



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106237388 B

(45)授权公告日 2019.05.10

(21)申请号 201610656974.4

A61L 27/38(2006.01)

(22)申请日 2016.08.11

A61L 27/20(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61L 27/18(2006.01)

申请公布号 CN 106237388 A

A61L 27/12(2006.01)

A61L 27/22(2006.01)

(43)申请公布日 2016.12.21

(56)对比文件

(73)专利权人 武汉大学

CN 103877620 A,2014.06.25,

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

CN 101584885 A,2009.11.25,

CN 102274548 A,2011.12.14,

(72)发明人 朱有家 万影 王九龙

CN 105214138 A,2016.01.06,

US 2013202670 A1,2013.08.08,

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

CN 1515232 A,2004.07.28,

CN 103751847 A,2014.04.30,

代理人 程欣

审查员 王燕

(51)Int.Cl.

A61L 27/40(2006.01)

A61L 27/54(2006.01)

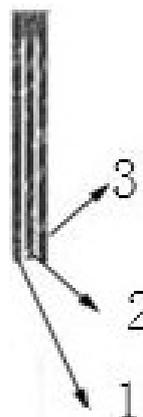
权利要求书3页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种用于牙周组织缺损修复的仿生层状支
架及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种用于牙周组织缺损修复的
仿生层状支架及其制备方法,其中支架包括牙骨
质层、牙槽骨层和位于牙骨质层、牙槽骨层之
间的牙周膜层;制备时首先合成一类壳聚糖-聚
己内酯共聚物,其中聚己内酯侧链取代度及链
长可调;通过改变PCL侧链长及PCL在CH-PCL
中的含量来控制该共聚物的力学、膨胀、降解
和亲疏水性;将优化获得的可利用水性溶剂加
工CH-PCL作为主要材料用于制备仿生层状支
架。



1. 一种用于牙周组织缺损修复的仿生层状支架,其特征在于:包括牙骨质层(1)、牙槽骨层(3)和位于牙骨质层(1)、牙槽骨层(3)之间的牙周膜层(2);所述牙骨质层(1)与牙周膜层(2)之间、牙周膜层(2)与牙槽骨层(3)之间分别通过粘合剂粘结;所述牙骨质层(1)材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA(40wt%)/Co1-I;所述牙周膜层(2)材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/Co1-I/CS;所述牙槽骨层(3)材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA(60wt%)/Co1-I;其中CH-PCL/nHA(40wt%)/Co1-I和CH-PCL/nHA(60wt%)/Co1-I中40wt%和60wt%指nHA在CH-PCL/nHA中含量。

2. 如权利要求1所述的用于牙周组织缺损修复的仿生层状支架,其特征在于:所述牙骨质层(1)和牙周膜层(2)的厚度为0.2-0.3mm;所述牙骨质层(1)、牙周膜层(2)和牙槽骨层(3)总厚度为1.2-1.8mm。

3. 如权利要求1所述的用于牙周组织缺损修复的仿生层状支架,其特征在于:所述牙骨质层(1)、牙周膜层(2)、牙槽骨层(3)的一端通过粘合剂粘结;所述粘合剂为医用纤维蛋白胶。

4. 一种如权利要求1所述的用于牙周组织缺损修复的仿生层状支架的制备方法,其特征在于:步骤如下:

一、CH-PCL共聚物的合成;

二、壳聚糖-聚己内酯/纳米羟基磷灰石复合物的制备:

(1) 将步骤一所得的CH-PCL取a克溶于体积分数为0.5-1.0%乙酸溶液制备2% (w/v) 的CH-PCL溶液;

(2) 另分别制备0.2M的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液和0.2M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液,备用;

(3) 将两体积的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液加入到一体积的CH-PCL溶液中,高速搅拌2h,得到混合液1;其后将一体积的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 加入到混合液1中并加入体积浓度为25%的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 使其pH值为11,得到混合液2;将混合液2中分别加入(2/3)a克和(3/2)a克的nHA,在室温下连续搅拌24h后在室温条件下陈化24h,减压过滤,弃去滤液,所获得产物于60°C条件下干燥24h,分别得到粉末状CH-PCL/nHA(40wt%) 和CH-PCL/nHA(60wt%);

三、仿生膜制备:

(1) CH-PCL/nHA(40wt%)/Co1-I复合膜制备:

A、以0.5-1.0%的乙酸为溶剂,制备0.5-1.0wt%的CH-PCL/nHA(40wt%) 溶液,备用;

