



(21) 申请号 202211544287.5

(22) 申请日 2022.12.04

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115887731 A

(43) 申请公布日 2023.04.04

(73) 专利权人 贵州医科大学

地址 550000 贵州省贵阳市花溪区花溪大
学城栋青路2号

(72) 发明人 陈晋 龚敏 石欢欢 王赟

胡祖权 曾柱

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所(普通

合伙) 42001

专利代理师 龚莹莹

(51) Int. Cl.

A61L 15/32 (2006.01)

A61L 15/24 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109187981 A, 2019.01.11

CN 109260508 A, 2019.01.25

CN 113509317 A, 2021.10.19

CN 113575752 A, 2021.11.02

CN 114052241 A, 2022.02.18

KR 20130111849 A, 2013.10.11

US 2003008396 A1, 2003.01.09

US 2021322628 A1, 2021.10.21

US 2022145014 A1, 2022.05.12

黄颖等. // .乳球蛋白纤维化过程中的界面
及乳化性质. 食品科学. 2018, 第39卷(第6期),
20-25.

Neelima Varshney, et al. Freeze-Thaw-
Induced Physically Cross-linked
Superabsorbent Polyvinyl Alcohol/Soy
Protein Isolate Hydrogels for Skin Wound
Dressing: In Vitro and In Vivo
Characterization. ACS Appl. Mater.
Interfaces. 2022, 第14卷(第12期), 14033-
14048.

Das S, et al. Amyloid Fibrils:
Versatile Biomaterials for Cell Adhesion
and Tissue Engineering
Applications. Biomacromolecules. 2017, 第19
卷(第6期), 1826-1839.

司徒方民; 赵巨鹏; 邱勋; 查振刚; 屠美; 曾
戎. 聚乙烯醇/季铵盐壳聚糖复合水凝胶的制备
及其烫伤敷料的应用. 功能材料. 2015, (09), 全
文.

审查员 龙燕飘

权利要求书1页 说明书10页 附图7页

(54) 发明名称

β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的制备方
法及其在制备皮肤敷料中的应用

(57) 摘要

本发明属于生物医用材料领域, 具体涉及 β
乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的制备方法及其
在制备皮肤敷料中的应用。本发明制备的 β 乳球
蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶具有生物相容性好、
亲水性强的优点。该气凝胶在皮肤创面可快速吸
收渗出液, 转变为水凝胶实现封闭创面并保持创
面湿润, 其良好的透气性和促成纤维细胞粘附特
性可促进创面的愈合。本发明制备的 β 乳球蛋白

纤维-聚乙烯醇气凝胶同时具有海绵状和水凝胶
状创面敷料优点, 并且制备工艺简单、成本低廉、
易于存储和运输。

1. β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的制备方法,包括下述步骤:

步骤1:用超纯水配置浓度为3~4 wt%的 β 乳球蛋白溶液,使用盐酸将pH调为1.5~2.5,在80~90℃水浴条件下搅拌加热3~7 h、转速为200~500 rpm;制备好的 β 乳球蛋白纤维溶液冷却至0~4℃之后用8~12 M的NaOH调整pH至7.0~7.5;

步骤2:将聚乙烯醇固体颗粒加入到85~100℃的超纯水中,加热至完全溶解,得到浓度为10~15 wt%的聚乙烯醇溶液,冷却到0~25℃保存备用;所述的聚乙烯醇1799的醇解度为98~99%;

步骤3:将步骤1中的 β 乳球蛋白纤维溶液和步骤2中聚乙烯醇溶液按照比例加入到15~25℃的超纯水中,使得 β 乳球蛋白纤维和聚乙烯醇在溶液中的质量分数之和为3.5~8.5 wt%,其中 β 乳球蛋白纤维的质量分数为1~3.5 wt%,聚乙烯醇的质量分数为2.5~5 wt%;混合均匀后进行循环冻融3~4次,每一次循环在-20 ~ -80℃下进行21~24 h,在15~25℃下进行3~6 h;将冻融所得样品进行真空冷冻干燥后即得;

以上所述的聚乙烯醇为聚乙烯醇1799。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3中 β 乳球蛋白纤维和聚乙烯醇在溶液中的质量分数之和为6wt%。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3中 β 乳球蛋白纤维的质量分数为2~3.5 wt%。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3所述的 β 乳球蛋白来源于牛乳,其干重的纯度 ≥ 93 wt%。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3中的真空冷冻干燥的温度为-50 ~ -80℃,时间为24~48 h。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3中所述的溶液中 β 乳球蛋白纤维和聚乙烯醇的浓度均为3 wt%。

7. 权利要求1所述的方法制备的 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶在制备成皮肤敷料中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用,所述的皮肤敷料为皮肤创面敷料。

9. 根据权利要求7所述的应用,所述的皮肤敷料为护肤面膜载体。

β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的制备方法及其在制备皮肤敷料中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医用材料领域,具体涉及β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的制备方法及其在制备皮肤敷料中的应用。

背景技术

[0002] 皮肤是人体重要的器官,发挥着维持机体内稳态和保护机体不受有害物质和微生物入侵的重要作用。由于与外界直接接触,皮肤非容易发生损伤形成创面。皮肤自身具有一定的修复能力,创面的愈合主要包括止血、炎症、增生、组织重塑四个阶段^[1]。然而,整个愈合的过程通常不能完美有序地进行,特别是有感染、缺血、过度炎症、大面积烧伤、血管疾病、糖尿病等因素存在时,容易导致创面难以愈合^[2]。因此需要适当的敷料以实现创面闭合和愈合加速。

[0003] 从临床应用角度上看,理想的敷料应具有多种特性^[3-5],包括:1、生物相容性好,不引起毒性或炎症;2、对创面渗出的血液和组织液有较好的吸收作用,能保持创面湿润环境;3、有足够的机械强度,避免外界细菌侵入造成材料破损;4、能够促进细胞粘附、增殖和分化等。因此,传统的以棉纱为主的纱布、绷带等敷料很难满足临床需求。目前市场上有一些海绵状或者水凝胶状敷料,然而这些敷料仍然存在一些局限。海绵状敷料虽然具有快速吸收渗出液的优点,但渗出液容易漏回到创面组织中,造成创面的二次污染;水凝胶状敷料虽然具有较强的渗出液保存能力,但是其对渗出液的吸收较为缓慢且透气性较差。其次,从材料成分和制备方法上看,已有的海绵或者水凝胶的主要成分为纤维素、海藻酸盐、壳聚糖、明胶等,为了提高这些成分之间的结合强度,多数敷料都是通过化学交联实现成型^[6-8]。化学交联剂的加入会增加制备工艺的复杂度,同时也有生物安全性的风险。这些都会对敷料的成本、保存和运输都造成了不利的影 响。因此,开发一种生物相容性较好、工艺简单、非化学交联、同时具有海绵和水凝胶优点的新型敷料,成为亟待解决的技术问题。

[0004] 聚乙烯醇是一种半结晶的高分子聚合物,具有机械强度高、生物相容性较好的特点。聚乙烯醇通过循环冻融的工艺方法可获得物理交联的海绵状或水凝胶状的材料,该过程无需添加化学交联剂。因此,聚乙烯醇在生物材料领域有重要的应用价值^[9-12]。然而,通过冻融法制备的聚乙烯醇海绵或水凝胶的孔隙率小、亲水性差,导致其对渗出液的吸收和保存能力较差^[4]。此外,聚乙烯醇对细胞的粘附能力较弱,有研究表明需要45次以上的冻融循环才能获得一定的粘附细胞能力^[10],过多的冻融次数增加了制备工艺的复杂度和成本。因此,单纯的聚乙烯醇很难满足创面敷料的临床使用和大规模制备的需求。

[0005] β乳球蛋白是牛羊鲜奶中主要的蛋白质之一,具有来源广泛、提取便宜、生物安全性好等优点^[13]。但是,β乳球蛋白在自然条件下是直径仅为7nm左右的球形蛋白,很难满足凝胶的形成条件。虽然有研究表明,在pH=2.0酸性条件下的加热可促使β乳球蛋白聚合形成纤维状态的β乳球蛋白纤维^[14],但是该方法获得的β乳球蛋白纤维很难应用于生物材料领域,特别是应用于制备皮肤敷料。主要原因有三点:

[0006] 第一、 β 乳球蛋白纤维是在酸性较强的溶液 ($\text{pH}=2.0$) 中制备并保存的,较强的酸性会引起皮肤的不适,而调整溶液的 pH 值由酸性至中性的过程会破坏 β 乳球蛋白纤维的稳定性,容易导致纤维变短或分解^[15]。

[0007] 第二、目前已有的将 β 乳球蛋白纤维制备为凝胶的方法主要依靠化学交联,需要添加乙醇、 Ca/Na 盐、脲酶、表面活性剂等化学试剂促进 β 乳球蛋白纤维之间的缠绕和交联^[16]。化学交联剂的加入会增加制备工艺的复杂度,同时也有生物安全性的风险,这些成型方式不适用于创面敷料的制备。

[0008] 第三、虽然聚乙烯醇在循环冻融下可实现物理交联,但是聚乙烯醇的冻融成型前是需要提高体系的结晶性^[10],而 β 乳球蛋白纤维会破坏体系的结晶性,进而影响成型过程。并且 β 乳球蛋白纤维的稳定性易受外界环境温度和 pH 值的影响^[17]。因此,制备工艺流程和参数对 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶理化性能的影响,以及这些性能变化对最终创面修复效果的影响,并不可知。

[0009] 本发明中,我们希望利用 β 乳球蛋白纤维和聚乙烯醇两种材料制备出生物相容性好、工艺简单、吸水性好、物理交联的气凝胶,其吸收渗出液后可转变为水凝胶并利于细胞粘附,以实现兼具海绵和水凝胶优点的创面敷料设计需求。

[0010] 参考文献:

[0011] [1]Zhu J,Li F,Wang X,et al.Hyaluronic Acid and Polyethylene Glycol Hybrid Hydrogel Encapsulating Nanogel with Hemostasis and Sustainable Antibacterial Property for Wound Healing.ACS Appl Mater Interfaces.2018;10(16):13304-13316.

[0012] [2]Liang Y,He J,Guo B.Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing.ACS Nano.2021;15(8):12687-12722.

[0013] [3]Zou F,Wang Y,Tang T,et al.Synergistic strategy constructed hydrogel-aerogel biphasic gel (HAB-gel) with self-negative-pressure exudate absorption,M2 macrophage-polarized and antibacterial for chronic wound treatment.Chem Eng J.2023;451(P4):138952.

[0014] [4]Varshney N,Sahi AK,Poddar S,et al.Freeze-Thaw-Induced Physically Cross-linked Superabsorbent Polyvinyl Alcohol/Soy Protein Isolate Hydrogels for Skin Wound Dressing:In Vitro and In Vivo Characterization.ACS Appl Mater Interfaces.2022;14(12):14033-14048.

[0015] [5]Nuutila K,Eriksson E.Moist Wound Healing with Commonly Available Dressings.Adv Wound Care.2021;10(12):685-698.

[0016] [6]Hu Y,Li N,Yue P,et al.Highly antibacterial hydrogels prepared from amino cellulose,dialdehyde xylan,and Ag nanoparticles by a green reduction method.Cellulose.2022;29(2):1055-1067.

[0017] [7]Yin M,Wan S,Ren X,et al.Development of Inherently Antibacterial, Biodegradable,and Biologically Active Chitosan/Pseudo-Protein Hybrid Hydrogels as Biofunctional Wound Dressings.ACS Appl Mater Interfaces.2021;13(12):14688-14699.

- [0018] [8] Nazarnezhada S, Abbaszadeh-Goudarzi G, Samadian H, et al. Alginate hydrogel containing hydrogen sulfide as the functional wound dressing material: In vitro and in vivo study. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:3323-3331.
- [0019] [9] Dou X, Li P, Schönherr H. Three-Dimensional Microstructured Poly(vinyl alcohol) Hydrogel Platform for the Controlled Formation of Multicellular Cell Spheroids. *Biomacromolecules.* 2018;19(1):158-166.
- [0020] [10] Gupta S, Webster TJ, Sinha A. Evolution of PVA gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(7):1763-1772.
- [0021] [11] Wang LY, Wang MJ. Removal of Heavy Metal Ions by Poly(vinyl alcohol) and Carboxymethyl Cellulose Composite Hydrogels Prepared by a Freeze-Thaw Method. *ACS Sustain Chem Eng.* 2016;4(5):2830-2837.
- [0022] [12] Kenawy ER, Kamoun EA, Mohy Eldin MS, et al. Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications. *Arab J Chem.* 2014;7(3):372-380.
- [0023] [13] Jain S, Dongave SM, Date T, et al. Succinylated β -Lactoglobulin-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes with Improved Colloidal Stability and Biocompatibility. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019;5(7):3361-3372.
- [0024] [14] Nyström G, Roder L, Fernández-ronco MP, et al. Amyloid Templated Organic-Inorganic Hybrid Aerogels. *Adv Funct Mater.* 2017;1703609:1-11.
- [0025] [15] Jay G, Osvaldo C, Owen GJ. Electrostatic Stabilization of β -lactoglobulin Fibrils at Increased pH with Cationic Polymers. *Biomacromolecules.* 2014;15(8):3119-3127.
- [0026] [16] Hoppenreijs LJG, Fitzner L, Ruhmlieb T, et al. Engineering amyloid and amyloid-like morphologies of β -lactoglobulin. *Food Hydrocoll.* 2022;124(PA):107301.
- [0027] [17] Heyn TR, Garamus VM, Neumann HR, et al. Influence of the polydispersity of pH 2 and pH 3.5 β -lactoglobulin amyloid fibril solutions on analytical methods. *Eur Polym J.* 2019;120(May):109211.

发明内容

[0028] 鉴于上述技术问题,本发明提供了一种制备 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的制备方法。该气凝胶通过循环冻融法实现物理交联,无需添加化学交联剂,在吸收渗出液后可迅速转变为水凝胶状态,其良好的透气性和保湿性可以创造一个利于成纤维细胞增殖及粘附的微环境,这样的环境适合促进创面的愈合。

[0029] 本发明的另一个目的在于提供了上述方法制备出的气凝胶的应用。

[0030] β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的制备方法,包括下述步骤:

[0031] 步骤1:用超纯水配置浓度为3~4wt%的 β 乳球蛋白溶液,使用盐酸将pH调为1.5~

2.5,在80~90℃水浴条件下搅拌加热3~7h、转速为200~500rpm;制备好的β乳球蛋白纤维溶液冷却至0~4℃之后用8~12M的NaOH调整pH至7.0~7.5;

[0032] 步骤2:将聚乙烯醇固体颗粒加入到85~100℃的超纯水中,加热至完全溶解,得到浓度为10~15wt%的聚乙烯醇溶液,冷却到0~25℃保存备用;所述的聚乙烯醇1799的醇解度为98~99%;

[0033] 步骤3:将步骤1中的β乳球蛋白纤维溶液和步骤2中聚乙烯醇溶液按照比例加入到15~25℃的超纯水中,使得β乳球蛋白纤维和聚乙烯醇在溶液中的质量分数之和为3.5~8.5wt%,其中β乳球蛋白纤维的质量分数为1~3.5wt%,聚乙烯醇的质量分数为2.5~5wt%;混合均匀后进行循环冻融3~4次,每一次循环在-20~-80℃下进行21~24h,在15~25℃下进行3~6h;将冻融所得样品进行真空冷冻干燥后即可得到β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶,所述的聚乙烯醇为聚乙烯醇1799。

[0034] 以上所述的方法中,优选的:β乳球蛋白纤维和聚乙烯醇在溶液中的质量分数之和为6wt%;

[0035] 以上所述的方法中,优选的:β乳球蛋白纤维的质量分数为2~3.5wt%;

[0036] 以上所述的方法中,优选的:所述的β乳球蛋白来源于牛乳,其干重的纯度≥93wt%;

[0037] 步骤3中的真空冷冻干燥的温度为-50~-80℃,时间为24~48h;

[0038] 所述的溶液中β乳球蛋白纤维和聚乙烯醇的浓度均为3wt%;

