



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104307005 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201410583411. 8

(22) 申请日 2014. 10. 27

(71) 申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路 92 号天津大学

(72) 发明人 亓洪昭 杨贤金 卢云峰 李朝阳
李雪 崔振铎 原续波 王思颖
汪亚运

(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 王丽

(51) Int. Cl.

A61L 2/08 (2006. 01)

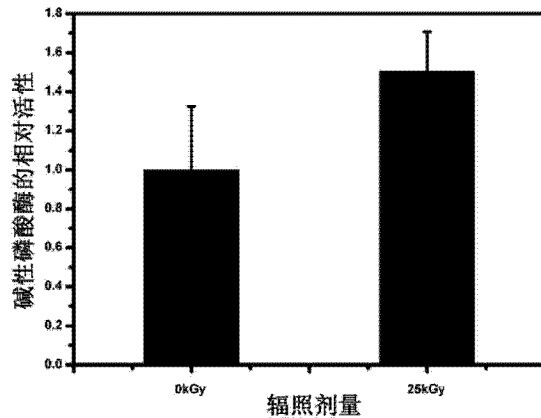
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种辐照灭菌条件下维持骨形态发生蛋白-2 活性的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种利用射线辐照维持 BMP-2 活性的方法。将 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用 ⁶⁰Co、¹³⁷Cs、¹⁹²Ir 源射线辐照,设定剂量为 0.01-100kGy;实现对 BMP-2 的辐照过程。本发明的优点在于有效解决了 BMP-2 辐照过程中失活问题,推动了负载 BMP-2 的医疗器械的研究发展,大大提高了其应用前景。



1. 利用射线辐照维持BMP-2活性的方法,其特征在于:射线发射源为 ^{60}Co 、 ^{137}Cs 或 ^{192}Ir ,辐照剂量为0.01-100kGy。
2. 如权利要求书1所述的方法,其特征在于:辐照剂量为25-50kGy。

一种辐照灭菌条件下维持骨形态发生蛋白-2 活性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 辐照灭菌过程中的活性保持, 其辐照对象为 BMP-2, 采用 ^{60}Co 、 ^{137}Cs 、 ^{192}Ir 发射源, 辐照剂量为 0.01-100kGy。

背景技术

[0002] 骨形态发生蛋白 (BMP) 被广泛应用, 主要是因为它可以诱导骨和软骨的形成, 可作为治疗骨折和牙周缺陷的治疗剂, 并能够在植入物和人工假体周围诱导骨生长。传统的基因剔除实验表明, 骨形态发生蛋白拥有着多种多样的生物活性, 比如在早期的胚胎发生、多方位的器官形成等方面都能通过调节细胞的增殖、分化和凋亡来实现功能。通过体外和体内试验, 一系列人骨形态发生蛋白已经被证实可以刺激骨形成, 同时重组人骨形成蛋白也被应用。至今, 已经有超过 20 种 BMP 被鉴定和表征, 他们都是转化生长因子 β (TGF- β) 超家族的成员。其中, BMP-2 具有几乎和自体骨相当的骨修复能力, 被认为具有最强的骨诱导活性。

[0003] 灭菌是 BMP-2 及负载 BMP-2 医疗器械临床使用前必需的操作。但是现行的几种常规灭菌方式都会使 BMP-2 失去活性。环氧乙烷可与蛋白类物质发生化学反应而使 BMP-2 失活; 高压蒸汽灭菌使 BMP-2 变性而失活。

[0004] 辐照灭菌是通过放射性物质发出辐射线杀死大多数物质上的微生物的一种有效方法, 在整个灭菌过程中, 温度并不明显升高, 对于热敏性化合物是很好的灭菌方式。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于射线辐照有效地对 BMP-2 灭菌同时维持其活性。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 本发明将 BMP-2 溶液加入离心管中, 用封口膜封好, 放入保温瓶中, 装满冰, 用 ^{60}Co 、 ^{137}Cs 、 ^{192}Ir 源射线辐照, 设定剂量为 0.01-100kGy, 优选设定剂量为 15-50kGy; 实现对 BMP-2 的辐照过程。

[0008] 然后将细胞在 DF12 完全培养液中常规培养, 分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组, 细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。通过 ALP 含量的高低来确定 BMP-2 的活性高低, 实现对 BMP-2 活性的检测。

[0009] 本发明检测 BMP-2 活性的原理是 ALP 是细胞向成骨细胞分化的重要指标, BMP-2 活性高, 细胞向成骨细胞分化的趋势明显, 则 ALP 表达量高, 通过 ALP 的含量高低可以检测 BMP-2 活性的高低。

[0010] 本发明的优点在于有效解决了 BMP-2 辐照灭菌过程中失活问题, 提高了其应用前景。

附图说明

[0011] 图 1: ^{60}Co 射线 25kGy 辐照后细胞中 ALP 含量变化;

