



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112245651 A

(43) 申请公布日 2021.01.22

(21) 申请号 202011072244.2

(22) 申请日 2020.10.09

(71) 申请人 苏州康瑞健生物医疗科技有限公司

地址 215153 江苏省苏州市高新区五台山  
路28号办公楼402室

(72) 发明人 蒋序林 马梦思

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 42222

代理人 吴艳姣

(51) Int. Cl.

A61L 26/00 (2006.01)

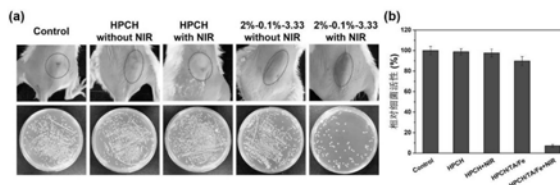
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶及其使用方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶及其使用方法和应用。成分包括:可在35-45℃自发交联的温敏性含多羟基的聚合物溶液A基质,低温下是液体;单宁酸水溶液;铁、钆或钒离子溶液;三者低温混合后喷射或注射到既定身体位置形成水凝胶。该凝胶温度敏感,低温时流动性良好,可注射可喷射,在体温下迅速形成凝胶。具有光热效应,经光照射后,短时间内温度即可从25℃升高到60多度,可经反复光照,实现一次注射,多次光热治疗。光热效应还能促进组织生长和修复,同时水凝胶升温后,抗菌效果随之升高。该水凝胶使用方法简单,具有良好的生物相容性和生物降解性,可缓慢释放抗菌剂,减少疤痕形成。可用于修复皮肤创伤。



1. 一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备可在生理条件下原位自发物理交联的温敏性含多羟基的聚合物溶液A,在低温保存;

(2) 低温下向溶液A中加入单宁酸溶液,混合均匀得到混合溶液B;

(3) 低温下向混合溶液B中加入金属离子溶液,混合均匀后得到低温下具有良好流动性的可注射复合水凝胶前体溶液C;

(4) 将复合水凝胶前体溶液C注射或喷射到既定身体位置形成复合水凝胶;

(5) 对复合水凝胶进行光照射,能将光能转变成热能提高水凝胶的温度,从而提高该位置的温度;

其中低温是指37℃以下。

2. 根据权利要求1所述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶的使用方法,其特征在于,还包括步骤(6):

(6) 对复合水凝胶多次进行光照射,达到一次注射或喷射能反复进行升温降温的效果。

3. 根据权利要求1所述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶的使用方法,其特征在于,步骤(1)(2)(3)中的配制温度范围为2~15℃,将各组分快速混合均匀,形成具有良好流动性的可注射水凝胶前体溶液;步骤(5)所述光为近红外光。

4. 根据权利要求3所述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶的使用方法,其特征在于,近红外光的波长为808nm。

5. 根据权利要求1所述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶,其特征在于,所述混合溶液C中温敏性含多羟基的聚合物的质量浓度范围为0.5~20wt%,混合溶液C中单宁酸的质量浓度范围为0.01~0.2wt%;混合溶液C中金属离子的质量浓度范围为0.01~0.3wt%。

6. 一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶,其特征在于,所述水凝胶成分包括:

(1) 可在35-45℃原位自发物理交联的温敏性含多羟基的聚合物溶液A基质,低温下是液体;

(2) 单宁酸水溶液;

(3) 金属离子溶液;

所述金属离子的种类为铁离子、钆离子、钒离子中的任一种或者几种的混合物;

该水凝胶具有可逆温敏性,而且在光的照射下能够在5~60min内将水凝胶温度从室温升高到65℃以内。

7. 根据权利要求6所述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶,其特征在于,水凝胶能经多次升温降温,可一次注射,多次光照。

8. 根据权利要求6所述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶,其特征在于,所述溶液A中温敏性含多羟基的聚合物为温敏性改性甲壳素。

9. 根据权利要求8所述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶,其特征在于,所述温敏性改性甲壳素为温敏性羟丁基壳聚糖、温敏性羟戊基壳聚糖、温敏性羧甲基甲壳素、温敏性羟乙基甲壳素、温敏性羟丙基甲壳素、温敏性羟丁基甲壳素中的任一种或者几种的混合物。

10. 根据权利要求6~9任一项所述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶用于创面愈合。

## 一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶及其使用方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医用材料领域,具体涉及一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶及其使用方法和应用。

### 背景技术

[0002] 由于近红外光(NIR)具有良好的组织穿透能力和较低的能量损失,对人体组织无害,因此对近红外光可以有效地吸收并将其有效转化为热的具有光热效应的生物材料在光热治疗领域具有广阔的应用前景,例如在皮肤创伤修复方面。但是现有光热材料体系主要包含贵金属纳米颗粒如Au、Ag、Pt,石墨烯、碳纳米棒,这些光热转换效率较高,但价格昂贵,并且生物相容性有待研究,可用于体外诊断,但还不能用于体内。

[0003] 聚合物水凝胶是具有亲水性含有大量的水的三维交联网状结构,但是不溶于水,能保持一定的形状,与细胞外基质相似,具有良好的生物相容性。温敏性聚合物水凝胶如甲壳素基温敏性水凝胶在低温时保持液体,可均匀地包载细胞/药物并填充不规则的创面部位,在体温下迅速形成凝胶,能够促进组织生长和修复。这种体内可降解的甲壳素基温敏性水凝胶可以装载活性因子和药物,用于局部注射微创治疗,在生物医用方面具有很好的开发前景。

