



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108588006 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810444741.7

(22)申请日 2018.05.10

(71)申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

(72)发明人 周燕 张咪 刘伟 谭文松

(74)专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所  
(普通合伙) 31218

代理人 翟羽

(51)Int.Cl.

*C12N 5/071*(2010.01)

*D06M 10/00*(2006.01)

*D06M 14/14*(2006.01)

*D06M 13/385*(2006.01)

*D06M 101/32*(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54)发明名称

一种用于肝细胞三维培养的生物支架及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供一种用于肝细胞三维培养的生物支架,由半乳糖基化或半乳糖修饰的聚对苯二甲酸乙二醇酯纤维制成。本发明还提供上述半乳糖基化或半乳糖修饰的聚对苯二甲酸乙二醇酯纤维的制备方法及其应用。

1. 一种用于肝细胞三维培养的生物支架,由半乳糖基化或半乳糖修饰的聚对苯二甲酸乙二醇酯纤维制成。

2. 如权利要求1所述的生物支架,其特征在于,所述生物支架的厚度为200~400 $\mu\text{m}$ 。

3. 一种如权利要求1所述的生物支架的制备方法,所述制备方法是对聚合物纤维进行等离子体表面处理后,以丙烯酸气体对经等离子体表面处理后的聚合物纤维进行气相接枝反应,获得接枝丙烯酸的聚合物纤维;随后,将所述接枝丙烯酸的聚合物纤维与预制的半乳糖胺反应,最终获得所述用于肝细胞三维培养的生物支架;其中,所述聚合物纤维为聚对苯二甲酸乙二醇酯纤维。

4. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,使用氩气作为等离子体气体对所述聚合物纤维进行等离子体表面处理。

5. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,在所述气相接枝反应中,在真空环境下通入所述丙烯酸气体,使得丙烯酸单体的体积浓度为10%~60%。

6. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,在所述接枝丙烯酸的聚合物纤维与半乳糖胺反应中,以羧基活化剂对所述接枝丙烯酸的聚合物纤维进行活化羧基,洗净后,在4 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 下以浓度为0.5~5g/l的半乳糖胺溶液与经羧基活化的聚合物纤维反应,获得所述用于肝细胞三维培养的生物支架。

7. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述羧基活化剂为EDC/NHS的MES溶液;其中,所述EDC的浓度为2~100mg/ml,NHS的浓度为2~100mg/ml。

8. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,半乳糖胺的制备方法为:以甲醇和乙醇的混合溶液作为溶剂溶解乳糖酸,然后减压蒸馏以去除溶剂,获得中间产物;以无水二甲基亚砷溶解所述中间产物后,加入过量乙二胺,50 $^{\circ}\text{C}$ ~80 $^{\circ}\text{C}$ 冷凝回流2~6小时,随后加入丙酮使产物沉淀,过滤并真空干燥后获得所述半乳糖胺。

9. 如权利要求8所述的制备方法,其特征在于,所述甲醇和乙醇的体积比范围为1:1~1:4。

10. 如权利要求1所述的生物支架在hiHep细胞体外培养中的应用。

## 一种用于肝细胞三维培养的生物支架及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物材料领域,尤其是涉及一种用于肝细胞三维培养的生物支架及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 生物型人工肝支持系统,简称生物人工肝,是上世纪50年代逐渐发展起来的一项临床治疗系统。生物人工肝以人工培养的肝细胞为基础,由肝细胞、生物反应器和其他辅助装置等组成,其中肝细胞和负载肝细胞的生物材料填充于生物反应器中。生物人工肝除了具有非生物型人工肝系统的过滤、吸附等功能外,还可替代患者衰竭的肝脏,执行生物转化、氧化代谢以及合成和分泌等功能。临床上采用生物人工肝进行治疗时,病人的血液经血浆分离器和血浆成分分离器后,血浆中的有毒成分进入生物反应器,通过生物反应器中的肝细胞进行代谢而解毒,同时肝细胞合成和分泌的有益物质回流至病人血浆中,再回输到病人体内。基于这一技术,可以帮助病患恢复自身受损的肝脏以重新获得功能,或帮助需要进行肝脏移植的病患行使肝功能以维持生命、等待合适的供体,或暂时替代移植后尚未发挥功能的肝行使功能以起到支撑作用。

[0003] 一般而言,一个成人肝脏约含有 $10^{11}$ 的肝细胞。生物人工肝要达到一定的治疗效果,则需要在生物反应器中至少填充 $10^{10}$ 个肝细胞。由于临床治疗中病人的血液经生物人工肝处理后回输至体内,故作为生物人工肝核心部分的生物反应器,其体积是有限的。肝细胞主要来源于人原代肝细胞、人肝癌细胞系、猪原代肝细胞和转分化获得的人肝样细胞(Human induced hepatocyte, hiHep)。肝细胞为上皮样细胞,呈多角形,是贴壁依赖型细胞。体外培养肝细胞常需要贴附于培养介质上,才能在一定的条件下生存、增殖、维持形态和功能。有研究表明,与二维培养相比,由三维培养获得的肝细胞有利于其功能的维持和提高。因此,在有限的生物反应器中高密度地培养和负载 $10^{10}$ 个以上的肝细胞,且要维持肝细胞的活性和功能,成为生物人工肝设计、研究和应用中面临的巨大挑战。

[0004] 目前生物人工肝系统中研制的生物反应器一般仅考虑其细胞负载能力和功能维持,细胞扩增则在其他的培养装置中进行。扩增的细胞通常需要通过酶消化处理后收集,再接种到生物反应器中,待细胞贴附、铺展后用于治疗。上述方法操作繁琐,步骤复杂,细胞易结团,过程控制难,容易染菌。如能在生物人工肝系统的生物反应器中同时实现肝脏细胞扩增和功能维持,则可以避免这些问题。鉴于肝细胞是贴壁依赖型细胞,在生物人工肝系统的生物反应器中要进行细胞扩增需要细胞贴附的载体。以往的细胞培养载体大多为商业化载体,细胞贴附性差,特别是在流动的培养环境中细胞的贴壁率较低,而且细胞分布不均匀,载体材料成本高,且大部分载体仅支持细胞二维培养。因此,需要开发新型的适于肝细胞贴附、增殖的三维培养载体,即生物支架材料。

