



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101214393 B

(45) 授权公告日 2010.10.13

(21) 申请号 200710192030.7

(22) 申请日 2007.12.28

(73) 专利权人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路 199 号

(72) 发明人 尹桂波 张幼珠 王红卫 王曙东
王立新 吴佳林 施德兵 董智慧
符伟国

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 陶海锋

(51) Int. Cl.

A61L 27/40 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

A61L 27/26 (2006.01)

A61F 2/06 (2006.01)

D01F 8/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1887362 A, 2007.01.03, 全文.

WO 2006/136817 A1, 2006.12.28, 全文.

鲍(韦华)(韦华),张幼珠,尹桂波,虞青亮. 丝素与明胶共混静电纺丝. 纺织学报 28 3. 2007, 28(3), 1-4.

审查员 陈安玥

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

纳米纤维组织工程血管及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种组织工程材料及其制备方法,特别涉及一种纳米纤维组织工程血管及其制备方法。它由内外两层纳米纤维形成的三维网状无纺膜组成;血管内层材料为天然聚合物,按重量计,其中 40~80%为丝素,20~50%为明胶,0~20%为细胞外基质蛋白,血管外层材料为合成聚合物。其制备方法是:将天然聚合物溶解在三氟乙醇等溶剂中,合成高聚物溶解在六氟异丙醇等溶剂中,分别制成纺丝原液,采用静电纺丝工艺,在收集辊上先后形成内层和外层,取下后进行交联处理,制得纳米纤维组织工程血管。它的内层能够模仿细胞外基质构造,为内皮细胞提供良好的生长环境,支持细胞的粘附、增殖和分化,有利于血管的内皮化,外层具有良好的力学性能。

1. 一种纳米纤维组织工程血管,其特征在于:它由内外两层纳米纤维形成的三维网状无纺膜组成;所述的血管内层材料为天然聚合物,按重量计,它由40~80%的丝素、20~50%的明胶和0~20%的细胞外基质蛋白组成,内层纳米纤维直径为40~300nm;所述的血管外层材料由合成聚合物组成,外层纳米纤维直径为600~1800nm。

2. 根据权利要求1所述的一种纳米纤维组织工程血管,其特征在于:所述的细胞外基质蛋白为胶原蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白、纤维蛋白原和血清纤维结合蛋白中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的一种纳米纤维组织工程血管,其特征在于:所述的合成聚合物为聚己内酯、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸和聚羟基乙酸中的一种或多种。

4. 根据权利要求1所述的一种纳米纤维组织工程血管,其特征在于:它的口径为3~6mm,长度超过6cm,血管管壁厚度为0.3~0.7mm;按重量计,内层材料占20~50%;内层纳米纤维膜的孔隙率为60~90%,平均孔径为0.5~5 μ m。

5. 一种制备如权利要求1所述的纳米纤维组织工程血管的方法,先将蚕丝经脱胶、溶解、透析、过滤,于室温下干燥制得纯丝素蛋白,其特征在于再进行如下步骤的加工:

a. 按重量计,40~80%的丝素、20~50%的明胶和0~20%的细胞外基质蛋白共混后溶解在三氟乙醇、甲酸、六氟异丙醇和六氟丙酮中的一种或多种溶剂中,制备质量分数为8~25%的天然聚合物纺丝原液,采用静电纺丝工艺,在收集辊上形成纳米纤维三维网状无纺膜内层;所述的收集辊匀速转动并相对于纺丝喷嘴作轴向匀速运动;

b. 将合成高聚物溶解在六氟异丙醇、三氯甲烷、二氯甲烷、四氢呋喃、丙酮和二甲基甲酰胺中的一种或多种溶剂中,制备质量分数为3~8%的合成高聚物纺丝原液,采用静电纺丝工艺,在上述收集辊的无纺膜内层上形成纳米纤维三维网状无纺膜外层;

c. 将收集辊上形成的内外两层纳米纤维三维网状无纺膜取下后进行交联处理,制得纳米纤维组织工程血管。

6. 根据权利要求5所述的一种纳米纤维组织工程血管的制备方法,其特征在于:所述的收集辊经过表面处理,其方法包括氟化处理、包覆聚四氟乙烯或涂覆PVA。

7. 根据权利要求5所述的一种纳米纤维组织工程血管的制备方法,其特征在于:所述的交联处理方法包括热交联处理、紫外线辐射交联处理和化学交联剂处理。

8. 根据权利要求7所述的一种纳米纤维组织工程血管的制备方法,其特征在于:所述的热交联处理方法是在50~80 $^{\circ}$ C的温度中加热处理40~100min。