B、以0.2%的乙酸为溶剂,制备0.2-0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

C、将CH-PCL/nHA(40wt%) 溶液与Co1-I溶液按体积比为7:3的比例混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中缓慢除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70°C条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的 NaHCO_3 溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.025-0.1%的京尼平溶液中交联2-10h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中缓慢除湿形成厚度0.2-0.3mm的薄膜后于-70°C冻干,即得到CH-PCL/nHA(40wt%)/Co1-I复合膜;

(2) CH-PCL/Co1-I/CS复合膜制备

A、将步骤一所得PCL含量小于40wt%的CH-PCL溶于0.5-1.0%乙酸溶液制备0.5-1.0wt%的CH-PCL溶液,备用;

B、以0.2%的乙酸为溶剂制备0.2-0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

C、将CS溶于双蒸水制备0.1-0.3wt%的CS溶液,备用;

D、将CH-PCL溶液与Co1-I溶液按体积比为7:3的比例混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.025-0.1%的京尼平溶液中交联2-10h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/Co1-I/CS复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.2-0.3mm;

(3) CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜制备

A、以0.5-1.0%的乙酸为溶剂,制备0.5-1.0wt%的CH-PCL/nHA (60wt%) 溶液,备用;

B、以0.2%的乙酸为溶剂,制备0.2-0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

C、将CH-PCL/nHA (60wt%) 溶液与Co1-I溶液按体积比为7:3的比例混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.025-0.1%的京尼平溶液中交联2-10h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.9-1.1mm;

四、加载生长因子;

(1) 将PDGF溶于PBS中制备成浓度在0.1-1.0μg/mL的溶液,备用;

(2) 分别将上步制备的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜浸入PDGF溶液中达到饱和溶胀后放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成薄膜后于-70℃冻干,然后在环氧乙烷气体氛围下灭菌、备用;

所述除湿后CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS复合膜的厚度为0.2-0.3mm,CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜的厚度为0.9-1.1mm;

五、仿生层状支架组装

(1) 将体外预培养牙周膜细胞分别加载到已消毒的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I三种复合膜中,分别在标准条件下体外培养7天,备用;

(2) 将医用纤维蛋白胶涂加到三种已加载细胞的膜的一端,将三种膜在无菌条件下按CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I顺序叠合,按压涂胶部位,即得到仿生层状支架。

5. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述步骤一中CH-PCL共聚物的合成方法如下;将脱乙酰度为100%的壳聚糖与3倍量的邻苯二甲酸酐在干燥的二甲基甲酰胺中加热到130℃,常规实验条件下反应5-7小时,混合物变为清亮的黄色液体;此时得到中间产物A,接下来将产物A与己内酯按1:0.9的比例在N₂保护,100℃的条件下不断搅拌,反应20个小时,此时得到中间产物B;将中间产物B置于索氏抽提器中用丙酮萃取24小时以去除反应中的同聚物;最后将1g萃取的B产物溶于20ml的二甲基甲酰胺中,100℃,N₂保护条件下孵育2小时,冷却至室温并使其自然沉淀,收集沉淀物并用双蒸水及乙醇漂洗净,干燥得到CH-

PCL。

6. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述步骤五(2)中医用纤维蛋白胶涂加长度为2-3mm。

一种用于牙周组织缺损修复的仿生层状支架及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于仿生学领域,特别是涉及一种用于牙周组织缺损修复的仿生层状支架及其制备方法。

背景技术

[0002] 牙周炎所造成的牙周附着丧失和牙槽骨缺损,可能导致牙齿最终丧失,该病在我国有较高的发病率,现已成为严重影响患者生活质量的口腔疾病之一。

[0003] 目前临床上牙周病的治疗原则主要是通过控制口腔内菌斑及微生物、清除牙石、改善口腔微环境等方法来消除牙周致病因素和控制炎症。具体方法包括以机械的洁刮治和根面平整为核心的牙周基础治疗,配合药物治疗、新技术新材料的应用等。这些治疗方法能在一定程度上控制牙周炎的发展,但不能解决已经发生的牙周附着丧失的重建和牙槽骨缺损修复等问题。