[0004] 单宁酸是自然界中存在广泛的一种复杂的多元酚酸,富含于多种树木的树皮与果实中,可用作食品抗氧化剂,是一种由美国食品和药物管理局(FDA)批准的可用于食品添加剂的多酚类配体,单宁酸具有较好的抗菌特性,能够有效抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生物膜的形成。虽然单宁酸本身毒性较小,但浓度过高也具有明显的毒性。将单宁酸和金属离子引入可注射甲壳素基温敏性水凝胶促使单宁酸缓慢释放实现相对长期抗菌作用,得到既具有温敏性又具有pH敏感性的可注射抗菌水凝胶[中国发明专利申请公开说明书CN201910768980.2]。若能进一步开发出无毒副作用的具有光热特性和可降解可注射的新型温敏水凝胶将非常有意义。

[0005] 本发明将单宁酸和金属离子引入可注射温敏性含多羟基的聚合物如甲壳素基温敏性水凝胶,得到具有光热效应和可注射可降解复合医用温敏水凝胶,期望在皮肤创伤修复方面得到应用。

### 发明内容

[0006] 为了解决现有光热材料中存在的各种问题,本发明提供一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶及其使用方法和应用。该材料具有明显的光热效应,经光照射后,短时间内温度即可从25℃升高到60多度,可经反复光照,实现“一次注射,多次光热治疗”的目的。同时还具有温度敏感性,在低温时液体具有良好的流动性,可原位注射可喷射,能够填充不规则的伤口形状。在体温下快速成胶保持了单宁酸不易被冲走,可缓慢释放单宁酸抗菌剂,降低其毒性,该材料具有长时间的抗菌性能且抗菌范围广,具有良好的生物相容性和

生物可降解性；

[0007] 一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶的使用方法，包括以下步骤：

[0008] (1) 制备可在生理条件下原位自发物理交联的温敏性含多羟基的聚合物溶液A，在低温保存；

[0009] (2) 低温下向溶液A中加入单宁酸溶液，混合均匀得到混合溶液B；

[0010] (3) 低温下向混合溶液B中加入金属离子溶液，混合均匀后得到低温下具有良好流动性的可注射复合水凝胶前体溶液C；

[0011] (4) 将复合水凝胶前体溶液C注射或喷射到既定身体位置形成复合水凝胶；

[0012] (5) 对复合水凝胶进行光照射，能将光能转变成热能提高水凝胶的温度，从而提高该位置的温度。

[0013] 上述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶的使用方法，还包括步骤(6)：

[0014] (6) 对复合水凝胶多次进行光照射，达到一次注射或喷射能反复进行升温降温的效果。

[0015] 上述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶的使用方法，步骤(1)(2)(3)中的配制温度范围为2~15℃，将各组分快速混合均匀，形成具有良好流动性的可注射水凝胶前体溶液；步骤(5)所述光为近红外光。

[0016] 上述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶的使用方法，近红外光的波长为808nm。

[0017] 一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶，所述水凝胶成分包括：

[0018] (1) 可在35-45℃原位自发物理交联的温敏性含多羟基的聚合物溶液A基质，低温下是液体；

[0019] (2) 单宁酸水溶液；

[0020] (3) 金属离子溶液；

[0021] 所述温敏性含多羟基的聚合物可以是温敏性淀粉改性聚合物或者温敏性改性甲壳素衍生物等；优选为温敏性改性甲壳素；这里的低温是指体温37度以下。

[0022] 所述金属离子的种类为铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ )、钌离子( $\text{Ru}^{3+}$ )、钒离子( $\text{V}^{3+}$ )中的任一种或者几种的混合物，均显示优异的光热效应；而铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )、锌离子( $\text{Zn}^{2+}$ )、二价锰离子( $\text{Mn}^{2+}$ )、二价镍离子( $\text{Ni}^{2+}$ )、三价钆离子( $\text{Gd}^{3+}$ )的加入几乎没有光热性能。

[0023] 该水凝胶具有可逆温敏性，这种可注射水凝胶经光照射后，5~60min内水凝胶温度可升高到60多度(从室温如25度升高到65℃)。

[0024] 上述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶，水凝胶能经多次升温降温，可一次注射，多次光照。

[0025] 上述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶，所述温敏性改性甲壳素为温敏性羟丁基壳聚糖、温敏性羟戊基壳聚糖、温敏性羧甲基甲壳素、温敏性羟乙基甲壳素、温敏性羟丙基甲壳素、温敏性羟丁基甲壳素中的任一种或者几种的混合物。

[0026] 上述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶，所述混合溶液C中温敏性含多羟基的聚合物的质量浓度范围为0.5~20wt%，混合溶液C中单宁酸的质量浓度范围为0.01~0.2wt%；混合溶液C中金属离子的质量浓度范围为0.01~0.3wt%。

[0027] 上述的一种具有良好光热效应的温敏复合抗菌水凝胶,该水凝胶材料作为抗菌敷料用于创面愈合,多次反复的近红外光热效应有利于加速创面愈合。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0029] (1) 该可注射水凝胶经光照射后,短时间内温度即可从25℃升高到60多度,而且可经反复光照,实现“一次注射,多次光热治疗”的目的。

[0030] (2) 现有光热材料体系如贵金属纳米颗粒Au、Ag、Pt,石墨烯、碳纳米棒价格昂贵,不可降解和生物相容性有待研究,本发明使用铁离子体内本身就含有,价廉无毒,生物相容性好。

