



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106581068 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201610979821.3

A61K 31/73A(2006.01)

(22)申请日 2016.11.08

(71)申请人 广州医科大学附属第三医院

地址 510010 广东省广州市荔湾区多宝路  
63号

(72)发明人 李爽

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 胡辉

(51)Int.Cl.

A61K 35/44(2015.01)

A61K 9/70(2006.01)

C12N 5/071(2010.01)

A61P 17/02(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种可以快速恢复皮肤创面的生物膜及其  
制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种可以快速恢复皮肤创面的生物膜及其制备方法。该生物膜由内皮祖细胞的无血清培养液和海藻酸钙制备而成。其制备的具体步骤是:1)分离单核细胞层细胞,并接种于培养瓶中初步培养,第4天全量更换培养液,以后每隔2-3天更换培养液一次;2)待细胞生长至70-80%融合时进行传代培养;3)培养细胞至第3-5代,更换培养液进行低氧诱导;4)将诱导培养后的细胞,更换无血清培养液后进行复氧培养;5)离心过滤,收集培养液,利用冷冻干燥法制备海藻酸钙复合生物膜。该制备方案操作简便易行,成本低,效率高,针对糖尿病创面治疗效果好,并可以长期储存。

1. 一种可以快速恢复皮肤创面的生物膜,其特征在于:所述生物膜为细胞无血清培养液制备的海藻酸钙复合生物膜。

2. 根据权利要求1所述的生物膜,其特征在于:所述细胞无血清培养液为脐血来源人内皮祖细胞培养液。

3. 根据权利要求1或2所述生物膜的制备方法,包括以下步骤:

1) 分离单核细胞层细胞,并接种于培养瓶中初步培养,第4天全量更换培养液,以后每隔2-3天更换培养液一次;

2) 待细胞生长至70-80%融合时进行传代培养;

3) 培养细胞至第3-5代,更换培养液进行低氧诱导;

4) 将诱导培养后的细胞,更换无血清培养液后进行复氧培养;

5) 离心过滤,收集培养液,利用冷冻干燥法制备海藻酸钙复合生物膜。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:在饱和湿度、5%二氧化碳浓度,37℃恒温条件下初步培养。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:在0.5-2%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下进行诱导24-72小时条件下进行诱导。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:低氧诱导培养后更换的培养液为无血清基础培养液。

7. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:在21%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下复氧培养。

8. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:复氧培养时间为24~72h。

## 一种可以快速恢复皮肤创面的生物膜及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种促进皮肤创面愈合的制剂,特别涉及到一种可以快速恢复皮肤创面的生物膜。

### 背景技术

[0002] 糖尿病已经成为继肿瘤、心血管病变之后严重威胁人类健康的慢性疾病。糖尿病对患者最大的威胁来自其并发症,其中,糖尿病创面(diabetic wound)已成为严重威胁糖尿病患者生存和生活质量的严重并发症,具有难治愈、易感染、高截肢率的特点,其病理机制复杂。目前,糖尿病创面主要局限于传统处理,临床治疗效果不理想,新开发的一些单一生长因子类药物效果仍较有限,缺乏简便经济、安全高效的新型药物和生物治疗手段。因此,如何有效促进糖尿病创面愈合已成为多学科共同关注的课题,攻克糖尿病创面的治疗需要新的策略和突破点。

[0003] 随着细胞治疗(cell therapy)在临床应用研究领域的兴起,干细胞为基础的细胞治疗在临床治疗中显示出良好的应用价值,并取得一定的效果,日渐成为一项有前景的治疗选择。目前,细胞移植和旁分泌机制是干细胞是临床应用研究的两个主要途径。随着对干细胞研究的不断深入,细胞移植的临床应用研究遇到一些问题。研究显示移植干细胞至体内分化为组织细胞的几率很低且移植后存活时间短,不适宜体外大量生产,使用不便,可能涉及干细胞使用的一些争议,这些问题成为临床应用的障碍。与此同时,干细胞依靠其产生的旁分泌因子网络改善病理微环境,用于组织再生修复的思路逐渐被接受,成为干细胞促进创面修复的重要途径。干细胞旁分泌机制日益受到关注,进而形成一种以旁分泌机制为基础的新型“无细胞”治疗策略(cell-free strategy)。

[0004] 目前,常用的治疗方法是将干细胞进行培养后治疗糖尿病创面的制剂,但是这种方法见效慢,成本较高不利于大规模地推广应用。因此发明一种安全高效,简便易用的促进糖尿病创面愈合的制剂是具有重大意义的。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种可以快速恢复皮肤创面的生物膜及其制备方法

