

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 24520121153192

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

环形多肽表面修饰 PET 韧带促进骨整合的 体外研究

Research on surface modification of PET ligament using
cyclo polypeptide for the promotion of bone integration in
vitro

指导教师姓名: 刘好源教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 4 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

摘要	I
ABSTRACT	III
缩略语及中英文对照表	V
第一章 前言	1
第二章 PET 材料的表面修饰	3
1 实验背景	3
2 材料与方法	4
3 C-RGDfV 多肽修饰 PET 材料表面的技术鉴定	5
4 讨论	10
第三章 多肽表面修饰的 PET 材料在体外对骨髓间充质干细胞粘附、生长和分化的影响	12
1 实验背景	12
2 骨髓间充质干细胞的原代培养与传代培养	14
3 骨髓间充质干细胞成骨分化的茜素红染色观察	17
4 碱性磷酸酶活性的测定	20
5 骨髓间充质干细胞与 PET 材料的粘附率	22
6 讨论	24
第四章 讨论	28
第五章 结论	31
参考文献	32
致谢	37

Table of contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreviations	V
Chapter I Introduction	1
Chapter II To surface modify PET material	3
1 Backgrounds	3
2 Materials and methods	4
3 To identify the Results of c-RGDfV polypeptide	5
4 Discussion	10
Chapter III The influence of surface modified PET on cell adhesion and proliferation in vitro	12
1 Backgrounds	12
2 Subculture and cryopreservation of Bone marrow mesenchymal stem cells	14
3 Alizarin red stain the Osteoblast	17
4 Determination of alkaline phosphatase activity	20
5 Cells adhesion rate of surface modified PET	22
6 Discussion	24
Chapter IV Discussion	28
Chapter V Conclusion	31
References	32
Acknowledge	37

摘要

背景: 重建膝关节交叉韧带损伤有多种材料,各自有不同优缺点。聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)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,术后康复快等优点,具有较好应用前景。PET人工韧带在骨髓道内“骨整合”效果可能影响交叉韧带重建的远期疗效。目前文献报道 LARS 人工韧带重建术后近期疗效良好,但远期疗效暂不明确。PET材料与骨界面骨整合程度,对于PET人工韧带重建交叉韧带术后的远期疗效具有重要意义。本研究通过应用环形多肽表面修饰PET材料,促进PET材料与细胞相结合,初步研究PET人工韧带与骨髓道骨界面实现生物愈合的可行性。

目的: 应用c-RGDfV多肽表面修饰PET材料,初步探讨PET材料与c-RGDfV多肽实现共价结合的方法及促进其牢固结合的因素。将表面修饰后的PET材料与骨髓间充质干细胞体外共培养,探讨c-RGDfV表面修饰PET材料后促进其生物相容性的有效性。

实验方法: 应用NaOH碱性水解方法处理PET材料。将处理后的PET材料及未经处理的PET材料分别与不同浓度的c-RGDfV多肽溶液进行结合,采用X线衍射分析技术,分析其共价结合效果和肽结合含量。分别将表面修饰的PET材料和未经处理的PET材料与骨髓间充质干细胞共培养,细胞血球板计数法测定细胞的粘附率。同时应用细胞茜素红染色法及碱性磷酸酶法鉴定骨髓间充质干细胞的成骨诱导分化。

实验结果: 采用NaOH碱性水解方法处理PET材料方法简单可靠,效率较高。单纯将PET材料与c-RGDfV多肽混合,无法实现与c-RGDfV多肽共价结合。采用NaOH碱性水解法处理的PET材料与c-RGDfV多肽的结合效果最佳。XPS提示: 1.0mg/ml的多肽表面修饰的PET材料氮元素含量达3.15%,而未经处理的PET材料分别与0.3mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.0mg/ml和1.5 mg/ml的c-RGDfV多肽混合后的氮元素含量分别为0.62%, 0.79%, 1.05%, 1.94%。新西兰兔骨髓间充质干细胞成功实现了分离、原代及传代培养、冷冻保存、复苏及诱导分化成为成

