



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109464699 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201811623317.5

(22)申请日 2018.12.28

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 丁明星 丁一 朱红梅 田杭宇
张秋林 明洁 孙晋睿

(74)专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 马辉

(51)Int.Cl.

A61L 27/18(2006.01)

A61L 27/20(2006.01)

A61L 27/36(2006.01)

A61L 27/54(2006.01)

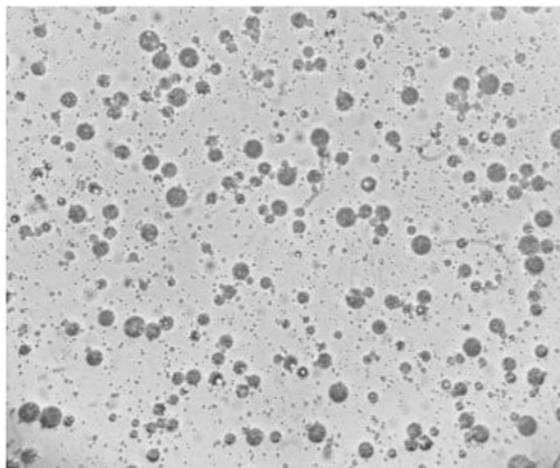
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种用于骨缺损修复填充材料及制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于骨缺损修复填充材料及制备方法,该填充材料由羧甲基纤维素、脱钙骨基质和黄酮缓释微囊组成,其中羧甲基纤维素和脱钙骨基质的重量比例为13:87,另外添加羧甲基纤维素和脱钙骨基质重量总和0.03%~0.12%的黄酮缓释微囊;制备时将分别制备好的脱钙骨基质和羧甲基纤维素准确称量均匀混合,向其中加入黄酮缓释微囊,制作成成品封装,辐照灭菌,-20℃保存即可得到可塑型的移植骨泥;该填充材料物理性状稳定,可塑性强,使用方便;促进新生骨生长和骨折线消失,且与宿主骨连接更加紧密;价格便宜、安全有效、使用方便且能长期保存的骨修复材料,可减轻患病宠物的治疗时间和痛苦。



1. 一种用于骨缺损修复填充材料,其特征在于:该填充材料由羧甲基纤维素、脱钙骨基质和黄酮缓释微囊组成,其中羧甲基纤维素和脱钙骨基质的重量比例为13:87,另外添加羧甲基纤维素和脱钙骨基质重量总和0.03%~0.12%的黄酮缓释微囊。

2. 根据权利要求1所述的用于骨缺损修复填充材料,其特征在于:所述脱钙骨基质骨颗粒的直径为200~800 μm 。

3. 根据权利要求1所述的用于骨缺损修复填充材料的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 室温条件下,在洁净操作台,将羧甲基纤维素和脱钙骨基质准确称量均匀混合,研成粉末;

2) 在步骤1) 混合物中加入黄酮缓释微囊,然后调和呈糊状,制作成成品封装,待用。

3) 将混合物在25kGy伽马射线下灭菌,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

4. 根据权利要求3所述的用于骨缺损修复填充材料的制备方法,其特征在于:所述脱钙骨基质的制备包括如下步骤:

取新鲜四肢骨长管状骨,去除两端松质骨,剔除骨膜和肌肉组织,清除骨髓,低温冷冻后砸碎成小骨块,反复冲洗、风干;加入脱脂液溶液进行脱脂,倾去有机溶剂冲洗,用无水乙醇脱水,将骨块冷冻后取出粉碎研磨,筛取200~800 μm 骨颗粒,用盐酸溶液脱钙,再次用脱脂液脱脂,冲洗,即可得到脱钙骨基质,放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。

5. 根据权利要求3所述的用于骨缺损修复填充材料的制备方法,其特征在于:所述黄酮缓释微囊的制备包括如下步骤:

将该黄酮溶液滴加至含有聚乳酸-羟基乙酸共聚物的二氯甲烷溶液中,转移至匀浆机中搅拌乳化形成初乳,再将该初乳加至聚乙烯醇溶液中,搅拌形成复乳,再将该复乳加至聚乙烯醇溶液中搅拌除去二氯甲烷,离心,取试管底部微囊洗涤、干燥后制得淡黄色粉末状物质。

