



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102671238 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201210188005. 2

(22) 申请日 2009. 01. 16

(62) 分案原申请数据

200910020942. 5 2009. 01. 16

(73) 专利权人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710032 陕西省西安市长乐西路 15 号

(72) 发明人 胡学昱 罗卓荆 黄景辉

(74) 专利代理机构 西安吉盛专利代理有限责任

公司 61108

代理人 鲍燕平

(51) Int. Cl.

A61L 27/24(2006. 01)

A61L 27/22(2006. 01)

A61L 27/20(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1380115 A, 2002. 11. 20,

CN 1546182 A, 2004. 11. 17,

US 2004047892 A1, 2004. 03. 11,

US 5116824 A, 1992. 05. 26,

刘文静等. 应用胶原-壳聚糖桥接管引导大鼠坐骨神经再生. 《解剖学杂志》. 2008, 第 1 卷 (第 3 期), 第 336-338 页.

审查员 谢林

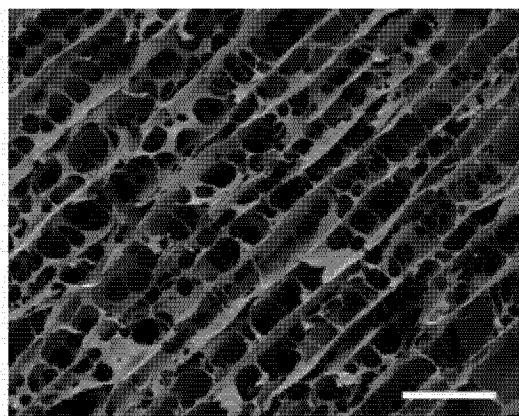
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种高仿真组织工程神经修复材料

(57) 摘要

本发明涉及一种高仿真组织工程神经修复材料,其特征是该材料包括 I 型胶原蛋白、壳聚糖、明胶中的一种或两种或三种原料混合制成。该材料是按照下述重量份数的原料制成:I 型胶原蛋白 1-10 份,壳聚糖 1 份。它既可用于神经损伤修复的基础研究,也可用于临床人体脊髓和周围神经损伤或缺损的桥接修复。有利于神经再生纤维的生长,可用于脊髓、周围神经损伤的修复。



1. 一种高仿真组织工程神经修复材料,其特征是:所述的神经修复材料是按照下述重量份数的原料制成:I型胶原蛋白1-10份,壳聚糖1份;其制作方法按以下步骤进行:

1)按上述重量份数称取浓度为28mg/ml的I型胶原蛋白按放入浓度为3mg/ml醋酸溶液中溶解24小时;

2)在4℃恒温环境中,以15000r/min搅拌速度搅拌90min,制成悬浊液;

3)称取壳聚糖1份,加入3mg/ml醋酸溶液中溶解24小时;

4)在4℃恒温条件下,以15000r/min搅拌速度搅拌90min制成悬浊液;

5)混合步骤2)、4)两种悬浊液并保持4℃恒温,再以15000r/min搅拌速度搅拌90min,制成胶原蛋白和壳聚糖的悬浊液,抽真空静置12小时;

6)将制备好的步骤5)的悬浊液注入硅胶管中密封两端,沿管轴方向缓慢放入深低温冷凝剂液氮中,进入速度控制为 $10 \times 10^{-7} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 至 $10 \times 10^{-5} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ;

7)将悬浊液-硅胶管冷冻物放入预冷好的铝盘中,于-60℃、100mtorr条件中冻干24小时;

8)真空状态下升温至0℃保持6h,再继续升温至22℃保持30~60min,解除真空,升至常温;

9)将材料用1wt%京尼平浸泡48h交联,对双蒸水反复透析;

