

蚕丝相关组织工程支架在肌腱和韧带再生修复中的应用

胡叶君¹, 乐辉辉², 金张楚^{1,2}, 陈晓¹, 茵梓¹, 沈炜亮^{1,2}, 欧阳宏伟¹

1. 浙江大学医学院干细胞与再生医学系 浙江大学李达三·叶耀珍干细胞与再生医学研究中心

浙江省组织工程与再生医学技术重点实验室, 浙江 杭州 310058

2. 浙江大学医学院附属第二医院骨科 浙江大学骨科研究所, 浙江 杭州 310009

[摘要] 肌腱和韧带损伤是临床常见运动系统损伤之一。传统治疗手段因供体来源有限、机体免疫排斥等局限,尚无法达到令人满意的临床疗效,尤其是对那些竞技运动员。目前的组织工程学手段能够突破传统治疗的局限,促进肌腱和韧带损伤的修复再生。蚕丝是一种天然的生物材料,具有生物相容性较好、力学强度跨度大和物理结构可调节等特性,可以作为肌腱和韧带的组织工程支架。以蚕丝支架为核心提供力学支持,复合胶原等其他生物成分能增加支架的三维空间,促进更多细胞黏附,并提升材料的生物相容性。体内研究逐步验证了蚕丝支架在发病率较高的肌腱和韧带(前交叉韧带、内侧副韧带、跟腱、肩袖韧带)修复中的临床应用潜能。生物力学良好,宿主自然整合的组织工程肌腱和韧带需要深入基础微观领域研究和延伸临床操作领域研究,促进产品走出实验室,开辟临床应用新航路,为肌腱和韧带损伤患者带来新的希望。本文就蚕丝相关组织工程支架的历史演变及其用于肌腱和韧带损伤修复的效果进行综述和展望。



[关键词] 蚕属; 腱损伤; 韧带; 支架; 修复外科手术; 组织工程; 再生; 综述

[中图分类号] R686 **[文献标志码]** A

Application of silk-based tissue engineering scaffold for tendon / ligament regeneration

HU Yejun^{1,2}, LE Huihui², JIN Zhangchu^{1,2}, CHEN Xiao¹, YIN Zi¹, SHEN Weiliang^{1,2}, OUYANG Hongwei¹ (1. Center of Stem Cell and Tissue Engineering, Dr. Li Dak Sum & Yip Yio Chin Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Key Laboratory of Stem Cell of Zhejiang Province, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; 2. Department of Orthopedic Surgery, Orthopedics Research

收稿日期:2015-11-26 接受日期:2015-12-10

基金项目:国家自然科学基金(81572157,81201396,81572115);国家自然科学基金青年基金(81271970);浙江省自然科学基金(LY14H060003)

第一作者:胡叶君(1988-),男,博士研究生,从事运动医学研究;E-mail: huyejun@zju.edu.cn; http://orcid.org/0000-0001-6536-9456

通讯作者:欧阳宏伟(1971-),男,博士,教授,博士生导师,从事干细胞与组织工程、运动医学研究;E-mail: hwoy@zju.edu.cn; http://orcid.org/0000-0003-0627-2536. 沈炜亮(1982-),男,博士,主治医师,硕士生导师,从事骨科疾病研究;E-mail: shenweiliang365@163.com; http://orcid.org/0000-0002-8099-8258

Institute of Zhejiang University, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

Corresponding author: OUYANG Hongwei, E-mail: hwoy@zju.edu.cn, <http://orcid.org/0000-0003-0627-2536>; SHEN Weiliang, E-mail: shenweiliang365@163.com, <http://orcid.org/0000-0002-8099-8258>

[Abstract] Tendon/ligament injury is one of the most common impairments in sports medicine. The traditional treatments of damaged tissue repair are unsatisfactory, especially for athletes, due to lack of donor and immune rejection. The strategy of tissue engineering may break through these limitations, and bring new hopes to tendon/ligament repair, even regeneration. Silk is a kind of natural biomaterials, which has good biocompatibility, wide range of mechanical properties and tunable physical structures; so it could be applied as tendon/ligament tissue engineering scaffolds. The silk-based scaffold has robust mechanical properties; combined with other biological ingredients, it could increase the surface area, promote more cell adhesion and improve the biocompatibility. The potential clinical application of silk-based scaffold has been confirmed by *in vivo* studies on tendon/ligament repairing, such as anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, achilles tendon and rotator cuff. To develop novel biomechanically stable and host integrated tissue engineered tendon/ligament needs more further micro and macro studies, combined with product development and clinical application, which will give new hope to patients with tendon/ligament injury.

[Key words] Bombyx; Tendon injuries; Ligaments; Scaffolds; Reconstructive surgical procedures; Tissue engineering; Regeneration; Review

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2016,45(2):152-160.]

