

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 3 月 4 日 (04.03.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/035679 A1

(51) 国际专利分类号:
A61L 27/38 (2006.01) *A61L 27/22* (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
A61L 27/20 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/103649

(22) 国际申请日: 2019 年 8 月 30 日 (30.08.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。

(72) 发明人: 陆乃彦(LU, Naiyan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 张轩(ZHANG, Xuan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 翁雨燕(WENG, Yuyan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 余雪健(YU, Xuejian); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 杨国锋(YANG, Guofeng); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。

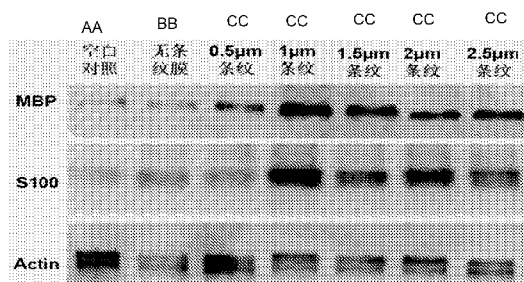
(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E 区 501 张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) Title: TISSUE ENGINEERED NERVE GRAFT AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种组织工程化神经移植体及其制备方法



AA Blank control
BB Stria-free film
CC Stria

图 3

(57) Abstract: The present application belongs to the technical fields of biological materials and tissue engineering, and discloses a tissue engineered nerve graft and a preparation method therefor. The present application optimizes the specification of a stria such that the stria can maximally and independently induce differentiation of EMSCs into myelin-forming cells (Schwann cells), thus obtaining an EMSCs/bio-material scaffold complex. The EMSCs/biomaterial scaffold complex can be used as a three-dimensional cell culture model for in vitro study of the molecular mechanisms underlying neural stem cell differentiation, nerve fiber growth and myelination, and can also be used as a tissue engineered graft for in vivo grafting to repair nervous system damage. According to the present application, an EMSCs/micro-patterned biomaterial film is rolled into a cylindrical multi-channel nerve regeneration conduit for grafting to repair sciatic nerve damage. Results have indicated that the present application can promote nerve regeneration and rehabilitation of lower limb motor function by means of grafting at the site of damage. The present application has promising clinical application prospects and good research and development value.

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要：本发明公开了一种组织工程化神经移植物及其制备方法，属于生物材料和组织工程技术领域。本发明通过优化条纹的规格，使条纹能够最大化地独立诱导EMSCs分化为髓鞘形成细胞（雪旺细胞），得到EMSCs/生物材料支架复合物。这种EMSCs/生物材料支架复合物既可作为体外研究神经干细胞分化、神经纤维生长和髓鞘形成分子机制的三维细胞培养模型又可作为组织工程移植物用于体内移植修复神经系统损伤。本发明将EMSCs/微图案化生物材料膜卷成圆筒状多隧道式的神经再生导管用于移植修复坐骨神经损伤，结果表明本发明能通过损伤部位移植，促进神经再生和下肢运动功能恢复，具有良好的临床应用前景和研究开发价值。

说明书

发明名称：一种组织工程化神经移植物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种组织工程化神经移植物及其制备方法，属于生物材料和组织工程技术领域。

背景技术

[0002] 干细胞/组织工程支架移植是修复神经组织损伤的主要策略。在中枢神经系统，大脑的神经细胞通过突起的相互连接形成网络结构。脑组织损伤后，干细胞/支架移植的主要目的是促进新的神经网络形成以恢复其信息整合和传导功能，因此对植入的干细胞/支架的要求是可促进神经网络的形成；与脑组织的信息整合功能相比，脊髓的主要功能是通过下行传导束，如皮质脊髓束将大脑的信息传导到脊髓的运动神经元，并通过上行感觉传导束，如薄束和楔束将脊髓接受的感觉信息上传到大脑。因此，脊髓损伤后，干细胞/组织工程支架移植主要是促进神经传导束的再生和神经纤维的平行性生长并顺向通过损伤部位定向延伸至损伤远端（运动神经）或近端（感觉神经）的脊髓组织，再生的神经纤维沿着原有的通道生长最终与其靶细胞重新建立突触连接。与此同时，所移植的干细胞/组织工程支架还应具有促进新生神经纤维形成髓鞘的作用。周围神经损伤的修复机制与脊髓损伤的修复机制相类似，干细胞/组织工程支架（导管）移植修复外周神经，如坐骨神经损伤，亦促进神经纤维平行性有效再生和髓鞘形成。因此，如何对支架进行物理和化学修饰并选择合适的种子细胞（可分化为髓鞘形成细胞）种植于支架，以诱导神经纤维的平行性生长和髓鞘形成，是提高干细胞/组织工程支架移植修复脊髓或外周神经损伤治疗效果的关键因素。

[0003] 目前干细胞/支架移植修复脊髓和周围神经（如坐骨神经）损伤主要是将干细胞/生物材料制作成水凝胶或神经导管移植到损伤缺损部位。尤其是当创伤造成外周神经较长缺损时，神经导管移植将是修复神经缺损的最为有效的治疗方法。目前应用的大多数神经导管虽然可促进神经再生，但由于缺少引导神经纤维平行有序生长的条纹，导致神经纤维延伸的方向性迷失，使得纤维前行速度缓

慢，同时由于缺少髓鞘形成细胞，使得再生神经纤维的髓鞘化不全（仅仅依靠神经断端残留的内源性雪旺细胞增殖后形成髓鞘）。因此，亟需发明研制一种既能够明显促进再生神经纤维平行性定向生长又能提供髓鞘形成种子细胞，促进体内损伤神经再生和髓鞘形成的神经导管，以供移植，更有效地修复神经损伤。

发明概述

问题的解决方案

技术解决方案

- [0004] 本发明的目的是提供一种组织工程化神经移植物，以表面引入条纹状微图案的生物材料作为支架，以外胚间充质干细胞EMSCs作为种子细胞，将种子细胞接种到支架上得到组织工程化神经移植物。
- [0005] 在本发明的一种实施方式中，所述生物材料表面利用微图案技术印刻条纹状微图案；所述微图案技术包括但不限于光刻、电子束曝光或纳米压印
- [0006] 在本发明的一种实施方式中，所述条纹状微图案的宽度为1-2 μm ，间距为1-2 μm ，条纹高度为1-2 μm 。
- [0007] 在本发明的一种实施方式中，以聚二甲基硅氧烷（PDMS）、聚己内酯（PCL）、壳聚糖、纤维蛋白原中的一种或多种作为生物材料。
- [0008] 在本发明的一种实施方式中，所述生物材料包括壳聚糖-纤维蛋白。
- [0009] 在本发明的一种实施方式中，所述壳聚糖-纤维蛋白是将壳聚糖和纤维蛋白原通过生物交联剂交联细胞生长因子获得的，所述细胞生长因子为EGF、FGF、NGF、SHH中的一种或多种。
- [0010] 在本发明的一种实施方式中，生物交联剂包括京尼平或/和谷氨酰氨转氨酶（TG）。
- [0011] 在本发明的一种实施方式中，所述EMSCs的初始细胞密度为 10^4 - 10^5 个/ cm^2 。
- [0012] 在本发明的一种实施方式中，所述组织工程化神经移植物的形状包括膜状。
- [0013] 在本发明的一种实施方式中，所述组织工程化神经移植物卷曲形成单层或多层多隧道神经导管。
- [0014] 在本发明的一种实施方式中，所述组织工程化神经移植物填充有促进神经生长

的药物或生长因子缓释材料。

[0015] 在本发明的一种实施方式中，促进神经生长的药物或生长因子缓释材料包括微球、纳米颗粒或水凝胶为载体的药物缓释系统。

[0016] 在本发明的一种实施方式中，所述组织工程化神经移植物用于修复神经损伤。

[0017] 本发明还提供了制备上述组织工程化神经移植物的方法，所述方法包括以下步骤：

[0018] (1) 制备表面微图案化的生物材料支架；EMSCs的取材培养和扩增：

[0019] (2) 将步骤(1)得到的EMSCs种植于微图案化的生物材料支架。

[0020] 本发明还提供了一种神经导管，以表面引入条纹状微图案的生物材料作为支架，以外胚间充质干细胞EMSCs作为种子细胞，将种子细胞接种到支架上得到组织工程化神经移植物，所述组织工程化神经移植物卷曲形成单层或多层多隧道神经导管。

[0021] 在本发明的一种实施方式中，所述条纹状微图案的宽度为1-2 μm ，间距为1-2 μm ，条纹高度为1-2 μm 。

[0022] 在本发明的一种实施方式中，以聚二甲基硅氧烷、聚己内酯、壳聚糖、纤维蛋白原中的一种或多种作为生物材料。

[0023] 本发明还提供了上述组织工程化神经移植物或上述神经导管在制备医疗器械中的应用。

发明的有益效果

有益效果

[0024] 本发明将EMSCs/微图案化生物材料膜卷成圆筒状多隧道式的神经再生导管用于移植修复坐骨神经损伤，结果表明，无神经导管处理的小鼠坐骨神经损伤侧坐骨神经功能指数达 -91 ± 25 ，而使用本申请的神经导管处理后小鼠坐骨神经损伤侧坐骨神经功能指数达 -37 ± 17 。本发明提供的组织工程化神经移植物能通过损伤部位移植，促进神经再生和下肢运动功能恢复，具有良好的临床应用前景和研究开发价值。

对附图的简要说明

附图说明

- [0025] 图1: 表面条纹化微图案PDMS膜, 条纹规格为 $0.5\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}$ (A), $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ (B), $1.5\ \mu\text{m}\times 1.5\ \mu\text{m}\times 1.5\ \mu\text{m}$ (C), $2.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}$ (D)。
- [0026] 图2: 种植于微图案化的PDMS膜表面的EMSCs向雪旺细胞分化后的荧光染色 (S100) 图 (荧光显微镜拍摄)。条纹规格为 $0.5\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}$ (A), $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ (B), $1.5\ \mu\text{m}\times 1.5\ \mu\text{m}\times 1.5\ \mu\text{m}$ (C), $2.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}$ (D)。
- [0027] 图3: 种植于微图案化的PDMS膜表面的EMSCs向雪旺细胞分化后细胞表达雪旺细胞标志蛋白水平的Western blotting检测结果。
- [0028] 图4: 神经干细胞在无条纹PCL膜表面分化为神经细胞, 神经纤维呈放射状生长 (A); 在条纹化 ($1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$) PCL膜表面神经纤维平行生长 (B); 为了同时显示条纹和神经纤维, 将分散的神经干细胞种植于条纹 ($1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$) PCL膜表面, 可见神经纤维沿条纹生长 (C)。
- [0029] 图5: 神经细胞在EMSCs (雪旺细胞) /条纹化微图案PCL膜表面平行生长 (底层雪旺细胞用标志蛋白S100的免疫荧光染色 (荧光素488, 绿色); 上层神经纤维用标志蛋白NF-200的免疫荧光染色 (cy3红色)。A: 条纹 $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$; B: 条纹 $2.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}$ 。
- [0030] 图6: 坐骨神经损伤大鼠动物模型的EMSCs (雪旺细胞) /条纹化微图案膜 (导管) 移植手术示意图。
- [0031] 图7: 坐骨神经损伤大鼠动物模型的EMSCs (雪旺细胞) /条纹化 ($1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$) 微图案PCL复合膜移植手术过程。A: 坐骨神经切断; B: EMSCs (雪旺细胞) /条纹化 ($1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$) 微图案PCL复合膜 (由于用京尼平交联, 膜呈深蓝色) 包裹神经断端 (两端用吸收缝线连接对位, 中间留存5mm间隙), 并用纤维蛋白胶封固断端; C: 将膜卷曲成导管, 并用可吸收缝线缝合后用纤维蛋白胶封固导管外表面。
- [0032] 图8: 大鼠坐骨神经损伤动物模型的EMSCs (雪旺细胞) /条纹化 ($1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$) 微图案纤维蛋白/壳聚糖复合膜移植手术过程。A: 分离并切断坐骨神经; B: EMSCs (雪旺细胞) /条纹化 ($1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$) 微图案纤维蛋

