



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110302425 A

(43)申请公布日 2019.10.08

(21)申请号 201910534349.6

A61L 27/22(2006.01)

(22)申请日 2019.06.20

A61L 27/50(2006.01)

A61L 27/52(2006.01)

(71)申请人 温州医科大学附属第一医院

地址 325000 浙江省温州市瓯海区三垟街  
道生命健康小镇创新中心(A幢)1025、  
1026、2026室

申请人 温州嘉一三维技术有限公司

(72)发明人 方练 李花琼 余媛 祝梦渝  
吴存造

(74)专利代理机构 温州匠心专利代理事务所  
(特殊普通合伙) 33279

代理人 姜莹

(51)Int.Cl.

A61L 27/36(2006.01)

A61L 27/20(2006.01)

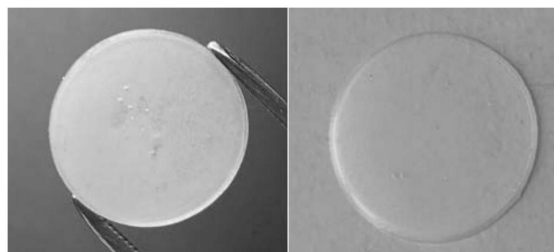
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

混合水凝胶生物材料的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明提出了一种混合水凝胶生物材料的制备方法及其应用,该材料由脱细胞软骨基质、甲基丙烯酰化明胶(Gelatin Methacryloyl, GelMA)和甲基丙烯酰化透明质酸(Hyaluronic Acid Methacryloyl, HAMA)三种材料以一定的比例混合制得。本发明所有材料的制备方法具备安全无毒、易操作、免疫原性低的特点,可以应用于临床鼓膜穿孔的修复,替代传统的治疗方法,应用前景广泛。



1. 混合水凝胶生物材料的制备方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

(1) 将HAMA固体加入管中,水浴溶解并震荡混匀,形成HAMA水溶液;

(2) 在步骤(1)所得的HAMA水溶液中,加入GelMA固体,水浴溶解并震荡混匀,形成混合水凝胶溶液;

(3) 在步骤(2)所得的混合水凝胶溶液中,加入过筛后的脱细胞软骨基质,震荡混匀;

(4) 在经过步骤(3)后所得的混合水凝胶溶液中,加入光交联剂Ig2959,震荡混匀,形成混合水凝胶生物材料;

(5) 处理玻片:将玻片浸泡于聚乙烯醇(PVA)水溶液中,取出后置于烘箱内烘干,备用;

(6) 取一片步骤(5)处理后的玻片,将步骤(4)所得的混合水凝胶生物材料滴加于玻片上,迅速在材料上方盖上一张步骤(5)处理后的玻片;

(7) 将步骤(6)处理后的材料放置于紫外灯下照射,进行光交联;

(8) 将步骤(7)处理后的材料浸泡于水中,PVA溶于水,玻片脱落,制得薄片状混合水凝胶生物材料。

2. 根据权利要求1所述的混合水凝胶生物材料的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,加入的HAMA的比例为1%-3% w/v,水浴温度为40-50℃,震荡转速为100-200rpm。

3. 根据权利要求1所述的混合水凝胶生物材料的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,加入的GelMA的比例为5%-15% w/v,水浴温度为40-50℃,震荡转速为100-200rpm。

4. 根据权利要求1所述的混合水凝胶生物材料的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,加入的脱细胞软骨基质是经过小于100 $\mu$ m的筛子筛选后的粉末状基质,加入的比例为3%-15% w/v,震荡转速为100-200rpm。

5. 根据权利要求1所述的混合水凝胶生物材料的制备方法,其特征在于,步骤(4)中,加入的光交联剂为Ig2959,加入的比例为0.1%-0.5%。

6. 根据权利要求1所述的混合水凝胶生物材料的制备方法,其特征在于,步骤(5)中,玻片可以为爬片、盖玻片、塑料片中的一种,将玻片浸泡于3%-5% w/v的PVA水溶液中,50-70℃烘干。

