

负载丹酚酸 B 甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶对椎间盘退变的作用

曹胜, 孔令伟, 徐昆, 孙志杰

https://doi.org/10.12307/2023.883

投稿日期: 2022-11-04

采用日期: 2022-12-09

修回日期: 2023-02-16

在线日期: 2023-03-02

中图分类号:

R459.9; R318.08; R628

文章编号:

2095-4344(2024)03-00380-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 丹酚酸 B 对氧化应激诱导的椎间盘退变的作用

体外细胞实验:

- ▲ A 组常规培养
- ▲ B 组加入 H_2O_2
- ▲ C 组接种于甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上, 加入 H_2O_2
- ▲ D 组接种于负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上, 加入 H_2O_2
- ▲ E 组接种于负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上, 加入 H_2O_2 、TLR4 信号通路抑制剂

制备负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶

大鼠体内实验:

- ▲ 正常组
- ▲ 针刺组: 椎间盘退变模型, 以丹酚酸 B 注射治疗
- ▲ 针刺 + 水凝胶组: 椎间盘退变模型, 以甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶注射治疗
- ▲ 针刺 + 载药水凝胶组: 椎间盘退变模型, 以负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶注射治疗

检测细胞增殖、氧化应激、炎症反应、细胞基质相关蛋白的基因表达及 TLR4/核因子 κ B 信号通路蛋白表达

影像学检测、病理组织形态观察

文题释义:

水凝胶: 具有良好的亲水与高度溶胀特性, 既可以保持大量的水分, 又可以维持独特的三维结构网络, 近年来在药物输送、干细胞递送、传递生物活性蛋白等方面展现了良好的优越性。

丹酚酸 B: 是丹参中含量最多的水溶性物质, 其可抑制 H_2O_2 诱导的细胞损伤, 有效清除过量的活性氧, 发挥抗氧化特性, 已被应用于许多疾病的治疗研究中。

摘要

背景: 丹酚酸 B 可抑制 H_2O_2 诱导的细胞损伤, 有效清除过量的活性氧, 发挥抗氧化特性, 已被应用于许多疾病的治疗研究中。但是, 有关丹酚酸 B 在椎间盘退变中作用及其作用机制的研究相对较少。

目的: 以甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶为载体, 通过体外细胞实验与动物体内实验观察丹酚酸 B 对氧化应激诱导的椎间盘退变的作用以及作用机制。

方法: 制备负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶(载药水凝胶)。①体外细胞实验: 分离提取成年 SD 大鼠腰椎髓核细胞, 选择第 3 代髓核细胞, 分组处理: A 组加入完全培养基; B 组加入含 H_2O_2 的完全培养基; C 组接种于未载药水凝胶上, 加入含 H_2O_2 的完全培养基; D 组接种于载药水凝胶上, 加入含 H_2O_2 的完全培养基; E 组接种于载药水凝胶上, 加入含 H_2O_2 与 TLR4 信号通路抑制剂的完全培养基, 检测细胞增殖、氧化应激、炎症反应、细胞基质相关蛋白的基因表达以及 TLR4/核因子 κ B 信号通路蛋白表达。②动物体内实验: 将 60 只成年 SD 大鼠随机分为正常组、针刺组、针刺+丹酚酸 B 组、针刺+水凝胶组、针刺+载药水凝胶组, 每组 12 只, 后 4 组采用针刺建立椎间盘退变模型后依次注射生理盐水、丹酚酸 B 溶液、未载药水凝胶、载药水凝胶治疗, 术后 4 周分别进行影像学检测、病理组织形态观察。

结果与结论: ①体外细胞实验: 与 A 组比较, B 组细胞增殖下降, 氧化应激反应及炎症反应增强, 细胞外基质降解酶(基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13、ADAMTS4、ADAMTS5)的表达增加 ($P < 0.05$), 细胞外基质(II 型胶原、蛋白聚糖)的合成减少 ($P < 0.05$), TLR4/核因子 κ B 信号通路蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, D、E 组细胞增殖升高, 氧化应激反应及炎症反应减弱, 细胞外基质降解酶的表达减少 ($P < 0.05$), 细胞外基质的合成增加 ($P < 0.05$), TLR4/核因子 κ B 信号通路蛋白表达减少 ($P < 0.05$), 其中以 E 组效果更显著。②动物体内实验: 术后 4 周, 针刺+载药水凝胶组退变椎间盘的椎间盘高度指数、MRI 指数以及椎间盘病理组织学评分均较针刺组有了显著改善, 而单纯注射水凝胶或是丹酚酸 B 溶液虽也可一定程度地改善椎间盘退变情况, 但均不及注射载药水凝胶组。③结果表明, 负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶可抑制退变椎间盘组织中的氧化应激反应与炎症反应, 抑制细胞外基质的降解, 缓解椎间盘退变的进程, 该作用可能通过抑制 TLR4/核因子 κ B 信号通路来完成的。

关键词: 椎间盘退变; 髓核细胞; 丹酚酸 B; 水凝胶; 氧化应激; 甲基丙烯酸酯化明胶

Effect of gelatin methacryloyl hydrogel loaded with salvianolic acid B on intervertebral disc degeneration

Cao Sheng, Kong Lingwei, Xu Kun, Sun Zhijie

Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Cao Sheng, Master, Attending physician, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Corresponding author: Xu Kun, Master, Associate chief physician, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Abstract

BACKGROUND: Salvianolic acid B can inhibit cell damage induced by H_2O_2 , effectively remove excess reactive oxygen species, and exert antioxidant properties. It has been used in the treatment of many diseases. However, there are relatively few studies on the role and mechanism of salvianolic acid B in intervertebral

承德医学院附属医院, 河北省承德市 067000

第一作者: 曹胜, 男, 1989 年生, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事骨外科学研究。

通讯作者: 徐昆, 硕士, 副主任医师, 承德医学院附属医院, 河北省承德市 067000

https://orcid.org/0000-0001-7342-0530(曹胜)

基金资助: 河北省卫健委医学科学研究课题计划(20200386), 项目负责人: 曹胜

引用本文: 曹胜, 孔令伟, 徐昆, 孙志杰. 负载丹酚酸 B 甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶对椎间盘退变的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(3):380-386.



disc degeneration.

OBJECTIVE: To observe the effect and mechanism of salvianolic acid B on oxidative stress-induced intervertebral disc degeneration by using gelatin methacryloyl hydrogel as a carrier through the *in vitro* cell experiment and the *in vivo* animal experiment.

