



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114949354 B

(45) 授权公告日 2023.08.18

(21) 申请号 202210360549.6

A61L 27/54 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.07

B29D 7/01 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

(56) 对比文件

申请公布号 CN 114949354 A

CN 102012632 A, 2011.04.13

(43) 申请公布日 2022.08.30

CN 111803231 A, 2020.10.23

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

CN 113769158 A, 2021.12.10

地址 518000 广东省深圳市南山区粤海街道高新技术产业园南区粤兴一道18号香港理工大学产学研大楼205室

US 2020101305 A1, 2020.04.02

(72) 发明人 赵昕 杨雨禾 徐天鹏 赵远锦

审查员 郑森

(74) 专利代理机构 北京华清迪源知识产权代理有限公司 11577

专利代理人 杜立军

(51) Int.Cl.

A61L 27/34 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图6页

(54) 发明名称

一种粘附人工骨膜及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于促进骨修复的人工骨膜及其制备方法与应用。所述方法包括以下步骤：以具有仿天然骨膜微凹槽的模板和壁虎仿生刚毛孔槽结构模板组合形成模具；向所述模具中加入成膜前体材料，而后得到具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌和壁虎仿生刚毛结构的人工骨膜。本发明提供的仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌和壁虎仿生刚毛的双面人工骨膜制备方法具有简便快捷的特点，且能够保留模板形状，得到的人工骨膜能够有效地紧密贴附骨组织，同时诱导间充质干细胞(MSC)成骨分化与内皮细胞(EC)成血管分化。



1. 一种用于促进骨修复的人工骨膜的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤: 以具有仿天然骨膜微凹槽的模板和壁虎仿生刚毛孔槽结构模板组合形成模具; 向所述模具中加入成膜前体材料, 经过抽真空挥发、化学交联或紫外光交联处理得到具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌和壁虎仿生刚毛结构的人工骨膜;

所述人工骨膜的制备过程还包括:

将所述人工骨膜浸泡在含有合成聚甲基丙烯酰胺-羟乙基甲基丙烯酸酯(DMA-HEMA)的乙醇溶液中, 该聚甲基丙烯酰胺-羟乙基甲基丙烯酸酯(DMA-HEMA)在所述人工骨膜结构表面形成具有儿茶酚氨基团的涂层, 得到涂覆有贻贝仿生儿茶酚氨涂层的人工骨膜。

2. 如权利要求1所述的用于促进骨修复的人工骨膜的制备方法, 其特征在于,

所述仿天然骨膜微凹槽的模板的制备过程为:

按照设计要求设计掩膜版, 将紫外光通过所述掩膜版照射光刻胶薄膜, 通过显影技术除去未曝光区域光刻胶, 使得掩膜版图形复制到光刻胶薄膜上;

再通过刻蚀技术将所述光刻胶薄膜仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌结构转移到模板基片上, 形成仿天然骨膜微凹槽的模板。

3. 如权利要求2所述的用于促进骨修复的人工骨膜的制备方法, 其特征在于,

所述仿天然骨膜微凹槽的模板的凹槽宽度为20-160μm;

所述凹槽的深度为10-80μm。

4. 如权利要求1所述的用于促进骨修复的人工骨膜的制备方法, 其特征在于,

所述人工骨膜的厚度为100-1000μm。

5. 如权利要求1所述的用于促进骨修复的人工骨膜的制备方法, 其特征在于,

所述壁虎仿生刚毛孔槽结构模板的制备过程为:

按照设计要求设计掩膜版, 将紫外光通过所述掩膜版照射光刻胶薄膜, 通过显影技术除去未曝光区域光刻胶, 使得掩膜版图形复制到光刻胶薄膜上;

再通过刻蚀技术将所述壁虎仿生刚毛结构转移到模板基片上, 形成壁虎仿生刚毛孔槽结构模板。

6. 如权利要求5所述的用于促进骨修复的人工骨膜的制备方法, 其特征在于,

所述壁虎仿生刚毛结构的微柱直径为1-50μm, 微柱高度为1-50μm, 微柱间隔为1-50μm。

7. 权利要求1-6任一所述方法制备的用于促进骨修复的人工骨膜在如下任一中的应用,

- (a) 促进间充质干细胞贴附;
- (b) 促进间充质干细胞成骨分化;
- (c) 促进内皮细胞成血管分化;
- (d) 提高成骨基因的表达与成血管基因的表达;
- (e) 促进骨组织再生和修复。

一种粘附人工骨膜及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗器械技术领域,具体涉及一种用于促进骨修复的人工骨膜及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 骨膜是一种致密的结缔组织膜,包裹大多数骨骼的外表面。相关研究表明,骨膜在骨组织的动态重建过程中具有重要作用,其促骨再生能力也被广泛认可。因此,骨膜在骨缺损重建中起决定性作用。一般认为,有效的骨膜组织能明显促进重度骨缺损患者的骨愈合,尤其是骨质疏松症患者和糖尿病患者。然而,目前的人工骨膜多由细胞片、猪小肠黏膜下层、脱细胞真皮等材料制成,这些产品大多忽略了人工骨膜应具备的成骨性能与成血管性能,或者仅简单采用昂贵但脆弱的生长因子,如骨形貌发生蛋白-2(BMP-2)来增强骨愈合。然而,由于生长因子的不可控释放和短暂的半衰期,这些方法在临床中的应用仍具有很大局限性。

[0003] 一般来说,细胞的行为可受化学刺激与物理刺激调控,化学刺激虽然具有良好的细胞行为诱导效果,但由于其作用时间有限、副作用不明确等缺点,限制了其在人工骨膜中的应用。因此,物理刺激在人工骨膜的制备中受到了越来越广泛的关注。一般而言,细胞可以感觉周围物理微环境的变化而表现出特定的行为。人体组织中的细胞和细胞外基质(ECM)具有精确的分层组织结构,因此,模仿特定组织的分层结构在组织工程领域具有重要意义,而天然骨膜表现了与骨生长方向一致的纵向表面微凹槽拓扑形貌。在相关研究中,微凹槽的拓扑表面形貌被认为是调节间充质干细胞(MSC)成骨分化与内皮细胞(EC)成血管分化以促进骨修复的有效物理刺激手段。然而,到目前为止,这种仿天然骨膜的微凹槽结构仍未被引入人工骨膜的制备中。

