



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102973980 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201210555888. 6

(22) 申请日 2012. 12. 20

(73) 专利权人 福州大学

地址 350001 福建省福州市鼓楼区工业路
523 号

(72) 发明人 陈景帝 余其凤 张玉珏 张惠
张其清

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限
公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

A61L 27/46 (2006. 01)

A61L 27/20 (2006. 01)

A61L 27/12 (2006. 01)

A61L 27/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101693774 A, 2010. 04. 14,

CN 1961974 A, 2007. 05. 16,

陈景帝等. 利用冷冻干燥原位构筑仿生型纳

米羟基磷灰石、壳聚糖多孔支架材料. 《稀有金属
材料与工程》. 2009, 第 38 卷

Liu Lu et al.. Mechanical properties
of hyaluronic acid modifying chitosan/
collagen/nano-hydroxyapatite composite
scaffold and its effect on osteoblast
proliferation. 《中国组织工程研究与临床康
复》. 2011, 第 15 卷 (第 38 期),

吕彩霞等. 纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖 - 硫酸
软骨素复合材料的制备及其性能研究. 《复合材
料学报》. 2007, 第 24 卷 (第 1 期),

审查员 郭翔

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支
架及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种无机 / 有机双相纳米复合
骨组织工程支架及其制备方法, 采用原位仿生法
和纳米自组装技术制备骨组织工程支架; 以壳聚
糖、硫酸软骨素、透明质酸为有机基质, 可溶性钙
盐和可溶性磷酸盐为无机相纳米羟基磷灰石的前
驱体, 模仿生物矿化采取有机大分子调控无机相
生长的方式, 在有机基质上原位成核结晶制备无
机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架—纳米羟
基磷灰石 / 壳聚糖 / 硫酸软骨素 / 透明质酸骨组
织工程支架。本发明制备程序简单, 工艺条件温
和, 制备的复合支架在宏观及微观上与天然骨相
似, 性能优越, 成型加工方便。

1. 一种无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架的制备方法, 其特征在于: 采用原位仿生法和纳米自组装技术制备骨组织工程支架; 以壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸为有机基质, 可溶性钙盐和可溶性磷酸盐为无机相纳米羟基磷灰石的前驱体, 模仿生物矿化采取有机大分子调控无机相生长的方式, 在有机基质上原位成核结晶制备无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架—纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖 / 硫酸软骨素 / 透明质酸骨组织工程支架;

包括以下步骤:

(1) 称取壳聚糖溶解于乙酸溶液, 硫酸软骨素和透明质酸溶解于去离子水;

(2) 缓慢将硫酸软骨素和透明质酸的混合溶液加入壳聚糖的乙酸溶液; 随后加入可溶性钙盐和可溶性磷酸盐溶液;

(3) 在步骤(2)的混合液中加入交联剂进行交联, 注入模具, 移至冰箱预冷冻, 转入冷冻干燥机中进行冷冻干燥;

(4) 将步骤(3)的干燥样品置于醇碱溶液中进行原位结晶, 再用去离子水反复浸洗至中性, 冷藏后进行冷冻干燥, 即得到无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架—纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖 / 硫酸软骨素 / 透明质酸骨组织工程支架;

骨组织工程支架包括以下质量百分比的组分:

硫酸软骨素	0.1 ~ 1%
透明质酸	0.05 ~ 0.5%
壳聚糖	1 ~ 3%
羟基磷灰石	0.5 ~ 2%;

各步骤的工艺参数如下:

(1) 乙酸溶液的体积分数为 1 ~ 2%;

(2) 可溶性钙盐溶液的浓度为 1.5 ~ 3mol/L, 可溶性磷酸盐溶液的浓度为 0.6 ~ 1.8mol/L, 二者间隔 30-60min 加入;

(3) 加入交联剂, 常温交联 4-8h, 注入模具, 4℃冰箱静置 4-6h, -5℃ ~ -80℃冰箱至少冷冻 24h, 转入冷冻干燥机中进行冷冻干燥至完全脱水;

(4) 将干燥样品置于质量分数为 3 ~ 10% NaOH 或 KOH 的乙醇 / 水中进行原位结晶, 乙醇 / 水中乙醇与水的体积比为 1 ~ 2 : 1, 再用去离子水反复浸洗至中性, -5℃ ~ -80℃冷藏后进行冷冻干燥获得产品;

硫酸软骨素为硫酸软骨素 A 或硫酸软骨素 C, 透明质酸选用它的钠盐; 可溶性钙盐是硝酸钙或氯化钙; 可溶性磷酸盐是磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠或磷酸二氢钠;

无机相纳米羟基磷灰石前驱体 Ca/P 摩尔比为 $n(\text{Ca}^{2+}) : n(\text{PO}_4^{3-}) = 1.67 : 1$;

交联剂为 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺;

交联剂中 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺的质量百分比为 0.02 ~ 0.2%, 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为 1.5 ~ 4 : 1。

一种无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于骨组织工程支架材料制造领域,具体涉及一种无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架及其制备方法。

