



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102895702 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201210447616. 4

(22) 申请日 2012. 11. 09

(71) 申请人 四川大学华西医院

地址 610041 四川省成都市武侯区国学巷
37 号

(72) 发明人 程南生 蒋霞 张杰 熊先泽
林圯昕 李富宇 许瑞华 陆燕蓉
程惊秋

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务
所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡 张娟

(51) Int. Cl.

A61L 27/34(2006. 01)

A61L 27/36(2006. 01)

A61F 2/04(2013. 01)

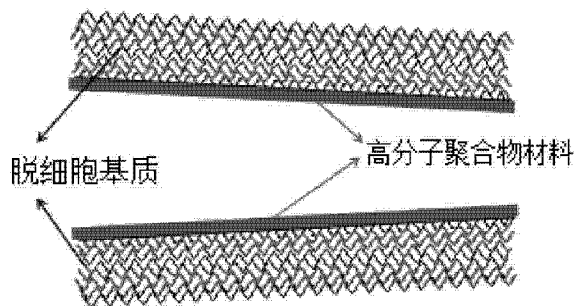
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种复合人工胆管及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种复合人工胆管,它是内外表面涂覆有可降解高分子聚合物材料的管状脱细胞基质,其中,脱细胞基质内表面上每平方厘米均匀分布 2~20mg 可降解高分子聚合物材料,外表面上每平方厘米均匀分布 0~20mg 可降解高分子聚合物材料。本发明人工胆管免疫原性低,体内修复效果好,具有良好的临床应用前景。



1. 一种复合人工胆管,其特征在于:它是内外表面涂覆有可降解高分子聚合物材料的管状脱细胞基质,其中,脱细胞基质内表面上每平方厘米均匀分布 $2\sim 20\text{mg}$ 可降解高分子聚合物材料,外表面上每平方厘米均匀分布 $0\sim 20\text{mg}$ 可降解高分子聚合物材料。

2. 根据权利要求1所述的人工胆管,其特征在于:脱细胞基质外表面上每平方厘米均匀分布 $2\sim 20\text{mg}$ 可降解高分子聚合物材料。

3. 根据权利要求1或者2所述的人工胆管,其特征在于:所述人工胆管为圆柱形,直径为 $4\sim 13\text{mm}$;或者为圆台形,小底面直径为 $4\sim 13\text{mm}$,大底面直径最多比小底面直径大 2mm 。

4. 根据权利要求1~3任意一项所述的人工胆管,其特征在于:所述人工胆管长 $10\sim 150\text{mm}$,管壁厚度为 $0.5\sim 2\text{mm}$ 。

5. 根据权利要求1所述的人工胆管,其特征在于:所述可降解高分子聚合物材料为聚氨酯或者聚乙醇酸。

6. 根据权利要求5所述的人工胆管,其特征在于:所述聚氨酯的分子量为 $2\sim 5$ 万 g/mol ,所述聚乙醇酸的分子量为 $3\sim 5$ 万 g/mol 。

7. 一种制备权利要求1~6任意一项所述人工胆管的方法,其特征在于:它包括如下步骤:

(1) 按照权利要求1或者2所述配比取管状脱细胞基质和可降解高分子聚合物材料;

(2) 将管状脱细胞基质,套入不沾模具上,冷冻干燥;

所述不沾磨具为圆柱形,直径与脱细胞基质直径相同;或者为圆台形,小底面直径与脱细胞基质直径相同,大底面直径最多比小底面直径大 2mm ;

(3) 取可降解高分子聚合物材料,制成浓度为 $5\sim 20\text{wt}\%$ 的乳液,涂覆步骤(2)处理后的管状脱细胞基质, $30\sim 37^\circ\text{C}$ 干燥,灭菌,即可。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:步骤(1)所述可降解高分子聚合物材料为聚氨酯或者聚乙醇酸。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述聚氨酯的分子量为 $2\sim 5$ 万 g/mol ,所述聚乙醇酸的分子量为 $3\sim 5$ 万 g/mol 。

10. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:步骤(2)所述不沾模具采用四氟乙烯材料制备而成。

11. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述步骤(3)中,乳液的浓度为 $15\text{wt}\%$ 。

12. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述步骤(3)中,干燥时的温度为 37°C 。

一种复合人工胆管及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种复合人工胆管及其制备方法。

背景技术

[0002] 肝外胆管是胆汁下行的唯一通道,在临床上,胆管肿瘤、胆管损伤、胆管先天畸形等疾病以及肝脏移植治疗中,通常采用胆肠吻合手术。该手术能疏通胆道,但手术改变了胆道的正常生理途径,会使 Oddi 括约肌功能丧失,术后易发生逆行感染、吻合口狭窄等并发症。因此,可用于临床治疗的人工胆管的开发和研究具有重要的现实意义。

