



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114796620 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 29

(21) 申请号 202210434186.6

(22) 申请日 2022.04.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114796620 A

(43) 申请公布日 2022.07.29

(73) 专利权人 广东顺德工业设计研究院(广东
顺德创新设计研究院)
地址 528311 广东省佛山市顺德区北滘镇
三乐路一号广东工业设计城二期广东
顺德创新设计研究院604

(72) 发明人 黄灿锋 姜涛 许杰盛

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202
专利代理师 郝传鑫

(51) Int. Cl.
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/16 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61L 33/00 (2006.01)
C08F 122/24 (2006.01)

(56) 对比文件

- WO 2021007899 A1, 2021.01.21
- CN 114213679 A, 2022.03.22
- CN 111662464 A, 2020.09.15
- CN 112086611 A, 2020.12.15
- US 2010105801 A1, 2010.04.29
- CN 110917391 A, 2020.03.27
- US 2004170663 A1, 2004.09.02
- CN 104479150 A, 2015.04.01
- CN 112300420 A, 2021.02.02
- US 2019358365 A1, 2019.11.28
- MY 187125 A, 2021.09.02
- CN 113788960 A, 2021.12.14
- US 2017313827 A1, 2017.11.02
- US 2006083773 A1, 2006.04.20
- US 2008208347 A1, 2008.08.28
- US 2020330647 A1, 2020.10.22
- US 2012282584 A1, 2012.11.08
- CN 114230812 A, 2022.03.25
- CN 113956507 A, 2022.01.21
- US 2008317818 A1, 2008.12.25
- JP 2019085521 A, 2019.06.06
- US 2010330383 A1, 2010.12.30

(续)

审查员 梁玉平

权利要求书1页 说明书13页 附图8页

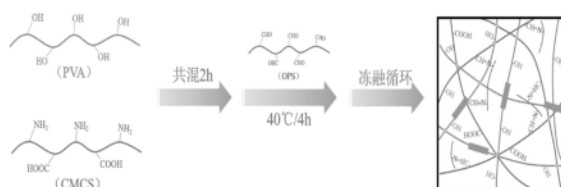
(54) 发明名称

一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶及其制备方法和应用,涉及水凝胶材料领域。互穿网络水凝胶由主网络和次网络于水性介质中交互穿插形成,主网络由聚乙烯醇反复冻融交联而成,次网络由含氨基的天然高分子聚合物与醛基多糖交联形成。本申请制备的互穿网络凝胶交联效果更稳定,且无毒性,两重凝胶网络之间以静电作用、氢键作用等物理交联形成,力学强度大,水凝胶的多孔结构也为细胞粘

附提供条件,具有良好生物相容性、低溶胀和抗凝血功能,可以作为人体组织/器官的损伤修复的有效生物材料,用于如骨修复、软骨修复、促血管修复、人造血管等植入材料领域。



CN 114796620 B

[接上页]

(56) 对比文件

陈琪琅.基于硅橡胶的配电站房电缆套管密封系统.《新材料与新技术》.2016,全文.

zhen zhang et al.Low temperature electrophoretic deposition of porous chitosan/silk fibroin composite coating for titanium biofunctionalization.《journal of materials chemistry》.2011,全文.

李云洁;滕彬宏;赵艳红;杨强;王连永;黄颖.软骨组织工程用羧甲基壳聚糖/氧化海藻酸钠复合水凝胶的制备及体外评估.华西口腔医学杂志.2019,(03),全文.

xin fan et al.tough self adhesive antibacterial and recyclable supramolecular double network flexible hydrogel sensor based on PVA chitosan cyclodextrin.《ind. eng. chem. res.》.2022,第61卷3620-3635.

1. 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,其特征在于,所述互穿网络水凝胶由主网络和次网络于水性介质中交互穿插形成,所述主网络由聚乙烯醇反复冻融交联而成,所述次网络由含氨基的天然高分子聚合物与醛基多糖交联形成,所述含氨基的天然高分子聚合物为羧甲基壳聚糖,所述醛基多糖为醛基羟乙基淀粉和醛基海藻酸钠中的一种或多种,所述醛基多糖的醛基取代度在 0.8mol/mol 以上;所述聚乙烯醇的质量浓度为11%-12%,所述聚乙烯醇和天然高分子聚合物的体积比为6:4;所述醛基多糖与含氨基的天然高分子聚合物的质量比为1:(2-4)。

2. 如权利要求1所述的一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,其特征在于,所述水性介质为去离子水、生理盐水或缓冲溶液。

3. 如权利要求1所述的一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,其特征在于,所述天然高分子聚合物的质量浓度为2%-6%。

4. 如权利要求1所述的一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,其特征在于,所述醛基多糖的制备方法包括以下步骤:取多糖溶于去离子水中,多糖为葡聚糖、普鲁兰多糖、环糊精、羧甲基纤维素钠、羟乙基淀粉、羟乙基纤维素、海藻酸钠和硫酸软骨素中的一种或多种,质量浓度为3%-5%,加入高碘酸钠避光搅拌反应,加入乙二醇继续避光搅拌以终止反应,透析、冻干后,得到醛基多糖。

5. 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的制备方法,其特征在于,用于制备如权利要求1-4任一所述的一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,包括以下步骤:

(1) 将PVA溶解于水性介质中得到PVA溶液,将含氨基的天然高分子聚合物溶解于水性介质中得到含氨基的天然高分子聚合物溶液,混合PVA溶液和含氨基的天然高分子聚合物溶液制得预凝胶;

(2) 将醛基多糖加入到预凝胶中,混合均匀,获得预聚液;

(3) 将预聚液注入模具中并迅速搅拌排气,在 $35-50^{\circ}\text{C}$ 下反应2-4h后,反复冻融,获得互穿网络水凝胶。

6. 如权利要求5所述的一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的制备方法,其特征在于,在步骤(1)中,PVA溶解于水性介质时温度为 $90-100^{\circ}\text{C}$,含氨基的天然高分子聚合物溶解于水性介质时温度为 $45-60^{\circ}\text{C}$;在步骤(3)中,反复冻融过程中,冷冻温度为 -20°C ,冷冻时间为8-12h,解冻时间为1-3h,反复冻融次数为3-8次。

7. 一种如权利要求1-4任一所述的用作医用植入材料的互穿网络水凝胶在制备人体组织或器官植入材料中的应用。

一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及水凝胶材料领域,尤其涉及一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 实现人体组织/器官的损伤修复是临床医学中的关键难题。目前临床上治疗人体组织/器官的修复手段仍以自体组织、同种异体组织或异种组织为主。以血管通道修复为例,针对重症患者常见的治疗方式主要有:(1)服用抗血栓药物,但只能起到缓解作用;(2)搭建血管支架,但再闭塞几率较大;(3)血管移植。自体血管移植是血管修复的“黄金”治疗手段,但自体血管获取难度大,同种异体血管移植和异种血管移植都易出现免疫原性,需要在移植后对患者的免疫系统进行药物压制,常出现并发症和其它器官损伤等情况。

[0003] 近年来,组织工程作为再生医学的分支飞速发展,组织工程技术是一种结合人工生物材料、生物活性因子(生长因子、细胞因子等)、以及多分化功能的干细胞或特定组织分化的功能性细胞,通过工程方法结合构建具有功能性组织/器官的交叉学科新兴技术。利用组织工程技术搭建人工组织/器官修复成为可能,且其临床应用效果有较高的预期性,然而作为只发展了三十多年的新兴技术,其在临床应用上仍存在诸多问题。其中关键技术难关包括:(1)缺乏全面替代人体组织细胞外基质、仿生细胞外微环境的人工生物材料体系;(2)生活活性因子量产困难,且缺乏可缓释控制的载体材料;(3)细胞来源有限、干细胞体内分化的控制难度大、细胞提取扩增到移植治疗周期和临床质量控制体系难建立。

[0004] 显而易见,生物材料是组织工程的基础,其既要满足作为替代胞外基质性能、还要作为生物信号分子的载体。而水凝胶作为一种含有丰富三维网络结构的“软物质”生物材料,在水中能保持一定形状而不被水溶解,同时,其多孔结构也能允许生物大分子通过网络扩散传播。典型的水凝胶可通过高分子间键合形成稳定的宏观结构和强度,形成微米/纳米多孔网络将细胞包裹其中,并为细胞提供可粘附、铺展、迁移和增殖的平台。对于化学交联水凝胶,细胞还能与水凝胶预聚体溶液共混,再引发化学交联/聚合实现细胞三维固载。

[0005] 然而问题依然存在:(1)物理交联水凝胶是基于弱的氢键形成,其力学性能较差;(2)化学交联水凝胶需通过化学反应实现凝胶化,通常具有细胞毒性,影响细胞包埋后的存活率;(3)水凝胶常会引入交联剂,但大多数交联剂都是小分子,且一样具有较大的细胞毒性;(4)单一组分的凝胶网络难以控制交联度,孔隙率和力学性能往往没办法达到医用移植材料的要求。因此,开发良好生物相容性、高力学强度的新型水凝胶体系对临床人体组织/器官的损伤修复具有重要意义。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶及其制备方法和应用,以解决水凝胶生物相容性差、力学性能差的技术问题。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明目的之一提供了一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,所述互穿网络水凝胶由主网络和次网络于水性介质中交互穿插形成,所述主网络由聚乙烯醇反复冻融交联而成,所述次网络由含氨基的天然高分子聚合物与醛基多糖交联形成,所述含氨基的天然高分子聚合物为羧甲基壳聚糖、壳聚糖、壳寡糖和聚赖氨酸中的一种或多种,所述醛基多糖为醛基葡聚糖、醛基普鲁兰多糖、醛基环糊精、醛基羧甲基纤维素、醛基羟乙基淀粉、醛基羟乙基纤维素、醛基海藻酸钠和醛基硫酸软骨素中的一种或多种。

