



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109966552 B

(45)授权公告日 2020.04.07

(21)申请号 201910223339.0

A61L 27/58(2006.01)

(22)申请日 2019.03.22

A61L 27/22(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C08J 3/24(2006.01)

申请公布号 CN 109966552 A

C08B 37/08(2006.01)

C08L 5/08(2006.01)

(43)申请公布日 2019.07.05

审查员 张凌

(73)专利权人 宁波市医疗中心李惠利医院

地址 315040 浙江省宁波市江东区兴宁路
57号

(72)发明人 沈志森 吴益栋 裘世杰 崔翔

王静刚 徐捷 侯瑞霞 邓红霞

(74)专利代理机构 杭州华进联浙知识产权代理

有限公司 33250

代理人 李丽华

(51)Int.Cl.

A61L 27/20(2006.01)

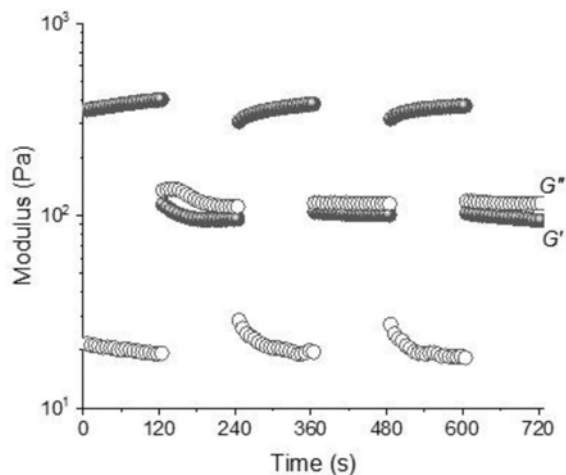
权利要求书1页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

组织工程支架材料及其制备方法、应用、应用方法

(57)摘要

本发明涉及一种组织工程支架材料及其制备方法、应用、应用方法。所述组织工程支架材料的制备方法包括：提供壳聚糖，采用甲基丙烯酸酐接枝壳聚糖得到甲基丙烯酰化壳聚糖；将所述甲基丙烯酰化壳聚糖与基质金属蛋白酶-可降解肽进行酯化反应，得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖；将所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸和无机盐溶液混合形成混合液，以使所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖中的氨基和所述氧化透明质酸中的醛基进行缩合交联反应，得到组织工程支架材料。本发明的组织工程支架材料具有可注射性和自我修复性能，在用于诱导组织修复时，获得的组织工程支架的机械强度和降解速率可控。



1. 一种组织工程支架材料的制备方法,其特征在于,包括:
提供壳聚糖,采用甲基丙烯酸酐接枝壳聚糖得到甲基丙烯酰化壳聚糖;
将所述甲基丙烯酰化壳聚糖与基质金属蛋白酶-可降解肽进行酯化反应,得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖;
将所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸和无机盐溶液混合形成混合液,以使所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖中的氨基和所述氧化透明质酸中的醛基进行缩合交联反应,得到组织工程支架材料。
2. 根据权利要求1所述的组织工程支架材料的制备方法,其特征在于,在所述缩合交联反应结束后,还包括进行冷冻干燥的步骤。
3. 根据权利要求1所述的组织工程支架材料的制备方法,其特征在于,形成所述混合液后,将所述混合液于30℃~50℃静置5min~20min,进行所述缩合交联反应。
4. 根据权利要求1所述的组织工程支架材料的制备方法,其特征在于,所述混合液中,所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖的质量分数为0.05%~2%,所述氧化透明质酸的质量分数为3%~6%,所述无机盐溶液中无机盐在所述混合液中的质量分数为2%~5%。
5. 根据权利要求1所述的组织工程支架材料的制备方法,其特征在于,所述无机盐包括氯化钙、氯化钠、氯化镁、硫酸钙、硫酸镁、氯化锌、硫酸锌、溴化钙、溴化镁中的至少一种。
6. 一种组织工程支架材料,其特征在于,如权利要求1~5任一项所述的制备方法得到。
7. 一种权利要求6所述的组织工程支架材料的应用,其特征在于,所述组织工程支架材料在制备用于诱导组织再生的材料中的应用。

