



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109316632 B

(45) 授权公告日 2021.04.20

(21) 申请号 201811358380.0

(22) 申请日 2018.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109316632 A

(43) 申请公布日 2019.02.12

(73) 专利权人 北京大学口腔医学院
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
22号
专利权人 上海交通大学

(72) 发明人 卫彦 邓旭亮 冯传良 江圣杰
司梦婷

(74) 专利代理机构 北京怡丰知识产权代理有限公司 11293
代理人 于振强

(51) Int.Cl.

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

(56) 对比文件

CN 105363070 A, 2016.03.02

CN 103910893 A, 2014.07.09

CN 102558304 A, 2012.07.11

IN 201741001964 A, 2018.07.20

EP 1183016 B1, 2004.04.21

CN 103694131 A, 2014.04.02

冯传良. 仿生手性超分子水凝胶材料. 《2016年全国高分子材料科学与工程研讨会论文摘要集》. 2016, 第398页.

审查员 魏如男

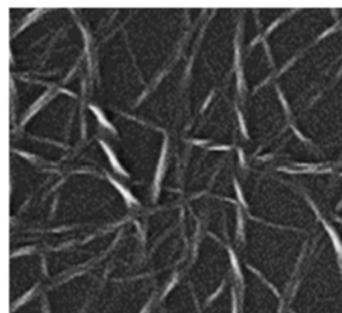
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法,其解决了现有基质材料难以精确调控干细胞成骨分化的技术问题,其主要步骤为:将左旋凝胶因子溶于二甲基亚砜溶液,获得左旋凝胶因子溶液,置于24孔板底部;将制得的左旋凝胶因子溶液混入骨髓间充质干细胞的培养基悬液,在24孔板中混匀,静置,形成水凝胶;将制得的水凝胶放入无成骨诱导因子的间充质干细胞培养基培养,间隔时间更换间充质干细胞培养基;所述左旋水凝胶中的骨髓间充质干细胞在左旋手性环境中生长7天后,进行骨髓间充质干细胞免疫荧光成骨分化检测。本发明可广泛应用于水凝胶纤维调控三维间充质干细胞成骨分化领域。



1. 一种使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法,其特征是,包含以下步骤:

(1) 将左旋凝胶因子溶于二甲基亚砜溶液,获得质量体积浓度为 $12\text{mg}/\mu\text{L}\sim 33\text{mg}/\mu\text{L}$ 的左旋凝胶因子溶液,置于24孔板底部;所述左旋凝胶因子为C2对称的苯丙氨酸衍生物类水凝胶因子;

(2) 将所述步骤(1)中制得的左旋凝胶因子溶液混入骨髓间充质干细胞的培养基悬液,在24孔板中混匀,在 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 $30\sim 60\text{min}$,形成左旋水凝胶;

(3) 将所述步骤(2)中制得的左旋水凝胶放入无成骨诱导因子的间充质干细胞培养基培养,间隔时间更换所述的间充质干细胞培养基;

(4) 所述左旋水凝胶中的骨髓间充质干细胞在左旋手性环境中生长7天后,进行骨髓间充质干细胞免疫荧光成骨分化检测。

2. 根据权利要求1所述的使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述的培养基悬液内含有骨髓间充质干细胞的个数为10万个。

3. 根据权利要求1所述的使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述间隔时间为2天。

使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及水凝胶生物植入材料领域,具体地说是一种使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法。

背景技术

[0002] 干细胞的生长局部微环境可以调节细胞命运和细胞行为,并指导发育过程。在胚胎发育期间,细胞外基质微环境参与调控胚胎成型和器官发生。多能干细胞的物理环境调节它们的自我更新和分化。机械和物理线索在成体组织中也很重要,其中成体干细胞需要与细胞外基质的物理相互作用以维持其效力。因此,如何通过细胞外基质调节干细胞分化和功能,成为了如今再生医学研究热点。从仿生和组织修复需求的角度设计与构建高生物活性支架材料,实现组织细胞功能的选择性调控,促进骨组织修复重建成为医学领域重要发展方向。因此,干细胞响应支架材料微环境特征引发功能分化是科学问题的核心,从而设计与获得具有“生物响应调控”功能的支架材料。

