



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114288464 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 07

(21) 申请号 202111401631.0

US 2020030496 A1, 2020.01.30

(22) 申请日 2021.11.24

US 2021128688 A1, 2021.05.06

(65) 同一申请的已公布的文献号

US 2020360281 A1, 2020.11.19

申请公布号 CN 114288464 A

CN 107496348 A, 2017.12.22

CN 113616851 A, 2021.11.09

(43) 申请公布日 2022.04.08

CN 111068069 A, 2020.04.28

(73) 专利权人 中国科学院理化技术研究所

Tong Shen等.Sulfated chitosan rescues dysfunctional macrophages and accelerates wound healing in diabetic mice.《Acta Biomaterialia》.2020,第117卷第192-203页.

地址 100190 北京市海淀区中关村东路29号

(72) 发明人 朱萌 牛忠伟 陈禹州 鞠晓燕

Kai Wang等.Exosomes laden self-healing injectable hydrogel enhances diabetic wound healing via regulating macrophage polarization to accelerate angiogenesis.《Chemical Engineering Journal》.2021,第430卷第1-15页.

(74) 专利代理机构 北京正理专利代理有限公司

11257

专利代理师 赵晓丹

(51) Int.Cl.

A61L 26/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 113214507 A, 2021.08.06

审查员 王俊尧

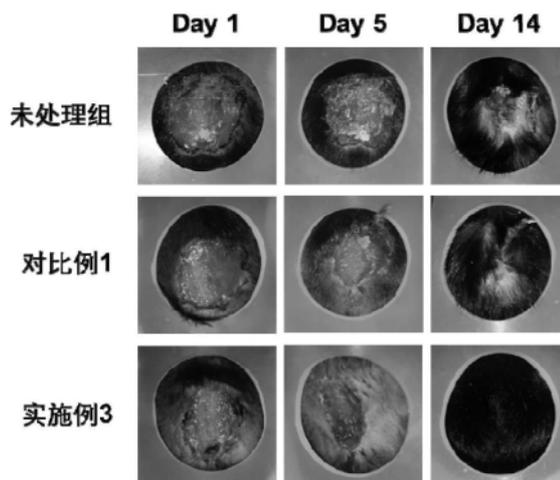
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种抗菌促愈合水凝胶敷料及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开一种抗菌促愈合水凝胶敷料,包括0.01-10wt%的抗菌促愈合材料、1-20wt%的聚乙烯醇和1-20wt%的明胶。该敷料具有与天然细胞外基质类似的物理和化学环境,可长时间停留在伤口部位并与体液进行交换,为细胞和组织的生长提供营养物质和空间;同时敷料中的抗菌促愈合材料能够有效抗菌,及时控制感染,促愈合作用能够促进成纤维细胞增殖进而推动上皮化进程,促进伤口愈合。此外,本发明还公开了该水凝胶敷料的制备方法和在制备医用伤口敷料方面的应用。



1. 一种抗菌促愈合材料在制备具有抗菌性以及促进巨噬细胞M2极化的水凝胶敷料中的应用,其特征在于,包括0.05-5wt%的抗菌促愈合材料、5-10wt%的聚乙烯醇和5-10wt%的明胶;所述抗菌促愈合材料选自PEG化壳聚糖;所述PEG化壳聚糖中壳聚糖主链的分子量为5~100万Da,脱乙酰度不低于70%;

所述PEG化壳聚糖中PEG的分子量为550~5000Da,壳聚糖上羟基或/和氨基的PEG化比例为50~75%;

所述PEG化壳聚糖包括PEG化壳聚糖-抗菌肽偶联物或/和PEG胍基双改性壳聚糖。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述PEG化壳聚糖-抗菌肽偶联物中壳聚糖主链的分子量为5~100万Da,脱乙酰度不低于70%;所述PEG化壳聚糖-抗菌肽偶联物中PEG的分子量为550~5000Da,壳聚糖上羟基或/和氨基的PEG化比例为50~75%。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述明胶选自甲基丙烯酰胺化的明胶。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述聚乙烯醇的醇解度不低于70%。

5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,包括如下步骤:

将抗菌促愈合材料、聚乙烯醇和明胶分别溶于无菌溶剂中,然后按一定比例混匀,得预凝胶溶液;

对预凝胶溶液重复进行多次冻融处理,直至得到室温下的呈凝胶状态的抗菌促愈合水凝胶敷料。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述无菌溶剂选自去离子水、生理盐水或细胞培养基等。

7. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述冻融处理包括在-20℃~-80℃下冷冻和在室温下解冻。

## 一种抗菌促愈合水凝胶敷料及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医用材料技术领域。更具体地,涉及一种抗菌促愈合水凝胶敷料及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 包括烧烫伤、外科手术创伤以及下肢静脉溃疡等在内的皮肤创伤问题给社会及医疗体系造成严重负担。而当创面受到金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌等病原微生物的感染,会进一步延长创面的愈合时间,增加治疗费用,严重时还会引起全身性的脓毒症,最终导致组织坏死甚至截肢。因此,感染创面的治疗与修复成为了国家的重大需求。

