



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104874024 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201510259835. 3

A61L 27/50(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 05. 20

(71) 申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路  
818 号

(72) 发明人 赵基源 李梅 谷俏俏 陈梦洁  
罗钊妙 陈松娣

(74) 专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所  
(普通合伙) 33226

代理人 程晓明

(51) Int. Cl.

A61L 27/46(2006. 01)

A61L 27/38(2006. 01)

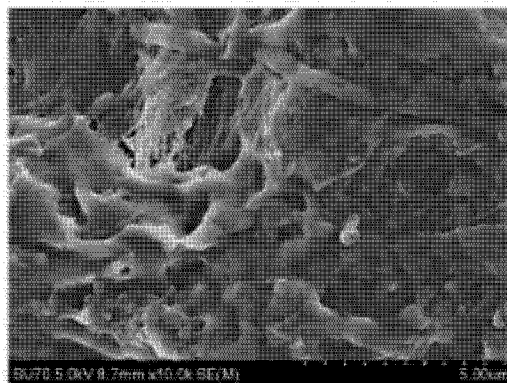
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开的细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨,具有较高的机械强度,在干、湿状态下的弹性模量分别可达 350MPa、100MPa,在植入体内初期能够提供较好的组织支撑,该组织工程骨与天然骨内部的矿物化结构和分布极为接近,具有高度类似于天然骨的微观结构,利于植入后更好地被识别和加速骨再生;本发明公开的仿生复合工程骨的制备方法,是一种新型的诱导成骨细胞分化及矿物化方法,通过钙离子和淫羊藿苷组合培养液刺激 SIS 上的成骨细胞,在 SIS 材料上进行大量的原位矿物化和成骨分化,同时可以避免钙离子对于分化后期重要基质蛋白 OCN 的抑制,增强工程骨的成骨诱导性,最终实现 SIS 材料上大量羟基磷灰石结晶和类骨细胞外基质沉积,且机械强度较 SIS 本身有大幅提高。



1. 细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨,其特征在于该仿生复合工程骨的微观结构包括 SIS 胶原纤维骨架、矿物化结晶和细胞外基质成分,所述的 SIS 胶原纤维骨架呈网状纤维结构,所述的矿物化结晶和所述的细胞外基质成分沉积于所述的 SIS 胶原纤维骨架上,所述的矿物化结晶和所述的细胞外基质成分由 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞指导和分泌得到,所述的矿物化结晶主要由羟基磷灰石结晶构成。

2. 根据权利要求 1 所述的细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨,其特征在于所述的矿物化结晶的沉积量为  $68.50 \pm 6.75 \text{ mg/cm}^3$ 。

3. 权利要求 1 或 2 所述的细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 细胞培养及传代:准备含有 5-10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基作为培养液;将从小鼠颅顶前骨 MC3T3-E1 细胞系中分离的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞置于 5% 二氧化碳浓度、37°C 的细胞培养箱中培养,所述的培养液的用量为  $200 \mu\text{L/cm}^2$ ,每隔 48h 弃去旧的培养液并加入等量新的培养液,确保培养液的用量为  $200 \mu\text{L/cm}^2$ ,当培养至 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞汇合度大于 90% 时进行细胞传代,所述的细胞传代的过程为:弃去旧的培养液,加入用量为  $200 \mu\text{L/cm}^2$  的 PBS 缓冲液,清洗 2-3 次;然后加入用量为  $40-50 \mu\text{L/cm}^2$  的 0.25% 的胰酶,在 37°C 下孵育 1 min;收集细胞并加入至离心管,在 1000 rpm 转速下离心 2 min;弃去上清,然后加入 1 mL 培养液重悬细胞,得到细胞悬液,对此细胞悬液进行细胞计数并计算该细胞悬液的细胞密度;根据计算得到的细胞密度,将所述的细胞悬液以  $(1-2) \times 10^4$  细胞/ $\text{cm}^2$  的用量加入至新的细胞培养瓶,然后在该细胞培养瓶中加入 5 mL 的培养液混匀,置于细胞培养箱中培养;重复上述细胞传代过程直至获得足够量的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞;

