

• 药理与临床 •

海螵蛸/牛血清白蛋白光交联水凝胶促进骨愈合作用及机制

吴思贤^{1,2}, 卓 涛^{1,2}, 王国威^{1,2}, 李梦颖², 何 毅^{1,2}, 刘建航^{2*}

1. 广西中医药大学研究生院, 广西 南宁 530200

2. 北海市中医医院 骨伤科, 广西 北海 536006

摘要: 目的 探讨海螵蛸 (cuttlebone, CB) /牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 光交联水凝胶干预大鼠颅骨临界尺寸骨缺损 (critical-sized bone defects, CSBD) 模型的作用与潜在机制。方法 SD 大鼠随机分为对照组、阳性对照组、BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组, 每组 6 只。采用 5 mm 外径环钻建立大鼠 CSBD 模型, 对照组仅造模, 无植入物; 阳性对照组植入 Bio-Oss® Collagen 骨填充材料; BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组分别植入 CB 质量分数为 0、0.5%、1.5% 和 3% 的 CB/BSA 光交联水凝胶。术后 8 周, 通过微型计算机断层扫描 (micro-computed tomography, Micro-CT) 对骨组织微结构变化进行分析; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 染色观察颅骨组织病理改变; 免疫组化和免疫荧光法分别检测颅骨组织 I 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type I alpha 1, COL1A1)、血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 及骨钙素 (osteocalcin, OCN) 的阳性表达及荧光强度; qRT-PCR 和 Western blotting 分别检测颅骨组织 Wnt 家族成员 3A (Wnt family members 3A, WNT3A)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、COL1A1、PECAM-1、OCN 的基因及蛋白表达。为评估水凝胶的体内安全性, 采集大鼠腹主动脉血分析血常规和血清肝肾功能指标变化。结果 Micro-CT 结果显示, 对照组大鼠骨缺损区未见新生骨形成, 表明其在观察期内未能实现骨性愈合。病理组织切片结果显示, 对照组缺损区以疏松的纤维组织为主; 而 CB/BSA 光交联水凝胶组可见新骨形成。与对照组比较, CB/BSA 光交联水凝胶组大鼠的骨体积分数、骨密度、骨小梁厚度显著升高 ($P < 0.05$), 骨表面积与骨体积比显著降低 ($P < 0.05$), 颅骨组织 COL1A1、PECAM-1、OCN 阳性表达和荧光强度显著增加 ($P < 0.05$), COL1A1、PECAM-1、 β -catenin、WNT3A、VEGFA、OCN 的表达水平显著上调 ($P < 0.05$), 其中以 3.0% CB/BSA 光交联水凝胶组的综合效果最佳。各组大鼠血常规和血清肝肾功能指标均未见明显异常, 主要脏器未见炎症、坏死或纤维化等病理改变。结论 CB/BSA 光交联水凝胶展现出良好的骨修复作用与体内安全性, 其促成骨效应可能是通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路介导。

关键词: 海螵蛸; 牛血清白蛋白; 光交联水凝胶; 骨修复; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2026)16 - 6356 - 15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.16.012

Effect and mechanism of cuttlebone/bovine serum albumin photocrosslinked hydrogel on promoting bone healing

WU Sixian^{1,2}, ZHUO Tao^{1,2}, WANG Guowei^{1,2}, LI Mengying², HE Yi^{1,2}, LIU Jianhang²

1. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Department of Orthopedics and Traumatology, Beihai Hospital of Chinese Medicine, Beihai 536006, China

Abstract: Objective To investigate the effect and potential mechanism of cuttlebone (CB)/bovine serum albumin (BSA) photocrosslinked hydrogel on rats with critical sized bone defects (CSBD) model in skull tissues. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, positive control group, BSA group, 0.5% CB/BSA group, 1.5% CB/BSA group and 3.0% CB/BSA group,

收稿日期: 2026-03-04

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (8216140594); 广西壮族自治区科技厅自然科学基金项目 (2022JJA140818); 广西中医药大学 2025 年校级博士研究生科研创新项目 (YCBXJ2025026); 广西中医药大学 2025 年自治区级硕士研究生科研创新项目 (YCSW2025452); 广西中医药大学研究生科研创新项目 (YCLT2025008); 北海市科技局研发项目 (北科合 2023258021)

作者简介: 吴思贤, 博士研究生, 研究方向为中医骨伤科学。E-mail: 494090516@qq.com

***通信作者:** 刘建航, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中医骨伤科学。E-mail: secondmix@sina.com

with six rats in each group. A rat CSBD model was established using a 5 mm outer diameter ring drill, while the control group only underwent modeling without implants, positive control group implanted with Bio-Oss® collagen bone filling material, CB/BSA photocrosslinked hydrogels with CB mass fraction of 0, 0.5%, 1.5% and 3% were implanted in BSA group, 0.5% CB/BSA group, 1.5% CB/BSA group and 3.0% CB/BSA group, respectively. After eight weeks after surgery, the microstructural changes of bone tissue were analyzed using micro computed tomography (Micro CT). Hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining were used to observe pathological changes in skull tissue. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to detect the positive expressions and fluorescence intensity of collagen type I alpha 1 (COL1A1), platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and osteocalcin (OCN) in skull tissue, respectively. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the gene and protein expressions of Wnt family members 3A (WNT3A), β -catenin, vascular endothelial growth factor A (VEGFA), COL1A1, PECAM-1 and OCN in skull tissue, respectively. In order to evaluate the safety of hydrogel *in vivo*, the abdominal aorta blood of rats was collected to analyze the changes of blood routine and serum liver and kidney function indexes. **Results** Micro-CT results showed that no new bone formation was observed in the bone defect area of rats in control group, indicating that bone healing was not achieved during the observation period. The pathological tissue section results showed that the defect area in control group was mainly composed of loose fibrous tissue. In CB/BSA photocrosslinked hydrogel group, new bone formation was observed. Compared with control group, bone volume/tissue volume (BV/TV), bone mineral density (BMD and trabecular thickness (Tb.Th) of rats in CB/BSA photocrosslinked hydrogel group were significantly increased ($P < 0.05$), bone surface/bone volume (BS/BV) was significantly decreased ($P < 0.05$), the positive expressions and fluorescence intensity of COL1A1, PECAM-1, OCN in skull tissue were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of COL1A1, PECAM-1, β -catenin, WNT3A, VEGFA, OCN were significantly increased ($P < 0.05$), among which, the 3.0% CB/BSA photocrosslinked hydrogel group had the best comprehensive effect. No significant abnormalities were found in the blood routine and serum liver and kidney function indicators of rats in each group, and no pathological changes such as inflammation, necrosis or fibrosis were observed in the main organs. **Conclusion** CB/BSA photocrosslinked hydrogel shows good bone repair effect and safety *in vivo*, and its osteogenic effect may be mediated by activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: cuttlebone; bovine serum albumin; photocrosslinked hydrogel; bone repair; Wnt/ β -catenin signaling pathway

临界尺寸骨缺损 (critical-sized bone defects, CSBD) 常由严重创伤、肿瘤切除、感染或先天畸形所致, 其缺损范围已超越骨组织的自愈能力, 无法自行修复, 常需手术干预^[1]。全球每年需接受骨移植的 CSBD 病例超过 200 万, 治疗费用高达 30 亿美元以上, 给患者和医保系统造成沉重负担^[2]。自体骨移植是临床治疗 CSBD 的“金标准”, 但存在供区并发症与骨量不足等问题; 而异体/异种骨材料则面临免疫排斥、疾病传播等潜在风险。研发安全、有效的新型骨修复材料, 是当前骨组织工程领域的迫切需求。水凝胶因其三维网络结构与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 相似, 为细胞生长、迁移提供有利的微环境^[3]。蛋白质基水凝胶特别是牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 来源的材料, 具备良好的生物相容性、可调控的降解性及低免疫原性, 已成为骨修复支架的研究热点^[4]。通过甲基丙烯酸酐对 BSA 进行化学修饰, 可赋予其光交联特性, 使材料在紫外光照射下快速原位固化, 形成结构稳定的三维支架^[5]。体外实验证实, 该材料能促进小鼠胚胎成纤维细胞的黏附和增殖, 细胞存活率维持在 95% 以上, 且无溶血反应^[6]。然

而, 单纯经甲基丙烯酸酐修饰的 BSA 水凝胶缺乏成骨活性, 难以有效诱导干细胞成骨分化及促进钙盐沉积, 因而其在骨组织工程中的应用受限。

海螵蛸 *Sepiellae Seu Sepiae Endoconcha* 又称乌贼骨, 为乌贼科动物曼氏无针乌贼 *Sepiella maindroni* Rochebrune 或金乌贼 *Sepia esculenta* Hoyle 的干燥内壳^[7], 具有收敛止血、收湿敛疮等功效。研究发现, 海螵蛸主要成分为碳酸钙 (CaCO_3), 并含有钠 (Na)、锶 (Sr)、铁 (Fe)、镁 (Mg) 等无机元素, 其通过释放 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 等多种离子调控细胞成骨分化, 表现出良好的成骨活性, 是一种潜在的骨修复生物材料^[8]。由于人体骨骼主要成分为羟基磷灰石, 其生物活性优于碳酸钙。经磷酸盐处理后, 海螵蛸表面转化为羟基磷灰石, 其粗糙度与亲水性显著提升, 有助于促进细胞黏附、ECM 的钙盐沉积, 最终加速成骨矿化^[9]。尽管磷酸盐改性后的海螵蛸生物活性有所提高, 但其粉末形态在植入后易发生移位和流失, 无法在骨缺损区形成稳定填充^[10]。BSA 光交联水凝胶具有良好的可注射性与原位成型能力, 可作为海螵蛸的载体材料。本研究通过将两者复合, 旨在实现功能协同: BSA