骨细胞。骨髓间充质干细胞与多肽表面修饰的 PET 材料共培养实现了早期粘附和增殖，随着时间的延长，各组材料的细胞粘附率均明显提高，培养 48 小时后，c-RGDfV 多肽表面修饰的 PET 材料对细胞的粘附率显著增高，其次为 c-RGDfV 多肽混合 PET 材料组，最后为未处理 PET 材料组。

结论：应用 NaOH 碱性水解方法处理 PET 材料方法简单可靠，效率较高，NaOH 碱性水解法处理的 PET 材料与 c-RGDfV 多肽实现了较好的共价结合，c-RGDfV 多肽表面修饰的 PET 材料可明显提高细胞在材料上的粘附和增殖，但本实验仅研究了在体外情况下表面修饰的 PET 韧带对细胞的影响情况，我们要下一步要在新西兰大兔体内进行表面修饰 PET 人工韧带与骨界面的结合情况研究，来进一步验证表面修饰 PET 人工韧带促进骨整合的效果。

关键词：聚对苯二甲酸乙二醇酯，多肽，生物相容性

ABSTRACT

Backgrounds: Reconstruction of knee cruciate ligament injury has a variety of materials. They all have their own advantages and disadvantages. Polyethylene terephthalate (PET) Artificial ligament is a kind of graft material which has good application prospect for its outstanding capability such as good mechanical property, rapid postoperative rehabilitation and easy to get and handle, wide range of application, etc. It may influence the long-term treatment effect of the cruciate reconstruction if the PET artificial ligament couldn't reach the natural healing of the bone-to-tendon structure in the bone tunnel. According to the report, the short-term effect of LARS artificial ligament appears good in the cruciate reconstruction, but its long-term effect seems unclear. LARS artificial ligament can matter a lot in the long-term effect of cruciate reconstruction if it can reach a biological healing in the bone interface. In this study, we use the cyclo peptide to surface modify PET material, in order to promote the histocompatibility between PET material and body cells, and then further observe its biological healing in the bone interface.

Objectives: To surface modify PET material using "c-RGDfV polypeptide" and try to find a simple method of operation which can make it possible for c-RGDfV polypeptide and PET material bound with each other covalently. To co-culture polypeptide surface modified PET material and the mesenchymal stem cells in vitro and explore whether the PET material can achieve such biocompatibility when modified with c-RGDfV polypeptide.

Methods : NaOH alkaline hydrolysis methods were applied to treat the PET material. The treated PET materials and untreated PET materials were combined with different solubility of c-RGDfV polypeptide solution, using X-ray diffraction analysis technique to analyze the content of polypeptide binding and its covalent binding effect. Surface modification of PET material and untreated PET material were

co-cultured with bone marrow mesenchyma stem cells. We use blood cell plate count method was applied to the determination of the adhesion rate of cells. Meanwhile, cell alizarin red staining and alkaline phosphatase were applied to identify the bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic differentiation.

Results : The method using NaOH alkaline hydrolysis to treat PET materials is simple and reliable, and efficient. The combined effect of c-RGDfV polypeptide with the PET material treated by the alkaline hydrolysis is excellent. XPS result: the nitrogen consistent of 1.0mg/ml c-RGDfV polypeptide surface modified PET material was 3.15%, while the nitrogen consistent of the untreated PET material mixed with c-RGDfV peptide with the concentration of 0.3mg/ml, 0.75 mg / ml , 1.0 mg / ml and 1.5 mg / ml was 0.62%, 0.79%, 1.05%and 1.94%, respectively. Bone marrow mesenchymal stem cells can achieve successful separation, subculture, cryopreservation, recovery and induced to differentiate into osteoblasts. Early adhesion, proliferation and cell adhesion rate of bone marrow mesenchymal stem cells cultured with PET material were improved with time for each group. 48 hours after the co-culture, the cells adhesion rate of PET materia with c-RGDfV polypeptide surface modification was significantly higher.