9. 根据权利要求7所述的一种纳米纤维组织工程血管的制备方法,其特征在于:所述的紫外线辐射交联处理方法是在波长为280~320nm的紫外线下辐射处理24~48h。

10. 根据权利要求7所述的一种纳米纤维组织工程血管的制备方法,其特征在于:所述化学交联剂处理的方法是在交联剂中真空浸渍30min~24h,或利用交联剂饱和蒸气处理30min~24h后,再真空干燥或于50 $^{\circ}$ C的温度条件下烘干处理1~24h;所述的交联剂为甲醇、乙醇、戊二醛、甲醛或二乙烯基砒。

纳米纤维组织工程血管及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种组织工程材料及其制备方法,特别涉及一种由丝素、明胶和细胞外基质蛋白共混形成纳米纤维膜(血管内层),再与合成高聚物纤维膜(血管外层)复合分层构建组织工程血管的方法,属于高分子材料生物学应用领域。

背景技术

[0002] 血管损伤由于自修复能力差而成为困扰医学界的难题。自1952年 Voorhees 首次研制成功维纶人造血管,并于次年用于临床取得成功以来,人们陆续开发出各种材料、多种成型方法的人造血管。现在普遍采用的移植血管主要采用涤纶(Dacron)、尼龙(Nylon)和聚四氟乙烯(PTFE)等非降解材料编织而成,但这些非降解材料不支持内皮细胞的粘附和生长,血管难以充分内皮化,对血管的长期适应性造成障碍。该类血管只能用作病变血管的替代品,且口径较粗,口径在6mm以下的血管易造成栓塞而在临床上无法使用。

[0003] 近年来组织工程血管(tissue engineered blood vessels, TEBV)的发展为血管损伤治疗开辟了另外的途径,组织工程血管的基本原理是使用可降解材料构建供细胞粘附和生长的支架(scaffold),体外将内皮细胞(endothelial cell, EC)等种子细胞种植于支架,培养一段时间后植入体内,在体内支架材料不断降解由宿主自身组织逐步替代,最终的结构和功能类似于自体血管,由此获得理想的中远期通畅率和抗感染性能。与编织人造血管相比,组织工程血管更具优势。当前组织工程血管的研究主要选用具有良好生物性能的天然及合成高聚物,根据细胞外基质蛋白由50~500nm纤维构成的特点,通过不同方法构建由纳米纤维组成的血管,体外引导细胞增殖、扩展和分化,体内移植后最终实现自体血管的再生。静电纺丝法能够直接形成所需口径的管状结构,而且能够模仿细胞外基质的组成和结构,为细胞提供良好的生长环境,为自体血管的再生和重建提供重要前提。

[0004] 材料的组成影响血管的力学性能和生物性能。有文献报道聚乳酸(PLA)电纺纤维膜为外层,聚己内酯(PCL)电纺纤维膜为内层的组织工程血管(Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layered electrospinning technique, Acta Biomaterialia[J], 2005, 1:575-582),虽能使血管有一定的力学性能,但因属憎水性材料不利于细胞生长和分化。天然聚合物形成的纳米纤维具有良好的生物性能,可以支持细胞生长,但力学性能差,在水中易溶解,经化学试剂处理后变脆,难以用作血管材料。

[0005] 血管材料包括天然生物材料与合成材料,两者各有优缺点,前者包含许多生物信息,提供信号,有利于细胞的粘附和生长,后者力学性能好,可塑性强。但是,利用两种材料良好的互补性,采用天然材料与合成材料相结合,形成能够同时具有良好的力学和生物学性能的复合纳米纤维组织工程血管及其制备方法的技术,目前未见报道。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术存在的不足,本发明提供一种不仅具有与人体良好的组织相容

性和生物可降解性,且还具有良好的力学性能的组织工程血管及其制备方法。

[0007] 实现本发明目的的技术方案是提供一种纳米纤维组织工程血管,它由内外两层纳米纤维形成的三维网状无纺膜组成;所述的血管内层材料为天然聚合物,按重量计,它由40~80%的丝素、20~50%的明胶和0~20%的细胞外基质蛋白组成,天然聚合物纳米纤维直径为40~300nm;所述的血管外层材料由合成聚合物组成,合成聚合物纳米纤维直径为600~1800nm。