[0008] 作为优选方案,所述水性介质为去离子水、生理盐水、缓冲溶液或低浓度乙酸溶液。

[0009] 作为优选方案,所述醛基多糖的醛基取代度在0.8mol/mol以上。

[0010] 作为优选方案,所述聚乙烯醇的质量浓度为5%-12%,所述天然高分子聚合物的质量浓度为2%-6%,所述聚乙烯醇和天然高分子聚合物的体积比为(6-9):(1-4)。

[0011] 作为优选方案,所述醛基多糖与含氨基的天然高分子聚合物的质量比为1:(2-4)。

[0012] 作为优选方案,所述醛基多糖的制备方法包括以下步骤:取多糖溶于去离子水中,多糖为葡聚糖、普鲁兰多糖、环糊精、羧甲基纤维素钠、羟乙基淀粉、羟乙基纤维素、海藻酸钠和硫酸软骨素中的一种或多种,质量浓度为3%-5%,加入高碘酸钠避光搅拌反应,加入乙二醇继续避光搅拌以终止反应,透析、冻干后,得到醛基多糖。

[0013] 作为优选方案,加入高碘酸钠避光搅拌反应时间为6-10h。

[0014] 作为优选方案,高锰酸钠的高碘酸根与多糖含相邻羟基的糖环基团摩尔比例为1:1。

[0015] 作为优选方案,多糖溶于去离子水中的质量浓度为3%-5%。

[0016] 作为优选方案,所述醛基多糖为醛基环糊精、醛基海藻酸钠和醛基羟乙基淀粉中的一种。

[0017] 为了解决上述技术问题,本发明目的之二提供了一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的制备方法,包括以下步骤:

[0018] (1) 将PVA溶解于水性介质中得到PVA溶液,将含氨基的天然高分子聚合物溶解于水性介质中得到含氨基的天然高分子聚合物溶液,混合PVA溶液和含氨基的天然高分子聚合物溶液制得预凝胶;

[0019] (2) 将醛基多糖加入到预凝胶中,混合均匀,获得预聚液;

[0020] (3) 将预聚液注入模具中并迅速搅拌排气,在35-50℃下反应2-4h后,反复冻融,获得互穿网络水凝胶。

[0021] 作为优选方案,在步骤(1)中,PVA溶解于水性介质时温度为90-100℃,含氨基的天然高分子聚合物溶解于水性介质时温度为45-60℃。

[0022] 作为优选方案,在步骤(3)中,反复冻融过程中,冷冻温度为-20℃,冷冻时间为8-12h,解冻时间为1-3h。

[0023] 作为优选方案,反复冻融次数为3-8次。

[0024] 为了解决上述技术问题,本发明目的之三提供了一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶在制备人体组织或器官植入材料中的应用,如故骨修复、促血管修复、人造血管等植入材料。

[0025] 相比于现有技术,本发明实施例具有如下有益效果:

[0026] 1、本申请制备的互穿网络凝胶由主网络和次网络于水性介质中交互穿插形成,主网络由聚乙烯醇反复冻融形成分子间氢键和结晶交联,属于物理交联,交联效果更稳定,且无毒性,次网络由含氨基的天然高分子聚合物与醛基多糖通过醛基和氨基形成C=N亚胺键,属于动态共价交联,避免引入其他交联剂产生较大的细胞毒性,互穿凝胶网络之间存在以静电作用、氢键作用和分子链缠绕等作用,力学强度大,水凝胶的多孔结构也为细胞粘附提供条件。

[0027] 2、本申请提高的互穿网络水凝胶具有良好生物相容性,可诱导细胞粘附,选用低毒的PVA既能提高力学强度,其细胞相容性和血液相容性都满足应用要求,同时通过天然高分子聚合物进一步提高生物活性,避免引入价格昂贵的生物活性成分,从原料本身赋予水凝胶材料良好生物相容性。

[0028] 3、本申请制备的互穿网络水凝胶具有高力学强度、低溶胀率、良好生物相容性和优异抗凝血等性能,制备方法简单,利于临床推广,原料低廉适合大量生产,可以作为人体组织/器官的损伤修复的有效生物材料,用于如骨修复、软骨修复、促血管修复、人造血管等植入材料领域。

附图说明

[0029] 图1:为本发明一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的反应示意图;

[0030] 图2:为本发明制备例1中一种醛基羧甲基纤维素的红外图谱结果;

[0031] 图3:为本发明制备例2中一种醛基葡聚糖的红外图谱结果;

[0032] 图4:为本发明制备例3中一种醛基羟乙基淀粉的红外图谱结果;

[0033] 图5:为本发明制备例4中一种醛基羟乙基纤维素的红外图谱结果;

[0034] 图6:为本发明制备例5中一种醛基海藻酸钠的红外图谱结果;

[0035] 图7:为本发明制备例6中一种醛基硫酸软骨素的红外图谱结果;

[0036] 图8:为本发明制备例7中一种醛基普鲁兰多糖的红外图谱结果;

[0037] 图9:为本发明制备例8中一种醛基环糊精的红外图谱结果;

[0038] 图10:为本发明实施例1-3和对比例2中一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的蛋白粘附结果;

[0039] 图11:为本发明实施例1-3和对比例2中一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的血小板吸附检测结果;

[0040] 图12:为本发明实施例1、10-12中一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的循环拉伸测试结果;

[0041] 图13:为本发明实施例1-3和对比例2中一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的血液相容性检测结果;

[0042] 图14:为本发明实施例1、13-15和对比例1中一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的血液相容性检测结果(注:对比例1为附图中的0%组);

[0043] 图15:为本发明实施例1-3和对比例2中一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的细胞相容性检测结果;

[0044] 图16:为本发明实施例1、13-15中一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶的细

胞相容性检测结果。

具体实施方式

[0045] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,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。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动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。

[0046] 常见的高强度水凝胶主要包括有:滑动水凝胶、DN互穿水凝胶、复合水凝胶。其中,滑动水凝胶是利用超分子化学技术合成多聚轮烷水凝胶,其伸缩性能较好,但其溶胀率较高,不适应于医用移植材料,且合成路线和制备工艺复杂。复合水凝胶是指多元聚合物聚合交联而成的水凝胶,通常会引入金属纳米粒子和纳米纤维降低其溶胀率和提高力学强度,但其中大多数聚合网络与纳米结构物质的交联依赖物理交联,即氢键交联,在应用过程中金属纳米粒子和纳米纤维容易脱落而产生细胞毒性。DN互穿水凝胶是较为理想的选择,仅通过两个相互穿插的聚合物网络,刚柔并济实现高强度力学性能。

[0047] 但要实现应用在医用植入材料,还需要赋予水凝胶良好的生物相容性。传统的DN双穿水凝胶柔性聚合物网络交联过程中多采用紫外交联光引发交联,容易引起细胞毒性,同时在制备过程中,难以实现包埋细胞。此外,为了提高DN互穿水凝胶的生物相容性,大多数研究采用引入生物活性成分,其价格高昂且性能不稳定;亦有研究通过在凝胶表面涂覆涂层提高生物相容性,但其工艺路线复杂,且涂层容易脱落。

[0048] 本申请提供一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,基于物理-化学双交联方式制备多孔高强度低溶胀生物相容性良好的水凝胶,互穿网络水凝胶由主网络和次网络于水性介质中交互穿插形成,主网络选用合成高分子材料,具体由聚乙烯醇反复冻融交联而成,次网络由含氨基的天然高分子聚合物或衍生物与醛基多糖交联形成,含氨基的天然高分子聚合物或衍生物可以为羧甲基壳聚糖(CMCS)、壳聚糖(CS)、壳寡糖(COS)和聚赖氨酸(PL),优选为羧甲基壳聚糖(CMCS);生物交联剂选择大分子量的醛基多糖交联剂,可以为醛基葡聚糖(ODex)、醛基普鲁兰多糖(OPu1)、醛基环糊精(OCD)、醛基羧甲基纤维素(OCMC)、醛基羟乙基淀粉(OHES)、醛基羟乙基纤维素(OHEC)、醛基海藻酸钠(OSA)、醛基硫酸软骨素(OCS)等,优选为醛基环糊精,醛基多糖中醛基的取代度在0.8mol/mol以上。可以作为人体组织/器官损伤修复的有效生物材料,如骨修复、促血管修复、人造血管等植入材料领域的应用。

[0049] 本申请具体选用软链聚乙烯醇(Professional Video Assistant,PVA)和刚链羧甲基壳聚糖(Carboxymethyl chitosan,CMCS)作为互穿网络的主体材料。PVA通过冻融循环在物理交联作用下形成稳定的结晶区,其交联效果更稳定,且无毒性,同时PVA水凝胶的弹性和压缩性能良好,是一种理想的生物材料。CMCS作为壳聚糖的羧甲基化衍生物,其生物相容性良好,含有丰富的羟基、羧基和氨基,可与生物交联剂交联形成多孔结构网络,CMCS通过与醛基多糖发生氨基席夫碱交联,互穿凝胶网络之间以静电作用、氢键作用等物理交联形成,水凝胶的多孔结构也为细胞粘附提供条件。水凝胶具体包括以下制备步骤:

[0050] (1) 制备混合溶液:将PVA和CMCS经水溶解制备混合溶液,将PVA在90-100℃下溶解在去离子水中,优选浓度范围为5%-12%;将CMCS在45-60℃下溶解在去离子水中,优选浓

度范围为2%-6% ; 并通过不同的体积比混合PVA和CMCS溶液2-4小时制得预凝胶, 优选比例范围为9:1-6:4;