2) SIS 仿生工程骨的制备:取出干燥无菌的 SIS 材料,用剪刀或合适器械裁剪成所需的大小及形状,再将裁剪好的 SIS 材料浸泡于所述的培养液,置于 37°C 的细胞培养箱中预处理 24-48h;取汇合度为 70-80% 的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞,加入至离心管,在 1000 rpm 转速下离心 2 min,弃去上清,再加入 1 mL 培养液重悬细胞,得到细胞悬液,对此细胞悬液进行细胞计数并计算该细胞悬液的细胞密度,然后根据计算得到的细胞密度将该细胞悬液稀释至  $1 \times 10^6$  细胞/mL 的终浓度,即配制得到细胞悬液;取出浸泡 24-48h 的 SIS 材料,平铺于新的细胞培养皿上,再按  $5 \times 10^3$  细胞/ $\text{mm}^2$  的细胞密度将配制得到的稀释的细胞悬液均匀滴加于 SIS 材料上,完成对 SIS 材料的细胞种植,然后立即放入细胞培养箱中孵育;孵育 4-6h 后,取出植有细胞的 SIS 材料,用  $1-2 \text{ mL/cm}^2$  用量的培养液清洗 2-3 次,除去表面未黏附的细胞,之后以  $2.5 \text{ mL/cm}^2$  的用量加入新的培养液,最后将该植有细胞的 SIS 材料置于细胞培养箱孵育;

3) 复合工程骨的制备:植有细胞的 SIS 材料于细胞培养箱孵育 16h 后,得到细胞-SIS 复合材料,从细胞培养箱中取出该细胞-SIS 复合材料,弃去旧的培养液,加入等量诱导矿物化及成骨分化的组合培养液,所述的组合培养液为含有 8-15mM 的  $\text{CaCl}_2$ 、 $(1-10) \times 10^{-6} \text{ M}$  的淫羊藿苷和 5-10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基,然后置于 37°C 的细胞培养箱孵育,此后每隔 48h 更换一次组合培养液,处理 4-8 周时间后,得到 SIS 复合工程骨;

4) 复合工程骨的去细胞化:取出上述处理得到的 SIS 复合工程骨,以用量为  $(1-2) \text{ mL/cm}^2$  的 PBS 缓冲液清洗 2-3 次;此后将该 SIS 复合工程骨置于  $-80^\circ\text{C}/37^\circ\text{C}$  反复冻融 3-5 次,每次 1 h;之后再次以用量为  $(1-2) \text{ mL/cm}^2$  的 PBS 缓冲液清洗 2-3 次,进行去细胞化;将去细

胞化后的复合工程骨置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用, 此即为细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨。

## 细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学工程中利用组织工程技术构建人造组织 / 器官技术领域, 具体是一种细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 我国每年约有 350 万人因不同原因出现骨缺损, 骨手术移植约为 150 万例, 对替代骨的需求量非常大, 尤其是大骨骼损伤的替代骨。随着组织工程技术的快速发展, 在体外构建具有成骨传导性和成骨诱导性的人造替代骨是解决这一需求的重要途径。骨架材料在组织工程骨构建中起着至关重要的作用, 相比于其他合成材料, 天然细胞外基质 (ECM) 材料由于其以下特点: 1. 优异的生物相容性; 2. 最接近于体内细胞生长微环境的三维结构; 3. 为细胞生命活动提供了各种活性分子, 一直被认为是理想的组织工程材料。猪小肠黏膜下层 (SIS) 是目前研究最多的天然细胞外基质材料, 已通过美国 FDA 批准, 被广泛用来构建人造膀胱、人造尿道、人造食道、人造血管和人造皮肤等软组织。SIS 材料骨架成分胶原蛋白 (collagen) 已经被广泛用来作为骨架材料和药物载体用于骨组织工程。SIS 相比于胶原有两大优点: 1. SIS 是个天然的药物库, 它保留了许多有利于骨再生的生物活性分子; 2. SIS 在取材上更加便利, 成本也要远低于胶原。国内外用 SIS 材料作为骨组织工程骨架材料报道已有一些, 但是主要有两个问题使之无法进一步推广使用: 1. SIS 材料机械强度较低, 无法在植入体内后提供足够机械支撑; 2. 成骨诱导性的不足。如果能解决上述两个难题, SIS 材料将成为理想的骨组织工程材料。由于 SIS 本身取自于软组织, 作为骨组织工程骨架材料存在机械强度不足的缺陷, 为了使 SIS 骨架材料在植入体内初期更好地提供支撑, 需要增加它的机械强度。

