

可梯度降解支架细胞化后修复兔前交叉韧带缺损

张文元 杨亚冬 张科技 唐 靓 房国坚

摘 要 **目的** 通过可梯度降解的绳-网支架复合自体骨髓间充质干细胞(MSCs),修复兔前交叉韧带(ACL)缺损。**方法** 将聚乳酸:蚕丝丝素:聚羟基乙酸纤维按质量比 7:6:5 混合,分别捻拧成绳芯与纬编织成网状物,滴加 I 型胶原并冻干。将网状物包裹绳芯,种植兔自体 MSCs,植入兔前交叉韧带(ACL)缺损处,作为实验组。单纯支架置入为对照组。分别于术后 12、24 周,取材,HE 染色,并行力学测试。**结果** 术后 12 周,实验组新生韧带与骨之间产生大量有序的垂直胶原纤维;对照组形成少量垂直胶原纤维。术后 24 周,实验组形成类似直接止点结构;对照组则产生许多垂直胶原纤维。力学测试结果显示,术后 12、24 周实验组的最大载荷分别为 $72.7 \pm 23.4\text{N}$ 与 $121.8 \pm 34.3\text{N}$,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 可梯度降解支架复合自体 MSCs 能较好地重建兔 ACL。

关键词 前交叉韧带 修复 骨髓间充质干细胞 梯度降解支架

中图分类号 R318

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.011

Gradient Degraded Scaffold Seeded with Mesenchymal Stem Cells Repairing Anterior Cruciate Ligament in Rabbits. Zhang Wenyuan, Yang Yadong, Zhang Keji, et al. Institute of Bioengineering, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang 310013, China

Abstract Objective To use a gradient degraded wire-mesh scaffold compound autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) repairing rabbit anterior cruciate ligament(ACL) defect. **Methods** After polylactic acid(PLA): silk fibroin(SF): polylactic acid(PGA) fibers(mass ratio 7:6:5) being mixed, they were twisted into a rope core and knitted into mesh respectively, then the rope core was wrapped with the mesh to obtain wire-mesh binding scaffold. Autologous MSCs were seeded in the binding scaffold to produce scaffold-MSCs complexe. The complexe was implanted in defect of ACL in rabbits, as experimental group. Only scaffold was implanted, as control group. 12 and 24 weeks postoperatively, the animals were sacrificed for HE staining of longitudinal sections of neo-ACL together with tibia or femur and biomechanical testing of newborn ACL-bone. **Results** Twelve weeks postoperatively, many Sharpey's fibers were generated to form indirect stop point in experimental group. While in control group, cells lineage was disorder, and rare Sharpey's fibers were formed. Twenty four weeks postoperatively, a structure similar to direct stop point of four areas from newborn ACL to bone was formed in experimental group. While in control group, many Sharpey's fibers were generated to form indirect stop point. Biomechanical testing of newborn ACL-bone results showed that: 12 and 24 weeks postoperatively, the maximum load of newborn ACL-bone in experimental group were $72.7 \pm 23.4\text{N}$ and $121.8 \pm 34.3\text{N}$, respectively, and there were statistical significance($P < 0.01$) compared with the control group. **Conclusion** The gradient degraded wire-mesh scaffold seeded with MSCs can make ACL defect get a well repair.

Key words Anterior cruciate ligament; Repair; Mesenchymal stem cells; Gradient degraded scaffold

大部分膝部韧带损伤发生在前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL),发生率一般为 1/3000,ACL 一旦断裂无法自愈。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,但都存在无法克服的局限性。其缺陷主要包括:自体移植物来源有限且多有供区部位并发症;异

体移植物受来源限制,且有传播疾病和产生免疫排斥的风险;人工材料重建 ACL 自 20 世纪 80 年代起逐渐得以在临床使用,然而尽管短期效果令人满意,但是长期随访结果不尽人意,主要原因是材料力学强度和抗摩擦性质都较差,疲劳断裂发生率高,还有材料和组织之间的生物相容性较差是阻碍其临床推广的主要因素。通过组织细胞培养使支架材料细胞化的组织工程技术为 ACL 重建提供了新的思路和方法,为再生韧带组织提供了一条新的途径^[1]。本实验采用捻拧-针织、绳-网结合制备可梯度降解的蚕丝丝素-PLA-PGA/胶原支架,并以自体骨髓间充质干细胞(MSCs)为种子细胞,构建支架-MSCs 复合物。