光交联水凝胶构建三维网络,为海螵蛸提供结构支撑,而海螵蛸则通过释放骨矿物关键组分,发挥促成骨性能。本课题组前期已完成海螵蛸/BSA (cuttlebone/BSA, CB/BSA) 光交联水凝胶的制备,体外实验证实其能够促进小鼠胚胎成骨细胞前体细胞增殖、迁移与成骨分化。然而,该材料在体内的骨修复效能、安全性及其潜在的分子机制尚不明确。因此,本研究通过建立大鼠颅骨 CSBD 模型,评价其体内促成骨效果与生物安全性,并探究其作用是否与调控 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路有关,以期为该材料的进一步研发与转化提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,8 周龄,体质量 (250 ± 30) g,购自湖南斯莱克景达有限公司,许可证号 SYXK (湘) 2021-0002,动物质量合格证号 430727251100765064。动物饲养于武汉华联科生物技术有限公司,许可证号 SYXK (鄂) 2023-0104,饲养环境温度 (22 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~60%,自由进食饮水。动物实验经武汉华联科生物技术有限公司动物实验福利伦理委员会批准 (批准号 HLK-20250109-002),符合 3R 原则、动物福利基本原则等相关要求。

1.2 药材

海螵蛸 (500 g/袋) 购自北海市中医医院,经广西中医药大学李永华教授鉴定为乌贼科动物曼氏无针乌贼 *Sepiella maindroni* Rochebrune 的干燥内壳。

1.3 药品与试剂

Bio-Oss[®] Collagen 骨填充材料 (批号 20153460268) 购自瑞士盖氏制药有限公司;BSA (批号 V34377)、甲基丙烯酸酐 (批号 S50425)、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂 (lithium phenyl 2,4,6-trimethylbenzoyl phosphinate, LAP, 批号 Y43995)、10%醋酸溶液 (批号 W14374)、1%氨水溶液 (批号 R20788)、磷酸氢二铵 (批号 S24237) 购自上海源叶生物科技有限公司;苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 高清恒染试剂盒 (批号 G1076)、Masson 三色染色液 (批号 G1006)、TSA 荧光三标四色染色试剂盒 (批号 G1236) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司;PBS 缓冲液 (批号 P1020)、碳酸盐缓冲液 (批号 IC9110)、SBF 模拟体液 (批号 G0390) 购自上海碧云天生物技术有限公司;TRIzol RNA 提取试剂 (批号 15596026) 购自美国赛默飞科技公司;SYBR[®]

Premix Ex Taq[™] GC (批号 RR071A) 购自宝日医生物技术有限公司;I 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type I alpha 1, COL1A1) 抗体 (批号 A27820)、血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 抗体 (批号 A19014)、 β -catenin 抗体 (批号 A19657)、Wnt 家族成员 3A (Wnt family members 3A, WNT3A) 抗体 (批号 A25322)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 抗体 (批号 A23759)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 抗体 (批号 A6205SP)、 β -actin 抗体 (批号 AC026) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.4 仪器

DMS5-280/120 型加热型磁力搅拌器 (北京大龙实验仪器科技公司);LC-WB-4 型恒温水浴锅 (浙江力辰科学仪器有限公司);5427R 型高速冷冻离心机 (德国艾本德生物技术有限公司);SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司);DHG-9030 型恒温鼓风干燥箱 (上海蚁霖科学仪器有限公司);DMi8 型倒置荧光显微镜、Histo Core Arcadia C 型石蜡包埋机 (德国徕卡仪器有限公司);NEMO[®] 型小动物高分辨 Micro-CT (昆山平生医疗科技有限公司);Nano Drop One C 型核酸定量仪 (美国赛默飞科技公司);Light Cycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 系统 (美国罗氏生物科技公司);VICTOR Nivo 型多功能酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司);Chemi Doc 型化学发光成像系统 (美国伯乐生命医学产品有限公司);BC-5000Vet 型全自动血液细胞分析仪、BS-430 型全自动生化分析仪 (深圳迈瑞生物有限公司)。

2 方法

2.1 CB/BSA 光交联水凝胶的制备

2.1.1 磷酸盐处理海螵蛸 海螵蛸研磨后过 200 目筛,在 10%醋酸溶液中于室温下磁力搅拌 6 h,超纯水冲洗 3 次并烘干。参考 Sudhakar 等^[11]的处理方法,称取 2.5 g 海螵蛸粉末,超声分散于 50 mL 超纯水,在 90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下磁力搅拌,将 0.2 mol/L 磷酸氢二铵溶液缓慢加入其中,并滴加氨水调节反应液 pH 值至 11~12,继续搅拌 12 h。反应结束后,用超纯水反复离心洗涤沉淀,直至洗涤液呈中性,用无水乙醇洗涤 1 次,烘干。称取 1 g 上述制备的海螵蛸磷酸盐混合物,与 100 mL SBF 模拟体液在锥形瓶中混合,超声处理 20 min 使其均匀分散。随后将混合液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中孵育 72 h。孵育结束,再次用超纯水洗涤 3 次,烘干常温储存。

2.1.2 甲基丙烯酸酐修饰 BSA 参考 Chen 等^[12]的方法制备甲基丙烯酸酐化 BSA。称取 10 g BSA 溶于 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液并定容至 100 mL, 于 37 °C 持续搅拌下滴加 1 mL 甲基丙烯酸酐反应 2 h, 用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 7.0~7.4 终止反应, 随后在截留相对分子质量为 3.5×10^3 的透析袋中于 4 °C 超纯水中透析 24 h, 每 4 小时换液 1 次, 最后经超滤离心、冷冻干燥, 于 -20 °C 保存备用。配制 0.25% LAP 水溶液作为光引发剂, 4 °C 避光保存。取 1.5 g 甲基丙烯酸酐化 BSA 冻干品, 用 0.25% LAP 水溶液溶解并定容至 10 mL, 得到含 15% 甲基丙烯酸酐化 BSA、0.25% LAP 的前驱体溶液, 于 37 °C 水浴锅避光孵育 30 min 充分溶解。取适量该溶液加入 96 孔板中, 在波长 365 nm、光强 10 mW/cm² 的紫外光源下照射 30 s, 使其交联固化成水凝胶。

2.1.3 CB/BSA 光交联水凝胶的构建 参考 Tan 等^[13]的方法和课题组前期的配比探索, 设定甲基丙烯酸酐化 BSA 水凝胶前驱体溶液中海螵蛸的质量分数分别为 0、0.5%、1.5% 和 3.0%。各组甲基丙烯酸酐化 BSA 质量分数统一为 15%, LAP 光引发剂质量分数为 0.25%。各组海螵蛸添加量分别为 0、50、150、300 mg, 与 1.5 g 甲基丙烯酸酐化 BSA 在离心管中混合。加入 8 mL 预先配制的 0.25% LAP 光引发剂, 经涡旋振荡混匀, 使各离心管中的甲基丙烯酸酐化 BSA 充分溶解, 海螵蛸分散均匀。用同一 LAP 光引发剂定容至 10 mL 刻度线, 即制得光交联水凝胶前驱体溶液, 分别标记为 BSA、0.5% CB/BSA、1.5% CB/BSA 和 3.0% CB/BSA。

2.2 动物分组、造模与给药

36 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、阳性对照组、BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组, 每组 6 只。采用双侧直径 5 mm 的颅骨全层缺损作为 CSBD 模型。该尺寸的设定参考骨缺损模型研究领域的公认标准, 经文献证实, 可确保缺损在实验观察期内无法自行愈合, 从而有效评估植入材料的骨修复效能^[14]。各组大鼠备皮、消毒后沿颅骨正中矢状缝切开约 2 cm, 暴露双侧顶骨。用 5 mm 外径环钻于矢状缝两侧, 距中线约 3 mm, 制备对称的全层颅骨缺损, 术中以生理盐水间断冲洗降温, 避免骨组织热损伤。对照组缺损处不做处理; 阳性对照组缺损处植入 Bio-Oss® Collagen 骨填充材料; BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组缺

损处分别植入海螵蛸质量分数为 0、0.5%、1.5%、3% 的 CB/BSA 光交联水凝胶, 用波长 365 nm、光强 10 mW/cm² 的紫外光源照射 30 s, 使水凝胶溶液固化, 冲洗术野后逐层缝合。

2.3 取材

术后 8 周, 大鼠 ip 戊巴比妥钠处死, 完整取出颅骨及心、肝、脾、肺、肾主要脏器。将部分颅骨及脏器置于 4% 多聚甲醛中固定, 用于后续组织学分析; 另一部分颅骨组织保存于 -80 °C 冰箱, 用于提取总蛋白与 mRNA。经腹主动脉采血, 分别收集于 EDTA 抗凝管和普通促凝管用于血液学检测和血清生化分析。

2.4 显微计算机断层扫描 (micro-computed tomography, Micro-CT) 分析

将各组大鼠颅骨样本置于 Micro-CT 床进行扫描, 收集原始图像。用 Avatar 数据分析软件对目标区域图像分析处理, 所有样本均选择同一区域。定量分析骨体积分数 (bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨表面积与骨体积比 (bone surface/bone volume, BS/BV) 指标。

2.5 颅骨组织病理学变化观察

各组大鼠颅骨组织脱钙, 石蜡包埋固定, 按 5 μm 厚度切片, 分别进行 HE 和 Masson 染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.6 免疫组化检测颅骨组织 COL1A1、PECAM-1、OCN 表达

取各组大鼠颅骨组织石蜡切片, 脱蜡、抗原修复后, 分别孵育 COL1A1、PECAM-1、OCN 一抗 (稀释比例均为 1:200), DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 用中性树脂封固, 于显微镜下观察并拍照。苏木素染细胞核为蓝色, 阳性表达为棕黄色。

