



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115944781 A

(43) 申请公布日 2023.04.11

(21) 申请号 202111177643.X *A61L 27/52* (2006.01)
(22) 申请日 2021.10.09 *A61L 27/56* (2006.01)
(71) 申请人 上海软馨生物科技有限公司 *A61L 27/58* (2006.01)
地址 200241 上海市闵行区东川路555号乙楼3017室 *B33Y 10/00* (2015.01)
B33Y 70/10 (2020.01)
B33Y 80/00 (2015.01)
(72) 发明人 周广东 刘豫 张伟 慈政 *C12N 5/077* (2010.01)
(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 徐迅 崔佳佳
(51) Int. Cl.
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种基于3D打印的软骨组织工程复合物及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一种软骨组织工程复合物。具体地,所述复合物包括含有软骨细胞的软骨凝胶或软骨膜片颗粒,和一3D打印的多孔框架,并且所述软骨凝胶或软骨膜片负载于3D打印的多孔框架,形成软骨凝胶/软骨膜片颗粒-3D打印多孔框架复合物。本发明的软骨组织工程复合物在移植进入软骨缺损处后,可以在缺损处实现稳定的软骨再生。本发明还提供了所述软骨组织工程复合物的制备方法及其在实现软骨再生中的用途。

1. 一种软骨组织工程复合物,其特征在于,所述复合物包括:
 - (a) 载体,所述载体包括3D打印的多孔框架;和
 - (b) 接种于或负载于所述载体的含有软骨细胞的软骨凝胶或软骨膜片颗粒。
2. 如权利要求1所述的复合物,其特征在于,所述软骨细胞来源于弹性软骨、纤维软骨或透明软骨。
3. 如权利要求1所述的复合物,其特征在于,所述的软骨凝胶包括软骨细胞构成的细胞群以及软骨细胞所分泌的细胞外基质,其中所述细胞外基质包裹所述的细胞群,并且所述软骨凝胶呈凝胶态,并且软骨细胞的密度为至少 1.0×10^8 个/ml或 1.0×10^8 个/g。
4. 如权利要求1所述的复合物,其特征在于,所述软骨膜片颗粒包括软骨细胞构成的细胞群以及软骨细胞所分泌的细胞外基质,其中所述细胞外基质包裹所述的细胞群,并且所述软骨颗粒是由薄片状的软骨膜片剪碎制得,其中软骨细胞的密度为至少 1.0×10^8 个/ml或 1.0×10^8 个/g。
5. 如权利要求1所述的复合物,其特征在于,所述3D打印的多孔框架包括上层结构和下层结构,所述结构的孔径大小为100-300 μ m;并且由选自下组的可降解高分子材料制成:聚乙交酯、聚丙交酯、聚己内酯、或乙交酯-丙交酯共聚物。
6. 如权利要求1所述的复合物,其特征在于,所述3D打印的多孔框架还可以负载有明胶、胶原、丝素、水凝胶或其组合。
7. 一种制备如权利要求1所述的软骨组织工程复合物的方法,其包括以下步骤:将权利要求3所述的软骨凝胶或权利要求4所述的软骨膜片颗粒接种于3D打印的多孔框架,经体外成软骨培养,从而获得所述的软骨组织工程复合物。
8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,将所述软骨凝胶采用直接填充的方法接种于3D打印的多孔框架。
9. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,将所述软骨膜片颗粒采用离心的方法接种于3D打印的多孔框架。
10. 一种如权利要求1所述的软骨组织工程复合物的用途,其特征在于,用于制备用于修复关节缺损的医用产品。

一种基于3D打印的软骨组织工程复合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学组织工程领域,具体地,涉及一种基于3D打印的软骨组织工程复合物,及其在软骨再生中的应用。

背景技术

[0002] 近些年来,随着经济社会的快速发展,各类外伤及先天畸形导致的软骨缺损日趋多见,而大多数外伤导致软骨缺损及先天畸形导致的缺损依靠患者自体是难以修复的。临床治疗中目前临床上对于关节软骨缺损的治疗方法主要为姑息性治疗及修复性治疗。姑息性治疗主要包括关节镜下清理术和软骨成形术等,这类治疗方法可清理关节表面不平整的软骨面及移除软骨碎片等,以恢复关节面的光滑平整,此类方法创伤较小且可以一定程度缓解患者的症状,但其疗效有限,不能有效缓解关节炎的发展。修复性治疗包括微骨折治疗、骨软骨移植等,此类治疗虽使得局灶性关节软骨缺损得到一定的修复,但创伤较大易导致供区并发症。

