

前交叉韧带组织工程支架及其构建的研究进展

张科技 张文元

摘 要 目前临床重建前交叉韧带使用的材料包括自体移植物、异体移植物和人工合成材料,但均存在难以克服的问题。组织工程技术的发展和应用于前交叉韧带重建提供了新的思路、方法和途径。目前用于前交叉韧带组织工程支架材料有天然生物材料和合成高分子材料,本文对利用组织工程技术重建前交叉韧带的支架材料及其构建做一综述。

关键词 组织工程 前交叉韧带 支架材料 蚕丝 构建

中图分类号 R318

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.048

随着全民健身及体育运动的职业化的发展,韧带损伤的发生率也逐年提高,其中大部分为膝部韧带损伤,而大部分膝部韧带损伤发生在前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)。ACL 断裂是最常见的膝关节损伤之一,发生率一般为 1/3000,由于 ACL 的血管化能力有限,交叉韧带损伤后愈合能力极差,ACL 一旦断裂无法自愈。在临床上没有非常有效的韧带损伤修复的手段,因此 ACL 损伤修复已成为国际上一个重要课题^[1]。目前临床重建 ACL 使用的材料包括自体移植物、异体移植物和人工韧带材料,但都存在无法克服的局限性。最近的生物学和材料科学的发展和应用于组织工程技术重建 ACL 提供了新的思路和方法,有可能模仿天然 ACL 的生物和机械性能,为再生 ACL 组织提供了一条新的途径^[2]。

支架材料及其构建技术是组织工程研究的重要组成部分。支架材料可为细胞提供停泊、生长、分化、代谢环境及力学支撑。目前用于 ACL 组织工程支架材料有天然生物材料和合成高分子材料,天然生物材料主要有蚕丝、胶原等,合成高分子材料主要有聚乳酸、聚羟基乙酸及其共聚物 PLGA 等。本文对前交叉韧带组织工程的支架材料及其构建做一综述。

一、天然高分子支架材料

1. 蚕丝丝素纤维:天然高分子支架材料以蚕丝丝素(silk fibroin, SF)纤维为主要代表, SF 是蚕丝通过脱胶后获得的天然高分子纤维蛋白,免疫原性很

低,能支持细胞的黏附、迁移和增殖。SF 于纺织过程后容易产生高度有序的支架结构,可能进一步扩大 SF 作为支架材料在组织工程和再生医学中应用。SF 易于处理,生物相容性好,具有非凡的机械性能和缓慢的降解性^[3]。因此,蚕丝丝素蛋白(SF)越来越被认为是一种很有前途的重建 ACL 支架材料。研究发现缆索样支架中的丝素蛋白纤维排列方式与天然的人交叉韧带的胶原纤维排列相似,而且生物力学性能与正常的人前交叉韧带相当^[4]。天然 SF 纤维降解的同时不引起组织工程韧带力学性质的显著下降,能在体内外长期保持其优良的机械性能,是制作组织工程 ACL 的良好支架材料。但 SF 纤维也存在降解速度缓慢,单独使用可能难以与组织再生速率相匹配等问题。

2. 胶原:胶原作为韧带组织最主要的细胞外基质,可以促进组织的修复,对细胞的黏附、迁徙、增殖起重要的作用。但单纯使用未交联的胶原不能满足 ACL 组织工程的力学要求。因此需要与其他高力学强度的材料复合。胶原本身所包含的细胞黏附信号肽序列(arg-gly-asp, RGD)可以引导细胞对支架材料的特定的识别,有助与保持细胞的表型及活性。胶原的包埋冻干可以增强支架整体对细胞的黏附,增加细胞亲和性,给予细胞适宜生长空间^[5]。以胶原基的电纺网聚乳酸羟基乙酸(PLGA)(50:50)-I 型胶原-聚氨酯(PU)支架的力学性能与 ACL 相似,并且纤维对齐支架的力学性能高于纤维随机取向的支架^[6]。另外,用于 ACL 重建的天然高分子材料还有人发、纤维素、糖氨基聚糖等。

二、合成高分子材料

韧带组织工程中研究和应用较多的合成高分子材料是聚羟基乙酸(PGA)、聚乳酸(PLA)及其共聚物

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071467);浙江省自然科学基金资助项目(LY13H060004);浙江省医学重点学科群项目(XKQ-010-001)生物医药重点学科群;浙江省医药卫生科技平台重点项目(2014ZDA005)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所

