DOI:10.16016/j.1000-5404.201512094

柠檬酸-EDC/NHS 胶原凝胶修复破损纤维环

王 言[1],孙 超[1],黄 博[1],刘 欢[1],袁 懿[2],郭 宇[3],周 跃[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科[1];400038 重庆,第三军医大学药学院[2];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像科[3])

[摘要] **目的** 探讨利用柠檬酸-EDC/NHS 一型胶原凝胶修复纤维环损伤,减缓椎间盘退变的效果。**方法** 使用鼠尾肌腱一型胶原凝胶,柠檬酸(CA)、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)作为交联剂,将一型胶原凝胶与交联剂按不同质量比混合制成一型胶原混合凝胶。建立鼠尾椎间盘纤维环穿刺模型。清洁级 SD 大鼠 48 只,分为假手术组($n=8$)、CA-EDC/NHS 凝胶(CA6)治疗组($n=10$)、CA-EDC/NHS 凝胶(CA3)治疗组($n=10$)、EDC/NHS 凝胶(CA0)治疗组($n=10$)、穿刺未治疗组($n=10$)。分别于 1、2、4 周行小动物 X 摄片、小动物 MRI 检查,统计分析不同时间点椎间隙高度系数、髓核像素值及 Pfirrmann 分级,于第 4 周时将大鼠处死行组织学切片观察。**结果** 4 周后,CA-EDC/NHS 凝胶(CA6)治疗组的鼠尾椎间盘对比假手术组仅发生了轻微的退变,基本保持了髓核组织的完整性,在椎间盘高度系数(均数 79%)、髓核像素值(均数 126.9)和 Pfirrmann 分级结果(平均 1.3 分)均优于其余两个治疗组和穿刺未治疗组($P<0.05$)。CA-EDC/NHS 凝胶(CA6)治疗组的组织学观察显示,针道的周围没有发现炎性细胞浸润和瘢痕组织,针道尽头可见一团凝胶状物质在断裂的纤维环组织之间形成了桥接使其闭合。**结论** 柠檬酸-EDC/NHS 胶原凝胶具有一定的修复破损纤维环,减缓椎间盘退变的能力,并且与柠檬酸剂量存在相关性。

[关键词] 纤维环修复;柠檬酸;1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺;N-羟基琥珀酰亚胺;鼠尾穿刺模型

[中图法分类号] R-332;R341.26;R681.53 [文献标志码] A

Annular repair using citric acid-EDC/NHS collagen gel in rats

Wang Yan[1], Sun Chao[1], Huang Bo[1], Liu Huan[1], Yuan Yi[2], Guo Yu[3], Zhou Yue[1] ([1]Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department of Radiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of citric acid (CA)-1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) collagen gel on repairing annular defects. **Methods** Type I collagen was extracted from the rat tail tendon and crosslinked with CA at different mass ratios using EDC and NHS as crosslinking reagents to prepare 4 kinds of collagen gels. Forty-eight adult SD rats were divided into sham-operation group ($n=8$), CA6 group ($n=10$) which was punctured and injected with CA-EDC/NHS collagen gel (CA6), CA3 group ($n=10$) which was punctured and injected with CA-EDC/NHS collagen gel (CA3), CA0 group ($n=10$) which was punctured and injected with EDC/NHS collagen gel (CA0), and model group ($n=10$) which was punctured and untreated. X-ray filming and magnetic resonance imaging (MRI) were performed before only puncture and at the 1st, 2nd, and 4th week after puncture. At each time point, disc height index (%DHI), voxel count and modified MRI Pfirrmann grading were collected and analyzed. All animals were killed at the 4th week for the morphological study. **Results** The discs in the second group showed only slight degeneration compared with the healthy discs, and the results of %DHI (average 79%), voxel count (average 126.9), Pfirrmann grading (average grade 1.3) and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271982, 81472076);国家杰出青年科学基金(81401801)

[通信作者] 周 跃, E-mail: happyzhou@vip.163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160201.1434.037.html(2016-02-01)

morphology in the CA6 group indicated less degeneration tendency compared with the other 3 puncture groups at the 4th week ($P<0.05$). The annular fibrosus was partially repaired by the collagen gels that bridged the defects. **Conclusions** CA-EDC/NHS collagen gel is capable of repairing annular defects induced by needle puncture, which may be closely related with the dose of CA.

