



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112972763 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(21) 申请号 202110210473.4

C08L 61/16 (2006.01)

(22) 申请日 2021.02.25

(71) 申请人 中国科学院长春应用化学研究所  
地址 130022 吉林省长春市人民大街5625号

(72) 发明人 章培标 孙烁 王宗良 焦自学

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 张柳

(51) Int. Cl.

A61L 27/18 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

G12N 5/073 (2010.01)

C08J 7/12 (2006.01)

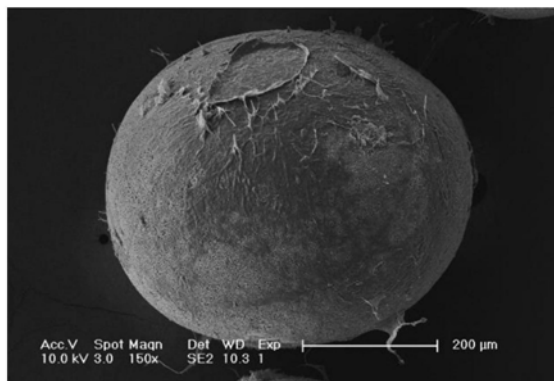
权利要求书2页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称

一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及聚醚醚酮技术领域,尤其涉及一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球、其制备方法及应用。所述制备方法包括:PEEK微球表面多孔化处理、灭菌、浸泡于DMEM培养基,然后与传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK微球在DMEM培养基中混匀,进行培养,通过更换培养基培养以及脱细胞处理,得到表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球。本发明制备的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球提高了细胞的培养密度与效率,有利于细胞的黏附、增殖与分化,从仿生学角度模拟了成骨过程。



1. 一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球的制备方法,包括以下步骤:

A) 在保护气的条件下,将PEEK微球置于处理液中加热搅拌,干燥后,得到表面多孔化的PEEK微球;

所述处理液包括二甲基亚砷和硼氢化钠;

B) 将所述表面多孔化的PEEK微球进行灭菌,然后浸泡于DMEM培养基中12~24h后,得到浸泡后的PEEK多孔微球;

C) 将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀,进行培养,22~26h后更换DMEM培养基继续培养,22~26h后将DMEM培养基更换为矿化培养基进行培养,22~26h后换液,之后,每隔46~50h进行一次换液,更换为矿化培养基的第7~9d经脱细胞处理,得到表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球;

所述矿化培养基包括DMEM培养基、CaCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和聚天门冬氨酸。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述PEEK微球按照以下方法制备得到:

将聚醚醚酮粉末与浓硫酸混合,得到混合溶液;

将所述混合溶液采用气流法制备得到微球体;

将所述微球体与水进行水热反应,得到PEEK微球。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤A)中,所述保护气为氮气;

所述二甲基亚砷和硼氢化钠的用量比为60~80mL:130~150mg;

所述处理液按照以下方法进行制备:

将二甲基亚砷和硼氢化钠混合后,加热至115~125℃,得到处理液。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤A)中,所述加热搅拌的温度为115~125℃,时间为5~7h,加热搅拌的转速为200~400rpm。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤A)中,所述加热搅拌后,还包括洗涤;

所述洗涤包括:

将加热搅拌后的PEEK微球依次浸没于甲醇中15~30min、一次水10~20min、0.4~0.6mol/L的盐酸溶液10~20min、一次水10~20min,体积浓度为95%~100%的乙醇10~20min。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤B)中,所述灭菌包括:

将所述表面多孔化的PEEK微球采用体积浓度为75%的乙醇灭菌,用PBS缓冲液清洗后,再在115~120℃下蒸汽灭菌25~35min。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤C)中,将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀前,还包括:

将传至第3代的MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ 每孔的密度种植于细胞培养板中;

将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀的时间为1~2min。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤C)中,所述脱细胞处理包括以下步骤:

a) 将经过矿化培养基培养的PEEK微球用PBS缓冲液清洗1~3遍,然后转移到脱细胞液

中,室温下置于转速为60~100rpm的摇床10min;

所述脱细胞液包括 $\text{NH}_4\text{OH}$ 和Triton X-100;所述脱细胞液中, $\text{NH}_4\text{OH}$ 的浓度为20mmol/L, Triton X-100的浓度为0.25wt%;

b) 将步骤a)得到的PEEK微球用PBS缓冲液清洗后,进行冷冻干燥。

9. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤C)中,所述矿化培养基中, $\text{CaCl}_2$ 的浓度为 $4.5 \times 10^{-3} \sim 9 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 的浓度为 $2.1 \times 10^{-3} \sim 4.2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ ,聚天门冬氨酸的浓度为0.05~0.2mg/mL。

10. 权利要求1~9任意一项所述的制备方法制得的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球。

11. 权利要求10所述的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球在规模化细胞培养和制备可注射骨植入材料中的应用。

## 一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球、其制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及聚醚醚酮技术领域,尤其涉及一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球、其制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 在临床细胞治疗和骨组织工程领域中,大规模细胞培养已经成为了研究的核心和热点。近年来,微球由于在细胞治疗和骨组织工程中的广泛应用而备受关注。相较于传统的平面细胞培养体系,微球在维持细胞分化表型、可注射和作为细胞载体修复不规则骨缺损方面有巨大优势。然而,表面光滑微球的相对表面积较小,限制了细胞的黏附,从而降低了其细胞承载能力。多孔微球由于其表面和内部具有互相连通的孔结构和较大的比表面积,更有利于营养物质和氧气的运输,同时能够支持细胞黏附与生长,而这又恰是提高细胞培养密度的关键所在。另外,通过修饰微球表面的化学和物理特性已被证实可以对组织修复过程中的关键步骤产生影响,比如免疫反应,血管化和细胞分化等。因此,可以通过对微球的表面改性处理进一步增强其细胞承载能力。

[0003] 而细胞培养通常需要数目较多的微球,但其重复利用率不高,造成了巨大的资源浪费。因此,非常有必要开发一种可重复利用的细胞培养微球,不仅能够承受高温高压灭菌处理,同时,还能够有足够的强度支撑细胞的生长,并且在3D培养中耐受住剪切力。

[0004] 目前,制备多孔微球的方法主要有溶剂挥发法,乳化聚合法,种子溶胀法,烧结法,合成法,喷雾干燥法,相分离法等。比如:刘凌志等首先将具有功能性的羟基和吡啶基团引入到聚芳醚酮分子结构中制备出一系列含有功能性基团的聚芳醚酮类聚物,再利用胶束成球法制备出以聚芳醚酮为核,另一种聚合物为壳的非共价键相连接的新型胶束,最后利用化学交联的方法制备出聚芳醚酮微球材料。张春峰等以具有刚性结构的超支化聚芳醚酮为出发点,利用溶剂挥发法制备超支化聚芳醚酮微球。

