



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112940304 B

(45) 授权公告日 2023.02.28

(21) 申请号	202110283154.6	A61L 27/50 (2006.01)
(22) 申请日	2021.03.16	A61L 27/52 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号		A61L 27/54 (2006.01)
申请公布号	CN 112940304 A	A61L 27/58 (2006.01)
(43) 申请公布日	2021.06.11	A61L 27/60 (2006.01)
(73) 专利权人	杭州基智生物科技有限公司	A61L 26/00 (2006.01)
地址	310000 浙江省杭州市余杭区五常街道丰岭路17-1号5楼518室	G12N 5/00 (2006.01)
(72) 发明人	余建文 商造森	(56) 对比文件
(74) 专利代理机构	成都鱼爪智云知识产权代理有限公司 51308	CN 104225677 A, 2014.12.24
专利代理师	赵晨宇	CN 110204746 A, 2019.09.06
(51) Int. Cl.		CN 109805890 A, 2019.05.28
C08J 3/24 (2006.01)		CN 101244290 A, 2008.08.20
C08L 5/08 (2006.01)		CN 106397795 A, 2017.02.15
A61L 27/38 (2006.01)		CN 102805880 A, 2012.12.05
A61L 27/20 (2006.01)		CN 108465128 A, 2018.08.31
		FR 2861734 A1, 2005.05.06
		审查员 周伟

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

一种三维细胞培养支架、成纤维细胞凝胶及其制备方法

(57) 摘要

本发明提出了一种三维细胞培养支架、成纤维细胞凝胶及其制备方法,涉及生物材料技术领域。该三维细胞培养支架的制备方法,包括如下步骤,将透明质酸钠交联、冻干后即得到三维细胞培养支架,通过对透明质酸钠进行交联改性,制备成具有一定微孔径的三维细胞培养支架,能使细胞均匀分布,且具有良好的透气性,不会对细胞的活性造成抑制。此外本发明还提出一种成纤维细胞凝胶的制备方法,包括如下步骤,成纤维细胞培养和成纤维细胞凝胶制备,既能使成纤维细胞在支架中正常生长,又能使成纤维细胞在支架中均匀分布活性的同时,使成纤维细胞能正常发挥作用。

1. 一种三维细胞培养支架的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将透明质酸钠交联、冻干后即得到三维细胞培养支架,其中三维细胞培养支架中透明质酸的浓度为13 mg/mL;

所述交联时所用的交联剂为碳化二亚胺、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、聚乙二醇、戊二醛、二乙烯基砒和京尼平中的一种或多种;

所述交联剂与透明质酸钠的重量比为1:(3-15);

所述交联后、冻干前还包括透析,所述透析包括如下步骤,采用透析液去除所述交联剂;所述透析液包括水、平衡盐溶液、生理盐水和磷酸缓冲液;

所述交联的温度为40-65℃,所述交联的时间为1-5 h,所述交联剂溶于碱性溶液中,所述碱性溶液为氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠溶液中的一种,所述碱性溶液的质量百分比为0.2-2%。

2. 根据权利要求1所述的三维细胞培养支架的制备方法,其特征在于,当透析后支架的重量为透析前支架重量的1-80倍时,即为透析终点。

3. 根据权利要求2所述的三维细胞培养支架的制备方法,其特征在于,所述透析后、冻干前还包括灭菌,所述灭菌为纯蒸汽湿热灭菌,所述纯蒸汽湿热灭菌的温度为110-130℃,F₀为8-15。

4. 一种如权利要求1-3任意一项所述的三维细胞培养支架的制备方法制备的三维细胞培养支架。

5. 一种成纤维细胞凝胶的制备方法,其特征在于,包括如下步骤,

成纤维细胞培养:取成纤维细胞,加入胰蛋白酶液处理,重复1-4次,加入培养基,再传代培养至新的培养皿内培养24-72 h,得到成纤维细胞悬浮液;

成纤维细胞凝胶制备:将所述成纤维细胞悬浮液与权利要求4所述三维细胞培养支架混合并培养24-96 h,即得到成纤维细胞凝胶。

6. 根据权利要求5所述的成纤维细胞凝胶的制备方法,其特征在于,每0.1-1.0 g所述三维细胞培养支架辅以1 mL所述成纤维细胞悬浮液。

7. 根据权利要求6所述的成纤维细胞凝胶的制备方法,其特征在于,所述胰蛋白酶液处理的时间为1-2 min,所述胰蛋白酶液中胰蛋白酶的浓度为0.25%,所述传代培养的比例为1:(1-10)。

