

医用支架型前交叉韧带的设计

吴惠英^{1,2}, 左保齐³

(1. 苏州经贸职业技术学院, 江苏 苏州 215009;

2. 苏州大学 纺织与服装工程学院, 江苏 苏州 215006;

3. 苏州大学 现代丝绸国家实验室, 江苏 苏州 215123)

摘要: 利用丝素蛋白优良的生物相容性, 以天然桑蚕丝为原料设计编织支架型人工韧带, 经冷冻干燥方式形成海绵状多孔丝素支架材料, 并利用扫描电镜、流变仪以及电子强力仪测试材料性能。结果表明: 海绵状多孔丝素支架材料的表面出现多孔, 同时针织线圈之间也由多孔丝素材料相连接; 溶液的黏度随溶液浓度的增加而增加; 浸入丝素蛋白溶液前后的支架材料的力学性能没有明显差异。

关键词: 前交叉韧带; 丝素蛋白; 丝素支架材料; 冷冻干燥; 纬平针组织

中图分类号: TS 182+.4

文献标志码: B

文章编号: 1000-4033(2012)12-0017-03

随着运动水平的提高, 前交叉韧带 (Anterior Cruciate Ligament, ACL) 的损伤率也明显增高。前交叉韧带损伤后会造成膝关节不稳, 继发关节内其他结构如半月板、软骨的损伤, 导致关节炎的发生, 后期导致严重的关节退变^[1-3]。由于前交叉韧带自身愈合能力差, 人们很早就放弃了单独使用前交叉韧带缝合修复的方法, 而多使用移植物重建^[4-5]。丝素蛋白是从蚕丝中提取的天然高分子纤维蛋白, 具有优良的生物相容性和良好的物理化学性能, 近年来成为组织工程支架材料研究的热点之一。本文采用天然蚕丝为原料进行支架型组织工程前交叉韧带的设计, 为其进一步应用提供参考。

1 前交叉韧带的生物学特征

前交叉韧带对于保证膝关节的正常运动和稳定性起到了十分重要的作用^[6]。前交叉韧带由纵形

排列的成纤维细胞和平行排列的细胞外基质构成, 细胞外基质以 I 型胶原为主 (占去脂后干质量的 70%), 其次为 III 型胶原。纵行、致密的 I 型胶原组成直径约 20 μm 的纤维, 被较细的 III 型胶原分隔成直径 20~400 μm 的纤维束^[7]。韧带中还含有少量弹性蛋白 (<5%) 和糖蛋白 (<1%)。ACL 中多数纤维束呈纵向走行, 但有部分纤维束呈螺旋排列^[8]。它是膝关节内最重要的韧带结构之一, 起于股骨髁间的后部, 向前向下止于胫骨髁间隆突的前外侧^[9-11]。主要功能是稳定膝关节, 防止膝关节胫骨过度前移或股骨后移, 并协助控制膝关节侧方运动和旋转运动。

2 支架型前交叉韧带的编织及性能测试

2.1 原料选择

用于组织工程的多孔支架材料必须具备以下特点: 良好的生物

相容性; 合适的生物降解性和降解速度; 可负载生长因子及传递生物信号, 利于细胞黏附、生长和增殖; 合适的孔径、高的孔隙率 (>90%) 和贯通的孔形态; 与植入部位组织相匹配的力学性能和机械强度; 材料来源充足, 成本合适^[12-13]。蚕丝经过脱胶制得的丝素蛋白具有无毒、无刺激、良好的生物相容性等优点, 在生物医学领域被广泛应用。目前以桑蚕丝为原料制备的生物医用材料主要有手术缝合线、人工血管、创面保护材料、药物缓释体等。本文在进行支架型前交叉韧带原料的选择时, 充分考虑桑蚕丝的优良生物相容性, 以天然桑蚕丝作为前交叉韧带的编织原料, 每根纱线由 6 根单纱合并而成, 直径约为 50 μm , 编织支架型前交叉韧带。

2.2 编织工艺

支架型前交叉韧带采用机号为 14 针/25.4 mm 的 SK270 型横机编

作者简介: 吴惠英 (1980—), 女, 讲师, 硕士研究生。主要从事丝素蛋白的基础及应用研究工作。

织,其编织尺寸为 30 mm×60 mm,组织结构为纬平针组织。所编织织物参数如下:

圈距	1.1 mm
圈高	1.0 mm
线圈长度	4.6 mm
横密	55 纵行/50 mm
纵密	50 横列/50 mm
厚度	3.485 mm
克质量	263 g/m ²

2.3 脱胶处理

将编织好的支架材料放入 0.5% 的碳酸钠溶液中脱胶,浴比 1:10,处理温度 100 ℃,处理时间 30 min,去离子水洗涤,如此反复进行 3 次。完成脱胶后放在室温通风处晾干,即获得纯丝素支架材料。

