



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116059156 B

(45) 授权公告日 2023.06.20

(21) 申请号 202310360011.X

A61K 38/39 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.06

A61K 47/36 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 47/42 (2017.01)

申请公布号 CN 116059156 A

A61K 45/06 (2006.01)

(43) 申请公布日 2023.05.05

A61P 17/02 (2006.01)

(73) 专利权人 四川大学

A61P 31/02 (2006.01)

地址 610000 四川省成都市一环路南一段
24号

A61P 31/04 (2006.01)

A61M 37/00 (2006.01)

(72) 发明人 杨立 王云兵 杨霞 龙林宇
胡成

(56) 对比文件

CN 113559314 A, 2021.10.29

CN 112546288 A, 2021.03.26

CN 111643447 A, 2020.09.11

CN 111388407 A, 2020.07.10

CN 112717194 A, 2021.04.30

(74) 专利代理机构 成都正德明志知识产权代理
有限公司 51360

专利代理师 陈瑶

审查员 屈小又

(51) Int. Cl.

A61K 9/00 (2006.01)

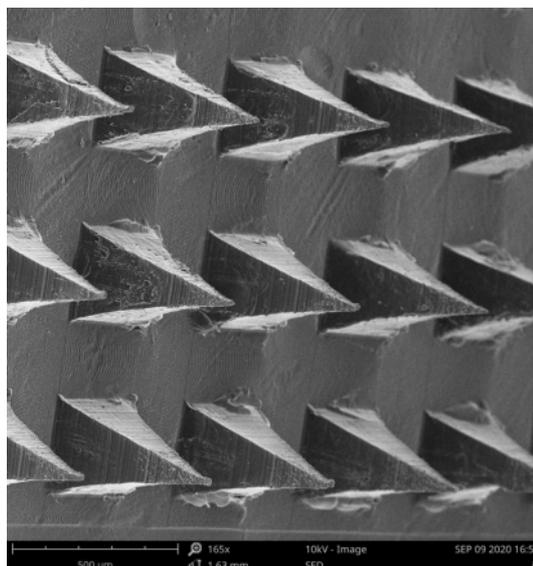
权利要求书1页 说明书14页 附图6页

(54) 发明名称

一种双层网络水凝胶微针及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种双层网络水凝胶微针及其制备方法和应用,属于医用材料技术领域,制备方法包括以下步骤:将含羧基的聚合物与含氨基和邻苯二酚的化合物接枝,制备含邻苯二酚的功能化聚合物;将明胶与重组人源化胶原蛋白溶解,制得溶液A;将含邻苯二酚的功能化聚合物、含至少两个邻苯二酚结构的化合物和抗菌材料溶解,制得溶液B;将溶液A注入模具内,干燥;将溶液B倒入模具内,交联反应并进行干燥,制得双层网络水凝胶微针。该双层网络水凝胶微针可有效解决现有的伤口敷料存在的促进伤口愈合效果差的问题,同时本发明提供的微针的制备过程具有操作简单、成本低的优点。



1. 一种双层网络水凝胶微针的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将含羧基的聚合物与含氨基和邻苯二酚的化合物接枝,制备含邻苯二酚的功能化聚合物,所述含羧基的聚合物为海藻酸钠、透明质酸钠、羧甲基壳聚糖、羧甲基纤维素或明胶;所述含氨基和邻苯二酚的化合物为3,4-二羟基苯甲胺氢溴酸盐、盐酸多巴胺或4-(3-氨基丙基)苯-1,2-二醇;

(2) 将明胶与重组人源化胶原蛋白溶解,制得溶液A;将含邻苯二酚的功能化聚合物、酚类化合物和抗菌材料溶解,制得溶液B,酚类化合物为儿茶酚紫、鞣花酸、单宁酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、棉酚或原花青素,所述抗菌材料为抗生素、金属氧化物和银纳米材料中的至少一种;

(3) 将溶液A注入模具内,离心使溶液A填充针孔,去除表面多余的溶液后干燥,干燥后形成微针结构;然后将溶液B倒入模具内,离心后于室温下使溶液B进行交联反应并进行干燥,干燥后形成基座结构,制得双层网络水凝胶微针。

2. 如权利要求1所述的双层网络水凝胶微针的制备方法,其特征在于,步骤(1)中具体反应过程为:将含羧基的聚合物溶解,制得聚合物溶液,向聚合物溶液中添加催化剂并搅拌反应,然后向其中加入含氨基和邻苯二酚的化合物,于加热和惰性气体环境下反应,然后进行透析并干燥,制得含邻苯二酚的功能化聚合物。

3. 如权利要求1或2所述的双层网络水凝胶微针的制备方法,其特征在于,所述含羧基的聚合物和含氨基和邻苯二酚的化合物的质量比为0.4-1:1。

4. 如权利要求2所述的双层网络水凝胶微针的制备方法,其特征在于,所述催化剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,所述含羧基的聚合物、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为10:2-7:2-5。

5. 如权利要求1所述的双层网络水凝胶微针的制备方法,其特征在于,步骤(2)中溶液A中明胶的浓度为100-500 mg/mL,重组人源化胶原蛋白的浓度为50-800 $\mu\text{g/mL}$;溶液B中含邻苯二酚的功能化聚合物的浓度为100-400 mg/mL;酚类化合物的浓度为50-200 mg/mL;抗菌材料的浓度为0.001-100 mg/mL。

6. 如权利要求1或5所述的双层网络水凝胶微针的制备方法,其特征在于,所述重组人源化胶原蛋白为重组人源化I型胶原蛋白或重组人源化III型胶原蛋白。

7. 如权利要求1所述的双层网络水凝胶微针的制备方法,其特征在于,步骤(3)中双层网络水凝胶微针中,微针结构为圆锥形或棱锥型,微针的长度为400-1000 μm ,微针的底面直径或边长为200-400 μm ,相邻两针尖之间的距离为400-800 μm ,基座结构厚度为3-10 mm。

8. 一种双层网络水凝胶微针,其特征在于,采用权利要求1-7中任一项所述的方法制得。

9. 权利要求8所述的双层网络水凝胶微针在制备伤口敷料中的应用。

一种双层网络水凝胶微针及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于医用材料技术领域,具体涉及一种双层网络水凝胶微针及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 皮肤作为人体最大的器官,在维持体内稳态中起着关键作用。随着糖尿病患者数量以及患者老龄化程度不断增加,导致慢性伤口的患病率逐年上升。

[0003] 当前用于治疗慢性伤口的护理标准(SOC)中主要采用手术清创、感染控制、缓解糖尿病足和压力性溃疡的压力、对静脉溃疡的适当压迫以及使用伤口敷料等操作手段进行治疗。随着生物材料领域的巨大进步以及对伤口愈合过程的深入了解,已经开发了纳米天然高分子纤维绷带、水凝胶、纱布、泡沫、海绵、喷雾、薄膜等许多新颖的护理产品,目前市场上已有5000多种伤口护理产品。尽管常规药物剂型(例如溶液,纤维垫和水凝胶)可以吸收伤口渗出液并在一定程度上防止伤口感染,但是它们在伤口部位的滞留性差的缺点会导致药物生物利用度低、伤口粘连的风险增加以及频繁使用的问题。

[0004] 对于伤口愈合,伤口部位活性氧(ROS)的过量产生会破坏氧化剂和抗氧化剂的平衡,从而导致组织再生和伤口愈合缓慢。而且,目前临床上慢性伤口的闭合率低,且复发率高,因此,亟需开发出新型功能敷料,促进慢性伤口愈合。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的上述问题,本发明提供一种双层网络水凝胶微针及其制备方法和应用,该双层网络水凝胶微针可有效解决现有的伤口敷料存在的促进伤口愈合效果差的问题,同时本发明提供的微针的制备过程具有操作简单、成本低的优点。