[0003] 经典的创面愈合过程主要包括三个阶段。在炎症阶段,经止血而形成的凝血块成为免疫细胞的支架,同时免疫细胞被招募到创面,清除微生物并控制感染;在增殖阶段,免疫细胞能够分泌多种介质,刺激细胞增殖迁移及分化,导致新的细胞外基质沉积从而促进再上皮化以及伤口的新生血管形成;在重塑阶段,免疫细胞释放多种活性酶,进一步改变创面组成和结构。在创面愈合过程中,微生物的有效清除即控制感染与细胞的有序增殖即上皮化形成都是至关重要的。

[0004] 使用伤口敷料覆盖并保护创面是创面治疗现有技术手段中较为有效的方法之一。如海藻酸盐敷料被证明可以修复组织并为细胞提供增殖环境(Pereira R et al., International Journal of Biological Macromolecules,2013,52:221-230.Thu H E et al.,International Journal of Pharmaceutics,2012,434(1-2):375-383.);高分子量透明质酸可阻断内皮细胞迁移和血管生成,而低分子量透明质酸具有促炎症和促血管生成功能(Fakhari A and Berkland C.Acta Biomaterialia,2013,9(7):7081-7092.)。但对于感染创面,由于伤口中存在大量病原微生物,从而极大地阻碍了创面愈合。因此,在感染创面上应用敷料前需要对伤口进行彻底的清创,并在敷料中增加具有抗菌功能的活性组分。由于含银敷料能够对革兰氏阳性和阴性细菌均具有较强的抗菌性,且能够减轻炎症、减弱感染(Mina Mohseni et al.,Artificial Organs,2016,40(8):765-773.),常被用于感染创面治疗。但同时,银可能通过创面进入人体,进行富集,进而导致细胞死亡,产生毒副作用(Min Ji Hong et al.,Polymers,2018,10(10).Shahin Homaeigohar and Aldo R.Boccaccini.Acta Biomaterialia,2020,107:25-49.)因此含银敷料的生物相容性并不理想。如磺胺嘧啶银乳膏虽然常被临床用于感染创面治疗,但由于银离子对正常组织细胞的毒性较大,尤其是对上皮化进程的阻碍作用明显,因此,在其说明书中明确指出,一旦上皮化开始应立即停药。可见,对于能够用于感染创面的伤口敷料,需要根据伤口愈合不同阶段的特征,不仅应能够高效抗菌,从而及时控制感染,同时还应具有良好的生物相容性并能够促进成纤维细胞增殖而推动上皮化进程,促进伤口愈合。

[0005] 因此,需要提供一种伤口敷料满足抗菌、控制感染、良好生物相容性和促进伤口愈合的功效。

## 发明内容

[0006] 本发明的一个目的在于提供一种抗菌促愈合水凝胶敷料,包括抗菌促愈合材料、聚乙烯醇和明胶。该水凝胶敷料不仅为伤口处细胞的生长提供了适宜环境,还具有抗菌、控制感染、促进伤口愈合的功效。

[0007] 本发明的另一个目的在于提供一种抗菌促愈合水凝胶敷料的制备方法。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种抗菌促愈合水凝胶敷料的应用

[0009] 为达到上述目的,本发明采用下述技术方案:

[0010] 一种抗菌促愈合水凝胶敷料,包括0.01-10wt%的抗菌促愈合材料、1-20wt%的聚乙烯醇和1-20wt%的明胶。

[0011] 本发明提供的水凝胶敷料中聚乙烯醇和明胶具有良好的生物相容性、无毒,与抗菌促愈合材料共同形成水凝胶状态敷料。该敷料具有海绵多孔结构,三维结构内高度连通,类似于人类皮肤组织的胞外基质(ECM)。敷料在伤口上可形成与天然细胞外基质类似的物理和化学环境,可长时间停留在伤口部位并与体液进行交换,为细胞和组织的生长提供营养物质和空间;同时抗菌促愈合材料能够有效抗菌,及时控制感染,促愈合作用能够促进成纤维细胞增殖进而推动上皮化进程,促进伤口愈合。

[0012] 优选地,所述抗菌促愈合水凝胶敷料包括0.05-5wt%的抗菌促愈合材料、5-10wt%的聚乙烯醇和5-10wt%的明胶。

[0013] 本发明中所述抗菌促愈合材料包括但不限于为PEG化壳聚糖、氨基酸改性壳聚糖、单胍或双胍改性壳聚糖、壳聚糖-抗菌肽偶联物、含有 $\alpha$ 螺旋及疏水域的抗性多肽等。

[0014] 壳聚糖作为自然界唯一带有正电荷的碱性天然多糖,具有优越的生物相容性、良好的生物粘附性和可控的生物降解性,已被广泛用作伤口敷料的活性组分。但由于其溶解性差,因此通常并不能在生理条件下直接使用。PEG化壳聚糖、氨基酸改性壳聚糖、单胍或双胍改性壳聚糖不仅保留了壳聚糖的抗菌性,还改善了壳聚糖的可溶解性以及促进伤口愈合的作用。

