



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113941025 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 14

(21) 申请号 202111256906.6

A61L 26/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.10.27

C08J 3/075 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C08J 3/28 (2006.01)

申请公布号 CN 113941025 A

C08L 5/08 (2006.01)

C08L 5/04 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.01.18

C08K 5/1545 (2006.01)

(73) 专利权人 四川大学华西医院

审查员 魏如男

地址 610000 四川省成都市武侯区国学巷
37号

(72) 发明人 解慧琪 邹晨宇 雷雄心

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务
所(普通合伙) 51222

专利代理师 肖柯岑 张娟

(51) Int. Cl.

A61L 24/08 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

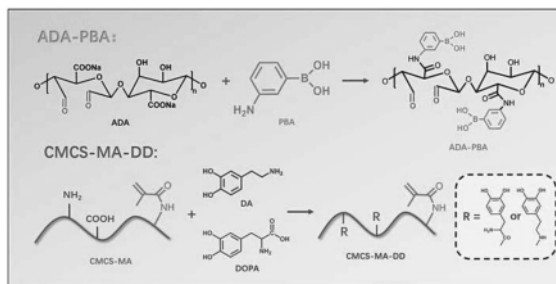
权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称

一种组织粘附性水凝胶及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一种组织粘附性水凝胶,由含有烯基和邻苯二酚基团的改性羧甲基壳聚糖、含有醛基和二羟硼基苯基的改性海藻酸或其盐、溶剂和/或单宁酸交联而成。本发明水凝胶机械性能和生物相容性好,且具有优异的组织粘附性、抗菌性和止血性能,作为医用组织粘合剂、创伤敷料,可以快速闭合伤口,实现止血、抑菌、促进伤口愈合的功效,具有非常好的应用前景。



1. 一种水凝胶前驱体溶液,其特征在于,它含有如下组分:组分A:含有烯基和邻苯二酚基的改性羧甲基壳聚糖;组分B:含有醛基和二羟硼基苯基的改性海藻酸或其盐;组分C:溶剂;组分A和溶剂的质量体积比为(3~5):100,组分B和溶剂的质量体积比为(3~5):100。

2. 如权利要求1所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述组分A为:含有烯基的结构与含有邻苯二酚基团的结构接枝改性的羧甲基壳聚糖,所述含有烯基的结构的接枝率为16%~26%,所述含有邻苯二酚基团的结构接枝率为8%~18%。

3. 如权利要求2所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述含有烯基的结构为甲基丙烯酸基团;所述含有邻苯二酚基团的结构为:多巴胺基团和/或左旋多巴基团。

4. 如权利要求1所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述组分B为含有二羟硼基苯基的结构接枝改性的氧化海藻酸或其盐;所述含有二羟硼基苯基的结构接枝率为13%~23%。

5. 如权利要求4所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述含有二羟硼基苯基的结构为氨基苯硼酸基团。

6. 如权利要求1所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述组分C为水或PBS缓冲液。

7. 如权利要求1所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,它还含有光引发剂。

8. 如权利要求7所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述光引发剂为蓝光引发剂。

9. 如权利要求8所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述蓝光引发剂为LAP。

10. 如权利要求7所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述光引发剂与溶剂的质量比为(0.2~0.7):100。

11. 如权利要求10所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述光引发剂与溶剂的质量比为0.5:100。

12. 如权利要求1~11任一项所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,它还含有单宁酸,所述单宁酸在水凝胶前驱体溶液中浓度为3~7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

13. 如权利要求12所述的水凝胶前驱体溶液,其特征在于,所述单宁酸在水凝胶前驱体溶液中浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

14. 一种组织粘附性水凝胶,其特征在于,它是将权利要求1~13任一项所述的水凝胶前驱体溶液调至碱性固化制得。

15. 如权利要求14所述的组织粘附水凝胶,其特征在于,所述碱性是:pH大于7。

16. 一种组织粘附性水凝胶,其特征在于,它是将权利要求14或15所述的水凝胶在400~450nm的蓝光下照射50~120s交联制得。

17. 权利要求14~16任一项所述的组织粘附性水凝胶在制备组织粘合剂和/或创伤敷料中的用途。

一种组织粘附性水凝胶及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于医用材料领域,具体涉及一种组织粘附性水凝胶及其用途。

背景技术

[0002] 急性创伤在军事训练与日常生活中时常发生,组织损伤后的不可控出血和创面感染是导致伤亡的主要原因。因此,在急救中使用具有快速封闭创面、快速止血、抗感染和使用便捷等特点的急救用品是十分必要的。目前,临床上封闭创面的金标准是缝合术和吻合术,但这些方法会导致继发性组织损伤、创面感染且不适合在急救现场操作等缺点。因此,迫切需要开发更合理的急性创面处理方法。

[0003] 随着生物材料的发展,许多组织粘合剂被用于急性创面闭合。纤维蛋白胶和氰基丙烯酸酯胶是临床常用的组织粘合剂,但组织粘附强度低、生物相容性差、炎症反应严重、易导致感染等缺点限制了其进一步的应用。近年来,水凝胶由于能与创面紧密贴合、保持创面湿润、吸收渗出物和促进创面愈合等优点引起了人们的广泛关注,尤其是由具有优异生物相容性和高生物活性的天然高分子制备的水凝胶。但是,现有的天然高分子水凝胶存在力学强度弱、凝胶稳定性差、组织粘附性欠佳等问题,在控制严重创伤出血和防止创面感染方面的能力有待提高。

[0004] 壳聚糖是一种已被美国食品和药物管理局(FDA)批准的天然多糖,其成本低廉、组织相容性优异、体内可降解,特别是固有的止血和抗菌性能等特点备受人们的关注,羧甲基壳聚糖是壳聚糖羧甲基化的衍生物,其在保留壳聚糖生物活性的同时大大提高了溶解性。海藻酸盐是一类从藻类中提取的多糖物质,成本低,安全性好,已经在食品工业、医药、组织修复领域得到了广泛应用。因此,羧甲基壳聚糖和海藻酸盐是制备组织粘合剂的理想材料。单宁酸是从中药五倍子中提取的一种多酚类物质,具有止血、抗炎、抗菌和抗氧化等独特的生物活性,近年来,在生物医学领域受到越来越多的关注。此外,单宁酸含有丰富的酚羟基,常被用于交联剂使用。

[0005] 目前,尽管已有研究者利用天然的壳聚糖、海藻酸盐改性后进行交联制备粘附性的水凝胶,例如专利申请201510891554.X公开了一种医用粘合剂,即是由醛基化海藻酸钠和氨基化羧甲基壳聚糖混合后形成席夫碱键制得的粘附性水凝胶。尽管生物相容性较好,但其凝胶时间相对较长,且对组织的粘附性能较差,仅仅为 $10\sim 30\text{gfcm}^2$ ($1\sim 3\text{KPa}$),应用受限,且其机械强度、抗菌性、止血效果尚待明确和提升。

[0006] 因此,研制一种能够很好地粘附于组织,有效控制出血,抑制细菌生长的天然高分子水凝胶具有非常重要的意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种能够很好地粘附于组织,有效控制出血,抑制细菌生长的天然高分子水凝胶组织粘合剂。

[0008] 本发明提供了一种水凝胶前驱体溶液,它含有如下组分:

- [0009] 组分A:含有烯基和邻苯二酚基团的改性羧甲基壳聚糖;
- [0010] 组分B:含有醛基和二羟硼基苯基的改性海藻酸或其盐;
- [0011] 组分C:溶剂;
- [0012] 组分A和溶剂的质量体积比为(3~5):100,组分B在溶剂中的质量体积比为(3~5):100。
- [0013] 进一步地,上述组分A为:含有烯基的结构与含有邻苯二酚基团的结构接枝改性的羧甲基壳聚糖;
- [0014] 所述含有烯基的结构接枝率为16%~26%,优选为20%~25%,更优选为21%;所述含有邻苯二酚基团的结构接枝率为8%~18%,优选为10%~15%,更优选为13%;
- [0015] 优选地,所述含有烯基的结构为甲基丙烯酸基团;所述含有邻苯二酚基团的结构为:多巴胺基团和/或左旋多巴基团。
- [0016] 更进一步地,所述组分A是烯基改性的羧甲基壳聚糖与多巴胺、左旋多巴反应制得的聚合物;所述烯基改性的羧甲基壳聚糖与多巴胺、左旋多巴的摩尔比为1:(1.5~3):(1.5~3),优选为1:2:2;所述烯基改性的羧甲基壳聚糖是羧甲基壳聚糖与甲基丙烯酸酐反应制成的,所述羧甲基壳聚糖与甲基丙烯酸酐的质量体积比为1:(2~5),优选为1:3。
- [0017] 进一步地,上述组分B为含有二羟硼基苯基的结构接枝改性的氧化海藻酸或其盐;所述含有二羟硼基苯基的结构接枝率为13%~23%,优选为15%~20%,更优选为18%;
- [0018] 优选的,所述含有二羟硼基苯基的结构为氨基苯硼酸基团;优选为3-氨基苯硼酸基团;
- [0019] 更进一步地,所述组分B是将氧化海藻酸或其盐与氨基苯硼酸反应形成的聚合物;所述氧化海藻酸或其盐与氨基苯硼酸的摩尔比为1:(1.5~3);所述氧化海藻酸或其盐是海藻酸或其盐与 NaIO_4 反应制得的,所述海藻酸或其盐与 NaIO_4 的质量比为(3~5):1,优选为4:1。
- [0020] 进一步地,上述组分C为水或PBS缓冲液。
- [0021] 进一步地,上述水凝胶前驱体溶液还含有光引发剂,优选地,所述光引发剂为蓝光引发剂,更优选地,上述蓝光引发剂为LAP;
- [0022] 更进一步地,上述光引发剂与溶剂的质量比为(0.2~0.7):100,优选为0.5:100。
- [0023] 进一步地,上述水凝胶前驱体溶液还含有单宁酸,所述单宁酸在水凝胶前驱体溶液中浓度为3~7 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优选为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- [0024] 本发明还提供了一种组织粘附性水凝胶,它是将前述的水凝胶前驱体溶液调至碱性固化制得;优选地,所述碱性是:pH值大于7,更优选为pH值大于7但不超过8。
- [0025] 本发明还提供了另一种组织粘附性水凝胶,它是将上述的水凝胶在400~450nm的蓝光下照射50~120s交联制得。
- [0026] 本发明还提供了上述的组织粘附性水凝胶在组织粘合剂和/或创伤敷料中的用途。
- [0027] 本发明的有益效果至少包括如下几点:
- [0028] 1、本发明水凝胶的组织粘附性优异,搭接剪切强度可高达162.5KPa,达到目前常用的医用组织粘合剂纤维蛋白胶的12.4倍,而且界面韧性强,最高可达170.1 J/m^2 ,使用方便,无需缝合即可牢固黏附于组织上,非常适于急性创面闭合;

[0029] 2、本发明水凝胶具有优异的抗菌性能,而且,进一步加入单宁酸还与改性羧甲基壳聚糖和改性海藻酸钠形成的凝胶体系形成了协同增效抗菌的作用,使得水凝胶的抗菌性能进一步显著提升;

[0030] 3、本发明水凝胶的止血效果优异,能快速、牢固地粘附于创伤组织,达到封闭止血效果,显著降低出血量和止血时间;进一步加入单宁酸还可促进纤维蛋白原的聚集,从而加速止血的过程。

[0031] 4、本发明水凝胶机械强度优异,使用过程中不易损坏。

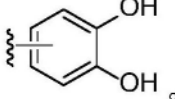
[0032] 5、本发明水凝胶以天然高分子作为基体,具有优异的生物相容性。

[0033] 本发明的术语解释:

[0034] 本发明“接枝改性”是指聚合物主链上通过化学键结合连接特定的支链结构或功能性侧基的反应。本发明“接枝率”是指:接枝率(%) = (结合连接到聚合物主链上的支链结构或功能性侧基的物质的量/聚合物主链的物质的量)*100%。

[0035] 本发明“含有烯基和邻苯二酚基团的改性羧甲基壳聚糖”是指:羧甲基壳聚糖的分子链上接枝了:(1)含有烯基的结构与含有邻苯二酚基团的结构,或(2)同时含有烯基和邻

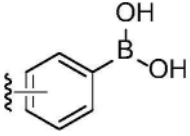
苯二酚基团的结构,进而形成的聚合物。邻苯二酚基团结构式为:



[0036] 本发明“含有醛基和二羟硼基苯基的改性海藻酸或其盐”是指:海藻酸或其盐的分子链经化学改性产生醛基并接枝了含有二羟硼基苯基的结构,进而形成的聚合物;

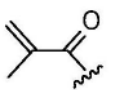
[0037] 或,海藻酸或其盐的分子链接枝了:(1)含有醛基的结构和含有二羟硼基苯基的结构或(2)同时含有醛基和二羟硼基苯基的结构,进而形成的聚合物。二羟硼基苯基的结构式

为:

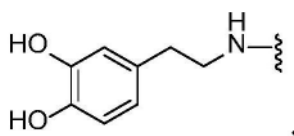


[0038] 本发明“含有烯基的结构与含有邻苯二酚基团的结构接枝改性的羧甲基壳聚糖”是指:羧甲基壳聚糖分子链上接枝修饰上“带有烯基的结构”与带有“邻苯二酚基团的结构”形成的改性羧甲基壳聚糖聚合物。

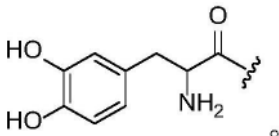
[0039] 甲基丙烯酸基团结构式为:



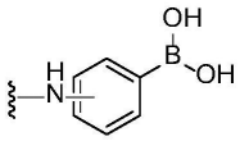
, 多巴胺基团结构式为:

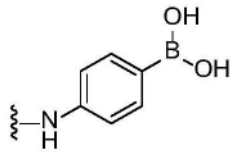


左旋多巴基团结构式为:

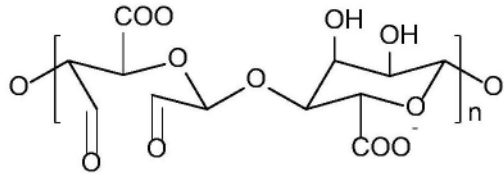


[0040] 本发明“含有二羟硼基苯基的结构接枝改性的氧化海藻酸或其盐”是指:氧化海藻酸或氧化海藻酸盐分子链上接枝修饰上“含有二羟硼基苯基的结构”形成的改性氧化海藻酸(改性氧化海藻酸盐)聚合物。