组织工程支架材料及其制备方法、应用、应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学材料领域,特别是涉及一种组织工程支架材料及其制备方法、应用、应用方法。

背景技术

[0002] 人体器官例如皮肤、软骨等一旦因烧伤、外伤、肿瘤等原因发生损伤,很难通过人体自身修复,自体以及同种异体移植也往往会因为操作复杂、费用过高、供体来源等原因受到限制。而组织工程的出现为解决这个问题提供了可能性,其主要思路是用负载有细胞和/或生长因子的组织工程支架填补创伤,然后在支架降解的同时促进组织修复。

[0003] 目前,组织工程支架包括多孔泡沫支架、组织脱细胞基质材料、水凝胶等。其中,水凝胶由于具有溶胀/消融胀、易加工成形、可原位装载药物和细胞等独特的性质而备受关注。同时,水凝胶含水量极高(可达到80%~95%),与人体组织含水量相似,虽然有利于组织再生,但也导致水凝胶的机械性能较差。

发明内容

[0004] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种组织工程支架材料及其制备方法、应用、应用方法;所述制备方法通过氨基-醛基反应获得的组织工程支架材料具有可注射性和自我修复性能,且在应用时,获得的组织工程支架的机械强度和降解速率可控,可更好的诱导组织再生。

[0005] 一种组织工程支架材料的制备方法,其特征在于,包括:

[0006] 提供壳聚糖,采用甲基丙烯酸酐接枝壳聚糖得到甲基丙烯酰化壳聚糖;

[0007] 将所述甲基丙烯酰化壳聚糖与基质金属蛋白酶-可降解肽进行酯化反应,得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖;

[0008] 将所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸和无机盐溶液混合形成混合液,以使所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖中的氨基和所述氧化透明质酸中的醛基进行缩合交联反应,得到组织工程支架材料。

[0009] 在其中一个实施例中,在所述缩合交联反应结束后,还包括进行冷冻干燥的步骤。

[0010] 在其中一个实施例中,形成所述混合液后,将所述混合液于30℃~50℃静置5min~20min,进行所述缩合交联反应。

[0011] 在其中一个实施例中,所述混合液中,所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖的质量分数为0.05%~2%,所述氧化透明质酸的质量分数为3%~6%,所述无机盐溶液中无机盐在所述混合液中的质量分数为2%~5%。

[0012] 在其中一个实施例中,所述无机盐包括氯化钙、氯化钠、氯化镁、硫酸钙、硫酸镁、氯化锌、硫酸锌、溴化钙、溴化镁中的至少一种。

[0013] 一种组织工程支架材料,如上述的制备方法得到。

[0014] 上述组织工程支架材料的应用,所述组织工程支架材料用于诱导组织再生。

- [0015] 上述组织工程支架材料的应用方法,包括:
- [0016] 将组织工程支架材料与光引发剂混合,得到预制品;
- [0017] 将所述预制品注射至待修复的组织处,光照,以使所述预制品中的甲基丙烯基基团交联,得到组织工程支架,所述组织工程支架用以诱导组织的修复。
- [0018] 在其中一个实施例中,采用波长为400nm~480nm的光线照射所述预制品。
- [0019] 在其中一个实施例中,所述预制品中还包括有生物活性物质,所述生物活性物质包括蛋白质、肽、核酸、胞外基质物质、细胞中的至少一种。
- [0020] 本发明中,经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖的氨基和氧化透明质酸的醛基反应,形成席夫键,该席夫键为动态键,可反复拉断组合,所以,本发明制备方法获得的组织工程支架材料具有可注射性,在应用时,将该组织工程支架材料注射至待修复的组织处时,可更好的贴合待修复的组织部位。之后,依据所要修复的组织,通过控制光照条件以控制组织工程支架材料中的甲基丙烯基基团的交联程度,从而控制所获得的组织工程支架的机械强度,使其更好的匹配待修复的组织。
- [0021] 进一步,通过控制组织工程支架材料中基质金属蛋白酶-可降解肽的含量以及席夫键的含量来控制其在应用时所获得的组织工程支架的降解速率,使其更符合组织的生长速率。进而,采用本发明的组织工程支架材料获得的组织工程支架可更好的诱导组织再生。