背景技术

[0002] 由创伤、肿瘤、感染、病理等因素造成的骨组织缺损是临床面临的重大难题之一。其修复的方法有:自体骨移植修复,异体、异种骨移植修复和金属合金、高分子聚合物等各种人工骨替代材料移植修复。然而,自体骨供应来源有限,异体、异种骨存在免疫排斥反应和疾病感染的风险;而医学领域长期以来广泛使用的金属、有机高分子等生物医学材料,其成分和自然骨完全不一样,用来作为骨的替代材料或填补骨缺损材料,其生物相容性和人体适应性尚不能令人满意。天然骨是由低结晶度纳米羟基磷灰石和胶原蛋白、蛋白多糖等有机基质巧妙结合在一起形成的无机-有机复合材料。近年来,骨缺损修复研究最早尝试的是骨材料的成分仿生,由于羟基磷灰石(HA)与骨的无机相化学成分相近而被广泛应用于骨替代材料。但是在骨修复中,单纯由羟基磷灰石(HA)构建的材料,存在脆性大、较难成型等问题,限制了它在负重骨修复和替代领域的应用。

[0003] 随着复合材料的研究发展,国内外研究者将焦点转移到羟基磷灰石(HA)与其它生物材料的结合上如:(1)HA与天然生物材料的复合(2)HA与非天然生物材料的复合(3)HA与多种材料的复合合成材料。通常HA复合生物材料的制备大多是将HA粉体与其它生物材料通过简单、机械或化学方式混合均匀后,再注入模具,冷冻干燥成型。在简单复合制备的HA复合材料中羟基磷灰石颗粒分散不均匀,易发生团聚,界面结合力弱,使得材料的力学性能下降,微观结构无序。

[0004] 然而,随着复合材料研究的不断深入,人们认识到单纯模拟骨基质的成分是不够的,对于任何一种生物材料,成分和结构是它的相互独立又紧密关联的两个方面,共同决定材料的性能。受生物体生物矿化的启发,仿生制备法应运而生。仿生法是指模仿或利用生物体结构,生物矿化功能和生化过程的技术,把这种技术用到材料设计制造中以便获得接近或超过生物材料优异性能的新材料或用天然生物合成的方法获得所需材料。仿生合成技术模仿了无机物在有机物调制下形成的机理,合成过程中先形成有机物的自组装体,使无机先驱物于自组装聚集体和溶液的相界面发生化学反应,在自组装体的模板作用下,形成具有特殊结构和功能的无机-有机复合体。虽然骨组织工程支架的仿生学研究已经取得了相当大的进展,但迄今为止仍存在以下几个方面的问题:

[0005] (1) 组成与微细结构与天然骨组织存在较大差异,从而导致材料与骨组织在理化、生物学及力学性能上存在较大差异,材料的组织及细胞亲和性不够理想;

[0006] (2) 与骨组织形成化学键合的速度及可控降解性还不够理想,有些材料降解太快有些则难以降解,材料在体内的降解速度与新骨的生长速度难以匹配;

[0007] (3) 复合支架中无机相分散性差,与有机相相互作用力弱,影响复合支架的力学性

能；

[0008] (4) 材料制备工艺条件较复杂,材料性能难以稳定,给加工造成困难。

[0009] 鉴于此,本发明选用具有良好生物相容性的壳聚糖 / 硫酸软骨素 / 透明质酸为有机基质,模仿骨组织形成过程中无机钙磷矿物在有机基质生物大分子调控下原位析晶过程,采用原位仿生法和纳米自组装技术在成分仿生的基础上进行结构和功能仿生制备一种具有较好力学性能、生物性能,分级结构的新型无机 - 有机双相纳米复合骨组织工程支架—纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖 / 硫酸软骨素 / 透明质酸骨组织工程支架。

[0010] 壳聚糖是由氨基葡萄糖和 N- 乙酰氨基葡萄糖两种氨基多糖组成的带正电荷的天然聚多糖,N- 乙酰氨基葡萄糖也是细胞外基质 (extracellular matrix,ECM) 的成分,它可与核心蛋白通过共价键连接成蛋白多糖,形成多孔亲水的凝胶结构,有利于水分及小分子的渗透,并调节细胞生长、分化与胶原形成。因此,壳聚糖在组成和结构上与 ECM 具有部分相似性,且生物相容性好。

[0011] 硫酸软骨素是一种带负电荷的是酸性粘多糖,是细胞外基质的重要组成部分之一,对细胞的结构形态、迁移、增殖、分化具有重要作用。透明质酸也是一种带负电荷的酸性粘多糖,由于其结构疏松,含水及多孔性特别适于细胞的迁移及增殖,防止细胞在迁移到位及增殖够数之前过早地进行分化。

[0012] 壳聚糖和硫酸软骨素、透明质酸的分子结构极其类似,且均具有良好的细胞亲和性,分子中的重复单元均具有六元环的稳定结构,比较适合作为受力材料。而它们所带电荷却刚好相反,可以利用它们之间的静电作用预组织成有机基质组装体,为无机纳米晶体提供结构框架的同时,与无机离子在界面上通过静电匹配、几何相似性和立体化学互补、表面络和、氢键联接等方式来控制纳米晶体的成核和生长,制备具有一定形状和结构的无机 - 有机纳米复合材料。

发明内容

[0013] 本发明的目的在于克服目前用于骨组织工程的各种材料在微观结构、机械性能、生物相容性、生物矿化活性等方面的一些不足,模拟天然骨的成分和结构特点,利用原位仿生法和纳米自组装技术将性能完全不同的有机相与无机相结合起来,实现二者分子级复合,制备一种新型的纳米复合骨组织工程支架。该方法的制备工艺条件温和,操作简捷,制备所得的支架性能优越,可塑性强,可被加工成所需的形状。