Conclusions : NaOH Alkaline hydrolysis method is simple, reliable, and efficient and it makes it possible for c-RGDfV polypeptide and PET material bound with each other covalently. The polypeptide surface modified PET material can significantly increase the material and cell adhesion and proliferation. Meanwhile,the follow-up study of vivo test to make clear of the true nature about this binding process and see whether it can achieve the natural bio-binding.

Key words: Poly Ethylene Terephthalate, Polypeptide, Biocompatibility

缩略语及中英文对照表

缩写	全称（英文）	全称（中文）
ACL	Anterior Cruciate Ligament	前交叉韧带
PET	Polyethylene Terephthalate	聚对苯二甲酸二醇酯
LARS	Ligament Advanced Reinforcement System	先进韧带加强系统
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
c-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-)
ECM	Extracellular Matrix	细胞外基质
DMSO	Dimethyl Sulphoxide	二甲基亚砷
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
EDTA	Ethylene Diamine Teaacetic Acid	2-一二乙酰四乙酸
L-DMEM	High Glucosum Dulbecco Modified Eagle's Medium	低糖 DMEM 培养基
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy	X 线衍射分析

第一章 前言

随着社会的发展及人民生活水平的提高，交通、体育事业及各种户外活动等方面均迅速发展，因此而导致的各类运动医学损伤也迅速的增多，其中又以交叉韧带损伤最为常见。包括前交叉韧带损伤，后交叉韧带损伤，前、后交叉韧带同时损伤。膝关节交叉韧带做为稳定膝关节的重要结构之一，交叉韧带断裂时，由于交叉韧带血供差及缺乏自我愈合能力，且韧带断裂后引起股骨与胫骨相对移动，如行保守治疗可引起膝关节不稳及其他膝关节继发病变，膝关节软骨及半月板损伤，引起早期膝关节骨性关节炎等，终致严重的膝关节骨性关节炎造成肢体病残。尤其该损伤引起青少年的膝关节骨性关节炎目前尚无有效治疗方案。交叉韧带损伤不仅严重影响日常生活，同时加重医疗负担。膝关节镜下交叉韧带重建术修复损伤的韧带以避免并发症成为目前共识。术中常用的韧带重建材料基本分为三种来源：自体肌腱、异体肌腱和人工韧带，且每种材料各有优缺点。目前临床最广泛采用的是自体肌腱和异体肌腱，效果明确，但也有较明显的缺点：1. 自体肌腱来源有限，且易造成取腱区后遗症，如膝前痛，跪痛，屈膝力量下降，胫骨内旋力量下降等；2. 异体肌腱移植加大了组织排异和疾病传播的可能，因为来源非自身，容易引起组织排异，导致滑膜炎，软骨退化，而且加大了肝炎及艾滋病传染的可能性；3. 二者术后短期内稳定性均差，需采用支具外固定，使得康复周期延长；不能早期行功能锻炼，产生关节活动受限及关节僵硬，而功能锻炼积极又使得韧带早期松弛；4. 两种重建的韧带愈合需要 1-2 年骨髓道内骨整合和再韧带化。过程经历韧带坏死，细胞迁移，血管再生及韧带重塑，该过程时间较长，重建的韧带短期内无法达到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。而人工韧带在极大程度上规避了这些缺点和风险，20 世纪 80 年代各种材料的人工韧带开始逐渐运用于临床，但初期的人工韧带由于设计上的缺陷和材料的生物相容性较差，导致疗效欠佳或其他问题，故而在临床上已很少应用。可由于人工韧带来源广泛，术后稳定性良好，可早期活动及可靠的力学性能等较为突出的优点，人们从未放弃对人工韧带的研究。继而出现了以聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET）材料组成的人工韧带，较为常见的为英国和日本合作研发的