附图说明

- [0022] 图1为本发明实施例1的组织工程支架材料的自修复效果图,其中, G' 为储能模量, G'' 为损耗模量;
- [0023] 图2为本发明实施例1的组织工程支架的自修复效果图;
- [0024] 图3为本发明实施例1~4的组织工程支架材料的力学性能变化图,其中, G' 为储能模量, G'' 为损耗模量。

具体实施方式

- [0025] 以下将对本发明提供的组织工程支架材料及其制备方法、应用、应用方法作进一步说明。
- [0026] 本发明提供的组织工程支架材料的制备方法,包括:
- [0027] S11,提供壳聚糖,采用甲基丙烯酸酐接枝壳聚糖得到甲基丙烯酰化壳聚糖;
- [0028] S12,将所述甲基丙烯酰化壳聚糖与基质金属蛋白酶-可降解肽进行酯化反应,得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖;
- [0029] S13,将所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸和无机盐溶液混合形成混合液,以使所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖中的氨基和所述氧化透明质酸中的醛基进行缩合交联反应,得到组织工程支架材料。
- [0030] 步骤S11中,壳聚糖具有优异的生物相容性,低毒性和可降解的优点,同时还可以调节细胞功能,促进皮肤,软骨等组织的修复,是一种较好的组织工程支架材料。
- [0031] 甲基丙烯酸酐具有促进血管形成的功能,将其与壳聚糖接枝后共同作为组织工程支架材料时,可使在应用时获得的组织工程支架能够更好的诱导组织再生。同时,甲基丙烯酸酐中的双键在光照条件下可以发生交联,所以,组织工程支架材料在应用时可提高获得

的组织工程支架的机械强度。

[0032] 具体的,在接枝过程中,甲基丙烯酸酐作为酰化剂,与壳聚糖进行酰化反应,反应结束后经透析、冷冻干燥得到甲基丙烯酰化壳聚糖。

[0033] 步骤S12中,基质金属蛋白酶-可降解肽作为一种多功能的多肽,将其修饰于甲基丙烯酰化壳聚糖的表面,不仅可以提高组织工程支架材料在应用时获得的组织工程支架的细胞黏附性,还能使组织工程支架被细胞分泌的金属蛋白酶识别并降解。从而,可通过控制组织工程支架材料中基质金属蛋白酶-可降解肽的含量来控制应用时的组织工程支架的降解速率,使其更符合组织的生长速度,且当应用时的组织工程支架原位负载生物活性物质时,更有利于生物活性物质向组织定向分化。

[0034] 具体的,所述甲基丙烯酰化壳聚糖在与所述基质金属蛋白酶-可降解肽酯化反应时,还可提供N-羟基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以提供酯化反应所需的条件。

[0035] 步骤S13中,所述氧化透明质酸优选采用高碘酸钠对透明质酸进行部分氧化开环得到。具体的,可将质量比为2~4:0.5~2:1的透明质酸、高碘酸钠和乙二醇混合于去离子水中,其中,乙二醇用于消耗多余的高碘酸钠,以终止反应,反应结束后,将产物进行透析,冷冻干燥得到氧化透明质酸。

[0036] 将所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸混合后,经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖中的氨基会和氧化透明质酸中的醛基发生反应形成席夫键,从而使经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖和氧化透明质酸交联在一起形成第一网络。

[0037] 其中,经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖中,原壳聚糖和原基质金属蛋白酶-可降解肽均具有氨基,所以,所述氨基均会与氧化透明质酸的醛基反应形成席夫键。该席夫键为动态键,可反复拉断组合,所以,使形成的组织工程支架材料具有可注射性和自我修复能力,从而在应用时,将该组织工程支架材料注射至待修复的组织处,可更好的贴合待修复的组织部位。

[0038] 具体的,所形成的组织工程支架材料为凝胶态,若给予其较大的变形量,如20%变形量,组织工程支架材料会因席夫键可拉断组合的性能从凝胶态变为溶胶态,再变回凝胶态。

[0039] 为了使经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸缩合交联反应充分,优选的,形成混合液后,将混合液于30℃~50℃静置5min~20min。