[**Key words**] annular repair; citric acid; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; N-hydroxysuccinimide; rat tail punctured model

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271982, 81472076) and the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (81401801). Corresponding author: Zhou Yue, E-mail: happyzhou@vip.163.com

近年,髓核摘除术已经成为一种非常有效的治疗椎间盘突出症的手段,但由于术中操作造成患者纤维环损伤而引起的术后椎间盘进行性退变和较高的再突出发生率依旧不可小视。进行及时的纤维环修复则可以显著提高退变性脊柱疾病的治疗效果[1],所以急需探寻一种行之有效的纤维环修复方法,以减少甚至避免残留髓核的挤出,减缓椎间盘的退变。胶原具有天然的低毒性、低抗原性、低免疫性、可诱导细胞再生以及与人体相容性好的优点,被广泛应用于制作生物医学材料和临床医疗领域[2-3]。水溶性 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺($C_8H_{17}N_3$ HCl,EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺($C_4H_5NO_3$,NHS)是常见的无毒、生物相容性良好的交联剂,可促使胶原间发生交联[4]。本实验将不同剂量的柠檬酸(citric acid, CA)这一天然三羧酸物质加入一型胶原与 EDC/NHS 溶液,配比后填充于大鼠鼠尾椎间盘穿刺处,观察和统计不同时间点影像学和组织学的结果,对比分析修复破损纤维环效果的优劣。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Ⅰ型鼠尾胶原蛋白(5 mg/mL,pH=4.2)由上海创赛科学仪器有限公司提供,柠檬酸由美国 Sigma-Aldrich 公司提供,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺($C_8H_{17}N_3$ HCl, EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺($C_4H_5NO_3$,NHS)由国药集团化学试剂有限公司提供,DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)由美国 Gibco 公司提供,四甲基偶氮唑蓝(MTT)由上海碧云天生物技术有限公司提供,L929 成纤维细胞由上海拜力生物科技有限公司提供。在注射前即刻将Ⅰ型鼠尾胶原蛋白凝胶与 EDC/NHS 溶液(20mg/mL)按质量比 Col: CA: EDC: NHS=50: 0: 12: 8混合,制成 EDC/NHS 胶原注射凝胶(CA0)。再将柠檬酸溶液(100 mmol/L)按质量比 Col: CA: EDC: NHS=50: 6: 12: 8(CA6)和 Col: CA: EDC: NHS=50: 3: 12: 8(CA3)的比例加入,即制成两组柠檬酸浓度不同的 CA-EDC/NHS 胶原注射凝胶。

1.2 实验分组

清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,由新桥医院实验动物中心提供,批准号 SCXK-(军)2012-0013,6 周龄,体质量 180 g 左右,普通环境常温常规饮食饲养。采用随机数字表法分为 5 组:假手术组($n=8$)、CA-EDC/NHS 凝胶(CA6)治疗组($n=10$)、CA-EDC/NHS 凝胶(CA3)治疗组($n=10$)、EDC/NHS 凝胶(CA0)治疗组($n=10$)、穿刺未治疗组($n=10$)。4 周后全部处死,收集鼠尾标本行组织学检查。生物相容性实验使用雌性昆明小鼠 6 只,由新桥医院实验动物中心提供,批准号 SCXK-(军)2012-0013,7 周龄,体质量 20 g 左右,普通环境常温常规饮食饲养。

1.3 细胞毒性实验

用含 15% FBS 的 DMEM 培养基培养 L929 成纤维细胞。采用 MTT 法研究柠檬酸-EDC/NHS 胶原凝胶对 L929 成纤维细胞的细胞活性与增殖的影响。实验分为 4 组:对照组(含 15% FBS 的 DMEM 完全培养液 + L929 成纤维细胞)、CA0 组(含 15% FBS 的 DMEM 完全培养液 + L929 成纤维细胞,孔内加入 EDC/NHS 胶原凝胶)、CA3 组(含 15% FBS 的 DMEM 完全培养液 + L929 成纤维细胞,孔内加入 CA3 剂量的 CA-EDC/NHS 凝胶)、CA6 组(含 15% FBS 的 DMEM 完全培养液 + L929 成纤维细胞,孔内加入 CA6 剂量的 CA-EDC/NHS 凝胶),每组设 5 个复孔。L929 成纤维细胞 5 000/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μL 细胞悬液。细胞培养箱中培养至第 1、2、3、4、5 天各取出 1 块 96 孔板,每孔中加入 10 μL MTT 溶液,37℃继续孵育 4 h 后,终止培养,小心吸弃孔内上清液;每孔加入 100 μL formanzan 溶解液,震荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪测定 570 nm 处光密度值[$D(570)$],间接反映细胞活性与增殖能力。

1.4 生物相容性实验

将 1 mL CA6 剂量的 CA-EDC/NHS 凝胶分别注射于 6 只小鼠背部,评价该材料的生物相容性。1 周后处死小鼠,在背部标记处切开,取出注射处组织,固定包埋后切片,行 HE 染色观察。

1.5　大鼠鼠尾穿刺模型和 EDC 凝胶注射

采用鼠尾穿刺模型,麻醉后取俯卧位,常规消毒鼠尾背侧皮肤后铺巾,触及鼠尾第 3、4 椎间隙后,以其为中心作一长约 2 cm 切口,仔细分离后即可直视纤维环后壁,使用 18G 注射器针头经正后方小心刺入,治疗组注射约 0.4 mL 凝胶覆盖穿刺口,完毕后缝合皮肤切口。全过程确保刺入方向与深浅保持一致。假手术组仅在切开显露后缝合,椎间盘不作处理。

