

• 论 著 •

# 静电纺纳米纤维 PLCL/纤维蛋白原人工 韧带的生物相容性评价

郭佳花<sup>1,2</sup>, 张羽<sup>2</sup>, 陈丽媛<sup>2</sup>, 徐丽明<sup>2</sup>, 莫秀梅<sup>1</sup>, 陈亮<sup>2</sup>

1. 东华大学 化学化工与生物工程学院 (上海 201620)

2. 中国食品药品检定研究院 (北京 102629)

**【摘要】** 本研究旨在评价聚乳酸-己内酯 (PLCL)/纤维蛋白原纳米纤维膜 (P/F-Ns) 的安全性和功能性, 为临床应用提供理论支撑。通过扫描电镜、材料测试机、接触角测量仪和酶标仪分别研究 P/F-Ns 的表面形态、力学性能、亲水性和纤维蛋白原含量。通过 CCK-8 法和实时荧光定量 PCR 评价 Hig-82 细胞在 P/F-Ns 上的黏附、增殖及韧带修复相关基因表达。结果显示, 随着纤维蛋白原含量增加, P/F-Ns 表面纤维孔隙增大, 力学性能下降, 亲水性增强, 其中 P/F-N-2 最有利于细胞黏附和增殖。以不含纤维蛋白原的 P/F-N-0 为对照, 含纤维蛋白原的 P/F-N-1、P/F-N-2 和 P/F-N-3 上细胞韧带修复相关基因在第 3 天和第 7 天表达均上调。与 P/F-N-0 相比, 含纤维蛋白原的 P/F-Ns 具有更好的生物相容性, 能够有效应用于前交叉韧带重建。

**【关键词】** 生物相容性; 静电纺丝; PLCL/纤维蛋白原纳米纤维膜; 韧带重建

## Biocompatibility evaluation of electrospun PLCL/fibrinogen nanofibers in anterior cruciate ligament reconstruction

GUO Jiahua<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu<sup>2</sup>, CHEN Liyuan<sup>2</sup>, XU Liming<sup>2</sup>, MO Xiumei<sup>1</sup>, CHEN Liang<sup>2</sup>

1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, P. R. China

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, P. R. China

Corresponding author: MO Xiumei, Email: xmm@dhu.edu.cn; CHEN Liang, Email: chenliang@nifdc.org.cn

**【Abstract】** The study aimed to evaluate the safety and function of poly(lactic-acid-co-ε-caprolactone) (PLCL)/fibrinogen nanofibers (P/F-Ns), and provide theoretical basis for the clinical application. The surface morphology, mechanical properties, the hydrophilicity and the fibrinogen content of P/F-Ns were tested by scanning electron microscope, the material testing machine, the contact angle meter and the microplate reader, respectively. The cell adhesion, proliferation and ligament remodeling genes expression of Hig-82 cells on P/F-Ns were conducted through cell counting kit-8 (CCK-8) and real-time quantitative PCR analyses, respectively. The results showed that with the increase of the fibrinogen content, the pore sizes and hydrophilicity of three P/F-Ns increased, but the mechanical properties decreased. Cell adhesion and proliferation tests showed that P/F-N-2 held the best ability to promote cell adhesion and proliferation. The ligament remodeling genes expressions of Hig-82 cells on P/F-N-1, P/F-N-2 and P/F-N-3 were all up-regulated compared to P/F-N-0 on days 3 and 7. All the three P/F-Ns containing fibrinogen (P/F-N-1, P/F-N-2 and P/F-N-3) had better biocompatibility compared to P/F-N-0, and could be efficiently applied to the reconstruction of anterior cruciate ligament.

**【Key words】** Biocompatibility; Electrospun; PLCL/Fibrinogen nanofibers; Ligament reconstruction

## 引言

前交叉韧带是膝关节内一种致密的结缔组织,

主要由胶原 (I 型胶原、III 型胶原和 V 型胶原)、弹性蛋白、糖基质蛋白及蛋白聚糖组成, 在维持膝关节稳定性和功能运动中起重要的作用<sup>[1]</sup>。然而, 在

DOI: 10.7507/1001-5515.202107011

基金项目: 中国科技部重点项目研发计划 (2018YFC1106200, 2018YFC1106201); 中央高校基本业务费专项基金 (2232019A3-07); 上海市科委 2019 年度生物医药领域科技支撑项目 (19441902600); 国家自然科学基金 (31771023)

通信作者: 莫秀梅, Email: xmm@dhu.edu.cn; 陈亮, Email: chenliang@nifdc.org.cn



频繁的膝关节运动中,前交叉韧带的生物力学性能极易受损。文献研究表明,前交叉韧带损伤发生率为 35/100 000 人,其中女性运动员的发生率是男性运动员的 2~8 倍<sup>[2-3]</sup>。仅仅在美国,每年将发生 100 000~200 000 韧带损伤案例<sup>[4-5]</sup>。大部分韧带损伤患者还伴随有关节炎和滑膜炎等,这将严重影响其正常生活,降低其生活质量。

由于韧带的有限自我再生能力,前交叉韧带修复在临床医疗上面临巨大的挑战。目前韧带修复的手术治疗方法为前交叉韧带重建术,使用自体移植物<sup>[6]</sup>、同种异体移植物、异种移植物或人工韧带移植物等。自体韧带移植物是目前临床疗效理想的替代物,但是存在增加供体部位发病率、损坏自身健康组织的风险。同种异体和异种移植物也会带来一系列的免疫排斥反应,加剧患者的损伤情况和增加患者康复周期<sup>[7-8]</sup>。因此,人工韧带移植物在临床医疗应用中受到关注。