[0008] 制备上述纳米纤维组织工程血管的方法,先将蚕丝经脱胶、溶解、透析、过滤,于室温下干燥制得纯丝素蛋白,再进行如下步骤的加工:

[0009] a. 按重量计,将40~80%的丝素、20~50%的明胶和0~20%的细胞外基质蛋白共混后溶解在三氟乙醇、甲酸、六氟异丙醇和六氟丙酮中的一种或多种溶剂中,制备质量分数为8~25%的天然聚合物纺丝原液,采用静电纺丝工艺,在收集辊上形成纳米纤维三维网状无纺膜内层;所述的收集辊匀速转动并相对于纺丝喷嘴作轴向匀速运动。

[0010] b. 将合成高聚物溶解在六氟异丙醇、三氯甲烷、二氯甲烷、四氢呋喃、丙酮和二甲基甲酰胺中的一种或多种溶剂中,制备质量分数为3~8%的合成高聚物纺丝原液,采用静电纺丝工艺,在上述收集辊的无纺膜内层上形成纳米纤维三维网状无纺膜外层;

[0011] c. 将收集辊上形成的内外两层纳米纤维三维网状无纺膜取下后进行交联处理,制得纳米纤维组织工程血管。

[0012] 上述技术方案中,所述的细胞外基质蛋白为胶原蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白、纤维蛋白原和血清纤维结合蛋白中的一种或多种。

[0013] 所述的合成聚合物为聚己内酯(PCL)、聚乳酸(PLA)、聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)和聚羟基乙酸(PGA)中的一种或多种。

[0014] 所述纳米纤维组织工程血管的口径为3~6mm,长度超过6cm,血管管壁厚度为0.3~0.7mm;按重量计,内层材料占20~50%;内层纳米纤维膜的孔隙率为60~90%,平均孔径为0.5~5 μ m。

[0015] 所述的收集辊经过表面处理,其方法包括氟化处理、包覆聚四氟乙烯或涂覆聚乙烯醇(PVA)。

[0016] 所述的交联处理方法包括热交联处理、紫外线辐射交联处理和化学交联剂处理。

[0017] 其中,所述的热交联处理方法是在50~80 $^{\circ}$ C的温度中加热处理40~100min。所述的紫外线辐射交联处理方法是在波长为280~320nm的紫外线下辐射处理24~48h。所述化学交联剂处理的方法是在交联剂中真空浸渍30min~24h,或利用交联剂饱和蒸气处理30min~24h后,再真空干燥或于50 $^{\circ}$ C的温度条件下烘干处理1~24h;所述的交联剂为甲醇、乙醇、戊二醛、甲醛或二乙烯基砒。

[0018] 本发明技术方案中,根据不同材料具有不同降解速度的特点,可通过改变材料的组成和比例的方法,从而获得具有不同降解速度的组织工程血管,同时,还可通过改变化学交联方法和工艺条件,以改善分子内部构象,调节结晶度,获得具有不同降解速度的组织工程血管。

[0019] 与现有技术相比,本发明具有以下明显的有益效果:

[0020] 1. 本发明所提供的一种分层构建的纳米纤维组织工程血管,内层由40~300nm的天然聚合物纤维组成,外层由600~1800nm的合成聚合物纤维组成,两层纤维膜结合牢

固均匀、不分离、不脱落。内层能够模仿细胞外基质构造,为内皮细胞提供良好的生长环境,支持细胞的粘附、增殖和分化,有利于血管的内皮化;外层经交联处理后,材料具有良好的强度、柔软性和弹性,能够满足作为组织工程血管的力学要求。整个血管壁纤维以无纺状排列,具有多孔结构,它的微孔弯曲,存在于纤维间,能够满足血管内外营养传输,防止血液渗透,移植时不需要预凝处理。

[0021] 2. 本发明所提供的一种分层构建的纳米纤维组织工程血管,制备工艺能够控制血管的口径、壁厚和材料组成,并且通过调节材料组成和共混比例可以改变降解速度,能够随自体血管的再生而自然降解,防止栓塞。

[0022] 3. 本发明所提供的一种分层构建的纳米纤维组织工程血管,可通过控制交联工艺条件,或改变交联方法,有效改变材料内部分子构象,调节材料结晶度,从而具有可控的降解速度,体内移植时,能够根据自体血管组织再生速度,调节血管材料的降解速度。

