



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114569795 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 24

(21) 申请号 202210228465.7

A61L 27/18 (2006.01)

(22) 申请日 2022.03.08

A61L 27/12 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61L 27/50 (2006.01)

申请公布号 CN 114569795 A

A61L 27/54 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.06.03

审查员 赵哲晗

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

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

(72) 发明人 赵昕 徐天鹏 杨雨禾

(74) 专利代理机构 北京华清迪源知识产权代理  
有限公司 11577

专利代理师 李楠楠

(51) Int. Cl.

A61L 27/40 (2006.01)

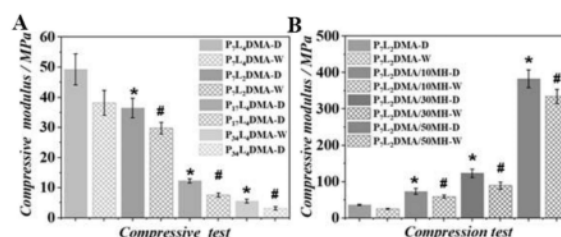
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

## (54) 发明名称

一种双层骨软骨支架材料及其制备方法与  
应用

## (57) 摘要

本发明公开了一种双层骨软骨支架材料及其制备方法与应用,所述支架材料包括软骨相和软骨下骨相;构成所述软骨相的可光交联的 $P_mL_nDMA$ ;以及构成所述软骨下骨相的 $P_mL_nDMA/MH$ 纳米复合材料;其中,P为聚丙二醇;m为聚丙二醇内单体的个数;L为聚乳酸;n为聚乳酸内单体的个数;DMA为二甲基丙烯酸酯,MH为甲基丙烯酸化羟基磷灰石。本发明的疏水性可注射的水下交联双层骨软骨支架,在液体环境中快速实施并交联注射并形成坚固的两相界面,通过调节物理化学微环境协同增强软骨生成和成骨,机械刺激和生长因子刺激可以协同影响间充质干细胞的细胞功能,以调控间充质干细胞在体外和体内的软骨和成骨分化。



1. 一种双层骨软骨支架材料,其特征在于,所述支架材料包括软骨相和软骨下骨相;  
构成所述软骨相的可光交联的 $P_m L_n$  DMA;以及  
构成所述软骨下骨相的 $P_m L_n$  DMA/MH纳米复合材料;  
其中,P为聚丙二醇;m为聚丙二醇内单体的个数;L为聚乳酸;n为单体内聚乳酸的个数;  
DMA为二甲基丙烯酸酯,MH为甲基丙烯酸羟乙酯磷酸灰石;  
所述可光交联的 $P_m L_n$  DMA是通过 $P_m L_n$  DMA、甲基丙烯酸羟乙酯和光引发剂混合制得;  
所述 $P_m L_n$  DMA/MH纳米复合材料是将 $P_m L_n$  DMA与不同浓度甲基丙烯酸羟乙酯功能化纳米羟基磷酸灰石混合制得。
2. 如权利要求1所述的双层骨软骨支架材料,其特征在于,  
所述可光交联的 $P_m L_n$  DMA中,各组分的质量百分数为: $P_m L_n$  DMA 90wt%、甲基丙烯酸羟乙酯9wt%和光引发剂819 1wt%。
3. 如权利要求1所述的双层骨软骨支架材料,其特征在于,  
所述支架材料还包括TGF- $\beta$ 1和/或BMP-2。
4. 如权利要求1所述的双层骨软骨支架材料,其特征在于,  
所述 $P_m L_n$  DMA为 $P_7 L_4$  DMA、 $P_7 L_2$  DMA、 $P_{17} L_2$  DMA、 $P_{17} L_4$  DMA、 $P_{34} L_2$  DMA、 $P_{34} L_4$  DMA、 $P_{68} L_2$  DMA或 $P_{68} L_4$  DMA。
5. 一种制备权利要求1-4中任一所述的双层骨软骨支架材料的方法,其特征在于,所述方法包括:  
将所述可光交联的 $P_m L_n$  DMA和 $P_m L_n$  DMA/MH纳米复合材料经光聚合反应得到所述双层骨软骨支架材料。
6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,  
所述光聚合反应在液体环境中进行固化交联形成双层骨软骨支架材料。
7. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,  
所述方法还包括将不同浓度生长因子加入到所述可光交联的 $P_m L_n$  DMA  
和/或将生长因子加入到所述不同浓度的 $P_m L_n$  DMA/MH纳米复合材料中;  
所述生长因子为TGF- $\beta$ 1和/或BMP-2。
8. 权利要求1-4中任一所述双层骨软骨支架材料在制备治疗或修复软骨损伤或美容产品中的应用。

## 一种双层骨软骨支架材料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,具体涉及一种双层骨软骨支架材料及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 骨软骨复合体由软骨和软骨下骨构成,在细胞表型、细胞外基质组成和机械性能方面具有不同的生物学性能。目前应用组织工程学支架治疗骨软骨缺损时,通常通过植入模拟天然骨软骨复合体的双层预制支架来促进骨与软骨组织的修复。该方法存在一定的限制性,植入双层预制支架是一种侵入性手术,存在潜在的局部组织损伤、术后并发症、恢复时间长和患者不适的风险。作为一种替代方案,可注射粘合剂与双层预制支架相比有着以下有点:1、微创性:可通过注射的方式完成修复;2、全面性:对深层区域的良好修复;3、高可塑性:可满足不同形状的骨软骨缺损修复需求。

[0003] 目前胶原蛋白、明胶和海藻酸盐等水凝胶因为具有出色的可注射性和生物相容性以及负载生物分子(例如生长因子)的能力,已被用作可注射粘合剂。但是水凝胶粘合剂的高亲水性可能导致注射溢出或无法填充指定的缺损区域,会影响注射后修复区域覆盖的完整性。同时手术过程中液体压力环境,会导致水凝胶粘合剂的移位和生物分子的急剧释放,这些缺点限制水凝胶粘合剂在液体环境下的应用。因此,液体疏水材料作为可注射粘合剂受到了关注,包括聚甲基丙烯酸甲酯、聚富马酸丙二醇酯、聚癸二酸甘油酯和聚酸酐等。当这些材料原位制造成双层结构时,它们的交联过程中会产生大量的热量,从而损害它们的生物相容性和封装生物活性分子的能力,同时需要较长的交联时间。并且,这些支架都缺乏强的界面粘合而易导致分层,或需要额外的胶水进行粘连,限制了其在手术中的应用。从利于手术操作的角度来看,可注射的疏水材料可以在水下快速交联,形成具有强界面结合的仿生各向异性双层结构,并允许生长因子长期释放,有利与骨软骨损失的修复。