Leeds-Keio 韧带和法国研发的 LARS (Ligament Advanced Reinforcement System) 人工韧带。学者们对效果良好的 Leeds-Keio 韧带重建术后行组织学检测，见自体纤维组织及胶原组织包绕韧带，且沿着韧带孔隙的方向长入，伴有长入自体组织的 Leeds-Keio 韧带的最大拉伸强度比单纯 Leeds-Keio 韧带明显增高。因此说明 PET 材料组成的韧带生物相容性较好，允许宿主自身组织的长入，并按韧带受力方向重新塑型，形成功能良好的新韧带。这为同是 PET 材料的人工韧带能否在体内的较好生长及功能化提供了依据。同样为 PET 材料的 LARS 人工韧带，其独创的关节腔游离部平行的纤维排列设计，减轻了韧带由于网状编织导致的纤维间摩擦，且更宽大内部的间隙更有利于自体组织的长入，这种根据人体解剖及生物力学设计的韧带具有了高强度，高弹性模量，及较好的抗疲劳性，使得 LARS 人工韧带成为了目前临床最广泛应用的人工韧带。

PET人工韧带在骨髓道内的骨整合效果直接影响韧带重建的疗效，已有文献证明PET人工韧带重建术后近期疗效良好。但由于PET韧带表面生物活性基团少，亲水性较差这些固有属性，不利于细胞的粘附和生长，故专家学者对其远期疗效提出怀疑。基于这些原因，人们利用现有的理论积极探索增强远期疗效的方法，如促进PET人工韧带在骨髓道内的骨整合。当前多采用PET韧带表面改性的方法，使得其表面理化性质改变，从而促进细胞的粘附，增殖及分化。常见的表面改性方法主要为：化学法, 酶处理法, 紫外光辐照法, 高能射线照射法和等离子体处理法等。RGD多肽是促进细胞与材料生物粘附的一种多肽序列，包括RGD序列的多肽，根据其氨基酸残基不同，粘附力也不同。这其中C-RGDfV多肽 [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）多肽]与骨髓间充质干细胞的粘附能力最强。本研究应用C-RGDfV多肽修饰PET材料后，与骨髓间充质干细胞于体外共培养，观察其对骨髓间充质干细胞粘附、增殖和成骨诱导分化的影响，为多肽修饰对促进PET人工韧带骨髓道内“骨整合”提供理论基础。

本实验包括以下两部分：第一部分：PET材料的表面修饰；第二部分：表面修饰的PET材料在体外对骨髓间充质干细胞粘附、增殖和分化的影响。

第二章 PET 材料的表面修饰

1 实验背景

为改善人工韧带骨整合速度，目前新的热点即运用生物活性物质将人工韧带表面改性，即将对细胞的粘附、增殖分化有促进作用的蛋白质、多肽序列等固定于人工韧带表面。目前较常用的是 ECM 蛋白，细胞因子、某种化学基团或多肽片段等。^[1-4]多数哺乳动物的细胞必须在富含细胞外基质（extracellular matrix, ECM）的组织基板上附着，从而进行正常的增殖、分化和新陈代谢^[5-6]，纤维粘连蛋白（fibronectin）、层粘连蛋白（laminin）、骨桥素（osteopontin）等是 ECM 重要组成成分。1984 年 RGD 肽在纤维粘连蛋白中被发现^[7]，随后研究发现其广泛存在于层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、血纤维蛋白、骨桥素及玻璃粘连蛋白等 ECM 中，它是一种高度保守的多肽序列^[8]，是与细胞粘附结合的特异性位点，因此学者们将促进细胞在人工韧带粘附及增殖分化的研究热点聚焦在了 RGD 多肽序列上。RGD 多肽主要与被粘附细胞的细胞膜整合素识别并结合，活化 MAPK 或 JNK 等细胞通路，将信号向细胞内传导，从而促进细胞的粘附，增殖和分化。整合素是介导细胞粘附的重要受体，是细胞表面的一系列跨膜蛋白，其与肌动蛋白骨架结合，并由 α 、 β 亚单位组成异二聚体，由于 α 、 β 亚单位不同组合，构成不同的整合素受体。不同种类细胞表面存在不同的整合素受体，其整合素的亲和性及特异性均对细胞的粘附，增殖和分化的能力产生影响。人工韧带重建中与细胞粘附相关的整合素主要是三种 $\alpha_{IIb}\beta_3$ ， $\alpha_5\beta_1$ ， $\alpha_v\beta_3$ 三种，而介导成骨样细胞或成软骨细胞粘附的最重要的整合素是 $\alpha_v\beta_3$ ^[9]。因此，目前在生物材料处理中，RGD 多肽被广泛用来促进细胞的粘附，使其成为组织工程学中的重要修饰物^[10-11]。PET 材料是由惰性的高分子组成聚合物，表面活性基团较少。要解决 PET 材料与骨隧道的骨整合问题，首先要促进 PET 材料与组织的生物相容性，使细胞更好的粘附和生长，而人工韧带的表面处理是实验的关键步骤。PET 材料的表面处理有多种方法，物理手段，如高能射线照射，紫外线照射法，激光蚀刻等；化学手段，如氢氧化钠碱性水解法，高锰酸钾和硫酸水解法^[12]。我们参考学者们的文献，找出处理 PET

