

静电纺丝技术在纤维环组织工程支架中的应用进展

刘晨 张珂 肖良 赵泉来 徐宏光

摘要 采用静电纺丝技术制备的组织工程支架具有高表面积比和高孔隙率,因此近年来广泛用于纤维环组织工程的研究。聚己内酯等多种材料已被成功用于制备成各种纤维环组织工程支架,在纤维环缺损修复中取得良好效果,而静电纺丝技术则为纤维环组织工程支架材料的制备提供了新途径。随着该技术的日益完善,其在纤维环组织工程支架制备领域的应用前景将更为广阔。该文就近年静电纺丝技术在纤维环组织工程支架中的应用作一综述。

关键词 静电纺丝;纤维环组织工程;支架

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2019.04.003

椎间盘退行性疾病是骨科常见疾病,其发病率及致残率均较高,可能严重影响患者生活质量^[1-2]。目前该类疾病的治疗方法主要有保守治疗和手术治疗两大类。椎间融合术虽被认为是首选治疗方法,却无法终止椎间盘退变。此外,由椎间融合术导致的脊柱稳定性改变甚至可能引发或加重相邻节段退变,从而导致更严重的脊柱退行性疾病。近年的研究表明,通过以组织工程方式培育的仿生椎间盘替代病变椎间盘的方法可用于治疗椎间盘退行性疾病,其应用前景广阔^[3-4]。此外,对组织工程方法治疗髓核退变的研究也取得一定进展。许多研究认为,如果髓核外纤维环损伤不能得到有效修复,椎间盘退变治疗终究会失败。因此,有关纤维环组织工程的研究越来越受关注。

用组织工程技术制备的纤维环由支架材料、种子细胞和生长因子3部分构成。支架是组织工程化纤维环的重要组成部分。理想的纤维环支架应具备以下性能:①良好的生物相容性,种子细胞可以在支架材料上黏附并增殖;②合适的机械力学性能;③仿生于天然细胞外基质的纤维组织结构,如合适的孔隙率和相连的孔形态;④纤维环组织的降解速率与再生速率相匹配。只有特殊的制备工艺才可以使纤维环支架达到上述要求。

静电纺丝技术是一种特殊的纤维制造工艺。该工艺通过电场作用将针头处的聚合物液滴由球形变为圆锥形(即“泰勒锥”),再通过圆锥尖端延展得到纤维细丝,最终生产出直径为微米级及纳米级的聚合物细丝^[5]。静电纺丝纤维支架的结构类似于天然的细胞外基质,且具有较高的表面积/容积比率,有利于种子细胞的黏附、增殖和分化^[6],近年来在各类组织工程支架的研究中备受关注。

1 静电纺丝支架材料选择

材料选择在纤维环组织工程中至关重要,目前可用于静电纺丝技术制备纤维环组织工程支架的材料主要分为两大类,即高分子合成材料和复合材料。

1.1 高分子合成材料

人工合成材料具有低免疫原性和结构均一性,且原材料来源可靠,近些年来越来越受关注。目前用于纤维环组织工程的高分子合成材料主要有聚己内酯(PECUU)、聚羟基乙酸、聚乳酸和聚己内酯(PCL)等。Zhu等^[7]利用不同弹性模量的 PECUU 制备静电纺丝三维支架,以模拟实际纤维环径向力学梯度差异,并在支架上种植兔纤维环源干细胞(AFSC),发现 AFSC 可在不同弹性模量的静电纺丝上分化成类似纤维环内、中、外区的细胞。对植入小鼠体内的不同弹性模量的静电纺丝支架开展降解实验,则可发现 PECUU 具有较好的降解能力。Nesti等^[8]以左旋聚乳酸(PLLA)为支架材料制备纤维环组织工程支架,并在支架上接种人骨髓间充质干细胞(BMSC),通过免疫组化和二甲基亚甲基蓝法可以检测到胶原及糖胺聚糖的分泌。Nerurkar等^[9]将 PCL 通过静电纺丝技术制备成厚度为

基金项目:国家自然科学基金(81702158)、安徽省自然科学基金(1708085QH205)、皖南医学院弋矶山医院科研能力“高峰培育计划”(GF2019G07)

作者单位:241001 安徽芜湖, 皖南医学院脊柱外科研究中心、皖南医学院弋矶山医院脊柱外科

通信作者:徐宏光 E-mail: xuhgyjsyy@163.com

1 mm、长宽分别为 30 mm 和 5 mm 的矩形定向静电纺丝纤维支架,并在支架上种植牛间充质干细胞,培养 120 d 后发现支架上沉积了丰富的胶原及糖胺聚糖,同时胶原呈现定向排列,结果表明静电纺丝技术非常适合于制备纤维软骨支架材料。