[0014] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0015] 一种无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架的制备方法,采用原位仿生法和纳米自组装技术制备骨组织工程支架;以壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸为有机基质,可溶性钙盐和可溶性磷酸盐为无机相纳米羟基磷灰石的前驱体,模仿生物矿化采取有机大分子调控无机相生长的方式,在有机基质上原位成核结晶制备无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架—纳米羟基磷灰石 / 壳聚糖 / 硫酸软骨素 / 透明质酸骨组织工程支架。包括以下步骤:

[0016] (1) 称取壳聚糖溶解于乙酸溶液,硫酸软骨素和透明质酸溶解于去离子水;

[0017] (2) 缓慢将硫酸软骨素和透明质酸的混合溶液加入壳聚糖的乙酸溶液;随后加入可溶性钙盐和可溶性磷酸盐溶液;

[0018] (3)在步骤(2)的混合液中加入交联剂进行交联,注入模具,移至冰箱预冷冻,转入冷冻干燥机中进行冷冻干燥;

[0019] (4)将步骤(3)的干燥样品置于醇碱溶液中进行原位结晶,再用去离子水反复浸洗至中性,冷藏后进行冷冻干燥,即得到无机/有机双相纳米复合骨组织工程支架—纳米羟基磷灰石/壳聚糖/硫酸软骨素/透明质酸骨组织工程支架。

[0020] 复合骨组织工程支架包括以下质量百分比的组分:

[0021] 硫酸软骨素 0.1 ~ 1%

[0022] 透明质酸 0.05 ~ 0.5%

[0023] 壳聚糖 1 ~ 3%

[0024] 羟基磷灰石 0.5 ~ 2%。

[0025] 各步骤的工艺参数如下:

[0026] (1)乙酸溶液的体积分数为 1 ~ 2%;

[0027] (2)可溶性钙盐溶液的浓度为 1.5 ~ 3mol/L,可溶性磷酸盐溶液的浓度为 0.6 ~ 1.8mol/L,二者间隔 30-60min 加入;

[0028] (3)加入交联剂,常温交联 4-8h,注入模具,4℃冰箱静置 4-6h, -5℃ ~ -80℃冰箱至少冷冻 24h,转入冷冻干燥机中进行冷冻干燥至完全脱水;

[0029] (4)将干燥样品置于质量分数为 3 ~ 10% NaOH 或 KOH 的乙醇/水中进行原位结晶,乙醇/水中乙醇与水的体积比为 1 ~ 2:1,再用去离子水反复浸洗至中性, -5℃ ~ -80℃冷藏后进行冷冻干燥获得产品。

[0030] 硫酸软骨素为硫酸软骨素 A 或硫酸软骨素 C, 透明质酸选用它的钠盐;可溶性钙盐是硝酸钙或氯化钙;可溶性磷酸盐是磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠或磷酸二氢钠。

[0031] 无机相纳米羟基磷灰石前驱体 Ca/P 摩尔比为 $n(\text{Ca}^{2+}):n(\text{PO}_4^{3-})=1.67:1$ 。

[0032] 交联剂为 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。

[0033] 交联剂中 EDC 的质量百分比为 0.02 ~ 0.2%, EDC 和 NHS 的质量比为 1.5 ~ 4:1。

[0034] 一种无机/有机双相纳米复合骨组织工程支架的制备,可以简单概括为以下几个过程:

[0035] (1)壳聚糖/硫酸软骨素/透明质酸有机基质的预组装;

[0036] (2)有机基质与无机离子的界面识别,形成有效的成核位点;

[0037] (3)交联剂进行交联,进一步保护和固定有机基质组装体;

[0038] (4)支架前驱体的预成型;

[0039] (5)有机基质调控无机离子原位成核结晶自组装成纳米粒,形成具有多级结构的复合支架;

[0040] (6)复合支架的后处理。

[0041] 本发明的显著优点在于:硫酸软骨素、透明质酸均属于阴离子糖胺聚糖,是细胞外基质的主要成分,可促进细胞粘附,提高骨组织的韧性,具有极好的生物活性。壳聚糖中的 N-乙酰基吡喃与硫酸软骨素、透明质酸等糖胺聚糖结构类似,因此也具有类似于糖胺聚糖的特性。壳聚糖本身带有独特的阳离子特性,可以与硫酸软骨素、透明质酸(聚阴离子)通

过静电络合作用,预组织成有机基质组装体;接着加入无机相前驱体可溶性钙盐和可溶性磷酸盐,此时有机基质的极性官能团与无机离子在界面上发生相互作用(有机基质上的官能团:酰胺基、羧基、磺酸基、氨基、羟基与无机钙离子、磷酸根离子可通过离子配位、静电吸引以及氢键相互结合)为后续无机晶体的定位生长提供了有效的成核位点,再利用交联剂的交联作用,进一步稳定该组装体的结构;最后,模仿骨组织形成过程中无机钙磷矿物在有机基质生物大分子调控下原位析晶过程,采用原位仿生法和纳米自组装技术在成分仿生的基础上进行结构和功能仿生制备一种新型的无机-有机双相纳米复合骨组织工程支架—纳米羟基磷灰石/壳聚糖/硫酸软骨素/透明质酸骨组织工程支架。

[0042] 相对于其他复合支架有以下优点:

[0043] (1) 复合支架中的各组分与细胞外基质的组成成分相似,支架具有较好的生物相容性、生物矿化活性;

[0044] (2) 采用原位仿生法和纳米自组装技术,使得无机相在支架上实现了纳米级分散,改善了无机相与有机相的界面相容性,从而改善复合支架的力学性能;