METHODS: The gelatin methacryloyl hydrogel (drug-loaded hydrogel) loaded with salvianolic acid B was prepared. (1) *In vitro* cell experiment: The lumbar nucleus pulposus cells of adult SD rats were isolated and extracted, and passage 3 nucleus pulposus cells were selected and divided into groups: Group A was added complete medium. In group B, a complete medium containing H₂O₂ was added. Group C was inoculated on methylacrylylated gelatin hydrogel and added with a complete medium containing H₂O₂. Group D was inoculated on methyl acrylyl gelatin hydrogel loaded with salvianolic acid B and added into a complete medium containing H₂O₂. The E group was inoculated on the methylacrylyl gelatin hydrogel loaded with salvianolic acid B, and the complete medium containing H₂O₂ and the complete medium containing TLR4 signaling pathway inhibitor were added. Cell proliferation, oxidative stress, inflammatory response, gene expression of cell matrix-associated proteins and the protein expression of TLR4/nuclear factor- κ B signaling pathway were detected. (2) Animal *in vivo* experiment: Sixty adult SD rats were randomly divided into normal group, acupuncture group, acupuncture + salvianolic acid group, acupuncture + hydrogel group and acupuncture + loading potion gel group, with 12 rats in each group. The last four groups were treated with acupuncture to establish models of intervertebral disc degeneration and then injected with normal saline, salvianolic acid B solution, non-drug loaded gel and drug-loaded gel in turn. Imaging examination and pathological observation were performed 4 weeks after surgery.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) *In vitro* cell experiment: Compared with group A, the cell proliferation was decreased; the oxidative stress reaction and inflammation reaction were enhanced; the expression of extracellular matrix degrading enzymes (matrix metalloproteinase 3, matrix metalloproteinase 13, ADAMTS4, ADAMTS5) was increased in group B ($P < 0.05$), and the synthesis of extracellular matrix (type II collagen, proteoglycan) was decreased ($P < 0.05$). The protein expression of the TLR4/nuclear factor- κ B signaling pathway was increased ($P < 0.05$). Compared with group B, the cell proliferation of groups D and E was increased, the oxidative stress response and inflammatory response were weakened, and the expression of extracellular matrix degrading enzymes (matrix metalloproteinase 3, matrix metalloproteinase 13, ADAMTS4, ADAMTS5) was decreased ($P < 0.05$), and the synthesis of extracellular matrix was increased ($P < 0.05$). The protein expression of TLR4/nuclear factor- κ B signaling pathway was decreased ($P < 0.05$), and the effect was more significant in group E. (2) Animal *in vivo* experiment: 4 weeks after surgery, intervertebral disc height index, index of MRI and pathological and histological grading of the intervertebral disc had improved significantly in the acupuncture+drug-loaded hydrogel group, and simply injecting hydrogel or salvianolic acid B solution can to a certain extent improve the intervertebral disc degeneration, but they are not as good as the injection of the drug-loaded hydrogel. (3) It is concluded that gelatin methacryloyl hydrogel loaded with salvianolic acid B can inhibit oxidative stress and inflammation in the degenerated intervertebral disc tissue, inhibit the degradation of extracellular matrix, and alleviate the process of intervertebral disc degeneration, which may be accomplished by inhibiting the TLR4/nuclear factor- κ B signaling pathway.

Key words: intervertebral disc degeneration; nucleus pulposus cell; salvianolic acid B; hydrogel; oxidative stress; gelatin methacryloyl

Funding: Medical Science Research of Hebei Provincial Health Commission, No. 20200386 (to CS)

How to cite this article: CAO S, KONG LW, XU K, SUN ZJ. Effect of gelatin methacryloyl hydrogel loaded with salvianolic acid B on intervertebral disc degeneration. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(3):380-386.

0 引言 Introduction

椎间盘是脊柱中连接相邻椎体的纤维软骨盘，其内富含弹性胶状物质的髓核，周围是由多层纤维软骨环以同心圆排列而成的纤维环，椎间盘具有承受压力、缓冲振荡冲击与保护脊髓等作用^[1-2]。椎间盘的退变与病变会引起一系列的临床症状，也是引起下腰痛的重要原因之一^[3-5]。经过长期的研究，目前认为椎间盘退变主要是由于椎间盘组织内髓核细胞数量减少、细胞外基质成分改变、局部调节及炎性小分子影响等因素的综合作用所导致的^[6-10]，另外，也与一些生物力学因素、氧化应激因素及血管增生等相关。目前主要采用保守与手术进行治疗，以改善椎间盘退变引发的临床症状，但是治疗效果均有一定的局限性，无法抑制或是逆转椎间盘的退变进程。因此，研发有效且安全的药物成为椎间盘退变治疗的重要方向之一。

丹酚酸 B 是丹参中含量最多的水溶性物质，其可抑制 H₂O₂ 诱导的细胞损伤，有效清除过量的活性氧，发挥抗氧化特性，已被应用于许多疾病的治疗研究中^[11-13]。但是，有关丹酚酸 B 在椎间盘退变中作用及其作用机制的研究相对较少。此次实验以甲基丙烯酰化明胶水凝胶为载体，通过体外细胞实验与动物体内实验观察丹酚酸 B 对氧化应激诱导的椎间盘退变的作用以及作用机制，以期对椎间盘退变的临床药物治疗提供一些依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验，体内动物实验，组间比较采用 Student's *t* 检验或单因素方差分析 (ANOVA) 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 6-12 月在承德医学院附属医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 8 周龄 SD 大鼠 3 只，雄性，体质量 (220±15) g，用于提取原代髓核细胞；12 周龄 SD 大鼠 60 只，雄性，体质量 (320±20) g，用于动物体内实验。大鼠均购自河北省实验动物中心，生产许可证号：SCXK(冀)2022-001。实验已通过承德医学院附属医院伦理委员会批准 (20220326)。

1.3.2 主要试剂与仪器 甲基丙烯酰化明胶购自苏州北科纳米科技有限公司；丹酚酸 B 购自上海诗丹德标准技术服务有限公司；光引发剂 LAP 购自西安瑞禧生物科技有限公司；戊巴比妥钠购自前衍化学科技(武汉)有限公司；DMEM/F-12 培养基、胎牛血清购自北京缔一生物科技有限公司；丙二醛、超氧化物歧化酶检测试剂盒购自上海科艾博生物技术有限公司；白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 检测试剂盒购自上海双赢生物科技有限公司；TLR4 信号通路抑制剂 TAK-242 购自北京百奥莱博科技有限公司；高迁移率族蛋白抗体购自武汉菲恩生物科技有限公司；TLR4、I κ B α 和核因子 κ B P65 抗体购自济南博航生物技术有限公司；7.0-T MRI 扫描仪购自上海辰光医疗科技股份有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 制备负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酰化明胶水凝胶 称量 0.5 g 的甲基丙烯酰化明胶，分装于包裹有锡箔纸的 15 mL 离心管内，置于 -20 °C 冰箱备用。称量 0.05 g 的光引发剂 LAP 加入棕色瓶内，向瓶内加入 20 mL 的 PBS，于 40-50 °C 水浴加热溶解 15 min，期间振荡数次，置于 4 °C 冰箱备用。取出装有甲基丙烯酰化明胶的离心管，向其内加入 5 mL 的 LAP 溶液，于 40-50 °C 水浴避光加热 30 min，期间振荡数次，制得甲基丙烯酰化明胶水凝胶前体溶液。趁热立即用无菌针头器进行过滤处理，将甲基丙烯酰化明胶水凝胶前体溶液置