[0041] 氨基苯硼酸基团的结构式为： 3-氨基苯硼酸基团的结构式为：

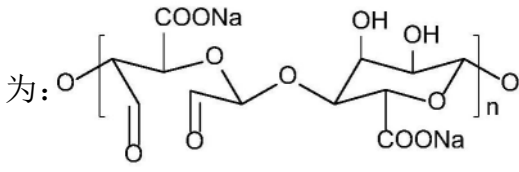


[0042] 所述“氧化海藻酸或其盐”是对海藻酸或海藻酸盐进行氧化改性,使得海藻酸或海藻酸盐结构中的部分糖醛酸单元的羟基转变为醛基形成的聚合物,示意结构式为:



其中羧酸根与带1个正电荷的阳离子(例如 H^+ 、 Na^+ 、 K^+)结合。

[0043] 所述海藻酸盐优选为海藻酸钠,氧化海藻酸盐优选为氧化海藻酸钠,示意结构式为:



[0044] 本发明所述“LAP”为苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基亚磷酸锂(CAS No.85073-19-4)。

[0045] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0046] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0047] 图1为本发明水凝胶组分A和组分B的合成示意图。

[0048] 图2改性海藻酸钠(ADA-PBA)和改性羧甲基壳聚糖(CMCS-MA-DD)的 1H NMR图(400MHz)

[0049] 图3为不同组分浓度的水凝胶光固化前后的流变学分析。(a)组分为C8-A_x(x=6,8,10)水凝胶光固化前后的储能模量(G');(b)组分为C8-A_x(x=6,8,10)水凝胶光固化前后的流动点处的剪切应变(τ_f);(c)组分为A10-C_x(x=6,8,10)水凝胶光固化前后的储能模量(G');(d)组分为A10-C_x(x=6,8,10)水凝胶光固化前后的流动点处的剪切应变(τ_f);(C和A分别为CMCS-MA-DD和ADA-PBA的简称,C和A后的数字代表该组分的浓度,单位为%)(* $p < 0.05$,ns:无显著性差异)。

[0050] 图4为(a)H(Non-P),H(P)和H(P+T)三种水凝胶在应变扫描模式下的流变学曲线;

(b) H (Non-P) , H (P) 和H (P+T) 三种水凝胶的储能模量 (G') ; (c) H (Non-P) , H (P) 和H (P+T) 三种水凝胶的流动点处的剪切应变 (τ_f) (* p <0.05, ** p <0.01, ns: 无显著性差异)。

[0051] 图5为(a) H (Non-P) , (b) H (P) 和 (c) H (P+T) 三种水凝胶截面的SEM图(标尺=200 μ m)及(d) 孔径统计图 (** p <0.01, **** p <0.0001)。

[0052] 图6为H (Non-P) , H (P) 和H (P+T) 的 (a) 搭接剪切强度和 (b) 界面韧性 (** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001)。

[0053] 图7为(a) H (Non-P) , H (P) 和H (P+T) 三种水凝胶的细胞增殖实验; (b) H (Non-P) , H (P) 和H (P+T) 三种水凝胶刺激3天的细胞活死染色图标尺=200 μ m)。

[0054] 图8为(a) 培养皿上存活的大肠杆菌菌落和金黄色葡萄球菌菌落的图片; 经水凝胶处理过的大肠杆菌 (b) 和金黄色葡萄球菌 (c) 的存活率; 不同浓度单宁酸处理后大肠杆菌液在600nm处的吸光度 (d) 和抑菌率 (e) ; 不同浓度单宁酸处理后金黄色葡萄球菌液在600nm处的吸光度 (f) 和抑菌率 (g) ; (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ns: 无显著性差异)。

[0055] 图9为(a) 兔肝脏出血模型构建与水凝胶止血过程的示意图; (b) 纤维蛋白胶, H (P) 和H (P+T) 在止血过程中及止血后滤纸的图片; (c) - (d) 不同组水凝胶止血后出血量和止血时间的统计图(未经处理的兔肝脏出血模型作为对照) (* p <0.05, ** p <0.01, ns: 无显著性差异)。

具体实施方式

[0056] 除另有说明外, 本发明所用原料与设备均为已知产品, 通过购买市售产品所得。

[0057] 本发明所用氧化海藻酸钠(ADA) 为购买市售产品或按照如下方法合成:

[0058] 1. 将海藻酸钠以2%的比例在无水乙醇中分散均匀, 持续搅拌。将 NaIO_4 溶于与无水乙醇同等体积的水中, NaIO_4 的质量为海藻酸钠的0.25倍。

[0059] 2. 避光下, 将 NaIO_4 溶液逐滴加入海藻酸钠/无水乙醇分散体系, 室温反应6h。反应完成后, 加入15mL乙二醇搅拌30min以终止反应。

[0060] 3. 将反应产物装入透析袋(截留分子量为3500Da), 在去离子水中透析3天, 每天换3次水。冷冻干燥获得ADA样品。

[0061] 本发明实施例所用“含有醛基和二羟硼基苯基的改性海藻钠”即3-氨基苯硼酸修饰的氧化海藻酸钠(ADA-PBA), 按照如下方法合成:

[0062] 1. 将ADA以0.5%的浓度完全溶解在水中, 加入EDC搅拌至完全溶解。

[0063] 2. 将3-氨基苯硼酸(PBA) 溶于无水乙醇后逐滴加入ADA溶液。调节pH至7, 反应24h。其中, ADA与PBA的物质的量之比为1:2。PBA与EDC的物质的量之比为1:1.5。

[0064] 3. 反应完成后, 将反应产物装入透析袋(截留分子量为3500Da), 在去离子水中透析3天, 每天换3次水。冷冻干燥获得ADA-PBA样品。

[0065] 合成示意图如图1所示。

[0066] 制备完成后通过傅立叶变换红外吸收光谱仪对海藻酸钠改性前后产物进行红外表征, 证明了: 在 NaIO_4 的氧化作用下, 部分海藻酸钠中的羟基形成了醛基形成了ADA, 且二羟硼基苯基被成功接枝在ADA上。

[0067] 本发明实施例所用的“含有烯基和邻苯二酚基团的改性羧甲基壳聚糖”是甲基丙烯酸酐、多巴胺、左旋多巴修饰的羧甲基壳聚糖(CMCS-MA-DD), 按照如下方法合成:

[0068] 1. 室温下将羧甲基壳聚糖 (CMCS) 以2%的比例溶解在纯水中, 将其置于4℃水浴中孵育15min。

[0069] 2. 逐滴加入甲基丙烯酸酐 (MA), CMCS与MA的质量体积比为1:3, 用5%NaOH调节体系pH值至9, 4℃条件下持续反应24h。

[0070] 3. 反应完成后将反应产物装入透析袋(截留分子量为3500Da), 在去离子水中透析3天, 每天换3次水。透析后冷冻干燥制得CMCS-MA样品。

[0071] 4. 将CMCS-MA以0.5%的浓度完全溶解在水中, 在N₂环境下, 加入EDC和NHS, EDC和NHS的物质的量为CMCS-MA的1.5倍。

[0072] 5. 将盐酸多巴胺 (DA) 和左旋多巴 (DOPA) 溶液(将DOPA溶解于1mol/L的HCl中) 加入到步骤4的溶液中, 在pH=5.5的条件下避光室温反应24h。CMCS-MA、DA和DOPA的物质的量之比为1:2:2。反应全程在N₂环境中进行。

[0073] 6. 反应完成后, 透析、冷冻干燥、保存步骤同步骤3。合成示意图如图1所示。

[0074] 制备完成后通过傅立叶变换红外吸收光谱仪对CMCS改性前后产物进行红外表征, 证明了: 甲基丙烯酸基团和邻苯二酚基团都被成功接枝在CMCS上。

[0075] 实施例1、本发明粘附性水凝胶的制备

[0076] 1. 将冻干后的ADA-PBA以质量体积比10%溶解在含有1%LAP的0.02%NaOH PBS溶液中。在50℃孵育15min使其充分溶解, 待用。

