



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112972760 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 25

(21) 申请号 202110198400.8

(22) 申请日 2021.02.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112972760 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(73) 专利权人 广州医科大学附属口腔医院(广
州医科大学羊城医院)

地址 510000 广东省广州市荔湾区黄沙大
道59号

(72) 发明人 江千舟 涂欣冉 郭吕华 张阳
郭黎洋 谭国忠 陈荣丰

(74) 专利代理机构 广州圣理华知识产权代理有
限公司 44302
专利代理师 董觉非 胡小英

(51) Int. Cl.

A61L 27/10 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

B33Y 70/00 (2020.01)

B33Y 80/00 (2015.01)

B33Y 10/00 (2015.01)

审查员 周丹

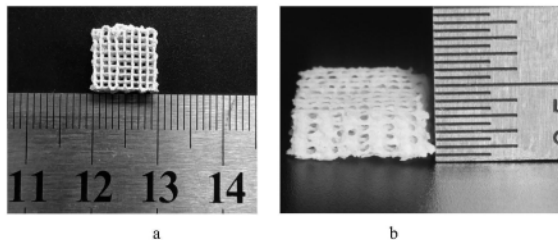
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损
修复支架及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种负载内皮细胞外基质的
3D打印骨缺损修复支架,所述支架的制备原料包
括明胶、海藻酸钠和58S生物玻璃,支架的孔径为
0.5~0.7mm,支架的孔隙率为60~75%;所述支
架负载内皮细胞外基质的制备工艺如下:S1.将
3D打印制备好的支架进行消毒处理;S2.消毒后
的支架接种RAOEC细胞,每3d进行换液,共培养细
胞14d;S3.取出支架,脱细胞处理,冻干即得。本
发明的支架由明胶,海藻酸钠,58S生物玻璃构
成,采用3d打印技术制备,操作简单,支架的结构
和架构可控;且发明人研究发现负载内皮细胞的
细胞外基质可促进成骨及成血管分化,支架负载
上述细胞外基质能够促进缺损部位骨组织及血
管组织形成,明显提高骨缺损修复的效率。



1. 一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,其特征在于,包括支架和负载在支架上的内皮细胞外基质,所述支架的制备原料包括明胶、海藻酸钠和58S生物玻璃,支架的孔径为0.5~0.7mm,支架的孔隙率为60~75%;

所述支架负载内皮细胞外基质的制备工艺如下:

S1. 将3D打印制备好的支架进行消毒处理;

S2. 消毒后的支架接种RAOEC细胞,每3d进行换液,共培养细胞14d;

支架接种RAOEC细胞的具体步骤如下:将RAOEC细胞悬液以 1×10^5 /孔接种于每个消毒后的支架上,细胞密度为 5×10^4 /ml;将支架置于12孔板的孔,每孔滴注2ml细胞悬液;

S3. 取出支架,通过脱细胞处理液对其进行脱细胞处理,冻干即得;所述脱细胞处理液包括如下成分:体积百分浓度0.1%的Triton-100X和20mM氨水;

脱细胞处理的具体步骤如下:使用脱细胞处理液对支架浸泡30min,随后依次用PBS清洗3次,DNAase处理5min,PBS清洗3次后放入4℃冰箱保存。

2. 根据权利要求1所述负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,其特征在于,所述支架的制备包括如下步骤:

S1. 将明胶、海藻酸钠和58S生物玻璃溶于蒸馏水中获得溶液,其中,溶液中各成分的质量/体积的浓度为明胶15%、海藻酸钠6%、58S生物玻璃10.5%;

S2. 将溶液搅拌均匀,获得3D打印浆料,并通过3D打印制备支架;3D打印操作中,采用0.41mm孔径的针头,在0.38Mpa气压、28℃条件下,按照10mm/s的打印速度进行打印;

S3. 打印完成获得支架半成品,支架半成品先用氯化钙溶液进行物理交联,后浸泡于戊二醛溶液中进行化学交联;最后清洗,冻干即得。

3. 根据权利要求1所述负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,其特征在于,S1所述消毒处理为:紫外线辐射消毒25~40min,再采用无水乙醇冲洗多次,随后用无菌PBS冲洗多次。

4. 根据权利要求1或2所述负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,其特征在于,所述58S生物玻璃的化学组成为58%SiO₂-33%CaO-9%P₂O₅,58S生物玻璃的粒径为1~3微米。

5. 根据权利要求2所述负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,其特征在于,所述氯化钙溶液的浓度为5%~8%,通过将氯化钙粉体加入蒸馏水中溶解而成。

6. 根据权利要求2所述负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,其特征在于,所述戊二醛溶液浓度为1.0%~2.0%,通过用蒸馏水对50%的戊二醛溶液进行稀释获得。

7. 根据权利要求2所述负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,其特征在于,S2中,将3D打印浆料注入3D打印料筒,除泡均化后开始打印。

8. 根据权利要求2所述负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,其特征在于,S2中,通过磁力搅拌和/或机械搅拌将溶液搅拌均匀,获得3D打印浆料。

一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于骨组织工程修复及重建的技术领域,主要涉及一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架及其制备方法。

背景技术

[0002] 随着老龄化、关节退行性病变、车祸等外伤引起的骨组织损伤的增多,骨缺损修复越来越受到重视,临床中通常采用自体骨移植、异体骨移植和人工骨移植等骨移植方法。自体骨移植是进行缺损修复的“金标准”,但自体骨来源有限,往往供不应求,异体骨移植有感染疾病的风险,而人工骨移植缺乏骨诱导活性,成骨效率差,难以形成与健康骨组织相似结构的新生组织。因此,研究具有高生物活性和能够高效促成骨的新型再生骨缺损修复材料成为近年来的难点和热点,且具有巨大的临床需求和市场前景。

[0003] 生物活性玻璃是一种重要的骨组织工程的支架材料,能在体内有效促进生物矿化,释放硅、钙离子促进干细胞成骨、成血管。明胶/海藻酸钠水凝胶是由天然高分子材料混合而成,具有良好的生物相容性、组织可吸收性、低免疫原性等优点,特别是其利于和高生物活性无机粉体结合进行3D打印成型,但其力学强度比较差。3D打印能有效构建多孔生物玻璃骨组织工程支架,精确调控孔隙率、孔径等参数,赋予其较好的生物活性,修复支架通常需要具备良好的力学性质、生物相容性、骨传导性、骨诱导性。CN201911197154.3公开了一种用于骨修复的抗菌支架的制备方法,首先,将明胶和海藻酸钠溶于超纯水中,得到明胶/海藻酸钠浆料;将58s生物活性玻璃与明胶/海藻酸钠浆料混合,搅拌均匀后放入3d打印料筒中脱泡,得到明胶/海藻酸钠/生物玻璃复合浆料;用3d打印机将浆料打印成三维多孔结构的支架,冷冻干燥处理后获得明胶/海藻酸钠/生物玻璃复合骨修复支架;将复合骨修复支架置于聚多巴胺溶液中反应一晚,反应完成后放入硝酸银溶液中;用去离子水冲洗支架,冷冻干燥后获得能够用于骨修复的抗菌支架。上述专利的抗菌支架,侧重于对支架的抗菌效果进行改善,以减少用于人体时发炎的概率,但对支架促进干细胞成骨、成血管的效果没有进行研究,因此本领域技术人员对其使用效果较难预料。

