(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104587525 A
(43)申请公布日 2015.05.06

(21)申请号 201410805755.9

(22)申请日 2014.12.19

(71)申请人 深圳中元生物科技有限公司
地址 518000 广东省深圳市南山区科技园中区科苑路15号科兴科学园A栋1单元701单元

(72)发明人 沈政 郭小勇 张文 陈倩文

(74)专利代理机构 深圳中一专利商标事务所 44237
代理人 寇闯

(51)Int.Cl.
A61L 27/20(2006.01)
A61L 27/56(2006.01)
A61L 27/36(2006.01)
A61L 27/52(2006.01)

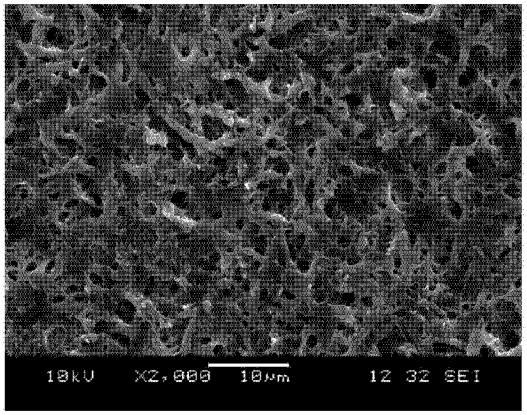
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

包含血小板及透明质酸的支架及其制备方法

(57)摘要

本发明适用于生物医学材料技术领域，提供了一种生物支架，包含均匀混合的血小板及透明质酸，其中血小板在与透明质酸混合之前经钙离子激活。还提供了生物支架的制备方法，包括：获得富血小板血浆PRP；向PRP中加入钙离子；将所得PRP与透明质酸溶液均匀混合。本发明的生物支架具有良好的生物相容性，具有更多的孔隙结构，能使得血小板缓慢释放生长因子。



CN 104587525 A

1. 一种生物支架，包含混合的血小板及透明质酸，所述血小板在与透明质酸混合之前经钙离子激活。

2. 如权利要求 1 所述的生物支架，其特征在于，所述血小板来自于富血小板血浆。

3. 如权利要求 1 所述的生物支架，其特征在于，所述钙离子来自于氯化钙或葡萄糖酸钙。

4. 如权利要求 1 所述的生物支架，其特征在于，所述激活过程中钙离子的终浓度为 0.1％～ 0.5％。

5. 一种生物支架的制备方法，包括以下步骤：

(1) 获得富含血小板的血浆；

(2) 向所述富含血小板的血浆中加入钙离子，以激活血小板；

(3) 将步骤 (2) 获得的血小板被激活的富含血小板的血浆与透明质酸溶液混合均匀。

6. 如权利要求 5 所述的生物支架的制备方法，其特征在于，所述步骤 (2) 中加入的钙离子的终浓度为 0.1％～ 0.5％。

7. 如权利要求 5 所述的生物支架的制备方法，其特征在于，所述步骤 (2) 还包括在加入钙离子后使所得混合物于 30℃ -37℃放置 5-20min 的操作。

8. 如权利要求 5 所述的生物支架的制备方法，其特征在于，所述步骤 (3) 中透明质酸溶液中透明质酸的浓度为 0.5-2％。

9. 如权利要求 5 所述的生物支架的制备方法，其特征在于，所述步骤 (3) 中富含血小板的血浆与透明质酸溶液以 1：1-1：4 的体积比混合。

10. 如权利要求 1-4 中任一项所述的生物支架的保存方法，包括以下步骤：将所述生物支架置于液氮中放置 1.5-2.5 小时，然后置于冷冻干燥机中冻干 40-50 小时。