2.7 免疫荧光检测颅骨组织 COL1A1、PECAM-1、OCN 表达

取各组大鼠颅骨组织石蜡切片, 脱蜡、抗原修复后, 封闭, 依次孵育 PECAM-1 抗体 (稀释比例为 1:100)、二抗 (稀释比例为 1:400)、TSA 荧光试剂, 再次孵育 COL1A1 (稀释比例为 1:200)、OCN (稀释比例为 1:200)、TSA 荧光试剂, DAPI 染核, 避光孵育, 用抗荧光淬灭封片剂封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.8 qRT-PCR 检测颅骨组织 PECAM-1、VEGFA、COL1A1、WNT3A、β-catenin 和 OCN 基因表达

提取各组大鼠颅骨缺损区域组织的总 RNA, 反

转录为 cDNA。采用 SYBR® Premix Ex Taq™ GC 于 Light Cycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 系统上进行扩增。反应体系为 20 μL, 反应程序: 95 °C 预变性

5 min, 随后以 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火/延伸 1 min 的参数进行 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>PECAM-1</i>	CACCGTGATACTGAACAGCAA	GTCACAATCCCACCTTCTGTC
<i>VEGFA</i>	TCGGGCCTCCGAAACCATGA	CCGCCTCGGCTTGTCACATCT
<i>COL1A1</i>	ATCAGCCCAAACCCCAAGGAGA	CGCAGGAAGGTCAGCTGGATAG
<i>WNT3A</i>	GGTGGTAGAGAAACACCGAGA	CAGCTGACATAACAGCACCAG
<i>β-catenin</i>	AAGTTCTTGGCTATTACGACA	ACAGCACCTTCAGCACTCT
<i>OCN</i>	CAGACAAGTCCCACACAGCA	CCAGCAGAGTGAGCAGAGAGA
<i>GAPDH</i>	ATGGCTACAGCAACAGGGT	TTATGGGGTCTGGGATGG

2.9 Western blotting 检测颅骨组织 COL1A1、PECAM-1、β-catenin、WNT3A、VEGFA 和 OCN 蛋白表达

提取各组大鼠颅骨缺损区域组织的总蛋白, 用 BCA 法测定总蛋白含量, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别加入 COL1A1、PECAM-1、β-catenin、WNT3A、VEGFA、OCN、β-actin 一抗 (稀释比例均为 1:1 500), 4 °C 孵育过夜。洗涤 3 次, 加二抗 (稀释比例为 1:100 000), 室温孵育 1 h, 进行化学发光成像, 用 Image J 软件定量分析条带的灰度值, 计算目的蛋白相对表达量。

2.10 安全性评价

采用全自动血液细胞分析仪, 对收集于 EDTA 抗凝管中的血液进行血常规 (红细胞、白细胞、血红蛋白、血小板) 检测。采用全自动生化分析仪检测血清肝肾功能相关指标 [丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、肌酐 (creatinine, Cr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)]。对各组大鼠的肝、心、脾、肺、肾进行 HE 染色, 评估组织病理学改变。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件处理与分析数据, Graph Pad Prism 10.0 软件绘制图像。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较进行单因素方差分析。

3 结果

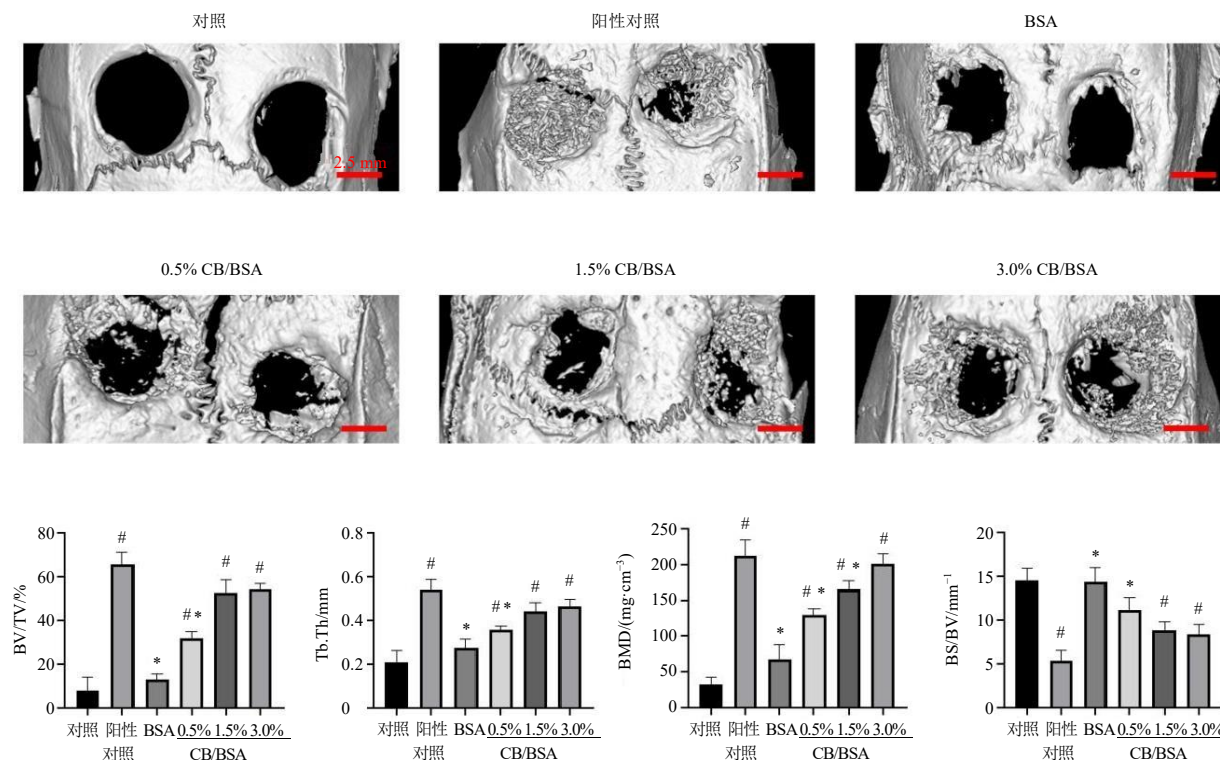
3.1 CB/BSA 光交联水凝胶对 CSBD 模型大鼠骨愈合的影响

如图 1 所示, Micro-CT 扫描结果显示, 对照组

大鼠骨缺损边界清晰, 周围无明显新生骨组织, 缺损区未发生自愈, 表明大鼠颅骨 CSBD 模型构建成功。阳性对照组可见缺损区域内有均匀、高密度的骨组织填充, 新生骨与宿主骨整合良好。0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组缺损边缘可见新骨形成, 其中 1.5%、3.0% CB/BSA 组缺损边缘的骨组织高密度影更明显, 新生骨组织向缺损中心区域延伸。骨参数定量结果显示, 与对照组比较, 阳性对照组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 BV/TV、Tb.Th、BMD 显著升高 ($P < 0.05$), 阳性对照组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 BS/BV 显著降低 ($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, BSA 组和 0.5% CB/BSA 组 BV/TV、Tb.Th 显著降低 ($P < 0.05$), BS/BV 显著升高 ($P < 0.05$), BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组 BMD 显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2 CB/BSA 光交联水凝胶对 CSBD 模型大鼠颅骨组织病理变化的影响

HE 染色结果 (图 2) 显示, 对照组大鼠颅骨缺损区域主要由疏松、无定形的纤维结缔组织填充, 细胞密度较低, 仅见少量纤维排列, 未见典型的新生骨小梁或活跃的成骨细胞带, 从病理组织学角度证实临界尺寸缺损模型建立成功。阳性对照组的缺损区被大量结构致密的新生组织填充, 细胞丰富, 并形成初步的骨小梁样结构, 与宿主骨连接紧密, 修复效果显著。植入 CB/BSA 光交联水凝胶后, 随着海藻酸钠含量的增加, 可观察到缺损区被结构致密的新生组织填充越多, 由边缘向中间迁移的趋势愈发明显, 表明新骨的生长更活跃, 组织的修复作用更好。



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与阳性对照组比较: * $P < 0.05$, 下图同。

$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs positive control group, same as below figures.

图 1 各组大鼠颅骨组织的 Micro-CT 扫描结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Micro-CT images results of skull tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

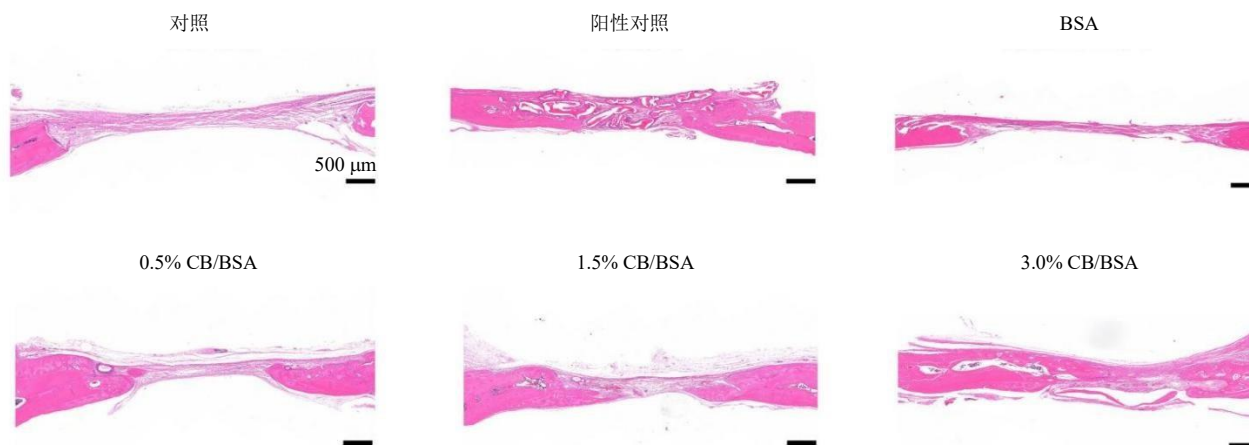


图 2 各组大鼠颅骨组织的 HE 染色结果 ($\times 100$)

Fig. 2 HE staining results of skull tissues of rats in each group ($\times 100$)

