



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116099047 A

(43) 申请公布日 2023.05.12

(21) 申请号 202211689534.0

D04H 1/728 (2012.01)

(22) 申请日 2022.12.27

D01D 5/00 (2006.01)

(71) 申请人 湖南美柏生物医药有限公司

地址 410300 湖南省长沙市浏阳经济技术  
开发区湘台路18号长沙E中心一期B1  
栋103、104号房

(72) 发明人 魏强 郭慧 肖锲

(74) 专利代理机构 北京市万慧达律师事务所

11111

专利代理师 张兴利

(51) Int. Cl.

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/02 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

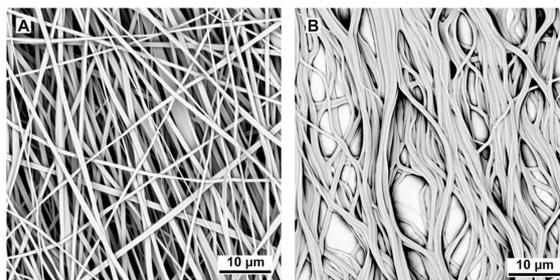
权利要求书2页 说明书9页 附图12页

### (54) 发明名称

一种低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜及其制备方法

### (57) 摘要

本发明属于生物医学复合材料技术领域,具体涉及一种低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜及其制备方法,所述纤维膜包括如下组分:改性明胶、负载锌离子的材料、溶剂;所述改性明胶包括:甲基丙烯酸酯明胶、甲基丙烯酰胺明胶、丙烯酸酯明胶、丙烯酰胺化明胶中的任意一种或者更多种。用于细胞培养时,通过力学信号和金属离子的协同作用,诱导了体外间充质干细胞的黏附和成骨分化、体内新骨的再生,体现出其良好的骨诱导和骨再生能力,为通过多种调控因素的仿生设计提高缺损骨组织的功能重建提供了新的思路。



1. 一种柔性纤维膜,其特征在于,包括如下组分:改性明胶、负载锌离子的材料、溶剂;  
所述改性明胶包括:甲基丙烯酸酯明胶、甲基丙烯酰胺明胶、丙烯酸酯明胶、丙烯酰胺化明胶中的任意一种或者更多种。

2. 如权利要求1所述的纤维膜,其特征在于,所述负载锌离子的材料包括:含有锌离子的盐、锌离子螯合结构、锌基金属有机框架材料中的任意一种或者更多种。

3. 如权利要求1所述的纤维膜,其特征在于,以mg:mg:ml计,所述改性明胶、负载锌离子的材料以及溶剂的添加比例为:50-250:0.1-100:0.5-2;优选地,所述改性明胶、负载锌离子的材料以及溶剂的添加比例为:80-200:1-20:0.5-2。

4. 如权利要求2所述的纤维膜,其特征在于,所述含有锌离子的盐包括: $ZnCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $Zn(NO_3)_2$ 、 $Zn(ClO_4)_2$ 中的任意一种或者更多种;

优选地,所述锌离子螯合结构包括:氨基酸螯合锌、柠檬酸锌螯合物中的任意一种或者更多种;

优选地,所述锌基金属有机框架材料包括Zn-MOF-74、ZIF-67、ZIF-8、ZIF-11中的任意一种或者更多种;

优选地,所述溶剂包括:氯仿、甲醇、四氢呋喃、六氟异丙醇以及三氟乙醇中的任意一种或者更多种。

5. 如权利要求1-4任一所述的纤维膜,其特征在于,所述纤维膜的孔隙度为:80%-90%;

优选地,所述纤维膜的密度为: $1.2-1.4g/cm^3$ ;

优选地,所述纤维膜的模量为0.5-6KPa;

优选地,所述纤维膜的接枝率为20%-70%;优选地,所述纤维膜的接枝率为20%-60%;优选地,所述纤维膜的接枝率为20%-40%;优选地,所述纤维膜的溶胀率为1-3;优选地,所述纤维膜的募集率为1.05-1.50。

6. 一种如权利要求1-5任一所述的纤维膜的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将改性明胶溶解于所述溶剂中,得到静电纺丝预制液;

(2) 将所述静电纺丝预制液与负载锌离子的材料混合,得到静电纺丝工作液;

(3) 将所述静电纺丝工作液通过,制备得到所述纤维膜。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述静电纺丝工艺包括:将所述静电纺丝工作液注入静电纺丝针管中,装配至静电纺丝机上,调节静电纺丝参数,制备得到所述纤维膜维膜;

优选地,所述静电纺丝的参数包括:施加电压、接收距离、流速、纺丝时间;

优选地,所述施加电压为:10-30KV;所述接收距离为:10-40cm;所述流速为:0.006-0.012ml/min;所述纺丝时间为:2h-6h。

8. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:对步骤(3)制备得到的纤维膜使用交联剂溶液进行交联,得到交联后的纤维膜;优选地,所述交联后的纤维膜的溶胀率为1-3,募集率为1.05-1.50;

优选地,所述交联剂选自:2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基膦酸锂中的任意一种或者两种;优选地,所述交联剂溶液的溶剂选自:水、甲醇、乙醇中的任意一种或者多种;优选地,所述光交联剂溶液中交联剂的浓度为50-300mg/ml;

优选地,所述光交联剂溶液中交联剂的浓度为80-200mg/ml。

9.如权利要求1-5任一所述的纤维膜或者如权利要求6-8任一所述的方法在制备骨或者软骨修复材料中的应用。

10.如权利要求1-5任一所述的纤维膜在人工仿生骨膜、诱导骨再生膜和引导组织再生膜中的应用。

## 一种低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学复合材料技术领域,涉及一种低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 由创伤、炎症、肿瘤等疾病造成的骨和软骨缺损发病率高,并伴随着老龄化程度的加剧不断增长。细胞外基质(ECM)重塑是缺损修复的重要环节,受到细胞和生长因子的调控,但由于骨和软骨缺损区域内源性细胞和生长因子的供给有限,需要移植或替代材料递送外源性细胞和生长因子来助力缺损修复。水凝胶材料是目前最常用的骨修复材料,然而其需要达到较高的硬度才能促进细胞力,而材料达到很高的硬度时又会因为其降解太慢容易诱发炎症。因此,需要开发一类易降解的“软材料”用于骨和软骨修复再生。

### 发明内容

[0003] 本发明目的在于提供一种低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜及其制备方法。

[0004] 首先,明胶作为天然ECM中常见的成分,具有良好的生物相容性和生物降解性,通过静电纺丝制备的明胶纤维膜一方面能在细胞力的作用下形变,产生更大的反作用力,促进细胞黏附,进而诱导干细胞成骨分化;另一方面纤维结构能更好的模拟天然ECM的形态。其次,骨骼中存在多种金属微量元素,它们在促进成骨相关细胞生长以及功能分化方面起着重要作用,金属微量元素也是维持骨代谢必不可少的微量元素。近年来金属微量元素在骨组织修复中的作用越来越得到重视,越来越多负载锌离子的材料被用于骨修复中。其中,金属有机框架(MOF)是一类由金属离子与有机框架所构建而成的晶体材料,其具有结构多样、比表面积大、腔体均匀等特点。基于此,本发明基于改性的明胶、多负载锌离子的材料、以及结合静电纺丝工艺,提供了一种低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜。

[0005] 一方面,本发明提供了一种柔性纤维膜,所述柔性纤维膜通过如下组分制备得到:改性明胶、负载锌离子的材料、溶剂;所述改性明胶包括:甲基丙烯酸酯明胶、甲基丙烯酰胺明胶、丙烯酸酯明胶、丙烯酰胺化明胶中的任意一种或者更多种。

[0006] 在本发明所提供的上述方案中,首先,相比于普通明胶,本发明所提供的上述纤维膜具有较低的模量以及较好的细胞粘附能力;其次,相比其他静电纺丝材料纤维膜,因为本发明所提供的明胶纤维膜易降解,且模量低,能避免诱发炎症;本发明提供的纤维膜具有较好的富集能力,能被细胞较好的富集,实现了较好的促细胞增殖粘附能力。

[0007] 在一些实施方案中,所述负载锌离子的材料包括:含有锌离子的盐、锌离子螯合结构、锌基金属有机框架材料中的任意一种或者更多种。

[0008] 在一些实施方案中,以mg:mg:ml计,所述改性明胶、负载锌离子的材料以及溶剂的添加比例为:50-250:0.1-100:0.5-2;优选地,所述改性明胶、负载锌离子的材料以及溶剂的添加比例为:80-200:1-20:0.5-2;优选地,所述改性明胶、负载锌离子的材料以及溶剂的添加比例为:120-150:1-5:1-2。

[0009] 在一些实施方案中,所述含有锌离子的盐包括: $ZnCl_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $Zn(NO_3)_2$ 、 $Zn(ClO_4)_2$ 中的任意一种或者更多种。

[0010] 在一些实施方案中,所述锌离子螯合结构包括:氨基酸螯合锌、柠檬酸锌螯合物中的任意一种或者更多种。

[0011] 在一些实施方案中,所述锌基金属有机框架材料包括Zn-MOF-74、ZIF-67、ZIF-8、ZIF-11中的任意一种或者更多种。

[0012] 在一些实施方案中,所述溶剂包括:氯仿、甲醇、四氢呋喃、六氟异丙醇以及三氟乙醇中的任意一种或者更多种。

[0013] 在一些实施方案中,所述纤维膜的孔隙度为:80%-90%;密度为: $1.2-1.4\text{g/cm}^3$ 。

[0014] 在一些实施方案中,所述纤维膜的模量为:0.5-6Kpa;优选地,所述纤维膜的模量为:0.8-3Kpa;优选地,所述纤维膜的模量为:0.8-1.5Kpa。