[0015] 抗菌肽则是一类具有一定杀菌或抑菌能力的短链多肽,具有良好的杀菌抑菌能力。但天然的抗菌肽溶血活性高、细胞毒性大,不利于伤口愈合,从而限制了其在感染创面治疗领域的应用。

[0016] 含有 $\alpha$ -螺旋和疏水结构域的一系列抗菌性多肽,与天然抗菌肽相比,其溶血活性与细胞毒性均有大幅改善,选择性较好,兼具抗菌和促愈合潜力。壳聚糖-抗菌肽偶联物在杀灭浮游微生物的同时,还对微生物膜具有较强的穿透作用,是良好抗菌促愈合能力的材料。

[0017] 更优选地,所述抗菌促愈合材料为PEG化壳聚糖;

[0018] 所述PEG化壳聚糖包括但不限于为PEG化壳聚糖-抗菌肽偶联物或PEG胍基双改性壳聚糖。PEG化改善了壳聚糖的水溶性,增加了其生物安全性、生物相容性,还保留了其抗菌性能。同时,本发明还创造性的发现PEG化壳聚糖能够诱导巨噬细胞极化成为具有抗炎修复作用的M2表型,促进伤口处血管、肉芽等组织的生成,促进伤口愈合。

[0019] 合适的壳聚糖主链分子量既可保证壳聚糖的高分子属性,又不会因为分子量过高影响材料的水溶性;较高的脱乙酰度范围可以确保聚糖分子链上有尽可能多的可以被PEG化。

[0020] 优选地,所述PEG化壳聚糖或PEG化壳聚糖-抗菌肽偶联物中壳聚糖主链的分子量为5~100万Da(例如可以为8万Da、10万Da、20万Da、40万Da、50万Da、70万Da、90万Da等)间任意分子量之间的任何范围,脱乙酰度不低于70%。

[0021] PEG化壳聚糖同时具有抗菌性以及促进巨噬细胞M2极化作用的主要原因在于PEG组分与壳聚糖主链的平衡关系,PEG分子量需要限定在一定范围,若PEG分子量太低,所得的PEG化壳聚糖溶解性不充分,不利于抗菌性的发挥;若PEG分子量过高,由于其强烈的亲水作用将会把壳聚糖主链包裹在内部,难以直接暴露而发挥促进巨噬细胞极化的作用。

[0022] 优选地,所述PEG化壳聚糖或PEG化壳聚糖-抗菌肽偶联物中PEG的分子量为550~5000Da(例如可以为700Da、1000Da、2000Da、3000Da、4000Da、5000Da等等)间任意分子量之间的任何范围。

[0023] PEG化壳聚糖中不仅PEG的分子量直接影响结构从而影响抗菌性和促进巨噬细胞极化作用的平衡关系;PEG化率也至关重要。过低的取代度会使水溶性不充分,氨基难以充分质子化,抗菌性不理想;PEG化率过高也会降低壳聚糖的占比,同时包裹壳聚糖,失去促进巨噬细胞M2极化的作用。

[0024] 优选地,所述壳聚糖上羟基或/和氨基的PEG化比例为50~75%(例如可以为55%、58%、60%、63%、65%、68%、70%或73%等)间任意比例之间的任何范围。

[0025] 明胶是由胶原蛋白水解得到的产物,具有无毒、生物相容性好、可生物降解等优势。在一个优选的示例中,所述明胶选自中粘度或高粘度的A型明胶,或甲基丙烯酰胺化的明胶。

[0026] 聚乙烯醇则是一种生物可降解、无毒、不致癌、生物相容性好、水溶性低、价格低廉的合成聚合物。同时,还具有对小分子的渗透性、对细菌的不渗透性、软稠度、低界面张力、高含水量和高透明度等用于制作水凝胶的理想性能。优选地,所述聚乙烯醇的醇解度不低于70%。

[0027] 本发明第二个方面提供上述抗菌促愈合水凝胶敷料的制备方法,包括如下步骤:

[0028] 将抗菌促愈合材料、聚乙烯醇和明胶分别溶于无菌溶剂中,然后按一定比例混匀,得预凝胶溶液;

[0029] 对预凝胶溶液重复多次进行冻融处理,直至得到室温下的呈凝胶状态的抗菌促愈合水凝胶敷料。

[0030] 优选地,所述冻融处理包括在-20℃~-80℃下冷冻和在室温下解冻。冻融处理可以使凝胶内部充满海绵多孔结构,且内部高度连通,类似于人类皮肤组织的胞外基质。因此,本发明中的水凝胶有利于细胞附着,为细胞提供支持并促进细胞迁移增殖,进而促进创面愈合。