于 -20 °C 冰箱备用。

将一定量的丹酚酸 B 加入 PBS 中溶解，其中丹酚酸 B 浓度为 1 μmol/L。在超净工作台上，将丹酚酸 B 溶液加入甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶前体溶液中，轻轻反复吹打均匀，其中丹酚酸 B 浓度为 200 nmol/L；将混合溶液以波长 405 nm、强度 25 W/cm² 的蓝光光源照射 10 s 成胶，即得负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶。扫描电子显微镜下观察水凝胶的形貌。

1.4.2 负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶的体外药物释放 将 400 μL 负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶加入 24 孔板内，向孔内加入 2 mL 的 1×PBS，置于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养箱内。在预定的时间下 (5, 10, 15, 20, 25, 30 d)，分别吸取 PBS 至 EP 管内，1 000 r/min 离心 20 min，将上清液转移至新的 EP 管内备用。同时向管内补充等量的新鲜的 PBS。在 570 nm 波长处检测上清液的吸光度值，同时根据丹酚酸 B 的标准曲线计算药物的释放率。每种实验重复 3 次。

1.4.3 分离培养大鼠髓核细胞^[14] 取 8 周龄 SD 大鼠 3 只，用于提取原代髓核细胞。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠，随后脱颈处死，分离腰椎，置于体积分数 75% 乙醇中 15 min，剥皮后置于 PBS 中，显露椎间盘，挑出胶冻样髓核组织，置于装有 PBS 的培养皿中。将髓核组织转移至离心管内，1 000 r/min 离心 5 min，弃掉上清，加入髓核组织 2 倍体积的 0.1% II 型胶原酶中，37 °C 水浴 4 h。观察离心管内无明显絮状物时加入 3 mL 的 DMEM/F-12 培养基终止消化，1 000 r/min 离心 5 min，弃掉上清，以 DMEM/F-12 培养基 (含 1% 青 - 链霉素和体积分数 10% 胎牛血清) 重悬沉淀，将细胞转移至 T25 培养瓶内，置于体积分数 5%CO₂ 培养箱 37 °C 恒温培养。每 3 d 换液一次。当细胞融合率达到 85% 时进行传代培养。取贴壁的细胞，分别进行甲苯胺蓝染色、番红 O 染色与 II 型胶原免疫荧光染色，以鉴定为髓核细胞。

1.4.4 体外细胞实验

实验分组：选择第 3 代髓核细胞，接种于 24 孔板内，细胞密度为 2×10⁴/孔，分 5 组处理，A 组置于含 1% 青 - 链霉素和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基 (完全培养基)；B 组加入含 100 μmol/L H₂O₂ 的完全培养基中^[15]；C 组接种于甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上，加入含 100 μmol/L H₂O₂ 的完全培养基；D 组接种于负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上，加入含 100 μmol/L H₂O₂ 的完全培养基；E 组接种于负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上，加入含 100 μmol/L H₂O₂、10 μmol/L TLR4 信号通路抑制剂 TAK-242 的完全培养基。孔板内水凝胶体积为 400 μL，完全培养基体积为 1 mL。每组设置 3 个平行复孔。置于体积分数 5%CO₂ 培养箱 37 °C 恒温培养。

细胞增殖检测：培养 1, 3, 7 d 后，吸弃培养基，向每孔中加入 10 μL CCK-8 反应液，轻轻摇动混合均匀，放入恒温培养箱内孵育 2 h。随后取出孔板，利用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度值。

细胞内活性氧水平：培养 5 d 后，取出孔板，弃培养

液，加入培养基清洗细胞，每孔加入含 25 μmol/L DCFH-DA 的 PBS 100 μL，放入培养箱内避光孵育 1 h。取出孔板，弃上清，以 PBS 清洗后加入适量培养基，利用酶标仪检测荧光强度值，计算实验样品的相对荧光强度。

细胞内氧化应激与炎症因子指标检测：培养 5 d 后，取出孔板，弃掉培养基，以 PBS 清洗 3 次，每孔加入 0.25% 胰酶消化 3 min，将消化液放入离心管内，1 000 r/min 离心 5 min，利用 Elisa 试剂盒检测超氧化物歧化酶、丙二醛、白细胞介素 1β、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的含量。严格按照相关试剂盒说明书操作。

qRT-PCR 检测细胞基质相关蛋白的基因表达：培养 5 d 后，取出孔板，加入细胞裂解液，提取总 RNA，检测 RNA 纯度。按照反转录试剂盒说明书操作进行反转录反应，将得到的 cDNA 产物置于 -20 °C 冰箱备用。设计引物序列 (表 1)，配制 10 μL 反应体系，进行实时荧光定量 PCR 反应，PCR 程序为：变性阶段 95 °C，30 s；变性阶段 95 °C，5 s，退火延伸阶段 60 °C，30 s，共 40 个循环。熔解曲线阶段：95 °C，15 s；60 °C，1 min；95 °C，30 s；60 °C，15 s。分析扩增曲线和熔解曲线，各个基因的相对表达水平以 Ct 值表示，得到的数据通过通用的公式 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因的相对表达量。

表 1 | PCR 扩增中的引物序列

Table 1 | Primer sequences in PCR amplification

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
II 型胶原	CCG GGA CCC CGT GGC AGA GA	CAG CCA TCT GGG CTG CAA AG
蛋白聚糖	AGG ATG GCT TCC ACC AGT GC	TGC GTA AAA GAC CTC ACC CTC C
基质金属蛋白酶 3	TCT TCC TCT GAA ACT TGG CG	AGT GCT TCT GAA TGT CCT TCG
基质金属蛋白酶 13	TCC TCA GGC TTG GGT CTT GT	AGA AAC TTC CAG GGG CAA GC
ADAMTS4	CGT TCC GCT CCT GTA ACA CT	TTG AAG AGG TCG GTT CCG TG
ADAMTS5	GCC TGC AAG GGA AAT GTG TG	GGC GGA AAG ATT TGC CGT TAG
GAPDH	GCA AGT TCA ACG GCA CAG	CGC CAG TAG ACT CCA CGA C

