



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106563173 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201610890806.1

A61L 27/36(2006.01)

(22)申请日 2016.10.12

(66)本国优先权数据

201510673305.3 2015.10.13 CN

(71)申请人 温州华贞医疗科技有限公司

地址 浙江省温州市瓯海区高新技术产业开
发区创业服务中心科技企业孵化器研
发总部大楼14楼1407室

(72)发明人 周鹤 赵子建 孙雪丽 史啟
潘璐琪

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51)Int.Cl.

A61L 27/60(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54)发明名称

一种脱细胞生物真皮材料及其制备方法和
应用

(57)摘要

本发明公开了一种脱细胞生物真皮材料的制备方法,(1)将猪皮用加有EDTA的胰蛋白酶溶液处理,冲洗,用除垢剂溶液浸泡并震荡,冲洗;(2)将处理后得到的材料用中性蛋白酶溶液处理,冲洗,用除垢剂溶液浸泡并震荡,冲洗;(3)以上步骤(1)和(2)处理1~3遍后,将处理后得到的材料用 α -1,3-半乳糖苷酶溶液处理,冲洗后即得。本发明制备得到的脱细胞生物真皮材料经过一系列理化处理,具有安全无毒、脱细胞、除 α -1,3-半乳糖苷、去免疫原性的特点,保留有天然胶原结构,且韧性及强度很好能够作为植入型生物组织材料用于外科、整形、疝修复、腹腔修复、盆腔修复等领域,并可以用于皮肤创伤修复。

1. 一种脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,它包括如下步骤:
 - (1) 将猪皮用加有EDTA的胰蛋白酶溶液处理,冲洗,用除垢剂溶液浸泡并震荡,冲洗;
 - (2) 将步骤(1)处理后得到的材料用中性蛋白酶溶液处理,冲洗,用除垢剂溶液浸泡并震荡,冲洗;
 - (3) 以上步骤(1)和(2)处理1~3遍后,将处理后得到的材料用 α -1,3-半乳糖苷酶溶液处理,冲洗后即得。
2. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(1)~(3)中,所述的冲洗用0.5wt%~0.9wt%钠盐且PH在6.0~7.9的Tris-HCl水溶液冲洗。
3. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的加有EDTA的胰蛋白酶溶液为加有0.02wt%~0.05wt%EDTA和0.15wt%~0.3wt%胰蛋白酶且PH在6.0~7.9的磷酸盐缓冲液。
4. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,将猪皮用加有EDTA的胰蛋白酶溶液在30℃~37℃浸泡12~24小时。
5. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述的中性蛋白酶溶液为含有500~700U/L中性蛋白酶PH在6.0~7.9含0.5wt%~0.9wt%钠盐的Tris-Hcl水溶液。
6. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,将步骤(1)处理后得到的材料用中性蛋白酶溶液在30℃~37℃浸泡12~24小时。
7. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(1)或(2)中,所述的除垢剂溶液为0.05~0.15wt%离子除垢剂且PH在6.0~7.9的磷酸盐缓冲液,所述的离子除垢剂为十二烷基硫酸钠和TritonX-200d的混合物。
8. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(1)和(2)中,所述的用除垢剂溶液浸泡并持续震荡,为室温条件下将酶处理后的材料浸泡在除垢剂中处理18~24小时并持续震荡;所述的震荡可以用搅拌替换。
9. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述的 α -1,3-半乳糖苷酶溶液为含有10~20 μ g/mL α -1,3-半乳糖苷酶的磷酸盐缓冲液。
10. 根据权利要求1所述的脱细胞生物真皮材料的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述的将处理后得到的材料用 α -1,3-半乳糖苷酶溶液处理,为将处理后得到的材料用 α -1,3-半乳糖苷酶溶液在25℃~37℃浸泡2~4小时。
11. 权利要求1~10中任意一项所述的方法制备得到的脱细胞生物真皮材料。
12. 权利要求11所述的脱细胞生物真皮材料在植入型生物组织材料中的应用。
13. 权利要求11所述的脱细胞生物真皮材料在制备修复皮肤创伤材料中的应用。

一种脱细胞生物真皮材料及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物皮肤材料及外科、整形、疝修复、腹腔修复、盆腔修复等领域中的植入型生物材料,具体涉及一种脱细胞的真皮材料及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 生物材料在国际上已经日益在临床上广泛应用,而目前我国在这方面的研发工作总体还处于落后状态,利用生物材料制备的可吸收材料医疗器械有着巨大的需求。然而,皮肤又是人体最大的组织器官,是人体的外屏障,皮肤的完整性对于人类有着重要的作用。烧(创)伤等多种原因造成皮肤大面积缺损后,可导致人体严重的功能障碍,甚至危及生命。目前修复皮肤缺损最有效的方法是自体皮肤移植,但自体皮常因大面积烧伤等而严重不足,且切取自体皮对患者本身也是一种创伤。同种异体皮、异种皮作为暂时性皮肤替代物虽然可以用于治疗皮肤缺损创面,但由于免疫排斥等因素无法达到自体皮一样的效果,而仅仅能起到覆盖保护创面的作用。因此寻找安全可靠、不被人体排斥且的异种皮显得更为重要。

