

王飞燕,李志凌,尹博丰,等. 可评价注射式再生支架修复效果的小鼠骨缺损模型的构建研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 985-992.

Wang FY, Li ZL, Yin BF, et al. Establishment of a mouse bone defect model to evaluate the repair effect of injectable regenerative scaffolds [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 985-992.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.08.002

可评价注射式再生支架修复效果的小鼠骨缺损模型的构建研究

王飞燕^{1,2},李志凌²,尹博丰²,李佩霖²,郝瑞聪^{1,2},韩梦月^{1,2},
李晓彤²,田家仪^{2,3},丁丽³,武文卿^{4*},朱恒^{1,2*}

(1. 安徽医科大学基础医学院,合肥 230032;2. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所,北京 100850;
3. 空军特色医学中心血液科,北京 100142;4. 军事科学院军事医学研究院实验动物中心,北京 100071)

【摘要】 目的 建立小鼠股骨缺损模型并探索甲基丙烯酸酯化明胶 (gelatin methacryloyl, GelMA) 对缺损后骨再生的影响。**方法** 将 40 只 8 周龄的雌性 C57BL/6N 小鼠随机分成 4 组:骨缺损组 ($n = 10$), 5% GelMA 组 ($n = 10$), 10% GelMA 组 ($n = 10$), 15% GelMA 组 ($n = 10$)。造模 2 周后,使用 HE 染色观察股骨组织结构;使用 Masson 染色观察股骨胶原纤维形态;使用 OCN 免疫组化染色分析骨特异性蛋白表达水平。**结果** GelMA 具有良好的可注射性,可经 PCR Pipettes 移液器注入骨缺损区。HE 染色结果表明 10% GelMA 组相较于骨缺损组、5% GelMA 组和 15% GelMA 组具有更好的骨修复效果,缺损部位组织结构更加完整;Masson 染色结果表明 10% GelMA 组有更多成骨相关的胶原纤维形成;RT-qPCR 分析显示,10% GelMA 组小鼠骨缺损部位 OCN 表达显著高于骨缺损组 ($P < 0.001$)、5% GelMA 组 ($P < 0.01$) 和 15% GelMA 组 ($P < 0.01$)。10% GelMA 组小鼠骨缺损部位 Osterix 表达显著高于骨缺损组 ($P < 0.001$)、5% GelMA 组 ($P < 0.001$) 和 15% GelMA 组 ($P < 0.01$);OCN 免疫组化染色结果表明 10% GelMA 组的修复区骨特异性蛋白表达显著高于骨缺损组 ($P < 0.01$)、5% GelMA 组 ($P < 0.01$) 和 15% GelMA 组 ($P < 0.05$)。**结论** 构建了可评价注射式再生支架修复效果的小鼠骨缺损模型,并应用于基于 GelMA 的可注射再生支架筛选和治疗效果评价,为开展相关领域工作提供实验基础。

【关键词】 可注射式再生支架;骨缺损模型;甲基丙烯酸酯化明胶;骨再生;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 08-0985-08

Establishment of a mouse bone defect model to evaluate the repair effect of injectable regenerative scaffolds

WANG Feiyan^{1,2}, LI Zhiling², YIN Bofeng², LI Peilin², HAO Ruicong^{1,2}, HAN Mengyue^{1,2},
LI Xiaotong², TIAN Jiayi^{2,3}, DING Li³, WU Wenqing^{4*}, ZHU Heng^{1,2*}

(1. Basic Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230032, China. 2. Institute of Radiation Medicine, Military Medical College, Beijing 100850. 3. Air Force Medical Center, Hematology Department, Beijing 100142.
4. Experimental Animal Center, Military Medical College, Beijing 100071)

Corresponding author: WU Wenqing. E-mail:wwq5206@sina.com; ZHU Heng. E-mail:zhudingdingabc@163.com

【基金项目】 国家干细胞重点研发专项 (2022YFA1104100, 2022YFA1103500), 国家自然科学基金 (82172388, 81871771, 81500083, 81572159), 北京自然科学基金 (7192203, 7182123, L212065)。

Funded by the National Stem Cell Research and Development Project (2022YFA1104100, 2022YFA1103500), National Natural Science Foundation of China (82172388, 81871771, 81500083, 81572159), Beijing Natural Science Foundation (7192203, 7182123, L212065).

【作者简介】 王飞燕 (1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 干细胞与再生医学。Email: w135329@163.com

【通信作者】 武文卿 (1984—), 助理研究员, 研究方向: 实验动物管理。Email: wwq5206@sina.com;