[0031] (3) 本发明通过直接将温敏性甲壳素基衍生物溶液,单宁酸和金属离子直接混合,制备过程简单。通过物理交联形成水凝胶,无需引入小分子交联剂,且甲壳素及其衍生物具有良好生物可降解性和良好的生物相容性,复合水凝胶材料为伤口提供湿润的愈合环境,对创面愈合有很好的治疗效果,促进皮肤再生并减少疤痕形成。复合水凝胶在低温时为具有良好流动性的液体,可完全填充不规则的伤口形状,阻隔外源污染物和微生物,有效预防伤口感染。

## 附图说明

[0032] 图1为本发明实施例3中的2%-0.1%-3.33水凝胶的可注射性和温敏性图片,分别是凝胶前体溶液通过26G针头注射写出“Ge1”图形(a)、凝胶在4℃下的溶液图片(b1)和凝胶在37℃下的凝胶状态图片(b2)。

[0033] 图2为不同组成的HPCH/TA/Fe水凝胶的光热性能的评价,分别是HPCH浓度固定为2wt%,TA浓度固定为0.1wt%,具有不同Fe<sup>3+</sup>/TA的摩尔比的水凝胶的升温曲线(a)及其相应的红外图像(b);2%-0.1%-3.33水凝胶在不同激光功率密度照射下的升温曲线(c)及其在激光开关循环中的升温降温曲线(d)。

[0034] 图3为不同组成的HPCH/TA/Fe水凝胶的体外抗菌性能的评价,分别是水凝胶在有NIR照射和没有NIR照射下对大肠杆菌的抗菌活性实物图(a);水凝胶在有NIR照射和没有NIR照射下对大肠杆菌的抗菌相对活性柱状图(b);水凝胶在有NIR照射和没有NIR照射下对金黄色葡萄球菌的抗菌活性实物图(c);水凝胶在有NIR照射和没有NIR照射下对金黄色葡萄球菌的抗菌相对活性柱状图(d);及相应的活死细菌染色图片(e)。

[0035] 图4为本发明实施例8中的2%-0.1%-3.33水凝胶的体内抗菌实验结果的实物图(a)和相对细菌活性柱状图(b)。

[0036] 图5为本发明实施例9中HPCH/TA/Fe光热水凝胶及其对照对BALB/C小鼠背部全厚度切除伤口模型在近红外弱光每天照射后不同时间伤口图片(a),伤口面积分析柱状图(b)和治疗后伤口的H&E染色和马松三色染色切片图片(c)。

## 具体实施方式

[0037] 为使本发明更加容易理解,下面将进一步阐述本发明的具体实施例。

[0038] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步的描述,其目的在于帮助更好的理解本发明的内容,但这些具体实施例不以任何方式限制本发明的保护范围。

[0039] 根据我们前期的研究工作[中国发明专利申请公开说明书CN201910768980.2],采

用均相法在氢氧化钠-尿素体系中制备低脱乙酰度的温敏性甲壳素衍生物羟丙基甲壳素和羧甲基甲壳素。具体制备方法为：称取2克纯化后的甲壳素搅拌分散于预先冷冻的含有11wt%氢氧化钠和4wt%尿素的100克水溶液中，在-30℃下冷冻24h，取出在室温下机械搅拌将其解冻得到溶解的甲壳素水溶液。向得到的甲壳素溶液(100克, 2wt%)中加入11.4克环氧丙烷，体系在2℃下搅拌使反应物混合均匀后，升温至5℃反应24h，随后升温至15℃反应6h。最后将体系冷却至2℃，用3M盐酸调节体系pH值到7，用去离子水透析，冷冻干燥得到白色海绵状羟丙基甲壳素(HPCH)，产率为87%。<sup>1</sup>HNMR谱图计算得出产物的乙酰度为0.89，取代度为0.84。用乌氏粘度计测得其粘均分子量为 $M_n=410\text{kDa}$ 。该均相合成的HPCH溶液具有温度敏感性，流变结果显示出可逆的溶胶-凝胶的转变行为，其中浓度为2wt%的HPCH溶液的凝胶转变温度为18℃。根据我们前期的研究工作[中国发明专利申请公开说明书CN201310641249.6]，采用均相法在氢氧化钠-尿素体系中制备低脱乙酰度的羧甲基甲壳素，<sup>1</sup>HNMR谱图计算得出产物的乙酰度为0.87，羧甲基取代度为0.19。类似的，采用均相法在氢氧化钠-尿素体系中制备低脱乙酰度的羟乙基甲壳素和羟丁基甲壳素，这些甲壳素衍生物的乙酰度范围在0.7-0.92，其分子量范围为5kDa~1000kDa。

[0040] 实施例1羟丙基甲壳素/单宁酸/氯化铁HPCH/TA/Fe水凝胶的制备和命名

[0041] 将温敏性的羟丙基甲壳素HPCH、单宁酸TA和六水氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 分别于低温2-15℃溶于超纯水中，配置质量浓度为3wt%的HPCH溶液、0.375wt%的TA溶液和0.8wt%的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液。取1g HPCH溶液加入0.4g TA溶液在低温2~15℃快速涡旋混合均匀，再快速加入0.1g  $\text{FeCl}_3$ 溶液在低温2~15℃涡旋混合均匀，则混合溶液中HPCH的浓度为2wt%，TA的浓度为0.1wt%， $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的浓度0.053wt%， $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与TA的摩尔比为3.33。该溶液在低温2-15℃时具有良好的流动性，可注射可喷射，升温至37℃时静置1min很快形成水凝胶，将该组成的凝胶命名为2%-0.1%-3.33。

