



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116370691 A

(43) 申请公布日 2023.07.04

(21) 申请号 202310536599.X

A61L 15/44 (2006.01)

(22) 申请日 2023.05.12

(71) 申请人 中国人民解放军海军军医大学第一附属医院

地址 200082 上海市杨浦区长海路168号

(72) 发明人 高洁 武艳 李玉林 苏梦 李梦  
张世豪 卢正茂 张梦亚 袁晓环  
张婷琳 吴丽丽 陈翠敏

(74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204

专利代理师 丁振英

(51) Int. Cl.

A61L 15/40 (2006.01)

A61L 15/32 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

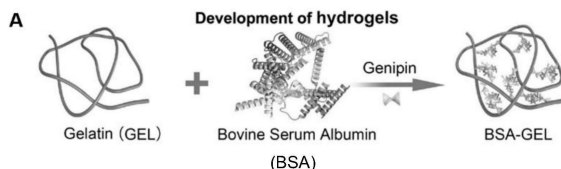
权利要求书2页 说明书9页 附图6页

(54) 发明名称

一种含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜及其在糖尿病创面修复敷料中的应用

(57) 摘要

本发明提供了一种含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜及其在糖尿病创面修复敷料中的应用,属于生物医用材料和再生医学技术领域。该含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,具有这样的特征,包括:水凝胶以及纳米细胞囊泡,其中,将水凝胶制备成水凝胶膜片,然后通过扩散杂交法将纳米细胞囊泡加载到水凝胶膜片中,得到含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜。该含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜具有优异的促细胞增殖、迁移、成管抗炎、抗氧化和抗菌性能,并能按需降解,能够显著加快糖尿病创面的愈合。



1. 一种含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,其特征在于,包括:  
水凝胶以及纳米细胞囊泡,  
其中,将所述水凝胶制备成水凝胶膜片,然后通过扩散杂交法将所述纳米细胞囊泡加载到所述水凝胶膜片中,得到含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜。
2. 根据权利要求1所述的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,其特征在于:  
其中,所述水凝胶以质量百分比计,其制备原料包括:  
单体2-5%;  
牛血清蛋白0.5-5%;  
交联剂0-1%;  
余量为PBS,  
所述单体为A型明胶和/或B型明胶。
3. 根据权利要求2所述的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,其特征在于:  
其中,所述水凝胶的制备方法包括以下步骤:  
将300mg单体的颗粒放入6mLPBS中置于40℃恒温水浴磁力搅拌装置之上搅拌直到彻底溶解得到单体溶液;  
将150mg或300mg牛血清蛋白溶解在2mL的PBS中,并在室温下搅拌至完全溶解,得到牛血清蛋白溶液;  
取8mg交联剂溶解于2mLPBS中,制备成交联剂溶液;  
将所述单体溶液、所述牛血清蛋白溶液以及所述交联剂溶液混合在一起并搅拌5min,得到所述水凝胶。
4. 根据权利要求2所述的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,其特征在于:  
其中,所述单体为A型明胶,胶强度为100~500g Bloom,  
所述交联剂选自戊二醛、甲醛、京尼平和甲基丙烯酰胺中的一种或几种。
5. 根据权利要求2所述的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,其特征在于:  
其中,将所述水凝胶制备成所述水凝胶膜片的过程如下:  
将所述水凝胶加入到模具中,然后在10-40℃下反应2-10h,得到所述水凝胶膜片。
6. 根据权利要求1所述的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,其特征在于:  
其中,将所述纳米细胞囊泡加载到所述水凝胶膜片中的过程为:将所述水凝胶膜片按照0.01g:0.5mL的质量体积比浸泡在纳米细胞囊泡溶液中,该纳米细胞囊泡溶液的浓度为0.2mg/mL,通过分子的扩散运动将纳米细胞囊泡加载并固定在水凝胶膜片中,得到最终的所述含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜。
7. 根据权利要求1所述的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,其特征在于:  
其中,所述纳米细胞囊泡的制备过程包括:  
提取骨髓间充质干细胞,然后用0.25%胰酶消化于离心管中1000r离心5min,吸出上清液,用PBS重悬细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/mL。使用微型挤出机将细胞悬浮液依次通过5 $\mu$ m、1 $\mu$ m、0.2 $\mu$ m聚碳酸酯膜,每种膜挤压15次。最终挤压样品在4℃下10000g离心10min以除去细胞碎片和微囊,将离心样品在室温下用100kDa离心过滤器1000g浓缩15min后用等量PBS重悬样品再次离心,重复3次。
8. 根据权利要求1所述的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,其特征在于:

其中,提取所述骨髓间充质干细胞的过程包括:

取0~3日龄C57BL/6J乳鼠,乳鼠被吸入二氧化碳安乐死;在无菌环境下取乳鼠四肢股骨和胫骨放入抗凝缓冲溶液中,将乳鼠四肢股骨和胫骨转移至配置好的I型胶原酶溶液中并用眼科剪刀切成约1mm大小的块,在震荡培养箱37℃200r震荡1h后取出300g离心10min;最后,收集原代骨髓间充质干细胞,使用骨髓间充质干细胞完全培养基重悬细胞,并在37℃和5%二氧化碳下培养。孵育2-3天后,去除非贴壁细胞,每2-3天更新一次培养基;在约80-90%的细胞融合度下,细胞用0.25%的胰蛋白酶-EDTA消化并按照1:2传代,第三代细胞作为提取的所述骨髓间充质干细胞。

9.一种如权利要求1-8中任意一项所述的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜在糖尿病创面修复敷料中的应用。

10.根据权利要求9所述的应用,其特征在于:所述含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜在使用时,通过缓慢降解实现纳米细胞囊泡的缓释。

## 一种含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜及其在糖尿病创面修复敷料中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物医用材料和再生医学技术领域,具体涉及一种含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜及其在糖尿病创面修复敷料中的应用。

### 背景技术

[0002] 糖尿病是一类以慢性高血糖症状为主要特征的代谢性疾病,是目前全球最大流行病之一。糖尿病可引起许多并发症,约15%慢性糖尿病患者可发生糖尿病难愈合伤口。糖尿病难愈合创面已成为截肢的重要原因,其治疗周期长、费用高,且患者生活质量较差。伤口愈合是一个复杂的生物过程,其发生在创伤、烧伤或糖尿病溃疡后的皮肤组织。正常创面愈合过程包括四个阶段:止血、炎症、增殖和重塑。期间有多种细胞因子及生长因子参与。当愈合过程受到一些因素干扰时,例如微生物入侵或某些疾病将会导致伤口无法愈合并成为慢性伤口,如糖尿病伤口。通常,糖尿病会导致血管生成异常,持续炎症,肉芽组织形成不足,胶原含量减少等。

