

蚕丝组织工程支架重建前交叉韧带的研究进展

赵思雨 李跃中 张文元

摘要 前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 断裂是最常见的膝关节损伤。由于 ACL 的愈合能力差, 断裂后常需要手术治疗。临床重建 ACL 使用的材料包括自体移植物、异体移植物和人工合成材料, 但均存在诸多问题。组织工程的应用为 ACL 治疗提供了新的可能性。蚕丝因生物相容性好、力学性能优异、降解缓慢、可编织等特点, 成为组织工程韧带理想材料。其联合其他高分子材料、种子细胞、生长因子制成复合支架, 效果更佳。本文对蚕丝组织工程支架重建 ACL 的研究进展进行综述。

关键词 蚕丝 组织工程 重建 前交叉韧带 支架

中图分类号 R318

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.08.038

前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 是致密结缔组织, 是连接股骨和胫骨的绳状组织, 在稳定膝盖关节和正常运动中起着重要的作用, ACL 断裂无法自愈。移植物植入骨隧道重建 ACL 是最具挑战性的临床问题之一。临床重建 ACL 使用的材料包括自体移植物、异体移植物和人工合成材料, 但均存在诸多问题。自体移植物供体部位发生率高, 且需二次手术, 并可能伴有功能障碍和不适等问题。异体移植物, 存在供体缺乏和免疫排斥, 且易传播疾病和高感染率。人工合成韧带可以有效地避免供体部位发生率和疾病传播的风险, 尽管短期效果令人满意, 但是长期随访结果不尽人意, 可能导致更高的移植物失败率和晚期炎症反应^[1]。

目前应用于临床的人工韧带结构单一, 韧带在骨隧道中的愈合主要是胶原纤维与骨组织的直接结合, 在结合部位由于“软-硬”组织的直接连接缺乏力学梯度, 容易造成应力集中, 从而导致重建失败。因此, 在软-硬组织之间实现功能化的组织学转变仍是一个难题。组织工程的策略可能会突破这些限制, 为韧带修复带来新的希望。理想的组织工程方法重建 ACL 主要包含韧带再生和移植物-骨愈合两个方面: ①构建的组织工程 ACL 需要有足够的力学强度, 在植入与替代过程中不断裂, 不过度伸缩; ②构建的移植物-骨界面止点愈合与否直接关系到移植的成

败, 缺乏生物稳固性乃是移植失败的主要原因^[2]。

一、蚕丝的特性

脱胶蚕丝丝素纤维具有良好的生物及细胞相容性、独特而非凡的力学性能, 其断裂力、弹性模量和拉伸强度与人 ACL 相当。其弹性模量和拉伸强度不受编织纤维数量的影响, 而是受蚕丝的固有性能的影响。另一方面, 断裂力值随着组成支架的蚕丝数量的增加而增加, 只需增加或减少组成支架的纤维数量, 就能使其更具仿生性^[3]。蚕丝与其他生物成分结合, 可增加表面面积, 促进细胞黏附, 提高生物相容性^[4,5]。蚕丝基支架在肌腱/韧带修复方面的体内研究, 如 ACL、内侧副韧带、跟腱、肩袖等, 已经证实了其潜在的临床应用前景^[6]。

近年来, 蚕丝凭借其出色的综合力学性能和较慢而适当的降解时间, 在众多的 ACL 组织工程材料中脱颖而出, 为研究者所青睐^[7]。蚕丝作为一种蛋白质是可降解和吸收的, 只是降解时间相对较长^[8]。结合其缓慢的降解速率, 由蚕丝丝素纤维蛋白制成的 ACL 支架在相当长的一段时间内, 可以提供稳定性, 允许细胞重建新韧带组织。实现稳定属性的逐渐转移, 即可将稳定的特性从蚕丝支架移植物转移到新形成的组织中, 而不让病人膝关节暴露于不稳定的松弛期。因此, 蚕丝丝素纤维是组织工程韧带很有吸引力的候选材料。

二、蚕丝基组织工程前交叉韧带的构建

目前蚕丝的构架方式主要有两类。一类是天然蚕丝脱胶后的蚕丝丝素纤维, 编织成多种形状 (如绳索状、网状、鞭状等) 后, 具有优异的承载受力功能, 可用于韧带组织再生^[9]。另一类是天然蚕丝脱胶、溶解、过滤、透析从而生成丝素溶液, 并进一步加工成

