

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520141153548

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

环形多肽表面修饰PET人工韧带促进骨整合
的实验研究

Research on surface modification of PET artificial ligament
using cyclic polypeptide for the promotion of
osseointegration

夏 弢

指导教师姓名: 刘 好 源 教授

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2017 年 月

论文答辩时间: 2017 年 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

缩略语及中英文对照表.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
第一章 前言.....	1
第二章 环形多肽表面修饰 PET 人工韧带.....	4
2.1 材料.....	4
2.2 实验方法.....	4
2.2.1 cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰 PET 人工韧带.....	4
2.2.2 XPS 检测.....	4
2.3 实验结果.....	5
第三章 环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带在体外研究中对 BMSCs 粘附、增殖和分化的影响.....	11
3.1 动物及材料.....	11
3.2 实验方法.....	11
3.2.1 兔 BMSCs 的分离与培养.....	11
3.2.2 BMSCs 与 PET 人工韧带体外培养后粘附情况的观察.....	12
3.2.3 BMSCs 与 PET 人工韧带体外培养后增殖情况的观察.....	12
3.2.4 碱性磷酸酶活性的测定.....	13
3.3 统计学方法.....	13
3.4 实验结果.....	13

3.4.1 兔 BMSCs 全骨髓贴壁法培养结果.....	14
3.4.2 粘附情况观察结果.....	16
3.4.3 增殖情况观察结果.....	17
3.4.4 碱性磷酸酶活性的测定结果.....	18
第四章 环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带重建兔 ACL 后其与骨 界面的骨整合情况.....	20
4.1 动物及材料.....	20
4.2 实验方法.....	20
4.2.1 ACL 重建动物实验模型的建立.....	20
4.2.2 组织学 HE 染色.....	21
4.2.3 生物力学测试.....	21
4.3 统计学方法.....	21
4.4 实验结果.....	21
4.4.1 组织学 HE 结果.....	22
4.4.2 生物力学结果.....	23
第五章 讨论.....	25
第六章 结论.....	34
参考文献	35
致谢	42

Table of Contents

Abbreviation table	I
Abstract in Chinese	II
Abstract in English	IV
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 To surface modify PET artificial ligament	4
2.1 Materials	4
2.2 Methods	4
2.2.1 cyclo-RGDFV polypeptide to surface modify PET material.....	4
2.2.2 X-ray photoelectron spectroscopy.....	4
2.3 Results	5
Chapter 3 The effect of cyclo-RGDFV polypeptide surface modified PET on cell adhesion, proliferation and differentiation in vitro	11
3.1 Animals and Materials	11
3.2 Methods	11
3.2.1 Isolation and culture of BMSCs.....	11
3.2.2 Cell adhesion analysis.....	12
3.2.3 Cell proliferation analysis.....	12
3.2.4 Alkaline phosphatase activity analysis.....	13
3.3 Statistical analysis	13
3.4 Results	13

3.4.1 In vitro culture of rabbit BMSCs.....	14
3.4.2 Cell adhesion result.....	16
3.4.3 Cell proliferation result.....	17
3.4.4 ALP activity result.....	18
Chapter 4 The osteointegration between PET artificial ligament surface modified by cyclo-RGDFV and bone interface in vivo.....	20
4.1 Animals and Materials.....	20
4.2 Methods.....	20
4.2.1 Animal experiments.....	20
4.2.2 Histological analysis.....	21
4.2.3 Biomechanical tests.....	21
4.3 Statistical analysis.....	21
4.4 Results.....	21
4.2.1 Histological findings.....	22
4.2.2 Biomechanical findings.....	23
Chapter 5 Discussion.....	25
Chapter 5 Conclusion.....	34
Reference.....	35
Acknowledgement.....	42

缩略语及中英文对照表

缩写	全称（英文）	全称（中文）
PET	Polyethylene Terephthalate	聚对苯二甲酸乙二醇酯
ACL	Anterior Cruciate Ligament	前交叉韧带
BMSCs	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells	骨髓间充质干细胞
RGD	Arg-Gly-Asp	精-甘-天门冬氨酸
cyclo-RGDFV	cyclo (Arg-Gly-Asp-Phe-Val)	环形（-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-苯丙氨酸-缬氨酸）
LARS	Ligament Advanced Reinforcement System	先进韧带加强系统
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy	X 线衍射分析
ALP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
L-DMEM	Low Glucosum Dulbecco Modified Eagle's Medium	低糖 DMEM 培养基
SEM	Scanning Electron Miroscope	扫描电镜
ECM	Extracellular Matrix	细胞外基质
DMSO	Dimethyl Sulphoxide	二甲基亚砷
EDTA	Ethylene Diamine Teaacetic Acid	2 一二乙酰四乙酸

