



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101116755 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200610107999.5

(22) 申请日 2006.08.02

(73) 专利权人 香港理工大学

地址 中国香港九龙红磡

(72) 发明人 李加深 麦福达

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

公司 72003

代理人 吴小瑛

(51) Int. Cl.

A61L 27/28 (2006.01)

(56) 对比文件

Peter X. MA et al.. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network. Tissue Engineering 7. 2001, 7(1), 23-33.

Anita W. T. Shum et al.. Fabrication

and structural characterization of porous biodegradable poly(DL-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with controlled range of pore sizes. Polymer Degradation and Stability 87. 2004, 87487-493.

Yun Chen et al.. Composite Coating of Bone-like Apatite Particles and Collagen Fibers on Poly L-Lactic Acid Formed Through an Accelerated Biomimetic Coprecipitation Process. Journal of Biomedical Materials Research 77. 2006, 77315-322.

审查员 张宇腾

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 14 页

(54) 发明名称

将细胞粘着强化剂从媒介物均匀涂敷到多孔骨架或管道孔壁表面的方法

(57) 摘要

本发明提供了将细胞粘着强化剂涂敷在天然或合成材料制备的多孔骨架或管道的孔壁表面的方法,该方法包括以下步骤:将一种或多种细胞粘着强化剂涂敷于媒介物表面并使媒介物成型;将天然或合成的骨架材料浇铸到具有涂层的成型媒介物上;除去媒介物材料,该细胞粘着强化剂均匀地从媒介物表面转移到多孔骨架的孔壁表面。该细胞粘着强化剂镶嵌在孔壁表面,甚至包埋在骨架基体中。这种涂层结构可以加强涂层材料与骨架之间的涂层强度。该涂层赋予骨架以细胞识别信号,且可以改进细胞的种植,分布与繁殖,有利于新组织和血管的形成。应用该方法可以根据不同的组织工程要求,使用相应的涂层材料对多孔骨架或者管道表面进行涂敷改性。

1. 将细胞粘着强化剂涂敷在管道内表面或多孔骨架内的方法,该方法包括以下步骤:
将一种或多种细胞粘着强化剂涂敷于媒介物表面并使媒介物成型;
将天然或合成的骨架材料浇铸到具有涂层的成型媒介物的内部空隙中;
除去媒介物材料,该细胞粘着强化剂均匀地从媒介物表面转移到多孔骨架的孔壁表面。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述将细胞粘着强化剂涂敷于媒介物表面并使媒介物成型的步骤为将细胞粘着强化剂涂敷在每个单独的媒介物颗粒表面,然后成型。
3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述将细胞粘着强化剂涂敷于媒介物表面并使媒介物成型的步骤为将细胞粘着强化剂和媒介物颗粒混合并压制成型。
4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述方法是连续过程。
5. 权利要求 1 所述的方法,其中所述方法是非连续批次进行的过程。
6. 权利要求 1 所述的方法,其中涂敷步骤和浇铸步骤中的细胞粘着强化剂为液体。
7. 权利要求 4 所述的方法,其中所述细胞粘着强化剂在涂敷和浇铸步骤中为溶液、悬浮液、熔融物、可流动的粉末、可流动的糊及其混合物中至少一种。
8. 权利要求 1 所述的方法,其中所述媒介物材料选自盐、氢氧化钠、糖、糖精、蜡、萘、天然或合成的水溶性聚合物、天然或合成的非水溶性聚合物及其混合物中至少一种。
9. 权利要求 8 所述的方法,其中所述媒介物材料为明胶。
10. 权利要求 8 所述的方法,其中所述盐选自氯化钠、氯化钾、氟化钠、氟化钾、碘化钠、硝酸钠、硫酸钠、碘酸钠及其混合物中至少一种。
11. 权利要求 8 所述的方法,其中所述糖为水溶性糖。
12. 权利要求 11 所述的方法,其中所述糖为葡萄糖、果糖及其混合物。
13. 权利要求 8 所述的方法,其中所述蜡选自石蜡、蜂蜡及其混合物中至少一种。
14. 权利要求 1 所述的方法,其中所述天然或合成的骨架材料是在除去媒介物材料的步骤后仍能保持骨架浇铸形状的材料,并且,所述天然或合成的骨架材料是聚合物材料。
15. 权利要求 14 所述的方法,其中所述聚合物材料为可生物降解聚合物材料。
16. 权利要求 15 所述的方法,其中所述可生物降解聚合物材料选自聚乳酸、聚羟基乙酸、PLA/PGA 共聚物、聚酐、聚邻醚、聚己酸内酯、聚乙二醇、聚氨酯、及其共聚物、及其混合物中的至少一种。
17. 权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞粘着强化剂选自磷酸钙盐、蛋白、及其混合物中至少一种,所述磷酸钙盐选自羟基磷灰石、类骨磷灰石、磷酸三钙、 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 中至少一种。
18. 权利要求 17 所述的方法,其中所述磷酸钙盐是合成的或在模拟体液中沉积得到的。
19. 权利要求 17 所述的方法,其中所述蛋白是胶原。
20. 权利要求 19 所述的方法,其中所述胶原是天然胶原或合成胶原。
21. 权利要求 1 所述的方法,其进一步包括向多孔骨架或管道中加入功能性或惰性添加剂的步骤。
22. 权利要求 21 所述的方法,其中所述功能性或惰性添加剂为药物。
23. 权利要求 21 所述的方法,其中所述功能性或惰性添加剂选自无机盐、肽、氨基酸、

维生素、葡萄糖及其混合物。

24. 权利要求 21 所述的方法,其中所述功能性或惰性添加剂为矿物。

25. 权利要求 1 所述的方法,其中所述媒介物材料的成型形状为规则几何形状或不规则几何形状。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中所述媒介物材料的成型形状为球形或盘状。

27. 由权利要求 1-26 中任意一项所述方法形成的具有细胞粘着强化剂涂层的多孔材料。

将细胞粘着强化剂从媒介物均匀涂敷到多孔骨架或管道孔壁表面的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及将细胞粘着强化剂均匀涂敷在作为组织代用品（如骨代用品和关节软骨代用品）的多孔可生物降解聚合物的骨架或管道内的方法。

背景技术

[0002] 修复和替换患病的组织结构和器官需要耗费巨大的健康保健资源。最普遍的办法是自体移植，然而，自体移植物 (autograft) 甚至同种异体移植物 (allograft) 的供应都是非常有限的。相对而言，使用包含哺乳动物细胞和骨架材料的工程化组织 (engineering tissue) 和器官来治疗器官功能障碍或缺失具有广泛的应用前景。见 Langer, R. S. and J. P. Vacanti, "Tissue engineering: the challenges ahead," *Scientific American* 280(4), 86 (1999)。在这种方法中，需要用临时骨架作为植入细胞的附着基质和引导器官形成的载体。因此，该骨架材料必须满足所要置换的特定组织或器官的生物力学、生物化学以及生物学的需要。移植的细胞附着在骨架材料上，繁殖，分泌自己的胞外基质 (extracellular matrices, ECM)，并刺激新组织的形成。见 Langer, R. and J. Vacanti, "Tissue engineering," *Science* 260(5110), 920-926 (1993); Hubbell, J. A., "Biomaterials in Tissue Engineering," *Bio/Technology* 13, 565 (1995); 和 Saltzman, W. M., "Cell Interactions with Polymers," *Principles of Tissue Engineering*, R. Lanza, R. Langer and W. Chick, Editors, (1997) Academic Press, R. G. Landes Company, Austin, Tex., 225。在该过程中，该骨架必须逐渐发生降解并被除去，最终消失。因此，除了促进细胞粘着、生长，以及保持分化细胞的功能外，该骨架还应该是生物相容的、可生物降解的、高度多孔性（表面/体积比值高）、机械强度高，且可制成预定形状。生物材料骨架的生物物理和生物力学性质对组织工程学的结果是至关重要的。在很多情况下，材料的选择要兼顾物理和生物学的要求。合成的可生物降解聚合物是一种颇具吸引力的骨架材料，因为当新组织形成时，这种聚合物则发生降解，最终在体内不留下任何异物。而且合成的可生物降解聚合物的物理和生物学性质可通过不同的合成条件和方法得到控制和调整。

[0003] 可生物降解聚合物包括合成的脂肪族聚酯，例如聚羟基乙酸 (PGA)、聚乳酸 (PLA)、及其 PLA/PGA 共聚物 (PLGA)。PLA、PGA 和 PLGA 已被美国食品及药物管理局 (FDA) 批准用于某些人类临床应用中，例如用作外科缝合线和可植入设备中。这些物质的一个潜在优点是它们的降解速度可得到调节以配合新组织的再生速度。由于具有足够的机械强度，它们可以保持框架结构直到新组织的形成。这些物质还可被制成与待置换组织或器官相同的复杂形状或结构。

[0004] 尽管合成材料得到广泛应用，但它们仍具有很多缺陷，例如具有疏水性和缺乏细胞识别信号。这些性质导致聚合物材料表面没有足够的细胞粘着能力。因此，材料与寄主环境的相互作用还有很大的改进空间。如何改进生物材料/细胞间的相互作用以得到可控的细胞粘着并保持不同的表型表达已经成为在组织工程学领域中主要的挑战之一。

[0005] 为了克服合成的可生物降解聚合物材料的相关缺陷,在这些聚合物材料表面上涂敷细胞粘着强化剂成为人们关注的焦点,一般的细胞粘着强化剂包括:胶原、类骨磷灰石和羟基磷灰石。

[0006] 胶原作为一类蛋白质是动物组织中最重要蛋白之一,作为骨架材料广泛分布在体内。它是大多数胞外基质的主要结构单元,因而,是大多数组织至关重要的结构单元。胶原以多种形式存在于不同的组织和器官中。

[0007] 对胶原进行的大多数研究集中在胶原凝胶或固体胶原构成物如薄膜的应用中。然而,这些构成物的问题是缺少结构强度(胶原凝胶也有同样的问题),或者植入后失去强度,而且不易用于形成具有移植特定形状的组织结构。因为它们的结构和定向性与天然组织不同,较硬的胶原移植物易于折断。

[0008] Kokubo 和同事们在 1990 年最先用仿生工艺通过将板材浸在模拟体液(SBF)中形成类骨磷灰石涂层。该磷灰石涂层可以减少纤维包裹,促进骨骼内生,促进直接的骨接触,而且促进骨髓基质细胞分化为成骨细胞。研究者试图在整形外科和齿科植入材料的表面涂敷磷灰石,这些植入材料可包括生物陶瓷、金属和聚合物。

[0009] 羟基磷灰石(HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)和人类骨骼系统中的磷灰石具有相似的化学组成和晶体结构,因此在骨重建中作为骨接枝材料具有重要用途。 HA 主动与其生物环境发生作用,例如吸附蛋白和病毒,以及在其晶格内进行离子的交换。由于机械性能差,尤其是断裂韧性较低, HA 不能独自承载重负荷, HA 在医用领域的应用目前十分有限。

[0010] 因此,可以综合合成的或者源于天然的细胞粘着强化剂以及可生物降解聚合物二者的优点而制备用于组织工程的三维多孔骨架。

[0011] 用胶原修饰可生物降解聚合物骨架看似是一个解决上述问题的好方法。胶原纤维嵌入 PLA 基质以强化胶原纤维,用于腱和韧带的重建。用胶原涂敷 PLGA 泡沫或将胶原凝胶嵌入 PLGA 泡沫中用来改善 PLGA 和肝细胞的相互作用。最近,有人开发了一种新方法,将胶原微海绵嵌入聚合物海绵的孔中。该方法包括两个主要步骤:制造聚合物骨架,以及在聚合物骨架中注入胶原。制成聚合物骨架后,在真空下将其浸入胶原酸性溶液中,使得骨架的孔洞中填满胶原溶液。然后冻干,在聚合物孔洞中形成胶原微海绵。最后,交联该胶原微海绵且封端。胶原微海绵嵌入聚合物海绵增加了聚合物表面的润湿性,而且使细胞种植变得容易。然而,该注入方法还有很多缺陷。首先,当可生物降解聚合物浸在胶原溶液中,与化学品交联、封端时,该可生物降解聚合物可能发生一定程度的降解,尤其是那些可被快速降解的聚合物。胶原溶液的低 pH 值可加速聚酯的降解速度。第二,尽管胶原微海绵在聚合物孔中能增加表面积/体积比,但骨架的孔径、孔隙率和相互连通性都有所下降,这会阻碍细胞向骨架的移动。相似地,骨架中营养的流入和废物的排出也受到限制。第三,聚合物海绵中胶原微海绵的机械性质和纯胶原骨架一样弱;潜在的塌陷对细胞的附着和增殖不利。