Masson 染色结果 (图 3) 显示, 对照组仅见少量蓝色胶原纤维, 表明骨缺损自身修复能力有限。阳性对照组可见密集、排列有序的深蓝色胶原纤维, 表明有大量成熟的 I 型胶原基质形成。植入 CB/BSA 光交联水凝胶后, 随着海藻酸钠含量的增加,

缺损区蓝色胶原填充增多。0.5% CB/BSA 组和 1.5% CB/BSA 组缺损边缘可见明显的红色成熟骨组织, 而 3.0% CB/BSA 组可见大量蓝色胶原纤维沉积, 表明其正处于旺盛的骨基质合成与矿化阶段, 具有更强的成骨诱导潜力。

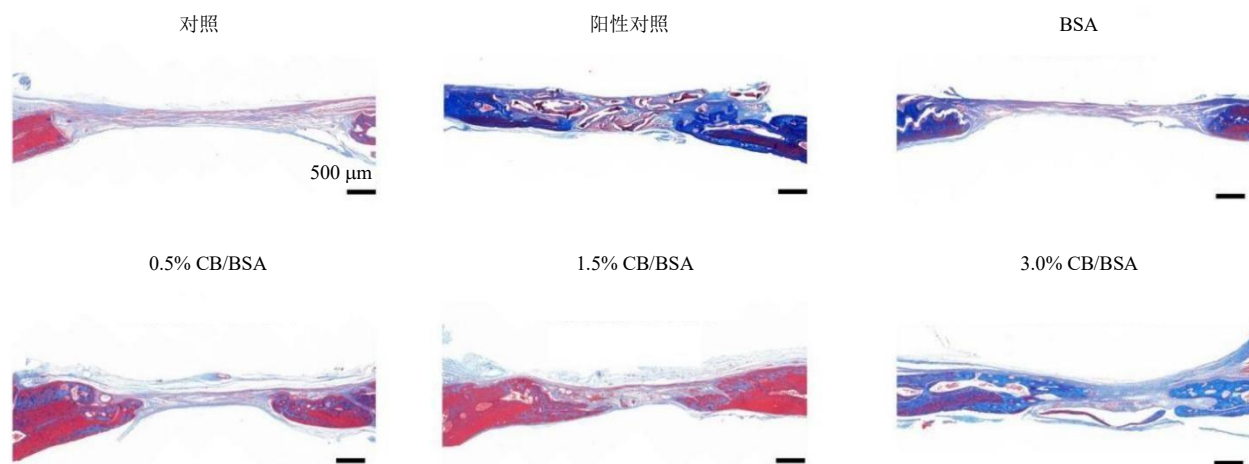


图 3 各组大鼠颅骨组织的 Masson 染色结果 (×100)

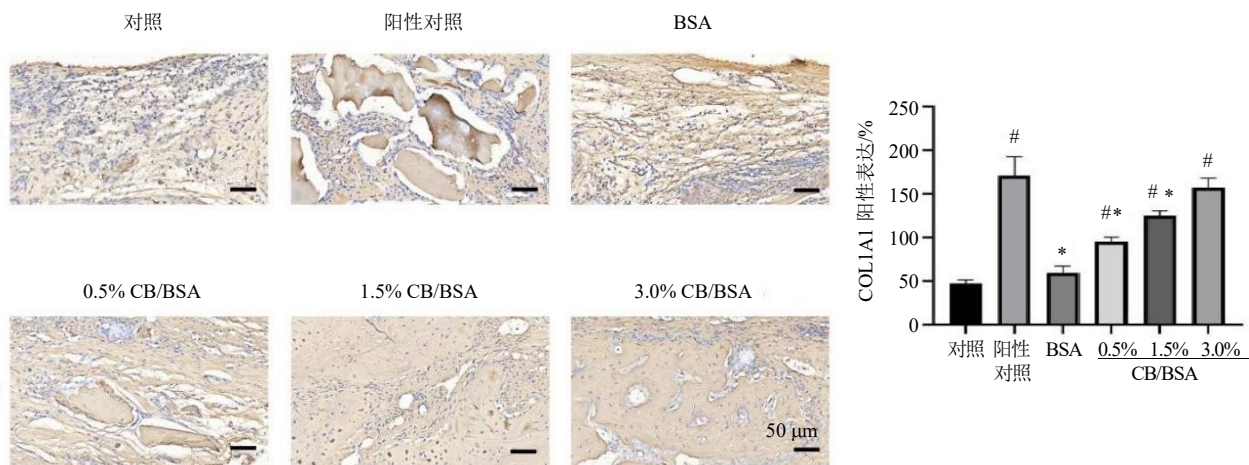
Fig. 3 Masson staining results of skull tissues of rats in each group (×100)

3.3 CB/BSA 光交联水凝胶对 CSBD 模型大鼠颅骨组织 COL1A1、PECAM-1、OCN 表达的影响

3.3.1 免疫组化结果 如图 4 所示,对照组的缺损区域表现为稀疏的棕黄色阳性信号表达,缺损区未见明显骨基质的合成。阳性对照组的缺损区域内可见多个散在分布的块状胶原沉积骨,其四周被稀疏的胶原组织围绕。0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组骨组织缺损区内 COL1A1 的阳性信号表达分布更均匀、密集,骨基质的形成明显。定量分析结果显示,与对照组比较,阳性对照组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 COL1A1 阳性表达显著升高 ($P < 0.05$);与阳性对照组比较,BSA 组、0.5% CB/BSA 组和 1.5% CB/BSA 组 COL1A1 阳性表达显著降低 ($P < 0.05$)。

如图 5 所示,对照组的缺损区内仅观察到少量散在的阳性信号表达,而阳性对照组 PECAM-1 阳性信号表达明显,说明有成熟的血管组织生成。植入 CB/BSA 光交联水凝胶后,可观察到 PECAM-1 阳性信号表达增强,尤其是 1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组的阳性信号表达更为明显,说明新生的血管网络更为丰富。定量分析结果显示,与对照组比较,阳性对照组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 PECAM-1 阳性表达显著升高 ($P < 0.05$);与阳性对照组比较,BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 PECAM-1 阳性表达显著降低 ($P < 0.05$)。

如图 6 所示,对照组的骨缺损区内 OCN 阳性信号表达较少,说明骨修复的进程不明显,缺乏矿

图 4 各组大鼠颅骨组织的 COL1A1 免疫组化染色结果 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 COL1A1 immunohistochemistry results of skull tissues of rats in each group (×400; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

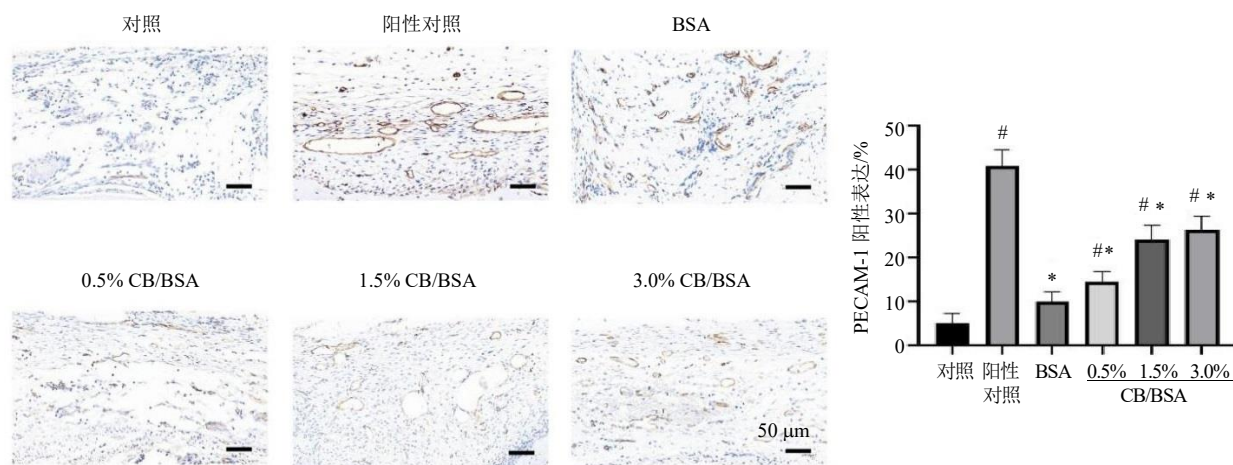


图5 各组大鼠颅骨组织的 PECAM-1 免疫组化染色结果 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 PECAM-1 immunohistochemistry results of skull tissues of rats in each group ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

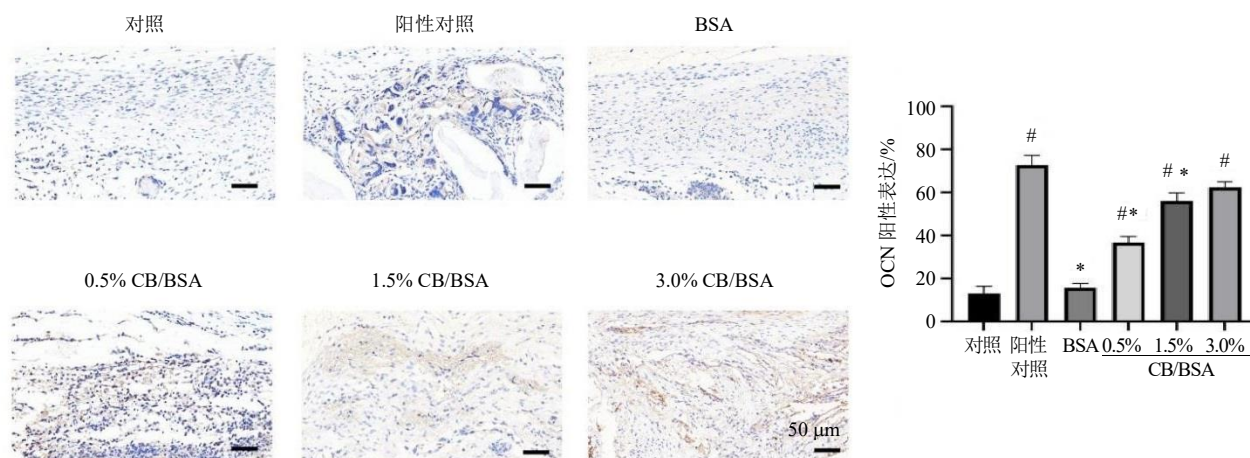


图6 各组大鼠颅骨组织的 OCN 免疫组化染色结果 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 OCN immunohistochemistry results of skull tissues of rats in each group ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