[0077] 2. 将冻干后的CMCS-MA-DD以质量体积比10%溶解在PBS溶液中。在50℃孵育15min使其充分溶解, 待用。

[0078] 3. 将步骤1和步骤2中的溶液按体积比1:1混合均匀, 用一定量2%NaOH PBS溶液将体系pH值调整至7-8之间, 凝胶在5s内形成, 得到水凝胶H (Non-P)。

[0079] 实施例2、本发明粘附性水凝胶的制备

[0080] 将实施例1的凝胶H (Non-P) 用405nm蓝光照射60s, 凝胶体系进一步交联, 形成水凝胶H (P)。

[0081] 实施例3、本发明粘附性水凝胶的制备

[0082] 1. 将冻干后的ADA-PBA以质量体积比10%溶解在含有1%LAP的0.02%NaOH PBS溶液中。在50℃孵育15min使其充分溶解, 待用。

[0083] 2. 将冻干后的CMCS-MA-DD以质量体积比10%溶解在PBS溶液中。在50℃孵育15min使其充分溶解, 待用。

[0084] 3. 配置400μg/mL的单宁酸PBS溶液, 该溶液现配现用。

[0085] 4. 将步骤1和步骤2中的溶液按体积比1:1混合, 再加入一定量步骤3中溶液, 使最终凝胶中单宁酸浓度为5μg/mL, 混合均匀。用一定量2%NaOH PBS溶液将体系pH值调整至7-8之间, 凝胶在5s内形成, 用405nm蓝光照射60s, 凝胶体系进一步交联, 得到水凝胶H (P+T)。

[0086] 以下通过实验例证明本发明的有益效果。

[0087] 实验例1、ADA-PBA和CMCS-MA-DD结构表征

[0088] 1、实验方法

[0089] ADA-PBA和CMCS-MA-DD结构通过核磁共振氢谱测定(瑞士布鲁克公司, D₂O)。进一步, 通过7.3-7.8ppm的积分面积与3.4-4.4ppm的积分面积之比计算出ADA-PBA中二羟甲基苯基的接枝率。在CMCS-MA-DD中, 甲基丙烯酸基团和邻苯二酚基团的接枝率分别由5.4-

5.6ppm的积分面积和2.8-4.2ppm的积分面积之比,6.5-7.0ppm的积分面积和2.8-4.2ppm的积分面积之比确定。

[0090] 2、实验结果

[0091] 如图2所示。在ADA-PBA的¹H NMR图谱中,7.3-7.8ppm范围对应的三个峰为二羟硼基苯基的特征峰,而3.4-4.4ppm范围对应的峰为海藻酸钠主链的特征峰。通过计算,二羟硼基苯基的接枝率为18%。在CMCS-MA-DD的¹H NMR图谱中,5.4ppm和5.6ppm对应的两个峰为甲基丙烯酸基团的特征峰,6.5-7.0ppm范围对应的峰为邻苯二酚的特征峰,2.8-4.2ppm是羧甲基壳聚糖主链的特征峰。甲基丙烯酸基团的接枝率为21%,邻苯二酚基团的接枝率为13%。

[0092] 实验例2、ADA-PBA和CMCS-MA-DD的用量确定

[0093] 1、实验方法

[0094] 参照实施例2、3的方法,制备一系列ADA-PBA和CMCS-MA-DD在溶剂中浓度不同的,光固化和未光固化的凝胶。通过水凝胶的流变学特性筛选最优的浓度。

[0095] 流变学性能评价方法:用模块化智能型高级旋转流变仪(MCR302,奥地利安东帕有限公司)的应变扫描模式检测水凝胶的流变学特性。测试条件为温度为37℃,1Hz频率,剪切应变的范围为1%-1000%。水凝胶在线性粘弹区的储能模量(G')和损耗模量(G'')被认为是水凝胶的储能模量(G')和损耗模量(G'')。

[0096] 2、实验结果

[0097] 如图3所示。当CMCS-MA-DA/DOPA浓度为8%,调整ADA-PBA的浓度为6%,8%和10%。大于10%后溶液无法完全溶解且难以混合均匀。从图3(a)和3(b)可以看出,在光固化前,随着ADA-PBA浓度的从6%增加至10%,水凝胶的储能模量(G')从1028Pa增加到1933Pa,流动点对应的应变(τ_f)从88.6%增加到134.7%。该结果表明,随着ADA-PBA的浓度增加,不仅水凝胶的强度上升,而且水凝胶网络在更大的剪切应变率下才发生破坏。这是因为随着ADA-PBA的浓度增加,可以形成更多的席夫碱和硼酸酯动态共价键使得凝胶体系更加坚硬。当其被破坏后,可以在短时间内再次成键,保持着水凝胶完整的网络,水凝胶抵抗外界应变的能力增加。光固化后,C8-A6,C8-A8和C8-A10的 G' 均有大幅度的提升,分别为2039Pa,3489Pa和4502Pa,相较于光固化前分别增加了1.98倍,2.52倍和2.33倍,且随着ADA-PBA浓度的增加而增加。光固化后的 τ_f 和光固化前表现出相似的趋势,随着ADA-PBA含量的增加, τ_f 逐渐增加,并且在10%时达到最大,所以优选的ADA-PBA浓度为10%。

[0098] 固定ADA-PBA浓度为10%,优化CMCS-MA-DA/DOPA的浓度。从图3(c)可以看出,光固化前后,水凝胶的 G' 都表现出相似的规律,随着CMCS-MA-DA/DOPA组分的增加, G' 逐渐增加并在10%时达到最大值4731Pa。图3(d)表明,在光固化前,随着CMCS-MA-DA/DOPA浓度从6%增加到10%, τ_f 从176.9%逐渐下降到123.6%,这是因为体系内不可重建的化学键增加,而可以重建的动态化学键并没有改变,所以凝胶被破坏时的应变降低。光固化后,由于形成了更多的C-C键 τ_f 进一步下降,但是A10-C8和A10-C10的 τ_f 无统计学差异, G' 有统计学差异。故选定CMCS-MA-DA/DOPA浓度10%。

[0099] 综上所述,水凝胶CMCS-MA-DA/DOPA和ADA-PBA两个组分的浓度都在10%时为最优的方案。

[0100] 实验例3、本发明水凝胶的强度和稳定性

[0101] 1、实验方法

[0102] 对实施例1~3制备的水凝胶进行流变学性能评价,并通过扫描电子显微镜对凝胶截面的形貌进行观察。

[0103] 2、实验结果

[0104] 如图4所示。H(Non-P)、H(P)和H(P+T)三种水凝胶都表现出相似的特性,在初始阶段,储能模量(G')大于损耗模量(G''),表现出凝胶体的性质,随着剪切应变增加,损耗模量(G'')大于储能模量(G'),表现出流体的性质,凝胶网络被破坏(图4(a))。从图4(b)的结果可以看出,光固化前后,水凝胶的 G' 从2535Pa增加到4598Pa,这是因为光固化在凝胶网络中引入了C-C键,因而凝胶强度增加。单宁酸加入后, G' 进一步增加到5400Pa,相较于光固化前增长了2.13倍。这是因为单宁酸在凝胶体系中形成了氢键网络,每个单宁酸分子有15个酚羟基,可以与体系中的羟基形成氢键相互作用,进一步增强凝胶强度。图4(c)表明,单宁酸加入后并没有影响其 τ_f ,这说明单宁酸在增强水凝胶强度的同时,并没有降低其韧性。