[0051] (2) 制备生物交联剂: 选用不同多糖进行氧化获得醛基多糖, 可选用多糖包括: CMC (羟甲基纤维素)、Dex (葡聚糖)、HES (羟乙基淀粉)、HEC (羟乙基纤维素)、SA (海藻酸钠)、CS (硫酸软骨素)、Pu1 (普鲁兰多糖)、CD (环糊精) 等; 取多糖溶于去离子水中, 质量浓度为3%-5%, 按基团摩尔比例1:1加入高碘酸钠避光搅拌反应6-10h, 加入乙二醇继续避光搅拌2h以终止反应, 并置于透析袋中透析3天, 最后冻干得到白色固体产物醛基多糖;

[0052] (3) 将加入醛基多糖到预凝胶中, 混合均匀, 获得预聚液;

[0053] (4) 将预聚液注入模具中并迅速搅拌排气, 在35-50℃下反应2-4h, 置于-20℃冷冻8-12h, 后在室温解冻1-3h, 反复冻融3-8次, 获得PVA/CMCS水凝胶。

[0054] 为了能够更清楚地理解本申请的技术内容, 以下结合具体的实施例以说明本申请方案实际的效果。本申请中, 所涉及的组分或原料均为常规市售产品, 或可通过本领域的常规技术手段获得。

[0055] 制备例1-8

[0056] 一种醛基多糖, 包括以下制备步骤: 取2.1389g NaIO_4 溶解于30mL纯水中, 搅拌溶解, 按高锰酸钠的高碘酸根与多糖含相邻羟基的糖环基团摩尔比1:1的比例往 NaIO_4 溶液里加入多糖, 多糖为葡聚糖、普鲁兰多糖、环糊精、羧甲基纤维素、羟乙基淀粉、羟乙基纤维素、海藻酸钠或硫酸软骨素, 避光搅拌反应8h, 随后加入200 μL 乙二醇继续避光搅拌2h以终止反应, 并置于500Da的透析袋中透析3天, 去除反应剩余的少量高碘酸钠、乙二醇、副产物碘酸钠、甲醛等, 最后冻干得到白色固体产物醛基多糖。

[0057] 为了满足水凝胶制备的人工血管进行日常的膨胀、收缩和拉伸需要, 对8种醛基多糖的机械性能、溶胀性能以及结构稳定性进行筛选:

[0058] 1、利用盐酸羟胺-氢氧化钠滴定检测获得醛基多糖的取代度如表1所示, 醛基多糖的红外图谱表征结果如图2-9所示。

[0059] 表1-制备例1-8中醛基多糖选用的多糖和醛基取代度

项目	制备例 1	制备例 2	制备例 3	制备例 4	制备例 5	制备例 6	制备例 7	制备例 8
多糖	CMC	Dex	HES	HEC	SA	CS	Pu1	CD
醛基取代度 (mol/mol)	0.52	1.23	1.06	0.56	0.94	0.86	1.69	1.87

[0061] 2、CMCS/醛基多糖水凝胶网络稳定性数据 (流变): 取4mL CMCS (6%) 溶液于烧杯中, 加入700 μL 制备例1-8醛基多糖 (5%) 溶液, 快速搅拌均匀后置于40℃烘箱中交联4h, 得到CMCS/醛基多糖水凝胶。使用旋转流变仪的频率扫描模式测定不同醛基多糖交联CMCS水凝胶的储能模量和损耗模量, 其中应变1%, 频率范围为1-100rad/s, 检测结果如表2所示。

[0062] 表2-不同醛基多糖/CMCS水凝胶的模量

检测项目	储能模量/KPa	损耗模量/Pa
CMCS/OCMC	0.58	8.4

CMCS/ODex	5.49	19.8
CMCS/OHES	6.85	22.1
CMCS/OHEC	1.16	6
CMCS/OSA	7.10	21.9
CMCS/OCS	3.75	13.5
CMCS/OPu1	6.53	18.9
CMCS/OCD	7.49	27

[0064] 3、CMCS/醛基多糖水凝胶的溶胀比：

[0065] 取4mL CMCS (6%) 溶液于烧杯中，加入700 μ L制备例1-8醛基多糖 (5%) 溶液，快速搅拌均匀后置于40 $^{\circ}$ C烘箱中交联4h，得到CMCS/醛基多糖水凝胶。采用称重法分析CMCS/醛基多糖水凝胶的动态溶胀行为；将水凝胶裁剪成直径8mm的圆片，冻干后称重，并将干胶浸泡在PBS缓冲溶液中，每隔一段时间取出并用滤纸吸干表面水分，称量水凝胶质量，直至水凝胶恒重；记录干胶的质量 m_1 ，溶胀恒重时的质量 m_2 ，通过公式(1.1)计算水凝胶的平衡溶胀比SR，SR越小，质量和体积变化越小，越满足医用植入材料的应用要求，检测结果如表3所示。

$$[0066] \quad SR = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \quad (1.1)$$

[0067] 表3-不同醛基多糖/CMCS水凝胶的溶胀比SR

检测项目	SR
CMCS/OCMC	170.57
CMCS/ODex	127.26
CMCS/OHES	116.69
CMCS/OHEC	232.89
CMCS/OSA	88.25
CMCS/OCS	821.40
CMCS/OPu1	132.15
CMCS/OCD	64.04

[0069] 结合表1-3的结果可知，醛基羧甲基纤维素和醛基羟乙基纤维素的醛基取代度低于0.8mol/mol，取代度过低，醛基多糖与CMCS交联的密度会下降，导致水凝胶结构不稳定，强度不足；醛基羧甲基纤维素、醛基羟乙基纤维素和醛基硫酸软骨素的模量较低，导致水凝胶交联网络稳定性降低，不能满足结构稳定性要求；醛基葡聚糖、醛基普鲁兰多糖、醛基羧甲基纤维素钠、醛基羟乙基纤维素和醛基硫酸软骨素的溶胀比过大，水凝胶溶胀过程的质量和体积变化较大，较大的溶胀率会极大地影响尺寸的调控，强度也会受到一定的影响，难以满足医用植入材料的性能要求。因此，选用醛基环糊精、醛基海藻酸钠、醛基羟乙基淀粉作为生物交联剂，制备获得的水凝胶可以同时满足高模量、低溶胀比和结构稳定性高的要求。

[0070] 实施例一

[0071] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶，包括以下制备步骤：

[0072] (1) 将PVA在90-100 $^{\circ}$ C下溶解在去离子水中，质量浓度为10%；将CMCS在45-60 $^{\circ}$ C下

溶解在去离子水中,质量浓度为6%;

[0073] (2)取PVA溶液(10%)和CMCS溶液(6%)按体积比9:1比例混合形成预凝胶,混合时间为2h;

[0074] (3)加入0.025g制备例8获得的醛基环糊精(OCD)到10mL预凝胶中,此时醛基环糊精与CMCS的质量比为1:2.4,混合均匀,获得预聚液;

[0075] (4)将预聚液注入模具后排气,在40℃下反应4h,置于-20℃冷冻8h,后在室温解冻2h,反复冻融4次,获得水凝胶。

[0076] 实施例二

[0077] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(3)中制备例8获得的醛基环糊精(OCD)采用制备例3获得的醛基羟乙基淀粉(OHES)替代。

[0078] 实施例三

[0079] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(3)中制备例8获得的醛基环糊精(OCD)采用制备例5获得的醛基海藻酸钠(OSA)替代。

[0080] 实施例四

[0081] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(3)中制备例8获得的醛基环糊精(OCD)添加量为0.015g,此时醛基环糊精与CMCS的质量比为1:4。

[0082] 实施例五

[0083] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(3)中制备例8获得的醛基环糊精(OCD)添加量为0.02g,此时醛基环糊精与CMCS的质量比为1:3。

[0084] 实施例六

[0085] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(3)中制备例8获得的醛基环糊精(OCD)添加量为0.03g,此时醛基环糊精与CMCS的质量比为1:2。

[0086] 实施例七

[0087] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(2)中PVA溶液(10%)和CMCS溶液(6%)按体积比8:2比例混合形成预凝胶,此时醛基环糊精的添加量为0.05g。

[0088] 实施例八

[0089] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(2)中PVA溶液(10%)和CMCS溶液(6%)按体积比7:3比例混合形成预凝胶,此时醛基环糊精的添加量为0.075g。

[0090] 实施例九

[0091] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(2)中PVA溶液(10%)和CMCS溶液(6%)按体积比6:4比例混合形成预凝胶,此时醛基环糊精的添加量为0.1g。

[0092] 实施例十

[0093] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(4)中反复冻融3次。

[0094] 实施例十一

[0095] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(4)中反复冻融5次。

[0096] 实施例十二

[0097] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(4)中反复冻融6次。

[0098] 实施例十三

[0099] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(1)中制备CMCS溶液的浓度为3%,此时醛基环糊精的添加量为0.0125g。

[0100] 实施例十四

[0101] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(1)中制备CMCS溶液的浓度为4%,此时醛基环糊精的添加量为0.0167g。

[0102] 实施例十五

[0103] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(1)中制备CMCS溶液的浓度为5%,此时醛基环糊精的添加量为0.0208g。

[0104] 实施例十六

[0105] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(1)中制备PVA溶液的浓度为8%。

[0106] 实施例十七

[0107] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(1)中制备PVA溶液的浓度为9%。

[0108] 实施例十八

[0109] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(1)中制备PVA溶液的浓度为11%。

[0110] 实施例十九

[0111] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,CMCS采用CS替代,步骤(2)中PVA溶液与CS溶液按体积比8:2的比例混合形成预凝胶。

[0112] 实施例二十

[0113] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,CMCS采用CS替代,步骤(2)中PVA溶液与CS溶液按体积比6:4的比例混合形成预凝胶。