化组织沉积。阳性对照组的阳性信号表达散在分布于骨块的周围，提示骨愈合处于成骨矿化沉积的过程。植入 CB/BSA 光交联水凝胶后，OCN 棕黄色的阳性信号表达增强，棕色区域广泛。定量分析结果显示，与对照组比较，阳性对照组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 PECAM-1 阳性表达显著升高 ($P < 0.05$)；与阳性对照组比较，BSA 组、0.5% CB/BSA 组和 1.5% CB/BSA 组 COL1A1 阳性表达显著降低 ($P < 0.05$)。

3.3.2 免疫荧光染色结果 如图 7 所示，对照组 PECAM-1 (黄色)、OCN (绿色) 及 COL1A1 (红色) 荧光信号强度较弱。而阳性对照组可见密集、明亮、广泛的黄、绿、红 3 种颜色的荧光信号交织。

植入 CB/BSA 光交联水凝胶后，随着海藻酸钠含量的增加，PECAM-1、OCN 及 COL1A1 的荧光信号强度呈现出逐渐增强的趋势。定量分析结果 (表 2) 显示，与对照组比较，阳性对照组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 PECAM-1、OCN 阳性表达显著升高 ($P < 0.05$)；与阳性对照组比较，BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 COL1A1 阳性表达显著升高 ($P < 0.05$)；与阳性对照组比较，BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 PECAM-1 阳性表达显著降低 ($P < 0.05$)；BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组 OCN、COL1A1 阳性表达显著降低 ($P < 0.05$)。

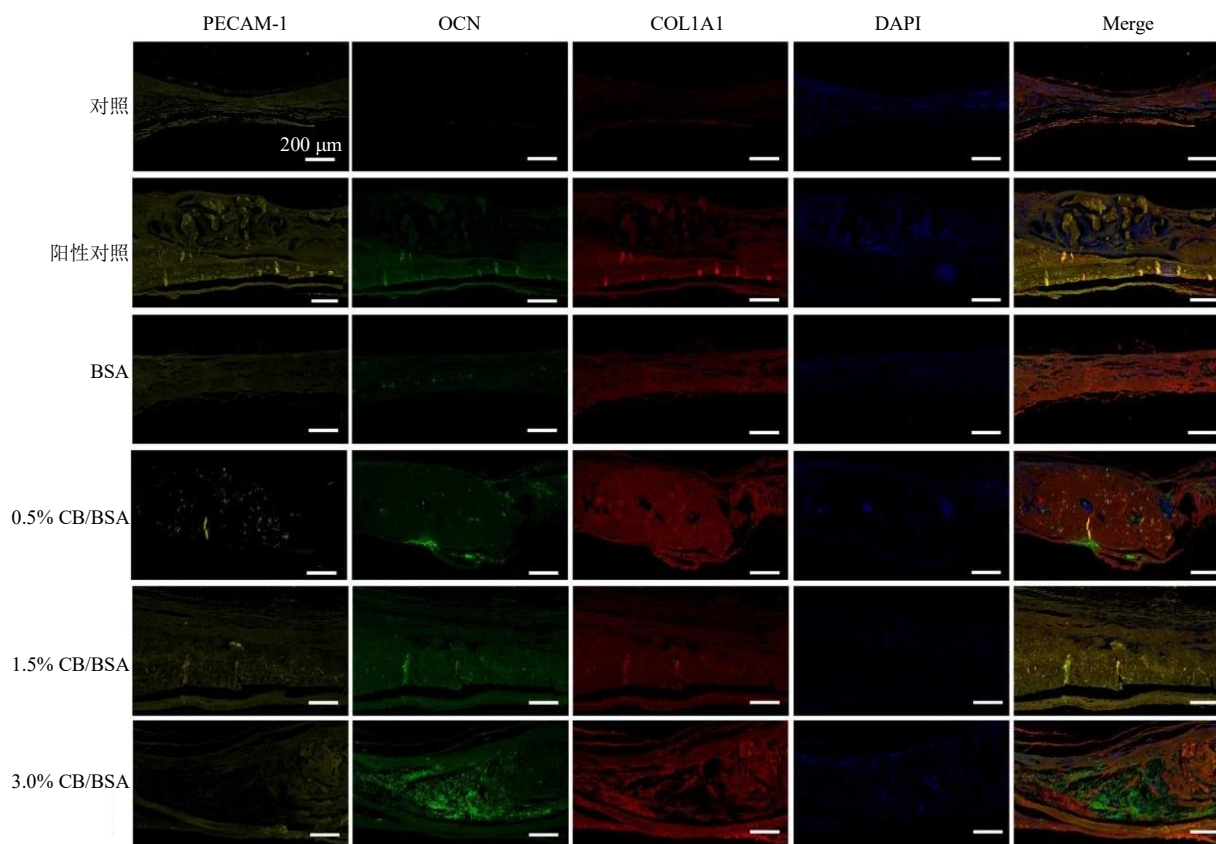


图 7 各组大鼠颅骨组织的 PECAM-1、OCN、COL1A1 免疫荧光染色结果 (×200)

Fig. 7 Immunofluorescence of PECAM-1, OCN, COL1A1 results of skull tissues of rats in each group (× 200)

表 2 各组大鼠颅骨组织 PECAM-1、OCN、COL1A1 荧光阳性面积比 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 2 Positive area ratio of PECAM-1, OCN and COL1A1 immunofluorescence in skull tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	PECAM-1/%	OCN/%	COL1A1/%
对照	8.10 ± 1.05	6.90 ± 0.90	26.43 ± 4.38
阳性对照	45.65 ± 3.16 [#]	38.85 ± 1.84 [#]	76.52 ± 4.90 [#]
BSA	8.29 ± 1.43 [*]	11.87 ± 2.98 [*]	38.63 ± 3.31 ^{#*}
0.5% CB/BSA	17.02 ± 2.27 ^{#*}	15.54 ± 2.46 ^{#*}	49.25 ± 5.52 ^{#*}
1.5% CB/BSA	25.70 ± 1.96 ^{#*}	25.33 ± 2.91 ^{#*}	63.04 ± 5.89 ^{#*}
3.0% CB/BSA	27.69 ± 2.67 ^{#*}	33.27 ± 5.13 [#]	73.33 ± 2.82 [#]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与阳性对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs positive control group.

3.4 CB/BSA 光交联水凝胶对 CSBD 模型大鼠颅骨组织 PECAM-1、VEGFA、COL1A1、WNT3A、 β -catenin 和 OCN 基因表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 阳性对照组和 3.0% CB/BSA 组大鼠颅骨组织 PECAM-1、VEGFA、COL1A1、WNT3A mRNA 表达水平显著升高 ($P <$

0.05), 阳性对照组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组大鼠颅骨组织 β -catenin、OCN mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, BSA 组和 0.5% CB/BSA 组颅骨组织 PECAM-1、VEGFA、COL1A1、WNT3A、 β -catenin、OCN mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 1.5% CB/BSA 组 PECAM-1、VEGFA、COL1A1、WNT3A、 β -catenin mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 3.0% CB/BSA 组 PECAM-1、COL1A1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.5 CB/BSA 光交联水凝胶对 CSBD 模型大鼠颅骨组织 COL1A1、PECAM-1、 β -catenin、WNT3A、VEGFA 和 OCN 蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 阳性对照组大鼠颅骨组织 PECAM-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 阳性对照组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 COL1A1、 β -catenin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 阳性对照组和 3.0% CB/BSA 组 OCN 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 阳性对照

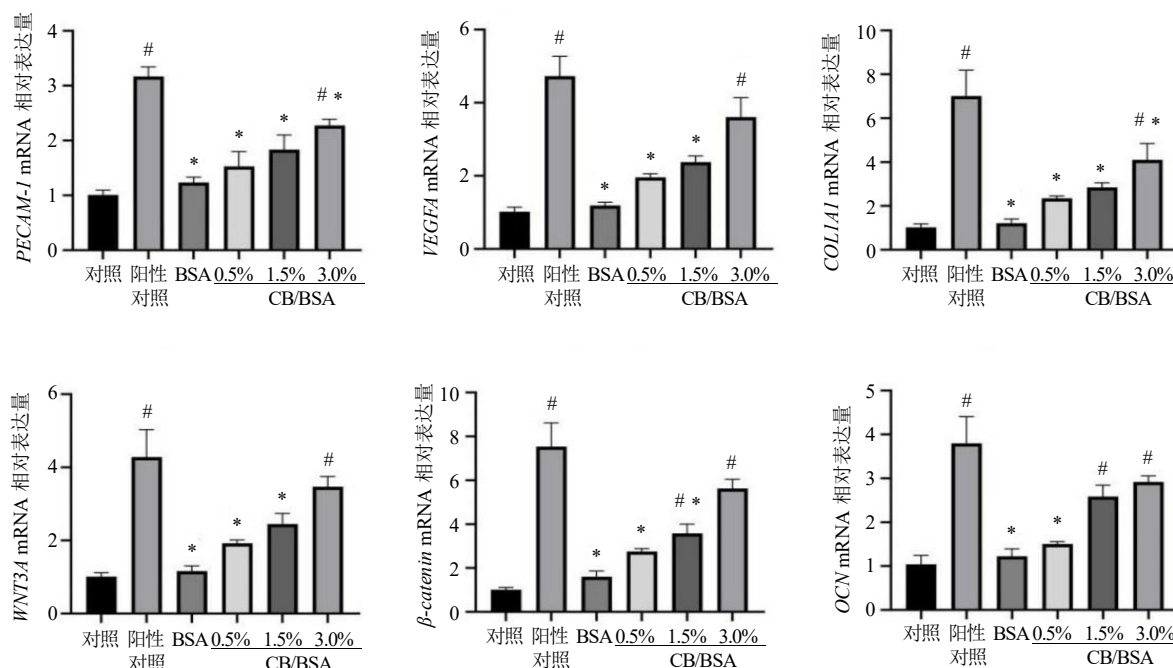


图8 各组大鼠颅骨组织 *PECAM-1*、*VEGFA*、*COL1A1*、*WNT3A*、*β-catenin* 和 *OCN* 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Gene expressions of *PECAM-1*, *VEGFA*, *COL1A1*, *WNT3A*, *β-catenin* and *OCN* in skull tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