1.6　鼠尾 X 线片观察

术前和穿刺后 1、2、4 周时行小动物 X 线检查(美国 Faxitron 公司),所得矢状位 X 线片用于体现椎间隙高度变化和椎体大体情况观察。高度变化由椎间盘高度系数(disc height index, %DHI)[5](图 1)表示,通过测量椎间盘与健康邻近锥体高度比值确定,计算公式如下(DH 为椎间隙高度,PV、DV 分别为上下位椎体高度,均测量 3 个不同位置以利于计算准确)。

$$DHI = 2 \times \frac{(DH1 + DH2 + DH3)}{(PV1 + PV2 + PV3) + (DV1 + DV2 + DV3)}$$

$$\%DHI = \frac{DHI\ 术后}{DHI\ 术前} \times 100\%$$

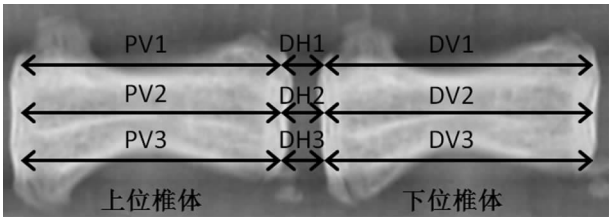
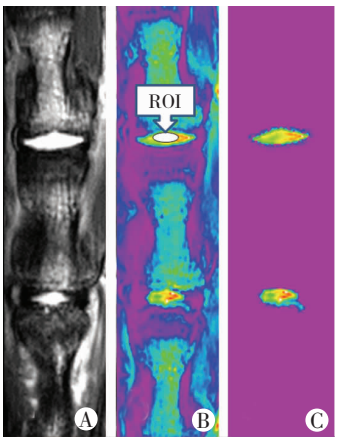


图 1　椎间盘高度系数测量示意图

1.7　鼠尾 MRI 观察

定量核磁共振分析穿刺后 1、2、4 周时行 7.0T 小动物核磁共振检查(德国 Bruker 公司,图 2A)。定量核磁共振分析是通过统计实验涉及的髓核高信号区域的像素值多少来进行量化,并用所得量化结果进行比较评价。采用多回波序列矢状位多层扫描(TR = 2 500 ms,TE = 45 ms,NEX = 4,回波数量 = 10,回波间隔 = 15 ms,层面厚度 = 0.7 mm,矩阵尺度 = 256 × 256,分辨率:176 μm × 95 μm × 0.7 mm),使用 TopSpin 软件(德国 Bruker 公司),拟合 10 个回波的 T_2 信号强度和弛豫时间的半对数图绘制出一个 T_2 MAP(图 2B)。在穿刺节段临近的健康髓核上截取一个 ROI 区域(region of interest),并测量该区域的 T_2 弛豫时间,减去两个标准差获得该层像素阈值,将低于该阈值的部分除去得到只有髓核组织的像素图像(图 2C),采用 TopSpin 软件记数得出像素值进行量化统计。

定性核磁共振分析通过评估实验涉及椎间盘的髓核信号强度、同质性、椎间隙高度丢失来进行福尔曼分级评分[6](modified magnetic resonance imaging pfirrmann grading,表 1)。



A:鼠尾椎间盘 T_2 加权核磁共振图像,上方为健康椎间盘,下方为穿刺椎间盘;B:测量 T_2 弛豫时间后得到的伪彩图;C:去除低于阈值部分后只显示髓核区域

图 2　通过 T_2 弛豫时间确定髓核大小

表 1　改良 MRI 福尔曼分级评分

分级	髓核变化	信号强度	椎间高度
Ⅰ	质地均匀,髓核呈白色	高信号	正常
Ⅱ	质地不均匀	中等信号	正常
Ⅲ	质地不均匀,髓核呈灰色	中等信号	降低
Ⅳ	质地不均匀,髓核呈黑色	低信号	明显降低或塌陷

1.8　组织学观察

4 周后处死大鼠,取出连接上下椎体的完整椎间盘组织,多聚甲醛固定后脱钙,由矢状位中线切开后石蜡包埋,切至 2.5 μm 厚度,行番红 O 染色。

1.9　统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析。

2　结果

通过 X 线片、MRI 和组织学结果(图 3)的比较,CA-EDC/NHS 凝胶(CA6)治疗组相较于假手术组仅发生了轻微的退变,髓核形态保持较好,福尔曼分级Ⅰ。EDC/NHS 凝胶(CA0)治疗组的髓核明显减少,破损纤维环修复的瘢痕组织侵占了髓核的空间,福尔曼分级Ⅲ。MRI 观察穿刺未治疗组明显退变为黑色椎间盘,髓核消失,椎间高度塌陷,并且伴有终板骨化和轻微骨折。

