



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115154673 B

(45) 授权公告日 2023.07.14

(21) 申请号 202210746085.2

A61L 27/54 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.28

A61L 27/38 (2006.01)

G12N 5/077 (2010.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115154673 A

(43) 申请公布日 2022.10.11

(73) 专利权人 北京航空航天大学宁波创新研究院

地址 315800 浙江省宁波市北仑区梅山街道康达路北京航空航天大学宁波创新研究院

(72) 发明人 朱晨凯 丁希仑 张武翔 邵振宗 常保宁 吴浩 郭威望 黄长用

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569 专利代理师 赵琪

(51) Int. Cl.

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/10 (2006.01)

A61L 27/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103920190 A, 2014.07.16

CN 104399131 A, 2015.03.11

CN 109228404 A, 2019.01.18

JP 2006230722 A, 2006.09.07

US 2008269895 A1, 2008.10.30

US 2017306295 A1, 2017.10.26

US 2018235634 A1, 2018.08.23

吴浩俊;谭荣雄;何艳霞;陈航;刘衍志;林瀚;魏波;郑越瑜.磷酸钙活性人工骨与自体骨颗粒环抱式植骨治疗四肢骨不连.中国临床解剖学杂志.2020,(第02期),全文.

江健;孙磊;冯华;陈磊;陶剑锋;Peter I.Lelkes.脱细胞真皮基质的改建及其作为软骨细胞移植载体在兔软骨缺损修复中的应用.中国运动医学杂志.2008,(第04期),全文.

审查员 张会平

权利要求书1页 说明书17页 附图2页

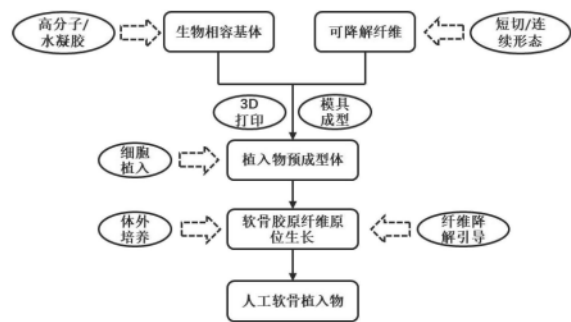
(54) 发明名称

人工软骨植入物预成型体及制备方法和应用、类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法

(57) 摘要

本发明提供了一种人工软骨植入物预成型体及其制备方法和应用、类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,属于医疗器械技术领域。生物相容基体具备良好的生物相容性、结构稳定性、表面平滑性与耐磨性,其仿生纤维结构的成型以人体膝关节软骨的胶原纤维结构特征为仿生参考,以可降解纤维为孔道构筑预成型体,随着纤维的逐步降解,水凝胶基体中微纳级孔道形成并缓释细胞生长活性离子,以孔道结构为通路,容纳、诱导自体软骨细胞沿孔道繁殖、生长、分化、成骨,实现自体软骨胶原纤维增强结构的原位成型,形成具备人体软骨生物力学特征与活

性机能的类生人工关节软骨植入物。



1. 一种类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

将自体软骨组织用PBS溶液进行预处理,然后用胰蛋白酶-EDTA处理,待大部分细胞游离时,得到原代软骨细胞;

将所述原代软骨细胞附在人工软骨植入物预成型体周围,进行胶原纤维原位培养,形成所述类生人工软骨植入物胶原纤维,所述人工软骨植入物预成型体包括生物相容基体和可降解纤维,所述可降解纤维在基体中交错穿插形成微纳级孔道,所述人工软骨植入物预成型体中可降解纤维的体积含量为5~50%;

所述可降解纤维包括可降解磷酸盐基生物玻璃纤维和/或镁合金纤维;

所述可降解纤维发生体外降解并在生物相容高分子基体中形成微纳级孔道,可降解纤维降解后诱导自体软骨细胞向微纳孔道生长繁殖,分化构成胶原纤维结构,从而形成富含自体软骨胶原纤维结构的人工软骨植入物。

2. 根据权利要求1所述的类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,其特征在于,所述胶原纤维原位培养使用软骨细胞培养液,所述软骨细胞培养液以pH为7.0~7.6的PBS缓冲液为基本溶液,包括以下浓度的组分:氨基葡萄糖0.1~0.3g/mL、脯氨酸0.8~2.0g/mL、丙酮酸钠0.5~2.5g/mL、维生素E1.2~4.0g/mL、维生素C0.3~3.0g/mL以及胎牛血清,所述胎牛血清的质量浓度为1~10%。

3. 根据权利要求1所述的类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,其特征在于,所述可降解纤维包括连续纤维或短切纤维,所述短切纤维的长度为0.1~5mm,所述连续纤维的形态包括单向0°、编织、0°/90°交错、0°/45°交错和0°/45°/90°交错中的一种或多种。

4. 根据权利要求1所述的类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,其特征在于,所述可降解纤维的表面负载功能性涂层,所述可降解纤维中功能性涂层的质量含量为0.1%~5.0%。

5. 根据权利要求4所述的类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,其特征在于,所述功能性涂层包括纤维结构高分子粘接剂、生长因子和抗菌剂。

6. 根据权利要求1所述的类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,其特征在于,所述生物相容基体包括合成高分子材料或水凝胶高分子材料,所述合成高分子材料包括聚醚醚酮、聚醚酮酮、尼龙、聚乳酸、聚己内酯、聚乙醇酸和甲壳素中的一种或多种,所述水凝胶高分子材料包括聚乙烯醇、透明质酸和海藻酸钠中的一种或多种。

7. 根据权利要求6所述的类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,其特征在于,

当所述生物相容基体为合成高分子材料时,所述人工软骨植入物预成型体的制备方法包括以下步骤:

将所述合成高分子材料热熔后进行模压,得到高分子片材;

将所述高分子片材与可降解纤维交替堆叠后进行热压,得到所述人工软骨植入物预成型体;

当所述生物相容基体为水凝胶高分子材料时,所述人工软骨植入物预成型体的制备方法包括以下步骤:

将所述水凝胶高分子材料与水混合,得到水凝胶前驱液;

在树脂传递模塑的模具内堆叠所述可降解纤维后,注入所述水凝胶前驱液,然后进行冷冻-解冻循环,得到所述人工软骨植入物预成型体。

## 人工软骨植入物预成型体及制备方法和应用、类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医疗器械技术领域,尤其涉及一种人工软骨植入物预成型体及其制备方法和应用、类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法。

### 背景技术

[0002] 膝骨关节是人体骨骼中结构最复杂的敏感部位,其中关节软骨具有承担载荷、缓冲负荷、稳定关节和润滑关节等重要功能。骨关节炎、软骨坏死、半月板撕裂等关节病症对人的健康生活造成极大影响。由于关节软骨缺少血运,成熟软骨细胞代谢缓慢,生长分化能力低,故体内关节软骨自身修复能力极其有限,一旦造成损伤或病变,不具备完全愈合能力,若治疗不及时或不恰当,将导致严重的功能障碍。目前临床上的治疗方法还无法使软骨组织完全再生,只可通过局部修复、自体/异体软骨移植、人工软骨假体置换等组织工程重建方式根除病灶以恢复关节活动能力;但软骨移植受供体来源以及免疫排斥等问题限制,而人工软骨假体往往采用单一材料标准化制备,不仅结构力学难以满足关节生物力学要求,形貌特征也无法与关节解剖结构完全契合,松脱、磨损等后遗症导致其植入寿命往往不足20年。

[0003] 近年来,使用自体软骨细胞移植(ACI)以及采用人工植入物载入自体软骨细胞移植(MACI)来进行软骨修复替换成为新兴起的治疗手段,其中MACI可以在ACI的基础上极大地简化手术步骤,提高人工软骨的安全性及有效性(CN201810559175.4、CN201710952296.0)。然而,人工软骨植入物材料往往采用聚乳酸(PLA)、聚己内酯(PCL)、聚乙烯醇(PVA)等人工合成高分子,由于单组分合成材料的骨诱导性差且结构性能较弱,不能满足支架细胞外基质中仿生有序胶原束结构形成,目前主要通过掺杂羟基磷灰石、磷酸钙、石墨烯等零维功能性粒子的方式对材料进行改性提升其生物活性。然而,改性植入物结构仍为均质各向同性特征,与人体富含胶原纤维的各向异性软骨结构完全不同,不具备仿生结构力学行为。

