



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113456886 A

(43)申请公布日 2021.10.01

(21)申请号 202010246314.5

C12N 15/87(2006.01)

(22)申请日 2020.03.31

(71)申请人 中国人民解放军第四军医大学  
地址 710032 陕西省西安市长乐西路169号

(72)发明人 牛丽娜 陈吉华 焦凯 沈敏娟  
马雨轩 闫舰飞 万千千 李婧

(74)专利代理机构 北京元合联合知识产权代理  
事务所(特殊普通合伙)  
11653

代理人 李非非

(51)Int.Cl.

A61L 27/12(2006.01)

A61L 27/24(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

A61L 27/54(2006.01)

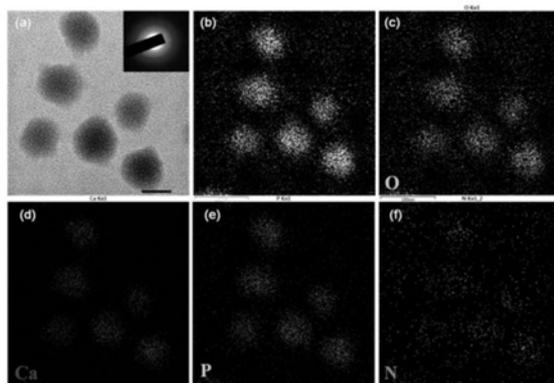
权利要求书2页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

核酸-磷酸钙纳米颗粒复合物及其在生物矿化中的应用

(57)摘要

本发明涉及核酸-磷酸钙纳米颗粒复合物及其在生物矿化中的应用。具体而言,本发明涉及一种生物矿化剂和其制备方法,所述矿化剂包含核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒形成的复合物。本发明还涉及包含所述生物矿化剂或用所述生物矿化剂处理的胶原纤维制品,例如用于植入患者的医疗器械。本发明还涉及所述生物矿化剂或者胶原纤维制品用于在患者中治疗骨相关疾病或病症或者改善骨况状的用途。本发明还涉及使用生物矿化剂诱导胶原纤维仿生矿化或制备矿化的胶原纤维制品的方法。



1. 一种生物矿化剂,其包含核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒形成的复合物,优选通过静电吸附形成。

2. 权利要求1的生物矿化剂,其中在所述复合物中,所述核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒通过以下方式来形成:

核酸的磷酸基团与纳米颗粒的钙离子之间的静电吸附,以及游离的磷酸根离子与吸附在核酸上的钙离子的进一步静电吸附。

3. 权利要求1-2中任一项的生物矿化剂,其通过核酸溶液、氯化钙溶液和磷酸氢二钾溶液混合形成。

4. 权利要求1-3中任一项的生物矿化剂,

其中钙离子的浓度为1-10mM,优选2-5mM,更优选1.67-3.5mM;其中磷酸根离子的浓度0.5-10mM,优选1-5mM,更优选1.0-2.1mM。

5. 权利要求1-4中任一项的生物矿化剂,

其中钙离子与磷酸根离子之比为10:1至1:5,优选5:1至1:3,优选3.5:1至1:1.25、更优选2:1至1:1,例如1.67:1。

6. 权利要求1-5中任一项的生物矿化剂,其中所述复合物的粒径为1-100nm,优选10-100nm,更优选20-100nm,例如40-60nm或60-100nm。

7. 权利要求1-6中任一项的生物矿化剂,其中所述核酸为DNA或RNA,例如分离自哺乳动物细胞的总DNA或总RNA或质粒DNA;或者所述核酸包含促进成骨分化和/或促进骨再生的核酸,例如miR-17-92、miR-26a或miR-148b或BMP2-质粒DNA等。

8. 权利要求1-7中任一项的生物矿化剂,其中所述哺乳动物细胞为骨祖细胞、前成骨细胞、骨细胞、骨原细胞、成骨细胞、破骨细胞或骨髓间充质干细胞。

9. 权利要求1-8中任一项的生物矿化剂,其中核酸的工作浓度为10-500ug/ml,优选工作浓度50-500ug/ml,更优选工作浓度100-300ug/ml,例如150-250ug/ml。

10. 权利要求1-9中任一项的生物矿化剂,其pH值为5.5-7,优选6.0-6.5。

11. 权利要求1-10中任一项的生物矿化剂,其为液体形式,例如溶液、胶体液;半固体形式,例如凝胶;或者固体形式,例如粉末或冻干粉。

12. 一种矿化的胶原纤维制品,其包含权利要求1-11中任一项的生物矿化剂,或者经过权利要求1-11中任一项的生物矿化剂处理。

13. 权利要求12的胶原纤维制品,其选自胶原支架、胶原膜、胶原纤维片、脱矿骨组织、脱矿牙本质切片、鼠尾、牙或骨修复材料、牙或骨支架材料、牙或骨的再生材料、或者牙或骨植入材料。

14. 权利要求1-11中任一项的生物矿化剂或者权利要求12-13中任一项的矿化的胶原纤维制品在制备用于在患者中治疗骨相关疾病或病症或者改善骨况状的药物或医疗器械中的用途。

15. 权利要求14的用途,所述药物或器械用于在患者中治疗骨缺损或骨丢失,或促进骨修复、骨分化或骨再生。

16. 权利要求1-10中任一项的生物矿化剂在制备用于在患者中使骨胶原纤维矿化的药物中的用途。

17. 一种用于制备权利要求1-11中任一项的生物矿化剂的方法,所述方法包括:

(1) 获得核酸, 优选从哺乳动物细胞中提取总DNA (包括各种类型的DNA) 或总RNA (包括各种类型的RNA) 或提取质粒DNA,

(2) 将从步骤(1)中获得核酸与氯化钙溶液混合,

(3) 向从步骤(2)中获得的混合物加入磷酸氢二钾溶液, 从而得到核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒形成的复合物。

18. 权利要求17的方法, 其中步骤(1)中获得的核酸起始浓度为100-5000ng/ $\mu$ l, 优选起始浓度500-5000ng/ $\mu$ l, 更优选起始浓度1000-3000ng/ $\mu$ l, 例如1500-2500ng/ $\mu$ l。其中核酸分子量范围较广, 优选核酸分子量大于40kDa。

19. 一种诱导胶原纤维仿生矿化或制备矿化的胶原纤维制品的方法, 所述方法包括将权利要求1-11中任一项的生物矿化剂与胶原纤维或包含胶原纤维的制品接触。

20. 一种核酸递送或转染系统, 所述核酸递送包含权利要求1-10中任一项的生物矿化剂。

21. 权利要求20的核酸递送或转染系统, 其可用于细胞转染、控制和维持促成骨蛋白在骨缺损处的表达、或者促进成骨分化及骨再生。

22. 权利要求20或21的核酸递送或转染系统, 其中所述生物矿化剂包含促进成骨分化和/或促进骨再生的核酸。

## 核酸-磷酸钙纳米颗粒复合物及其在生物矿化中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及骨组织工程领域及生物材料领域,具体涉及核酸-磷酸钙纳米颗粒复合物在仿生矿化中的应用,包括矿化胶原复合材料的制备及应用,以及核酸-磷酸钙复合材料介导基因的高效率转染及传递。

### 背景技术

[0002] 人体骨组织作为重要的器官,除了能为身体提供机械支撑和保护,也可维持体内矿物质及酸碱平衡。然而,由于肿瘤、创伤、炎症、手术清创等各种原因频发,导致患者出现骨丢失及骨缺损,继而严重降低生活质量。因此,骨组织缺损修复迫在眉睫。目前,传统的自体骨、异体骨、异种骨等移植技术仍存在诸多不可忽视的问题及缺陷,如二次创伤,免疫排斥等。因此,探寻具有优异生物学及力学性能、在结构上再现自然骨组织微观和宏观结构的仿生矿化人工骨修复材料,可对临床治疗骨缺损、促进骨修复发挥着重要作用。

[0003] 基于天然骨组织的分级结构分析,I型胶原纤维、水以及磷灰石是骨组织最初始的三大主要成分。而含有磷灰石晶体沉积的I型胶原纤维则是骨的第二级层次结构。因此,若在体外重现及制备矿化的胶原纤维,可在结构及性能上高度模拟天然骨组织,是高度仿生的骨缺损修复材料。