附图说明

[0023] 图 1 是按照本发明实施例 3 提供的技术方案所获得的组织工程血管,经成纤维细胞培养 12 天后的断面扫描电镜照片图。

具体实施方式

[0024] 下面结合附图和实施例对本发明技术方案及其效果作进一步描述:

[0025] 实施例 1:

[0026] 1. 将 0.2kg 废桑蚕丝放入 6L 浓度为 0.05% 的碳酸钠水溶液,煮沸 0.5h,重复煮三次,脱尽蚕丝表面丝胶,室温下晾干,得到丝素;

[0027] 2. 将干燥丝素用 1.2L 摩尔比为 1:8:2 的氯化钙、水、乙醇溶液,在 $75 \pm 2^\circ\text{C}$ 下加热溶解成丝素蛋白溶液;

[0028] 3. 将步骤 2 制得的丝素蛋白溶液倒入纤维素透析袋中,先用自来水透析 48h,再用去离子水透析 8h,除去溶液中的乙醇和氯化钙小分子,过滤后制得纯丝素蛋白溶液;

[0029] 4. 分别取 100ml 纯丝素蛋白溶液倒入面积为 $20 \times 20\text{cm}^2$ 的聚苯乙烯塑料盘中,在恒温恒湿 (25°C , RH65%) 下干燥成膜;

[0030] 5. 称取 6.58g 再生丝素膜和 3.49g 医用明胶,加入无水甲酸 70g,在室温下搅拌 30min,搅拌成均匀的天然聚合物纺丝原液,其质量分数为 12.5%。将 2g PLA 溶解在 48g 氯仿/丙酮(体积比 1:1)混合溶剂中,获得 4% 的天然聚合物纺丝原液;

[0031] 6. 将步骤 5 制得的天然聚合物纺丝原液倒入微量注射泵,由泵将纺丝液喂入纺丝管内。将静电发生器的阳极与金属喷嘴相接,阴极与金属转辊摩擦的电刷连接,转棍直径 5mm,转棍表面包覆聚四氟乙烯,转棍长度为 8cm,收集辊平移速度为 2m/h,转速为 350rpm。调节静电发生器的静电压为 25kV,纺丝距离为 10cm,开启静电发生器和微量注射泵,调节微量注射泵使纺丝液的喂入量为 0.3ml/h,连续静电纺丝 75min,在转辊上收集到由天然聚合物材料形成的纳米纤维三维网状无纺膜内层;

[0032] 7. 将步骤 5 所得的 PLA 纺丝液倒入微量注射泵,由泵将纺丝液注入纺丝管内。按步骤 6 进行静电纺丝,静电纺丝电压为 26kV,纺丝距离 13cm,纺丝液喂入量 0.1ml/h,收集辊平移速度为 2m/h,转速为 1500rpm。在步骤 6 已形成的包覆有纳米纤维无纺膜内层的转辊

上收集由 PLA 材料形成的纳米纤维无纺膜外层,静电纺丝时间为 45min,即可分层构建组织工程血管;

[0033] 8. 将步骤 7 制备的组织工程血管从转辊取下,于室温下放入 100ml 无水甲醇中真空浸渍 1h,随后取出放入真空干燥箱内抽真空 24h,用双层塑料袋包装并在高频封口机上封口,然后用 γ 射线辐照消毒,得到纳米纤维组织工程血管。它的内层纤维直径为 40nm ~ 300nm,孔径为 0.8 μ m,孔隙率为 81%,血管壁厚为 0.45mm,口径为 5mm,长度为 8mm,爆破强度为 0.3MPa,缝合强度为 1.2N/针,内层纤维膜能够支持成纤维细胞、人脐带静脉内皮细胞和平滑肌细胞增殖、粘附和扩展,外层能够提供良好力学性能的组织工程血管的方法。

[0034] 本实施例中所述的组织工程血管的降解速度随外层 PLA 含量和内层明胶含量的增加而加快,甲醇处理时间增长,降解速度变慢。

[0035] 实施例二:

[0036] 1. 将 0.1kg 下脚蚕丝放入 3L 浓度为 0.05% 的碳酸钠水溶液中,煮沸 0.5h,重复处理三次,脱尽蚕丝外围的丝胶,得到丝素;