[0114] 实施例二十一

[0115] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,CMCS采用COS替代,步骤(2)中PVA溶液与COS溶液按体积比8:2的比例混合形成预凝胶。

[0116] 实施例二十二

[0117] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,CMCS采用COS替代,步骤(2)中PVA溶液与COS溶液按体积比6:4的比例混合形成预凝胶。

[0118] 实施例二十三

[0119] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,CMCS采用PL替代,步骤(2)中PVA溶液与PL溶液按体积比8:2的比例混合形成预凝胶。

[0120] 实施例二十四

[0121] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,CMCS采用PL替代,步骤(2)中PVA溶液与PL溶液按体积比6:4的比例混合形成预凝胶。

[0122] 对比例一

[0123] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,各步骤及各步骤使用的试剂、工艺参数均匀实施例一相同,不同的地方在于,步骤(2)中CMCS溶液的添加量为0。

[0124] 对比例二

[0125] 一种用作医用植入材料的互穿网络水凝胶,包括以下制备步骤:

[0126] (1)将PVA在90-100℃下溶解在去离子水中,质量浓度为10%,制得预聚液;

[0127] (2)预聚液注入模具后排气,在40℃下反应4h,置于-20℃冷冻8h,后在室温解冻2h,反复冻融4次,获得水凝胶。

[0128] 性能检测试验

[0129] 1、选用BCA试剂盒对上述实施例1-3和对比例2获得的水凝胶进行蛋白粘附测试,检测结果如图10所示,包括以下步骤:将水凝胶冻干后灭菌,放置于PBS溶液中溶胀30min,转移至48孔板中,每孔加入500μLBSA溶液;37℃孵育2h后将水凝胶取出,使用无菌PBS溶液清洗三次;然后加入500μL2%SDS溶液,于37℃摇床孵育1h,使吸附在水凝胶上的蛋白质脱落到溶液中;通过BCA蛋白质检测试剂盒绘制蛋白质标准曲线并于560nm波长处测定吸光值,通过计算水凝胶片上粘附蛋白质的量。

[0130] 如图10的结果显示,不同醛基多糖交联的PVA/CMCS水凝胶对蛋白的粘附情况各不相同,其中实施例1中采用醛基环糊精交联的水凝胶具有一定的抗蛋白黏附能力,研究表明较低的蛋白粘附量有利于血小板粘附,从而避免了血管内膜增生、闭塞等情况的发生。

[0131] 2、使用乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH试剂盒)对上述实施例1-3和对比例2获得的水凝胶进行血小板吸附测试,确定吸附在水凝胶的血小板的相对数量,检测结果如图11所示,包括以下步骤:将水凝胶冻干后灭菌,放置于PBS溶液中溶胀30min,转移至48孔板中,并加入200μLPRP,37℃孵育1h后将水凝胶片取出并置于干净的孔板中,加入200μL2%Titon-X100,37℃孵育30min后,按LDH试剂盒说明,于440nm波长处测定吸光值。

[0132] 如图11所示,本申请不同醛基多糖交联PVA/CMCS水凝胶对血小板的吸附量显著低

于PVA交联水凝胶,其中采用醛基环糊精交联的PVA/CMCS水凝胶对血小板的粘附量最低,说明该实施例1中水凝胶制备人工血管时的抗凝血效果最佳。

[0133] 3、参照GB/T 14233.2-2005、ISO 10993-4:2017和ASTM F756-17等标准对实施例1-3、7-9、19-24和对比例1-2中水凝胶的复钙化时间进行测试,测试结果如表4所示,包括以下步骤:将水凝胶冻干后灭菌,放置于PBS溶液中溶胀30min,转移至48孔板中,加入200 μ L PPP,并于37 $^{\circ}$ C孵育1h后,取100 μ L于96孔板中,加入100 μ L 37 $^{\circ}$ C预热的CaCl₂ (25mM),震荡30s后,用酶标仪于405nm波长处,每一分钟测定一次吸光值,观察30min,取曲线的半峰值对应时间为复钙化时间。

[0134] 表4-实施例1-3、7-9、19-24和对比例1-2中水凝胶的复钙化时间

检测项目	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 7	实施例 8
APTT/min	7.4	6.8	3.5	8.0	10.2
检测项目	实施例 9	实施例 19	实施例 20	实施例 21	实施例 22
APTT/min	14.1	7.2	13.2	8.4	13.8
检测项目	实施例 23	实施例 24	对比例 1	对比例 2	市售聚四氟乙烯人工血管
APTT/min	8.9	14.5	2.5	2.9	7.5

[0136] 如表4中实施例1-3和对比例2的结果显示,不同醛基多糖交联PVA/CMCS水凝胶的复钙化时间在3.5min以上,其中采用醛基环糊精交联PVA/CMCS水凝胶的复钙化时间最长,同时采用醛基环糊精交联的PVA/CMCS水凝胶对血小板和蛋白均较低,证明本申请实施例制备的人工血管水凝胶具备有优秀的抗凝血效果,其中醛基环糊精交联PVA/CMCS水凝胶的抗凝效果最佳。

[0137] 如表4中实施例7-9、19-24和对比例1的结果显示,PVA溶液与CMCS/CS/COS/PL溶液的质量比例不同,其制备获得的水凝胶复钙化时间也发生变化,当PVA溶液与CMCS/CS/COS/PL溶液的质量比例在6:4时,复钙化时间最长,抗凝血效果最好。

[0138] 4、使用旋转流变仪的频率扫描模式测定实施例1-6、16-18和对比例2中不同OCD含量下水凝胶的储能模量和损耗模量,其中应变1%,频率范围为1-100rad/s,检测结果如表5所示,储能模量越高具有较好的网络稳定性和流变力学强度;此外,储能模量与损耗模量的差值越大,也证明材料的网络稳定性越好。

[0139] 表5-实施例1-6、16-18和对比例2中水凝胶的模量结果

检测项目	储能模量/kPa	损耗模量/kPa
实施例1	24.7	7.1
实施例2	23.4	6.8
实施例3	21.6	6.2
实施例4	13.8	0.3
实施例5	14.6	1.0

实施例6	15.3	3.6
实施例16	11.6	2.7
实施例17	13.5	2.9
实施例18	23.1	6.9
对比例2	10.5	1.9

[0141] 如表5中实施例1、4-6的结果所示,PVA/CMCS/醛基多糖水凝胶的力学性能关键依靠醛基多糖与CMCS的交联能力,在一定的区间内当醛基环糊精的添加量提高,醛基环糊精与CMCS的交联密度提高,模量也得到提高。随着醛基多糖含量的继续增加,储能模量呈现减小的趋势,分析原因可能是醛基多糖含量增多,导致其醛基利用率降低,理想状态为一条分子链上的OCD的醛基都与CMCS的氨基交联。

[0142] 如表5中实施例1、16-18的结果所示,PVA/CMCS/醛基多糖水凝胶的力学性能关键依靠PVA在冻融循环时形成的结晶交联,因此在一定区间内PVA溶度越高,理论上交联的密度会越大,水凝胶的网络稳定性越强,因此水凝胶的模量越高。

[0143] 5、使用万能力学试验机对实施例1-3、7-9、19-24和对比例1-2中不同PVA/CMCS比例下水凝胶的拉伸强度、拉伸模量、压缩强度和压缩模量进行测试,检测结果如表6所示,包括以下步骤:将水凝胶浸泡在PBS溶液中达到平衡溶胀状态后,用滤纸吸去表面水分,利用CMT1203微机控制电子万能试验机对其进行机械性能测试;测试标准参照YY 0500-2004/ISO 7198:1998;拉伸测试:用条形模具制备拉伸样品(长度60mm,宽度10mm,厚度2mm),将水凝胶样条的两端固定在试验机的夹具上,夹具间的原始标距50mm,拉伸速率设定为50mm/min,采用单侧拉伸直到将样条拉断;压缩性能测试:用圆形模具制备压缩样品,样品为圆柱形(直径25mm,高度4mm);将水凝胶放置在试验机的夹具上,压缩速率设定为10mm/min。但样品被压缩到80%时,记录其抗压强度。

[0144] 表6-实施例1-3、7-9、19-24和对比例1-2中不同PVA/CMCS比例水凝胶的力学性能结果

检测项目	拉伸强度/MPa	拉伸模量/MPa	压缩强度/MPa	压缩模量/MPa
实施例 1	0.745	0.760	3.362	3.279
实施例 2	0.532	0.545	2.025	2.111
实施例 3	0.621	0.633	2.351	2.293
实施例 7	0.637	0.543	1.811	2.217
实施例 8	0.599	0.727	1.244	1.630
[0145] 实施例 9	0.538	0.524	1.180	1.397
实施例 19	0.701	0.733	1.735	2.186
实施例 20	0.433	0.419	1.213	1.596
实施例 21	0.791	0.737	1.663	1.982
实施例 22	0.454	0.432	1.372	1.410
实施例 23	0.781	0.745	1.595	1.703
实施例 24	0.557	0.541	1.341	1.447
[0146] 对比例 1	0.322	0.423	1.003	1.260
对比例 2	0.310	0.375	1.014	1.178

[0147] 如表6中实施例1、7-9、19-24和对比例2的结果所示,如表6中实施例结果所示,PVA与天然高分子聚合物缠绕形成互穿网络后,其力学强度均得到提高,但当PVA与天然高分子聚合物的比例较大时,力学强度有所下降,这主要是由于PVA的含量降低,其通过冻融循环形成的氢键作用和结晶交联作用减弱。

[0148] 此外,对比CMCS/CS/COS/PL对PVA互穿后力学性能的增强效果发现,CMCS的效果较优,这与CMCS更加丰富的亲水官能团有关,其外分子链上的羧基也能增强分子间和分子内的静电作用,从而增大力学性能。

