



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110433341 A

(43)申请公布日 2019. 11. 12

(21)申请号 201910804397.2

(22)申请日 2019.08.29

(71)申请人 上海白衣缘生物工程有限公司

地址 201202 上海市浦东新区六陈路1029
号第三幢

(72)发明人 韩韦红 葛翠兰 钱镭 张国强

(51)Int.Cl.

A61L 27/36(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

(54)发明名称

一种组织修复材料及其制备方法

(57)摘要

本发明属于医用修复材料领域,涉及一种用于组织修复的去细胞医用材料及其制备方法。本发明的创新点在于,使用种畜结缔组织或器官,这比来自商品肉畜的材料,具有更强的韧性和更好的稳定性;同时避免了交联的麻烦和化学试剂的残留。另外发明方法中,采用植物源非离子表面活性剂作为去细胞试剂,避免了化学去污剂、蛋白酶制剂等对ECM立体结构的损坏和ECM中有效活性成份的较多流失;不仅能较好维护ECM立体三维结构,并且能让ECM存留较多的有效生物活性成份。采用此方法制得的去细胞材料,不仅具有较好的稳定性和力学性能;而且因有效活性成份含量高,诱导组织再生能力强。

1. 一种医用去细胞生物材料,其特征在于,所述去细胞生物材料,含有种畜的组织、器官或其组合物。

2. 根据权利要求1所述的材料,其特征在于,所述去细胞的去细胞试剂主要由皂素组成。

3. 根据权利要求1所述的材料,其特征在于,所述种畜为,经产的母猪、母牛、母羊、母马、母骆驼、母驴、母骡。

4. 根据权利要求1所述的材料,其特征在于,所述种畜为,健康的淘汰母猪、母牛。

5. 根据权利要求1所述的材料,其特征在于,所述种畜的器官为肝脏、胰腺、心脏、肾脏、肺脏、气管中的一种或多种组合;所述种畜的组织为,小肠粘膜下层、胃粘膜下层、真皮、心包膜、脏器膜、腹膜、膀胱膜的一种或多种组合。

6. 一种医用去细胞生物材料的制备方法,其特征在于,去细胞工艺中去细胞试剂主要由植物源非离子表面活性剂组成。

7. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述去细胞试剂,是植物源五环三萜烯皂素、类固醇皂素之一或其组合物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述去细胞试剂,是Quil-A、茶皂素之一或其组合物。

9. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述去细胞试剂的有效工作浓度重量比为0.05-1%,与补片原料作用时间为每次10-60分钟,作用温度为4-15℃。

10. 根据权利要求7-10所述的任一项方法,其特征在于,所述医用去细胞生物材料的制备方法,原料主要由种畜的组织、器官或其组合物组成。

一种组织修复材料及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及组织修复材料,具体涉及一种去细胞组织修复材料及其制备方法。

背景技术

[0002] 现在临床上用于组织修复的医学生物材料,正从传统的不可吸收材料,向天然、可降解、而且能够主动诱导组织再生的新型生物材料变革;而基于组织工程学原理,以动物组织为原料,去除组织中的细胞,保留较完整的细胞外基质 (Extracellular Matrix,ECM),以此为原料制备的去细胞医用材料,用于组织修复和再生,是今后外科医学的一个主要发展方向。

[0003] 去细胞ECM通常具有立体三维结构,并含有各类大分子物质如胶原蛋白、弹性蛋白、糖胺聚糖(包括透明质酸等)、生长因子等多种成分,能为细胞的生存及生长提供适宜的场所和微环境,并能够参与调节各种细胞的生长、表型表达、形状形成、新陈代谢、迁移、增殖和分化,进而调控组织和器官的功能。去除动物组织中的细胞成分,以及其他免疫原性成份,保留其他ECM中的有效成分,能够开发出较理想的组织修复材料,行业内称作组织源去细胞医用材料;目前已有不少这类去细胞基质材料,在硬膜损伤、腹壁修复、烧伤、盆底修复、肌腱修复、神经修复等领域成功进入临床应用。

[0004] 理想组织修复材料应具备下列条件:①具有安全性,无毒性,无感染性。②组织相容性好,无免疫排斥反应。③致密性好,无渗透性。④具有韧性,易牢固缝合。⑤能促使组织再生,不发生粘连。⑥使用方便,手术简单,易于消毒灭菌。⑦取材广泛,价格低廉。⑧不引起急慢性炎症反应。

[0005] 目前应用较多的组织修复材料,主要是异种去细胞基质,这类医用材料,也称为组织去细胞材料,其初始原料主要来源于猪、牛、羊、马等哺乳动物的小肠粘膜下层、真皮、膀胱粘膜下层、胃粘膜下层、心包膜、脑膜、羊膜、脏器膜、腹膜等组织;通过一系列加工处理,包含重要的工艺步骤如去细胞;有的还采用专门的试剂来进一步去DNA,去 α -Gal抗原等免疫原成分。这种方法获得的去细胞基质支架(或称为补片),一方面能够保留三维立体结构,同时也含有一些重要活性成份。由去细胞基质制备而成的理想生物去细胞材料,应具有良好的生物适应性,可降解性、可吸收性;力学强度适宜性,无毒性,无免疫性;能够为宿主细胞的趋化、附着、增殖、分化提供理想的空间支架和适宜的微(营养)环境,有利于靶组织的结构修复和功能重建。在临床应用中,以猪小肠粘膜下层(SIS)制成的去细胞材料是目前产业界和学术界双公认的较理想的组织修复材料,其次是应用较早也较多的是真皮组织(dermal tissue)源医用材料。

[0006] 对去细胞医学生物材料而言,去细胞工艺是制备优质生物医用材料中的第一大技术难点。其直接关系到去细胞医用材料的质量,即去细胞医用材料的有效性和安全性。如果去细胞不彻底,则会导致去细胞医用材料仍残留有动物源细胞,则导致具有较强的免疫源性,会引起免疫排斥反应和炎症,如补片植入后易发生浆液肿等不良反应,存在一定的安全隐患;另一方面,如果为了充分保证将从组织中的细胞彻底去除干净,往往会使用去细胞作

用方式较猛烈的试剂,或者是长时间地将去细胞液与组织反复作用(如浸泡、振荡、灌注等),这样会导致不同程度地影响ECM天然的三维结构稳定性,破坏ECM中的各类生长因子的功能结构域(如成纤维细胞生长因子、转化生长因子,血管内皮生长因子等),同时还会引起活性成份(如透明质酸HA等)的损耗和流失。