Western blot 检测 TLR4/核因子 κB 信号通路蛋白的表达：培养 5 d 后，取出孔板，加入细胞裂解液，提取总蛋白，采用 BCA 法检测蛋白浓度。加入适量 Loading buffer，并上样，利用 120 V 凝胶电泳在 10% 聚丙烯酰胺凝胶中分离蛋白。用聚偏二氟乙烯转膜，湿式转运和转膜的电压控制在 100 mV，持续 1 h。而后将膜密封于 5% 的脱脂奶粉 TBST 溶液中，摇床充分混摇 1 h。取出牛奶 TBST 溶液，洗涤 3 次后，再向其中加入按 1 : 1 000 稀释的一抗 (高迁移率族蛋白、TLR4、IκBα 和核因子 κB P65 抗体) 4 °C 过夜孵育；加入二抗 (稀释比为 1 : 5 000)，室温封闭 1 h。TBST 洗膜 3 次后，加入 ECL 化学发光液，利用凝胶成像系统中采集图像，同时采用 Image J 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.4.5 动物体内实验

实验动物分组：选取 12 周龄 SD 大鼠 60 只，按照随机数字表法分成 5 组，分别为正常组、针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组，每组 12 只。

建立椎间盘退变模型^[16]：除正常组外，其余 4 组大鼠均建立椎间盘退变模型。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠，通过触诊找到 Co_{7/8}、Co_{8/9} 椎体，应用 20 G 针头

从椎间盘正上方垂直刺入髓核中心部位并旋转 360°，维持 30 s，刺入深度约 5 mm。造模后，随即进行对应的干预，针刺组向退变椎间盘内注射 2 μL 的生理盐水，针刺 + 丹酚酸组注射 2 μL 的丹酚酸 B 溶液 (200 nmol/L)，针刺 + 水凝胶组注射 2 μL 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶，载药水凝胶组注射 2 μL 负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶。

X 射线检查：术后 0，4 周，腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠后，将其以仰卧位固定于检测平台，保持尾巴静止伸直，调整 X 射线光源对准目标节段 (Co_{7/8}、Co_{8/9})，拍摄并获取射线照片，计算椎间盘高度指数。椎间盘高度指数越大，退变椎间盘高度恢复越好。

MRI 检查：术后 0 周与 4 周，腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠后，置于检测平台，并检测目标椎间盘，T2 加权 7.0-T MRI 扫描仪用于显示椎间盘的结构。获得目标 MRI 图像后，使用 Radiant dicomviewer 软件测量髓核面积和 T2 信号强度，计算髓核组织的 MRI 指数 (髓核面积 × 平均 T2 信号强度) 评估髓核改变。

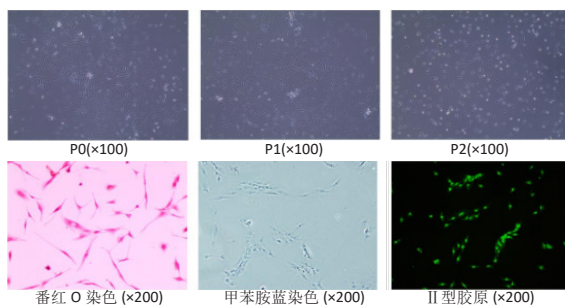
椎间盘病理观察：术后 4 周影像学检查结束后，过量麻醉处死大鼠，在 Co₇ 和 Co₈ 椎体中央用咬骨钳剪断，在剪骨时避免过度牵拉或挤压对椎间盘结构产生影响。浸泡于 40 g/L 多聚甲醛中固定 7 d，随后进行、脱钙、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片 (片厚 4 μm) 处理，进行苏木精 - 伊红染色与番红 O 染色。采用改良的组织学评分进行组织学评价 [17]，该评分系统为 0-15 分，评分越高椎间盘退变越严重。

1.5 主要观察指标 体外细胞实验与体内动物实验结果。

1.6 统计学分析 通过统计学软件 SPSS 25.0 处理实验数据，数据以 $\bar{x} \pm s$ 的格式表达，组间比较采用 Student's t 检验或单因素方差分析 (ANOVA) 检验。文章统计学方法已通过承德医学院附属医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 髓核细胞的培养与鉴定 分离培养的细胞呈梭形或多角形，呈旋涡状排列，甲苯胺蓝染色、番红 O 染色与 II 型胶原免疫荧光染色均呈阳性，见图 1，符合髓核细胞的特征。



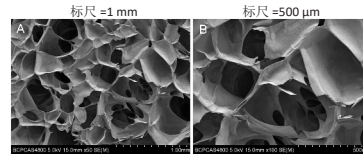
图注：髓核细胞呈梭形或多角形，呈旋涡状排列，甲苯胺蓝染色、番红 O 染色与 II 型胶原免疫荧光染色均呈阳性

图 1 | 髓核细胞的形态与鉴定

Figure 1 | Morphology and identification of nucleus pulposus cells

2.2 水凝胶的微观形貌 将水凝胶冷冻干燥后进行扫描电子显微镜观察，可见水凝胶内呈现疏松多孔结构，孔隙之间相

互交锁，孔径在 (259.36±45.39) μm，图 2 展示了低倍与高倍镜下水凝胶的内部形貌。

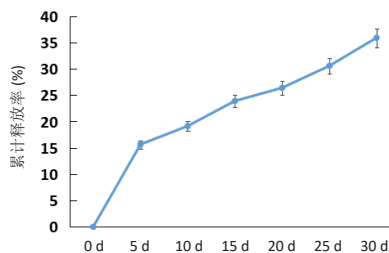


图注：A 为低倍镜下观，B 为高倍镜下观。凝胶内呈现疏松多孔结构，孔隙之间相互交锁

图 2 | 甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶的微观形貌 (扫描电子显微镜)

Figure 2 | Micromorphology of gelatin methacryloyl hydrogel (scanning electron microscopy)

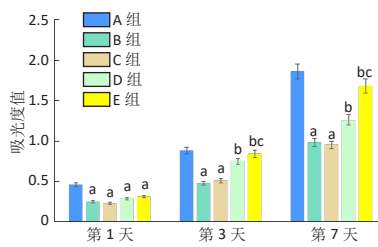
2.3 水凝胶的体外药物释放 实验对水凝胶体外释放药物的情况进行了 30 d 的观察，结果显示：在 1-5 d 的时间里，可见水凝胶快速释放丹酚酸 B，在第 5 天时累计释放药物达 (15.63±6.87)%；在第 5 天之后，水凝胶释放药物的速率减慢，直到 30 d 时药物累计释放率为 (35.88±11.09)%。体外各时间点水凝胶释放药物的累计释放率见图 3。