[0003] 随着组织工程学的进步,人们逐渐开始研究使用组织工程所构建的支架或组织来尝试修复软骨缺损。组织工程学是涉及细胞生物学、材料科学、工程学以及生物反应器的一门交叉学科,利用生命科学和工程学的基本原理和方法,构建人体所需要组织,用于修复、替代因创伤、疾病而无功能的组织或器官。

[0004] 近年来,随着3D打印机的出现,3D打印技术也在多个领域得到应用,包括医疗行业。根据组织工程相关技术生产的可注射软骨,也已在医学美容,修复重建等领域得到应用,但仍存在诸多劣势。

[0005] 据此,通过与基于3D打印的组织工程学技术有望成为组织工程软骨构建的新方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种基于3D打印的软骨组织工程复合物。

[0007] 本发明的第一方面,提供了一种软骨组织工程复合物,所述复合物包括:

[0008] (a) 载体,所述载体包括3D打印的多孔框架;和

[0009] (b) 接种于或负载于所述载体的含有软骨细胞的软骨凝胶或软骨膜片颗粒。

[0010] 在另一优选例中,所述的复合物包括将所述软骨凝胶或软骨膜片颗粒接种于所述载体并经成软骨培养后所形成的复合物(在所述复合物中,软骨细胞负载于载体并与载体形成更为紧密的一体结构)。

[0011] 在另一优选例中,所述的复合物包括将所述软骨凝胶或软骨膜片颗粒接种于所述载体但未经成软骨培养后所形成的复合物。

[0012] 在另一优选例中,所述软骨细胞来源于人类或非人类哺乳动物。

[0013] 在另一优选例中,所述软骨细胞来源于自体软骨细胞或异体软骨细胞,优选地为自体软骨细胞。

- [0014] 在另一优选例中,所述软骨细胞来源于弹性软骨、纤维软骨或透明软骨。
- [0015] 在另一优选例中,所述软骨细胞取自受试者自体软骨细胞。
- [0016] 在另一优选例中,所述自体软骨细胞包括弹性软骨细胞、纤维软骨细胞或透明软骨细胞。
- [0017] 在另一优选例中,所述受试者为人类或非人类的哺乳动物。
- [0018] 在另一优选例中,所述受试者具有关节缺损。
- [0019] 在另一优选例中,所述关节缺损为关节软骨缺损。
- [0020] 在另一优选例中,所述关节缺损为膝关节缺损、肘关节缺损、髋关节缺损、踝关节缺损、腕关节缺损、下颌关节缺损或其组合。
- [0021] 在另一优选例中,所述的软骨凝胶包括软骨细胞构成的细胞群以及软骨细胞所分泌的细胞外基质,其中所述细胞外基质包裹所述的细胞群,并且所述软骨凝胶呈凝胶态,并且软骨细胞的密度为至少 1.0×10^8 个/ml或 1.0×10^8 个/g。
- [0022] 在另一优选例中,所述的软骨凝胶是用软骨细胞经凝胶化培养而制备的。
- [0023] 在另一优选例中,所述的凝胶化培养是用凝胶化培养基进行的体外培养。
- [0024] 在另一优选例中,所述的凝胶化培养基含有以下组分:含4-5wt%葡萄糖的高糖DMEM培养基、10%FBS(v/v)和100U/ml青-链霉素。
- [0025] 在另一优选例中,所述软骨凝胶的粘附率 $\geq 90\%$,较佳地 $\geq 95\%$ 。
- [0026] 在另一优选例中,所述软骨凝胶中,软骨细胞的浓度为 1.0×10^8 个/ml- 10×10^8 个/ml,较佳地 $1.5-5 \times 10^8$ 个/ml。
- [0027] 在另一优选例中,所述软骨凝胶是凝胶化培养2.5-5.5天,较佳地3-5天得到的。
- [0028] 在另一优选例中,所述软骨膜片颗粒包括软骨细胞构成的细胞群以及软骨细胞所分泌的细胞外基质,其中所述细胞外基质包裹所述的细胞群,并且所述软骨颗粒是由薄片状的软骨膜片剪碎制得,其中软骨细胞的密度为至少 1.0×10^8 个/ml或 1.0×10^8 个/g。
- [0029] 在另一优选例中,所述软骨膜片中,软骨细胞的浓度为 1.0×10^8 个/ml- 10×10^8 个/ml,较佳地 $1.5-5 \times 10^8$ 个/ml。
- [0030] 在另一优选例中,所述软骨膜片是凝胶化培养6-30天,较佳地7-20天,最佳地10-15天得到的。
- [0031] 在另一优选例中,所述的凝胶化培养是用凝胶化培养基进行的体外培养。
- [0032] 在另一优选例中,所述的凝胶化培养基含有以下组分:含4-5wt%葡萄糖的高糖DMEM培养基、10%FBS(v/v)和100U/ml青-链霉素。
- [0033] 在另一优选例中,所述软骨膜片的厚度为0.2-0.25mm。
- [0034] 在另一优选例中,所述软骨膜片颗粒的平均体积为 $0.2\mu\text{l}$ 。
- [0035] 在另一优选例中,所述软骨膜片颗粒的表面积为 $0.05-10\text{mm}^2$,优选地,为 $1-5\text{mm}^2$,更优选地,平均面积为 1mm^2 。
- [0036] 在另一优选例中,所述3D打印的多孔框架包括上层结构和下层结构,所述结构的孔径大小为100-300 μm ;并且由选自下组的可降解高分子材料制成:聚乙交酯、聚丙交酯、聚己内酯、或乙交酯-丙交酯共聚物。
- [0037] 在另一优选例中,所述3D打印的多孔框架还可以负载有明胶、胶原、丝素、水凝胶或其组合。