人工韧带移植物材料包括合成聚合物高分子、天然高分子以及复合材料等。合成聚合物高分子一般认为具有良好的力学性能,但生物相容性不足,可能产生骨关节炎和滑膜炎等<sup>[9-14]</sup>,目前上市的产品包括 Gore-Tex 十字交叉韧带、Stryker Dacrone 韧带和 3M Kennedy LADTM 韧带增强器<sup>[15-20]</sup>。天然高分子材料包括胶原、蚕丝蛋白、纤维蛋白原、明胶及壳聚糖等,生物相容性优于合成聚合物,但通常不能提供足够的力学支撑。由两者构成的复合材料被认为将具有合适的力学性能和生物相容性,因此在韧带修复的研究中获得了越来越多的应用。

本研究中人工韧带是由聚乳酸-己内酯[poly(lactic-acid-co-ε-caprolactone), PLCL]和猪源的纤维蛋白原按照不同比例混合经静电纺丝技术制成的前交叉韧带修复材料,其中的纤维蛋白原被认为具有改善材料亲水性、赋予修复材料良好细胞相容性的作用,因此本课题主要对韧带修复材料的理化性能(包括表面形貌、力学性能、亲水性和纤维蛋白原含量)和细胞相容性(细胞黏附增殖、基因表达)进行研究,为开展动物体内韧带修复实验提供依据。

## 1 材料与仪器

Hig-82 滑膜细胞(ATCC® CRL-1832™)购买于美国 ATCC 公司,人工韧带是由上海松力生物技术有限公司按课题组要求以不同比例的 PLCL 和纤维蛋白原为原料通过静电纺丝技术制成的 PLCL/纤维

蛋白原纳米纤维膜(PLCL/fibrinogen nanofibers, P/F-Ns),其中纤维蛋白原含量分别为 0 mg/g(P/F-N-0)、70 mg/g(P/F-N-1)、140 mg/g(P/F-N-2)和 180 mg/g(P/F-N-3)。

主要试剂有:硫酸铜、酒石酸钾钠、碘化钾、氢氧化钠(阿拉丁公司,中国),牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、青链霉素混合液、CCK-8(Solarbio 公司,中国),胎牛血清、Ham's F-12 培养液(Gibco 公司,美国),PBS(Hyclone 公司,美国),RNeasy Plus Mini Kit、QuantiTect Reverse Transcription Kit(Qiagen, 德国),TB Green Premix Ex Taq II(TAKARA, 日本),ddH<sub>2</sub>O(生工生物工程公司,中国)。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

主要仪器有:SU8010 Scanning Electron Microscope(HITACHI 公司,日本),OCA40 接触角测量仪(Dataphysics 公司,德国),XPE205 电子天平(梅特勒公司,美国),JXFSTRRP-CL 冷冻研磨机(上海净信公司,中国),H5K-S 材料测试机(Hounsfield 公司,英国),Spectramax M5 酶标仪(Molecular Devices 公司,美国),MJ-54A 高压灭菌锅(上海施都凯公司,中国),BAO-80A 干燥箱(上海施都凯公司,中国),MQT-60R 恒温摇床(上海旻泉公司,中国),BB150 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Thermo 公司,美国),倒置荧光显微镜(奥林巴斯公司,日本),TD5 台式低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司,中国),Veriti 基因扩增仪(Life Technology 公司,美国),Lightcycler480 II 实时定量 PCR 仪(Roche 公司,瑞士)。

## 2 实验方法

### 2.1 表面形貌观察

将 P/F-Ns 剪成 0.5 cm×0.5 cm 的大小,用双面胶固定到载物台上,在真空状态下喷金 2 min,然后在 5 kV 电压下进行表面形貌的拍摄。每种样品随机选取四张 3 000 倍扫描电镜图,并根据式(1)通过图像分析软件 Image J(National Institutes of Health, 美国)计算孔隙率。每种样品再随机选取 100 根纤维并通过 Image J 测量纤维直径。

$$\text{孔隙率} = (\text{孔隙面积}/\text{总面积}) \times 100\% \quad (1)$$

### 2.2 力学性能测试

人工合成韧带必须具备一定的拉伸强度和应力-应变行为,在植入人体后才能发挥较好的替代作用,满足患者日常生活的需求。因此本实验拟借

助 H5K-S 材料测试机研究不同 P/F-Ns 的力学性能。具体操作为：将 4 种 P/F-Ns 剪成 1 cm × 5 cm 的大小，用双面胶分别将材料的两端 1 cm 处固定在两块载玻片上，然后将两端的载玻片固定到 H5K-S 材料测试机的夹具上，在室温为 20 ℃、相对湿度为 60% 的环境下，以 10 mm/min 的速度进行拉伸测试。应力、应变计算如下式：

$$\text{应力} = \text{拉力}/(\text{宽度} \times \text{厚度}) \quad (2)$$

$$\text{应变} = (\text{位移}/\text{标距}) \times 100\% \quad (3)$$

### 2.3 亲疏水性测试

在测试样品上滴加 3 μL 水滴，通过接触角测量仪测量 50 s 内水滴在 P/F-Ns 上的角度变化并记录。每种样品测试三个平行样。

### 2.4 纤维蛋白原含量测试

双缩脲试剂的制备：取硫酸铜 1.5 g、酒石酸钾钠 6.0 g 和碘化钾 5.0 g，加纯化水 500 mL 使其溶解，边搅拌边加 10% 的氢氧化钠溶液 300 mL，纯水稀释至 1 000 mL，混匀。以双缩脲试剂为溶剂，配制 1 mL 浓度分别为 2、4、6、8、10 mg/mL 的 BSA 标准品溶液，以双缩脲溶液为空白对照，每种浓度设置三个平行样。