[0003] 脱细胞真皮基质(Acellular Dermal Matrix,ADM)是近十年国内外兴起的一种新型组织代替物。这种基质是用物理、化学等方法将皮肤中的表皮层及细胞成分彻底去除,仅保留真皮中含胶原网架的细胞外基质,具有创面覆盖、组织缺损填充、引导组织再生和支架等作用。ADM由于完全没有了细胞成分和I型、II型细胞相容性抗原的主要免疫活性,故一般不会诱发排斥反应。但ADM保留有正常胶原的三维结构和真皮中含胶原支架的细胞外基质,能为组织细胞的再生提供一个良好的支架结构。

[0004] ADM最早应用于大面积烧伤切痂创面的修复上,发现其能有效地减少疤痕形成。在整形重建外科领域,其应用已广泛扩展至腭裂修复、矫正鼻畸形、眼睑、结膜层缺损的修复、隆唇、乳房假体包裹等。另外,ADM已广泛应用于口腔牙龈组织缺损修补、骨科跟腱及关节囊修补、腹部外科腹壁或盆底缺损修补及疝修补等众多领域,具有巨大的市场需求。

[0005] 目前ADM的来源一是人真皮,二是动物真皮。来源为人真皮组织的材料,存在巨大的伦理争议,并且往往需向相关组织或供者家属支付数量可观的补偿费用,因此利用人的皮肤材料的产品将日益面临组织来源紧缺和价格高昂等一系列劣势。目前国内推出的以猪真皮组织为来源的ADM产品,但由于异种ADM组织免疫原性明显高于同种等原因,应用受到明显限制。猪在解剖、组织、生理和营养代谢等方面与人类最为相近,特别是猪的皮肤在结构、理化特性及功能等方面均与人类皮肤极为相似,并且猪的体表面积较大,皮源丰富,猪皮肤透气性好,可以防止血浆外渗,防止创口感染,早在1965年就被用于烫、烧伤患者的代用皮肤。另外,猪皮可以为表皮细胞的增殖铺垫基质和提供营养,有利于上皮细胞的增生、促进创面愈合。目前,猪皮作为临时的皮肤替代品在临床烧伤治疗中发挥作用,在欧洲国家,猪皮的应用率几乎与同种异体皮肤相当。一般来说,猪皮如果能够在创面覆盖20天以上,创面就能够基本愈合,达到理想的治疗效果。但是,猪细胞表面存在一种称为 α -1,3-半乳糖苷的异种抗原,而人体内先天存在着 α -1,3-半乳糖苷的抗体。当猪皮与伤员烧伤面的体液接触之后,会在短时间内(约一周)被排斥,所以病人在治疗过程中需多次换药、切削

痂、植皮,既增加了患者的痛苦,又在供皮区留下瘢痕或色素沉着。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种脱细胞生物真皮材料,该材料安全无毒,有去免疫原性,能够满足临床需求。

[0007] 本发明还要解决的技术问题是提供上述脱细胞生物真皮材料的制备方法。

[0008] 本发明最后要解决的技术问题是提供上述脱细胞生物真皮材料的应用。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0010] 一种脱细胞生物真皮材料的制备方法,它包括如下步骤:

[0011] (1) 将猪皮用加有EDTA的胰蛋白酶溶液处理,冲洗,用除垢剂溶液浸泡并震荡,冲洗;

[0012] (2) 将步骤(1)处理后得到的材料用中性蛋白酶溶液处理,冲洗,用除垢剂溶液浸泡并震荡,冲洗;

[0013] (3) 以上步骤(1)和(2)处理1~3遍后,将处理后得到的材料用 α -1,3-半乳糖苷酶溶液处理,冲洗后即得。

[0014] 步骤(1)~(3)中,所述的冲洗用0.5%~0.9wt%钠盐的10mM Tris-HCl水溶液冲洗。其中,所述的钠盐为氯化钠和/或磷酸钠,所述的Tris-HCl水溶液PH值为6.0~7.9。

[0015] 步骤(1)中,所述的加有EDTA的胰蛋白酶溶液为加有0.02wt%~0.05wt%EDTA和0.15wt%~0.3wt%胰蛋白酶的磷酸盐缓冲液。其中,所述的磷酸盐缓冲液优选为PH6.0~7.9的磷酸钠缓冲液,更优选PH7.2磷酸钠缓冲液。

[0016] 胰蛋白酶的酶活 ≥ 1000 ~2000BAEE units/mg。

[0017] 胰蛋白酶的酶活单位定义为:在底物N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(N-benzoyl-L-arginine ethyl ester,BAEE)浓度1mmol/L,光程1cm,波长253nm,温度25℃,测量体积3.2mL条件下吸光值每分钟递增0.001($\Delta A/\text{min}=0.001$)为1个BAEE酶活单位。

[0018] 步骤(1)中,将猪皮用加有EDTA的胰蛋白酶溶液在30℃~37℃(优选37℃)浸泡12~24小时(优选24小时)。

[0019] 步骤(2)中,所述的中性蛋白酶包括DispaseII和分散酶(DispaseI)。

[0020] 分散酶(DispaseI产品编号D4818|CAS号42613-33-2|SIGMA)的酶活 $\geq 10\text{unit/mg}$ 。酶活定义:在37℃,PH7.5条件下,1分钟水解酪素产生1umole(181ug)酪氨酸为1个酶活力单位,以u/g表示。

[0021] Dispase II的酶活 $\geq 0.8\text{U/mg}$ (37℃,以酪蛋白作为底物)。酶活定义:1U是在检测条件下1分钟释放相当于1umol酪氨酸的Folin阳性氨基酸或肽的酶量,相当于181PU(Protease units)或600U日本单位的Dispase®。