白/壳聚糖复合膜包裹神经断端，并用纤维蛋白胶封固断端；C：将膜卷曲成导管，并用可吸收缝线缝合后用纤维蛋白胶封固导管外表面。

[0033] 图9：荧光金坐骨神经注射背根神经节神经细胞示踪结果，A-F图分别为：正常组（A）；损伤未移植组（B）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜组（C）；损伤移植条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜（无细胞）组（D）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/无条纹PCL复合膜组（E）；损伤移植无条纹PCL复合膜（无细胞）组（F）。

[0034] 图10：正常侧下肢腓肠肌和其他各组坐骨神经损伤侧腓肠肌大体外观比较。A-F图分别为：正常组（A）；损伤未移植组（B）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜组（C）；损伤移植条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜（无细胞）组（D）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/无条纹PCL复合膜组（E）；损伤移植无条纹PCL复合膜（无细胞）组（F）。

[0035] 图11：正常侧下肢腓肠肌和其他各组坐骨神经损伤侧腓肠肌组织切HE染色观察腓肠肌纤维截面积：A-F图分别为：正常组（A）；损伤未移植组（B）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜组（C）；损伤移植条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜（无细胞）组（D）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/无条纹PCL复合膜组（E）；损伤移植无条纹PCL复合膜（无细胞）组（F）。

[0036] 图12：大鼠坐骨神经损伤动物模型的EMSCs（雪旺细胞）/条纹化微图案PCL复合膜移植手术后16周，动物麻醉后进行坐骨神经取材，将移植的神经导管连同远近端的神经取出固定，沿纵轴剖开导管（原来的导管壁已经被体内的组织改建），观察导管内神经生长情况，A：EMSCs（雪旺细胞）/条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜移植组；B：条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜移植组（无细胞）；C：EMSCs（雪旺细胞）/无条纹PCL复合膜移植组；D：无条纹PCL复合膜移植组（无细胞）。

[0037] 图13：移植和不移植神经导管的损伤部位坐骨神经组织切片HE染色观测结果

， A：坐骨神经损伤后EMSCs（雪旺细胞）/条纹化微图案PCL复合膜移植治疗组，损伤近端的坐骨神经已生长入神经导管内并通过导管达到远侧，可吸收缝线吸收后未见残留空洞；B：坐骨神经损伤未治疗组，可见神经纤维严重溃变，仅见少量再生神经纤维（图上侧），空洞为可吸收缝线吸收后所残留。

[0038] 图14：正常侧下肢坐骨神经和其他各组坐骨神经损伤部位（包括移植的导管）纵向组织切，神经纤维标志蛋白NF-200免疫组织化学染色观察神经纤维再生情况：A-F图分别为：正常组（A）；损伤未移植组（B）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜组（C）；损伤移植条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜（无细胞）组（D）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/无条纹PCL复合膜组（E）；损伤移植无条纹PCL复合膜（无细胞）组（F）。

[0039] 图15：下肢坐骨神经和其他各组坐骨神经损伤部位（导管移植部位）中点横断面组织切片，神经纤维标志蛋白NF-200免疫组织化学染色观察再生神经纤维的密度：A-F图分别为：正常组（A）；损伤未移植组（B）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜组（C）；损伤移植条纹化（ $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ）微图案PCL复合膜（无细胞）组（D）；损伤移植EMSCs（雪旺细胞）/无条纹PCL复合膜组（E）；损伤移植无条纹PCL复合膜（无细胞）组（F）。

发明实施例

本发明的实施方式

[0040] 实施例1 条纹的优化选择

[0041] 1. 材料表面微图案制作

[0042] 采用电子束曝光及纳米压印技术。首先在 $3\times 3\ \text{cm}$ 的硅片表面旋涂聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）薄膜，应用电子束曝光技术在PMMA膜表面蚀刻宽度、间距和高度相等的条纹型微图案；以上述微图案化的基片为模版，将聚二甲基硅氧烷（PDMS）的基料与固化剂按照10:1的比例混合并滴加在模版表面（ $0.5\ \text{mL}/\text{cm}^2$ ），置于真空干燥箱内 60°C 干燥4 h，PDMS在模版表面凝固成膜，将PDMS膜从模版上剥离，其表面即形成与模版微图案互补的图案（见图1）。实验用条纹等

宽、等高、等间距，规格包括 $0.5\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}\times 0.5\ \mu\text{m}$ ($0.5\ \mu\text{m}$)， $1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$ ($1.0\ \mu\text{m}$)， $1.5\ \mu\text{m}\times 1.5\ \mu\text{m}\times 1.5\ \mu\text{m}$ ($1.5\ \mu\text{m}$)， $2.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}$ ($2.0\ \mu\text{m}$)， $2.5\ \mu\text{m}\times 2.5\ \mu\text{m}\times 2.5\ \mu\text{m}$ ($2.5\ \mu\text{m}$)， $3.0\ \mu\text{m}\times 3.0\ \mu\text{m}\times 3.0\ \mu\text{m}$ ($3.0\ \mu\text{m}$)。

[0043] 2. EMSCs的取材、培养、扩增和鉴定

[0044] SD大鼠 (80-100 g) 经10%水合氯醛 (330 g/kg) 腹腔注射麻醉，全身皮肤消毒，在无菌条件下经鼻孔沿鼻腔向上至内眦部剪开皮肤及鼻骨，暴露鼻中隔黏膜，剪取下1/3鼻中隔置PBS缓冲液中，剥离全层鼻黏膜。取出SD大鼠鼻黏膜后用无血清DMEM/F12混合培养基 (含青霉素200 U/mL和链霉素200 U/mL) 漂洗三次去除血迹，置于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基 (即普通完全培养基，含青霉素100 U/mL和链霉素100 U/mL)，用眼科剪充分剪碎， 37°C 下0.25%胰酶消化15min，离心弃上清后将细胞和小组织块接种于Corning培养瓶，于 CO_2 培养箱内 (37°C ，5% CO_2 ，饱和湿度) 培养。在细胞培养3天后补充新的含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基。以后每三天半量换液一次，当细胞铺满瓶底时进行消化、传代。

[0045] 将第5代细胞接种于24孔培养板。分别用EMSCs的标志蛋白vimentin、Nestin、CD133、CD44和抗体进行免疫荧光染色，鉴定培养得到的细胞为EMSCs。操作步骤如下：细胞经4%多聚甲醛溶液固定后， 37°C 于0.25%TritonX-100和3%牛血清白蛋白 (BSA) 混合液中封闭30 min，第一抗体 4°C 孵育12 h，PBS缓冲液漂洗后用Cy3标记的相应二抗室温下孵育1 h，PBS漂洗3遍，Hoechst33342复染细胞核，PBS缓冲液漂洗，中性甘油封片，于Leica荧光显微镜下观察并摄片，阴性对照用PBS缓冲液代替第一抗体，其余步骤同上。其余细胞用于以下实验。

[0046] 3. 膜表面条纹的优化选择

[0047] 以条纹诱导EMSCs向雪旺细胞样细胞诱导分化的效果作为条纹优化选择的标准。将上述培养鉴定的第5代EMSCs用胰酶消化，收集细胞调整细胞密度约为 1×10^5 个/mL，以 $0.5\ \text{mL}/\text{cm}^2$ 的种植量种植于平铺在培养板内的微图案化的PDMS膜表面 (四周有石蜡围埂限制培养基和细胞流失)。将EMSCs/微图案化PDMS膜置于 CO_2 培养箱内 (37°C ，5% CO_2 ，饱和湿度) 用含10%胎牛血清的DMEM/F12 (

含青霉素100 U/mL和链霉素100 U/mL) 培养。2h

后EMSCs既贴附于微图案化PDMS膜表面。此后在培养板内加足新的含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基继续培养, 每三天半量换液一次。14天后用4%多聚甲醛溶液固定细胞/微图案膜复合物, 用雪旺细胞标志蛋白S100和MBP的抗体进行免疫荧光染色, 观察EMSCs在微图案膜上向雪旺细胞分化的情况。用Western blotting 方法检测雪旺细胞标志蛋白的相对含量, 比较几种条纹对EMSCs向雪旺细胞分化效果, 选择诱导能力最强的条纹作为修饰生物材料支架的图案。在上述试验过程中, 只用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养EMSCs, 不加任何诱导剂, 以获得条纹单因素的诱导分化效果。以表面具有该规格条纹的生物材料膜种植或不种植EMSCs作为制作神经导管的支架材料。

[0048] 4.结果分析

[0049] 雪旺细胞标志蛋白S100和MBP的免疫荧光染色结果表明, EMSCs种植于各种规格条纹化PDMS膜表面, 用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养, 细胞形态为雪旺细胞样, 沿条纹平行排列。不同规格条纹, 其膜表面的细胞的形态和染色强度存在差异(见图2); 用Western blotting方法检测雪旺细胞标志蛋白的相对含量, 比较几种条纹对EMSCs向雪旺细胞分化效果, 得出的结论是1.0 μm ×1.0 μm ×1.0 μm 的条纹诱导EMSCs向雪旺细胞分化的能力最强(见表1, 图3)。无条纹的PDMS膜诱导能力最弱。因此, 在后面的试验中均采用1.0 μm ×1.0 μm ×1.0 μm 的条纹膜作为细胞生长基底和神经导管材料。

[0050] 表1 条纹诱导EMSCs表达雪旺细胞标志蛋白的相对含量(与Actin的比值)比较($\bar{X} \pm \text{SD}$)

[0051]

雪旺细胞标志蛋白	空白对照	无条纹膜	0.5 μm 条纹	1 μm 条纹	1.5 μm 条纹	2 μm 条纹	2.5 μm 条纹
MBP	0.15 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.11	0.41 $\pm$ 0.07	1.57 $\pm$ 0.12	1.12 $\pm$ 0.07	0.77 $\pm$ 0.13	0.79 $\pm$ 0.11
S100	0.17 $\pm$ 0.09	0.91 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.15	1.99 $\pm$ 0.35	1.17 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.27	0.87 $\pm$ 0.33

[0052] 说明: 1 μm 条纹组的雪旺细胞标志蛋白MBP和S100的相对含量均明显高于其他各组 ($p < 0.05$, $n=3$)

[0053] 实施例2微图案化PCL膜的实际应用

[0054] 1. 制备表面微图案化的PCL膜

[0055] 采用电子束曝光及纳米压印技术。首先在3×3 cm的硅片表面旋涂聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）薄膜，应用电子束曝光技术在PMMA膜表面蚀刻宽度1 μm、间距1 μm、高度1 μm的条纹型微图案；以上述微图案化的基片为模版，将PDMS的基料与固化剂按照10:1的比例混合并滴加在模版表面，置于真空干燥箱内60℃干燥4 h，PDMS在模版表面凝固成膜，将PDMS膜从模版上剥离，其表面即形成与模版微图案互补的图案；以上述微图案化的PDMS膜为模版，将20%的PCL二氯甲烷溶液混合滴加在PDMS模版表面（0.5 mL/cm²），置于真空干燥箱内干燥1 h，PCL在PDMS模版表面凝固成膜，将PCL膜从模版上剥离，其表面即形成与模版微图案互补的图案。