包含血小板及透明质酸的支架及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学材料技术领域，具体涉及一种包含血小板及透明质酸的生物支架及其制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 医用生物材料在组织的损伤修复及整形外科中具有广泛的应用价值。其应用的理论基础是在体外模拟体内生理环境，使体外培养扩增的正常组织细胞黏附在生物相容性良好且可降解吸收的生物支架材料上，并向细胞提供营养使其扩增，当细胞与生物支架形成复合物时，可将该复合物植入机体组织或器官的病损部位。随着支架材料在体内逐步降解，细胞不断增殖并分泌细胞外基质，由此获得新生组织并且该组织在形态、功能方面与相应的组织、器官一致，从而达到修复创伤和组织重塑的目的。

[0003] 目前常用的生物医用材料主要分为天然可降解的生物材料、人工合成的可降解生物材料。然而，目前应用的大部分生物支架材料存在着各种缺陷，比如免疫原性高，生物相容性差，机械强度低等。因此，开发新型的生物活性支架材料，对促进组织工程学的发展具有重要的意义。

[0004] 透明质酸(Haluronic acid,HA)是一种酸性黏多糖，广泛存在于动物和人体内，在人的皮肤、关节滑膜液、脐带及眼玻璃体中均有分布。透明质酸在医药领域已得到广泛应用，其可用于眼科人工晶体植入手术中的黏弹剂、骨性关节炎和风湿性关节炎等关节手术的填充剂。透明质酸还具有促使药物缓释及预防手术后粘连的作用。另外由于HA具有良好的吸水性和保湿型，被广泛应用于化妆品和整形填充领域。因此，透明质酸具有良好的组织相容性。

[0005] 富血小板血浆(Platelet-rich plasma,PRP)是从全血中提取的含高浓度血小板的血浆。当PRP与氯化钙及牛凝血酶混合后，其中的血小板可被激活形成凝胶，并且血小板释放多种生长因子，包括转化生长因子-β(TGF-β)、胰岛素样生长因子(IGF)、表皮生长因子(EGF)等。然而对于单纯由PRP制成的凝胶，其中血小板易收缩，生长因子大量流失，该凝胶只能在较短时间内发挥作用；另外局限于血小板的存活时间，PRP凝胶只能现做现用，不利于PRP的大规模应用。因此亟需提供一种载体支架，该载体支架既可以保持PRP内部的多孔隙结构，又能维持其中的生长因子缓慢释放，同时还能在冻干的情况下保持血小板的活性。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种生物支架，该生物支架具有多孔隙结构，能维持生长因子缓慢释放，同时经长时间低温保存能保持血小板活性，旨在解决现有技术中生物支架材料效果不理想的问题。

[0007] 为解决以上问题，本发明提供一种生物支架，包含混合的血小板及透明质酸，该血小板在与透明质酸混合之前经钙离子激活。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种生物支架的制备方法，包括以下步骤：

[0009] (1) 获得富含血小板的血浆 PRP；

[0010] (2) 向富含血小板的血浆 PRP 中加入钙离子，以激活血小板；

[0011] (3) 将步骤 (2) 获得的血小板被激活的富含血小板的血浆与透明质酸溶液混合均匀。

[0012] 本发明还提供生物支架的保存方法，包括：将生物支架置于液氮中放置 1.5-2.5 小时，然后置于冷冻干燥机中冻干 40-50 小时。

[0013] 本发明提供的生物支架含有血小板及透明质酸，此种生物材料在现有技术中未被提及。本发明利用富含血小板的血浆和透明质酸制备生物支架，该生物支架具有良好的生物相容性，可以在体内充分降解。经过电镜扫描验证，本发明的生物支架相对于单纯由血小板制成的支架以及透明质酸制成的支架具有更多的孔隙结构，同时该支架还能使得血小板能缓慢释放生长因子。同时本发明的生物支架保存方法中，经过冷冻及冻干处理，该生物支架中的血小板能保持充分的活性，因此该保存方法延长了保存期限。本发明的用于生物支架的制备方法，操作简便，生产效率高，成本低廉，具有良好的工业应用前景。

