

面向韧带生物固定的多层支架设计与制造

张文友^{1,2}, 贺健康¹, 刘亚雄¹, 李涤尘¹, 靳忠民¹

(1. 西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 陕西省西安市 710049;

2. 西安交通大学青岛研究院, 山东省青岛市 266300)

摘要: 为解决韧带重建手术中将软质韧带移植物与硬质骨组织机械固定存在的临床问题, 提出了基于自然韧带-骨生物固定方式的多层支架的仿生设计与制造方法。通过显微 CT 扫描观察了自然韧带-骨界面的连接结构, 在此基础上设计了包含韧带、韧带-骨界面、骨三层结构的复合支架。采用有限元方法对比分析了不同韧带-骨支架界面连接方式对其力学性能的影响, 发现骨支架上的凹陷连接结构更有利于韧带-骨复合支架的固定。制备了韧带-骨多层支架, 在连接界面处呈现分层变化的微观多孔结构所能承受的最大拉力为 $58.77 \pm 12.48\text{N}$, 后期随着骨组织及界面组织在骨支架与界面支架部分的融合生长有望逐步提高, 最终实现生物固定。研究结果不仅为软质韧带移植物与硬质骨的临床固定提供了新思路, 也适用于其它软-硬组织的界面固定。

关键词: 韧带-骨界面; 多层支架; 仿生设计; 生物固定

中图分类号: TB17

Design and fabrication of multiphased scaffolds for biological fixation of ligament grafts

ZHANG Wenyu^{1,2}, HE Jiankang¹, LIU Yaxiong¹, LI Dichen¹, JIN Zhongmin¹

(1. State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an China 710049;

2. Qingdao R&D Institute, Xian Jiaotong University, Qingdao China 266300)

Abstract: To solve the clinical problem associated with mechanical fixation between soft ligament grafts and hard bone tissues in ligament reconstruction surgery, biomimetic design and fabrication method of multiphased scaffolds was proposed based on the natural ligament-to-bone fixation mechanisms. Micro-CT was used to characterize the ligament-bone connection interface, based on which the composite scaffolds were designed to include triple layers of ligament, interface and bone. Finite element analysis was performed to investigate the effect of different connection structures in bone region on the mechanical property of the composite scaffolds. The results showed that the concave structure is more advantageous to fix ligament region with bone region in comparison with convex and flat structure. The multiphased scaffolds were fabricated and exhibited gradually changed porous microstructures at the interface. The maximum tensile force to break up the composite scaffold is $58.77 \pm 12.48\text{N}$, which could be gradually improved with the regeneration of new bones as well as interface tissues at bony and interface regions of the scaffold. It not only provides a new way to effectively fix soft ligament grafts with host bones, but also applies to other tissues with soft-to-hard interface.

Key words: Ligament-bone interface; multiphased scaffolds; biomimetic design; biological fixation

0 引言

韧带对于维持关节稳定具有重要作用。目前对于韧带损伤, 由于其再生能力较差, 常通过韧带重建手术来恢复其功能。在关节韧带重建手术中, 所使用的韧带移植物主要有自体韧

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20110201120027)

作者简介: 张文友(1989-), 男, 硕士, 生物医学支架制造与3D打印技术推广应用

通信联系人: 贺健康(1981-), 男, 副教授, 生物制造与3D打印. E-mail: jiankanghe@mail.xjtu.edu.cn

45 带、异体韧带以及人工韧带。其中，自体移植物近期治疗效果良好，但受供源少、二次手术痛苦的影响 [1-4]；异体移植物存在免疫排斥、疾病传播及伦理道德等问题；人工韧带虽已有临床应用报道，但因与自然韧带的生理结构差异较大，远期临床疗效较差。仅就膝关节前交叉韧带而言，美国每年有超过 200,000 患者接受韧带重建手术，约有 60% 的患者在 10 年内需要进行二次韧带重建。其主要原因是现有韧带移植物无法与自体骨组织有效融合固定：
50 或因连接处的应力集中而疲劳断裂，或因自体骨内融合隧洞扩大而拉出。长久有效的关节韧带修复治疗已成为当今医学界的一个国际性难题。

