

可注射水凝胶再生修复退变髓核的研究进展

李名广, 黄卫*

三峡大学附属仁和医院骨科, 湖北 宜昌

收稿日期: 2024年8月10日; 录用日期: 2024年9月2日; 发布日期: 2024年9月11日

摘要

目的: 可注射水凝胶再生修复退变髓核的研究进展进行综述。方法: 广泛查阅近年来国内外相关研究文献, 对不同类型可注射水凝胶用于髓核再生修复研究进展进行总结。结果: 可注射水凝胶在机械性能、组织相容性、微创置入及负载生物活性物质等方面具有优势, 目前关于可注射水凝胶在髓核再生修复的临床研究也取得了较好的结果, 但其临床转化还需解决机械强度匹配、水凝胶泄露移位的问题。结论: 可注射水凝胶的特性可以实现水凝胶的微创化置入, 在成分和结构上模拟原生髓核组织, 恢复髓核微环境和生物力学功能, 同时可以作为生物活性物质的载体促进髓核再生, 在髓核修复领域具有广阔的应用场景。

关键词

髓核, 组织再生, 可注射水凝胶

Research Progress of Injectable Hydrogel for Regeneration and Repair of Degenerated Nucleus Pulposus

Mingguang Li, Wei Huang*

Department of Orthopedic Surgery, Affiliated Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang Hubei

Received: Aug. 10th, 2024; accepted: Sep. 2nd, 2024; published: Sep. 11th, 2024

Abstract

Objective: To review the research progress of injectable hydrogel for regeneration and repair of degenerated nucleus pulposus. **Methods:** The related research literature at home and abroad in

*通讯作者。

文章引用: 李名广, 黄卫. 可注射水凝胶再生修复退变髓核的研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(9): 421-427.

DOI: 10.12677/acm.2024.1492478

recent years was extensively reviewed, and the research progress of different types of injectable hydrogels for nucleus pulposus regeneration and repair was summarized. Results: Injectable hydrogel has advantages in mechanical properties, histocompatibility, minimally invasive implantation and loading of bioactive substances. At present, the clinical research of injectable hydrogel in the regeneration and repair of nucleus pulposus has also achieved good results, but its clinical transformation still needs to solve the problems of mechanical strength matching, hydrogel leakage and displacement. Conclusion: The characteristics of injectable hydrogel can realize the minimally invasive implantation of hydrogel, simulate the original nucleus pulposus tissue in composition and structure, restore the microenvironment and biomechanical function of nucleus pulposus, and can be used as a carrier of bioactive substances to promote the regeneration of nucleus pulposus, which has a broad application scenario in the field of nucleus pulposus repair.

Keywords

Nucleus Pulposus, Tissue Regeneration, Injectable Hydrogel

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着经济发展以及生活方式的改变,患有下腰痛(low back pain, LBP)的人群正与日俱增,目前已发展成为全世界较为普遍的疾病,在 WHO 提出的伤残调整生命年(disability-adjusted life years, DALYs)这项疾病负担的衡量标准中, LBP 引起的 DALYs 减少排名第一[1]-[3]。引起 LBP 的因素较多,一是机体本身的原因,包括椎间盘的退行性改变、免疫因素以及遗传因素等;二是因为劳损、外伤、长期震动、妊娠、吸烟、受寒、腰椎穿刺以及某些疾病累及等因素[4]。而这些病因最终都会导致一个椎间盘的基础病理改变-椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IVDD)。多项研究表明长期患有 LBP 与 IVDD 的发生有直接相关性[5]。椎间盘退变的特征性改变是椎间盘内细胞及细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)中营养物质的减少,主要表现为髓核(nucleus pulposus, NP)中蛋白聚糖及胶原含量的下降以及伴随水分的丢失,这一改变被认为是导致椎间盘退变的关键原因[6]。如何修复退变髓核是 IVDD 治疗目前尚未解决的难题,尚无修复退变碎裂髓核、重建椎间盘生物力学功能的有效手段。椎间盘退变现有的治疗方式包括保守治疗以及手术治疗,但以上方式均无法从病因上解决问题,其临床效果及预后并不理想[7]。目前, IVDD 的生物治疗(基因治疗、细胞治疗、组织工程)着眼于从根本上改变退变椎间盘生理环境从而抑制 IVDD 的进展,因此成为现在 IVDD 的研究热点之一。对于 IVDD 的生物治疗的研究主要集中在髓核退变及再生修复的基础研究上。当前 IVDD 的研究热点聚焦于椎间盘置换、3D 打印、基因疗法等,随着生物材料的兴起,生物材料中的髓核组织工程为治疗 IVDD 带来了新的策略方法,成为 IVDD 治疗的研究热点之一。可注射水凝胶是通过微创手术恢复椎间盘退变引起的椎间盘厚度和水化的最新方法。可注射水凝胶易于原位成型,能很好地填充缺陷部位,并具有良好的渗透性[8]。本文将就可注射水凝胶在治疗髓核退变中的应用进展做一综述。