[0003] 天然骨的无机成分主要由羟基磷灰石组成, 直接将 SIS 与羟基磷灰石混合作为人造骨, 虽然可以提高机械强度, 使得基质材料的组成接近于天然骨, 但是这种混合只是实现了宏观组分上模仿天然骨的组成, 而在微观结构上, 磷酸钙分子与其他细胞外基质组分在空间上的分布和结合和天然骨还是有很大差异。

[0004] 骨组织工程中所需要的成骨诱导因子一直是一个研究热点, BMP-2 蛋白虽然是广泛被认可和采用的最有效成骨诱导因子, 但是由于其非常昂贵, 而采用 BMP 基因导入方法又存在一定的安全问题, 因此它的临床使用还是受到成本和安全性的制约; 同时 BMP-2 和其他蛋白药物都存在稳定性差, 在体内半衰期很短的问题, 相应对于药物释放体系的要求非常高。因此寻找低成本、稳定又可以高效诱导骨再生的小分子化合物来替代 BMP 是非常有意义的。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是: 针对现有技术的不足, 提供一种细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨及其制备方法。

[0006] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为: 细胞组装小肠黏膜下层仿生复

合工程骨,该仿生复合工程骨的微观结构包括 SIS 胶原纤维骨架、矿物化结晶和细胞外基质成分,所述的 SIS 胶原纤维骨架呈网状纤维结构,所述的矿物化结晶和所述的细胞外基质成分沉积于所述的 SIS 胶原纤维骨架上,所述的矿物化结晶和所述的细胞外基质成分由 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞指导和分泌得到,所述的矿物化结晶主要由羟基磷灰石结晶构成。

[0007] 本发明细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨具有较高的机械强度,该组织工程骨与天然骨内部的矿物化结构和分布极为接近,具有高度类似于天然骨的微观结构。

[0008] 所述的矿物化结晶的沉积量为  $68.50 \pm 6.75 \text{ mg/cm}^3$ ,可确保仿生复合工程骨的机械强度满足使用要求。

[0009] 上述细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨的制备方法,包括以下步骤:

1) 细胞培养及传代:准备含有 5-10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基作为培养液;从小鼠颅顶前骨 MC3T3-E1 细胞系中分离的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞置于 5% 二氧化碳浓度、37°C 的细胞培养箱中培养,所述的培养液的用量为  $200 \mu\text{L/cm}^2$ ,每隔 48h 弃去旧的培养液并加入等量新的培养液,确保培养液的用量为  $200 \mu\text{L/cm}^2$ ,当培养至 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞汇合度大于 90% 时进行细胞传代,所述的细胞传代的过程为:弃去旧的培养液,加入用量为  $200 \mu\text{L/cm}^2$  的 PBS 缓冲液,清洗 2-3 次;然后加入用量为  $40-50 \mu\text{L/cm}^2$  的 0.25% 的胰酶,在 37°C 下孵育 1 min;收集细胞并加入至离心管,在 1000 rpm 转速下离心 2 min;弃去上清,然后加入 1 mL 培养液重悬细胞,得到细胞悬液,对此细胞悬液进行细胞计数并计算该细胞悬液的细胞密度;根据计算得到的细胞密度,将所述的细胞悬液以  $(1-2) \times 10^4$  细胞/ $\text{cm}^2$  的用量加入至新的细胞培养瓶,然后在该细胞培养瓶中加入 5 mL 的培养液混匀,置于细胞培养箱中培养;重复上述细胞传代过程直至获得足够量的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞;

2) SIS 仿生工程骨的制备:取出干燥无菌的 SIS 材料,用剪刀或合适器械裁剪成所需的大小及形状,再将裁剪好的 SIS 材料浸泡于所述的培养液,置于 37°C 的细胞培养箱中预处理 24-48h;取汇合度为 70-80% 的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞,加入至离心管,在 1000 rpm 转速下离心 2 min,弃去上清,再加入 1 mL 培养液重悬细胞,得到细胞悬液,对此细胞悬液进行细胞计数并计算该细胞悬液的细胞密度,然后根据计算得到的细胞密度将该细胞悬液稀释至  $1 \times 10^6$  细胞/mL 的终浓度,即配制得到细胞悬液;取出浸泡 24-48h 的 SIS 材料,平铺于新的细胞培养皿上,再按  $5 \times 10^3$  细胞/ $\text{mm}^2$  的细胞密度将配制得到的稀释的细胞悬液均匀滴加于 SIS 材料上,完成对 SIS 材料的细胞种植,然后立即放入细胞培养箱中孵育;孵育 4-6h 后,取出植有细胞的 SIS 材料,用  $1-2 \text{ mL/cm}^2$  用量的培养液清洗 2-3 次,除去表面未黏附的细胞,之后以  $2.5 \text{ mL/cm}^2$  的用量加入新的培养液,最后将该植有细胞的 SIS 材料置于细胞培养箱孵育;