通讯作者:张文元,电子邮箱:zhangwy61@163.com

PLGA。PGA 具有高降解速度及亲水性良好,PLA 具有高强度。与 PLA 及 PGA 相比,PLGA 的降解性、机械性能调节范围更大,在理想的期限内,可控的降解速率同步于组织形成速率,不但可作为硬组织缺损的修复,而且在软组织缺损修复方面也发挥了重要作用^[7]。研究表明 SF-PLA-PGA 纤维混合编织绳状支架的力学性能优异,并具有较好的生物相容性^[8]。研究表明,PLGA 纤维编织支架可用于重建组织工程韧带^[9]。

左旋聚乳酸(PLLA)具有良好的生物相容性、生物降解能力和高弹性模量。Surrao 等^[10,11]选择基于 PLLA 的电纺聚合物 poly(L-lactide-co-D,L-lactide,PLDLA)纤维支架,该支架为卷曲样纤维,拥有类似于天然 ACL 胶原的波长(46 μm)和振幅(5 μm)。牛成纤维细胞能该波浪形、卷曲样 PLDLA 纤维上附着、增殖,以及在纤维支架表面沉积细胞外基质(ECM)分子。沉积的 ECM 展示类似于天然 ACL 成簇的束形成,非常类似于 ACL 胶原纤维的微结构体系和机械性能。这些发现证明在构建有效的组织工程支架中复制几何微环境的重要性。种植于卷曲样纤维支架的成纤维细胞在 10% 应变幅度下进行长期动态的机械刺激,可导致胶原积累的显著上调,以及硫酸化蛋白多糖积累的下调,并类似于天然韧带的分层特征。

蚕丝丝素纤维、PLA、PGA 及 PLGA 等具有独特的优异性能,但是又具有局限性,利用它们的互补特性,通过不同的整合可取长补短获得较为理想的支架。除了上述材料外,还有许多种材料用于组织工程韧带,如聚乙烯醇、聚碳酸酯、聚己内酯等。

三、支架构建

支架的结构对生物反应和支架的临床使用效果有着非常重要的影响,支架制备的关键在于类似韧带结构。支架的成形方法对支架的孔隙率、孔径大小、机械性能以及三维形态的形成都有很大影响。编织材料可以较好地模拟韧带纤维走向,改善韧带力学性能。目前应用于支架成形的纺织技术有编织、拧捻、针织等。

1. 绳索状支架:Altman 等^[4]将蚕丝丝素纤维拧捻成绳索状组织工程韧带修复 ACL,其力学强度及疲劳耐受均优良,且支持骨髓间充质干细胞(MSCs)黏附、伸展。Li 等^[12]通过制造了 3 个不同的 SF 支架(绳状、编织和纤维),测试表明蚕丝绳状支架结构表现出最类似于人类天然 ACL 的生物力学行为。Free-

man 等^[13]利用 PLLA 纤维通过编织-拧捻结合设计一种新型的 ACL 组织工程支架,纤维加捻后再编织成支架,其能准确模拟 ACL 的机械性能,是一种很有前途的组织工程 ACL 支架。但是绳索状支架也存在不足,因为其内部的致密结构使细胞向内生长十分困难,不利于形成三维立体的细胞网络,阻碍了新生组织长入,有必要加以改进。

2. 纬编针织网状支架:通过纬编针织法将丝线顺序地弯曲成圈状并相互串套形成的织物。与编制法相比,针织法编制具有更高的孔隙率,能为组织向内部生长提供更多的空间供韧带组织生长^[14]。使用 SF 针织鞘结合编织芯(SF-KSBC)结构,细胞甚至可渗透到部分结构的内部,力学强度适合 ACL 重建^[15]。将 SF 针织网包裹微孔 SF 海绵并植入 MSCs,体内重建 ACL。植入 24 周后,组织学观察表明,MSCs 分布于整个再生韧带,并展示成纤维细胞形态,I、III 型胶原、腱糖蛋白-C(tenascin-C)产生显著。此外,重建的韧带-骨嵌入为直接止点,含有典型的 4 个区(骨、矿化纤维软骨、纤维软骨、韧带),类似于天然 ACL-骨嵌入的结构。再生韧带的拉伸强度满足力学需求,提示蚕丝支架在未来临床应用中具有巨大潜力^[16]。