[0149] 6、使用万能力学试验机对实施例1、10-12中不同冻融次数的水凝胶进行循环拉伸测试,根据YY0500-2004/ISO 7198:1998标准,其中拉伸速率为100mm/min、原始标距45mm,拉伸应变20%,循环拉伸次数100次,测试结果如图12所示。

[0150] 如图12结果所示,水凝胶冻融次数越多,在装卸-卸载过程中,拉伸应力应变曲线彼此重叠,显示出较好的抗疲劳性能,说明PVA形成结晶交联的程度越高,交联密度越大,最终形成水凝胶的力学强度越高,抗疲劳性能也越好。

[0151] 7、参照GB/T 16886.1-2011的标准用溶血率检测水凝胶的血液相容性,实施例1-3和对比例2的检测结果如图13所示,实施例1、13-15和对比例1(对应附图7中的0%组)中的检测结果如图14所示,包括以下步骤:取5mL无菌PBS溶液,按体积比 $V_{\text{抗凝兔血}}:V_{\text{PBS}}=4:5$ 加入新鲜抗凝兔血,制成稀释抗凝兔血并于4℃冰箱保存备用;将水凝胶冻干后灭菌,放置于PBS溶液中溶胀30min,转移至离心管中,每管加入10mLPBS溶液;阴性对照组直接加入10mLPBS溶

液至离心管中,阳性对照组直接加入10mL去离子水;将所有组别离心管置于37℃水浴预热30min,每管加入200μL稀释抗凝兔血,再次37℃水浴预热1h;将上述离心管用离心机在2500rpm离心15min,小心吸取上清液加入石英比色皿,于540nm波长处测定吸光度值;通过公式计算得到溶血率。

[0152] 6、参照GB/T 16886.1-2011标准并采用MTT检测方式测试实施例1-3、13-15和对比例2中水凝胶的体外细胞毒性(细胞相容性),实施例1-3和对比例2的检测结果如图15所示,实施例1、13-15的检测结果如图16所示,包括以下步骤:

[0153] (1) 制备浸提液:首先将水凝胶冻干后灭菌备用,将干胶放置于MEM培养基(含10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素溶液)溶胀30min后,置于MEM培养基(30mg/mL)中37℃浸提24h;

[0154] (2) 接种细胞和检测毒性:用胰酶消化对数生长期的L929小鼠成纤维细胞,调节细胞密度为 1×10^5 /mL,将细胞悬液接种于96孔细胞培养板中,每孔加100μL细胞悬液,并在37℃、含5%CO₂培养箱中培育24h后,吸弃培养液,实验组加凝胶浸提液,对照组加正常的培养基,每组设立5个平行孔,将培养板置于37℃、含5%CO₂培养箱中培育24h,每孔加入50μLMTT液(5g/L),常规孵育4h后吸弃培养液,加入100μL异丙醇,37℃恒温振荡10min,使用酶标仪于A570nm波长处测定吸光度值;

[0155] (3) 处理数据:通过公式计算细胞相对增殖率RGR%。

[0156] 如图13-16所示,CMCS组分的加入可以提高PVA水凝胶的生物相容性,细胞增值率和血液相容性提高,特别是血液相容性,由于CMCS中含有大量的COO⁻,这些带负电的基团能够有效地抑制血小板和蛋白质(与凝血机制相关的蛋白质带负电)的粘附,从而起到抗凝的效果,CMCS越多,抗凝效果越好,血液相容性越好。

[0157] 以上所述的具体实施例,对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步的详细说明,应当理解,以上所述仅为本发明的具体实施例而已,并不用于限定本发明的保护范围。特别指出,对于本领域技术人员来说,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