3) 复合工程骨的制备:植有细胞的 SIS 材料于细胞培养箱孵育 16h 后,得到细胞-SIS 复合材料,从细胞培养箱中取出该细胞-SIS 复合材料,弃去旧的培养液,加入等量诱导矿物化及成骨分化的组合培养液,所述的组合培养液为含有 8-15mM 的  $\text{CaCl}_2$ 、 $(1-10) \times 10^{-6}$  M 的淫羊藿苷和 5-10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基,然后置于 37°C 的细胞培养箱孵育,此后每隔 48h 更换一次组合培养液,处理 4-8 周时间后,得到 SIS 复合工程骨;

4) 复合工程骨的去细胞化:取出上述处理得到的 SIS 复合工程骨,以用量为  $(1-2) \text{ mL/cm}^2$  的 PBS 缓冲液清洗 2-3 次;此后将该 SIS 复合工程骨置于  $-80^\circ\text{C} / 37^\circ\text{C}$  反复冻融 3-5 次,

每次 1 h ;之后再次以用量为(1-2)mL/cm<sup>2</sup>的 PBS 缓冲液清洗 2-3 次,进行去细胞化 ;将去细胞化后的复合工程骨置于 -80℃ 保存备用,此即为细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨。

[0010] 本发明方法选用的 MC3T3-E1 细胞系细胞易保存使用,同时具有体外无限增殖能力,为工程骨制备方法的稳定和产品生产提供了有利条件。

[0011] 淫羊藿苷是植物药淫羊藿的主要活性成分,淫羊藿苷安全、经济、化学性质稳定,具有促骨再生能力和促血管再生能力,本发明通过淫羊藿苷刺激 SIS 上的成骨细胞,赋予本发明复合工程骨优异的成骨诱导性。

[0012] 本发明方法选用 SIS 材料作为骨架材料,SIS 是以胶原为骨架的细胞外基质材料,含有 90% 的 I 型和 III 型胶原,与天然骨的有机成分非常类似。本发明方法通过在 SIS 材料上种植并培养 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞作为成骨细胞系细胞,通过诱导使种子细胞在 SIS 材料上进行原位矿物化和成骨分化,采用特殊的培养方式促进成骨细胞分泌大量的矿物化结晶及细胞外基质成分到 SIS 骨架材料上,最终可在 SIS 骨架材料上形成高度类似于天然骨的复合材料,制备得到的细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨具有较高的机械强度,该组织工程骨与天然骨内部的矿物化结构和分布极为接近,具有高度类似于天然骨的微观结构。

[0013] 本发明方法中,在使用植入人体体内之前已进行去细胞化,可以避免细胞植入引起的人体免疫排斥等安全问题,同时保留的细胞外基质成分不仅可以提供类似于体内的微环境,而且大量成骨细胞分化过程中释放的各种细胞因子可以促进体内的骨再生。

[0014] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明公开的细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨,具有较高的机械强度,在干、湿状态下的弹性模量分别可达 350MPa、100MPa,在植入体内初期能够提供较好的组织支撑,该组织工程骨与天然骨内部的矿物化结构和分布极为接近,具有高度类似于天然骨的微观结构,利于植入后更好地被识别和加速骨再生;本发明公开的细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨的制备方法,是一种新型的组诱导成骨细胞分化及矿物化方法,通过钙离子和淫羊藿苷组合培养液刺激 SIS 上的成骨细胞,在 SIS 材料上进行大量的原位矿物化和成骨分化,同时可以避免钙离子对于分化后期重要基质蛋白 OCN 的抑制,增强工程骨的成骨诱导性,最终实现 SIS 材料上大量羟基磷灰石结晶和类骨细胞外基质沉积,且机械强度较 SIS 本身有大幅提高。