分别称取质量约为 50 mg 的四种 P/F-Ns 样品并剪碎。向剪碎的 P/F-Ns 中加入 1 mL 双缩脲试剂，以 65 Hz 的频率冷冻研磨匀浆 60 s 后置于 -20 ℃ 冰箱降温 5 min。重复匀浆过程 5 次后，以 4 000 r·min<sup>-1</sup> 的速度离心 10 min。取 500 μL 上清液，加入 500 μL 双缩脲试剂并混匀作为测试样品溶液，每种 P/F-Ns 设置三个平行样。

以上各管均加入 4 mL 双缩脲试剂，混匀，室温放置 30 min，在波长 540 nm 处测量吸光度。以 BSA 标准品的浓度为横坐标，以其相应的吸光度值为纵坐标求得线性回归方程。将测试样品吸光度值代入标准曲线方程得到相应的纤维蛋白原浓度，然后计算样品的纤维蛋白原含量。

### 2.5 细胞黏附实验

使用荧光染料羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯 (5, 6-carboxyfluorescein diacetatesuccinimidyl ester, CFSE) 标记 Hig-82 细胞，在不透光的 P/F-Ns 材料表面进行荧光标记细胞的观察，具体步骤为：在细胞悬液中加入 50 μmol·L<sup>-1</sup> 的 CFSE 染液，混匀后置于 37 ℃、含 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 15 min 后，加入预冷的 PBS 终止反应。随后以 1 000 r·min<sup>-1</sup> 的速度离心 5 min，弃上清，用 PBS 反复冲洗 3 次，离心 (条件同上)，弃去上清，加入含

10% 胎牛血清的完全培养液制备成 CFSE 标记的细胞悬液。将 P/F-Ns 剪成直径为 11 mm 的圆片置于 48 孔板中，每种 P/F-Ns 分别设置三个平行样。每孔加入 1 mL 完全培养液润湿 2 h，弃去培养液备用。P/F-Ns 上每孔播种 1×10<sup>5</sup> 个细胞，37 ℃ 培养箱分别培养 4、24 h 后，在荧光显微镜下观察细胞数量及形态。

同时，另取未用 CFSE 标记的 Hig-82 细胞同法接种 P/F-Ns 膜，在放入 37 ℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4、24 h 后，弃去细胞培养液，每孔加入 500 μL 完全培养液以及 20 μL CCK-8 溶液后，放入 37 ℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h。孵育完成后，每孔分别吸取 100 μL 培养液于 450 nm 下测量吸光度。

### 2.6 细胞增殖实验

P/F-Ns 处理同 2.5。每种 P/F-Ns 分别设置三个平行样，P/F-Ns 上每孔分别播种 1×10<sup>4</sup>、4×10<sup>4</sup> 个细胞，37 ℃ 培养箱分别培养 1、3、5、7 d 后，弃去细胞培养液，每孔加入 500 μL 完全培养液以及 20 μL CCK-8，放入 37 ℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h。孵育完成后，每孔吸取 100 μL 培养液在 450 nm 下测量吸光度。

### 2.7 韧带组织相关蛋白基因表达测试

P/F-Ns 处理同 2.5。每种 P/F-Ns 分别设置三个平行样，P/F-Ns 上每孔播种 4×10<sup>4</sup> 个 Hig-82 滑膜细胞，分别培养 3 d 和 7 d。在 P/F-Ns 上用 0.25% 的 Trypsin-EDTA 消化细胞，用 RNeasy Plus Mini Kit 提取 RNA，并使用 QuantiTect Reverse Transcription Kit 逆转录成为 cDNA。20 μL 实时定量荧光 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 反应体系为：10 μL 的 TB Green Premix Ex Taq II，上游引物和下游引物 (浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 0.8 μL，2 μL 的 cDNA，6.4 μL 的 ddH<sub>2</sub>O。RT-qPCR 扩增程序为：95 ℃ 预变性 30 s，40 个循环的扩增：95 ℃ 变性 10 s，50 ℃ 退火 20 s，72 ℃ 延伸 10 s。每组三个复孔。以 GAPDH 为内参引物，以 P/F-N-0 为对照，进行相对定量。相关基因引物如表 1 所示。

### 2.8 统计学分析

所有数据均用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，数据形式为均值±标准差。本文各实验组分别与对照组比较，采用 *t* 检验。所有的统计分析中，检验水准均为 0.05。

## 3 结果

### 3.1 表面形貌观察

如图 1 所示，P/F-N-0 表面致密，几乎未见孔

表 1 韧带修复相关基因引物

Tab.1 Genes primers related to ligament repair

Gene	Forward primer sequences	Reverse primer sequences
GAPDH	5'-CCTGCCGCCTGGAGAAAGCT-3'	3'-ACGACCTGGTCTCGGTGTAG-5'
COL1A1	5'-GCAGGGCTCCAATGATGT-3'	3'-CAAGGAAGGGCAAACGAG-5'
COL1A3	5'-TGGATCAGGCCAGTGGGAAT-3'	3'-AGCAGCCATCCTCCAGAACT-5'
BIGLYCAN	5'-GGATCTGCTCCGATACTCCAAGT-3'	3'-GCTCAGGCTCCCCTTCTCAA-5'
DECORIN	5'-TACCAACATAACCACCATCCC-3'	3'-CCCAACTTAGCCAAATTATTCA-5'