附图说明

[0014] 图 1 为显示 PRP 支架结构的扫描电镜图片；

[0015] 图 2 为显示 HA 支架结构的扫描电镜图片；

[0016] 图 3 为显示本发明实施例提供的 PRP/HA 混合生物支架结构的扫描电镜图片；

[0017] 图 4 显示了 HeLa 细胞在不同支架材料上的粘附情况比较；

[0018] 图 5 显示了 HeLa 细胞在不同支架材料上的增殖情况比较。

具体实施方式

[0019] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0020] 本发明实施例提供一种生物支架，包含混合的血小板及透明质酸，其中血小板在与透明质酸混合之前经钙离子激活。

[0021] 在本发明实施例中，用于与透明质酸混合的血小板来自于富血小板血浆 (Platelet-rich plasma, PRP)，富血小板血浆的含义为本领域已知的，其中富血小板血浆是全血经离心后得到的血小板浓缩物，其中包含有全血中 70％以上的血小板。

[0022] 富血小板血浆为新鲜血液经低速离心制备而成。通常的制备方法为：将采集的全血在室温下以 27.5 ～ 37.5 转 /min 低速离心 15 ～ 20min（或 1220 转 /min 离心 5min），使红细胞、白细胞基本下沉，取上层血浆，由于血小板比重轻，大部分保留在上层血浆中，由此获得富血小板血浆。

[0023] 本发明实施例中，采用二次离心法制备富血小板血浆，即，进行两次离心，第二次离心后用上层血清对富集有血小板的沉淀部分进行重悬。

[0024] 本发明实施例用于激活血小板的钙离子可以来自于氯化钙或葡萄糖酸钙。在激活血小板过程中，通过向富血小板血浆中加入氯化钙或葡萄糖酸钙溶液使得最终混合溶液中

钙离子终浓度为0.1%～0.5%。

[0025] 优选地，在向PRP中加入氯化钙或葡萄糖酸钙之后将该混合溶液于30℃-37℃放置5-20min以使其充分反应，由此获得最佳激活效果。

[0026] 被激活的血小板可保持良好的活性，在后续的体内应用过程中可持续释放生长因子，有利于发挥最好的治疗效果。

[0027] 本申请中，如没有明确指出，则所指的溶液为水溶液，例如氯化钙溶液是指氯化钙的水溶液。对于用百分数表示的浓度应理解为质量百分比浓度。

[0028] 本发明实施例中，与血小板被激活的PRP混合的透明质酸为0.5-2%的透明质酸溶液。优选地，用于制备本发明的生物支架的PRP与透明质酸溶液的体积比为1:1-1:4。

[0029] 本发明实施例还提供一种生物支架的制备方法，该方法包括以下步骤：

[0030] S01制备PRP：获取静脉血，通过二次离心法制备富血小板血浆PRP，其中二次离心法如上所述；

[0031] S02血小板激活：往步骤S01获得的PRP中加入氯化钙溶液或葡萄糖酸钙溶液，使得所得混合物中钙离子的终浓度为0.1%～0.5%，然后于30℃-37℃放置5-20min；

[0032] S03将上述血小板被激活的PRP与0.5-2%的透明质酸溶液以1：1-1：4的体积比混合均匀。

[0033] 通过本发明实施例制备的生物支架可以保持血小板的活性，使其能缓慢释放生长因子，同时发挥透明质酸的生物相容性、促使药物缓释及预防手术后粘连的功效。

[0034] 具体地，在上述步骤S03中，将所得的PRP/透明质酸混合液混合均匀优选通过摇床进行。具体地，将该混合液放置于30-37℃摇床，以150-200rpm/min转速，振荡20-40min。

[0035] 在具体实施例中，可以将上述混合液直接应用于医疗领域，例如将上述混合液作为填充物之间注射至皮下，也可以进行进一步处理，以获得更广泛的应用。具体地，可将上述混合均匀的混合液于室温下静置2-3小时，以得到PRP/透明质酸混合凝胶。

