doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.06.004

❖基础研究❖

蚕丝-PLGA 复合工程支架在大鼠肌腱损伤中的修复作用

梁永超[1],刘伟亮[2],王春龙[2],冯海莲[3],王娇[4]
(1.秦皇岛市第三医院外三科;2.通用环球中铁山桥医院骨外科;3.秦皇岛市妇幼保健院手术室;4.通用环球中铁山桥医院手术室,河北 秦皇岛 066000)

【摘要】**目的:** 探讨蚕丝-PLGA 复合材料制备的工程支架用于大鼠肌腱损伤中的修复作用。**方法:** 将 48 只雄性 SD 大鼠随机分为实验组和对照组,每组各 24 只。两组均行肌腱损伤手术造模。造模后,实验组在跟腱离断后将蚕丝-PLGA 支架植入大鼠肌肉,然后采用缝合线缝合皮肤;对照组在跟腱离断后,仅用缝合线进行皮肤切口的缝合。分别于术后 1、2、3、4 周进行取材,对各组大鼠进行大体观察、组织学评价,采用免疫组化法检测胶原蛋白 III 的表达,并进行生物力学测试。**结果:** 造模后 1 d,两组小鼠均恢复自主进食,能够正常走动跳跃,行为未受影响,但均存在不同程度摄食减少,所有大鼠术后均未见红肿感染。HE 染色组织学评价显示,实验组术后 3 周及 4 周肌腱胶原纤维排列整齐且致密,并且胶原蛋白 III 表达较高,而对照组肌腱胶原纤维排列无规则,且比较松散。与对照组比较,实验组术后 2、3、4 周胶原蛋白 III 表达均增高($P<0.05$),肌腱最大拉力载荷均增大($P<0.05$)。**结论:** 蚕丝-PLGA 复合工程支架对肌腱损伤修复具有促进作用,能够提高胶原蛋白 III 的表达,增强生物力学特性。

【关键词】肌腱损伤;蚕丝-PLGA 复合支架;修复;生物力学特性
【中图分类号】R686 【文献标志码】A

Repair effect of silk-PLGA composite scaffold on tendon injury in rats

LIANG Yong-chao[1], LIU Wei-liang[2], WANG Chun-long[2], FENG Hai-lian[3], WANG Jiao[4]
(1. *Department of Surgery III, the Third Hospital of Qinhuangdao*; 2. *Department of Orthopaedic Surgery, General Global Tieshanqiao Hospital*; 3. *Department of Operating Room, Maternity & Child Care Center of Qinhuangdao*; 4. *Department of Operating Room, General Global Tieshanqiao Hospital, Qinhuangdao* 066000, *Hebei*, *China*)

【**Abstract**】**Objective**: To investigate the repair effect of silk-PLGA composite scaffold on tendon injury in rats. **Methods**: Male SD rats (48 rats) were randomly divided into experimental group and control group, 24 rats in each group. Both groups underwent surgical modeling of tendon injuries. After modeling, the silk-PLGA scaffold was implanted into rat muscle after Achilles tendon rupture in the experimental group, and then the skin was sutured with suture. In the control group, after the Achilles tendon was broken, only suture was used to suture the skin incision. Samples were taken at 1, 2, 3 and 4 weeks after operation. Gross observation and histological evaluation were performed on each group of rats, and the expression of collagen III was detected by immunohistochemical detection and biomechanical test were performed. **Results**: The experimental group and the control group resumed independent eating 1 day after modeling could walk and jump normally, and the behavior was not affected, but there were different degrees of feeding reduction, no redness and swelling infection was found in all rats after operation. HE staining histological evaluation showed that the tendon collagen fibers in the experimental group were arranged neatly and densely at 3 and 4 weeks after operation, and the expression of collagen III was higher, while the tendon collagen fibers in the control group were arranged irregularly and loosely. Compared with the control group, the expression of collagen III in the experimental group was increased at each time point after 2, 3, and 4 weeks ($P<0.05$), and the maximum tensile load of the tendon was increased ($P<0.05$). **Conclusion**: Silk-PLGA composite engineering scaffold can promote the repair of tendon injury, express collagen III and enhance biomechanical properties.

