



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104225677 B

(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201310231903.6

*C08J 3/075*(2006.01)

(22)申请日 2013.06.13

*C08J 3/24*(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

*C08L 5/08*(2006.01)

申请公布号 CN 104225677 A

*A61P 7/04*(2006.01)

*A61P 41/00*(2006.01)

(43)申请公布日 2014.12.24

(73)专利权人 山东省生物药物研究院

地址 250101 山东省济南市高新区新泺大街989号

(72)发明人 凌沛学 陈建英 陈倩倩 刘少英  
王勤

(56)对比文件

US 2011/0118206 A1,2011.05.19,

US 2011/0118206 A1,2011.05.19,

CN 101596328 A,2009.12.09,

郝星等.蚕丝蛋白/明胶多孔肝组织支架的制备及性能研究.《西安交通大学学报》.2011,第45卷(第11期),121-126.

(51)Int.Cl.

*A61L 27/20*(2006.01)

*A61L 27/54*(2006.01)

*A61K 31/728*(2006.01)

*C08J 9/28*(2006.01)

审查员 扈娟

权利要求书4页 说明书16页 附图3页

(54)发明名称

交联透明质酸细胞支架材料及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种交联透明质酸细胞支架材料及其制备方法和应用。本发明交联透明质酸支架材料由一组高分子透明质酸盐和一组低分子透明质酸盐经交联获得,参与交联的透明质酸双糖分子比例为0.5%~20%,在等渗溶液中的膨胀率80%~110%。本发明细胞支架材料的制备方法包括两次冷冻干燥步骤,第一次将混合了交联剂的透明质酸盐成型,加热反应后,加水溶胀为凝胶,再次冷冻干燥获得多孔支架材料。该支架具有丰富的孔隙、一定的机械强度和孔径大小、良好的吸水性和生物相容性,可作为组织工程细胞支架用于促进软骨损伤的修复,也可用作制备止血、防粘连的材料。

1. 一种交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于:
  - a)由一组高分子透明质酸盐和一组低分子透明质酸盐经交联获得;
  - b)支架材料中交联的透明质酸双糖摩尔比例为0.5%~20%;
  - c)在等渗的水溶液中的膨胀率按膨胀后与膨胀前材料的体积之比计算,范围在80%~110%。
2. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的细胞支架材料含有糖胺聚糖和/或生理活性物质。
3. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的透明质酸盐选自透明质酸钠、透明质酸钾、透明质酸钙、透明质酸镁、透明质酸锌、透明质酸铋、透明质酸铵和透明质酸四丁基铵中的一种、任意两种或两种以上的混合物。
4. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的透明质酸盐为透明质酸钠。
5. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐平均分子量范围在800~2500kDa。
6. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐平均分子量范围在1000~1800kDa。
7. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐平均分子量范围在1200~1500kDa。
8. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的低分子透明质酸盐平均分子量范围在100~750kDa。
9. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的低分子透明质酸盐平均分子量范围在150~500kDa。
10. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的低分子透明质酸盐平均分子量范围在200~400kDa。
11. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐的质量比例为1:9~9:1。
12. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐的质量比例为1:4~4:1。
13. 权利要求1所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐的质量比例为2:3~3:2。
14. 权利要求2所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的糖胺聚糖选自透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、壳聚糖、肝素和它们的盐中的一种、任意两种或两种以上的混合物。
15. 权利要求2所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的糖胺聚糖选自透明质酸钠、硫酸软骨素A钠和壳聚糖。
16. 权利要求2所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的糖胺聚糖为透明质酸钠。
17. 权利要求2所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的生理活性物质选自促进血液凝固的药物、抗菌药物和成软骨诱导因子中的一种、任意两种或两种以上的

混合物。

18. 权利要求17所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的促进血液凝固的药物选自凝血酶、纤维蛋白原、6-氨基己酸、氨甲苯酸、氨甲环酸、抑肽酶、二乙酰氨乙酸乙二胺、卡巴克洛、卡络磺钠和三七氨酸中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

19. 如权利要求17所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的抗菌药物选自青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、两性霉素、杆菌肽、制霉菌素、四环素、红霉素中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

20. 权利要求17所述的交联透明质酸细胞支架材料,其特征在于,所述的成软骨诱导因子选自转化生长因子 $\beta$ 、胰岛素样生长因子、骨形态发生蛋白、软骨源性发生蛋白、血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子和地塞米松中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

21. 一种交联透明质酸细胞支架材料的制备方法,其特征在于,按如下步骤操作:

- a) 将高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐混合溶解于碱性水溶液;
- b) 向a)步骤得到的溶液中加入交联剂,混合均匀;
- c) 将b)步骤得到的溶液倒入模具,冷冻干燥;
- d) 将c)步骤得到的干燥物置于25~55℃保温0.5~24小时;
- e) 将d)步骤得到的干燥物浸泡于水中,使溶胀为凝胶;
- f) 将e)步骤得到的凝胶冷冻干燥。

22. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的透明质酸盐选自透明质酸钠、透明质酸钾、透明质酸钙、透明质酸镁、透明质酸锌、透明质酸铋、透明质酸铵和透明质酸四丁基铵中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

23. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的透明质酸盐为透明质酸钠。

24. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐平均分子量范围在800~2500kDa。

25. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐平均分子量范围在1000~1800kDa。

26. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐平均分子量范围在1200~1500kDa。

27. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的低分子透明质酸盐平均分子量范围在100~750kDa。

28. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的低分子透明质酸盐平均分子量范围在150~500kDa。

29. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的低分子透明质酸盐平均分子量范围在200~400kDa。

30. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐的质量比例为1:9~9:1。

31. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐的质量比例为1:4~4:1。

32. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐的质量比例为2:3~3:2。

33. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的透明质酸盐在碱性水溶液中的浓度,以g/mL计,为1%~10%。

34. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的透明质酸盐在碱性水溶液中的浓度,以g/mL计,为2%~7%。

35. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的透明质酸盐在碱性水溶液中的浓度,以g/mL计,为4%~6%。

36. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的碱性水溶液选自氢氧化钠溶液、氢氧化钾溶液、碳酸钠溶液和碳酸氢钠溶液中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

37. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的碱性水溶液选自氢氧化钠溶液和碳酸钠溶液中的一种或它们的混合物。

38. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的碱性水溶液为氢氧化钠溶液。

39. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的交联剂选自乙二醇二缩水甘油醚、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、新戊二醇二缩水甘油醚、聚乙二醇二缩水甘油醚、聚丙二醇二缩水甘油醚、聚二甲基硅氧烷二缩水甘油醚或二乙烯基砜。

40. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的交联剂选自1,4-丁二醇二缩水甘油醚或聚乙二醇二缩水甘油醚。

41. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的交联剂为1,4-丁二醇二缩水甘油醚。

42. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,d)步骤所述的保温时间为2~12小时。

43. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,d)步骤所述的保温时间为4~8小时。

44. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,d)步骤中干燥物置于35~45℃保温。

45. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,e)步骤中的水选自去离子水、蒸馏水、纯化水和注射用水。

46. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,e)步骤中的水为注射用水。

47. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,e)步骤中的水的温度为40~90℃。

48. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,e)步骤中的水的温度为50~80℃。

49. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,e)步骤中的水的温度为60~75℃。

50. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,e)步骤中的干燥物浸泡于水中的时间为2~48小时。

51. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,e)步骤中的干燥物浸泡于水中的时间为4~24小时。

52. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,e)步骤中的干燥物浸泡于水中的时间为6~12小时。

53. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的冷冻干燥包括在0~-80℃预冻0.5~24小时的步骤。

54. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的冷冻干燥包括在-5~-60℃预冻1~12小时的步骤。

55. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,所述的冷冻干燥包括在-10~-40℃预冻2~4小时的步骤。

56. 权利要求21所述的制备方法,其特征在于,在e)步骤之后、f)步骤之前加入糖胺聚糖和/或生理活性物质。

57. 权利要求56所述的制备方法,其特征在于,所述的糖胺聚糖选自透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、壳聚糖、肝素和它们的盐中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

58. 权利要求56所述的制备方法,其特征在于,所述的糖胺聚糖选自透明质酸钠、硫酸软骨素A钠和壳聚糖中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