[0005] 但是,现有技术均是从分子设计,引入功能基团等角度出发,来制备具有核壳结构或空心多孔的聚芳醚酮微球。核壳结构微球需进一步去除外侧壳结构,且仅能获得实心微球。空心多孔微球需进一步交联反应,去除另一种聚合物后才能获得空心微球,实验条件较严苛,且空心微球尺寸及形貌可控性较差。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球、其制备方法及应用,本发明制备的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球有利于细胞的黏附、增殖与分化,具有一定的力学强度,从仿生学角度模拟了成骨过程。

[0007] 本发明提供了一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球的制备方法,包括以下步骤:

[0008] A) 在保护气的条件下,将PEEK微球置于处理液中加热搅拌,干燥后,得到表面多孔

化的PEEK微球；

[0009] 所述处理液包括二甲基亚砷和硼氢化钠；

[0010] B) 将所述表面多孔化的PEEK微球进行灭菌,然后浸泡于DMEM培养基中12~24h后,得到浸泡后的PEEK微球；

[0011] C) 将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的多孔PEEK微球在DMEM培养基中混匀,进行培养,22~26h后更换DMEM培养基继续培养,22~26h后将DMEM培养基更换为矿化培养基进行培养,22~26h后换液,之后,每隔46~50h进行一次换液,更换为矿化培养基的第7~9d经脱细胞处理,得到表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球；

[0012] 所述矿化培养基包括DMEM培养基、CaCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和聚天门冬氨酸。

[0013] 优选的,所述PEEK微球按照以下方法制备得到：

[0014] 将聚醚醚酮粉末与浓硫酸混合,得到混合溶液；

[0015] 将所述混合溶液采用气流法制备得到微球体；

[0016] 将所述微球体与水进行水热反应,得到PEEK微球。

[0017] 优选的,步骤A)中,所述保护气为氮气；

[0018] 所述二甲基亚砷和硼氢化钠的用量比为60~80mL:130~150mg；

[0019] 所述处理液按照以下方法进行制备：

[0020] 将二甲基亚砷和硼氢化钠混合后,加热至115~125℃,得到处理液。

[0021] 优选的,步骤A)中,所述加热搅拌的温度为115~125℃,时间为5~7h,加热搅拌的转速为200~400rpm。

[0022] 优选的,步骤A)中,所述加热搅拌后,还包括洗涤；

[0023] 所述洗涤包括：

[0024] 将加热搅拌后的PEEK微球依次浸没于甲醇中15~30min、一次水10~20min、0.4~0.6mol/L的盐酸溶液10~20min、一次水10~20min,体积浓度为95%~100%的乙醇10~20min。

[0025] 优选的,步骤B)中,所述灭菌包括：

[0026] 将所述表面多孔化的PEEK微球采用体积浓度为75%的乙醇灭菌,用PBS缓冲液清洗后,再在115~120℃下蒸汽灭菌25~35min。

[0027] 优选的,步骤C)中,将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的多孔PEEK微球在DMEM培养基中混匀前,还包括：

[0028] 将传至第3代的MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ 每孔的密度种植于细胞培养板中；

[0029] 将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的多孔PEEK微球在DMEM培养基中混匀的时间为1~2min。

[0030] 优选的,步骤C)中,所述脱细胞处理包括以下步骤：

[0031] a) 将经过矿化培养基培养的多孔PEEK微球用PBS缓冲液清洗1~3遍,然后转移到脱细胞液中,室温下置于转速为60~100rpm的摇床10min；

[0032] 所述脱细胞液包括NH<sub>4</sub>OH和Triton X-100;所述脱细胞液中,NH<sub>4</sub>OH的浓度为20mmol/L,Triton X-100的浓度为0.25wt%；

[0033] b) 将步骤a)得到的PEEK微球用PBS缓冲液清洗后,进行冷冻干燥。

[0034] 优选的,步骤C)中,所述矿化培养基中,CaCl<sub>2</sub>的浓度为 $4.5 \times 10^{-3} \sim 9 \times 10^{-3}$ mol/L,

$K_2HPO_4$ 的浓度为 $2.1 \times 10^{-3} \sim 4.2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ ,聚天门冬氨酸的浓度为 $0.05 \sim 0.2 \text{mg/mL}$ 。

[0035] 本发明还提供了一种上文所述的制备方法制得的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球。

[0036] 本发明还提供了一种上文所述的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球在规模化细胞培养和制备可注射骨植入材料中的应用。

[0037] 本发明提供了一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球的制备方法,包括以下步骤:A)在保护气的条件下,将PEEK微球置于处理液中加热搅拌,干燥后,得到表面多孔化的PEEK微球;所述处理液包括二甲基亚砷和硼氢化钠;B)将所述表面多孔化的PEEK微球进行灭菌,然后浸泡于DMEM培养基中12~24h后,得到浸泡后的PEEK多孔微球;C)将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀,进行培养,22~26h后更换DMEM培养基继续培养,22~26h后将DMEM培养基更换为矿化培养基进行培养,22~26h后换液,之后,每隔46~50h进行一次换液,更换为矿化培养基的第7~9d经脱细胞处理,得到表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球;所述矿化培养基包括DMEM培养基、 $CaCl_2$ 、 $K_2HPO_4$ 和聚天门冬氨酸。

[0038] 本发明提供的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球提高了细胞的培养密度与效率,有利于细胞的黏附、增殖与分化,从仿生学角度模拟了成骨过程。另外,采用这种矿化细胞外基质的PEEK多孔微球可用作可注射材料进行微创手术,在修复不规则骨缺损方面具有重要意义。

## 附图说明

[0039] 图1为本发明实施例1制备的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球在 $200\mu\text{m}$ 下的SEM图;

[0040] 图2为本发明实施例1制备的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球在 $10\mu\text{m}$ 下的SEM图;

[0041] 图3为本发明实施例1的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球使用MC3T3-E1细胞系培养7d后钙黄绿素染色后的倒置荧光显微镜图;

[0042] 图4为本发明实施例1的光滑PEEK微球使用MC3T3-E1细胞系培养7d后钙黄绿素染色后的倒置荧光显微镜图;

[0043] 图5为本发明实施例3中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球和光滑PEEK微球对MC3T3-E1细胞增殖的影响效果图;

[0044] 图6为本发明实施例4中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球对产生细胞碱性磷酸酶的影响效果图;

[0045] 图7为本发明实施例4中光滑PEEK微球对产生细胞碱性磷酸酶的影响效果图;

[0046] 图8为本发明实施例5中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球和光滑PEEK微球对细胞碱性磷酸酶活性的影响图;

[0047] 图9为本发明实施例5中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球和光滑PEEK微球对细胞内钙沉积的影响图;

[0048] 图10为本发明实施例6中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球和光滑PEEK微球进行骨修复的效果评估图。

