

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810070865. X

[51] Int. Cl.

A61L 27/40 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 9 月 3 日

[11] 公开号 CN 101254313A

[22] 申请日 2008.4.3

[21] 申请号 200810070865. X

[71] 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

[72] 发明人 张其清 李 静 王秀燕 孙莉萍

[74] 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

代理人 马应森

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

双层胶原 - 壳聚糖海绵支架及其制备方法

[57] 摘要

双层胶原 - 壳聚糖海绵支架及其制备方法, 涉及一种组织工程支架。提供一种用于组织工程皮肤的双层胶原 - 壳聚糖海绵支架及其制备方法。为双层网状结构, 上、下层为胶原与壳聚糖复合膜, 孔径呈互相贯穿的层状孔状结构。胶原溶胀液溶于乙酸, 配浓度为 0.2% ~ 0.5% 和 0.5% ~ 0.8% 的胶原分散液; 壳聚糖溶于乙酸, 配浓度为 0.2% ~ 0.5% 和 0.5% ~ 0.8% 的壳聚糖分散液; 两种分散液混合, 得两种胶原 - 壳聚糖溶液; 浓度为 0.5% ~ 0.8% 的胶原 - 壳聚糖溶液冷冻过夜, 干燥得海绵状的白色支架, 压膜后交联, 清洗, 冷冻过夜, 干燥得单层支架; 倒入胶原 - 壳聚糖溶液, 冷冻过夜, 干燥得双层支架, 交联, 清洗, 冷冻过夜, 冷冻干燥。

1. 双层胶原-壳聚糖海绵支架, 其特征在于为双层网状结构, 下层为胶原与壳聚糖复合膜, 下层胶原与壳聚糖复合膜的孔径为 $80\sim 120\mu\text{m}$, 厚度为 $2\sim 3\text{mm}$, 下层胶原与壳聚糖复合膜的孔径呈互相贯穿的层状孔状结构; 上层为胶原与壳聚糖复合膜, 上层胶原与壳聚糖复合膜的孔径为 $30\sim 80\mu\text{m}$, 厚度为 $0.5\sim 1.5\text{mm}$, 上层胶原与壳聚糖复合膜的孔径呈互相贯穿的层状孔状结构。

2. 如权利要求 1 所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法, 其特征在于包括以下步骤:

1) 将胶原溶胀液溶解于乙酸中, 溶解后, 按质量百分比, 分别配制浓度为 $0.2\%\sim 0.5\%$ 和 $0.5\%\sim 0.8\%$ 的胶原分散液;

2) 将壳聚糖溶解于乙酸中, 溶解后, 按质量百分比, 分别配制浓度为 $0.2\%\sim 0.5\%$ 和 $0.5\%\sim 0.8\%$ 的壳聚糖分散液;

3) 按质量比, 分别将相同浓度的胶原分散液和壳聚糖分散液以 $(1:9)\sim (9:1)$ 的比例混合, 得按质量百分比, 浓度为 $0.2\%\sim 0.5\%$ 和 $0.5\%\sim 0.8\%$ 的两种胶原-壳聚糖溶液;

4) 按质量百分比, 称取浓度为 $0.5\%\sim 0.8\%$ 的胶原-壳聚糖溶液置于 $-60\sim -80^{\circ}\text{C}$ 冷冻过夜后, 冷冻干燥, 得到海绵状的白色支架;

5) 将冻干的海绵支架用聚四氟乙烯板压膜后, 用戊二醛进行交联, 清洗后, 冷冻过夜, 冷冻干燥, 得到颜色接近正常皮肤颜色的单层支架;

6) 再向单层支架上倒入按质量百分比浓度为 $0.2\%\sim 0.5\%$ 的胶原-壳聚糖溶液, 冷冻过夜, 再冷冻干燥, 得到含有两层结构的双层支架;

7) 将冻干的双层支架再次用戊二醛进行交联, 清洗后, 冷冻过夜, 冷冻干燥, 即得所需的双层胶原-壳聚糖海绵支架。

3. 如权利要求 2 所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法, 其特征在于在步骤 1) 中, 乙酸的浓度为 $0.05\sim 1\text{M}$ 。

4. 如权利要求 2 所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法, 其特征在于在步骤 2) 中, 乙酸的浓度为 $0.05\sim 1\text{M}$ 。

5. 如权利要求 2 所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法, 其特征在于在步骤 4) 中, 所述冷冻干燥的时间为 $24\sim 48\text{h}$ 。

6. 如权利要求 2 所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法, 其特征在于在步骤 5) 中,

将冻干的海绵支架用聚四氟乙烯板压膜的时间为 12~24h。

7. 如权利要求 2 所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法, 其特征在于在步骤 5) 中, 所述的清洗依次用蒸馏水、 NaBH_4 的磷酸盐缓冲液、饱和 NaCl 溶液及去离子水浸洗; 冷冻过夜的温度为 -20°C , 冷冻干燥的时间为 12~24h。

8. 如权利要求 2 所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法, 其特征在于在步骤 6) 中, 冷冻过液的温度为 -20°C , 冷冻干燥的时间为 24~48h。

9. 如权利要求 2 所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法, 其特征在于在步骤 7) 中, 所述清洗依次用蒸馏水、 NaBH_4 的磷酸盐缓冲液、饱和 NaCl 溶液及去离子水浸洗, 冷冻过夜的温度为 -20°C , 冷冻干燥的时间为 12~24h。

双层胶原-壳聚糖海绵支架及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种组织工程支架，尤其是涉及一种用于皮肤组织工程支架材料的双层胶原-壳聚糖海绵支架及其制备方法。

背景技术

组织工程支架用来模拟细胞外基质的多孔结构，以赋予支架某些细胞外基质的基本功能，同时支架材料被逐渐降解吸收，从而诱导种子细胞、受损组织或器官部位细胞定向迁移，达到修复组织或器官的目的。组织工程支架是形成组织工程化组织和器官的关键因素。理想的组织工程支架应具备：(1) 良好的生物相容性和生物降解性，无明显的炎症反应、免疫反应和细胞毒性，在体外以及植入体内后的降解和吸收速度应该与细胞和(或) 组织生长的速度相匹配；(2) 具有足够的力学强度，材料不会在患者活动中塌陷、撕裂、破溃；(3) 高孔隙率、高表面积，便于细胞的粘附和导入及营养和代谢产物的交换；(4) 表面(包括内表面) 亲和性良好，材料表面的化学结构、亲/疏水性、拓扑结构(粗糙度、孔洞的大小及其分布、沟槽的深度宽度、纤维的粗细)、电荷状况(电荷的性质、密度)、表面负载的活性因子等有利于细胞的粘附、铺展、繁殖等；(5) 可塑性强，易于加工成各种形状和结构；(6) 易于消毒。

从材料的选取方面来讲，当前认为天然高分子物质是一种优良的组织工程生物材料，这一类物质包括有胶原、壳聚糖、海藻酸(盐)、海底珊瑚和多种高分子的粘多糖。但每种材料的性能都存在不足之处。其中，胶原是细胞外基质的主要成分，有利于细胞的粘附、增殖和分化。壳聚糖的结构与人体内的糖胺聚糖极其相似，能促进生长因子及胶原的合成还能减缓胶原的降解速度([1] Ma Lie ,Gao Changyou ,Mao Zhengwei ,et al . Collagen/ chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering [J] . Biomaterials, 2003, 24 : 4833 -4841)。虽然各国在皮肤组织工程支架方面已有深入探索，但是由于存在生物相容性、细胞亲和性、免疫原性及力学性能等问题，还没有一种令人十分满意的皮肤支架材料在临床上广泛推广。目前，组织工程皮肤所使用的支架已报道有不同的制备方法，但大多都是结构均一的表皮或真皮单层支架。研究表明，模拟皮肤的真、表皮结构制备成的双层皮肤支架比单层的皮肤支架有更优越的性能：致密的表层可以防治细菌的入侵及体液的快速蒸发，多孔的内层有利于组织的长入([2] Hinrichs WL, Lommen EJ, Wildevuur CR, et al. Fabrication and

characterization of an asymmetric polyurethane membrane for use as a wound dressing[J]. J Appl Biomater. 1992, 3(4):287-303)。而已报道的双层皮肤支架大多以聚氨酯或壳聚糖为原料制备, 尚未见有胶原-壳聚糖双层海绵支架的报道 ([3] Matsuda K, Suzuki S, Isshiki N, et al. Re-freeze dried bilayer artificial skin. Biomaterials[J]. 1993, 14:1030-1035; [4] Fwu-Long Mi, Yu-Bey Wu, Shin-Shing Shyu, et al. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/ wet phase separation : a new type of wound dressing for controlled antibacterial release [J]. Journal of Membrane Science, 2003, 212 : 237 – 254; [5] Jianbiao Ma, Hongjun Wang, Binglin He, et al. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts[J]. Biomaterials, 2001, 22: 331-336)。鉴于胶原-壳聚糖材料优越的生物学性能, 利用其制备出类似于天然皮肤结构的组织工程支架对于组织工程皮肤的发展和完善具有重要的意义。

发明内容

本发明的目的在于提供一种用于组织工程皮肤的双层胶原-壳聚糖海绵支架。

本发明的另一目的在于提供一种上述双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法。

本发明所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架为双层网状结构, 下层为胶原与壳聚糖复合膜, 下层胶原与壳聚糖复合膜的孔径为 80~120 μm , 厚度为 2~3mm, 下层胶原与壳聚糖复合膜的孔径呈互相贯穿的层状孔状结构; 上层为胶原与壳聚糖复合膜, 上层胶原与壳聚糖复合膜的孔径为 30~80 μm , 厚度为 0.5~1.5mm, 上层胶原与壳聚糖复合膜的孔径呈互相贯穿的层状孔状结构。

所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架呈微黄色, 柔软有弹性, 可随意弯折不断裂, 与正常皮肤的厚度相符, 内层表面粗糙, 可见大小均一的小孔, 外层表面光滑, 未见小空洞, 支架大小和形状可根据需要制备。

本发明所述的双层胶原-壳聚糖海绵支架的制备方法包括以下步骤:

- 1) 将胶原溶胀液溶解于乙酸中, 溶解后, 按质量百分比, 分别配制浓度为 0.2%~0.5%和 0.5%~0.8%的胶原分散液;
- 2) 将壳聚糖溶解于乙酸中, 溶解后, 按质量百分比, 分别配制浓度为 0.2%~0.5%和 0.5%~0.8%的壳聚糖分散液;
- 3) 按质量比, 分别将相同浓度的胶原分散液和壳聚糖分散液以 (1:9) ~ (9:1) 的比例混合, 得按质量百分比, 浓度为 0.2%~0.5%和 0.5%~0.8%的两种胶原-壳聚糖溶液;
- 4) 按质量百分比, 称取浓度为 0.5%~0.8%的胶原-壳聚糖溶液置于 -60~-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻过

夜后，冷冻干燥，得到海绵状的白色支架；

5) 将冻干的海绵支架用聚四氟乙烯板压膜后，用戊二醛进行交联，清洗后，冷冻过夜，冷冻干燥，得到颜色接近正常皮肤颜色的单层支架；

6) 再向单层支架上倒入按质量百分比浓度为 0.2%~0.5%的胶原-壳聚糖溶液，冷冻过夜，再冷冻干燥，得到含有两层结构的双层支架；

7) 将冻干的双层支架再次用戊二醛进行交联，清洗后，冷冻过夜，冷冻干燥，即得所需的双层胶原-壳聚糖海绵支架。

在步骤 1) 中，乙酸的浓度最好为 0.05~1M。

在步骤 2) 中，乙酸的浓度最好为 0.05~1M。

在步骤 4) 中，所述冷冻干燥的时间最好为 24~48h。

在步骤 5) 中，将冻干的海绵支架用聚四氟乙烯板压膜的时间最好为 12~24h，所述的清洗最好依次用蒸馏水、 NaBH_4 的磷酸盐缓冲液、饱和 NaCl 溶液及去离子水浸洗，冷冻过夜的温度最好为 -20°C ，冷冻干燥的时间最好为 12~24h。

在步骤 6) 中，冷冻过夜的温度最好为 -20°C ，冷冻干燥的时间最好为 24~48h。

在步骤 7) 中，所述清洗最好依次用蒸馏水、 NaBH_4 的磷酸盐缓冲液、饱和 NaCl 溶液及去离子水浸洗，冷冻过夜的温度最好为 -20°C ，冷冻干燥的时间最好为 12~24h。