[0003] 间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)具有良好的再生能力,被认为适合于组织再生和伤口修复。然而,在以往的皮肤创面愈合研究中,都是将干细胞局部移植到创面或创面周围,存在着存活率低、细胞去向不可预测、细胞滞留率低、移植后移植率低等局限性。有研究表明MSCs-Exo具有与MSCs自身相似或更大的组织修复功能。更重要的是,与干细胞移植相比,Exo介导的无细胞治疗具有更大的稳定性和贮存性,无异位组织发育的风险,免疫反应的可能性更低。但由于大多数哺乳动物细胞分泌的Exo数量相对较少,且纯化过程繁琐,此外,快速、高效和可扩展的富集生产方法的缺乏,这致使Exo的研究和使用仍然受到限制。

[0004] 水凝胶由于其温和的加工条件和掺入许多生物活性剂的能力,为伤口敷料提供了巨大的优势。水凝胶可用于递送已知可加速伤口愈合的生物活性分子,通过促进血管生成和再上皮化,以及新的细胞外基质(ECM)的产生和成熟,最大化的发挥生物活性分子对受损皮肤的治疗潜力。

### 发明内容

[0005] 本发明是为了解决上述问题而进行的,目的在于提供一种含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜及其在糖尿病创面修复敷料中的应用。

[0006] 本发明提供了一种含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜,具有这样的特征,包括:水凝胶以及纳米细胞囊泡,其中,将水凝胶制备成水凝胶膜片,然后通过扩散杂交法将纳米细胞囊泡加载到水凝胶膜片中,得到含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜。

[0007] 在本发明提供的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜中,还可以具有这样的特征:其中,水凝胶以质量百分比计,其制备原料包括:

[0008] 单体 2-5%;

- [0009] 牛血清蛋白 0.5-5%；  
[0010] 交联剂 0-1%；  
[0011] 余量为PBS，  
[0012] 单体为A型明胶和/或B型明胶。

[0013] 在本发明提供的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜中，还可以具有这样的特征：其中，水凝胶的制备方法包括以下步骤：将300mg单体的颗粒放入6mL PBS中置于40℃恒温水浴磁力搅拌装置之上搅拌直到彻底溶解得到单体溶液；将150mg或300mg牛血清蛋白溶解在2mL的PBS中，并在室温下搅拌至完全溶解，得到牛血清蛋白溶液；取8mg交联剂溶解于2mLPBS中，制备成交联剂溶液；将单体溶液、牛血清蛋白溶液以及交联剂溶液混合在一起并搅拌5min，得到水凝胶。

[0014] 在本发明提供的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜中，还可以具有这样的特征：其中，单体为A型明胶，胶强度为100~500g Bloom，交联剂选自戊二醛、甲醛、京尼平和甲基丙烯酰胺中的一种或几种。

[0015] 在本发明提供的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜中，还可以具有这样的特征：其中，将水凝胶制备成水凝胶膜片的过程如下：将水凝胶加入到模具中，然后在10-40℃下反应2-10h，得到水凝胶膜片。

[0016] 在本发明提供的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜中，还可以具有这样的特征：其中，将纳米细胞囊泡加载到水凝胶膜片中的过程为：将水凝胶膜片按照0.01g:0.5mL的质量体积比浸泡在纳米细胞囊泡溶液中，该纳米细胞囊泡溶液的浓度为0.2mg/mL，通过分子的扩散运动将纳米细胞囊泡加载并固定在水凝胶膜片中，得到最终的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜。

[0017] 在本发明提供的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜中，还可以具有这样的特征：其中，纳米细胞囊泡的制备过程包括：提取骨髓间充质干细胞，然后用0.25%胰酶消化于离心管中1000r离心5min，吸出上清液，用PBS重悬细胞，调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/mL。使用微型挤出机将细胞悬浮液依次通过5 $\mu$ m、1 $\mu$ m、0.2 $\mu$ m聚碳酸酯膜，每种膜挤压15次。最终挤压样品在4℃下10000g离心10min以除去细胞碎片和微囊，将离心样品在室温下用100kDa离心过滤器1000g浓缩15min后用等量PBS重悬样品再次离心，重复3次。

[0018] 在本发明提供的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜中，还可以具有这样的特征：其中，提取骨髓间充质干细胞的过程包括：取0~3日龄C57BL/6J乳鼠，乳鼠被吸入二氧化碳安乐死；在无菌环境下取乳鼠四肢股骨和胫骨放入抗凝缓冲溶液中，将乳鼠四肢股骨和胫骨转移至配置好的I型胶原酶溶液中并用眼科剪刀切成约1mm大小的块，在震荡培养箱37℃200r震荡1h后取出300g离心10min；最后，收集原代骨髓间充质干细胞，使用骨髓间充质干细胞完全培养基重悬细胞，并在37℃和5%二氧化碳下培养；孵育2-3天后，去除非贴壁细胞，每2-3天更新一次培养基；在约80-90%的细胞融合度下，细胞用0.25%的胰蛋白酶-EDTA消化并按照1:2传代，第三代细胞作为提取的骨髓间充质干细胞。

[0019] 本发明还提供了上述含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜在糖尿病创面修复敷料中的应用。

[0020] 在本发明提供的上述应用中，还可以具有这样的特征：其中，含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜在使用时，通过缓慢降解实现纳米细胞囊泡的缓释。

[0021] 发明的作用与效果

[0022] 根据本发明所涉及的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜及其在糖尿病创面修复敷料中的应用,因为通过扩散杂交法将纳米细胞囊泡加载到水凝胶膜片中,从而得到含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜(NV@BSA-GEL),因此,该水凝胶膜具有优异的促细胞增殖、迁移、成管抗炎、抗氧化和抗菌性能,并能按需降解,可缓释纳米细胞囊泡(NV),能够显著加快糖尿病创面的愈合。

[0023] 另外,糖尿病创伤暴露在高血糖、缺氧和氧化应激升高的环境中,这对皮肤细胞的迁移和生存提出了挑战。创面敷料应促进这些真皮细胞的粘附、迁移和增殖。成纤维细胞和内皮细胞是存在于外表皮层的主要细胞类型,它们在受伤时从伤口边缘迁移到表皮屏障,以关闭伤口。发明人研究了NV@BSA-GEL对体外高血糖条件下HUVEC和NIH-3T3细胞的影响。水凝胶膜中缓释的NV可促进NIH-3T3和HUVEC细胞的增殖及迁移以及HUVEC细胞血管生成。因此,本发明的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜(NV@BSA-GEL)特别适合作为糖尿病创面修复的敷料使用。

[0024] 此外,糖尿病伤口会引起持续的炎症,而本发明的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜(NV@BSA-GEL)中缓释的NV可通过对单核巨噬细胞的化学激活作用,使巨噬细胞转化为M2型,M2型巨噬细胞能够分泌抗炎因子,降低炎症反应,有利于糖尿病伤口愈合。

[0025] 另外,本发明的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜(NV@BSA-GEL),保证了在一段时间内伤口处一直有充足的NV的补充,进而实现对糖尿病伤口微环境的持续调节,促进修复,这为伤口提供了较长的愈合时间,避免了持续更换敷料给患者带来的病痛。同时,水凝胶作为一种含水量较高的材料,为糖尿病慢性创面溃疡提供湿润的修复和愈合环境,减少伤口在恢复阶段因干燥带来的瘙痒、疼痛等问题。