[0005] 用于细胞三维培养的生物支架材料有:聚乙醇酸-乳酸共聚物(Poly(lactide-co-glycolide), PLGA)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(Polyethyleneterephthalate, PET)、胶原蛋白、丝绸蛋白、羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)等。支架材料需要具生物相容性、足够的表

面积、合适大小的孔隙和孔隙率、促进细胞的贴附、支持细胞三维生长等特性。与其他三维支架相比,PET纤维支架材料由无数根纤维无序堆积而成,其具有合适的孔隙率,能为细胞提供附着的面和足够的生长空间,有利于营养成分的进入和代谢产物的排出,进而提高细胞培养密度。但是,PET纤维支架表面亲水性较差,缺少功能性基团,不利于肝细胞贴壁和生长,因此,该纤维支架用于肝细胞培养之前需进行表面改性或处理。

[0006] PET材料缺少可活化的官能团,在过去的研究和应用中针对PET纤维支架改性的方法较少,主要包括用NaOH溶液处理以提高支架的亲水性、在表面孵育多壁碳纳米管以改善干细胞的贴附和增殖等。此外,针对由PET材料制成的薄膜,采用等离子体处理膜表面,接枝半乳糖基、RGD、丝氨酸等功能性基团,可以提高细胞的贴壁率。但是,由这些方法制备的PET材料在生物人工肝的应用方面存在一些不足:

[0007] (1) PET纤维支架表面针对肝细胞特异功能的修饰较少,仅提高亲水性无法在体外培养中很好地支持肝细胞的贴附和扩增;

[0008] (2) 用作表面接枝的功能性分子(如:RGD)价格昂贵,提高了生物人工肝的制造成本;

[0009] (3) PET薄膜虽然可为肝细胞提供二维表面生长,质地较软,难以在生物反应器有限的空间中进行层层叠加,无法支持细胞灌注培养、培养基/血浆成分在各层之间的均匀分布。

[0010] 因此,需要一种新的用于肝细胞三维培养的生物支架,以解决上述现有生物支架的问题。

## 发明内容

[0011] 本发明的一个目的在于,提供一种用于肝细胞三维培养的生物支架,利用丙烯酸在支架与功能分子间的“架桥”作用,在聚合物支架材料上接枝肝细胞特异性配体一半乳糖基团,使得聚合物支架材料与半乳糖基团间具有更强的结合力,从而提高肝细胞与半乳糖基的粘附性,促进肝细胞的三维生长,维持肝细胞功能。以此实现体外肝细胞培养,大大降低了生物人工肝系统的生产成本,推动生物人工肝系统的临床应用。

[0012] 为解决上述问题,本发明提供一种用于肝细胞三维培养的生物支架,由半乳糖基化或半乳糖修饰的聚对苯二甲酸乙二醇酯纤维(PET纤维)制成。

[0013] 在本发明一实施例中,所述生物支架的厚度为200~400 $\mu\text{m}$ 。

[0014] 本发明的另一个目的在于提供一种上述用于肝细胞三维培养的生物支架的制备方法。所述制备方法是等将等离子体处理技术与气相接枝技术相结合,在所述PET纤维表面接枝聚合丙烯酸,进而利用丙烯酸与半乳糖胺之间的酰胺反应,使得半乳糖配体共价结合于所述PET纤维表面,获得半乳糖配体(或半乳糖基)修饰的PET纤维生物支架。

[0015] 在本发明一实施例中,所述制备方法是等对聚合物纤维进行等离子体表面处理后,以丙烯酸气体对经等离子体表面处理后的聚合物纤维进行气相接枝反应,获得接枝丙烯酸的聚合物纤维;随后,将所述接枝丙烯酸的聚合物纤维与预制的半乳糖胺反应,最终获得所述用于肝细胞三维培养的生物支架;其中,所述聚合物纤维为聚对苯二甲酸乙二醇酯纤维(PET纤维)。

[0016] 本领域技术人员可以知晓的是,可以通过一现有的等离子体处理器对所述PET纤

维进行表面等离子体处理。在本发明一实施例中,使用氩气作为等离子气体对所述聚合物纤维进行等离子体表面处理。

[0017] 在本发明一较优实施例中,将所述PET纤维放置于一现有的等离子体处理器之腔体内,腔体抽真空后通入氩气,随后进行放电反应。等离子体处理器的功率为30~200W,腔体内压强为10~150Pa,放电反应时间为20~240s,获得经等离子体处理的PET纤维。

[0018] 在本发明一实施例中,在所述气相接枝反应中,在真空环境下通入所述丙烯酸气体,使得丙烯酸单体的体积浓度(V/V)为10%~60%。在本发明一较优实施例中,所述气相接枝反应亦在进行等离子体处理的腔体内进行。也就是说,在上述放电反应完成之后,再对腔体进行抽真空,随后通入减压产生的丙烯酸气体,使得丙烯酸气体均匀地喷射于所述PET纤维表面。

[0019] 在本发明一实施例中,在所述接枝丙烯酸的聚合物纤维与半乳糖胺反应中,以羧基活化剂对所述接枝丙烯酸的聚合物纤维进行活化羧基,洗净后,在4℃~10℃下以浓度为0.5~5g/l的半乳糖胺溶液与经羧基活化的聚合物纤维反应,获得所述用于肝细胞三维培养的生物支架。在一优选实施例中,所述半乳糖胺溶液与经羧基活化的聚合物纤维的反应时间为72小时。

[0020] 在本发明一实施例中,所述羧基活化剂为EDC/NHS的MES溶液;其中,所述EDC的浓度为2~100mg/ml,NHS的浓度为2~100mg/ml。

[0021] 本领域技术人员应当知晓的是,所述EDC/NHS的MES溶液是指1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide,EDC)与N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide,NHS)均溶解于2-吗啉乙磺酸(2-morpholino-ethanesulfonic acid,MES)缓冲液中而获得的溶液。

