



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112972766 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(21) 申请号 202110197499.X

(22) 申请日 2021.02.22

(71) 申请人 苏州大学

地址 215000 江苏省苏州市吴中区石湖西路188号

(72) 发明人 王卉 邵云菲 张克勤

(74) 专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代理事务所(普通合伙) 32257

代理人 王玉仙

(51) Int. Cl.

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

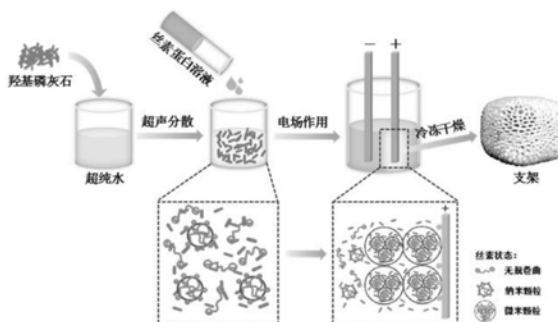
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54) 发明名称

高机械强度丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种高机械强度丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架及其制备方法。本发明将丝素蛋白溶液和羟基磷灰石水分散液通过超声作用形成混合溶液,通过直流定向电场诱导的方法,快速无毒的制备具有高机械强度的丝素蛋白/羟基磷灰石复合三维多孔支架,该方法制备周期短且操作简单,最终得到的支架具有优异并且可调节的力学性能,能够达到天然松质骨的机械性能要求,可以满足临床上的应用,是一种有效的新策略。



1. 一种高机械强度丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、将羟基磷灰石通过超声作用分散在水中,然后按照丝素蛋白与羟基磷灰石质量比10:0.5~5,向分散均匀的羟基磷灰石水溶液中加入丝素蛋白溶液,超声混合均匀,得到丝素/羟基磷灰石溶液;

S2、将两个石墨板插入丝素/羟基磷灰石溶液中,并分别连接直流电源的正负极,对丝素/羟基磷灰石溶液进行定向电场诱导作用,使得丝素蛋白溶液中自组装形成的纳米颗粒在正极板附近聚集成微米颗粒,并将羟基磷灰石包裹在里面,得到丝素/羟基磷灰石复合凝胶;

S3、将丝素/羟基磷灰石复合凝胶预冷后进行冷冻干燥,得到所述的丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的定向电场诱导作用是在20~30V直流稳定电压下处理10~40min。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的丝素溶液的浓度为5~10wt%。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述的丝素溶液通过如下方法进行制备:将蚕茧进行脱胶处理,脱胶后水洗、干燥,干燥后溶于LiBr溶液中,经过滤、透析、离心后获得丝素溶液。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述的脱胶处理是将蚕茧至于0.1~1%w/v的NaHCO₃溶液中,煮沸30~60min。

6. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述的LiBr溶液的浓度为9~10mol/L。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的预冷是在-10~-30℃放置10~20h。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的冷冻干燥是在-80℃冷冻1~5h后采用冷冻干燥机进行冻干。

9. 一种权利要求1~8任一项所述的方法制备得到的丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架。

10. 权利要求9所述的丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架在制备人造骨骼中的应用。

高机械强度丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学材料技术领域,尤其涉及一种高机械强度丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架及其制备方法。

背景技术

[0002] 骨骼是全球第二普遍移植的组织,每年至少进行四百万次手术,骨的缺损会给人的身体和生活带来极大的不便。虽然骨骼具有一定的再生能力,但是,在多数情况下仍需提高骨的修复能力。在临床上,对于骨缺损的治疗,常用自体骨移植或同种异体骨,但是存在免疫抗性、来源有限等问题。鉴于此,人们致力于研究出能模仿天然骨结构和性能的骨组织工程支架材料。近年来,由于其更好的生物相容性、多功能性等,人们对天然聚合物的关注越来越多,丝素作为一种具有生物相容性、易于加工成型、成本较低等各项优势的天然聚合物,被证实具有一定的骨修复性能。