2. 髓核结构、功能与病理

椎间盘是一个特殊结构,是人体内最大的无血供组织,由不同的亚结构组成:位于中心的髓核(nucleus pulposus, NP),在外层包绕 NP 的纤维软骨纤维环(AF)以及上下软骨终板构成[9][10]。髓核(NP)是一种高

度水化的胶质组织,主要是水,有多分散的带负电荷的蛋白多糖和多种胶原蛋白(主要是II型)和非胶原蛋白[11]。除了胶原蛋白和蛋白多糖外,NP中还含有大量的弹性蛋白、纤维连接蛋白和层粘连蛋白[12][13]。在高负荷下,NP受到纵向挤压,将NP组织间液通过外纤维环(AF)和软骨终板(CEP)流向低压区域,导致椎间盘高度降低,AF受到横向的压力向外膨出,这也是NP主要由抗压缩力的II型胶原纤维组成,而AF主要由抗张力强的I型胶原纤维组成的原因[14][15]。在这个过程中,中央胶状髓核(NP)渗透性增加,当负荷减小进入恢复期间,这一过程被椎间盘内部的高渗透压所逆转,导致液体流向NP在这个循环中,随着液体流动而发生的营养物质代谢物交换维持了椎间盘细胞内稳态。NP和AF被认为是无血管、淋巴和主要无神经的,有实质性的营养运输发生在带血管化的椎骨和IVD的亚结构之间[16]。因此,NP和AF中的液体流动对椎间盘的正常形态和功能是极为重要的。终板主要由透明软骨组成,是NP与AF和高度血管化椎体之间的接口,是维持椎间盘机械完整性和血管腔室与无血管腔室分离的关键。椎间盘退变的特征性改变是椎间盘内细胞及细胞外基质(ECM)中营养物质的减少,主要表现为髓核中蛋白聚糖及胶原含量的下降以及伴随水分的丢失,这一改变被认为是导致椎间盘退变的关键原因。

3. 可注射生物水凝胶对髓核的再生与修复

由于认识到髓核修复对椎间盘退变的重要性,目前对于髓核修复的研究也在不断的开展,而生物材料在最近的髓核组织工程研究中受到广泛的关注。近年来,水凝胶已经成为最有前途的可注射材料之一。并且,可注射水凝胶作为一种拥有3D多孔结构的支架,具有良好的负载药物、细胞、生物活性因子的能力。更重要的是,可注射水凝胶可以通过注射器注射的方式,实现微创治疗,减少支架植入导致的纤维环破坏、创伤过大等副作用。因此,在许多报道中,可注射水凝胶被认为是最合适的髓核组织工程学再生支架。

由于髓核的特殊解剖结构及位置,用于髓核修复和再生的生物材料应该具有以下特性:①良好的力学性能和自适应性,以填充髓核内不规则的空间达到恢复椎间隙高度、承受脊柱负荷并提供活动度;②良好的生物相容性及可降解性,材料及降解产物对自身组织和细胞无明显的毒性;③可注射性,可以通过微创的方式将材料置入髓核内,从而对其他组织无明显影响[4]。而生物材料修复和再生髓核的主要目的就是:①恢复髓核内环境,补充ECM并促进ECM的合成;②补充髓核内细胞或促进髓核内细胞的生长增殖;③恢复脊柱稳定性和活动度,为髓核再生和修复提供空间支持[17]。可注射水凝胶作为一种生物材料,具有多孔、亲水以及易于改性的特性。这样的特性可是使得水凝胶可以被制备成与不同生物组织相类似的结构、机械性能和生物特性。