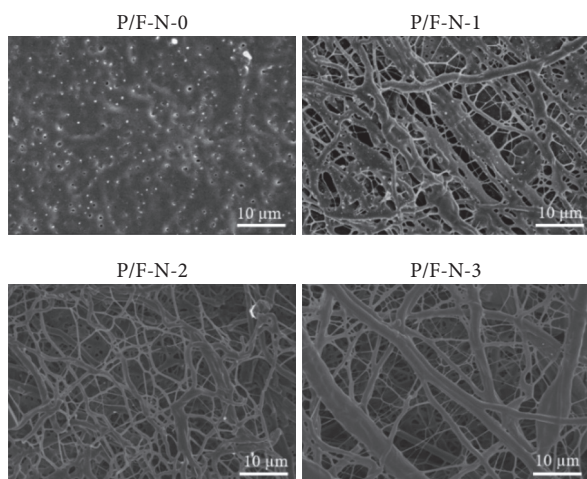


图 1 P/F-Ns 的表现形貌图 (3 000 ×)

Fig.1 The surface morphology of P/F-Ns (3 000 ×)

隙。P/F-N-1、P/F-N-2、P/F-N-3 表面呈网状结构，P/F-Ns 的孔隙率随纤维蛋白原含量增加而逐渐增大。其中 P/F-N-1、P/F-N-2、P/F-N-3 的孔隙率分别为： $(15.42 \pm 1.31)\%$ 、 $(28.53 \pm 1.70)\%$ 、 $(33.85 \pm 1.12)\%$ 。P/F-N-1、P/F-N-2、P/F-N-3 纤维直径分别为  $(603.92 \pm 158.61)$ 、 $(413.96 \pm 187.02)$ 、 $(244.54 \pm 42.81)$  nm，表明随着纤维蛋白原含量的增加，P/F-Ns 的纤维直径逐渐减小。

### 3.2 力学性能分析

如图 2 所示，P/F-N-0、P/F-N-1、P/F-N-2 与 P/F-N-3 断裂时的应变分别为： $(122.58 \pm 0.18)\%$ 、 $(140.36 \pm 0.21)\%$ 、 $(75.11 \pm 3.13)\%$ 、 $(68.74 \pm 0.11)\%$ ，断裂时的拉伸强度分别为  $(35.66 \pm 0.32)$ 、 $(12.24 \pm 0.12)$ 、 $(8.02 \pm 0.54)$ 、 $(7.25 \pm 0.22)$  MPa。因此，P/F-N-0、P/F-N-1、P/F-N-2、P/F-N-3 的断裂强度依次降低。上述实验现象表明未添加纤维蛋白原的 P/F-N-0 具有较好的力学性能，而纤维蛋白原的增加会降低 P/F-Ns 的力学性能。这是因为由无规则的纳米纤维堆积而成的静电纺纳米纤维膜的力学性能不仅与材料本身性能有关，还与纤维膜的结构（如纤维孔隙、纤维直径、纤维的长度和纤维直径的粘连程度）有关。由前文扫描电镜结果可知，P/F-N-0 表面致密，几乎无孔隙，并且纳米纤维

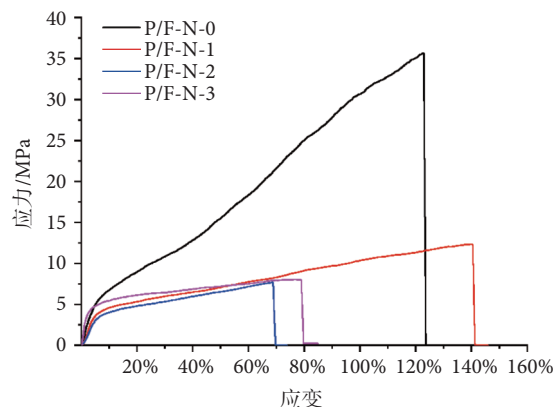


图 2 P/F-Ns 的力学性能结果

Fig.2 The mechanical properties results of P/F-Ns

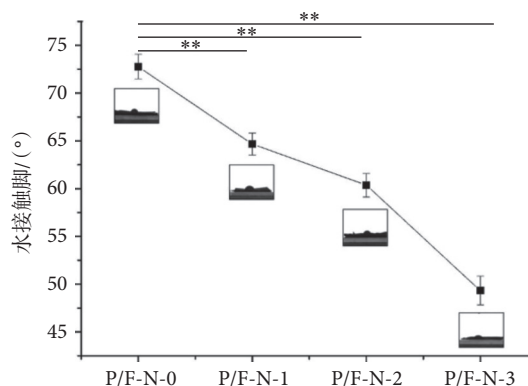


图 3 P/F-Ns 接触角 \*\*：与 P/F-N-0 相比， $P < 0.01$

Fig.3 The contact angle of P/F-Ns \*\*：compared with P/F-N-0,  $P < 0.01$

抱团缠绕在一起，不容易产生滑脱。随着纤维蛋白原含量增加，纤维直径逐渐减小，孔隙逐渐增大，膜变得较为松散，纤维之间的连接和缠绕较少，摩擦力也变小，在拉力的作用下极易从纳米纤维膜中抽离出来，最终断裂。

### 3.3 亲疏水性分析

在 50 s 内，P/F-N-0 的接触角大小基本不变  $(74.32 \sim 71.51^\circ)$ ，而 P/F-N-1 的接触角从  $75.21^\circ$  减小到  $63.33^\circ$ ，P/F-N-2 的接触角从  $72.53^\circ$  减小到  $41.21^\circ$ ，P/F-N-3 的接触角从  $70.65^\circ$  减小到  $33.23^\circ$ 。如图 3 所示，当水滴接触 30 s 后，P/F-N-0、P/F-N-

