



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110787322 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 30

(21) 申请号 201911131307.4

CN 105597155 A, 2016.05.25

(22) 申请日 2019.11.19

EP 1551471 A1, 2005.07.13

EP 1277482 A2, 2003.01.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110787322 A

Wu-Ya Chen等.M-keratin nano-materials create a mineralized micro-circumstance to promote proliferation and differentiation of DPSCs.《Journal of Materials Science: Materials in Medicine》.2020,第31卷(第124期),第1-13页.

(43) 申请公布日 2020.02.14

(73) 专利权人 佛山科学技术学院

地址 528000 广东省佛山市禅城区江湾一路18号

沈彤.丝素蛋白调控磷酸钙生物矿化的研究进展.《丝绸》.2010,(第07期),

(72) 发明人 陈吾雅 黄达鸿 李霞

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务有限公司 44205

Ryo Nakata等.Preparation of keratin hydrogel/hydroxyapatite composite and its evaluation as a controlled drug release carrier.《Materials Science and Engineering C》.2014,第41卷第59-64页.

代理人 朱继超

Chunxia Gao等.Preparation and Characterization of Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals by Using Partially Hydrolyzed Keratin as Template Agent.《Nanomaterials》.2019,第9卷第1-10页.

(51) Int.Cl.

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

审查员 余婷

(56) 对比文件

CN 106754665 A, 2017.05.31

CN 107982551 A, 2018.05.04

CN 1127140 A, 1996.07.24

CN 107982551 A, 2018.05.04

CN 105251050 A, 2016.01.20

权利要求书1页 说明书8页 附图7页

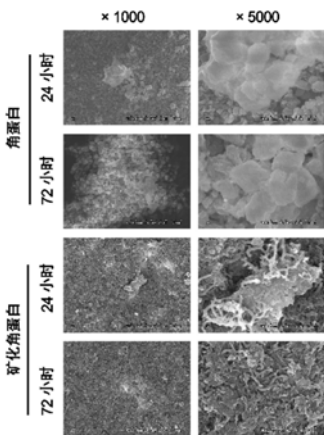
(54) 发明名称

一种矿化角蛋白仿生材料及其制备方法

长,从而为牙髓组织再生与修复的可行性提供重要的参考价值。

(57) 摘要

本发明公开了一种矿化角蛋白仿生材料的制备方法,其包括如下操作步骤:1) 纳米级角蛋白粉剂以0.1~500mg/ml的浓度加入无菌模拟体液环境中,静置矿化处理,后经收集、真空冷冻干燥、研磨成粉,得矿化角蛋白颗粒;2) 矿化角蛋白颗粒以0.1~500mg/ml的浓度经重悬后注入模板中,后置于烘箱中干燥,得膜状的矿化角蛋白仿生材料。本发明通过仿生合成法,诱导角蛋白自行矿化,在无需引入其它蛋白因子或者其它生物大分子的前提下构建出矿化角蛋白仿生材料。经实践表明该仿生材料可为DPSCs的生长和增殖提供一个理想的纳米矿化微环境以促进DPSCs的生



1. 一种矿化角蛋白仿生材料的制备方法,其特征在于包括如下操作步骤:

1) 纳米级角蛋白粉剂以0.1~500mg/mL的浓度加入无菌模拟体液环境中,静置矿化处理,后经室温下离心处理,弃上清并收集沉淀,进行重悬清洗、真空冷冻干燥、研磨成粉,得矿化角蛋白颗粒;

2) 取步骤1) 所得矿化角蛋白颗粒以0.1~500mg/mL的浓度经重悬后注入模板中,待沉淀完全后置于20~85℃烘箱中干燥1~5h,得膜状的矿化角蛋白仿生材料;

步骤1) 中所述静置的时间为1~6周;步骤1) 中所述矿化角蛋白颗粒的粒径为20~80nm。

2. 根据权利要求1所述的一种矿化角蛋白仿生材料的制备方法,其特征在于:步骤1) 中所述离心处理为1000~15000rpm条件下离心1~30min。

3. 一种由权利要求1~2任一项的制备方法制备而成的矿化角蛋白仿生材料。

4. 一种如权利要求3所述的矿化角蛋白仿生材料在制备促进DPSCs生长和增殖产品中的应用。

一种矿化角蛋白仿生材料及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医用材料,特别涉及一种矿化角蛋白仿生材料。

背景技术

[0002] 牙髓炎症、牙髓坏死及各类牙髓疾病,是常见而高发的口腔疾病,疾病发生过程伴随的牙髓组织坏死和严重的炎症反应,将导致剧烈的疼痛,对患者的正常饮食和生活造成不利的影响。当前,这类疾病的治疗方法以根管充填为主,因病变已造成牙齿根管内部的组织和细胞的损伤,故治疗思路是在杀死或清除牙髓腔中正常和病变组织之后,采用材料或药物填充根管,以实现止痛、消炎和防止病变扩散的效果。充填根管的材料根据其物理性能可分为固体类、液体类和糊剂类三种,而其中,固体类充填剂又常以马来乳胶、金属银或聚丙烯为主体,这些材料在治疗过程中各有优缺点。但是,目前根管治疗方式的根本作用是采用无活性材料消灭根管和髓腔,消灭死腔,杜绝再次感染来源,并未修复牙髓,而牙髓的缺失将导致牙体硬组织得不到营养来源,从而脆性增加,牙体折裂的发生率较活髓牙明显提高。因此,未来日益完善的根管治疗方案应该是能够促进牙髓再生、构建健康牙齿的策略,也因此,寻找一种具有促进牙髓组织再生的材料是牙髓再生研究的热点与难点之一。

[0003] 从组织结构层面来看,牙根管中的牙髓组织结构相对其它器官中的组织结构而言比较简单:牙根管呈中空,内含牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs);DPSCs向外周分化,形成牙本质细胞和造釉细胞;末梢神经和血管通过牙根底部的根尖孔进入牙髓内部,对牙齿起滋养和调控的作用。当前研究表明,DPSCs所处的环境对其生长、增殖和分化都将产生影响。特别的,钙化外环境可能与牙髓中各种细胞,尤其是DPSCs,相互影响、相互调控。一方面,DPSCs的成骨化、成牙本质细胞化或成牙釉质细胞化将增加细胞外环境中的钙含量,而这种钙环境的最终形成是牙髓、牙釉质和牙本质修复的目的和保障;另一方面,钙离子环境提高了材料界面的生物活性和生物相容性,促进了DPSCs的增殖和分化,可以使后者数量明显增加:例如,Tu等研究发现,相比于空白组而言,用羟基磷灰石处理的DPSCs细胞活力更高;Chen等的研究表明,矿化的材料表面将提高DPSCs的骨整合能力,使其更好的与材料界面相融,生长出更紧密的细胞结构;Türkkan等发现,培养基中CaP浓度的增加将有助于DPSCs对材料的粘附和生长。

[0004] 因此,能否为DPSCs创造一个理想的矿化微环境以促进其增殖和向牙本质细胞分化,是牙髓组织再生的一个关键。仿生学研究为寻找和构建这样的较理想的材料提供了思路,在模拟生物内环境的条件下构建材料,是当前生物材料领域研究的方法之一。值得一提的是,仿生法合成各类生物材料的最终目的绝不是单一地复制生物矿物,而是在认识自然界中生物矿化原理的基础上,指导人工矿化材料的合成,同时,通过改善材料的合成方式,最终创造出具有优越性能的各类无机材料。但是,矿化不能凭空产生,需要生物大分子作为支架和媒介,而现时并未获得理想的矿化微环境能有效、稳定地促进DPSCs增殖和向牙本质细胞分化。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对上述现有技术的不足,提供一种矿化角蛋白仿生材料的制备方法,其获得的矿化角蛋白仿生材料将为DPSCs的生长提供一个理想的纳米矿化微环境,以及调控DPSCs的生长与增殖,从而为牙髓组织再生获得新的填充材料。