[0026] 此外,因为本发明水凝胶以商用牛血清蛋白、明胶和京尼平为原料,通过一锅法制备得到,制备方法简单,无有机溶剂残留,反应条件温和,同时操作简单、原料成本低。

[0027] 另外,因为本发明的纳米细胞囊泡通过细胞挤出法制得,不仅与外泌体大小、形态及功能类似且产量要高于外泌体。

## 附图说明

[0028] 图1为本发明的实施例1中纳米细胞囊泡(NV)的制备及表征图。

[0029] 图2为本发明的实施例2中含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜的制备图。

[0030] 图3为本发明的实施例2中含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜吸附NV图。

[0031] 图4为本发明的实施例3中含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜(NV@BSA-GEL)促高糖条件下培养的NIH-3T3及HUVEC细胞增殖、迁移、成管的作用图。

[0032] 图5为本发明的实施例3中含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜(NV@BSA-GEL)促巨噬细胞极化图。

[0033] 图6为本发明的实施例3中小鼠糖尿病创面修复过程图:(A)用对照组、BSA-GEL、NV@BSA-GEL处理的小鼠伤口愈合过程的代表性图像;(B)伤口愈合模拟图;(C)不同时间点的伤口闭合率。

[0034] 图7为本发明的实施例3中伤口组织的病理检查:(A)伤口H&E染色;(B)伤口组织切片的MASSON染色;(C)术后21d表皮厚度分析;(D)术后21d新生真皮附属器分析;(E)masson

染色胶原纤维的定量。

[0035] 图8为本发明的实施例3中伤口组织的表皮分化,在上皮化结果:(A)创面组织切片角蛋白免疫组化染色;(B)角蛋白免疫组化染色结果统计分析。

[0036] 图9为本发明的实施例3中伤口组织的血管和毛细血管生长结果:(A)使用CD31抗体和 $\alpha$ -SMA抗体对创面组织切片进行荧光染色;(B)半定量分析结果。

### 具体实施方式

[0037] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,以下实施例结合附图对本发明含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜及其在糖尿病创面修复敷料中的应用作具体阐述。

[0038] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在限制本发明。本文所使用的术语“及/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0039] 如无特殊说明,本发明实施例所涉及的除纳米细胞囊泡的试剂均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。

[0040] 本发明的NIH-3T3和RAW 264.7巨噬细胞购于上海酶研生物科技有限公司,HUVECs购于上海迪医明生物科技有限公司;SPF级0-3天内C57BL/6J乳鼠用于骨髓间充质干细胞原代细胞培养;SPF级7-8周龄约20g雄性C57BL/6J小鼠36只用于糖尿病创面模型,C57BL/6J小鼠购于辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号:SCXK(辽)2015-0001,饲养于牡丹江医学院比较医学中心,获得牡丹江医学院动物实验伦理委员会批准,所有动物护理、饲养和处死程序均按照国家动物实验法规《实验动物管理条例(2017年修订)》执行。

[0041] 本研究经牡丹江医学院动物伦理委员会批准,本发明的所有数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差表示。统计学意义的测量采用单因素方差分析(one-wayANOVA),多重比较采用LSD-t检验与指示性对照,如果数据未通过正态性检验,则采用Tamhane's T2检验。P值 $< 0.05$ 为差异有统计学意义的判断标准。

[0042] <实施例1>

[0043] 实施例1为纳米细胞囊泡的制备及表征。

[0044] 实施例1中的纳米细胞囊泡的制备包括以下步骤:

[0045] 步骤一,骨髓间充质干细胞(BMSCs)的提取。

[0046] 取0~3日龄C57BL/6J乳鼠,乳鼠被吸入二氧化碳安乐死。在无菌环境下取乳鼠四肢股骨和胫骨放入抗凝缓冲溶液中,将乳鼠四肢股骨和胫骨转移至配置好的I型胶原酶溶液中并用眼科剪刀切成约1mm大小的块,在震荡培养箱37 $^{\circ}$ C 200r震荡1h后取出300g离心10min。最后,收集原代骨髓间充质干细胞,使用骨髓间充质干细胞完全培养基重悬细胞,并在37 $^{\circ}$ C和5%二氧化碳下培养。孵育2-3天后,去除非贴壁细胞,每2-3天更新一次培养基。在约80-90%的细胞融合度下,细胞用0.25%的胰蛋白酶-EDTA消化并按照1:2传代,第三代细胞作为提取的骨髓间充质干细胞。

[0047] 步骤二,利用骨髓间充质干细胞(BMSCs)制备纳米细胞囊泡(NV)。

[0048] 将BMSCs用0.25%胰酶消化于离心管中1000r离心5min,吸出上清液,用PBS(pH

7.4) 重悬细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/mL。使用微型挤出机将细胞悬浮液依次通过 $5\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ 、 $0.2\mu\text{m}$ 聚碳酸酯膜,每种膜挤压15次。最终挤压样品在 $4^\circ\text{C}$ 下 $10000\text{g}$ 离心10min以除去细胞碎片和微囊。将离心样品在室温下用 $100\text{kDa}$ 离心过滤器 $1000\text{g}$ 浓缩15min后用等量PBS重悬样品再次离心,重复3次,最终样品在 $-80^\circ\text{C}$ 下保存。利用骨髓间充质干细胞(BMSCs)制备纳米细胞囊泡如图1A所示。

[0049] 纳米细胞囊泡的表征

[0050] (一)透射电子显微镜(TEM)观察纳米细胞囊泡的形态

[0051] NV在2%多聚甲醛中分散5min,然后将NV悬浮液溶液装入碳涂层铜网格上,室温孵育10min,用1%醋酸铀酰溶液染色2min。在室温下干燥后,用透射电镜观察样品。结果如图1B透射电镜显示,纳米细胞囊泡(NV)具有完整的膜结构,呈典型的杯状形态。

[0052] (二)纳米细胞囊泡动态光散射(DLS)

[0053] 用ZetasizerNano测量纳米细胞囊泡的大小。将 $200\mu\text{L}$ 的悬液( $80\mu\text{g}/\text{mL}$ )稀释在 $1.8\text{mL}$   $\text{H}_2\text{O}$ 中制备样品。将溶液转移到 $1\text{mL}$ 聚苯乙烯比色管中进行分析。结果如图1C利用Malvern激光粒度分析仪检测纳米细胞囊泡的平均粒径,数据显示纳米细胞囊泡的平均粒径为 $147.1\text{nm}$ 。

[0054] (三)纳米细胞囊泡纳米颗粒跟踪分析(NTA)

[0055] 将纳米细胞囊泡(NV)用PBS稀释至 $1\text{mL}$ ,摇匀后,转入 $1\text{mL}$ 注射器。纳米细胞囊泡的粒子浓度和粒径分布由NTA探测器NanoSight NS300测量。结果如图1D所示,纳米细胞囊泡的平均粒子浓度为 $1.08 \times 10^9$ 粒子/mL。