[0015] 在一些实施方案中,所述纤维膜的接枝率为20%-70%;优选地,所述纤维膜的接枝率为20%-60%;优选地,所述纤维膜的接枝率为20%-40%;优选地,所述纤维膜的接枝率为30%。

[0016] 在一些实施方案中,所述纤维膜的溶胀率为1-3,募集率为1.05-1.50。

[0017] 另一方面,本发明还提供了一种所述的纤维膜的制备方法,包括如下步骤:

[0018] (1)将改性明胶溶解于所述溶剂中,得到静电纺丝预制液;

[0019] (2)将所述静电纺丝预制液与负载锌离子的材料混合,得到静电纺丝工作液;

[0020] (3)将所述静电纺丝工作液通过,制备得到所述纤维膜。

[0021] 在一些实施方案中,所述静电纺丝工艺包括:将所述静电纺丝工作液注入静电纺丝针管中,装配至静电纺丝机上,调节静电纺丝参数,制备得到所述纤维膜。

[0022] 在一些实施方案中,所述静电纺丝的参数包括:施加电压、接收距离、流速、纺丝时间。

[0023] 在一些实施方案中,所述施加电压为:10-30KV;所述接收距离为:10-40cm;所述流速为:0.006-0.012ml/min;所述纺丝时间为:2h-6h;优选地,所述施加电压为:25KV;所述接收距离为:20cm;所述流速为:0.008ml/min;所述纺丝时间为:4h。

[0024] 在一些实施方案中,所述方法还包括:对步骤(3)制备得到的纤维膜使用交联剂溶液进行交联,得到交联后的纤维膜。

[0025] 在一些实施方案中,所述交联后的纤维膜的溶胀率为1-3,募集率为1.05-1.50。

[0026] 在一些实施方案中,所述交联剂选自:2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基膦酸锂中的任意一种或者两种。

[0027] 在一些实施方案中,所述交联剂溶液的溶剂选自:水、甲醇、乙醇中的任意一种或者多种。

[0028] 在一些实施方案中,所述光交联剂溶液中交联剂的浓度为50-300mg/ml;优选地,所述光交联剂溶液中交联剂的浓度为80-200mg/ml;优选地,所述光交联剂溶液中交联剂的浓度为150-200mg/ml;优选地,所述光交联剂溶液中交联剂的浓度为140-160mg/ml。

[0029] 再另一方面,本发明还提供了一种所述的纤维膜或者所述的方法在制备骨或者软骨修复材料中的应用。

[0030] 本发明还提供了一种所述的纤维膜在人工仿生骨膜、诱导骨再生膜和引导组织再

生膜中的应用。

[0031] 综上所述,本申请包括以下至少一种有益技术效果:

[0032] (1)首先,相比于普通明胶,本发明所提供的上述纤维膜具有较低的模量以及较好的细胞粘附能力;其次,相比其他静电纺丝材料纤维膜,因为本发明所提供的明胶纤维膜易降解,且模量低,能避免诱发炎症;且本发明提供的纤维膜具有较好的富集能力,能被细胞较好的富集,达到较好的促细胞增殖粘附能力。

[0033] (2)本发明提供了一种负载锌离子并能促进细胞力的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜,使用溶剂溶解原料,按比例配置负载锌离子的材料,制备静电纺丝液,通过调整静电纺丝参数,制备出具有优异促进细胞力的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜材料。

[0034] (3)将本发明提供的该纤维膜材料用于细胞培养时,通过力学信号和金属离子的协同作用,诱导了体外间充质干细胞的黏附和成骨分化、体内新骨的再生,体现出其良好的骨诱导和骨再生能力,为通过多种调控因素的仿生设计提高缺损骨组织的功能重建提供新的思路。

## 附图说明

[0035] 图1为本发明实施例制备得到的明胶纤维膜扫描电子显微镜图;其中,A:初始干态下的明胶纤维膜表面形貌;B:交联后的明胶纤维膜表面形貌;

[0036] 图2为对比例1中明胶凝胶与本发明的明胶纤维膜两种材料的模量统计图,其中, fiber:明胶纤维膜;hydrogel:明胶凝胶;

[0037] 图3为对比例1中细胞在两种材料上的黏附铺展情况图;其中,A:明胶凝胶上的细胞铺展;B:明胶纤维膜上的细胞铺展;

[0038] 图4为对比例1中细胞在两种材料中的黏附有关蛋白p-Myosin II a的荧光图;其中,A:明胶凝胶上的细胞p-Myosin II a蛋白表达情况;B:明胶纤维膜上的细胞p-Myosin II a的蛋白表达;

[0039] 图5为对比例1中细胞在两种材料中的黏附有关蛋白LaminA/C的荧光图;其中,A:明胶凝胶上细胞LaminA/C的蛋白表达情况;B:明胶纤维膜上细胞LaminA/C蛋白的表达情况;

[0040] 图6为对比例1中细胞在两种材料中的黏附有关蛋白表达数据统计图,其中,A:p-Myosin II a蛋白相对表达量数据统计图;B:LaminA/C蛋白相对表达量数据统计图;

[0041] 图7为对比例2中两种接枝率的材料模量统计图;其中,Fiber-30%:接枝率为30%的明胶纤维膜;Fiber-60%:接枝率为60%的明胶纤维膜;

[0042] 图8为对比例2中接枝率为30%的明胶纤维膜的溶胀前后对比图;其中,A:接枝率为30%的明胶纤维膜溶胀前;B:接枝率为30%的明胶纤维膜溶胀后;C:接枝率为60%的明胶纤维膜溶胀前;D:接枝率为60%的明胶纤维膜溶胀后;

[0043] 图9为对比例2中两种接枝率纤维膜的溶胀率统计图;其中,Fiber-30%:接枝率为30%的明胶纤维膜;Fiber-60%:接枝率为60%的明胶纤维膜;

[0044] 图10为对比例2中的明胶纤维膜的募集前后对比图;其中,A:接枝率为30%的明胶纤维膜募集前;B:接枝率为30%的明胶纤维膜募集后;C:接枝率为60%的明胶纤维膜募集前;D:接枝率为60%的明胶纤维膜募集后;

[0045] 图11为对比例2中两种纤维膜的募集率统计图;其中,Fiber-30%:接枝率为30%的明胶纤维膜;Fiber-60%:接枝率为60%的明胶纤维膜;

[0046] 图12为对比例2中细胞在两种材料中的黏附有关蛋白p-Myosin II a的荧光图;其中,A:接枝率为30%的明胶纤维膜细胞p-Myosin II a蛋白表达情况;B:接枝率为60%的明胶纤维膜p-Myosin II a蛋白表达情况;

[0047] 图13为对比例2中细胞在两种材料中的黏附有关蛋白LaminA/C的荧光图;其中,A:接枝率为30%的明胶纤维膜细胞LaminA/C蛋白表达情况;B:接枝率为60%的明胶纤维膜LaminA/C蛋白表达情况;

[0048] 图14为对比例3中两种纤维膜的模量统计图;其中,Fiber-0mg/ml:未负载锌离子材料的明胶纤维膜;Fiber-2mg/ml:负载锌离子材料的明胶纤维膜;

[0049] 图15为对比例3中细胞在两种材料中的黏附有关蛋白p-Myosin II a的荧光图;其中,A:未负载锌离子材料的明胶纤维膜上细胞p-Myosin II a蛋白表达情况;B:负载锌离子材料的明胶纤维膜上细胞p-Myosin II a蛋白表达;

[0050] 图16为对比例3中细胞在两种材料中的黏附有关蛋白p-FAK的荧光图;其中,A:未负载有锌离子材料的明胶纤维膜上细胞p-FAK蛋白表达情况;B:负载锌离子材料的明胶纤维膜上细胞p-FAK蛋白表达;

[0051] 图17为对比例3中细胞在两种材料中的黏附有关蛋白数据统计图;其中,A:p-Myosin II a蛋白相对表达量数据统计图;B:p-FAK蛋白相对表达量数据统计图;

[0052] 图18为对比例3中碱性磷酸酶(ALP)测定的间充质干细胞7天成骨分化对比结果图;其中,A:明胶纤维膜诱导细胞分化结果;B:负载锌离子材料的明胶纤维膜诱导细胞分化结果;

[0053] 图19为对比例4中材料填充30天后大鼠体内骨缺损修复图像对比图;其中,A:空白组股骨愈合情况;B:负载锌离子材料的明胶纤维膜组股骨愈合情况。

## 具体实施方式

[0054] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案,具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

[0055] 本申请提供的实施例中,原料来源如下:

[0056] 明胶:购买自阿拉丁,货号为V900863;六氟异丙醇:购买自麦克林,货号为H811026;静电纺丝机:购买自北京新锐佰纳科技有限公司,型号为TADFS-103。

[0057] 实施例1一种促进细胞力的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜的制备方法

[0058] 一种促进细胞力的明胶静电纺丝纤维膜的制备方法,包含如下步骤:

[0059] (1)将甲基丙烯酸酐化明胶按120mg/ml的比例溶解于六氟异丙醇溶剂中,得到静电纺丝预制液;

[0060] (2)将负载锌离子的材料:Zn-MOF-74按2mg/ml的比例与步骤(1)得到的静电纺丝预制液混合,得到静电纺丝工作液;

[0061] (3)将步骤(2)得到的静电纺丝工作液注入静电纺丝针管中,装配至静电纺丝机上,调节静电纺丝的参数:施加电压为25KV,接收距离为20cm,流速为0.008ml/min,纺丝时