[0004] 综上,现有骨软骨修复材料存在着各种缺陷,亟待研发一种新型的双层骨软骨支架材料。

### 发明内容

[0005] 为此,本发明提供一种双层骨软骨支架材料及其制备方法与应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 本发明实施例提供一种双层骨软骨支架材料,所述支架材料包括软骨相和软骨下骨相;

[0008] 构成所述软骨相的可光交联的 $P_{\text{m}}L_n\text{DMA}$ ;以及

[0009] 构成所述软骨下骨相的 $P_{\text{m}}L_n\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料;

[0010] 其中,P为聚丙二醇;m为聚丙二醇内单体的个数;L为聚乳酸;n为单体内聚乳酸的个数;DMA为二甲基丙烯酸酯,MH为甲基丙烯酸化羟基磷灰石。

[0011] 本发明的一个实施例中,所述可光交联的 $P_{\text{m}}L_n\text{DMA}$ 是通过 $P_{\text{m}}L_n\text{DMA}$ 、甲基丙烯酸羟乙

酯和光引发剂混合制得。

[0012] 本发明的一个实施例中,所述可光交联的 $P_mL_n$ DMA中,各组分的质量百分数为: $P_mL_n$ DMA 90wt%、甲基丙烯酸羟乙酯9wt%和光引发剂819 1wt%。

[0013] 本发明的一个实施例中,所述支架材料还包括TGF- $\beta$ 1和/或BMP-2。

[0014] 本发明的一个实施例中,所述 $P_mL_n$ DMA/MH纳米复合材料是将 $P_mL_n$ DMA与不同浓度甲基丙烯酸羟乙酯功能化纳米羟基磷灰石混合制得。

[0015] 本发明的一个实施例中,所述 $P_mL_n$ DMA为 $P_7L_4$ DMA、 $P_7L_2$ DMA、 $P_{17}L_2$ DMA、 $P_{17}L_4$ DMA、 $P_{34}L_2$ DMA、 $P_{34}L_4$ DMA、 $P_{68}L_2$ DMA或 $P_{68}L_4$ DMA。

[0016] 本发明另一方面还提供一种制备所述的双层骨软骨支架材料的方法,所述方法包括:

[0017] 将所述可光交联的 $P_mL_n$ DMA和 $P_mL_n$ DMA/MH纳米复合材料经光聚合反应得到所述双层骨软骨支架材料。

[0018] 本发明的一个实施例中,所述光聚合反应在液体环境中进行固化交联形成双层骨软骨支架材料。

[0019] 本发明的一个实施例中,所述方法还包括将不同浓度生长因子加入到所述可光交联的 $P_mL_n$ DMA

[0020] 和/或将生长因子加入到所述不同浓度的 $P_mL_n$ DMA/MH纳米复合材料中;

[0021] 所述生长因子为TGF- $\beta$ 1和/或BMP-2。

[0022] 上述所述双层骨软骨支架材料在制备治疗或修复软骨损伤或美容产品中的应用,也属于本发明的保护范围。

[0023] 本发明中,在骨软骨重建修复过程中,可调控的材料机械性能不仅有助于手术中的操作性,而且还有利于调控自身细胞的修复性能。已有研究证实生物材料的力学性能可以调控间充质干细胞的成骨、成软骨分化。当细胞外机制的力学性能与天然组织相匹配时,可引导间充质干细胞的分化,例如天然软骨1-10MPa的弹性模量可以诱导软骨分化,骨组织100-1000MPa可以诱导成骨分化。除了生物物理刺激,生长因子也可以作为重要的生化刺激来调节骨软骨微环境,刺激软骨和骨修复。

[0024] 例如,转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 在抑制早期炎症(炎症可能导致骨/软骨变性)、减弱破骨细胞生成和增强软骨形成方面起着重要作用。此外,骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 是唯一经FDA批准的成骨生长因子,它通过上调Smad途径成为成骨的重要调节因子。因此,具备与天然组织匹配具有物理化学刺激能力的粘合剂,可以引导间充质干细胞向骨、软骨分化,有利于骨软骨损伤的修复。据此,本发明开发可注射的疏水双层骨软骨支架材料,它可以在水中快速实施,并通过紫外光交联,形成各向异性的双层结构,具有良好的界面结合力,形成与天然骨软骨类似的双层结构,并可长效释放目标生长因子,通过物化化学双重刺激调控骨软骨损伤的修复。

[0025] 由于材料的疏水性,发现这两个相可以被限制在缺损部位,而不会在体液中分散。经过紫外光照射,可光交联的 $P_mL_n$ DMA和 $P_mL_n$ DMA/nHAMA纳米复合材料可以作为粘合剂,该粘合剂可以在200秒内交联固化,形成双层骨软骨支架材料。由于 $P_mL_n$ DMA和 $P_mL_n$ DMA/nHAMA中存在“C=C”,这两层可以在界面上形成强共价键。通过系统地调节 $P_mL_n$ DMA的组成(m和n),以及MH与 $P_mL_n$ DMA的比例,将准确地控制两相的机械性能,以匹配天然组织。

[0026] 本发明具有如下优点：

[0027] 本发明的疏水性可注射的水下交联双层骨软骨支架材料在液体环境中快速实施并交联注射并形成坚固的两相界面，通过调节物理化学微环境协同增强软骨生成和成骨，机械刺激和生长因子刺激可以协同影响间充质干细胞的细胞功能，以调控间充质干细胞在体外和体内的软骨和成骨分化。

[0028] 本发明的双层骨软骨支架材料的两种组分匹配软骨与软骨下骨的力学性能，同时装载不同的生长因子，从物理特性到生物化学特性均与天然骨软骨组织匹配，并可实现生长因子的长效释放，加速骨软骨损伤修复，可注射双层骨软骨支架材料，可满足骨科关节镜手术应用的需求。

## 附图说明

[0029] 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。

[0030] 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。

[0031] 图1为本发明实施例提供的双层骨软骨支架材料的力学性能测试结果示意图，其中，PmLnDMA-D和PmLnDMA/MH-D为干燥条件下交联的力学性能；PmLnDMA-W和PmLnDMA/MH-W为湿润环境(W)下交联的力学性能；