[0056] 2. EMSCs的取材培养和扩增和鉴定

[0057] SD大鼠（80-100 g）经10%水合氯醛（330 g/kg）腹腔注射麻醉，全身皮肤消毒，在无菌条件下经鼻孔沿鼻腔向上至内眦部剪开皮肤及鼻骨，暴露鼻中隔黏膜，剪取下1/3鼻中隔置PBS缓冲液中，剥离全层鼻黏膜。取出SD大鼠鼻黏膜后用无血清DMEM/F12混合培养基（含青霉素200 U/mL和链霉素200 U/mL）漂洗三次去除血迹，置于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基（即普通完全培养基，含青霉素100 U/mL和链霉素100 U/mL），用眼科剪充分剪碎，37℃下0.25%胰酶消化15min，离心弃上清后将细胞和小组织块接种于Corning培养瓶，于CO₂培养箱内（37℃，5%CO₂，饱和湿度）培养。在细胞培养3天后补充新的含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基。以后每三天半量换液一次，当细胞铺满瓶底时进行消化、传代。

[0058] 将第5代细胞接种于24孔培养板。分别用EMSCs的标志蛋白vimentin、Nestin、CD133和CD44和抗体进行免疫荧光染色，鉴定培养得到的细胞为EMSCs。操作步骤如下：细胞经4%多聚甲醛溶液固定后，37℃于0.25%TritonX-100和3%牛血清白蛋白（BSA）混合液中封闭30min，第一抗体4℃孵育12 h，PBS缓冲液漂洗后用Cy3标记的相应二抗室温下孵育1 h，PBS缓冲液漂洗3遍，Hoechst33342复染细胞核，PBS缓冲液漂洗，中性甘油封片，于Leica荧光显微镜下观察并摄片。

，阴性对照用PBS缓冲液代替第一抗体，其余步骤同上。其余细胞用于以下实验。

[0059] 3. EMSCs种植于微图案化的PCL膜表面

[0060] 将上述EMSCs用胰酶消化，收集细胞调整细胞密度约为 1×10^5 个/mL，以 0.5 mL/cm^2 的密度种植于上述微图案化的PCL膜上（四周有石蜡围埂限制培养基和细胞流失），置 CO_2 培养箱内（ 37°C ， $5\% \text{CO}_2$ ，饱和湿度）用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养，每三天换培养液一次。培养14天后用4%多聚甲醛溶液固定EMSCs/微图案膜复合物，用雪旺细胞标志蛋白S100和MBP的抗体进行免疫荧光染色，观察EMSCs分化的雪旺细胞在微图案膜的生长情况。

[0061] 4. 大鼠胚胎神经干细胞的培养

[0062] 将孕14-16 d SD大鼠麻醉以后取出胚胎，取两侧大脑皮层组织大小约 $0.5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ ，将软脑膜剔除干净，放入无血清DMEM/F12混合培养基（含青霉素200 U/mL和链霉素200 U/mL）中清洗两遍。将所取的组织在PBS缓冲液中洗涤、剪碎、胰酶消化、筛网过滤，制得单细胞悬液。接种在神经干细胞培养基（DMEM/F12培养基中添加2% B27、 20 ng/mL bFGF、 20 ng/mL EGF、青霉素和链霉素各100 U/mL），接种密度是 2×10^5 个/mL。为了确保神经干细胞球的增殖。得到的干细胞球接种密度为2000个/mL。随后采用机械消化法每隔1~2周传代一次，进行多次传代。神经球及分化细胞以4%多聚甲醛溶液室温下固定30 min，用神经干细胞标志蛋白Nestin抗体进行免疫荧光染色鉴定。其余神经干细胞用于以下实验，模拟体内促进神经再生过程：（1）将神经球或分散的神经干细胞种植于条纹化（ $1.0 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$ ）PCL膜表面，用神经干细胞培养基培养21天后用神经纤维标志蛋白NF-200的抗体进行免疫荧光染色观察神经纤维沿条纹生长的情况（见图4）；（2）将神经干细胞种植于EMSCs/PCL微图案膜，观察神经纤维在细胞/条纹膜表面生长情况。

[0063] 5. 神经干细胞种植于EMSCs/PCL微图案膜

[0064] 将上述培养的次级神经球部分打散后种植于上述EMSCs/PCL复合膜表面，置C

O₂培养箱内（37℃，5%CO₂，饱和湿度）用神经干细胞培养基培养。培养14天后用4%多聚甲醛溶液固定神经干细胞/EMSCs/微图案膜复合物，用神经细胞/雪旺细胞标志蛋白NF-200/MBP的抗体进行免疫荧光双标记染色，观察神经干细胞在EMSCs/微图案膜上分化以及神经纤维平行生长情况（图5）。

[0065] 6.体内移植试验

[0066] （1）实验动物及移植手术过程

[0067] 健康成年雄性SD大鼠50只，体重250~300

g，将其随机分为5组，每组10只。第1组为单纯坐骨神经损伤组；第2组为坐骨神经损伤+移植单纯无条纹PCL导管组；第3组为坐骨神经损伤+移植EMSCs/无条纹PCL导管/组；第4组为坐骨神经损伤+移植单纯有条纹PCL导管组；第5组为坐骨神经损伤+移植EMSCs/有条纹PCL导管组。

[0068] 动物手术过程如下：10%水合氯醛400 mg/kg腹腔麻醉，股后部正中切口，暴露右后肢中段坐骨神经。第1组，切除坐骨神经6 mm后直接缝合肌肉和皮肤；第2组，在坐骨神经缺损部位移植单纯无条纹PCL导管；第3组，在坐骨神经缺损部位移植EMSCs/无条纹PCL导管；第4组，在坐骨神经缺损部位移植单纯有条纹PCL导管组；第5组，在坐骨神经缺损部位移植EMSCs/有条纹PCL导管。导管移植后用纤维蛋白胶封固吻合口，缝合肌肉和皮肤（见图6，7，8）。术后各组常规饲养，定期测量坐骨神经指数。

[0069] （2）导管移植修复神经损伤效果评价指标

[0070] ①一般情况观察及坐骨神经功能指数（SFI）测定

[0071] 术后常规观察大鼠饮食、足部溃疡、肢体活动及切口愈合情况。每周测定坐骨神经功能指数（SFI）：制作一长60 cm、宽10 cm、高20 cm的两端开口木槽，将70 g/m²白纸裁成与木槽等长等宽后铺于槽底。大鼠双侧后肢用颜料浸于双踝关节着色后，将大鼠放于槽的一端，使其自行向槽的另一方行走，每侧后肢各留下5~6个足印。选择印迹清晰的足印分别测量正常足（N）和伤侧足（E）的3个指标：A：PL（足印长度）；B：TS（足趾宽度）；C：IT（中间足趾宽度）。将上述指数代入Bain公式，计算出坐骨神经功能指数。

[0072] Bain公式：SFI=109.5（ETS-NTS）/NTS-38.3（EPL—NPL）/NPL+13.3（EIT—

NIT) /NIT-8.8。

[0073] 坐骨神经功能指数SFI=0为正常，-100为完全损伤。动物手术16周后各组坐骨神经损伤侧坐骨神经功能指数（SFI）测量结果见表2。

[0074] 表2各组坐骨神经损伤侧坐骨神经功能指数（SFI）（ $\bar{X} \pm SD$ ）比较

[0075] [表1]

第1组	第2组	第3组	第4组	第5组
-91±25	-77±31	-68±19	-57±23	-37±17

[0076] 说明：第5组的损伤侧坐骨神经功能指数均明显高于其他各组（ $p < 0.05$ ， $n=9$ ）

[0077] ②荧光金逆行示踪

[0078] 每组随机挑选3只大鼠于术后15周（观察终点前1周）进行荧光金逆行示踪。麻醉后再次暴露坐骨神经，于移植物远端5 mm处用微量注射器注射5%荧光金-磷酸盐缓冲液（PBS）溶液2 μ L。正常侧坐骨神经相应位置同样注射同等量的荧光金。缝合手术切口，动物继续饲养。1周后取出左右侧相对应的L4-L6，S1-S2背根神经节，用冰冻切片机进行纵向切片，厚度为10 μ m。在荧光显微镜下分别于观察10张连续切片（由于神经节很小，可以在一个低倍视野内观察全貌），用Image-proPlus6.0计数每张切片内荧光金标记的阳性细胞总数，并计算平均值。双侧标记阳性细胞比（阳性细胞比=实验侧标记阳性细胞数/对照侧阳性细胞数 $\times 100\%$ ）以阳性细胞比反映神经再生程度（阳性细胞总数与导管移植修复效果成正相关，结果见表3，图9）。

[0079] 表3各组坐骨神经损伤侧背根神经节荧光金标记阳性细胞数与正常侧细胞数比值（ $\bar{X} \pm SD$ ）比较

[0080]

第1组	第2组	第3组	第4组	第5组
0.07±0.02	0.13±0.07	0.21±0.15	0.37±0.11	0.57±0.12

[0081] 说明：第5组的损伤侧神经节阳性细胞数与正常侧比值均明显高于其他各组（ $p < 0.05$ ， $n=9$ ）

[0082] ③腓肠肌的湿重计量和形态学观察

[0083] 动物手术16周后，麻醉动物，完整切取双侧腓肠肌，电子天平称重（精确至0.001g），计算各组动物双侧腓肠肌湿重比（湿重比=实验侧肌肉湿重/对照侧肌肉湿重×100%），结果见表4。称重后将肌肉用4%多聚甲醛溶液固定，常规石蜡包埋，组织切片分别作H-E染色光镜观察，Leica显微图像分析系统分别测量左右侧腓肠肌纤维截面积，并计算截面积比（截面积比=实验侧肌肉截面积/对照侧肌肉截面积×100%），结果见表5，图10，图11。

[0084] 表4各组坐骨神经损伤侧腓肠肌湿重与正常侧腓肠肌湿重比值（ $\bar{X} \pm SD$ ）比较

[0085]

第1组	第2组	第3组	第4组	第5组
0.19 ± 0.07	0.31 ± 0.13	0.41 ± 0.13	0.63 ± 0.09	0.77 ± 0.18

[0086] 说明：第5组的腓肠肌湿重比值均明显高于其他各组（ $p < 0.05$ ， $n=9$ ）

[0087] 表5各组坐骨神经损伤侧腓肠肌纤维截面积与正常侧腓肠肌纤维截面积比值（ $\bar{X} \pm SD$ ）比较

[0088]

第1组	第2组	第3组	第4组	第5组
0.21 ± 0.09	0.29 ± 0.13	0.47 ± 0.17	0.75 ± 0.12	0.87 ± 0.23

[0089] 说明：第5组的腓肠肌纤维截面积比值均明显高于其他各组（ $p < 0.05$ ， $n=9$ ）

[0090] ④坐骨神经的形态学观察和计量

[0091] 动物手术16周后，同上法麻醉后自原切口切开并暴露坐骨神经，观察坐骨神经再生情况（图12）。选取大鼠坐骨神经损伤后移植神经导管和未移植神经导管的，损伤修复后的坐骨神经，包括损伤部位的近段（上段）、损伤段（移植神经导管部位）和远段（下段），神经经4%多聚甲醛溶液固定后进行常规石蜡包埋和切片。切片方向为纵向平行与神经纵轴，通过近段（上段）、损伤段（移植神经导管部位）和远段（下段），以便观察再生神经纤维通过导管的情况。组织切片分别作H.E染色（图13）、用神经纤维标志蛋白NF-200的抗体进行免疫组织化学染色（图14）。正常坐骨神经和其他各组坐骨神经损伤部位（导管移植部位）