[0004] 牙周炎治疗的目的在于不仅在于控制炎症,更在于使已破坏的牙周组织再生以形成新附着,实现牙槽骨和牙骨质以及锚定在二者之间的牙周膜结构及其功能的重建。随着组织工程学的快速发展,一些组织工程技术与方法已被证明在牙周组织再生方面具有明确的临床应用前景。引导组织再生术是目前牙周组织再生的主要方法之一,其主要利用膜性材料引导牙周组织的修复。有的研究者通过在膜性材料加入不同生长因子、釉基质衍生物等力图提高修复效果,虽然一定程度上加速了牙周组织再生,但再生组织通常仅局限在牙周缺损的底部,而且很大程度上受缺损形式和剩余组织量的影响。因此,这种方法获得的远期临床修复效果仍不理想。利用各类钙磷系列骨水泥虽能在一定程度上可修复牙周组织缺损,但面临着牙根尖周填充区域内成骨性差或长期不成骨等问题。Kumar等利用I型胶原制备屏障膜对牙周骨内缺损进行修复,实验结果表明使用该类胶原屏障膜与根面刮治清创术的修复效果没有显著差异。Shalumon等将纳米羟基磷灰石、聚己内酯-壳聚糖和纳米生物活性玻璃复合物通过静电纺丝技术制备成纳米纤维仿生支架用于模拟骨细胞外基质,取得了一定的修复效果。但成骨均匀性差和新生纤维组织缺乏等问题尚未解决。

[0005] 虽然组织工程学为牙周组织再生提供了新思路和方法,但目前的常用方法均难达到理想的牙周组织再生。近来Bottino等设计了具有梯度结构的层状PLGA/胶原蛋白/纳米羟基磷灰石的生物膜性材料用于牙周组织缺损修复,证实该型支架内部有更多的纤维细胞和成骨细胞附着,支架相容性和降解性能有所改善,但PLGA降解产物为酸性,长期造成组织局部慢性炎症,此外,该膜性材料也无法完全产生牙周组织的三层结构。

发明内容

[0006] 针对背景技术中存在的问题,本发明设计一种可调控仿生层状支架及其制备方法,以修复牙周组织缺损,重建牙齿的生理功能。

[0007] 本发明的具体技术方案如下:

[0008] 一种用于牙周组织缺损修复的仿生层状支架,包括牙骨质层、牙槽骨层和位于牙

骨质层、牙槽骨层之间的牙周膜层;所述牙骨质层与牙周膜层之间、牙周膜层与牙槽骨层之间分别通过粘合剂粘结;所述牙骨质层材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA (40wt%) / Co1-I;所述牙周膜层材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/Co1-I/CS;所述牙槽骨层材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA (60wt%) / Co1-I;其中CH-PCL/nHA (40wt%) / Co1-I和CH-PCL/nHA (60wt%) / Co1-I中40wt%和60wt%指nHA在CH-PCL/nHA中含量。

[0009] 作为优选项:所述牙骨质层和牙周膜层的厚度为0.2-0.3mm;所述牙骨质层、牙周膜层和牙槽骨层总厚度为1.2-1.8mm。

[0010] 作为优选项:所述牙骨质层、牙周膜层、牙槽骨层的一端通过粘合剂粘结;所述粘合剂为医用纤维蛋白胶。

[0011] 本发明还提供用于牙周组织缺损修复的仿生层状支架的制备方法,步骤如下:

[0012] 一、CH-PCL共聚物的合成:将脱乙酰度为100%的壳聚糖与3倍量的邻苯二甲酸酐在干燥的二甲基甲酰胺中加热到130℃,常规实验条件下反应5-7小时,混合物变为清亮的黄色液体;此时得到中间产物A(邻苯二甲酰化壳聚糖),接下来将产物A与己内酯按1:0.9的比例在N₂保护,100℃的条件下不断搅拌,反应20个小时,此时得到中间产物B(邻苯二甲酰化壳聚糖-g-聚己内酯);将中间产物B置于索氏抽提器中用丙酮萃取24小时以去除反应中的同聚物;最后将1g萃取的B产物溶于20ml的二甲基甲酰胺中,100℃,N₂保护条件下孵育2小时,冷却至室温并使其自然沉淀,收集沉淀物并用双蒸水及乙醇漂洗净,干燥得到CH-PCL;

[0013] 二、壳聚糖-聚己内酯/纳米羟基磷灰石(CH-PCL/nHA)复合物的制备:

[0014] (1) 将步骤一所得的CH-PCL取a克(a>0)溶于体积分数为0.5-1.0%乙酸溶液制备2% (w/v)的CH-PCL溶液;

[0015] (2) 另分别制备0.2M的Ca(NO₃)₂·4H₂O溶液和0.2M(NH₄)₂HPO₄溶液,备用;

