



(21)申请号 201611069014.4

(22)申请日 2016.11.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106750575 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(73)专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72)发明人 陈云 赵亚楠 王子健 张强

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 常海涛

(51)Int.Cl.

C08L 5/08(2006.01)

C08L 89/00(2006.01)

C08J 5/18(2006.01)

C08J 3/24(2006.01)

A61L 27/20(2006.01)

A61L 27/22(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

(56)对比文件

CN 102453329 A,2012.05.16,

CN 105968825 A,2016.09.28,

CN 105175799 A,2015.12.23,

CN 101168603 A,2008.04.30,

Yanteng Zhao et al.Epichlorohydrin-
Cross-linked Hydroxyethyl Cellulose/Soy
Protein Isolate Composite Films as
Biocompatible and Biodegradable Implants
for Tissue Engineering.《ACS APPLIED
MATERIALS & INTERFACES》.2016,第8卷(第4
期),第2781-2795页.

审查员 李椰

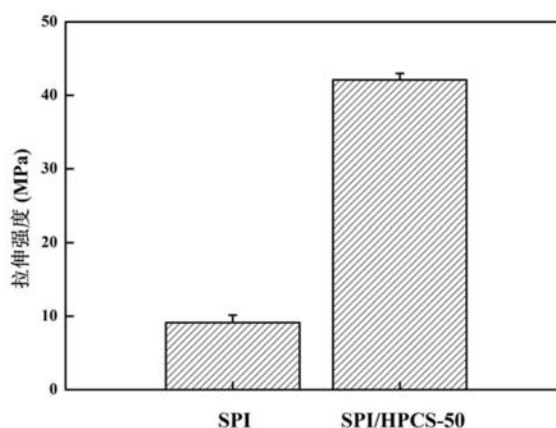
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜及其制
备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜及其制备方法与应用。本发明复合膜的制备方法包括如下步骤:将5%~6%的羟丙基壳聚糖溶液和9%~10%的大豆分离蛋白溶液按照质量比10:90~90:10的比例混匀,加入羟丙基壳聚糖和大豆分离蛋白总质量20%~100%的环氧氯丙烷混匀后进行交联,再离心脱气泡倒入平板中自然晾干制成膜;然后用稀醋酸溶液中和至中性,流水冲洗48h以上,再次自然晾干得到复合膜材料。本发明复合膜细胞毒性较低、血液相容性良好,生物相容性好,可作为细胞黏附的基质,促进细胞生长,其可作为细胞与组织工程支架材料,在生物医学领域以及临床上具有潜在的应用前景。



1. 一种羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:将质量浓度为5%~6%的羟丙基壳聚糖溶液和9%~10%的大豆分离蛋白溶液按照羟丙基壳聚糖、大豆分离蛋白质量比50:50的比例混合均匀,加入羟丙基壳聚糖和大豆分离蛋白总质量50%~100%的环氧氯丙烷混匀后进行交联,离心脱气泡倒入平板中自然晾干制成膜;然后用稀醋酸溶液中和至中性,流水冲洗48h以上,再次自然晾干得到羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述的羟丙基壳聚糖溶液通过将羟丙基壳聚糖溶解在去离子水中制备得到。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述的大豆分离蛋白溶液通过如下方法制备得到:往大豆分离蛋白中加入去离子水,混匀;再加入4%~5%NaOH溶液,混匀。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:大豆分离蛋白、去离子水与4%~5%NaOH溶液的质量比为1:6:3。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述的交联的条件为常温交联20~30min。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述的离心的条件为3000rpm离心8~10min。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述的稀醋酸溶液的浓度为4%~5%。

8. 一种羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜,其特征在于:通过权利要求1-7任一项所述的方法制备得到。

9. 权利要求8所述的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜在制备细胞支架或组织工程支架材料中的应用。

羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学材料及高分子材料领域,涉及羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜材料及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 随着生命科学和医学的发展,临床上对生物材料的要求越来越多,也越来越高,研究和开发用于细胞和组织工程的新型生物医学材料具有重要意义。目前用于制备生物材料的原料主要包括胶原蛋白、壳聚糖、聚乳酸、聚己内酯、聚羟基乙酸、透明质酸、聚氨酯及其衍生物或改性物质等。其中,壳聚糖是自然界唯一存在的碱性天然多糖,其本身及降解产物对机体组织、细胞均无明显的毒害作用,已被广泛应用于细胞和组织工程材料(MF Cervera, J Heinämäki, M Räsänen, SL Maunu, M Karjalainen, OMN Acosta, AI Colarte, J Yliruusi. Carbohydrate Polymers. 2004, 58 (4), 401-408.)。但是,壳聚糖不溶于水和一般有机溶剂,易溶于稀酸,因此大大限制了壳聚糖在生物医学领域的应用。羟丙基壳聚糖作为壳聚糖的衍生物,它不仅具有壳聚糖良好的生物相容性、广谱抗菌性等优点,而且大大提高了壳聚糖的极性和溶解性(K Ling, F Zheng, J Li, R Tang, J Huang, Y Xu, H Zheng, J Chen. J Biomed Mater Res A. 2008, 87A (1), 52-61.)。在某些条件下可能替代壳聚糖,大大扩展了壳聚糖及其衍生物在生物医学领域的应用范围。

[0003] 大豆分离蛋白是自然界最丰富的一种植物蛋白,由于其来源广泛、价格低廉以及具有优良的功能性,逐渐成为一种环境友好型材料,广泛应用于塑料、膜、纤维和粘合剂等领域(SYang, S Madbouly, J Schrader, G Srinivasan, D Grewell, K McCabe, M Kessler, W Graves. Green Chem. 2015, 17 (1), 380-393)。但是,单纯大豆分离蛋白膜在作为材料使用时具有耐水性差、易脆等缺陷,需通过一定的物理或化学改性,才可能制备出更具实用性和功能性的新型生物材料。

[0004] 目前还未见到有关制备羟丙基壳聚糖与大豆分离蛋白复合膜材料的报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术存在的缺点与不足,提供一种具有生物相容性的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜材料及其制备方法,所述复合膜材料主要是以羟丙基壳聚糖、大豆分离蛋白为主要原料,溶解在水和氢氧化钠溶液中,经过搅拌、离心、流延、漂洗、干燥等工艺制备成复合膜材料。

[0006] 本发明选用水溶性的羟丙基壳聚糖和碱溶性的大豆分离蛋白为主要原料,不仅解决了壳聚糖与大豆分离蛋白共混困难、难以形成均一复合溶液的难题,而且充分发挥了两种天然高分子材料的优势。在羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜中,羟丙基壳聚糖具有较好的力学强度和抗菌性能而起到支架和抗菌作用,大豆分离蛋白具有生物活性和携带细胞生长因子的作用。由于羟丙基壳聚糖与大豆分离蛋白均为易溶解或分散在水中的高分子材料,制备的复合材料也易溶解或分散在水中而难以在湿态下使用,所以,为进一步改善其耐

水性能,采用环氧氯丙烷对其进行交联,可获得在湿态下使用并能作为细胞支架材料的复合膜材料。所制备的复合膜材料具有优良的生物相容性,可促进间充质干细胞的粘附和增殖,可作为细胞和组织工程培养的载体进一步应用于组织再生的引导与修复。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0008] 一种具有生物相容性的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜的制备方法,包括如下步骤:将质量浓度为5%~6%的羟丙基壳聚糖溶液和9%~10%的大豆分离蛋白溶液按照质量比10:90~90:10的比例混合均匀,加入羟丙基壳聚糖和大豆分离蛋白总质量20%~100%的环氧氯丙烷混匀后进行交联,再离心脱气泡倒入平板中自然晾干制成膜。然后用稀醋酸溶液中和至中性,流水冲洗48h以上,再次自然晾干得到羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜材料。

[0009] 所述的羟丙基壳聚糖溶液优选通过将羟丙基壳聚糖溶解在去离子水中制备得到。

[0010] 所述的大豆分离蛋白溶液优选通过如下方法制备得到:往大豆分离蛋白中加入去离子水,混匀;再加入4%~5%NaOH溶液,混匀。其中,大豆分离蛋白、去离子水与4%~5%NaOH溶液的质量比优选为1:6:3。

