



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115122690 B

(45) 授权公告日 2023.09.29

(21) 申请号 202210754118.8

(22) 申请日 2022.06.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115122690 A

(43) 申请公布日 2022.09.30

(73) 专利权人 奥精医疗科技股份有限公司
地址 100085 北京市海淀区开拓路5号3层
A305

专利权人 山东奥精生物科技有限公司

(72) 发明人 崔云 宋天喜 朱金亮 胡艳丽
何志敏 仇志烨 吴晶晶 胡刚

(74) 专利代理机构 北京开阳星知识产权代理有限公司 11710
专利代理师 姚金金

(51) Int.Cl.

B29D 23/00 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2005260706 A1, 2005.11.24

CN 205007321 U, 2016.02.03

CN 105983136 A, 2016.10.05

CN 102178980 A, 2011.09.14

CN 111214709 A, 2020.06.02

CN 104399131 A, 2015.03.11

WO 0103609 A1, 2001.01.18

US 2004028738 A1, 2004.02.12

审查员 张广耀

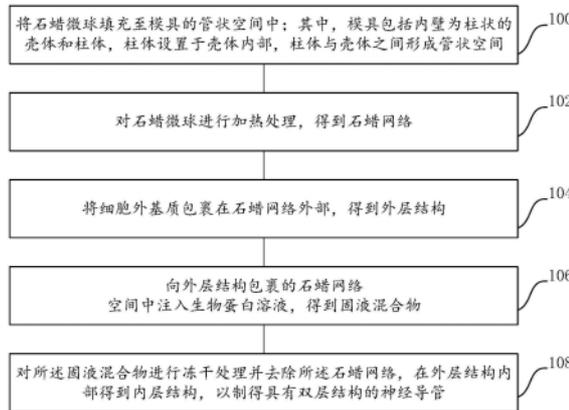
权利要求书2页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称

一种神经导管的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及神经导管技术领域,特别涉及一种神经导管的制备方法。该制备方法包括:将石蜡微球填充至模具的管状空间中;其中,所述模具包括内壁为柱状的壳体和柱体,柱体设置于所述壳体内部,所述柱体与所述壳体之间形成所述管状空间;对所述石蜡微球进行加热处理,得到石蜡网络;将细胞外基质包裹在所述石蜡网络外部,得到外层结构;向所述外层结构包裹的石蜡网络空间中注入生物蛋白溶液,得到固液混合物;对所述固液混合物进行冻干处理并去除所述石蜡网络,在所述外层结构内部得到内层结构,以制得具有双层复合结构的神经导管。本发明实施例提供了一种神经导管的制备方法,能够提供一种提升神经修复效果、加快神经修复效率的神经导管。



1. 一种神经导管的制备方法,其特征在于,包括:

将石蜡微球填充至模具的管状空间中;其中,所述模具包括内壁为柱状的壳体和柱体,柱体设置于所述壳体内部,所述柱体与所述壳体之间形成所述管状空间;

对所述石蜡微球进行加热处理,得到石蜡网络;

将细胞外基质包裹在所述石蜡网络外部,得到外层结构;

向所述外层结构包裹的石蜡网络空间中注入生物蛋白溶液,得到固液混合物;

对所述固液混合物进行冻干处理并去除所述石蜡网络,在所述外层结构内部得到内层结构,以制得具有双层复合结构的神经导管;

在所述将石蜡微球填充至模具的管状空间中之前,还包括:

将模具浸入聚环氧乙烷溶液中;

对浸入所述聚环氧乙烷溶液后的所述模具进行干燥处理;

所述将模具浸入聚环氧乙烷溶液中,包括:

将模具包括的壳体浸入浓度为15~30wt%的聚环氧乙烷溶液中;

将模具包括的柱体浸入浓度为8~12wt%的聚环氧乙烷溶液中;

其中,所述聚环氧乙烷溶液的溶剂为乙醇;

所述加热处理的温度为40~60℃,所述加热处理的时间为40~100min;

在所述得到石蜡网络之后,在所述将细胞外基质包裹在所述石蜡网络外部之前,还包括:

将容纳所述石蜡网络的所述模具浸入无水乙醇;

将所述石蜡网络从所述模具中取出;

清洗并烘干所述模具;

将所述模具浸入8~12wt%浓度的聚环氧乙烷溶液后取出;

在得到神经导管后,还包括:

将2~10wt%浓度的蛋黄卵磷脂溶液注入所述内层结构中;

对注入所述蛋黄卵磷脂溶液的神经导管进行真空干燥处理;

内层结构的孔隙率为70~85%,比表面积为15~21m²/g。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述生物蛋白溶液为10~15wt%浓度的丝素蛋白溶液。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述生物蛋白溶液为0.8~1.4wt%浓度的胶原凝胶。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述对所述固液混合物进行冻干处理并去除所述石蜡网络,包括:

对所述固液混合物进行冻干处理,得到冻干管体;

将所述冻干管体在90wt%浓度的甲醇中浸泡2小时;

用正己烷将所述冻干管体中的所述石蜡网络清洗掉。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述对所述固液混合物进行冻干处理并去除所述石蜡网络,包括:

对所述固液混合物进行冻干处理,得到冻干管体;

对所述冻干管体进行交联处理;

用正己烷将所述冻干管体中的所述石蜡网络清洗掉。

一种神经导管的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及神经导管技术领域,特别涉及一种神经导管的制备方法。

背景技术

[0002] 周围神经缺损是临床最常见的创伤之一,该类型的神经损伤会使受累神经所支配的远端肢体出现完全的感觉和运动功能的双重缺失,从而导致严重残疾的发生,给患者的工作和生活质量都带来巨大的影响。

[0003] 相关技术中,临床上对于较短距离的周围神经缺损,在无张力缝合的原则基础上,多采用神经断端直接缝合的方法进行修复;而对于长距离的周围神经缺损,则往往是采用自体神经移植的方法进行修复。但是,自体神经移植仅能实现部分神经功能的恢复,且修复效率低。

[0004] 因此,针对以上不足,急需一种神经导管的制备方法。

发明内容

[0005] 本发明实施例提供了一种神经导管的制备方法,能够提供一种提升神经修复效果、加快神经修复效率的神经导管。

[0006] 本发明实施例提供了一种神经导管的制备方法,包括:

[0007] 将石蜡微球填充至模具的管状空间中;其中,所述模具包括内壁为柱状的壳体和柱体,柱体设置于所述壳体内部,所述柱体与所述壳体之间形成所述管状空间;

[0008] 对所述石蜡微球进行加热处理,得到石蜡网络;

[0009] 将细胞外基质包裹在所述石蜡网络外部,得到外层结构;

[0010] 向所述外层结构包裹的石蜡网络空间中注入生物蛋白溶液,得到固液混合物;

[0011] 对所述固液混合物进行冻干处理并去除所述石蜡网络,在所述外层结构内部得到内层结构,以制得具有双层复合结构的神经导管。

[0012] 在一种可能的设计中,在所述将石蜡微球填充至模具的管状空间中之前,还包括:

[0013] 将模具浸入聚环氧乙烷溶液中;

[0014] 对浸入所述聚环氧乙烷溶液后的所述模具进行干燥处理。

[0015] 在一种可能的设计中,所述将所述模具浸入聚环氧乙烷溶液中,包括:

[0016] 将模具包括的壳体浸入浓度为15~30wt%的聚环氧乙烷溶液中;

[0017] 将模具包括的柱体浸入浓度为8~12wt%的聚环氧乙烷溶液中;

[0018] 其中,所述聚环氧乙烷溶液的溶剂为乙醇。

[0019] 在一种可能的设计中,所述加热处理的温度为40~60℃,所述加热处理的时间为40~100min。

[0020] 在一种可能的设计中,在所述得到石蜡网络之后,在所述将细胞外基质包裹在所述石蜡网络外部之前,还包括:

[0021] 将容纳所述石蜡网络的所述模具浸入无水乙醇;

- [0022] 将所述石蜡网络从所述模具中取出；
- [0023] 清洗并烘干所述模具；
- [0024] 将所述模具浸入8~12wt%浓度的聚环氧乙烷溶液后取出。
- [0025] 在一种可能的设计中,所述生物蛋白溶液为10~15wt%浓度的丝素蛋白溶液。
- [0026] 在一种可能的设计中,所述生物蛋白溶液为0.8~1.4wt%浓度的胶原凝胶。
- [0027] 在一种可能的设计中,所述对所述固液混合物进行冻干处理并去除所述石蜡网络,包括:
- [0028] 对所述固液混合物进行冻干处理,得到冻干管体；
- [0029] 将所述冻干管体在90wt%浓度的甲醇中浸泡2小时；
- [0030] 用正己烷将所述冻干管体中的所述石蜡网络清洗掉。
- [0031] 在一种可能的设计中,所述对所述固液混合物进行冻干处理并去除所述石蜡网络,包括:
- [0032] 对所述固液混合物进行冻干处理,得到冻干管体；
- [0033] 对所述冻干管体进行交联处理；
- [0034] 用正己烷将所述冻干管体中的所述石蜡网络清洗掉。
- [0035] 在一种可能的设计中,在所述得到神经导管后,还包括:
- [0036] 将2~10wt%浓度的蛋黄卵磷脂溶液注入所述内层结构中；
- [0037] 对注入所述蛋黄卵磷脂溶液的神导管进行真空干燥处理。
- [0038] 本发明与现有技术相比至少具有如下有益效果:
- [0039] 在本实施例中,将石蜡微球填充至由壳体和柱体形成的管状空间中,使石蜡微球在管状空间中形成管状体,然后对石蜡微球进行加热处理,使石蜡微球表面融化,进而互相粘连,形成石蜡网络;将细胞外基质包裹在石蜡网络的外部,得到外层结构,细胞外基质包括基底膜,因此,细胞外基质能够为同样具有基底膜的雪旺细胞的迁入提供条件,雪旺细胞能分泌神经营养因子,促进受损的神经元的存活及其轴突的再生,参与周围神经系统中神经纤维的构成,此外,细胞外基质还能够允许水分和营养物质的交换,阻碍非神经细胞进入神经导管内部,综上,细胞外基质能够提升神经修复的效果。向所述外层结构包裹的石蜡网络空间中注入生物蛋白溶液,生物蛋白溶液填充至石蜡网络的网状空隙中,得到固液混合物,对固液混合物进行冻干处理后,填充在石蜡网络中的生物蛋白溶液变为网状固体,去除石蜡网络后,得到外层结构为细胞外基质,内层结构为生物蛋白制备的网状结构的神经导管,生物蛋白制成的网状结构可降解,降解速率与组织再生的速率相匹配;冻干处理使该网状结构具备了良好的支撑性,能够对外部的细胞外基质起到良好的支撑作用,解决了细胞外基质缺血后导致的塌陷、再生不良、形成锁疤痕组织、增生及粘连等问题。内层网状结构具有多孔结构和高孔隙率,有利于生物活性因子的渗透,为毛细血管和纤维组织长入提供营养;生物蛋白具有良好的生物相容性,配合网状结构能够使细胞快速黏附和增殖,以提升神经修复的效率,此外,神经导管还具备高比表面积和优异的表面理化性质,能够进一步提升神经修复的效果和效率。

附图说明

- [0040] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现

有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

- [0041] 图1是本发明实施例提供的一种神经导管的制备方法的流程图;
- [0042] 图2是本发明实施例提供的另一种神经导管的制备方法的流程图;
- [0043] 图3是本发明实施例提供的又一种神经导管的制备方法的流程图;
- [0044] 图4是本发明实施例提供的一种模具的结构示意图;
- [0045] 图5是本发明实施例提供的一种神经导管内层网状结构电镜图;
- [0046] 图6是本发明实施例提供的另一种神经导管内层网状结构电镜图。
- [0047] 图中:
- [0048] 1-壳体;
- [0049] 2-柱体。

具体实施方式

[0050] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例,基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0051] 在本发明实施例的描述中,除非另有明确的规定和限定,术语“第一”、“第二”仅用于描述的目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性;除非另有规定或说明,术语“多个”是指两个或两个以上;术语“连接”、“固定”等均应做广义理解,例如,“连接”可以是固定连接,也可以是可拆卸连接,或一体地连接,或电连接;可以是直接相连,也可以通过中间媒介间接相连。对于本领域的普通技术人员而言,可以根据具体情况理解上述术语在本发明中的具体含义。

[0052] 本说明书的描述中,需要理解的是,本发明实施例所描述的“上”、“下”等方位词是以附图所示的角度来进行描述的,不应理解为对本发明实施例的限定。此外,在上下文中,还需要理解的是,当提到一个元件连接在另一个元件“上”或者“下”时,其不仅能够直接连接在另一个元件“上”或者“下”,也可以通过中间元件间接连接在另一个元件“上”或者“下”。

[0053] 如图1所示,本发明实施例提供了一种神经导管的制备方法,包括:

[0054] 步骤100,将石蜡微球填充至模具的管状空间中;其中,模具包括内壁为柱状的壳体1和柱体2(图4),柱体2设置于壳体1内部,柱体2与壳体1之间形成管状空间;

[0055] 步骤102,对石蜡微球进行加热处理,得到石蜡网络;

[0056] 步骤104,将细胞外基质包裹在石蜡网络外部,得到外层结构;

[0057] 步骤106,向外层结构包裹的石蜡网络空间中注入生物蛋白溶液,得到固液混合物;

