

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2025.01.005

人工虎骨粉联合 GelMA 水凝胶可促进退变椎间盘再生*

张永峰^{1#} 高荣^{2#} 李盼¹ 张鹏¹ 潘东晟¹ 张家玮¹ 丁坦^{1Δ}

(1 空军军医大学第一附属医院骨科 陕西 西安 710032;

2 西安交通大学生物工程与力学研究中心 陕西 西安 710049)

摘要 目的:探究负载人工虎骨粉的可注射甲基丙烯酸明胶(GelMA)水凝胶支架对大鼠椎间盘退变的修复效果。**方法:**分别合成3%、4%和5%的复合 GelMA 水凝胶支架,并表征微观结构,利用力学流变仪观察水凝胶基质刚度的变化。采用细胞染色技术和 CCK-8 观察髓核细胞在负载人工虎骨粉的水凝胶支架中的生长形态并对其增殖能力进行评估,随后采用 ELISA 检测细胞炎症反应。构建大鼠尾椎椎间盘退变模型,注射该水凝胶支架,通过 CT 扫描和免疫荧光染色评估水凝胶支架对椎间盘退变的修复效果。**结果:**成功构建了基质刚度可调控的 GelMA 水凝胶支架,该支架具有良好的生物相容性,体外实验发现人工虎骨粉可以明显促进细胞增殖,减弱细胞炎症反应。在体内研究中,该水凝胶支架显著恢复椎间盘高度,改善炎性微环境并促进髓核再生。**结论:**负载人工虎骨粉的 GelMA 水凝胶支架具有良好的机械性能和生物相容性,可以通过改善炎性微环境和力学微环境双重作用修复退变椎间盘。

关键词:椎间盘退变;人工虎骨粉;GelMA 水凝胶;炎症反应

中图分类号:R3;R687.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2025)01-36-10

Bionic Tiger Bone Powder Combined with GelMA Hydrogel Can Promote the Regeneration of Degenerative Intervertebral Disc*

ZHANG Yong-feng^{1#}, GAO Rong^{2#}, LI Pan¹, ZHANG Peng¹, PAN Dong-sheng¹, ZHANG Jia-wei¹, DING Tan^{1Δ}

(1 Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Research Center of Bioengineering and Mechanics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710049, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the repair effect of injectable GelMA hydrogel scaffold loaded with bionic tiger bone powder on intervertebral disc degeneration in rats. **Methods:** We synthesized composite GelMA hydrogels with concentrations of 3%, 4%, and 5%, characterized their microstructure, and observed changes in the stiffness of the hydrogel matrix using a rheometer. We used cell staining techniques and CCK-8 assays to observe the growth morphology and assess proliferation of nucleus pulposus cells in hydrogel scaffolds loaded with bionic tiger bone powder, followed by ELISA to detect cellular inflammatory responses. We then established a rat caudal intervertebral disc degeneration model and injected the hydrogel scaffolds, evaluating the scaffolds' repair effects on disc degeneration using CT scans and immunofluorescence staining. **Results:** We have successfully developed a GelMA hydrogel scaffold with adjustable matrix stiffness, which exhibits excellent biocompatibility. In vitro experiments

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2023-ZDLSF-12)

为共同第一作者

作者简介:张永峰,男,主治医师,研究方向:脊柱退变研究,E-mail: 349332809@qq.com;

高荣,男,硕士研究生,研究方向:椎间盘退变治疗,E-mail: gaorong_2015@163.com

Δ 通讯作者:丁坦,男,副教授,副主任医师,研究方向:椎间盘力学研究,E-mail: dtdyy@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2024-06-17)

have shown that bionic tiger bone powder can significantly promote cell proliferation and attenuate cell inflammatory responses. In vivo studies have demonstrated that the hydrogel scaffold significantly restores disc height, improves the inflammatory microenvironment and promotes nucleus pulposus regeneration. **Conclusions:** GelMA hydrogel scaffold loaded with bionic tiger bone powder has good mechanical properties and biocompatibility, and can repair degenerated intervertebral disc by improving both inflammatory microenvironment and mechanical microenvironment.

Key words: Intervertebral disc degeneration; Bionic tiger bone powder; GelMA hydrogel; Inflammatory response

Chinese Library Classification(CLC): R3; R687.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2025)01-36-10

前言

因椎间盘退变 (Intervertebral Disc Degeneration, IVDD) 导致的椎间盘突出和退行性椎体滑脱等是脊柱外科常见疾病, 在全球的发病率逐年上升^[1]。若退变在早期不能得到有效控制, 则会逐渐演变为脊柱失稳以及脊髓和神经根压迫症状, 严重影响个人生活质量^[2]。近年来, 随着组织工程技术研究的不断深入, 有越来越多的生物材料在促进髓核细胞 (Nucleus Pulposus, NP) 再生、恢复椎间盘理化性能方面显示出优越性能^[3,4], 其中 GelMA 水凝胶是最常用的材料之一。其具有三维网络结构, 良好的生物相容性, 机械性能可调和生物活性^[5], 已成为生物医学应用研究的热点, 可以通过水凝胶负载细胞、生长因子和药物促进骨融合, 消除炎症反应, 促进组织再生^[6,7], 为椎间盘的再生提供了新的治疗途径。

人工虎骨粉 (JinTianGe, JTG) 为新一代虎骨代用品制剂^[8,9], 是获得国家发明专利的一类新中药, 已被中国食品药品监督管理局批准用于骨质疏松症和骨关节炎的防治。经临床观察发现, 椎间盘退变和骨质疏松症经常同时发生, 严重的椎间盘退变常伴有严重的骨质疏松症^[10]。因此, 以治疗骨质疏松为依据, 我们尝试着将人工虎骨粉应用到 IVDD 的治疗过程中, 以 GelMA 水凝胶为载体, 将 JTG 吸附, 构建稳定的水凝胶体系, 后经体外实验验证, 该体系明显促进细胞增殖, 减轻炎症反应在动物模型中, 观察该水凝胶支架可以修复椎间盘退变。

1 材料与方法

1.1 材料

甲基丙烯酸酐和明胶 (GelMA) 购自苏州永沁泉智能设备有限公司; 光引发剂 (LAP) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 细胞计数试剂盒 (CCK-8) 试剂和脂多糖 (LPS) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 鬼笔环肽 (TRITC) 细胞染色剂由德国 Merck KgaA 公司提供; IL-1 (PAB45877)、IL-6 (PAB45871) 和 TNF- α 抗体 (PAB45964) 购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; ELISA 试剂盒从上海优选生物科技有限公司购买; SPF 级 SD 大鼠由西安交通大学动物实验中心提供; 大鼠椎间盘 NP 细胞由上海赛业生物科技有限公司提供; 人工虎骨 (粉 Z20030080) 购买自金花集团股份有限公司西安金花制药厂。