1.2 复合材料

纤维环组织工程对支架性能的要求是多方面的,单一基材通常很难满足实际需求。众多学者尝试通过静电纺丝技术将两种具有不同优势的材料制备成复合静电纺丝支架,使其既具备与天然材料相近的生物相容性,又具有合成材料的优越力学性能和抗拉强度,从而可以更好地为纤维环组织工程服务。Ma 等^[10]通过共轭纺丝的方式用明胶和聚乳酸制备三维纤维支架,电镜检查显示该支架具有大的孔径和较高的孔隙率。BMSC 在支架上可较好地增殖,其 I 型胶原蛋白表达率也较高。

2 静电纺丝纤维结构及性质

纤维环的组织结构对功能影响较大,通常较为复杂,系由 15~25 层的胶原纤维以斜交层叠方式围绕在髓核周围形成,每层胶原纤维均具有高度的取向性^[11]。斜交层叠结构对维持髓核的初始形态和位置并保持椎间盘内生理压力至关重要^[12]。组织工程化纤维环支架的制备应尽量模拟实际纤维环的斜交层叠结构,从而实现仿生支架的结构及力学模拟目的。

2.1 静电纺丝纤维取向性

Lazebnik 等^[13]通过静电纺丝法制备定向的 PCL 纳米纤维,以模拟纤维环的纤维取向特性。Koepsell 等^[14]为研究不同速度滚轴制备的纳米纤维的取向性特点,用 PCL 构建取向性纳米纤维支架,发现接收纤维的滚轴转速越快,其构建支架中的纳米纤维定向性就越强,平行于纳米纤维方向的力学强度也越高;在定向纳米纤维支架上种植的种子细胞分泌的纤维环细胞外基质含量明显高于无规支架。Koepsell 等^[15]用 PCL 制备定向、无规及两头圆钝的静电纺丝支架,并分别在支架上种植猪纤维环细胞,发现两头圆钝的静电纺丝支架能够更好地促进细胞黏附,同时证明定向结构纤维可以促进细胞定向排布。Liu 等^[16]应用静电纺丝法将 PECUU 分别制备成定向和无规静电纺丝纤维支架,并将兔 AFSC 种植在支架上,发现 AFSC 在定向静电纺丝纤维上呈定向排布,其分泌的 I 型胶原蛋白亦呈定向排布,且其对 I 型胶原蛋白和蛋白聚糖基因的表

达更多。

2.2 静电纺丝纤维斜交层叠结构

研究发现,模拟斜交层叠结构对纤维环组织工程具有重要意义。有学者为分别模拟纤维环和髓核,制备了由斜交层叠结构的 PCL 和琼脂糖凝胶组成的双相支架,在施加压应力刺激的同时分别对牛纤维环细胞进行短期培养(1 周)和长期培养(6 周),发现细胞在规则斜交结构支架上分泌的细胞外基质同样表现出斜交层叠结构^[17]。上述研究结果为构建仿生的组织工程化椎间盘提供了新思路。此外,有学者将混合牛纤维环细胞的斜交层叠结构 PCL 静电纺丝支架植入大鼠尾椎间盘以构建椎间盘置换动物模型,发现该支架可稳定地存在于尾椎中,且牛纤维环细胞可以迁移至支架^[18]。上述研究表明,在支架材料制备过程中精确模拟实际纤维环组织微观结构有助于实现组织工程化纤维环的有效构建。

3 静电纺丝复合细胞因子

在多数研究中,组织工程化纤维环构建尚不能令人满意,主要因为胶原和糖胺聚糖在支架中的含量与其在实际纤维环基质中的含量差距较大。细胞生长因子具有调节细胞增殖、分化及细胞外基质代谢的作用,胰岛素生长因子(IGF)-1、转化生长因子(TGF)- β 1、成纤维生长因子(FGF)-2 和 TGF- β 3 等可参与纤维环细胞生长代谢,在组织工程化纤维环构建中具有重要作用^[19-22]。细胞因子是纤维环组织工程的重要组成部分。