[0022] 在本发明一实施例中,半乳糖胺的制备方法为:以甲醇和乙醇的混合溶液作为溶剂溶解乳糖酸,然后减压蒸馏以去除溶剂,获得中间产物;以无水二甲基亚砜(DMSO)溶解所述中间产物后,加入过量乙二胺,50℃~80℃冷凝回流2~6小时,随后加入丙酮使产物沉淀,过滤并真空干燥后获得所述半乳糖胺。

[0023] 在本发明一实施例中,所述甲醇和乙醇的体积比范围为1:1~1:4。

[0024] 在本发明一较优实施例中,提供一种上述用于肝细胞三维培养的生物支架的制备方法,所述制备方法包含以下步骤:

[0025] (1) 聚合物纤维的等离子体表面处理

[0026] 将聚合物纤维放置于一现有的等离子体处理器之腔体内,腔体抽真空后通入氩气,随后进行放电反应,获得经等离子体处理的聚合物纤维;其中,所述等离子体处理器的功率为30~200W,腔体内压强为10~150Pa,放电反应时间为20~240s;

[0027] (2) 聚合物纤维的气相接枝

[0028] 继续对步骤(1)中的腔体进行抽真空,随后通入减压产生的丙烯酸气体,使得丙烯酸气体均匀地喷射于步骤(1)获得的所述经等离子体处理的聚合物纤维的表面,获得接枝丙烯酸的聚合物纤维;其中,丙烯酸单体的体积浓度(V/V)为10%~60%;

[0029] (3) 羧基活化

[0030] 以羧基活化剂对所述接枝丙烯酸的聚合物纤维进行活化羧基,完成后洗净待用;其中,所述羧基活化剂为EDC/NHS的MES溶液,所述EDC的浓度为2~100mg/ml,NHS的浓度为2

~100mg/ml;以及,

[0031] (4) 酰胺反应

[0032] 在4℃~10℃下以浓度为0.5~5g/l的半乳糖胺溶液与经羧基活化的聚合物纤维反应,获得半乳糖配体(或半乳糖基)修饰的聚合物纤维生物支架;

[0033] 其中,所述聚合物纤维为PET纤维。

[0034] 本领域技术人员可以知晓的是,所述步骤(4)中使用的半乳糖胺溶液为半乳糖胺溶于去离子水配制而得。

[0035] 在本发明一较优实施例中,所述半乳糖胺的制备方法为:以甲醇和乙醇的混合溶液作为溶剂溶解乳糖酸,然后减压蒸馏以去除溶剂,获得中间产物;以无水二甲基亚砷溶解所述中间产物后,加入过量乙二胺,50℃~80℃冷凝回流2~6小时,随后加入丙酮使产物沉淀,过滤并真空干燥后获得所述半乳糖胺;其中,所述甲醇和乙醇的体积比范围为1:1~1:4。

[0036] 本发明还提供上述由半乳糖配体(或半乳糖基)修饰的聚合物纤维制成的生物支架在hiHep细胞体外培养中的应用,尤其是hiHep细胞体外三维培养中的应用。

[0037] 在本发明一实施例中,所述应用是将获得的生物支架进行酒精消毒后,浸没于细胞培养基中,随后加入hiHep细胞悬液,放置于37℃培养箱培养。

[0038] 在本发明中,基于PET纤维材料所具有的良好生物相容性、足够的生长表面和空间支持细胞生长、合适的孔隙率利于物质传递等特点,在众多聚合物支架材料中选择PET纤维作为生物支架的基材。

[0039] 同时,为了改善肝细胞的贴附与生长,本发明利用了肝细胞表面存在一种特异性受体—去唾液酸糖蛋白受体(Asialoglycoprotein receptor, ASPGR)的特异性识别半乳糖或N-乙酰半乳糖胺的特性,设法对PET纤维表面进行半乳糖配体(或半乳糖基)修饰。实验表明,当培养肝细胞的支架材料表面含有半乳糖配体时,可以促进肝细胞在材料表面的贴附,支持肝细胞生长并维持其活性及功能。因此,半乳糖基化的纤维材料可以满足生物人工肝反应器中肝细胞黏附、增殖和行使功能的需要。

[0040] 再者,在本发明中,考虑到半乳糖配体(或半乳糖基)与PET纤维的结合度较低等问题,进而采用了丙烯酸作为支架与半乳糖配体(或半乳糖基)分子间的“架桥”,实现了半乳糖配体(或半乳糖基)接枝于PET纤维表面。

[0041] 此外,本发明利用等离子表面处理技术与气相接枝技术相结合的方式在PET纤维表面接枝丙烯酸,与传统的在丙烯酸溶液中浸泡利用紫外光照射的方法不同的是,本发明所述的方法可避免实验过程中有机溶剂丙烯酸的残留,不会对环境和人体健康造成危害。

[0042] 本发明所述的生物支架及其制备方法,基于PET纤维材料的良好特性,结合利用丙烯酸在支架与功能分子间的“架桥”作用,在PET纤维材料上接枝肝细胞特异性配体—半乳糖基团,使得PET纤维材料与半乳糖基团间具有更强的结合力,从而提高肝细胞与半乳糖基的粘附性,促进肝细胞的三维生长,维持肝细胞功能。以此实现体外肝细胞培养,大大降低了生物人工肝系统的生产成本,推动生物人工肝系统的临床应用。

## 附图说明

[0043] 图1为实施例1中所PET纤维经X射线电子能谱检测获得的N元素高分辨谱图;

[0044] 图2为实施例1中半乳糖基化PET纤维经X射线电子能谱检测获得的N元素高分辨谱图；

[0045] 图3为实施例1中半乳糖基化PET纤维上培养hiHep细胞7天后的细胞形态荧光染色图,放大倍数为20倍；

[0046] 图4为实施例2中半乳糖基化PET纤维经X射线电子能谱检测获得的N元素高分辨谱图；

[0047] 图5为实施例2所述半乳糖基化PET纤维培养hiHep细胞10天后的扫描电镜照片,放大倍数为1800倍；

[0048] 图6为实施例3中所述PET纤维经X射线电子能谱检测获得的全谱谱图；

[0049] 图7为实施例3中半乳糖基化PET纤维经X射线电子能谱检测获得的全谱谱图；

[0050] 图8是实施例3所述半乳糖基化PET纤维培养hiHep细胞7天后的扫描电镜照片,放大倍数为3000倍。

### 具体实施方式

[0051] 以下参考说明书附图介绍本发明的优选实施例,证明本发明可以实施,所述实施例可以向本领域中的技术人员完整介绍本发明,使其技术内容更加清楚和便于理解。本发明可以通过许多不同形式的实施例来得以体现,本发明的保护范围并非仅限于文中提到的实施例。