[0006] 本发明引入了仿生合成法(biomimetic synthesis),简而言之,就是模拟自然生物矿化的过程,在模拟体液中使生物大分子表面发生矿化累积、合成磷酸三钙、羟基磷灰石或类似结构。近年来,使用蛋白质、核酸等生物大分子作为模板的研究报道逐渐增加。例如,Xu等便采用这一方法构建矿化生物玻璃支架,促进骨细胞在其上的生长;Li等则利用左旋多巴胺上的酚羟基来诱导羟基磷灰石的生成,研制出与生物体内成分相仿的PDA复合粉体;Zhang等同样利用多巴胺作为模板,合成针型和微球型羟基磷灰石。

[0007] 但矿化是不能凭空产生的,需要生物大分子作为支架和媒介,而在生物大分子中,角蛋白(keratin)是一种理想的结构性材料。该蛋白分子单体成管状,两分子蛋白单体互相盘绕形成结构单元,并且结构单元平行排列,互相之间以氢键形成交联,在空间上呈现有序的结构。角蛋白因其坚韧的特性成为多种生物器官的主要成分,例如指甲、鸟喙或毛发。因此,角蛋白亦被视为构建仿生支架理想的材料之一。

[0008] 由于半胱氨酸中游离巯基的存在和水溶性较低这两大特点,角蛋白具有力学结构可塑性和可改善性。因此,由角蛋白所构建的生物学结构常常具有增强的机械强度。此外,角蛋白还具有细胞结合基序,如亮氨酸-天冬氨酸-缬氨酸(LDV),它可能潜在地促进细胞-基质相互作用。当前,对于角蛋白的研究集中在进化生物学领域,也有材料科学领域的研究人员开始尝试将角蛋白作为支架使用。Zhao等利用角蛋白提高己内酯支架的机械性能,并发现含有交联角蛋白的支架适于支持细胞附着和增殖,其上的细胞表现出比对照组更好的细胞活力;又如,Xu等研究表明,角蛋白含有亮氨酸-天冬氨酸-缬氨酸(LDV)的细胞粘附基序以及一些能够增强神经组织再生的调节分子,对于皮肤组织工程的支架修饰而言是合适的选择。这些研究工作提示我们,角蛋白对于DPSCs可能同样具有良好的生物相容性,同时,以其为主体的支架材料亦可能是理想的控释型药物载体。本发明基于上述科学假设进行深入研究,即外源性的矿化微环境是否能对DPSCs的生长和增殖产生积极影响。

[0009] 本发明所采取的技术方案是:一种矿化角蛋白仿生材料的制备方法,其包括如下操作步骤:

[0010] 1) 纳米级角蛋白粉剂以0.1~500mg/ml的浓度加入无菌模拟体液环境中,静置矿化处理,后经室温下离心处理,弃上清并收集沉淀,进行重悬清洗、真空冷冻干燥、研磨成粉,得矿化角蛋白颗粒;

[0011] 2) 取步骤1)所得矿化角蛋白颗粒以0.1~500mg/ml的浓度经重悬后注入模板中,待沉淀完全后置于20~85℃烘箱中干燥1~5h,得膜状的矿化角蛋白仿生材料。

[0012] 本发明操作过程中并未引入除了作为原材料的角蛋白之外的其它蛋白因子或者其它生物大分子,而仅是利用模拟体液为角蛋白制造出一个仿生环境,模拟自然生物矿化的过程让角蛋白实现自行矿化,使角蛋白表面发生矿化积累从而形成有利于DPSCs生长和增殖的仿生结构。

[0013] 其中,本发明中限定了步骤1)中角蛋白在模拟体液中的浓度为0.1~500mg/ml。这是因为当角蛋白浓度过低,即低于0.1mg/ml时,其矿化后的亲水性和在水中的分散性升高,

会造成其矿化物不容易离心收集的操作缺陷,而当角蛋白浓度过高,即高于500mg/ml时,其容易在模拟体液中发生团聚而导致无法充分进行矿化。另外本发明限定了步骤2)中矿化角蛋白在模拟体液中的浓度亦为0.1~500mg/ml。这是因为当矿化角蛋白浓度过高或过低时,均不利于稳定地在模板中形成膜状的仿生材料。所以,本发明两个步骤中对角蛋白在模拟体液中的浓度限定是最终获得膜状仿生材料的重要工艺参数之一。经本发明进一步的实验探究,优选控制步骤1)和步骤2)中角蛋白的浓度均为50~200mg/ml。

[0014] 值得一提的是,本发明步骤2)中所述的模板,是为矿化角蛋白膜合成提供支撑的表面和相应的直接限定的,因此在本发明的实际操作中可选用细胞培养板作为模板,亦可选用同类PVC材料所制造的具有平整结构的模板容器。

[0015] 作为上述方案的进一步改进,步骤1)中所述静置的时间为1~6周。具体地,本发明步骤1)中所述的静置矿化处理是使角蛋白表面形貌、结构发生变化的关键操作。经大量实验研究发现,当静置矿化处理的时间到达1周时,角蛋白表面形貌、结构发生的变化亦开始随静置矿化处理时间的增加而突显;当静置矿化处理时间为6周时,角蛋白表面形貌、结构的变化最为显著,其后续所形成的角蛋白膜结构更为平整、材料间相互联结紧密,呈现出了与牙本质内部的细微结构相似的仿生结构;当静置矿化处理时间为6周以后时,角蛋白表面形貌、结构的变化逐渐趋于停止。

[0016] 作为上述方案的进一步改进,步骤1)中所述离心处理为1000~15000rpm条件下离心1~30min。

[0017] 作为上述方案的进一步改进,步骤1)中所述矿化角蛋白颗粒的粒径为20~80nm。具体地,本发明步骤1)中所述矿化角蛋白颗粒的粒径是随着静置矿化处理时间的增加呈现逐渐下降趋势的,而当矿化角蛋白的粒径为20~80nm时,其有利于后续形成的与牙本质内部的细微结构相似的仿生膜结构。

[0018] 本发明的有益效果是:本发明通过仿生合成法,诱导角蛋白自行矿化,在无需引入其它蛋白因子或者其它生物大分子的前提下构建出矿化角蛋白仿生材料。经实践表明该仿生材料可为DPSCs的生长和增殖提供一个理想的纳米矿化微环境以促进DPSCs的生长,从而为牙髓组织再生与修复的可行性提供重要的参考价值。

附图说明

[0019] 图1是实施例1和对比例中角蛋白颗粒的质量检测;

[0020] 图2是对比例与实施例1中矿化1周和矿化6周的角蛋白颗粒的红外图谱结果;

[0021] 图3是对比例与实施例1中矿化6周的角蛋白颗粒的XPS结果;

[0022] 图4是对比例与实施例1中矿化6周的角蛋白颗粒的TEM和SAED结果(左边为透射电子显微镜照片;右边为选区电子衍射图样);

[0023] 图5是对比例与实施例1中矿化1周和矿化6周的角蛋白颗粒的SEM结果;

[0024] 图6是实施例1和对比例中角蛋白颗粒粒径的分析结果;