[0040] 另外,考虑到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸混合后会因静电作用而吸附在一起形成絮状沉淀,本发明在混合液中还同时加入无机盐用以屏蔽氧化透明质酸与经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖之间的静电作用,使二者在静置交联时成胶速度合适。所述无机盐包括氯化钙、氯化钠、氯化镁、硫酸钙、硫酸镁、氯化锌、硫酸锌、溴化钙、溴化镁中的至少一种,优选为氯化钙。

[0041] 具体的,可先将氧化透明质酸溶于无机盐溶液中形成组份A,以及,将经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖溶于无机盐溶液中形成组份B,然后将组份A和组份B混合,以使二者在静置交联时成胶更好。

[0042] 为了保证组织工程支架材料中基质金属蛋白酶-可降解肽的含量以及席夫键的含量,同时保证在静置交联时的成胶效果,所述混合液中,所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚

糖的质量分数为0.05%~2%，所述氧化透明质酸的质量分数为3%~6%，所述无机盐溶液中无机盐在所述混合液中的质量分数为2%~5%。

[0043] 考虑到人体各组织的弹性模量不同，如皮肤的弹性模量为KPa级，而软骨的弹性模量为MPa级，所以，可通过所述氧化透明质酸与所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖的质量比调整组织工程支架材料在应用时的弹性模量，使其符合组织的弹性模量，其中，氧化透明质酸与经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖的质量比越大，组织工程支架材料在应用时获得的组织工程支架的弹性模量越大。但是，不同的质量比对人体微环境细胞的刺激不同，可能会导致细胞生长的微环境发生变化。因此，本发明在应用时通过控制组织工程支架材料中的甲基丙烯基基团的交联程度协同控制组织工程支架的弹性模量，从而可将所述氧化透明质酸与所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖的质量比优选控制在(20~40):1。

[0044] 本发明制备方法获得的组织工程支架材料可以立即用于诱导组织再生，也可贮存待需要时使用。但是，考虑到氧化透明质酸是一种多糖，容易降解，所以，在反应结束后，还包括进行冷冻干燥的步骤，以使组织工程支架材料成固态，并优选于不高于4℃的避光环境中贮存。

[0045] 因此，通过本发明的制备方法可以调控组织工程支架材料的机械强度、降解速率等，在应用时可更好的诱导组织的再生，且制备方法可重复性强，适合批量生产。

[0046] 本发明还提供一种组织工程支架材料，由上述制备方法制得。该组织工程支架材料呈凝胶态或固态，包括经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸的交联产物以及包载于该交联产物中的无机盐和水。可以理解，当组织工程支架材料未经冷冻干燥步骤时，其为凝胶态，含水量高；当组织工程支架材料经冷冻干燥步骤后，其为固态，含水量低或不含水。

[0047] 本发明还提供上述组织工程支架材料的应用，所述组织工程支架材料用于诱导组织再生，包括骨、软骨、血管、神经、皮肤和人工器官，如肝、脾、肾、膀胱等。

[0048] 本发明还提供上述组织工程支架材料的应用方法，包括：

[0049] S21，将组织工程支架材料与光引发剂混合，得到预制品；

[0050] S22，将所述预制品注射至待修复的组织处，光照，以使所述预制品中的甲基丙烯基基团交联，得到组织工程支架，所述组织工程支架用以诱导组织的修复。

[0051] 步骤S21中，组织工程支架材料为凝胶态或者固态，在较大形变量或水存在的条件下，因席夫键的不稳定性，组织工程支架材料会因反复拉断组合而将光引发剂包载于预制品中，该预制品为凝胶态，可注射。

[0052] 具体的，当组织工程支架材料为固态时，优选加入水以使组织工程支架材料、水和光引发剂形成凝胶态的预制品。当组织工程支架材料为凝胶态时，可适量加入水或者通过形变使组织工程支架材料与光引发剂形成凝胶态的预制品。

[0053] 为了利于组织再生，使组织工程支架的含水量与人体组织相似，所述预制品中水的质量百分含量为80%~95%。

[0054] 而添加光引发剂是为了使预制品中的甲基丙烯基基团在光照的作用下进行交联，所以，所述预制品中所述光引发剂的质量百分含量为0.005%~0.05%，所述光引发剂包括重氮盐、二芳基碘鎓盐、三芳基硫鎓盐、烷基硫鎓盐、铁芳烃盐、磺酰氧基酮及三芳基硅氧醚、2-羟基-2-甲基-1-苯基丙酮、1-羟基环己基苯基甲酮、2-甲基-2-(4-吗啉基)-1-[4-(甲