[0042] 同样的，配置六水氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度为0.4wt%，混合溶液中 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与TA的摩尔比为1.67，该组成的水凝胶命名为2%-0.1%-1.67。配置六水氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度为1.6wt%，混合溶液中 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与TA的摩尔比为6.67，该组成的水凝胶命名为2%-0.1%-6.67。改变六水氯化铁溶液的浓度，可以分别制得温敏可注射的水凝胶2%-0.1%-10、水凝胶2%-0.1%-13.33、水凝胶2%-0.1%-16.67和水凝胶2%-0.1%-20。

[0043] 配置质量浓度为4.5wt%的HPCH溶液、0.375wt%的TA溶液和0.8wt%的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液。取1g HPCH溶液加入0.4g TA溶液在低温2~15℃快速涡旋混合均匀，再快速加入0.1g  $\text{FeCl}_3$ 溶液在低温2~15℃涡旋混合均匀，则混合溶液中HPCH的浓度为3wt%，TA的浓度为0.1wt%， $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的浓度0.053wt%， $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与TA的摩尔比为3.33，制得温敏性水凝胶命名为3%-0.1%-3.33。

[0044] 使用质量浓度为0.75wt%的HPCH溶液代替质量浓度为3wt%的HPCH溶液得到类似的温敏性水凝胶0.5%-0.1%-3.33。使用较低分子量的HPCH溶液( $M_n=40\text{kDa}$ )时，可以使用质量浓度为30wt%的HPCH溶液制得类似的可注射含单宁酸的温敏复合水凝胶20%-0.1%-3.33。

[0045] 改变单宁酸的配比：配置质量浓度为3wt%的HPCH溶液、0.75wt%的TA溶液和0.8wt%的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液。取1g HPCH溶液加入0.4g TA溶液在低温2~15℃快速涡旋混合

均匀,再快速加入0.1g  $\text{FeCl}_3$ 在低温 $2\sim 10^\circ\text{C}$ 涡旋混合均匀,则混合溶液中HPCH的浓度为2wt%,TA的浓度为0.2wt%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的浓度0.053wt%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与TA的摩尔比为1.67,制得温敏性水凝胶命名为2%-0.2%-1.67。同样可以制得温敏性水凝胶2%-0.05%-3.33和水凝胶2%-0.01%-3.33。

[0046] 实施例2羟丙基甲壳素/单宁酸HPCH/TA水凝胶的制备

[0047] 将温敏性的羟丙基甲壳素HPCH和单宁酸TA分别于低温 $2\sim 15^\circ\text{C}$ 溶于超纯水中,配置质量浓度为3wt%的HPCH溶液和0.375wt%的TA溶液,与实施例1不同的是,该水凝胶前体溶液中不加入六水氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,取1g HPCH溶液加入0.4g TA溶液在低温 $2\sim 15^\circ\text{C}$ 快速涡旋混合均匀后,再快速加入0.1g超纯水在低温 $2\sim 14^\circ\text{C}$ 涡旋混合均匀,该组成的水凝胶命名为2%-0.1%-0。但是这里没有加入金属离子的水凝胶前体溶液在 $37^\circ\text{C}$ 形成水凝胶后,再降温至 $2\sim 14^\circ\text{C}$ 不能再变成溶液,不具有良好的流动性,不具有可逆温敏性和可注射性。

[0048] 实施例3羟丙基甲壳素/单宁酸/氯化铁HPCH/TA/Fe水凝胶的温敏可注射性和光热转换性能

[0049] 将上述实施例1中制备的2%-0.1%-3.33水凝胶前体溶液在 $2\sim 10^\circ\text{C}$ 下注入配有26G针头的1mL注射器中,如图1中(a)所示,水凝胶前体溶液可以很容易地从26G针头中注射出来,并且可以制出各种形状和图形,说明该水凝胶具有优异的可注射性。将水凝胶前体溶液注入玻璃瓶,如图1中(b1)所示,在 $4^\circ\text{C}$ 时前体溶液为可流动的液体;如图1中(b2)所示, $37^\circ\text{C}$ 时很快形成凝胶,且此溶液-凝胶转变行为是可逆的。

[0050] 为了研究水凝胶的光热转换能力,以使用808nm近红外激光器(北京凯普林)照射水凝胶作为例子,并用红外成像相机观察和记录温度变化。如图2中(a)和(b)所示,当 $\text{Fe}^{3+}$ /TA的摩尔比增加时,光热效率提高。例如对于2%-0.1%-3.33水凝胶,用激光功率密度 $2\text{W cm}^{-2}$ 的近红外光照射10分钟后温度从 $25^\circ\text{C}$ 升高约 $29^\circ\text{C}$ 到达 $54^\circ\text{C}$ ,而单独羟丙基甲壳素凝胶或者只含氯化铁没用单宁酸的HPCH凝胶或者只含有单宁酸不用金属离子的2%-0.1%-0凝胶近红外光照射10分钟后温度升高只有约 $2\sim 4^\circ\text{C}$ ,并且对于含氯化铁但含单宁酸浓度低于0.01%的HPCH凝胶升温很少,光热效果很微弱不明显。此外,2%-0.1%-3.33水凝胶的温度随着激光功率密度的增加而升高,如图2中(c)所示。为了验证水凝胶的光热稳定性,将2%-0.1%-3.33水凝胶用808nm激光以 $2\text{W cm}^{-2}$ 的强度照射10min,紧接着冷却至室温,经过四个激光开/关循环后,还具有非常类似的光热效应,如图2中(d)所示,这表明水凝胶具有良好的可重复使用性,能够进行多次循环光热使用,绿色环保,实现“一次注射,多次光热治疗”的目的。

