



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1972644 B

(45) 授权公告日 2010.08.25

(21) 申请号 200480040532.2

(22) 申请日 2004.11.22

(30) 优先权数据

60/524,278 2003.11.21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.07.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SG2004/000380 2004.11.22

(87) PCT申请的公布数据

W02005/048885 EN 2005.06.02

(73) 专利权人 骨棚国际私人有限公司

地址 新加坡新加坡城

(72) 发明人 张瑞兴 陈金清 D·胡特马赫

T·C·林 J-T·车滋 N·朱

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

A61F 2/28(2006.01)

A61L 27/58(2006.01)

A61L 27/56(2006.01)

A61L 27/18(2006.01)

(56) 对比文件

US 5383932 A, 1995.01.24, 全文.

US 2003/0100947 A1, 2003.05.29, 全文.

JP 特开平 9-173435 A, 1997.07.08, 全文.

US 2002/0111693 A1, 2002.08.15, 全文.

US 2002/0183858 A1, 2002.12.05, 全文.

US 5364400 A, 1994.11.15, 全文.

US 2002/0032488 A1, 2002.03.14, 全文.

审查员 王锐

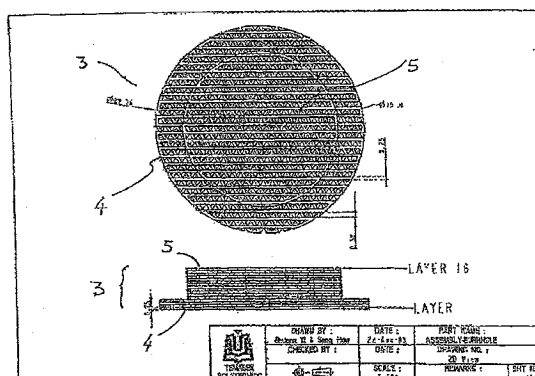
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 29 页

(54) 发明名称

用于骨组织再生的生物可吸收插销式植入体和方法

(57) 摘要

一种生物可吸收的插销式植入体,适于骨组织重建,其包含第一部分,和从第一部分向外延伸的第二部分,第一和第二部分是由膨胀材料制成的。骨骼组织重建的方法,包括步骤:提供生物可吸收的插销式植入体,其中植入体包括第一部分和从第一部分向外延伸的第二部分,第一部分和第二部分都是用可膨胀材料制成的;将第二部分插入到骨骼的缺陷或缝隙处,第一个表面接合了缺陷或缝隙的外轮廓;使插销植入与体液接触,因此插销植入的尺寸膨胀从而使这种插销与缺陷或缝隙相适合。



1. 一种生物可吸收的插销式植入体,其适合于骨组织再生,其包括第一部分,以及从第一部分向外延伸的第二部分,第一和第二部分由可膨胀材料形成,并且其中膨胀材料是在与亲水性液体接触时膨胀的多孔材料。

2. 如权利要求 1 中的插销式植入体,其中插销式植入体具有完全相互联结的多孔结构以及 60 到 70% 的多孔率。

3. 如权利要求 1 的插销式植入体,其中这种插销式植入体形状为类似圆锥形,截断的圆锥形,五面体,截断的五面体,和 / 或未张开的蘑菇形状。

4. 如权利要求 1 的插销式植入体,其中第一部分包括第一表面,第二部分包括第二表面,其与第一表面相对,第一表面的面积小于第二表面的面积。

5. 如权利要求 4 的插销式植入体,其中第一和第二表面是平面。

6. 如权利要求 4 的插销式植入体,其中第一和第二表面为圆形,正方形或者矩形。

7. 如权利要求 1 的插销式植入体,其中插销式植入体为锥形形状。

8. 如权利要求 1 的插销式植入体,其中第一部分的厚度为 X,第二部分的厚度为 Y, X : Y 的比值从 1 : 1 到 10 : 1。

9. 如权利要求 1 的插销式植入体,其中膨胀材料包括生物可吸收的聚己酸内酯。

10. 如权利要求 9 中的插销式植入体,其中膨胀材料是通过一层层地放置聚己酸内酯细丝制备的。

11. 如权利要求 9 的插销式植入体,其中材料是通过使用融合沉积模型技术一层层地放置聚己酸内酯细丝制备的。

12. 如权利要求 10 的插销式植入体,其中聚己酸内酯细丝的层的方向为 0 度,60 度和 / 或 120 度。

13. 如权利要求 1 的插销式植入体,其中这种膨胀材料包括生物可吸收的磷酸三钙-聚己酸内酯。

14. 如权利要求 13 中的插销式植入体,其中磷酸三钙-聚己酸内酯中磷酸三钙与聚己酸内酯的重量之比是 20 : 80。

15. 如权利要求 13 的插销式植入体,其中这种磷酸三钙-聚己酸内酯具有 60-70% 的多孔率。

16. 如权利要求 1 中的插销式植入体,其中这种插销式植入体包括用于放置或除去导管的开口。

17. 如权利要求 1 的插销式植入体,其中插销式植入体在与亲水性液体接触时膨胀。

18. 如权利要求 17 的插销式植入体,其中所述亲水性液体为体液。

19. 如权利要求 1 的插销式植入体,进一步包括生物活性剂。

20. 如权利要求 1 的插销式植入体,进一步包括播撒在插销式植入体的生物可吸收支架上的细胞。

21. 如权利要求 20 中的插销式植入体,其中细胞是干细胞。

22. 如权利要求 20 的插销式植入体,其中细胞是间叶细胞的干细胞。

23. 一种生物可吸收的插销式植入体,其适于骨骼组织再生,其包括第一部分,以及从第一部分向外延伸的第二部分,第一和第二部分是由膨胀材料形成,其中所述的膨胀材料是通过一层层地放置聚己酸内酯细丝来制备的,并且其中所述的膨胀材料在与亲水液体接

触的时候膨胀。

24. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中插销式植入体形状为类似圆锥形,截断的圆锥形,五面体,截断的五面体,和 / 或未张开的蘑菇形状。

25. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中第一部分包括第一表面,第二部分包括第二表面,其与第一表面相对,第一表面的面积小于第二表面的面积。

26. 如权利要求 25 的插销式植入体,其中第一和第二表面是平面。

27. 如权利要求 25 的插销式植入体,其中第一和第二表面为圆形的,正方形的或者矩形的形状。

28. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中插销式植入体具有锥形形状。

29. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中第一部分的厚度为 X,第二部分的厚度为 Y, X : Y 的比值从 1 : 1 到 10 : 1。

30. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中膨胀材料是多孔的材料。

31. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中插销式植入体具有完全相互连接的多孔结构以及 60 到 70% 的多孔率。

32. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中膨胀材料是通过使用融合沉积模型技术一层层地放置聚己酸内酯细丝制备的。

33. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中聚己酸内酯细丝的层的方向为 0 度,60 度和 / 或 120 度。

34. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中膨胀材料包括生物可吸收的磷酸三钙 - 聚己酸内酯。

35. 如权利要求 34 中的插销式植入体,其中磷酸三钙 - 聚己酸内酯中磷酸三钙与聚己酸内酯的重量之比是 20 : 80。

36. 如权利要求 34 的插销式植入体,其中磷酸三钙 - 聚己酸内酯具有 60-70% 的多孔率。

37. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中这种插销式植入体包括放置或除去导管的开口。

38. 如权利要求 23 的插销式植入体,其中所述亲水液体为体液。

39. 如权利要求 23 的插销式植入体,进一步包括生物活性剂。

40. 如权利要求 23 的插销式植入体,进一步包括接种于插销式植入体的生物可吸收支架上的细胞。

41. 如权利要求 40 中的插销式植入体,其中细胞是干细胞。

42. 如权利要求 40 的插销式植入体,其中细胞是间叶细胞的干细胞。

43. 包括如权利要求 1 的插销式植入体的试剂盒。

44. 包括如权利要求 23 的插销式植入体的试剂盒。

用于骨组织再生的生物可吸收插销式植入体和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于骨组织再生的可扩张的生物可吸收植入体以及用于骨组织重建和再生的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 骨,例如颅骨的重建,已经成为进行中的广泛研究。针对颅骨的重建,尽管一些报道侧重于大的和复杂型颅骨缺陷的重建,而对于那些颅骨钻孔治疗中的小的但是对于美容不重要的骨骼缝隙的报道很少。颅骨钻孔治疗通常产生小的但是不需要的头皮和皮肤的减少。硬膜下的血肿是一个普遍的问题,特别是如果患者具有头部损伤,这种损伤是由于事故或者由于中风在大脑中产生的血液堵塞引起的。颅骨环钻治疗工艺包括在患者的头盖骨上钻一个直径典型地为 14 到 19mm 的孔。

[0004] 已经有不同的骨骼移植或骨骼替代材料用来弥补这些缺陷,其通常不能使骨骼再生和重建缺陷。Tessier(Tessier 1982) 已经报道使用劈开颅盖的自体同源移植来连接或弥补缺陷。这种技术给出了一个便宜的并且直接的处理方法但是有时主要的切口必须被延伸从而实现与周围颅盖骨的移植。但是,骨骼组织移植物的使用中存在问题。如果患者自己的骨用作移植,外科医生必须进行一个额外的、损伤的手术来得到骨样品。如果骨移植植物来自另一个人的或者动物的骨,可能出现病毒污染或者免疫学问题,即使这种移植是处理过的从而使其与患者的组织相兼容。

[0005] 使用自体同源移植材料的另一个可能性是在穿颅术过程中收集骨粉以及将它与类似纤维胶体的水溶胶进行混合并且在该步骤后使用其粘贴来填充这种缺陷(Matsumoto, 1998)。

[0006] 基于金属的骨塑料材料已经广泛地应用于钛板和网的形成。这种高生物兼容性和机械强度与易于操作和精密安装结合因此可能需要相对高的成本(Broadbuss, 2002)。硅胶,在医学上经常使用的生物材料也可以用作颅骨钻孔覆盖,但是由于它的生物兼容性而引起了争论,比如报道显示了由于病态组织对其中的人造橡胶反应所产生的外来物体反应的形成(Winkler 2000)。

[0007] 近几年的研究转移到骨诱导生物材料和植入体方面其允许骨骼组织的生长并且因此更好的与植入体进行结合。这种使用生物再吸收材料和组织工程的趋势已经产生了膜层最终被同源的骨骼所代替(Habal1999, Stendel 2001, Schantz 2003a, b)。Kobayashi 等人(1987) 已经设计了并且制作了不同的氧化铝陶瓷植入体来构建颅骨环钻孔并且防止在皮肤上出现术后凹痕。基于羟基磷灰石的陶瓷植入体变得越来越普遍是由于它们的机械特性,诱导骨形成和综合特性(Yamashina, 1989, 1993, Miake, 2000)。Yamashina 已经设计了羟基磷灰石板其在形状上是半球形的和椭圆形的因此它们适合枕骨区域的凸面。作者还设计了 HA- 纽扣来符合颅骨钻孔缺陷以及磷灰石颗粒对于线性头盖骨缺陷。一种特殊设计的基于羟基磷灰石的“钥匙-孔纽扣”由 Koyama 等人(2000) 为环锯术缺陷而设计。

[0008] 已经发展得到了不同的外科手术方法和植入手段特别是为了治疗与颅骨钻孔缺陷有关的急性的或慢性的硬膜下血肿。在这些情况下经常需要放置一个分流器或导管来控

制或者排出头盖骨内部的或者周围的流体并且平行于压力特征的控制。Emonds 和 Hassler 已经发展了一种中空的螺栓其允许放置一个导管 (1999) 但是 Dujovny 等人 (2002) 设计了一个用于脑水肿分流排水的基于钛的颅骨钻孔覆盖其包括一个与螺栓有 5 个接触边的圆盘以及一个类似打开的钥匙孔。

[0009] 美国专利 NO. 6, 350, 284 (' 284) 公开了一种生物可吸收头盖植入物, 其由一个刚性板和一个含有直径为 30 到 1000 μm 的孔的纤维网层构成。但是, 这种植入需要通过附加手段安装到骨骼上, 例如, 缝合线, 粗缝, 或者螺栓, 因此这种方法并不实用。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明解决了上述问题, 特别是, 提供了新的和改进的植入物, 其适于组织骨再生和骨重建, 易于使用并且不需要连接至骨的手段。骨质缺陷或缝隙的组织骨再生可以是部分的或者完整的; 后者的情况中, 为了本申请的目的, 将标志为骨重建。

[0012] 特别是, 本发明公开了适于骨组织再生的生物可吸收插销式植入体, 其中植入体包括第一部分, 以及从第一部分向外延伸的第二部分, 第一和第二部分是由膨胀材料形成的。

[0013] 本发明的插销式植入体可以具有任意的形状从而适于插入到骨骼的缺陷中去, 例如, 插销式植入体可以是类似圆锥形, 截短的圆锥形, 五面体, 截短的五面体, 和 / 或未张开的蘑菇的形状。

[0014] 根据本发明插销式植入体的特定方面, 第一部分包括第一表面, 第二部分包括第二表面, 其与第一表面相对, 第一表面的面积小于第二表面的面积。插销式植入体的第一和第二表面可以具有圆形的, 正方形的或者矩形的形状。第一和第二表面可以是平面。

[0015] 根据一实施方案, 本发明的插销式植入体具有锥形的形状。

[0016] 根据另一实施方案, 插销式植入体包含厚度为 X 的第一部分, 以及厚度为 Y 的第二部分, X : Y 的比值为 1 : 1 到 10 : 1。

[0017] 本发明的插销式植入体由接触亲水性溶液、亲水性液体和 / 或体液后膨胀的材料制成。

[0018] 这种膨胀材料可以由多孔材料形成。

[0019] 本发明的插销式植入体优选可以由包含生物可吸收聚己酸内酯 (PLC) 的膨胀材料制成。例如, 20% TCP-PCL。可以通过一层层地放置 PLC 细丝来制备插销式植入体, 例如使用融合沉积成型 (FDM) 技术。

[0020] 插销式植入体的 PLC 细丝层的方向为 0 度, 60 度和 / 或 120 度。

[0021] 根据进一步的实施方案, 插销式植入体包括开口, 用来放置和除去排水的导管。

[0022] 特别是, 插销式植入体适于插入到骨骼的缺陷或者缝隙处并且插销式植入体不需要将插销固定到骨骼外表面的方法。

[0023] 插销式植入体进一步包括一个生物活性剂。

[0024] 本发明进一步提供了一种骨组织再生的方法, 其包括以下步骤:

[0025] 提供生物可吸收插销式植入体, 其中这种植入体包含第一部分和从第一部分向外延伸的第二部分, 第一和第二部分是由膨胀材料形成;

[0026] 将第一部分插入到骨骼的缺陷或者缝隙处, 第二部分接合了缺陷或者缝隙的外轮廓;

[0027] 允许插销式植入体与体液接触,从而使插销式植入体的尺寸膨胀使得插销与缺陷或者缝隙相适合。

[0028] 在本发明的方法中,植入体可以包括第一表面和第二表面,相互对着,第一表面的面积小于第二表面的面积。

[0029] 在本发明的方法中,插销式植入体可以由多孔材料形成允许骨细胞渗入到插销式植入体中并且再生骨骼组织。

[0030] 这种方法可以用于任意的骨骼组织再生。例如,可以是实施头颅成形术的方法。

[0031] 本发明方法中,插销式植入体被插入到骨骼的缺陷处,在这种方法中插销式植入体和骨骼缺陷的最初偏差为小于 1mm,小于 0.5mm,或者小于 0.2mm。

[0032] 根据本发明的方法可以用作骨质缺陷重建的治疗处理或者可以用作不重要的骨质缝隙美容重建的非治疗型处理。

[0033] 这种方法可以用于骨骼组织再生和 / 或骨质重建。

[0034] 附图的简要说明

[0035] 图 1 显示了为模型颅骨 (1) 上的排水 / 冲洗和神经学检查而形成的典型的钻孔或缺陷 (2)。

[0036] 图 2 是情况 1 中钻孔插销 (3) 设计的正视图。插销式植入体 (3) 包括第一或上表面 (5) 和第二的下表面 (4)。

[0037] 图 3 是图 2 的情况 1 中钻孔插销 (2) 设计的等大视图。

[0038] 图 4A 显示了实施方案,其中插销式植入体 (30) 的第一或者下表面 (50) 插入骨缺陷处,且其中插销式植入体具有锥形形状。图 4B 显示了图 2 和 3 的实施方案。

[0039] 图 5(A,B) 显示了图 4(a,b) 的实施方案,进一步包含开口,用来插入和 / 或除去排水导管。

[0040] 图 6(A,B,C) 显示了在钻孔插销设计中 PCL 细丝的 0/60/120° 的层方向。(a)0 度方向的 PCL 细丝层 ;(b)60 度方向的 PCL 细丝层 ;(c)120 度方向的 PCL 细丝层。