朱恒 (1978—), 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向: 干细胞与再生医学。Email: zhudingdingabc@163.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To establish a mouse femoral bone defect model and explore the effect of a GelMA hydrogel on bone regeneration and repair. **Methods** Forty 8-week-old female C57BL/6N mice were randomly divided into four groups: bone defect group ($n = 10$), 5% GelMA group ($n = 10$), 10% GelMA group ($n = 10$), and 15% GelMA group ($n = 10$). At 2 weeks after modeling, HE staining was used to observe the femur structure. Masson staining was used to observe the morphology of femoral collagen fibers. OCN immunohistochemical staining was used to analyze bone-specific protein expression levels. **Results** GelMA was well injectable and injected into bone defects using PCR pipettes. HE staining showed that the 10% GelMA group had a better bone repair effect than bone defect, 5% GelMA, and 15% GelMA groups, and the tissue structure of the defect site was more complete. Masson staining showed more osteogenic collagen fibers in the 10% GelMA group. RT-qPCR analysis showed that OCN expression in the bone defect site in the 10% GelMA group was significantly higher than that in the bone defect group ($P < 0.001$), 5% GelMA group ($P < 0.01$), and 15% GelMA group ($P < 0.01$). Osterix expression in the bone defect site in the 10% GelMA group was significantly higher than that in the bone defect group ($P < 0.001$), 5% GelMA group ($P < 0.001$), and 15% GelMA group ($P < 0.01$); OCN immunohistochemical staining showed that bone-specific protein expression in the repair area in the 10% GelMA group was significantly higher than that in the bone defect group ($P < 0.01$), 5% GelMA group ($P < 0.01$), and 15% GelMA group ($P < 0.05$). **Conclusions** A mouse bone defect model to evaluate the repair effect of injectable regenerative scaffolds was established and applied to the screening and therapeutic effect evaluation of injectable regenerative scaffolds based on GelMA, which provides an experimental basis to carrying out studies in related fields.

[Keywords] injectable regeneration stent; bone defect model; gelatin methacryloyl (GelMA); bone regeneration; mouse

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨缺损^[1]是临床上较为常见的骨损伤类型之一。严重开放性骨折、高能量创伤、爆炸伤、需要清创处置的骨感染和骨肿瘤切除术等多种场景均会导致骨缺损发生。虽然骨组织有一定的自我修复能力^[2],但如果缺损组织较多,机体很难完全自我恢复骨的结构与功能^[3]。此外骨缺损区域往往呈不规则状,事先预制的填充材料往往不能完成无缝隙填充,影响了再生修复的效果^[4]。

目前骨缺损的主要治疗方法有骨移植^[5]、骨组织工程技术^[6]、基因治疗^[7]等。骨移植是治疗骨缺损的常用且有效方法之一,其主要包括自体骨移植和异体(异种)骨移植及人工骨修复材料三大类。自体骨来源有限^[8],同种异体骨也具有免疫原性和交叉感染的潜在危险以及伦理学的限制^[9],人工骨修复材料目前仍存在活性不足和骨传导性差等缺点^[10]。在临床迫切需求的驱动下,骨组织工程技术应运而生^[11]。骨再生生物材料是一类组织工程支架^[12],可以支持骨缺损部位的再生过程^[13],同时原位降解后能够被新生成的骨组织取代^[14]。近年来,水凝胶^[15]、纳米纤维支架^[16]、3D 打印复合支架^[17]等多种形式的骨修复材料已取得重要进展^[18],其中水凝胶显示出与水相似的物理特性,可以模拟人体的组织环境,以最小的侵入方式为缺损部位提供结构支持,使骨缺损通过内在愈合机制进

行再生修复,具有独特的优势^[19]。

甲基丙烯酸酯化明胶(gelatin methacryloyl, GelMA)为烯烃双键改性明胶,是一种光敏性的生物水凝胶材料^[20]。GelMA 水凝胶具有优异的生物相容性和细胞反应特性^[21],例如提供合适的细胞粘附位点^[22],因此可以取代人工基底膜或其他天然胶原蛋白水凝胶^[23]。此外, GelMA 水凝胶具有良好的机械性能,用 GelMA 构建的 3D 微支架可根据需求调整其机械特性^[24]。研究表明,通过可注射 GelMA 水凝胶递送的人尿液来源的干细胞外泌体加速骨再生^[25]。

小鼠是一种常用的实验动物,便于构建基因动物模型,有利于从分子、细胞和动物等多水平评价再生支架材料^[26]。目前关于小鼠骨缺损模型应用于可注射式再生支架评估的相关研究数量稀少,相关领域工作进展缓慢。基于此,本研究旨在建立基于可注射式再生支架的小鼠股骨缺损再生修复模型,探究 GelMA 对小鼠股骨缺损再生修复的影响,为将来研究可注射式再生支架修复骨缺损提供一种小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只 8 周龄健康雌性 SPF 级 C57BL/6N 小鼠,

体重 16 ~ 22 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。小鼠饲养于军事医学研究院实验动物中心【SYXK(京)2017-0023】, 常规饲料喂养, 自由饮食水, 日光灯 12 h 明暗交替, 温度 22 ~ 24℃, 相对湿度 40% ~ 55%。本实验所有操作均经过军事医学研究院实验动物中心实验伦理审批(IACUC-DWZX-2023-505)。

1.1.2 主要试剂与仪器

甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA)(苏州永沁泉智能设备有限公司), 型号: EFL-GM-60, 组分 A: GelMA, 白色海绵状, 每瓶 1 g; 组分 B: 光引发剂 LAP, 白色粉末状, 每瓶 0.05 g; 4% 通用型组织固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司); 兔抗小鼠抗体 OCN (23418-1-AP, proteintech); Masson 三色染色液试剂盒(G1006-20 ML, 武汉塞维尔生物科技有限公司); 苏木精-伊红(HE)高清恒染试剂盒(G1076-500 ML, 武汉塞维尔生物科技有限公司); 组织 RNA 提取试剂盒 plus(RN002plus, ES Science); PCR Pipettes (5-000-1001-x10, Drummond Scientific Company)。紫外光固化电源(苏州永沁泉智能设备有限公司); 双孔恒温水浴锅(LC-WB-2, LICHEN 力辰); 低速台式离心机(湘仪 L500); 正置光学显微镜和成像系统均为日本尼康产品。