[0016] (3) 将两体积的Ca(NO₃)₂·4H₂O溶液加入到一体积的CH-PCL溶液中,高速搅拌2h,得到混合液1;其后将一体积的(NH₄)₂HPO₄加入到混合液1中并加入体积浓度为25%的NH₃·H₂O使其pH值为11,得到混合液2;将混合液2中分别加入2/3a克和3/2a克的nHA,在室温下连续搅拌24h后在室温条件下陈化24h,减压过滤,弃去滤液,所获得产物于60℃条件下干燥24h,分别得到粉末状CH-PCL/nHA (40wt%) 和CH-PCL/nHA (60wt%);

[0017] 三、仿生膜制备:

[0018] (1) CH-PCL/nHA (40wt%) / Co1-I复合膜制备:

[0019] A、以0.5-1.0%的乙酸为溶剂,制备0.5-1.0wt%的CH-PCL/nHA (40wt%) 溶液,备用;

[0020] B、以0.2%的乙酸为溶剂,制备0.2-0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0021] C、将CH-PCL/nHA (40wt%) 溶液与Co1-I溶液按体积比为7:3的比例混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.025-0.1%的京尼平溶液中交联2-10h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得到CH-PCL/nHA (40wt%) / Co1-I复合膜;

[0022] (2) CH-PCL/Co1-I/CS复合膜制备

[0023] A、将步骤一所得PCL含量小于40wt%的CH-PCL溶于0.5-1.0%乙酸溶液制备0.5-1.0wt%的CH-PCL溶液,备用;

[0024] B、以0.2%的乙酸为溶剂制备0.2-0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0025] C、将CS溶于双蒸水制备0.1-0.3wt%的CS溶液,备用;

[0026] D、将CH-PCL溶液与Co1-I溶液按体积比为7:3的比例混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.025-0.1%的京尼平溶液中交联2-10h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/Co1-I/CS复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.2-0.3mm;

[0027] (3) CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜制备

[0028] A、以0.5-1.0%的乙酸为溶剂,制备0.5-1.0wt%的CH-PCL/nHA (60wt%) 溶液,备用;

[0029] B、以0.2%的乙酸为溶剂,制备0.2-0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0030] C、将CH-PCL/nHA (60wt%) 溶液与Co1-I溶液按体积比为7:3的比例混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.025-0.1%的京尼平溶液中交联2-10h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.9-1.1mm;

[0031] 四、加载生长因子;

[0032] (1)、将PDGF溶于PBS中制备成浓度在0.1-1.0μg/mL的溶液,备用;

[0033] (2)、分别将上步制备的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜浸入PDGF溶液中达到饱和溶胀后放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成薄膜后于-70℃冻干,然后在环氧乙烷气体氛围下灭菌、备用;

[0034] 所述除湿后CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS复合膜的厚度为0.2-0.3mm,CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜的厚度为0.9-1.1mm;

[0035] 五、仿生层状支架组装

[0036] (1)、将体外预培养牙周膜细胞分别加载到已消毒的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I三种复合膜中,分别在标准条件下体外培养7天,备用;

[0037] (2)、将医用纤维蛋白胶涂加到三种已加载细胞的膜的一端,将三种膜在无菌条件下按CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I顺序叠合,按压涂胶部位,即得到仿生层状支架。

[0038] 作为优选项:所述步骤五(2)中医用纤维蛋白胶途加长度为2-3mm。

[0039] 由于正常牙骨质厚度平均约0.15-0.20mm,牙周膜厚度约为0.15-0.38mm,因此,我们设计制备的层状仿生支架的牙骨质层及牙周膜层各厚度约为0.2-0.3mm,支架(三层)总

厚度约1.5mm;由于支架厚度薄,在植入过程中及植入后都需要承受一定的张力和压力,因此,支架的力学性质变得尤为重要;另外,支架在体内的降解速率需要与新生组织的生长速率相匹配,支架的降解性质也成为影响修复效果的关键因素;我们首先按文合成一类壳聚糖-聚己内酯共聚物(chitosan-polycaprolactone,CH-PCL),其中聚己内酯(PCL)侧链取代度及链长可调;通过改变PCL侧链长及PCL在CH-PCL中的含量来控制该共聚物的力学、膨胀、降解和亲疏水性;将优化获得的可利用水性溶剂加工的CH-PCL作为主要材料用于制备仿生层状支架;该仿生支架具有层状结构并具有一定的孔度。

[0040] 本发明的有益技术效果为:按牙周组织的三层生理结构制作仿生支架,在各支架层加载修复用的牙周膜细胞,组装成整体后在一端2-3mm处压实。此类型支架植入牙周缺损处后,牙周膜细胞会在各相应层中产生对应于牙周的三层组织(牙骨质、牙周膜、牙槽骨),而支架材料会逐渐吸收,最终被产生的新生牙周组织替代,支架压实端则可以阻止生长较快的上皮组织进入支架中,确保牙周膜细胞完成牙周修复。