[0105] 如图5所示,扫描电镜结果显示水凝胶均呈现多孔和接近圆形的网络结构。H(Non-P)、H(P)和H(P+T)的平均孔径分别为89.0 μm ,63.7 μm 和53.1 μm 。H(Non-P)内部由于只存在单一的动态共价键网络(硼酸酯键和席夫碱键),交联程度最低,所以其孔径最大(89.0 μm);H(P)中由于光固化形成了大量C-C键,凝胶有双网络体系构成,交联程度提高,表现出中等的孔径大小(63.7 μm);加入单宁酸后,H(P+T)中除了动态共价键和光固化形成的共价键网络外还存在大量氢键,其交联程度最高,孔径也最小(53.1 μm)。水凝胶的孔径越小,意味着在相同组分浓度条件下体系密度越大,分子链间交联程度越高,其稳定性也越高。

[0106] 综上所述,本发明的水凝胶具有优异的机械强度和多孔结构,多孔结构的连通性和完整性使水凝胶具有良好的结构稳定性,也赋予水凝胶保持水分和吸收多余组织渗出物的能力。

[0107] 实验例4、本发明水凝胶的粘附能力

[0108] 1、实验方法

[0109] 搭接剪切强度和界面韧性是评价水凝胶组织粘附能力的重要评价指标,本发明对实施例1~3的水凝胶通过搭接剪切测试和T型片剥离实验测试粘附能力。以临床常用的纤维蛋白胶(倍绣胶,广州倍绣生物技术有限公司)为对照。

[0110] 水凝胶组织粘附性能评价方法:采用搭接剪切测试和T型片剥离测试评价水凝胶的组织粘附能力,测试仪器为电子万能材料试验机,型号为Instron5967。

[0111] 搭接剪切测试过程如下:先将1cm \times 1cm的透明猪肠衣组织用胶水粘在3cm \times 1cm \times 0.2cm的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)片上,在37 $^{\circ}\text{C}$ 水中浸泡30min,再将200 μL 水凝胶均匀黏附在猪肠衣上面。将两片带有猪肠衣的PMMA片贴合在一起。用200g的砝码压在结合部位30min,上机测试。测试速度为1mm/min。

[0112] T型片剥离测试过程如下:L型PMMA片长边的尺寸为6cm \times 2.5cm \times 0.2cm,短边的尺寸为3cm \times 2.5cm \times 0.2cm,两片L型PMMA片通过长边连接,短边用于电子万能材料试验机夹具的夹持。用胶水将3cm \times 1cm的透明猪肠衣组织用胶水粘在长边上,在37 $^{\circ}\text{C}$ 水中浸泡30min,再将1000 μL 水凝胶均匀黏附在猪肠衣上面。将两片L型PMMA片通过长边粘合,形成T型的样品,后用200g的砝码压30min,上机测试。

[0113] 2、实验结果

[0114] 如图6所示。图6 (a) 为纤维蛋白胶, H (Non-P), H (P) 和H (P+T) 四种材料的搭接剪切强度, 分别为13.1kPa, 58.1kPa, 103.1kPa和162.5kPa。由此可见, 三个实验组的搭接剪切强度均明显高于纤维蛋白胶, 其中H (P+T) 的搭接剪切强度是其12.4倍。H (P) 和H (Non-P) 中所含的邻苯二酚基团含量相同, 但光固化后的H (P) 的搭接剪切强度进一步提升, 为H (Non-P) 的1.77倍。更进一步地, 加入了单宁酸的H (P+T) 的搭接剪切强度达到162.5kPa, 是三种水凝胶中的最大值。

[0115] 此外, 纤维蛋白胶, H (Non-P), H (P) 和H (P+T) 四种材料的界面韧性也表现出与搭接剪切强度相似的结果。从图6 (b) 可以看出, 纤维蛋白胶的界面韧性为52.3J/m², 而H (Non-P), H (P) 和H (P+T) 的界面韧性分别为123.5J/m², 153.3J/m²和170.1J/m², 表明本发明水凝胶在被破坏时可以吸收更多的能量, 保持凝胶的完整性。

[0116] 综上所述, 相较于商用的纤维蛋白胶, 本发明水凝胶均表现出优异的组织粘附能力, 在医用组织粘合剂领域有潜在的应用价值。

[0117] 实验例5、本发明水凝胶的生物相容性

[0118] 1、实验方法

[0119] 细胞相容性是组织粘合剂的基本要求之一, 按照如下方法对实施例1~3的水凝胶进行细胞相容性评价:

[0120] 水凝胶的细胞相容性评价采用CCK-8法和活死染色法评价, 所用细胞为小鼠胚胎成纤维细胞系 (NIH-3T3)。用CCK-8法评价NIH-3T3细胞增殖, 96孔板每孔铺1500个细胞待其贴壁后更换100μL材料浸提液 (浸提液浓度为30mg/mL, 浸提时间为24h), 在第1, 3和5天时检测细胞增殖情况, 完全培养基作为对照。检测时, 吸干孔板内的培养基, 加入100μL CCK-8稀释液 (CCK-8试剂: 培养基稀释=1:10), 37℃孵育2h后用酶标仪检测450nm处的吸光度 (OD值)。

[0121] 活死检测检测细胞的存活情况与状态。细胞铺板方法与CCK-8法相同, 在材料浸提液刺激细胞3天后进行活死染色。将该钙黄绿素 (Calcein-AM) 和碘化丙定 (PI) 用PBS稀释1000倍, 加入到孔板中, 37℃孵育30min后, 用荧光显微镜进行观察并拍摄。

[0122] 2、实验结果

[0123] 如图7所示。图7 (a) 的结果表明, H (Non-P), H (P) 和H (P+T) 的浸提液与NIH-3T3细胞共培养1, 3和5天后, 相较于对照组并未表现出细胞毒性, 表明三种水凝胶都不会影响NIH-3T3细胞的增殖。通过活死染色结果 (图7 (b)) 可以看出, 视野中基本全部为绿色荧光, 即活细胞占了大部分, 但罕见死细胞, 也就是红色荧光区域。此外, 经过与水凝胶浸提液的共培养, 细胞保持了其长梭形的形态, 状态良好。综上所述, 本发明水凝胶并未影响细胞的增殖与活性, 说明其细胞相容性良好。

[0124] 实验例6、本发明水凝胶的抗菌性

[0125] 1、实验方法

[0126] 在严重的灾害环境和恶劣条件下伤口极易感染。在战争中, 感染的致死率极高, 仅次于失血性休克。此外, 感染的创面难以愈合给患者带来极大的困扰。因此, 对于组织粘附性水凝胶优良的抗菌性能是十分必要的。本发明采用大肠杆菌 (革兰氏阴性) 和金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性) 对实施例2的H (P) 和实施例3的H (P+T) 水凝胶的抗菌性能进行了评价。

[0127] 评价方法如下:

[0128] 用革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(ATCC6538)和革兰氏阴性菌大肠杆菌(ATCC25922)评价水凝胶的抗菌性能。用LB琼脂液体培养基摇菌,直到细菌浓度达到 10^8 CFU/mL($OD_{600}=0.5$),后将菌液用PBS稀释100倍待用。阳性对照组为氨苄青霉素(400 μ L),阴性对照组为PBS(400 μ L)。第一步,将400 μ L灭菌过的水凝胶均匀铺在24孔板内,置于37 $^{\circ}$ C稳定30min。第二步,将10 μ L稀释后的菌液加入到孔板中,37 $^{\circ}$ C孵育4h。第三步,每个孔加入1mL PBS吹打,吸10 μ L液体进行平板涂布。18h后观察细菌的生长情况并拍照。记录统计每个培养皿上的菌落数($n=3$),计算细菌的存活率(Bacterial Viability)。计算公式如下:

$$[0129] \quad \text{Bacterial Viability (\%)} = \frac{\text{CFU}(\text{experimental group})}{\text{CFU}(\text{PBS group})} \times 100\%$$

[0130] 其中,CFU(experimental group)和CFU(PBS group)分别代表实验组和PBS组中菌落的个数。

[0131] 2、实验结果

[0132] 如图8所示。从图8(a)可以看出,在两种细菌直接接触水凝胶4h后,PBS对照组依然有大量的菌落生长,而H(P)组、H(P+T)组和氨苄青霉素组的菌落数明显少于PBS组。H(P+T)组的菌落数少于H(P)。从图8(b)的统计图可以看出,氨苄青霉素作为公认的有效抗菌药物表现出优异的抗菌性能,大肠杆菌存活率仅为1.9%。H(P)组和H(P+T)组的细菌存活率为24.3%和7.4%,表明其可以有效抑制大肠杆菌的生长。对于金黄色葡萄球菌H(P)、H(P+T)和氨苄青霉素也表现优异的抗菌性能,细菌存活率分别为6.5%,4.0%和2.3%。

[0133] 由此可见,金黄色葡萄球菌的增殖受到了严重的抑制。此外,相比于大肠杆菌,不同水凝胶对于革兰阳性的金黄色葡萄球菌的抑菌效果更好,这可能是因为抗菌成分对于细菌细胞壁的影响更加显著。

[0134] 此外,在H(P+T)中,单宁酸的加入显著提高了对于两种细菌的抗菌能力。为了进一步说明单宁酸在提升水凝胶抗菌性能中所起的作用,我们测试了单宁酸对于抑制90%大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC_{90})。从图8(d)和8(f)中可以看出,单宁酸对于细菌增殖的影响表现出浓度依赖性。在高浓度下,细菌的生长增殖受到严重抑制,其在600nm处的吸光度(OD值)较低;当单宁酸浓度低于某一值时,其对细菌增殖的影响显著减小,细菌可以正常生长。尤其是需要特别强调的是:通过不同浓度单宁酸的抑菌率(图8(e)和8(g))确定单宁酸对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC_{90} 分别为256 μ g/mL和512 μ g/mL。而在本发明的H(P+T)水凝胶中,单宁酸浓度为仅为5 μ g/mL,远低于其 MIC_{90} ,说明H(P+T)的抗菌性能优于H(P)抗菌性能的原因不是单宁酸本身造成的。而是加入单宁酸至改性壳聚糖和改性海藻酸钠体系的水凝胶后,产生了协同增效的抑菌作用,最终导致了水凝胶的抑菌性能的显著提高。

[0135] 总的来说,上述结果说明本发明水凝胶具有非常优异的抑菌效果,且单宁酸能够与改性壳聚糖和改性海藻酸钠体系的水凝胶产生协同增效的抑菌作用。

[0136] 实验例7、本发明水凝胶的止血效果

[0137] 1、实验方法

[0138] 采用兔肝脏止血模型评价实施例2和实施例3的水凝胶的体内止血性能。新西兰大白兔麻醉后呈仰卧位,备皮,在腹腔处开约5cm的切口,用手将肝脏拉出放在滤纸上,清理干净肝脏上的渗出液,用刀片在肝脏下部划长1.5cm,深0.5cm的切口,待血液从创面处流出,

将事先准备好的材料盖在创面上,直到创面完全止血。后立即称量滤纸的重量,记作出血量。滤纸上血液所占的面积不在扩大的时间被认为是止血时间。用电子设备记录全部止血的全过程(n=3)。示意图如图9(a)所示。

[0139] 2、实验结果

[0140] 如图9所示。图9(b)为止血过程中的图片以及止血后滤纸上的出血量情况。从图中可以看出,对照组的滤纸上血液所占的面积最大,而纤维蛋白胶组,H(P)组和H(P+T)组滤纸上的血液面积明显减少,其中H(P+T)组的最小。进一步地,从图9(c)的出血量统计可以看出对照组的平均出血量为0.95g,而纤维蛋白胶组,H(P)组和H(P+T)组的分别为对照组的62%,58%和33%,均明显小于对照组。其中,H(P)组和纤维蛋白胶组的平均出血量相近,分别为0.59g和0.55g,H(P+T)组的最少为0.32g。相似地,止血时间也表现出相同而规律。从图9(d)可以看出,纤维蛋白胶组,H(P)组和H(P+T)组的止血时间分别为85s,79s和69s,比对照组的149s明显缩短。

[0141] 以上结果均说明了H(P)和H(P+T)水凝胶的止血效果可以达到甚至由于商用的纤维蛋白胶,这有以下两方面的原因:(1)H(P)和H(P+T)可以快速且牢固黏附在组织上面的,达到封闭止血的目的。结合图5(a)和(b)的结果,其组织粘附性能明显由于纤维蛋白胶。(2)H(P+T)中添加了单宁酸分子,其可以络合血液中的 Ca^{2+} ,促进纤维蛋白原的聚集,从而加速止血的过程。

[0142] 综上,本发明提供了一种新型天然高分子水凝胶,其机械性能和生物相容性好,且具有优异的组织粘附性、抗菌性和止血性能,作为医用组织粘合剂或创伤敷料,使用方便,可以快速闭合伤口,实现止血、抑菌、促进伤口愈合的功效,具有非常好的应用前景。