[0051] 由于HPCH/TA/Fe水凝胶对500-900nm的光均有明显的吸收,特别是对近红外光有较好的吸收,因而转变成热能产生光热效应,例如HPCH/TA/Fe水凝胶在660nm的吸收值明显高于在808nm的吸收值,使用660nm的激光照射升温效果更明显,但是660nm的近红外光对周边皮肤影响较大,而且穿透性较弱,因此优选为808nm的近红外光。

[0052] 实施例4羟丙基甲壳素/单宁酸/氯化钌HPCH/TA/Ru水凝胶

[0053] 将实施例1中制备的温敏性的羟丙基甲壳素HPCH、单宁酸TA和三氯化钌 $\text{RuCl}_3$ 分别于低温 $4^\circ\text{C}$ 溶于超纯水中,配置质量浓度为3wt%的HPCH溶液、0.375wt%的TA溶液和0.61wt%的 $\text{RuCl}_3$ 溶液。取1g HPCH溶液加入0.4g TA溶液在低温 $2\sim 15^\circ\text{C}$ 快速涡旋混合均匀,再快速加入0.1g  $\text{RuCl}_3$ 溶液在低温 $2\sim 15^\circ\text{C}$ 涡旋混合均匀。则混合溶液中HPCH的浓度为



2wt%，TA的浓度为0.1wt%， $\text{RuCl}_3$ 的浓度0.041wt%， $\text{RuCl}_3$ 与TA的摩尔比为3.33。该溶液在低温2-15℃时具有良好的流动性，可注射可喷射，升温至37℃时静置1min很快形成水凝胶，该类水凝胶具有很好的光热效应，用激光功率密度 $2\text{W cm}^{-2}$ 的近红外光照射10分钟后温度从25℃升高到49℃。

[0054] 实施例5羟丙基甲壳素/单宁酸/氯化钒HPCH/TA/ $\text{VCl}_3$ 水凝胶

[0055] 将实施例1中制备的温敏性的羟丙基甲壳素HPCH、单宁酸TA和三氯化钒 $\text{VCl}_3$ 分别于低温4℃溶于超纯水中，配置质量浓度为3wt%的HPCH溶液、0.375wt%的TA溶液和0.47wt%的 $\text{VCl}_3$ 溶液。取1g HPCH溶液加入0.4g TA溶液在低温2~15℃快速涡旋混合均匀，再快速加入0.1g  $\text{VCl}_3$ 溶液在低温2~15℃涡旋混合均匀。则混合溶液中HPCH的浓度为2wt%，TA的浓度为0.1wt%， $\text{VCl}_3$ 的浓度0.031wt%， $\text{VCl}_3$ 与TA的摩尔比为3.33。该含单宁酸的溶液在低温2-15℃时具有良好的流动性，可注射可喷射，将其置于温度为37℃的水浴静置1min很快形成水凝胶，该类水凝胶也具有很好的光热效应，用激光功率密度 $2\text{W cm}^{-2}$ 的近红外光照射10分钟后温度从25℃升高到56℃。

[0056] 与实施例3类似的是，加入金属离子的种类为铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ )、钒离子( $\text{Ru}^{3+}$ )、钒离子( $\text{V}^{3+}$ )中的任一种或者它们的混合物，均能显示优异的光热效应；而铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )、锌离子( $\text{Zn}^{2+}$ )、二价锰离子( $\text{Mn}^{2+}$ )、二价镍离子( $\text{Ni}^{2+}$ )、三价钆离子( $\text{Gd}^{3+}$ )的加入几乎没有光热性能。

[0057] 实施例6其它温敏性含多羟基的聚合物代替温敏性羟丙基甲壳素制备含单宁酸和铁离子水凝胶

[0058] 使用温敏性的羧甲基甲壳素CMCH于低温4℃溶于0.5M NaOH中，用3M HCl溶液调节pH至7.4，单宁酸TA和六水氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 分别于低温4℃溶于超纯水中，配置质量浓度为3wt%的CMCH溶液、0.375wt%的TA溶液和0.8wt%的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液。取1g CMCH溶液加入0.4g TA溶液在低温2~10℃快速涡旋混合均匀，再快速加入0.1g  $\text{FeCl}_3$ 溶液在低温2~10℃涡旋混合均匀。将其置于温度为37℃的水浴静置1min很快形成水凝胶，该类水凝胶也具有很好的光热效应。

[0059] 使用其它温敏性含多羟基的聚合物如温敏性胶原蛋白、改性木葡聚糖温敏水凝胶、温敏性羟丙基纤维素、温敏性羟丙基甲基纤维素、温敏性羟丁基纤维素、温敏性羟丁基壳聚糖、温敏性羟戊基壳聚糖，温敏性羟乙基甲壳素或者温敏性羟丁基甲壳素代替温敏性羟丙基甲壳素，在低温下加入单宁酸水溶液和金属离子水溶液，可以制成可注射含单宁酸的具有光热效应的温敏复合水凝胶。