[0003] 目前,用于制作人工胆管的材料种类甚多,根据材料的降解性,可分为非降解性材料和可降解性材料两大类。

[0004] 较为常见的非降解材料均为人工合成的无生物活性的材料,有硅橡胶、聚氨酯、氟橡胶、聚四氟乙烯等。申请号:200810033513.7,发明名称:“插入式内外壁双重结构聚四氟乙烯人工胆管及其制备”的专利申请公开了一种插入式外壁双重结构聚四氟乙烯人工胆管的制备方法,该人工胆管采用两层高分子材料复合而成,内层为聚四氟乙烯软管,外层为化学纤维以针织工艺编织而成。申请号:200710170515.6,发明名称:“一种聚四氟乙烯/氟橡胶复合人工胆管及其制备方法”的专利申请公开了一种人工胆管,该人工胆管是一种复合柔性管状物,由内向外依次为聚四氟乙烯薄膜内胆基层,萘-钠-四氢呋喃溶液处理层和氟橡胶浇铸层。非降解材料不可降解且力学性能与正常组织有较大差异,无法支持细胞生长和组织重建,只能作为短期的胆管替代物使用,不能长时间用于体内。

[0005] 生物可降解材料可在组织修复的同时降解,生成无生物毒性的小分子物质,并随细胞代谢排出体外,为人工胆管的研发开辟了一条新的途径。常见的降解材料有人工合成的高分子聚合物材料,如,聚己内酯,也有天然材料,如甲壳素、壳聚糖和天然脱细胞基质。人工合成的可降解材料具有良好的降解性,但无法支持细胞生长和组织重建,体内修复效果不够好。天然脱细胞基质材料具有良好的可降解性和生物相容性,并含有可促进细胞生长和组织修复的细胞因子,其在组织工程中应用的研究受到了广泛的关注。

[0006] Rosen 等人,“Rosen M, Ponsky J, Petras R, et al. Novel bile duct repair for bleeding biliary anastomatic varices: case report and literature review”, *JGastrointest Surg*, 2005, 9(2):832】应用常用的脱细胞基质材料-小肠粘膜下层(Small intestinal submucosa, SIS)修复胆道获得成功。SIS 植入 5 个月后完全降解,为再生的胆管组织所取代,再生的胆管组织周围纤维组织增生反应极轻微。但是 Gomez 等,“Gomez NA, Zapafier JA, Vargas PE. Re: “Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration”, *Surgery*, 2004, 135(4):460】对其研究结果提出质疑,认为 SIS 用于修复胆管缺损,会产生胆汁渗漏引起组织粘连,强烈的免疫反应引发的炎症,以及其他复杂的问题。根据申请人研究,单独使用胆管脱细胞基质修复胆道缺损,也会产生胆汁渗漏引起组织粘连,出现胆道狭窄,且有强烈的免疫反应引发的炎症,最终引起实验动物死亡。

发明内容

[0007] 为了解决上述问题,本发明提供了一种由人工合成材料和天然材料形成的新的复合人工胆管及其制备方法。

[0008] 本发明复合人工胆管,它是内外表面涂覆有可降解高分子聚合物材料的管状脱细胞基质,其中,脱细胞基质内表面上每平方厘米均匀分布 2~20mg 可降解高分子聚合物材料,外表面上每平方厘米均匀分布 0~20mg 可降解高分子聚合物材料。

[0009] 所述管状脱细胞基质,是指形状为管状的脱细胞基质,如猪,猴等哺乳动物的胆管、尿道或血管的脱细胞基质。

[0010] 优选地,脱细胞基质外表面上每平方厘米均匀分布 2~20mg 可降解高分子聚合物材料。

[0011] 其中,所述人工胆管各处的直径相同,为 4~13mm。

[0012] 优选地,所述人工胆管为圆柱形,直径为 4~13mm;或者为圆台形,小底面直径为 4~13mm,大底面直径最多比小底面直径大 2mm。

[0013] 其中,所述人工胆管长 10~150mm,管壁厚度为 0.5~2mm。

[0014] 优选地,所述可降解高分子聚合物材料为聚氨酯或者聚乙醇酸。

[0015] 优选地,所述聚氨酯的分子量为 2~5 万 g/mol,所述聚乙醇酸的分子量为 3~5 万 g/mol。

[0016] 本发明聚氨酯是可降解性聚氨酯,可以按照专利号:ZL 200610022715.2,发明名称:“水性无毒可降解聚氨酯弹性体的制备方法”的专利记载的方法制备。