[0025] 图7是对比例与实施例1中矿化1周和矿化6周的角蛋白膜材的SEM(A)和AFM(B),其中上层为空白对照组未矿化角蛋白;中层为矿化1周的矿化角蛋白;下层为矿化6周的矿化角蛋白;

[0026] 图8是对比例与实施例1中矿化1周和矿化6周的角蛋白膜材的表面粗糙度分析结

果；

[0027] 图9是对比例与实施例1中矿化1周和矿化6周的角蛋白膜材的表面亲水性分析结果；

[0028] 图10是实施例6中不同材料表面DPSCs培养4h、24h、48h和72 h后的MTT检测结果，其中“对照”是指细胞对照组，“角蛋白”是指对比例空白对照组，“矿化角蛋白”是指实施例1矿化6周的受试样品；

[0029] 图11是实施例6中不同材料表面DPSCs培养72 h后的流式细胞周期检测，其中“对照组”是指细胞对照组，“角蛋白”是指对比例空白对照组，“矿化角蛋白”是指实施例1矿化6周的受试样品；

[0030] 图12是实施例6中不同材料表面DPSCs培养24和72 h后的SEM检测结果，其中“角蛋白”是指对比例空白对照组，“矿化角蛋白”是指实施例1矿化6周的受试样品。

具体实施方式

[0031] 下面结合实施例对本发明进行具体描述，以便于所属技术领域的人员对本发明的理解。有必要在此特别指出的是，实施例只是用于对本发明做进一步说明，不能理解为本发明保护范围的限制，所属领域技术熟练人员，根据上述发明内容对本发明作出的非本质性的改进和调整，应仍属于本发明的保护范围。同时下述所提及的原料未详细说明的，均为市售产品；未详细提及的工艺步骤或制备方法均为本领域技术人员所知晓的工艺步骤或制备方法。

[0032] 本发明实施例中所述的纳米级蛋白粉剂为购自广州华奇盛生物技术有限公司的小鼠源性角蛋白粉剂；所述的无菌模拟体液为购自广州华奇盛生物技术有限公司的无菌模拟体液SBF；所述的低糖 α MEM培养基为购自GIBCOBRL公司的市售产品；所述的新生牛血清为购自杭州四季青生物工程材料有限公司的市售产品。

[0033] 实施例1：构建矿化角蛋白仿生材料

[0034] 一种矿化角蛋白仿生材料的制备方法，其包括如下操作步骤：

[0035] 1) 取纳米级角蛋白粉剂以100mg/ml的浓度加入无菌模拟体液环境中，静置矿化处理6周，每12h轻微搅拌分散，其中每隔1周取样以作为一个试样，取样时将矿化角蛋白置于1.5ml EP管中，室温下10000rpm离心处理15min，弃上清，收集沉淀，用去离子无菌水进行重悬并清洗3次，真空冷冻干燥、研磨成粉末，分别得到矿化1~6周的矿化角蛋白颗粒并用于后续的理化表征实验；

[0036] 2) 取步骤1) 所得矿化1~6周的矿化角蛋白颗粒分别以100mg/ml的浓度经重悬后注入24孔细胞培养板中，待其沉淀于24孔细胞培养板底部后，置于50℃烘箱中干燥3h，分别得矿化1~6周的膜状的矿化角蛋白仿生材料。

[0037] 实施例2：构建矿化角蛋白仿生材料

[0038] 一种矿化角蛋白仿生材料的制备方法，其包括如下操作步骤：

[0039] 1) 取纳米级角蛋白粉剂以0.5mg/ml的浓度加入无菌模拟体液环境中，静置矿化处理6周，每12h轻微搅拌分散，待矿化结束时取样，将矿化角蛋白置于1.5ml EP管中，室温下15000rpm离心处理1min，弃上清，收集沉淀，用去离子无菌水进行重悬并清洗3次，真空冷冻干燥、研磨成粉末，得到矿化角蛋白颗粒；

[0040] 2)取步骤1)所得矿化角蛋白颗粒分别以500mg/ml的浓度经重悬后注入24孔细胞培养板中,待其沉淀于24孔细胞培养板底部后,置于20℃烘箱中干燥5h,得实施例2矿化角蛋白仿生材料。

[0041] 实施例3:构建矿化角蛋白仿生材料

[0042] 一种矿化角蛋白仿生材料的制备方法,其包括如下操作步骤:

[0043] 1)取纳米级角蛋白粉剂以500mg/ml的浓度加入无菌模拟体液环境中,静置矿化处理6周,每12h轻微搅拌分散,待矿化结束时取样,将矿化角蛋白置于1.5ml EP管中,室温下1000rpm离心处理30min,弃上清,收集沉淀,用去离子无菌水进行重悬并清洗3次,真空冷冻干燥、研磨成粉末,得到矿化角蛋白颗粒;

[0044] 2)取步骤1)所得矿化角蛋白颗粒分别以0.1mg/ml的浓度经重悬后注入24孔细胞培养板中,待其沉淀于24孔细胞培养板底部后,置于85℃烘箱中干燥1h,得实施例3矿化角蛋白仿生材料。

[0045] 对比例:构建空白对照

[0046] 一种角蛋白膜材的制备方法,其包括如下操作步骤:

[0047] 1)取纳米级角蛋白粉剂以100mg/ml的浓度加入无菌模拟体液环境中,置于1.5ml EP管中,室温下10000rpm离心处理15min,弃上清,收集沉淀,用去离子无菌水进行重悬并清洗3次,真空冷冻干燥、研磨成粉末,得到空白对照组角蛋白颗粒;

[0048] 2)取步骤1)所得角蛋白颗粒以100mg/ml的浓度经重悬后注入24孔细胞培养板中,待其沉淀于24孔细胞培养板底部后,置于50℃烘箱中干燥3h,得空白对照组角蛋白膜材。

[0049] 实施例5:矿化角蛋白仿生材料的理化表征

[0050] 5.1矿化角蛋白颗粒质量检测

[0051] 取对比例的空白对照组角蛋白颗粒和实施例1的矿化1~6周的矿化角蛋白颗粒分别进行质量检测,其检测结果如图1所示,矿化1~6周后,受试样品质量有所增加。具体地,矿化6周后受试样品的质量从空白对照组的0.1g增加至 0.143 ± 0.006 g,质量增长率为14%,具有显著性差异,即表示经矿化处理后的角蛋白表面生成了新的物质。

[0052] 5.2矿化角蛋白颗粒红外图谱分析

[0053] 分别取对比例的空白对照组角蛋白颗粒、实施例1中矿化1周和矿化6周的矿化角蛋白颗粒各2g,通过KBr压片法进行傅里叶红外光谱分析,控制试样与KBr混合物粒度小于 $2\mu\text{m}$,以免散射光影响,其红外图谱检测结果如图2所示。结果表明,矿化作用使角蛋白的红外吸收波峰发生了变化,特别是在矿化6周后,变化更为显著。例如,根据“矿化角蛋白6w”(即矿化6周的矿化角蛋白颗粒)的检测数据,在 1045.2cm^{-1} 和 1174.0cm^{-1} 出现了明显的波峰,其分别是羟基磷灰石中 PO_4^{3-} 的 ν_1 和 ν_3 震动特征峰,可知角蛋白经矿化后,结构发生了变化,新的化学键产生,从而引起了样品红外波谱的变化。