[0038] 在另一优选例中,所述3D打印多孔框架的形状包括圆柱体、长方体或其他特定形状。

[0039] 本发明的第二方面,提供了一种制备如本发明第一方面所述的软骨组织工程复合物的方法,其包括以下步骤:将所述的软骨凝胶或软骨膜片颗粒接种于3D打印的多孔框架,经体外成软骨培养,从而获得所述的软骨组织工程复合物。

[0040] 在另一优选例中,将所述软骨凝胶采用直接填充的方法接种于3D打印的多孔框架。

[0041] 在另一优选例中,将所述软骨膜片颗粒采用离心的方法接种于3D打印的多孔框架。

[0042] 在另一优选例中,所述离心的方法的离心体系中不加入液体,采用反复离心法使软骨膜片颗粒进入3D打印的多孔框架。

[0043] 在另一优选例中,所述的成软骨培养是使用成软骨培养基进行的体外培养。

[0044] 在另一优选例中,所述的成软骨培养基具有以下组分:高糖DMEM培养基、血清替代物、脯氨酸、维生素C、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、胰岛素样生长因子1 (IGF-I) 和地塞米松。

[0045] 在另一优选例中,所述的血清替代物为ITS premix,其中包含胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸、亚油酸、牛血清清蛋白、丙酮酸、抗坏血酸磷酸盐。

[0046] 在另一优选例中,所述的成软骨培养时间为3-15天,优选地为5-11天。

[0047] 本发明的第三方面,提供了一种如本发明第一方面所述的软骨组织工程复合物的用途,用于制备用于修复关节缺损的医用产品。

[0048] 在另一优选例中,所述关节缺损为关节软骨缺损。

[0049] 在另一优选例中,所述关节缺损为膝关节缺损、肘关节缺损、髌关节缺损、踝关节缺损、腕关节缺损、下颌关节缺损或其组合。

[0050] 本发明的第四方面,提供了一种修复关节缺损的方法,包括步骤:使用本发明第一方面所述的软骨组织工程复合物,移植入待修复患者的缺损关节内。

[0051] 在另一优选例中,所述关节缺损为关节软骨缺损。

[0052] 在另一优选例中,所述关节缺损为膝关节缺损、肘关节缺损、髌关节缺损、踝关节缺损、腕关节缺损、下颌关节缺损或其组合。

[0053] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0054] 图1显示了3D打印框架。其中图1A为正面观,图1B后面观。图中标尺为400mm。

[0055] 图2显示了耳软骨细胞培养3天和15天所得到的耳软骨凝胶和耳软骨膜片示意图。其中A-C为3天培养的耳软骨凝胶,D-E为15天培养的耳软骨膜片(D和E)及剪碎形成的耳软骨膜片颗粒(F)。

[0056] 图3显示了软骨凝胶-3D打印多孔框架复合物实物图。其中图3A为正面观,图3B侧面观。

[0057] 图4显示了软骨膜片-3D打印多孔框架复合物实物图。其中图4A为正面观,图4B侧

面观。

具体实施方式

[0058] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次意外地发现并开发了一种软骨组织工程复合物,该软骨组织工程复合物是一体化的软骨凝胶/软骨膜片颗粒-3D打印多孔框架复合物。实验证明,通过获取原代软骨进行扩增培养,将特定数量的软骨细胞接种于和/或铺于平坦或基本平坦的培养表面,使得被接种的软骨细胞形成特定的层叠结构,并在合适的凝胶化培养条件下培养所述层叠的软骨细胞,因培养时间不同,可形成一种新颖的凝胶状软骨或膜片状软骨。将制得的凝胶状软骨或膜片状软骨与3D打印多孔框架结合,制备得到的软骨组织工程复合物在移植进入软骨缺损处后,可以在缺损处再生为软骨,有望成为软骨再生的新方法。在此基础上,完成了本发明。