2.1　细胞毒性实验

4 组 L929 成纤维细胞增殖未发现明显区别,1 ~ 5 d 时各组 $D(570)$ 值差异无统计学意义($P > 0.05$,图 4),表明 EDC/NHS 凝胶(CA0)、CA-EDC/NHS 凝胶(CA3)和 CA-EDC/NHS 凝胶(CA6)均具有较低的细胞毒性。

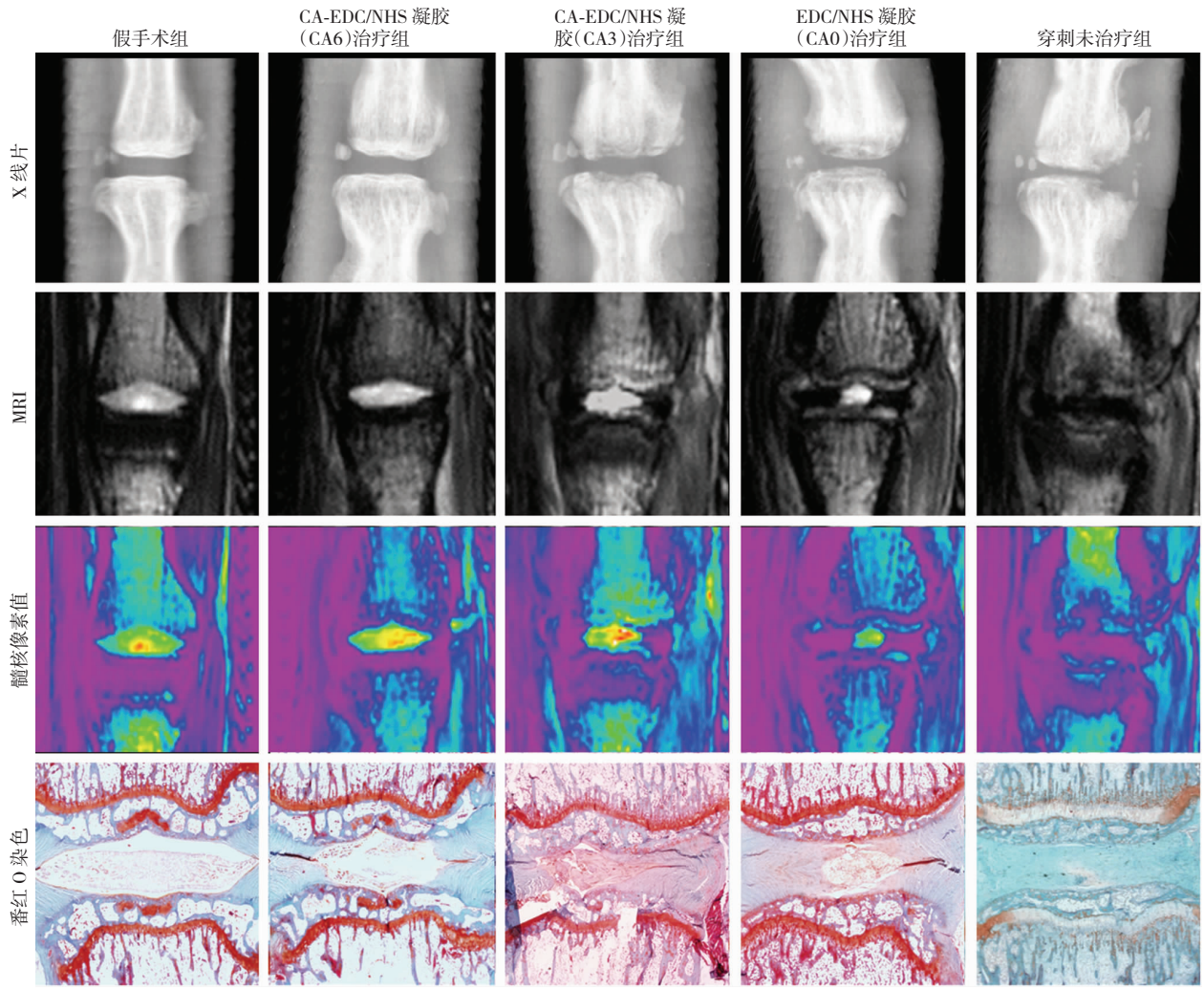


图 3　4 周后各组大鼠尾椎间盘 X 线片、MRI 和组织学病理变化　(番红 O ×20)