[0012] 磷灰石除了被涂在固体基质表面上之外,还可以通过将样品在 SBF 中浸泡一段时间而涂在多孔骨架内。然而这个方法也存在一些缺陷:第一,为了涂敷一定量的磷灰石,可生物降解聚合物可能需要在 SBF 中浸泡长达几周的时间,在这个过程中其基质材料可能会在某种程度上被降解。如果基质材料很容易降解的话,这将是一个严重问题。第二,受流通能力的限制,骨架外部和内部深孔之间 SBF 离子浓度差别会很大,从而会导致涂层厚度和质量的不同。尤其对于具有小孔的骨架,这将是一个重要问题。第三,在磷灰石涂敷工艺之

后,残留的 SBF 很难被冲洗干净。最后,在孔表面的磷灰石会降低原骨架中的孔径甚至堵塞一些小孔。

[0013] 结合 HA 和有机聚合物的常规方法是制备聚合物 /HA 共混复合物。虽然一般而言,这样的共混复合物比纯聚合物有更好的骨引导性能,但 HA 的功能没有被完全体现出来,因为大多数的 HA 颗粒被在聚合物掩盖了。为实现 HA 出色的骨引导性能,HA 表面必须暴露在周围环境中。将 HA 涂在多孔聚合物骨架内巨大的表面上会更好地实现这一性质。在金属假肢上沉积 HA 涂层的一些常用方法,如等离子喷涂、离子溅射和激光消融,通常需要在高温下进行(至少大于 500°C)热处理,因而不适合有机聚合材料。

发明内容

[0014] 本发明的目的旨在提供将合成的或天然的细胞粘着强化剂涂敷在作为组织代用品的多孔的可生物降解聚合物骨架或管道中的方法,其有利于形成用于细胞附着和繁殖的生物相容的亲水表面。

[0015] 本发明进一步的目的旨在提供一种涂敷多孔结构的方法,其有利于避免传统方法在某种程度上降解聚合物材料。

[0016] 此外,本发明再进一步的目的旨在提供一种在多孔骨架尤其是具有小孔洞的骨架内均匀涂敷材料的方法。

[0017] 本发明又进一步的目的旨在提供一种在骨架或管道内表面涂敷两种或多种材料的方法。

[0018] 本发明另外一个目的旨在提供通过将材料包埋或嵌入骨架基质使骨架孔壁表面涂敷的材料和基质材料之间具有高的结合强度的方法。

[0019] 本发明提出并解决了上述问题,并且通过提供将细胞粘着强化剂均匀地涂敷在多孔的可生物降解骨架或管道中的方法实现了列举的和没有列举的目的和优点。该方法包括以下步骤:将一种或多种细胞粘着强化剂涂敷于媒介物表面并使媒介物成型;将天然或合成的骨架材料浇铸到具有涂层的成型媒介物的内部空隙中;除去媒介物材料,该细胞粘着强化剂均匀地从媒介物表面转移到多孔骨架材料的孔壁表面。将细胞粘着强化剂涂敷于媒介物表面并成型的方法有两种:一种是先将细胞粘着强化剂涂敷在每个媒介物颗粒表面,然后成型;另外一种是将细胞粘着强化剂和媒介物颗粒混合然后压制成型,干燥后细胞粘着强化剂就存留在媒介物表面。

[0020] 本发明的方法中采用的细胞粘着强化剂可为液体。优选地,该细胞粘着强化剂可以是溶液、悬浮液、熔融物、浆液、可流动的粉末、可流动的糊、或其混合物中的至少一种。浇铸用的天然或合成的骨架材料的流动性可满足浇铸用途。

[0021] 本发明的方法可以是连续进行的(例如,该方法可以是自动的),将媒介物模制成型,例如印制成三维复制阴模结构,然后将浇铸材料浇铸到复制阴模上都是自动进行的。或是不连续的批次进行,此时可是人工的,也可是自动的。

[0022] 适合本发明的示例性媒介物包括:盐(包括但不限于氯化钠、硫酸钠、氯化钾、碘化钠、氟化钠、氟化钾、氟化钾、硝酸钠、碘酸钠、及其混合物)、其他水溶性化学物质,如氢氧化钠,糖(包括但不限于果糖、糖精、葡萄糖、其他水溶性糖、及其混合物)、蜡(石蜡、蜂蜡、其他蜡、及其混合物)、萘、明胶、及其混合物中的至少一种。

[0023] 媒介物材料可以被制成预定或必要的任何形状,包括球形、盘状、规则几何形状、不规则几何形状、或其混合形状。然而,在一个优选实施方式中,预定的形状选自球形。

[0024] 涂敷媒介物的细胞粘着强化剂可为包括(但不限于)蛋白质、磷酸钙盐、及其混合物在内的任何适宜材料。

[0025] 一些用于涂敷媒介物表面的蛋白质选自天然胶原或人造胶原。

[0026] 磷酸钙盐包括:羟基磷灰石、类骨磷灰石、磷酸三钙(TCP)、可再吸收的磷酸八钙($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;OCP)、及其混合物。

[0027] 本发明的方法所采用的天然或合成的骨架材料是任何在除去媒介物材料后仍能保持骨架浇铸形状的材料。天然或合成的骨架材料可以是聚合物材料,优选为可生物降解的聚合物材料。可生物降解聚合物材料优选自聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)、PLA/PGA共聚物、聚酐、聚邻醚(poly(ortho-ethers))、聚己酸内酯、聚乙二醇(PEG)、聚氨酯、及其共聚物、及其混合物中的至少一种。

[0028] 本发明的方法还进一步包括向多孔骨架或管道中加入功能性或惰性添加剂的步骤,所述的添加剂例如为细胞生长所必需的营养成分。在上述制得的涂敷细胞粘着强化剂的多孔骨架或管道上培养细胞之前,可将该多孔骨架或管道浸入培养液中,使孔壁表面附着一些细胞生长所必需的营养成分或其它所需物质,如药物、肽、氨基酸、无机盐、矿物、维生素、葡萄糖及其混合物等。

[0029] 本发明还提供了由本发明的方法制得的具有细胞粘着强化剂涂层的多孔材料,如多孔骨架或管道。

附图说明

[0030] 图1为石蜡支架的显微照片。石蜡球的粒径范围为180至250 μm 。石蜡球相互接触。在未来形成的多孔骨架中,其接触面形成连接两个大圆洞的小洞。

[0031] 图2(a)和图2(b)为无涂层的石蜡球表面的SEM显微照片,表面可见波纹状图案。

[0032] 图3(a)和图3(b)是通过石蜡球(无涂层)移除方法制得的PLGA骨架的SEM显微照片。所用石蜡球的粒径范围为180至250 μm 。所得骨架的孔隙率约为95%。石蜡球溶解之后,留下球形空间。因为没有涂层,骨架的壁表面是比较光滑的。

[0033] 图4(a)、图4(b)和图4(c)是石蜡球表面上涂有磷灰石的SEM显微照片。将石蜡球浸在37 $^{\circ}\text{C}$ 5SBF中24小时之后,磷灰石覆盖了90%以上石蜡球表面。多数磷灰石颗粒堆积在一起形成磷灰石涂层片段。可以看到磷灰石片段间的缝隙和磷灰石颗粒间的小间隙。

[0034] 图5(a)、图5(b)和图5(c)是PLGA骨架孔壁表面上涂有磷灰石的SEM显微照片。石蜡球的粒径范围为180至250 μm 。石蜡球被除去后,骨架的连通性很好。孔隙率约为95%。石蜡球上的磷灰石被转移到PLGA骨架孔壁表面。磷灰石颗粒以不同深度嵌入骨架壁中。

[0035] 图6(a)、图6(b)和图6(c)是石蜡微球表面上涂有HA涂层的SEM显微照片。HA均匀地沉积在石蜡微球表面。多数HA颗粒堆积在一起形成HA涂层片段。可以看到HA片段间的缝隙和HA颗粒间的小间隙。

[0036] 图7(a)和图7(b)是具有HA涂层的PLLA骨架的SEM显微照片。石蜡微球被除去后,骨架的连通性很好。孔径约为250 μm 。

[0037] 图 8(a) 和图 8(b) 是具有 HA 涂层的 PLLA 骨架的横截面 SEM 显微照片。HA 涂敷在 PLLA 骨架孔壁表面。一些 HA 颗粒的一部分嵌入骨架壁内, 另一部分暴露在外。 (a) 和 (b) 分别为放大倍数 ($\times 5000$) 和 ($\times 10000$) 的照片。

[0038] 图 9(a) 和图 9(b) 是具有胶原涂层的石蜡微球的 SEM 显微照片, 图示了石蜡微球上均匀的胶原涂层。在相邻微球接触面处可清楚地分辨出胶原。

[0039] 图 10 是具有胶原涂层的 PLGA 骨架的 SEM 显微照片。石蜡微球被除去后, 球形孔留在 PLGA 骨架中。孔径 (约 $280 \mu\text{m}$) 对应于石蜡微球的粒径范围 250 至 $280 \mu\text{m}$ 。

[0040] 图 11(a) 和图 11(b) 是具有胶原涂层的 PLGA 骨架的 SEM 显微照片, 该胶原涂层是用 0.5% 胶原溶液涂敷的。胶原涂层的一些区域可以明显观察到胶原网络。

[0041] 图 12(a) 和图 12(b) 是具有胶原涂层的 PLGA 骨架的 SEM 显微照片, 该胶原涂层是用 1.0% 胶原溶液涂敷的。PLGA 骨架的孔壁表面非常粗糙, 具有很多小胶原突起, 可以显著增加表面积。

[0042] 图 13(a) 和图 13(b) 是在石蜡微球之间或石蜡微球表面上涂有胶原和 HA 涂层的 SEM 显微照片。处于石蜡微球之间的含有 HA 的胶原纤维嵌入到聚合物基质内, 有利于增加涂层和孔壁表面间的涂层强度。

[0043] 图 14 是在骨架孔表面涂有胶原和 HA 涂层的 SEM 显微照片。部分胶原和 HA 包埋在孔壁内。

具体实施方式

[0044] 以下将参照实施例对本发明进行描述, 这些实施例只是用于对本发明进行举例说明而不应当理解为任何形式上的限定。

[0045] 实施例 1

[0046] PLGA (50/50) 购自 PURAC (Netherlands), 其平均分子量为 50000g/mol 。聚乙烯醇 (PVA) (水解度 88% , 平均分子量 25000g/mol), 石蜡 (熔点 $53-57^\circ\text{C}$), 吡啶 (沸点 115°C), 和环己烷 (沸点 81°C) 都购自 Acros (Belgium)。标准筛购自 Lantian Ltd Co., China。