6. 根据权利要求4所述的用于骨缺损修复填充材料的制备方法,其特征在于:所述脱脂液为氯仿/甲醇(1:1)溶液。

7. 根据权利要求5所述的用于骨缺损修复填充材料的制备方法,其特征在于:所述黄酮溶液为由骨碎补总黄酮粉末涡旋分散溶于双蒸水中得到0.1g/ml黄酮溶液。

8. 根据权利要求5所述的用于骨缺损修复填充材料的制备方法,其特征在于:所述聚乙烯醇溶液中聚乙烯醇的质量百分含量为1%。

一种用于骨缺损修复填充材料及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医用材料领域,具体涉及一种用于骨缺损修复填充材料及制备方法。

背景技术

[0002] 脱钙骨基质(demineralized bone matrix,DBM)是通过异体或异种骨脱钙、脱脂等处理的骨基质产物。DBM具有良好的三维空间结构和满意的生物相容性,也具备骨诱导、骨传导和骨发生能力,在临床骨移植手术中运用广泛。美国科学家Urist在1965年提出了具有里程碑式的骨诱导理论,研制出了经脱钙、脱抗原处理后的脱钙骨基质,并且最先建立了完整可靠的动物试验模型,将DBM植入肌肉或皮下部位,并成功诱导成骨。最终在1982年成功提取了牛的骨形态发生蛋白(bonemorphogenetic protein,BMP),也证明了BMP是能在骨和骨骼肌中诱导骨的形成。DBM含有一定量的BMP,与DBM内胶原紧密结合,BMP主要生物活性是诱导骨的形成并促进骨缺损的修复。骨髓间充质细胞能被BMP诱导形成破骨细胞和成骨细胞。破骨细胞能溶解和吸收骨质并参与骨组织重新构建和调节血钙浓度,而成骨细胞能合成和分泌骨钙蛋白和胶原纤维等有机成分,形成类骨质。Urist通过大量试验证明了BMP具有异种同源型,在骨移植手术后机体不会产生明显的抗原反应。这一系列重大发现使骨缺损治疗进入了全新的阶段。

[0003] 目前,在国内应用于人医骨科手术上的各类骨移植材料包括自体骨、异种骨、异体骨、人工骨等,各类干细胞和生长因子也被广泛的运用于临床中。然而在宠物临床中,动物骨折是临床常见病例,其中粉碎性骨折造成骨缺损、骨不连和骨髓炎的治疗难度大,使得临床上需要进行骨修复治疗的宠物也越来越多,不少小动物门诊对于骨折仍然大多采用简单的外固定方法,治疗效果不佳。宠物骨移植材料需要满足价格适中、方便保存、移植简易、效果良好这几个条件,人用骨移植材料并不完全适用于宠物医疗市场。当前,宠物医疗市场上的骨移植材料种类较少,价格昂贵,且治疗效果不佳。因而,在宠物临床寻找适合犬骨折的骨移植材料有重要的意义。

发明内容

[0004] 为了解决上述问题,本发明的目的在于提供一种采用W/O/W(水包油包水)法制备黄酮PLGA(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)缓释微囊,将其与DBM复合,并利用CMC(羧甲基纤维素)塑形,制备出具有缓释功能的、骨修复程度好的动物骨移植骨泥材料及其制备方法。

[0005] 本发明采用的技术方案如下:

[0006] 一种用于骨缺损修复填充材料,该填充材料由羧甲基纤维素(CMC)、脱钙骨基质(DBM)和黄酮缓释微囊组成,其中羧甲基纤维素(CMC)和脱钙骨基质(DBM)的重量比例为13:87,另外添加黄酮缓释微囊,其中黄酮类物质的含量为0.03%~0.12%。

[0007] 优选的、所述脱钙骨基质(DBM)骨颗粒的直径为200~800 μ m。

[0008] 上述用于骨缺损修复填充材料的制备方法,包括以下步骤:

- [0009] 1) 室温条件下,在洁净操作台,将羧甲基纤维素(CMC)和脱钙骨基质(DBM)准确称量均匀混合,研成粉末;
- [0010] 2) 在步骤1)混合物中加入黄酮缓释微囊,制作成成品封装;
- [0011] 3) 将混合物在25kGy伽马射线下灭菌,-20℃保存备用。
- [0012] 其中,所述脱钙骨基质(DBM)的制备包括如下步骤:
- [0013] 取新鲜四肢骨长管状骨,去除两端松质骨,剔除骨膜和肌肉组织,清除骨髓,低温冷冻后砸碎成小骨块,反复冲洗、风干;加入脱脂液溶液进行脱脂,倾去有机溶剂冲洗,用无水乙醇脱水,将骨块冷冻后取出粉碎研磨,筛取200~800 μ m骨颗粒,用盐酸溶液脱钙,再次用脱脂液脱脂,冲洗,即可得到DBM,放入-20℃冰箱冻存。
- [0014] 其中,所述黄酮缓释微囊的制备包括如下步骤:
- [0015] 将该黄酮溶液滴加至含有聚乳酸-羟基乙酸共聚物的二氯甲烷溶液中,转移至匀浆机中搅拌乳化形成初乳,再将该初乳加至聚乙烯醇(聚乙烯醇)溶液中,搅拌形成复乳,再将该复乳加至聚乙烯醇溶液中搅拌除去二氯甲烷,离心,取试管底部微囊洗涤、干燥后制得淡黄色粉末状物质。
- [0016] 优选的、所述脱脂液为氯仿/甲醇(1:1)溶液。
- [0017] 优选的、所述黄酮溶液为由骨碎补总黄酮粉末涡旋分散溶于双蒸水中得到0.1g/mL黄酮溶液。
- [0018] 优选的、所述聚乙烯醇溶液中聚乙烯醇的质量百分含量为1%。
- [0019] 本发明具有以下有益效果:
- [0020] 1) DBM具备骨诱导、骨传导和骨发生能力,能用于修复各种形状的骨缺损,是一种具有高效成骨活性的植骨材料。本发明在制备DBM时,将骨脱脂脱钙,使其获得良好柔韧性,便于塑形;
- [0021] 2) 加入CMC作为塑形剂制备骨泥,物理性状稳定,可塑性强,使用方便;
- [0022] 3) 骨碎补总黄酮是中医骨伤科常见药物,其黄酮主要成分是柚皮苷为主的二氢黄酮类化合物,能加速新生骨组织的生长、塑形和重建,在DBM和CMC的混合物中加入黄酮缓释微囊,促进新生骨生长和骨折线消失,且与宿主骨连接更加紧密。
- [0023] 本发明研制出了一种价格便宜、安全有效、使用方便且能长期保存的骨修复材料,可减轻患病宠物的治疗时间和痛苦,提升宠物的动物福利。

附图说明

- [0024] 图1是黄酮缓释微囊的显微图;
- [0025] 图2兔前臂骨缺损及本发明物置入手术过程
- [0026] A. 是打开手术通路,B. 是取出的骨段,C. 是填充本发明,D. 是闭合创口;
- [0027] 图3是术后第4周兔前臂骨缺损愈合情况(大体解剖图)
- [0028] A. 空白对照;B. DBM组;C. DBM+低剂量缓释黄酮;D. DBM+中剂量缓释黄酮;E. DBM+低剂量缓释黄酮
- [0029] 图4是术后第8周兔前臂骨缺损愈合情况(大体解剖图)
- [0030] 图5是术后第4周兔前臂骨缺损愈合情况(X线图)
- [0031] 图6是术后第8周兔前臂骨缺损愈合情况(X线图)

[0032] 图7是动物试验中实施例5、6、7以及比较例8、9术后兔前臂骨缺损愈合的Lane影像学评分统计结果。

[0033] 图8. 术后8周犬肋骨缺损愈合情况 (X线图) A. 空白对照; B. DBM组; C. DBM+缓释黄酮组

[0034] 图9. 术后8周犬肋骨缺损愈合的Lane影像学评分 (均值±标准差, n=3) 不同字母标注的组间评分差异显著 (p<0.05)

具体实施方式

[0035] 以下结合附图和具体实施例对本发明做进一步地详细说明, 但以下示意实施例及说明仅用来解释本发明, 本发明的实施方式不限于此。

[0036] 本发明实施例为兔DBM复合黄酮缓释微囊骨泥的制备, 并对可塑型移植骨泥进行动物试验, 建立兔骨缺损模型并向其中填充本发明, 通过术后临床表现、影像学检测等方法评估其效果。

[0037] 实施例1: 兔脱钙骨基质制备

[0038] 按兔骨30mL/g加入氯仿/甲醇(1:1)溶液中脱脂8h, 倾去有机溶剂, 双蒸水冲洗3次。用5倍于骨块体积无水乙醇脱水2h。将骨块放入深低温冰箱中冷冻4h, 取出利用液氮在研磨机低温粉碎研磨, 用样品筛筛取200~800 μ m骨颗粒。按稀盐酸与骨重量比20:1的比例将骨颗粒放入0.6M盐酸溶液中脱钙, 每隔半小时搅拌, 每8h跟换新的脱钙液, 大约24h脱钙完成。用双蒸水冲洗, pH为7.0左右为止。再次用氯仿/甲醇(1:1)脱脂4h, 双蒸水水洗3次, 风干, 展平25kGy伽马射线下灭菌, 放入-20 $^{\circ}$ C冰箱冻存。