[0004] I型胶原的体外仿生矿化是生物矿化研究领域的重点之一。非胶原蛋白如天然牙本质基质蛋白,牙本质涎磷蛋白等,带有较多负电荷。因此具有酸性氨基酸的性质,其在水相中可阻止羟基磷灰石成核即作为成核抑制剂,因此能够稳定水溶液中的无定形磷酸钙(ACP)纳米颗粒。随后,ACP进一步渗入胶原纤维的孔区或沉积在胶原纤维的表面实现胶原纤维的内外矿化。但是,天然生物大分子蛋白不易获取,体外合成繁琐,价格昂贵等缺陷对其应用造成了限制。因此,非胶原蛋白类似物如聚天冬氨酸、聚丙烯酸等聚阴离子性质的聚合物,在仿生矿化领域受到了诸多关注。然而,这些聚电解质由于具有极强的阴离子特性或阳离子特性,其残留物易造成细胞磷脂发生水解、细胞器损伤,甚至是细胞死亡。故在体内运用上,需要考虑生物相容性问题。因此,选取出具有良好生物相容性、获取便捷、同时又可促进骨组织中促成骨蛋白的高效表达的非胶原蛋白类似物并运用于体外胶原纤维的快速仿生矿化,从而制备出骨组织缺损修复材料,具有极大的运用前景及发展潜力。

### 发明内容

[0005] 随着生物技术的发展,带有遗传信息的生物大分子如RNA、DNA,可附着于由沉淀法所制备得到的磷酸钙颗粒中。但是,该种磷酸钙复合体并不是呈现无定形状态,也并不能运用在仿生矿化领域中。然而RNA及DNA其带有阴离子特性,则与矿物存在天然的静电吸附力,且较易获得。若改变制备方法,运用于胶原纤维的仿生矿化,可为新型骨材料的开发提供一条全新思路。

[0006] 针对现有技术的缺陷或不足,本发明的目的包括将体外仿生矿化理念应用到体内引导骨再生的探索中,利用核酸稳定钙磷,从而形成核酸-ACP纳米颗粒复合物。发明人首次

提出一种由核酸-ACP纳米颗粒诱导胶原发生纤维内外矿化的制备方法,同时在RNA及DNA的参与下,胶原纤维得到快速矿化。从而,形成羟基磷灰石-胶原的有机无机复合材料,继而用作骨材料以修复骨缺损。

[0007] 为达到上述目的,本发明采取的技术方案包括:

[0008] 根据本发明的第一个目的,本发明分别利用RNA或DNA稳定钙磷,分别形成RNA-ACP或DNA-ACP纳米颗粒复合物。主要包括以下步骤:

[0009] (1) RNA-ACP纳米颗粒的合成。

[0010] 首先小鼠BMSC,细胞初始接种密度为 $5 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>,经过成骨诱导分化7-28天,用Trizol法提取细胞内的总RNA,经酶标仪检测所得RNA起始浓度,约1500-2500ng/u1。随后,配置矿化液,分别配置高浓度及低浓度等体积二水氯化钙溶液及磷酸氢二钾溶液。由于,RNA中的磷酸根基团带有负电,可通过静电吸引力与带正电的钙离子发生吸附。因此,RNA首先与钙离子相混合,有利于混合物的稳定性,提高混合物的吸附效率。随后进一步添加磷酸根离子,利于与已吸附至RNA上的钙离子相结合,从而形成稳定的非晶态磷酸钙复合物。因此,将100u1RNA,与450u1高、低浓度二水氯化钙溶液均匀混合后,另取450u1高、低浓度磷酸氢二钾溶液缓慢滴入至RNA-二水氯化钙混合液中。最终合成两组稳定且澄清的高低浓度RNA-ACP纳米颗粒矿化液。

[0011] (2) DNA-ACP纳米颗粒的合成。

[0012] DNA-ACP纳米颗粒的合成步骤同RNA-ACP纳米颗粒的合成步骤相似。具体而言,经过Trizol法及试剂盒法提取所得DNA,其浓度可大于700ng/u1。随后,配置矿化液,将150u1DNA,与425u1高、低浓度二水氯化钙溶液均匀混合后,另取425u1高、低浓度磷酸氢二钾溶液缓慢滴入至DNA-二水氯化钙混合液中。合成两组稳定且澄清的高、低浓度DNA-ACP纳米颗粒矿化液。

[0013] 优选的,步骤(1)(2)中,选用的细胞可为小鼠BMSC或MC3T3,但不排除其他类型的细胞。

[0014] 优选的,步骤(1)(2)中,细胞初始接种密度为 $5 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>,初始培养基采用 $\alpha$ -MEM;10%FBS;1%双抗,在铺板后培养两天,在BMSC细胞状态良好的情况下更换成骨诱导培养基,并每2天换液。只有在细胞状态良好及数量足够的情况下,提取的RNA起始浓度可高于1500ng/u1。

[0015] 优选的,步骤(1)(2)中,所用成骨诱导培养基中,配方选用为: $\alpha$ -MEM;10%FBS;1%双抗;0.1 $\mu$ mol/l地塞米松;50mg/l抗坏血酸;10mmol/l $\beta$ -甘油磷酸钠。

[0016] 优选的,步骤(1)(2)中,成骨诱导分化天数为7天-14天。

[0017] 优选的,步骤(1)(2)中,二水氯化钙粉末分子量为147。单支高浓度二水氯化钙溶液浓度为:7mM;单支低浓度二水氯化钙溶液浓度为:3.5mM。磷酸氢二钾粉末分子量为174。单支高浓度磷酸氢二钾溶液浓度为:4.2mM;单支低浓度磷酸氢二钾溶液浓度为:2.1mM。

[0018] 优选的,步骤(1)中,获得的核酸起始浓度为100-5000ng/ $\mu$ l,优选起始浓度500-5000ng/ $\mu$ l,更优选起始浓度1000-3000ng/u1,例如1500-2500ng/u1。最终在RNA-ACP矿化液中,RNA工作浓度可大于150ug/ml。

[0019] 优选的,步骤(2)中,获得的核酸起始浓度为100-5000ng/ $\mu$ l,优选起始浓度500-5000ng/ $\mu$ l,更优选起始浓度700-3000ng/u1,更优选起始浓度700-1500ng/u1,例如1000ng/

ul。最终在DNA-ACP矿化液中,DNA工作浓度可大于150ug/ml。

[0020] 优选的,步骤(1)中,最终的两组高低浓度RNA-ACP矿化液,pH值约6.0-6.5,具有较好的稳定性,澄清无沉淀,可在4℃保存3天,RNA无降解。

[0021] 优选的,步骤(2)中,最终的两组高低浓度DNA-ACP矿化液,pH值约6.0-6.5,具有较好的稳定性,澄清无沉淀,可在4℃长期保存,DNA无降解。

[0022] 优选的,步骤(1)中,RNA-ACP纳米颗粒的平均粒径范围为40-60nm,衍射呈现为无定形状态的晶型。

[0023] 优选的,步骤(2)中,DNA-ACP纳米颗粒的平均粒径范围为60-100nm,晶体呈现无定形状态。

[0024] 优选的,步骤(1)(2)中高浓度钙磷矿化液最终浓度为3.5:2.1mM;低浓度钙磷矿化液最终浓度为:1.67:1mM。

[0025] 根据本发明的第二个目的,本发明分别利用RNA-ACP纳米颗粒,及DNA-ACP纳米颗粒诱导胶原纤维的内外矿化。主要包括以下步骤:

[0026] (1)自组装胶原纤维的制备。

[0027] 将大鼠鼠尾肌腱来源的胶原/醋酸溶液(5mg/ml)利用正反透析法,在37℃环境中完成胶原自组装,并负载于载碳支撑膜的金属网上。后经交联技术,完成自组装胶原纤维制备。

[0028] (2)矿化液-胶原的矿化策略。

[0029] 将所述核酸-ACP纳米颗粒矿化液约450ul,滴入至EP管盖中,形成均匀的球形。随后,将负载胶原纤维的镍/金网,正面接触矿化液,矿化5天。

[0030] 优选的,步骤(1)中,滴入载碳支撑膜的网,可为镍网及金网。铜网在液滴干燥挥发过程中不稳定,可能影响实验结果。

[0031] 优选的,步骤(1)中,胶原蛋白溶液易长菌,因此在制备过程中,严格注意防菌。

[0032] 优选的,步骤(1)中,所选用的材料可为大鼠的I型鼠尾肌腱来源的胶原/醋酸溶液、已自组装完成的鼠尾肌腱、已自组装完成的3D胶原支架、胶原膜、脱矿骨组织、脱矿牙本质片等。