## 附图说明

[0015] 图 1 为实施例中裁剪后的 SIS 材料的外观图;

图 2 为实施例中制备得到的复合工程骨的外观图;

图 3 为原始 SIS 材料与复合工程骨在干、湿两种状态下的弹性模量测试结果;

图 4 为原始 SIS 材料的微观结构示意图;

图 5 为植有细胞的 SIS 材料的微观结构示意图;

图 6 为去细胞化前的 SIS 复合工程骨的微观结构示意图;

图 7 为实施例中制备得到的复合工程骨的微观结构示意图;

图 8 为 SIS 原始材料与复合工程骨上的种植细胞的成骨分化标志基因 ALP、BSP、OCN 的 mRNA 相对表达量的对比结果;

图 9 为复合工程骨的扫描电镜照片;

- 图 10 为小鼠头盖骨的扫描电镜照片；  
图 11 为复合工程骨的 X 射线衍射结果；  
图 12 为小鼠头盖骨的 X 射线衍射结果；  
图 13 为应用实例中无植入物的空白对照骨的 HE 染色结果；  
图 14 为应用实例中复合工程骨的 HE 染色结果；  
图 15 为应用实例中无植入物的空白对照骨的 MTS 染色结果；  
图 16 为应用实例中复合工程骨的 MTS 染色结果。

## 具体实施方式

[0016] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0017] 实施例的细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨的制备方法,包括以下步骤:

1)细胞培养及传代:准备含有 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基作为培养液;从小鼠颅顶前骨 MC3T3-E1 细胞系中分离的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞(可从中科院或 ATCC 购置)置于 5% 二氧化碳浓度、37°C 的细胞培养箱中培养,培养液的用量为  $200 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ,每隔 48h 弃去旧的培养液并加入等量新的培养液,确保培养液的用量为  $200 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ,当培养至 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞汇合度大于 90% 时进行细胞传代,细胞传代的过程为:弃去旧的培养液,加入用量为  $200 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  的 PBS 缓冲液,清洗 2-3 次;然后加入用量为  $40-50 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  的 0.25% 的胰酶,在 37°C 下孵育 1 min;收集细胞并加入至离心管,在 1000 rpm 转速下离心 2 min;弃去上清,然后加入 1 mL 培养液重悬细胞,得到细胞悬液,对此细胞悬液进行细胞计数并计算该细胞悬液的细胞密度;根据计算得到的细胞密度,将细胞悬液以  $(1-2) \times 10^4$  细胞/ $\text{cm}^2$  的用量加入至新的细胞培养瓶,然后在细胞培养瓶中加入 5 mL 的培养液混匀,置于细胞培养箱中培养;重复上述细胞传代过程直至获得足够量的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞;

2)SIS 仿生工程骨的制备:取出干燥无菌的 SIS 材料,用剪刀或合适器械裁剪成所需的大小及形状( $2 \times 5 \text{ cm}^2$ ),再将裁剪好的 SIS 材料浸泡于培养液,置于 37°C 的细胞培养箱中预处理 24-48h;取汇合度为 70-80% 的 MC3T3-E1 Subclone 14 细胞,加入至离心管,在 1000 rpm 转速下离心 2 min,弃去上清,再加入 1 mL 培养液重悬细胞,得到细胞悬液,对此细胞悬液进行细胞计数并计算该细胞悬液的细胞密度,然后根据计算得到的细胞密度将该细胞悬液稀释至  $1 \times 10^6$  细胞/mL 的终浓度,即配制得到细胞悬液;取出浸泡 24-48h 的 SIS 材料(其外观图见图 1,微观结构示意图见图 4),平铺于新的细胞培养皿上,再按  $5 \times 10^3$  细胞/ $\text{mm}^2$  的细胞密度将配制得到的稀释的细胞悬液均匀滴加于 SIS 材料上,完成对 SIS 材料的细胞种植,然后立即放入细胞培养箱中孵育;孵育 4h 后,取出植有细胞的 SIS 材料(其微观结构示意图见图 5),用  $1-2 \text{ mL}/\text{cm}^2$  用量的培养液清洗 2-3 次,除去表面未黏附的细胞,之后以  $2.5 \text{ mL}/\text{cm}^2$  的用量加入新的培养液,最后将该植有细胞的 SIS 材料置于细胞培养箱孵育;