[0031] 优选地,所述无菌溶剂选自去离子水、生理盐水或细胞培养基等。

[0032] 本发明第三个方面提供了上述抗菌促愈合水凝胶敷料在制备医用伤口敷料方面的应用。

[0033] 在具体使用过程中,可将医用敷料定期喷涂于创伤、冻伤、烧烫伤、糖尿病足、压疮、下肢静脉溃疡等急性或慢性难愈性伤口,并用无菌纱布覆盖。

[0034] 根据伤口的情况,可以每间隔一段时间涂抹本发明中医用敷料一次,例如6-72h涂抹一次,优选为12~24h涂抹一次。本发明中抗菌促愈合水凝胶敷料具有与天然细胞外基质

类似的物理和化学环境,为细胞和组织的生长提供营养物质和空间,同时还具有良好的抗菌、控制感染以及促进伤口愈合效果。

[0035] 本发明的有益效果如下:

[0036] 本发明提供一种采用冻融方法制备得到的抗菌促愈合水凝胶敷料,该敷料具有与天然细胞外基质类似的物理和化学环境,可长时间停留在伤口部位并与体液进行交换,为细胞和组织的生长提供营养物质和空间;同时敷料中的抗菌促愈合材料能够有效抗菌,及时控制感染,促愈合作用能够促进成纤维细胞增殖进而推动上皮化进程,促进伤口愈合。因此,本发明中的水凝胶敷料具有广泛的应用潜力。

## 附图说明

[0037] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的说明。

[0038] 图1示出本发明实施例1-3和对比例1中水凝胶敷料成胶前和成胶后的状态。

[0039] 图2示出本发明实施例1-3中水凝胶敷料中的细胞存活率,水凝胶敷料中抗菌促愈合材料终浓度为128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,其中a)为HaCat细胞的存活率,b)为L929的细胞存活率。

[0040] 图3示出本发明检测例3中使用实施例水凝胶敷料的抑菌效果并用箭头标记抑菌范围的大小,其中a)为对大肠杆菌(*E. coli*)的抑制,b)为对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑制。

[0041] 图4示出检测例4中小鼠伤后不同时间的创面愈合情况。

[0042] 图5示出检测例5中创伤14天后小鼠愈合创面的组织切片HE染色结果。

## 具体实施方式

[0043] 为了更清楚地说明本发明,下面结合优选实施例和附图对本发明做进一步的说明。附图中相似的部件以相同的附图标记进行表示。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

[0044] 实施例

[0045] 实施例1

[0046] S1:称取0.16g分子量为 $5 \times 10^4 \text{Da}$ 、脱乙酰度为98%的壳聚糖加入到10mLMES缓冲液(25mM, pH=4.80)中,并滴入0.1mL HCl室温下搅拌半小时,使壳聚糖完全溶解,从而得到质量体积百分比浓度为1.6%的均一溶液;然后将在室温下活化1小时的分子量为1000Da的羧基-聚乙二醇-叠氨基、NHS和EDC·HCl的混合溶液(溶剂为25mM pH=4.80的MES缓冲液)20mL加入上述反应液中,于室温下持续搅拌反应24小时,其中壳聚糖、羧基-聚乙二醇-叠氨基、NHS、EDC·HCl的物质的量之比为1:2:4:4;反应结束后加入与羧基-聚乙二醇-叠氨基等物质的量的盐酸羟胺终止反应,随后将反应液转移至截留分子量为3500-7000Da的透析袋中,将透析袋两端扎紧置于去离子水中透析处理,每隔4小时换水一次,换水8次后将透析液放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻过夜后,放入真空冷冻干燥机直至充分干燥至恒重即可得到叠氨基聚乙二醇修饰的可溶性壳聚糖CP。称取适量CP于离心管中,加入适量无菌生理盐水溶解,得256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液。

[0047] S2:称取适量99%醇解度的聚乙烯醇(PVA)于圆底烧瓶,向其中加入适量生理盐水,使PVA质量分数为10%。向圆底烧瓶中加入磁子,90 $^{\circ}\text{C}$ ,550rpm加热搅拌12h,至PVA完全

充分溶解。将PVA溶液转移至玻璃样品瓶中,转移至灭菌锅中121℃灭菌20min备用。

[0048] S3:称取适量A型明胶于离心管,向其中加入适量无菌生理盐水,使明胶质量分数为5%。将离心管置于37℃的摇床中振荡4h,得均一的明胶溶液备用。

[0049] S4:将S1、S2、S3中CP、PVA、明胶以2:1:1的体积比混合均匀,并使得CPW终浓度为128μg/mL,通过分液器将混合溶液转移至24孔板中。将孔板放置于-20℃环境中,待溶液完全冷冻(约12h)后取出,放置于室温环境下待溶液完全熔化(约2h),再放回-20℃环境冷冻。重复这一过程直至不流动的水凝胶形成,得CP含量为128μg/mL的水凝胶敷料。另取一部分溶液至离心管中,重复上述过程以判断凝胶是否形成,如图1所示,可见形成了水凝胶。