作为韧带重建手术的“黄金法则”，取自自体其它部位的韧带-骨复合移植物在韧带重建手术中取得了良好的临床效果[5, 6]。由于在手术时将移植物的自体骨部分植入骨隧道内，从而能够促进移植物与病变区域骨组织的融合生长，从而实现韧带移植物的牢固固定。但供
55 区并发症与疼痛严重阻碍着自体韧带-骨复合移植物的广泛使用。组织工程综合细胞、生长因子、支架等因素，利用工程技术制造支架微结构系统，通过特定细胞的粘附生长实现组织器官的工程化再造，这为关节韧带的修复与重建提供了新思路。对于韧带组织工程，目前的研究热点是如何构建具有与自体韧带-骨移植物结构相近的多相支架，以期植入后可促进骨组织与界面组织的复合生长，从而实现韧带移植物与宿主骨组织的牢固生理固定 [7, 8]。

60 本文模拟自然韧带-骨移植物的微观结构，设计制造了由韧带/韧带-骨界面/骨支架组成的组织工程韧带/骨支架。韧带/骨界面将韧带与骨支架进行连接，与自然骨组织相似的骨支架为宿主骨组织生长的诱导基体，有望解决软质韧带移植物与自体骨的连接问题。

1 韧带-骨多层支架设计与优化

首先采用 Micro-CT 扫描技术观察了自然韧带-骨界面的结构形态。图 1(a, b)对猪自然
65 韧带-骨界面进行 CT 扫描，根据密度的不同进行三维重建。结果显示，自然韧带下方的骨组织为多孔骨小梁结构，韧带与骨组织之间通过一层界面结构连接，界面结构可以进一步分为钙化纤维软骨层和非钙化纤维软骨层。在日常运动中，界面结构对于韧带与骨组织间的应力缓冲起着重要作用。模拟自然韧带-骨界面在材料成分、微观结构和力学性能方面的逐渐过渡，将韧带-骨多层支架设计为韧带、韧带-骨界面和骨层的三相结构如图 1 (c) 所示。韧带
70 支架为聚乳酸纤维束组成，骨支架部分为多孔陶瓷，而界面结构为模拟自然非钙化纤维软骨与钙化纤维软骨所设计的包含不同材料的三层结构。

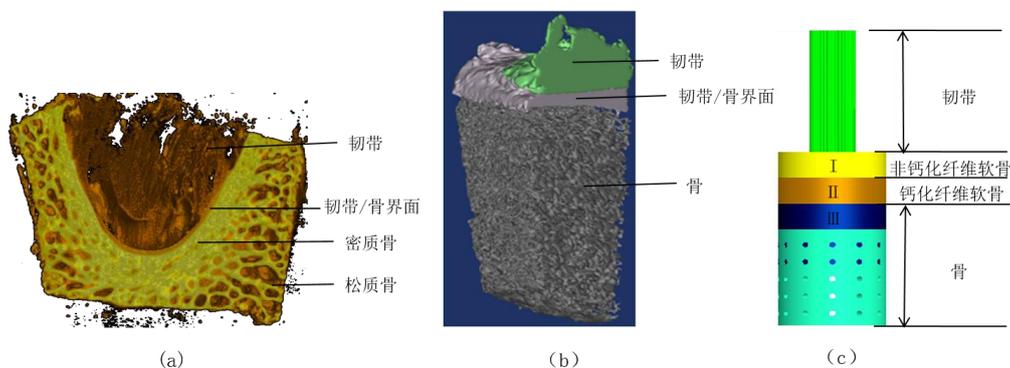


图 1 自然韧带-骨界面观察与支架仿生设计 (a) 自然韧带-骨界面 CT 扫描重建; (b) 自然韧带-骨界面 CT 扫描重建放大图(c) 韧带-骨支架设计^[9]

75 Fig.1 Observation of natural ligament-bone interface and biomimetic design of scaffold. (a) CT scan reconstruction of natural ligament-bone interface; (b) Enlarged view of CT scan reconstruction of natural ligament-bone interface; (c) Design of ligament-bone multiphased scaffolds.

