

DOI: 10.7652/xjtuxb201410022

韧带-骨支架仿生界面设计与制造方法

张文友¹, 贺健康¹, 刘亚雄¹, 李翔², 张维杰¹, 李涤尘^{1,3}

(1. 西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 710049, 西安; 2. 苏黎世联邦理工学院生物力学研究所, CH8088, 瑞士苏黎世; 3. 利兹大学医学生物研究所, LS2 9JT, 英国利兹)

摘要: 针对当前软质韧带支架与硬质骨组织通过机械固定进行韧带修复存在的应力集中与疲劳断裂问题,提出了具有仿生界面的韧带-骨支架设计与制造方法。研究了自然韧带-骨界面的微观结构,通过工程简化设计了具有仿生界面的韧带-骨复合支架,提出了韧带-骨支架仿生界面的分层制造方法,从材料、力学及微观结构方面对所制备的韧带-骨支架仿生界面进行了分析评价。结果表明,所提出的分层制造方法可在软质韧带纤维支架与硬质陶瓷骨支架之间精确制造出所设计的仿生界面,其在材料成分、力学性能及微观结构上呈现分区变化特性。后期通过骨支架与自体骨融合生长以及仿生界面的多组织再生,有望实现韧带纤维支架与自体骨骨道的生理愈合及可靠固定,从而为临床韧带修复提供一种新思路。

关键词: 韧带-骨支架; 仿生界面; 组织工程

中图分类号: Q811.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2014)10-0137-06

Design and Fabrication of Ligament-Bone Scaffolds with Biomimetic Interface

ZHANG Wenyu¹, HE Jiankang¹, LIU Yaxiong¹, LI Xiang², ZHANG Weijie¹,
LI Dichen¹, JIN Zhongmin^{1,3}

(1. State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;
2. Institute for Biomechanics, ETH Zürich, Zürich CH8088, Switzerland; 3. Institute of Medical and Biological Engineering, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK)

Abstract: A new strategy was proposed to design and fabricate ligament-bone scaffolds with biomimetic interfaces, which aims to solve the problem of stress concentration and fatigue fracture associated with the mechanical fixations between soft ligament scaffolds with hard host bones in current ligament surgery. The structural organization of native ligament-bone interface was investigated to provide the reference for the biomimetic design of ligament-bone interface. A layered fabrication schedule was developed to generate the predefined interface between ligament and bone scaffolds. The material, mechanical and structural properties of the resultant interface were evaluated and analyzed. The results show that the presented method can successfully fabricate ligament-bone composite scaffolds with biomimetic interface and the material composition, mechanical properties and porous microstructures in the interface exhibit layered variations in different phase. It is expected that physiological healing and reliable fixation

between ligament scaffolds and host bones can be achieved when the bone scaffolds are fused with the host bones and the multiple tissues are formed in the interface region.

Keywords: ligament-bone scaffold; biomimetic interface; tissue engineering

前交叉十字韧带主要是连接股骨和胫骨,对于膝关节的稳定起着至关重要的作用。但是,前交叉十字韧带是膝关节最主要也是最容易受损伤的韧带之一,其自我愈合能力较差^[1]。临床上通常需要进行韧带重建手术来恢复韧带的正常功能。如今的韧带移植大多为软质材料制造而成,其与骨通道通过界面螺钉进行机械固定。软质韧带移植和硬质骨组织之间的力学性能等各方面的不匹配严重阻碍了韧带移植与骨通道的生理结合^[2]。自然前交叉十字韧带与骨组织进行连接要经历纤维软骨过渡层,该过渡层对于韧带和骨这两种特性完全不同的组织之间的载荷传递起着减小应力集中的作用^[3-7]。纤维软骨过渡层可以进一步分为钙化纤维软骨层和非钙化纤维软骨过渡层^[8],其在成分、结构和力学性能方面都是变化的。

组织工程为韧带移植与自体骨通道的生理固定提供了可能。文献^[9]通过在韧带移植末端结合骨诱导因素来促进韧带移植的生理愈合。文献^[10]通过改变韧带移植嵌入区的微观结构来促进其生理愈合,然而韧带移植与骨通道的生理固定还需要韧带-骨界面的再生。交界面组织工程采用不同成分或者种植不同细胞的分层或多相支架对于再生韧带-骨界面具有重要的指导意义^[3,11-13]。虽然目前利用多相支架再生韧带-骨界面方面已经取得了较大的进展,但是对韧带-骨界面结合韧带移植进行的研究仍然较少。

