

PET 微孔编织结构张力环境下诱导细胞迁移机制的研究现状及发展动态

张东宪 毕 龙 孙鹏霄 卢 旭 韩一生[△]

(第四军医大学西京骨科医院 陕西 西安 710032)

摘要 随着关节韧带损伤发生率日益提高,人工材料植入重建韧带功能是重要治疗手段之一。植入后宿主细胞的趋向、黏附和迁移是人工材料在体内形成长期稳定生物连接的关键。以往研究集中于提高材料生物性,如增加材料亲水性、表面修饰、黏附适宜细胞以及复合细胞因子等,目前在张力环境下三维微孔结构对宿主细胞黏附、迁移、长入和分化影响的研究较少。本文拟以生物相容性良好的聚对苯二甲酸丁二醇酯(PET)材料作为载体,探讨在张力状态下新编 PET 的结构、孔径大小和孔隙率对细胞迁移等细胞生物学行为影响的研究现状和未来发展。为这些研究的深入指明方向,也为 PET 作为人工材料修复韧带损伤的临床应用奠定实验基础。

关键词 聚对苯二甲酸乙二酯;支架材料;细胞迁移

中图分类号 R318.08 R68 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)15-2974-04

PET Porous Woven Structure in Strain Environment Induced Cell Migration Mechanism of Research and Development

ZHANG Dong-xian, BI Long, SUN Peng-xiao, LU Xu, HAN Yi-sheng[△]

(Department of Orthopedics, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: As the joint ligament injury rate increasing, artificial materials implanted ligament reconstruction is an important feature of treatment. The trend, adhesion and migration of host cells after implantation is a key factor of artificial materials in the body forming a long-term stable of biological connections. Previous studies have focused on improving the biological material, such as increasing the hydrophilicity materials, surface modification, adhesion of suitable cell and composite cytokines. At present, there is few researches on three-dimensional porous structure under tension environment affecting the host cell adhesion, migration, growth and differentiation. This paper focuses on a good biocompatible Polyethylene terephthalate (PET) as a carrier, to explore the tension state of new PET structure, pore size and porosity on the behavior of cell migration and other cell biology studies the impact of present and future development. It indicates the direction of the depth of these studies, and establishes the basis of PET as a material for the repair ligament damage in human clinical application.

Key words: Polyethylene terephthalate (PET); Scaffold material; Cell migration

Chinese Library Classification(CLC): R318.08 R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2974-04

前言

关节内及关节周围韧带损伤,特别是前交叉韧带损伤是最常见的运动创伤^[1]。由于患者多为青壮年,处理不当常导致关节不稳、半月板损伤、关节软骨退变等并发症,严重影响患者生活质量,给家庭和社会造成沉重负担^[1-3]。由于韧带缺乏自我修复能力,保守治疗效果不佳,通过手术重建和修复受损韧带已成为目前的共识。以腓腱、腓绳肌腱、骨四头肌腱等为代表的自体组织移植是最常用的韧带修复方法。然而所取组织多为关节稳定结构的一部分,因此重建术后普遍存在膝关节屈伸肌力减弱以及膝前疼痛、髌腱炎、髌下脂肪垫挛缩、髌骨骨折等并发症^[4-6]。更重要的自体移植生物学转归机制目前还不明确,关于其能否演变成正常的韧带组织尚存在很大争议。目前对于异

体腓腱、跟腱、阔筋膜等移植学者公认存在着免疫排斥反应、生物长入延迟和传播疾病等问题,因此临床应用受到限制^[7-9]。人工韧带作为自体 and 异体移植物的替代品已存在了近百年,理论上其具有避免关节内组织次发性损伤,术后早期重建韧带结构和恢复关节功能,晚期被自体组织整合或替代等优势。然而传统人工韧带的实际应用并不理想,其主要原因是韧带材料多为致密的二维(2-D)结构,不利于宿主组织长入,韧带被机体整合或替代的生物化程度较低,导致其疲劳断裂^[10-12]。