【**Key words**】Tendon injury; Silk-PLGA composite scaffold; Repair; Biomechanical properties

肌腱损伤是常见的运动性损伤,可导致患肢疼痛及功能障碍,对患者生活质量有严重影响[1]。肌腱损伤后自我修复、愈合缓慢,损伤后的修复仍是临床难题[2]。临床常使用肌腱修复缝合术(完全断裂)或石膏/夹板固定、理疗、镇痛消肿等非手术手段(部分断裂)进行传统治疗,尽管有一定的临床价值,但其疗效仍未达理想,患者治疗后肌腱功能难以恢复至受损前水平[3]。因此,关于肌腱缺损组织工

基金项目: 河北省秦皇岛市科学技术局科研项目(202004A058)
作者简介: 梁永超(1986-),男,主治医师。E-mail:lyc18833818444@126.com

程化研究一直是现今研究的重点、热点。支架材料是主要限制组织工程研究结果应用于临床的因素之一[4],故而研制生物力学性能、生物相容性更好的新型支架材料具有重要价值。

聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid,PLGA)的生物相容性、可降解性俱佳,是常用的高分子材料[5]。当前领域中将蚕丝和PLAG材料复合制备组织工程支架已有报道,其生物相容性已被证实[6-7],但将其应用于肌腱修复方面尚无报道。本研究拟探讨蚕丝-PLGA复合材料制备的工程支架对肌腱损伤中的修复作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级雄性SD大鼠48只(北京维通利华),6~8周龄,体重200~220 g。均适应性饲养1周,通风良好,温度:25 ℃,相对湿度:50%,不限制饮食、饮水。本实验已通过伦理审批(编号:20200801)。

1.2 材料与试剂

蚕丝由河北秦皇岛蚕农赠送,PLGA细丝(GA:LA=90:10,上海天清),单丝直径17 μm,每束含12根单丝,色乳白,质柔软。LG-DMEM(Gibco),胎牛血清(FBS,杭州四季青),胰蛋白酶(Sigma),24、96孔塑料培养板为Costar产品。

1.3 蚕丝-PLGA支架的制备

500 mL Na2CO3溶液(0.3%)中添加1 g蚕丝,煮沸两次,30min/次,去除丝胶,获取蚕丝丝素纤维,清洗、晾干、备用。制作蚕丝-PLGA支架,编织次序为:取蚕丝丝素纤维单丝(160根)、PLGA细丝单丝(96根)混合均匀(质量比为2:3),平行排列(记为×1),将其按顺时针(记为×2)-逆时针(记为×4)-顺时针(记为×8)-逆时针(记为×16)-顺时针(记为×32)-逆时针(记为×48)的次序进行扭合,每次均由2捻扭合成1小索,即完成蚕丝-PLGA混合编织支架(包含两种单丝共12 288根)。75%乙醇消毒30 min后,充分清洗、晾干。术前,将蚕丝-PLGA支架剪成5 mm×2 mm×1 mm,采用无菌PBS溶液浸泡过夜。

1.4 大鼠肌腱损伤模型的建立、分组及处理

将48只雄性SD大鼠按随机数字表法分成实验组和对照组,每组各24只。实验组与对照组参照文献[8]方法造模,予以水合氯酸溶液(0.3~0.5 mL/100 g)腹腔注射麻醉,麻醉后,将大鼠摆放呈俯卧位,固定四肢,备皮,先用碘伏消毒,然后酒精脱碘。于后肢外侧作切口,分离周围的组织,暴露跟腱,尽量避免对营养血管造成损伤,小心分离排肠肌内侧头肌腱。实验组在跟腱离断后,将蚕丝-PLGA支架植入大鼠肌肉,与腱组织紧密贴合,然后缝合皮肤。对照组在跟腱离断后,仅进行皮肤切口的缝合,不作任何修复。

1.5 取材

分别于术后1、2、3、4周进行取材,每次每组取6只大鼠。解剖以显露术区,进行大体观察。并对肌腱损伤组织进行解剖,对损伤处的愈合情况以及生物膜吸收情况进行观察。采集损伤的肌腱组织,用无菌PBS进行清洗后,以4%多聚甲醛予以固定处理,置于-4 ℃下保存,用于后续测定。

1.6 HE染色组织学评价

待测组织用4%多聚甲醛固定,依次完成脱水、透明、浸润、包埋操作,切片(4~10 μm),HE染色,利用电镜下观察样本中胶原纤维成熟等情况。

1.7 免疫组化检测胶原蛋白III的表达

待测组织用4%多聚甲醛固定,乙醇梯度脱水、清洗,予以石蜡包埋,切片(5μm),HE染色,使用免疫组化法检测样本胶原蛋白III表达水平。

1.8 生物力学测试

取各组组织标本,通过单轴拉伸测试其最大拉伸应力。新鲜取材的组织先测其横截面积,将材料修剪成长条型,两端夹具固定,沿长轴方向均匀的对样品进行力学加载,拉伸速度为5 mm/min,记录最大拉力载荷。