[0004] 此外,目前的人工骨膜组织粘附性较低,不能有效附着在缺损部位,或在植入过程中需要额外固定,使其无法作为物理屏障防止周围软组织长入,也无法为细胞的附着与生长提供稳定的微环境。受壁虎启发的粘附材料在生物医用材料具有广泛的应用,这是因为壁虎足部覆盖的纤维刚毛阵列可以有效利用范德华力和毛细力,最大限度地提高界面对表面的粘附,因而被广泛应用于伤口密封和组织修复。但是,在潮湿的环境中,此类受壁虎启发的粘附材料的粘附力会大大削弱,严重影响了材料作为骨膜在骨修复中的应用。我们注意到,贻贝能有效地附着在潮湿的物体表面,这是由于它可以分泌含有儿茶酚氨的3,4-二羟基-苯丙氨酸(DOPA),从而使其具有在潮湿环境中的粘附能力。目前,具有潮湿环境下组织粘附能力的人工骨膜鲜有报道,其研发和制备面临巨大挑战。

[0005] 因此,如何制备仿生天然骨膜所具有的表面微凹槽拓扑形貌的人工骨膜,使其可诱导细胞定向生长,同时使其具备良好潮湿环境下组织粘附性,是亟待解决的技术问题。

发明内容

[0006] 为此,本发明提供用于促进骨修复的人工骨膜及其制备方法与应用。

- [0007] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:
- [0008] 本发明实施例提供一种用于促进骨修复的人工骨膜的制备方法,所述方法包括以下步骤:
- [0009] 以具有仿天然骨膜微凹槽模板和仿壁虎刚毛孔槽结构模板组合形成模具;
- [0010] 向所述模具中加入成膜前体材料,经过抽真空挥发、化学交联或紫外光交联等方法得到具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌和壁虎仿生刚毛结构的人工骨膜。
- [0011] 本发明的一个实施例中,所述仿天然骨膜微凹槽的模板的制备过程为:
- [0012] 按照设计要求设计掩膜版,将紫外光通过所述掩膜版照射光刻胶薄膜,通过显影技术除去未曝光区域光刻胶,使得掩膜版图形复制到光刻胶薄膜上;
- [0013] 再通过刻蚀技术将所述光刻胶薄膜仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌结构转移到模板基片上,形成仿天然骨膜微凹槽的模板。
- [0014] 本发明的一个实施例中,所述仿天然骨膜微凹槽的模板的凹槽宽度为20-160 μm ;
- [0015] 所述凹槽的深度为10-80 μm 。
- [0016] 本发明的一个实施例中,所述人工骨膜的厚度为100-1000 μm 。
- [0017] 本发明的一个实施例中,所述壁虎仿生刚毛孔槽结构模板的制备过程为:按照设计要求设计掩膜版,将紫外光通过所述掩膜版照射光刻胶薄膜,通过显影技术除去未曝光区域光刻胶,使得掩膜版图形复制到光刻胶薄膜上;
- [0018] 再通过刻蚀技术将所述壁虎仿生刚毛结构转移到模板基片上,形成壁虎仿生刚毛孔槽结构模板。
- [0019] 本发明的一个实施例中,所述壁虎仿生刚毛结构的微柱直径为1-50 μm ,微柱高度为1-50 μm ,微柱间隔为1-50 μm 。
- [0020] 本发明的一个实施例中,所述人工骨膜的制备过程还包括:
- [0021] 将所述人工骨膜浸泡在含有合成聚甲基丙烯酰胺-羟乙基甲基丙烯酸酯(DMA-HEMA)的乙醇溶液中,该聚甲基丙烯酰胺-羟乙基甲基丙烯酸酯(DMA-HEMA)在所述人工骨膜结构表面形成具有儿茶酚氨基团的涂层,得到涂覆有贻贝仿生儿茶酚氨基涂层的人工骨膜。
- [0022] 首先,合成聚甲基丙烯酰胺-羟乙基甲基丙烯酸酯(DMA-HEMA),具体如下:将羟乙基甲基丙烯酸酯(HEMA)的抑制剂通过碱性氧化铝过滤去除,然后将2.1 mL的HEMA,0.68g的多巴胺甲基丙烯酰胺(DMA)和42mg的偶氮二异丁腈与9.5mL的二甲基甲酰胺混合在一个50mL的圆底烧瓶中。用氮气将溶液鼓泡30min。在60°C下聚合3小时,将得到的溶液用10mL甲醇稀释。
- [0023] 将稀释后的溶液滴入150mL乙醚中,适量搅拌,沉淀合成的共聚物。所得DMA-HEMA聚合物溶于二氯甲烷中,经乙醚沉淀提纯,纯化后在真空炉中干燥一夜。
- [0024] 将制备的基体膜浸泡在含有DMA-HEMA的乙醇溶液中,该聚合物可在基体结构表面形成涂层,得到了贻贝仿生儿茶酚氨基涂层结构的人工骨膜。
- [0025] 上述所述方法制备的用于促进骨修复的人工骨膜在如下任一中的应用,(a)促进间充质干细胞贴附;(b)促进间充质干细胞成骨分化;(c)促进内皮细胞成血管分化;(d)提高成骨基因的表达与成血管基因的表达;(e)促进骨组织再生和修复。
- [0026] 本发明具有如下优点:
- [0027] 1)本发明提供的仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌模板与壁虎仿生刚毛结构模板采用

成熟的光刻工艺制备,其具有技术成熟、可定制的优点;

[0028] 2) 本发明提供的人工骨膜具有贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构,该涂层可以促进细胞黏附铺展,促进干细胞的增殖,同时上述的人工骨膜具有在潮湿环境中的较强组织粘附能力。

[0029] 3) 本发明制备的人工骨膜制备方法具有简便快捷的特点,且能够保留模板形状,得到的人工骨膜能够同时诱导间充质干细胞(MSC)成骨分化与内皮细胞(EC)成血管分化;

[0030] 4) 本发明制备的人工骨膜可选用不同的成膜前体材料,制备过程可调节,以满足不同疾病需求,具备个性化制造的优点;