3)复合工程骨的制备:植有细胞的 SIS 材料于细胞培养箱孵育 16h 后,得到细胞-SIS 复合材料,从细胞培养箱中取出该细胞-SIS 复合材料,弃去旧的培养液,加入等量诱导矿物化及成骨分化的组合培养液,组合培养液为含有 10mM 的  $\text{CaCl}_2$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  的淫羊藿苷和 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基,然后置于 37°C 的细胞培养箱孵育,此后每隔 48h 更换一次组合培养液,处理 4 周时间后,得到 SIS 复合工程骨(其微观结构示意图见图 6);

4)复合工程骨的去细胞化:取出上述处理得到的 SIS 复合工程骨,以用量为  $(1-2) \text{ mL}/$

cm<sup>2</sup>的PBS缓冲液清洗2-3次;此后将该SIS复合工程骨置于-80℃/37℃反复冻融3-5次,每次1h;之后再次以用量为(1-2)mL/cm<sup>2</sup>的PBS缓冲液清洗2-3次,进行去细胞化;将去细胞化后的复合工程骨置于-80℃保存备用,此即为细胞组装小肠黏膜下层仿生复合工程骨,其外观图见图2,微观结构示意图见图7,该复合工程骨的微观结构包括SIS胶原纤维骨架1、矿物化结晶3和细胞外基质成分4,SIS胶原纤维骨架1呈网状纤维结构,矿物化结晶3和细胞外基质成分4交错并间隔沉积于SIS胶原纤维骨架1上,矿物化结晶3和细胞外基质成分4由MC3T3-E1 Subclone 14细胞分泌得到,矿物化结晶3主要由羟基磷灰石结晶构成。经测定,该复合工程骨中的矿物化结晶的沉积量为68.50±6.75 mg/cm<sup>3</sup>。

[0018] 图4-图7中,1为SIS胶原纤维骨架,2为MC3T3-E1 Subclone 14细胞,3为矿物化结晶,4为细胞外基质成分。

[0019] 对制备得到的复合工程骨,测试其在干、湿两种状态下的弹性模量,作为对比,同样测试了原始SIS材料的弹性模量,测试结果见图3。从图3可见,本发明复合工程骨在干、湿状态下的弹性模量分别为350MPa、100MPa,相对于原始SIS材料在干、湿状态下的弹性模量100MPa、20MPa,本发明复合工程骨的弹性模量大幅提高。

[0020] 将MC3T3-E1 Subclone 14细胞分别植于原始SIS材料和本发明复合工程骨三天后,考察成骨分化标志基因ALP、BSP、OCN的mRNA相对表达量的对比结果见图8,可见,本发明复合工程骨上的成骨分化标志基因较原SIS材料明显上调,说明本复合工程骨的成骨诱导性明显提高。

[0021] 制备得到的复合工程骨的扫描电镜照片见图9,X射线衍射结果见图11;小鼠头盖骨的扫描电镜照片见图10,X射线衍射结果见图12。对比图9和图10可见,复合工程骨和小鼠头盖骨的微观结构均为网状纤维结构,两者均含有大量的钙沉积,表面形态非常类似。对比图11和图12可见,复合工程骨和小鼠头盖骨具有非常类似的谱峰(羟基磷灰石),进一步说明两者在微观结构上的类似性。

[0022] 应用实例:将制备得到的复合工程骨具体应用于小鼠头盖骨缺失模型骨修复,具体实验过程为:

1、选择实验对象:选取5只8周龄雄性C57BL/6小鼠作为实验对象;

2、建立头盖骨缺失模型:在小鼠头盖骨两侧部位用Miltex公司生产的Biopsy Punch设备移去直径为4mm的骨组织,然后在一侧缺失处植入本发明复合工程骨,另一处无植入物作为对照;手术缝合后小鼠正常饲养8周后处死,取得头盖骨组织进行体内成骨状况分析;

3、组织学结果:HE染色和MTS染色结果如图13、14和图15、16所示,图13为无植入物的空白对照骨的HE染色结果,图14为本发明复合工程骨的HE染色结果,图15为无植入物的空白对照骨的MTS染色结果,图16为本发明复合工程骨的MTS染色结果。对比图13和图14及图15和图16可见,在空白对照骨缺失处,8周后几乎没有新生骨,而在植入本发明复合工程骨的位置,出现了大量的包含血管、髓腔的成熟新生骨组织,且骨桥几乎覆盖了整个缺失区域。