基金项目: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生物医药重点学科群(XKQ-010-001);浙江省医药卫生科技计划项目(2014ZDA005,2013KYA045)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所(张文元、杨亚冬、张科技、房国坚);浙江省医学科学院保健食品研究所(唐靓)

通讯作者:张文元,电子信箱:zhangwy61@163.com

并将支架 - MSCs 复合物置入兔 ACL 缺损处,进行 ACL 修复重建,并检测重建情况。

材料与方法

1. 实验材料与仪器: 蚕丝 (*Bombyx mori* silk) 由浙江海宁蚕农赠送。聚乳酸 (PLA)、聚羟基乙酸 (PGA) 纤维细丝, 上海天清生物材料有限公司生产, 呈乳白色, 均匀柔韧。纤维连接蛋白 (Sigma 公司), I 型鼠尾胶原 (杭州生友生物技术有限公司), 抗兔 CD14 - FITC 与抗兔 CD44 - PE (Antigenix America)。主要实验仪器: 扫描电镜 (XL30 - ESEM, 荷兰 Philips 公司), 微机控制电子万能试验机 (QX - W300, 上海企想检测仪器有限公司生产), 冷冻干燥机 (Heto PowerDry LL3000, 丹麦生产), 流式细胞仪 (FACSCalibur, BD, 美国生产)。实验动物为新西兰白兔, 由浙江省实验动物中心提供并饲养, 实验动物质量合格证号: SCXK(浙)2009 - 0039 号。

2. 自体骨髓间充质干细胞 (MSCs) 提取: 参照文献 [2] 提取, 纯化, 培养。从 4 月龄新西兰白兔 (体重 2.0 ~ 2.2 kg, 雌性) 髂后上棘穿刺抽取骨髓, 通过密度梯度离心法及贴壁培养法分离、纯化、扩增而获得 MSCs。分离的 BMSCs 参照文献 [3] 进行抗兔 CD14 - FITC、抗兔 CD44 - PE 的流式细胞仪检测, 细胞表面标记 CD14 基本为阴性; 而 CD44 呈阳性, 表达均在 80% 以上。被抽取骨髓后的兔子继续饲养, 将作为制作韧带缺损动物模型, 回植自体 MSCs 组织工程韧带实验之用。

3. 蚕丝素 - PLA - PGA 纤维编织支架制备: 将蚕丝浸入 0.5% Na_2CO_3 溶液中 (按 1g 蚕丝加质量分数为 0.5% 的 Na_2CO_3 溶液 1000ml 比例) 煮沸 30min, 更换 Na_2CO_3 溶液, 再煮沸 30min, 去除丝胶。并用 95℃ 去离子水充分冲洗, 室温晾干, 得到蚕丝素 (SF) 纤维。按下列顺序编织: 按 PLA、SF、PGA 纤维以质量比 7:6:5 均匀混合并平行排列 (含蚕丝素纤维单丝 40 根、PLA 纤维单丝 16 根、PGA 纤维单丝 12 根, 共含三者单丝 68 根), 记为 ($\times 1$), 顺时针扭合成 1 束纤维束, 记为 ($\times 2$), 共含三者单丝 136 根。再将该纤维束 ($\times 2$) 通过经纬编织成长条状网状物 (长 3.00cm $\times$ 宽 0.65cm), 详见图 1。另外, 将丝素 - PLA - PGA 纤维束 ($\times 2$) 逆时针扭合、再顺时针扭合成绳芯支架 ($\times 8$, 含 544 根单丝)。将绳、网支架分别经 0.1mol/L 稀盐酸 (HCl)、蒸馏水、0.1mol/L NaOH、蒸馏水超声清洗机洗涤, 以清除在纺丝和编织过程中黏附在纤维表面和空隙内的杂质和污物。5mg/ml 浓度的 I 型鼠尾胶原用 0.1mol/L NaOH 中和后, 滴加于绳、网支架上, 尽量使其浸透, -60℃ 冰箱过夜, 置于冷冻干燥机冻干。再将网状物包裹绳芯 (图 2), 用 3 号缝合线编织缝合, 缝扎紧, 即为绳 - 网支架, 环氧乙烷消毒备用。

4. 支架 - MSCs 复合物制作: 采用培养液将纤维连接蛋白配制成为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液。将网 - 绳支架浸入该蛋白溶液中, 4℃ 静置 24h, 常温晾干。以注射方式将第 3 代自体 MSCs 悬液 (2×10^7 个细胞/毫升, 约 0.3ml 用量/支架) 注入支架, 使细胞充分渗入支架孔隙中, 并使细胞悬液在支架上达到饱和状态, 体外培养 7 天, 隔天换液, 制作支架 - 自体 MSCs 复合物。