[0006] 为实现上述目的,本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0007] 一种双层网络水凝胶微针的制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1)将含羧基的聚合物与含氨基和邻苯二酚的化合物接枝,制备含邻苯二酚的功能化聚合物;

[0009] (2)将明胶与重组人源化胶原蛋白溶解,制得溶液A;将含邻苯二酚的功能化聚合物、含至少两个邻苯二酚结构的化合物和抗菌材料溶解,制得溶液B;

[0010] (3)将溶液A注入模具内,离心使溶液A填充针孔,去除表面多余的溶液后干燥;然后将溶液B倒入模具内,离心后于室温下使溶液B进行交联反应并进行干燥,制得双层网络水凝胶微针。

[0011] 进一步地,步骤(1)中具体反应过程为:将含羧基的聚合物溶解,制得聚合物溶液,向聚合物溶液中添加催化剂并搅拌反应,然后向其中加入含氨基和邻苯二酚的化合物,于加热和惰性气体环境下反应,然后进行透析并干燥,制得含邻苯二酚的功能化聚合物。

[0012] 进一步地,含羧基的聚合物和含氨基和邻苯二酚的化合物的质量比为0.4-1:1;

[0013] 含羧基的聚合物为海藻酸钠及其衍生物、透明质酸钠及其衍生物、羧甲基壳聚糖

及其衍生物、羧甲基纤维素及其衍生物或明胶及其衍生物；含氨基和邻苯二酚的化合物为3,4-二羟基苯甲胺氢溴酸盐、盐酸多巴胺或4-(3-氨基丙基)苯-1,2-二醇。

[0014] 进一步地,催化剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,含羧基的聚合物、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为10:2-7:2-5。

[0015] 进一步地,步骤(2)中溶液A中明胶的浓度为100-500 mg/mL,重组人源化胶原蛋白的浓度为50-800 $\mu\text{g/mL}$;溶液B中含邻苯二酚的功能化聚合物的浓度为100-400 mg/mL;含至少两个邻苯二酚结构的化合物的浓度为50-200 mg/mL;抗菌材料的浓度为0.001-100 mg/mL。

[0016] 进一步地,重组人源化胶原蛋白为重组人源化I型胶原蛋白或重组人源化III型胶原蛋白。

[0017] 进一步地,步骤(2)中含至少两个邻苯二酚结构的化合物为儿茶酚紫、鞣花酸、单宁酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、棉酚或原花青素;抗菌材料为抗生素、金属氧化物和银纳米材料中的至少一种。

[0018] 进一步地,抗生素为万古霉素、庆大霉素、阿米卡星、四环素、土霉素、金霉素、米诺环素、红霉素和链霉素中的至少一种;

[0019] 银纳米材料为银纳米颗粒、银纳米簇、银纳米棒、银纳米星和银纳米片中的至少一种。

[0020] 进一步地,步骤(3)中双层网络水凝胶微针中,溶液A干燥后形成微针结构,溶液B干燥后形成基座结构,微针结构为圆锥形或棱锥型,微针的长度为400-1000 μm ,微针的底面直径或边长为200-400 μm ,相邻两针尖之间的距离为400-800 μm ,基座结构厚度为3-10 mm。

[0021] 一种双层网络水凝胶微针,采用上述的方法制得。

[0022] 上述的双层网络水凝胶微针在制备伤口敷料中的应用。

[0023] 本发明所产生的有益效果为:

[0024] 1、本发明制备的双层网络水凝胶微针中包括微针层和水凝胶基座层,微针层中含有多根微针结构,微针结构能以微创的方式克服坏死/角化过度的组织屏障,与创口内部的组织接触,在组织内快速溶解,实现有效成分重组人源化胶原蛋白的快速释放,利用重组人源化胶原蛋白促进组织再生,达到促进组织修复的目的。

[0025] 2、含至少两个邻苯二酚结构的化合物在空气环境中通过氢键与含氨基和邻苯二酚的化合物分子、含邻苯二酚的功能化聚合物之间发生氧化聚合,交联形成稳定的水凝胶基座层,水凝胶基座可以起到密封剂的作用,防止外界的细菌附着,同时还能保持创口湿润;水凝胶基座中含至少两个邻苯二酚结构的化合物既与含邻苯二酚的功能化聚合物交联,又能络合抗菌材料中的银纳米颗粒等金属/金属氧化物纳米粒子;在使用过程中,含至少两个邻苯二酚结构的化合物可从基座中缓慢释放;含至少两个邻苯二酚结构的化合物为抗氧化剂,具有较强的自由基清除作用,在使用过程中,被释放出来的含至少两个邻苯二酚结构的化合物可消耗组织内产生的活性氧,缓解氧化应激反应,提高创口的修复效果,同时,基座中添加的抗生素也逐渐释放,可抑制细菌感染,通过抗氧化剂和抗生素的使用降低细菌和活性氧对创口愈合的影响,加速创口的修复。

[0026] 3、本申请中直接采用明胶作为微针针尖的基体材料,使制得的针尖内部密度更高,以增加针尖的力学强度,提高针尖在创口的刺入效果,有效解决现有的交联凝胶结构的针尖存在的结构疏松,吸水后力学强度下降的问题;当微针针尖在创口组织内部快速溶解后,微针针尖在创口表面坏死的组织屏障上形成了微孔通道,该微孔通道可作为水凝胶基座层中的抗生素和抗氧化剂成分进入创口组织内部的药物渗透通道,提高抗生素和抗氧化剂成分在创口表面的渗入效果,进而提高促进创口修复的效果。

[0027] 4、本发明双层网络水凝胶微针的制备过程简单、成本较低,生物相容性良好,在体内无不良反应。

附图说明

[0028] 图1为实施例1中透明质酸(HA)和盐酸多巴胺接枝透明质酸(HA-DA)的核磁共振氢谱图;

[0029] 图2为实施例1中氧化交联的HA-DA/单宁酸水凝胶的图片;

[0030] 图3为实施例1中氧化交联的HA-DA/单宁酸水凝胶的频率扫描图;

[0031] 图4为实施例1中银纳米颗粒的透射电镜图;

[0032] 图5为实施例1中双层网络水凝胶微针的制备流程图;

[0033] 图6为实施例1中双层网络水凝胶微针的扫描电镜图;

[0034] 图7中a图力学强度检测图;b图为实施例1中和对比例1-3中不同双层网络水凝胶微针的力学强度统计图;

[0035] 图8为实施例1中和对比例1-4中不同双层网络水凝胶微针自由基清除性能统计图;

[0036] 图9为实施例1中和对比例1-4中不同双层网络水凝胶微针生物相容性统计图;

[0037] 图10为实施例1中和对比例1-4中不同双层网络水凝胶微针保护细胞免受氧化应激性能统计图;

[0038] 图11为实施例1中和对比例1-4中不同双层网络水凝胶微针抗菌性能统计图。

具体实施方式

[0039] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明,即所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。

[0040] 因此,以下对提供的本发明的实施例的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围,而是仅仅表示本发明的选定实施例。基于本发明的实施例,本领域技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0041] 需要说明的是,术语“第一”和“第二”等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个……”限定的要素,并不排除在包括要素

的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

[0042] 下面结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0043] 实施例1

[0044] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0045] (1) 盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0046] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH值为4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基;然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0047] (2) 抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0048] 将新鲜制备的硼氢化钠(2.00 mM)与柠檬酸三钠(4.28 mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60°C反应30min后,逐滴加入2 mL AgNO₃(1.00 mM)溶液,然后温度升高到90°C,并将溶液的pH值调整到10.5,搅拌25min后,混合物溶液在室温下缓慢冷却,最后,将混合液以12000 rpm/min的速度离心15 min,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4 °C冰箱中备用;

[0049] (3) 可溶解针尖的制备

[0050] 在37°C条件下,将100 μl含明胶(200 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0051] (4) 水凝胶基座的制备

[0052] 将150 μl含有HA-DA(200 mg/mL)、单宁酸(50 mg/ml)、AgNPs(20 μg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为600 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0053] 实施例2