[0060] 实施例7水凝胶的体外光热抗菌实验

[0061] 采用平板计数法评估HPCH，2%-0.1%-0、2%-0.1%-1.67、2%-0.1%-3.33和2%-0.1%-6.67水凝胶的抗菌活性。将200 $\mu\text{L}$ 灭菌的水凝胶前体溶液添加到48孔细胞培养板中，并置于37℃使其凝胶。将10 $\mu\text{L}$ 大肠杆菌或金黄色葡萄球菌悬浮液( $5 \times 10^6 \text{CFU mL}^{-1}$ )滴到水凝胶上，样品分为无近红外照射和有近红外NIR照射组。对于NIR照射组，将每个孔的水凝胶于808nm激光( $2\text{W cm}^{-2}$ )下照射10分钟，无近红外光照射组不做处理。然后，将接种细菌的水凝胶在潮湿的环境中于37℃孵育8小时。用1mL PBS重悬凝胶上的细菌，并取其中的10 $\mu\text{L}$ 细菌悬浮液涂布到琼脂平板上，37℃培养24小时后计数菌落数量。同时，用荧光染料将细菌进行活死染色，通过激光共聚焦显微镜观察细菌的活死情况。如图3所示，对于HPCH和2%-0.1%-0水凝胶来说，不管是否进行NIR照射，细菌存活率没有差异性，说明纯HPCH水凝

胶或只含有TA的HPCH水凝胶不具有光热性能;对于2%-0.1%-1.67水凝胶来说,当进行NIR照射后表现出弱的抗菌性能,这是因为当 $\text{Fe}^{3+}$ /TA的摩尔比较低时,光热效应较弱,温度升高较低;对于2%-0.1%-3.33水凝胶来说,在NIR照射10min后即表现出明显的抗菌活性,说明该水凝胶具有优异的光热性能,可以快速杀灭细菌。

[0062] 实施例8水凝胶动物体内光热抗菌实验

[0063] 将 $100\mu\text{L } 10^8\text{CFU mL}^{-1}$ 金黄色葡萄球菌悬浮液皮下注射到小鼠的背部。24小时后,分别在感染区域注射 $100\mu\text{L}$  PBS,HPCH或2%-0.1%-3.33水凝胶。每组中的小鼠3只用 $2\text{W cm}^{-2}$  808nm激光照射5分钟,3只不进行近红外光照射。再过24小时,处死小鼠,收集感染部位的皮肤组织在 $10\text{mL}$  PBS中匀浆使细菌悬浮。将均质的细菌悬浮液( $10\mu\text{L}$ )涂布在琼脂平板上, $37^\circ\text{C}$ 温育24小时后进行计数。如图4所示,2%-0.1%-3.33水凝胶加近红外光照射组与对照组相比,杀菌率达到97%以上,说明该凝胶在体内能够进行有效杀菌且不损伤皮肤,在水凝胶降解之前,可以多次进行光热杀菌治疗。

[0064] 实施例9动物体内光生物治疗促进伤口愈合实验

[0065] 6周龄的雌性BALB/C小鼠通过腹腔内注射水合氯醛进行麻醉,并将小鼠的背毛剃除,在每只小鼠的背部上造成直径5mm的圆形的全厚度圆形伤口。将小鼠分为6组,每组五只小鼠:(I) PBS, (II) PBS+NIR, (III) HPCH, (IV) HPCH+NIR, (V) 2%-0.1%-3.33水凝胶, (VI) 2%-0.1%-3.33水凝胶+NIR。将约 $100\mu\text{L}$ 的PBS或水凝胶前体溶液注射到小鼠的伤口上。然后,使用3M Tegaderm<sup>TM</sup>透明薄膜固定防止水凝胶移位。对于NIR治疗组,每天用808nm激光( $0.02\text{W cm}^{-2}$ )照射伤口部位30分钟。每两天更换一次敷料,并在第4、8和12天拍摄伤口的图片和测量伤口面积大小。12天后,处死所有小鼠,收集伤口区域的皮肤组织进行苏木精和曙红以及马松三色染色。图5说明2%-0.1%-3.33水凝胶+NIR组的伤口愈合速度最快。组织切片结果也表明2%-0.1%-3.33水凝胶+NIR组再生的皮肤组织结构更加完整,且已长出毛囊和皮脂腺,胶原纤维量更多,排列也更加有序,说明2%-0.1%-3.33水凝胶可以吸收近红外光,有利于创面愈合,促进皮肤再生。