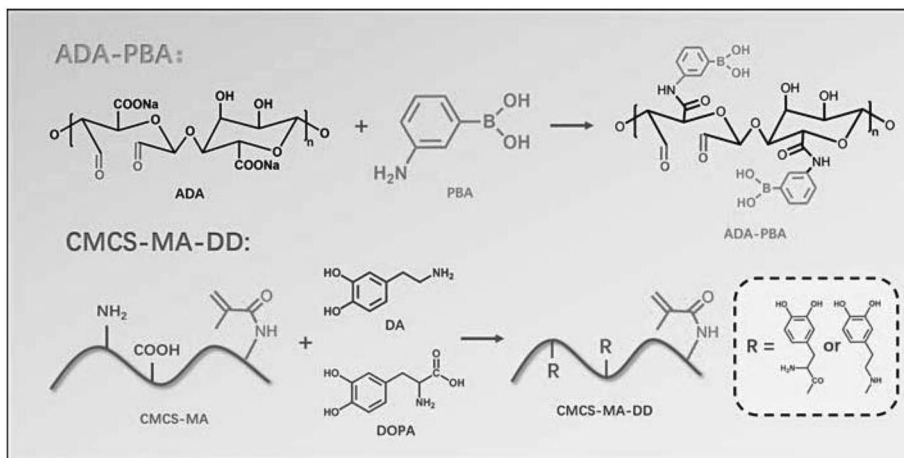


图1

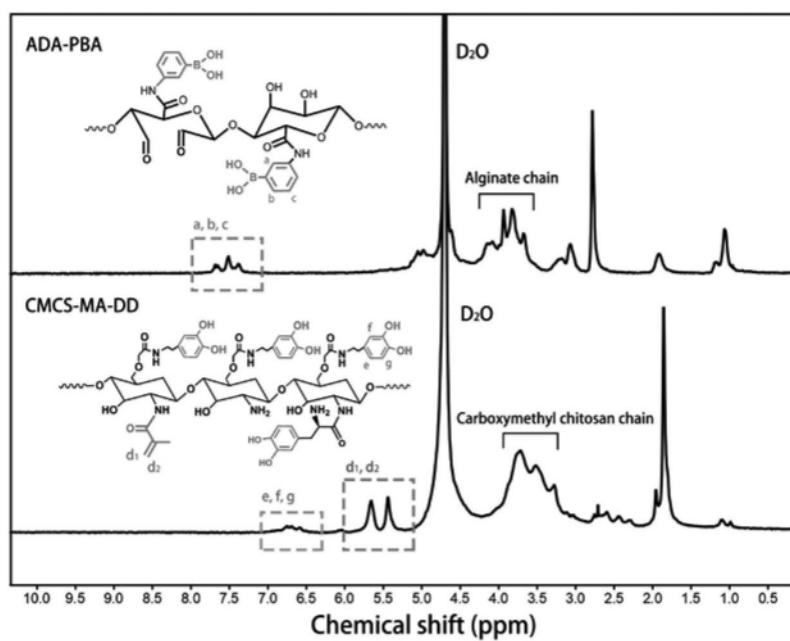


图2

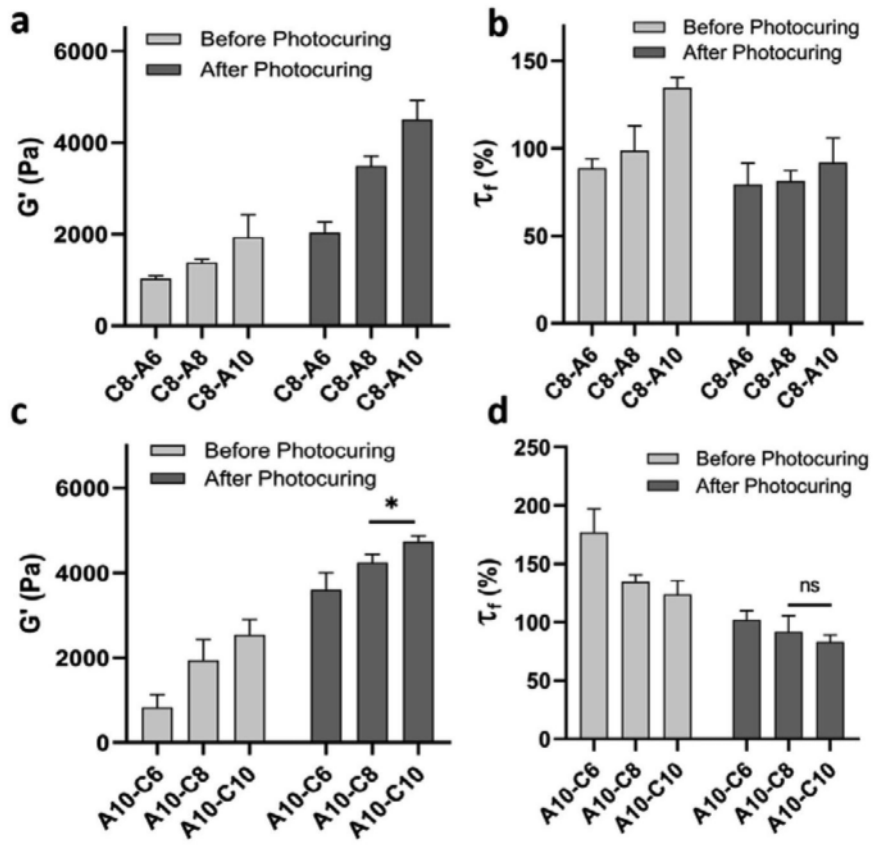


图3

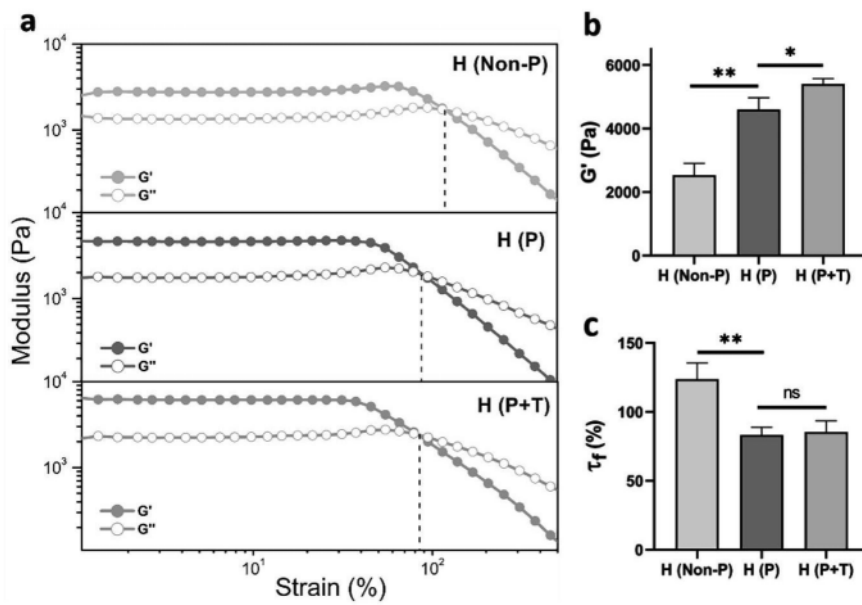


图4

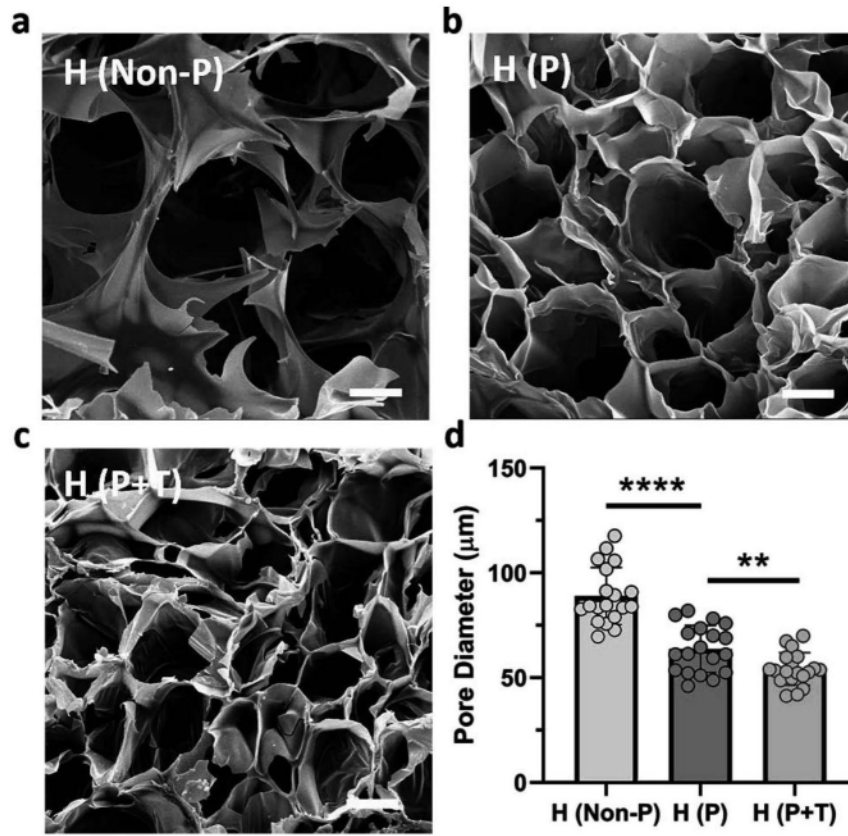