7. 根据权利要求1所述的混合水凝胶生物材料的制备方法,其特征在于,步骤(6)中,滴加30-150 $\mu$ l混合水凝胶生物材料于玻片上,迅速盖上处理过的玻片。

8. 根据权利要求1所述的混合水凝胶生物材料的制备方法,其特征在于,步骤(8)中,处理后的材料浸泡于水中,可制得厚度为0.2-3mm厚度的薄片状混合水凝胶生物材料。

9. 根据权利要求1-8之一所述的方法制备的混合水凝胶生物材料在制备鼓膜临床植入材料中的应用。

## 混合水凝胶生物材料的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及鼓膜修复生物材料和移植领域,具体涉及混合水凝胶生物材料的制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 近年来,外伤、中耳炎症和医源性损伤引起的鼓膜穿孔情况越来越多,治疗鼓膜穿孔的方法有很多种,大致可以分为非手术贴补(棉片、丝绸、明胶海绵、沙棘油、纱条、大蒜膜、蛋膜、人工皮肤、水解胶体敷料、纤维蛋白胶等)和手术修补(自体材料有颞肌筋膜、耳屏软骨-软骨膜、皮肤、脂肪组织等,异体材料为同种异体材料与生物合成材料等)两种方法。目前为止,采用自体组织的鼓膜修补手术是修复鼓膜穿孔的常用方法。采用这些方法,存在供源短缺、术后并发症、内陷、粘连等问题,在一定程度上限制了此类工作的发展。

[0003] 随着生物材料和组织工程领域的快速发展,人工合成鼓膜修复材料在实验和临床研究中呈现出良好的应用前景。与非手术贴补、自体 and 异体组织修补法相比,人工合成生物材料最大的优势就是无限的来源和无疾病传染风险。由于水凝胶与细胞外基质高度的相似性,组织工程对其展开了大量的研究。人工合成水凝胶材料有着良好的力学特性,但其缺乏生物活性。而生物材料水凝胶的生物学特性虽可以满足细胞要求,但缺少机械强度和力学可控性。因此,选用单一材料制备的生物支架效果并不理想,而复合支架逐渐成为研究热点。

### 发明内容

[0004] 基于上述问题,本发明目的在于提供一种混合水凝胶生物材料的制备方法,该材料免疫原性低、修复效果好、安全无毒、来源广,能够极大的满足临床需求。

[0005] 针对以上问题,提供了如下技术方案:混合水凝胶生物材料的制备方法,该方法包括如下步骤:

- (1) 将HAMA固体加入管中,水浴溶解并震荡混匀,形成HAMA水溶液;
- (2) 在步骤(1)所得的HAMA水溶液中,加入GelMA固体,水浴溶解并震荡混匀,形成混合水凝胶溶液;
- (3) 在步骤(2)所得的混合水凝胶溶液中,加入过筛后的脱细胞软骨基质,震荡混匀;
- (4) 在经过步骤(3)后所得的混合水凝胶溶液中,加入光交联剂Ig2959,震荡混匀,形成混合水凝胶生物材料;
- (5) 处理玻片:将玻片浸泡于聚乙烯醇(PVA)水溶液中,取出后置于烘箱内烘干,备用;
- (6) 取一片步骤(5)处理后的玻片,将步骤(4)所得的混合水凝胶生物材料滴加于玻片上,迅速在材料上方盖上一张步骤(5)处理后的玻片;
- (7) 将步骤(6)处理后的材料放置于紫外灯下照射,进行光交联;
- (8) 将步骤(7)处理后的材料浸泡于水中,PVA溶于水,玻片脱落,制得薄片状混合水凝胶生物材料。