中点横断面组织切片，神经纤维标志蛋白NF-200免疫组织化学染色观察再生神经纤维的密度（图15）。显微镜观察并采图后，用图像分析系统进行神经纤维密度测定（选取各组动物坐骨神经纵向切面的最粗切面进行比较），结果见表6。

[0092] 表6各组坐骨神经损伤侧再生神经纤维横断面数量与正常侧横断面数量比值（ $\bar{X} \pm SD$ ）比较

[0093]

第1组	第2组	第3组	第4组	第5组
0.18 ± 0.08	0.21 ± 0.07	0.35 ± 0.17	0.57 ± 0.21	0.69 ± 0.19

[0094] 说明：第5组的损伤侧神经纤维数量与正常侧的比值均明显高于其他各组（ $p < 0.05$ ， $n=9$ ）

[0095] 实施例3微图案化的纤维蛋白/壳聚糖复合膜的实际应用

[0096] 1. 制备表面微图案化的纤维蛋白/壳聚糖复合膜

[0097] 基于纤维蛋白原和壳聚糖具有生物相容性好，两种材料混合可增加复合膜的机械强度，并可借助生物交联剂如京尼平或/和谷氨酰氨转氨酶（TG）交联一种或多种细胞生长因子如EGF、FGE、NGF、SHH等，以构建成药物缓释放支架，进一步提高其促进神经再生的功能。本发明首先选择纤维蛋白原/壳聚糖复合膜作为制作条纹化神经导管的材料，种植或不种植EMSCs后用于体内移植修复坐骨神经损伤，评价本发明的应用价值。条纹化纤维蛋白原溶液/壳聚糖复合膜的制作过程如下：

[0098] 配制浓度为5%的纤维蛋白原水溶液和2%壳聚糖醋酸溶液，再将纤维蛋白原溶液和壳聚糖溶液按质量比9：1混合均匀。将配置好的溶液滴加在预先平铺在培养板内的表面修饰有1.0 μm 平行条纹的PDMS膜上（0.5 mL/cm²，四周有石蜡围埂以限制液体流失），液体流平后用微量喷雾器加入凝血酶（100 U/mL）50 μL （5 U），5分钟后再加入1%京尼平50 μL 。将培养板放入干燥箱内，37℃固化，12h后液体凝固成凝胶。此时在凝胶上

加压50克砝码继续置25°C真空干燥至膜表面无流动液体，但保持膜表面湿润。此后将膜和模版置入冰箱内4°C固化稳定24 h。将固化的纤维蛋白/壳聚糖复合膜从模版上缓慢仔细剥离以保证膜和条纹的完整性，此时纤维蛋白/壳聚糖复合膜表面即形成与模版微图案互补的图案。

[0099] 2. EMSCs种植于微图案化的纤维蛋白/壳聚糖复合膜表面

[0100] 为了验证其他材料膜表面条纹同样可诱导EMSCs向雪旺细胞样细胞分化的效果，本发明将上述EMSCs用胰酶消化，收集细胞调整细胞密度约为 1×10^5 个/mL，以 0.5 mL/cm^2 的密度种植于上述微图案化的纤维蛋白/壳聚糖复合膜表面（四周有围埂限制培养基和细胞流失）置CO₂培养箱内（37°C，5%CO₂，饱和湿度）用含普通培养基培养。培养14天后用4%多聚甲醛溶液固定EMSCs/微图案纤维蛋白/壳聚糖膜复合物，用雪旺细胞标志蛋白S100和MBP的抗体进行免疫荧光染色，观察EMSCs分化的雪旺细胞在微图案膜的生长情况。

[0101] 3. 大鼠胚胎神经干细胞的培养

[0102] 将孕14-16 d SD大鼠麻醉以后取出胚胎，取两侧大脑皮层组织大小约 $0.5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ ，将软脑膜剔除干净，放入无血清DMEM/F12混合培养基（含青霉素200 U/mL和链霉素200 U/mL）中清洗两遍。将所取的组织在PBS缓冲液中洗涤、剪碎、胰酶消化、筛网过滤，制得单细胞悬液。接种在神经干细胞培养基（DMEM/F12培养基中添加2% B 27 mL、20 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF、青霉素和链霉素各100 U/mL），接种密度是 2×10^5 个/mL。为了确保神经干细胞球的增殖。得到的干细胞球接种密度为2000个/mL。随后采用机械消化法每隔1~2周传代一次，进行多次传代。神经球及分化细胞以4%多聚甲醛溶液室温下固定30 min，用神经干细胞标志蛋白Nestin抗体进行免疫荧光染色鉴定。其余神经干细胞用于以下实验，模拟体内促进神经再生过程：（1）将神经球或分散的神经干细胞种植于条纹化（ $1.0 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$ ）纤维蛋白/壳聚糖微图案膜表面，用神经干细胞培养基培养，21天后用神经纤维标志蛋白NF-200的抗体进行免疫荧光染色，观察神经纤维沿条纹生长的情况；（2）将神经干细胞种植于EMSCs/纤维蛋白/壳聚糖微图案膜，观察神经纤维在细胞/条纹膜表面生长情况（下述）。

[0103] 4.神经干细胞种植于EMSCs/纤维蛋白/壳聚糖微图案膜

[0104] 将上述培养的次级神经球部分打散后种植于上述EMSCs/PCL微图案膜表面，置CO₂培养箱内（37℃，5%CO₂，饱和湿度）用含10%胎牛血清的DMEM/F12（含青霉素100 U/mL和链霉素100 U/mL）培养。培养14天后用4%多聚甲醛溶液固定神经干细胞/EMSCs/纤维蛋白/壳聚糖微图案膜复合物，用神经细胞/雪旺细胞标志蛋白NF-200/MBP的抗体进行免疫荧光双标记染色，观察神经干细胞在EMSCs/纤维蛋白/壳聚糖微图案膜上分化以及神经纤维平行性生长的情况。

[0105] 5.体内移植试验

[0106] （1）实验动物及移植手术过程

[0107] 健康成年雄性SD大鼠50只，体重250~300

g，将其随机分为5组，每组10只。第1组为单纯坐骨神经损伤组；第2组为坐骨神经损伤+移植单纯无条纹纤维蛋白/壳聚糖微图案导管组；第3组为坐骨神经损伤+移植EMSCs无条纹纤维蛋白/壳聚糖微图案导管/组；第4组为坐骨神经损伤+移植单纯有条纹纤维蛋白/壳聚糖微图案导管组；第5组为坐骨神经损伤+移植EMSCs/有条纹纤维蛋白/壳聚糖微图案导管组。

[0108] 动物手术过程如下：10%水合氯醛400 mg/kg腹腔麻醉，股后部正中切口，暴露右后肢中段坐骨神经。设置5个实验组：第1组，切除坐骨神经6 mm后直接缝合肌肉和皮肤；第2组，在坐骨神经缺损部位移植单纯无条纹纤维蛋白/壳聚糖微图案导管；第3组，在坐骨神经缺损部位移植EMSCs/纤维蛋白/壳聚糖微图案无条纹导管；第4组，在坐骨神经缺损部位移植单纯有条纹纤维蛋白/壳聚糖微图案导管组；第5组，在坐骨神经缺损部位移植移植EMSCs/有条纹纤维蛋白/壳聚糖微图案导管。导管移植后用纤维蛋白胶封固吻合口，缝合肌肉和皮肤（手术过程见图8）。术后各组常规饲养，定期测量坐骨神经指数。

[0109] （2）导管移植修复神经损伤效果评价指标

[0110] ①一般情况观察及坐骨神经功能指数（SFI）测定

[0111] 术后常规观察大鼠饮食、足部溃疡、肢体活动及切口愈合情况。每周测定坐骨神经功能指数（SFI）：制作一长60 cm、宽10 cm、高20 cm的两端开口木槽，将70 g/m²白纸裁成与木槽等长等宽后铺于槽底。大鼠双侧

后肢用颜料浸于双踝关节着色后，将大鼠放于槽的一端，使其自行向槽的另一方行走，每侧后肢各留下5~6个足印。选择印迹清晰的足印分别测量正常足（N）和伤侧足（E）的3个指标：A：PL（足印长度）；B：TS（足趾宽度）；C：IT（中间足趾宽度）。将上述指数代入Bain公式，计算出坐骨神经功能指数。

[0112] Bain公式： $SFI = 109.5 (ETS - NTS) / NTS - 38.3 (EPL - NPL) / NPL + 13.3 (EIT - NIT) / NIT - 8.8$ 。

[0113] 坐骨神经功能指数SFI=0为正常，-100为完全损伤。

[0114] ②荧光金逆行示踪

[0115] 每组随机挑选3只大鼠于术后15

周（观察终点前1周）进行荧光金（Fluorochrome）逆行示踪。麻醉后再次暴露坐骨神经，于移植物远端5

mm处用微量注射器注射5%荧光金-磷酸盐缓冲液（PBS）溶液2 μ L。正常侧坐骨神经相应位置同样注射同等量的荧光金。缝合手术切口，动物继续饲养。1周后取出左右侧相对应的L4-L6，S1-S2背根神经节，用冰冻切片机进行纵向切片，厚度为10 μ m。在荧光显微镜下分别于观察10张连续切片（由于神经节很小，可以在一个低倍视野内观察全貌），用Image-proPlus6.0计数每张切片内荧光金标记的阳性细胞总数，并计算平均值。双侧标记阳性细胞比（阳性细胞比=实验侧标记阳性细胞数/对照侧阳性细胞数 $\times$ 100%）以阳性细胞比反映神经再生程度（阳性细胞总数与导管移植修复效果成正相关）。

[0116] ③腓肠肌的形态学观察和计量

[0117] 动物手术16周后，完整切取双侧腓肠肌，电子天平称重（精确至0.001g），计算各组动物双侧腓肠肌湿重比（湿重比=实验侧肌肉湿重/对照侧肌肉湿重 $\times$ 100%）。称重后将肌肉用4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋，组织切片分别作H-E染色光镜观察，Leica显微图像分析系统分别测量左右侧腓肠肌纤维截面积，并计算截面积比（截面积比=实验侧肌肉截面积/对照侧肌肉截面积 $\times$ 100%）。

[0118] ④坐骨神经的形态学观察和计量

[0119] 动物手术16周后，同上法麻醉后自原切口切开并暴露坐骨神经，观察坐骨神经再生情况。选取大鼠坐骨神经损伤后移植神经导管和未移植神经导管的，损伤

修复后的坐骨神经，包括损伤部位的近段（上段）、损伤段（移植导管部位）和远段（下段），神经经4%多聚甲醛固定后进行常规石蜡包埋和切片。切片方向为纵向平行与神经纵轴，通过近段（上段）、损伤段（移植导管部位）和远段（下段），以便观察再生神经纤维通过导管的情况。组织切片分别作 H.E染色、用神经纤维标志蛋白NF-200的抗体进行免疫组织化学染色。显微镜观察并采图，图像分析系统进行神经纤维密度测定（选取各组动物坐骨神经纵向切面的最粗部位横切面进行比较）。

