



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110453378 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201910596475.4

(22)申请日 2019.07.03

(71)申请人 上海大学

地址 201900 上海市宝山区上大路99号

申请人 上海市第六人民医院

(72)发明人 施文彦 季舒婷 徐沁 王云

沈龙祥 吴明红 徐刚 唐量

(74)专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

代理人 车超平

(51) Int. Cl.

D04H 1/728(2012.01)

D01D 5/00(2006.01)

D01C 3/02(2006.01)

D01F 4/02(2006.01)

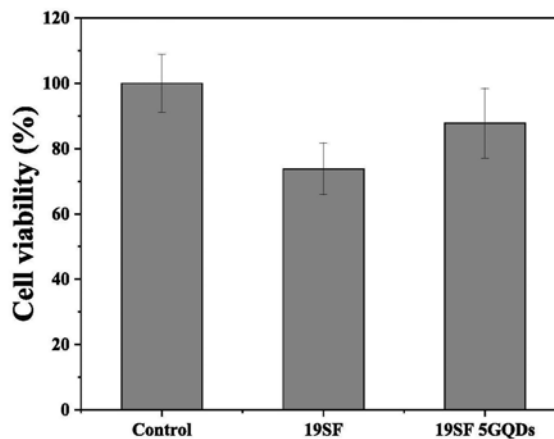
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜及其制备方法和应用,该制备方法包括以下过程:对天然蚕丝进行脱胶处理,获得丝素蛋白;接着溴化锂水溶液溶解丝素,并经过透析、离心以及冷冻干燥处理得到丝素蛋白海绵;将丝素蛋白海绵溶解在甲酸中混和均匀,然后将磺化石墨烯量子点水溶液通过超声均匀分散在丝素蛋白-甲酸溶液中,并通过静电纺丝设备制备了上述复合纳米纤维膜;并利用小鼠成纤维细胞对制备的复合纳米膜进行了细胞活性评估,体现了复合纳米膜具有优异的生物相容性。本发明所制备的复合纤维膜具有良好的生物相容性、可降解性,同时具备促进人骨髓基质干细胞增殖分化的潜能,具有良好的生物医用材料应用前景。



1. 一种磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

步骤一、将天然蚕丝采用碳酸钠水溶液进行脱胶处理,烘干,获得脱胶丝;

步骤二、将步骤一获得的脱胶丝置于溴化锂水溶液中溶解,进行透析、离心,获得丝素蛋白溶液;

步骤三、将步骤二获得的丝素蛋白溶液进行真空冷冻干燥,获得丝素蛋白海绵;

步骤四、将步骤三获得的丝素蛋白海绵置于甲酸有机溶剂中溶解,添加磺化石墨烯量子点水溶液使其超声分散在蛋白溶液中以制备纺丝液;

步骤五、将步骤四获得的纺丝液进行电纺获得磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜。

2. 根据权利要求1所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述方法具体包括如下步骤:

步骤(1) 将剪碎的蚕茧放入煮沸的质量浓度为0.3~0.7%的碳酸钠水溶液中,浴比为1:40~60,煮沸15~45min后捞起,用去离子水冲洗干净,重复2~4次以进行脱胶处理,将获得的蚕丝放置在烘箱中烘干,拉松作为脱胶丝封装备用;

步骤(2) 将步骤(1)得到的脱胶丝在30~50℃下溶解于6~12mol/L的溴化锂水溶液中,1~3小时后,放置恒温实验室静置8~12小时;

步骤(3) 将步骤(2)得到的溶液注入透析袋中,用去离子水进行透析,低温下持续搅拌,每隔1~3小时换一次去离子水,透析持续2~4天;

步骤(4) 将步骤(3)所述透析后的溶液离心10~25min以去除杂质,得到丝素蛋白溶液;

步骤(5) 将步骤(4)得到丝素蛋白溶液经真空冷冻干燥获得丝素蛋白海绵;

步骤(6) 将步骤(5)得到的丝素蛋白海绵溶解在90~99%甲酸有机溶剂中,添加磺化石墨烯量子点水溶液使其超声分散在蛋白溶液中以制备纺丝液;