59. 权利要求56所述的制备方法,其特征在于,所述的糖胺聚糖为透明质酸钠。

60. 权利要求56所述的制备方法,其特征在于,所述的生理活性物质选自促进血液凝固的药物、抗菌药物和成软骨诱导因子中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

61. 权利要求60所述的制备方法,其特征在于,所述的促进血液凝固的药物选自凝血酶、纤维蛋白原、6-氨基己酸、氨甲苯酸、氨甲环酸、抑肽酶、二乙酰氨乙酸乙二胺、卡巴克洛、卡络磺钠和三七氨酸中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

62. 权利要求60所述的制备方法,其特征在于,所述的抗菌药物选自青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、两性霉素、杆菌肽、制霉菌素、四环素、红霉素中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

63. 权利要求60所述的制备方法,其特征在于,所述的成软骨诱导因子选自转化生长因子 $\beta$ 、胰岛素样生长因子、骨形态发生蛋白、软骨源性发生蛋白、血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子和地塞米松中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

64. 权利要求21所述的制备方法获得的交联透明质酸细胞支架材料。

65. 权利要求1和64任一所述的交联透明质酸细胞支架材料,用于制备软骨组织工程细胞载体用途的医疗产品。

66. 权利要求1和64任一所述的交联透明质酸细胞支架材料,用于制备治疗关节软骨损伤用途的医疗产品。

67. 权利要求1和64任一所述的交联透明质酸细胞支架材料,用于制备止血用途的医疗产品。

68. 权利要求1和64任一所述的交联透明质酸细胞支架材料,用于制备手术防粘连用途的医疗产品。

## 交联透明质酸细胞支架材料及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及一种交联透明质酸细胞支架材料以及它的制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 透明质酸(hyalouronic acid,简称HA)是由(1- $\beta$ -4)D-葡糖醛酸和(1- $\beta$ -3)N-乙酰基-D-氨基葡糖双糖单位重复连接组成的一种链状聚阴离子黏多糖,是构成皮肤、玻璃体、关节滑液和软骨组织的重要成分,具有独特的理化性质和生物学功能。目前商品透明质酸产品以其钠盐为主,来源于动物组织或微生物发酵,广泛应用于食品、日化和医药领域,由于纯度的不同,具有食品级、医用级和化妆品级等多种级别产品。经过长期的研究开发,高纯度的医用级透明质酸钠已被制成注射剂,应用于眼科手术、骨科手术、治疗骨关节炎及类风湿关节炎和预防术后粘连。

[0003] 关节软骨组织代谢活性低,损伤难以自身修复,最终可引起关节表面的退变。通过关节软骨成型术、微骨折、自体软骨移植等外科手术方法可暂时改善病人的临床症状,但由于存在供体来源不足、免疫排斥、生成软骨不佳、远期效果不好等问题,远不能满足临床应用的需要。利用组织工程方法修复软骨缺损,具有需要供体组织少、可根据要求塑形等优点,有望成为一种新的治疗模式。

[0004] 组织工程研究包括种子细胞、细胞支架和包括细胞生长因子在内的周围环境三个方面,其中细胞支架材料选择的成功与否是成败的关键环节,因而使其成为研究的热点。理想的软骨组织工程支架材料应具备良好的生物相容性、适宜的生物降解性、利于种子细胞的黏附和增殖、孔径和孔隙率适宜的三维多孔结构以及具有一定机械强度、易于塑形和固定于缺损部位等条件[何森,等.国际生物医学工程杂志,2007,30(4):247-251]。

[0005] HA是软骨基质组成成分之一,作为软骨细胞生长的基质,能促进软骨细胞代谢,并维持软骨细胞表型、促进软骨基质分泌,是构建复合软骨细胞支架的首选材料。但天然的HA具有良好的水溶性,容易分散、被肌体组织中存在的酶及自由基降解,局部存留的时间较短,不能维持支架材料所必须的机械性能。

[0006] 有众多的研究公开了采用HA与其他生物材料或合成材料复合制备用于骨或软骨再生的组织工程细胞支架,如胶原-生物玻璃-透明质酸复合组织工程支架(CN101601869)、透明质酸改性聚己内酯-聚乳酸三维多孔复合支架(CN101352582)、以及胶原-透明质酸、胶原-透明质酸-硫酸软骨素、聚乙烯醇-透明质酸-胶原和胶原-透明质酸-壳聚糖的复合三维支架[Yan J, et al. Biotechnol, 2006, 34(1): 27-39; 李沁华,等.暨南大学学报(自然科学版), 2009, 30(3): 319-325; 张其清,等.中国修复重建外科杂志, 2006, 20(2): 130-133; 黄长斌,等.中外医疗, 2009, 27: 8-9]。虽然其他材料与透明质酸复合后在一定程度加强了支架的机械性能,但也带来了一些问题,如来源于动物的胶原材料有致敏性,合成材料的加入可影响支架的生物相容性,聚乳酸类材料的降解产物偏酸性可导致局部的炎症反应等。

[0007] 经修饰或交联的HA克服了天然HA易分散、易降解的缺陷。酯化修饰的HA适用于制

备组织工程支架,Aigner等合成了透明质酸苄基酯,作为培养软骨细胞的支架[Aigner J, et al.J Biomed Mater Res,1998,42(2):172-181]。Fidia公司开发的HA酯化产品Hyalograft-C通过软骨组织工程重建了兔喉气管[Weidenbecher M,et al.Laryngoscope,2007,117(10):1745-1749],目前该产品已经应用于临床修复软骨缺损。

[0008] 交联使链状的HA形成整体大分子的网架结构,调节交联程度可获得适宜降解速度和适宜细胞生长的孔隙,也是一种较理想的组织工程细胞支架材料。

[0009] 交联的HA保留了HA良好的生物相容性和非免疫原性,其降解产物为小分子HA,无毒、不致炎,与内源性HA代谢途径一致。目前,以二乙烯基砒和1,4-丁二醇二缩水甘油醚为交联剂的两类交联HA产品已往临床广泛用于骨科关节炎治疗、手术防粘连、软组织修复和美容整形填充,在组织工程领域的应用还处于研究阶段。

[0010] 有报道公开了采用Genzym公司的二乙烯基砒交联HA产品Hylan可作为动脉平滑肌细胞的支架用于重建大鼠主动脉的心脏瓣膜,将分离培养的成纤维细胞加入Q-med公司的1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)交联HA产品Restylane可用于修复软组织缺损[RamamurthiA,et al.Biomaterials,2005,26(9):999-1010;Yoon E S,et al.Ann Plast Surg,2003,51(6):587-592.]。

[0011] 作为细胞支架的交联HA材料一般制备成三维多孔的膜片,CN102805880公开了将透明质酸盐溶液和1,4-丁二醇二缩水甘油醚混合后平铺干燥得到干燥膜片,然后再用水和PBS透析的一种组织工程支架材料的制备方法,该支架材料在使用时将它破碎为一定大小的凝胶颗粒,然后与非交联透明质酸溶液混合,再与细胞混合获得细胞-支架复合物。采用冷冻干燥技术可以获得交联HA的多孔海绵状材料,专利KR20000025222、JP11322807和CN102558600公开了HA与交联剂混合反应后经过冷冻干燥制备用于止血、防粘连或牙科的多孔材料。

[0012] 目前,采用交联透明质酸钠制备软骨组织工程细胞支架鲜有研究报道。除了应具有一定的机械强度之外,多孔材料的孔隙率、孔径大小和降解速度直接影响接种细胞的生长和细胞-支架复合物的形成,较大的孔隙率使细胞可以在支架材料中均匀分布,适宜的孔径和降解速度可保证细胞的营养交换和细胞外基质的形成和累积;此外,易于塑形和固定于缺损部位也是软骨组织工程细胞支架必备的条件。为了制备适用于软骨组织修复用的细胞支架材料,本发明选取不同分子量的透明质酸进行适度的交联,采用冷冻干燥技术制备得到了具有一定机械强度,易于固定和塑形,孔隙率较高,孔径大小和降解速度适宜的多孔细胞支架,通过试验证明,本发明细胞支架适于软骨细胞的附着、生长和表型维持,可用于修复软骨缺失;同时,本发明细胞支架具有良好的生物相容性,具有高吸水率、黏附力强,用于止血的效果好于现有产品;本品能迅速吸收伤口渗出液,往体内局部存留时间可达一周,用于手术防粘连的效果好于现有产品。