[0007] 良好的去细胞工艺,就是要尽量去除动物源组织中各类细胞,同时又要维护完整的ECM三维多孔结构,以及尽可能保留ECM中能促进组织再生的各类细胞生长因子和有效成份的活性;因此这不仅需要考虑动物源组织本身的内在因素,如组织的厚薄和细胞密度的多少,更重要的是,要事先充分了解各类去细胞试剂与方法的优缺点,在精通熟悉每种去细胞试剂的主要技术参数的基础上,综合比较与平衡,科学合理选择,精心优化去细胞方案。

[0008] 现有技术中的去细胞方法主要有:物理方法、化学方法和消化酶法,实际应用中会将几种方法组合或联合使用:

- 1) 物理法去细胞:包括搅拌震荡、反复冻融、超声波处理、高压或超高压、灌注等;
- 2) 化学法去细胞:需要用到去污剂(也称除垢剂或表面活性剂)、酸性或碱性溶剂;
- 3) 消化酶法去细胞:如使用胰蛋白酶、中性蛋白酶等来进行去细胞处理。

[0009] 在制备去细胞医用材料过程中,最重要的一步就是如何有效去细胞,现有在制备补片中的去细胞方法的专利文献有:

赵子建申请号201811545271.X的专利,名称为一种去细胞血管基质及其制备方法;方法是将血管组织依次通过低渗处理、胰蛋白酶处理、去污剂处理和核酸酶处理,制得血管基质;

赵博申请号为201710126703.2的专利,名称为一种生物组织基质材料、制备方法及其用途,其方法中使用的去细胞液包括胰蛋白酶和PBS溶液,同时去细胞液还包括EDTA、EDTA 2Na或EDTA 4Na;在多频超声环境中用去细胞液处理进行去细胞;

李花琼申请号为201810140944.7的专利,名称为一种骨材料去细胞的方法及制备去细胞骨粉的方法;其方法为经过Tris Hcl溶液孵化、胰蛋白酶溶液作用、含有十二烷基硫酸钠(SDS)的Tris Hcl溶液孵化、含有乙二胺四乙酸及蛋白酶抑制剂的PBS缓冲液清洗、含有十二烷基硫酸钠的Tris Hcl溶液孵化、酶解、PBS缓冲液清洗等步骤;

王文加申请号为201710864637.9的专利,名称为一种真皮深层填充物及其制备方法和应用,其方法包括以下步骤:以分娩后的羊膜为原料,经胰蛋白酶联合Triton X 100去细胞处理后,再在液氮冷冻条件下,用高速研磨仪研磨成颗粒碎片,钴60辐照消毒,得到羊膜颗粒;将脐带间充质干细胞接种于羊膜颗粒上,联合培养8~10h,得到干细胞 羊膜颗粒混合物,再取离体的血液样品,制备富含血小板的血浆,即PRP;临用前,向干细胞 羊膜颗粒混合物中加入PRP,得到PRP 干细胞 羊膜颗粒三者混合物,即真皮深层填充物;

杨帅申请号为201710247775.2的专利,名称为一种医用去细胞真皮基质及其制备方法,制备方法包括将动物皮肤去肉后,依次进行消毒、清洗、高渗盐处理后,放入碱液和过氧化氢的混合溶液中浸泡;然后再浸泡在胰蛋白酶溶液中进行酶消化处理,再使用交联剂进行胶原蛋白的交联处理;

孙新君申请号为200310110871.0的专利,名称为一种异种去细胞骨基质材料及制备方法,其方法将猪的肋骨或四肢骨经过理化处理、并经过优选的几种蛋白水解酶之一联合Triton-X100作用后去去细胞及组织中的异种蛋白。

[0010] 非专利文献有：Xiaofeng Ye等在2016年发表的文章“Impact of decellularization on porcine myocardium as scaffold for tissue engineered heart tissue”；该文献报道中，采用胰蛋白酶试剂来去除组织中的细胞，胰蛋白酶是从牛、羊、猪的胰脏中提取的一种丝氨酸蛋白水解酶，是一种肽链内切酶，能把多肽链中赖氨酸和精氨酸残基中的羧基侧切断，即主要识别精氨酸和赖氨酸相邻的肽链，并针对此位点水解切分成独立的小肽链；胰蛋白酶对蛋白质的消化降解作用，不受蛋白质的品种类型和来源所限，对蛋白质本身不具有针对性和选择性，胰蛋白酶对各类蛋白质上的相应酶切位点具有普适性；因此在使用胰蛋白酶去细胞时，不可避免地会降解破坏组织中的胶原蛋白、弹性蛋白，粘蛋白以及其他蛋白类成份如纤连蛋白和层连蛋白等，正是由于胰蛋白酶对细胞外基质中的结构蛋白和功能蛋白有一定的降解和破坏作用，所以胰蛋白酶在去细胞的过程中，应该慎用、少用或者不用。

[0011] 与去污剂比较而言，胰蛋白酶去除细胞的效果也相对较缓慢，同时对细胞外基质中的胶原蛋白和弹力蛋白有着更大的破坏性，即造成对细胞外基质超微结构的破坏，从而直接导致ECM机械性能的下降。

[0012] 去细胞材料中的有效活性成份含量，因不同去细胞方式（机械法、化学法、酶法）及使用不同的去细胞试剂，在去细胞材料中保留的有效活性成份差异很大；ThomasW.Gilbertetal在杂志《Biomaterials》27 (2006) 第3677中表1对不同去细胞方法和去细胞试剂做了详细比较。去污剂都是化工合成或半合成的，去污力强，去细胞效果好；但是易导致ECM中有效成份如GAGs、HA的流失，以及对ECM天然立体结构的仿真性和完整性都有不同程度地损伤和破坏。组织去细胞所使用的试剂及方法比较如下表1：