步骤(7) 将步骤(6)所述的纺丝液盛装在静电纺丝装置注射器中,注射器针头与高压发生器正极连接,铝箔接收器与高压接受器负极连接,进行电纺,静电纺丝出的纤维膜承接在铝箔滚筒接收器上。

3. 根据权利要求2所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中,所述透析袋的压平宽度为34~55mm,截留分子量为3500~8000。

4. 根据权利要求2所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述步骤(4)中,所述离心速度为8000~12000r/min。

5. 根据权利要求2所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述步骤(5)中,所述真空冷冻干燥的温度为-60~-30℃,时间为2~4天。

6. 根据权利要求2所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述步骤(6)中,所述丝素蛋白海绵溶于甲酸所制备的溶液浓度为15~25wt%。

7. 根据权利要求2所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述步骤(6)中,添加的磺化石墨烯量子点溶于水不溶于有机溶剂,平均厚度为 1.64 ± 0.68 nm,平均横向尺寸为 2.5 ± 0.5 nm,磺化石墨烯量子点水溶液的浓度为6.62mg/L。

8. 根据权利要求2所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述步骤(6)中,所述磺化石墨烯量子点水溶液的添加量为3~10wt%。

9. 根据权利要求2所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述步骤(7)中,所述注射器喷丝头内径为0.15~2mm,所述注射器喷丝头与滚筒接收器表面距离为8-15cm,施加电压为20-30kV。

10. 根据权利要求2所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其特征在于,所述步骤(7)中,所述注射器推进速度为 $0.1\sim 0.2\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$,所述滚筒接收速度为50-100rpm,所述注射器推注水平往复移动距离为10-20mm,保证静电纺丝得到均匀的纤维膜。

11. 一种如权利要求1~10中任一项所述的制备方法制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜。

12. 一种如权利要求11所述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜在制备促进人骨髓基质干细胞细胞增殖的生物医用材料中的应用。

一种磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医用材料技术领域,尤其涉及一种磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜及其制备方法及应用。

背景技术

[0002] 桑蚕丝主要由丝胶和丝素两部分组成,其中,丝胶约占25%,丝素约占70%。丝胶水溶性较好,丝素不溶于水,因此利用简单的碱或酶脱胶即可脱去丝胶蛋白,获取我们所需的具有优良可塑性的丝素蛋白。丝素蛋白是一种天然的生物高聚合物,具有良好的生物相容性与优异的可生物降解性,因而备受生物材料界的广泛关注,为满足各种应用的要求,丝素蛋白需要溶解成凝胶、粉末、薄膜、电纺纤维等各种形态。

[0003] 静电纺丝是一种简单、方便且有效地制备纤维膜的技术。通过静电纺丝技术制备纤维材料,具有制造设备简单,工艺技术容易控制等优点,丝素蛋白电纺纤维支架已经被用作有吸引力的组织工程支架,因为其产生的纳米级三维(3D)纤维类似于天然的细胞外基质结构并且具有大的比表面积和孔隙率,为附着足够数量的细胞提供了场所,有利于一些特定细胞的增殖与分化。

[0004] 石墨烯量子点(GQD)是一类新兴的具有生物相容性的零维材料,有望广泛应用于各种新型应用。石墨烯量子点边缘位置的磺酸官能化能使其稳定地重新分散在水中,即使在退火至250℃后仍保持高荧光活性,HeLa细胞在高浓度量子点及长时间孵育条件下仍然保持良好的细胞活性,体现了磺化石墨烯量子点不具细胞毒性并具有环境友好性,最新研究表明它能促进人骨髓基质干细胞增殖与分化。

