

· 基础研究 ·

负载 DMOG 光交联明胶水凝胶的骨组织工程研究

张燕萍*, 陈花花, 顾永春, 周培刚

苏州市第九人民医院口腔科, 江苏 苏州 215200

[摘要] **目的:**探讨负载二甲基乙二酰甘氨酸(dimethylolallyl glycine, DMOG)的光交联明胶(gelatin methacryloyl, GelMA)水凝胶的促成骨分化作用以及对大鼠颅骨骨缺损的修复效果。**方法:**制备 GelMA-DMOG 水凝胶后,扫描电镜下观察其表面特征,体外检测其降解时间;将小鼠成骨前体细胞 MC3T3-E1 培养于 GelMA 和 GelMA-DMOG 水凝胶表面,鬼笔环肽染色荧光观察细胞骨架形态,CCK-8 法检测其细胞毒性;成骨诱导后,通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色、茜素红染色和 qRT-PCR 检测成骨相关基因的表达,观察其对 MC3T3-E1 细胞成骨向分化的影响;构建大鼠颅骨骨缺损模型,4周和8周后观察 GelMA 和 GelMA-DMOG 水凝胶对骨缺损的修复效果。**结果:**GelMA-DMOG 水凝胶孔径大小、分布及降解时间与 GelMA 水凝胶相比没有明显差异;两种水凝胶对 MC3T3-E1 细胞增殖均无明显影响;与培养在 24 孔板上的对照组相比,GelMA 组可促进 MC3T3-E1 细胞成骨向分化,而 GelMA-DMOG 组明显增强了细胞的成骨向分化和成骨相关基因 Runx2、ALP 和骨钙素的表达;体内实验发现与 GelMA 组相比,GelMA-DMOG 水凝胶处理组具有明显的促成骨成血管作用和较好的骨缺损修复效果。**结论:**GelMA-DMOG 水凝胶相对于 GelMA 材料自身的理化性能没有改变,且体外和体内实验显示该材料对于骨缺损修复具有较好的促进作用,为骨组织工程治疗骨缺损的临床应用开辟了新途径。

[关键词] DMOG;甲基丙烯酸酯明胶;水凝胶;骨组织工程

[中图分类号] R782.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)10-1449-07

doi:10.7655/NYDXBNS20201009

Bone tissue engineering study of DMOG-loaded photocrosslinked GelMA hydrogel

ZHANG Yanping*, CHEN Huahua, GU Yongchun, ZHOU Peigang

Department of Stomatology, Suzhou Ninth People's Hospital, Suzhou 215200, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of dimethylolallyl glycine (DMOG) - containing gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogel on promoting osteogenic differentiation *in vitro*, and the effect of repairing calvarial bone defects in rats *in vivo*. **Methods:** After synthesizing GelMA - DMOG hydrogel, the surface characteristics were observed by scanning electron microscope, and its degradation time was detected *in vitro*. Mouse osteoblast precursor cells MC3T3-E1 were cultured on the surface of GelMA and GelMA-DMOG hydrogel. The cytoskeleton morphology was observed by fluorescence, and its cytotoxicity was detected by CCK-8 assay. After cultured cells in osteogenesis induction medium, alkaline phosphatase (ALP), alizarin red staining and qRT-PCR were used to detect the effect of two kinds of hydrogel on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells. A rat calvarial bone defect model was constructed. The effects of GelMA and GelMA-DMOG hydrogels on bone defect repair were observed after 4 and 8 weeks. **Results:** Compared with GelMA hydrogel, there was no significant difference in the pore size, distribution, and degradation time of GelMA-DMOG hydrogel. The two groups of hydrogel had no significant effect on the proliferation of MC3T3-E1 cells. Compared with control group, the GelMA hydrogel cultured group slightly promoted osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells, while the GelMA-DMOG hydrogel cultured group significantly enhanced the osteogenic differentiation and the expression of osteogenesis-related genes, such as Runx2, ALP, and osteocalcin (OCN). *In vivo*, compared with control and GelMA group, the GelMA-DMOG hydrogel group has a much better calvarial bone repair effect. **Conclusion:** The physical and chemical properties of GelMA-DMOG hydrogel are not changed compared to GelMA hydrogel. *In vitro* and *in vivo* experiments show that the GelMA-DMOG hydrogel can promote the repair of bone defects, which opens up a new clinical application of bone tissue engineering in the treatment of bone defects.