[0031] 5) 本发明提供的人工骨膜其基体材料具有高生物相容性,植入体内后无需二次手术取出。

附图说明

[0032] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图仅仅是示例性的,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。

[0033] 本说明书所绘示的结构、比例、大小等,均仅用以配合说明书所揭示的内容,以供熟悉此技术的人士了解与阅读,并非用以限定本发明可实施的限定条件,故不具技术上的实质意义,任何结构的修饰、比例关系的改变或大小的调整,在不影响本发明所能产生的功效及所能达成的目的下,均应仍落在本发明所揭示的技术内容得能涵盖的范围内。

[0034] 图1为本发明实施例提供的仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌模板设计图,其中,40 μm :凹槽宽度为40 μm 的仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌人工骨膜;80 μm :凹槽宽度为80 μm 的仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌人工骨膜;120 μm :凹槽宽度为120 μm 的仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌人工骨膜;

[0035] 图2为本发明实施例提供的具有壁虎仿生刚毛孔槽结构模板结构设计图;

[0036] 图3为本发明实施例提供的制备的仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌基膜扫描电镜结果图;

[0037] 图4为本发明实施例提供的制备的壁虎仿生刚毛结构扫描电镜结果;

[0038] 图5为本发明实施例提供的制备的仿天然骨膜微凹槽与壁虎仿生刚毛结构的双面骨膜照片图;

[0039] 图6为本发明实施例提供的在干燥环境(Dry)下对上述的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜进行粘附性测试图;

[0040] 图7为本发明实施例提供的在潮湿环境(Wet)下对上述的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜进行粘附性测试图;

[0041] 图8为本发明实施例提供的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的黏附能力测试图;

[0042] 图9为本发明实施例提供的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜进行生物相容性测试的检测结果;

[0043] 图10为本发明实施例提供的鼠间充质骨髓干细胞(rMSC)种植于具有仿天然骨膜

微凹槽的人工骨膜上,3天后,通过细胞F-Actin染色,观察rMSC细胞的细胞形态,与骨基因表达的结果;

[0044] 图11为本发明实施例提供的将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)种植于具有仿天然骨膜微凹槽的人工骨膜上,3天后,通过细胞F-Actin染色,观察HUVEC细胞的细胞形态,与成血管基因表达结果;

[0045] 图12为本发明实施例提供的双面仿天然骨膜微凹槽与贻贝仿生儿茶酚氨涂层壁虎仿生刚毛结构的促进组织再生的能力检测结果;

[0046] 图中:Flat-不具有凹槽结构的人工骨膜;GP-仿天然骨膜微凹槽结构骨膜;PDMH-贻贝仿生儿茶酚氨涂层壁虎仿生刚毛结构结构骨膜;GP-PDMH-仿天然骨膜微凹槽与贻贝仿生儿茶酚氨涂层壁虎仿生刚毛结构结构双面骨膜;VEGF-血管内皮生长因子;eNOS-一氧化氮合酶;OCN-骨钙蛋白。

具体实施方式

[0047] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0048] 本发明中,聚己内酯-麦克林公司,P871874,CAS 24980-41-4;聚(丙二醇)二丙烯酸酯-Sigma公司,455024,52496-08-9;2-羟基-4'--(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮(PI2959)-麦克林公司,H823463,CAS 106797-53-9。

[0049] 实施例1

[0050] 本实施例提供一种用于促进骨修复的粘附人工骨膜,其制备方法包括以下步骤:

[0051] 步骤一、制备具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌模板

[0052] 采用光刻工艺进行制备,首先,设计了仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌的掩模版,凹槽宽度分别为40μm、80μm、120μm,凹槽高度均为40μm,如图1所示,然后,将紫外光通过掩膜版照射到附有一层光刻胶薄膜的基片表面,引起曝光区域的光刻胶发生化学反应;再通过显影技术溶解去除未曝光区域的光刻胶,使掩膜版上的图形被复制到光刻胶薄膜上;最后,利用刻蚀技术将具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌结构转移到模板基片上,得到具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌模板。

[0053] 步骤二、制备具有壁虎仿生刚毛孔槽结构模板

[0054] 采用光刻工艺进行制备,首先设计了壁虎仿生刚毛结构模板的掩模版,如图2所示,微柱直径为5μm,微柱高度为15μm,微柱间隔为5μm。然后,将紫外光通过掩膜版照射到附有一层光刻胶薄膜的基片表面,引起曝光区域的光刻胶发生化学反应;再通过显影技术溶解去除未曝光区域的光刻胶,使掩膜版上的图形被复制到光刻胶薄膜上;最后,利用刻蚀技术将壁虎仿生刚毛结构转移到模板基片上,得到具有壁虎仿生刚毛孔槽结构模板。

[0055] 步骤三、制备具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌与壁虎仿生刚毛结构的双面人工骨膜

[0056] 将聚己内酯以10%w/v溶解于二氯甲烷溶剂中,充分搅拌混匀后,形成成膜前体材料,将聚合物成膜前体材料浇筑于间隔250μm间隔的仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌模板与壁

虎仿生刚毛结构模板形成的模具之间。

[0057] 将浇筑后的材料置于真空中2小时,聚己内酯充分进入上述的结构模板中,待二氯甲烷充分挥发后,然后直接去除模板,得到具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌与壁虎仿生刚毛结构的双面人工骨膜,如图3-图5所示。

[0058] 作为可变换的实施方式,本步骤中,聚二甲基硅氧烷,添加10w/v%固化剂,将聚合物成膜前体材料浇筑于间隔250μm间隔的防天然骨膜微凹槽拓扑形貌模板与壁虎仿生刚毛结构模板形成的模具之间。

[0059] 将浇筑后的材料置于真空中0.5小时,聚二甲基硅氧烷充分进入上述的结构模板中,而后在60-80°烘箱中化学交联2h,然后直接去除模板,得到具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌与壁虎仿生刚毛结构的双面人工骨膜。

[0060] 作为可变换的实施方式,本步骤中,成膜前体材料可以使用聚(丙二醇)二丙烯酸酯,添加0.5w/v%光引发剂PI2959,将聚合物成膜前体材料浇筑于间隔250μm间隔的防天然骨膜微凹槽拓扑形貌模板与壁虎仿生刚毛结构模板形成的模具之间。