[0032] 图2为本发明实施例提供的可光交联的 $P_7L_2$ DMA与 $P_7L_2$ DMA/50%MH粘合剂可以形成不同形状的双层骨软骨支架材料；

[0033] 图3为本发明实施例提供的双层骨软骨支架材料水下注射经光聚反应制得双层骨软骨支架材料界面力试验结果示意图；

[0034] 图4为本发明实施例提供的双层骨软骨支架材料的界面力检测结果示意图；

[0035] 图5为本发明实施例提供的可光交联的 $P_mL_n$ DMA与 $P_mL_n$ DMA/MH交联过程中放热及生长因子释放测试结果示意图；

[0036] 图6和图7为本发明实施例提供的双层骨软骨支架材料具备良好的生物相容性测试的结果示意图；

[0037] 图8为本发明实施例提供的双层骨软骨支架材料促进软骨分化的结果示意图；

[0038] 图9为本发明实施例提供的双层骨软骨支架材料修复兔骨软骨缺损模的结果示意图。

## 具体实施方式

[0039] 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。

[0040] 本发明中, $P_m L_n$  DMA:聚(乳酸-丙二醇)二甲基丙烯酸酯;MH:甲基丙烯酸化羟基磷灰石; $P_m L_n$  DMA/MH:聚合可注射粘合剂,可构成软骨下骨相的 $P_m L_n$  DMA/MH纳米复合材料。

[0041] 实施例1、 $P_m L_n$  DMA的制备

[0042] 本实施例的提供 $P_m L_n$  DMA的制备方法:其中P代表丙二醇,m为单体内丙二醇的个数;L代表聚乳酸,n为单体内聚乳酸的个数,DMA为二甲基丙烯酸酯。本发明中,聚乳酸-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 $P_7 L_4$  DMA、 $P_7 L_2$  DMA、 $P_{17} L_4$  DMA或 $P_{34} L_4$  DMA。

[0043] 其中, $P_7 L_4$  DMA的制备过程包括以下步骤:

[0044] 步骤一、将34.4g聚丙二醇(PPG,平均分子量425,0.08mol)与46g丙交酯(LA,0.32mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 $P_7 L_4$ ;

[0045] 步骤二、称取10.01g  $P_7 L_4$  (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯(MAC)和4.05克三乙胺(TEA),两种试剂均在二氯甲烷(DCM)中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液(0.1mol/L)、200mL  $\text{NaHCO}_3$ 溶液(0.1mol/L)和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0046]  $P_7 L_2$  DMA的制备方法包括以下步骤:

[0047] 步骤一、将34.4g聚丙二醇(PPG,平均分子量425,0.08mol)与23g丙交酯(LA,0.16mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 $P_7 L_2$ ;

[0048] 步骤二、称取7.13g  $P_7 L_2$  (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯(MAC)和4.05克三乙胺(TEA),两种试剂均在二氯甲烷(DCM)中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液(0.1mol/L)、200mL  $\text{NaHCO}_3$ 溶液(0.1mol/L)和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0049]  $P_{17} L_4$  DMA的制备方法包括以下步骤:

[0050] 步骤一、将40g聚丙二醇(PPG,平均分子量1000,0.04mol)与23g丙交酯(LA,0.16mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 $P_{17} L_4$ ;

[0051] 步骤二、称取15.75g  $P_{17} L_4$  (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯(MAC)和4.05克三乙胺(TEA),两种试剂均在二氯甲烷(DCM)中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液(0.1mol/L)、200mL  $\text{NaHCO}_3$ 溶液(0.1mol/L)和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0052]  $P_{34} L_4$  DMA的制备方法包括以下步骤:

[0053] 步骤一、将40g聚丙二醇(PPG,平均分子量2000,0.02mol)与11.5g乳酸(LA,0.08mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 $P_{34} L_4$ ;

[0054] 步骤二、称取31.52g  $P_{34} L_8$  (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过

交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯 (MAC) 和4.05克三乙胺 (TEA), 两种试剂均在二氯甲烷 (DCM) 中稀释, 为了去除生成的三乙胺·盐酸, 将产品溶解于200mL乙醚中, 真空过滤, 最后用200mL盐酸溶液 (0.1mol/L)、200mL  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (0.1mol/L) 和200mL去离子水洗涤, 最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收, 然后旋转蒸发2小时, 以完全除去残留的溶剂。

[0055] 实施例2、 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料的制备

[0056] 本实施例提供 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料的制备方法:

[0057] 步骤一、甲基丙烯酸化羟基磷灰石 (MH) 的制备

[0058] 在本发明中对甲基丙烯酸化羟基磷灰石的来源不做严格限制, 例如, 可以通过如下方法制备得到:

[0059] 将20g HA在120℃下彻底干燥48小时, 在氮气保护下溶解于300mL二甲酰胺 (DMF) 中, 然后加入4mL HMDI和0.4mL二月桂酸二丁基锡 (DBTDL) 作为催化剂, 在50℃下反应24小时, 然后加入8mL HEMA, 在相同条件下反应5小时, 最后, 加入400ml甲醇停止反应, 反应得到的HAMA经离心分离, 用二氯甲烷 (DCM) 冲洗三次, 室温干燥96小时。

[0060] 步骤二、 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料

[0061] 将实施例1制备的 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$ 与步骤一制备得到的甲基丙烯酸化羟基磷灰石 (MH) 按照比例混合得到 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料, 即光聚合可注射粘合剂。

[0062] 实施例3、双层骨软骨支架材料的制备及力学性能测试

[0063] 本实施例提供了双层骨软骨支架材料, 其包括构软骨相的可光交联的 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$ ; 以及构成软骨下骨相的 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料;

[0064] 其中, 可光交联的 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$ 是通过将 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$  (90wt%) 与甲基丙烯酸羟乙酯 (9wt%) 和光引发剂819 (1wt%) 混合, 制备了作为软骨相的可光交联 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$ 。

[0065]  $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料是通过将 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$ 与不同浓度的MH (如10、30、50、70wt.%) 混合制备的, 作为软骨下骨相。

[0066] 分别将15μg转化生长因子-β1 (TGF-β1) 和骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 粉末混合于500mg  $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$ 与 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 中, 然后再进行紫外线照射, 可制备成装载生长因子的双层骨软骨支架材料。

[0067] 对上述双层骨软骨支架材料测试方法: 压缩测试, 将可光交联的 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$ 和 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料在空气中或水下注入特氟隆模具 (Ø6 mm×3mm) 中, 然后进行紫外线照射200秒。然后, 以1mm/min的速度压缩样品直至断裂。对每种材料配方测试三个平行样品。

[0068] 如图1所示, 本发明的 $\text{P}_7\text{L}_4\text{DMA}$ 和 $\text{P}_{34}\text{L}_4\text{DMA}$ 分别具有最高和最低的压缩模量 ( $49.3 \pm 5.2\text{MPa}$ 对 $5.6 \pm 0.6\text{MPa}$ )。