[0006] 步骤(1)中,加入的HAMA的比例为1%-3% w/v,水浴温度为40-50℃,震荡转速为100-200rpm。

[0007] 步骤(2)中,加入的GelMA的比例为5%-15% w/v,水浴温度为40-50℃,震荡转速为100-200rpm。

[0008] 步骤(3)中,加入的脱细胞软骨基质是经过小于100 $\mu$ m的筛子筛选后的粉末状基质,加入的比例为3%-15% w/v,震荡转速为100-200rpm。

[0009] 步骤(4)中,加入的光交联剂为Ig2959,加入的比例为0.1%-0.5%。

[0010] 步骤(5)中,玻片可以为爬片、盖玻片、塑料片中的一种,将玻片浸泡于3-5% w/v的PVA水溶液中,50-70℃烘干。

[0011] 步骤(6)中,滴加30-150 $\mu$ l混合水凝胶生物材料于玻片上,迅速盖上处理过的玻片。

[0012] 步骤(8)中,处理后的材料浸泡于水中,可制得厚度为0.2-3mm厚度的薄片状混合水凝胶生物材料。

[0013] 本发明选用的是高分子材料甲基丙烯酰化明胶(GelMA)和甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA),这两种材料是现如今常被用于组织工程与再生医学中的一种生物可降解的高分子材料,具有生物相容性好、机械性能强、易于加工成型、可降解、价格便宜、可光交联等显著优点。明胶基质可以促进细胞的迁移、增殖和分化以及引发细胞介导的酶促降解作用。透明质酸是结缔组织、上皮组织、软骨组织等的细胞外基质的主要组成成分之一,具有良好的生物相容性和高度黏弹性、渗透性、可塑性。以考虑到动物器官为来源的异种材料一直是人们思考和研究的重要课题,结合脱细胞软骨的鼓膜修复材料,这种材料既可以保留骨组织原有的天然基质,如其中包含一些重要特性的细胞因子,又能改变供体奇缺的困境,是一种具有很大潜力的植入材料。猪的器官由于其在解剖、生理、代谢和生物活性分子上都和人有极大的相似处,而被认为是人类异种移植的最理想供体,为异种材料的应用提供了很大的支持。因此将脱细胞软骨基质、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)和甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA)三种材料,以本发明所述的制备方法制成的混合水凝胶生物材料,在鼓膜临床植入材料中具有良好的应用前景。

[0014] 与现有技术相比,本发明方法具有以下优点:

(1) 本发明制备混合水凝胶生物材料的实验方法简单易操作,不需要复杂的仪器设备,材料来源广;

(2) 制备过程中所使用的三种材料为甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA)、甲基丙烯酰化明胶(GelMA)与动物器官来源的脱细胞软骨基质,材料具有生物相容性好、机械性能强、易于加工成型、可降解、价格便宜、可光交联的特点;

(3) 本发明制得的混合水凝胶生物材料,可以利用玻片做成薄片状,厚度和大小可根据不同大小的玻片和不同加样量来控制。

## 附图说明

[0015] 图1 为本发明中三种材料混合均匀后的形貌图。

[0016] 图2 为本发明中将混合均匀的材料制备成薄片状的形貌图。

[0017] 图3 为本发明中在混合水凝胶生物材料上种植细胞后观察细胞的生长状况图。

[0018] 图4 为本发明中在混合水凝胶生物材料上种植细胞后观察细胞生长的骨架图。

[0019] 图5 为本发明中建立动物模型后,利用耳内镜观察混合水凝胶生物材料植入情况图。

[0020] 图6 为本发明中植入混合水凝胶生物材料8周后HE染色图。

### 具体实施方式

[0021] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

#### [0022] 实施例一

(1)称取1% w/v的HAMA固体,加入到含有1ml去离子水的5ml离心管中,40℃水浴溶解,震荡混匀;

(2)称取15% w/v的GelMA固体,加入到溶解好的步骤(1)的溶液中,40℃水浴溶解,震荡混匀;

