



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105999400 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610552832.3

(22)申请日 2016.07.14

(71)申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 邓源 江川 李翠笛 李涛

王金武 戴尅戎

(74)专利代理机构 上海交达专利事务所 31201

代理人 王毓理 王锡麟

(51)Int.Cl.

A61L 27/12(2006.01)

A61L 27/02(2006.01)

A61L 27/56(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

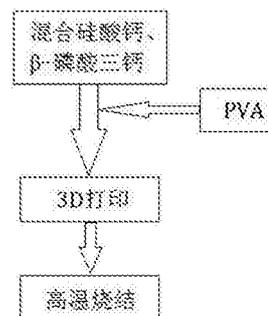
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

## (54)发明名称

用于促成骨成血管的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料及其制备方法

## (57)摘要

一种用于促成骨成血管的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料及其制备方法,通过按质量比混合硅酸钙(CS)和磷酸三钙( $\beta$ -TCP)的粉末,加入聚乙烯醇(PVA)均匀混合成糊状物,进行3D打印,将打印出的三维模型在常温干燥后进行高温烧结,得到CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料,孔道截面为 $350\mu\text{m}\times 350\mu\text{m}$ 的正方形;本发明工艺简单,具备较好的生物相容性和均匀贯通的孔道结构,有利于骨诱导和促血管生成。



1. 一种用于促成骨成血管的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料,其特征在于,具有正方形孔道结构。

2. 根据权利要求1所述的多孔复合材料,其特征是,所述的正方形孔道结构的孔道截面为 $350\mu\text{m}\times 350\mu\text{m}$ 。

3. 一种生产权利要求1所述的多孔复合材料的制备方法,其特征在于,通过按质量比混合硅酸钙和磷酸三钙的粉末,加入聚乙烯醇均匀混合成糊状物,进行3D打印,将打印出的三维模型在常温干燥后进行高温烧结,得到CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征是,所述的CS/ $\beta$ -TCP质量比为1~10%。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征是,所述的聚乙烯醇与CS/ $\beta$ -TCP混合粉末的质量比为6%。

6. 根据权利要求3所述的方法,其特征是,具体包括以下步骤:

步骤1、按照硅酸钙占总粉末质量为0%~10%的质量比称取硅酸钙粉末和 $\beta$ -磷酸三钙粉末共5g,在两支50mL离心管中分别过筛混合,逐一加入0.3gPVA混合均匀为糊状物,装入3Dbio-plotter打印机的料筒中;

步骤2、利用计算机辅助软件CAD进行三维模型建模,将材料参数保存为STL格式,导入3D bio-plotter逐层打印三维结构模型;

步骤3、打印出的三维结构模型常温干燥24h后进行高温烧结,得到烧结后的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料。

7. 一种块状多孔支架,其特征在于,根据上述任一权利要求所述的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料制成。

## 用于促成骨成血管的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种生物学材料修复骨组织领域的技术,具体是一种用于促成骨成血管的CS/ $\beta$ -TCP(Calcium Silicate/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate,硅酸钙/ $\beta$ -磷酸三钙)多孔复合材料及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 全球每年因创伤、肿瘤切除、慢性骨髓炎、血管坏死等导致的骨缺损或骨坏死的病人高达数千万,临床上急需大量合适的骨移植材料。目前临床上治疗骨缺损的主要方法有:自体骨移植、异体骨移植、人工生物材料填充。其中,自体骨移植是目前的金标准,但其来源有限,不能满足大段骨缺损的填充,并且会对病人造成二次伤害,延长手术和恢复时间。异体骨作为已广泛临床应用的次于自体骨的备选骨修复材料之一,主要包括同种异体骨(尸骨)和异种异体骨(牛骨、猪骨等),其虽能大量获取,但却具有一定的免疫原性,易造成感染。近年来,人工生物材料逐渐应用于临床,如HA、TCP、PLGA。但是,在修复自体血运不丰富的骨组织或严重大段骨缺损时,结合异体骨或人工生物材料的治疗常出现骨吸收、骨坏死等并发症。主要原因可能是血管较难长入其内,没有形成一个整合的具有血运的活性结构。