[0056] (四)纳米细胞囊泡表面标志物检测

[0057] 使用BCA试剂盒检测纳米细胞囊泡蛋白浓度。每个样本测三次,取平均值,蛋白浓度单位为 $\text{mg}/\text{mL}$ 。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纳米细胞囊泡表面标志物CD63、CD9及calnexin的表达情况。结果如图1E所示,纳米细胞囊泡与外泌体同时都具有阳性标记,如CD63,CD9,阴性标记,如calnexin。说明纳米细胞囊泡与外泌体类似。

[0058] (五)纳米细胞囊泡体外摄取

[0059] 将 $500\mu\text{L}$ 的NV( $40\mu\text{g}/\text{mL}$ )与等体积的Dil在 $1.5\text{mL}$ 的EP管中孵育20min。然后,在 $4^\circ\text{C}$ 下,以 $5000\text{g}$ 离心10min。待细胞贴壁后,才将标记的NV加入培养皿中与细胞共孵育。24h后,取出小皿用PBS洗涤3次,DAPI染色15min,用PBS清洗3次后在共聚焦显微镜下观察纳米细胞囊泡被细胞摄取情况并拍照记录。结果如图1F所示,共聚焦图像显示纳米细胞囊泡通过细胞膜被有效地内在化到靶细胞中,并分布在细胞质中。结果如图1F所示,共聚焦图像显示纳米细胞囊泡通过细胞膜被有效地内在化到靶细胞中,并分布在细胞质中。

[0060] <实施例2>

[0061] 实施例2为含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜的制备。含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜的制备如图2所示,其制备过程包括以下步骤:

[0062] 步骤一,制备水凝胶。具体如下:

[0063] 步骤1,将 $300\text{mg}$ A型明胶颗粒以5% (w/v)的浓度溶解在 $6\text{mL}$ 的PBS (pH 7.4)中,并在 $40^\circ\text{C}$ 下搅拌至完全溶解,得到单体溶液。其中,A型明胶颗粒的胶强度为 $100 \sim 500\text{g Bloom}$ 。

[0064] 步骤2,将 $300\text{mg}$ 牛血清蛋白溶解在 $2\text{mL}$ 的PBS (pH 7.4)中,并在室温下搅拌至完全溶解,得到牛血清蛋白溶液;



[0065] 步骤3,将单体溶液和牛血清蛋白溶液混合在一起并搅拌5min,得到液体状的水凝胶。

[0066] 步骤二,利用水凝胶制备水凝胶膜片。具体如下:

[0067] 将液体状的水凝胶加入到模具中,然后在37℃下反应7h,得到水凝胶膜片(BSA-GEL)。

[0068] 步骤三,利用水凝胶膜片和实施例1的纳米细胞囊泡制备含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜(NV@BSA-GEL)。具体如下:

[0069] 将水凝胶(0.01g)浸泡在NV溶液(0.5mL,0.2mg/mL)中,通过分子的扩散运动将纳米细胞囊泡加载并固定在水凝胶膜片中,产生最终的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜。其中,NV溶液是将纳米细胞囊泡(NV)的PBS溶液。所有的样品都通过冷冻干燥器干燥。纳米细胞囊泡(NV)的吸附如图3所示。

[0070] <实施例3>

[0071] 实施例3为对实施例2制备的含有纳米细胞囊泡的水凝胶膜(NV@BSA-GEL)相关性进行检测,具体如下。

[0072] (一)NV@BSA-GEL促细胞增殖测试

[0073] 取对数生长期的NIH-3T3细胞和HUVECs用0.25%的胰酶消化,离心后用完全培养基(含有25mM葡萄糖)将细胞制成单细胞悬浮液。将细胞浓度调整为 $5 \times 10^4$ 个/mL。在96孔板每孔中加入100 $\mu$ L细胞悬液,在5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。待细胞贴壁后,分别加入PBS、纳米细胞囊泡(NV)、BSA-GEL和NV@BSA-GEL。孵育24h(n=3/组)后,每孔加10 $\mu$ L MTT溶液继续孵育。4h后吸出96孔板中液体加入100 $\mu$ L DMSO。最后,使用酶标仪检测490nm处的吸光度值。实验重复3次。细胞存活率=(实验组的OD值-空白组的OD值)/(对照组的OD值-空白组的OD值) $\times 100\%$ 。

[0074] 结果如图4A、4B所示,MTT实验结果显示,NV、BSA-GEL、NV@BSA-GEL对在高糖条件下培养的NIH-3T3细胞和HUVECs的增殖均有影响。且与对照组相比,NV、BSA-GEL和NV@BSA-GEL处理组,NIH-3T3细胞和HUVECs活细胞数量明显增加(\*\*P<0.05)。从实验结果中可以看出BSA-GEL组也促进了细胞增殖。说明BSA-GEL水凝胶本身也具有一定促细胞增殖作用。BSA-GEL负载NV后,由于其对NV的缓释作用,使其具有了更强的促增殖作用。

[0075] (二)NV@BSA-GEL促细胞迁移试验

[0076] 采用Transwell细胞迁移实验验证细胞迁移。首先分别将NIH-3T3细胞和HUVECs制备成单细胞悬液。用无血清培养基(含有25mM葡萄糖)调整细胞浓度至 $5 \times 10^4$ 个/mL。在上室加入200 $\mu$ L细胞悬液,每组分别加入PBS、NV、BSA-GEL和NV@BSA-GEL。在下室加入完全培养基(含有20%血清),24h后,取出上室用PBS洗涤2次。上室用4%甲醛固定20min,用PBS清洗3次。结晶紫染色15min,用PBS清洗3次后用湿棉签小心地擦拭上室膜内侧残留在的细胞。最后在光学显微镜下观察细胞迁移情况并拍照记录。使用ImageJ计算细胞迁移数。

[0077] 结果如图4C、4D所示,NV、BSA-GEL和NV@BSA-GEL处理组都对高糖条件下培养的NIH-3T3细胞和HUVECs细胞的细胞迁移有明显的促进作用。NV@BSA-GEL处理组细胞迁移数量最高,显著高于对照组(\*\*P<0.001)。细胞迁移数量统计结果如图3F、3G所示。

[0078] (三)NV@BSA-GEL促血管形成试验

[0079] 将96孔板放在冰上,然后在每个孔上涂上50 $\mu$ L的冷基质凝胶,然后摇晃。然后,将

96孔板放在加湿培养箱中,在含5%二氧化碳的加湿培养箱中培养45min待胶凝结。收集HUVECs后,用细胞培养液(含有25mM葡萄糖)重悬HUVECs并调整细胞浓度为 $2 \times 10^5$ 个/mL,取50 $\mu$ L接种到Matrigel上,分别加入PBS、NV、BSA-GEL和NV@BSA-GEL,4h后在光学显微镜下观察HUVECs血管生成情况。使用ImageJ测量生成血管的连接点数量和分支数量。