附图说明

[0041] 图1为本发明结构示意图;

[0042] 图2为本发明植入示意图。

具体实施方式

[0043] 实施例1

[0044] 一、CH-PCL共聚物的合成:将6g脱乙酰度为100%的壳聚糖与18g的邻苯二甲酸酐在干燥的二甲基甲酰胺中加热到130℃,常规实验条件下反应5-7小时,混合物变为清亮的黄色液体;此时得到中间产物A(邻苯二甲酰化壳聚糖),接下来将上述含A的混合物与21g的己内酯在N₂保护,100℃的条件下不断搅拌,反应20个小时,此时得到中间产物B(邻苯二甲酰化壳聚糖-g-聚己内酯)接下来将反应物置于索氏抽提器中用丙酮萃取24小时以去除反应中的同聚物;最后取30g萃取的B产物溶于600ml的二甲基甲酰胺中,100℃,N₂保护条件下孵育2小时,冷却至室温并使其自然沉淀,收集沉淀物并用双蒸水及乙醇漂洗净,干燥得到CH-PCL;

[0045] 四、壳聚糖-聚己内酯/纳米羟基磷灰石(CH-PCL/nHA)复合物的制备:

[0046] (1) 将步骤一所得的CH-PCL取6克溶于300ml体积分数为1.0%乙酸溶液制备2% (w/v)的CH-PCL溶液;

[0047] (3) 另分别制备0.2M的Ca(NO₃)₂·4H₂O溶液和0.2M(NH₄)₂HPO₄溶液,备用;

[0048] (3) 将200ml的Ca(NO₃)₂·4H₂O溶液加入到100ml的CH-PCL溶液中,高速搅拌2h,得到混合液1;其后将100ml的(NH₄)₂HPO₄加入到混合液1中并加入180ml体积浓度为25%的NH₃·H₂O使其pH值为11,得到混合液2;将混合液2中分别加入4克和9克的nHA,在室温下连续搅拌24h后在室温条件下陈化24h,减压过滤,弃去滤液,所获得产物于60℃条件下干燥24h,分别得到粉末状CH-PCL/nHA(40wt%)和CH-PCL/nHA(60wt%);

[0049] 五、仿生膜制备:

[0050] (2) CH-PCL/nHA(40wt%)/Col-I复合膜制备;

[0051] C、取上述制备好的CH-PCL/nHA(40wt%)粉末1g,加以100ml的1.0%的乙酸为溶

剂,制备1.0wt%的CH-PCL/nHA (40wt%) 溶液,备用;

[0052] D、以0.2%的乙酸为溶剂,制备0.2-0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0053] C、将CH-PCL/nHA (40wt%) 溶液100ml与Co1-I 43ml溶液混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.085%的京尼平溶液中交联6.5h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得到CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I复合膜;

[0054] (2) CH-PCL/Co1-I/CS复合膜制备

[0055] A、将步骤一所得PCL含量小于40wt%的CH-PCL 5g溶于495g 1.0%乙酸溶液制备1.0wt%的的CH-PCL溶液,备用;

[0056] B、用2L 0.2%的乙酸为溶剂加入10g Co1-I粉质0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0057] C、将0.6g CS溶于200ml双蒸水制备0.3wt%的CS溶液,备用;

[0058] D、取70ml CH-PCL溶液与30ml Co1-I溶液混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.1%的京尼平溶液中交联4.2h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/Co1-I/CS复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.2-0.3mm;

[0059] (3) CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜制备

[0060] C、取0.5-1.0%的乙酸200ml,加入2.04g的CH-PCL/nHA (60wt%) 制备成0.5-1.0wt%的溶液,备用;

[0061] D、用2L的0.2%的乙酸为溶剂,加入10g Co1-I粉质,制备0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0062] C、将70ml CH-PCL/nHA (60wt%) 溶液与30ml Co1-I溶液混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.06%的京尼平溶液中交联7.4h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.9-1.1mm;

[0063] 四、加载生长因子;

[0064] (1)、将0.1mg的PDGF溶于100ml的PBS中制备成浓度在0.1-1.0μg/mL的溶液,备用;

[0065] (2)、分别将上步制备的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜浸入PDGF溶液中达到饱和溶胀后放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成薄膜后于-70℃冻干,然后在环氧乙烷气体氛围下灭菌、备用;