肌腱和韧带损伤是临床常见运动系统损伤之一,常导致工作和运动中的活动能力下降。据统计,每年全球有近 3000 万患者接受肌腱和韧带损伤后的相关治疗^[1]。在美国,肌腱和韧带、关节囊损伤占肌肉骨骼系统损伤的 45%,这一比例随着运动参与度和人口老龄化的增加仍在不断上升^[2]。肌腱和韧带损伤的类型包括部分撕裂和完全破裂^[3,4],这类损伤集中发生在高负荷肌腱和韧带上,如跟腱、前交叉韧带、肩袖韧带、内侧副韧带等。肌腱和韧带损伤后的自然病理转归往往是瘢痕组织替代正常组织^[5],其力学性能大大降低。传统治疗手段包括保守治疗、缝合、自体 and 异体移植及人工假体替代等。然而,这些方法因供区部位发病、疾病传播、免疫排斥、替代假体的生物相容性不良和力学性能低下导致重复断裂等^[6-7]弊端致使组织结构无法恢复到伤前的力学强度和活动角度,从而未能达到令人完全满意的临床治疗效果,尤其是那些高水平的竞技运动员。

除了原发性损伤外,前交叉韧带损伤后治疗不当还会继发以疼痛症状为主的骨关节炎,增加治疗难度和经济负担^[8]。因此,探寻能够有效促进肌腱和韧带再生修复的方法具有极其重要的临床意义和应用价值。

随着“组织工程学”概念的提出,外科学已进入“再生医学”的新阶段。组织工程三元素包括种子细胞、支架材料和生物信息调控^[9]。考虑到临床外科手术操作的便捷性、无菌性和可操作性,支架材料相比生长因子、细胞等更具优势。Hollister 等^[10]曾提出支架的四个关键属性:形状、固定、功能和形成。简要说形状指材料具有一定形态可填补缺损部位;固定指支架可被整合于宿主组织;功能指支架能够模拟所替代组织的生物力学功能;形成指支架必须能够诱导新生组织的正常发育。其描述的虽是骨材料,但也同样适用于骨骼肌肉系统。对于肌腱和韧带损伤再生治疗来说,最重要的两点是可以诱导强大的修复过

程和在组织再生过程中可以抵抗过度张力,保护修复组织。目前常用的肌腱和韧带组织工程支架主要为人工合成材料和天然生物材料。人工合成材料的力学强度足以与正常肌腱和韧带相比拟,但其作为外源性物质是否对机体有远期影响尚不得而知。天然生物材料(如人脱细胞真皮基质^{®[11]}、GraftJacket^{®[12]}以及 Restore^{®[13]}等)的主要成分均为胶原,高度模拟机体细胞外基质,生物相容性较好。然而,其缺陷是无法满足肌腱和韧带的力学要求,常在修复过程中断裂,进而影响机体组织再生^[14]。蚕丝是一种从蚕蛹中提取出来的天然蛋白质,具有相对良好的力学性能、较好的生物相容性和可控的生物降解性。这一定程度上克服了以上材料的弊端,为肌腱和韧带组织工程支架开发带来新的契机。

1 蚕丝的生物特性及应用概况

1.1 蚕丝的分子结构

蚕丝具有独特的蛋白多聚物结构,由蚕的腺体上皮细胞合成分泌,经喷射在空气中形成^[15]。其主要成分为丝胶蛋白和丝素蛋白。丝胶蛋白是蚕丝表面的黏附蛋白,占25%~30%。丝素蛋白在蚕丝的核心,是聚集态结构的物质,由结晶态和无定形态两部分组成。丝素蛋白含有18种氨基酸,大部分为甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸。在蚕丝降解过程中,细胞微环境会富集大量氨基酸,特别是脯氨酸和赖氨酸,为胶原合成的主要原料。

1.2 蚕丝作为支架材料的优势特性

早在20世纪90年代,已经证实天然和再生丝素是一种适合培养动物细胞的生物材料^[16-17]。吴微宇^[18]比较了丝素膜和新鲜猪皮对兔皮肤创面修复的效果,结果显示丝素具有更好的生物相容性。近年来,Omenetto等^[19]研究发现丝素蛋白具有 β 折叠结构,这一结构可以增加丝素材料的机械强度和韧性,其中韧性甚至可以优于最好的合成材料。同时,通过改进 β 折叠结构的比例,丝素材料的力学强度也优于绝大多数目前常用的可降解聚合材料,如胶原、多聚乳酸等。除此之外,蚕丝材料表面加工修饰容易^[20],体内降解缓慢,可加工成从液态溶液到有机固态各种形态^[21-22],如凝胶、管道、海绵、微球、薄膜等。蚕丝材料的这些特性使其在组织工程应用上具有广阔的范围和独特的优势。