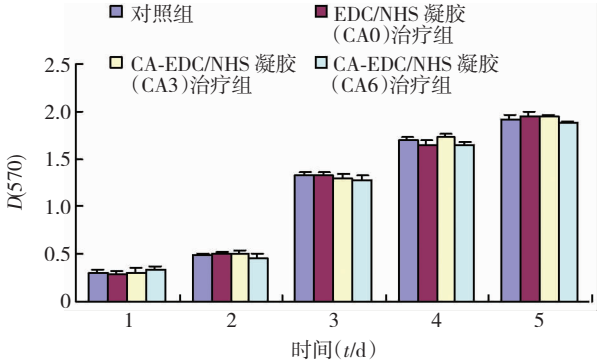


图 4　MTT 法检测各组不同时间 EDC/NHS 凝胶对 L929 成纤维细胞的增殖变化

2.2　生物相容性实验

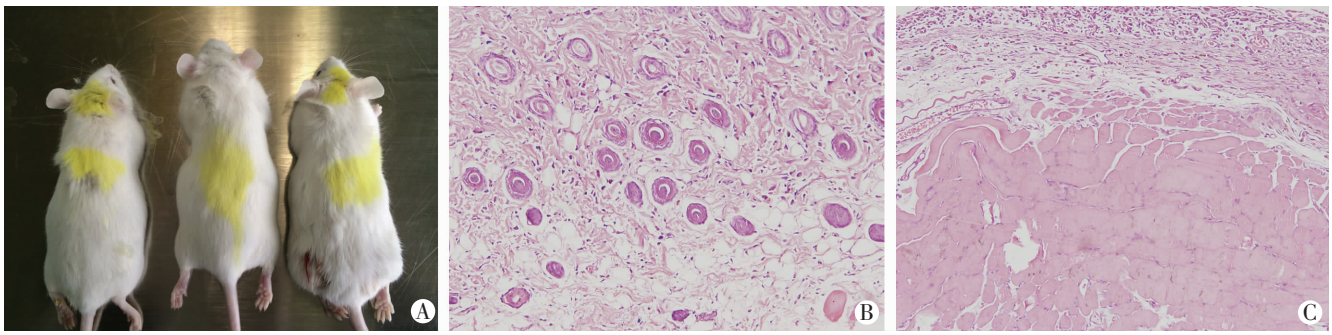
1 周后,注射了 CA-EDC/NHS 凝胶(CA6)的小鼠背部组织取材切片染色,镜下观察均未发现炎性细胞浸润和明显的炎症反应(图 5)。

2.3　椎间盘高度系数测量

所有被穿刺的椎间盘高度有不同程度的下降(图 6)。4 周后,CA-EDC/NHS 凝胶治疗组(CA6)维持了约为初始高度的 79%,并于 1 周时基本稳定,CA-EDC/NHS 凝胶治疗组(CA3)为 70%,EDC/NHS 凝胶治疗组(CA0)为 66%,穿刺未治疗组仅为 48%。可见,该凝胶通过添加柠檬酸加强了交联作用,促进了穿刺纤维环椎间盘高度的保持,相较于其余两组差异有统计学意义,且 CA6 剂量组效果优于 CA3 剂量组($P<0.05$)。

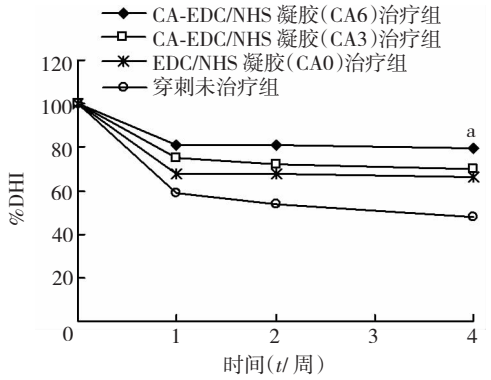
2.4　小动物 MRI 分析

2.4.1　定量核磁共振分析　　第 4 周时,假手术组的大鼠椎间盘髓核像素值记数平均为 147;CA-EDC/NHS 凝胶治疗组(CA6)的椎间盘像素值为 122~143,该值从第 2 周时开始便趋于稳定;CA-EDC/NHS 凝胶治疗组(CA3)的第 4 周的像素值为 66;EDC/NHS 凝胶治疗组(CA0)在第 1 周时椎间盘髓核像素值为 62,随后在第 2、4 周逐渐下降至 22;穿刺未治疗组第 1 周便下降至 26,随后逐渐降至 6。CA3 和 CA6 剂量的 CA-EDC/NHS 凝胶治疗组相较于 CAO 组及未治疗组获得更满意的髓核像素值结果,差异有统计学意义($P<0.05$),且 CA6 组优于 CA3 组($P<0.05$,图 7)。