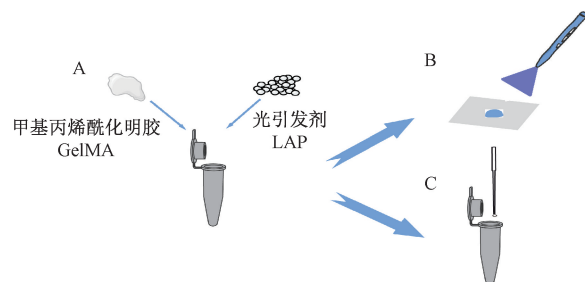
1.2 方法

1.2.1 可注射式再生支架的制备

(1) 光敏性可注射式再生支架原理: 甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA)为烯炔双键改性明胶, 其可通过紫外光及可见光在光引发剂作用下迅速固化成胶。GelMA 光固化水凝胶兼具天然和合成生物材料的特征, 具有适于细胞生长和分化的三维(3D)结构。

(2) 光敏性可注射式再生支架配置: 首先配制 0.25% 光引发剂标准溶液, 向装有光引发剂 LAP (0.25 g) 的棕色瓶中加入 10 mL PBS, 40 ~ 50℃ 水浴加热 15 min, 期间振荡数次, 使其充分溶解, 分装至 10 mL 离心管中, 每管 0.5 mL, 再加 4.5 mL PBS, 配制成终浓度 0.25% 的标准溶液, 该标准液可在 4℃ 避光下保存 12 个月。接着配制 15% (w/v) GelMA 浓缩溶液, 称取 0.09 g GelMA, 放入避光离心管中, 加 600 μ L 上述光引发剂标准溶液(图 1A); 60 ~ 70℃ 水浴加热 20 ~ 30 min, 期间振荡数次, 使其充分溶解; 立即用 0.22 μ m 除菌滤器过滤灭菌, 并将其分装后分别稀释为 5%、10%、15% 3 个浓度, 5%: 取 50 μ L GelMA 浓缩液 + 100 μ L LAP 标准液;

10%: 取 100 μ L GelMA 浓缩液 + 50 μ L LAP 标准液; 15%: 取 150 μ L GelMA 浓缩液。使用紫外光评估 3D 微支架 GelMA 的光固化性(图 1B), 使用 PCR Pipettes 移液器评估 3D 微支架 GelMA 的可注射性(图 1C)。



注: A: 白色海绵状 GelMA 和颗粒状光引发剂 LAP 按比例配置成 GelMA 水凝胶; B: GelMA 水凝胶具有光固化性; C: GelMA 水凝胶具有可注射性。

图 1 GelMA 水凝胶制备过程

Note. A. White spongy GelMA and granular photoinitiator LAP are proportionally configured to form GelMA hydrogel. B. GelMA hydrogel is photocuring. C. GelMA hydrogel is injectable.

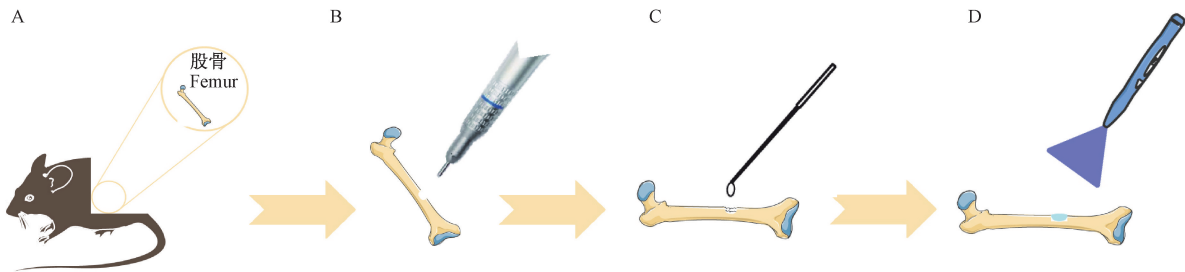
Figure 1 GelMA hydrogel preparation process

1.2.2 小鼠股骨缺损动物分组及模型干预

小鼠正常喂养 1 周后随机分为 4 组: 骨缺损组 ($n = 10$), 5% GelMA 组 ($n = 10$), 10% GelMA 组 ($n = 10$), 15% GelMA 组 ($n = 10$)。用 2% 戊巴比妥钠(按 0.25 ~ 0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉小鼠, 剥离小鼠大腿皮肤、肌肉组织和骨膜, 完全暴露股骨外侧面(图 2A); 随后, 各组操作如下, 骨缺损组: 使用钻头直径为 1 mm 的 STRONG90 微型直流高速调速电钻在股骨中、下 1/3 交界点制备骨缺损模型^[18], 确认深度可达骨髓腔, 同时不穿过对侧皮质骨(图 2B); 5% GelMA 组: 造模方式同骨缺损组, 后用 PCR Pipettes 移液器向缺损处注射 5% GelMA (2 ~ 3 μ L)(图 2C); 10% GelMA 组: 造模方式同骨缺损组, 后用 PCR Pipettes 移液器向缺损处注射 10% GelMA (2 ~ 3 μ L); 15% GelMA: 造模方式同骨缺损组, 后用 PCR Pipettes 移液器向缺损处注射 15% 水凝胶 (2 ~ 3 μ L)。每组注射结束后, 均立刻用紫外光固化电源在骨缺损位置照射 30 s(图 2D), 最后小心对位缝合肌肉和皮肤, 整个过程严密消毒。