10)将材料无菌密封包装并置于20kGy C060环境中照射消毒24小时。

## 一种高仿真组织工程神经修复材料

### 技术领域

[0001] 本发明涉及胶原、明胶及壳聚糖等多种生物原材料以及其加工工艺和制作方法,确切讲是一种高仿真组织工程神经修复材料。

### 背景技术

[0002] 神经损伤的修复是一个世界性难题。近年来,应用组织工程技术制备修复支架材料组装组织工程替代物修复神经损伤成为研究的热点,其研究重点包括:(1) 人工移植支架材料微观结构的仿生性以及材料的组织相容性、细胞相容性和可降解性研究;(2) 支架与细胞外基质及神经营养因子的联合应用;(3) 种子细胞的引入。其中支架作为种子细胞和神经营养因子的载体,作为组成神经损伤修复微环境的主体,其构建和性能改进研究成为制约周围神经损伤修复的关键。

[0003] 生物衍生材料具有良好的生物相容性,是目前比较理想的支架原料之一,主要有胶原蛋白、纤维蛋白、甲壳素、壳聚糖以及纤维素衍生物等。胶原(collagen)是机体细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要结构蛋白质,在人体分布最广,约占 30%,有 14 种之多。而 I 型胶原则是各种胶原中含量最多的,它为生物细胞提供用于维持结构的支架。I 型胶原由三个  $\alpha$  链组成,构成直径为 67nm 的三螺旋结构的原纤维,是基模的主要组成部分,具有抗压和维持空间结构的功能,主要分布在骨角膜,肌腱等处。它是一种良好的表面活性剂,并显示出很好的无脂界面的穿透性、生物可降解性、弱抗原性和优越的生物相容性、易于被吸收,不产生炎症反应,是组织工程中常用的生物材料;明胶(Gelatin)是一种由胶原分子降解而制得的多肽混合物,共有 18 种氨基酸组成了明胶肽链,胶原广泛存在于动物的骨、肌腱及结缔组织中,可被生物酶降解。大量的实验表明:用细胞外基质制成的神经组织工程材料不仅具有良好的生物相容性,同时也具有良好的生物学活性,有利于神经细胞的粘附、增殖和再生纤维的迁延与生长。壳聚糖(Chitosan)是一种天然的多聚糖,带一定的量的氨基,溶于酸性介质,并带一定正电荷。它来源广泛,价格低廉,具有良好的生物学性能,不会引起过敏反应和排斥反应,在体内能逐步降解,具有良好的生物相容性和生物可降解性。壳聚糖具有抗菌活性、生物黏附作用、絮凝作用和抗癌活性;能够加工成不同形式,如粉末,膜剂,糊剂,纤维等。正是由于这些性质使壳聚糖在生物医学和药物制剂学方面的应用引起越来越多的注意。

[0004] 神经组织再生不同于其它组织,神经再生纤维必须沿一定方向定向生长,才有可能有效地修复损伤。有研究表明,桥接修复材料内部结构的仿生程度,在很大程度上决定了神经再生细胞的生长、迁移结果,并且对再生神经纤维的伸展和神经轴突生长、连接等均有重要作用。目前,应用和研究较多的神经移植材料的内部结构主要包括大空管状结构、空管加内容凝胶状结构和平行纵管状结构。这些结构虽然在一定程度上均能桥接两神经断端、为神经再生提供一个相对隔绝的微环境,但材料内部没有定向的、规律性排列的孔隙和结构,不利于神经轴突的生长,神经损伤的修复效果相对较差。

[0005] 理想的组织工程支架材料必须具有轴取向的微管矩阵排列的仿真特征,这样才能

使移植的种子细胞可顺微管壁轴向排列、迁移,并有利于再生轴突定向生长,从而最大限度地使损伤的神经获得有效的修复再生。但由于既往复合的桥接载体材料内部结构均无一定规律(在孔径大小和方向上),在体内无法保持理想的物理结构,不利于脊髓或周围神经节段性损伤再生纤维定向生长,从而影响了治疗或实验的效果。制备具有轴取向微管矩阵排列仿真结构特征的胶原-壳聚糖桥接材料,目前世界上尚无类似报道。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的之一是提供一种高仿真组织工程神经修复材料,该材料具有轴取向矩阵排列微管和微管间广泛孔隙沟通的仿真结构,微管孔径大小及方向可根据需要进行调控,而且具有良好生物相容性和可控生物可降解性,它既可用于神经损伤修复的基础研究,也可用于临床人体脊髓和周围神经损伤或缺损的桥接修复。有利于神经再生纤维的生长,可用于脊髓、周围神经损伤的修复。