[0080] 纳米细胞囊泡可正向调控在高糖条件下培养的HUVECs的血管生成。如图4E所示,与对照组相比,NV以及NV@BSA-GEL处理组均显著促进HUVECs的血管生成(\* $P < 0.05$ )。如图4H-I所示,与BSA-GEL或NV组相比,NV@BSA-GEL组处理的HUVECs细胞具有更好的成管性能,所形成的血管管数更高,管状结构更完整(\*\* $P < 0.01$ )。这一结果表明,NV的持续释放可以对血管生成产生强有力的影响,类似于之前的研究中外泌体可以加速血管生成。

[0081] (四)NV@BSA-GEL抗炎性能表征

[0082] 具有体外抗炎活性的RAW264.7巨噬细胞在6孔细胞培养板中培养。孵育12h后,用100ng/mL脂多糖(LPS)刺激细胞。然后,加入NV(2mL,40 $\mu$ g/mL)、BSA-GEL或NV@BSA-GEL水凝胶(含80 $\mu$ g NV)。孵育24小时后,按照制造商的说明,使用HP TRIzol RNA试剂盒从细胞中提取总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒获得cDNA。然后使用iTaq SYBR Green超混合和7900HT快速实时PCR系统进行实时定量RT-PCR。使用管家基因b-肌动蛋白作为一个内部控制。结果证实了NV和NV@BSA-GEL水凝胶处理显著降低了LPS刺激的巨噬细胞中CD86的表达,并显著增加了CD206的表达(图5)。同样,在LPS处理的巨噬细胞中,炎症细胞因子基因包括白细胞介素6(IL-6)和一氧化氮合酶(iNOS)的表达也显著降低,而抗炎标志物,如精氨酸酶(Arg1)和白细胞介素10(IL-10)水凝胶处理的表达显著增加。这些结果表明,NV和NV@BSA-GEL水凝胶可以有效抑制巨噬细胞产生促炎细胞因子,促进巨噬细胞向抗炎M2表型极化。

[0083] (五)糖尿病小鼠创面模型制备及伤口愈合率分析

[0084] 选取体重22-25g C57/BL6J雄性小鼠共36只。禁食12h后,小鼠腹腔注射链脲佐菌素(STZ,100mg/kg)连续2天,2周后用血糖测试仪测小鼠空腹血糖。糖尿病小鼠定义为空腹12h,血糖水平高于16.7mM。手术前一天,36只糖尿病小鼠用电动剃须刀剃完他们的背部毛发。手术时对糖尿病小鼠采用呼吸麻醉(吸入异氟醚)。在他们的背部制造了两个直径6mm的全层皮肤伤口。用PBS、NV、BSA-GEL和NV@BSA-GEL覆盖创面( $n=3$ )。所有接受治疗的老鼠都单笼饲养,并在整个过程中密切观察。分别在第0、7、14、21天拍摄小鼠伤口愈合情况,用ImageJ软件根据公式计算创面面积比。创面面积比(%) =  $(WA_0 - WA_t) / WA_0 \times 100\%$   $WA_0$ :初始创面面积; $WA_t$ :愈合后创面面积

[0085] 结果显示术后21天,各组创面面积均下降(图6A、B)。与接受假手术的对照组小鼠相比,植入NV、BSA-GEL水凝胶或NV@BSA-GEL水凝胶的小鼠术后7天和14天的创面修复率显著提高( $P < 0.05$ ) (图6C)。NV@BSA-GEL水凝胶处理的小鼠创面修复速度最快,到第14天,对照组的伤口仅部分闭合,而NV@BSA-GEL组的创面完全闭合。对修复过程中创面面积的定量分析显示,NV@BSA-GEL水凝胶处理小鼠、NV处理小鼠和BSA-GEL水凝胶处理小鼠在21d时创面愈合率分别为99.0%、95.8%和92.97%,显著高于对照组(83.5%)。这可能部分是因为NV更容易在细胞外环境中失活,导致NV无法在伤口中持续产生生物学效应。在NV@BSA-GEL水凝胶组中,BSA-GEL对NV的保护扩展了它们的生物活性,我们的假设是这些NV继续被释放,导致伤口的增加、持续和快速愈合。

[0086] (六)小鼠糖尿病创面愈合部位组织学检测

[0087] 具体操作为:创面诱导后第7、14、21天,每组脱颈处死3只糖尿病小鼠,切除创面,随后进行后续实验。切除的伤口组织,随机分成两组,一组用聚甲醛固定24h,然后用石蜡包埋,另一组使用OTC胶固定放入液氮速冻,-80℃保存。

[0088] 石蜡切片是切成5μm薄层,然后进行组织病理学研究:(1)通过苏木精和伊红染色(hematoxylin and eosin staining,H&E)后进行肉芽组织的形态结构和表皮观察;(2)通过马松染色观察胶原纤维的完整性;(3)用角蛋白观察创面处的细胞分化;

[0089] 冰冻切片是切成5μm薄层。然后进行组织病理学研究:(1)用CD31和α-SMA荧光染色血管内皮细胞观察血管新生;

[0090] 将染色的组织样本在光学显微镜和共聚焦显微镜下观察并拍照,细胞数量的统计是使用图像处理软件(imagej)进行半定量的分析。(上述检测方法均为标准检测方法)

[0091] H&E染色评价NV@BSA-GEL水凝胶治疗后的创面愈合病理情况。如图7A所示,伤口愈合是一个复杂的过程,在表皮形成过程中,处于重塑期的皮肤组织,其表皮厚度逐渐变薄。如图7C所示,H&E染色分析结果显示在21天时NV@BSA-GEL组表皮厚度与其他组相比最薄(\*\*\*\*P<0.0001)。这是由于21天时伤口处于重塑期,表皮变薄。此外,尽管单纯的NV可用于创面愈合,但NV@BSA-GEL组中NV的缓释可更有效地促进糖尿病创面的修复。如图7D所示,与空白对照组相比,NV@BSA-GEL组在第21天时创面间隙形成了大量皮肤附属物。

[0092] 体内胶原沉积分析,适当的胶原沉积和重塑可以提高组织的抗拉强度,并产生更好的愈合效果。胶原纤维的数量随着愈合时间的增加而增加,其特征是伤口部位出现大量排列良好的胶原纤维。Masson染色结果如图7BNV@BSA-GEL水凝胶通过持续释放NV从而更好的改善了胶原蛋白在伤口部位的沉积,从而加速了皮肤再生,甚至可以更好地或完全修复全厚度糖尿病伤口。如图7E所示,我们可以看到NV@BSA-GEL组和NV组处理的伤口在21天时显示出丰富的胶原纤维。

[0093] 总之,H&E和Masson染色提供的组织学结果表明,NV@BSA-GEL支架敷料非常适合糖尿病创面,NV的缓慢释放能更好的促进肉芽组织形成和胶原形成,产生皮肤附属器,最终加速糖尿病愈合过程。