1.2.3 HE 染色

造模 2 周后^[13], 将小鼠麻醉处死, 取造模侧股骨用 4% 通用型组织固定液固定 48 h, 10% EDTA 脱钙, 石蜡包埋、切片, 制备骨缺损区域的 5 μ m 矢状切片, 使用 HE 高清恒染试剂盒, 将切片置于二甲苯



注:A:切开并剥离小鼠大腿皮肤、肌肉组织,暴露骨面;B:制备骨缺损模型;C:将 GelMA 水凝胶注射至小鼠骨缺损区;D:使用紫外光固化电源在骨缺损处照射 30 s。

图 2 小鼠股骨缺损模型建立及 GelMA 水凝胶注射过程

Note. A. Skin and muscle tissue of mouse femur were cut and peeled off to expose the bone surface. B. Bone defect model was prepared. C. GelMA hydrogel was injected into the bone defect area of mice. D. Bone defect was irradiated for 30 s by ultraviolet curing power.

Figure 2 Establishment of mouse femur bone defect model and GelMA hydrogel injection process

中脱蜡,随后放入苏木素染液 0.5 ~ 1 min;自来水漂洗,1%盐酸乙醇分化 3 ~ 5 s;自来水漂洗,然后 1%氨水溶液返蓝 1 min;流水冲洗 20 s,放入伊红染液中染色 15 ~ 30 s;流水漂洗,依次放入 75%乙醇 2 min, 85%乙醇 2 min,无水乙醇 5 min,无水乙醇 5 min,环保型脱蜡透明液透明 5 min,最后用中性树胶封片,倒置显微镜下观察骨组织形成情况。

1. 2. 4 Masson 染色

使用 Masson 三色染色液进行 Masson 染色。切片常规脱蜡,用配制好的 Weigert 铁苏木素染色 5 ~ 10 min;用酸性乙醇分化液分化,水洗;用 Masson 蓝分化液返蓝,水洗;丽春红品红染色液染色 5 ~ 10 min;以 2%冰醋酸水溶液洗 1 min;1%磷钼酸水溶液分化 3 ~ 5 min,2%冰醋酸水溶液洗 1 min;不经水洗,直接用苯胺蓝水溶液或 1%光绿水溶液染 1 ~ 2 min;以 0. 2%冰醋酸水溶液洗 1 min;95%乙醇脱水 2 ~ 3 s,无水乙醇脱水 3 次,每次 5 s,环保型脱蜡透明液透明 3 次,每次 1 min,中性树胶封固。

1. 2. 5 RT-qPCR 分析

取各组小鼠造模侧股骨缺损处组织,放入做好标记的 Ep 管内,按照组织 RNA 提取试剂盒说明书提取骨组织总 RNA。计算样品总 RNA 浓度;根据小鼠 OCN、Osterix 序列,使用 Premier 5. 0 设计合成扩增 OCN、Osterix 片段的特异性引物(以 GAPDH 基因作为内参),进行引物序列设计(见表 1);根据反转录以及 PCR 反应体系,进行 RT-qPCR 实验。为减少误差,各组 OCN、Osterix 的表达水平均以相对表达量表示。

1. 2. 6 免疫组织化学染色

取材、固定、包埋、切片方法同 HE 和 Masson 染

表 1 各检测基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of each detected gene	
基因 Gene	序列 Sequence
OCN	F:5'-GGAAAGGAGGCACAAAGAAGC-3' R:5'-CCCCTTAGGCACTAGGAGC-3'
Osterix	F:5'-GAACAGACAAGTCCCACACAGC-3' R:5'-TCAGCAGAGTGAGCAGAAAGAT-3'
GAPDH	F:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTC-3' R:5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

色,石蜡切片梯度乙醇脱水,用内源性过氧化物酶淬灭、抗原修复并阻断非特异性结合位点后,将股骨切片与 OCN 抗体一起孵育过夜,接着滴加与一抗相应种属的二抗孵育 1 h,最后 DAB 显色,复染细胞核,脱水封片,光学显微镜采图。

1. 3 统计学分析

所有计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Prism 8. 0. 1 软件进行绘图,两组比较采用 *t* 检验,*P* < 0. 05 为具有统计学意义。

2 结果

2. 1 组织学观察

2. 1. 1 HE 染色

HE 染色观察骨缺损处的组织结构。术后 2 周,骨缺损组大部分骨小梁仍处于重塑期,骨小梁排列连续性、致密性较差;10% GelMA 组骨组织结构及骨缺损愈合情况显著优于其他各组。显微镜下可见较多成熟骨小梁,结构连续,排列整齐、致密;5% GelMA 组和 15% GelMA 组,成熟骨小梁数量少于 10% GelMA 组,见少量骨组织形成,但骨小梁排列整齐性、连续性、致密性较 10% GelMA 组差,