力学测试仪 (HY-10080LX) 购自美国 BOSE 公司; 场发射扫描电镜 (SU3800) 购自苏州诺赛德自动化设备有限公司; 便携式固化光源 (EFL-LS-1600-405) 购自苏州永沁泉智能设备有限公司; CT 扫描仪 (SU-07-3800) 购自日本 HITACHI 公司。

1.2 方法

1.2.1 复合 GelMA 水凝胶体系的制备 将 10 g 明胶 (Gelatin) 溶于 100 mL PBS 溶液中, 后滴加 1 mL 甲基丙烯酸酐 (MA) 溶液 (质量比 8%), 充分搅拌 2 h 后, 在去离子水中透析一周, 冷冻干燥后得到 GelMA 前体。参考文献^[10]的方法并简单修改, 取 0.5 g 的 GelMA 与 9 mL 0.25% 光引发剂 (LAP) 溶液混合, 以 40-50 °C 水浴避光加热 30 min, 期间震荡数次, 即可配得 6% (g/mL) GelMA 水凝胶, 立即使用规格为 0.22 μm 的无菌针头过滤器过滤处理, 即可得到无菌的光固化 GelMA 水凝胶前体溶液。

随后取 150 μL GelMA 前体液分别与 0.002、0.02 和 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人工虎骨粉溶液等体积混合, 构建负载不同浓度人工虎骨粉的 GelMA 水凝胶体系, 后取 300 μL 混合液注入模具中, 使用波长为 405 nm, 强度为 25 w/cm^2 的蓝光光源照射 20 s 充分成胶后, 将该前体溶液置于 -20°C 冰箱避光保存备用。

1.2.2 扫描电镜表征水凝胶结构 分别取 GelMA 和 JTG-GelMA 凝胶, 蓝光照射固化后, 放置于 -80°C 冰箱中过夜, 将冻凝后的水凝胶支架进行冷冻干燥处理, 充分冻干后, 采用低速锯片切割法, 将样本切割为厚度 1 mm 薄片, 对样品进行喷金后, 置于加速 12.0 KV 电压的扫描电镜中, 观察其微观形态并拍照。

1.2.3 水凝胶支架的溶胀性能测试 水凝胶在 PBS 中溶胀平衡后, 分别对比了 3%、4% 和 5% 的 JTG-GelMA 水凝胶的溶胀倍率。首先取 100 μL 10% 的水凝胶前体液和等体积的人工虎骨粉溶液, 使用 0.25% 的 LAP 溶液稀释, 保证体系中 GelMA 的最终浓度分别为 3%、4% 和 5%。取 200 μL 的溶液在 8 mm \times 2 mm 的圆形模具中, 蓝光光源照射 20 s, 使其完全成胶, 将其置于 -80°C 冰箱冷冻各样品 2 h, 后充分干燥, 称其初始重量记 W_0 , 对样本分别标记, 置于 6 孔板中, 各孔中加入 5 mL 的 PBS 溶液, 置于 37°C 恒温培养箱中, 在 48 h 后取出, 用滤纸小心擦拭水凝胶表面水分, 称其吸水后的重量记 W_1 , 后计算其溶胀率。溶胀率 (%) = $(W_1 - W_0) / W_0 \times 100\%$ 。

1.2.4 JTG-GelMA 水凝胶的力学检测 将配置好的 3%、4% 和 5% JTG-GelMA 水凝胶在 37°C 恒温水浴箱中充分溶解, 各取 200 μL 在模具中充分成胶, 随后从模具中小心取出, 采用微压缩法测试水凝胶力学性能, 在力学流变仪上样, 并设置程序开始测试, 每个样品设置 3 个重复, 数据点自动保存, 在测试结束后, 统计实验数据并计算各组凝胶储能模量和剪切模量。

1.2.5 大鼠 NP 细胞的复苏及传代 将 NP 细胞完全培养基在 37°C 恒温水浴箱中充分预热, 细胞 (P1 代) 冻存管置于 37°C 恒温水浴箱中, 快速晃动, 待完全融化后快速取出, 加入少量完全培养基, 转移至离心管, 以 1000 r/min 转速离心 3 min, 弃去上清液, 加入新的完全培养基, 将细胞悬液接种于 25 cm^2 培养瓶中, 置于恒温细胞培养箱 (37°C 、5% CO_2), 定期观察并及时更换

培养基。

当细胞密度达 80%, 用 PBS 溶液充分清洗细胞后, 加入 0.25% Trypsin EDTA 约 1 mL, 轻轻旋转将细胞消化脱落, 后立即加入完全培养基终止胰酶消化, 离心后, 转移至新的培养瓶, 重复上述操作, 获得 P3-P4 代次的细胞。

1.2.6 细胞骨架染色 取第 4 代 NP 细胞, 消化离心得到细胞沉淀, 随后取 3%、4% 和 5% 的 JTG-GelMA 水凝胶前体液各 300 μL , 与细胞沉淀充分混匀, 分别转移至 48 孔板中, 均设置 3 个平行样本, 在其完全成胶后, 各孔中加入 1 mL 的细胞培养液, 培养 3 天后拍照观察细胞外观形态。

用 PBS 溶液快速清洗各组凝胶, 洗去残留培养基, 将细胞固定封闭处理后, 加入 FITC 工作液, 室温孵育 60 min, 随后用 PBS 溶液再次清洗凝胶 3 次, 向孔中加入 DAPI 染色液, 室温孵育 20 min 后, 充分清洗, 使用共聚焦荧光显微镜下观察并使用 Image J 软件测量细胞长度和细胞面积, 以评估细胞在不同刚度的复合 GelMA 水凝胶支架中的生存能力。

1.2.7 CCK-8 检测细胞的增殖活力 将 5×10^4 个 NP 细胞分散在 96 孔板上培养, 在培养液中分别加入 1、5 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液, 孵育 48 h 后, 使用 PBS 溶液快速清洗各组, 随后向每孔加入 CCK-8 检测液 10 μL , 后与细胞共同孵育 2 h, 采用酶标仪 (以检测波长 450 nm、参考波长 600 nm) 检测其各孔吸光度 (OD) 值。

将水凝胶前体液与细胞悬液在孔板中充分混匀, 光照成胶后, 加入 50 μL 的 LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液和细胞培养液, 设置 Control 组、LPS 组、JTG-GelMA (0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组、JTG-GelMA (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和 JTG-GelMA (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组, 培养 3 天后, 采用 CCK-8 试剂盒检测吸光度值, 观察不同浓度的 JTG 对 NP 细胞增殖率的影响。