4. 可注射水凝胶的分类

根据实现水凝胶的成型方式可以将水凝胶分成原位交联水凝胶和前体溶液响应性水凝胶。可注射的原位交联水凝胶往往是一个不断交联的过程,以诱导前体溶液进行不断地从“溶液-凝胶”转变。近些年来,各种不同的化合物被用作物理或者化学交联形成原位交联水凝胶。例如,运用海藻酸钠和 Ca^{2+} 的物理交联体系,通过 Ca^{2+} 和海藻酸盐反应形成的“蛋盒”结构,不断的交联形成水凝胶[18]。Liang等人[19]通过过氧化氢/辣根过氧化物酶体系,实现了明胶/壳聚糖水凝胶的原位交联,用于药物的递送。Mekhail等人[20]通过5'-二磷酸鸟苷(GDP)交联壳聚糖海绵具有更好的性能,并且它们在不需外部刺激的情况下在不到1.6秒的时间内凝胶化。同时,GDP是一种细胞成分具有良好的细胞相容性及中枢神经治疗效果。但是由于这一类水凝胶往往需要通过特殊的注射器才能实现不断地交联,并且还存在着接触面交联导致交联不全不均匀的问题。因此,另一种前体溶液响应性水凝胶应运而生。这一类可注射水凝胶往往是注射前体溶液至体内指定部位,通过指定的刺激后形成溶胶-凝胶化过程。这类刺激往往是物理的,例如

温度、pH、紫外光等;在文献中被广泛研究的热敏性壳聚糖/ β -甘油磷酸酯水凝胶在 37℃ 下在 4~9 分钟内凝胶;PNIPAAm 是一种热敏性聚合物,由于其在 32 摄氏度可以发生迅速的可逆的“溶胶-凝胶”转变被广泛运用与可注射水凝胶,并且其和其他非热敏聚合物混合后,可以使其他聚合物产生热敏行为[21]。光诱导交联光诱导交联或光聚合是另一种流行的凝胶机制,通过该机制可注射水凝胶经历溶胶-凝胶转变,例如 chen 等人[22]开发了一种光交联明胶-甲基丙烯酸透明质酸(GelHA)水凝胶,通过注射前提溶液到髓核内,使用紫外光交联后产生水凝胶。最后, Alimirzaei 等人[23]报道了一种 pH 敏感的壳聚糖水凝胶,用于包裹人脂肪间充质干细胞(HADSCs)。当达到生理 pH 时,这种水凝胶经历了从溶胶到凝胶的转变。他们发现这种水凝胶能够在几秒钟内完成从溶胶到凝胶的转变。

5. 可注射水凝胶在髓核组织再生中的应用

5.1. 可注射水凝胶髓核假体

可注射人工髓核假体治疗髓核退变具有较长的一段历史,这种治疗策略的主要目的在于恢复髓核的生物力学(恢复椎间盘高度和脊柱活动度)特性,而对于生物学特性(如髓核细胞的生长、分化、信号转导等)的关注较少[24]。2006 年,美国 Spine Wave 公司开发出名为 NuCore™ 的可注射髓核,这种可注射髓核是由丝素、弹性蛋白聚合溶液和多功能的交联剂组成。通过广泛的机械测试、生物相容性和毒理学测试显示,该材料与天然髓核的蛋白质含量、水分含量、pH 值和弹性模量非常接近。另一种可注射髓核 BioDisc™ 和 NuCore™ 的方法类似,使用的是戊二醛交联的白蛋白基材料。常用的原位成型的髓核植入物材料主要为含有大量糖胺聚糖的天然蛋白质,如透明质酸(HA)、胶原、丝素蛋白等[25]。大量的糖胺聚糖使得这些材料在成份上呈现出类似天然的细胞外基质的特性,然而,尽管他们呈现出“类 ECM”的特性[26],但是他们单纯的作为材料与髓核内的细胞的相互作用一直没得到深入的研究。这些类似物似乎有可能在不久的将来走向临床应用,但是可能会出现生物相互作用和与其他结构的机械负荷分担的新问题。为了增强可注射水凝胶的机械性能, Gan 等人通过将葡聚糖和明胶作为主要网络,聚乙二醇为辅助网络制备了一种互穿网络(IPN)增强水凝胶[27]。通过调配两种网络的比例,在体内光交联得到了与髓核相似的力学性能和韧性的水凝胶。这种水凝胶的韧性和延展性为 NP 在压缩和耐压力挤出条件下的再生提供了一个长期的再生模板。可注射髓核假体的优势在于可微创操作性,可以和髓核空腔良好的适配;但是同时也存在水凝胶泄露、聚合过程中发生热损伤等风险。并且,人工髓核只是着眼于恢复结构,从空间上替换髓核,而不能达到再生和修复生物学功能作用。