[0059] 术语

[0060] 除非另外定义,否则本文中所有的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0061] 如本文所用,术语“软骨组织工程复合物”包括如本文所述的经体外成软骨培养和未经体外成软骨培养的软骨凝胶-3D打印多孔框架复合物和软骨膜片颗粒-3D打印多孔框架复合物,在本发明中,可统一称为软骨组织工程复合物。

[0062] 如本文所用,术语“接种”意指将软骨细胞接种于细胞培养皿中,也可意指将软骨凝胶/软骨膜片颗粒接种于3D打印多孔框架中并使其均匀分布,本领域技术人员根据上下文可以理解所用“接种”的含义。

[0063] 如本文所用,在提到具体列举的数值中使用时,术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于1%。例如,如本文所用,表述“约100”包括99和101和之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0064] 如本文所用,术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之,所述术语也包括“基本上由...构成”、或“由...构成”。

[0065] 软骨凝胶及其制备

[0066] 如本文所用,“凝胶软骨”、“软骨凝胶”、“凝胶态软骨”、“凝胶状软骨”、“本发明的软骨凝胶”或“本发明的凝胶软骨”可互换使用,皆指本发明的呈凝胶状态的软骨(干)细胞,尤其是将特定浓度的软骨细胞接种于和/或铺于平坦或基本平坦的培养表面,使得被接种的软骨细胞形成层叠结构,并在合适的凝胶化培养条件下培养具有层叠结构的软骨细胞,从而形成凝胶状软骨培养物。

[0067] 本发明的凝胶软骨是不同于游离的软骨细胞、离心沉淀的软骨细胞和软骨团块(pellet)的新型软骨。本发明的凝胶软骨可视为介于游离的软骨细胞和致密的软骨团块之间的一种特定形态的软骨。本发明凝胶软骨,由于在凝胶化培养过程中,软骨细胞不仅与平面(X-Y平面)上相邻细胞存在接触和/或相互作用,而且还与其上方和/或下方和/或侧上方或下方等多方向的相邻软骨细胞存在接触和/或相互作用,从而促使软骨细胞分泌和形成更多的细胞外基质,从而将凝胶化培养的软骨细胞包裹于具有一定粘性的细胞外基质中,从而使得本发明的凝胶软骨既具有紧密联系,而具有一定的粘性和流动性,从而使得本发明的凝胶软骨更适合接种和负载于各种不同的载体材料(尤其是多孔的载体材料)上,从

而形成用于修复软骨的复合物。

[0068] 此外,本发明的凝胶软骨一方面具有凝胶状态,另一方面具有异乎寻常高的细胞密度(通常至少 1.0×10^8 个/ml或更高,如 1.0×10^8 个- 10×10^8 个/ml),因此,特别适合制备修复各类软骨的移植物,或用于软骨移植或软骨修复手术。

[0069] 在本发明中,修复软骨的复合物包括将本发明的凝胶软骨负载于载体材料(尤其是3D打印多孔框架)所形成的未经成软骨培养的复合物,也包括将本发明的凝胶软骨负载于载体材料(尤其是3D打印多孔框架)并经成软骨培养所形成的复合物。

[0070] 在本发明中,适合用于移植于人体或动物体的复合物就是本发明软骨组织工程复合物,即将本发明的凝胶软骨负载于载体材料(尤其是3D打印多孔框架)并经成软骨培养所形成的复合物。

[0071] 优选地,在本发明中,在凝胶化培养条件系下,体外培养一段时间 t_1 ,从而形成了凝胶软骨。优选地,所述的 t_1 为2.5-5.5天,较佳地3-5天。

[0072] 在本发明中,一个特征是层叠接种,即将特定密度的软骨细胞接种于培养容器后,接种的软骨细胞会通过例如沉积作用形成互相层叠的多层软骨细胞群(即具有层叠结构的软骨细胞群)。典型地,以培养皿(或培养容器)的培养面积计算,并设铺设单层细胞的汇合度为100%,则本发明的层叠接种的细胞数量 S_1 是对于100%汇合度的细胞数量 S_0 的 n 倍(即 $S_1/S_0=n$),其中所述的 n 为1.5-20,较佳地2-10,更佳地2.5-5。