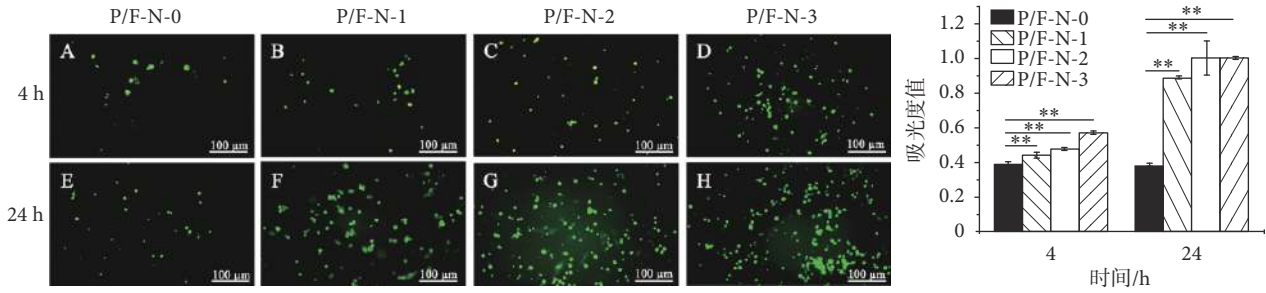


图4 CFSE 染色的 HIG-82 细胞在 P/F-Ns 上的黏附 \*\*：与 P/F-N-0 相比， $P < 0.01$

Fig.4 Adhesion of CFSE-stained HIG-82 cells to P/F-Ns \*\*：Compared with P/F-N-0,  $P < 0.01$

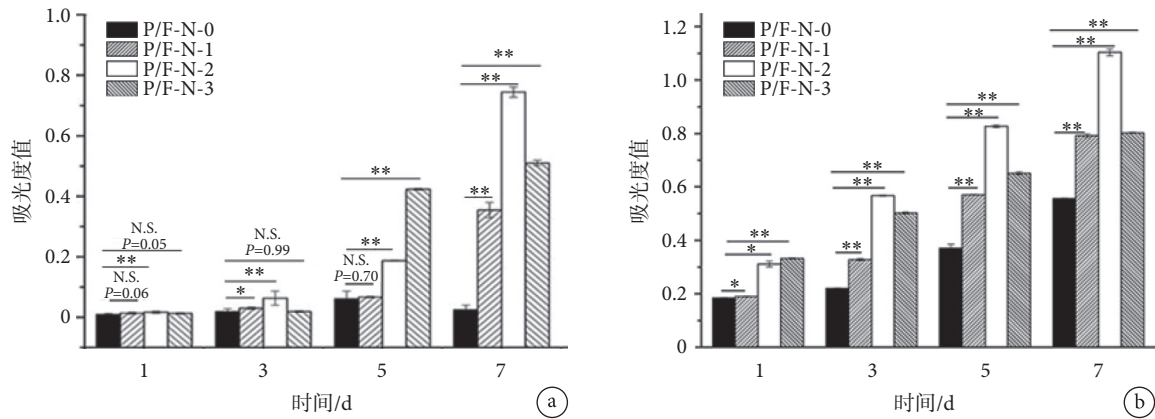


图5 HIG-82 滑膜细胞在 P/F-Ns 上的增殖 a. 接种密度为  $1 \times 10^4$  个；b. 接种密度为  $4 \times 10^4$  个。\*：与 P/F-N-0 相比， $P < 0.05$ ；\*\*：与 P/F-N-0 相比， $P < 0.01$ ；N.S.：not significant

Fig.5 Proliferation of HIG-82 synovial cells in P/F-Ns a. inoculation densities:  $1 \times 10^4$ ; b. inoculation densities:  $4 \times 10^4$ . \*：compared with P/F-N-0,  $P < 0.05$ ; \*\*：compared with P/F-N-0,  $P < 0.01$ ; N.S.：not significant

1、P/F-N-2、P/F-N-3 的接触角分别为： $(72.75 \pm 1.26)^\circ$ 、 $(64.67 \pm 1.16)^\circ$ 、 $(60.35 \pm 4.24)^\circ$ 、 $(49.33 \pm 3.51)^\circ$ 。与 P/F-N-0 相比，含有纤维蛋白原的 P/F-Ns 的接触角明显减小，且随着纤维蛋白原的增加接触角逐渐减小。

### 3.4 纤维蛋白原含量

BSA 定量标准曲线为  $Y = 0.048\ 03 X + 0.003\ 52$ ，其中  $R^2 = 0.999\ 34$ 。通过计算得出 P/F-N-1 纤维蛋白原含量为  $(67.81 \pm 1.88)\text{ mg/g}$ ，P/F-N-2 纤维蛋白原含量为  $(140.23 \pm 3.25)\text{ mg/g}$ ，P/F-N-3 纤维蛋白原含量为  $(151.33 \pm 13.46)\text{ mg/g}$ 。

### 3.5 黏附和增殖结果

如图 4 左图所示，当 HIG-82 细胞与 P/F-Ns 共培养 4 h 时，在 P/F-Ns 上的细胞数量较少，前三组几乎无差别，P/F-N-3 上的细胞数最多。当 HIG-82 细胞与 P/F-Ns 共培养 24 h 时，各组荧光强度均增强，表明黏附在 P/F-Ns 上的细胞数量增多。其中黏附在 P/F-N-1、P/F-N-2 和 P/F-N-3 上的细胞数量较多，且在 P/F-N-2 上的部分细胞形态呈梭形。如图 4 右图所示，当 HIG-82 细胞与 P/F-Ns 共培养

