

分类号：  
学 号：20212014071

密 级：  
单位代码：10759

# 石河子大学



## 硕 士 学 位 论 文

### 超声响应型纳米材料 $BaTiO_3$ 通过抗炎延缓椎间盘退变的研究

学 位 申 请 人	毛润泽
指 导 教 师	阮智
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	骨科
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2024年10月

分类号：  
学号：20212014071

密级：  
单位代码：10759

# 石河子大学



## 硕士学位论文

### 超声响应型纳米材料 $BaTiO_3$ 通过抗炎延缓椎间盘退变的研究

学位申请人	毛润泽
指导教师	阮智
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	外科学
研究方向	骨科
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子

2024年10月

**Study on ultrasound responsive piezoelectric material BaTiO<sub>3</sub> delaying  
intervertebral disc degeneration through anti-inflammatory effects**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Medicine**

By

**Runze Mao**

**Surgery(Orthopedics)**

Dissertation Supervisor: Prof. **Zhi Ruan**

**May 2024**

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明


本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 毛润泽 时间： 2024年 10月22日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 毛润泽 时间： 2024年 10月 22日

导师签名：  时间： 2024年 10月 22日

## 摘要

### 目的:

下腰痛(LBP)亟需更多的恢复治疗方案。椎间盘退变(IVDD)是与LBP相关的主要因素。最近的研究集中于利用电刺激法对IVDD引起的炎症进行治疗,希望通过此方法缓解退变的症状。新型超声响应型压电材料BaTiO<sub>3</sub>具有良好的机电转换特性,并且能够适应椎间盘独有的应力条件,展现出对IVDD治疗的巨大潜力。在过去的几十年里,纳米技术为治疗不同的疾病提供了有效的解决方案。其中,超声响应型压电材料以非侵入性和远程的方法,使电信号传递到细胞和组织局部来发挥治疗作用。其中压电材料BaTiO<sub>3</sub>是一个具有潜力的治疗方案,本研究通过体内、外实验验证了超声响应型纳米材料BaTiO<sub>3</sub>通过抗炎对大鼠尾椎中对椎间盘的保护作用,为今后超声响应型纳米材料的多用途应用和IVDD的治疗打下基础。

### 方法:

本研究分为体外实验和体内实验,其中体外实验所采用的是人源性髓核(NP)细胞,该NP细胞来源于石河子大学第一附属医院脊柱外科就诊的符合相关标准的患者,提取后立即无菌保存,并进行分离、纯化、培养、传代。通过查阅文献找到合适的纳米材料浓度,实验中使用体外超声仪器激发超声响应型纳米材料的压电属性,并利用脂多糖(LPS)体外刺激健康细胞发生氧化应激以构建炎症衰老的细胞模型。利用CCK8实验,评估在不同处理条件下的细胞生长和死亡情况。通过蛋白质免疫印迹分析(Western blot)和免疫荧光方法,检测各试验组内炎症相关分子的蛋白水平。同时,使用实时荧光定量PCR(qPCR)技术来量化各试验组细胞中特定炎症基因的活性。并进行转录组测序,检测该材料对髓核细胞信号通路的影响。体内实验采用6-8周雄性SD大鼠通过针刺法构建椎间盘退变模型,并加入BaTiO<sub>3</sub>进行超声引导下的治疗,验证该超声响应型纳米材料BaTiO<sub>3</sub>通过抗炎抗衰老延缓椎间盘退变的作用。在治疗4周后进行取材,并使用MRI及HE染色、番红固绿染色和ELISA进行验证。

### 结果:

体外实验结果表明,超声引导下的BaTiO<sub>3</sub>材料显著抑制了由LPS诱导的髓核细胞炎症反应,炎症相关蛋白和基因的表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。此外,CCK8实验显示BaTiO<sub>3</sub>在200  $\mu$ g/mL浓度下具有良好的生物相容性,对髓核细胞增殖无显著影响。在体内实验中,MRI和组织学分析结果显示,BaTiO<sub>3</sub>处理组的大鼠椎间盘结构损伤较轻,纤维环和髓核的完整性得到较好保持。血清中炎症因子水平显著降低,而抗炎因子水平升高( $P < 0.05$ ),验证了BaTiO<sub>3</sub>在超声引导下延缓椎间盘退变的有效性。

### 结论:

本研究通过构建体外NP细胞炎症模型,验证了压电纳米材料BaTiO<sub>3</sub>在NP细胞中具有抗炎

作用，并体内实验构建了大鼠 IVDD 模型，验证了 BaTiO<sub>3</sub> 对椎间盘的保护作用。

**关键词：**超声响应型纳米材料；椎间盘退变；髓核细胞；抗炎

论文类型：A（基础研究）

## Abstract

### Objective:

Lower back pain (LBP) requires more recovery treatment options. A major factor associated with LBP is intervertebral disc degeneration (IVDD). Recent research reports have focused on using electrical stimulation to treat inflammation caused by IVDD, with the hope of alleviating degenerative symptoms through this method. Considering that the new ultrasonic responsive piezoelectric material BaTiO<sub>3</sub> has simple electromechanical conversion characteristics and can adapt to the unique stress conditions of intervertebral discs, they demonstrate great potential for IVDD treatment. In the past few decades, nanotechnology has provided effective solutions for treating different diseases, which can effectively improve systemic drug delivery and enhance drug bioavailability. Among them, ultrasound responsive piezoelectric materials represent a promising platform for non-invasive and remote transmission of local electrical signals to cells and tissues for therapeutic purposes. Among them, the piezoelectric material BaTiO<sub>3</sub> is a promising treatment option. This study verified the anti-inflammatory effect of ultrasound responsive nanomaterial BaTiO<sub>3</sub> on intervertebral discs in rats through in vitro and in vivo experiments, laying the foundation for the future multi-purpose application of ultrasound responsive nanomaterials and the treatment of IVDD.

### Method:

The human derived nucleus pulposus (NP) cells used in the in vitro experiment of this study were collected from patients who met the relevant standards and were treated in the Spinal Surgery Department of the First Affiliated Hospital of Shihezi University. After extraction, they were immediately sterile stored, isolated, purified, cultured, and passaged. By consulting literature to find the appropriate concentration of nanomaterials, an in vitro ultrasound instrument was used to excite the piezoelectric properties of ultrasound responsive nanomaterials in the experiment, and lipopolysaccharide (LPS) was used to stimulate healthy cells to undergo oxidative stress in vitro to construct a cellular model of inflammatory aging. By using the CCK8 experiment, we can evaluate the cell growth and death under different treatment conditions. The observation of inflammation related protein levels in each experimental group was achieved through Western blot analysis and immunofluorescence methods. Meanwhile, quantitative real-time PCR (RT qPCR) technology was used to quantify the activity of specific inflammatory genes in cells of each experimental group. And transcriptome sequencing was performed to detect the effect of the material on the signaling pathway of nucleus pulposus cells. In vivo experiments were conducted using 6-8 week male SD rats to construct an intervertebral disc degeneration model through acupuncture, and BaTiO<sub>3</sub> was added and treated under ultrasound guidance. Verified the

anti-inflammatory effect of the ultrasound responsive nanomaterial BaTiO<sub>3</sub> on intervertebral disc degeneration (IVDD) and its ability to delay intervertebral disc degeneration. After 4 weeks of treatment, samples were taken and validated using MRI and HE staining, safranin green staining, and ELISA.

**Result:**

The results of in vitro experiments showed that ultrasound-guided BaTiO<sub>3</sub> significantly inhibited the LPS-induced inflammatory response in nucleus pulposus cells, and the expression levels of inflammation-related proteins and genes were significantly decreased ( $p < 0.05$ ). In addition, CCK8 experiment showed that BaTiO<sub>3</sub> had good biocompatibility at a concentration of 200  $\mu$ g/mL, and had no significant effect on proliferation of nucleus pulposus cells. In vivo experiments, MRI and histological analysis showed that the intervertebral disc structure of rats treated with BaTiO<sub>3</sub> was less damaged, and the integrity of the annulus fibrosus and nucleus pulposus was better maintained. The levels of inflammatory factors in serum were significantly decreased, while the levels of anti-inflammatory factors were increased ( $p < 0.05$ ), which verified the effectiveness of BaTiO<sub>3</sub> in ultrasound-guided delay of intervertebral disc degeneration.

**Conclusion:**

This study successfully validated the anti-inflammatory effect of the piezoelectric nanomaterial BaTiO<sub>3</sub> in NP cells by constructing an in vitro NP cell inflammation model, and constructed a rat IVDD model through in vivo experiments to verify the protective effect of BaTiO<sub>3</sub> on intervertebral discs.

**Key words:** Ultrasound responsive nanomaterials; Intervertebral disc degeneration; Nucleus pulposus cells; antiinflammatory

**Paper type:** A (Basic Research)

# 目录

摘要.....	I
<b>Abstract.....</b>	<b>III</b>
目录.....	I
主要符号表.....	I
引言.....	1
第 1 章 实验材料.....	3
1.1 主要试剂.....	3
1.2 器械及设备.....	4
1.3 髓核细胞和实验动物的来源.....	5
第 2 章 实验方法.....	6
2.1 原代人源性髓核细胞的培养、传代、冻存、复苏.....	6
2.2 BaTiO <sub>3</sub> 无菌母液的配制.....	7
2.3 不同浓度 BaTiO <sub>3</sub> 的细胞培养液配制详述.....	7
2.4 髓核细胞 LPS 处理构建炎症模型的详细步骤.....	7
2.5 实验中采用外部超声波刺激 BaTiO <sub>3</sub> 产生压电效应.....	8
2.6 CCK8 实验检测与不同浓度 BaTiO <sub>3</sub> 共培养的的 NP 细胞活力.....	8
2.7 免疫印迹实验 (Western Blot).....	9
2.8 定量实时聚合酶链反应 (RT-qPCR).....	10
2.9 建立椎间盘退变大鼠动物模型.....	11
2.10 HE 染色.....	12
2.11 番红固绿染色.....	13
2.12 elisa 实验检测大鼠血液中炎症因子情况.....	13
2.13 MRI 检测大鼠椎间盘退变情况.....	14
2.14 统计学分析.....	14
第 3 章 实验结果.....	16
3.1 BaTiO <sub>3</sub> 与 NP 细胞具有良好的生物相容性.....	16
3.2 超声引导下压电材料 BaTiO <sub>3</sub> 抑制 NP 细胞内炎症、衰老.....	17
3.3 体内实验 MRI 检测椎间盘退变情况.....	18
3.4 HE、番红固绿染色检测 BaTiO <sub>3</sub> 延缓椎间盘退变作用.....	18

3.5 大鼠血液中炎症因子的水平检测 .....	19
3.6 使用转录组测序技术研究 BaTiO <sub>3</sub> 椎间盘退变保护的机制 .....	21
第 4 章 讨论 .....	22
第 5 章 结论 .....	26
参考文献 .....	37
致谢 .....	48
作者简介 .....	49
石河子大学硕士研究生学位论文 .....	50

## 主要符号表

英文缩写	英文全称	对应中文
IVD	Intervertebral disk	椎间盘
IVDD	Intervertebral disc degeneration	椎间盘退变
LBP	Low back pain	下腰痛
NP	Nucleus pulposus	髓核
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
qPCR	Real time quantitative PCR	实时定量 PCR
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
sGAG	glycosaminoglycan	糖胺聚糖
IL-1	Interleukin 1	白细胞介素-1
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子- $\alpha$
US	Ultrasound	超声
TBHP	t-Butyl Hydroperoxide	叔丁基过氧化氢
ECM	ExtraCellular Matrix	细胞外基质
BTE	Bone tissue engineering	骨组织工程
GFs	Growth factors	生长因子
DDS	Drug delivery system	药物递送系统
PNS	Peripheral nervous system	外周神经系统

## 引言

椎间盘 (Intervertebral disk, IVD) 是两个相邻椎骨的椎体之间的软骨连结, 由外围的纤维环和中心的髓核组成, 其主要功能包括承受并传递脊柱负荷。椎间盘合成代谢和分解代谢过程的不平衡常常是导致椎间盘变性 (Intervertebral disc degeneration, IVDD) 主要原因, 其中伴随着细胞外基质 (ExtraCellular Matrix, ECM) 组成的改变、髓核 (Nucleus pulposus, NP) 细胞的丢失、过度的氧化应激和炎症<sup>[1]</sup>。最近的研究报道, 炎症在 IVDD 的病理过程中起着至关重要的作用, 如基质降解、细胞衰老和细胞凋亡<sup>[2,3]</sup>。IVDD 的一个常见特征是炎性细胞因子水平升高, 如肿瘤 TNF- $\alpha$  和 IL-1 等炎性因子。这些炎性细胞因子会破坏 ECM 降解和合成的平衡<sup>[4]</sup> 并促进细胞死亡。NP 细胞是椎间盘组织最具有代表性的一类细胞, 髓核细胞的炎症反应与椎间盘退变过程息息相关。因此, 本研究针对 NP 的细胞的炎症反应进行研究。

目前, 纳米医学是生物医学研究中最有前途和最先进的领域之一, 它将纳米技术与医学相结合。近年来, 许多种类的纳米材料被引入生物医学领域, 并可装载多种药物和活性分子, 实现靶向治疗的功能化<sup>[5]</sup>, 为治疗不同的疾病提供了有效的解决方案。纳米材料是指一种尺寸最大不超过 1000nm 的结构, 由于其具有良好的生物利用度及稳定性使其在生物载药领域有较多的应用<sup>[6]</sup>, 因此探究更多生物医学纳米材料成为近年来的研究热点。近年来外部刺激, 例如磁场、超声、电刺激调控生物过程的研究较为热门, 但是由于其渗透效率不高, 侵入性较强, 时间和空间上的局限性较大<sup>[7]</sup>, 大大地阻碍了其研究及应用。而癌症纳米医学的一个创新范例可以消除这个局限, 其开发了能够远程对外界刺激作出反应的活性纳米器件。并将不同形式的能量转化为物理或化学抗癌效应 (热, 活性氧, 电效应)<sup>[8]</sup>。并有团队采用超声响应型压电材料, 通过超声引导使其远程激活并在作用部位产生电刺激, 改变细胞微环境, 进而达到治疗效果<sup>[9]</sup>。超声响应型纳米材料不仅可以非侵入性和远程传递局部电信号到细胞和组织来发挥治疗作用, 而且具有较好的生物利用度和稳定性, 故而超声响应型纳米材料作为一个有前途的新兴平台, 具有相当的研究价值。

在课题组的前期研究基础上, 经过相关领域的文献阅读, 本研究采用超声响应型压电材料钛酸钡 ( $\text{BaTiO}_3$ ) 作为研究对象。 $\text{BaTiO}_3$  作为一个可超声远程激活的压电材料<sup>[10]</sup>, 其受到超声刺激后也会发生机械形变, 从而产生电刺激, 从而达到远程激活的效果。有研究表明, 电刺激可以通过对髓核细胞炎症的抑制作用, 从而延缓 IVDD<sup>[11]</sup>。而椎间盘退变与炎症息息相关, 并且椎间盘的主要功能是承受并传递脊柱负荷, 因此其天生存在的机械应力, 使得  $\text{BaTiO}_3$  与 IVDD 的研究更加契合。本研究在上述基础上

开展，通过体外细胞实验建立 NP 细胞炎症模型，随后在超声引导下使用压电纳米材料  $\text{BaTiO}_3$  对其进行治疗，并检测 NP 细胞中的炎性指标来验证  $\text{BaTiO}_3$  的抗炎作用，随后建立 SD 大鼠 IVDD 模型，对体内  $\text{BaTiO}_3$  的抗炎作用及延缓椎间盘退变的效果进行验证。探求  $\text{BaTiO}_3$  在体内、外的抗炎效果及对椎间盘退变的保护作用，为超声响应型压电材料在生物医学领域的应用做出初步的尝试，同时也为椎间盘退变的治疗提供新思路。

## 第 1 章 实验材料

### 1.1 主要试剂

本次实验所使用的实验试剂及来源见表 1-1 所示：

表 1-1 实验所用试剂及来源

试剂	来源
改良 Eagle 培养基 (DMEM) 培养基	Gibco 生物科技公司
胎牛血清	ScienCell 生物科技公司
青霉素-链霉素混合液	中国 (Solarbio)
II 型胶原酶	Bioroxx 生物科技公司
细胞计数 (CCK8) 试剂盒	Beyotime 生物科技公司
BaTiO <sub>3</sub> 纳米颗粒	Sigma 官网
DEPC 水	Biosharp 生物科技公司
LPS 试剂	Beyotime 官网
PCR 引物	Tsingke 生物科技公司
5×HiScriptIII qRT SuperMix 试剂	诺唯赞生物科技公司
SYBR Green Supermix 试剂	诺唯赞生物科技公司
异丙醇	国药集团
无水乙醇	国药集团
Trizol 试剂	伯欧乐基生物科技公司
P53 兔一抗	百奥莱博生物科技公司
P21 兔一抗	百奥莱博生物科技公司
IL-1 鼠一抗	百奥莱博生物科技公司
B-action 兔一抗	百奥莱博生物科技公司
HRP 标记羊抗鼠二抗	百奥莱博生物科技公司
HRP 标记羊抗兔二抗	百奥莱博生物科技公司
Loading Buffer	Beyotime 生物科技公司
Western blot 制胶试剂	雅酶生物科技公司
Western blot 电泳液	BioFROXX 生物科技公司
Western blot 转膜液	BioFROXX 生物科技公司
脱脂奶粉	Biosharp 生物科技公司

95%乙醇	中国（山东浩中）
75%乙醇	中国（山东浩中）
磷酸盐缓冲盐水	Biosharp 生物科技公司
二甲苯	中国（湖北恒久）
苏木素	中国（江苏伊势久）
0.1%伊红染液	中国（上海联迈）
0.4%多聚甲醛	美国（sigma）
DAPI 染色液	美国（Thermo Fisher Scientific）
抗荧光淬灭剂	美国（Thermo Fisher Scientific）
10×TBST	中国（Solarbio）
彩虹蛋白 Mark	中国（上海生工）
Tris	中国（Solarbio）
甘氨酸	中国（Solarbio）
无酶水	中国（Solarbio）
PVDF 膜	美国（sigma）
转膜滤纸	美国（sigma）
TEMED	美国（sigma）
甲醇	美国（sigma）
BCA 蛋白检测试剂盒	美国（sigma）

