



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112316204 B

(45) 授权公告日 2021.08.27

(21) 申请号 202011265601.7

(22) 申请日 2020.11.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112316204 A

(43) 申请公布日 2021.02.05

(73) 专利权人 四川大学
地址 610000 四川省成都市一环路南一段
24号

(72) 发明人 顾志鹏 张恒杰 李乙文

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

A61L 26/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104059234 A, 2014.09.24

CN 110354295 A, 2019.10.22

CN 105597156 A, 2016.05.25

US 2008081077 A1, 2008.04.03

CN 111714643 A, 2020.09.29

审查员 唐敏健

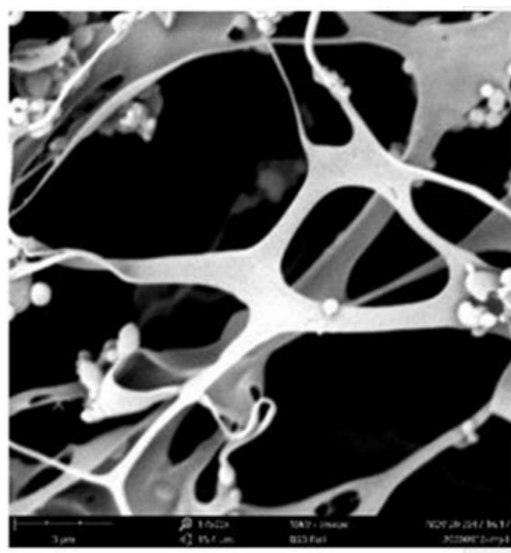
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

一种金属多酚胶原蛋白膜材料、其制备方法
及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种金属多酚胶原蛋白膜材料、其制备方法及应用,该金属多酚胶原蛋白膜材料为水凝胶材料,包括胶原蛋白以及负载于胶原蛋白多孔结构上的纳米络合物,所述纳米络合物由金属离子和多酚螯合获得。该金属多酚胶原蛋白膜材料具有良好的PH响应性,在响应条件下同时具有抗菌和止血效果,对皮肤创伤创面修复效果优良,可应用于皮肤创伤修复材料。



1. 一种金属多酚胶原蛋白膜材料,其特征是:

为水凝胶材料,包括胶原蛋白以及负载于胶原蛋白多孔结构上的纳米络合物,所述纳米络合物由金属离子和多酚螯合获得;

所述金属多酚胶原蛋白膜材料采用如下方法制备:

(1) 将金属离子水溶液滴加到多酚水溶液中,调节PH为8~10,常温下进行螯合反应,得金属离子和多酚螯合的纳米络合物;其中,金属离子和多酚的用量分别为10~20重量份和100~120重量份;

(2) 将胶原蛋白溶解于酸溶液中,常温搅拌直到完全溶解,得胶原蛋白溶液;

(3) 将纳米络合物加入胶原蛋白溶液,调节PH为7.4~8.0,于35~37℃温度下孵育成水凝胶;

(4) 将水凝胶冻干制成冻干海绵,经碾压成膜得膜材料;

所述水凝胶材料包括85重量份的胶原蛋白,15重量份的纳米络合物,1体积份水;

所述金属离子为镁离子、铜离子、铁离子中的一种或多种的混合;

所述多酚为表没食子儿茶素没食子酸酯、多巴胺、槲皮素中的一种或多种。

2. 如权利要求1所述的金属多酚胶原蛋白膜材料,其特征是:

所述酸溶液为醋酸溶液或盐酸溶液。

3. 权利要求1~2中任一项所述金属多酚胶原蛋白膜材料用作制作皮肤创伤修复材料。

一种金属多酚胶原蛋白膜材料、其制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及响应性膜材料,具体涉及一种金属多酚胶原蛋白膜材料、其制备方法及应用。

背景技术

[0002] 胶原蛋白是哺乳动物体内的一种常见蛋白质,其种类繁多,常常来自于皮肤、骨骼、筋腱、血管、内脏等器官。在其中胶原蛋白起着使结构稳定、参与代谢过程的作用。另外,胶原蛋白常常呈三维的螺旋结构,主要由甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸等氨基酸构成,分子结构中暴露出较多的氨基、羧基、羟基。与其它聚合物相比,目前对胶原蛋白的研究主要集中于合成胶原蛋白及其构象的稳定性和交联结构方面,对其智能行为的研究还不多见。将胶原蛋白进行化学改性,赋予其刺激响应性,可以丰富其在作为生物材料、药物负载等领域的应用,从而逐步扩展到皮肤伤口愈合、生物支架、组织工程等领域。

[0003] 天然多酚在自然界中广泛存在,具有优异的抗氧化能力和自由基清除特性,具有抗菌特性和吸收紫外光的能力。并且多酚无毒无害,价格便宜,能够用于皮肤伤口愈合,促进细胞的生长和增殖。镁、铁、铜等作为人体的微量元素,具有广泛的应用价值。镁离子、铜离子、铁离子微量的金属离子能够破坏细菌真菌的结构,在止血和杀菌以及其他生物医用方面具有广阔的应用。天然多酚中表没食子儿茶素没食子酸酯、多巴胺、槲皮素等由于存在多个酚羟基,可以螯合金属离子,起到协同的抗氧化和抗菌止血作用。