[0004] 另一方面,目前已有相关专利(CN201710999938.2、US 2021/0137691)提出采用碳纤维、凯夫拉等高性能纤维,通过编织工艺构建类似软骨内胶原纤维结构的仿生纤维结构,再与高分子基体复合构成具备仿生力学的软骨植入物。该类技术虽然在结构力学上可满足人工软骨的生物力学要求,但非自体纤维材料在患者体内引发的过敏反应和排斥问题难以避免。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种人工软骨植入物预成型体及其制备方法和应用、类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法。本发明的人工软骨植入物预成型体以可降解纤维为软骨成型引导纤维,通过自体软骨细胞植入与体外培养的方式,使可降解纤维发生体外降解并在生物相容高分子基体中形成微纳级孔道,可降解纤维降解后诱导自体

软骨细胞向微纳孔道生长繁殖,分化构成胶原纤维结构,从而形成富含自体软骨胶原纤维结构的人工软骨植入物,实现人工软骨植入物从当前“仿生命材料”(仿生)阶段向“类生命材料”(类生)跨越。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种人工软骨植入物预成型体,包括生物相容基体和可降解纤维,所述可降解纤维在基体中交错穿插形成微纳级孔道,所述人工软骨植入物预成型体中可降解纤维的体积含量为5~50%。

[0008] 优选地,所述可降解纤维包括可降解磷酸盐基生物玻璃纤维和/或镁合金纤维。

[0009] 优选地,所述可降解纤维包括连续纤维或短切纤维,所述短切纤维的长度为0.1~5mm,所述连续纤维的形态包括单向0°、编织、0°/90°交错、0°/45°交错和0°/45°/90°交错中的一种或多种。

[0010] 优选地,所述可降解纤维的表面负载功能性涂层,所述可降解纤维中功能性涂层的质量含量为0.1%~5.0%。

[0011] 优选地,所述功能性涂层包括纤维结构高分子粘接剂、生长因子和抗菌剂。

[0012] 优选地,所述生物相容基体包括合成高分子材料或水凝胶高分子材料,所述合成高分子材料包括聚醚醚酮、聚醚酮酮、尼龙、聚乳酸、聚己内酯、聚乙醇酸和甲壳素中的一种或多种,所述水凝胶高分子材料包括聚乙烯醇、透明质酸和海藻酸钠中的一种或多种。

[0013] 本发明还提供了上述技术方案所述的人工软骨植入物预成型体的制备方法,

[0014] 当所述生物相容基体为合成高分子材料时,所述制备方法包括以下步骤:

[0015] 将所述合成高分子材料热熔后进行模压,得到高分子片材;

[0016] 将所述高分子片材与可降解纤维交替堆叠后进行热压,得到所述人工软骨植入物预成型体;

[0017] 当所述生物相容基体为水凝胶高分子材料时,所述制备方法包括以下步骤:

[0018] 将所述水凝胶高分子材料与水混合,得到水凝胶前驱液;

[0019] 在树脂传递模塑的模具内堆叠所述可降解纤维后,注入所述水凝胶前驱液,然后进行冷冻-解冻循环,得到所述人工软骨植入物预成型体。

[0020] 本发明还提供了一种类生人工软骨植入物自体胶原纤维构建方法,包括以下步骤:

[0021] 将自体软骨组织用PBS溶液进行预处理,然后用胰蛋白酶-EDTA处理,待大部分细胞游离时,得到原代软骨细胞;

[0022] 将所述原代软骨细胞附在人工软骨植入物预成型体周围,进行胶原纤维原位培养,形成所述类生人工软骨植入物胶原纤维,所述人工软骨植入物预成型体为上述技术方案所述的人工软骨植入物预成型体。

[0023] 优选地,所述胶原纤维原位培养使用软骨细胞培养液,所述软骨细胞培养液以pH为7.0~7.6的PBS缓冲液为基本溶液,包括以下浓度的组分:氨基葡萄糖0.1~0.3g/mL、脯氨酸0.8~2.0g/mL、丙酮酸钠0.5~2.5g/mL、维生素E1.2~4.0g/mL、维生素C0.3~3.0g/mL以及胎牛血清,所述胎牛血清的质量浓度为1~10%。

[0024] 本发明提供了一种人工软骨植入物预成型体,包括生物相容基体和可降解纤维,所述可降解纤维在基体中交错穿插形成微纳级孔道,所述人工软骨植入物预成型体中可降

解纤维的体积含量为5~50%。本发明以可降解纤维为软骨成型引导纤维、生物相容高分子为基体,复合构建仿生人工软骨植入物预成型体,通过自体软骨细胞植入与体外培养的方式,使可降解纤维发生体外降解并在高分子基体中形成微纳级孔道,可降解纤维降解所释放的钙、镁、铁、磷酸根等活性离子,诱导自体软骨细胞向微纳孔道生长繁殖,分化构成胶原纤维结构,从而形成富含自体软骨胶原纤维结构的人工软骨植入物,形成的自体胶原纤维增强类生人工软骨植入物具备关节软骨生物力学特性和生物活性特征,实现人工软骨植入物从当前“仿生命材料”(仿生)阶段向“类生命材料”(类生)跨越,有效避免了传统单一材质植入物结构性能不足,非自体颗粒、纤维材料增强植入物的人体排异、过敏问题。

[0025] 本发明提供的人工软骨植入物预成型体通过定制化成型工艺,可对软骨病灶部位进行定制化设计,制成与其完全契合的定制化类生人工软骨植入物。

[0026] 本发明提供的类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,以人工软骨植入物预成型体中可降解纤维为预设结构,基于可降解纤维的降解机制与软骨细胞附着繁殖过程,实现细胞培养过程中软骨细胞在孔道内对可降解纤维的动态置换,逐步填充纤维孔道,并在降解过程中缓释的营养离子以及培养液中的生长因子(IGF类胰岛素生长因子、BMP骨形态发生蛋白、转化生长因子-p等)作用下,分化形成细胞外胶原基质,交联构建自体胶原纤维结构,形成与人体软骨相同的胶原纤维增强结构。

## 附图说明

[0027] 图1为本发明制备人工类生软骨植入物的流程图;

[0028] 图2为本发明人工类生软骨植入物胶原纤维原位成型的原理图,其中(A)为植入物预成型体成型截面示意图,(B)为纤维降解与自体软骨细胞诱导长入,(C)为自体软骨细胞长入孔道并分化,(D)为自体软骨纤维增强植入物构建,①为生物相容基体,②为可降解纤维,③为纤维降解并引导细胞长入,④为自体软骨细胞在孔道中分化,⑤为自体软骨胶原纤维结构在孔道中形成;

[0029] 图3为实施例1制得的人工软骨植入物的SEM谱图,其中①为孔道内壁,②为骨细胞附着分化。

## 具体实施方式

[0030] 本发明提供了一种人工软骨植入物预成型体,包括生物相容基体和可降解纤维,所述可降解纤维在基体中交错穿插形成微纳级孔道,所述人工软骨植入物预成型体中可降解纤维的体积含量为5~50%。

[0031] 在本发明中,若无特殊说明,使用的原料均为本领域市售商品。

[0032] 在本发明中,所述可降解纤维优选包括可降解磷酸盐基生物玻璃纤维和/或镁合金纤维。

[0033] 在本发明中,所述可降解磷酸盐基生物玻璃纤维的结构主链中桥氧键(-P-O-P-)可与水分子发生水解反应而断裂分解,降解过程中可释放玻璃结构中的磷、钙、镁、铁离子骨骼修复所需元素,诱导骨细胞生长、分化、成骨;所述镁合金纤维中镁金属具备独特的体内降解特性,可在内环境缓释镁离子作用于骨细胞分化与软骨形成。

[0034] 在本发明中,所述可降解纤维优选包括连续纤维或短切纤维,所述短切纤维的长

度优选为0.1~5mm,所述连续纤维的形态优选包括单向0°、编织、0°/90°交错、0°/45°交错和0°/45°/90°交错中的一种或多种。

[0035] 在本发明中,所述编织的形态优选包括平纹、斜纹和缎纹编织中的一种或多种。

[0036] 在本发明中,所述可降解纤维的表面优选负载功能性涂层,所述可降解纤维中功能性涂层的质量含量优选为0.1%~5.0%。

[0037] 在本发明中,所述功能性涂层的厚度优选为20~500nm。

[0038] 在本发明中,所述功能性涂层优选包括纤维结构高分子粘接剂、生长因子和抗菌剂。

[0039] 在本发明中,所述纤维结构高分子粘接剂优选包括聚乙烯醇、聚乳酸和聚乙二醇中的一种或多种。在本发明中,所述功能性涂层中纤维结构高分子粘接剂的质量含量优选为20~50%。