[0036] 进一步地，可将上述获得的凝胶置于液氮中放置1.5-2.5小时，然后置于冷冻干燥机中冻干40-50小时，即得到PRP/透明质酸支架。此种冻干处理可提高本发明的生物支架的保存期限，并且与冻干前的凝胶相比没有降低生物支架的活性。

[0037] 具体地，冻干后的生物支架应于-20℃或更低的温度保存，以获得最佳的保存期限。

[0038] 本发明实施例制备的凝胶，可以根据需要预先确定凝胶的形状，例如将PRP/透明质酸混合液倒入具有预定形状的容器中；可选地，也可以将冻干后的支架切割成预定的形状，以应用于不同的领域。

[0039] 在经冻干处理后的本发明的生物支架，在使用之前应利用生理盐水还原以激活血小板使其发挥最大生物活性。

[0040] 本发明的制备方法操作简便，成本低，制备的生物支架同时保持了两种主要成分的活性及功能，且经过冻干处理，大大延长了保存期限同时没有降低活性。

[0041] 以下通过具体实施例说明本发明的生物支架的制备方法及经检测所得该生物支架的性能参数。

[0042] 实施例一 PRP/HA复合生物支架制备方法

[0043] S01获取静脉血，通过二次离心法制备富血小板血浆PRP，其中二次离心法具体操

作步骤可参见：金哲等，《二次离心法制备富血小板血浆离心条件的比较》，中国医科大学学报，第 41 卷，第 3 期，2012 年 3 月。

[0044] S02 向步骤 S01 获得的富血小板血浆中加入氯化钙溶液，使得氯化钙在所得血浆混合物中的终浓度为 0.5%，混匀，然后于 37℃放置 5min，使激活反应充分进行。

[0045] S03 将步骤 S02 获得的含有被氯化钙激活的血小板的 PRP 与浓度为 0.5%的透明质酸溶液以 1:4 的比例混合。

[0046] S04 将步骤 S03 获得的混合物于室温下静置 3 小时，使得混合物中透明质酸充分交联成型，得到 PRP/ 透明质酸混合凝胶。

[0047] S05 将步骤 S04 得到的凝胶置于液氮中放置 1.5 小时后取出，放入冷冻干燥机中冻干 40 小时，即得到本发明的 PRP/ 透明质酸支架。

[0048] 实施例二 PRP/HA 复合生物支架制备方法

[0049] S01 获取静脉血，通过二次离心法制备富血小板血浆 PRP，其中二次离心法具体操作步骤同实施例一。

[0050] S02 向步骤 S01 获得的富血小板血浆中加入葡萄糖酸钙溶液，使得葡萄糖酸钙在所得血浆混合物中的终浓度为 0.1%，混匀，然后于 30℃放置 20min，使得钙离子对于血小板进行充分激活。

[0051] S03 将步骤 S02 获得的含有被激活的血小板的 PRP 与浓度为 2%的透明质酸溶液以 1:1 的比例混合。

[0052] S04 将步骤 S03 获得的混合物于室温下静置 2 小时，使得混合物中透明质酸充分交联成型，得到含血小板的 PRP/ 透明质酸混合凝胶。

[0053] S05 将步骤 S04 得到的凝胶置于液氮中冷冻 2.5 小时后取出，放入冷冻干燥机中冻干 50 小时，即得到本发明的 PRP/ 透明质酸支架，该支架于 -20℃保存。

[0054] 实施例三 PRP/HA 复合生物支架电镜检测

[0055] 将 PRP 生物支架、HA 生物支架（制备方法略）及上述实施例一制得的 PRP/HA 生物支架分别固定于铝桩上，通过喷射装置对三种不同生物支架溅射镀金，均采用 15mA 电流镀金 90sec，然后置于扫描电子显微镜（也称为扫描电镜，SEM）下进行检测。