[0006] 本发明的生物膜是由人内皮细胞无血清条件培养液和海藻酸盐制备而成的,其制备方式为:

[0007] 1) 分离单核细胞层细胞,并接种于培养瓶中初步培养,第4天全量更换培养液,以后每隔2-3天更换培养液一次;

[0008] 2) 待细胞生长至70-80%融合时进行传代培养;

[0009] 3) 培养细胞至第3-5代,更换培养液进行低氧诱导;

[0010] 4) 将诱导培养后的细胞,更换无血清培养液后进行复氧培养;

[0011] 5) 离心过滤,收集培养液,利用冷冻干燥法制备海藻酸钙复合生物膜。

[0012] 优选的,在饱和湿度、5%二氧化碳浓度,37℃恒温条件下初步培养。

[0013] 优选的,在0.5-2%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下进行诱导24-72小时条件下进行诱导。

[0014] 优选的,更换的培养液为无血清基础培养液。

[0015] 优选的,在21%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下复氧培养。

[0016] 优选的,复氧培养时间为24~72h。

[0017] 本发明的有益效果是:

[0018] 1) 具有促进血管生成和神经营养双重功能,能够促进糖尿病创面的血管新生和神经再生,加速糖尿病创面愈合,促进创面修复,减少创面进一步恶化及其带来的并发症及不良后果。

[0019] 2) 自脐血获得人内皮祖细胞,来源丰富,操作简便易行,成本低,效率高,针对糖尿病创面治疗效果好。此外,可发挥保护创面、止血、吸收渗液等作用。制备海藻酸钙复合生物膜,在一定保存条件下,活性因子可以保存最大活性,起到缓释效果并发挥最大的治疗作用

### 具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施方式,对本发明的权利要求做进一步的详细说明,但不构成对本发明的任何限制,任何人在本发明权利要求范围内所做的有限次的修改,仍在本发明的权利要求保护范围内。

[0021] 实施例1 EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(I)

[0022] 1) 人脐血内皮祖细胞的提取:注射器抽取60ml健康新生儿脐带血,肝素钠抗凝,加体积比1:1PBS稀释,缓慢加入含有2:1体积比的Ficoll(1.077)淋巴细胞分离液离心管中,通过密度梯度离心法,水平离心机2000rpm,25分钟离心,用吸管小心吸取单个核细胞层。然后用等体积PBS清洗细胞,水平离心机2000rpm,8分钟离心,将细胞接种于人纤维连接蛋白包被的25cm<sup>2</sup>培养瓶中,加适量内皮细胞培养液培养(含10%胎牛血清),在饱和湿度、5%二氧化碳浓度,37℃恒温下培养。

[0023] 2) 人脐血内皮祖细胞的扩增培养:第4天全量更换培养液,以后每隔2-3天更换培养液一次。人脐血内皮祖细胞为贴壁培养细胞,随着培养时间,细胞形状和排列方式有所变化,待细胞生长至70-80%融合时进行传代培养。

[0024] 3) 人脐血内皮祖细胞的低氧预处理:培养细胞至第3代,待细胞生长至80%融合时,将细胞置于2%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下进行诱导48小时;

[0025] 4) 人脐血内皮祖细胞的复氧培养:更换细胞培养液为无血清基础培养液,恢复21%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下培养24h;

[0026] 5) 离心过滤,收集培养液,利用冷冻干燥法制备海藻酸钙复合生物膜。

[0027] 实施例2 EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(II)

[0028] 按照实施例1中1)、2)的步骤传代培养内皮祖细胞。在培养细胞至第3代,待细胞生长至70-80%融合时,将细胞置于0.5%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度条件下低氧诱导36h,之后,更换细胞培养液为无血清基础培养液,恢复21%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下培养72h。离心过滤,收集培养液,利用冷冻干燥法制备海藻酸钙复合生物膜。

[0029] 实施例3 EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(III)

[0030] 按照实施例1中1)、2)的步骤传代培养内皮祖细胞。在培养细胞至第5代,待细胞生

长至70-80%融合时,将细胞置于1.5%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度条件下低氧诱导24h,之后,更换细胞培养液为无血清基础培养液,恢复21%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下培养48h。离心过滤,收集培养液,利用冷冻干燥法制备海藻酸钙复合生物膜。