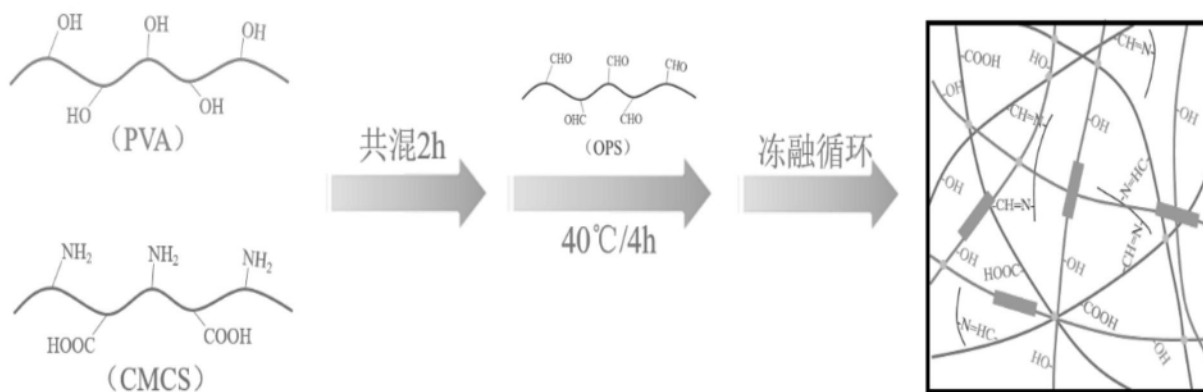


图1

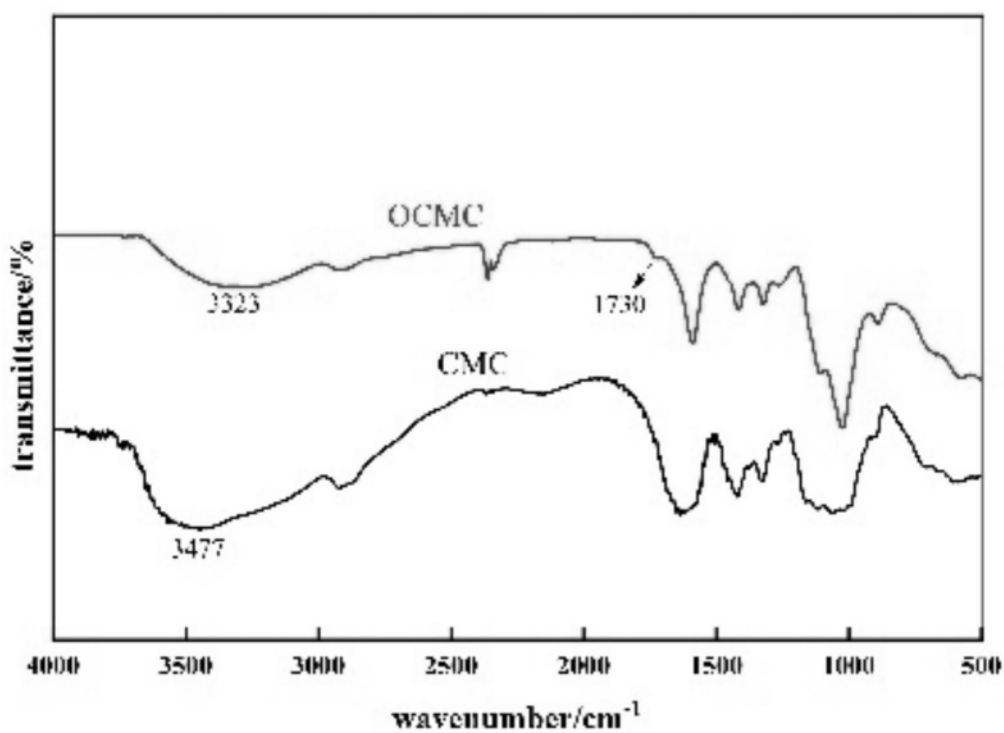


图2

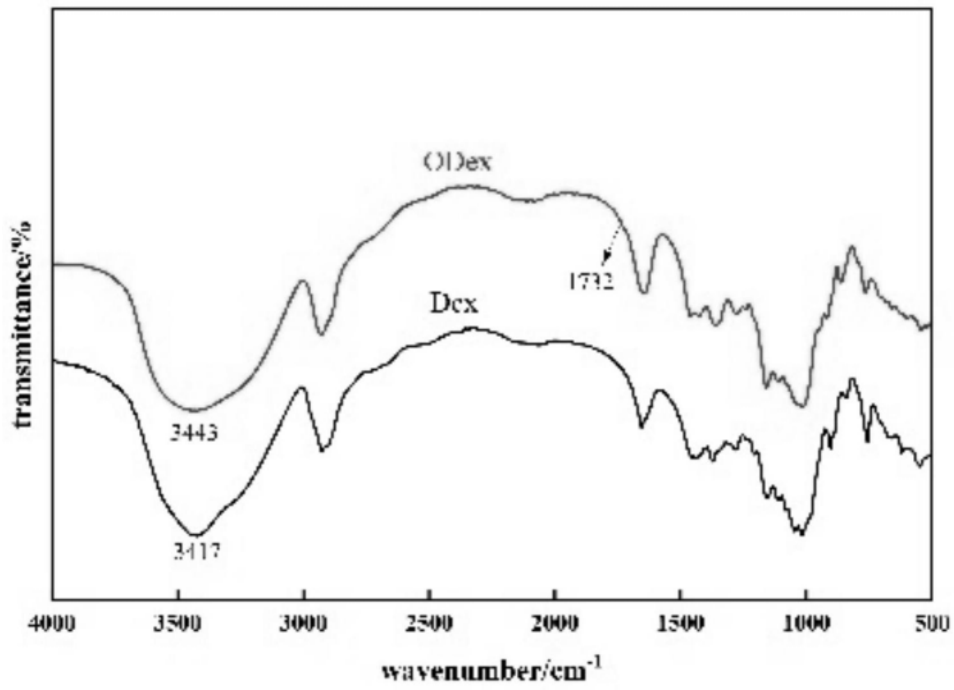


图3

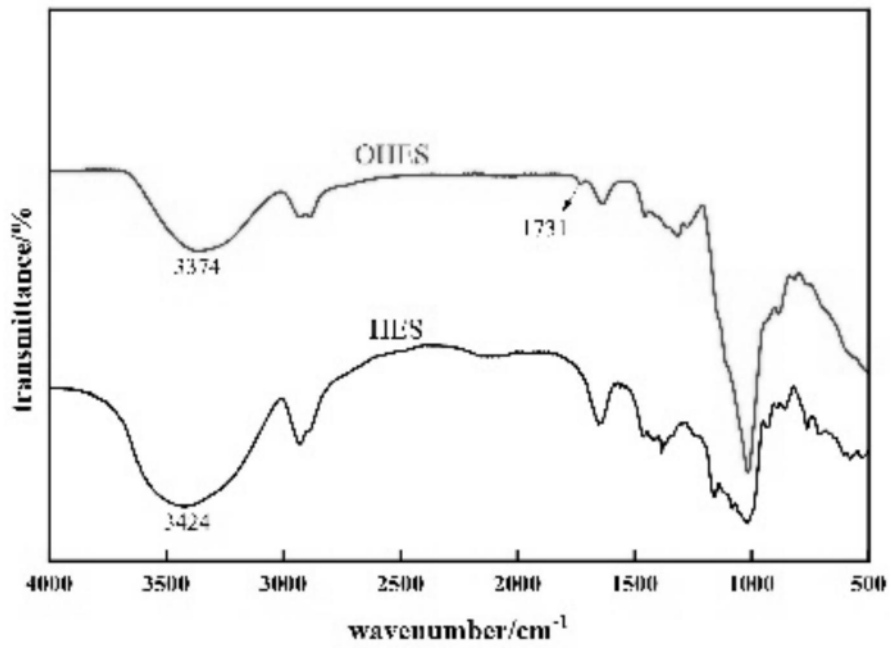


图4

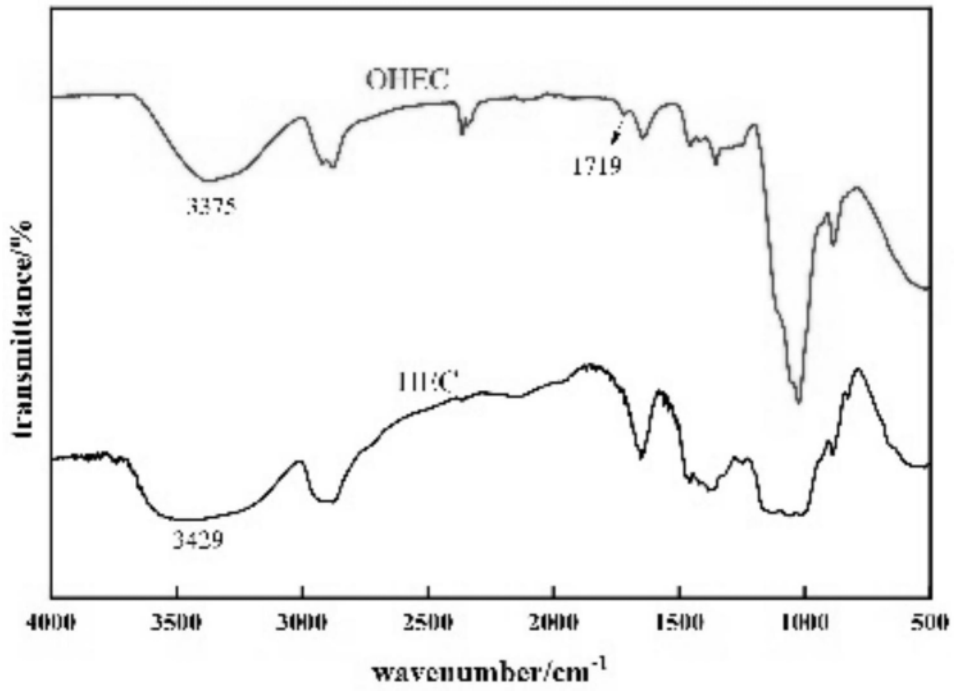


图5