[0061] 将浇筑后的材料置于真空中2小时,成膜前体材料可以使用聚(丙二醇)二丙烯酸酯充分进入上述的结构模板中,而后通过波长为365nm,强度为5mw/cm²的紫外光交联2min,然后直接去除模板,得到具有仿天然骨膜微凹槽拓扑形貌与壁虎仿生刚毛结构的双面人工骨膜。

[0062] 步骤四、制备具有贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜

[0063] 首先,合成聚甲基丙烯酰胺-羟乙基甲基丙烯酸酯(DMA-HEMA),具体如下:将羟乙基甲基丙烯酸酯(HEMA)的抑制剂通过碱性氧化铝过滤去除,然后将2.1 mL的HEMA,0.68g的多巴胺甲基丙烯酰胺(DMA)和42mg的偶氮二异丁腈与9.5mL的二甲基甲酰胺混合在一个50mL的圆底烧瓶中。用氮气将溶液鼓泡30min。在60°C下聚合3小时,将得到的溶液用10mL甲醇稀释。

[0064] 将稀释后的溶液滴入150mL乙醚中,适量搅拌,沉淀合成的DMA-HEMA共聚物。所得DMA-HEMA聚合物溶于二氯甲烷中,经乙醚沉淀提纯,纯化后在真空炉中干燥过夜,获得DMA-HEMA聚合物。

[0065] 将上述制备的具有仿生结构的双面人工骨膜浸泡在含有DMA-HEMA的乙醇溶液中,该DMA-HEMA聚合物可在人工骨膜的表面形成黏附涂层,得到了具有贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜。

[0066] 试验例1

[0067] 本试验例分别在干燥(Dry)与潮湿环境(Wet)下,对实施例1具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜进行粘附性测试。

[0068] 如图6-8所示,无论是在切向测试还是法向测试的条件下,本发明实施例1制备的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜均具有较强的组织粘附能力。在负重800g的情况下,本发明制备的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜可以与天然骨组织紧密粘附,如图8所示。

[0069] 试验例2

[0070] 本试验例是将大鼠间充质骨髓干细胞(rMSC)以细胞密度20000/cm²种植于实施例1制得的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜上,对人工骨膜

进行生物相容性测试。在第一天进行细胞活死染色与细胞骨架染色,观察细胞的存活与粘附,分别在第1、2、3天进行CCK8增殖实验,评估细胞的增殖活力。

[0071] 如图9所示,A为第1天细胞活力的定量分析;C为第1、2、3天细胞增殖分析结果。B为第1天rMSC细胞面积的定量分析。各组对rMSC细胞均具有良好的生物相容性,其中,具有DMA-HEMA涂层的壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜具有更好的细胞相容性,能够更好地促进细胞的生长、增殖、粘附。

[0072] 试验例3

[0073] 本试验例是将鼠间充质骨髓干细胞(rMSC)以细胞密度20000/cm²种植于实施例1制得的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜上,3天后,通过细胞F-actin染色,观察rMSC细胞的细胞形态,与骨基因表达情况。

[0074] 如图10所示,rMSC在40μm宽的微凹槽中呈定向排列,且成骨基因表达上调。A、B为rMSC细胞在平面与壁虎仿生刚毛结构的人工骨膜中的细胞形貌,C、D为rMSC成骨基因的表达。

[0075] 试验例4

[0076] 本试验例将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)以细胞密度20000/cm²种植于对实施例1制得的具有壁虎仿生刚毛结构和贻贝仿生儿茶酚氨涂层结构的人工骨膜上,3天后,通过细胞F-Actin染色,观察HUVEC细胞的细胞形态,与成血管基因表达。

[0077] 如图11所示,HUVEC在40μm宽的微凹槽中呈定向排列,且成血管基因表达上调。A、B为HUVEC细胞在平面与壁虎仿生刚毛结构的人工骨膜中的细胞形貌,C、D为HUVEC成血管基因的表达。

[0078] 试验例5

[0079] 本试验例采用SD大鼠(雄性,体重200-250g)随机分为4组:空白组、GP(仿天然骨膜微凹槽结构)、PDMH(贻贝仿生儿茶酚氨涂层壁虎仿生刚毛结构)和GP/PDMH组(双面仿天然骨膜微凹槽与贻贝仿生儿茶酚氨涂层壁虎仿生刚毛结构)。

[0080] 使用牙钻在大鼠颅骨矢状缝两侧制备直接为5mm的全层缺损,将实施例2制备的人工骨膜植于大鼠颅骨缺损模型中。植入4周和8周后,通过micro-CT扫描评估颅骨的再生修复。

[0081] 如图12所示,双面仿天然骨膜微凹槽与贻贝仿生儿茶酚氨涂层壁虎仿生刚毛结构具备良好的粘附性与促进组织再生的能力,4周与8周之后的颅骨再生面积与新生骨体积显著高于其他组。其中,A为大鼠颅骨植入骨膜大体照片,B、C分别为Micro-CT定量分析结果骨密度(BMD)与骨体积与软组织体积比(BV/TV)。

[0082] 综上所述,本发明的人工骨膜均对大鼠间充质骨髓干细胞(rMSC)的定向生长产生了诱导效果。本发明实施例的制备的人工骨膜可显著提高rMSC成骨基因的表达(OCN)与HUVEC成血管基因的表达(eNOS、VEGF)。因此,该人工骨膜具备同时诱导间充质干细胞(MSC)成骨分化与内皮细胞(EC)成血管分化的能力,进而可加快骨组织再生。