[0040] 在本发明中,所述生长因子优选包括IGF类胰岛素生长因子、BMP骨形态发生蛋白和转化生长因子- $\beta$ 中的一种或多种。在本发明中,所述功能性涂层中生长因子的质量含量优选为4~40%。

[0041] 在本发明中,所述抗菌剂优选包括广谱抗生素和/或非抗生素类抗菌剂,所述广谱抗生素优选万古霉素、庆大霉素、头孢菌素、阿莫西林和妥布霉素中的一种或多种,所述非抗生素类抗菌剂优选为氯己定。在本发明中,所述功能性涂层中抗菌剂的质量含量优选为4~40%。

[0042] 在本发明中,所述生物相容基体优选包括合成高分子材料或水凝胶高分子材料,所述合成高分子材料优选包括聚醚醚酮、聚醚酮酮、尼龙、聚乳酸、聚己内酯、聚乙醇酸和甲壳素中的一种或多种,所述水凝胶高分子材料优选包括聚乙烯醇、透明质酸和海藻酸钠中的一种或多种。

[0043] 在本发明中,所述人工软骨植入物预成型体的制备方法对植入物最终的形貌特征以及自体软骨胶原纤维结构特征有影响;本发明提出两种制备方法:模具成型与定制化成型;根据不同的纤维形态(短切纤维与连续纤维)以及基体材质(高分子、水凝胶),具体制备方法如下:

[0044] 模具成型

[0045] 当所述生物相容基体为合成高分子材料时,所述制备方法包括以下步骤:

[0046] 将所述合成高分子材料热熔后进行模压,得到高分子片材;

[0047] 将所述高分子片材与可降解纤维交替堆叠后进行热压,得到所述人工软骨植入物预成型体;

[0048] 当所述生物相容基体为水凝胶高分子材料时,所述制备方法包括以下步骤:

[0049] 将所述水凝胶高分子材料与水混合,得到水凝胶前驱液;

[0050] 在树脂传递模塑的模具内堆叠所述可降解纤维后,注入所述水凝胶前驱液,然后进行冷冻-解冻循环,得到所述人工软骨植入物预成型体。

[0051] 在本发明中,优选进行纤维预成型,所述纤维预成型优选包括依次进行纤维功能化处理和纤维毡成型。

[0052] 在本发明中,所述纤维功能化处理优选包括以下步骤:

[0053] 将所述抗菌剂、生长因子和溶剂混合,得到分散液;

[0054] 将所述分散液喷涂于纤维毡表面后干燥,形成所述功能性涂层。

[0055] 在本发明中,所述抗菌剂和生长因子的质量比优选为1:0.1~1:10。

[0056] 在本发明中,所述溶剂优选为去离子水或有机溶剂,所述有机溶剂优选为乙酸、乙酸丁酯或丙酮。

[0057] 在本发明中,所述抗菌剂和生长因子的总质量与溶剂的质量比优选为1:100~1:1000。

[0058] 在本发明中,所述干燥的温度优选为50℃,时间优选为0.5~1小时,所述干燥的作用是使所述溶剂挥发。

[0059] 在本发明中,所述纤维毡成型优选包括以下步骤:

[0060] 当所述纤维结构高分子粘接剂优选包括聚乙烯醇或聚乳酸时,即所述纤维结构高分子粘接剂优选为常温固态粘接剂时,优选采用机械混合法,将所述纤维功能化处理所得功能化纤维和粘接剂混合,使所述常温固态粘接剂均匀分布在功能化纤维表面,优选按照常温固态粘接剂的熔融、固化温度,加热至60~230℃,使所述功能化纤维与常温固态粘接剂结合,形成稳定纤维毡(适用于短切纤维与连续纤维)。

[0061] 在本发明中,所述功能化纤维和粘接剂的质量比优选为1:0.01~1:0.1。

[0062] 当所述纤维结构高分子粘接剂优选聚乙二醇或聚乙烯醇时,即所述纤维结构高分子粘接剂优选为常温液态粘接剂或可常温溶于水或有机溶剂的粘接剂时,优选采用液体喷涂法,将所述粘接剂与去离子水或有机溶剂优选按照质量比1:10~1:100混合,然后匀速搅拌1~5小时,使所述粘接剂均匀分散形成溶液,通过表面喷涂工艺将所述溶液喷涂至所述纤维功能化处理所得功能化纤维的表面,然后置于60~80℃烘箱干燥1~2小时,形成稳定纤维毡(适用于短切纤维与连续纤维)。

[0063] 当所述纤维结构高分子粘接剂优选聚乙二醇时,优选采用纤维织物浸渍法;将粘接剂与去离子水或有机溶剂按照质量比1:10~1:100混合,通过匀速搅拌1~5小时形成均质混合溶液。然后将所述连续纤维浸渍在所述混合溶液浸润0.1~0.5小时,再取出置于60~80℃烘箱干燥1~3小时,形成稳定纤维毡(适用于连续纤维)。

[0064] 当所述生物相容基体优选为合成高分子材料时,所述制备方法优选包含以下步骤:

[0065] 基体预成型体制备:将所述合成高分子材料(聚醚醚酮、聚醚酮酮、尼龙、聚乳酸、聚己内酯)在熔融温度120~400℃下加热,采用模压成型技术,置于压片机中保温5~20min后,采用0.1~1MPa的压力热压成0.2~1mm厚度的高分子片材,然后依据标准软骨植入物预成型模具尺寸裁剪;

[0066] 植入物预成型体制备:依次将所述稳定纤维毡与所述高分子片材交替堆叠,置于热压机的模具中,根据熔融成型温度进行加热,并在1~10MPa的压力下成型。

[0067] 当所述生物相容基体优选为水凝胶高分子材料时,所述制备方法优选包含以下步骤:

[0068] 水凝胶前驱液配置:将所述水凝胶高分子材料以质量比1:10~1:5与去离子水均匀混合,在60~90℃水浴内磁力搅拌0.5~2小时,然后在50~70℃的真空箱内真空去除气泡,形成均质无泡低粘度水凝胶前驱液;

[0069] 植入物预成型体制备:基于树脂传递模塑(RTM)技术,选用裁切好的所述稳定纤维

毡,在RTM模具内堆叠,接上导管,匀速向模具内注入所述均质无泡低粘度水凝胶前驱液,在所述均质无泡低粘度水凝胶前驱液完全浸润所述稳定纤维毡后,将模具放入冰箱中;依照冷冻-解冻法,在-20℃环境中冷冻交联6~12小时,然后在4℃环境解冻6~12小时,以此循环3~6次,然后得到所述人工软骨植入物预成型体。

[0070] 定制化3D打印成型法

[0071] 在本发明中,所述定制化3D打印成型法包含四种不同成型工艺,具体方案如下:

[0072] 1、短切纤维/合成高分子材料构成的所述人工软骨植入物预成型体的定制化成型

[0073] a. 短切纤维/合成高分子丝材制备:

[0074] 混合分散:将短切可降解纤维依照所述纤维预成型进行表面功能化处理,然后置于已加热至120~400℃的密炼机中,填入所述合成高分子材料并保温10~30分钟后,以20~60rpm的转子速度搅拌5~30分钟后取出获得短切纤维/高分子母料。

[0075] 丝材成型:将所述母料打碎至尺寸不大于5mm的粒料后,添入单螺杆挤出机,螺杆转速设为30~80rpm,挤出区温度范围为150~380℃,母料经过直径1.8~3.0mm孔径模口形成丝材并在收卷机上以10~100rpm的速率匀速收卷。

[0076] b. 定制化成型:

[0077] 3D设计:通过计算机三维软件,依照软骨缺损病灶部位形貌,设计人工软骨植入物3D模型。

[0078] 定制化成型:采用FDM熔融沉积式打印策略,通过三维切片软件设计3D打印路径,设计打印温度为180~410℃、打印速率为0.5~5mm/s、单层切片厚度范围0.1~0.6mm,完成3D打印制备。

[0079] 2、短切纤维/水凝胶高分子材料构成的所述人工软骨植入物预成型体的定制化成型

[0080] a. 短切纤维/水凝胶前驱体制备:

[0081] 水凝胶前驱液配置:将短切可降解纤维依照所述纤维预成型进行表面功能化处理,依照前述方案制备水凝胶前驱液。

[0082] 纤维/水凝胶混合前驱液:将所述短切纤维与水凝胶前驱液混合,通过500~2000rpm搅拌分散后,置于50~70℃的真空箱内真空去除气泡,形成短切纤维/水凝胶混合前驱液。

[0083] 预交联处理:为提升前驱液黏度并具备剪切增稀效果,实现水凝胶基体低粘度挤出、高粘度直写成型,将纤维/水凝胶混合前驱液置于-4℃环境中1~6小时,形成剪切增稀特性水凝胶前驱液。

[0084] b. 定制化成型:

[0085] 3D打印挤出装备设计:针对FDM熔融沉积打印装备,采用水凝胶挤出机构代替传统丝材熔融堆积机构,采用注射器式挤出装置储存预交联前驱液,其液腔容积为25~50mL,挤出孔径为0.2~1mm,通过电机控制其挤出速率。

[0086] 3D设计:通过计算机三维软件,依照软骨缺损病灶部位形貌,设计人工软骨植入物3D模型。

[0087] 水凝胶直写挤出成型:通过三维切片软件设计3D打印路径,前驱液挤出速率为0.2~3mm/s,打印速率为0.5~5mm/s,层厚控制为0.2~1mm。



- [0088] 3、连续纤维/合成高分子材料构成的所述人工软骨植入物预成型体的定制化成型
- [0089] a. 连续纤维/高分子丝材制备:
- [0090] 连续纤维表面处理:将所述抗菌剂、生长因子以1:0.1~1:10的质量比均匀分散于去离子水或生物溶剂形成分散液,并置于纤维浸渍槽中;所述连续纤维以0.5~5米/分钟速率通过浸渍槽,并通过50℃热风干燥挥发水分,功能涂层在纤维表面厚度为10~200nm。
- [0091] 高分子熔融:将所述合成高分子材料添入双螺杆挤出机,螺杆转速设为20~50rpm,温度区间范围为120~360℃,高分子粒料经过螺杆完全熔融呈高分子熔体,通过螺杆挤出送入纤维浸渍模腔。
- [0092] 丝材成型:所述连续纤维穿入浸渍模腔后,与所述高分子熔体充分接触浸渍,在收卷机牵引下从直径为1.8~3mm的模口穿出,丝材直径控制为1.7~2.9mm。
- [0093] b. 定制化成型:
- [0094] 3D设计:通过计算机三维软件,依照软骨缺损病灶部位形貌,设计人工软骨植入物3D模型。
- [0095] 路径规划:采用FDM熔融沉积式打印策略,通过三维切片软件设计3D打印路径,考虑连续纤维铺放模式,设计单向0°、0°/90°交错、0°/45°交错、0°/45°/90°等多种铺放形态。
- [0096] 3D打印成型:根据所述合成高分子材料的熔融温度参数,设计打印温度为180~410℃、打印速率为0.3~3mm/s、单层切片厚度为0.5~2mm。
- [0097] 4、连续纤维/水凝胶高分子材料构成的所述人工软骨植入物预成型体的定制化成型
- [0098] a. 连续纤维/水凝胶浸润挤出成型:
- [0099] 连续纤维表面处理:将连续纤维依照所述纤维预成型进行表面功能化处理。
- [0100] 水凝胶前驱液配置:依照前述方案制备水凝胶前驱液。
- [0101] 水凝胶预交联:依照前述预交联处理进行水凝胶预交联。
- [0102] 纤维浸渍与丝材成型:将水凝胶置于浸渍模腔,连续纤维以1~5米/分钟的速率穿过预交联水凝胶充分浸渍,在牵引辊牵引下从孔径为1.5~3mm模口穿出;与此同时,为实现水凝胶与纤维同步穿出,对水凝胶施加0.1~0.5MPa空气压强,水凝胶在空气压力与纤维牵引摩擦双重推动下与连续纤维从模口同步穿出,形成连续纤维/水凝胶复合丝材;丝材中连续纤维含量可通过调控纤维束单丝数量调整。
- [0103] b. 预成型体定制化成型
- [0104] 3D设计:通过计算机三维软件,依照软骨缺损病灶部位形貌,设计人工软骨植入物3D模型。
- [0105] 路径规划:采用FDM熔融沉积式打印策略,通过三维切片软件设计3D打印路径,考虑连续纤维铺放模式,设计单向0°、0°/90°交错、0°/45°交错、0°/45°/90°等多种铺放形态。
- [0106] 铺放装置:在常温、低温环境下(-4~20℃),通过牵引辊引出丝材。
- [0107] 3D打印成型:丝材随路径设计在目标位置铺放,移动速率为0.3~3mm/s,打印厚度范围为0.5~1mm。
- [0108] 本发明还提供了上述技术方案所述的人工软骨植入物预成型体在制备人工软骨植入物材料中的应用。
- [0109] 现有软骨修复替代植入物主要通过非自体的零维纳米颗粒或一维纤维作为增强

结构,虽可有效提升植入物结构性能或通过结构仿生设计达到一定的生物力学效果,但与实际人体软骨生物结构力学特性差别较大。本发明提出的人工软骨植入物为自体胶原纤维原位构建的纤维增强植入物,实现“仿生”向“类生”的跨越。

[0110] 本发明通过预成型体构建植入物初始形态,采用可降解纤维的降解诱导作用,实现自体软骨细胞沿孔道繁殖分化,逐步替换可降解纤维填充孔道空间,并分化为软骨胶原纤维,实现自体软骨纤维原位构建,形成类生人工软骨植入物。

[0111] 本发明还提供了一种类生人工软骨植入物胶原纤维原位构建方法,包括以下步骤:

[0112] 将自体软骨组织用PBS溶液进行预处理,然后用胰蛋白酶-EDTA处理,待大部分细胞游离时,得到原代软骨细胞;

[0113] 将所述原代软骨细胞附在人工软骨植入物预成型体周围,进行胶原纤维原位培养,形成所述人工软骨植入物胶原纤维,所述人工软骨植入物预成型体为上述技术方案所述的人工软骨植入物预成型体。

[0114] 在本发明中,所述人工软骨植入物胶原纤维原位成型方法优选包括:植入物预成型体培养、自体软骨细胞植入和软骨胶原纤维构建。

[0115] 在本发明中,所述植入物预成型体培养优选包括以下步骤:

[0116] 1. 培养液准备:

[0117] 在本发明中,使用软骨细胞培养液,所述软骨细胞培养液优选以pH为7.0~7.6的PBS缓冲液为基本溶液,优选包括以下浓度的组分:氨基葡萄糖0.1~0.3g/mL、脯氨酸0.8~2.0g/mL、丙酮酸钠0.5~2.5g/mL、维生素E1.2~4.0g/mL、维生素C 0.3~3.0g/mL以及胎牛血清,所述胎牛血清(DMEM)的质量浓度优选为1~10%。

[0118] 在本发明中,所述软骨细胞培养液优选还包括转化生长因子- $\beta$ 、BMP骨形态发生蛋白和、IGF类胰岛素生长因子,所述软骨细胞培养液中转化生长因子- $\beta$ 的浓度优选为0.5~5  $\mu$ g/mL,BMP骨形态发生蛋白的浓度优选为0.01~0.1ng/mL,IGF类胰岛素生长因子的浓度优选为10~20 $\mu$ g/mL。

[0119] 在本发明中,所述IGF类胰岛素生长因子、BMP骨形态发生蛋白和转化生长因子- $\beta$ 均具备刺激诱导软骨细胞分化增殖的功能。

[0120] 2自体软骨细胞体外培养

[0121] 软骨预处理:自体软骨组织进行剪碎,剪碎至面积为0.5~2mm<sup>3</sup>,用PBS溶液进行预处理,所述PBS溶液包含抗生素,所述PBS溶液中抗生素浓度优选为50~200U/mL,所述抗生素包括青霉素和/或链霉素。

[0122] 原代细胞培养:预处理后软骨组织用质量浓度0.01~0.25%胰蛋白酶-EDTA处理,待大部分细胞游离时,过细胞筛网过滤,游离细胞收集后重新培养3~5天,得到原代软骨细胞。