## 1.2 器械及设备

本研究所涉及器械、设备列表如表 1-2 所示

表 1-2 器械、设备及其来源

器械及设备	来源
各体积 EP 管，冻存管离心管	Biosharp 生物科技公司
T25 细胞培养瓶	BIOFIL 生物科技公司
六孔板、十二孔板	NEST 生物科技公司
移液器	Therom 生物科技公司
高速离心机	BioRAD 生物科技公
精密天平	上海奥豪斯有限公司
酶标仪	BioRAD 生物科技公司
PCR 荧光定量仪	BioRAD 生物科技公司

Western blot 电泳槽	六一生物科技公司
Western blot 转膜槽	六一生物科技公司
ChemiDocTM MP 成像系统	BioRAD 生物科技公司
倒置荧光显微镜	OLYMPUS 生物科技公司
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	北京科誉兴业科技发展公司
冰箱 (4°C、-20°C)	中国 (海尔)
-80°C 冰箱	美国 (Thermo Fisher Scientific)
水浴箱	中国 (北京光明)
高压灭菌器	中国 (上号博讯)
电热鼓风恒温干燥箱	中国 (上海博讯)
快速混匀仪	中国 (山东博客)
磁力搅拌器	中国 (厦门国仪)
电转仪	美国 (Bio Rad)
超净工作台	AIRTECH 生物科技公司

### 1.3 髓核细胞和实验动物的来源

此项研究收集的人体 NP 细胞样本源于 4 位进行脊柱融合术的青少年特发性脊柱侧弯患者，年纪分布在 13 至 16 岁之间。这些样本是从第三腰椎至第一骶椎之间采集的。患者在手术前都经过了基于 Pfirmann 标准的 MRI 分级，分级结果均不超过 II 级。样本收集中涉及的具体纳入条件与排除标准参见第表 1-3。采集的 NP 组织在手术时刻被迅速转移到实验室，采取无菌储存措施，确保样本的完整与纯净以备后续的实验研究使用。

表 1-3 纳入排除标准

纳入标准	排除标准
青少年特发性脊柱侧凸接受椎间融合手术的患者	青少年特发性脊柱侧弯患者接受翻修手术
根据术前 MRI 影像结果判断，纳入 Pfirmann 1 级和 2 级的青少年患者	青少年伴神经纤维瘤病的特发性脊柱侧凸
手脊柱术节段为 L3-S1 的青少年患者	患有马凡综合症的病患

实验动物为 SPF 级雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 30 只，6-8 周龄，体重约 180±20 g，由武汉市华联科实验动物中心提供。所有 SD 大鼠均在标准的动物饲养环境下喂养，室内温度保持在 22±2°C，12 小时光照/黑暗循环，湿度维持在 60-70%，动物可自由获取食物和水。

## 第 2 章 实验方法

### 2.1 原代人源性髓核细胞的培养、传代、冻存、复苏

原代培养：在手术过程中获取的椎间盘样本被迅速转移到包含 20ml 无胎牛血清的高糖 Gibco DMEM 培养介质中，并立即送往实验室进行细胞的基础培养。提取的样本尺寸约为 1cm x 2cm x 2cm，主要含有髓核细胞，以及一些附着的软骨终板和纤维环成分。在无菌的环境下，使用体视显微镜去除硬化的软骨终板和纤维环，只留下柔软的髓核部分，并分别使用不含抗生素和含抗生素的 Hank's 缓冲溶液进行两次清洗。随后，准备 0.2% II 型胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶溶液，向经过处理的核心样本中加入充足的胰蛋白酶，确保样本被完全覆盖，并尽量将其切割成更小的片段，目标大小约为 1mm<sup>3</sup>，以促进有效的酶解。之后，样本在 37°C、转速 200rpm 的振荡器中振荡 20 分钟，用 1200rpm 的速度离心 10 分钟移除上层液体，加入事先准备的 II 型胶原酶溶液，在相同的条件下混合 3-5 小时。在组织被完全消化后，使用 200 孔径的滤网过滤至 10ml 的离心管中，并添加胎牛血清终止消化。以 1200rpm 速度离心 6 分钟，移除顶层液体，加入发育成熟的培养基，混合后再次离心以移除上清。随后补充 5ml 的完整培养基，混合并计算细胞浓度，以每毫升 5 万细胞的密度接种至 25 平方厘米的培养器皿中，并在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 培养箱中孵化。随后定期监测细胞增长情况，并每隔 3-4 天更换培养基。

细胞过程和繁殖步骤描述：当用显微镜观察到细胞密集度超过 85%-90%，即准备进行细胞分散与复制过程。首先，移除培养容器里的旧培养液，并利用 37 度的 Hank's 缓冲溶液进行两次清洗；接着，向容器中添加 4ml 浓度为 0.05% 的 EDTA，用以断开细胞之间的连接，防止过长时间处理伤害细胞（加入 EDTA 后处理的时间是多少）。弃掉 EDTA 后，再加入 0.05% 的胰蛋白酶，覆盖细胞层，并在显微镜下观察形态变化，一旦观察到细胞变圆和间隙扩张的情况，立即加入新鲜的完全培养基以停止消化。用移液工具轻轻吹动细胞以分散均匀，计算密度后，把细胞以 50,000/ml 细胞的密度种植于 75cm<sup>2</sup> 的培养容器中，在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 的环境中继续培养，并记录细胞生长情况。

细胞的冷冻保存与复苏说明：当细胞重新聚集至超过 85%-90% 的密度时，按照上述步骤处理后，把细胞悬液在 1200rpm 的条件下离心 5 分钟，以去除液体。之后添加 3-4ml 的血清并均匀吹拌。计数之后，将细胞均匀分入每个冷冻管中（每个管约 1ml），加入 0.1ml 的二甲基亚砜，调整细胞密度到每 1-3 百万/ml，之后在逐步降温后放入液

氮中存储。复苏细胞时，将冻存管放入 37 度加热的去离子水中，等到细胞悬浮液完全溶解后转移至离心管，并添加 2ml of Hank's 缓冲液与 1ml 的胎牛血清混合后，1200rpm 离心 6 分钟弃掉顶层液体。加入新鲜培养基，进行最后一次离心以混合均匀，然后计算细胞浓度并按需种植。

## 2.2 BaTiO<sub>3</sub> 无菌母液的配制

实验中采用的 BaTiO<sub>3</sub> 是从 Sigma 官网购得的纳米级颗粒，这种纳米材料因其独特的物理和化学性质而被广泛研究。为了保证实验的准确性和安全性，首先需要配制一种浓度为 10mg/ml 的无菌 BaTiO<sub>3</sub> 母液。这一过程涉及到精确的称量和无菌操作，确保最终溶液的纯度和稳定性。首先，在无菌条件下，准确称量所需的 BaTiO<sub>3</sub> 粉末量，并将其转移到一个 5mL 的透明 EP 管中，使用记号笔在管壁上标记好体积。为了彻底灭菌，将装有 BaTiO<sub>3</sub> 粉末的 EP 管放入高压蒸汽灭菌器中，高压灭菌 1 小时，以确保材料的无菌状态。灭菌完成后，将 EP 管放置在无菌操作台下的紫外线灯下照射 24 小时，进一步保证无菌环境。

在这些准备工作完成后，在无菌操作台中，慢慢向 EP 管中加入预先准备好的无菌磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered solution, PBS），以达到最终浓度为 10mg/ml 的 BaTiO<sub>3</sub> 无菌母液。这一步骤需要非常小心，以避免任何污染。配制好的母液需用封口膜紧密封闭，防止污染，并在室温下储存，以备后续实验使用。

## 2.3 不同浓度 BaTiO<sub>3</sub> 的细胞培养液配制详述

针对 BaTiO<sub>3</sub> 对间充质细胞如椎间盘 NP 细胞的压电效应的研究，合适的 BaTiO<sub>3</sub> 浓度的选择至关重要。为此，本研究设计了包括对照组在内的六种不同浓度的 BaTiO<sub>3</sub> 溶液（0μg/ml、20μg/ml、30μg/ml、50μg/ml、100μg/ml 和 200μg/ml），这些浓度的选择基于广泛的文献调研以及我们实验室之前的研究成果。在配制这些不同浓度的 BaTiO<sub>3</sub> 细胞培养液之前，首先需要将储存的 BaTiO<sub>3</sub> 母液均匀混悬。将封存的 BaTiO<sub>3</sub> 母液 EP 管置于超声水浴中处理 3 分钟，确保 BaTiO<sub>3</sub> 纳米颗粒能够在 PBS 溶液中充分且均匀地分散。随后，在无菌操作台下，将这些均匀混悬的 BaTiO<sub>3</sub> 母液与 NP 细胞培养基按照特定比例混合，制备成不同预定浓度 BaTiO<sub>3</sub> 的细胞培养液，这些培养液将用于后续的细胞培养实验。

## 2.4 髓核细胞 LPS 处理构建炎症模型的详细步骤

为了深入研究椎间盘退变中的炎症过程及 BaTiO<sub>3</sub> 潜在的干预效果, 本实验设计了以脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 处理 NP 细胞的方式来构建炎症模型<sup>[12,13]</sup>。首先, 将培养至 80-90%融合率的 NP 细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的环境下继续培养, 确保细胞的健康生长状态。基于先前的研究成果, 我们选择将 LPS 与 F12 细胞培养基按 50μg/ml 的浓度混合, 以此浓度与 NP 细胞共培养。实验设置了五个组别, 包括对照组 (未经 LPS 处理)、LPS 刺激组、BaTiO<sub>3</sub>+LPS 刺激组、超声+LPS 刺激组和超声+BaTiO<sub>3</sub>+LPS 刺激组, 以全面评估不同干预措施对 LPS 引发的细胞炎症反应的影响。

## 2.5 实验中采用外部超声波刺激 BaTiO<sub>3</sub> 产生压电效应

在该项研究中, 我们应用了来源于美国 Chattanooga 品牌的 2776 型号的治疗级超声波设备进行外部超声波刺激, 这台设备可以产生 1MHz 频率的正弦波超声信号, 其脉冲持续时间定为 1 毫秒。在实施超声波刺激前, 首先要保证 NP 细胞在六孔板上均匀分布。我们选定的超声波刺激平均强度设置为 0.3W/cm<sup>2</sup>, 并且每个处理孔的照射时间为 3 分钟, 以每隔一天的频率执行超声波刺激, 共计进行了三轮刺激实验。所有这些操作参数都是基于之前的相关研究基本而精心挑选的, 合适的超声参数可以尽可能提高实验效率<sup>[14-16]</sup>。

## 2.6 CCK8 实验检测与不同浓度 BaTiO<sub>3</sub> 共培养的的 NP 细胞活力

在此项研究中, 我们通过使用 CCK8 试剂盒进行了一系列的细胞实验, 目的是考察不同实验环境对 NP 细胞增殖能力的影响。这一过程旨在验证 BaTiO<sub>3</sub> 的生物相容性以及确定 LPS 的有效浓度范围。实验操作细节包括: 起始阶段, 保证 P2 代的 NP 细胞在一个装有 2 万细胞的 96 孔培养板上均匀种植, 并在 37.5%的 CO<sub>2</sub> 环境下进行过夜培养, 以利于细胞的附着。之后, 在确认细胞已稳定粘着于板底之后, 我们对不同浓度的 BaTiO<sub>3</sub> 和叔丁基过氧化氢 (t-Butyl Hydroperoxide, TBHP) 溶液进行配制, 并精确分配到 96 孔板的指定孔中, 每组浓度设立 3 个重复实验, 每孔添加 200μL 的溶剂以保障实验处理的均一性及数据的可复制性。接着, 把培养板放入一个设置为 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的孵化器中, 并根据预定的实验时长进行孵化, 从而评估不同实验设置下 NP 细胞的生长表现。这一实验时长的安排依据之前的设计及细胞预期反应时间, 目的是为了深入观察在不同条件下 NP 细胞的增殖情况。为了顺利进行 CCK8 检测, 我们先在避光条件下制备 CCK8 试剂与无血清培养基按 1:10 的比例混合。然后向每个培养的 96 孔板孔中精确加入 100μL 的混合稀释液, 确保每孔均匀接收到 CCK8 试剂, 以便进一步执行吸光度测试。在 37°C 孵化 1 小时之后, 利用 VICTOR Nivo®多模式检测仪

(PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) 对每孔在 450nm 波长处的吸光度进行测量。通过这些吸光度数据的分析, 我们不仅能够评定在各种条件下 NP 细胞的增殖能力, 还可以基于这些信息确认 BaTiO<sub>3</sub> 与 TBHP 的生物相容性及其安全、有效的使用浓度范围。

## 2.7 免疫印迹实验 (Western Blot)

我们采用了 Western blot 技术来分析 NP 细胞内部的蛋白质情况。首要步骤包括从不同条件下处理的 NP 细胞提取出蛋白质。这个过程细节如下: 先将装有 NP 细胞的 T25 培养瓶从孵化器内取出, 并放在冷却板上以降温, 随后丢弃瓶里的培养基并利用 PBS 溶液进行一到两次清洗。接着, 我们将增强型 RIPA 缓冲溶液与 PMSF 以 100 比 1 的比例混合, 这种混合溶液每瓶 100 $\mu$ L 添加到 T25 培养瓶中以破裂 NP 细胞。在整个细胞破裂过程中, 将培养瓶保持在冷冻板上以防止样品过热。然后使用细胞刮刀从 T25 培养瓶底部反复刮蹭瓶子底部, 并收集细胞破裂后流出的裂解产物, 使用超声波裂解仪使细胞进一步裂解以更顺利地提取蛋白。接下来, 将收集到的液体放入 4 $^{\circ}$ C 的离心机中, 以 12000rpm/min 的速度旋转 15 分钟。离心结束后, 取出上清 (即所需的蛋白质液)。随后, 我们使用位于中国上海的碧云天 BCA 蛋白检测盒来量化蛋白液中的蛋白浓度。浓度确定后, 向蛋白液中加入适量的 loading buffer 并充分混合, 随后在 95 $^{\circ}$ C 热盒中处理 10 分钟以使蛋白质发生变性。若短时间内不用蛋白质, 则需将其保存在 -80 $^{\circ}$ C 的条件下。

表 2-1 凝胶浓度及线性分离范围

凝胶浓度	线性分离范围 (KDa)
15%	10-43
12%	12-60
10%	20-80
7.5%	36-94
5%	57-212

蛋白质提取完毕之后, 配置 10% 的 SDS-PAGE 胶体。胶体的配比应根据目标蛋白质的大小进行调整。整个准备步骤包括挑选合适尺寸的玻片, 并使用清洁剂彻底清洗后, 用去离子水冲洗并自然风干。干燥后, 将玻片放入胶框中 (短边向内), 并用夹子固定。接着制备分离胶, 将所有试剂混合均匀后倒入玻片间, 待 7ml 添加完毕后覆盖 500 $\mu$ l 的乙醇并静置 30 分钟。去除乙醇后, 再配制浓缩胶, 并迅速将其加入玻片间隙, 然后插入梳子并等待 30 分钟使凝胶固化。之后, 将准备好的蛋白液缓慢注入凝胶的样本孔中 (总质量定为 30  $\mu$ g), 在边缘孔中加入少量的标记蛋白液。用 80 伏的恒

定电压进行电泳操作。具体时间如表格 9 所示。

表 2-2 转膜时间与目的蛋白分子量关系表

分子量 (KDA)	转膜时间 (小时)
135-190	2.5-3.5
80-135	1.8-2.5
30-80	1.8
15-30	0.8
<15	0.5

在蛋白质达到分离凝胶底部时，终止电泳并进行膜转移步骤。此步骤首先需要根据目标蛋白的大小裁剪适合的 PVDF 膜，确保它能覆盖整个蛋白凝胶，并进行标记。使用甲醇激活切割好的膜（浸泡 1 分钟），然后将该膜转移到转膜液中浸泡 5 分钟。按照目的蛋白在凝胶中的位置，切下蛋白区域并放置在夹板上，倾倒转膜液以防气泡并覆盖 PVDF 膜。确认无气泡后，将夹板密封并放入装有转膜液的槽中，在冰水混合物中进行转膜，使用 200mA 的恒电流进行操作。转膜结束后，进行膜的封闭、一抗和二抗孵育处理。首先，按照说明书准备 0.5% 脱脂牛奶溶液，将 PVDF 膜浸入其中，在室温下封闭 1-2 小时。之后，使用含 0.1% Tween® 20 的 TBST 溶液清洗膜四次，然后将 PVDF 膜放入一抗溶液中孵育过夜。第二天，取出膜，用 TBST 清洗四次后再浸入二抗溶液中孵育 1-2 小时。最后，对膜进行显影处理，在避光条件下配制曝光液并滴加在膜上微微摇晃使其分布均匀，利用 ChemiDoc™ MP 成像仪进行成像。并使用相关软件进行量化处理分析。

## 2.8 定量实时聚合酶链反应 (RT-qPCR)

在本研究中，我们利用了反转录定量聚合酶链反应技术，来评估不同测试组中 NP 细胞的基因表达水平。实验初始化阶段，我们准备了必需的试剂，包括 Trizol、氯仿、异丙醇、无水酒精以及 DEPC 处理过的水。首先是 RNA 的提取工作，如下是执行步骤的摘要：首段工作是处理含有 NP 细胞的 T25 型号培养瓶，清空其中的培养基，并以 PBS 对其进行两次冲洗。紧接着，移去瓶中残留的 PBS，并向其中添加 1.5ml 的 Trizol 试剂，保持反应 30 分钟，期间需多次翻转以促进混合。将样品冷却 10 分钟后，再将其转移至 EP 管中准备下一阶段反应。此时，向 EP 管添加氯仿，并通过旋转混合后冷却固定。把管子以 12000rpm/min 速度离心 20 分钟后，会观察到液体分层。随后，把上层液体吸入到新的 EP 管中，并加入异丙醇，再次冷却并离心，以沉淀 RNA。去除上层液体后，以 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀，并通过冷离心完成清洗过程。最后，在 EP 管中加入 DEPC 水重悬 RNA，并利用 NanoDrop2000 测定各样品的 RNA 浓度，其中，