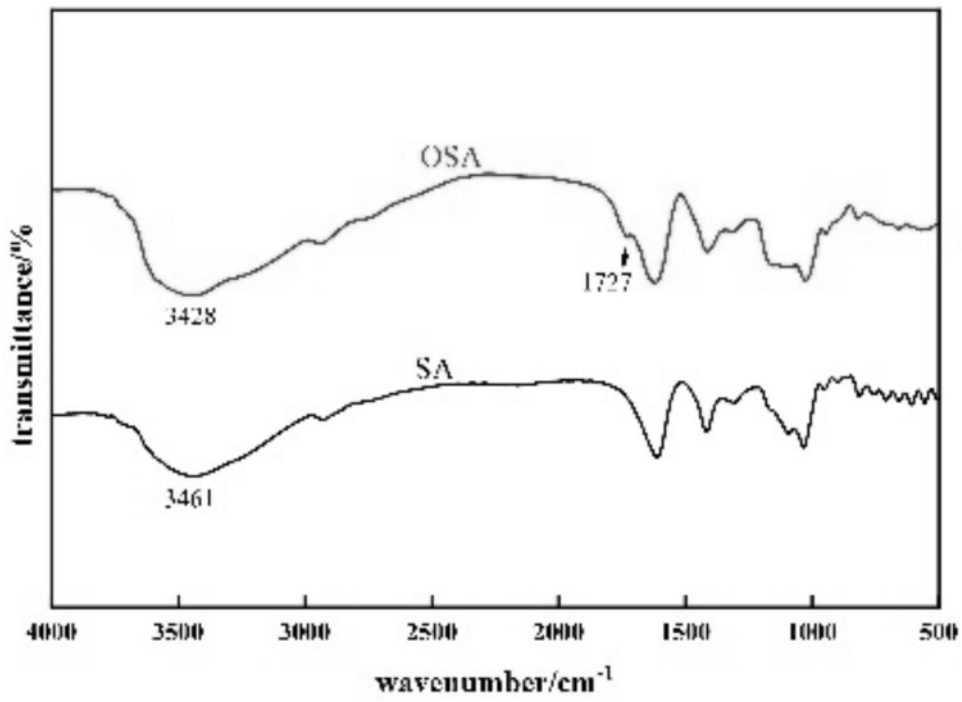


图6

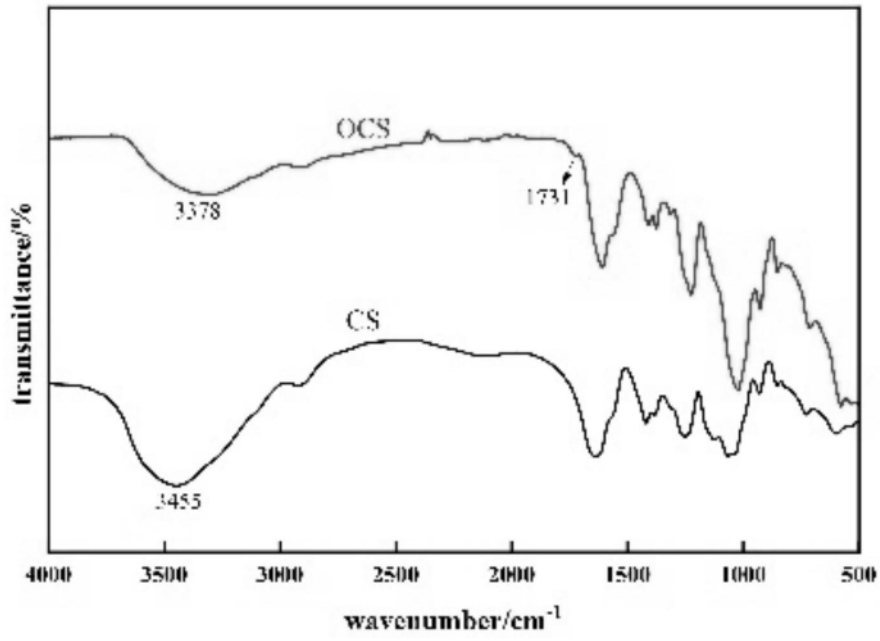


图7

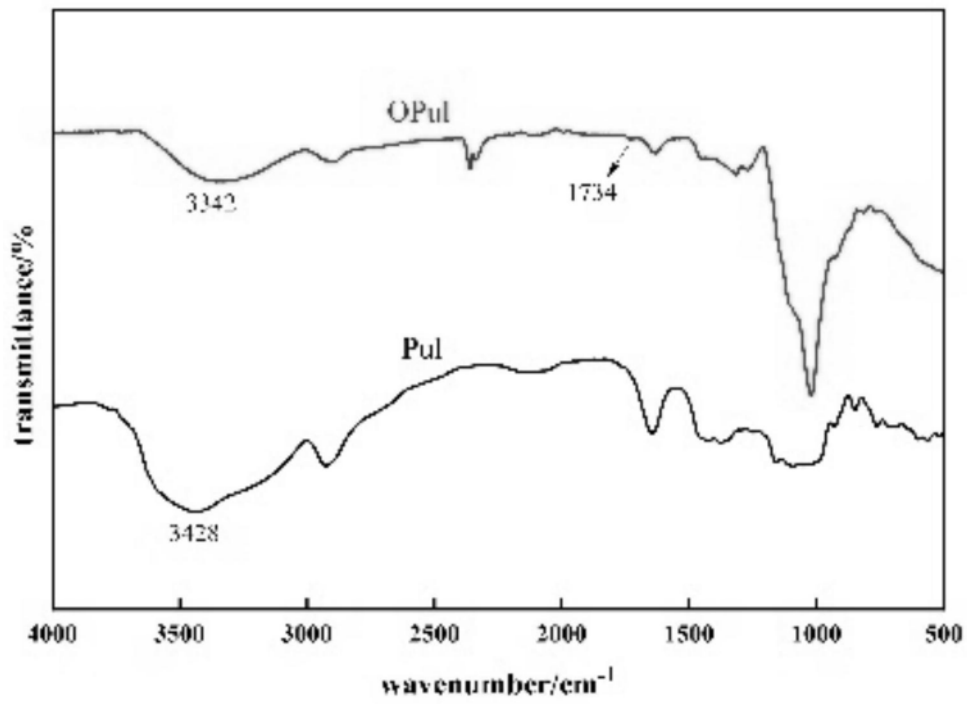


图8

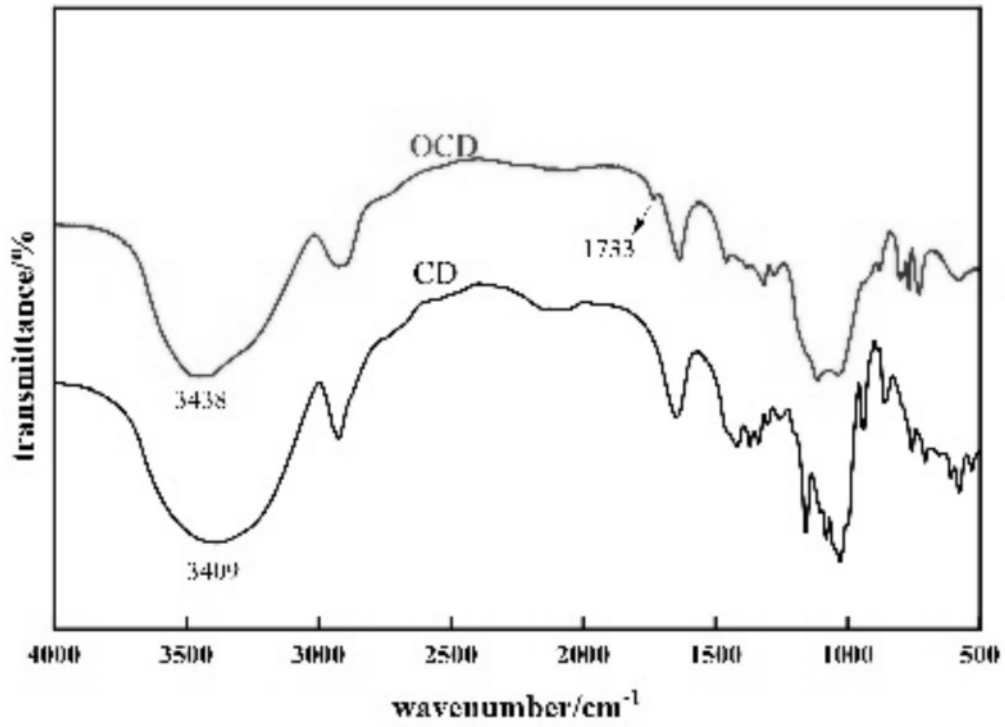


图9

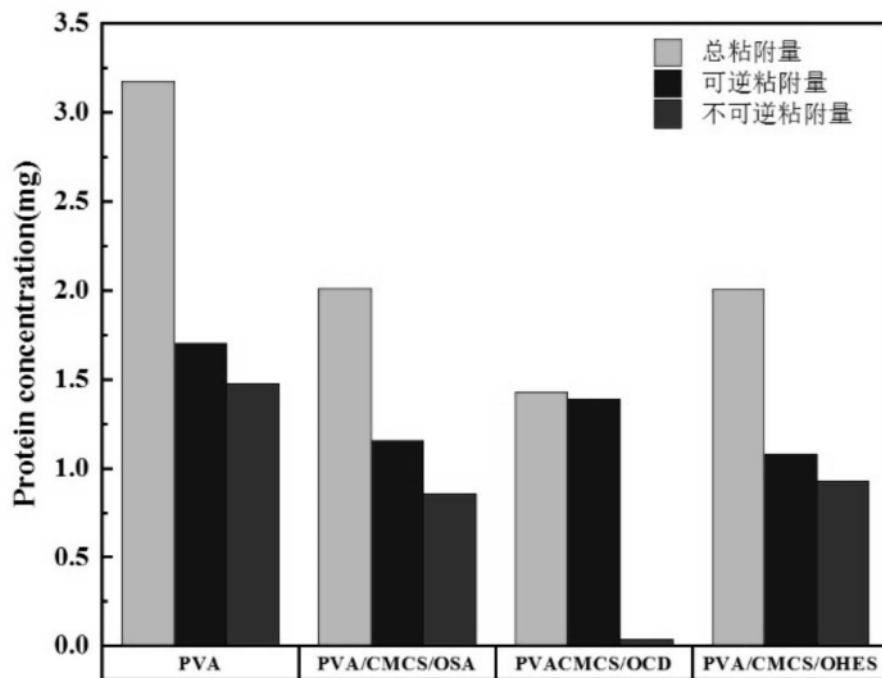


图10

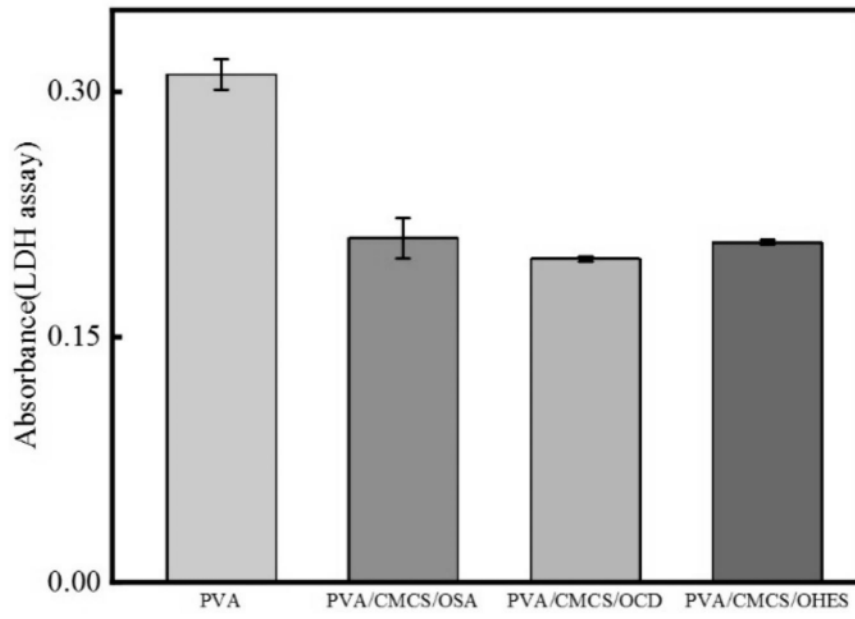