[0007] 本发明的另一目的是提供一种神经修复材料的制备方法。

[0008] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:一种高仿真组织工程神经修复材料,其特征是:所述的神经修复材料是按照下述重量份数的原料制成:I型胶原蛋白1-10份,壳聚糖1份;其制作方法按以下步骤进行:

[0009] 1)按上述重量份数称取浓度为28mg/ml的I型胶原蛋白按放入浓度为3mg/ml醋酸溶液中溶解24小时;

[0010] 2)在4℃恒温环境中,以15000r/min搅拌速度搅拌90min,制成悬浊液;

[0011] 3)称取壳聚糖1份,加入3mg/ml醋酸溶液中溶解24小时;

[0012] 4)在4℃恒温条件下,以15000r/min搅拌速度搅拌90min制成悬浊液;

[0013] 5)混合步骤2)、4)两种悬浊液并保持4℃恒温,再以15000r/min搅拌速度搅拌90min,制成胶原蛋白和壳聚糖的悬浊液,抽真空静置12小时;

[0014] 6)将制备好的步骤5)的悬浊液注入硅胶管中密封两端,沿管轴方向缓慢放入深低温凝固剂液氮中,进入速度控制为 $10 \times 10^{-7} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 至 $10 \times 10^{-5} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ;

[0015] 7)将悬浊液-硅胶管冷冻物放入预冷好的铝盘中,于-60℃、100mtorr条件中冻干24小时;

[0016] 8)真空状态下升温至0℃保持6h,再继续升温至22℃保持30~60min,解除真空,升至常温;

[0017] 9)将材料用1wt%京尼平浸泡48h交联,对双蒸水反复透析;

[0018] 10)将材料无菌密封包装并置于20kGy C060环境中照射消毒24小时。本发明所研制的新型脊髓、周围神经修复桥接材料具有①材料的外表面为相对封闭结构(厚度:2.45±1.43μm);②材料的微管孔径大小可控制在20μm~200μm;③微管的走行方向为轴向且平行、均匀;④微管间存在大量微孔相互沟通(孔径大小:20.68±4.61μm)。支架材料孔径可控,能够适应不同条件的不同需要:大孔径的材料对细胞的附壁爬行或灌注如嗅鞘细胞、雪旺细胞等起支架载体作用;而小孔径的材料则适宜于复合各种神经生长因子、药物等。轴向矩阵排列微管仿真结构,有利于定向引导再生神经细胞延展和神经纤维生长,适用于脊髓和周围神经缺损处的桥接修复。微管间广泛孔隙沟通,有利于细胞迁移和营养物质运输交换,利用神经再生。所研制的材料表面相对封闭,使得在植入脊髓或周围神经缺损

处能防止增生结缔组织纤维长入缺损段,避免阻碍神经再生轴突的定向生长。

[0019] 本发明的材料具有同一条件下材料的内部孔径大小均匀、微管轴向平行排列高度仿真、邻近微管孔隙广泛沟通等结构优点,在神经修复组织工程中,将更有利于脊髓和周围神经再生纤维沿轴向微管定向生长和迁移,有望获得脊髓和周围神经的有效修复、再生,在临床和实验中,应用前景广阔,作用巨大。

[0020] 本发明提出的高仿真组织工程神经损伤修复材料具有以下特点:

[0021] 1. 采用了生物相容性更好的原料,更接近生物的体内环境,更加有利于神经的再生。其中 I 型胶原蛋白(collagen I)是细胞外基质的主要组分,有利于细胞的粘附、迁移和增殖,可促进神经的再生,明胶(gelatin)则是组织工程修复最常用的原料,是神经营养因子最理想的载体;

[0022] 2. 探明了 I 型胶原蛋白(collagen I)、壳聚糖(chitosan)、明胶(gelatin)等生物材料的最佳混合比例及对材料在生物学性质及力学性质等方面的影响;