[0052] 实施例1

[0053] 在本实施例中,提供一种由半乳糖基化或半乳糖修饰的PET纤维,用于制作肝细胞三维培养生物支架。

[0054] 所述半乳糖基化或半乳糖修饰的PET纤维由以下方法制得。

[0055] (1) 等离子体表面处理

[0056] 将PET纤维放置于一现有的等离子体处理器之腔体内,腔体抽真空后通入氩气,随后进行放电反应,所述等离子体处理器的功率为30W,腔体内压强为150Pa,放电反应时间为20s；

[0057] (2) 气相接枝

[0058] 放电结束后,继续对步骤(1)中的腔体进行抽真空,随后通入减压产生的丙烯酸气体,使得丙烯酸气体均匀地喷射于步骤(1)获得的所述经等离子体处理的PET纤维的表面,获得接枝丙烯酸的PET纤维;其中,丙烯酸单体浓度为10% (V/V),处理器的功率为100W,腔体内压强为30Pa,反应时间为120s；

[0059] (3) 羧基活化

[0060] 将接枝丙烯酸的PET纤维浸没于羧基活化剂中活化羧基,完成后去离子水冲洗干净待用;其中,所述羧基活化剂为EDC/NHS的MES溶液,所述EDC的浓度为6mg/ml,NHS的浓度为2mg/ml；

[0061] (4) 制备半乳糖胺

[0062] 取15ml甲醇和15ml乙醇混合,随后加入0.5g乳糖酸溶解。减压蒸馏以除去甲醇和乙醇,反复三次直至溶剂蒸干,得到中间体。中间体以无水DMSO溶解,随后加入过量乙二醇(30ml),50℃冷凝回流2小时。再加入80ml丙酮沉淀,获得的固体真空干燥后即为本发明的半乳糖胺。

糖胺；称取一定量的所述半乳糖胺并溶于去离子水，配制成0.5g/1半乳糖胺溶液，待用；

[0063] (5) 酰胺反应

[0064] 将步骤(3)获得的PET纤维放入浓度为0.5g/1的半乳糖胺溶液中，4℃下反应，获得半乳糖基PET纤维。

[0065] 图1为作为原始材料的PET纤维经X射线电子能谱检测获得的N元素高分辨谱图；图2为本实施例获得的半乳糖基PET纤维经X射线电子能谱检测获得的N元素高分辨谱图。经X射线电子能谱检测，获得的半乳糖基PET纤维表面的N/C为0.03。由图1和图2相比较可见，图2中出现N元素峰而图1没有，说明图2所示的PET纤维表面成功接枝半乳糖基。

[0066] 将获得的半乳糖基PET纤维制成厚度为200~400μm的支架，将支架在70%的酒精中消毒24小时后放置于24孔板内，用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次。随后，在支架上加入100ml的含有hiHep细胞的HMM培养基孵育12小时，hiHepμ细胞接种密度为 $1 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>。随后加入1ml的HMM培养基，将孔板放入37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养hiHep细胞7天，获得如图3所示的细胞形态荧光染色图(放大20倍)。

[0067] 实施例2

[0068] 在本实施例中，提供一种由半乳糖基化或半乳糖修饰的PET纤维，用于制作肝细胞三维培养生物支架。

[0069] 所述半乳糖基化或半乳糖修饰的PET纤维由以下方法制得。

[0070] (1) 等离子体表面处理

[0071] 将PET纤维放置于一现有的等离子体处理器之腔体内，腔体抽真空后通入氩气，随后进行放电反应，所述等离子体处理器的功率为100W，腔体内压强为120Pa，放电反应时间为120s；

[0072] (2) 气相接枝

[0073] 放电结束后，继续对步骤(1)中的腔体进行抽真空，随后通入减压产生的丙烯酸气体，使得丙烯酸气体均匀地喷射于步骤(1)获得的所述经等离子体处理的PET纤维的表面，获得接枝丙烯酸的PET纤维；其中，丙烯酸单体浓度为30%(V/V)，处理器的功率为150W，腔体内压强为80Pa，反应时间为180s；

[0074] (3) 羧基活化

[0075] 将接枝丙烯酸的PET纤维浸没于羧基活化剂中活化羧基，完成后去离子水冲洗干净待用；其中，所述羧基活化剂为EDC/NHS的MES溶液，所述EDC的浓度为20mg/ml，NHS的浓度为60mg/ml；

[0076] (4) 制备半乳糖胺

[0077] 取10ml甲醇和20ml乙醇混合，随后加入1g乳糖酸溶解。减压蒸馏以除去甲醇和乙醇，反复三次直至溶剂蒸干，得到中间体。中间体以无水DMSO溶解，随后加入过量乙二胺(40ml)，60℃冷凝回流3小时。再加入50ml丙酮沉淀，获得的固体真空干燥后即所述半乳糖胺；称取一定量的所述半乳糖胺并溶于去离子水，配制成1.0g/1半乳糖胺溶液，待用；

[0078] (5) 酰胺反应

[0079] 将步骤(3)获得的PET纤维放入浓度为1.0g/1的半乳糖胺溶液中，6℃下反应，获得半乳糖基PET纤维。

[0080] 图4为本实施例获得的半乳糖基PET纤维经X射线电子能谱检测获得的N元素高分



辨谱图。经X射线电子能谱检测,获得的半乳糖基PET纤维表面的N/C为0.04。由图4可见,PET纤维表面成功接枝半乳糖基。

[0081] 将获得的半乳糖基PET纤维制成厚度为200~400 $\mu\text{m}$ 的支架,将支架在70%的酒精中消毒24小时后放置于24孔板内,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次。随后,在支架上加入100ml的含有hiHep细胞的HMM培养基孵育12小时,hiHep细胞接种密度为 $5 \times 10^4$ 个/ $\text{cm}^2$ 。随后加入1ml的HMM培养基,将孔板放入37 $^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 的培养箱内培养hiHep细胞10天,获得如图5所示的扫描电镜照片,放大倍数为1800。