[0004] 在复合材料支架的基础上,为进一步提高支架的成骨效率,在支架上负载促生长因子或药物成为提高骨组织修复的另一有效手段。其中,生长因子因在生物体内高效的促进细胞增殖分化及功能性蛋白形成,在人工合成的复合生物支架中的应用引起了研究者们极大的兴趣。在复合支架中添加生长因子例如骨基质蛋白2(one matrix protein-2,BMP-2),可促进干细胞成骨向分化,但由于其在体内半衰期短,为长期保持有效剂量,需要在支架中大量添加,超过了安全标准剂量1.5mg/ml,因此导致了一系列不良反应,例如炎症,异位骨和肿瘤形成。因此,如何在不引起不良反应的情况下进一步提高骨组织形成效率,成为目前亟待解决的问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,由明胶,海藻酸钠,58S生物玻璃构成,其中明胶,海藻酸钠具有良好的生物相容性及生物可降解性,利于细胞的黏附与增殖,58S生物玻璃具有局部释放钙离子的功能,促进骨组织生成。且发明人研究发现负载内皮细胞的细胞外基质可促进成骨及成血管分化,支架负载上述细胞外基质能够促进缺损部位骨组织及血管组织形成,明显提高骨缺损修复的效率。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供的技术方案如下:

[0007] 一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架,包括支架和负载在支架上的内皮细胞外基质,所述支架的制备原料包括明胶、海藻酸钠和58S生物玻璃,支架的孔径为0.5~0.7mm,支架的孔隙率为60~75%;

[0008] 所述支架负载内皮细胞外基质的制备工艺如下:

[0009] S1. 将3D打印制备好的支架进行消毒处理;

[0010] S2. 消毒后的支架接种RAOEC细胞,每3d进行换液,共培养细胞14d;

[0011] S3. 取出支架,通过脱细胞处理液对其进行脱细胞处理,冻干即得;所述脱细胞处理液包括如下成分:体积百分浓度0.1%的Triton-100X和20mM氨水。

[0012] 本发明采用明胶/海藻酸钠/58S生物玻璃复合材料为支架基质,从而提高支架的成骨效率。海藻酸钠(SA)凝胶具有适合细胞营养交换的三维培养结构,并能保持因表面积大、气孔多而形成的特定形态。其具有良好的生物相容性、细胞粘附性、生物降解性和生物活性因子负载能力。明胶(Gel)作为从天然动物皮革中提取的蛋白,多年来已在食品医药工业及医疗器械中得到了广泛的应用。Gel/SA复合水凝胶的机械强度较单一组分的水凝胶有显著提高,并且能够较好地模拟细胞生长所需要的内环境。58S生物玻璃(BG)能够在支架中稳定释放钙离子,提供局部弱碱性的微环境,有利于新生骨组织的矿化结节形成。

[0013] 细胞外基质(extracellular matrix,ECM)是由细胞分泌的一系列蛋白及其他成分的总称,在细胞信号转导,调节细胞生理功能等方面起到关键的作用。目前大量体外细胞实验结果表明,ECM作为诱导细胞行使其生理功能的最理想介质,已成功用于多种组织再生。特别的,本发明经过研究发现,在上述的明胶/海藻酸钠/58S生物玻璃复合支架上负载大鼠血管内皮细胞(RAOEC)的细胞外基质,应用于骨缺损修复,其形成血管组织面积、分支数量显著提高,有效促进骨组织及血管组织形成,明显提高骨缺损修复的效率。

[0014] 本发明研究和优化了支架上负载大鼠血管内皮细胞(RAOEC)的细胞外基质的工艺参数,以获得良好的负载效果。在本发明支架负载内皮细胞外基质的制备工艺中,优选地,S1所述消毒处理为:紫外线辐射消毒25~40min,再采用无水乙醇冲洗多次,随后用无菌PBS冲洗多次。优选地,S2中,支架接种RAOEC细胞的具体步骤如下:将RAOEC细胞悬液以 1×10^5 /孔接种于每个消毒后的支架上,细胞密度为 5×10^4 /ml;将支架置于12孔板的孔,每孔滴注2ml细胞悬液。优选地,S3中,脱细胞处理的具体步骤如下:使用脱细胞处理液对支架浸泡30min,随后依次用PBS清洗3次,DNAase处理5min,PBS清洗3次后放入4℃冰箱保存。

[0015] 在本发明中,优选地,所述支架的制备包括如下步骤:

[0016] S1. 将明胶、海藻酸钠和58S生物玻璃溶于蒸馏水中获得溶液,其中,溶液中各成分的质量/体积的浓度为明胶15%、海藻酸钠6%、58S生物玻璃10.5%;

[0017] S2. 将溶液搅拌均匀,获得3D打印浆料,并通过3D打印制备支架;3D打印操作中,

采用0.41mm孔径的针头,在0.38Mpa气压、28℃条件下,按照10mm/s的打印速度进行打印;

[0018] S3. 打印完成获得支架半成品,支架半成品先用氯化钙溶液进行物理交联,后浸泡于戊二醛溶液中进行化学交联;最后清洗,冻干即得。

[0019] 上述支架通过3D打印技术制备,操作简单,支架的结构和架构可控。本发明进一步研究优化了3D打印制备过程中的参数细节,如打印用的针头、以及气压和温度,打印速度等。使打印获得的支架在结构的稳定性和力学强度上较优。优选地,S2中,将3D打印浆料注入3D打印料筒,除泡均化后开始打印。优选地,S2中,通过磁力搅拌和/或机械搅拌将溶液搅拌均匀,获得3D打印浆料。

[0020] 优选地,所述氯化钙溶液的浓度为5%~8%,通过将氯化钙粉体加入蒸馏水中溶解而成。优选地,所述戊二醛溶液浓度为1.0%~2.0%,通过用蒸馏水对50%的戊二醛溶液进行稀释获得。氯化钙溶液和戊二醛溶液的浓度选择,使支架的交联效果较好。