本发明采用的制备方法所涉及的技术原理是：胶原、壳聚糖不仅各自有许多优良的生物特性，而且在复合使用时功能上还显示互补性。较高固含量的胶原-壳聚糖溶液制备的海绵孔径较小，可以减少细胞植入过程中的漏液，增加细胞在支架中的停驻数量。另外，较高固含量的溶液制备的海绵孔径较小，交联处理的过程中较小的孔之间易发生融合，从而使材料收缩。24h 的压膜则可以显著降低较高固含量的胶原-壳聚糖溶液制备的海绵交联后沿直径方向的收缩，以较高固含量的胶原-壳聚糖溶液制备的海绵经压膜、交联后作为表皮层，可以避免内层海绵的卷曲变形并保证复合双层支架有足够的强度，而表层孔径小于 $0.22\mu\text{m}$ ，可有效防止外界细菌的入侵。较低固含量的胶原-壳聚糖溶液制备的海绵孔径较大，作为真皮层可在长时间内提供细胞增殖的空间，促进细胞的增殖。

附图说明

图 1 为双层胶原-壳聚糖海绵支架真皮层横截面的 SEM 照片。

图 2 为双层胶原-壳聚糖海绵支架表皮层横截面的 SEM 照片。

图 3 为双层胶原-壳聚糖海绵支架表皮层经压膜后表层的 SEM 照片。

图 4 为 0.2%胶原-壳聚糖溶液制备的海绵支架及 0.8%胶原-壳聚糖溶液制备的海绵支架

SEM 照片比较图。

图 5 为双层胶原-壳聚糖海绵支架内层细胞生长情况的 SEM 照片。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明作进一步说明。

实施例 1

分别将胶原溶胀液及壳聚糖溶于 0.05M 乙酸水溶液中, 得到 0.2% (wt) 的胶原分散液与壳聚糖分散液及 0.8% (wt) 的胶原分散液与壳聚糖分散液。将相同浓度的胶原分散液与壳聚糖分散液按 9 : 1 的质量比混合得固含量为 0.8% 及 0.2% 的胶原-壳聚糖溶液。将 15g 固含量为 0.8% 的胶原-壳聚糖溶液倒入直径 9cm 的玻璃培养皿中, 保持液面水平置于一 60℃ 冰箱冷冻过夜后, 迅速将其移入冷冻干燥机冷冻干燥 40h。将冻干的海绵置于两块光滑的聚四氟乙烯板之间, 以 15kg 重物压膜 24h。将压膜后的海绵浸入 0.2% 戊二醛交联液中, 4℃ 反应 24h 后, 分别用蒸馏水、NaBH₄ 的磷酸盐缓冲液、饱和 NaCl 溶液及去离子水浸洗, -20℃ 冷冻过夜后再进行 15h 冷冻干燥。在冻干的海绵上倒入 60g 固含量为 0.2% 胶原-壳聚糖溶液, 保持液面水平置于一 20℃ 冷冻过夜。再将其移入冷冻干燥机冷冻干燥 40h。冻干的双层海绵支架再次按上述步骤进行交联、清洗、冻干, 即得到厚度为 3.8mm 的海绵支架。扫描电镜显示真皮层呈网状结构, 平均孔径为 80~100μm (如图 1); 表皮层呈互相贯穿的层状孔状结构, 平均孔径为 30~50μm, (如图 2) 表层孔直径小于 0.22μm (如图 3)。

实施例 2

分别将胶原溶胀液及壳聚糖溶于 0.5M 乙酸水溶液中, 得到 0.2% (wt) 的胶原分散液与壳聚糖分散液及 0.8% (wt) 的胶原分散液与壳聚糖分散液。将相同浓度的胶原分散液与壳聚糖分散液按 8 : 2 的质量比混合。将 10g 固含量为 0.8% 的胶原-壳聚糖溶液倒入直径 6cm 的玻璃培养皿中, 保持液面水平置于一 60℃ 冰箱冷冻过夜后, 迅速将其移入冷冻干燥机冷冻干燥 24h。将冻干的海绵置于两块光滑的聚四氟乙烯板之间, 以 15kg 重物压膜 24h。将压膜后的海绵浸入 0.25% 戊二醛交联液中, 4℃ 反应 12h, 再分别用蒸馏水、NaBH₄ 的磷酸盐缓冲液、饱和 NaCl 溶液及去离子水浸洗浸洗, -20℃ 冷冻过夜后再进行 24h 冷冻干燥。在冻干的海绵上倒入 40g 固含量为 0.2% 胶原-壳聚糖溶液, 保持液面水平置于一 20℃ 冷冻, 再冻干 24h。冻干的双层海绵支架按上述步骤进行交联、清洗、冻干, 即得到厚度为 3mm 的海绵支架。扫描电镜显示真皮层呈网状结构, 平均孔径为 80~100μm; 表皮层呈互相贯穿的层状孔状结构, 平均孔径为 30~50μm, 表层孔直径小于 0.22μm。

实施例 3

分别将胶原溶胀液及壳聚糖溶于 1M 乙酸水溶液中, 得到 0.3% (wt) 的胶原分散液与壳聚糖分散液及 0.7% (wt) 的胶原分散液与壳聚糖分散液。将相同浓度的胶原分散液与壳聚糖分散液按 7 : 3 的质量比混合得固含量为 0.7% 及 0.3% 的胶原-壳聚糖复合液。将 100g 固含量为 0.7% 的胶原-壳聚糖复合液倒入大小为 28cmX18cm 陶瓷托盘中, 保持液面水平置于 -60℃ 冰箱冷冻过夜后, 迅速将其移入冷冻干燥机冷冻干燥 42h。将冻干的海绵置于两块光滑的聚四氟乙烯板之间, 以 15kg 重物压膜 24h。将压膜后的海绵浸入 0.5% 戊二醛交联液中, 4℃ 反应 12h 后, 分别用蒸馏水、NaBH₄ 的磷酸盐缓冲液、饱和 NaCl 溶液及去离子水浸洗, -20℃ 冷冻过夜后再进行 24h 冷冻干燥。在冻干的海绵上倒入 400g 固含量为 0.3% 胶原-壳聚糖复合液, 保持液面水平置于 -20℃ 冷冻过夜。再将其移入冷冻干燥机冷冻干燥 42h。冻干的双层海绵支架再次按上述步骤进行交联、清洗、冻干, 即得到厚度为 4mm 的海绵支架。扫描电镜显示真皮层呈网状结构, 平均孔径为 100~120μm; 表皮层呈互相贯穿的层状孔状结构, 平均孔径为 50~80μm, 表层孔直径小于 0.22μm。

以下给出实验结果。

所得的胶原-壳聚糖双层海绵支架呈微黄色, 柔软有弹性, 可随意弯折不断裂, 厚度在正常人体皮肤的厚度范围 (0.5~4mm)。傅立叶红外光谱表明胶原、壳聚糖分子之间存在化学作用; 将所得的胶原-壳聚糖双层海绵支架在万能材料试验机上监测其抗拉强度平均为 58.7 ± 1.3 KPa 表明, 改支架具有一定的力学强度, 可以用于手术操作和移植需要。

将所得的胶原-壳聚糖双层海绵支架进行细胞种植实验及动物移植实验, 监测其生物相容性及皮肤修复活性。细胞实验表明该材料无细胞毒性(如图 5), 其中成纤维细胞在材料中的生长规律表明较高固含量的胶原-壳聚糖溶液制备的海绵可以减少细胞植入过程中的漏夜, 增加细胞在支架中的停驻数量; 较低固含量的胶原-壳聚糖溶液制备的海绵可在长时间内提供细胞增殖的空间, 促进细胞的增殖; 用该胶原-壳聚糖双层海绵支架构建完整的人工皮肤, 通过建立 SD 大鼠皮肤缺损模型进行人工皮肤替代物移植实验表明该人工皮肤替代物组织附着性、吸湿性好, 能促进伤口愈合, 并具有引导组织形成, 促进组织细胞生长的效果。这些实验结果均表明该胶原-壳聚糖双层海绵支架不仅具有良好的结构稳定性, 而且具有良好的生物相容性和皮肤修复活性, 具有较大的实际应用价值。

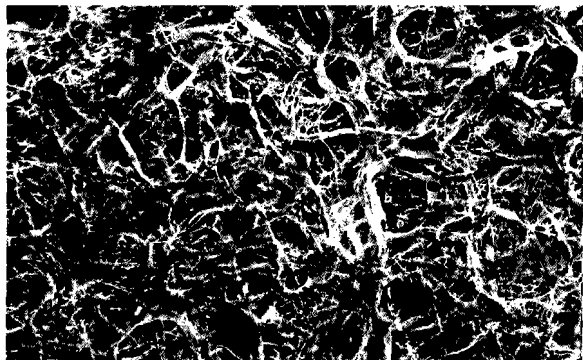


图 1

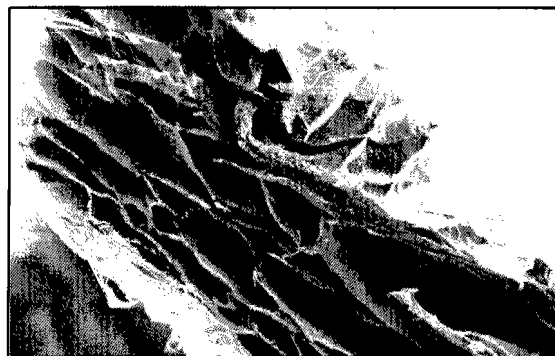


图 2

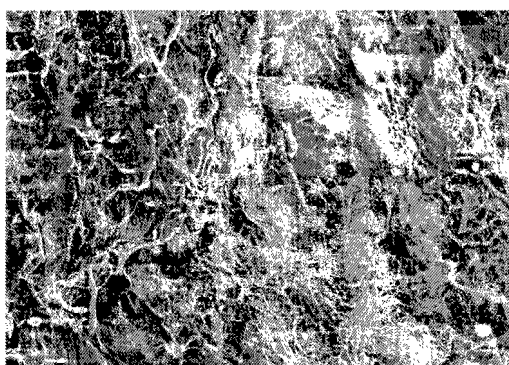


图 3

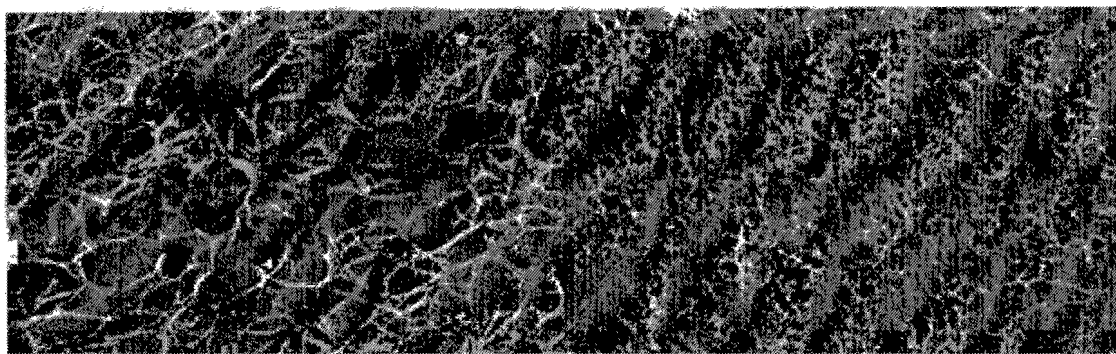


图 4



图 5

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810058675.6

[51] Int. Cl.

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 8 月 19 日

[11] 公开号 CN 101507834A

[22] 申请日 2008.7.14

[21] 申请号 200810058675.6

[71] 申请人 昆明理工大学

地址 650093 云南省昆明市五华区学府路 253
号(昆明理工大学)

[72] 发明人 陈庆华 杨喜昆 李娜娜

[74] 专利代理机构 昆明今威专利代理有限公司
代理人 赛晓刚

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

可降解皮肤组织工程支架材料及其制备的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种生物学组织工程领域的材料，特别是采用自然界的多糖类物质利用共混法来制备皮肤组织工程支架的方法。先分别配制 II 型胶原的甘油溶液、壳聚糖的质子化溶液，将其共混均匀，加入定量的魔芋葡甘聚糖精粉，持续搅拌成溶胶状。将凝胶样品置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜恒温干燥揭膜即可。本发明为一种高分子材料应用于皮肤或神经修复，制得的膜的力学性能和降解性能、吸水率、水蒸气透过系数均很理想。本发明涉及一种可降解皮肤组织工程支架材料及其制备的方法。

1、一种可降解皮肤组织工程支架材料，其特征在于该材料含有以下成分：

II型胶原(COL)的甘油溶液、壳聚糖(CS)的质子化溶液和魔芋葡甘聚糖(KGM)，该材料化学分子式为： $[\text{COL}]_l \cdot [\text{CS}]_m \cdot [\text{KGM}]_n$ ，II型胶原的甘油溶液、壳聚糖的质子化溶液以及魔芋葡甘聚糖的质量比例为： $[\text{COL}]_l : [\text{CS}]_m : [\text{KGM}]_n = (1.4\text{wt}\% \sim 73.2\text{wt}\%) : (1.4\text{wt}\% \sim 73.2\text{wt}\%) : (14.3\text{wt}\% \sim 85.7\text{wt}\%)$ ，所述胶原蛋白以胶原原纤维或成胶原纤维的形式存在。