[0047] 通过 5 倍 SBF 处理, 将类骨磷灰石涂敷在石蜡微球表面

[0048] 5SBF 包含接近 5 倍于人体血浆的无机离子浓度, 其通过将 NaCl , NaHCO_3 , Na_2SO_4 , KCl , K_2HPO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶解在蒸馏去离子水 (DDI) 中而制得。用 HCl 和 Tris 将溶液 pH 调到 6.4 以增加化学物质的溶解性。离子浓度分别为 710.0mM Na^+ , 25.0mM K^+ , 12.7mM Ca^{2+} , 7.7mM Mg^{2+} , 739.7mM Cl^- , 21.0mM HCO_3^- , 5.0mM HPO_4^{2-} 和 2.5mM SO_4^{2-} 。将具有所需粒径的石蜡微球浸在 37°C 5SBF 中 24 小时, 以便进行磷灰石的涂敷。将已被涂敷的石蜡球用 DDI 认真清洗三遍, 去除残留的 SBF。在下一步骤之前, 将石蜡球保存在蒸馏水中。

[0049] 制备石蜡和聚合物骨架

[0050] 利用塑料注射管 (直径 6mm) 作为制备石蜡泡沫的模具。将悬浮在水中的涂敷了磷灰石的石蜡球吸入模具。多余的水被注射橡胶活塞挤出。没有观察到有水流时, 释放加在活塞上的压力。全部的石蜡泡沫被管的活塞推出。测得厚度约 3mm 。泡沫在 37°C 恒温箱中干燥 12 小时以后, 被冷却到室温。将 PLGA 50/50 溶解在吡啶中达到一定浓度。将 PLGA 溶液逐滴加入浇铸到石蜡泡沫上, 直到石蜡球的间隙都填满了聚合物溶液。具有 PLGA 溶液的石蜡泡沫在低真空下保持 2 天, 以除去残余的溶剂。然后从真空箱中移出干燥的石

蜡 / 聚合物盘状物。盘状物的顶层用刀片切去得到一个平坦的表面。室温下将该盘状物浸在 40mL 己烷中 6 小时以溶解和去除石蜡。每 1.5 小时更换一次己烷。将该盘状物在冷冻器 (-20℃) 冷冻 6 小时以上后, 在 -10℃ 冻干 2 天, 然后在真空中室温干燥 1 周以除去任何残余溶剂直到重量没有变化。

[0051] 结果与讨论

[0052] 用扫描电子显微镜 (SEM) 来检查形态。在将石蜡微球浸在 5SBF 中 24 小时以后, 大量直径 100 至 500nm 的类骨磷灰石小颗粒在石蜡微球表面形成, 该涂层覆盖了 90% 以上的石蜡表面。

[0053] 多数磷灰石颗粒聚在一起在石蜡微球表面上形成磷灰石涂层片段。也可在表面上找到一些分离的磷灰石颗粒。磷灰石涂层片段有一些缝隙。在后续聚合物溶液浇铸时, 聚合物溶液将填满这些缝隙。当聚合物溶液的溶剂蒸发后, 磷灰石被嵌入聚合物壁中, 这可以在石蜡球被己烷溶解后, 增强 PLGA 骨架上的磷灰石的涂层强度。

[0054] 在传统的 SBF 涂敷方法中, 需要 15 天的时间才能完全将磷灰石覆盖在基质表面。而使用高离子浓度的 5SBF 加速了这个涂敷过程, 把时间缩短为 24 小时。高浓度的钙和磷酸根离子可以增强基质周围的过饱和条件。由于核生长过程消耗周围液体的钙和磷酸根离子, 高离子浓度可为基质上提供更多的磷灰石核, 且迅速为核周围提供离子, 从而导致涂层的快速生长。因此, 覆盖整个表面的时间被大大缩短了。

[0055] 当将 PLGA 溶液浇铸到石蜡球泡沫中时, PLGA 覆盖了磷灰石涂层粗糙的表面, 甚至进入磷灰石颗粒的缝隙中, 有助于石蜡球被溶解后包埋磷灰石颗粒。磷灰石颗粒均匀地分散在孔壁上, 这可能有利于骨架内部深处的细胞附着。

[0056] 总之, 本发明的新方法可以在聚合物骨架中涂敷类骨磷灰石, 由于涂层均匀, 涂敷后的骨架可用于多种潜在的组织工程学和其他生物医学应用中。利用这一涂敷方法, 磷灰石涂层可以以很小的分布差异遍布整个骨架。该方法尤其适用于具有小孔的较厚骨架中。另一个优点是可生物降解聚合物无需接触酸性 SBF, 避免了不必要的降解。这对于一些在酸性环境下迅速降解的聚合物材料尤为重要。

[0057] 实施例 2

[0058] HA 粉末 (粒径 100 到 500 纳米); 可降解聚氨酯; 盐和糖 (粒径范围 250 到 280 微米)、二甲基甲酰胺和无水乙醇都来自 Acros (Belgium)。

[0059] 制备 HA/ 食盐 (或者糖) 颗粒骨架

[0060] 将 HA 颗粒与无水乙醇混合, 得到浓度为 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 和 15.0% 的悬浊液。将盐 (或者糖) 颗粒与 HA 悬浊液混合。将无头的塑料注射管 (直径 3mm) 用作制备 HA/ 盐 (或者糖) 颗粒骨架的模具。将一些 HA/ 盐 (或者糖) 颗粒悬浮液倒入模具中。小心操作以保证模具中没有气泡。注射器端部接触一块橡胶板, 用注射器活塞将多余的 HA 悬浮液通过注射器端部和橡皮板间的缝隙从模具中挤出。最后将 HA/ 盐 (或者糖) 颗粒悬浮液压成骨架, 用活塞从管中推出。该 HA/ 盐 (或者糖) 颗粒骨架大约 3mm 厚。在保温箱 37℃ 干燥 2 小时后, 冷却到室温。

[0061] 制备聚氨酯骨架

[0062] 将聚氨酯溶解在二甲基甲酰胺中得到所需浓度的溶液。逐滴将聚氨酯溶液浇铸到 HA/ 盐 (或者糖) 颗粒骨架上, 直到盐 (或者糖) 颗粒的间隙都填满了聚氨酯溶液。具有聚

氨酯溶液的盐（或者糖）骨架在低真空下保持 2 天，以除掉残留的溶剂。然后从真空箱中移出干燥的 HA/ 盐（或者糖）颗粒 / 聚氨酯盘状物。室温下将该盘室温下浸在 50mL 去离子水中 12 小时以溶解除去盐（或者糖）。每 2 小时更换一次去离子水。然后将盘状物在冷冻器中 -20°C 冷冻 6 小时以上，在 -10°C 冻干 2 天，在真空中室温干燥一周以除去任何残余溶剂。为了制备用于观察形态的样品，将该样品在冷冻之后冻干之前切开。

[0063] 结果与讨论

[0064] 在制备 HA/ 盐（或者糖）颗粒骨架的过程中，保证骨架中没有气泡是很重要的，以便每个盐（或者糖）颗粒可以与 HA 悬浮液最大程度地均匀接触。在 HA/ 盐（或者糖）颗粒骨架被干燥后，HA 颗粒看似已经非常均匀地沉积在盐（或者糖）颗粒表面上。HA 沉积物表面由高高低低的 HA 堆组成，极大地增加了表面积。当聚氨酯溶液浇铸到盐（或者糖）颗粒上时，溶液可以广泛接触 HA 颗粒。由于 HA 沉积物不是致密层，HA 涂层上有很多亚微米孔。聚氨酯溶液可以通过表面的孔隙进入 HA 涂层，甚至有可能到达盐（或者糖）颗粒表面。HA 堆被聚氨酯溶液包围，甚至处于聚氨酯溶液中。在聚氨酯溶液干燥后，聚氨酯基质可以包裹骨架孔壁表面上的 HA 涂层。

[0065] 当盐（或者糖）颗粒被溶解除去时，相应的孔隙仍被保留。因为盐（或者糖）颗粒上的 HA 涂层被转移到骨架孔壁表面，该具有 HA 涂层的骨架表面比没有 HA 涂层的聚氨酯骨架粗糙得多。粗糙性有可能增强细胞附着。由于所有盐（或者糖）颗粒具有几乎均匀的 HA 涂层，用这个方法转移到整个骨架上的 HA 分布也几乎没有差别。

[0066] 为了量化盐（或者糖）颗粒上的 HA 涂层，选用不同浓度的（0.5 至 15.0%）HA/ 无水乙醇悬浮液。当 HA/ 无水乙醇悬浮液浓度小于 2.5% 时，HA 沉积物不能完全覆盖盐（或者糖）颗粒。必然地，留在聚氨酯骨架的孔表面上的 HA 涂层比使用较高浓度 HA/ 无水乙醇悬浮液的要少。然而，当 HA/ 无水乙醇悬浮液浓度大于 7.5% 时，盐（或者糖）颗粒上的 HA 涂层太厚以致盐（或者糖）颗粒间的间隙会被堵塞，阻止聚氨酯溶液进入。基于定量性观察，该工艺的 HA/ 无水乙醇悬浮液的合适浓度显然为 5.0 至 7.5%。

[0067] 实施例 3

[0068] PLGA 50/50 购自 PURAC(Netherlands)，其平均分子量为 50000g/mol。聚乙烯醇 (PVA)（水解度 88%，平均分子量 25000g/mol）、石蜡（熔点 53 至 57°C ）、吡啶（沸点 115°C ）、丙二酸和环己烷（沸点 81°C ）都购自 Acros(Belgium)。标准筛购自 Lantian Ltd Co., China。牛 I 型胶原 (Bovine type I) 购自清华大学。去离子水由 nanopure diamond ultrapurewater system(Barnstead, USA) 制得。胶原交联剂为甲醛和丙酮的混合物。

[0069] 制备石蜡微球 / 胶原骨架

[0070] 将不同浓度的胶原溶液（在 0.3% 丙二酸中的浓度，从 0.1 至 1.5%）和具有所需粒径的石蜡微球混合。在低气压下去除悬浮液中俘获的和石蜡微球之间的气泡。采用塑料注射器 (3.5mL) 作为制备石蜡骨架的模具。切掉注射器端部。用砂纸磨平注射器端部和橡胶活塞。为了制备约 3mm 高的石蜡骨架，拉动该活塞，在其与注射器端部之间留出约 5mm 的空隙。将该空隙用石蜡微球 / 胶原悬浮液填满。在这一步中要小心保证模具中没有气泡。注射器端部垂直地放在一块橡胶板上；慢慢将活塞推下来。将多余的胶原溶液从注射器端部和橡皮板间的缝隙挤出。没有观察到有胶原溶液流出时，释放加在活塞上的压力。用活塞推出含有胶原的全部石蜡骨架，并在空气中 37°C 干燥 12 小时。然后将样品浸入 20mL 交

联剂中,并振摇 4 小时。最后,用去离子水清洗涂敷胶原的石蜡骨架 3 次,再干燥。

[0071] 制备 PLGA/ 胶原骨架

[0072] 将 PLGA 50/50 溶解在吡啶中,得到所需浓度的溶液。将 PLGA 溶液逐滴浇铸到石蜡微球骨架中,直到石蜡球的间隙都填满了聚合物溶液。样品在低真空下保持 2 天,以蒸发掉吡啶。干燥后,PLGA 留在具有胶原的石蜡微球中。如果需要,浇铸和真空干燥步骤可以重复进行以得到具有更高聚合物含量的骨架。

[0073] 然后从真空箱中移出干燥的石蜡微球 / 胶原 / 聚合物盘状物。室温下将该盘状物浸在 20mL 己烷中,振摇 6 小时以溶解石蜡。每 1.5 小时更换一次己烷。将该盘状物移到冷冻器中,在 -20°C 冷冻约 6 小时。然后,在 -10°C 冻干 2 天,在真空中室温干燥以完全除去任何残余溶剂。该具有胶原涂层的 PLGA 骨架保存在干燥器中直到表征。

[0074] 结果与讨论

[0075] 表面无涂层的石蜡微球的 SEM 显微照片图示了两个石蜡微球间的接触更清晰(见图 1a)。胶原涂层均匀地分布在微球表面(图 1b)。在相邻微球接触面可以清楚地观察到涂层(图 1c)。可以注意到一些胶原纤维跨越两个相邻的石蜡微球(图 1d)。这些纤维可在 PLGA 浇铸后嵌入 PLGA,有助于在除去石蜡微球时,将胶原涂层固定在 PLGA 基质中。

