



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110898257 B

(45) 授权公告日 2021.12.24

(21) 申请号 201911078331.6

A61L 27/58 (2006.01)

(22) 申请日 2019.11.06

B33Y 70/10 (2020.01)

B33Y 80/00 (2015.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110898257 A

(56) 对比文件

CN 109227877 A, 2019.01.18

CN 102153713 A, 2011.08.17

(43) 申请公布日 2020.03.24

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518000 广东省深圳市南山区粤海街道高新技术产业园南区粤兴一道18号
香港理工大学产学研大楼205室

蒋乙峰. 生物基UV固化预聚物制备及性能研究.《影像科学与光化学》.2019,第37卷(第3期),
Francesca Scaleran et al..Development and characterization of UV curable epoxy/hydroxyapatite suspensions for stereolithography applied to bone tissue engineering.《Ceramics International》.2014,

Francesca Scaleran et al..Development and characterization of UV curable epoxy/hydroxyapatite suspensions for stereolithography applied to bone tissue engineering.《Ceramics International》.2014,

(72) 发明人 赵昕 杨雨禾

(74) 专利代理机构 北京知呱呱知识产权代理有限公司 11577

代理人 朱芳

审查员 郭翔

(51) Int. Cl.

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

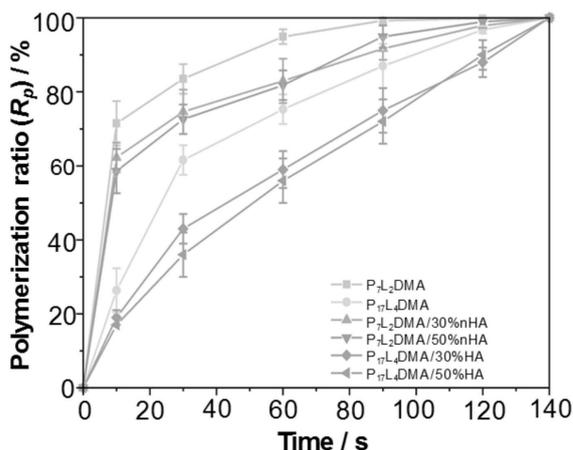
权利要求书2页 说明书11页 附图9页

(54) 发明名称

一种用于骨组织工程的光固化复合材料及基于其的骨组织工程支架

(57) 摘要

本发明实施例公开了一种用于骨组织工程的光固化复合材料及基于其的骨组织工程支架,所述复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯(poly(lactide-co-propylene glycol-co-lactide)dimethacrylate)和羟基磷灰石光聚合得到;本发明聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯具有良好的生物相容性和降解性,并能够在紫外光照射下迅速光交联,并通过将丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石光聚合得到;本发明聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石共同进行光聚合,使得制备得到的复合材料具有优异的力学性能和生物活性。



1. 一种用于骨组织工程的光固化复合材料,其特征在于,所述复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石光聚合得到,所述聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 P_7L_2 DMA、 $P_{17}L_4$ DMA或 $P_{34}L_8$ DMA;

其中, P_7L_2 DMA:通过如下方法制得:

(1) 将聚丙二醇与丙交酯在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在一定温度下进行开环聚合反应,得到 P_7L_2 ;

(2) 取 P_7L_2 溶于二氯甲烷,然后在一定温度条件下,通过交替滴加甲基丙烯酰氯和三乙胺,两种试剂均在二氯甲烷中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于乙醚中,真空过滤,最后用盐酸溶液、 $NaHCO_3$ 溶液和去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发,以完全除去残留的溶剂;

$P_{17}L_4$ DMA:通过如下方法制得:

(1) 将聚丙二醇与丙交酯在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在一定温度下进行开环聚合反应,得到 $P_{17}L_4$;

(2) 称取 $P_{17}L_4$ 溶于二氯甲烷,然后在一定温度条件下,通过交替滴加甲基丙烯酰氯和克三乙胺,两种试剂均在二氯甲烷中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于乙醚中,真空过滤,最后用盐酸溶液、 $NaHCO_3$ 溶液和去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发,以完全除去残留的溶剂;

$P_{34}L_8$ DMA:通过如下方法制得:

(1) 将聚丙二醇与丙交酯在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在一定温度下进行开环聚合反应,得到 $P_{34}L_8$;

(2) 称取 $P_{34}L_8$ 溶于二氯甲烷,然后在一定温度条件下,通过交替滴加甲基丙烯酰氯和克三乙胺,两种试剂均在二氯甲烷中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于乙醚中,真空过滤,最后用盐酸溶液、 $NaHCO_3$ 溶液和去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发,以完全除去残留的溶剂。

2. 根据权利要求1所述的复合材料,其特征在于,所述羟基磷灰石的粒径为50-100nm。

3. 根据权利要求1或2所述的复合材料,其特征在于,所述羟基磷灰石为甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石。

4. 根据权利要求1或2所述的复合材料,其特征在于,所述复合材料中羟基磷灰石含量为30-70%。

5. 根据权利要求4所述的复合材料,其特征在于,所述复合材料中羟基磷灰石含量为40-60%。

6. 根据权利要求1所述的复合材料,其特征在于,所述光聚合采用的紫外线照射光强为 $5.2-5.8mW/cm^2$ 。

7. 一种骨组织工程支架,其特征在于,所述骨组织工程支架基于权利要求1-6任一所述的复合材料得到。

8. 根据权利要求7所述的骨组织工程支架,其特征在于,通过如下方法制得:

(a) 建立骨组织工程支架的三维模型的STL文件,并根据三维模型微结构处理STL文件,随后导出STL文件;

(b) 将STL文件导入至3D打印机中;

(c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石进行混匀,得到混合物,随后,采用3D打印机打印,然后通过紫外照射使得打印后的混合物发生光聚合反应,固化成型,即得所述骨组织工程支架。

9. 根据权利要求8所述的骨组织工程支架,其特征在于,所述紫外照射采用的紫外线照射光强为 $5.2-5.8\text{mW}/\text{cm}^2$ 。

一种用于骨组织工程的光固化复合材料及基于其的骨组织工程支架

技术领域

[0001] 本发明实施例涉骨组织工程技术领域,具体涉及一种用于骨组织工程的光固化复合材料及基于其的骨组织工程支架。

背景技术

[0002] 在大型骨缺损中,人体缺乏自愈能力,需要配合一定的骨移植物才能进行修复。虽然自体骨移植是临床认可的,也是最有效的治疗方法之一,但它们受到供体部位发病率、免疫和炎症反应以及疾病传播风险的限制。为了克服这些问题,骨组织工程作为一种创新的、有前途的替代方法受到了广泛的关注。目前,制备三维(3D)骨组织工程材料主要有两大类,即聚合物[聚己内酯(PCL)、聚乳酸(PLA)、聚乳酸-糖基乙酸(PLGA)、胶原蛋白等]和陶瓷[生物活性玻璃、羟基磷灰石(HA)、磷酸三钙(TCP)等],每种材料都有其优点和局限性;例如,许多聚合物已经被证明是生物相容的,并且在不产生有毒副产品的情况下,以可控的速度降解;然而,它们未能满足对高机械性能和/或生物活性的需求,阻碍了它们促进骨再生的潜力;另一方面,HA是骨支架中最常用的无机成分,其化学性质与天然骨矿物相似,但其脆性和机械稳定性较差,限制了其在承重骨中的应用。为了解决这些问题并提高复合材料的生物活性,研究人员设计了各种复合材料,如PCL/HA、PLGA/HA和PCL/PLGA/HA作为潜在的骨移植替代品,遗憾的是,由于羟基磷灰石的团聚和聚合物/羟基磷灰石的弱相互作用,这些复合材料的力学性能仍然不理想;此外,这些复合支架主要是通过传统工艺如盐浸,热诱导,相分离等制备的,除了有机溶剂的潜在毒性和制造过程中的热损伤,这些技术对支架孔隙度和连通性的控制很差。