[0003] 丝素是一种源于蚕丝的天然高分子材料,其在骨组织工程领域的研究和应用越来越多。目前,与天然骨相比,再生丝素制备的多孔支架力学性能和成骨性能较差,为了改善这一缺点,可以加入羟基磷灰石颗粒,更有效的模拟天然骨结构。羟基磷灰石是一种生物活性陶瓷,其化学组成和结晶结构类似于人体骨基质中无机物的主要组成组分。之前的研究表明,人工合成的羟基磷灰石与人体骨骼中的羟基磷灰石组成相同,结构相似,植入人体内无不良反应,具有良好的生物相容性,同时表现出一定的成骨诱导性和骨传导性。因此,以丝素蛋白为基质,掺入羟基磷灰石颗粒,可以制备力学性能和骨修复性能优异的支架。

[0004] 目前,丝素/羟基磷灰石复合骨支架制备主要有两种方法,一是直接将丝素蛋白和羟基磷灰石机械混合,然后通过如粒滤、发泡、直接冷冻干燥等方法制备复合骨支架,二是制备好纯丝素蛋白支架,通过仿生矿化的方法引入羟基磷灰石。这些制备方法操作步骤多,得到的复合骨支架力学性能均比较差,不利于在临床上的使用。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明通过直流定向电场诱导的方法,快速无毒的制备丝素/羟基磷灰石复合骨支架,制备周期短且操作简单,最终得到的支架具有优异并且可调节的力学性能。

[0006] 本发明的第一个目的是提供了一种高机械强度丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架的制备方法,包括如下步骤:

[0007] S1、将羟基磷灰石通过超声作用分散在水中,然后按照丝素蛋白与羟基磷灰石质量比10:0.5~5,向分散均匀的羟基磷灰石水溶液中加入丝素蛋白溶液,超声混合均匀,得到丝素/羟基磷灰石溶液;

[0008] S2、将两个石墨板插入丝素/羟基磷灰石溶液中,并分别连接直流电源的正负极,对丝素/羟基磷灰石溶液进行定向电场诱导作用,使得丝素蛋白溶液中自组装形成的纳米颗粒在正极板附近聚集成微米颗粒,并将羟基磷灰石包裹在里面,从而得到丝素/羟基磷灰

石复合凝胶；

[0009] S3、将丝素/羟基磷灰石复合凝胶预冷后进行冷冻干燥，得到所述的丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架。

[0010] 进一步地，所述的定向电场诱导作用是在20~30V电压下处理10~40min。

[0011] 进一步地，所述的丝素溶液的浓度为5~10%wt%。

[0012] 进一步地，所述的丝素溶液通过如下方法进行制备：将蚕茧进行脱胶处理，脱胶后水洗、干燥，干燥后溶于LiBr溶液中，经过滤、透析、离心后获得丝素溶液。

[0013] 进一步地，所述的脱胶处理是将蚕茧至于0.1~1%w/v的NaHCO₃溶液中，煮沸30~60min。

[0014] 进一步地，所述的LiBr溶液的浓度为9~10mol/L。

[0015] 进一步地，所述的预冷是在-10~-30℃放置10~20h。

[0016] 进一步地，所述的冷冻干燥是在-80℃冷冻1~5h后采用冷冻干燥机进行冻干。

[0017] 本发明的第二个目的是提供一种所述的方法制备得到的丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架。

[0018] 本发明的第三个目的是提供所述的丝素蛋白-羟基磷灰石复合骨支架在制备人造骨骼中的应用。

[0019] 借由上述方案，本发明至少具有以下优点：

[0020] 本发明方法操作简单，制备周期短，并且环保、安全、无污染，制备得到的丝素/羟基磷灰石复合骨支架力学性能优异，能够达到临床使用要求。

[0021] 上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以本发明的较佳实施例并配合详细附图说明如后。