间为4h,即可得到促进细胞力的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜;

[0062] (4)将光交联剂:2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮(Irgacure2959)溶解于甲醇溶剂中,最终配置得到终浓度为150mg/mL的光交联溶液,将步骤(3)得到的纤维膜在光交联溶液中进行交联,得到交联后的纤维膜。

[0063] 实施例2

[0064] 一种促进细胞力的明胶静电纺丝纤维膜的制备方法,包含如下步骤:

[0065] (1)将甲基丙烯酸酐化明胶按150mg/ml的比例溶解于六氟异丙醇溶剂中,得到静电纺丝预制液;

[0066] (2)将负载锌离子的材料:Zn-MOF-74按4mg/ml的比例与步骤(1)得到的静电纺丝预制液混合,得到静电纺丝工作液;

[0067] (3)将步骤(2)得到的静电纺丝工作液注入静电纺丝针管中,装配至静电纺丝机上,调节静电纺丝的参数:施加电压为25KV,接收距离为20cm,流速为0.008ml/min,纺丝时间为4h,即可得到促进细胞力的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜;

[0068] (4)将光交联剂:2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮(Irgacure2959)溶解于甲醇溶剂中,最终配置得到终浓度为150mg/mL的光交联溶液,将步骤(3)得到的纤维膜在光交联溶液中进行交联,得到交联后的纤维膜。

[0069] 实施例3

[0070] 一种促进细胞力的明胶静电纺丝纤维膜的制备方法,包含如下步骤:

[0071] (1)将甲基丙烯酸酐化明胶按120mg/ml的比例溶解于六氟异丙醇溶剂中,得到静电纺丝预制液;

[0072] (2)将负载锌离子的材料:Zn-MOF-74按4mg/ml的比例与步骤(1)得到的静电纺丝预制液混合,得到静电纺丝工作液;

[0073] (3)将步骤(2)得到的静电纺丝工作液注入静电纺丝针管中,装配至静电纺丝机上,调节静电纺丝的参数:施加电压为25KV,接收距离为20cm,流速为0.008ml/min,纺丝时间为4h,即可得到促进细胞力的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜;

[0074] (4)将光交联剂:2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮(Irgacure2959)溶解于甲醇溶剂中,最终配置得到终浓度为150mg/mL的光交联溶液,将步骤(3)得到的纤维膜在光交联溶液中进行交联,得到交联后的纤维膜。

[0075] 实施例4

[0076] 一种促进细胞力的明胶静电纺丝纤维膜的制备方法,包含如下步骤:

[0077] (1)将丙烯酰胺化明胶按120mg/ml的比例溶解于六氟异丙醇溶剂中,得到静电纺丝预制液;

[0078] (2)将负载锌离子的材料:Zn-MOF-74按2mg/ml的比例与步骤(1)得到的静电纺丝预制液混合,得到静电纺丝工作液;

[0079] (3)将步骤(2)得到的静电纺丝工作液注入静电纺丝针管中,装配至静电纺丝机上,调节静电纺丝的参数:施加电压为25KV,接收距离为20cm,流速为0.008ml/min,纺丝时间为4h,即可得到促进细胞力的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜;

[0080] (4)将光交联剂:2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮(Irgacure2959)溶解于甲醇溶剂中,最终配置得到终浓度为150mg/mL的光交联溶液,将步骤(3)得到的纤维膜在光

交联溶液中进行交联,得到交联后的纤维膜。

[0081] 实施例5

[0082] 一种促进细胞力的明胶静电纺丝纤维膜的制备方法,包含如下步骤:

[0083] (1) 将甲基丙烯酸酐化明胶按120mg/ml的比例溶解于六氟异丙醇溶剂中,得到静电纺丝预制液;

[0084] (2) 将负载锌离子的材料:柠檬酸锌螯合物按2mg/ml的比例与步骤(1)得到的静电纺丝预制液混合,得到静电纺丝工作液;

[0085] (3) 将步骤(2)得到的静电纺丝工作液注入静电纺丝针管中,装配至静电纺丝机上,调节静电纺丝的参数:施加电压为25KV,接收距离为20cm,流速为0.008ml/min,纺丝时间为4h,即可得到促进细胞力的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜;

[0086] (4) 将光交联剂:2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮(Irgacure2959)溶解于甲醇溶剂中,最终配置得到终浓度为150mg/mL的光交联溶液,将步骤(3)得到的纤维膜在光交联溶液中进行交联,得到交联后的纤维膜。

[0087] 效果例1

[0088] 实施例1-5得到的纤维膜的孔隙度为:80%-90%;密度为:1.2-1.4g/cm<sup>3</sup>。并进一步将上述实施例制备得到未交联的纤维膜与交联后的纤维膜分别通过扫描电子显微镜进行观察,结果表明:未交联的纤维膜和交联后的纤维膜均具有纳米纤维形态和孔隙结构,有利于细胞更好的黏附和铺展。实施例1中未交联的纤维膜以及交联后的纤维膜分别通过扫描电子显微镜进行观察的扫描电子显微镜图具体如图1所示,结果表明:未交联的纤维膜和交联后的纤维膜均具有纳米纤维形态和孔隙结构,有利于细胞更好的黏附和铺展。

[0089] 对比例1

[0090] 该对比例对现有技术公开的普通明胶凝胶与交联后的接枝率为30%的明胶纤维膜(未负载锌离子的材料)的促细胞黏附能力以促相关蛋白的表达情况进行了探索分析,具体如下:

[0091] 该对比例中,接枝率为30%的明胶纤维膜的制备方法参照实施例1的方法进行,与实施例1的不同之处在于:步骤(2)中,将锌离子材料按0mg/ml的比例与步骤(1)得到的静电纺丝预制液混合,得到静电纺丝工作液,其余步骤及条件均相同,制备得到接枝率为30%的明胶纤维膜(未负载锌离子的材料)。

[0092] 黏着斑连接细胞内肌动球蛋白(Actomyosin)骨架,并将细胞内分子马达-肌球蛋白(Myosin)的牵引力传递到ECM,通过黏着斑建立了机械力的双向传递。肌球蛋白(Myosin)对细胞的运动与细胞内物质传输起着重要的作用,其在一定程度上反应了细胞的黏附情况。核纤层蛋白(LaminA/C)是细胞核内骨架蛋白,是构成核纤层的主要成分,属于中间纤维的一种。近年来发现,核纤层蛋白(LaminA/C)能够促进细胞的分化,促进肌肉的生长等。粘着斑激酶(FAK)是一种细胞质蛋白酪氨酸激酶,在胚胎发育和人类疾病(包括癌症和心血管疾病)的发病机制中发挥重要作用,长期以来被认为是细胞迁移的调节剂。在大多数实验系统中,增强的FAK信号传导促进细胞运动,而通过各种方法抑制FAK信号传导会损害细胞迁移。FAK在控制随机迁移细胞的运动和响应广泛的刺激(包括趋化、趋触和定向信号)中发挥作用。

[0093] 将上述接枝率为30%的明胶纤维膜和普通明胶凝胶进行灭菌后,并使用无菌PBS

清洗5次后,接种间充质干细胞(hASCs),随后放进CO<sub>2</sub>培养箱中进行体外培养,培养24h后,对细胞黏附相关蛋白的表达情况进行统计分析,结果如图2-图6所示:

[0094] 如图2所示,通过纳米压痕仪测量结果得知,上述普通明胶凝胶的模量为3Kpa,接枝率为30%的明胶纤维膜的模量为0.8Kpa。

[0095] 如图3所示,与模量为3Kpa的明胶凝胶相比,细胞在模量为0.8Kpa的明胶纤维膜上细胞铺展情况更好,即,细胞在模量更小的明胶纤维膜上细胞铺展情况更好,更有助于细胞的粘附增殖生长;同时,因为明胶纤维膜易降解,模量低,相比其他静电纺丝材料纤维膜,能避免诱发炎症。

[0096] 如图4、图5所示,从细胞在明胶纤维膜以及明胶凝胶两种不同材料中的p-Myosin II a和LaminA/C表达情况看,与模量为3Kpa的明胶凝胶相比,在模量更小的明胶纤维膜(0.8Kpa)上,细胞黏附相关蛋白的表达量更高,诱导细胞黏附情况更好。

[0097] 如图6所示,对p-Myosin II a和LaminA/C在明胶纤维膜以及明胶凝胶两种不同材料中的表达情况进行数据统计,结果与图4、图5的结果相同,与明胶凝胶(3Kpa)相比,在模量更小的明胶纤维膜(0.8Kpa)上,细胞黏附相关蛋白的表达量更高,诱导细胞黏附情况更好。

[0098] 对比例2

[0099] 该对比例对将明胶纤维膜进行交联后得到的不同接枝率的明胶纤维膜(未负载锌离子材料)的纤维溶胀情况以及募集情况进行了对比分析,具体如下:

[0100] (1)分别对不同接枝率的明胶纤维膜进行灭菌,并使用无菌PBS浸泡24h后,对纤维溶胀情况进行统计分析;

[0101] (2)在体外细胞实验中,分别对不同接枝率的明胶纤维膜进行灭菌,并使用无菌PBS清洗5次后,接种间充质干细胞(hASCs),随后放进CO<sub>2</sub>培养箱中进行体外培养,24h后,对各纤维膜的募集情况进行统计分析。结果如图7-图13所示:

[0102] 如图7所示,通过纳米压痕仪测量得知,接枝率为30%的明胶纤维膜的模量为0.8Kpa(同对比例1中的明胶纤维膜),而接枝率为60%的明胶纤维膜的模量为3Kpa。