[0041] 图 7 是情况 2 中心孔钻孔插销设计的正面的和等大的视图,其使得可以容易地放置和除去导管。

[0042] 图 8 显示了术后几周的 CT,显示了两个颅骨钻孔 (左侧);在术后 3 个月的 CT 植入体充分整合并且在人患者中开始矿物化 (右侧)。

[0043] 图 9 是两名患者的术后视图,显示了头发已经在覆盖缺陷的皮肤上生长。

[0044] 图 10 显示了 20% TPC PCL 支架的结构。空 TPC-PCL 支架的 SEM 显示了直径 400-600 μm 互相连接的孔。

[0045] 图 11 和 12 显示了层 - 支架的结构。

[0046] 图 13 体外培养 3 周的细胞连接 (phalloidin 染色) (200x)。

[0047] 图 14(A, B) 细胞增殖 (内部 FDA-PI 染色)。A) 体外一周 (100x)。B) 体外 5 周 (200x)。

[0048] 图 15(A,B) 细胞层 - 支架构造。照片 (A) (俯视图) 和 (B) (侧视图) 显示了在诱导的情况下在体外培养 3 周后,形成的覆盖支架的细胞层和胶原纤维。

[0049] 图 16(A, B) 细胞层 - 支架构造 (在支架内)。A) 是侧视图,以及 B) 是俯视图。

[0050] 图 17(A, B) 构建体上的 von Kossa 染色。照片 (A) (100x) 和 (B) (400) 显示了在

支架上形成的矿化结节,诱导后 5 周。

[0051] 图 18. Alamar 蓝色试验。

[0052] 图 19. 细胞层状支架构建体中的细胞内 ALPase 活性。

[0053] 图 20. 通过 ELISA 测定的释放进入培养基中的 ALPase。

[0054] 图 21 RT-PCR 试验。体外 RT-PCR 剖析图显示了层支架构建体的 *osterix*, 骨钙素和骨桥蛋白的 mRNA 表达水平在诱导后显著增加了, 同时 I 型胶原和 *Cbfa1* 的表达水平轻微增加了。

[0055] 图 22 *osterix* 和骨钙素表达水平的 RT-PCR 试验。在诱导骨骼形成后 *osteorix* 和骨钙素的表达水平提高了 10 到 5 倍。数据按照 PCR 产品的密度进行计算。

[0056] 图 23 和 24 蛋白剖析图, 显示了诱导骨骼形成后特别观察到的层支架构建体中的骨钙素, 以及骨桥蛋白的表达水平在诱导后显著提到了 4-5 倍。

[0057] 图 25 (A, B) 层支架构建体的植入。

[0058] 图 26 (A, B) 体内试验中的层支架构建体, 4 周 (A) 后和 8 周 (B) 后。

[0059] 图 27 (A, B, C) 软 X- 射线。通过 25KV, 6. 3Mas 的 X- 射线显现的骨形成。(A) 在裸鼠中植入 4 周后。(B) 8 周。(C) 12 周。骨骼主要在支架的周围形成。

[0060] 图 28. 皮层骨形成的微型 CT 分析。由植入的层支架构建体形成的骨骼的体积和表面积都随着时间降低了。

[0061] 图 29 (A, B) 植入后 4 周 (A) 和 8 周 (B) 样品的组织学数据 (中性红染色)。组织学数据显示了骨骼主要在支架的表面形成; 纤维组织在支架的内部形成。

[0062] 图 30 (A, B, C) 植入 8 周后的 H/E 染色。H/E 染色显示了层支架的骨骼形成可能经历了软骨化 (endochondry) 步骤因为在骨骼组织中发现了一些类软骨细胞。(A) 25x; (B) 100x; 和 (C) 400x。

[0063] 图 31 (A, B) 荧光标记细胞形成了骨骼。(A) 4 周; (B) 8 周。都是 400x。大多数新形成的骨骼组织是由绿色荧光标记的 PMSCs 形成的。

[0064] 发明详述

[0065] 本申请说明书中所提到的参考书籍目录为了方便以参考文献列表的形式进行列举并且添加到实施例的后面。这些参考书籍目录的整个内容在此引入作为参考。

[0066] 本发明的一方面涉及适于骨骼组织再生的生物可吸收插销式植入体的构建。骨质缺陷或者缝隙的骨骼组织再生可以是部分的或者是完整的; 在后一种情况下, 为了本发明的目的, 将其表示为骨重建。

[0067] 生物可吸收插销式植入体和骨骼组织再生方法可以应用于任意的骨质缺陷或缝隙。本发明插销式植入体的特定应用是例如头颅成形术。

[0068] 根据本发明的植入体具有插销的形状。为了本发明的目的, 适于骨组织再生和 / 或骨重建的插销式植入体被定义为基本上紧密适合骨缺陷或缝隙的植入体, 例如骨骼上的孔, 其被用于填补缺陷或者缝隙或者作为楔子或塞子。为了本发明的目的, 缺陷或者缝隙是指骨骼上的洞。术语缺陷指认为是疾病并需要进行治疗处理的情况, 同时术语缝隙是指不是疾病并可能为了美容的目的而进行非治疗处理的情况。为了本申请的目的, 术语“钻孔”通常被用于表示这种缺陷和 / 或缝隙。本发明的插销式植入体也可以被表示为“钻孔插销”。用于形成这种插销式植入体的膨胀材料的构造也可以被称为“支架”。

[0069] 特别是,本发明公开了适于骨组织再生的生物可吸收插销式植入体,其中这种植入体包括第一部分,以及从第一部分上向外延伸的第二部分,第一和第二部分都是由膨胀材料形成的。

[0070] 本发明的插销式植入体可以具有任何适合插入到缺陷或者缝隙中去的形状,例如,这种插销式植入体可以形成类似圆锥形,截断的圆锥形,五面体,截断的五面体,和 / 或未张开蘑菇的形状。

[0071] 根据本发明插销式植入体的特定的方面,第一部分包括第一表面,第二部分包括第二表面,其与第一表面相对,第一表面的面积小于第二表面的面积。这种插销式植入体的第一和第二表面可以是圆形的,正方形的或者矩形的形状。第一和第二表面可以是平面。

[0072] 用于制备本发明插销式植入体的原料当与亲水溶液,亲水液体和 / 或体液接触的时候会膨胀。

[0073] 图 1 显示了包括一个钻孔 (2) 的颅骨 (1) 示意图形,其为了本发明的目的可以被定义为缺陷 (2) 或缝隙 (2)。

[0074] 参考图 2,其示范了本发明的一个实施方案,插销式植入体可以形成类似一个“未张开的蘑菇” (3) 形,包括第一部分 (5),和从第一部分向外延伸的第二部分 (4),第一和第二部分是由膨胀材料形成的。但是本发明的插销式植入体不限于未张开的蘑菇的形状而是可以具有任何适合于插入到骨骼缺陷中去的形状,例如,插销式植入体形状可以类似圆锥形,截断的圆锥形,五面体,截断的五面体,和 / 或未张开的蘑菇的形状。

[0075] 更特别是,在图 2 所示范的实施方式中,第一部分 (5) 包括第一表面 (5),第二部分 (4) 包括第二表面 (4),其与第一表面相对,第一表面的面积小于第二表面的面积。在图 2 中,这种插销式植入体的第一和第二表面具有圆形的形状。第一和第二表面具有平面。但是,形状不限于圆形的形状,而是可以例如,正方形或者矩形的形状。相似地,表面不限于所述的表面而是可以具有任意的适合于本发明目的的表面,例如,一种不规则形状,圆锥形,尖锐的,或者椭圆的形状都在本发明的范围之内。

[0076] 第一和第二部分也可以按照它们的厚度进行划分。特别是,第一部分 (5) 包括第一表面,厚度为 X,同时第二部分 (4) 包括第二表面,厚度为 Y,X : Y 的比值可以从 1 : 1 到 1 : 10。更特别的是,在图 2 中,X : Y 的比值为 11 : 4,也就是说,第一部分 (5) 包括 11 层,同时第二部分包括 4 层。本领域技术人员可以按照插销式植入体的特定形状和骨骼、钻孔的类型,和患者、人类或动物的特定情况来选择层的数量。作为一个特定的实施例,插销式植入体可以按照这种方法设计成第二部分的厚度为 1mm 和第一部分的厚度为 3mm。

[0077] 图 3 是图 2 实施方案的等大视图。更特别的是,图 3 显示了从生物可降解的聚合物细丝制备成的分层支架结构。

[0078] 按照一个进一步的实施方案,本发明的插销式植入体具有锥形形状或者可以具有任意适合于插入到骨骼缺陷中去的形状,例如,这种插销式植入体的形状类似圆锥形,截断的圆锥形,五面体,截断的五面体,和 / 或未张开的蘑菇的形状。

[0079] 图 4(A) 显示了一个具有锥形形状的插销式植入体,包括第一部分 (50),其包括第一表面 (50),以及第二部分 (40),其包括第二表面 (40),与第一表面相对,第一表面 (50) 的面积小于第二表面 (40) 的面积。插销式植入体的第一部分 (50) 插入到骨骼的缺陷或者缝隙中同时第二部分 (40) 用来与缺陷或者缝隙的外表面接合从而避免这种插销式植入体穿

透到骨骼洞穴内。

[0080] 插销式植入体的第一和第二表面可以为圆形的,正方形的或者矩形的形状。第一和第二表面可以为平面。

[0081] 图 4(B) 显示了图 2 和 3 的实施方案。

[0082] 按照本发明的任意的实施方案这种插销式植入体的尺寸以及第一和第二部分可以由技术人员根据骨骼缺陷或者缝隙的尺寸来进行选择。例如,这种插销式植入体可以按照这样一种方法设计成第二部分厚度为 1mm 和第一部分厚度为 3mm。这种插销式植入体可以具有例如直径为 15mm 的第一部分和直径为 20mm 的第二部分(参见图 2 和 3)。

[0083] 本发明插销的特定的形状结合这种材料其中该材料当与亲水溶液、亲水液体或者体液接触的时候可以膨胀或者扩大(例如聚己酸内酯(PCL))从而允许这种插销式植入体“突然地进入”缺陷或者缝隙中而不需要连接这种插销和骨骼的手段。因此本发明的插销植入的使用可以不需要类似螺钉的连接手段,其被用于头颅成形术钛金属板所使用或者其对于 US 6,350,284 中所述的植入来说是必需的。因此,本发明的插销式植入体不需要开孔以插入连接骨骼表面的手段,例如螺钉。螺钉的节省意味着一个重要的进步-其允许在可能的最短的时间内对转孔插销进行简单安装。

[0084] 更特别的是,在插销式植入体和骨骼上(例如,在头盖骨上)缺陷或缝隙间的最初偏差不超过 1.0mm,不超过 0.5mm 或者不多于 0.2mm,允许这种“突然地插入”设计有效地操作。更大的第二部分(“顶部的帽子”)保证了这种插销式植入体保留在骨骼缺陷或者缝隙的外轮廓的位置上而不会意外地进入结构骨骼(例如,头盖骨)厚度以下太深。

[0085] 此外,膨胀的材料可以是多孔的材料。例如 20% 的 TCP-PCL。更特别的是,具有 60-70% 孔的 20% 的 TCP-PCL。优选,具有 65% 孔的 20% 的 TCP-PCL。由于多孔结构的弹性的可压缩性从而允许这种插销式植入体更好的与缺陷或者缝隙的外轮廓相适合。它将被评述为一个刚硬的结构,就像在 US 6,350,284 中所描述的结构不具有这样一个能力。插销式植入体的支架可以为完全相互连接的多孔结构以及接近 60 到 70% 的多孔率。当支架被植入到体内的时候,这种形态允许细胞被收集和增生扩散(Hutmacher 等人,2001)。

[0086] 图 5(A) 和 (B) 以及图 7 显示了一个进一步的实施方案其中插销式植入体包括一个开口(600,610),来放置用于排水的导管。这种设计允许导管的简便的安装和除去,该导管可以以一定的角度插入到支架中来实现排水目的。

[0087] 任意的在本领域中已知的适合于构建本发明插销式植入体的生物可吸收的材料可以被使用。例如,任意的生物可吸收的聚合物或者共聚物可以被使用。特别是,一种生物可吸收的聚己酸内酯(PCL)聚合物,其已经被证明是生物兼容的,降解缓慢并且允许骨骼细胞粘接和增生扩散,已经被证明特别适合于本发明的目的。随着这种细胞表达的时间它们拥有了额外的细胞矩阵和骨骼类似结构,其是由于 PCL 被身体再吸收并代谢。TCP-PCL(每体积 20% 重量)混合的支架使用一个不含固体形式的制作技术,被称为融合沉积模型(FDM),在磷酸三钙(TCP)与 PCL 结合后可以按照(Dennis 等人,2003)进行制备。更特别的是,20% 的 TCP-PCL 具有 60-7-% 的孔,优选 65% 的孔可以被使用。更重要的是,计算机控制的 FDM 工艺允许这种具有适合的机械强度并模仿了体内骨骼结构的多孔支架的设计和构建。这种方法包含了组织工程的概念。这种插销式植入体的支架设计可以按照本领域中已知的任意方法进行构建。例如,通过一个快速的成型过程来一层层地放置 PLC 细

丝,比如所谓的“融合沉积模型”(FDM)(Iwan Zein 等人,2002)。这些细丝可以按照任意适合的方向进行沉积,例如 PLC 细丝层的方向可以为 0 度,60 度和 / 或 120 度(参见图 6A,B,C)。

[0088] PCL 支架的设计和制作

[0089] 生物可降解的聚合物植入体是由一种医疗级聚己酸内酯(PCL,黏度 1.0-3.0;伯明翰,A1)使用 FDM 快速成型技术(FDM 3D Modeller,来自于 Stratasys Inc, Eden Prairie, MN)。这种支架具有一个完全相互连接的多孔结构并且多孔度接近 60 到 70%。这种可生物降解的聚合物是 TCP-PCL。特别是,三维的 TCP-PCL(20 : 80%)。更特别的是,三维的 TCP-PCL(20 : 80%)具有 60-70%的孔,优选 65%的孔。当支架被植入到体内的时候这种形态允许细胞被收集和增生扩散(Hutmacher 等人,2001)。这种支架的几何形态首先在 Unigraphics CAD 软件中进行制作并随后以“STL 文件”的形式输出到 Stratasys QuickSlice™ 软件中。对于所有的层,采用了一个简单的轮廓和光栅-填充图案。0/60/120° 的放置模式被用来形成三角形孔的模式(图. 6A, B, C)。这种生产 FDM 细丝的方法是本领域中所公知的。

[0090] 细胞可以在支架上培养。作为一个实施例,间叶细胞的干细胞(MSC)可以被使用。在通过在具有骨传导或诱导骨形成特性的多孔支架上播撒 MSCs 来修复骨骼缺陷方面已经进行了大量的研究。Caplanh 和 Bruder(1997)首先描述了这样一种技术其中在手术植入到骨骼缺陷处之前有大量的细胞被培养在陶的(ceremaic)支架上。但是,要成为有用的临床应用,关于培养技术和支架特性的问题必须要被克服。在培养中增殖 MSCs 从而获得更可靠的矿物化和骨骼形成率的改进技术首先被开发出来。随后,使用 MSCs 分化的造骨细胞中的二维培养的检查已经显示了成骨质发展的特征性模式并且建立了控制 MSCs 转变造骨细胞的事件层次(Nicole 等人,2003)。除了二维培养,也已经对 MSCs 在不同的三维支架上的生长进行了研究,其中最初的播种密度对于体外分化和随后的体内骨骼形成具有重要的影响。此外, MSCs 的密集培养已经显示出提高了分化和矿物化,与低密度培养相比产生了更高水平的碱性磷酸酶(AP)活性。为了获得更好的骨骼-诱导环境,具有高细胞数的细胞层已经被应用于三维支架。这种细胞层簇技术已经在大量的文章中证明对组织工程是有效的。首先,与酶学处理相比移植单一的细胞层用于皮肤和角膜重建已经证明了更为成功(Kushida 等人,2001)。其次,不同细胞层的层可以被用于重建复杂的具有多样细胞类型的组织。使用这种技术,已经在没有合成的或外源的材料条件下利用培养人类细胞而建成了血管,其证明了具有足够的机械强度来保证体内的移植(Nicolas,1998)。最后,通过放置几层细胞层,可以构建包括肝脏,肾脏和脉管器官的薄层结构(Shimizu 等人,2001)。

[0091] 进一步,本发明也提供了特别是,插销式植入体适于被插入到骨骼的缺陷或缝隙处并且插销式植入体不需要将这种插销固定到骨骼外表面的手段。

[0092] 这种插销式植入体可以进一步包括一个生物活性剂。

[0093] 本发明进一步提供了骨骼组织再生的方法包括的步骤为:

[0094] 提供生物可吸收的插销式植入体,其中这种植入体包括第一部分和从第一部分向外延伸的第二部分,第一和第二部分是由膨胀的材料形成的;

[0095] 将第一部分插入到骨骼的缺陷或缝隙处,第二部分与缺陷或者缝隙的外表面接合;