[0066] 所述除湿后CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS复合膜的厚度为0.2-0.3mm,CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜的厚度为0.9-1.1mm;

[0067] 五、仿生层状支架组装

[0068] (1)、将体外预培养牙周膜细胞分别加载到已消毒的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I三种复合膜中,分别在标准条件下体外培养7天,备用;

[0069] (2)、将医用纤维蛋白胶涂加到三种已加载细胞的膜的一端,将三种膜在无菌条件下按CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I顺序叠合,按压涂胶部位,即得到仿生层状支架。

[0070] 所述步骤五(2)中医用纤维蛋白胶涂加长度为2-3mm。

[0071] 图1中牙骨质层1材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I;牙周膜层2材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/Co1-I/CS;牙槽骨层3材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I。

[0072] 实施例2

[0073] 一、CH-PCL共聚物的合成:将20g脱乙酰度为100%的壳聚糖与60g的邻苯二甲酸酐在干燥的二甲基甲酰胺中加热到130℃,常规实验条件下反应5-7小时,混合物变为清亮的黄色液体;此时得到中间产物A(邻苯二甲酰化壳聚糖),接下来将上述含A的混合物与72g的己内酯在N₂保护,100℃的条件下不断搅拌,反应20个小时,此时得到中间产物B(邻苯二甲酰化壳聚糖-g-聚己内酯)接下来将反应物置于索氏抽提器中用丙酮萃取24小时以去除反应中的同聚物;最后取42g萃取的B产物溶于840ml的二甲基甲酰胺中,100℃,N₂保护条件下孵育2小时,冷却至室温并使其自然沉淀,收集沉淀物并用双蒸水及乙醇漂洗净,干燥得到CH-PCL;

[0074] 二、壳聚糖-聚己内酯/纳米羟基磷灰石(CH-PCL/nHA)复合物的制备:

[0075] (1)将步骤一所得的CH-PCL取20克溶于1000ml体积分数为1.0%乙酸溶液制备2% (w/v)的CH-PCL溶液;

[0076] (2)另分别制备0.2M的Ca(NO₃)₂·4H₂O溶液和0.2M(NH₄)₂HPO₄溶液,备用;

[0077] (3)将400ml的Ca(NO₃)₂·4H₂O溶液加入到200ml的CH-PCL溶液中,高速搅拌2h,得到混合液1;其后将200ml的(NH₄)₂HPO₄加入到混合液1中并加入360ml体积浓度为25%的NH₃·H₂O使其pH值为11,得到混合液2;将混合液2中分别加入13.3克和30克的nHA,在室温下连续搅拌24h后在室温条件下陈化24h,减压过滤,弃去滤液,所获得产物于60℃条件下干燥24h,分别得到粉末状CH-PCL/nHA (40wt%) 和CH-PCL/nHA (60wt%);

[0078] 三、仿生膜制备:

[0079] (1)CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I复合膜制备:

[0080] A、取上述制备好的CH-PCL/nHA (40wt%) 粉末5g,加以1000ml的0.5%的乙酸为溶剂,制备1.0wt%的CH-PCL/nHA (40wt%) 溶液,备用;

[0081] B、以0.2%的乙酸为溶剂,制0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0082] C、将CH-PCL/nHA (40wt%) 溶液500ml与Co1-I 214ml溶液混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.068%的京尼平溶液中交联5.3h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得到CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I复合膜;

[0083] (2) CH-PCL/Co1-I/CS复合膜制备

[0084] A、将步骤一所得PCL含量小于40wt%的CH-PCL 20g溶于3960g 0.5%乙酸溶液制备1.0wt%的CH-PCL溶液,备用;

[0085] B、用3L 0.2%的乙酸为溶剂加入15g Co1-I粉质0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0086] C、将6g CS溶于2000ml双蒸水制备0.3wt%的CS溶液,备用;

[0087] D、取100ml CH-PCL溶液与42.9ml Co1-I溶液混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.09%的京尼平溶液中交联3.2h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/Co1-I/CS复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.2-0.3mm;

[0088] (3) CH-PCL/nHA (60wt%)/Co1-I复合膜制备

[0089] A、取1.0%的乙酸320ml,加入3.26g的CH-PCL/nHA (60wt%) 制备成1.0wt%的溶液,备用;

[0090] B、用2.8L的0.2%的乙酸为溶剂,加入14g Co1-I粉质,制备0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0091] C、将200ml CH-PCL/nHA (60wt%) 溶液与85.7ml Co1-I溶液混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.0875%的京尼平溶液中交联6.4h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/nHA (60wt%)/Co1-I复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.9-1.1mm;