在 260/280nm 波长下,所有测试样品的吸光值比介于 1.8 到 2.0 之间。提取完 RNA 后,接下来对提取的 RNA 进行逆转录,使提取的 RNA 逆转录成 cDNA,本次实验逆转录所使用的体系及反应条件如表 2-3 及表 2-4 所示。

表 2-3 反应体系

试剂	体积
总体积	20ul
5×HiScriptIII qRT SuperMix	4ul
RNA	1000/对应 RNA 浓度
DEPC 水	20ul-上述试剂体积

表 2-4 逆转录反应条件

温度	时间
37.2°C	16 分钟
85.2°C	6 秒钟
4°C	∞

cDNA 提取完成后,开始配制 PCR 上机检测体系,其反应体系如表 2-5 所示。

表 2-5 PCR 上机液体系

试剂	体积
总体积	20ul
PCR 引物 (正向)	0.6ul
PCR 引物 (逆向)	0.6ul
DEPC 水	7.8ul
SYBR Green Supermix	10ul
cDNA	1ul

最后将配置好的 PCR 上机体系使用移液枪点入 96 孔板中,置于 PCR 仪器中进行扩增,循环数为 40 个循环,每个循环中,95°C 变性 5-10 个循环后,改用 87-90°C 以改善 PCR 产量。95°C 变性 10s,60°C 退火 30s,最后 70°C 延展 30s。数据处理时,使用 2- $\Delta\Delta C_t$  的计算方法,来计算各分组中相关炎症基因的表达情况。

## 2.9 建立椎间盘退变大鼠动物模型

通过针刺法建立大鼠尾椎椎间盘退变模型:选取 6-8 周龄 SD 大鼠 30 只,清洁级,雄性,体重 (350±10) g,由石河子大学医学院动物实验中心提供,单笼清洁饲养。大鼠称重,10%水合氯醛腹腔注射 (3.5ml/kg)。实验开始前,所有大鼠均经 10%水合

氯醛进行腹腔麻醉，剂量为 3.5ml/kg。确保麻醉效果后对大鼠尾部进行清洁处理，并固定于带凹槽的 3cm 高木板上，确保穿刺操作的稳定性。随后，将两种自制的 20G 限制型皮肤穿刺针，分别穿刺于 Co7/8、Co8/9 两个椎间盘处，以 Co9/10 椎间盘作为对照。针穿透皮肤后，垂直深入 5mm 并旋转 360 度后停留 30 秒拔出。为了减少数据的冗余，在后续的结果展示中，仅选取一个椎间盘（如 Co7/8）的 MRI 图像进行展示，另外一个椎间盘的结果用于定量分析。所有实验均至少进行三次重复，以确保数据的可靠性和可重复性。

术前及术后，我们对大鼠的饮食情况和尿潴留情况进行仔细观察，并连续 3 天给予青霉素注射以预防感染。实验设计包括五个组别，每组 6 只大鼠：对照组、针刺组、BaTiO<sub>3</sub>+针刺组、超声+针刺组以及超声+BaTiO<sub>3</sub>+针刺组。为评估模型的建立效果，在第 2 周和第 4 周分别对大鼠进行血液采集和尾椎取材，之后采用 MRI 及组织学分析方法来评估 IVDD 模型的严重程度。

## 2.10 HE 染色

研究目标：分析大鼠尾部椎间盘组织的结构改变，对比不同实验组椎间盘在显微镜观察下的病理特征差异。

实验操作流程：

样本预处理：首先，在温度控制为 60°C 的干燥器中对切片进行预热，持续时间为一小时。

脱蜡和水化：使用二甲苯进行两轮脱蜡处理，每轮持续时间 15 分钟。接着，通过 100%、95%、80%以及 70%的酒精梯度对样本进行逐步水化，每个步骤持续时间为 5 分钟，并用蒸馏水清洗一次，持续 5 分钟。

染色过程：用苏木精进行染色处理，时间为 5 分钟。用流动水清除多余的染液，接着用盐酸乙醇溶液进行 30 秒的分化处理（上下提拉几次），后用自来水浸泡 15 分钟。

观察与评估：在显微镜下观察通过苏木精染色的细胞样本，优质样本特征为细胞及其染色清晰，而细胞质基本不着色。用伊红染色 1 分钟，随后以自来水清洗 2 分钟。

常规的后续处理：包括用 95%乙醇和 100%乙醇进行脱水（每步骤 1 分钟），接着用二甲苯和石碳酸（3:1）混合液透明化处理（1 分钟），最后两次使用纯二甲苯处理每次 1 分钟，用中性树脂材料进行封固。

标本评估：切割每个样本为 6 个薄片，在光学显微镜下检验经过 HE 染色的样本，详细记录椎间盘的病理学特征，尤其是腰椎间盘突出病理类型的差异。

## 2.11 番红固绿染色

首先,将大鼠的尾椎样本在恒温烘箱中以 65°C 的温度进行两小时的热处理。接下来,将处理过的样本依次放入三个不同的二甲苯容器中,每个容器中浸泡 15 分钟,以便于样本彻底浸透。随后,利用一系列不同浓度的乙醇溶液(从 100% 递减至 75%)进行缓步水化处理,每种浓度处理 3 分钟。用流动的自来水清洗样本 10 分钟,以去除残留的处理液。

样本水化后,先后将其浸入苏木精和 0.2% 的固绿溶液中,分别处理 1 分钟和 5 分钟。之后,使用 PBS(磷酸盐缓冲盐溶液)进行两次 15 秒的冲洗,并轻轻摇晃以促进溶液的交换。接着,样本分别被浸泡在 1% 的冰乙酸和 0.1% 的番红 O 染液中,每次浸泡 15 秒,之后再进行 PBS 冲洗。

染色后,样本通过与水化相反的顺序进行脱水处理,使用从 75% 到 100% 的乙醇梯度,每步骤 3 分钟。完成脱水后,样本在两次二甲苯处理后变得透明,每次 5 分钟。然后,用中性树脂封闭样本,并确保移除气泡。

最终,将染色和处理完成的大鼠关节切片放置于显微镜下进行观察,所有实验数据被仔细记录,并进行后续的分析处理。

## 2.12 ELISA 实验检测大鼠血液中炎症因子情况

### (1) 试剂的配置:

①将所需 ELISA 试剂与样品回温至常温(25°C±3°C)。

②1×清洗溶液的制备:以 1:20 的比例兑水,并轻摇以避免气泡的形成。

③1×检测缓冲溶液的配制:保持 1:10 的配比,轻摇混合。

④检测抗体的前处理与稀释:将检测抗体离心后,与 1×检测缓冲液以 1:100 的比例混合。

⑥将链霉亲和素通过 1:100 的配比,利用 1×检测缓冲液稀释制备工作溶液。

### (2)、血浆的收集与预处理:

①收集血样并立即离心以分离血浆,随后于 2-8°C 环境下进行二次离心并冷藏。

②使用 1N HCl 与 1N NaOH 对样本进行 pH 值调节后,进一步用检测缓冲液稀释。

### (3)、标准曲线制备:

—标准品首先进行离心处理,并用水重溶,经过混合后静置。逐级稀释以生成一系列标准浓度点。

### (4)、样品检测流程:

①准备工作:整理所需试剂及标准、样品。

- ②酶标板的预处理：填充 1×洗液并在一分钟后清除，拍干。
- ③添加标准品及样本：分别给定量的标准品溶液和样本溶液。
- ④检测抗体的加入：向每个孔注入稀释后的检测抗体溶液。
- ⑤每孔填充洗液进行清洗，并拍干。
- ⑥添加链霉亲和素并孵育，随后再次清洗。
- ⑦底物的加入并进行光孵育。
- ⑧终止反应并立即进行光度测量。

#### (5)、数据解析：

—根据实验生成的标准曲线，通过样品的 OD 值计算得到其浓度。

### 2.13 MRI 检测大鼠椎间盘退变情况

完成造模后，于中科院影像科行大鼠尾椎间盘 MRI 图像进行分析。层面厚度：0.8 毫米。获取大鼠尾椎间盘后使用 Pfirrmann 分级标准对进行分析，回波重复时间 2320ms；回波时间：87ms；视野范围，5 厘米；激发次数：加权相扫描，显示椎间盘内为富水组织；检测时仪器参数设置如下：自旋鼠后（方法同前），将大鼠置于平台，并定位于大鼠尾椎椎间盘；采用 T2 成像，应用西门子 4.7-T 磁共振仪器对大鼠尾椎间盘行扫描检测。

### 2.14 统计学分析

本研究中各项实验数据以至少三个独立实验的平均值±SD 表示。使用 GraphPad Prism 软件 7.0 用于生成图表并进行统计测试。Student t 检验和双向方差分析被使用来鉴定两组和多组之间的显著差异。P 值用\*或#表示：n.s.无显著性，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ ，\*\*\* $P<0.001$ 。

### 2.15 转录组测序（RNA-seq）分析

为了探讨 BaTiO<sub>3</sub> 在超声引导下对椎间盘退变的分子机制，我们对处理后的髓核细胞（NP 细胞）进行了转录组测序（RNA-seq）分析。具体步骤如下：

(1)RNA 提取：从 BaTiO<sub>3</sub> 处理组和对照组的髓核细胞中提取总 RNA，使用 TRIzol 试剂进行裂解和纯化，确保 RNA 的完整性和纯度。RNA 质量通过 Nanodrop 和 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测，要求样品的 RNA 完整性数值（RIN 值）大于 7.0。

(2)cDNA 文库构建和测序:使用 NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit 进行 cDNA 文库构建。文库构建完成后,在 Illumina NovaSeq 平台上进行高通量测序,生成 150 bp 的双端读长序列。

(3) 数据分析:测序数据通过 Trimmomatic 软件进行质量控制和过滤,随后使用 HISAT2 对人类参考基因组进行比对。通过 DESeq2 软件进行差异表达基因 (DEG) 分析,筛选出在处理组和对照组之间显著上调或下调的基因。进一步使用 Gene Ontology (GO) 和 KEGG 通路富集分析,识别与炎症、细胞外基质 (ECM) 修复及其他相关生物过程的关键基因和信号通路。

(4)验证和功能分析:将 RNA-seq 筛选出的关键基因通过 qRT-PCR 和 Western Blot 进行验证,进一步分析其在 BaTiO<sub>3</sub> 处理中的功能作用。

### 第 3 章 实验结果

#### 3.1 BaTiO<sub>3</sub> 与 NP 细胞具有良好的生物相容性

本次研究旨在探究不同浓度的 BaTiO<sub>3</sub> 粉末对 NP 细胞活性的影响。此研究建立在以前实验结果的基础上，遵循了一套详细的实验流程。起初步骤涉及将 BaTiO<sub>3</sub> 粉末和 F12 培养基按特定比例混合，创建了多种含有不同浓度 BaTiO<sub>3</sub> 的培养基，详细制备过程可以在文中“实验材料与操作方法”找到。接着，将制备好的混合培养基加入 NP 细胞中，开启 48 小时的培养过程。在培养 24 小时后，实验组样本受到指定时长的超声波刺激，激活 BaTiO<sub>3</sub> 的压电特性，并持续共培养 24 小时。通过利用 CCK8 实验来评估处理过的 NP 细胞增殖情况，如图 3-1 所示。实验发现，在 200ug/ml 的 BaTiO<sub>3</sub> 浓度，细胞的增殖活力与仅使用 F12 培养基对照组相比没有明显变化，而在 10 至 50ug/ml 的 BaTiO<sub>3</sub> 浓度范围内，NP 细胞增殖活力均较对照组有所下降。

这些实验结果表明，在 F12 培养基中加入 200ug/ml 的 BaTiO<sub>3</sub> 时，显示出良好的生物相容性。这一结果为 BaTiO<sub>3</sub> 在 NP 细胞培养应用中提供了实验支持。鉴于压电效应可能对未来研究的重要性，为了充分利用 BaTiO<sub>3</sub> 的压电属性，特选用含 200ug/ml BaTiO<sub>3</sub> 的培养基进行进一步研究，以期揭示其在调节 NP 细胞活性方面的潜在机制及应用价值。

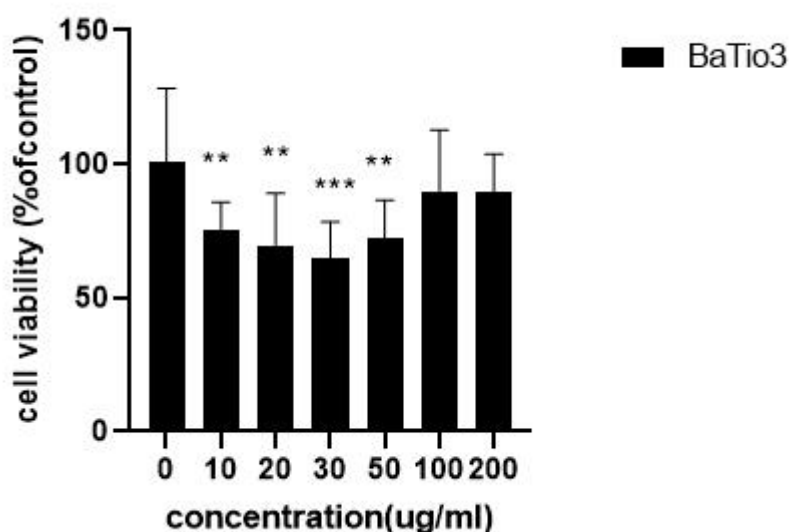


图 3-1 CCK8 检测各 BaTiO<sub>3</sub> 浓度条件下 NP 细胞增值率

### 3.2 超声引导下压电材料 BaTiO<sub>3</sub> 抑制 NP 细胞内炎症、衰老

根据前期研究基础，使用 200ug/ml 的 BaTiO<sub>3</sub> 对 NP 细胞进行处理，实验根据需要分为以下不同处理组（对照组，Ultrasound+LPS 组，BaTiO<sub>3</sub>+LPS 组，Ultrasound+BaTiO<sub>3</sub>+LPS 组，BaTiO<sub>3</sub>+LPS 组）。

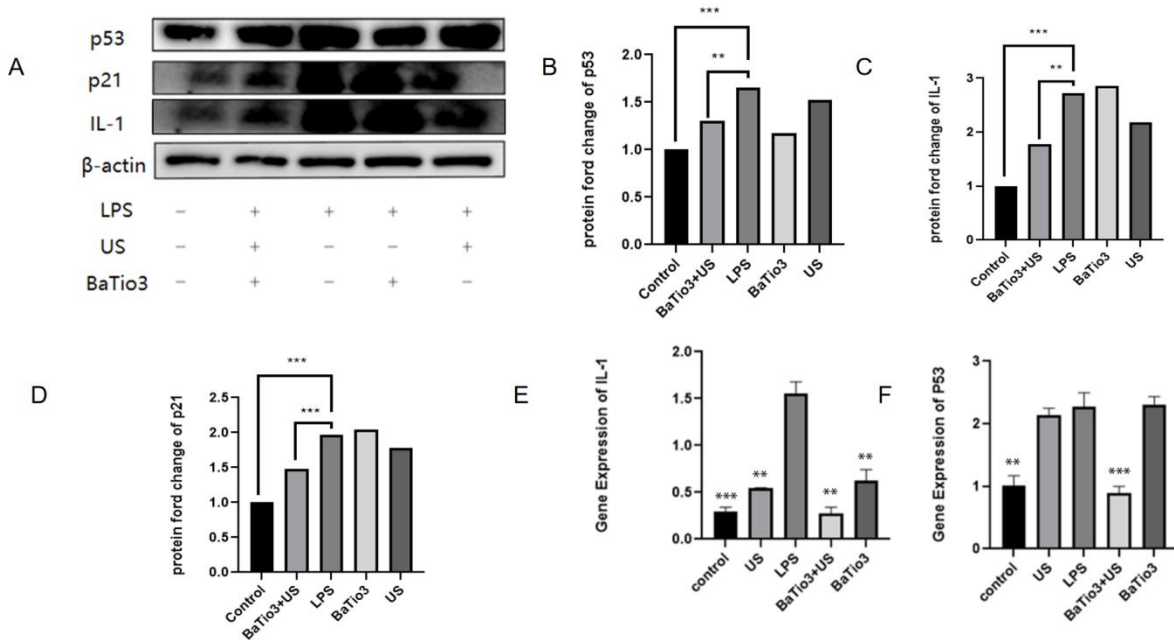


图 3-2 检测不同刺激组内 NP 细胞相关炎症因子表达情况；

按照分组完成处理后，我们通过采用 Western blot 实验分析了 NP 细胞在不同处理条件下炎症相关蛋白的表达情况。图 A-D 清晰展示了在 LPS 刺激下，NP 细胞内炎症、衰老相关蛋白，如 P53、P21 反映了 NP 细胞衰老情况，而 IL-1 是与椎间盘炎症相关蛋白，以上蛋白均是与椎间盘退变进展正相关的蛋白，该几种蛋白的表达水平发生了显著上调，这表明 LPS 成功引发了 NP 细胞的炎症、衰老反应。然而，而使用超声引导 BaTiO<sub>3</sub> 产生压电效应产生电刺激作用于 NP 细胞后，几种蛋白的含量出现明显降低，而单独加入材料或仅使用超声引导的组别并未显示出能够明显缓解这种退变状态的迹象。这表明单独的使用超声刺激是无法对 NP 细胞的炎症产生缓解效果的，并且仅仅加入 BaTiO<sub>3</sub> 不给与超声刺激也无法产生抗 NP 细胞退变作用。为了进一步的对 BaTiO<sub>3</sub> 延缓 NP 细胞退变作用进行探究，我们采用了 RT-PCR 技术进一步检测了 NP 细胞中炎症相关基因的表达情况。图 E、F 展示了在 LPS 诱导的炎症模型中，退变相关基因的表达水平显著上调，而在超声引导 BaTiO<sub>3</sub> 处理组中，这些退变相关基因的表达则明显下调，特别是 P53 和 IL-1 的表达降低，具有了统计学意义，进一步证实了压电刺激在抑制 NP 细胞退变中的有效性。以上实验结果综合表明，通过超声引导 BaTiO<sub>3</sub> 产生的电刺激，可以显著延缓 NP 细胞的炎症、衰老过程。这一发现表明了细胞电刺激在 NP