[0004] 近些年来,智能型和响应性的物质和凝胶等已经引起广泛的关注。其中主要包括:温度、PH、光、化学物质、电、机械力等响应性手段,其中比较常见的是温度、光和PH响应。但是在胶原蛋白领域,响应性的研究却较少。

发明内容

[0005] 为了解决背景技术中所提出的问题,本发明对胶原蛋白的响应性进行研究,提供了一种金属多酚胶原蛋白膜材料、其制备方法及应用,该金属多酚胶原蛋白膜材料具有优异的PH响应性,在响应条件下同时具有抗菌和止血效果。

[0006] 本发明利用胶原蛋白的多孔结构负载大量的金属多酚纳米粒子,通过氢键等作用形成新型杂化响应性薄膜。多酚螯合金属离子,使胶原蛋白膜材料能够在酸碱响应的条件下释放和结合金属离子。

[0007] 本发明提供的一种金属多酚胶原蛋白膜材料,其为水凝胶材料,包括胶原蛋白以及负载于胶原蛋白多孔结构上的纳米络合物,所述纳米络合物由金属离子和多酚螯合获得。

[0008] 进一步的,水凝胶材料包括1~100重量份的胶原蛋白,1~100重量份的纳米络合物,1体积份水。本发明中,重量份与体积份的比例为mg:mL。

[0009] 作为优选,水凝胶材料包括85重量份的胶原蛋白,15重量份的纳米络合物,1体积份水。

[0010] 进一步的,金属离子为可溶于水且具抗菌性的金属离子,具体为镁离子、铜离子、铁离子中的一种或多种的混合,优先考虑镁离子、铜离子、铁离子。

[0011] 进一步的,多酚为表没食子儿茶素没食子酸酯、多巴胺、木犀草素、杨梅黄酮、槲皮素、漆黄素中的一种或多种。表没食子儿茶素没食子酸酯、多巴胺、木犀草素、杨梅黄酮、槲皮素、漆黄素的分子结构分别见图1中的图(a)、图(b)、图(c)、图(d)、图(e)、图(f)。

[0012] 进一步的,胶原蛋白来自哺乳动物的生物组织,例如牛跟腱、猪皮、鱼皮等。

[0013] 通过调整络合物和胶原蛋白的用量比,可进一步调整本发明金属多酚胶原蛋白膜材料的响应性能、力学性能和生物学性能,更好的提高抗氧化性和抗菌止血性,从而实现生物功能的精确可控。

[0014] 本发明提供了一种金属多酚胶原蛋白膜材料的制备方法,包括:

[0015] (1) 将金属离子水溶液滴加到多酚水溶液中,调节PH为8~10,常温下进行螯合反应,得金属离子和多酚螯合的纳米粒子络合物;

[0016] (2) 将胶原蛋白溶解于醋酸溶液中,常温搅拌直到完全溶解,得胶原蛋白溶液;

[0017] (3) 将纳米粒子络合物加入胶原蛋白溶液,调节PH为7.4~8.0,于35~37℃温度下孵育成凝胶;

[0018] (4) 将凝胶冻干制成冻干海绵,经碾压成膜得膜材料。

[0019] 本发明提供了一种金属多酚胶原蛋白膜材料具有良好的PH响应性,在响应条件下同时具有抗菌和止血效果,对皮肤创伤创面修复效果优良,可应用于皮肤创伤修复材料。

[0020] 本发明所制备膜材料能在PH响应下,进行多酚和金属离子的释放,多酚能吸收过量的活性氧,消除炎症,抑制细菌增长,促进创伤伤口愈合。金属离子的螯合改变了多酚原有的结构,在PH响应条件下,金属离子释放,更多的酚羟基暴露,从而起到协同抗菌止血的作用。

[0021] 本发明具有如下特点和有益效果:

[0022] 本发明膜材料具有良好的PH响应性,而且具有协同止血和抗菌效果,能够在短时间清除过量的活性氧,对皮肤创伤创面修复效果优良,利于新生组织的结构重塑和构建,达到快速修复口腔创伤的目的,满足临床需要。

附图说明

[0023] 图1为本发明所采用多酚的结构式,其中,图(a)、图(b)、图(c)、图(d)、图(e)、图(f)分别为表没食子儿茶素没食子酸酯、多巴胺、木犀草素、杨梅黄酮、槲皮素、漆黄素的分子结构;

[0024] 图2为不同多酚的电镜图,其中,图(a)、图(b)、图(c)分别为表没食子儿茶素没食子酸酯、多巴胺、槲皮素的电镜图;

[0025] 图3为不同多酚与不同金属粒子螯合后的络合物电镜图,其中,图(a)为表没食子儿茶素没食子酸酯与镁离子螯合后的络合物电镜图,图(b)为多巴胺与铁离子螯合后的络合物电镜图,图(c)为槲皮素与铜离子螯合后的络合物电镜图;