1.3 蚕丝支架构建方案

目前蚕丝的构架方式主要有两类。一类是天然蚕丝脱胶,经多种扭转成形(如绳索状、缆线状、辫子状等)后用于组织再生。Altman等^[23]最早使用编织状蚕丝用于前交叉韧带的重建再生。这种编织状蚕丝可以复合到三维多孔组织工程支架上,从而加固支架的承载受力功能。另一类是生蚕丝脱胶、溶解、过滤、透析从而生成丝素溶液,并进一步加工成不同形态的丝素模型。丝素膜可以通过直接浇铸丝素溶液,或者层层自组装形成不同厚度的膜^[24],随后通过湿热^[25]、醇化等交联方式促进 β 折叠,增强膜稳定性。同时,还可以在丝素膜表面进行物理化学修饰,从而调控细胞增殖、分化等行为^[26]。另外,电纺丝可以通过电纺蚕丝形成纳米纤维网,其巨大的表面积和多孔结构可用于血管移植和神经引导。再生丝素纤维可以通过湿纺和微流体溶液纺制作,湿纺纤维处于微米级的纤维直径比天然蚕丝纤维优越,可以根据需要调整表型和复合生物分子。丝素凝胶可以通过钙盐溶液^[27]、超声^[28]、冷冻^[29]、醇化^[30]等方法制备,用于宫颈^[31]、软骨^[32]等组织修补,并可负载药物进行缓释^[33],类似的缓释功能也可以通过丝素微球实现^[34]。最常见的再生丝素材料是三维多孔丝素海绵支架,可以通过冻干、致孔^[35]等手段制备,其三维结构恰当模拟了机体生理微环境的立体结构。支架的孔径大小可通过不同冷冻温度、溶液酸碱度值和有机溶液的量进行调节^[36]。另外,反复冻融可将材料孔径从60 μm 提升到250 μm ^[35]。蚕丝复合支架通过将不同状态的蚕丝材料复合,从而改善支架的整体物理特性,如Kaplan等通过多孔丝素海绵中混入丝素微粒,将原来不足50 kPa的压缩模量增加到了2.2 MPa^[37],并将丝素微粒改良为微细蚕丝纤维,使材料的弹性模量增加到13 MPa^[38]。这种力学特性满足了扁骨再生的力学要求,但尚不能满足受力较大的长骨组织工程需求。也有研究者将蚕丝海绵复合到天然编织状蚕丝网上,增强其抗拉特性,体内实验的组织学研究发现,材料上细胞能够均匀分布,未出现材料内部细胞难以长入的现象。以上研究均提示蚕丝材料具有广阔的应用领域,可以应用于以力学为主要功能的组织的组织工程。

1.4 蚕丝材料体外研究

蚕丝材料的不同构建方案使其在软硬度、表面修饰、拓扑结构、力学强度、孔径大小等方面均具有较宽广的特性。已经有多个研究小组采用不同形式的蚕丝材料在多种组织细胞上进行了大量体外研究。Kaplan 研究组对丝素蛋白支架持续进行了 10 余年的深入研究。体外培养结果表明,不同蚕丝材料对于人软骨细胞^[39]、人肌腱细胞^[40]、人主动脉内皮细胞和冠状动脉平滑肌细胞^[41]以及角膜细胞^[42]、皮肤角质细胞^[43]均具有较好的支持。羟基磷灰石的复合可以进一步诱导人间充质干细胞向成骨细胞分化^[44]。丝素材料联合 TGF- β 3 与人成纤维细胞和软骨细胞共培养可以维持种植的软骨细胞表型,并形成更高水平的葡糖氨基葡聚糖、I 型胶原、II 型胶原^[45]。此外,其他研究组也相继在肝细胞^[46]、嗅鞘细胞^[47]、纤维环细胞^[47]上进行了研究,结果表明上述细胞能够较好地在这类材料上黏附和增殖。

1.5 蚕丝材料体内研究

目前蚕丝相关的各种材料已成功地在动物体内各种不同系统中实现了组织的部分修复和再生。在循环系统方面,Enomoto 等^[48]用管状丝素材料替代小鼠部分腹主动脉,术后 18 个月内不同时间点检测结果显示,丝素材料逐渐降解,伴随血管内皮细胞、平滑肌细胞构成的动脉样结构新生。在运动系统方面,无论是抗压的骨组织^[49],还是抗拉的韧带组织^[50],蚕丝材料均能通过不同的加工达到相应组织的力学特性,从而实现组织的功能重建。在神经系统方面,Huang 等^[51]使用蚕丝复合材料促进了外周神经轴突再生与功能恢复;Das 等^[52]使用蚕丝纳米复合材料修复坐骨神经,其结果显示实验组在屈伸、跳跃等运动功能上均优于对照组。另外,在膀胱^[53]、食管^[54]、盆腔^[55]等组织中,也有相应的功能修复研究报道。以上相关研究提示,蚕丝作为一种生物相容性较好的生物材料,在组织工程的研究应用上已引起广泛关注。中国作为蚕丝产量大国,在蚕丝相关生物医学产业的本土化应用和推广上具有极大的前景和可行性。

1.6 蚕丝材料临床应用

尽管蚕丝材料的临床前研究结果显示其具有巨大的应用潜力,但尚需要严格的审批流程和临床质控,走向临床尚需进一步验证和检验。蚕丝产品中,最早应用于临床的是蚕丝丝线。蚕丝丝

线具有较好的生物相容性和力学性能,可用于组织的缝合。随着近年来转化医学的不断推进,目前已经开展临床应用的蚕丝产品包括外用的蚕丝敷贴用于缓解湿疹症状^[55]和治疗压疮^[56];血管内埋植的蚕丝血流导向支架用于治疗复杂颅内动脉瘤^[57];SeriTM用于乳房重建^[58]以及蚕丝蛋白生物支架用于腹壁皮瓣供区的修复、腹壁疝修补和腹壁成形术^[59]等。逐步推进、稳步推广蚕丝相关材料从科研成果向临床应用转化,需要基础与临床科技工作者密切合作,加快进程,从而使更多的患者受益。