[0094] (七)小鼠伤口愈合过程中在上皮化过程

[0095] 细胞角蛋白是与表皮的分化和再上皮化相关的重要生物标志物,通过免疫组化染色来评估愈合过程中细胞角蛋白的再上皮化水平。如图8A和8B所示,NV@BSA-GEL水凝胶组与其他组相比,在第21天新表皮内的细胞角蛋白染色最强。NV@BSA-GEL水凝胶处理的创面也显示出最厚的新表皮,具有分化的结构和更有组织的层,而对照组创面细胞角蛋白染色明显较低,再上皮化较少。单独NV组也能促进糖尿病创面的再上皮化,新表皮细胞角蛋白阳性染色细胞多于对照组。这一结果也证实了释放到创面部位的NV促进了上皮细胞分化,导致更强的细胞角蛋白水平和更快的再上皮化。上述数据表明NV@BSA-GEL水凝胶是一种纳米细胞囊泡的缓释系统,可更快的促进伤口处再上皮化和伤口愈合。

[0096] 综上,NV@BSA-GEL水凝胶可促进伤口处再上皮化,使糖尿病创面愈合更快更好地进行。

[0097] (八)小鼠糖尿病创面血管生成

[0098] 由于创面缺氧,血管的形成是成纤维细胞形成肉芽组织填充创面的先决条件,血管被认为对组织再生至关重要,因为它们的功能是为伤口周围的细胞提供营养和氧气。本

发明用抗体 $\alpha$ -SMA和CD31进行免疫荧光染色来评价7组创面组织7天的新生血管形成情况，观察不同处理组的新生血管形成方式和程度。结果如图9所示，NV@BSA-GEL水凝胶膜治疗的糖尿病创面中 $\alpha$ -SMA及CD31的表达明显高于其他三组(\*\*\*\* $P < 0.0001$ )。这表明NV@BSA-GEL水凝胶膜更好地促进了糖尿病伤口处血管生成。