摘要

目的:应用 cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带与骨髓间充质干细胞 (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs) 共培养, 探索 cyclo-RGDFV 多肽表面修饰 PET 人工韧带后其生物相容性情况; 并用 cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带重建兔前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL), 研究 cyclo-RGDFV 多肽表面修饰 PET 人工韧带与骨界面的骨整合情况。

方法:应用 NaOH 碱性水解法处理 PET 人工韧带, 将处理的 PET 人工韧带与不同浓度的 cyclo-RGDFV 多肽进行结合, 利用 X 线衍射分析 (XPS) 技术, 分析韧带与多肽共价结合情况; 用骨髓间充质干细胞与 cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带共培养, 以与未处理的 PET 人工韧带共培养做对照, 观察细胞粘附、增殖及分化情况。成年雄性新西兰大白兔 64 只, 随机分成 2 组, 实验组植入环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带重建前交叉韧带 (共 32 膝), 对照组植入未处理的 PET 人工韧带 (共 32 膝), 分别于术后 4、8、12、24 周取材做大体观察、组织学和生物力学检测; 另取 6 只兔的正常膝关节, 行生物力学测定, 作为空白组。

结果: (1) XPS 分析技术证实 NaOH 碱性水解法处理的 PET 人工韧带经过 cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰后, PET 人工韧带氮元素含量明显增高, 1.0mg/ml cyclo-RGDFV 多肽表面修饰的 PET 人工韧带氮元素含量最高; (2) cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带与未处理的 PET 人工韧带比较细胞早期粘附、增殖情况更好, 12h、24h、48h 粘附细胞数与未处理的 PET 人工韧带比较均有统计学差异 ($P < 0.01$); 且骨髓间充质干细胞与环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带共培养 14d、21d 后表达显著高的 ALP 活性, 与未处理的 PET 人工韧带共培养细胞比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。 (3) 组织学观察: 实验组术后 4 周, 韧带-骨界面纤维结缔组织连接相对紧密, 部分区域可见类软骨细胞, 排列不规则; 术后 8 周, 韧带-骨界面部分标本可见胶原纤维直接插入骨隧道形成有序的 Sharpey 纤维结构, 类软骨细胞逐渐成熟, 排列也规则, 软骨移行带慢慢形成; 术后 12 周, 韧带-骨界面区可见明显纤维结缔组织、纤维软骨带, 部分区域可见钙化纤维软骨; 术后 24 周, 韧带-骨界面区可见纤维软骨带、钙化纤维软骨带, 类似正常韧

带直接止点结构。而对照组术后 4 周，韧带-骨界面可见疏松结缔组织，含成纤维细胞、新生的毛细血管，可见到炎细胞浸润表现；术后 8 周，韧带-骨界面之间纤维组织更加致密，韧带被包裹紧密，可见成骨反应，部分区域可见类 Sharpey 纤维样结构；术后 12 周，韧带-骨界面可见 Sharpey 纤维结构，部分区域可见类软骨细胞、新骨形成，未见钙化纤维软骨；术后 24 周，韧带-骨界面可见纤维软骨带样结构，紧密连接的纤维组织中软骨细胞明显成熟，未见钙化纤维软骨。(4) 生物力学结果发现，在不同时间点都将人工韧带从骨隧道中拉出，韧带均未见断裂。结果显示实验组术后 12 周、24 周最大抗拉强度明显高于对照组，两组比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$)，实验组术后 4 周、8 周最大抗拉强度与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；实验组、对照组术后 12 周与 24 周最大抗拉强度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，实验组、对照组术后 4、8、12 周最大抗拉强度比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.05$)；空白组与实验组、对照组术后 4、8、12、24 周最大抗拉强度比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