[0003] 目前在临床上为了保证缺损区具有良好血运以获得较好的骨修复效果,医生主要取带有血管蒂的自体骨进行治疗,取骨位点有髂骨和腓骨。当自体骨量不够时,将结合异体骨或人工生物材料填补缝隙,甚至将其作为大段支架材料进行治疗。相对于自体骨,异体骨移植易发生感染、排异等并发症,并且其成骨诱导性、成骨整合性依旧不够理想,没有促进血管生成的作用。临床上已应用的人工无机生物填充材料TCP、HA等常见形态是颗粒状至体积 $1\text{cm}^3$ 不等的不规则小块。HA在体内不会降解,TCP没有骨诱导性和促血管生成效果,并且块状内部没有均匀贯通的孔道结构,因此骨传导和骨整合效果均不够理想。综上所述,通过一种简单可控的技术制备出一种具有良好生物相容性、均匀贯通的孔道结构、成骨诱导性和促血管生成的人工生物填充材料,将有利于推动临床骨组织缺损的治疗。

### 发明内容

[0004] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提出一种用于促成骨成血管的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料及其制备方法,通过3D打印技术制备一定质量比的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合支架,高温烧结后得到具有良好生物相容性、均匀贯通的孔道结构、骨诱导性、骨传导性以及促血管生成的多孔复合材料,有望作为骨填充材料用于修复骨组织。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0006] 本发明涉及一种用于促成骨成血管的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料,具有正方形孔道结构。

[0007] 所述的正方形孔道结构的孔道截面为 $350\mu\text{m} \times 350\mu\text{m}$ ,能够显著的促进血管的长入、骨的生成与整合。

[0008] 本发明涉及的材料的制作方法,通过按质量比混合硅酸钙(CS)和磷酸三钙( $\beta$ -

TCP)的粉末,加入聚乙烯醇(PVA)均匀混合成糊状物,进行3D打印,将打印出的三维支架在常温干燥后进行高温烧结,得到CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料。

[0009] 所述的CS/ $\beta$ -TCP质量比为1~10%。

[0010] 优选的,所述的CS/ $\beta$ -TCP质量比为1~5%。

[0011] 所述的聚乙烯醇与CS/ $\beta$ -TCP混合粉末的质量比为6%。

[0012] 本发明涉及一种多孔块状支架材料,基于上述CS/ $\beta$ -TCP复合材料制成。

#### 技术效果

[0013] 与现有技术相比,本发明通过实验验证,5%质量比的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料具有良好的生物相容性和均匀贯通的 $350\mu\text{m}\times 350\mu\text{m}$ 的正方形孔道结构,比表面积大,有利于细胞的粘附增殖和血管的长入、骨的生成与整合;多孔复合材料中硅离子的存在,使其具备成骨诱导性,并具有促血管生成效果,有望减少临床上骨吸收、骨坏死等并发症的发病率。

#### 附图说明

[0014] 图1为本发明CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料制备方法示意图;

[0015] 图2为HBMSCs细胞增殖实验结果图;

[0016] 图3为HUVECs细胞增殖实验结果图;

[0017] 图4为HBMSCs和HUVECs在多孔复合材料上的生长状态的扫描电镜图;

[0018] 图中:(a)为在 $\beta$ -TCP上的HBMSCs,(b)为在5%的CS/ $\beta$ -TCP上的HBMSCs,(c)为在 $\beta$ -TCP上的HUVECs,(d)为在5%的CS/ $\beta$ -TCP上的HUVECs;

[0019] 图5为碱性磷酸酶活性检测结果图;