[0076] 石蜡微球上的胶原涂层的厚度可以通过改变胶原溶液的浓度来调节。显然,胶原溶液的浓度越高,石蜡微球上的胶原涂层越厚。为了得到有效的胶原涂层,胶原溶液的浓度应该在 0.5 至 1.0% (w/v) 之间。当胶原浓度小于 0.5% (w/v) 时,没有足够的胶原覆盖在石蜡微球的整个表面。当胶原浓度大于 1.0% (w/v) 时,一些石蜡微球间的间隙会被胶原堵塞,在下一步浇铸工序中无法填入聚合物溶液。

[0077] 当石蜡微球被除去以后,胶原涂层被转移到 PLGA 骨架的孔壁表面。通常,由于对比度几乎无差别,很难通过 SEM 从 PLGA 上分辨胶原。然而,在具有胶原涂层(0.5% 胶原溶液)的 PLGA 骨架表面上可以清晰地观察到一些胶原网络。一些胶原涂层薄膜太薄,以致不能抵抗表面张力;它们收缩起皱,在孔壁上形成具有圆孔的胶原网络。这种胶原结构增加了其对比度,很容易在 SEM 下看到。由于一些胶原纤维嵌在 PLGA 基质中,多数胶原网络在整个制备过程后牢牢地附在孔壁表面。

[0078] 与 0.5% 胶原溶液相比,采用 1.0% 的胶原溶液进行涂敷,会使更多的胶原涂敷在石蜡微球并且转移到 PLGA 骨架上。相比没有涂层的 PLGA 骨架的光滑表面,具有胶原涂层的 PLGA 骨架的孔壁非常粗糙。表面的突起是胶原。这些胶原突起显著地增加了粗糙度和骨架的表面积。这对于后面的细胞种植和培养过程的细胞附着和增殖很有利。利用这种涂层转移法制得的胶原涂层的主要结构、孔隙率和 PLGA 骨架的连通性都不会发生变化。

[0079] 实施例 4

[0080] 选用塑料注射器(3.5mL)作为石蜡泡沫的模具。切掉注射器端部。将注射器端部和黑橡胶活塞用砂纸小心打平。为了制备约 3mm 高的石蜡骨架,拉出活塞使其与注射器端部之间留出约 3mm 的空隙。将石蜡微球和 HA 与 I 型胶原溶液混合,然后将该混合物填充到上述空隙内。小心填充保证石蜡悬浮液中没有气泡。注射器端部垂直地压在一块橡胶板上。慢慢将活塞推下来,避免石蜡球在这一过程中变形。多余的胶原溶液和 HA 从注射器端部和橡皮板间的缝隙挤出。当再没有胶原溶液流出时,释放加在活塞上的压力。用活塞将全部石蜡泡沫推出,并且在保温箱中 37°C 干燥 6 小时,然后冷却到室温。胶原进一步与甲醛溶液

交联 4 小时,然后用甘氨酸水溶液封端。用去离子水清洗,再干燥。

[0081] 然后,将 PLLA 溶液浇铸到石蜡微球 /HA/ 胶原骨架中。通过之后去除石蜡微球的方式,将胶原和 HA 转移到 PLLA 骨架孔壁表面上。处于石蜡微球间的具有 HA 的胶原纤维被嵌入 PLLA 基质中。这类结构可以有助于将涂层并入到 PLLA 骨架的孔壁内。

[0082] 在骨架材料上面培养细胞之前,把骨架浸入培养液中,使骨架孔表面附着一些细胞生长必须的营养成分,包括:氨基酸、无机盐、维生素、葡萄糖等。

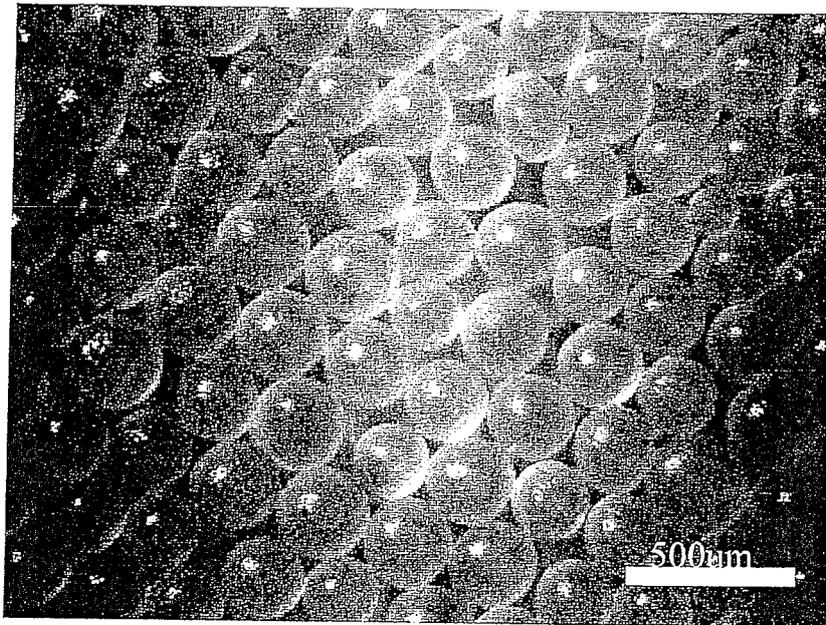


图 1



图 2(a)

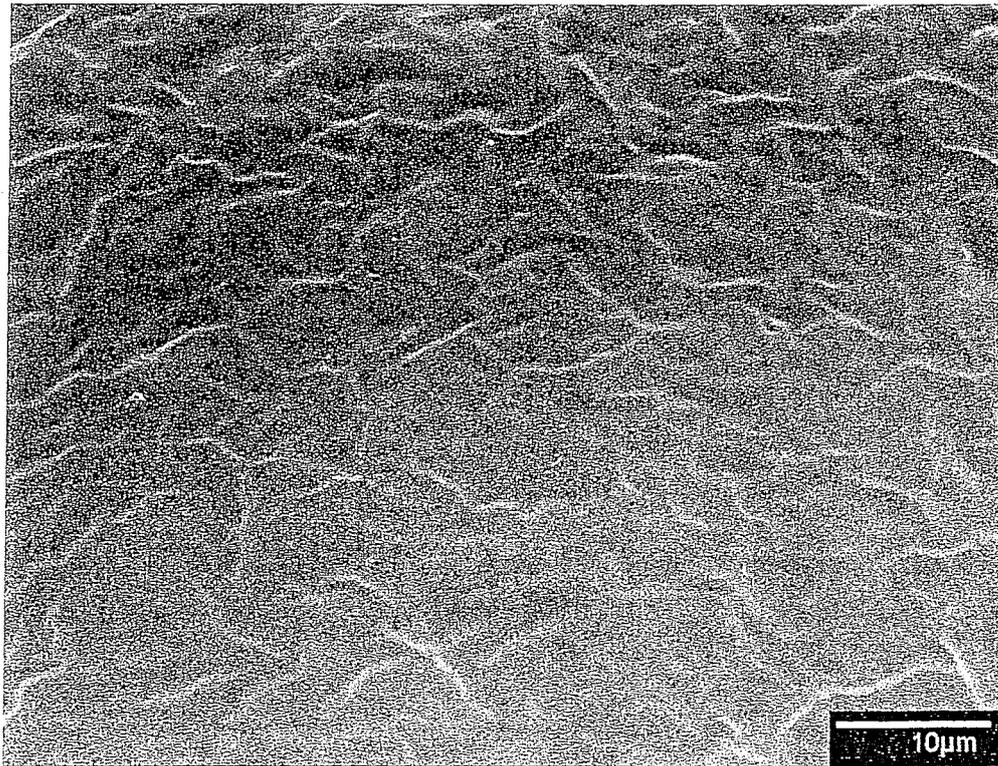


图 2(b)



图 3(a)

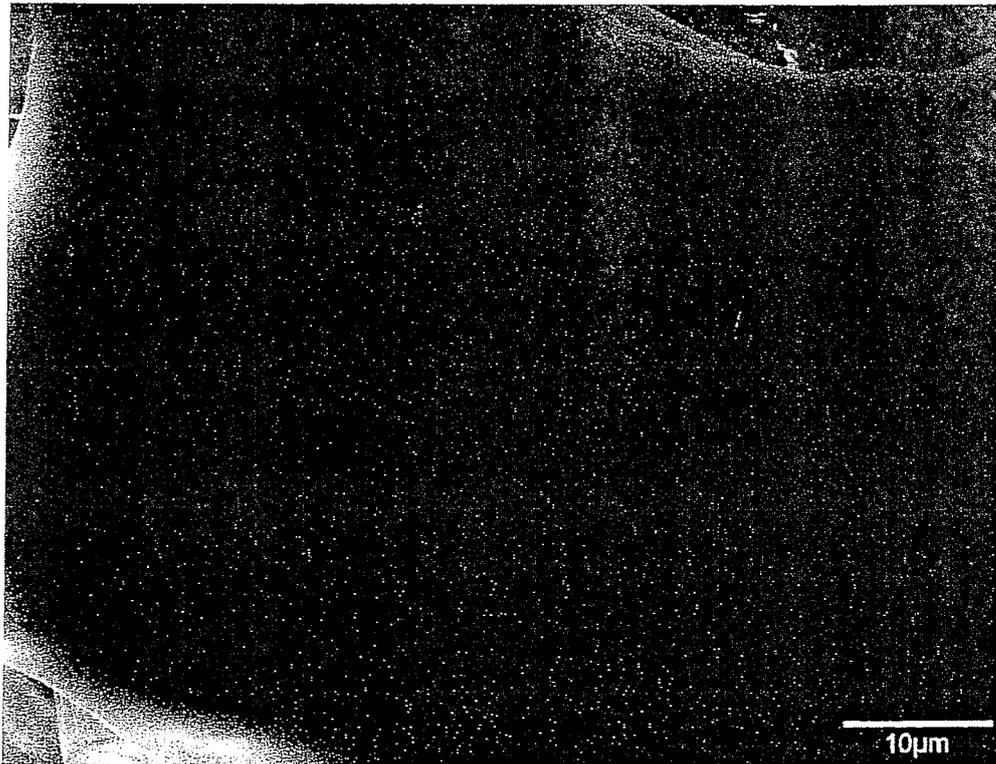


图 3(b)

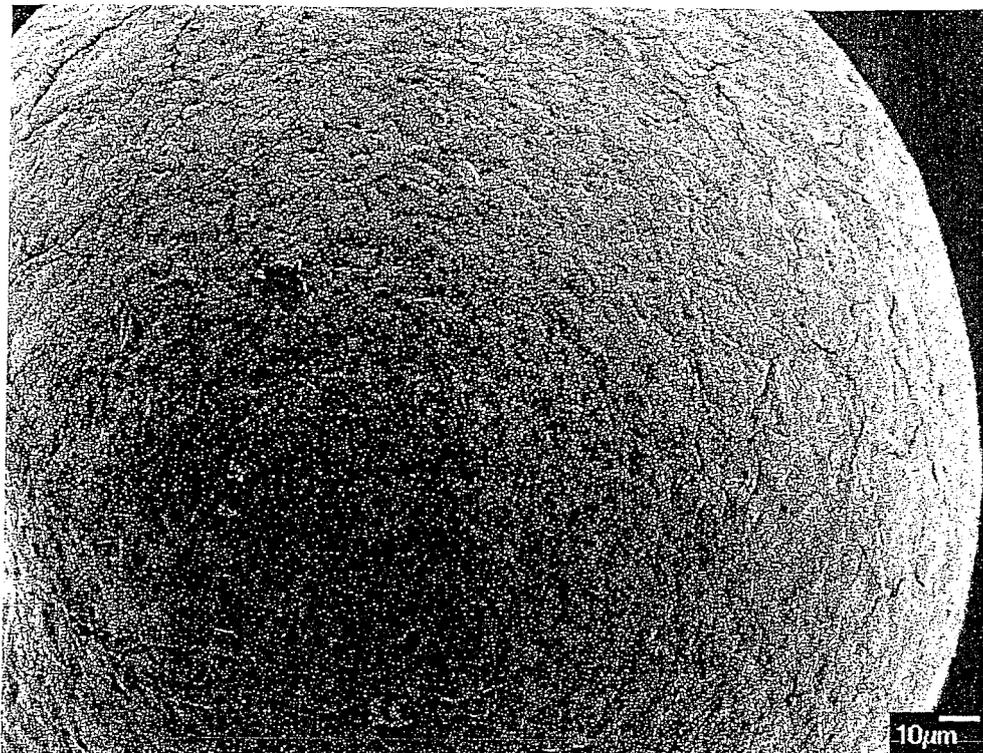


图 4(a)