(3)称取12% w/v的粒径小于40 $\mu$ m的脱细胞软骨基质粉末,加入到溶解好的步骤(2)的溶液中,震荡混匀;

(4)加0.1% w/v的光交联剂Ig2959到步骤(3)的溶液中,震荡混匀;

(5)将直径14mm的爬片浸泡于3% w/v的PVA水溶液中,取出后70℃烘箱中烘干;

(6)将步骤(4)制备好的材料滴加45 $\mu$ l到步骤(5)制备好的爬片上,迅速盖上另一片爬片;

(7)将步骤(6)制备好的材料放置于365nm的紫外灯下照射2min,光交联完成;

(8)步骤(7)得到的材料放置于水中浸泡,浸泡10-30min,爬片脱落,取出材料即可。

#### [0023] 实施例二

(1)称取1% w/v的HAMA固体,加入到含有1ml去离子水的5ml离心管中,40℃水浴溶解,震荡混匀;

(2)称取5% w/v的GelMA固体,加入到溶解好的步骤(1)的溶液中,40℃水浴溶解,震荡混匀;

(3)称取3% w/v的粒径小于40 $\mu$ m的脱细胞软骨基质粉末,加入到溶解好的步骤(2)的溶液中,震荡混匀;

(4)加0.1% w/v的光交联剂Ig2959到步骤(3)的溶液中,震荡混匀;

(5)将直径14mm的爬片浸泡于3% w/v的PVA水溶液中,取出后70℃烘箱中烘干;

(6)将步骤(4)制备好的材料滴加45 $\mu$ l到步骤(5)制备好的爬片上,迅速盖上另一片爬片;

(7)将步骤(6)制备好的材料放置于365nm的紫外灯下照射2min,光交联完成;

(8)步骤(7)得到的材料放置于水中浸泡,浸泡10-30min,爬片脱落,取出材料即可。

#### [0024] 实施例三

(1)称取2% w/v的HAMA固体,加入到含有1ml去离子水的5ml离心管中,45℃水浴溶解,震荡混匀;

(2)称取9% w/v的GelMA固体,加入到溶解好的步骤(1)的溶液中,45℃水浴溶解,震荡混匀;

(3) 称取10% w/v的粒径小于40 $\mu$ m的脱细胞软骨基质粉末,加入到溶解好的步骤(2)的溶液中,震荡混匀;

(4) 加0.1% w/v的光交联剂Ig2959到步骤(3)的溶液中,震荡混匀;

(5) 将直径14mm的爬片浸泡于3% w/v的PVA水溶液中,取出后70 $^{\circ}$ C烘箱中烘干;

(6) 将步骤(4)制备好的材料滴加45 $\mu$ l到步骤(5)制备好的爬片上,迅速盖上另一片爬片;

(7) 将步骤(6)制备好的材料放置于365nm的紫外灯下照射2min,光交联完成;

(8) 步骤(7)得到的材料放置于水中浸泡,浸泡10-30min,爬片脱落,取出材料即可。

#### [0025] 实施例四

(1) 称取2% w/v的HAMA固体,加入到含有1ml去离子水的5ml离心管中,50 $^{\circ}$ C水浴溶解,震荡混匀;

(2) 称取12% w/v的GelMA固体,加入到溶解好的步骤(1)的溶液中,50 $^{\circ}$ C水浴溶解,震荡混匀;

(3) 称取12% w/v的粒径小于40 $\mu$ m的脱细胞软骨基质粉末,加入到溶解好的步骤(2)的溶液中,震荡混匀;

(4) 加0.1% w/v的光交联剂Ig2959到步骤(3)的溶液中,震荡混匀;

(5) 将直径14mm的爬片浸泡于3% w/v的PVA水溶液中,取出后70 $^{\circ}$ C烘箱中烘干;

(6) 将步骤(4)制备好的材料滴加45 $\mu$ l到步骤(5)制备好的爬片上,迅速盖上另一片爬片;