[0017] 本发明人工胆管的制备方法,它包括如下步骤:

[0018] (1) 取前述配比的管状脱细胞基质和可降解高分子聚合物材料;

[0019] (2) 将管状脱细胞基质,套入不沾模具上,冷冻干燥;

[0020] 所述不沾模具为圆柱形,直径与脱细胞基质直径相同;或者为圆台形,小底面直径与脱细胞基质直径相同,大底面直径最多比小底面直径大 2mm;

[0021] (3) 取可降解高分子聚合物材料,制成浓度为 5~20wt% 的乳液,涂覆步骤(2)处理后的管状脱细胞基质,30~37°C 干燥,灭菌,即可。

[0022] 不沾模具,是指与脱细胞基质不粘连的模具。

[0023] 其中,步骤(1)所述可降解高分子聚合物材料为聚氨酯或者聚乙醇酸。

[0024] 其中,所述聚氨酯的分子量为 2-5 万 g/mol,所述聚乙醇酸的分子量为 3-5 万 g/mol。

[0025] 其中,步骤(2)所述不沾模具采用四氟乙烯材料制备而成。

[0026] 其中,所述步骤(3)中,聚氨酯溶液的浓度为 15wt%。

[0027] 其中,所述步骤(3)中,干燥时的温度为 37°C。

[0028] 本发明复合人工胆管的免疫原性低,体内修复效果优良,可克服传统人工胆管的缺陷,具有良好的临床应用前景。

[0029] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0030] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说

明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

- [0031] 图 1 复合人工胆管支架横截面示意图；
- [0032] 图 2 复合人工胆管支架纵截面示意图；
- [0033] 图 3 在 45° C 烘箱烘烤 6 小时后复合人工胆管的结构；
- [0034] 图 4 在 20° C 烘箱烘烤 6 小时后复合人工胆管的结构；
- [0035] 图 5 在 37° C 烘箱烘烤 6 小时后本发明复合人工胆管的结构；
- [0036] 图 6 复合人工胆管支架肌肉埋置试验中的免疫原性检测。A 为脱细胞基质支架；B 为聚氨酯；C 为本发明人工胆管；
- [0037] 图 7 对照组修复胆道缺损的解剖图；
- [0038] 图 8 本发明复合人工胆管移植入成年猪体内试验结果。(A) 正常胆管组织 HE 染色；(B) 复合人工胆管修复 90 天后 HE 染色。

具体实施方式

- [0039] 实验材料：
- [0040] 聚氨酯，按照专利号：ZL 200610022715. 2，发明名称：“水性无毒可降解聚氨酯弹性体的制备方法”的专利记载的方法制备。
- [0041] 聚乙醇酸，购自 Aldrich。
- [0042] 实施例 1 制备本发明复合人工胆管
- [0043] 1、管状脱细胞基质的制备：
- [0044] 取一根成年猪胆管，剔除胆管管腔组织周围的脂肪和结缔组织，剪切成长度为 30mm 长的管道，直径 4mm，厚 1mm；
- [0045] 管道在 PBS 液中搅拌清洗 2 小时，在 1%SDS 溶液中浸泡搅拌 24 小时；
- [0046] 取出 PBS 清洗 2 小时后在 1%Triton-100 溶液中浸泡搅拌 24 小时；
- [0047] 脱细胞后的支架在 PBS 中清洗 2 小时，固定在大端直径为 6mm、小端直径为 4mm 的聚四氟乙烯棒上，冷冻干燥后得到干燥的脱细胞基质支架。
- [0048] 2、在干燥的脱细胞支架内表面涂覆浓度为 5wt% 的聚氨酯水乳液，控制管壁厚度为 0.5mm，30°C 干燥 72h，密封包装， γ 射线灭菌，即得到本发明复合人工胆管，可用于修复直径较小的病变胆管。
- [0049] 实施例 2 制备本发明复合人工胆管
- [0050] 1、管状脱细胞基质的制备：
- [0051] 取一根成年猪胆管，剔除胆管管腔组织周围的脂肪和结缔组织，剪切成长度为 10mm 长的管道，直径 6mm，厚 2mm；
- [0052] 管道在 PBS 液中搅拌清洗 2 小时，在 1%SDS 溶液中浸泡搅拌 24 小时；
- [0053] 取出 PBS 清洗 2 小时后在 1%Triton-100 溶液中浸泡搅拌 24 小时；
- [0054] 脱细胞后的支架在 PBS 中清洗 2 小时，固定在大端直径为 8mm、小端直径为 6mm 的聚四氟乙烯棒上，冷冻干燥后得到干燥的脱细胞基质支架。