[0039] 实施例2: 黄酮缓释微囊

[0040] 用移液枪精确吸取0.4mL的黄酮溶液作为内水相。涡旋搅拌下将该黄酮溶液快速滴加至140mg/mL PLGA的4mL二氯甲烷溶液中, 迅速转移至匀浆机中1500转/分转速下搅拌乳化5min形成初乳。再将该初乳加至10mL1%聚乙烯醇溶液中, 在涡旋高速搅拌乳化数分钟, 形成复乳。在通风厨内移至20mL1%聚乙烯醇溶液中磁力搅拌4h除去二氯甲烷, 于高速离心机5000rpm下离心10min, 收集上清液后, 取试管底部微囊经双蒸水洗涤、干燥后经冷冻干燥制得淡黄色粉末状物质。

[0041] 实施例3: 可塑型移植骨泥制备

[0042] 1) 室温条件下, 在洁净操作台, 将羧甲基纤维素(CMC)和脱钙骨基质(DBM)准确称量均匀混合, 研成粉末;

[0043] 2) 在步骤2)混合物中加入黄酮缓释微囊, 制作成成品封装;

[0044] 3) 将混合物在25kGy伽马射线下灭菌, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0045] 按照CMC:DBM=130mg:870mg比例准确称量均匀混合, 随机分为4组, 每组骨泥重量相同。向其中3组加入高(2.4mg)、中(1.2mg)、低(0.6mg)剂量黄酮PLGA微囊, 超净台内制作成成品封装, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0046] 实施例4: 兔前臂骨缺损模型建立

[0047] 使用新西兰雄兔制作骨缺损模型, 在麻醉情况下, 于前臂肌间隙显露右侧桡骨中上段, 用摆锯截取1.5cm长桡骨连同骨膜, 造成节段性骨缺损。以0.9%无菌生理盐水冲洗断端及创口, 去除骨屑, 用生理盐水将填充材料调和成糊状, 植入缺损区。

[0048] 实施例5~7,以及对比例8~9均为兔骨缺损试验。

[0049] 实施例5:使用6只上述实施例4中制作的骨缺损兔模型进行试验,在骨缺损区填充含高剂量黄酮的本发明物。

[0050] 实施例6:使用6只上述实施例4中制作的骨缺损兔模型进行试验,在骨缺损区填充含中剂量黄酮的本发明物。

[0051] 实施例7:使用6只上述[骨缺损模型建立]中制作的骨缺损兔模型进行试验,在骨缺损区填充本含低剂量黄酮的本发明物。

[0052] 对比例8:使用6只上述实施例4中制作的骨缺损兔模型进行试验,在骨缺损区不进行填充。

[0053] 对比例9:使用6只上述实施例4中制作的骨缺损兔模型进行试验,在骨缺损区仅填充DBM。

[0054] 兔标本形态学观察:术后4周,空白对照组骨缺损处被纤维结缔组织覆盖,剔除纤维结缔组织未发现新生骨生长;DBM组和DBM+低剂量缓释黄酮组骨缺损处可见少量骨痂和纤维结缔组织形成,移植物和宿主骨结合界限开始模糊;DBM+中剂量缓释黄酮组和DBM+高剂量缓释黄酮组骨缺损处可见大量骨痂,质地较坚硬,与宿主骨结合相当牢固(见图3)。术后8周,空白对照组骨缺损处少量骨痂和新生骨出现,骨缺损仍明显;DBM组和DBM+低剂量缓释黄酮组骨缺损处可见大量骨痂,质地坚硬;DBM+中剂量缓释黄酮组缺损处新生骨生长良好,与宿主骨界限较不明显;DBM+高剂量缓释黄酮组骨缺损处新生骨大量出现,与宿主骨界限不明显(见图4)。