[0039] 本发明的保护范围还包括利用上述方法制备的β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶在制备成皮肤敷料中的应用,所述的应用包括但不限于:直接将该气凝胶制备成皮肤创面敷料,或者与其他有效物质联合制备成皮肤创面敷料;或是制备成护肤面膜载体等。

[0040] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0041] (1)β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶通过循环冻融法实现物理交联,无需添加化学交联剂,生物相容性好。该方法操作简单、反应条件温和、易于大规模制备。

[0042] (2)β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶具有高孔隙率、高吸水率、高亲水性的优点,能够快速吸收创面渗出液,并增大细胞的粘附面积。

[0043] (3)β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶吸收渗出液后可转变为水凝胶状态,具有良好的透气性和保湿性,能够维持一个合适的湿润环境,防止干痂的形成。

[0044] (4)β乳球蛋白纤维中富含高度重复的β折叠结构,能够促进细胞粘附。β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶仅需3~4次循环冻融过程即可实现促进成纤维细胞粘附,细胞粘附对于创面的愈合十分重要。而纯相的聚乙烯醇需要45次以上的冻融循环才能获得一定的促细胞粘附能力。

[0045] (5)本发明中所选的β乳球蛋白来源于牛奶,具有成本低廉、易于提取、生物安全性好的优点。其所形成的β乳球蛋白纤维具有良好的生物相容性,并且制备方法简单、产物形状易于控制。

[0046] (6)申请人在前期研究过程中发现,逐级调整酸性的β乳球蛋白纤维的pH,这样所得样品效果不好,β乳球蛋白纤维容易分解。本发明通过高浓度氢氧化钠溶液快速调节β乳球蛋白纤维,克服了该问题,使其可以与聚乙烯醇在生理pH条件下凝胶成型。

附图说明

[0047] 图1为不同型号和不同浓度的聚乙烯醇溶液在循环冻融前后的照片;

[0048] 图中a为冻融前的照片,b为冻融后的照片,每张照片从左到右分别为聚乙烯醇1750 (2.5wt%),1750 (10wt%),1788 (2.5wt%),1788 (10wt%),1799 (2.5wt%)、1750 (10wt%)。

[0049] 图2为pH=7.4时, β 乳球蛋白单体和 β 乳球蛋白纤维的原子力显微镜 (AFM) 图片;

[0050] 其中a为 β 乳球蛋白单体的图片,b为 β 乳球蛋白纤维放置一周后的图片。

[0051] 图3为 β 乳球蛋白纤维与聚乙烯醇按照不同比例进行混合,所得混合溶在进行循环冻融后的结果, β 乳球蛋白纤维简称为BLGF、聚乙烯醇简称为PVA;

[0052] 其中a为各组样品中 β 乳球蛋白纤维和聚乙烯醇含量以及是否凝胶成型的统计图,b为冻融后的照片。

[0053] 图4为聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的照片;

[0054] PVA表示聚乙烯醇气凝胶,BLGF-1/PVA-5、BLGF-2/PVA-4、BLGF-3/PVA-3表示不同比例的 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶。

[0055] 图5为聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的扫描电子显微镜 (SEM) 图和利用Image J软件统计的孔径分布结果。

[0056] 图6为聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的孔隙率统计结果。

[0057] 图7为聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的接触角表征结果;

[0058] 其中a为10s时的接触角照片图像;b为接触角统计结果。

[0059] 图8为聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的吸水率变化统计结果图。

[0060] 图9为聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的水蒸气透过率统计结果。

[0061] 图10为聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的浸提液细胞毒性评价。Control表示完全培养基组,PVA表示聚乙烯醇气凝胶组,BLGF-1/PVA-5、BLGF-2/PVA-4、BLGF-3/PVA-3表示不同比例的 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶组,NS表示与Control组相比无统计学意义。

[0062] 图11为聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的细胞粘附实验的细胞核和细胞骨架染色结果;

[0063] 图中a为培养24h后的结果,图中b为培养72h后的结果。PVA表示聚乙烯醇气凝胶组,BLGF-1/PVA-5、BLGF-2/PVA-4、BLGF-3/PVA-3表示不同比例的 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶组。

[0064] 图12为 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶 (BLGF-3/PVA-3) 敷料的动物实验结果。

具体实施方式:

[0065] 为了更清楚地说明本发明实施例,将通过具体的实施例对本发明提供的一种 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的制备方法、材料表征和应用领域进行描述,但本发明并不仅限于这些实施例,该领域技术人员在本发明核心指导思想下做出的非本质性改进或调整,仍属于本发明的保护范围。

[0066] 实施例1:

[0067] β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶形成条件的筛选:

[0068] 1) 各组分材料的制备

[0069] 聚乙烯醇水凝胶的制备:

[0070] 聚乙烯醇在循环冻融下可实现物理交联,但是 β 乳球蛋白纤维会破坏体系的结晶性,进而影响成型过程。为了寻找凝胶效果较好的聚乙烯醇材料并探索制备工艺条件,将聚乙烯醇1750、聚乙烯醇1788、聚乙烯醇1799加入到95℃的超纯水中,在沸水中水浴至完全溶解,分别获得浓度为2.5wt%和10wt%的聚乙烯醇1750溶液、聚乙烯醇1788溶液、聚乙烯醇1799溶液。冷却到25℃后进行循环冻融3~4次,每一次循环在-80℃下进行21h,在25℃下进行3h。

[0071] 如图1所示,聚乙烯醇1750、聚乙烯醇1788在浓度为2.5wt%和10wt%时均不能成胶,而聚乙烯醇1799在浓度为2.5wt%和10wt%时均能成胶。因此在后续实验中所述的聚乙烯醇均为聚乙烯醇1799。

[0072] β 乳球蛋白纤维的制备:

[0073] 用超纯水配制浓度4wt%的 β 乳球蛋白溶液,使用盐酸将pH调为2.0,在90℃水浴条件下搅拌加热变性5h,搅拌速度为300rpm获得 β 乳球蛋白纤维溶液。为了使 β 乳球蛋白纤维更适合作为一种敷料材料,需要获得pH 7.4(生理条件)的 β 乳球蛋白纤维溶液。但是根据已有报道(Biomacromolecules.2014,15,3119-3127), β 乳球蛋白的等电位点在pH 5.0附近,因此溶液pH值由2.0经过等电点(5.0左右)调至7.4的过程会破坏 β 乳球蛋白纤维的稳定性,容易导致纤维变短或分解。

[0074] 在本申请中,发明人采用一次性加入适量高浓度NaOH溶液(浓度为10M)的方法,将 β 乳球蛋白纤维溶液的pH快速调至7.4。此方法下, β 乳球蛋白纤维能保持较好的稳定性(如图2所示),一周后样品仍呈现明显的纤维状。

[0075] 所述的 β 乳球蛋白来源于牛乳,其干重的纯度 ≥ 93 wt%。

[0076] 2) β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇凝胶成型的条件筛选

[0077] 将pH=7.4的 β 乳球蛋白纤维溶液与聚乙烯醇溶液按照不同比例进行混合,所得混合溶液中二者的配比如图3所示, β 乳球蛋白纤维简称为BLGF、聚乙烯醇简称为PVA。混合溶液搅拌均匀后进行循环冻融4次,每一次循环在-80℃下进行21h,在25℃下进行3h。

[0078] 部分结果如图3所示,混合溶液中 β 乳球蛋白纤维和聚乙烯醇的比例对于冻融后能否凝胶成型非常重要。一方面, β 乳球蛋白纤维会破坏聚乙烯醇的结晶性,进而影响凝胶成型过程,因此提高聚乙烯醇的含量有助于样品的凝胶成型。另一方面,过多的聚乙烯醇可能会导致所得凝胶敷料性能的降低,如:孔隙率小、亲水性差、吸水性和保水性较低、以及缺乏足够的促细胞粘附能力等。最后实验结果为:混合溶液中 β 乳球蛋白纤维的质量分数为1~3.5wt%,聚乙烯醇的质量分数为2.5~5wt%时,可凝胶成型。

[0079] 实施例2:

[0080] β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的获得

[0081] 步骤1:用超纯水配制浓度为4wt%的 β 乳球蛋白溶液,使用盐酸将pH调为2,在90℃水浴条件下搅拌加热5h、转速为300rpm。 β 乳球蛋白通过热变性形成 β 乳球蛋白纤维,制备好的 β 乳球蛋白纤维溶液冷却至4℃之后用适量的10M的NaOH溶液调整pH至7.4。