[0055] 2、在干燥的脱细胞支架内表面涂覆浓度为 15wt% 的聚氨酯水乳液,控制管壁厚度为 1mm,37℃干燥 24h,密封包装,γ 射线灭菌,即得到本发明复合人工胆管,可用于替代中等直径的病变胆管。

[0056] 实施例 3 制备本发明复合人工胆管

[0057] 1、管状脱细胞基质的制备:

[0058] 取一根成年猪胆管,剔除胆管管腔组织周围的脂肪和结缔组织,剪切成长度为 10mm 长的管道,直径 6mm,厚 2mm;

[0059] 管道在 PBS 液中搅拌清洗 2 小时,在 1%SDS 溶液中浸泡搅拌 24 小时;

[0060] 取出 PBS 清洗 2 小时后在 1%Triton-100 溶液中浸泡搅拌 24 小时;

[0061] 脱细胞后的支架在 PBS 中清洗 2 小时,固定在直径为 6mm 的圆柱形聚四氟乙烯棒上,冷冻干燥后得到干燥的脱细胞基质支架。

[0062] 2、在干燥的脱细胞支架内表面涂覆浓度为 15wt% 的聚氨酯水乳液,控制管壁厚度为 1mm,37℃干燥 24h,密封包装,γ 射线灭菌,即得到本发明复合人工胆管,可用于替代中等直径的病变胆管。

[0063] 实施例 4 制备本发明复合人工胆管

[0064] 1、管状脱细胞基质的制备:

[0065] 取一根成年猪胆管,剔除胆管管腔组织周围的脂肪和结缔组织,剪切成长度为 150 毫米长的管道,直径 13mm,厚 2mm;

[0066] 管道在 PBS 液中搅拌清洗 2 小时,在 1%SDS 溶液中浸泡搅拌 24 小时;

[0067] 取出 PBS 清洗 2 小时后在 1%Triton-100 溶液中浸泡搅拌 24 小时;

[0068] 脱细胞后的支架在 PBS 中清洗 2 小时,固定在大端直径为 15mm、小端直径为 13mm 的聚四氟乙烯棒上,冷冻干燥后得到干燥的脱细胞基质支架。

[0069] 2、在干燥的脱细胞支架内表面涂覆浓度为 20wt% 的聚乙醇酸水乳液,控制管壁厚度为 2mm,35℃干燥 48h,密封包装,γ 射线灭菌,即得到本发明复合人工胆管,可用于替代较大直径的病变胆管。

[0070] 实施例 5 制备本发明复合人工胆管

[0071] 1、管状脱细胞基质的制备:

[0072] 取一根成年猪胆管,剔除胆管管腔组织周围的脂肪和结缔组织,剪切成长度为 100 毫米长的管道,直径 8mm,厚 2mm;

[0073] 管道在 PBS 液中搅拌清洗 2 小时,在 1%SDS 溶液中浸泡搅拌 24 小时;

[0074] 取出 PBS 清洗 2 小时后在 1%Triton-100 溶液中浸泡搅拌 24 小时;

[0075] 脱细胞后的支架在 PBS 中清洗 2 小时,固定在大端直径为 10mm、小端直径为 8mm 的聚四氟乙烯棒上,冷冻干燥后得到干燥的脱细胞基质支架。

[0076] 2、在干燥的脱细胞支架内表面和外表面涂覆浓度为 12wt% 的聚氨酯水乳液,控制管壁厚度为 2mm,37℃干燥 24h,密封包装,γ 射线灭菌,即得到本发明复合人工胆管,可用于替代中等直径的病变胆管。

[0077] 实施例 6 温度筛选实验

[0078] 1、实验方法

[0079] (1) 管状脱细胞基质的制备:

[0080] 取一根成年猪胆管,剔除胆管管腔组织周围的脂肪和结缔组织,剪切成长度为 100 毫米长的管道,直径 6mm,厚 1.5mm;

[0081] 管道在 PBS 液中搅拌清洗 2 小时,在 1%SDS 溶液中浸泡搅拌 24 小时;

[0082] 取出 PBS 清洗 2 小时后在 1%Triton-100 溶液中浸泡搅拌 24 小时;