[0005] 目前,单一组分的丝素蛋白电纺纤维膜已有报道,而将边缘磺化的量子点纳米材料与丝素蛋白共混,通过静电纺丝法制备复合纤维膜尚未见报道。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术存在的问题,本发明通过将极小纳米级的量子点分散在再生丝素蛋白溶液中的方法,制备了一种制备磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜,其克服了量子点水溶液无法单独静电纺丝的性能,所制备的复合膜结合了丝素蛋白与磺化石墨烯量子点优良的生物相容性、可降解性,并且具有促进人骨髓基质干细胞(hMSCs)增殖分化的潜能。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 本发明的第一个目的是提供一种磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其包括如下步骤:

[0009] 步骤一、将天然蚕丝采用碳酸钠水溶液进行脱胶处理,烘干,获得脱胶丝;

[0010] 步骤二、将步骤一获得的脱胶丝置于溴化锂水溶液中溶解,进行透析、离心,获得丝素蛋白溶液;

- [0011] 步骤三、将步骤二获得的丝素蛋白溶液进行真空冷冻干燥,获得丝素蛋白海绵;
- [0012] 步骤四、将步骤三获得的丝素蛋白海绵置于甲酸有机溶剂中溶解,添加碘化石墨烯量子点水溶液使其超声分散在蛋白溶液中以制备纺丝液;
- [0013] 步骤五、将步骤四获得的纺丝液进行电纺获得磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜。
- [0014] 为了进一步地优化上述制备方法,本发明采取的技术措施还包括:
- [0015] 进一步地,所述制备方法具体包括如下步骤:
- [0016] 步骤(1)将剪碎的蚕茧放入煮沸的质量浓度为0.3~0.7%的碳酸钠水溶液中,浴比为1:40~60,煮沸15~45min后捞起,用去离子水冲洗干净,重复2~4次以进行脱胶处理,将获得的蚕丝放置在烘箱中烘干,拉松作为脱胶丝封装备用;
- [0017] 步骤(2)将步骤(1)得到的脱胶丝在30~50℃下溶解于6~12mol/L的溴化锂水溶液中,1~3小时后,放置恒温实验室静置8~12小时;
- [0018] 步骤(3)将步骤(2)得到的溶液注入透析袋中,用去离子水进行透析,低温下持续搅拌,每隔1~3小时换一次去离子水,透析持续2~4天;
- [0019] 步骤(4)将步骤(3)所述透析后的溶液离心10~25min以去除杂质,得到丝素蛋白溶液;
- [0020] 步骤(5)将步骤(4)得到丝素蛋白溶液经真空冷冻干燥获得丝素蛋白海绵;
- [0021] 步骤(6)将步骤(5)得到的丝素蛋白海绵溶解在90~99%甲酸有机溶剂中,添加碘化石墨烯量子点水溶液使其超声分散在蛋白溶液中以制备纺丝液;
- [0022] 步骤(7)将步骤(6)所述的纺丝液盛装在静电纺丝装置注射器中,注射器针头与高压发生器正极连接,铝箔接收器与高压接受器负极连接,进行电纺,静电纺丝出的纤维膜承接在铝箔滚筒接收器上。
- [0023] 更进一步地,所述制备方法包括如下步骤:
- [0024] 步骤(1)剪碎的蚕茧放入煮沸的质量浓度为0.5%的碳酸钠水溶液中,浴比为1:50,煮沸30min后捞起,用去离子水冲洗干净,重复三次以进行脱胶处理,将获得的蚕丝放置在烘箱中烘干,拉松作为脱胶丝封装备用;
- [0025] 步骤(2)将步骤(1)得到的脱胶丝在40℃下溶解于9mol/L的溴化锂水溶液中,2小时后,放置恒温实验室静置10小时;
- [0026] 步骤(3)将步骤(2)得到的溶液注入透析袋中,用去离子水进行透析,低温下持续搅拌,每隔2小时换一次去离子水,透析持续3天;
- [0027] 步骤(4)将步骤(3)所述透析后的溶液离心15min以去除杂质,得到的丝素蛋白溶液;
- [0028] 步骤(5)将步骤(4)得到丝素蛋白溶液经真空冷冻干燥获得的丝素蛋白海绵;
- [0029] 步骤(6)将步骤(5)得到的丝素蛋白海绵溶解在98%甲酸有机溶剂中,添加碘化石墨烯量子点水溶液使其超声分散在蛋白溶液中以制备纺丝液;
- [0030] 步骤(7)将步骤(6)所述纺丝液盛装在静电纺丝装置注射器中,注射器针头与高压发生器正极连接,铝箔接收器与高压接受器负极连接,进行电纺,静电纺丝出的纤维膜承接在铝箔滚筒接收器上。
- [0031] 进一步地,所述步骤(3)中,所述透析袋的压平宽度为34~55mm,截留分子量为