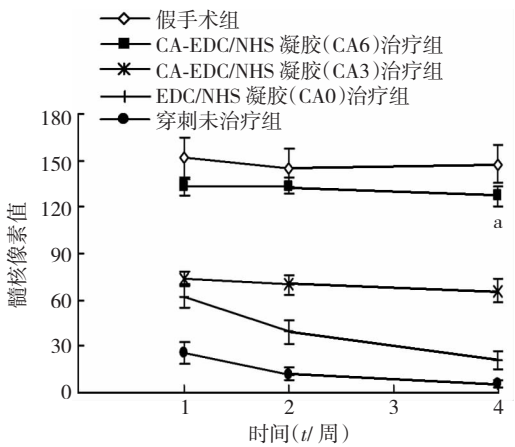
A:小鼠背部外观(黄色为注射区域);B、C:注射区域皮肤和皮下组织病理变化(HE ×100)

图5　小鼠背部注射区域1周后大体观察与组织病理变化



a:$P<0.05$,与其余3组比较

图6　各组大鼠不同时间尾椎间盘高度系数统计分析



a:$P<0.05$,与CA-EDC/NHS凝胶(CA3)治疗组、EDC/NHS凝胶(CA0)治疗组及穿刺未治疗组比较

图7　各组大鼠不同时间尾椎间盘髓核像素值统计分析

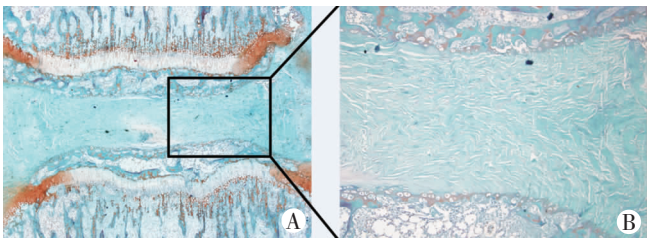
2.4.2　定性核磁共振分析　　10只使用了CA-EDC/NHS凝胶(CA6)治疗的椎间盘MRI结果未发现显著的退行性改变,使用福尔曼分级评分,分布为1~2级,平均1.3;CA-EDC/NHS凝胶(CA3)组福尔曼分级平均2.2;EDC/NHS凝胶(CA0)治疗的椎间盘表现出了部分髓核的减少,纤维环侵犯了髓核的空间,福尔曼分级为3~4级,平均3.1;穿刺未治疗组的椎间盘几乎全部变为黑色椎间盘,发生了严重退变,平均福尔曼分级为3.7(表2)。

表2　各组大鼠尾椎间盘改良MRI福尔曼分级评分结果

分级	假手术组(8只)	CA6治疗组(10只)	CA3治疗组(10只)	CA0治疗组(10只)	未治疗组(10只)
Ⅰ	8	7	1	0	0
Ⅱ	0	3	6	0	0
Ⅲ	0	0	3	9	1
Ⅳ	0	0	0	1	9

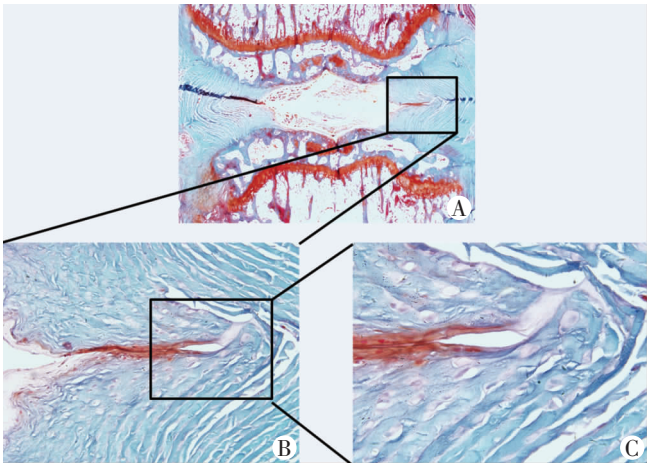
2.5　组织学观察

由组织学切片可直观看到穿刺未治疗组椎间盘髓核消失,终板发生骨化甚至有骨质破坏,退变严重(图8)。柠檬酸-EDC/NHS胶原凝胶(CA6)穿刺治疗组椎间盘较好地保持了髓核组织,且优于柠檬酸-EDC/NHS胶原凝胶(CA3)穿刺治疗组和EDC/NHS胶原凝胶(CA0)穿刺治疗组(图3)。柠檬酸-EDC/NHS胶原凝胶(CA6)组组织学切片显示针头穿破纤维环后留下的针道逐渐闭合,较好地维持了髓核组织的完整性,仅在针道内发现少量红染的髓核组织流入(图9),同时,软骨终板以及周围组织并未发生显著的退变。在高倍镜视野下,在针道的周围没有发现炎性细胞浸润,无瘢痕组织的形成,并在针道闭合的尽头观察到一团凝胶状物质在断裂的纤维环组织之间形成了桥接,关闭了针道。



A:(×20);B:框图放大观察(×200)

图8　4周后穿刺未治疗组大鼠组织病理学变化　(番红O)



A:(×20);B:A 中框图放大观察(×200);C:B 中框图放大观察(×400)

图 9 4 周后 CA-EDC/NHS 凝胶(CA6)治疗组大鼠组织病理学变化 (番红 O)