[Key words] DMOG; gelatin methacryloyl; hydrogels; bone tissue engineering

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(10): 1449-1455]

[基金项目] 苏州市第九人民医院院级科研基金(院201613)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yanpingzhangsz@163.com

近年需要修复的颅颌面部骨缺损病例日益增多,这对口腔颌面外科提出了更高的要求^[1]。目前临床上通常采用自体骨、异体骨或应用生物替代材料等修复骨组织缺损^[2],但因自体骨和异体骨费用较高、来源较少和易出现排斥反应,在临床应用依然受限。单纯的骨替代物,如磷酸钙骨水泥、硫酸钙骨水泥、羟基磷灰石、生物活性玻璃等,由于其成骨能力和成血管能力仍存在不足,易引起骨愈合障碍等,仍无法有效修复大面积骨缺损^[3]。随着骨转导生物可吸收材料及骨组织工程技术的发展,利用自体细胞和支架材料来修复骨组织缺损成为研究的热点^[4]。

光交联明胶(gelatin methacryloyl, GelMA)水凝胶最早于2000年由Van Den Bulcke合成^[5]。GelMA水凝胶可以在紫外光(360~480 nm)照射下共价交联固化,因此塑形性佳,固化后具有较好的机械性能。体外实验证实GelMA水凝胶在2D和3D培养环境中均为一种较好的细胞培养基质材料,包括小鼠成骨前体细胞(MC3T3-E1)在内的多种细胞均可以在固化的GelMA水凝胶中存活、增殖、分化、迁移,并能够形成细胞与细胞间的交互网络。最近研究证实, GelMA水凝胶作为支架材料具有修复皮肤、肌肉肌腱、骨、软骨和神经等的潜能^[6-7]。

低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)能调控细胞的增殖、分化和多种基因的表达。有研究发现骨髓间充质干细胞转染HIF-1 α 基因后具有更好的成骨成血管能力,能够改善骨的修复与再生。HIF-1 α 常氧浓度下易降解,可能的潜在风险也阻碍了其在临床上的应用^[8]。二甲基乙二酰甘氨酸(dimethylolxalyl glycine, DMOG)是人工合成的小分子脯氨酰羟化酶抑制剂,能够稳定常氧浓度下HIF-1 α 在细胞中的表达,与HIF-1 α 相比更有希望安全应用于临床^[9]。本实验旨在构建负载DMOG的光交联水凝胶GelMA-DMOG,通过体外实验观察其对MC3T3-E1细胞增殖和成骨向分化的影响,体内实验观察其对大鼠颅骨缺损修复的效果,评价GelMA-DMOG水凝胶在骨组织工程治疗骨缺损中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性SD大鼠(体重250 g左右),购自上海苏尚生物科技有限公司。明胶(吉林罗赛洛明胶有限公司);甲基丙烯酸酐(北京百顺化学科技有限公司);

DMOG(上海陶素生化科技有限公司);胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、青链霉素(Gibco公司,美国); α -MEM培养基(Hyclone公司,美国);CCK-8试剂盒(Dojindo公司,日本);地塞米松、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠(Sigma-Aldrich公司,美国);逆转录试剂盒、qRT-PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本);CO₂恒温孵箱、离心机(Thermo公司,美国);荧光倒置显微镜(蔡司ZEISS公司,德国);实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司,美国);酶标仪(Bio-Tek公司,美国);脱水机、包埋机、切片机、临界点干燥仪(Leica公司,德国);发射扫描电镜(FESEM, Hitachi 4800公司,日本);Micro-CT仪(Skyscan公司,比利时)。

1.2 方法

1.2.1 GelMA和GelMA-DMOG水凝胶的制备

合成GelMA的主要实验步骤如下:取20 g甲基丙烯酸酐加入预热的200 mL灭菌PBS溶液中水浴搅拌2 h后,每隔2 min缓慢滴加1次1 mL甲基丙烯酸酐,共滴加16次,边滴加边60℃水浴搅拌,滴加结束后加入800 mL预热的PBS溶液终止反应。将混合液放入14 kDa的透析袋中室温透析1~2周以除去未反应的单体。用中性滤纸抽滤后的GelMA混合液-80℃冷冻至少24 h,室温干燥储存,待用。GelMA-DMOG则是先用PBS缓冲液配制浓度为500 μ mol/L的DMOG溶液,然后用DMOG溶液制备GelMA-DMOG水凝胶。GelMA/GelMA-DMOG水凝胶支架材料具体制备过程如下:取冷冻干燥的GelMA 200 mg,溶于2 mL 37℃的PBS溶液中,直至完全溶解形成10%(W/V)溶液。在360 nm波长紫外灯下照射3 min,即可形成GelMA水凝胶薄片。