[0096] 使插销式植入体与体液接触,因此膨胀插销式植入体的尺寸,从而使这种插销与缺陷或者缝隙相适合。

[0097] 在本发明的方法中,这种植入可以包括第一和第二表面,二者相对,第一表面的面积小于第二表面的面积。

[0098] 在本发明的方法中,插销式植入体可以由多孔材料形成,其允许骨骼细胞渗透到插销式植入体中并且再生骨骼组织。插销式植入体可以形成类似圆锥形,截断的圆锥形,五面体,截断的五面体,和/或未张开的蘑菇的形状。例如,第一和第二表面可以具有平面。进一步,第一和第二表面可以具有圆形的,正方形的或者矩形的形状。

[0099] 在本发明的方法中,这种插销式植入体可以由多孔的材料形成,其允许骨骼细胞渗透到插销式植入体中并且再生骨骼组织。

[0100] 本发明的方法可以被针对任意形式的骨骼结构的用于骨骼组织再生和骨骼修复,但是,它特别适用于进行头颅成形术。

[0101] 按照这种方法,插销式植入体和骨骼的缺陷或缝隙具有最初偏差为小于 1mm。特别是,最初偏差小于 0.5mm。优选,最初偏差小于 0.2mm。

[0102] 本发明的方法也可以包括在插销式植入体的开口放入导管来进行排水。

[0103] 本发明的方法特性是插销式植入物插入骨缺陷时并不需要在骨缺陷周围部分的骨外表面固定插销。

[0104] 本发明的方法可以是一种治疗动物,包括人组织骨再生和缺陷骨的修复的方法。这种方法可以是用于不重要的骨质裂痕的美容修复的非治疗方法。

[0105] 目前已经概括性地描述了本发明,通过下面的实施例将更容易理解,实施例经由图解的方式提供,其不能被理解为对本发明的限制。

[0106] 实施例

[0107] 实施例 1

[0108] 临床前的实验结果

[0109] 一个预临床研究在国立大学医院 (NUH) 对 10 名患者进行。该研究由国家和国际道德规范顾问部 (National and International Ethics Advisory Board) 检查,并且得到新加坡 NUH 道德委员会 (Ethics Committee, NUH, Singapore) 的允许。患者的合格条件是慢性硬膜下的血肿。他们被告知优于手术的不同的选择。例如图 8,一个 (左边) 显示两个钻孔的 CT 扫描。一个手术后 3 天的 CT 扫描显示 FDM PLC 支架 / 细胞移植被安装到位置,以及头盖骨的 3D 图已经被很好地重建。这里没有结块现象或者流体淤积出现。PCL 的缓慢降解动力学提供了一个稳定的模板并且符合颅骨的形状。没有膨胀出现。早在移植这个移植体之后的 3 个月就已经整合并且开始矿物化 (Fig. 8, b (右侧))。触诊显示移植体在周围颅骨中的稳定的整合。毛发已被观测到已经在皮肤上生长覆盖了缺陷处 (Fig 9, a, b)。

[0110] b). 化妆效应明显可以被患者很好的接受。

[0111] 实施例 2

[0112] 在体外和体内将猪骨的间叶干细胞播撒在三维 TCP-PCL 支架内部和周围用来增加骨的形成。

[0113] 骨骼组织工程已经成为一个修复骨缺陷的有前途的技术。利用细胞培养和一个生物可降解支架的结合,用比传统骨移植有更好特性的构建可能证实作为一个骨移植的代替

品非常适合移植。在这项研究中,我们培养了自身同源的猪间叶干细胞(PMSCs)层,铺在三维空间的TCP-PCL的模型架(20%)上,并且检验它们的生骨分化与裸鼠的皮下移植后体内骨的形成。包含携带65%的孔的20%的TCP-PCL构建被利用作为PMSCs三维空间的矩阵,体外培养至八周。PMSCs的增值在一定间隔利用新陈代谢测定和共焦成像来评估。在骨质诱导的培养集中培养后8,PMSCs保持可行的矿化节结,其在支架的里外均可以看见。细胞内的碱性磷酸酯酶(ALP)活性在诱导之后增长 >50 倍,在培养阶段含有可溶解的ALP会继续增加。同样地,骨相关的转录因子 $osterix$,骨钙素(OPN),和骨桥蛋白(OCN)的mRNA表达,在诱导之后提高4~10倍,同时核心DNA结合因子1(Cbfa1)和胶原质I型转录子可以被轻微的调高。在蛋白质水平上,OCN提高10倍同时OPN水平提高2~4倍。移植到裸鼠之后,微-CT和X-射线检测4周后皮质和多孔骨质在构造内并且继续随着时间提高。大多数皮质骨骼在构造的周围被检测到,在构造内检测到多孔骨骼。组织学检测显示构造内形成的骨骼从植入的PMSCs池通过软骨骨化形成。这些发现证明PMSCs细胞层构造在体内和体外增生扩散并且骨化,提供了一个有用的检测成骨的三维空间模型。此外,潜在存在利用TCP-PCL构造作为体外可降解的支架,以及用于移植到位点来进行临床骨骼修复的预先播种的骨骼细胞层,尤其承重的骨细胞层。

[0114] 材料与方法:

[0115] 支架的制作和特性

[0116] 直到最近,PCL(Sigma, USA)在支架制作中的利用已经被限制在非临床的应用。为了符合该技术应用到临床,我们改用有着相同化学成分和特性的医学级的PCL(Birmingham, AL)。在FDM制作之前,医学级的PCL/CaP薄片通过一个细丝挤出过程使用一个在内部(built-in-house)的挤压机设备被制备成 $\Phi 1.70 \pm 0.10\text{mm}$ 的单纤维丝(图11和12)。一个来自Stratasys Inc的FDM 3000快速成型系统(rapid phototyping system)被利用制作一个体积尺寸为 $40 \times 40 \times 4\text{mm}$ (分别为长、宽、高)的支架。FDM的工作原理已经在其他地方被描述(Caplan等人,1997)。

[0117] 支架多孔性定义为真实支架体积和外观支架体积之比。真实体积是组成支架材料的体积,而外观体积是支架全部几何体积,包括内部空气空间。支架多孔性如已经在它处报道过的方法测量,支架的形态和气孔的大小通过扫描电子显微镜(SEM)检测。支架表面被喷金并且利用15Kv加速电压进行检测(Phillips XL30 FEG, Netherlands)。

[0118] 压缩测试通过一个Instron 4302材料测试系统由Series IX Automated Materials Tester v. 7.43系统软件利用1-kN测压元件(load-cell)操作来运行。支架根据ASTM D695-96指导方针检测。样品以1mm/min的速率被压缩到大约0.6N的张力水平。计算重压张力($\sigma - \epsilon$)弯曲,并测定压缩硬度(Young's系数)和支架的耐压强度。然后定义弯曲初始的线性部分的斜率从重压张力曲线计算坚硬度,任何脚趾区域(最初样品的沉淀)忽略不计。耐压强度可以从耐受点(yield point)上得到(如果有)或者在线性区域的末端。

[0119] 利用差示扫描量热法(DSC)进行热量分析,以研究原料的热量反应,并测定聚合物的结晶度分数。使用从Perkin-Elmer购得的热流量Pyris 6 DSC,将平均样品量5~12mg承放在从Perkin-Elmer购得的标准铝平板和盖中。样品从20到80℃以斜率5℃/min进行扫描,利用氮气作为净化气体。根据100%晶体PCL'的熔解值焓为139.5J/g计算结晶度

分数 (Pitt 等人, 1981)。

[0120] PCL 的平均分子量是由高效液相色谱利用凝胶透过色谱柱 (GPC) 测得的。PCL 支架的被切片并且溶解在浓度为 0.1% (1mg/mL) 四氢呋喃 (THF) 中。样品溶液进一步通过 0.2 μ m 的无机膜过滤器过滤, 聚合物分子量分布是利用安装了不同折射镜 (Waters 410) 和吸收率检测折射镜 (Waters 2690) 的 GPC 而测定的。样品是通过 Styragel 柱折射镜在流速为 1ml/min 下洗提的, 利用 THF 作为流动相。为了得到标准曲线, 使用聚苯乙烯标准 (Polysciences)。重量平均分子量的重量 (M_w) 和数量平均分子量的数量 (M_n) 以及多分散性 (M_w/M_n) 都被估测。

[0121] 其中, 利用 Student's t- 检验完成统计学分析, 可信度为 95% ($p < 0.05$)。

[0122] 细胞分离和培养

[0123] 猪间叶干细胞被分离并且按照以前报道的进行培养 (Hutmacher, 等人, 2001)。猪是从新加坡国立大学 (NUS) 的 Animal Holding Unit 在无适当的伦理问题之后获得, 并且骨髓的样品是根据 NUS 的伦理指导方针得到的。简言之, MSCs 是从骨髓中吸出并且倾斜离心, 而后在低葡萄糖 (GIBCO, Invitrogen, CA, USA) 和包含 2% 两性霉素 B (Sigma, MO, USA) 及 2% 抗生素 (200 μ g/ml 青霉素和 200 μ g/ml 链霉素) 的 Dulbecco's 修饰的 Eagle's 培养基 (DMEM) 在中培养, 在此次培养基作为标准培养基, 在 37°C 和 5% 的 CO_2 潮湿环境培养。细胞开始植入的密度是每 75 平方厘米的长颈瓶含 2×10^5 个细胞。所有的实验传代 (passage) 2 到 4 个培养代。细胞汇合时, 将培养基改变成骨质培养基, 其包含标准培养基加上 L- 抗坏血酸-2- 磷酸盐 (50ug/ml), β - 甘油磷酸盐 (10mM) 和地塞米松 (100nM) (Sigma, USA) 以诱导成骨分化 (已诱导的)。对照培养 (未经诱导) 在标准培养液中培养。所有的培养基两天更换一次。

[0124] 支架制作和细胞接种

[0125] TCP-PCL (20 : 80%) 支架, 每一个放置的模式为 0/60/120 和 65% 的多孔性, 通过融合沉积模型 (FDM) 按照我们以前的方法 (Hutmacher 等人, 2001) 而制作 (图 10, 11 和 12)。TCP-PCL 支架被切割成 4mm $\times$ 5mm $\times$ 5mm 的块然后利用 5M 的 NaOH 处理 1 小时以提高支架表面的疏水特性。支架然后彻底地利用 PBS 漂洗以去掉 NaOH 残渣, 利用 75% 的乙醇至少浸泡半小时而后风干。然后将标准培养液中的细胞 (在 20 μ l 中 5×10^5) 播种到支架中在加入培养基之前, 在 37°C 粘附 2 小时。

[0126] 细胞薄片支架构造

[0127] 使用消毒后的细的镊子将汇合诱导 (A 组) 和未诱导的 (B 组) MSCs 薄片 (25cm²) 轻轻地长颈瓶剥落, 包裹预先植入的支架, 培养一个星期。然后这些结构被分成 3 个小组 a) 诱导的细胞薄片支架构造; b) 未诱导的构造; 供养达 8 周; c) 2D 板。为了在体内移植, 支架大小是 10mm $\times$ 10mm $\times$ 4mm, 其内植入 1 百万 MSCs, 然后用细胞薄片形式包装 75 平方厘米的长颈瓶。所有用于移植的细胞在体外培养 4 周。移植被划分为两组: a) 诱导; b) 未诱导薄片支架结构。诱导结构被证实在移植前经历骨质生长过程和矿物化。

[0128] 细胞发育能力和 phalloidin 染色

[0129] 细胞发育能力通过生存 - 死亡化验利用荧光素二乙酸酯 (FDA) 和碘化丙啶 (PI) (Molecular Probes Inc., Oregon, USA) 来评估的。每一组的荧光显微照片是由使用共焦激光显微镜 (CLM) (Leica, Germany) 照得的。在 FDA/PI 处理之前, 从培养孔中除去构造, 在

PBS 中漂洗,在 37℃下在具有 2 μ g/ml FDA 的 PBS 中孵育 15 分钟。经未消毒 PBS 洗后,然后将样品放置在 0.1mg/ml 碘化丙啶溶液的 PBS 中,室温下放置 2 分钟。然后再次在 PBS 中洗样品,放置在显微镜盖片玻璃上,通过共焦显微镜观察。

[0130] 细胞标记和 Alamar 兰 (Alamarblue) 分析

[0131] 利用 cFDA (分子探针) 标记 MSCs,然后使用 PBS 冲洗,在移植之前,根据制造商的使用说明在 37℃下使用绿色荧光标记 15 分钟。

[0132] 为了测定生长,将 1ml 的 alamar 兰 (Probes, OR, USA) (10% (v/v) 在不同的时间点加入到含有细胞 / 支架结构的培养基中,孵育 3 小时。然后检测培养基转移到 96- 孔的平板内,并且利用微量平板读卡机 (Brand, CA, USA) 测定 570nm 和 600nm 的吸收值。通过产品的使用说明来计算缩小率。

[0133] 碱性磷酸酶活性

[0134] 细胞碱性磷酸酶 (AP) 活性是通过以由 p- 磷酸硝基苯形成 p- 硝基酚的速率为基础,使用动力学评价来测定的 (procedure no. 104, Sigma)。简要地,通过去除培养基制备细胞裂解物,并加入冰的包含了蛋白酶抑制剂的混合物 (Calbiochem, UK) 的缓冲液 (5mM MgCl₂, 150mM NaCl, 1% triton-100, pH7.5)。然后通过 12,000 $\times$ g 离心 5 分钟收集蛋白质上清,利用蛋白分析试剂盒 (Cat No. 500-0002, Bio-Rad) 测定蛋白的成分。样品 (20 μ l) 与 50 μ l 的 AP 试剂结合,在 96- 孔平板中在 37℃经过 30 分钟孵育后测定活性。根据制造商的指导说明在 405nm (Bio-Rad microplate reader benchmark 10892, Bio-Rad, USA) 处测得 AP 活性,通过与标准曲线比较确定酶的量。在裂解物质中 AP 活性通过每分钟每毫克蛋白质产生的 p- 硝基酚的纳摩尔来表达。

[0135] RNA 分离和 RT-PCR

[0136] 总的细胞 RNA 利用 Trizol 试剂 (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA) 根据制造商的推荐每周萃取。cDNA 的合成是从 2 μ g 总的 RNA 利用 Superscript II 和 Oligo dT (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA) 根据制造商的指导说明完成的。Cbfa-1, osterix, 胶原质 I 型, 骨桥蛋白和骨钙素的表达通过使用 ABI Prism 7000 序列测定仪和 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) 的实时 PCR, 使用 Proligo (新加坡) 合成的特异引物来定量的。引物序列的设计是借助 Applied Biosystems 的 Primerexpress[®] 程序 v2.0 进行,其特异性在 National Centre for Biotechnology Information (NCBI) 中检索 (blasted)。测定在 PCR 循环中由 SYBR Green 直接结合到双链 DNA 导致的荧光的增加监控 PCR 中反应产物的增加。反应混合物根据生产商的指导说明建立。在 95℃的一个 8 分钟的 Taq 聚合酶活化之后,反应循环为 95℃变性 30 秒, 60℃退火, 延长 1 分钟 (每个引物均相同) 然后是 72℃延伸 1 分钟, 重复 35 个循环, 最后的延伸阶段是 72℃延伸 7 分钟。靶向基因 C_t 数值作为相对表达单元 (REU) 被表达, 针对 GAPDH 进行标准化。反应产物也被克隆至 pGEM-TEasy 载体 (Promega) 并且测序验证。

[0137] 蛋白质印迹

[0138] 细胞裂解物通过利用含有蛋白酶抑制剂的 (1mM 原钒酸钠, 10 μ g/mL 亮抑霉肽, 1 μ g/mL 抑肽酶和 1mM PMSF) 的冰的裂解缓冲液 (1% Triton $\times$ 100, 150mM NaCl, 10mM Tris pH7.4, 2mM EDTA, 0.5% NP 40, 0.1% SDS) 制备。利用蛋白质检测试剂盒 (Bio-Rad) 根据

制造商的推荐测定上清中的蛋白质浓度。细胞裂解物 (40 μ g) 通过 6–12% SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 凝胶解析, 蛋白质转移至硝化纤维膜 (Amersham, Buckinghamshire, UK)。非特异性结合使用含 5% 低脂牛奶的 tris 盐缓冲液 (TBS) 在室温下 (RT) 1 小时阻断。然后使用 TBS 洗 2 次膜, 然后与用含有 0.1% Tween 的 TBS (TBST) 稀释 1:1000 的小鼠抗 -OCN (Biodesign, ME, USA), 抗 -OPN (DSHB, IA, USA) 或者抗 -肌动蛋白 (Santa Cruz, CA, USA) 初级抗体在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 洗涤, 然后与在 TBST 中稀释 1:1000 的二级抗体孵育 1 小时, 清洗, 然后通过化学发光试剂 (Supersignal west pico kit, Pierce, USA) 进一步检测。OPN 抗体是在 NICHD 赞助下来自于杂交瘤银行发展研究 (Developmental Studies Hybridoma Bank), 并且保藏在 Iowa 市的 Iowa 大学的生物科学系, IA 52242。