5.2. 可注射水凝胶为载体的细胞疗法

NP 内固有细胞群的数量减少及其表型的改变可能是 NP 降解、失水以及失去节段功能和稳定性的最早因素。髓核组织的细胞密度非常低,只有 $2\sim5\times10^6/\text{mL}$,而且随着年龄的增长而减少,维持细胞密度和充足的营养供应通常被认为是成功的基于生物的再生策略的关键[28] [29]。因此, NP 内细胞的补充引起了学者们广泛的研究,研究发现,不同来源、不同类型的原代细胞都能在 NP 内合成和储存某种类型的胶原和糖胺聚糖,尽管对于这种现象的靶向成分尚无一致的意见[30]。目前已经有多种的治疗 NP 退变或用于 NP 再生的细胞产品处于临床试验阶段,其中德国一种产品已经上市,用于治疗椎间盘切除术的患者术后的 NP 再生。但是,已经产生退变的 NP 中内环境的变化可能对移植细胞的功能产生影响。如果通过对生物材料进行设计,让生物材料作为细胞输送的载体,改变移植细胞的生存环境,可能会对 NP 治疗的结果产生影响。通过建立兔或大鼠的 IVDD 模型,一些早期的研究比较了单纯注射 MSCs 和植入负载了 MSCs 的胶原凝胶到兔或大鼠的 NP 中的效果。研究表明,植入了含细胞的胶原纤维凝胶组可以在植入后可以较长时间的保持椎间盘高度、核磁共振下的髓核信号强度以及正常的组织学形态。这一研究表明了

细胞外基质对细胞的生存十分重要, 通过生物材料模拟细胞外基质的同时负载细胞对 NP 进行治疗具有广阔的前景。而单纯的注射 MSCs 和温敏性水凝胶还是存在细胞悬液因椎间盘内高压而从注射部位挤出的问题, 导致治疗失败。因此, Zeng [17] 等人通过将 MSCs 包裹在海藻酸盐前体中, 并将其负载到 PGEDA 凝胶中, 制成了可注射的负载细胞的 3D 水凝胶。这种可注射水凝胶不但可以有效的负载和保护细胞对髓核进行再生和修复, 还可以通过双重结构对凝胶的机械性能进行增强。综上所述, 虽然 MSCs 细胞疗法在 IVDD 治疗中取得一些有效的结果, 如为 IVD 细胞的分化, 并显著促进 IVD 组织中 ECM 的合成, 并改善 IVDD 患者的临床结局。但是由于细胞外基质存在组织特异性, 人工合成的载体还是存在 MSCs 存活率低和多向分化不受控制的问题。因此, Shao 等人将牛的髓核脱细胞后合成为可注射水凝胶, 并将人骨髓源性间充质细胞在支架上共培养[31]。这项研究发现和髓核脱细胞水凝胶共培养的 hBMSCs 会逐渐分化为 NP 细胞。这说明 NP 细胞的特异性分化依赖于细胞外基质成分和空间特征。由于可注射水凝胶的可塑性, 这为后期的可注射水凝胶的仿生设计, 模仿细胞基质的成分和空间特征, 并保持其功能的 ECM 成分, 为修复变性的 NP 提供有效的治疗策略。