[0022] 步骤(2)中,所述的中性蛋白酶溶液为含有500~700U/L中性蛋白酶PH在6.0~7.9(优选PH 7.2)含0.5wt%~0.9wt%钠盐的Tris-HCl水溶液。其中,所述的钠盐包括为氯化钠和/或磷酸钠。

[0023] 步骤(2)中,将步骤(1)处理后得到的材料用中性蛋白酶溶液在30℃~37℃(优选30℃)浸泡12~24小时(优选12小时)。

[0024] 步骤(1)或(2)中,所述的除垢剂溶液为0.05~0.15wt%离子除垢剂的磷酸盐缓冲

液,所述的离子除垢剂为十二烷基硫酸钠和TritonX-200的混合物,两者可以以任意比混合且总浓度要求在所述范围内即可。其中,所述的磷酸盐缓冲液优选PH 6.0~7.9磷酸钠缓冲液,更优选PH7.2磷酸钠缓冲液。

[0025] 步骤(1)和(2)中,所述的用除垢剂溶液浸泡并持续震荡,为室温条件下将酶处理后的材料浸泡在除垢剂中处理18~24小时(优选20小时)并持续震荡;所述的震荡可以用搅拌替换。

[0026] 步骤(3)中,所述的 α -1,3-半乳糖苷酶溶液为含有10~20 μ g/mL α -1,3-半乳糖苷酶的磷酸盐缓冲液。其中,所述的磷酸盐缓冲液优选PH6.0~7.9磷酸钠缓冲液,更优选PH7.2磷酸钠缓冲液。

[0027] 所述的 α -1,3-半乳糖苷酶的酶活: ≥ 20 units/mg。酶活定义为:在25 $^{\circ}$ C,PH6.5条件下,1分钟水解1 μ mole对硝基-苯基- α -D-吡喃半乳糖苷为1个酶活力单位。

[0028] 步骤(3)中,所述的将处理后得到的材料用 α -1,3-半乳糖苷酶溶液处理,为将处理后得到的材料用 α -1,3-半乳糖苷酶溶液在25 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C(优选37 $^{\circ}$ C)浸泡2~4小时(优选2小时)。

[0029] 上述方法制备得到的脱细胞生物真皮材料也在本发明保护范围之内。

[0030] 上述脱细胞生物真皮材料在植入型生物组织材料中的应用也在本发明保护范围之内。其中,所述的植入型生物组织材料包括但不限于外科、整形、疝修复、腹腔修复、盆腔修复等领域。

[0031] 上述脱细胞生物真皮材料在制备修复皮肤创伤材料中的应用也在本发明保护范围之内。

[0032] 本发明提供的脱细胞生物真皮材料安全无毒且无细胞、无 α -1,3-半乳糖苷、无免疫原性,可以用于外科手术修复、口腔牙龈组织修补、以及整形重建外科等领域。

[0033] 有益效果:与现有技术相比,本发明的脱细胞生物真皮材料,是一种安全无毒的生物真皮材料,无细胞、除 α -1,3-半乳糖苷、去免疫原性的特点,且维持天然的胶原结构,且韧性及强度很好能够作为植入型生物组织材料用于外科、整形、疝修复、腹腔修复、盆腔修复等领域,并可以用于皮肤创伤修复。制备方法简单,易于操作,成本低,具有很好的应用前景。

附图说明

[0034] 图1是处理的和未处理的苏木精-伊红染色对比图;其中,A、B未经脱细胞处理;C、D经脱细胞处理;放大倍数:200倍。

[0035] 图2是处理的和未处理的 α -1,3-半乳糖苷免疫荧光染色对比图;其中,A未经脱细胞处理;B经脱细胞处理;放大倍数:200倍。

[0036] 图3是处理后I型、III型、IV型、VII型胶原蛋白免疫组化染色图。

[0037] 图4是处理后玻尿酸免疫组化染色图;其中,A放大倍数40倍;B放大倍数200倍;

[0038] 图5是生物真皮材料的拉伸强度。

[0039] 图6是生物真皮材料力学检测的拉伸状况。

[0040] 图7是实施例8中的接种分布(96孔板)。

[0041] 图8是细胞毒性检测后在波长为450下的吸光度值即OD值。

[0042] 图9是图8吸光度值和所对应样品的整理合并。

具体实施方式

[0043] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0044] 实施例1:脱细胞生物真皮材料的制备。

[0045] 取健康成年猪的侧腹壁和背部全层皮肤,清洗消毒处理后裁剪成适当大小,用含有0.5wt%的磷酸钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.2水溶液消毒冲洗,然后,37℃在加有0.02wt%EDTA和0.15wt%胰蛋白酶(产品编号T4799|CAS号9002-07-7|SIGMA)且PH为7.4的磷酸钠缓冲液中浸泡处理24小时,将皮片取出,用加有0.5wt%的磷酸钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.2水溶液冲洗。用离子除垢剂0.1wt%TritonX-200和0.03wt%十二烷基硫酸钠且PH为7.2的磷酸钠缓冲液室温震荡浸泡20小时,进一步用加有0.5wt%的磷酸钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.2水溶液冲洗。用680U/L的中性蛋白酶(Dispase II 货号:04942078001|Roche)加有0.5wt%的磷酸钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.2水溶液中30℃处理12小时,用加有0.5wt%的磷酸钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.2水溶液冲洗。再用离子除垢剂0.1% TritonX-200和0.03wt%十二烷基硫酸钠且PH为7.2的磷酸钠缓冲液室温震荡浸泡20小时,进一步用加有0.5wt%的磷酸钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.2水溶液冲洗。重复以上步骤1遍后,处理后的皮片用20ug/mL的 α -1,3-半乳糖苷酶(产品编号G7163|CAS号9025-35-8|SIGMA)且PH为7.8的磷酸钠缓冲液37℃处理2小时,最后用加有0.5wt%的磷酸钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.2水溶液冲洗后即得所需脱细胞生物真皮材料。