[0092] 四、加载生长因子;

[0093] (1)、将0.3mg的PDGF溶于300ml的PBS中制备成浓度在0.1g/mL的溶液,备用;

[0094] (2)、分别将上步制备的CH-PCL/nHA (40wt%)/Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%)/Co1-I复合膜浸入PDGF溶液中达到饱和溶胀后放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成薄膜后于-70℃冻干,然后在环氧乙烷气体氛围下灭菌、备用;

[0095] 所述除湿后CH-PCL/nHA (40wt%)/Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS复合膜的厚度为0.2-0.3mm,CH-PCL/nHA (60wt%)/Co1-I复合膜的厚度为0.9-1.1mm;

[0096] 五、仿生层状支架组装

[0097] (1)、将体外预培养牙周膜细胞分别加载到已消毒的CH-PCL/nHA (40wt%)/Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%)/Co1-I三种复合膜中,分别在标准条件下体外培养7天,备用;

[0098] (2)、将医用纤维蛋白胶涂加到三种已加载细胞的膜的一端,将三种膜在无菌条件下按CH-PCL/nHA (40wt%)/Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%)/Co1-I顺序叠合,按压涂胶部位,即得到仿生层状支架。

[0099] 所述步骤五(2)中医用纤维蛋白胶涂加长度为2-3mm。

[0100] 图1中牙骨质层1材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA (40wt%)/Co1-I;牙周膜

层2材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/Co1-I/CS; 牙槽骨层3材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA (60wt%)/Co1-I。

[0101] 实施例3

[0102] 一、CH-PCL共聚物的合成: 将14g脱乙酰度为100%的壳聚糖与42g的邻苯二甲酸酐在干燥的二甲基甲酰胺中加热到130℃, 常规实验条件下反应5-7小时, 混合物变为清亮的黄色液体; 此时得到中间产物A (邻苯二甲酰化壳聚糖), 接下来将上述含A的混合物与21g的己内酯在N₂保护, 100℃的条件下不断搅拌, 反应20个小时, 此时得到中间产物B (邻苯二甲酰化壳聚糖-g-聚己内酯) 接下来将反应物置于索氏抽提器中用丙酮萃取24小时以去除反应中的同聚物; 最后取36g萃取的B产物溶于720ml的二甲基甲酰胺中, 100℃, N₂保护条件下孵育2小时, 冷却至室温并使其自然沉淀, 收集沉淀物并用双蒸水及乙醇漂洗净, 干燥得到CH-PCL;

[0103] 二、壳聚糖-聚己内酯/纳米羟基磷灰石 (CH-PCL/nHA) 复合物的制备:

[0104] (1) 将步骤一所得的CH-PCL取15克溶于750ml体积分数为1.0%乙酸溶液制备2% (w/v) 的CH-PCL溶液;

[0105] (2) 另分别制备0.2M的Ca (NO₃)₂ · 4H₂O溶液和0.2M (NH₄)₂HPO₄溶液, 备用;

[0106] (3) 将300ml的Ca (NO₃)₂ · 4H₂O溶液加入到150ml的CH-PCL溶液中, 高速搅拌2h, 得到混合液1; 其后将150ml的 (NH₄)₂HPO₄加入到混合液1中并加入270ml体积浓度为25%的NH₃ · H₂O使其pH值为11, 得到混合液2; 将混合液2中分别加入10克和22.5克的nHA, 在室温下连续搅拌24h后在室温条件下陈化24h, 减压过滤, 弃去滤液, 所获得产物于60℃条件下干燥24h, 分别得到粉末状CH-PCL/nHA (40wt%) 和CH-PCL/nHA (60wt%);

[0107] 三、仿生膜制备:

[0108] (1) CH-PCL/nHA (40wt%)/Co1-I复合膜制备;

[0109] A、取上述制备好的CH-PCL/nHA (40wt%) 粉末8g, 加以800ml的1.0%的乙酸为溶剂, 制备1.0wt%的CH-PCL/nHA (40wt%) 溶液, 备用;

[0110] B、以0.2%的乙酸为溶剂, 制备0.2-0.5wt%的Co1-I溶液, 备用;

[0111] C、将CH-PCL/nHA (40wt%) 溶液180ml与Co1-I 77ml溶液混合均匀, 利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜, 然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干, 得到初膜; 将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h, 用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.025%的京尼平溶液中交联9h; 然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.3mm的薄膜后于-70℃冻干, 即得到CH-PCL/nHA (40wt%)/Co1-I复合膜;