[0069]  $\text{P}_7\text{L}_2\text{DMA}$ 组的压缩模量为 $36.5 \pm 3.2\text{MPa}$ , 拉伸模量为 $16.5 \pm 2.3\text{MPa}$ , 与天然软骨机械匹配。此外, 在水下或干燥条件下交联的样品之间没有显著差异, 表明水下交联过程不会损害双层骨软骨支架材料的机械性能。因此, 选择 $\text{P}_7\text{L}_2\text{DMA}$ 作为构成软骨相的可光交联的 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}$ , 即软骨相粘合剂。

[0070] 将MH掺入 $\text{P}_7\text{L}_2\text{DMA}$ 后,  $\text{P}_7\text{L}_2\text{DMA}/\text{MH}$ 的压缩和拉伸模量显著增加。50%MH组的最高压缩和拉伸模量分别为 $382.2 \pm 24.9\text{MPa}$ 和 $173.2 \pm 14.9\text{MPa}$ , 与天然松质骨相当, 可以为上软骨层和周围组织提供足够的支撑, 可作为构成软骨下骨相的 $\text{P}_{\text{m}}\text{L}_{\text{n}}\text{DMA}/\text{MH}$ 纳米复合材料, 即软

骨下骨相粘合剂。

[0071] 实施例4、双层骨软骨支架材料成型分层结构

[0072] 本实施例制备不同形状的特氟龙模具(圆形,月型,星形,三角形),依次在模具中注入可光交联的 $P_7L_2$ DMA与 $P_7L_2$ DMA/50%MH粘合剂500 $\mu$ L,使用365nm波长紫外光照射200s,形成不同形状的双层骨软骨支架材料。

[0073] 如图2所示,可光交联的 $P_7L_2$ DMA与 $P_7L_2$ DMA/50%MH粘合剂可以形成良好的分层结构双层软骨之间材料,并且填充不同形状的模具。

[0074] 实施例5、双层骨软骨支架材料水下光聚合反应

[0075] 本实施例提供可光交联的 $P_7L_2$ DMA与 $P_7L_2$ DMA/50%MH在水下发生光聚合反应的过程:

[0076] 在20mL水中注射 $P_7L_2$ DMA与 $P_7L_2$ DMA/50%MH粘合剂,或在5mm圆形PDMS模具中水下依次注入 $P_7L_2$ DMA与 $P_7L_2$ DMA/50%MH粘合剂500 $\mu$ L,使用365nm波长紫外光照射200秒。

[0077] 如图3所示,该双层骨软骨支架材料可在水下注射未发生弥散并且在缺损处快速交联,形成具有坚固界面力的双层结构,可满足关节镜下水下注射填充的需求。

[0078] 实施例6、双层骨软骨支架材料界面力测试

[0079] 本实施例将 $P_mL_n$ DMA和 $P_mL_n$ DMA/MH注入20mm $\times$ 20mm特氟隆模具中,然后进行光交联形成双层骨软骨支架材料。然后,双层骨软骨支架材料将通过3M透明胶带粘合到载玻片上,以评估剪切强度。法向力和剪切力均被执行。分离速度将设置为1cm/min,粘合界面的粘合力将由临界剥离分离强度决定。本实施例为每种材料配方准备了三个平行样品,以确保重现性。

[0080] 如图4所示,双层骨软骨支架材料的界面力检测,分别检测了垂直方向与切向的粘附力,干燥与湿润环境下的交联界面力无明显差异,同时,本实施例的双层骨软骨支架材料形成的界面力显著高于商用3M胶水。

[0081] 实施例7、双层骨软骨支架材料缓释性能

[0082] 本实施例分别将15 $\mu$ g转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)和骨形态发生蛋白-2(BMP-2)粉末混合于500mg  $P_mL_n$ DMA与 $P_mL_n$ DMA/MH中,制备成装载生长因子的双层骨软骨粘合剂,即双层骨软骨支架材料。

[0083] 交联的样品在室温下在10mL磷酸盐缓冲盐水(PBS)中孵育。在不同的预定时间点,从培养介质中收集1mL PBS,并添加相同体积的新鲜PBS。然后通过TGF- $\beta$ 1ELISA试剂盒分析释放的TGF- $\beta$ 1量。同样,加载BMP-2的 $P_7L_2$ DMA/50HAMA(7/2/50MH@BMP-2)使用同样方法制备,通过ELISA试剂盒分析释放的BMP-2量。

[0084] 如图5所示,本发明可光交联的 $P_mL_n$ DMA与 $P_mL_n$ DMA/MH交联过程中无明显放热,分别在软骨相装载了转化生长因子- $\beta$ 1,在软骨下骨相装载了骨形成发生蛋白2,生长因子伴随着材料可以在60天内稳定释放,释放量大于60%。

[0085] 实施例8、双层骨软骨支架材料相容性

[0086] 本实施例将15 $\mu$ g转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)和骨形态发生蛋白-2(BMP-2)粉末混合于500mg  $P_mL_n$ DMA与 $P_mL_n$ DMA/MH中,制备成装载生长因子的骨软骨粘合剂,即双层骨软骨支架材料,将制备不同的盘状双层骨软骨支架材料样品( $\varnothing 10\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ )通过将大鼠间充质干细胞(rBMSCs)以密度 $1\times 10^4$ 个细胞/ $\text{cm}^2$ 接种到的双层骨软骨支架材料上来评估双



层骨软骨支架材料的生物相容性。

[0087] 如图6所示,双层骨软骨支架材料具备良好的生物相容性,可支持种植的大鼠骨髓间充质干细胞的黏附铺展。

[0088] 如图7所示,双层骨软骨支架材料具备良好的生物相容性,可提供种植的大鼠骨髓间充质干细胞的良好增殖,细胞存活率均大于90%。

[0089] 实施例9、双层骨软骨支架材料促进软骨分化

[0090] 本实施例将15 $\mu$ g转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 和骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 粉末混合于500mgP<sub>7</sub>L<sub>2</sub>DMA与P<sub>7</sub>L<sub>2</sub>DMA/MH中,制备成装载生长因子的骨软骨粘合剂,即双层骨软骨支架材料。

[0091] 制备不同的盘状双层骨软骨支架材料样品(  $\varnothing$ 10 mm $\times$ 1 mm ),通过将大鼠间充质干细胞(rBMSCs)以密度 $4\times 10^4$ 个细胞/cm<sup>2</sup>接种到的双层骨软骨支架材料上来评估粘合剂对干细胞的分化诱导能力,成软骨以及成骨实验分别使用对应的成软骨与成骨诱导培养基干预。

[0092] 如图8所示,本实施例的双层骨软骨支架材料力学性能匹配的软骨相装载了转化生长因子- $\beta$ 1促进了大鼠间充质干细胞的成软骨分化,翻红O快绿与阿利新蓝染色证明软骨支架材料可以促进干细胞的成软骨分化。