[0011] 所述的交联的条件优选为常温交联20~30min。

[0012] 所述的离心的条件优选为3000rpm离心8~10min。

[0013] 所述的稀醋酸溶液的浓度优选为4%~5%。

[0014] 一种羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜,通过上述方法制备得到。

[0015] 本发明所获得的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜中,羟丙基壳聚糖的固含量质量百分比为10%~90%,不同比例复合膜呈现出不同的结构和理化性能。

[0016] 体外细胞培养实验与血液相容性实验表明,本发明复合膜材料细胞毒性较低、血液相容性良好,生物相容性好,可作为细胞黏附的基质,促进细胞生长。因此,本发明复合膜可作为细胞与组织工程支架材料,在生物医学领域以及临床上具有潜在的应用前景。

[0017] 本发明具有如下优点和有益效果:(1)充分利用来源丰富、价格低廉的羟丙基壳聚糖和大豆分离蛋白,且原料及复合物均具有生物相容性;(2)以单纯大豆分离蛋白膜和单纯羟丙基壳聚糖膜为对照,本发明制备的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜较对照组而言,其力学强度明显增加;(3)通过改变原材料配比、交联剂的用量及制备工艺等可获得具有不同结构和性能的复合膜;(4)复合膜在细胞支架和组织工程支架材料领域具有潜在用途。

附图说明

[0018] 图1是实施例1和实施例2所获得的膜材料的表面结构扫描电镜图,从左至右依次为纯大豆分离蛋白膜、羟丙基壳聚糖含量为30%的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜、羟丙基壳聚糖含量为50%的复合膜、羟丙基壳聚糖含量为70%的复合膜和纯羟丙基壳聚糖膜。

[0019] 图2是实施例1和实施例2所获得的膜材料的断面结构扫描电镜图,从左至右依次为纯大豆分离蛋白膜、羟丙基壳聚糖含量为30%的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜、羟丙基壳聚糖含量为50%的复合膜、羟丙基壳聚糖含量为70%的复合膜和纯羟丙基壳聚糖膜。

[0020] 图3是实施例2所制备的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜(羟丙基壳聚糖含量

为70%)表面培养大鼠骨髓间充质干细胞后的扫描电镜图,右图为左图的放大图。

[0021] 图4是实施例2所制备的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜(羟丙基壳聚糖含量为70%)表面培养大鼠脂肪间充质干细胞后的扫描电镜图,右图左图的放大图。

[0022] 图5是实施例1和实施例2所获得的纯大豆分离蛋白膜(羟丙基壳聚糖含量为0%,图注中标记为SPI)和羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜(羟丙基壳聚糖含量为50%,图注中标记为SPI/HPCS-50)的拉伸强度比较结果图。

[0023] 图6是实施例1和实施例2所获得的纯大豆分离蛋白膜(图注中标记为SPI)、羟丙基壳聚糖含量为50%的复合膜(图注中标记为SPI/HPCS-50)和纯羟丙基壳聚糖膜(图注中标记为HPCS)的吸水率与时间的关系图。

[0024] 图7是实施例1和实施例2中所获得的纯大豆分离蛋白膜(图注中标记为SPI)、羟丙基壳聚糖含量为50%的复合膜(图注中标记为SPI/HPCS-50)和纯羟丙基壳聚糖膜(图注中标记为HPCS)的吸潮率与时间的关系图。

具体实施方式

[0025] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0026] 实施例1(对照例)

[0027] 将羟丙基壳聚糖溶于去离子水中配制质量浓度为6%的羟丙基壳聚糖溶液。往6%羟丙基壳聚糖溶液中加入羟丙基壳聚糖质量50%的环氧氯丙烷,混匀,常温交联30min,3000rpm离心10min脱气泡后以2mm的厚度倒入平板中自然晾干制成膜。流水冲洗48h以上,再次自然晾干得到纯羟丙基壳聚糖膜(HPCS)。

[0028] 在大豆分离蛋白中加入去离子水,搅拌均匀,再加入5%NaOH溶液,得到质量浓度为10%的大豆分离蛋白溶液,其中大豆分离蛋白、去离子水、5%NaOH溶液的质量比为1:6:3。往10%大豆分离蛋白溶液中加入大豆分离蛋白质量50%的环氧氯丙烷,混匀,常温交联30min,3000rpm离心10min脱气泡后以2mm的厚度倒入平板中自然晾干制成膜。然后用4%~5%稀醋酸溶液中和至中性,流水冲洗48h以上,再次自然晾干得到纯大豆分离蛋白膜(SPI)。