[0058] 步骤108,对固液混合物进行冻干处理并去除石蜡网络,在外层结构内部得到内层结构,以制得具有双层复合结构的神经导管。

[0059] 在本实施例中,将石蜡微球填充至由壳体1和柱体2形成的管状空间中,使石蜡微

球在管状空间中形成管状体,然后对石蜡微球进行加热处理,使石蜡微球表面融化,进而互相粘连,形成石蜡网络;将细胞外基质包裹在石蜡网络的外部,得到外层结构,细胞外基质包括基底膜,因此,细胞外基质能够为同样具有基底膜的雪旺细胞的迁入提供条件,雪旺细胞能分泌神经营养因子,促进受损的神经元的存活及其轴突的再生,参与周围神经系统中神经纤维的构成,此外,细胞外基质还能够允许水分和营养物质的交换,阻碍非神经细胞进入神经导管内部,综上,细胞外基质能够提升神经修复的效果。向外层结构包裹的石蜡网络空间中注入生物蛋白溶液,生物蛋白溶液填充至石蜡网络的网状空隙中,得到固液混合物,对固液混合物进行冻干处理后,填充在石蜡网络中的生物蛋白溶液变为网状固体,去除石蜡网络后,得到外层结构为细胞外基质,内层结构为生物蛋白制备的网状结构(图5、图6)的神经导管,生物蛋白制成的网状结构可降解,降解速率与组织再生的速率相匹配;冻干处理使该网状结构具备了良好的支撑性,能够对外部的细胞外基质起到良好的支撑作用,解决了细胞外基质缺血后导致的塌陷、再生不良、形成锁疤痕组织、增生及粘连等问题。内层网状结构具有多孔结构和高孔隙率,有利于生物活性因子的渗透,为毛细血管和纤维组织长入提供营养;生物蛋白具有良好的生物相容性,配合网状结构能够使细胞快速黏附和增殖,以提升神经修复的效率,此外,神经导管还具备高比表面积和优异的表面理化性质,能够进一步提升神经修复的效果和效率。

[0060] 需要说明的是,通过该方法制备的网状结构的的孔隙率为70~85%,比表面积为 $15\sim 21\text{m}^2/\text{g}$ 。

[0061] 在本实施例中,石蜡微球的制备方法如下:

[0062] 将石蜡块加入到0.5% (质量体积比)浓度的聚乙烯醇溶液中,其中,每5g石蜡块加入100ml聚乙烯醇溶液,加入石蜡块后以60~380r/min,60~90℃恒温加热搅拌,待石蜡完全融化后形成均匀分散在溶液中的石蜡微球,停止加热,然后加入冰块继续搅拌数分钟后,用梯度筛子35目(筛网直径500 μm)、50目(300 μm)、70目(212 μm)、140目(106 μm)过筛,用流水洗掉聚乙烯醇,然后用酒精脱水晾干,制得不同粒径的石蜡微球,分装后在4℃下储存备用。

[0063] 制作过程中的搅拌速率及聚乙烯醇溶液的浓度会影响石蜡小球的粒径,在一定范围内,搅拌速率越快、聚乙烯醇浓度越高,所制得的石蜡小球粒径越小,形状越趋向于球形;相反搅拌速率越慢,聚乙烯醇浓度越低,所制得的石蜡小球粒径越大,形状非球形的比例也越高。加入石蜡块后的最佳搅拌速度为180r/min,聚乙烯醇溶液的最佳浓度为0.5% (质量体积比),搅拌过程中的最佳加热温度75℃,上述参数下制备的石蜡微球形状规则,200微米~300微米的产率最高,需要说明的是,孔径100~300微米最利于细胞的爬行替代。

[0064] 在本实施例中,细胞外基质的制备材料包括降主动脉、猪心和猪小肠粘膜下层中的至少一种。

[0065] 通过降主动脉制备细胞外基质的方法如下:

[0066] (1)新鲜屠宰肉猪降主动脉

[0067] 在动物屠宰后24小时内低温运输至实验室进行处理,具体地,用显微剪将降主动脉外周的结缔组织及脂肪剥除干净,使用9-0缝合线结扎细小分支,取出血管后使用肝素化的生理盐水冲洗三次,置于含有1%聚苯乙烯的生理盐水溶液中,在4℃的温度中保存;

[0068] (2)细胞处理

[0069] 在超净台中,将血管切割成2~5cm片段,置入0.075%的十二烷基硫酸钠溶液中,

室温下摇床温和震荡12小时,生理盐水冲洗3次,每次4小时,得到细胞外基质。

[0070] 通过猪心制备或猪小肠粘膜下层制备细胞外基质的方法如下:

[0071] (1) 预处理

[0072] 选取无创伤、厚度均匀的新鲜猪心前壁部分或猪小肠粘膜下层,剔除脂肪组织,将猪心包膜或猪小肠粘膜下层置于去离子水中浸泡并反复冲洗3次,每次5分钟,用剪刀将剩余脂肪组织剔除干净,修剪成约 $10 \times 10 \text{cm}^2$ 大小,得到预处理物料;

[0073] (2) 脱脂

[0074] 调整磁力加热搅拌器温度为 40°C ,按照2.5~5(优选3)的料液比加入0.4%的十二烷基硫酸钠中,以120r/min的转速转动1.5h后按照3~6(优选4)的料液比水洗两次;

[0075] (3) 碱处理

[0076] 调整磁力加热搅拌器的温度为 $25 \sim 35^\circ\text{C}$,按照料液比2.5~5(优选3)加入0.2~1.4%(优选浓度1.1%)的NaOH溶液,调整转速120r/min转动30min,然后每隔50min转动10min,总共转动16h,处理完后按照料液比3~6(优选4)水洗三次;需要说明的是,碱液有消蚀作用,能够破坏细胞质成分,有利于去除部分免疫成分,此外,温度过高会对纤维结构造成严重破坏。

[0077] (4) 脱碱:调整磁力加热搅拌器的温度为 30°C ,按照料液比2.5~5(优选3)加入3.0%的氯化铵溶液,调整转速转动1.5h,并每隔30min测一次pH值,直至到达中性,处理完后按照料液比2.5~5(优选3)水洗三次;

[0078] (5) 酶软化:调整磁力加热搅拌器的温度为 40°C ,按照料液比2~3(优选2.5)加入0.2~0.5%的胰酶溶液或胃蛋白酶溶液,调整转速转动30min,完成后加入0.2~0.8%浓度的1398中性蛋白酶溶液或Triton-X-100溶液中转动1~4h,完成后按照料液比2.5~5(优选3)水洗3次;

[0079] (6) PBS清洗:调整磁力加热搅拌器至室温(25°C),按照液比2.5~5(优选3)清洗3次,每次15min,得到细胞外基质;

[0080] (7) 试样保存:将脱细胞后的心包保存于PBS缓冲液,并置于 4°C 冰箱中。

[0081] 在本发明的一些实施例中,在将石蜡微球填充至模具的管状空间中之前,还包括:

[0082] 将模具浸入聚环氧乙烷溶液中;

[0083] 对浸入聚环氧乙烷溶液后的模具进行干燥处理。

[0084] 在本实施例中,将模具浸入聚环氧乙烷溶液中,使模具表面布满聚环氧乙烷溶液,对模具进行干燥处理后,模具的表面包裹一层聚环氧乙烷固体,该固体具有一定厚度,能够占据一定空间,该空间为预留空间,如此设置,在石蜡微球形成石蜡网络后,将石蜡微球取出后清洗掉模具表面的聚环氧乙烷固体,能够为包裹在石蜡网络外壁的细胞外基质提供空间,进而使包裹细胞外基质的石蜡网络能够装入模具的管状空间。

[0085] 需要说明的是,上述预留空间的厚度可以通过聚环氧乙烷溶液的浓度进行调节,溶液的浓度越高,厚度越厚。

[0086] 在本发明的一些实施例中,将模具浸入聚环氧乙烷溶液中,包括:

[0087] 将模具包括的壳体1浸入浓度为15~30wt%的聚环氧乙烷溶液中;

[0088] 将模具包括的柱体2浸入浓度为8~12wt%的聚环氧乙烷溶液中;