2.4 拉伸性能测试

由于前交叉韧带在运动过程中要经过反复拉伸,因此拉伸性能是支架型前交叉韧带的重要性能之一。采用 YG065HC 电子织物强力仪对脱胶后的支架型前交叉韧带织物的拉伸性能进行测试,试样宽度 50 mm,有效夹持距离为 200 mm,预加张力 2 N,拉伸速度为 100 mm/min,测试 5 次取平均值。测试结果如下:

横向断裂强力	280 N
纵向断裂强力	294 N
横向断裂伸长率	63.8%
纵向断裂伸长率	54.6%

3 丝素支架材料制备及性能测试

3.1 再生丝素溶液的制备

丝素蛋白不溶于水,也不溶于乙醇等有机溶剂,但在某些中性盐溶液中可无限膨胀成为黏稠的液体,经透析除盐即可得到丝素蛋白溶液^[14]。将脱胶后的桑蚕丝溶于 LiBr+C₂H₅OH+H₂O (质量比 44:45:11) 混合溶液中,恒温 (80±2) ℃ 水浴搅拌溶解制得再生丝素蛋白溶液,经冷却以后,将丝素溶液注入 8 000~

14 000 道尔顿的透析袋中,用自来水流动透析两天,再用去离子水透析一天,得到纯丝素蛋白水溶液,浓度约为 2.7%。然后在 37 ℃ 下,缓慢搅拌使其蒸发浓缩,得到浓度约为 12% 的溶液。

3.2 三维支架材料的制备

冷冻干燥作为一种温和的干燥方式,有利于减小蛋白质的变性程度,能够获得结构疏松、孔的空间结构相互贯通的多孔材料^[15]。将再生丝素蛋白溶液注入铝制器皿内,同时将编织的针织支架型织物浸入丝素溶液中至完全浸润。然后放置于 -20 ℃ 冷冻 12 h,之后放入冷冻干燥机真空干燥 72 h,得到海绵状多孔支架丝素材料。

3.3 支架形态结构观察

用 S4800 型 (日本日立公司) 扫描电子显微镜观察经喷金处理后的海绵状多孔丝素支架材料的形态结构。

3.4 丝素蛋白溶液的流变性测量

采用美国 TA 公司 AR2000 流变仪,在 0.01~1 000.00 s⁻¹ 剪切速率范围内,测定 25 ℃ 条件下不同浓度的丝素水溶液的表观黏度变化。

3.5 丝素支架材料力学性能测试

采用 YG065HC 电子织物强力仪测试支架材料的力学性能,测试环境:温度 21.5 ℃,湿度 59.9%。根据韧带尺寸要求,有效夹持长度 40 mm,拉伸速度 10 mm/min,预加张力 0.2 N。选取 5 份试样,每一试样测量 5 次,取平均值。

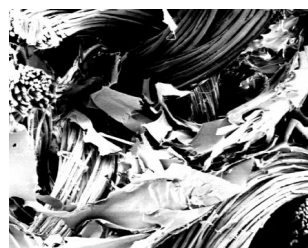
4 结果与讨论

4.1 丝素支架材料的形态结构

支架材料形态结构的 SEM 图如图 1 所示。丝素水溶液在冷冻过程中,当溶液中水的温度低于冰点时,由于热交换而产生了微小的冰核。随温度的降低,分散在丝素相中的冰升华后,继而得到了多孔丝素材料^[15]。由于在织物成形后,先将织物进行了脱胶处理,因此在丝素支架材料中纱线的表面较为光滑。通过冷冻干燥的方式得到了 3-D 支架材料,在针织线圈的结构中间可以看到网状的多孔丝素海绵状连接。相对低浓度的丝素蛋白溶液来说,高浓度的丝素蛋白溶液在支架材料中表现出更为紧密的结构。与孔隙率较低的其他材料相比,这种经过冷冻干燥方式形成的丝素海绵状的支架材料中存在



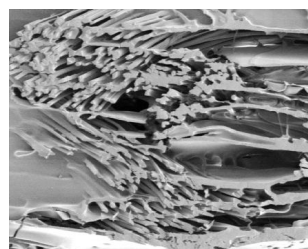
(a) 丝素浓度 2.7%、纵截面



(b) 丝素浓度 2.7%、横截面



(c) 丝素浓度 12%、纵截面



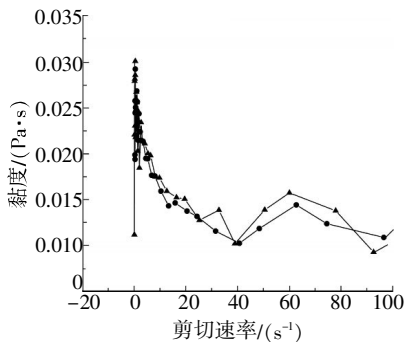
(d) 丝素浓度 12%、横截面

图 1 不同浓度的海绵状多孔丝素支架材料 SEM 图

多种孔径大小的孔隙,这样的结构有利于细胞增殖^[16]。

4.2 丝素溶液的流变性能

不同浓度的丝素蛋白溶液的流变曲线如图 2 所示。结果显示丝素蛋白溶液的黏度呈现随溶液浓度的增加而增加的趋势,然而两种不同浓度的丝素蛋白溶液的流变曲线差异不十分明显。