[0083] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

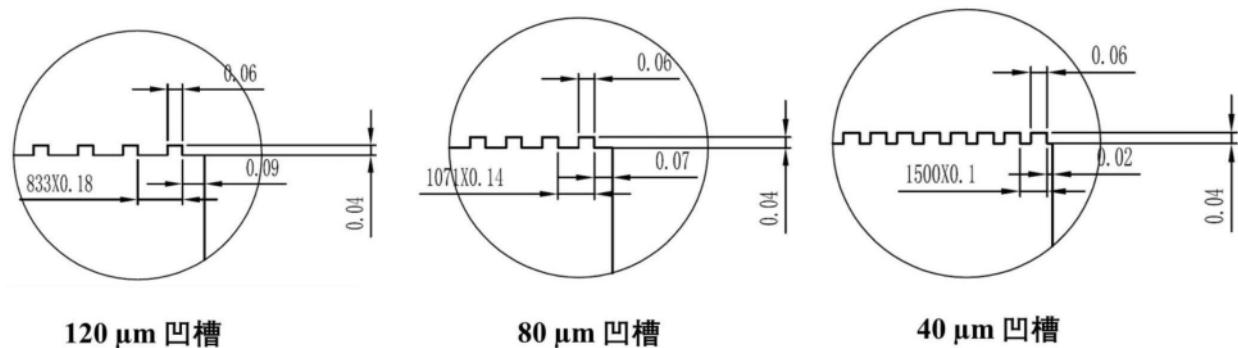


图1

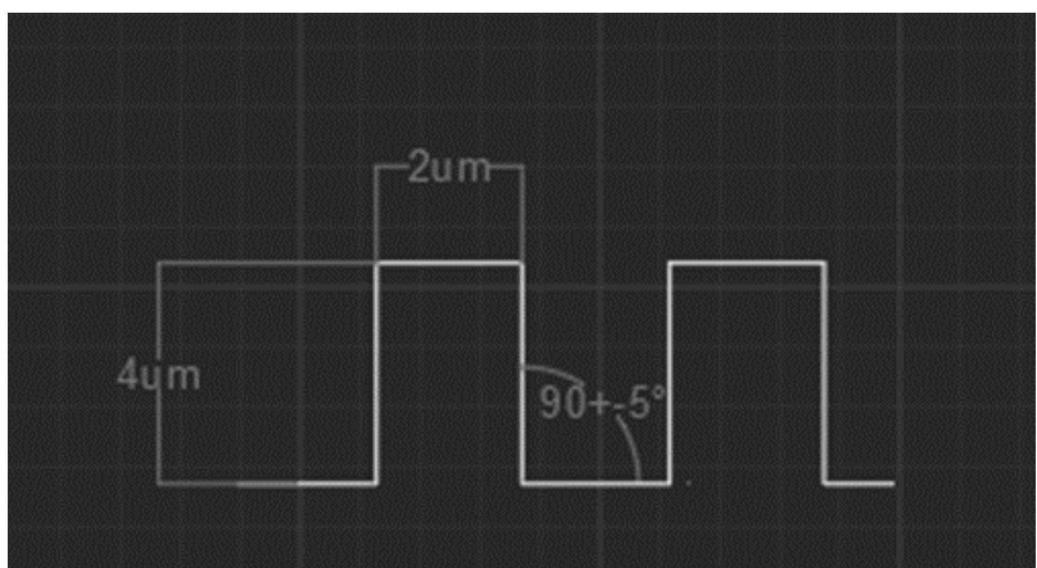