[0089] 其中,聚环氧乙烷溶液的溶剂为乙醇。

[0090] 在本实施例中,将壳体1浸入浓度为15~30wt%的聚环氧乙烷溶液中,以得到厚度与细胞外基质相同的预留空间;将柱体2浸入浓度为8~12wt%的聚环氧乙烷溶液中,能够得到包裹在柱体2外的薄层聚环氧乙烷,该薄层聚环氧乙烷仅是用于后期便于将石蜡网络取出,因此,厚度较薄,清洗掉便于将石蜡网络脱模即可。

[0091] 可以理解的是,聚环氧乙烷溶液的浓度可根据需求灵活调整,以适应不同厚度的细胞外基质。

[0092] 需要说明的是,选取乙醇作为溶剂,能够缩短去除溶剂的时间,进而缩短神经导管的制备时间,此外,乙醇挥发后无毒,不会污染环境和危害人体健康。

[0093] 在本发明的一些实施例中,加热处理的温度为40~60℃,加热处理的时间为40~100min。

[0094] 在本实施例中,加热处理的温度接近或等于石蜡的熔点,在上述加热温度下,加热处理的时间为40~100min,使石蜡微球的表面融化,并且能保持球形的形态,如此使相邻的石蜡微球之间互相粘连,形成石蜡网络。若加热处理的温度高于60℃和/或加热处理的时间长于100min,则石蜡微球无法保持球形,若加热处理的温度低于40℃和/或加热处理的时间短于40min,则石蜡微球不会融化,也就无法互相粘连形成石蜡网络。

[0095] 在本发明的一些实施例中,在得到石蜡网络之后,在将细胞外基质包裹在石蜡网络外部之前,还包括:

[0096] 将容纳石蜡网络的模具浸入无水乙醇;

[0097] 将石蜡网络从模具中取出;

[0098] 清洗并烘干模具;

[0099] 将所述模具浸入8~12wt%浓度的聚环氧乙烷溶液后取出。

[0100] 在本实施例中,将容纳石蜡网络的模具浸入无水乙醇中,使石蜡网络便于从模具中取出,此外,若模具表面包裹有聚环氧乙烷,则乙醇还能够将包裹的聚环氧乙烷溶解,进一步地便于将石蜡网络取出。乙醇还能够将壳体1内壁上的聚环氧乙烷溶解,能够为后续包裹在石蜡网络外部的细胞外基质提供空间,便于将包裹细胞外基质的石蜡网络装入模具。将烘干后的模具再次浸入8~12wt%浓度的聚环氧乙烷溶液后取出,如此设置,后续制得神经导管需要进行脱模时,将模具浸过乙醇后即可顺利脱模。

[0101] 在本发明的一些实施例中,生物蛋白溶液为10~15wt%浓度的丝素蛋白溶液。

[0102] 在本实施例中,丝素蛋白具备优异的生物相容性,降解速率与组织再生的速率相匹配,丝素蛋白溶液的浓度越高,冻干后得到的网状固体密度越大。若丝素蛋白溶液的浓度高于15wt%,则取得的网状固体比表面积低,若丝素蛋白溶液的浓度低于10wt%,则取得的网状固体支撑性差。

[0103] 需要说明的是,蚕丝丝素蛋白是由蚕后部绢丝腺的内皮细胞分泌的高纯度蛋白质,不含细胞器和其他生物杂质,生物安全性高。蚕丝丝素蛋白由乙氨酸、丙氨酸、丝氨酸等二十种氨基酸组成,生物相容性好,可被生物降解且最终降解产物为多肽和游离氨基酸容易被机体代谢。研究显示,丝素蛋白材料也能够很好地支持神经元和神经干细胞的生长。丝素蛋白制备的导管材料,体内炎症反应低、可降解,能够促进周围神经缺损的功能性恢复。

[0104] 在本发明的一些实施例中,丝素蛋白的制备方法包括:

[0105] 将桑蚕丝放入100℃的0.02mol/L Na_2CO_3 溶液中煮两次,每次30min,先用自来水后

用蒸馏水洗涤数次彻底除去丝胶蛋白,晾干后备用。将脱胶蚕丝溶于9.3mol/L的LiBr溶液中,在60℃下溶解4h,经过透析3d(截留分子量为12000-14000),得到浓度约为8%的丝素溶液,12000rpm离心15min,低浓度PEG溶液浓缩一定时间,得到高浓度丝素溶液,12000rpm离心15min,离心并用干燥恒重法测量其浓度。置于4℃冰箱保存备用。

[0106] 在本发明的一些实施例中,生物蛋白溶液为0.8~1.4wt%浓度的胶原凝胶。

[0107] 在本实施例中,胶原具备优异的生物相容性,降解速率与组织再生的速率相匹配,胶原凝胶的浓度越高,冻干后得到的网状固体密度越大。若胶原凝胶的浓度高于1.4wt%,则取得的网状固体比表面积低,若胶原凝胶的浓度低于10wt%,则取得的网状固体支撑性差。

[0108] 在本发明的一些实施例中,胶原凝胶的制备方法包括:

[0109] (1) 剔除牛跟腱上多余的筋膜、脂肪、肌肉等,用自来水冲洗干净,整齐的排放在冷冻盒中,进行冷冻,-20℃,至少冷冻12h;

[0110] (2) 将冷冻的牛跟腱切成1mm左右的薄片,置于滤网中进行翻洗至液体澄清;

[0111] (3) 酶解:将清洗干净的牛跟腱薄片进行酶解,充分搅拌,酶解时间不少于72h;其中酶解液与牛跟腱的质量比为130:1,酶解液中纯化水与乙酸的体积比为25:1,纯化水与胃蛋白酶的质量比为15:1。

[0112] (4) 盐析:将酶解后的溶液离心,取其上清液,将上清液加入到氯化钠溶液中,析出白色絮状胶原蛋白,过滤清洗后沥干水分。

[0113] (5) 透析:将盐析后的材料灌入透析袋中,灌入体积为透析袋的1/3左右;将透析袋置于0.057mol/L的乙酸溶液中透析液中6天,偷袭温度10-20℃,每3天更换一次透析液;再将透析袋置于0.00057mol/L的乙酸溶液中透析5天,透析温度为10-20℃,每1天更换一次透析液;从第12天开始置于0.0000057mol/L的乙酸溶液中透析至PH为5.0-5.5之间,透析温度为10-20℃,根据需要可每天换一次透析液。

[0114] (6) 取出胶原凝胶,测试固含量。

[0115] 在本发明的一些实施例中,对固液混合物进行冻干处理并去除石蜡网络,包括:

[0116] 对固液混合物进行冻干处理,得到冻干管体;

[0117] 将冻干管体在90wt%浓度的甲醇中浸泡2小时;

[0118] 用正己烷将冻干管体中的石蜡网络清洗掉。

[0119] 在本实施例中,将冻干管体在90wt%浓度的甲醇中浸泡2小时能够使丝素蛋白定型,增加制得的网状固体的支撑性。此外,清洗掉石蜡网络的方法可以是索氏提取法,具体地,先用正己烷将支架内部的石蜡网络洗掉,然后用环己烷置换掉正己烷,再通过抽真空除去环己烷。

[0120] 在本发明的一些实施例中,冻干处理包括预冻阶段、第一升华阶段、第二升华阶段和降温阶段,各个阶段的工艺条件如下:

[0121] 预冻阶段:目标温度为-12~-8℃,速率为3~4.0℃/min,恒温时长为280~320min;

[0122] 第一升华阶段:抽真空,掺气90~110Pa,目标温度为-4~-2℃,速率为0.6~0.8℃/min,恒温时长为1300~1340min;

[0123] 第二升华阶段,抽真空,掺气90~110Pa,包括五个升温阶梯,分别为:

- [0124] -1~1℃,速率为0.2~0.3℃/min,恒温时长为110~130min;
- [0125] 8~12℃,速率为1.0~1.2℃/min,恒温时长为110~130min;
- [0126] 18~22℃,速率为1.0~1.2℃/min,恒温时长为110~130min;
- [0127] 28~32℃,速率为1.0~1.2℃/min,恒温时长为110~130min;
- [0128] 38~42℃,速率为1.0~1.2℃/min,恒温时长:每隔10分钟进行终点判断,至终点判断合格为止;终点判断为 $\leq 0.9\text{Pa}/10\text{min}$;
- [0129] 降温阶段:降至室温,速率为1.4~1.6℃/min。
- [0130] 在本实施例中,预冷阶段还可以是在-20℃处理10~14h、-70℃下处理2~6h或在液氮中处理3~10min后,剩余步骤再按照上述工艺进行冷冻干燥。
- [0131] 在本发明的一些实施例中,对固液混合物进行冻干处理并去除石蜡网络,包括:
- [0132] 对固液混合物进行冻干处理,得到冻干管体;
- [0133] 对冻干管体进行交联处理;
- [0134] 用正己烷将冻干管体中的石蜡网络清洗掉。
- [0135] 在本实施例中,对冻干管体进行交联处理能够避免胶原遇水发生溶胀破坏网状固体的结构,增加制得的网状固体的稳定性。此外,清洗掉石蜡网络的方法可以是索氏提取法,具体地,先用正己烷将支架内部的石蜡网络洗掉,然后用环己烷置换掉正己烷,再通过抽真空除去环己烷。
- [0136] 在本发明的一些实施例中,交联处理的工艺包括:
- [0137] a. 配制交联剂溶液:用量筒量取一定体积的食用酒精,移于反应釜中,用移液枪移取一定体积的戊二醛溶液(戊二醛的质量分数为50%),按照食用酒精和戊二醛溶液体积比为100:0.05的比例配制戊二醛的酒精溶液;
- [0138] b. 将材料浸泡于上述交联液,反应釜搅拌速度为20-30r/min,以最上层材料能随搅拌而转动为宜,交联48h。(注意:交联时,材料吸附交联剂下沉后,若材料在搅拌桨以下,搅拌桨与材料不接触,降低搅拌速度,改为10r/min.若搅拌桨与材料接触,则关闭搅拌)。
- [0139] c. 水洗工序
- [0140] (1) 将交联后的材料从交联剂溶液中取出;
- [0141] (2) 离心机装载过滤袋,离心一次(5秒);离心机转速默认为3000r/min;
- [0142] (3) 用3%过氧化氢溶液浸泡 $42 \pm 1\text{h}$,浸泡比例为1:80,即3%过氧化氢溶液体积(ml) = 产品质量(g) $\times 80$,产品完全浸入过氧化氢液中。
- [0143] (4) 纯化水超声处理,时间设定为30min,超声后离心一次(5s);重复2次;
- [0144] (5) 食用酒精超声处理,时间设定为5min,食用酒精体积以浸没产品为原则。超声结束后,离心操作一次(5秒);
- [0145] d. 真空干燥
- [0146] 离心后的材料,装入真空干燥箱中真空干燥,真空度不高于-0.08Mpa,温度设定为50℃,干燥至少24小时。
- [0147] 在本发明的一些实施例中,在得到神经导管后,还包括:
- [0148] 将2~10wt%浓度的蛋黄卵磷脂溶液注入内层结构中;
- [0149] 对注入蛋黄卵磷脂溶液的神经导管进行真空干燥处理。
- [0150] 在本实施例中,蛋黄卵磷脂经消化释放出胆碱,胆碱与乙酰辅酶受胆碱乙酰转移

酶催化反应生成乙酰胆碱,乙酰胆碱是自主神经系统的节前与节后纤维之间所有突触、肌肉神经接头、所有副交感神经节后纤维和交感神经的节后纤维的化学传递质,其含量增加可促进大脑神经突触迅速增强,从而使大脑中神经细胞间信息传递速度加快,进而提高人的记忆力和学习能力。此外蛋黄卵磷脂还可治疗多种神经官能症。若蛋黄卵磷脂的质量份数少于2wt%,则修复神经的效果差,若蛋黄卵磷脂的质量份数多于10wt%,则会减少网状结构的孔隙率。

[0151] 需要说明的是,蛋黄卵磷脂溶液可以通过注射器注入到网状结构中。

[0152] 如图2所示,本发明还提供了另一种神经导管的制备方法,包括:

[0153] 步骤200,将模具包括的壳体1浸入浓度为15~30wt%的聚环氧乙烷溶液中;

[0154] 步骤202,将模具包括的柱体2浸入浓度为8~12wt%的聚环氧乙烷溶液中;

[0155] 步骤204,对浸入聚环氧乙烷溶液后的模具进行干燥处理;

[0156] 步骤206,将石蜡微球填充至模具的管状空间中;其中,模具包括内壁为柱状的壳体1和柱体2,柱体2设置于壳体1内部,柱体2与壳体1之间形成管状空间;

[0157] 步骤208,对石蜡微球进行加热处理,得到石蜡网络;

[0158] 步骤210,将容纳石蜡网络的模具浸入无水乙醇;

[0159] 步骤212,将石蜡网络从模具中取出;

[0160] 步骤214,清洗并烘干模具;

[0161] 步骤216,将模具浸入8~12wt%浓度的聚环氧乙烷溶液后取出;

[0162] 步骤218,将细胞外基质包裹在石蜡网络外部,得到外层结构;

[0163] 步骤220,向外层结构包裹的石蜡网络空间中注入生物蛋白溶液,得到固液混合物;

[0164] 步骤222,对固液混合物进行冻干处理,得到冻干管体;

[0165] 步骤224,将冻干管体在90wt%浓度的甲醇中浸泡2小时;

[0166] 步骤226,用正己烷将冻干管体中的石蜡网络清洗掉,在外层结构内部得到内层结构,以制得具有双层复合结构的神经导管;

[0167] 步骤228,将2~10wt%浓度的蛋黄卵磷脂溶液注入内层结构中;

[0168] 步骤230,对注入蛋黄卵磷脂溶液的神经导管进行真空干燥处理。

[0169] 如图3所示,本发明实施例还提供了又一种神经导管的制备方法,包括:

[0170] 步骤300,将模具包括的壳体1浸入浓度为15~30wt%的聚环氧乙烷溶液中;

[0171] 步骤302,将模具包括的柱体2浸入浓度为8~12wt%的聚环氧乙烷溶液中;

[0172] 步骤304,对浸入聚环氧乙烷溶液后的模具进行干燥处理;