[0073] 软骨膜片及其制备

[0074] 如本文所用,“软骨膜片”、“膜片状软骨”、或“本发明的软骨膜片”可互换使用,皆指本发明的呈膜片状态的软骨(干)细胞,尤其是将特定浓度的软骨细胞接种于和/或铺于平坦或基本平坦的培养表面,使得被接种的软骨细胞形成层叠结构,并在合适的培养条件下培养具有层叠结构的软骨细胞,从而形成膜片状软骨培养物。

[0075] 本发明的“软骨膜片”是在本发明所述的“软骨凝胶”的制备基础上,通过延长凝胶化培养时间所制备得到的。即,在本发明中,在凝胶化培养条件下,将接种于和/或铺于平坦或基本平坦的培养表面的软骨细胞体外培养一段时间 t_2 ,从而形成了软骨膜片。优选地,所述的 t_2 为6-30天,较佳地7-20天,最佳地10-15天。

[0076] 本发明的软骨膜片一方面具有异乎寻常高的细胞密度(通常至少 1.0×10^8 个/ml或更高,如 1.0×10^8 个- 10×10^8 个/ml),另一方面它的厚度薄(仅有0.2-0.25mm)并且韧性佳,可被剪碎为平均体积0.2 μ l的“软骨膜片颗粒”,通过简单离心的方式填充于多孔框架结构中,因此,特别适合制备修复各类软骨的移植物,或用于软骨移植或软骨修复手术。

[0077] 在本发明中,修复软骨的复合物包括将本发明的软骨膜片颗粒负载于载体材料(尤其是多孔框架结构)所形成的未经成软骨培养的复合物,也包括将本发明的软骨膜片颗粒负载于载体材料(尤其是多孔框架结构)并经成软骨培养所形成的复合物。

[0078] 在本发明中,适合用于移植于人体或动物体的复合物就是本发明的软骨组织工程复合物,即将本发明的软骨膜片颗粒负载于载体材料(尤其是多孔框架结构)并经成软骨培养所形成的复合物。

[0079] 如本文所用,“特定浓度”或“特定密度”是指在3.5cm的培养皿(例如,六孔板中的一个孔)中,接种 1.0×10^7 - 2.0×10^7 个细胞,较佳地,为 1.5×10^7 个细胞。经凝胶化培养不同的时间,最终形成所含软骨细胞密度为 1.0×10^8 个- 10×10^8 个/ml的软骨凝胶或所含软骨细

胞密度为 1.0×10^8 个- 10×10^8 个/ml的软骨膜片。

[0080] 在另一优选例中,所述的凝胶化培养条件为:接种特定密度的软骨细胞,使用凝胶化培养基培养,所述凝胶化培养基为含10%胎牛血清及100U/ml青-链霉素的高糖(4-5wt%葡萄糖)DMEM培养基。

[0081] 如本文所用,术语“成软骨培养”是指使用成软骨培养基培养接种了软骨凝胶或软骨膜片颗粒的多孔框架结构,最终使其形成一体化的软骨凝胶-框架结构复合物或软骨膜片颗粒--框架结构复合物,即本发明的软骨组织工程复合物,用于移植于人体或动物体的软骨缺损处。

[0082] 软骨和软骨细胞

[0083] 软骨即软骨组织,由软骨细胞和细胞间质组成。软骨内的基质呈凝胶状态,具有较大韧性。软骨是以支持作用为主的结缔组织。软骨内不含血管和淋巴管,营养物由软骨膜内的血管中渗透到细胞间质中,再营养骨细胞。

[0084] 根据细胞间质的不同可把软骨分为3种,即透明软骨、弹性软骨和纤维软骨。透明软骨的基质是由胶原纤维、原纤维和周围无定形的基质组成。在胚胎时期有临时支架作用,后来这种作用被骨代替。成人的透明软骨主要分布在气管和支气管壁中、肋骨的胸骨端和骨的表面(关节软骨)。弹性软骨的基质中除了胶原纤维还有弹性纤维,这种软骨弹性较大,主要分布在耳廓、外耳道壁、耳咽管和会厌、喉部等处。纤维软骨基质中有成束的胶原纤维平行或交叉排列,较坚韧。分布在椎间盘、关节盂、关节盘以及一些腱、韧带等处,以增强运动的灵活性和保护、支持等作用。

[0085] 本发明所述的软骨组织工程复合物中所用的软骨细胞可以为取自透明软骨、弹性软骨或纤维软骨的透明软骨细胞、弹性软骨细胞或纤维软骨细胞,在植入受试者的软骨缺损处后,可再生为软骨实现缺损的修复。

[0086] 3D打印

[0087] 3D打印(3DP)即快速成型技术的一种,又称增材制造,它是一种以数字模型文件为基础,运用粉末状金属或塑料等可粘合材料,通过逐层打印的方式来构造物体的技术。3D打印通常是采用数字技术材料打印机来实现的,经过三维设计和切片处理完成打印。