## 发明内容

[0013] 本发明的目的是提供一种交联透明质酸细胞支架材料及其制备方法,以及使用该方法制备得到的细胞支架材料在软骨组织缺损修复和止血、防粘连等医疗领域的应用。

[0014] 本发明交联透明质酸细胞支架材料,具有如下特征:

[0015] (1)由一组高分子透明质酸盐和一组低分子透明质酸盐经交联获得。

[0016] 本发明细胞支架采用的原料透明质酸盐可以是透明质酸的金属盐,如透明质酸钠、透明质酸钾、透明质酸钙、透明质酸镁、透明质酸锌、透明质酸铋,也可以是透明质酸的有机盐,如透明质酸铵和透明质酸四丁基铵,可以是上述这些盐的一种,如透明质酸钠,或者透明质酸钾,也可以任意两种或两种以上的混合物,例如透明质酸钠和透明质酸钾两种盐的混合物,或者透明质酸钠、透明质酸铵和透明质酸四丁基铵三种盐的混合物。优选采用目前商品化最广泛的一种透明质酸盐,即透明质酸钠。

[0017] 本发明细胞支架所采用的原料包括两组平均分子量不同的透明质酸盐。一组为高分子透明质酸盐,其平均分子量范围在800~2500kDa,优选1000~1800kDa,更优选1200~1500kDa;另一组为低分子透明质酸盐,其平均分子量范围在100~750kDa,优选150~500kDa,更优选200~400kDa。

[0018] 本发明细胞支架所采用的这两组平均分子量不同的透明质酸盐以重量计算(w/w),比例如下:高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐的比例在1:9~9:1的范围之内,优选比例在1:4~4:1的范围之内,更优选比例为2:3~3:2的范围之内。

[0019] 本发明细胞支架是采用上述两组透明质酸盐经化学交联获得的,交联剂选自具有双功能基团的化合物,可以是乙二醇二缩水甘油醚、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、新戊二醇二缩水甘油醚、聚乙二醇二缩水甘油醚、聚丙二醇二缩水甘油醚或聚二甲基硅氧烷二缩水甘油醚等环氧醚化合物中的一种,也可以是二乙烯基砜。优选其中的1,4-丁二醇二缩水甘油醚或聚乙二醇二缩水甘油醚,更优选1,4-丁二醇二缩水甘油醚。

[0020] (2) 支架材料中交联的透明质酸双糖比例0.5%~20%(mol/mol)。

[0021] 本发明细胞支架材料中参与交联的透明质酸双糖的比例,指被交联剂连接的透明质酸双糖占支架中所有透明质酸双糖的百分数,可以通过两种方法来计算。在交联剂投入量微小、发生完全反应的情况下,该比例可以通过投入的交联剂和透明质酸双糖的摩尔比来计算;在交联剂投入量相对较大、没有发生完全反应的情况下,即投入的交联剂有部分未连接到透明质酸大分子,而在随后的纯化过程中被除去,该比例的计算可以通过测定支架材料中交联剂残基和透明质酸双糖残基的摩尔比来计算。

[0022] 本发明通过调节交联剂的投入量,可以获得不同交联程度的支架材料,支架材料中交联的透明质酸双糖比例可以在0.5%~20%(mol/mol)范围之内。用作软骨修复组织工程细胞支架材料,该比例范围可以在1%~20%,其中比例范围在5%~10%更为合适。用作止血和防粘连材料,该比例范围可以在0.5%~15%,其中比例范围在0.5%~5%更为合适。

[0023] (3) 在等渗的水溶液中的膨胀率80%~110%。

[0024] 本发明细胞支架材料的膨胀率可以通过膨胀后与膨胀前材料的体积之比来计算,范围在80%~110%之间。所述等渗的水溶液可以是渗透压为250~350mOsmol/kg的氯化钠溶液、缓冲溶液或细胞培养液,例如0.9%的氯化钠溶液(生理盐水),含有0.3mmol/L磷酸二氢钠、1.6mmol/L磷酸氢二钠、146.5mmol/L氯化钠的磷酸盐缓冲溶液(PBS),含有牛血清的DMEM培养液。

[0025] 本发明交联透明质酸细胞支架材料,其特征还在于含有糖胺聚糖和/或生理活性物质。

[0026] 所述的糖胺聚糖选自透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、壳聚糖、肝素和它们的



盐中的一种、任意两种或两种以上的混合物,优选透明质酸钠、硫酸软骨素A钠和壳聚糖,更优选透明质酸钠。

[0027] 所述的生理活性物质选自促进血液凝固的药物、抗菌药物和成软骨诱导因子中的一种、任意两种或两种以上的混合物。其中,所述的促进血液凝固的药物选自凝血酶、纤维蛋白原、6-氨基己酸、氨甲苯酸、氨甲环酸、抑肽酶、二乙酰氨基乙酸乙二胺、卡巴克洛、卡络磺钠和三七氨酸中的一种、任意两种或两种以上的混合物;所述的抗菌药物选自青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、两性霉素、杆菌肽、制霉菌素、四环素、红霉素中的一种、任意两种或两种以上的混合物;所述的成软骨诱导因子选自转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、骨形态发生蛋白(BMP)、软骨源性发生蛋白(CDMP)、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)和地塞米松中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

[0028] 本发明交联透明质酸细胞支架材料的制备方法,按如下步骤操作:

[0029] a)将高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐混合溶解于碱性水溶液;

[0030] b)向a)溶液加入交联剂,混合均匀;

[0031] c)将b)溶液倒入模具,冷冻干燥;

[0032] d)将c)干燥物置于25~55℃保温0.5~24小时;

[0033] e)将d)干燥物浸泡于水中,使溶胀为凝胶;

[0034] f)将e)凝胶冷冻干燥;

[0035] 在步骤a)中,所述的透明质酸盐可以是透明质酸的金属盐,如透明质酸钠、透明质酸钾、透明质酸钙、透明质酸镁、透明质酸锌、透明质酸铋,也可以是透明质酸的有机盐,如透明质酸铵和透明质酸四丁基铵,可以是上述这些盐的一种,如透明质酸钠,或者透明质酸钾,也可以任意两种或两种以上的混合物,例如透明质酸钠和透明质酸钾两种盐的混合物,或者透明质酸钠、透明质酸铵和透明质酸四丁基铵三种盐的混合物。优选采用目前商品化最广泛的一种透明质酸盐,即透明质酸钠。

[0036] 在步骤a)中,所述的高分子透明质酸盐,其平均分子量范围在800~2500kDa,优选1000~1800kDa,更优选1200~1500kDa。

[0037] 在步骤a)中,所述的低分子透明质酸盐,其平均分子量范围在100~750kDa,优选150~500kDa,更优选200~400kDa。

[0038] 在步骤a)中,所述的透明质酸盐在碱性水溶液中的浓度,是指包括两组透明质酸盐(高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐)在内的、所有透明质酸盐的总和在碱性溶液中的浓度范围为1%~10%(w/v),优选2%~7%(w/v),更优选4%~6%(w/v)。

[0039] 在步骤a)中,所述的碱性水溶液选自氢氧化钠溶液、氢氧化钾溶液、碳酸钠溶液和碳酸氢钠溶液中的一种、任意两种或两种以上的混合物,优选氢氧化钠溶液和碳酸钠溶液中的一种或它们的混合物,更优选氢氧化钠溶液。例如,0.1%的氢氧化钠溶液,0.2%的氢氧化钾溶液,0.25%的碳酸钠溶液,0.03mol/L、pH10的氢氧化钠-碳酸钠缓冲溶液,或者0.05mol/L、pH9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。

[0040] 在步骤a)中,所述的高分子透明质酸盐和低分子透明质酸盐的比例在1:9~9:1的范围之内,优选比例在1:4~4:1的范围之内,更优选比例为2:3~3:2的范围之内。

[0041] 在步骤b)中,所述的交联剂可以是乙二醇二缩水甘油醚、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、新戊二醇二缩水甘油醚、聚乙二醇二缩水甘油醚、聚丙二醇二缩水甘油醚、聚二甲基硅