[0033] 优选的,步骤(2)中,胶原纤维需负载于镍/金网正面,在矿化过程中,胶原得以均匀接触矿化液。

[0034] 根据本发明的第三个目的,本发明的制备方法所得到的胶原纤维矿化材料可作为硬组织缺损修复材料,并可将其运用于骨组织工程。

[0035] 本发明相比于其他非胶原蛋白/非胶原蛋白类似物稳定的磷酸钙纳米颗粒以诱导胶原纤维的体外仿生矿化而言,具有以下优越性:

[0036] 第一,在体外仿生矿化领域,虽然非胶原蛋白/非胶原蛋白类似物均能稳定ACP,并诱导ACP进入胶原纤维内部,完成胶原纤维的内矿化。但是,非胶原蛋白通常难以从组织或细胞中直接提取,且在体外合成过程中操作极其繁琐,价格昂贵,不利于后续研究。因此,诸多非胶原蛋白类似物如聚阴离子化何物或聚阳离子化何物等受到关注并被运用于研究胶原的仿生纤维内矿化。但是,胶原纤维骨修复材料除了具备一定的机械强度和硬度之外,还需要具有良好的生物相容性、无毒性、及较低免疫原性。而非胶原蛋白类似物如聚阳离子可造成磷脂膜的穿孔,引起细胞器损伤,最后造成细胞的死亡,具有较大毒性。同时,聚阴离子

中游离的大量高浓度羧基也可对细胞造成伤害,因此其运用受限。而带有遗传信息的生物大分子如RNA、DNA来源于细胞自身,不仅具有免疫原性低、毒性低、生物相容性好等特点,还广泛运用于细胞转染,且相比于天然蛋白获得较为容易,同时又带有阴离子特性,与钙离子之间能发生天然静电吸引力。因此,其作为磷酸钙的稳定剂及纤维内矿化诱导剂,在运用上具有突出的优势。

[0037] 第二,核酸-ACP实现胶原纤维的内外矿化,羟基磷灰石不仅在胶原纤维内达到有序沉积,也附着在胶原纤维表面,实现胶原纤维内外同步矿化。这进一步模拟了天然骨组织的表面形貌、组成成分、分级微观结构、机械性能等方面、也满足了上述生物材料的所有要求。因此是一类理想的、仿生的骨缺损再生修复材料。

[0038] 第三,核酸-ACP诱导胶原纤维内矿化效率高,周期短,5-6小时即可完成大范围纤维内矿化,在矿化胶原材料制备上具有快速高效的特点,后期可满足临床转化。

[0039] 第四,核酸与胶原纤维之间存在吸引力,高程度地模拟了胶原、非胶原蛋白(核酸)、矿物质三者之间的相互作用关系,因此矿化模式仿生,为体内探明真实体内胶原纤维内矿化机制提供了重要的思路。

[0040] 第五,核酸-ACP纳米颗粒复合物中, RNA、DNA结构稳定,且长时间不易降解。因此可添加促成骨表达相关基因,完成胶原纤维仿生矿化的同时,达到细胞转染,提高转染效率,控制和维持促成骨蛋白在骨缺损处的表达,进一步促进成骨分化及骨再生。因此,经核酸-ACP纳米颗粒复合物制备的转染-矿化双调控胶原复合支架,不仅可在缺损空间处起到支架承托的作用,赋予缺损区良好的机械性能,创造出良好的细胞微环境,利于细胞长入;同时还可将促成骨相关基因持续递送入细胞内部。因此,可广泛运用于治疗或预防骨疾病、骨损伤、骨丢失及骨紊乱,还可以诱导或增强骨再生、骨分化,促进骨缺损的修复。

[0041] 在一个方面,本发明涉及一种核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒形成的复合物(或称为“核酸-无定形磷酸钙纳米颗粒复合物”,“RNA或DNA-ACP纳米颗粒复合物”,“核酸-ACP纳米颗粒复合物”,“RNA/DNA-ACP纳米颗粒复合物”,“RNA/DNA-ACP纳米颗粒”或者“核酸-ACP”,它们可以互换使用)。在一个方面,核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒通过静电吸附形成复合物。在一个方面,本发明涉及所述复合物作为生物矿化剂在仿生矿化中的用途。例如,所述复合物或矿化剂用于使胶原纤维矿化,例如骨、牙齿或牙本质胶原纤维的矿化。所述骨或牙齿可以是患者的骨或牙齿,或者体外的骨或牙齿材料。在一个方面,本发明的生物矿化剂可以呈组合物的形式,例如用于使骨、牙齿或牙本质胶原纤维矿化的组合物。

[0042] 在一个方面,本发明涉及一种生物矿化剂,其包含核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒形成的复合物。在复合物中,所述核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒通过静电吸附形成复合物。例如,通过以下方式来形成复合物:核酸的磷酸基团与纳米颗粒的钙离子之间的静电吸附,以及游离的磷酸根离子与吸附在核酸上的钙离子的进一步静电吸附。

[0043] 在一个方面,本发明的生物矿化剂通过核酸溶液、氯化钙溶液和磷酸氢二钾的溶液混合形成。

[0044] 在本发明的生物矿化剂中,钙离子的浓度为0.1-100mM,优选0.5-50mM,更优选1-10mM,更优选2-5mM,更优选1.67-3.5mM。例如,钙离子的浓度可为1mM、1.2mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM或7mM。在本发明的生物矿化剂中,磷酸根离子的浓度可为0.1-100mM,优选0.2-50mM,优选0.5-10mM,更优选1-5mM,更优选1.0-2.1mM。例如,磷酸根离子的浓度可为

0.5mM、0.6mM、0.8mM、1.0mM、1.2mM、1.5mM、2.1mM或4.2mM。这些特征适用于本发明的生物矿化剂制备方法。

[0045] 在本发明的生物矿化剂中,钙离子与磷酸根离子之比为10:1至1:5,优选5:1至1:3,优选3.5:1至1:1.25、更优选2:1至1:1,例如1.67:1。例如钙离子与磷酸根离子之比为10:1、8:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1.9:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.2:1、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.9、1:2、1:3或1:4。这些特征适用于本发明的生物矿化剂制备方法。

[0046] 在本发明的生物矿化剂中,核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒形成的复合物的粒径为1-100nm,优选10-100nm,更优选20-100nm,例如40-60nm或60-100nm。例如,粒径可为5nm,30nm,50nm,70nm或80nm。这些粒径范围适用于DNA或RNA所形成的复合物。

[0047] 在一个方面,本发明所述的核酸可以是RNA。在一个方面,本发明所述的核酸可以是DNA。在另一方面,核酸是分离自哺乳动物细胞的总DNA或总RNA或质粒DNA。在另一方面,核酸包含促进成骨分化和/或促进骨再生的核酸。在一个方面,核酸选自miR-17-92、miR-26a或miR-148b或BMP2-质粒DNA。在该方面中,哺乳动物细胞可选自骨祖细胞、前成骨细胞(例如MC3T3)、骨髓间充质干细胞(例如BMSC)、骨细胞、骨原细胞、成骨细胞、破骨细胞。优选地,核酸是分离自前成骨细胞系或骨髓间充质干细胞系的总DNA或总RNA。在该方面中,哺乳动物细胞可以是来源于人、小鼠、大鼠、猪、牛、羊、猫、犬、马或猴的细胞。在一个例子中,哺乳动物细胞是小鼠前成骨细胞或小鼠骨髓间充质干细胞。质粒DNA可来源于大肠杆菌等菌种。

[0048] 在本发明的生物矿化剂中,核酸的工作浓度为20-800ug/ml,更优选50-700ug/ml,更优选80-600ug/ml,优选100-500ug/ml,更优选150-300ug/ml,例如160-250ug/ml或150ug/ml。这些核酸浓度适合于DNA或RNA。

[0049] 核酸的起始浓度为100-5000ng/ $\mu$ l,优选起始浓度500-5000ng/ $\mu$ l,更优选起始浓度1000-3000ng/ $\mu$ l。这些核酸浓度适合于DNA或RNA。例如,核酸工作浓度优选为70-150ug/ml(适用于DNA);工作浓度优选150-250ug/ml(适用于RNA)。在本发明的生物矿化剂中,生物矿化剂的pH值为5.5-7,优选6.0-6.5。pH例如是5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8或6.9。