[0139] von Kossa 组织化学和扫描电子显微方法 (SEM)

[0140] von Kossa 组织化学用来评价整个支架-细胞结构的矿化程度。简要地, 将结构放在 PBS 中冲洗并且用 4% 的多聚甲醛 (Sigma) 进行固定并且用超纯水 (UPW) 进行冲洗。切片 (25 μ m 厚) 在紫外线照射下用 AgNO₃ (Sigma) 处理 45 分钟并用 UPW 进行冲洗。随后用 5% (w/v) 的碳酸钠溶液处理切片 8 分钟; 再次用 UPW 进行冲洗并用 5% (w/v) 的硫代硫酸钠 (Sigma) 处理并且使用装备了采用 AxioVision 软件 3.1 版 (Zeiss) 的数码相机 (AxioCam; Zeiss) 的解剖显微镜进行骨节照相。

[0141] 对于 SEM 分析, 在支架-结构中的细胞在甲次砷酸盐缓冲液中与 ~3% 的 gluteraldehyde 进行固定。然后在 1% OsO₄ (ProSciTech) 中培养固定的细胞并且使用乙醇脱水。随后将结构植入到六甲基二硅氮烷 (HMDS) (ProSciTech) 中并且使用喷射涂布机 (Eiko, Japan) 包覆钛。随后在 15Kv 时利用 XL30SEM (FEI Inc, OR, USA) 检测样品。

[0142] 组织学

[0143] 用于常规组织学分析的样品被 3.7% 的福尔马林 (Sigma) 固定, 包埋到组织-tek 中 (德国) 并且使用显微薄片切片机 (Leica) 进行切片。7 μ m 厚的切片被安装到聚合-L-赖氨酸 (Sigma) 预先包被的封片上。切片随后使用苏木精 (hemotoxylin) 和曙红和自然红进行染色 (Hutmacher, 2003)。

[0144] MicroCT 扫描和 X-射线分析

[0145] 一种 Skyscan 体内微断层 X 光摄像装置 1076 μ CT 扫描仪用来确定在细胞/支架结构中骨骼的生长。样品被放在 68mm 宽的样品孔中并且这种结构放置的高度和宽度平行于扫描平面。扫描分辨率为 35 μ m, 平均值为 5 并且与一种 1mm 的铝过滤器联合使用, 转动步调为 0.8 $^{\circ}$, 转动角度为 180 $^{\circ}$ 。大约扫描 500 片, 且按照制作说明书 (Skyscan) 使用改进的 Feldkamp 运算法则在步调尺寸为 4 时重建文件。输出为一系列的 120 个连续的 1968 $\times$ 1968 位图像其随后使用 Mimics 7.3 被重建到 3D 堆积中。Mimics 使得可以计算出骨骼生长的体积和表面积。除了测量体积和表面积, 还可以基于阈值标准估测出细胞/支架结构中新骨骼生长的程度。这些标准 (多孔的和皮层的骨骼) 是使用 Mimics 的压型功能从新收获的猪骨骼样品计算出来的。在本研究中所使用的计算出的阈值对于皮层骨骼为 68 到 1732 HU (Housefield 单位) 以及对于多孔骨骼为 -70 到 67HU。

[0146] 作为常规的 X-射线分析, 使用一个 Mammomat 3000 (Siemens) X-射线仪进行样品分析。在成像过程中对使用的电压和电流进行调整来取得最好的清晰度和分辨率。

[0147] 异位植入

[0148] 动物研究方案是经过新加坡国立大学 (NUS) 动物伦理委员会检查和核准的 (小動物方案 NIDCR 00-113)。裸大鼠, rnu/rnu, 最初来自于 Harlan Sprague Dawley (印第安纳波利斯, IN) 在 NUS 动物房 (布法罗, NY) 中喂养和保持并处于特定的无致病菌环境中。所有的动物处理在薄片流动罩 (laminar flowing hood) 中进行。细胞 / 支架结构 (每个动物中两个诱导的和两个非诱导的) 被皮下植入到重量为 110 到 130g 的四月龄免疫力缺乏鼠的脊柱 (tree) 后表面。移植后 4, 8 和 12 周取出移植物, 按照相应的制作说明书, 在 4% 的福尔马林中进行固定, 以及或者在 10% 的 EDTA (pH8.0) 溶液中除去石灰质来进行石蜡包埋或者在 70% 的乙醇中进行固定并且在 Technovit 8100 中树脂包埋来包埋在树脂中 (Technovit 8100, Kulzer, Germany)。石蜡切片 (10 μ m) 被脱石蜡, 与水化合, 并且使用苏木精和曙红 (H&E) 进行染色。塑料切片利用 H&E 进行处理以及 von Kossa 染色。为了定量体内新的骨骼形成, 使用 NIH 图像对经过诱导的或者两个没有诱导的移植在 5 倍放大的情况下计算 5 个典型区域。

[0149] 统计学分析

[0150] 所有的值都以平均值 $\pm$ 标准偏差的形式给出。所有的数据都进行两种方法 (two-way) ANOVA 以及试验后 (post-hoc) 的 Bonferroni 和成对的比较 (SPSS 版本 11.02)。显著水平被设置成 $p < 0.05$ 。数据是在相同条件下得到的三次重复的平均值。

[0151] 结果

[0152] MSC 在支架上的生长

[0153] 在不同的时间点对支架上播撒和包裹的 MSCs 的粘附和生存能力进行测试。培养 3 天后, MSCs 粘附到支架的条上并且 phalloidin 染色显现了由 MSCs 形成的肌动蛋白纤维, 并且在细胞和支架的接触点上积聚。3 周后, 支架的条全部被 MSCs 所覆盖并且细胞均匀地涂布在支架的表面上 (图 13)。一周后对于支架内部的细胞, MSCs 通过 ECM 的产生从而在支架的孔之间形成了桥 (图 14A)。因此, 5 周后, 大部分的孔都被细胞和 ECM 所填充并且仅观察到很少的死细胞 (图 14B)。包裹在支架上的细胞层形成了 ECMs, 着色点可以存活达 8 周。SEM 图像的图 15A, B 显示了由 MSCs 形成的胶原纤维。在成骨质诱导后在支架的表面形成了片并且在构造内部形成了细胞层 (图 16A, B)。在诱导的构造中形成的矿化结节在 3 周的时候首先被通过 von Kossa 染色检测到 (图 17A, B)。

[0154] 使用拉马尔蓝色 (alamar blue) 染色测试不同时间点时构造的代谢率转化率如图 18 中所示。在成骨诱导的情况下构造的减少率轻微高于没有诱导情况下构造的减少。构造的减少率在第 2 周开始增加并且稳定维持 7 周。对于在盘中培养细胞, 其率高于细胞层 - 支架构造的率。但是, 很难进行比较因为两种培养系统具有不同的基质和播种密度。

[0155] ALPase 活性

[0156] 为了定量构造在体内的成骨能力, 对细胞外和细胞内的 ALPase 活性进行检测。图 19 显示了释放到培养基中的 ALP 在诱导后随着时间而增加。在第 49 天, 诱导的构造的 ALPase 活性是没有诱导的情况的 10 倍。对于细胞内的 ALPase, 它的活性在第 1 周急剧增加超过 30 倍并且在第 3 周达到峰值 (图 20)。其水平在整个培养过程中一直维持直到 8 周。

[0157] 骨骼相关生物标记的表达

[0158] 为了确定体外构造的成骨分化过程, 提取构造的 RNA 并且实施 RT-PCR 来监测与骨骼相关的分子的实时表达, 也就是两个重要的转录因子, Cbfa1 和 osterix, 骨钙素 (OCN),

骨桥蛋白 (OPN) 和胶原 I 型 (Col1) (图 21)。图 22 显示 osterix 和 ocn 的表达水平在诱导后分别被显著提高了至少 10 倍和 5 倍,并且在培养过程中保持高水平。在诱导的构造中 OPN 表达水平同样得到提高并且 cbfa1 和 Col I 的水平轻微地增加了。为了进一步确定骨骼生成中的某个关键分子,OCN 和 OPN 蛋白合成也利用蛋白印迹法进行测量 (图 23,24)。如在图 24 中所显示的,OCN 在诱导的构造中被特异的表达并且在 7 周的培养时间中其表达水平保持稳定。OPN 的表达在第 3 周增加了 3-4 倍并且随后轻微地降低。

[0159] 体内骨骼形成

[0160] 为了检验工程化的构造的骨骼形成能力,诱导的和没有诱导的构造被植入裸鼠中并且在 4,8,12 周取出 (图 25,26)。在图 27A, B, C 中的 X-射线图像显示了在诱导的构造中有骨骼的形成。图 8 证明在构造中形成了皮层的和多孔的骨骼。通过微 CT 扫描发现皮层的骨骼主要形成在构造的外面,多孔的骨骼形成在构造的内部。构造内形成的骨骼的体积和表面积随着植入时间而减少 (图 28,29A,B)。为了确定植入的细胞对于骨骼生成的贡献,我们标记了植入的细胞 cFDA。图 30A,B 显示荧光的细胞主要分布在骨骼区域,意味着大多数的造骨细胞是由植入的细胞衍生的。在图 31A, B, C 中的 H/E 染色显示构造中的 MSCs 组织学上类似于生长在软骨细胞和骨骼区域的接触面上盘状结构。这表明构造内的 MSCs 经历了软骨化骨骼的形成过程。

[0161] 讨论

[0162] 在本研究中,我们已经检查了体内和体外的 PMSCs 层支架构造的混合物的骨骼生成。体外结果显示通过 ALP、骨骼相关蛋白的上调诱导成骨后,构造中的 MSCs 可以生长和分化成造骨细胞。体内数据证明了在裸鼠中植入 4 周后,整个构造由皮层骨骼和多孔骨骼形成。这意味着这种与 TCP-PCL 支架结合使用的 MSCs 的试验中的新观念可以被应用到骨骼组织工程中。这种工程化的构造可以参与到骨骼替代中,特别是在支撑-装填区域,原因是试验中这种支架与以前报道的支架相比可以支撑更大的机械力,其主要是聚合物泡沫或者片状。

[0163] 参考文献

[0164] Broaddus WC, Holloway KL, Winters CJ, Bullock MR, Graham RS, Mathern BE, Ward JD, Young HF. Titanium min iplates or stainless steelwire for cranial fixation :a prospective randomized comparison. JNeurosurg. 2002 Feb ;96(2) :244-7。

[0165] Bruijn JD de, vanBlitterswijk CA, Davies JE. Initial bone-matrixformation at the hydroxyapatite interface in vivo. J Biomed Mater Res1995 ;29 :89。

[0166] Caplan Al, Bruder SP. In :Lanza RP, Langer R, Chick WL(eds), Celland molecular engineering of bone regeneration :Principles of tissueengineering, Academic Press :NewYork, 1997. p. 603-18。

[0167] Dennis Rohner, Dietmar W. Huttmacher, Tan Kim Cheng, MgrtinOberholzer, Beat Hammer ;In vivo efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig ;J Biomed Mater Res Part B :Appl Biomater 66B :574-580, 2003。

[0168] Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan Al. Osteogenesis inmarrow-derived mesenchymal cell porous ceramic compositestransplanted

subcutaneously ;effect of fibronectin and lamin in on cellretention and rate of osteogenic expression.Cell Transplant 1992 ;1 :23-30。

[0169] Du C, Cui FZ, Zhu XD, de Groot K. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. J Biomed Mater Res 1999 ; 44 :407-414。

[0170] Ducy P, Ruiz H, Valerie G, Amy LR, Gerard K ;Osf2/Cbfa1 :Osf2/Cbfa1 :a transcriptional activator of osteoblast differentiation ;1997, Cell, 89 :747-54。

[0171] Dujovny M, Dujovny N, Vinas F, Park HK, Lopez F. Burr hole cover for ventriculo-peritoneal shunts and ventriculostomy ;technical note. Neurol Res。

[0172] Emonds N, Hassler WE. New device to treat chronic subdural hematoma--hollow screw. Neurol Res. 1999 Jan ;21(1) :77-8。

[0173] Habal MB, Pietrzak WS. Key points in the fixation of the craniofacial skeleton with absorbable biomaterial. J Craniofac Surg. 1999 Nov ; 10(6) :491-9。

[0174] Hutmacher DW, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. J Biomater Sci Polym Ed. 2001 ;12(1) :107-24。

[0175] Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. J Biomed Mater Res. 2001 May ;55(2) : 203-16

[0176] Kobayashi S, Hara H, Okudera H, Takemae T, Sugita K. Usefulness of ceramic implants in neurosurgery. Neurosurgery. 1987 Nov ;21(5) :751-5。

[0177] Koyama J, Hongo K, Iwashita T, Kobayashi S. A newly designed key-hole button. J Neurosurg. 2000 Sep ;93(3) :506-8。

[0178] Kushida A, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets ;the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. J Biomed Mater Res 54(2001), pp 37-46。

[0179] Linda G, Gail N, Tissue engineering--Current challenges and expanding opportunities ;Science ;2002, 295 :1009-1012。

[0180] Matsumoto K, Kohmura E, Kato A, Hayakawa T. Restoration of small bone defects at craniotomy using autologous bone dust and fibrin glue. Surg Neurol. 1998 Oct ;50(4) :344-6。

[0181] Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. Laminated three-dimensional biodegradable forms for use in tissue engineering. Biomaterials 1993 ;14 :323-330。

[0182] Miyake H, Ohta T, Tanaka H. A new technique for cranioplasty with L-shaped titanium plates and combination ceramic implants composed of hydroxyapatite and

tricalcium phosphate(Ceratite).Neurosurgery.2000 Feb ;46(2) :414-8。

[0183] Nakashima K,Zhou X,Kunkel G,ZhangZ,Deng JM,Behringer RR,de Crombrughe B.The novel zinc finger-containing transcription factorosterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.Cell.2002 Jan 11 ;108(1) :17-29。

[0184] Nicolas L ' heureux, St phanie Paquet, Raymond Labbe, Lucie Germain, andFran ois A.Auger ;A completely biological tissue-engineered humanblood vesselFASEB J.12,47-56(1998)。

[0185] Nicole IZur Nieden, Grazyna Kempka, Hans J Ahr, In vitrodifferentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts ;Differentiation,2003,71 : 18-27。

[0186] PittC G, Gratzl MM, Kimmel GL, Surles J, Schindler A.Aliphaticpolyesters 11 The degradation of poly(DL-lactide), poly(epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo.Biomaterials.1981,2(4) :215-220。

[0187] Rochet N, Loubat A, Laugier JP, Hofman P, Bouler JM 等人, Modification of gene expression induced in human osteogenic andosteosarcoma cells by culture on a biphasic calcium phosphate bonesubstitutes.Bone,2003,32 :602-10。

[0188] SchantzJ-T " Hutmacher DW, Lam CXF, Brinkmann M, Wong KM, Lim TC, Chou N, Gulberg RE 和 Teoh SH, Repair of Calvarial Defects withCustomised Tissue-Engineered Bone Grafts.Part li ;Evaluation of cellularefficiency and efficacy in vivo, Tissue Engineering 9(Sup 1) (2003b) :S127-S139。

[0189] Shimizu T,M.Yamato,A.Kikuchi 和 T.Okano,Two-dimensionalmanipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsiveculture dishes augments the pulsatile amplitude.Tissue Eng 7(2001), pp.141-151。

[0190] Stendel R,Krischek B,Pietila TA.Biodegradable implants inneurosurgery. Acta Neurochir(Wien). 2001 ;143(3) :237-43。

[0191] Tessier P.Auto geneous bone grafts taken from the calvarium forfacial and cranial applications.ClinPlast Surg.9 ;531.1982。

[0192] Toshimasa u, et al ;Transplantation of cultured bone cells usingcombinations of scaffolds and culture techniques ;Biomaterials ;2003,24 : 2277-86。

[0193] Winkler PA, Herzog C, Weiler C, Krishnan KG.Foreign-body reactionto silastic burr-hole covers with seroma formation ;case report and reviewof the literature.Pathol Res Pract. 2000 ;196(1) :61-6。

[0194] Yamashima T.Cranioplasty with hydroxylapatite ceramic plates thatcan easily be trimmed during surgery.A preliminary report.Acta Neurochir(Wien). 1989 ;96(3-4) :149-53。

[0195] Yamashina T. Modem cranioplasty with hydroxyapatite button, granules and plates. Neurosurgery. 1993 Nov ;33(5) :939-40。

[0196] Iwan Zein, Dietmar W. Hutmacher, Kim Cheng Tan, Swee HinTeoh.Fused

deposition modeling of novel scaffold architectures for tissueengineering applications ;Biomaterials 23(2002)1169-1185。