(7) 将步骤(6)制备好的材料放置于365nm的紫外灯下照射2min,光交联完成;

(8) 步骤(7)得到的材料放置于水中浸泡,浸泡10-30min,爬片脱落,取出材料即可。

#### [0026] 实施例五

(1) 称取3% w/v的HAMA固体,加入到含有1ml去离子水的5ml离心管中,50 $^{\circ}$ C水浴溶解,震荡混匀;

(2) 称取15% w/v的GelMA固体,加入到溶解好的步骤(1)的溶液中,50 $^{\circ}$ C水浴溶解,震荡混匀;

(3) 称取15% w/v的粒径小于40 $\mu$ m的脱细胞软骨基质粉末,加入到溶解好的步骤(2)的溶液中,震荡混匀;

(4) 加0.1% w/v的光交联剂Ig2959到步骤(3)的溶液中,震荡混匀;

(5) 将直径14mm的爬片浸泡于3% w/v的PVA水溶液中,取出后70 $^{\circ}$ C烘箱中烘干;

(6) 将步骤(4)制备好的材料滴加45 $\mu$ l到步骤(5)制备好的爬片上,迅速盖上另一片爬片;

(7) 将步骤(6)制备好的材料放置于365nm的紫外灯下照射2min,光交联完成;

(8) 步骤(7)得到的材料放置于水中浸泡,浸泡10-30min,爬片脱落,取出材料即可。

[0027] 经过上述实施例一至实施例五中任一实施例所述的实验步骤中溶解、混匀后得到的材料如图1所示,经过夹片和光胶联步骤处理后的材料如图2所示。

[0028] 将实施例一至实施例五中任一实施例所制备好的材料进行鼓膜临床植入的应用实验。(1)将制备好的材料移至超净台内操作,浸泡于PBS中12h,再取出浸泡于75%乙醇中1h,最后取出用PBS清洗3次,每次5min;

(2) 将经过步骤(1)处理的材料移至24孔板中,备用;

(3) 培养骨髓间充质干细胞,将骨髓间充质干细胞悬液的细胞密度调整为 $1 \times 10^5$  /mL后接种于装有材料的孔板中,加入DMEM培养基进行培养;

(4) 在培养3天、7天和14天后,对细胞形态特征进行观察,并进行AO-EB死活染和细胞骨架染色对细胞的活力和增殖情况进行分析。

[0029] 如图3至图4所示,经过上述实验步骤后,在3天、7天和14天利用AO-EB死活染后荧光显微镜记录实验结果;在3天、7天和14天利用细胞骨架染色液染色后荧光显微镜记录实验结果;结果显示细胞在材料表面生长良好,与不加材料的组相比较,有明显的促进细胞的生长和增殖的现象。

[0030] (1) 使用5只体重为400-500 g的耳郭反射灵敏、鼓膜完整、结构清楚的健康大鼠作为模型动物,构建慢性鼓膜穿孔损伤模型;

(2) 术前腹腔注射水合氯醛麻醉,清洁外耳道,75%酒精消毒后,显微镜下以虹膜切开刀将大鼠双侧鼓膜紧张部前方部分鼓膜切除,穿孔面积占鼓膜紧张部40%-50%,以耳显微刮匙刮除穿孔边缘鼓室侧部分粘膜1-2 mm,于穿孔四角放射性切开1mm后将创缘内翻;术前一天应用磺胺嘧啶钠肌肉注射(0.125 ml/kg),术后应用5天;术后每日于麻醉后观察鼓膜愈合情况,清理渗出物,如有穿孔愈合,以显微耳探针将愈合鼓膜挑开,并重新将创缘内翻。术后观察2月鼓膜穿孔不愈合为慢性穿孔,可作为动物实验模型使用;

(3) 在构建好的慢性鼓膜穿孔动物的鼓膜内侧植入鼓膜修复支架作为实验组;并设置空白对照组;