[0082] 步骤2:将聚乙烯醇1799固体颗粒加入到95℃的超纯水中,加热10min,得到浓度为12wt%的聚乙烯醇溶液,冷却到25℃保存备用。

[0083] 步骤3:将步骤1中的β乳球蛋白纤维溶液和步骤2中聚乙烯醇溶液按照比例加入到25℃的超纯水中。混合溶液中,β乳球蛋白纤维(简称为BLGF)和聚乙烯醇的质量分数比分别为:1wt%:5wt%、2wt%:4wt%、3wt%:3wt%的,依次标记为BLGF-1/PVA-5、BLGF-2/PVA-4、BLGF-3/PVA-3样品。混合均匀后进行循环冻融3~4次,每一次循环在-80℃下进行21h,在25℃下进行3h。将冻融所得样品进行真空冷冻干燥后即可得到β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶。

[0084] 聚乙烯醇气凝胶的获得

[0085] 为了证明加入β乳球蛋白纤维对于敷料性质的重要影响,以不含β乳球蛋白纤维的聚乙烯醇气凝胶作为对照组。其制备方法如下:将聚乙烯醇1799固体颗粒加入到95℃的超纯水中直至溶解,得到浓度为12wt%的聚乙烯醇溶液,冷却到25℃后,用25℃的超纯水稀释浓度至6wt%。混合均匀后进行循环冻融3~4次,每一次循环在-80℃下进行21h,在25℃下进行3h。将冻融所得样品进行真空冷冻干燥后即可得到聚乙烯醇气凝胶。

[0086] 气凝胶性能表征与检测

[0087] 1) 气凝胶形貌分析

[0088] 如图4所示,与聚乙烯醇气凝胶相比,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶密度较低,体积更大。并且随着β乳球蛋白纤维含量的增加,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶越蓬松。

[0089] 2) 扫描电子显微镜(SEM)表征分析

[0090] 采用扫描电子显微镜对聚乙烯醇气凝胶和β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的形貌进行检测。结果如图5所示,聚乙烯醇气凝胶聚合紧密,没有明显的孔径和网络支架结构。β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶具有相互连通的多孔结构,且随着β乳球蛋白纤维含量的增加,孔径逐渐变大,具有明显的网络支架结构。

[0091] 3) 孔隙率分析

[0092] 为了表征聚乙烯醇气凝胶和β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的孔隙率,将每个气凝胶的重量记为 W_0 ,并浸入乙醇溶液中,然后将所有样品放在真空干燥器中反复抽真空,直到乙醇完全充满气凝胶。对气凝胶表面的乙醇擦拭干净,将饱和的气凝胶称重记为 W_1 ,实验重复三次。孔隙率计算公式为:

$$[0093] \quad \text{孔隙率} = \frac{W_1 - W_0}{\rho V} \times 100$$

[0094] 其中 V 和 ρ 分别表示β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的表观体积和乙醇的密度($0.789\text{g}/\text{cm}^3$)。结果如图6所示,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的孔隙率明显高于聚乙烯醇气凝胶,并且随着β乳球蛋白纤维含量的增加,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的孔隙率逐渐提高。孔隙率会影响细胞活力、血管形成、生物体液中的稳定性和降解以及细胞迁移和分布,高孔隙率的创面敷料可以提高吸收创面渗出液的能力。

[0095] 4) 表面润湿性能分析

[0096] 为了评价聚乙烯醇气凝胶和β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的表面润湿性能,在室温下测量了气凝胶的接触角。取 $10\mu\text{L}$ 超纯水滴在气凝胶表面,用数码相机记录静置10s后的图像。用Image J测量接触角,结果如图7所示,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的接触角

明显小于聚乙烯醇气凝胶,并且随着 β 乳球蛋白纤维含量的增加,接触角逐渐减小。说明 β 乳球蛋白纤维可以明显地提升气凝胶的亲水性。

[0097] 5) 吸水率分析

[0098] 为了探究聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶在室温下的吸水率。将每个气凝胶称重记为 W_0 ,浸泡在30mL PBS (pH 7.4) 中,定期从PBS中取出吸水的气凝胶,用滤纸擦拭气凝胶表面的液体。将每个时间点称重的气凝胶记为 W_s 。吸水率由下式计算

$$[0099] \quad \text{吸水率}(\%) = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100$$

[0100] 结果如图8所示, β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的吸水率明显高于聚乙烯醇气凝胶,并且随着 β 乳球蛋白纤维含量的增加, β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的吸水率逐渐提高。较高的吸水率可快速吸收创面渗出的组织液或血液,有助于创面的止血和封闭。当混合溶液中 β 乳球蛋白纤维和聚乙烯醇的浓度均为3wt%时,制备的 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶为效果最佳的敷料。

[0101] 实施例3:

[0102] β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶在促进创面愈合中的应用

[0103] 1) 水蒸气透过率分析

[0104] 为了评价聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的水蒸气透过性能。首先,在离心管10mL中加入6mL超纯水,瓶口的直径为1.4cm,用气凝胶覆盖瓶口,管口用封口膜密封。将整个装置(气凝胶+离心管+水+封口膜)称重记为 W_i ,置于37°C、相对湿度为60 \pm 15%的培养箱中24h。最后,从培养箱中取出整个装置,称重记为 W_t 。此外,空白对照组(Control组)为装有水的离心管,整个装置的表面不覆盖任何材料,并置于与实验组相同的的环境条件,以模拟水自然蒸发的状态。气凝胶的水蒸气透过率计算公式如下:

$$[0105] \quad \text{水蒸气透过率} = \frac{W_i - W_t}{AT}$$

[0106] 其中A、T分别为离心管口的面积(m^2)和设备在培养箱中的时间(day)。

[0107] 结果如图9所示,聚乙烯醇气凝胶的水蒸气透过率为 $526 \pm 27 g \cdot m^{-2} \cdot day^{-1}$, β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶各组的水蒸气透过率均大于 $526 \pm 27 g \cdot m^{-2} \cdot day^{-1}$ 。随着 β 乳球蛋白纤维含量的增加, β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的水蒸气透过率显著增加(1149 ± 170 、 1467 ± 151 、 $1632 \pm 92 g \cdot m^{-2} \cdot day^{-1}$)。同样条件下,空白组的水蒸气透过率为 $2190 \pm 23 g \cdot m^{-2} \cdot day^{-1}$ 。一般认为当水蒸气透过率过低时会引起渗出物过量积累,这将增大细菌增长的风险,而当水蒸气透过率过高时会导致创面过度干燥,易产生疤痕。

[0108] 2) 浸提液细胞毒性分析

[0109] 为了评价细胞的生物相容性,采用CCK8法测定细胞活力。将 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶置于紫外光下1h灭菌。将样品置于完全培养基中孵育后得到浸提液。将小鼠L929成纤维细胞接种于含有最低必需培养基、10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素溶液的完全培养基的96孔板中,置于37°C、5% CO_2 培养箱中,培养24h后用浸提液代替完全培养基,继续培养成纤维细胞。培养12h和24h后,用完全培养基代替浸提液。每孔加入CCK8试剂孵育。最后,用酶标仪在450nm处测定吸光度。以完全培养基单独培养的成纤维细胞作为对照组(Control组),聚乙烯醇气凝胶和 β 乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的浸提液培养的

成纤维细胞为实验组。

[0110] 统计结果如图10所示,当培养后12h时,聚乙烯醇气凝胶和β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶的浸提液对细胞增殖的影响无显著差异;与空白对照组相比,各组细胞存活率均大于90%,且各组间无明显差异。当培养后24h时,虽然聚乙烯醇气凝胶和β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶浸提液培养的细胞均表现出增殖趋势,但与空白对照组相比,聚乙烯醇气凝胶组细胞的增殖能力较弱。与聚乙烯醇气凝胶组相比,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶组的细胞表现出良好的增殖能力,接近甚至超过了对照组,说明β乳球蛋白纤维可以提高气凝胶的细胞相容性。