[0050] 实施例2

[0051] S1:称取适量抗菌性多肽WR于离心管中,加入适量无菌生理盐水溶解,得256μg/mL的样品溶液。

[0052] S2:称取适量99%醇解度的聚乙烯醇(PVA)于圆底烧瓶,向其中加入适量生理盐水,使PVA质量分数为10%。向圆底烧瓶中加入磁子,90℃,550rpm加热搅拌12h,至PVA完全充分溶解。将PVA溶液转移至玻璃样品瓶中,转移至灭菌锅中121℃灭菌20min备用。

[0053] S3:称取适量A型明胶于离心管,向其中加入适量无菌生理盐水,使明胶质量分数为5%。将离心管置于37℃的摇床中振荡4h,得均一的明胶溶液备用。

[0054] S4:将S1、S2、S3中WR、PVA、明胶以2:1:1的体积比混合均匀,并使得CPW终浓度为128μg/mL,通过分液器将混合溶液转移至24孔板中。将孔板放置于-20℃环境中,待溶液完全冷冻(约12h)后取出,放置于室温环境下待溶液完全熔化(约2h),再放回-20℃环境冷冻。重复这一过程直至不流动的水凝胶形成,得WR含量为128μg/mL的水凝胶敷料。另取一部分溶液至离心管中,重复上述过程以判断凝胶是否形成,如图1所示,可见形成了水凝胶。

[0055] 实施例3

[0056] S1:将一定量的壳聚糖溶于2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)缓冲液中形成溶液1,将带有羧基基团的聚乙二醇-叠氮加入缓冲液中形成溶液2,在溶液2中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC盐酸盐)和N-羟基琥珀酰亚胺活化羧基,室温或4℃振荡5-120分钟后将溶液1与溶液2混匀,室温或4℃振荡6-72小时,将样品透析、冻干得到叠氮-聚乙二醇修饰的壳聚糖。

[0057] 将叠氮-聚乙二醇修饰的壳聚糖和修饰有炔基的抗菌性多肽WR共同溶解于2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液中,加入催化剂溶液,室温或者4度振荡反应10分钟到48小时,反应完成后,加入过量的乙二胺四乙酸,振荡、透析、冻干得壳聚糖-抗菌肽偶联物CPW。其中,所述催化剂溶液包括0.5M的硫酸铜、1M的抗坏血酸钠和1M的氨基胍。

[0058] S2:称取适量99%醇解度的聚乙烯醇(PVA)于圆底烧瓶,向其中加入适量生理盐水,使PVA质量分数为10%。向圆底烧瓶中加入磁子,90℃,550rpm加热搅拌12h,至PVA完全充分溶解。将PVA溶液转移至玻璃样品瓶中,转移至灭菌锅中121℃灭菌20min备用。

[0059] S3:称取适量A型明胶于离心管,向其中加入适量无菌生理盐水,使明胶质量分数为5%。将离心管置于37℃的摇床中振荡4h,得均一的明胶溶液备用。

[0060] S4:将S1、S2、S3中CPW、PVA、明胶以2:1:1的体积比混合均匀,并使得CPW终浓度为128μg/mL,通过分液器将混合溶液转移至24孔板中。将孔板放置于-20℃环境中,待溶液完全冷冻(约12h)后取出,放置于室温环境下待溶液完全熔化(约2h),再放回-20℃环境冷冻。

重复这一过程直至不流动的水凝胶形成,得CPW含量为128 $\mu$ g/mL的水凝胶敷料。另取一部分溶液至离心管中,重复上述过程以判断凝胶是否形成,如图1所示,可见形成了水凝胶。

#### [0061] 实施例4

[0062] S1:称取0.16g分子量为 $2 \times 10^5$ Da、脱乙酰度为98%的壳聚糖加入到10mLMES缓冲液(25mM,pH=4.80)中,并滴入0.1mL HCl室温下搅拌半小时,使壳聚糖完全溶解,从而得到质量体积百分比浓度为1.6%的均一溶液;然后将在室温下活化1小时的分子量为1000Da的羧基-聚乙二醇-甲氧基、NHS和EDC·HCl的混合溶液(溶剂为25mM pH=4.80的MES缓冲液)20mL加入上述反应液中,于室温下持续搅拌反应24小时,其中壳聚糖、羧基-聚乙二醇-叠氮基、NHS、EDC·HCl的物质的量之比为1:1:3:3;反应结束后加入与羧基聚乙二醇单甲醚等物质的量的盐酸羟胺终止反应,随后将反应液转移至截留分子量为8000-14000Da的透析袋中,将透析袋两端扎紧置于去离子水中透析处理,每隔6小时换水一次,换水6次后将透析液放入-20 $^{\circ}$ C冷冻过夜后,放入真空冷冻干燥机直至充分干燥至恒重即可得到PEG化壳聚糖。