3500~8000。更进一步地,所述透析袋的宽度为MD44mm,截留分子量为7000。

[0032] 进一步地,所述步骤(4)中,所述离心速度为8000~12000r/min。更进一步地,所述离心速度为10000r/min。

[0033] 进一步地,所述步骤(5)中,所述真空冷冻干燥的温度为-60~-30℃,时间为2~4天。更进一步地,所述真空冷冻干燥的温度为-45℃,时间为3天。

[0034] 进一步地,所述步骤(6)中,所述丝素蛋白海绵溶于甲酸所制备的溶液浓度为15-25wt%。更进一步地,所述丝素蛋白海绵溶于甲酸所制备的溶液浓度为18~20wt%。

[0035] 进一步地,所述步骤(6)中,添加的磺化石墨烯量子点溶于水不溶于有机溶剂,平均厚度为 1.64 ± 0.68 nm,平均横向尺寸为 2.5 ± 0.5 nm,磺化石墨烯量子点水溶液的浓度为6.62mg/L。

[0036] 进一步地,所述步骤(6)中,所述磺化石墨烯量子点水溶液的添加量为3-10wt%。更进一步地,所述丝素蛋白海绵溶于甲酸所制备的溶液浓度为5wt%。

[0037] 进一步地,所述步骤(7)中,所述注射器喷丝头内径为0.15~2mm,所述注射器喷丝头与滚筒接收器表面距离为8-15cm,施加电压为20-30kV。更进一步地,注射器喷丝头内径为0.50mm,注射器喷丝头与滚筒接收器表面距离为10cm,施加电压为30kV。

[0038] 进一步地,所述步骤(7)中,所述注射器推进速度为 $0.1 \sim 0.2 \text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$,所述滚筒接收速度为50-100rpm,所述注射器推注水平往复移动距离为10-20mm,保证静电纺丝得到均匀的纤维膜。更进一步地,注射器推进速度为 $0.14 \text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$,滚筒接收速度为100rpm,注射器推注水平往复移动距离为20mm。

[0039] 本发明的第二个目的是提供一种任一上述的制备方法制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜。

[0040] 本发明的第三个目的是提供一种任一上述的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜在制备促进人骨髓基质干细胞细胞增殖的生物医用材料中的应用。

[0041] 本发明采用上述技术方案,具有如下技术效果:

[0042] 本发明提供了一种磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其目的是提供一种能够促进人骨髓基质干细胞(hMSCs)增殖的蛋白膜,作为潜在生物医用材料;本发明利用小鼠成纤维细胞(L929)对制备的复合纳米膜进行了细胞活性评估,体现了复合纳米膜具有优异的生物相容性。本发明所制备的复合纤维膜具有良好的生物相容性、可降解性,同时具备促进人骨髓基质干细胞(hMSCs)增殖分化的性能,具有良好的生物医用材料应用前景。

附图说明

[0043] 图1为本发明实施例1制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜在UV光下的荧光照片;

[0044] 图2为本发明实施例1制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的扫描电镜图;

[0045] 图3为本发明实施例1制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的傅立叶红外图。

[0046] 图4为本发明实施例1制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的热分析

图。

[0047] 图5为本发明实施例1制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜对小鼠成纤维细胞(L929)毒性的评估。