结论： cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰 PET 人工韧带对骨髓间充质干细胞粘附、增殖和分化均有促进作用，能显著提高 PET 人工韧带的生物相容性；cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰 PET 人工韧带重建 ACL 后，其骨隧道中人工韧带-骨界面可通过纤维软骨、钙化软骨结构形成直接连接，有效改善骨隧道中人工韧带-骨界面的骨整合情况，形成人工韧带-骨界面的直接愈合。

关键词： cyclo-RGDFV 多肽，PET 人工韧带，骨髓间充质干细胞，骨整合，前交叉韧带

Abstract

Purposes: To co-culture cyclo-RGDFV polypeptide surface modified polyethylene terephthalate(PET) artificial ligament and bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) in vitro, explore whether the PET artificial ligament can achieve effective biocompatibility when modified with cyclo-RGDFV. And then reconstruction of anterior cruciate ligament (ACL) using PET artificial ligament surface modified with cyclo-RGDFV to study the osteointegration between PET artificial ligament and bone interface in rabbits.

Methods: Sodium hydroxide (NaOH) alkaline hydrolysis method was applied to treat the PET artificial ligament. The treated PET artificial ligament was combined with different solubility of cyclo-RGDFV polypeptide solution, using X-ray diffraction analysis technique to analyze the content of polypeptide covalently binding effect. Cyclic polypeptide surface modified PET artificial ligament and untreated PET artificial ligament were respectively co-cultured with bone marrow mesenchyma stem cells in vitro to observe cell adhesion, proliferation and differentiation. Sixty-four adult male New Zealand rabbits were randomly divided into an experimental group and a control group for the two groups reconstruction of anterior cruciate ligament, and the experimental group was implanted with the cyclic polypeptide surface modified PET artificial ligament (32 knees) while the control group was implanted with the untreated PET artificial ligament (32 knees). Gross observation was made, histological and biomechanical changes were observed at 4,8,12 and 24 weeks after surgery, respectively. The normal knee joints of 6 rabbits were taken as blank group and biomechanical test was performed.

Results: (1) X-ray diffraction analysis confirmed that after the alkaline hydrolysis method treated PET artificial ligament, and then by cyclo-RGDFV polypeptide surface modified, the content of nitrogen in PET artificial ligament was significantly higher compared with the untreated PET artificial ligament. The content of nitrogen in

the PET artificial ligament modified with 1.0 mg/ml cyclo-RGDFV solution was the highest. (2) After 12h, 24h and 48h co-culture, the cyclic polypeptide surface modified PET artificial ligament can significantly increase the cell adhesion and proliferation, and there was statistically significant difference in the number of adherent cells at 12h, 24h and 48h compared with the untreated PET artificial ligament ($P < 0.01$). At the end of 14d and 21d the cultured BMSCs on cyclic polypeptide surface modified PET artificial ligament expressed higher ALP activity than that cultured on the untreated PET artificial ligament, and there was statistically significant difference ($P < 0.05$). (3) Histological observation: The experimental group 4 weeks after operation, fibrous connective tissues in the ligament-bone interface connected relatively tight, and some areas appeared chondrocyte-like cells arranging irregularly, and there was new bone formation; 8 weeks after operation, ligament-bone interface showed that collagen fibers were directly inserted into the bone tunnel to form dense and orderly Sharpey fibers and chondrocytes-like cells were mature and arranged more regularly, the cartilage transition zone gradually formed; 12 weeks after operation, fibrous connective tissues and fibrocartilage zone were observed in the ligament-bone interface, and calcified cartilage was founded; 24 weeks after operation, fibrocartilage zone and calcified cartilage zone were found in the ligament-bone interface, being similar to the direct type of insertion of a normal ligament. In the control group 4 weeks after operation, ligament-bone interface appeared a great number of loose connective tissues that containing neovascularization and fibroblasts and infiltration of chronic inflammation cells; 8 weeks after operation, the fibrous tissue of the ligament-bone interface was tightly connected, and there was new bone formation. Part of samples had Sharpey fibers; 12 weeks after operation, Sharpey fibers were observed at the interface between PET artificial ligament and bone interface. In some areas, chondrocytes were seen and new bone was formed. But calcified cartilage was not founded; 24 weeks after operation, fibrocartilage zone can be seen in the ligament-bone interface and chondrocytes in the tightly connected fibrous tissue were obviously mature, but still no calcified cartilage

was observed. (4) Biomechanics observation: The biomechanics tests founded that all PET ligaments were pulled out from the bone tunnel and no ligament was ruptured. At 12 and 24 weeks after operation, the results showed that the ultimate tensile failure loads of the experimental group were significantly higher than that of the control group, respectively ($P < 0.01$); At 4 and 8 weeks after operation, there was no significant difference in the ultimate tensile failure loads between the experimental group and the control group, respectively ($P > 0.05$). Compared with the experimental group and the control group at 4, 8, 12, 24 weeks after operation, the ultimate tensile failure loads of the blank group all showed statistically significant difference ($P < 0.01$).