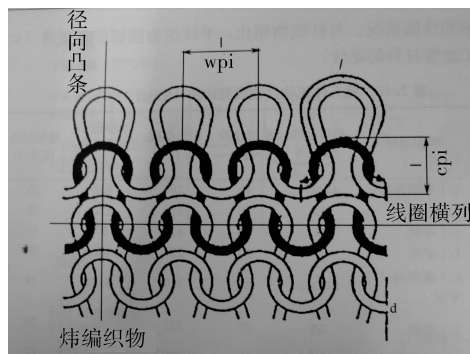


图 1 经纬编织示意图

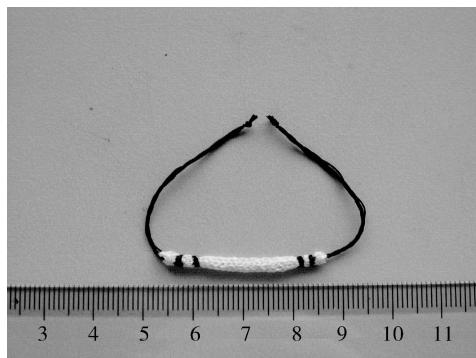


图 2 网状物包裹绳芯的复合支架

置入动物前清洗掉残余培养液。

5. 前交叉韧带 (ACL) 缺损动物模型制作及支架 - MSCs 复合物的植入: 参照文献 [4] 制作 ACL 缺损动物模型 (图 3)。先前已抽过骨髓的新西兰白兔, 3% 戊巴比妥钠 1.1ml/kg (即 33mg/kg) 耳缘静脉注射麻醉, 取双膝内侧髌旁切口暴露关节, 切断并完全去除正常 ACL, 沿原 ACL 走向, 用直径 2.7mm 钻头分别钻股骨和胫骨骨髓道, 将支架 - MSCs 复合物穿经骨髓道, 于膝关节屈曲 30° 状况下拉紧移植物, 两端钻骨桥打结固定, 检查前抽屉及 Lachman 试验阴性后, 逐层间断缝合切口。患肢不固定, 单笼饲养。术后每只兔子连续耳缘静脉注射青霉素 (50 万 U/d) 3 天。实验组 10 只 (20 膝, 置入支架 - 自体 MSCs 复合物), MSCs 均为自体分离回植; 对照组 10 只 (20 膝, 单纯置入支架)。

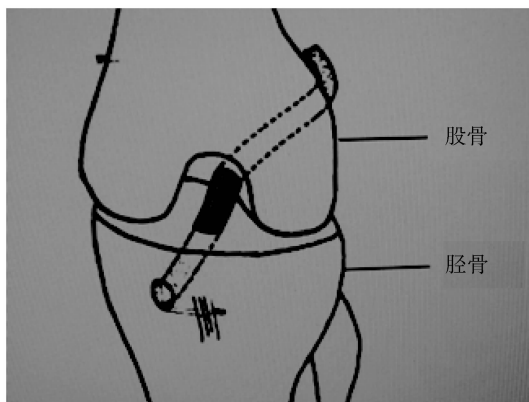


图 3 ACL 手术模型示意图

6. 前交叉韧带缺损修复重建情况观察:分别于移植术后12与24周,各随机处死一半动物。新生ACL连同胫骨及股骨取材,每组于一个时间点取2个标本用于组织学检测,8个标本用于拉力实验。(1)新生韧带-骨愈合的组织学观察:观察骨隧道内移植物界面愈合情况。取材新生前交叉韧带连同胫骨、股骨,脱钙,沿骨隧道纵向剖开,修整,石蜡包埋,沿骨隧道纵向切片,HE染色。观察骨隧道和新生韧带间界面愈合的组织学变化。(2)新生ACL的力学性能检测:取实验兔膝关节,保留股骨远端和胫骨近端各约3cm,去除膝关节标本周围软组织及缝线,保留新生ACL。将股、胫骨端分别固定于试验机牵引台两端,股骨与胫骨轻度倾斜,拉力经过韧带轴线。试验过程滴加生理盐水保持标本湿润。先行预拉伸3次后,行拔出或拉断试验,拉伸速度50mm/min,测试最大抗拉载荷(最大拔出或断裂载荷),观察股骨-移植物-胫骨复合体是断裂还是被拔出。