[0012] 图 2：⁶⁰Co 射线 50kGy 辐照后细胞中 ALP 含量变化；

[0013] 图 3：⁶⁰Co 射线 35kGy 辐照后细胞中 ALP 含量变化。

[0014] 具体实施方法

[0015] 下面通过例子对本发明专利进行进一步的阐述。

[0016] 实施例 1：

[0017] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用⁶⁰Co 源射线辐照,设定剂量为 0.01kGy。

[0018] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0019] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0020] 实施例 2：

[0021] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用¹³⁷Cs 源射线辐照,设定剂量为 0.01kGy。

[0022] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0023] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0024] 实施例 3：

[0025] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用¹⁹²Ir 源射线辐照,设定剂量为 0.01kGy。

[0026] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0027] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0028] 实施例 4：

[0029] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用⁶⁰Co 源射线辐照,设定剂量为 100kGy。

[0030] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0031] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0032] 实施例 5：

[0033] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用¹³⁷Cs 源射线辐照,设定剂量为 100kGy。

[0034] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养, 分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0035] 3. 通过对 ALP 含量的分析, 我们可以看到, BMP-2 辐照之后, 其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近, 并没有显著性差异, 从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0036] 实施例 6 :

[0037] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中, 用封口膜封好, 放入保温瓶中, 装满冰, 用 ^{192}Ir 源射线辐照, 设定剂量为 100kGy。

[0038] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养, 分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0039] 3. 通过对 ALP 含量的分析, 我们可以看到, BMP-2 辐照之后, 其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近, 并没有显著性差异, 从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0040] 实施例 7 :

[0041] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中, 用封口膜封好, 放入保温瓶中, 装满冰, 用 ^{60}Co 源射线辐照, 设定剂量为 25kGy。

[0042] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养, 分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0043] 3. 通过对 ALP 含量的分析, 我们可以看到, BMP-2 辐照之后, 其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近, 并没有显著性差异, 从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。实验结果如附图 1 所示。

[0044] 实施例 8 :

[0045] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中, 用封口膜封好, 放入保温瓶中, 装满冰, 用 ^{60}Co 源射线辐照, 设定剂量为 50kGy。

[0046] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养, 分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0047] 3. 通过对 ALP 含量的分析, 我们可以看到, BMP-2 辐照之后, 其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近, 并没有显著性差异, 从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。实验结果如附图 2 所示。

[0048] 实施例 9 :

[0049] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中, 用封口膜封好, 放入保温瓶中, 装满冰, 用 ^{60}Co 源射线辐照, 设定剂量为 35kGy。

[0050] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养, 分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0051] 3. 通过对 ALP 含量的分析, 我们可以看到, BMP-2 辐照之后, 其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近, 并没有显著性差异, 从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。实验结果如附图 3 所示。

[0052] 实施例 10 :

[0053] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中, 用封口膜封好, 放入保温瓶中, 装满冰, 用 ^{137}Cs

源射线辐照,设定剂量为 25kGy。

[0054] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0055] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0056] 实施例 11 :

[0057] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用 ^{192}Ir 源射线辐照,设定剂量为 50kGy。

[0058] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0059] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0060] 实施例 11 :

[0061] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用 ^{192}Ir 源射线辐照,设定剂量为 28kGy。

[0062] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0063] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0064] 实施例 12 :

[0065] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用 ^{60}Co 源射线辐照,设定剂量为 15kGy。

[0066] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0067] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

[0068] 实施例 13 :

[0069] 1. 准备 BMP-2 溶液加入离心管中,用封口膜封好,放入保温瓶中,装满冰,用 ^{137}Cs 源射线辐照,设定剂量为 15kGy。

[0070] 2. 脐带血间充质干细胞在 DF12 完全培养液中常规培养,分别设立未辐照的 BMP-2 组、辐照的 BMP-2 组。细胞培养 7 天后检测每个孔 ALP 含量。

[0071] 3. 通过对 ALP 含量的分析,我们可以看到, BMP-2 辐照之后,其 ALP 表达量与未辐照的 BMP-2 的 ALP 表达量相近,并没有显著性差异,从而证明辐照之后 BMP-2 活性得到维持。