3 讨论

纤维环是一个复合型结构,由多层环状的胶原纤维和蛋白多糖凝胶构成,各层胶原纤维成一定角度紧密层叠排列的方式则是构成其生物力学和功能特性的基础,该结构允许正方和侧方的屈-伸,同时限制剪切和扭转来维持盘间的稳定[7]。因此一旦纤维环发生了破损,其特有的功能和力学性能也都会受到破坏,McGirt 等[8]和 Carragee 等[9]在文献中强调了纤维环对于维持髓核在位和防止再突出的重要性。此外,患者在破损后伴随而来的下腰痛症状,以及髓核摘除术后椎间盘再突出的潜在风险都值得我们关注。

纤维环具有较差的自我修复能力,并且也只能通过形成瘢痕组织来进行修复,所以有必要通过人为干预的方式促进其修复与闭合[1]。如今,关于纤维环修复的研究和产品也越来越多。已用于临床的关闭器械中,比较常见的就是 Barricaid™(Intrinsic Therapeutics Inc., Woburn, MA)和 Xclose Tissue Repair System™(Anulex Technologies, Minnetonka, MN),并已有相关的在体和离体研究论证其较为满意的关闭效果[10-12]。Grunert 在大鼠尾椎间盘穿刺模型中,在破损处原位注射一型胶原凝胶进行修复,通过 X 光、核磁共振以及组织学观察其修复效果,并论证了加入一种目前已用于治疗圆锥角膜的光敏交联剂核黄素能够获得更加满意的结果,较好地维持了髓核组织和椎间盘结构[13]。本实验采用的针头穿刺是最常见的一种用来诱导椎间盘退变的方法,已有大量文献报道在不同实验动物上使用了该方法,而鼠尾模型由于其结构简单、易于获得、价格低廉和标本量大而被广泛选择[14]。一个 18G 的针头穿刺形成的破口几乎等同于鼠尾椎间盘纤维环后壁的全部,按照破口比例来讲,甚至要比髓核摘除手术或椎间盘造影所造成的破口还要大,若不进行破口相应的关闭修复,高盘内压力和髓核流动性会使髓核组织逐渐挤出。

化学交联可以显著增强胶原凝胶硬度和降低透水性[15-16]。对于纤维环结构来说,胶原凝胶硬度增强会形成一个更加坚固的屏障来封闭破损,而该屏障透水性的降低也同时限制了含水量较高的髓核从破口丢失的可能性。同时,由于交联的作用,注射进入的胶原凝胶也会更加容易的黏附于纤维环组织,从而降低了植入材料从纤维环上脱离的发生率。本实验选择的一型胶原是外层纤维环的主要胶原纤维种类,具有优良的生物相容性、生物可降解性和生物活性[2-3]。使用碳化二亚胺,尤其是 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)交联胶原类生物材料,要优于醛类交联剂。碳化二亚胺类似于催化剂,只协助胶原分子的羧基和氨基之间形成酰胺键,自身并没有进入最后化学交联的结构中,EDC 最先与羧基偶合形成一个 O-异酰基脲结构,之后-NH2 基团进攻活化中间物形成酰胺交联,产生的活化中间物可被清洗掉[17]。此外,NHS 可以通过反应生成更加稳定的酯,以此来增强 EDC 交联产物的稳定性。柠檬酸是一个典型的三羧酸循环中的物质,拥有 3 个羧基基团,它作为交联分子时会避免产生毒性物质,可以很容易和胶原链状结构上的氨基交联来提高结构稳定性和力学强度。Zhao 等[18]使用柠檬酸、EDC、NHS 和一型胶原制成组织工程人工角膜,移植到新西兰兔模型中获得了满意的效果。此外,Taguchi 等[19]曾报道在 EDC 作为催化剂的条件下,NHS 中的琥珀酰亚胺可以通过替换掉羧基末尾的氢离子而引入柠檬酸结构中,形成一种新的柠檬酸衍生物,该衍生物具有很强的化学交联能力,可参与到胶原上的氨基之间形成酰胺键达到交联目的,并使用该衍生物和一型胶原制成了具有较高强度的皮肤黏合剂。

综上所述,本实验中 EDC/NHS 胶原凝胶能够通过交联获得一定修复纤维环的能力,而加入适量柠檬酸后的实验组,尤其是 CA6 胶原凝胶治疗组,在椎间隙高度系数、髓核像素值大小、椎间盘退变评分和组织学结果中都有比较明显的优势。我们观察到,柠檬酸-EDC/NHS 凝胶穿刺治疗组中的椎间盘观测的各项指标几乎都是在第 1 周后基本趋于稳定,说明修复效果主要发生在治疗后 1 周之内,而穿刺未治疗组的椎间盘则显示出较快的退变趋势。因此,柠檬酸-EDC/NHS 胶原凝胶具有修复破损纤维环的作用,较好的维持的髓核的完整性,减缓了椎间盘的退变,为纤维环修

复材料研究提供了新的选择。

本实验不足:鼠尾穿刺模型制作由人为操作,在穿刺深度、角度无法达到绝对的标准化;大鼠尾椎的解剖结构和生物力学与人类脊柱有较大不同,还需在大动物模型中验证;本研究尚处于初步阶段,还需要采取其他试验方法进一步观察和论证其修复作用。

参考文献:

[1] Guterl C C, See E Y, Blanquer S B, *et al*. Challenges and strategies in the repair of ruptured annulus fibrosus[J]. Eur Cell Mater, 2013, 25:1-21.