具体实施方式

[0048] 本发明涉及一种磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其包括:对天然蚕丝进行脱胶处理,获得所需的丝素蛋白;用一定浓度的溴化锂(LiBr)水溶液溶解丝素,并经过透析、离心以及冷冻干燥处理得到再生的丝素蛋白海绵;将丝素蛋白海绵按一定的配比溶解在甲酸中混和均匀,然后将一定量的磺化石墨烯量子点水溶液通过超声均匀分散在丝素蛋白-甲酸溶液中,并通过静电纺丝设备在一定的纺丝条件下制备了磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米膜。本发明还涉及上述制备方法制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜及其应用。

[0049] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0050] 实施例1

[0051] 本实施例为一较佳的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其包括如下步骤:将20g剪碎的蚕茧放入1000ml煮沸的质量浓度为0.5%的碳酸钠(Na_2CO_3)水溶液中,煮沸30min后捞起,用大量的去离子水冲洗干净,以上步骤重复三次以进行脱胶处理,将所述蚕丝室温风干,拉松封装备用。取2g脱胶丝40℃下在9mol/L的溴化锂(LiBr)水溶液中溶解2小时,所得溶液放置恒温实验室静置10小时后注入截留分子量为7000的透析袋中,用去离子水进行透析,低温下持续搅拌,每隔2小时换一次去离子水,持续3天后将所得溶液以10000r/min的速度离心15min以去除杂质,得到的丝素蛋白溶液在-45℃条件下真空冷冻干燥3天后获得再生的丝素蛋白海绵。配制质量浓度为19%的丝素蛋白-甲酸溶液(0.57g再生的丝素蛋白海绵溶解在2ml 98%浓度的甲酸中),然后添加5wt%磺化石墨烯量子点水溶液使其超声分散在蛋白溶液中以制备纺丝液。得到的纺丝液盛装在与静电纺丝高压装置链接的医用注射器中,注射器喷丝头内径为0.50mm,推进速度为0.14mm·min⁻¹,推柱水平往复移动距离为20mm,与滚筒接收器表面距离为10cm,滚筒接收速度为100rpm,调节电压为30kV,进行电纺,静电纺丝出的纤维膜承接在以铝箔为基底的滚筒接收器上。

[0052] 实施例2

[0053] 本实施例为一较佳的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的制备方法,其包括如下步骤:将20g剪碎的蚕茧放入1000ml煮沸的质量浓度为0.7%的碳酸钠(Na_2CO_3)水溶液中,煮沸20min后捞起,用大量的去离子水冲洗干净,以上步骤重复三次以进行脱胶处理,将所述蚕丝室温风干,拉松封装备用。取2g脱胶丝40℃下在6mol/L的溴化锂(LiBr)水溶液中溶解3小时,所得溶液放置恒温实验室静置12小时后注入截留分子量为8000的透析袋中,用去离子水进行透析,低温下持续搅拌,每隔1.5小时换一次去离子水,持续2天后将所得溶液以12000r/min的速度离心10min以去除杂质,得到的丝素蛋白溶液在-30℃条件下真空冷冻干燥4天后获得再生的丝素蛋白海绵。配制质量浓度为25%的丝素蛋白-甲酸溶液(0.75g再生的丝素蛋白海绵溶解在2ml 98%浓度的甲酸中),然后添加8wt%磺化石墨烯量子点水溶液使其超声分散在蛋白溶液中以制备纺丝液。得到的纺丝液盛装在与静电纺丝高压装置

链接的医用注射器中,注射器喷丝头内径为0.25mm,推进速度为 $0.1\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$,推柱水平往复移动距离为15mm,与滚筒接收器表面距离为8cm,滚筒接收速度为80rpm,调节电压为20kV,进行电纺,静电纺丝出的纤维膜承接在以铝箔为基底的滚筒接收器上。

[0054] 实施例3

[0055] 本实施例为实施例1制得的磺酸基量子点/丝素蛋白复合纳米纤维膜的细胞毒性实验:

[0056] 根据ISO10993-5标准测试(间接接触)方法评估实施例1制得的纤维膜的生物相容性。复合纳米纤维膜用75%浸泡并经紫外灭菌处理后,在 37°C 条件下浸入含完全培养基的24孔聚苯乙烯板中($6\text{cm}^2\cdot\text{mL}^{-1}$)中培养24h。小鼠成纤维细胞(L929)以每孔 5×10^3 的密度接种在96孔板中,在5% CO_2 , 37°C 培养箱中培育24小时后,用24孔板中的100 μL 提取培养基替换96孔板中的培养基继续培养24小时,然后每孔加入10 μL 的CCK8试剂,继续放入培养箱中培养4小时后,用酶标仪测定450nm处的吸光度。其结果分别如下所示:

[0057] 图1为上述制备的复合纳米纤维膜在UV光下的荧光照片,其所呈现的荧光颜色与量子点溶液的颜色一致。

[0058] 图2为上述制备的复合纳米纤维膜的扫描电镜图,放大倍数为10000倍,可发现纺丝纤维光滑且均匀,量子点很好的融合在纺丝纤维中,无明显团聚现象发生,纤维的平均直径在126nm。

[0059] 图3为上述制备的复合纳米纤维膜的傅立叶红外(FTIR)图,丝素蛋白酰胺I、酰胺II、酰胺III所对应的峰值分别在 1693cm^{-1} 、 1514cm^{-1} 、 1242cm^{-1} 。

[0060] 图4为上述制备的复合纳米纤维膜的热分析图。 80°C 左右为水损失所对应的峰, 270°C 左右开始的质量损失对应于丝素蛋白的热分解。

[0061] 图5为复合纳米纤维膜的细胞活力图。相对于纯丝素蛋白73.8%的细胞活力而言,加了量子点的复合纳米纤维膜的细胞毒性更小,所对应的细胞活力为87.8%,体现了其具有更良好的生物相容性,同时具备量子点本身能促进人骨髓基质干细胞增殖分化的潜能,可作为一种有良好前景的生物医用材料。