氧烷二缩水甘油醚或二乙烯基砜中的一种,优选1,4-丁二醇二缩水甘油醚或聚乙二醇二缩水甘油醚,更优选1,4-丁二醇二缩水甘油醚。

[0042] 在步骤c)中,所述的冷冻干燥包括在0~-80℃预冻0.5~24小时的步骤,优选在-5℃~-60℃预冻1~12小时,更优选在-10~-40℃预冻2~4小时。所述预冻,是指在真空干燥之前,透明质酸盐和交联剂的混和溶液在0~-80℃环境下冷冻,可以是在一个特定温度冷冻一定时间,也可以是变化温度条件分段冷冻,例如,在-45℃预冻4小时,或者在-80℃冷冻30分钟、然后-40℃冷冻2小时。

[0043] 在步骤d)中,将完成c)冷冻干燥步骤之后获得的干燥物放置在特定温度环境保温,使发生交联反应,所述的保温温度范围在25~55℃,优选35~45℃;所述的保温时间范围在0.5~24小时,优选2~12小时,更优选4~8小时。例如,在25℃保温24小时,或者在50℃保温40分钟;也可以是先于40℃保温3小时,然后再于25℃保温10小时。

[0044] 在步骤e)中,将完成d)保温步骤的干燥物浸泡于水中,使其吸水溶胀成为凝胶,所述的水可以采用去离子水、蒸馏水、纯化水或者注射用水,优选采用注射用水。

[0045] 在步骤e)中,所述的水的温度,即浸泡干燥物使其吸水溶胀成为凝胶的过程控制温度在40~90℃,优选50~80℃,更优选60~75℃。

[0046] 在步骤e)中,所述浸泡的时间为2~48小时,优选4~24小时,更优选6~12小时。

[0047] 在步骤f)中,所述的冷冻干燥包括在0~-80℃预冻0.5~24小时的步骤,优选在-5~-60℃预冻1~12小时,更优选在-10~-40℃预冻2~4小时。所述预冻,是指在真空干燥之前,透明质酸盐和交联剂的混和溶液在0~-80℃环境下冷冻,可以是在一个特定温度冷冻一定时间,也可以是变化温度条件分段冷冻,例如,在-35℃预冻2小时,或者在-70℃冷冻45分钟、然后在-5℃冷冻1小时,最后在-35℃冷冻2小时。

[0048] 本发明交联透明质酸细胞支架材料的制备方法,其特征还在于可以在f)步骤之前加入糖胺聚糖和/或生理活性物质。即在第二次冷冻干燥之前,将所需的糖胺聚糖和/或生理活性物质加入到凝胶中。加入的方法可以是将凝胶浸泡于含有糖胺聚糖和/或生理活性物质的溶液中,也可以是将凝胶干燥后再加入含有糖胺聚糖和/或生理活性物质的溶液。

[0049] 所述的糖胺聚糖选自透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、壳聚糖、肝素和它们的盐中的一种、任意两种或两种以上的混合物,优选透明质酸钠、硫酸软骨素A钠和壳聚糖,更优选透明质酸钠。

[0050] 所述的生理活性物质选自促进血液凝固的药物、抗菌药物和成软骨诱导因子中的一种、任意两种或两种以上的混合物。其中,所述的促进血液凝固的药物选自凝血酶、纤维蛋白原、6-氨基己酸、氨甲苯酸、氨甲环酸、抑肽酶、二乙酰氨乙酸乙二胺、卡巴克洛、卡络磺钠和三七氨酸中的一种、任意两种或两种以上的混合物;所述的抗菌药物选自青霉素、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、两性霉素、杆菌肽、制霉菌素、四环素、红霉素中的一种、任意两种或两种以上的混合物;所述的成软骨诱导因子选自转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、骨形态发生蛋白(BMP)、软骨源性发生蛋白(CDMP)、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)和地塞米松中的一种、任意两种或两种以上的混合物。

[0051] 采用本发明所公开的交联透明质酸细胞支架材料,以及采用本发明制备方法获得的交联透明质酸细胞支架材料,可以用于制备软骨组织工程细胞载体用途的医疗产品。例如,制备成软骨细胞支架,用作人或动物的软骨细胞在体外培养的载体,也可以用作人或动

物的干细胞在体外培养和诱导向软骨细胞分化的载体。

[0052] 采用本发明所公开的交联透明质酸细胞支架材料,以及采用本发明制备方法获得的交联透明质酸细胞支架材料,可以用于制备治疗关节软骨损伤用途的医疗产品。例如,可以制备成软骨组织替代物,覆盖在人或动物的软骨损伤部位,起到临时的保护作用,在微骨折技术治疗软骨损伤的手术中,可以覆盖于手术穿刺部位,吸收骨髓细胞,同时作为细胞支架将这些细胞固定在损伤位置,促进软骨组织的再生;也可以制备成细胞-支架复合物,将人或动物的软骨细胞或者干细胞接种在支架材料上,形成细胞-支架复合物,在体外培养一段时间或者直接移植到软骨损伤部位,促进软骨组织的再生。

[0053] 采用本发明所公开的交联透明质酸细胞支架材料,以及采用本发明制备方法获得的交联透明质酸细胞支架材料,可以用于制备止血用途的医疗产品。例如,可以制备成止血膜,用于局部创伤、烧伤和手术创面的止血。

[0054] 采用本发明所公开的交联透明质酸细胞支架材料,以及采用本发明制备方法获得的交联透明质酸细胞支架材料,可以用于制备手术防粘连用途的医疗产品。例如,可以制备成防粘连膜,用于外科手术中,覆盖在手术部位组织之间,起到隔离作用,预防粘连发生。

#### 附图说明

[0055] 图1光学显微镜下的支架表面结构(15×10,样品:左上1-1,右上1-3,左下1-5,右下1-7)

[0056] 图2光学显微镜下的支架内部结构(15×20,样品1-3,左:亮视场,右:暗视场)

[0057] 图3扫描电子显微镜下的支架结构(样品1-5,左:表面;右:内部)

[0058] 图4透明质酸酶水解支架材料的<sup>1</sup>H-NMR图谱(样品2-6)

[0059] 图5反转录PCR结果(左:Ba1b/3T3细胞;右:软骨细胞-支架复合体)

#### 具体实施方式

[0060] 以下实施例是为了更好地说明本发明,不是限制本发明。

[0061] 实施例1制备交联透明质酸钠细胞支架材料(第一组)

[0062] 按表1中的比例,分别取高分子透明质酸钠(SH,1350kDa)和低分子透明质酸钠(500kDa),加入适量0.2%的NaOH溶液,使透明质酸钠的浓度为5%,搅拌溶解,加入适量1,4-丁二醇二缩水甘油醚使其浓度为0.2%,搅拌均匀,倾倒入底面光滑无渗透性的模具中,按模具底面积的大小,倾倒量为0.2ml/cm<sup>2</sup>。将模具置于-70℃预冻1小时,然后放入冷冻干燥机中,-20℃预冻2小时,再抽真空进行干燥。干燥样品置40℃保温4小时,然后浸泡于70℃注射用水中溶胀5小时。将溶胀的凝胶置冷冻干燥机中,-35℃预冻3小时,再抽真空进行干燥,即得。

[0063] 所得样品按实施例7中描述的方法测定支架材料的厚度和孔径。结果显示,仅采用高分子量透明质酸钠制备的支架样品(1-7)孔径比较均匀,但厚度不均匀,且平均孔径较小,作为细胞支架材料不利于营养交换,影响种子细胞在支架内的生长和增殖;而仅采用低分子量透明质酸钠制备的支架样品(1-1)虽然厚度比较均匀、平均孔径比较大,但孔径大小不均匀,存在少量孔径500μm以上的大孔,支架容易碎裂。

[0064] 表1高分子和低分子透明质酸钠不同比例的支架厚度和孔径(n=10)

[0065]

样品编号	比例 (高/低)	厚度 (mm)	孔径 ( $\mu\text{m}$ )
1-1	0 : 10	1.77 $\pm$ 0.71	150 $\pm$ 50 (100~500)
1-2	1 : 9	2.21 $\pm$ 0.65	130 $\pm$ 45 (100~350)
1-3	1 : 4	2.59 $\pm$ 0.12	125 $\pm$ 25 (75~200)
1-4	1 : 1	3.47 $\pm$ 0.06	110 $\pm$ 30 (50~175)
1-5	4 : 1	4.49 $\pm$ 0.81	50 $\pm$ 25 (25~100)
1-6	9 : 1	4.54 $\pm$ 0.96	45 $\pm$ 20 (20~100)
1-7	10 : 0	4.68 $\pm$ 1.24	35 $\pm$ 15(5~100)