80 骨支架与韧带-骨界面连接处的结构是影响韧带-骨多层支架可以承受的最大拉伸力的最主要因素。本文在骨支架与韧带-骨界面连接处设计了三种典型的结构形式：凹进结构、凸出结构和平结构，如图 2 所示。运用有限元分析软件 ABAQUS/Standard 对带有不同结构形式骨支架的韧带-骨多层支架进行有限元分析，确定骨支架在与韧带-骨界面连接处较优的结构。

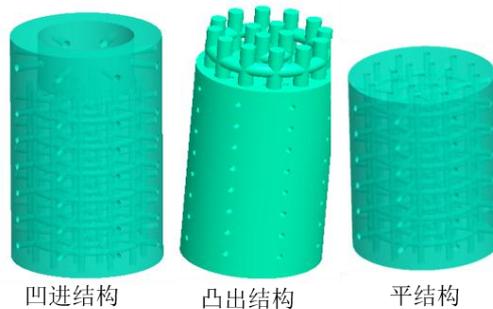


图 2 骨支架与韧带-骨界面连接处结构设计

85 Fig.2 Structure design of bone scaffolds connect with ligament-bone interface.

韧带-骨连接方式中，韧带支架不是断裂的主要因素，因此将韧带支架简化来建立有限元分析模型，并将拉伸力施加于表层，即所设计的非钙化纤维软骨表面。设计的分析模型为对称结构，故采用 1/4 对称单元建立分析计算模型，以节省计算时间和成本。

90 骨支架内部带有相互连通的管道结构，不易划分为六面体单元，因此选择将其划分为四面体单元网格，单元尺寸设为 0.4mm。二阶四面体 C3D10M 单元类型可以同时解决复杂的几何外形与接触问题，因此，选择骨支架的单元类型为 C3D10M。韧带-骨界面 I 和 II 相网格划分为六面体单元，单元尺寸设为 0.3mm，III 相网格划分为四面体单元，单元尺寸设为 0.4 mm。各材料的弹性模量和泊松比如表 1 所示。

表 1 有限元分析参数设置

95 Tab. 1 Parameter settings of finite element analysis

类型	弹性模量/MPa	泊松比
(I) 仿生非钙化纤维软骨层	9.7	0.36
(II) 仿生钙化纤维软骨层	12.0	0.34
(III) 骨层	27.0	0.32
(IV) 骨支架	1228.94	0.28

骨支架的底端设置为全约束，1/4 模型的对称面各自施加对称边界条件，I、II、III 相和骨支架之间建立绑定约束连接。在支架的顶端（非钙化纤维软骨层）施加 150 N 的拉伸力，相当于在整个支架上施加 600 N 的力，具体载荷与约束条件设置如图 3 所示。