[0045] (3) 复合支架独特的表面性能(比表面积大、表面能高、表面粗糙度及表面润湿性增加)有利于生长因子的吸附,细胞的粘附、增殖、分化;

[0046] (4) 可以通过改变交联剂的用量来控制交联度,得到具有不同亲水性和力学性能的复合支架;

[0047] (5) 体外生物矿化研究表明,该复合支架材料具有较高的表面矿化能力;

[0048] (6) 该复合支架的制备工艺较简单,操作方便,成本低。

附图说明

[0049] 图 1-2 是纯有机组分支架的 SEM 扫描电子显微镜图。

[0050] 图 3-5 是无机/有机双相纳米复合骨组织工程支架的 SEM 扫描电子显微镜图。

[0051] 图 6-7 是无机/有机双相纳米复合骨组织工程支架在模拟体液(SBF)中浸泡矿化 24h、48h 的 SEM 扫描电子显微镜图。

[0052] 图 8 是矿化晶体的 SEM 扫描电子显微镜图。

[0053] 图 9-11 是矿化晶体的倒置相差显微镜图。

具体实施方式

[0054] 实施例 1

[0055] 1) 配制 1.5mol/L 的可溶性钙盐溶液,1.8mol/L 的可溶性磷酸盐溶液;按质量百分比计壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸的含量分别为 2%、0.1%、0.05%;

[0056] 2) 将所述配比的壳聚糖溶于 1% 乙酸溶液,所述配比的硫酸软骨素/透明质酸溶于去离子水;

[0057] 3) 将硫酸软骨素/透明质酸混合液缓慢地加入壳聚糖乙酸溶液中,搅拌使其充分混合均匀;

[0058] 4) 按照 $n(\text{Ca}^{2+}):n(\text{PO}_4^{3-})=1.67:1$ 的比例将一定量的可溶性钙盐溶液,可溶性磷酸盐溶液分别加入到上述混合液中,持续搅拌 2 h,理论形成 HAP 的质量配比为 1%;

[0059] 5) 加入交联剂 EDC/NHS,EDC 质量配比为 0.02%,EDC 和 NHS 质量比 2:1,常温交联

5h;最终混合液注入模具,移至4℃冰箱静置4h,随后放入-10℃冰箱冷冻,再进行冷冻干燥至完全脱水;

[0060] 6)将干燥样品置于3% NaOH的乙醇/水中进行原位结晶,再用去离子水反复浸洗至中性,-10℃冷冻后进行冷冻干燥获得产品。

[0061] 实施例2

[0062] 1)配制2mol/L的可溶性钙盐溶液,1.2mol/L的可溶性磷酸盐溶液;按质量百分比计壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸的含量分别为1%、0.1%、0.05%;

[0063] 2)将所述配比的壳聚糖溶于1%乙酸溶液,所述配比的硫酸软骨素/透明质酸溶于去离子水;

[0064] 3)将硫酸软骨素/透明质酸混合液缓慢地加入壳聚糖乙酸溶液中,搅拌使其充分混合均匀;

[0065] 4)按照 $n(\text{Ca}^{2+}):n(\text{PO}_4^{3-})=1.67:1$ 的比例将一定量的可溶性钙盐溶液,可溶性磷酸盐溶液分别加入到上述混合液中,持续搅拌1h,理论形成HAP的质量配比为0.5%;

[0066] 5)加入交联剂EDC/NHS,EDC质量配比为0.02%,EDC和NHS质量比3:1,常温交联4h;最终混合液注入模具,移至4℃冰箱静置6h,随后放入-20℃冰箱冷冻,再进行冷冻干燥至完全脱水;

[0067] 6)将干燥样品置于5% NaOH的乙醇/水中进行原位结晶,再用去离子水反复浸洗至中性,-20℃冷冻后进行冷冻干燥获得产品。

[0068] 实施例3

[0069] 1)配制3mol/L的可溶性钙盐溶液,0.6mol/L的可溶性磷酸盐溶液;按质量百分比计壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸的含量分别为2%、0.2%、0.065%;

[0070] 2)将所述配比的壳聚糖溶于2%乙酸溶液,所述配比的硫酸软骨素/透明质酸溶于去离子水;

[0071] 3)将硫酸软骨素/透明质酸混合液缓慢地加入壳聚糖乙酸溶液中,搅拌使其充分混合均匀;

[0072] 4)按照 $n(\text{Ca}^{2+}):n(\text{PO}_4^{3-})=1.67:1$ 的比例将一定量的可溶性钙盐溶液,可溶性磷酸盐溶液分别加入到上述混合液中,持续搅拌1.5h,理论形成HAP的质量配比为0.8%;

[0073] 5)加入交联剂EDC/NHS,EDC质量配比为0.04%,EDC和NHS质量比3:1,常温交联6h;最终混合液注入模具,移至4℃冰箱静置5h,随后放入-80℃冰箱冷冻,再进行冷冻干燥至完全脱水;

[0074] 6)将干燥样品置于5% KOH的乙醇/水中进行原位结晶,再用去离子水反复浸洗至中性,-80℃冷冻后进行冷冻干燥获得产品。

[0075] 实施例4

[0076] 1)配制2mol/L的可溶性钙盐溶液,1.5mol/L的可溶性磷酸盐溶液;按质量百分比计壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸的含量分别为1%、0.5%、0.05%;

