况, 结果显示各组中均有 L929 细胞定植, 说明负载 EGCG 水凝胶支架具有良好的生物相容性。

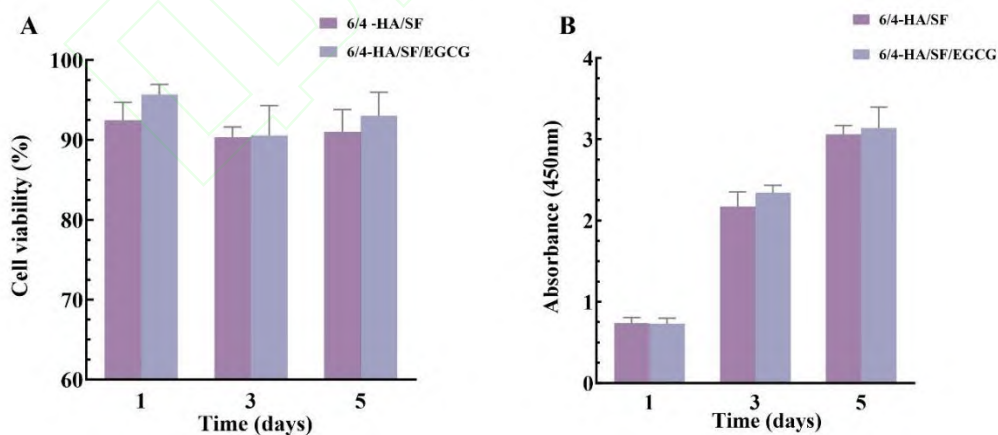


图 7 L929 细胞在各组水凝胶支架中的存活率 (A) 和增殖情况 (B)

Fig. 7 Cell viability (A) and proliferation status (B) of L929 cells cultured in different hydrogel scaffolds

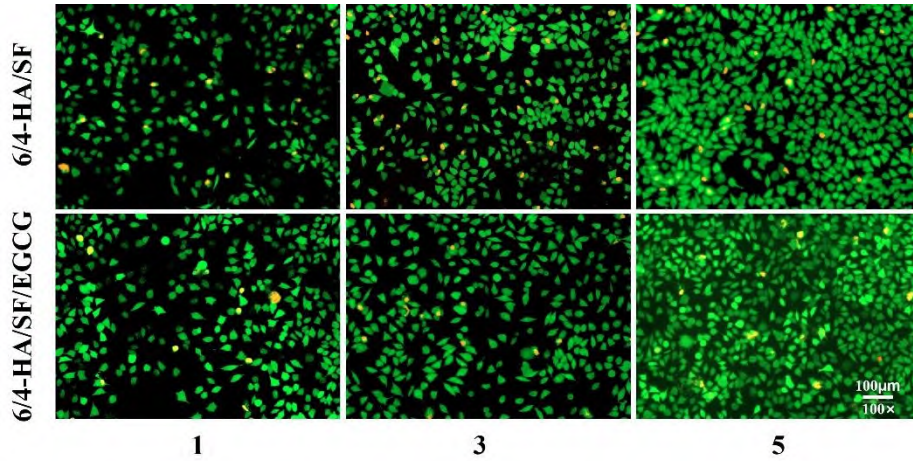


图 8 通过活死染色检测 L929 细胞在各组水凝胶支架中的分布

Fig. 8 Distribution of L929 cells in each group of hydrogel scaffolds

2.8 体外抗炎

小鼠巨噬细胞通过 LPS 刺激后，检测每组 NO 释放量（图 9A）及采用 qPCR 检测每组对应的炎症基因表达（图 9B、C、D），组间 NO 释放量存在显著差异（ $F=164.9$, $P<0.001$ ）；Dunnett's t 多重比较检验显示，与对照组相比，6/4-HA/SF 组和 6/4-HA/SF/EGCG 组的 NO 释放量显著降低（ $q=16.93$ 、 38.55 , $P<0.001$ ）。同时，qPCR 检测各组炎症因子基因（ $TNF-\alpha$ 、 $iNOS$ 、 $IL-6$ ）的表达，各组间差异均具有统计学意义（ $F=42.44$ 、 94.43 、 92.44 , $P<0.05$ ）。Dunnett 多重比较检验，与对照组相比，6/4-HA/SF 组的炎症因子表达轻度下调（ $q=5.21$ 、 6.19 、 7.83 , $P<0.05$ ），而 6/4-HA/SF/EGCG 组的炎症因子表达水平较对照组显著降低（ $q=12.64$ 、 21.80 、 20.05 , $P<0.001$ ），表明 EGCG 的加入显著增强了复合水凝胶的抗炎活性。