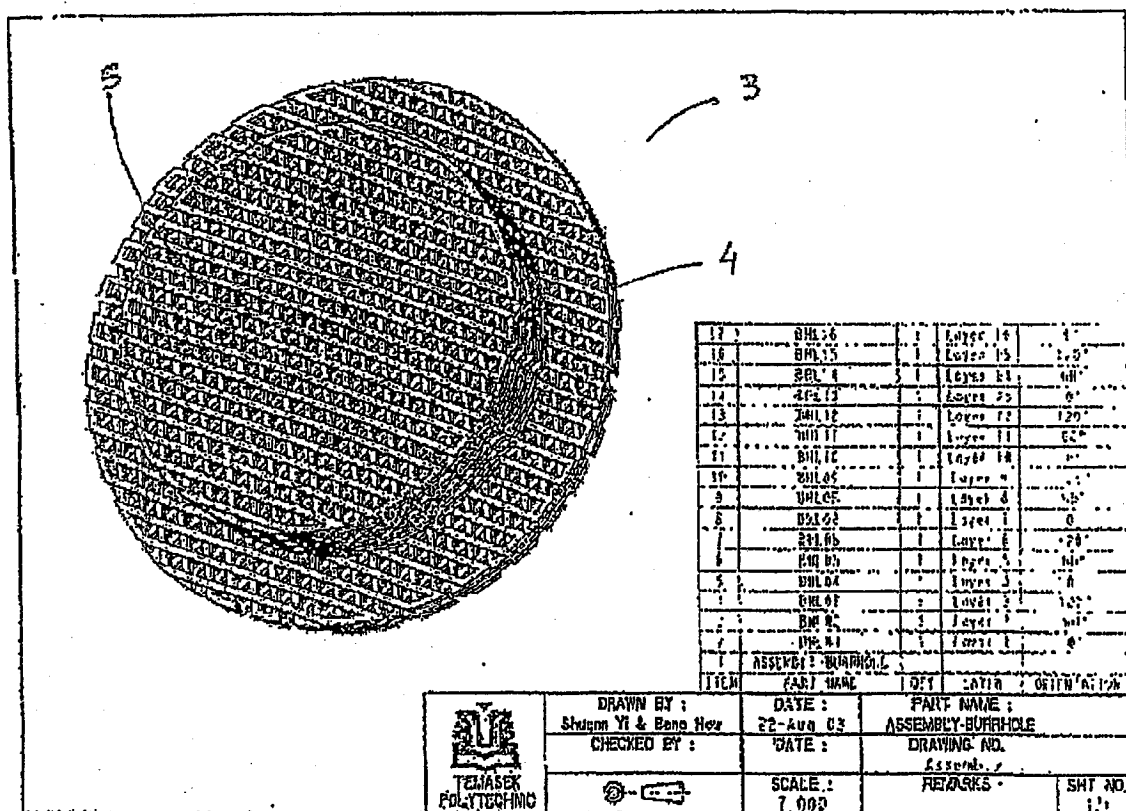


图 3

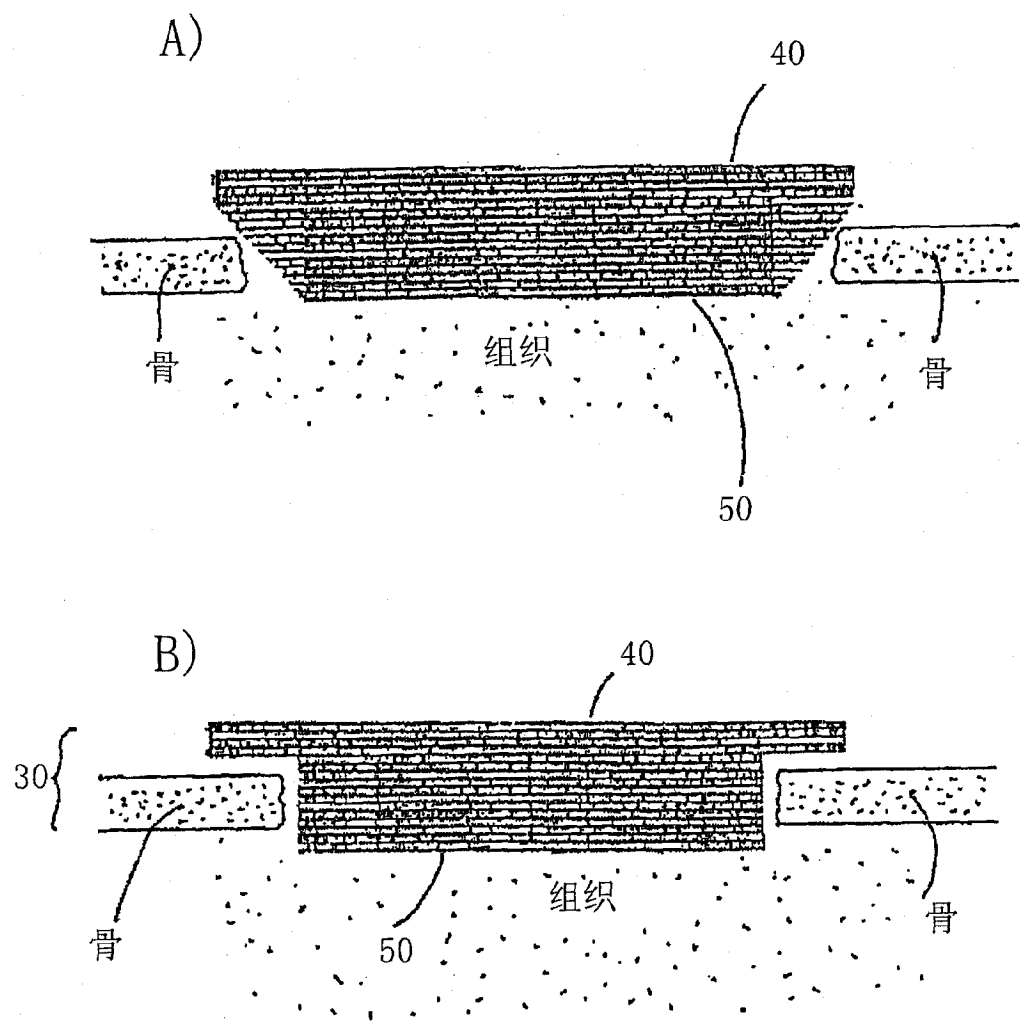


图4(A, B)

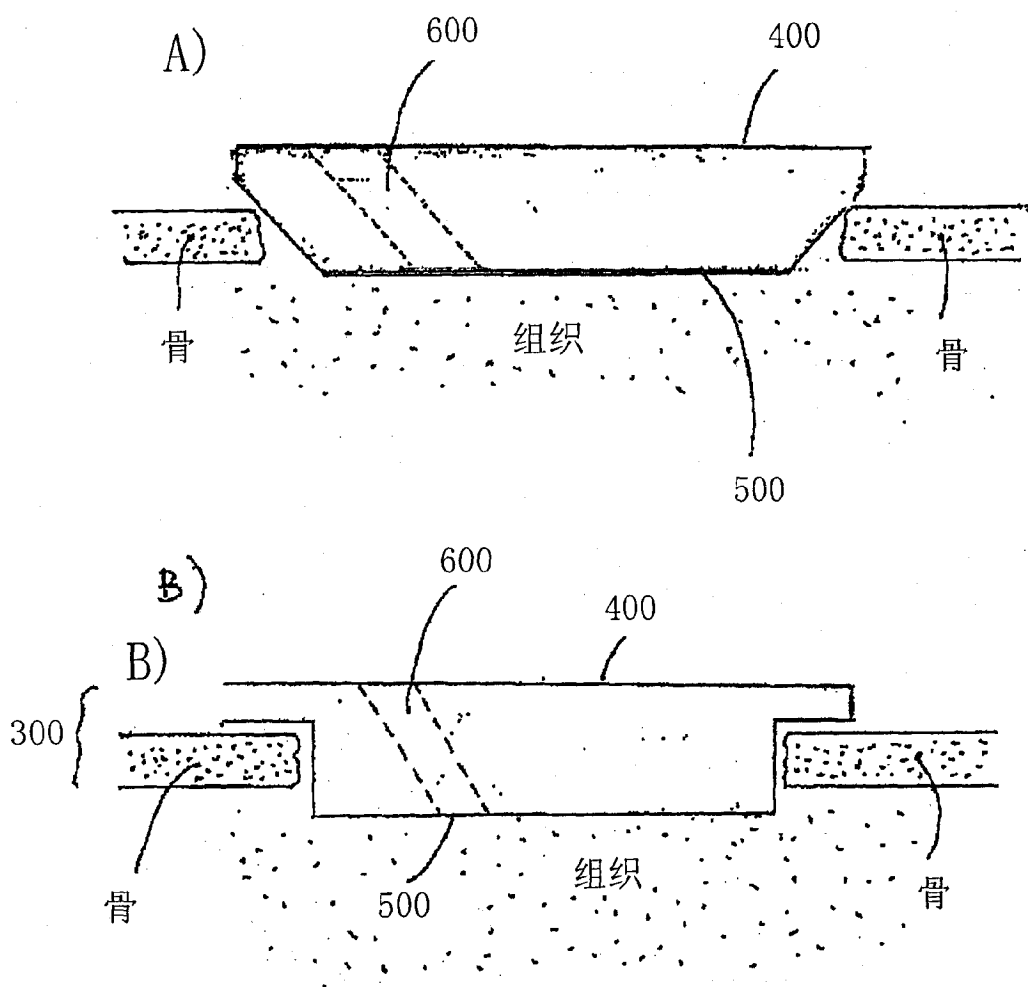
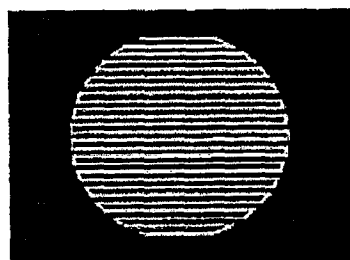
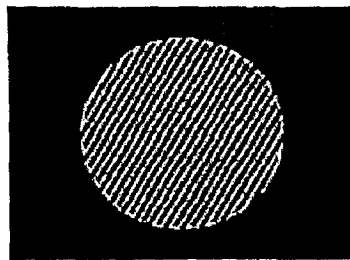


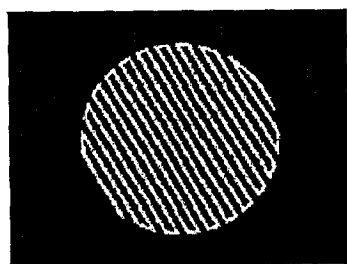
图5 (A, B)



(a) 0度方向的PCL
细丝层



(b) 60度方向的PCL
细丝层



(c) 120度方向的PCL
细丝层

图6 (a, b, c)

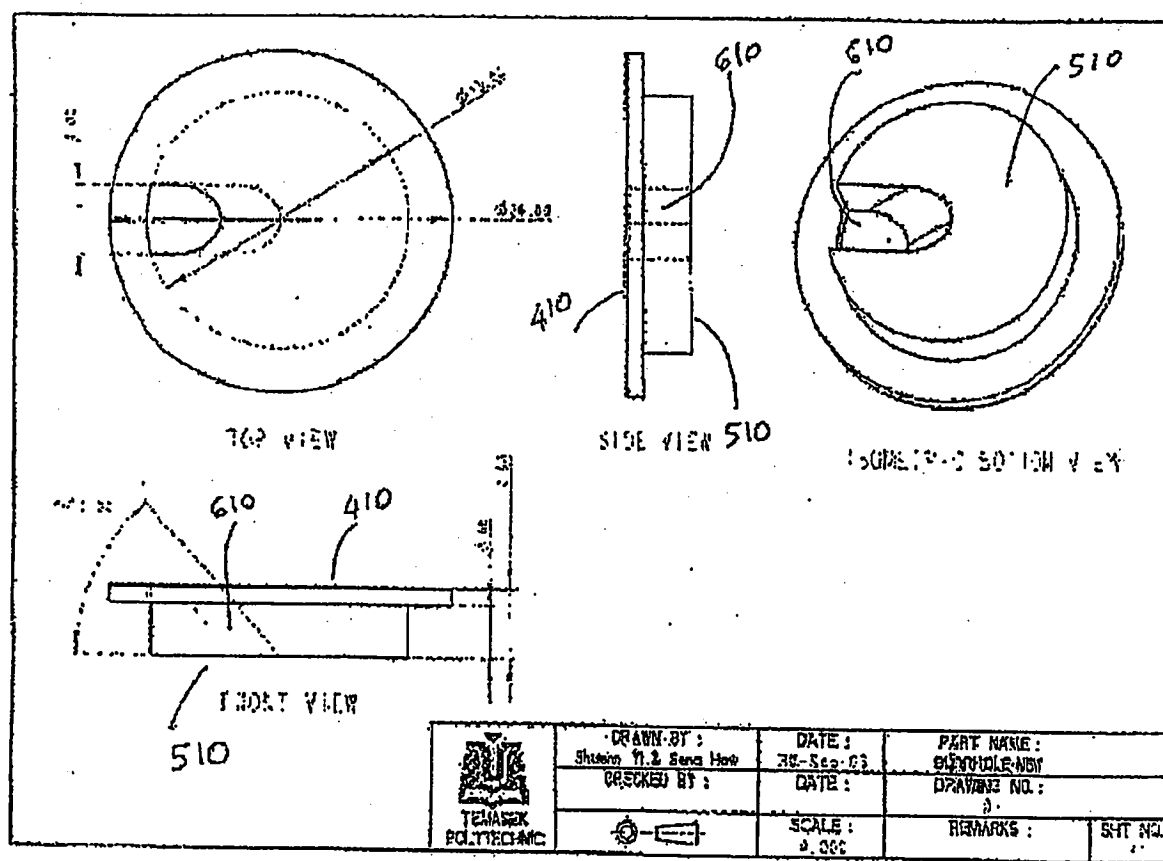
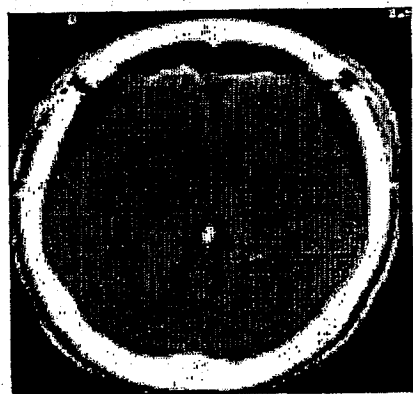
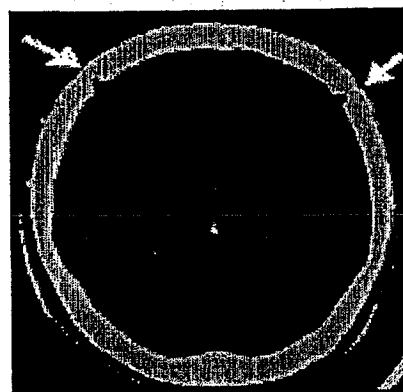


图 7

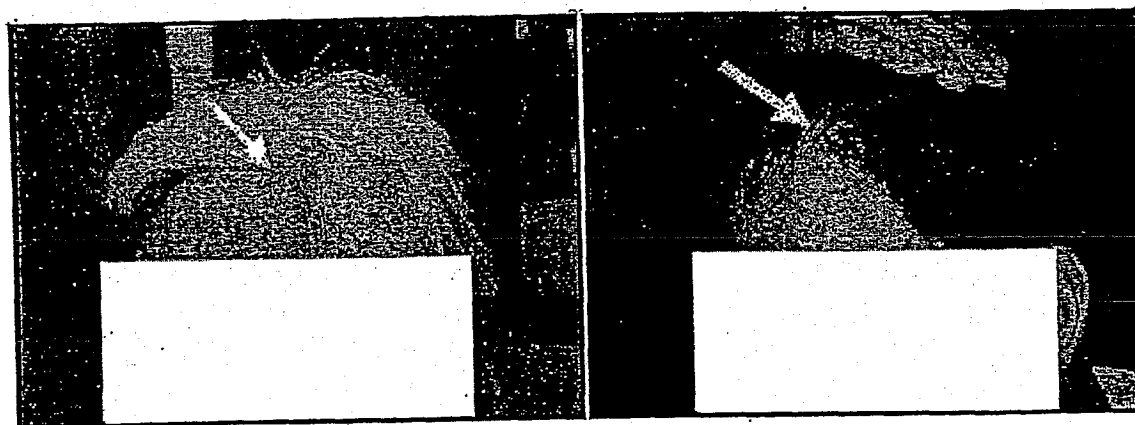


(A)

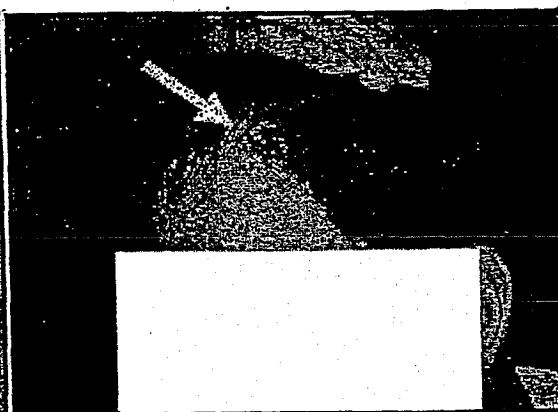


(B)