[0054] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0055] (1) 盐酸多巴胺(DA)修饰海藻酸钠(Alg)的合成

[0056] 将0.5 g Alg溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活Alg分子链上的羧基,然后将358 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到Alg-DA;

[0057] (2) 抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0058] 将新鲜制备的硼氢化钠(2.00 mM)与柠檬酸三钠(4.28 mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60°C反应30min后,逐滴加入2 mL AgNO₃(1.00 mM)溶液,然后温度又升高到90°C,并将溶液的pH值调整到10.5,搅拌25min后,混合物溶液在室温下缓慢冷却,最后,将混合液以12000 rpm/min的速度离心15 min,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4 °C冰箱中备用;

[0059] (3)可溶解针尖的制备

[0060] 在37℃,将100 μl含明胶(200 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm / min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0061] (4)水凝胶基座的制备

[0062] 将150 μl含Alg-DA(150 mg/mL)、原花青素(100 mg/ml)、AgNPs(20 μg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0063] 实施例3

[0064] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0065] (1)盐酸多巴胺(DA)修饰羧甲基壳聚糖(CMCS)的合成

[0066] 将1.5 g CMCS溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3h以激活CMC分子链上的羧基,然后将624 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到CMCS-DA;

[0067] (2)抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0068] 将新鲜制备的硼氢化钠(2.00 mM)与柠檬酸三钠(4.28 mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60℃反应30min后,逐滴加入2 mL AgNO₃(1.00 mM)溶液,然后温度又升高到90℃,并将溶液的pH值调整到10.5,搅拌25min后,混合物溶液在室温下缓慢冷却,最后,将混合液以12000 rpm/min的速度离心15 min,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4 °C冰箱中备用;

[0069] (3)可溶解针尖的制备

[0070] 在37℃,将100 μl含明胶(250 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0071] (4)水凝胶基座的制备

[0072] 将150 μl含CMCS-DA(250 mg/mL)、表没食子儿茶素没食子酸酯(50 mg/ml)、AgNPs(15 μg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0073] 实施例4

[0074] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0075] (1)盐酸多巴胺(DA)修饰羧甲基纤维素(CMCL)的合成

[0076] 将1 g CMCL溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活CMCL分子链上的羧基,然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻

干,得到CMCL-DA;

[0077] (2) 抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0078] 将新鲜制备的硼氢化钠(2.00 mM)与柠檬酸三钠(4.28 mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60℃反应30min后,逐滴加入2 mL AgNO_3 (1.00 mM)溶液,然后温度又升高到90℃,并将溶液的pH值调整到10.5,搅拌25min后,混合物溶液在室温下缓慢冷却,最后,将混合液以12000 rpm/min的速度离心15 min,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4℃冰箱中备用;

[0079] (3) 可溶解针尖的制备

[0080] 在37℃,将100 μl 含明胶(200 mg/mL)和重组人源化III型胶原蛋白(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0081] (4) 水凝胶基座的制备

[0082] 将150 μl 含CMCL-DA(200 mg / mL)、棉酚(80 mg/ml)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm ,四棱锥型底面边长为300 μm ,相邻两针尖之间的距离为600 μm ,基座结构厚度为5 mm。

[0083] 实施例5

[0084] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0085] (1) 盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0086] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在 N_2 氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35℃条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基,然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0087] (2) 抗菌材料氧化锌纳米颗粒的制备

[0088] 将50 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和25 mM六亚甲基四胺(HMT)溶解在100 mL去离子水中,在密封条件下搅拌10 min,在65℃的水浴中加热15 min后,将0.14 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、0.1 g羟丙基甲基纤维素(HPMC)和0.025 g碳添加到上述溶液中,并将其放在85℃水浴条件下保持10 h,然后将混合物溶液用无水乙醇洗涤两次,并用水洗涤两次,进行微波辐射15 min(850瓦),在-80℃冷冻后,冷冻干燥12 h,最终获得纳米氧化锌(ZnO)粉末,并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4℃冰箱中备用;

[0089] (3) 可溶解针尖的制备

[0090] 在37℃,将100 μl 含明胶(300 mg/mL)和重组人源化III型胶原蛋白(600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的混合溶液倒入微针模具中,然后以4000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0091] (4) 水凝胶基座的制备

[0092] 将150 μl 含HA-DA(200 mg/mL)、单宁酸(70 mg/mL)、ZnO(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm ,四棱锥型底面边长为300 μm ,相邻两

针尖之间的距离为600 μm ,基座结构厚度为5 mm。

[0093] 实施例6

[0094] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0095] (1) 盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0096] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在 N_2 氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基,然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0097] (2) 抗菌材料银纳米簇的制备

[0098] 将制备的谷胱甘肽(300 μL , 50 mM)和 AgNO_3 (250 μL , 20 mM)的水溶液在4.45 mL的去离子水中剧烈搅拌混合,可立即观察到白色沉淀形成,表明GSH-Ag(I)配合物形成,然后加入一定量的氢氧化钠溶液(180 μL , 0.1 M),将溶液pH调至6.1,几秒钟内白色沉淀溶解,反应溶液变清,将反应溶液加热至175 $^{\circ}\text{C}$,维持约5h,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,制备银纳米簇;

[0099] (3) 可溶解针尖的制备

[0100] 在37 $^{\circ}\text{C}$,将100 μl 含明胶(300 mg/mL)和重组人源化III型胶原蛋白(600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的混合溶液倒入微针模具中,然后以4000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0101] (4) 水凝胶基座的制备

[0102] 将150 μl 含HA-DA(200 mg/mL)、鞣花酸(70mg/mL)、银纳米簇(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm ,四棱锥型底面边长为300 μm ,相邻两针尖之间的距离为600 μm ,基座结构厚度为5 mm。

[0103] 实施例7

[0104] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0105] (1) 盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0106] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在 N_2 氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基,然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0107] (2) 抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0108] 将新鲜制备的硼氢化钠(2.00 mM)与柠檬酸三钠(4.28 mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60 $^{\circ}\text{C}$ 反应30min后,逐滴加入2 mL AgNO_3 (1.00 mM)溶液,然后温度又升高到90 $^{\circ}\text{C}$,并将溶液的pH值调整到10.5,搅拌25min后,混合物溶液在室温下缓慢冷却,最后,将混合液以12000 rpm/min的速度离心15min,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用;

[0109] (3) 可溶解针尖的制备

[0110] 在37℃,将100 μl含明胶(300 mg/mL)和重组人源化I型胶原蛋白(580 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0111] (4)水凝胶基座的制备

[0112] 将150 μl含HA-DA(200 mg/mL)、单宁酸(70 mg/mL)、AgNPs(20 μg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0113] 实施例8

[0114] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0115] (1)盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0116] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基,然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0117] (2)抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0118] 将新鲜制备的硼氢化钠(2.00 mM)与柠檬酸三钠(4.28 mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60℃反应30min后,逐滴加入2 mL AgNO₃(1.00 mM)溶液,然后温度又升高到90℃,并将溶液的pH值调整到10.5,搅拌25 min后,混合物溶液在室温下缓慢冷却,最后,将混合液以12000 rpm/min的速度离心15 min,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4 °C冰箱中备用;

[0119] (3)可溶解针尖的制备

[0120] 在37℃,将100 μl含明胶(200 mg/mL)和重组人源化III型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0121] (4)水凝胶基座的制备

[0122] 将150 μl含HA-DA(200 mg/mL)、单宁酸(70 mg/mL)、AgNPs(20μg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0123] 实施例9

[0124] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0125] (1)盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0126] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基,然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0127] (2) 抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0128] 将新鲜制备的硼氢化钠(2.00 mM)与柠檬酸三钠(4.28 mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60℃反应30min后,逐滴加入2 mL AgNO₃(1.00 mM)溶液,然后温度又升高到90℃,并将溶液的pH值调整到10.5,搅拌25 min后,混合物溶液在室温下缓慢冷却,最后,将混合液以12000 rpm/min的速度离心15 min,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4℃冰箱中备用;