[0021] 在本发明中,优选地,所述58S生物玻璃的化学组成为58%SiO₂-33%CaO-9%P₂O₅,58S生物玻璃的粒径为1~3微米。上述规格的58S生物玻璃有着优异的生物性能,用于骨修复效果显著。

[0022] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0023] 1、本发明采用3d打印技术制备支架,操作简单,支架的结构和架构可控。研究优化了3D打印制备过程中的参数细节,如打印用的针头、以及气压和温度,打印速度等。使打印获得的支架在结构的稳定性和力学强度上较优。

[0024] 2、本发明经过研究发现,在明胶/海藻酸钠/58S生物玻璃复合支架上负载大鼠血管内皮细胞(RA0EC)的细胞外基质,应用于骨缺损修复,其形成血管组织面积、分支数量显著提高,有效促进骨组织及血管组织形成,明显提高骨缺损修复的效率。

[0025] 3、本发明研究和优化了明胶/海藻酸钠/58S生物玻璃支架上负载大鼠血管内皮细胞(RA0EC)的细胞外基质的制备工艺参数,获得了良好的负载效果。

[0026] 4、本发明制备工艺简单、易操作,选用的材料生物活性高,在再生医学和骨修复领域的应用前景广阔。

附图说明

[0027] 图1本发明负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架标准件的照片(a:正面照片,b:侧面照片)。

[0028] 图2 本发明负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的PCR测定相关基因表达图(a: BMP-2,b:CD31,c:RUNX2,d:OCN,e:VEGF)。

[0029] 图3 本发明负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的抗压强度测试图。

[0030] 图4 本发明负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的动物实验成骨效率图(左:本发明支架组,中:空白组,右:BI0-OSS骨粉阳性对照组)。

[0031] 图5 本发明负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的吸水性及溶胀率检测图(a:吸水性检测图,b:溶胀率检测图)。

[0032] 图6 本发明负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的体外降解检测实验图。

[0033] 图7 DAPI染色示RA0EC在支架表面的黏附、增殖图。

[0034] 图8 SEM观察负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的表面微观形貌及RA0EC

在支架上的黏附伸展情况(箭头示RAOEC)。

[0035] 图9 RAOEC接种14d后支架的表面CD31抗原呈阳性。

[0036] 图10 RAOEC接种14d后支架的表面VEGF抗原呈阳性。

[0037] 图11 RBMSC细胞在负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的的增殖活性。

具体实施方式

[0038] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合说明书附图和具体实施例,对本发明进一步详细说明,但本发明要求的保护范围并不局限于实施例。

[0039] 下述实施例所采用的原料如无特殊说明,均为市售。

[0040] 其中,采用的58S生物玻璃的化学组成为58%SiO₂-33%CaO-9%P₂O₅,58S生物玻璃的粒径为1~3微米。

[0041] 实施例1:

[0042] 一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的制备:

[0043] S1. 将明胶、海藻酸钠和58S生物玻璃溶于蒸馏水中获得溶液,其中,溶液中各成分的质量/体积的浓度为明胶15%、海藻酸钠6%、58S生物玻璃10.5%。

[0044] S2. 溶液通过磁力搅拌和机械搅拌的方式搅拌均匀,获得3D打印浆料,将3D打印浆料注入3D打印料筒,除泡均化后开始3D打印,3D打印采用0.41mm孔径的针头,在0.38Mpa气压、28℃条件下,按照10mm/s的打印速度进行打印。

[0045] S3. 打印完成获得支架半成品,支架半成品先用氯化钙溶液进行物理交联,后浸泡于戊二醛溶液中进行化学交联;最后清洗,冻干即得支架。支架的孔径为0.6mm,支架的孔隙率为68%;所述氯化钙溶液的浓度为5%,所述戊二醛溶液浓度为1.0%。

[0046] S4. 将3D打印制备好的支架进行消毒处理;紫外线辐射消毒30min,再采用无水乙醇冲洗3次,随后用无菌PBS冲洗3次。

[0047] S5. 消毒后的支架接种RAOEC细胞,将RAOEC细胞悬液以 1×10^5 /孔接种于每个消毒后的支架上,细胞密度为 5×10^4 /ml;将支架置于12孔板的孔,每孔滴注2ml细胞悬液。每3d进行换液,共培养细胞14d。

[0048] S6. 取出支架,使用脱细胞处理液对支架浸泡30min,随后依次用PBS清洗3次,DNAase处理5min,PBS清洗3次后放入4℃冰箱保存,冻干即得。脱细胞处理液成分如下:体积百分浓度0.1%的Triton-100X和20mM氨水。

[0049] 实施例2:

[0050] 一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的制备:

[0051] S1. 将明胶、海藻酸钠和58S生物玻璃溶于蒸馏水中获得溶液,其中,溶液中各成分的质量/体积的浓度为明胶15%、海藻酸钠6%、58S生物玻璃10.5%。

[0052] S2. 溶液通过磁力搅拌和机械搅拌的方式搅拌均匀,获得3D打印浆料,将3D打印浆料注入3D打印料筒,除泡均化后开始3D打印,3D打印采用0.43mm孔径的针头,在0.40Mpa气压、27℃条件下,按照10mm/s的打印速度进行打印。

[0053] S3. 打印完成获得支架半成品,支架半成品先用氯化钙溶液进行物理交联,后浸泡于戊二醛溶液中进行化学交联;最后清洗,冻干即得支架。支架的孔径为0.7mm,支架的孔隙率为60%;所述氯化钙溶液的浓度为8%,所述戊二醛溶液浓度为2.0%。

[0054] S4. 将3D打印制备好的支架进行消毒处理;紫外线辐射消毒35min,再采用无水乙醇冲洗3次,随后用无菌PBS冲洗3次。

[0055] S5. 消毒后的支架接种RAOEC细胞,将RAOEC细胞悬液以 1×10^5 /孔接种于每个消毒后的支架上,细胞密度为 5×10^4 /ml;将支架置于12孔板的孔,每孔滴注2ml细胞悬液。每3d进行换液,共培养细胞14d。

[0056] S6. 取出支架,使用脱细胞处理液对支架浸泡30min,随后依次用PBS清洗3次,DNAase处理5min,PBS清洗3次后放入4℃冰箱保存,冻干即得。脱细胞处理液成分如下:体积百分浓度0.1%的Triton-100X和20mM氨水。

[0057] 实施例3:

[0058] 一种负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的制备:

[0059] S1. 将明胶、海藻酸钠和58S生物玻璃溶于蒸馏水中获得溶液,其中,溶液中各成分的质量/体积的浓度为明胶15%、海藻酸钠6%、58S生物玻璃10.5%。