▲.丝素浓度 2.7%;◆.丝素浓度 12%。

图 2 不同浓度丝素溶液的流变曲线

4.3 丝素支架材料的力学性能

3 种丝素支架材料的力学性能如表 1 所示。极限断裂强力(*UTS*)是指在测试过程中材料所能承受的最大外力作用。没有经过丝素蛋白溶液处理过的丝素支架材料的极限断裂强力为 305 N,其断裂伸长为 56.3%。经丝素蛋白溶液处理过的海绵状多孔丝素支架材料的极限断裂强力与未处理的相似,而其伸长率在某种程度上有所降低。这主要是因为丝素支架材料经过处理后,其织物间有冷冻后的溶液相连接,在受到外力作用时限制了材料的延伸性。比较两种海绵状多孔丝素支架材料后发现,浸入浓度越高的丝素蛋白溶液的支架材料的 *UTS* 越高,伸长率相对下降,但材料的强伸性仍能满足基本的力学需求^[17]。

5 结论

5.1 海绵状多孔丝素支架材料的表面出现多孔,同时针织线圈之间也由多孔丝素材料相连接。

表 1 丝素支架材料的力学性能

样品		<i>UTS</i> /N	伸长率/%
丝素支架材料		305	56.3
海绵状多孔丝素支架材料	丝素浓度 2.7%	283	32.7
	丝素浓度 12%	314	28.4

5.2 丝素蛋白溶液的黏度随着溶液浓度的增加而增加。

5.3 浸入丝素蛋白溶液前后的支架材料的力学性能没有明显差异。

参考文献

- [1] BACH B R Jr, LEVY M E, BOJCHUK J, et al. Single-incision endoscopic anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft. Minimum two-year follow-up evaluation [J]. Am J Sports Med, 1998, 26(1): 30-40.
- [2] BACH B R Jr, TRADONSKY S, BOJCHUK J, et al. Arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft. Five-to nine-year follow-up evaluation [J]. Am J Sports Med, 1998, 26(1): 20-29.
- [3] CRAWFORD C, KAINER M, JERNIGAN D, et al. Investigation of postoperative allograft-associated infections in patients who underwent musculoskeletal allograft implantation [J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(2): 195-200.
- [4] ALTMAN G H, HORAN R L, LU H H, et al. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments [J]. Biomaterials, 2002, 23(20): 4131-4141.
- [5] 王永健.人工韧带在前交叉韧带重建中的应用[J].中国运动医学杂志, 2002 (3): 300-304.
- [6] 吕永钢, 薛茹月, 罗自维, 等.膝关节前交叉韧带修复的组织工程研究进展 [J].医用生物力学, 2009(3): 159-161.
- [7] BOISGARD S, LEVAI J P, GEIGER B, et al. Study of the variations in length

of the anterior cruciate ligament during flexion of the knee: use of a 3D model reconstructed from MRI sections [J]. Surg Radiol Anat, 1999, 21(5): 313-317.

[8] PETERSEN W, TILLMANN B. Anatomy and function of the anterior cruciate ligament [J]. Orthopade. 2002, 31(8): 710-718.

[9] 陈世益, 洪国威, 陈疾忤, 等. LARS 人工韧带与自体腘绳肌腱重建前交叉韧带早期临床疗效比较 [J]. 中国运动医学杂志, 2007(5): 530-533.

[10] 李嘉, 伍中庆, 吴宇峰, 等. 前交叉韧带胫骨附着处解剖学观察 [J]. 颈腰痛杂志, 2005(3): 178-181.

[11] 张弛, 蒋垚, 曾炳芳. 组织工程学前交叉韧带人工韧带的特征 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007(6): 1149-1153.

[12] 姚康德, 尹玉姬. 组织工程相关生物材料 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.

[13] WHANG K, GOLDSTICK T K, HEALY K E, et al. A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors [J]. Biomaterials, 2000, 21(24): 2545-2551.

[14] 高欣, 张海萍, 陈宇, 等. 丝素蛋白多孔材料及其在组织工程领域的应用 [J]. 纺织学报, 2008(10): 132-136.

[15] 李明忠, 卢神州, 吴徽宇, 等. 多孔丝素膜的制备及其形态结构 [J]. 纺织学报, 2000(5): 4-8.

[16] 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.

[17] FREEMAN J W, WOODS M D, LAURENCIN C T. Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid-twist scaffold design [J]. Biomaterials, 2007, 40(9): 2029-2036.

收稿日期 2012 年 4 月 26 日