[0063] 称取0.10克PEG化壳聚糖加入到100mL去离子水中,室温下搅拌半小时,以使其完全溶解,从而得到质量百分比为0.1%的均匀溶液;待温度升高至80 $^{\circ}$ C,向可溶性壳聚糖溶液中缓慢加入三氧化硫脒,三氧化硫脒与壳聚糖的物质的量之比为10:1,投料用时90分钟,投料完毕后继续加热搅拌60分钟,随后将反应液转移至截留分子量为8000-14000Da的透析袋中,将透析袋两端扎紧置于去离子水中透析处理,每隔10小时换水一次,换水5次后将透析液放入-20 $^{\circ}$ C冷冻过夜后,放入真空冷冻干燥机中直至充分干燥至恒重即可得聚乙二醇胍基双改性壳聚糖PG。称取适量PG于离心管中,加入适量无菌生理盐水溶解,得512 $\mu$ g/mL的样品溶液。

[0064] S2:称取适量80%醇解度的聚乙烯醇(PVA)于圆底烧瓶,向其中加入适量生理盐水,使PVA质量分数为20%。向圆底烧瓶中加入磁子,90 $^{\circ}$ C,550rpm加热搅拌12h,至PVA完全充分溶解。将PVA溶液转移至玻璃样品瓶中,转移至灭菌锅中121 $^{\circ}$ C灭菌20min备用。

[0065] S3:称取适量A型明胶于离心管,向其中加入适量无菌生理盐水,使明胶质量分数为10%。将离心管置于37 $^{\circ}$ C的摇床中振荡4h,得均一的明胶溶液备用。

[0066] S4:将S1、S2、S3中PG、PVA、明胶以2:1:1的体积比混合均匀,通过分液器将混合溶液转移至24孔板中。将孔板放置于-20 $^{\circ}$ C环境中,待溶液完全冷冻(约12h)后取出,放置于室温环境下待溶液完全融化(约2h),再放回-20 $^{\circ}$ C环境冷冻。重复这一过程直至不流动的水凝胶形成,得PG含量为256 $\mu$ g/mL的水凝胶敷料。

#### [0067] 对比例1

[0068] S1:称取适量99%醇解度的聚乙烯醇(PVA)于圆底烧瓶,向其中加入适量生理盐水,使PVA质量分数为10%。向圆底烧瓶中加入磁子,90 $^{\circ}$ C,550rpm加热搅拌12h,至PVA完全充分溶解。将PVA溶液转移至玻璃样品瓶中,转移至灭菌锅中121 $^{\circ}$ C灭菌20min备用。

[0069] S2:称取适量A型明胶于离心管,向其中加入适量无菌生理盐水,使明胶质量分数为5%。将离心管置于37 $^{\circ}$ C的摇床中振荡4h,得均一的明胶溶液备用。

[0070] S3:将无菌生理盐水以及S1、S2中的PVA、明胶以2:1:1的体积比混合均匀,通过分液器将混合溶液转移至24孔板中。将孔板放置于-20 $^{\circ}$ C环境中,待溶液完全冷冻(约12h)后取出,放置于室温环境下待溶液完全融化(约2h),再放回-20 $^{\circ}$ C环境冷冻。重复这一过程直

至不流动的水凝胶形成,得水凝胶敷料。另取一部分溶液至离心管中,重复上述过程以判断凝胶是否形成,如图1所示,可见形成了水凝胶。

[0071] 检测例

[0072] 检测例1

[0073] S1:将培养瓶中HaCat细胞或L929细胞用胰蛋白酶溶液消化,离心,并用培养基溶液复溶。使用细胞计数板对溶液中细胞浓度进行计算并将其稀释至 $6 \times 10^4$ 个/mL。取一新的24孔板,将溶液加入该24孔板中,每孔1mL。将24孔板放入 $37^\circ\text{C}$  5% $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养适当时间。其中一组加入新鲜培养基溶液作为阴性对照。

[0074] S2:取出之前铺好的24孔板,吸出原培养基溶液,注意不要触碰到孔底部以破坏细胞附着。将新鲜培养基溶液加入该24孔板中,每孔1mL。使用镊子向24孔板转移制备好的实施例1-3中的水凝胶敷料。将24孔板放入 $37^\circ\text{C}$  5% $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养24h。其中一组直接更换新鲜培养基溶液作为阳性对照。每组水凝胶敷料样品和阴阳对照的平行样品为3个。

[0075] 在离心管中配制10%体积浓度的CCK-8溶液。取出之前24孔板,使用镊子取出24孔板孔中的水凝胶敷料,吸出原培养基溶液,注意不要触碰到孔底部以破坏细胞附着。向24孔板中转移CCK-8溶液,每孔500 $\mu\text{L}$ 。将24孔板放入 $37^\circ\text{C}$  5% $\text{CO}_2$ 的培养箱中1-2h。

[0076] S3:取出之前的24孔板和一新的96孔板,将24孔板中实验组和对照组上清液转移至新96孔板,24孔板中每孔转移成96孔板中3孔,每孔100 $\mu\text{L}$ ,注意尽可能减少气泡的产生。对新96孔板使用酶标仪测定450nm吸光度。

[0077] 细胞存活率的计算公式如下:

$$[0078] \quad \text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{阴}}}{A_{\text{阳}} - A_{\text{阴}}} \times 100\%$$