组织工程和再生医学技术的发展,为研制高度生物化的人工韧带带来了新的希望^[13]。目前关于实现人工材料植入后生物化主要目标是“引起宿主细胞的趋向、黏附和迁移,使材料在体内形成长期稳定的生物性连接”。以往研究多集中于通过表面改性以提高材料生物性,如增加材料亲水性、表面修饰、黏附适宜细胞以及复合细胞因子等方面,而忽略了材料微观结构在人工韧带生物化方面的重要作用。人们通过对天然韧带的仿生学研究发现,构建具有三维(3-D)多孔结构的人工韧带,不仅有利于提高人工韧带的生物力学强度,更有利于细胞的长入,实现

作者简介 张东宪(1983-),男,硕士研究生,主要研究方向:人工韧带的编织,电话:13991862377, E-mail: zhangdx1225@163.com

△通讯作者 韩一生, E-mail: drhanys@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-10-06 接受日期: 2011-10-31)

早期的生物化^[13-14]。然而,人工韧带植入体内后,由于关节稳定的需要,其必须处于高张力状态,其孔隙率、孔隙结构、纤维排列方向等重要结构参数与松弛状态下具有很大的差异。因此研究张力状态下,具有3-D微孔结构的人工韧带材料对细胞黏附、长入和迁移等生物学机制的影响对于构建生物化人工韧带意义重大,并为PET作为人工材料修复韧带损伤的临床应用奠定实验基础。

1 材料改性提高人工韧带材料生物化的研究进展

新型的人工韧带尽管在制造工艺方面完善了亲水性等相关问题,但往往由于没有细胞和组织长入人工韧带,伴随着不断拉伸,其力学性能逐渐减弱,从而产生断裂。为了构建理想的“生物化”人工韧带,人们在提高材料的生物活性方面进行了许多有益尝试。

1.1 表面修饰

人工韧带植入后,首先材料表面与人体组织细胞发生接触并相互作用。生理状态下,细胞能否顺利黏附在人工材料表面是其后续发挥迁移、增殖、分化等生物活性的基础。细胞在材料表面的黏附可分为非特异性黏附和特异性黏附两种形式。特异性黏附主要是生物化学特异识别性黏附,由细胞表面蛋白与材料表面分子特异性结合,一方面介导细胞黏附,另一方面产生细胞信号传导,引起一系列相应的细胞生物学行为。而非特异性黏附是指物理性黏附,由材料的材质、微观结构等物理性质以及材料表面与细胞间的范德化力、离子力、静电斥力等决定。近年研究发现细胞表面受体直接调节其黏附特异性,而整联蛋白家族发挥了最重要的作用^[15]。整联蛋白作为跨膜糖蛋白的一种,其细胞外的球蛋白结构域(Domain)通过结合细胞外基质(ECM)和细胞骨架蛋白来黏附细胞。因此含有细胞黏附分子和蛋白,如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列、纤维连接蛋白、玻璃连接蛋白、层黏连蛋白、胶原等常被用来修饰材料表面^[16-19]。另外,纤维连接蛋白作为交叉韧带细胞外基质的主要成分之一,也参与调节细胞的形变、迁移、附着、生长,其在交叉韧带的形成及损伤愈合过程中均有较高的表达水平,研究人员亦尝试将其用于人工韧带表面的修饰,以期取得良好的应用效果。

1.2 复合细胞

天然韧带由成纤维细胞、胶原纤维和细胞外基质等组成。成纤维细胞能分泌细胞外基质,细胞外基质通过提供支架结构与附着位点,参与调节韧带细胞的活动。因而可选择适宜的细胞与人工韧带材料复合,通过细胞在其中的生长,分泌细胞外基质,从而提高人工韧带的生物活性。理想的细胞应具有强大的增殖、分化和分泌细胞基质的能力,能够与材料紧密结合并适应材料的结构和力学等生物学变化^[19]。自体骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能,可经诱导向韧带细胞方向分化,并分泌胶原蛋白、蛋白多糖及各种组织蛋白,构成韧带组织及细胞外基质。目前的研究热点是体外共培养条件下调控骨髓间充质干细胞向前交叉韧带细胞分化^[20-21]。最近研究发现应力刺激是对促进骨髓间充质干细胞生长分化为成熟的韧带组织具有重要作用。有学者通过生物反应器将纵向及扭转力作用于未分化的骨髓间充质干细胞,发现其可上调表达韧带成纤维细胞表型,而且I型胶原蛋白表达明显升高。同时人们还发现周期性应力