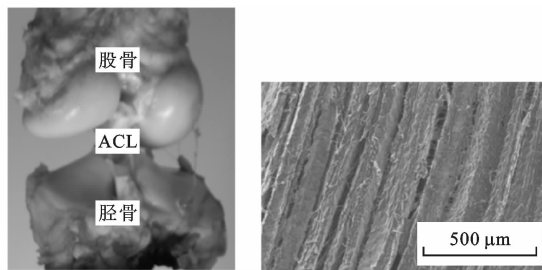
为此,本文模拟自然韧带-骨界面,设计制造了带有仿生界面的韧带-骨支架。其中,韧带支架由相互平行的聚乳酸纤维组成,骨支架为 β 磷酸三钙烧结而成的具有可控管道结构的陶瓷,韧带-骨支架仿生界面为模拟自然韧带-骨界面钙化纤维软骨和非钙化纤维软骨的多孔聚合物与陶瓷的复合体。

1 自然韧带-骨界面结构

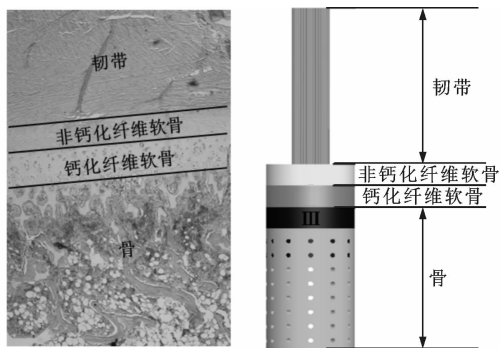
研究自然韧带-骨界面是为韧带-骨支架仿生设计制造提供依据。以猪自然前交叉十字韧带-骨界面为研究对象,用体积分数为10%的福尔马林溶液固定及石蜡包埋之后进行组织学观察。随后,样品被切成5 μm 厚度的片并且用苏木精-伊红(HE)染色。将自然韧带-骨界面的样品沿着平行韧带纤维的

方向切开,切开的自然韧带-骨样品在体积分数为4%的多聚甲醛溶液中于4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下浸泡72 h后,冷冻干燥48 h,观察的韧带-骨界面喷铂处理(40 mA, 60 s),然后利用扫描电镜在5 kV的加速电压下观察样品的微观形貌。

由图1组织学结果可以看出,韧带通过纤维软骨层与骨组织进行连接,纤维软骨层的厚度为200~400 μm ,可以分为非钙化纤维软骨层和钙化纤维软骨层。由扫描电镜结果可以看出,自然韧带由直径为70~250 μm 的韧带纤维近似平行排列而成。



(a) 自然前交叉十字韧带 (b) 自然韧带扫描电镜图



(c) 自然韧带-骨界面 HE 染色 (d) 韧带-骨支架设计图

图1 自然韧带-骨界面观察及韧带-骨支架设计图

2 韧带-骨支架的仿生设计

模拟自然关节韧带-骨的连接方式,设计了连接韧带-骨支架的韧带-骨支架仿生界面,具体韧带-骨支架结构设计如图1d所示。韧带支架由近似平行排列的聚乳酸纤维形成,骨支架为带有相互连通管道的圆柱状多孔陶瓷结构。由聚合物材料构成的I相模拟自然韧带-骨界面的非钙化纤维软骨层;由聚合物材料与陶瓷之比为8.5:1.5组成的II相模拟自然韧带-骨界面的钙化纤维软骨层;由聚合物材料与

陶瓷之比为 7:3 组成的Ⅲ相和骨支架共同模拟自然骨组织。

3 韧带-骨支架的制造及评价

3.1 实验材料及设备

实验材料:聚乳酸纤维(PLA,海宁新能纺织有限公司)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, 85/15, 相对分子质量为 20 万,济南岱罡生物科技有限公司); β -磷酸三钙(β -TCP)粉体(上海贝奥路生物材料有限公司);环氧树脂。

实验设备:SPS250B 快速成型机;快速升温电阻炉;VFD2000 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);微机控制电子万能试验机(CMTS503,深圳市新三思材料检测有限公司);扫描电镜(su-8010,日本)。

