



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109793927 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201910066736.1

(22)申请日 2019.01.24

(71)申请人 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

地址 100036 北京市海淀区太平路27号

(72)发明人 周瑾 刘伟 王常勇 朱惠敏  
王春兰

(74)专利代理机构 北京华仲龙腾专利代理事务所(普通合伙) 11548

代理人 李静

(51)Int.Cl.

A61L 27/22(2006.01)

A61L 27/38(2006.01)

A61L 27/56(2006.01)

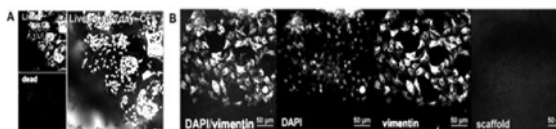
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

基于细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白多孔支架的制备方法

(57)摘要

本发明公开了属于生物材料技术领域的一种基于细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白多孔支架的制备方法。本发明利用心肌成纤维细胞对丝素蛋白多孔支架进行修饰,得到的支架材料表面具有细胞外基质组份,同时DNA残留低于5%,并且该支架材料具有良好的生物相容性,为工程化心肌组织的体外构建提供了良好的支架材料。



1. 一种基于细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白多孔支架的制备方法,其特征在于,将心肌成纤维细胞接种到丝素蛋白支架材料上进行培养,得到修饰后的丝素蛋白多孔支架。

2. 根据权利要求1所述基于细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白多孔支架的制备方法,其特征在于,按照如下步骤进行:

S1. 丝蛋白预处理:将蚕茧剪碎并放入质量分数为17%的煮沸的碳酸钠水溶液中煮30分钟,取出冷却并挤出水分,然后用水漂洗丝蛋白20分钟,取出后通风干燥;

S2. 制备丝蛋白溶液:将干燥的丝蛋白溶于20%的9.3M溴化锂溶液中,60℃条件下溶解4小时,得到20%的丝素蛋白,透析2天,然后于在4℃9000rpm条件下离心20分钟,取出于4℃保存;

S3. 制备丝蛋白支架:将丝素蛋白溶液加入模具中,并撒上盐颗粒凝胶化1-2天,将凝胶化的丝蛋白支架于蒸馏水浸泡去盐后进行高压灭菌;

S4. 分离心肌成纤维细胞:取新生1天龄SD大鼠,开胸,取心脏,置于预冷的PBS液体中,剪碎,并利用0.05%胰酶反复消化直至组织块消化完全,1000rpm/7分钟离心,获得细胞沉淀,于高糖DMEM加15%胎牛血清中重悬并接种在培养皿上,1小时后弃去未贴壁的心肌细胞,获得原代心肌成纤维细胞;并利用高糖-DMEM加10%胎牛血清培养基培养心肌成纤维细胞至85-90%融合后消化;

S5. 心肌成纤维细胞修饰丝素蛋白:将消化好的心肌成纤维细胞接种在支架材料上,接种密度为 $1 \times 10^7$ 个/ml,每个支架接种30 $\mu$ l,利用高糖-DMEM加10%胎牛血清培养基培养10天,得到细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白支架。

## 基于细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白多孔支架的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物材料技术领域,具体涉及一种基于细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白多孔支架的制备方法。

### 背景技术

[0002] 支架材料是种子细胞粘附和生长的基础,也是心肌组织工程基础。支架材料的特性和结构决定着工程化组织的形态与功能。与骨、软骨、皮肤等组织不同,心脏的组织结构较为复杂,其对支架材料的理化特性要求更高。近年来,基于仿心肌细胞外组份、取向结构、力学、电生理特性的支架材料构建更具仿生特性的心肌组织研究进展迅速,进一步利用天然心肌的微环境结构特点,研发基于仿心肌细胞外基质组份及微结构的支架材料构建工程化心肌组织受到广泛关注,目前有报道利用胶原、全器官脱细胞基质等天然细胞外基质组份构建工程化心肌组织备受关注。