Conclusions: This study provides evidence that cyclo-RGDFV polypeptide surface modified PET artificial ligament has a satisfactory biocompatibility and promoted the adhesion, proliferation and differentiation of BMSCs. After reconstruction of ACL using PET artificial ligament surface modified with cyclo-RGDFV, direct connecting developed via fibrocartilage zone and calcified cartilage zone in the ligament-bone interface. This finding indicates that PET artificial ligament surface modified with cyclo-RGDFV can significantly improve osteointegration between PET artificial ligament and bone interface.

Key Words: cyclo-RGDFV polypeptide; PET artificial ligament; BMSCs; osseointegration; ACL

第一章 前言

前交叉韧带 (Anterior Cruciate Ligament, ACL) 是膝关节稳定的重要结构, ACL损伤将会严重影响患者膝关节的功能, ACL损伤可导致胫骨相对股骨位置的异常移动, 而且还可能导致膝关节失稳后的相关并发症, 比如膝关节半月板的损伤, 软骨损害等, 最终可导致严重的膝关节骨性关节炎。因为ACL其自身缺乏血供以及自体愈合能力相对较差, 常常需要进行手术治疗。目前, 前交叉韧带重建手术是ACL断裂后最常见的手术方法, 目的是恢复膝关节的稳定性。ACL重建手术移植物的选择并没有金标准, 使用的移植物主要包括: 自体移植物、同种异体移植物和人工韧带等^[1-4], 早期临床上进行 ACL 重建多采用自体肌腱作为移植物。自体移植物主要包括骨-髌腱-骨 (bone-patellar tendon-bone, BPTB)、腘绳肌腱 (hamstring tendon, HT) 和半腱肌-股薄肌肌腱 (SGT), 但自体移植物取材易引发供区病痛, 如膝前疼痛、跪痛等^[5], 切取HT导致屈膝肌力和胫骨内旋肌力减弱等相关并发症^[6-7], 以及韧带的多发损伤和ACL重建后翻修手术移植物来源缺乏^[6-7]。同种异体肌腱重建ACL不需进行自体肌腱取材, 优点是没有供区的病损、手术时间短、移植物强度高, 但主要缺点是花费高、愈合缓慢、移植物机械性减弱、断裂概率大、易引发异物的免疫排斥反应, 也有使受者感染传染性疾病的风险^[8-9]。而据文献报道^[10-11]: 两种重建的韧带愈合需要在骨隧道内1-2年的骨整合和再韧带化, 将经历肌腱韧带坏死, 组织细胞的迁移, 新生血管再生及肌腱韧带的重塑, 此过程时间比较长, 重建的韧带在短期内无法到达正常韧带的力学强度, 易使重建的韧带在早期松弛或断裂, 导致患者无法早期活动。而应用人工韧带可以避免上述自体肌腱或异体肌腱带来的并发症及缺点, 人工韧带还具有材料来源充足, 力学性能良好, 手术创伤小, 可早期活动及术后康复快等优点, 使得人工韧带作为重要的移植物被应用于ACL的重建^[12]。

目前在临床使用的人工韧带是用聚对苯二甲酸乙二醇酯 (Polyethylene Terephthalate, PET) 材料制造而成, 如 LARS 人工韧带和 Leeds-Keio 韧带。由于 LARS 人工韧带具有材料来源充足, 适用范围广, 力学性能良好, 手术操作方便, 可早期活动及术后康复快等优点, 使得 LARS 人工韧带成为了目前临床最广