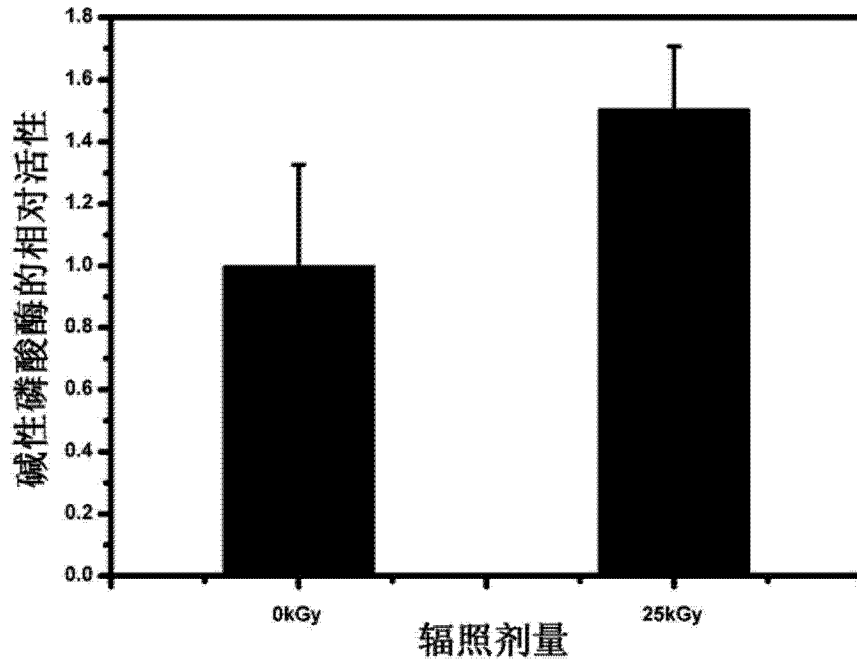


图 1

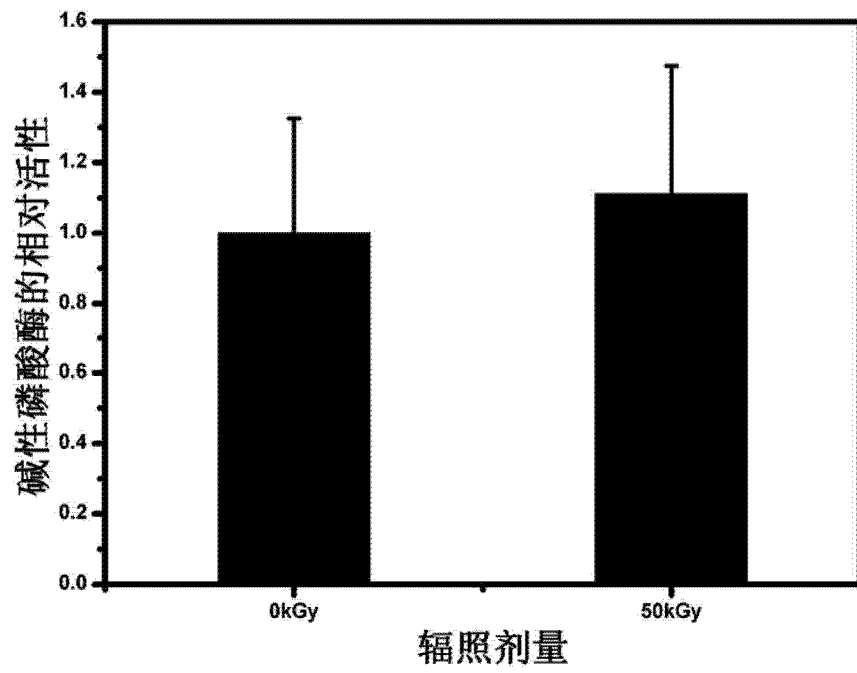


图 2

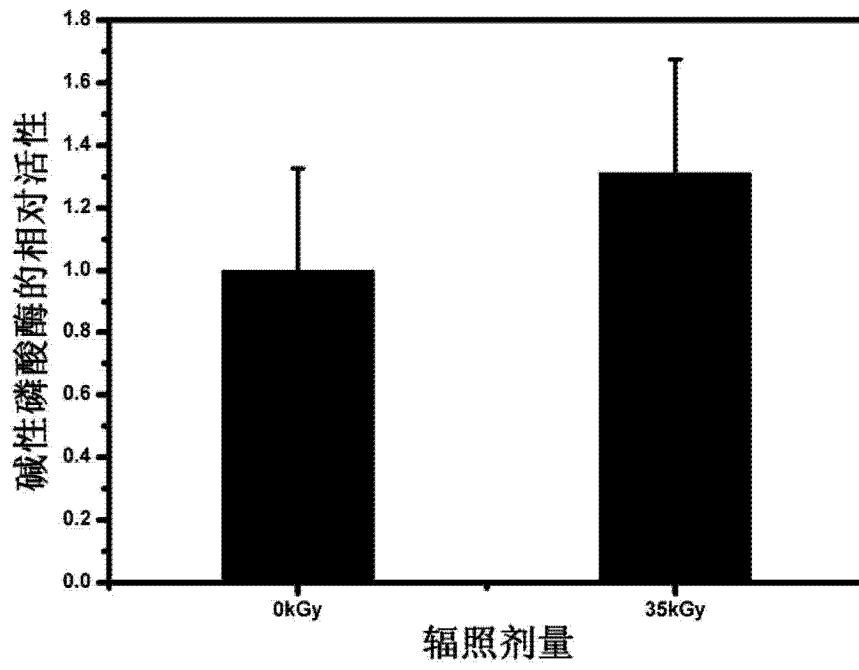


图 3