静电纺丝共纺方法即在支架材料中加入生长因子,不仅可以达到生长因子缓释的目的,而且能够促进纤维环细胞外基质的分泌。Vadalà 等^[23]通过将 TGF- β 1 以 20 ng:1 g 的比例溶于质量分数为 13% 的 PLLA 的方式制备 TGF- β 1 功能性 PLLA 静电纺丝支架,并以纯 PLLA 静电纺丝支架作为对照,结果证实实验组 TGF- β 1 于 4 d 后开始释放,并于第 7 d 达到缓释平衡;将牛纤维环细胞分别种植于上述两种支架上,发现实验组缓释 TGF- β 1 的 PLLA 静电纺丝支架上牛纤维环细胞可以分泌更多的胶原及糖胺聚糖。Sahoo 等^[24]通过同轴共纺方式将碱性成纤维生长因子(bFGF)纺至聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)静电纺丝纤维支架,证实 bFGF 的缓慢释放有助于提高 BMSC 的成纤维分化能力,并可促进 I 型胶原蛋白和纤维蛋白等合成。上述研究表明,将生长因子通过共纺方式加入静电纺丝支架材料中,可通过生长因子的缓慢释放促进细胞外

基质的分泌,使组织工程化纤维环更接近于实际纤维环的组分。

将生长因子与高分子聚合物混纺可以改善支架性能,而在静电纺丝支架表面修饰生长因子则可以达到促进基质分泌的目的。Guo 等^[25]制备 PECUU 静电纺丝支架,并用兔 BMSC 作为种子细胞模拟实际纤维环细胞外基质的表达,发现向细胞培养基添加质量浓度为 10 ng/mL 的 TGF- β 3 可使 AFSC 表达 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白和蛋白聚糖基因的能力与 BMSC 在支架上的表达能力接近。Nesti 等^[8]以 PLLA 静电纺丝制备纤维环支架,以透明质酸(HA)作为髓核支架,构建成双相支架来模拟实际椎间盘结构;将人间充质干细胞种植在该支架上,并在添加 10 ng/mL 的 TGF- β 后对细胞培养 28 d,免疫组化检测发现 I 型、II 型、IX 型胶原蛋白和糖胺聚糖可持续分泌,所得基质接近于实际椎间盘组织。

无论是通过共纺方式还是支架表面修饰方式,生长因子均可提高支架与种子细胞间的相互作用,促进细胞外基质分泌。但是上述生长因子在体内实验效果仍需要体内实验予以验证。

4 结语

用静电纺丝技术制备的纤维纺丝支架具有表面积大、孔连通性好、孔隙率高等特点,有利于细胞黏附及营养物质渗入^[26]。由于静电纺丝支架可模拟天然的细胞外基质结构,因此利用该技术制备的组织工程支架受到越来越多的关注。虽然静电纺丝技术在制备组织工程化纤维环支架方面已经取得一定的进展,但随着组织工程对支架材料的要求不断提升,该项技术仍有待进一步完善。目前采用该项技术制备的纤维环组织工程支架仍处于实验室阶段,其生产效率较低,且制备过程中影响因素较多,各批次产品难以保证稳定,且国内外均尚未有利用静电纺丝技术将胶原、藻酸盐等天然材料制备成纤维环组织工程支架的文献报道。有关天然生物材料与高分子合成材料混纺的报道亦少之又少。此外,大多数研究仅限于体外实验,有关纤维环组织修复的体内实验研究不多。因此,有必要进一步开发更为先进的静电纺丝技术,制备性质更加稳定的天然材料纺丝,并构建具有可控三维结构的纳米纤维支架,从而更好地实现仿生纤维环细胞外基质的结构和功能。