[0055] 兔前臂骨缺损愈合的影像学观察:在术后4周和8周时采用统一拍摄条件分别摄X片,观察骨修复程度。根据Lane骨移植影像学评分标准,从成骨程度、新骨与宿主连接程度和骨髓腔改建程度3个方面全面评价骨修复程度。术后4周,空白对照组骨缺损处未出现明显新生骨,骨缺损端边缘有少量低密度类骨质,骨折线非常清晰;DBM组和DBM+低剂量缓释黄酮组骨缺损处有少量低密度云雾状类骨质,骨折线比较清晰;DBM+中剂量缓释黄酮组骨缺损处有少量低密度新生骨组织,骨折线部分模糊;DBM+高剂量缓释黄酮组骨缺损处有丰富新生骨,与宿主骨部分连接(见图5)。术后8周,空白对照组骨缺损断端模糊,断端新生骨密度升高;DBM组与DBM+低剂量缓释黄酮组骨缺损处有高密度新生骨,断端骨折线模糊;DBM+中剂量缓释黄酮组骨缺损处有较多高密度新骨,骨折线模糊,两断端连接;DBM+高剂量缓释黄酮组与宿主骨连接紧密,出现了同等密度皮质骨轮廓,骨折线基本消失(见图6)。根据Lane影像学评分标准,术后4周,4个骨泥组影像学评分都显著高于空白对照组($p < 0.05$),且各组影像学评分随着时间推移递增;DBM组和DBM+低剂量组影像学评分无显著性差异($p > 0.05$);DBM+中剂量组影像学评分显著高于DBM组和DBM+低剂量组($p < 0.05$);DBM+高剂量组影像学评分显著高于DBM+中剂量组($p < 0.05$)。术后8周,4个试验组影像学评分均显著高于空白对照组($p < 0.05$);DBM组和DBM+低剂量组影像学评分无显著性差异($p > 0.05$);DBM+中剂量组和DBM+高剂量组影像学评分无显著性差异($p > 0.05$),但均显著高于其他组($p < 0.05$)(如图7)。

[0056] 实施例10:犬左侧第11肋骨缺损模型建立

[0057] 使用德国牧羊犬制作骨缺损模型,在麻醉情况下,于左侧暴露倒数第2骨中上段,用线锯截取1.5cm长肋骨,造成节段性骨缺损。以0.9%无菌生理盐水冲洗断端及创口,去除

骨屑,用生理盐水将填充材料调和成糊状,植入缺损区。

[0058] 实施例11,以及对比例12和13均为犬骨缺损试验。

[0059] 实施例11:使用上述实施例10中制作的3只犬肋骨缺损模型进行试验,在骨缺损区填充含黄酮(2.4mg)本发明物。

[0060] 实施例12:使用上述实施例10中制作的3只犬骨缺损模型进行试验,在骨缺损区填充DBM。

[0061] 对比例13:使用上述实施例10中制作的3只骨缺损犬模型进行试验,在骨缺损区不进行填充。

[0062] 犬肋骨缺损愈合的影像学观察:空白对照组骨缺损间隙有低密度新生骨;DBM组骨缺损间隙有中等密度新生骨,骨折线存在;DBM+缓释黄酮组骨缺损间隙有高密度新生骨,皮质骨轮廓,骨折线基本消失(见图8)。根据Lane影像学评分,空白对照组、DBM组和DBM+缓释黄酮组骨缺损处影像学评分依次增高,各组间存在显著差异($p < 0.05$) (如图9)。