[0060] S2. 将溶液通过磁力搅拌和机械搅拌搅拌均匀,获得3D打印浆料,并通过3D打印制备支架;3D打印操作中,将3D打印浆料注入3D打印料筒,除泡均化后开始打印,采用0.40mm孔径的针头,在0.35Mpa气压、29℃条件下,按照10mm/s的打印速度进行打印。

[0061] S3. 打印完成获得支架半成品,支架半成品先用氯化钙溶液进行物理交联,后浸泡于戊二醛溶液中进行化学交联;最后清洗,冻干即得支架。支架的孔径为0.5mm,支架的孔隙率为75%;所述氯化钙溶液的浓度为6%,所述戊二醛溶液浓度为1.5%。

[0062] S4. 将3D打印制备好的支架进行消毒处理;紫外线辐射消毒40min,再采用无水乙醇冲洗3次,随后用无菌PBS冲洗3次。

[0063] S5. 消毒后的支架接种RAOEC细胞,将RAOEC细胞悬液以 1×10^5 /孔接种于每个消毒后的支架上,细胞密度为 5×10^4 /ml;将支架置于12孔板的孔,每孔滴注2ml细胞悬液。每3d进行换液,共培养细胞14d。

[0064] S6. 取出支架,使用脱细胞处理液对支架浸泡30min,随后依次用PBS清洗3次,DNAase处理5min,PBS清洗3次后放入4℃冰箱保存,冻干即得。脱细胞处理液成分如下:体积百分浓度0.1%的Triton-100X和20mM氨水。

[0065] 性能测试

[0066] 对上述实施例1制备的负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架进行性能测试,如下:

[0067] 1、拍照,负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的结构尺寸如附图1所示。

[0068] 2、测试成骨及成血管相关基因表达,如图2所示,负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的PCR测定相关基因(a: BMP-2,b:CD31,c:RUNX2,d:OCN,e:VEGF)高表达。

[0069] PCR方法如下:

[0070] 将细胞用预冷的PBS清洗3次,除去培养基和其他杂质。每孔加入Trizol裂解液1ml,吹打混匀2min。将吹打后的混合液转移至1ml的EP管中(不立即提取RNA则转入-80℃冰箱备用)。每个EP管的混合液中加入200 μ l三氯甲烷,震荡15s,待混合液呈乳浊液后置于冰上静置15min。待混合液分层后,转入低温离心机,12000r/min,4℃离心15min。离心后小心吸取400 μ l上清液,转移到新的EP管中,加入500 μ l异丙醇,颠倒混匀10s,冰上静置10min,12000r/min,4℃离心10min,此时可见EP管底部有白色RNA沉淀。弃去上清,在沉淀中加入

75%乙醇1ml,震荡,7500r/min,4℃离心5min,去上清。在沉淀中加入无水乙醇1ml,震荡,7500r/min,4℃离心5min,去上清。将EP管倒置于滤纸上,风干8-10min。在沉淀中加入15 μ l的DEPC处理水,吹打,充分溶解后检测RNA浓度。

[0071] RNA逆转录反应

[0072] 将RNA稀释至1000ng/ μ l,置于冰上备用每个样本按照表1-1的体积混合,转移入200 μ l的EP管,吹打均匀。将EP管离心,放入常规PCR仪,调制程序并运行。将EP管取出,按照表1-2混合均匀。将EP管离心,放入常规PCR仪,调制程序并运行。逆转录完成后,将样本取出放入-20℃冰箱备用。

[0073] 表1-1 逆转录反应体系

试剂	体积
RNA 溶液	7 μ l
5 \times DNA Eraser Buffer	2 μ l
gDNA Eraser	1 μ l
总计	10 μ l

[0075] 表1-2 qRT-PCR反应体系

试剂	体积
Primer Script RT Enzyme Mix 2	1 μ l
RT Primer Mix	1 μ l
5 \times Primer Script Buffer 2	4 μ l
RNAase Free H ₂ O	4 μ l
总计	20 μ l

[0077] qRT-PCR

[0078] 设计反应板,将96孔板置于冰上,每个反应孔按照表1-3加入各种试剂。用封闭膜将96孔板封闭,2000r/min离心2min。将板放入CFX96荧光定量PCR仪的反应模块,调制程序并运行。运行结束后,记录数据。

[0079] 表1-3 qRT-PCR反应体系

试剂	体积
SYBR Green mix	12.5 μ l
正向引物 (F)	1 μ l
反向引物 (R)	1 μ l
RNAase Free H ₂ O	8.5 μ l
cDNA 溶液	2 μ l

[0081] 3、抗压强度测试,试件尺寸10mm×10mm×4.5mm。测试方法:将充分溶胀的负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架置于万能力学测试仪上,使测试仪压板中心与支架中心重合。开启测试仪,当上压板与支架恰好接触时停止。调试测试仪参数,以1mm/min的速度进行加荷,负载为1kN时停止负载,通过软件计算杨氏模量,绘制载荷曲线,实验3次取平均值。如图3所示,测得平均杨氏模量:265.63MPa。

[0082] 4、动物实验,大鼠颌骨缺损模型植入负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架后骨缺损修复情况,如图4所示(左:实施例1支架组,中:空白组,右:Bio-OSS骨粉阳性对照组),实验表明负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架具有良好的成骨效率。

[0083] 实验方法如下:

[0084] 大鼠无菌状态下腹腔注射麻醉,在平行下颌骨下缘上作1.0-1.5 cm厘米切口,皮下组织分层切开后钝性分离暴露下颌骨,利用直径5mm环骨钻配合生理盐水灌注冷却制作直径为5mm圆形全层骨缺损,分别植入负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架、Bio-OSS骨胶原。空白组不放任何材料,组织内伤口采用5-0缝合线分层缝合,术后连续3天予青霉素钠肌肉注射抗感染。

[0085] Micro-CT成骨分析

[0086] 4周和8周两个时间点取材,大鼠采用二氧化碳窒息法行安乐死,摘取缺损区在内的下颌骨固定在10%中性缓冲福尔马林24小时,然后Micro-CT进行扫描。使用NRecon软件Skyscan对图像文件进行扫描重建,分析缺损部位新生骨组织情况。图4为8周时间点的骨缺损修复情况。

[0087] 5、吸水性、溶胀率和体外降解性检测。负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架在浸泡于SBF中2小时后溶胀率达到最大(附图5),在浸泡于SBF中4周后支架形态基本保持稳定,16周后质量损失约为16%(附图6)。SBF为模拟体液,由多种无机盐溶液组成,模拟人体体液成分及pH值。