5.3. 可注射水凝胶为载体的非细胞疗法

虽然细胞疗法在 NP 修复和再生中有广泛的运用, 但是细胞的生存和储存条件限制了细胞疗法的临床推广。因此学者们开始研究生物材料和非细胞物质的结合用于治疗 NP 退变和 NP 再生。目前研究的着重点主要集中在生物材料和各类生长因子, 药物的结合。Growney 等人将富血小板血浆负载到海藻酸盐水凝胶中, 制成了负载 PRP 的可注射水凝胶[32]。海藻酸盐是一种高度可塑性的生物相容性聚合物, 其性能可以调整以模拟天然髓核(NP)组织的特性。富含血小板血浆(PRP)是一种易于获得、价格低廉、易于获得的促再生因子混合物。通过将藻酸盐与 PRP 功能化, 经过机械优化的生物活性藻酸盐 NP 类似物可以刺激 NP 细胞在更长的时间内增殖和积累基质。但是这样的生长因子负载方式没有对 PRP 进行额外保护, 导致 PRP 会在短时间内“爆释”, 无法实现长期的治疗。除了生长因子外, 还有些药物也被负载到可注射水凝胶中。在一些研究中发现, 在人和大鼠退行性 IVD 中都检测到异常的 EGFR 激活水平。Pan 等人[33]通过实验证明 EGFR 缺失增加了髓核内 ECM 的产生, 因此他们将吉非替尼(一种 EGFR 抑制剂)负载到一种温敏型可注射水凝胶中, 实现了长达 10 天的吉非替尼释放, 并有效地促进了 ECM 的合成。在大鼠 IVD 模型的治疗中, MRI 信号强度和 DHI 明显恢复。随着基因技术的不断发展, 通过对退变的髓核组织差异性基因进行分析, 不断发现与髓核退变相关的基因。由此, 通过传递合成的 miRNA 来调节基因表达水平, 为椎间盘退变提供了一种理想的治疗方法。Chen 等人[24]将一种胆固醇、甲基化和硫代磷酸修饰的 miRNA-Agomir 加入到了由四臂聚乙二醇水凝胶中, 合成了一种可注射、自愈合、抗菌等多重作用的水凝胶。通过将该水凝胶注射到髓核内, 原位构建了基因-水凝胶微环境, 减少了 MMPs 的表达, 促进了组织微环境的再生。

6. 展望

综上所述, 可注射水凝胶既可作为携带生长因子的载体, 诱导髓核细胞分化, 促进 ECM 合成, 又可通过负载药物及基因抑制 IVD 炎症反应和沉默相关致病基因, 缓解 IVD 进程并修复 NP。同时, 可注射水凝胶还可负载 IVD 细胞, 从而有效补充髓核退变过程中丢失的 IVD 细胞和细胞外基质成分。此外, 可注射水凝胶还能构建 IVD 适宜微环境, 从而形成髓核再生的组织再生支架。而由于可注射水凝胶的可注射性能, 因此, 可注射水凝胶移植有可能成为外科微创治疗 IVDD 的有效手段。