[0082] 实施例3

[0083] 在本实施例中,提供一种由半乳糖基化或半乳糖修饰的PET纤维,用于制作肝细胞三维培养生物支架。

[0084] 所述半乳糖基化或半乳糖修饰的PET纤维由以下方法制得。

[0085] (1) 等离子体表面处理

[0086] 将PET纤维放置于一现有的等离子体处理器之腔体内,腔体抽真空后通入氩气,随后进行放电反应,所述等离子体处理器的功率为200W,腔体内压强为120Pa,放电反应时间为240s;

[0087] (2) 气相接枝

[0088] 放电结束后,继续对步骤(1)中的腔体进行抽真空,随后通入减压产生的丙烯酸气体,使得丙烯酸气体均匀地喷射于步骤(1)获得的所述经等离子体处理的PET纤维的表面,获得接枝丙烯酸的PET纤维;其中,丙烯酸单体浓度为60%(V/V),处理器的功率为180W,腔体内压强为150Pa,反应时间为100s;

[0089] (3) 羧基活化

[0090] 将接枝丙烯酸的PET纤维浸没于羧基活化剂中活化羧基,完成后去离子水冲洗干净待用;其中,所述羧基活化剂为EDC/NHS的MES溶液,所述EDC的浓度为35mg/ml,NHS的浓度为100mg/ml;

[0091] (4) 制备半乳糖胺

[0092] 取10ml甲醇和40ml乙醇混合,随后加入1.5g乳糖酸溶解。减压蒸馏以除去甲醇和乙醇,反复三次直至溶剂蒸干,得到中间体。中间体以无水DMSO溶解,随后加入过量乙二胺(60ml),80 $^\circ\text{C}$ 冷凝回流6小时。再加入30ml丙酮沉淀,获得的固体真空干燥后即所述半乳糖胺;称取一定量的所述半乳糖胺并溶于去离子水,配制成5g/l半乳糖胺溶液,待用;

[0093] (5) 酰胺反应

[0094] 将步骤(3)获得的PET纤维放入浓度为5g/l的半乳糖胺溶液中,10 $^\circ\text{C}$ 下反应72小时,获得半乳糖基PET纤维。

[0095] 图6为作为原始材料的PET纤维经X射线电子能谱检测获得的全谱谱图;图7为本实施例获得的半乳糖基PET纤维经X射线电子能谱检测获得的全谱谱图。经X射线电子能谱检测,获得的半乳糖基PET纤维表面的N/C为0.05。由图6和图7相比较可见,图7中出现N元素峰而图6没有,说明图7所示的PET纤维表面成功接枝半乳糖基。

[0096] 将获得的半乳糖基PET纤维制成厚度为200~400 $\mu\text{m}$ 的支架,将支架在70%的酒精中消毒24小时后放置于24孔板内,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次。随后,在支架上加入100ml的含有hiHep细胞的HMM培养基孵育12小时,hiHep细胞接种密度为 $5 \times 10^5$ 个/ $\text{cm}^2$ 。随后

加入1ml的HMM培养基,将孔板放入37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养hiHep细胞7天,获得如图8所示的扫描电镜照片,放大倍数为3000。

[0097] 本发明所述的生物支架及其制备方法,基于PET纤维材料的良好特性,结合利用丙烯酸在支架与功能分子间的“架桥”作用,在PET纤维材料上接枝肝细胞特异性配体—半乳糖基团,使得PET纤维材料与半乳糖基团间具有更强的结合力,从而提高肝细胞与半乳糖基的粘附性,促进肝细胞的三维生长,维持肝细胞功能。以此实现体外肝细胞培养,大大降低了生物人工肝系统的生产成本,推动生物人工肝系统的临床应用。

[0098] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,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。