泛应用的人工韧带。据我们以前的相关研究及国内外文献报道^[13-15]，应用 PET 人工韧带重建 ACL 后具有良好的近期疗效，但其远期疗效还不明确，人工韧带在骨髓道内能否达到骨整合一直困扰着临床研究人员。由于 PET 人工韧带是一种惰性材料，亲水性较差，因此韧带表面并不十分适合细胞的粘附和生长。据相关报道显示^[1,10]，PET 人工韧带与骨隧道界面之间虽有纤维结缔组织相连，但这种连接并不是很牢固，人工韧带需要依靠骨隧道移植植物两端的内固定来固定，而人工韧带在骨隧道内的骨整合情况如何，是否可以形成韧带-骨界面的生物性愈合，极大可能会影响 ACL 重建术后的长期临床疗效。因此研究如何促进 PET 人工韧带与骨隧道的韧带-骨整合就非常必要，而且是目前临床上急需解决的问题。

在组织工程领域，生物材料表面是最先也是直接与种子细胞相接触并发生作用的地方，生物材料表面与种子细胞的相互作用是实验研究的关键。细胞与生物材料的黏附是细胞生长、增殖和分化的基础。为了使 PET 人工韧带具有良好的细胞亲和性和生物相容性，促进人工韧带与骨隧道间的愈合，需对 PET 人工韧带表面进行处理和修饰，利用生物活性分子固定在人工韧带表面，改变其表面理化特性。在生物材料学领域，用来改变生物材料表面理化性质的生物分子很多，其中最常见的是 RGD 多肽。RGD 多肽包括线性多肽和环形多肽，常见的线性多肽包括 GRGDS, GRGDSPC, GRGDSY, RGDS 等，环形多肽主要包括 cyclo-RGDFV、cyclo-DFVRA、cyclo-DFKRG 等。线性多肽大多数在体内的半衰期很短，其生物活性因此减弱，但因环形多肽的空间结构稳定，其在体内半衰期较长，生物活性因此较持久，其较小的多肽浓度就能产生比线性多肽更强的粘附力^[16-18]，这其中 cyclo-RGDFV 多肽与骨髓间充质干细胞的粘附能力最强。

但由于 PET 人工韧带化学结构单一，生物活性基团较少，是一种惰性的分子聚合物，因此其与 RGD 多肽并不易直接结合，所以常常需要物理或者化学方法进行 PET 材料的表面处理，使其表面变得粗糙易于结合高分子活性物质。有关文献研究报道^[19]：用 NaOH 碱性水解方法处理 PET 人工韧带表面，发现 NaOH 碱性水解法处理 PET 人工韧带简单易行，水解效率也高，可重复操作，我们以前的相关研究也证实此方法的可行性^[20]。因此本实验研究选择 NaOH 碱性水解法来处理 PET 人工韧带表面，来促进 PET 人工韧带与生物活性分子的结合。组织工程韧带研究中，常常采用的种子细胞是骨髓间充质干细胞 (BMSCs)，因为其具有多向分化的

潜能，并认为在体外不同的条件诱导下可分化为骨、软骨、肌肉以及韧带的成纤维细胞^[21-24]。BMSCs 大量存在于自体骨髓当中，所以取材简单方便，而且由于 BMSCs 来源于自体的骨髓，能够避免免疫排斥反应的发生。BMSCs 在体外培养时，其具有旺盛的生长增殖活性，用于实验研究具有可靠的操作性和易用性，并且体外培养可分泌表达 I、III型胶原蛋白细胞外基质，BMSCs 的这些生物学活性优点，非常适合用作组织工程韧带的种子细胞。

因此为解决 PET 人工韧带与骨界面的愈合问题，本研究应用 cyclo-RGDFV 环形多肽表面修饰 PET 人工韧带，与 BMSCs 体外共培养，观察细胞粘附、增殖和分化情况，探究 cyclo-RGDFV 促进 PET 人工韧带与 BMSCs 组织相容性的有效性，再进一步将 cyclo-RGDFV 表面修饰的 PET 人工韧带重建兔 ACL，观察其与骨界面的骨整合情况，初步探讨实现 PET 人工韧带与骨界面生物性骨整合的可行性。本实验研究包括以下三个部分：

第一部分：环形多肽表面修饰 PET 人工韧带；

第二部分：环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带在体外研究中对 BMSCs 粘附、增殖和分化的影响；

第三部分：环形多肽表面修饰的 PET 人工韧带重建兔 ACL 后其与骨界面的骨整合情况。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库