[0056] 图 1 显示了由 PRP 制成的生物支架的扫描结果，图 2 显示了由 HA 制成的生物支架的扫描结果，图 3 显示了本发明实施例提供的 PRP/HA 生物支架的扫描结果。经比较可看出，PRP 支架的表面形态（图 1）呈现块或颗粒状，孔径大而不规则，HA 支架的表面形态（图 2）结构致密，孔隙率低，而实施例二制备的 PRP/HA 支架的表面形态（图 3）具有大小不一的孔洞，交错纵横排列并具有从纳米尺度到微米的尺度范围。扫描电镜的结果表明，PRP/HA 混合生物支架相比于 PRP 支架和 HA 支架具有更高的孔隙率。

[0057] 有研究表明微米尺度的生物支架将更利于细胞的增殖及对外的物质交流，因此实施例一制备的生物支架更有利于发挥血小板的功效并进行体内组织的修复。

[0058] 实施例四 PRP/HA 复合生物支架生物相容性检测

[0059] 为了对 PRP/HA 支架的生物相容性进行评价，将 HeLa 细胞置于上述实施例一制备的生物支架上进行培养，检测细胞在该支架上的黏附及增殖情况，同时以 PRP 支架和 HA 支架作为对照，采取同样的 HeLa 细胞培养方法。具体操作步骤如下：

[0060] 1. 将 HeLa 细胞以 $2\times10^4/cm^2$的密度接种于 48 孔板中，每个孔中事先放置有 PRP

支架、HA 支架或实施例一制备的支架材料，其中每个样品设 3 个平行样，以相对应的材料基质类型没有接种细胞的空白孔为阴性对照。

[0061] 2. 于细胞培养 3h 后，吸去培养液，用 PBS 漂洗一次。

[0062] 3. 每孔中加入 300μl 的细胞培养基和 CCK-8 的混合液（体积比 9:1），在细胞培养箱中孵育 2h。

[0063] 4. 每孔取 200μl 细胞培养液到 96 孔培养板中进行检测，移液过程中尽量避免气泡产生。

[0064] 5. 用酶标仪测细胞的吸光值 (OD)，于 A450nm 波长下进行。

[0065] 图 4 显示了 HeLa 细胞在三种支架材料上的黏附情况，如图所示，培养后的 HeLa 细胞在实施例一制备的 PRP/HA 支架上的黏附程度与在 PRP 支架上相近，但高于 HA 支架。图 5 显示了 HeLa 细胞在在三种支架材料上的增殖情况，如图所示，HeLa 细胞在实施例一制备的 PRP/HA 支架上的增殖程度略高于在 PRP 支架上的增殖程度，并且显著高于 HA 支架。HeLa 细胞在三种支架材料上的黏附和增殖实验的结果表明，PRP 与 HA 的混合能够明显促进细胞的黏附和增殖，也即提高了本发明的支架材料的生物相容性。

[0066] 实施例五 PRP/HA 复合生物支架血小板活性检测

[0067] 研究显示，当血小板被激活剂（例如凝血酶）活化后，存在于细胞质内 α 颗粒膜上的 P- 选择因子会表达于血小板细胞膜表面，其中 P- 选择因子是一种糖蛋白，因此测量血小板被凝血酶活化前及活化后 P- 选择因子的表达量的变化，即可测出血小板被活化的程度。

[0068] 血小板活性检测步骤如下：

[0069] 1. 取分别于 -20℃低温保存三个月的 PRP 支架和实施例一制备的 PRP/HA 支架 0.5g，加入 200μl 生理盐水还原；

[0070] 2. 加入凝血酶，其中凝血酶与生理盐水的比例为 1:1(v/v)；

[0071] 3. 利用 ELISA 试剂盒检测 P- 选择因子的表达量值，检测结果如下表 1 所示。

[0072] 表 1 P- 选择因子表达量检测结果

[0073]