[0050] 在一个方面,本发明的生物矿化剂可以呈液体形式,例如溶液或胶体液;半固体形式,例如凝胶;或者固体形式,例如粉末或冻干粉。本发明的生物矿化剂优选为液体形式,更优选溶液形式。另一方面,本发明的生物矿化剂可为冻干粉。所述生物矿化剂还可包含生理可接受的辅料或添加剂,优选可有助于胶原纤维矿化的辅料或添加剂。在液体形式中,所述生物矿化剂还可包含溶媒或溶剂,例如水。这些辅料、添加剂或溶媒为本领域技术人员所熟知。

[0051] 在一个方面,本发明涉及一种矿化的胶原纤维制品,其包含本发明的生物矿化剂,或者经过本发明的生物矿化剂处理。矿化的胶原纤维制品可以是医疗器械,例如用于植入到患者中的医疗器械。在一个方面,矿化的胶原纤维制品可以选自或包含胶原支架(或3D胶原支架)、胶原膜、胶原纤维片(或2D胶原支架)、脱矿骨组织、脱矿牙本质切片、或鼠尾。在一个方面,矿化的胶原纤维制品选自牙或骨修复材料、牙或骨支架材料、牙或骨再生材料、或者牙或骨植入材料。

[0052] 在一个方面,本发明所述的胶原纤维是骨胶原纤维,优选I型胶原纤维。在一个方

面,本发明的生物矿化剂用于使胶原纤维、例如骨胶原纤维矿化。在一个方面,本发明的生物矿化剂用于使胶原纤维制品矿化。矿化过程可以在患者的体外或体内进行。

[0053] 在一个方面,患者可以是人、小鼠、大鼠、猪、牛、羊、猫、犬、马或猴,优选人。

[0054] 在一个方面,本发明涉及生物矿化剂或矿化的胶原纤维制品在制备用于在患者中治疗骨相关疾病或病症或者改善骨况状的药物或医疗器械中的用途。另一方面,本发明涉及生物矿化剂或矿化的胶原纤维制品,其用于在患者中治疗骨相关疾病或病症或者改善骨况状。另一方面,本发明涉及在有需要的患者中治疗骨相关疾病或病症或者改善骨况状的方法,所述方法包括向患者施用治疗有效量的本发明矿化剂或者经矿化的胶原纤维制品。治疗有效量可以由本领域技术人员根据实际情况确定。

[0055] 在一个方面,本发明制备的药物用于治疗骨缺损或骨丢失,或促进骨修复、骨分化或骨再生。另一方面,本发明的生物矿化剂或者经矿化的胶原纤维制品用于治疗骨缺损或骨丢失,或促进骨修复、骨分化或骨再生。另一方面,本发明涉及在有需要的患者中治疗骨缺损或骨丢失,或促进骨修复、骨分化或骨再生的方法,所述方法包括向患者施用治疗有效量的本发明矿化剂或者经矿化的胶原纤维制品。

[0056] 在一个方面,本发明涉及生物矿化剂在制备用于在患者中使骨胶原纤维矿化的药物中的用途。另一方面,本发明涉及一种生物矿化剂,其用于在患者中使骨胶原纤维矿化。一个方面,本发明涉及在患者中使骨胶原纤维矿化的方法,所述方法包括向患者施用治疗有效量的本发明矿化剂。

[0057] 在一个方面,本发明涉及一种用于制备生物矿化剂的方法,所述方法包括:(1)获得核酸,(2)将从步骤(1)中获得核酸与氯化钙溶液混合,和(3)向从步骤(2)中获得的混合物加入磷酸氢二钾溶液,从而得到核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒形成的复合物。在该方法的步骤(1)中,可以从哺乳动物细胞中提取总DNA或总RNA或质粒DNA。在一个方面,步骤(1)中获得的核酸优选起始浓度为700-1000ng/ $\mu$ l (DNA);1500-2500ng/ $\mu$ l (RNA)。例如,核酸起始浓度可为700ng/ $\mu$ l、1000ng/ $\mu$ l、1600ng/ $\mu$ l、1700ng/ $\mu$ l、1800ng/ $\mu$ l、1900ng/ $\mu$ l、2000ng/ $\mu$ l或2500ng/ $\mu$ l。在一个方面,步骤(1)中获得的RNA起始浓度为1400-2500ng/ $\mu$ l,优选起始浓度1500-2500ng/ $\mu$ l。在一个方面,步骤(1)中获得的DNA起始浓度可大于700ng/ $\mu$ l,最适1000ng/ $\mu$ l。在所述方法中,步骤(3)中钙离子的浓度为1-10mM,优选2-5mM,更优选1.67-3.5mM。在所述方法中,步骤(3)中磷酸根离子的浓度0.5-10mM,优选1-5mM,更优选1.0-2.1mM。在所述方法中,钙离子与磷酸根离子之比为为10:1至1:5,优选5:1至1:3,优选3.5:1至1:1.25、更优选2:1至1:1,优选为5:3或1.67:1。

[0058] 在一方面,本发明涉及一种诱导胶原纤维仿生矿化的方法。在另一个方面,本发明涉及制备矿化的胶原纤维制品的方法。所述方法包括将本发明的生物矿化剂与胶原纤维或包含胶原纤维的制品接触,例如在溶液中接触。在该方面中,本发明的生物矿化剂与胶原纤维在溶液中混合。接触时间或矿化时间可为超过0.5小时,例如至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少8小时、至少10小时、至少12小时、至少16小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少48小时、至少60小时或至少72小时。接触时间或矿化时间可为至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少15天、至少20天、至少25天、至少30天。例如,接触时间或矿化时间可为1天至10天,优选2天至8天,更优选3天至7天,更优选4天至6天,例如5天。在一方面,

在接触5小时后实现完全矿化。在一方面,本发明涉及一种制备RNA与无定形磷酸钙纳米颗粒的复合物的方法。本发明的方法可包括以下步骤:(1)提取RNA,(2)将所得RNA与氯化钙溶液混合,和(3)将RNA-氯化钙混合液与磷酸氢二钾溶液混合,得到RNA-ACP矿化液。在一个方面,使用Trizol法提取RNA。提取的RNA起始浓度可为约1500-2500ng/u1。在一个方面,钙离子可通过静电吸引力与RNA上带负电的磷酸基团相吸附。在一个方面,溶液中的磷酸根与RNA上的钙离子进一步发生静电吸附。得到的RNA-ACP矿化液可以是澄清的。

[0059] 在一方面,在RNA-ACP矿化液中,钙离子或钙的浓度为1.67-3.5mM;和磷酸根离子或磷酸的浓度为1.0-2.1mM。在一方面,钙离子与磷酸根离子之比是5:3或1.67:1。

[0060] 在一方面,所提取的RNA是哺乳动物细胞的总RNA,例如来源于小鼠前成骨细胞系(MC3T3)或小鼠骨髓间充质干细胞系(BMSC)的总RNA。在一方面,RNA包括具有促进成骨分化和/或促进骨再生的RNA,如miR-17-92、miR-26a、miR-148b。

[0061] 在一方面,RNA起始浓度在1500-2500ng/u1。在最终RNA-ACP矿化液中,RNA工作浓度可为150-250ug/ml。

[0062] 本发明的RNA-ACP矿化液澄清无沉淀,可在4℃保存三天,RNA无降解,具有较好的稳定性,pH值约6.0-6.5。

[0063] 在一方面,RNA-ACP纳米颗粒的粒径为40-60nm。本发明的纳米颗粒呈现为无定形状态或者非晶形。

[0064] 在一方面,本发明涉及一种制备DNA与无定形磷酸钙纳米颗粒的复合物的方法。本发明的方法可包括以下步骤:(1)提取DNA,(2)将所得DNA与氯化钙溶液混合,和(3)将DNA-氯化钙混合液磷酸氢二钾溶液混合,得到DNA-ACP矿化液。在一个方面,使用Trizol法或试剂盒法提取DNA。提取物的DNA起始浓度可大于700ng/u1。在一个方面,钙离子可通过静电吸引力与DNA上带负电的磷酸基团相吸附。在一方面,溶液中的磷酸根与DNA上的钙离子进一步发生静电吸附。得到的DNA-ACP矿化液可以是澄清的。