作者贡献

李名广: 综述设计、文献检索和文章撰写; 黄卫: 文章审阅及指导修改。

基金项目

本文章受到湖北省自然科学基金面上项目: No. 2022CFB098 的支持。

利益冲突

在文章撰写过程中不存在利益冲突; 基金支持未影响文章观点及报道。

参考文献

- [1] Cieza, A., Causey, K., Kamenov, K., Hanson, S.W., Chatterji, S. and Vos, T. (2020) Global Estimates of the Need for Rehabilitation Based on the Global Burden of Disease Study 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, **396**, 2006-2017. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32340-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32340-0)
- [2] Murray, C.J.L. and Lopez, A.D. (2013) Measuring the Global Burden of Disease. *New England Journal of Medicine*, **369**, 448-457. <https://doi.org/10.1056/nejmra1201534>
- [3] Deyo, R.A. and Weinstein, J.N. (2001) Low Back Pain. *New England Journal of Medicine*, **344**, 363-370. <https://doi.org/10.1056/nejm200102013440508>
- [4] Bowles, R.D. and Setton, L.A. (2017) Biomaterials for Intervertebral Disc Regeneration and Repair. *Biomaterials*, **129**, 54-67. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.013>
- [5] Sampara, P., Banala, R.R., Vemuri, S.K., Av, G.R. and Gpv, S. (2018) Understanding the Molecular Biology of Intervertebral Disc Degeneration and Potential Gene Therapy Strategies for Regeneration: A Review. *Gene Therapy*, **25**, 67-82. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0004-0>
- [6] Xia, C., Zeng, Z., Fang, B., Tao, M., Gu, C., Zheng, L., et al. (2019) Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Intervertebral Disc Degeneration via Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects. *Free Radical Biology and Medicine*, **143**, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.026>
- [7] Zhu, M., Tan, J., Liu, L., Tian, J., Li, L., Luo, B., et al. (2021) Construction of Biomimetic Artificial Intervertebral Disc Scaffold via 3D Printing and Electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*, **128**, Article ID: 112310. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112310>
- [8] Wang, F., Nan, L., Zhou, S., Liu, Y., Wang, Z., Wang, J., et al. (2019) Injectable Hydrogel Combined with Nucleus Pulposus-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Degenerative Intervertebral Disc in Rats. *Stem Cells International*, **2019**, Article ID: 8496025. <https://doi.org/10.1155/2019/8496025>
- [9] Malandrino, A., Lacroix, D., Hellmich, C., Ito, K., Ferguson, S.J. and Noailly, J. (2014) The Role of Endplate Poromechanical Properties on the Nutrient Availability in the Intervertebral Disc. *Osteoarthritis and Cartilage*, **22**, 1053-1060. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.05.005>
- [10] Rodriguez, A.G., Slichter, C.K., Acosta, F.L., Rodriguez-Soto, A.E., Burghardt, A.J., Majumdar, S., et al. (2011) Human Disc Nucleus Properties and Vertebral Endplate Permeability. *Spine*, **36**, 512-520. <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e3181f72b94>
- [11] Roughley, P.J. (2004) Biology of Intervertebral Disc Aging and Degeneration: Involvement of the Extracellular Matrix. *Spine*, **29**, 2691-2699. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146101.53784.b1>
- [12] Melrose, J., Ghosh, P. and Taylor, T.K.F. (2001) A Comparative Analysis of the Differential Spatial and Temporal Distributions of the Large (Aggrecan, Versican) and Small (Decorin, Biglycan, Fibromodulin) Proteoglycans of the Intervertebral Disc. *Journal of Anatomy*, **198**, 3-15. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19810003.x>
- [13] Sztrolovics, R., Alini, M., Mort, J.S. and Roughley, P.J. (1999) Age-Related Changes in Fibromodulin and Lumican in Human Intervertebral Discs. *Spine*, **24**, 1765. <https://doi.org/10.1097/00007632-199909010-00003>
- [14] Schultz, A., Andersson, G., Ortengren, R., Haderspeck, K. and Nachemson, A. (1982) Loads on the Lumbar Spine. Validation of a Biomechanical Analysis by Measurements of Intradiscal Pressures and Myoelectric Signals. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, **64**, 713-720. <https://doi.org/10.2106/00004623-198264050-00008>
- [15] Adams, M.A., McNally, D.S. and Dolan, P. (1996) "Stress" Distributions Inside Intervertebral Discs. The Effects of Age and Degeneration. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **78**, 965-972. <https://doi.org/10.1302/0301-620x78b6.1287>
- [16] Chrastil, J. and Patel, A.A. (2012) Complications Associated with Posterior and Transforaminal Lumbar Interbody Fusion. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, **20**, 283-291. <https://doi.org/10.5435/jaaos-20-05-283>
- [17] Zeng, Y., Chen, C., Liu, W., Fu, Q., Han, Z., Li, Y., et al. (2015) Injectable Microcryogels Reinforced Alginate Encapsulation of Mesenchymal Stromal Cells for Leak-Proof Delivery and Alleviation of Canine Disc Degeneration. *Biomaterials*, **59**, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.029>
- [18] Aderibigbe, B. and Buyana, B. (2018) Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics*, **10**, Article No. 42.