	复水后的 PRP 支架	复水后的 PRP/HA 支架
体积	1ml	1ml
P-选择因子	0.128±0.01ng/ml	0.35±0.017ng/ml

[0074] 表 1 的检测结果表明，复水还原活性后的 PRP/HA 支架中的血小板比 PRP 支架中的血小板更具有生物活性。由此可见，通过加入 HA 可提高 PRP 中的血小板的活性。同时可以看出，经冷冻三个月后本发明实施例制备的 PRP/HA 支架中血小板活性依然很高。

[0075] 实施例六 PRP/HA 生物支架 PDGF（血小板衍生因子）及 EGF 释放检测

[0076] 生长因子的缓慢释放在组织工程应用中具有重要的作用，如果生长因子释放太快，它们可能被从移植部位迅速清除，因此它们对组织损伤修复的作用就会大大减小。理想的负载有生长因子的生物支架一般需要在数天或数周时间内，生长因子得以缓慢地释放。

[0077] 对于 PRP/HA 生物支架中 PDGF 及 EGF 释放的检测步骤如下：

[0078] 为了检测复水还原的PRP/HA生物支架中血小板的生物活性，将制备好的置于低温（-20℃）保存的PRP支架和PRP/HA支架分别与生理盐水混合，之后加入凝血酶，其中生理盐水和凝血酶的比例为1:1(v/v)。在浸泡后的第1,3,5,7天分别取适当量的浸泡支架的生理盐水溶液，通过ELISA分析法检测生长因子PDGF以及EGF的释放情况。

[0079] 复水后PRP支架中血小板释放的生长因子检测结果如下表2所示，而本发明的PRP/HA支架的检测结果如表3所示。

[0080] 表2 复水后PRP支架释放的生长因子检测结果

[0081]

	复水后的PRP支架			
检测天数	1天	3天	5天	7天
PDGF（pg/ml）	12486.3±156	607±25.8	52.9±15.6	未检测到
EGF（pg/ml）	801±12.2	64.7±8.9	未检测到	未检测到

[0082] 表3 复水后PRP/HA支架释放的生长因子检测结果

[0083]

	复水后的PRP/HA支架			
检测天数	1天	3天	5天	7天
PDGF（pg/ml）	11347.2±148	965±42.1	607±26.3	235±16.7
EGF（pg/ml）	624±11.7	439.5±22.4	213.1±11.8	84.5±8.5

[0084] 由上述表2和表3的结果可以看出，复水后PRP/HA支架释放生长因子的持续时间要明显长于PRP支架，因此该结果表明PRP/HA支架具有优异的生长因子缓释效果。

[0085] 上述实施例二制备的PRP/HA生物支架也进行了如实施例三至六所述的测试，结果同样表明本发明的PRP/HA生物支架相对于PRP支架及HA支架具有更好的性能。