[0112] (2) CH-PCL/Co1-I/CS复合膜制备

[0113] A、将步骤一所得PCL含量小于40wt%的CH-PCL 16g溶于1584g 1.0%乙酸溶液制备1.0wt%的CH-PCL溶液, 备用;

[0114] B、用2.4L 0.2%的乙酸为溶剂加入12g Co1-I粉质0.2wt%的Co1-I溶液, 备用;

[0115] C、将2.1g CS溶于700ml双蒸水制备0.3wt%的CS溶液, 备用;

[0116] D、取160ml CH-PCL溶液与68ml Co1-I溶液混合均匀, 利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜, 然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干, 得到初膜; 将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理

5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.075%的京尼平溶液中交联8h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/Co1-I/CS复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.2-0.3mm;

[0117] (3) CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜制备

[0118] A、取1.0%的乙酸300ml,加入3.06g的CH-PCL/nHA (60wt%) 制备成1.0wt%的溶液,备用;

[0119] B、用2.3L的0.2%的乙酸为溶剂,加入11.5g Co1-I粉质,制备0.5wt%的Co1-I溶液,备用;

[0120] C、将120ml CH-PCL/nHA (60wt%) 溶液与51.4ml Co1-I溶液混合均匀,利用旋涂方法制备成厚度约0.6mm的薄膜,然后将该薄膜在室温条件下于气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度0.3-0.4mm的薄膜后于-70℃条件下冻干,得到初膜;将初膜在2wt%的NaHCO₃溶液中处理5h,用双蒸水洗至中性后在室温条件下在0.05%的京尼平溶液中交联7h;然后再用双蒸水清洗除去交联剂后再放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成厚度约0.2-0.3mm的薄膜后于-70℃冻干,即得CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜;该复合膜的最终厚度控制在0.9-1.1mm;

[0121] 四、加载生长因子;

[0122] (1)、将0.1mg的PDGF溶于100ml的PBS中制备成浓度在0.1g/mL的溶液,备用;

[0123] (2)、分别将上步制备的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜浸入PDGF溶液中达到饱和溶胀后放入气体内循环式蒸发器中慢速除湿形成薄膜后于-70℃冻干,然后在环氧乙烷气体氛围下灭菌、备用;

[0124] 所述除湿后CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS复合膜的厚度为0.2-0.3mm,CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I复合膜的厚度为0.9-1.1mm;

[0125] 五、仿生层状支架组装

[0126] (1)、将体外预培养牙周膜细胞分别加载到已消毒的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I三种复合膜中,分别在标准条件下体外培养7天,备用;

[0127] (2)、将医用纤维蛋白胶涂加到三种已加载细胞的膜的一端,将三种膜在无菌条件下按CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I、CH-PCL/Co1-I/CS和CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I顺序叠合,按压涂胶部位,即得到仿生层状支架。

[0128] 所述步骤五(2)中医用纤维蛋白胶涂加长度为2-3mm。

[0129] 图1中牙骨质层1材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA (40wt%) /Co1-I;牙周膜层2材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/Co1-I/CS;牙槽骨层3材料为加载有牙周膜细胞的CH-PCL/nHA (60wt%) /Co1-I。

[0130] 应当理解的是,本说明书未详细阐述的部分均属于现有技术。

[0131] 应当理解的是,上述针对较佳实施例的描述较为详细,并不能因此而认为是对本发明专利保护范围的限制,本领域的普通技术人员在本发明的启示下,在不脱离本发明专利要求所保护的范围内,还可以做出替换或变形,均落入本发明的保护范围之内,本发明的请求保护范围应以所附权利要求为准。

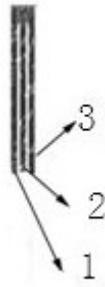


图 1

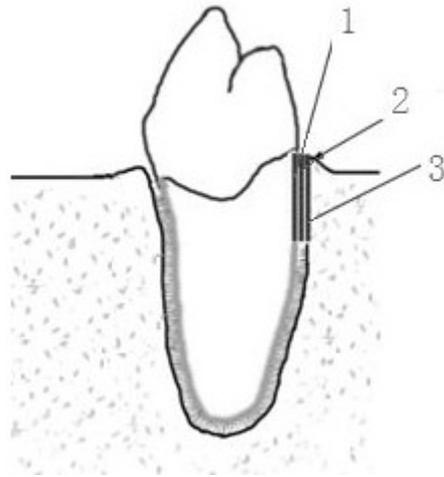


图 2