1.2.8 水凝胶支架对细胞炎症反应的影响 按照上述分组, 将水凝胶前体液与 2×10^5 个细胞悬液充分混匀, 加入 50 μL 的 LPS 和细胞培养液, 充分成胶后, 在培养箱中孵育 3 天, 期间收集细胞上清液, 随后参照 ELISA 检测试剂盒检测方法, 分别对 IL-1、IL-6 和 TNF- α 定量检测。

1.2.9 大鼠椎间盘退变模型的构建 使用清洁级雄性 SD 大鼠, 平均体重 350 g, 购自西安交通大学医学部实验动物中心, 本研究经西安交通大学医学部实验动物福利伦理委员会审查

批准(编号伦动科批字 2019 第 100 号),所有实验老鼠正常饲养,状态良好。

首先在大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,尾巴用 70%的乙醇溶液来清洗和消毒,参考文献^[11,12]中的 IVDD 模型构造方法,采用 CT 扫描,透视定位 Coccyxes(Co)8-10 椎间盘空间,并标记相应的皮肤区域,使用电钻将 2 根钢丝(长 50 mm,直径 1.2 mm)垂直插入在 Co8 和 Co10 椎体中心,并采用刻度尺和量角器来协助钢丝的精确定位,2 根钢丝以 40° 的角度固定在弧形尾部的凹面,弹簧被放置在 2 根钢丝之间的凸面,距离尾巴轴的中心 25 mm,造模用塑料板来防止尾巴扭曲。

1.2.10 水凝胶支架对椎间盘退变的治疗效果在造模后 4 周,把大鼠随机分为 3 个治疗组和 1 个对照组。治疗组分别注射 10 μ L 的 JTG-GelMA(0.02 μ g/mL)、JTG-GelMA(0.2 μ g/mL)和 JTG-GelMA(2 μ g/mL)水凝胶体系,对照组为注射 10 μ L 生理盐水的假手术组。手术后正常喂食和换水,并及时更换垫料,保证老鼠的生命状态良好。在水凝胶支架治疗 4 周后,各组随机取 3 只大鼠,麻醉后,对治疗部位尾椎进行 CT 成像。利用 Image J 软件测量 CT 扫描图像的 DHI 并进行组间比较,(DHI = 椎间隙前、中、后边缘高度之和的两倍 / 相邻椎体前、中、后高度之和)。

收集各组治疗部位的椎间盘,在 10%甲醛溶液中固定 24 h,用 14%的乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙 30 天后,包埋石蜡,切片至 6 μ m 厚度,使用苏木精伊红(H&E)来观察椎间盘组织结构,以及髓核和纤维细胞的形态,以及马松(Masson)和番红-固绿(Safranin O/Fast green stain)染色表征胶原纤维组织的变化,并参考 Histological Grading 标准^[13],进行组织学评分。

1.2.11 免疫荧光分析 免疫荧光染色同^[13]报导的类似,简而言之,将上述 4 组和正常未干预组中,收集的椎间盘组织在二甲苯中脱蜡,60℃枸橼酸钠中过夜修复,3% H₂O₂ 中孵育 15 min,然后与 10%山羊血清在室温下孵育 30 min,后分别与抗 IL-1、IL-6 和 TNF- α 抗体(1:200)在 4℃孵育过夜,清洗过后,在 37℃下用生物素标记的二抗处理 30 min,使用链霉亲和素生物素-过氧化物酶复合物(SABC)方法评估了炎症因子的表达,随后使用 Image J 软件统计荧光面积

占比,进一步量化炎症表达。

1.3 统计学分析

本实验所有实验结果的统计学分析均使用 SPSS 26.0 进行处理,所有结果都经过双尾 t 检验,对于多组比较,单向或双向方差分析(ANOVA)采用 Tukey's 检验,采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制统计图, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复合水凝胶支架的制备与形态表征

在 3%的 GelMA 前体液中引入人工虎骨粉后,蓝光照射,快速固化,外观呈现透明果冻状,具有一定的黏附性,形状外观可调的水凝胶(图 1A)。通过红外光谱(FTIR)观察发现:GelMA 水凝胶在 3000-3500 nm 范围内并没有明显的吸收峰(图 1B)。在交联人工虎骨粉后,可以看到出现新的 C-N 键吸收峰变化,同样指纹区也出现大量新的吸收峰变化。扫描电镜观察发现,水凝胶的横断面呈蜂窝状孔隙结构(图 1C),与文献^[14]所表征的结果一致。利用 GelMA 的多孔径结构包载人工虎骨粉后,明显在空隙中负载了大量颗粒物,体现了 GelMA 水凝胶对人工虎骨粉的负载能力(图 1D),以上结果表明 JTG-GelMA 水凝胶体系合成成功。

2.2 水凝胶体系的机械性能测试

在测量水凝胶的机械性能之前,需要保证水凝胶充分溶胀至平衡,因此我们测试了负载人工虎骨粉(0.2 μ g/mL)的 GelMA 水凝胶体系的溶胀性能。随着水凝胶体系刚度的升高,其溶胀倍率逐渐减小,其中 3%的 JTG-GelMA 溶胀率为 $1532.74\% \pm 104.23\%$,显著高 5%的 JTG-GelMA 水凝胶(图 2A),差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明高浓度 GelMA 在内部形成较高的交联度和较密集的网络来抵抗其吸水能力。在此基础上,我们进一步优化了水凝胶体系的浓度,分别测试了水凝胶的储能模量和剪切模量测试,随着水凝胶体系的交联度增加,其机械强度也在不断增大,基质刚度不断增强,其中 3%的 JTG-GelMA 水凝胶的储能模量为 $253.42 \text{ Pa} \pm 0.32 \text{ Pa}$ (图 2B、C),可以满足细胞生长所需的力学微环境。不难发现,该水凝胶体系具有灵活可控的刚度调节能力,可以满足组织工程材料的基本应用。

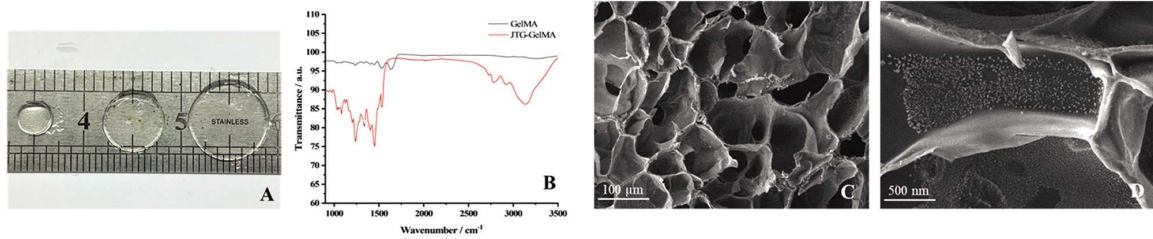


图 1 GelMA 水凝胶支架表征

Fig.1 Characterization of GelMA hydrogel scaffold

Note: A. Appearance of JTG-GelMA hydrogel; B. Infrared visible spectrum; C, D. SEM images.