[0029] 将HPCS膜和SPI膜作为对照。

[0030] 实施例2

[0031] 将实施例1中配制的羟丙基壳聚糖溶液和大豆分离蛋白溶液共混,加入羟丙基壳聚糖和大豆分离蛋白总质量50%的环氧氯丙烷,继续搅拌,常温交联30min,控制复合体系中羟丙基壳聚糖与大豆分离蛋白含量的质量比分别为1/9、3/7、5/5、7/3和9/1,后续实验步骤同实施例1,制备出羟丙基壳聚糖含量分别为10%、30%、50%、70%和90%的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜材料。

[0032] 图1为实施例1和实施例2所获得的膜材料的表面结构扫描电镜图片,从左至右依次为纯大豆分离蛋白膜、羟丙基壳聚糖含量为30%的复合膜、羟丙基壳聚糖含量为50%的复合膜、羟丙基壳聚糖含量为70%的复合膜和纯羟丙基壳聚糖膜,如图可见,随着羟丙基壳聚糖含量的不同,复合膜表面呈现不同的结构特征。如50%的复合膜表面有凸起,呈沟壑状,而纯羟丙基壳聚糖膜和纯大豆分离蛋白膜的表面较光滑。

[0033] 图2是实施例1和实施例2所获得的膜材料的断面结构扫描电镜图片,从左至右依

次为纯大豆分离蛋白膜、羟丙基壳聚糖含量为30%的复合膜、羟丙基壳聚糖含量为50%的复合膜、羟丙基壳聚糖含量为70%的复合膜和纯羟丙基壳聚糖膜),如图所见,随着羟丙基壳聚糖含量的不同,复合膜断面呈现不同的结构特征。如50%的复合膜断面呈条纹状,而纯羟丙基壳聚糖膜和纯大豆分离蛋白膜的断面则相对比较平滑。

[0034] 实施例3

[0035] 将实施例1和实施例2获得的膜材料剪成1cm×1cm的样品放入试管中,用蒸馏水清洗3次后,生理盐水漂洗30min,之后在37℃水浴锅中恒温水浴30min,接着加入全血与生理盐水质量比为1:1.25的稀释全血0.2mL混匀,37℃恒温水浴60min,于1500rpm下离心10min。用10mL蒸馏水稀释0.2mL全血为阳性对照,10mL生理盐水稀释0.2mL全血为阴性对照。最后用紫外分光光度计检测上清液在545nm波长处的吸光度。经溶血率统计分析,初步评价复合膜的血液相容性。

[0036] 下列表1为实施例2所获得的一系列羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜(羟丙基壳聚糖含量为10%、30%、50%、70%和90%)的溶血测试结果,从表格可以看出各样品的溶血率(HR)<5%,表明该复合膜材料符合医疗器材溶血性能的要求。

[0037] 表1

[0038]

样品	HR (%)
阳性对照	100
阴性对照	0
10%	1
30%	0.27
50%	1
70%	0.47
90%	1

[0039] 实施例4

[0040] 将实施例2所制备的羟丙基壳聚糖含量为70%的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜(70%复合膜)高压灭菌后,浸泡在装有MEM培养基的24孔培养板中,之后放置在37℃、5%CO₂培养箱中。24h后,将复合膜材料取出放置在新的24孔培养板中。同时将大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)、大鼠脂肪间充质干细胞(ADSC)分别消化得到细胞悬液,以 5×10^4 的密度接种到复合膜材料上,放置在37℃、5%CO₂培养箱中培养3d后,经扫描电子显微镜观察细胞生长情况。

[0041] 图3为70%复合膜表面培养大鼠骨髓间充质干细胞后的扫描电镜图,大鼠骨髓间充质干细胞在70%复合膜上细胞体呈典型的梭形形态,表明该复合膜材料促进细胞的粘附和生长。