巯基) 苯基]-1-丙酮、苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基) 磷酸锂盐、2,4,6-三甲基苯甲酰基-二苯基氧化膦、2,4,6-三甲基苯甲酰基苯基膦酸乙酯、2-二甲氨基-2-苄基-1-[4-(4-吗啉基) 苯基]-1-丁酮、2-羟基-2-甲基-1-[4-(2-羟基乙氧基) 苯基]-1-丙酮、苯甲酰甲酸甲酯中的至少一种。

[0055] 其中,考虑到苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基) 磷酸锂盐相比其它光引发剂毒性更低,成胶速度快、均匀,因此,所述光引发剂优选为苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基) 磷酸锂盐。

[0056] 步骤S22中,根据光引发剂,可采用波长为400nm~480nm的光线照射所述预制品,以使所述预制品中的甲基丙烯基基团中的双键形成共价键,进而使甲基丙烯基基团交联形成第二网络,且该第二网络与第一网络会因纠缠或相互作用而形成双网络互穿结构,所以,得到的组织工程支架的机械强度大大提高。

[0057] 可以理解,可通过控制光线的波长以及光线照射时间来控制甲基丙烯基基团的交联程度,从而控制组织工程支架的机械强度。

[0058] 考虑到光线照射的效果,优选采用405nm的光线照射预制品,并通过控制光线照射时间来控制甲基丙烯基基团的交联程度。

[0059] 具体的,可采用医用光镜为组织处的预制品提供光源,如关节内窥镜等。

[0060] 从而,因预制品的可注射性,将所述预制品以注射的方式置于待修复的组织处以及通过光线照射的方式获得组织工程支架,可使该组织工程支架更好的贴合待修复的组织部位。进而,使该组织工程支架的机械强度和降解速率能够更好的匹配待修复的组织,诱导组织再生。

[0061] 虽然组织工程支架可以起到修复组织的作用,但是,为了获得更好的修复效果,一般在组织工程支架中会包载有生物活性物质,所述生物活性物质于步骤S21中包载于所述预制品中,所述生物活性物质包括蛋白质、肽、核酸、胞外基质物质、细胞中的至少一种。

[0062] 其中,所述蛋白质包括激素、细胞因子、酶、抗体、生长因子、转录控制因子、血液因子、结构蛋白、配体蛋白、受体、细胞表面抗原、受体拮抗剂中的至少一种。所述细胞包括纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、神经细胞、骨细胞、真皮细胞、软骨细胞、干细胞中的至少一种。

[0063] 可以理解,本发明的光引发剂和/或生物活性物质也可在制备组织工程支架材料时于步骤S13中混合于混合液中。此时,未经冷冻干燥、呈凝胶态的组织工程支架材料可直接注射至待修复的组织处,经光照获得组织工程支架。

[0064] 如:得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖后,将所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖与氧化透明质酸、无机盐溶液、光引发剂混合形成混合液,以使所述经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖中的氨基和所述氧化透明质酸中的醛基进行缩合交联反应,得到组织工程支架材料。然后将所述组织工程支架材料注射至待修复的组织处,光照,以使所述组织工程支架材料中的甲基丙烯基基团交联,得到组织工程支架,用以诱导组织的修复。此时,可依据情况选择是否在混合液中加入生物活性物质。

[0065] 或者,本发明的光引发剂和/或生物活性物质也可在制备组织工程支架材料时于步骤S13中混合于混合液中,经冷冻干燥、呈固态的组织工程支架材料可直接与水作用后变为可注射的凝胶态的预制品,然后注射至待修复的组织处,经光照获得组织工程支架。

[0066] 因此,应用本发明的组织工程支架材料修复组织时,可以依据组织的不同调节工

程组织支架所需要的机械强度和降解速率,从而更好的诱导组织再生。

[0067] 以下,将通过以下具体实施例对所述组织工程支架材料及其制备方法、应用、应用方法做进一步的说明。

[0068] 实施例1:

[0069] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0070] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0071] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mL MES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0072] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.125混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。