附图说明

[0022] 图1为电场作用下制备丝素/羟基磷灰石复合骨支架示意图；

[0023] 图2为两种复合骨支架的电镜图；

[0024] 图3为两种复合骨支架的红外表征图；

[0025] 图4为两种复合骨支架的XRD表征图；

[0026] 图5为两种复合骨支架的机械性能对比图；

[0027] 图6为电场复合骨支架与松骨质以及参考文献中的丝素蛋白/羟基磷灰石复合骨支架的机械性能比较图。

具体实施方式

[0028] 下面结合实施例，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。

[0029] 复合骨支架做压缩力学性能测试方法：

[0030] 用聚四氟乙烯模具将支架制备成尺寸为10mm(直径)×8mm(高)的圆柱形，使用质构仪(TMS-PRO)对样品进行压缩力学性能测试。测试速度设置为10mm/min，触发力为0.03N，压缩比为80%，每组测试三个样品。

[0031] 实施例1：

[0032] 按照图1的示意图,制备复合骨支架:

[0033] 1、将蚕茧剪成大约 1cm^2 的茧片,称取一定量的蚕茧茧片,放入到含有 $0.5\%w/v$ 的 NaHCO_3 溶液中,煮沸45min后,用温的去离子水对脱胶丝进行冲洗4-5次,干燥后将丝素溶于 9.3mol/L 的 LiBr 溶液中, 60°C 下溶解1h。经过滤、透析、离心后获得最终浓度约为 $9\text{wt}\%$ 的丝素溶液。

[0034] 2、按质量分数丝素:羟基磷灰石 $=10:2$ 的比例将羟基磷灰石先分散在一定的水中,后加入丝素,经过超声使两者混合均匀。

[0035] 3、在 25V 的电压下,进行丝素/羟基磷灰石溶液的直流定向电场诱导处理(约 $20\sim 30\text{min}$)。

[0036] 4、取出丝素/羟基磷灰石复合凝胶,放在 -20°C 下过夜,后经 -80°C 冷冻4h,放入冷冻干燥机冻干。

[0037] 5、取出冻干支架,得到复合骨支架。

[0038] 实施例2:

[0039] 1、将蚕茧剪成大约 1cm^2 的茧片,称取一定量的蚕茧茧片,放入到含有 $0.5\%w/v$ 的 NaHCO_3 溶液中,煮沸45min后,用温的去离子水对脱胶丝进行冲洗4-5次,干燥后将丝素溶于 9.3mol/L 的 LiBr 溶液中, 60°C 下溶解1h。经过滤、透析、离心后获得最终浓度约为 $9\text{wt}\%$ 的丝素溶液。

[0040] 2、按质量分数丝素:羟基磷灰石 $=10:1$ 的比例将羟基磷灰石先分散在一定的水中,后加入丝素,经过超声使两者混合均匀。

[0041] 3、在 20V 的电压下,进行丝素/羟基磷灰石溶液的直流定向电场诱导处理(约 $30\sim 40\text{min}$)。

[0042] 4、取出丝素/羟基磷灰石复合凝胶,放在 -20°C 下过夜,后经 -80°C 冷冻4h,放入冷冻干燥机冻干。

[0043] 5、取出冻干支架,得到复合骨支架。

[0044] 实施例3:

[0045] 1、将蚕茧剪成大约 1cm^2 的茧片,称取一定量的蚕茧茧片,放入到含有 $0.5\%w/v$ 的 NaHCO_3 溶液中,煮沸45min后,用温的去离子水对脱胶丝进行冲洗4-5次,干燥后将丝素溶于 9.3mol/L 的 LiBr 溶液中, 60°C 下溶解1h。经过滤、透析、离心后获得最终浓度约为 $9\text{wt}\%$ 的丝素溶液。

[0046] 2、按质量分数丝素:羟基磷灰石 $=10:3$ 的比例将羟基磷灰石先分散在一定的水中,后加入丝素,经过超声使两者混合均匀。

[0047] 3、在 30V 的电压下,进行丝素/羟基磷灰石溶液的直流定向电场诱导处理(约 $30\sim 40\text{min}$)。

[0048] 4、取出丝素/羟基磷灰石复合凝胶,放在 -20°C 下过夜,后经 -80°C 冷冻4h,放入冷冻干燥机冻干。

[0049] 5、取出冻干支架,得到复合骨支架。

[0050] 对比例1:

[0051] 1、将蚕茧剪成大约 1cm^2 的茧片,称取一定量的蚕茧茧片,放入到含有 $0.5\%w/v$ 的 NaHCO_3 溶液中,煮沸45min后,用温的去离子水对脱胶丝进行冲洗4-5次,干燥后将丝素溶于

9.3mol/L的LiBr溶液中,60℃下溶解1h。经过滤、透析、离心后获得最终浓度约为9wt%的丝素溶液。

[0052] 2、按质量分数丝素:羟基磷灰石=10:2的比例,先将羟基磷灰石先分散在一定的丁醇溶液中,经超声混匀,逐滴加入丝素溶液中,边加边混匀溶液。

[0053] 3、将混合好的溶液放在-20℃下过夜,后经-80℃冷冻4h,放入冷冻干燥机冻干。

[0054] 4、取出冻干支架,得到复合骨支架。

[0055] 对比实施例1和对比例1得到的复合骨支架的性能,结果如下:

[0056] 图2为两种复合骨支架的电镜图,结果显示:两种复合骨支架均呈现出多孔结构,丁醇复合骨支架孔径较均匀,大小为50-100 μm 。电场复合骨支架的孔径大多集中在0-50 μm ,同时出现了一些200-300 μm 的大孔,表现出一种多级多孔结构。

[0057] 图3为两种复合骨支架的红外表征图,结果显示:丁醇复合骨支架材料酰胺I的FTIR吸收峰主要出现在1621 cm^{-1} 处,表明丁醇复合骨支架材料中丝素蛋白以 β -折叠为主,而电场复合骨支架材料酰胺I的FTIR吸收峰主要出现在1637 cm^{-1} 处,表明电场复合骨支架材料中丝素蛋白以无规卷曲为主。两种复合骨支架均在1030 cm^{-1} ,600 cm^{-1} ,560 cm^{-1} 处有吸收峰,这与羟基磷灰石中的 PO_4^{3-} 基团相对应,说明羟基磷灰石成功复合在丝素蛋白支架中。

[0058] 图4为两种复合骨支架的XRD表征图,结果显示:两种不同方法制备的复合骨支架,均在26°、31.7°、33°、34°处出现特征峰,分别对应羟基磷灰石的(002)、(211)、(300)、(202)晶面。其结果与红外均表明两种方法都成功制备了丝素蛋白/羟基磷灰石复合骨支架。

[0059] 图5为两种复合骨支架的机械性能对比图,结果显示:与丁醇复合骨支架相比,电场复合骨支架的抗压强度大幅度提高。

[0060] 表1为两种复合骨支架的最大压缩强度和弹性模量,结果显示:与丁醇复合骨支架相比,电场复合骨支架的最大压缩强力和弹性模量都有大幅度提升,分别达到丁醇复合骨支架的14倍和21倍。

[0061] 表1

[0062]

样品	最大压缩强力 (MPa)	弹性模量 (MPa)
丁醇复合骨支架	1.75 \pm 0.18	1.35 \pm 0.17
电场复合骨支架	24.66 \pm 0.88	28.91 \pm 3.19

[0063] 图6为电场复合骨支架与松骨质以及参考文献中的一些丝素蛋白/羟基磷灰石复合骨支架的机械性能比较图,结果显示:电场复合骨支架的机械性能比大多参考文献中都有较大提高,并且达到天然松质骨的机械性能要求,可以满足临床上的应用,是一种有效的策略。

[0064] 以上仅是本发明的优选实施方式,并不用于限制本发明,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,这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