[0037] 2. 将步骤 1 所得的干燥丝素用 0.6L 摩尔比为 1 : 8 : 2 的氯化钙、水、乙醇溶液,在 78 \pm 2 $^{\circ}$ C 下加热溶解成丝素蛋白溶液;

[0038] 3. 将上述丝素蛋白溶液倒入纤维素透析袋中,先用自来水透析,再用去离子水透析,以除去溶液中的乙醇和氯化钙小分子,再用多层脱脂纱布过滤,制得纯丝素蛋白溶液;

[0039] 4. 分别取 100ml 纯丝素蛋白溶液倒入面积为 20 \times 20cm² 的不锈钢盘中,在 -20 $^{\circ}$ C 下冷冻 8h,再置于冷冻干燥机内真空干燥 20h,制得海绵状再生丝素膜;

[0040] 5. 称取 7.3g 再生丝素膜、2g 明胶和 1g 弹性蛋白、0.42g 层粘连蛋白,加入 69.5g 三氟乙醇中,在室温下搅拌 30 分钟,纺丝液质量分数为 13.4%。称取 2.4g PLGA 溶解在 56.9g 三氯甲烷中,获得 4% 的纺丝液;

[0041] 6. 将步骤 5 制得的丝素-弹性蛋白纺丝液倒入微量注射泵。由泵将纺丝液注入纺丝管内。将静电发生器的阳极与金属喷嘴相接,阴极与金属转辊摩擦的电刷连接,调节静电发生器的静电压为 28kV,纺丝距离为 13cm,开启静电发生器和微量注射泵,调节微量注射泵使纺丝液的喂入量为 0.3ml/h,转辊直径为 4mm,长度为 8cm,表面经氟化处理,收集辊平移速度为 3m/h,转速为 350rpm,连续静电纺丝 60min,在转辊上收集到丝素-明胶共混纳米纤维膜;

[0042] 7. 将步骤 5 所得的 PLGA 纺丝液倒入微量注射泵,由泵将纺丝液注入纺丝管内。按步骤 6 进行静电纺丝,静电纺丝电压为 26kV,纺丝距离 13cm、纺丝液喂入量 0.15ml/h,收集辊平移速度为 4m/h,转速为 1000rpm。在步骤 6 已形成的包覆有丝素-弹性蛋白纳米纤维膜的转辊上收集 PLGA 纤维膜,静电纺丝时间为 38min,即可分层构建组织工程用血管;

[0043] 8. 将步骤 7 制备的组织工程血管从转辊取下,于 70 $^{\circ}$ C 下加热 60min,在波长为 280nm 的紫外线下辐射 36h,用双层塑料袋包装并在高频封口机上封口,然后用 γ 射线辐照消毒,得到纳米纤维组织工程血管,其内层纤维直径在 40nm ~ 300nm 之间,孔径为 0.8 μ m,孔隙率为 84%,血管壁厚为 0.49mm,口径为 4mm,长度为 8mm,爆破强度为 0.25MPa,缝合强度为 0.9N/针。

[0044] 本实施例中所述的组织工程血管的降解速度随外层 PLGA 含量和内层明胶蛋白含量的增加而加快,加热及在紫外线下辐射时间增长,降解速度变慢。

[0045] 实施例三：

[0046] 1. 将 0.15kg 下脚蚕丝放入 4.5L 浓度为 0.05% 的碳酸钠水溶液中，煮沸 0.5h，重复处理三次，得到丝素；

[0047] 2. 将步骤 1 所得的干燥丝素用 0.9L 摩尔比为 1 : 8 : 2 的氯化钙、水、乙醇溶液，在 $75 \pm 2^\circ\text{C}$ 下加热溶解成丝素蛋白溶液；

[0048] 3. 将上述丝素蛋白溶液倒入纤维素透析袋中，先用自来水透析，再用去离子水透析，以除去溶液中的乙醇和氯化钙小分子，再用多层脱脂纱布过滤，制得纯丝素蛋白溶液；

[0049] 4. 分别取 100ml 纯丝素蛋白溶液倒入面积为 $20 \times 20\text{cm}^2$ 的 ABS 盘中，室温干燥得再生丝素膜；

[0050] 5. 称取 6.7g 再生丝素膜、1.3g 明胶和 0.7g 弹性蛋白，加入 70.5g 六氟异丙醇中，在室温下搅拌 30 分钟，纺丝液质量分数为 12%。称取 1.2g PLA 和 1.3g PCL 溶解在 58.3g 三氯甲烷 / 丙酮（体积比 2 : 1）中，获得 4.11% 的纺丝液；