[0065] 在一个方面,在DNA-ACP矿化液中,钙离子浓度为1.67-3.5mM;和磷酸根离子浓度为1.0-2.1mM。在一方面,钙离子与磷酸根离子之比是5:3或1.67:1。

[0066] 在一方面,所提取的DNA是哺乳动物细胞的总DNA或质粒DNA,例如来源于小鼠前成骨细胞系(MC3T3)或小鼠骨髓间充质干细胞系(BMSC)的总DNA或大肠杆菌质粒DNA。在一方面,DNA包括具有促进成骨分化和/或促进骨再生的DNA。

[0067] 在一方面,DNA最适起始浓度在1000ng/u1。在最终DNA-ACP矿化液中,DNA工作浓度可大于150ug/ml。

[0068] 本发明的DNA-ACP矿化液澄清无沉淀,可在4℃长期保存,DNA无降解,具有较好的稳定性,pH值约6.0-6.5。

[0069] 在一方面,DNA-ACP纳米颗粒的粒径为60-100nm。本发明的纳米颗粒呈现衍射呈现为无定形状态或者非晶形。

[0070] 在一方面,本发明涉及使用核酸-ACP纳米颗粒诱导胶原纤维仿生矿化的方法。所述方法可包括将胶原纤维与本发明的生物矿化剂接触。在一个方面,所述方法可包括将发明的生物矿化剂与胶原纤维在溶液中混合。

[0071] 在一个方面,能矿化的胶原纤维包括:3D胶原支架、胶原膜、2D胶原纤维、脱矿骨组织、脱矿牙本质切片、鼠尾等。

[0072] 在一个方面, RNA或DNA-ACP纳米颗粒可介导胶原发生快速纤维内矿化。胶原浸泡3小时, 即可观察到纤维内矿化。浸泡6小时, 可观察到大面积胶原纤维内矿化, 且纤维内晶体沿着胶原C轴有序排列。

[0073] 在一个方面, 矿物(例如纳米颗粒)可在胶原纤维的表面及内部发生沉积, 完成胶原纤维内矿化及纤维外矿化。矿化模式可以是核酸与胶原纤维表面发生粘附作用和/或吸引作用。

[0074] 在一个方面, 核酸-ACP纳米颗粒介导的纤维内及纤维外矿化胶原。在微观结构上, 本发明的矿化胶原与体内小鼠股骨处矿化的胶原纤维十分相似。

[0075] 在一方面, RNA或DNA-ACP纳米颗粒诱导胶原发生纤维内外矿化。矿化胶原复合材料可用于骨缺损的修复、促进骨分化及增强骨再生。

[0076] 在一方面, RNA或DNA-ACP纳米颗粒在诱导胶原发生仿生矿化的同时, 还可将促成骨表达相关基因持续递送入细胞内部。本发明的核酸与无定形磷酸钙纳米颗粒的复合物可以作为RNA或DNA的递送系统。所述递送系统可用于细胞转染, 控制和维持促成骨蛋白在骨缺损处的表达, 进一步促进成骨分化及骨再生。

[0077] 在一个方面, 经RNA或DNA-ACP纳米颗粒复合物制备的转染-矿化双调控胶原复合支架。本发明的制品、支架或复合物可用于治疗或预防骨疾病、骨损伤、骨丢失及骨紊乱, 或者诱导或增强骨再生、骨分化, 促进骨缺损的修复。

## 附图说明

[0078] 图1为低浓度下RNA-ACP纳米颗粒的透射电镜图。a. 右上角为RNA-ACP纳米颗粒的选区电子衍射图像。c-f. 分别为氧元素、钙元素、磷元素、与氮元素的元素分布图像。b. 以上四种元素的分布合成图。

[0079] 图2为低浓度下磷酸钙的电位及粒径分布。a. b. 分别为未添加稳定剂的单纯钙磷混合液的情况及粒径分布。c. d. RNA-ACP矿化液的情况及粒径分布。e. f. DNA-ACP矿化液的情况及粒径分布。

[0080] 图3为傅里叶红外光谱图。从上至下依次为低浓度羟基磷灰石冻干粉、低浓度DNA-ACP冻干粉及低浓度RNA-ACP冻干粉的红外光谱图。

[0081] 图4为胶原纤维的透射电镜图像。a. 胶原纤维在低浓度RNA-ACP矿化液中矿化5天, 胶原纤维内部及外部均有矿物沉积。b. 胶原纤维在低浓度DNA-ACP矿化液中矿化5天, 胶原纤维完成内外矿化。

[0082] 图5为胶原纤维支架的扫描电镜图像。a. 鼠龄4月的小鼠股骨处矿化胶原纤维的表面形貌。b. 纯胶原纤维支架在低浓度RNA-ACP矿化液中矿化5天的表面形貌。胶原纤维内部及表面均有矿物沉积。

[0083] 图6为RNA浓度时实监测图, 监测时长为72小时。从上至下依次为RNA-无酶水及RNA-ACP纳米颗粒。RNA较稳定, 72小时内基本无降解。

[0084] 图7为胶原纤维在低浓度RNA-ACP矿化液中矿化5小时的扫描透射电镜图。a. 暗视野下, 胶原纤维内部磷酸钙有序沉积, 完成胶原纤维内矿化。b. 左下角为选区电子衍射图像, 显示出磷酸钙已转变为沿着胶原C轴排列的羟基磷灰石晶体。c. d. 分别为钙元素及磷元素的元素分布图像。

[0085] 图8为经钨红染色的胶原纤维透射电镜图像。a. 纯胶原纤维与纯RNA (200ug/ml) 共孵育48小时后, 经冲洗及钨红染色。b. 纯胶原纤维与无酶水共孵育48小时后, 经冲洗及钨红染色。

### 具体实施方式

[0086] 本发明通过提取细胞中具有阴离子性质的RNA及DNA生物大分子, 并通过仿生矿化技术, 将其运用于体外以稳定磷酸钙矿物, 从而制备出核酸-ACP纳米颗粒复合物。同时, 核酸作为胶原纤维矿化诱导剂, 使得ACP分别进入胶原纤维内部, 及沉积于胶原纤维间, 从而完成胶原纤维仿生内外矿化。继而制备出生物相容性好、免疫原性低、矿化速度快、机械强度高羟基磷灰石-胶原有机/无机复合材料, 从而为骨组织缺损修复提供了独到高效的解决方案。

[0087] 以下是发明人提供的具体实施例, 以对本发明的技术方案作进一步解释说明。

[0088] 实施例1:

[0089] (1) 小鼠BMSC细胞接种于T75中, 初始铺板密度为 $5 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>, 用含有10% FBS的 $\alpha$  MEM培养基培养两天。待细胞状态良好, 且融合度约为70-80%时, 加入成骨诱导培养基, 每2-3天换液。

[0090] (2) 经过成骨诱导分化7天后, 细胞长势良好时, 用Trizol法提取细胞内的总RNA, 由于RNA极易降解, 注意低温、冰上操作以及所用器具需无酶处理。最后所得的RNA沉淀用无酶水溶解。

[0091] (3) 利用酶标仪检测各个EP管中, RNA溶液的浓度, 选取起始浓度在1500ng/u1以上的RNA溶液, 并混合, 得到约1600-2500ng/u1, 1ml的高浓度RNA溶液。

[0092] (4) 在2支15ml离心管中分别加入等量无酶水, 取二水氯化钙粉末(分子量147) 分别配制浓度为7mM与3.5mM的含钙离子溶液。

[0093] (5) 在2支15ml离心管中分别加入等量无酶水, 取磷酸氢二钾粉末(分子量174) 分别配制浓度为4.2mM与2.1mM的含磷酸根离子溶液。本实验中所用配制试剂所用到的溶液, 均为无酶水。

[0094] (6) 将100u1RNA, 与7mM二水氯化钙(450u1) 混合, 随后缓慢滴入等体积4.2mM磷酸氢二钾溶液(450u1)。配制最终钙磷浓度为3.5:2.1的高浓度RNA-ACP矿化液。同样的, 将100u1RNA, 与3.5mM二水氯化钙(450u1) 混合, 随后缓慢滴入等体积2.1mM磷酸氢二钾溶液(450u1)。配制最终钙磷浓度约为1.67:1的低浓度RNA-ACP矿化液。