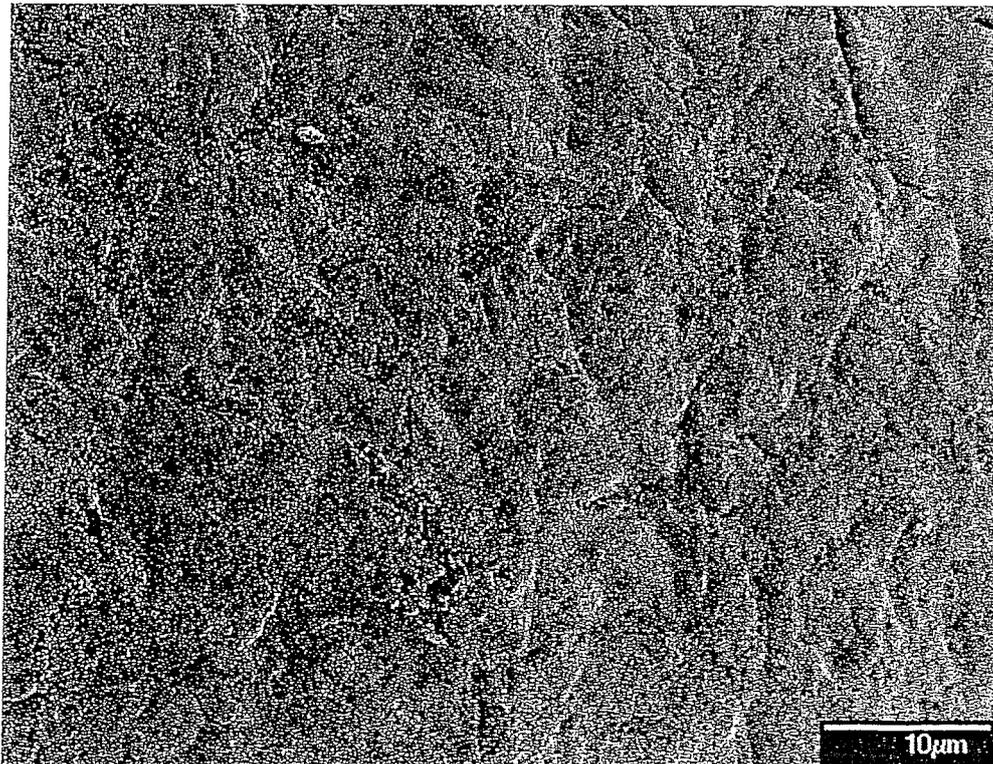


图 4(b)

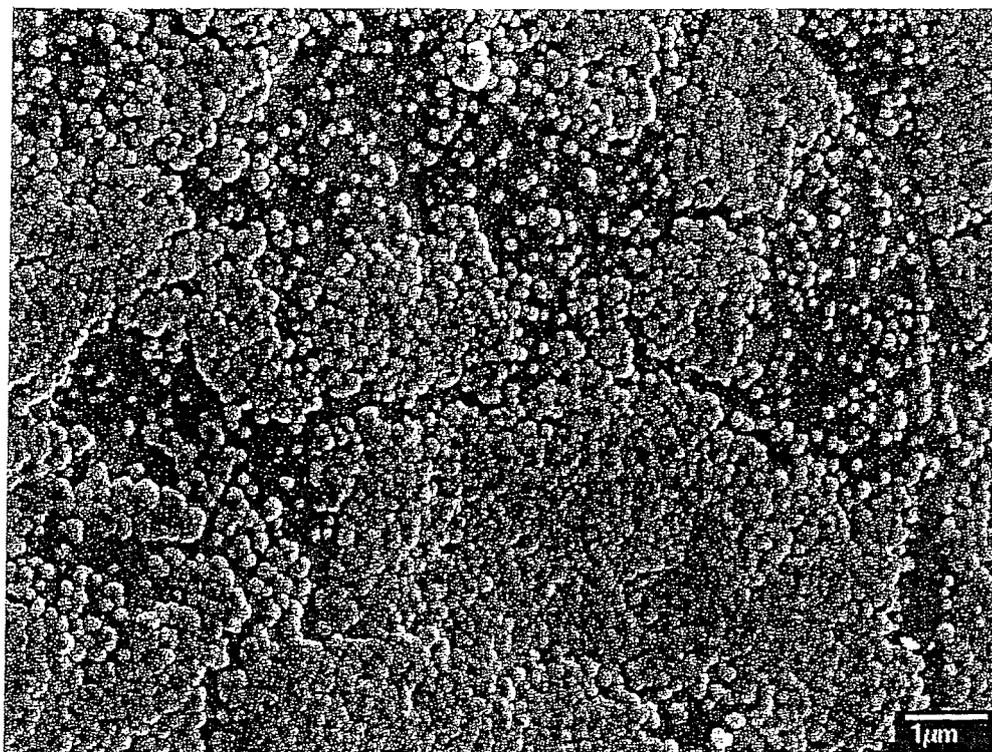


图 4(c)

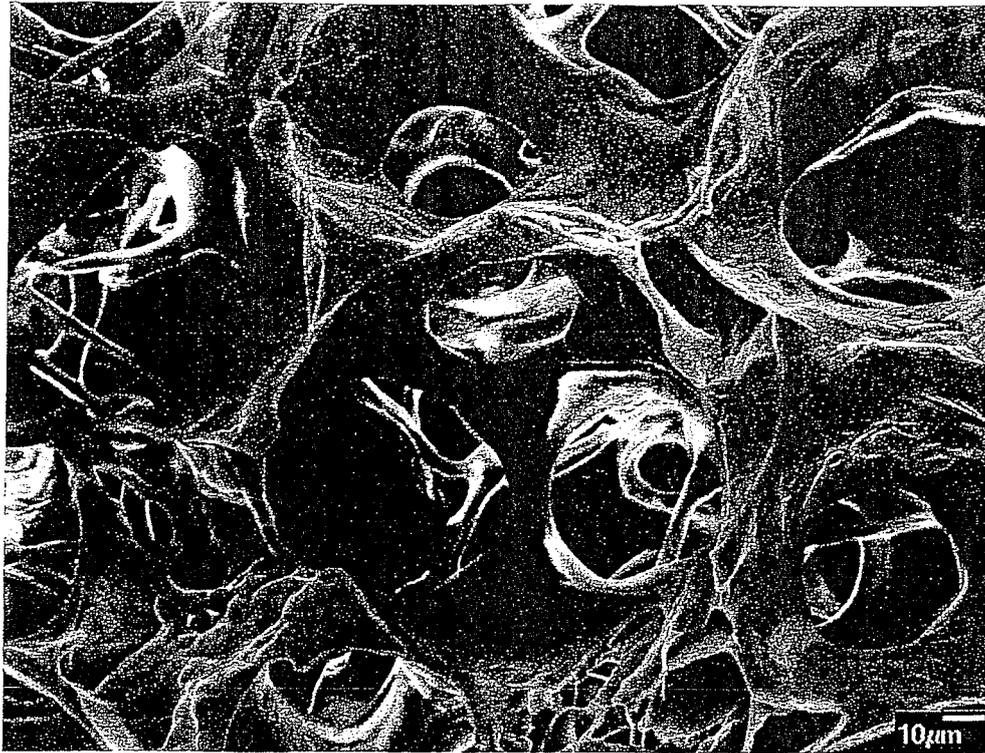


图 5(a)

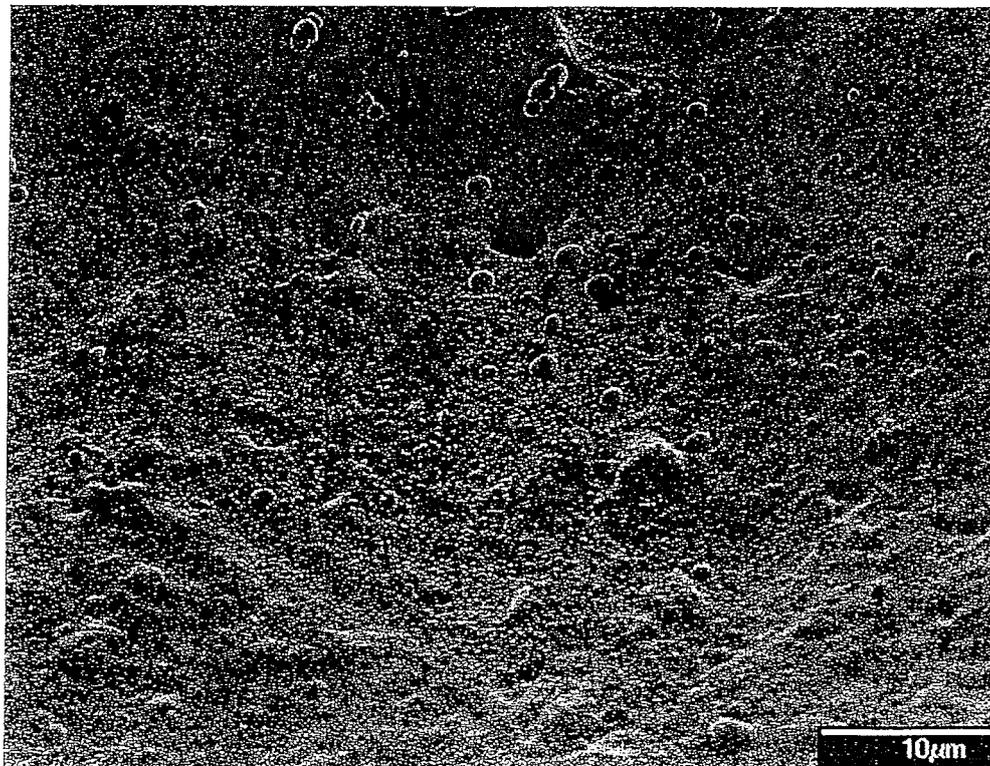


图 5(b)