[0020] 图中:(a)为 $\beta$ -TCP组,(b)为5%的CS/ $\beta$ -TCP组;

[0021] 图6为体外内皮细胞成管检测结果图;

[0022] 图中:(a)为 $\beta$ -TCP组,(b)为5%的CS/ $\beta$ -TCP组;

[0023] 图7为裸鼠皮下masson检测成骨结果图;

[0024] 图中:(a)为 $\beta$ -TCP组,(b)为5%的CS/ $\beta$ -TCP组;

[0025] 图8为裸鼠皮下masson检测成血管效果图。

#### 具体实施方式

[0026] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

##### 实施例1

[0027] 本实施例涉及一种用于促成骨成血管的块状支架材料,采用CS/ $\beta$ -TCP复合材料制成,孔道截面为 $350\mu\text{m}\times 350\mu\text{m}$ 的正方形。

[0028] 如图1所示,本实施例包括以下步骤:

[0029] 步骤1、按照硅酸钙占粉末总量的0%、5%、10%的质量比称取硅酸钙粉末和 $\beta$ -磷酸三钙粉末共5g,在两支50mL离心管中分别过筛混合,逐一加入0.3gPVA混合均匀为糊状物,装入3D bio-plotter打印机的料筒中。

[0030] 所述的硅酸钙粉末为实验室自制,按1:1的摩尔比将硅酸钠与硝酸钙搅拌混匀过

夜后过滤悬浊液,用去离子水洗涤沉淀3次,无水乙醇洗涤2次后在真空状态下干燥过夜;800℃下高温煅烧2h,用粉碎机粉碎15min后获得硅酸钙粉末。

[0031] 所述的 $\beta$ -TCP粉末的纯度大于98%。

[0032] 所述的过筛筛目为500目。

[0033] 所述的PVA与CS/ $\beta$ -TCP混合粉末的质量比为6%。

[0034] 步骤2、利用计算机辅助软件CAD进行三维模型建模,将材料参数保存为STL格式,导入3D bio-plotter逐层打印三维结构模型。

[0035] 所述的三维模型的尺寸为1cm $\times$ 1cm $\times$ 0.5cm,孔道结构为500 $\mu$ m $\times$ 500 $\mu$ m的正方形。

[0036] 所述的逐层打印的压强为300~450kPa,挤压速度为6mm/s,打印针头21G。

[0037] 步骤3、对打印出的三维结构模型常温干燥24h后进行高温烧结,得到烧结后的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料。

[0038] 所述的高温烧结的温度为1200℃,时间为2h。

[0039] 所述的烧结后的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料有20%~30%的收缩率,最终尺寸为0.7cm $\times$ 0.7cm $\times$ 0.35cm,孔道截面尺寸为350 $\mu$ m $\times$ 350 $\mu$ m。

[0040] 步骤4、对得到的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料进行实验检测。

[0041] 所述的实验检测包括:CCK-8细胞增殖实验、细胞生长状态的扫描电镜检测、ALP(alkaline phosphatase,碱性磷酸酶)活性检测、铺胶实验和动物体内实验。

[0042] 所述的CCK-8细胞增殖实验是指:将HBMSCs(Human bone marrow mesenchymal stem cells,人骨髓间充质干细胞)和HUVECs(人脐带内皮细胞)分别与组分为 $\beta$ -TCP、5%的CS/ $\beta$ -TCP和10%的CS/ $\beta$ -TCP的多孔复合材料进行混合培养,并进行CCK-8检测。

[0043] 如图2和图3所示,所制备的材料具有良好的生物相容性。HBMSCs和HUVECs观察到的实验结果相似,随着培养时间的增长,三组细胞均呈上升趋势。第1天CCK-8检测时各组间细胞活性没有显著性差异,但在第3天和第5天检测时,5%的CS/ $\beta$ -TCP组的生物相容性均比10%的CS/ $\beta$ -TCP组的生物相容性好,所以5%的CS/ $\beta$ -TCP是优选组。