[0129] (3) 可溶解针尖的制备

[0130] 在37℃,将100 μl含明胶(200 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0131] (4) 水凝胶基座的制备

[0132] 将150 μl含HA-DA(300 mg/mL)、单宁酸(70 mg/mL)、AgNPs(30 μg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0133] 实施例10

[0134] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0135] (1) 盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0136] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35℃条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基,然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0137] (2) 可溶解针尖的制备

[0138] 在37℃,将100 μl含明胶(200 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0139] (3) 水凝胶基座的制备

[0140] 将150 μl含HA-DA(200 mg/mL)、单宁酸(50 mg/mL)、庆大霉素(10 mg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0141] 实施例11

[0142] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0143] (1) 盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0144] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35℃条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基,然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,

得到HA-DA;

[0145] (2)可溶解针尖的制备

[0146] 在37℃,将100 μl含明胶(200 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0147] (3)水凝胶基座的制备

[0148] 将150 μl HA-DA(200 mg / mL)、单宁酸(50 mg/ml)、四环素(18 mg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0149] 实施例12

[0150] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0151] (1)3,4-二羟基苯甲胺氢溴酸盐(DBH)修饰透明质酸(HA)的合成

[0152] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH 4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3h以激活HA分子链上的羧基,然后将569 mg DBH加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DBH;

[0153] (2)抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0154] 将新鲜制备的硼氢化钠(2.00 mM)与柠檬酸三钠(4.28 mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60℃反应30min后,逐滴加入2 mL AgNO₃(1.00 mM)溶液,然后温度又升高到90℃,并将溶液的pH值调整到10.5,搅拌25 min后,混合物溶液在室温下缓慢冷却,最后,将混合液以12000 rpm/min的速度离心15 min,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,使用前储存在4 °C冰箱中备用;

[0155] (3)可溶解针尖的制备

[0156] 在37℃,将100 μl含明胶(200 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合物充满模具,并去除模具表面多余的溶液;

[0157] (4)水凝胶基座的制备

[0158] 将150 μl含HA-DBH(200 mg/mL)、单宁酸(50 mg/ml)、AgNPs(20 μg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有圆锥形微针的水凝胶,微针的长度为500 μm,圆锥形底面直径为400 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0159] 对比例1

[0160] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0161] (1)盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0162] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH值为4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基;然后将569 mg盐

酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0163] (2)在37 °C条件下,将100 μ l明胶(200 mg/mL)溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将溶液充满模具,并去除模具表面多余的溶液;将150 μ l含有HA-DA(200 mg/mL)、单宁酸(50 mg/ml)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为600 μ m,四棱锥型底面边长为300 μ m,相邻两针尖之间的距离为600 μ m,基座结构厚度为5 mm。

[0164] 对比例2

[0165] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0166] (1)盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0167] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH值为4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基;然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0168] (2)在37 °C条件下,将100 μ l明胶(200 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μ g/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将混合溶液充满模具,并去除模具表面多余的溶液;将150 μ l 含有HA-DA(200 mg / mL)、单宁酸(50 mg/ml)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为600 μ m,四棱锥型底面边长为300 μ m,相邻两针尖之间的距离为600 μ m,基座结构厚度为5 mm。

[0169] 对比例3

[0170] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0171] (1)盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0172] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH值为4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基;然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0173] (2)在37 °C条件下,将100 μ l明胶(200 mg/mL)溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将溶液充满模具,并去除模具表面多余的溶液;将150 μ l 含有HA-DA(200 mg/mL)、单宁酸(50 mg/ml)、AgNPs(20 μ g/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为600 μ m,四棱锥型底面边长为300 μ m,相邻两针尖之间的距离为600 μ m,基座结构厚度为5 mm。

[0174] 对比例4

[0175] 一种双层网络水凝胶微针,其制备方法包括以下步骤:

[0176] (1)盐酸多巴胺(DA)修饰透明质酸(HA)的合成

[0177] 将1 g HA溶解在100 mL去离子水中,并将溶液保持在N₂氛围下,将575 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和345 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加到溶液中并在pH值为4.75-5.0、35 °C条件下搅拌3 h以激活HA分子链上的羧基;然后将569 mg盐酸多巴胺加入混合物中,在室温下持续反应12 h后,将溶液在pH值5.5的条件下透析3天并冻干,得到HA-DA;

[0178] (2)在37 °C条件下,将100 μL明胶(200 mg/mL)和重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(500 μg/mL)的混合溶液倒入微针模具中,然后以3000 rpm/min的速度离心10 min,将溶液充满模具,并去除模具表面多余的溶液;将150 μL含有HA-DA(200 mg/mL)和AgNPs(20 μg/mL)的混合溶液倒入模具中,然后在空气中、室温下交联24 h后放入烘箱中,干燥后将微针从模具上剥离,获得含有四棱锥形微针的水凝胶,微针的长度为600 μm,四棱锥型底面边长为300 μm,相邻两针尖之间的距离为600 μm,基座结构厚度为5 mm。

[0179] 试验例

[0180] 以实施例1中制得的物质为例,进行检测,具体操作过程及结果如下:

[0181] 一、对实施例1步骤(1)中合成的HA-DA进行检测,具体结果见图1。在核磁共振氢谱图中,可以观察盐酸多巴胺亚甲基质子峰(δ 3.1和2.7 ppm)和芳香质子峰(δ ~ 6.8 ppm),说明盐酸多巴胺分子被成功接枝在HA的分子链上。

[0182] 二、对实施例1步骤(1)中合成的HA-DA与单宁酸的成胶性能进行验证。

[0183] 将2 mL HA-DA(200 mg/mL)和单宁酸(50 mg/ml)的混合溶液加入玻璃瓶,静置8 h后将玻璃瓶倾斜90°,如图2所示,玻璃瓶中形成水凝胶,且未观察到玻璃瓶中的水凝胶流动;此外,如图3所示,玻璃瓶中水凝胶的频率扫描图表明,水凝胶的储能模量远大于损耗模量,也证明水凝胶成功形成;还可以观察到,单宁酸的加入,明显增强了水凝胶的储能模量,从821 Pa到1223 Pa,表明掺杂富含邻位羟基的单宁酸的HA-DA水凝胶具有更稳定的水凝胶结构。

[0184] 三、对实施例1步骤(2)中制得的银纳米颗粒采用透射电镜(TEM)进行形貌检测,如图4所示,透射电镜(TEM)结果表明银纳米颗粒为均一的球形结构,粒径约为14 ± 1.75 nm,证明银纳米颗粒成功制备。

[0185] 三、对实施例1中制得的双层网络水凝胶微针进行检测,双层网络水凝胶微针的制备流程如图5所示,用扫描电镜观察了双层网络水凝胶微针的形貌,如图6所示,所得双层网络水凝胶微针为阵列结构,每根微针针尖都为金字塔形状,高度为600 μm,相邻微针尖端距离为600 μm,底边长为300 μm,这是良好的皮肤组织插入能力的基础。

[0186] 四、对实施例1中制得的双层网络水凝胶微针的力学性能进行检测,具体测试方法为:将双层网络水凝胶微针固定在万能力学测试仪的平台上,随后以0.1 mm/min的速率压缩,总位移0.4mm,如图7中a图所示;图7中b图中测量结果显示,双层网络水凝胶微针的力学强度为70N/针,足以穿透皮肤组织。

[0187] 五、对实施例1、对比例1-4中制得的双层网络水凝胶微针的体外抗氧化性能进行检测,具体测试过程如下:将15 mg双层网络水凝胶微针匀浆和100 μM 2,2-联苯基-1-苦基肼基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)分散于3 mL乙醇中,将混合溶液避光搅拌30 min,测定混合溶液在517 nm处的紫外吸收强度,DPPH的清除效率按以下公式计算:

[0188] DPPH清除效率 = $(A_B - A_H) / A_B$

[0189] 其中 A_B 为DPPH和乙醇混合后溶液的吸收强度, A_H 为DPPH、乙醇和水凝胶基座混合后溶液的吸收强度,每个试验分三个平行样进行。

[0190] 结果如图8所示,实施例1、对比例1-3中含有单宁酸的双层网络水凝胶微针对DPPH的清除效率都超过95%,对比例4中不含有单宁酸的双层网络水凝胶微针对DPPH的清除效率低于80%,表明单宁酸的添加可以增强微针的抗氧化能力。

[0191] 六、采用小鼠成纤维细胞(L929细胞)对实施例1和对比例1-4中的双层网络水凝胶微针的生物相容性进行评价,评价过程中以与实施例1和对比例1-4中双层网络水凝胶微针溶液等体积的磷酸盐缓冲溶液(PBS)作为对照组。

[0192] 将等量实施例1和对比例1-4中的双层网络水凝胶微针分别加入2 mL完全细胞培养基中,48h后将培养基用0.22 μm 的过滤器过滤,制得双层网络水凝胶微针溶液;将L929细胞以8000个细胞/孔的标准接种到96孔板中,并在37 $^{\circ}\text{C}$ (5% CO_2)下孵育24 h,然后将100 μL 双层网络水凝胶微针溶液和磷酸盐缓冲溶液分别添加到96孔培养板中,培养24 h和48 h后,分别将稀释的细胞计数试剂(CCK8)溶液添加到每个培养孔中,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下再孵育2 h,然后在450 nm条件下测定96孔板中每个培养孔中混合物的吸光度,吸光度值用于计算细胞存活率(%),每个测试进行了六次。

[0193] 结果如图9所示,结果表明,培养24 h和48 h后,与对照组(等体积PBS处理)相比,实施例1和对比例1-4中所有双层网络水凝胶微针组以及对照组中小鼠成纤维细胞的存活率均大于95%,显示双层网络水凝胶微针材料无毒性,且表明微针具有良好的细胞相容性。此外,由于双层网络水凝胶微针良好的生物活性,实施例1、对比例2和对比例4组中含有重组人源化III型胶原蛋白的双层网络水凝胶微针的细胞活性明显高于其它三组。

[0194] 七、采用小鼠成纤维细胞(L929细胞)对实施例1和对比例1-4中的双层网络水凝胶微针保护细胞免受氧化应激的功能进行评价,评价过程中以与实施例1和对比例1-4中双层网络水凝胶微针溶液等体积的磷酸盐缓冲溶液(PBS)作为对照组。

[0195] 将等量实施例1和对比例1-4中的双层网络水凝胶微针分别加入2 mL完全细胞培养基中,48h后将培养基用0.22 μm 的过滤器过滤,制得双层网络水凝胶微针溶液;将L929细胞在正常生长培养基中孵育24小时后,将培养基替换为含有0.1 mM H_2O_2 的新鲜培养基,然后分别向部分培养孔中加入100 μL 实施例1、对比例1-4中双层网络水凝胶微针溶液和对照组中的磷酸盐缓冲溶液,预留部分培养孔不添加任何物质,作为 H_2O_2 空白组,然后通过活/死测定用于评估 H_2O_2 处理后不同处理组中的细胞活力。在培养24 h和48 h后,将稀释的细胞计数试剂(CCK8)溶液添加到每个孔中,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下再孵育2 h,然后在450 nm条件下测定混合物的吸光度,吸光度值用于计算细胞存活率(%),每个测试进行了六次。

[0196] 结果如图10所示,结果表明,培养24 h和48 h后,由于 H_2O_2 处理导致L929细胞产生氧化应激,出现凋亡, H_2O_2 空白组和对照组(等体积PBS处理)的细胞存活率不足70%;而由于实施例1和对比例1-3组中的双层网络水凝胶微针溶液中含有单宁酸成分,具有一定的抗氧化能力,可以抵抗细胞产生的氧化应激,使得L929细胞的存活率均大于90%,而对比例4组中不含单宁酸的双层网络水凝胶微针溶液中细胞存活率仅在80%左右,低于实施例1中的双层网络水凝胶微针溶液,表明含有单宁酸的双层网络水凝胶微针可赋予细胞较好的抗氧化应激能力,可提高细胞在氧化环境下的存活率,提高组织的修复能力。

[0197] 八、采用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌对水凝胶进行抗菌效果评价,评价过程中以

与实施例1和对比例1-4中双层网络水凝胶微针溶液等体积的磷酸盐缓冲溶液(PBS)作为对照组。

[0198] 将等量实施例1和对比例1-4中的双层网络水凝胶微针分别加入2 mL完全细胞培养基中,48h后将培养基用0.22 μm的过滤器过滤,制得双层网络水凝胶微针溶液;分别将1mL金黄色葡萄球菌和大肠杆菌(1×10^6 CFU/mL)与实施例1、对比例1-4中的双层网络水凝胶微针溶液和对照组中的磷酸盐缓冲溶液在24孔板中共培养12 h,然后将细菌悬浮液涂在溶菌肉汤培养基(LB固体培养基),于37 °C培养12 h;然后在600 nm波长处检测上述细菌悬浮液的光密度,测定该细菌悬浮液的浓度。

[0199] 结果如图11所示,实施例1、对比例3和对比例4中的双层网络水凝胶微针中含有银纳米颗粒,采用实施例1、对比例3和对比例4中的双层网络水凝胶微针溶液处理后的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的存活率均低于50%,对比例1、对比例2中的双层网络水凝胶微针中不含银纳米颗粒,采用对比例1、对比例2中的双层网络水凝胶微针溶液和对照组中磷酸盐缓冲溶液处理后的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的存活率均高于50%,证明实施例1、对比例3和对比例4中的双层网络水凝胶微针表现出较好的抗菌性,而对比例1和对比例2中不含银纳米颗粒的双层网络水凝胶微针抗菌性能较差。

[0200] 以上内容仅仅是对本发明结构所作的举例和说明,所属本领域的技术人员不经创造性劳动即对所描述的具体实施例做的修改或补充或采用类似的方式替代仍属本专利的保护范围。