[0079] 其中, $A_{\text{样}}$ 、 $A_{\text{阴}}$ 、 $A_{\text{阳}}$ 分别表示样品、阴性对照以及阳性对照在450nm处的吸光度,结果如图2所示。

[0080] 检测例2

[0081] S1:向其中两个琼脂板上分别滴加100 $\mu\text{L}$ 浓度为 $10^5$ CFU/mL的大肠杆菌(E.coli)菌液和金黄色葡萄球菌(S.aureus),并用涂布棒将菌液涂布均匀。

[0082] S2:取制备好的对比例1以及实施例1-3中的水凝胶敷料,轻轻贴敷在S1中已涂有菌液的琼脂板上,随后转移至 $37^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养24h。

[0083] S3:从培养箱中取出琼脂板,放置于菌落计数仪中,观察抑菌圈大小,结果如图3所示。可见,本发明实施例1-3中的水凝胶敷料皆具有良好的抗菌效果。

[0084] 检测例3

[0085] 对小鼠进行称重,使用4%体积分数水合氯醛以0.1mL/10g对小鼠进行麻醉,使用电动剃毛刀对小鼠背部进行剃毛,使用镊子和剪刀在小鼠背部皮肤制造一个直径约为15mm的圆形伤口,避免伤及肌肉组织。对伤口滴加50 $\mu\text{L}$ 培养12小时的MRSA菌液。放回笼中饲养72小时。对小鼠进行随机分组,每组为3只,观察小鼠伤口并拍照记录。其中,未处理组伤口不做任何处理,对照样品组覆盖对比例1中的水凝胶敷料,抗菌促愈合水凝胶组覆盖实施例3中的水凝胶敷料。于第2、3、5、8、11、14天进行上样并对小鼠伤口进行拍照记录,结果如图4所示,可见涂覆了实施例3中水凝胶敷料的小鼠后背伤口愈合的更快,远好于对比例1和未

处理组。

[0086] 检测例4

[0087] 伤后14天处死检测例3中的动物,对创面组织进行取材、固定。随后组织样本取材3mm厚,70%、80%、95%、100%乙醇梯度脱水各30分钟,1L二甲苯处理各20分钟,石蜡浸蜡两缸各12分钟后包埋,切片4 $\mu$ m,烤片。1.5L二甲苯分三次脱蜡,每次8分钟;1L无水乙醇处理两次,每次500mL,8分钟;90%、80%、60%乙醇各处理8分钟。苏木精染色4分钟,流水清洗;盐酸乙醇分化2-3秒,流水清洗;0.5%氨水处理20秒,流水清洗;光学显微镜观察。0.5%伊红染色1分钟;80%、90%乙醇各分化3-5秒;95%乙醇处理5分钟;1.5L无水乙醇分三次处理,每次5分钟;1L二甲苯处理两次,每次5分钟;中性树脂胶封固,光学显微镜下观察创面肉芽组织、成纤维细胞等结构的生长情况,结果如图5所示。图5中箭头标记区域为新生表皮覆盖下的创缘宽度,创缘宽度越小说明伤口愈合得越好,结果表明实施例3覆盖的创面与对照组相比有更好的愈合效果。

[0088] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定,对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动,这里无法对所有的实施方式予以穷举,凡是属于本发明的技术方案所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