基金项目: 浙江省自然科学基金-青山湖科技城联合基金资助项目 (LQY20H060001); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2019KY364, 2021KY124)

作者单位: 310013 杭州医学院生物工程学院 (赵思雨、张文元), 食品科学与工程学院 (李跃中)

通讯作者: 张文元, 研究员, 电子信箱: zhangwy61@163.com

不同形态的再生丝素模型(如纤维状、多孔海绵状、膜状等)。再生丝素纤维可以通过湿纺和微流体溶液纺制作获得,也可用于 ACL 重建^[10, 11]。多孔海绵状丝素蛋白可以通过冻干、致孔等手段制备,其三维结构恰当模拟了机体生理微环境的立体结构,可提供种子细胞生长场所。

生物材料的三维结构比二维结构更接近体内的生理环境。丝素蛋白的三维结构通常以水凝胶或海绵的形式存在。水凝胶为高含水率,高孔隙率,以便为细胞迁移和扩张提供足够的互连网络结构。为进一步提高支架性能,蚕丝常与其他天然高分子材料(胶原、明胶、壳聚糖和透明质酸)混合使用。大量实验证明丝素蛋白的加入可完善支架结构,提升支架性能。如使支架生物相容性,力学性能明显提升,孔隙分布更加均匀。体内外结果表明,壳聚糖-丝素/聚对苯二甲酸/银@羟基磷灰石肌腱通过扩大细胞增殖和上调肌腱发育使得细胞相容性和骨整合得到了根本改善。该肌腱支架是未来 ACL 置换术的一个很有前途的候选者^[12]。此外,混合支架可以进行物理或化学交联,以改善参数。目前,许多合成交联剂包括甲醛、戊二醛、甘油磷酸和双醛淀粉等被用于生物材料的改性。

Grabska-Zielinska 等^[13]以丝素蛋白、胶原蛋白和壳聚糖为基质,双醛淀粉为交联剂,制备了三维支架材料。丝素蛋白的加入提高了支架的稳定性,同时双醛淀粉在不影响支架的微观结构的前提下,使支架材料的膨胀率与孔隙率得到改善,支架稳定性和孔径规整性得到进一步提升。为满足 ACL 重建需求,研究者通常将三维结构的水凝胶或海绵支架负载到编织支架上使用^[14]。韧带高级强化系统由聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene glycol terephthalate, PET)制成,是目前用于 ACL 重建最常用的人工韧带。但是 PET 是疏水的,因此很难诱导自体组织的长入。与单纯 PET 韧带比较,脱胶丝/PET 杂化韧带保持了更强的诱导自体组织长入的能力,说明通过丝杂化增强了 PET 人工韧带与组织的结合力^[15]。丝素蛋白涂层通过 EDC/NHS 交联可在体内外提高 PET 人工韧带的生物相容性和促进重构过程。研究表明丝素蛋白涂层能显著改善成纤维细胞的黏附、增殖和细胞外基质分泌,并可明显抑制炎症反应,促进新生组织再生,并在移植体内及周围浸润梭形细胞^[16]。目前,尚未见人体临床试验的报道,但临床前研究正转向更大的动物模型^[17]。

天然蚕丝丝素纤维缆索状支架,虽然力学性能强健,但内部致密,阻碍了细胞及新生组织长入^[18]。编织的鞭状结构其空隙性得到了良好的改善。而网状支架伸缩性和柔软性良好,可提供足够的内部空间供细胞及韧带组织生长^[19]。这几种编织方式结合使用,可提高蚕丝基支架的综合性能。

三、仿生 ACL-骨界面止点的构建

正常的 ACL-骨界面是一个渐进的过程,强调分层组织区域是不同的,但在结构上又是连续的^[20]。每一层都表现出一个典型的细胞表型和基质组成。界面相关的细胞群在界面修复与体内平衡中扮演重要角色。从软组织(韧带)到硬组织(矿化骨)通过纤维软骨过渡区,可以有效地减少骨和弹性韧带之间的应力集中。根据天然界面的复杂性,战略性地生物模拟对界面再生至关重要。为了重建这个多区域组织,支架界面设计必须考虑到再生多种类型的组织,有一个分层多相的支架是非常必要的。韧带-骨结合部构建多相支架对于重建结合部具有重要的指导意义。