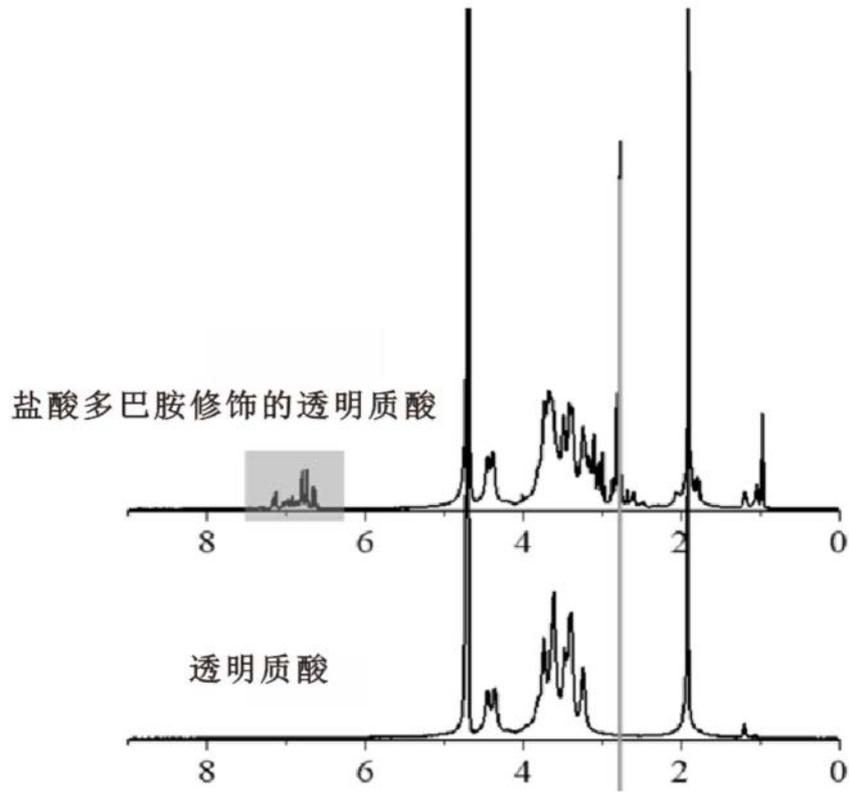


图1



图2

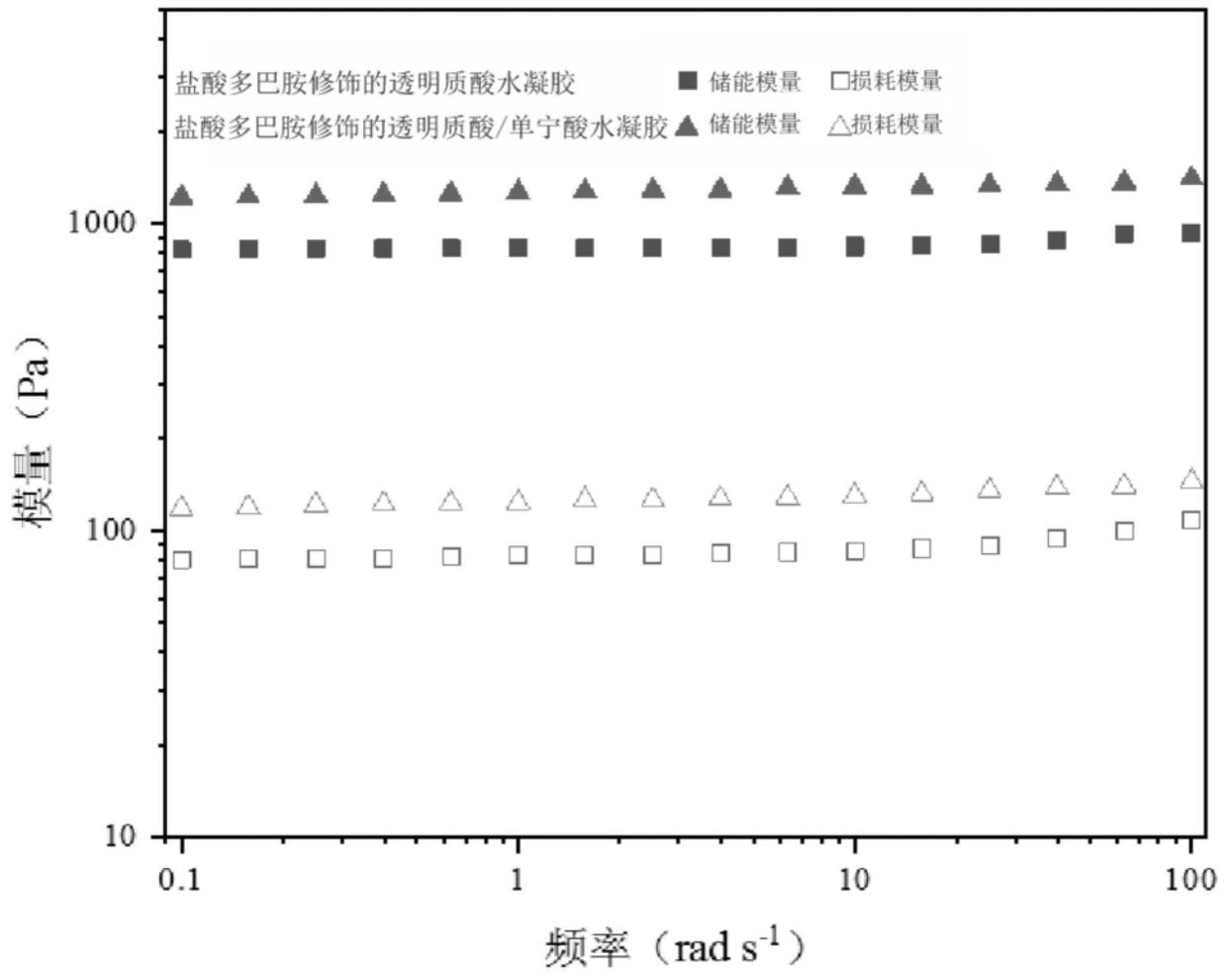


图3

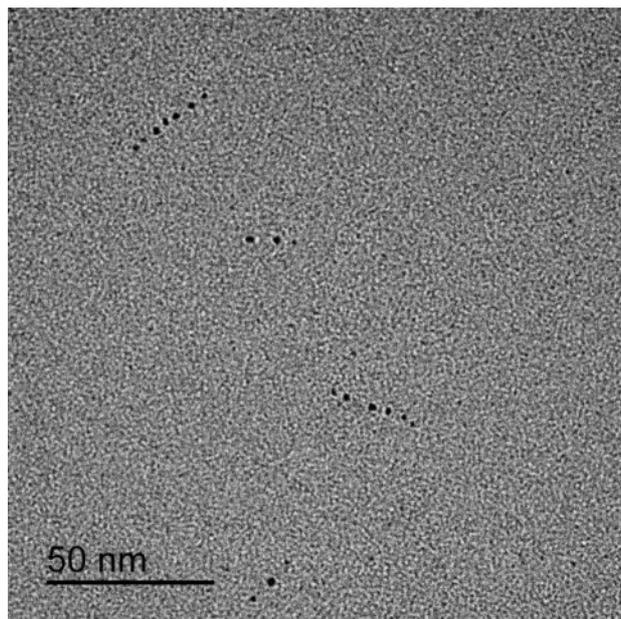


图4