试剂/方法		作用方式	对 ECM 的影响
化学方法	酸液	溶解细胞质成分、破碎核酸、使蛋白质变性	可能破坏胶原、GAG 及生长因子
	高低渗	破裂细胞、打断 DNA 与蛋白质之间的相互作用	能够有效地裂解细胞，但是不能够有效的去除细胞残骸
非离子去污剂	TritonX-100	打破 DNA-蛋白质之间的相互作用，破裂脂-脂及脂-蛋白之间的相互作用	效果依据组织不同而不同，对较薄组织去细胞更有效，部分破坏 ECM 超微结构，会去除部分 GAG，比 SDS 效果差。
两性离子去污剂	CHAPS 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐	兼具离子去污剂及非离子去污剂的特性	较好的去除，较薄组织中的细胞，伴随轻微的超微结构的破坏
	SB-10, SB-16		较好的去除，较薄组织中的细胞，伴随轻微的超微结构的破坏
离子去污剂	SDS (十二烷基硫酸钠)	溶解细胞和核膜，使蛋白变性	有效地去除致密组织中的细胞核残留及细胞质蛋白，去除 GAG 和生长因子，破坏胶原
	去氧胆酸盐		根据组织的厚度不同效果不同，对 ECM 超微结构的部分破坏及部分的去除 GAG。
其他溶剂	醇类	通过去水作用使细胞溶解，溶解并去除脂肪	有效去除致密组织中的细胞，灭活热源，使包括胶原在内的蛋白发生交联和沉淀
	丙酮	通过去水作用使细胞溶解，溶解并去除脂肪	有效去除致密组织中的细胞，灭活热源，使包括胶原在内的蛋白发生交联和沉淀
	TBP	与金属形成稳定的复合物，打断蛋白-蛋白之间的相互作用	根据组织不同效果不同，损失致密组织中的胶原，但对机械性能的影响轻微
生物学方法-酶法	核酸酶	催化核糖核苷酸和去氧核糖核苷酸链的水解	难于将其从组织中去除，可能引起免疫反应
	胰酶	将 C 端多肽降解成精氨酸和赖氨酸	过长时间胰酶作用会破坏 ECM 的超微结构，不同程度降解 ECM 中胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、弹力蛋白和 GAGs。
	中性蛋白酶	降解特定的肽，主要是纤维连接蛋白和 ^{IV} 型胶原	长时间作用会破坏 ECM 的超微结构，会降解 ECM 中纤维连接蛋白和 ^{IV} 型胶原
螯合物	EDTA,EGTA	结合金属离子，因此破坏细胞对 ECM 的黏附	一般与酶共用（如胰酶）；也可与其他试剂连用，单独作用效果不明显

通常去细胞程度和活性因子保留程度成负相关，在去细胞的同时，不同程度地伴随着活性因子的丢失；如果使用试剂剂量过小，可使细胞成分残留较多，易引起机体免疫排斥反应，并可能伴有局部组织的粘连或组织包裹钙化等不良反应；若去细胞时，使用大剂量试剂，长时间的处理，的确能将细胞除去干净，但同时又会对超微立体结构本身造成损伤；因

此,如何较彻底清除细胞和DNA成分,同时尽可能降低对超微立体结构、生物活性成份和力学特性等方面的破坏和损伤,这是当前制备去细胞基质的研究重点。

[0013] 为了解决上述问题,急需采用一种无副作用或极低副作用的去细胞方法,以便制备更高效更安全的去细胞医用材料。

[0014] 同时伴随而生的另一个技术难题是:由于为了确保医用材料的高度地安全性,通常各生产企业在实际操作中都要求彻底地去细胞,因此去细胞工艺都很苛刻,甚至有点过度,这会不同程度地导致ECM中有效活性成份的较多流失,以及对ECM三维立体结构的破坏;进而削弱去细胞材料的力学性能。

[0015] 实际应用中,这类去细胞医用材料,在力学性能上常常达不到用于某些特定部位(例如疝、肌腱等)组织修复所需要的力学强度;因此在制备这类去细胞医用材料过程中,目前常采用以下二种方法来增强去细胞医用生物材料的力学性能,以达到韧性好、拉伸强度高的技术要求。

[0016] 一是:化学(生化)方法,在去细胞材料制备过程中,使用环氧化物、戊二醛、京尼平、谷氨酰胺转胺酶(TGase)等各类交联剂,以提高去细胞补片的生物力学特性。例如广东冠昊的生物补片产品,使用的原料是牛心包膜,其用于硬脑膜手术、胸腹手术修补时的组织修复产品,在制备时都采用了交联工艺,以确保产品有一定的力学性能。再比如北京清源伟业的疝补片产品,是原料是真皮,也是采用去细胞工艺制备的;为了确保成品有足够的力学性能,也使用了交联工艺。再比如,申请人是北京桀亚莱福生物技术有限责任公司、发明人是孙继煌的公开号为CN108261565的专利,和发明人是刘博文的公开号为CN105999411的专利,这两篇专利在去(脱)细胞工艺上有所优化,同时为了达到去细胞材料在力学上的要求,都使用了交联剂。其缺点是交联程度很难控制,残留的交联剂有潜在的细胞毒性,且这类交联型去细胞材料通常力学性能好,抵抗力强,不易降解或降解缓慢,降解与组织再生不能同步匹配,易导致纤维化、慢性炎症等不良反应;广东某公司的组织修复材料,采用心包膜或胸膜经环氧交联处理等加工而成,去细胞材料力学强度够,但降解较慢,可导致纤维化、慢性炎症反应、存在与颅骨或脑组织粘连等风险;且因其较硬,无法与脑组织表面完美贴合。

[0017] 二是:物理方法,如将单层片横向或纵向,多层交叉部分重叠放置,如申请人为上海宏创医疗科技有限公司,发明人是周宁辉,公开号为CN106039404A的专利,虽然整体上采用此方法制备成的去细胞材料,其拉伸强度有所提高,但使用去细胞原料较多,一方面是原料被浪费,另一方面是去细胞材料过厚,会使整个去细胞材料完全降解的时间被拖得过长,进而影响靶组织的修复和功能的康复。另外本申请人公开的专利CN109248339A文献,其创新点是将去细胞原料制成细条状后捻成线,再通过编织的方式制成去细胞材料;经过编织而制成的去细胞材料,其拉伸强度得到明显提高,但是此步骤需要先将去细胞原料制成细条,再通过编织方式制备,技术上有点难度,步骤上有点复杂。

发明内容

[0018] 本发明的目的之一,在于解决部分去细胞医用材料,在医学临床上使用时,存在的稳定性差,容易降解,或降解较快,不能有效满足医学临床上实际需要,例如生物补片降解过快,不利于作为可靠稳定的细胞支架来协助损伤部位新生组织结构的生成和功能的康复。

[0019] 本发明的目的之二,在于解决去细胞医用材料,在部位组织损伤修复过程中,存在的力学性能较差、较弱,实际临床使用时易出现破裂、撕裂或其他事故,不能有效满足医学临床实际需要,例如力学性能差的疝补片、肌腱补片、肩袖补片及硬脑膜补片等会出现胀裂,拉裂或裂缝,严重的会出现积液渗漏。

[0020] 本发明的目的之三,在于避免了使用交联剂制备医用材料中,可能残留的交联剂及其可能对宿主细胞的毒性;同时也避免了为增强去细胞医用材料的力学强度而要费心费力地做精细编织再加工。