图注：在 1-5 d 的时间里，可见水凝胶快速释放丹酚酸 B，在第 5 天之后，水凝胶释放药物的速率减慢

2.4 体外细胞实验结果

2.4.1 各组细胞增殖实验 CCK-8 检测结果显示，5 组细胞随着培养时间的增加持续增殖，见图 4。培养第 1 天时，与 A 组比较，B 组细胞增殖吸光度值显著降低 ($P < 0.05$)；与 B 组比较，C、D、E 组细胞增殖吸光度值无明显变化 ($P > 0.05$)。培养第 3 天时，与 A 组比较，B 组细胞增殖吸光度值显著降低 ($P < 0.05$)；与 B 组比较，C 组细胞增殖吸光度值无明显变化 ($P > 0.05$)，D 组细胞增殖吸光度值显著升高 ($P < 0.05$)；与 D 组比较，E 组细胞增殖吸光度值显著升高 ($P < 0.05$)。培养第 7 天时，与 A 组比较，B 组细胞增殖吸光度值显著降低 ($P < 0.05$)；与 B 组比较，C 组细胞增殖吸光度值无明显变化 ($P > 0.05$)，D 组细胞增殖吸光度值显著升高 ($P < 0.05$)；与 D 组比较，E 组细胞增殖吸光度值显著升高 ($P < 0.05$)。



图注：A 组常规培养；B 组加入 H₂O₂；C 组接种于甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上，加入 H₂O₂；D 组接种于负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上，加入 H₂O₂；E 组接种于负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶上，加入 H₂O₂、TLR4 信号通路抑制剂。

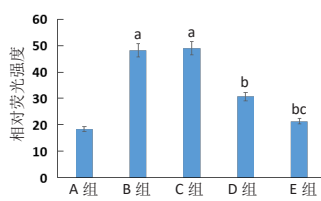
与 A 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 B 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 D 组比较，^c $P < 0.05$

图 4 | 各组髓核细胞增殖情况比较

Figure 4 | Comparison of proliferation of nucleus pulposus cells in each group

2.4.2 各组细胞内活性氧水平 与 A 组比较，B 组细胞内活性氧水平增加 ($P < 0.05$)；与 B 组比较，C 组细胞内活性氧水平无明显变化 ($P > 0.05$)，D、E 组细胞内活性氧水平减少 ($P <$

0.05); 与 D 组比较, E 组细胞内活性氧水平减少 ($P < 0.05$)。各组细胞内活性氧水平检测结果见图 5。



图注: A-E 分组情况见图 4。与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 D 组比较, ^c $P < 0.05$

Figure 5 | Comparison of reactive oxygen species in nucleus pulposus cells of each group

2.4.3 各组细胞内氧化应激与炎症因子指标检测 见表 2。

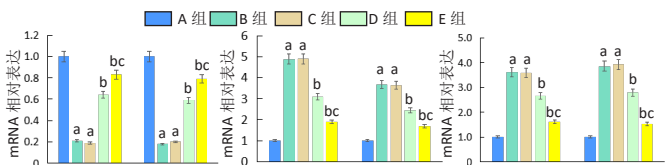
表 2 | 各组髓核细胞内氧化应激与炎症因子指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 | Detection results of oxidative stress and inflammatory factors in nucleus pulposus cells of each group

组别	超氧化物歧化酶 (U/mg)	丙二醛 (nmol/g)	白细胞介素 1 β (ng/g)	白细胞介素 6 (ng/g)	肿瘤坏死因子 α (ng/g)
A 组	47.38 \pm 6.89	23.22 \pm 3.94	5.28 \pm 0.19	3.69 \pm 0.37	1.68 \pm 0.29
B 组	19.66 \pm 3.11 ^a	59.71 \pm 10.27 ^a	21.55 \pm 6.18 ^a	13.52 \pm 2.37 ^a	7.84 \pm 2.16 ^a
C 组	20.33 \pm 1.19	57.38 \pm 12.18	22.03 \pm 5.83	14.76 \pm 3.14	7.79 \pm 1.67
D 组	31.57 \pm 8.86 ^b	42.09 \pm 9.71 ^b	15.34 \pm 3.11 ^b	9.62 \pm 1.35 ^b	5.35 \pm 0.64 ^b
E 组	41.16 \pm 7.22 ^{bc}	30.52 \pm 5.36 ^{bc}	9.65 \pm 1.43 ^{bc}	5.49 \pm 0.27 ^{bc}	3.08 \pm 0.17 ^{bc}

表注: A 组常规培养; B 组加入 H₂O₂; C 组接种于甲基丙烯酰化明胶水凝胶上, 加入 H₂O₂; D 组接种于负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酰化明胶水凝胶上, 加入 H₂O₂; E 组接种于负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酰化明胶水凝胶上, 加入 H₂O₂; TLR4 信号通路抑制剂。与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 D 组比较, ^c $P < 0.05$

与 A 组比较, B 组超氧化物歧化酶含量降低 ($P < 0.05$), 丙二醛、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 含量升高 ($P < 0.05$)。与 B 组比较, C 组各指标均无明显变化 ($P > 0.05$); D、E 组超氧化物歧化酶含量升高 ($P < 0.05$), 丙二醛、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 含量降低 ($P < 0.05$)。与 D 组比较, E 组超氧化物歧化酶含量升高 ($P < 0.05$), 丙二醛、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 含量降低 ($P < 0.05$)。

2.4.4 qRT-PCR 检测各组细胞基质相关蛋白的基因表达 见图 6。

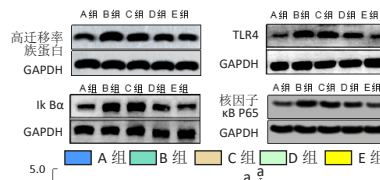


图注: A-E 分组情况同图 4。与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 D 组比较, ^c $P < 0.05$

Figure 6 | Gene expression of matrix associated proteins in nucleus pulposus cells in each group

与 A 组比较, B 组 II 型胶原、蛋白聚糖的 mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13、ADAMTS4、ADAMTS5 的 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$)。与 B 组比较, C 组各基因的 mRNA 表达量无明显变化 ($P > 0.05$), D、E 组 II 型胶原、蛋白聚糖的 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13、ADAMTS4、ADAMTS5 的 mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$)。与 D 组比较, E 组 II 型胶原、蛋白聚糖的 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13、ADAMTS4、ADAMTS5 的 mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$)。

2.4.5 Western blot 检测各组细胞 TLR4/ 核因子 κ B 信号通路蛋白的表达 见图 7。



图注: A-E 分组情况同图 4。与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 D 组比较, ^c $P < 0.05$