[0095] (7) 将大鼠鼠尾肌腱来源的胶原/醋酸(8mg/mL) 溶液置于透析袋中, 并扎紧透析袋。

[0096] (8) 于外部放置磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)。在37°C环境下, 每隔12h更换一次透析液。

[0097] (9) 72h后待胶原纤维自组装完成后, 为了降低磷酸盐离子对自组装完成后胶原纤维的影响, 将PBS透析液替换为去离子水(pH 7.4), 进行反透析。

[0098] (10) 48h后, 将透析袋中的胶原蛋白溶液(8mg/mL), 用移液枪取适量滴入400目覆盖碳支撑膜的镍/金网上, 正面朝上, 并在室温下晾干。

[0099] (11) 用0.3M 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐(EDC)/0.06M及N-羟基丁二

酰亚胺(NHS)溶液交联胶原纤维4h,并用去离子水冲洗3次后在室温下晾干备用。

[0100] (12)将所述核酸-ACP纳米颗粒矿化液约450ul,滴入至EP管盖中,形成均匀的球形。

[0101] (13)将负载胶原纤维的镍/金网,正面接触矿化液,矿化5天。

[0102] 优选的方案中,所选用的矿化基质可为大鼠的I型鼠尾肌腱来源的胶原/醋酸溶液、已自组装完成的鼠尾肌腱、已自组装完成的3D胶原支架、胶原膜、脱矿骨组织、脱矿牙本质片等。

[0103] 实施例2:

[0104] 该实施例与实例1不同的是:

[0105] (1)用Trizol法及试剂盒法提取细胞内的总DNA,经酶标仪检测所得DNA起始浓度,其浓度可大于700ng/ul。

[0106] (2)将150ulDNA,与425ul高、低浓度二水氯化钙溶液均匀混合后,另取425ul高、低浓度磷酸氢二钾溶液缓慢滴入至DNA-二水氯化钙混合液中。合成两组稳定且澄清的高、低浓度DNA-ACP纳米颗粒矿化液。并后期运用于矿化。

[0107] 按照实施例1、2所述,本发明所构建核酸-ACP纳米颗粒诱导胶原纤维的仿生矿化具有以下特点:

[0108] 如图1所示,透射电镜检测结果表明,实施例1所构建的磷酸钙复合物的颗粒粒径呈现为较为均一的球形,约为50nm(图1,a)。选区电子衍射结果显示磷酸钙为非晶态,无定形的(图1,a右上角)。元素能谱结果表明,电子致密颗粒的主要组成成分为氧元素、钙元素、磷元素及氮元素(图1,c-f)。其中元素复合图显示(图1,b),氮元素与其他元素分布一致。由于氮元素只存在于有机物核酸中,这说明,在此方法下,RNA可参与稳定钙磷颗粒,并最终形成粒径较为均匀的RNA-ACP纳米颗粒。

[0109] 如图2所示,Zeta电位结果表明,在不添加任何稳定剂的单纯钙磷溶液中(图2,a),电位基本为0,然而在添加RNA(150-250ug/ml)作为稳定剂的钙磷溶液中(图2,c),其电位为负,约为-10mv;在添加DNA(150ug/ml)作为稳定剂的钙磷溶液中(图2,e),其电位约为-20mv。这说明,由于核酸带有负电,因此在核酸参与稳定下的ACP纳米颗粒复合物同样带有负电荷。粒径结果表明,在不添加任何稳定剂的单纯钙磷溶液中(图2,b),钙磷颗粒粒径大于1微米,这表明,钙磷颗粒直接以沉淀的形式从溶液中分离。而DNA-ACP纳米颗粒的粒径约为60-100nm(图2,f),RNA-ACP纳米颗粒的粒径更小更均一,约为40-60nm(图2,d)。这说明,RNA与DNA均可参与磷酸钙的稳定,同时可能由于DNA是双链结构、分子量也较大,因此在空间上所呈现出的DNA-ACP纳米颗粒直径要略大于RNA-ACP纳米颗粒。

[0110] 如图3所示,傅里叶红外光谱结果表明,RNA-ACP与DNA-ACP在 $500\text{cm}^{-1}$ 、 $600\text{cm}^{-1}$ 及 $1000\text{cm}^{-1}$ 处,均有O-P-O磷氧键、磷酸根的振动峰。这说明,RNA-ACP及DNA-ACP的复合物中含有磷酸钙。同时,RNA与DNA的特征性碱基如鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶等振动峰并未发生改变,因此表明,这两类复合物中,RNA与DNA的结构并没有遭到破坏,依旧保持稳定。

[0111] 如图4所示,透射电镜结果表明(图4,a-b),核酸-ACP作为矿化液,ACP纳米颗粒可进入至胶原纤维内部,并沿着胶原纤维的C轴方向进一步有序生长,最终转化为热力学稳定的羟基磷灰石,完成胶原纤维内矿化。同时钙磷也可在胶原纤维间或其表面发生沉积,沿着各个方向无序生长最终完成胶原纤维外矿化。这说明,核酸-ACP具有诱导胶原纤维发生内

外矿化的作用,可在微观结构上模拟出精巧的天然骨组织矿化胶原特点,为仿生骨修复材料的制备打下坚实基础。

[0112] 如图5所示,扫描电镜显示,用RNA-ACP矿化纯胶原纤维支架5天时(图5,b),胶原纤维支架多处发生了体积膨胀,同时,膨胀处表面不光滑、原有的特征性的横纹结构被覆盖。提示纤维内、外的空间均被无机矿物质所占据,胶原纤维发生内外矿化。值得注意的是,扫描电镜显示(图5,a),在天然小鼠股骨处的矿化胶原表面形貌也同样很粗糙,表面被覆羟基磷灰石,这与RNA-ACP矿化液诱导的矿化胶原纤维形貌极其一致。这说明,该实例1、2中所运用的稳定物、制备方法、矿化过程与体内真实胶原纤维矿化情况相比具有相似性,因此从矿化模式上来说该材料的制备也较为仿生。

[0113] 如图6所示,RNA浓度监测结果表明,当两份相同浓度的RNA溶液进行如下等比配置时(RNA-无酶水及RNA-ACP),在RNA-ACP矿化液中的RNA浓度要明显低于RNA-无酶水中的浓度。这提示,RNA参与稳定ACP,形成纳米颗粒聚集体,故RNA不易被检测到。同时,在单组RNA-ACP矿化液中,RNA在三天内并未发生明显降解。这说明RNA-ACP纳米颗粒具有良好的稳定性,可较长时间保存,利于胶原纤维的矿化。

[0114] 如图7所示,扫描透射电镜结果显示,胶原纤维仅在RNA-ACP矿化液中接触5小时即可出现大面积胶原纤维内矿化(图7,a)。元素分布结果显示,钙磷在胶原纤维内发生有序沉积,同时选区电子衍射结果也表明,沉积在胶原纤维内部的矿物为有序的羟基磷灰石晶体。这表明,RNA作为钙磷稳定剂及胶原纤维诱导剂,可快速诱导胶原纤维发生大范围纤维内矿化,矿化时间极短,而效率极高。这为骨修复材料的高效制备及临床转化提供有力的支持。

[0115] 如图8所示,纯胶原纤维与纯RNA共孵育48小时后,经冲洗及钨红染色,透射电镜结果显示,电子致密的RNA-钨红染液,均匀大面积吸附在胶原纤维上(图8,a),而未与RNA孵育组的胶原纤维无电子致密颗粒(图8,b)。这表明,RNA与胶原之间存在着吸引力,进一步验证本专利所涉及的实验模型的仿生之处,为探明真实体内胶原纤维内矿化机制提供了重要的思路。

[0116] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施方式仅限于此,对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单的推演或替换,都应当视为属于本发明由所提交的权利要求书确定专利保护范围。