2、按照权利要求1所述的可降解皮肤组织工程支架材料，其特征在于：所述的壳聚糖的质子化溶液中所采用的质子化酸可为柠檬酸、甲酸、乙酸、丙酸、乳酸或马来酸中的任一种。

3、根据权利要求1所述的可降解皮肤组织工程支架材料，其特征在于，所述的II型胶原溶液，其浓度范围为0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为0.5wt%~5wt%；甘油溶液的浓度范围为0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为0.25wt%~2.5wt%；所述的壳聚糖的质子化溶液为，用质子化酸来溶解壳聚糖，所配的壳聚糖的溶液浓度范围为0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为0.25wt%~5wt%；魔芋葡甘聚糖的浓度范围为0.1wt%~25wt%，最佳浓度范围为0.5wt%~2wt%。

4、一种可降解皮肤组织工程支架材料的制备方法，其特征在于，先分别配制II型胶原的甘油溶液、壳聚糖的质子化溶液，将其共混均匀，加入定量的魔芋葡甘聚糖精粉，持续搅拌成溶胶状，将凝胶样品置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

5、根据权利要求4所述的可降解皮肤组织工程支架材料的制备方法，其特征是，所述的II型胶原溶液，其浓度范围为0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为0.5wt%~5wt%；甘油溶液的浓度范围为0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为0.25wt%~2.5wt%。

6、根据权利要求4所述的可降解皮肤组织工程支架材料的制备方法，其特征是，所述的壳聚糖的质子化溶液为，用质子化酸来溶解壳聚糖，所配的壳聚糖的溶液浓度范围为0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为0.25wt%~5wt%；乙酸溶液的浓度范围为0.01wt%~

20wt%，最佳浓度范围为 0.25wt%~5wt%。

7、根据权利要求 4 所述的可降解皮肤组织工程支架材料的制备方法，其特征是，将 II 型胶原的甘油溶液、壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉，II 型胶原的浓度范围为 0.05wt%~10wt%，最佳浓度范围为 0.25wt%~5wt%；壳聚糖的浓度范围为 0.05wt%~10wt%，最佳浓度范围为 0.25wt%~5wt%；魔芋葡甘聚糖的浓度范围为 0.1wt%~25wt%，最佳浓度范围为 0.5wt%~2wt%。

8、根据权利要求 4 所述的可降解皮肤组织工程支架的制备方法，其特征是，溶胶状最终混合液的搅拌时间为 10~60min，凝胶状样品的真空脱泡的真空度为 10~200Pa，抽真空时间为 10~60min，所浇制膜恒温干燥温度为 60~70℃，干燥时间为 5~9h。

9、根据权利要求 4 所述的可降解皮肤组织工程支架材料的制备方法，其特征是，将所制膜用于生物相容性实验时，用碱性溶液进行处理使其由酸性膜转化为中性或微碱性膜，其用量应与质子化酸用量相匹配。

10、按照权利要求 9 所述的可降解组织工程支架材料的制备方法，其特征在于：所述的碱性溶液采用氨水、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸铵、碳酸氢铵、氢氧化钠、氢氧化钾的任一种。

可降解皮肤组织工程支架材料及其制备的方法

技术领域

本发明涉及的是一种生物医学组织工程领域的材料，特别是采用自然界的多糖类物质利用共混法来制备皮肤组织工程支架的方法。

背景技术

组织工程皮肤是组织工程学中发展最早、最成熟的领域，最早的研究是从天然材料开始，后来为天然材料和合成材料的复合，直到现在为合成材料和生物材料的杂化、交联、互传网络，以及最近的人工合成类天然材料——仿生材料。但目前的材料仍存在一些缺陷，为了满足体外人工器官的构建，生物可降解材料的生物相容性、理化性能、体内降解速率、缓释性能以及满足特定组织要求的支架制备方法和工艺都需要得到进一步的完善和改性。与其他医学应用中的生物材料性能不同，组织工程支架材料作为细胞生长代谢的外环境，其生物相容性是材料选择的关键。

虽然目前有自体皮移植、异体皮移植等诸多方法，但都存在一定局限性。组织工程皮肤在临床上应用成功给皮肤缺损患者带来了希望。针对目前研究应用于组织工程皮肤高分子薄膜的吸湿性和透水性差的问题，我们提出制备以魔芋葡甘聚糖为基的共混膜。魔芋葡甘聚糖具有良好的成膜和凝胶性，并具有良好的生物降解性、生物相容性、一定的生物活性等功能，同时特殊的分子结构使其具有较好的吸湿性和透水性，因此魔芋葡甘聚糖作为一种新型的生物材料，近几年在组织工程领域的研究已日益活跃；胶原蛋白是肌体自然蛋白，对皮肤表面的蛋白质分子具有较大的亲和力、较弱的抗原性、良好的生物相容性和生物降解安全性，可降解吸收，粘着力好，具有独特的皮肤修复功能，在皮肤组织工程中已经有了较深入的研究。胶原原纤维的基本结构单位是原胶原分子，其相对分子质量约为 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ 道尔顿。其氨基酸组成比较特殊（表1），甘氨酸含量约占1/3，脯氨酸和羟脯氨酸约占1/4。原胶原分子在胶原原纤维中有规则地相互错位，首尾相随，平行排列而成纤维束。每个原胶原分子由三条

α -肽链组成， α -肽链自身为 α 螺旋结构，三条 α -肽链则以平行、右手螺旋形成缠绕成“草绳状”三股螺旋结构(图1)，氨基酸排列顺序是十分规整的，几乎每隔两个氨基酸残基，便出现一个甘氨酸，且甘氨酸(Gly)－脯氨酸(Pro)－羟脯氨酸(Hyp)的三连顺序经常出现。胶原中3条多肽链通过离子键、氢键、非极性基团疏水键和一些交联键(醛醇缩合、醛胺缩合、醛醇组胺酸交联)形成侧联接(侧链连接)、赖氨酸在胶原的交联中起主要作用。

以下为II型胶原的结构：如图1所示。

壳聚糖(CS)是甲壳素的脱乙酰化衍生物，其结构与硫酸软骨素、透明质酸等物质类似，是一种由2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖通过 β -1,4糖苷键聚合的天然聚阳离子多糖，分子量 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ 道尔顿。其分子结构式如下所示：

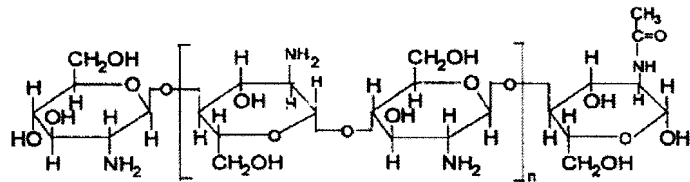
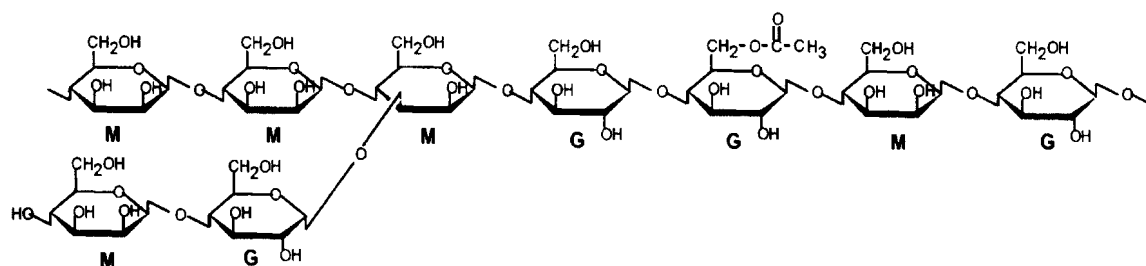


表1 II型胶原的氨基酸组成

| 氨基酸 | 含量 (%) |
|----------------------|-----------|
| 甘氨酸 | 31.4~33.8 |
| 脯氨酸 | 11.7~13.8 |
| 羟脯氨酸 | 9.4~12.5 |
| 酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺) | 11.5~12.5 |
| 碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸) | 8.5~9.5 |
| 其他氨基酸 | 余量 |

壳聚糖是甲壳素脱乙酰后的一系列碱性多糖($pK_a=6.3$)，具有独特的分子结构特征、化学性质及生物功能。它能与细胞负电成分呈现非特异相互作用，具有良好的生物相容性和生物可降解性，并可调控生物活性分子释放，降解产物为对人体无毒的N-乙酰胺基葡萄糖和氨基葡萄糖，降解过程中产生的中间产物在体内不积累，无免疫源性，壳聚糖具有优良的生物相容性、保湿性能、成膜性能等功能，在皮肤修复中已得到广泛的应用。

魔芋葡甘聚糖(KGM), 主链由 D-甘露糖和 D-葡萄糖以 β -1,4 吡喃糖苷键链接的杂多糖, 在甘露糖主链的 C₃ 位上存在着通过 β -1,3 键结合的支链结构, 大约每 32 个糖残基上有 3 个左右支链, 支链只有几个残基的长度, 并且某些糖残基上可能有乙酰基, 约每 19 个糖残基上有一个, 以酯的方式相结合。其分子量为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 道尔顿, 1% 的 KGM 水溶胶粘度为 10^4 mPa·s, KGM 的分子结构式如下所示:



目前以魔芋葡甘聚糖为基的载体已有广泛的应用, 而且以魔芋葡甘聚糖为基的细胞播植支架材料已经取得了一些进展。刘学旭、王碧等进行了胶原/葡甘聚糖/硫酸软骨素复合膜对全层皮肤损伤修复的研究, 结果表明这种复合物生物相容性良好、有促进皮肤结构再生的能力且无明显的免疫排斥反应。因此, 本发明提出的采用自然界的多糖类物质利用共混法来制备皮肤组织工程支架的方法, 将可能解决薄膜吸湿性和透水性差及形成积液而导致细菌繁殖的问题, 实现进一步的自体皮移植治疗, 在皮肤组织工程的修复中应具有较好的研究意义和广泛的应用前景。

发明内容

本发明的目的在于克服魔芋葡甘聚糖、II 型胶原、壳聚糖三者单独使用的不足, 以期采用自然界的多糖类物质(魔芋葡甘聚糖、II 型胶原、壳聚糖)利用共混法来制备皮肤组织工程支架的方法。本发明为一种高分子材料应用于皮肤或神经修复, 制得的膜的力学性能和降解性能、吸水率、水蒸气透过系数均很理想。

本发明是通过以下的技术方案实现的:

先分别配制 II 型胶原的甘油溶液、壳聚糖的质子化溶液, 将其共混均匀, 加入定量的魔芋葡甘聚糖精粉, 持续搅拌成溶胶状。将凝胶样品置于真空脱泡装置进行脱泡, 取出静置后, 浇入模具中成膜, 恒温干燥揭膜。

所述的壳聚糖的质子化溶液中所采用的质子化酸可为柠檬酸、甲酸、乙酸、丙酸、乳酸或马来酸中的任一种。

所述的Ⅱ型胶原溶液，其浓度范围为 0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为 0.5wt%~5wt%；甘油溶液的浓度范围为 0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为 0.25wt%~2.5wt%。

所述的壳聚糖的质子化溶液为，用质子化酸来溶解壳聚糖，所配的壳聚糖的溶液浓度范围为 0.1wt%~10wt%，最佳浓度范围为 0.25wt%~5wt%。

将上述Ⅱ型胶原的甘油溶液、壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉，Ⅱ型胶原的浓度范围为 0.05wt%~10wt%，最佳浓度范围为 0.25wt%~5wt%；壳聚糖的浓度范围为 0.05wt%~10wt%，最佳浓度范围为 0.25wt%~5wt%；魔芋葡甘聚糖的浓度范围为 0.1wt%~25wt%，最佳浓度范围为 0.5wt%~2wt%。

所述最终混合液的搅拌时间约为 10~60min 而成溶胶状，将凝胶样品进行真空脱泡，真空度为 10~200Pa，抽真空为 10~60min，浇制膜恒温干燥温度为 60~70℃，干燥时间为 5~9h。

所述的膜用于生物相容性实验时，用碱性溶液进行处理使其有酸性膜转化为中性或微碱性膜，其用量与质子化酸用量匹配。

所述的碱性溶液采用氨水、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸铵、碳酸氢铵、氢氧化钠、氢氧化钾的任一种。

附图说明：

图 1 为Ⅱ型胶原的结构。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明进行进一步详细描述，但发明并不限于此。本发明中 wt%为质量百分比。

实施例 1 将 0.1wt%的Ⅱ型胶原的 0.1wt%的甘油溶液与 0.1wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制 0.1wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，

取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例2 将10wt%的II型胶原的10wt%的甘油溶液与10wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制25wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例3 将0.1wt%的II型胶原的10wt%的甘油溶液与0.1wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制0.1wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例4 将0.1wt%的II型胶原的0.1wt%的甘油溶液与10wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制0.1wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例5 将0.1wt%的II型胶原的0.1wt%的甘油溶液与0.1wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制25wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例6 将10wt%的II型胶原的0.1wt%的甘油溶液与0.1wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制0.1wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例7 将10wt%的II型胶原的0.1wt%的甘油溶液与10wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制0.1wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例8 将10wt%的II型胶原的0.1wt%的甘油溶液与0.1wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制25wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例9 将1wt%的II型胶原的0.8wt%的甘油溶液与1wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制1wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取