[0003] 细胞衍生细胞外基质材料作为天然生物材料的一种,是利用化学试剂、物理冻融等方法对细胞进行脱细胞基质,从而获得没有细胞核存留,但具有天然细胞外基质(ECM)特性的生物支架材料。这种细胞衍生的细胞外基质材料的优点在于,与组织来源的ECM支架相比,细胞衍生的ECM基质由于其培养及扩增时可有效排除病原体污染。其可以保持良好的天然细胞外基质成分,且这种细胞衍生的ECM基质可保留细胞原有的印迹,对再接种细胞具有一定的调控作用。同时,与组织来源的ECM支架相比,细胞衍生的细胞外ECM可塑性强,可对其他材料进行有效的修饰。但是这种细胞衍生的ECM材料也存在一定程度的缺点,如在脱细胞的过程中涉及的物理和化学方法可能使原有的细胞中因子流失,细胞衍生的基质与组织衍生的基质相比较少等。心肌成纤维细胞(CFs)约占正常心肌组织细胞总数的60%-70%,其广泛存在于心脏组织中,包绕心肌细胞。心肌成纤维细胞分泌的细胞外基质作为心脏基质的的重要组成部分,其与心脏发育、结构、细胞信号系统、电机械功能等密切相关。因此,心肌成纤维细胞衍生的基质材料作为提供细胞生长的重要微环境因素受到广泛关注。已有研究报道,Gu等人通过用施旺细胞衍生的ECM与壳聚糖材料重建新型支架,用于组织工程神经修复。而目前细胞衍生细胞外基质用于心肌组织构建的研究尚未见报道。

[0004] 蚕丝来源于家蚕茧,是一种被广泛使用和研究的蛋白质聚合物的生物材料。蚕丝分为丝胶蛋白和丝素蛋白,其中丝素蛋白为主要成分,约占到70-80%。丝素蛋白在形成不同材料时具有显著的机械性能,表现出较好的生物相容性,具有可控的降解速率,并且可以通过化学改性以改变表面性质或固定生长因子。目前研究可从蚕茧中提取丝素蛋白以研制水凝胶,海绵支架,纤维支架,微球和薄膜等。丝素蛋白材料可直接用作体内植入物,可作为组织工程和体外疾病研究模型中的支架,以及用于药物递送等。David L.Kaplan团队已利用丝素蛋白多孔支架体外成功构建出脂肪组织、肾组织、软骨组织以及脑皮层组织。Shoei-Shen Wang等也利用丝素蛋白多孔支架携带骨髓间充质干细胞进行大鼠心梗修复研究,也取得了良好的效果,证实复合物可以有效提高移植细胞在心梗区的滞留和存活。然而,丝素蛋白支架存在材料组份单一,不具有细胞外基质组份微环境组份,仿生能力不足的问题。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提出一种基于细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白多孔支架的制备方法。

[0006] 为实现上述技术目的,本发明采取了如下的技术方案:

[0007] 一种基于细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白多孔支架的制备方法,将心肌成纤维细胞接种到丝素蛋白支架材料上进行培养,得到修饰后的丝素蛋白多孔支架。

[0008] 上述多孔支架的制备方法,按照如下步骤进行:

[0009] S1. 丝蛋白预处理,方法如下:将蚕茧剪碎并放入质量分数为17%的煮沸的碳酸钠水溶液中煮30分钟,取出冷却并挤出水分,然后用水漂洗丝蛋白20分钟,取出后通风干燥;

[0010] S2. 制备丝蛋白溶液,方法如下:将干燥的丝蛋白溶于20%的9.3M溴化锂溶液中,60℃条件下溶解4小时,得到20%的丝素蛋白,透析2天,然后于在4℃ 9000rpm条件下离心20分钟,取出于4℃保存;

[0011] S3. 制备丝蛋白支架,方法如下:将丝素蛋白溶液加入模具中,并撒上盐颗粒凝胶化1-2天,将凝胶化的丝蛋白支架于蒸馏水浸泡去盐后进行高压灭菌;

[0012] S4. 分离心肌成纤维细胞,方法如下:取新生1天龄SD大鼠,开胸,取心脏,置于预冷的PBS液体中,剪碎,并利用0.05%胰酶反复消化直至组织块消化完全,1000rpm/7分钟离心,获得细胞沉淀,于高糖DMEM加15%胎牛血清中重悬并接种在培养皿上,1小时后弃去未贴壁的心肌细胞,获得原代心肌成纤维细胞;并利用高糖-DMEM加10%胎牛血清培养基培养心肌成纤维细胞至85-90%融合后消化;

[0013] S5. 心肌成纤维细胞修饰丝素蛋白,方法如下:将消化好的心肌成纤维细胞接种在支架材料上,接种密度为 $1 \times 10^7$ 个/ml,每个支架接种30 $\mu$ l,利用高糖-DMEM加10%胎牛血清培养基培养10天,得到细胞外衍生基质修饰的丝素蛋白支架。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:本发明利用心肌成纤维细胞对丝素蛋白多孔支架进行修饰,得到的支架材料表面具有细胞外基质组份,同时DNA残留低于5%,并且该支架材料具有良好的生物相容性,为工程化心肌组织的体外构建提供了良好的支架材料。