[0046] 实施例2:脱细胞生物真皮材料的制备。

[0047] 取健康成年猪的侧腹壁和背部全层皮肤,清洗消毒处理后裁剪成适当大小,用含有0.9wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为6.7水溶液消毒冲洗,然后,30℃在加有0.03wt%EDTA和0.3wt%胰蛋白酶(产品编号T4799|CAS号9002-07-7|SIGMA)且PH为6.5的磷酸钠缓冲液中浸泡处理12小时,将皮片取出,用加有0.9wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为6.7水溶液冲洗。用离子除垢剂0.03wt%TritonX-200和0.08wt%十二烷基硫酸钠且PH为6.7的磷酸钠缓冲液室温震荡浸泡18小时,进一步用加有0.9wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为6.7水溶液冲洗。用500U/L的分散酶(Dispase I 产品编号D4818|CAS号42613-33-2|SIGMA)加有0.9wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为6.7水溶液中37℃处理24小时,用加有0.9wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为6.7水溶液冲洗。再用离子除垢剂0.03% TritonX-200和0.08wt%十二烷基硫酸钠且PH为6.7的磷酸钠缓冲液室温震荡浸泡18小时,进一步用加有0.9wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为6.7水溶液冲洗。重复以上步骤2遍后,处理后的皮片用10ug/mL的 α -1,3-半乳糖苷酶(产品编号G7163|CAS号9025-35-8|SIGMA)且PH为6.5的磷酸钠缓冲液28℃处理4小时,最后用加有0.9wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为6.7水溶液冲洗后即得所需脱细胞生物真皮材料。

[0048] 实施例3:脱细胞生物真皮材料的制备。

[0049] 取健康成年猪的侧腹壁和背部全层皮肤,清洗消毒处理后裁剪成适当大小,用含有0.7wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.8水溶液消毒冲洗,然后,34℃在加有

0.03wt%EDTA和0.2wt%胰蛋白酶(产品编号T4799|CAS号9002-07-7|SIGMA)且PH为7.8的磷酸钠缓冲液中浸泡处理18小时,将皮片取出,用加有0.7wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.8水溶液冲洗。用离子除垢剂0.03wt%TritonX-200和0.03wt%十二烷基硫酸钠且PH为7.8的磷酸钠缓冲液室温震荡浸泡24小时,进一步用加有0.7wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.8水溶液冲洗。用600U/L的中性蛋白酶(Dispase II 货号:04942078001|Roche)加有0.7wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.8水溶液中37℃处理18小时,用加有0.7wt%的氯化钠的10mMTris-Hcl且PH为7.8水溶液冲洗。再用离子除垢剂0.03% TritonX-200和0.03wt%十二烷基硫酸钠且PH为7.8的磷酸钠缓冲液室温震荡浸泡24小时,进一步用加有0.7wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.8水溶液冲洗。重复以上步骤3遍后,处理后的皮片用16ug/mL的 α -1,3-半乳糖苷酶(产品编号G7163|CAS号9025-35-8|SIGMA)且PH为7.2的磷酸钠缓冲液30℃处理3小时,最后用加有0.7wt%的氯化钠的10mM Tris-Hcl且PH为7.8水溶液冲洗后即得所需脱细胞生物真皮材料。

[0050] 实施例4:

[0051] 用实施例1得到的脱细胞生物真皮材料进行脱细胞效果实验。

[0052] 脱细胞生物真皮材料的脱细胞效果采用HE染色法进行鉴定。

[0053] HE染色法:

[0054] 原理:HE染色法既是苏木精-伊红染色法,石蜡切片技术里常用的染色法之一。苏木精为碱性,主要使细胞核内的染色质与胞质内的核糖体着紫蓝色,伊红为酸性,主要使细胞质和细胞外基质中成分着红色。

[0055] 具体实施步骤如下:

[0056] 1、将组织经过固定,脱水,透明,浸蜡,包埋后制成石蜡切片

[0057] 2、将石蜡切片进行HE染色:石蜡切片烤片后二甲苯I中浸泡10min→二甲苯II中浸泡10min→二甲苯III中浸泡10min→无水乙醇中浸泡3min→95%乙醇中浸泡3min→90%乙醇中浸泡3min→80%乙醇中浸泡3min→自来水浸洗3次控净→苏木素染色5min→自来水洗3-4次(可以在显微镜下观察一下是否清洗干净染液,不行继续清洗)→1%盐酸酒精分化3-5s(在里面摇晃两下)在显微镜下观察,可以自来水洗3次→45度温水2min→自来水洗3次(在显微镜下观察可以再进行下一步染色)→1%伊红水溶液3min→自来水洗3次(显微镜下观察一下)→90%乙醇→95%乙醇→100%乙醇泡一下(里面晃动几下)→二甲苯I(2min)→二甲苯II(2min)→二甲苯III(搁置至封片)→通风橱一直吹风第二天进行拍照。

[0058] 3、拍照结果见图1。图1说明经实施例1的制备方法处理后,细胞已去除。

[0059] 实施例5:

[0060] 用实施例1得到的脱细胞生物真皮材料进行去免疫原效果实验。

[0061] 脱细胞生物真皮材料的脱细胞效果采用免疫荧光染色法进行鉴定。

[0062] 具体实施步骤如下:

[0063] 1、包埋好的标本用切片机切石蜡切片(5微米),并将蜡片贴附于多聚赖氨酸处理过的载玻片上(可购买,我用的是江苏海门的,从不掉片)。

[0064] 2、经60℃烘片2小时

[0065] 3、二甲苯I脱蜡30分钟(若要保证脱蜡完全可将其加热至40-60℃),二甲苯II脱蜡10分钟。

[0066] 4、梯度酒精复水：100%酒精3分钟，100%酒精3分钟，95%酒精3分钟，85%酒精3分钟，75%酒精3分钟，50%酒精3分钟，蒸馏水3分钟，蒸馏水3分钟，PBS浸洗5分钟。

[0067] 5、进行抗原修复：将切片置于0.1mol/L且pH=6.0的枸橼酸液修复液中，用微波炉100火力三分钟至微微沸腾，再用50火力维持7分钟，停止加热后自然冷却20-30分钟。

[0068] 6、用PBS浸洗3分钟，用滤纸擦去标本外的PBS，滴加封闭血清，在湿盒中37℃封闭30分钟。

[0069] 7、用滤纸擦去封闭液，勿洗。滴加适宜浓度的荧光一抗置湿盒中4℃避光孵育过夜。

[0070] 8、用PBS浸洗3分钟×3次洗去一抗，用滤纸擦去标本外的PBS。

[0071] 9、最后用含甘油封片，并在荧光显微镜下立即观察并拍照。

[0072] 10、拍照后结果见图2。

[0073] 图2说明经实施例1制备方法处理后，组织材料中已无 α -1,3-半乳糖苷。

[0074] 实施例6：

[0075] 用实施例1得到的脱细胞生物真皮材料保留了胶原蛋白及玻尿酸成分的效果。

[0076] 脱细胞生物真皮材料保留了胶原蛋白及玻尿酸成分其中I型、III型胶原及玻尿酸采用免疫组化SABC染色法，IV型、VII型胶原蛋白采用免疫组化S-P染色法进行鉴定。

[0077] SABC法

[0078] 1) 脱蜡、水化。

[0079] 2) PBS洗两次各5分钟。

[0080] 3) 用蒸馏水或PBS配置新鲜的3%H₂O₂，室温封闭5~10分钟，蒸馏水洗3次。

[0081] 4) 抗原修复。

[0082] 5) PBS洗5分钟。

[0083] 6) 滴加正常山羊血清封闭液，室温20分钟。甩去多余液体。

[0084] 7) 滴加I抗，室温1小时或者4℃过夜或者37℃1小时（4℃过夜后在37℃复温45分钟）。

[0085] 8) PBS洗三次每次2分钟。

[0086] 9) 滴加生物素化二抗，20℃~37℃20分钟。

[0087] 10) PBC洗3次每次2分钟。

[0088] 11) 滴加试剂SABC，20℃~37℃20分钟。

[0089] 12) PBS洗4次每次5分钟。

[0090] 13) DAB显色：DAB显色试剂盒或者自配显色剂显色（镜下掌握显色程度）。

[0091] 14) 蒸馏水洗。苏木素复染2分钟、盐酸酒精分化。

[0092] 15) 脱水、透明、封片、镜检。

[0093] SP法

[0094] 1) 脱蜡、水化；

[0095] 2) PBS洗2~3次各5分钟；

[0096] 3) 3%H₂O₂（80%甲醇）滴加在TMA上，室温静置10分钟；

[0097] 4) PBS洗2~3次各5分钟；5) 抗原修复；

[0098] 6) PBS洗2~3次各5分钟；

- [0099] 7) 滴加正常山羊血清封闭液,室温20分钟。甩去多余液体。
- [0100] 8) 滴加I抗50 μ l,室温静置1小时或者4℃过夜或者37℃1小时。
- [0101] 9) 4℃过夜后需在37℃复温45分钟。
- [0102] 10) PBS洗3次各5分钟;
- [0103] 11) 滴加II抗40~50 μ l,室温静置,或37℃1小时;
- [0104] 12) II抗中可加入0.05%的tween-20。
- [0105] 13) PBS洗3次各5分钟;
- [0106] 14) DAB显色5~10分钟,在显微镜下掌握染色程度;
- [0107] 15) PBS或自来水冲洗10分钟;
- [0108] 16) 苏木精复染2分钟,盐酸酒精分化;
- [0109] 17) 自来水冲洗10~15分钟;
- [0110] 18) 脱水、透明、封片、镜检。
- [0111] 拍照结果见图3和图4。图3和图4说明经上述制备方法处理后,保留了胶原蛋白支架及玻尿酸成分。
- [0112] 实施例7:
- [0113] 用实施例1得到的脱细胞生物真皮材料的力学检测,保留了胶原蛋白的韧性和强度。
- [0114] 具体实施如下
- [0115] 皮肤样品检测的宽度:3.4mm,厚度:2.5mm,长度:36.1mm在室温条件下,采用单轴拉伸方式测量样本的应力应变曲线,实验设备采用单立柱台式材料试验机(5943,Instron, USA),传感器量程为1kN。实验加载过程采用位移控制,初始加载阶段,为消除样本本身缺陷的影响,先将样本预加载至2N,然后开始记录数据,整个实验过程以2mm/min的加载速率进行。
- [0116] 检测数据分析如图5,图5说明力学检测拉伸强度在10MPa以上,即85N/CM²以上,图6是具体拉伸操作的状态,通过图5和图6说明生物真皮材料韧性及强度很好。实施例8:
- [0117] 用实施例1得到的脱细胞生物真皮材料进行细胞毒理性实验检测,具体实验如下:
- [0118] 1) 目的及原理:
- [0119] 目的:检测产品潜在的毒理学危害
- [0120] 原理:CCK-8试剂对细胞的毒性非常低。它和活细胞内的脱氢酶持续反应使颜色不断加深,OD值不断增加。(注:活细胞内的脱氢酶是持续产生的)。所以与阴性对照组的OD值比较,越接近表示毒性越小,因为阴性对照组反应的是正常细胞生长情况,阳性对照组是有毒性的。
- [0121] 参考:GB/T 16886.5-2003体外细胞毒性试验;GB/T 16886.12-2000样品制备和参照材料
- [0122] 2) 试剂和仪器
- [0123] CCK-8试剂盒[货号:CK04厂家同仁化学研究所(Dojindo)];高糖DMEM细胞培养基;生理盐水
- [0124] 5ml离心管,96孔板,24孔板,培养皿
- [0125] 滤纸,手术刀,尺子,烧杯或锥形瓶,