[0173] 步骤306,将石蜡微球填充至模具的管状空间中;其中,模具包括内壁为柱状的壳体1和柱体2,柱体2设置于壳体1内部,柱体2与壳体1之间形成管状空间;

[0174] 步骤308,对石蜡微球进行加热处理,得到石蜡网络;

[0175] 步骤310,将容纳石蜡网络的模具浸入无水乙醇;

[0176] 步骤312,将石蜡网络从模具中取出;

[0177] 步骤314,清洗并烘干模具;

[0178] 步骤316,将模具浸入8~12wt%浓度的聚环氧乙烷溶液后取出;

[0179] 步骤318,将细胞外基质包裹在石蜡网络外部,得到外层结构;

- [0180] 步骤320,向外层结构包裹的石蜡网络空间中注入生物蛋白溶液,得到固液混合物;
- [0181] 步骤322,对固液混合物进行冻干处理,得到冻干管体;
- [0182] 步骤324,对冻干管体进行交联处理;
- [0183] 步骤326,用正己烷将冻干管体中的石蜡网络清洗掉,在所述外层结构内部得到内层结构,以制得具有双层复合结构的神经导管;
- [0184] 步骤328,将2~10wt%浓度的蛋黄卵磷脂溶液注入内层结构中;
- [0185] 步骤330,对注入蛋黄卵磷脂溶液的神经导管进行真空干燥处理。
- [0186] 为了更加清楚地说明本发明的技术方案及优点,下面通过几个实施例对一种神经导管的制备方法进行详细说明。
- [0187] 实施例1
- [0188] (1) 模具预处理
- [0189] 将模具包括的壳体和柱体分别浸入20wt%浓度和10wt%浓度的聚环氧乙烷(分子量2000)溶液中,取出后干燥;其中,溶剂为乙醇;
- [0190] (2) 制备石蜡网络
- [0191] 将石蜡微球填充至经过步骤(1)处理的模具中,轻轻震荡,于50℃下加热处理60min,以得到石蜡网络;
- [0192] (3) 包裹细胞外基质
- [0193] 将模具浸入乙醇,轻轻取出石蜡网络,将细胞外基质包裹在石蜡网络外,得到外层结构;
- [0194] (4) 制备神经导管
- [0195] 将模具清洗干燥,将外层结构及其包裹的石蜡网络置于模具中,注入浓度为13wt%的丝素蛋白溶液,冻干处理后得到冻干体,用90%浓度的甲醇浸泡2h,去除冻干体中的石蜡网络后得到神经导管;
- [0196] (5) 复合蛋黄卵磷脂
- [0197] 将6wt%浓度的蛋黄卵磷脂溶液注入内层结构中,使蛋黄卵磷脂溶液填充在神经导管内层的网状结构的空隙中,经过真空干燥后得到复合蛋黄卵磷脂的神经导管。
- [0198] 实施例2
- [0199] 实施例2与实施例1基本相同,不同之处在于:
- [0200] 在步骤(1)中,将模具包括的壳体和柱体分别浸入15wt%浓度和10wt%浓度的聚环氧乙烷(分子量2000)溶液中;
- [0201] 在步骤(2)中,于40℃下加热处理40min;
- [0202] 在步骤(4)中,注入浓度为10wt%的丝素蛋白溶液;
- [0203] 在步骤(5)中,将2wt%浓度的蛋黄卵磷脂溶液注入内层结构中。
- [0204] 实施例3
- [0205] 实施例3与实施例1基本相同,不同之处在于:
- [0206] 在步骤(1)中,将模具包括的壳体和柱体分别浸入30wt%浓度和12wt%浓度的聚环氧乙烷(分子量2000)溶液中;
- [0207] 在步骤(2)中,于60℃下加热处理100min;

- [0208] 在步骤(4)中,注入浓度为15wt%的丝素蛋白溶液;
- [0209] 在步骤(5)中,将10wt%浓度的蛋黄卵磷脂溶液注入内层结构中。
- [0210] 实施例4
- [0211] 实施例4与实施例1基本相同,不同之处在于:
- [0212] 在步骤(4)中,将模具清洗干燥,将外层结构及其包裹的石蜡网络置于模具中,注入浓度为1.2wt%的胶原凝胶,冻干处理后得到冻干体,对冻干体进行交联处理,去除冻干体中的石蜡网络后得到神经导管。
- [0213] 实施例5
- [0214] 实施例5与实施例2基本相同,不同之处在于:
- [0215] 在步骤(4)中,将模具清洗干燥,将外层结构及其包裹的石蜡网络置于模具中,注入浓度为0.8wt%的胶原凝胶,冻干处理后得到冻干体,对冻干体进行交联处理,去除冻干体中的石蜡网络后得到神经导管。
- [0216] 实施例6
- [0217] 实施例6与实施例3基本相同,不同之处在于:
- [0218] 在步骤(4)中,将模具清洗干燥,将外层结构及其包裹的石蜡网络置于模具中,注入浓度为1.4wt%的胶原凝胶,冻干处理后得到冻干体,对冻干体进行交联处理,去除冻干体中的石蜡网络后得到神经导管。
- [0219] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