8. 一种如权利要求5-7任意一项所述的成纤维细胞凝胶的制备方法制备的成纤维细胞凝胶。

一种三维细胞培养支架、成纤维细胞凝胶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物材料技术领域,具体而言,涉及一种三维细胞培养支架、成纤维细胞凝胶及其制备方法。

背景技术

[0002] 细胞的培养即传统的单层平面培养的细胞,由于没有支架进行支持,所以细胞只能贴壁生长,而贴壁生长的细胞在生长时无论是在形态、结构和功能上都与体内自然生长的细胞差别较大,导致研究者无法得到细胞在体内生长的准确情况,对于体内细胞的研究会造成一定程度的阻碍。

[0003] 此外,在一般创伤中,常常会造成不同程度的细胞变性、坏死和组织缺损,必须通过细胞增生和细胞间基质的形成来进行组织修复。在此修复过程中,成纤维细胞起着十分重要的作用。以伤口愈合过程为例,成纤维细胞通过有丝分裂大量增殖,并从4-5天或6天开始合成和分泌大量的胶原纤维和基质成分,与新生毛细血管等共同形成肉芽组织,填补伤口组织缺损,为表皮细胞的覆盖创造条件,使皮肤真皮层的厚度和密度增加,舒展皱纹,填平凹陷,恢复皮肤的弹性和光泽。而透明质酸类作为一种生理活性物质,广泛分布在动物和人体结缔组织细胞外基质中。随着交联技术的发展,可获得不同分子量大小和不同结构的交联玻璃酸钠,它们的性状如粘弹性、降解时间等也各不相同,根据这些特性,适应症和具体用途也各不相同。交联透明质酸作为有效的皮肤填充剂,在填充塑形效果以及维持时间、安全性上,有着其他填充剂无可比拟的优势。

[0004] 如今市面上现有的以透明质酸为主原料的凝胶型皮肤填充剂会随着时间的推移而被人体降解,填充效果只能维持6-12个月,需要反复注射。给临床使用造成不便。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种三维细胞培养支架的制备方法,通过对透明质酸钠进行交联改性,制备成具有一定微孔径的三维细胞培养支架,能使细胞均匀分布,该三维细胞培养支架为多孔结构,且具有良好的通透性,为细胞与外界进行物质交换预留了空间。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种三维细胞培养支架,具有一定的微孔径,为细胞生长提供空间结构,能使细胞均匀分布,并且具有良好的生物相容性,能与细胞和人体都良好兼容,不会与细胞和人体产生排斥反应,能使细胞在支架中正常生长。该三维细胞培养支架具有可降解、可注射的优势,可广泛用于3D生物打印、细胞/干细胞培养、整形美容填充、类器官、肿瘤疾病模型、药物筛选细胞芯片以及基因药物递送系统等领域。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种成纤维细胞凝胶的制备方法,既能使成纤维细胞在支架中正常生长,又能使成纤维细胞在支架中均匀分布并维持活性的同时,使成纤维细胞能发挥正常功能,分泌代谢产物。作为创伤修复敷料使用时,能够促进组织再生,加速伤口愈合。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种成纤维细胞凝胶,具有一定的粘度,并且还具

一定的弹性,作为皮肤填充剂使用时具有良好的塑形效果,此外还与人体具有良好的相容性,不容易产生排斥反应,易降解,无残留。成纤维细胞凝胶作为组织工程材料,在再生医学领域具有广阔的应用前景,与人体自身组织融为一体,发挥持久的组织填充和创伤修复作用。

[0009] 本发明解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。

[0010] 一方面,本申请实施例提供一种三维细胞培养支架的制备方法,包括如下步骤,将透明质酸钠交联、冻干后即得到三维细胞培养支架,交联时所用的交联剂为碳化二亚胺、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、聚乙二醇、戊二醛、二乙烯基砜和京尼平中的一种或多种。