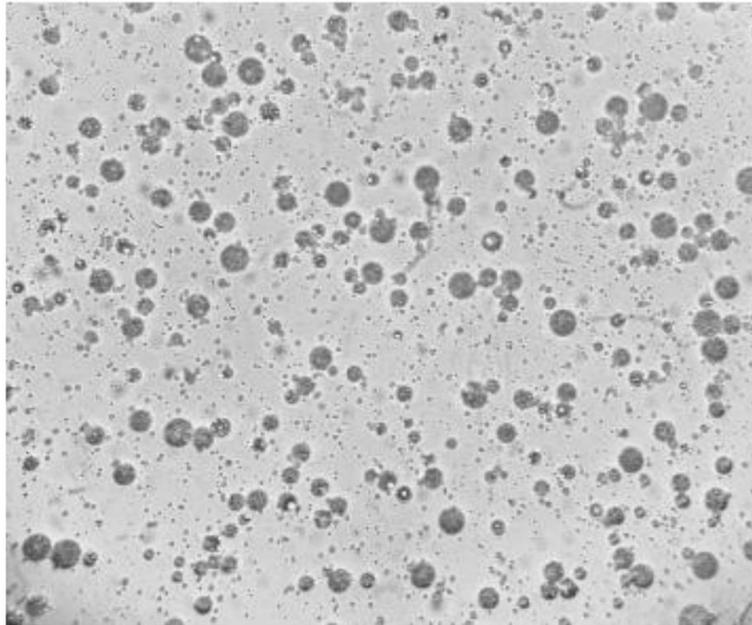


图1

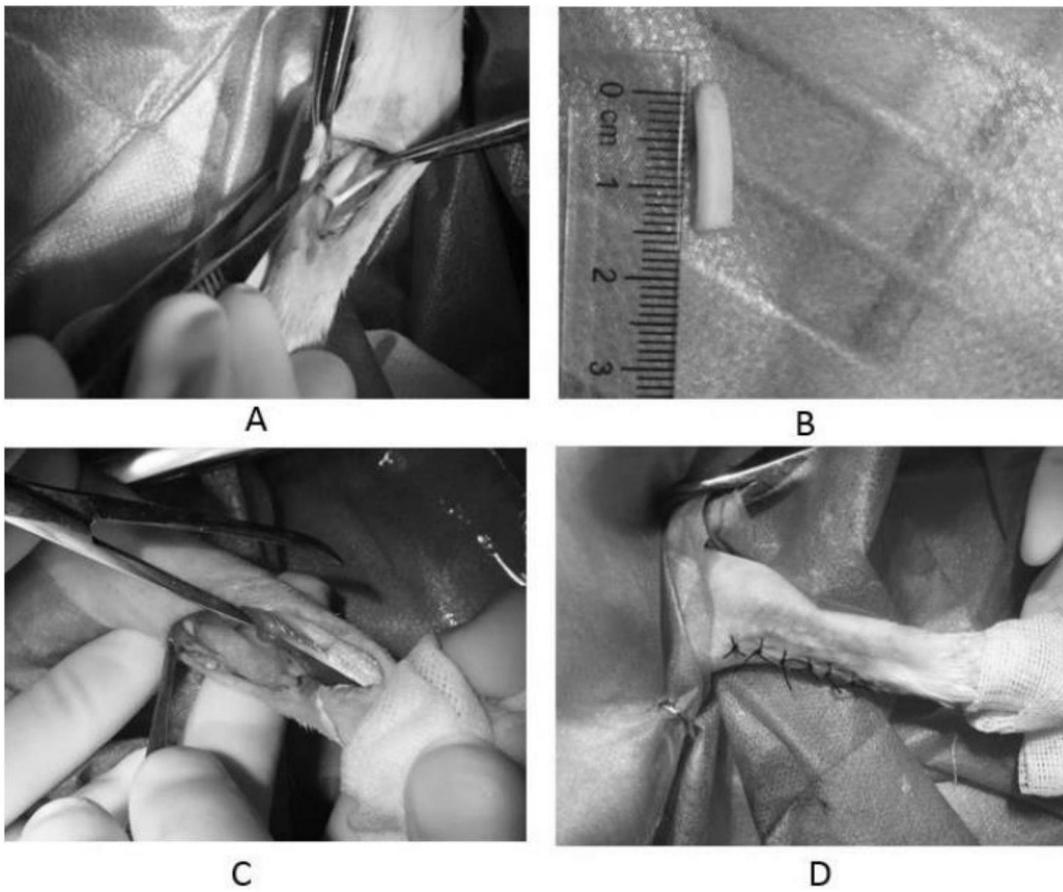


图2



图3