4 h 时，细胞吸光度值较低。当 HIG-82 细胞与 P/F-Ns 共培养 24 h 时，P/F-Ns 上的细胞吸光度值均有所增高，P/F-N-0 与其他三组的吸光度值具有显著差异 ( $P < 0.01$ )。其中 P/F-N-1、P/F-N-2 和 P/F-N-3 上的细胞吸光度值较高，表明添加纤维蛋白原的 P/F-Ns 更有利于细胞的黏附。

如图 5a 所示，当 HIG-82 细胞接种量为  $1 \times 10^4$  个时，在 7 天的培养过程中 P/F-N-0 的细胞吸光度值均未表现出明显的增加，表明细胞未明显增殖；而在含有纤维蛋白原的材料上，虽然在 3 天时细胞吸光度值未明显变化，但从第 5 天开始，P/F-N-2 和 P/F-N-3 的细胞吸光度值均明显增加；在第 7 天时，P/F-N-1 的细胞吸光度值也开始明显增加，P/F-N-2 和 P/F-N-3 的细胞吸光度值进一步增加，表明 P/F-Ns 中含有的纤维蛋白原有促进细胞增殖的作用。

当 HIG-82 细胞接种量增加为  $4 \times 10^4$  个时，如图 5b 所示，虽然 P/F-N-0 的细胞吸光度值在 7 天的培养过程中逐渐升高，表明细胞有增殖，但是在每一检测时间点，P/F-N-0 的细胞吸光度值均明显低

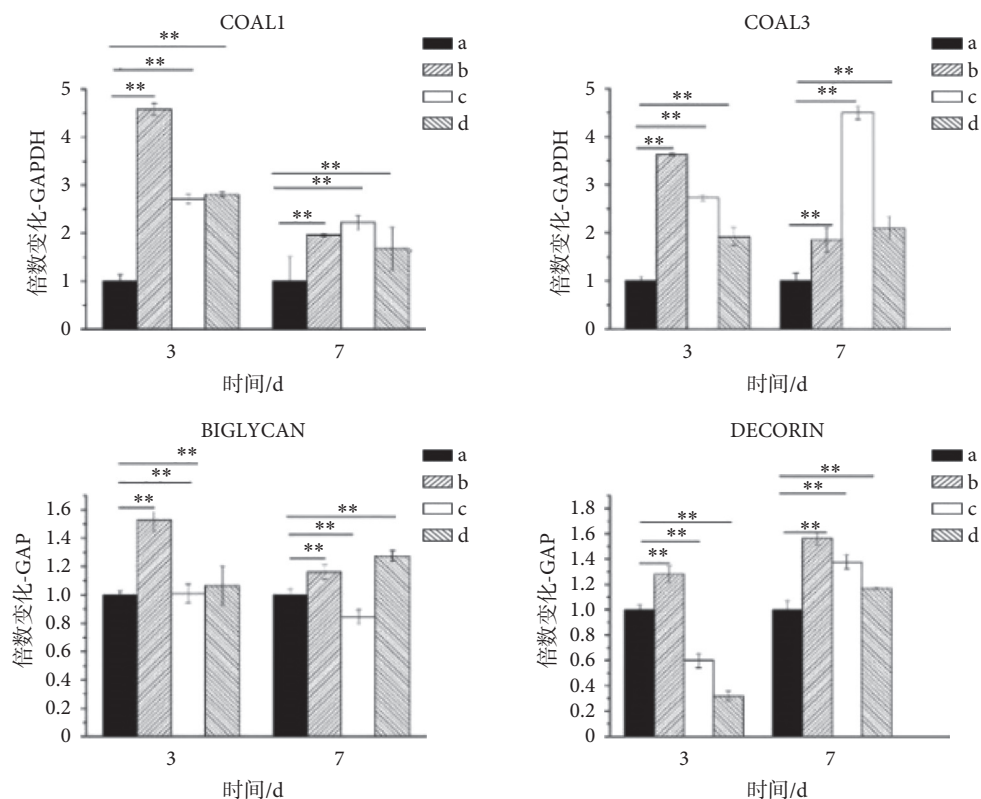


图6 Hig-82 细胞在 P/F-Ns 上培养 3 d 和 7 d 时, 各基因在 P/F-Ns 的表达情况 a. P/F-N-0; b. P/F-N-1; c. P/F-N-2; d. P/F-N-3. \*: 与 P/F-N-0 相比,  $P < 0.05$ ; \*\*: 与 P/F-N-0 相比,  $P < 0.01$

Fig.6 Gene expression of Hig-82 cells cultured on P/F-Ns for 3 d and 7 d, respectively a. P/F-N-0; b. P/F-N-1; c. P/F-N-2; d. P/F-N-3. \*: compared with P/F-N-0,  $P < 0.05$ ; \*\*: compared with P/F-N-0,  $P < 0.01$

于含有纤维蛋白原的 P/F-Ns, 表明细胞在含有纤维蛋白原的材料上增殖更为明显。且随着细胞接种数量的增加, 细胞在含有纤维蛋白原的 P/F-Ns 上接种后迅速出现明显增殖, 第 1 天时, P/F-N-2 和 P/F-N-3 的细胞吸光度值就明显增加, 在第 3 天时, P/F-N-1 的细胞吸光度值开始升高。7 天的增殖实验结果显示, 在含有纤维蛋白原的材料中, P/F-N-2 上的细胞数量增加更为明显, 表明该浓度的纤维蛋白原更有利于细胞在纳米纤维膜上的增殖。