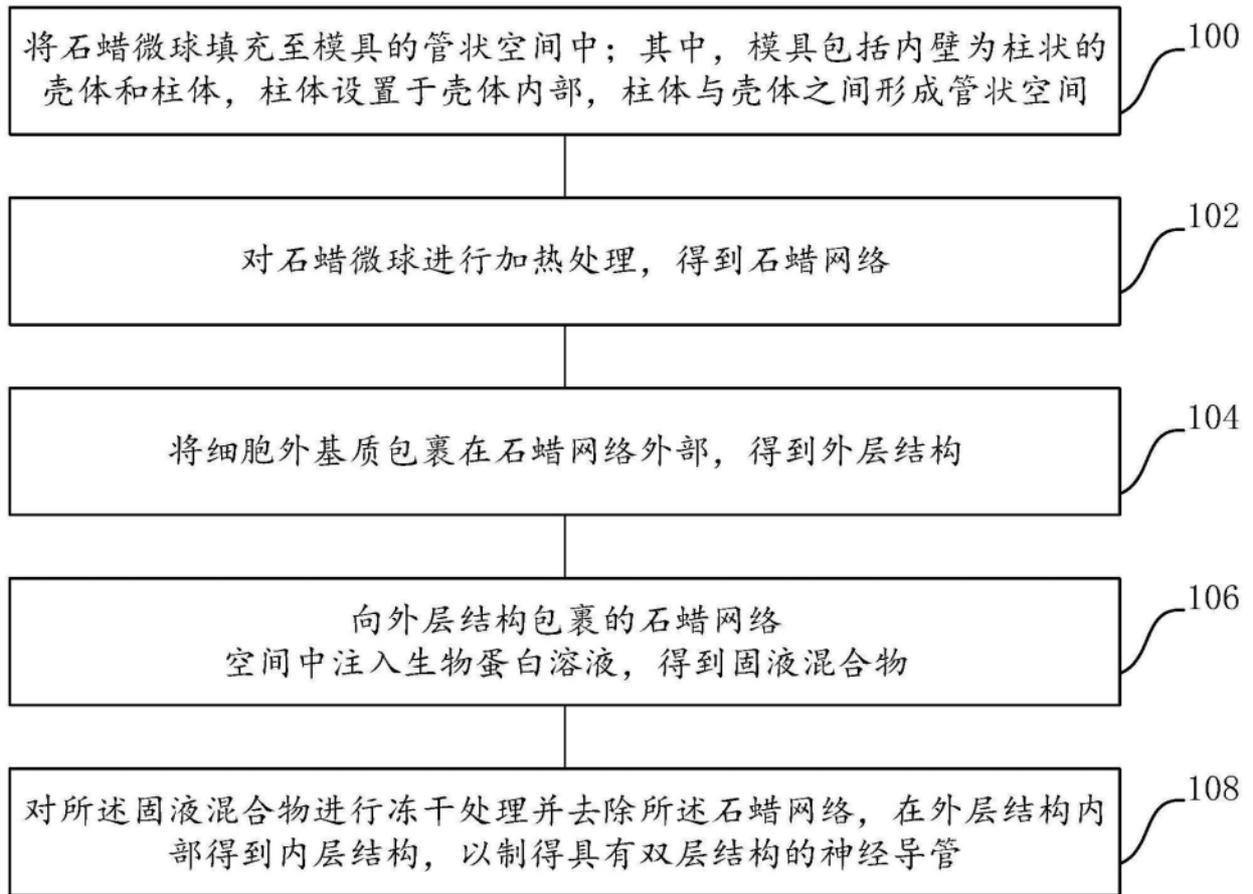


图1

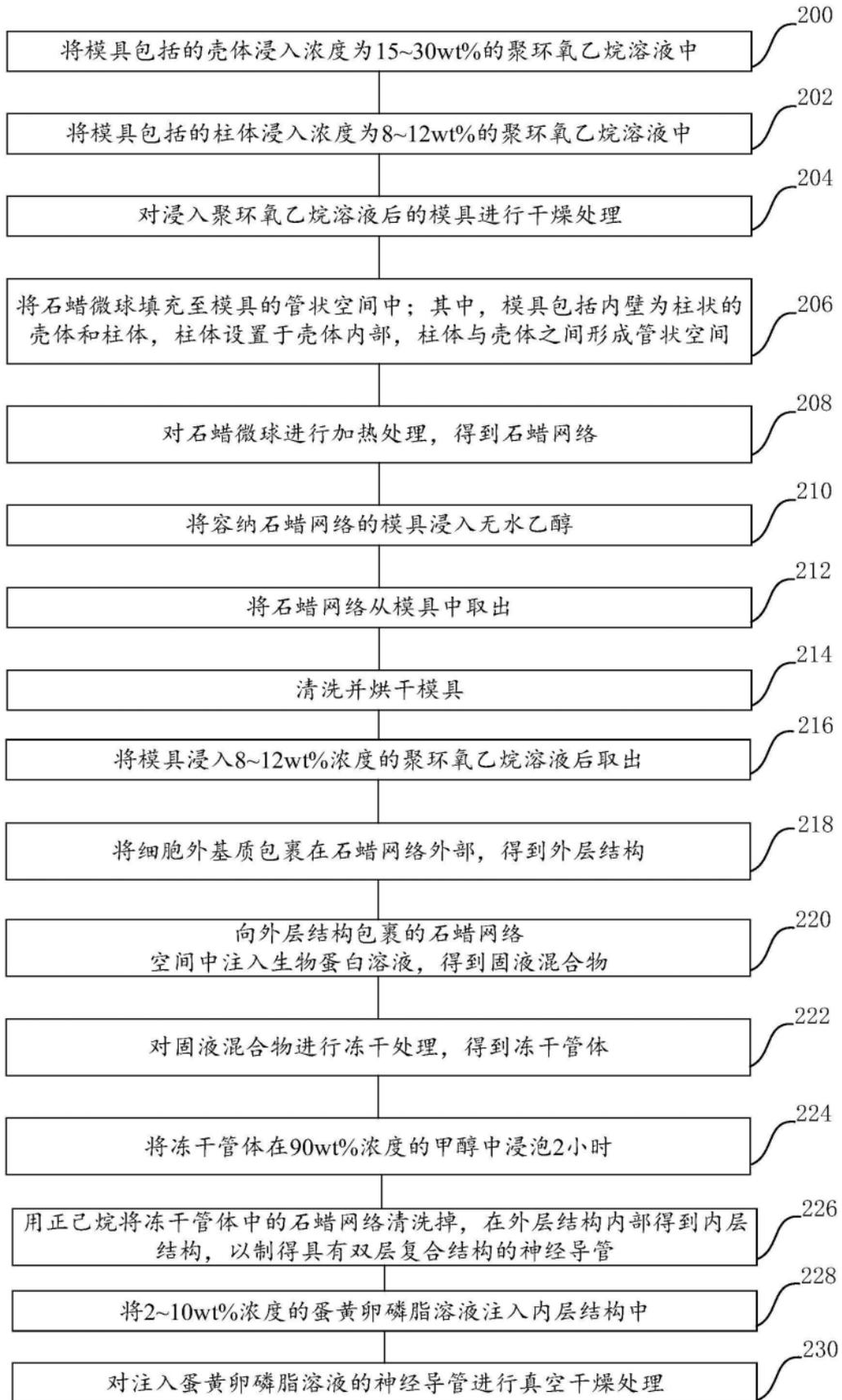


图2

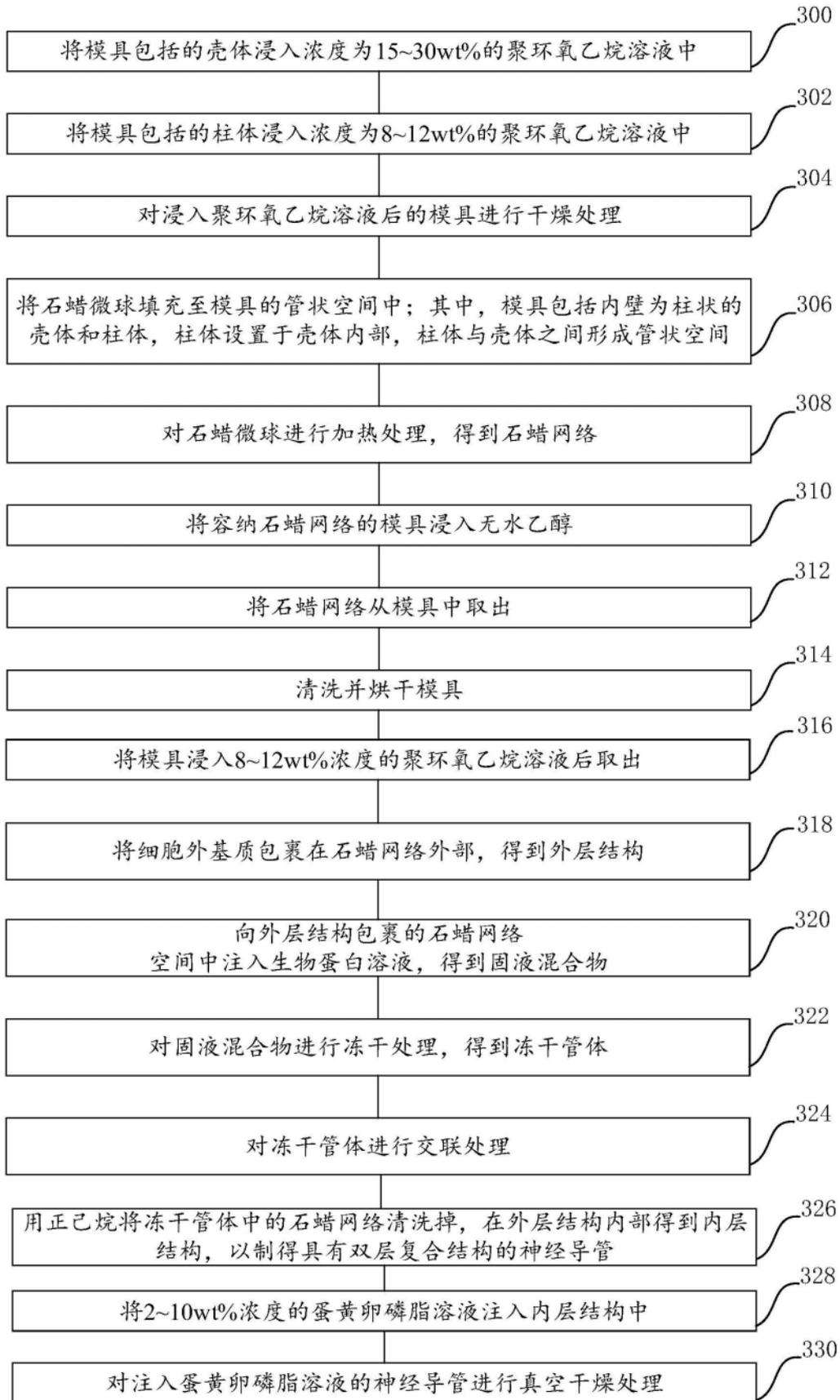


图3