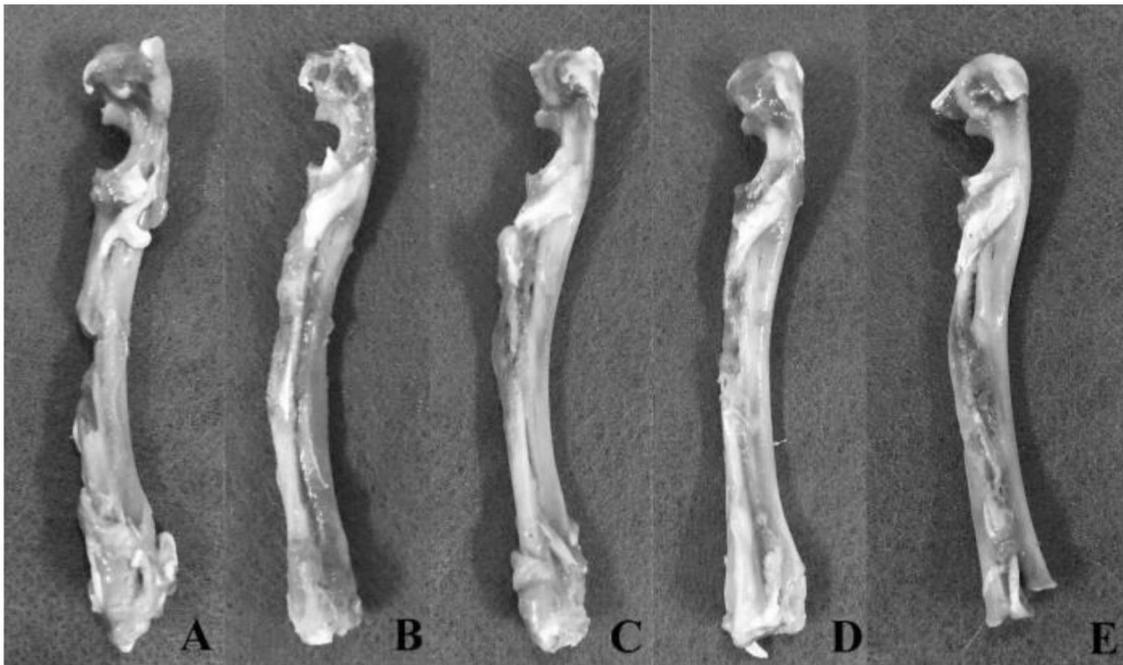


图4



图5

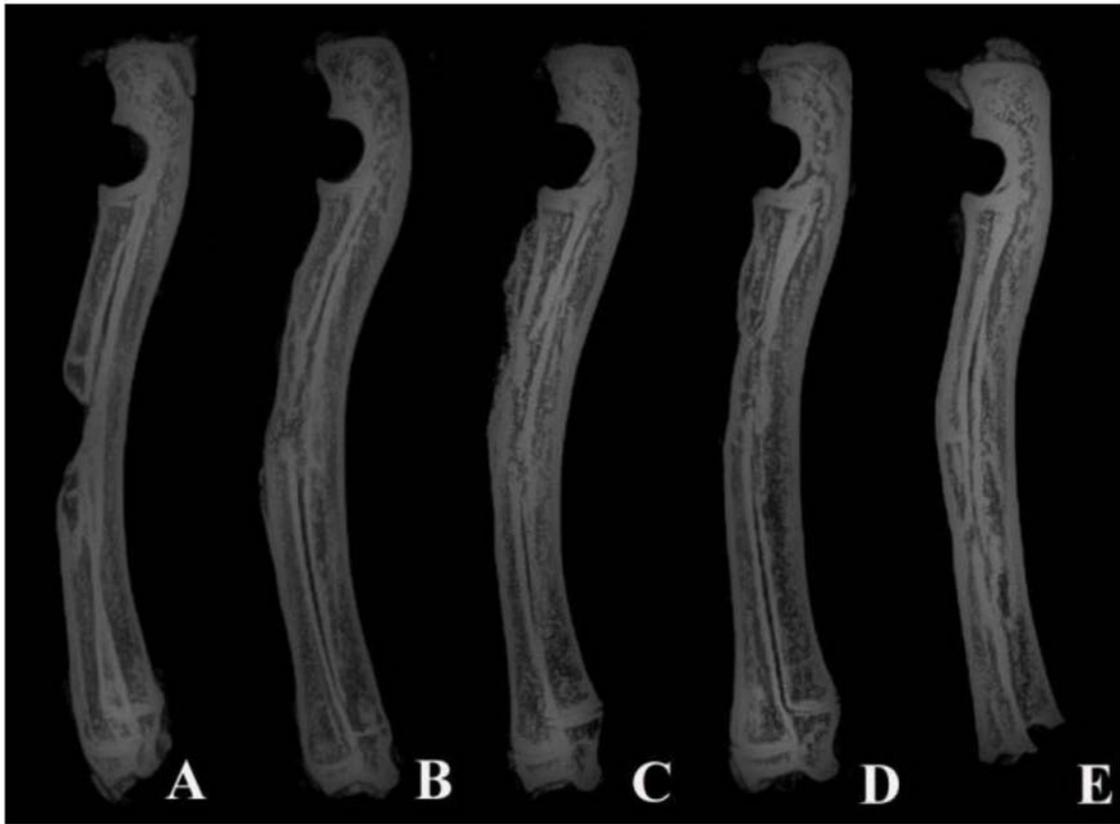


图6

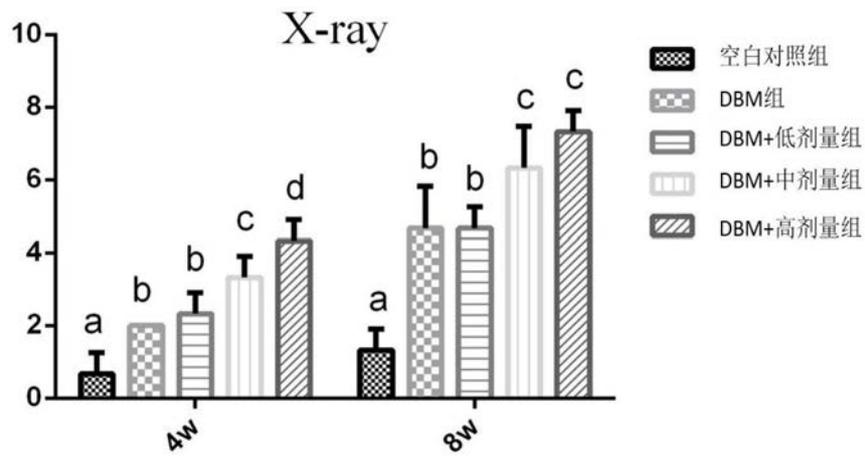