[0026] 图4为胶原蛋白凝胶电镜图;

[0027] 图5为负载络合物胶原蛋白的凝胶电镜图;

[0028] 图6为实施例4凝胶的PH响应性曲线图;

- [0029] 图7为实施例6所测定的细菌存活率；
[0030] 图8为实施例7所测定的自由基清除能力曲线；
[0031] 图9为实施例8所测定的24h时间节点的细胞存活率；
[0032] 图10为实施例9所测定的皮肤伤口愈合效果图。

具体实施方式

[0033] 以下将结合实施例来进一步说明本发明。以下实施例为本发明较佳的实施方式，并不对本发明保护范围做任何形式的限定。除非特别说明，实施例中所采用的试剂、方法和设备均为本技术领域的常规试剂、方法和设备。除非特别说明，以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0034] 实施例1

[0035] 本实施例为制备多酚与金属离子络合物的实施例，本实施例制备3组络合物，第一组将表没食子儿茶素没食子酸酯与镁离子螯合，第二组将多巴胺与铁离子螯合，第三组将槲皮素与铜离子螯合。

[0036] 制备方法如下：

[0037] 将多酚溶解于水，获得多酚溶液，加入氨水调节多酚溶液PH为8~10，室温下搅拌24小时，得多酚纳米粒子。将金属离子水溶液（例如氯化镁水溶液、氯化铁水溶液、氯化铜水溶液）缓慢滴加到多酚溶液中，其中金属离子和多酚的用量分别为10~20重量份和100~120重量份；加入氨水调节PH至8~10，室温下搅拌24小时进行螯合反应，得螯合络合物。

[0038] 对各络合物样品，分别配置2mg/ml的样品溶液，将样品溶液旋涂于光滑的云母片表面，经干燥、喷金处理后，利用台式扫描电镜观察样品微观形貌，所得图像见图3。图2为未螯合的多酚电镜图，图3为螯合后的络合物电镜图，从图中可以直观观察到，所制备络合物均为纳米尺度，且粒子形貌良好，分布均一。

[0039] 实施例2

[0040] 本实施例为制备胶原蛋白凝胶的实施例。

[0041] 将胶原蛋白完全溶解于醋酸溶液，然后冻干成凝胶。对所得胶原蛋白凝胶进行电镜观察，电镜图见图4，从图中可以看出胶原蛋白凝胶粒径为 μm 级，且具有多孔结构，可以很好地负载纳米络合物粒子。

[0042] 实施例3

[0043] 将85重量份的胶原蛋白溶解在醋酸溶液中，过夜常温搅拌，直到完全溶解。将15重量份的表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)纳米粒子加入胶原蛋白溶液，将PH调到7.4~8.0，放在35℃~37℃的烘箱中孵育24小时，直到成胶。将水凝胶放在冷冻机里冻干2天，制备冻干海绵，用有机玻璃框模具对冻干海绵碾压成膜。

[0044] 实施例4

[0045] 将85重量份的胶原蛋白溶解在醋酸溶液中，过夜常温搅拌，直到完全溶解。将15重量份的螯合络合物纳米粒子加入胶原蛋白溶液，将PH调到7.4~8.0左右，放在35℃~37℃的烘箱中孵育24小时，直到成胶。将水凝胶放在冷冻机里冻干2天，制备冻干海绵，用有机玻璃框模具对冻干海绵碾压成膜。本实施例中螯合络合物纳米粒子采用实施例1方法制备，为镁离子和EGCG螯合的络合物。对本实施例产品进行电镜观察，电镜图见图5，从图4和5中可

以看出,胶原蛋白很好地负载了络合物纳米粒子。

[0046] 实施例5

[0047] 测试实施例4样品的PH响应性曲线,具体为:将冻干海绵放入酸性溶液,调整PH为3~4,凝胶降解;然后将降解后的凝胶重新加入PBS(聚丁二酸丁二醇酯)中性溶液中,凝胶再次形成。所得PH响应性曲线见图6,从图中可以看出,调节PH至酸性后,凝胶产生了降解,凝胶重量下降;而将PH调节至中性和碱性后,又再次成胶,证明酸碱条件下凝胶具有PH响应性。

[0048] 通过上述实验观察到,将冻干海绵放入酸性溶液,凝胶溶解,则必然释放出多酚和镁离子,从而可达到更好的抗氧化和抗菌效果。当调节PH至弱碱性,放入PBS溶液之中,通过氢键等相互作用与胶原蛋白结合,会再次成胶。通过这种酸碱变化可暴露出更多的酚羟基,提高抗氧化效果和抗菌效果,从而证明了其氧化还原响应。

[0049] 实施例6

[0050] 本实施例是使用大肠杆菌(ATCC8739)和金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)对所制备膜材料进行抗菌活性测定。