[0099] 如图9A所示，与DSEP@PB组相比，对照组的小动脉数量明显降低。图9B的半定量结果也证实了这一点。

[0100] 这些结果表明，NV@BSA-GEL可以诱导高水平的血管生成和新生血管，从而通过适当的再上皮化，胶原沉积和皮肤层的成熟，促进伤口成功愈合。

[0101] 上述实施方式为本发明的优选案例，并不用来限制本发明的保护范围。

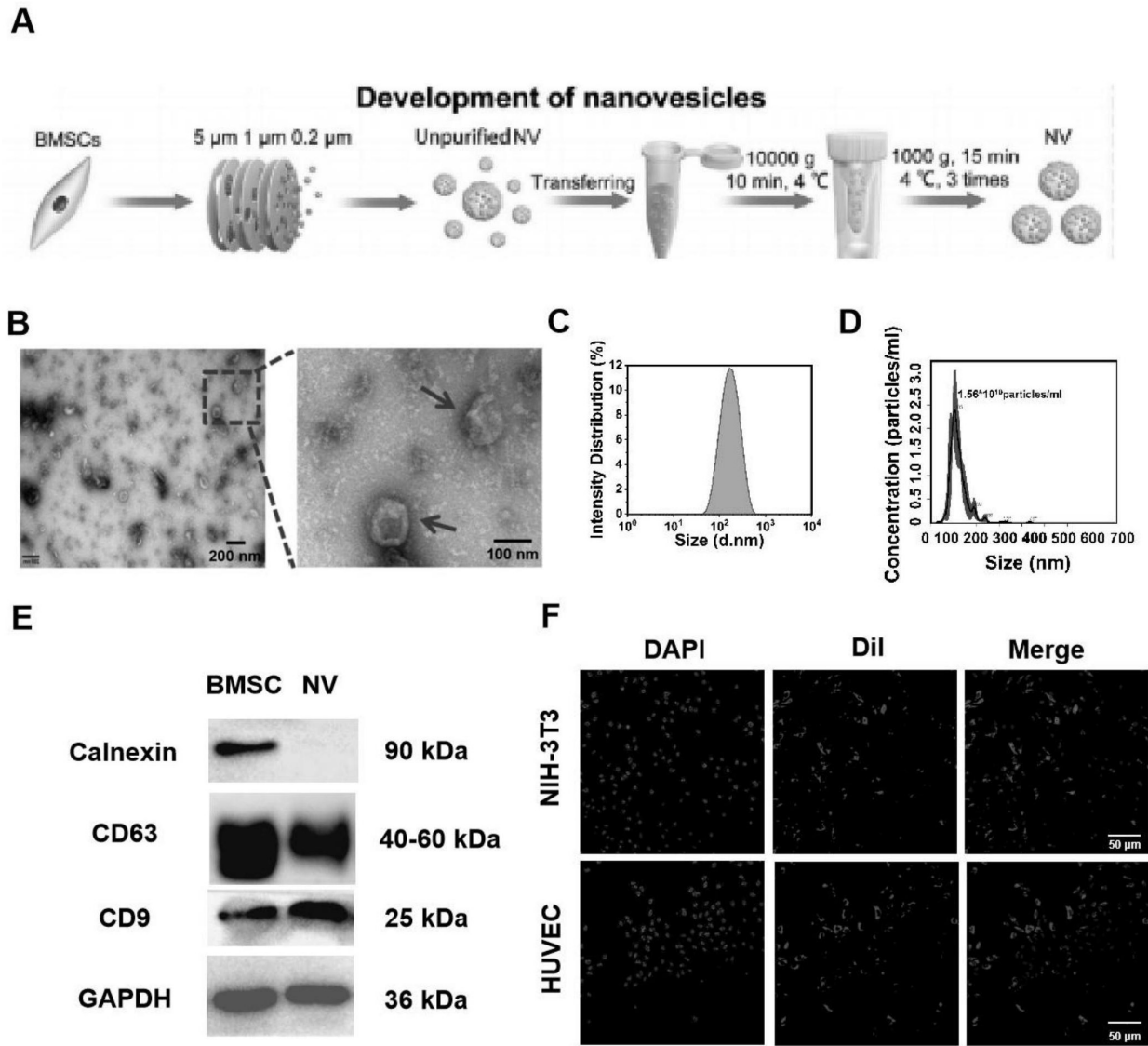


图1

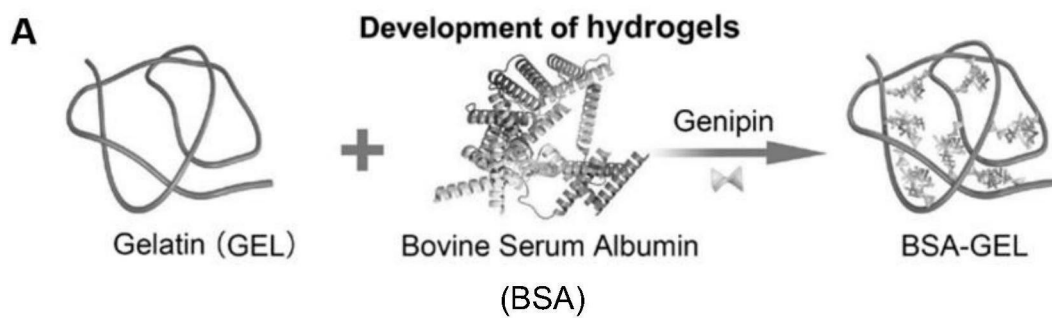