ACL 重建术后早期韧带张力丧失的原因多种多样,其中移植物与骨融合缓慢被广泛认为是主要原因。骨隧道内肌腱移植物的愈合依赖于骨与肌腱界面的骨长入或增强肌腱-骨愈合,这对减少 ACL 重建后的失败率非常重要。临床上,断裂的韧带需要修复到其骨附着处,但末端结构在手术修复后通常不能很好地重建,因此韧带-骨界面整合是评价 ACL 重建效果的重要指标。Ran 等^[21]先将蚕丝胶原支架皮下植入 2 周,然后使支架一端游离转移,在不中断血液灌注的情况下重建兔 ACL。重建后 2 周,骨和支架之间有较多的纤维结缔组织产生。重建后 4 周和 12 周,形成典型的韧带-骨界面和纤维软骨层。支架与骨之间没有明显的缝隙,骨隧道内出现大量的矿化组织。

Qing 等^[22]制备了锂藻土-蚕丝支架并重建兔 ACL,锂藻土的加入改善了蚕丝的力学性能,与单纯蚕丝支架比较,骨隧道段周围产生了更多的新骨组织,减小了骨隧道。另一方面,含有锂藻土的支架可以促进纤维软骨组织和成熟的胶原纤维的形成,促进了移植物的骨整合过程。Teuschl 等^[23]对绵羊行 ACL 切除,分别使用蚕丝支架和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs)复合蚕丝支架重建 ACL。丝质支架由于其特殊的力学性能和生物相容性,在人 ACL 重建中显示出很高的潜力。ACL 界面恢复效率低下被认为是常见的丝基韧带移

植物的主要障碍。Fan 等^[24]通过将分层方法和基因固定化相结合,开发了一种基因固定化三联丝支架来增强 ACL 骨整合。基因固定的三相丝支架显著促进 BMSCs 的增殖和向相应细胞系分化。结果表明,采用分层方法和基因固定化有效加快了丝介导的 ACL 界面形成,扩大了丝韧带移植用于 ACL 重建的治疗潜力。

Font 等^[25]制备了双相丝素蛋白支架,用以模拟界面胶原分子排列的梯度。支架有两种不同的孔排列,在肌腱/韧带侧是各向异性的,在骨侧是各向同性的。双相支架支持细胞附着,能够更好地支持功能性组织再生,允许肌腱/韧带和骨之间的机械应力逐步转移。PET 人工韧带的生物相容性较差,可能导致 ACL 重建后关节内和骨内愈合不良。通过丝素蛋白和羟基磷灰石分段涂层观察对 PET 韧带移植结扎和骨整合过程的影响。体内研究表明,分段涂层可以提高移植韧带化和骨整合过程。因此,丝素蛋白和羟基磷灰石分段涂层在临床增强 ACL 重建手术及移植-骨愈合中可能有很大的应用潜力^[26]。Zhi 等^[27]研究表明,采用种植兔 BMSCs 的电纺丝纤维垫包裹可促进移植软组织的肌腱-骨愈合。

四、展望

随着组织工程学的不断发展,证明蚕丝支架在保证力学性能的同时,能促进移植愈合。BMSCs 和成纤维细胞等表现出与支架的相容性,并已被证明可以增加组织胶原蛋白的产生。使用生长因子和细胞外基质衍生物可以增强这些效应。蚕丝是一种易于加工的生物聚合物,这使得以丝为基础的生物材料被塑造成不同的形式和结构。丝蛋白作为生物材料的选择不仅是由于其自然聚合、机械鲁棒性、灵活性和广泛的细胞相容性,还因为它可引导羟基磷灰石(骨矿物质基质的主要无机成分)增长的能力,从而改善骨整合。

蚕丝支架虽然目前在动物实验中应用广泛,但真正应用于临床还有很长的路要走。未来蚕丝组织工程韧带的发展方向,一方面可以提高和改善蚕丝性能和蚕丝支架结构,更好地与种子细胞相结合,并可与生长因子或其他材料联合应用,以满足临床中 ACL 修复的更高需求。另一方面,可以改善手术方式,先将蚕丝支架预血管化,模拟关节外炎症刺激,以促进血管和细胞的早期生长。另外,也可以先体外培养 ACL 来源的干细胞,蚕丝支架重建 ACL 后,行细胞关节腔内注射,以更好地促进骨-韧带-骨再生,抑制