[0051] 将膜材料制备成48孔微孔板,将10mL无菌PBS中的细菌悬浮液添加到48孔培养板的每个膜材料表面上。将接种的膜材料在37℃下孵育2小时,微孔板内部的相对湿度不小于90%。在该时间结束时,将1mL无菌PBS加到每个孔中,以重新悬浮任何细菌幸存者。将悬浮于1mL PBS中的10mL细菌悬浮液用作阴性对照。在37℃下孵育24小时后,计数琼脂平板上的菌落形成单位。

[0052] 采用上述方法测定实施例2~5所得4组样品的抗菌活性,4组样品分别为未负载的胶原蛋白膜(实施例2样品)、仅负载EGCG的胶原蛋白膜(实施例3样品)、负载络合物的胶原蛋白膜(实施例4样品)、以及酸性条件下的实施例4胶原蛋白膜(实施例5样品)。每组至少测试三个样品,结果表示为细菌存活率%:细菌存活率%=实验组存活细菌数/对照组细菌数100%。所测细菌存活率见图7。

[0053] 实施例7

[0054] 本实施例是使用2,2-二苯基-1-苦基肼(DPPH)方法,来评定实施例2~5所得4组样品的乙醇相自由基清除能力。

[0055] 分别制备0.1mM的DPPH乙醇溶液与1mg/ml的样品乙醇相溶液。取300μL DPPH溶液与2600μL乙醇混合均匀,而后加入100μL样品溶液混合均匀开始测定清除速率。利用517nm处的吸光度来评价其清除效果,以评估样品的乙醇相抗氧化能力,通常在30分钟内取不同时间点进行测定吸光度的变化。所测自由基清除能力见图8。

[0056] 结果发现,清除效果与Mg/EGCG络合物的浓度具有一定的依赖性,浓度越大,占比越大,则拥有较强的抗氧化活性;但经过金属离子的螯合,改变了多酚原有的结构,在PH的响应性,金属离子释放,更多的酚羟基暴露出来,抗氧化作用更加明显,可以达到近80%的清除率。

[0057] 实施例8

[0058] 本实施例以NIH小鼠胚胎成纤维细胞3T3细胞为细胞株,采用染色方法验证实施例2~5的4组薄膜样品的细胞毒性。细胞的培养方式为将10%的胎牛血清(FBS)加入到DMEM培养基中共同孵育,培养的氛围为含有5%CO₂的潮湿气氛,温度维持在37℃。进一步,将培养

好的NIH 3T3细胞,以每孔1000个细胞的密度在96孔板中孵育24h,以不同浓度样品再处理24h及48h;采用MTT比色法检测相应细胞存活率。24h时间节点的细胞存活率见图9。

[0059] 从实验结果中可以看出,在所采用的三个浓度下,4组样品的细胞活性均较高,且随材料施加浓度提升,细胞活性变化不大,在24h与48h两个时间节点都有相似的统计结果。

[0060] 从实施例6~8的实验可看出,本发明胶原蛋白膜具有良好的抗氧化和抗菌效果,且具有明显的酸碱响应性生物相容性较为良好,因此具备进一步探索其在动物层面的具体应用。

[0061] 实施例9

[0062] 将实施例2~5样品用于大鼠的皮肤损伤修复动物模型中。本实验由四川大学华西口腔医院医学伦理委员会批准(批准号为WCHSIRB-D-2017-263),所有实验操作均按照四川大学实验动物保护和指南进行。所选用的动物为健康的雌性大鼠,来自成都硕大动物公司,大鼠体重约200g。

[0063] 具体操作为:首先对大鼠的背部毛发进行剔除并消毒,在大鼠背部切开两个直径15毫米的全厚圆形皮肤创面,将样品施加于伤口表面,并用透明敷料覆盖伤口,进行生物学评估。在此期间,分别于第0、3、5、8、10、13、15天对大鼠创口进行清创处理并施加材料,采用拍照方式记录伤口变化过程,见图10所示,其中,图a0、a3、a5、a8、a10、a15分别施加实施例2样品的伤口在第0、3、5、8、10、13、15天的情况;图b0、b3、b5、b8、b10、b15分别施加实施例3样品的伤口在第0、3、5、8、10、13、15天的情况;图c0、c3、c5、c8、c10、c15分别施加实施例3样品的伤口在第0、3、5、8、10、13、15天的情况;图d0、d3、d5、d8、d10、d15分别施加实施例5样品的伤口在第0、3、5、8、10、13、15天的情况。并分别取第0、5、10、15天的大鼠创口统计伤口面积并进行分析。

[0064] 根据结果可以观察到,施加了实施例2~5样品的伤口,在15天时间内均逐渐缩小。但施加了实施例4~5样品(即负载了金属多酚的胶原蛋白膜)的大鼠伤口修复速度明显更为迅速,在第15天伤口已基本复原,而施加实施例2~3样品的创口仍然明显。可见本发明金属多酚胶原蛋白膜材料对皮肤创口的修复有明显的加速效果,修复效果更为明显,