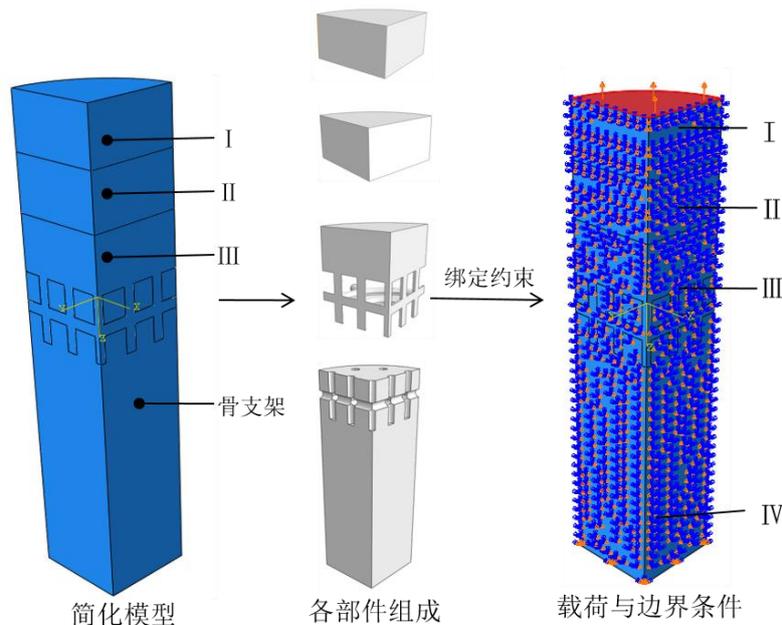


图3 骨支架与韧带-骨界面连接处有限元条件设置

Fig.3 Finite element analysis setting of structure optimizing bone scaffolds connect with ligament-bone interface.

对不同结构骨支架组成的韧带-骨多层支架进行有限元分析拉伸测试之后，对整个支架承受的最大变形，陶瓷骨支架承受的最大应力及应力分布进行了统计，如图4所示。由分析结果图4(a)知，在承受同等拉伸载荷（150 N）时，凹进结构和凸出结构骨支架组成的韧带-骨多层支架相比平结构骨支架组成的韧带-骨多层支架所受最大变形显著减小（~2/3），韧带-骨界面所受变形由非钙化纤维软骨向骨层逐渐减小。对骨支架应力状态进行统计，如图4(b)所示，韧带-骨多层支架在骨支架与韧带-骨界面处所受应力最大，表明，韧带-骨界面为韧带-骨多层支架连接最薄弱环节。凹进结构骨支架相比平结构和凸出结构骨支架所受的最大应力最小，因此选择凹进结构作为骨支架与韧带-骨界面连接处最终的结构。

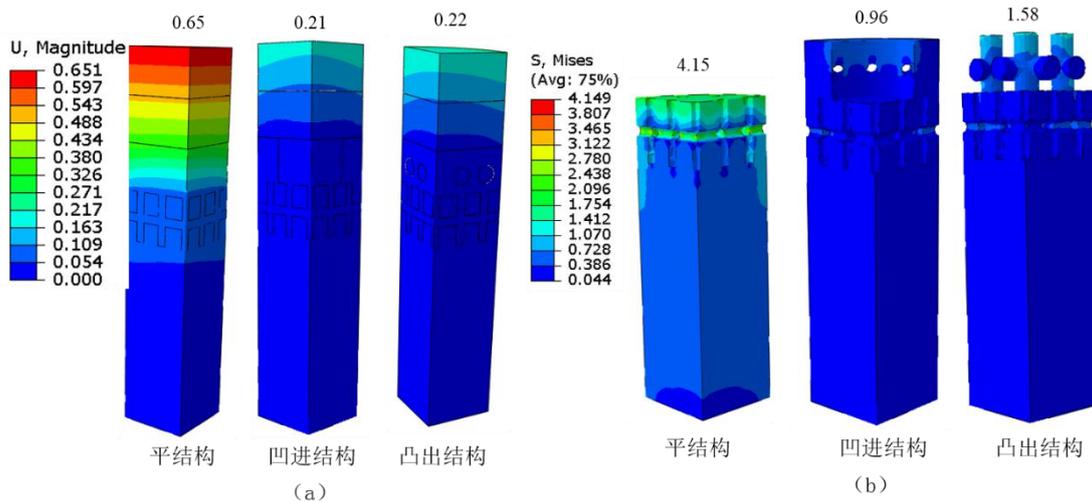


图4 骨支架与韧带-骨界面连接处结构优化结果 (a) 韧带-骨多层支架变形图； (b) 骨支架应力分布图
Fig.4 Finite element analysis results of structure bone scaffolds connect with ligament-bone interface.