细胞抗炎、抗衰老方面的潜力和重要性，而 IVDD 的进展与炎症、衰老息息相关，因此也为我们提供了一种潜在的治疗 IVDD 的新策略。

### 3.3 体内实验 MRI 检测椎间盘退变情况

通过针刺法造模制造大鼠为椎间盘退变模型，分为空白对照组，针刺组，BaTiO<sub>3</sub>+针刺组，Ultrasound+针刺组，Ultrasound+BaTiO<sub>3</sub>+针刺组五组。MRI 是重要的影像学检测工具，在脊柱检查和椎间盘退变的判别中具有重要地位，可通过 MRI 观察椎间盘形态结构、含水量等辅助诊断及分析 IVDD 程度及进程。本研究中，我们通过 MRI 检查，评估 SD 大鼠针刺法 IVDD 造模术后 1 个月各组 IVD 的结构和髓核组织情况，见图 3-3。如图所示，针刺法造模后 4 周，针刺造模 IVDD 组发生了较为明显的退行性改变，椎间盘结构受损严重，包括 NP 含水量降低，纤维环形态结构损伤等。而 Ultrasound+BaTiO<sub>3</sub>+针刺组较大程度维持了 IVD 形态结构的完整性，髓核组织的完整性以及含水量得到了较大程度的保留。以上结果提示，超声引导下 BaTiO<sub>3</sub> 产生的电刺激可有效促进椎间盘退变术后 IVD 修复，维持髓核组织正常形态、纤维环组织正常结构以及椎间盘结构完整性，具有良好的治疗效果及应用潜力。

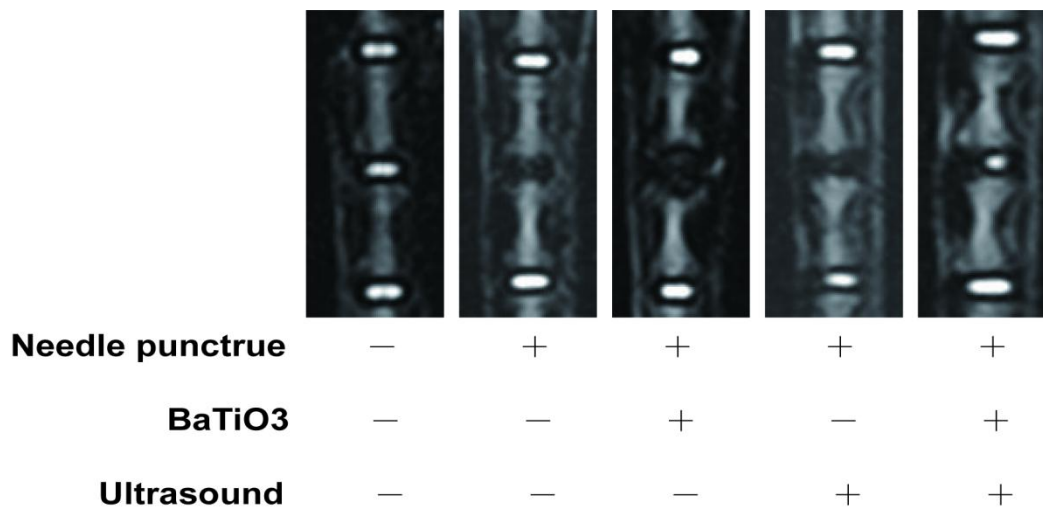


图 3-3 大鼠尾椎 MRI

### 3.4 HE、番红固绿染色检测 BaTiO<sub>3</sub> 延缓椎间盘退变作用

随后我们进行了 HE 染色及番红固绿染色，如图 3-4 所示，在进行针刺法造模 4 周后，观察两种染色对各组进行对比，结果显示，在针刺组的 IVD 中已经出现了较为明显的退行性变化。这种退行性改变主要表现在多个方面，包括：NP 中的细胞数量有了显著的减少，ECM 的含量降低，同时 NP 及纤维环的形态结构也遭受了损伤和改

变。这些变化反映出 IVD 经历了一系列负面的变化，进而影响到了其功能和稳定性。

另一方面，当通过超声波结合 BaTiO<sub>3</sub> 和针刺这一组合方法处理后的 IVD 显示出了不同的结果。这种联合治疗策略在很大程度上保持了 IVD 的正常形态结构，并维持了较好的髓核细胞(NP 细胞)的数量和细胞外基质的含量，并同时保护了 IVD 的结构完整性，避免了因退行性改变而带来的潜在损害。这表明，相比单一的针刺法，使用 Ultrasound+BaTiO<sub>3</sub> 结合针刺的治疗组合不仅能够有效减缓 IVD 的退行性改变，还能在一定程度上恢复或维持其正常的形态和功能，为治疗椎间盘退变提供了一种可能的新策略。

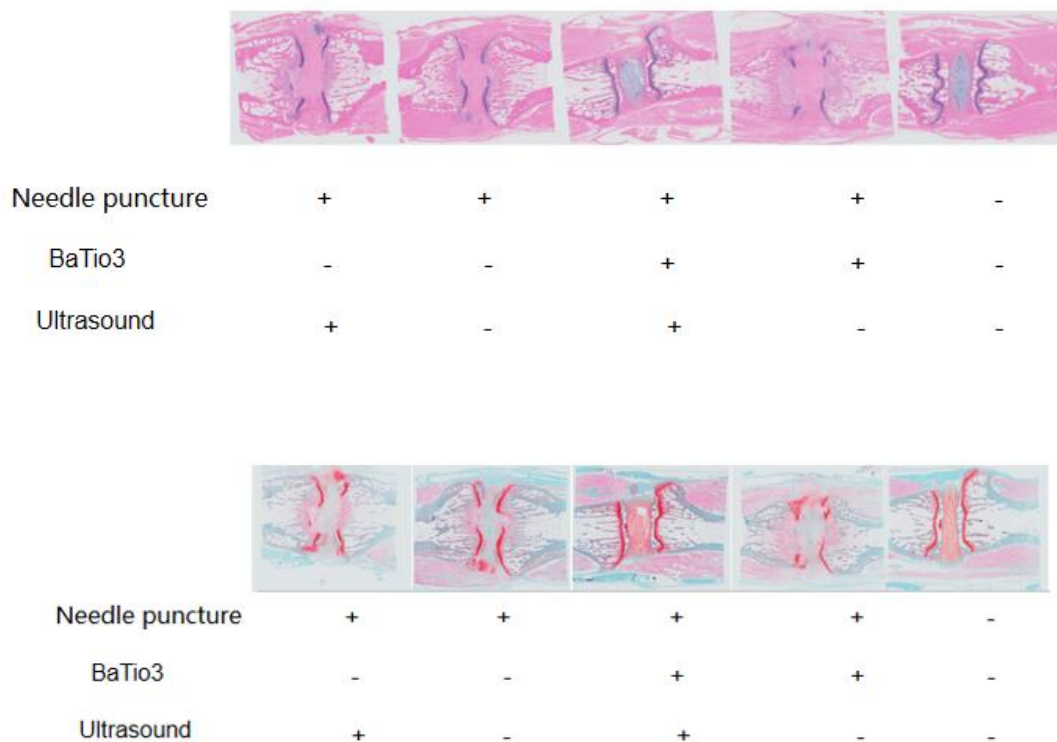


图 3-4 大鼠尾椎间盘 HE 染色及番红固绿染色

### 3.5 大鼠血液中炎症因子的水平检测

随后我们进行了大鼠眼眶取血，在不同时间点中采集大鼠的血液，使用 ELISA 试剂盒，检测血液中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等炎症因子以及 IL-10 抗炎因子的含量，见图 3-5。其中图 3-5 A-D 为 2 周大鼠血液，图 3-5 E-H 为 4 周大鼠血液。在 2 周大鼠血液中与针刺法造模组相比，超声引导下压电材料 BaTiO<sub>3</sub> 的压电作用下 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子的含量均有降低而抗炎因子 IL-10 的含量明显升高，而其他三组（针刺造模组，BaTiO<sub>3</sub>+针刺造模组，Ultrasound+针刺造模组）与空白对照组和超声引导下压

电材料 BaTiO<sub>3</sub> 治疗组相比 IL-6、IL-1β、TNF-α 的含量均有升高且具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。4 周大鼠血液中, 各组中 IL-6、IL-10、IL-1β、TNF-α 等炎症因子的含量略微降低, 其余结果与第二周相似, 超声引导下压电材料 BaTiO<sub>3</sub> 的压电作用下 IL-6、IL-1β、TNF-α 等炎症因子的含量相比于针刺法造模组降低而 IL-10 的含量呈现升高趋势且具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。因此我们发现, 超声引导下压电材料 BaTiO<sub>3</sub> 的电刺激在大鼠体内发挥了抗炎作用, 与体外实验的抗炎表现出相同的结果, 进一步论证了该材料的抗炎作用, 该抗炎作用对于大鼠椎间盘环境的发生发展也具有积极作用。(与治疗组(针刺+US+BaTiO<sub>3</sub>组)比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ ; 与空白对照组比较,  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#P < 0.01$ ,  $\#\#\#P < 0.001$ ,  $\#\#\#\#P < 0.0001$ 。)

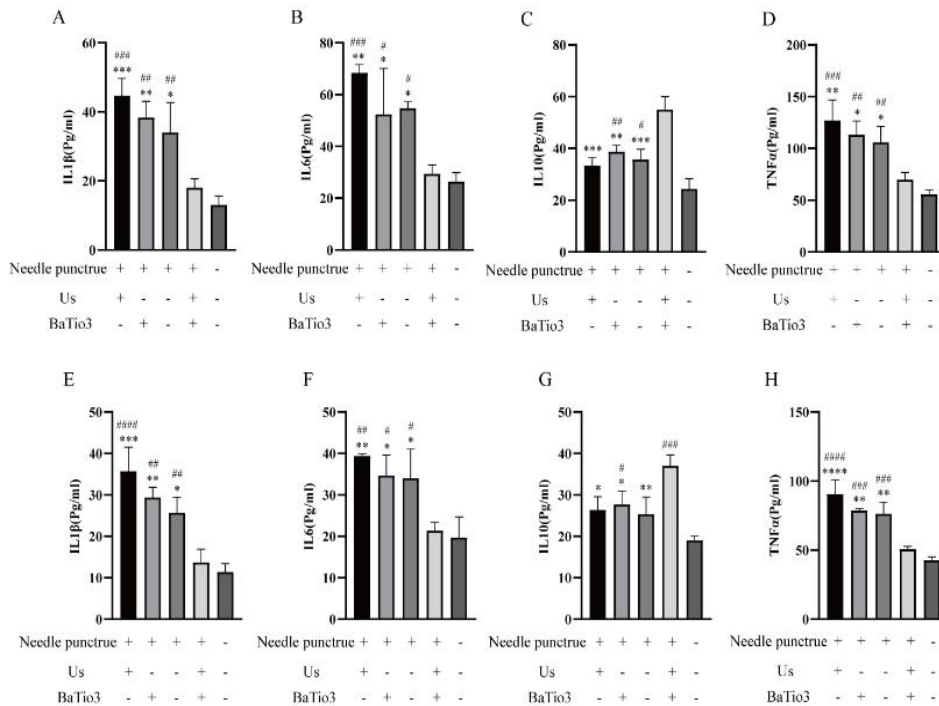


图 3-5 大鼠尾血液炎症因子检测 (A-D 2 周大鼠, E-F 4 周大鼠)

### 3.6 使用转录组测序技术研究 BaTiO<sub>3</sub> 椎间盘退变保护的机制

我们对人髓核细胞进行了两组处理，第一组我们加入了 TBHP 从而诱导髓核细胞衰老炎症模型，第二组我们在加入 TBHP 的基础上加入了适宜浓度的 BaTiO<sub>3</sub> 并给与了超声刺激。最后将该两组处理过的髓核细胞进行转录组测序（图 3-6）。我们进行了差异表达基因聚类分析（图 A），将两组处理中差异较显著的部分通过红（上调）、蓝（下调）标记出来，并通过火山图和柱状图（图 B、C）展示了两组处理中差异表达的基因数。随后我们进行了差异基因表达的 GO 富集分析，分析超声引导下 BaTiO<sub>3</sub> 处理的治疗组信号通路的改变（图 D），我们发现经过 BaTiO<sub>3</sub> 治疗组的处理，与 ECM 相关的通路表达上调，而 ECM 的修复与椎间盘退变的恢复息息相关。随后我们对相关差异表达的基因进行了分析（图 E），发现经过 BaTiO<sub>3</sub> 治疗组的处理，一些对椎间盘退变具有保护作用的基因表达上调，如 SOX9、SOX5 等基因。BaTiO<sub>3</sub> 治疗组可促进与椎间盘退变正相关基因 ADAMTS14、ADAMTS2 的下调，以延缓椎间盘 ECM 的降解，且升高了与椎间盘退变负相关的 SOX9、SOX5 的表达。我们通过转录组测序对 BaTiO<sub>3</sub> 作用的机制有了初步了解，进一步证实了 BaTiO<sub>3</sub> 对 IVDD 的保护作用，并为该超声响应型压电材料的下一步研究打下基础。

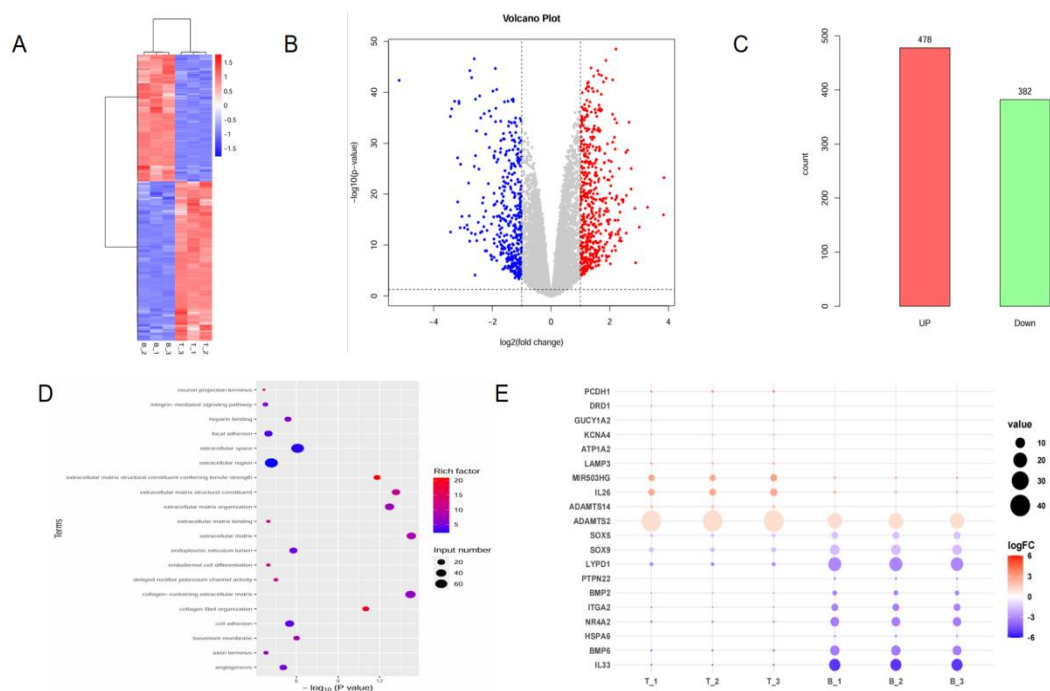


图 3-6 转录组测序

## 第 4 章 讨论

下腰痛 (Low back pain, LBP) 是一个在全球范围内都普遍流行的慢性疾病, IVDD 的高发病率不仅损害了人类的生命健康还给社会经济带来了重大的负担<sup>[17]</sup>。统计数据显示, 超过 80% 的成年人在其一生中都会在某个时期经历下腰痛的困扰。当前的研究显示, 椎间盘退变是引发下腰痛的主要原因之一, 并且其与下腰痛的严重程度存在紧密的联系。椎间盘结构主要由髓核和纤维环组成, 其中髓核组织是椎间盘中关键的结构, 其稳定性和完整性对预防椎间盘退变发挥着至关重要的作用<sup>[18,19]</sup>。研究表明, 伴随着椎间盘开始退变, 髓核组织的结构稳定性和完整性就已经遭受破坏, 并且伴随着炎症反应的产生, 这种破坏被认为是促进椎间盘退变的关键机制之一。研究还发现, 椎间盘髓核细胞生理功能的异常改变, 是导致髓核结构不稳定, 进而引发椎间盘退变的重要因素。在椎间盘退变过程中, 炎症因子的积累象征着细胞炎症在这椎间盘退变发展过程中的不利作用, 并且炎症因子的积累是导致椎间盘退变不断进展的重要原因<sup>[20,21]</sup>。这些炎症反应不仅减少了功能性细胞的数量, 而且破坏了椎间盘的稳定性, 促进了退变进程。

炎症是一个复杂而关键的病理生理过程, 在多种人类疾病的发展中发挥作用, 椎间盘退变就是其中之一。有研究指出, 在椎间盘退变过程中, 促炎分子如肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 (IL-1) 的表达量会显著增加<sup>[22-24]</sup>。此外, 已有报道显示, 椎间盘中有很多种促炎细胞因子在椎间盘内的代谢失衡与炎症反应密切相关, 其中 IL-1 炎症因子被认为是关键因素, 而椎间盘退变中炎症和衰老因子常常同时出现, 因此对 P53、P21 的检测也同样重要。以上三种指标对椎间盘退变的发展和炎症衰老反应的产生发挥了不可替代的显著作用。有相关研究报道, IL-1 可以加速了椎间盘的分解代谢和炎症反应, 还加剧了细胞外基质的降解。因此, 椎间盘蜕变中所涉及的炎症途径已经成为临床上治疗椎间盘退变的重要靶点之一<sup>[25,26]</sup>。这一发现为开发新的治疗策略提供了重要的理论依据, 指明了缓解椎间盘退变和下腰痛可能需从调控炎症反应入手, 以达到维持椎间盘结构稳定性和功能性细胞数量的目的。如前文所述, BaTiO<sub>3</sub> 作为一个可远程激活产生抗炎作用的压电材料, 与椎间盘日常承受并传递脊柱负荷的天然环境相得益彰, 因此使得 BaTiO<sub>3</sub> 与 IVDD 的研究更加契合。