3.2 骨与韧带支架制备

利用光固化成型技术结合凝胶注模法^[14]制作骨支架。首先,利用三维设计软件 Pro/Engineer 设计带有相互连通管道的骨支架模型。然后,通过布尔运算生成骨支架模型的负型,并利用光固化成型机制造环氧树脂负型。最后,准备 β -TCP 浆料并灌注入环氧树脂负型,待 β -TCP 浆料固化后在 100% 湿度、60℃ 环境下反应 120 h,60℃ 环境下干燥 24 h 后,在快速升温电阻炉中高温烧结 72 h,使环氧树脂负型气化,得到带有相互连通管道的多孔陶瓷结构骨支架。韧带支架采用 PLA 纤维进行制造,通过测定不同根数 PLA 纤维可以承受的最大拉伸力确定纤维的根数,然后将 PLA 纤维按 1 匝/cm 的编织参数进行编织制作韧带支架。

3.3 韧带-骨支架仿生界面制作

通过将不同比例的 PLGA 和 β -TCP 混合溶液灌注入硅橡胶模具后冷冻干燥而成韧带-骨支架仿生界面,其制作流程如图 2 所示。首先将韧带与骨支架进行连接,之后与硅橡胶模具进行连接固定,硅橡胶模具的内径与骨支架的外径大小相一致。配制 1,4 二氧六环与去离子水质量比为 90:10 的混合溶液作为溶剂,分别向其中加入不同质量的 PLGA 和 β -TCP 粉体,配制质量分数为 20.0% 的 PLGA 与 8.6% 的 β -TCP 混合溶液、质量分数为 15.0% 的 PLGA 与 2.7% 的 β -TCP 混合溶液、质量分数为 10.0% 的 PLGA 混合溶液。向韧带-骨界面逐层注入上述溶液,将灌注好的韧带-骨支架置于一 20℃ 低温环境下预冻,随后放入真空冷冻干燥机内冷冻干燥 72 h,去除硅橡胶模具得到具有仿生界面的韧带-

骨支架。

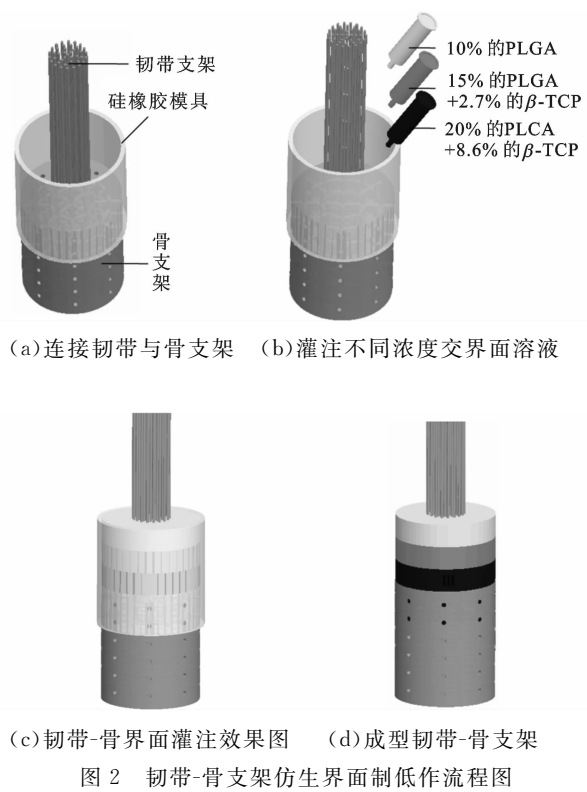


图 2 韧带-骨支架仿生界面制低作流程图

3.4 韧带-骨支架评价

对聚乳酸纤维进行喷铂处理(40 mA,60 s),利用扫描电镜在 15 kV 的加速电压下观察其表面形貌。采用微机控制电子万能试验机对不同根数聚乳酸纤维进行拉伸力学性能测试,以确定其可以承受的最大拉伸力。

对韧带-骨支架仿生界面进行 CT 检测,观察制造的韧带-骨支架仿生界面的三维形貌。通过 XRD 检测韧带-骨仿生界面的成分,扫描步长为 0.001°,扫描速率为 5°/min,所有样品的扫描范围为 10°~80°。