2 蚕丝组织工程支架用于肌腱和韧带损伤后再生修复

目前,许多生物材料被研发尝试用于肌腱和韧带重建。传统天然生物材料以胶原为主,降解较快,无法为长入的尚未成熟的新生组织提供足够的力学支持,易出现组织再断裂;合成高分子材料虽力学强度大,但生物相容性低,且降解产物易导致滑膜炎^[60]等,无法实现肌腱和韧带的理想再生。于是,越来越多的研究聚焦于基于蚕丝材料的组织工程,将其作为未来的临床肌腱和韧带重建策略进行探索。

Altman 等^[23]最早尝试用天然蚕丝纤维制作的三维支架作为肌腱的替代物,结果显示蚕丝扭曲支架力学特性近似正常人前交叉韧带强度,且可促进祖细胞的生长和向腱系分化。另外,通过加载力学刺激可以进一步强化组织的腱性分化^[61-63]。随后,Horan 等^[64]通过研究纺纱设计对蚕丝支架力学性能的影响,证实了扭曲状和缆线状的支架用于力学需求较大的肌腱和韧带组织工程更合适。近年来新加坡 Fan 等^[65]构建的蚕丝海绵和蚕丝支架在保持蚕丝力学性能的同时,增加了材料多孔结构,更有利于细胞的迁移、依附和组织长入。近年来,Chen 等^[66]构建了编织状蚕丝—胶原海绵复合支架,新的蚕丝编制技术改进了以往缆线状蚕丝过于致密不利于细胞长入的缺陷,同时复合胶原增强了细胞的黏附性,提高了生物相容性。这些研究均基于肌腱和韧带损伤的动物体内模型,逐步验证了蚕丝支架在发病率较高的肌腱和韧带(前交叉韧带、内侧副韧带、跟腱、肩袖韧带)修复中的临床应用潜能。

2.1 前交叉韧带

新加坡 Goh 课题组的 Fan 等^[65]采用蚕丝海绵和蚕丝支架进行了第一个前交叉韧带重建的体内实验,结果显示韧带主体部分的细胞外基质主要含有 I 型胶原、II 型胶原和生腱蛋白。该课题组 Liu 等^[67]发现相比于前交叉韧带来源成纤维细胞,骨髓来源间充质干细胞复合支架体内植入表现出更好的细胞生长和增殖效果,并逐渐形成腱系表型和出现胞外基质沉积。随后,该课题组使用细胞复合支架进一步在大动物体内进行验证,术后 6 个月重建的猪前交叉韧带大量的胞外基质沉积,可有效维持组织的力学,并且在腱骨交界处形成了间接止点^[50]。考虑到丝素并不是天然细胞外微环境成分,该课题组进一步在丝素海绵表面修饰了一种细胞外基质样蛋白肽纳米纤维 RADA16,体外结果显示腱系分化因子表达均有短暂上升,特别是 tenascin-C 的表达^[68]。此外,研究者们也尝试直接使用丝素复合其他材料支架用于前交叉韧带再生。如 Seo 等^[69-70]使用蚕丝和胶原—透明质酸复合支架,结果显示支架能有效促进血管形成、细胞长入和胶原合成。然而前交叉韧带修复成功与否不仅仅依赖于腱性部分,腱骨结合处的修复情况更不能忽视,支架与骨组织之间的纤维软骨层的缺乏往往是前交叉韧带重建失败的主要原因。Fan 等^[65]在蚕丝网和蚕丝海绵复合支架上种植细胞,体外培育成组织工程韧带,随后体内移植重建前交叉韧带。术后 6 个月腱骨结合处形成直接止点的典型四层结构(骨、矿化纤维软骨、纤维软骨和韧带),类似于天然腱骨接合处结构。随后他们将原有蚕丝支架改进复合羟基磷灰石^[71]或复合磷酸钙^[72],其中蚕丝复合磷酸钙修复兔前交叉韧带术后 4 个月组织学和 μ -CT 显示骨隧道内腱骨再生,同时恢复了将近 60% 的骨量和 80% 的力学性能^[72]。该课题组还针对软骨层形成不足的问题,研发了一种 TGF- β 3 修饰蚕丝缆线加固的硫酸软骨素—透明质酸—丝素复合支架。这种支架能够支持细胞的增殖,并在体外促进细胞在交界面形成软骨层的能力^[73]。Li 等^[74-75]也研发了一种 silk-TCP-PEEK 支架用于猪腱骨修复,可以观察到纤维软骨的再生,并形成了从蚕丝移植物到骨的类似正常结构。有学者研究了编织状蚕丝—胶原海绵支架用于兔前交叉韧带修复的可行性。术后 18 个月观察结果显示,这种复合支架相比单纯蚕丝支架更能够促进新生韧

带结构的成熟,并能够介导腱骨愈合处形成直接止点。以上结果提示这种复合蚕丝材料有希望成为未来的前交叉韧带重建的功能性组织工程支架。更重要的是,新型的支架可有效延缓骨性关节炎的发生^[75],具有重要的临床意义。

2.2 内侧副韧带

内侧副韧带位于皮下,血供相对丰富,有部分自我修复能力。中国学者原创性地将编织状的蚕丝和胶原海绵复合,构建出了一个实用的胶原和蚕丝支架。其中,胶原海绵提供修复细胞黏附和长入的空间,编织状蚕丝纤维提供足够的力学强度。研究结果显示,复合支架相对单纯蚕丝支架具有更多胶原沉积和更粗胶原生成,其力学特性更接近正常组织^[66]。