[0021] 本发明的目的之四,在于提高去细胞医用材料中,有效活性成份(如HA)等促进组织修复成份的含量,以更有利于宿主细胞的趋化、附着、增殖、以及成熟与分化。

[0022] 本发明的目的之五,在于提高去细胞医用材料中,ECM三维立体结构的仿真性和完整性,以利于更早且更好地诱导受损组织结构的修复再生和功能地全面康复。

[0023] 本发明方法的目的,在于避免去细胞过程中,因使用化学性或合成性去污剂或酶制剂等所导致的ECM中有效成份较多流失,以及对ECM三维立体结构较多损伤和破坏,导致产品的稳定性差,力学性能弱,使用后诱导宿主组织再生能力存在不足,同时还包括避免这类去污剂可能的残留及对宿主细胞的潜在伤害。

[0024] 为了有效解决上述所列的技术问题,达到前述发明目的;发明人紧紧地围绕,去细胞医用生物材料的生物力学强度、稳定性、有效活性成份含量以及ECM三维立体结构的完整性等关键技术特征,通过持续不断地海量阅读国内外的专业文献,结合团队自身对学术理论的深入研究和仔细分析,加上团队成员在海外多年丰富的工作经验,将理论与实践密切结合,巧妙又方便地解决了去细胞医用材料稳定性不足、力学性能弱、有效活性成份流失多,存留量少,ECM结构破坏较多的技术难题。

[0025] 为了实现本发明的目的,一方面本发明提供一种医用去细胞生物材料,其特征在于,所述去细胞生物材料,含有种畜的组织、器官或其组合物;

进一步的,所述去细胞的去细胞试剂主要由皂素组成;

进一步的,所述种畜为经产的母猪、母牛、母羊、母马、母骆驼、母驴、母骡;

进一步的,所述种畜为健康的淘汰母猪、母牛;

进一步的,所述种畜的组织为,小肠粘膜下层、膀胱粘膜下层、胃粘膜下层、真皮基质、心包膜、脑膜、羊膜、脏器膜、腹膜、膀胱膜的一种或多种组合;

进一步的,所述种畜的器官为肝脏、胰腺、心脏、肾脏、肺脏、气管中的一种或多种组合;

另一方面本发明提供一种医用去细胞生物材料的制备方法,其特征在于,去细胞工艺中去细胞试剂主要由植物源非离子表面活性剂组成;

进一步的,所述去细胞试剂,是植物源五环三萜烯皂素、类固醇皂素之一或其组合物;

进一步的,所述去细胞试剂,是Quil-A、茶皂素之一或其组合物;

进一步的,所述去细胞试剂的有效工作浓度重量比为0.05-1%,与补片原料作用时间为每次10-60分钟,作用温度为4-15℃;

进一步的,所述医用去细胞生物材料的制备方法,原料主要由种畜的组织、器官或其组合物组成。

[0026] 本发明主要创新点在于,选择种畜的组织或器官作为去细胞的原料,而不是商品肉畜。因为现有动物源去细胞原料,例如小肠、真皮、心包、腹膜、胸膜、肌腱等,所使用的新

鲜屠宰动物组织,都是刚出栏的商品肉猪、肉牛、肉羊;例如规模化屠宰场里待宰的,绝大多数都是刚出栏的商品化肉猪,并以外三元杂交,如杜长大等品种为主,也有一些内三元肉猪品种;出栏肉猪的体重在90—120公斤;饲养日龄为5—6个月,按季节和猪价行情,肉猪出栏体重和天数有所变动。

[0027] 为了实现本发明产品的目的,即解决组织修复材料,稳定性差,力学性能不足的技术问题,发明人采用了与现有技术完全不同的技术思路,既不是停留在加工去细胞材料时物理方法的细微改进,如采用何种方式重叠(纵/横/斜)、重叠比是多少、需要重叠几层、编织时使用的原料线粗细、是平纹织、斜纹织还是拧织等方式、也不是停留在交联剂的品种选择、配比、浓度改进,交联时间长短等技术参数的优化。

[0028] 为了达到发明的目的,发明人采用了新的技术方案,即从制备去细胞生物去细胞材料的第一步即原料的源头抓起,从最初的动物源出发,以此为技术突破点或着力点来进行深入研究,本发明产品的主要创新点,就在于去细胞材料的动物组织原料的选择,不是现在大家使用的商品级肉畜,而是选用种畜,优选经产母畜,最优选的是因繁殖性能有所下降而健康淘汰母猪;发明人在深入养猪第一线,在与大型养猪场负责人充分沟通后,根据其讲述的养殖模式(通常都是自繁自养)和养殖周期(肉猪5—6个月出栏,体重约90—120公斤;而母猪在八到十胎之后,因繁殖性能下降而渐渐淘汰,此时饲养已有36个多月的实际情况,发明人通过分析比较检测源自淘汰母猪SIS和肉猪SIS所制备的两种去细胞材料的力学性能差异,发现用母猪源SIS去细胞材料,其拉伸强度(即韧性)要比商品肉猪源SIS去细胞材料要明显地高许多;同时源自淘汰母猪SIS去细胞材料又要比胎次少的经产母猪SIS去细胞材料的韧性(拉伸强度)要好;综合比较,优选价格低廉的淘汰母猪作为去细胞原料。

[0029] 本发明产品优选组织部位是小肠粘膜下层(SIS),次选才是真皮、膀胱、心包、腹膜、以及其他脏器膜等结缔组织,由这类结缔组织去细胞而制成的去细胞材料,通常都含有类似的天然立体三维结构,但与其他组织部位比较而言,小肠粘膜下层(SIS)的成份构成以I型纤维胶原蛋白为主,同时还含有III、IV、VI型胶原蛋白,特别是其中含有重要的IV型胶原蛋白,对新生血管和基膜的形成具有明显的促进作用。

[0030] 另外依据美国STEPHEN F. BADYLAK博士发表的多篇文章表明SIS去细胞材料的降解产物具有较强的抗菌活性,有类似于防御素(porcine defensin, pBD-1)的功能;以及George S. Hussey 2018年的文章《Extracellular Matrix Bioscaffolds for Building Gastrointestinal Tissue》报道SIS去细胞材料降解产物还具有诱导细胞趋化和有丝分裂的作用。

[0031] 为达到避免去细胞材料ECM中有效成份(如透明质酸HA)较多流失,减少ECM三维立体结构遭受破坏之目的,以及增强去细胞材料的稳定性和力学强度。本发明的制备方法有二个创新点,第一个是:在去细胞这一关键步骤中,使用植物源天然试剂,例如非离子表面活性剂,来替代化学性或半合成的去污剂;也不使用蛋白质酶来达到去细胞目的;第二个是:去细胞的原料,使用的是种畜结缔组织或器官,而不是商品肉畜的组织或器官。