7. 统计学方法:采用SPSS 13.0统计软件包进行分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MSCs在支架材料上增殖、生长的扫描电镜观察情况:复合培养48h, MSCs细胞附于支架生长,增殖良好,细胞大多呈梭形,形态较佳,呈立体状生长,并分泌基质(图4)。

2. 大体观察:在大体观察方面,术后1~3天,动

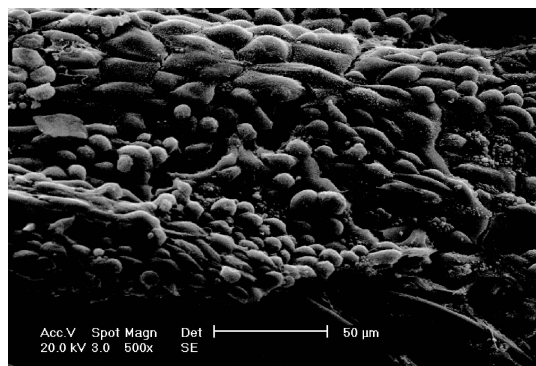


图4 MSCs在支架上培养48h的扫描电镜观察($\times 500$)

物的饮食、精神、活动稍差,而后状态良好,伤口愈合良好,未见感染与死亡。

3. 新生韧带-骨愈合的组织学观察:术后12周,实验组新生韧带与骨之间产生许多有序的垂直胶原纤维(Sharpey's fiber)(图5A),并有类软骨细胞出现,形成间接止点,说明已经出现软骨化骨过程。而对照组新生韧带组织细胞排列较紊乱,罕见形成垂直胶原纤维(图5B)。术后24周,实验组从新生韧带向骨方向形成类似于韧带-纤维软骨-钙化软骨-骨4个区域的直接止点结构(图5C)。而对照组新生韧带与骨之间产生许多有序的垂直胶原纤维(图5D),形成间接止点。

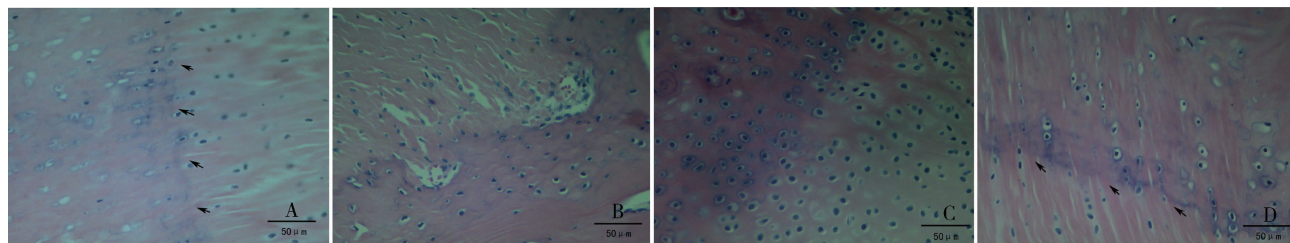


图5 术后两组病理切片(HE染色, $\times 400$)

A. 术后12周实验组;B. 术后12周对照组;C. 术后24周实验组;D. 术后24周对照组;图中箭头所示为垂直胶原纤维

4. 生物力学测试结果:术后12周,实验组、对照组新生韧带均从骨隧道拔出(拔出率100%);实验组、对照组的最大抗拉载荷分别为 72.7 ± 23.4 N、 39.2 ± 15.5 N,差异有统计学意义($t = 3.38$, $P < 0.01$)。术后24周,实验组大多从骨隧道拔出(拔出率75%),而对照组均拔出(拔出率100%);实验组、对照组的最大抗拉载荷分别为 121.8 ± 34.3 N、 67.4 ± 26.2 N,差异有统计学意义($t = 3.56$, $P < 0.01$)。

讨 论

韧带组织工程对力学性能有特殊的要求,天然蚕丝丝素纤维力学强度高,生物相容性好^[5]。将丝素

纤维经螺旋缠绕成绳索状后,具有很强的耐疲劳性能^[6]。但也存在种子细胞主要附于绳状支架表面,难以渗入支架内部的问题,阻碍了新生组织长入,有必要加以改进。纬编织网状结构具有更高的孔隙率,能为细胞生长与组织向内生长提供更多的空间^[7]。本实验通过拧捻-针织-绳-网结合进行,将网状物包裹绳芯而成支架,兼顾力学性能与细胞生长。这样既能保证支架的优异的力学性能,又能使种子细胞较好地生长在支架上,利于支架-MSCs复合物的构建。