### 3.6 韧带组织相关蛋白基因表达结果

COAL1 和 COAL3 是构成韧带组织的主要细胞外基质, 其 DECORIN 和 BIGLYCAN 能够影响胶原纤维组装<sup>[21]</sup>。如图 6 所示, 3 天和 7 天时, 除个别组外, 在含有纤维蛋白原的 P/F-Ns 上细胞的 COAL1、COAL3、BIGLYCAN、DECORIN 基因表达均明显高于 P/F-N-0 组。

## 4 讨论

前交叉韧带连接着股骨下端和胫骨上端, 在骨与骨之间传递能量以促进运动, 对于维持膝关节内部的稳定性和正常的生命运动起着重要的作用。

由于韧带不可再生, 一旦损伤, 只能通过前交叉韧带重建进行治疗。传统的用于韧带修复的材料各有缺点, 如材料获取难、生物相容性差, 因此在临床应用中十分受限。而人工合成韧带因材料来源简单得到了广泛的研究与应用。为了避免单一合成高分子材料生物相容性差以及天然高分子力学性能有限的缺点, 本实验中的人工韧带是以 PLCL 和不同含量的纤维蛋白原为原料, 通过静电纺丝技术制备的纳米纤维膜。

之前的研究表明亲水性对于细胞在材料表面的黏附是相当重要的, 材料的接触角越小表明亲水性越强, 更有利于细胞在材料表面的黏附<sup>[22]</sup>。本研究中接触角测试结果表明, P/F-Ns 中纤维蛋白原的添加可显著改变材料的亲水性, 并且随着纤维蛋白原的增加, 亲水性逐渐增强。同时, 细胞黏附实验中纤维蛋白原的增加确实更利于细胞在材料上的黏附。

纳米纤维的孔径和孔隙率在支架的细胞培养过程中起着至关重要的作用, 较大的孔径和较高的孔隙率可以为细胞提供营养物质和代谢物质输送的通道<sup>[23]</sup>。在本研究中, 扫描电镜测试结果显示,

添加了纤维蛋白原的 P/F-Ns 具有较高的孔隙率, 并且随着纤维蛋白原含量的增加, 孔隙率逐渐增大, 更有利于细胞在 P/F-Ns 上的生长和增殖。纤维蛋白原是一种天然高分子材料, 具有良好的生物相容性, 因此含纤维蛋白原材料中细胞的吸光度值高于未添加纤维蛋白原的材料; 但随着 P/F-Ns 中纤维蛋白原含量的增加, 其力学性能逐渐下降, 孔隙率逐渐增加, 且纤维直径逐渐降低, 可能影响细胞的黏附与增殖<sup>[23]</sup>。因此, 增殖实验结果显示细胞吸光度值随纤维蛋白原含量增加呈先增加后降低的趋势, P/F-N-2 的细胞吸光度值最高。

I 型胶原和 III 型胶原是构成韧带组织的主要组分, DECORIN 和 BIGLYCAN 可以调控纤维的形成和组装<sup>[24]</sup>。因此, 在人工韧带修复过程中, 细胞在 P/F-Ns 上的韧带组织相关基因的表达会反映韧带组织修复情况。韧带修复相关基因表达结果显示, 3 天和 7 天时, 以 P/F-N-0 为对照, 除个别组外, 在 P/F-N-1、P/F-N-2 和 P/F-N-3 上细胞的 COL1A1、COL1A3、BIGLYCAN 和 DECORIN 的表达量整体均发生上调, 表明含有纤维蛋白原的 P/F-Ns 能促进细胞韧带组织相关基因的表达, 有利于韧带组织修复。

## 5 结论

与 P/F-N-0 相比, P/F-N-1、P/F-N-2 和 P/F-N-3 具有更好的生物相容性, 更有利于细胞在组织支架上的黏附、生长和增殖, 更有利于韧带修复, 因此为其临床应用<sup>[25-32]</sup> 提供了安全性和功能性的理论依据。

### 重要声明

利益冲突声明: 本文全体作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 郭佳花进行了实验设计和论文撰写, 张羽和陈丽媛进行了数据分析和图片润色, 徐丽明、莫秀梅和陈亮提出研究思路、指导实验并修订论文初稿。

### 参考文献

- Chen P, Zhu S, Wang Y, *et al.* The amelioration of cartilage degeneration by ADAMTS-5 inhibitor delivered in a hyaluronic acid hydrogel. *Biomaterials*, 2014, 35(9): 2827-2836.
- Kim H S, Seon J K, Jo A R. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Relat Res*, 2013, 25: 165-173.
- Cohen M, Amaro J T, Ejnisman B, *et al.* Anterior cruciate ligament reconstruction after 10 to 15 years: association between meniscectomy and osteoarthritis. *Arthroscopy*, 2007, 23: 629-634.
- Buonocristiani A M, Tjoumakaris F P, Starman J S, *et al.* Anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction.

*Arthroscopy*, 2006, 22: 11-16.