[0077] 2)将所述配比的壳聚糖溶于1%乙酸溶液,所述配比的硫酸软骨素/透明质酸溶于去离子水;

[0078] 3)将硫酸软骨素/透明质酸混合液缓慢地加入到壳聚糖乙酸溶液中,搅拌使其充分混合均匀;

[0079] 4) 按照 $n(\text{Ca}^{2+}) : n(\text{PO}_4^{3-}) = 1.67:1$ 的比例将一定量的可溶性钙盐溶液,可溶性磷酸盐溶液分别加入到上述混合液中,持续搅拌 1 h,理论形成 HAP 的质量配比为 0.5%;

[0080] 5) 加入交联剂 EDC/NHS, EDC 质量配比为 0.05%, EDC 和 NHS 质量比 4:1, 常温交联 5h; 最终混合液注入模具, 移至 4℃ 冰箱静置 4 h, 随后放入 -10℃ 冰箱冷冻, 再进行冷冻干燥至完全脱水;

[0081] 6) 将干燥样品置于 3% KOH 的乙醇 / 水中进行原位结晶, 再用去离子水反复浸洗至中性, -10℃ 冷冻后进行冷冻干燥获得产品。

[0082] 实施例 5

[0083] 1) 配制 3mol/L 的可溶性钙盐溶液, 0.9mol/L 的可溶性磷酸盐溶液; 按质量百分比计壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸的含量分别为 3%, 0.1%, 0.05%;

[0084] 2) 将所述配比的壳聚糖溶于 2% 乙酸溶液, 所述配比的硫酸软骨素 / 透明质酸溶于去离子水;

[0085] 3) 将硫酸软骨素 / 透明质酸混合液缓慢地加入到壳聚糖乙酸溶液中, 搅拌使其充分混合均匀;

[0086] 4) 按照 $n(\text{Ca}^{2+}) : n(\text{PO}_4^{3-}) = 1.67:1$ 的比例将一定量的可溶性钙盐溶液, 可溶性磷酸盐溶液分别加入到上述混合液中, 持续搅拌 1.5 h, 理论形成 HAP 的质量配比为 2%;

[0087] 5) 加入交联剂 EDC/NHS, EDC 质量配比为 0.04%, EDC 和 NHS 质量比 1.5:1, 常温交联 5h; 最终混合液注入模具, 移至 4℃ 冰箱静置 5 h, 随后放入 -20℃ 冰箱冷冻, 再进行冷冻干燥至完全脱水;

[0088] 6) 将干燥样品置于 10% NaOH 的乙醇 / 水中进行原位结晶, 再用去离子水反复浸洗至中性, -20℃ 冷冻后进行冷冻干燥获得产品。

[0089] 实施例 6

[0090] 1) 配制 2mol/L 的可溶性钙盐溶液, 1.8mol/L 的可溶性磷酸盐溶液; 按质量百分比计壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸的含量分别为 3%、1%、0.5%;

[0091] 2) 将所述配比的壳聚糖溶于 1% 乙酸溶液, 所述配比的硫酸软骨素 / 透明质酸溶于去离子水;

[0092] 3) 将硫酸软骨素 / 透明质酸混合液缓慢地加入壳聚糖乙酸溶液中, 搅拌使其充分混合均匀;

[0093] 4) 按照 $n(\text{Ca}^{2+}) : n(\text{PO}_4^{3-}) = 1.67:1$ 的比例将一定量的可溶性钙盐溶液, 可溶性磷酸盐溶液分别加入到上述混合液中, 持续搅拌 2 h, 理论形成 HAP 的质量配比为 1.5%;

[0094] 5) 加入交联剂 EDC/NHS, EDC 质量配比为 0.2%, EDC 和 NHS 质量比 4:1, 常温交联 6h; 最终混合液注入模具, 移至 4℃ 冰箱静置 5 h, 随后放入 -10℃ 冰箱冷冻, 再进行冷冻干燥至完全脱水;

[0095] 6) 将干燥样品置于 5% KOH 的乙醇 / 水中进行原位结晶, 再用去离子水反复浸洗至中性, -10℃ 冷冻后进行冷冻干燥获得产品。

[0096] 实施例 7

[0097] 1) 配制 2.5mol/L 的可溶性钙盐溶液, 1.2mol/L 的可溶性磷酸盐溶液; 按质量百分比计壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸的含量分别为 2%、1%、0.1%;

[0098] 2) 将所述配比的壳聚糖溶于 1% 乙酸溶液, 所述配比的硫酸软骨素 / 透明质酸溶于

去离子水；

[0099] 3) 将硫酸软骨素 / 透明质酸混合液缓慢地加入壳聚糖乙酸溶液中, 搅拌使其充分混合均匀；

[0100] 4) 按照 $n(\text{Ca}^{2+}) : n(\text{PO}_4^{3-}) = 1.67 : 1$ 的比例将一定量的可溶性钙盐溶液, 可溶性磷酸盐溶液分别加入到上述混合液中, 持续搅拌 1h, 理论形成 HAP 的质量配比为 1%；

[0101] 5) 加入交联剂 EDC/NHS, EDC 质量配比为 0.1%, EDC 和 NHS 质量比 3:1, 常温交联 5h；最终混合液注入模具, 移至 4℃ 冰箱静置 6 h, 随后放入 -20℃ 冰箱冷冻, 再进行冷冻干燥至完全脱水；