[0032] 针对本发明方法的第一个创新点,详细介绍如下,在制备去细胞材料过程中,使用了一种植物源非酶类去细胞试剂,包括天然的非离子型表面活性剂,例如植物源天然皂素;能有效地去除组织中的细胞;这类表面活性剂,去细胞的方式针对性很强,主要是通过破坏脂质细胞膜和细胞器的膜,去细胞效果不仅彻底,而且作用方式温和,既不对ECM结构有明

显损伤,也不会引起ECM中有效活性成份的明显流失,故而能保留ECM中更多的有效活性成份,包括各类细胞生长因子(如FGF-2,VEGF等)和有效活性成份(如透明质酸HA、肝素等),进而更有利于诱导细胞趋化、生长和组织修复再生;在低温条件下去细胞即破坏细胞,可以大大减少并减缓,因细胞破碎后释放出来的内源酶可能会产生的对ECM所产生的一些降解、破坏作用。

[0033] 本发明中所述皂素又称皂甙或皂角苷;是天然优质的非离子表面活性剂,具双功能基团,分子结构中既包含水溶性基团,又具有脂溶性基团,是天然的清洁剂或表面活性剂。皂素能结合细胞膜上的胆固醇及脂类,从而破坏细胞表面结构;另外皂苷有助溶性,可促进其他成分在水中的溶解。皂素在植物,特别是在中药材中分布非常广泛(如著名的人参,三七等主要活性成份都是皂甙),近些年来,在中药领域,对皂甙的研究不断深入和广泛,例如目前已从人参中分离提纯出十八种人参单体皂甙,如Rb1、Rb2、Rd、Rc、Re、Rg1、Rg2、Rh1,并发现Rg1和Rb1最具药物活性;皂苷化合物,如美国Antigenis公司著名的疫苗佐剂QS-21,单体分子量为1990。目前已确认皂素具有多种多样的药理活性和生物活性,如抗菌、消炎、双向免疫调节,降低血浆胆固醇,降血压等方面的药理作用;同时皂素是一种非常好的天然表面活性剂,能降低液体表面张力,因此有人还将其可以作为发泡剂、乳化剂,增味剂和抗氧化剂使用。

[0034] 皂素根据结合于糖(己糖、戊糖或糖醛酸)上的皂素配基的性质不同,可将它们分为两类:三萜烯皂素(triterpenoidal saponins,C27,三萜通过碳氧键与糖链相连)和类固醇皂素(steroidal saponins,C30,类固醇通过碳氧键与糖链相连)两大类。而国内价廉物美的三萜烯皂素是油茶皂素(TeaSaponin),从山茶油加工副产品茶粕中通过精制提取而成;90%以上茶皂素(HPLC级纯度)容易制备和获得,如金德国的发明专利,申请号为CN201610990197,名称是:一种高纯茶皂素的生产方法;另外还可以选择无患子科植物来源的皂素。另一个优选的皂素是QuillajaSaponariaMolina植物精取物,也称为Quil-A,CAS号8047-15-2,可从多种商业化渠道购得。

[0035] 在本发明中使用的去细胞试剂,皂素,不仅可以选择三萜皂素或类固醇皂素,而且可以选择两类皂素的混合物作为去细胞试剂;做为去细胞试剂时的用量,以纯皂素(saponin)为有效成分来计算,去细胞的工作浓度为0.05%--1%,优选0.25—0.5%。

[0036] 另外由于皂素作用的方式是温和的,可能存在与细胞膜脂质结合的部分可逆性;若后续的冲洗液或浸泡液因皂素含量低或无皂素,则可能会使去细胞及其碎片效果降低;所以去细胞后的下一步洗液或泡液中也需要使用含有皂素的溶液;可选择原浓度的皂素溶液进行是可洗或浸泡,以利更彻底地去除细胞及其细胞碎片。

[0037] 发明原理:

本发明的去细胞医用材料,其去细胞原料来源是种畜的组织或器官,如已产过几胎的母猪,饲养时长通常超过24个月;正常母猪每年产2.2胎左右,母猪妊娠期平均是114天,空怀期为10-15天,母猪哺乳天数为21-28天;淘汰母猪主要是因为繁殖性能下降,如产仔数少,产弱仔多,难配种或者奶水少,断奶窝重轻等因素,通常淘汰母猪,其饲养月龄达到40个月以上;相对于商品肉猪而言,经产母猪各方面的组织和器官发育都很完全,在亚器官水平和结构、介观和微观性能、组织学强度等指标上实现了真正意义上,充分且全面地成熟;进一步从分子水平和分子结构上来讲,可能胶原蛋白羟基化程度高,三螺旋结构稳定性更好,

胶原间天然交联度高,热稳定性较好;在宏观上表现为结缔组织的力学性能较好,制备成的去细胞材料,检测出来的拉伸强度高。

[0038] 而现在去细胞原料的来源都是商品肉畜如肉猪,其通常饲养周期短,只有5-6个月时间,其出栏体重90—120公斤,相对于经产母猪(包括淘汰母猪180—200公斤)的体重和大小而言,商品肉猪的体重是明显偏轻的,其体积是偏小的;而且商品肉猪在屠宰出栏时,其饲养时长只有5—6个月,而经产母猪的饲养时长达至少在12个月以上(按只生了一胎仔窝计算),淘汰母猪则会达到40个月;饲养时长是商品肉猪的2到8倍;同时商品肉猪的各组织器官,相对经产母猪而言,只是表面初具规模,框架结构成形,但实际上其内部结构、微观性能、组织学强度等指标,并没有真正彻底地充分且全面地成熟,进一步从分子水平和分子结构上来讲,可能胶原蛋白羟基化程度低,三螺旋结构稳定性差,胶原间天然交联度低,热稳定性较差;在宏观上表现为结缔组织的力学性能较差,制备成的去细胞材料,检测出来的拉伸强度低。

[0039] 本发明的方法中,去细胞试剂使用植物源非离子型表面活性剂,如植物源皂素,优选三萜烯皂素,如Quil-A、茶皂素,这类试剂去细胞的方式针对性强,主要是通过破坏脂质细胞膜和细胞器膜,作用方式针对性强,对ECM结构无损伤,不会引起ECM中有效成份(如透明质酸)的流失;相比于其他化工类或半合成类去污剂而言,都是去细胞效果彻底,但植物源皂素作用方式独特且温和,使用这类植物源皂素去细胞,能保留更多ECM中有效成份;如采用本发明方法制备的去细胞材料,与化工类去污剂去细胞制备的去细胞材料相比,其去细胞材料中透明质酸(HA)含量要明显高。