[0065] 本领域的普通技术人员将会意识到,在本发明各方法实施例中,所述各步骤的序号并不能用于限定各步骤的先后顺序,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,对各步骤的先后变化也在本发明的保护范围之内。这里所述的实施例是为了帮助读者理解本发明的实施方法,应被理解为本发明的保护范围并不局限于这样的特别陈述和实施例。本领域的普通技术人员可以根据本发明公开的这些技术启示做出各种不脱离本发明实质的其它各种具体变形和组合,这些变形和组合仍然在本发明的保护范围内。

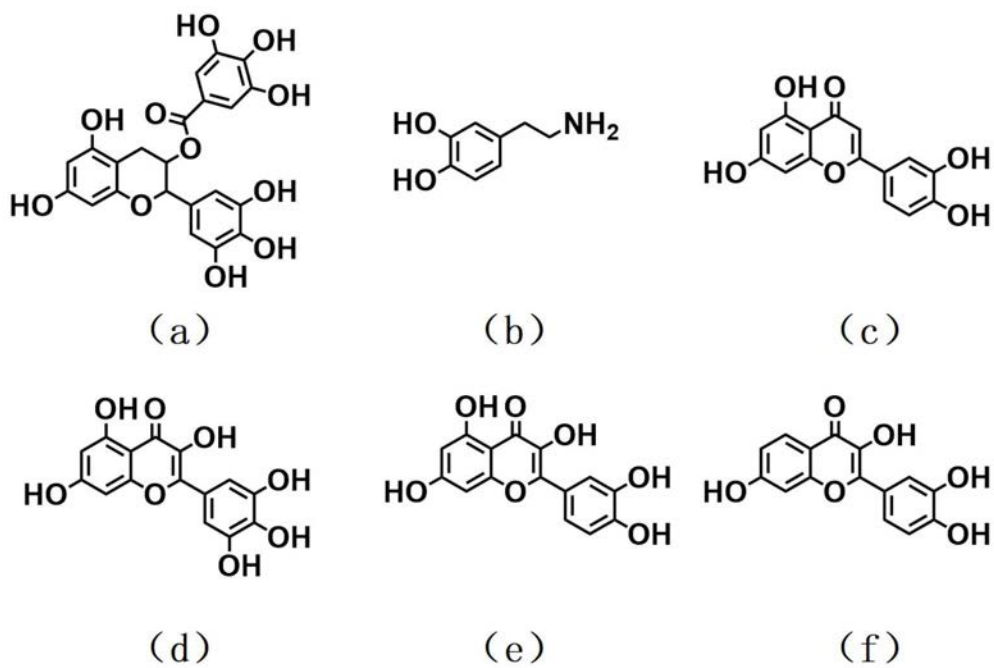


图1

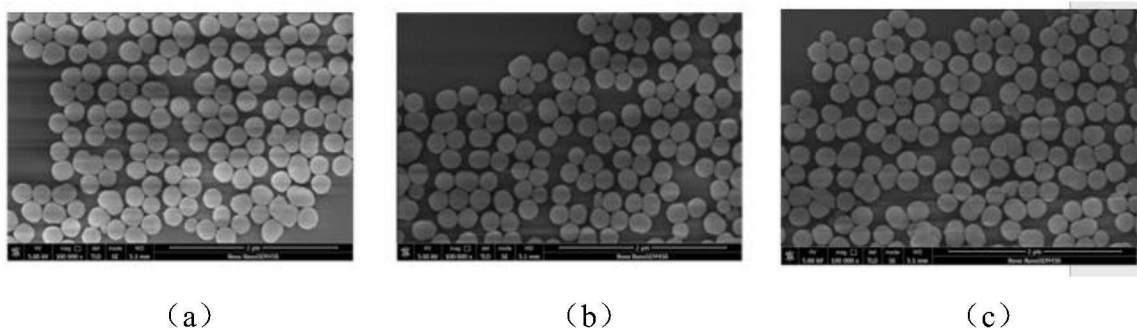


图2