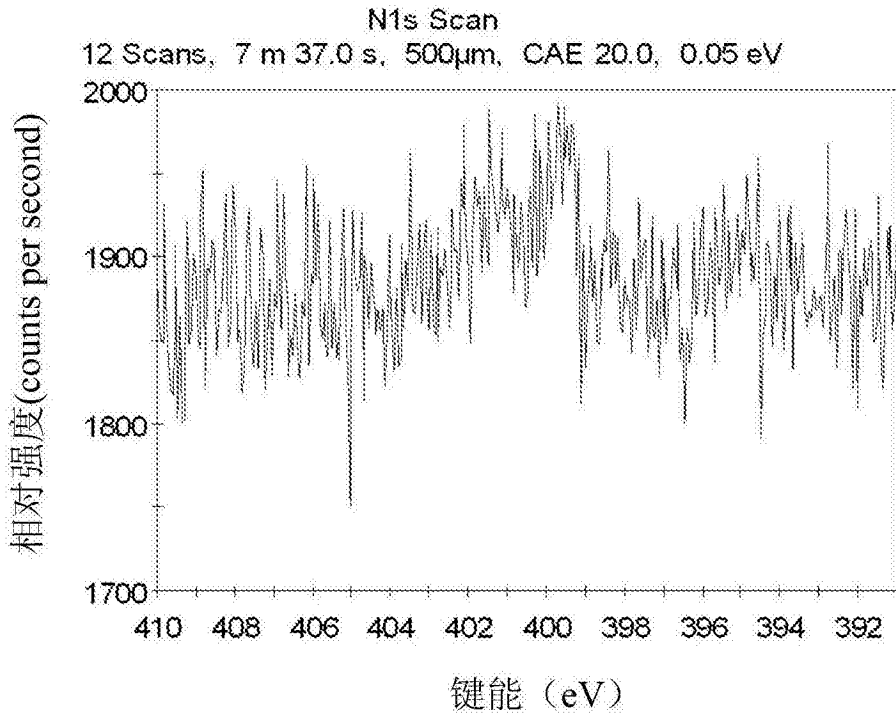


图1

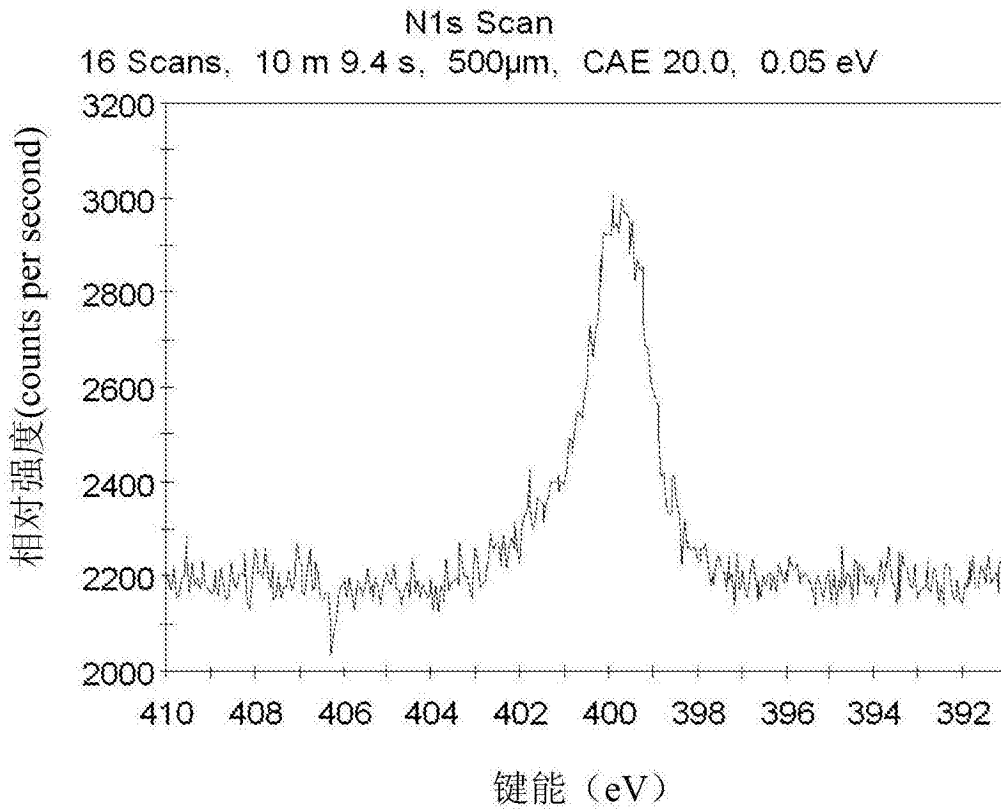


图2

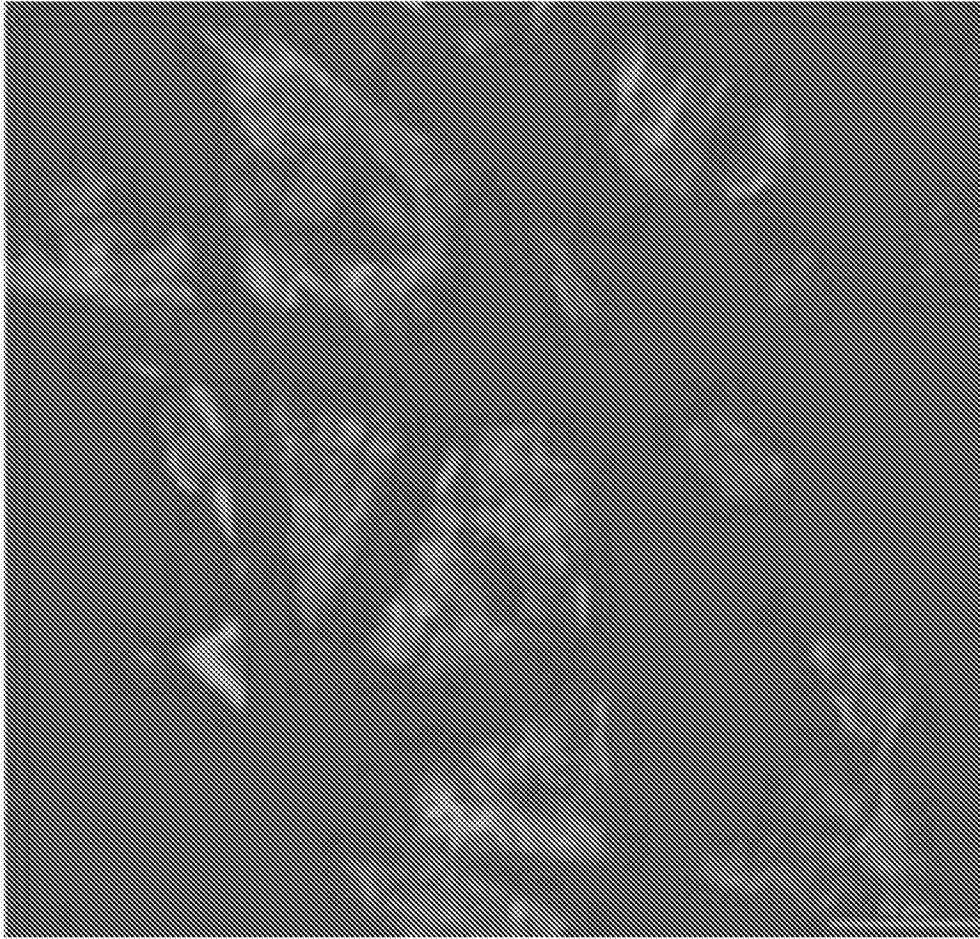