[0031] 实施例4 EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(IV)

[0032] 按照实施例1中1)、2)的步骤传代培养内皮祖细胞。在培养细胞至第4代,待细胞生长至70-80%融合时,将细胞置于1%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度条件下低氧诱导72h,之后,更换细胞培养液为无血清基础培养液,恢复21%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度下培养24h。离心过滤,收集培养液,利用冷冻干燥法制备海藻酸钙复合生物膜。

[0033] 对比比例EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(O)

[0034] 按照实施例1中1)、2)的步骤传代培养内皮祖细胞。在培养细胞至第3代,待细胞生长至70-80%融合时,将细胞置于2%氧气浓度,饱和湿度、5%二氧化碳浓度条件下低氧诱导48h,之后,离心过滤,收集培养液,利用冷冻干燥法制备海藻酸钙复合生物膜。

[0035] 实验例

[0036] 1) 创面愈合的时间

[0037] 将实施例1和对比例的海藻酸钙复合生物膜进行创面愈合实验:创面形成后每天记录创伤形成后创面面积,记录创面愈合时间。采用方法:用数码相机按设置的统一参数直接拍摄小鼠创面区域(含有标尺)。将图片中的创面部分使用IPP(Image-Pro Plus)图像处理软件测量其面积。结果表明,按照实施例1的方法制备的海藻酸钙复合生物膜,其创面愈合时间为 $12.8 \pm 0.789$ 天,而对比例的方法制备的海藻酸钙复合生物膜其创面愈合时间为 $14.1 \pm 0.738$ 天。进一步地,对创面愈合第10天检测创面愈合组织中CD31的IOD值进行检测:标本经固定包埋、切片、脱蜡水化、抗原热修复、兔抗小鼠一抗CD31及二抗孵育后镜检,在显微镜下每张切片随机采集5个视野(10x10倍),采用全自动图像分析系统(Image-pro plus 6.0)测量其平均积分光密度(mean of IOD),结果表明:实施例1的方法制备的海藻酸钙复合生物膜,创面愈合第10天检测创面愈合组织中CD31的IOD值为 $15903.85 \pm 1729.30$ .,而对比例的方法制备的海藻酸钙复合生物膜,IOD值为 $13399.19 \pm 752.23$ 。

[0038] 2) EPC-CM中活性因子的含量

[0039] 用蛋白芯片半定量检测EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(O)和EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(I)中促创面愈合相关因子的含量,其结果如下表所示:

[0040] EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(O)的促创面愈合相关因子含量

[0041]

活性因子	信号值	活性因子	信号值	活性因子	信号值
PDGF-BB	395,269	Angiopoietin-2	278,013	Angiogenin	247,908
MCP-3	200,966	uPAR	105,039	EGF	73,550
IL-6	82,900	RANTES	29,276	I-TAC	33,456
GRO	46,711	MMP-1	33,457	PECAM-1	16,160
VEGF R2	5,790	ENA-78	5,740	PLGF	4,097
IL-1alpha	2,841	Tie-2	2,545	IL-4	2,878
TGF-beta1	2,108	Thrombopoietin	1,669	VEGF R3	1,630
IFN-gamma	1,078	GRO-alpha	1,193	IL-10	1,212

[0042] EPC细胞培养液海藻酸钙复合生物膜(I)的促创面愈合相关因子含量

[0043]

活性因子	信号值	活性因子	信号值	活性因子	信号值
PDGF-BB	450,101	Angiopoietin-2	300,409	Angiogenin	257,289

[0044]

MCP-3	237,106	uPAR	202,282	EGF	175,007
IL-6	115,684	RANTES	57,784	I-TAC	51,268
GRO	47,580	MMP-1	42,042	PECAM-1	27,061
VEGF R2	18,703	ENA-78	6,467	PLGF	6,025
IL-1alpha	5,598	Tie-2	5,549	IL-4	3,523
TGF-beta1	3,012	Thrombopoietin	2,223	VEGF R3	2,028
IFN-gamma	1,717	GRO-alpha	1,594	IL-10	1,519

[0045] 上述结果表明,实施例1中的培养基海藻酸钙复合生物膜相较于对比例方法制备的海藻酸钙复合生物膜中,促创面愈合相关因子的含量更高。

[0046] 综上所述,本发明申请的方法制备的海藻酸钙复合生物膜相较于对比例,愈合时间更短,含有的相关促伤口愈合的蛋白因子更多,具有更为良好的促愈合效果。