Figure 7 | Expression of TLR4/nuclear factor- κ B signaling pathway protein in nucleus pulposus cells of each group

与 A 组比较, B 组高迁移率族蛋白、TLR4、Ik B α 和核因子 κ B P65 的蛋白表达量明显增加 ($P < 0.05$)。与 B 组比较, C 组高迁移率族蛋白、TLR4、Ik B α 和核因子 κ B P65 的蛋白表达量无明显变化 ($P > 0.05$), D、E 组高迁移率族蛋白、TLR4、Ik B α 和核因子 κ B P65 的蛋白表达量明显减少 ($P < 0.05$)。与 D 组比较, E 组高迁移率族蛋白、TLR4、Ik B α 和核因子 κ B P65 的蛋白表达量明显减少 ($P < 0.05$)。

与 A 组比较, B 组高迁移率族蛋白、TLR4、Ik B α 和核因子 κ B P65 的蛋白表达量明显增加 ($P < 0.05$)。与 B 组比较, C 组高迁移率族蛋白、TLR4、Ik B α 和核因子 κ B P65 的蛋白表达量无明显变化 ($P > 0.05$), D、E 组高迁移率族蛋白、TLR4、Ik B α 和核因子 κ B P65 的蛋白表达量明显减少 ($P < 0.05$)。与 D 组比较, E 组高迁移率族蛋白、TLR4、Ik B α 和核因子 κ B P65 的蛋白表达量明显减少 ($P < 0.05$)。

2.5 动物体内实验结果

2.5.1 各组大鼠椎间盘 X 射线片检测 见图 8A、B。

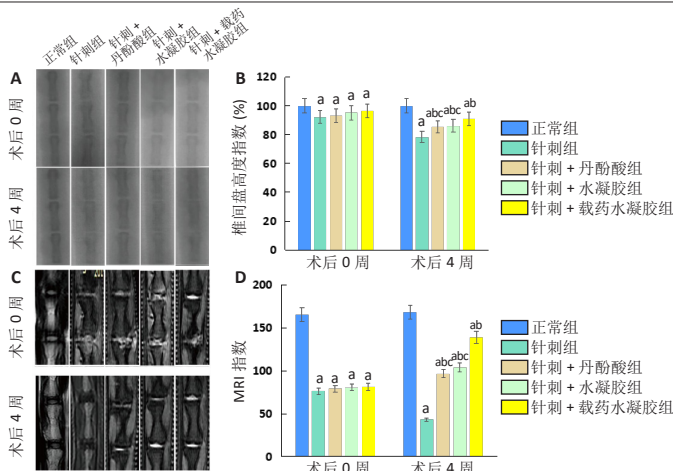
术后 0 周时, 针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组椎间盘高度指数均低于正常组 ($P < 0.05$); 针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组椎间盘高度指数比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。术后 4 周时, 针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组椎间盘高度指数均低于正常组 ($P < 0.05$); 与针刺组比较, 针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组椎间盘高度指数升高 ($P < 0.05$); 与针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组比较, 针刺 + 载药水凝胶组椎间盘高度指数升高 ($P < 0.05$)。

2.5.2 各组大鼠椎间盘 MRI 检查 见图 8C、D。

术后 0 周时, 针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组 MRI 指数均低于正常组 ($P < 0.05$); 针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组 MRI 指数比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。术后 4 周时, 针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组 MRI 指数均低于正常组 ($P < 0.05$); 与针刺组比较, 针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组 MRI 指数升高 ($P < 0.05$); 与针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组比较, 针刺 + 载药水凝胶组 MRI 指数升高 ($P < 0.05$)。

2.5.3 各组大鼠椎间盘病理观察 见图 9。

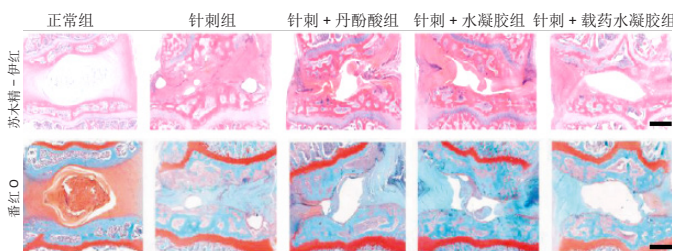
苏木精 - 伊红染色显示, 正常组中细胞和细胞外基质组织良好; 针刺组髓核结构不完整, 纤维环层片状结构混乱, 退变位点被纤维软骨组织和不同细胞形态的细胞所占据, 损伤部位存在大量的瘢痕与纤维缔结组织, 椎间盘结构模糊不



图注：A、B 为各组大鼠椎间盘 X 射线片检查结果，C、D 为各组大鼠椎间盘 MRI 检查结果。与正常组比较，^a $P < 0.05$ ；与针刺组比较，^b $P < 0.05$ ；与针刺 + 载药水凝胶组比较，^c $P < 0.05$

图 8 | 各组大鼠椎间盘高度指数与 MRI 指数

Figure 8 | Intervertebral disc height index and MRI index in rats of each group



图注：针刺组髓核结构不完整，纤维环层片状结构混乱，椎间盘结构模糊不清，仅见少量的胶原组织；其余 3 组损伤部位存在瘢痕和纤维结缔组织，部分椎间盘结构模糊不清，胶原含量增加，其中针刺 + 载药水凝胶组细胞和细胞外基质结构较针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组清晰、规则，胶原含量更多

图 9 | 各组大鼠椎间盘病理学观察结果 (标尺 = 100 μm)

Figure 9 | Pathological results of intervertebral disc in rats of each group (scale bars=100 μm)

清；其余 3 组损伤部位存在瘢痕和纤维结缔组织，部分椎间盘结构模糊不清，其中针刺 + 载药水凝胶组细胞和细胞外基质结构较针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组清晰、规则。番红 O 染色显示，正常组可见完整的髓核组织，含有丰富的胶原组织；针刺组髓核结构不完整，仅见少量的胶原组织；其余 3 组髓核组织结构破坏程度均轻于针刺组，胶原含量增加，其中以针刺 + 载药水凝胶组髓核组织结构更清晰、规则且胶原含量最多。

椎间盘组织学评分结果显示，正常组、针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组目标椎间盘组织学评分依次为 4.39 ± 0.12 , 13.09 ± 0.13 , 9.38 ± 0.12 , 10.54 ± 0.18 , 7.03 ± 0.22 。针刺组、针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组评分高于正常组 ($P < 0.05$)，针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组、针刺 + 载药水凝胶组评分低于针刺组 ($P < 0.05$)，针刺 + 载药水凝胶组评分低于针刺 + 丹酚酸组、针刺 + 水凝胶组 ($P < 0.05$)。