2.3 跟腱

跟腱连接跟骨和小腿三头肌,使得人类可以正常行走、奔跑、攀登等。前交叉韧带损伤后尚可以依靠关节周围韧带代偿,而跟腱损伤患者则导致运动功能完全丧失。Chen 等^[76]将胚胎—间充质干细胞复合到编织的蚕丝胶原海绵支架上,并进行体外动态机械力学刺激和皮下动态生物力学刺激,使其分化为肌腱样细胞,形成具有功能的组织工程肌腱。随后,研究人员进行了大鼠原位跟腱损伤修复实验,结果证明该方法能够促进组织腱系因子表达和损伤跟腱的修复。Shen 等^[77]通过在蚕丝胶原支架中加入外源性间质衍生因子用于大鼠损伤跟腱的修复,术后 1 周发现功能蚕丝支架可有效减少炎症细胞的浸润,增加支架内部成纤维细胞的迁移;术后 4 周可见腱系因子表达增加,粗大胶原的形成更多,肌腱具有更强的力学特性。

2.4 肩袖韧带

我国传统运动以下肢运动为主,但近年来随着国际文化交流的增进,皮划艇、棒球、网球等运动日益盛行,肩袖损伤也逐年增加。Shen 等^[77]通过体外种植同种异体肌腱干细胞在蚕丝胶原海绵支架上构建了组织工程肌腱,对兔肩袖损伤进行修复:术后 4 周和 8 周的结果显示,组织工程肌腱无明显免疫反应,并且淋巴细胞在种植区域的浸润减少;术后 12 周可见更多的胶原沉积,且新生肌腱的结构和生物力学特性均优于对照组,提示该支架促进了体内肩袖损伤的再生。越来越多的研究表明,作为构成组织微环境核心要素的细胞

外基质的拓扑结构^[78]可以影响干细胞的黏附、增殖和分化。该课题组前期结果表明,平行纳米高分子材料可以模拟肌腱组织细胞外基质的独特结构,促进肌腱干细胞平行排列,并诱导肌腱干细胞形态拉长呈梭形,与成熟肌腱细胞类似^[79]。同时这种平行材料的体内研究结果显示,修复组织的力学强度提升^[79]。这一结果与 Teh 等^[80]的平行蚕丝纤维支架促进间充质干细胞腱系分化的研究结果类似。据此,将胶原海绵蚕丝支架进行三维仿生改进,以编织状蚕丝支架为基础,将复合的胶原海绵从无序改良成平行有序排列进行肩袖韧带修复,或许可以进一步提升肌腱和韧带组织修复效果。

3 结 语

未来的蚕丝支架发展方向可以基于蚕丝的组织工程策略。一方面,我们可以通过延续传统组织工程三元素概念,继续改进材料的机械性能、生物相容性、细胞亲和力和长期生物可降解性等,同时通过基因修饰、物理模拟、生长因子和化学小分子调控等有机结合,促进肌腱和韧带的再生。另一方面,我们可以借鉴现有临床手术方式和关节注射方式,通过分离提取前交叉韧带手术切除的残余韧带中的干细胞进行体外培养,同时植入构建的 SDF-1 缓释蚕丝—胶原海绵支架。然后将扩增的大量自体前交叉韧带祖细胞进行关节腔内注射,细胞靶向迁移,归巢于支架,促进前交叉韧带修复再生。这种关节腔内细胞注射方法不但可以避免手术创伤后早期关节腔内的炎症环境,而且增加了关节腔内腱性细胞来源。另外,也可以结合整形外科常用的皮瓣移植术,将蚕丝胶原支架预血管化,促进血管长入和腱性组织形成。

肌腱和韧带损伤是临床常见运动系统损伤之一。缺乏足够的肌腱和韧带来源是临床骨科医师修复肌腱和韧带损伤亟待解决的首要问题。因此,构建生物力学良好、宿主自然整合的组织工程肌腱和韧带需要基础微观领域深入研究并延伸临床操作领域研究,促进产品走出实验室,开辟临床应用新航路,为肌腱和韧带损伤患者带来新的希望。作为肌腱和韧带组织工程天然生物支架之一的蚕丝,具有生物相容性较好、力学强度跨度大和物理结构可调节等特性,有望为解决这一问题带来新的契机。