[0088] 6、支架表面负载RAOEC细胞的状态表征,将RAOEC细胞定植于支架上进行培养,DAPI染色结果显示RAOEC能够在支架上黏附,增殖(附图7);SEM检测观察RAOEC细胞定植培养14d后在支架上的黏附情况,结果表面RAOEC能够在支架表面黏附,伸展(附图8)。

[0089] 7、脱细胞处理的状态表征,在RAOEC接种于支架7/14/21d后,对负载RAOEC的3D打印骨缺损修复支架进行脱细胞处理并进行对ECM的标记物CD31和VEGF的免疫荧光检测,在激光共聚焦显微镜下观察,结果表明支架表面CD31及VEGF在14d后呈阳性,表明支架表面存在着RAOEC的ECM(附图9和10)。

[0090] 8、测试RBMSC细胞在负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的的增殖活性；将RBMSC细胞以 10^5 /个接种于负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架上，在0/7/14/21d取样，更换为含10% cck-8的完全培养基，37℃孵育30min后，置于酶标仪，观察490nm波长时吸光度。如图11所示，RBMSC细胞在负载细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架的增殖活性好。

[0091] 从上述测试结果来看，本发明制备的负载内皮细胞外基质的3D打印骨缺损修复支架达到了本发明的目的，负载效果良好，获得的复合支架在结构的稳定性和力学强度上较优，应用于骨缺损修复，能够有效促进骨组织及血管组织形成，明显提高骨缺损修复的效率。

[0092] 根据上述说明书的揭示和教导，本发明所属领域的技术人员还可以对上述实施方式进行变更和修改。因此，本发明并不局限于上面揭示和描述的具体实施方式，对发明的一些修改和变更也应当落入本发明的权利要求的保护范围内。此外，尽管本说明书中使用了一些特定的术语，但这些术语只是为了方便说明，并不对本发明构成任何限制。

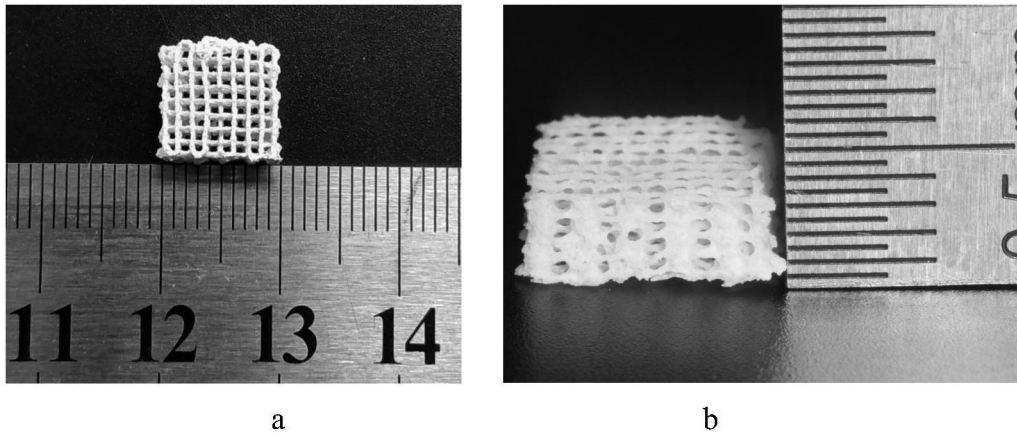
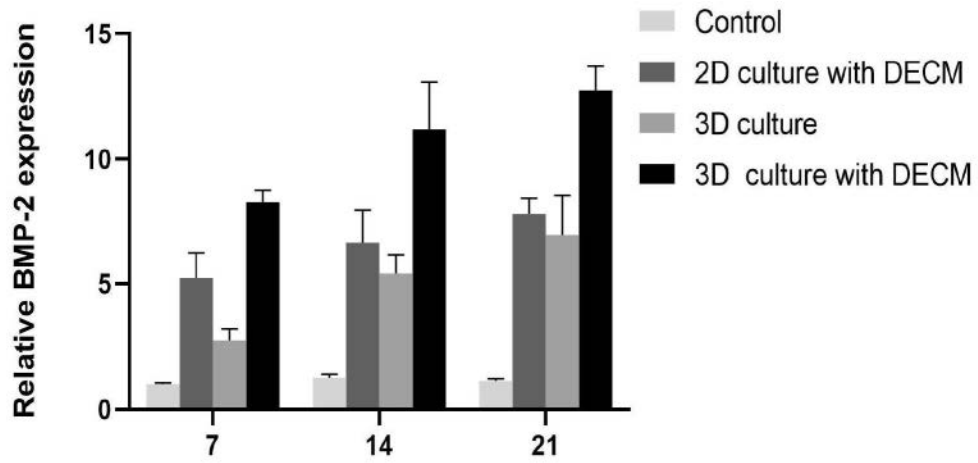
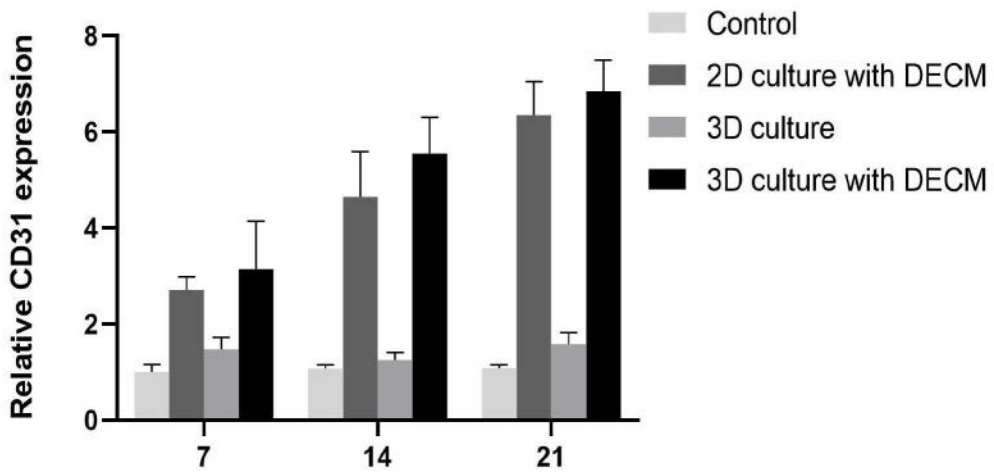