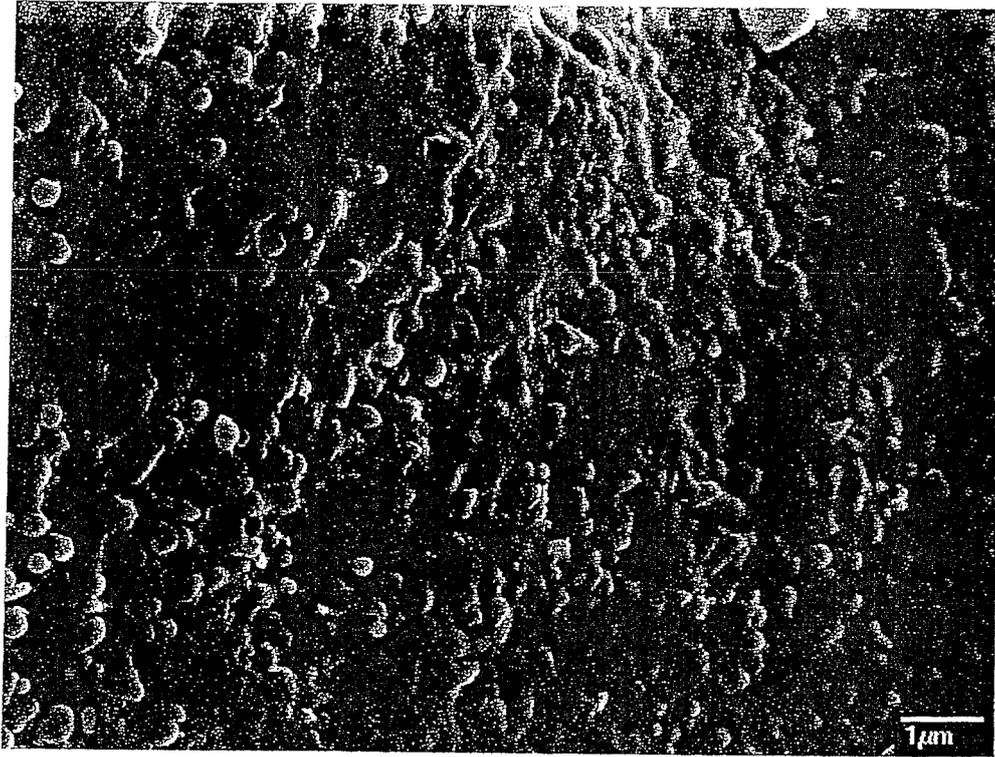


图 5(c)

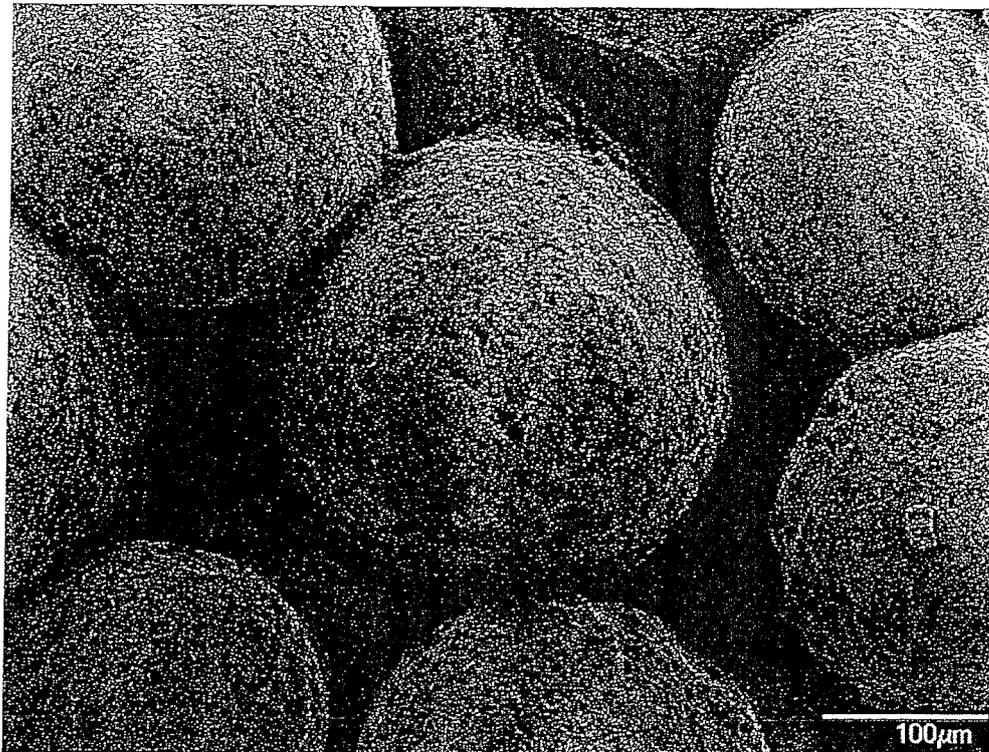


图 6(a)



图 6(b)

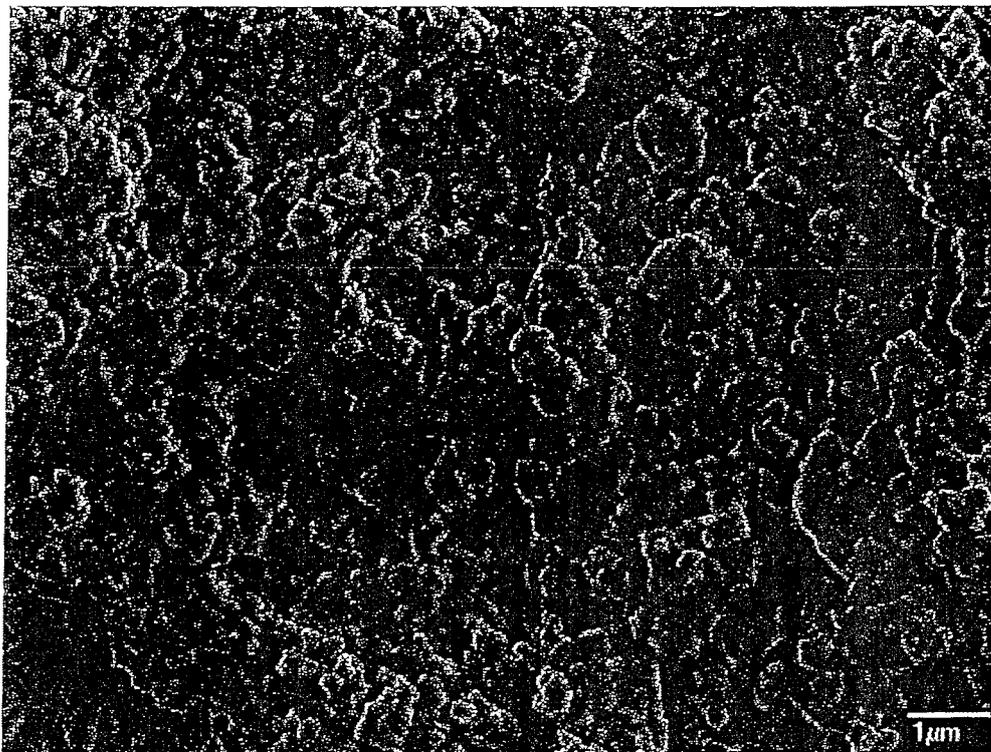


图 6(c)

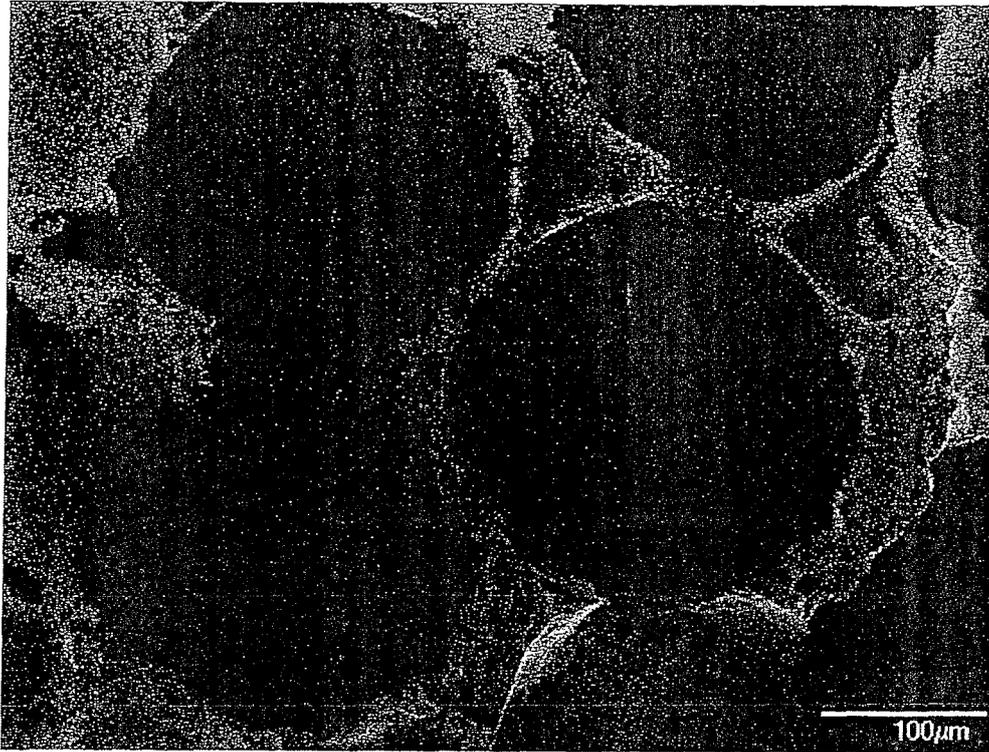


图 7(a)



图 7(b)

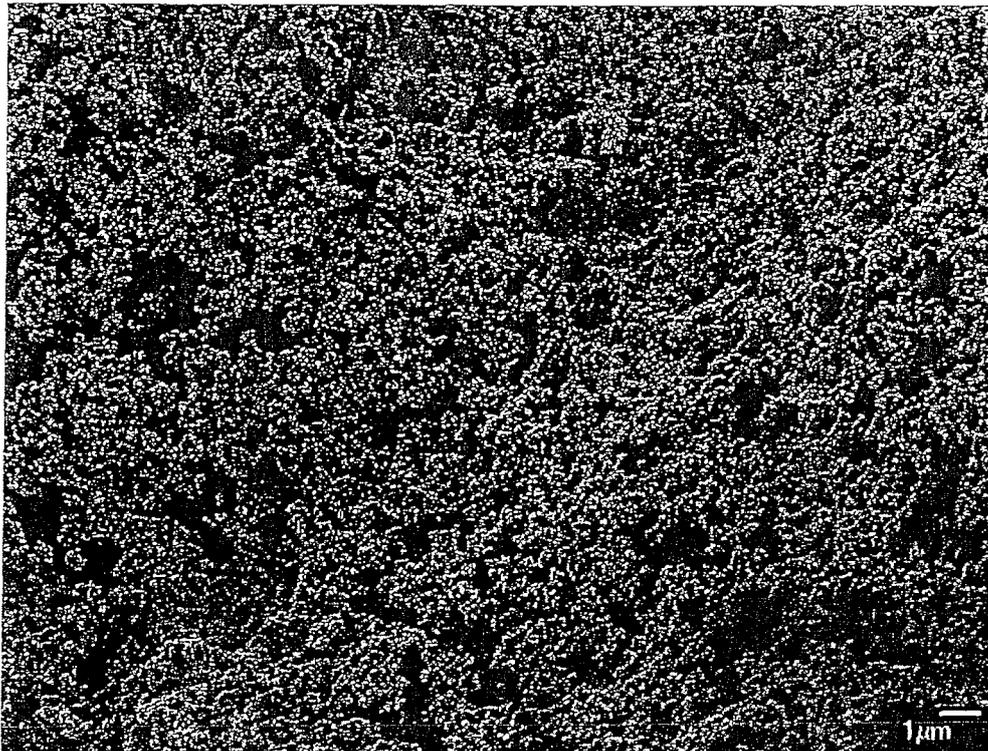


图 8(a)