[0066] 实施例2制备交联透明质酸钠细胞支架材料(第二组)

[0067] 取高分子透明质酸钠(1680kDa)和低分子透明质酸钠(250kDa),按1:1(高分子:低分子)的比例混合,加入适量0.2%的NaOH溶液,使透明质酸钠的浓度为5%,搅拌溶解,加入适量1,4-丁二醇二缩水甘油醚使其浓度在0.0125%~0.5%(表2),搅拌均匀,倾倒入底面光滑无渗透性的模具中,按模具底面积的大小,倾倒量为0.2ml/cm<sup>2</sup>。将模具置于冷冻干燥机中,-40℃预冻2小时,再抽真空进行干燥。干燥样品置40℃保温4小时,然后浸泡于75℃注射用水中溶胀5小时。将溶胀的凝胶置于-50℃预冻1小时,然后放入冷冻干燥机中,-35℃预冻1小时,再抽真空进行干燥,即得。

[0068] 所得样品按实施例7中描述的方法测定支架材料的孔径和溶解性。结果显示,在高分子量透明质酸钠和低分子量透明质酸钠比例相同的情况下,交联剂投入量的变化对支架样品的孔径大小影响较小。交联剂的投入量增加可以延长支架材料在等渗溶液中的存留时间,在交联剂投入量达透明质酸钠摩尔数的5%以上时,支架样品在等渗溶液中的存留时间超过2周。

[0069] 表21,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)不同加入量支架材料的孔径和溶解性(n=10)

[0070]

样品编号	BDDE 浓度	BDDE : SH	孔径 ( $\mu\text{m}$ )	溶解性 (d)
------	---------	-----------	----------------------	---------

[0071]

	(g/ml)	(mol/mol)		
2-1	0.0125 %	0.5 %	110±20 (50~200)	2.5±1.6
2-2	0.025 %	1 %	125±25 (50~200)	4.0±1.8
2-3	0.05 %	2 %	120±20(50~200)	7.7±2.3
2-4	0.075 %	3 %	125±30 (50~200)	8.2±1.7
2-5	0.1 %	4 %	115±30 (50~200)	12.4±2.5
2-6	0.125 %	5 %	120±25 (50~200)	≥15
2-7	0.25 %	10%	115±20 (50~200)	>15
2-8	0.5 %	20%	120±25 (50~200)	>15

[0072] 实施例3制备交联透明质酸钠细胞支架材料(第三组)

[0073] 取高分子透明质酸钠(1860kDa)和低分子透明质酸钠(300kDa),二者按1:4(高分子:低分子)的比例混合,加入适量0.2%的NaOH溶液,使透明质酸钠的浓度在1%~10%(表3),搅拌溶解,加入适量1,4-丁二醇二缩水甘油醚使其与透明质酸钠的摩尔比达到10%,搅拌均匀,倾倒入底面光滑无渗透性的模具中,按模具底面积的大小,倾倒入量为0.2ml/cm<sup>2</sup>。将模具置于冷冻干燥机中,-35℃预冻4小时,再抽真空进行干燥。干燥样品置40℃保温3小时,然后再置25℃保温16小时,浸泡于65℃注射用水中溶胀8小时。将溶胀的凝胶置于-40℃预冻2小时,然后放入冷冻干燥机中,-25℃预冻1小时,再抽真空进行干燥,即得。

[0074] 所得样品按实施例7中描述的方法测定支架材料的孔隙率和溶解性。结果显示,支架材料的孔隙率随透明质酸钠的浓度增加而降低;支架材料的溶解性随透明质酸钠的浓度增加而延长。增加透明质酸钠的浓度可以延长支架材料在等渗溶液中的存留时间,在透明质酸钠的浓度达5%以上时,则支架样品在等渗溶液中的存留时间超过2周。

[0075] 表3不同浓度透明质酸钠(SH)制备的支架材料的孔隙率和溶解性(n=10)

[0076]

样品编号	SH 浓度	BDDE 浓度	孔隙率 (%)	溶解性 (d)
	(g/ml)	(g/ml)		
3-1	1 %	0.05 %	98.2±2.3	2.0±1.5
3-2	2.5 %	0.125 %	96.6±1.9	5.8±1.3
3-3	5 %	0.25 %	94.8±2.4	>15
3-4	7.5 %	0.375 %	90.4±2.1	>15
3-5	10 %	0.5 %	88.9±2.3	>15

[0077] 实施例4制备交联透明质酸钠细胞支架材料(第四组)

[0078] 取高分子透明质酸钠(1630kDa)和低分子透明质酸钠(250kDa),二者按1:1(高分子:低分子)的比例混合,按表4加入适量0.25%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液或0.1%的NaOH溶液,使透明质

酸钠的浓度为5%，搅拌溶解，加入不同量的交联剂二乙烯基砒(DVS)或聚乙二醇二缩水甘油醚( $M_n=500$ , PEGDE)，其余操作按实施例1描述的方法进行，即得。

[0079] 所得样品按实施例7中描述的方法测定支架材料的孔径和孔隙率。结果显示，交联剂投入量的增加对支架材料的孔径和孔隙率无显著影响。

[0080] 表4不同交联剂制备的支架的孔径和孔隙率( $n=10$ )

样品编号	碱溶液	交联剂/浓度 (g/ml)	孔径 ( $\mu\text{m}$ )	孔隙率 (%)
[0081] 4-1	0.25 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$	DVS / 0.015%	120±30 (50~200)	95.5±2.7
4-2	0.25 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$	DVS / 0.15%	110±25 (50~200)	94.1±2.3
4-3	0.1 % NaOH	PEGDE / 0.06%	150±20 (50~200)	96.2±2.0
4-4	0.1 % NaOH	PEGDE / 0.6%	135±20 (50~200)	93.7±1.8

[0082] 实施例5制备含有糖胺聚糖和/或生理活性物质的交联透明质酸钠细胞支架材料

[0083] 按1:4的比例分别取高分子透明质酸钠(平均分子量1450kDa)和低分子透明质酸钠(平均分子量350kDa)，加入适量0.1%的NaOH溶液，使透明质酸钠的浓度为5%，搅拌溶解，加入适量1,4-丁二醇二缩水甘油醚，在第二次冷冻干燥之前，将凝胶浸泡于不同溶液中(如表5中5-1~5-5)，或者将凝胶减压干燥至减失重量40%~60%后加入不同溶液(如表5中5-6~5-10)，或者将凝胶冷冻干燥后加入不同溶液(如表5中5-11~5-15)。其余操作按实施例1描述的方法进行，即得。

[0084] 表5不同的糖胺聚糖和/或生理活性物质的溶液及其浓度

[0085]

样品编号	溶液 (100 ml)
5-1	透明质酸钠 0.2 g
5-2	硫酸软骨素 A 钠 0.5 g
5-3	壳聚糖 0.3 g
5-4	肝素钠 500 单位
5-5	壳聚糖 0.1 g 和三七氨酸 0.5 g
5-6	透明质酸钠 0.1 g 和人纤维蛋白原 1 g
5-7	凝血酶 2000 单位
5-8	青霉素钠 1 万单位和硫酸链霉素 1 万单位
5-9	转化生长因子- $\beta_1$ 1 $\mu\text{g}$ 和胰岛素样生长因子 5 $\mu\text{g}$
5-10	转化生长因子- $\beta_1$ 1 $\mu\text{g}$ 和地塞米松磷酸钠 5 $\mu\text{g}$

[0086]

- 5-11 硫酸软骨素 A 钠 0.25 g 和骨形态发生蛋白-2 100  $\mu\text{g}$
- 5-12 转化生长因子- $\beta_1$  1  $\mu\text{g}$  和骨形态发生蛋白-2 10  $\mu\text{g}$
- 5-13 血管内皮生长因子 80  $\mu\text{g}$  和骨形态发生蛋白-2 20  $\mu\text{g}$
- 5-14 骨形态发生蛋白-7 20  $\mu\text{g}$  和血小板衍生生长因子-B 7.5  $\mu\text{g}$
- 5-15 软骨源性发生蛋白-2 10 $\mu\text{g}$  和转化生长因子- $\beta_1$  1  $\mu\text{g}$