[0103] 如图8、9所示,经过交联后的不同接枝率的明胶纤维膜在水中发生溶胀,接枝率为30%的纤维膜溶胀率为1.2,接枝率为60%的明胶纤维膜溶胀率在1.07,溶胀率通过溶胀前后纤维长度变化进行计算。

[0104] 如图10、11所示,接枝率为30%的纤维膜募集率在2,接枝率为60%的明胶纤维膜募集率在1.5,募集率通过细胞周围纤维密度与总体纤维密度之比计算。纤维溶胀后,能在pN-nN级别细胞力的作用下募集,纤维募集后提供更大的反作用,且随着募集率的提高,提供的反作用力也随之提高,能更进一步地促进细胞黏附,进而诱导干细胞成骨分化,即合适的接枝率可以使得纤维膜具有优异的募集率,以进一步达到较好的促进细胞粘附以及诱导干细胞成骨分化的能力。

[0105] 对比例3

[0106] 该对比例基于实施例1,对是否负载锌离子材料的明胶纤维膜的促进细胞黏附和成骨分化能力进行了对比分析,具体如下:

[0107] 碱性磷酸酶(ALP)是反应骨组织中分解代谢水平的一种标志酶,在钙化中起着关键作用。钙离子在ALP作用下沉积于胶原上,完成基质矿化过程,骨组织是通过骨基质钙化而形成,而骨基质由成骨细胞合成、分泌;在基质开始钙化时,成骨细胞的ALP活性最高,在

钙化接近结束时活性则最低,其活力在一定程度上反映成骨细胞的分化程度和功能状态。

[0108] 该对比例中,未负载锌离子材料的低模量柔性明胶静电纺丝纤维膜(接枝率为30%)的制备方法参照实施例1的方法,与实施例1的不同之处在于:步骤(2)中,将锌离子材料按0mg/ml的比例与步骤(1)得到的静电纺丝预制液混合,得到静电纺丝工作液,其余步骤及条件均相同,制备得到未负载锌离子材料的明胶纤维膜,进行下述实验:

[0109] 体外成骨分化实验:对本发明实施例1制备得到的负载有锌离子材料的明胶纤维膜与上述制备得到的未负载锌离子材料的明胶纤维膜分别进行灭菌,并均使用无菌PBS清洗5次后,接种间充质干细胞(hASCs),随后放进CO<sub>2</sub>培养箱中进行体外培养,7天后取出并使用试剂盒测定细胞中碱性磷酸酶的形成情况,具体结果如下:

[0110] 如图14所示,通过纳米压痕仪测量得知,未负载有锌离子材料的明胶纤维膜的模量为0.8Kpa,而负载有锌离子材料后,明胶纤维膜的模量为1.5Kpa。

[0111] 如图15、图16所示,从细胞在负载与未负载有锌离子材料的两种不同纤维膜材料中的p-Myosin II a和p-FAK表达情况看,与未负载有锌离子材料的纤维膜相比,负载锌离子材料后,明胶纤维膜诱导细胞黏附情况更好;

[0112] 如图17所示,对p-Myosin II a和p-FAK在负载与未负载有锌离子材料的两种不同纤维膜材料中的表达情况进行数据统计,结果与图14和图15结果相同,与未负载有锌离子材料的纤维膜相比,负载有锌离子材料后,明胶纤维膜诱导细胞黏附情况更好。

[0113] 如图18所示,通过碱性磷酸酶(ALP)测定的间充质干细胞7天成骨分化结果可知,与未负载有锌离子材料的明胶纤维膜(图18,A)相比,负载有锌离子材料后的明胶纤维膜(图18,B)诱导细胞分化效果更好。

[0114] 即,通过上述结果进一步表明,与未负载有锌离子材料的明胶纤维膜相比,负载有锌离子材料的明胶纤维膜具有较好的模量,诱导细胞黏附能力以及诱导细胞分化的效果更好。

[0115] 对比例4

[0116] 为研究材料对体内成骨的影响,构建了大鼠颅骨缺损模型。按照材料不同,实验共分为2组,分别为对照组(空白组,不做任何处理)、负载锌离子材料的明胶纤维膜组(同实施例1)。具体操作如下:

[0117] 使用多咪静对大鼠进行镇静,使用异氟烷作为实验大鼠的诱导麻醉和维持麻醉药物。实验大鼠麻醉并皮肤消毒后,在股骨侧面皮肤行1cmx1cm大小的切口,分离出肌肉组织,并暴露出股骨后,使用直径为1mm转头的骨钻,在股骨远端制备直径为1mm、深度为15mm的骨缺损。完成骨屑的冲洗和止血后,按组别将支架材料完全填埋至骨缺损处。髌骨完全复原后,使用5-0可吸收缝合线缝合切口,伤口常规消毒。按照实验计划,在30天时,使用过量异氟烷,安乐处死实验大鼠,取出股骨进行观察,结果如图19所示。

[0118] 图19结果表明,与A组空白组的骨缺损相比,B组(负载锌离子材料的明胶纤维膜组)的治愈率明显更高。以上结果说明,锌基金属/明胶组在体内环境下,能够有效促进骨缺损区新骨形成,促进干细胞成骨分化。

[0119] 可以理解,本发明是通过一些实施例进行描述的,本领域技术人员知悉的,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对这些特征和实施例进行各种改变或等效替换。另外,在本发明的教导下,可以对这些特征和实施例进行修改以适应具体的情况及材料而不