[0086] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

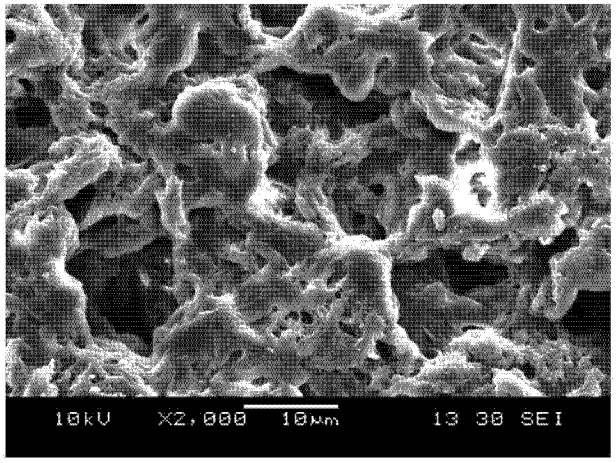

10kV X2,000 10μm 13 30 SEI

图 1

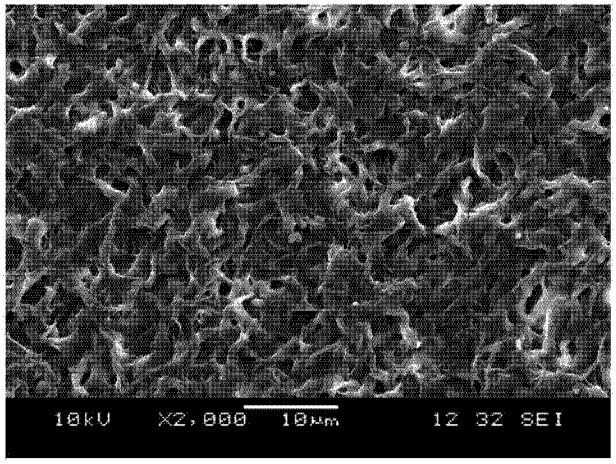

10kV X2,000 10μm 12 32 SEI

图 2

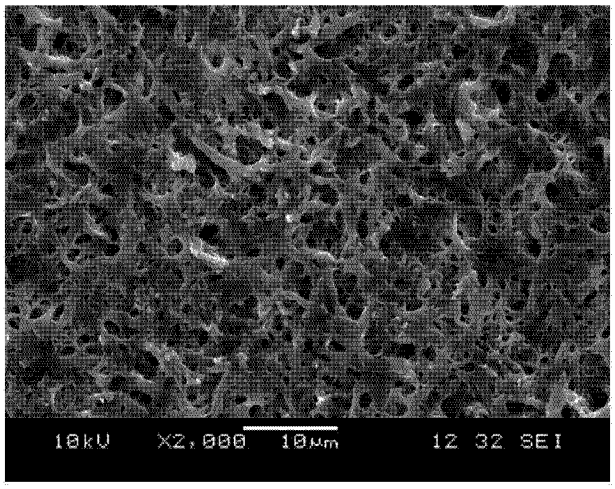

10kV X2,000 10μm 12 32 SEI

图 3

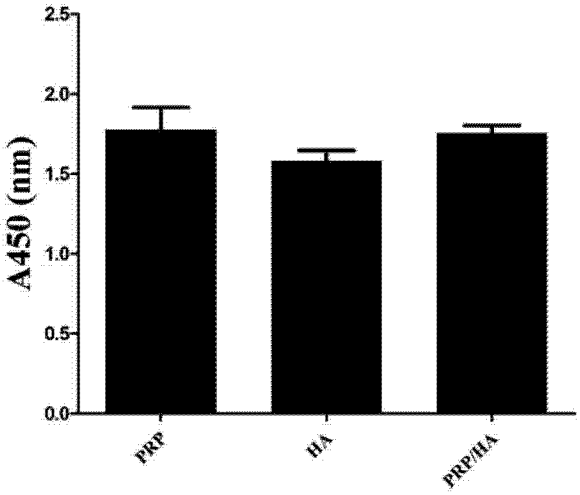

A450 (nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PRP
HA
PRP/HA

图 4

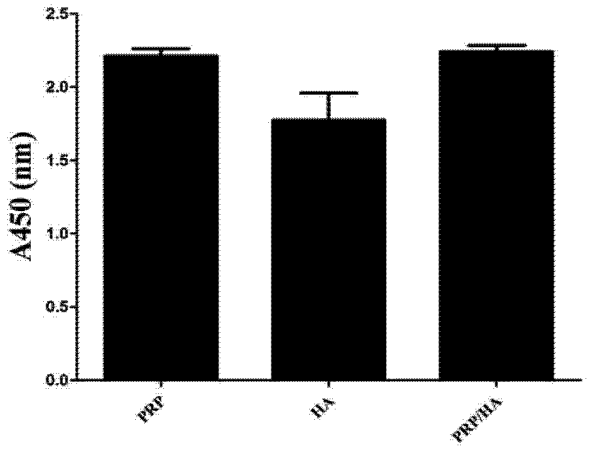


图 5