刺激能够有效促进骨髓间充质干细胞生长和分化^[22]。组织学上,髓间充质干细胞排列有序,长轴方向垂直于力场方向,其形态与成纤维细胞相似。虽然在细胞复合能够显著提高韧带材料生物性,但细胞与人工韧带复合后如何储存和使用方面仍有许多问题需要解决。

1.3 复合细胞因子

研究发现许多细胞因子,如成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、胰岛素样生长因子(IGF)和表皮生长因子(EGF)均可促进人体韧带细胞有丝分裂,使其增殖速度加快。Moreau等尝试使用不同细胞因子的组合促进骨髓间充质干细胞增殖及向成纤维细胞方向分化,取得较好的效果^[21-23]。体外实验测定了细胞因子对韧带细胞的具体作用,已证实EGF能够对韧带成纤维细胞的增殖起诱导作用,并可促进糖蛋白合成,但却使I型胶原的合成减少;IGF-1可促进细胞增殖,合成I型胶原和糖蛋白;TGF- β 1则可刺激基质的形成,使用TGF- β 1治疗老鼠内侧副韧带损伤,治疗后其力学性能均增大,所以TGF- β 1最可能成为促进交叉韧带生长的首要因子。实验将细胞因子处理的韧带细胞种植在生物降解聚合物上,其增殖和基质合成能力得到增强。因此可以设想通过一定的缓释系统将这些细胞因子直接加入人工韧带上,不仅可形成屏障以隔离有害的关节液,还可持久缓慢释放细胞因子促进细胞的增殖、分化及细胞外基质的合成。但生长因子的使用尚存在诸多争议,如基因重组生长因子活性不稳定、成本较高且基因产品往往被认为具有潜在致癌性,而生物提取生长因子具有免疫原性和病毒原性等弊端,很多问题有待研究和解决。

2 结构改进提高韧带生物化的研究进展

人工韧带植入体内后,由于关节稳定的需要,其必须处于一定的张力状态。张力状态下韧带的孔隙率、孔隙结构、纤维排列方向等重要参数都与静态或松弛状态下存在很大差异。因此研究张力状态下,人工韧带材料的生物化进程具有重要意义。

目前韧带损伤移植重建的发展趋势是利用编织技术构建组织工程ACL支架材料。编织好的材料通过模拟天然韧带的纤维走向来增强其力学性能。研究发现多次拉伸普通2-D编织技术的人工韧带后,不但不能恢复其初始的长度和力学强度,反而引起断裂,说明其抗疲劳强度差,更重要的是由于缺乏孔隙,严重影响细胞的长入和迁移。而采用3-D编织方式的优势正是大大加强韧带的力学强度和抗疲劳性,就算部分纤维结构撕裂,力学强度也不会明显下降^[23-25]。同时采用了控制化的孔隙设计,大大增加了与体内和组织接触的韧带表面积,促进细胞和组织进入韧带内部,也便于体内营养物质和细胞代谢废物的运输,为韧带血管化和再生创造了条件。

Lu等以聚乳酸和聚对苯二甲酸乙二醇酯混合物为原材料设计了一种3-D编织的人体组织工程学支架材料,其结构特点是在2-D纵向纤维上有宽10 μ m、深5~15 μ m的开放式凹槽结构。在体外利用鼠皮肤成纤维细胞培养后观察到其在凹槽内平行生长,并高度趋向附着,产生大量细胞外基质结构^[26]。Altman等分别将不同的聚合物作为人工韧带材料,采用3-D编织技术和表面多孔化技术和“钢缆式”空间编织设计成新型的人工