[0011] 另一方面,本申请实施例提供一种三维细胞培养支架的制备方法制备的三维细胞培养支架。

[0012] 另一方面,本申请实施例提供一种成纤维细胞凝胶的制备方法,包括如下步骤,成纤维细胞培养:取成纤维细胞,加入胰蛋白酶液处理,重复1-4次,加入培养基,再传代培养至新的培养皿内培养24-72h,得到成纤维细胞悬浮液;成纤维细胞凝胶制备:将成纤维细胞悬浮液与上述三维细胞培养支架混合并培养24-96h,即得到成纤维细胞凝胶。

[0013] 另一方面,本申请实施例提供一种成纤维细胞凝胶的制备方法制备的成纤维细胞凝胶。

[0014] 相对于现有技术,本发明的实施例至少具有如下优点或有益效果:

[0015] 一、本申请实施例提供的一种三维细胞培养支架的制备方法,改变了透明质酸钠凝胶的弹性和粘性,使三维细胞培养支架与细胞具有更好的生物相容性,因为冻干后的透明质酸钠凝胶具有一定的空间结构,为细胞生长提供了一定的微孔径,保证细胞能够均匀分布,并且透明质酸钠本身不仅不会对细胞的活性造成抑制。由于透明质酸是细胞外基质的重要组成部分,所以透明质酸钠能够使细胞更容易适应生长环境,保证了细胞能够在支架内正常生长。

[0016] 二、本申请实施例提供的一种三维细胞培养支架,不仅具有一定的微孔径,在保证细胞能够均匀分布的同时还具有良好的通透性,使细胞能够与外界进行正常的物质交换,并且硬度适中、柔软、粘弹性较好,不易破损,方便转移。该三维细胞培养支架具有可降解、可注射的优势,可广泛用于3D生物打印、细胞/干细胞培养、整形美容填充、类器官、肿瘤疾病模型、药物筛选细胞芯片以及基因药物递送系统等领域。

[0017] 三、本申请实施例提供的一种成纤维细胞凝胶的制备方法既能使成纤维细胞在支架中正常生长,又能使成纤维细胞在支架中均匀分布维持活性的同时,使成纤维细胞能发挥正常功能,分泌代谢产物。作为创伤修复敷料使用时,能够促进组织再生,加速伤口愈合。

[0018] 本申请实施例提供的一种成纤维细胞凝胶,具有一定的粘度,并且还具有一定的弹性和硬度,作为皮肤填充剂使用时具有良好的塑形效果,此外还与人体具有良好的相容性,不容易产生排斥反应,易降解,无残留。成纤维细胞凝胶作为组织工程材料,在再生医学领域具有广阔的应用前景,与人体自身组织融为一体,发挥持久的组织填充和创伤修复作用。

具体实施方式

[0019] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中

的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0020] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考具体实施例来详细说明本发明。

[0021] 本申请实施例提供一种三维细胞培养支架的制备方法,包括如下步骤,将透明质酸钠交联、冻干后即得到三维细胞培养支架,交联时所用的交联剂为碳化二亚胺、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、聚乙二醇、戊二醛、二乙烯基砒和京尼平中的一种或多种。通过采用交联剂对透明质酸钠进行一定程度的交联和改性,改变了透明质酸钠凝胶的弹性和粘性,使三维细胞培养支架与细胞具有更好的生物相容性,并将透明质酸钠凝胶冻干,为透明质酸钠凝胶提供了一定的微孔径,保证细胞能够均匀分布,并且透明质酸钠本身不会对细胞的活性造成抑制,保证了细胞能够在支架内正常生长。碳化二亚胺主要用于活化羧基,促使酰胺和酯的生成;1,4-丁二醇二缩水甘油醚可增加凝胶的柔韧性、强度、粘度等,二乙烯基砒能够增强凝胶的抗氯性,避免透明质酸钠中钠离子与氯离子结合,提高透明质酸钠的利用率;聚乙二醇是一种水溶性的高分子化合物,毒性低,与透明质酸钠交联制备水凝胶;京尼平是一种优良的天然生物交联剂,毒性极低,可以与蛋白质、胶原、明胶和壳聚糖等交联制作生物材料,改变原料的交联程度,对原料进行改性,戊二醛在常温常压下为带有刺激性气味的无色透明油状液体,低毒且具有较低的刺激性和腐蚀性,可与透明质酸钠交联制备凝胶。