[0102] 6) 将干燥样品置于 5% NaOH 的乙醇 / 水中进行原位结晶, 再用去离子水反复浸洗至中性, -20℃ 冷冻后进行冷冻干燥获得产品。

[0103] 实施例 8

[0104] 1) 配制 3mol/L 的可溶性钙盐溶液, 0.6mol/L 的可溶性磷酸盐溶液；按质量百分比计壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸的含量分别为 2%、0.5%、0.05%；

[0105] 2) 将所述配比的壳聚糖溶于 1% 乙酸溶液, 所述配比的硫酸软骨素 / 透明质酸溶于去离子水；

[0106] 3) 将硫酸软骨素 / 透明质酸混合液缓慢地加入壳聚糖乙酸溶液中, 搅拌使其充分混合均匀；

[0107] 4) 按照 $n(\text{Ca}^{2+}) : n(\text{PO}_4^{3-}) = 1.67 : 1$ 的比例将一定量的可溶性钙盐溶液, 可溶性磷酸盐溶液分别加入到上述混合液中, 持续搅拌 1.5 h, 理论形成 HAP 的质量配比为 1.2%；

[0108] 5) 加入交联剂 EDC/NHS, EDC 质量配比为 0.05%, EDC 和 NHS 质量比 4:1, 常温交联 4h；最终混合液注入模具, 移至 4℃ 冰箱静置 6 h, 随后放入 -10℃ 冰箱冷冻, 再进行冷冻干燥至完全脱水；

[0109] 6) 将干燥样品置于 5% KOH 的乙醇 / 水中进行原位结晶, 再用去离子水反复浸洗至中性, -10℃ 冷冻后进行冷冻干燥获得产品。

[0110] 将所制备的一系列支架进行结构和性能表征, 并采用乳鼠成骨细胞建立复合支架的体外评价模型, 考察壳聚糖 / 硫酸软骨素 / 透明质酸 / 纳米羟基磷灰石复合支架的细胞学特性。

[0111] 结论：制备所得的复合支架易于塑形, 可以根据需要加工成各种形状和大小, 且具有良好的机械性能；支架的孔隙率大于 83%, 具有极好的吸水 / 保水性能；比较图 1-2 与图 3-5 可发现纳米复合支架的表面粗糙度大大增加；由 3-5 图可以观察到支架具有较好的微观孔结构, 孔径大小范围为 45-136 μm , 孔间连通性好, 支架孔壁上有均匀分布的细小纳米颗粒, 无机相呈纳米状态分散在有机相中, 起弥散增强作用, 提高支架的力学强度；由支架的仿生矿化图 6-7, 可发现矿化 24h 后支架上有许多近球形颗粒生成, 48h 后支架上细小的晶体颗粒融合成不规则块状晶体, 表明支架具有良好的生物矿化活性；图 8-11 中的矿化结晶体是成骨细胞与无机 / 有机双相纳米复合骨组织工程支架浸提液相互作用的一种富含钙元素的结晶物质, 表明复合支架可以提升成骨细胞的功能。

[0112] 以上所述仅为本发明的较佳实施方式, 凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰, 皆应属本发明的涵盖范围。