[0003] 为了制作具有可控结构的三维骨支架,各种3D打印技术应运而生,用于制备个性化治疗的定制骨支架。其中,光交联辅助直写(Direct-Ink-Writing,DIW)是常用的一种方法。利用该技术,该打印材料在微孔挤出后,在紫外光照射下进行快速交联成型,形成支架结构。DIW打印具有设置相对简单、运行成本低、速度快、分辨率高、精度高等优点。此外,它不需要使用有毒溶剂或过多的热处理,使其包裹脆弱的生物分子,如生长因子,DNA和RNA成为可能。然而,与上述可降解聚合物类似,一些用于DIW打印的光交联材料,如甲基丙烯酸海藻酸盐、聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(PEGDMA)、甲基丙烯酸明胶(GelMA)等,机械性能较差,交联后的抗压模量小于1MPa,远低于松质骨的抗压模量(大于80MPa);即使加入HA后,由于界面相互作用不足和荷载传递的不足,其压缩模量也几乎没有改善。因此,由这些材料制成的打印支架无法为骨再生提供可靠的支持。另一方面,其他光交联材料如聚甲基丙烯酸羟乙酯(pHEMA)和聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)具有良好的力学性能,然而,它们的生物相容性差、降解性差、光交联放热反应严重,严重阻碍了它们的应用。

发明内容

[0004] 为此,本发明实施例第一目的提供一种用于骨组织工程的光固化复合材料,以解

决现有复合材料力学性能、生物相容性以及降解性较差,且交联放热严重的问题。

[0005] 本发明实施例第二目的提供一种基于上述复合材料的骨组织工程支架,该骨组织工程支架的制备方法避免了传统工艺存在的使用有机溶剂而导致的潜在毒性以及制造过程中对复合材料易造成热损伤,且复合材料孔隙度和互连性的控制较差的问题。

[0006] 为了实现上述目的,本发明实施例提供如下技术方案:

[0007] 根据本发明实施例的第一方面提供一种用于骨组织工程的光固化复合材料,所述复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯(缩写为 P_mL_n DMA,其中P代表丙二醇,m为单体丙二醇的个数;L代表丙交酯,n为单体丙交酯的个数)和羟基磷灰石(HA)光聚合得到。

[0008] 本发明上述 P_mL_n DMA具有良好的生物相容性和降解性,并能够在引光剂的作用与紫外光照射下迅速光交联,并通过将 P_mL_n DMA和HA混合后共同进行光聚合,使得制备得到的复合材料具有优异的力学性能和生物活性。

[0009] 进一步地,所述羟基磷灰石的粒径为50-100nm。通过对HA粒径的限定,能够更好的促进HA在 P_mL_n DMA中的分散度,能够更好的提高制备的复合材料的综合性能。

[0010] 进一步地,所述羟基磷灰石为甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石(HAMA)。通过对HA进行功能化修饰,能够在制备的复合材料中形成无机-有机双交联网络,能够更好的提高光交连后复合材料的力学性能。

[0011] 在本发明中对甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石的来源不做严格限制,例如,可以通过如下方法制备得到:

[0012] 将20g HA在120℃下彻底干燥48小时,在氮气保护下溶解于300mL二甲酰胺(DMF)中,然后加入4mL HMDI和0.4mL二月桂酸二丁基锡(DBTDL)作为催化剂,在50℃下反应24小时,然后加入8mL HEMA,在相同条件下反应5小时,最后,加入400毫升甲醇停止反应,反应得到的HAMA经离心分离,用二氯甲烷(DCM)冲洗三次,室温干燥96小时。

[0013] 进一步地,所述聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 P_7L_2 DMA、 $P_{17}L_4$ DMA或 $P_{34}L_8$ DMA,优选为 P_7L_2 DMA。

[0014] 进一步地,所述 P_7L_2 DMA通过如下方法制备得到:

[0015] (1) 将34.4g聚丙二醇(PPG,平均分子量425,0.08mol)与23g丙交酯(LA,0.16mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 P_7L_2 ;

[0016] (2) 称取7.13g P_7L_2 (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯(MAC)和4.05克三乙胺(TEA),两种试剂均在二氯甲烷(DCM)中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液(0.1mol/L)、200mL NaHCO_3 溶液(0.1mol/L)和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0017] 进一步地,所述 $P_{17}L_4$ DMA通过如下方法制得:

[0018] (1) 将40g聚丙二醇(PPG,平均分子量1000,0.04mol)与23g丙交酯(LA,0.16mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 $P_{17}L_4$;

[0019] (2) 称取15.75g $P_{17}L_4$ (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯(MAC)和4.05克三乙胺(TEA),两种试剂均在二氯甲烷(DCM)中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液(0.1mol/L)、200mL NaHCO_3 溶液(0.1mol/L)和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相

通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0020] 进一步地,所述 $P_{34}L_8$ DMA通过如下方法制得:

[0021] (1) 将40g聚丙二醇 (PPG, 平均分子量2000, 0.02mol) 与23g丙交酯 (LA, 0.16mol) 在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 $P_{34}L_8$;

[0022] (2) 称取32.62g $P_{34}L_8$ (0.01mol) 溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯 (MAC) 和4.05克三乙胺 (TEA),两种试剂均在二氯甲烷 (DCM) 中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液 (0.1mol/L)、200mL $NaHCO_3$ 溶液 (0.1mol/L) 和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0023] 在本发明中对复合材料中羟基磷灰石含量不作严格限制,优选地,所述复合材料中羟基磷灰石含量为30-70%;更优选地,所述复合材料中羟基磷灰石含量为40-60%,进一步优选为50%。

[0024] 本发明通过控制羟基磷灰石含量以及聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯中最小重复单元内单体的个数,能够更好的提高复合材料的流变行为、润湿性和生物降解性能,使得复合材料具有良好的3D打印性,利于采用3D打印。

[0025] 进一步地,所述光聚合采用的紫外线照射光强为5.2-5.8mW/cm²。

[0026] 根据本发明实施例的第二方面提供一种骨组织工程支架,所述骨组织工程支架基于上述复合材料得到。

[0027] 进一步对,所述骨组织工程支架通过如下方法制得:

[0028] (a) 建立骨组织工程支架的三维模型的STL文件,并根据三维模型微结构处理STL文件,随后导出STL文件;

[0029] (b) 将STL文件导入至3D打印机中;

[0030] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石进行混匀,得到混合物,随后,采用3D打印机打印,然后通过紫外照射使得打印后的混合物发生光聚合反应,固化成型,即得所述骨组织工程支架。

[0031] 进一步地,所述紫外照射采用的紫外线照射光强为5.2-5.8mW/cm²。

[0032] 本发明通过采用上述方法制备骨组织工程支架,能够更好地控制复合材料孔隙度和互连性,并且上述方法无需其他溶剂的添加,能够避免有机溶剂的添加导致的潜在毒性以及制造过程中对复合材料易造成热损伤的问题。

[0033] 本发明实施例具有如下优点:

[0034] (1) 本发明通过将 P_mL_n DMA和HA共同进行光聚合,使得制备得到的复合材料具有优异的力学性能和生物活性。

[0035] (2) 本发明通过对HA粒径的选择以及功能化修饰,能够更好的促进HA在 P_mL_n DMA中的分散度,减少粉末团聚,并能够在制备的复合材料中形成无机-有机双交联网络,更好的提高复合材料的综合性能。

[0036] (3) 本发明通过控制羟基磷灰石含量以及聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯中最小重复单元内单体的个数,能够更好的提高复合材料的流变行为、润湿性和生物降解性能,使得复合材料具有良好的3D打印性,利于采用3D打印。

[0037] (4) 本发明骨组织工程支架的制备方法能够更好地控制复合材料孔隙度和互连

性,并且无需其他溶剂的添加,能够避免有机溶剂的添加导致的潜在毒性以及制造过程中对复合材料易造成热损伤的问题。

附图说明

[0038] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图仅仅是示例性的,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。

[0039] 图1为本发明实验例1中提供的不同材料光聚合速率随时间变化的关系的之一;

[0040] 图2为本发明实验例1中提供的不同材料光聚合速率随时间变化的关系的之二;

[0041] 图3为本发明实验例1中提供的不同材料在光交联过程中温度随时间的变化关系的之一;

[0042] 图4为本发明实验例1中提供的不同材料在光交联过程中温度随时间的变化关系的之二;

[0043] 图5为本发明实验例1中提供的不同材料在光交联过程中温度随时间的变化关系的之三;

[0044] 图6为本发明实验例1中提供的不同材料拉伸试验结果之一;

[0045] 图7为本发明实验例1中提供的不同材料拉伸试验结果之二;

[0046] 图8为本发明实验例1中提供的不同材料压缩试验的应力应变曲线之一;

[0047] 图9为本发明实验例1中提供的不同材料压缩试验的应力应变曲线之二;

[0048] 图10为本发明实验例1中提供的不同材料拉伸试验中拉伸模量;

[0049] 图11为本发明实验例1中提供的不同材料拉伸试验中最大伸长;

[0050] 图12为本发明实验例1中提供的不同材料压缩试验中单位体积所吸收的压缩模量;