对韧带-骨支架仿生界面进行扫描电镜观察,观察其孔隙连通程度及 I、II、III 相内部孔隙结构,采用 ImageJ 软件进行孔径统计。对韧带-骨支架仿生界面的 I、II、III 相分别制造直径为 10 mm、高度为 10 mm 的支架,采用微机控制电子万能试验机对其进行压缩力学实验,测量 I、II、III 相的力学性能,试验速度为 2 mm/min。

3.5 实验结果

3.5.1 韧带与骨支架 骨支架制造流程如图 3 所示,其中图 3a 为所设计的骨支架通过布尔运算生成的负型模型,图 3b 为采用光固化成型技术制造的环氧树脂负型,图 3c 为向环氧树脂负型中灌注陶瓷浆料后得到的陶瓷胚体,图 3d 为陶瓷胚体烧结之后得

到的骨支架。骨支架的管道对于营养和代谢的传递具有重要作用,图 3e 显示,骨支架的管道结构连通性良好。图 3f 为陶瓷颗粒之间形成的紧密结合。

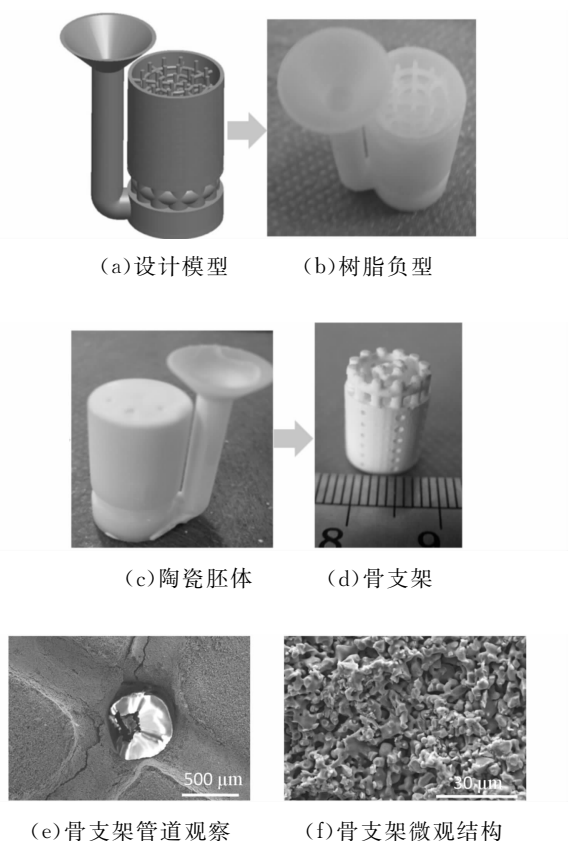


图3 骨支架制造流程图及结构观察

韧带支架制作结果如图 4 所示。图 4b 的扫描电镜结果显示,聚乳酸纤维(直径为 $150\sim 300\ \mu\text{m}$)由 $40\sim 60$ 根直径为 $5\sim 20\ \mu\text{m}$ 近似平行排列的纤维组成,与自然韧带纤维直径及排列类似。单根韧带纤维的最大拉伸力为 $(6.85\pm 0.15)\ \text{N}$,为研究不同根数纤维可以承受的最大力,每次测量 5 个样品,通过拟合,韧带支架可以承受的最大拉伸力 y 与纤维根数 x 满足方程 $y=5.84x+1.82$,测试结果见图 4d。实验时,可以根据不同的动物类型以及上述方程采用合适的纤维根数。

3.5.2 韧带-骨支架仿生界面 CT 和 XRD 分析

图 5a 为所制造的韧带-骨支架,将韧带-骨支架仿生界面进行 CT 扫描,根据密度的差异可以分为 3 种颜色。图 5b 结果显示制造的韧带-骨界面的 3 层结构: I 相对应非钙化纤维软骨层, II 相对应钙化纤维软骨层, III 相对应骨层。XRD 结果显示 II、III 相中存在 β -TCP 成分的存在以及 III 相(骨)比 II 相(钙化纤维软骨层)含有更多的 β -TCP。韧带-骨支架仿生界面成分的变化模拟了自然韧带-骨界面的梯度变化。