图7

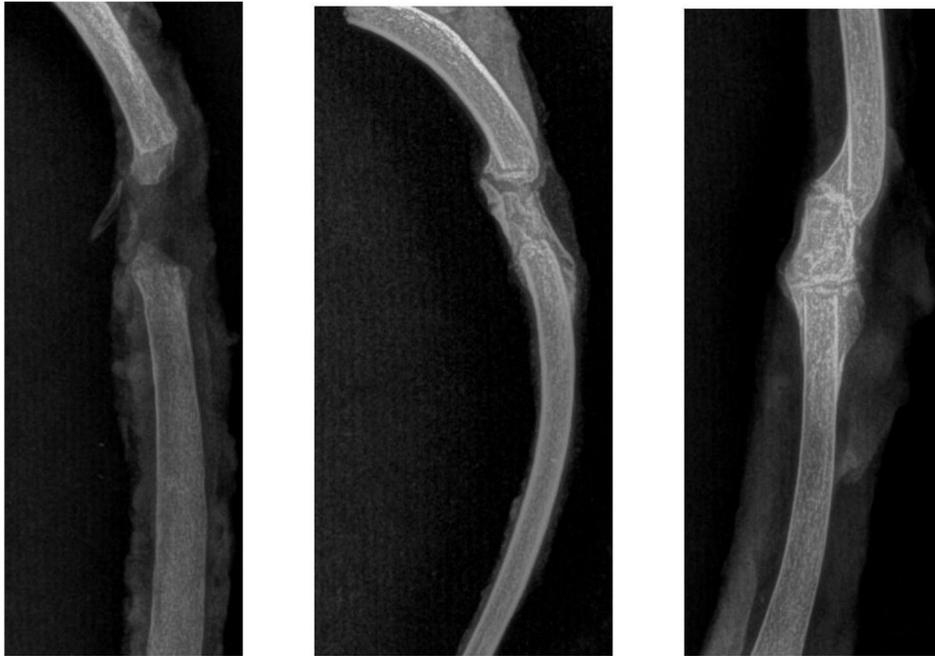


图8

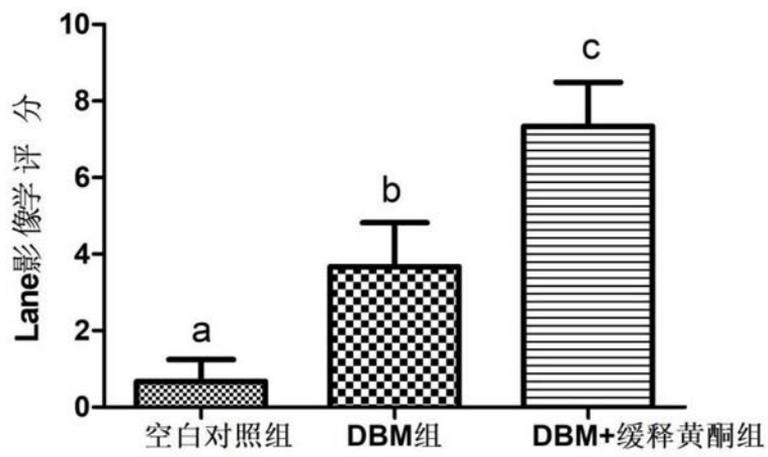


图9