1.2.2 扫描电镜(SEM)观察水凝胶表面形貌

将GelMA及GelMA-DMOG水凝胶经过冷冻干燥,真空下膜表面喷金后,在SEM下观察形态并拍摄图片,使用Nanomesure软件测得水凝胶膜截面孔洞的孔径。

1.2.3 GelMA及GelMA-DMOG水凝胶的体外降解

取同等质量光固化后的两种水凝胶(质量记为 W_0)放入15 mL离心管中,加入5 mL的PBS,置于37℃恒温水浴摇床。每天观察水凝胶降解情况并在规定的时间点(5、10、15、20、25 d),尽可能取尽液体并对剩余的水凝胶称重(记为 W_t),然后加入新的PBS,每个时间点每个样本重复检测3次。降解率= $(W_0 - W_t) / W_0 \times 100\%$ 。

1.2.4 小鼠MC3T3-E1细胞的培养

将冻存的MC3T3-E1细胞复苏,使用 α -MEM培

培养基(含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素),放入37℃、5% CO₂培养箱。每2 d更换1次培养基,待细胞增殖至培养皿的80%时,将细胞按照1:3比例进行传代备用。

1.2.5 GelMA及GelMA-DMOG水凝胶对MC3T3-E1生长增殖的影响

光固化的GelMA和GelMA-DMOG水凝胶置于96孔板中,PBS清洗消毒后,1×10⁴个细胞接种于不同水凝胶材料及空白孔板中。培养3 d后行鬼笔环肽(phalloidin)及DAPI染色,荧光显微镜下观察细胞形态及黏附情况;按照上述分组分别培养1、3、5、7 d时,弃去细胞上清,加入CCK-8检测液反应后,于酶标仪下检测450 nm波长处的吸光度,每个时间点每组3个复孔。

1.2.6 GelMA及GelMA-DMOG水凝胶对MC3T3-E1细胞成骨向分化能力的影响

首先按前述方法接种2×10⁴个细胞于不同水凝胶材料及空白24孔板中,在培养箱中培养24 h,直至细胞充分贴壁生长。每2 d更换成骨诱导培养基(10% FBS,100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,100 nmol/L地塞米松,50 μg/mL抗坏血酸和10 mmol/Lβ-甘油磷酸钠)。14 d时行ALP染色,21 d时行茜素红染色,显微镜下拍照,使用Image J软件分析照片中ALP和茜素红阳性面积百分率。

1.2.7 qRT-PCR检测成骨相关基因

按前述方法接种1×10⁵个细胞于6孔板内成骨诱导7 d后,TRIzol试剂盒提取各组细胞总RNA,使用逆转录试剂盒合成cDNA,qRT-PCR检测成骨相关基因核心结合因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和骨钙素(osteocalcin, OCN)的基因表达水平。所用引物如表1所示,由上海生工生物工程股份有限公司合成。GAPDH作为内参,通过2^{-ΔΔCT}方法计算各指标的相对量。

1.2.8 大鼠颅骨缺损模型检测GelMA及GelMA-DMOG水凝胶体内促成骨效果

取健康雄性SD大鼠18只构建双侧颅骨临界骨缺损模型。本实验经苏州市第九人民医院伦理学委员会批准。按照3 mL/kg体重腹腔注射10%水合氯醛麻醉。切开皮肤、皮下及骨膜后,用直径5 mm电钻在中线两侧钻孔,去除颅骨全层。按压止血后,用移液器注入200 μL PBS或不同水凝胶于骨缺损部位,紫外光照射3 min固化水凝胶后,依次缝合。一共获得36个颅骨缺损,根据是否植入及植入

表1 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of the genes

基因	引物序列(5'→3')
GAPDH	上游引物:AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	下游引物:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Runx2	上游引物:GACACTGCCACCTCTGACTT
	下游引物:GATGAAATGCTTGGGAACTG
OCN	上游引物:CGGCCCTGAGTCTGACAAA
	下游引物:GCCGGAGTCTGTTCACCTT
ALP	上游引物:ACGTGGCTAAGAATGTCATC
	下游引物:CTGGTAGGGGATGTCCTTA

材料的不同,随机分为空白对照组(Control)、GelMA水凝胶组和GelMA-DMOG水凝胶组。在术后4周、8周各处死9只大鼠,颅骨用10%中性福尔马林固定后Micro-CT扫描,使用Mimics重建三维图像,CTAn软件分析建模区域的骨密度和骨量。样品Micro-CT扫描后,使用EDTA脱钙液脱钙21 d,梯度脱水,石蜡包埋,切片,HE染色,显微镜观察拍照。

1.3 统计学方法

采用SPSS16.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GelMA/GelMA-DMOG水凝胶的表面形貌和降解

如图1A所示,未聚合的GelMA和GelMA-DMOG水凝胶为透明液态,完全固化后的水凝胶则为半透明样薄层,表面光滑。SEM观察显示两种水凝胶均为低密度、高孔隙率和孔道互相连通的通孔结构(图1B)。两种水凝胶的孔径相近,为100~500 μm,平均(150±30)μm。两种水凝胶的降解时间也无明显差异,均在22 d左右完全降解(图1C)。这些结果显示DMOG溶液制备的GelMA水凝胶并没有影响其表面形貌和降解。