[0051] 图13为本发明实验例1中提供的不同材料压缩试验中单位体积所吸收的能量;

[0052] 图14为本发明实验例1中提供的不同材料粘度与剪切速率的关系以及不同材料的流变学行为;

[0053] 图15为本发明实验例1中提供的不同材料与骨髓干细胞的生物相容性的分析结果;

[0054] 图16为本发明实验例1中提供的不同材料对骨髓间充质干细胞成骨分化活性的影响结果;

[0055] 图17为本发明实验例1中提供的不同材料对骨髓间充质干细胞成骨分化过程中细胞基质钙化的影响结果。

[0056] 图中:nHA和HA相同,均为羟基磷灰石;nHAMA和HAMA相同,均为甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石。

具体实施方式

[0057] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一

部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0058] 以下各实施例采用的原料如下:

[0059] 羟基磷灰石:来源于Sigma-Aldrich公司,货号:677418;

[0060] 甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石:通过如下方法制得:

[0061] 将20g HA在120℃下彻底干燥48小时,在氮气保护下溶解于300mL二甲酰胺(DMF)中,然后加入4mL HMDI和0.4mL二月桂酸二丁基锡(DBTDL)作为催化剂,在50℃下反应24小时,然后加入8mL HEMA,在相同条件下反应5小时,最后,加入400毫升甲醇停止反应,反应得到的HAMA经离心分离,用二氯甲烷(DCM)冲洗三次,室温干燥96小时。

[0062] P_7L_2 DMA:通过如下方法制得:

[0063] (1) 将34.4g聚丙二醇(PPG,平均分子量425,0.08mol)与23g丙交酯(LA,0.16mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 P_7L_2 ;

[0064] (2) 称取7.13g P_7L_2 (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯(MAC)和4.05克三乙胺(TEA),两种试剂均在二氯甲烷(DCM)中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液(0.1mol/L)、200mL $NaHCO_3$ 溶液(0.1mol/L)和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0065] $P_{17}L_4$ DMA:通过如下方法制得:

[0066] (1) 将40g聚丙二醇(PPG,平均分子量1000,0.04mol)与23g丙交酯(LA,0.16mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 $P_{17}L_4$;

[0067] (2) 称取15.75g $P_{17}L_4$ (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯(MAC)和4.05克三乙胺(TEA),两种试剂均在二氯甲烷(DCM)中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液(0.1mol/L)、200mL $NaHCO_3$ 溶液(0.1mol/L)和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0068] $P_{34}L_8$ DMA:通过如下方法制得:

[0069] (1) 将40g聚丙二醇(PPG,平均分子量2000,0.02mol)与23g丙交酯(LA,0.16mol)在含氮环境下,以辛酸亚锡为催化剂,在150℃下进行6小时开环聚合反应,得到 $P_{34}L_8$;

[0070] (2) 称取32.62g $P_{34}L_8$ (0.01mol)溶于100ml二氯甲烷,然后在0℃条件下,通过交替滴加4.22g甲基丙烯酰氯(MAC)和4.05克三乙胺(TEA),两种试剂均在二氯甲烷(DCM)中稀释,为了去除生成的三乙胺·盐酸,将产品溶解于200mL乙醚中,真空过滤,最后用200mL盐酸溶液(0.1mol/L)、200mL $NaHCO_3$ 溶液(0.1mol/L)和200mL去离子水洗涤,最后的油溶剂相通过分离漏斗从混合物中回收,然后旋转蒸发2小时,以完全除去残留的溶剂。

[0071] 实施例1

[0072] 一、用于骨组织工程的光固化复合材料

[0073] 上述用于骨组织工程的光固化复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石光聚合得到,其中:

[0074] 聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 P_7L_2 DMA;

[0075] 复合材料中羟基磷灰石含量为30%;

- [0076] 光聚合采用的紫外线光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 。
- [0077] 二、基于上述复合材料的骨组织工程支架
- [0078] 上述骨组织工程支架通过如下方法制得：
- [0079] (a) 建立复合材料三维模型的STL文件，并根据三维模型微结构处理STL文件，随后导出STL文件；
- [0080] (b) 将STL文件导入至3D打印机中；
- [0081] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石进行混匀，得到混合物，随后，采用3D打印机打印，然后通过光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照射使得打印后的混合物发生光聚合反应，固化成型，即得上述复合材料。
- [0082] 实施例2
- [0083] 一、用于骨组织工程的光固化复合材料
- [0084] 上述用于骨组织工程的光固化复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石光聚合得到，其中：
- [0085] 聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 $P_7L_2\text{DMA}$ ；
- [0086] 复合材料中羟基磷灰石含量为50%。
- [0087] 光聚合采用的紫外线光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 。
- [0088] 二、基于上述复合材料的骨组织工程支架
- [0089] 上述骨组织工程支架通过如下方法制得：
- [0090] (a) 建立复合材料三维模型的STL文件，并根据三维模型微结构处理STL文件，随后导出STL文件；
- [0091] (b) 将STL文件导入至3D打印机中；
- [0092] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石进行混匀，得到混合物，随后，采用3D打印机打印，然后通过光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照射使得打印后的混合物发生光聚合反应，固化成型，即得上述复合材料。
- [0093] 实施例3
- [0094] 一、用于骨组织工程的光固化复合材料
- [0095] 上述用于骨组织工程的光固化复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石光聚合得到，其中：
- [0096] 聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 $P_7L_2\text{DMA}$ ；
- [0097] 复合材料中甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石含量为30%。
- [0098] 光聚合采用的紫外线光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 。
- [0099] 二、基于上述复合材料的骨组织工程支架
- [0100] 上述骨组织工程支架通过如下方法制得：
- [0101] (a) 建立复合材料三维模型的STL文件，并根据三维模型微结构处理STL文件，随后导出STL文件；
- [0102] (b) 将STL文件导入至3D打印机中；
- [0103] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石进行混匀，得到混合物，随后，采用3D打印机打印，然后通过光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照射使得打印后的混合物发生光聚合反应，固化成型，即得上述复合材料。

[0104] 实施例4

[0105] 一、用于骨组织工程的光固化复合材料

[0106] 上述用于骨组织工程的光固化复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石光聚合得到,其中:

[0107] 聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 P_7L_2 DMA;

[0108] 复合材料中甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石含量为50%。

[0109] 光聚合采用的紫外线光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 。

[0110] 二、基于上述复合材料的骨组织工程支架

[0111] 上述骨组织工程支架通过如下方法制得:

[0112] (a) 建立复合材料三维模型的STL文件,并根据三维模型微结构处理STL文件,随后导出STL文件;

[0113] (b) 将STL文件导入至3D打印机中;

[0114] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石进行混匀,得到混合物,随后,采用3D打印机打印,然后通过光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照射使得打印后的混合物发生光聚合反应,固化成型,即得上述复合材料。

[0115] 实施例5

[0116] 一、用于骨组织工程的光固化复合材料

[0117] 上述用于骨组织工程的光固化复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石光聚合得到,其中:

[0118] 聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 $P_{17}L_4$ DMA;

[0119] 复合材料中羟基磷灰石含量为30%。

[0120] 光聚合采用的紫外线光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 。

[0121] 二、基于上述复合材料的骨组织工程支架

[0122] 上述骨组织工程支架通过如下方法制得:

[0123] (a) 建立复合材料三维模型的STL文件,并根据三维模型微结构处理STL文件,随后导出STL文件;

[0124] (b) 将STL文件导入至3D打印机中;

[0125] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石进行混匀,得到混合物,随后,采用3D打印机打印,然后通过光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照射使得打印后的混合物发生光聚合反应,固化成型,即得上述复合材料。

[0126] 实施例6

[0127] 一、用于骨组织工程的光固化复合材料

[0128] 上述用于骨组织工程的光固化复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石光聚合得到,其中:

[0129] 聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 $P_{17}L_4$ DMA;

[0130] 复合材料中羟基磷灰石含量为50%。

[0131] 光聚合采用的紫外线光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 。

[0132] 二、基于上述复合材料的骨组织工程支架

[0133] 上述骨组织工程支架通过如下方法制得:

[0134] (a) 建立复合材料三维模型的STL文件,并根据三维模型微结构处理STL文件,随后导出STL文件;

[0135] (b) 将STL文件导入至3D打印机中;

[0136] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和羟基磷灰石进行混匀,得到混合物,随后,采用3D打印机打印,然后通过光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照射使得打印后的混合物发生光聚合反应,固化成型,即得上述复合材料。

[0137] 实施例7

[0138] 一、用于骨组织工程的光固化复合材料

[0139] 上述用于骨组织工程的光固化复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石光聚合得到,其中:

[0140] 聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 $P_{17}L_4\text{DMA}$;

[0141] 复合材料中甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石含量为30%。

[0142] 光聚合采用的紫外线光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 。

[0143] 二、基于上述复合材料的骨组织工程支架

[0144] 上述骨组织工程支架通过如下方法制得:

[0145] (a) 建立复合材料三维模型的STL文件,并根据三维模型微结构处理STL文件,随后导出STL文件;

[0146] (b) 将STL文件导入至3D打印机中;

[0147] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石进行混匀,得到混合物,随后,采用3D打印机打印,然后通过光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照射使得打印后的混合物发生光聚合反应,固化成型,即得上述复合材料。

[0148] 实施例8

[0149] 一、用于骨组织工程的光固化复合材料

[0150] 上述用于骨组织工程的光固化复合材料由聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石光聚合得到,其中:

[0151] 聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯为 $P_{17}L_4\text{DMA}$;

[0152] 复合材料中甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石含量为50%。

[0153] 光聚合采用的紫外线光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 。

[0154] 二、基于上述复合材料的骨组织工程支架

[0155] 上述骨组织工程支架通过如下方法制得:

[0156] (a) 建立复合材料三维模型的STL文件,并根据三维模型微结构处理STL文件,随后导出STL文件;

[0157] (b) 将STL文件导入至3D打印机中;

[0158] (c) 将聚丙交酯-丙二醇二甲基丙烯酸酯和甲基丙烯酸羟乙基功能化羟基磷灰石进行混匀,得到混合物,随后,采用3D打印机打印,然后通过光强为 $5.5\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照射使得打印后的混合物发生光聚合反应,固化成型,即得上述复合材料。

[0159] 实验例1

[0160] 分别选取上述实施例1-8制备得到的复合材料并相应依次命名为 $P_7L_2\text{DMA}/30\%\text{HA}$ 、 $P_7L_2\text{DMA}/50\%\text{HA}$ 、 $P_7L_2\text{DMA}/30\%\text{HAMA}$ 、 $P_7L_2\text{DMA}/50\%\text{HAMA}$ 、 $P_{17}L_4\text{DMA}/30\%\text{HA}$ 、 $P_{17}L_4\text{DMA}/50\%\text{HA}$ 、

$P_{17}L_4$ DMA/30%HAMA和 $P_{17}L_4$ DMA/50%HAMA;

[0161] 一、采用红外光谱 (FTIR) 或红外热像仪分别计算各种材料 (P_7L_2 DMA/30%HA、 P_7L_2 DMA/50%HA、 P_7L_2 DMA/30%HAMA、 P_7L_2 DMA/50%HAMA、 $P_{17}L_4$ DMA/30%HA、 $P_{17}L_4$ DMA/50%HA、 $P_{17}L_4$ DMA/30%HAMA和 $P_{17}L_4$ DMA/50%HAMA) 制备过程中光聚合速率或温度随时间变化的关系以及 P_7L_2 DMA、 $P_{17}L_4$ DMA或HEMA材料光聚合速率或温度随时间变化的关系;

[0162] 计算结果如图1-图5所示,图1、图2为不同材料光聚合速率随时间变化的关系;图3、图4、图5为不同材料在光交联过程中温度随时间的变化关系;

[0163] 由图1-图5可知,所有的实施例中,材料均可以在120秒内完全固化,形成固体结构,显示了所有的实施例中复合材料均具有快速的光固化能力;此外,所有的实施例中,在光交联过程中,材料最高温度不超过37℃,不会对生物分子造成损伤,这对于材料包裹生物分子提供了极大的便利。

[0164] 二、对选取的各种材料 (P_7L_2 DMA/30%HA、 P_7L_2 DMA/50%HA、 P_7L_2 DMA/30%HAMA、 P_7L_2 DMA/50%HAMA、 $P_{17}L_4$ DMA/30%HA、 $P_{17}L_4$ DMA/50%HA、 $P_{17}L_4$ DMA/30%HAMA和 $P_{17}L_4$ DMA/50%HAMA) 以及 P_7L_2 DMA和 $P_{17}L_4$ DMA材料的力学性能进行试验;

[0165] 各种材料试验结果如图6-图13所示,图中,图6和图7为拉伸试验结果;图8和图9为压缩试验的应力应变曲线;图10为拉伸模量;图11为拉伸试验中的最大伸长;图12为压缩试验中压缩模量;图13压缩试验中单位体积所吸收的压缩能量;

[0166] 由图6-图13可知:与 $P_{17}L_4$ DMA相比, P_7L_2 DMA实施例显示出更高的拉伸模量和强度,这可能是由于 P_7L_2 DMA聚合物网络密度更大;在 P_mL_n DMA中加入nHA后,复合材料的拉伸模量和强度均有所增加,断裂时的拉伸率显著降低;如预期的,与加载nHA的复合材料相比,添加nHAMA的复合材料的拉伸模量和强度分别提高了80%和114%;与相同固体载荷下含nHA的复合材料相比,含nHAMA的复合材料在破坏后的最大伸长率得到了恢复;一个可能的原因是纳米粒子的加入限制了大单体链的自由,降低了聚合物网络的柔顺性,导致拉伸性降低;然而,在含有nHAMA的聚合物基体中,两相界面间的键合越强,在变形过程中基体屈服越大,塑性变形也越大;同样,在复合材料中加入50%的nHAMA,其压缩模量和强度分别增加了9.2倍和12.3倍; P_7L_2 DMA/50%nHAMA的最大值分别为363MPa和235MPa;这种优良的压缩力学性能使这些复合材料可与天然松质骨相媲美;在相同的加载条件下, P_mL_n DMA/nHAMA比 P_mL_n DMA/nHA具有更高的能量吸收能力和更好的韧性。

[0167] 三、针对 P_7L_2 DMA和 $P_{17}L_4$ DMA以及分别在添加HAMA为30%或50%的情况下,研究材料粘度与剪切速率的关系,以及不同材料在紫外线照射下流变学行为的监测情况;

[0168] 实验结果如图14所示,图中A为不同材料粘度与剪切速率的关系,B为不同材料的流变学行为;

[0169] 由图14可知:对于相同含量的nHAMA, $P_{17}L_4$ DMA的粘度普遍高于 P_7L_2 DMA,这可能是由于聚合物链较长所致;此外, P_7L_2 DMA和 $P_{17}L_4$ DMA均表现出牛顿流体行为,尽管施加了剪切速率,粘度仍然很低,没有变化;然而,当与nHAMA结合时,复合材料表现出剪切变薄的行为,含50%nHAMA的复合材料表现得更为明显;所有实施例中,贮存模量在UV照射下均逐渐增加,最终在120s后趋于稳定,说明存在完全的交联反应;这些结果与上述光交联实验结果一致,表明该复合材料具有良好的光交联性能。

[0170] 四、对 P_7L_2 DMA、 P_7L_2 DMA/30%HAMA、 P_7L_2 DMA/50%HAMA材料的生物相容性进行实验

研究;

[0171] 实验方法为:将不同实施例中样品制备为直径10毫米,厚度400 μ m的圆形样品;然后将样品浸泡在70%乙醇溶液中消毒1小时,用无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗2次,用空白组织培养板(TCP)作为空白对照;采用兔间充质干细胞(rMSC)对复合材料的生物相容性进行了分析;以 1×10^4 个细胞/孔的密度将细胞加入样品表面;细胞在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养,每2天更换一次培养基。在培养1、3和5天后,使用Thermo Fisher公司的活/死检测试剂盒(Live/Dead assay kit)评估细胞存活率。细胞存活率是通过在每个样本中随机选择6张图像,计算活细胞与总细胞的比率;细胞增殖测定采用Thermo Fisher公司的Picogreen[®] DNA定量试验,时间分别为第1、3、5天,除去培养基后,样品用PBS洗3次,根据说明处理样品,最后使用荧光Plate Reader(Bio Tek,US)分别在485和530nm激发波长和发射波长下测量样品。实验结果如图15所示,图中A为不同材料上显示细胞活力的典型活/死染色图像,无材料培养的细胞作为对照,绿色表示活细胞,红色表示死细胞;B为基于活/死染色的细胞活力定量分析;C为Picogreen[®] DNA定量检测材料上的细胞增殖。