出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例 10 将 1wt%的 II 型胶原的 10wt%的甘油溶液与 10wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制 25wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例 11 将 10wt%的 II 型胶原的 0.8wt%的甘油溶液与 1wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制 1wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

实施例 12 将 1wt%的 II 型胶原的 0.8wt%的甘油溶液与 1wt%的壳聚糖的质子化溶液混合，加入魔芋葡甘聚糖精粉配制 25wt%的溶液搅拌至凝胶状，置于真空脱泡装置进行脱泡，取出静置后，浇入模具中成膜，恒温干燥揭膜。

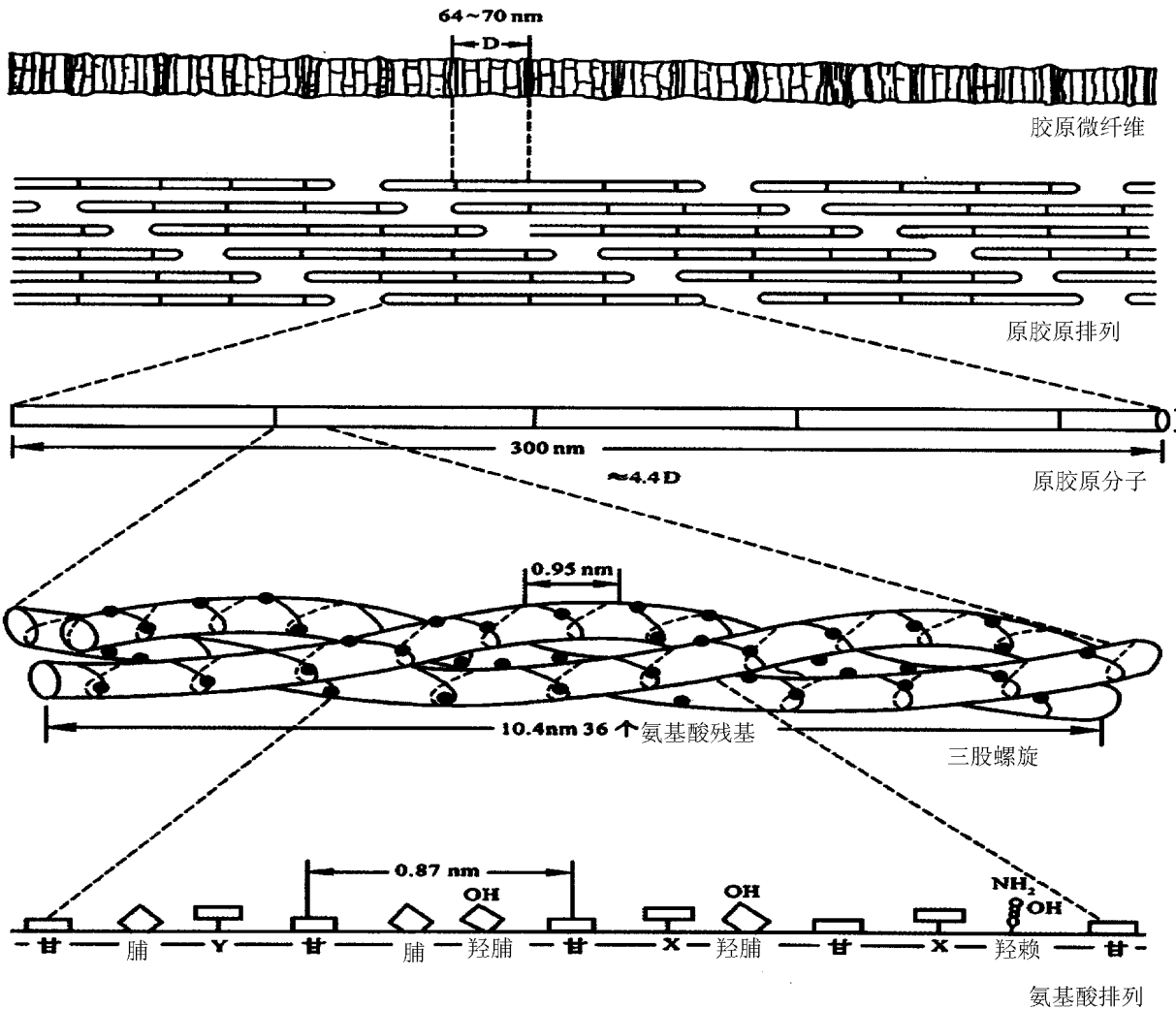


图 1



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109091708 A

(43)申请公布日 2018.12.28

(21)申请号 201810926611.7

A61L 27/24(2006.01)

(22)申请日 2018.08.15

A61L 27/22(2006.01)

A61L 27/56(2006.01)

(71)申请人 杭州市萧山区中医院

地址 311201 浙江省杭州市萧山区育才路
156号(72)发明人 郑宣 全仁夫 高旦华 冯晓燕
瞿钢 许世超 方伟利 胡云根(74)专利代理机构 杭州恒翌专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33298

代理人 王从友

(51)Int.Cl.

A61L 27/60(2006.01)

A61L 27/54(2006.01)

A61L 27/20(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

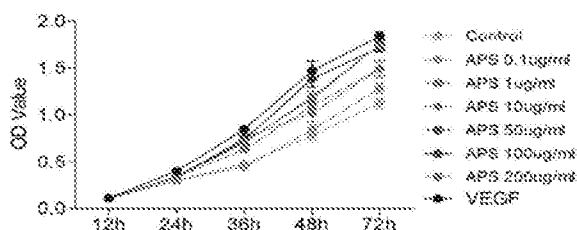
权利要求书1页 说明书12页 附图6页

(54)发明名称

胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤
三维支架

(57)摘要

本发明涉及医疗器械领域,尤其涉及人工工程皮肤领域。胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤三维支架,该工程皮肤三维支架包括胶原/丝素蛋白支架和黄芪多糖/壳聚糖微球,黄芪多糖/壳聚糖微球均匀负载在胶原/丝素蛋白支架上,黄芪多糖/壳聚糖微球与胶原/丝素蛋白支架的质量比为1:1~1:20;所述的胶原/丝素蛋白支架由胶原蛋白和丝素蛋白构成,胶原蛋白和丝素蛋白的质量百分比为1:1~5:1;所述的黄芪多糖/壳聚糖微球由黄芪多糖和壳聚糖构成,黄芪多糖包封在壳聚糖内,黄芪多糖的载药量为10~30%,黄芪多糖的浓度为0.1 μ g/ml-200 μ g/ml。该工程皮肤三维支架巧妙利用壳聚糖微球包裹黄芪多糖构建缓释系统,并复合在胶原-丝素蛋白三维支架上,以解决该生物复合材料支架促血管化的目的。



1. 胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤三维支架,其特征在于,该工程皮肤三维支架包括胶原/丝素蛋白支架和黄芪多糖/壳聚糖微球,黄芪多糖/壳聚糖微球均匀负载在胶原/丝素蛋白支架上,黄芪多糖/壳聚糖微球与胶原/丝素蛋白支架的质量比为1:1~1:20;所述的胶原/丝素蛋白支架由胶原蛋白和丝素蛋白构成,胶原蛋白和丝素蛋白的质量百分比为1:1~5:1;所述的黄芪多糖/壳聚糖微球由黄芪多糖和壳聚糖构成,黄芪多糖包封在壳聚糖内,黄芪多糖的载药量为10~30%,黄芪多糖的浓度为0.1ug/ml-200ug/ml。

2. 根据权利要求1所述的胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤三维支架,其特征在于,黄芪多糖/壳聚糖微球与胶原/丝素蛋白支架的质量比为1:5~1:10。

3. 根据权利要求1所述的胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤三维支架,其特征在于,黄芪多糖/壳聚糖微球的平均粒径为20~50 μ m,胶原/丝素蛋白支架的孔隙率为85~95%。

4. 根据权利要求1所述的胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤三维支架,其特征在于,胶原蛋白和丝素蛋白的质量百分比为2:1~3:1,所述的黄芪多糖的载药量为15~25%。

胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤三维支架

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗器械领域,尤其涉及人工工程皮肤领域。

背景技术

[0002] 皮肤是面积最大的人体器官,具有感觉、调节体温、分泌与排泄、防止水分蒸发等多种作用,其中最主要的功能是作为人体与外界环境的屏障以维持内环境的稳定,同时也是免疫系统的重要组成部分。随着我国经济、社会的快速发展,各种急、慢性致伤因素,如机械损伤、烧伤、体表肿瘤切除、慢性溃疡、交通事故、建筑事故等导致的皮肤缺损在临床上十分常见,常常导致非常严重的肢体残疾,甚至死亡。大面积皮肤缺损的治疗方法,主要有伤口覆盖物、自体皮肤移植、异体皮肤移植等,但伤口覆盖物没有生理功能,自体皮肤移植取材面积有限,异体皮肤移植免疫排斥反应大、皮肤容易脱落坏死等,易造成对患者的二次损伤,增加患者的痛苦。因此,应用组织工程皮肤修复为解决此问题带来了希望。

[0003] 近二十年来,组织工程学的迅猛发展,为大面积皮肤缺损的重建与修复提供了新的思路和治疗途径。1987年,美国国家科学基金会(NSF)在加利福尼亚举行的生物工程专家讨论会上,首次提出了组织工程的概念,并明确了组织工程的定义:“Tissue Engineering” is the application of principles and methods of engineering and life sciences toward the fundamental understanding of structure-function relationships in normal and pathological mammalian tissues and development of biological substitutes to restore, maintain, or improve tissue function。其核心是利用生命科学、材料学、计算机科学和工程学等学科的原理与方法,研究和开发产品替代、修复、改善人体各种组织和器官或使其再生的一门交叉学科。随着组织工程学的创立和发展,皮肤组织工程学迅速兴起,并成为近十年来研究的热点。经典意义上的组织工程皮肤包括表皮替代物、真皮替代物和表皮-真皮双层替代物,涉及生物支架材料、种子细胞、体内微环境、生物活性因子和刺激信号等多个方面。理想的皮肤替代物应符合如下4个条件:(1)具有相互连通的三维多孔结构,为细胞的长入、营养物质与代谢产物的转运提供便利;(2)具有良好的生物相容性和生物可降解性,并且降解速率与新生组织生成速率相匹配;(3)合适的表面化学结构,有利于细胞的黏附、增殖及分化;(4)具有与待植入部位的目标组织相匹配的机械强度。

[0004] 经过几十年的发展,目前已有多个组织工程皮肤产品问世,如ApligrafTM、OrCelTM、IntegraTM等产品已先后被美国药品与食品管理局(FDA)批准上市并应用于临床皮肤缺损的治疗中。然而,结合多年临床应用过程中遇到的问题,经文献检索,我们认为目前组织工程皮肤还面临着许多缺点和不足:1、由于血管生成能力差,易导致移植的皮肤早期没有血管系统供给营养,使皮肤替代物容易发生坏死,致移植失败;2、活性组织工程皮肤中所含的各种异体细胞容易引起免疫排斥反应,临床上常出现移植的皮肤坏死、脱落,甚至出现全身免疫反应等严重并发症,且存在传播疾病的危险;3、目前所有的组织工程皮肤产品都只能恢复正常皮肤的部分解剖结构和生理功能,无法再生具有重要功能的皮肤附属器结

构,如:血管、毛囊、皮脂腺、汗腺等;4、现阶段组织工程皮肤修复常伴有创面感染、不愈合等并发症,成活率低,治疗效果并不理想。究其原因,与创面移植物修复的早期血管化程度密切相关。目前所研究的组织工程皮肤、脱细胞真皮支架等,都不具备血管网结构,本身没有营养来源,植入体内后,需通过诱导周围组织血管长入,使其逐渐与周围组织建立血液循环、获得营养。因此,如何实现快速血管化是目前组织工程皮肤领域面临的重大难题之一。