## 附图说明

[0015] 图1中A为丝素蛋白支架上活性检测图;B为丝素蛋白支架上心肌成纤维细胞vimentin的表达图。

[0016] 图2为免疫荧光染色检测细胞衍生基质修饰的丝素蛋白支架材料图。

[0017] 图3中为A为DAPI染色检测细胞核残留图;B为支架材料上DNA残留测定图。

[0018] 图4中为A支架材料上棕色脂肪干细胞的活性染色图;B为利用DNA含量测定支架材料中棕色脂肪干细胞的增殖图。

## 具体实施方式

[0019] 下面结合附图和实施例对本发明作详细描述,但本发明的实施不仅限于此。

[0020] 实施例1制备心肌成纤维细胞修饰的丝素蛋白支架

[0021] 1、丝蛋白预处理,方法如下:准备装有2L超纯水,加入4.24g碳酸钠,煮沸。用剪刀

将蚕茧剪切成硬币大小蚕茧片,并称量5g蚕茧片放入煮沸的碳酸钠水溶液中,煮30分钟。结束后用超纯水冲洗冷却,将多余的水从丝中挤出。在水中漂洗丝蛋白20分钟,并用搅拌棒搅拌。将漂洗好的丝蛋白放在通风橱中干燥过夜。

[0022] 2、制备丝蛋白溶液,方法如下:将干燥的丝蛋白溶于20%的9.3M溴化锂溶液中,并使丝蛋白在60℃的烘箱中溶解4小时,即得20%的蚕丝素蛋白。将溶液进行透析2天,期间每隔8小时换一次水。将透析后的溶液以4℃9000rpm 条件下进行离心20分钟,以去除杂质。小心将丝溶液吸出,4℃保存。

[0023] 3、制备丝蛋白支架,方法如下:取2ml丝溶液加入模具中,并称取4g 750 μm的盐颗粒,并将盐颗粒均匀撒到丝溶液中1-2天进行凝胶化。将凝胶化好的丝蛋白支架进行蒸馏水浸泡,去盐,每天更换2-3次水,浸泡2天。后续将支架按实验需要大小进行裁剪,并进行高压灭菌。

[0024] 4、分离心肌成纤维细胞,方法如下:首先取新生1天龄SD大鼠,开胸,取心脏,于预冷的PBS液体中,剪碎,并利用0.05%胰酶反复消化直至组织块消化完全。1000rpm/7分钟离心,获得细胞沉淀,于高糖DMEM加15%胎牛血清 (gibco)中重悬并接种在培养皿上,1小时后弃去未贴壁的心肌细胞,获得原代心肌成纤维细胞。并利用高糖-DMEM加10%胎牛血清培养基培养心肌成纤维细胞至85-90%融合后消化。

[0025] 5、心肌成纤维细胞修饰丝素蛋白,方法如下:将消化好的心肌成纤维细胞接种在支架材料上,接种密度为 $1 \times 10^7$ 个/ml,每个支架接种30μl,利用高糖 -DMEM加10%胎牛血清培养基培养10天,利用live/dead染料 (invitrogen) 进行live/dead活性检测,活死细胞染色证实细胞活性良好(图1A)。并进一步利用免疫荧光染色检测心肌成纤维细胞vimentin的表达,vimentin抗体购买自abcam,结果显示丝素蛋白多孔支架上的心肌成纤维细胞显著表达vimentin(图1B)。

[0026] 实施例2修饰的丝素蛋白多孔支架的检测

[0027] 1.免疫荧光检测:将培养10天后的丝素蛋白多孔支架材料于0.3% (体积/体积) Triton X-100和20mM的NH<sub>4</sub>OH PBS在37℃条件下处理10分钟,弃去消化液并进行免疫荧光检测,观察细胞衍生基质是否有效的修饰到丝蛋白支架上。如图2所示,丝素蛋白支架上有大量基质的表达,其中包括Collagen I、Collagen III、α-tubulin、fibronectin以及F-actin。抗体均购买自abcam。

[0028] 2.通过对脱细胞支架上的DNA含量进行检测是否可有效去除细胞核:将衍生基质修饰的支架材料用4%多聚甲醛固定15分钟后,用PBS洗三次,并加入DAPI染料(中杉金桥),DAPI染色结果显示细胞核可大量去除。并进一步利用DNA检测试剂盒 (invitrogen) 检测DNA含量,如图3所示,DNA大约残留5%,体外炎症检测ECM支架中的DNA片段的量不会导致显著的免疫应答。