[0073] 采用较大应变(strain%=20%)的旋转流变仪测试组织工程支架材料的自修复效果,结果见图1。从图1可知,旋转流变仪采用较大应变(strain%=20%)对组织工程支架材料进行一定时间点的频率扫描,其中当G' (储能模量)大于G'' (损耗模量)时组织工程支架材料为凝胶态,G'' (损耗模量)大于G' (储能模量)时组织工程支架材料为溶胶态,当经过2min后,组织工程支架材料的储能模量基本恢复,说明该组织工程支架材料具有自修复效果。

[0074] 将获得的组织工程支架材料于405nm蓝光照射1min,得到组织工程支架,该组织工程支架的自修复效果见图2,在人为破坏后,该组织工程支架能够完成自修复。

[0075] 采用旋转流变仪测试组织工程支架材料和组织工程支架的储能模量,结果见表1。

[0076] 表1

[0077]	OHA:CHMA (V:V)	储能模量(光交联前)/Pa	储能模量(光交联1min)/Pa
	1:0.125	2×10^3	0.8×10^5

[0078] 从表1可知,经光照后,组织工程支架的机械强度大大提高,说明光照后形成的双网络互穿结构可大幅度提高组织工程支架的机械强度。

[0079] 实施例2:

[0080] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0081] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5

天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0082] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0083] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.25混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。

[0084] 将获得的组织工程支架材料于405nm蓝光照射1min,得到组织工程支架。

[0085] 采用旋转流变仪测试组织工程支架材料和组织工程支架的储能模量,结果见表2。

[0086] 表2

OHA:CHMA (V:V)	储能模量(光交联前)/Pa	储能模量(光交联1min)/Pa
1:0.25	8×10^3	1×10^5

[0088] 实施例3:

[0089] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0090] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0091] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0092] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.5混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。

[0093] 将获得的组织工程支架材料于405nm蓝光照射1min,得到组织工程支架。

[0094] 采用旋转流变仪测试组织工程支架材料和组织工程支架的储能模量,结果见表3。

[0095] 表3

OHA:CHMA (V:V)	储能模量(光交联前)/Pa	储能模量(光交联1min)/Pa
1:0.5	2×10^4	1×10^6

[0097] 实施例4:

[0098] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于

冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0099] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0100] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0101] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.0625混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。

[0102] 将获得的组织工程支架材料于405nm蓝光照射1min,得到组织工程支架。

[0103] 采用旋转流变仪测试组织工程支架材料和组织工程支架的储能模量,结果见表4。

[0104] 表4

[0105]

OHA:CHMA (V:V)	储能模量(光交联前)/Pa	储能模量(光交联1min)/Pa
1:0.0625	1×10^3	8×10^4

[0106] 图3为实施例1~实施例4的组织工程支架材料的力学性能变化图,从图3可知,快速上升过程是指在405nm蓝光照射下,组织工程支架材料发生光交联,随着光交联时间的改变,组织工程支架材料的力学性能也可以随之改变,并且可以在1min内快速交联完全。

[0107] 实施例5:

[0108] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0109] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0110] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0111] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.125混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。再将该组织工程支架材料于405nm蓝光照射5s得组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 2×10^4 Pa。

[0112] 实施例6:

[0113] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0114] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0115] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0116] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.125混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。再将该组织工程支架材料于405nm蓝光照射15s得组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 6×10^4 Pa。

[0117] 实施例7:

[0118] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0119] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0120] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mL MES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0121] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.125混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。再将该组织工程支架材料于405nm蓝光照射30s得到组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 8×10^4 Pa。

[0122] 实施例8:

[0123] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0124] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5

天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0125] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羧基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0126] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.5混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。再将该组织工程支架材料于405nm蓝光照射5s得到组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 6×10^4 Pa。

[0127] 实施例9:

[0128] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0129] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0130] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羧基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0131] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.5混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。再将该组织工程支架材料于405nm蓝光照射10s得到组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 1×10^5 Pa。

[0132] 实施例10:

[0133] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0134] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0135] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羧基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0136] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.5混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料。再将该组织工程支架材料于405nm蓝光照射30s得到组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 2×10^5 Pa。

[0137] 实施例11:

[0138] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0139] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0140] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mL MES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0141] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.125混合,在30℃下静置交联20min得到组织工程支架材料。