## 具体实施方式

[0049] 下面将结合本发明实施例,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0050] 本发明提供了一种表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球的制备方法,包括以下步骤:

[0051] A) 在保护气的条件下,将PEEK微球置于处理液中加热搅拌,干燥后,得到表面多孔化的PEEK微球;

[0052] 所述处理液包括二甲基亚砷和硼氢化钠;

[0053] B) 将所述表面多孔化的PEEK微球进行灭菌,然后浸泡于DMEM培养基中12~24h后,得到浸泡后的PEEK多孔微球;

[0054] C) 将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀,进行培养,22~26h后更换DMEM培养基继续培养,22~26h后将DMEM培养基更换为矿化培养基进行培养,22~26h后换液,之后,每隔46~50h进行一次换液,更换为矿化培养基的第7~9d经脱细胞处理,得到表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球;

[0055] 所述矿化培养基包括DMEM培养基、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 和聚天门冬氨酸。

[0056] 在本发明的某些实施例中,所述PEEK微球按照以下方法制备得到:

[0057] 将聚醚醚酮粉末与浓硫酸混合,得到混合溶液;

[0058] 将所述混合溶液采用气流法制备得到微球体;

[0059] 将所述微球体与水进行水热反应,得到PEEK微球。

[0060] 本发明通过相分离法制备出外表光滑、内部多孔的PEEK微球。进一步通过步骤A)的羟化处理后使PEEK微球表面产生均一多孔结构,且与内部孔隙相贯通。同时羟化处理改变了PEEK微球表面的化学性质,提高了PEEK的亲水性能。同表面多孔形貌协同,有利于细胞增殖和黏附。

[0061] 在本发明的某些实施例中,浓硫酸的质量浓度为95%~98%。

[0062] 在本发明的某些实施例中,聚醚醚酮粉末与浓硫酸的用量比为1.8g:30mL。

[0063] 在本发明的某些实施例中,聚醚醚酮粉末与浓硫酸混合的温度为26℃,混合的时间为2h。在本发明的某些实施例中,聚醚醚酮粉末与浓硫酸的混合为搅拌混合。本发明对所述搅拌混合的搅拌方法并无特殊的限制,采用本领域技术人员熟知的搅拌方法即可。

[0064] 在本发明的某些实施例中,将聚醚醚酮粉末与浓硫酸混合后,还包括:静置10min。

[0065] 得到混合溶液后,将所述混合溶液采用气流法制备得到微球体。

[0066] 优选的,具体包括以下步骤:

[0067] 将所述混合溶液加入50mL针筒中,针筒配备直径为27G的铁氟龙针头,配制体积浓度为30%的乙醇沉降液1000mL,冰浴,所述铁氟龙针头距离乙醇沉降液的液面高度为14cm,采用气流法制备微球体。所述气流法中采用的气体为氮气,氮气的流速为4.5L/min。

[0068] 在本发明的某些实施例中,将所述微球体与水进行水热反应之前,还包括:

[0069] 将所述微球体用一次水浸泡24h,期间每8h换水一次,然后,用筛网过滤,得到直径为500~600μm的微球体。

- [0070] 在本发明的某些实施例中, 水热反应采用的水为一次水。
- [0071] 在本发明的某些实施例中, 水热反应的温度为170℃, 时间为8h。
- [0072] 在本发明的某些实施例中, 水热反应后, 还包括:
- [0073] 降至室温后真空干燥, 得到PEEK微球。
- [0074] 本发明对所述真空干燥的方法和参数并无特殊的限制, 采用本领域技术人员熟知的真空干燥的方法和参数即可。
- [0075] 本发明中, 所述PEEK微球为光滑PEEK微球。
- [0076] 得到PEEK微球后, 在保护气的条件下, 将PEEK微球置于处理液中加热搅拌, 干燥后, 得到表面多孔化的PEEK微球 (即羟化PEEK微球)。
- [0077] 在本发明的某些实施例中, 所述保护气为氮气。
- [0078] 本发明中, 所述处理液包括二甲基亚砷和硼氢化钠。
- [0079] 在本发明的某些实施例中, 所述二甲基亚砷和硼氢化钠的用量比为60~80mL:130~150mg。在某些实施例中, 所述二甲基亚砷和硼氢化钠的用量比为70mL:140mg。
- [0080] 在本发明的某些实施例中, 所述处理液按照以下方法进行制备:
- [0081] 将二甲基亚砷和硼氢化钠混合后, 加热至115~125℃, 得到处理液。
- [0082] 在本发明的某些实施例中, PEEK微球置于处理液中加热搅拌的温度为115~125℃, 时间为5~7h。在本发明的某些实施例中, PEEK微球置于处理液中加热搅拌的转速为200~400rpm。
- [0083] 在本发明的某些实施例中, 所述加热搅拌后, 还包括洗涤。
- [0084] 在本发明的某些实施例中, 所述洗涤包括:
- [0085] 将加热搅拌后的PEEK微球依次浸没于甲醇中15~30min、一次水10~20min、0.4~0.6mol/L的盐酸溶液10~20min、一次水10~20min, 体积浓度为95%~100%的乙醇10~20min。
- [0086] 所述洗涤可以清除微球上可能残留的硼氢化钠或者二甲基亚砷。
- [0087] 在本发明的某些实施例中, 所述干燥为真空干燥。本发明对所述真空干燥的方法和参数并无特殊的限制, 采用本领域技术人员熟知的真空干燥的方法和参数即可。
- [0088] 得到表面多孔化的PEEK微球后, 将所述表面多孔化的PEEK微球进行灭菌, 然后浸泡于DMEM培养基中12~24h后, 得到浸泡后的PEEK多孔微球。
- [0089] 在本发明的某些实施例中, 所述灭菌包括:
- [0090] 将所述表面多孔化的PEEK微球采用体积浓度为75%的乙醇灭菌, 用PBS缓冲液清洗后, 再在115~120℃下蒸汽灭菌25~35min。
- [0091] 在本发明的某些实施例中, 所述蒸汽灭菌的压强为0.1MPa。
- [0092] 得到浸泡后的PEEK多孔微球后, 将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀, 进行培养, 22~26h后更换DMEM培养基继续培养, 22~26h后将DMEM培养基更换为矿化培养基进行培养, 22~26h后换液, 之后, 每隔46~50h进行一次换液, 更换为矿化培养基的第7~9d经脱细胞处理, 得到表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球。
- [0093] 在本发明的某些实施例中, 将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀前, 还包括:

- [0094] 将传至第3代的MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ 每孔的密度种植于细胞培养板中。
- [0095] 在本发明的某些实施例中,所述细胞培养板为48孔细胞培养板。
- [0096] 在本发明的某些实施例中,将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀的时间为1~2min。
- [0097] 在本发明的某些实施例中,将传至第3代的MC3T3-E1细胞与所述浸泡后的PEEK多孔微球在DMEM培养基中混匀,进行培养的温度为36~37℃。
- [0098] 本发明中,22~26h后更换DMEM培养基继续培养是指:22~26h后采用新的DMEM培养基更换使用后的DMEM培养基继续培养,新的DMEM培养基的组分和含量与进行培养前的DMEM培养基的组分和含量相同。
- [0099] 在本发明的某些实施例中,24h后更换DMEM培养基。在本发明的某些实施例中,继续培养的温度为36~37℃。
- [0100] 采用新的DMEM培养基更换使用后的DMEM培养基后,22~26h后将DMEM培养基更换为矿化培养基进行培养。
- [0101] 在本发明的某些实施例中,24h后将DMEM培养基更换为矿化培养基进行培养。
- [0102] 在本发明的某些实施例中,22~26h后将DMEM培养基更换为矿化培养基进行培养的温度为36~37℃。
- [0103] 本发明中,所述矿化培养基包括 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 和聚天门冬氨酸。
- [0104] 在本发明的某些实施例中,所述矿化培养基中, $\text{CaCl}_2$ 的浓度为 $4.5 \times 10^{-3} \sim 9 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 的浓度为 $2.1 \times 10^{-3} \sim 4.2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ ,聚天门冬氨酸的浓度为0.05~0.2mg/mL。在某些实施例中,所述矿化培养基中, $\text{CaCl}_2$ 的浓度为 $9 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 的浓度为 $4.2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ ,聚天门冬氨酸的浓度为0.2mg/mL。
- [0105] 在本发明的某些实施例中,所述矿化培养基按照以下方法制备得到:
- [0106] 向DMEM培养基中添加 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 和聚天门冬氨酸,得到矿化培养基。
- [0107] 更换为矿化培养基培养22~26h后,换液。
- [0108] 在本发明的某些实施例中,更换为矿化培养基培养24h后,换液。
- [0109] 本发明中,所述换液是指:采用新的矿化培养基替换为使用过的矿化培养基,新的矿化培养基的组分和含量与进行培养前的矿化培养基的组分和含量相同。
- [0110] 所述换液后,每隔46~50h进行一次换液。在本发明的某些实施例中,所述换液后,每隔48h进行一次换液。所述换液同上所述,在此不再赘述。
- [0111] 更换为矿化培养基的第7~9d经脱细胞处理。
- [0112] 在本发明的某些实施例中,所述脱细胞处理包括以下步骤:
- [0113] a) 将经过矿化培养基培养的PEEK多孔微球用PBS缓冲液清洗1~3遍,然后转移到脱细胞液中,室温下置于转速为60~100rpm的摇床10min;
- [0114] 所述脱细胞液包括 $\text{NH}_4\text{OH}$ 和Triton X-100;所述脱细胞液中, $\text{NH}_4\text{OH}$ 的浓度为20mmol/L,Triton X-100的浓度为0.25wt%;
- [0115] b) 将步骤a)得到的PEEK微球用PBS缓冲液清洗后,进行冷冻干燥。
- [0116] 在本发明的某些实施例中,所述脱细胞处理后,还包括干燥。
- [0117] 本发明对所述干燥的方法和参数并无特殊的限制,采用本领域技术人员熟知的干燥的方法和参数即可。

[0118] 本发明对上文采用的原料的来源并无特殊的限制,可以为一般市售。

[0119] 本发明提供的制备方法中无需添加无机组分用于成孔。

[0120] 本发明利用了聚合物引发的液基前体矿化过程进行生物矿化,不仅在胶原表面、同时在内部也能形成矿化。同时,利用配制的矿化细胞培养基,在进行细胞培养的同时即可形成矿化细胞外基质,无需额外进行矿化过程,省时省力。配合反复的脱细胞与再细胞化过程可以使PEEK多孔微载体表面包被的矿化细胞外基质密度更大、分布更均匀,从而增强了微载体的骨诱导性能,有利于细胞的黏附、增殖与分化。同时该微球可耐受高温高压灭菌,可反利用,有利于实现大规模细胞培养。因此,本发明在组织工程规模化细胞培养和可注射骨修复材料中具有重要意义。

[0121] 本发明还提供了一种上文所述的制备方法制得的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球。

[0122] 本发明提供的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球包括:

[0123] 羟化PEEK微球;

[0124] 以及附着在所述羟化PEEK微球上的矿化的细胞外基质。

[0125] 在本发明的实施例中,羟化PEEK微球具有内外连通的微孔结构。所述羟化PEEK微球由上文所述的PEEK微球经过步骤A)的处理后得到。

[0126] 在本发明的实施例中,矿化的细胞外基质附着在所述羟化PEEK微球的外表面和所述羟化PEEK微球的内部孔隙中。在所述羟化PEEK微球的外表面均匀附着有矿化的细胞外基质。

[0127] 在本发明的某些实施例中,所述矿化的细胞外基质呈丝网状。

[0128] 本发明首次制备出表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球,制备方法简单,利用一步反应同时实现了表面化学改性和多孔形貌的形成。微球表面细胞外基质的生成与生物矿化同步进行,并可高温高压灭菌、反复利用。

[0129] 在进行大规模细胞培养时,PEEK微球起到支撑作用,表面的多孔结构有利于细胞的锚定和生长。同时,羟化的PEEK微球表面,提高了PEEK材料的亲水性能,从而有利于细胞黏附与增殖。细胞外基质为自分泌细胞外基质,作为一种细胞自分泌的复杂实体,主要由以胶原为主的结构蛋白、蛋白聚糖和多种黏附蛋白构成。在成骨发育中以胶原为主的细胞外基质为矿化沉积提供了临时的基础,同时也包含了大量的信号分子,调控细胞的增殖、分化以及细胞间的相互作用。因此微球表面包被的细胞外基质可增强其在细胞培养时细胞间的相互作用,促进细胞的增殖与成骨分化。同时从仿生学的角度出发,组织工程材料应该与天然骨生长和发育过程相类似。为此,我们使微球表面细胞外基质的生成与生物矿化同步进行。

[0130] 本发明提供的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球提高了细胞的培养密度与效率,有利于细胞的黏附、增殖与分化,从仿生学角度模拟了成骨过程。另外,采用这种矿化细胞外基质的PEEK多孔微球可用作可注射材料进行微创手术,在修复不规则骨缺损方面具有重要意义。

[0131] 因此,本发明还请求保护上文所述的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球在规模化细胞培养和制备可注射骨植入材料中的应用。

[0132] 为了进一步说明本发明,以下结合实施例对本发明提供的一种表面包被矿化细胞

外基质的PEEK多孔微球及其制备方法进行详细描述,但不能将其理解为对本发明保护范围的限定。

[0133] 以下实施例中所用的原料均为市售。

[0134] 实施例1

[0135] 制备光滑PEEK微球:

[0136] 称取1.8gPEEK粉,加入到30mL浓硫酸(质量浓度为96%)中,置于26℃水浴锅中,机械搅拌两小时,待PEEK粉完全溶解后静置10分钟。将上述混合液体加入50mL针筒中,铁氟龙针头直径27G,配备30%乙醇沉降液1000mL,冰浴,针头距离沉降液液面高度为14cm,采用气流法制得光滑PEEK微球,氮气流速4.5L/min。获得PEEK球后,一次水浸泡24h,每8h换水1次。用筛网过滤后,获得直径500~600 $\mu$ m的PEEK球。将PEEK球转入75mL反应釜中,加入20mL一次水,170℃反应8h;降至室温后真空干燥。

[0137] PEEK微球表面多孔化处理:

[0138] 将70mL新蒸馏的二甲基亚砜(DMSO)和140mg硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ )加入至100mL锥形瓶中,油浴加热至120℃使 $\text{NaBH}_4$ 完全溶解。将0.1g光滑PEEK微球加入锥形瓶中使其完全浸没,在氮气氛围保护下,保持120℃、300rpm磁力搅拌6h。将PEEK微球从DMSO中移出后,使其依次浸没在下列搅拌的溶液中进行洗涤:甲醇20min、一次水15min、0.5mol/L盐酸15min,一次水15min,体积浓度为95%的乙醇15min。将洗涤后的PEEK微球进行真空干燥并在氮气氛围下保存。

[0139] 表面多孔化的PEEK微球用体积浓度为75%的乙醇浸泡灭菌后,用PBS缓冲液充分清洗3遍后,120℃、0.1MPa下进行高温高压蒸汽灭菌30min,随后用常规DMEM培养基浸泡24h,得到浸泡后的PEEK多孔微球。将传至第3代的MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ 每孔的密度种植于48孔细胞培养板中,用常规DMEM将所述细胞与浸泡后的PEEK多孔微球充分混匀,在36~37℃下培养,24h后用新的常规DMEM培养基更换使用过的DMEM培养基(新的DMEM培养基的组分和含量与进行培养前的DMEM培养基的组分和含量相同),继续在36~37℃下培养。再过24h后,更换为矿化培养基(在常规DMEM培养基中添加 $9 \times 10^{-3}$ mol/L  $\text{CaCl}_2$ , $4.2 \times 10^{-3}$ mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 和0.2mg/mL的聚天门冬氨酸)在36~37℃下培养,24h后换液(采用新的矿化培养基替换为使用过的矿化培养基,新的矿化培养基的组分和含量与进行培养前的矿化培养基的组分和含量相同),以后每隔48h进行一次换液。

[0140] 更换为矿化培养基的第8d时进行脱细胞处理:

[0141] a) 将经过矿化培养基培养的PEEK多孔微球用PBS缓冲液清洗2遍,然后转移到脱细胞液中,室温下置于转速为80rpm的摇床10min;

[0142] 所述脱细胞液包括 $\text{NH}_4\text{OH}$ 和Triton X-100;所述脱细胞液中, $\text{NH}_4\text{OH}$ 的浓度为20mmol/L,Triton X-100的浓度为0.25wt%;

[0143] b) 将步骤a)得到的PEEK多孔微球用PBS缓冲液清洗后,进行冷冻干燥,制得表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球。

[0144] 对制备得到的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球进行扫描电镜扫描分析,结果如图1和图2所示。图1为本发明实施例1制备的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球在200 $\mu$ m下的SEM图。从图1可知,多孔PEEK微球表面覆盖有较为致密的矿化细胞细胞基质,且分布较为均匀。图2为本发明实施例1制备的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微

球在10 $\mu$ m下的SEM图。从图2可知,多孔微球表面有较为厚实的矿化细胞外基质,孔隙内也能观察到丝网状的细胞外基质。以上结果表明,在多孔PEEK微球表面成功包被了矿化细胞外基质。基质致密且分布较为均匀,并能深入到孔隙结构当中,进一步丰富了多孔微球的拓扑形貌。

#### [0145] 实施例2

[0146] 将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球种植于48孔细胞培养板中的24孔中,将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的光滑PEEK微球种植于48孔细胞培养板中的另外24孔中,在37 $^{\circ}$ C下进行培养,每2d使用新的DMEM培养基(所述新的DMEM培养基的组分和含量与上文所述的进行培养前的DMEM培养基的组分和含量相同)进行换液,培养7d后,将微球转移至新的48孔细胞培养板中,用PBS轻轻洗1遍,在每孔中加入稀释至2~5 $\mu$ mol/L的钙黄绿素染液500 $\mu$ L,放入37 $^{\circ}$ C烘箱孵育10min,后吸弃染液,加入PBS浸泡5min后吸弃,再在孔内加入500 $\mu$ L PBS,用含490nm激发波长,515nm发射波长的滤光片的荧光显微镜观察细胞并拍摄,结果如图3和4所示。

[0147] 图3为本发明实施例1的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球使用MC3T3-E1细胞系培养7d后钙黄绿素染色后的倒置荧光显微镜图。图4为本发明实施例1的光滑PEEK微球使用MC3T3-E1细胞系培养7d后钙黄绿素染色后的倒置荧光显微镜图。

[0148] 从图3和图4可以看出,与表面光滑PEEK微球相比,表面包被矿化细胞外基质的多孔微球表面有更多的细胞附着,显著促进了细胞的有效黏附。

#### [0149] 实施例3

[0150] 将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球种植于48孔细胞培养板中的24孔中,将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的光滑PEEK微球种植于48孔细胞培养板中的另外24孔中,在37 $^{\circ}$ C下进行培养,每2d使用新的DMEM培养基(所述新的DMEM培养基的组分和含量与上文所述的进行培养前的DMEM培养基的组分和含量相同)进行换液。分别培养1、3、7d后,吸弃孔内原有培养基,然后向每孔内加入30 $\mu$ L CCK-8试剂和500 $\mu$ L DMEM细胞培养基,在37 $^{\circ}$ C恒温箱内孵育2h,然后从每孔内吸出200 $\mu$ L液体转移至新的96孔板中,使用酶标仪在450nm检测吸光度。结果如图所示。图5为本发明实施例3中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球和光滑PEEK微球对MC3T3-E1细胞增殖的影响效果图。

[0151] 从图5可以看出,表面光滑PEEK微球组在1、3、7d时测得的吸光度值分别为 $0.319 \pm 0.016$ , $0.387 \pm 0.075$ , $0.589 \pm 0.041$ 。表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球组在1、3、7d时的吸光度值分别为 $0.369 \pm 0.033$ , $0.460 \pm 0.061$ , $0.994 \pm 0.028$ 。两组数据相比较可知,表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球组在第7天测得的吸光度值显著高于表面光滑PEEK微球组。因此,与表面光滑PEEK微球组相比,表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球组在培养7天时,明显促进了细胞的增殖。