会脱离本发明的精神和范围。因此,本发明不受此处所公开的具体实施例的限制,所有落入本申请的权利要求范围内的实施例都属于本发明所保护的范围内。

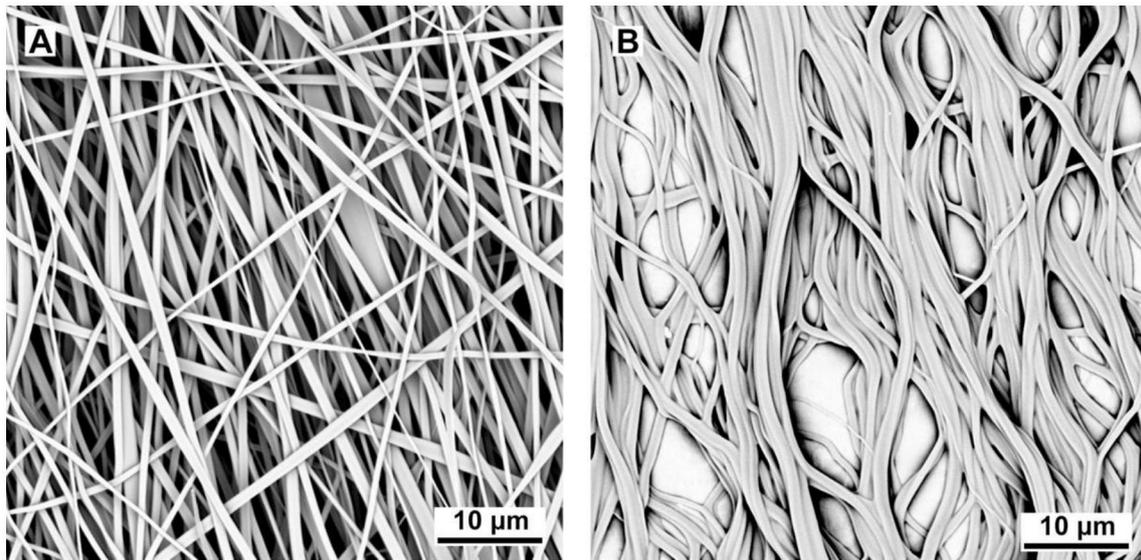


图1

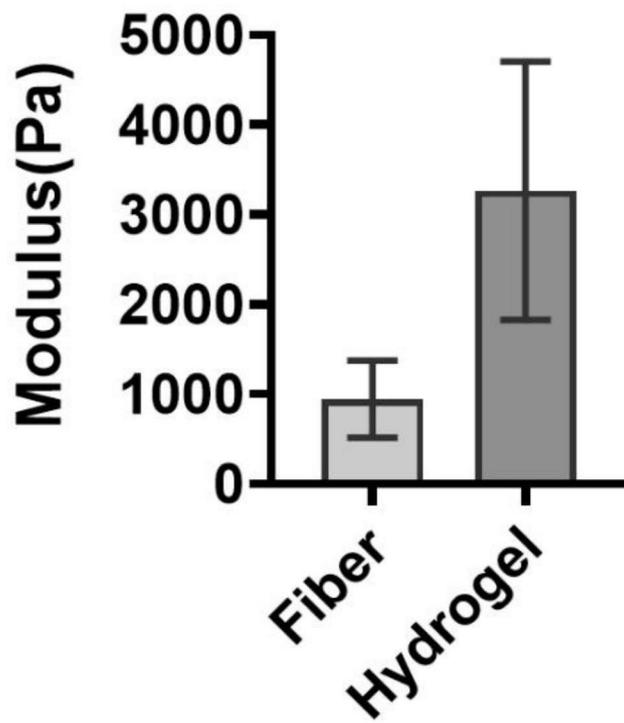


图2

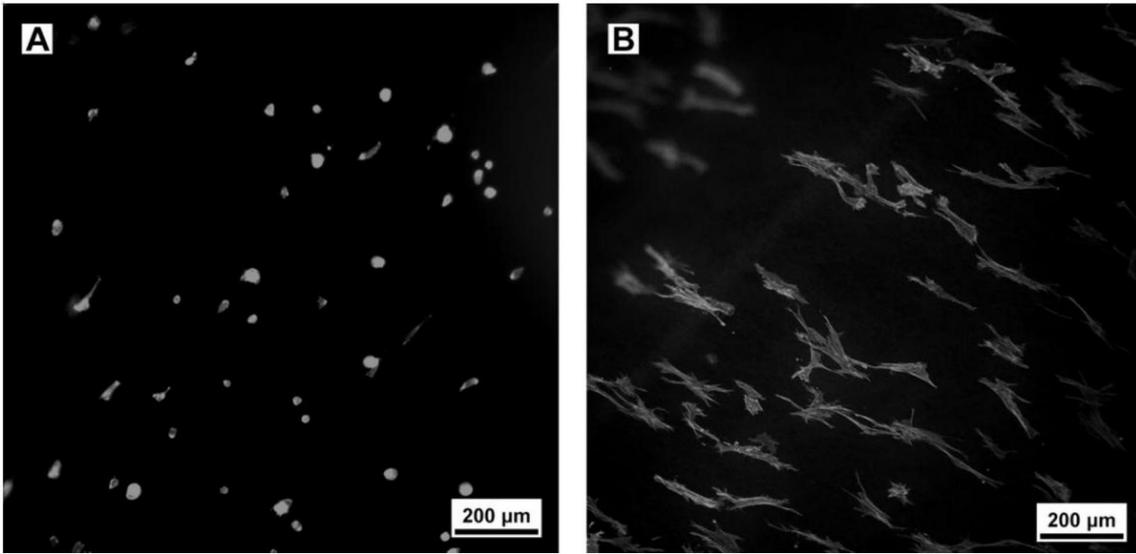


图3

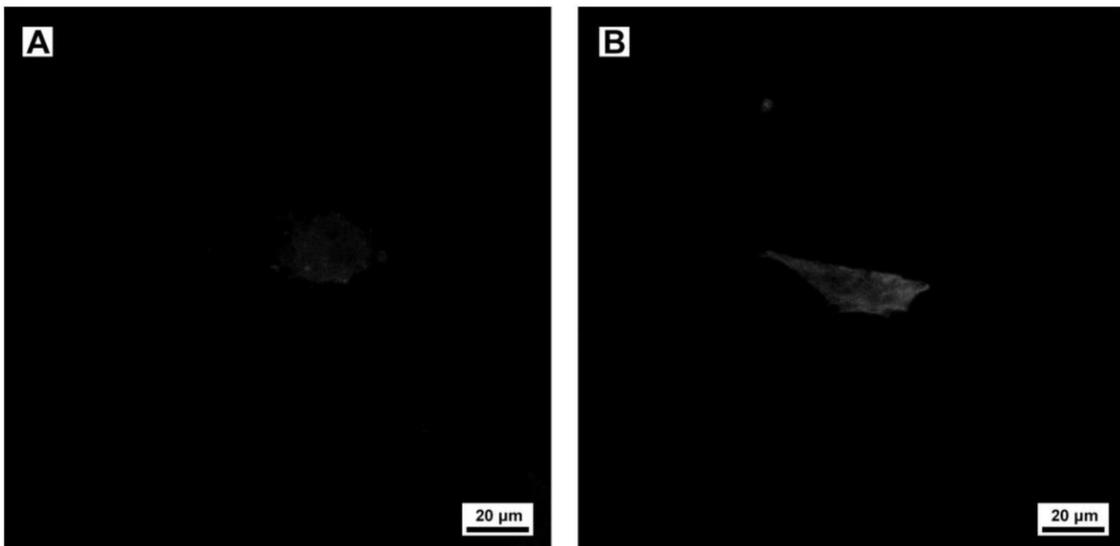