3. 复合多重支架:单一的编织支架尚无法满足组织工程 ACL 的需求,复合多重支架是一种趋势。Fan 等^[17]制备蚕丝缆绳加强的明胶/SF 杂合支架,微孔明胶/SF 海绵成形于蚕丝缆绳周围,模拟韧带 ECM 的微观结构。蚕丝缆绳显著增加杂合支架的抗拉强度,可满足韧带组织工程支架的力学要求。支架具有良好的细胞黏附性能,MSCs 能很好地生长,并分化成韧带成纤维细胞,以及表达 I、III 型胶原、腱糖蛋白-C mRNA 及蛋白。Freeman 等^[18]采用 PLLA 纤维编织-拧捻支架,结合聚乙二醇-双丙烯酸脂(PEG-DA)水凝胶来改善黏弹性,在张力方面类似于自然韧带,并支持成纤维细胞生长,水凝胶虽然降低了支架的极限拉伸应力(UTS),但 UTS 仍能与天然 ACL 相当。

一个合适的 ACL 组织工程支架必须匹配于生物学、形态学和生物力学要求。通过计算机辅助组织工程可找到最合适的支架及相关的应用程序。Laurent 等^[19]应用计算机辅助组织工程,通过有限元(FE)代码,可计算出多层编织支架的生物力学行为。其根据聚(乳酸-co- ϵ -己内酯)(PLCL)纤维的力学行为输入 FE 代码,并考虑接触摩擦/纤维之间的相互作用,在编织过程中,可根据支架初始几何形状计算出

最终的实际几何形状。通过模拟拉伸测试和实验数据对比,表明该方法可预测多层编织支架的强度响应,并可作为支架制备过程中的工艺参数。

4. 机械刺激:ACL 组织形成于体内的动态环境中,自然状态下要承受不同的外界应力作用。韧带细胞的新陈代谢也均受到外界应力的影响,其中张应力对 ACL 组织的形成和发展起着重要作用。各种研究表明,物理刺激可调节细胞功能,利于细胞拉伸、迁移及分泌胶原。利用生物反应器对 ACL 移植物进行机械刺激,可获得最大载荷和刚度与人类 ACL 相匹配的蚕丝支架移植物^[20]。Mizutani 等^[21]通过高取向纤维弹性蛋白和胶原构建的支架进行压力和扭曲刺激的多型动态培养,结果表明,压力刺激和弹性蛋白 A 可上调碱性磷酸酶(成骨分化标志物)的表达及促进韧带细胞的成骨分化,而扭曲刺激则可上调Ⅲ型胶原的表达(韧带组织的主要成分)。Wang 等^[22]采用冲击波疗法(ESWT)可显示改善兔 ACL 重建治疗。Qiu 等^[23]采用周期性张力刺激(10% 应变,1Hz,3h on/3h off)可促进在胶原纤维支架上的人 MSCs 向成纤维细胞样分化。

5. 新生韧带-骨界面愈合:骨-韧带结合部位组织结构复杂,在很短的距离内由软组织(韧带)经过纤维软骨、钙化纤维软骨过渡区逐渐转变为硬组织(骨),形成直接止点。这种转变被认为是促进两种不同组织之间力的转换,改善由于界面应力集中的潜在危害。He 等^[24]使用交替浸泡技术,将羟基磷灰石(HA)涂层于蚕丝基支架两端。通过 RT-PCR 及碱性磷酸酶测定表明:在骨诱导性方面,HA 涂层的丝支架导致骨髓间充质干细胞的成骨分化;在骨传导性方面,HA 涂层的丝支架支持成骨细胞生长并维护成熟的成骨细胞性质;该韧带移植物具有增强移植物-宿主骨整合的潜能。Jiang 等^[25]研究也表明 HA 涂层的再生 SF 支架增强骨髓间充质干细胞的骨诱导性与骨传导性。