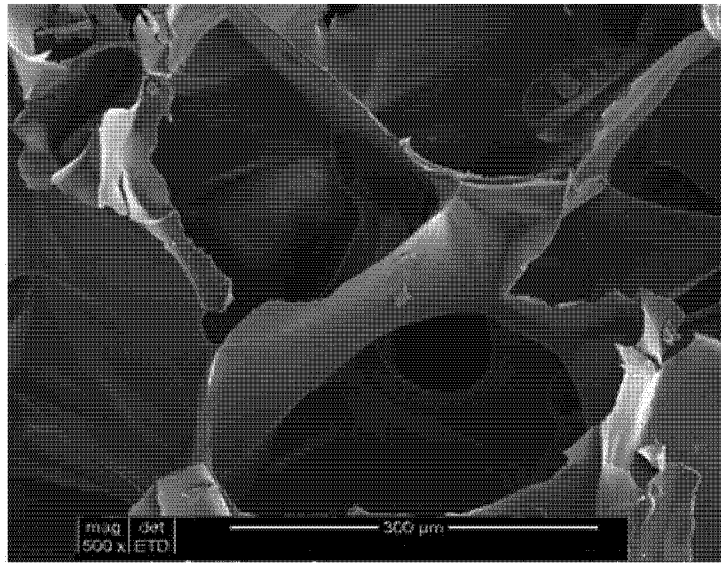


图 1

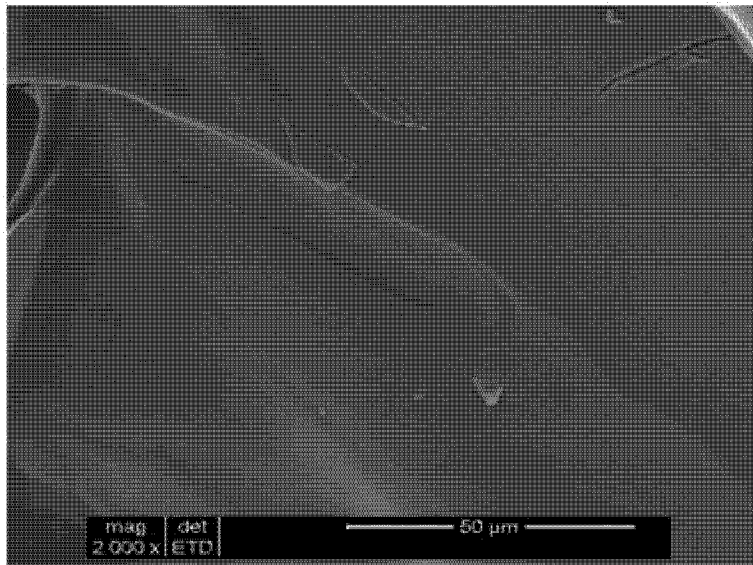


图 2

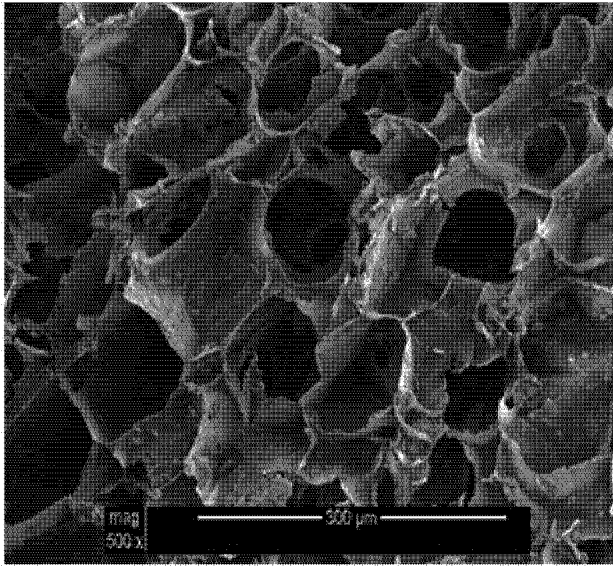


图 3

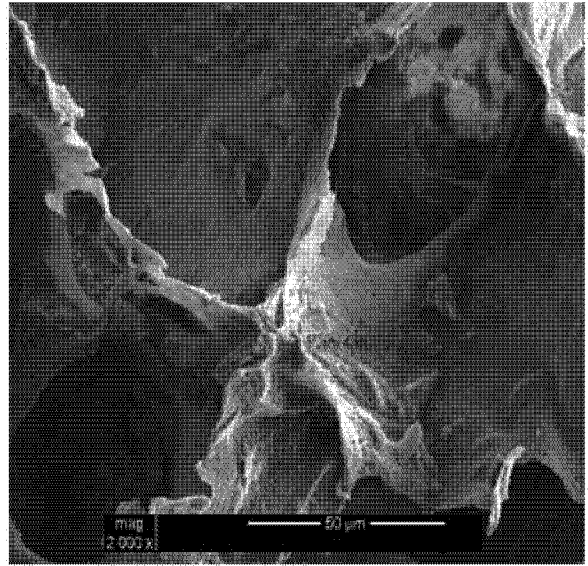


图 4

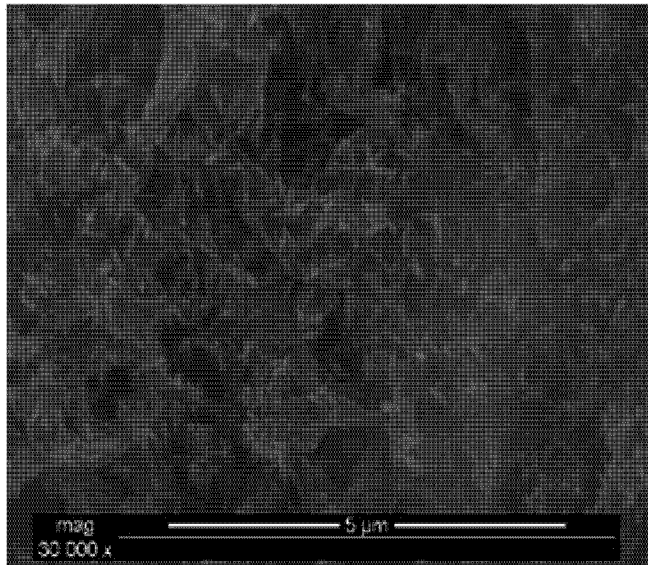


图 5

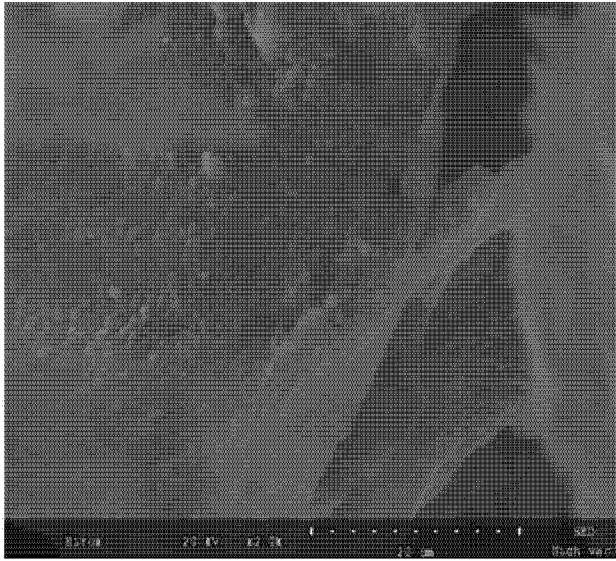