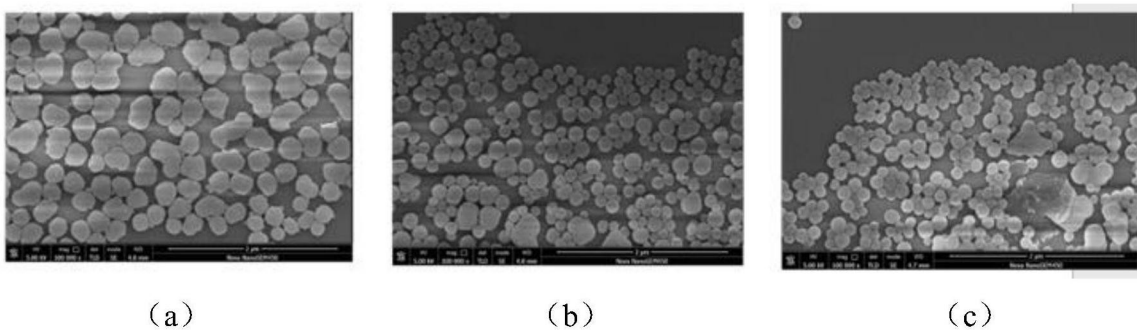


图3

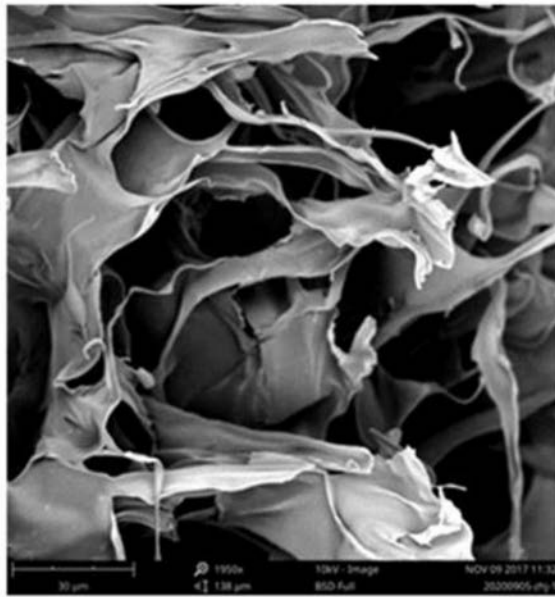


图4

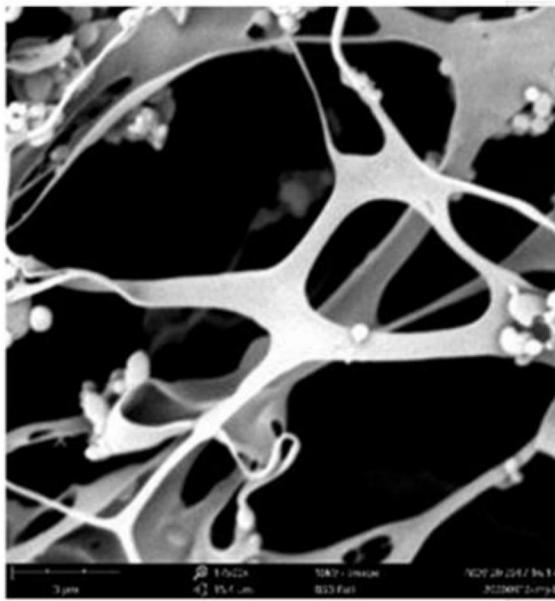


图5

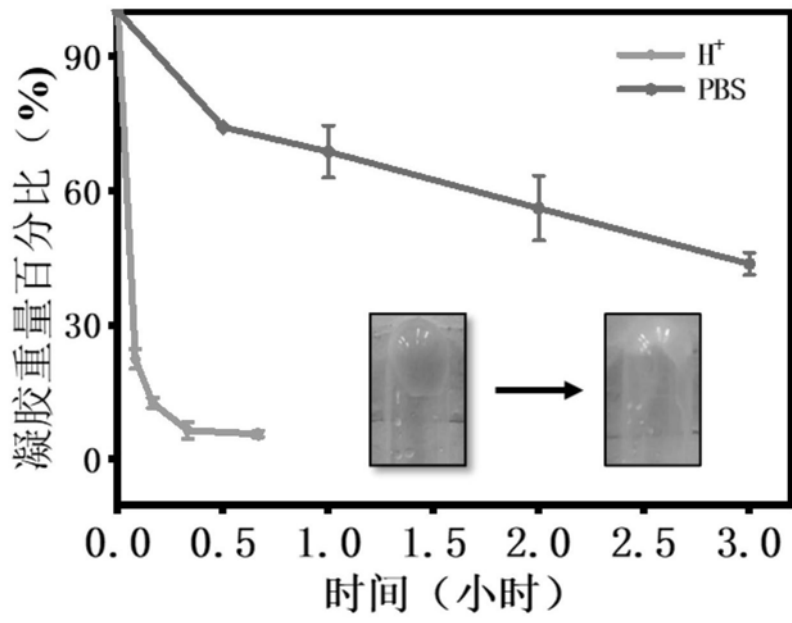


图6