[0087] 实施例6交联透明质酸钠细胞支架材料的微观结构

[0088] 将交联透明质酸钠细胞支架置光学显微镜下观察,支架表面呈蜂窝网状结构,用镊子将支架撕成薄片于镜下观察,支架内部结构呈互通的管状结构,见图1和图2。

[0089] 用薄刀片将交联透明质酸钠细胞支架切成0.5cm $\times$ 0.5cm的小片,加入蒸馏水,使支架充分伸展、膨胀,置冷冻干燥机中,-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冻1小时,抽真空进行干燥,将干燥后的样品喷金,置扫描电子显微镜下观察,支架的表面呈现多孔海绵状结构,内部呈现多孔的片层状、管网状结构,见图3。

[0090] 实施例7交联透明质酸钠细胞支架材料的理化性质测定

[0091] 试验一测定支架材料的厚度

[0092] 方法:将每片样品按“米”字分为8个小区,采用游标卡尺测定不同小区支架的厚度,计算平均值。

[0093] 结果:见表1。

[0094] 试验二测定支架材料的孔径

[0095] 方法:将每片样品按“井”字分为9个小区,采用光学显微镜在低倍镜视野观察并测量不同小区支架的孔径大小,计算平均值,并记录最大孔径和最小孔径。

[0096] 结果:见表1和表2。

[0097] 试验三测定支架材料的溶解性

[0098] 方法:将支架样品裁剪为1cm $\times$ 1cm的小片,加入10ml生理盐水,置37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴,以50~80次/分钟的频率振荡保温15天,观察并记录支架样品消失的时间。

[0099] 结果:见表2和表3。

[0100] 试验四测定支架材料的孔隙率

[0101] 方法:采用密度瓶法测定支架材料的孔隙率[Zhang R Y, et al. J Biomed Mater Res, 1999, 44: 446-455.]

[0102] 取25ml的密度瓶,加满乙醇,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,称重( $W_1$ )。将支架材料裁剪为0.5cm $\times$ 2cm的细长条,称重( $W_s$ )。将支架材料浸入25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温的乙醇中,脱气后移入密度瓶中,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,称重( $W_2$ )。将浸满乙醇的支架材料取出,剩余乙醇和密度瓶称重( $W_3$ )。孔隙率(P)按如下公式计算:

[0103] 
$$P = (W_2 - W_3 - W_s) / (W_1 - W_3) \times 100\%$$

[0104] 结果:见表3和表4。

[0105] 试验五测定支架材料的膨胀率

[0106] 方法:将支架样品裁剪为3cm $\times$ 2cm的小片,加入50ml生理盐水,置37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴2

小时,采用游标卡尺测定样品的长(L/cm)和宽(W/cm),按下式计算材料的膨胀率(S)。

$$[0107] \quad S=L \times W/6 \times 100\%$$

[0108] 结果:见表6。

[0109] 表6交联透明质酸钠支架材料的膨胀率(n=10)

[0110]

样品	膨胀率(%)	样品	膨胀率(%)
1-3	98.1±3.5	3-1	105.6±3.9
1-4	96.7±4.1	3-3	102.4±2.5
1-5	94.9±5.7	3-5	95.7±4.0
2-2	102.5±2.3	4-2	88.3±5.6
2-5	100.3±2.8	4-4	92.6±4.4
2-7	98.8±3.6	5-1	98.4±4.3

[0111] 试验六测定支架材料的吸水率

[0112] 方法:将支架样品裁剪为1cm×1cm的小片,称重(W<sub>1</sub>),用平板以5N的压力将支架压为薄片,加入37℃的生理盐水10ml,5分钟以内将支架用镊子取出,吸水纸吸干支架表面水分,再次称重(W<sub>2</sub>),吸水率(A)的意义是每1g支架材料在特定时间内可以吸收水分的克数,以支架吸收水分的重量与支架本身重量的比值[(W<sub>2</sub>-W<sub>1</sub>)/W<sub>1</sub>]表示。

[0113] 结果:见表7。

[0114] 表7交联透明质酸钠支架材料的吸水率(n=10)

[0115]

样品	吸水率	样品	吸水率
1-3	64.8±2.4	3-1	78.7±2.5
1-4	58.6±2.0	3-3	62.3±2.0
1-5	52.9±2.8	3-5	51.9±3.2
2-2	50.5±1.9	4-2	53.8±3.5
2-5	51.4±2.6	4-4	55.2±3.6
2-7	49.4±3.0	5-1	63.4±2.7

[0116] 试验七支架中交联的透明质酸双糖比例(CHA/HA)

[0117] 方法一:以投入的交联剂的摩尔数(M<sub>1</sub>)和透明质酸钠的摩尔数(M<sub>2</sub>),按下式计算CHA/HA(mol/mol):

$$[0118] \quad \text{CHA/HA}(\%) = 2M_1/M_2 \times 100\%$$

[0119] 方法二:将支架裁剪为2.5mm×2.5mm的小片,加入适量透明质酸酶,于37℃水解至支架完全溶解,沸水浴30分钟,1000r/min离心15分钟,取上清液冷冻干燥,进行<sup>1</sup>H-NMR图谱分析,透明质酸双糖残基的甲基氢出现在2.1ppm附近,交联剂残基的亚甲基氢出现在1.7ppm附近(图4),以亚甲基(S<sub>1</sub>)和甲基(S<sub>2</sub>)的峰面积比例计算以1,4-丁二醇二缩水甘油醚为交联剂制备的支架材料CHA/HA(mol/mol):



[0120]  $CHA/HA(\%) = 3S_1/4S_2 \times 100\%$

[0121] 结果:见图4和表8。

[0122] 表8不同样品支架中交联的透明质酸双糖比例(CH A/HA)

[0123]

样品编号	交联剂投入量		CHA/HA (%)	
	(mol/mol)		方法一	方法二 (n=3)
2-1		0.5 %	1	0.97±0.16
2-2		1 %	2	1.95±0.24
2-3	BDDE/SH	2 %	4	3.98±0.32
2-6		5 %	--	6.25±0.29
2-7		10 %	--	7.26±0.51
2-8		20 %	--	15.25±0.79
4-1	DVS/SH	1 %	2	--
4-3	DVS/SH	1 %	2	--

[0124] 试验七测定支架材料的机械强度

[0125] 方法:将支架样品裁剪为长3cm×3cm的小片,采用旋转流变仪加载样品程序,夹具选用直径2cm的不锈钢平板,以0.01mm/s的速度加压,收集压缩至样品25%厚度的位移值和应力值,以位移作为X轴,应力作为Y轴,绘制曲线并作一次方程回归,以斜率(b)计算支架的压缩模量 $E_1$ (MPa/mm)。

[0126]  $E_1 = b/3.14 \times 10^{-2}$

[0127] 将支架样品裁剪为长2cm×2cm的小片,加入10ml生理盐水,置37℃恒温水浴30分钟。采用旋转流变仪加载样品程序,夹具选用直径4cm的刻槽不锈钢平板,以0.01mm/s的速度加压,收集压缩至样品25%厚度的位移值和应力值,以位移作为X轴,应力作为Y轴,绘制曲线并作一次方程回归,以斜率(b)计算支架在等渗溶液中的表观压缩模量 $E_2$ (MPa/mm)。

[0128]  $E_2 = b/4 \times 10^{-2}$

[0129] 结果:见表9。

[0130] 表9交联透明质酸钠支架的压缩模量/( $\times 10^{-4}$ MPa/mm)

[0131]

样品	$E_1 (n=3)$	$E_2 (n=3)$
1-3	68.31±5.02	16.78±2.26
1-4	82.86±4.73	13.42±2.10
1-5	76.44±5.11	12.88±2.00
2-6	80.85±4.24	12.35±1.87
3-3	65.74±4.17	15.81±2.03
5-1	67.82±3.87	16.11±2.05

[0132] 试验八测定支架材料的交联剂残留

[0133] 方法:气相色谱法

[0134] 将支架样品裁剪为0.2cm×0.2cm的小片,称定重量,加适量无水乙醇,超声并振摇10分钟,用0.22μm滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。取交联剂对照品适量,精密称定,加无水乙醇制成每1ml中含0.2μg的溶液,作为对照品溶液。按照《中国药典》(2010年版)二部附录VIII P中规定的方法进行试验,分别精密量取供试品溶液和对照品溶液1μl,注入气相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算交联剂的含量。