2.2 GelMA-DMOG水凝胶对MC3T3-E1细胞黏附和增殖的影响

为了明确加入DMOG对GelMA水凝胶支架的生物学性能是否有影响,首先观察了MC3T3-E1细胞在两种水凝胶上的生长黏附情况。鬼笔环肽和DAPI染色后荧光显微镜观察可见,在两种水凝胶上细胞黏附和生长情况都很好,细胞亮度高且均匀,伪足伸展长(图2A)。CCK-8检测两种水凝胶对MC3T3-E1细胞增殖的影响,结果显示与在96孔板

上培养的对照组(Control)相比, GelMA 和 GelMA-DMOG 水凝胶组对细胞的增殖无明显影响, 说明两种水凝胶均具有很好的生物相容性(图2B)。

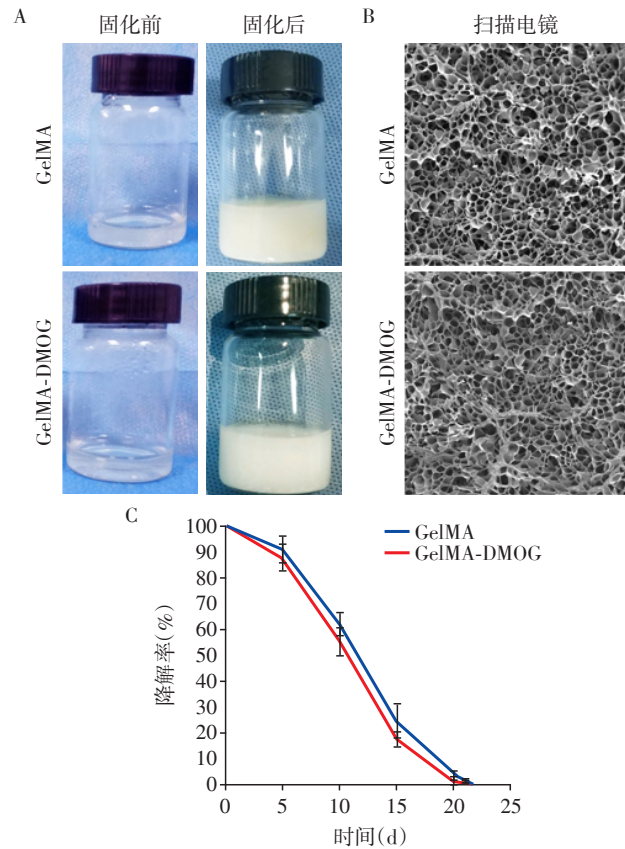
2.3 GelMA/GelMA-DMOG 水凝胶对 MC3T3-E1 细胞成骨向分化的影响

ALP 染色结果显示, 与培养在 24 孔板上的 Control 组相比, 细胞培养 14 d 后 GelMA 水凝胶培养组 ALP 阳性面积百分率略有提升; 与 Control 和 GelMA 组相比, GelMA-DMOG 水凝胶培养组 ALP 阳性面积明显增加, 差异有统计学意义(图 3A、B)。茜素红染色可反映钙盐沉积的情况, 细胞培养 21 d 后行茜素红染色, 结果发现, 与 Control 组相比, GelMA 和 GelMA-DMOG 培养组茜素红阳性面积百分率均明显增高, GelMA-DMOG 组与 GelMA 组相比也明显增高, 差异有统计学意义(图 3A、C)。

检测细胞在 3 种条件下培养 7 d 后成骨相关基因的表达情况。结果显示, 与 Control 组和 GelMA 组相比, GelMA-DMOG 组 Runx2、ALP 和 OCN 基因的表达水平均明显上调, 差异有统计学意义。而与 Control 组相比, GelMA 组 Runx2 和 ALP 的基因表达水平也有一定程度的上调(图 3D~F), 这与细胞染色的结果相一致。这些结果提示, 负载 DMOG 明显增强了 GelMA 水凝胶的促细胞成骨向分化能力。

2.4 GelMA-DMOG 水凝胶对大鼠颅骨骨缺损的修复效果

构建大鼠双侧颅骨临界骨缺损模型并植入 GelMA 或 GelMA-DMOG 水凝胶, 无植入材料设为 Control 组(图 4A)。术后所有 SD 大鼠的活动、进食以及大小便均正常。所有动物的切口愈合良好, 无红