[0083] 脱细胞后的支架在 PBS 中清洗 2 小时,固定在大端直径为 8mm、小端直径为 6mm 的聚四氟乙烯棒上,冷冻干燥后得到干燥的脱细胞基质支架。

[0084] (2) 在干燥的脱细胞支架内表面涂覆浓度为 12wt% 的聚氨酯水乳液,控制管壁厚度为 1mm,分别在 20℃、37℃和 45℃干燥 48h,密封包装,γ 射线灭菌,即得到复合人工胆管。

[0085] 2、实验结果

[0086] 结果如图 3~图 5 所示,温度为 45℃时,温度过高,支架结构被破坏;温度为 20℃时,温度过低,局部较厚,聚氨酯在多孔支架表面涂层不均匀;温度为 37℃时,温度合适,聚氨酯在管腔内壁形成均匀涂层,且支架结构完整。

[0087] 实验说明,温度过高或者过低均不能获得涂覆了均匀可降解高分子聚合物材料的脱细胞基质,多次实验发现,只有在温度 30~37℃的范围内,才可以获得本发明人工胆管——涂覆了均匀可降解高分子聚合物材料的脱细胞基质。

[0088] 以下以实验例的方式说明本发明的有益效果:

[0089] 实验例 1 本发明复合人工胆管的免疫原性检测

[0090] 1、实验方法

[0091] 将本发明实施例 2 制备的直径 8mm,厚 2mm 脱细胞基质支架和人工胆管,以及聚氨酯支架材料包埋于体重约 2.5kg 的成年兔背部脊柱两侧背阔肌内。手术开始前,每只实验动物注射 40 万单位青霉素,动物背部手术部位备皮后腹腔注射 3ml/kg 的水合氯醛进行麻醉。在动物背部切开 8-10cm 纵切口,在脊柱两侧切开肌肉包膜后露出背部肌肉,在包埋材料位置剪开 1cm 小口,将支架材料平整的置入其中。然后,5-0 可吸收缝线间断缝合,待动物苏醒后置入饲养箱中饲养,并密切观察动物状态。材料植入后第一、二、三天给每只兔子注射 40 万单位青霉素。于术后第 7 天,对实验动物腹腔注射戊巴比妥钠注射液(100mg/kg)处死。解剖取出移植标本及周边组织,石蜡包埋切片进行 HE 染色,观察移植标本与兔正常组织接触部位炎症细胞聚集状况。

[0092] 2、实验结果

[0093] 实验结果如图 6 所示,脱细胞基质材料与肌肉组织接触部位有大量炎症细胞聚集;聚氨酯支架材料上只能观察到极少量的炎症细胞;本发明复合人工胆管支架上也有炎症细胞的聚集,但细胞数量较少。

[0094] 实验结果说明本发明人工胆管的免疫原性低,与聚氨酯多孔支架相当,显著低于脱细胞基质。

[0095] 实验例 2 本发明复合人工胆管体内修复实验

[0096] 1、实验方法

[0097] 选用本地封闭群的内江猪,术前 2.5% 戊巴比妥钠(1ml/kg)静脉麻醉。游离胆总管,距十二指肠上缘 1cm 左右处切取约 1cm 胆总管,置入本发明实施例 2 制备的复合人工胆管,5-0 可吸收缝线间断缝合,针距 1.5mm,边距 1.5mm。检查吻合口有无胆汁渗漏,术中输注 0.9% 生理盐水 500ml 加庆大霉素 16 万 U。术后当天动物禁食,静脉补充 10% 葡萄糖液体和

5%糖盐水,术后第二天开始进食流汁或半流饮食,并逐渐过渡到正常饮食。

[0098] 移植后于 90 天对实验动物实施腹腔内戊巴比妥钠麻醉,解剖取出移植标本及周边组织,用 10% 甲醛固定,进行 HE 染色。

[0099] 对照组:游离胆总管,距十二指肠上缘 1cm 左右处切取约 1cm 胆总管,置入已消毒的实施例 2 制备的脱细胞基质支架,5-0 可吸收缝线间断缝合,针距 1.5mm,边距 1.5mm。检查吻合口有无胆汁渗漏,术中输注 0.9% 生理盐水 500ml 加庆大霉素 16 万 U。术后当天动物禁食,静脉补充 10% 葡萄糖液体和 5% 糖盐水,术后第二天开始进食流汁或半流饮食,并逐渐过渡到正常饮食。

[0100] 2、实验结果

[0101] 如图 7 所示,对照组出现胆汁渗漏,造成周围组织粘连,出现胆道狭窄,7 天后死亡。

[0102] 实验组动物逐步恢复正常,实验后未发生胆漏,未出现胆道狭窄,损伤处胆管逐步修复。移植后于 90 天 HE 染色的实验结果如图 8 所示,与正常胆管组织对照可知,本发明人工胆管修复胆道缺损以后,人工胆管支架已经发生降解,胆管细胞外基质已经形成,修复仍在继续。