四、展 望

目前组织工程前交叉韧带研究取得了一定的进展,但与临床要求还有较大距离,在很多方面仍需深入研究和探索。如理想支架材料的进一步筛选,支架材料的组合、修饰及其生物相容性、力学强度研究,构建方法的组合研究,新生韧带与骨界面愈合等研究。另外,种子细胞来源、生长因子的选择也是组织工程研究的重要组成部分。在种子细胞方面,MSCs 具有分化为成骨、软骨、肌腱及韧带等细胞的多向分化潜

能,理论上有利于移植后形成韧带-骨愈合的致密结缔组织、纤维软骨、钙化纤维软骨、骨的 4 区为特征的直接止点。体内外研究表明,MSCs 为优于内侧副韧带成纤维细胞、ACL 成纤维细胞、皮肤成纤维细胞。MSCs 还可分泌多种物质,如 I、Ⅲ型胶原、腱糖蛋白 C、细胞因子和一些对韧带修复有促进作用的组织酶。符合韧带生物学特征,是韧带组织工程较理想的种子细胞^[26]。在生长因子方面,BMP-2 不仅在骨组织中,而且在异位骨化区也具强烈的诱导骨长入和新骨形成能力^[27]。可促进未钙化纤维软骨、钙化纤维软骨、骨组织有序排列,形成与正常 ACL 止点区非常类似的 4 层结构。另外,BMP-12 可促进 MSCs 向韧带细胞分化,并在附丽位点发育中发挥主要作用,可有效增强韧带-骨愈合。另外,如 bFGF、TGF- β 1、PDGF、HGF、GDF、IGF 等在促进韧带组织再生与血管化,以及促进韧带-骨界面愈合发挥重要作用。随着研究的深入,组织工程前交叉韧带有望得到临床应用。

参考文献

- 1 Leong NL, Petrigliano FA, McAllister DR. Current tissue engineering strategies in anterior cruciate ligament reconstruction [J]. J Biomed Mater Res A, 2014,102(5):1614-1624
- 2 Longo UG, Rizzello G, Berton A, *et al.* Synthetic grafts for anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(6):429-437
- 3 Mandal BB, Kundu SC. Biospinning by silkworms: silk fiber matrices for tissue engineering applications [J]. Acta Biomater, 2010, 6(2):360-371
- 4 Altman GH, Horan RL, Lu HH, *et al.* Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments [J]. Biomaterials, 2002, 23(20):4131-4141
- 5 Chen X, Qi YY, Wang LL, *et al.* Ligament regeneration using a knitted silk scaffold combined with collagen matrix [J]. Biomaterials, 2008, 29(27):3683-3692
- 6 Full SM, Delman C, Gluck JM, *et al.* Effect of fiber orientation of collagen-based electrospun meshes on human fibroblasts for ligament tissue engineering applications [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015, 103(1):39-46
- 7 Urita Y, Komuro H, Chen G, *et al.* Evaluation of diaphragmatic hernia repair using PLGA mesh-collagen sponge hybrid scaffold: An experimental study in a rat model [J]. Pediatr Surg Int, 2008, 24(9):1041-1045
- 8 张文元, 杨亚冬, 李颖, 等. 蚕丝-聚乳酸-聚羟基乙酸纤维混合编织绳状支架的生物学性能 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(5):931-933
- 9 van Eijk F, Saris DB, Fedorovich NE, *et al.* In vivo matrix production by bone marrow stromal cells seeded on PLGA scaffolds for ligament tissue engineering [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(10):3109-3117
- 10 Surrao DC, Waldman SD, Amsden BG. Biomimetic poly(lactide)