[0142] 将获得的组织工程支架材料与水、无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐混合,得到预制品,预制品中光引发剂的质量百分含量为0.005%,水的质量百分含量为80%。将该预制品于405nm蓝光照射1min,得到组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 0.8×10^5 Pa。

[0143] 实施例12:

[0144] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0145] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0146] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mL MES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0147] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分B。将A液与B液按体积比

1:0.25混合,在35℃下静置交联15min得到组织工程支架材料。

[0148] 为获得的组织工程支架材料提供大于20%的形变量使其成为溶胶态后与无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐混合,得到凝胶态的预制品,预制品中光引发剂的质量百分含量为0.01%。将该预制品于400nm蓝光照射1min,得到组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 $1 \times 10^5 \text{Pa}$ 。

[0149] 实施例13:

[0150] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0151] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0152] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0153] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.5混合,在40℃下静置交联8min得到组织工程支架材料,冷冻干燥。

[0154] 将获得的组织工程支架材料与水、无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐混合,得到预制品,预制品中光引发剂的质量百分含量为0.02%,水的质量百分含量为90%。将该预制品于420nm蓝光照射50s,得到组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 $1 \times 10^6 \text{Pa}$ 。

[0155] 实施例14:

[0156] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0157] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0158] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0159] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂,为组

分B。将A液与B液按体积比1:0.0625混合,在50℃下静置交联5min得到组织工程支架材料,冷冻干燥。

[0160] 将获得的组织工程支架材料与水、无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐混合,得到预制品,预制品中光引发剂的质量百分含量为0.05%,水的质量百分含量为95%。将该预制品于450nm蓝光照射30s,得到组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 8×10^4 Pa。

[0161] 实施例15:

[0162] 取3g透明质酸,加入300mL去离子水中,搅拌下加入10mL质量分数为10%高碘酸钠溶液,避光搅拌反应3h,再加入2g乙二醇,搅拌3h,并装入12000D的透析袋中透析3天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到氧化透明质酸3g。

[0163] 取5g壳聚糖,溶解于100mL质量分数为2%的醋酸溶液中,在60℃恒温水浴下加入3.5mL甲基丙烯酸酐反应3h,用碳酸氢钠水溶液调节pH至6.5,装入12000D的透析袋中透析5天,置于冷冻干燥箱中在-42℃下冷冻干燥24h,得到甲基丙烯酰化壳聚糖5g。

[0164] 将1g甲基丙烯酰化壳聚糖溶解在100mLMES buffer,然后再加入274mg N-羟基琥珀酰亚胺,484mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,以及112mg基质金属蛋白酶-可降解肽,常温反应20h,然后透析5天并冷冻干燥得到经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖1g。

[0165] 取6g氧化透明质酸,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,为组分A。取1.5g经过修饰的甲基丙烯酰化壳聚糖,加入100mL氯化钙溶液(200mmol/L),搅拌后置于高压灭菌锅中灭菌处理20min,加入10mg无菌的光引发剂,为组分B。将A液与B液按体积比1:0.125混合,在37℃下静置交联10min得到组织工程支架材料,冷冻干燥。

[0166] 将获得的组织工程支架材料与水、无菌的光引发剂苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐混合,得到预制品,预制品中光引发剂的质量百分含量为0.015%,水的质量百分含量为85%。将该预制品于480nm蓝光照射5s得组织工程支架,此时经旋转流变仪测得储能模量为 2×10^4 Pa。

[0167] 本发明实施例1~15获得的组织工程支架材料均可用于诱导组织再生,使用时,实施例1~10的凝胶态的组织工程支架材料直接注射至待修复的组织处,采用波长为400nm~480nm的蓝光照射,获得组织工程支架。实施例11的凝胶态的组织工程支架材料与水、光引发剂混合后形成凝胶态的预制品;实施例12可为凝胶态的组织工程支架材料提供大于20%的形变量使其成为溶胶态后与光引发剂混合,形成凝胶态的预制品;实施例13~15的固态的组织工程支架材料与水、光引发剂混合后形成凝胶态的预制品后,再将实施例11~15的预制品注射至待修复的组织处,采用波长为400nm~480nm的蓝光照射,获得组织工程支架。