[0005] 近年来,随着科学技术的不断发展,组织工程皮肤血管化的研究也逐渐深入,并取得了很大的成功。研究表明,通过构建复合材料缓释系统、筛选种子细胞类型、添加有效活性因子、细胞基因修饰等方式,均可促进组织工程皮肤的早期血管化。而复合生物材料以其优越的性能而备受青睐,其中,胶原蛋白(collagen,COL)-丝素蛋白(silkfibroin,SF)材料支架被发现具有很好的亲水性、组织相容性和生物降解性。胶原蛋白,是动物结缔组织的主要结构成分,不同种类动物来源的胶原具有非常相似的化学和生物学特征。胶原蛋白无毒具有较低的免疫原性、良好的生物相容性及生物可降解性,而且来源广泛,是应用最早的天然生物材料,可为细胞的贴壁、生长、增殖和定向分化提供微环境;丝素蛋白,是一种含有人体必需氨基酸的天然蛋白质,具有良好的生物相容性和力学性能,且降解缓慢。丝素蛋白由蚕丝经过脱胶制得,是一种无生理活性的天然高分子纤维蛋白,占蚕丝的70%~80%,含18种氨基酸,其中甘氨酸(Gly)约占46%、丙氨酸(Ala)约占29%、丝氨酸(Ser)约占12%。丝素蛋白由重链(H链,相对分子质量350kD)、轻链(L链,相对分子质量25.8kD)及糖蛋白p25(相对分子质量23.55kD)、3个寡糖链组成。此外,丝素蛋白存在SilkI和SilkII两种不同的构象,SilkI构象包括无规则线团和 α -螺旋,SilkII构象则为反平行 β -折叠。其中SilkI结构不够稳定,经极性溶剂、热处理等可转变成稳定的SilkII结构。Vepari等与Altman等认为丝素蛋白主要优点如下:1、具有其他天然纤维无法比拟的力学性能和柔性;2、对水和氧通透性好;3、可通过相对简单的处理获得多种不同的形态;4、有利于组织细胞长入,体内、外降解缓慢。基于上述优点,多孔丝素蛋白在皮肤组织工程支架中的应用研究日趋得到发展。因此,在胶原中加入一定比例的丝素蛋白,能有效改善其干态下的机械物理性能,如提高力学和抗水性能、降低热水溶失率、增强其对成纤维细胞、皮肤表皮细胞的黏附性,为细胞提供长久的支持,以更好的地匹配组织细胞的生长速度,而且可经过不同的处理方法达到不同的形态和孔隙要求,增强支架的弹性和多空状结构。

[0006] 作为祖国医学的瑰宝,中医中药在治疗骨伤科、皮肤科疾病方面,活血化瘀法一直被认为是最重要的治法之一。而活血药物促进血管新生的药理作用已被许多学者证实,其广泛应用于缺血性脑卒中、冠心病、骨折等疾病的临床治疗。黄芪是常用中草药,其味甘,性微温,具有益气补虚之功效,可生用,亦可炙用。生用能固表,并能排毒、生肌;炙用能益气补中;其皮可利尿逐水湿,且持续时间较长。是中医补气要药。现代药理研究发现其具有增强免疫系统,抵御疾病、增强体质,抗氧化延缓衰老,改善心功能状态,抗病毒,抗癌等功能。中医认为补气以生血,李杲《内外伤辨惑论》首载该方重用黄芪,认为黄芪能够“大补脾肺之气,以裕生血之源…使阳生阴长,气旺血生”。有学者研究发现证明黄芪具有很强的促血管再生作用,而该作用主要归功于黄芪的有效成分-黄芪多糖(Astragalus Polysacharin, APS)。黄芪多糖对体外培养的大鼠肠黏膜微血管内皮细胞增殖具有促进作用,研究发现APS在低浓度时可明显促进细胞的增殖。

[0007] 中国发明专利(公开号:CN104586775A)公开了一种治疗放射性肺炎的黄芪多糖缓

释微球,按重量计,包括:黄芪多糖1份,壳聚糖3~7份,其中壳聚糖的聚合度为30CPS,50CPS,130CPS,同时公开了该黄芪多糖缓释微球的制备方法,采用该方法制备的黄芪多糖缓释微球,具有理想的靶向效果,给药后缓慢释放,作用时间长,增强黄芪多糖在靶器官中的浓度,且不造成局部血液浓度高;产品安全、环保、对放射性肺炎的治疗效果高、副作用小;操作简便、工艺稳定、易于工业化生产;产品的包封率及载药量高;皮肤光滑细腻。

发明内容

[0008] 为了解决上述的技术问题,本发明的第一个目的是提供一种胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤三维支架,该工程皮肤三维支架巧妙利用壳聚糖微球包裹黄芪多糖构建缓释系统,并复合在胶原-丝素蛋白三维支架上,以解决该生物复合材料支架促血管化的目的。本发明的第二个目的是提供上述的工程皮肤三维支架的制备方法。

[0009] 为了实现上述的第一个目的,本发明采用了以下的技术方案:

[0010] 胶原-丝素蛋白-壳聚糖/黄芪多糖工程皮肤三维支架,该工程皮肤三维支架包括胶原/丝素蛋白支架和黄芪多糖/壳聚糖微球,黄芪多糖/壳聚糖微球均匀负载在胶原/丝素蛋白支架上,黄芪多糖/壳聚糖微球与胶原/丝素蛋白支架的质量比为1:1~1:20;所述的胶原/丝素蛋白支架由胶原蛋白和丝素蛋白构成,胶原蛋白和丝素蛋白的质量百分比为1:1~5:1;所述的黄芪多糖/壳聚糖微球由黄芪多糖和壳聚糖构成,黄芪多糖包封在壳聚糖内,黄芪多糖的载药量为10~30%,黄芪多糖的浓度为0.1ug/ml-200ug/ml。

[0011] 作为优选,所述的黄芪多糖/壳聚糖微球与胶原/丝素蛋白支架的质量比为1:5~1:10。

[0012] 作为优选,所述的黄芪多糖/壳聚糖微球的平均粒径为20~50 μ m,胶原/丝素蛋白支架的孔隙率为85~95%。

[0013] 作为优选,所述的胶原蛋白和丝素蛋白的质量百分比为2:1~3:1,所述的黄芪多糖的载药量为15~25%。

[0014] 本发明由于采用了上述的技术方案,以胶原-丝素蛋白构建的三维结构为基质制备组织支架,复合壳聚糖包裹中药单体黄芪多糖缓释系统,来构建的新型生物复合皮肤材料。该工程皮肤三维支架具有以下独特的优点:1、COL-SF支架材料具有良好的生物相容性、生物可降解性和合适的表面化学结构,其无明显毒性,不会引起皮内免疫排斥反应,具有良好的生物安全性,并在一定的时间内讲解有利于组织内细胞长入支架,符合其作为组织工程皮肤的基本条件,将大大提高临床治疗效率;2、缓释APS的COL-SF支架在制备过程和SD大鼠体内依旧保持其活性,可显著促进COL-SF支架内血管化和组织再生;3、制备的COL-SF三维支架具有相互连通的三维多孔结构,能为组织内细胞的迁移、生长、贴壁、增殖、营养物质与代谢产物的转运提供便利;4、动物移植术后能形成早期新生血管系统,将很好得解决移植皮肤容易坏死、成活率低的问题;5、相对于目前的组织工程皮肤产品,此新型皮肤复合材料将更大程度的恢复和再生正常皮肤组织的解剖结构和生理功能。

[0015] 本发明工程皮肤三维支架具有良好的生物相容性,可以促进新生皮肤血管网络再生,提高新生皮肤修复的速度和效率,增强修复重建的生物活性,有利于新生皮肤组织的重塑,为机械损伤、体表肿瘤切除、交通事故和建筑事故等导致的大面积皮肤缺损的治疗,提供源源不断且高效的新型组织工程皮肤来源,为创伤骨科、烧伤外科和修复重建外科对大

面积皮肤缺损的治疗,开辟了一种崭新的将组织工程皮肤和中医药理论相结合的途径。

附图说明

[0016] 图1为APS对HUVEC细胞增殖的影响。在培养12,24,36,48和72h后用MTT法分析细胞的增殖。

[0017] 图2为APS对HUVEC细胞迁移的影响。A:对照组;B:0.1 μ g/mL APS;C:1 μ g/mL;D:10 μ g/mL;E:50 μ g/mL;F:100 μ g/mL;G:200 μ g/mL;H:20ng/mL VEGF。

[0018] 图3为流式细胞仪检测HUVEC被相应处理24小时后的细胞周期。A:对照组;B:0.1 μ g/mL APS;C:1 μ g/mL;D:10 μ g/mL;E:50 μ g/mL;F:100 μ g/mL;G:200 μ g/mL;H:20ng/mL VEGF。

[0019] 图4为流式细胞仪检测HUVEC被相应处理24小时后的细胞凋亡。A:对照组;B:0.1 μ g/mL APS;C:1 μ g/mL APS;D:10 μ g/mL APS;E:50 μ g/mL APS;F:100 μ g/mL APS;G:200 μ g/mL APS;H:20ng/mL VEGF。

[0020] 图5为图4中流式细胞仪检测细胞凋亡率图。

[0021] 图6为荧光倒置显微镜检测HUVEC被相应处理24小时后的VEGF表达(200X)。A:对照组;B:0.1 μ g/mL APS;C:1 μ g/mL APS;D:10 μ g/mL APS;E:50 μ g/mL APS;F:100 μ g/mL APS;G:200 μ g/mL APS;H:20ng/mL VEGF。

[0022] 图7为黄芪多糖/壳聚糖微球光镜下观察结果。

[0023] 图8为黄芪多糖/壳聚糖微球扫描电子显微镜下观察结果。

[0024] 图9为黄芪多糖/壳聚糖微球体外缓释曲线。

[0025] 图10为复合支架扫描电子显微镜下观察结果。

具体实施方式

[0026] 实施例1黄芪多糖对huvec增殖的影响

[0027] 1.实验目的

[0028] (1)研究黄芪多糖(APS)体外对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)细胞周期的影响。

[0029] (2)研究黄芪多糖(APS)体外对内皮细胞生长因子(VEGF)表达的影响。

[0030] 2.实验试剂及仪器

[0031] 2.1实验试剂

[0032] 实验所需试剂见表1-1。

[0033] 表1-1实验试剂

| | 试剂名称及规格 | 生产厂商 |
|--------|----------------------------|--------------|
| [0034] | 黄芪多糖 (APS) | 山西芮城科龙制药有限公司 |
| | M200 细胞培养基 | 美国 Gibco 公司 |
| | 胎牛血清 | 美国 Gibco 公司 |
| | 胰蛋白酶 | 美国 Gibco 公司 |
| | PBS | 美国 Gibco 公司 |
| | VEGF | 杭州纽龙生物公司 |
| | 鼠抗人 VEGF 单抗 | Abcam |
| | 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 | 康成生物 |
| | AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒 | 碧云天生物 |
| | 细胞周期检测试剂盒 | 碧云天生物 |

[0035] 2.2实验仪器

[0036] 实验所需试剂见表1-2。

[0037] 表1-2实验仪器

| | 仪器设备及型号 | 生产厂商 |
|--------|-------------------|---------------------|
| [0038] | 电子天平 AL204 | 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司 |
| | 数显式恒温水浴锅 XMTD-204 | 上海博讯实业有限公司 |
| | 二氧化碳培养箱 HW30 | Thermo |
| [0039] | 荧光倒置显微镜 DHG-9070A | 日本 Nikon |
| | 流式细胞仪 TU-1810SPC | 美国 BD 公司 |
| | 电动磁力搅拌器 GL-3250B | 海门市其林贝尔仪器制造有限公司 |
| | 超净工作台 H2050R-1 | 苏州净化设备有限公司 |
| | 电子显微镜 JSM-5610 | 日本电子株式会社 |

[0040] 3.实验步骤

[0041] 3.1 MTT法检测细胞增殖

[0042] HUVEC经PBS洗涤,消化,用含0.5%FBS的M200培养基制成细胞悬液。经细胞记数,按每孔 5×10^3 /150 μ L接种与96孔板。全培养基培养24小时后弃去培养液,换上只含有0.5%FBS的培养基预处理24小时,以达到细胞同步化。分别加入对照组,实验组和阳性对照组培养基。继续常规培养12,24,36,48,72小时后,加入MTT溶液50 μ L,使用酶标仪按MTT法测定各孔490nm和690nm的吸光度(OD值)。每组设3个复孔,至少重复三次实验。

[0043] 3.2 Transwell小室检测细胞迁移

[0044] 采用transwell小室迁移法检测。Transwell小室为8.0 μ m膜。HUVEC经PBS洗涤,消化,用含0.5%FBS的M200培养基制成细胞悬液。血球计数板计数后,调整HUVEC的密度为 1×10^5 /ml;取200 μ L HUVEC细胞加入24孔板transwell上室,下室分别加入600 μ L空白组,实验组和阳性对照组。每组设置3个复孔。将培养板放入37℃ 5%CO₂的培养箱中孵育24h。培养结束后,取出上层小室,用棉签拭去小室内的细胞,后以20%乙醇固定细胞10min。PBS洗去未固定的细胞。用0.1%结晶紫染色Transwell下表面的细胞20min,PBS洗涤3次。在100x显微镜下每个孔随机选取5个视野,计数着色细胞。用Image ProPus软件进行分析。3.3细胞