[0044] 所述的细胞生长状态的扫描电镜检测是指:将HBMSCs和HUVECs分别接种到 $\beta$ -TCP和质量比为5%的CS/ $\beta$ -TCP的多孔复合材料上,培养3d后做扫描电镜观察。

[0045] 如图4所示,5%的CS/ $\beta$ -TCP的材料结构均一,内部孔道结构为350 $\mu$ m $\times$ 350 $\mu$ m的正方形,HBMSCs和HUVECs在5%的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料上有显著的增殖,细胞铺展姿态良好。

[0046] 所述的ALP活性检测是指:将HBMSCs接种在24孔板中, $\beta$ -TCP和5%的SC/ $\beta$ -TCP分别放置于对应的Transwell小室中,加入成骨诱导液进行7d的诱导后进行ALP活性检测。

[0047] 由于HBMSCs在成骨诱导液诱导下可以向成骨细胞分化,并分泌碱性磷酸酶(ALP),ALP表达量高,则说明体外成骨较好。

[0048] 如图5所示,5%的CS/ $\beta$ -TCP组相对于 $\beta$ -TCP组的多孔复合材料具有较高的ALP活性表达,即具有较好的成骨诱导性。

[0049] 所述的铺胶实验是指:在24孔板中铺250 $\mu$ l的基质胶(matrigel),基质胶凝固后,将内皮细胞接种在基质胶上,在对应孔中放置transwell小室,在Transwell小室中放入对应的 $\beta$ -TCP或5%的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料,在37℃培养箱中培养2h后观察基质胶上的内皮细胞的成管情况。

[0050] 如图6所示,5%的CS/ $\beta$ -TCP组的内皮细胞形成管状结构的效果要好于 $\beta$ -TCP组的成管效果。

[0051] 所述的动物体内实验是指:将 $\beta$ -TCP和5%的CS/ $\beta$ -TCP多孔复合材料植入裸鼠背部皮下,8w后取材做masson分析检测。

[0052] 由于裸鼠背部皮下是一个相对缺血的环境,且干细胞稀少,能够较好模拟人体大段骨缺损中央较差血运与较少细胞的环境,以及本身血运不丰富的骨的缺损环境,是经典的异位成骨模型。

[0053] 如图7和图8所示,5%的CS/ $\beta$ -TCP组较 $\beta$ -TCP组具有较好的血管生成,血管有长入多孔复合材料内部;5%的CS/ $\beta$ -TCP孔道内有较好的成骨效果,具有显著性差异。