发明内容

[0003] 本发明就是为了解决现有基质材料难以精确调控干细胞成骨分化的技术问题,提供了一种使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法。

[0004] 为此,本发明提供了一种使用左旋水凝胶材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的方法,具体步骤如下:(1)将左旋凝胶因子溶于二甲基亚砜溶液,获得质量体积浓度为12mg/u1~33mg/u1的左旋凝胶因子溶液,置于24孔板底部;所述左旋凝胶因子为C2对称的苯丙氨酸衍生物类水凝胶因子;(2)将步骤(1)中制得的左旋凝胶因子溶液混入骨髓间充质干细胞的培养基悬液,在24孔板中混匀,在30~40℃条件下静置30~60min,形成左旋水凝胶;(3)将步骤(2)中制得的左旋水凝胶放入无成骨诱导因子的间充质干细胞培养基培养,间隔时间更换间充质干细胞培养基;(4)所述左旋水凝胶中的骨髓间充质干细胞在左旋手性环境中生长7天后,进行骨髓间充质干细胞免疫荧光成骨分化检测。

[0005] 优选地,步骤(2)中,培养基悬液内含有骨髓间充质干细胞的个数为10万个。

[0006] 优选地,步骤(3)中,间隔时间为2天。

[0007] 本发明的有益性:

[0008] 本发明设计一种可以三维培养间充质干细胞的水凝胶材料,并能通过改变材料分子手性这一基本特性,达到调控干细胞命运的目的,解决了现有基质材料难以精确调控干细胞成骨分化这一技术难点,从而满足临床精准医疗的需求。

[0009] 本发明中,调控骨髓间充质干细胞成骨分化的材料是左旋凝胶因子,C2对称的苯丙氨酸衍生物类水凝胶因子能在细胞悬液中自组装形成纤维网状链,为细胞的生长提供左旋纤维空间,利用细胞对三维空间手性的响应,左旋纤维空间结构能够促进环境内的骨髓间充质干细胞成骨分化,左旋水凝胶混合干细胞植入骨缺损区域有明显的骨修复效果。

附图说明

[0010] 图1为本发明中的C2对称的苯丙氨酸衍生物类水凝胶因子形成的左旋纤维空间的扫描电镜;

[0011] 图2为本发明实施例1左旋水凝胶培养7天后,免疫荧光观察成骨检测;

[0012] 图3为本发明实施例3和对比例的颅骨缺损实验microCT。

[0013] 附图标记:

[0014] 1.左旋组,2右旋组,3消旋组,4.空白组。

具体实施方式

[0015] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所描述的本发明。

[0016] 实施例1

[0017] 使用左旋凝胶因子溶于二甲基亚砷溶液,获得质量体积浓度为33mg/u1左旋凝胶因子溶液,并置于24孔板底部,500u1的含10万个骨髓间充质干细胞的培养基悬液快速注入上述的24孔板孔中,40℃下静置60分钟可形成左旋水凝胶。

[0018] 将左旋水凝胶加入无成骨诱导因子的间充质干细胞培养基(组分为间充质干细胞基础培养基+10%的胎牛血清+100IU/mL青霉素-链霉素,均购买于赛业生物科技有限公司,下同),培养期间,每间隔2天更换左旋水凝胶上的间充质干细胞培养基。

[0019] 将左旋水凝胶混合间充质干细胞培养7天后,进行骨髓间充质干细胞免疫荧光成骨分化检测,如图2所示。

[0020] 实施例2

[0021] 使用左旋凝胶因子溶于二甲基亚砷溶液中,获得质量体积浓度为23mg/u1左旋凝胶因子溶液,并置于24孔板底部,500u1的含10万个骨髓间充质干细胞的培养基悬液快速注入上述的24孔板孔中,35℃下静置45分钟可形成左旋水凝胶。