[0172] 由图15可知:培养1、3、5天后,活/死染色显示,大多数细胞存活,均匀分布于材料表面;此外,在培养期间,所有实施例的细胞存活率几乎相同(超过90%),表明它们适合支持细胞存活;使用Picogreen[®] DNA定量分析方法,通过检测DNA浓度来评估细胞增殖,DNA浓度与细胞数量成正比;随着时间的推移,所有含或不含nHAMA的材料的细胞数量都在增加,这表明所有实施例都支持细胞增殖;此外,含30%或50%nHAMA的复合材料的DNA浓度明显高于无nHAMA组。

[0173] 五、体外评价P₇L₂DMA、P₇L₂DMA/30%HAMA、P₇L₂DMA/50%HAMA材料对骨髓间充质干细胞成骨分化后ALP活性的影响;

[0174] 实验方法为:以 4×10^4 细胞/孔的密度接种rMSCs,并使用成骨培养基培养。在第0、3、7和14天,采用Thermo Fisher公司的ALP活性测定试剂盒测定ALP活性,以总蛋白含量为标准,按照制造商的说明进行测定;

[0175] 实验结果如图16所示,图中A为对照组和不同材料组ALP染色的代表性显微图像;B为通过将每个样品的总蛋白浓度归一化,测定不同样品上已播种骨髓间充质干细胞的ALP活性;

[0176] 由图16可知:紫色的染色区域出现在所有组的第三天;随着时间的推移,

[0177] 包含nHAMA(30%或50%)的实施例染色区域更大,不含nHAMA的实施例染色区域明显较少;ALP活性的检测结果进一步证明了上述结果,包含nHAMA实施例能更好的促进细胞ALP的分泌,促进干细胞成骨分化。六、体外评价P₇L₂DMA、P₇L₂DMA/30%HAMA、P₇L₂DMA/50%HAMA材料对骨髓间充质干细胞成骨分化过程中细胞外基质钙化的影响;

[0178] 具体方法为:以 4×10^4 细胞/孔的密度接种rMSCs,并使用成骨培养基培养。在第0、3、7和14天后,ARS染色用4%多聚甲醛固定细胞10min,后用PBS冲洗,并加入ARS溶液孵育15min,然后用去离子水冲洗样品直至颜色消失;用显微镜拍照后,用10%氯化十六烷基吡啶在室温下溶解矿化3小时;用Plate Reader在592nm处测定了ARS提取物的吸光度;

[0179] 结果如图17所示,图中A为对照组和不同材料组ARS染色的代表性显微图像;B为用测量提取液在592nm波长下的吸光度,测定不同样品上接种骨髓间充质干细胞的细胞外基

质钙化浓度；

[0180] 由图17可知：经过7天的培养，含30%或50% nHAMA的材料有明显的钙化结节，而不含nHAMA的材料很少；将培养时间延长至14天后，含nHAMA组的钙化结节数量仍较多；在培养7天和14天之后，含nHAMA的组细胞外基质钙化增加了大约2倍；与第7天和第14天30%的nHAMA相比，50%的nHAMA的加入使钙化增强。