蚕丝丝素纤维具有缓慢的降解速度,单纯以蚕丝

丝素纤维制作支架,可能存在不能及时腾出足够空间而影响组织再生等问题。PGA 具有高降解速度及亲水性良好,PLA 具有高强度,支架整体的降解速率可以通过调节 PLA 与 PGA 的比例而得到较好的控制^[8-10]。胶原、PGA 先降解,PLA 次之,蚕丝最后降解。研究表明蚕丝-PLA-PGA 纤维混合绳状支架的力学性能优异,并具有良好的生物相容性^[11]。

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、骨的四区为特征的直接止点^[12]。理想的韧带组织工程种子细胞应具有以下特性:来源广,数量充足,增殖能力强,可大量扩增并且具备特定的生物学功能,分泌具有合适构成的细胞外基质。Ge 等^[13]通过体外细胞培养比较内侧副韧带成纤维细胞、ACL 成纤维细胞、皮肤成纤维细胞、MSCs 几种细胞发现:MSCs 增殖率和分泌胶原总量是最高的,并且 3 种细胞都表达 I、III 型胶原, α -肌动蛋白,都不表达 II 型胶原,表明与其他几种细胞相比,MSCs 可能是较理想的种子细胞。有研究表明,MSCs 能促进 ACL 重建后腱-骨愈合作用,缩短腱骨愈合时间,可形成类似正常的直接止点结构,而非瘢痕连接的间接止点^[14,15]。MSCs 可分泌 I、III 型胶原、腱糖蛋白 C 以及一些对韧带修复有促进作用的细胞因子与组织酶,符合韧带生物学特征,是韧带组织工程较理想的种子细胞^[16]。

本实验结果表明,实验组术后 12 周可形成间接止点,术后 24 周可形成类似于直接止点的结构。对照组术后 12 周,新生韧带组织细胞排列较紊乱,术后 24 周可形成间接止点。在力学性能方面:术后 12 周,实验组、对照组新生韧带均从骨隧道拔出;术后 24 周,实验组大多从骨隧道拔出,而对照组均拔出。在最大抗拉载荷方面,实验组与对照组的差异有统计学意义,但与成年兔正常 ACL 均有较大差距。因此,支架材料与构建及种子细胞的选择等问题尚需进一步研究。

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 张文元,杨亚冬,房国坚,等. 兔骨髓基质干细胞的分离生长及冻存技术研究[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(6):651-653
- 3 杨亚冬,张文元,房国坚,等. 兔骨髓间充质干细胞表面抗原检测及其变化特点[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(3):455-458
- 4 魏学磊,李峰,林霖,等. 转基因兔骨髓间充质干细胞对异体跟腱重建前交叉韧带生物力学特性的影响[J]. 医用生物力学,2008,23(2):103-106
- 5 Chen K, Sahoo S, He P, *et al.* A hybrid silk/RADA-based fibrous scaffold with triple hierarchy for ligament regeneration[J]. Tissue Eng Part A, 2012,18(13-14):1399-1409
- 6 Li X, Snedeker JG. Wired silk architectures provide a biomimetic ACL tissue engineering scaffold[J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2013,22:30-40
- 7 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
- 8 Mandal BB, Kundu SC. Biospinning by silkworms: Silk fiber matrices for tissue engineering applications[J]. Acta Biomater, 2010,6(2):360-371
- 9 Cao D, Liu W, Wei X, *et al.* In vitro tendon engineering with avian tenocytes and polyglycolic acids: a preliminary report[J]. Tissue Eng, 2006,12(5):1369-1377
- 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 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):667-670
- 12 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002,418(6893):41-49
- 13 Ge Z, Goh JC, Lee EH. Selection of cell source for ligament tissue engineering[J]. Cell Transplant, 2005,14(8):573-583
- 14 周维锋,童松林,徐建杰,等. 骨髓间充质干细胞促进前交叉韧带重建后腱-骨愈合的生物力学研究[J]. 中华创伤杂志,2013,29(7):931-933
- 15 黄相杰,姜红江,孟鹏. 兔骨髓骨髓间充质干细胞移植促进前交叉韧带重建后腱-骨愈合的实验研究[J]. 当代医学,2012,18(9):39-41
- 16 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

(收稿日期:2015-02-02)

(修回日期:2015-02-13)