[0042] 图4为70%复合膜表面培养大鼠脂肪间充质干细胞后的扫描电镜图,从图中可以看出大鼠脂肪间充质干细胞在70%复合膜上的生长状况良好。

[0043] 细胞在复合膜表面生长状况良好的可能原因在于:一方面是70%复合膜表面形貌有利于细胞的粘附,另一方面是复合膜中的大豆分离蛋白可能缓释出有利于细胞增殖的营养成分,从而进一步促进细胞的生长。

[0044] 该实施例结果表明羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜可作为细胞与组织工程支架材料,在生物医学领域以及临床上具有潜在的应用前景。

[0045] 实施例5

[0046] 将实施例1和实施例2所获得的膜材料裁制成 $10\text{cm} \times 1\text{cm}$ 的片材,在真空干燥箱内干燥3h,用电子拉力机检测膜材料在干态条件下的拉伸强度,拉伸速率设置为 $10\text{mm}/\text{min}$ 。

[0047] 图5为纯大豆分离蛋白膜和羟丙基壳聚糖含量为50%的羟丙基壳聚糖/大豆分离蛋白复合膜(50%复合膜)的拉伸强度比较结果,从图中可以看出50%复合膜的拉伸强度明显高于纯大豆分离蛋白膜的拉伸强度。

[0048] 实施例6

[0049] 将实施例1和实施例2所获得的膜材料真空干燥后切成 $3\text{cm} \times 3\text{cm}$ 大小的膜片,称其质量记为 M_1 。再浸入含有100mL超纯水的玻璃容器中,室温静置,在不同的时间点小心取出,用滤纸吸去表面水分,称其质量记为 M_2 ,直至其达到平衡为止,测其吸水率。

[0050] 图6为纯大豆分离蛋白膜材料、50%复合膜材料和纯羟丙基壳聚糖膜材料的吸水率与时间的关系图,从图中可以看出,50%复合膜的吸水率介于纯大豆分离蛋白膜与纯羟丙基壳聚糖膜之间,表明在有环氧氯丙烷交联的情况下,大豆分离蛋白的加入提高了羟丙基壳聚糖的耐水性能。

[0051] 实施例7

[0052] 将实施例1和实施例2所获得的膜材料真空干燥后切成 $3\text{cm} \times 3\text{cm}$ 大小的膜片,称其质量记为 M_0 ,将其放入含有饱和 CuSO_4 溶液的密闭干燥器内,样品不接触液面,室温静置,在不同的时间点,小心取出,称其质量记为 M_t ,直至其达到平衡为止,测其吸潮率。