(4) 8周后按照巴比妥类标准致死剂量处死大鼠,立即收集植入的鼓膜修复支架及周边组织,观察炎症或感染情况,处理后进行组织学和形态学分析;

(5) 通过组织学和形态计量学评估鼓膜修复效果:样品经过梯度乙醇脱水后固定于甲基丙烯酸甲酯树脂中,并使用切片机制备10  $\mu$ m厚的组织切片,用HE染色后进行组织学和形态学分析。

[0031] 如图5至图6所示,图5中1为正常鼓膜,2为鼓膜穿孔,3为鼓膜穿孔后自行愈合的示意图,4为采用鼓膜修复支架后愈合的鼓膜的示意图;图6中1为自行愈合的鼓膜的HE染色显示的鼓膜穿孔部位结构,2为采用鼓膜修复支架后愈合的鼓膜HE染色显示的鼓膜穿孔部位结构。经过上述方法步骤,可以通过耳内镜和HE染色观察到鼓膜的修复情况,用显微耳探针刺破鼓膜紧张部,造成鼓膜紧张部60-70%面积的穿孔,继续观察穿孔部位,发现约60%鼓膜穿孔能于一周内自行愈合,但愈合部位鼓膜较浑浊,鼓室内组织增生粘连明显,愈合鼓膜较薄,采用鼓膜修复支架植入后,全部鼓膜穿孔均能在一周内愈合,而且鼓膜修复部位标志清晰,鼓室内组织增生粘连少,修复鼓膜明显增厚。

[0032] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变型,上述假设的这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。