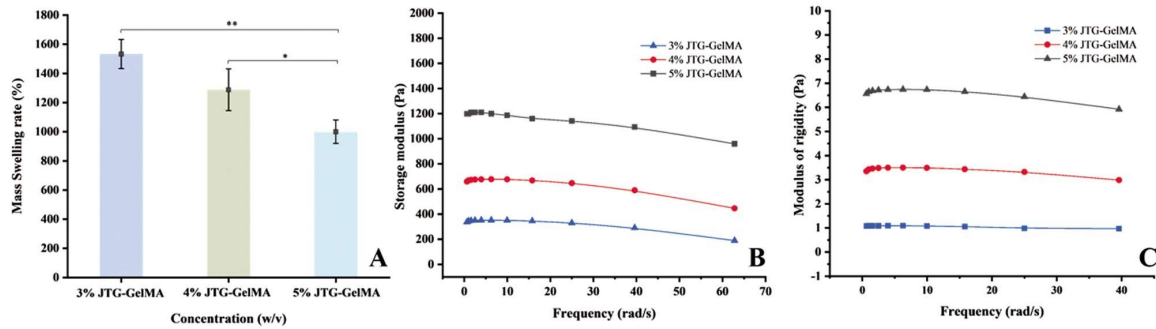


图 2 不同浓度水凝胶体系的力学模量

Fig.2 Mechanical modulus of hydrogel systems with different concentrations

Note: A. Comparison of swelling ratio of JTG-GelMA hydrogel; B, C. energy storage modulus change diagram and shear modulus diagram (compared with 5% JTG-GelMA group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

2.3 复合水凝胶支架的生物相容性

将 NP 细胞在不同刚度的水凝胶体系中三维培养 5 天后,观察细胞形态变化。与对照组相比,NP 细胞在 3%的水凝胶支架上培养均能较好的生长,细胞明显发生铺展增殖,而在 4%和 5%的水凝胶体系中,细胞生长状态较差,形态皱缩,并没有明显增殖,特别是在 5%的水凝胶体系中,细胞没有完全铺展,有大量的细胞碎片产生,且细胞发生死亡(图 3A)。NP 细胞在 3%的水凝胶体系中细胞长度和细胞面积均比其他组较大,细胞铺展明显(图 3B、C),说明 3%的水凝胶支架可以为细胞生长提供良好的微环境,具有较好的生物相容性,因此后续实验中以 3%的 JTG-GelMA 作为细胞培养的最优基质。

2.4 水凝胶体系可促进 NP 细胞增殖

在排除水凝胶对 NP 的副作用后,选择了 3%的水凝胶体系作为研究对象。首先将 NP 细胞在不同浓度的 LPS 培养 3 天后,进行 CCK-8 测试,随着 LPS 浓度的增加,NP 增殖明显被抑制,并且在相同浓度的 LPS 环境下,随着培养时间的延长,细胞的增殖率也进一步降低(图 4A),说明采用 LPS 来模拟椎间盘退变微环境是可行的。在此基础上,探索水凝胶支架对 NP 增殖的影响,与 LPS 组相比,在水凝胶支架中随

着人工虎骨粉浓度的升高 NP 细胞的增殖率明显增大,在 2 $\mu\text{g/mL}$ 的人工虎骨粉组中,增殖率可以达到 $92.65\% \pm 0.08\%$,具有明显的变化差异($P < 0.01$)(图 4B),表明人工虎骨粉可促进 NP 细胞增殖,加快细胞的生长。

2.5 人工虎骨粉可改善细胞炎症反应

与 Control 组相比,在 LPS 组中,IL-6、IL-1 和 TNF- α 的分泌均显著增加 2 倍以上($P < 0.01$)。与 LPS 组相比,细胞在水凝胶体系中共培养后,炎症因子分泌均有所下降,并且随着人工虎骨粉浓度的增加,下降更为显著,在 2 $\mu\text{g/mL}$ 的人工虎骨粉组中,IL-6 的表达量由 $124.23 \pm 2.02 \text{ pg/mL}$ 下降到 $102.05 \pm 0.53 \text{ pg/mL}$,TNF- α 的表达量由 $1.71 \pm 0.06 \text{ pg/mL}$ 下降到 $0.96 \pm 0.11 \text{ pg/mL}$ ($P < 0.01$),以上结果表明,人工虎骨粉可以明显的抑制细胞炎症反应的发生。见图 5A-C。

2.6 复合水凝胶支架可促进椎间盘再生

通过机械挤压法在大鼠尾部构建 IVDD 模型后,椎间盘高度(DHI)迅速降低,椎骨结构明显损伤,椎间盘组织结构明显被破坏,髓核组织仅有少量残留,纤维环排列紊乱,很难辨识髓核和纤维环的边界(图 6A 和 6C),表明该模型构建方法可行,成功建立了退变椎间盘模型。