1.9 统计学分析

应用SPSS 26.0软件进行统计分析。服从正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)进行描述,组间比较采用独立样本t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

造模后1 d,实验组与对照组即恢复自主进食,能够正常走动跳跃,行为未受影响,但均存在不同程度摄食减少;所有大鼠术后均未见红肿感染。

术后1周,实验组采用血管钳进行切口钳钝性分离、显露深层组织,可见皮肤、周围存在水肿,肌腱修复区愈合不牢,予以轻微牵拉便可见组织分离,能够清晰辨认生物支架,与肌腱组织易分离;对照组同样存在周围组织水肿。术后2周,实验组切口愈合良好,通过锐性切开显露术区,组织水肿减轻,生物支架与肌腱贴合紧密;对照组的肌腱损伤处和周围组织轻微黏连,但可经轻微钝性分离。术后3周,实验组切口基本愈合,生物支架与肌腱贴合致密,无法完整分离,且生物支架可见液化降解迹象,肌腱活动

良好;对照组肌腱损伤处和周围组织之间存在明显粘连带。术后 4 周,实验组生物支架降解吸收,肌腱损伤处和周围组织基本融合,肌腱活动正常;对照组损伤的肌腱损伤处和周围组织明显粘连,肌腱活动比较差。

2.2　组织学评价

术后 1 周,实验组与对照组肌腱周围组织均存在大量淋巴细胞,同时可见少量中性粒细胞,无巨噬细胞,伴随少量成纤维细胞。术后 3 周、4 周,实验组术区支架外可见成纤维细胞大量聚集,可见胶原纤维排列紧密、规则,瘢痕组织形成,肌腱细胞生长入支架内;对照组肌腱损伤处成纤维细胞大量聚集,浸润至正常细胞,胶原纤维排列松散、不整齐。见图 1。

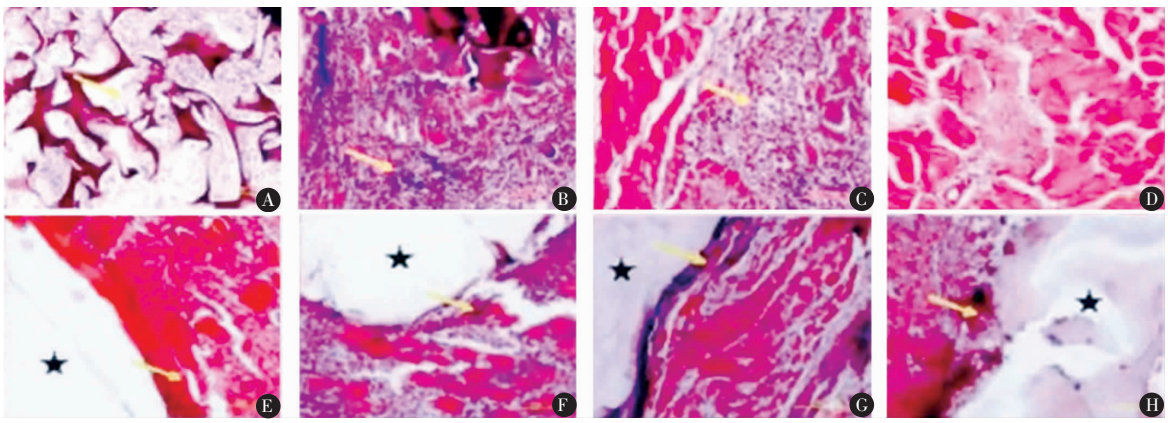

图 1　HE 染色组织学评价(400×)

A-D. 对照组;E-H. 实验组。

2.3　两组胶原蛋白 III 表达比较

与对照组比较,实验组术后 2、3、4 周后胶原蛋白 III 表达水平均增高($P<0.05$)。见表 1。

表 1　3 组胶原蛋白 III 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周
对照组($n=6$)	0.261±0.074	0.287±0.084	0.311±0.108	0.354±0.105
实验组($n=6$)	0.318±0.089	0.428±0.091	0.654±0.089	0.731±0.112
t 值	1.040	2.789	6.004	6.015
P 值	0.323	0.019	<0.001	<0.001