[0054] 5.3 矿化角蛋白颗粒XPS分析

[0055] 分别取对比例的空白对照组角蛋白颗粒和实施例1中矿化6周的矿化角蛋白颗粒,采用MICROLAB MK II型光电子能谱仪测量各受试样品的薄膜的XPS能谱,靶分别为Ca和P、电子枪空间分辨率为50 nm、电压10 kV。其XPS检测结果如图3所示。检测结果显示实施例1中受试样品矿化6 周后,XPS结合能347eV和133eV处出现明显的特征峰,表明矿化后的角蛋白表面富集了更多的钙离子和磷离子,其结合上述傅里叶红外图谱分析结果可知,矿化后的

角蛋白表面新形成的物质可能是羟基磷灰石类似物。

[0056] 5.4 矿化角蛋白颗粒TEM和SAED分析

[0057] 分别取对比比例的空白对照组与实施例1中矿化6周的矿化角蛋白颗粒对其进行TEM和SAED分析。如图4(左)所示,矿化6周使角蛋白的结构发生了改变,具体地矿化作用增加了角蛋白的颗粒性,角蛋白电子密度降低、边界变得明显、颗粒间彼此分离。如图4(右)所示,空白对照组未经矿化的角蛋白SAED并不呈现明显的晶体规则、图像中亮斑之间距离不一、各点呈分散分布,但基本围绕图样中心排列于同心圆上,即其为电子束经过角蛋白的 α 螺旋后所衍射出的图样;而经过矿化6周的作用,受试样品的SAED图谱上出现了规则的四边形结构、各亮斑之间排列均一、呈规则四边形,由此推断得矿化作用可使角蛋白表面形貌发生变化,且出现四面体的晶体结构。

[0058] 5.5矿化角蛋白颗粒SEM分析

[0059] 分别取对比比例的空白对照组角蛋白颗粒和实施例1中矿化6周的矿化角蛋白颗粒,将各受试样品自然风干后黏贴固定于样品台上并做喷金处理,置于扫描电镜样品室内,抽真空,进行电镜观察。其观察结果如图5所示(左图空白对照组、中图矿化1周、右图为矿化6周),空白对照组未经矿化的角蛋白相互联结缠绕,形成块状结构,边界并不明显,而经1周和6周矿化后,角蛋白出现明显的颗粒状结构,颗粒均匀,颗粒间相互联结形成的片状结构明显减少,颗粒间呈现明显的相互独立性,其分析结果与TEM检测结果相对应。

[0060] 5.6矿化角蛋白颗粒粒径

[0061] 取对比比例的空白对照组角蛋白颗粒和实施例1的矿化1~6周的矿化角蛋白颗粒分别进行粒径检测,其检测结果如图6所示,发现角蛋白的粒径随着矿化时间的增加呈现逐渐下降的趋势,具体地对比例的空白对照组角蛋白颗粒粒径为100nm,矿化3周后颗粒粒径下降至50nm,下降了50%,而随着矿化时间的进一步延长,矿化角蛋白颗粒粒径在6 周后可达30 nm,而1~6 周的检测结果较对比比例的空白对照组而言 $P < 0.01$,具有统计学差异。

[0062] 5.7矿化角蛋白膜材表面形貌

[0063] 取对比比例的空白对照组角蛋白颗粒、实施例1中矿化1周和矿化6周的矿化角蛋白仿生材料分别通过SEM和AFM进行表面形貌观察,如图7所示,矿化处理时长不同,对角蛋白成膜的效果将产生影响,具体地空白对照组未矿化的角蛋白所形成的膜结构存在更多的孔洞结构,表面不平整,相比之下矿化处理6 周后的矿化角蛋白所形成的膜结构更为平整,材料间相互联结紧密,且其所呈现的结构与牙本质内部的细微结构相似,这表面本发明的矿化角蛋白仿生材料可能模拟牙齿内部的结构,为后续DPSCs的生长和分化提供理想的微环境。

[0064] 5.8矿化角蛋白膜材表面粗糙度

[0065] 取对比比例的空白对照组角蛋白颗粒、实施例1中矿化1周和矿化6周的矿化角蛋白仿生材料分别进行粗糙度分析。具体地的操作方法为取每块受试样品上表面 $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 大小的区域,分为200层进行扫描,每一层分为200个扫描点,故每个区域共分为 4×10^4 个扫描点。仪器扫描所得数据通过NanoScope Analysis 1.5(Bruker, Germany)和OriginPro 9 (OriginLab, USA)进行处理,得到可视化三维图形和二维图形。继而,定义了角蛋白膜材每一层平均粗糙度Ra公式如下:

$Ra = \sum_{n=1}^{200} \frac{|z_n - \bar{z}|}{200}$ 公式中, z_n 表示每个扫描点的高度, $\bar{z}$ 代表该层平均

高度。计算出每一层的Ra后,再计算出同一角蛋白膜材的200个片层的平均Ra值,以此代表其粗糙度。如图8所示,随着矿化时间的延长,所形成的角蛋白膜材的粗糙度逐渐下降,实施例两个受试样品的粗糙度较空白对照组的下降了50%,这与矿化角蛋白颗粒的SEM结果相对应,表明本发明的矿化角蛋白仿生材料表面的空隙减少、表面变得平整。

[0066] 5.9矿化角蛋白膜材亲水性

[0067] 取对比比例的空白对照组角蛋白颗粒、实施例1中矿化1周和矿化6周的矿化角蛋白仿生材料分别进行表面亲水性分析,如图9所示,矿化6周的矿化角蛋白所形成的膜材具有更高的亲水性,表现为表面接触角数值的减少,且较空白对照组和实施例1中矿化1周的受试样品而言具有显著性差异,表面本发明的矿化角蛋白仿生材料的生物相容性更好,更有利于DPSCs在其上的生长。

[0068] 实施例6:细胞培养

[0069] 取由赛百慷(上海)生物技术股份有限公司提供的大鼠牙髓干细胞(DPSCs),分装到24孔或96孔细胞培养板中,再分别加入对比比例空白对照组的角蛋白膜材和实施例1中矿化6周的矿化角蛋白仿生材料,保证各孔加入的角蛋白总体质量一致,并将未加入角蛋白膜材或矿化角蛋白仿生材料的纯大鼠牙髓干细胞作为细胞对照组。细胞在培养瓶中融合培养至80%后,以 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ /孔的密度接种至细胞培养板上,培养72 h,以进行后续的MTT检测、流式细胞检测和扫描电镜观察。其它细胞培养条件为:含10%新生牛血清的低糖 α MEM培养基,37 °C,5.0%CO₂。

[0070] 6.1 MTT检测

[0071] 取细胞培养后的细胞液弃培养液,加入浓度为5 mg/ml的MTT,比例为1:10,37°C孵育4h。弃上清,加入DMSO 100 μ L,充分振荡,溶解结晶,酶标仪检测490nm吸光值,进行MTT检测,其检测结果如图10所示。根据MTT检测结果可知,DPSCs显示出了明显不同的生长情况,实施例1中矿化6周的受试样品的结果明显优于对比比例空白对照组和细胞对照组的受试样品。从数据上来看,在培养24 h后,矿化6周的受试样品的OD值分别约为细胞对照组的3倍和空白对照组的2倍,而这一倍数关系在细胞培养48 h和72 h小时后,进一步被扩大。培养72 h后,矿化6周的受试样品的OD值为~3.0,而细胞对照组的OD值<1.0,即表面本发明的矿化角蛋白仿生材料更适宜DPSCs的生长并可显著地促进该细胞的增殖。