基于体外实验结果, 我们发现 BaTiO<sub>3</sub> 在 NP 细胞中有较好的生物相容性, 这有利于我们进行接下来的研究, 随后我们使用 LPS 对 NP 细胞进行炎症衰老造模, 并且使用 WB 和 qPCR 对 NP 细胞中衰老和炎症相关蛋白如 P53、IL-1 及相关基因进行了检测, 结果显示 LPS 可以造成 NP 细胞炎症相关蛋白和基因的增高。与 LPS 造模组相比

较,在超声引导下的 BaTiO<sub>3</sub> 可以有效的抑制 NP 细胞退变相关蛋白的增加,表明 BaTiO<sub>3</sub> 在超声刺激对 NP 细胞退变具有治疗作用,而不加超声条件只加入压电材料 BaTiO<sub>3</sub> 则没有足够的延缓 NP 细胞退变作用,且只超声刺激 NP 细胞也没有出现延缓 NP 细胞退变的效果<sup>[27]</sup>。随后我们利用针刺法对大鼠尾椎进行椎间盘退变模型的建立,从 MRI 检测和组织学染色看出,通过针刺法造模组有明显 IVD 结构损坏,破坏的组织杂乱无章,相邻椎体发生融合。而 BaTiO<sub>3</sub> 超声组则有效缓解椎间盘组织破坏,一定程度上保持了 NP 区域胶质形态,ECM 含量和椎间隙高度,仅超声组以及仅 BaTiO<sub>3</sub> 组则没有起到明显的缓解椎间盘退变的作用<sup>[28,29]</sup>。随后我们进行大鼠眼眶取血,在第 2 周第 4 周分别取血,进行 Elisa 实验检测血液中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子以及抗炎因子 IL-10 的含量,我们发现针刺法大鼠椎间盘退变组血液中的炎症因子升高,说明椎间盘退变往往伴随着炎症改变,而超声引导下的 BaTiO<sub>3</sub> 组相比于针刺造模组其 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子的含量均有降低,而抗炎因子 IL-10 的含量显著升高,这说明超声引导下 BaTiO<sub>3</sub> 可以在体内有效的发挥抗炎作用,并发挥了延缓椎间盘退变的作用<sup>[30]</sup>。最后我们对 NP 细胞做了两组处理,一组是炎症退变的 NP 细胞,另一组则为超声引导下的 BaTiO<sub>3</sub> 治疗,最后对其进行转录组测序分析,我们分析了两组间表达差异的基因,并找到了 BaTiO<sub>3</sub> 超声刺激下发生改变的基因和通路,并推测 BaTiO<sub>3</sub> 的抗炎和椎间盘退变的保护作用与其相关。

我们在细胞层面、动物层面以及基因转录组测序对 BaTiO<sub>3</sub> 的作用进行了研究,得出了 BaTiO<sub>3</sub> 在超声引导下具有抗炎和保护椎间盘退变的作用。尽管如此,我们还需深入探讨 BaTiO<sub>3</sub> 治疗椎间盘退变的具体机制和分子通路,同时为了发挥此纳米材料的物理化学特性,为了将其作为适用于不同疾病的纳米载体的研究也是有希望和需求的<sup>[31-33]</sup>。BaTiO<sub>3</sub> 作为一种新型的超声响应型压电纳米材料,在各个学科均有很好的应用前景,本课题创新性的探究了其在 IVDD 这一领域的应用,该项研究表明超声引导下 BaTiO<sub>3</sub> 产生的压电效果对 NP 细胞炎症的抑制作用,并在动物体内验证了其对 IVDD 的治疗效果,这不仅为 IVDD 的探索开辟了一条新的途径,也为其临床治疗提供了材料储备<sup>[34,35]</sup>。

虽然本研究主要集中在 BaTiO<sub>3</sub> 材料在体外环境中的生物相容性和功能性,但了解该材料在体内的代谢路径和存留情况对于其在医学应用中的安全性和有效性至关重要。未来的研究中,建议通过标记 BaTiO<sub>3</sub> 纳米颗粒(如使用放射性同位素或荧光分子进行标记),并结合活体成像技术(如小动物 PET-CT 或荧光成像),对材料在生物体内的分布和代谢进行追踪<sup>[47,48]</sup>。这将帮助确定 BaTiO<sub>3</sub> 在注入体内后,尤其是在椎间盘内的存留时间、分布模式以及最终的代谢去向。此外,通过组织分布分析,可以明确材料是否在特定组织中富集,并评估其在体内的生物安全性<sup>[49]</sup>。这些研究将为 BaTiO<sub>3</sub> 材料的临床应用提供重要的科学依据,并指导未来在医学领域的进一步开发和优化。

在本研究中, BaTiO<sub>3</sub> 材料即使在较低浓度 (10-50 μg/mL) 下也显示出一定的细胞毒性, 这可能与材料的表面性质、粒径和分散性有关。首先, BaTiO<sub>3</sub> 纳米颗粒的高表面积可能增加了其与细胞膜的相互作用, 从而导致细胞膜损伤和毒性反应。其次, 材料的粒径分布可能影响其在细胞培养环境中的稳定性和分散性, 进而影响其生物相容性。已有研究表明, 纳米材料的粒径和表面化学特性对其生物效应具有显著影响<sup>[39,40]</sup>。此外, 材料在培养基中的分散性也可能影响细胞摄取和反应, 因此需要进一步优化材料的制备和分散条件, 以减少潜在的细胞毒性。

在本研究中, 我们选择了 LPS 作为诱导剂, 主要原因是 LPS 在实验性炎症模型中广泛应用, 能够有效模拟急性炎症反应。LPS 是来源于革兰氏阴性菌的内毒素, 通过激活细胞表面的 TLR4 受体, 启动下游的 NF-κB 信号通路, 从而引发强烈的炎症反应<sup>[41]</sup>。这一特性使得 LPS 成为在体外和体内研究中常用的炎症诱导剂, 尤其适用于研究炎症机制和筛选抗炎药物<sup>[42]</sup>。尽管 LPS 主要用于模拟感染相关的炎症反应, 但其强大的促炎作用也使其适用于非感染性炎症的研究, 如椎间盘退变模型<sup>[43]</sup>。未来的研究可以进一步探讨使用 IL-1β 或 TNF-α 等更为特异的炎症因子, 以更精确地模拟非感染性炎症环境。本研究使用了 LPS 和 TBHP 作为不同的诱导剂, 分别用于模拟椎间盘退变中的炎症和氧化应激反应。LPS 广泛用于炎症研究, 通过激活 TLR4 信号通路有效诱导急性炎症反应<sup>[44]</sup>。然而, 椎间盘退变不仅涉及炎症, 还包括显著的氧化应激, 因此我们选择 TBHP 来模拟这一病理过程。TBHP 通过增加细胞内 ROS 水平, 引发氧化应激反应, 为我们提供了研究椎间盘细胞在应激状态下的反应机制的工具<sup>[45,46]</sup>。这两种模型的结合使用, 使我们能够更全面地研究椎间盘退变的多重病理机制, 并为未来的治疗策略提供基础。在实验中我们观察到 BaTiO<sub>3</sub> 与超声波联合处理组的 P53 表达水平高于单独使用 BaTiO<sub>3</sub> 处理组。可能的原因包括: 超声波引发了细胞应激反应, 从而激活了 P53 表达; 实验中微小的处理条件差异, 如超声波强度或处理时间的变化, 可能影响了结果<sup>[36-38]</sup>; 此外, BaTiO<sub>3</sub> 与超声波的协同作用可能激活了某些未被充分理解的信号通路。为了验证这些解释, 未来我们将进一步重复实验, 严格控制实验条件, 同时单独测试超声波对 P53 表达的影响, 并检测氧化应激标志物, 以深入探讨这些因素对 P53 表达的具体影响。

本研究通过转录组分析揭示了 BaTiO<sub>3</sub> 可能通过多种细胞机制发挥其生物学效应。首先, 转录组数据表明, BaTiO<sub>3</sub> 处理后, 细胞内与氧化应激反应相关的基因显著上调。这可能与 BaTiO<sub>3</sub> 材料在细胞内引发的 ROS 产生有关。氧化应激已被证明在多种细胞病理状态中发挥重要作用, ROS 的过度积累会导致细胞损伤, 而适度的 ROS 水平则有助于细胞信号传导和应激反应<sup>[50]</sup>。因此, BaTiO<sub>3</sub> 可能通过调控细胞内 ROS 水平, 激活与氧化应激应答相关的信号通路, 如 Nrf2/ARE 通路, 从而促进细胞的保护性反应<sup>[51]</sup>。此外, 转录组数据还显示, BaTiO<sub>3</sub> 处理组中多种炎症相关基因的表达显著下

调, 包括 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等关键炎症因子。BaTiO<sub>3</sub> 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路发挥其抗炎作用, 因为 NF- $\kappa$ B 是炎症反应的核心调控因子<sup>[52,53]</sup>。这一机制推测与已有文献报道的 BaTiO<sub>3</sub> 在其他模型中的抗炎效果一致, 进一步验证了该材料在炎症性疾病中的潜在应用。最后, BaTiO<sub>3</sub> 对细胞应激反应的影响可能与其对线粒体功能的调节有关。已有研究表明, BaTiO<sub>3</sub> 能够通过调控线粒体自噬 (mitophagy) 减少受损线粒体的积累, 降低细胞的氧化应激负担<sup>[54]</sup>。这种通过调节线粒体自噬保护细胞的机制为理解 BaTiO<sub>3</sub> 在组织修复中的作用提供了新的思路。未来的研究应继续探索 BaTiO<sub>3</sub> 在这些信号通路中的具体分子作用, 并通过基因敲除或抑制剂实验进一步验证这些推测。

## 第 5 章 结论

本研究构建体外 NP 细胞炎症模型和体内大鼠椎间盘退变模型，利用该模型检测超声响应型纳米压电材料  $\text{BaTiO}_3$  对 NP 细胞炎症和大鼠椎间盘退变的作用。并利用转录组测序寻找  $\text{BaTiO}_3$  发挥作用可能通过的信号通路。本研究结果表明，超声响应型纳米压电材料  $\text{BaTiO}_3$  具有良好的生物相容性，超声引导下纳米压电材料  $\text{BaTiO}_3$  产生的治疗作用可缓解 NP 细胞炎症，且可以延缓椎间盘退变的进程，并且与多条椎间盘修复的通路相关。

## 综述：纳米材料在生物医学领域的应用

摘要:

纳米材料技术这一领域自本世纪初以来受到了世界范围内的广泛关注和投资与研究，其涉猎的领域繁多，包括建筑材料、微电子器件、健康护理、环境保护、可再生能源探索与电能传输等诸多技术领域的革新与发展。在当代的医疗领域中，传统药物给患者的治疗往往是广泛作用于全身而没有足够特异性的，无法对药物释放的半衰期及部位进行精准管控。而借助纳米技术制成的药物则大大提升了药物的兼容性和目标定位准确性，使药物利用率得以提高，同时降低了药物的潜在毒性和副作用。现在市面上的新一代抗肿瘤、抗病毒和抗风湿性关节炎药物多与纳米药物结合使用，以期增强其疗效。目前，科研领域正积极发展与完善纳米药物原料的筛选及药物释放控制技术。因此纳米材料技术在生物医学领域具有重大的发展前景。本篇文章对于纳米医疗的原料及应用领域进行了综述，为纳米医疗领域的探索提供最新动态和前景展望。

关键词：纳米材料；生物医疗

### 1. 纳米材料的简介

当提及纳米材料时，我们指的是那些具备一定的物理、化学特性或生物活性的微粒，这些微粒在尺寸上（无论是外部、内部尺寸还是表面构造）都处于纳米尺度范畴（1nm 至 1000nm）<sup>[55]</sup>。纳米材料分为有机纳米材料与无机纳米材料两大类，前者涵盖纳米纤维、碳纳米管、脂质体及聚合物颗粒等，后者则包括元素、合金、氧化硅、量子点等<sup>[56]</sup>。这些纳米级材料因为拥有高比表面积而能高效运输、装载药物。同时，这些材料亦具备出色的生物相容性与降解性能，令其能在人体内部逐步积累且副作用小<sup>[57]</sup>。它们还具有缓释特性，有助于减少药物的浓度从而减轻毒性和副作用<sup>[58]</sup>。比起传统药物有效性短暂、难以穿透生物屏障等弱点，生物纳米材料在医疗领域扮演着不能忽视的角色，在疾病的诊断、治疗或是修复损伤组织方面都有显著作用。小尺寸的纳米颗粒易于被细胞摄入；具备广泛比表面积和丰富官能团的纳米药物能达到高药物载量；纳米材料的多孔、中空、层叠结构有利于药物控释，有效延长了药物在体内的持续时间。随着纳米技术研究的继续深化，纳米材料不再局限于作为递送载体，而是已经转化为具备生物活性、可参与治疗进程的创新型材料。纳米材料的不断进步和创新也使得纳米药物的物理化学特性与结构特点更为复杂丰富，加之它们的多功能性质，使得这些材料在生物医疗领域的潜在应用更加广泛。

## 2. 纳米材料在神经疾病方面的应用

纳米材料在神经疾病方面的进展和应用也较为广泛，随着先进医疗科技的发展推进与纳米材料科学的创新性突破，为健康治疗领域带来了显著贡献。目前在医疗领域对于受损的神经系统，特别是在退行性疾病、瘢痕组织生成和细胞间通讯等方面，仍面临着众多挑战。为了应对这些挑战，科研人员已经研发并测试了依托于纳米材料的多种治疗方案。目前主流的纳米材料是含金属的硅基材料，而为了创造更佳的神修复解决方案，与此同时具有高分子和碳元素的有机纳米材料也正在飞速发展。这些纳米级材料通过其特殊的理化特性，支持并促进细胞的粘附和增殖，可提高神经细胞的特化能力，并加强神经细胞的功能恢复。神经系统中，数百万神经元在大脑内精心组成网络，执行独特功能，同时保持身体与神经系统的交流。而神经系统的损害通常表现在神经元之间的沟通中断、神经退化，以及瘢痕组织的形成<sup>[59]</sup>。令人遗憾的是，中枢神经系统（CNS）的组织不具备自我修复的能力。这一恢复过程不仅受限于其复杂的解剖构造，而且受到血脑屏障以及次生伤害的干扰。通常情况下 CNS 受损会引发星形胶质细胞的异常增生，导致胶质细胞瘢痕形成，进而阻碍神经的重新连接<sup>[60]</sup>。对于轴突的生长指向性及定位的精确控制，几乎不容乐观。外周神经系统的伤害情况相对常见，可能是手术或其它因素导致，有时伴随着神经系统功能的完全受损。幸运的是，外周神经系统（Peripheral nervous system, PNS）在遭受损害后能够重新长出，通过轴突生长填补损失间隙<sup>[61]</sup>。尽管理论上 PNS 的恢复进程较慢，但如果借助神经组织工程手段，即便是那些无法自然愈合的严重伤害也有希望治愈。其中无机纳米材料在神经系统疾病的治疗中得到了很好的研究。

在神经系统疾病中无机纳米材料受到了广泛关注，贵金属基纳米粒子就是其中一种，并在生物医药和组织工程有重要应用。例如贵金属金（Au）颗粒能够与 A $\beta$  淀粉样蛋白结合，并能聚焦热量分解这些结合的 A $\beta$  淀粉样蛋白团块<sup>[62]</sup>。这些金颗粒同样在制作用于检测阿尔茨海默病的光学传感器方面具有潜力。Park 等人报道了通过硅纳米球来集成金颗粒，并增加其附着力以及与神经走向的连接的工作。此外，其他金属氧化物颗粒也有在生物医学领域的应用尝试，如铁氧化物颗粒等。Shefi 团队分析了金和银纳米粒子对于 PC12 细胞能量水平、分化能力以及神经生长的影响。被这些纳米粒子覆盖的表面显著促进了 PC12 以及 SHSY5Y 细胞的扩展，并通过增强神经突的形态特征（例如延伸长度和分枝形态）促进了细胞的分化<sup>[63]</sup>。另一方面，神经母细胞瘤细胞的银纳米颗粒具有包覆基质分化效果，及其细胞内神经突伸展数量与纳米银粒子浓度相关<sup>[64]</sup>。研究还利用结合银导线的基质来引导神经突的定向重生，这项研究获得了令人兴奋的成果，成功地指导了神经细胞沿着底物中的银导线生长<sup>[65]</sup>。金纳米结构由于其卓越的成像对比性，在 MRI 和医学研究中被普遍采用。Racheal 团队通过高效

的 CT 成像技术, 把金以及功能性的金纳米颗粒用于诊断神经病症和癌症的应用<sup>[66-67]</sup>。这些发现为利用金属纳米粒子来追踪和监管神经损害, 并且通过 CT 成像技术进行修复治疗, 提供了新的视野和方法。金属纳米粒子在人体内表现还须深入分析研究, 但纳米颗粒在神经工程领域具有很大的应用潜力和前景。

### 3. 超声响应型纳米材料在癌症诊断治疗中的应用

超声响应型纳米材料是纳米材料中的新兴领域, 接下来我们讨论了超声响应型纳米材料在癌症治疗方面的应用进展。医疗领域对生物相容性高的纳米递送工具的探索已有很多尝试。在这一领域的研究中, 如何在加强治疗效果的同时促进此类载体深入肿瘤细胞内部的研究十分关键。研究集中于开发对各类物理化学刺激较为敏感的纳米级药物递送平台, 并专注于改良癌症治疗方案。尽管超声波技术通常服务于临床诊断, 但该技术亦对操控生理细胞活动以及优化抗癌药物输送与释放中具有积极作用。作为促进靶向治疗药物释放和直接抗癌的双重工具, 治疗性超声波(TUS)展现了其突破性潜能, 成功应对血管障碍、癌症微观环境及免疫系统干扰等挑战。纳米技术结合超声波的智能药物递送系统(Drug delivery system, DDS)获得了原位治疗效果和穿透难以渗透组织能力的提升。智能 DDS 可通过不同癌细胞微环境反应、外部激励或多种刺激机制定向释放药物。这种方法既提升了疗效, 亦降低了对周边健康细胞的潜在影响。超声结合 DDS 目前尚处探索阶段, 对超声波的深层物理特性、以及它与多种纳米递送载体和丰富细胞类型的交互, 未来还需进行更多科研与临床测试。本节重点讲述超声波与超声响应型纳米材料在癌症治疗中的应用, 纳米颗粒(NPs)与超声波间的相互作用, 药物释放机制和对敏感超声波 NPs 种类的检验。在此基础上, 本节进一步探讨了 TUS 治疗在试管内、活体内及临床试验中的扩展前景, 旨在将超声疗法推向有效、安全、直接且便捷的癌症治疗新纪元。下面将分别阐述不同的 TUS 策略, 并讨论其应用效果和发展前景。