[0066] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

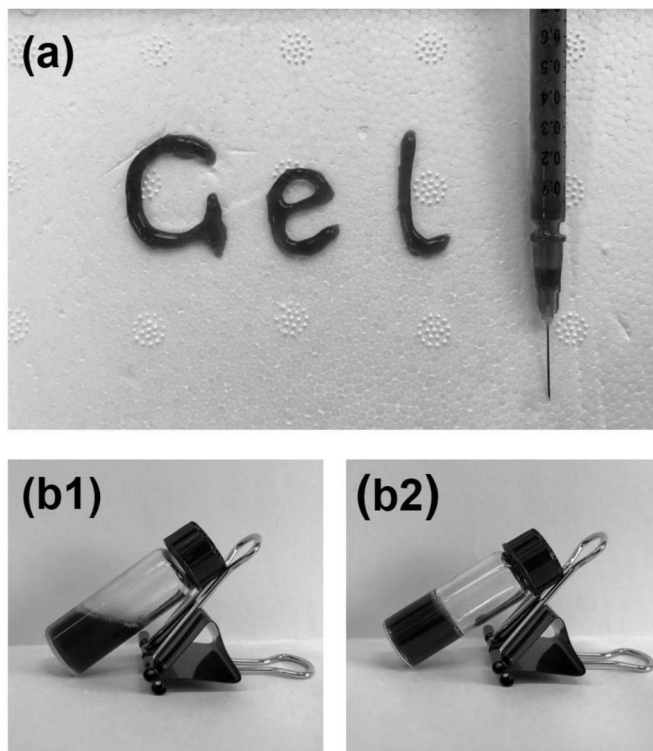


图1

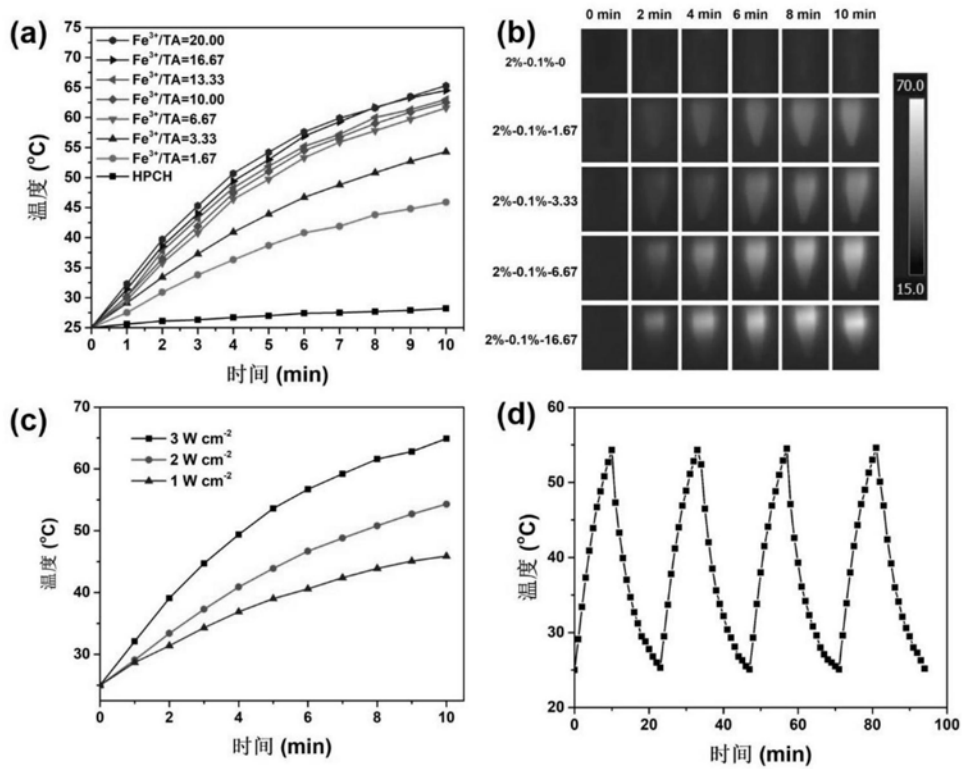