[0123] 在本发明中,所述自体软骨细胞植入和软骨胶原纤维构建优选包括以下步骤:

[0124] 人工软骨植入物成型

[0125] 预成型体预处理

[0126] 在完成培养基配置后,将所述人工软骨植入物预成型体经紫外消毒处理后置入培养液中,预浸渍12~24小时后,清洗预成型并更换培养液以去除材料表面降解杂质,准备自

体软骨细胞植入。

[0127] 软骨细胞植入

[0128] 原代软骨细胞浓度优选为 $2.0 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^5$ /mL。

[0129] 所述原代软骨细胞在离心管中通过1500rpm离心1~3次,每次离心时间3~10min。

[0130] 所述原代软骨细胞,离心后置换培养液并重悬。

[0131] 所述原代软骨细胞,在重悬后通过移液枪小心滴入0.75mL细胞液至12孔细胞培养板中,让所述原代软骨细胞附在经过预处理的预成型体的周围,细胞数量与预成型体表面积比为 $1.5 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^3 : 1\text{mm}^2$ 。

[0132] 软骨胶原纤维原位构建

[0133] 所述预处理的预成型体表面原代软骨细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>环境培养箱中培养;第2天,换培养液,去除未成功附着或死亡细胞;第4日,换培养液,随机筛选植入物清洗后计算附着细胞数量,并观察纤维降解、孔道中细胞附着、生长、分化情况。

[0134] 所述预处理的预成型体表面原代软骨细胞在第5日起,每隔2~3日换培养液一次,每隔4~5日取样进行细胞数量检测,并观察纤维降解、孔道中细胞附着、生长、分化情况。

[0135] 所述预处理的预成型体表面原代软骨细胞,在第28日起,观察纤维是否完全降解,确定基体中形成微纳基孔道,软骨原代细胞附着孔道内壁并繁殖多代形成软骨细胞簇填充孔道。

[0136] 所述软骨细胞簇,在培养液中生长因子以及可降解纤维降解后缓释产物的刺激下,分化为成熟软骨细胞,并形成细胞外基质(ECM),交联汇聚形成胶原纤维。

[0137] 所述胶原纤维,在基体微纳基孔道引导下,为近程无序交织、远程有序取向的独特结构,给予人工软骨植入物类生的纤维结构与生物活性特征。

[0138] 所述人工软骨植入物在胶原纤维形成并充分填充微纳级孔道,交联形成宏观胶原纤维增强人工软骨植入物。

[0139] 在本发明中,所述人工软骨植入物成型的过程中的培养液优选为与所述软骨细胞培养液一致。

[0140] 图1为本发明制备人工软骨植入物的流程图。

[0141] 图2为本发明人工软骨植入物胶原纤维原位成型的原理图,其中(A)为植入物预成型体成型截面示意图,(B)为纤维降解与自体软骨细胞诱导长入,(C)为自体软骨细胞长入孔道并分化,(D)为自体软骨纤维增强植入物构建,①为生物相容基体,②为可降解纤维,③为纤维降解并引导细胞长入,④为自体软骨细胞在孔道中分化,⑤为自体软骨胶原纤维结构在孔道中形成可降解纤维增强植入物预成型体在体外自体细胞植入培养过程中与纤维发生“动态替换”过程,软骨细胞在孔道中分化形成软骨组织并依托孔道取向形成胶原纤维结构。

[0142] 为了进一步说明本发明,下面结合实例对本发明提供的人工软骨植入物预成型体及其制备方法和应用、人工软骨植入物胶原纤维原位成型方法进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0143] 实施例1

[0144] a. 主体材料:短切磷酸盐玻璃纤维、医用尼龙

[0145] b. 预成型体模具成型制备:

[0146] ①取长度为0.5mm的磷酸盐玻璃纤维,随机平铺在平板

[0147] ②将IGF类胰岛素生长因子、庆大霉素以质量比1:1的比例配置,再分散于去离子水中形成分散液后均匀喷涂于纤维毡表面,IGF类胰岛素生长因子与庆大霉素的总质量与去离子水的质量比为1:1000,然后置于50℃烘箱干燥0.5小时直至溶剂挥发。功能涂层在纤维表面厚度为50nm,质量比占纤维毡0.2%。

[0148] ③将聚乙烯醇与去离子水按照质量比1:50混合,匀速搅拌1小时,使粘接剂均匀分散形成溶液。通过表面喷涂工艺将混合液喷涂至纤维表面,并置于60℃烘箱干燥1小时,得到结构稳定的纤维毡。

[0149] ④将尼龙材料粒料,取适量在压片机中,采用220℃保温10分钟后,通过0.2MPa的压力热压成0.2mm厚度的片材,依据标准软骨植入物预成型模具尺寸裁剪。

[0150] ⑤依次将短切PGF纤维与尼龙片材交替堆叠,设计纤维体积含量为50%,置于模具中通过热压成型技术,在220℃下通过5MPa压力模压成型

[0151] ⑥预成型中纤维体积含量为50%。

[0152] c. 培养液配置:

[0153] ①以PBS缓冲液为基本溶液,取胎牛血清DMEM配置细胞培养液,最终培养液中胎牛血的质量浓度为5%。

[0154] ②其余营养成分配料包括:0.1g/mL氨基葡萄糖、1.0g/mL脯氨酸、1.0g/mL丙酮酸钠、2.0g/mL维生素E、1.0g/mL维生素C、1μg/mL转化生长因子- $\beta$ 、0.05ng/mL BMP骨形态发生蛋白、20μg/mL IGF类胰岛素生长因子。

[0155] d. 自体软骨细胞培养:

[0156] ①取自体软骨组织并切至1mm<sup>3</sup>大小,用PBS溶液清洗,其中包含青霉素浓度为50U/mL。

[0157] ②用浓度0.1wt%胰蛋白酶-EDTA处理,过细胞筛网过滤收集,重新培养3天得到原代软骨细胞。

[0158] e. 胶原纤维原位成型:

[0159] ①预成型体进行紫外消毒处理后置入培养液,预浸渍12小时并清洗预成型。

[0160] ②原代细胞通过0.2wt%胰蛋白酶-EDTA处理分离呈游离态细胞,控制细胞浓度范围 $3.0 \times 10^5$ /mL,通过1次5分钟的1500rpm高速离心,重悬后用移液枪小心滴入培养液中的预成型体。

[0161] ③将预成型体置于37℃、5%CO<sub>2</sub>环境培养箱中培养,每隔2日换培养液一次,每隔4日取样进行细胞数量检测,并观察纤维降解、孔道中细胞附着、生长、分化情况。

[0162] ④在第28日后观察纤维降解情况,待纤维完全降解且细胞外ECM形成胶原纤维形态交联后可取出,成型人工软骨植入物。

[0163] 图3为人工软骨植入物的SEM谱图,其中①为孔道内壁,②为骨细胞附着分化,说明人工软骨植入物中可降解纤维降解后,骨细胞在孔道内壁发生了附着繁殖分化。

[0164] 实施例2

[0165] a. 主体材料:短切磷酸盐玻璃纤维、医用聚醚醚酮

[0166] b. 预成型体定制化成型制备:

[0167] ①短切磷酸盐玻璃纤维平铺于平板。同实施例1,将IGF类胰岛素生长因子与庆大

霉素同实施例1配置,喷涂于纤维表面。

[0168] ②短切纤维置于已加热至360℃的密炼机中与聚醚醚酮粒料混合保温15分钟,再以60rpm的转子速度搅拌15分钟后取出,获得短切磷酸盐玻璃纤维/聚醚醚酮母料。

[0169] ③将母料打碎至4mm大小的粒料,通过单螺杆挤出机在50rpm转速、360℃温度区间内挤出,母料经过直径2mm孔径模口形成1.75mm丝材并在收卷机上匀速收卷。

[0170] ④通过计算机三维软件,依照软骨缺损病灶部位形貌设计人工软骨植入物3D模型。

[0171] ⑤采用FDM熔融沉积式打印方式,通过三维切片软件设计3D打印路径,打印条件包括:打印温度为380℃,打印速率为3mm/s,单层切片厚度为0.2mm。完成预成型体3D打印制备。

[0172] ⑥预成型中纤维体积含量为50%。

[0173] c. 培养液配置:同实施例1-c

[0174] d. 自体软骨细胞培养:同实施例1-d

[0175] e. 胶原纤维原位成型:同实施例1-e

[0176] 实施例3

[0177] a. 主体材料:短切磷酸盐玻璃纤维、PVA水凝胶

[0178] b. 预成型体模具成型制备:

[0179] ①取长度为0.5mm的磷酸盐玻璃纤维,随机平铺在平板。

[0180] ②将IGF类胰岛素生长因子、头孢菌素以质量比1:1的比例配置,再按照IGF类胰岛素生长因子和头孢菌素的总质量与去离子水的质量比1:500均匀混合分散,形成分散液后均匀喷涂于纤维毡表面,并置于50℃烘箱干燥0.5小时直至溶剂挥发。其功能涂层在纤维表面厚度为60nm,质量比占纤维毡0.3%。

[0181] ③将聚乙烯醇与去离子水按照质量比1:50混合,匀速搅拌1小时,使粘接剂均匀分散形成溶液。通过表面喷涂工艺将混合液喷涂至纤维表面,并置于60℃烘箱干燥1小时,得到结构稳定的纤维毡。

[0182] ④将聚乙烯醇粒料以1:10的质量比例与去离子水均匀混合,在90℃水浴内磁力搅拌1小时,然后在60℃的真空箱内真空去除气泡,形成均质无泡低粘度水凝胶前驱液。

[0183] ⑤将裁切好的短切可降解纤维毡置于模具内堆叠,接上导管匀速向模具内注入水凝胶前驱液,在完全浸润纤维后,将模具放入冰箱中;在-20℃环境中冷冻12小时,然后在4℃环境解冻12小时,以此循环3次,形成人工软骨植入物预成型体。

[0184] ⑥预成型中纤维体积含量为50%。

[0185] c. 培养液配置:

[0186] ①以PBS缓冲液为基本溶液,取胎牛血清DMEM配置细胞培养液,最终培养液中胎牛血的质量浓度为5%。

[0187] ②其余营养功能配料包括:0.2g/mL氨基葡萄糖、1.3g/mL脯氨酸、1.0g/mL丙酮酸钠、3.0g/mL维生素E、2.0g/mL维生素C、1μg/mL转化生长因子- $\beta$ 、0.05ng/mL BMP骨形态发生蛋白、20μg/mL IGF类胰岛素生长因子。

[0188] d. 自体软骨细胞培养:同实施例1-d

[0189] e. 胶原纤维原位成型:

- [0190] ①预成型体进行紫外消毒处理后置入培养液,预浸渍24小时并清洗预成型。
- [0191] ②原代细胞通过0.2wt%胰蛋白酶-EDTA处理分离呈游离态细胞,控制细胞浓度范围 $4 \times 10^5$ /mL,通过1次5分钟的1500rpm高速离心,重悬后用移液枪小心滴入培养液中的预成型体表面让细胞附着。
- [0192] ③将预成型体置于37°C、5%CO<sub>2</sub>环境培养箱中培养,在第2日与第4日分别更换培养液去除死亡与为附着细胞,然后每隔3日换培养液一次,每隔5日取样进行细胞数量检测,并观察纤维降解、孔道中细胞附着、生长、分化情况。
- [0193] ④在第28日后观察纤维降解情况,待纤维完全降解且细胞外ECM形成胶原纤维形态交联后可取出,成型人工软骨植入物。
- [0194] 实施例4
- [0195] a. 主体材料:短切磷酸盐玻璃纤维、PVA水凝胶
- [0196] b. 预成型体定制化成型材料准备:
- [0197] ①取长度为1mm的磷酸盐玻璃纤维。
- [0198] ②将IGF类胰岛素生长因子、头孢菌素以质量比1:1的比例配置,再按照IGF类胰岛素生长因子和头孢菌素的总质量与去离子水的质量比1:500均匀分散于去离子水,形成分散液后均匀喷涂于纤维毡表面,并置于50°C烘箱干燥1小时直至溶剂挥发,其功能涂层在纤维表面厚度约为60nm,质量比占纤维毡0.3%。
- [0199] ③将聚乙烯醇粒料以1:10的质量比例与去离子水均匀混合,在90°C水浴内磁力搅拌1小时,然后在60°C的真空箱内真空去除气泡,形成均质无泡低粘度水凝胶前驱液。
- [0200] ④将纤维与PVA水凝胶前驱液混合,通过1000rpm高速搅拌分散后,置于60°C的真空箱内真空去除气泡,形成纤维/水凝胶混合前驱液。
- [0201] ⑤将纤维/水凝胶混合前驱液置于-4°C环境中6小时,形成剪切增稀特性水凝胶前驱液。
- [0202] c. 定制化成型:
- [0203] ①基于FDM熔融沉积打印装备,采用注射器式挤出装置储存预交联前驱液,其液腔容积为25mL,挤出孔径为0.8mm,通过电机控制其挤出速率。
- [0204] ②通过计算机三维软件,依照软骨缺损病灶部位形貌,设计人工软骨植入物3D模型。
- [0205] ③通过三维切片软件设计3D打印路径,控制挤出装置挤出速率为1mm/s,打印速率为1mm/s,层厚控制为0.5mm。
- [0206] ④预成型中纤维体积含量为50%。
- [0207] d. 培养液配置:同实施例3-c。
- [0208] e. 自体软骨细胞培养:同实施例1-d。
- [0209] f. 胶原纤维原位成型:同实施例3-e。
- [0210] 实施例5
- [0211] a. 主体材料:连续磷酸盐玻璃纤维、医用尼龙
- [0212] b. 预成型体模具成型制备:
- [0213] ①取连续磷酸盐玻璃纤维平纹织物。
- [0214] ②将IGF类胰岛素生长因子、头孢菌素以质量比1:1的比例配置,再按照IGF类胰岛

素生长因子和头孢菌素的总质量与去离子水的质量比1:1000均匀分散于去离子水,形成分散液后均匀喷涂于纤维毡表面,并置于50℃烘箱干燥0.5小时直至溶剂挥发。其功能涂层在纤维表面厚度为50nm,质量比占纤维毡0.2%。

[0215] ③将尼龙与三氯甲烷以质量比1:50比例混合,使其充分分散,通过匀速搅拌5小时形成均质混合溶液,然后将连续纤维织物浸渍在溶液充分浸润0.1小时,再取出置于80℃烘箱干燥1小时,形成片状稳定纤维毡。

[0216] ④将尼龙材料粒料,取适量在压片机中,采用220℃保温10分钟后,通过0.2MPa的压力热压成0.2mm厚度的片材,依据标准软骨植入物预成型模具尺寸裁剪。

[0217] ⑤依次将短切PGF纤维与尼龙片材交替堆叠,设计纤维体积含量为50%,置于模具中通过热压成型技术,在220℃下通过5MPa压力模压成型。

[0218] ⑥预成型中纤维体积含量为50%。

[0219] c. 培养液配置:

[0220] ①以PBS缓冲液为基本溶液,取胎牛血清DMEM配置细胞培养液,最终培养液中胎牛血的质量浓度为5%。

[0221] ②其余营养成分配料包括:0.2g/mL氨基葡萄糖、1.5g/mL脯氨酸、1.0g/mL丙酮酸钠、3.0g/mL维生素E、3.0g/mL维生素C、3μg/ml转化生长因子- $\beta$ 、0.1ng/mL BMP骨形态发生蛋白、20μg/mL IGF类胰岛素生长因子。

[0222] d. 自体软骨细胞培养:同实施例1-d

[0223] e. 胶原纤维原位成型:

[0224] ①预成型体进行紫外消毒处理后置入培养液,预浸渍24小时并清洗预成型。

[0225] ②原代细胞通过0.2wt%胰蛋白酶-EDTA处理分离呈游离态细胞,控制细胞浓度范围 $3.5 \times 10^5$ /mL,通过1次10分钟的1500rpm高速离心,重悬后用移液枪小心滴入培养液中的预成型体表面让细胞附着。

[0226] ③将预成型体置于37℃、5%CO<sub>2</sub>环境培养箱中培养,在第2日与第4日分别更换培养液去除死亡与为附着细胞,然后每隔3日换培养液一次,每隔5日取样进行细胞数量检测,并观察纤维降解、孔道中细胞附着、生长、分化情况。

[0227] ④在第42日后观察纤维降解情况,待纤维完全降解且细胞外ECM形成胶原纤维形态交联后可取出,成型人工软骨植入物。

[0228] 实施例6

[0229] a. 主体材料:连续磷酸盐玻璃纤维、医用尼龙

[0230] b. 预成型体定制化成型材料制备:

[0231] ①取连续磷酸盐玻璃纤维纱线。

[0232] ②将头孢菌素与BMP骨形态发生蛋白以质量比1:1的比例配置,再按照头孢菌素与BMP骨形态发生蛋白的总质量与去离子水的质量比1:500均匀分散于去离子水,在纤维浸渍槽中以1米/分钟速率通过浸渍槽,并通过50℃热风干燥挥发水分,功能涂层在纤维表面厚度为50nm,质量比占纤维毡0.1%。

[0233] ③将医用尼龙粒料添入双螺杆挤出机,在40rpm的转速下,温度区间范围为240℃,高分子粒料经过螺杆完全熔融呈高粘度熔体,通过螺杆挤出送入纤维浸渍模腔。

[0234] ④连续纤维穿入浸渍模腔后,与高分子熔体充分接触浸渍,在收卷机牵引下从直

径为1.8mm的模口穿出,丝材直径控制在1.7mm,连续纤维体积含量为50%。

[0235] c. 预成型体定制化成型:

[0236] ①通过计算机三维软件,依照软骨缺损病灶部位形貌,设计人工软骨植入物3D模型。

[0237] ②采用FDM熔融沉积式打印策略,通过三维切片软件设计3D打印路径,考虑连续纤维铺放模式,设计单向0°/90°交错铺放形态,设计打印温度为220℃、打印速率为1mm/s、单层切片厚度为0.5mm。

[0238] ③预成型体纤维体积含量为50%

[0239] d. 培养液配置:同实施例5-c。

[0240] e. 自体软骨细胞培养:同实施例1-d。

[0241] f. 胶原纤维原位成型:同实施例5-e。

[0242] 实施例7

[0243] a. 主体材料:连续磷酸盐玻璃纤维、PVA水凝胶

[0244] b. 预成型体模具成型制备:

[0245] ①取连续磷酸盐玻璃纤维平纹织物。

[0246] ②将头孢菌素、转化生长因子-p以质量比1:2的比例配置,再按照头孢菌素与转化生长因子-p的总质量与去离子水的质量比1:1000分散于去离子水,形成分散液后均匀喷涂于纤维毡表面,并置于50℃烘箱干燥1小时直至溶剂挥发;其功能涂层在纤维表面厚度为100nm,质量比占纤维毡1%。

[0247] ③将PVA聚乙烯醇粒料与去离子水按照质量比1:50混合,使其充分分散,通过匀速搅拌1小时形成均质混合溶液,然后将连续纤维织物浸渍在溶液充分浸润0.2小时,再取出置于60℃烘箱干燥1小时,形成稳定纤维毡。

[0248] ④将PVA聚乙烯醇粒料以质量比1:10的比例与去离子水均匀混合,在90℃水浴内磁力搅拌0.5小时,然后在60℃的真空箱内真空去除气泡,形成均质无泡低粘度水凝胶前驱液。

[0249] ⑤基于树脂传递模塑(RTM)技术,将裁切好的连续可降解纤维毡在RTM模具内堆叠,通过导管匀速向模具内注入水凝胶前驱液,在前驱液完全浸润织物后,将模具放入冰箱中。

[0250] ⑥依照冷冻-解冻法,在-20℃环境中冷冻交联6小时,然后在4℃环境解冻6小时,以此循环3次,然后取出人工软骨植入物预成型体。

[0251] ⑦预成型体纤维体积含量为50%。

[0252] c. 培养液配置:

[0253] ①以PBS缓冲液为基本溶液,取胎牛血清DMEM配置细胞培养液,最终培养液中胎牛血的质量浓度为5%。

[0254] ②其余营养功能配料包括:0.2g/mL氨基葡萄糖、1.5g/mL脯氨酸、1.0g/mL丙酮酸钠、3.0g/mL维生素E、3.0g/mL维生素C、3μg/mL转化生长因子-p、0.1ng/mL BMP骨形态发生蛋白、20μg/mL IGF类胰岛素生长因子。

[0255] d. 自体软骨细胞培养:同实施例1-d。

[0256] e. 胶原纤维原位成型:



[0257] ①预成型体进行紫外消毒处理后置入培养液,预浸渍24小时并清洗预成型。

[0258] ②原代细胞通过0.2%胰蛋白酶-EDTA处理分离呈游离态细胞,控制细胞浓度范围 $4 \times 10^5$ /mL,通过1次10分钟的1500rpm高速离心,重悬后用移液枪小心滴入培养液中的预成型体表面让细胞附着。

[0259] ③将预成型体置于37℃、5%CO<sub>2</sub>环境培养箱中培养,在第2日与第4日分别更换培养液去除死亡与为附着细胞,然后每隔3日换培养液一次,每隔5日取样进行细胞数量检测,并观察纤维降解、孔道中细胞附着、生长、分化情况。

[0260] ④在第42日后观察纤维降解情况,待纤维完全降解且细胞外ECM形成胶原纤维形态交联后可取出,成型人工软骨植入物。

[0261] 实施例8

[0262] a. 主体材料:连续磷酸盐玻璃纤维、PVA水凝胶

[0263] b. 预成型体模定制化成型材料制备:

[0264] ①将头孢菌素、转化生长因子-p以质量比1:2的比例配置,再按照头孢菌素与转化生长因子-p的总质量与去离子水的质量比1:1000分散于去离子水,形成分散液后均匀喷涂于纤维毡表面,并置于50℃烘箱干燥1小时直至溶剂挥发;其功能涂层在纤维表面厚度为100nm,质量比占纤维毡1%。

[0265] ②将PVA聚乙烯醇粒料与去离子水按照质量比1:50混合,使其充分分散,通过匀速搅拌1小时形成均质混合溶液,然后将连续纤维织物浸渍在溶液充分浸润0.2小时,再取出置于60℃烘箱干燥1小时,形成稳定纤维毡。

[0266] ③将纤维/水凝胶混合前驱液置于-4℃环境中6小时,形成剪切增稀特性水凝胶前驱液。

[0267] ④将水凝胶置于浸渍模腔,连续纤维以1米/分钟的速率穿过预交联水凝胶充分浸渍,在牵引辊牵引下从孔径为1.8mm模口穿出;与此同时,对水凝胶施加0.2MPa空气压强,水凝胶在空气压力与纤维牵引摩擦双重推动下与连续纤维从模口同步穿出,形成连续纤维/水凝胶复合丝材。

[0268] ⑤丝材中连续纤维含量可通过调控纤维束单丝数量调整,纤维体积含量50%。

[0269] c. 预成型体定制化成型

[0270] ④通过计算机三维软件,依照软骨缺损病灶部位形貌,设计人工软骨植入物3D模型。

[0271] ①采用FDM熔融沉积式打印策略,通过三维切片软件设计3D打印路径,考虑连续纤维铺放模式,设计单向0°/90°交错铺放形态,

[0272] ②纤维铺放在低温环境下进行(-4℃),通过牵引辊引出丝材,移动速率为1mm/s,打印厚度为0.5mm。

[0273] ③预成型纤维体积含量为50%。

[0274] d. 培养液配置:同实施例7-c。

[0275] e. 自体软骨细胞培养:同实施例1-d。

[0276] 胶原纤维原位成型:同实施例7-e。

[0277] 对比例1

[0278] 与实施例1相同,区别仅在于不添加可降解纤维PGF(短切)。

[0279] 对比例2

[0280] 与实施例6相同,区别仅在于不添加可降解纤维PGF(连续)。

[0281] 对比例3

[0282] 与实施例3相同,区别仅在于不添加可降解纤维PGF(短切)。

[0283] 对实施例1~8以及对比例1~3的制备过程以及人工软骨植入物的性能进行测试,结果如表1所示。由表1可知,本发明以可降解纤维为软骨成型引导纤维、生物相容高分子为基体,复合构建仿生人工软骨植入物预成型体,通过自体软骨细胞植入与体外培养的方式,使可降解引导纤维发生体外降解并在高分子基体中形成微纳级孔道,纤维降解所释放的钙、镁、铁、磷酸根等活性离子可诱导自体软骨细胞向微纳孔道生长繁殖,分化构成胶原纤维结构,从而形成富含自体软骨胶原纤维结构的人工软骨植入物,实现人工软骨植入物从当前“仿生命材料”(仿生)阶段向“类生命材料”(类生)跨越。