纳米材料在 DDS 设计领域, 可能会根本性地改革治疗癌症等多种病症的方法。最近几年, 科研工作者致力于提升纳米疗法的效能, 并且在癌症侦测、防止、控管及治理方面实现了突破, 这带来了生存率的增长和传统化疗副作用的下降。药物递送领域利用纳米载体系统包裹有毒性的抗癌药物是创新手段, 这通过 EPR 效应的增强或新的细胞间传输增强技术<sup>[68]</sup>, 提升了药物在癌细胞位置靶向作用的可用性, 降低了对健康细胞的伤害及副作用。尽管这样, 纳米粒子(NPs)在实验室以外的治疗实验当中并没有表现出显著的疗效进步, 且大量纳米材料载体在临床试验阶段效果不佳<sup>[69,70]</sup>。文献中指出, 只有仅仅 0.7%的纳米粒子因 EPR 效应而最终到达癌症组织, 这限制了其临床效能<sup>[71]</sup>, 尽管对这些发现还需持审慎态度<sup>[72]</sup>。新开发的纳米粒子技术和在医学上

的实践可能具有强化化疗的疗效<sup>[73]</sup>。不过相比传统 DDS，纳米 DDS 可显著降低副作用，主因为该载药系统可将药物优先聚集在恶变细胞位置<sup>[74]</sup>。纳米基础 DDS 的物理化学特点，如其形态、尺寸、表面特性、药物加载力度、多孔性和释放节奏等，皆有广泛综述<sup>[75-78]</sup>。但是，药物传递至肿瘤实体受到生物体本身特性的限制，使游离药物与包裹药物难以发挥最佳效能。高间质压、组织结构变化及淋巴系统受损均可阻碍药物在肿瘤中的定位<sup>[79]</sup>。最近的研究表明，对刺激反应敏感的纳米 DDS 在未来转为临床应用及癌症治理有很大发展空间。这些创新的给药系统（如药物加载的纳米载体、感应胰岛素贴<sup>[80]</sup>和微针贴等）也在其他病症治理上显示了应用潜力。还有，诸如 pH、酶、氧化还原反应等内源刺激和超声、电磁、光等外源性刺激响应纳米系统正被用来进行精确，有控，定时释放药物<sup>[81]</sup>。在 NPs 的外源性药物激活方法中，超声使得药物在药物量更集中的实体肿瘤区域获得良好吸收，这在前临床<sup>[82]</sup>及临床试验中<sup>[83]</sup>已证明其出色疗效。超声不仅在诊断方面广泛应用，也在癌症治疗中发挥多种作用，包括消融型（如热消融）<sup>[84]</sup>和非消融型治疗（如高温疗法 HT）<sup>[85,86]</sup>，比如超声能被当作聚焦的高强度波，用于细胞的消融。同时，超声的热作用和机械作用近来也开始被用于刺激纳米 DDS 中的药物释放<sup>[87]</sup>。目前，这一领域正在获得大量关注，力求提升现行的治疗效果或开发新的超声激发 DDS 应用。针对体内深层组织的治疗依旧是难题，主要因超声波的穿透受频率衰减影响。然而，聚焦式超声能够深入组织，抵消这项技术的最小化替代物的影响。另外，生物组织的不均一性使得超声瞄准癌变部位愈发复杂<sup>[88]</sup>。近期对超声波增强的药物递送系统（DDS）的研究呈现上升趋势，其优势在于它能够增强药物在特定位置的分配，尤其是在恶性肿瘤区域<sup>[89]</sup>。通过调整纳米粒子（NPs）的物理和化学特性以及表面性质，我们可以有效地调节它们的体内分布、生物动力学行为、穿透血脑屏障的能力，以及其在不同器官和细胞水平的定位。超声波技术与纳米 DDS 相结合的方案，克服了传统方案的一些缺陷，诸如 NPs 在细胞内的低积累和难以吸收问题<sup>[90]</sup>，以及在渗透肿瘤组织和保持其靶向特性方面的不足。利用超声波诱导产生的机械和热效应，装载在 NPs 中的药物能得到较为充分的释放，与传统纳米 DDS 的局限性不同。同时，这种技术的应用还能通过诱导药物从 NPs 表面释放或者破坏那些载药的 NPs 来提升药物传递效率。超声波的应用进一步通过提高生理屏障的透过性，加强药物在生理屏障中的运输，有效减轻不良反应。这包括由肝脏和脾脏造成的免疫清除作用，以及克服血管内皮层<sup>[91]</sup>、肿瘤内皮组织<sup>[92,93]</sup>、密集上皮细胞层、跨越组织间隙、细胞摄入及质膜穿透<sup>[94]</sup>，最终使得药物通过核膜进入细胞核的难题。非侵入性治疗的革新开辟了不必借助手术便能为癌症患者提供治疗的新思路。基于超声波的纳米级药物治疗是针对癌症靶向疗法的一项创新技术。超声波敏感的 DDS 融合了超声技术的物理和生物学特性、NPs 的形式配比、药物动力学以及生物分布特性。众多研究已证实，超声波辅助 NPs 的递送策略潜力巨大，能显著增强治疗效果。然而，

这一领域虽不断探索,包括体外研究、动物实验以及人类临床试验,但整体性的评估尚未见报道。要充分利用超声波激活的纳米 DDS,就必须深入理解其传输机制和 NPs 的物理特性。

#### 4. 肿瘤中可行的纳米材料治疗方案及临床转化

应用于肿瘤诊断和治疗的前沿纳米技术,有望实现疾病治疗新思路的重大突破。该技术在蛋白质工程和新型材料学领域内的革新,为癌症病人提供了前所未有的治疗选择。目前市场上有数种经过认证的治疗用纳米药物载体,它们已步入临床应用阶段。然而迄今为止,仅有极少数经过批准的药物载体包含了特异性结合分子,以便精准锁定肿瘤细胞。该节将评估了这些合法化配方,并探讨将实验室研究成果成功转化为临床应用过程中所遇到的诸多挑战。下面我们将详细解析一系列可针对性靶向肿瘤的纳米载体及分子工具,并强调了在对抗肿瘤的长期斗争中,所面临的重重困难。全球范围内,恶性肿瘤是导致健康受损的主要疾病,年新增病例超千万<sup>[95]</sup>。尽管如此,得益于对恶性肿瘤特性的深入研究分析,以及医疗技术和治疗手段的革新,近两年来患者的存活率呈上升趋势。现行的抗癌疗法涵盖手术切除、放射疗法、化学疗法等,但这些治疗手段往往同时对健康细胞会造成不可逆的伤害,从而产生副作用。因此,开发一种可精准定位癌变细胞的载体或疗法是医学发展的目标。近年来我们研究了被动药物递送策略来治疗恶性肿瘤,被动药物递送策略的核心是利用恶性肿瘤的生物特征,例如具有的滞留效应,从而在肿瘤区域内积聚纳米级药物载体<sup>[96]</sup>。早在上世纪 80 年代,首个以此原理为基础的纳米药物载体就已进入临床测试阶段,随后,首批此类药物在 90 年代达到商业化。通过基于此基础进行的研究,多个治疗性纳米载体得到认证,并开展了进一步提高其药物靶向能力的探索。而主动药物输送方式涉及对纳米载体进行功能化处理,使其可以与肿瘤细胞表面的特定分子相结合,从而高效传递化疗药物。近期有关纳米技术在癌症探索及纳米医学领域应用的综述已详细概述了此种策略的潜力及基础研究转向临床试验的各种难题<sup>[97,98]</sup>。在根据被动及主动策略设计纳米载体时,要克服多种生物障碍,例如粘膜屏障的存在和偶发的非特异性吸收等<sup>[99]</sup>。面对纳米医学在肿瘤靶向中的诸多挑战,一个成功的方案需将纳米载体优化设计与对恶性肿瘤生物特性的认识相结合。肿瘤的典型表现包括异常血管及不良的淋巴排液情况。利用这些特点,纳米载体可依赖 EPR 效应,通过血管漏斗效应进入并停留在肿瘤组织中,进行有效的药物递送。研究指出,直径 400 纳米以下脂质体的囊泡能较好地穿透肿瘤,而进一步研究更表明,小于 200 纳米的颗粒能更加有效地到达肿瘤细胞<sup>[100]</sup>。尽管目前的主流方法为被动靶向方法,但其无法确保药物彻底覆盖肿瘤内的每一个细胞,部分药物分子的扩散能力不足,且过程难以精准控制,这种不确定性可能诱发多药耐药现象,即癌细胞开始抵抗治疗中使用的药物。另一方面,转运蛋白在癌细胞中的过度表

这是药物排除过程的关键，这导致治疗效果的降低及耐药性的发展。由于不是所有肿瘤都表现出 EPR 效应，因此纳米载体的被动策略的应用存在着限制。因此，对于纳米材料在生物医学领域载体的作用我们需要进一步探索研究。

## 5. 纳米材料在医学中药物运输的载体作用

纳米技术在医学应用中的前沿进展包含将药物运输系统进行设计优化，以实现其对特定类型细胞的有针对性的作用。其中一种策略为纳米粒子设计特定编码，进而允许它们在转移至目标位置后能与某些细胞进行结合。此种技术可通过在粒子表面附着专一性较高的分子（如与细胞特有受体相结合的化合物），通过缀合化学反应实现精确的细胞识别与结合。这项技术的关键在于通过特定的分子间作用力实现精准对接，以确保药物精确释放在预定的靶点。为了确保识别的专一性，必须在目的细胞上过度表达某些生物标记与受体。识别这些标记与受体的存在是针对性治疗的关键，如针对某些癌细胞表面抗原的单克隆抗体载体设计。此外，特定情境下配体结合可能会促进细胞吞噬过程，有助于在细胞内部快速释放药物有效成分。对于某些药物运输方式来说，这是实现预期治疗效果的必要条件。例如，在一些血液病变的治疗中，通过靶向动作让药物载体进入病变细胞的情况就更为明显。同时，需要意识到高结合亲和力并不总是呈现出最佳的靶向效能。如实体肿瘤中，强烈的结合力可能会妨碍药物的深入渗透，导致治疗效果不佳。因此，想找到合适的药物载体需要在维持靶向性和改善药物输送效率之间寻找平衡<sup>[101]</sup>。

聚合物是最为常见的构建纳米材料的药物载体。在过去的研究应用中，它们在治疗肿瘤领域的首次应用出现在 1962 年，当时报告提到抗肿瘤制剂附着在一种聚合物纳米粒子上<sup>[102]</sup>。Couvreur 和同事们展示了如何从血清中向聚合物释放药物，并在模拟肿瘤的条件下研究了其分布和疗效。那些研究支撑了后来的纳米粒子研究，这些纳米粒子后来装载了阿霉素，并在 20 世纪 80 年代进行了人体临床试验。合成聚合纳米粒子能够不需调整化学构造即封装药物，这些粒子包括聚乳酸或是壳聚糖、胶原等天然材料。这些药物可被控制地释放，可能是由于来自表面侵蚀、扩散或者因应局部环境变化而膨胀。目前，一系列在研的聚合物纳米粒子具备多种功能，处于临床测试不同阶段。然而，基于聚合物纳米粒子所面临的挑战包括其结构的不规则性，如不均匀性，这在它们的多分散性指数中有所体现。对此，少数聚合纳米粒子展现出了相近一致的大小分布<sup>[103]</sup>。某些基于脂类的载体有其独特的生物学属性，这些包括通用的生物兼容性、生物可分解能力，以及能隔离药物与环境的特性。简单的化学修饰或表面特性的改变就能轻易修改脂类载体的特性，比如改变它们的大小或是电荷。脂质体、聚合体和胶束是某类具有亲和疏水特性的颗粒，脂质体是一种闭合的球形结构，由双层脂质

构成, 并含有一个或多个水相核心<sup>[104]</sup>。经过监管机构认证的脂质体已用于承载多种化疗药剂。与之相似的, 聚合物与脂质体结构相似, 但由人工合成的聚合材料构成。与治疗用的聚合物一样, 现阶段还未有获得临床认可的基于脂类的载体用于活性细胞定位策略。胶束则是自组装的脂质单层, 具有疏水核心和亲水外壳, 它们已成功地用作难溶于水的药物载体。这些胶束能在特定浓度和温度条件下自动形成, 是由两亲性物质或界面活性剂构成的胶体群体。如 NK911 是正在临床评估中的一种聚合物胶束, 由阿霉素结合部分和自由药物组成, 用于对抗胰腺癌。NK105 则是另一种胶束, 内含紫杉醇, 针对胰腺、结肠和胃的肿瘤治疗<sup>[105]</sup>。对于基于脂类的载体, 挑战包括在静脉注射后迅速被血液清除, 以及其不稳定性和药物释放的不可预测性。此外, 单核吞噬系统(MPS)的非特异性吸收, 对这些载体的临床转化构成了额外挑战。

挑选理想的纳米粒子载体的评价条件通常不是直观可见的, 各种不同的因子可能会共同作用于其分子分布与特定靶位的精确性, 使得现行的对比研究很难提供清晰的解释。况且, 研发出能明确纳米粒子载体优良特征的有效筛选机制一直颇具挑战性。因此, 精确的治疗定位策略只能通过针对性的实验研究来制订, 通常这一过程相当繁琐。另外, 如果能让纳米粒子在系统性疗法中发挥作用, 则必须找到克服由单一核心吞噬细胞和其他非目标细胞产生的广泛摄取效应的方法。在不显著增加纳米粒子载体复杂结构且无损于规模化生产的前提下, 这一目标能否实现尚未明了。针对性的纳米粒子已在多个癌症动物模型治疗研究中展现出了明显的疗效增强, 目前有超过 120 项临床试验正在探索包含特定抗体的纳米粒子配方<sup>[106]</sup>。对于实际临床应用场景而言, 强化对肿瘤种类与定位的成像技术来提升信任度同样至关重要。当面临细胞表面标记物选择的难题时, 诸如在固态肿瘤中, 可能需要直接将治疗靶向至肿瘤供血血管或周边肿瘤微环境中的细胞外基质。针对流动性肿瘤细胞的情况, 例如血癌与淋巴癌, 锚定能够强力结合目标表面抗原且具有延长半衰期载体的治疗或许更有效。类似于个性化药物联合用药方案, 未来肿瘤专家可能会倾向于选择特定的纳米载体与靶点分子的组合用以提升治疗成效并节约成本。

## 6. 纳米材料在骨组织领域的应用

接下来我们讨论了纳米材料在骨组织相关生物学领域的应用, 骨组织工程 (Bone tissue engineering, BTE), 交织了多个学科领域, 旨在通过创建新型的, 具有高生物兼容性的骨骼替代材料, 来克服传统骨移植的限制。BTE 包含了三种关键成分, 分别是支撑结构、种植细胞和促进生长的生化因子, 它们一起促进骨骼的构建、组织分化、细胞活性增强以及骨骼自我修复过程。尽管骨骼为硬质结构, 目前尚缺乏可匹配其机械强度以及模拟自然组织功能的适宜材料。鉴于此, 借助纳米材料技术达成所

期望目标的 BTE 效果成为本节要阐述的中心话题。本节回顾了对骨骼更新至关重要的纳米材料工程领域，重点包括：(a)通过纳米结构化的支架提升物理与化学作用力、生物相容性、力学稳定及细胞粘附；(b)应用基于纳米粒子的途径来投递生化活性分子、细胞增殖因子及遗传材料。它首先阐述了骨骼的结构组成与伤口愈合过程及其影响因素。众多研究集中探讨了当前在支架构建方面采用的众多纳米级构形，解释了这些构形的制造方法和它们可能会影响免疫系统的机制。同时，也有研究强调了采用纳米墨水进行 BTE 中 4D 生物打印技术的显著优势。这外，研讨了计算技术在发现药物与其特定受体间联系上的价值，为设计更为精确的药物投放系统带来帮助。最终总结了纳米材料工艺如何在组织修复和骨骼重生领域发挥作用，并提升了支架结构与药物输送效果的进步。

在骨组织工程中，三大核心元素包括框架结构、促进细胞增长的因子以及各种细胞本身。在这个领域，框架结构发挥着基础而关键的作用。缺乏适当的框架结构将极大地阻碍在控制条件下的细胞培养工作。理想的框架应为细胞提供适宜的环境以促进 ECM 在损伤组织中的发展，并需确保兼容生物体、无毒性及可被生物分解<sup>[107]</sup>。框架应提供坚固的基底以便细胞附着，而骨细胞外基质主要由多种成分如胶原蛋白（一型和二型）、弹性蛋白和纤维蛋白质等组成，并嵌入有助于组织恢复的关键生长分子<sup>[108,109]</sup>。设计用于再生的框架的策略目标是模仿自然的组织层次结构、化学成分以及物理特性。额外的，蛋白质因子如骨形态发生蛋白、血小板衍生因子，以及其他干细胞因子等被植入到基质中以调节骨骼代谢和再生。在 BTE 中常用的细胞源包含诱导性多能干细胞和间充质干细胞，后者可以通过患者自己的骨髓或其他细胞样本获得，前者则是通过重新编程得到，如皮肤细胞转化成血细胞<sup>[110]</sup>。尽管间充质干细胞在传统上是 BTE 的偏好选择，相比之下，一项新研究发现诱导性多能干细胞在无限自我更新和骨分化方面展现出了更卓越的潜能。利用微纳技术的进步已经打开了骨修复和再生的新篇章。特别是，在建立骨修复框架方面的应用，纳米级别的结构已经显示出其优势<sup>[111]</sup>。这些细微的特征对应的尺寸极小，通常不超过百纳米，它们可以被编织在一起形成了一种高表面积与体积比的新型骨再生的框架<sup>[112]</sup>。小尺寸的框架以及其模拟骨组织形态的能力，为优化骨再生过程中的免疫调节和成骨细胞分化创造了有利条件。这些纳米特征支架提高了细胞与支架之间的相互作用，进而促成了更高效的组织恢复速度。此外，纳米构造还能引导细胞沿特定方向排列，仿照天然骨骼中细胞的布局从而提高效果。