图 8 (A,B)



(A)



(B)

图 9 (A,B)

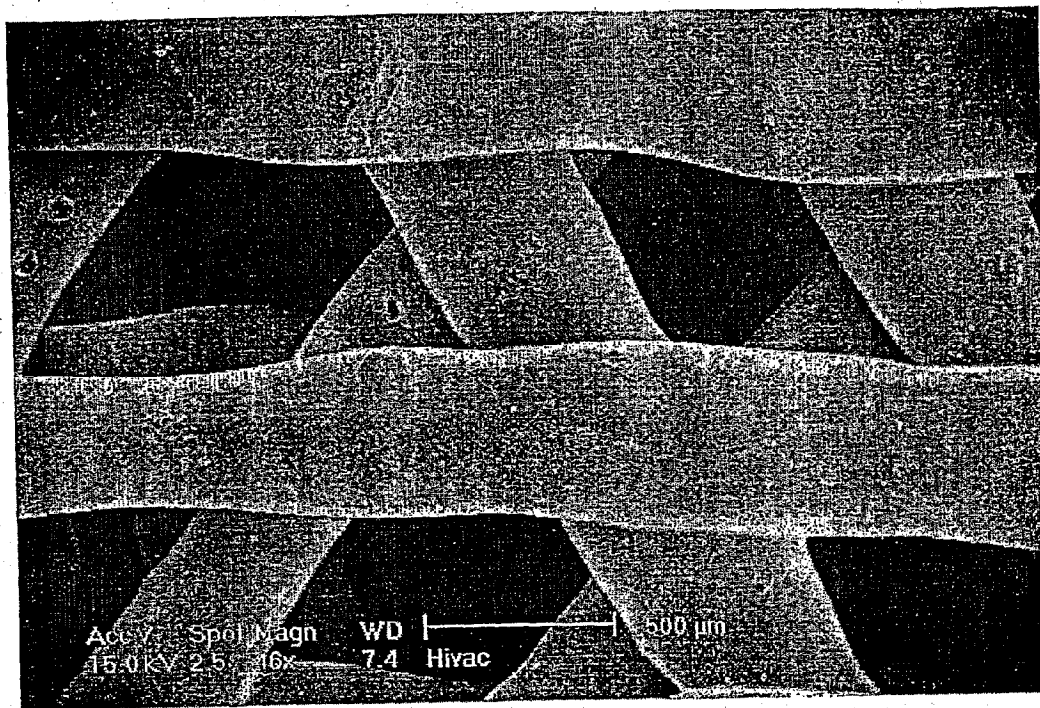


图 10

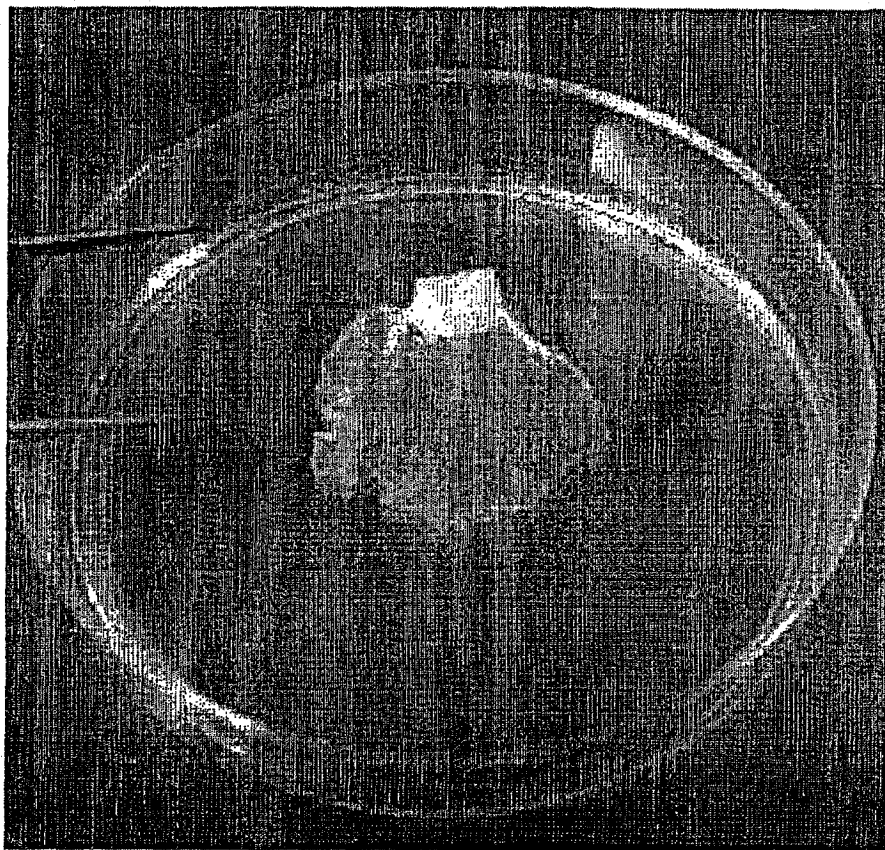


图 11

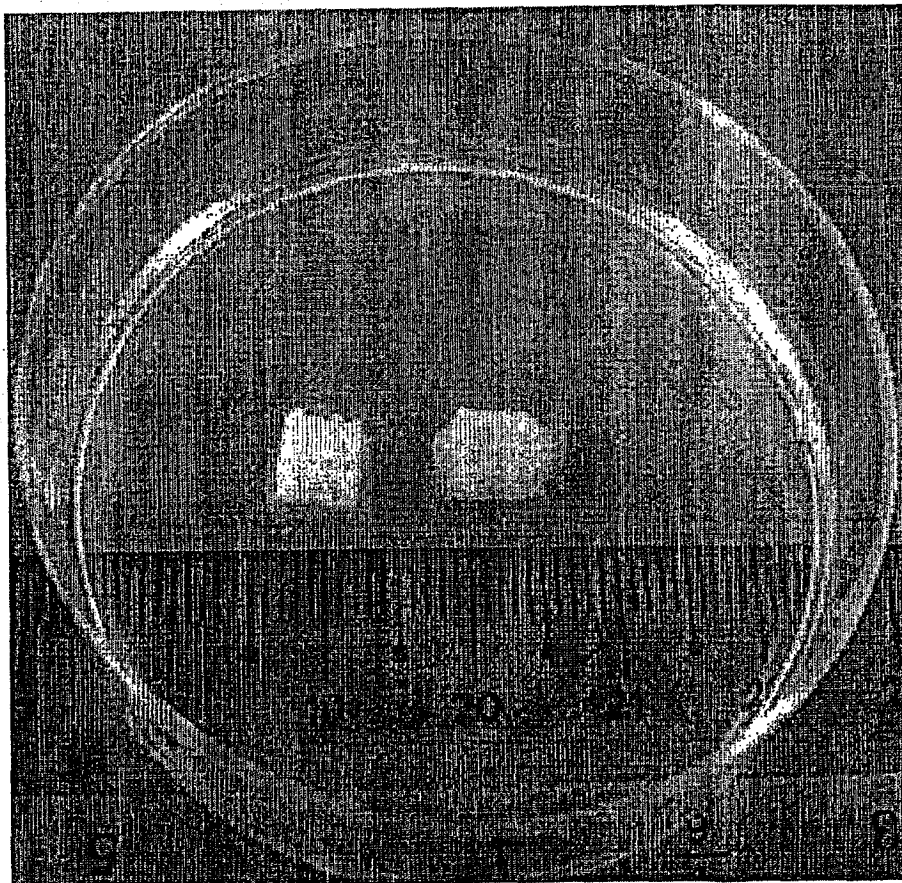


图 12



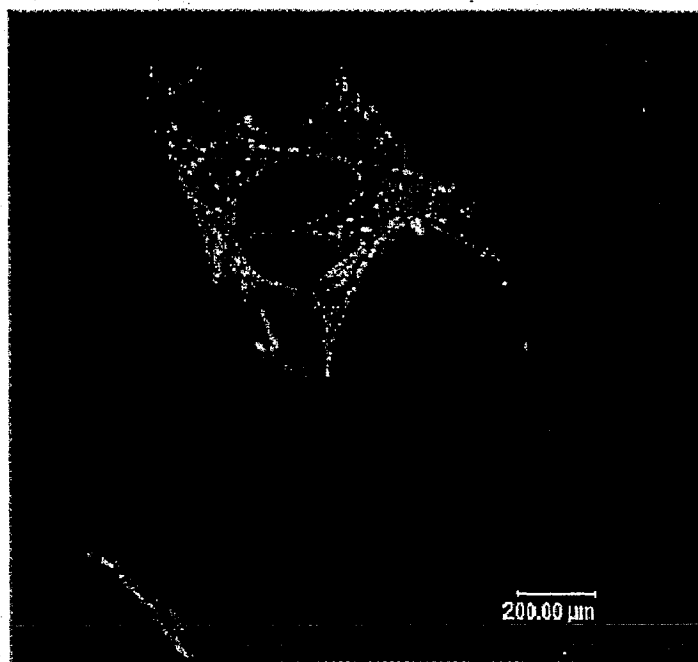
200x

80.00 μ m

体外培养 3 周

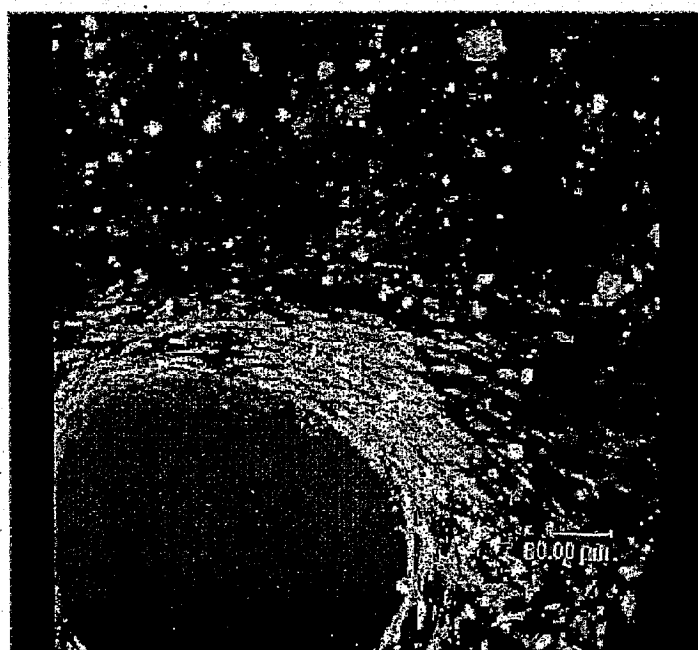
图 13

图 14 (A,B)



100x

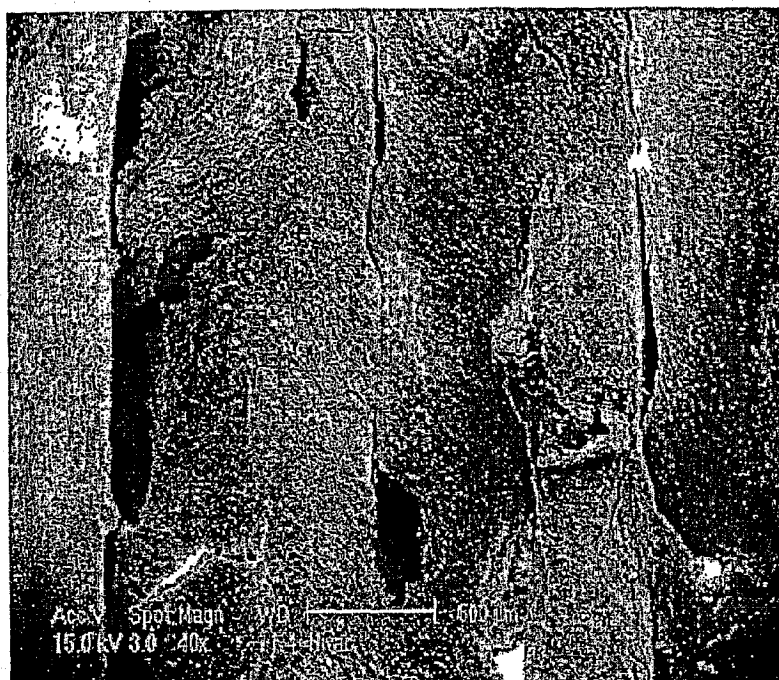
(A)



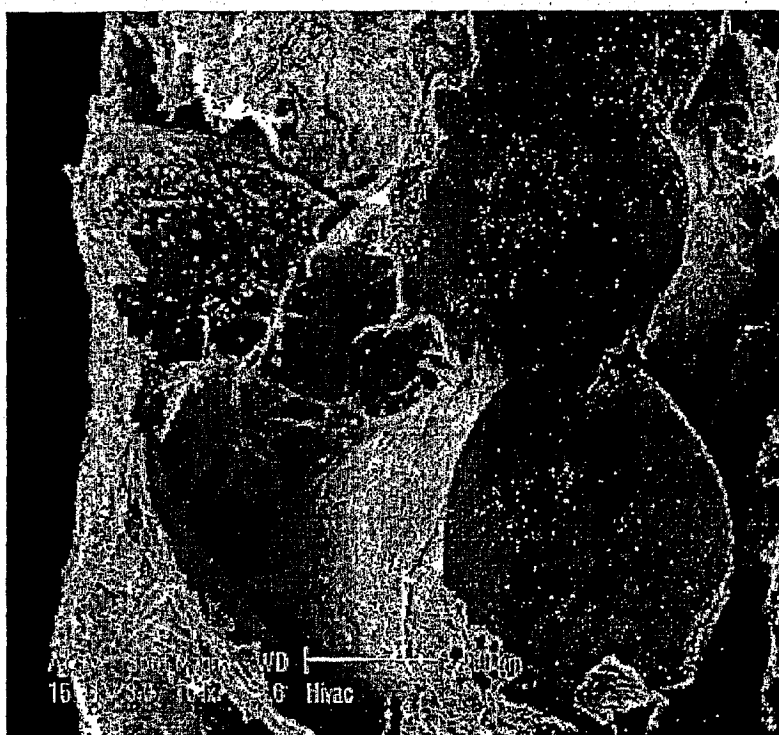
200x

(B)

图 15 (A,B)

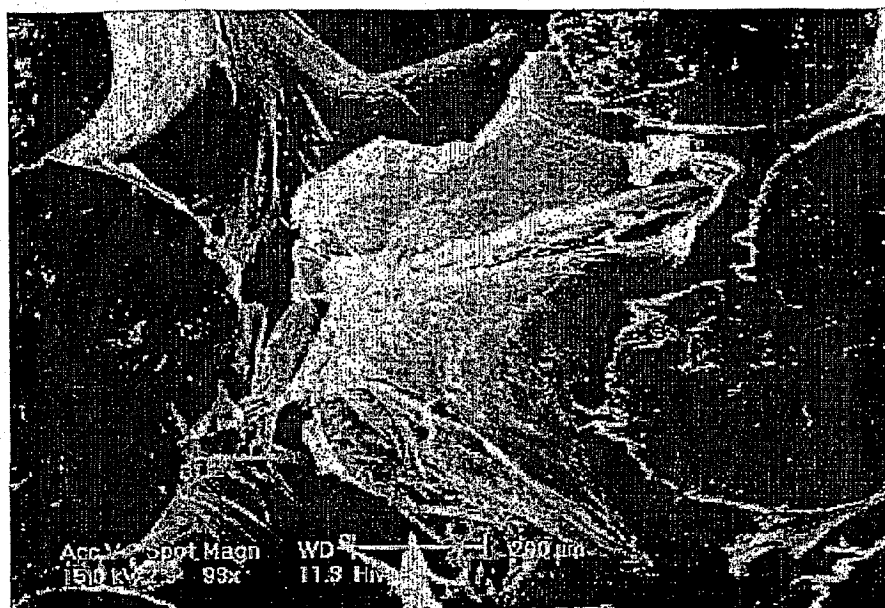


(A)



(B)

图 16 (A,B)