参 考 文 献

- [1] Nohara A, Kawakami N, Tsuji T, et al. Intervertebral disc degeneration during postoperative follow-up more than 10 years after corrective surgery in idiopathic scoliosis: comparison between patients with and without surgery[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2018, 43(4): 255-261.
- [2] Ökmen K, Ökmen BM. The efficacy of interlaminar epidural steroid administration in multilevel intervertebral disc disease with chronic low back pain: a randomized, blinded, prospective study[J]. Spine J, 2017, 17(2): 168-174.
- [3] Wan S, Borland S, Richardson SM, et al. Self-assembling peptide hydrogel for intervertebral disc tissue engineering[J]. Acta Biomaterialia, 2016, 46: 29-40.
- [4] Xin L, Zhang C, Zhong F, et al. Minimal invasive annulotomy for induction of disc degeneration and implantation of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) plugs for annular repair in a rabbit model[J]. Eur J Med Res, 2016, 21: 7.
- [5] Fuller KP, Gaspar D, Delgado LM, et al. Influence of porosity and pore shape on structural, mechanical and biological properties of poly-caprolactone electro-spun fibrous scaffolds[J]. Nanomedicine (Lond), 2016, 11(9): 1031-1040.
- [6] Baiguera S, Del Gaudio C, Lucatelli E, et al. Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering [J]. Biomaterials, 2014, 35(4): 1205-1214.
- [7] Zhu C, Li J, Liu C, et al. Modulation of the gene expression of annulus fibrosus-derived stem cells using poly (ether carbonate urethane) urea scaffolds of tunable elasticity[J]. Acta Biomater, 2016, 29: 228-238.
- [8] Nesti LJ, Li WJ, Shanti RM, et al. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold (HANFS) amalgam[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(9): 1527-1537.
- [9] Nerurkar NL, Han W, Mauck RL, et al. Homologous structure-function relationships between native fibrocartilage and tissue engineered from MSC-seeded nanofibrous scaffolds [J]. Biomaterials, 2011, 32(2): 461-468.
- [10] Ma J, He Y, Liu X, et al. A novel electrospun-aligned nanoyarn/three-dimensional porous nanofibrous hybrid scaffold for annulus fibrosus tissue engineering [J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 1553-1567.
- [11] Han SK, Chen CW, Wierwille J, et al. Three dimensional mesoscale analysis of translamellar cross-bridge morphologies in the annulus fibrosus using optical coherence tomography [J]. J Orthop Res, 2015, 33(3): 304-311.
- [12] Vergari C, Mansfield J, Meakin JR, et al. Lamellar and fibre bundle mechanics of the annulus fibrosus in bovine intervertebral disc[J]. Acta Biomaterialia, 2016, 37: 14-20.

- [13] Lazebnik M, Singh M, Glatt P, et al. Biomimetic method for combining the nucleus pulposus and annulus fibrosus for intervertebral disc tissue engineering[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5(8): e179-e187.
- [14] Koepsell L, Remund T, Bao J, et al. Tissue engineering of annulus fibrosus using electrospun fibrous scaffolds with aligned polycaprolactone fibers[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 99(4): 564-575.
- [15] Koepsell L, Zhang L, Neufeld D, et al. Electrospun nanofibrous polycaprolactone scaffolds for tissue engineering of annulus fibrosus[J]. *Macromol Biosci*, 2011, 11(3): 391-399.
- [16] Liu C, Zhu C, Li J, et al. The effect of the fibre orientation of electrospun scaffolds on the matrix production of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells[J]. *Bone Res*, 2015, 3: 15012.
- [17] Nerurkar NL, Sen S, Huang AH, et al. Engineered disc-like angle-ply structures for intervertebral disc replacement[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010, 35(8): 867-873.
- [18] Martin JT, Milby AH, Chiaro JA, et al. Translation of an engineered nanofibrous disc-like angle-ply structure for intervertebral disc replacement in a small animal model[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(6): 2473-2481.
- [19] Elmasry S, Asfour S, de Rivero Vaccari JP, et al. A computational model for investigating the effects of changes in bioavailability of insulin-like growth factor-1 on the homeostasis of the intervertebral disc[J]. *Comput Biol Med*, 2016, 78: 126-137.
- [20] Chou PH, Wang ST, Ma HL, et al. Development of a two-step protocol for culture expansion of human annulus fibrosus cells with TGF- β 1 and FGF-2[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 89.
- [21] Blanquer SB, Gebraad AW, Miettinen S, et al. Differentiation of adipose stem cells seeded towards annulus fibrosus cells on a designed poly(trimethylene carbonate) scaffold prepared by stereolithography[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(10): 2752-2762.
- [22] Martin JT, Gullbrand SE, Mohanraj B, et al. Optimization of preculture conditions to maximize the in vivo performance of cell-seeded engineered intervertebral discs[J]. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(17-18): 923-934.
- [23] Vadalà G, Mozetic P, Rainer A, et al. Bioactive electrospun scaffold for annulus fibrosus repair and regeneration[J]. *Eur Spine J*, 2012, 21(Suppl 1): S20-S26.
- [24] Sahoo S, Ang LT, Goh JC, et al. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 93(4): 1539-1550.
- [25] Guo Q, Liu C, Li J, et al. Gene expression modulation in TGF- β 3-mediated rabbit bone marrow stem cells using electrospun scaffolds of various stiffness[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(7): 1582-1592.
- [26] Henry JJ, Yu J, Wang A, et al. Engineering the mechanical and biological properties of nanofibrous vascular grafts for in situ vascular tissue engineering[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(3): 035007.

(收稿:2019-02-19)

(本文编辑:富饶)