图4

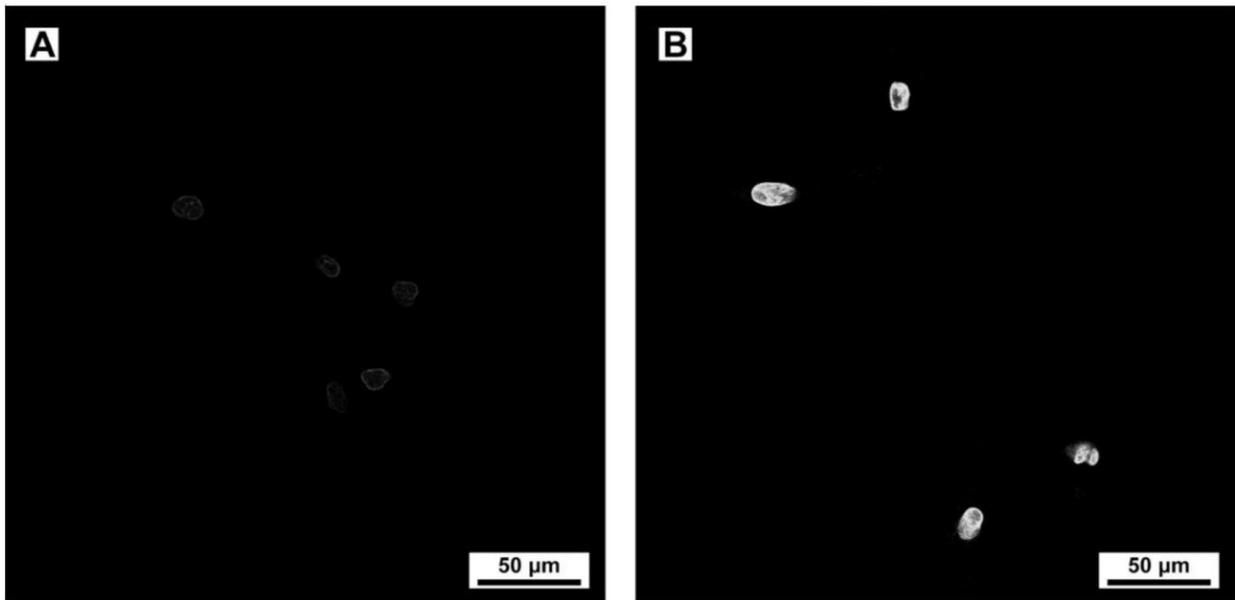


图5

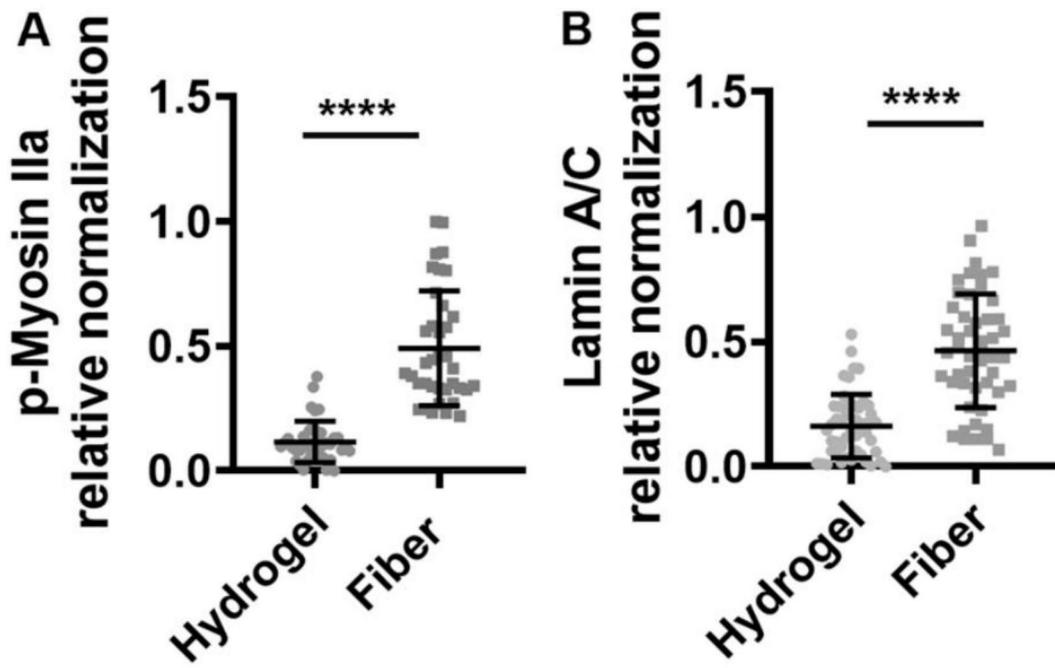


图6

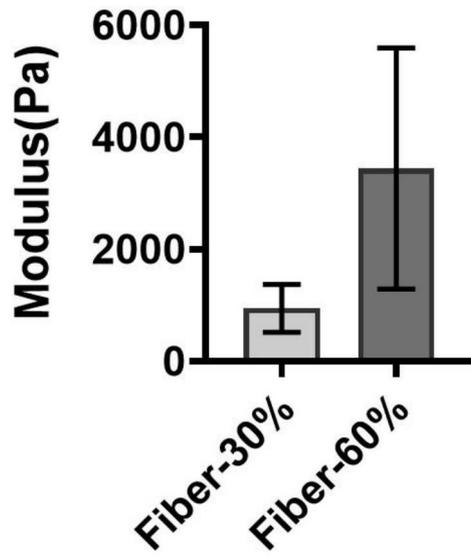


图7

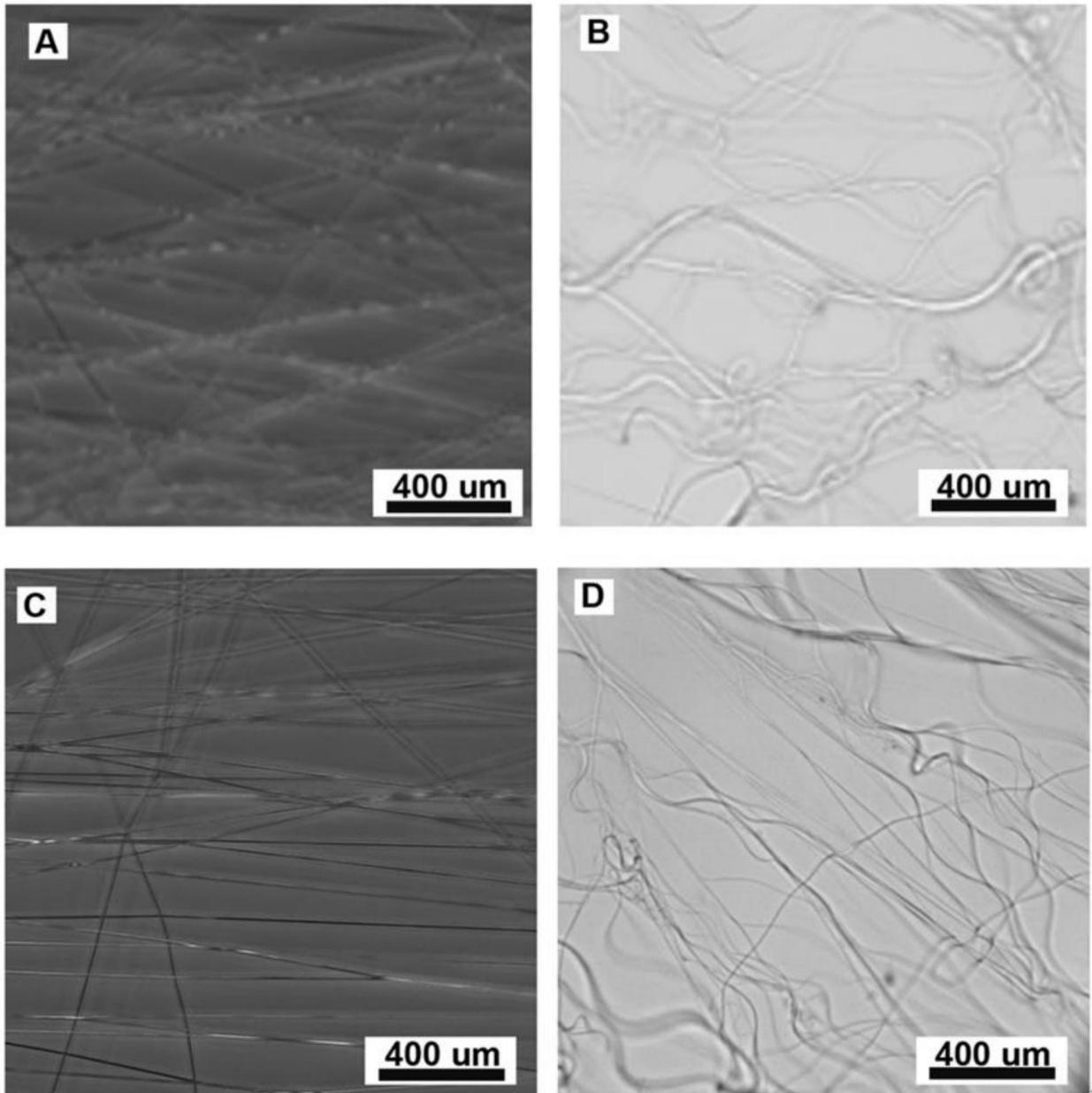


图8

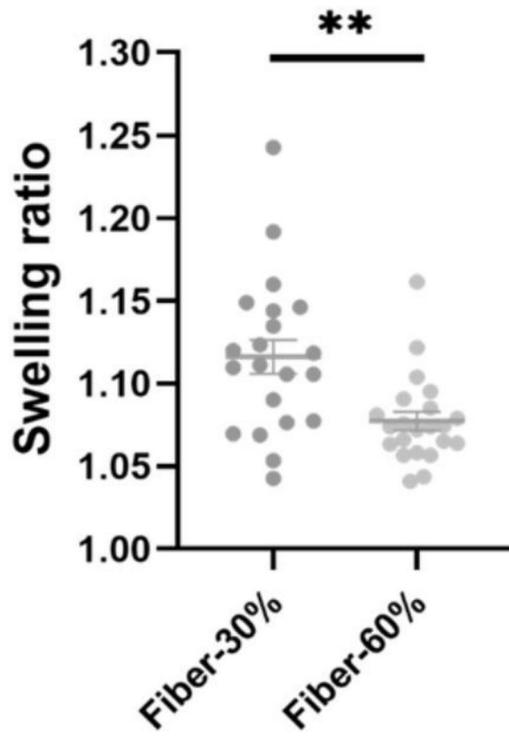