[0022] 在本发明的一些实施例中,上述交联的温度为40-65℃,交联的时间为1-5h,交联剂与透明质酸钠的重量比为1:(3-15),交联剂溶于碱性溶液中,所述碱性溶液为氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠溶液中的一种,所述碱性溶液的质量百分比为0.2-2%。控制好交联的温度、时间还有交联剂与透明质酸钠的重量比,保证最后得到的三维细胞培养支架具有一定的微孔径和交联度,使支架具有适当的粘度和弹性,可以使细胞在支架中均匀分布,并且留有足够的空间使细胞能够与外界进行正常的物质交换。其中交联时优先选用水浴加热,保证受热均匀,温度易于控制,避免温度突然降低或升高,从而导致透明质酸钠凝胶的性质受到影响。交联剂溶于碱性溶液可以将交联剂的pH调整为碱性,使其更容易形成凝胶,其中优选的碱性溶液为氢氧化钠,氢氧化钠为强碱,效果较好,见效较快,并且其中的钠离子与透明质酸钠中的钠离子重合,提升了钠离子的富集度。当透明质酸钠交联完毕后,透明质酸钠的质量百分比为0.1-50%。

[0023] 在本发明的一些实施例中,上述交联后、冻干前还包括透析,透析包括如下步骤,采用透析液去除交联剂,透析液包括水、平衡盐溶液、生理盐水和磷酸缓冲液。通过透析去除其中的交联剂,降低三维细胞培养支架的毒性,避免残留的交联剂导致接种在支架上的细胞活性降低甚至死亡。其中透析液优选为生理盐水和磷酸缓冲液,保证透明质酸钠凝胶能够达到最佳的通透性,提升透明质酸钠的生物相容性。在透析前优选将透明质酸钠凝胶切成0.3-0.8cm³的小块,避免溶胀后的体积过大,不方便处理。

[0024] 在本发明的一些实施例中,上述透析后、冻干前还包括灭菌,灭菌为纯蒸汽湿热灭菌,纯蒸汽湿热灭菌的温度为110-130℃,F₀为8-15。纯蒸汽湿热灭菌以高温高压水蒸气为介质,由于蒸汽热量大,穿透力强,容易使蛋白质变性或凝固,最终导致微生物的死亡,灭菌

效率较高,通过调节合适的温度和 F_0 从而提高蒸汽的质量和灭菌效果。在灭菌前最好将透明质酸钠凝胶切成 $0.5-1\text{cm}^3$ 的小块,方便分装和彻底灭菌。

[0025] 另一方面,本申请实施例还提供了一种三维细胞培养支架的制备方法制备的三维细胞培养支架。该三维细胞培养支架不仅具有一定的微孔径,在保证细胞能够均匀分布的同时还具有良好的通透性,使细胞能够与外界进行正常的物质交换,并且硬度适中、柔软、粘弹性较好,不易破损,方便转移。该三维细胞培养支架具有可降解、可注射的优势,可广泛用于3D生物打印、细胞/干细胞培养、整形美容填充、类器官、肿瘤疾病模型、药物筛选细胞芯片以及基因药物递送系统等领域。实际上本发明所述的三维细胞培养支架除了可以培养成纤维细胞制备成纤维细胞凝胶之外,同样适用于上皮细胞、干细胞、肿瘤细胞等其他各类细胞的三维培养,以及通过这些细胞培养构建类器官。

[0026] 另一方面,本申请实施例还提供了一种成纤维细胞凝胶的制备方法,包括如下步骤,成纤维细胞培养:取成纤维细胞,加入胰蛋白酶液处理,重复1-4次,加入培养基,再传代培养至新的培养皿内培养24-72h,得到成纤维细胞悬浮液;成纤维细胞凝胶制备:将成纤维细胞悬浮液与三维细胞培养支架混合并培养24-96h,即得到成纤维细胞凝胶。该成纤维细胞凝胶的制备方法通过将三维细胞培养支架和成纤维细胞结合使用,既能使成纤维细胞在支架中正常生长,又能使成纤维细胞在支架中均匀分布,维持活性的同时,使成纤维细胞能发挥正常功能,分泌代谢产物。作为创伤修复敷料使用时,能够促进组织再生,加速伤口愈合。其中培养基优选DMEM,为成纤维细胞的生长提供充足的营养物质。成纤维细胞的培养在 CO_2 培养箱内进行培养,其中 CO_2 的体积浓度为5%,温度为 37°C 。采用胰蛋白酶液处理后,直到采用镜检观察到细胞回缩变圆,间隙增大后,再加入DMEM培养基。在传代培养前,最好用吸管反复吹打细胞至细胞完全分散后,再进行传代培养。