如图 3。

2. 1. 2 Masson 染色

Masson 骨胶原染色观察骨缺损处的新骨形成情况。其结果显示 4 组均可见骨缺损部位出现蓝染

的新生骨和骨胶原组织,其间夹杂呈点状或条状分布的红染纤维组织。其中 10% GelMA 组的新生骨量面积及胶原、纤维组织生成明显多于骨缺损组、5% GelMA 组和 15% GelMA 组,如图 4。

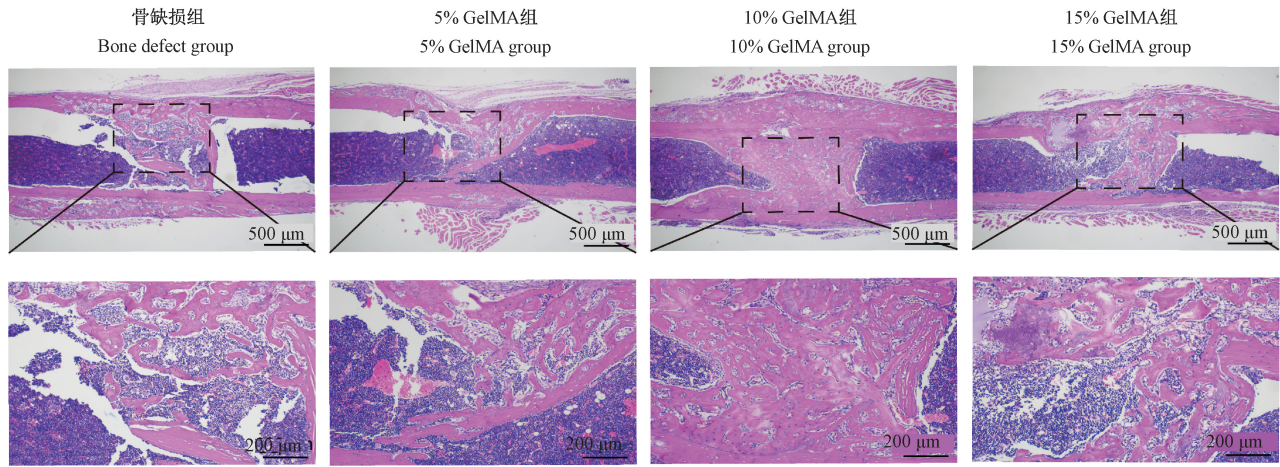


图 3 植入 GelMA 后各组小鼠股骨缺损区(HE 染色, $n \geq 3$)

Figure 3 Femur defect of mice in each group after GelMA implantation (HE staining, $n \geq 3$)

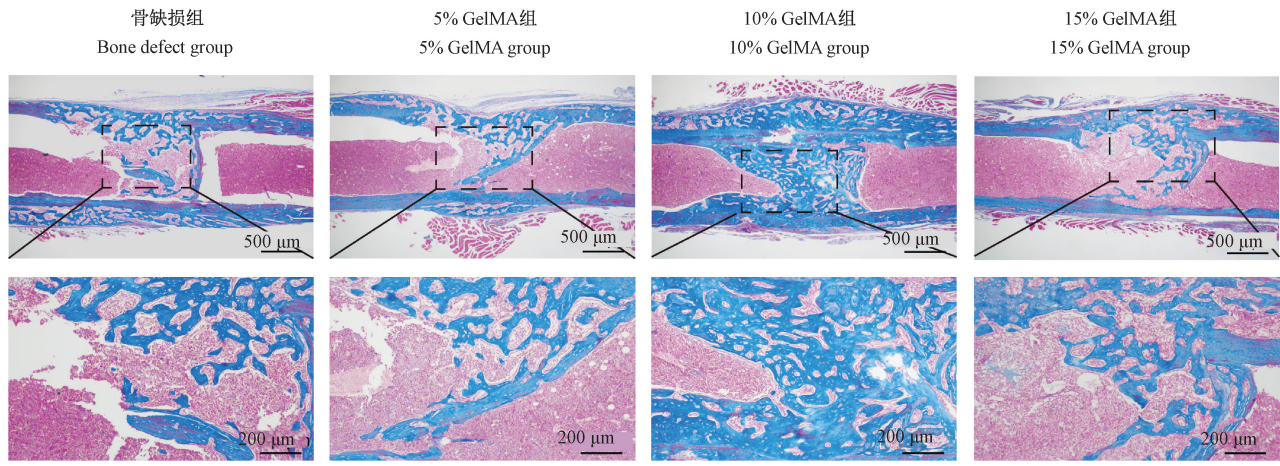


图 4 植入 GelMA 后各组小鼠股骨缺损区(Masson 染色, $n \geq 3$)

Figure 4 Femoral defect of mice in each group after GelMA implantation (Masson staining, $n \geq 3$)