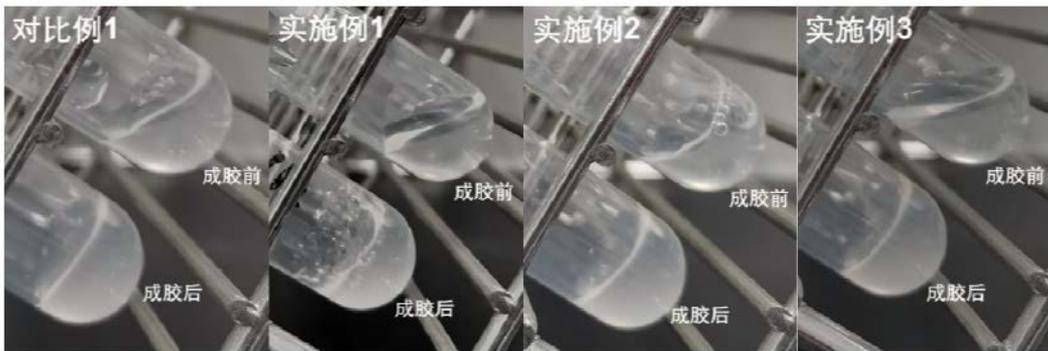


图1

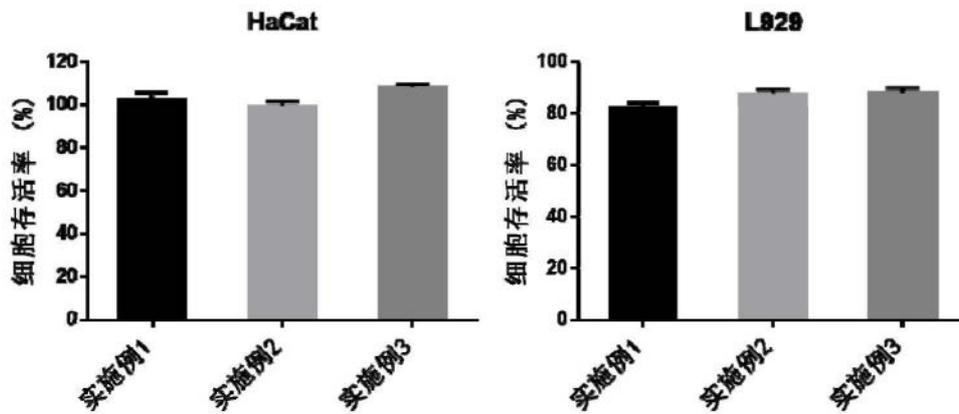


图2

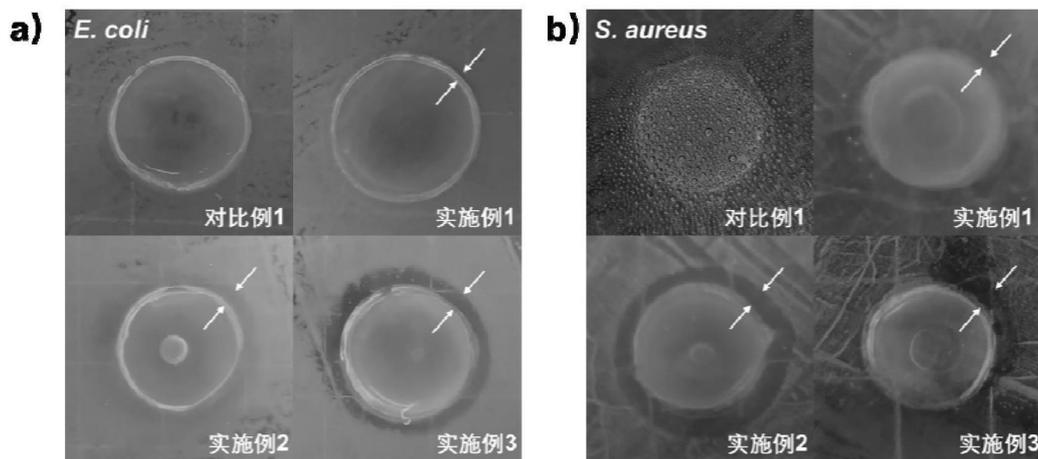


图3

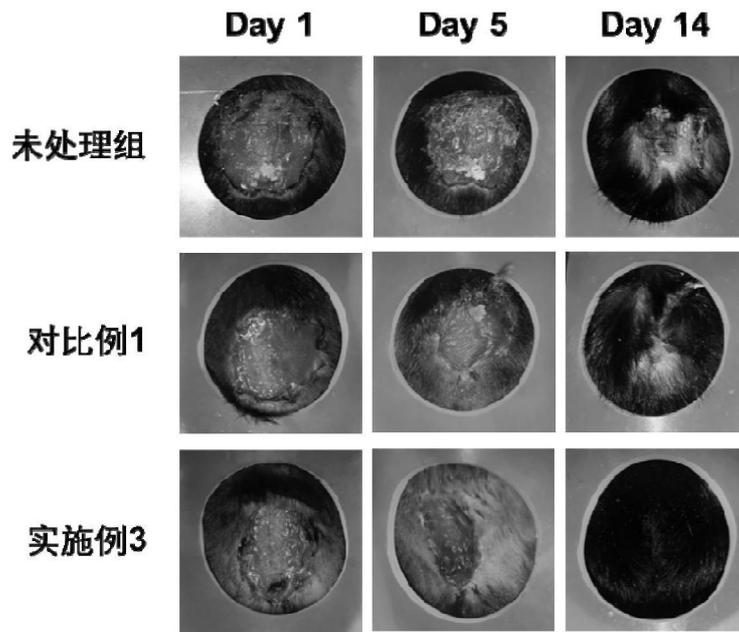


图4

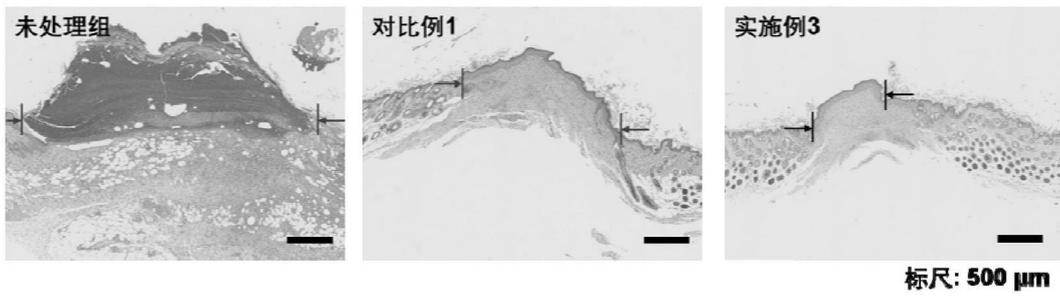


图5