图 6

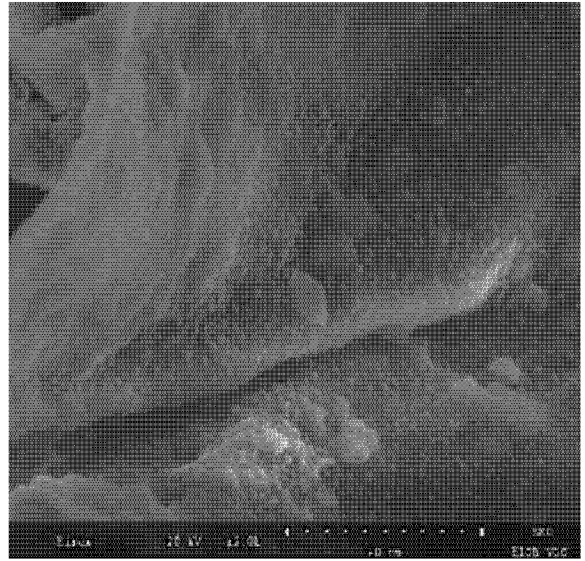


图 7

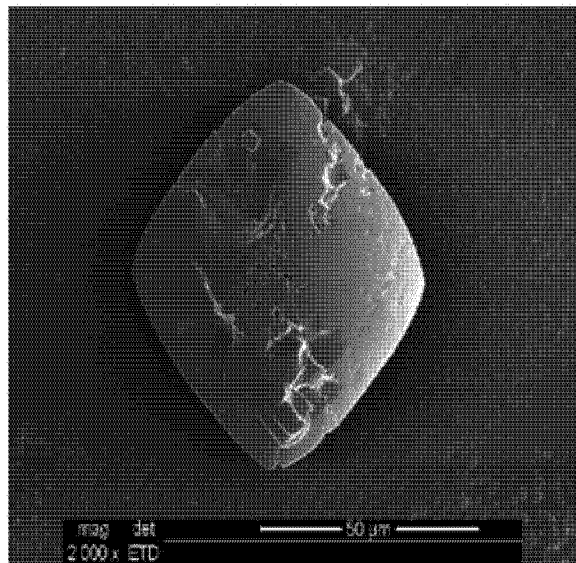


图 8

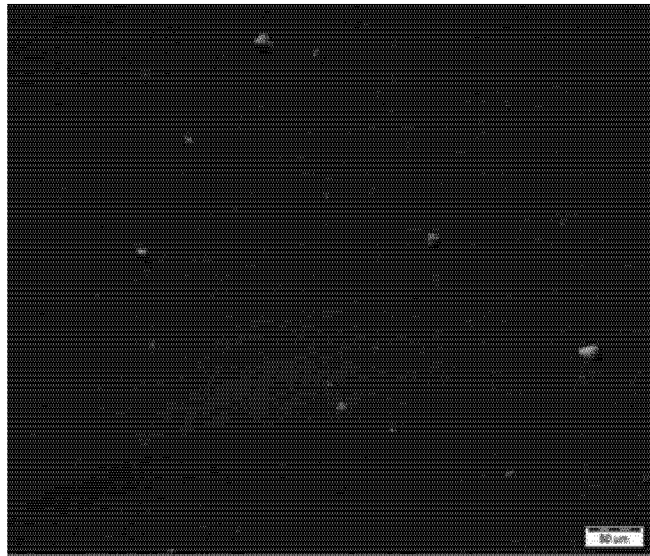


图 9

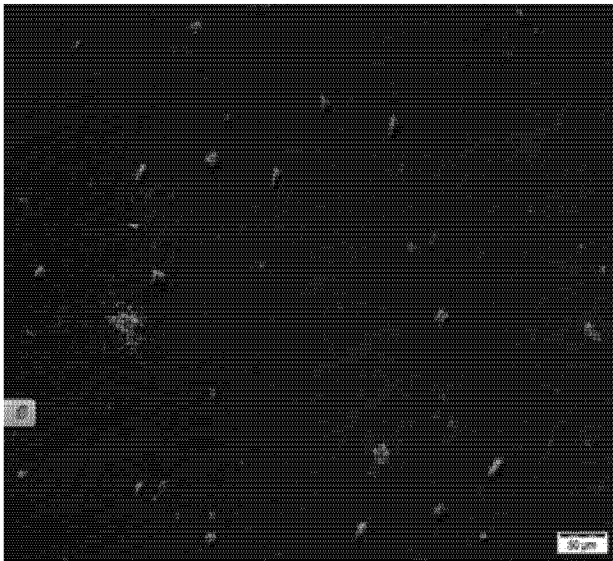


图 10

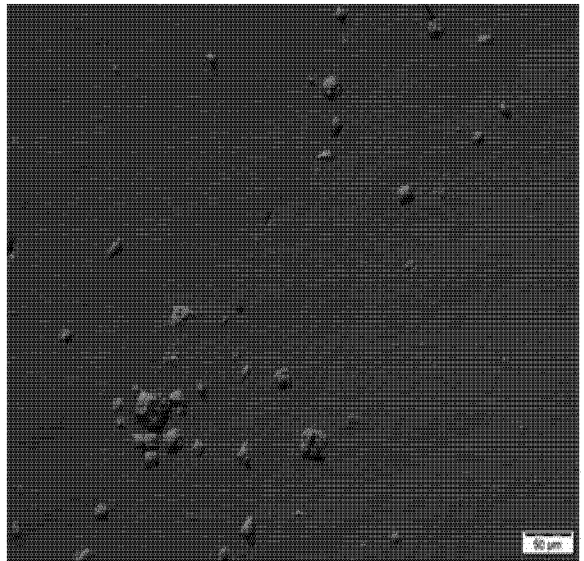


图 11