[0027] 在本发明的一些实施例中,每 $0.1-1.0\text{g}$ 上述三维细胞培养支架辅以 1mL 上述成纤维细胞悬浮液。以适当的比例将三维细胞培养支架和成纤维细胞进行结合,保证了成纤维细胞能够在三维细胞培养支架中均匀分布,并且保证了成纤维细胞凝胶的粘度和弹性适中,既不容易破损和粘连,又不会因为过硬、粘性差从而导致细胞活性降低和对创口的粘附性差。

[0028] 在本发明的一些实施例中,上述胰蛋白酶液处理的时间为 $1-2\text{min}$,上述胰蛋白酶液中胰蛋白酶的浓度为 0.25% ,传代培养的比例为 $1:(1-10)$ 。选用浓度适宜的胰蛋白酶液按照合理的时间处理成纤维细胞,使成纤维细胞能够均匀分散,不会导致成纤维成团从而无法在三维细胞培养支架内均匀分布。

[0029] 另一方面,本申请实施例还提供了一种成纤维细胞凝胶的制备方法制备的成纤维细胞凝胶。该成纤维细胞凝胶具有一定的粘度,并且还具有一定的弹性和硬度,作为皮肤填充剂使用时具有良好的塑形效果,此外还与人体具有良好的相容性,不容易产生排斥反应,易降解,无残留。成纤维细胞凝胶作为组织工程材料,在再生医学领域具有广阔的应用前景,与人体自身组织融为一体,发挥持久的组织填充和创伤修复作用。

[0030] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0031] 实施例1

[0032] 本实施例中提供了一种三维细胞培养支架,通过如下步骤制备而成:取 20g 的透明质酸钠原料,备用。配制 1.2% 浓度的氢氧化钠溶液 200mL ,加入 1.3mL 的1,4-丁二醇二缩水

甘油醚混匀,常温条件下与透明质酸钠混匀,搅拌溶解,直至全部溶解为止。调节水浴温度至60℃,并进行交联反应,时间为90min。将交联完的凝胶分割成尺寸为0.5cm³的正方形块状,备用。配制渗透压为270-320mosmol/kg的透析液(水),将块状凝胶加入透析,分别间隔5h,10h和15h更换透析液,每次12L,直至透析液pH至中性和凝胶重量为1000g,达到透析终点,停止透析,共用时20h。将透析完成的凝胶再次进行切块,尺寸为1cm³,分装到培养瓶中,在灭菌柜内采用121℃,F₀=12的条件进行纯蒸汽湿热灭菌,得无菌凝胶。将凝胶冻干,周期为45-60h,得到三维细胞培养支架,于2-8℃保存备用。

[0033] 实施例2

[0034] 本实施例中提供了一种三维细胞培养支架,通过如下步骤制备而成:取20g的透明质酸钠原料,备用。配制1.2%浓度的氢氧化钠溶液200mL,加入1.3mL的1,4-丁二醇二缩水甘油醚混匀,常温条件下与透明质酸钠混匀,搅拌溶解,直至全部溶解为止。调节水浴温度至60℃,并进行交联反应,时间为90min。将交联完的凝胶分割成尺寸为0.5cm³的正方形块状,备用。配制渗透压为270-320mosmol/kg的透析液(生理盐水),将块状凝胶加入透析,分别间隔5h,10h和15h更换透析液,每次12L,直至透析液pH至中性和凝胶重量为1500g,达到透析终点,停止透析,共用时26h。将透析完成的凝胶再次进行切块,尺寸为1cm³,分装到培养瓶中,在灭菌柜内采用121℃,F₀=12的条件进行纯蒸汽湿热灭菌,得无菌凝胶。将凝胶冻干,周期为45-60h,得到三维细胞培养支架,于2-8℃保存备用。