[0072] 6.2 流式细胞检测

[0073] 细胞培养72h后收集细胞,过流式细胞仪进行细胞计数。同时,采用流式细胞术检测细胞周期,以表征细胞的增殖情况。其检测结果如图11所示,实施例1中矿化6周的受试样品上的细胞较高比例的通过了G1周期检验点,进入了S、G2或M期,处于G1/G0期的细胞比例较细胞对照组下调了21%,同时实施例1中矿化6周的受试样品上的S期细胞比例较高,为26.71%,且较其余两组有显著性差异,而对比比例空白对照组G2/M期细胞比例较高,为22.23%

[0074] 6.3扫描电镜观察

[0075] 根据图12所示可知,细胞培养引起了角蛋白膜材表面形貌的变化。对比比例空白对照组的角蛋白膜材表面起伏较多,其局部结构多呈现球状或颗粒状结构,颗粒表面光滑,无多余结构,而实施例1中矿化6周的受试样品中,其仿生材料表面整体平整,同时出现管状结构,由此推断出管状结构应为DPSCs上生长的可用于附着材料的黏连蛋白或胶原蛋白。

[0076] 综上,本发明的矿化角蛋白仿生材料对于DPSCs有较好的生物相容性,能够为细胞

生长和增殖提供良好的环境,以促进细胞的生长。因此,具有进一步开发成可用于牙髓组织修复的生物材料的潜能。

[0077] 上述实施例为本发明的优选实施例,凡与本发明类似的工艺及所作的等效变化,均应属于本发明的保护范畴。