图9

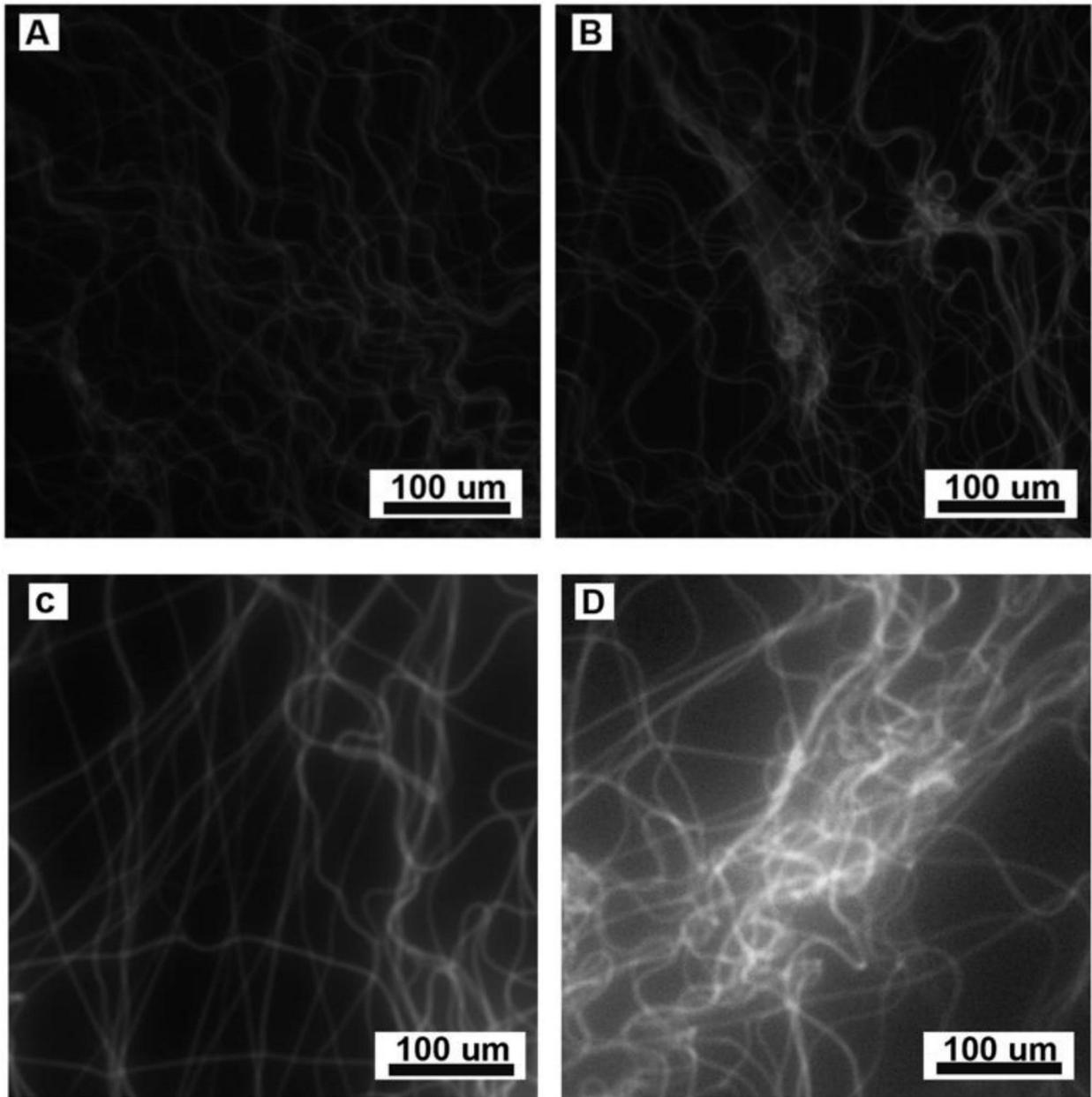


图10

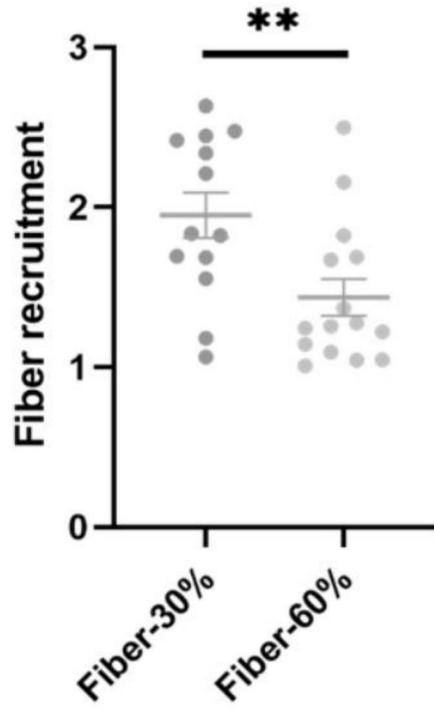


图11

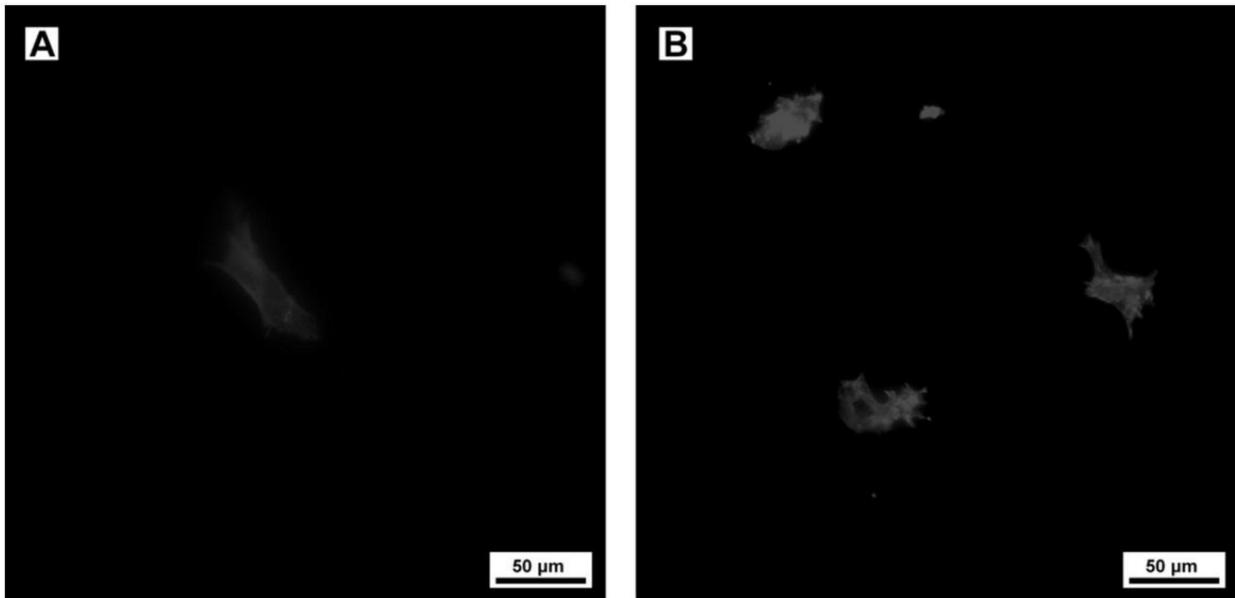


图12

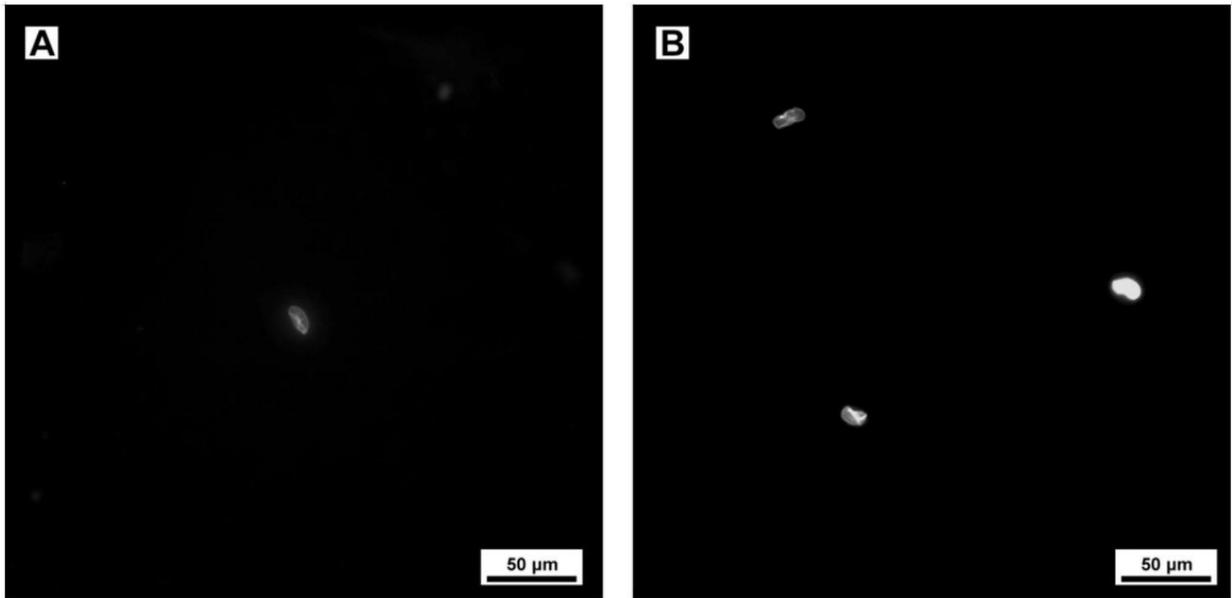


图13

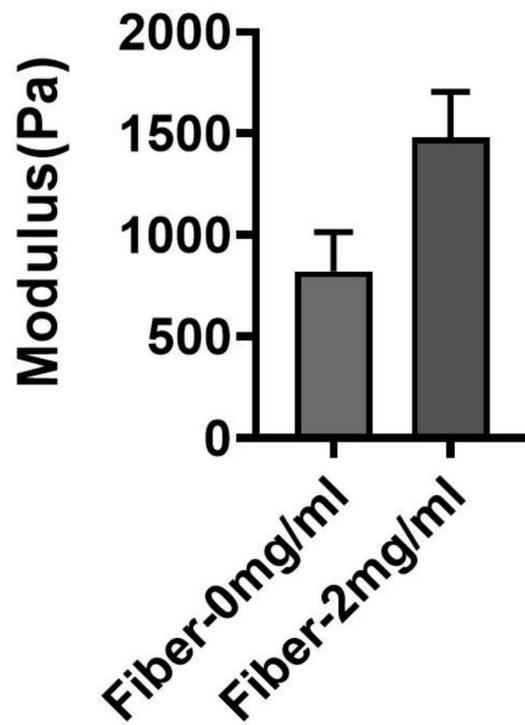