韧带支架材料。即 6 根平行排列的束构成整条韧带主体,3 条螺旋编织的股构成 1 束(反时针 3 tw/cm),6 条螺旋编织的丝条构成 1 股(顺时针 3 tw/cm),30 根平行排列的蚕丝纤维拉制成 1 丝。其力学性质和疲劳耐受良好。细胞培养后利用电镜观察其结构显示其丝蛋白表面孔隙的范围为 5~60 μm ,细胞仅良好地生长在支架表面,未渗入支架内部^[24]。目前已在临床使用 LARS 韧带在编织方式上采用了编织混合针织的方法,不仅具有良好的力学性能,其生物学特性也得到了改善。LARS 韧带由两部分构成:平行的纵行纤维束组成关节内部分,通过扭转来模仿人体韧带的活动,在骨隧道内由横行和纵行纤维交织而成的纤维模仿人体韧带的构造,其表面多孔结构大大促进细胞的黏附和生长^[24]。Trieb 等对 LARS 韧带移植术后 6 个月的 LARS 韧带进行活检及组织学分析,同时体外实验在 LARS 韧带上培养成纤维细胞或成骨细胞,而后进行组织学分析,活检结果显示细胞和结缔组织完全长入 LARS 韧带,体外实验结果显示成 LARS 韧带纤维被纤维细胞和成骨细胞形成的细胞网完全包裹^[25]。

对于理想支架材料的孔径范围也存在很大争议。通常认为大于 150 μm 直径的孔隙设计对骨性组织长入有利,而大于 200~250 μm 的直径设计适合纤维组织。但孔径 >500 μm 时,则会影响材料的强度和细胞粘附率。近期研究发现影响细胞组织长入材料孔隙的首要因素是孔间连通率和孔间通道的直径,而不是孔径范围。孔隙率高达 90% 以上增加了支架材料与细胞的接触面积,促进了细胞黏附生长、ECM 沉积、营养物质以及代谢产物的运输。另外纺丝纤维的纤度、直径、松紧度、编织材料的孔隙率、孔径结构、编织角度等各种条件均直接影响细胞的黏附与长入。有研究显示纤维的纤度和直径较小,有益于提高支架材料的力学性能。其原因可能是降低纤维纤度和直径后,单位体积内纤维数量增多,提高其力学性能。此外,纤维数量增多可以增大支架材料的表面积,有利于细胞在支架材料上黏附及营养物质的交换^[25]。

3 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)材料研究进展

随着 LARS 韧带优越性的初步显现,作为 LARS 韧带的主要组成材料,聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)日益受到人们关注。1941 年英国科学家最早制出聚对苯二甲酸乙二醇酯纤维,其商品名 Dacron,中文名涤纶,即我们熟知的“的确凉”。此后研究发现 PET 材料具有良好的力学性能和一定的生物相容性,并被 FDA 批准应用于医学领域,包括人工血管、人工心脏瓣膜缝合环、心脏修补片和医用缝合线。法国人 Laboureaud 于 1985 年研制出 Ligastic 韧带,是最早将 PET 材料的应用到人工韧带领域的研究之一。基于此技术,Laboureaud 等改进编织技艺,制作出性能更佳的 LARS 韧带,最大限度的发挥了 PET 材料的力学强度优势^[27-28]。然而好的人工韧带不仅仅需要优良的力学强度,其生物学特性同样至关重要。PET 材料尽管没有生物毒性,但因其分子结构对称,结晶度较高,缺乏极性基团,所以其亲水性较差,不利于细胞黏附生长。研究发现新型人工韧带尽管利用化学修饰方法使纤维微孔表面带有大量的羧基或者羧基,提高材料的亲水性,但仍然不能很好的诱导周围细胞和组织的长入。而且化学修饰使用不当会严重损害材料本身的