另外，配合纳米材料来传递药物亦是 BTE 的一种创新手段<sup>[113]</sup>。通过纳米载体，生长因子（Growth factors,GFs）、激素等疗效物可以直接转运至恢复性骨组织的部位，这样既增加了疗效的同时，也降低了副作用的风险。利用纳米粒子递送的靶向性药物治疗限制了对整个生物体的影响并减缓了副作用，同时提供了精确浓度的药物至靶向

区域。经过特殊设计的纳米粒子载体能在预定的持续期间内，精确控制释放药剂，纳米粒子的微小尺寸有助于它们渗透生物性屏障比如肌理膜，显著提升质水难溶药物及大型生物分子如生长因子的递送效率<sup>[114]</sup>。本节综述旨在深入探讨纳米技术如何在生物 BTE 领域，尤其是促进骨重生这一关键医疗领域，实现了革命性的进展。我们将详细分析纳米材料在骨组织工程支架的设计与构建、高效药物输送系统的开发、免疫调节及促进骨修复和再生过程中的核心作用。此外还着重讨论了运用纳米墨水进行 4D 生物打印技术的巨大发展潜力，以及开发细致入微的药物输送策略在实现更加个性化和目标化治疗中的重要性。随着科技的不断进步，纳米技术已经成为推动生物医学工程领域革命的重要力量。在 BTE 中，纳米材料因其独特的物理、化学和生物学属性，成为设计和构建骨支架的理想选择。这些纳米级支架不仅能够模拟自然骨组织的微观环境，还能促进细胞黏附、增殖和分化，从而有效支持骨再生。通过纳米技术，科研人员能够精确控制支架的孔隙率、机械强度及表面特性，这些都是骨重生过程中不可或缺的因素。此外，纳米技术的应用还极大地促进了高效药物输送系统的发展。通过纳米载体，如纳米粒子、纳米囊泡等，可以实现对药物释放速率和释放周期的精确控制，确保药物在特定的时间和位置以最有效的方式发挥作用。这一策略不仅显著提高了治疗效率，还减少了药物的副作用，为患者带来了更为安全和有效的治疗选择。免疫响应在骨修复和再生中扮演着重要角色。纳米材料通过调节免疫细胞的活动和促进抗炎或促进再生的免疫环境的形成，为骨重生创造了有利的条件。这种通过纳米技术调控免疫环境的策略，开辟了一条促进损伤骨组织快速恢复和再生的新途径。4D 生物打印技术，作为一种创新的制造技术，利用纳米墨水不仅能打印出精确的三维结构，还能随着时间的推移响应环境刺激而发生形态改变。这一技术展现了巨大的潜力，能够生产出更加贴近自然生物组织行为的人工结构，为未来的骨组织工程及其他医学应用提供了新的可能性。最后，本节强调了开发精细化药物输送系统的重要性。通过纳米技术，可以设计出具有高度特异性和响应性的药物输送平台，这些平台能够根据患者的具体病情和治疗需求，实现个性化的治疗方案。这种方法不仅能够提高治疗的有效性，还能显著降低治疗过程中的风险和副作用。

因此，纳米技术在生物组织工程领域，尤其是在促进骨重生方面，正展现出无限的潜力和前景。通过精细化的支架构建、高效的药物输送、免疫响应的调控以及 4D 生物打印技术，纳米技术为骨重生研究及应用开辟了新的道路，预示着在未来可能带来更加有效和安全的治疗方法，从而为患者带来更大的希望。

综上所述，本文深入探讨了纳米技术在生物医学领域的多方面应用，特别是在神经治疗、癌症治疗中超声响应型及传统药物负载纳米材料的使用，以及骨组织工程中纳米材料的关键作用。这些内容展现了纳米材料在近年来生物医学研究与发展中的进展。纳米技术因其独特的物理和化学性质，为治疗方法的创新提供了强有力的支撑，

尤其是在提高治疗效率、降低副作用方面展现出巨大潜力。然而，尽管目前的研究成果令人鼓舞，纳米材料的探索与应用还远未触及其广泛的潜能。从材料选择、表面改性到功能化处理，研究者们仍有广阔的空间进行探索，以发现和设计出更为高效、更具针对性的纳米材料。例如，通过改善纳米材料的生物相容性和靶向能力，可以显著提高其在靶向药物输送和精准治疗中的应用效果。此外，对于纳米材料如何与生物体系相互作用的机制研究，目前仍然处于初级阶段。深入理解这些机制不仅对提高纳米材料的应用效果至关重要，也是推动纳米医学发展的关键。随着未来研究方法的不断完善和技术的进步，预期会有更多关于纳米材料与细胞、组织乃至整个生物体相互作用的深入研究，从而为纳米技术在医学领域的应用提供更加坚实的理论基础和实践指导。尽管当前的研究成果已经揭示了纳米技术在医学领域的巨大应用潜力，但我们仍需谨慎对待这些技术可能带来的风险和挑战。例如，纳米材料的长期生物安全性、可能的环境影响以及对人体健康的潜在威胁都需要进一步的研究和评估。综合来看，尽管面临种种挑战，纳米技术在生物医学领域的应用前景仍然十分广阔。随着科研人员对纳米材料性能的深入了解和技术创新的不断推进，相信在不久的将来，纳米技术将在提高疾病诊断准确性、治疗效率以及患者生活质量方面发挥更加重要的作用。

## 参考文献

- [1] Martinelli C, Pucci C, Ciofani G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy[J]. *APL bioengineering*, 2019, 3(1).
- [2] Tinkle S, McNeil S E, Mühlebach S, et al. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2014, 1313(1): 35-56.
- [3] Li J, Duan H, Pu K. Nanotransducers for near-infrared Photoregulation in biomedicine[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(33): 1901607.
- [4] Yang J, Shi Z, Liu R, et al. Combined-therapeutic strategies synergistically potentiate glioblastoma multiforme treatment via nanotechnology[J]. *Theranostics*, 2020, 10(7): 3223.
- [5] Kong Y, Liu F, Ma B, et al. Wireless localized electrical stimulation generated by an ultrasound-driven piezoelectric discharge regulates proinflammatory macrophage polarization[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(13): 2100962.
- [6] Wu H, Dong H, Tang Z, et al. Electrical stimulation of piezoelectric BaTiO<sub>3</sub> coated Ti6Al4V scaffolds promotes anti-inflammatory polarization of macrophages and bone repair via MAPK/JNK inhibition and OXPHOS activation[J]. *Biomaterials*, 2023, 293: 121990.
- [7] Kim T W, Kim A G, Lee K H, et al. Microfluidic Electroceuticals Platform for Therapeutic Strategies of Intervertebral Disc Degeneration: Effects of Electrical Stimulation on Human Nucleus Pulposus Cells under Inflammatory Conditions[J]. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(17): 10122.
- [8] Ye J, Lv W, Li C, et al. Tumor Response and NIR-II Photonic Thermal Co-Enhanced Catalytic Therapy Based on Single-Atom Manganese Nanozyme[J]. *Advanced Functional Materials*, 2022, 32(47): 2206157.
- [9] Tian R, Li Y, Xu Z, et al. Current advances of atomically dispersed metal-centered nanozymes for tumor diagnosis and therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(21): 15712.
- [10] Gao F, Xu Z, Liang Q, et al. Osteochondral regeneration with 3D-printed biodegradable high-strength supramolecular polymer reinforced-gelatin hydrogel scaffolds[J]. *Advanced Science*, 2019, 6(15): 1900867.
- [11] Humzah M D, Soames R W. Human intervertebral disc: structure and function [J]. *The Anatomical Record*, 1988, 220(4): 337-356.

- [12] Shi Y, Li H, Chu D, Lin W, Wang X, Wu Y, Li K, Wang H, Li D, Xu Z, Gao L, Li B, Chen H. Rescuing Nucleus Pulposus Cells From Senescence via Dual-Functional Greigite Nanozyme to Alleviate Intervertebral Disc Degeneration. *Adv Sci (Weinh)*. 2023 Sep;10(25):e2300988. doi: 10.1002/advs.202300988. Epub 2023 Jul 3. PMID: 37400370; PMCID: PMC10477883.
- [13] Tang Y, Zhang K, Zhou H, Zhang C, Liu Z, Chen H, Li H, Chen K. Transplantation of active nucleus pulposus cells with a keep-charging hydrogel microsphere system to rescue intervertebral disc degeneration. *J Nanobiotechnology*. 2023 Nov 28;21(1):453. doi: 10.1186/s12951-023-02226-1. PMID: 38017517; PMCID: PMC10683266.
- [14] Wu H, Dong H, Tang Z, Chen Y, Liu Y, Wang M, Wei X, Wang N, Bao S, Yu D, Wu Z, Yang Z, Li X, Guo Z, Shi L. Electrical stimulation of piezoelectric BaTiO<sub>3</sub> coated Ti6Al4V scaffolds promotes anti-inflammatory polarization of macrophages and bone repair via MAPK/JNK inhibition and OXPHOS activation. *Biomaterials*. 2023 Feb;293:121990. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121990. Epub 2022 Dec 26. PMID: 36586147.
- [15] Liu D, Li L, Shi BL, Shi B, Li MD, Qiu Y, Zhao D, Shen QD, Zhu ZZ. Ultrasound-triggered piezocatalytic composite hydrogels for promoting bacterial-infected wound healing. *Bioact Mater*. 2022 Dec 14;24:96-111. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.11.023. Erratum in: *Bioact Mater*. 2023 Oct 05;32:147-148. doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.09.013. PMID: 36582346; PMCID: PMC9772564.
- [16] Sapkota B, Ogut S, Klie RF. Nanoscale Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS) Study of Phase Transition in Barium Titanate (BaTiO<sub>3</sub>). *Microsc Microanal*. 2023 Jul 22;29(Supplement\_1):1676-1677. doi: 10.1093/micmic/ozad067.862. PMID: 37613811.
- [17] Knezevic NN, Candido KD, Vlaeyen JWS, Van Zundert J, Cohen SP. Low back pain. *Lancet*. 2021 Jul 3;398(10294):78-92. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00733-9. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34115979.
- [18] Bhujel B, Shin HE, Choi DJ, Han I. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Intervertebral Disc Regeneration: Review. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 30;23(13):7306. doi: 10.3390/ijms23137306. PMID: 35806304; PMCID: PMC9267028.
- [19] Kamali A, Ziadlou R, Lang G, Pfannkuche J, Cui S, Li Z, Richards RG, Alini M, Grad S. Small molecule-based treatment approaches for intervertebral disc degeneration: Current options and future directions. *Theranostics*. 2021 Jan 1;11(1):27-47. doi: 10.7150/thno.48987. PMID: 33391459; PMCID: PMC7681102.
- [20] Desmoulin GT, Pradhan V, Milner TE. Mechanical Aspects of Intervertebral Disc Injury and Implications on Biomechanics. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2020 Apr 15;45(8):E457-E464. doi: 10.1097/BRS.0000000000003291. PMID: 31651681.

- [21] Li Y, Dai C, Wu B, Yang L, Yan X, Liu T, Chen J, Zheng Z, Peng B. Intervertebral disc injury triggers neurogenic inflammation of adjacent healthy discs. *Spine J.* 2024 Aug;24(8):1527-1537. doi: 10.1016/j.spinee.2024.04.002. Epub 2024 Apr 10. PMID: 38608821.
- [22] Smith LJ, Nerurkar NL, Choi KS, Harfe BD, Elliott DM. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. *Dis Model Mech.* 2011 Jan;4(1):31-41. doi: 10.1242/dmm.006403. Epub 2010 Dec 1. PMID: 21123625; PMCID: PMC3008962.
- [23] Lawson LY, Harfe BD. Developmental mechanisms of intervertebral disc and vertebral column formation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2017 Nov;6(6). doi: 10.1002/wdev.283. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28719048.
- [24] Urban JP, Winlove CP. Pathophysiology of the intervertebral disc and the challenges for MRI. *J Magn Reson Imaging.* 2007 Feb;25(2):419-32. doi: 10.1002/jmri.20874. PMID: 17260404.
- [25] Li Z, Yang H, Hai Y, Cheng Y. Regulatory Effect of Inflammatory Mediators in Intervertebral Disc Degeneration. *Mediators Inflamm.* 2023 Apr 17;2023:6210885. doi: 10.1155/2023/6210885. PMID: 37101594; PMCID: PMC10125773.
- [26] Tessier S, Risbud MV. Understanding embryonic development for cell-based therapies of intervertebral disc degeneration: Toward an effort to treat disc degeneration subphenotypes. *Dev Dyn.* 2021 Mar;250(3):302-317. doi: 10.1002/dvdy.217. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32564440.
- [27] Wang K, Li B, Zhao C, Yuan S, Zhang C, Liang X, Wang J, Wu Y, He Y. A novel NiO/BaTiO<sub>3</sub> heterojunction for piezocatalytic water purification under ultrasonic vibration. *Ultrason Sonochem.* 2023 Jan;92:106285. doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.106285. Epub 2022 Dec 28. PMID: 36586339; PMCID: PMC9830376.
- [28] Xiao C, Fan L, Zhou S, Kang X, Guan P, Fu R, Li C, Ren J, Wang Z, Yu P, Wang Y, Deng C, Zhou L, Ning C. One-Dimensional Ferroelectric Nanoarrays with Wireless Switchable Static and Dynamic Electrical Stimulation for Selective Regulating Osteogenesis and Antiosteosarcoma. *ACS Nano.* 2022 Dec 27;16(12):20770-20785. doi: 10.1021/acsnano.2c07900. Epub 2022 Nov 22. PMID: 36412574.
- [29] Sikder P, Nagaraju P, Naganaboyina HPS. 3D-Printed Piezoelectric Porous Bioactive Scaffolds and Clinical Ultrasonic Stimulation Can Help in Enhanced Bone Regeneration. *Bioengineering (Basel).* 2022 Nov 11;9(11):679. doi: 10.3390/bioengineering9110679. PMID: 36421081; PMCID: PMC9687159.
- [30] Gao H, Zhang Y, Xia H, Mao X, Zhu X, Miao S, Shi M, Zha S. The Piezo-Fenton synergistic effect of ferroelectric single-crystal BaTiO<sub>3</sub> nanoparticles for hi

- gh-efficiency catalytic pollutant degradation in aqueous solution. *Dalton Trans.* 2022 Aug 9;51(31):11876-11883. doi: 10.1039/d2dt01248k. PMID: 35876113.
- [31] Zhao Y, Wang S, Ding Y, Zhang Z, Huang T, Zhang Y, Wan X, Wang ZL, Li L. Piezotronic Effect-Augmented Cu<sub>2</sub>-xO-BaTiO<sub>3</sub> Sonosensitizers for Multifunctional Cancer Dynamic Therapy. *ACS Nano.* 2022 Jun 28;16(6):9304-9316. doi: 10.1021/acsnano.2c01968. Epub 2022 Jun 14. PMID: 35699224.
- [32] Mohan H, Vadivel S, Shin T. Sonophotocatalytic water splitting by BaTiO<sub>3</sub>@SrTiO<sub>3</sub> core shell nanowires. *Ultrason Sonochem.* 2023 Dec;101:106650. doi: 10.1016/j.ultsonch.2023.106650. Epub 2023 Oct 15. PMID: 37866137; PMCID: PMC10623364.
- [33] Xue K, Jiang Y, Mofarah SS, Doustkhah E, Zhou S, Zheng X, Huang S, Wang D, Sorrell CC, Koshy P. Composition-driven morphological evolution of BaTiO<sub>3</sub> nanowires for efficient piezocatalytic hydrogen production. *Chemosphere.* 2023 Oct;338:139337. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.139337. Epub 2023 Jul 11. PMID: 37442379.
- [34] Bowles RD, Setton LA. Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair. *Biomaterials.* 2017 Jun;129:54-67. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.013. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28324865; PMCID: PMC5627607.
- [35] Silwal P, Nguyen-Thai AM, Mohammad HA, Wang Y, Robbins PD, Lee JY, Vo NV. Cellular Senescence in Intervertebral Disc Aging and Degeneration: Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Opportunities. *Biomolecules.* 2023 Apr 18;13(4):686. doi: 10.3390/biom13040686. PMID: 37189433; PMCID: PMC10135543.
- [36] Jiang B, Iocozzia J, Zhao L, Zhang H, Harn YW, Chen Y, Lin Z. Barium titanate at the nanoscale: controlled synthesis and dielectric and ferroelectric properties. *Chem Soc Rev.* 2019 Feb 18;48(4):1194-1228. doi: 10.1039/c8cs00583d. PMID: 30663742.
- [37] Santiago Santos GO, Freitas Bergamaski FO, Magalhães LG, Eguiluz KIB, Santos JCAD, Sampaio DV, Pizani PS, Silva RSD, Salazar-Banda GR. Electrochemical Synthesis of La-Doped BaTiO<sub>3</sub> Nanopowders. *J Nanosci Nanotechnol.* 2020 Feb 1;20(2):1033-1038. doi: 10.1166/jnn.2020.16920. PMID: 31383102.
- [38] Tan VT, Vinh T, Khoi VM, Chinh HD, Tuan PV, Khiem TN. A New Approach for the Fabrication of Tetragonal BaTiO<sub>3</sub> Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2021 Apr 1;21(4):2692-2701. doi: 10.1166/jnn.2021.19097. PMID: 33500095.
- [39] Fadeel B. Nanomaterial characterization: Understanding nano-bio interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Dec 10;633:45-51. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.08.095. PMID: 36344160.