[0111] 3) 细胞粘附分析

[0112] 为了评价敷料对细胞形态及粘附的影响,各组样品在紫外线下照射1h灭菌后加入培养基中预孵过夜。吸弃培养基,滴加细胞悬液于样品上,置于CO₂培养箱中培养。培养24h和72h后取出并用4%多聚甲醛固定,用PBS洗涤三次;加入Triton X-100通透,用PBS洗三次;随后用罗丹明标记的鬼笔环肽和DAPI分别对细胞骨架和细胞核进行染色并用荧光显微镜拍摄图像。以聚乙烯醇气凝胶培养成纤维细胞作为对照组,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶培养成纤维细胞为实验组。

[0113] 结果如图11中a所示,当培养24h后,与聚乙烯醇气凝胶组相比,各个β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶组表面粘附的细胞数量均显著增加,表现出良好的细胞粘附能力,并且随着β乳球蛋白纤维含量增加,细胞均呈现增殖和形成细胞球的趋势,数量明显增多。

[0114] 如图11中b所示,当培养72h后,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶组表面细胞附着的数量明显多于聚乙烯醇气凝胶组,并且表现出多细胞球体生长的特性。随着β乳球蛋白纤维含量增加,表现出细胞粘附数量增多且多细胞球体趋于体积增大的趋势。我们认为这一现象的主要原因是β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇凝胶具有高孔隙结构和更大的比表面积,这些特定结构可以将更多的营养物质转移到细胞中,促进细胞生长和粘附。除此之外,β乳球蛋白纤维富含β折叠,具有促进细胞粘附特性。相比于β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶,聚乙烯醇气凝胶表面致密、亲水性较差,且没有孔隙结构,因此不利于细胞粘附和生长。

[0115] 4) 动物实验

[0116] 用Wistar大鼠(6~8周龄、雄性)构建了全层皮肤缺损动物模型,以进一步评价β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶作为创口敷料的伤口愈合性能。将Wistar大鼠麻醉后,从背侧剪去毛发,用75%的酒精溶液和碘伏清洗皮肤表面;随后,使用皮肤活检取样器(直径为10mm,面积约78.5mm²)和无菌手术剪在小鼠背部制造一个创面模型。用直径为12mm的β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶(BLGF-3/PVA-3)覆盖创口,记录创面的愈合情况,直至敷料脱落。同时,以纱布覆盖的创面作为对照组。

[0117] 结果如图12所示,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶组敷料可以很好的附着于创口上面,第5天才会脱落。与对照组相比,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶组敷料在第2天形成明显的结痂,促进了创面愈合速度。第3天和4天时,与对照组相比,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶组的创面收缩程度明显增强,且结痂面积更小。第5天时,实验组创面的结痂连同敷料一并脱落,可观察到其新生组织明显多于对照组。利用软件对创面的面积进行统计,发现实验组的创面未愈合的面积约为30.08mm²,对比创面初始面积(78.5mm²)愈合率超过61.68%。然而,对照组创面未愈合的面积约为47.06mm²,对比创面初始面积(78.5mm²)愈合

率仅为40.05%。

[0118] 动物实验结果说明,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶具有促进创面愈合的能力,主要是因为其具有良好的连通孔形态,孔径在100μm以下,孔隙率在85%以上,适合细胞和组织的生长。另一方面,β乳球蛋白纤维-聚乙烯醇气凝胶吸收液体后转变为水凝胶状态,它们将作为屏障,防止伤口进一步出血和细菌感染,引导更有效的愈合过程。