参考文献

- [1] ABBAH S A, SPANOUEDES K, O'BRIEN T, et al. Assessment of stem cell carriers for tendon tissue engineering in pre-clinical models[J]. **Stem Cell Res Ther**, 2014, 5(38):444-453.
- [2] BUTLER D L, JUNCOSA N, DRESSLER M R. Functional efficacy of tendon repair processes[J]. **Annu Rev Biomed Eng**, 2004, 6(1):303-329.
- [3] DOCHEVA D, MÜLLER S A, MAJEWSKI M, et al. Biologics for tendon repair[J]. **Adv Drug Deliv Rev**, 2014, 84: 222-239.
- [4] VOLETI P B, BUCKLEY M R, SOSLOWSKY L J. Tendon healing: repair and regeneration[J]. **Annu Rev Biomed Eng**, 2012, 14: 47-71.
- [5] 梁华伟. 肌腱损伤的治疗进展[J]. **中华物理医学与康复杂志**, 2010, 32(9):715-717.
LIANG Huawei. Advances in the treatment of tendon injuries[J]. **Chin J Phys Med Rehabil**, 2010, 32(9):715-717. (in Chinese)
- [6] SHRIVATS A R, MCDERMOTT M C, HOLLINGER J O. Bone tissue engineering: state of the union[J]. **Drug Discov Today**, 2014, 19(6):781-786.
- [7] ZMISTOWSKI B, KARAM J A, DURINKA J B, et al. Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality[J]. **J Bone Joint Surg Am**, 2013, 95(24):2177-2184.
- [8] 卢宏章, 刘震宁, 张道俭, 等. 慢性前交叉韧带损伤合并骨关节炎患者的特点及治疗[J]. **中华医学杂志**, 2012, 92(7):472-475.
LU Hongzhang, LIU Zhenning, ZHANG Daojian, et al. Treatment of unstable chronic anterior cruciate ligament-deficient knee with osteoarthritis[J]. **Chinese Medical Journal**, 2012, 92(7):472-475. (in Chinese)
- [9] MURPHY C M, O'BRIEN F J, LITTLE D G, et al. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad[J]. **Eur Cell Mater**, 2013, 26(4):120-132.
- [10] HOLLISTER S J, MURPHY W L. Scaffold translation: barriers between concept and clinic[J]. **Tissue Eng Part B Rev**, 2011, 17(6):459-474.
- [11] BARBER F A, BURNS J P, DEUTSCH A, et al. A prospective, randomized evaluation of acellular human dermal matrix augmentation for arthroscopic rotator cuff repair[J]. **Arthroscopy**, 2012, 28(1):8-15.
- [12] WONG I, BURNS J, SNYDER S. Arthroscopic GraftJacket repair of rotator cuff tears[J]. **J Shoulder Elbow Surg**, 2010, 19(2 Suppl):104-109.
- [13] SCLAMBERG S G, TIBONE J E, ITAMURA J M, et al. Six-month magnetic resonance imaging follow-up

- of large and massive rotator cuff repairs reinforced with porcine small intestinal submucosa [J]. **J Shoulder Elbow Surg**, 2004, 13(5):538-541.
- [14] GOTT M, AST M, LANE L B, et al. Tendon phenotype should dictate tissue engineering modality in tendon repair: a review[J]. **Discov Med**, 2011, 12(62):75-84.
- [15] ALTMANG H, DIAZ F, JAKUBA C, et al. Silk-based biomaterials [J]. **Biomaterials**, 2003, 24(3):401-416.
- [16] INOUE K, KUROKAWA M, NISHIKAWA S, et al. Use of bombyx mori silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells [J]. **J Biochem Biophys Methods**, 1998, 37(3):159-164.
- [17] MINOURA N, AIBA S, HIGUCHI M, et al. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1995, 208(2):511-516.
- [18] 吴徽宇. 丝素蛋白作为生物医用材料的研究[J]. 材料导报, 2001, 15(2):50-51.
WU Huiyu. Studies on applications of silk fibroin as a biomedical material [J]. **Materials Review**, 2001, 15(2):50-51. (in Chinese)
- [19] OMENETTO F G, KAPLAN D L. New opportunities for an ancient material [J]. **Science**, 2010, 329(5991):528-531.
- [20] WENK E, MURPHY A R, KAPLAN D L, et al. The use of sulfonated silk fibroin derivatives to control binding, delivery and potency of FGF-2 in tissue regeneration [J]. **Biomaterials**, 2010, 31(6):1403-1413.
- [21] ROCKWOOD D N, PREDA R C, YUCEL T, et al. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin [J]. **Nat Protoc**, 2011, 6(10):1612-1631.
- [22] VEPARI C, KAPLAN D L. Silk as a biomaterial [J]. **Prog Polym Sci**, 2007, 32(8-9):991-1007.
- [23] 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.
- [24] WANG X, KIM H J, XU P, et al. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin [J]. **Langmuir**, 2005, 21(24):11335-11341.
- [25] HU Y, ZHANG Q, YOU R, et al. The relationship between secondary structure and biodegradation behavior of silk fibroin scaffolds [J]. **Advances in Materials Science and Engineering**, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/185905>.
- [26] TAO H, KAPLAN D L, OMENETTO F G. Silk materials—a road to sustainable high technology [J]. **Advanced Materials**, 2012, 24(21):2824-2837.
- [27] WANG H, LIU X Y, CHUAH Y J, et al. Design and engineering of silk fibroin scaffolds with biomimetic hierarchical structures [J]. **Chem Commun**, 2013, 49(14):1431-1433.
- [28] WANG X, KLUGE J A, LEISK G G, et al. Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation [J]. **Biomaterials**, 2008, 29(8):1054-1064.
- [29] AK F, OZTOPRAK Z, KARAKUTUK I, et al. Macroporous silk fibroin cryogels [J]. **Biomacromolecules**, 2013, 14(3):719-727.
- [30] KUNDU B, KUNDU S C. Bio-inspired fabrication of fibroin cryogels from the muga silkworm *Antheraea assamensis* for liver tissue engineering [J]. **Biomed Mater**, 2013, 8(5):055003.
- [31] CRITCHFIELD A S, MCCABE R, KLEBANOV N, et al. Biocompatibility of a sonicated silk gel for cervical injection during pregnancy: *in vivo* and *in vitro* study [J]. **Reprod Sci**, 2014, 21(10):1266-1273.
- [32] YODMUANG S, MCNAMARA S L, NOVER A B, et al. Silk microfiber-reinforced silk hydrogel composites for functional cartilage tissue repair [J]. **Acta Biomater**, 2014, 11: 27-36.
- [33] GUZIEWICZ N A, MASSETTI A J, PEREZ-RAMIREZ B J, et al. Mechanisms of monoclonal antibody stabilization and release from silk biomaterials [J]. **Biomaterials**, 2013, 34(31):7766-7775.
- [34] 党婷婷, 陈爱政, 王士斌. 丝素蛋白微球作为药物缓释载体的研究进展 [J]. 化工进展, 2012, (7): 1587-1591.
DANG Tingting, CHEN Aizheng, WANG Shibin. Research progress of silk fibroin microsphere as sustained-release carrier of drug [J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2012(7): 1587-1591. (in Chinese)
- [35] LI M Z, WU Z Y, ZHANG C S, et al. Study on porous silk fibroin materials. II. Preparation and characteristics of spongy silk fibroin materials [J]. **J Appl Polym Sci**, 2001, 79(12):2192-2199.
- [36] TSUKADA M, FREDDI G, MINOURA N, et al. Preparation and application of porous silk fibroin materials [J]. **J Appl Polym Sci**, 1994, 54(4): 507-514.
- [37] RAJKHOWA R, GIL E S, KLUGE J, et al. Reinforcing silk scaffolds with silk particles [J]. **Macromol Biosci**, 2010, 10(6):599-611.
- [38] MANDAL B B, GRINBERG A, GIL E S, et al. High-strength silk protein scaffolds for bone repair [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2012, 109(20):