图1

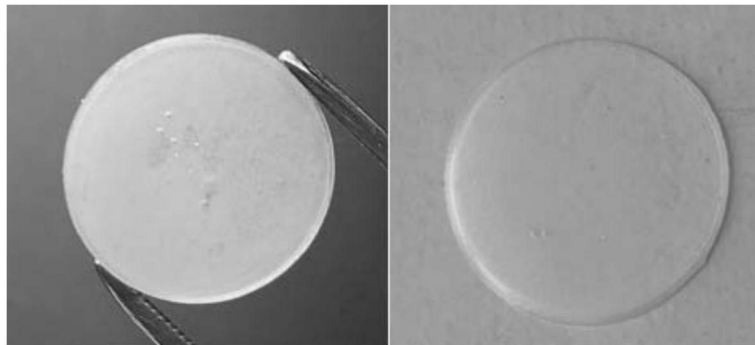


图2

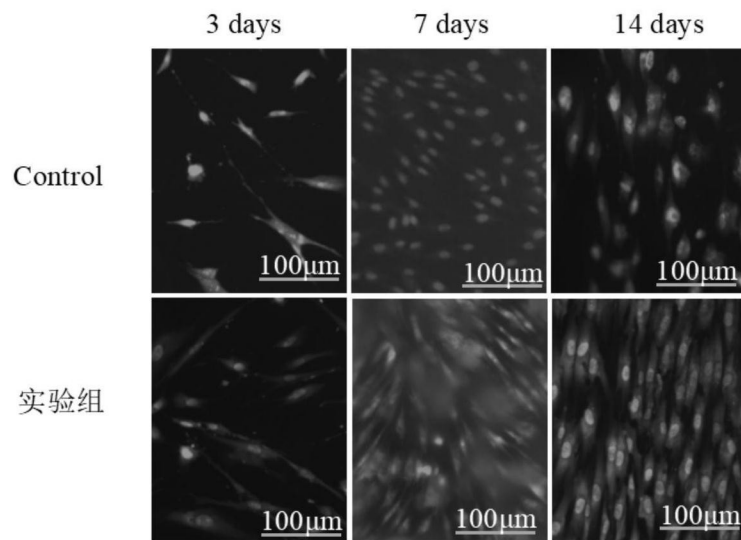


图3

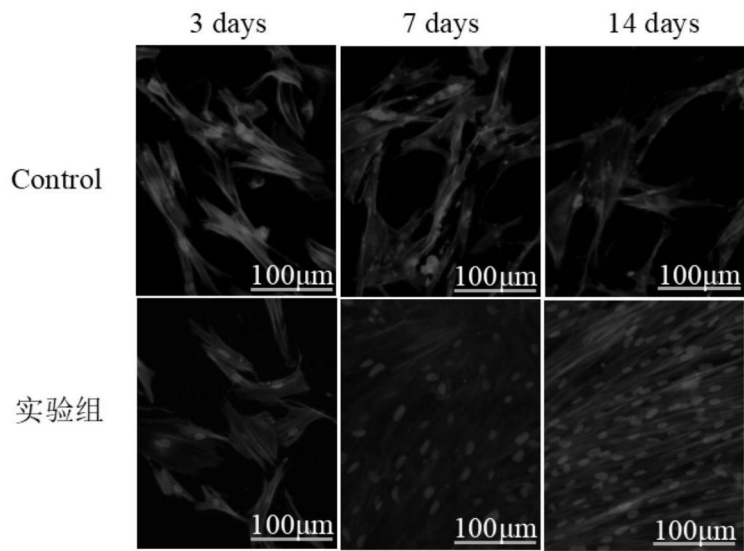


图4

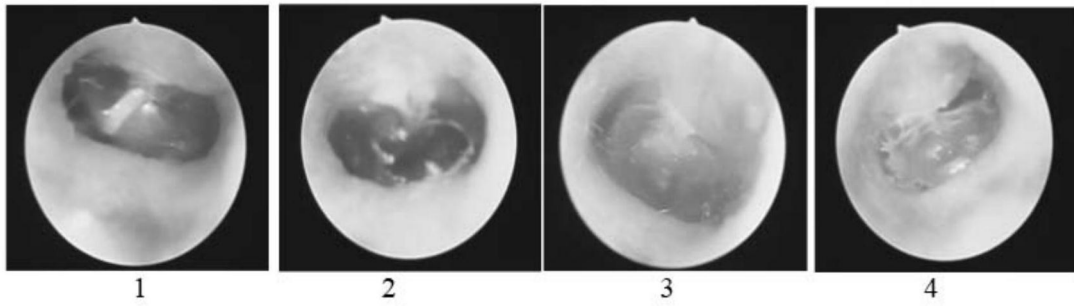


图5

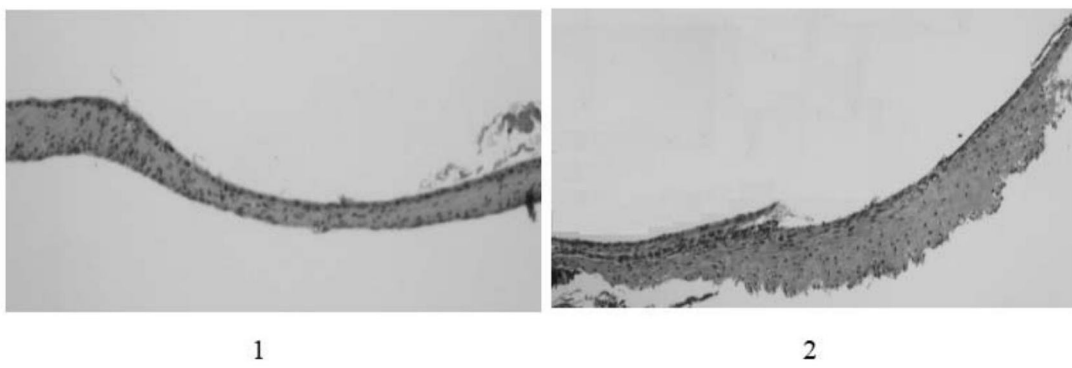


图6