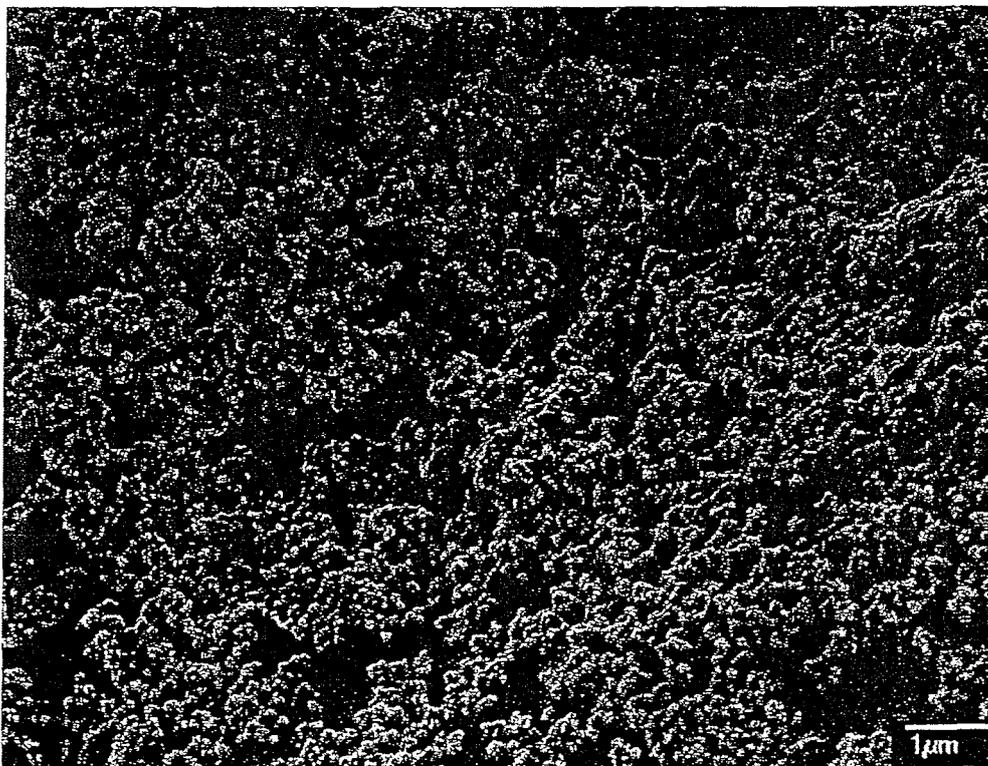


图 8(b)

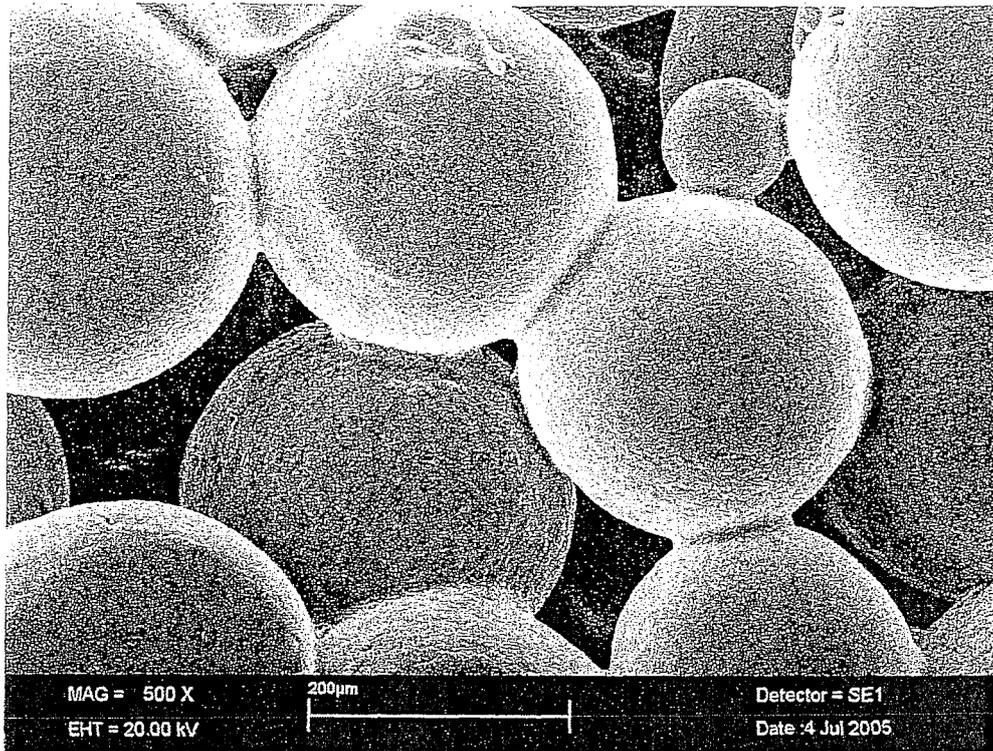


图 9(a)

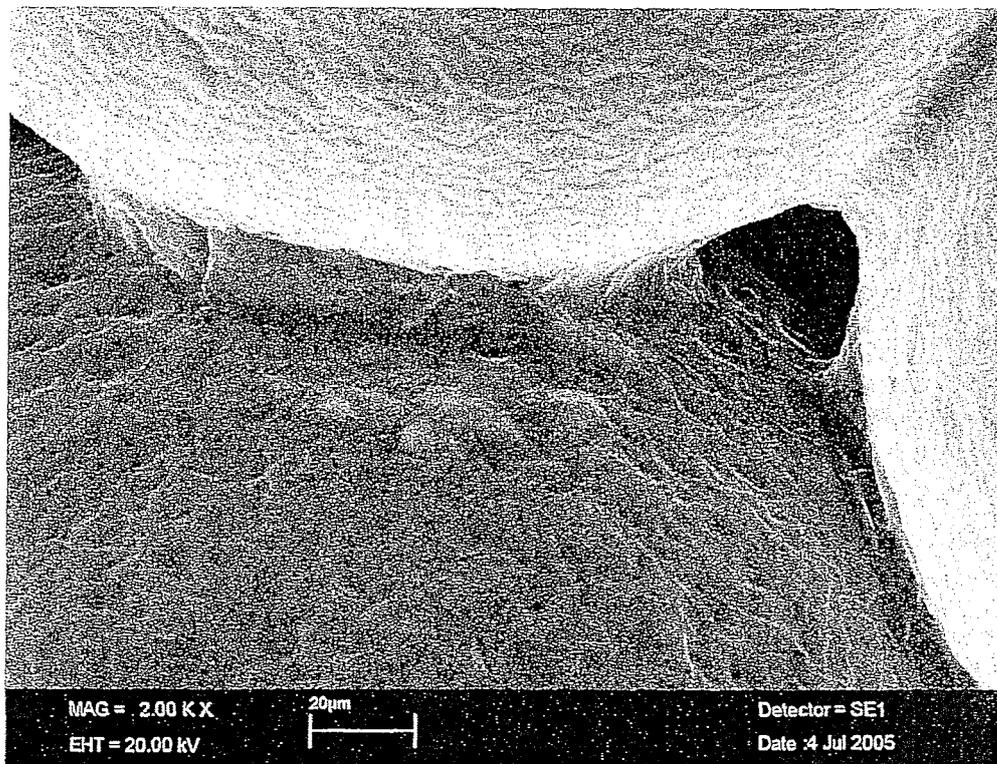


图 9(b)

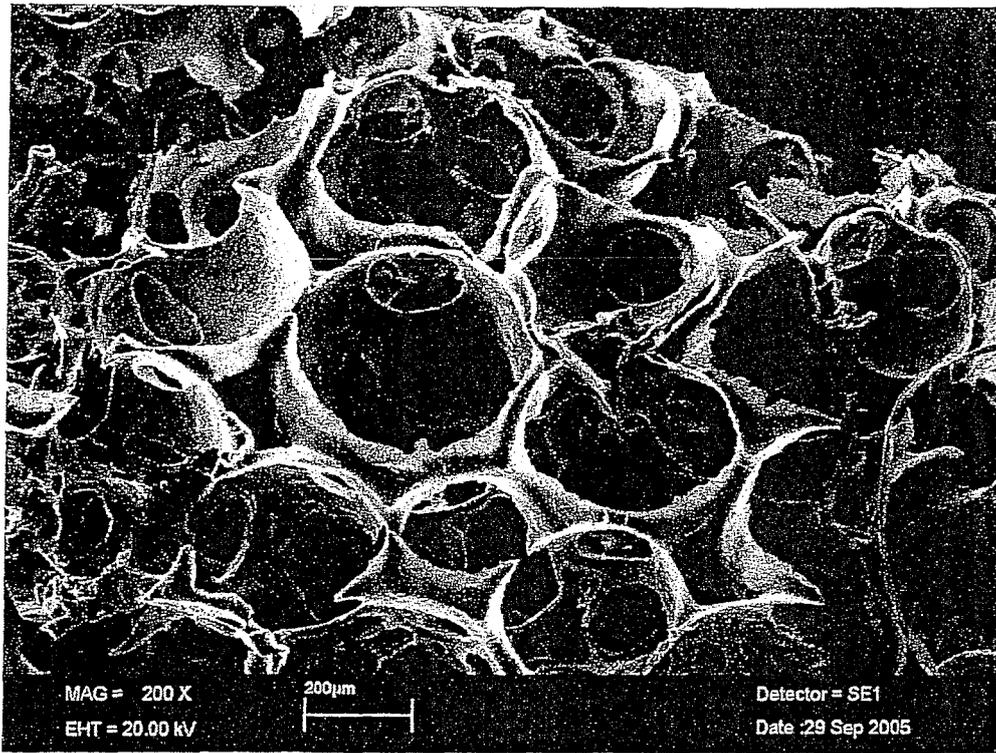


图 10



图 11(a)

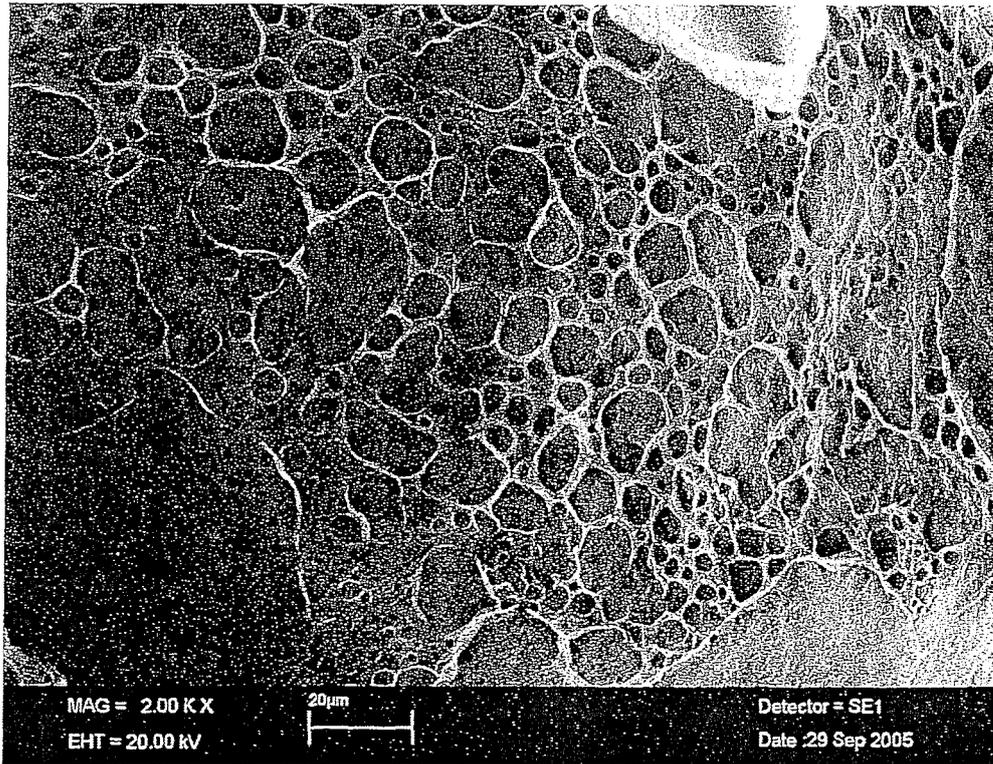


图 11(b)