[0088] 三维打印的设计过程是:先通过计算机建模软件建模,再将建成的三维模型“分区”成逐层的截面,即切片,从而指导打印机逐层打印。打印机通过读取文件中的横截面信息,用液体状、粉状或片状的材料将这些截面逐层地打印出来,再将各层截面以各种方式粘合起来从而制造出一个实体。

[0089] 本发明所述的3D打印的多孔框架通过3D打印技术制成,其中的孔径大小为100-300mm。并且所述3D打印的多孔框架由可降解高分子材料制成,即打印时所用材料为可降解高分子材料。

[0090] 在另一优选例中,所述可降解高分子材料选自下组:聚乙交酯、聚丙交酯、聚己内酯、或乙交酯-丙交酯共聚物。

[0091] 本发明所用的培养基

[0092] 成软骨培养基:高糖DMEM培养基,1%1×ITS premix((ITS通用型培养混合剂,含胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸、亚油酸、牛血清蛋白、丙酮酸、抗坏血酸磷酸盐),40μg/ml脯氨酸,10ng/ml TGF-β1,100ng/ml IGF-1,40ng/ml地塞米松和50μg/ml维生素C。

[0093] 凝胶化培养基：含4-5wt%葡萄糖,10%FBS(v/v)和100U/ml青链霉素的DMEM培养基。

[0094] 粘附率

[0095] 在本发明中,当将本发明的软骨凝胶接种于载体材料(尤其是3D打印多孔框架)时,本发明中的软骨凝胶具有一定的粘附率,通过本发明提供的粘附率测定方法确定。本发明的软骨凝胶的粘附率 $\geq 90\%$,较佳的, $\geq 95\%$ 。

[0096] 本发明中的粘附率如下定义:

[0097] 检测所接种样品(例如软骨凝胶)的DNA定量A1;检测接种后复合物(例如软骨凝胶-框架复合物)培养24小时后的DNA定量A2;粘附率为 $A2/A1*100\%$ 。

[0098] 所述粘附率的测定方法包括以下步骤:

[0099] 取接种样品(例如软骨凝胶或软骨凝胶-3D打印多孔框架复合物),使用蛋白酶K消化,消化后的样品使用PicoGreen试剂盒(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)定量检测,使用荧光酶标仪测定520nm的吸光度,依据标准曲线公式计算出DNA含量。

[0100] 本发明的主要优点包括:

[0101] (1) 本发明提供的软骨凝胶或软骨膜片颗粒较软骨细胞而言更加成熟,且具有一定的流动性。

[0102] (2) 3D打印多孔框架作为可降解的高分子材料,可在体内降解,机体免疫反应较低,生物安全性好。

[0103] (3) 3D打印双层3D打印多孔框架材料孔径较大,孔隙率较好,易于接种,但接种软骨细胞悬液时细胞黏附率极低,本发明使用具有一定流动性且较为粘稠的软骨组织可有效提高黏附率。

[0104] (4) 本发明的3D打印双层3D打印多孔框架材料包括上下两层结构,上层结构的孔径较大,易于接种;而下层结构的孔径较小,防止接种的细胞漏出。

[0105] (5) 单纯的软骨凝胶或软骨膜片颗粒无法成型,且张力条件下软骨吸收率较高,临床应用受限;本发明使用3D打印多孔框架作为框架结构,可构建一定特殊形状的软骨凝胶/软骨膜片颗粒-3D打印多孔框架复合物,提供力学支撑的同时有效降低软骨吸收率。

[0106] (6) 根据需求可将本发明的3D打印多孔框架灵活定制为不同形状,构建成的软骨凝胶/软骨膜片颗粒-3D打印多孔框架复合物可用于不同部位、不同形状的修复重建。

[0107] 下面,通过具体的实施例对本发明做进一步说明。下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。除非特别说明,否则本发明实施例中所用材料和试剂均为市售产品。

[0108] 实施例1

[0109] 3D打印多孔框架的制备

[0110] 基于三维数字模型经3D打印机(MAM- II Free Form Fabrication System)打印PCL基材制备毫米级软骨相和硬骨相分体式内核网格框架。通过调节不同层宽,不同沉积角度($-45^\circ/45^\circ$ 、 $-60^\circ/60^\circ$ 或 $0^\circ/60^\circ/120^\circ$)及不同直径的不锈钢针头(19G、20G或21G),设置合适的挤料速度、打印速度和层高等打印参数,制备3D打印多孔框架。