[0284] 表1实施例1~8以及对比例1~3的制备过程以及人工软骨植入物的性能测试结果

实例例	预成型体			人工软骨植入物		
	可降解纤维	基体	成型方式	第28天细胞分化ALP(AU/ $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	第28天阿尔玛蓝活性	杨氏模量(MPa)
实施例 1	PGF(短切)	PA(高分子)	模具成型	0.18	910	3353.49
实施例 2	PGF(短切)	PEEK(高分子)	3D 打印	0.19	970	5343.33
实施例 3	PGF(短切)	PVA(水凝胶)	模具成型	0.21	1100	23.34
实施例 4	PGF(短切)	PVA(水凝胶)	3D 打印	0.20	1074	24.83
实施例 5	PGF(连续)	PA(高分子)	模具成型	0.18	984	9353.59
实施例 6	PGF(连续)	PEEK(高分子)	3D 打印	0.20	897	11543.42
实施例 7	PGF(连续)	PVA(水凝胶)	模具成型	0.21	994	79.57
实施例 8	PGF(连续)	PVA(水凝胶)	3D 打印	0.20	967	86.93
对比例 1	/	PA(高分子)	模具成型	0.10	440	1153.43
对比例 2	/	PEEK(高分子)	3D 打印	0.14	590	3659.28
对比例 3	/	PVA(水凝胶)	模具成型	0.13	540	0.65

[0287] 表1中:PGF为磷酸盐玻璃纤维,PEEK为医用聚醚醚酮,PA为医用尼龙,PVA为聚乙烯醇。

[0288] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,并非对本发明作任何形式上的限制。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若

干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

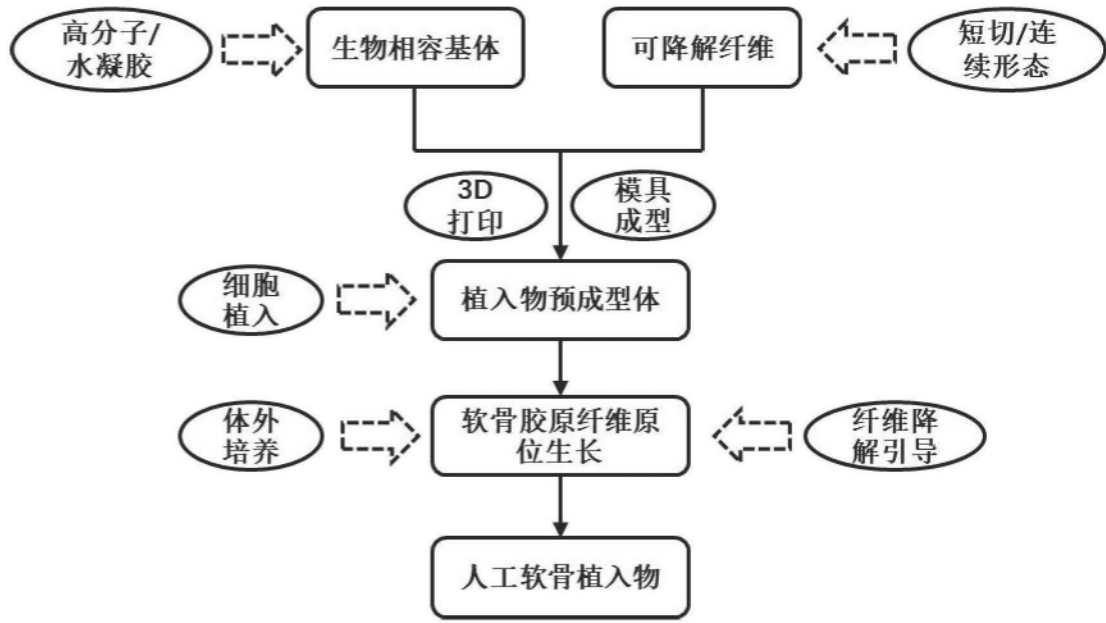


图1

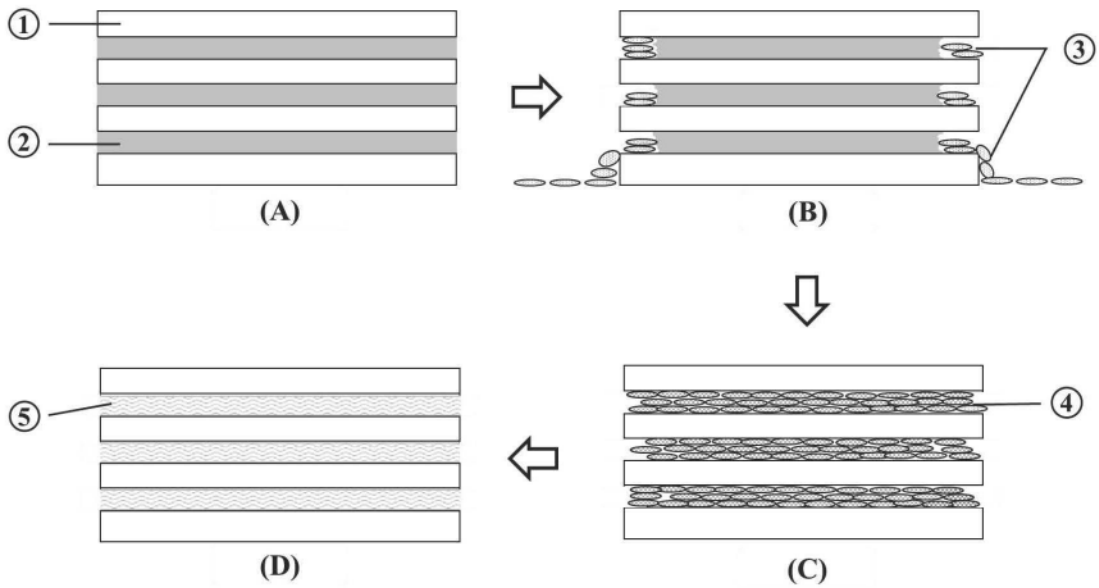


图2

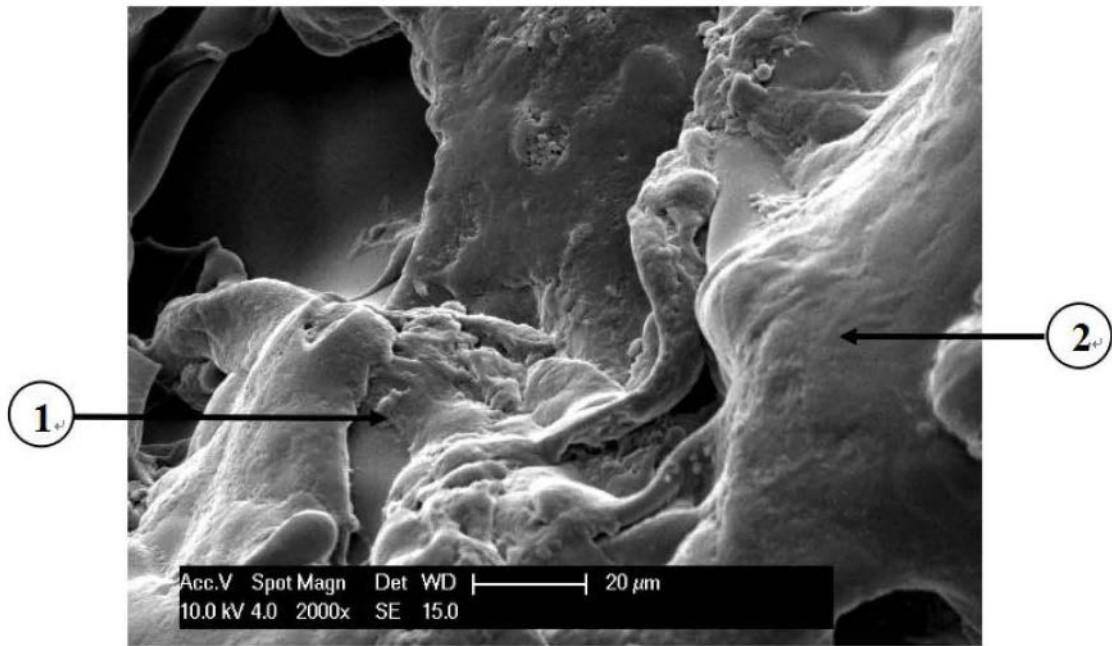


图3