[0135] 结果:见表10。

[0136] 表10交联透明质酸钠支架的交联剂残留

[0137]

样品	交联剂	残留量 (ppm)
1-3	BDDE	<2.0
1-5	BDDE	<2.0
1-7	BDDE	<2.0
2-6	BDDE	<2.0
2-7	BDDE	<2.0
4-2	DVS	<2.0
4-4	PEGDE	<2.0

[0138] 实施例8交联透明质酸钠细胞支架材料的细胞毒性

[0139] 方法:MTT法

[0140] 将支架样品裁剪为0.2cm×0.2cm的小片,按每1mg加入1ml细胞培养液,于37+2℃浸提24小时,取浸提液作为供试液。按照GB/T16886.5医疗器械生物学评价中第5部分:体外细胞毒性试验,供试液接触培养细胞48小时,测定细胞相对增值率并判断细胞毒性反应程度。

[0141] 结果:见表11。

[0142] 表11交联透明质酸钠支架的细胞毒性试验结果

	样品	细胞毒性反应
	1-3	0级
[0143]	2-6	<1级
	3-3	0级
	5-1	≤1级

[0144] 实施例9交联透明质酸钠细胞支架材料的体外抗酶降解性

[0145] 方法:将支架样品裁剪为0.2cm×0.2cm的小片,称取5mg,每个样品2份,加入5mlPBS,测试组加入玻璃酸酶240Eu,对照组加入与酶液相同体积的PBS,置37℃恒温水浴2小时,100℃加热30分钟,离心取上清液1ml作10倍稀释,按糖醛酸的含量测定方法(Bitter T, et al. A modified uronic acid carbarbazole reation. Anal Biochem, 1962, 4: 330-333.)显色,在530nm处测定对照样品的吸光度 $A_1$ 和测试样品的吸光度 $A_2$ ,以 $\Delta A = A_2 - A_1$ 表示酶降解量,以样品1-1的酶降解量为100%、抗酶系数为1,与其它样品的酶降解量的比值即为其它样品的抗酶系数

[0146] 结果:见表12。

[0147] 表12交联透明质酸钠支架的体外抗酶降解性(n=5)

	样品	抗酶系数
	1-1	1
	1-3	7.57±0.29
	1-4	13.05±0.54
[0148]	1-5	11.31±1.00
	1-7	11.78±0.78
	2-6	8.13±0.34
	3-3	7.81±0.26

[0149] 实施例10交联透明质酸钠细胞支架材料用于止血的动物试验

[0150] 试验动物:2.5~3kg新西兰大白兔,雌雄不限,随机分组。

[0151] 试验方法:备皮、麻醉后,常规备皮、消毒后开腹,暴露脾脏和肝脏,在脾脏表面用手术刀片作一个1cm长、0.2cm深的切口,在肝表面用手术刀片切除1cm×0.5cm大小的组织,在出血创面分别放置2cm×2cm的支架材料、纱布和明胶海绵,用100g的砝码压在支架材料上,记录止血时间。支架材料和明胶海绵留在肝脏创面上,关闭腹腔,定期观察其吸收降解情况并进行病理检测。

[0152] 结果:不同材料的止血时间结果见表13,体内吸收降解试验尚在进行中。

[0153] 表13不同材料的止血时间/s(n=5)

	材料	肝脏	脾脏
	本发明支架样品 1-6	47±2	31±3
[0154]	本发明支架样品 5-7	25±3	15±2
	明胶海绵	81±4	41±5
	纱布	>120	>120

[0155] 结果显示,本发明支架材料可显著缩短创面的止血时间,止血效果明显好于手术常用止血辅料产品纱布和明胶海绵。

[0156] 实施例11交联透明质酸钠细胞支架材料用于预防术后粘连的动物试验

[0157] 试验动物:200~250g SD大鼠,雌雄不限,随机分组。

[0158] 试验方法:参考文献方法[王德娟,等.中山大学学报(医学科学版),2008,29(3):287-293.]制备大鼠腹腔粘连模型,试验组将支架材料裁剪为3.5cm×3.5cm的小片,放置在刮伤盲肠与缺损腹壁之间,对照组分别用生理盐水或者医用透明质酸钠凝胶(HA凝胶)涂布,术后7天处死大鼠,切开腹腔,观察腹膜粘连情况,参照文献方法[Phillips R K, et al.Br J Surg,1984,71(7):537-539.]评分。

[0159] 结果:见表14。

[0160] 表14交联透明质酸钠支架材料防粘连实验结果

[0161]

组别	样品	n	粘连分级				
			0	I	II	III	IV
试验组 I	本发明 2-4	8	5	3	-	-	-
试验组 II	本发明 3-2	9	5	3	I	-	-
模型组	NS	8	-	-	1	2	5
阳性对照	HA 凝胶	10	2	4	3	1	-

[0162] 结果表明,本发明支架材料可以减少术后粘连的发生和显著减轻粘连的程度,防粘连效果好于市售防粘连产品医用透明质酸钠凝胶。

[0163] 实施例12交联透明质酸钠细胞支架材料用于构建体外组织工程软骨

[0164] 种子细胞:来源于4周龄新西兰大白兔的膝关节软骨细胞。参考文献方法[田丰,等.中国组织工程研究与临床康复,2011,15(20):3633-3635.]进行分离、纯化和鉴定。

[0165] 方法:将灭菌后的支架材料(本发明支架样品5-1)裁剪为1cm×0.5cm的小片,置细胞培养皿中。收集体外培养传代3次的软骨细胞,重悬于胎牛血清中,调整浓度至 $6 \times 10^7$  cell/ml。将200 $\mu$ L细胞悬液滴加于支架材料上,37℃培养180分钟,使细胞贴附于支架材料之后,加入10ml含有20%胎牛血清的DMEM/F12培养基,每天换液,正常培养21d,形成软骨细胞-支架复合体。

[0166] 以支架材料为对照,按常规方法制备冰冻切片,显微镜下观察细胞的贴附和生长情况;4%多聚甲醛固定2小时,采用免疫组化的方法[ShahinK, et al.PLoS One,2011,6

(8):e23119.],检测复合体中软骨组织特异性蛋白II型胶原的表达。

[0167] 以阴性对照Balb/3T3细胞作为阴性对照,参考文献方法[Dragoo J L,et al.J Bone Joint Surg Br,2003,85(5):740-747.]提取总RNA,反转录PCR,检测软骨组织特异性基因aggrecan与前II型胶原基因的转录。

[0168] 结果:冰冻切片显微图像显示,种子细胞能够帖附在支架材料上生长,在支架材料空隙中,有大量软骨细胞增殖聚集形成球状,在支架材料内部的空隙腔管表面有单层细胞附着生长。

[0169] 免疫组化检测结果显示,体外培养的软骨细胞一支架复合体中有大量II型胶原蛋白,说明本发明支架材料能够维持软骨组织特异性蛋白的表达,可推测软骨细胞在本支架材料中可维持其表型。

[0170] aggrecan基因与前II型胶原基因的反转录PCR结果见图5。结果显示,阴性对照的细胞内可检测到内参基因gapdh的转录,软骨组织特异基因aggrecan与前II型胶原基因不转录。软骨细胞-支架复合体中,软骨组织特异性基因aggrecan与前II型胶原基因能够维持转录,说明本发明支架材料可维持软骨细胞的表型。

[0171] 以上结果表明,本发明支架材料有利于软骨细胞的黏附、生长和增殖,软骨细胞与本发明支架材料复合后,可以维持其表型并分泌特异性细胞外基质成分——II型胶原,本发明支架材料可用于体外构建组织工程软骨。