图5

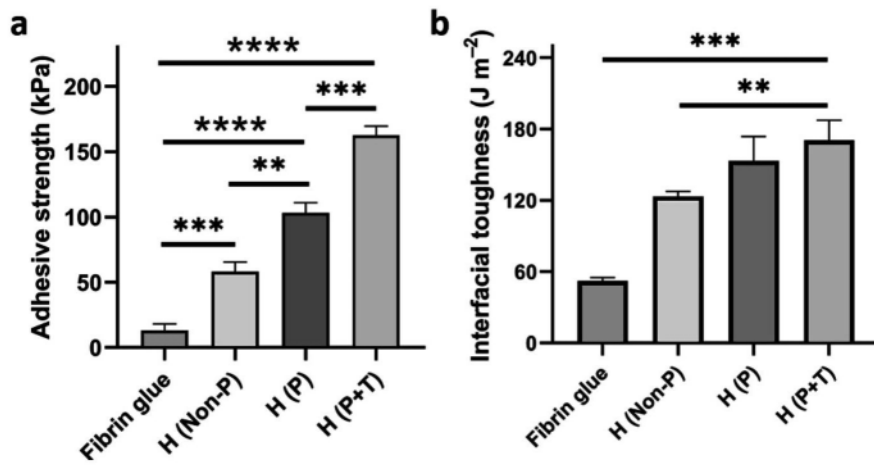


图6

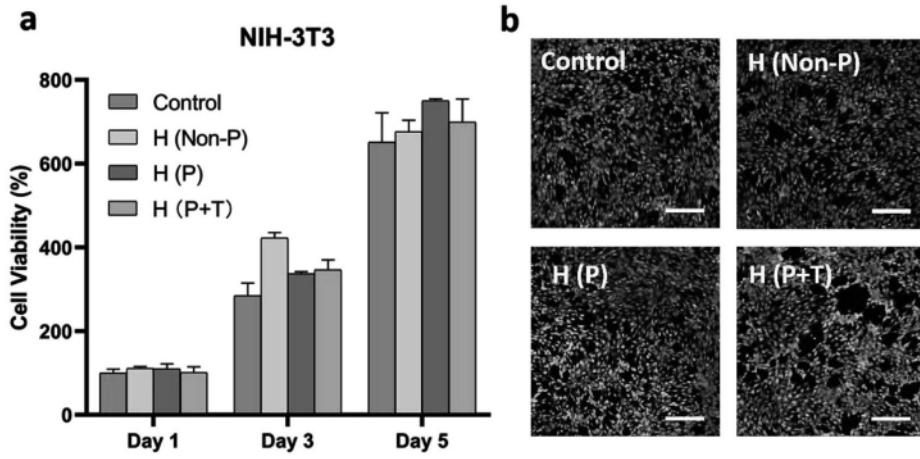


图7

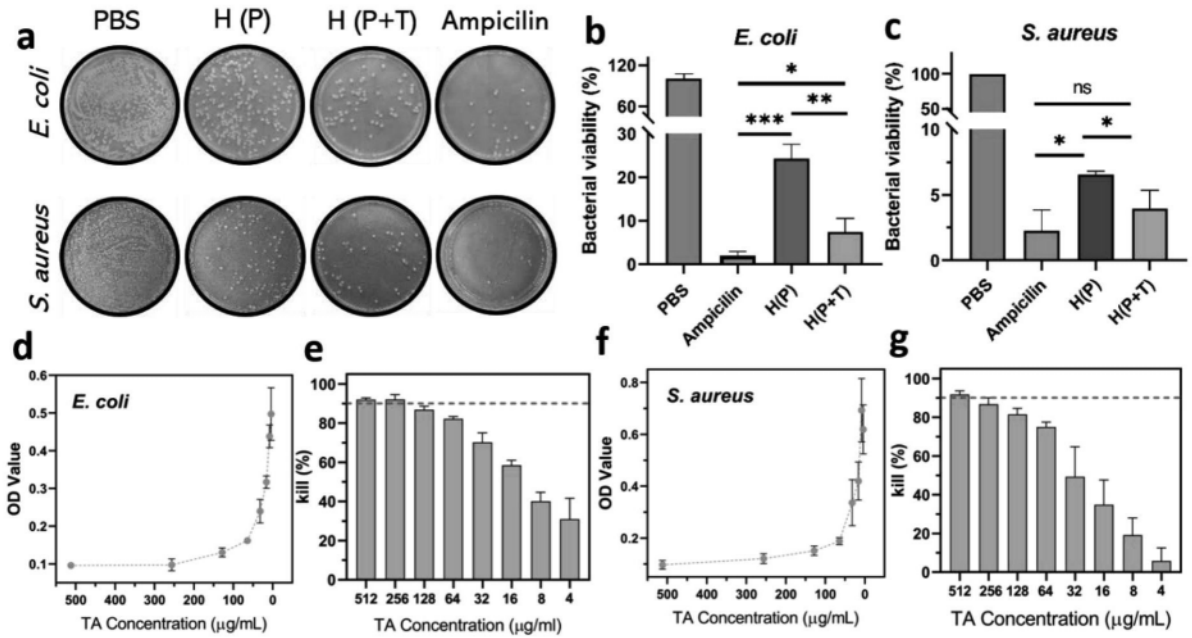


图8

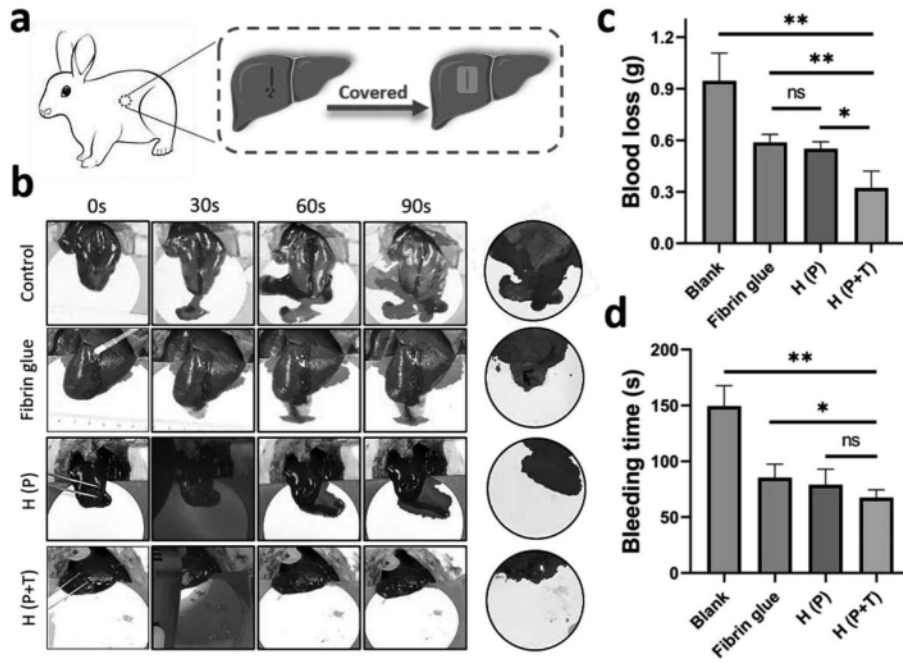


图9