材料的简便易行并且效果可靠方法，即氢氧化钠碱性水解法。用此方法处理 PET 材料后，观察其与 C-RGDfV 多肽的结合情况，为之后进一步观察 C-RGDfV 表面修饰后的 PET 材料对细胞的粘附和生长状况打下基础。

2 材料与方 法

2.1 材料

PET 材料（术中人工韧带残端），将其剪开铺平，剪为 7mm×7mm 大小正方形形状。C-RGDfV 多肽[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-）]由上海吉尔公司合成，纯度>98%。

2.2 实验分组和处理方法

2.2.1 人工韧带消毒

将剪好的 20 片人工韧带置于 75%乙醇中，消毒 4 小时后，除去乙醇溶液，双蒸水冲洗 3-4 遍，置于 37℃烘干箱中烘干，取出后于紫外灯下照射 8-12h，将消毒好的人工韧带置于密闭无菌容器中备用。

2.2.2 NaOH 处理人工韧带

于电子天平称取 NaOH 5g，溶于 50ml 去离子水中，制成 2.5mol/L NaOH 溶液，将消毒好的 20 片 PET 韧带称重后，加入 2.5mol/L NaOH 溶液中，于 50℃处理 3h。取出韧带，三蒸水反复冲洗 4-5 次，于 37℃烘干箱中烘干。失重量是 12.7mg，失重率为 3.39%。

2.2.3 NaOH 处理后 PET 韧带与多肽溶液混合

将 NaOH 处理好的 PET 韧带分别浸泡在浓度为 0.3mg/ml，0.75mg/ml，1.0 mg/ml，1.5mg/ml 的 10ml 环形多肽溶液中，于 120rpm 摇床 37℃下处理 40h，用 1% TritonX-100 缓冲液冲洗 2-3 次，之后双蒸水冲洗 4-5 次后，于 40℃干燥，紫外灯照射 1-2h 后，置于密闭无菌容器中备用。

2.2.4 PET 材料直接与多肽溶液混合

将按前述消毒方法的处理好的 PET 韧带分别浸泡在 0.3mg/ml，0.75mg/ml，1.0 mg/ml，1.5 mg/ml 的 10ml 环形多肽溶液中，于 120rpm 摇床 37℃下处理 24h，加入 10mgEDC·HCl 使其质量浓度为 0.1%继续共同处理 30h，用 1% TritonX-100 缓冲液冲洗 2-3 次，之后双蒸水冲洗 4-5 次后，于 40℃干燥，紫外灯照射 1-2h 后，置于密闭无菌容器中备用。