[0062] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

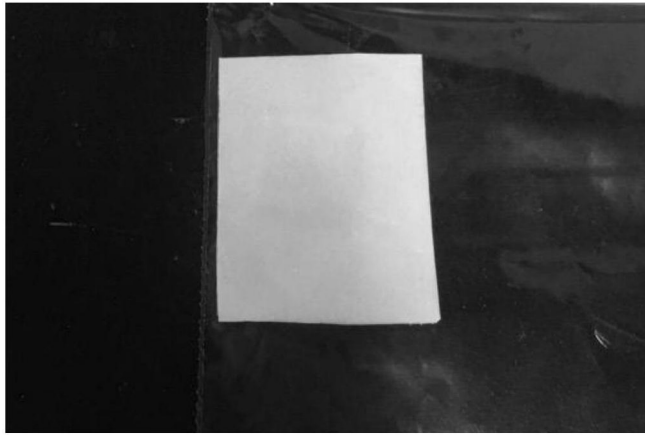


图1

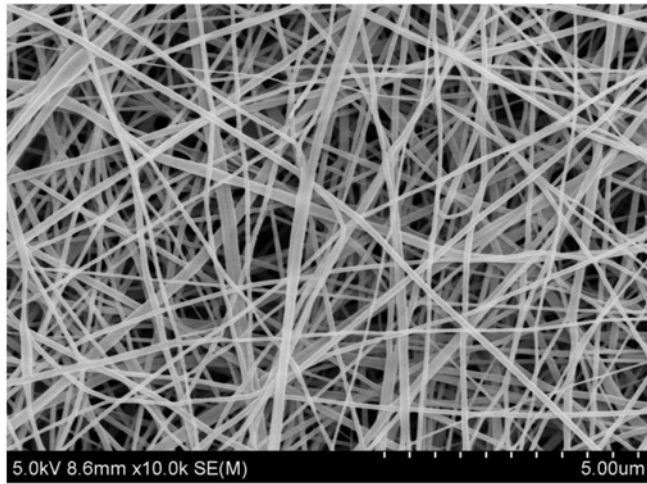


图2

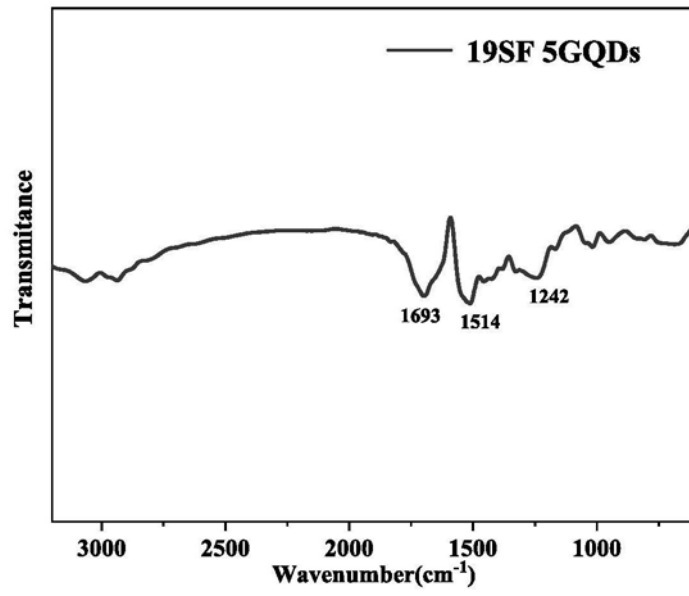


图3

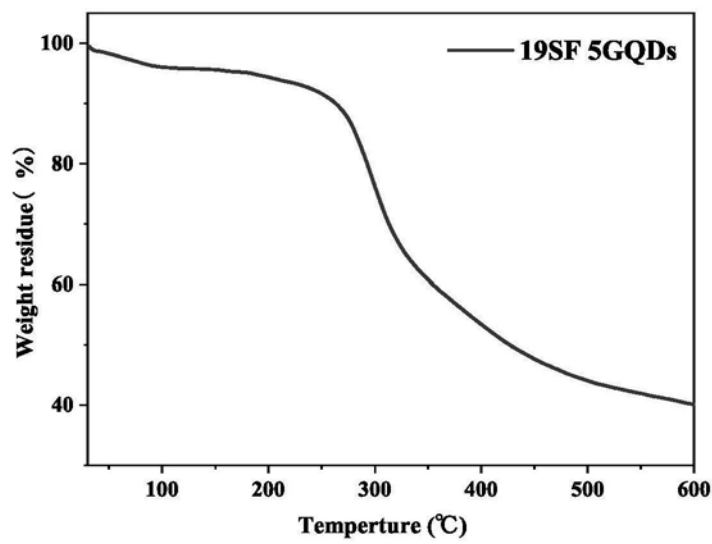


图4

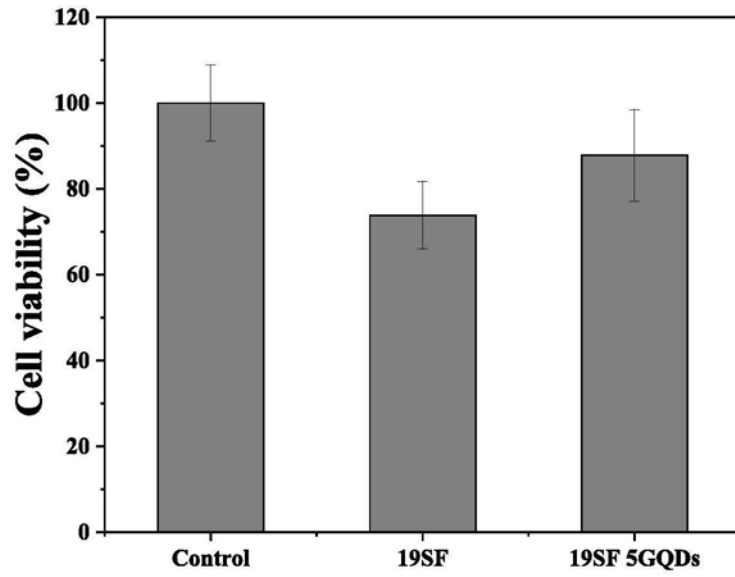


图5