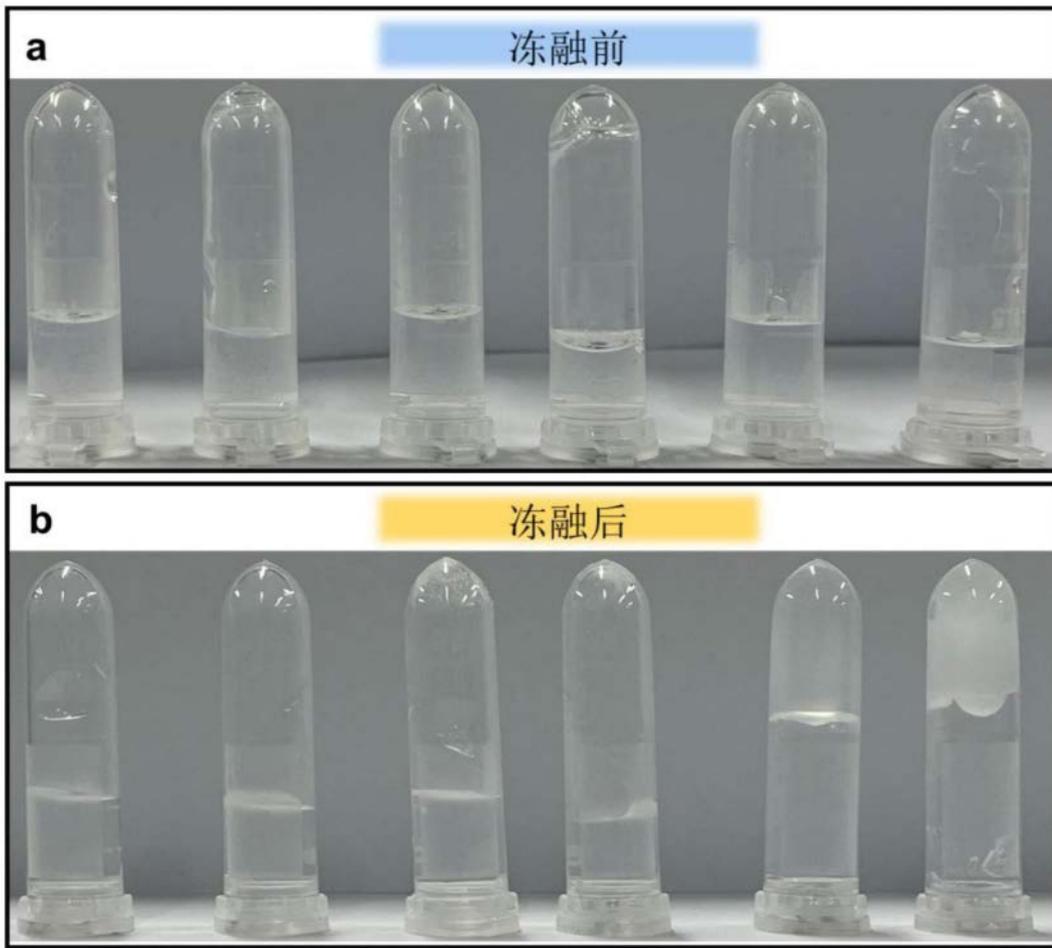


图1

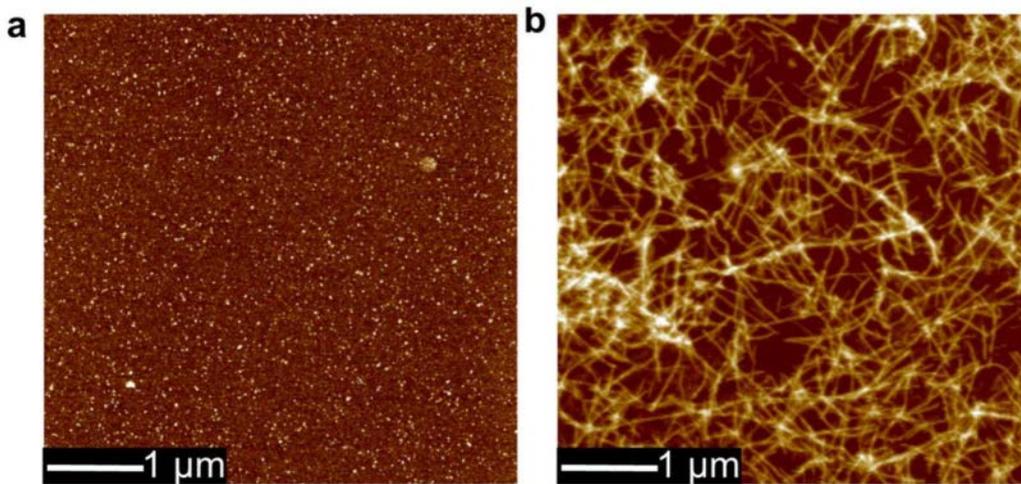


图2

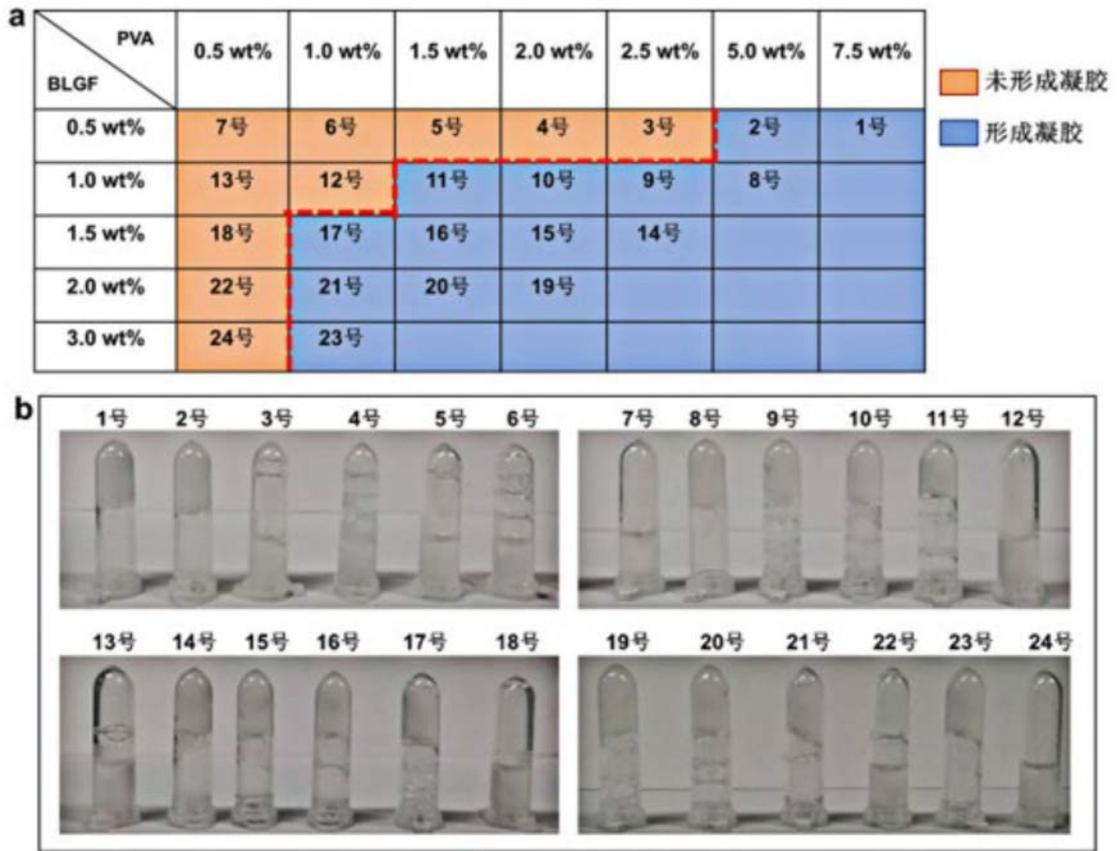


图3

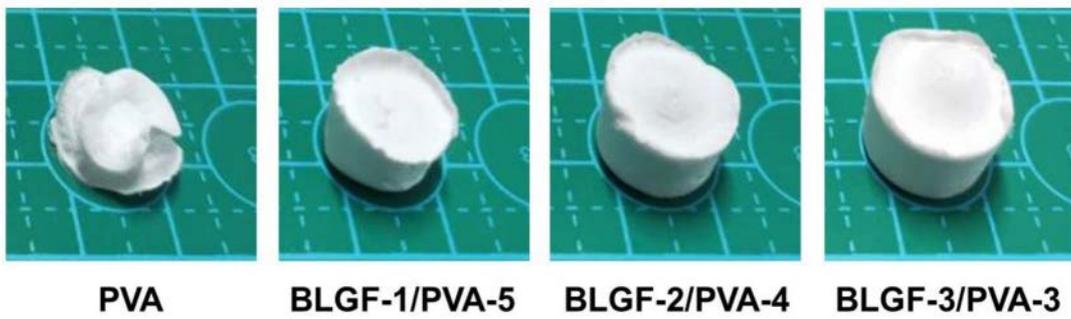


图4