[0023] 4、统计学计算结果:采用NIH软件Imagej对小鼠骨缺失处的新生骨面积比例进行计算,每个样品取5张不同截面的切片,通过统计学分析发现空白组中新生骨面积比例为5.7%±4.6% (Mean±S. D.),而实验组中新生骨面积比例为77.9%±18.8% (Mean±S. D.),



两者具有显著差异( $p < 0.001$ ),证明本发明复合工程骨在体内骨修复过程中效果显著。

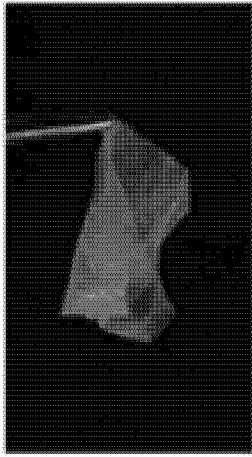


图 1

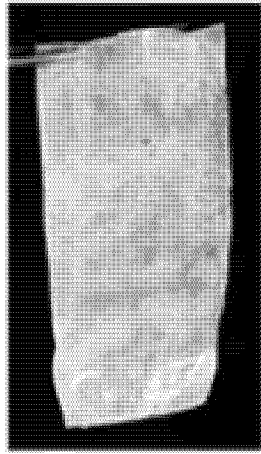


图 2

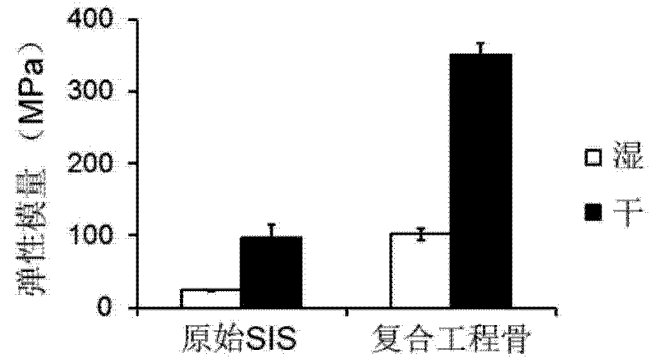


图 3

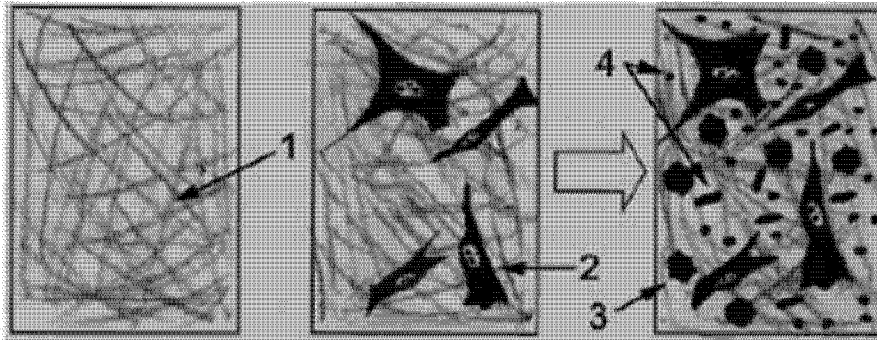


图 4

图 5

图 6