图14

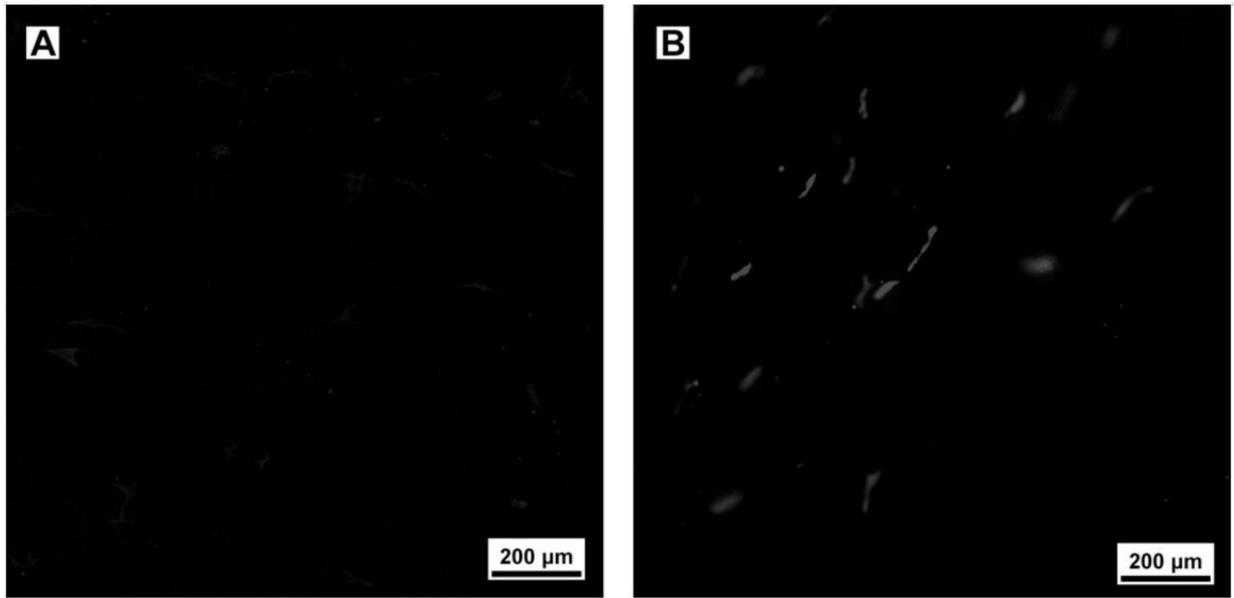


图15

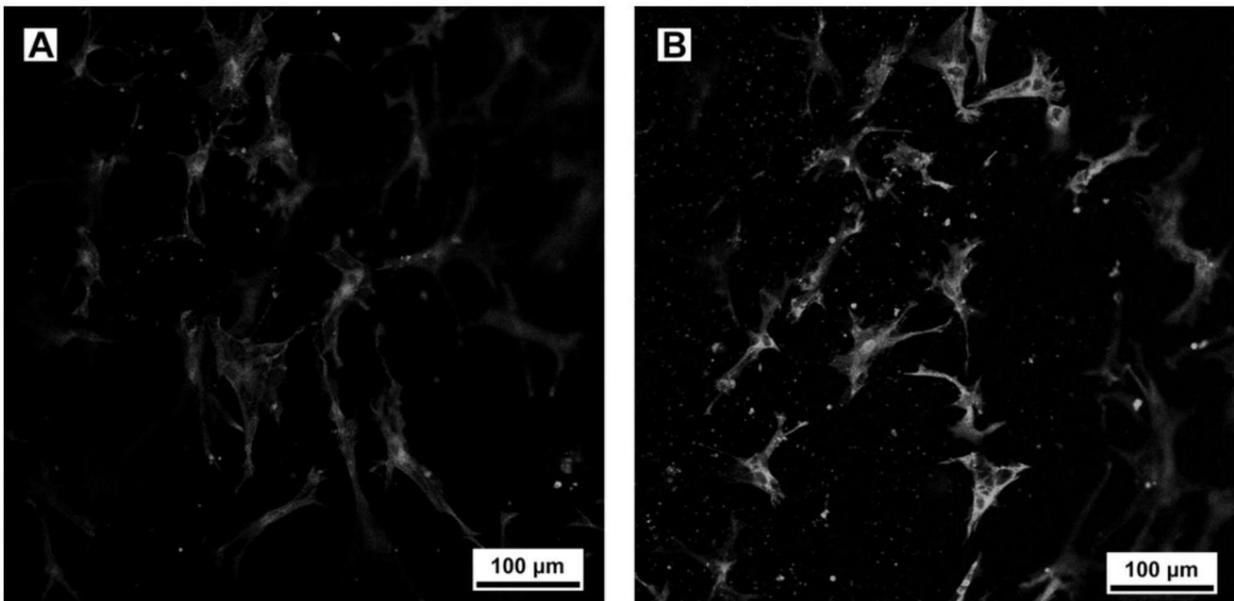


图16

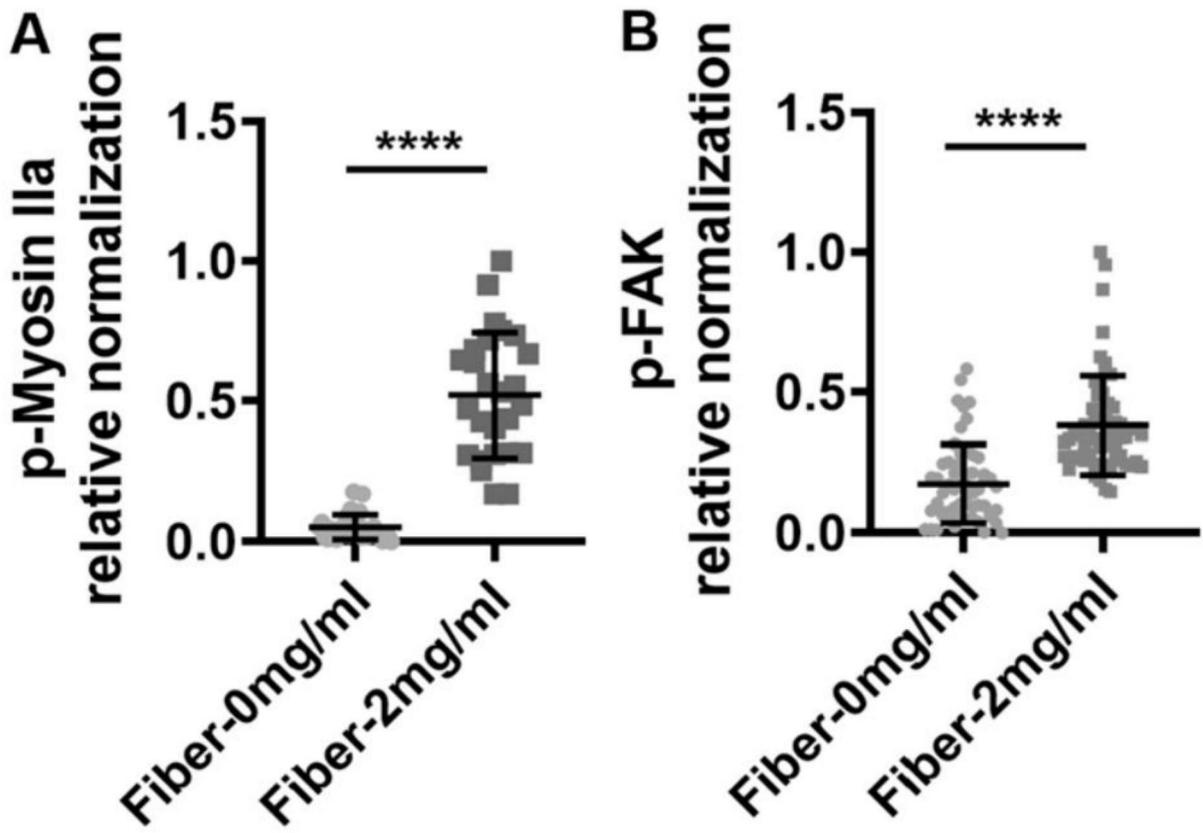


图17

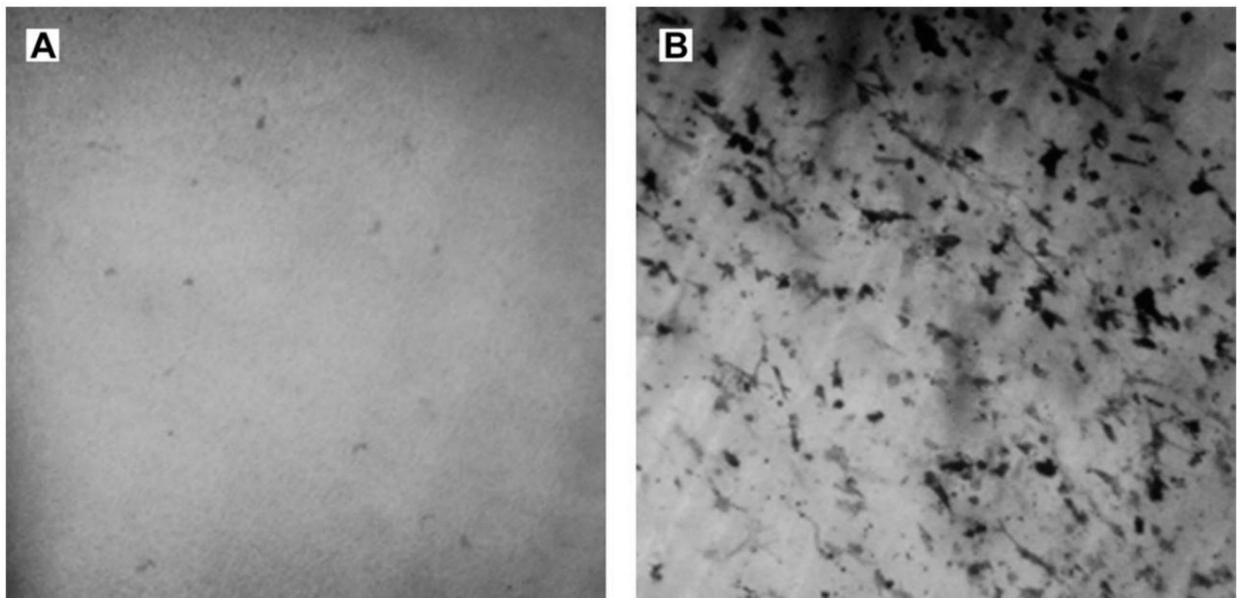


图18

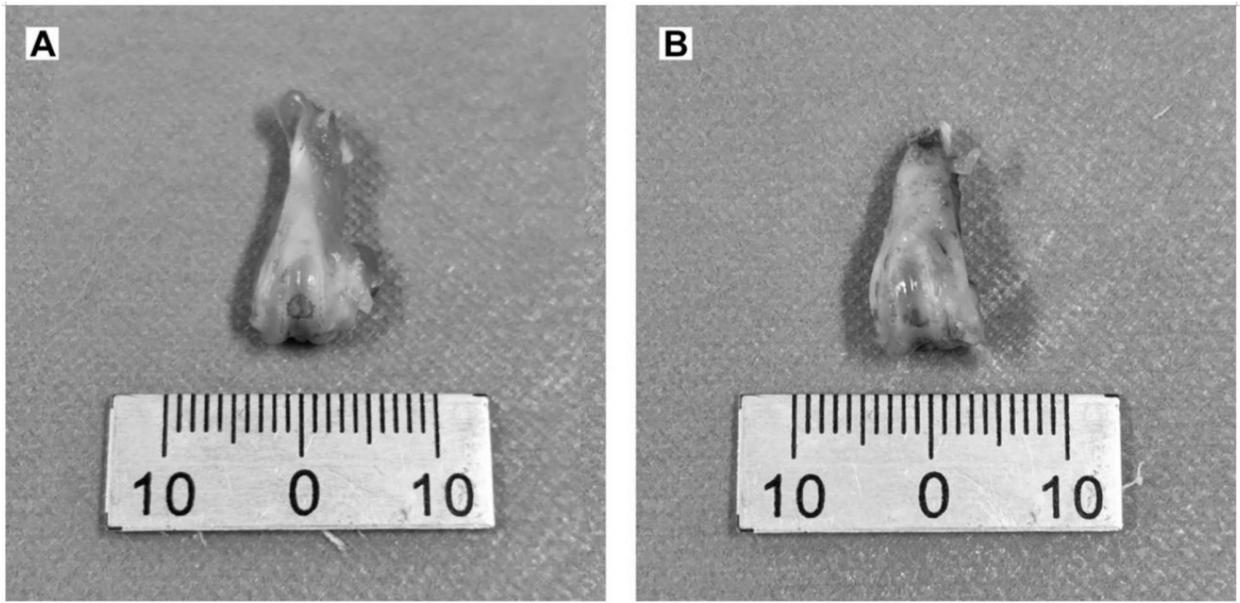


图19