周期检测

[0045] 采用流式细胞仪检测。HUVEC经PBS洗涤,消化,用含0.5%FBS的M200培养基制成细胞悬液。经细胞记数,按每孔 1×10^5 /2ml接种于6孔板。全培养基培养24小时后弃去培养液,换上只含有0.5%FBS的培养基预处理24小时,以达到细胞同步化。分别加入2ml对照组,实验组和阳性对照组培养基。继续常规培养24小时后,离心收集细胞,PBS洗涤2次,弃上清,加入1ml预冷的70%乙醇,细胞吹打成单细胞悬液固定,4℃存放。PBS洗涤固定的细胞2次,2000rpm离心5min,加入n(终浓度为20μg/ml)和RNaseA(终浓度为50μg/ml),37℃避光染色30min,上机前将细胞混匀,过200目尼龙网。30分钟内上机检测。采用美国BD公司生产的流式细胞仪进行DNA测量,激发波长480nm,检测细胞周期分布情况。应用BD公司提供的相应软件程序进行资料处理。

[0046] 3.4细胞凋亡检测

[0047] 采用流式细胞仪检测。HUVEC经PBS洗涤,消化,用含0.5%FBS的M200培养基制成细胞悬液。经细胞记数,按每孔 1×10^5 /2ml接种与6孔板。全培养基培养24小时后弃去培养液,换上只含有0.5%FBS的培养基预处理24小时,以达到细胞同步化。分别加入2ml对照组,实验组和阳性对照组培养基。继续常规培养24小时后,离心收集细胞,PBS洗涤2次,收集各组细胞 1×10^6 个于离心管中。将细胞重悬于500μL Buffer液中,分别加入5μL PI和5μL AnnexinV-FITC,室温避光孵育30min后混匀转到流式管中用于检测。

[0048] 3.6细胞免疫荧光染色

[0049] HUVEC经PBS洗涤,消化,用含0.5%FBS的M200培养基制成细胞悬液。经细胞记数,按每孔 1×10^5 /2ml接种与6孔板。全培养基培养24小时后弃去培养液,换上只含有0.5%FBS的培养基预处理24小时,以达到细胞同步化。分别加入2ml对照组,实验组和阳性对照组培养基。继续常规培养24小时后,PBS清洗3次。4%多聚甲酸固定细胞60min,PBS清洗3次。滴加5%正常山羊血清封闭30min后直接滴加滴加兔VEGF单克隆抗体(1:100稀释),常温孵育90min。PBS清洗3次后滴加FITC标记的山羊抗兔荧光二抗(1:100稀释),室温避光孵育60min。PBS清洗3次,滴加DAPI标记细胞核,室温避光孵育10min。PBS清洗3次,直接荧光显微镜观察细胞绿色荧光的多少。DAPI标记细胞核,荧光显微镜观察为蓝色。

[0050] 4.实验结果

[0051] 4.1 APS对HUVEC细胞增殖的影响

[0052] MTT法表明,APS在一定的范围内(0.1-100μg/ml)能促进huvec细胞增殖,呈剂量依赖性。APS作用24、48、72h后,该剂量范围组OD值均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。72h后作用最为明显,100μg/ml APS组较空白对照组细胞增值率达158.80%。

[0053] 如图1所示,APS对HUVEC细胞增殖的影响。在培养12,24,36,48和72h后用MTT法分析细胞的增殖。

[0054] 4.2 APS对HUVEC迁移的作用

[0055] 如图2所示,与对照组相比,APS对HUVEC对迁移作用与浓度成正比,并在100μg/mL时作用达到最高。200μg/mL APS对HUVEC的迁移作用较100μg/mL降低。对照组相比,APS在0.1μg/ml,1μg/ml,10μg/ml,50μg/ml,100μg/mL,200μg/mL时使HUVEC迁移率分别提高了12.092%,39.328%,57.835%,72.253%,112.875%,76.923%。

[0056] 4.3 APS对HUVEC细胞周期的影响

[0057] 流式细胞周期检测结果显示APS组, VEGF组均能使HUVEC细胞周期G2/M和S期比例增加。空白对照组G0/G1期, G2/M期和S期分别为50.67%, 23.49%, 10.21%。随着APS浓度增加, G2/M期和S期的比例增加, 10ug/ml时与空白对照组相比即有统计学意义。APS浓度在100ug/ML时达到最高, G2/M期和S期分别为40.67%和13.01%。VEGF组作用小24h后, G0/G1期, G2/M期和S期分别为32.87%, 40.67%和15.59%, 其作用较空白对照组有统计学差异。如图3所示, 表明处理细胞后可以诱导细胞周期向G2/M期和S期转变。

[0058] 4.4检测细胞凋亡

[0059] 流式细胞仪检测细胞凋亡率如图5所示。空白对照组, APS组和VEGF组作用24h后Q2期和Q3期凋亡率没有明显改变。如图4所示, 表明APS对HUVEC无明显的毒性作用。

[0060] 4.5细胞免疫荧光染色

[0061] EGF是HUVEC细胞特异性促增长因子, 可促进HUVEC细胞形成血管网[3]。如图6所示, 空白对照组HUVEC细胞仅少量表达VEGF。APS, VEGF组均能刺激HUVEC细胞表达更多的VEGF。随着APS浓度的增加, VEGF表达量增加, 并在100μg/mL时VEGF表达量最高, 为空白对照组表达量的倍, 有显著统计学差异。100μg/mL APS较空白组VEGF表达增加, 比VEGF组表达量略低, 是VEGF组VEGF表达量的88.9%。如图6表明, APS可以促进HUVEC细胞表达VEGF, 这对于HUVEC细胞早提血管化尤其重要。

[0062] 5. 结论

[0063] 体外实验显示, 本次制得的黄芪多糖/壳聚糖微球在48h内可较稳定地释放药物, 且不存在突释现象。本实验发现APS在一定浓度范围内具有促进HUVEC增殖的作用, 促进HUVEC细胞周期从G0/G1期向G2/M期和S期转变, 并且与剂量成正比, 在100μg/mL时达到最高。APS作用24h后, 100μg/mL组和VEGF组G2/M期和S期分别为40.67%和13.01%以及40.67%和15.59%, 而空白对照组G2/M期和S期分别为23.49%和10.21%。且24h作用后, 流式细胞凋亡检测显示APS并未增加HUVEC凋亡率, APS促进内皮细胞增殖和血管化作用而不产生副作用。细胞免疫荧光染色实验结果表明, APS作用24h后, HUVEC的VEGF表达也与APS剂量成正相关, 100μg/mL APS促进HUVEC的VEGF表达比较空白对照组有明显的提高。200μg/mL时APS作用较100μg/mL略下降, 这一现象可能是由于APS浓度为200μg/mL时出现的轻微细胞毒性。

[0064] 以上研究结果证实APS有良好的促进HUVEC细胞增殖, 增加HUVEC细胞周期中G2/M期和S期的比例。同时APS可以上调HUVEC细胞VEGF表达, 可以进一步促进新生血管的生成。

[0065] 实施例2负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架的制备及质量评价

[0066] 1. 实验目的

[0067] (3) 采用乳化-交联法制备黄芪多糖/壳聚糖微球, 并优化制备方案;

[0068] (4) 构建负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架。

[0069] 2. 实验试剂及仪器

[0070] 2.3实验试剂

[0071] 实验所需试剂见表2-1。

[0072] 表2-1实验试剂

| | 试剂名称及规格 | 生产厂商 |
|--------|-------------------------|----------------|
| [0073] | 壳聚糖（脱乙酰度 90%、分子量 100 万） | 浙江金壳药业有限公司 |
| | 黄芪多糖 | 萧山市中医院提供 |
| | 2,6-无水葡萄糖标准品 | 中国食品药品检定研究院 |
| | 戊二醛（25%） | 国药集团化学试剂有限公司 |
| | 液体石蜡（药用） | 无锡市佳妮化工有限公司 |
| | 冰乙酸 | 无锡市佳妮化工有限公司 |
| | Span-80 | 广东光华科技有限公司 |
| | 异丙醇 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| | 石油醚 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| | 胶原蛋白 | 嘉兴恒杰生物制药有限公司 |
| | 丝素蛋白 | 江莱生物有限公司 |
| | 磷酸氢二钠 | 天津市科密欧化学试剂有限公司 |
| | 磷酸二氢钠 | 天津市科密欧化学试剂有限公司 |

[0074] 2.4实验仪器

[0075] 实验所需试剂见表2-2。

[0076] 表2-2实验仪器

| | 仪器设备及型号 | 生产厂商 |
|--------|---------------------|---------------------|
| [0077] | 电子天平 AL204 | 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司 |
| | 数显式恒温水浴锅 XMTD-204 | 上海博讯实业有限公司 |
| | 拆叶式搅拌器 HW30 | 上海恒川机械设备有限公司 |
| | 电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9070A | 杭州蓝天化验仪器厂 |
| | 紫外分光光度计 TU-1810SPC | 北京普析通用仪器有限公司 |
| | 电动磁力搅拌器 GL-3250B | 海门市其林贝尔仪器制造有限公司 |
| | 高速冷冻离心机 H2050R-1 | 湖南湘仪离心机仪器有限公司 |
| | 离子溅射仪 JFC-1600 | 日本电子株式会社 |
| | 冷冻干燥机 SCIENTZ-12N | 宁波新芝生物科技有限公司 |
| | 扫描电子显微镜 JSM-5610 | 日本电子株式会社 |

[0078] 3.实验步骤

[0079] 3.5黄芪多糖/壳聚糖微球制备

[0080] 采用乳化-交联法制备黄芪多糖/壳聚糖微球,具体步骤如下:

[0081] (1) 精确称取2g壳聚糖固体,50℃水浴条件下,加至100mL 2%的冰乙酸溶液中,40rpm搅拌,使壳聚糖完全溶解,获得壳聚糖-冰乙酸溶液。

[0082] (2) 精确称取1g黄芪多糖,加至制备好的壳聚糖-乙酸溶液中,搅拌使其完全溶解,然后量取20mL混合溶液。

[0083] (3) 在烧杯中加入90mL含2mL Span-80的液体石蜡作为油相,将壳聚糖混合溶液逐滴加入到油相,50℃水浴条件下,40rpm搅拌30min使其乳化并维持20min。

[0084] (4) 待乳化结束后,向溶液中加入2mL 25%的戊二醛。50℃水浴条件下,40rpm搅拌3h后,将反应物转移至离心管,静置离心,弃上层液,石油醚洗涤沉淀3次。

[0085] (5) 将洗涤好的混合物进行真空抽滤,同时用异丙醇淋洗,预期获得橘黄色固体粉末,即为黄芪多糖/壳聚糖微球。将在载药微球取出,放在干净的表面皿上,50℃的恒温烘箱中烘干24h。

[0086] 3.6负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架的制备

[0087] 采用溶液浇注-冷冻干燥技术,具体制备过程如下:

[0088] (1) 将胶原蛋白与丝素蛋白分别溶于一定体积的蒸馏水中,配成3.5%的胶原蛋白水溶液以及1.5%的丝素蛋白水溶液中。

[0089] (2) 将胶原蛋白水溶液与丝素蛋白水溶液按照溶质蛋白质量比7:3混合,在将制备好的黄芪多糖/壳聚糖微球按一定的量加入到混合液中,充分搅拌混匀。

[0090] (3) 将上述含有微球的混合溶液加至事先做好的模具容器内,-20℃预冻成型,然后-60℃真空干燥48h至72h,获得的支架为圆柱形,底面半径为0.70cm,高度为0.50cm,每个支架含有黄芪多糖/壳聚糖微球0.1g。

[0091] 4.性能测试

[0092] 4.1形貌粒径观察

[0093] 采用离子溅射仪对黄芪多糖/壳聚糖微球及负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架做导电处理,喷镀电流为10mA,时间为40s。然后,应用扫描电镜对处理好的样品进行表面形貌观察,并通过图像测量和分析,计算微球平均粒径。

[0094] 4.2载药率和包封率

[0095] 采用蒽酮-硫酸比色法测定黄芪多糖/壳聚糖微球载药率及包封率。首先,称取蒽酮0.2g,加至100mL浓硫酸中,充分搅拌溶解,得到蒽酮试剂。然后,取6支带塞试管,精密配制一系列葡萄糖溶液,浓度依次为0、10、20、30、40、50μg/mL,每支试管1mL,每个浓度做3次重复。然后,迅速向每只试管中加入蒽酮试剂4mL,振荡混匀后,各管同时置于沸水中加热10min。取出,迅速浸入冰水中冷却并放置10min。以0μg/mL管为空白,分别用紫外分光光度计于620nm处测定吸光度A,并以浓度(μg/mL)为横坐标、吸光度A为纵坐标,绘制标准曲线。

[0096] 取一定量的黄芪多糖/壳聚糖微球于研钵中充分研磨后,移至烧杯中,加入蒸馏水充分溶解黄芪多糖(可超声助溶),离心取上清,蒸馏水定容后,于620nm处测定吸光度A,并根据标准曲线计算黄芪多糖浓度。微球载药率及包封率的计算公式如下:

[0097] 载药率=(微球内药量/微球总质量)×100%

[0098] 药物包封率=(微球内药量/加入的总药量)×100%

[0099] 4.3微球体外释放行为

[0100] 精确称取一定量的黄芪壳聚糖微球于pH 7.4的磷酸缓冲液中,模拟药物体内释放条件,设置转速为200rpm,温度为37℃±5℃。分别于0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、8、10、12、20、25、30、48h各取样5.0mL,并补充5.0mL新鲜介质溶液。然后,采用紫外分光光度计于620nm处测定样品吸光度A,并根据标准曲线计算黄芪多糖浓度以及药物累计释放率,公式如下:

[0101] 累计释放率=药物释放总量/(载药微球重量×载药率)×100%

[0102] 4.4孔隙率测定

[0103] 采用介质浸泡法测定支架孔隙率。首先测定样本的底面半径(r)以及高度(h),并计算出支架体积。然后,称得干燥样品在空气中的质量记为m1,将支架浸入液体石蜡(密度为ρ)中待其饱和(可通过负压脱气)后,再取出样品,轻轻擦去样品表面的介质。再次称量样品质量记为m2,并根据公式计算出孔隙率:

[0104] $\text{孔隙率}(\%) = (m_2 - m_1) / \rho / (\pi r^2 h) \times 100\%$

[0105] 5.实验结果

[0106] 5.1黄芪多糖/壳聚糖微球载药量及包封率

[0107] (1)标准曲线

[0108] 分别以药物浓度(C)和吸光度(A)为横坐标及纵坐标,绘制黄芪多糖在溶液中的散点图及线性拟合曲线,并推算线性拟合方程为 $Y = 0.0056X - 0.0007$, $R^2 = 0.9996$, 620nm处,黄芪多糖在10μg/ml~50μg/ml浓度范围内线性关系良好。

[0109] (2)样品包封率及载药率

[0110] 根据测得的载药微球在溶液中的吸光度,代入线性拟合方程,计算出药物浓度,每个测试点平行测量3次,得出黄芪多糖/壳聚糖微球的载药率为13.7%,包封率为70.6%。

[0111] 5.2黄芪多糖/壳聚糖微球光镜及扫描电镜结果

[0112] (1)光镜下观测结果

[0113] 黄芪多糖/壳聚糖微球外观呈橘黄色粉末,颗粒分散均匀,无粘连。显微镜下微球呈橘黄色圆球状,微球大小比较均一,见图7。

[0114] (2)扫面电子显微镜下观测结果

[0115] 壳聚糖载药微球的球形形态较好,微球平均粒径为35μm,分散性较好,少量微球之间有粘连现象,见图8。

[0116] 5.3黄芪多糖/壳聚糖微球体外释放结果

[0117] 将制备的黄芪/壳聚糖微球置于pH 7.4的PBS缓冲溶液中测试其体外缓释性质,所得缓释曲线如图9所示。从载药微球的累积释放时间曲线可以看出在2h内黄芪多糖释放量达到50%,在8h内黄芪多糖释放量达到70%,说明载药微球前期释放速度稍快,但是没有突释现象出现。在10h后载药微球释放速度变缓,缓释效果明显,在48h后黄芪多糖累积释放接近100%,基本完成释放。整个缓释过程,累积缓释曲线是逐渐上升的,载药微球有明显的缓释效果。

[0118] 5.4负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架孔隙率分析

[0119] 负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架的质地均匀。根据三次平行测量的结果可知(表2-3),负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架的孔隙率为90.8%,较为合理,有利于细胞营养物质的吸收和废物的排放。

[0120] 表2-3复合支架孔隙率分析

| 样品 | 实验数据 | | | | |
|----------|--------|--------|---------|---------|------|
| | m1/g | m2/g | 半径 r/cm | 高度 h/cm | 孔隙率% |
| [0121] 1 | 0.1609 | 0.7448 | 0.69 | 0.51 | 90.6 |
| 2 | 0.1519 | 0.7419 | 0.69 | 0.51 | 91.6 |
| 3 | 0.1555 | 0.7428 | 0.70 | 0.50 | 90.3 |

[0122] 5.5

[0123] 5.6负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架电镜结果

[0124] 组织工程支架的表面微结构(如孔的尺寸、分布、孔的形态及孔隙率)均影响细胞的黏附、增殖和分化。根据扫描电镜结果(图10)显示,负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架孔隙较大,形态良好,微球在其中分布均匀。

[0125] 6.结论

[0126] (1)经重复实验优化处理,制备出载药率13.7%、包封率70.6%的黄芪多糖/壳聚糖微球,其平均粒径为35 μ m。光镜及扫描电镜下观察,黄芪多糖/壳聚糖微球形态较好,分散性较好,只有少量微球之间有粘连现象。

[0127] (2)体外实验显示,本次制得的黄芪多糖/壳聚糖微球在48h内可较稳定地释放药物,且不存在突释现象。

[0128] (3)负载黄芪多糖/壳聚糖微球的胶原/丝素蛋白支架质地均匀,孔隙率为90.8%。扫描电子显微镜下观察,复合支架孔隙较大,形态良好,微球在其中分布均匀,有利于黄芪多糖在人体内的缓慢长效稳定释放,也有利于细胞的物质交流及废物排放。

[0129] 实施例3制备胶原-丝素蛋白-壳聚糖(COL-SF-CTS)三维支架

[0130] 1、I型胶原的提取与纯化

[0131] 取新鲜的牛腹,剔除肌肉、脂肪和筋膜,用三蒸水反复冲洗。取适量处理的牛腱剪成碎块,用0.1%的Na₂CO₃浸泡2h,再用三蒸水冲洗5次。将牛腱碎块移入研钵,倒入适量液氮充分冷冻,然后用组织匀浆机将其打成牛腱粉末,-20℃下保存备用。取适量牛腱粉末,加入0.5%乙酸溶液加1%胰蛋白酶溶液4℃下充分溶胀、消化24h以上,然后加入几滴H₂O₂,充分混匀后静置10-15min。加入3%乙酸1000ml,充分混匀后,布氏漏斗过滤,将未溶胀的牛腱颗粒过滤掉。溶胀物于离心机中离心(2000rpm/min,15min)以除去不溶物。后以5%NaCl溶液盐析、离心(2000rpm/min,5min),收集沉淀。沉淀物于3%乙酸中充分溶胀,未溶胀牛腱颗粒再溶胀后上述步骤。4℃下三蒸水中透析72h,每12h换水一次。透析后的胶原,经冷冻冻干后于4℃下保存备用。

[0132] 2、壳聚糖微球(CTS)制备

[0133] (1)10g壳聚糖溶于100ml双蒸水中配制成100ml明胶溶液(浓度为10%),在95℃快速均匀搅拌直至溶解,其间将大豆油放在水浴锅中预热。

[0134] (2)磁力搅拌器上放100ml烧杯,内放磁子,先将100ml大豆油倒入烧杯,再倒入5ml壳聚糖溶液使二者混合,45℃搅拌10min,搅拌速度尽可能最大。

[0135] (3)搅拌同时将反应物冰水浴冷却(准备500ml烧杯,放在搅拌器上,内放冰水和磁子,将明胶和大豆油混合物缓慢倒入冷却)。壳聚糖冷却即凝结。

[0136] (4)分液漏斗分液,去除下层水相,加入预冷却丙酮,充分洗涤。

[0137] (5)将反应物倒入烧杯内,用丙酮洗涤三次,除去残余大豆油。

[0138] (6)加入0.5%的戊二酸溶液,交联固化2h。

[0139] (7)加适量的甘氨酸,以除去未反应的交联剂,所得产品用离心机在3000r/min下离心,样品抽滤,丙酮洗涤三次,自然晾干,得到浅黄色的粉末产物即为壳聚糖微球。

[0140] (8)将实验所需剂量的黄芪多糖溶液或者VEGF溶液直接滴加入2mg干燥的壳聚糖微球(溶液体积在明胶微球的膨胀率范围内),待自然晾干后APS和VEGF即包被于壳聚糖微球内,以用于后续实验。

[0141] 3、胶原-丝素蛋白 (COL-SF) 三维支架和胶原-丝素蛋白-壳聚糖微球 (COL-SF-CTS) 复合支架制备

[0142] 用0.5M的乙酸分别将胶原、丝素蛋白配制成0.5% (w/v) 的溶胀液, 胶原和壳聚糖溶胀液按体积比9:1的质量比共混, 搅拌均匀即得到胶原/丝素蛋白混合液, 真空脱泡后于4℃保存备用。制备胶原/丝素蛋白-壳聚糖微球复合支架前需将胶原/丝素蛋白混合液与上步骤所制得的2mg内含所需APS或VEGF剂量的壳聚糖微球(一个复合支架内壳聚糖微球量)混合。将制备的胶原/丝素蛋白混合液或者制备胶原/丝素蛋白-壳聚糖微球混合液中逐滴加入0.5% (w/v) 的戊二酸水溶液, 室温交联2小时。后均匀注入模具, -70℃冷冻过夜后置冻干机中冻干24h得到胶原/丝素蛋白三维支架或者胶原/丝素蛋白-壳聚糖微球复合支架。