- <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020042>
- [19] Liang, Y., Zhao, X., Hu, T., Han, Y. and Guo, B. (2019) Mussel-Inspired, Antibacterial, Conductive, Antioxidant, Injectable Composite Hydrogel Wound Dressing to Promote the Regeneration of Infected Skin. *Journal of Colloid and Interface Science*, **556**, 514-528. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.08.083>
 - [20] Mekhail, M., Daoud, J., Almazan, G. and Tabrizian, M. (2013) Rapid, Guanosine 5'-Diphosphate-Induced, Gelation of Chitosan Sponges as Novel Injectable Scaffolds for Soft Tissue Engineering and Drug Delivery Applications. *Advanced Healthcare Materials*, **2**, 1126-1130. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200371>
 - [21] Alexander, A., Ajazuddin, Khan, J., Saraf, S. and Saraf, S. (2014) Polyethylene Glycol (PEG)-Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) Based Thermosensitive Injectable Hydrogels for Biomedical Applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **88**, 575-585. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.07.005>
 - [22] Chen, P., Ning, L., Qiu, P., Mo, J., Mei, S., Xia, C., et al. (2019) Photo-Crosslinked Gelatin-Hyaluronic Acid Methacrylate Hydrogel-Committed Nucleus Pulposus-Like Differentiation of Adipose Stromal Cells for Intervertebral Disc Repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **13**, 682-693. <https://doi.org/10.1002/term.2841>
 - [23] Alimirzaei, F., Vasheghani-Farahani, E., Ghiaseddin, A., et al. (2017) pH-Sensitive Chitosan Hydrogel with Instant Gelation for Myocardial Regeneration. *Journal of Tissue Science & Engineering*, **8**, Article ID: 1000212. <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000212>
 - [24] Chen, W., Chen, H., Zheng, D., Zhang, H., Deng, L., Cui, W., et al. (2019) Gene-Hydrogel Microenvironment Regulates Extracellular Matrix Metabolism Balance in Nucleus Pulposus. *Advanced Science*, **7**, Article ID: 1902099. <https://doi.org/10.1002/adv.201902099>
 - [25] Hu, J., Chen, B., Guo, F., Du, J., Gu, P., Lin, X., et al. (2012) Injectable Silk Fibroin/Polyurethane Composite Hydrogel for Nucleus Pulposus Replacement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **23**, 711-722. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4533-y>
 - [26] Sivan, S.S., Roberts, S., Urban, J.P.G., Menage, J., Bramhill, J., Campbell, D., et al. (2014) Injectable Hydrogels with High Fixed Charge Density and Swelling Pressure for Nucleus Pulposus Repair: Biomimetic Glycosaminoglycan Analogues. *Acta Biomaterialia*, **10**, 1124-1133. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.11.010>
 - [27] Gan, Y., Li, P., Wang, L., Mo, X., Song, L., Xu, Y., et al. (2017) An Interpenetrating Network-Strengthened and Toughened Hydrogel That Supports Cell-Based Nucleus Pulposus Regeneration. *Biomaterials*, **136**, 12-28. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.017>
 - [28] Maroudas, A., Stockwell, R.A., Nachemson, A., et al. (1975) Factors Involved in the Nutrition of the Human Lumbar Intervertebral Disc: Cellularity and Diffusion of Glucose *in Vitro*. *Journal of Anatomy*, **120**, 113-130.
 - [29] Boubriak, O.A., Watson, N., Sivan, S.S., Stubbens, N. and Urban, J.P.G. (2013) Factors Regulating Viable Cell Density in the Intervertebral Disc: Blood Supply in Relation to Disc Height. *Journal of Anatomy*, **222**, 341-348. <https://doi.org/10.1111/joa.12022>
 - [30] del Rosario, C., Rodríguez-Évora, M., Reyes, R., Delgado, A. and Évora, C. (2015) BMP-2, PDGF-BB, and Bone Marrow Mesenchymal Cells in a Macroporous β -TCP Scaffold for Critical-Size Bone Defect Repair in Rats. *Biomedical Materials*, **10**, Article ID: 045008. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/4/045008>
 - [31] Cui, P., Pan, P., Qin, L., Wang, X., Chen, X., Deng, Y., et al. (2023) Nanoengineered Hydrogels as 3D Biomimetic Extracellular Matrix with Injectable and Sustained Delivery Capability for Cartilage Regeneration. *Bioactive Materials*, **19**, 487-498. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.032>
 - [32] Growney, E.A., Linder, H.R., Garg, K., Bledsoe, J.G. and Sell, S.A. (2019) Bio-Conjugation of Platelet-Rich Plasma and Alginate through Carbodiimide Chemistry for Injectable Hydrogel Therapies. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **108**, 1972-1984. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34538>
 - [33] Pan, Z., Sun, H., Xie, B., Xia, D., Zhang, X., Yu, D., et al. (2018) Therapeutic Effects of Gefitinib-Encapsulated Thermosensitive Injectable Hydrogel in Intervertebral Disc Degeneration. *Biomaterials*, **160**, 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.016>