[0103] 实验结果说明,本发明人工胆管修复胆管缺损的效果优良,不会出现胆汁渗漏导致的组织粘连以及胆道狭窄等副作用。

[0104] 本发明复合人工胆管免疫原性低,用于胆道缺损不会出现胆汁渗漏和胆道狭窄等副作用,体内修复胆道缺损的效果优良,临床应用前景优良。

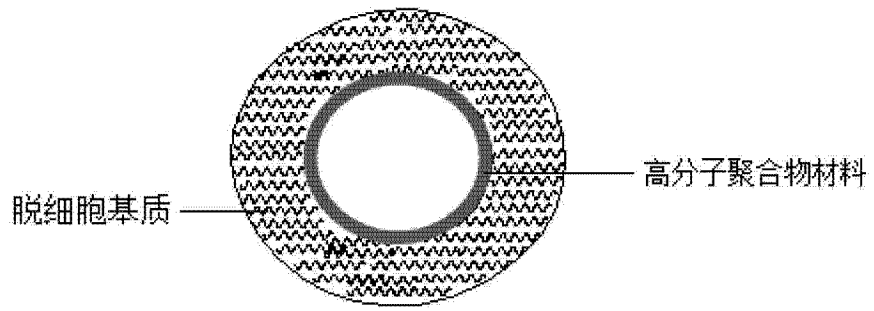