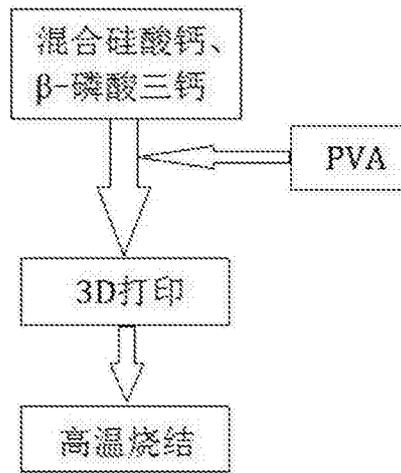


图1

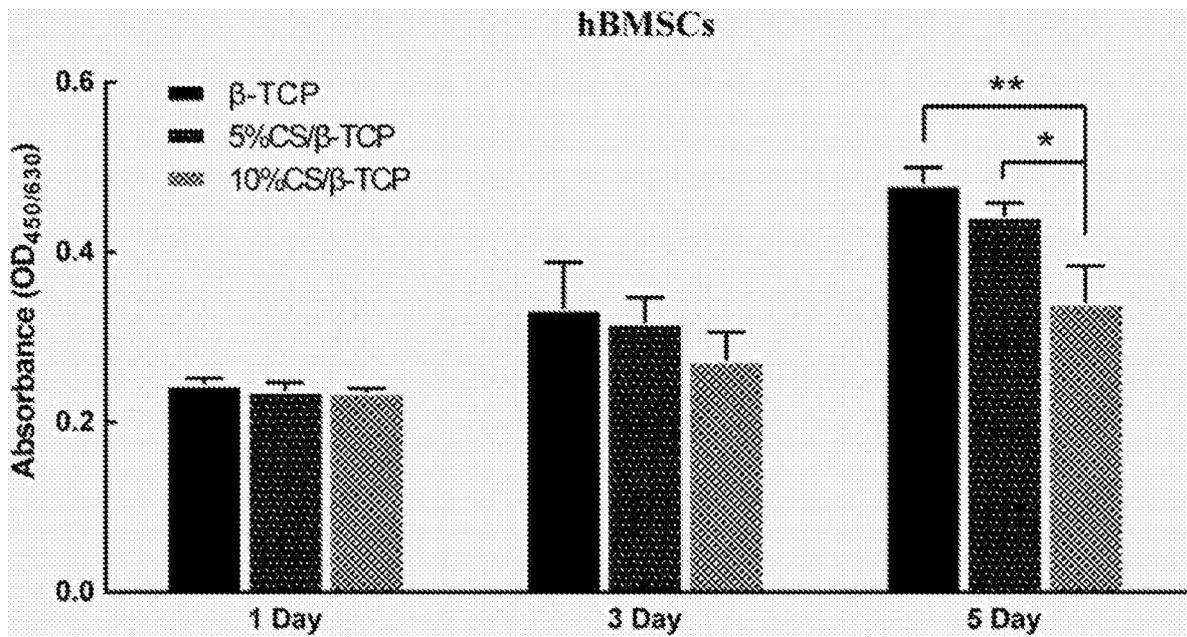


图2

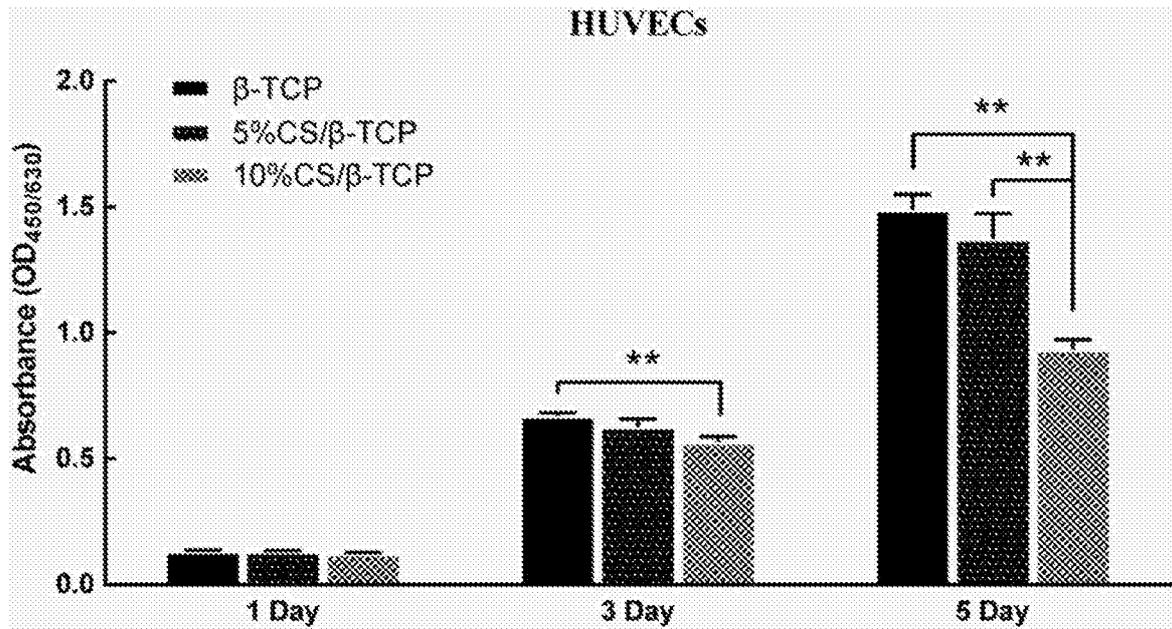