[0022] 将左旋水凝胶加入无成骨诱导因子的间充质干细胞培养基,培养期间,每间隔2天更换左旋水凝胶上的间充质干细胞培养基。

[0023] 将左旋水凝胶混合间充质干细胞培养7天后,进行骨髓间充质干细胞免疫荧光成骨分化检测。

[0024] 实施例3

[0025] 使用左旋凝胶因子溶于二甲基亚砷溶液,获得质量体积浓度为12mg/u1的左旋凝胶因子溶液,并置于24孔板底部,500u1的含10万个骨髓间充质干细胞的培养基悬液快速注入上述的24孔板孔中,30℃下静置30分钟可形成左旋水凝胶。

[0026] 将左旋水凝胶加入无成骨诱导因子的间充质干细胞培养基培养,其中无成骨诱导因子的间充质干细胞培养基,培养期间,每间隔2天更换左旋水凝胶上的间充质干细胞培养基。

[0027] 将左旋水凝胶混合间充质干细胞培养3天后,植入大鼠颅骨缺损模型手术区域,八周后取颅骨标本microCT观察新骨生成,如图3所示。

[0028] 对比例

[0029] 分别使用右旋凝胶因子、无旋凝胶因子溶于二甲基亚砜溶液,获得质量体积浓度均为12mg/u1的右旋凝胶因子溶液、无旋凝胶因子溶液,并置于24孔板底部,500u1的含10万个骨髓间充质干细胞的培养基悬液快速注射入上述的24孔板孔中,30℃下30静置分钟可形成右旋水凝胶或者无旋水凝胶。

[0030] 将右旋水凝胶和无旋水凝胶分别加入无成骨诱导因子的间充质干细胞培养基,培养期间,每间隔2天更换右旋水凝胶或者无旋水凝胶上的间充质干细胞培养基。

[0031] 实施例4成骨检测

[0032] 将左旋水凝胶、右旋水凝胶、无旋水凝胶混合间充质干细胞培养3天后,植入大鼠颅骨缺损模型手术区域,以及无水凝胶混合只有干细胞植入大鼠颅骨缺损模型手术区域,八周后取颅骨标本microCT观察左旋组、右旋组、消旋组及空白组新骨生成,如图3所示,可以证明,左旋纤维的水凝胶中的干细胞向成骨分化。

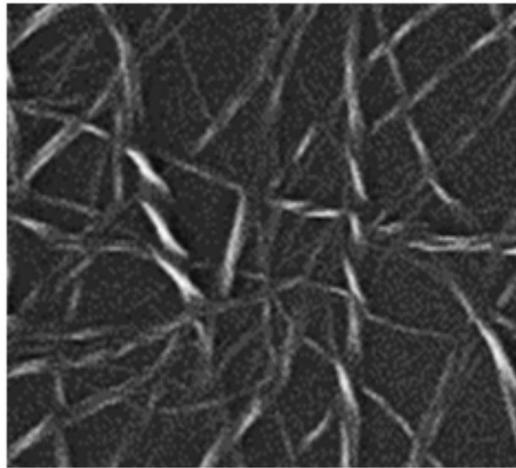


图1

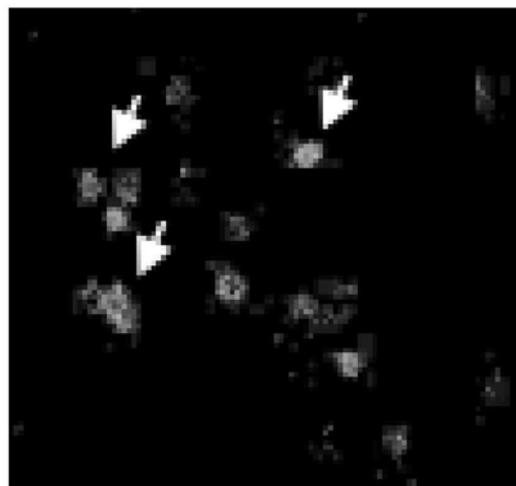


图2



图3