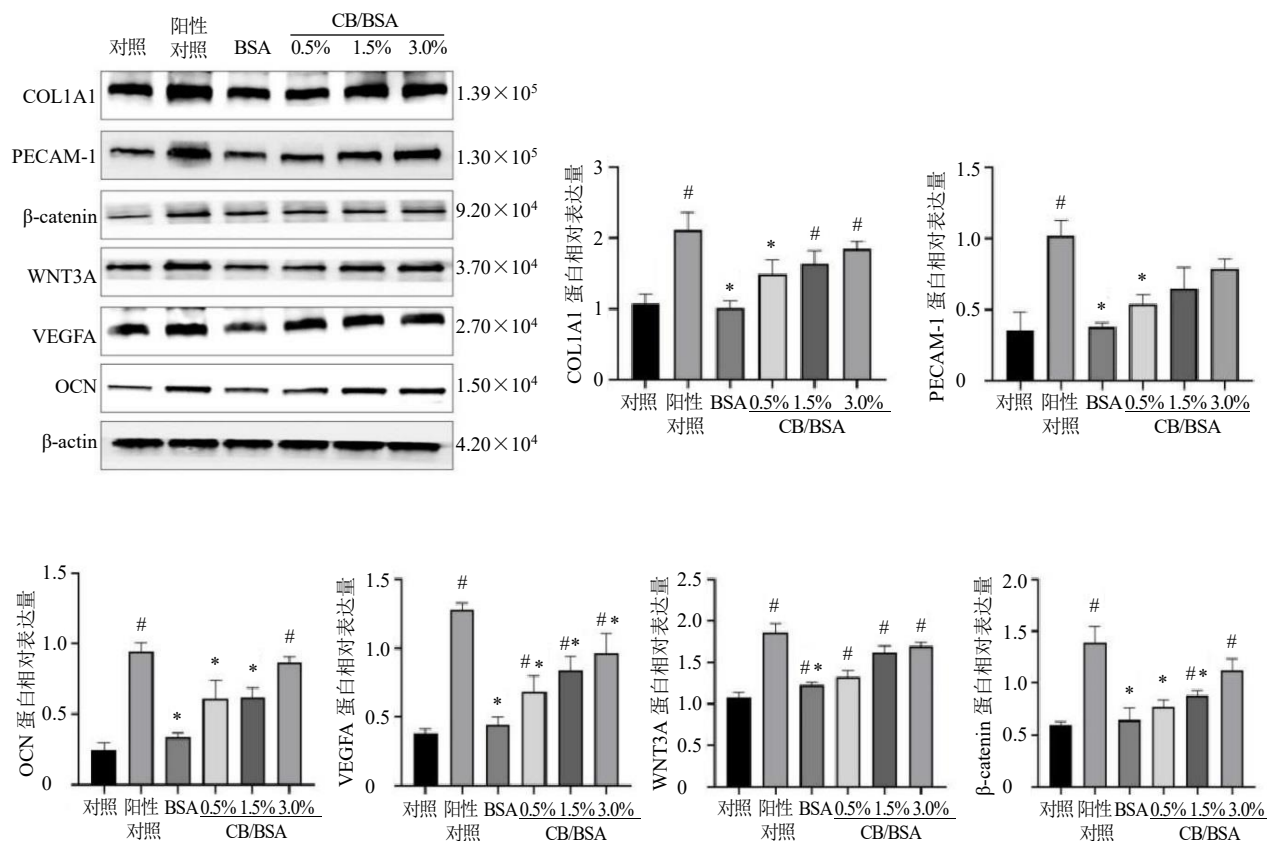


图9 各组大鼠颅骨组织 *COL1A1*、*PECAM-1*、*β-catenin*、*WNT3A*、*VEGFA* 和 *OCN* 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Proteins expressions of *COL1A1*, *PECAM-1*, *β-catenin*, *WNT3A*, *VEGFA* and *OCN* in skull tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 VEGFA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 阳性对照组、BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组 WNT3A 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与阳性对照组比较, BSA 组和 0.5% CB/BSA 组 COL1A1、PECAM-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), BSA 组、0.5% CB/BSA 组和 1.5% CB/BSA 组 OCN、 β -catenin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), BSA 组、0.5% CB/BSA 组、1.5% CB/BSA 组和 3.0% CB/BSA 组

VEGFA 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); BSA 组 WNT3A 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$).

3.6 CB/BSA 光交联水凝胶的体内安全性评价

3.6.1 CB/BSA 光交联水凝胶对 CSBD 模型大鼠血常规和肝肾功能的影响 如图 10 所示, 各给药组血液中红细胞、白细胞、血小板、血红蛋白、ALT、AST、Cr、BUN 水平均处于正常生理范围, 表明 CB/BSA 光交联水凝胶未对大鼠的血液系统、血清肝肾功能产生毒性影响, 初步证明其良好的体内生物安全性。

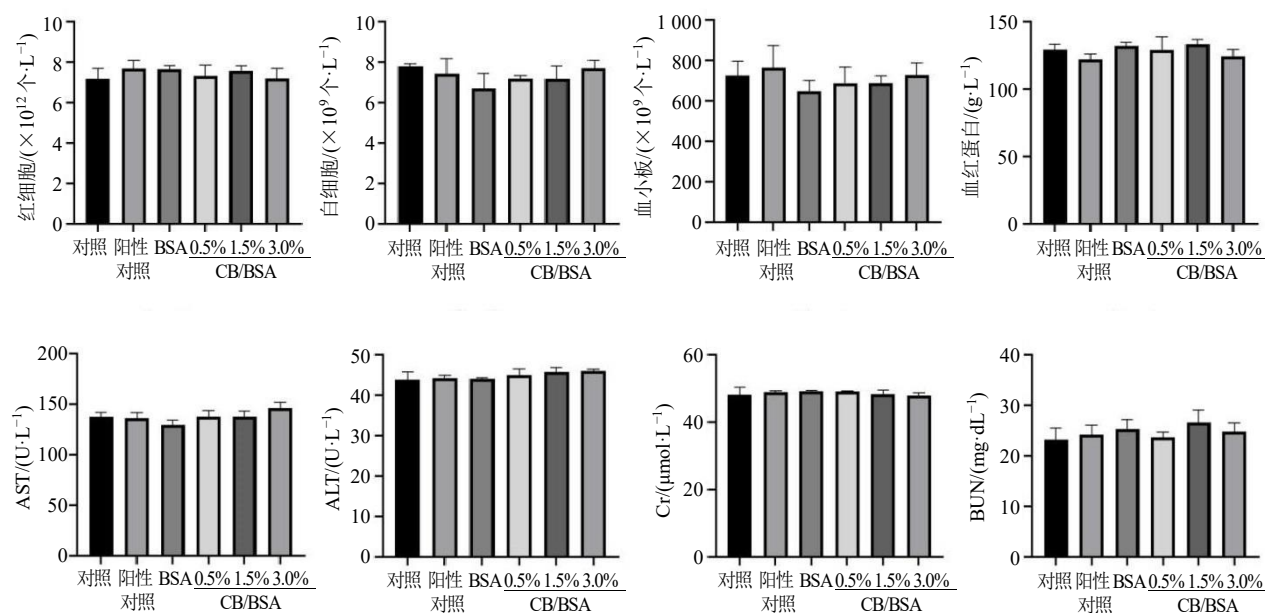


图 10 各组大鼠血常规和肝肾功能相关指标 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Blood routine and liver and kidney function related indicators of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.6.2 CB/BSA 光交联水凝胶对 CSBD 模型大鼠主要脏器病理变化的影响 如图 11 所示, 植入 CB/BSA 光交联水凝胶 8 周后, 未对大鼠的主要脏器造成毒性损害。各给药组肝小叶结构正常, 肝细胞索排列有序, 未见明显的脂肪变性、水样变性或坏死灶; 心肌纤维排列整齐, 未见断裂、坏死或炎性细胞浸润; 脾脏白髓与红髓分界清楚, 淋巴细胞分布正常; 肺泡结构完整, 未见明显充血、水肿或炎性渗出; 肾小球及肾小管结构清晰, 肾小球上皮细胞呈圆形, 未见水肿、变性或管型形成。

4 讨论

骨移植已成为仅次于输血的第二大移植手术, 目前临床上仍缺乏令人满意的骨修复解决方案。尽管自体骨或异体骨移植、金属假体取得一定成效, 但常伴随感染、疼痛、二次手术及费用高昂

等问题^[15]。为应对这些挑战, 国内外学者融合生物学、工程学与材料科学, 研发了能负载并可控释放生长因子或特定药物的生物活性材料, 以便提高细胞存活率与诱导其定向分化^[16]。水凝胶作为一种多功能体系, 已在生物医学领域得到广泛应用, 覆盖了从细胞研究到多种组织工程等多个重要场景^[17]。经过甲基丙烯酰化处理的 BSA, 具有三维多孔结构、低细胞毒性、良好的溶胀与降解性能, 是海螵蛸的理想载体。