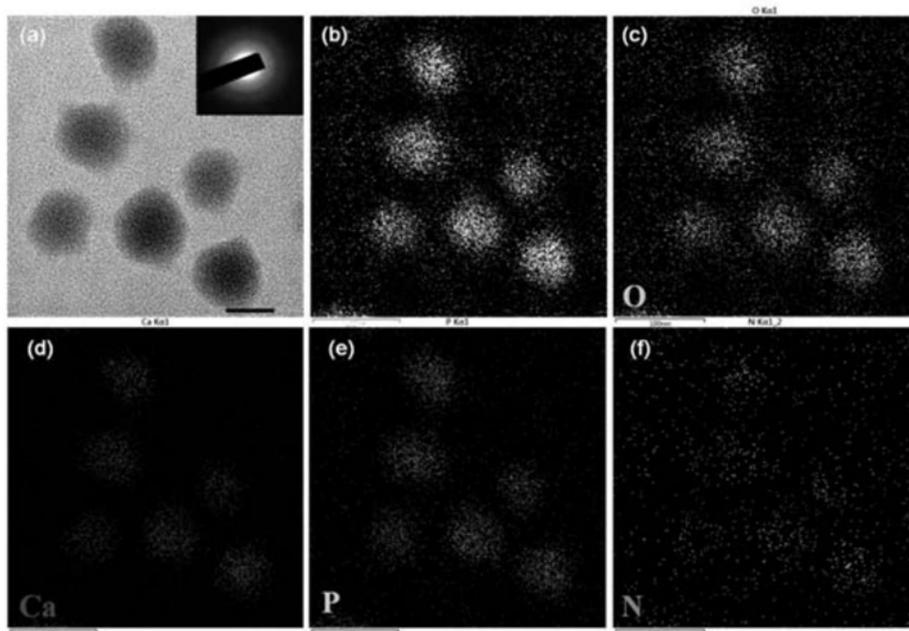


图1

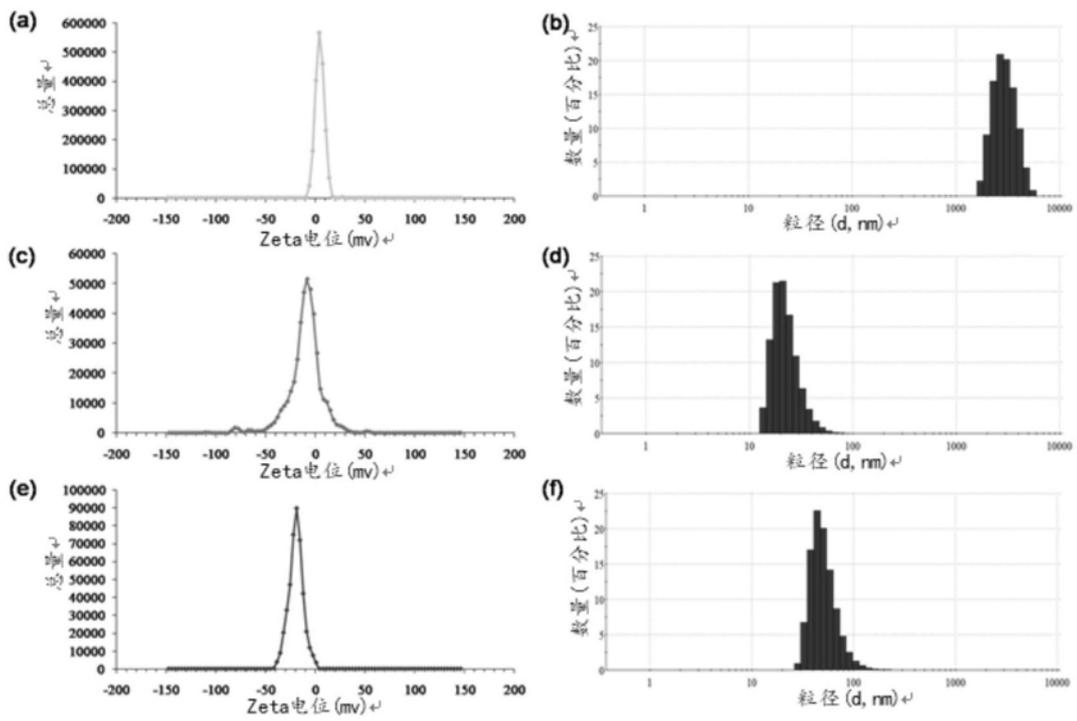


图2

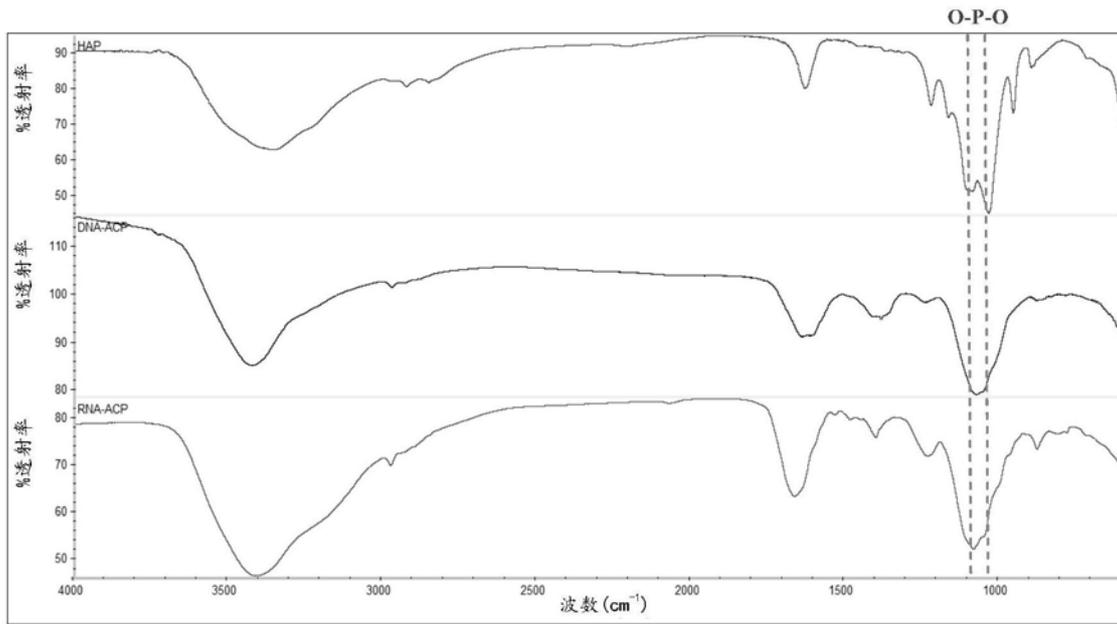


图3

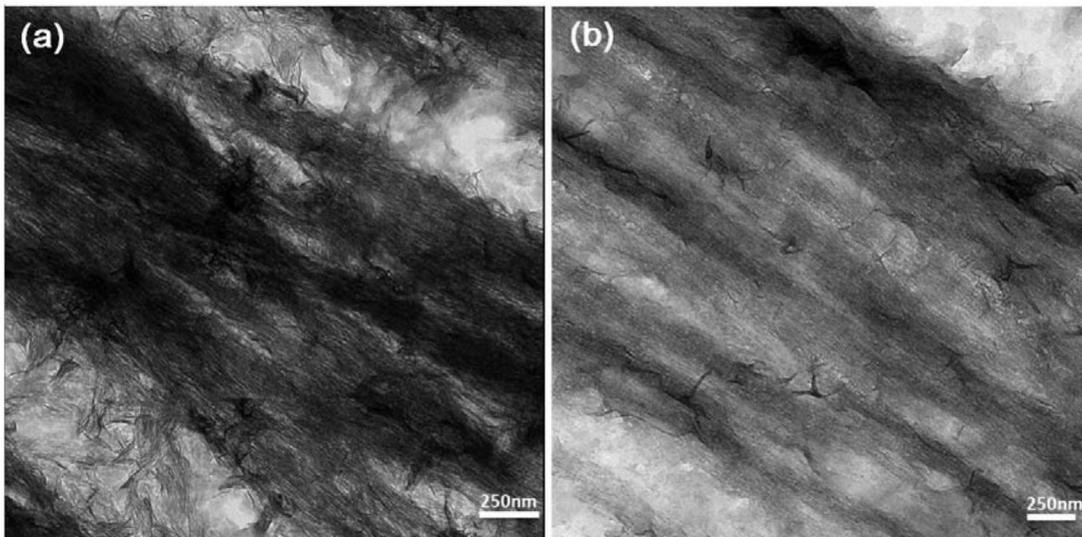


图4