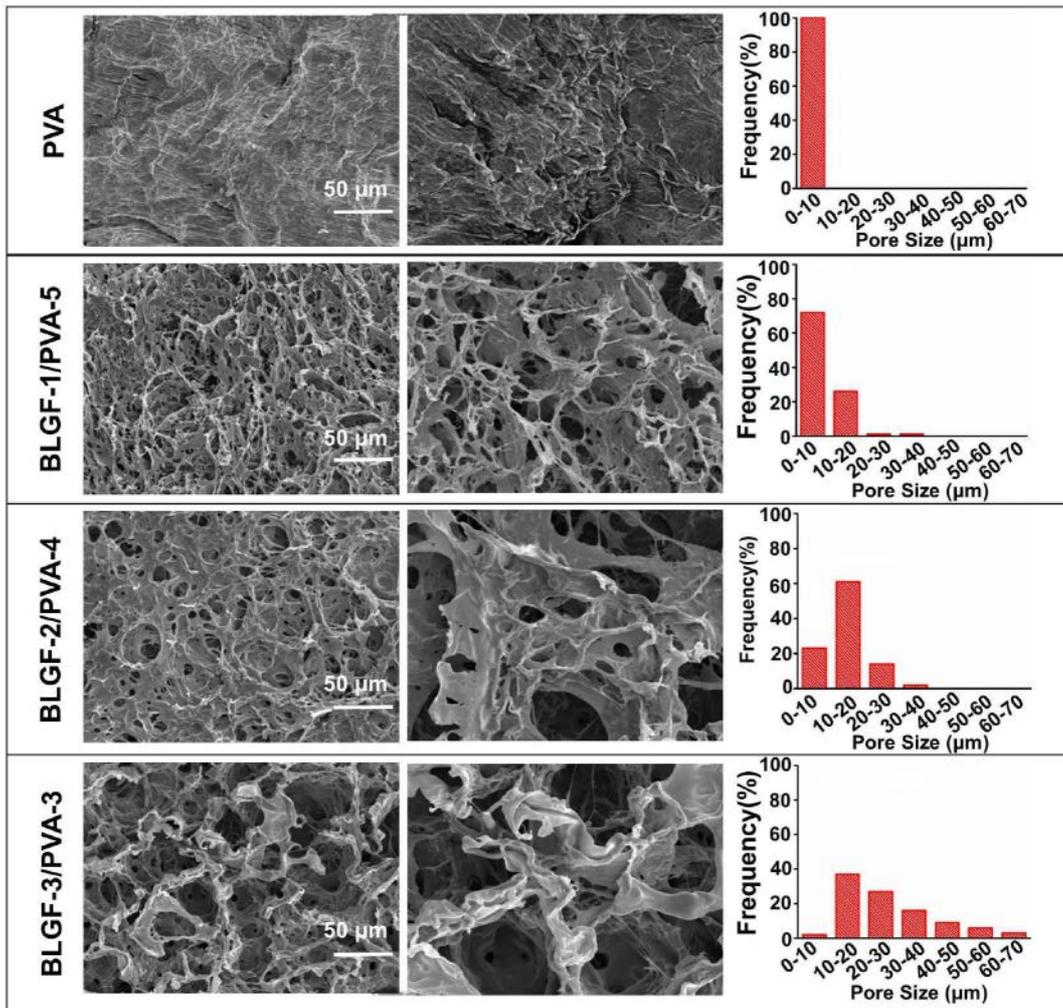


图5

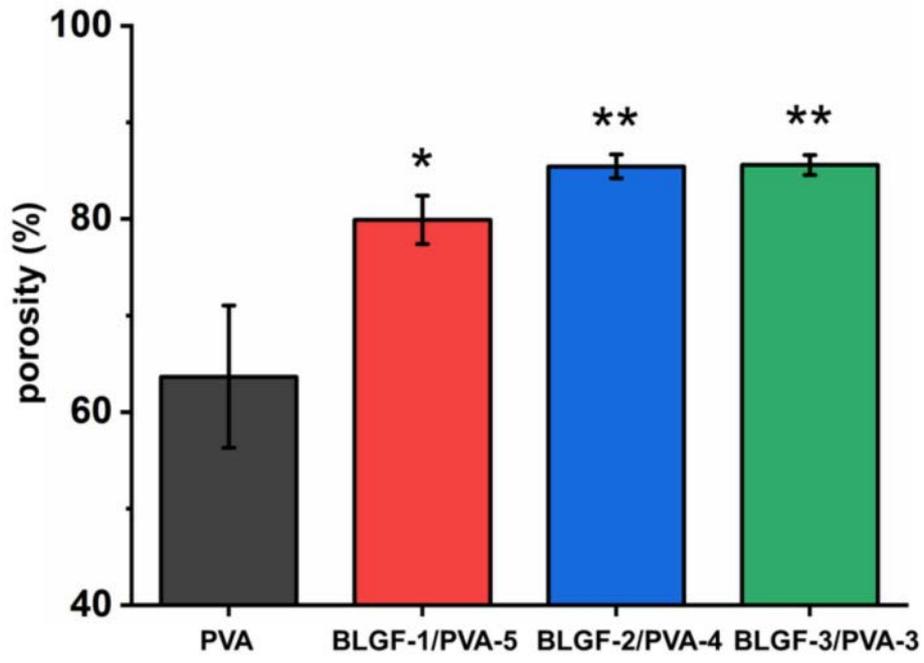


图6

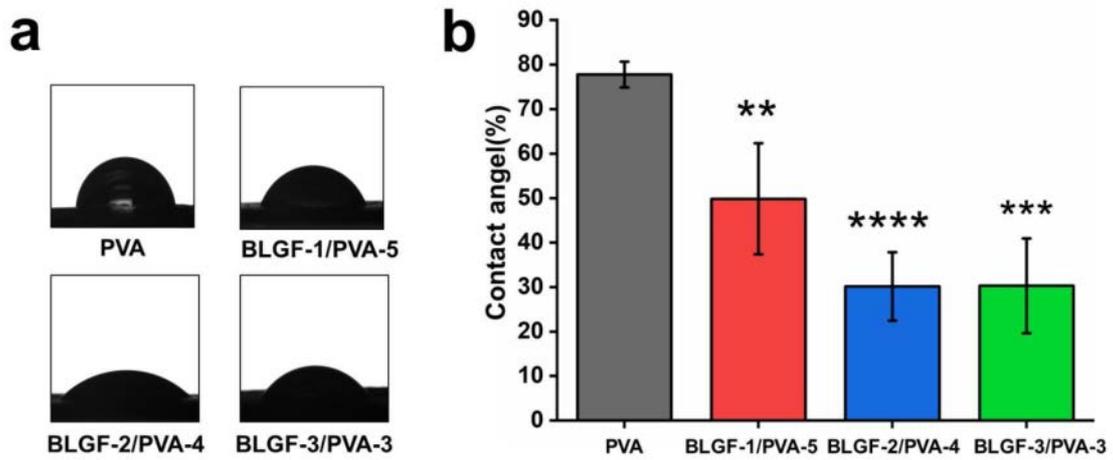


图7

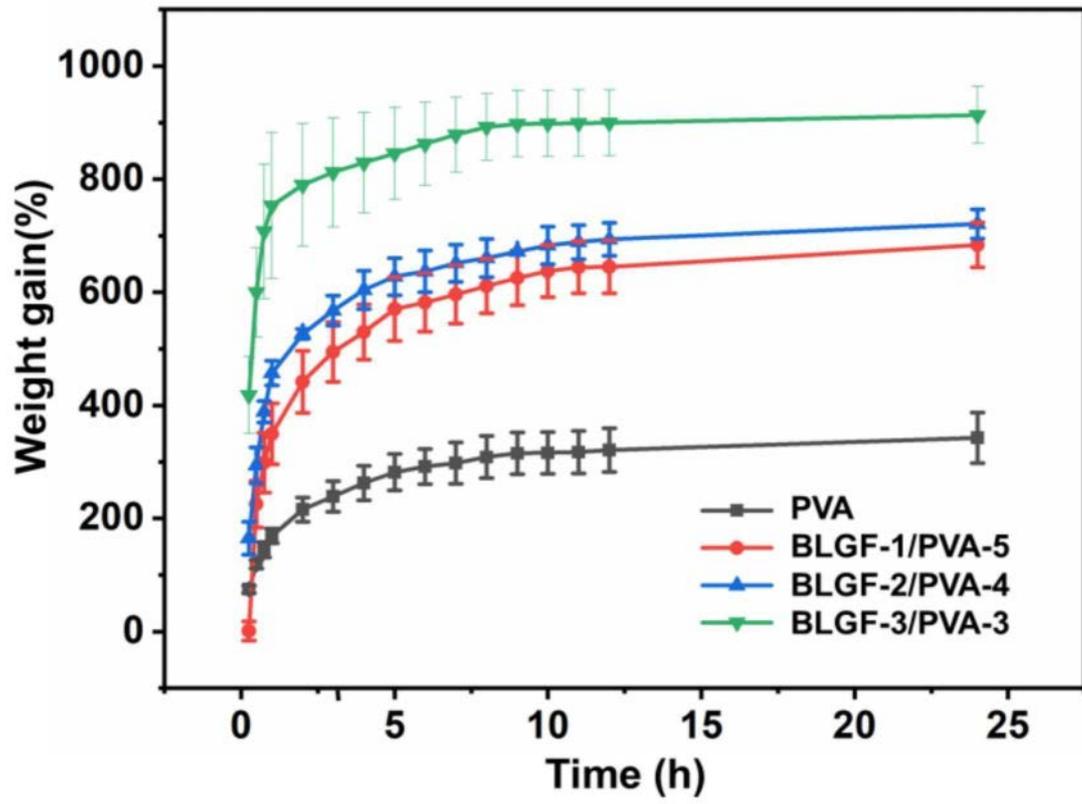


图8