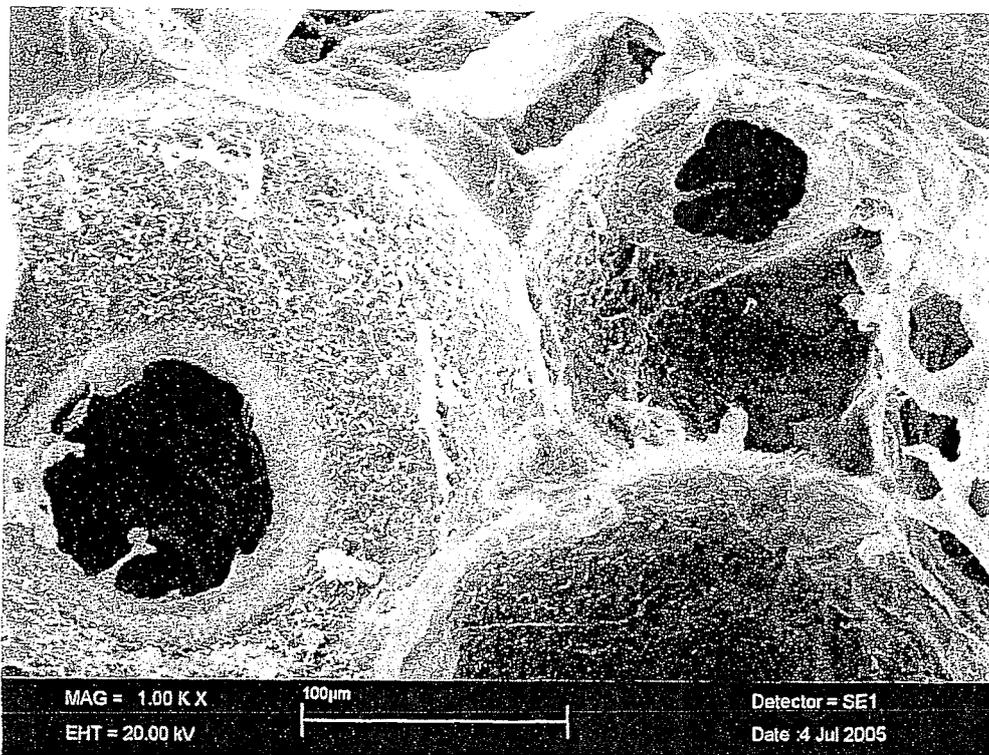


图 12(a)

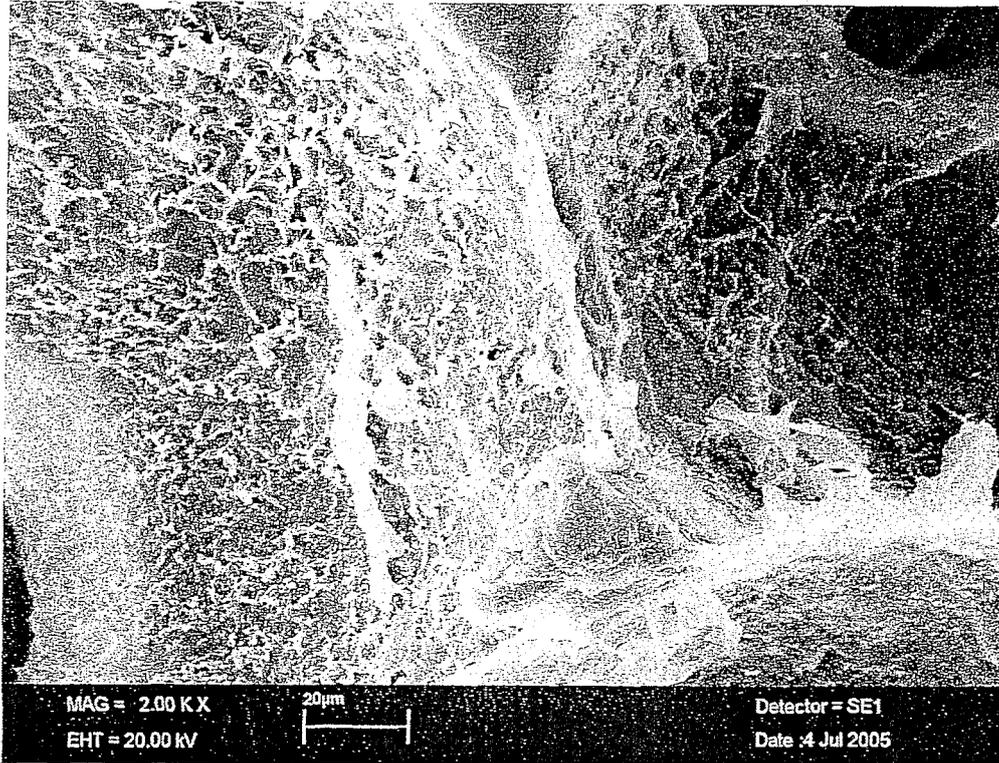


图 12(b)

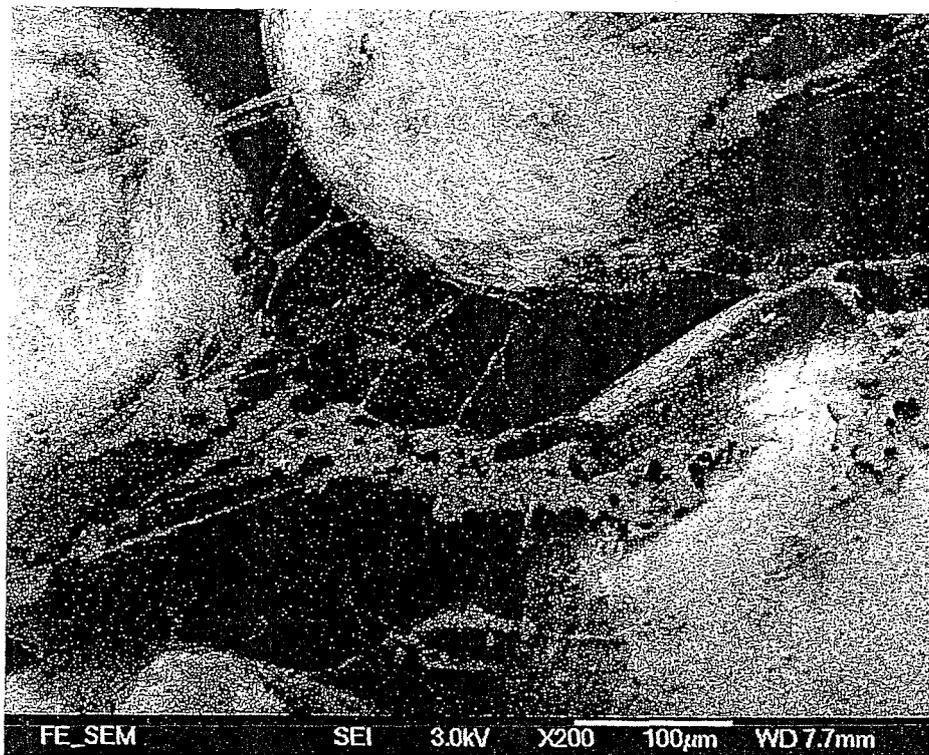


图 13(a)

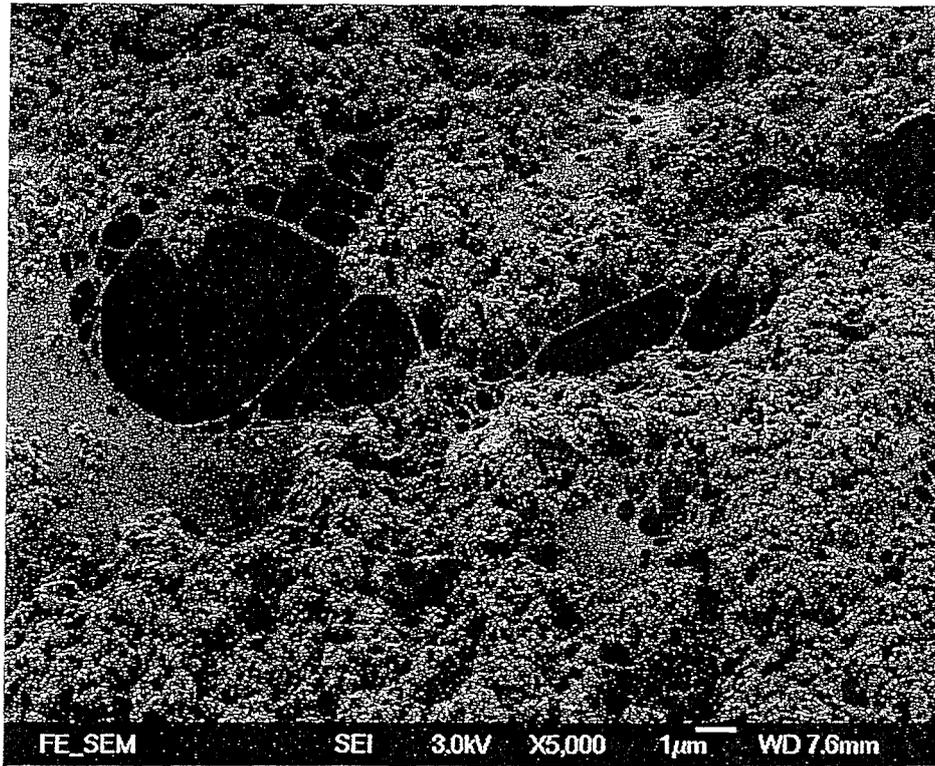


图 13(b)

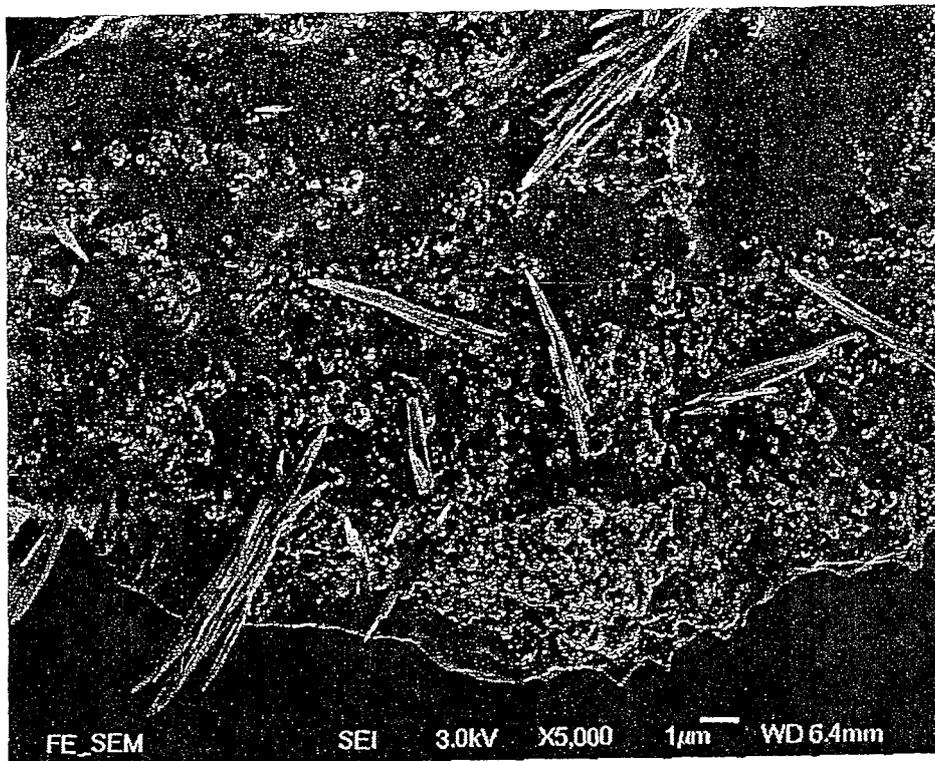


图 14