3 C-RGDfv 多肽修饰 PET 材料表面的技术鉴定

X 线衍射分析技术 (XPS), X 射线衍射技术是用来研究物质微观结构的最重要的方法。X 射线是一种波长范围一般为 $10^{-2}\text{\AA}\sim 10^2\text{\AA}$ 电磁辐射, 波长介于紫外线与射线之间, 比可见光短得多, 而其频率约为可见光的 1000 倍左右。常用的 X 射线波长约 $0.5\text{\AA}\sim 2.5\text{\AA}$ 在之间, 与晶体中的原子和分子间距 ($1\sim 10\text{\AA}$) 数量级相同, 因此材料中晶体可以作为 X 射线的空间衍射光栅, 即当一束 X 射线通过晶体时将发生衍射, 衍射波叠加的结果使射线的强度在某些方向上加强, 在其他方向上减弱。分析在照相底片上得到的衍射花样, 便可确定晶体结构, 并且可得出材料中元素含量。本实验中, PET 材料主要元素为碳、氧、氢等, 而环形多肽序列则含有较特殊的氮元素, 因此测定材料中氮元素的衍射峰及含量即可反映多肽的结合成度及结合量。

3.1 结果

3.1.1 PET 材料的处理方式及 C-RGDfv 多肽浓度对材料结合效率的影响

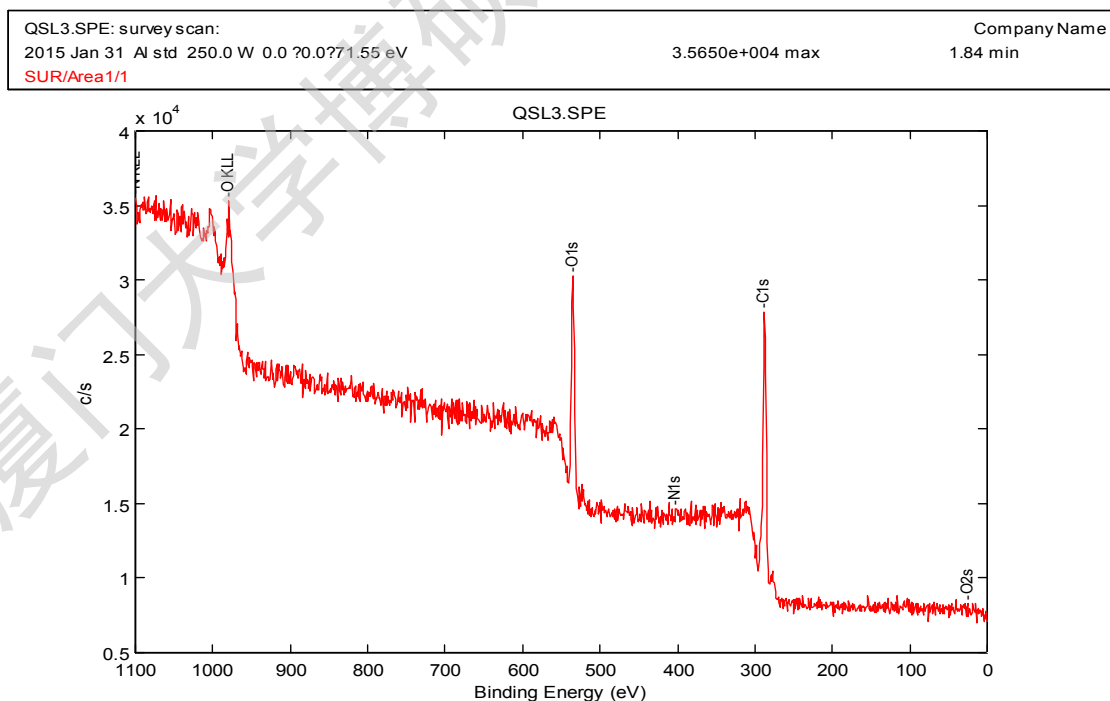


图 1：该图为未经 NaOH 及多肽修饰的 PET 材料组 XPS 分析结果，400eV 区域为氮元素的衍射波峰，氮元素的组成含量为 0.47%。

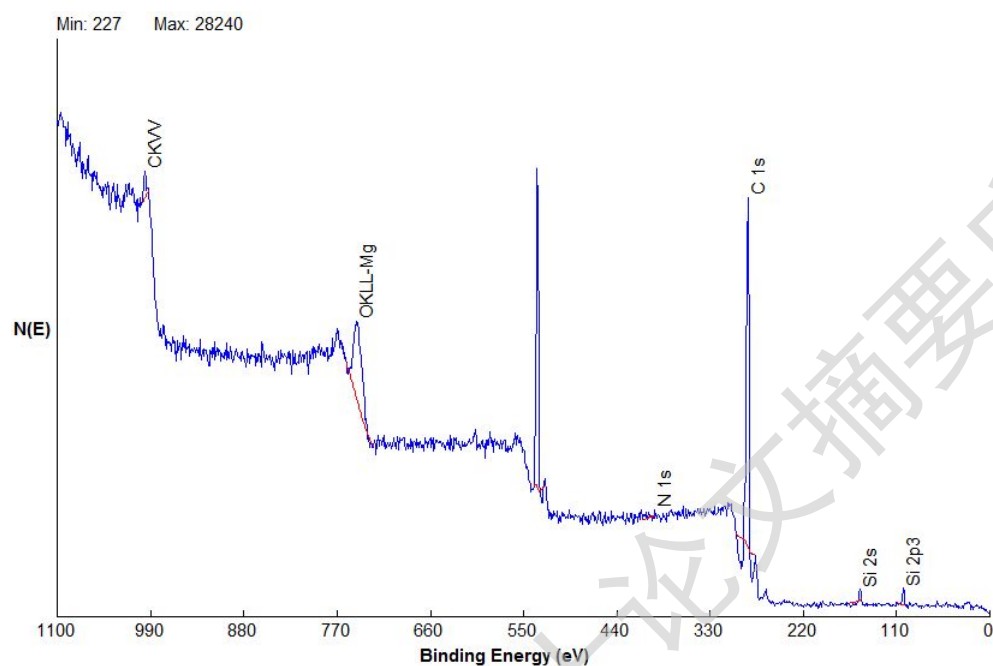
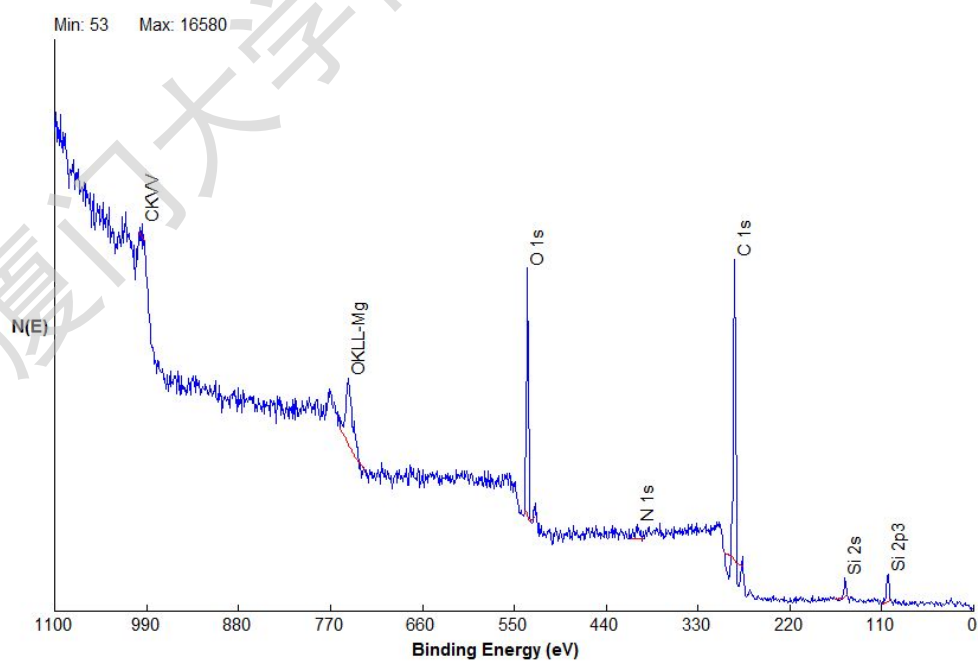


图 2：该图为 PET+0.3mg/ml 环形多肽修饰材料组 XPS 分析结果，400eV 区域为氮元素的衍射波峰，氮元素的组成含量为 0.62%。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.