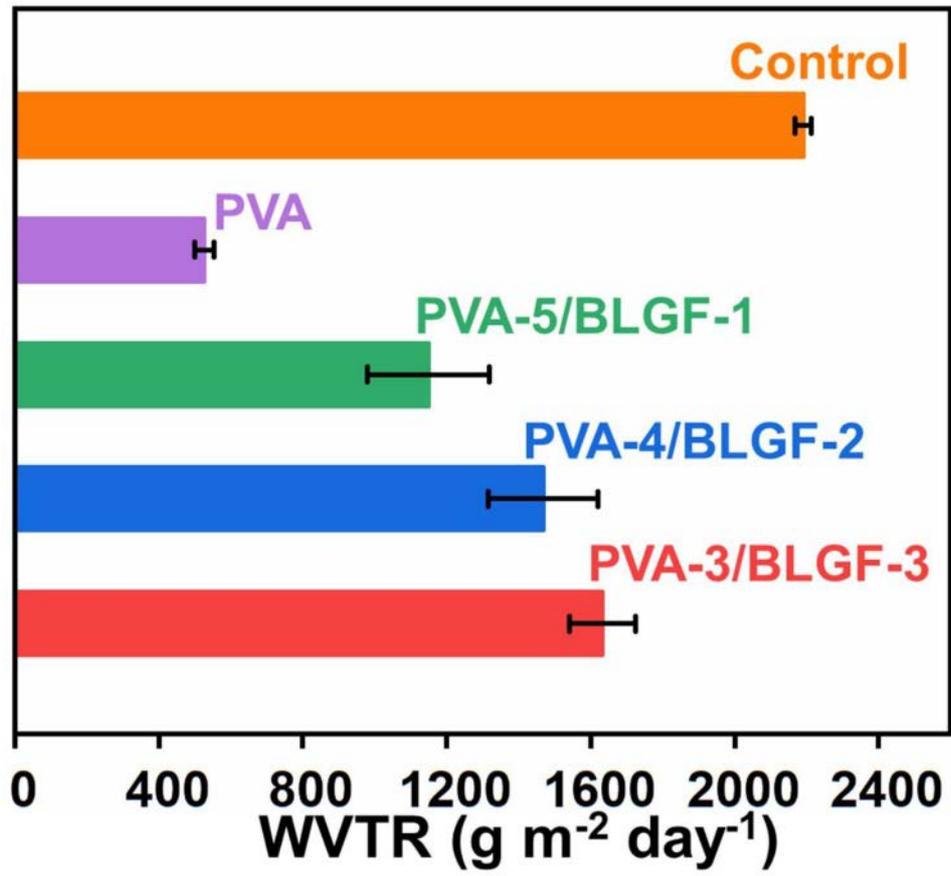


图9

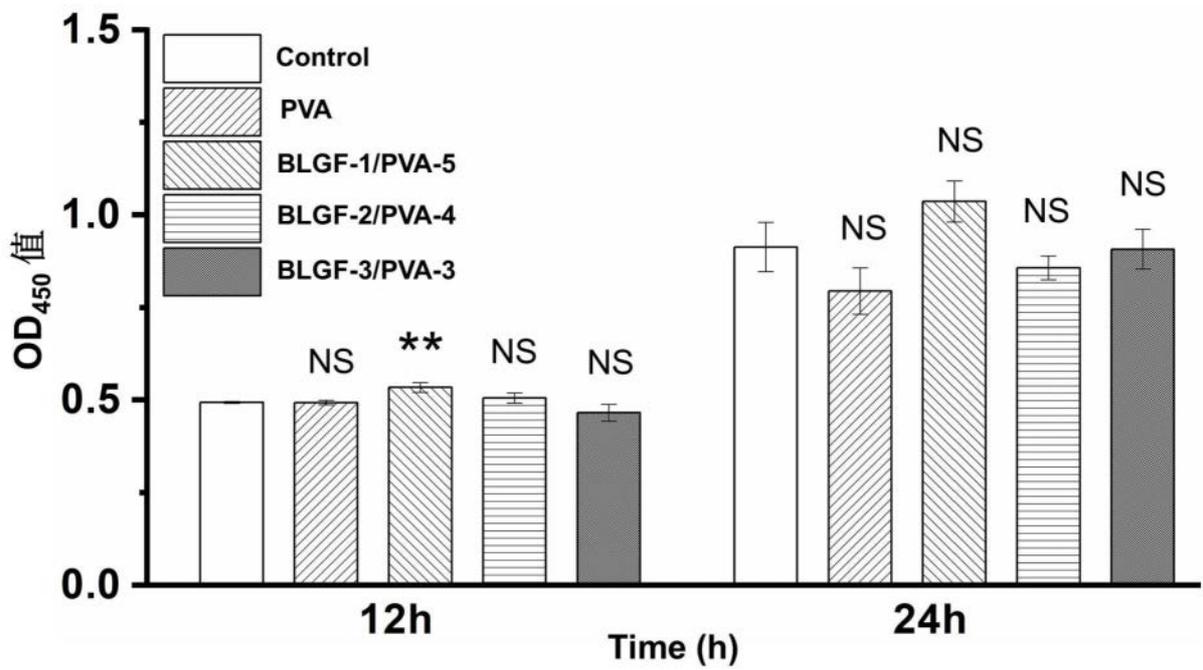


图10

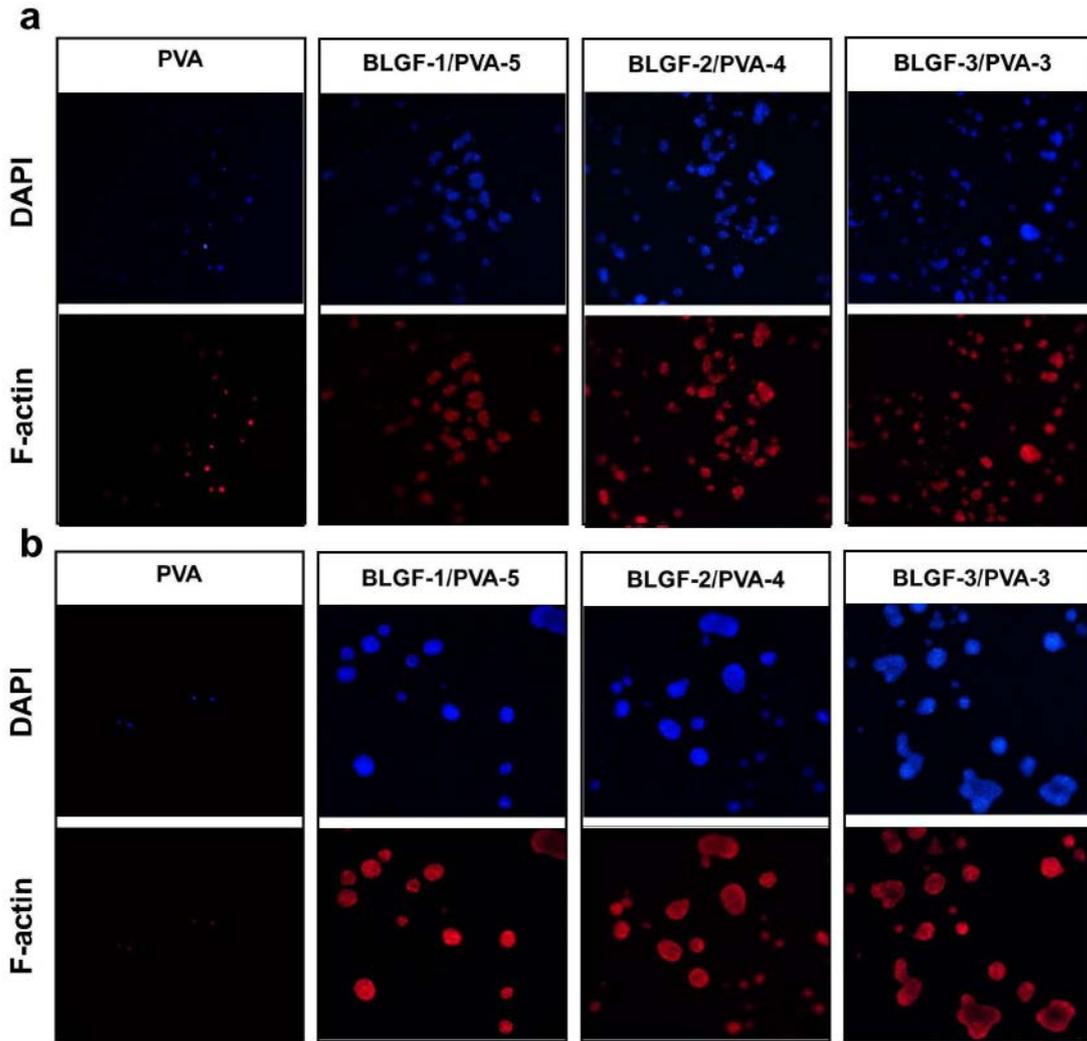


图11

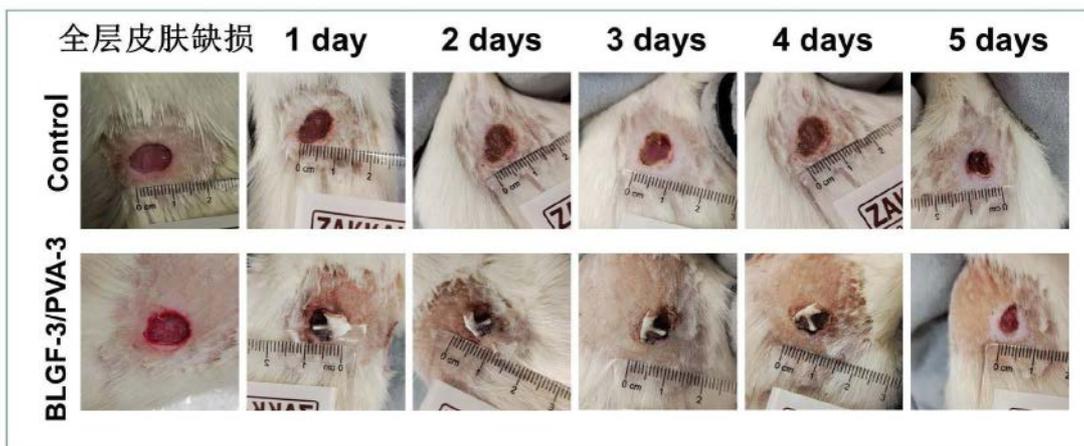


图12