[0120] 结果表明，本发明提供的组织工程化神经移植物能通过损伤部位移植，促进神经再生和下肢运动功能恢复。

[0121] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种组织工程化神经移植物，其特征在于，以表面引入条纹状微图案的生物材料作为支架，以外胚间充质干细胞EMSCs作为种子细胞，将种子细胞接种到支架上得到组织工程化神经移植物。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，所述生物材料表面利用微图案技术印刻条纹状微图案。
- [权利要求 3] 如权利要求2所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，所述微图案技术包括但不限于光刻、电子束曝光或纳米压印。
- [权利要求 4] 如权利要求1-3任一所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，所述条纹状微图案的宽度为1-2 μm ，间距为1-2 μm ，条纹高度为1-2 μm 。
- [权利要求 5] 如权利要求1所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，以聚二甲基硅氧烷、聚己内酯、壳聚糖、纤维蛋白原中的一种或多种作为生物材料。
- [权利要求 6] 如权利要求1所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，所述生物材料包括壳聚糖-纤维蛋白。
- [权利要求 7] 如权利要求6所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，所述壳聚糖-纤维蛋白是将壳聚糖和纤维蛋白原通过生物交联剂交联细胞生长因子获得的，所述细胞生长因子为EGF、FGE、NGF、SHH中的一种或多种。
- [权利要求 8] 如权利要求7所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，生物交联剂包括京尼平或/和谷氨酰氨转氨酶。
- [权利要求 9] 如权利要求1所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，所述EMSCs的初始细胞密度为 10^4 - 10^5 个/ cm^2 。
- [权利要求 10] 如权利要求1所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，所述组织工程化神经移植物填充有促进神经生长的药物或生长因子缓释材料。
- [权利要求 11] 如权利要求10所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，促进神经生长的药物或生长因子缓释材料包括微球、纳米颗粒或水凝胶为载体

的药物缓释系统。

[权利要求 12] 如权利要求1-11任一所述的组织工程化神经移植物，其特征在于，所述组织工程化神经移植物的制备方法包括以下步骤：

(1) 制备表面微图案化的生物材料支架；EMSCs的取材培养和扩增：

(2) 将步骤（1）得到的EMSCs种植于微图案化的生物材料支架。

[权利要求 13] 一种神经导管，其特征在于，以表面引入条纹状微图案的生物材料作为支架，以外胚间充质干细胞EMSCs作为种子细胞，将种子细胞接种到支架上得到组织工程化神经移植物，所述组织工程化神经移植物卷曲形成单层或多层多隧道神经导管。