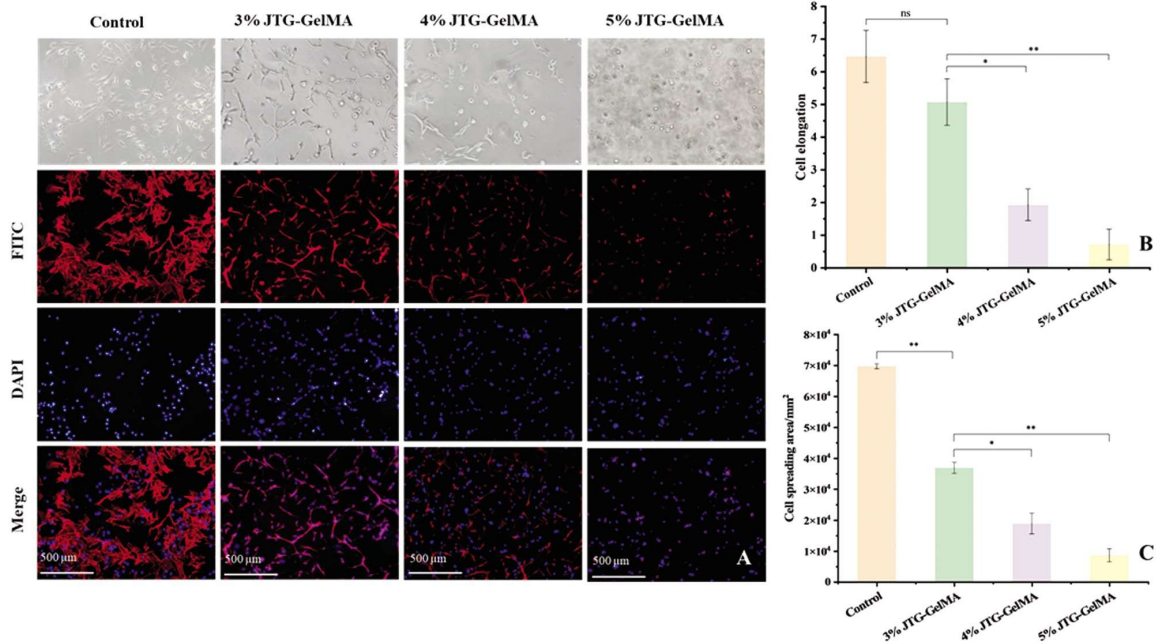


图 3 JTG-GelMA 水凝胶的细胞毒性

Fig.3 Cytotoxicity of JTG-GelMA hydrogel

Note: A. NP cell growth morphological changes FITC/DAPI staining diagram (red for cell cytoskeleton, blue for nucleus); B, C. statistical diagrams of cell length and cell area changes (compared with the 3% JTG-GelMA group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

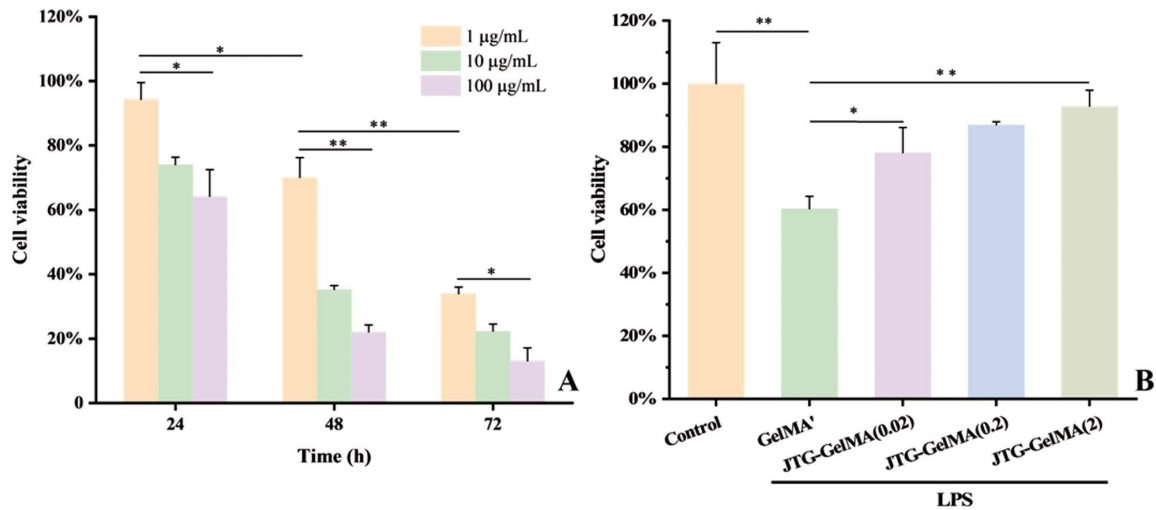


图 4 细胞增殖率比较

Fig.4 Comparison of cell proliferation rate

Note: A. Graph showing the proliferation rate of NPs in the LPS microenvironment; B. Graph showing the proliferation rate of NPs in the JTG-GelMA hydrogel system (compared with the LPS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

给予复合水凝胶支架治疗后 DHI 数值有所恢复, 在 2 μg/mL 的人工虎骨粉组中 DHI 明显增大(图 6B)。组织学观察发现, 与 IVDD 组相比, 经人工虎骨粉治疗后的椎间盘结构更完整, 核和纤维环边界清晰, 大部分的髓核组织得以保留, 并且髓核细胞呈现出与空白对照组类似的大液泡状, 红色的番红染色区域较多, 间接说

明了该位置蛋白聚糖水平较高(图 6C)。对组织结果量化后发现, IVDD 组的评分相对最高, 可达到 13.33 ± 0.43 分, 在 JTG-GelMA 组中, 随着人工虎骨粉浓度的增加, 组织学分级逐渐降低达到 8.52 ± 0.72 分(图 6D), 组织学分析结果量化了水凝胶支架对退变椎间盘的修复作用。

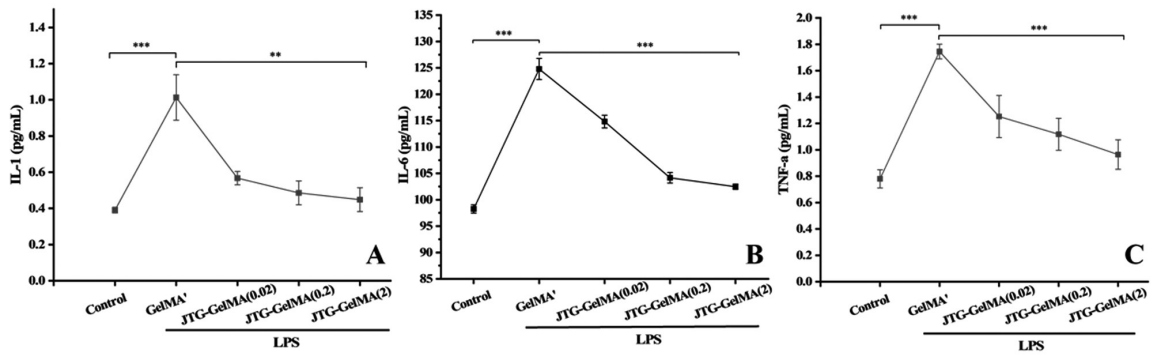


图 5 NP 细胞炎症因子分泌变化

Fig.5 Secretion of inflammatory factors in NP cells

Note: A. IL-1; B. IL-6 and C. TNF-α (compared with LPS group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