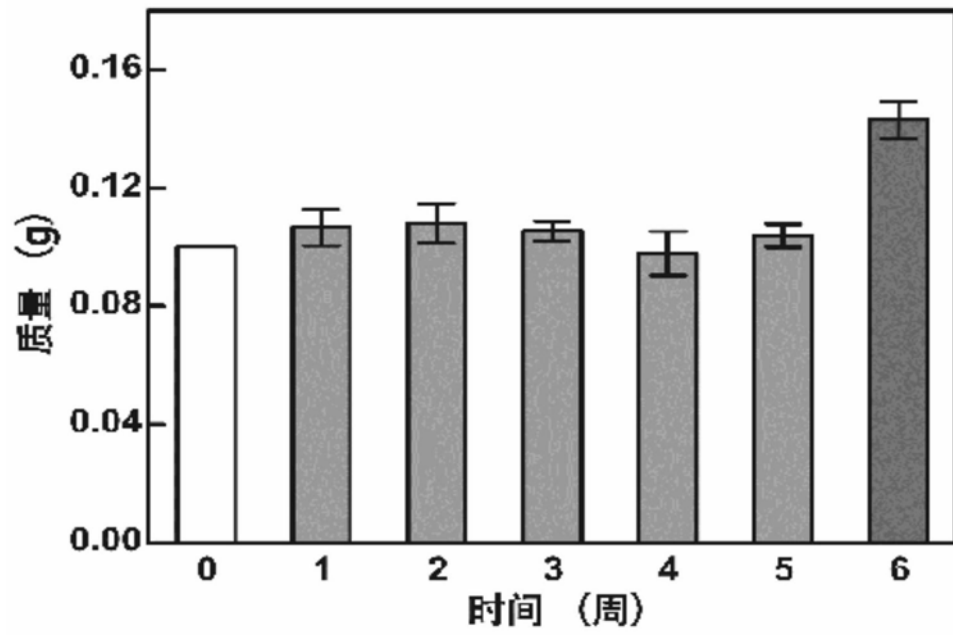


图1

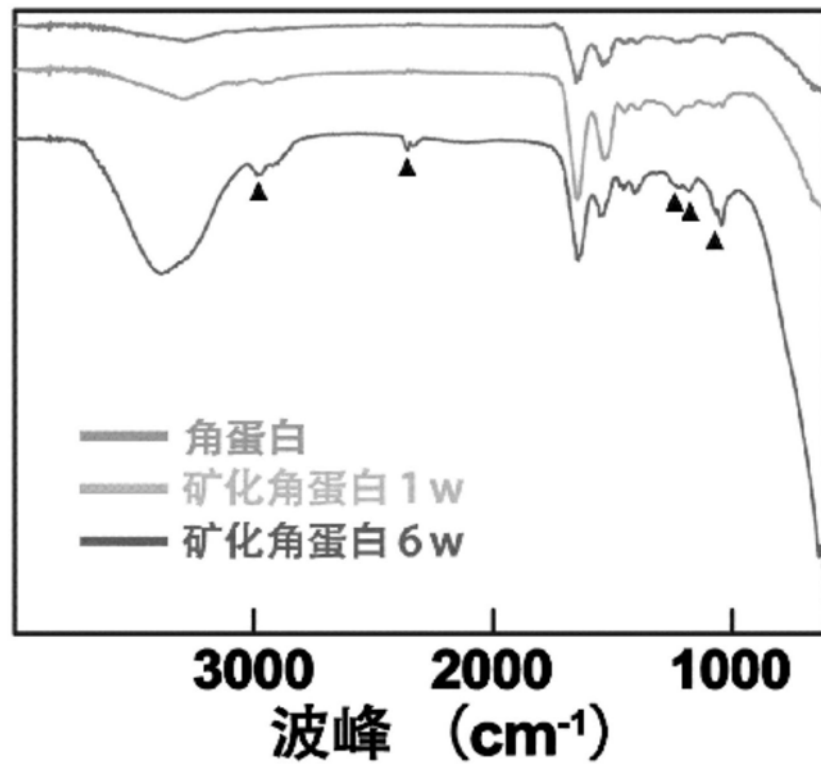


图2

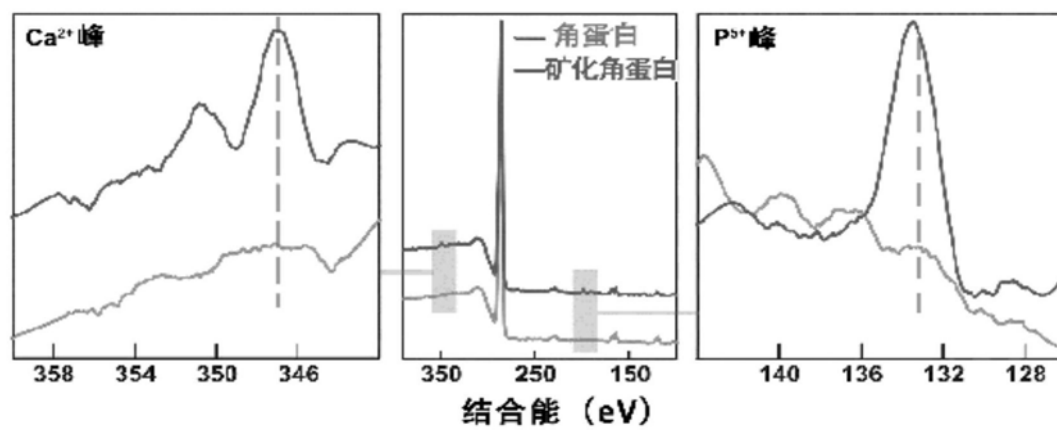


图3

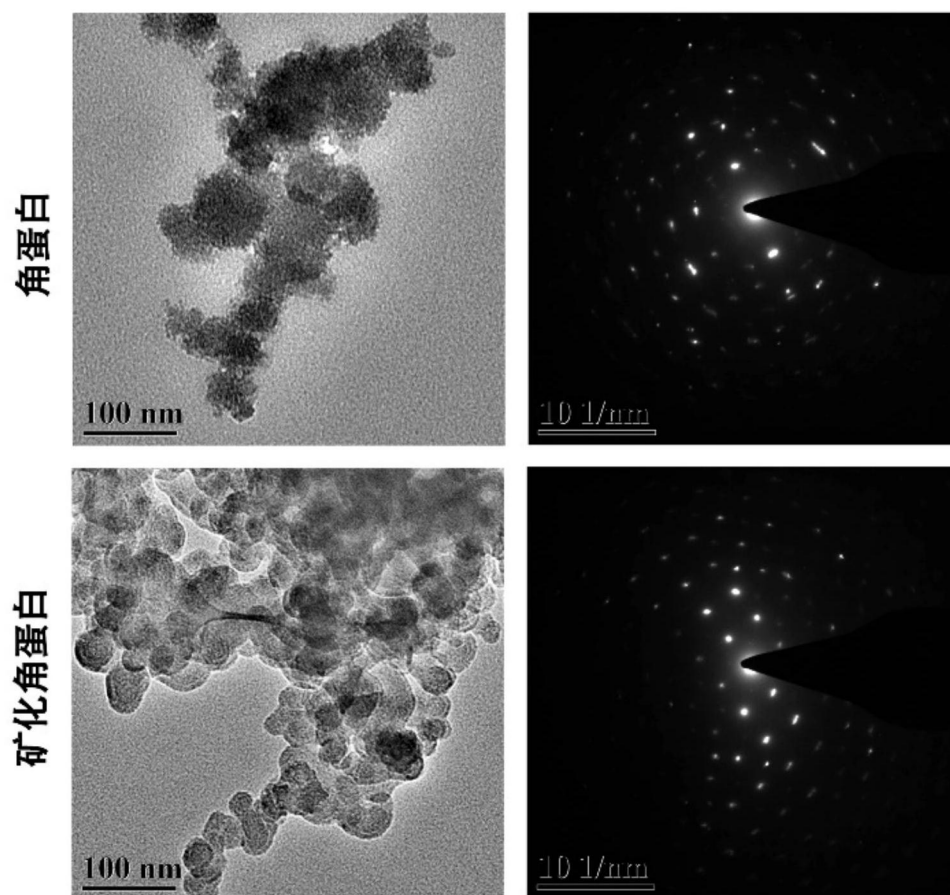


图4

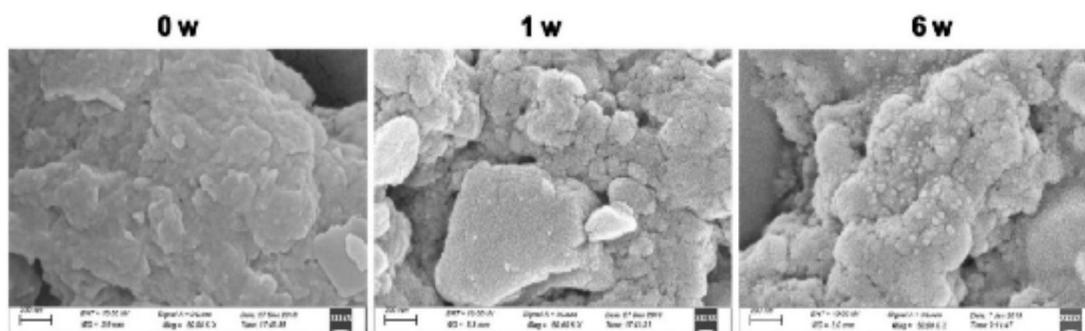


图5

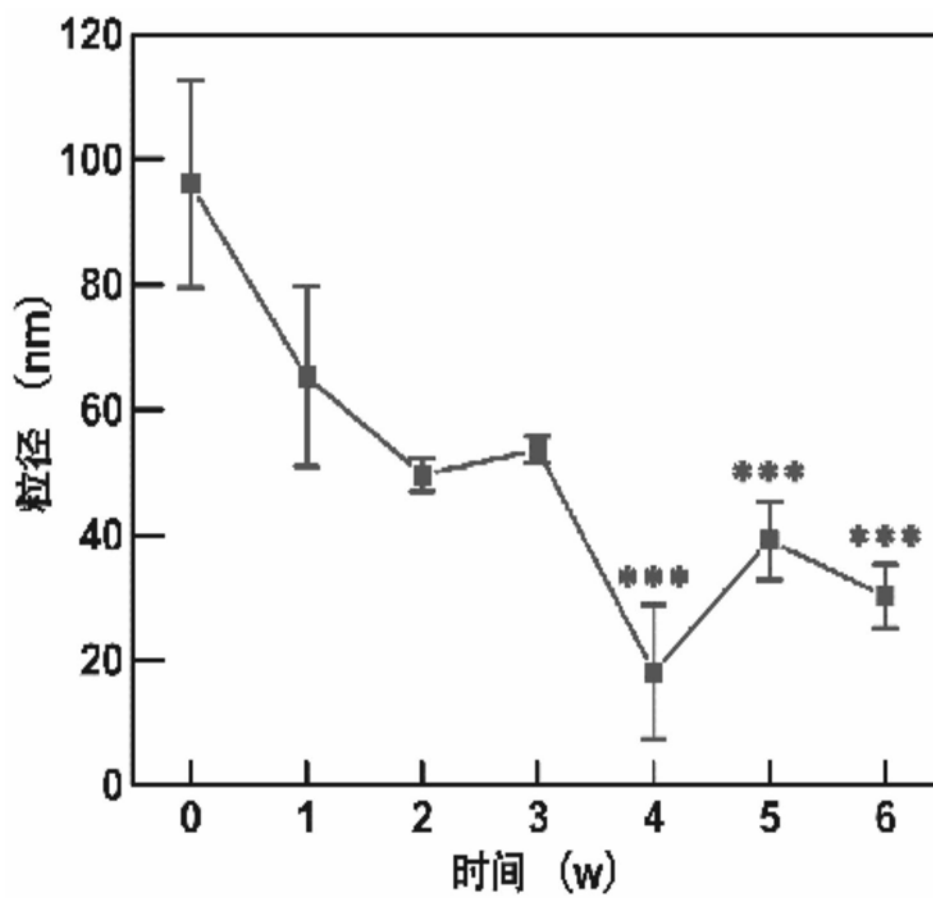