骨关节炎。在目前可用的各种天然和合成聚合物中,蚕丝在各个医疗/制药领域表现出了巨大的前景,这将继续为未来组织工程、药物输送、生物传感和制造技术等方面的发展做出贡献。

参考文献

- Jia Z, Xue C, Wang W, *et al.* Clinical outcomes of anterior cruciate ligament reconstruction using LARS artificial graft with an at least 7 - year follow - up[J]. *Medicine*, 2017, 96(14): e6568
- Teuschl AH, Tangl S, Heimel P, *et al.* Osteointegration of a novel silk fiber - based ACL scaffold by formation of a ligament - bone interface[J]. *Am J Sports Med*, 2019, 47(3): 620 - 627
- Pagan A, Aznar Cervantes SD, Perez Rigueiro J, *et al.* Potential use of silkworm gut fiber braids as scaffolds for tendon and ligament tissue engineering. *Journal of biomedical materials research*[J]. Part B Applied Biomaterials, 2019, 107(7): 2209 - 2215
- 田科, 陈央娣, 梁魁, 等. 蚕丝 - 胶原支架用于兔前交叉韧带重建的研究[J]. *中华外科实验杂志*, 2020, 37(9): 1691 - 1694
- 杨继祥, 刘庆鹏, 高勇, 等. 蚕丝韧带复合骨髓干细胞重建兔前交叉韧带[J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28(20): 1883 - 1887
- 胡叶君, 乐辉辉, 金张楚, 等. 蚕丝相关组织工程支架在肌腱和韧带再生修复中的应用[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2016, 45(2): 152 - 160
- Teuschl A, Heimel P, Nürnberger S, *et al.* A novel silk fiber - based scaffold for regeneration of the anterior cruciate ligament: histological results from a study in sheep[J]. *Am J Sports Med*, 2016, 44(6): 1547 - 1557
- Zhang L, Liu X, Li G, *et al.* Tailoring degradation rates of silk fibroin scaffolds for tissue engineering[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2019, 107(1): 104 - 113
- Zhang W, Yang Y, Zhang K, *et al.* Silk - poly(lactic - co - glycolic acid) scaffold/mesenchymal stem cell composites for anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits[J]. *J Biomater Tissue Engineer*, 2017, 7(7): 571 - 581
- Guo Y, Chen Z, Wen J, *et al.* A simple semi - quantitative approach studying the in vivo degradation of regenerated silk fibroin scaffolds with different pore sizes[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 79: 161 - 167
- Jiang N, He J, Zhang W, *et al.* Directed differentiation of BMSCs on structural/compositional gradient nanofibrous scaffolds for ligament - bone osteointegration[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 110: 110711
- Jiang S, Liu X, Liu Y, *et al.* Synthesis of silver @ hydroxyapatite nanoparticles based biocomposite and their assessment for viability of Osseointegration for rabbit knee joint anteriorcruciate ligament rehabilitation[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2020, 202: 111677
- Grabska - Zielinska S, Sionkowska A, Reczynska K, *et al.* Physico - chemical characterization and biological tests of collagen/silk fibroin/chitosan scaffolds cross - linked by dialdehyde starch[J]. *Polymers*