- 7699-7704.
- [39] WANG Y, BLASIOLI D J, KIM H J, et al. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes[J]. **Biomaterials**, 2006, 27(25):4434-4442.
 - [40] KARDESTUNCER T, MCCARTHY M B, KARAGEORGIOU V, et al. RGD-tethered silk substrate stimulates the differentiation of human tendon cells[J]. **Clin Orthop Relat Res**, 2006, 448: 234-239.
 - [41] WANG X, ZHANG X, CASTELLOT J, et al. Controlled release from multilayer silk biomaterial coatings to modulate vascular cell responses[J]. **Biomaterials**, 2008, 29(7):894-903.
 - [42] LAWRENCE B D, MARCHANT J K, PINDRUS M A, et al. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering[J]. **Biomaterials**, 2009, 30(7):1299-1308.
 - [43] HAN F, LIU S, LIU X, et al. Woven silk fabric-reinforced silk nanofibrous scaffolds for regenerating load-bearing soft tissues[J]. **Acta Biomater**, 2014, 10(2):921-930.
 - [44] BHUMIRATANA S, GRAYSON W L, CASTANEDA A, et al. Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds[J]. **Biomaterials**, 2011, 32(11):2812-2820.
 - [45] MANDAL B B, PARK S H, GIL E S, et al. Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering[J]. **Biomaterials**, 2011, 32(2):639-651.
 - [46] KASOJU N, BORA U. Silk fibroin based biomimetic artificial extracellular matrix for hepatic tissue engineering applications[J]. **Biomed Mater**, 2012, 7(4):045004.
 - [47] SHEN Y, QIAN Y, ZHANG H, et al. Guidance of olfactory ensheathing cell growth and migration on electrospun silk fibroin scaffolds [J]. **Cell Transplant**, 2010, 19(2):147-157.
 - [48] ENOMOTO S, SUMI M, KAJIMOTO K, et al. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material[J]. **J Vasc Surg**, 2010, 51(1):155-164.
 - [49] PERRONE G S, LEISK G G, LO T J, et al. The use of silk-based devices for fracture fixation[J]. **Nat Commun**, 2014, 5: 3385.
 - [50] FAN H, LIU H, TOH S L, et al. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model [J]. **Biomaterials**, 2009, 30(28):4967-4977.
 - [51] HUANG W, BEGUM R, BARBER T, et al. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats [J]. **Biomaterials**, 2012, 33(1):59-71.
 - [52] DAS S, SHARMA M, SAHARIA D, et al. *In vivo* studies of silk based gold nano-composite conduits for functional peripheral nerve regeneration [J]. **Biomaterials**, 2015, 62: 66-75.
 - [53] MAUNEY J R, CANNON G M, LOVETT M L, et al. Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation [J]. **Biomaterials**, 2011, 32(3):808-818.
 - [54] CHUNG E J, JU H W, PARK H J, et al. Three-layered scaffolds for artificial esophagus using poly (varepsilon-caprolactone) nanofibers and silk fibroin: an experimental study in a rat model[J]. **J Biomed Mater Res A**, 2015, 103(6):2057-2065.
 - [55] STINCO G, PICCIRILLO F, VALENT F. A randomized double-blind study to investigate the clinical efficacy of adding a non-migrating antimicrobial to a special silk fabric in the treatment of atopic dermatitis[J]. **Dermatology**, 2008, 217(3):191-195.
 - [56] TWERSKY J, MONTGOMERY T, SLOANE R, et al. A randomized, controlled study to assess the effect of silk-like textiles and high-absorbency adult incontinence briefs on pressure ulcer prevention[J]. **Ostomy Wound Manage**, 2012, 58(12): 18-24.
 - [57] TÄHTINEN O I, MANNINEN H I, VANNINEN R L, et al. The silk flow-diverting stent in the endovascular treatment of complex intracranial aneurysms; technical aspects and midterm results in 24 consecutive patients[J]. **Neurosurgery**, 2012, 70(3):617-624.
 - [58] FINE N A, LEHFELDT M, GROSS J E, et al. SERI surgical scaffold, prospective clinical trial of a silk-derived biological scaffold in two-stage breast reconstruction; 1-year data [J]. **Plast Reconstr Surg**, 2015, 135(2):339-351.
 - [59] CLEMENS M W, DOWNEY S, AGULLO F, et al. Clinical application of a silk fibroin protein biologic scaffold for abdominal wall fascial reinforcement[J]. **Plast Reconstr Surg Glob Open**, 2014, 2(11): e246. doi:10.1097/GOX.0000000000000217.
 - [60] GLEZOS C M, WALLER A, BOURKE H E, et al. Disabling synovitis associated with LARS artificial ligament use in anterior cruciate ligament reconstruction: a case report [J]. **Am J Sports Med**, 2012, 40(5):1167-1171.
 - [61] ALTMAN G, HORAN R, MARTIN I, et al. Cell differentiation by mechanical stress[J]. **FASEB J**,