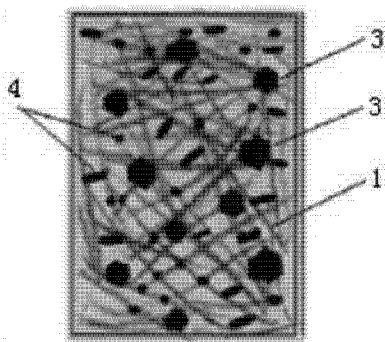


图 7

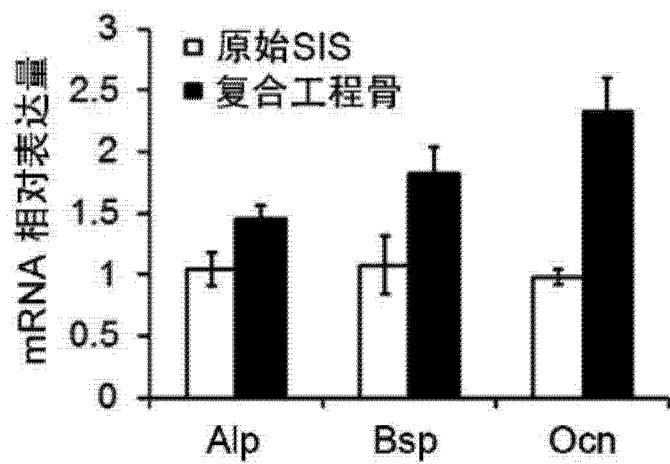


图 8

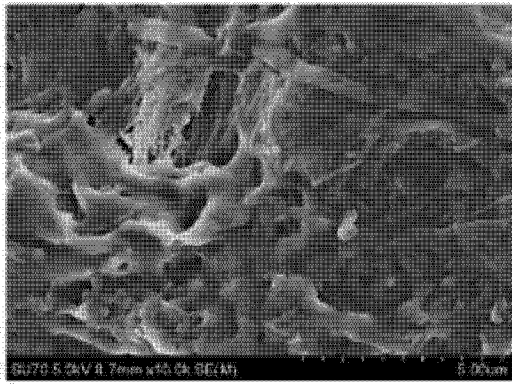


图 9

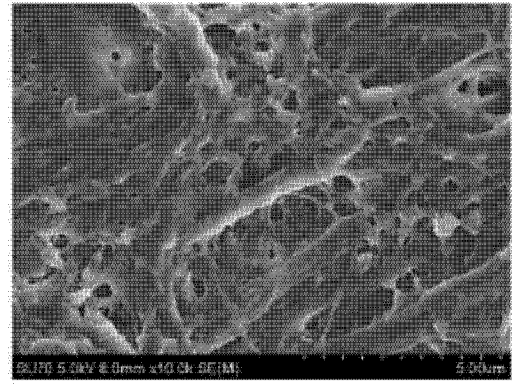


图 10

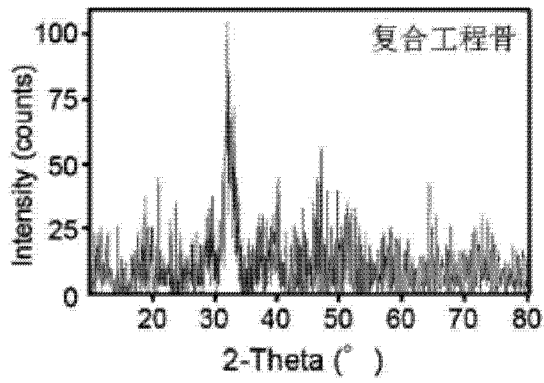


图 11

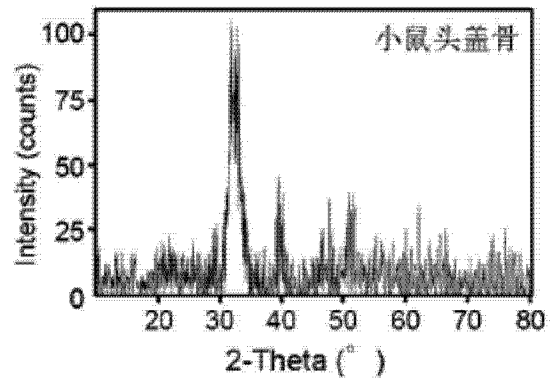


图 12

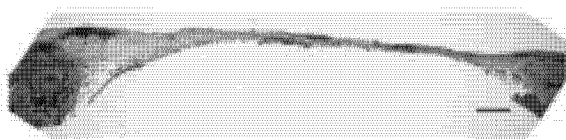


图 13

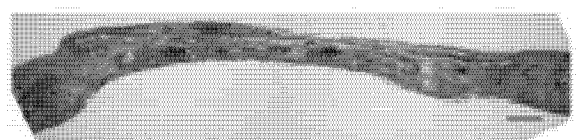


图 14

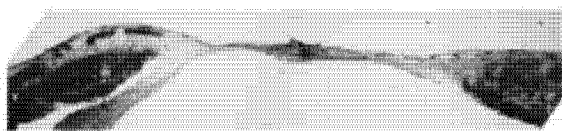


图 15



图 16