(a) Distorting of ligament-bone scaffolds; (b) Stress distrition of bone scaffolds.

115 2 韧带-骨多层支架制造

韧带-骨多层支架的具体制造流程为：编织 PLA 纤维得到韧带支架，光固化成型技术结合凝胶注模法制造陶瓷骨支架，将韧带与骨支架进行连接。根据骨支架的外径尺寸制作内径与其相似的硅胶界面模具，用于固定骨支架。仿照自然韧带-骨界面非钙化纤维软骨、钙化纤维软骨和骨的三层过渡形式，向韧带-骨界面处灌注三种不同浓度和比例的 PLGA 与 β -TCP 混合溶液。混合溶液配制以 1, 4 二氧六环：去离子水=90：10 作为溶剂，向其中加入一定量的 PLGA，待溶解充分后，加入 β -TCP 粉体，搅拌至混合均匀。首先灌注 20wt%PLGA 与 8.5wt% β -TCP 的混合溶液（PLGA： β -TCP=7：3，模拟自然骨中有机物：无机物=7：3 的成分），然后灌注 15wt%PLGA 与 2.64wt% β -TCP 的混合溶液（PLGA： β -TCP=8.5：1.5），最后灌注 10wt%PLGA 溶液。PLGA： β -TCP=7：3 模拟自然韧带-骨界面的骨层，PLGA： β -TCP=8.5：1.5 模拟自然韧带-骨界面的钙化纤维软骨层，10wt%PLGA 模拟自然韧带-骨界面的非钙化纤维软骨层，这样在韧带-骨界面处形成了材料成分的梯度过渡。

向韧带-骨界面处灌注界面溶液后，将支架放在-20℃低温环境中预冻 2h 至灌注的混合溶液凝固，冷冻干燥 72h 后去除硅胶界面模具，成型的韧带-骨支架，如图 5 所示。之后将支架在水中浸泡 48h，以去除韧带-骨界面制造过程中使用的有机溶剂 1, 4 二氧六环。冷冻干燥法能够制作出较为稳定且高度连通孔隙的界面结构，便于细胞贴附、生长及营养和代谢物的传递，因此韧带-骨界面采用冷冻干燥的方法制造。



图 5 制造的韧带-骨多层支架

Fig.5 The fabricated ligament-bone multiphased scaffolds.

135 3 韧带-骨多层支架评价

为进一步评价制造的韧带-骨界面的微观结构，对韧带-骨界面进行 SEM 微观结构观察。结果表明，韧带-骨界面形成了从 I 相到 III 相孔隙微观结构的梯度过渡，经过统计，仿生非钙化纤维软骨层 I 相孔径为 $130 \pm 30.67 \mu\text{m}$ ，仿生钙化纤维软骨层 II 相孔径为 $69.46 \pm 17.72 \mu\text{m}$ ，仿生骨层 III 相孔径为 $43.11 \pm 11.59 \mu\text{m}$ [9]。

韧带-骨界面制造方法为分别灌注不同浓度与比例的 I、II、III 三相交界面混合溶液，然后 I、II 和 III 三相混合溶液同时预冻，冷冻干燥。三相同同时由无缝连接的液态固化，各相之间靠分子间引力进行连接。所制造的韧带-骨界面为高度连通的孔隙结构，对 I 与 II、II 与 III 两相之间的孔隙微观结构进行观察，如图 6 所示，可以看到两相之间孔隙结合良好，形成了大孔与小孔的无缝梯度过渡。三相之间无缝连接，为同相及不同相之间细胞的交流、营养和代谢的传递提供了良好的环境。