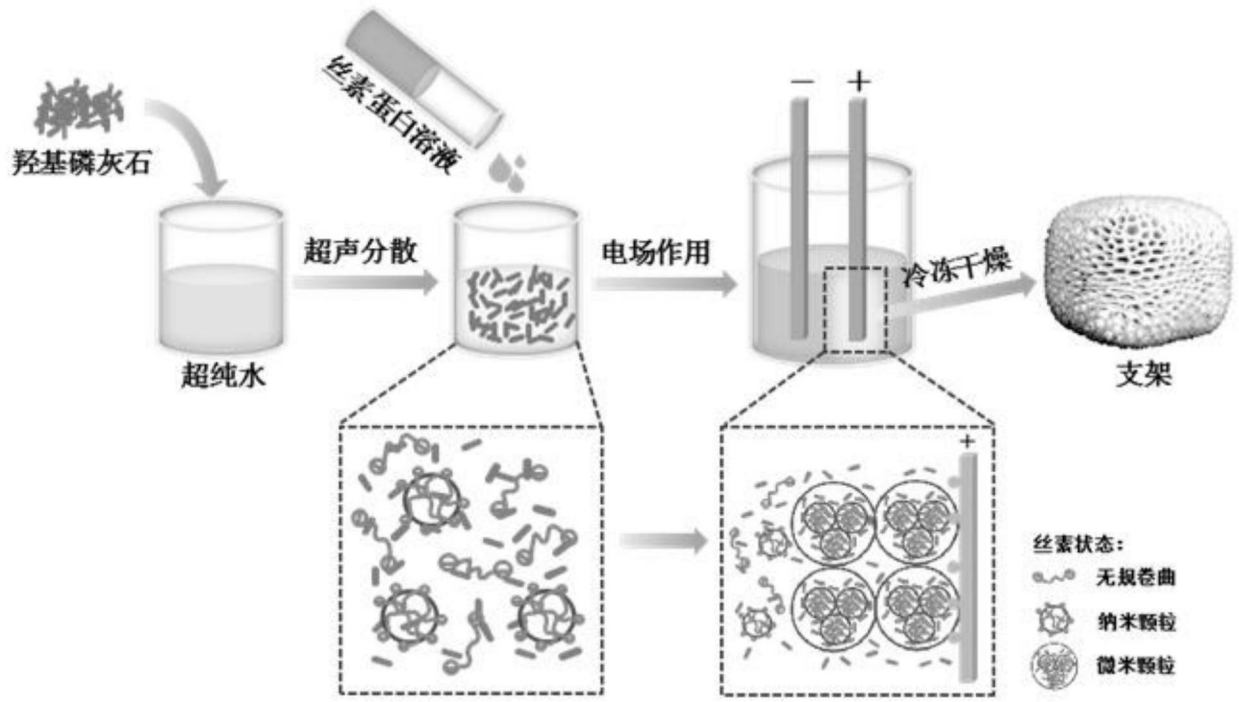
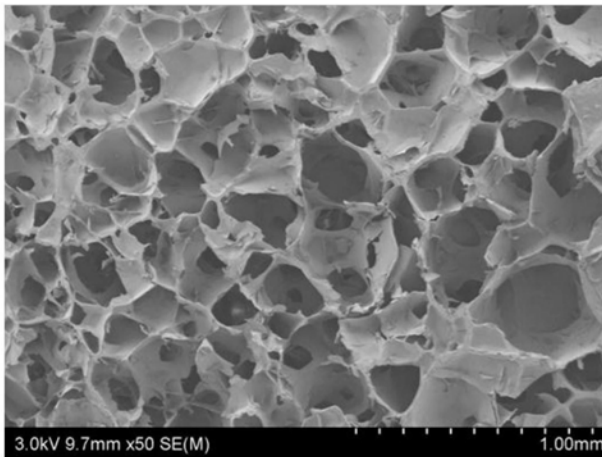