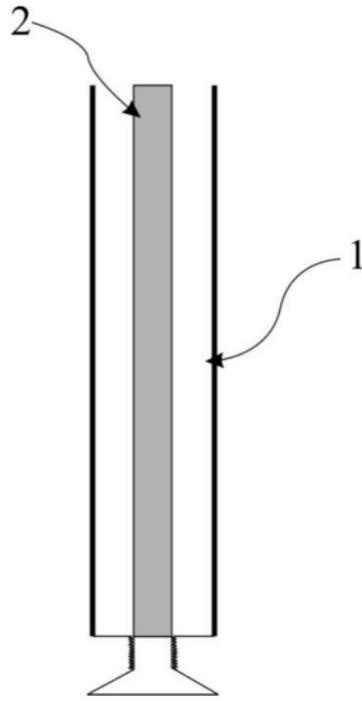


图4

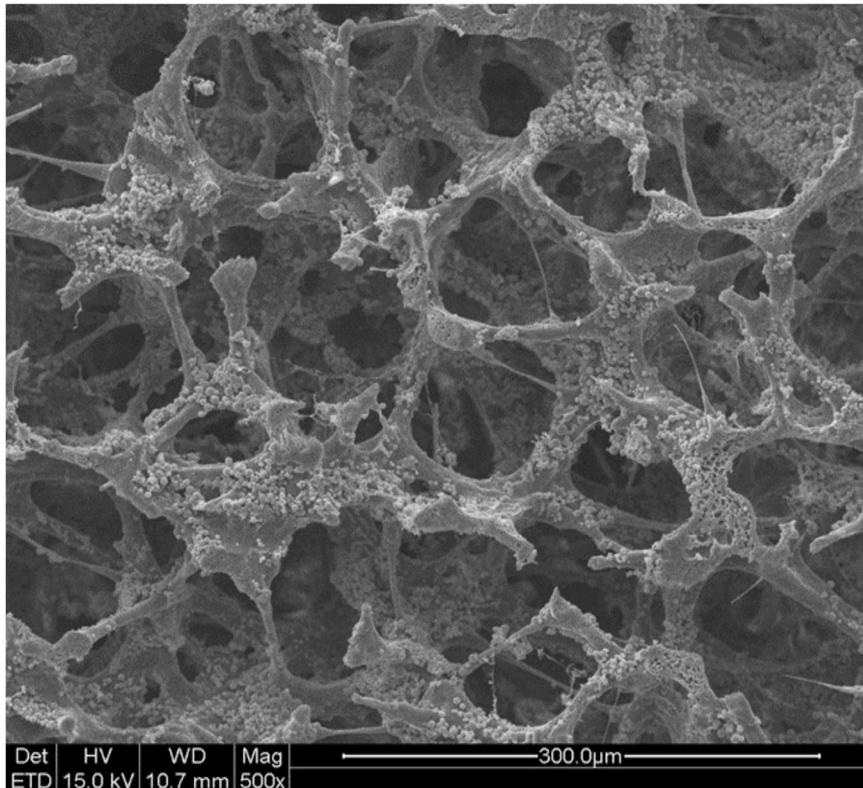


图5

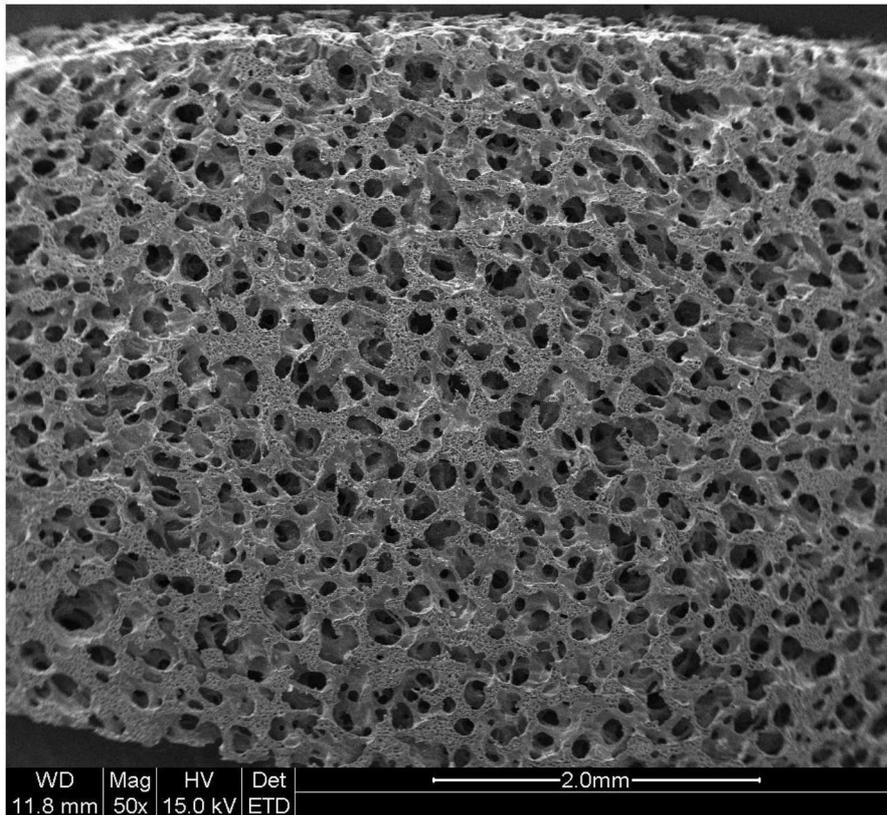


图6