[2] Wang X, You C, Hu X, *et al*. The roles of knitted mesh-reinforced collagen-chitosan hybrid scaffold in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats[J]. Acta Biomater, 2013, 9(8): 7822-7832. DOI:10.1016/j.actbio.2013.04.017

[3] Kim B S, Kim J S, Lee J. Improvements of osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation *in vitro via* fibrin network formation in collagen sponge scaffold[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(9): 2661-2666. DOI: 10.1002/jbm.a.34567

[4] Usha R, Sreeram K J, Rajaram A. Stabilization of collagen with EDC/NHS in the presence of L-lysine: a comprehensive study[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2012, 90:83-90. DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.10.002

[5] Masuda K, Aota Y, Muehleman C, *et al*. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(1):5-14. DOI: 10.1097/01.brs.0000148152.04401.20

[6] Yu L P, Qian W W, Yin G Y, *et al*. MRI assessment of lumbar intervertebral disc degeneration with lumbar degenerative disease using the Pfirrmann grading systems[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e48074. DOI: 10.1371/journal.pone.0048074

[7] Middleditch A, Oliver J. Functional Anatomy of the Spine[M]. Elsevier Health Science, 2002: 59-82.

[8] McGirt M J, Eustacchio S, Varga P, *et al*. A prospective cohort study of close interval computed tomography and magnetic resonance imaging after primary lumbar discectomy: factors associated with recurrent disc herniation and disc height loss[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(19): 2044-2051. DOI:10.1097/BRS.0b013e3181b34a9a

[9] Carragee E J, Han M Y, Suen P W, *et al*. Clinical outcomes after lumbar discectomy for sciatica: the effects of fragment type and anular competence[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A(1):102-108.

[10] Wilke H J, Ressel L, Heuer F, *et al*. Can prevention of a reherniation be investigated? Establishment of a herniation model and experiments with an anular closure device[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(10): E587-E593. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31828ca4bc

[11] Parker S L, Grahovac G, Vukas D, *et al*. Effect of an annular closure device (barricaid) on same level recurrent disc herniation and disc height loss after primary lumbar discectomy: two-year results of a multi-center prospective cohort study[J]. J Spinal Disord Tech, 2013 [Epub ahead of print]. DOI: 10.1097/BSD.0b013e3182956ec5

[12] Bailey A, Araghi A, Blumenthal S, *et al*. Prospective, multicenter, randomized, controlled study of anular repair in lumbar discectomy: two-year follow-up[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(14): 1161-1169. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31828b2e2f

[13] Grunert P, Borde B H, Hudson K D, *et al*. Annular repair using high-density collagen gel: a rat-tail *in vivo* model[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2014, 39(3): 198-206. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000103

[14] Keorochana G, Johnson J S, Taghavi C E, *et al*. The effect of needle size inducing degeneration in the rat caudal disc: evaluation using radiograph, magnetic resonance imaging, histology, and immunohistochemistry[J]. Spine J, 2010, 10(11): 1014-1023. DOI:10.1016/j.spinee.2010.08.013

[15] Stewart J M, Schultz D S, Lee O T, *et al*. Collagen cross-links reduce corneal permeability[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(4):1606-1612. DOI:10.1167/iovs.08-2727

[16] Tirella A, Liberto T, Ahluwalia A. Riboflavin and collagen: New crosslinking methods to tailor the stiffness of hydrogels[J]. Mater Lett, 2012, 74:58-61. DOI:10.1016/j.matlet.2012.01.036

[17] 王迎军,杨春蓉,汪凌云. EDC/NHS 交联对胶原物理化学性能的影响[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2007, 35(12): 66-70,96.

[18] Zhao X, Liu Y, Li W, *et al*. Collagen based film with well epithelial and stromal regeneration as corneal repair materials: Improving mechanical property by crosslinking with citric acid[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015, 55: 201-208. DOI:10.1016/j.msec.2015.05.030

[19] Taguchi T, Saito H, Iwasashi M, *et al*. Development of a novel glue consisting of naturally-derived biomolecules: citric acid and human serum albumin[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2007, 7(3): 742-747. DOI:http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2007.515

(**收稿**:2015-12-16;**修回**:2016-01-06)

(编辑 龙 亮)