对于骨组织修复水凝胶而言, 体内成骨活性与体内安全性是其最核心的性能指标。颅骨缺损模型是骨再生研究中常用的体内评价方法^[18]。啮齿类动物颅骨缺损模型具有成本低、易饲养、便于制备标准化缺损以供组织学及影像学定量分析等优点^[19]。然而, 其局限性在于无法模拟承重状态下的力学环

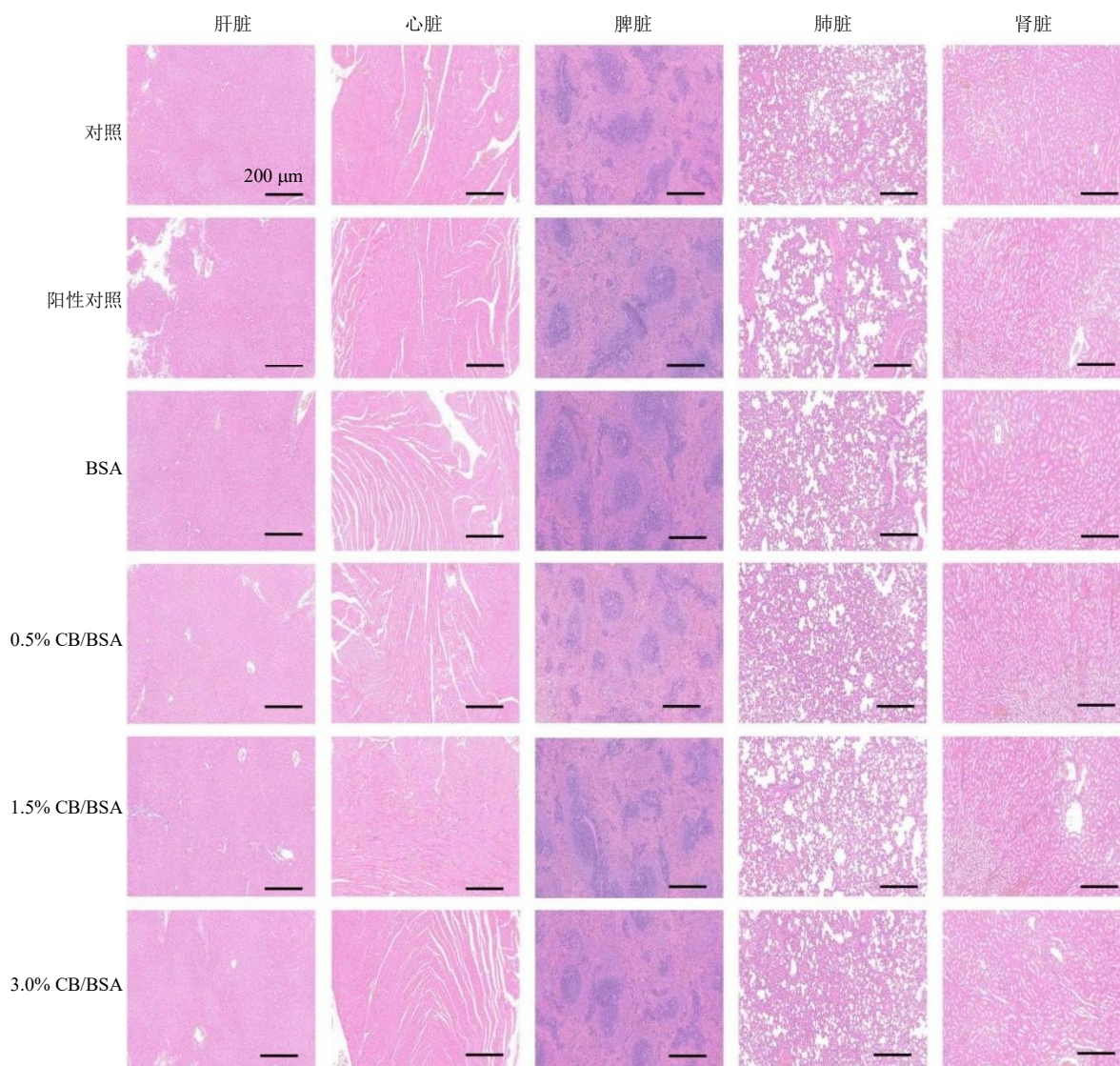


图 11 各组大鼠主要脏器的 HE 染色结果 (×200)

Fig. 11 HE staining results of major organs of rats in each group (× 200)

境, 且因动物寿命较短, 不适用于材料长期效应的观察。本研究选用雄性 SD 大鼠, 使用 5 mm 尖钻头钻孔, 建立双侧颅骨 CSBD 模型, 所有动物术后活动、饮食良好, 无感染或意外死亡。Micro-CT 能显示骨缺损区域的新骨形成, 追踪骨愈合的进展, 通过定量分析骨修复过程中的 BV/TV、BS/BV、Tb.Th、BMD 等关键参数, 评估材料和治疗手段的效果^[20]。本研究的 Micro-CT 结果显示, 对照组颅骨缺损未见明显新生骨组织形成, 表明模型构建成功。在 BSA 光固化水凝胶中引入海螵蛸后, 可见更多成熟的骨组织形成, 并且表现为由缺损区域边缘往中心加速愈合的迹象。与阳性对照组比较, 3.0% CB/BSA 组在 BV/TV、BS/BV、Tb.Th 方面无显著

差异, 证明其促进骨愈合的效果在影像学参数的评价接近阳性对照组。HE 和 Masson 染色结果同样验证了这一结果, HE 染色可见对照组缺损区域仍然以稀疏的纤维连接为主, 无新生骨出现, Masson 染色可见其边缘为红色的成熟骨组织, 表明其无法通过自身的修复来完成骨愈合与重建。与对照组比较, 不同剂量的 CB/BSA 组均能观察到骨新生组织往中心迁移。值得注意的是, 在 Masson 染色结果中, 阳性对照组和 3.0% CB/BSA 组表现为红色成熟骨组织与蓝色新生胶原矿化交织的现象, 表明缺损区域的骨愈合效应仍处于持续进展阶段, 骨修复的作用得到进一步增强。

骨形成相关标志物 COL1A1、OCN、PECAM-

1、VEGFA 与胶原沉积、骨基质矿化、血管生成密切相关, 调控骨的修复与再生^[21]。COL1A1 是 I 型胶原中的重要组分, 其表达量直接反映成骨活动和新生骨基质的合成^[22]。OCN 对骨矿化及羟基磷灰石晶体的形成具有正向调控作用, 是评价骨形成效率的特异性分子^[23]。PECAM-1 是血小板内皮细胞黏附分子, VEGFA 是血管内皮生长因子家族中最核心的成员, 两者常协同用于检测新生血管的活性、形态和密度^[24]。研究显示, 用 EDTA 蚀刻墨鱼骨制成的有机骨膜材料通过上调 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、PECAM-1 和 OCN 的免疫荧光表达, 加速了大鼠骨组织形成和新生血管形成^[25]。免疫组化和免疫荧光染色结果显示, 不同剂量的 CB/BSA 组大鼠颅骨组织中 COL1A1、OCN、PECAM-1 阳性表达和荧光强度均有所增加, 表明 CB/BSA 光交联水凝胶在植入动物体内之后, 有助于血管网的形成, 为骨修复提供营养与细胞支持; 与此同时, CB/BSA 光交联水凝胶降解过程中, 海螺蛸释放钙、磷等元素, 进一步驱动成骨细胞活化与胶原蛋白沉积, 加速骨基质矿化与骨重塑的过程。qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 不同剂量的 CB/BSA 组 COL1A1、OCN、PECAM-1、VEGFA、WNT3A、 β -catenin 基因和蛋白表达水平显著升高。Wnt/ β -catenin 信号通路对骨骼发育和重建具有重要作用, 表明 CB/BSA 光交联水凝胶可能通过激活经典 Wnt/ β -catenin 信号通路, 导致 WNT3A 及下游效应分子 β -catenin 表达上调, 促进成骨相关分子 COL1A1、OCN 的活化, 驱动骨基质的合成与矿化进程; 另一方面, 该信号通路同步上调了 VEGFA 的表达, 促进内皮细胞增殖、迁移与血管生成, 表现为 PECAM-1 标志物阳性血管网络的显著增加^[26]。

CB/BSA 光交联水凝胶的促成骨作用并非单一组分或单一通路所能解释, 这可能归因于海螺蛸与 BSA 光交联水凝胶复合之后, 2 种组分降解过程中在时间与空间上释放的生物活性信号的协同与序贯作用。海螺蛸持续释放的 Ca^{2+} 不仅是成骨矿化的原料, 更作为重要的第二信使, 持续激活细胞膜上的钙敏感受体 (calcium-sensing receptor, CaSR), 启动 Wnt/ β -catenin 信号通路, 从促增殖和促分化 2 个层面驱动成骨^[27]。研究证实, 适宜浓度的 Ca^{2+} 可以促进人成骨细胞的迁移、增殖和骨基质矿化。引入 CaSR 拮抗剂后, Ca^{2+} 诱导的细胞迁移和成骨分

化作用被显著抑制, CaSR 缺失将导致小鼠成骨细胞的增殖和分化障碍, 其机制与经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路被抑制有关^[28]。双相磷酸钙 (biphasic calcium phosphate, BCP) 持续释放的 Ca^{2+} 能够刺激巨噬细胞上的 CaSR, 激活下游的 AKT/ β -catenin 信号通路, 促进巨噬细胞向促修复的 M2 型极化, 营造有利于成骨的微环境^[29]。