- [40] Kladko DV, Falchevskaya AS, Serov NS, Prilepskii AY. Nanomaterial Shape Influence on Cell Behavior. *Int J Mol Sci*. 2021 May 17;22(10):5266. doi: 10.3390/ijms22105266. PMID: 34067696; PMCID: PMC8156540.
- [41] Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*. 2010 Apr;49(2):97-107. doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.002. Epub 2009 Oct 6. PMID: 19815028.
- [42] Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev*. 2016 Jul;40(4):480-93. doi: 10.1093/femsre/fuw007. Epub 2016 Apr 12. PMID: 27075488; PMCID: PMC4931227.
- [43] Yang YJ, Lu LJ, Wang JJ, Ma SY, Xu BL, Lin R, Chen QS, Ma ZG, Mo YL, Wang DT. Tubson-2 decoction ameliorates rheumatoid arthritis complicated with osteoporosis in CIA rats involving isochlorogenic acid A regulating IL-17/MAPK pathway. *Phytomedicine*. 2023 Jul 25;116:154875. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154875. Epub 2023 May 22. PMID: 37263000.
- [44] Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013 Dec 6;45(12):e66. doi: 10.1038/emm.2013.97. PMID: 24310172; PMCID: PMC3880462.
- [45] Lv Z, Han J, Li J, Guo H, Fei Y, Sun Z, Dong J, Wang M, Fan C, Li W, Xie Y, Sun W, Chen J, Liu Y, Chen F, Liu Z, Liu A, Wu R, Xu X, Yan W, Jiang Q, Ikegawa S, Chen X, Shi D. Single cell RNA-seq analysis identifies ferroptotic chondrocyte cluster and reveals TRPV1 as an anti-ferroptotic target in osteoarthritis. *EBioMedicine*. 2022 Oct;84:104258. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104258. Epub 2022 Sep 19. PMID: 36137413; PMCID: PMC9494174.
- [46] Lu H, Jia C, Wu D, Jin H, Lin Z, Pan J, Li X, Wang W. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) alleviates senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the SIRT1-mTOR signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2021 Sep 23;12(10):865. doi: 10.1038/s41419-021-04157-x. PMID: 34556628; PMCID: PMC8460788.
- [47] Liu W, Li X, Jiao Y, Wu C, Guo S, Xiao X, Wei X, Wu J, Gao P, Wang N, Lu Y, Tang Z, Zhao Q, Zhang J, Tang Y, Shi L, Guo Z. Biological Effects of a Three-Dimensionally Printed Ti6Al4V Scaffold Coated with Piezoelectric BaTiO<sub>3</sub> Nanoparticles on Bone Formation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 Nov 18;12(46):51885-51903. doi: 10.1021/acsami.0c10957. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33166458.
- [48] Dubey AK, Thirivikraman G, Basu B. Absence of systemic toxicity in mouse model towards BaTiO<sub>3</sub> nanoparticulate based eluate treatment. *J Mater Sci Mater*

- Med. 2015 Feb;26(2):103. doi: 10.1007/s10856-015-5414-6. Epub 2015 Feb 6. PMID: 25655497.
- [49] Sharma V, Chowdhury S, Bose S, Basu B. Polydopamine Codoped BaTiO<sub>3</sub>-Functionalized Polyvinylidene Fluoride Coating as a Piezo-Biomaterial Platform for an Enhanced Cellular Response and Bioactivity. *ACS Biomater Sci Eng.* 2022 Jan 10;8(1):170-184. doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c00879. Epub 2021 Dec 29. PMID: 34964600.
- [50] Mirjalali S, Bagherzadeh R, Mahdavi Varposhti A, Asadnia M, Huang S, Chang W, Peng S, Wang CH, Wu S. Enhanced Piezoelectricity of PVDF-TrFE Nanofibers by Intercalating with Electrosprayed BaTiO<sub>3</sub>. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2023 Sep 6;15(35):41806-41816. doi: 10.1021/acсами.3c06215. Epub 2023 Aug 23. PMID: 37610412.
- [51] Zhu P, Chen Y, Shi J. Piezocatalytic Tumor Therapy by Ultrasound-Triggered and BaTiO<sub>3</sub>-Mediated Piezoelectricity. *Adv Mater.* 2020 Jul;32(29):e2001976. doi: 10.1002/adma.202001976. Epub 2020 Jun 14. PMID: 32537778.
- [52] Lupi E, Wexler RB, Meyers D, Zahradnik A, Jiang Y, Susarla S, Ramesh R, Martin LW, Rappe AM. Engineering Relaxor Behavior in (BaTiO<sub>3</sub>)<sub>n</sub>/(SrTiO<sub>3</sub>)<sub>n</sub> Superlattices. *Adv Mater.* 2023 Dec;35(51):e2302012. doi: 10.1002/adma.202302012. Epub 2023 Nov 16. PMID: 37433562.
- [53] Rodriguez M, Kaushik A, Lapierre J, Dever SM, El-Hage N, Nair M. Electro-Magnetic Nano-Particle Bound Beclin1 siRNA Crosses the Blood-Brain Barrier to Attenuate the Inflammatory Effects of HIV-1 Infection in Vitro. *J Neuroimmunol Pharmacol.* 2017 Mar;12(1):120-132. doi: 10.1007/s11481-016-9688-3. Epub 2016 Jun 10. PMID: 27287620; PMCID: PMC5241243.
- [54] Fuentes S, Valenzuela J, León J, Guzmán-Salas S, Zárate RV, Arancibia D. Structural characterization, stability, and cytocompatibility study of chitosan BaTiO<sub>3</sub>@ZnO:Er heterostructures. *Int J Biol Macromol.* 2023 Apr 30;235:123796. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123796. Epub 2023 Feb 21. PMID: 36822293.
- [55] FDA U S. Considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology[J]. Guidance for industry, 2014.
- [56] Kumar R, Aadil K R, Ranjan S, et al. Advances in nanotechnology and nanomaterials based strategies for neural tissue engineering[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020, 57: 101617.
- [57] Qiu M, Singh A, Wang D, et al. Biocompatible and biodegradable inorganic nanostructures for nanomedicine: silicon and black phosphorus[J]. *Nano Today*, 2019, 25: 135-155.
- [58] Horner P J, Gage F H. Regenerating the damaged central nervous system[J]. *Nature*, 2000, 407(6807): 963-970.

- [59] Fawcett J W, Asher R A. The glial scar and central nervous system repair[J]. Brain research bulletin, 1999, 49(6): 377-391.
- [60] Fawcett J W, Asher R A. The glial scar and central nervous system repair[J]. Brain research bulletin, 1999, 49(6): 377-391.
- [61] Willets K A, Van Duyne R P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing[J]. Annu. Rev. Phys. Chem., 2007, 58: 267-297.
- [62] Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity[J]. Chemical society reviews, 2009, 38(6): 1759-1782.
- [63] Nissan I, Schori H, Lipovsky A, et al. Effect of different densities of silver nanoparticles on neuronal growth[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2016, 18: 1-10.
- [64] Nissan I, Schori H, Kumar V B, et al. Topographical impact of silver nanolines on the morphology of neuronal SH-SY5Y Cells[J]. Journal of materials chemistry B, 2017, 5(47): 9346-9353.
- [65] Shilo M, Reuveni T, Motiei M, et al. Nanoparticles as computed tomography contrast agents: current status and future perspectives[J]. Nanomedicine, 2012, 7(2): 257-269.
- [66] Reuveni T, Motiei M, Romman Z, et al. Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study[J]. International journal of nanomedicine, 2011(1): 2859-2864.
- [67] Sindhvani S, Syed A M, Ngai J, et al. The entry of nanoparticles into solid tumours[J]. Nature materials, 2020, 19(5): 566-575.
- [68] Shafei A, El-Bakly W, Sobhy A, et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2017, 95: 1209-1218.
- [69] Kashkooli F M, Soltani M, Souri M, et al. Nexus between in silico and in vivo models to enhance clinical translation of nanomedicine[J]. Nano Today, 2021, 36: 101057.
- [70] Dai Q, Wilhelm S, Ding D, et al. Quantifying the ligand-coated nanoparticle delivery to cancer cells in solid tumors[J]. ACS nano, 2018, 12(8): 8423-8435.
- [71] Skotland T, Sandvig K. Transport of nanoparticles across the endothelial cell layer[J]. Nano Today, 2021, 36: 101029.
- [72] Anselmo A C, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update[J]. Bioengineering & translational medicine, 2019, 4(3): e10143.
- [73] Peer D, Karp J M, Hong S, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy[J]. Nano-enabled medical applications, 2020(1): 61-91.

- [74] Peer D, Karp J M, Hong S, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy[J]. *Nano-enabled medical applications*, 2020: 61-91.
- [75] Stylianopoulos T, Jain R K. Design considerations for nanotherapeutics in oncology[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2015, 11(8): 1893-1907.
- [76] Zhao Z, Ukidve A, Krishnan V, et al. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2019, 143: 3-21.
- [77] Zhu M, Nie G, Meng H, et al. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate[J]. *Accounts of chemical research*, 2013, 46(3): 622-631.
- [78] Moradi Kashkooli F, Soltani M, Momeni M M, et al. Enhanced drug delivery to solid tumors via drug-loaded nanocarriers: An image-based computational framework[J]. *Frontiers in oncology*, 2021, 11: 655781.
- [79] Yu J, Wang J, Zhang Y, et al. Glucose-responsive insulin patch for the regulation of blood glucose in mice and minipigs[J]. *Nature biomedical engineering*, 2020, 4(5): 499-506.
- [80] Yu J, Wang J, Zhang Y, et al. Glucose-responsive insulin patch for the regulation of blood glucose in mice and minipigs[J]. *Nature biomedical engineering*, 2020, 4(5): 499-506.
- [81] Schultz C W, Ruiz de Garibay G, Langer A, et al. Selecting the optimal parameters for sonoporation of pancreatic cancer in a pre-clinical model[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2021, 22(3): 204-215.
- [82] Snipstad S, Mørch Ý, Sulheim E, et al. Sonopermeation enhances uptake and therapeutic effect of free and encapsulated cabazitaxel[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2021, 47(5): 1319-1333.
- [83] Ter Haar G. HIFU tissue ablation: concept and devices[J]. *Therapeutic ultrasound*, 2016(1): 3-20.
- [84] Meng Y, Hynynen K, Lipsman N. Applications of focused ultrasound in the brain: from thermoablation to drug delivery[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2021, 17(1): 7-22.
- [85] Ouyang J, Tang Z, Farokhzad N, et al. Ultrasound mediated therapy: Recent progress and challenges in nanoscience[J]. *Nano Today*, 2020, 35: 100949.
- [86] Hornsby T K, Kashkooli F M, Jakhmola A, et al. Multiphysics modeling of low-intensity pulsed ultrasound induced chemotherapeutic drug release from the surface of gold nanoparticles[J]. *Cancers*, 2023, 15(2): 523.

- [87] Hornsby T, Jakhmola A, Kolios M C, et al. Significance of non-thermal effects in LIPUS induced drug release from gold nanoparticle drug carriers[C]//2021 IEEE UFFC Latin America Ultrasonics Symposium (LAUS). IEEE, 2021: 1-4.
- [88] Zhang L, Lin Z, Zeng L, et al. Ultrasound-induced biophysical effects in controlled drug delivery[J]. *Science China Life Sciences*, 2021(1): 1-13.
- [89] Ahmadi A, Hosseini-Nami S, Abed Z, et al. Recent advances in ultrasound-triggered drug delivery through lipid-based nanomaterials[J]. *Drug Discovery Today*, 2020, 25(12): 2182-2200.
- [90] Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery[J]. *Nature biotechnology*, 2015, 33(9): 941-951.
- [91] Deprez J, Lajoinie G, Engelen Y, et al. Opening doors with ultrasound and microbubbles: Beating biological barriers to promote drug delivery[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2021, 172: 9-36.
- [92] Roberts J W, Powlovich L, Sheybani N, et al. Focused ultrasound for the treatment of glioblastoma[J]. *Journal of Neuro-oncology*, 2022, 157(2): 237-247.
- [93] Jo S H, Sun I C, Ahn C H, et al. Recent trend of ultrasound-mediated nanoparticle delivery for brain imaging and treatment[J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2022, 15(1): 120-137.
- [94] Barua S, Mitragotri S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: a review of current status and future prospects[J]. *Nano today*, 2014, 9(2): 223-243.
- [95] World cancer report[M]. Lyon: IARC press, 2003.
- [96] American Cancer Society. Breast cancer facts & figures[M]. American Cancer Society, 2007.
- [97] Duncan R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines[J]. *Nature reviews cancer*, 2006, 6(9): 688-701.
- [98] Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges[J]. *Nature reviews cancer*, 2005, 5(3): 161-171.
- [99] Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease[J]. *Pharmaceutical research*, 2006, 23: 1417-1450.
- [100] Torchilin V P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers[J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2005, 4(2): 145-160.
- [101] Hong S, Leroueil P R, Majoros I J, et al. The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform[J]. *Chemistry & biology*, 2007, 14(1): 107-115.

- [102] Couvreur P, Kante B, Roland M, et al. Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and their release in calf serum[J]. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1979, 68(12): 1521-1524.
- [103] Guo R, Zhang L, Jiang Z, et al. Synthesis of alginate-chitosan-coated poly [2-(diethylamino) ethyl methacrylate] monodispersed nanoparticles by a polymer-monomer pair reaction system[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(3): 843-850.
- [104] Ahmed F, Pakunlu R I, Srinivas G, et al. Shrinkage of a rapidly growing tumor by drug-loaded polymersomes: pH-triggered release through copolymer degradation[J]. *Molecular pharmaceutics*, 2006, 3(3): 340-350.
- [105] Torchilin V P. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives[J]. *Pharmaceutical research*, 2007, 24: 1-16.
- [106] Sapra P, Allen T M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs[J]. *Progress in lipid research*, 2003, 42(5): 439-462.
- [107] Huang K, Huang J, Zhao J, et al. Natural lotus root-based scaffolds for bone regeneration[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2022, 33(4): 1941-1945.
- [108] Lin X, Patil S, Gao Y G, et al. The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration[J]. *Frontiers in pharmacology*, 2020, 11: 521497.
- [109] Halper J. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: fibronectin, fibrinogen, laminin, elastin, fibrillins, fibulins, matrilins, tenascins and thrombospondins[J]. *Progress in heritable soft connective tissue diseases*, 2021(1): 105-126.
- [110] Hashemi S, Mohammadi Amirabad L, Farzad-Mohajeri S, et al. Comparison of osteogenic differentiation potential of induced pluripotent stem cells and buccal fat pad stem cells on 3D-printed HA/ $\beta$ -TCP collagen-coated scaffolds[J]. *Cell and Tissue Research*, 2021, 384: 403-421.
- [111] Lemos R, Maia F R, Reis R L, et al. Engineering of Extracellular Matrix-Like Biomaterials at Nano-and Macroscale toward Fabrication of Hierarchical Scaffolds for Bone Tissue Engineering[J]. *Advanced NanoBiomed Research*, 2022, 2(2): 2100116.
- [112] Xing F, Yin H M, Zhe M, et al. Nanotopographical 3D-printed poly ( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds enhance proliferation and osteogenic differentiation of urine-derived stem cells for bone regeneration[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(7): 1437.
- [113] Chu Y S, Wong P C, Jang J S C, et al. Combining Mg-Zn-Ca Bulk Metallic Glass with a Mesoporous Silica Nanocomposite for Bone Tissue Engineering[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(5): 1078.
- [114] Hao Z, Ren L, Zhang Z, et al. A multifunctional neuromodulation platform utilizing Schwann cell-derived exosomes orchestrates bone microenvironment via im

---

munomodulation, angiogenesis and osteogenesis[J]. *Bioactive Materials*, 2023, 23: 206-222.

## 致谢

时光如白驹过隙，转眼三年硕士生涯即将画上句号。回顾这三年来的学习时光，有过艰辛，有过迷惑，有过开心，也有过感动。在学位论文即将完成之际，我在这里要对硕士期间给与我帮助的热和鼓励的人表示由衷的感激。

首先我要感谢的是我的导师阮智教授，整个硕士期间，我的恩师无论是在学业上还是生活中都给与我很大的帮助。但我的恩师从我刚到学校便对我悉心关怀，积极帮助我解决生活中遇到的难题，闲暇之余也会组织团建活动，虽然离家万里，但却让我有了一种家的感觉。

其次我要感谢武汉同济医学院附属协和医院骨科的师兄们，首先我要感谢王琨师兄，给与我这三年向武汉师兄们学习的机会，并且在我整个课题的执行过程中给与了耐心的指导和坚定不移的支持。

最后，我要感谢我的家人，在我攻读硕士学位的三年里，我的父母对我给予了最大程度的理解，关心和支持，三年的硕士时光，总有彷徨的时候，每每在这个时候，我的父母都会坚定不移的站在我的身后，成为我最坚固的后盾，帮助我跨越障碍。

如今，毕业在即，我会铭记各位老师与师兄们的教诲，继续努力，以崭新的姿态面对即将到来的工作与生活。

## 作者简介

毛润泽，男，出生于 1997 年 10 月，籍贯河北省沧州市。2020 年毕业于华北理工大学麻醉学专业，获医学学士学位。2021 年考入石河子大学医学院，就读外科学专业，攻读硕士学位，主要从事普通外科的研究工作。


研究生期间在校期间曾获得校级三等奖学金，2021 至 2023 学年作为课题组自然项目“LncRNA NEAT1 的 m6A 修饰在椎间盘退变中的保护作用及其机制研究”负责人委派至华中科技大学同济医学院进行科研。系统掌握了临床科研的思路与流程，可单独设计课题，同时熟练操作各项实验技能。

在校期间主要参与的研究项目：

参加了国家自然科学基金项目《LncRNA NEAT1 的 m6A 修饰在椎间盘退变中的保护作用及其机制研究》的研究工作

参加了石河子市社会发展科技攻关与成果转化类项目《保留颈后伸肌群的颈椎椎板成形术的临床疗效分析》的部分研究工作

## 石河子大学硕士研究生学位论文 导师评阅表

研究生姓名	毛润泽	学制	三年制
专业	外科学	研究方向	骨科
<p>学术评语:</p> <p>该生具有扎实的理论基础和专业知识,并经常结合实践加以思考,可以将理论知识更好地与实践工作结合起来,具有很强的自我学习能力和认真严谨的科研态度,生活中与同学友好相处,相互帮助,学习上严格要求,积极进取。科研中认真负责,始终保持严谨的科研态度。</p> <p>经过三年的研究生培养,该生的科研能力及学术水平得到了极大的提升,能够熟练应对科研中遇到的困难,外语水平较好,能熟练地阅读国内外最新的研究进展,并加以总结归纳,应用到实际科研中。研究生期间,按期完成了学术论文的撰写工作,书写规范,内容详实,具有一定创新性,临床实用性具有较大的价值。</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;">                 指导教师签字:                   2024年10月22日             </div>			