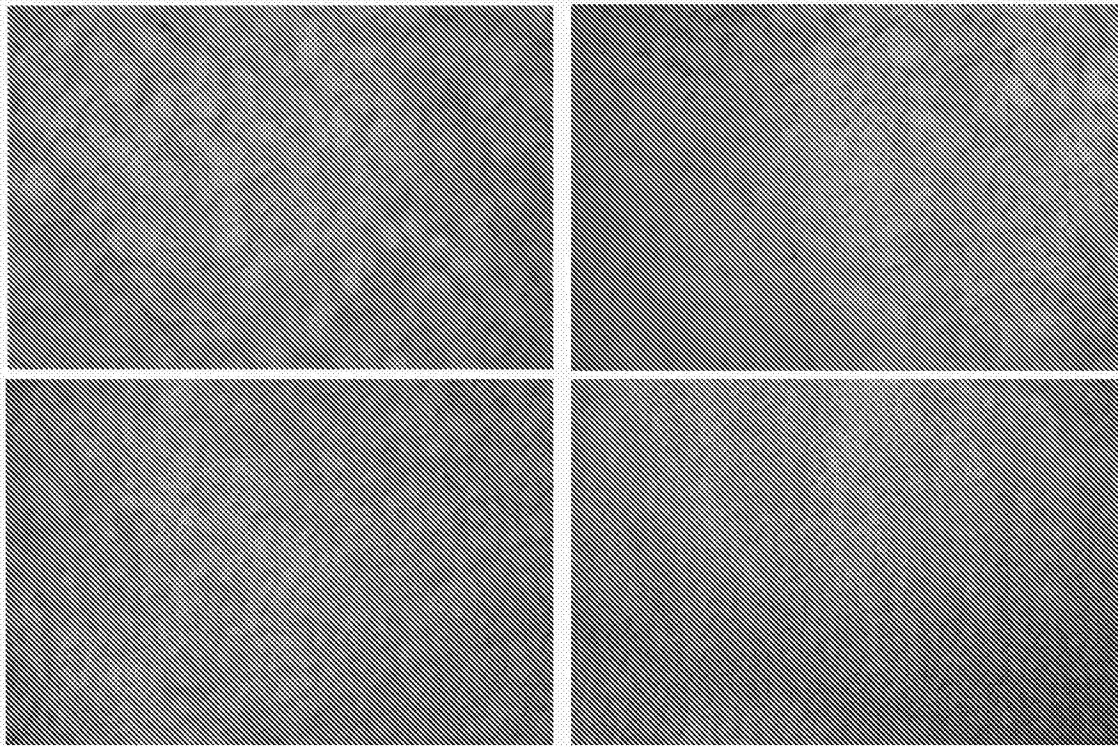


图1

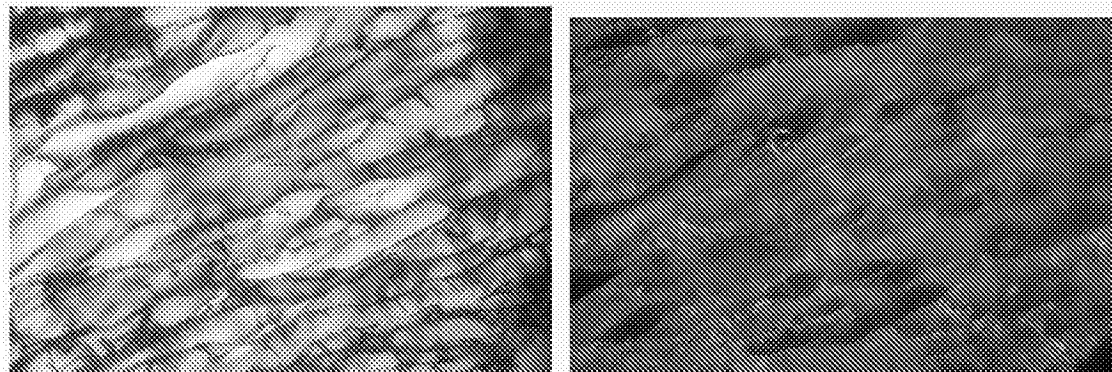


图2

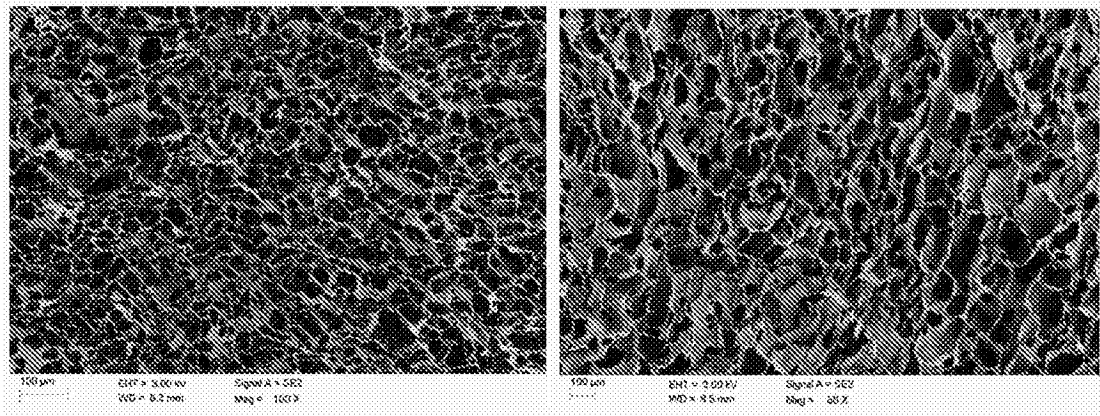


图3

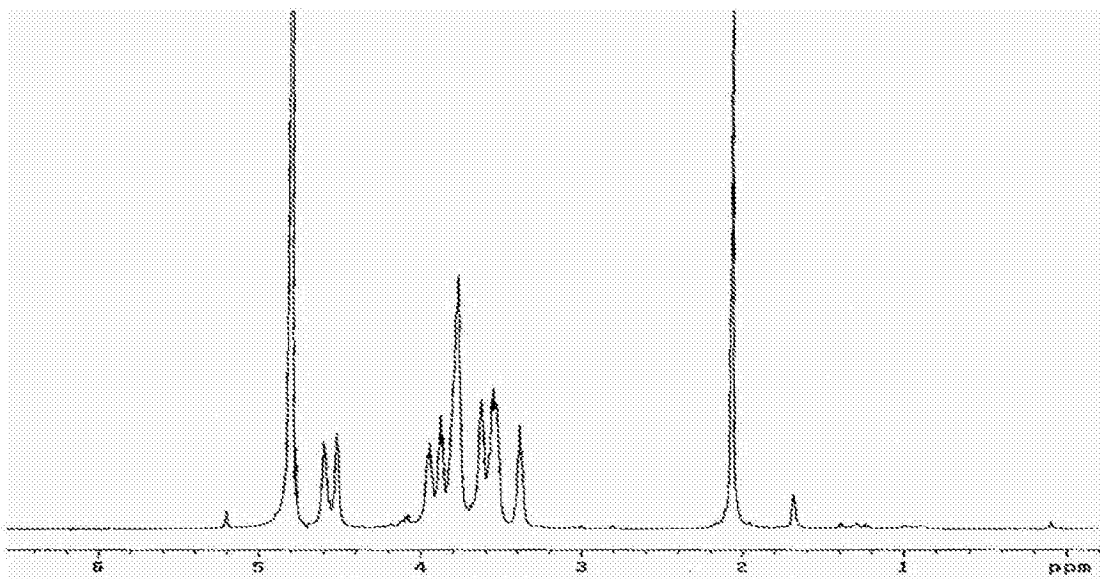
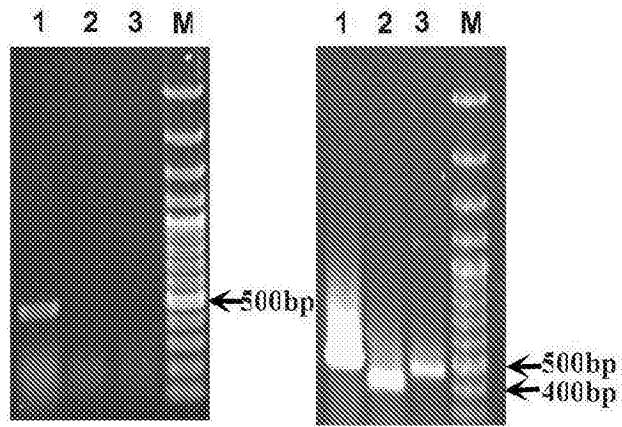


图4



1 内参基因 GAPDH; 2 前II型胶原基因; 3 aggrecan 基因; M DNA Ladder

图5