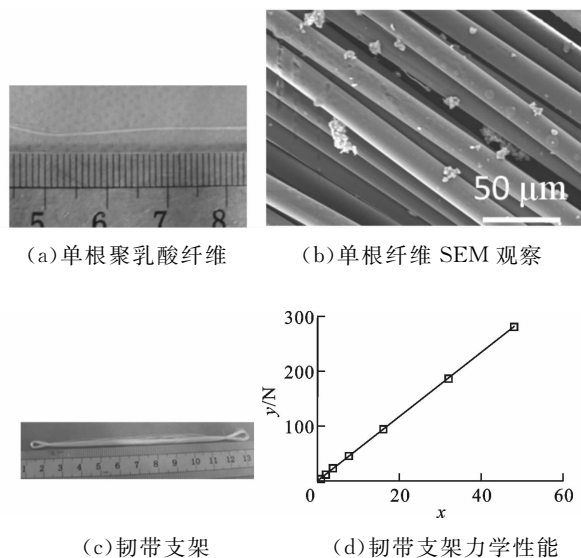


图4 韧带支架及力学性能测试

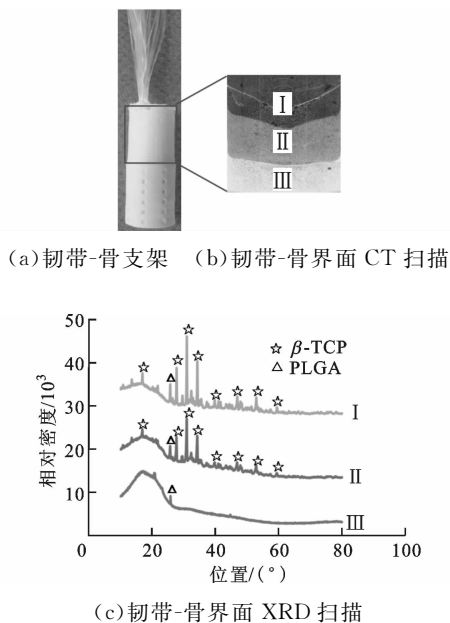


图5 韧带-骨支架 CT 及 XRD 分析结果

3.5.3 韧带-骨支架仿生界面扫描电镜观察

图 6 为韧带-骨支架仿生界面微观结构观察,扫描电镜结果显示,韧带-骨支架仿生界面由相互高度连通的大孔和小孔构成,同时 I、II、III 相 3 层孔洞大小不同。对孔径进行统计,结果如图 7 所示, I 相大孔的直径为 $(130\pm 30.67)\ \mu\text{m}$, II 相大孔的直径为 $(69.46\pm 17.72)\ \mu\text{m}$, III 相大孔的直径为 $(43.11\pm 11.59)\ \mu\text{m}$ 。韧带-骨支架仿生界面孔径的变化模拟了自然韧带-骨界面韧带区向骨区孔洞逐渐变小的结构,为细胞的生长提供了不同环境。