图2

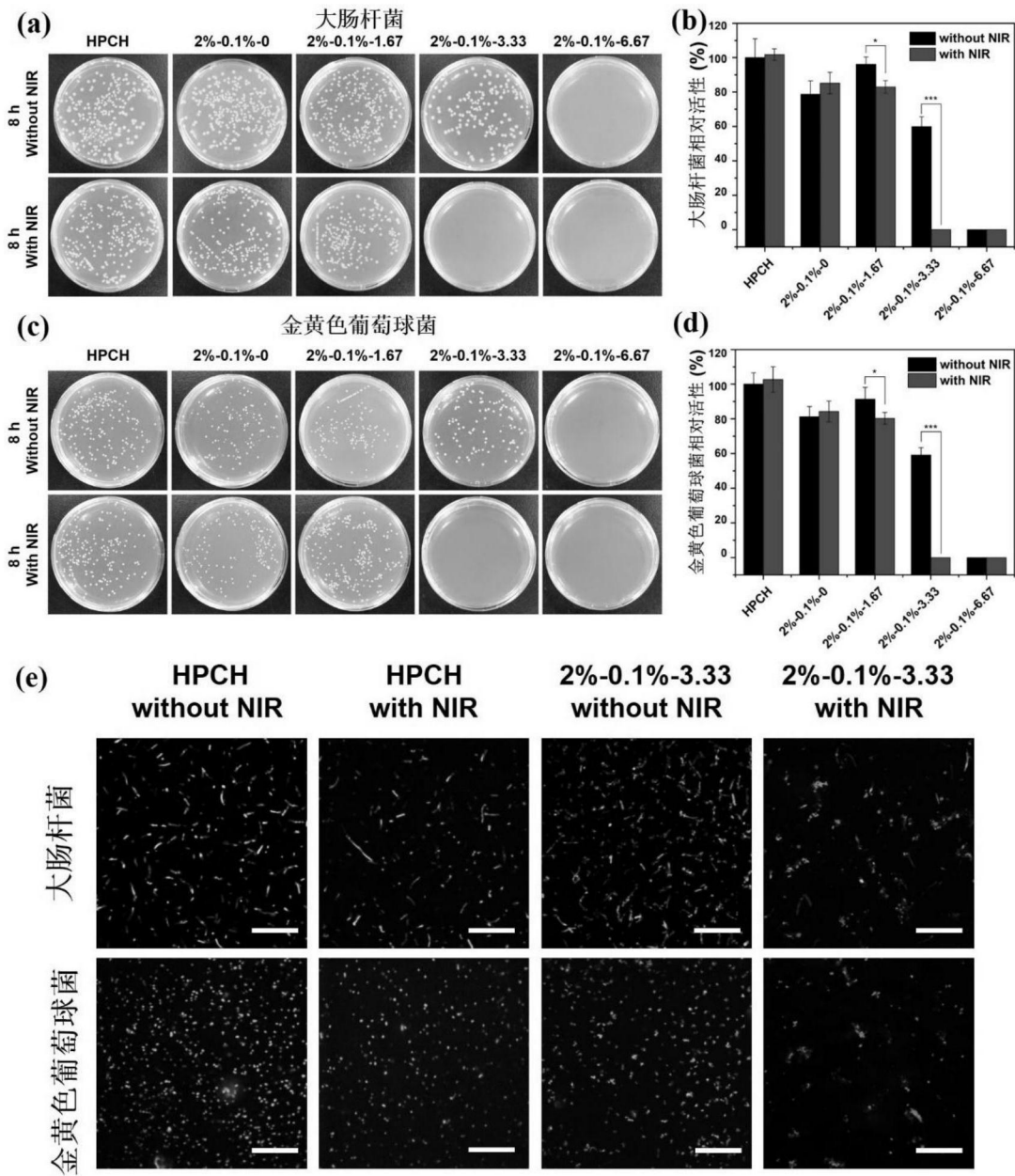


图3

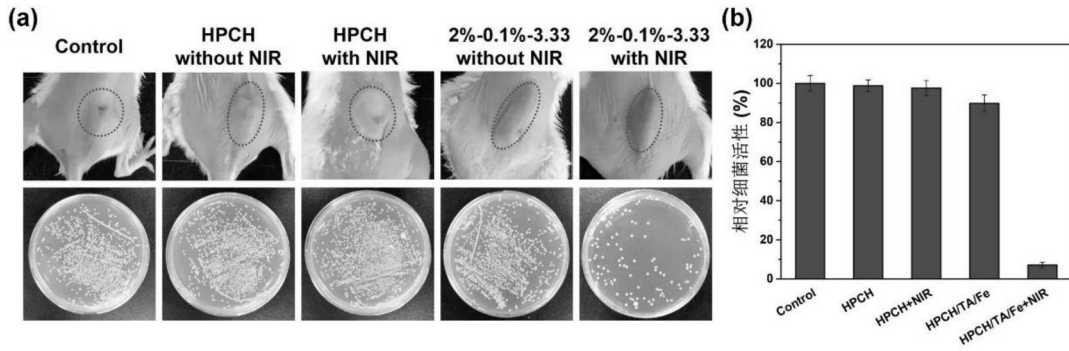


图4

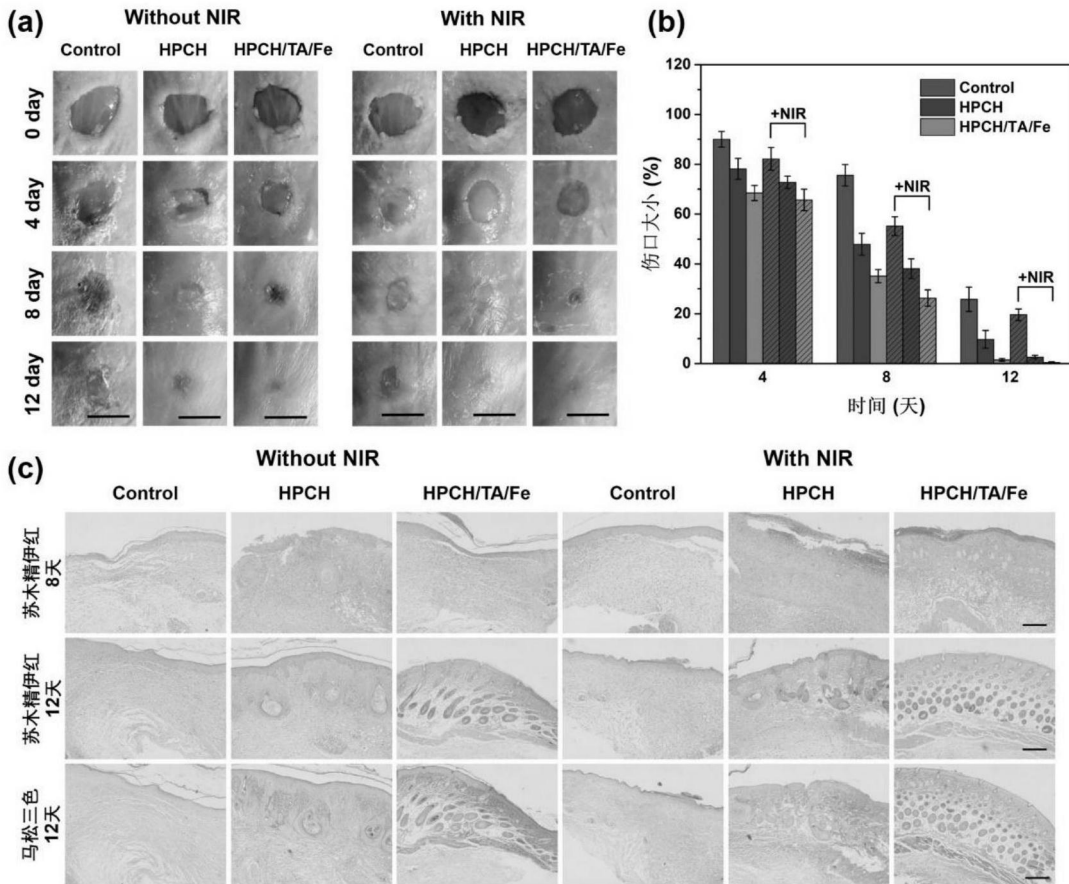


图5