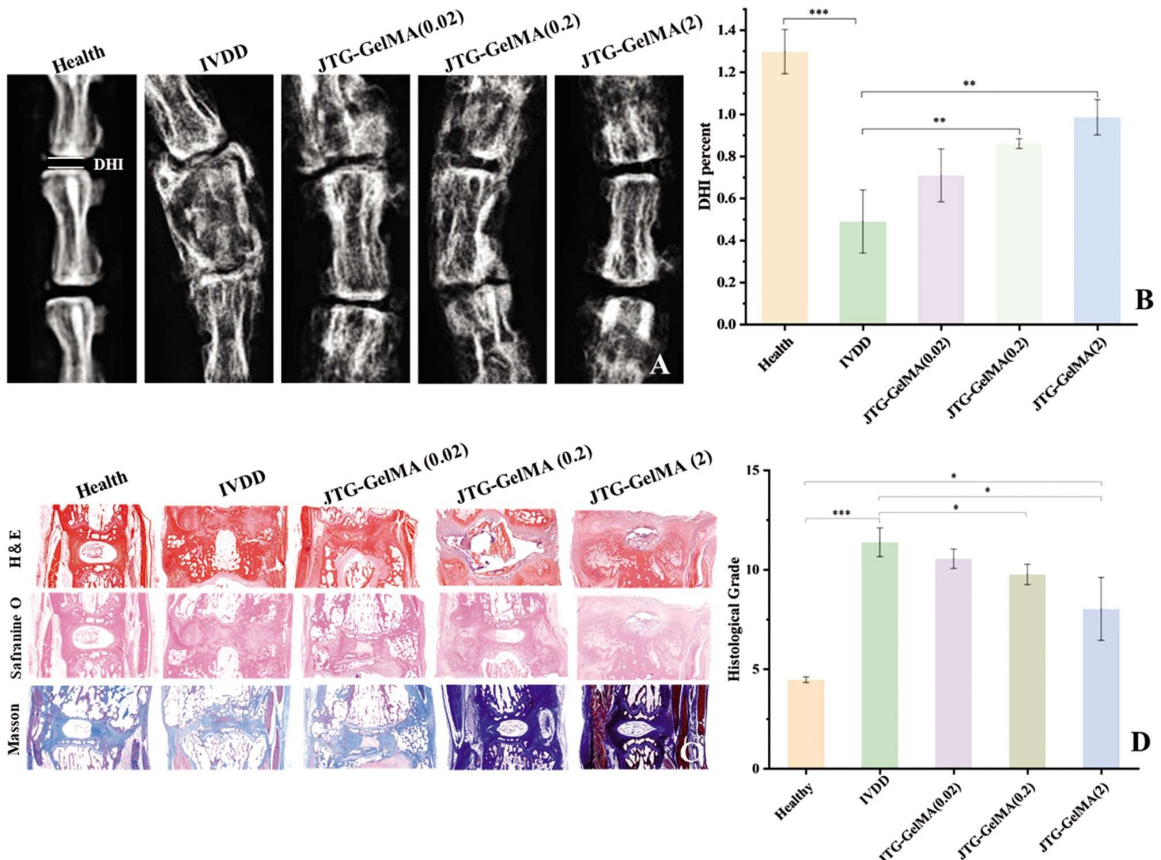


图 6 JTG-GelMA 水凝胶基质对退变椎间盘的修复效果

Fig.6 Repair effect of JTG-GelMA hydrogel matrix on degenerative intervertebral disc

Note: A. CT scan imaging; B. Comparison of DHI changes; C. HE, safranin O and Masson staining results; D. Histological score 4 weeks after surgery (compared with IVDD group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

2.7 复合水凝胶支架的体外抗炎效果

为了进一步考察了人工虎骨粉的体内抗炎效果,我们分别对椎间盘组织中炎症因子 IL-1、IL-6 和 TNF-α 进行了免疫荧光染色分析。与正常未干预组相比,退变后的椎间盘组织中炎症因子的分泌均显著增加,炎症因子所占比例达到 50% 以上。在水凝胶体系治疗后,椎间盘组织炎症因子分泌均有所下降,并且随着人工虎骨

粉浓度的增加,炎症因子表达逐渐减少显著,在 2 μg/mL 的 JTG 组中,IL-1 的分泌量下降到 $11.62 \pm 0.72\%$, IL-6 分泌量下降到 $15.42 \pm 2.03\%$, TNF-α 分泌量下降到 $19.61 \pm 3.52\%$ ($P < 0.01$),以上结果表明,该复合水凝胶支架可以明显的抑制椎间盘组织炎症反应的发生,进而缓解椎间盘退变。见图 7A-D。