[0093] 本实施例的力学性能匹配的P<sub>7</sub>L<sub>2</sub>DMA/MH软骨下骨相装载了骨形成发生蛋白2促进了大鼠间充质干细胞的成骨分化,碱性磷酸酶与茜素红染色证明软骨下骨粘合剂可以促进干细胞的成骨分化。

[0094] 实施例10、双层骨软骨支架材料促进软骨修复

[0095] 本实施例提供新西兰大白兔(雄性,体重3.0~3.5kg)随机分为5组:空白组、7/2组(填充P<sub>7</sub>L<sub>2</sub>DMA胶粘剂)、7/2/50MH组(填充P<sub>7</sub>L<sub>2</sub>DMA/50%MH胶粘剂)、BL组(填充有双层骨软骨支架材料)和BL/GFs组(填充有TGF $\beta$ -1和BMP-2掺入不同层的双层骨软骨支架材料)。使用牙钻在兔股骨远端的滑车槽上形成全层骨软骨圆柱形缺损(直径5毫米,深度4毫米)。

[0096] 然后,用不同的比例组成的双层骨软骨支架材料填充缺陷,然后用紫外线照射200秒。接下来,用肌肉内抗生素缝合(4-0线)缝合手术膝关节。植入8周和12周后,处死兔子并采集股骨样本。通过ICRS国际软骨修复评分评估软骨损伤修复结果,通过micro-CT扫描评估软骨下骨的再生修复。

[0097] 如图9所示,本实施例通过兔骨软骨缺损模型证明双层骨软骨支架材料可以促进兔骨软骨缺损的软骨与软骨下骨修复再生,8周和12周后的兔股骨标本可以观察到缺损区域的软骨再生,CT扫描结果观察到了软骨下骨的再生。装载了生长因子、力学性能匹配的双相粘合剂可以同步促进兔骨软骨的修复。