2.4　两组生物力学评价比较

与对照组比较,实验组术后 2、3、4 周的肌腱最大拉力载荷均增大($P<0.05$)。见表 2。

表 2　3 组肌腱最大拉力载荷比较($\bar{x}\pm s$,N)

组别	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周
对照组($n=6$)	6.75±2.25	8.35±1.94	12.36±2.12	17.44±2.31
实验组($n=6$)	7.41±1.63	10.87±1.87	16.45±1.55	26.31±2.85
t 值	0.582	2.291	3.815	5.922
P 值	0.574	0.045	0.003	<0.001

3　讨论

近年来,随着组织工程医学的持续发展,利用组织工程技术将有生命的种植体植入到损伤区域以加快肌腱损伤修复,正成为当前肌腱损修复研究领域的新思路[9-10]。但目前组织工程的实际应用仍存在较大挑战,支架材料是主要限制因素之一,寻找适宜的支架材料是当前阶段的重点。PLGA 是一种降解速度可控,机械性能及柔韧性均优异的组织工程肌腱支架[11]。蚕丝的机械性能则因含有支链含有生长因子、黏附因子而独具优势,在医疗领域应用广泛。既往研究[12]发现,蚕丝可明显吸附肌腱细胞,且生物相容性、力学性能均显示良好,具有促进肌腱损伤修复、改善修复效果的巨大潜能。复合材料可有效结合天然材料、人工合成材料的优势,打破其局限性,从而改进材料性能。Sahoo 等[13]发现细胞适应材料伸展,呈梭形,并与支架材料呈大致平行的排列方式。当前领域中将蚕丝和 PLAG 材料复合制备组织工程支架已有报道,其细胞毒性、生物相容性亦被实验一一证实,但将其在肌腱修复应用方面尚无论据。本研究构建大鼠肌腱损伤模型,拟探讨蚕丝-PLAG 材料复合工程支架对肌腱损伤的修复作用。

在肌腱损伤修复中,设计生物膜或者管状支架植入损伤部位,对于手术部位的固定有益,能够提高抗拉强度,为术后早期活动创造稳定修复环境,有利于新肌腱的生成[14-15]。本研究中,实验组术后行为不受影响,能够正常跳跃,说明该支架的应用具有一定的可行性。肌腱有着与长轴平齐的具有层次感的纤维束结构,组织纤维排列整齐,呈正弦波型特征性结构[16-17]。本研究组织学评价显示,实验组术后 3、4 周肌腱胶原纤维排列整齐且致密,且胶原蛋白 III 表达较高,而对照组肌腱胶原纤维排列无规则,且比较松散,提示蚕丝-PLGA 复合工程支架能够促进肌腱损伤的修复,提高腱化效果。另外,本研究生

物力学结果显示,实验组术后 2、3、4 周的肌腱最大拉力载荷均增大,充分证明蚕丝-PLGA 复合工程支架能够促进肌腱的愈合,增强其生物力学特性,是治疗肌腱损伤的有效措施。

综上,蚕丝-PLGA 复合工程支架能够促进肌腱损伤修复,提高胶原蛋白 III 的表达,增强生物力学特性,是肌腱损伤的有效治疗手段。

参考文献

[1] 贺延雷,雷芳,李强. 胎盘多肽注射液对手部肌腱损伤修复术后伤口感染发生和血清 PCT、PGE2 水平的影响[J]. 广东医学,2020,41(2):189 - 192.

[2] 曹东明. 各种原因所致肌肉和肌腱损伤的超声诊断临床研究进展[J]. 中国全科医学,2020,23(33):4274 - 4278.

[3] 曹庆,邵松,许俊胜,等. 两种时机行关节镜下自体肌腱重建手术治疗急性前交叉韧带损伤的效果对比[J]. 中国现代手术学杂志,2020,24(6):424 - 429.

[4] Long C, Wang Z, Legrand A, *et al*. Tendon tissue engineering: mechanism and effects of human tenocyte coculture with adipose-derived stem cells[J]. The Journal of Hand Surgery, 2018, 43(2):183. e1 - 183. e9.

[5] Lipner J, Li X, Liu YX, *et al*. Functional grading of PLGA nanofiber scaffolds for tendon-to-bone insertion tissue engineering[J]. ASME Summer Bioengineering Conference, 2010, 18(2):383 - 384.