[0035] 实施例3

[0036] 本实施例中提供了一种三维细胞培养支架,通过如下步骤制备而成:取20g的透明质酸钠原料,备用。配制1.2%浓度的氢氧化钠溶液200mL,加入1.3mL的1,4-丁二醇二缩水甘油醚混匀,常温条件下与透明质酸钠混匀,搅拌溶解,直至全部溶解为止。调节水浴温度至60℃,并进行交联反应,时间为90min。将交联完的凝胶分割成尺寸为0.5cm³的正方形块状,备用。配制渗透压为270-320mosmol/kg的透析液(磷酸缓冲液),将块状凝胶加入透析,分别间隔5h,10h和15h更换透析液,每次12L,直至透析液pH至中性和凝胶重量为2000g,达到透析终点,停止透析,共用时26h。将透析完成的凝胶再次进行切块,尺寸为1cm³,分装到培养瓶中,在灭菌柜内采用121℃,F₀=12的条件进行纯蒸汽湿热灭菌,得无菌凝胶。将凝胶冻干,周期为45-60h,得到三维细胞培养支架,于2-8℃保存备用。

[0037] 实施例4

[0038] 本实施例中提供了一种三维细胞培养支架,通过如下步骤制备而成:取20g的透明质酸钠原料,备用。配制2%浓度的氢氧化钠溶液200mL,加入1.3mL的1,4-丁二醇二缩水甘油醚、碳化二亚胺、聚乙二醇、戊二醛、二乙烯基砒和京尼平的混合液混匀,常温条件下与透明质酸钠混匀,搅拌溶解,直至全部溶解为止。调节水浴温度至40℃,并进行交联反应,时间为60min。将交联完的凝胶分割成尺寸为1cm³的正方形块状,备用。配制渗透压为270-320mosmol/kg的透析液(平衡盐溶液),将块状凝胶加入透析,分别间隔5h,10h和15h更换透析液,每次12L,直至透析液pH至中性和凝胶重量为2000g,达到透析终点,停止透析,共用时26h。将透析完成的凝胶再次进行切块,尺寸为0.5cm³,分装到培养瓶中,在灭菌柜内采用121℃,F₀=12的条件进行纯蒸汽湿热灭菌,得无菌凝胶。将凝胶冻干,周期为45-60h,得到三维细胞培养支架,于2-8℃保存备用。

[0039] 实施例5

[0040] 本实施例中提供了一种三维细胞培养支架,通过如下步骤制备而成:取20g的透明质酸钠原料,备用。配制1.1%浓度的氢氧化钠溶液200mL,加入1.3mL的1,4-丁二醇二缩水甘油醚、碳化二亚胺、二乙烯基砒和京尼平的混合液混匀,常温条件下与透明质酸钠混匀,搅拌溶解,直至全部溶解为止。调节水浴温度至52℃,并进行交联反应,时间为300min。将交联完的凝胶分割成尺寸为0.8cm³的正方形块状,备用。配制渗透压为270-320mosmol/kg的透析液(水),将块状凝胶加入透析,分别间隔5h,10h和15h更换透析液,每次12L,直至透析液pH至中性和凝胶重量为2000g,达到透析终点,停止透析,共用时26h。将透析完成的凝胶再次进行切块,尺寸为1.5cm³,分装到培养瓶中,在灭菌柜内采用121℃,F₀=12的条件进行纯蒸汽湿热灭菌,得无菌凝胶。将凝胶冻干,周期为45-60h,得到三维细胞培养支架,于2-8℃保存备用。

[0041] 实施例6

[0042] 本实施例中提供了一种成纤维细胞凝胶,通过如下步骤制备而成:取生长状态良好的成纤维细胞,加入2mL浓度为0.25%的胰蛋白酶液,覆盖细胞表面后,消化1min,倾去胰蛋白酶液,再重复进行2次。采用镜检观察,当细胞回缩变圆,间隙增大后,加入2mL的DMEM终止消化,用吸管反复轻轻吹打使细胞均匀分散后,按照1:5的比例传代至新的培养皿内,于37℃,5%二氧化碳浓度的培养箱中培养24h,得到成纤维细胞悬浮液。用移液管吸取2mL成纤维细胞悬浮液并与实施例1中得到的三维细胞培养支架1.2g混合,轻轻摇晃1min,再于37℃,5%的CO₂浓度的条件下培养24h,即得到成纤维细胞凝胶。