[0126] 摇床,培养箱

[0127] 3) 具体操作步骤

[0128] a. 样本制备:

[0129] 浸提液制备:取 $0.6\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 样本(表面积 1.26cm^2);样本分别为用实施例1得到的脱细胞生物真皮材料边角S边,用实施例1得到的脱细胞生物真皮材料中间S中,野生型WT。

[0130] 将以上样本浸泡于 1ml 细胞培养基质中, 37°C , 100rpm ,培养 24h ;

[0131] 对照组制备:阴性对照NC:高密度聚乙烯(表面积 1.26cm^2)浸提液;阳性对照PC:10%DMSO($100\text{u1DMSO}+900\text{u1}$ 培养基);

[0132] b. 细胞培养

[0133] 小鼠成纤维细胞(L929)培养于5% CO_2 37°C 培养箱中至近汇合状态(铺板80%);制成 10×10^4 个/ ml 细胞悬浮液接种于96孔板中,每个孔加 100u1 即 10^4 个细胞,接种孔 7×5 ;待细胞长至近汇合状态,弃去培养基;

[0134] c. 浸提液接种

[0135] 长好细胞的96孔板中每个孔分别加入 100u1 阴性对照组浸提液和阳性对照, 100u1 的100%和50%(50u1 浸提液+ 50u1 培养基)的样本浸提液,设5组平行,5% CO_2 37°C 培养箱中继续培养 24h ;见图7;

[0136] 4) 细胞毒性测试

[0137] CCK-8试剂盒测细胞增殖毒性检测:将浸提液弃去,每孔加入新的 100u1 培养液和 10u1 CCK-8溶液,培养箱内孵育 2.5h 后测OD450。

[0138] 检测结果如图8,整理图8数据和对应样品合并整理后如图9,图8和图9为检测的OD值,根据检测原理和实验数据表明脱细胞生物真皮材料对细胞的毒性非常低,所以该材料安全无毒可以作为植入型生物材料。