图6

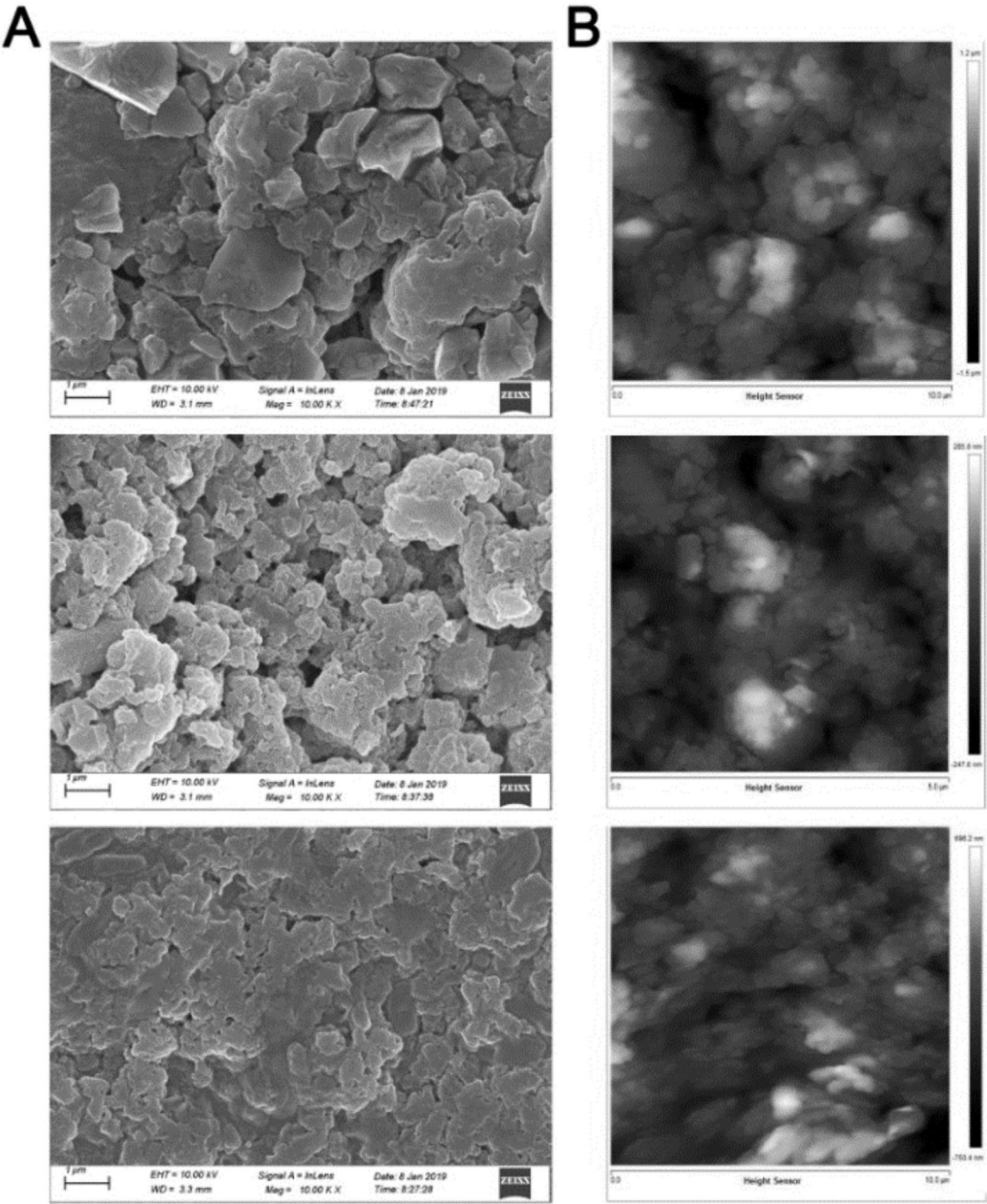


图7

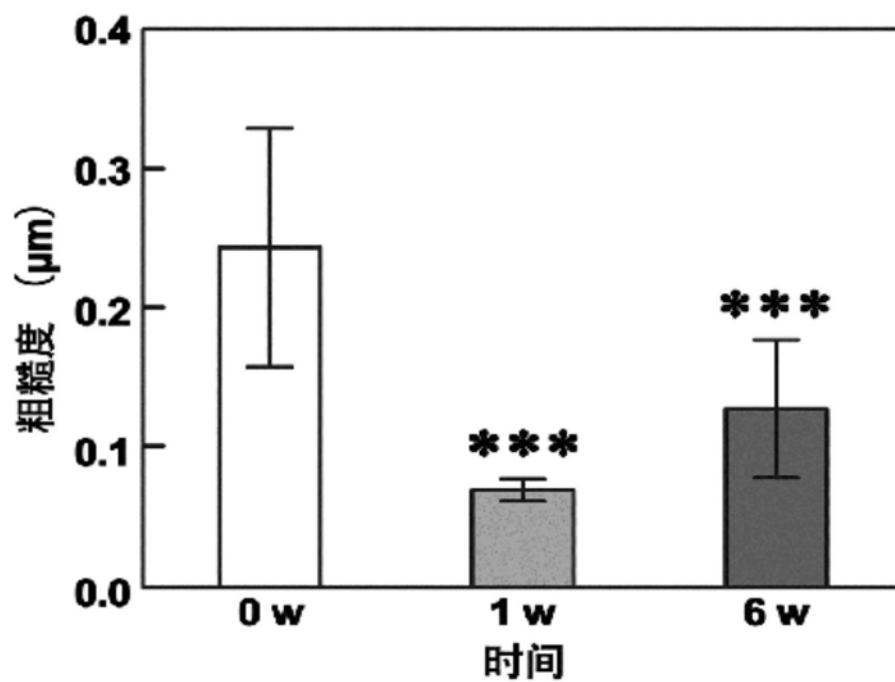


图8

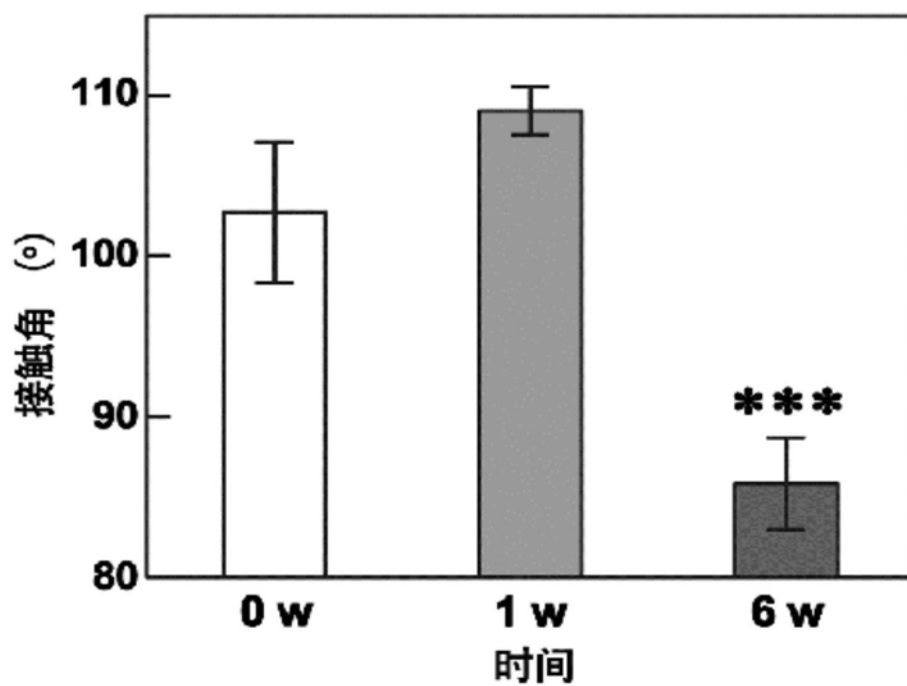


图9

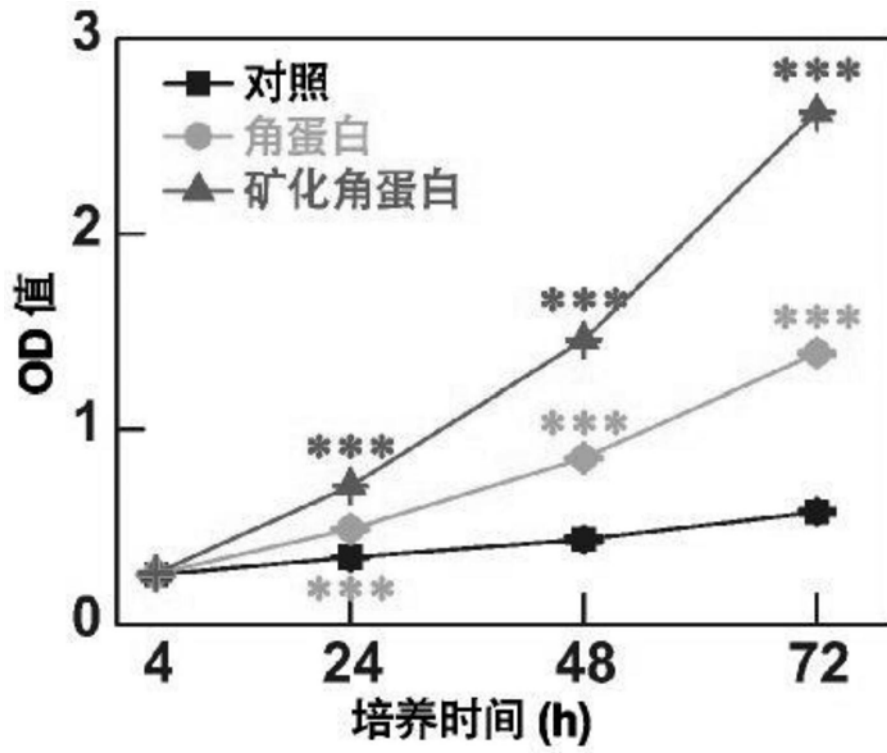


图10

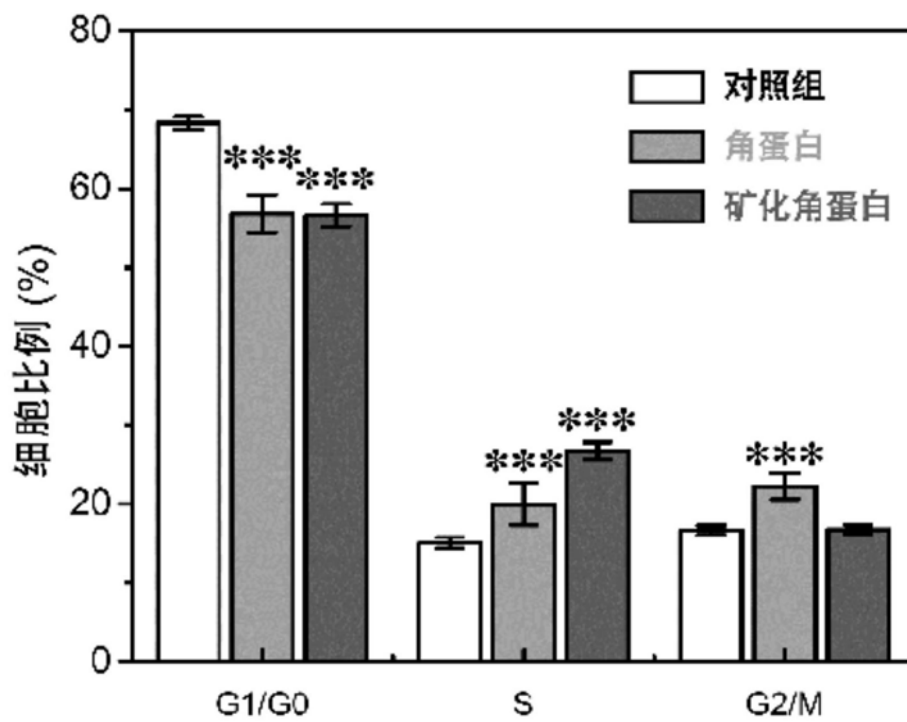


图11

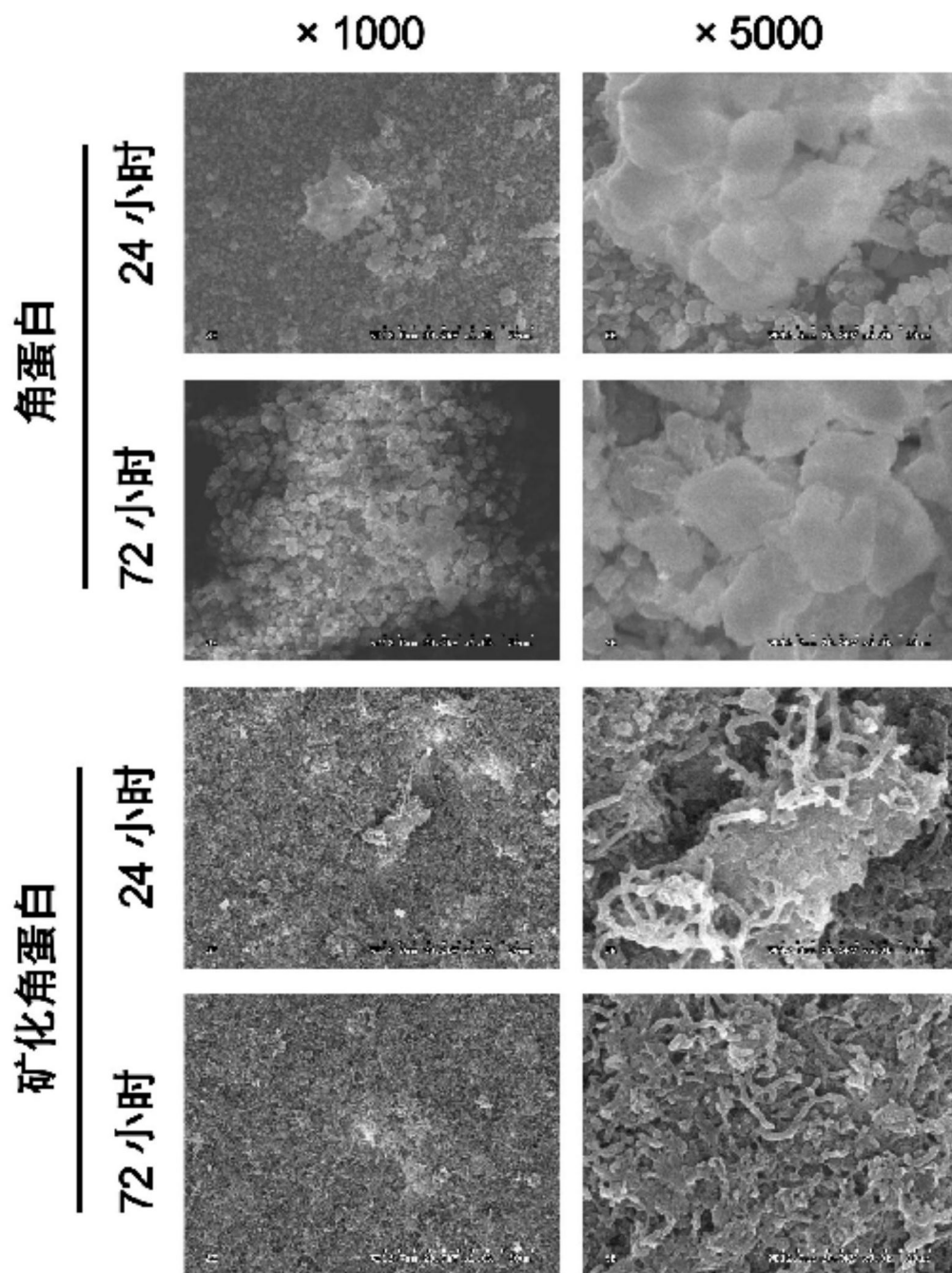


图12