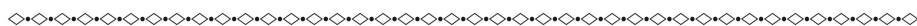
- Brunet P, Charrois O, Degeorges R, *et al.* Reconstruction of acute posterior cruciate ligament tears using a synthetic ligament. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, 2005, 91(1): 34-43.
- 余浩, 邓晚秋, 桑鹏, 刘毅. 关节镜下自体同侧腓骨长肌腱重建膝关节前交叉韧带. *中国修复重建外科杂志*, 2020, 34(7): 843-847.
- Schindler O S. Surgery for anterior cruciate ligament deficiency: a historical perspective. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2012, 20: 5-7.
- Seo Y K, Yoon H H, Song K Y, *et al.* Increase in cell migration and angiogenesis in a composite silk scaffold for tissue-engineered ligaments. *J Orthop Res*, 2009, 27: 495-503.
- Schindler O S. Surgery for anterior cruciate ligament deficiency: a historical perspective. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2012, 20: 45-47.
- Murray A W, Macnicol M F. 10-16 years results of Leeds-Keio anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee*, 2004, 11: 9-14.
- Indelicato P A, Pascale M S, Huegel M O. Early experience with the GORE-TEX polytetrafluoroethylene anterior cruciate ligament prosthesis. *Am J Sports Med*, 1989, 17: 52-55.
- Woods G A, Indelicato P A, Prevot T J. The Gore-Tex anterior cruciate ligament prosthesis. Two versus three year results. *Am J Sports Med*, 1991, 19: 48-55.
- Maletius W, Gillquist J. Long-term results of anterior cruciate ligament reconstruction with a Dacron prosthesis. The frequency of osteoarthritis after seven to eleven years. *Am J Sports Med*, 1997, 25: 88-93.
- Rushton N, Dandy D J, Naylor C P. The clinical, arthroscopic and histological findings after replacement of the anterior cruciate ligament with carbon-fiber. *J Bone Jt Surg Br*, 1983, 65: 30-39.
- Wredmark T, Engstrom B. Five-year results of anterior cruciate ligament reconstruction with the Stryker Dacron high-strength ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1993, 1(2): 71-75.
- Frank C B, Jackson D W. The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am*, 1997, 79(10): 1556-1576.
- Fukubayashi T, Ikeda K. Follow-up study of Gore-Tex artificial ligament—special emphasis on tunnel osteolysis. *J Long Term Eff Med Implants*, 2000, 10(4): 267-277.
- Miller M D, Peters C L, Allen B. Early aseptic loosening of a total knee arthroplasty due to Gore-Tex particle-induced osteolysis. *J Arthroplasty*, 2006, 21(5): 765-770.
- Hehl G, Kinzl L, Reichel R. Carbon-fiber implants for knee ligament reconstruction. 10-year results. *Chirurg*, 1997, 68(11): 1119-1125.
- Debnath U K, Fairclough J A, Williams R L. Long-term local effects of carbon fibre in the knee. *Knee*, 2004, 11(4): 259-264.
- 史新立, 谭芳奕, 王召旭. 疯牛病病原体研究及动物源性医疗器械产品安全性思考. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(11): 1138-1144.
- 陶凯忠, 陈尔瑜, 丁光宏. 胶原纤维的结构和生物力学. *解剖科学进展杂志*, 1998, 4(4): 289-293.
- 张弛. 纤维连接蛋白表面修饰后聚酯纤维韧带细胞相容性的变化. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(31): 6149-6154.
- 孙康, 王立德, 张羽飞, 等. 人工合成材料重建膝关节交叉韧带的进展. *骨与关节损伤杂志*, 2000, 15(3): 236-238.

(下转第 560 页; *Continued on Page 560*)

- intelligent lab-on-chips. *View*, 2020, 1(3): 20200034.
- 44 唐曲, 胡文琪, 陈欢欢, 等. 微流控技术在循环肿瘤细胞异质性分析领域的应用. *中国科学: 化学*, 2022, 52(1): 52-70.
- 45 Yu M, Xu L, Tian F, *et al.* Rapid transport of deformation-tuned nanoparticles across biological hydrogels and cellular barriers. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2607.
- 46 Cui P, Wang S. Application of microfluidic chip technology in pharmaceutical analysis: A review. *J Pharm Anal*, 2019, 9(4): 238-247.
- 47 Miao L, Li L, Huang Y, *et al.* Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(10): 1174-1185.
- 48 Battat S, Weitz D A, Whitesides G M. An outlook on microfluidics: the promise and the challenge. *Lab Chip*, 2022, 22(3): 530-536.

收稿日期: 2022-01-27 修回日期: 2022-03-24

本文编辑: 李蓓兰

(上接第 550 页; *Continued from Page 550*)

- 25 Barber F A, Burans J P, Deutsch A, *et al.* A prospective, randomized evaluation of acellular human dermal matrix augmentation for arthroscopic rotator cuff repair. *Arthroscopy*, 2012, 28(1): 8-15.
- 26 金良. 生长因子包被的PLCL/纤维蛋白原静电纺丝膜片与兔骨髓间充质干细胞的体外生物相容性研究. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- 27 尹玉霞, 郑秀娥, 鲁守涛, 等. 静电纺丝及其在生物医用材料中的应用. *中国医疗器械信息*, 2019, 25(1): 46-47, 128.
- 28 董鑫. 静电纺丝纳米纤维的制备及其在生物医药方面的应用. *中外医疗*, 2008, 32: 154.
- 29 王枫. 膝关节人工韧带损伤与人工韧带研究进展. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(21): 3919-3922.
- 30 侯立刚, 杨建义. 人工韧带生物材料修复膝关节交叉韧带损伤: 问题及前景. *中国组织工程研究*, 2016, 20(8): 1196-1202.
- 31 赵旭辉, 王芳. 人工韧带材料表面修饰及在膝关节交叉韧带重建中的应用. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(42): 7915-7918.
- 32 王昆, 朱蕾, 金文涛, 等. 生物型人工韧带的体外检测和体内组织相容性的实验研究. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(12): 2394-2399.

收稿日期: 2021-07-06 修回日期: 2022-04-01

本文编辑: 李蓓兰