图3

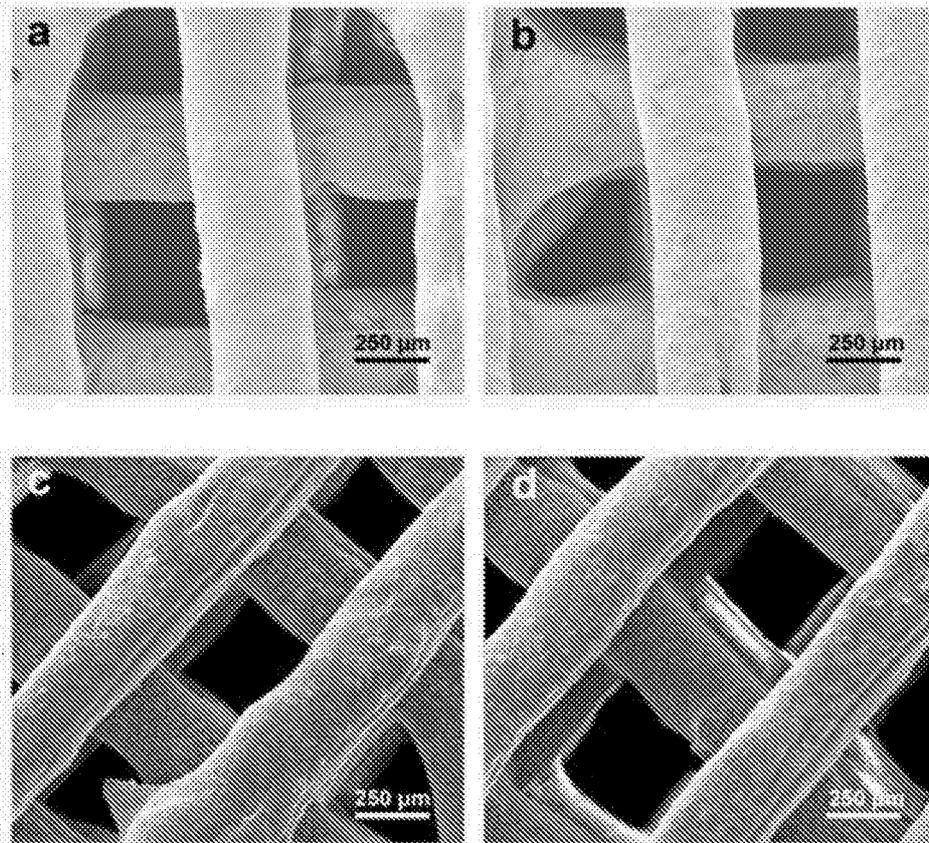


图4

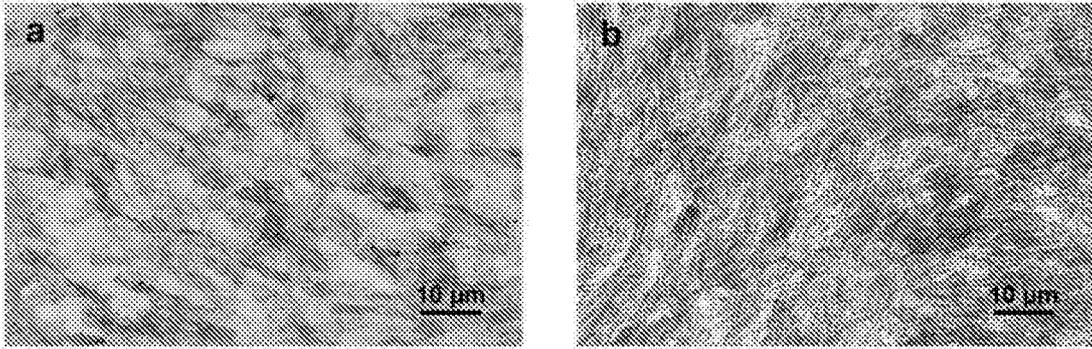


图5