[0098] 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。

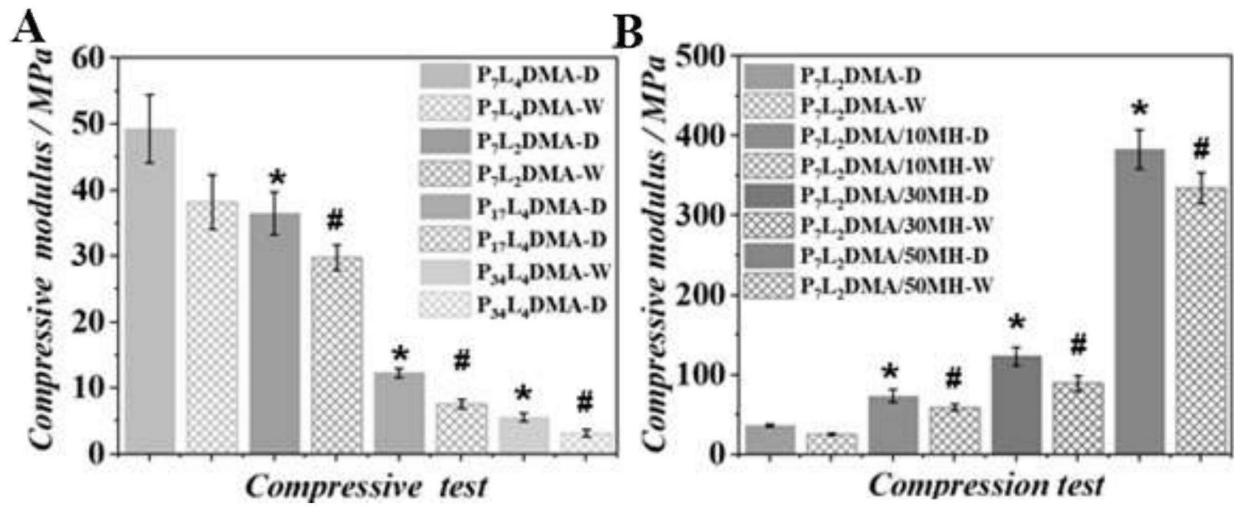


图1

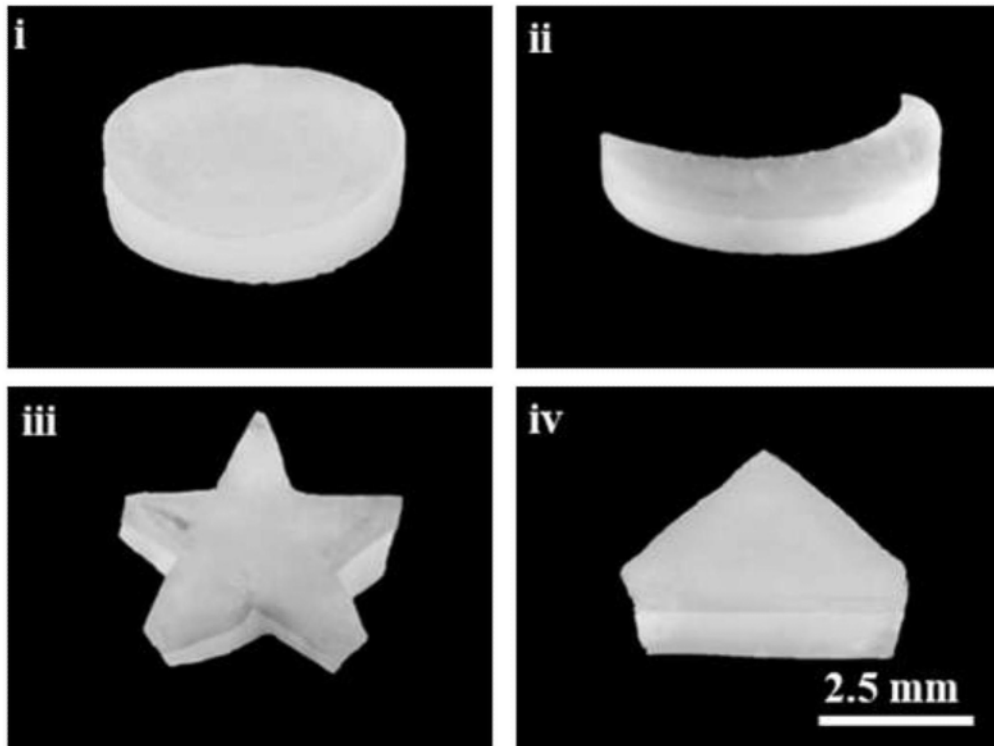


图2