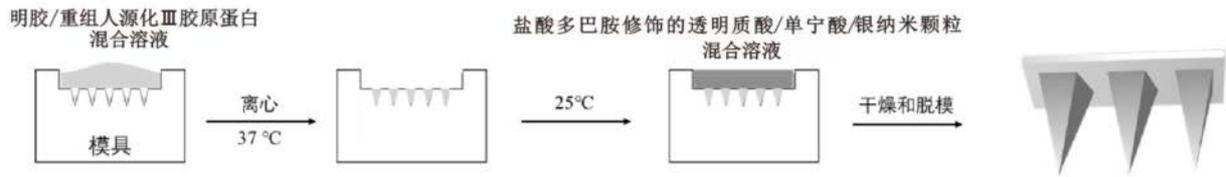


图5

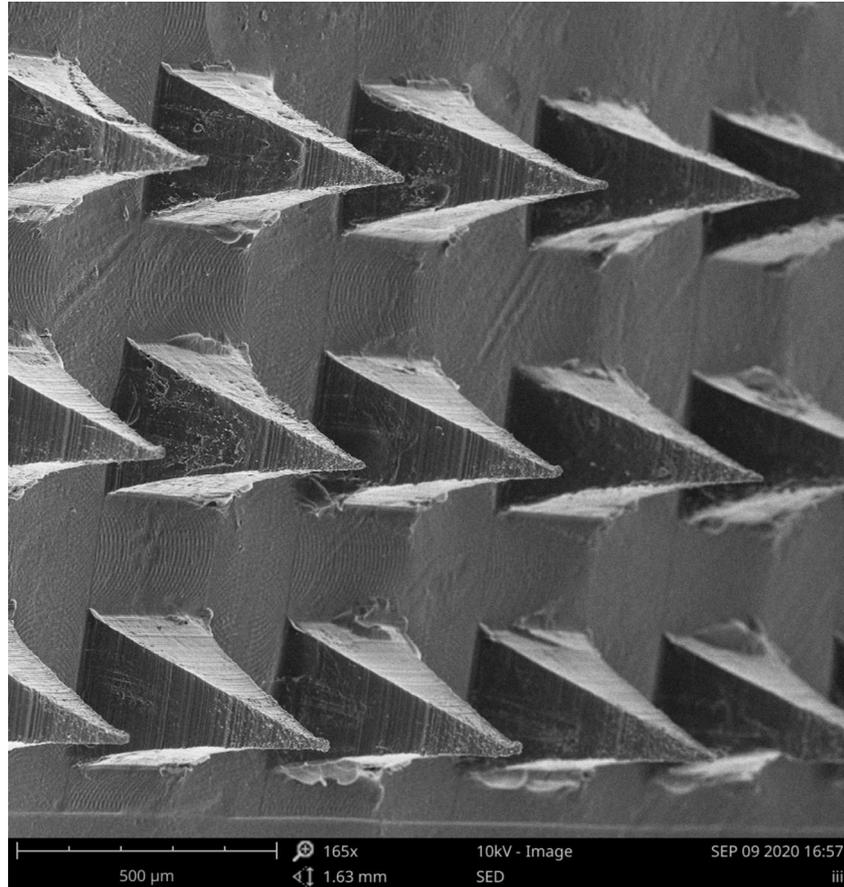


图6

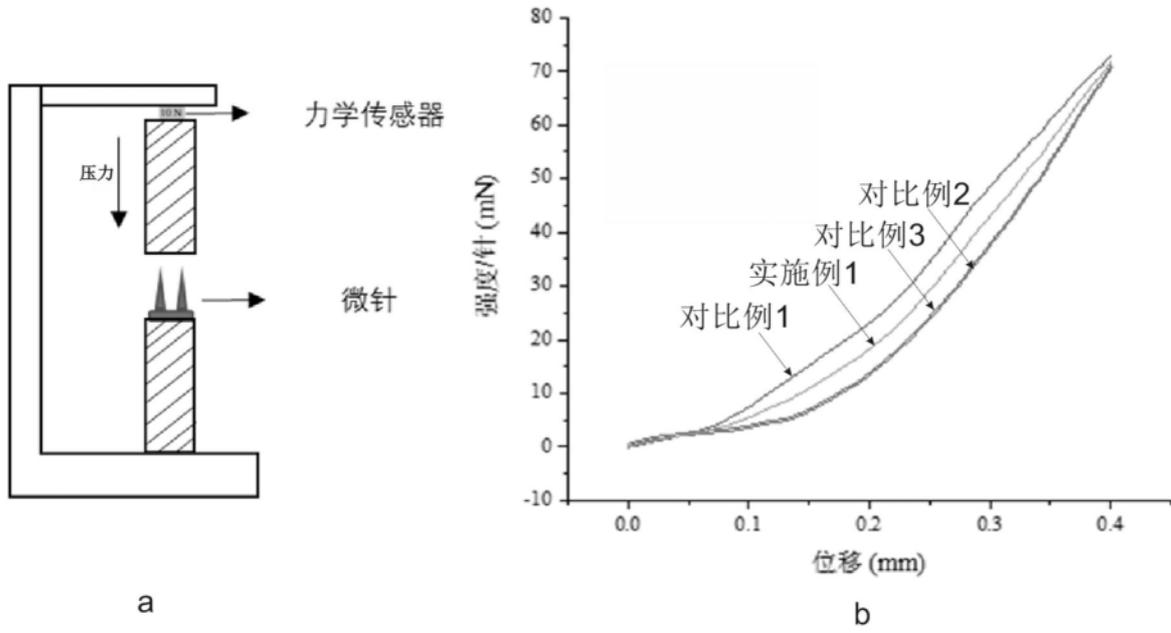


图7

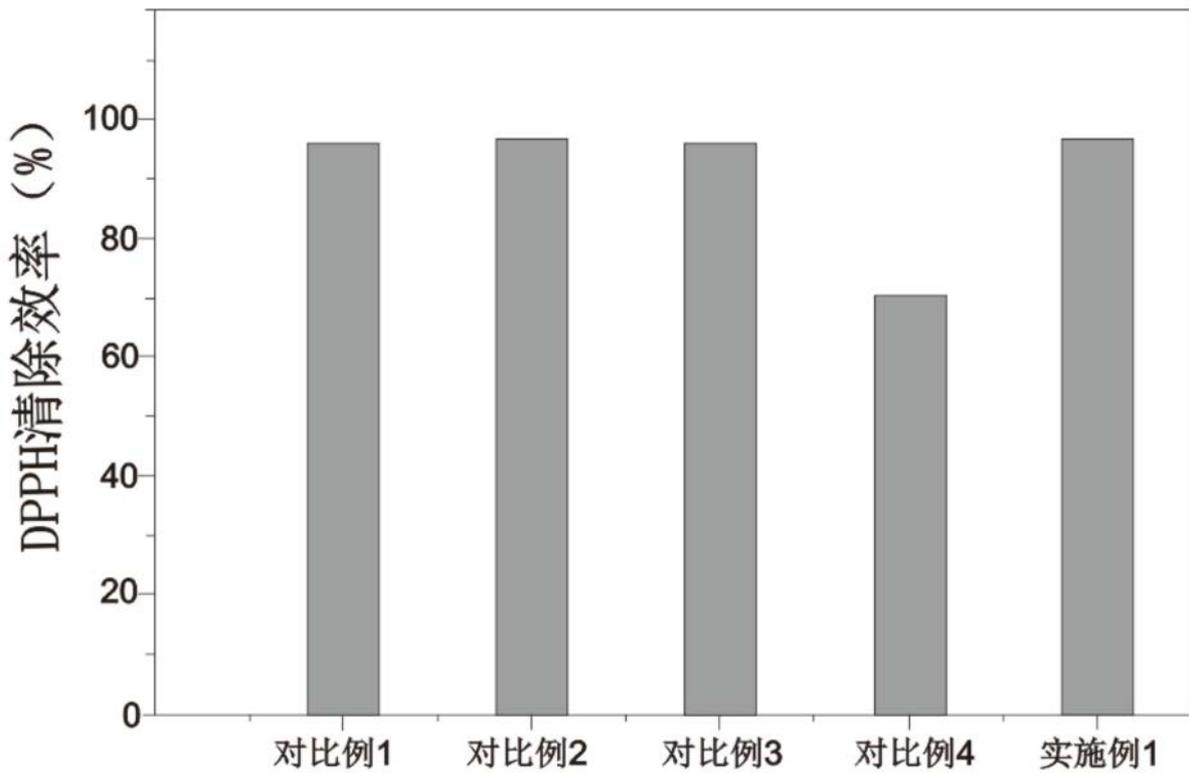