[0040] 与现有技术相比,本发明具有以下显著优点和有益效果:

1. 本发明的组织修复材料产品,以种畜组织为原料,而不是源自商品肉畜,有更好的天然交联度,去细胞材料韧性好、拉伸强度高、不易破裂,能防止脑脊液渗漏;

2. 本发明的组织修复材料,以小肠粘膜下层为主要原料,保留了细胞外基质中立体三维结构、各类功能蛋白、生长因子以及透明质酸等成分,具有良好诱导组织再生功能,能加快术后组织的生长和功能的重建;

3. 本发明的产品,没有交联剂和合成类去污剂残留,不会具有潜在细胞毒性,不会导致纤维化、慢性炎症;

4. 本发明的组织修复材料,其ECM三维结构具诱导细胞和血管长入功能,在新组织长入的同时自身会逐渐降解,降解产物多肽成分具有抗菌性能,可降低植入后炎症和感染的发生;

5. 本发明的方法中,使用植物源非离子型表面活性剂作为去细胞试剂,替代化工类去污剂,不会导致ECM中有效成份较多流失,不会对ECM立体结构产生破坏和导致力学性能下降。6. 从经济学上来讲,原料可以是因繁殖性能下降而被淘汰的经产母猪,通常这类原料价格要明显低于商品肉猪;对于今后大批量采购原料来说,使用淘汰母猪作为原料,可以为企业节省大笔的开支,这也是创新点之一。

[0041] 本发明的目的在于,提供一种组织修复材料及其制备方法,为达到实现本发明的目的,一方面本发明提供一种医用去细胞生物材料,其特征在于,所述去细胞生物材料,含有种畜的组织、器官或其组合物;

进一步的,所述去细胞的去细胞试剂主要由皂素组成;

进一步的,所述种畜为经产的母猪、母牛、母羊、母马、母骆驼、母驴、母骡;

进一步的,所述种畜为健康的淘汰母猪、母牛;

进一步的,所述种畜的组织为,小肠粘膜下层、膀胱粘膜下层、胃粘膜下层、真皮基质、心包膜、脑膜、羊膜、脏器膜、腹膜、膀胱膜的一种或多种组合;

进一步的,所述种畜的器官为肝脏、胰腺、心脏、肾脏、肺脏、气管中的一种或多种组合;

另一方面本发明提供一种医用去细胞生物材料的制备方法,其特征在于,去细胞工艺中去细胞试剂主要由植物源非离子表面活性剂组成;

进一步的,所述去细胞试剂,是植物源五环三萜烯皂素、类固醇皂素之一或其组合物;

进一步的,所述去细胞试剂,是Quil-A、茶皂素之一或其组合物;

进一步的,所述去细胞试剂的有效工作浓度重量比为0.05-1%,与补片原料作用时间为每次10-60分钟,作用温度为4-15℃;

进一步的,所述医用去细胞生物材料的制备方法,原料主要由种畜的组织、器官或其组合物组成。

[0042] 本发明还提供了一种组织修复材料的制备方法,包括:

1) 取材和洗净:取种畜的结缔组织,充分洗净;

2) 预处理:机械刮除其中的非结缔组织,并扔弃;将靶组织冲洗干净,置于弱酸溶液中浸泡,得到预处理待用去细胞原料;

3) 预消毒:用含有过氧乙酸和乙醇的混合溶液,在超声及室温条件下,浸泡去细胞原料,进行消毒;再用纯化水超声清洗;

4) 去脂:使用乙醇溶液,在超声、常温条件下浸泡去细胞原料,之后用注射用水超声清洗;

5) 去细胞:用含植物源表面活性剂溶液,在低温和超声下浸泡去细胞原料;接着用新的同浓度植物源表面活性剂溶液对去细胞原料进行浸泡;去细胞原料与溶液的比例为1:10 (W/V);再用PBS-EDTA超声清洗去细胞原料,去细胞原料与溶液的比例为1:10 (W/V);按实际情况可重复去细胞1-3次;

6) 去DNA和去 α -Gal抗原:含DNA酶的溶液浸泡去细胞原料,浸泡温度36℃,浸泡时间为15--40分钟;清洗后再用含 α -半乳糖苷酶溶液,浸泡去细胞原料,时间为15--40分钟;

7) 使用10mMNaOH溶液,常温、超声条件下,浸泡去细胞原料;再用PBS超声清洗至中性;

8) 将半成品去细胞材料制成片状,重叠固定于模具上,冷冻干燥,包装、辐照灭菌可得去细胞材料。

[0043] 进一步具体操作方法是:

1. 取材和洗净:取种畜的小肠,充分洗净;

2. 预处理:机械刮除除去小肠的粘膜层、肌层、浆膜层、淋巴结,分离出粘膜下层;将小肠粘膜下层冲洗干净,置于醋酸溶液中浸泡,浸泡时间30--120分钟,小肠粘膜下层与醋酸溶液的比例为1:5--1:10;得到预处理待用去细胞原料;

3. 预消毒:用含有过氧乙酸和乙醇的混合溶液,在超声及室温条件下,浸泡去细胞原料,进行消毒;过氧乙酸浓度为0.5-1.5%,乙醇浓度为15-25%,去细胞原料与混合水溶液的比例为1:5--1:10,浸泡时间为30--120分钟;再用纯化水超声清洗;

4. 去脂:使用醇溶液,在超声、常温条件下浸泡去细胞原料,乙醇浓度为90-100%,去细

胞原料与乙醇比例为1:5--1:10,常温浸泡时间为0.5--6h;之后使用注射用水超声清洗;

5.去细胞:使用含植物源皂素溶液,在4-15℃和超声下浸泡去细胞原料10--60分钟;去细胞原料与溶液的比例为1:10(W/V);之后用同浓度新鲜皂素溶液对去细胞原料浸泡5--60分钟;接着用PBS-EDTA进行浸泡10--60分钟;重复去细胞1-3次;

6.去DNA和去 α -Gal抗原:含DNA酶的水溶液浸泡去细胞原料,浸泡温度为36℃,浸泡时间为15--40分钟;清洗后再用含 α -半乳糖苷酶溶液,浸泡,浸泡时间为15--40分钟;

7.使用10mMNaOH水溶液,常温超声条件下,浸泡;再用PBS超声清洗直至中性;

8.将半成品去细胞材料制成片状,交叉重叠固定于模具上,冷冻干燥,包装、辐照灭菌可得去细胞材料。

[0044] 进一步的,在上述去细胞工艺(步骤5)中,优选以下技术参数:

皂素溶液中有效皂素含量为0.05--1%(W/W),去细胞原料与植物源皂素溶液的比例为1:5--1:10,在超声条件下,于低温4--10℃条件下浸泡20--45分钟;然后用同浓度新鲜皂素溶液再对去细胞原料浸泡5--30分钟;接着用PBS-EDTA进行浸泡10--30分钟;重复去细胞1次。

[0045] 进一步的,在去细胞工艺(步骤4)中,更优选,以下技术参数:

皂素溶液中有效皂素的含量为0.25--0.5%(W/W),去细胞原料与植物源皂素溶液的比例为1:10,在超声条件下,于低温4℃条件下浸泡20--45分钟;

进一步的,植物源表面活性剂是指植物源类固醇皂素、三萜烯皂素之一或其组合物;

进一步的,植物源三萜烯皂素是Quil-A来源、茶皂素之一或其组合物;

进一步的,皂素的工作浓度为0.25--0.5%(W/W),注意,不是按商品来计算有效工作浓度;

进一步的,皂素溶液去细胞所需要浸泡作用时间为20--30分钟;作用温度都是4℃。

[0046] 中英文术语/名词首选按下列文字说明来理解,另有详细说明了的除非;其他术语按本领域普通技术人员水平来理解其含义。

[0047] 中英文术语名词解释:

1)种畜:是针对商品肉畜而言的;饲养的主要目的是用来繁育幼畜的,而不是作为商品肉畜短期饲养(如肉猪饲养时间为5-6个月左右);饲养商品肉畜主要目的是用于长肉,以供;种畜包括猪、牛、羊、马、驴、驼、犬;在本专利中所指的种畜都是成年的,能繁能育的,通常饲养时间至少一年以上;例如种猪包括母猪和公猪,这里的母猪就是指能繁殖的成年母猪,不包括年轻的后备小母猪;

2)经产母畜:属于种畜的一部分,是至少生过一胎的母畜;是相对于后备母畜而言的,后备母畜主要是指因为年龄或月龄还没有到,还没有怀过孕的的年轻母畜;

3)淘汰母畜:本属于种畜的一部分;在养殖场里,管理者考虑到,当母畜繁殖性能下降到一定程度,如产仔数少,泌乳量低,断奶窝重轻,以及综合考虑母畜栏的利用率、淘汰母猪的价格等多种因素;从经济学角度来判断分析,认为继续饲养该母畜所获得的价值已显著降低,淘汰这类母畜会更加划算;每个养殖场对淘汰母畜的评判标准存在一定的差异;例如通常母猪在分娩8胎之后会渐渐地被淘汰;不同品种的猪之间略有差异;

4)组织修复材料、组织再生材料、生物补片,去细胞医用材料、生物修补片、生物支架、可降解补片、可吸收补片、可吸收体内植入物以及Bio-Mesh、Bio-Patch、Patch、

Bioscaffold,这些中英文名词或术语,表面上虽有不同,但其目的和用途基本是一样的;除非有特殊具体说明,否则上述名词或术语内涵,在实质上是完全相同或等同,只是因每人表达习惯有差异;

5) 小肠粘膜下层SIS(Small Intestinal Submucosa):小肠组织包括空肠和回肠部分,在除去小肠粘膜层、肌层、浆膜层后所剩余的部分,以胶原蛋白为主要成份,约占80%以上;

6) 真皮(Dermis):属于皮肤的一部分,介于在表皮和皮下层之间;由中胚层分化而来,分乳头层和网状层两层,两者之间无明显界限。真皮一般厚1~2mm;主要由成纤维细胞及其产生的胶原纤维、基质构成,并有血管、淋巴管、神经附着。基质由透明质酸、硫酸软骨素等黏多糖和蛋白质组成的复合物构成,充填于胶原纤维及纤维束间隙和细胞间,具有亲水性;

7) 去细胞生物材料:由动物组织或器官,经过理化等方式去除细胞,使成无细胞的状态,没有免疫排斥反应;可用于医学上的组织或器官的修复再生;也可以与干细胞一起用于直接或间接的治疗某些疾病;物理状态可以是固体的单层或多层片状、粉状、也可以是凝胶状或液体;

8) 细胞外基质ECM(Extracellular Matrix):是存在于所有组织和器官中的非细胞成分,其不仅对细胞组织提供必需的物理支撑,为各种细胞的正常生理活动,提供适宜的场所及微环境;而且对组织的形态发生、细胞的趋化和分化,以及重要的生理生化和生物力学等方面,起到重要的杠杆调节作用,从而影响或调控组织和器官的功能。细胞50%的功能是由细胞外基质所营造的外部微环境所决定的。

[0048] 除非上下文有清楚的说明,本说明书和所附权利要求中用到的单数形式“一个和“该”包括复数含义。因此,例如,“该方法”包括一或多种方法,和/或步骤,它们属于本文所述类型和/或是本领域技术人员阅读了本文后很明显能认识到的。术语“约”或“接近”是指统计学意义上的范围值,范围可以是在一个数量级之内,通常在指定数值或范围的50%以内,进一步指在20%以内,还更通常在10%以内,甚至更通常在5%以内。术语“约”或“接近”所涵盖的能允许的变化取决于研究的具体体系,是本领域技术人员可以很容易地认识到的。

[0049] 下面结合具体实施例,以进一步描述本发明的原理和方案;应当理解,这些实施例只是为了举例说明和方便理解本发明的思想,但不能局限于此;实施例并非以任何方式来限制本发明范围,以下实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中使用的公知常识的方法;也可能包括省略了在医学生物材料领域使用的惯用手法和方法;例如将本发明的构思和原理,以及相应的技术方案,运用到其他哺乳动物,如母羊,母牛等中大型养殖动物,也包括各类种公畜在内,显而易见地,都应纳入本发明的保护范围之内。

具体实施方式

[0050] 实施例1(淘汰母猪SIS+0.25%Saponin)

猪小肠粘膜下层组织修复材料的制备,具体步骤如下:

1) 取材:在屠宰场选取淘汰母猪的新鲜小肠作为去细胞原料;经深入了解,淘汰的二元杂母猪通常的胎龄在8胎以上,体重180公斤左右,都是空怀的;饲养已有40多个月;

2) 预处理:使用物理刮除法,除去猪小肠的粘膜层、肌层、浆膜层、淋巴结,分离出粘膜下层,置于0.5%醋酸溶液浸泡30分钟,猪小肠与醋酸溶液的比例为1:5,再使用纯化水浸泡3

遍,得到生物去细胞原料,即小肠粘膜下层,下述简称为SIS材料;