#### [0152] 实施例4

[0153] 将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球种植于48孔细胞培养板中的24孔中,将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的光滑PEEK微球种植于48孔细胞培养板中的另外24孔中,在37 $^{\circ}$ C下培养7d后,用4wt%的多聚甲醛溶液对细胞进行固定,经过磷酸盐缓冲液清洗3次后,细胞与碱性磷酸酶

试剂盒中的BCIP/NBT溶液在室温下孵育24h。孵育到时间后,用磷酸盐缓冲液清洗2次,然后用体视显微镜进行观察并拍摄。结果如图6和图7所示。图6为本发明实施例4中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球对产生细胞碱性磷酸酶的影响效果图。图7为本发明实施例4中光滑PEEK微球对产生细胞碱性磷酸酶的影响效果图。

[0154] 对比图6和图7可知,与光滑PEEK微球相比,表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球明显促进了细胞碱性磷酸酶的产生,即对骨的早期分化有重要影响。

[0155] 实施例5

[0156] 将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球种植于48孔细胞培养板中的24孔中,将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的光滑PEEK微球种植于48孔细胞培养板中的另外24孔中,在37℃下分别培养7d后,用磷酸盐缓冲液对细胞进行清洗,然后用含有1mM/L PMSF的Western及IP细胞裂解液对细胞进行裂解。细胞裂解液反复冻融2次后,于12000g、4℃条件下离心5min去除细胞碎片。离心后,取50μL上清液与50μL pNPP溶液在37℃下避光孵育30min。孵育到时间后加入100μL终止液。并在450nm处进行吸光度值检测。同时,BCA蛋白质试剂盒在562nm处测定吸光度值。最终用二者的比值作为碱性磷酸酶定量分析的结果。结果如图8所示。图8为本发明实施例5中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球和光滑PEEK微球对细胞碱性磷酸酶活性的影响图。从图8中可以看出,光滑PEEK微球组在培养7d后测得的碱性磷酸酶活性为: $0.291 \pm 0.020$ ;表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球组在培养7d后测得的碱性磷酸酶活性为: $0.633 \pm 0.054$ 。二者具有显著性差异,显然,与光滑PEEK微球相比,表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球明显提升了细胞碱性磷酸酶的活性。

[0157] 将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球种植于48孔细胞培养板中的24孔中,将MC3T3-E1细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度和实施例1的光滑PEEK微球种植于48孔细胞培养板中的另外24孔中,在37℃下分别培养14d后,用磷酸盐缓冲液清洗2次,然后用4wt%多聚甲醛溶液对细胞进行固定,然后再用磷酸盐缓冲液进行清洗。然后向每孔中加入500μL的10wt%氯化十六烷基吡啶溶液,在37℃下孵育1h,然后在540nm处测吸光度值,结果如图9所示。图9为本发明实施例5中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球和光滑PEEK微球对细胞内钙沉积的影响图。从图9可以看出,光滑PEEK微球组的吸光度值为 $1.303 \pm 0.355$ ,表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球组的吸光度值为 $2.418 \pm 0.092$ ,后者显著高于前者,表明表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球有利于钙沉积,促进了成骨矿化过程。

[0158] 因此,与光滑PEEK微球相比,表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球明显提升了细胞碱性磷酸酶的活性和细胞内的钙沉积,促进了细胞的成骨分化,对骨的分化与生长有重要影响。

[0159] 实施例6

[0160] 用大鼠颅骨缺损作为模型,对实施例1的光滑PEEK微球和实施例1的表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球进行骨修复效果的评估:

[0161] 动物实验使用的是SD雌性大鼠,体重200~220g,使用磨钻在其颅骨磨出直径5mm的骨缺损作为临界骨缺损。手术前12h对大鼠禁食,手术前2h禁水。麻醉前对大鼠进行称重,使用10%(w/v)水合氯醛作为麻醉剂,每100g体重给予0.3mL麻醉剂。术前使用电动备皮刀

对颅骨区域进行备皮。确切固定四肢和上前牙后,使用强力碘对手术区域进行消毒。用皮刀在颅骨正中处,从眼后到耳前切开约3.5cm的皮肤,用组织剪和血管钳等器械分离皮下组织直至骨膜,并继续用皮刀刮除颅骨表面的骨膜,充分暴露双侧宽大、平整的颅骨区。双手持直径5mm的金刚砂平头高速电动磨钻,控制脚踏进行操作,用无菌生理盐水不断冲洗磨钻头降温,防止灼伤脆弱组织。当完全磨透颅骨的外板与内板时停止操作,用移液枪吸取50 $\mu$ L微球注入骨缺损区域。对侧操作同前所述。最后小心将筋膜等覆于微球表面,尽量防止材料产生位移,小心缝合切口皮肤。肌注抗生素后将大鼠置于保温垫上加速麻醉苏醒。术后连续7d,每只大鼠每天肌注8万IU青霉素钠。分别在4周和8周的时候处死大鼠,用4wt%多聚甲醛溶液进行固定,然后用Micro CT进行扫描,使用机器配套的软件对缺损区域的新生骨比例进行计算与统计,结果如图10所示。图10为本发明实施例6中表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球和光滑PEEK微球进行骨修复的效果评估图。从图10可以看出,光滑PEEK微球在4周和8周时的新生骨组织分数分别为 $(29.514 \pm 1.553) \%$ 和 $(39.02 \pm 2.722) \%$ 。表面包被矿化细胞外基质的PEEK多孔微球在4周和8周时的新生骨组织分数分别为 $(42.186 \pm 2.797) \%$ 和 $(65.190 \pm 1.625) \%$ ,后者均显著高于前者。这表明制备的表面包被矿化细胞外基质的多孔PEEK微球可注射于缺损部位,同时通过加速骨组织再生,提升了对不规则临界骨缺的修复效果。