[0053] 图7为纯大豆分离蛋白膜材料、50%复合膜材料和纯羟丙基壳聚糖膜材料的吸潮率与时间的关系图,所测试的结果与吸水率结果相一致。

[0054] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

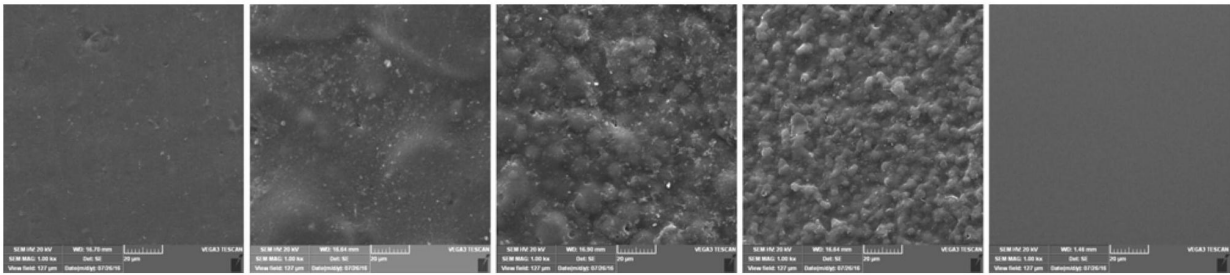


图1

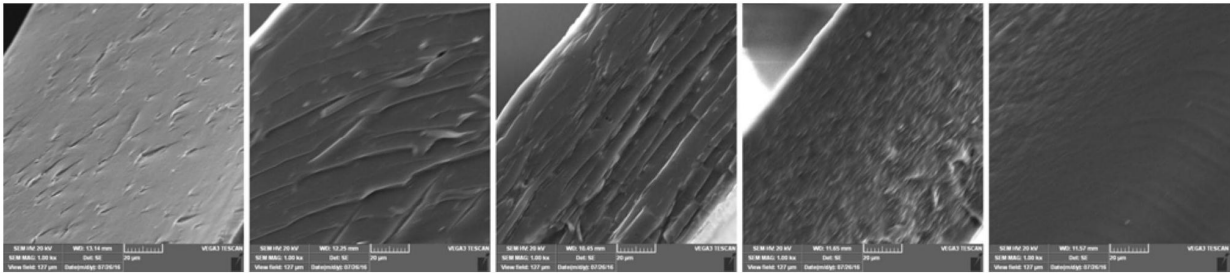


图2