图1

丁醇复合支架



电场复合支架

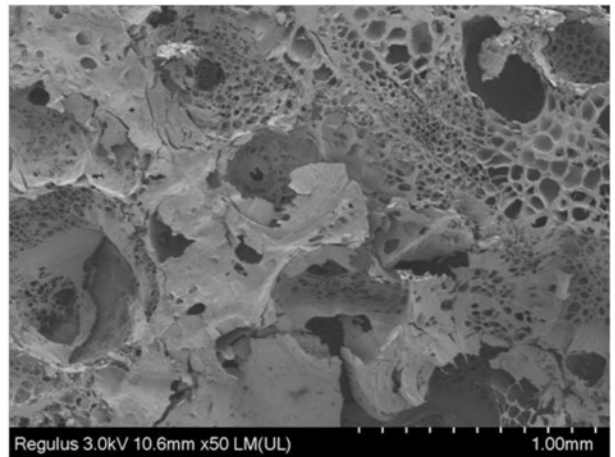


图2

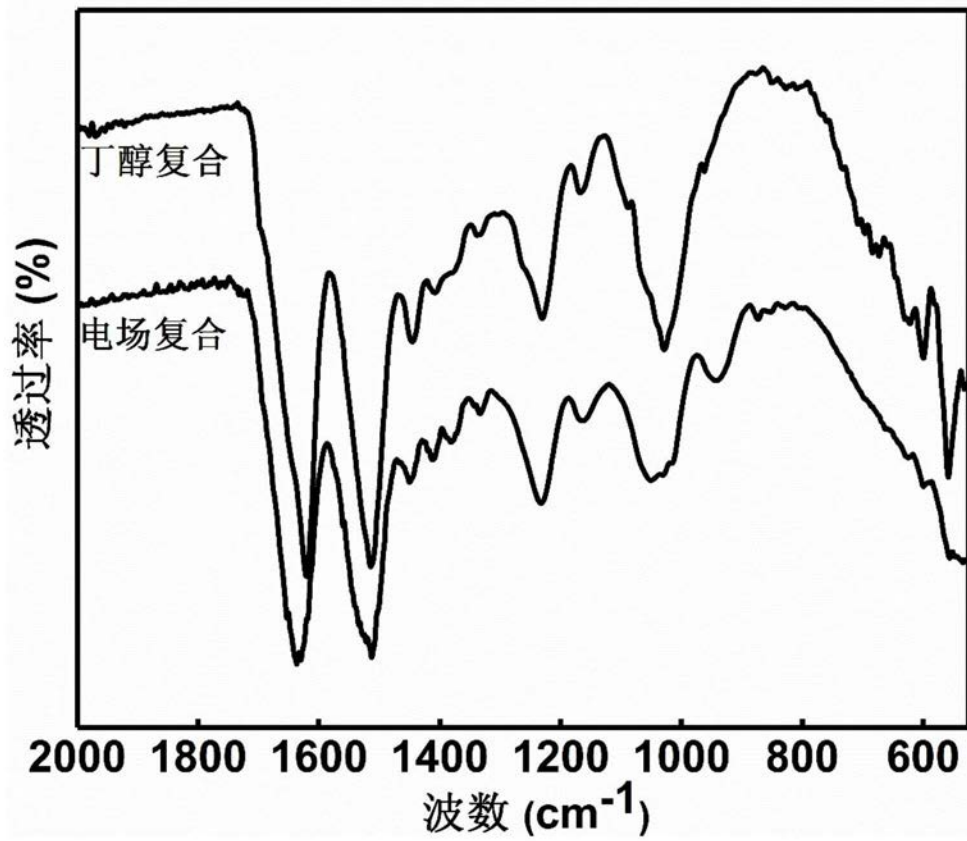


图3

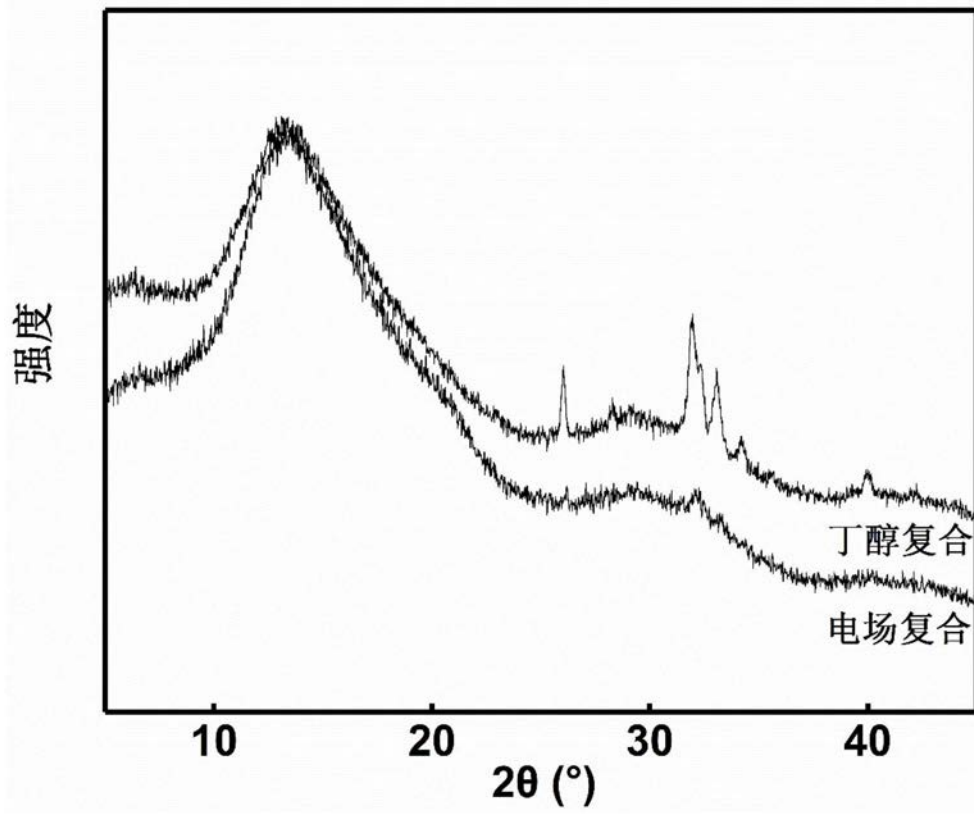


图4