图11

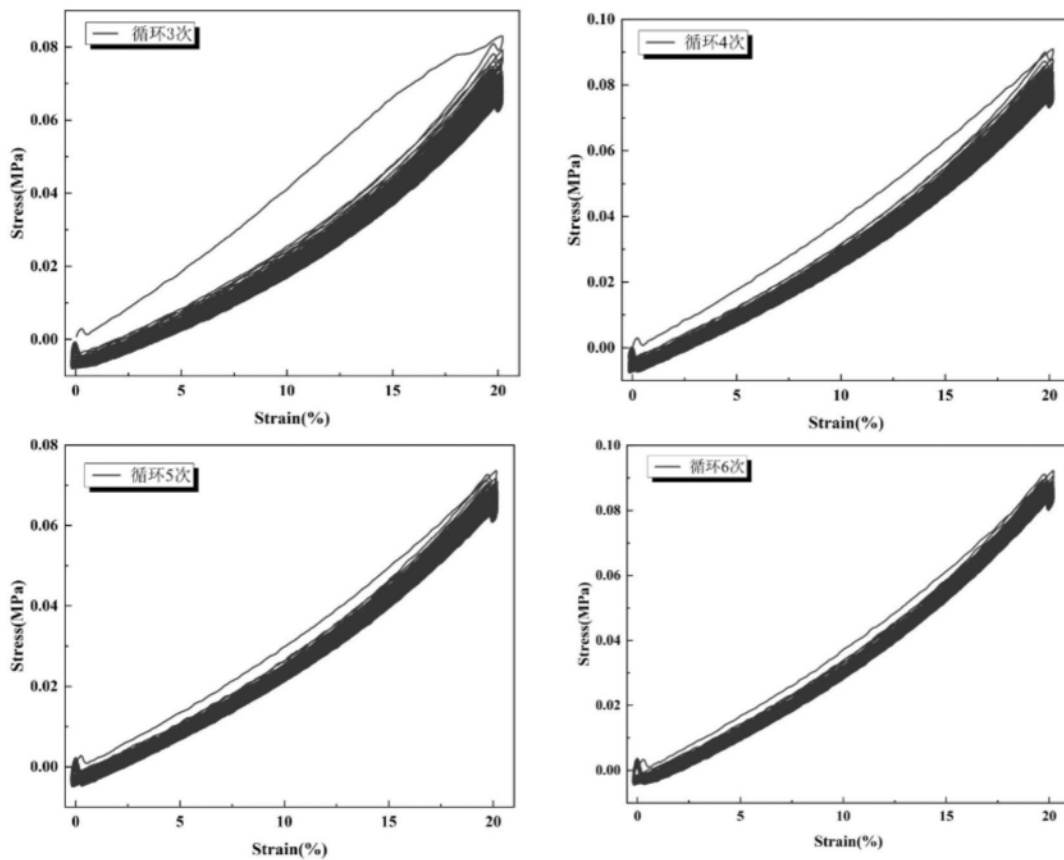


图12

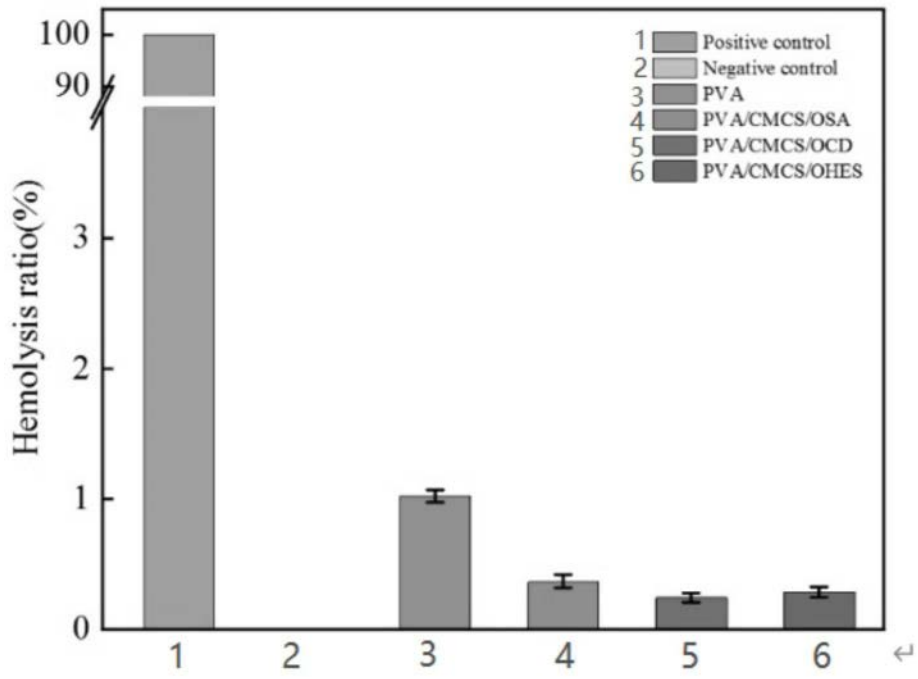


图13

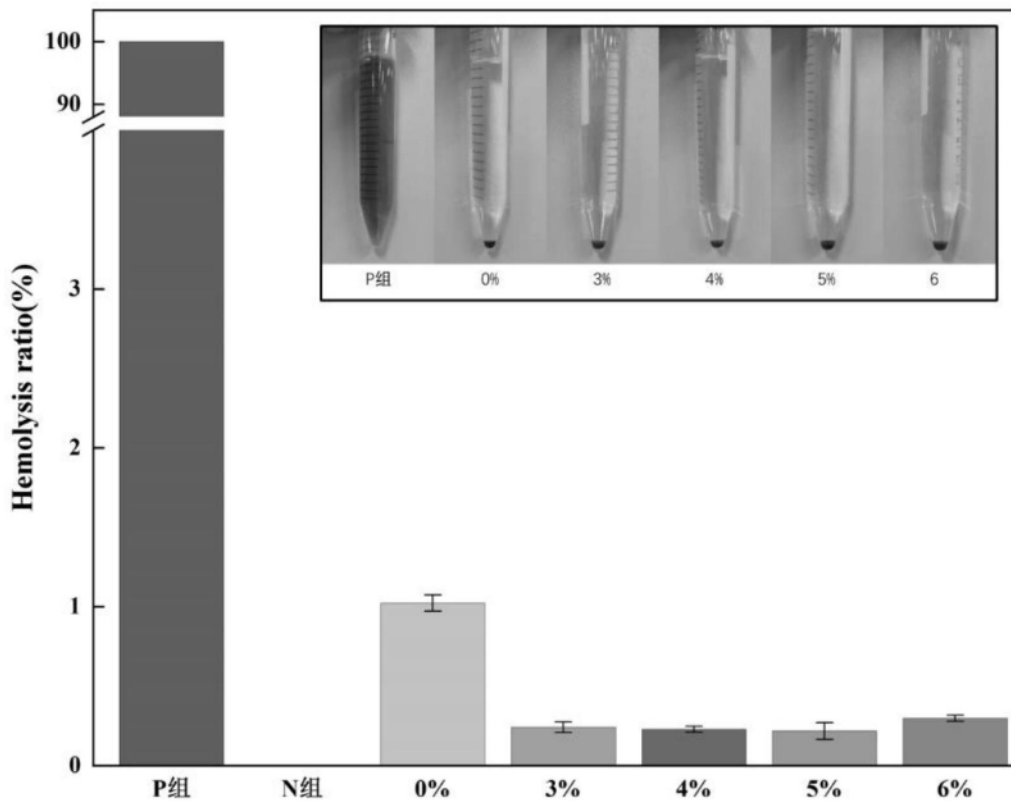


图14

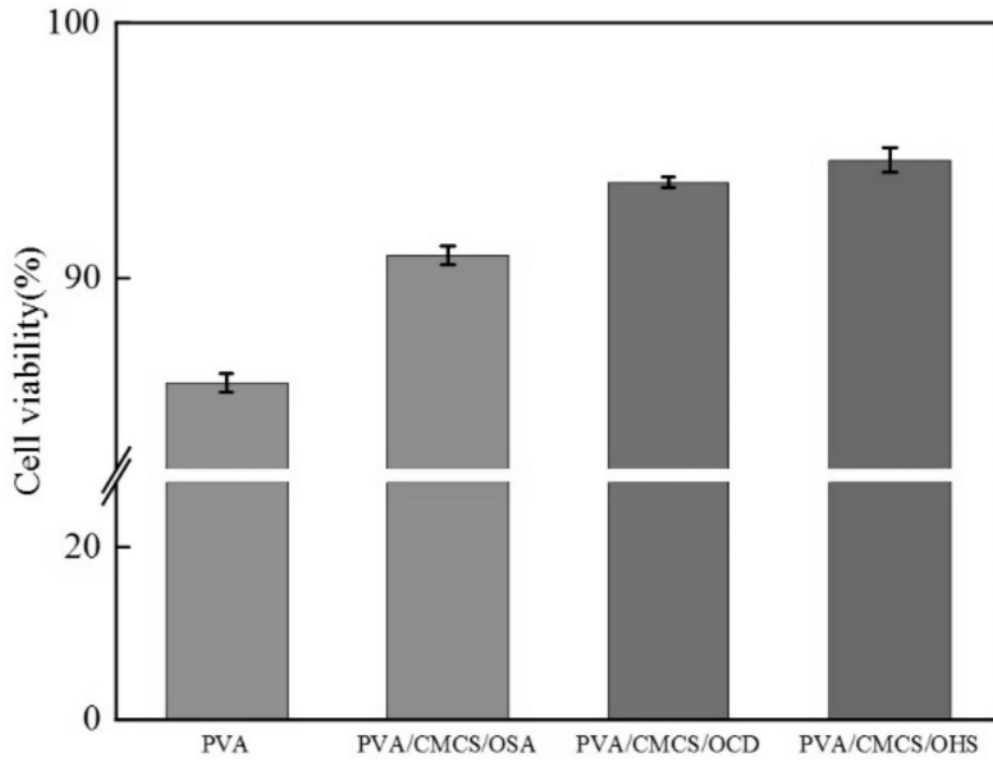


图15

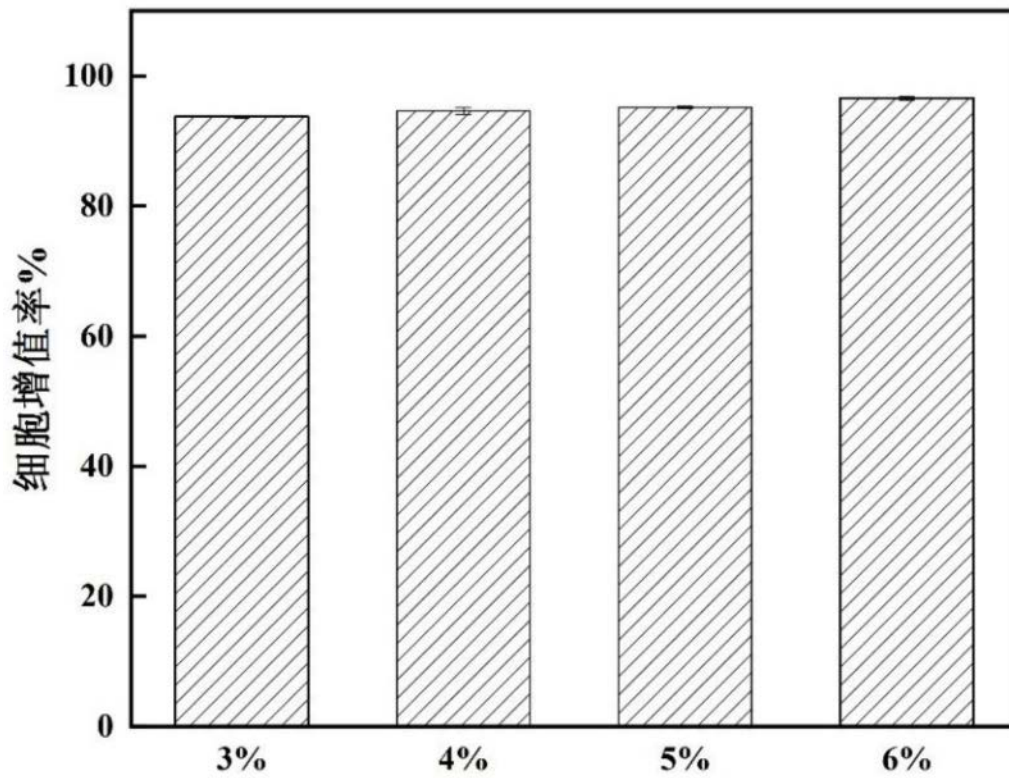


图16