[0029] 3.衍生基质修饰的丝素蛋白支架以及单纯丝素蛋白支架的比较

[0030] 进行原代棕色脂肪干细胞的分离,通过对接种密度的摸索以及文献调研,最终确定接种密度以 $1 \times 10^6$  cells/mL,每个衍生基质修饰的丝素蛋白支架以及单纯丝素蛋白支架上均接种30μL。接种后在37℃培养箱中孵育15-20分钟后添加含15%胎牛血清的α-MEM培养基。通过live/dead检测棕色脂肪干细胞在支架材料上培养第7天的活性,如图4所示,衍生基质修饰后的支架材料上棕色脂肪干细胞的活性较好。

[0031] 以上公开的仅为本发明的一个具体实施例,但是,本发明并非局限于此,任何本领域的技术人员能思之的变化都应落入本发明的保护范围。

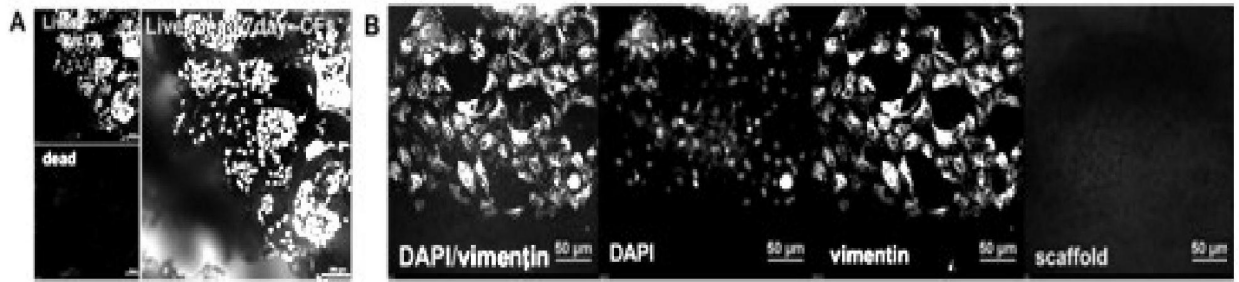


图1

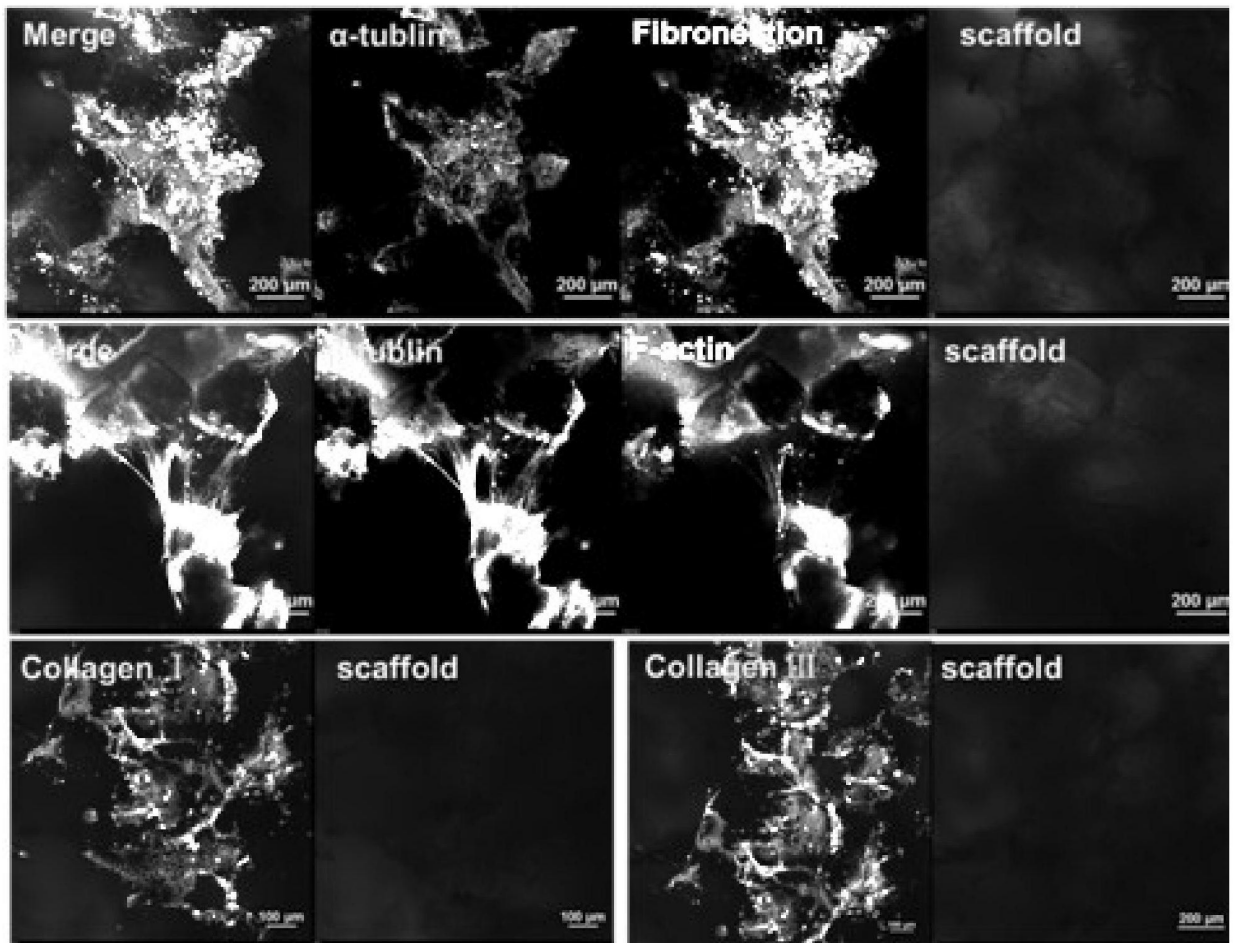


图2

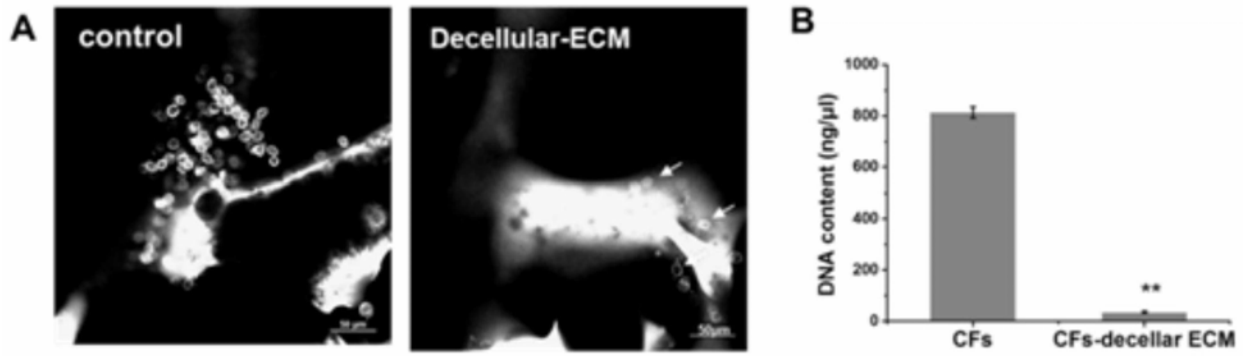


图3

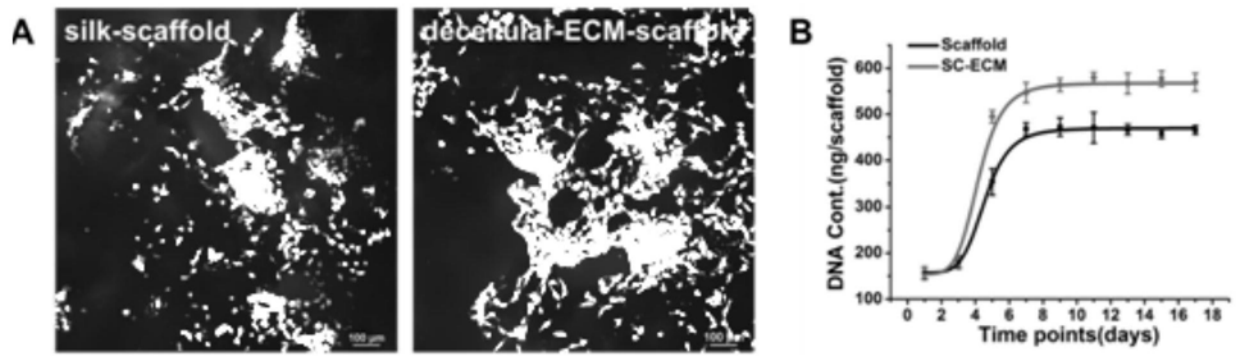


图4