图8

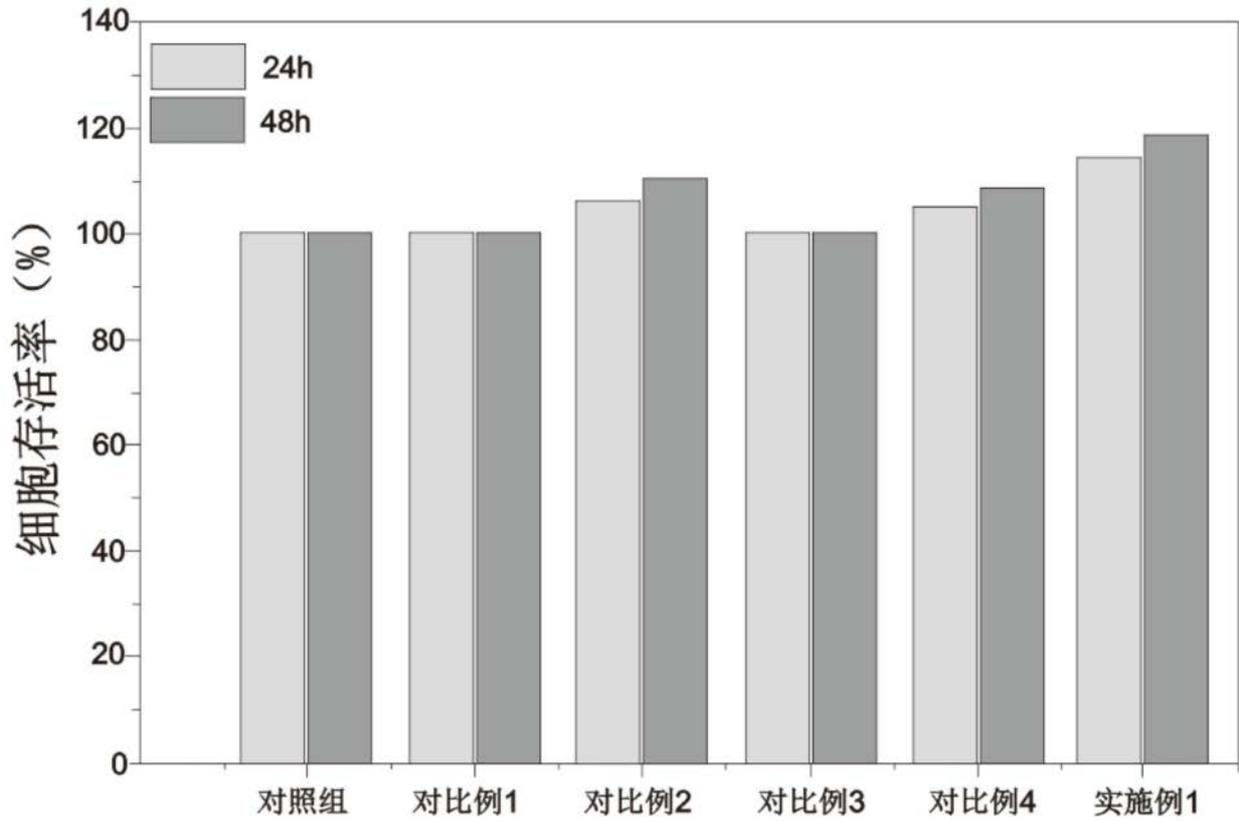


图9

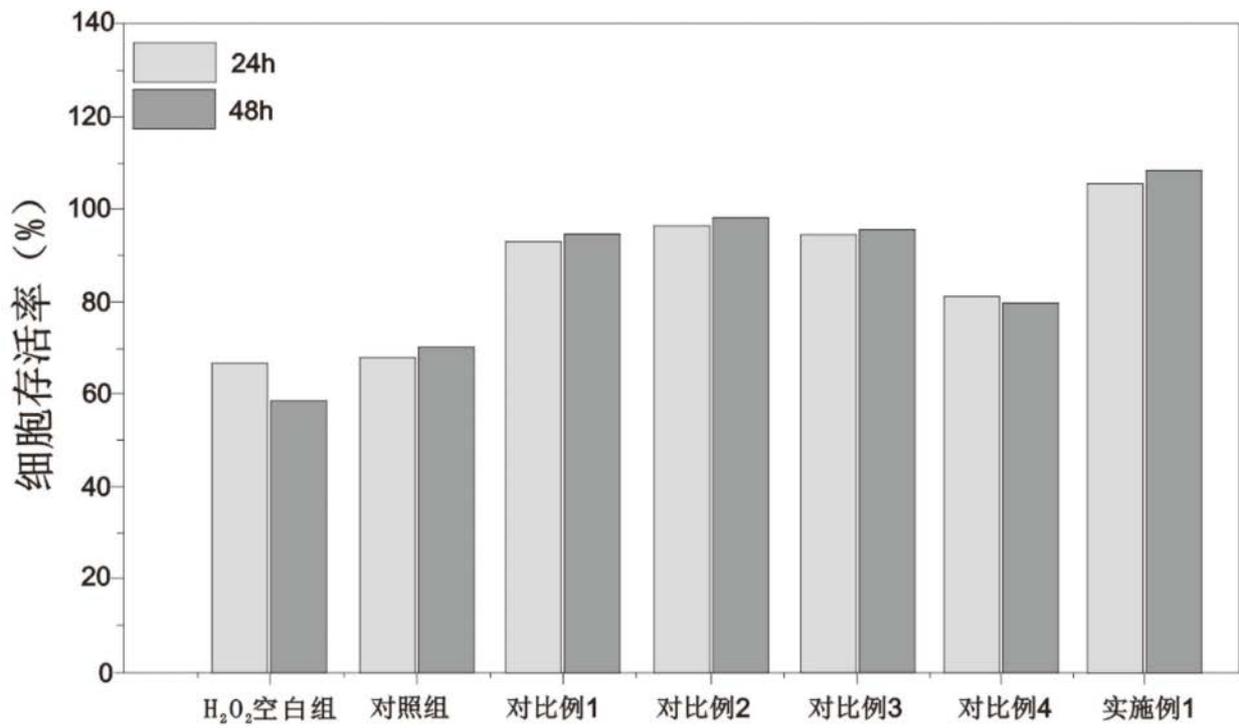


图10

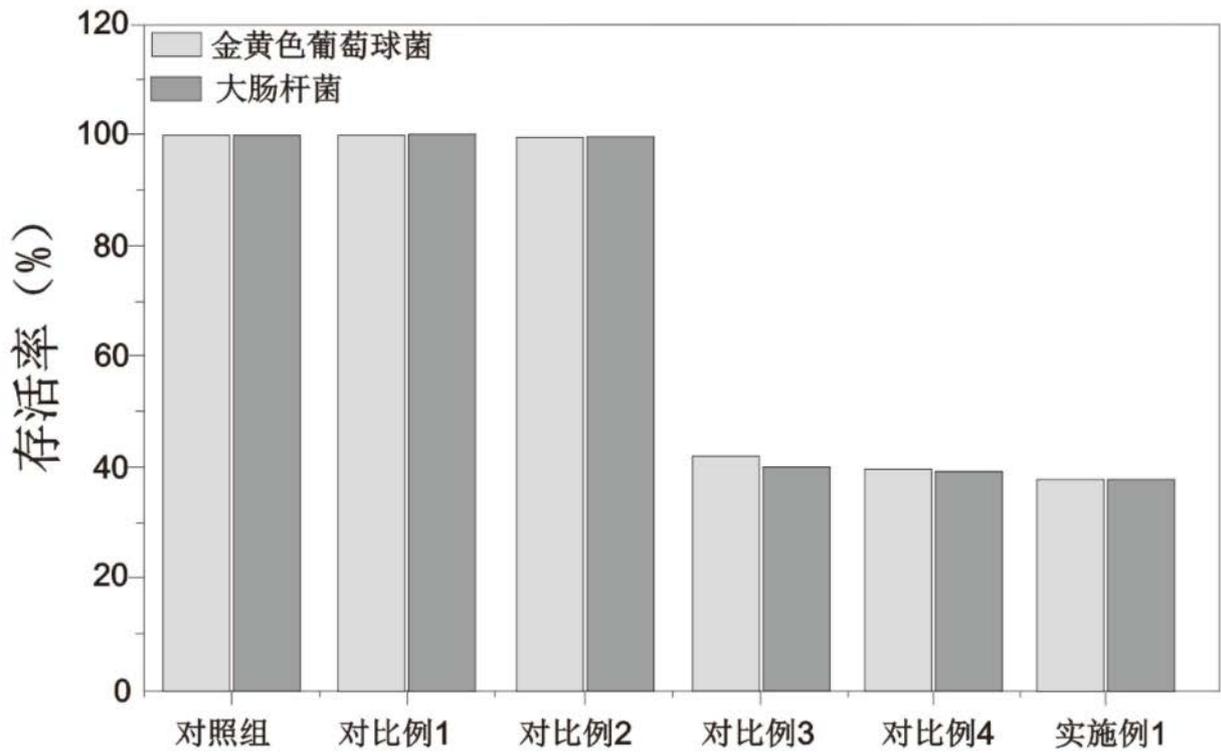


图11