图3

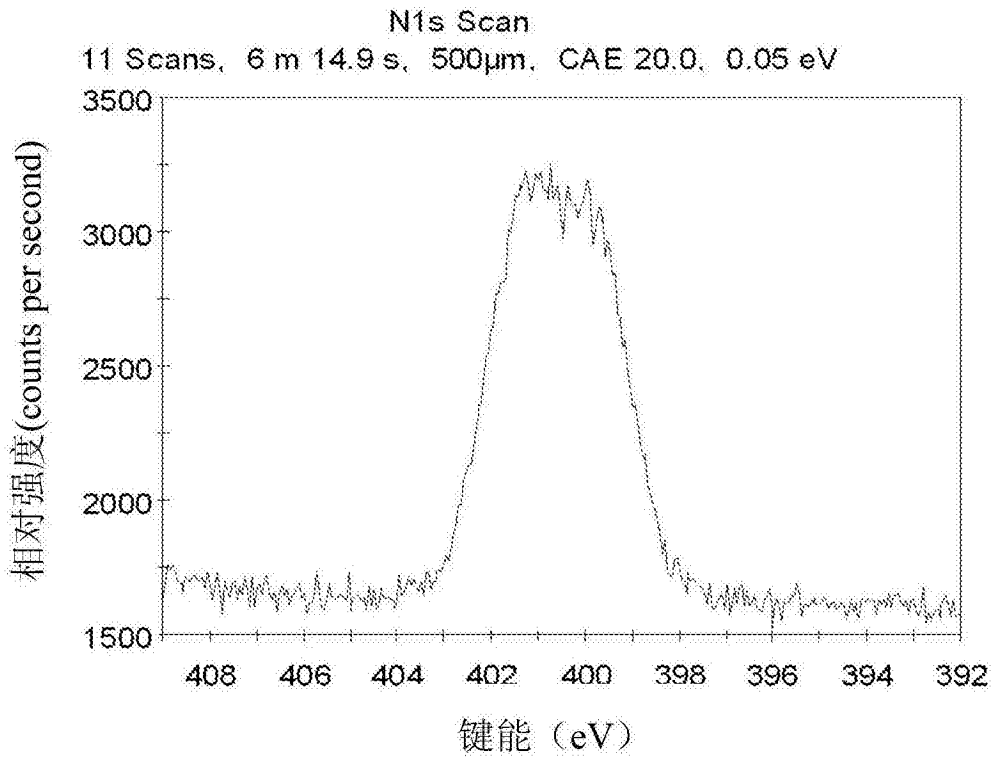


图4

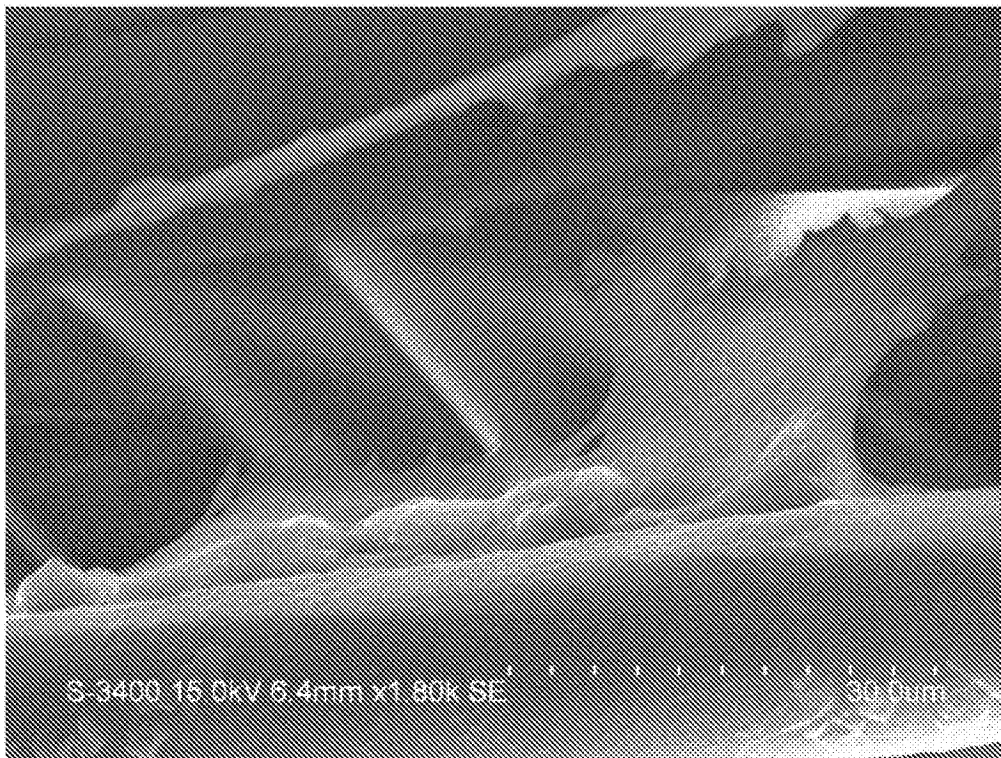


图5