海螺蛸所含的微量元素 (如 Sr、Mg 等) 在体内以离子形式释放, 介导其积极的成骨调控作用。研究发现, Sr^{2+} 通过模拟 Ca^{2+} , 与人骨髓间充质干细胞 (human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs) 表面的 CaSR 结合并激活该受体, 进一步启动下游的肌醇-1,4,5-三磷酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate, IP3) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的传导, 促进 hBMSCs 细胞成骨分化^[30]。 SrCl_2 能够增强 RUNX2 的表达, 而这一促进作用可被 CaSR 的特异性抑制剂 NPS-2143 所阻断, 证明 Sr 是通过作用于 CaSR 来发挥促成骨效应^[31]。 Mg^{2+} 是多种酶的辅因子, 参与三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 代谢和核酸合成, 对成骨细胞的增殖和分化有直接促进作用^[32]。 Mg^{2+} 可促进巨噬细胞向促修复的 M2 型极化, 增加成骨相关因子骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 的分泌, 同时降低促炎细胞因子水平^[33]。另一方面, Mg^{2+} 通过促进血管内皮细胞的增殖、迁移、黏附和成管能力, 加速 H 型血管的生成, 为骨再生创造良好的微环境^[34]。BSA 光交联水凝胶在降解过程中释放的氨基酸、多肽等物质, 可为细胞代谢提供底物, 部分胶原片段则可作为细胞黏附的临时支架^[35]。CB/BSA 光交联水凝胶的促成骨作用源于其降解产物的协同作用, 共同激活 Wnt/ β -catenin 信号通路所实现, 该过程可能涉及 CaSR、MAPK、IP3、BMP 等相关通路。然而这些通路之间具体的交互与协同机制, 仍有待进一步研究阐明。

对于骨修复水凝胶支架而言, 其体内降解行为与新骨生成速率之间的动态平衡是评估其设计合理性与转化潜力的关键。理想情况下, 支架应提供临时的力学支撑并持续释放活性信号, 直至被新生骨组织逐步替代^[36]。尽管本研究未直接检测 CB/BSA 水凝胶在体内的降解动力学, 但结合材料组成与本研究观察到的修复结果对该过程进行分析显示, 磷酸盐改性之后, 海螺蛸的主要成分为羟

基磷灰石,在骨缺损的微环境中通过溶解和离子交换途径,释放 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 等多种离子;而甲基丙烯酸酯化 BSA 形成的水凝胶网络,则可经由酶解与水解作用逐步断裂。以上 2 种进程共同赋予 CB/BSA 光交联水凝胶可控且具有时序性的降解行为。本研究中,3.0%CB/BSA 组在植入后第 8 周表现出最佳的骨愈合效果,表明该组分配方可能使水凝胶的降解动力学与骨缺损的修复过程在时间上更为协调。但今后仍需通过建立动物模型,动态监测 CB/BSA 光交联水凝胶在体内的质量残留、形貌变化与新生骨组织的时空形成过程,明确其降解速率与骨组织再生速率之间的匹配关系。

综上,CB/BSA 光交联水凝胶在大鼠颅骨 CSBD 模型中展现出良好的成骨活性,能显著促进新生骨组织的形成,其中,3.0%CB/BSA 光交联水凝胶的综合效果最佳。推测其作用机制为激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,上调 WNT3A 及 β -catenin 的表达,启动 COL1A1、PECAM-1、VEGFA、OCN 标志物的基因转录与蛋白合成,加速骨愈合。且 CB/BSA 光交联水凝胶表现出良好的体内生物安全性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, *et al.* Bone substitutes: A review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management [J]. *J Tissue Eng*, 2018, 9: 2041731418776819.
- [2] Jimi E, Hirata S, Osawa K, *et al.* The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects [J]. *Int J Dent*, 2012, 2012: 148261.
- [3] Huang L, Guo Z Y, Yang X X, *et al.* Advancements in GelMA bioactive hydrogels: Strategies for infection control and bone tissue regeneration [J]. *Theranostics*, 2025, 15(2): 460-493.
- [4] Ferracci G, Zhu M X, Ibrahim M S, *et al.* Photocurable albumin methacryloyl hydrogels as a versatile platform for tissue engineering [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3(2): 920-934.
- [5] 覃淮, 杨宽, 伍静, 等. 光交联甲基丙烯酸水凝胶在伤口修复中的研究进展 [J]. *中国塑料*, 2025, 39(10): 141-150.
- [6] Huang Y Q, Zhu Q C, Zhu Y, *et al.* Rapid UV photo-cross-linking of α -lactalbumin hydrogel biomaterial to enable wound healing [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(1): 401-412.
- [7] 陈兴华. 海螵蛸的药用认识沿革 [J]. *中药材*, 2024, 47(7): 1840-1846.
- [8] 刘睿, 魏爽, 王欣之, 等. 海螵蛸蛋白质、肽类物质基础研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(16): 3883-3889.
- [9] Mao A R, Zhao N F, Liang Y H, *et al.* Mechanically efficient cellular materials inspired by cuttlebone [J]. *Adv Mater*, 2021, 33(15): 2007348.
- [10] Barrera Bernal J L, Gaytán Salvatella Í, del Campo B I M, *et al.* Synthesis of hydroxyapatite-gelatin composite hydrogel for bone tissue application [J]. *Gels*, 2025, 11(8): 630.
- [11] Sudhakar M P, Ali S, Chitra S. Scrutinizing the effect of rGO-cuttlefish bone hydroxyapatite composite infused carrageenan membrane towards wound reconstruction [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 262: 130155.
- [12] Chen Y, Zhai M J, Mehresh N, *et al.* Comparison of globular albumin methacryloyl and random-coil gelatin methacryloyl: Preparation, hydrogel properties, cell behaviors, and mineralization [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 204: 692-708.
- [13] Tan B Z, Liu X, Chen S, *et al.* An injectable nano-hydroxyapatite-incorporated hydrogel with sustained release of notoginsenoside R_1 enhances bone regeneration by promoting angiogenesis through Notch1/Akt signaling [J]. *J Adv Res*, 2026, 80: 411-422.
- [14] Liu Y, Fang J R, Zhang Q, *et al.* Wnt10b-overexpressing umbilical cord mesenchymal stem cells promote critical size rat calvarial defect healing by enhanced osteogenesis and VEGF-mediated angiogenesis [J]. *J Orthop Transl*, 2020, 23: 29-37.
- [15] 赵越, 许燕, 周建平, 等. 骨组织工程中传统与仿生支架结构设计的差异 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(16): 3458-3468.
- [16] 刘潇, 郑晓勇, 刘道宏, 等. 骨组织工程生物材料结构改性策略的研究进展 [J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2025, 18(5): 462-469.
- [17] Fu J, in het Panhuis M. Hydrogel properties and applications [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(10): 1523-1525.
- [18] 王霏扬, 马语卓, 吕雪蓉, 等. 牙周疾病动物模型复制研究进展 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2025, 56(2): 339-344.
- [19] 孙明策, 徐珊珊, 金明, 等. 脂肪间充质干细胞联合三维水凝胶支架在大鼠颅骨缺损修复中的成骨效应 [J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(13): 3196-3200.
- [20] 巫旭娜, 许碧莲, 田佳, 等. 用 Micro-CT 评价大鼠骨质疏松合并骨性关节炎模型 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(5): 1044-1047.
- [21] Kanczler J M, Oreffo R O C. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone [J]. *Eur Cell Mater*, 2008, 15: 100-114.

- [22] Eyre D R, Weis M A. Bone collagen: New clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta [J]. *Calcif Tissue Int*, 2013, 93(4): 338-347.
- [23] Chen X, Chen J S, Xu D L, *et al*. Effects of Osteoglycin (OGN) on treating senile osteoporosis by regulating MSCs [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18(1): 423.
- [24] Yang M, Li C J, Xiao Y, *et al*. Ophiopogonin D promotes bone regeneration by stimulating CD31hiEMCNhi vessel formation [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(3): e12784.
- [25] Wei Y Q, Ju M M, Zheng F, *et al*. Cuttlebone-derived organic matrix: A facile periosteum substitute for bone regeneration [J]. *Adv Funct Mater*, 2023, 33(31): 2214095.
- [26] Hu K, Olsen B R. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair [J]. *J Clin Investig*, 2016, 126(2): 509-526.
- [27] 雷群, 林东, 黄文秀, 等. 钙离子对人成骨细胞迁移与成骨分化的影响 [J]. 华西口腔医学杂志, 2018, 36(6): 602-608.
- [28] 张崛, 冯玉旭, 徐勇, 等. 钙敏感受体缺失对小鼠成骨细胞增殖与分化的影响及机制研究 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2013, 15(5): 430-434.
- [29] 杨刚, 刘鑫, 王元银. 牙源性双相磷酸钙与两种临床骨替代材料在兔上颌窦中成骨效果的对比研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(11): 1699-1704.
- [30] 席雪瑶, 高亚男, 王加启, 等. 锶的成骨机制及富锶食品的研发现状 [J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 380-392.
- [31] 宋跃, 郭澍, 吕梦竹, 等. 锶通过 CaSR 途径促进脂肪来源干细胞成骨分化的研究 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2018, 29(8): 478-481.
- [32] 马振, 孙伟, 叶丹丹, 等. 含镁介孔生物活性玻璃/锌黄长石复合支架的成骨活性 [J]. 硅酸盐学报, 2022, 50(7): 1964-1971.
- [33] 钟宁莹, 王丽萍. 锶成骨机制的研究进展 [J]. 华西口腔医学杂志, 2020, 38(6): 697-703.
- [34] Ye J T, Miao B Z, Xiong Y J, *et al*. 3D printed porous magnesium metal scaffolds with bioactive coating for bone defect repair: Enhancing angiogenesis and osteogenesis [J]. *J Nanobiotechnol*, 2025, 23(1): 160.
- [35] Liu W J, Sun J, Sun Y, *et al*. Multifunctional injectable protein-based hydrogel for bone regeneration [J]. *Chem Eng J*, 2020, 394: 124875.
- [36] 程若昱, 燕宇飞, 陈皓, 等. 双效骨诱导性的有机-无机水凝胶的构建及其骨再生研究 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2018, 38(8): 900-909.

[责任编辑 李亚楠]