- Basel, 2020, 12(2): 372
- 14 Liu H, Fan H, Wang Y, *et al.* The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(6): 662 - 674
 - 15 Zhi Y, Jiang J, Zhang P, *et al.* Silk enhances the ligamentization of the polyethylene terephthalate artificial ligament in a canine anterior cruciate ligament reconstruction model[J]. *Artif Organs*, 2019, 43(6): E94 - E108
 - 16 Cai J, Zhang L, Chen J, *et al.* Silk fibroin coating through EDC/NHS crosslink is an effective method to promote graft remodeling of a polyethylene terephthalate artificial ligament [J]. *J Biomater Appl*, 2019, 33(10): 1407 - 1414
 - 17 Archer DE, Mafi R, Mafi P, *et al.* Preclinical studies on biomaterial scaffold use in knee ligament regeneration: a systematic review[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(8): 691 - 701
 - 18 Altman GH, Horan RL, Lu HH, *et al.* Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(20): 4131 - 4141
 - 19 Liang T, Yadong Yang, Yuezhong Li, *et al.* Knitted silk mesh - like scaffold incorporated with sponge - like regenerated silk fibroin/collagen I and seeded with mesenchymal stem cells for repairing achilles tendon in rabbits [J]. *Acta of Bioengineering Biomechanics*, 2018, 20(3): 77 - 87
 - 20 Harris E, Liu Y, Cunniffe G, *et al.* Biofabrication of soft tissue templates for engineering the bone - ligament interface[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(10): 2400 - 2411
- (上接第22页)
- 11 Arthur CF, Salvatore L, Donna MK. Guidance for cerclage using transrectal sonography [J]. *J Ultrasound Med*, 1989, 8(10): 589 - 590
 - 12 邓姗, 田秦杰. 子宫发育异常合并不孕症的诊治策略[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020, 36(6): 519 - 523
 - 13 张颖, 杨立, 杨淑玲, 等. 超声引导和腹腔镜监视下子宫中隔切除术的手术疗效比较[J]. *中国医药指南*, 2015, 13(21): 48 - 50
 - 14 马英. 超声引导和腹腔镜监视下子宫纵隔切除术的手术疗效比较[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(81): 119
 - 15 李振红. 超声监测在宫腔镜电切术治疗纵隔子宫中的作用[J]. *中国医药科学*, 2014, 4(23): 95 - 96
 - 16 李静, 韦德湛, 左越, 等. 超声监护下宫腔镜电切术治疗子宫纵隔63例分析[J]. *中国当代医药*, 2013, 20(19): 181 - 183
 - 17 叶飞雪, 王丽敏, 王洁梅. 育龄女性子宫肌瘤瘤体激素受体及激素水平与宫腔镜术后复发关系[J]. *医学理论与实践*, 2020, 33(12): 1992 - 1994
 - 18 Stewart EA, Stewart EA. Clinical practice. Uterine fibroids[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(17): 1646 - 1655
 - 19 Maria CM, Francesca M, Giulia B, *et al.* Intraoperative ultrasound assistance during myomectomy in pregnant woman[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2020, 55(6): 840 - 841
 - 20 Yan H, Si - Jing L, Ping Z, *et al.* Intraoperative ultrasound - assisted enucleation of residual fibroids following laparoscopic myomectomy [J]. *Clini Chim Acta*, 2019, 495: 652 - 655
 - 21 马强, 陈雯, 吴乾凤, 等. 术中超声应用于腹腔镜子宫肌瘤剔除术对肌瘤残留及复发率的影响分析[J]. *中国生育健康杂志*, 2020, 31(2): 155 - 157
 - 22 郭红霞. 超声监视下宫腔镜电切术治疗黏膜下子宫肌瘤患者的疗效及安全性分析[J]. *首都食品与医药*, 2020, 27(11): 51
 - 23 Federica DG, Luigi DC, George AV, *et al.* Evaluation and treatment of infertile women with Asherman syndrome: an updated review focusing on the role of hysteroscopy[J]. *Reproductive BioMed Online*, 2020, 41(1): 55 - 61
 - 24 黎涛, 黄永申. 超声监护在宫腔镜粘连电切手术治疗中的应用[J]. *实用医技杂志*, 2018, 25(8): 835 - 836
 - 25 戴晨燕, 胡娅莉, 朱湘虹, 等. 经腹部超声实时引导在重度宫腔粘连宫腔镜手术中的应用价值[J]. *中华医学超声杂志: 电子版*, 2020, 17(5): 447 - 450
 - 26 Maya K, Amy S, Jewel A, *et al.* A novel ultrasound - guided technique for hysteroscopic adhesiolysis in high - risk patients[J]. *J Ultrasound Med*, 2019, 38(5): 1 - 5
 - 27 Sotirios HS, Tin - Chiu L. Intrauterine balloon therapy: a novel ultrasound guided treatment for intrauterine adhesions[J]. *Gynecol Surg*, 2016, 13(4): 403 - 407

(收稿日期: 2021 - 03 - 09)
(修回日期: 2021 - 03 - 11)

(收稿日期: 2020 - 12 - 12)
(修回日期: 2021 - 01 - 22)