- 2002, 16(2):270-272.
- [62] ALTMAN G H, LU H H, HORAN R L, et al. Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering[J]. **J Biomech Eng**, 2002, 124(6):742-749.
- [63] CHEN X, YIN Z, CHEN J L, et al. Force and scleraxis synergistically promote the commitment of human ES cells derived MSCs to tenocytes[J]. **Sci Rep**, 2012, 2: 977.
- [64] HORAN R L, COLLETTE A L, LEE C, et al. Yarn design for functional tissue engineering [J]. **J Biomech**, 2006, 39(12):2232-2240.
- [65] FAN H, LIU H, WONG E J, et al. *In vivo* study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold [J]. **Biomaterials**, 2008, 29(23):3324-3337.
- [66] CHEN X, QI Y Y, WANG L L, et al. Ligament regeneration using a knitted silk scaffold combined with collagen matrix [J]. **Biomaterials**, 2008, 29(27):3683-3692.
- [67] 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.
- [68] CHEN K, SAHOO S, HE P, et al. A hybrid silk/RADA-based fibrous scaffold with triple hierarchy for ligament regeneration [J]. **Tissue Eng Part A**, 2012, 18(13-14):1399-1409.
- [69] 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]. **J Orthop Res**, 2009, 27(4):495-503.
- [70] SEO Y, YOUN H, PARK J, et al. Effect of collagen-GAG on the anterior cruciate ligament regeneration of rabbit [J]. **J Tissue Eng**, 2010, 7(5):548-555.
- [71] HE P, SAHOO S, NG K S, et al. Enhanced osteoinductivity and osteoconductivity through hydroxyapatite coating of silk-based tissue-engineered ligament scaffold [J]. **J Biomed Mater Res A**, 2013, 101(2):555-566.
- [72] SHI P, TEH T K, TOH S L, et al. Variation of the effect of calcium phosphate enhancement of implanted silk fibroin ligament bone integration [J]. **Biomaterials**, 2013, 34(24):5947-5957.
- [73] SUN L, LI H, QU L, et al. Immobilized lentivirus vector on chondroitin sulfate-hyaluronate acid-silk fibroin hybrid scaffold for tissue-engineered ligament-bone junction [J]. **Biomed Res Int**, 2014, 2014: 816979.
- [74] LI X, HE J, BIAN W, et al. A novel silk-based artificial ligament and tricalcium phosphate/polyether ether ketone anchor for anterior cruciate ligament reconstruction-safety and efficacy in a porcine model [J]. **Acta Biomater**, 2014, 10(8):3696-3704.
- [75] LI X, HE J, BIAN W, et al. A novel silk-TCP-PEEK construct for anterior cruciate ligament reconstruction: an off-the shelf alternative to a bone-tendon-bone autograft [J]. **Biofabrication**, 2014, 6(1):15010.
- [76] CHEN J L, YIN Z, SHEN W L, et al. Efficacy of hESC-MSCs in knitted silk-collagen scaffold for tendon tissue engineering and their roles [J]. **Biomaterials**, 2010, 31(36):9438-9451.
- [77] SHEN W, CHEN X, CHEN J, et al. The effect of incorporation of exogenous stromal cell-derived factor-1 alpha within a knitted silk-collagen sponge scaffold on tendon regeneration [J]. **Biomaterials**, 2010, 31(28): 7239-7249.
- [78] RECKNOR J B, SAKAGUCHI D S, MALLAPRAGADA S K. Directed growth and selective differentiation of neural progenitor cells on micropatterned polymer substrates [J]. **Biomaterials**, 2006, 27(22):4098-4108.
- [79] YIN Z, CHEN X, CHEN J L, et al. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers [J]. **Biomaterials**, 2010, 31(8):2163-2175.
- [80] TEH T K, TOH S L, GOH J C. Aligned fibrous scaffolds for enhanced mechanoresponse and tenogenesis of mesenchymal stem cells [J]. **Tissue Eng Part A**, 2013, 19(11-12):1360-1372.

[本文编辑 李璐 沈敏]