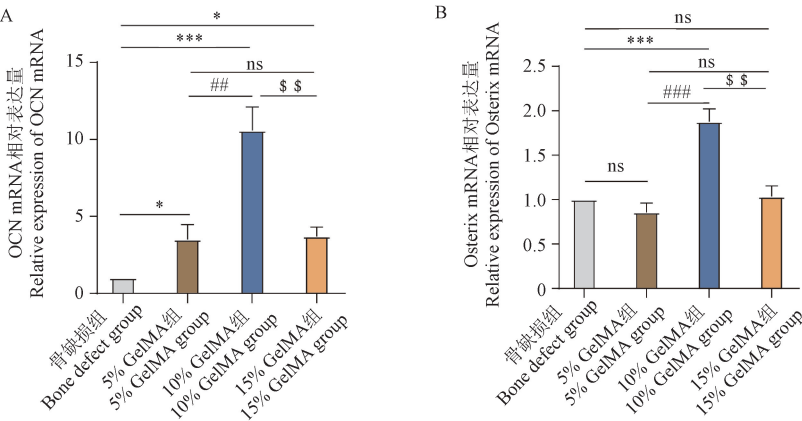
2. 2 RT-qPCR 分析

OCN mRNA 检测显示:10% GelMA 组小鼠骨缺损部位 OCN 表达显著高于骨缺损组($P < 0.001$)、5% GelMA 组($P < 0.01$)和 15% GelMA 组($P < 0.01$);5% GelMA 组和 15% GelMA 组相比 OCN mRNA 水平无显著差异,但都高于骨缺损组,如图 5A。Osterix mRNA 检测显示:10% GelMA 组 Osterix mRNA 表达水平明显高于骨缺损组($P < 0.001$)、5% GelMA 组($P < 0.001$)和 15% GelMA 组($P < 0.01$);5% GelMA 组和 15% GelMA 组与骨缺损组

相比 Osterix mRNA 表达水平无显著差异,如图 5B。

2. 3 免疫组化染色分析

免疫组化染色观察成骨标志物 OCN 在各组股骨缺损处的表达情况。结果显示 5% GelMA 组 OCN 蛋白表达量与骨缺损组比无统计学意义;10% GelMA 组 OCN 蛋白表达量明显高于骨缺损组($P < 0.01$)、5% GelMA 组($P < 0.01$)和 15% GelMA 组($P < 0.05$);15% GelMA 组 OCN 蛋白表达高于骨缺损组($P < 0.05$),低于 10% GelMA 组($P < 0.05$),和 5% GelMA 组比无统计学意义,如图 6。

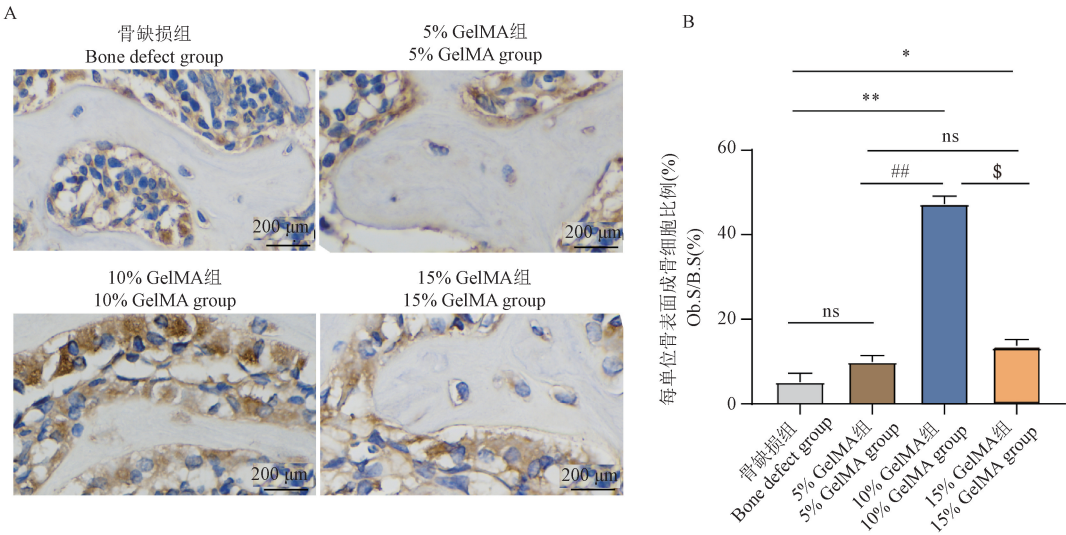


注:与骨缺损组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与5% GelMA 组相比,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与10% GelMA 组相比,## $P < 0.01$ 。(下图同)

图5 各组小鼠骨缺损组织 RT-qPCR 表达情况($n \geq 3$)

Note. Compared with bone defect group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with 5% GelMA group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. Compared with 10% GelMA group, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 5 Expression of RT-qPCR in bone defect tissue of mice in each group($n \geq 3$)



注:A:植入 GelMA 后各组小鼠股骨缺损区 OCN 免疫组化染色;B:OCN 免疫组化染色定量分析;与骨缺损组相比,** $P < 0.01$;与10% GelMA 组相比,\$ $P < 0.05$ 。

图6 各组 OCN 免疫组化染色与定量分析($n \geq 3$)

Note. A. OCN immunohistochemical staining of femur defect in each group after GelMA implantation. B. Quantitative analysis of OCN immunohistochemical staining. Compared with bone defect group, ** $P < 0.01$. Compared with 10% GelMA group, \$ $P < 0.05$.