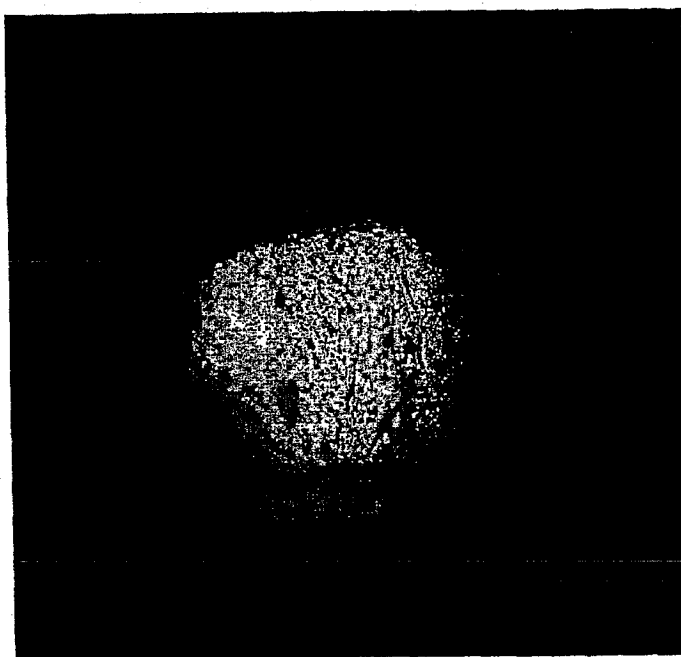


(A)



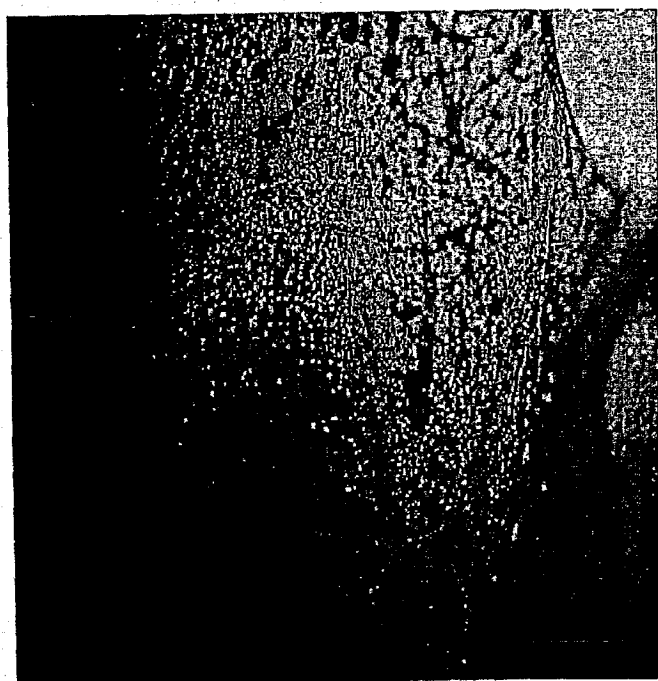
(B)

图 17 (A,B)



5 周 100X

(A)



400X

(B)

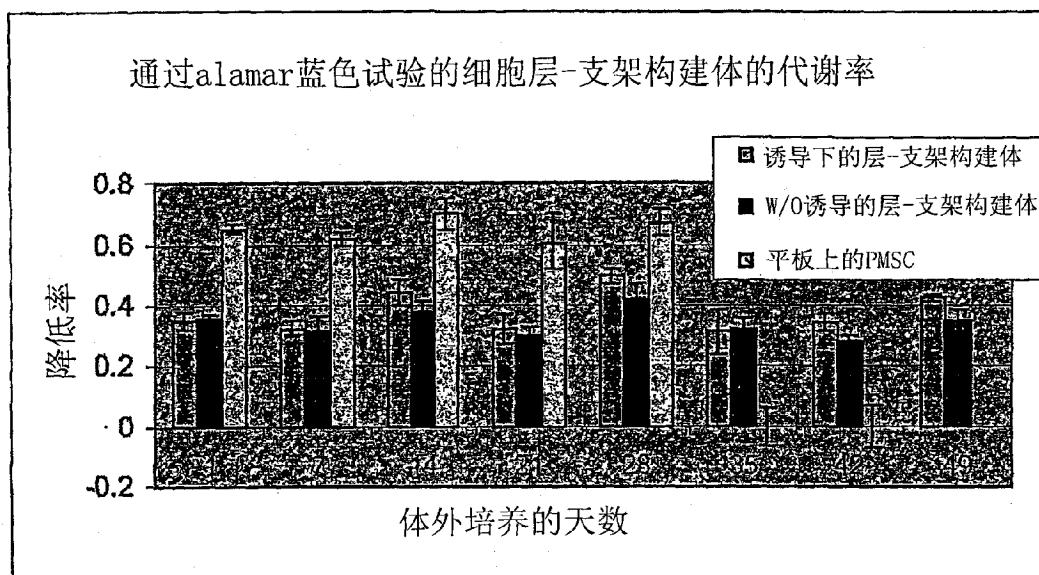


图18

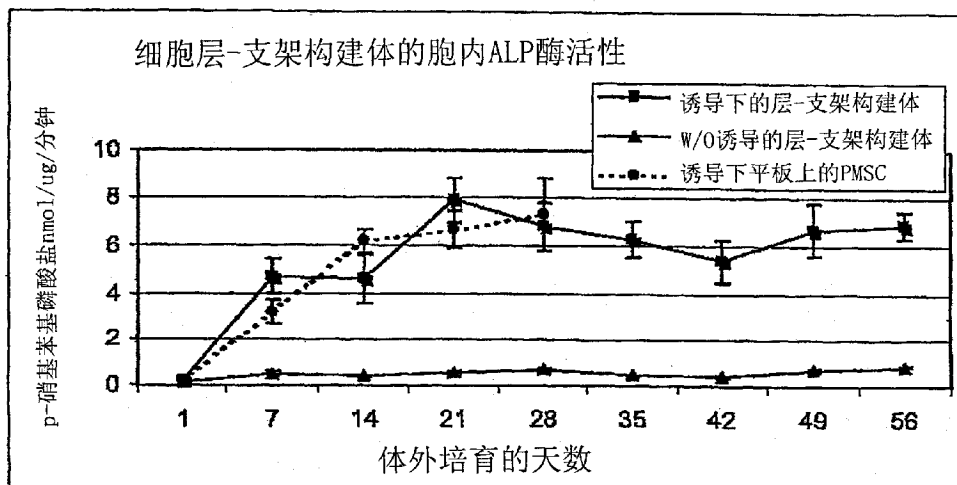


图19

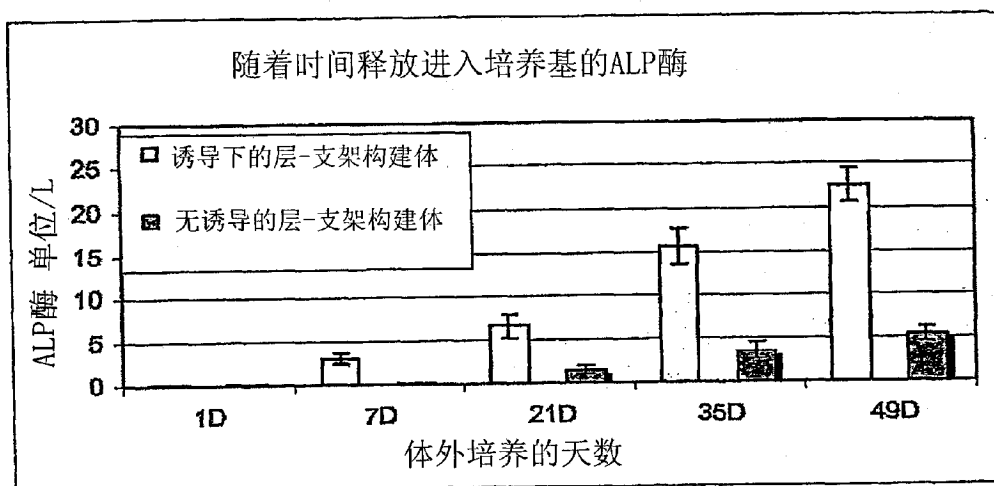


图20

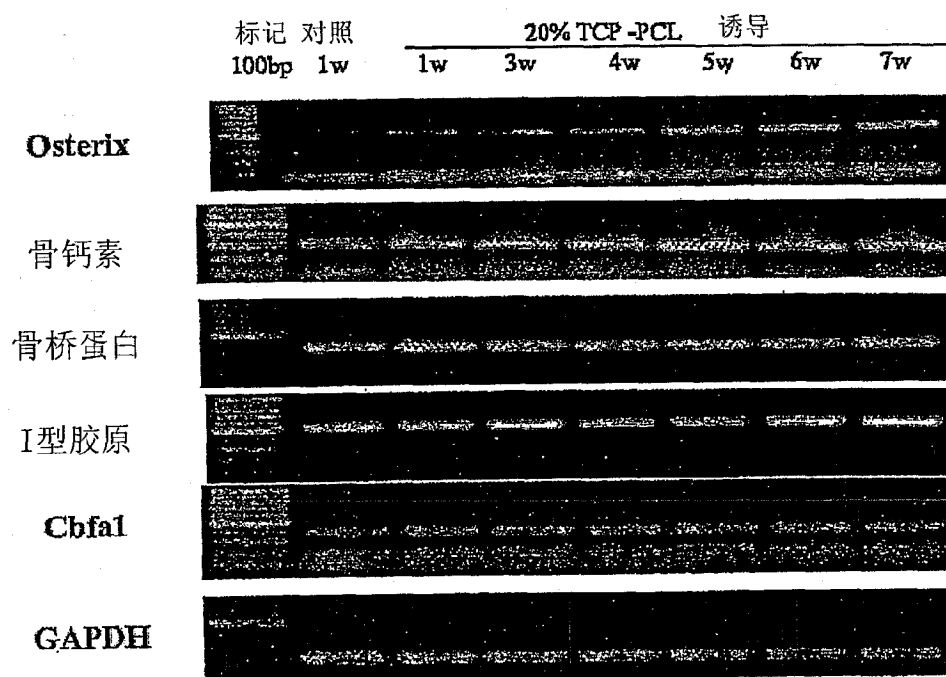


图21

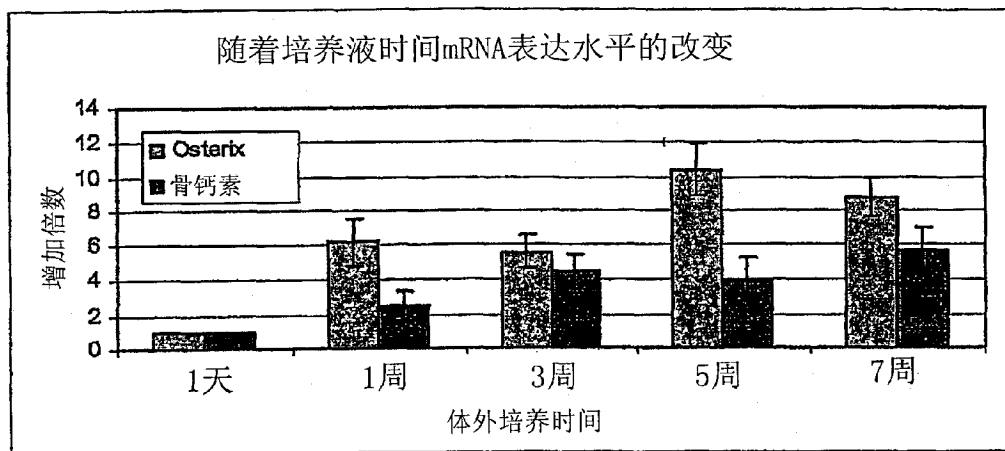


图22

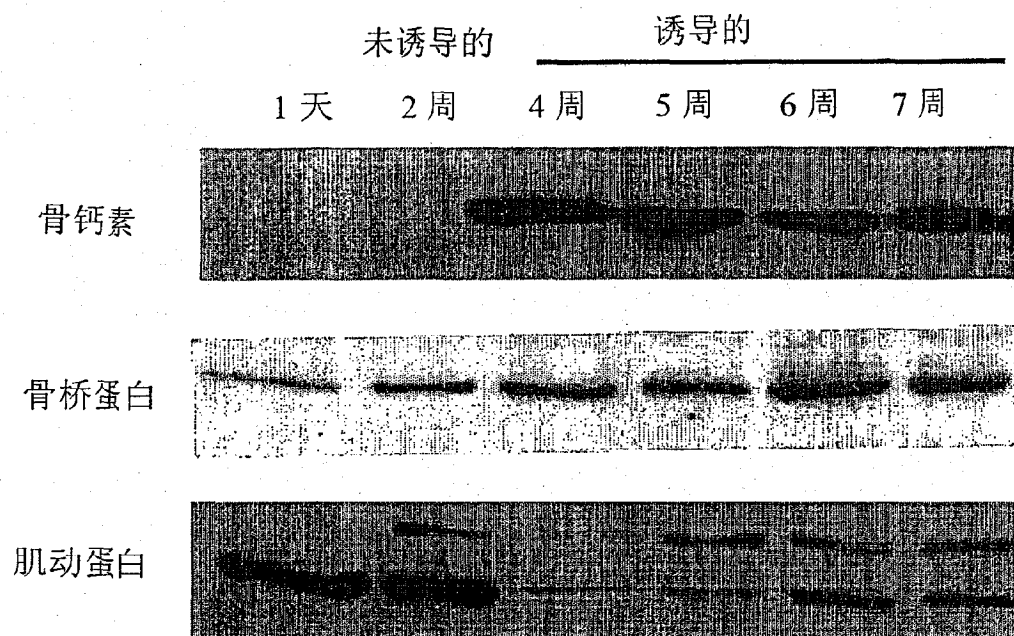


图 23

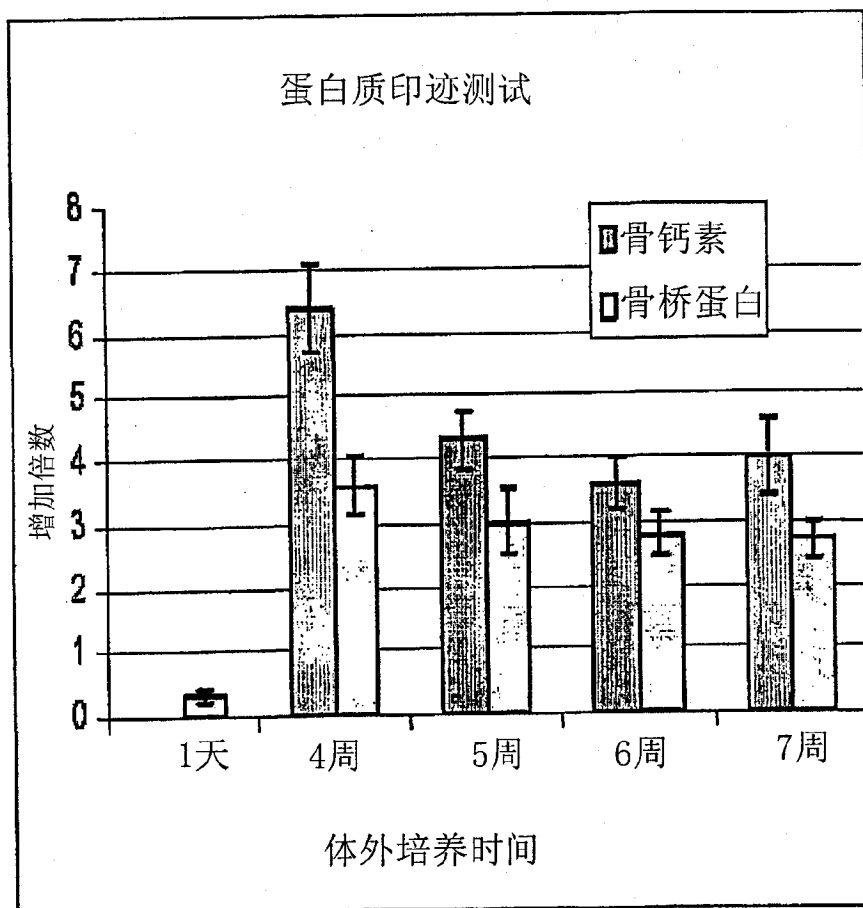
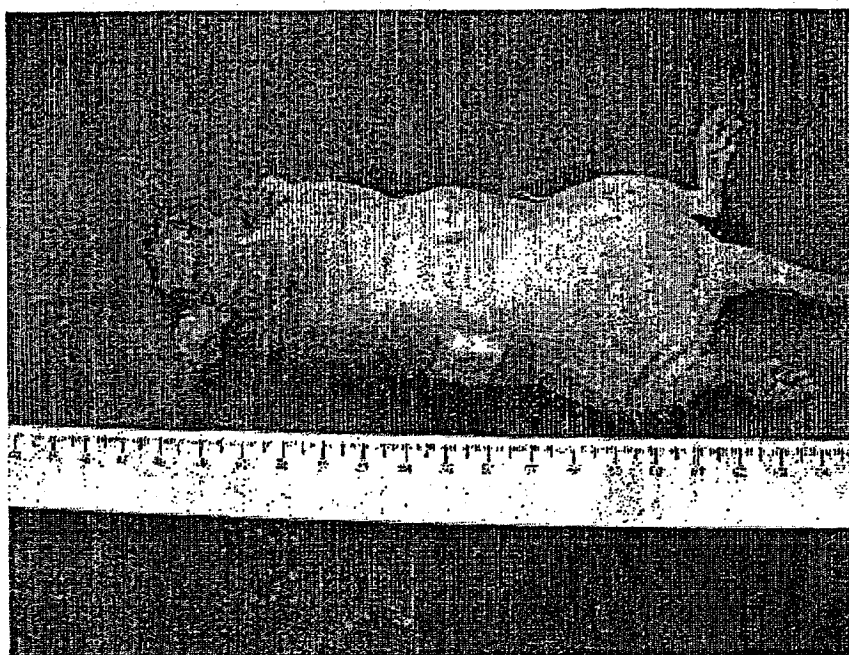