3) 消毒:使用含有1.0%过氧乙酸和15%乙醇的混合溶液,SIS材料与混合水溶液的比例为1:10,超声条件下,室温浸泡100分钟,进行消毒。之后使用纯化水超声清洗3遍;

4) 脱脂:使用浓度为90%的乙醇,SIS原料与乙醇的比例为1:10,超声条件下,常温浸泡2h;之后使用注射用水超声清洗3遍;

5) 去细胞:使用含0.25%皂素的溶液(源自Quil-A,以纯皂素含量来计算工作浓度),在4℃和超声条件下浸泡去细胞原料30分钟;之后用同样浓度0.5%皂素溶液对去细胞原料进行冲洗10分钟;接着再用PBS-EDTA溶液对去细胞材料浸泡20分钟;重复前述去细胞步骤一次,总共计时120分钟左右;

6) 去DNA和去 α -Gal抗原:使用含5U/ml DNA酶的水溶液,SIS材料与DNA酶溶液的比例为1:5,超声条件下,于37℃条件下浸泡20分钟;之后使用PBS冲洗3遍;使用含5U/ml α -半乳糖苷酶的水溶液,SIS材料与 α -半乳糖苷酶溶液的比例为1:5,超声条件下,于30℃条件下浸泡20分钟;之后使用PBS溶液冲洗;

7) 使用浓度为10mM的NaOH水溶液,SIS材料与NaOH溶液的比例为1:20,超声条件下,常温浸泡50分钟;之后使用PBS超声清洗直至中性;

8) 定型、冻干、灭菌:将去细胞后的片状原料,四片间纵横交叉,重叠固定于模具上,冷冻干燥后,包装,最后进行灭菌。

[0051] 实施例2 (出栏商品肉猪SIS+0.25% Saponin)

本实施例中去细胞原料是商品肉猪的小肠组织,制备方法中猪小肠组织的预处理,消毒、脱脂、去细胞、去DNA和去 α -Gal抗原、冻干、灭菌等步骤,完全同实施例一;区别只是在动物月龄上,本实施例,选择源自屠宰场商品肉猪的新鲜小肠,作为去细胞原料;经了解,这些商品肉猪多为外三元品种,如杜长大等,体重90—110公斤不等;饲养日龄约为150—180天左右。

[0052] 实施例3 (出栏商品肉猪SIS+0.25% SDS)

本实施例中去细胞原料是商品肉猪的小肠组织,制备方法中猪小肠组织的预处理,消毒、脱脂、去DNA和去 α -Gal抗原、冻干、灭菌等步骤,完全同实施例二;区别只是在第四步去细胞试剂的选择上,本实施例中选用0.25%SDS替代实施例一中的0.25%皂素溶液。

[0053] 实施例4 (淘汰母猪真皮+0.5%茶皂素)

去细胞的原料预处理、消毒、脱脂、去细胞、去DNA和去 α -Gal抗原、冻干、灭菌等步骤基本同实施例一;但是在第一步、第五步和第八步有区别。

[0054] 第一步的区别点是原料类型不同,本实施例选用健康淘汰母猪的皮肤作为原料,取材部位是肉猪背部中间部区域;使用电动取皮机进行处理,除去角质层和表皮层,并采用机械法将真皮层的厚度制成0.5mm,以利于后续的各项处理。

[0055] 第二个区别点是在第五步,即去细胞试剂选用0.5%茶皂素,皂素来源并不是Quil-A。

[0056] 第三个区别点是在第八步,取去细胞后的片状原料二片,而不是像SIS一样用四层,重叠固定于模具上,冷冻干燥后,包装,最后进行灭菌。

[0057] 实施例5 (商品肉猪真皮+0.5%茶皂素)

本实施例中的去细胞原料预处理、消毒、脱脂、去细胞、去DNA和去 α -Gal抗原、冻干、灭

菌等步骤基本同实施例四。区别点仅仅是在第一步,即原料类型不同,本实施例选用来自屠宰场健康商品肉猪的真皮,而不是来自淘汰母猪的真皮作为最初的原料。

[0058] 实施例6:组织修复材料光学观察及有效成份检测。

[0059] 光学显微镜观察。

[0060] 方法:用福尔马林固定,石蜡包埋,将实施例中的去细胞材料切成薄片,经二甲苯脱蜡、酒精脱水,苏木精—伊红染色,显微镜下观察细胞残留情况和基质纤维结构。

[0061] 结果:六个实施例中所有的去细胞去细胞材料,都没有观察到细胞及其碎片残留;能看到胶原纤维连续,粗细不一,但均无明显地断裂。

[0062] 对1-5个实施例制备得到的去细胞材料样品,采用商业化ELISA法试剂盒对重要活性成份透明质酸(HA)的含量进行检测;产品的预处理方式是采用低温研磨法对各类去细胞材料进行处理,检测结果如下表2:

组别	去细胞材料来源及处理方式	透明质酸 HA (ug/mg)
实施例 1	淘汰母猪 SIS + 0.25% 皂素 (源自 Qui1-A)	2.37
实施例 2	商品肉猪 SIS + 0.25% 皂素 (源自 Qui1-A)	2.85
实施例 3	商品肉猪 SIS + 0.25% SDS	0.92
实施例 4	淘汰母猪真皮 + 0.5% 茶皂素	1.87
实施例 5	商品肉猪真皮 + 0.5% 茶皂素	2.62

实施例7:组织修复材料的力学性能检测。

[0063] 对实施例1---5制备得到的组织修复材料样品进行拉伸强度的检测。

[0064] 方法:将样品沿两个方向分别裁剪为宽度为10mm形状;裁剪后在相对湿度40%-60%、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 环境内放置2小时后进行试验。夹具间距为25mm,将试样两端固定在拉伸试验机的夹头上,以100mm/分钟的速度拉伸,记录断裂时的最大力值。

[0065] 结果见下表3:

组别	去细胞材料来源及处理方式	韧性（拉伸强度） 单位：N
实施例 1	淘汰母猪 SIS + 0.25% 皂素（源自 Quil-A）	47.8
实施例 2	商品肉猪 SIS + 0.25% 皂素（源自 Quil-A）	34.1
实施例 3	商品肉猪 SIS + 0.25% SDS	29.7
实施例 4	淘汰母猪真皮 + 0.5% 茶皂素	41.5
实施例 5	商品肉猪真皮 + 0.5% 茶皂素	32.6

本领域中普通技术人员可根据上述说明，对本发明做出多种简单的变化或调整或组合；因而，在不违反本发明的权利要求宗旨的前提下，实施例中的某些细节，不应构成对本发明的限定，本发明将以所附权利要求书界定的范围作为保护范围。