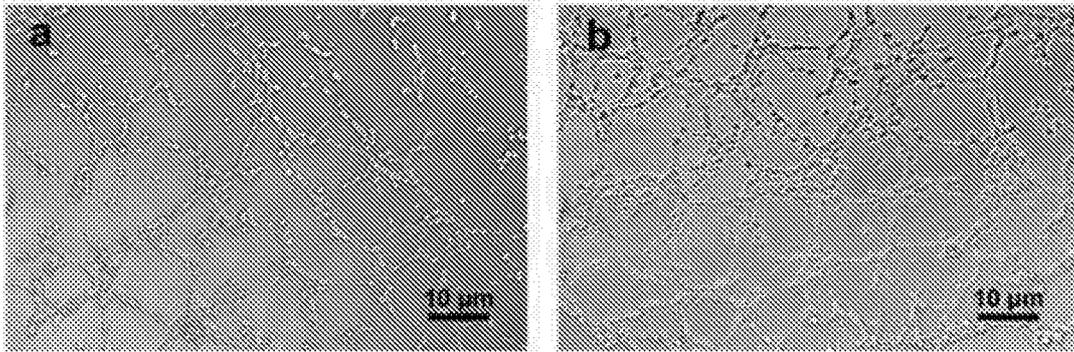


图6

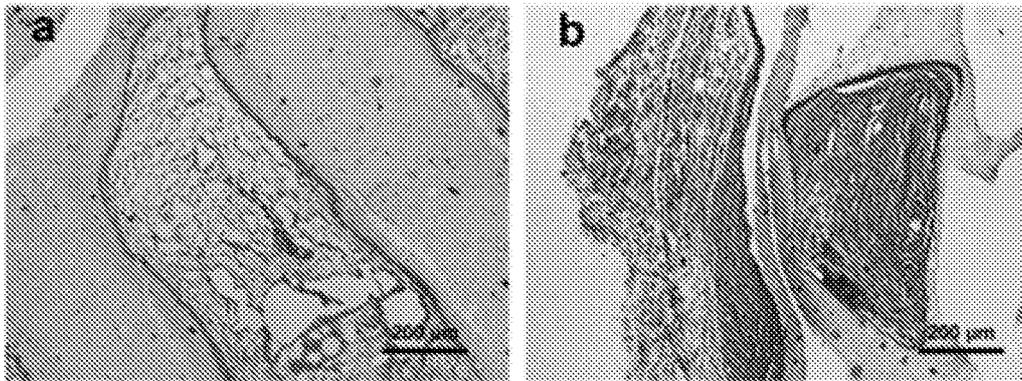


图7

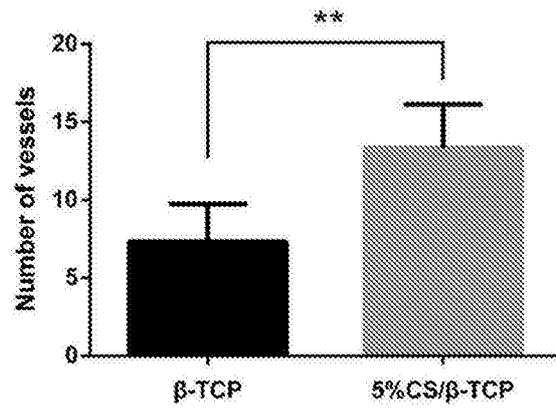


图8