[0181] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

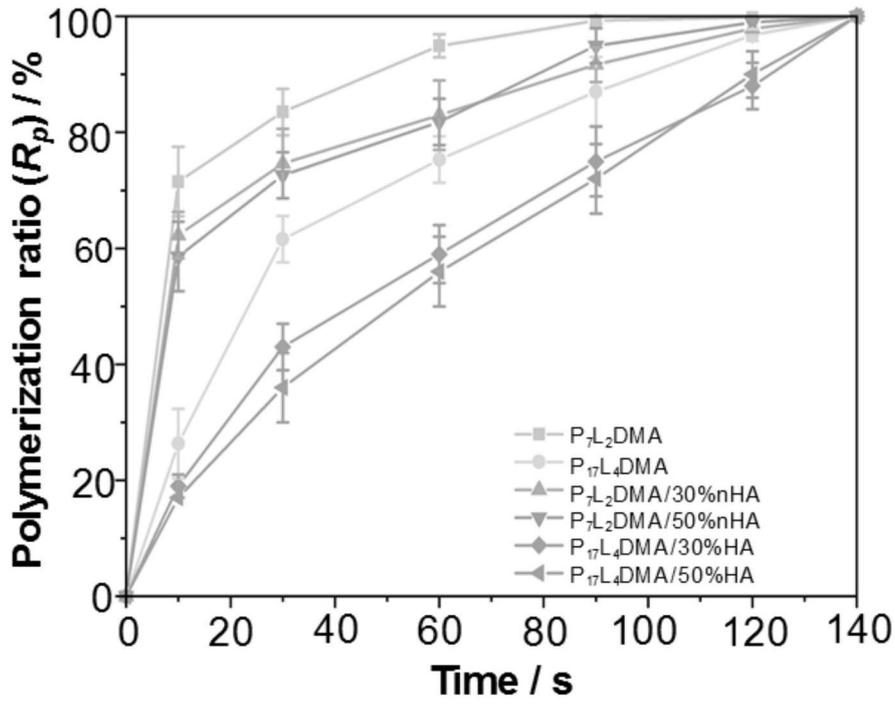


图1

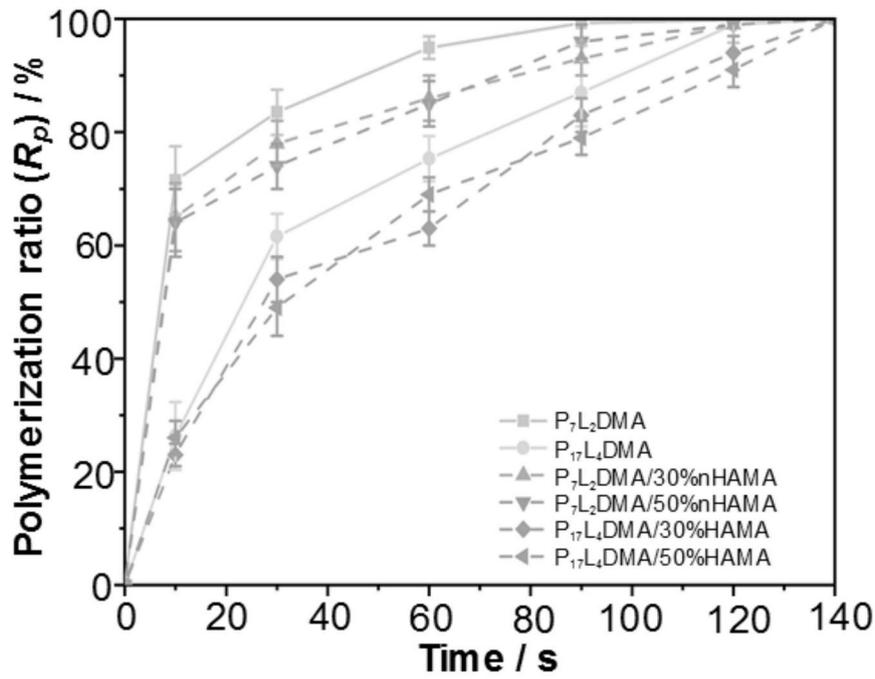


图2

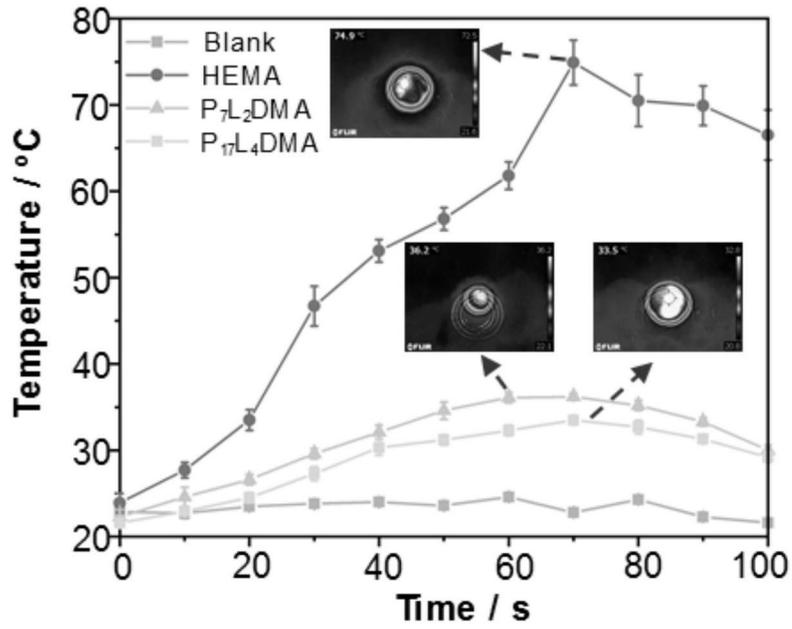


图3

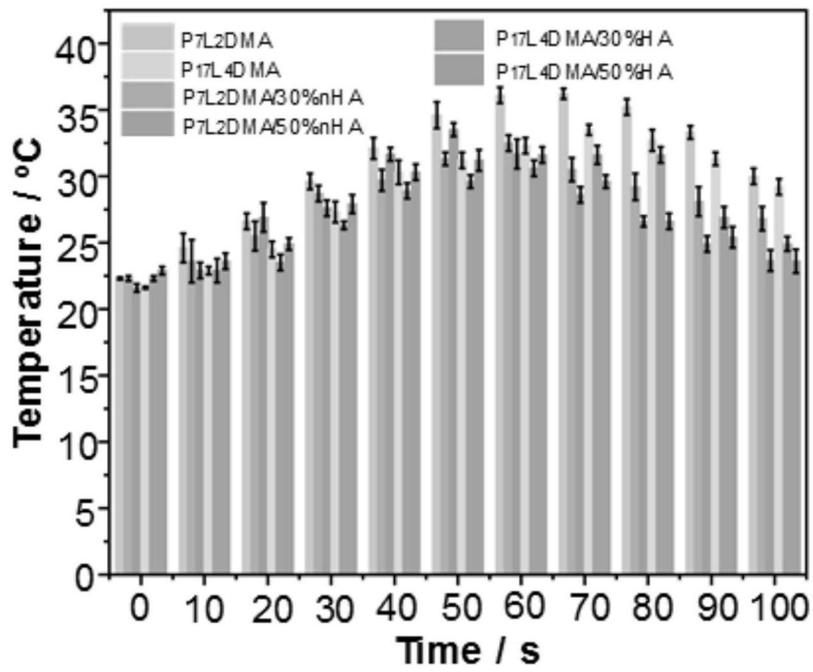


图4

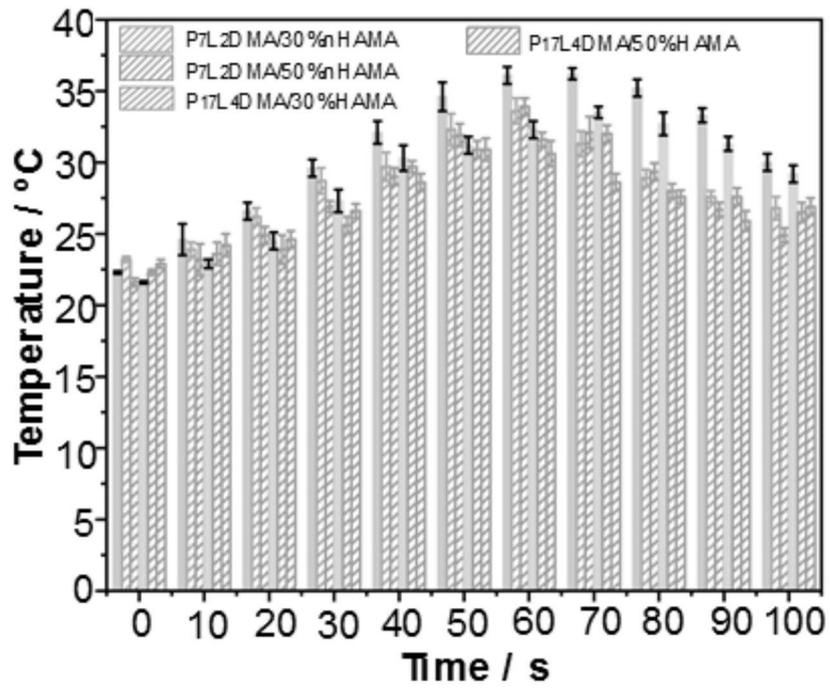