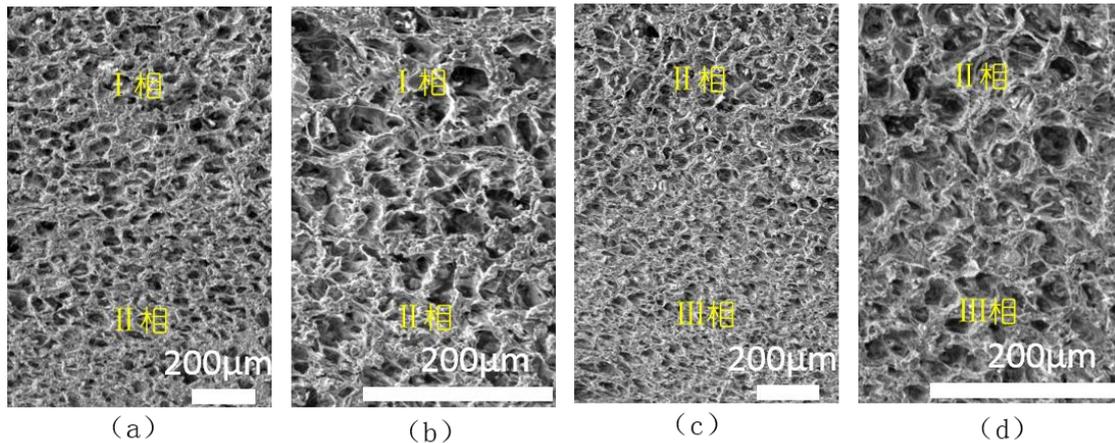


图6 韧带-骨界面微观结构观察 (a) I 与 II 相连接处 SEM 观察($\times 100$); (b) I 与 III 相连接处 SEM 观察($\times 300$); (c) II 与 III 相连接处 SEM 观察($\times 100$); (d) II 与 III 相连接处 SEM 观察($\times 300$)

Fig.6 Mirostructure observation of ligament-bone interface. (a) SEM observation of phase I connects with phase II ($\times 100$); (b) SEM observation of phase I connects with phase II ($\times 300$); (c) SEM observation of phase II connects with phase III ($\times 100$); (d) SEM observation of phase II connects with phase III ($\times 300$).

150

为测试韧带-骨界面各相之间及韧带-骨界面与骨支架的连接力，对制造的韧带-骨多层支架进行拉伸力学性能测试，实验如图 7 (a) 所示。骨支架外表面结合熔融工业级聚乳酸，防止拉伸力学性能测试时多孔陶瓷骨支架的脆性破裂。拉伸力学测试表明，韧带-骨支架在韧带-骨界面与陶瓷骨支架结合部分断裂，如图 7 (b) 所示，最终拉伸力为 $58.77 \pm 12.48 \text{ N}$ ，如图 7 (c) 所示。说明韧带-骨界面三相之间的结合力较大，形成了较为稳固的连接，韧带-骨界面与骨支架的连接强度仍需提高。

155

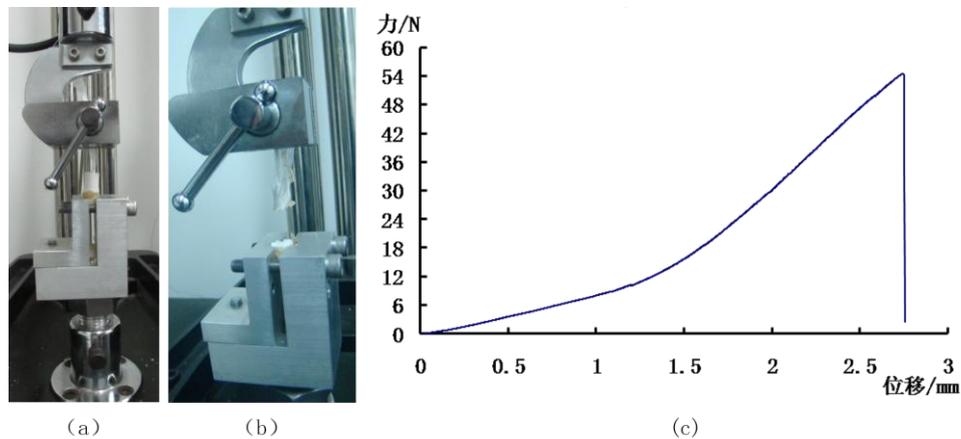


图7 韧带-骨多层支架力学性能测试 (a) 拉伸力学测试实验; (b) 拉伸断裂图; (c) 拉伸力-位移曲线
Fig.7 Mechanical test of ligament-bone multiphased scaffolds. (a) Tensile test; (b) Fracture after tensile test; (c) Force-displacement curve of tensile test.