[0043] 实施例7

[0044] 本实施例中提供了一种成纤维细胞凝胶,通过如下步骤制备而成:取生长状态良好的成纤维细胞,加入2mL浓度为0.25%的胰蛋白酶液,覆盖细胞表面后,消化1min,倾去胰蛋白酶液,再重复进行1次。采用镜检观察,当细胞回缩变圆,间隙增大后,加入2mL的DMEM终止消化,用吸管反复轻轻吹打使细胞均匀分散后,按照1:5的比例传代至新的培养皿内,于37℃,5%二氧化碳浓度的培养箱中培养72h,得到成纤维细胞悬浮液。用移液管吸取2mL成纤维细胞悬浮液并与实施例2制得的三维细胞培养支架2.0g混合,轻轻摇晃1min,再于37℃,5%的CO₂浓度的条件下培养84h,即得到成纤维细胞凝胶。

[0045] 实施例8

[0046] 本实施例中提供了一种成纤维细胞凝胶,通过如下步骤制备而成:取生长状态良好的成纤维细胞,加入2mL浓度为0.25%的胰蛋白酶液,覆盖细胞表面后,消化1min,倾去胰蛋白酶液,再重复进行4次。采用镜检观察,当细胞回缩变圆,间隙增大后,加入2mL的DMEM终止消化,用吸管反复轻轻吹打使细胞均匀分散后,按照1:5的比例传代至新的培养皿内,于37℃,5%二氧化碳浓度的培养箱中培养48h,得到成纤维细胞悬浮液。用移液管吸取2mL成纤维细胞悬浮液并与实施例3中制得的三维细胞培养支架0.2g混合,轻轻摇晃1min,再于37℃,5%的CO₂浓度的条件下培养96h,即得到成纤维细胞凝胶。

[0047] 实施例9

[0048] 本实施例中提供了一种成纤维细胞凝胶,通过如下步骤制备而成:取生长状态良好的成纤维细胞,加入1.5mL浓度为0.25%的胰蛋白酶液,覆盖细胞表面后,消化2min,倾去胰蛋白酶液,再重复进行3次。采用镜检观察,当细胞回缩变圆,间隙增大后,加入2mL的DMEM终止消化,用吸管反复轻轻吹打使细胞均匀分散后,按照1:5的比例传代至新的培养皿内,

于37℃,5%二氧化碳浓度的培养箱中培养50h,得到成纤维细胞悬浮液。用移液管吸取2mL成纤维细胞悬浮液并与实施例4中制得的三维细胞培养支架0.4g混合,轻轻摇晃1min,再于37℃,5%的CO₂浓度的条件下培养74h,即得到成纤维细胞凝胶。

[0049] 实施例10

[0050] 本实施例中提供了一种成纤维细胞凝胶,通过如下步骤制备而成:取生长状态良好的成纤维细胞,加入1mL浓度为0.25%的胰蛋白酶液,覆盖细胞表面后,消化1.5min,倾去胰蛋白酶液,再重复进行2次。采用镜检观察,当细胞回缩变圆,间隙增大后,加入2mL的DMEM终止消化,用吸管反复轻轻吹打使细胞均匀分散后,按照1:5的比例传代至新的培养皿内,于37℃,5%二氧化碳浓度的培养箱中培养40h,得到成纤维细胞悬浮液。用移液管吸取2mL成纤维细胞悬浮液并与实施例5中制得的三维细胞培养支架0.6g混合,轻轻摇晃1min,再于37℃,5%的CO₂浓度的条件下培养60h,即得到成纤维细胞凝胶。

[0051] 效果例1

[0052] 取实施例6-8所制得的成纤维细胞悬浮液,分别加入DNA-CaCl₂-HBS溶液(取0.25mL氯化钙溶液,1mL的2×HBS缓冲液分别分装至4mL离心管内,开启恒温金属浴,设置温度为37℃。将恒温完成后的氯化钙溶液,分别加入4μl的AAV外壳质粒,30μl的CN408辅助质粒,6μl的载体质粒,质粒加入完成后,再加入灭菌超纯水,使氯化钙的终浓度为0.25mol/L,得到CaCl₂-DNA溶液。将装有CaCl₂-DNA溶液的离心管在漩涡震荡器上混合均匀,用移液枪取恒温完毕的2×HBS缓冲液0.5mL缓慢滴加至漩涡状态的CaCl₂-DNA溶液内,得到DNA-CaCl₂-HBS溶液),当在显微镜下观察到少数丝点状黑色物质后,即得到转染后的成纤维细胞悬浮液。将转染后的成纤维细胞悬浮液放回到CO₂培养箱,设置温度37℃,CO₂浓度5%,继续培养48h,再按1:5的比例传代至新的培养皿内,于37℃,5%CO₂浓度的培养箱中培养2h,轻摇培养皿,用移液管吸取转染后的成纤维细胞悬浮液2mL与实施例1-3所制得的三维细胞培养支架混合,轻轻摇晃1min,使二者充分接触,再于温度为37℃,CO₂浓度为5%的条件下培养72-96h。得到三组成纤维细胞凝胶,并以实施例6、实施例7和实施例8的顺序按A、B和C进行编号。再分别对A、B和C中的透明质酸浓度、体积、形态、表达绿色荧光的成纤维细胞分布、弹性模量和粘性模量进行计算和检测,所得结果如表1所示。