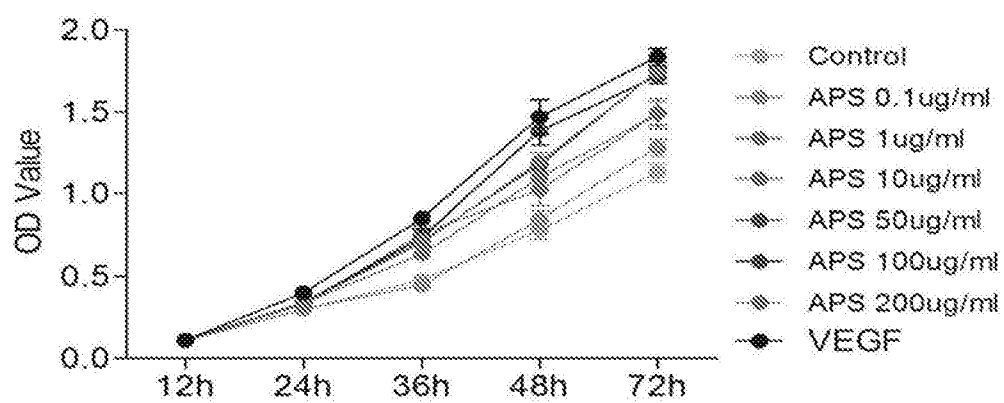


图1

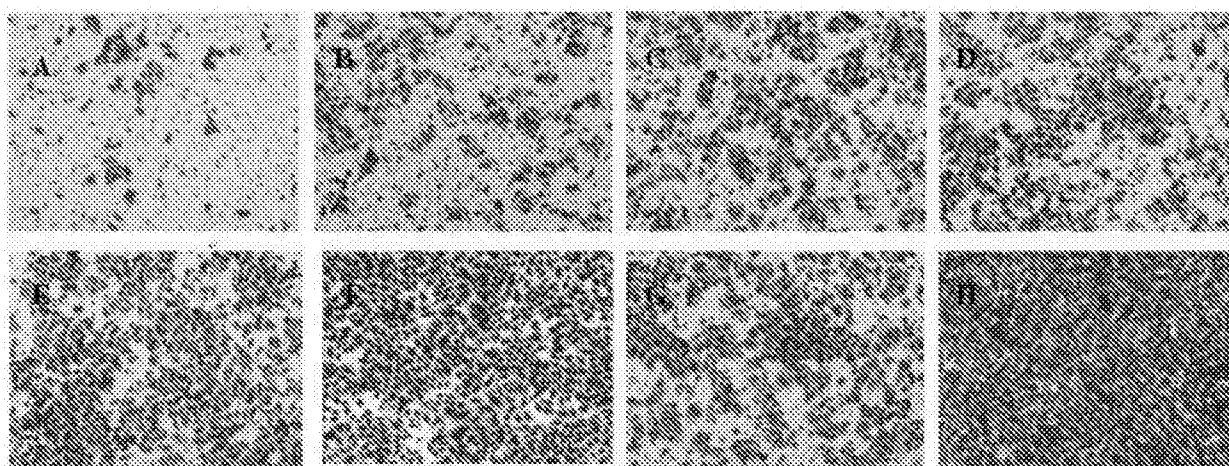


图2

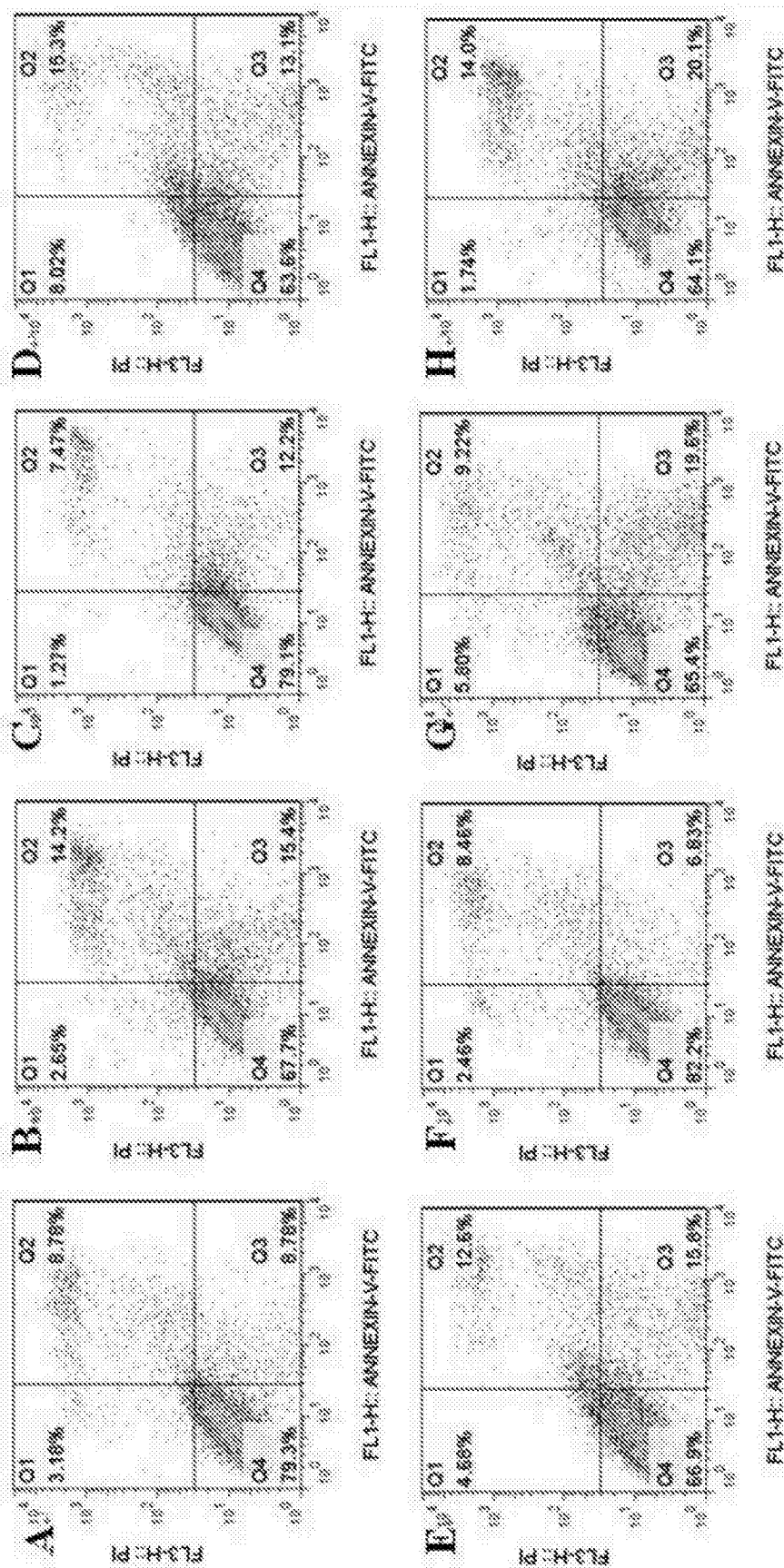


图4

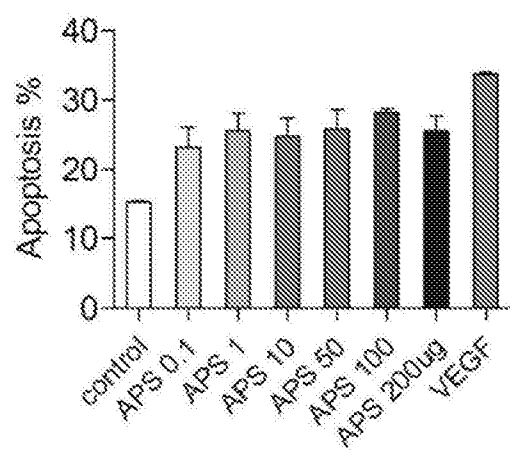


图5

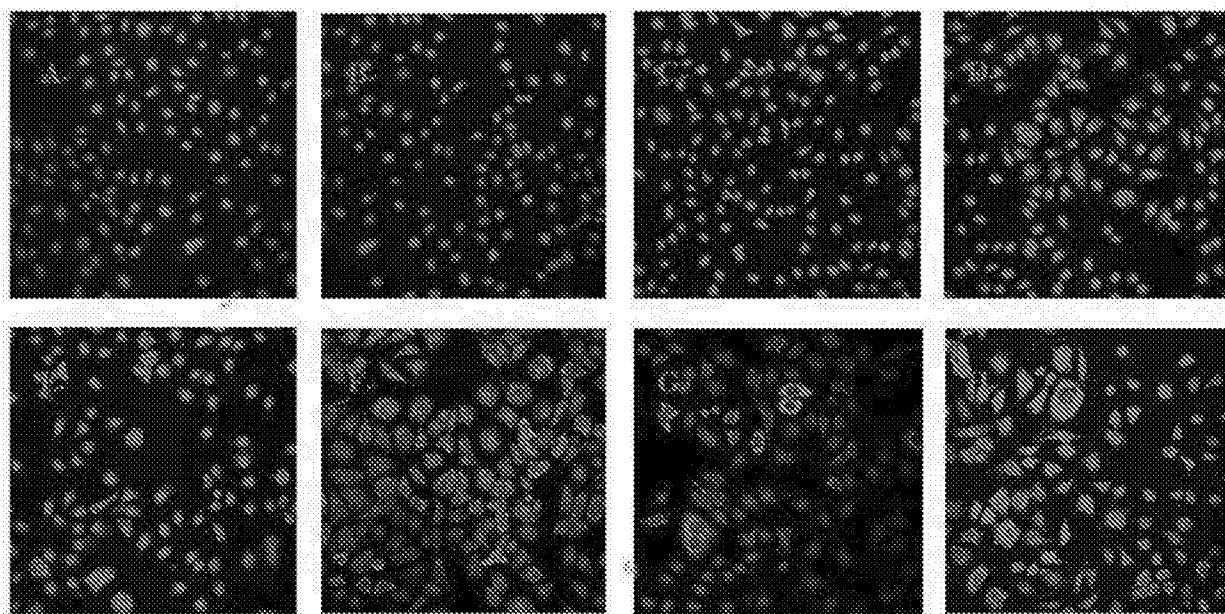


图6

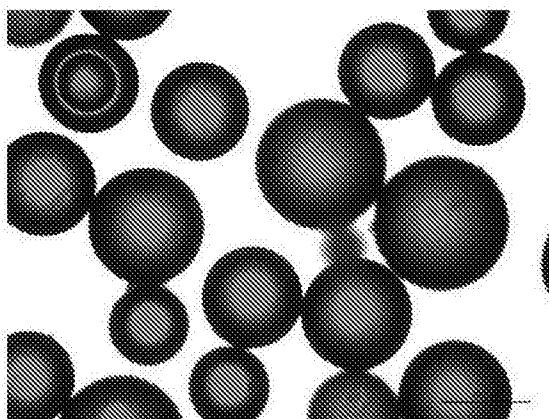


图7

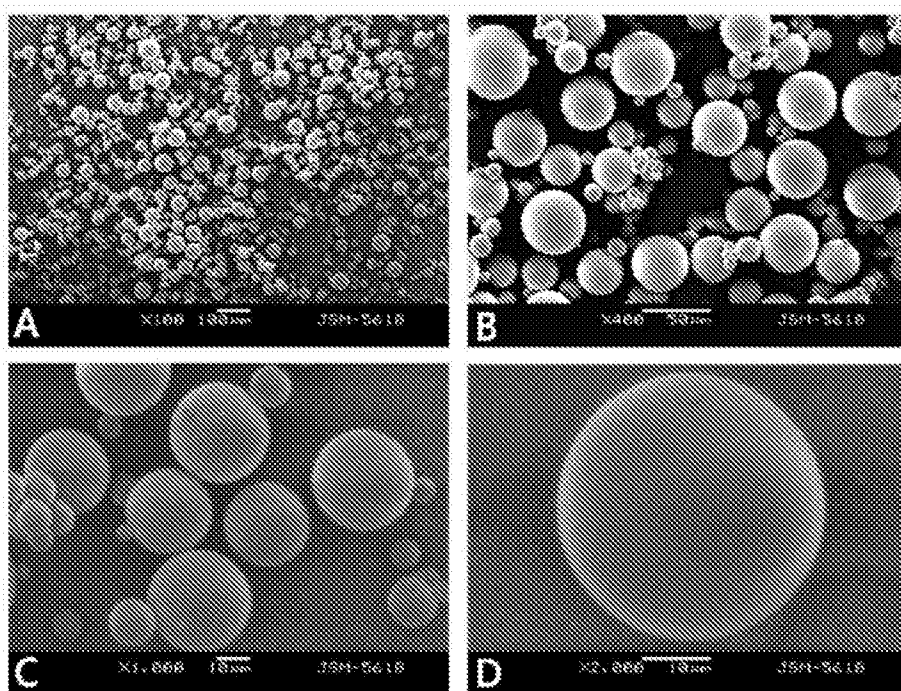


图8

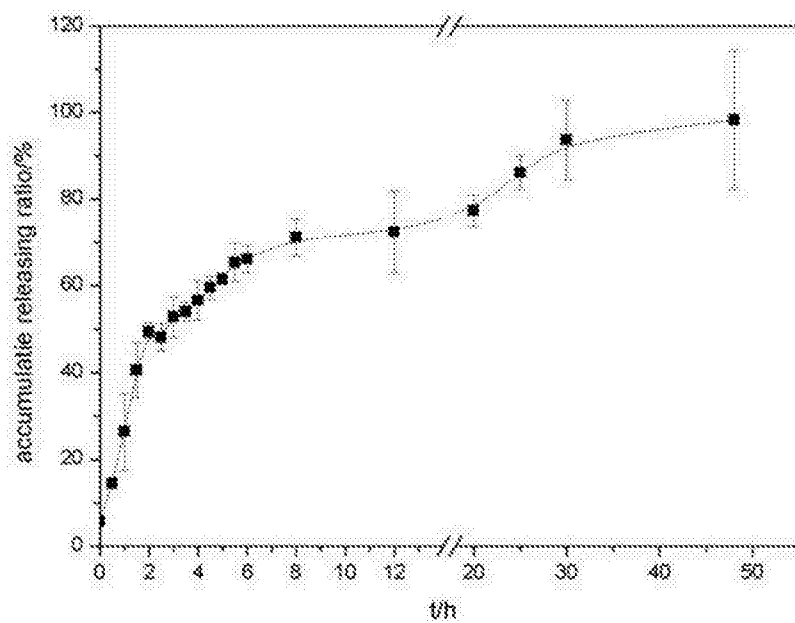


图9

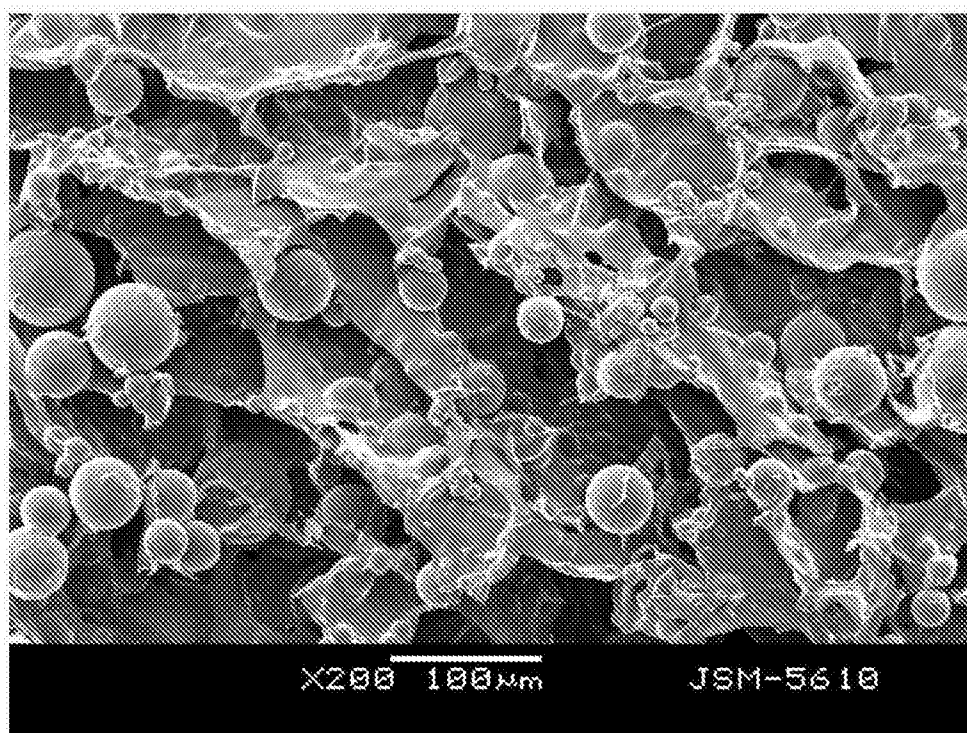


图10