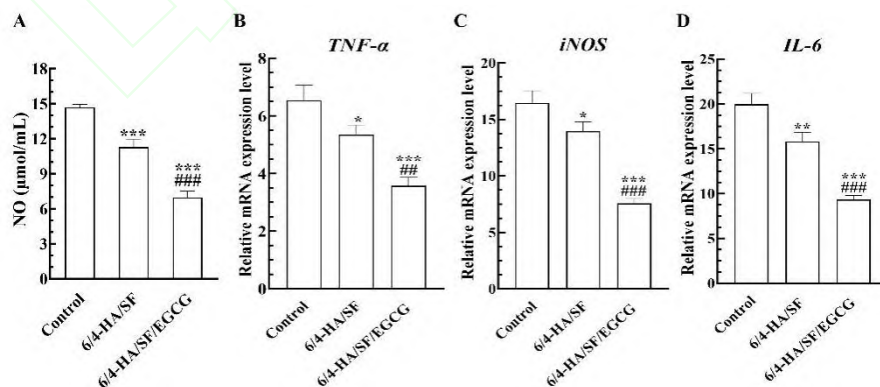


图 9 复合水凝胶支架体外抗炎性能检测

Fig. 9 *In vitro* anti-inflammatory properties of composite hydrogel scaffolds

A: NO release amount; B–D: Gene expression of inflammatory factors; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,
*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs 6/4-HA/SF group.

3 讨论

牙周炎是全球成年人牙齿缺失的首要原因，重度牙周炎位列全球第六大高发慢性非传染性疾病，严重损害患者的口腔健康及生活质量，已成为重要的公共口腔健康问题^[9]。该病由牙周菌群失调引起的慢性炎症，与多种系统性疾病相关^[10]。典型表现为牙龈出血、口臭和局部肿痛，进展后可出现牙周袋形成、牙槽骨吸收，甚至牙齿松动和咀嚼功能下降^[11]。

牙周局部的炎性刺激会产生大量自由基，引发氧化应激，破坏牙周组织。超氧化物歧化酶作为关键抗氧化酶，能清除活性氧自由基，抑制氧化应激，其含量减少会导致氧自由基生成与清除失衡，加重炎症^[12]。临床治疗的核心目标是控制菌斑、消除刺激、控制炎症，保存天然牙及功能，改善患者生活质量^[13]。传统牙周基础治疗（龈上洁治、龈下刮治和根面平整）虽能清除大部分菌斑与牙石，对于深牙周袋和复杂解剖结构区域的细菌清除仍存在局限。重度深袋牙周炎患者需要通过翻瓣术来治疗：切开牙龈，翻起黏膜骨膜瓣，暴露病变牙根，清除袋内菌斑、牙石及病灶组织，促进新附着形成^[14]。但是翻瓣术为有创操作，术后局部炎症刺激，易出现手术效果不佳或复发。因此，有效控制术后的炎症、减轻氧化应激损伤、促进牙周组织再生，是提升牙周炎疗效的关键。

HA 和 SF 作为天然生物材料，生物相容性、可降解性、机械性能和细胞调控能力好，两者复合制备的水凝胶支架孔径结构适宜，机械强度高，良好的降解和溶胀性能，能提供良好的物理支撑和组织再生微环境。EGCG 具有抗炎和抗氧化生物活性，抗炎是通过抑制核因子 κB (NF- κB) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路来减少促炎因子的生成，并调节炎症细胞的活化和迁移；抗氧化通过直接清除活性氧，增强机体抗氧化酶活性及抑制氧化应激相关酶^[15-16]。

本研究将 EGCG 与 HA、SF 复合，构建具有“抗炎-抗氧化协同调控”功能的水凝胶支架，实现功能互补与增强。该支架在翻瓣术后应用潜力显著：HA 和 SF 载体具有良好的生物相容性、可降解性和机械性能，降低排异风险；EGCG 为抗炎抗氧化的核心成分，下调术区促炎因子的表达、增强抗氧化酶活性以及去除活性氧，协同打破“炎症-氧化应激”恶性循环，减轻术后红肿、渗出等反应，为牙周组织修复再生提供了有利的微环境。该设计有望为牙周炎的治疗带来新的突破，具有较高的临床应用价值。但尚存局限性：虽体外实验表现出色，但其在复杂的口腔环境中的长期稳定性、缓释动力学、抗菌效应以及是否可促进骨组

织生长等尚有待进一步研究和验证。此外，患者的牙周状况差异较大，个性化应用需后续研究。

综上所述，本研究成功制备了负载 EGCG 的 HA/SF 水凝胶支架，通过“抗炎-抗氧化协同调控”机制，有效抑制术区炎症、减轻氧化应激损伤，打破“炎症-氧化应激”恶性循环，为牙周组织的修复再生提供良好的环境，展现出作为翻瓣术等传统治疗手段有效辅助工具的巨大潜力，为重度牙周炎的临床治疗带来了新的希望，值得后续深入研究与探索。