[权利要求 14] 如权利要求13所述的神经导管，其特征在于，所述条纹状微图案的宽度为1-2 μm ，间距为1-2 μm ，条纹高度为1-2 μm 。

[权利要求 15] 如权利要求13所述的神经导管，其特征在于，以聚二甲基硅氧烷、聚己内酯、壳聚糖、纤维蛋白原中的一种或多种作为生物材料。

[权利要求 16] 权利要求1-12任一所述的组织工程化神经移植物或权利要求13-15任一所述的神经导管在制备医疗器械中的应用。

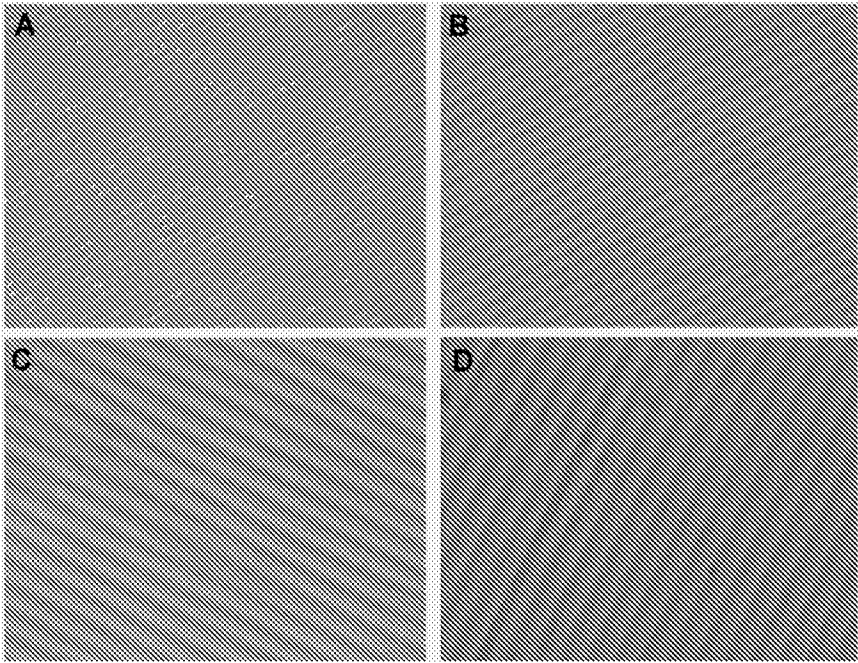


图 1

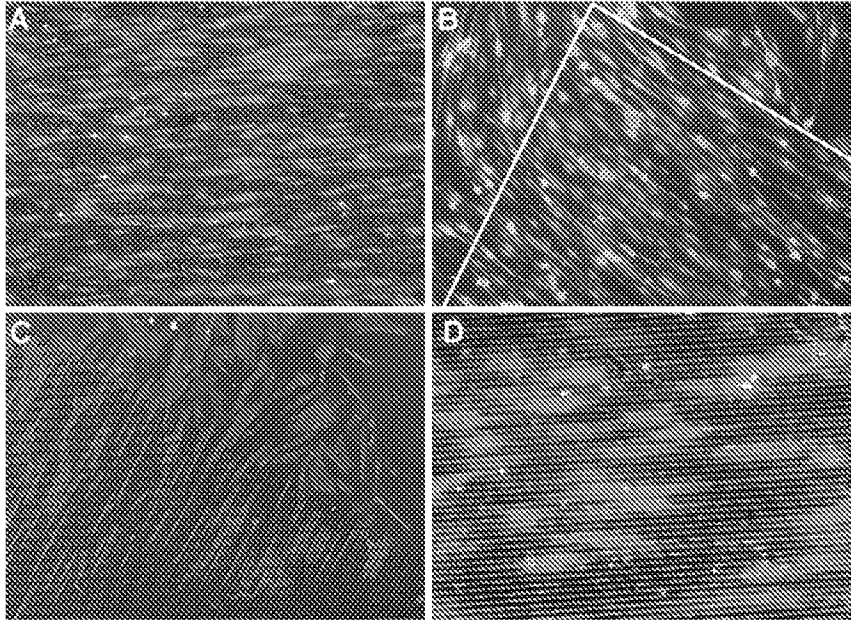


图 2

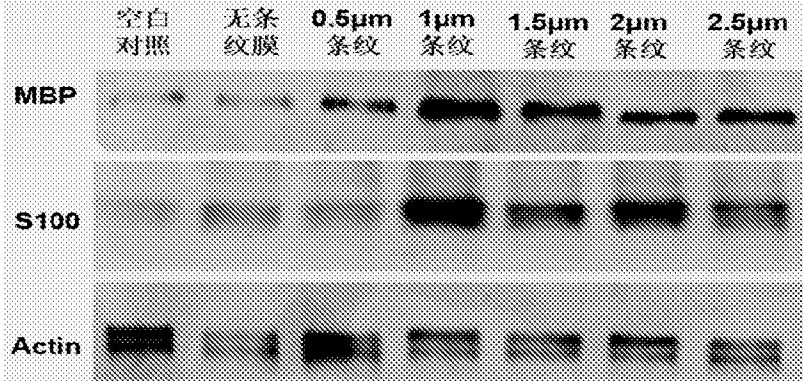


图 3

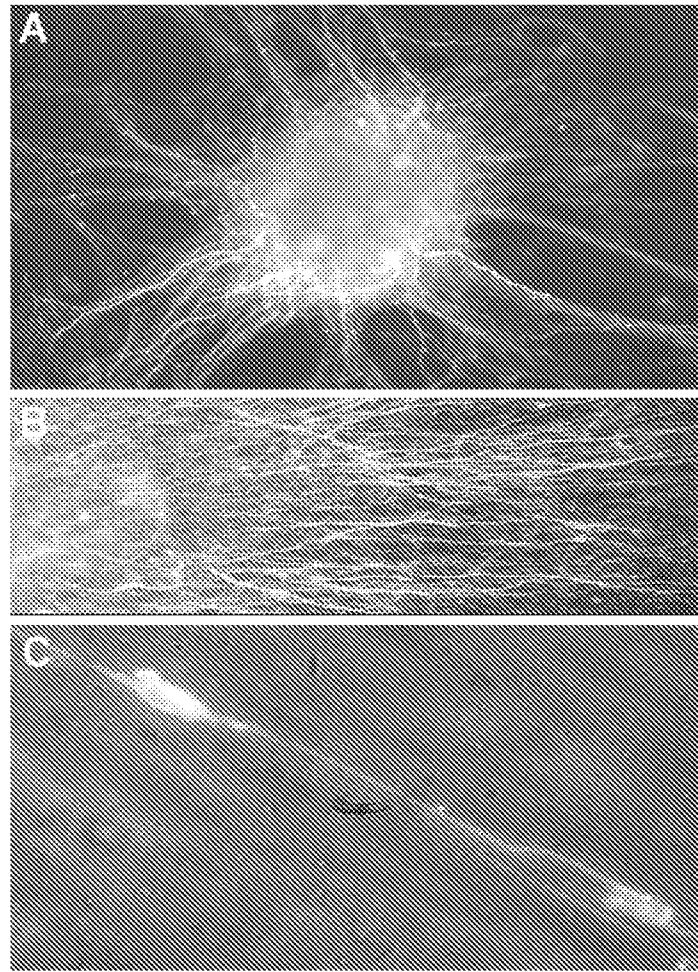


图 4

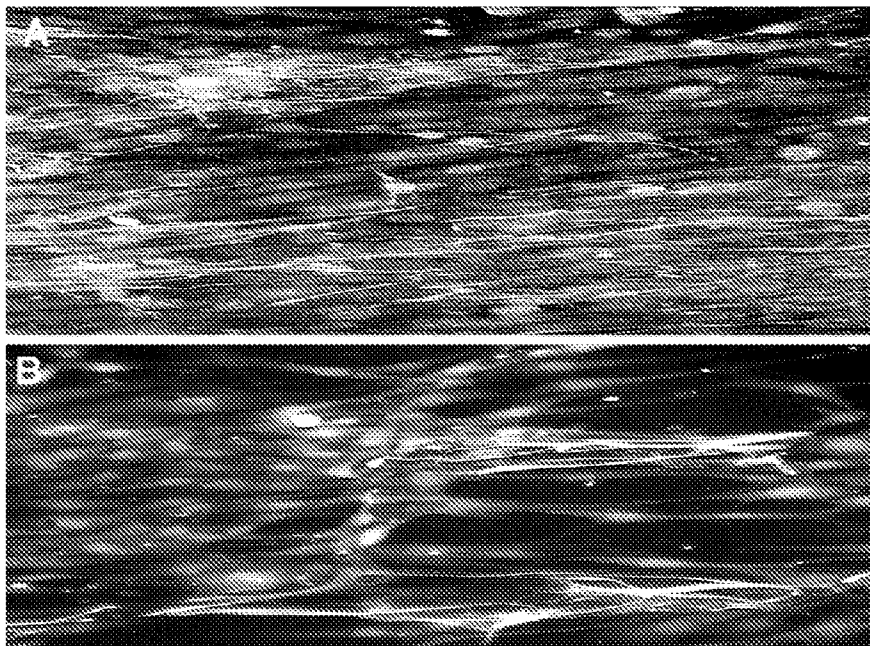


图 5

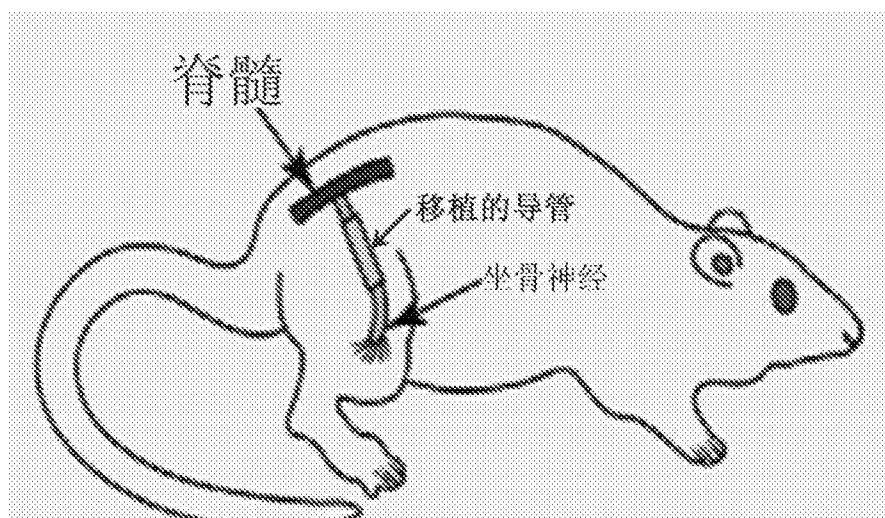


图 6

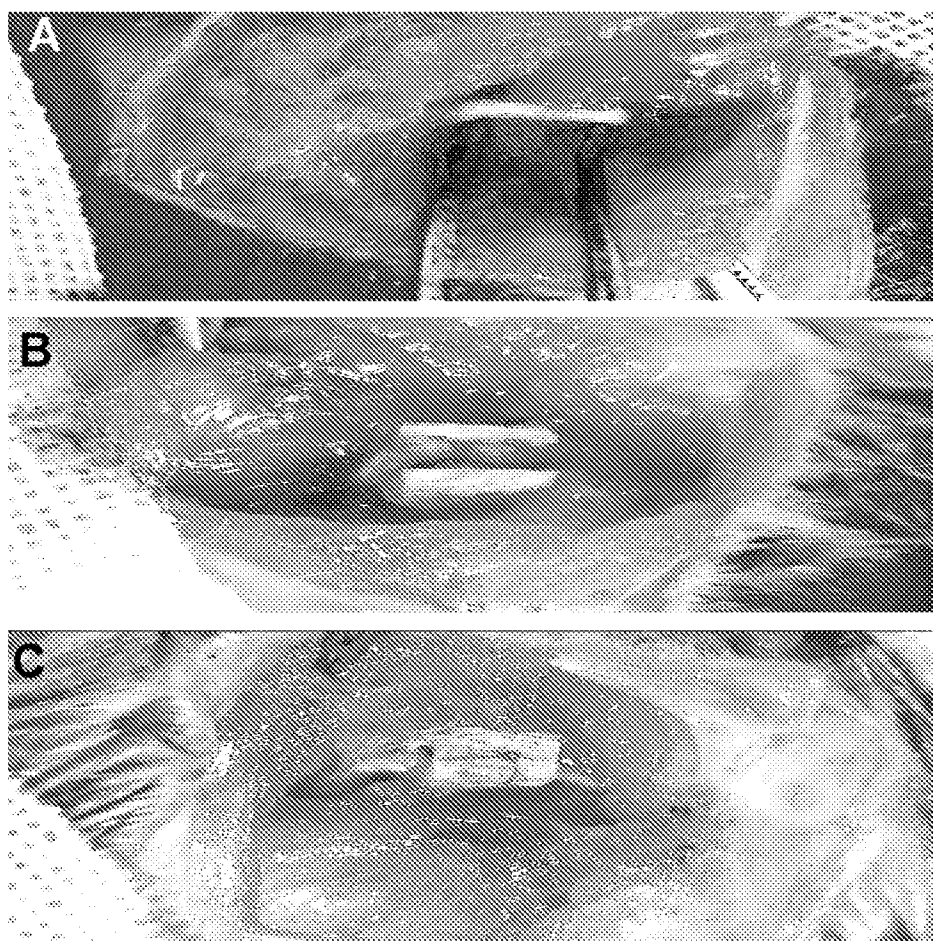


图 7

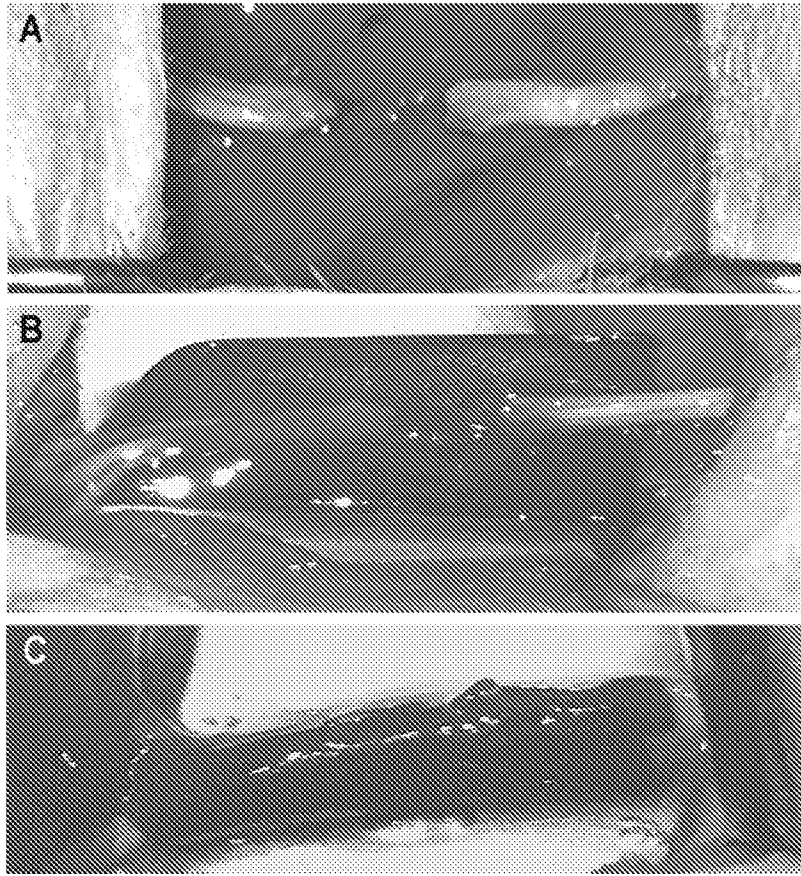


图 8

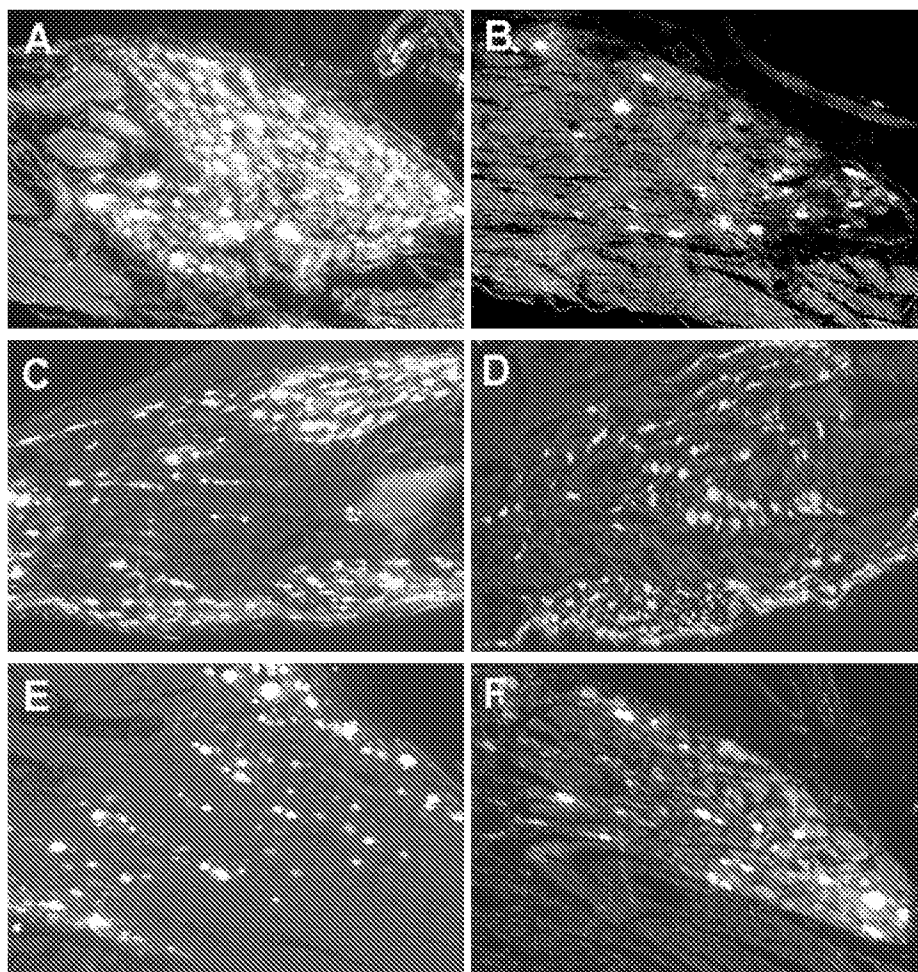


图 9

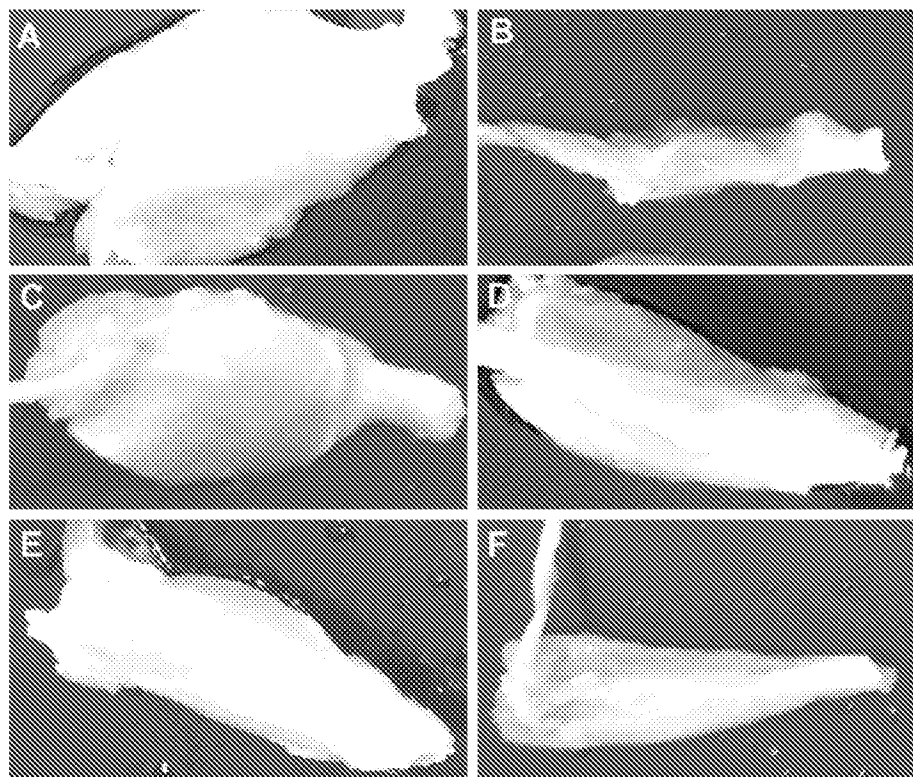


图 10

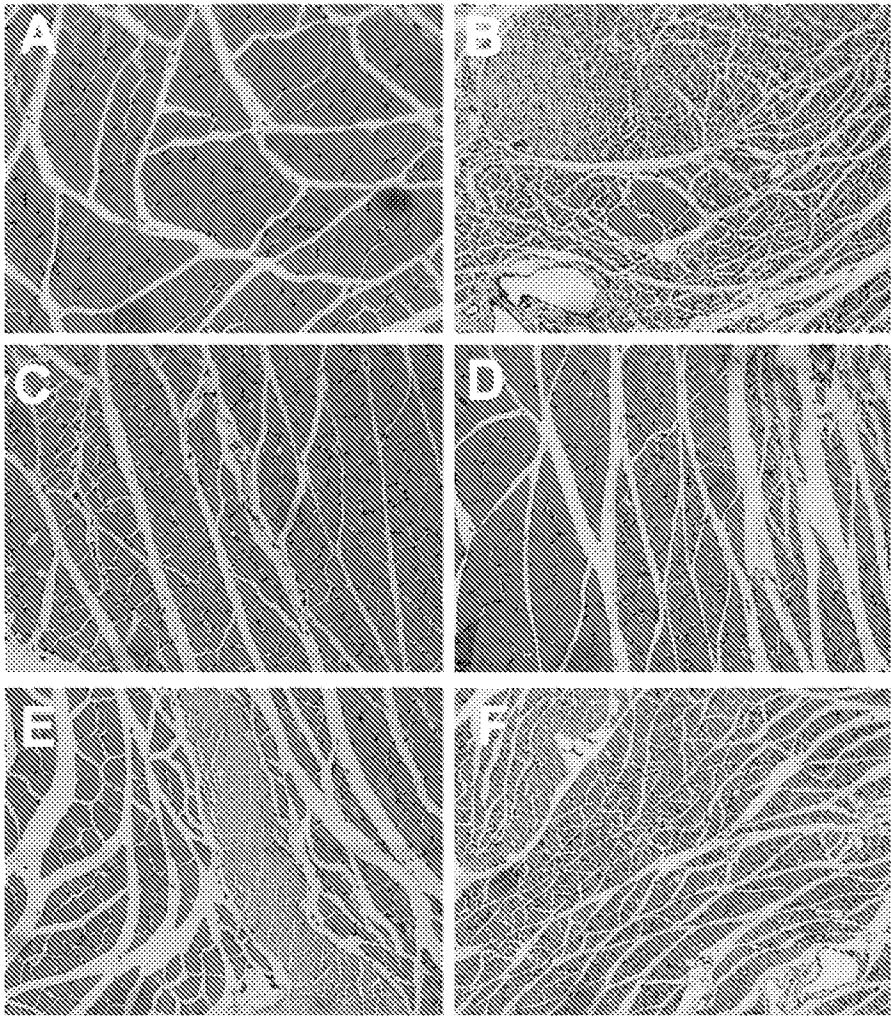


图 11

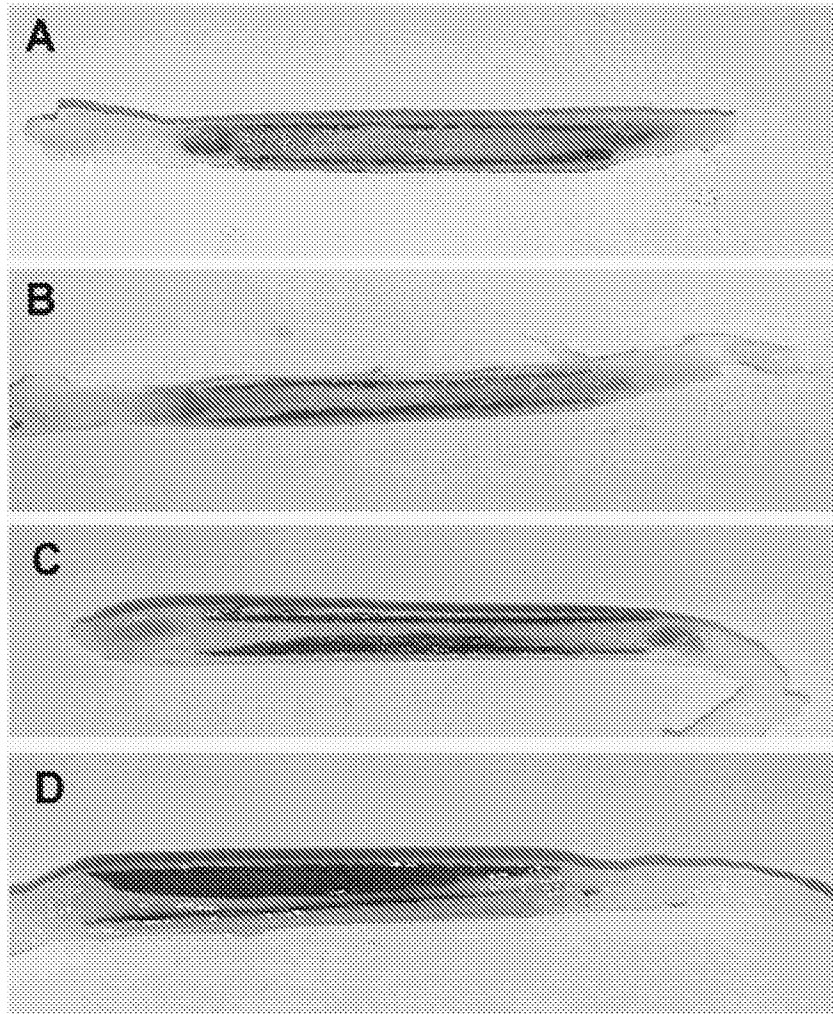


图 12

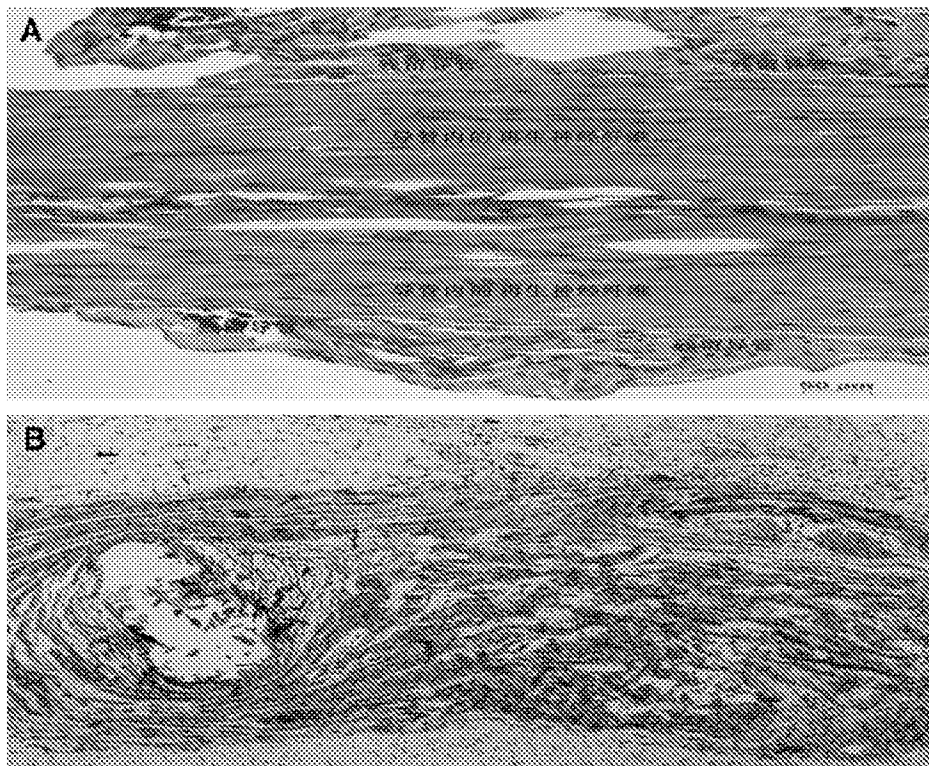


图 13

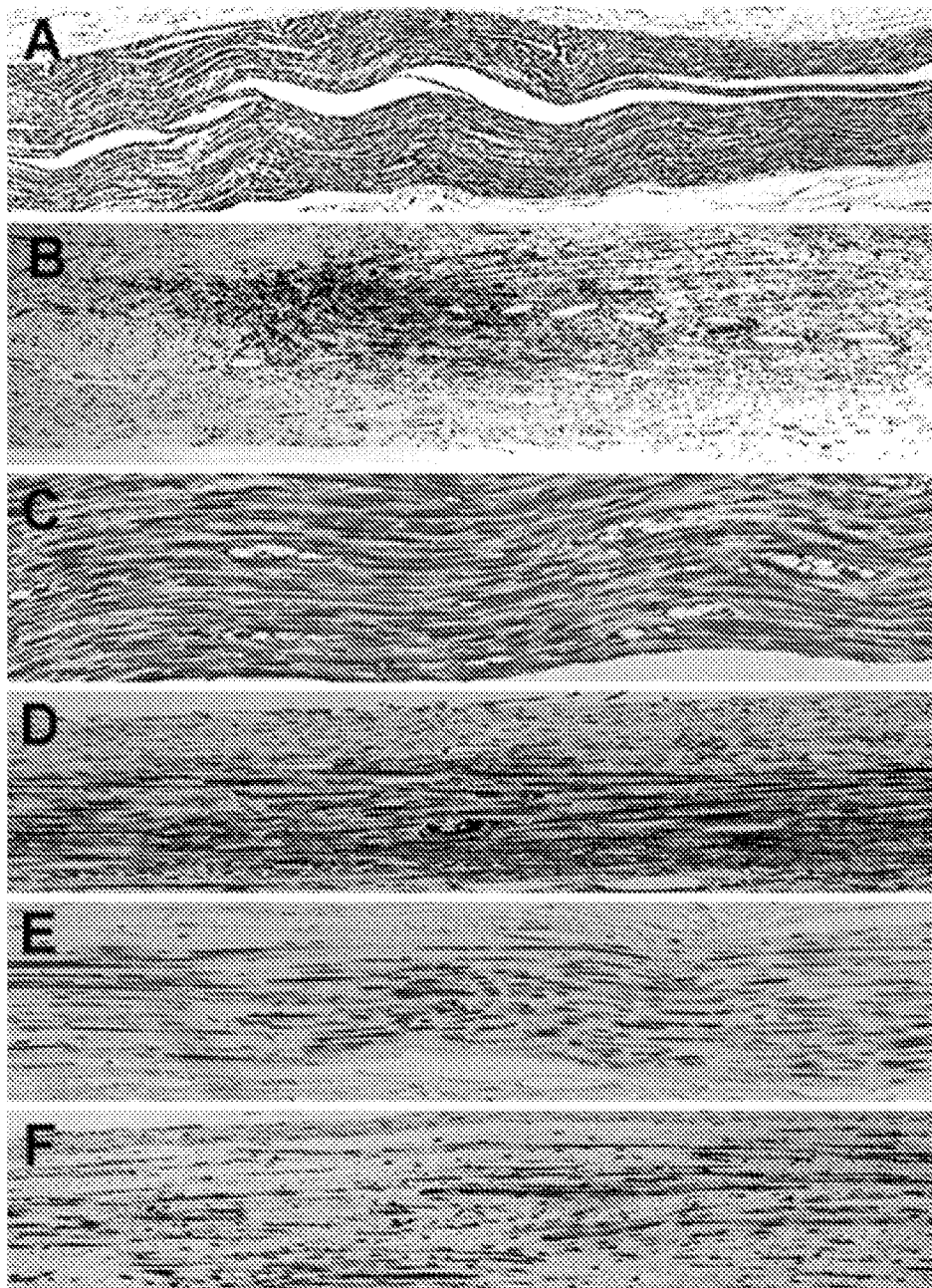


图 14

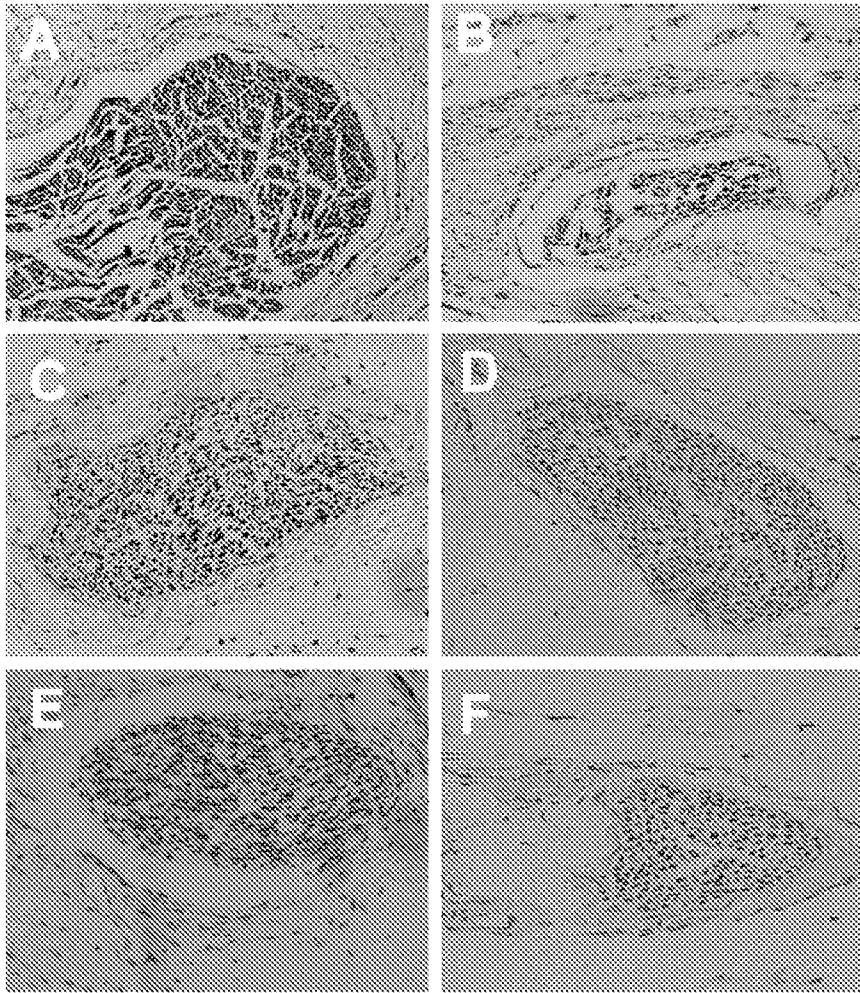


图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/103649

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/18(2006.01)i; A61L 27/20(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L,C12N5

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI; SIPOABS; CNABS; CNTXT; CNKI: 神经导管, 神经移植, 表面, 条纹, 图案, 凸起, 凹槽, 外胚间充质干细胞, EMSCs, nerve, conduit, conduct, tube, implant+, transplant+, surface, external, pattern, stripe, band, line, groove, recess, fillister, ectodermal mesenchymal stem cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 105310794 A (LI, Guicai) 10 February 2016 (2016-02-10) description, paragraphs 3 and 6-19	1-16
Y	KR 20180052163 A (DANKOOK UNIV CHEONAN CAMPUS INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 18 May 2018 (2018-05-18) abstract, and description, pages 1-2	1-16
Y	CN 106730034 A (JIANGSU UNIVERSITY) 31 May 2017 (2017-05-31) description, paragraphs 3 and 8	1-16
A	CN 104056306 A (NANJING NORMAL UNIVERSITY) 24 September 2014 (2014-09-24) entire document	1-16
A	CN 1590537 A (COLLEGE OF ORAL CAVITY MEDICINE, NO.4 UNIV. OF MILITARY MEDICINE, PLA) 09 March 2005 (2005-03-09) entire document	1-16
A	EP 2349364 B1 (MIMEDX GROUP INC) 12 April 2017 (2017-04-12) entire document	1-16
A	EP 1201256 A2 (INST TEXTIL & FASERFORSCHUNG) 02 May 2002 (2002-05-02) entire document	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 May 2020

Date of mailing of the international search report

22 May 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/103649

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013103423 A2 (FIBRALIGN CORP et al.) 11 July 2013 (2013-07-11) entire document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/103649

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105310794	A	10 February 2016	CN	105310794	B	25 October 2019
KR	20180052163	A	18 May 2018	KR	102002206	B1	02 October 2019