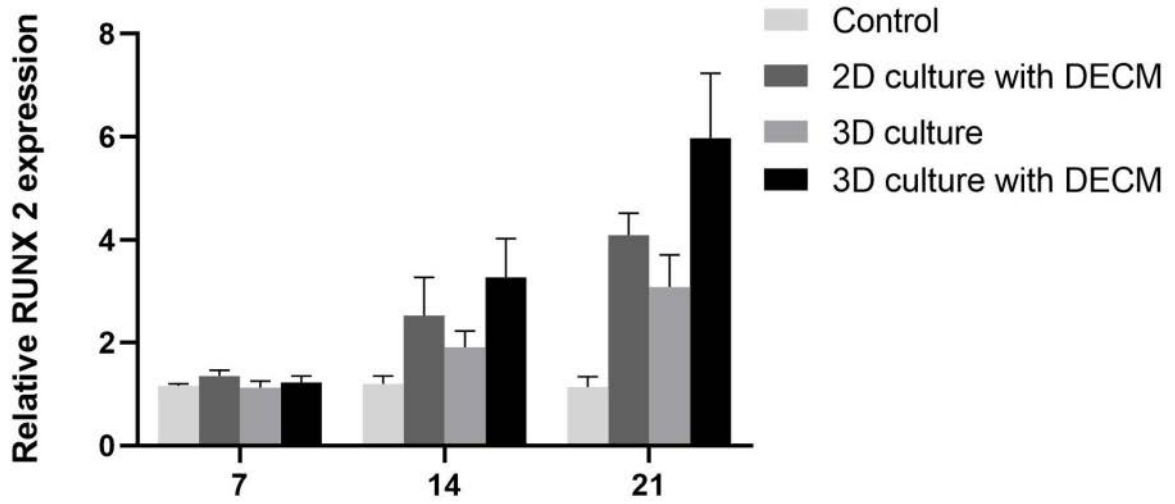
图1



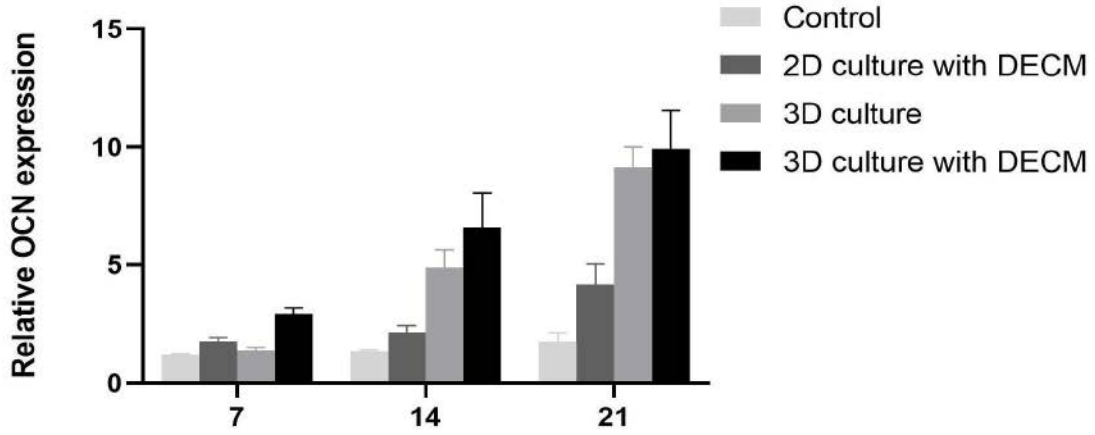
a



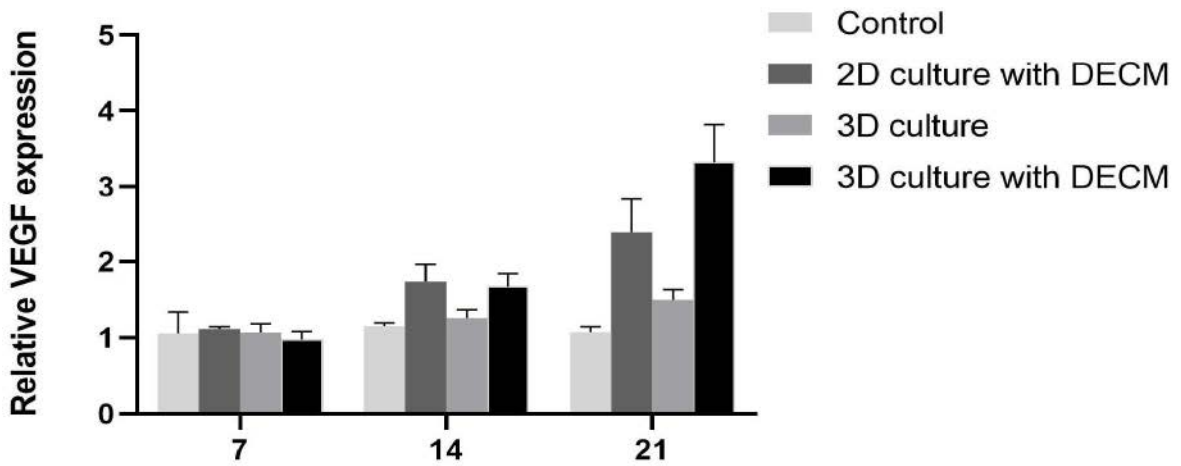
b



c



d



e

图2

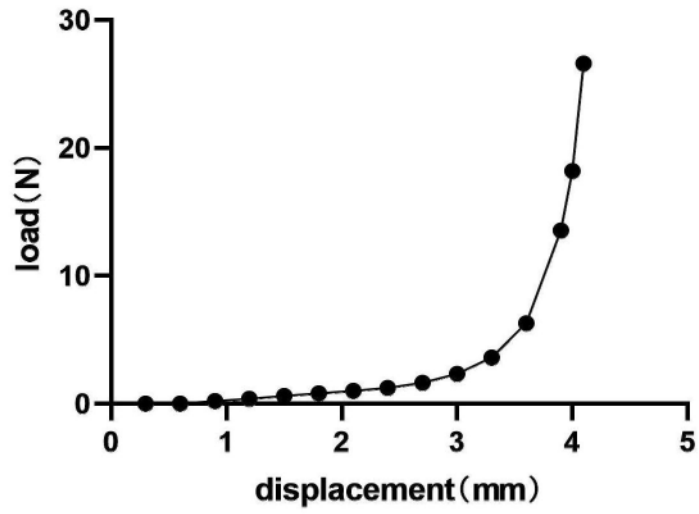