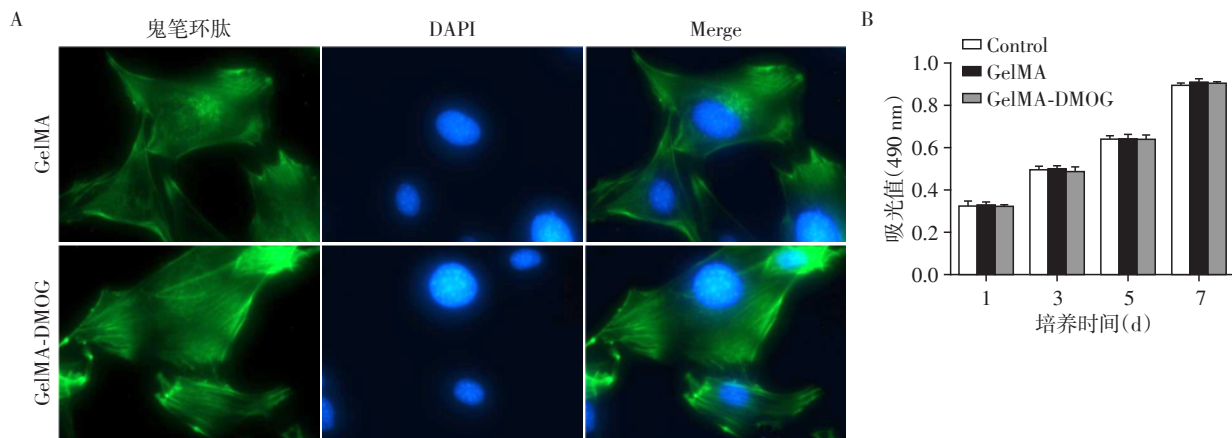


A: GelMA 和 GelMA-DMOG 水凝胶固化前和固化后的大体照片; B: 两种水凝胶横截面扫描电镜照片($\times 400$); C: 两种水凝胶的降解率, $n=3$ 。

图1 GelMA/GelMA-DMOG 水凝胶的大体观、表面形貌和降解率

Figure 1 General observation, surface morphology and degradation rate of GelMA/GelMA-DMOG hydrogels

肿, 无渗出, 无流脓, 无皮肤坏死或破溃。术后 4 周和 8 周, 过量麻醉处死大鼠后取大鼠颅骨行 Micro-



A: MC3T3-E1 细胞在两种水凝胶上培养 3 d 后行鬼笔环肽和 DAPI 荧光染色($\times 400$); B: MC3T3-E1 细胞分别在 96 孔板(Control)和两种水凝胶上培养 1、3、5、7 d 后, CCK-8 检测细胞增殖活性, $n=3$ 。

图2 MC3T3-E1 细胞在 GelMA/GelMA-DMOG 水凝胶上的黏附生长和增殖情况

Figure 2 Adhesion and proliferation of MC3T3-E1 cells cultured on GelMA/GelMA-DMOG hydrogels

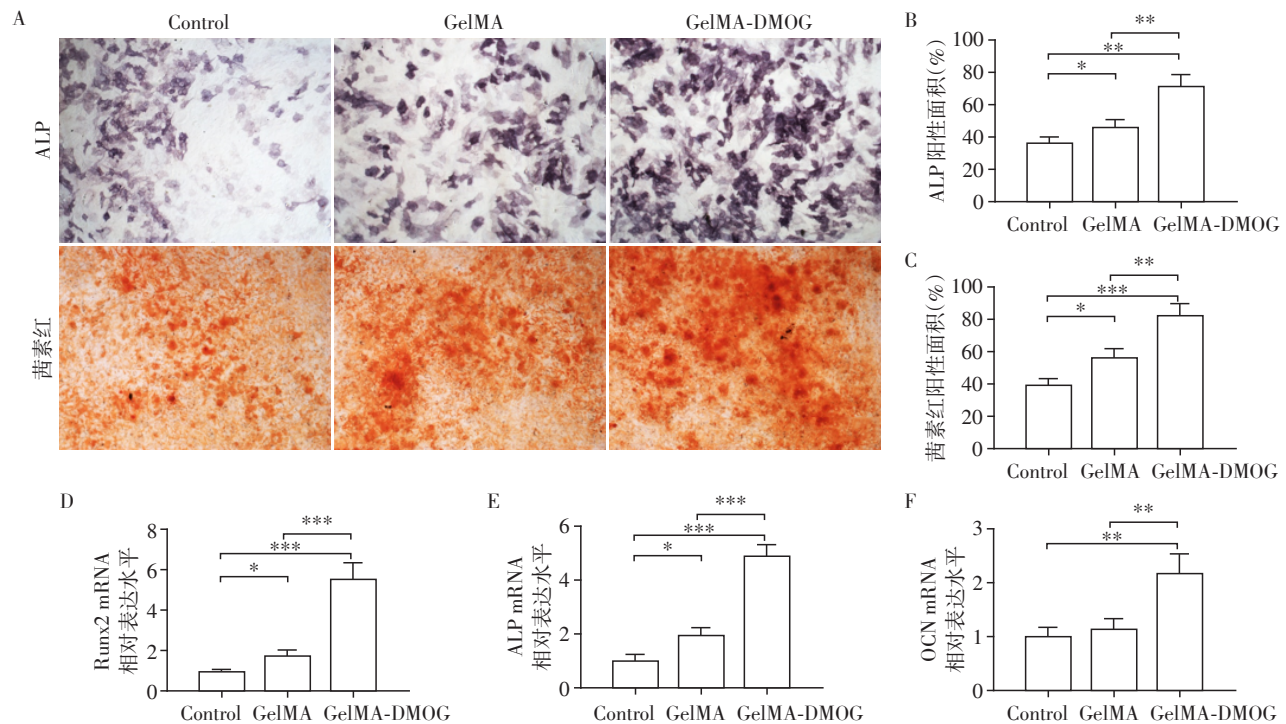
CT扫描检测。三维重建后发现,Control组骨缺损并无明显的修复,边缘不规则且模糊;GelMA组随着时间的延长骨缺损面积有减小,边缘较毛糙;GelMA-DMOG组骨缺损面积显著减小,边缘极不规则(图4B)。对缺损区域(红色圆圈区域)分析发现,与Control和GelMA组相比,GelMA-DMOG组骨密度和骨量均明显增加(图4C~D)。HE染色发现,在Control组骨缺损区域充满大量纤维组织,期间分布少量新生毛细血管;GelMA组在术后4周时主要为纤维样组织,术后8周时可以发现大量不成熟编织骨;GelMA-DMOG组在术后4周时可见在残余材料周围大量新生血管网和编织骨形成,术后8周时则可见成熟及不成熟的板层骨交替排列,存在大量成熟骨小梁及微血管结构(图4E)。这些结果提示,负载DMOG后,明显增强了GelMA水凝胶的骨缺损修复能力。