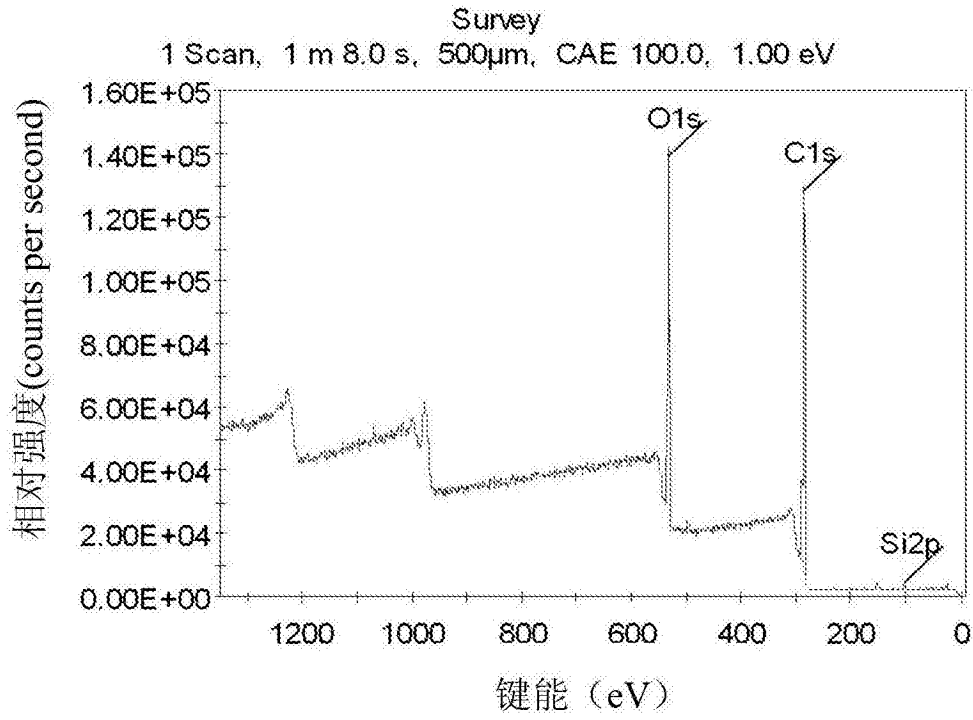


图6

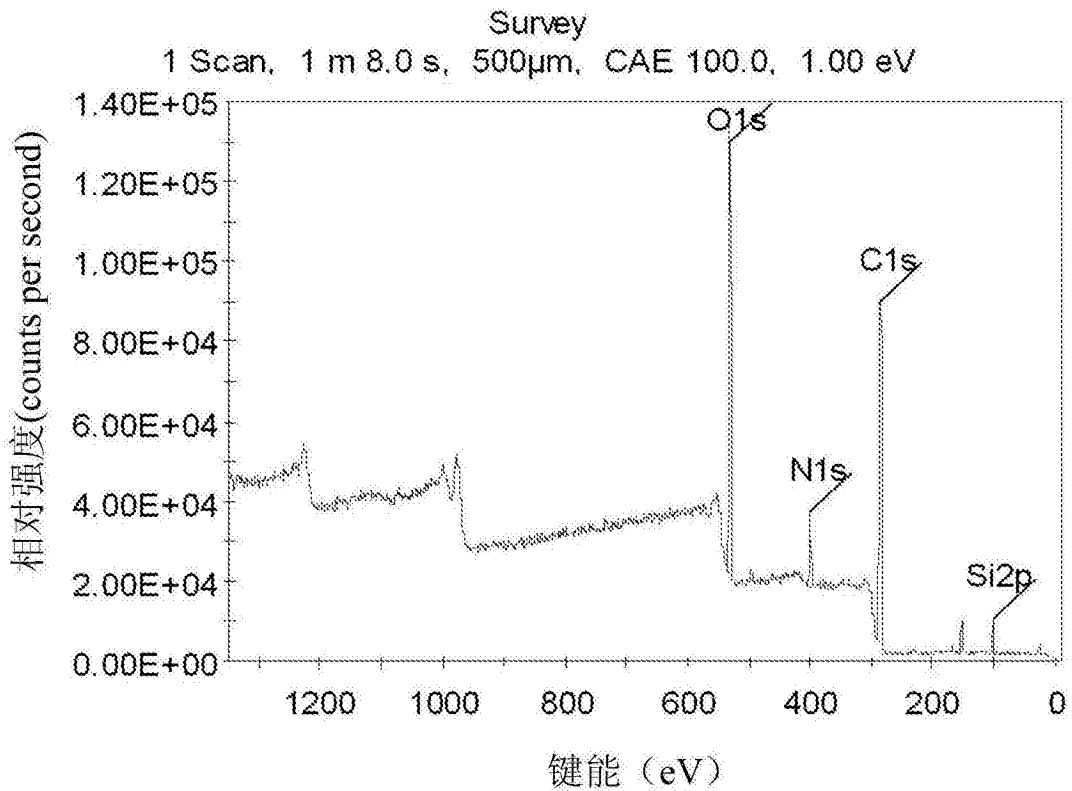


图7

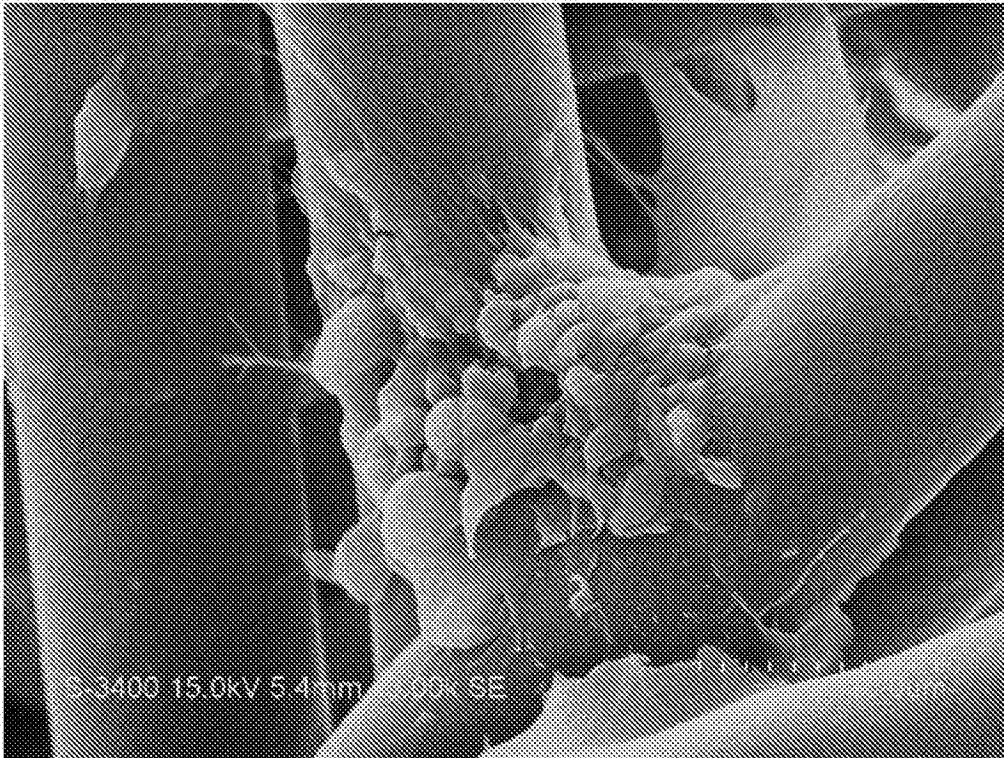


图8