图2

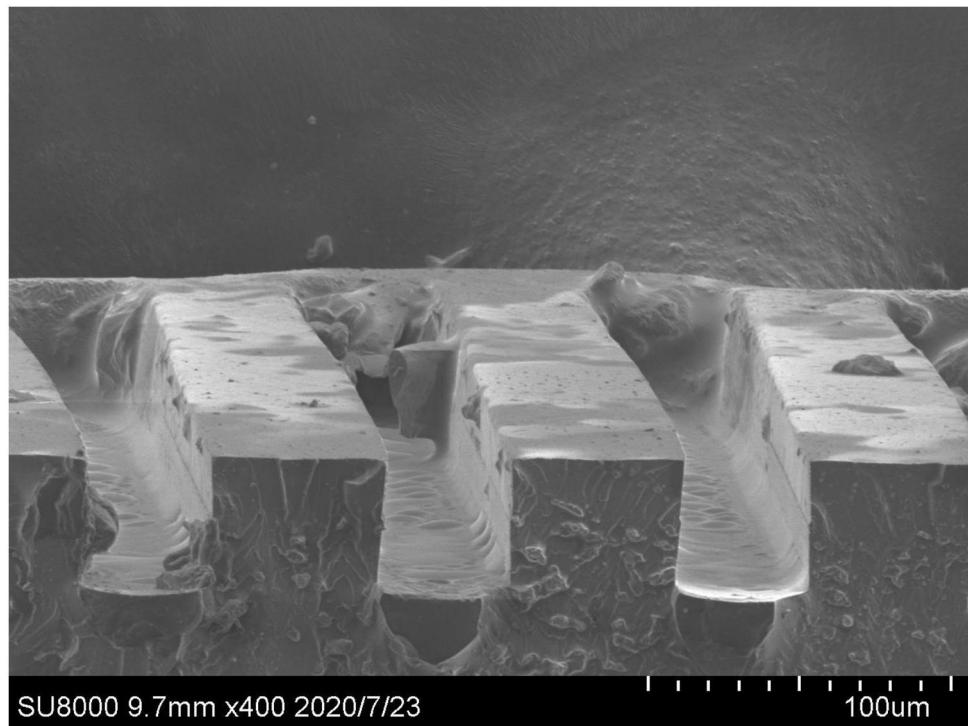


图3

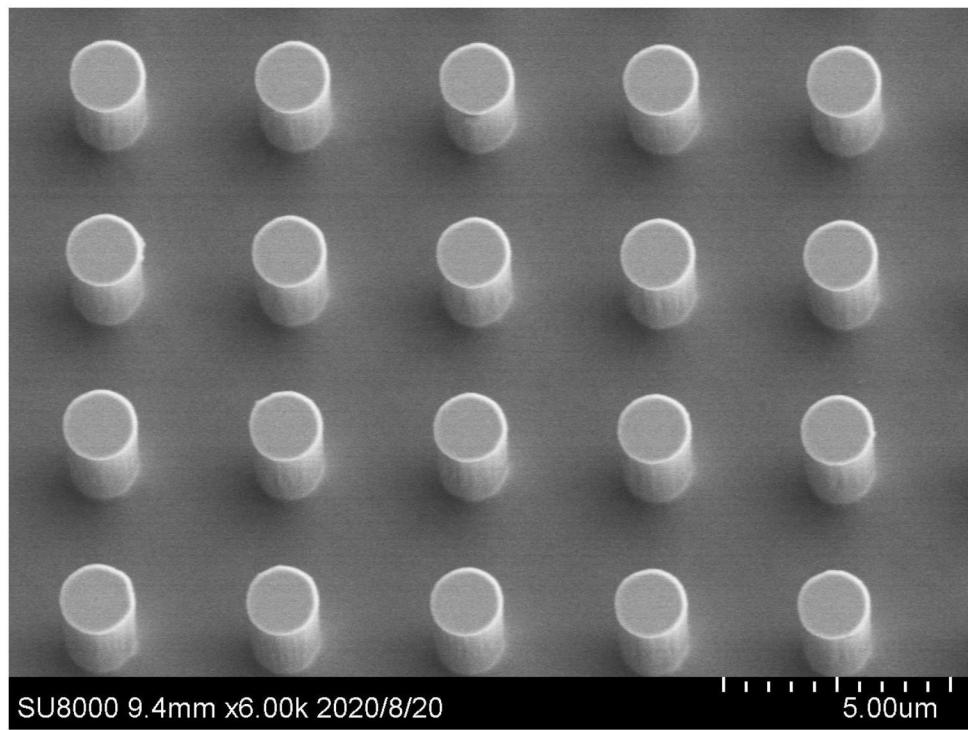


图4

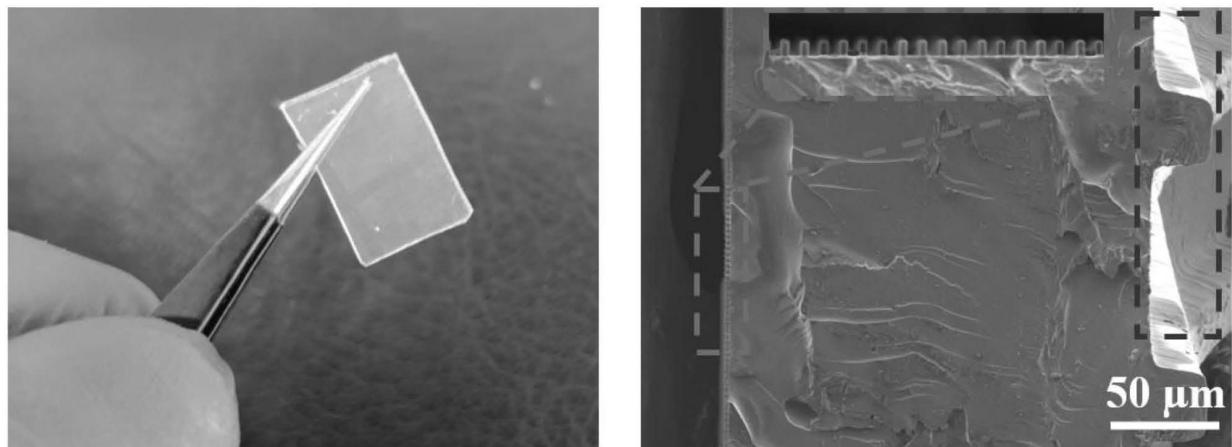