[0023] 3. 探明了温度、速度及添加剂(醋酸)浓度与新型神经组织工程修复材料内部结构间关系;

[0024] 4. 探明了各种成分不同比例混合对材料内部结构的影响;

[0025] 5. 探明了组分之间交联、固化的最佳条件增加了材料的抗拉强度和刚度,更好的改善了材料的力学性质;

[0026] 6. 通过控制材料的成分构成比率和交联参数,有效的降低了材料在体内的分解速度。

[0027] 本发明的高仿真组织工程神经损伤修复材料是一种新型脊髓、周围神经修复桥接材料,既可直接植入脊髓、周围神经缺损处;也可作为神经组织工程各种种子细胞移植的载体,可复合、携带各种促进神经再生的药物,用于人体脊髓、周围神经节段性损伤、缺损后的桥接;同样可用于脊髓、周围神经节段损伤修复的基础研究。

## 附图说明

[0028] 图 1 是扫描电镜下轴向切面观察的图片,其材料内部为走向平行、孔径均一、排列规律的仿真轴向微管(标尺 =200  $\mu\text{m}$ );

[0029] 图 2 是扫描电镜下轴向切面观察的图片,显示材料内部轴向矩阵排列的微管间有广泛的微孔结构相互沟通(标尺 =50  $\mu\text{m}$ );

[0030] 图 3 是横切面电镜下的图片,显示材料外部相对封闭结构(标尺 =200  $\mu\text{m}$ );

[0031] 图 4 是横切面电镜下的图片,显示材料内部微孔内径较为均一(标尺 =200  $\mu\text{m}$ )。

## 具体实施方式

[0032] 以下结合制作工艺及实施实例对本发明做进一步详细说明。需要说明的是本实施例仅用于说明本发明,并不限制本发明的实施范围。

[0033] 依照本发明的技术方案,该高仿真组织工程神经损伤修复材料用胶原及壳聚糖混合制成,材料采用 I 型胶原蛋白(collagen I)、壳聚糖(chitosan)、明胶(gelatin)。其配方比例为:(280:28:28)~(280:280:280)

[0034] 上述材料在低温温度梯度环境中,调整原料混合物的冷淋速度及添加剂(醋酸)浓

度变化和温度梯度递减速率,是决定材料内部微孔结构孔径大小、微孔取向的关键因素,改变注有胶原-壳聚糖混合物硅胶管进入冷淋剂的速度可以达到对所需制备的材料在内部结构上孔径大小和孔隙方向及均匀程度均具有可调控性,从而得到高仿真脊髓、周围神经组织工程损伤修复材料。

[0035] 实施例 1:(按照 I 型胶原蛋白:壳聚糖:明胶的比例为 280:70:70):

[0036] 按照本发明的技术方案,以胶原蛋白、明胶和壳聚糖为例,其制作方法按以下步骤进行:

[0037] 1). 按重量份数称取上述比例的 I 型胶原蛋白,按 28mg/ml 的浓度放入 3mg/ml 醋酸溶液中溶解 24 小时;

[0038] 2). 在 4℃ 恒温环境中,15000r/min 搅拌 90min,制成悬浊液;

[0039] 3). 另按比率称取上述重量比例的壳聚糖、明胶加入 3mg/ml 醋酸溶液中溶解 24 小时;

[0040] 4). 在 4℃ 恒温,15000r/min 搅拌 90min 制成悬浊液;

[0041] 5). 混合两种悬浊液保持 4℃ 恒温,15000r/min 搅拌 90min,制成胶原蛋白和壳聚糖的悬浊液,抽真空静置 12 小时;

[0042] 6). 将制备好的桥接材料悬浊液注入内径为 2mm、外径为 3mm、长 5cm 至 20cm 的硅胶管中密封两端,沿管轴方向缓慢放入深低温冷淋剂中,进入速度控制为  $10 \times 10^{-7} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  至  $10 \times 10^{-5} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ;