- based fibrous scaffolds for ligament tissue engineering[J]. *Acta Biomater*, 2012,8(11):3997-4006
- 11 Surrao DC, Fan JC, Waldman SD, *et al*. A crimp-like microarchitecture improves tissue production in fibrous ligament scaffolds in response to mechanical stimuli[J]. *Acta Biomater*, 2012,8(10):3704-3713
- 12 Li X, Snedeker JG. Wired silk architectures provide a biomimetic ACL tissue engineering scaffold[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2013,22:30-40
- 13 Freeman JW, Woods MD, Laurencin CT. Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid-twist scaffold design[J]. *J Biomech*, 2007,40(9):2029-2036
- 14 陶沙,张佩华,郭正,等.组织工程人工肌腱支架的制备工艺及降解性能[J]. *东华大学学报:自然科学版*,2009,35(2):153-156,185
- 15 Farè S, Torricelli P, Giavaresi G, *et al*. In vitro study on silk fibroin textile structure for anterior cruciate ligament regeneration[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013,33(7):3601-3608
- 16 Fan H, Liu H, Wong EJ, *et al*. In vivo study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold[J]. *Biomaterials*, 2008,29(23):3324-3337
- 17 Fan H, Liu H, Wang Y, *et al*. Development of a silk cable-reinforced gelatin/silk fibroin hybrid scaffold for ligament tissue engineering[J]. *Cell Transplant*, 2008,17(12):1389-1401
- 18 Freeman JW, Woods MD, Cromer DA, *et al*. Evaluation of a hydrogel-fiber composite for ACL tissue engineering[J]. *J Biomech*, 2011,44(4):694-699
- 19 Laurent CP, Durville D, Mainard D, *et al*. A multilayer braided scaffold for Anterior Cruciate Ligament: mechanical modeling at the fiber scale[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2012,12:184-196
- 20 Hohlrieder M, Teuschl AH, Cicha K, *et al*. Bioreactor and scaffold design for the mechanical stimulation of anterior cruciate ligament grafts[J]. *Biomed Mater Eng*, 2013,23(3):225-237
- 21 Mizutani N, Kawato H, Maeda Y, *et al*. Multiple-type dynamic culture of highly oriented fiber scaffold for ligament regeneration[J]. *J Artif Organs*, 2013,16(1):49-58
- 22 Wang CJ, Ko JY, Chou WY, *et al*. Shockwave therapy improves anterior cruciate ligament reconstruction[J]. *J Surg Res*,2014,188(1):110-118
- 23 Qiu Y, Lei J, Koob TJ, *et al*. Cyclic tension promotes fibroblastic differentiation of human MSCs cultured on collagen-fibre scaffolds[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2014, doi: 10.1002/term.1880
- 24 He P, Sahoo S, Ng KS, *et al*. Enhanced osteoinductivity and osteoconductivity through hydroxyapatite coating of silk-based tissue-engineered ligament scaffold[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013,101(2):555-566
- 25 Jiang J, Hao W, Li Y, *et al*. Hydroxyapatite/regenerated silk fibroin scaffold-enhanced osteoinductivity and osteoconductivity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Biotechnol Lett*, 2013,35(4):657-661
- 26 Spoliti M, Iudicone P, Leone R, *et al*. In vitro release and expansion of mesenchymal stem cells by a hyaluronic acid scaffold used in combination with bone marrow[J]. *Muscles Ligaments Tendons J*,2013,2(4):289-294
- 27 Hashimoto Y, Naka Y, Fukunaga K, *et al*. ACL reconstruction using bone-tendon-bone graft engineered from the semitendinosus tendon by injection of recombinant BMP-2 in a rabbit model[J]. *J Orthop Res*,2011,29(12):1923-1930

(收稿日期:2014-10-10)

(修回日期:2014-10-29)

红细胞分布宽度与血栓的关系

梁云婷 王 萍 陈 晖

摘 要 红细胞分布宽度(red cell distribution width,RDW)为临床检验中血常规的项目之一,是反应红细胞异质性的指标。红细胞分布宽度水平与血流动力学、血液炎症水平有着一定的相关性。大量的临床研究显示红细胞分布宽度可作为深静脉血栓、脑卒中以及冠状动脉粥样硬化性心脏病等疾病的预测因子,提示其与血栓有着密切的关系。

关键词 红细胞分布宽度 血栓 冠状动脉粥样硬化性心脏病

中图分类号 R743 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.049

血栓性疾病是影响当今社会人类健康的重大因素,利用简便、有效的方法对疾病进行危险分层并评

估其预后有着重要的意义。红细胞分布宽度作为衡量红细胞异质性的重要实验室指标,被广泛用于贫血的鉴别诊断中,一些临床研究显示,红细胞分布宽度可作为肺栓塞、脑卒中和急性冠脉综合症的独立预测风险因子,暗示其在血栓性疾病的发生、发展中微妙

基金项目:首都发展专项基金资助项目(2014-3-2024)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院心内科

通讯作者:陈晖,电子信箱:chenhui72@medmail.com.cn