CN	106730034	A	31 May 2017	None			
CN	104056306	A	24 September 2014	CN	104056306	B	07 December 2016
CN	1590537	A	09 March 2005	None			
EP	2349364	B1	12 April 2017	EP	2575911	B1	06 March 2019
				US	9801978	B2	31 October 2017
				EP	2349363	B1	05 December 2018
				WO	2010042207	A3	08 July 2010
				US	2018177921	A1	28 June 2018
				CA	2806396	A1	15 December 2011
				US	9125759	B2	08 September 2015
				US	2016022874	A1	28 January 2016
				US	2015283305	A1	08 October 2015
				US	8367148	B2	05 February 2013
				WO	2010042207	A2	15 April 2010
				US	10238773	B2	26 March 2019
				WO	2010042205	A3	22 July 2010
				EP	2575911	A4	10 February 2016
				WO	2011156319	A2	15 December 2011
				WO	2010042205	A2	15 April 2010
				WO	2011156319	A3	12 April 2012
				EP	2575911	A2	10 April 2013
				CA	2740008	C	31 January 2017
				CA	2976265	A1	15 April 2010
				EP	2349363	A2	03 August 2011
				US	2010094404	A1	15 April 2010
				US	9179976	B2	10 November 2015
				US	2011282448	A1	17 November 2011
				US	9078775	B2	14 July 2015
				US	2013131781	A1	23 May 2013
				EP	2349364	A2	03 August 2011
				CA	2740008	A1	15 April 2010
				CA	2740009	A1	15 April 2010
				EP	2349363	A4	06 November 2013
				US	2010094318	A1	15 April 2010
				CA	2976265	C	19 March 2019
				EP	2349364	A4	30 October 2013
				CA	2806396	C	08 January 2019
				CA	2740009	C	26 September 2017
EP	1201256	A2	02 May 2002	PT	1201256	E	29 December 2006
				US	2002086047	A1	04 July 2002
				DE	50111082	D1	09 November 2006
				DE	10053611	A1	02 May 2002
				EP	1201256	A3	05 November 2003
				ES	2273771	T3	16 May 2007
				AT	340596	T	15 October 2006
				US	7198799	B2	03 April 2007
				US	2006018947	A1	26 January 2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/103649

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)		
						EP	1201256	B1	27 September 2006		
						DK	1201256	T3	05 February 2007		
WO	2013103423	A2	11 July 2013	US	10238769	B2	26 March 2019				
				WO	2013103423	A3	12 September 2013				
				US	2014242347	A1	28 August 2014				

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/103649

A. 主题的分类

A61L 27/38(2006.01)i; A61L 27/18(2006.01)i; A61L 27/20(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61L, C12N5

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI; SIPOABS; CNABS; CNTXT; CNKI: 神经导管, 神经移植, 表面, 条纹, 图案, 凸起, 凹槽, 外胚间充质干细胞, EMSCs, nerve, conduit, conduct, tube, implant+, transplant+, surface, external, pattern, stripe, band, line, groove, recess, fillister, ectodermal mesenchymal stem cell

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 105310794 A (李贵才) 2016年 2月 10日 (2016 - 02 - 10) 说明书第3和6-19段	1-16
Y	KR 20180052163 A (DANKOOK UNIV CHEONAN CAMPUS INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 2018年 5月 18日 (2018 - 05 - 18) 摘要, 说明书第1-2页	1-16