参考文献

- [1] Zhong W, Liu X, Wang Y, et al. Trapzyme as multimodal Janus nanoplatform for apoptosis-based immunotherapy of periodontitis[J]. *Bioact Mater*, 2025, 52: 139-54. doi:10.1016/j.bioactmat.2025.05.029.
- [2] 王震, 张香路, 李阳, 等. 改良透明质酸水凝胶控释脑源性神经营养因子对大鼠胚胎神经干细胞生长、分化和凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(5): 805-11. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.025.
- Wang Z, Zhang X L, Li Y, et al. Effect of modified hyaluronic acid hydrogel controlled release of brain derived neurotrophic factor on growth, differentiation and apoptosis of embryonic neural stem cells in rats[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(5): 805-11. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.025.
- [3] Yoshinori S, Takatomo I, Toshiaki N, et al. Periodontal wound healing/regeneration of two-wall intrabony defects following reconstructive surgery with cross-linked hyaluronic acid-gel with or without a collagen matrix: a preclinical study in dogs.[J]. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, 2021, 52(4): 308-316. DOI:10.3290/J.QI.B937003.
- [4] 廖小毓, 方辉, 杨飞宇, 等. 高模量高强度丝素蛋白 GBR 膜的制备及性能评估[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(4): 590-5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.005.
- Liao X Y, Fang H, Yang F Y, et al. Fabrication and performance evaluation of high-modulus and high-strength silk fibroin guided bone regeneration membrane[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(4): 590-5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.005.
- [5] Panda S K, Sharma V G S, Sorathiya V L, et al. Efficacy of epigallocatechin-3-gallate against oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome[J]. *Indian J Pharmacol*, 2025, 57(6): 380-4. doi:10.4103/ijp.ijp_518_24.
- [6] Sha Q, Wang Y, Zhu Z, et al. A hyaluronic acid/silk fibroin/poly-dopamine-coated biomimetic hydrogel scaffold with incorporated neurotrophin-3 for spinal cord injury repair[J]. *Acta Biomater*, 2023, 167: 219-33. doi:10.1016/j.actbio.2023.05.044.
- [7] Singh B, Singh J P, Kaur A, et al. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of *Citrus peel*[J]. *Food Res Int*, 2020, 132: 109114. doi:10.1016/j.foodres.2020.109114.
- [8] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9-10): 1231-7. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

- [9] 赵军伟. 脱矿冻干骨联合浓缩生长因子治疗牙周骨下袋的临床疗效评价[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2021. doi:10.26921/d.cnki.ganyu.2021.001045.
- Zhao J W. Clinical evaluation of demineralized freeze dried bone allografts (DFDAB) when used alone and in combination with concentrated growth factor (CGF) in the treatment of periodontal intrabony defects[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2021. doi:10.26921/d.cnki.ganyu.2021.001045.
- [10] Wu Q, Zhang W, Lu Y, et al. Association between periodontitis and inflammatory comorbidities: the common role of innate immune cells, underlying mechanisms and therapeutic targets[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 128: 111558. doi:10.1016/j.intimp.2024.111558.
- [11] Tastan Eroglu Z, Kalender M E, Ucan Yarkac F, et al. Impact of non-surgical periodontal therapy on self-perceived halitosis, and the senses of smell and taste: a prospective clinical study[J]. *BMC Oral Health*, 2025, 25(1): 321. doi:10.1186/s12903-025-05702-2.
- [12] İyigün S, Görgülü N G, Doğan B. Changes in MMP-9, T-SOD and SIRT-1 levels after non-surgical periodontal treatment[J]. *BMC Oral Health*, 2025, 25(1): 262. doi:10.1186/s12903-025-05610-5.
- [13] 刘杰, 薛玲, 罗莹. 盐酸米诺环素软膏对轻中度慢性牙周炎患者牙周指标和龈沟液炎症因子水平的影响效果研究[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2025, 9(20): 64-7.
- Liu J, Xue L, Luo Y. Effect of minocycline hydrochloride ointment on periodontal indexes and inflammatory factors in gingival crevicular fluid in patients with mild and moderate chronic periodontitis[J]. *Mod Med Health Res Electron J*, 2025, 9(20): 64-7.
- [14] Ari G, Rajendran S, Mahendra J, et al. Estimation of GCF and salivary levels of NT-proBNP in systemically healthy subjects with severe chronic periodontitis before and after periodontal flap surgery[J]. *Int J Gen Med*, 2023, 16: 1809-16. doi:10.2147/IJGM.S402929.
- [15] Joo S Y, Song Y A, Park Y L, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits LPS-induced NF- κ B and MAPK signaling pathways in bone marrow-derived macrophages[J]. *Gut Liver*, 2012, 6(2): 188-96. doi:10.5009/gnl.2012.6.2.188.
- [16] Potenza M A, Iacobazzi D, Sgarra L, et al. The intrinsic virtues of EGCG, an extremely good cell guardian, on prevention and treatment of diabetes complications[J]. *Molecules*, 2020, 25(13): 3061. doi:10.3390/molecules25133061.