力学特性。

综上所述,韧带修复重建的最终目的是对韧带大体解剖和显微解剖结构的恢复以及所有力学、神经肌肉、生理指标完全恢复到完好关节水平,为了达到此目的,学者们尝试了多种材料,目前看来最为可行的是聚对苯二甲酸丁二醇酯(PET)。以生物相容性良好的聚对苯二甲酸丁二醇酯(PET)新型编织材料作为载体,随着在张力状态下新编 PET 的结构、孔径大小和孔隙率对细胞迁移等细胞生物学行为影响研究的深入,必将为 PET 作为人工材料修复韧带损伤的临床应用奠定实验基础。

参考文献(References)

- [1] Rishiraj N, Taunton JE, Lloyd-Smith R, et al. The potential role of prophylactic/functional knee bracing in preventing knee ligament injury[J]. Sports Med, 2009,39(11):937-960
- [2] Brophy RH, Gill CS, Lyman S, et al. Effect of anterior cruciate ligament reconstruction and meniscectomy on length of career in National Football League athletes: a case control study [J]. Am J Sports Med. 2009 Nov, 37(11):2102-2107
- [3] Widuchowski W, Widuchowski J, Koczy B, et al. Untreated asymptomatic deep cartilage lesions associated with anterior cruciate ligament injury: results at 10- and 15-year follow-up[J]. Am J Sports Med, 2009 Apr, 37(4):688-692
- [4] Ahlde n M, Kartus J, Ejerhed L, et al. Knee laxity measurements after anterior cruciate ligament reconstruction, using either bone-patellar-tendon-bone or hamstring tendon autografts, with special emphasis on comparison over time[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009 Sep,17(9):1117-1124
- [5] Eriksson E. Patellar tendon or quadriceps tendon grafts for ACL reconstruction [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc,2007 Nov; 15(11):1283
- [6] Gorschewsky O, Klakow A, Pütz A, et al. Clinical comparison of the autologous quadriceps tendon (BQT) and the autologous patella tendon (BPTB) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2007,Nov,15 (11): 1284-1292
- [7] Sun K, Tian SQ, Zhang JH, et al. Anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone autograft versus allograft[J]. Arthroscopy, 2009 Jul,25(7): 750-759
- [8] Edgar CM, Zimmer S, Kakar S, et al. Prospective comparison of auto and allograft hamstring tendon constructs for ACL reconstruction [J]. Clin Orthop Relat Res, 2008 Sep;466(9):2238-2246
- [9] Baer GS, Harner CD. Clinical outcomes of allograft versus autograft in anterior cruciate ligament reconstruction [J]. Clin Sports Med, 2007 Oct, 26(4):661-681
- [10] Murray AW, Macnicol MF. 10-16 year results of Leeds-Keio anterior cruciate ligament reconstruction[J]. Knee, 2004 Feb,11(1):9-14
- [11] Cuppone M, Seedhom BB. Effect of implant lengthening and mode of fixation on knee laxity after ACL reconstruction with an artificial ligament: a cadaveric study[J]. Orthop Sci, 2001,6(3):253-261
- [12] Minezaki T, Tomatsu T, Hanada K. Calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease after anterior cruciate ligament reconstruction[J]. Arthroscopy, 1998 Sep,14(6): 634-636