160

4 结论

提出了一种面向韧带移植生物固定的韧带-骨多层支架的仿生设计与制造方法，以解决韧带移植与宿主骨组织的长期固定难题。研究了自然韧带-骨界面的微观结构，模拟自然韧带-骨界面设计了韧带-骨多层支架。有限元分析了骨支架在与韧带-骨界面连接处的不同结构，确定了骨支架与韧带-骨界面连接处凹进结构可以为韧带-骨多层支架提供最大的拉伸力。研究了韧带-骨多层支架的成型方法，韧带-骨界面采用灌注三种不同浓度和比例的聚合物/陶瓷混合溶液及冷冻干燥的方法制造。研究了韧带-骨界面的微观结构，韧带-骨界面三相

165

170 材料形成无间隙的紧密连接。对制造的韧带-骨多层支架进行拉伸力学测试, 结果表明, 韧带-骨多层支架可以承受的拉伸力达到 $58.77 \pm 12.48\text{N}$, 后期随着骨组织及界面组织在骨支架与界面支架部分的融合生长有望逐步提高, 最终实现生物固定。

[参考文献] (References)

- 175 [1] Jeremy J Lim, Temenoff JS. Tendon and Ligament Tissue Engineering: Restoring Tendon-Ligament and Its Interfaces [J]. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2009: 255-269.
- [2] Kawai Tomoyuki, Yamada Takeki, Yasukawa Akio, et al. Biological fixation of fibrous materials to bone using chitin/chitosan as a bone formation accelerator[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009, 88B (1): 264-270.
- 180 [3] Freedman KB DAM, Nedeff DD, Kaz A, Bach BR Jr. 37Arthroscopic Anterior Cruciate Ligament Reconstruction A Metaanalysis Comparing Patellar Tendon and Hamstring Tendon Autografts [J]. *The American Journal of Sports Medicine*, 2003, 31 (1): 2-11.
- [4] Foster TE, Wolfe BL, Ryan S, et al. Does the Graft Source Really Matter in the Outcome of Patients Undergoing Anterior Cruciate Ligament Reconstruction?: An Evaluation of Autograft Versus Allograft Reconstruction Results: A Systematic Review[J]. *The American Journal of Sports Medicine*, 2010, 38 (1): 189-199.
- 185 [5] Wen CY, Qin L, Lee KM, et al. The Use of Brushite Calcium Phosphate Cement for Enhancement of Bone-Tendon Integration in Orrin H. Sherman, Michael B. Banffy. Anterior cruciate ligament reconstruction: Which graft is best?[J]. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 2004, 20 (9): 974-980.
- [6] Pierre Chambat, Christian Guier, Bertrand Sonnery-Cottet, et al. The evolution of ACL reconstruction over the last fifty years[J]. *International Orthopaedics*, 2013, 37 (2): 181-186.
- 190 [7] Liu HF, Fan HB, Toh SL, et al. A comparison of rabbit mesenchymal stem cells and anterior cruciate ligament fibroblasts responses on combined silk scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2008, 29 (10): 1443-1453.
- [8] Samuelsson K, Andersson D, Ahlén M, et al. Trends in Surgeon Preferences on Anterior Cruciate Ligament Reconstructive Techniques [J]. *Clinics in Sports Medicine*, 2013, 32 (1): 111-126.
- [9] 张文友, 贺健康, 刘亚雄, 等. 韧带-骨支架仿生界面设计与制造方法[J]. *西安交通大学学报*, 2014, 10 (48): 137-142.
- 195