图3

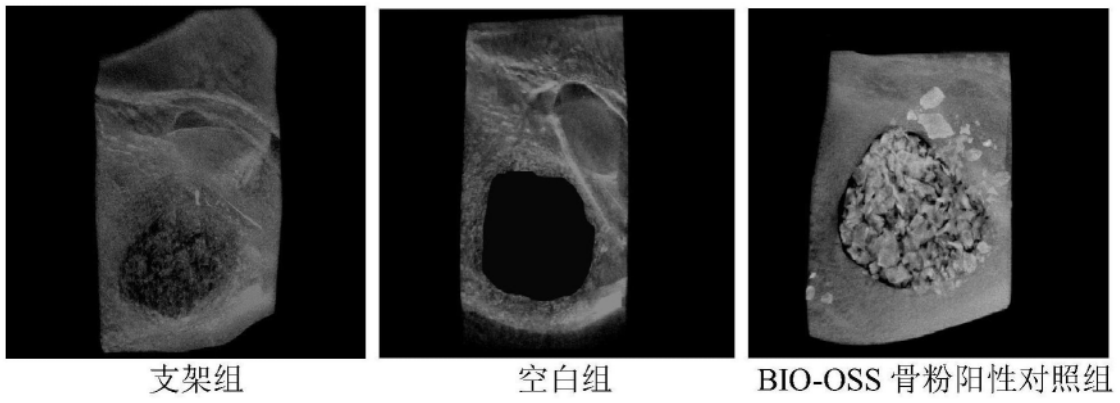


图4

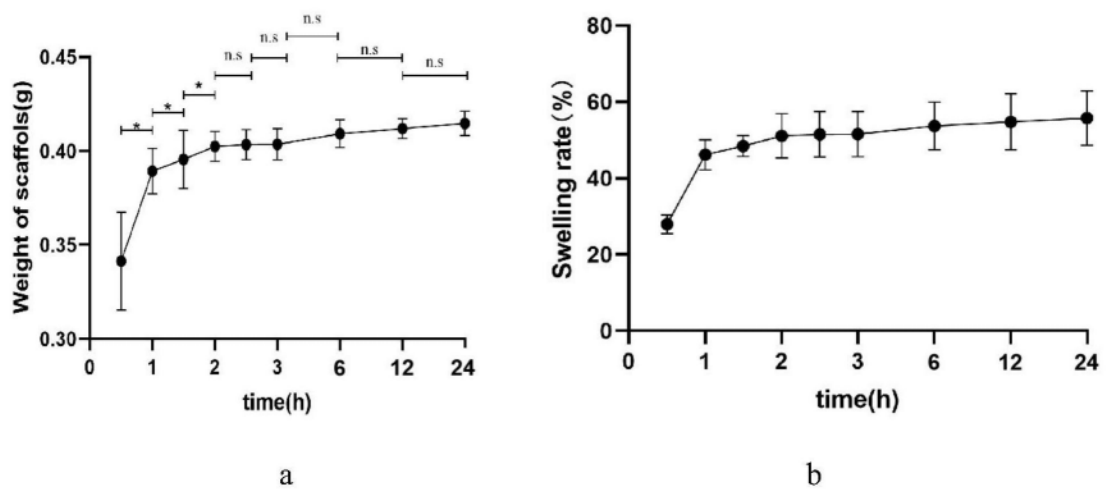


图5

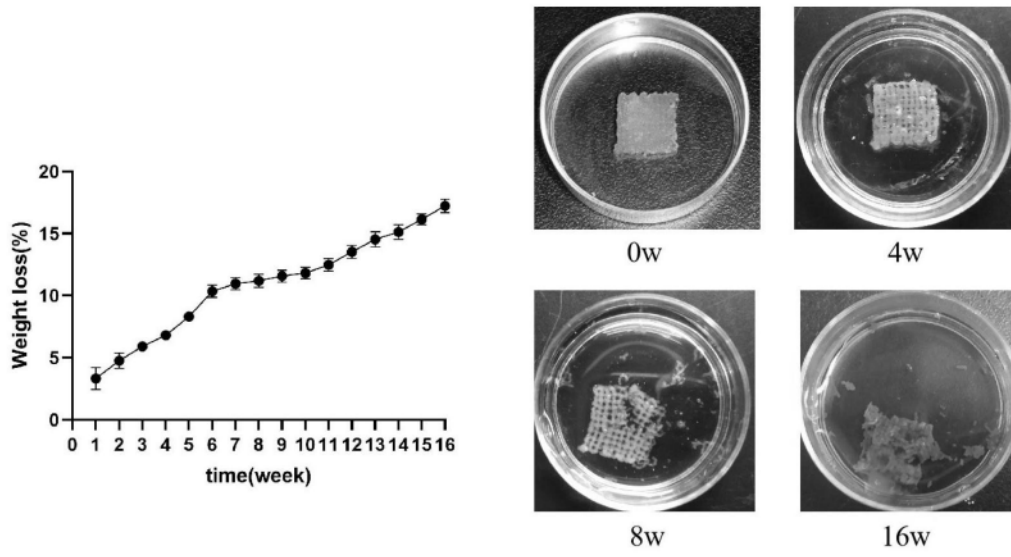


图6

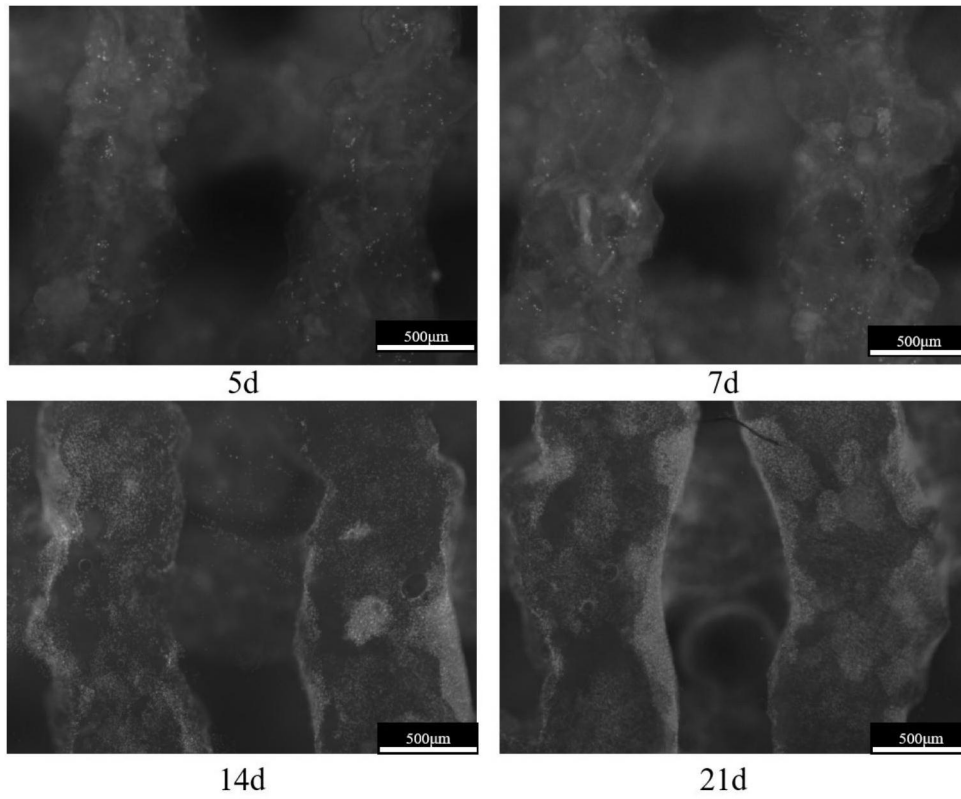