图24

图 25(A,B)

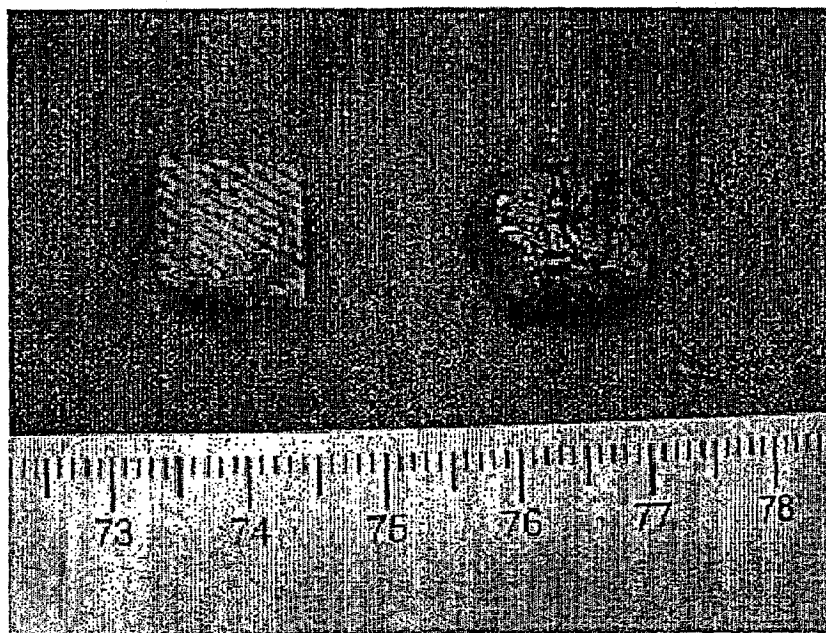


(A)

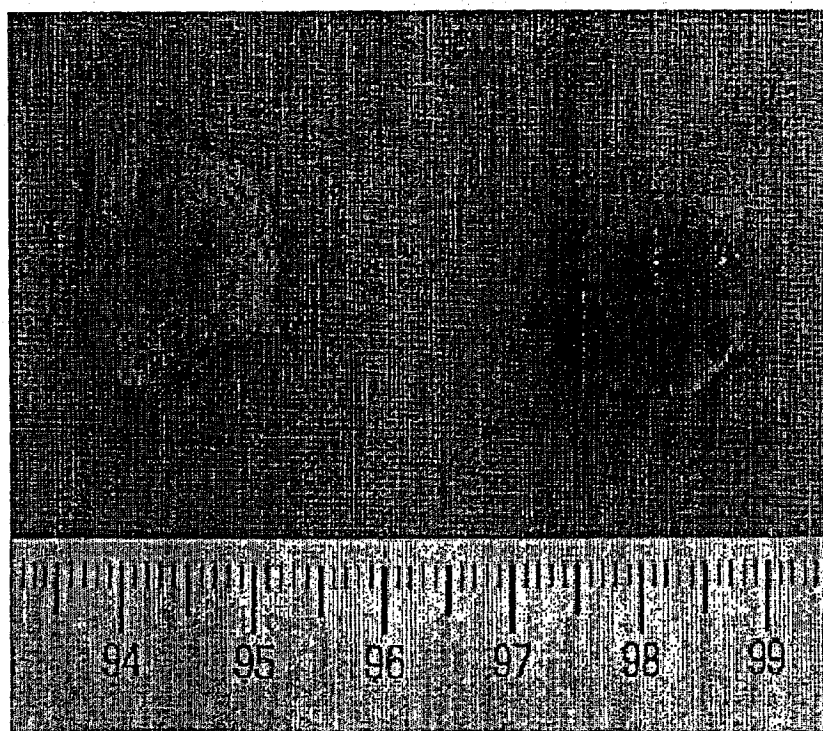


(B)

图 26 (A,B)

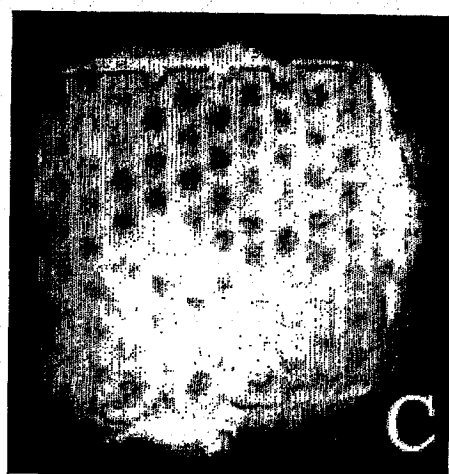
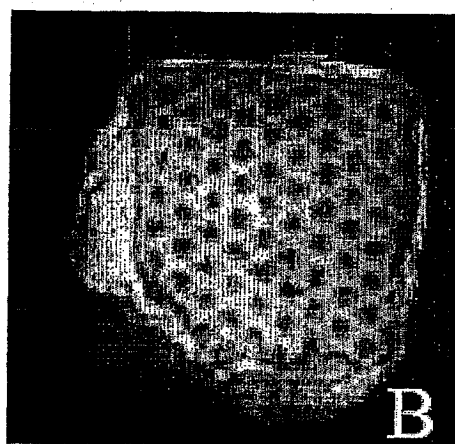
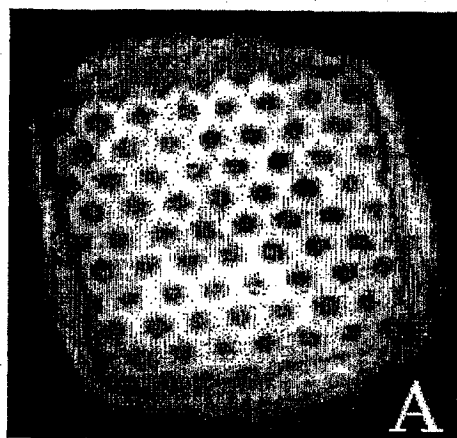


(A)



(B)

图 27(A,B,C)



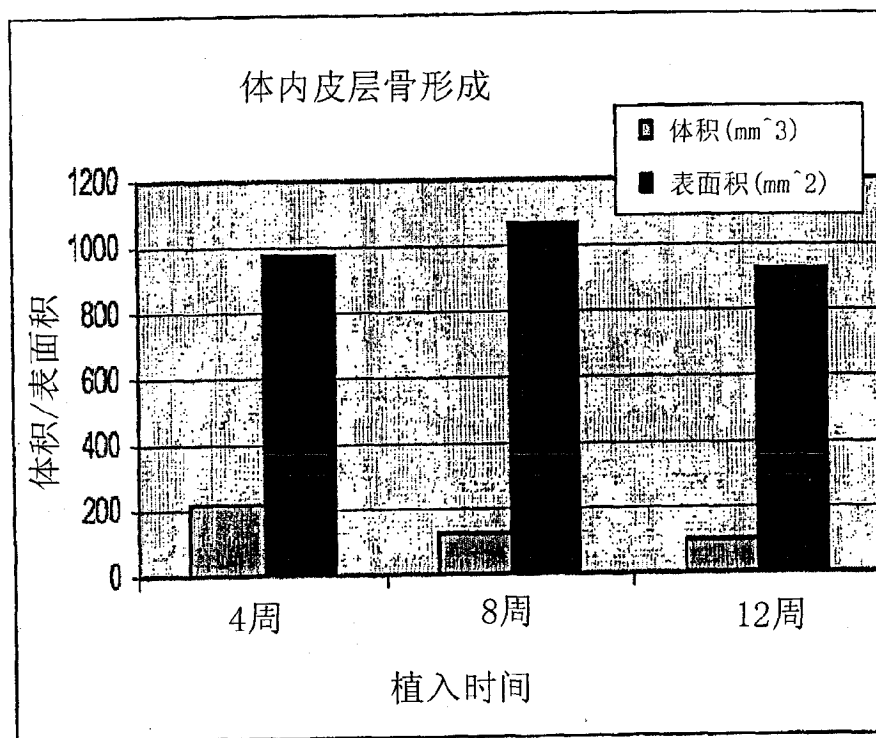
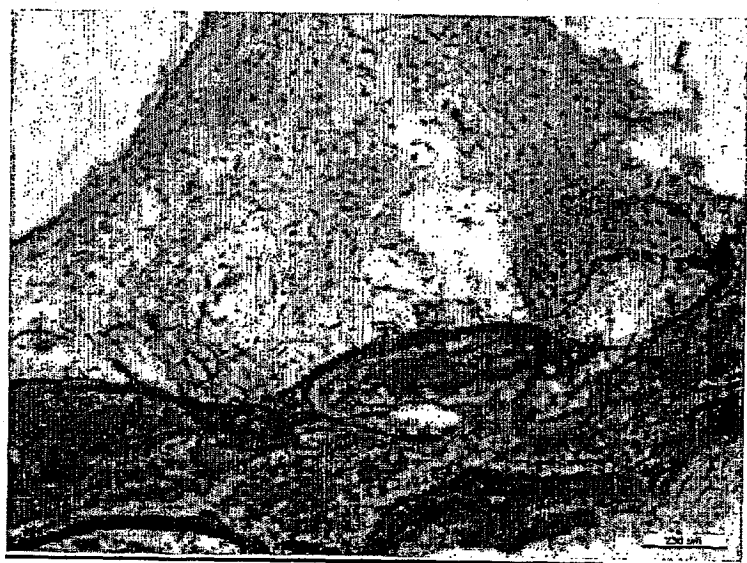
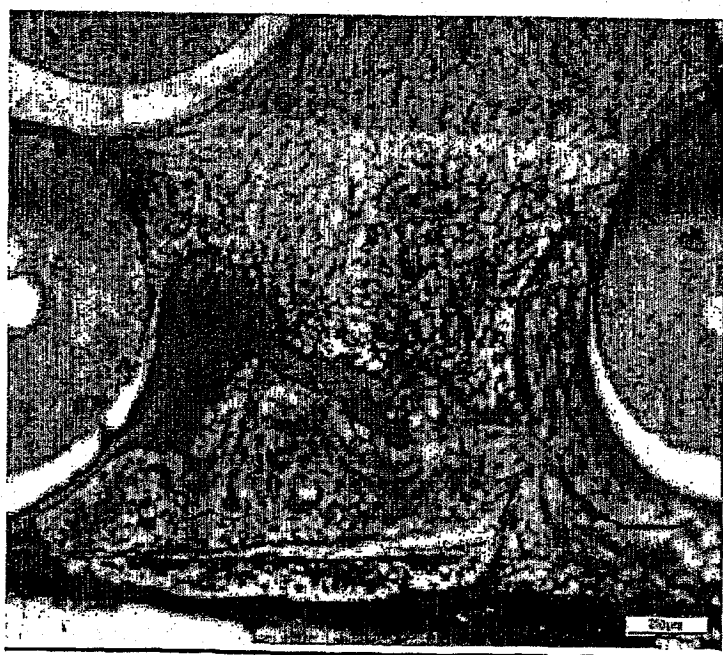


图28

图 29 (A,B)



(A)



(B)

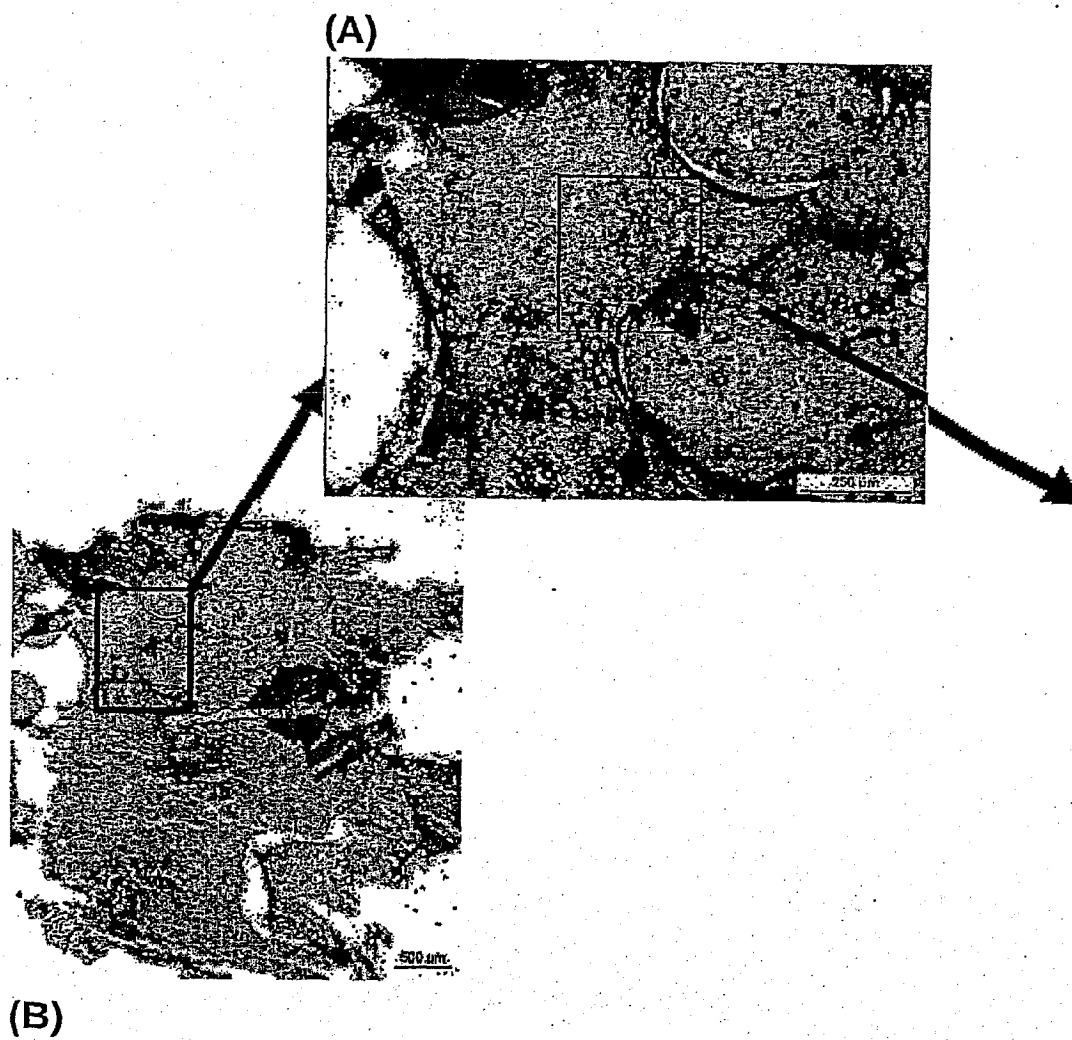


图 30 (A,B)

(来自于图 30A)



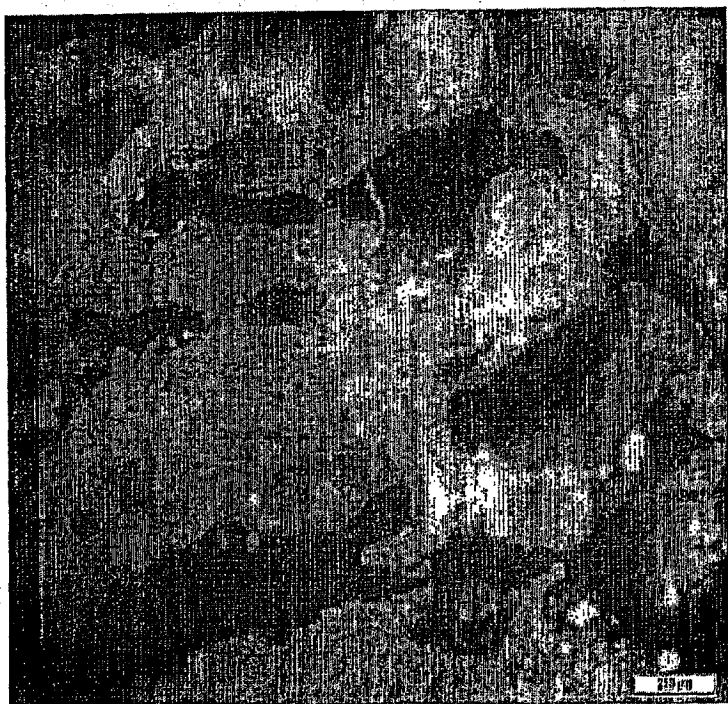
(C)

图 30 (C)

图 31 (A,B)



(A)



(B)