3.5.4 力学实验结果

对 I、II 和 III 相各取 3 个试样分别进行压缩试验,图 8 的压缩试验结果表明, I

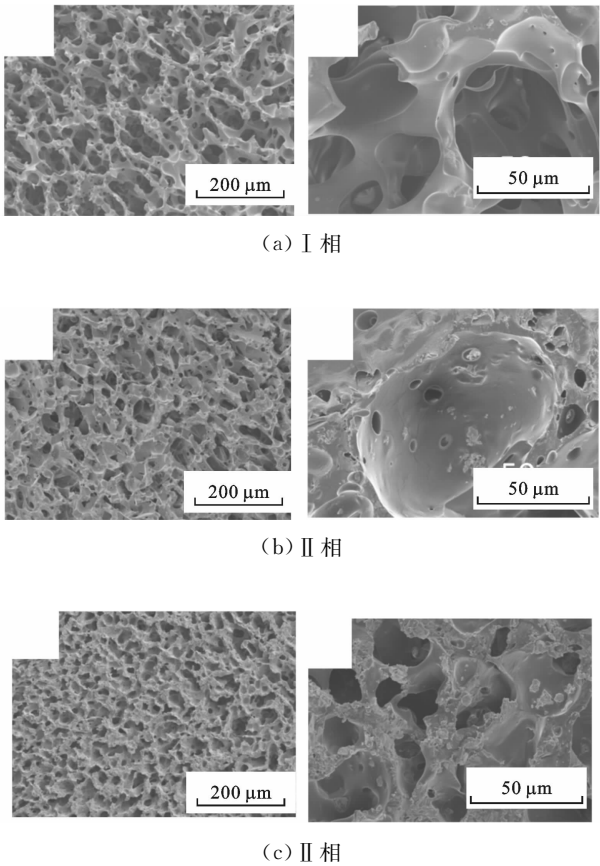


图 6 韧带-骨界面扫描电镜观察结果

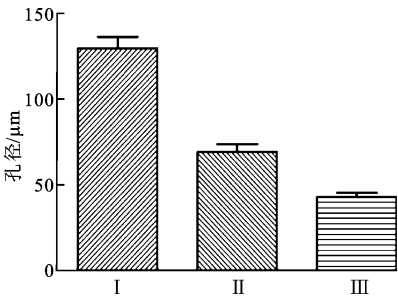


图 7 韧带-骨界面孔径统计

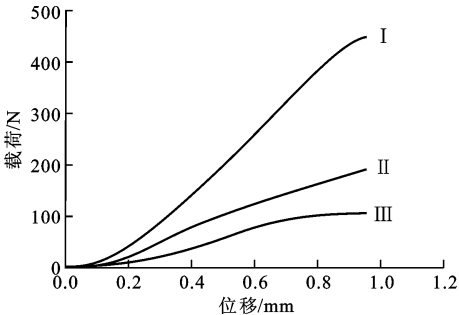


图 8 韧带-骨仿生界面力学分析

相的弹性模量为 (9.7 ± 0.48) MPa, II 相的弹性模量为 (12.0 ± 0.90) MPa, III 相的弹性模量为 (27.0 ± 0.21) MPa。II 相比 I 相表现出了更好的力学性

能,III 相的力学性能最好。韧带-骨支架仿生界面力学性能的变化为减小韧带-骨支架的应力集中起到了缓冲作用,解决了韧带与骨支架力学性能不匹配的问题,为韧带-骨支架与自体骨的生理固定提供了可能。

4 讨论

针对韧带移植长期固定效果较差的难题,组织工程韧带-骨支架成为研究的热点和难点。Laurencin 等研究了三维编织的支架,允许通过控制编织参数实现对支架力学性能、孔的尺寸、降解特性和几何形貌的控制,同一编织物既包含孔隙较大的多孔韧带区,又包含孔隙较小的骨连接区^[1]。但是,此研究所用材料均为软质韧带材料制作而成,并未模拟自然韧带-骨界面成分的变化,造成此韧带移植与骨通道进行固定时存在应力集中的问题,仍然难以实现韧带移植与自体骨通道的生理结合。Jeffrey 等制作了非钙化纤维软骨区、钙化纤维软骨区、骨区三相支架,三相通过加热或者烧结结合在一起^[15-16]。研究发现,三相支架支持不同细胞的生长和分化,证明了在单一支架上再生多种组织的可行性,以及交界面组织工程使得韧带移植与骨通道固定的可能性。但是,该研究只是制造了韧带-骨支架的仿生界面,并未考虑韧带-骨支架仿生界面与韧带移植物的结合问题。

本文制作了带有韧带-骨支架仿生界面的韧带-骨支架, I、II、III 相力学性能的差异提供了刚性的逐渐过渡,有利于解决韧带与骨支架直接进行连接存在的应力集中问题,有助于韧带移植与自体骨的固定。II、III 相 β -TCP 的存在有利于钙化组织的形成,韧带-骨支架仿生界面高度连通的管道结构有利于营养和代谢物的传递。同时,制作的韧带-骨界面在成分、微观结构和力学性能方面的变化为不同细胞的生长分化和不同组织的再生提供了可能。

虽然本文制作了连接韧带与骨支架的韧带-骨支架仿生界面,但是针对韧带-骨支架与骨通道的固定问题还需要做深入的研究。韧带-骨支架与骨通道的固定可以通过进一步改进骨支架的结构,设计制作与骨支架进行连接的倒刺牙型结构固定钉,通过倒刺牙型结构固定钉与骨通道过盈配合进行固定。针对韧带-骨支架仿生界面需要进行体外和体内实验,验证韧带-骨支架仿生界面在成分、微观结构和力学性能等方面的变化是不是有利于再生多组织。