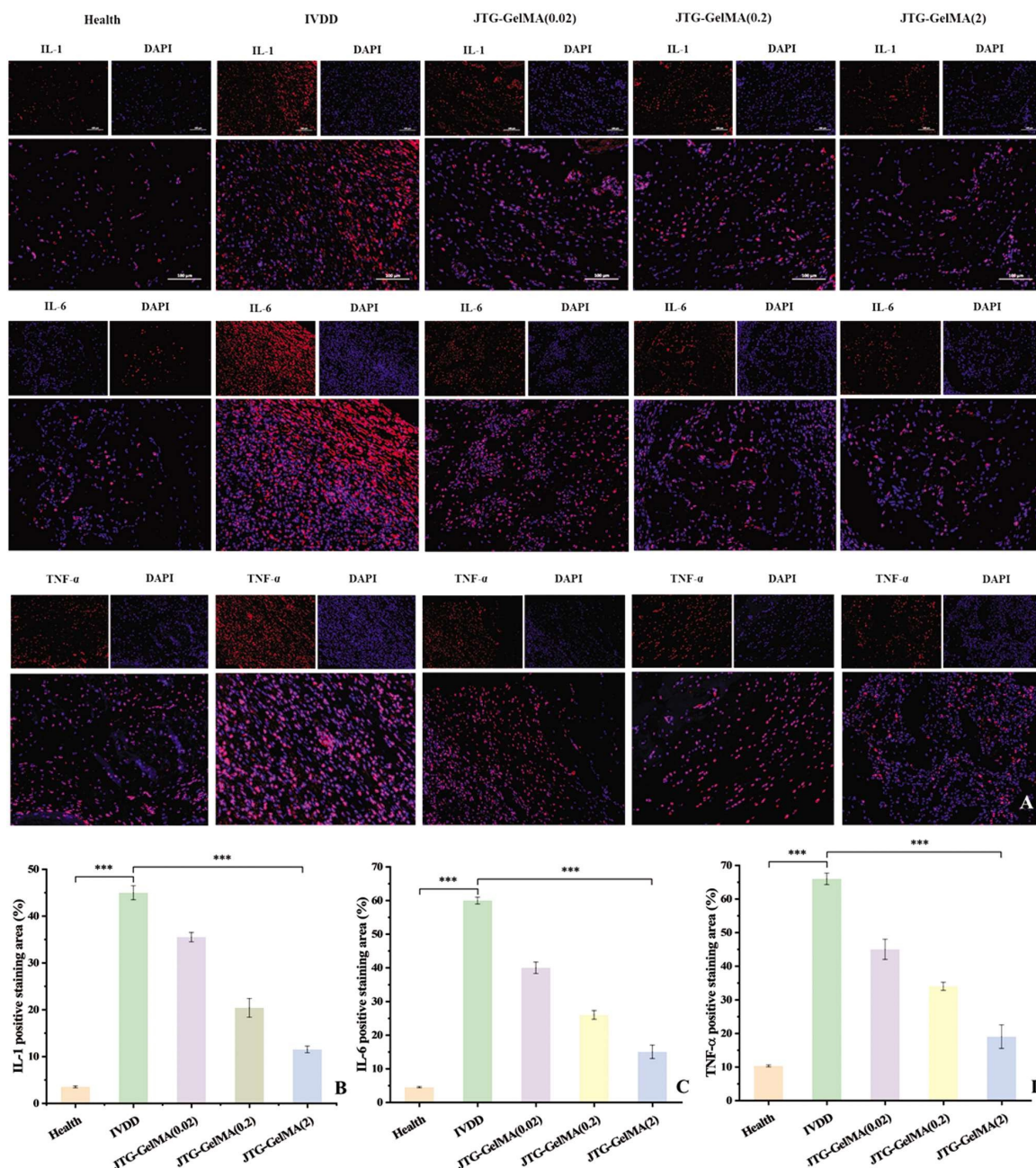


图 7 JTG-GelMA 水凝胶对椎间盘组织炎症反应的抑制

Fig.7 Inhibition of inflammation in intervertebral disc tissue by JTG-GelMA hydrogel

Note: A. Immunofluorescence staining of intervertebral discs in different groups; B, C and D. Quantitative analysis of IL-1, IL-6 and TNF-α fluorescence areas in different groups at 4 weeks (compared with IVDD group, *** $P < 0.001$).

3 讨论

IVDD 导致脊柱运动节段不稳、狭窄、畸形，进而引起腰痛和运动功能障碍等症状，极大地威胁公众身体健康^[15]，由于 IVDD 的分子机制尚未完全阐明，目前治疗 IVDD 的主要方法包括保守治疗和手术治疗。保守治疗如卧床休息、服用非甾体抗炎镇痛药以及理疗等，仅对症状有短期疗效^[16]。而手术治疗如微创髓核摘除术或者脊柱融合术可以缓解神经症状以及恢复脊

柱序列，因而被广泛应用^[17]。但也存在着高度侵入性风险、对脊柱生物力学的破坏以及可能导致相邻椎间盘加速退化等弊端。人工虎骨粉为人工合成的虎骨替代性药物，含有的骨胶原等物质可以促进成骨细胞的增殖，加强活性，减轻炎症反应和促进细胞外基质合成的作用，在治疗 IVDD 中具有较大潜力^[18,19]，通过与 GelMA 材料结合，二者协同作用，水凝胶可以提供机械支撑和适合细胞生存和增殖的 3D 微环境，同时实现药物的精准递送。

生理状态下的髓核是一种凝胶状的软组织。随着椎间盘的退变, 柔软的髓核出现纤维化, 其微环境的基质刚度可能也会发生改变。Gong Yu 等人^[20]测量了不同退变阶段大鼠髓核组织的弹性模量, 发现随着椎间盘退变的加剧, 髓核的弹性模量显著上升, 上升的刚度通过激活 PI3K/AKT 通路, 较低刚度的基质更有助于保持 NP 细胞表型。这种现象可能与软水凝胶基质更适合 NP 细胞 YAP 机械信号在细胞质中表达, 而在硬水凝胶基质中 YAP 信号在细胞核表达, 可能会引起细胞表型丢失^[21]。水凝胶材料是高度含水的三维网络, 具有仿生细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 的优点。其中明胶作为一种天然来源的水凝胶, 可以促进细胞黏附的多肽序列^[22,23], 机械性能灵活可调控, 更有助于细胞黏附生长。因此, 明胶及其改性材料适用于细胞培养。

GelMA 水凝胶一种新型组织工程材料, 是对明胶进行光基团修饰后合成, 保留了明胶良好的生物相容性, 且机械性能可以大幅度调节^[24], 已成为生物医学应用研究的热点, 尤其是在骨科领域^[25]。本研究中, 分别通过光交联 3%、4% 和 5% 的 GelMA 和人工虎骨粉溶液, 制备获得不同刚度的 GelMA 基质。利用软水凝胶基质培养细胞, NP 细胞形态可以明显铺展并增殖, 而在硬水凝胶基质组中细胞生长状态较差, 形态皱缩, 并没有增殖。不难发现, 在软基质中可以更好的维持 NP 细胞的固有形态和生理功能, 有益于椎间盘结构的恢复。

炎症反应在 IVDD 发生发展过程中起着重要的作用, 在炎症因子和趋化因子的刺激下, 巨噬细胞被激活并聚集到髓核组织区域, 引起细胞浸润并分泌炎症因子于 NP 细胞, 形成炎症微环境, 影响 NP 细胞的生物学功能, 出现细胞增殖抑制、细胞凋亡、ECM 代谢失衡等异常表现^[26,27]。各种实验研究也证实 JTG 能够有效降低血清中促炎症细胞因子 IL-6、TNF- α 及 MMP-9 水平, 达到抑制小鼠关节局部炎症, 在临床上仅被广泛应用于骨质疏松的治疗^[28], 这使得其有可能成为 IVDD 的潜在治疗手段, 但目前仍然需要大量实验的支持。本研究中我们尝试将 GelMA 水凝胶材料与人工虎骨粉联合, 观察人工虎骨粉在椎间盘 NP 细胞炎症, 以及椎间盘组织炎症中的抗炎作用, 进而更全面地了解

人工虎骨粉对 IVDD 的疗效, 为扩大其临床应用提供实验依据。

本研究中, 模型组中大鼠炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 水平明显升高, 而使用 JTG-GelMA 水凝胶体系治疗 IVDD 明显改善了炎症反应, 并且高浓度的人工虎骨粉组中改善效果越明显, 椎间盘组织的退变程度也随着微环境中的炎症反应减轻而逐渐恢复, 此外, IVDD 是多种因素相互作用并参与调节的复杂过程, 研究表明 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、神经生长因子、生物力学载荷等因素调节椎间盘免疫炎症反应等过程^[29,30], 相关作用机制有待于进一步深入探讨。

综上所述, 本研究构建了不同刚度的复合 GelMA 水凝胶支架对 NP 细胞体外培养, 结果显示低刚度的 JTG-GelMA 水凝胶体系具有更好的细胞相容性, 可以保持 NP 细胞表型和功能, 使用高浓度人工虎骨粉处理 IVDD 大鼠模型, 明显改善了椎间盘组织病理损伤和炎症反应, 体内治疗退变椎间盘具有较好的疗效。

参考文献 (References)