图5

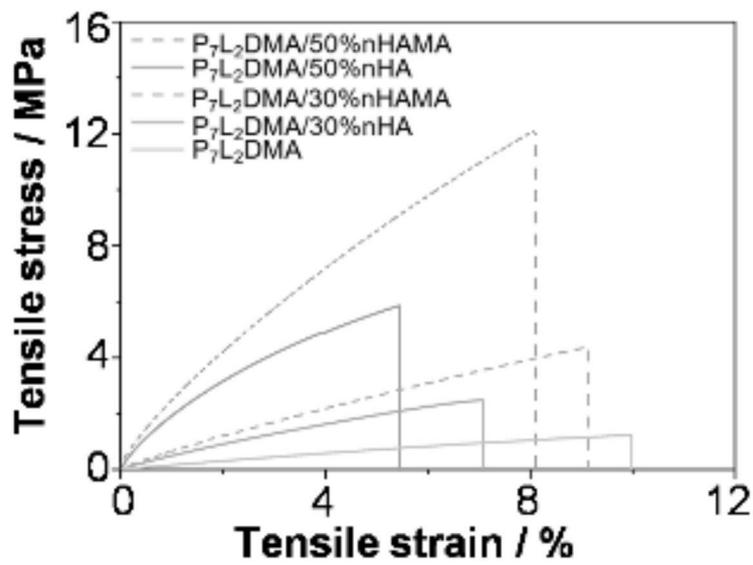


图6

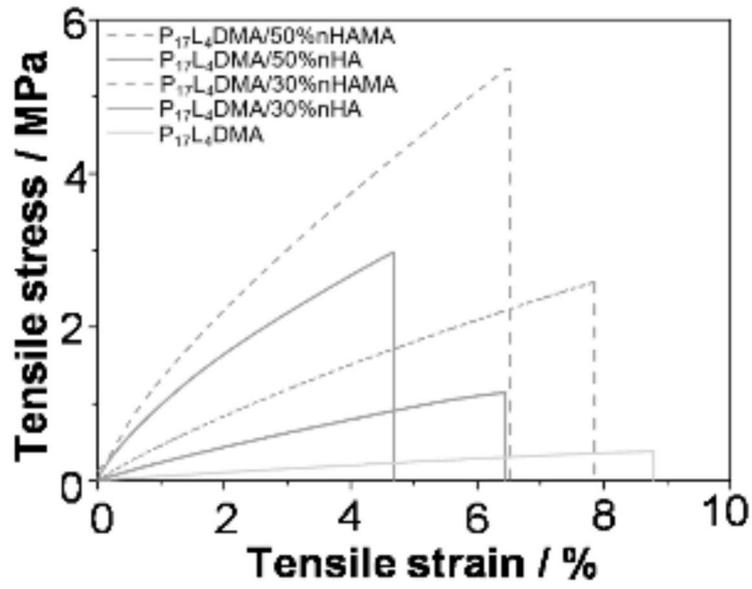


图7

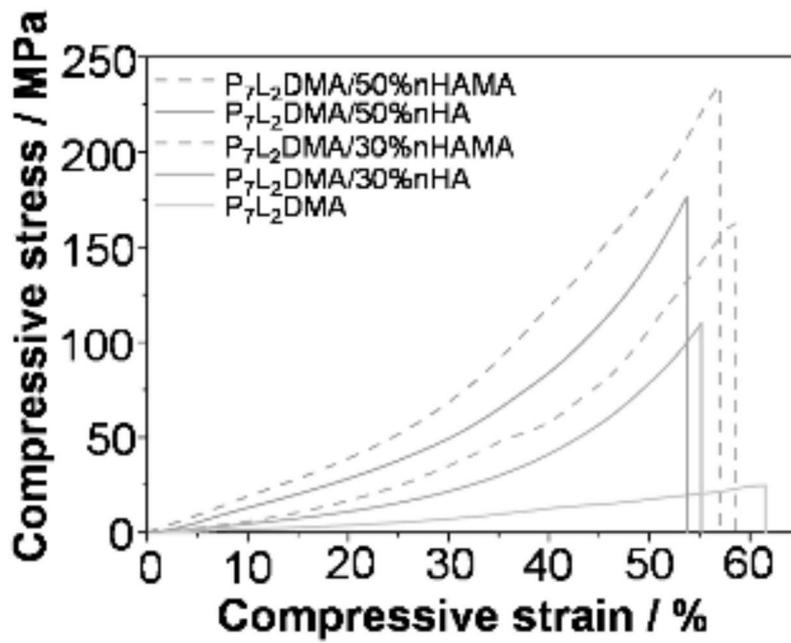


图8

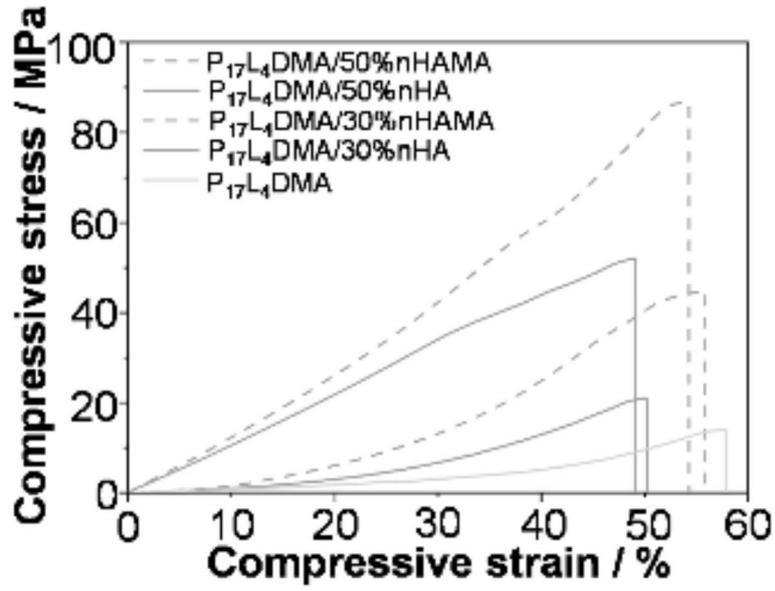


图9

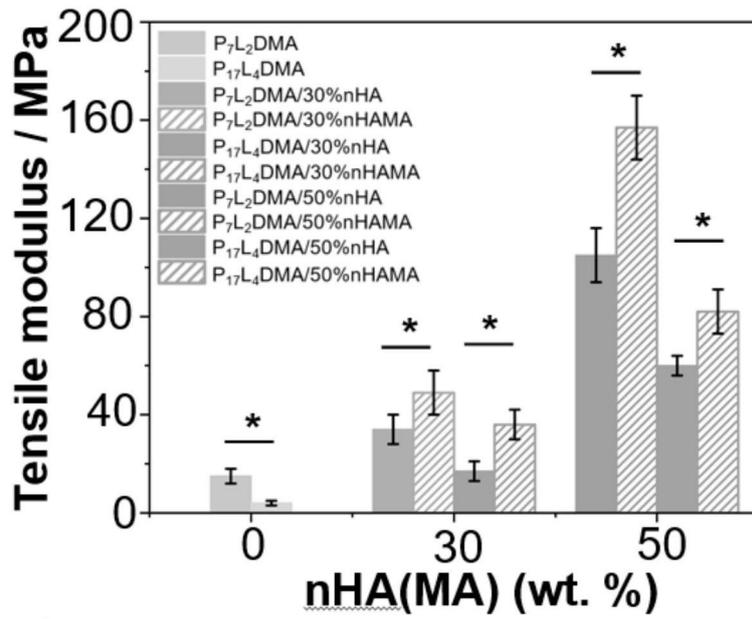


图10

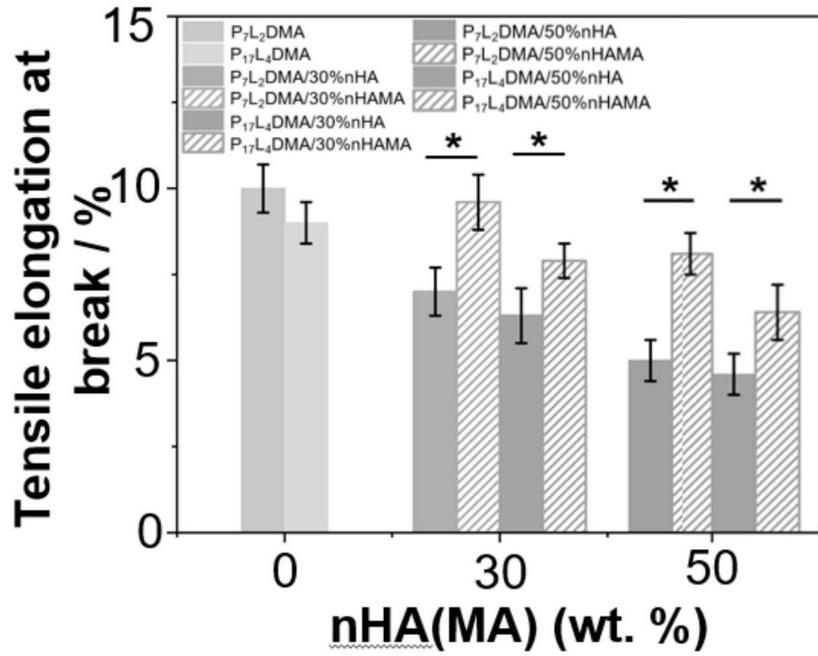