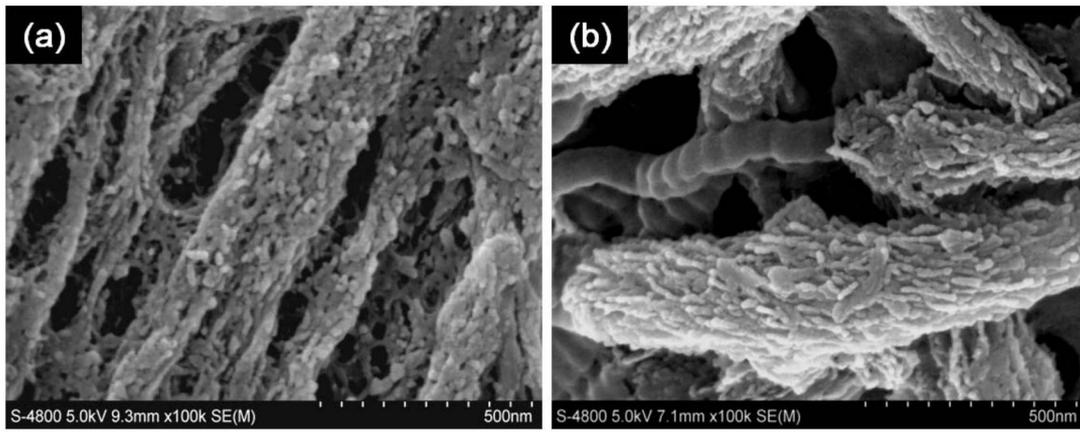


图5

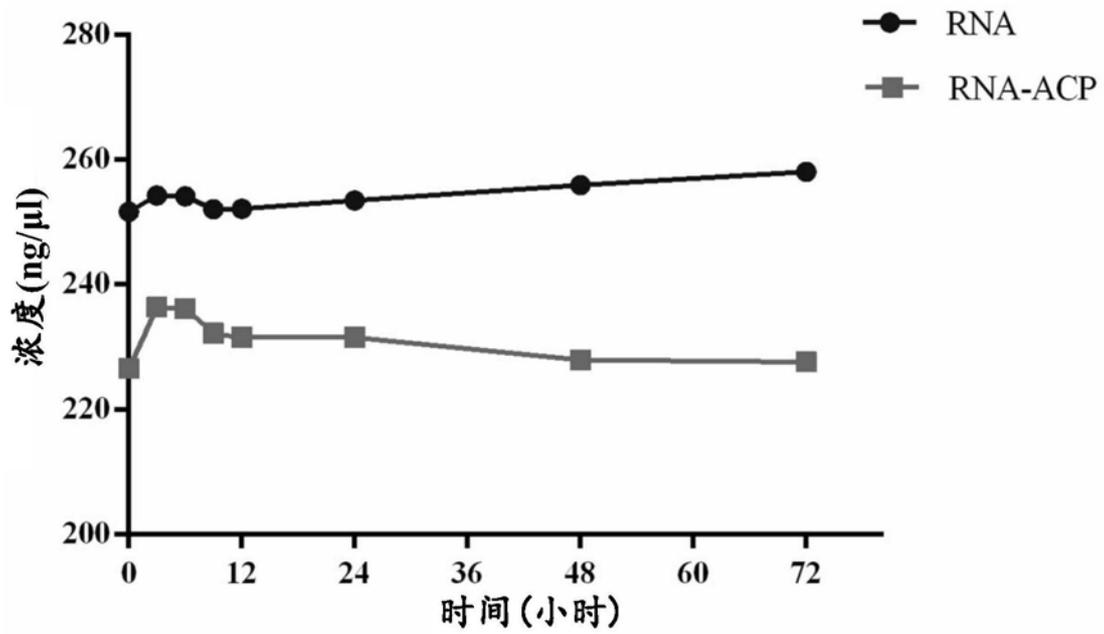


图6

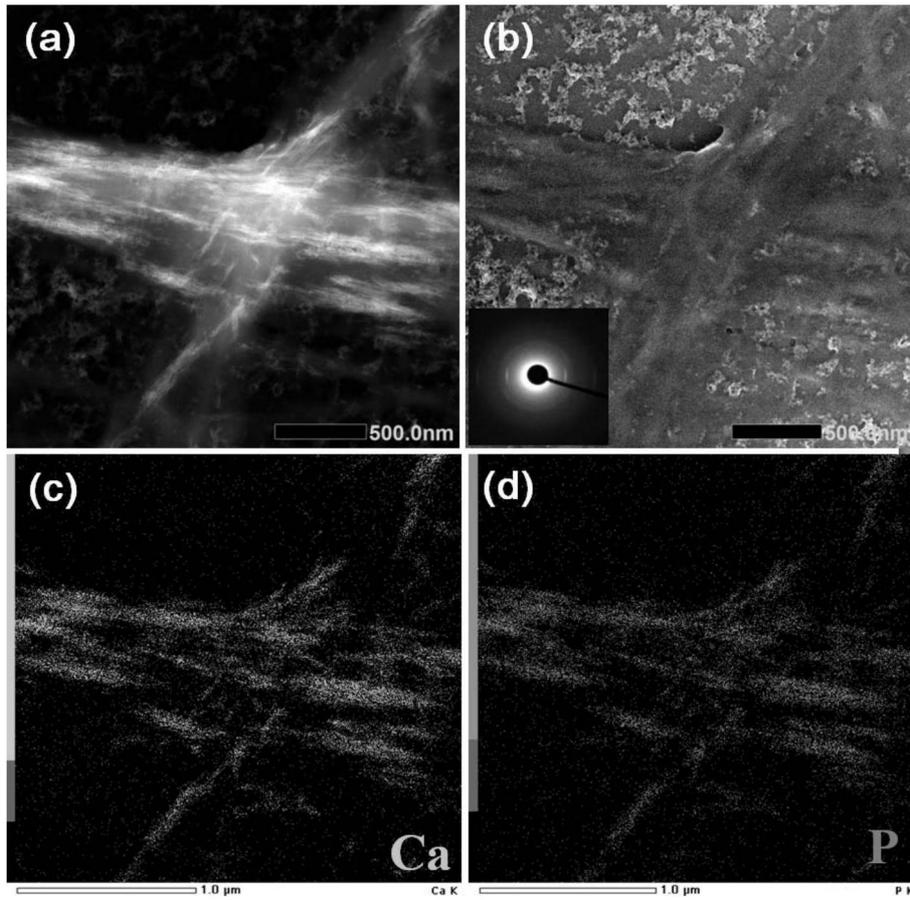


图7

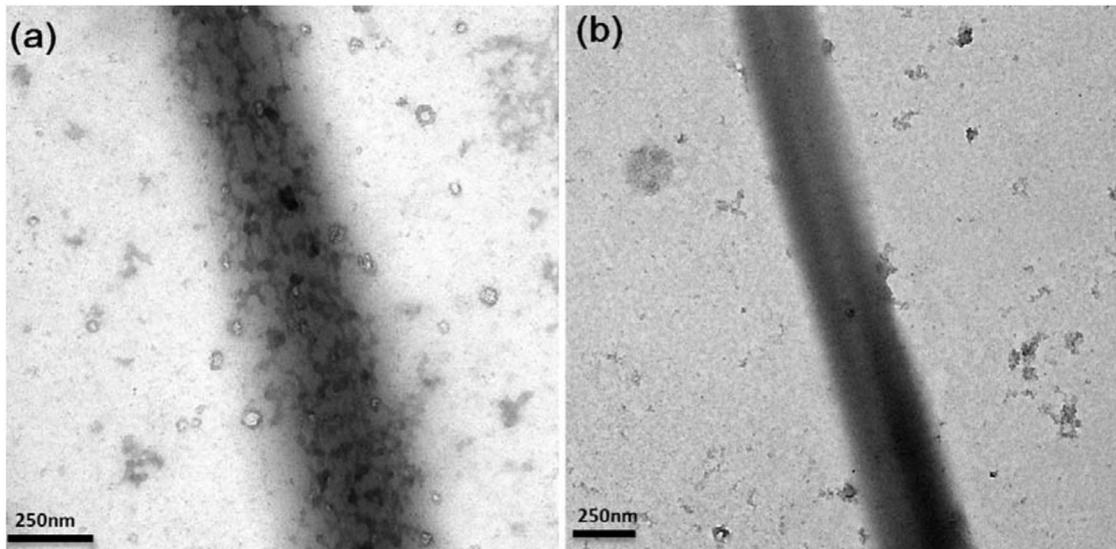


图8