3 讨论

在体内组织中,细胞之间含有细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。ECM中包含了大量细胞分泌的细胞因子,为细胞提供了一个具有组织活性的

3D环境。骨组织是一种坚硬的结缔组织,也是由细胞和ECM构成。骨的ECM主要由大量固体无机盐和I型胶原组成,其中胶原纤维是矿物沉积、骨传导和骨诱导的基础^[10]。应用于骨软骨组织工程的水凝胶材料有很多种,从聚乳酸水凝胶、聚己酸内酯水凝胶、透明质酸水凝胶到胶原水凝胶等。胶原是ECM中主要成分之一,具有更好的生物相容性和低免疫原性,但单纯的胶原水凝胶存在机械强度不足,耐热性欠佳等缺陷。

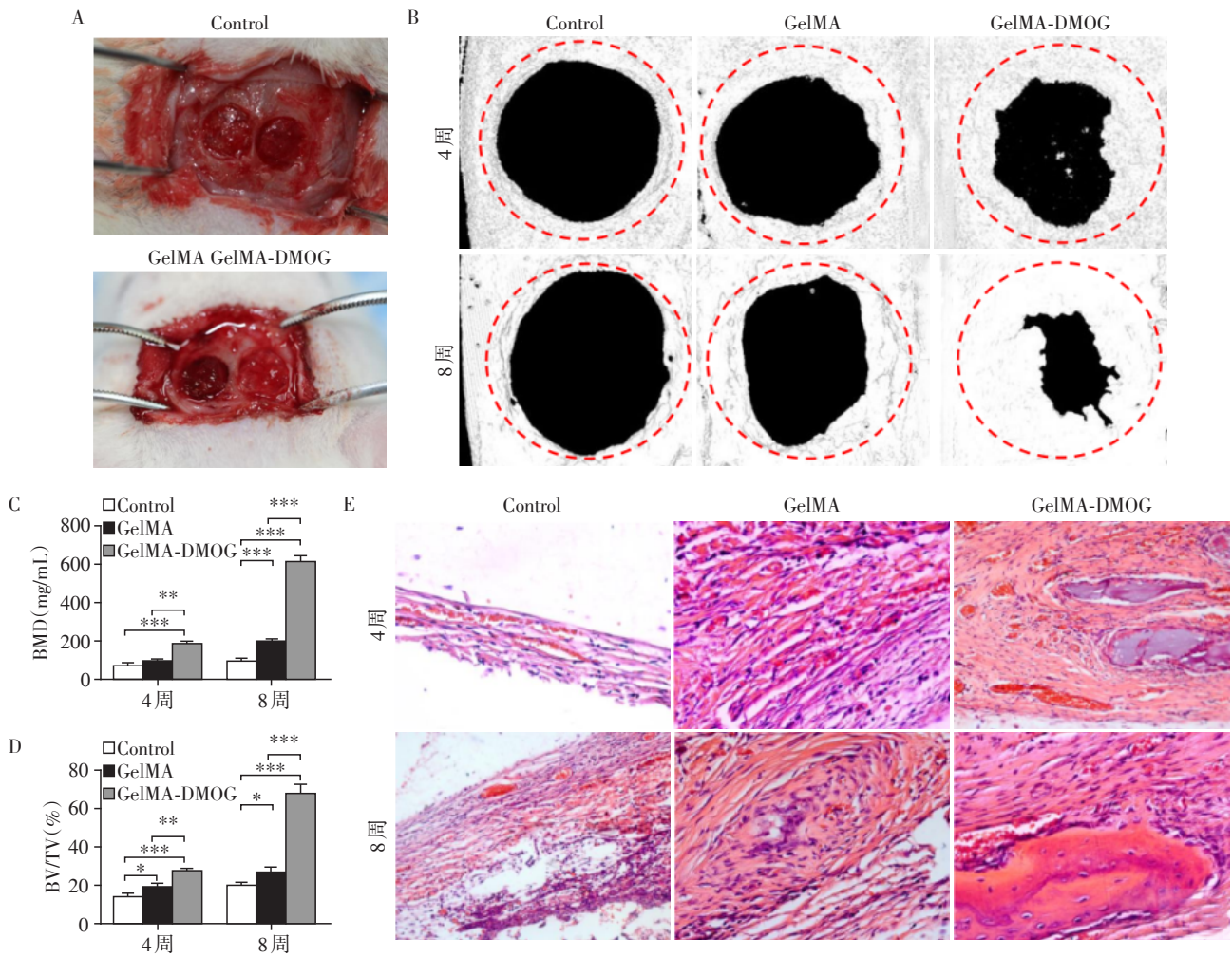
GelMA是一种经过改良修饰的天然ECM水凝胶,兼具了天然和人工水凝胶的优势。而通过一定的手段方法来调控GelMA的孔隙率、孔径和降解率,可以使其获得一个理想的力学性能,适宜所有种类的细胞的黏附、伸展和增殖。这一特性比I型胶原水凝胶有更为明显的优势^[11]。而且,GelMA的主要成分为明胶,是来源于胶原水解产物的生物高分子,富含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸黏附肽序列(arginine glycine aspartic acid, RGD)和基质金属蛋白酶敏感性降解位点。RGD序列存在于多种细胞外基质中,可与多种整合素特异性结合,能有效地促进细胞对生物材料的黏附,具有更佳的骨组织工程应



A: MC3T3-E1细胞分别在24孔板(Control)和两种水凝胶上培养14 d后行ALP染色(上),培养21 d后行茜素红染色(下),显微镜下拍摄细胞染色照片($\times 100$);B: Image J分析ALP染色阳性面积百分率;C: Image J分析茜素红染色阳性面积百分率;D~F: MC3T3-E1细胞分别在6孔板(Control)和两种水凝胶上培养7 d后,成骨相关基因Runx2、ALP和OCN的相对表达水平。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 GelMA/GelMA-DMOG水凝胶对MC3T3-E1细胞成骨向分化的影响