[0043] 7). 将悬浊液-硅胶管冷冻物放入预冷好的铝盘中,于 -60℃、100mtorr 条件中冻干 24h;

[0044] 8). 真空状态下升温至 0℃ 保持 6h,再继续升温至 22℃ 保持 30 ~ 60min,解除真空,升至常温;

[0045] 9). 将材料用 1wt% 京尼平浸泡 48h 交联,对双蒸水反复透析;

[0046] 10). 将材料无菌密封包装并置于 20kGy  $\text{CO}^{60}$  环境中照射消毒 24 小时。

[0047] 本发明所研制出的桥接材料具有以下特点:①材料的外表面为相对封闭结构,可有效的阻止疤痕组织长入(图 3);②材料的微孔直径可人为简单调控,既有利于神经再生纤维的长入,又有利于神经因子和种子细胞的植入;③内部微管尺寸均匀,呈轴向矩阵排列,与正常神经基底膜结构高度仿真,有利于神经再生纤维的定向生长(图 1、图 4);④微管间广泛孔隙沟通,有利于细胞迁移和营养物质运输交换,利用神经再生(图 2);⑤动物实验证明该材料生物相容性好且降解速度可控有利于神经再生;⑥该材料经特殊工艺处理后,力学性质好,抗拉及抗变形能力好。