2.6 水凝胶的生物相容性 由体外细胞实验与动物体内实验可知，负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶具有良好的生物相容性。

3 讨论 Discussion

在传统的椎间盘退变治疗策略中，单一的药物存在反复给药、药物流失、局部感染等相关问题，选择水凝胶作为控释载体有良好的应用前景。水凝胶具有良好的亲水与高度溶胀特性，既可以保持大量的水分，又可以维持独特的三维结构网络，近年来在药物输送、干细胞递送、传递生物活性蛋白等方面展现了良好的优越性^[19-20]。甲基丙烯酸酯化明胶由甲基丙烯酸与明胶化合成，加入光引发剂后可在蓝光照射下发生交联固化，制作成本低，近年来被广泛应用于组织工程再生研究领域，更有望应用于微创领域。刘翔宇等^[21]将外源性转化生长因子 $\beta 1$ 负载于甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶中，用于大鼠颅骨缺损部位获得了良好的骨再生效果。JIANG 等^[22]研究显示，复合富血小板血浆的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶具有良好的软骨和软骨下骨修复性能。因此，实验选择甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶作为丹酚酸 B 的载体，结果显示甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶可持续释放丹酚酸 B，可作为药物载体应用。

研究已证实， H_2O_2 可导致髓核细胞氧化应激损伤与细胞凋亡增加，进而导致髓核细胞退变^[23-24]，因此利用 H_2O_2 诱导的髓核细胞氧化应激模型是研究椎间盘退变机制、预防及治疗的有效方法。实验采用 H_2O_2 诱导髓核细胞氧化应激模型，观察丹酚酸 B 对髓核细胞增殖、氧化应激反应、炎症因子及细胞外基质代谢的影响，并探索了其中可能的作用机制。

氧化应激在很多生理与病理过程中发挥着重要作用，可以激活多种信号通路引发细胞损伤。氧化应激中产生的大量活性氧会对组织器官造成不可逆的损伤。大量研究已证实，氧化应激可影响椎间盘退变的发生与发展过程，退变椎间盘中氧化应激相关的标志物会显著增加^[25-26]，因此抗氧化应激治疗可能成为预防及治疗椎间盘退变的有效措施。此次实验结果显示， H_2O_2 诱导组髓核细胞的超氧化物歧化酶活性显著降低，而丙二醛含量显著升高，使得细胞内活性氧水平增加；而经过丹酚酸 B 干预后，髓核细胞内的超氧化物歧化酶活性显著升高、丙二醛含量显著降低，细胞内活性氧水平显著降低。超氧化物歧化酶是生物体系中抗氧化酶系的重要组成成员^[27-28]，而丙二醛是膜脂过氧化最重要的产物之一^[29]，实验结果说明髓核细胞内的抗氧化系统因 H_2O_2 而减弱，而丹酚酸 B 可以显著抑制 H_2O_2 的作用，增强细胞内抗氧化系统作用，证实丹酚酸 B 可通过调控抗氧化系统对抗椎间盘髓核细胞的氧化应激反应。

在椎间盘退变的过程中，髓核细胞会分泌大量的炎症因子，这些炎症因子进一步加速椎间盘退变的进展。椎间盘退变相关分泌的促炎性递质包括白细胞介素 1β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1α 、白细胞介素 6 等^[30-31]，其中白细胞介素 1 是介导椎间盘基质降解的关键细胞因子，肿瘤坏死因子 α 可促进蛋白多糖的降解，促进椎间盘分解代谢及促炎性因子的表达。此次实验结果显示， H_2O_2 可诱导髓核细胞分泌大量的促炎性因子，增加细胞外基质降解酶 (基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13、ADAMTS4、ADAMTS5) 的表达，抑制细胞外基质 (II 型胶原、蛋白多糖) 的合成；而丹酚酸 B 干预可显著抑制 H_2O_2 诱导的细胞内促炎性因子分泌、细胞外基质

降解酶的表达, 增加细胞外基质的合成。因此, 实验结果提示丹酚酸 B 可以抑制 H₂O₂ 诱导的细胞外基质降解, 缓解髓核细胞退变与椎间盘退变的进展。

有研究表明, 氧化应激中的活性氧不仅可直接导致细胞的损伤, 还可以通过多种信号通路进行信号传导, 包括核因子 κ B 信号通路、MAPK 信号通路、PKC 信号通路及 PI3K/AKT 信号通路等^[32-33]。相关研究已证实, TLR4/核因子 κ B 信号通路存在于机体的各种细胞中, 参与调节细胞的多种生理功能, 与氧化应激及炎症反应关系密切, 在氧化应激与炎症反应中可以将信号从细胞膜直接传导到细胞核, 以启动基因转录。TLRs 是一种跨膜糖蛋白, 其在炎症的发生中具有重要的作用^[34]。TLR4 是 TLR 家族中的主要成员之一, 其通过识别相应受体发挥生物学功能, 再通过相关的细胞内信号转导途径激活核因子 κ B, 参与炎症反应、促进细胞因子的合成与释放等。此次实验发现, 在 H₂O₂ 诱导的氧化应激与炎症反应中, TLR4/核因子 κ B 信号通路被激活, 信号通路的上游和下游蛋白明显增加, 而丹酚酸 B 可以抑制该种现象。为了进一步验证丹酚酸 B 对 TLR4/核因子 κ B 信号通路的抑制作用, 使用了 TLR4 信号通路抑制剂, 实验结果显示丹酚酸 B 可通过抑制 TLR4/核因子 κ B 信号通路的激活来抑制氧化应激反应与炎症反应, 促进细胞外基质的合成。

选择大鼠尾椎穿刺模型进一步评估了丹酚酸 B 的治疗效果, 结果显示注射载药水凝胶 4 周后, 退变椎间盘的椎间盘高度指数、MRI 指数以及椎间盘病理组织学评分均较针刺组有了显著改善, 而单纯地注射水凝胶或是丹酚酸 B 溶液, 虽也可一定程度改善椎间盘退变情况, 但均不及注射载药水凝胶组。甲基丙烯酰化明胶水凝胶可维持椎间盘水分, 保持椎间盘高度, 缓冲脊柱的轴向载荷, 同时其还富含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 细胞黏附序列, 可为细胞的生长、黏附等提供良好的局部微环境, 因而可在一定程度上缓解椎间盘的退变, 具体的作用机制有待研究。

综上所述, 负载丹酚酸 B 的甲基丙烯酰化明胶水凝胶可抑制退变椎间盘组织中的氧化应激反应与炎症反应, 抑制细胞外基质的降解, 缓解椎间盘退变的进程, 该作用可能通过抑制 TLR4/和核因子 κ B 信号通路来完成的。

作者贡献: 曹胜进行实验设计, 实验实施为曹胜、孔令伟、孙志杰, 实验评估为徐昆、孔令伟, 资料收集为曹胜、孔令伟, 曹胜成文, 徐昆审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

[1] DESMOULIN GT, PRADHAN V, MILNER TE. Mechanical Aspects of Intervertebral Disc Injury and Implications on Biomechanics. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2020;45(8):E457-E464.