Figure 6 OCN immunohistochemical staining and quantitative analysis of each group($n \geq 3$)

3 讨论

骨缺损是指骨的结构完整性被破坏,常见于军事作业、创伤和骨病手术后等场景。通常情况下,大段、大面积的骨缺损无法进行自我修复,需要借助临床技术干预。目前临床上主要通过骨移植术修复骨缺损,但自体骨移植需要进行手术同时其材

料来源有限,限制了其可用性。同种异体骨移植与异种骨移植虽然无需额外手术同时也克服了材料限制,但可能会产生某些免疫排斥反应,影响移植骨的存活率并增加患传染疾病的风险,且受到伦理学的限制^[27]。因此,寻找更安全、有效的骨缺损修复材料,并构建适宜的动物模型对相关材料进行评价仍是骨再生领域亟待解决的重要问题。

新型光敏水凝胶材料甲基丙烯酸酯化明胶 (GelMA) 近来日益受到关注。这种类似于天然细胞外基质 (ECM) 的水凝胶材料不仅能够通过刺激细胞来形成具有机械整合性的功能组织, 而且还能确保移植植物在植入后能继续存活^[28]。GelMA 还具有优异的生物相容性和物理可塑性^[29], 与其他可用的水凝胶生物材料相比, 更能满足组织再生修复的需求。虽然 GelMA 已经被应用于多种临床前场景开展研究, 但是有关其在小鼠骨缺损模型中的修复作用及其评价体系报道不多, 这限制了对于 GelMA 支架的筛选^[30], 以及修复作用相关的细胞和分子机制的评价, 不利于优化可注射式骨再生支架材料的安全性和有效性。

本研究选择建立小鼠股骨缺损模型来评价 GelMA 水凝胶对小鼠骨创伤的再生修复作用。早期研究表明, 颅骨血液运行较差, 且离中枢神经系统较近, 不利于构建复杂骨缺损模型, 同时颅骨缺损模型无法用来评估骨髓腔是否再通的修复效果。在后期的长骨骨缺损模型中发现, 胫骨靠近腓骨, 且外观呈三角形, 因此在一定程度会影响骨修复过程。而股骨外观呈管状, 内外径相对一致, 与胫骨和颅骨相比可以提供如放创复合伤、骨缺合并感染等更复杂的骨缺损模型。而且股骨作为负重骨, 可以更加客观地评价骨修复过程中的力学载荷情况。因小鼠具备较强的抗感染能力, 便于集中管理, 且整体死亡率较低, 因此本文选用小鼠股骨进行骨缺损建模^[31]。在成功建立模型的基础上, 利用 GelMA 自身的可注射性, 配置 5%、10%、15% 共 3 个不同浓度的 GelMA 体系, 将其注射至小鼠股骨缺损处, 待其填满整个缺损区后用紫外光源固化。造模 2 周后发现, 随着支架材料降解, 各组均有不同程度的新生骨组织形成。以 HE 染色和 Masson 染色鉴别新生骨组织和骨胶原纤维; RT-qPCR 鉴定成骨基因 OCN、Osterix mRNA 表达水平; OCN 免疫组化鉴定骨缺损处骨特异性蛋白表达情况。最后得出结论, 相比于骨缺损组、5% GelMA 组与 15% GelMA 组, 10% GelMA 组骨缺损处骨小梁较为成熟, 缺损附近有大量新骨形成, 这也通过 RT-qPCR 及免疫组织染色得到了验证。综上, 本研究建立了一种简便易行的小鼠骨缺损模型, 并运用此模式发现了可加速骨缺损修复的适宜浓度 GelMA 可注射支架材料。

本研究结果具有较好的实践意义, 一方面该模型可以用于其他材质的可注射式再生支架的体内

评价, 另一方面该模型可以评价携带了干细胞和生物活性因子的可注射式再生修复支架的修复效果, 并开展相关机制研究。但是, 同时也应当看到, 本研究的结果是基于小型实验动物得到的, 大动物甚至人体临床研究的结果对于可注射式再生支架的评价更为重要, 需要系统而深入的后继工作。

参 考 文 献 (References)

- [1] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions [J]. BMC Med, 2011, 9: 66.
- [2] Salhotra A, Shah HN, Levi B, et al. Mechanisms of bone development and repair [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 696–711.
- [3] Zha Y, Li Y, Lin T, et al. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects [J]. Theranostics, 2021, 11(1): 397–409.
- [4] Agarwal R, García AJ. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 94: 53–62.
- [5] Hofmann A, Gorbulev S, Guehring T, et al. Autologous iliac bone graft compared with biphasic hydroxyapatite and calcium sulfate cement for the treatment of bone defects in tibial plateau fractures: a prospective, randomized, open-label, multicenter study [J]. J Bone Joint Surg Am, 2020, 102(3): 179–193.
- [6] Li W, Liu W, Wang W, et al. Sinusoidal electromagnetic fields accelerate bone regeneration by boosting the multifunctionality of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 234.
- [7] Panos JA, Coenen MJ, Nagelli CV, et al. IL-1Ra gene transfer potentiates BMP2-mediated bone healing by redirecting osteogenesis toward endochondral ossification [J]. Mol Ther, 2023, 31(2): 420–434.
- [8] Dai W, Leng X, Wang J, et al. Quadriceps tendon autograft versus bone-patellar tendon-bone and hamstring tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review and meta-analysis [J]. Am J Sports Med, 2022, 50(12): 3425–3439.
- [9] 邓子文, 黄东. 同种异体骨移植修复骨缺损的应用进展 [J]. 山东医药, 2017, 57(32): 98–100.
Deng ZW, Huang D. Application progress of allogeneic bone transplantation in repairing bone defects [J]. Shandong Med J, 2017, 57(32): 98–100.
- [10] He Y, Zhao Y, Fan L, et al. Injectable affinity and remote magnetothermal effects of Bi-based alloy for long-term bone defect repair and analgesia [J]. Adv Sci, 2021, 8(14): e2100719.
- [11] Ehterami A, Kazemi M, Nazari B, et al. Fabrication and characterization of highly porous Barium titanate based scaffold coated by Gel/HA nanocomposite with high piezoelectric coefficient for bone tissue engineering applications [J]. J Mech