图11

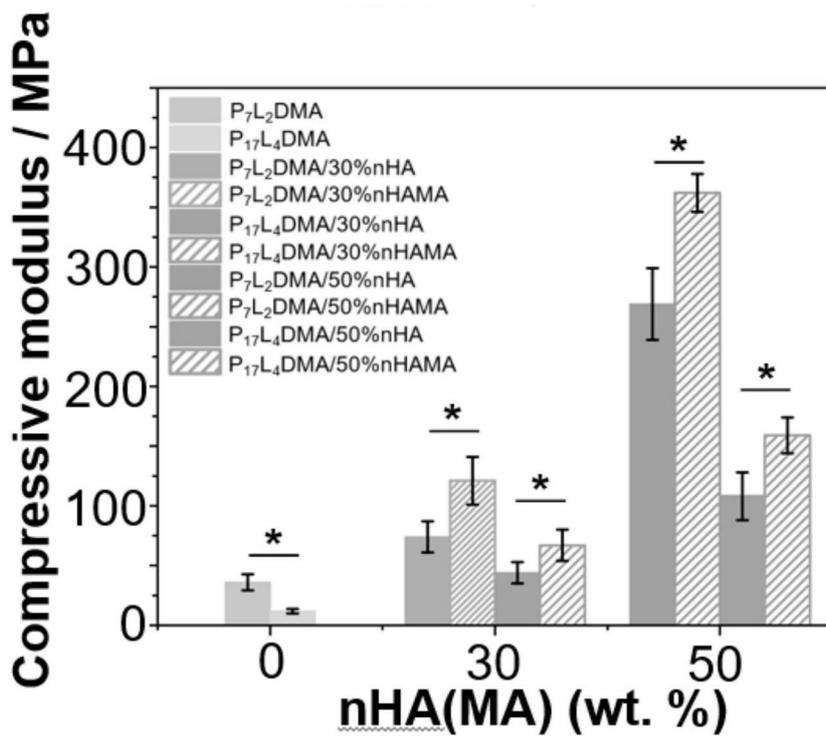


图12

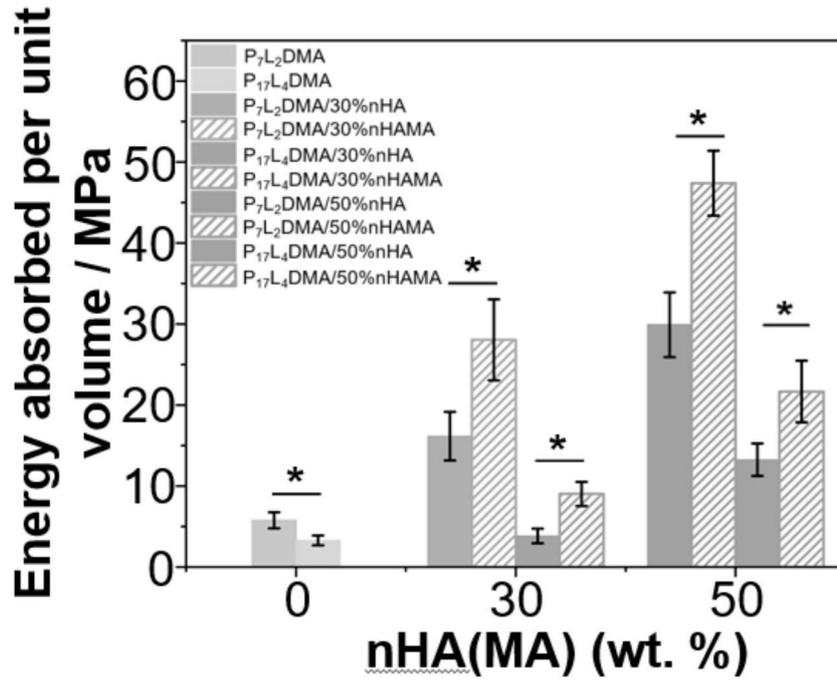


图13

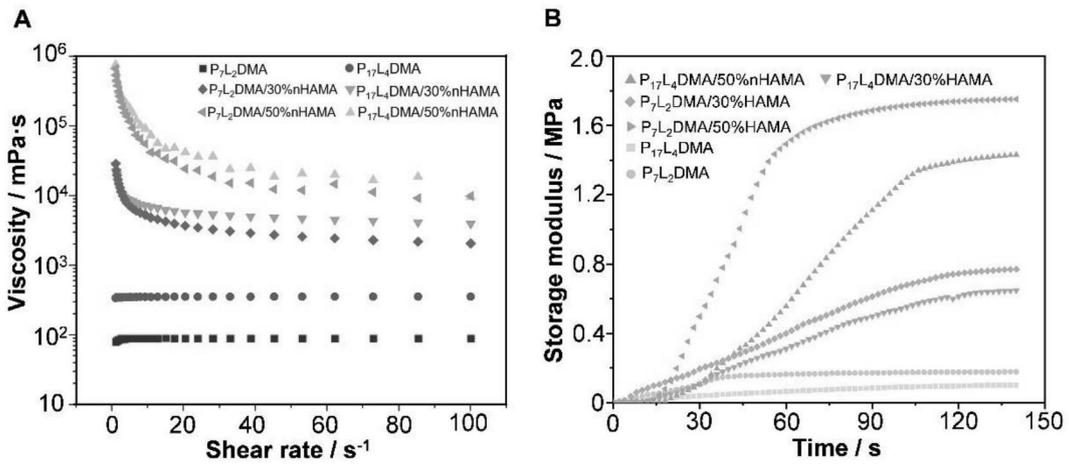


图14

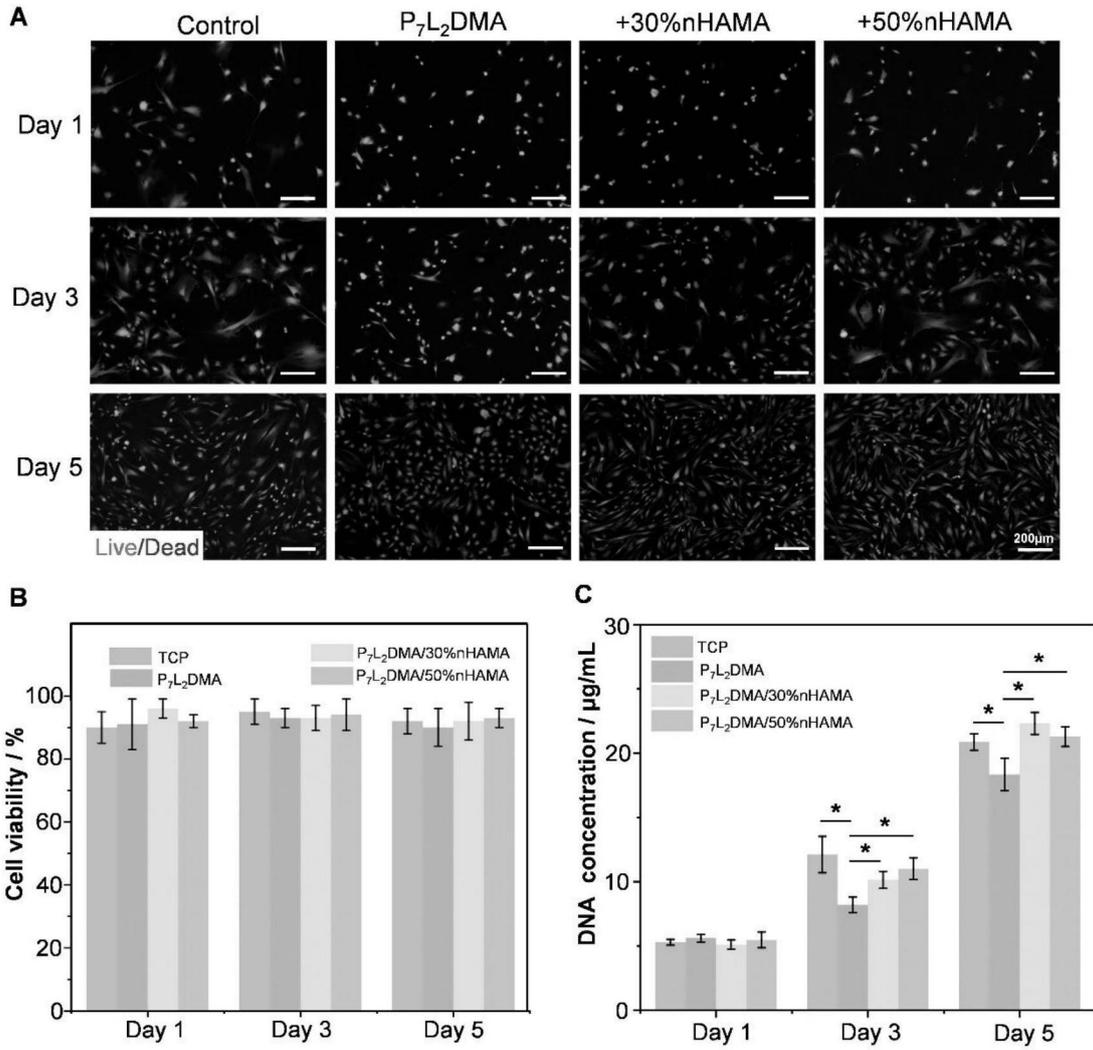


图15

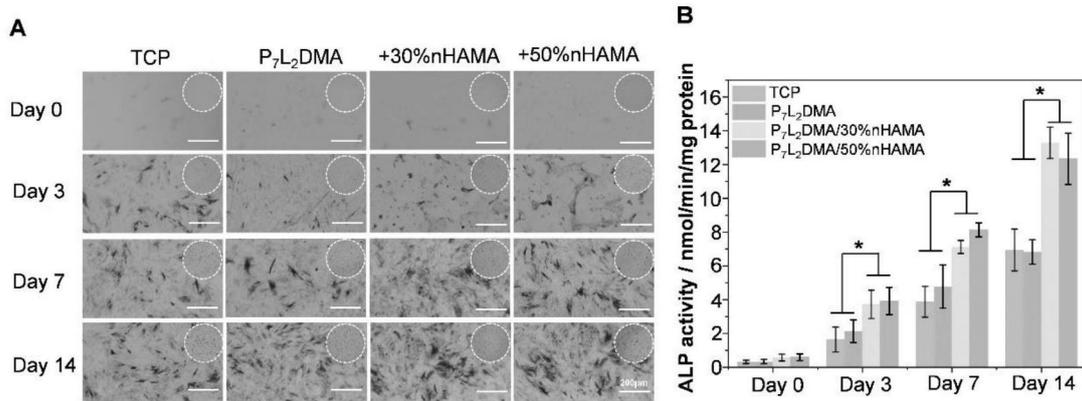


图16

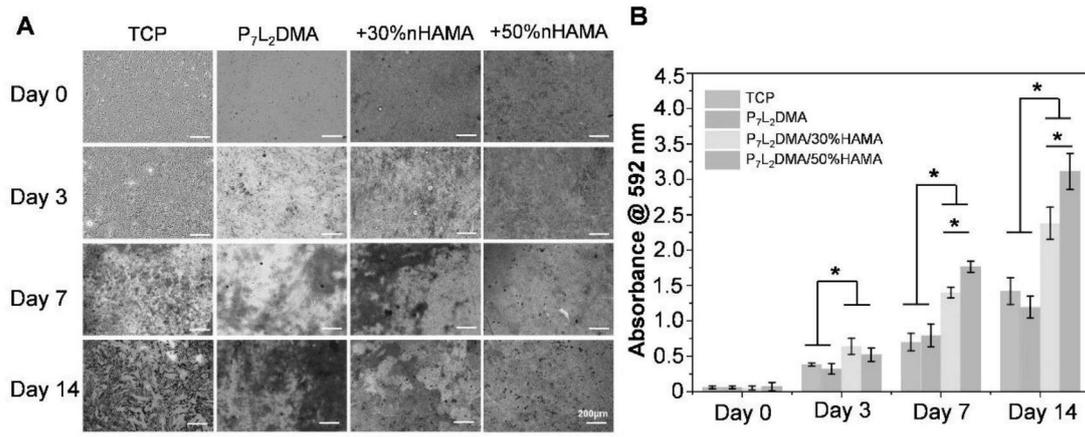


图17