[0111] 制备得到的3D打印多孔框架如图1所示。

[0112] 其中,图1A为正面观,图1B后面观。图中标尺为400mm。

[0113] 实施例2

[0114] 软骨凝胶-3D打印多孔框架复合物制备

[0115] 在本实施例中,制备软骨凝胶-3D打印多孔框架复合物。具体操作方法如下:

[0116] (1) 取受试者自体部分耳软骨组织,无菌切取 $2.5 \times 2.5 \text{cm}^2$ 的软骨组织,使用无菌器械将软骨表面的黏膜及纤维组织剥离;

[0117] (2) 将软骨组织剪为 $1.5 \times 1.5 \text{mm}^2$ 大小软骨碎片;配置浓度为0.15%胶原酶;将软骨碎片加入配置好的胶原酶中消化8小时;

[0118] (3) 8小时后将胶原酶溶液过滤离心得到耳软骨细胞,使用含有10%的FBS的高糖DMEM培养基进行原代及传代培养;

[0119] (4) 扩增后收集细胞重悬,按照 $8 \times 10^6/10 \text{ml}$ 至 $30 \times 10^6/10 \text{ml}$ /孔的细胞量接种于六孔板中,以凝胶化培养基(含4-5wt%葡萄糖,10%FBS(v/v)和100U/ml青链霉素的DMEM培养基)培养;

[0120] (5) 在接种72小时(3天)后将六孔板中培养基吸去,可见六孔板底部的凝胶状软骨组织(图3A),使用镊子将六孔板底部的凝胶状软骨聚集(图2B),一个孔的凝胶软骨产量为0.1-0.2ml,收集至5ml注射器中;该凝胶软骨中,细胞密度为 1.0×10^8 个/ml- 10×10^8 个/ml,较佳地 $1.5-5 \times 10^{10}$ 个/ml。将其与0.15ml培养基混合,制成含软骨凝胶的制剂,如图2C所示;

[0121] (6) 将软骨凝胶制剂(步骤(5)制备,体积约0.25-0.35ml),接种于3D打印多孔框架(实施例1中制备,如图1所示),于 37°C 、95%湿度、5%二氧化碳静置2小时;

[0122] (7) 静置后加入成软骨培养基继续体外培养3-11天,形成软骨凝胶-3D打印多孔框架复合物,如图3所示。

[0123] 当用于关节缺损修复时,可根据前期MRI、CT等辅助检查确定所需修复的软骨形状、大小切割软骨凝胶-3D打印多孔框架复合物。

[0124] 实施例3

[0125] 软骨膜片颗粒-3D打印多孔框架复合物制备

[0126] 在本实施例中,制备软骨膜片颗粒-3D打印多孔框架复合物。具体操作方法如下:

[0127] (1) 无菌切取 $2.5 \times 2.5 \text{cm}^2$ 的耳软骨组织;使用无菌器械将软骨表面的黏膜及纤维组织剥离;

[0128] (2) 将软骨组织剪为 $1.5 \times 1.5 \text{mm}^2$ 大小软骨碎片;配置浓度为0.15%胶原酶;将软骨碎片加入配置好的胶原酶中消化8小时;

[0129] (3) 8小时后将胶原酶溶液过滤离心得到耳软骨细胞,进行原代及传代培养;

[0130] (4) 扩增后收集细胞重悬,按照 $8 \times 10^6/10 \text{ml}$ 至 $30 \times 10^6/10 \text{ml}$ /孔的细胞量接种于六孔板中,以凝胶化培养基(含4-5wt%葡萄糖,10%FBS(v/v)和100U/ml青链霉素的DMEM培养基)培养;培养24小时或48小时后更换新鲜凝胶化培养基,继续体外培养至15天;

[0131] (6) 吸去六孔板中的培养基,可见六孔板底部的软骨膜片组织(图2D),其中软骨膜片组织中的细胞密度约为 1.0×10^8 个/ml- 10×10^8 个/ml;

[0132] 使用镊子将软骨膜片夹起(图3E),将其切割为 $1 \times 1 \text{mm}^2$ 大小的软骨膜片颗粒后,收集至50ml离心管,如图2F所示;

[0133] (7) 将需要接种的3D打印多孔框架(实施例1中制备,如图1和图2所示)置于装有软骨膜片颗粒的离心管中,确保框架被完全浸没过;将装有框架及软骨膜片颗粒的离心管放于离心机中,600转/分钟,离心2分钟;

[0134] (8) 将接种好的3D打印多孔框架于37℃、95%湿度、5%二氧化碳静置一定时间;静置后加入成软骨培养基继续体外培养3-11天,形成软骨膜片颗粒-3D打印多孔框架复合物,如图4所示。