Figure 3 Effect of GelMA / GelMA-DMOG hydrogels on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells



A: 构建大鼠双侧颅骨临界骨缺损模型并植入两种水凝胶材料,无植入材料为Control组;B: 术后4周和8周颅骨骨缺损区域Micro-CT扫描后三维重建图片;C~D: 骨缺损区域的骨密度(BMD)和新生骨骨量(BV/TV),两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n=6$);E: 术后4周和8周颅骨骨缺损区域的HE染色图片($\times 100$)。

图4 GelMA/GelMA-DMOG水凝胶对大鼠颅骨骨缺损的修复

Figure 4 Effect of GelMA/GelMA-DMOG hydrogels on repairing rat calvarial bone defect

用潜能。如GelMA复合软骨来源基质颗粒能够促进多能干细胞软骨向分化^[6],GelMA作为支架材料负载成骨生长肽能够用于大鼠股骨髁骨缺损的修复^[12]。研究发现材料表面孔径大于100 μm 能促进新骨形成^[13]。本研究制备的GelMA水凝胶具有多微孔和相互交通的结构,孔径大小合适,非常利于骨的形成。体外细胞实验也可以发现,GelMA水凝胶对细胞没有毒性,具有良好的生物相容性。

HIF-1 α 是一个在缺氧环境下被激活,能够影响细胞对葡萄糖的利用、铁转运、血细胞形成、血管发生、细胞的存活和凋亡诱导干细胞的转录因子,在骨再生时成骨和成血管的耦联反应中也发挥了重要作用^[8]。研究证实HIF-1 α 在骨组织的形成和再生中发挥非常重要的作用^[14]。有研究发现激活HIF-