[0168] 此外,在使用时,实施例1~10可在制备组织工程支架材料时加入生物活性物质,实施例11~15可在制备组织工程支架材料或预制品时加入生物活性物质。

[0169] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0170] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不

不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

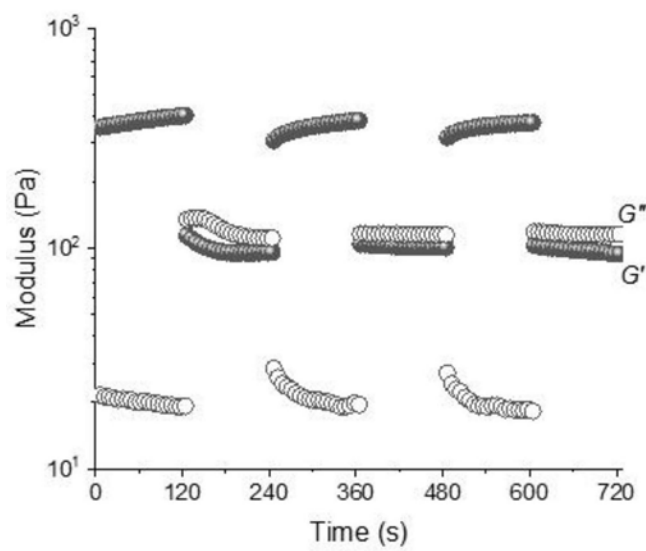


图1

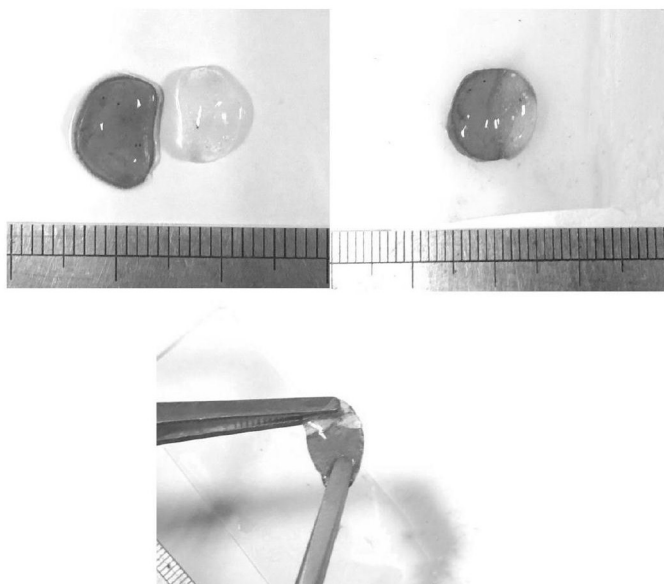


图2

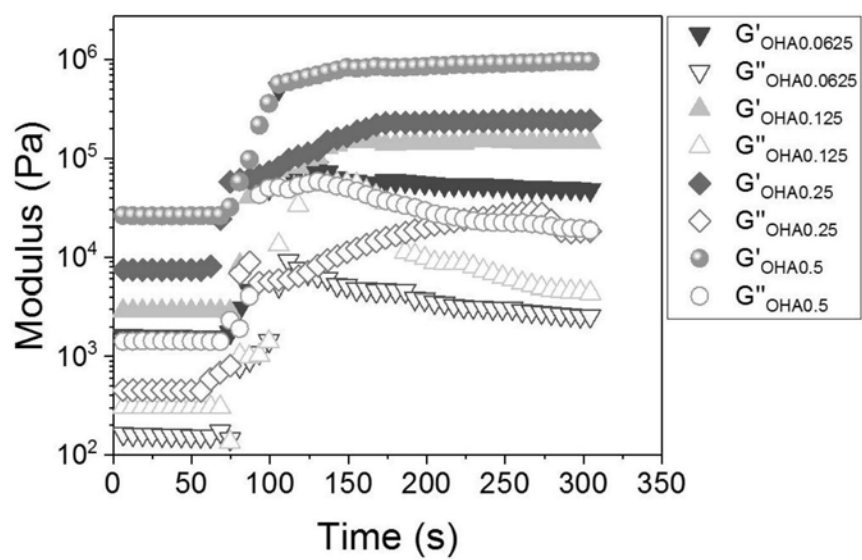


图3