[0162] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

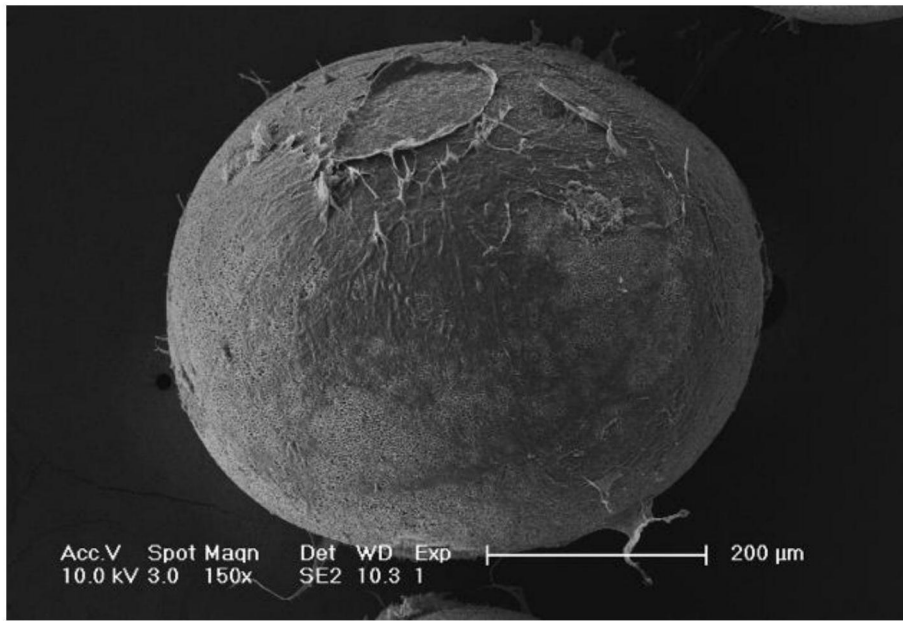


图1

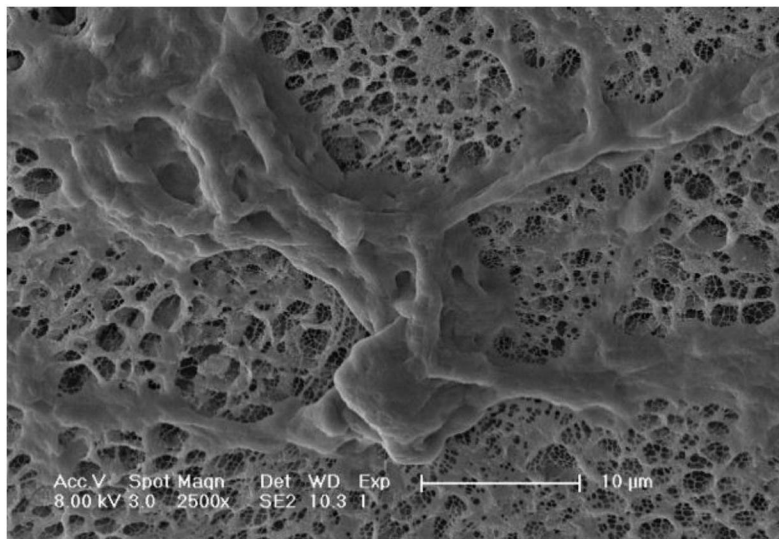


图2

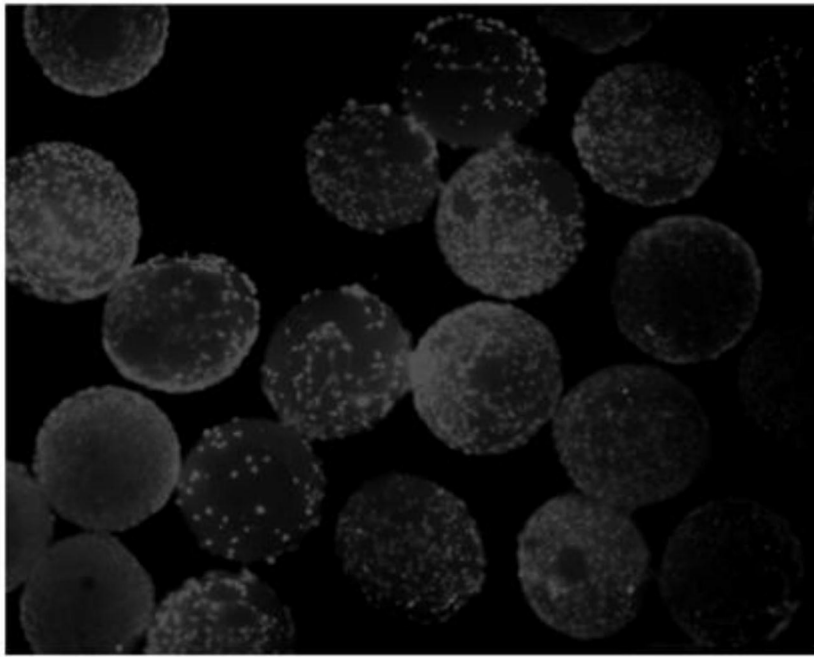


图3

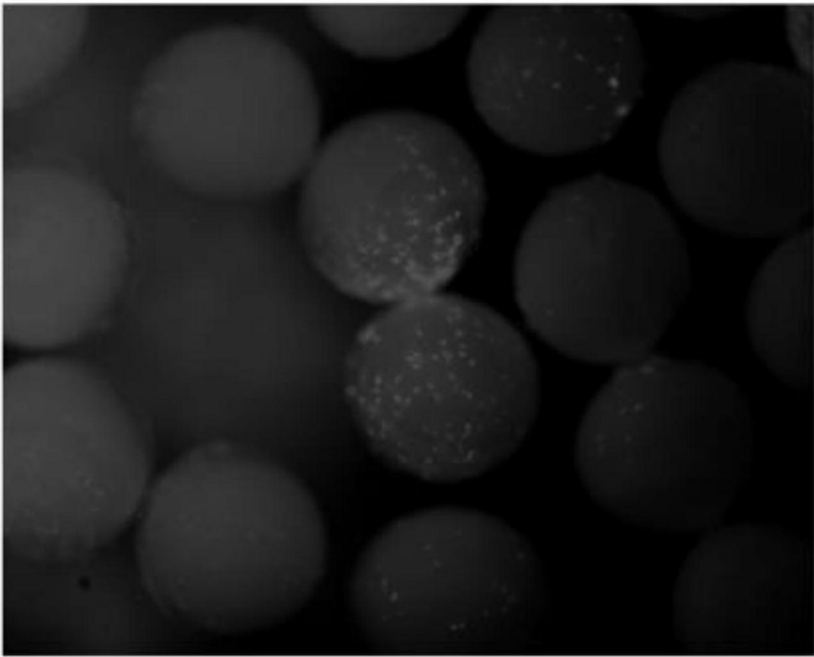