图 1

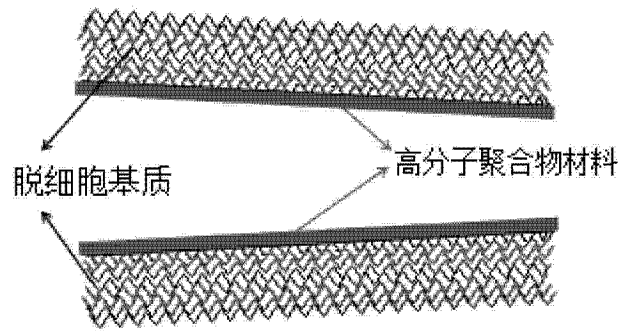


图 2

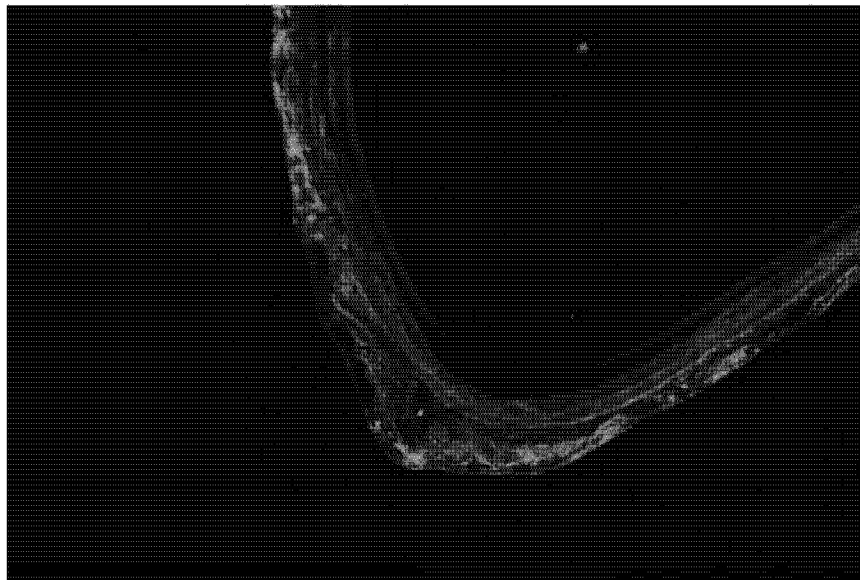


图 3

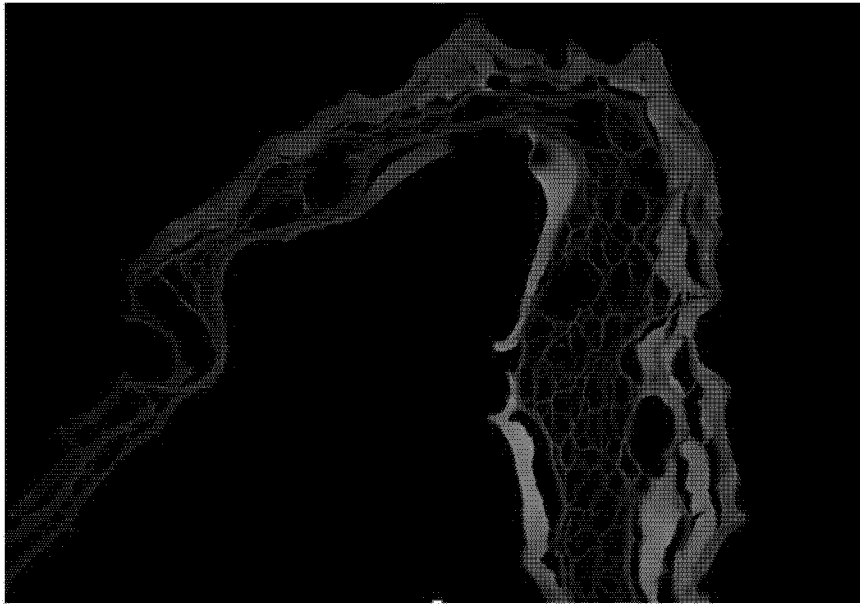


图 4