- [13] Petrigliano FA, McAllister DR, Wu BM. Tissue engineering for anterior cruciate ligament reconstruction: a review of current strategies[J]. Arthroscopy, 2006 Apr;22(4):441-451
- [14] Bernardino S. ACL prosthesis: any promise for the future?[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009 Nov;14
- [15] Brune T, Borel A, Gilbert TW, et al. In vitro comparison of human fibroblasts from intact and ruptured ACL for use in tissue engineering [J]. Eur Cell Mater, 2007 Dec;17(14):78-90
- [16] Cornwell KG, Landsman A, James KS. Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair[J]. Clin Podiatr Med Surg, 2009 Oct, 26(4): 507-523
- [17] Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach[J]. Biomaterials, 2005 Dec;26(36): 7530-7536
- [18] Murray MM, Spindler KP, Ballard P, et al. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold [J]. Orthop Res, 2007 Aug, 25(8): 1007-10017
- [19] Murray MM. Current status and potential of primary ACL repair. [J] Clin Sports Med, 2009 Jan;28(1):51-61
- [20] Heckmann L, Schlenker HJ, Fiedler J, et al. Human mesenchymal progenitor cell responses to a novel textured poly (L-lactide) scaffold for ligament tissue engineering [J]. Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007 Apr;81(1):82-90
- [21] Moreau JE, Bramono DS, Horan RL, et al. Sequential biochemical and mechanical stimulation in the development of tissue-engineered ligaments[J]. Tissue Eng Part A, 2008 Jul;14(7):1161-1172
- [22] Moreau JE, Chen J, Horan RL, et al. Sequential growth factor application in bone marrow stromal cell ligament engineering [J]. Tissue Eng, 2005 Nov-Dec;11(11-12): 1887-1897
- [23] Lu HH, Cooper JA Jr, Manuel S, et al. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies[J]. Biomaterials, 2005, 26(23): 4805-4816
- [24] Altman GH, Lu HH, Horan RL, et al. Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering[J]. Biomech Eng, 2002 Dec, 124(6): 742-749
- [25] Trieb K, Blahovec H, Brand G, et al. In vivo and in vitro cellular ingrowth into a new generation of artificial ligaments [J]. Eur Surg Res, 2004 May-Jun; 36(3):148-151
- [26] Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, et al. Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering[J]. Biomed Mater Res A, 2005;74(3):338-346
- [27] Ibrahim SA. Surgical treatment of chronic Achilles tendon rupture[J]. Foot Ankle Surg, 2009, 48(3):340-346
- [28] Mascarenhas R, Macdonald PB. Anterior cruciate ligament reconstruction: a look at prosthetics-past, present and possible future [J]. McGill Med, 2008;11(1): 29-37

(上接第 2980 页)

- Ji Ying-yao, Hu Guang, Lin Chang-xiao. Analysis of 82 cases in surgical treatment of Pilon fracture [J]. The Orthopedic Journal of China, 2000;7(3):243-244
- [16] Endres T, Grass R, Biewener A, et al. Advantages of minimally invasive reposition, retention, and Ilizarov- (hybrid) fixation for pilon tibial fractures with particular emphasis on C2/C3 fractures [J]. Unfallchirurg, 2004;107(4):273-284
- [17] Saleh M, Shanahan MD, Fern ED, et al. Intra-articular fractures of the distal tibia: surgical management by limited internal fixation and articulated distraction. Injury, 1993;24:37-40
- [18] Bahari S, Lenehan B, Khan H, McElwain JP. Minimally invasive percutaneous plate fixation of distal tibia fractures. Acta Orthop Belg, 2007;73:635-640
- [19] Barbieri R, Schenk R, Koval K, et al. Hybrid external fixation in the treatment of tibial plafond fractures. Clin Orthop Relat Res, 1996: 16-22
- [20] Blauth M, Bastian L, Kresek C, et al. Surgical options for the treatment of severe tibial Pilon fractures: a study of three techniques [J]. J Orthop Trauma, 2001;15(3):153-160
- [21] 纪方, 王秋根, 张秋林, 等. Pilon 骨折的微创治疗 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2005;7 (3):225-229
- Ji Fang, Wang Qiu-Gen, Zhang Qiu-Lin, et al. Minimally invasive treatment of Pilon fractures [J]. Chinese Journal of Orthopaedic Trauma, 2005;7 (3):225-229
- [22] Kilian O, Bundner MS, Horas U, et al. Long term results in the surgical treatment of Pilon tibial fractures [J]. Chirurg, 2002;73(1): 65-72
- [23] Neuman PC, Catalano JD. Treatment of the sequelae of Pilon fractures[J]. Clin Podiatr Med Surg, 2000;17:117-130