Y	CN 106730034 A (江苏大学) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 说明书第3和8段	1-16
A	CN 104056306 A (南京师范大学) 2014年 9月 24日 (2014 - 09 - 24) 全文	1-16
A	CN 1590537 A (中国人民解放军第四军医大学口腔医学院) 2005年 3月 9日 (2005 - 03 - 09) 全文	1-16
A	EP 2349364 B1 (MIMEDX GROUP INC) 2017年 4月 12日 (2017 - 04 - 12) 全文	1-16

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 5月 9日

国际检索报告邮寄日期

2020年 5月 22日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

杨金辉

电话号码 62084764

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	EP 1201256 A2 (INST TEXTIL & FASERFORSCHUNG) 2002年 5月 2日 (2002 - 05 - 02) 全文	1-16
A	W0 2013103423 A2 (FIBRALIGN CORP等) 2013年 7月 11日 (2013 - 07 - 11) 全文	1-16

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/103649

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)
CN	105310794	A	2016年 2月 10日	CN	105310794 B	2019年 10月 25日
KR	20180052163	A	2018年 5月 18日	KR	102002206 B1	2019年 10月 2日
CN	106730034	A	2017年 5月 31日	无		
CN	104056306	A	2014年 9月 24日	CN	104056306 B	2016年 12月 7日
CN	1590537	A	2005年 3月 9日	无		
EP	2349364	B1	2017年 4月 12日	EP	2575911 B1	2019年 3月 6日
				US	9801978 B2	2017年 10月 31日
				EP	2349363 B1	2018年 12月 5日
				WO	2010042207 A3	2010年 7月 8日
				US	2018177921 A1	2018年 6月 28日
				CA	2806396 A1	2011年 12月 15日
				US	9125759 B2	2015年 9月 8日
				US	2016022874 A1	2016年 1月 28日
				US	2015283305 A1	2015年 10月 8日
				US	8367148 B2	2013年 2月 5日
				WO	2010042207 A2	2010年 4月 15日
				US	10238773 B2	2019年 3月 26日
				WO	2010042205 A3	2010年 7月 22日
				EP	2575911 A4	2016年 2月 10日
				WO	2011156319 A2	2011年 12月 15日
				WO	2010042205 A2	2010年 4月 15日
				WO	2011156319 A3	2012年 4月 12日
				EP	2575911 A2	2013年 4月 10日
				CA	2740008 C	2017年 1月 31日
				CA	2976265 A1	2010年 4月 15日
				EP	2349363 A2	2011年 8月 3日
				US	2010094404 A1	2010年 4月 15日
				US	9179976 B2	2015年 11月 10日
				US	2011282448 A1	2011年 11月 17日
				US	9078775 B2	2015年 7月 14日
				US	2013131781 A1	2013年 5月 23日
				EP	2349364 A2	2011年 8月 3日
				CA	2740008 A1	2010年 4月 15日
				CA	2740009 A1	2010年 4月 15日
				EP	2349363 A4	2013年 11月 6日
				US	2010094318 A1	2010年 4月 15日
				CA	2976265 C	2019年 3月 19日
				EP	2349364 A4	2013年 10月 30日
				CA	2806396 C	2019年 1月 8日
				CA	2740009 C	2017年 9月 26日
EP	1201256	A2	2002年 5月 2日	PT	1201256 E	2006年 12月 29日
				US	2002086047 A1	2002年 7月 4日
				DE	50111082 D1	2006年 11月 9日
				DE	10053611 A1	2002年 5月 2日
				EP	1201256 A3	2003年 11月 5日
				ES	2273771 T3	2007年 5月 16日
				AT	340596 T	2006年 10月 15日
				US	7198799 B2	2007年 4月 3日
				US	2006018947 A1	2006年 1月 26日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/103649

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
W0	2013103423	A2	2013年 7月 11日	EP	1201256	B1		2006年 9月 27日	
				DK	1201256	T3		2007年 2月 5日	
				US	10238769	B2		2019年 3月 26日	
				W0	2013103423	A3		2013年 9月 12日	
				US	2014242347	A1		2014年 8月 28日	