1 α 的表达能够促进牵张成骨术中骨的再生,加速骨组织的形成^[15]。同时,HIF-1 α 是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的上游基因,HIF-1 α 过表达能够增强VEGF在细胞中的分泌。然而在常氧环境下,脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylases, PHD)能够羟基化HIF-1 α ,使其泛素化并迅速降解,无法发挥相应的功能。PHD抑制剂DMOG能够在常氧条件下抑制PHD的活性,从而上调HIF-1 α 基因的表达^[16]。有研究报道将DMOG及氯化钴负载到多孔生物活性玻璃材料上,同时在材料上培养间充质干细胞,培养一定时间后其成骨及成血管相关的基因均得到明显上调,而且体内实验表明负载有氯化钴或DMOG处理的间充质干细胞的材料能有效促进颅盖骨骨缺损愈合^[17-18]。本研究

使用GelMA水凝胶作为支架材料负载了DMOG,体外实验表明与GelMA相比,GelMA-DMOG水凝胶能明显增强MC3T3-E1细胞的成骨向分化。大鼠颅骨骨缺损模型体内实验则显示,GelMA-DMOG水凝胶能显著增强骨缺损的修复。从HE染色可以发现,在GelMA-DMOG材料周围存在大量新生血管,而在骨的生物性构建中,血管化的完善与否将对骨形成的质与量起着举足轻重的作用^[19]。

因此,本研究制备出的可注射光固化GelMA-DMOG水凝胶具有良好的生物相容性和较好的促成骨和促血管生成的能力。而GelMA水凝胶本身作为一种3D支架也可以通过负载种子细胞来促进骨的修复,因此GelMA-DMOG水凝胶有望作为一种新型的骨修复支架材料应用于骨缺损修复。

[参考文献]

- [1] ORYAN A, ALIDADI S, MOSHIRI A, et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions[J]. *J Orthop Surg Res*, 2014, 9(1): 18
- [2] LEGEROS R Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2002, 395: 81-98
- [3] SEEBACH C, HENRICH D, KAHLING C, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(6): 1961-1970
- [4] 吕振京,孙国栋,焦延鹏,等. 壳聚糖/亚磷酸壳聚糖海绵复合人脐带间充质干细胞构建组织工程骨修复骨缺损的实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(10): 1361-1366
- [5] VAN DEN BULCKE A I, BOGDANOV B, DE ROOZE N, et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels[J]. *Biomacromolecules*, 2000, 1(1): 31-38
- [6] VISSER J, GAWLITTA D, BENDERS K E, et al. Endochondral bone formation in gelatin methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles[J]. *Biomaterials*, 2015, 37: 174-182
- [8] BARTNIKOWSKI M, BARTNIKOWSKI N J, WOODRUFF M A, et al. Protective effects of reactive functional groups on chondrocytes in photocrosslinkable hydrogel systems[J]. *Acta Biomater*, 2015, 27: 66-76
- [9] RIDDLE R C, KHATRI R, SCHIPANI E, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in angiogenic-osteogenic coupling[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2009, 87(6): 583-590
- [10] BERNHARDT W M, GOTTMANN U, DOYON F, et al. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(50): 21276-21281
- [11] FLORENCIO-SILVA R, SASSO G R, SASSO-CERRI E, et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 421746
- [12] VLIERBERGHE S V, CNUUDE V, DUBRUEL P, et al. Porous gelatin hydrogels: 1. Cryogenic formation and structure analysis[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(2): 331-337
- [13] QIAO Y, LIU X, ZHOU X, et al. Gelatin templated polypeptide co-cross-linked hydrogel for bone regeneration[J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(1): e1901239
- [14] KUBOKI Y, JIN Q, TAKITA H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83-A Suppl 1(Pt 2): S105-S115
- [15] WAN C, SHAO J, GILBERT S R, et al. Role of HIF-1alpha in skeletal development[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1192: 322-326
- [16] WAN C, GILBERT S R, WANG Y, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(2): 686-691
- [17] ZHDANOV A V, OKKELMAN I A, COLLINS F W, et al. A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1847(10): 1254-1266
- [18] FAN W, CRAWFORD R, XIAO Y. Enhancing *in vivo* vascularized bone formation by cobalt chloride-treated bone marrow stromal cells in a tissue engineered periosteum model[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(13): 3580-3589
- [19] DING H, GAO Y S, WANG Y, et al. Dimethylxaloylglycine increases the bone healing capacity of adipose-derived stem cells by promoting osteogenic differentiation and angiogenic potential[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(9): 990-1000
- [20] GOTZ W, REICHERT C, CANULLO L, et al. Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing - a brief overview[J]. *Ann Anat*, 2012, 194(2): 171-173

[收稿日期] 2020-01-25