图5

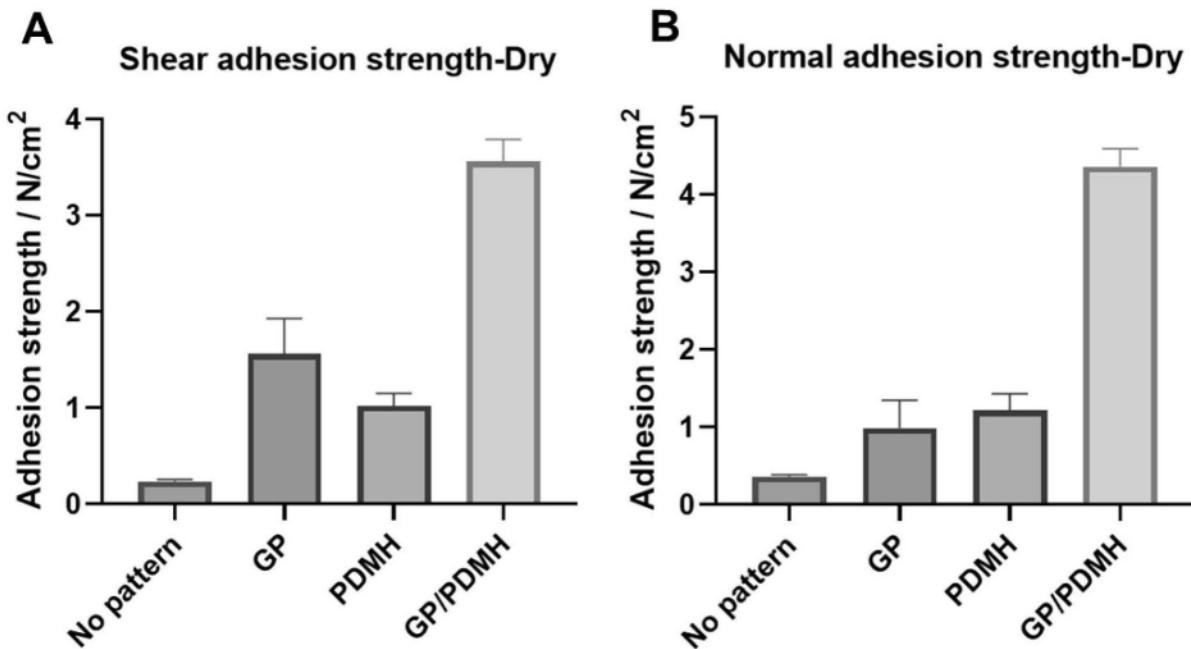


图6

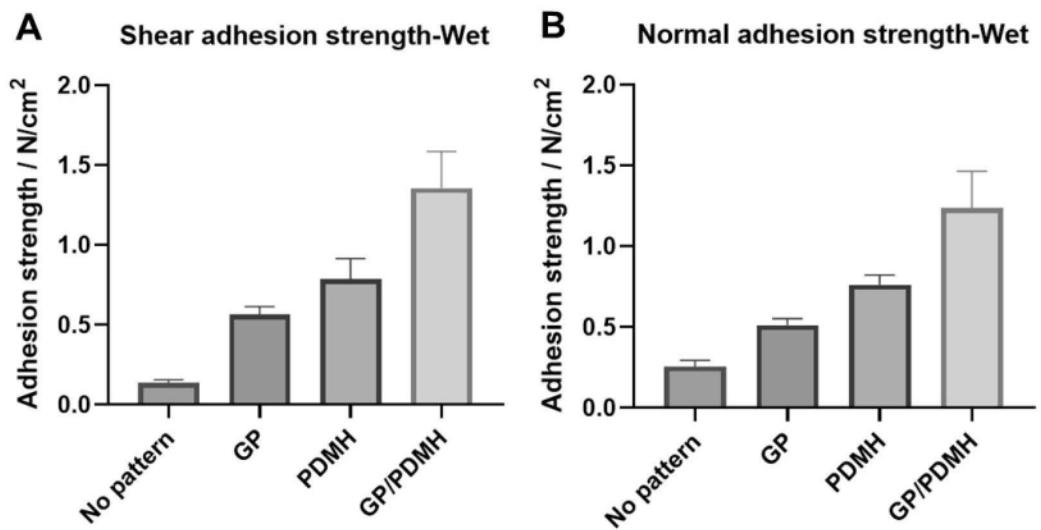


图7



图8

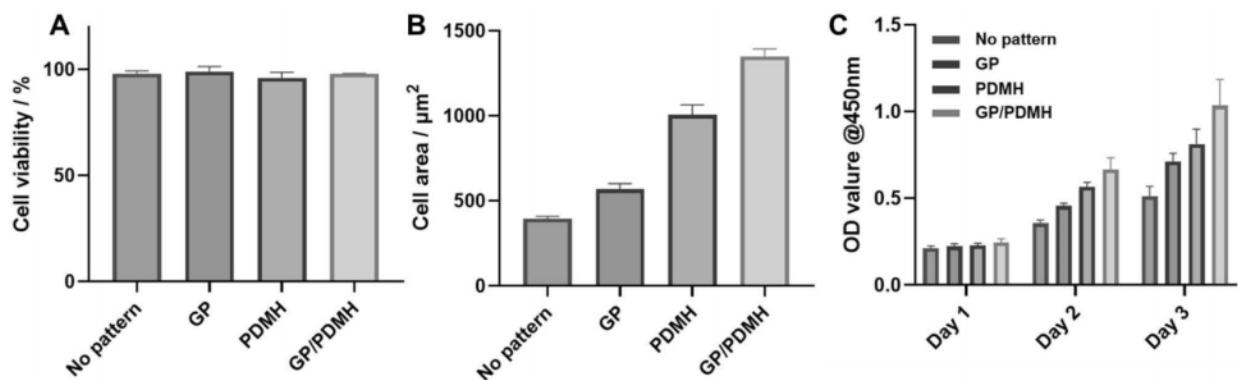