[2] KAMALI A, ZIADLOU R, LANG G, et al. Small molecule-based treatment approaches for intervertebral disc degeneration: Current options and future directions. *Theranostics*. 2021;11(1):27-47.

[3] KOS N, GRADISNIK L, VELNAR T. A Brief Review of the Degenerative Intervertebral Disc Disease. *Med Arch*. 2019;73(6):421-424.

[4] ZHANG Y, HAN S, KONG M, et al. Single-cell RNA-seq analysis identifies unique chondrocyte subsets and reveals involvement of ferroptosis in human intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(9):1324-1334.

[5] CAZZANELLI P, WUERTZ-KOZAK K. MicroRNAs in Intervertebral Disc Degeneration, Apoptosis, Inflammation, and Mechanobiology. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3601.

[6] WU PH, KIM HS, JANG IT. Intervertebral Disc Diseases PART 2: A Review of the Current Diagnostic and Treatment Strategies for Intervertebral Disc Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):2135.

[7] DU J, XU M, KONG F, et al. CB2R Attenuates Intervertebral Disc Degeneration by Delaying Nucleus Pulposus Cell Senescence through AMPK/GSK3 β Pathway. *Aging Dis*. 2022;13(2):552-567.

[8] LIANG W, HAN B, HAI Y, et al. Mechanism of Action of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in the Intervertebral Disc Degeneration Treatment and Bone Repair and Regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:833840.

[9] SABERI M, ZHANG X, MOBASHERI A. Targeting mitochondrial dysfunction with small molecules in intervertebral disc aging and degeneration. *Geroscience*. 2021;43(2):517-537.

[10] HWANG PY, CHEN J, JING L, et al. The role of extracellular matrix elasticity and composition in regulating the nucleus pulposus cell phenotype in the intervertebral disc: a narrative review. *J Biomech Eng*. 2014;136(2):021010.

[11] 胡琳, 叶巧玲, 庄和思, 等. 丹酚酸 B 对糖尿病肾病 db/db 小鼠肾纤维化及炎症的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(4):1084-1092.

[12] 张一凡, 韩向晖, 刘萍. 丹酚酸 B 通过抑制 MAPKs/NF- κ B 信号通路减轻动脉粥样硬化模型小鼠肝脏炎症反应 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(4):525-530.

[13] 李君, 王倩青, 邹智慧, 等. 丹酚酸 B 抑制 AKT 的磷酸化诱导子宫内腺癌 MFE-280 细胞自噬性死亡和细胞衰老 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(6):671-675.

[14] SHI M, ZHAO Y, SUN Y, et al. Therapeutic effect of co-culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells and degenerated nucleus pulposus cells on intervertebral disc degeneration. *Spine J*. 2021;21(9):1567-1579.

[15] LIU Y. Hydrogen peroxide induces nucleus pulposus cell apoptosis by ATF4/CHOP signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2020;20(4):3244-3252.

[16] 张贺星, 张明, 张奕. 软骨终板干细胞源性外泌体对椎间盘退变的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30(13):1198-1203.

[17] FAN Y, YI J, ZHANG Y, et al. Fabrication of curcumin-loaded bovine serum albumin (BSA)-dextran nanoparticles and the cellular antioxidant activity. *Food Chem*. 2018;239:1210-1218.

[18] TAVAKOLI S, KLAR AS. Advanced Hydrogels as Wound Dressings. *Biomolecules*. 2020;10(8):1169.

[19] BERNHARD S, TIBBITT MW. Supramolecular engineering of hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;171:240-256.

[20] JERVIS PJ, AMORIM C, PEREIRA T, et al. Dehydropeptide Supramolecular Hydrogels and Nanostructures as Potential Peptidomimetic Biomedical Materials. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2528.

[21] 刘翔宇, 王照东, 徐陈, 等. 载外源性 TGF- β 1 甲基丙烯酰化明胶复合支架促进颅骨缺损修复实验研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2021, 35(7):904-912.

[22] JIANG G, LI S, YU K, et al. A 3D-printed PRP-GeIMA hydrogel promotes osteochondral regeneration through M2 macrophage polarization in a rabbit model. *Acta Biomater*. 2021;128:150-162.

[23] TANG Z, HU B, ZANG F, et al. Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration. *Cell Death Dis*. 2019;10(7):510.

[24] ZHANG X, HUANG Z, XIE Z, et al. Homocysteine induces oxidative stress and ferroptosis of nucleus pulposus via enhancing methylation of GPX4. *Free Radic Biol Med*. 2020;160:552-565.

[25] CHE H, LI J, LI Y, et al. p16 deficiency attenuates intervertebral disc degeneration by adjusting oxidative stress and nucleus pulposus cell cycle. *Life*. 2020;9:e52570.

[26] YANG RZ, XU WN, ZHENG HL, et al. Involvement of oxidative stress-induced annulus fibrosus cell and nucleus pulposus cell ferroptosis in intervertebral disc degeneration pathogenesis. *J Cell Physiol*. 2021;236(4):2725-2739.

[27] ROSA AC, BRUNI N, MEINERI G, et al. Strategies to expand the therapeutic potential of superoxide dismutase by exploiting delivery approaches. *Int J Biol Macromol*. 2021;168:846-865.

[28] MIAO L, ST CLAIR DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):344-356.

[29] CALDIROLI A, AUXILIA AM, CAPUZZI E, et al. Malondialdehyde and bipolar disorder: A short comprehensive review of available literature. *J Affect Disord*. 2020;274:31-37.

[30] WANG Y, CHE M, XIN J, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110660.

[31] FRANCISCO V, PINO J, GONZÁLEZ-GAY MÁ, et al. A new immunometabolic perspective of intervertebral disc degeneration. *Nat Rev Rheumatol*. 2022;18(1):47-60.

[32] FORMAN HJ, ZHANG H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(9):689-709.

[33] XIE X, DENG T, DUAN J, et al. Exposure to polystyrene microplastics causes reproductive toxicity through oxidative stress and activation of the p38 MAPK signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;190:110133.

[34] REHMAN SU, ALI T, ALAM SI, et al. Ferulic Acid Rescues LPS-Induced Neurotoxicity via Modulation of the TLR4 Receptor in the Mouse Hippocampus. *Mol Neurobiol*. 2019;56(4):2774-2790.

(责任编辑: GW, ZN, QY, YJ)