图7

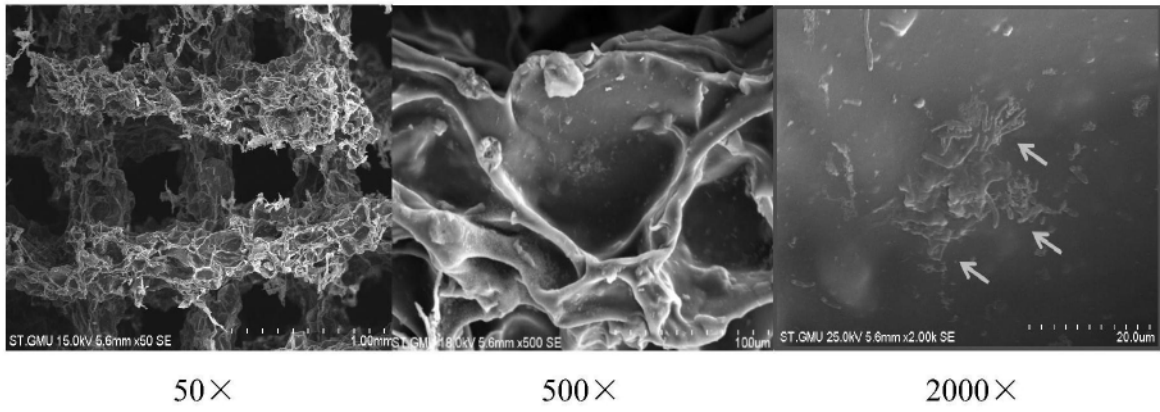


图8

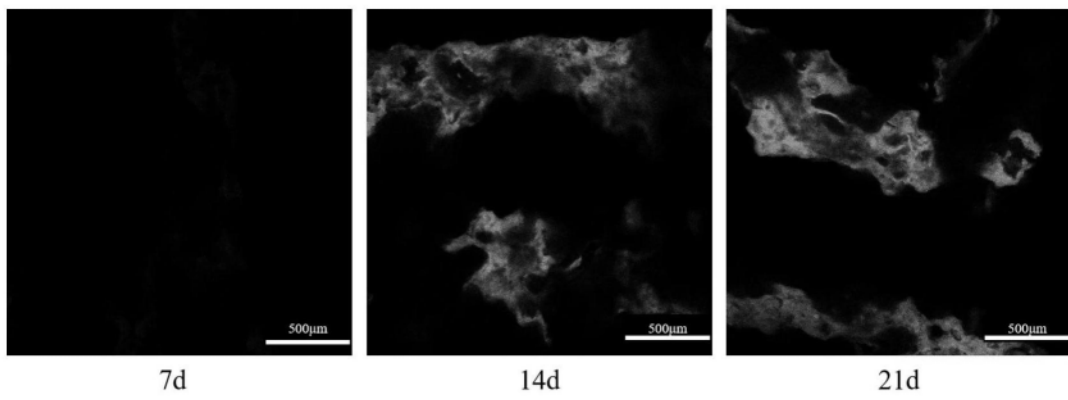


图9

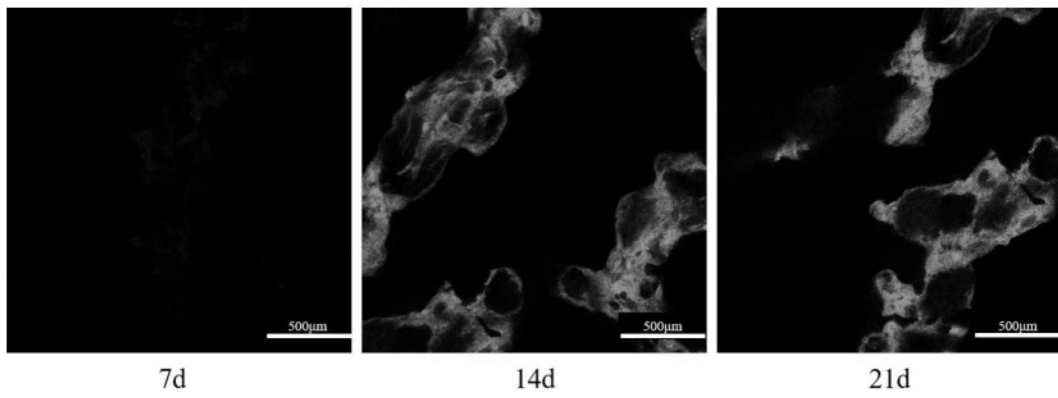


图10

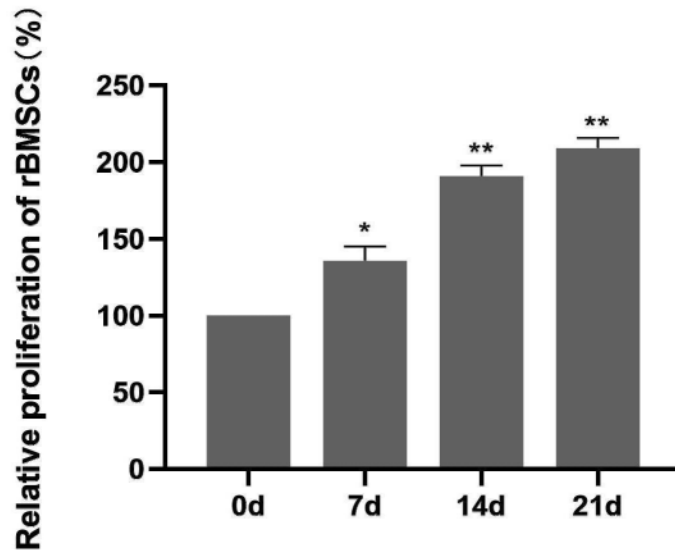


图11