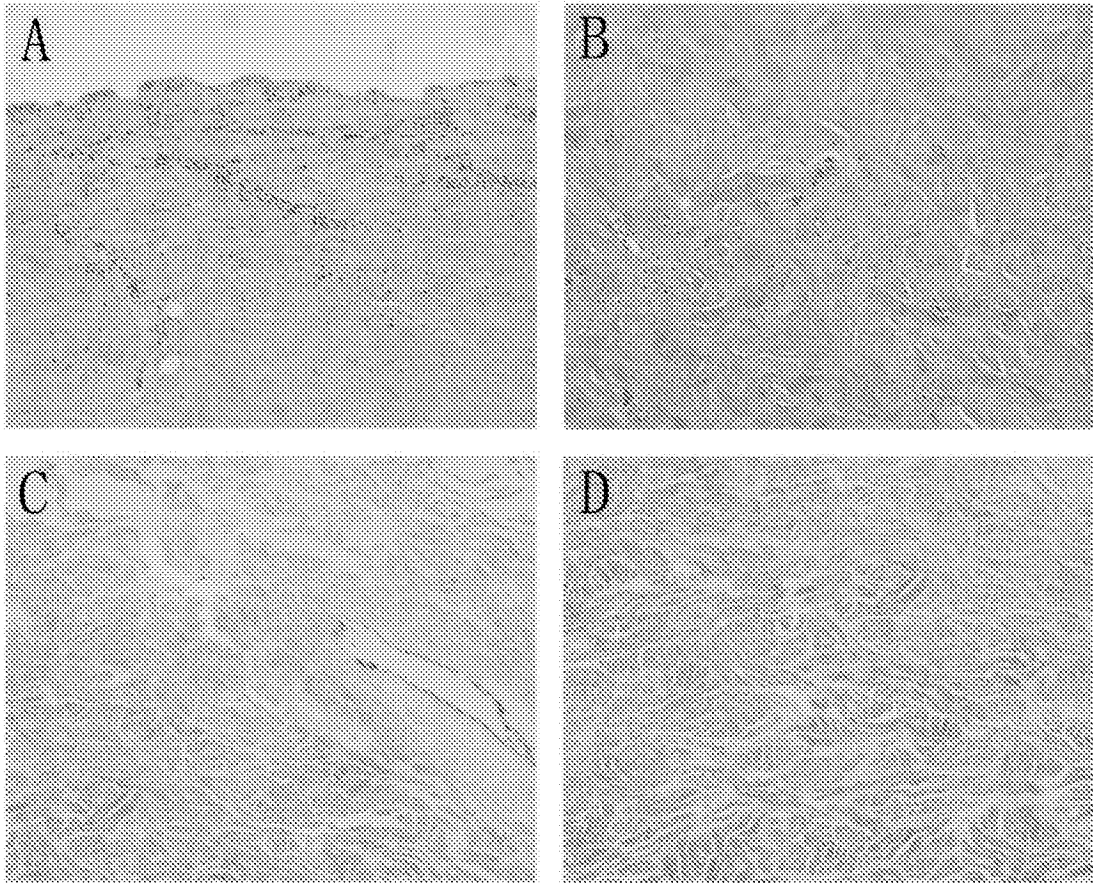


图1

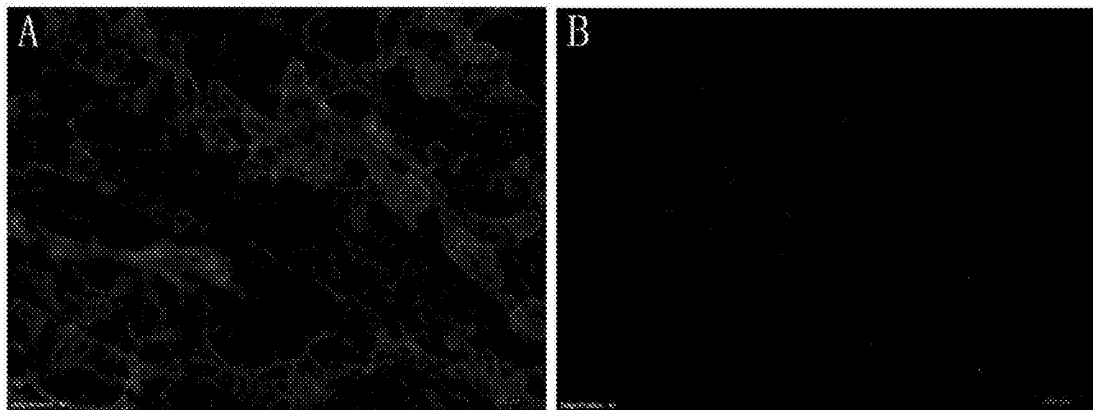


图2

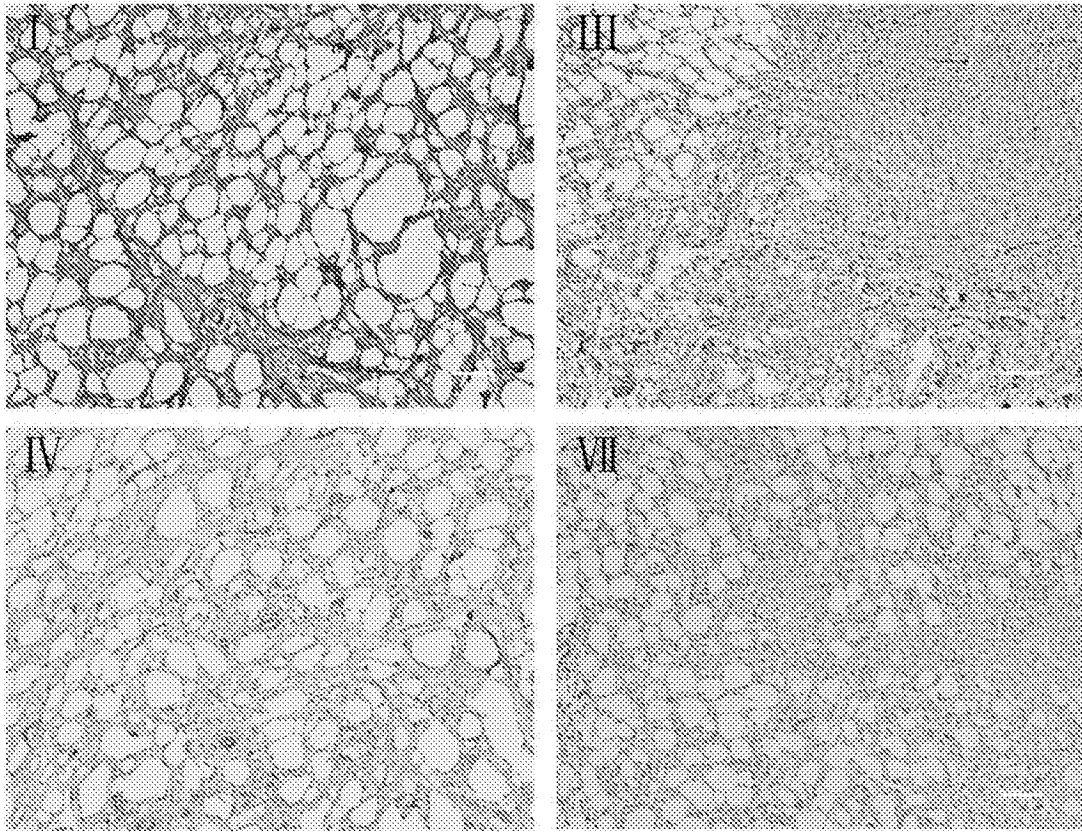


图3

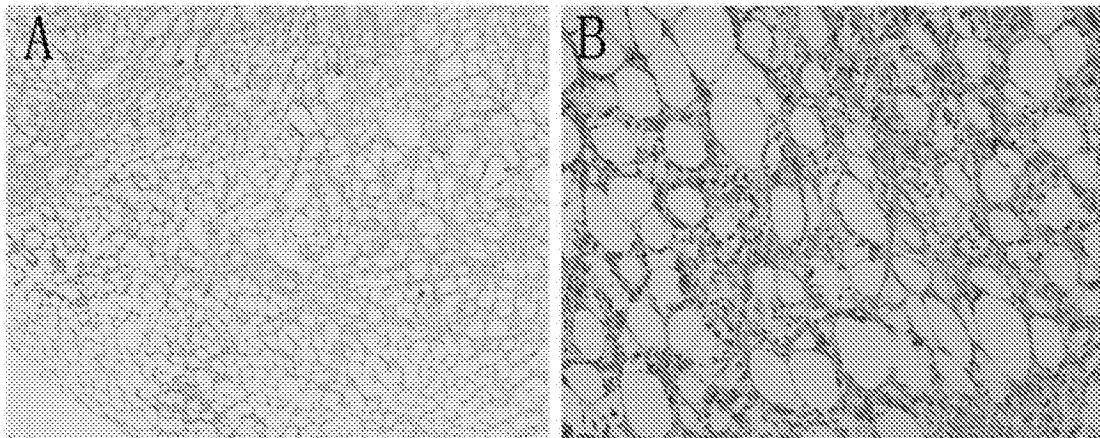


图4

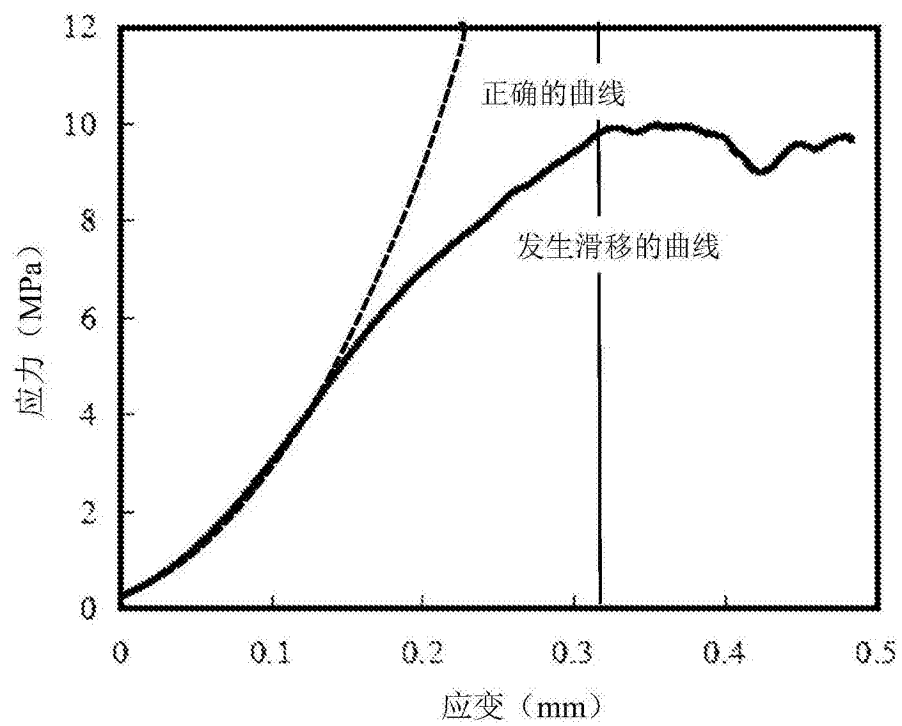


图5



图6

96孔板加样顺序，边缘空白孔为PBS											
		S 边 100%	S 中 100%	WT 100%	NC	PC	S 边 50%	S 中 50%			
		同上	同上	同上	同上	同上	同上	同上			
		同上	同上	同上	同上	同上	同上	同上			
		同上	同上	同上	同上	同上	同上	同上			
		同上	同上	同上	同上	同上	同上	同上			

图7

OD:45

0

0.058	0.054	0.062	0.074	0.052	0.089	0.077	0.065	0.095	0.059	0.088	0.068
0.034	0.078	0.071	0.059	0.089	0.053	0.071	0.055	0.065	0.076	0.067	0.059
0.081	0.062	3.801	3.815	1.346	3.841	0.807	3.836	3.827	0.066	0.079	0.075
0.041	0.037	3.792	3.817	0.989	3.838	0.803	3.842	3.848	0.071	0.057	0.051
0.064	0.066	3.834	3.813	0.876	3.841	0.791	3.829	3.807	0.055	0.003	0.084
0.021	0.002	3.801	3.796	0.836	3.867	0.876	3.842	3.839	0.068	0.128	0.058
0.062	0.076	3.817	3.819	1.207	3.835	0.762	3.834	3.842	0.077	0.066	0.089
0.063	0.039	0.081	0.078	0.077	0.054	0.072	0.037	0.063	0.069	0.076	0.077

图8

S 边 100%	S 中 100%	WT 100%	NC	PC	S 边 50%	S 中 50%
3.801	3.815	1.346	3.841	0.807	3.836	3.827
3.792	3.817	0.989	3.838	0.803	3.842	3.848
3.834	3.813	0.876	3.841	0.791	3.829	3.807
3.801	3.796	0.836	3.867	0.876	3.842	3.839
3.817	3.819	1.207	3.835	0.762	3.834	3.842

图9