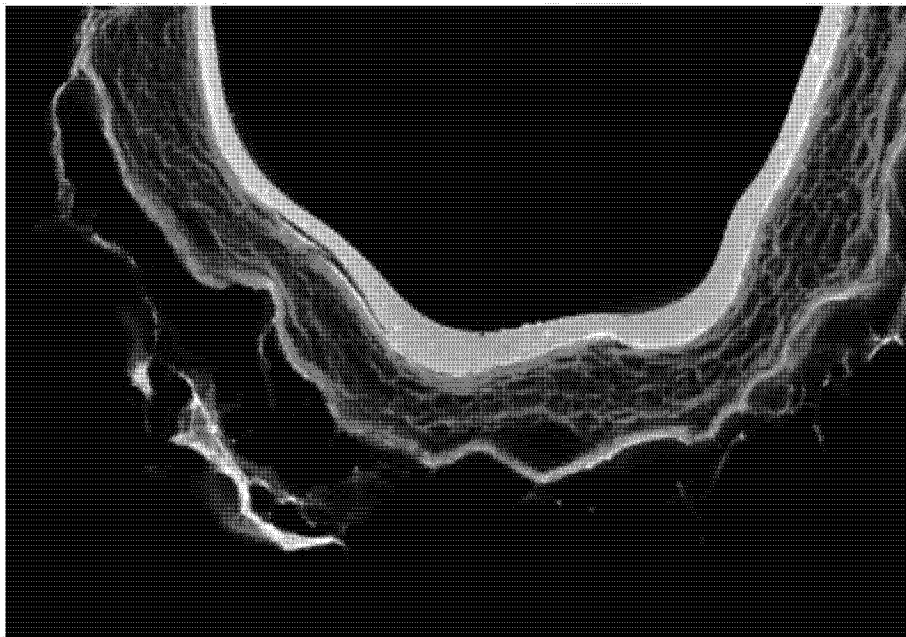


图 5

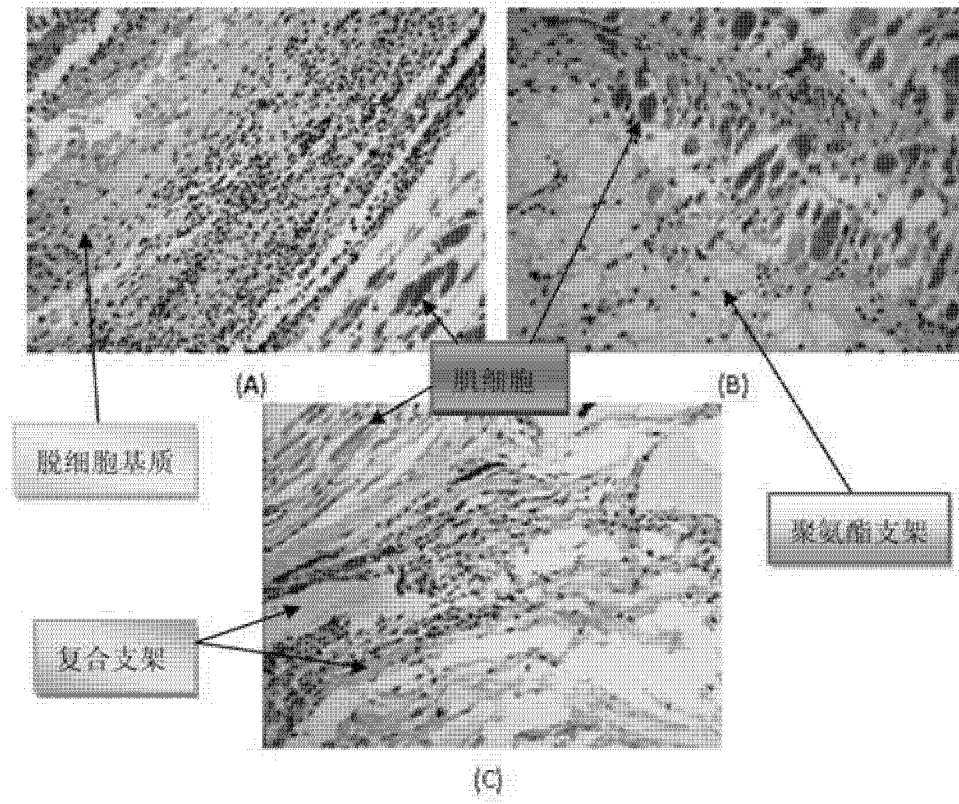


图 6

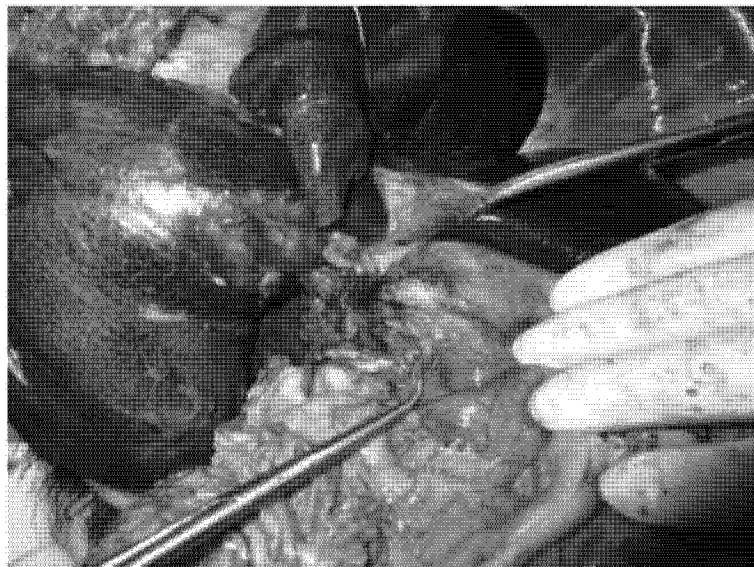


图 7

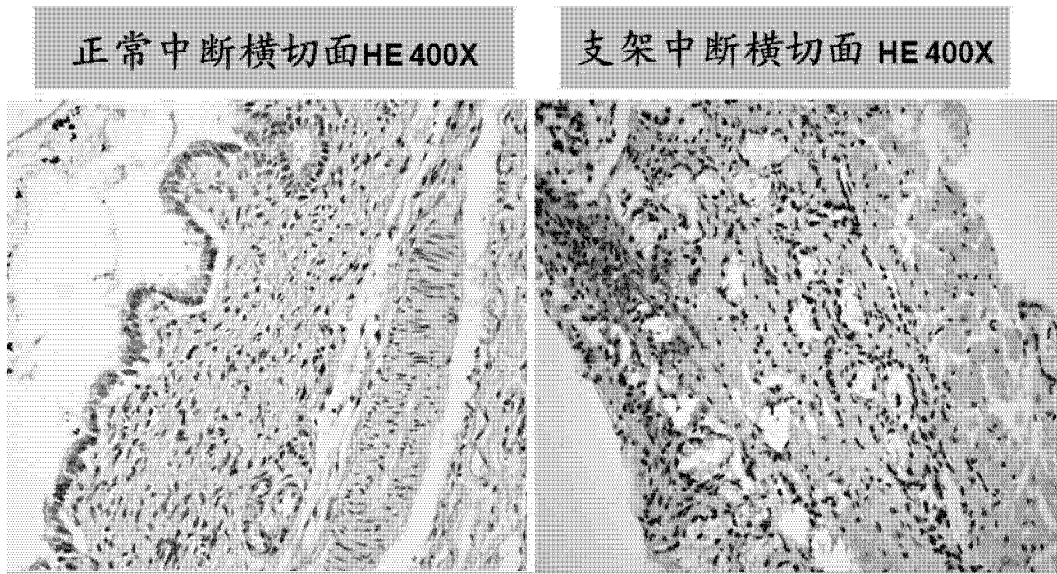


图 8