[0048] 以下实例 2 ~ 8 各原材料的混合比相同。

[0049] 实施例 2:采用胶原(I 型)、壳聚糖和明胶作为原材料,其重量分别为 280mg、280mg、280mg,实施过程同实例 1。

[0050] 实施例 3:采用胶原(I 型)、壳聚糖和明胶作为原材料,其重量分别为 280mg、28mg、28mg,实施过程同实例 1。

[0051] 实施例 4:采用胶原(I 型)和壳聚糖作为原材料,其重量分别为 280mg、280mg,实施过程同实例 1。

[0052] 实施例 5:采用胶原(I 型)和壳聚糖作为原材料,其重量分别为 280mg、28mg,实施

过程同实例 1。

[0053] 实施例 6 :采用胶原(I 型)和壳聚糖作为原材料,其重量分别为 280mg、70mg,实施过程同实例 1。

[0054] 实施例 7 :采用胶原(I 型)和明胶作为原材料,其重量分别为 280mg、280mg,实施过程同实例 1。

[0055] 实施例 8 :采用胶原(I 型)和明胶作为原材料,其重量分别为 280mg、28mg,实施过程同实例 1。

[0056] 实施例 9 :采用胶原(I 型)和明胶作为原材料,其重量分别为 280mg、70mg,实施过程同实例 1。

[0057] 实施例 10 :采用壳聚糖和明胶作为原材料,其重量分别为 70mg、70mg,实施过程同实例 1 ;其制备步骤省略了步骤 1)、2)。

[0058] 实施例 11 :采用胶原(I 型)作为原材料,其重量为 280mg,实施过程同实例 1 ;其制备步骤省略了步骤 3)、4)、5)。

[0059] 实施例 12 :采用胶原(I 型)作为原材料,其重量为 28mg,实施过程同实例 1 ;其制备步骤省略了步骤 3)、4)、5)。

[0060] 实施例 13 :采用胶原(I 型)作为原材料,其重量为 70mg,实施过程同实例 1 ;其制备步骤省略了步骤 3)、4)、5)。

[0061] 实施例 14 :采用壳聚糖作为原材料,其重量为 70mg,实施过程同实例 1 ;其制备步骤省略了步骤 1)、2)。

[0062] 实施例 15 :采用明胶作为原材料,其重量为 70mg,实施过程同实例 1 ;其制备步骤省略了步骤 1)、2)。

[0063] 本发明所研制的新型高仿真神经组织工程修复材料具有可简易调控的内径大小在 20 ~ 200  $\mu$  m 之间的各种尺寸的孔径和平行、均匀的单一轴取向的纵轴向微管以及广泛沟通的管间微孔结构。该材料还可方便的制成不同的外型,如圆柱型,椭圆柱型等。在生物组织工程材料的应用中,较大孔径的对细胞附壁爬行或灌注如嗅鞘细胞、雪旺细胞等起支架、载体作用 ;而较小孔径的则适宜于复合各种神经生长因子、药物等,作为其缓释的载体,用于脊髓或周围神经组织缺损处的桥接。本发明所研制的材料无论内部轴向矩阵排列的微管结构,还是表面相对封闭结构,均接近于正常的神经组织结构,使得植入脊髓或周围神经组织缺损处,既能防止增生结缔组织长入缺损部位造成神经再生阻碍,又能有效物理引导再生神经纤维的定向生长,同时支持再生神经组织营养物质交换和代谢。广泛用于人体周围神经或脊髓节段性损伤的临床治疗和动物周围神经或脊髓节段性损伤的实验研究中。

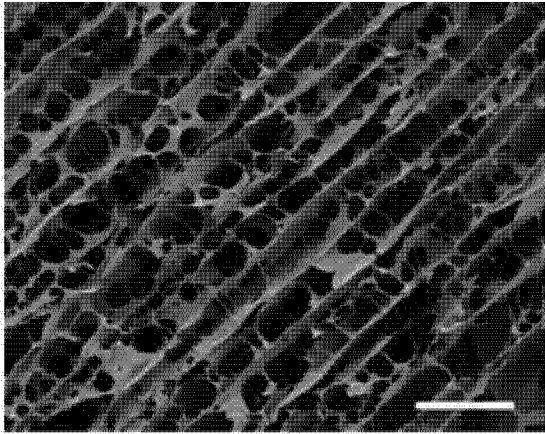


图 1

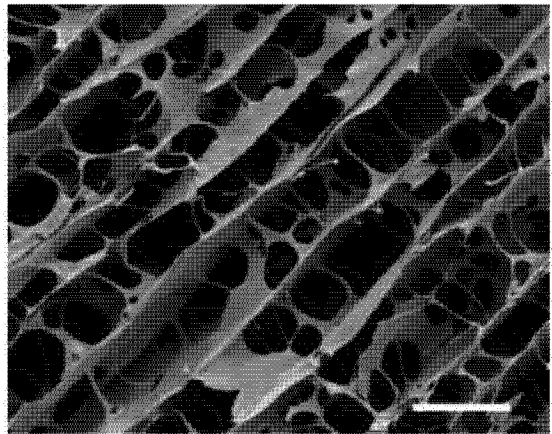


图 2

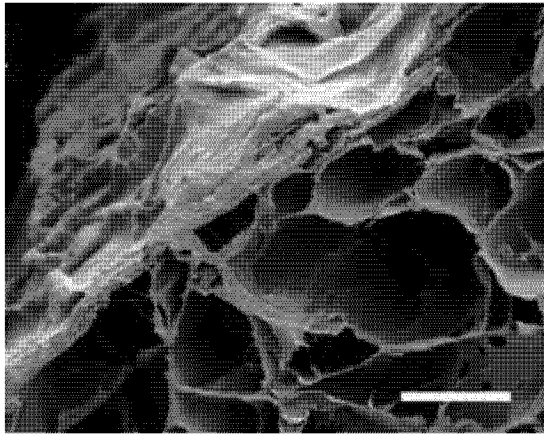


图 3

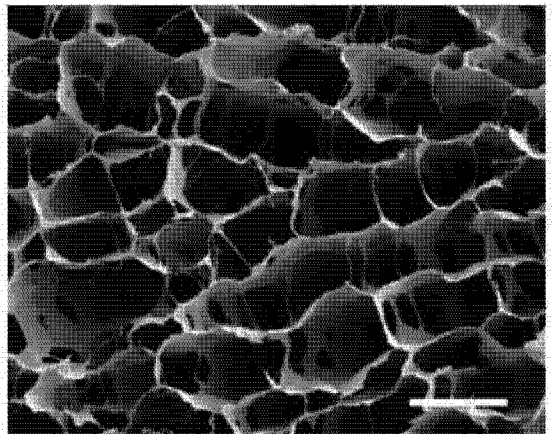


图 4