- Behav Biomed Mater, 2018, 79: 195–202.
- [12] Li L, Li Q, Gui L, et al. Sequential gastrodin release PU/n-HA composite scaffolds reprogram macrophages for improved osteogenesis and angiogenesis [J]. Bioact Mater, 2023, 19: 24–37.
- [13] Yin BF, Li ZL, Yan ZQ, et al. Psoralen alleviates radiation-induced bone injury by rescuing skeletal stem cell stemness through AKT-mediated upregulation of GSK-3 β and NRF₂ [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 241.
- [14] Zhao Z, Wang Y, Yin B, et al. Defect-adaptive stem-cell-microcarrier construct promotes tissue repair in rabbits with knee cartilage defects [J]. Stem Cell Rev Rep, 2023, 19(1): 201–212.
- [15] Hu ZC, Lu JQ, Zhang TW, et al. Piezoresistive MXene/Silk fibroin nanocomposite hydrogel for accelerating bone regeneration by re-establishing electrical microenvironment [J]. Bioact Mater, 2023, 22: 1–17.
- [16] Wang L, Zhu T, Kang Y, et al. Crimped nanofiber scaffold mimicking tendon-to-bone interface for fatty-infiltrated massive rotator cuff repair [J]. Bioact Mater, 2022, 16: 149–161.
- [17] Lai Y, Li Y, Cao H, et al. Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect [J]. Biomaterials, 2019, 197: 207–219.
- [18] Liang JW, Li PL, Wang Q, et al. Ferulic acid promotes bone defect repair after radiation by maintaining the stemness of skeletal stem cells [J]. Stem Cells Transl Med, 2021, 10(8): 1217–1231.
- [19] Yu W, Sun W, Chen H, et al. Gradual stress-relaxation of hydrogel regulates cell spreading [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 5170.
- [20] Goto R, Nishida E, Kobayashi S, et al. Gelatin methacryloyl-riboflavin (GelMA-RF) hydrogels for bone regeneration [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1635.
- [21] Kurian AG, Singh RK, Patel KD, et al. Multifunctional GelMA platforms with nanomaterials for advanced tissue therapeutics [J]. Bioact Mater, 2022, 8: 267–295.
- [22] Rehman SRU, Augustine R, Zahid AA, et al. Reduced graphene oxide incorporated GelMA hydrogel promotes angiogenesis for wound healing applications [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 9603–9617.
- [23] Klotz BJ, Gawlitza D, Rosenberg AJWP, et al. Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair [J]. Trends Biotechnol, 2016, 34(5): 394–407.
- [24] Lu W, Zeng M, Liu W, et al. Human urine-derived stem cell exosomes delivered via injectable GelMA templated hydrogel accelerate bone regeneration [J]. Mater Today Bio, 2023, 19: 100569.
- [25] Jiang G, Li S, Yu K, et al. A 3D-printed PRP-GelMA hydrogel promotes osteochondral regeneration through M2 macrophage polarization in a rabbit model [J]. Acta Biomater, 2021, 128: 150–162.
- [26] Wagner JM, Conze N, Lewik G, et al. Bone allografts combined with adipose-derived stem cells in an optimized cell/volume ratio showed enhanced osteogenesis and angiogenesis in a murine femur defect model [J]. J Mol Med, 2019, 97(10): 1439–1450.
- [27] 历龙飞, 张朝旭, 张馨丹, 等. 先进材料在骨缺损修复中的应用研究进展 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2022, 15(1): 63–69.
- Li LF, Zhang ZX, Zhang XD, et al. Research progress of advanced materials for bone defect repair [J]. Chin J Bone Jt Surg, 2022, 15(1): 63–69.
- [28] Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels [J]. Biomaterials, 2015, 73: 254–271.
- [29] Liu Y, Li T, Sun M, et al. ZIF-8 modified multifunctional injectable photopolymerizable GelMA hydrogel for the treatment of periodontitis [J]. Acta Biomater, 2022, 146: 37–48.
- [30] Chai S, Huang J, Mahmut A, et al. Injectable photo-crosslinked bioactive BMSCs-BMP2-GelMA scaffolds for bone defect repair [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 875363.
- [31] 周世博, 关键斌, 俞兴, 等. 股骨骨缺损动物模型制备现状及特点 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(4): 633–638.
- Zhou SB, Guan JB, Yu X, et al. Status and characteristics of animal model preparation of femoral bone defect [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(4): 633–638.

[收稿日期] 2023-04-11