图4

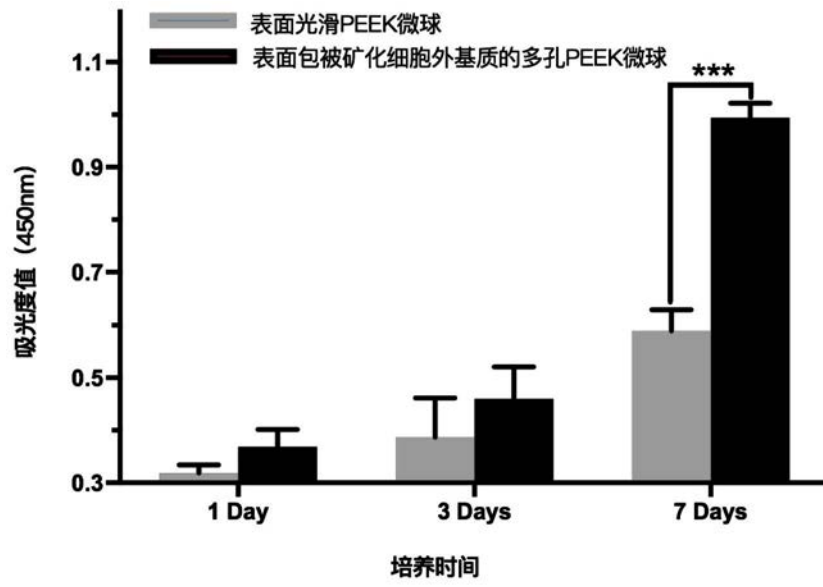


图5

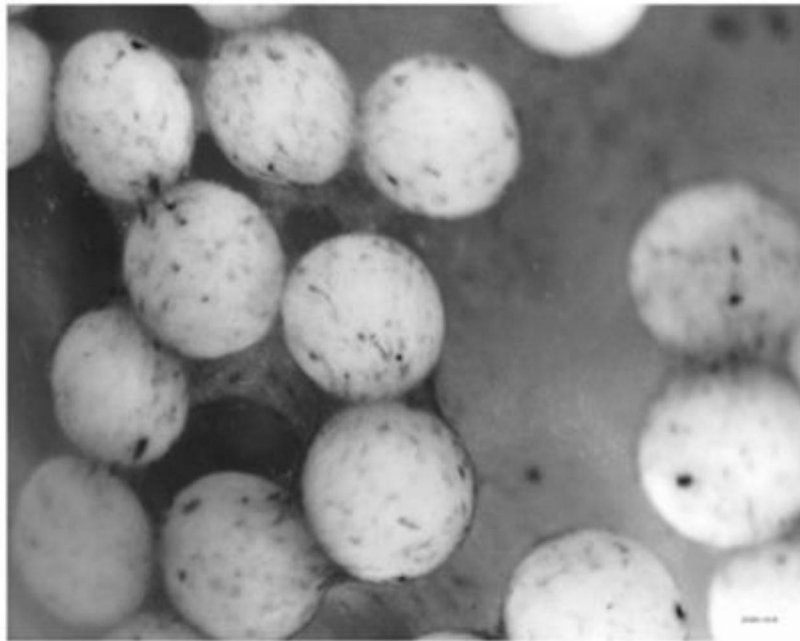


图6



图7

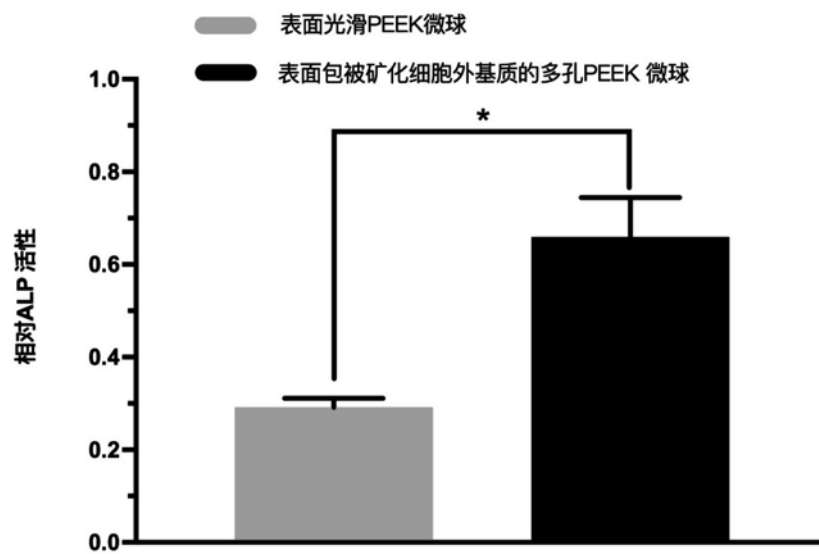


图8

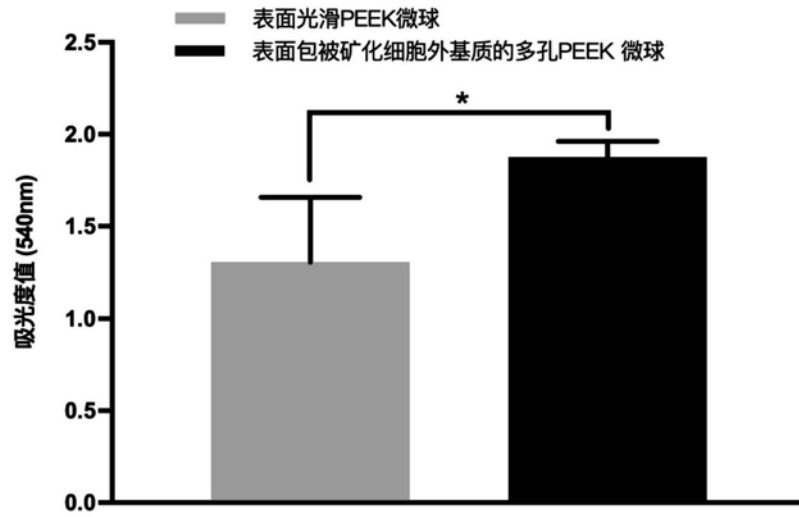


图9

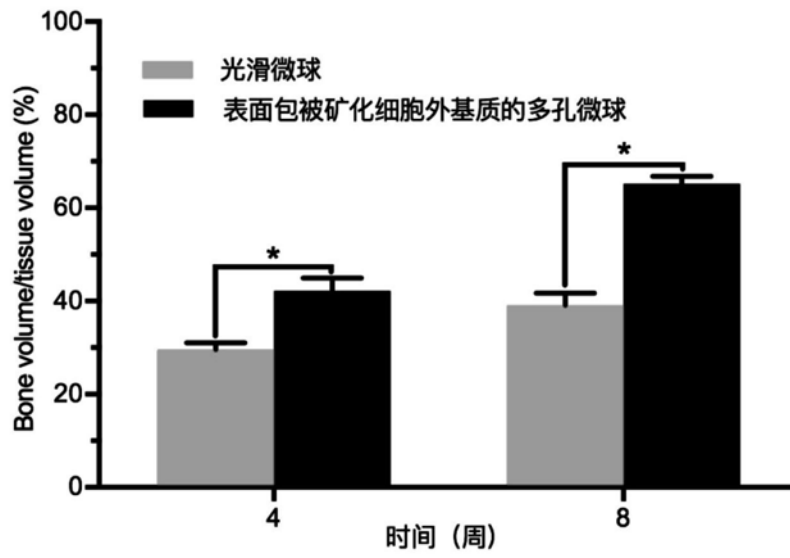


图10