[0135] 当用于关节缺损修复时,可根据前期MRI、CT等辅助检查确定所需修复的软骨形状、大小切割耳软骨膜片颗粒-框架结构复合物。

[0136] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

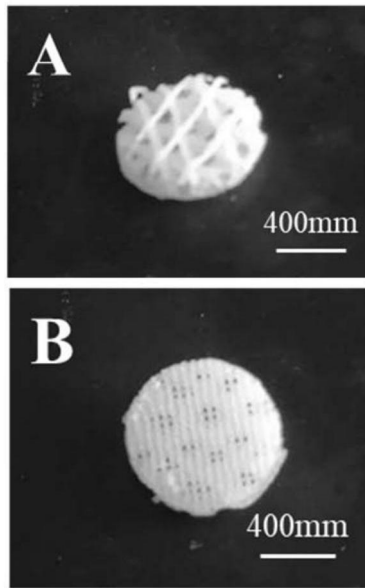


图1

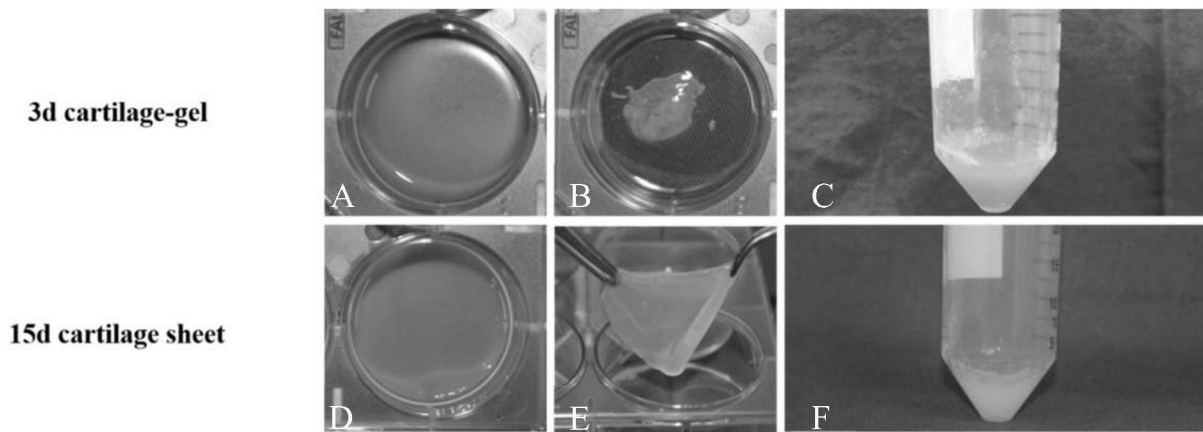


图2

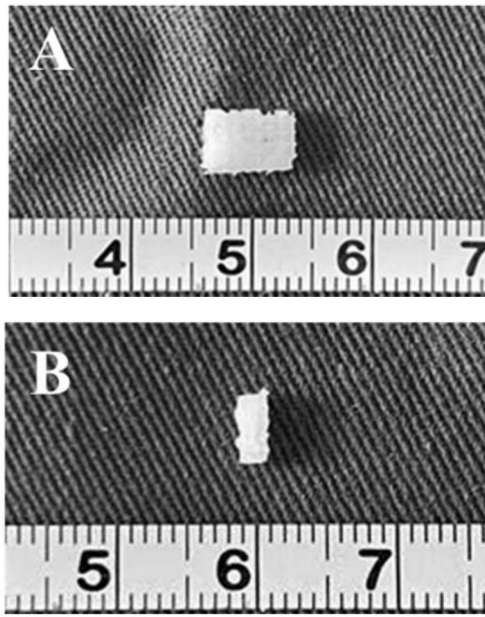


图3

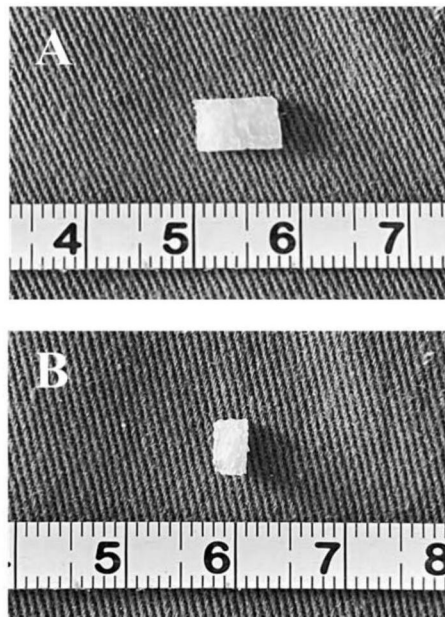


图4