[6] 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.

[7] 杨子林,张兵,杨东福. 蚕丝纤维对 PVA/PVP 复合膜结构和力学性能的影响[J]. 塑料科技,2020,48(4):67 - 70.

[8] 闫明童,翟申浩,褚国庆,等. 肩袖肌腱损伤动物模型的建立及初步研究[J]. 中国运动医学杂志,2019,38(5):406 - 411.

[9] Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, *et al*. Enhanced differentiation of wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in insulin-producing cells by the extract of Nigella sativa seeds[J]. Iranian Red Crescent Medical Journal, 2018, 20(3):28 - 33.

[10] 李稚君,张华峰,李晖. 骨界面组织工程治疗韧带与肌腱损伤研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志,2019,42(5):436 - 440.

[11] 王聪,桑伟林,陈燕敏,等. 负载成骨生长肽的静电纺丝 PLGA 支架可加速大鼠颅骨缺损再生[J]. 南方医科大学学报,2021,41(8):1183 - 1190.

[12] Kuo CK, Marturano JE, Tuan RS. Novel strategies in tendon and ligament tissue engineering: Advanced biomaterials and regeneration motifs[J]. BMC Sports Medicine and Rehabilitation, 2010, 2:20.

[13] Sahoo S, Ouyang H, Goh C, *et al*. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering[J]. Tissue Engineering, 2006, 12(1):91 - 99.

[14] 胡兴峰,李青松,季亮,等. Ⅰ型胶原蛋白生物膜在损伤肌腱内源性愈合过程中的作用[J]. 局解手术学杂志,2021,30(2):103 - 107.

[15] Naghashzargar E, Fare S, Catto V, *et al*. Nano/micro hybrid scaffold of PCL or P3HB nanofibers combined with silk fibroin for tendon and ligament tissue engineering[J]. Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials, 2015, 13(2):156 - 168.

[16] Rieu C, Picaut L, Mosser G, *et al*. From tendon injury to collagen-based tendon regeneration: overview and recent advances[J]. Current Pharmaceutical Design, 2017, 23(24):3483 - 3506.

[17] 张凯红,刘雪剑,孙百川,等. 大鼠尾腱细胞外基质制备方法及其用于肌腱损伤修复的前期研究[J]. 中国医药生物技术,2018,13(6):500 - 505.

(收稿日期:2023 - 01 - 13 修回日期:2023 - 03 - 05)

(上接第 740 页)

[16] Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, *et al*. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity[J]. Arthritis Research & Therapy, 2005, 7(3):R458 - R467.

[17] Lin NY, Beyer C, Giessl A, *et al*. Autophagy regulates TNFα-mediated joint destruction in experimental arthritis[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2013, 72(5):761 - 768.

[18] Shin YJ, Han SH, Kim DS, *et al*. Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress[J]. Arthritis Research & Therapy, 2010, 12(1):R19.

[19] Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, *et al*. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance[J]. Journal of Experimental Medicine, 2011, 208(3):455 - 467.

[20] Arsov I, Adebayo A, Kucerova-Levisohn M, *et al*. A role for autophagic protein beclin 1 early in lymphocyte development[J]. Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950), 2011, 186(4):2201 - 2209.

[21] Maurizio S, Cristina I, Valeria M, *et al*. Autophagy generates citrullinated peptides in human synoviocytes: a possible trigger for anti-citrullinated peptide antibodies[J]. Rheumatology, 2016, 55(8):1374 - 1385.

[22] Zhu L, Wang HZ, Wu Y, *et al*. The autophagy level is increased in the synovial tissues of patients with active rheumatoid arthritis and is correlated with disease severity[J]. Mediators of Inflammation, 2017, 2017:7623145.

[23] Saitoh T, Fujita N, Jang MH, *et al*. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production[J]. Nature, 2008, 456(7219):264 - 268.

[24] Hamaoui D, Subtil A. ATG16L1 functions in cell homeostasis beyond autophagy[J]. The FEBS Journal, 2022, 289(7):1779 - 1800.

[25] Pandey R, Bakay M, Strenkowski BP, *et al*. JAK/STAT inhibitor therapy partially rescues the lipodystrophic autoimmune phenotype in Clec16a KO mice[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):1 - 17.

(收稿日期:2023 - 01 - 14 修回日期:2023 - 02 - 27)