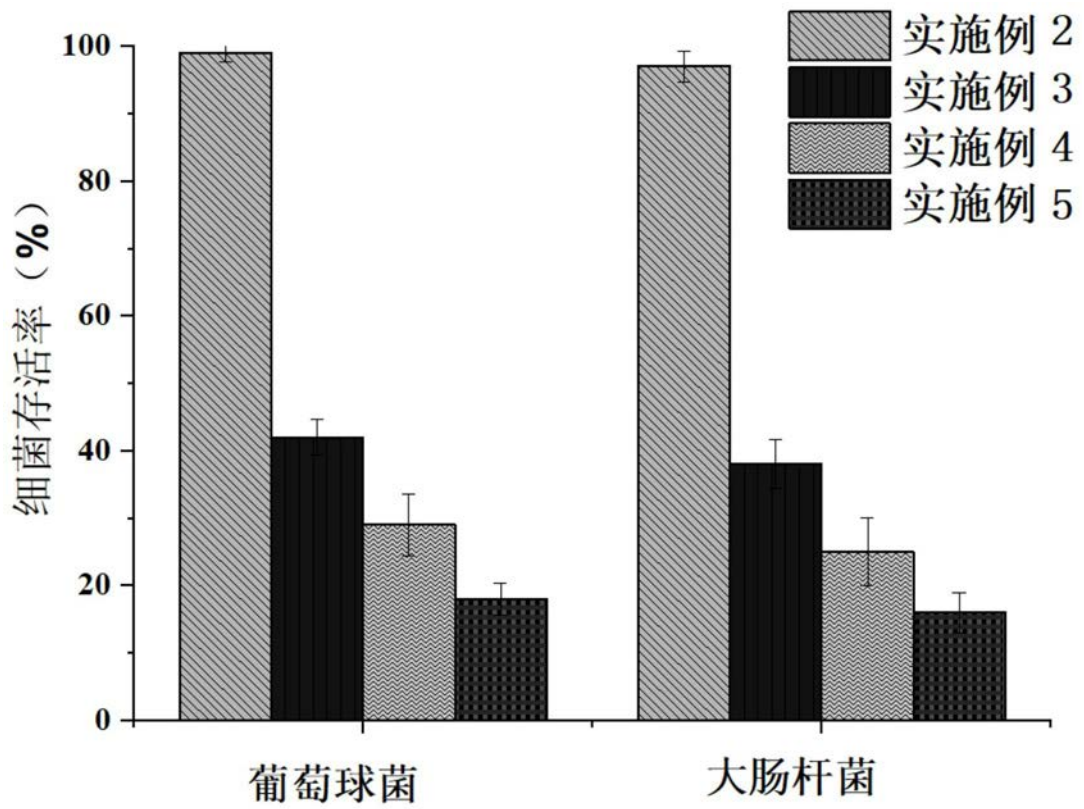


图7

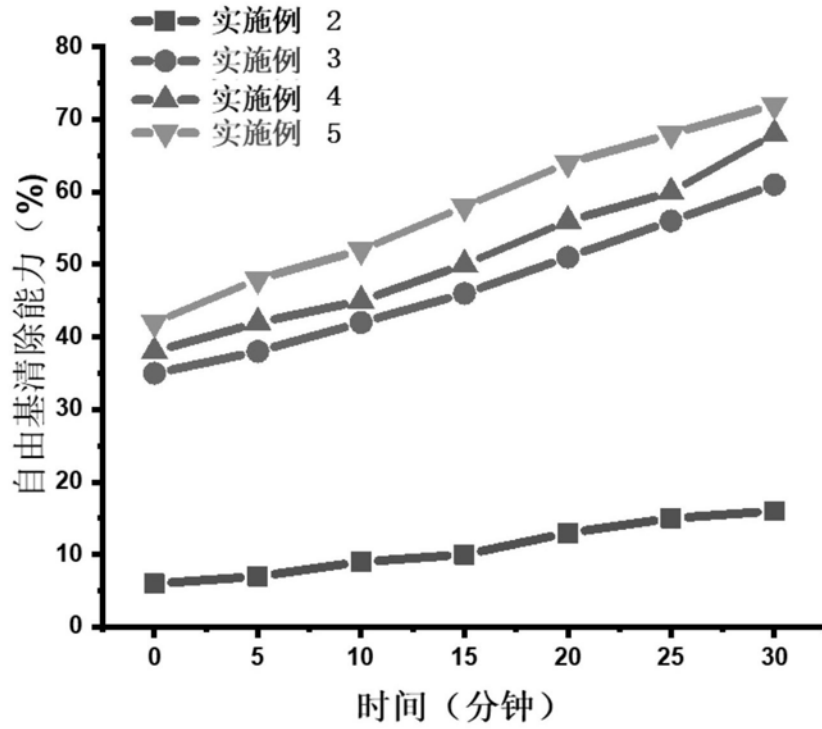


图8

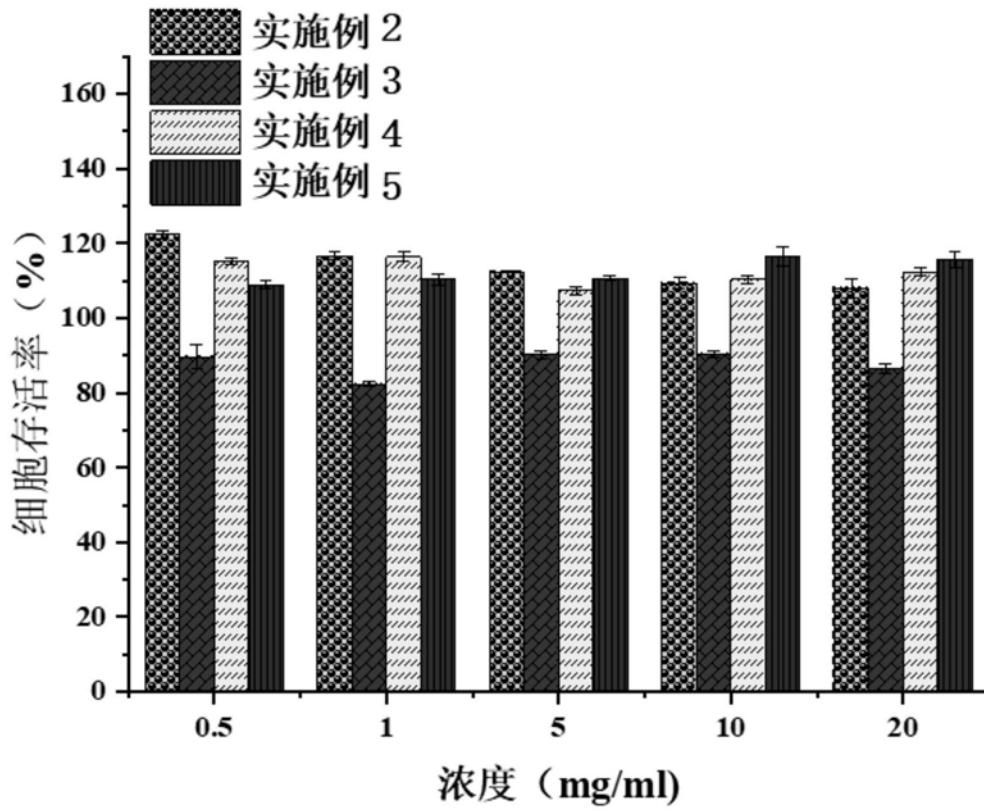


图9

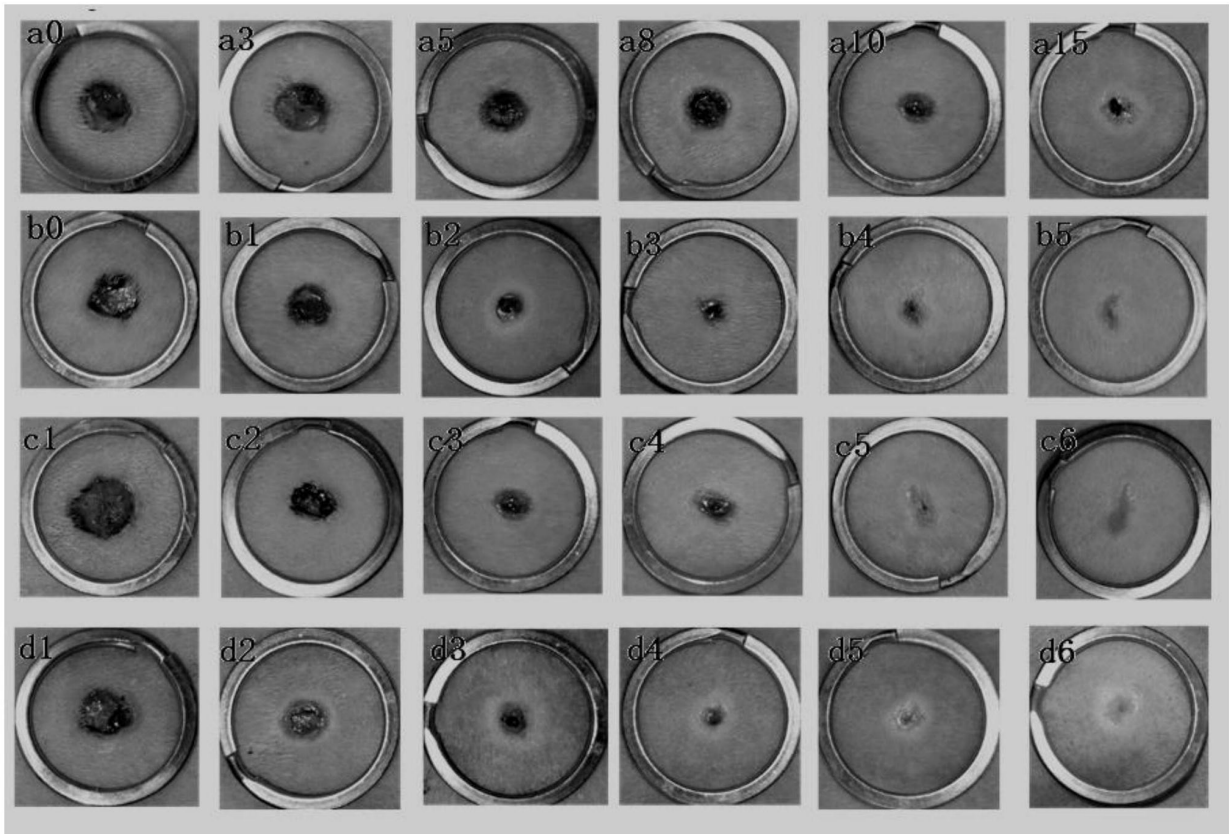


图10