[0053] 表1成纤维细胞凝胶理化性质表

指标	A	B	C
透明质酸浓度(理论值)	20 mg/mL	13 mg/mL	10 mg/mL
体积	0.8 cm ³	1.2 cm ³	2.5 cm ³
[0054] 形态	块状, 硬度较大, 粘弹性高	块状, 硬度适中, 柔软, 粘弹性较好	脆性较大, 易碎,
表达绿色荧光的成纤维细胞分布	区域荧光密度大	荧光密度大, 分布均匀	荧光密度相对较小, 分布均匀
弹性模量 (0.5Hz)	332	285	95
粘性模量 (0.5Hz)	149	102	32

[0055] 通过表1结果所示,随着成纤维细胞凝胶内透明质酸浓度的降低,成纤维细胞凝胶的硬度降低,弹性模量和粘性模量也降低。当成纤维细胞凝胶呈块状、硬度适中、柔软且粘弹性好时,其中成纤维细胞的分布才既均匀且分布密度大。其中B组的效果最好,即用实施例7中的成纤维细胞悬浮液所制得的成纤维细胞凝胶效果最好。

[0056] 综上所述,本发明实施例提供了一种三维细胞培养支架的制备方法,

[0057] 一、通过采用交联剂对透明质酸钠进行一定程度的交联和改性,改变了透明质酸钠凝胶的弹性和粘性,使三维细胞培养支架与细胞和人体具有更好的生物相容性,并且使凝胶能够吸附成纤维细胞,增大成纤维细胞的分布密度。将透明质酸钠凝胶冻干,为透明质酸钠凝胶提供了一定的微孔径,保证细胞能够均匀分布,并且透析时可以除去透明质酸钠凝胶中的交联剂,降低其中的毒性,直到交联剂的残余量符合标准为止,保证支架不会对细胞的活性造成严重的抑制,保证了细胞能够在支架内正常生长。

[0058] 二、本发明实施例提供了一种三维细胞培养支架,该三维细胞培养支架具有一定的微孔径,为细胞与外界进行物质交换预留了空间,并且能够容纳细胞,使细胞在支架内均匀分布。此外该支架硬度适中、柔软、粘弹性较好,不易破损,方便转移。

[0059] 三、本发明实施例提供了一种成纤维细胞凝胶的制备方法,通过将三维细胞培养支架和成纤维细胞结合使用,既能使成纤维细胞在支架中正常生长,又能使成纤维细胞在支架中均匀分布,并且还保证了成纤维细胞的活性,使成纤维细胞能正常发挥修复作用。

[0060] 四、本发明实施例提供了一种成纤维细胞凝胶,成纤维细胞凝胶具有一定的粘度,能够贴合人体皮肤或伤口,并且不会因为粘度过大导致粘连从而影响成纤维细胞的活性,并且还具有一定的弹性和硬度,当该成纤维细胞凝胶作为皮肤填充剂使用时具有良好的塑形效果,能够保证填充后的皮肤具有弹性,且手感与正常皮肤无异,此外还与人体具有良好的相容性,不容易产生排斥反应,易降解,无残留。如同人体自身组织一样,发挥持久的组织填充作用。并且该成纤维细胞凝胶对于伤口的修复也具有有益的作用,成纤维细胞本身快速的分裂增殖效果配上凝胶的粘性,能够协同作用,加快伤口愈合。

[0061] 以上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。本发明的实施例的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围,而是仅仅表示本发明的选定实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作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。