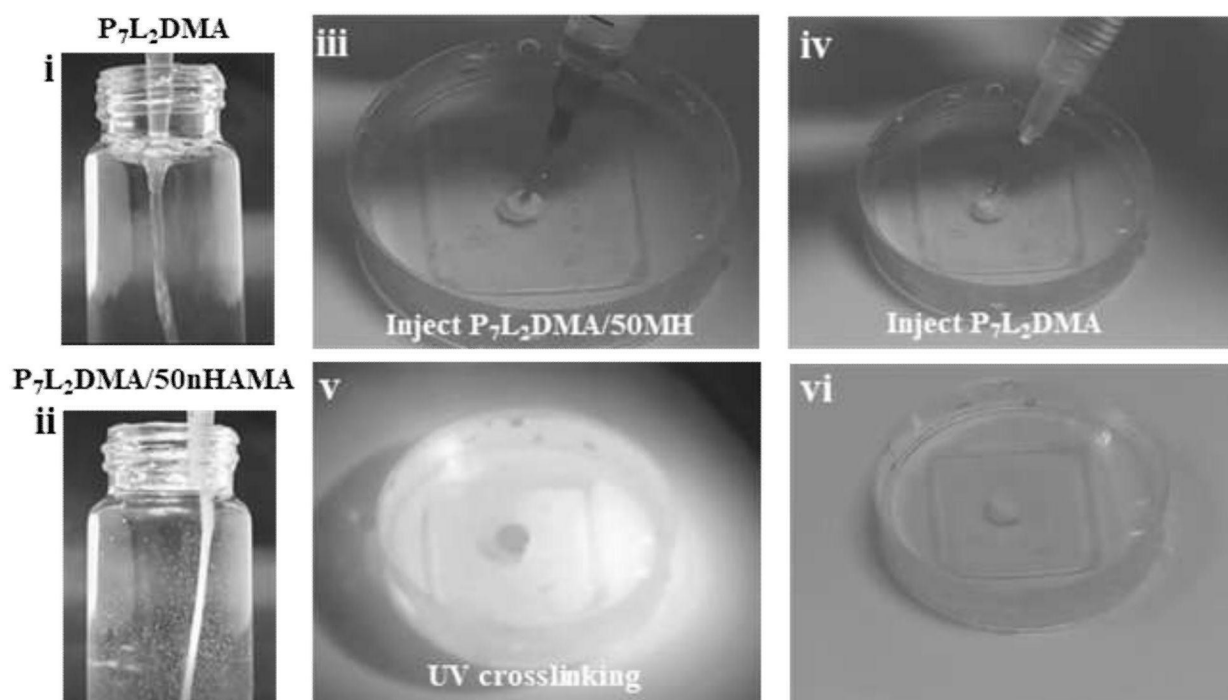


图3

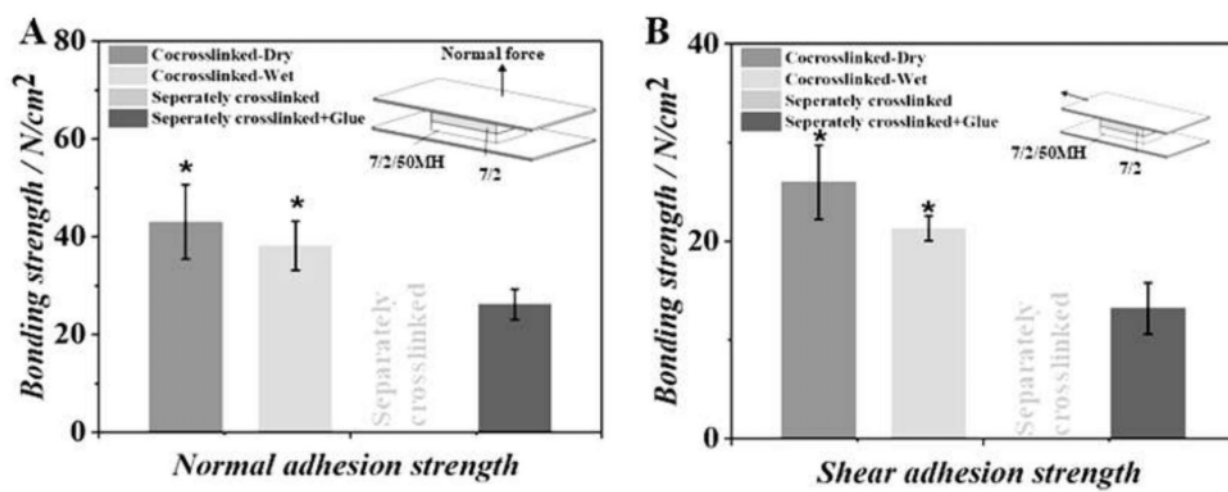


图4

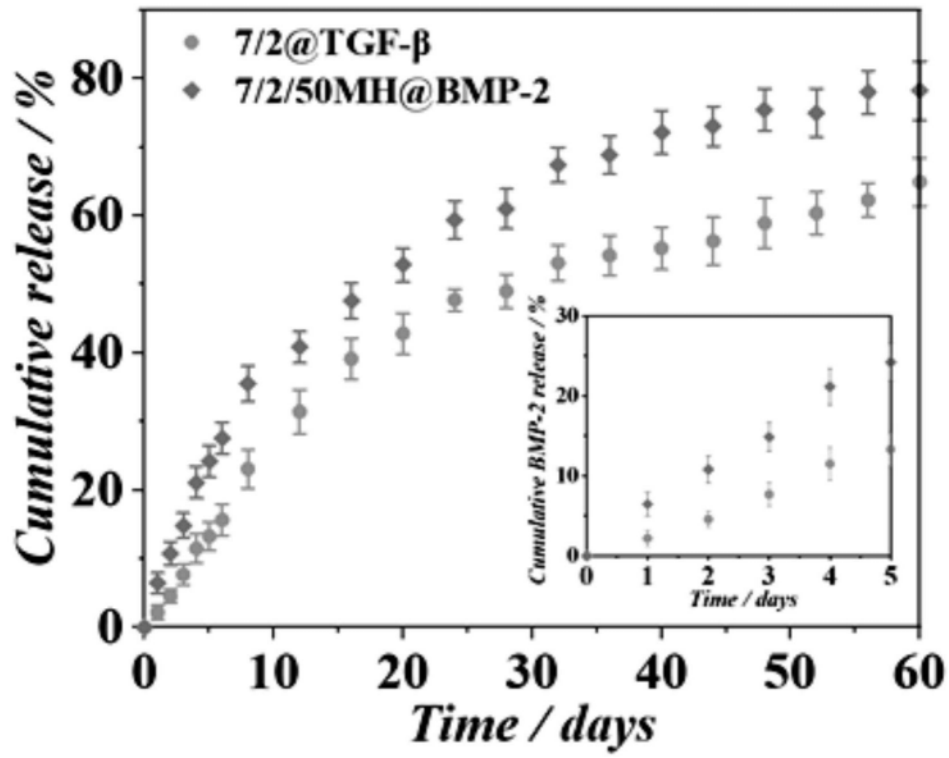


图5

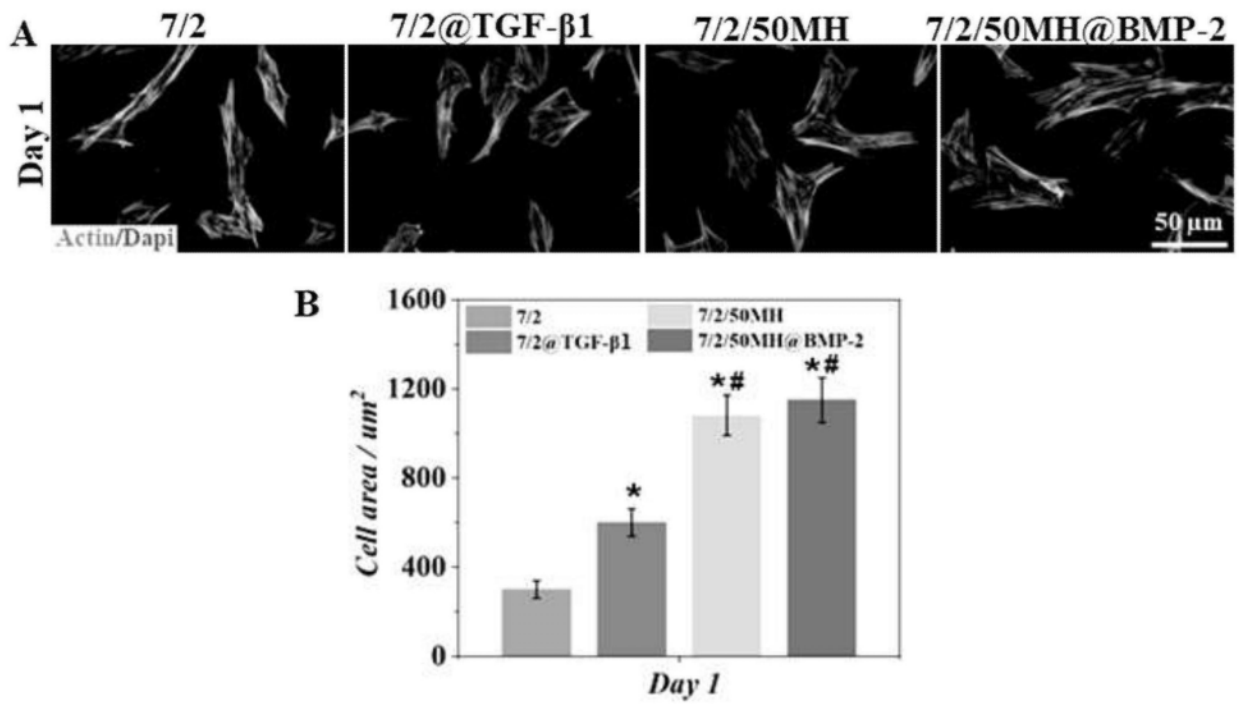