[0051] 6. 将步骤 5 制得的丝素 - 弹性蛋白 - 胶原纺丝液倒入微量注射泵。由泵将纺丝液注入纺丝管内。将静电发生器的阳极与金属喷嘴相接，阴极与金属转辊摩擦的电刷连接，调节静电发生器的静电压为 26kV，纺丝距离为 15cm，开启静电发生器和微量注射泵，调节微量注射泵使纺丝液的喂入量为 0.2ml/h，转辊直径为 4mm，长度为 8cm，表面涂覆 PVA，收集辊平移速度为 3m/h，转速为 500rpm，连续静电纺丝 40min，在转辊上收集到丝素 - 弹性蛋白 - 胶原共混纳米纤维膜；

[0052] 7. 将步骤 5 所得的 PLA-PCL 纺丝液倒入微量注射泵，由泵将纺丝液注入纺丝管内。按步骤 6 进行静电纺丝，静电纺丝电压为 30kV，纺丝距离 15cm、纺丝液喂入量 0.25ml/h，收集辊平移速度为 4m/h，转速为 1800rpm。在步骤 6 已形成的包覆有丝素 - 弹性蛋白 - 胶原纳米纤维膜的转辊上收集 PLA-PCL 纤维膜，静电纺丝时间为 40min，即可分层构建组织工程用血管；

[0053] 8. 将步骤 7 制备的组织工程血管从转辊取下，放入甲醛饱和蒸气中处理 1h，随后取出放入真空干燥箱内抽真空 24h，用双层塑料袋包装并在高频封口机上封口，然后用 γ 射线辐照消毒，得到纳米纤维组织工程血管，内层纤维直径在 60nm ~ 300nm 之间，孔隙率为 79%，孔径为 $1.8 \mu\text{m}$ ，血管壁厚为 0.47mm，口径为 4mm，长度为 8mm，爆破强度为 0.4MPa，缝合强度为 1.5N/针。

[0054] 本实施例中所述的组织工程血管的降解速度随外层 PLA 和内层明胶蛋白含量的增加而提高，在饱和蒸汽中处理时间提高，降解速度变慢。

[0055] 将成纤维细胞植入内层纳米纤维膜内生长、增殖。参见附图 1，成纤维细胞经 12 天的培养后，由断面扫描电镜照片图可以看到细胞粘附在共混层纤维表面，细胞呈纺锤形并以单层细胞排列在纤维表面，细胞连为整体，表明纳米纤维能够支持细胞的粘附和增殖。

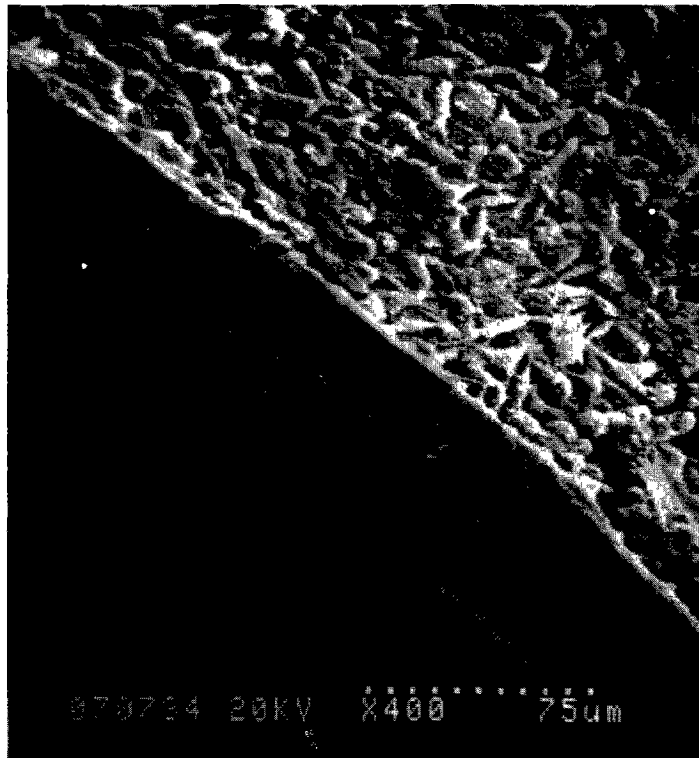


图 1