5 结论

针对目前韧带移植忽略了韧带-骨界面的现

象,本文研究了自然韧带-骨界面的结构,并且模拟它设计制造了韧带-骨支架仿生界面。针对目前韧带移植与韧带-骨界面的连接问题,提出了韧带与骨支架分别制造,灌注不同比例聚合物/陶瓷的混合溶液、冷冻干燥的方法。结果表明,韧带-骨支架的仿生界面可以模拟自然韧带-骨界面在成分、微观结构和力学性能方面的变化。

参考文献:

- [1] LAURENCIN C T, FREEMAN J W. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(36): 7530-7536.
- [2] KAWAI T, YAMADA T, YASUKAWA A, et al. Biological fixation of fibrous materials to bone using chitin/chitosan as a bone formation accelerator [J]. *Journal of Biomedical Materials Research; Part B Applied Biomaterials*, 2009, 88B(1): 264-270.
- [3] LU H H, SPALAZZI J P. Biomimetic stratified scaffold design for ligament-to-bone interface tissue engineering [J]. *Combination Chemistry & High Through Screening*, 2009, 12(6): 589-597.
- [4] MOFFAT K L, SUN W H S, PENA P E, et al. Characterization of the structure-function relationship at the ligament-to-bone interface [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(23): 7947-7952.
- [5] SPALAZZI J P, GALLINA J, FUNG-KEE-FURG S D. Elastographic imaging of strain distribution in the anterior cruciate ligament and at the ligament-bone insertions [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2006, 24(10): 2001-2010.
- [6] COOPER J A, SAHOTA J S, GORUM W J, et al. Biomimetic tissue-engineered anterior cruciate ligament replacement [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(9): 3049-3054.
- [7] 李彬, 吴海山. 韧带-骨交界处组织理化特性及相关组织工程学策略 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2008, 16(18): 1399-1418.
LI Bin, WU Haishan. Physical and chemical properties and related tissue engineering strategies at the junction of ligament-bone [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2008, 16(18): 1399-1418.
- [8] SCHIAVONE P A, DENTI M, FRANZESE S, et al. The bone-ligament junction a comparison between biological and artificial ACL reconstruction [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1993, 1(1): 9-12.
- [9] HE P, SAHOO S, NG K S, et al. Enhanced osteoinductivity and osteoconductivity through hydroxyapatite coating of silk-based tissue-engineered ligament scaffold [J]. *Journal of Biomedical Materials Research; Part A*, 2013, 101(2): 555-566.
- [10] LEE J, CHOI W I, TAE G, et al. Enhanced regeneration of the ligament-bone interface using a poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) scaffold with local delivery of cells/BMP-2 using a heparin-based hydrogel [J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(1): 244-257.
- [11] HE P, NG K S, TOH S L, et al. In vitro ligament-bone interface regeneration using a trilineage coculture system on a hybrid silk scaffold [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(9): 2692-2703.
- [12] PAXTON J Z, GROVER L M, BAAR K. Engineering an in vitro model of a functional ligament from bone to bone [J]. *Tissue Engineering; Part A*, 2010, 16(11): 3515-3525.
- [13] SAMAVEDI S, GUELCHER S A, GOLDSTEIN A S, et al. Response of bone marrow stromal cells to graded co-electrospun scaffolds and its implications for engineering the ligament-bone interface [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(31): 7727-7735.
- [14] LI X, SNEDEKER J G, BIAN W, et al. Fabrication of porous beta-tricalcium phosphate with microchannel and customized geometry based on gel-casting and rapid prototyping [J]. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers; Part H Journal of Engineering in Medicine*, 2011, 225(3): 315-323.
- [15] SPALAZZI J P, DAGHER E, DOTY S B, et al. In vivo evaluation of a multiphased scaffold designed for orthopaedic interface tissue engineering and soft tissue-to-bone integration [J]. *Journal of Biomedical Materials Research; Part A*, 2008, 86A(1): 1-12.
- [16] SPALAZZI J P, DOTY S B, MOFFAT K L, et al. Development of controlled matrix heterogeneity on a triphasic scaffold for orthopedic interface tissue engineering [J]. *Tissue Engineering*, 2006, 12(12): 3497-3508.

(编辑 杜秀杰)