- [1] Bahar ME, Hwang JS, Ahmed M, et al. Targeting Autophagy for Developing New Therapeutic Strategy in Intervertebral Disc Degeneration [J]. *Antioxidants*, 2022, 11: 1571.
- [2] Guo W, Li B, Zhao J, et al. Causal associations between modifiable risk factors and intervertebral disc degeneration[J]. *Spine J*, 2024, 24(2): 195-209.
- [3] Li Z, Zhang Y, Zhao Y, et al. Graded-Three-Dimensional Cell-Encapsulating Hydrogel as a Potential Biologic Scaffold for Disc Tissue Engineering[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2022, 19(5): 1001-1012.
- [4] 王超锋, 张超, 徐成, 等. hBMP7 基因修饰的髓核细胞与同种异体椎间盘复合后体内原位移植的实验研究[J]. *骨科*, 2018, 9(4): 306-312.
- [5] Su D, Bai X, He X. Research progress on hydrogel materials and their antifouling properties [J]. *Eur Polymer J*, 2022, 181: 111666.
- [6] Zhu Z, Yu Q, Li H, et al. Vanillin-based functionalization strategy to construct multifunctional microspheres for treating inflammation and regenerating intervertebral disc [J]. *Bioact Mater*, 2023, 28: 167-182.
- [7] 宁庆, 李明, 李玉希, 等. 腰椎间盘突出纤维环修复的

- 研究进展 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2023, 33(8): 753-759.
- [8] Luo Z, Zhang Y, Ye X. Safety of Jintiang capsule in treating bone and joint diseases: a Meta-analysis[J]. J Navy Med, 2023, 44(11): 1126-1136.
- [9] Fu Y, Wang W, Zhan M, et al. Efficacy of the Chinese herbal medicine Jintiang capsules in the postoperative treatment of osteoporotic vertebral compression fractures: a systematic review and meta-analysis[J]. Front Med, 2023, 10: 1289818.
- [10] Xie M, Gao Q, Zhao H, et al. Electro-Assisted Bioprinting of Low-Concentration GelMA Microdroplets [J]. Small, 2019, 15(4): e1804216.
- [11] Xia W, Zhang L, Mo J, et al. Effect of Static Compression Loads on Intervertebral Disc: An in Vivo Bent Rat Tail Model [J]. Orthop Surg, 2018, 10(2): 134-143.
- [12] Che Y, Guo J, Liang T, et al. Assessment of changes in the micro-nano environment of intervertebral disc degeneration based on Pfirrmann grade [J]. Spine J, 2019, 19(7): 1242-1253.
- [13] Zhang C, Zhang X, Chai Y, et al. Proteomic study of Jintiang capsule in the treatment of retinoic acid-induced osteoporosis rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(35): 5634-5641.
- [14] Yu H, Liu Y, Xie W, et al. IL-38 alleviates the inflammatory response and the degeneration of nucleus pulposus cells via inhibition of the NF-kappaB signaling pathway in vitro [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 85: 106592.
- [15] Li P, Zhang M, Chen Z, et al. Tissue-Engineered Injectable Gelatin-Methacryloyl Hydrogel-Based Adjunctive Therapy for Intervertebral Disc Degeneration [J]. ACS Omega, 2023, 8(15): 13509-13518.
- [16] Riahinezhad H, Amsden BG. In situ forming, mechanically resilient hydrogels prepared from 4a-[PEG-b-PTMC-Ac] and thiolated chondroitin sulfate for nucleus pulposus cell delivery [J]. J Mater Chem B, 2024, 12(5): 1257-1270.
- [17] Zhang Z, Qin F, Feng Y, et al. Icaritin regulates stem cell migration for endogenous repair of intervertebral disc degeneration by increasing the expression of chemotactic cytokines [J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1): 63-74.
- [18] Gansau J, Grossi E, Rodriguez L, et al. Intervertebral disc cells from human back pain subjects exhibit TNFR1 mediated senescence and lack TNFR2-modulated repair capacity[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2024, 25: 89-95.
- [19] Shu L, Zhang J. Effect of Artificial Tiger Bone Powder (Jintiang Capsule (R)) on Vertebral Height Ratio, Cobb's Angle, Bone Mineral Density, and Visual Analog Score [J]. Orthop Surg, 2022, 14(2): 427-434.
- [20] Liang H, Wang O, Cheng Z, et al. Jintiang combined with alfacalcidol improves muscle strength and balance in primary osteoporosis: A randomized, double-blind, double-dummy, positive-controlled, multicenter clinical trial [J]. J Orthop Translat, 2022, 35: 53-61.
- [21] Gong Y, Qiu J, Jiang T, et al. Maltol ameliorates intervertebral disc degeneration through inhibiting PI3K/AKT/NF-kappaB pathway and regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(1): 369-84.
- [22] Ke W, Liao Z, Liang H, et al. Stiff Substrate Induces Nucleus Pulposus Cell Ferroptosis via YAP and N-Cadherin Mediated Mechanotransduction [J]. Adv Healthc Mater, 2023, 12(23): e2300458.
- [23] Tevenson AT, Jankus DJ, Tarshis MA, et al. The correlation between gelatin macroscale differences and nanoparticle properties: providing insight into biopolymer variability [J]. Nanoscale, 2018, 10(21): 10094-10108.
- [24] Manthrammel MA, Shkir M, Zahran HY, et al. Facile Synthesis Optical-Dielectric-Electrical Studies on Carbon-Coated ZnO: An Effect of Gelatin [J]. Electron, 2020, 49(3): 2144-2150.
- [25] Xu P, Lou L, Zhan W, et al. Bicomponent hydrogel laden with TGF- β 3-nucleus pulposus stem cells for disc degeneration repair [J]. Chem Eng. J, 2024, 49(3): 2144-2150.
- [26] Xu P, Guan J, Chen Y, et al. Stiffness of photocrosslinkable gelatin hydrogel influences nucleus pulposus cell properties in vitro [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(2): 880-891.
- [27] Wang Z, Hu X, Cui P, et al. Progress in understanding the role of cGAS-STING pathway associated with programmed cell death in intervertebral disc degeneration [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 377.
- [28] 程金莲, 张翔, 潘汉升, 等. 金天格胶囊治疗原发性骨质疏松症前瞻性多中心随机双盲对照临床试验[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 36-41.
- [29] Qiu C, Wu X, Bian J, et al. Differential proteomic analysis of fetal and geriatric lumbar nucleus pulposus: immunoinflammation and age-related intervertebral disc degeneration [J]. BMC Musculoskel Dis, 2020, 21(1): 339-351.
- [30] Guo Z, Qiu C, Mecca C, et al. Elevated lymphotoxin-alpha (TNFbeta) is associated with intervertebral disc degeneration [J]. BMC Musculoskel Dis, 2021, 22(1): 77-87.