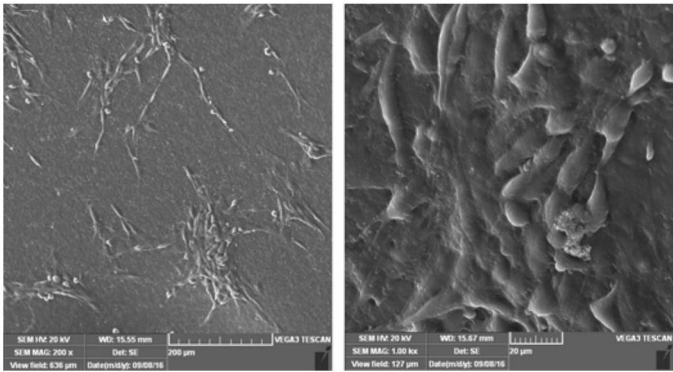


图3

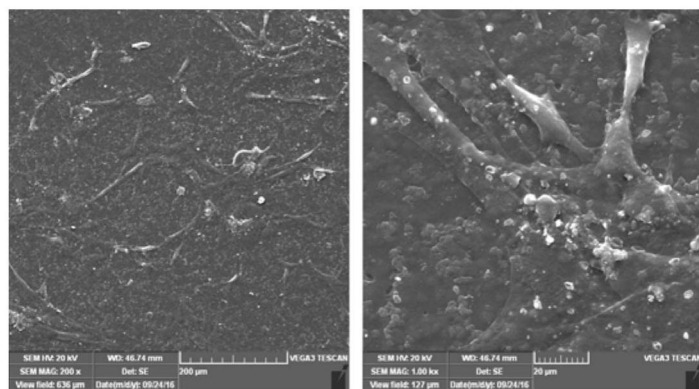


图4

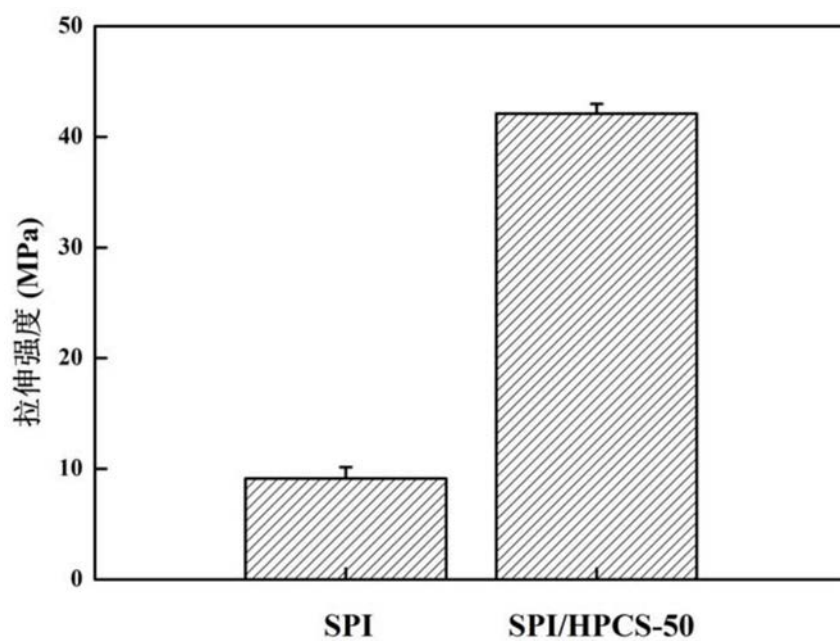


图5

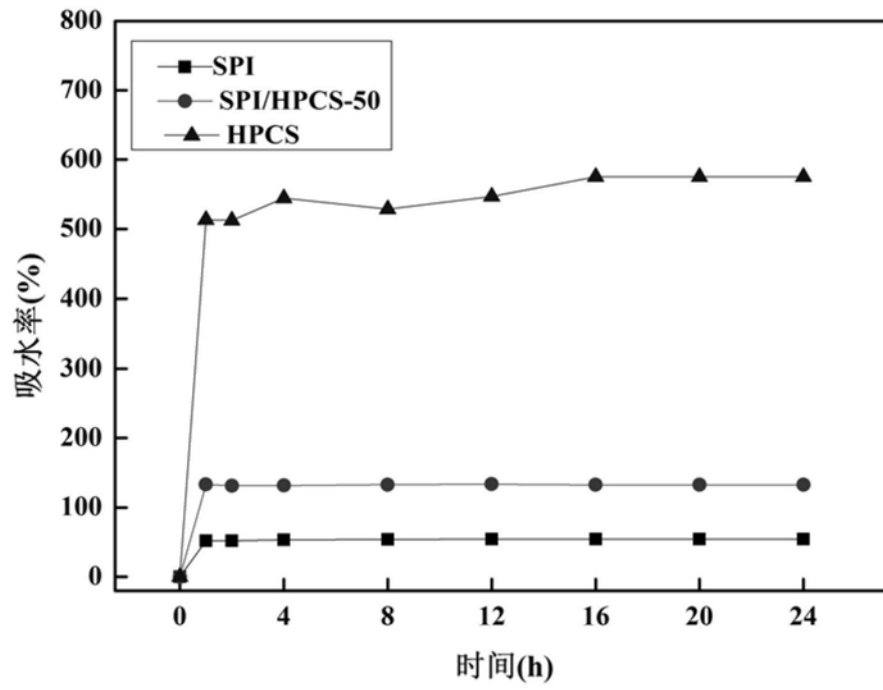


图6

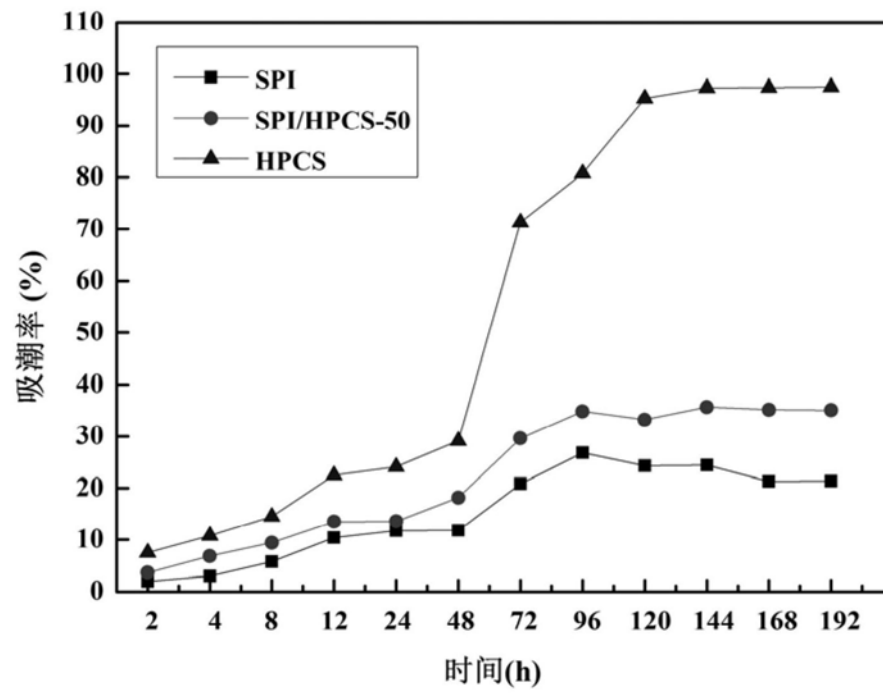


图7