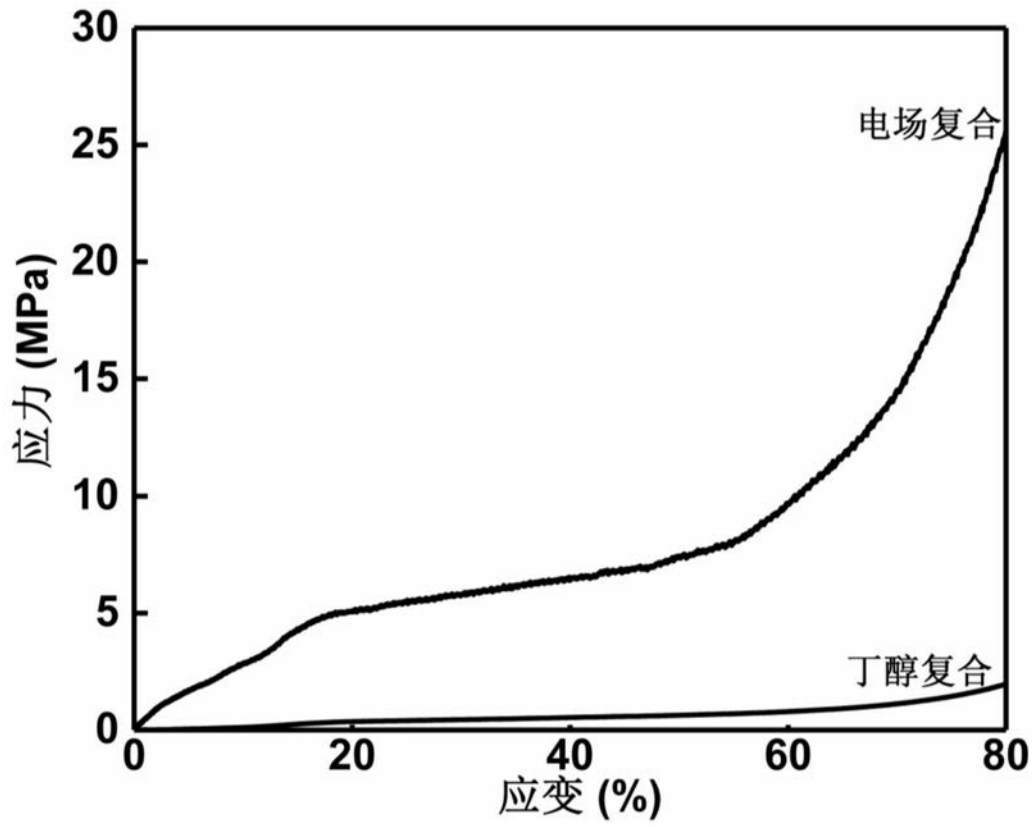


图5

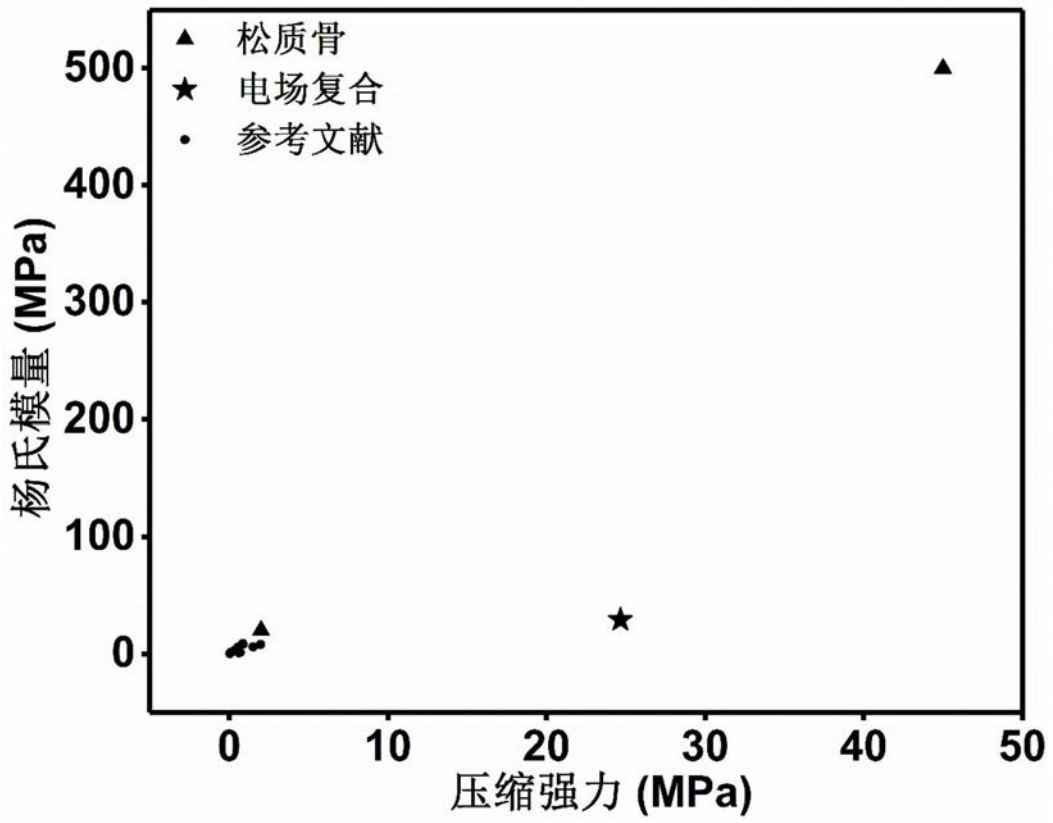


图6