图9

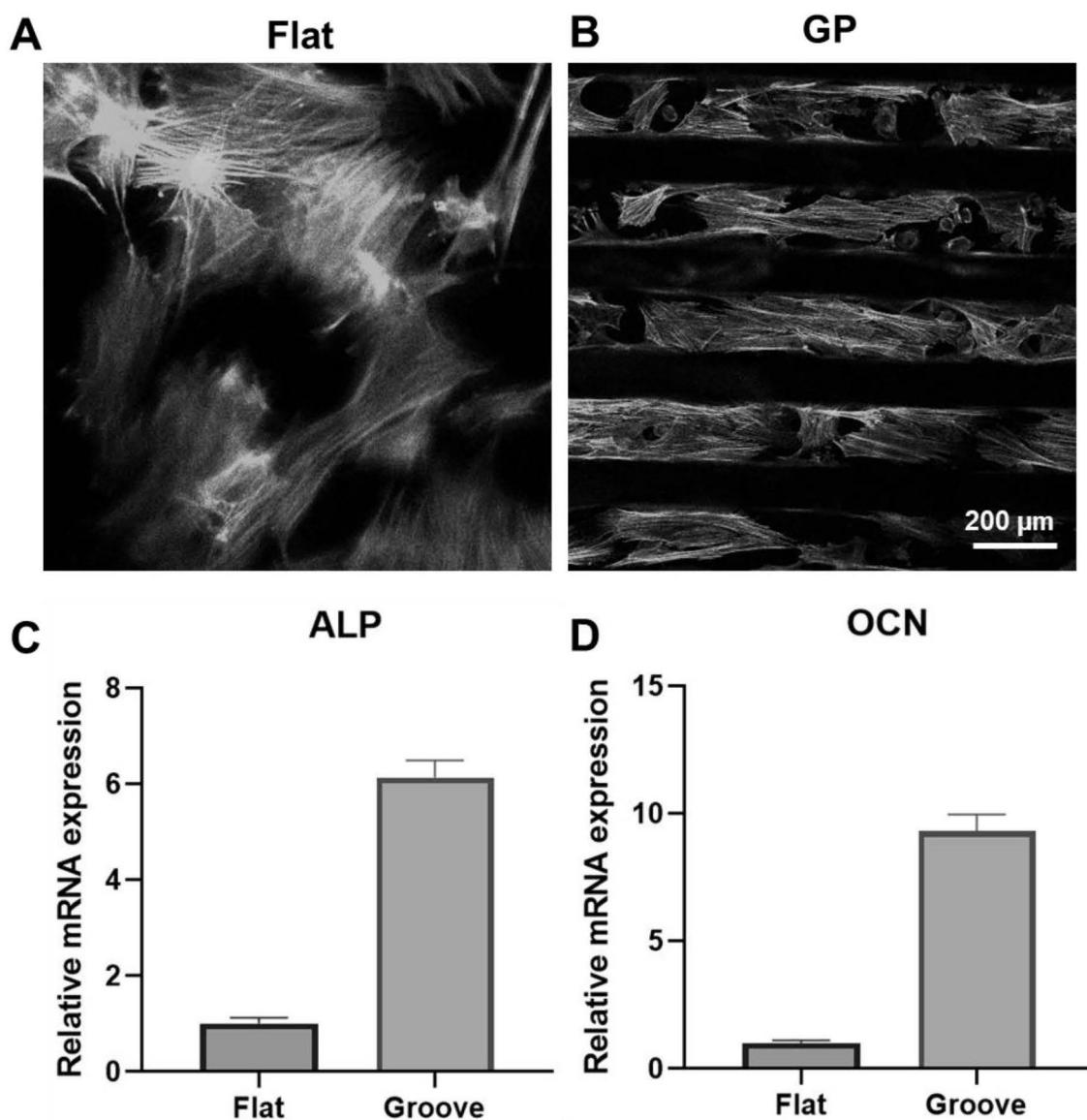


图10

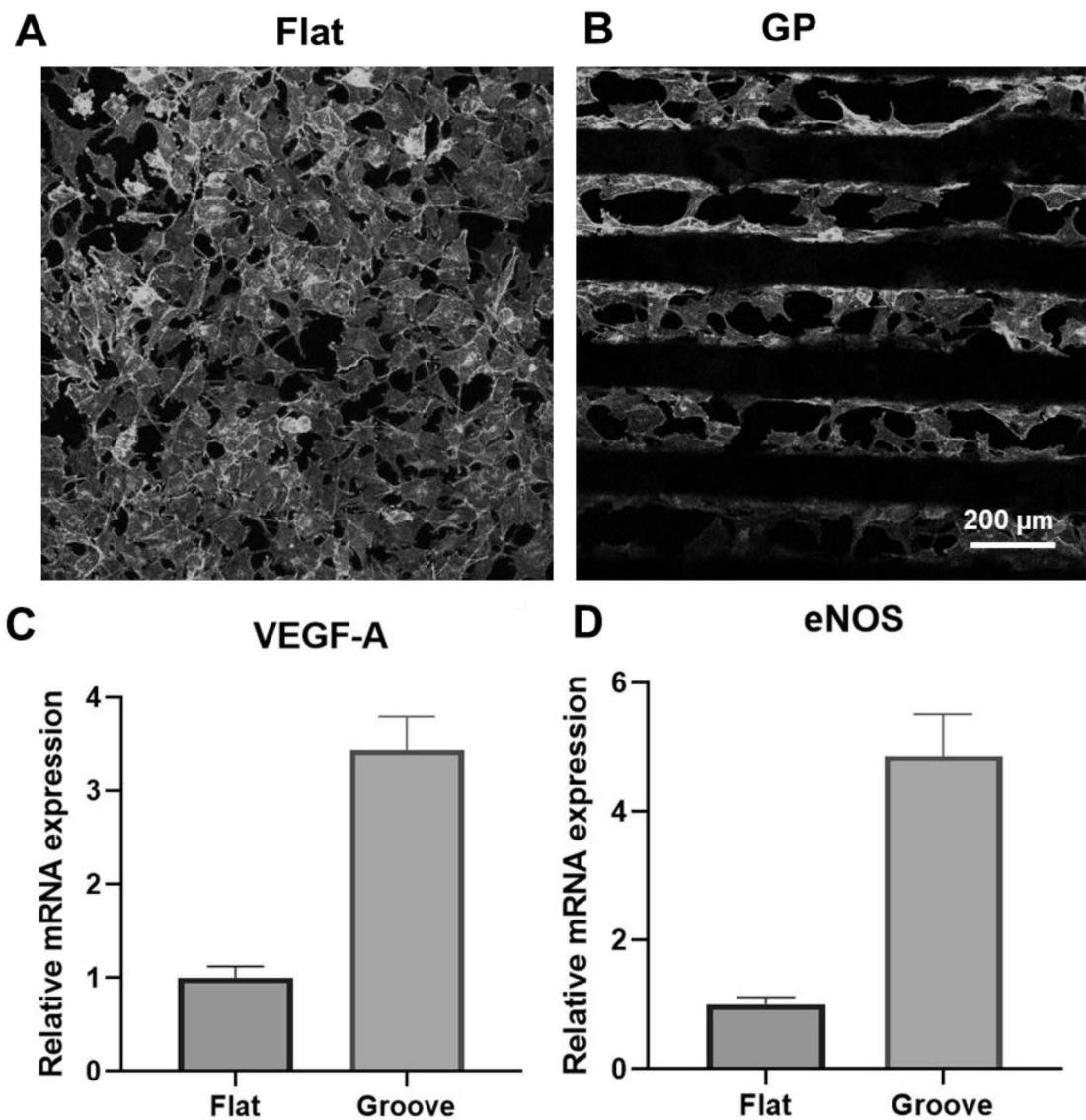


图11

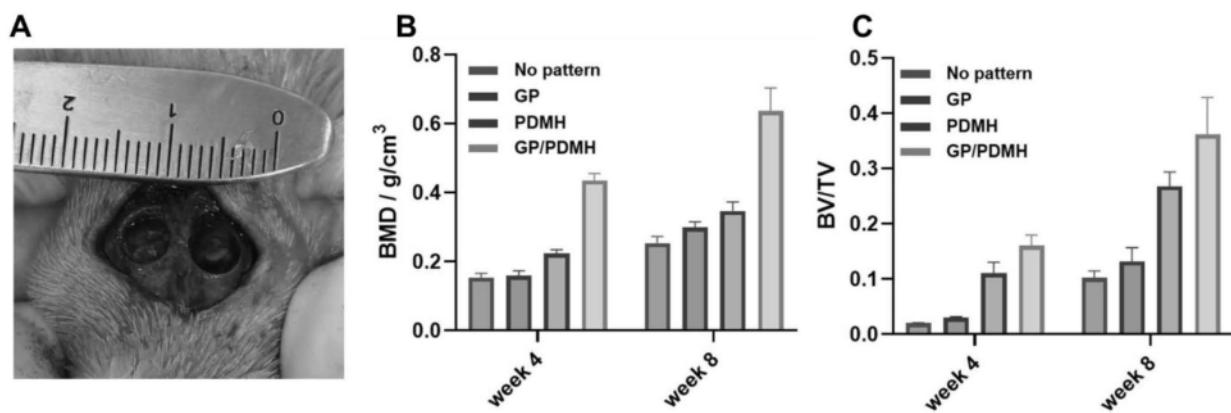


图12