图6

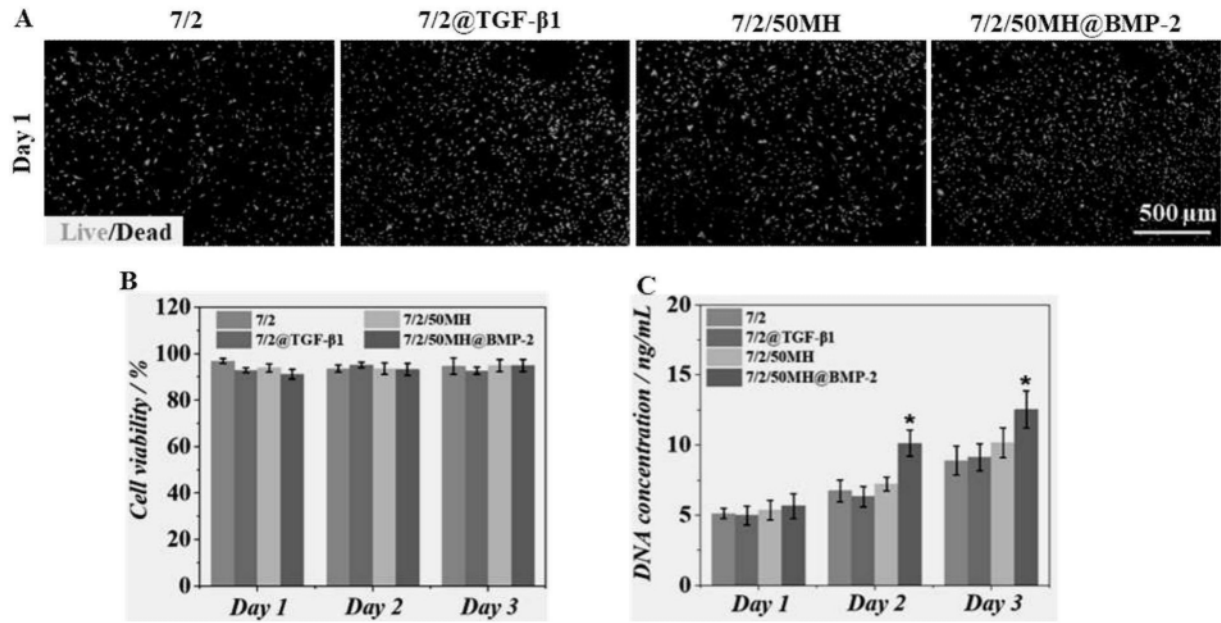


图7

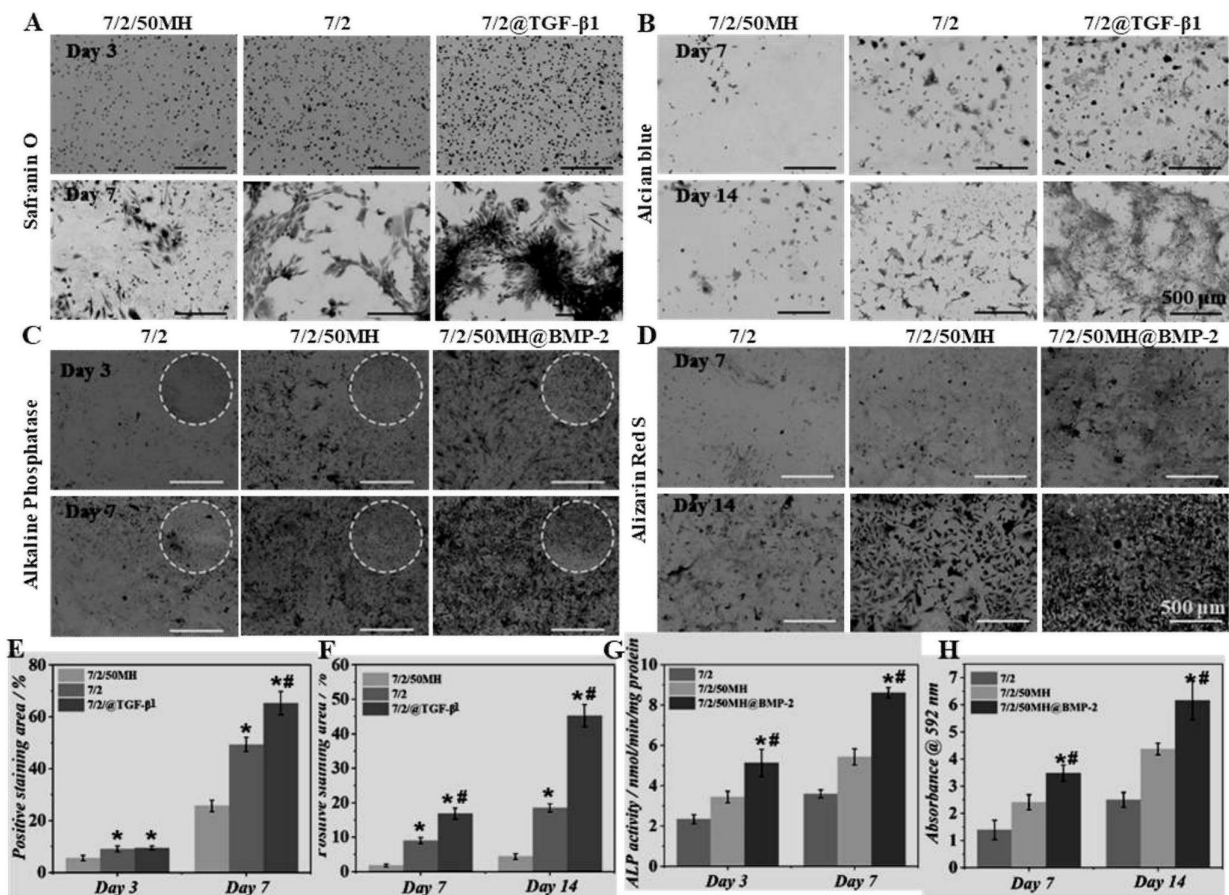


图8

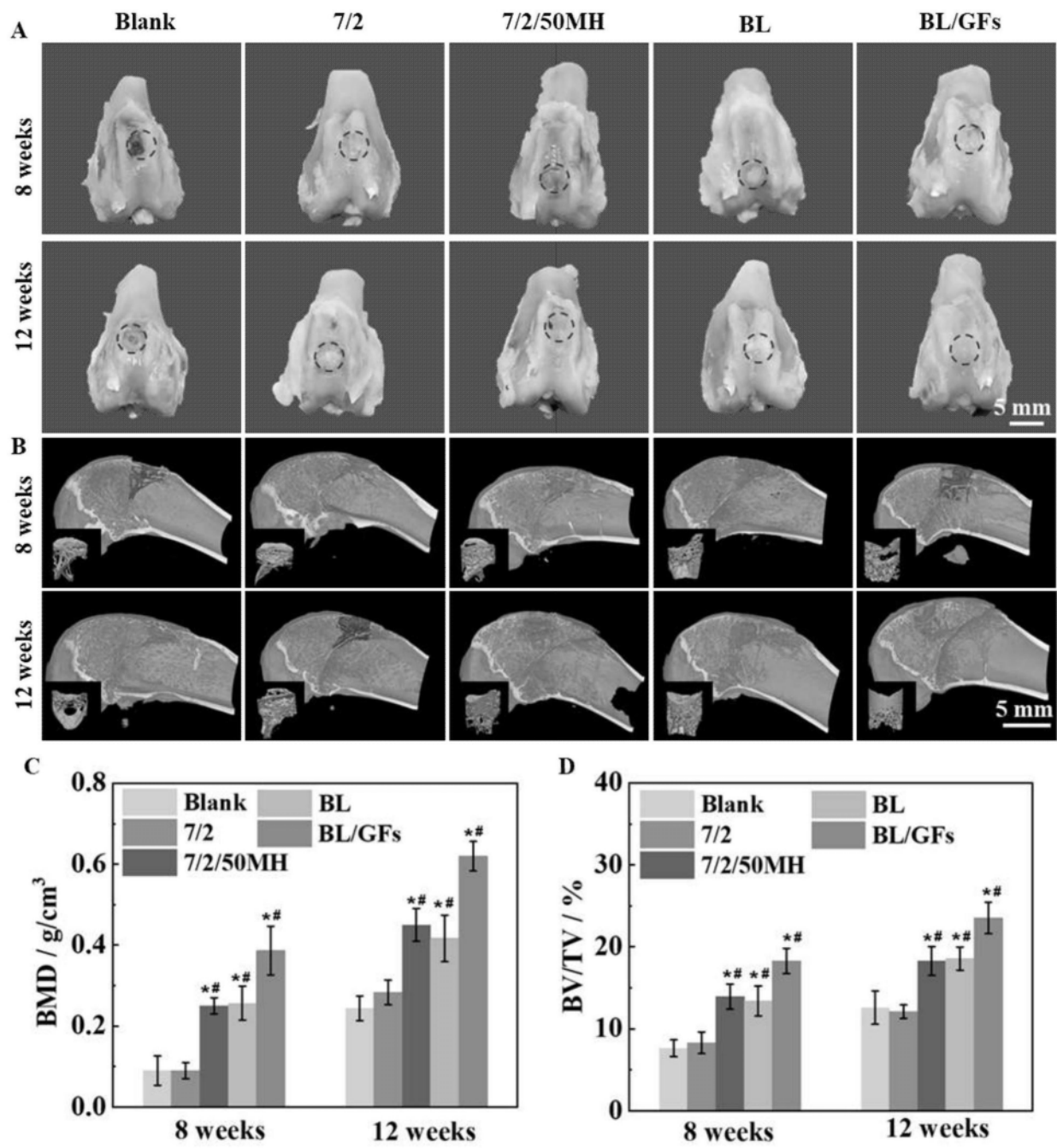


图9