图2

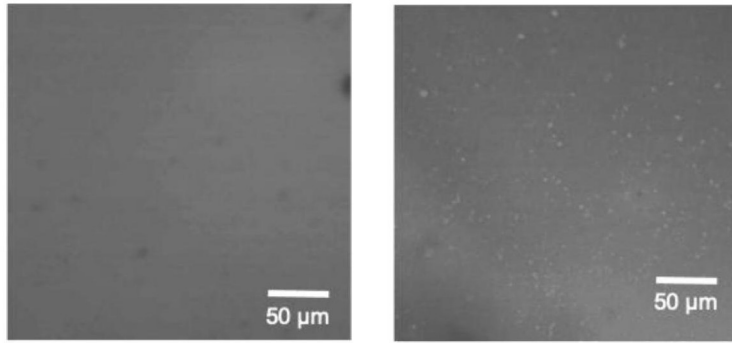


图3

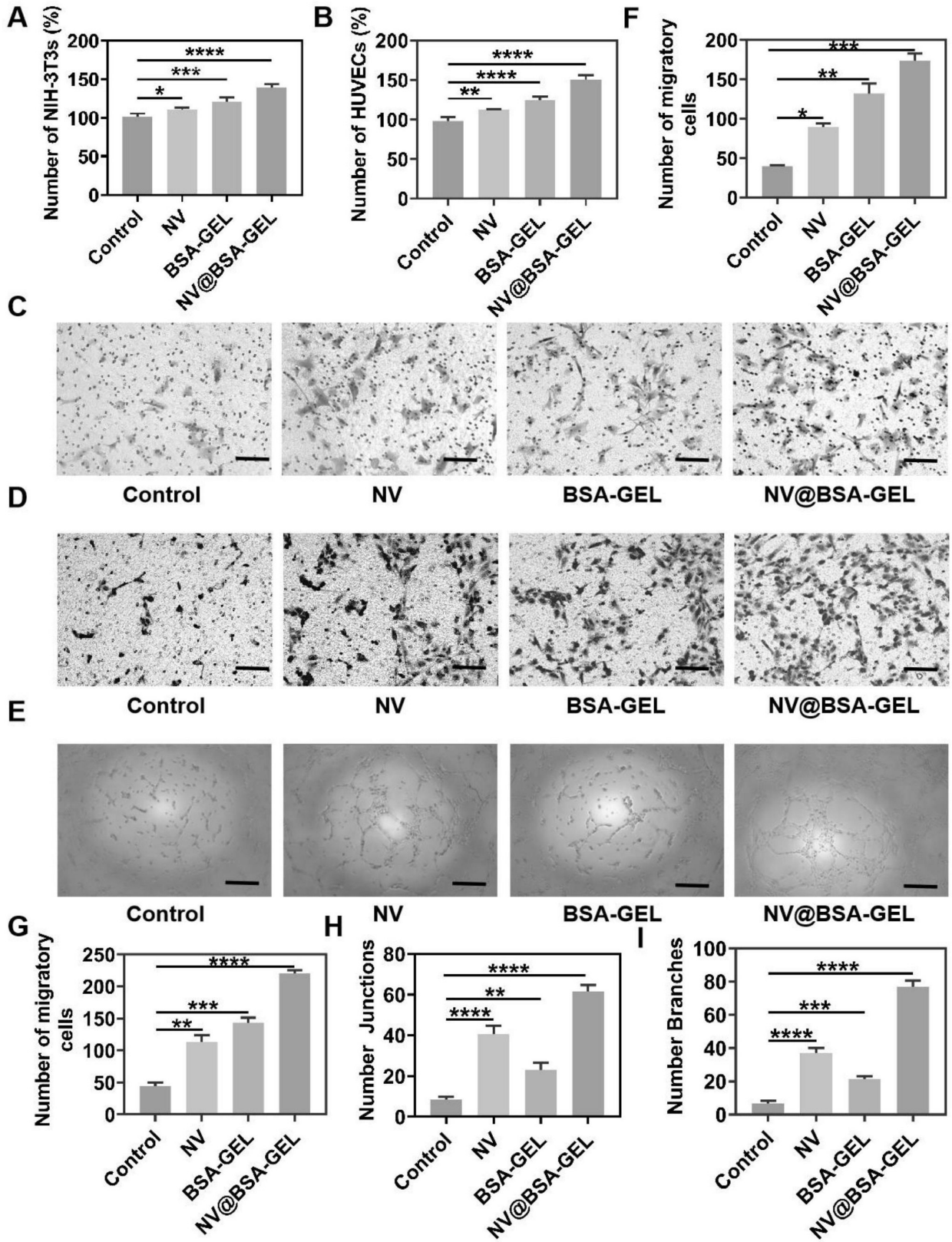


图4

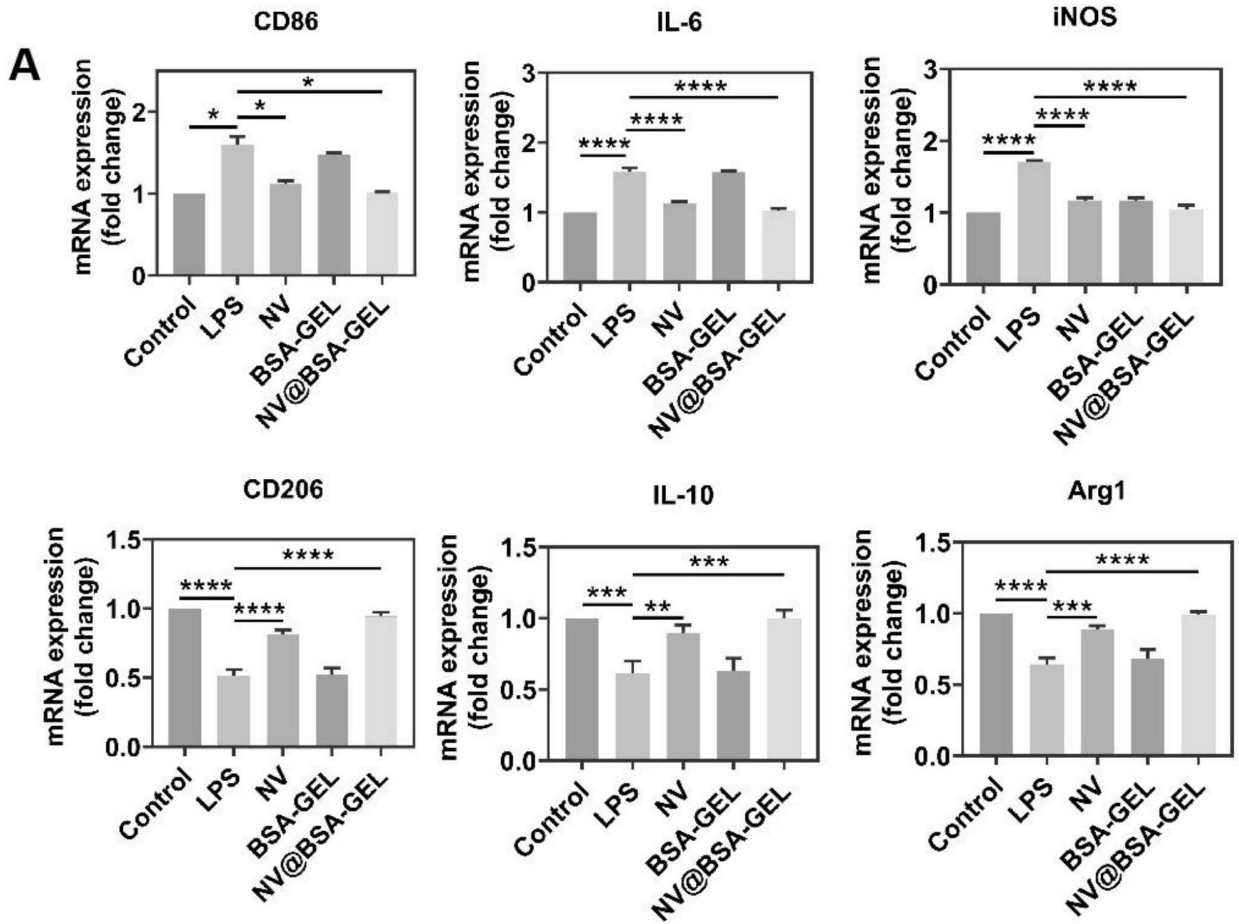


图5

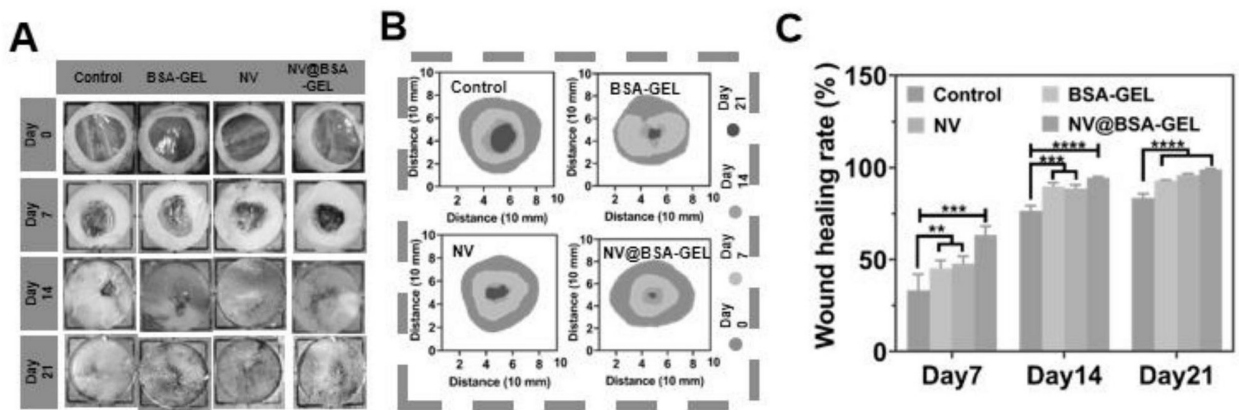


图6



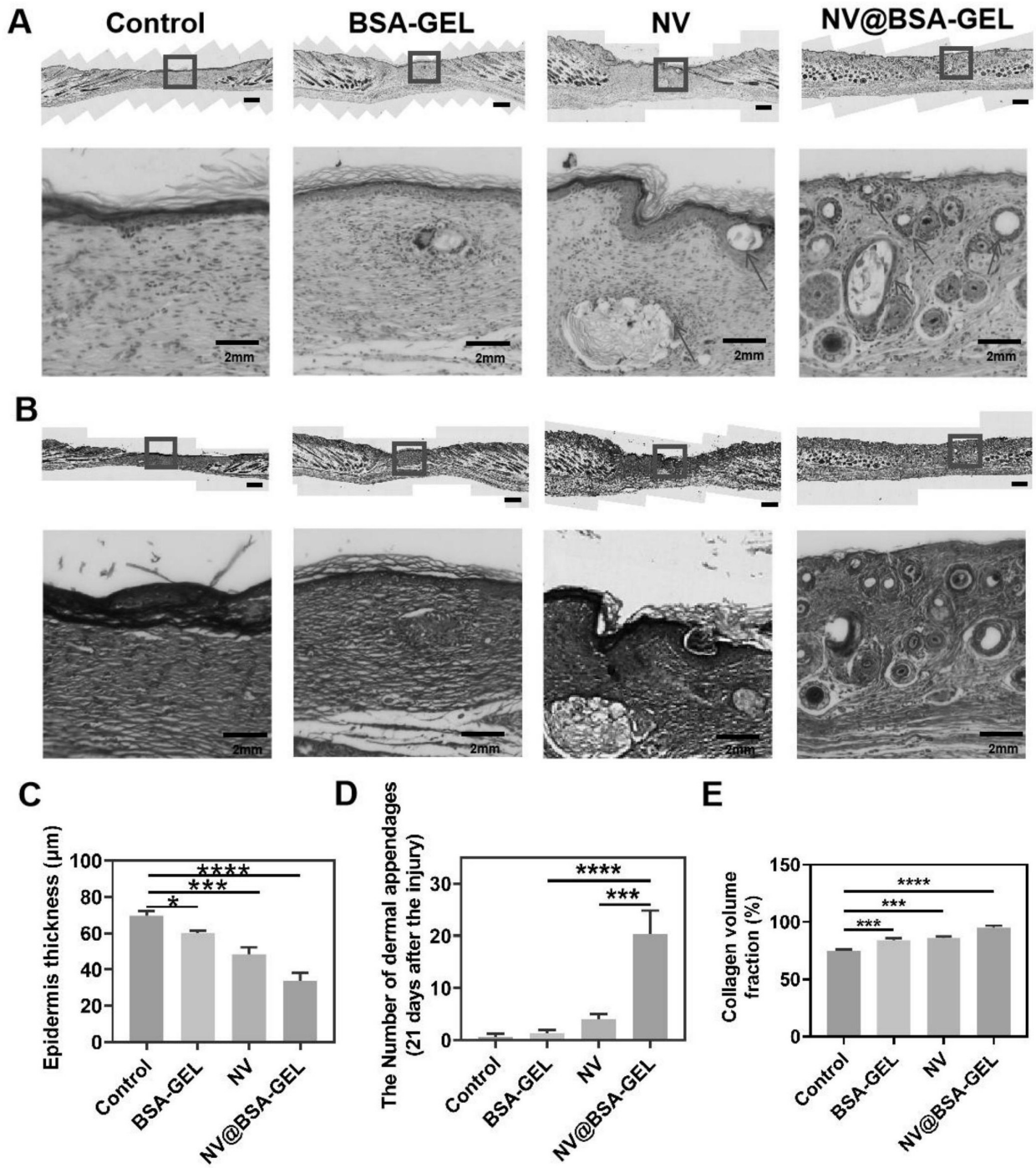


图7

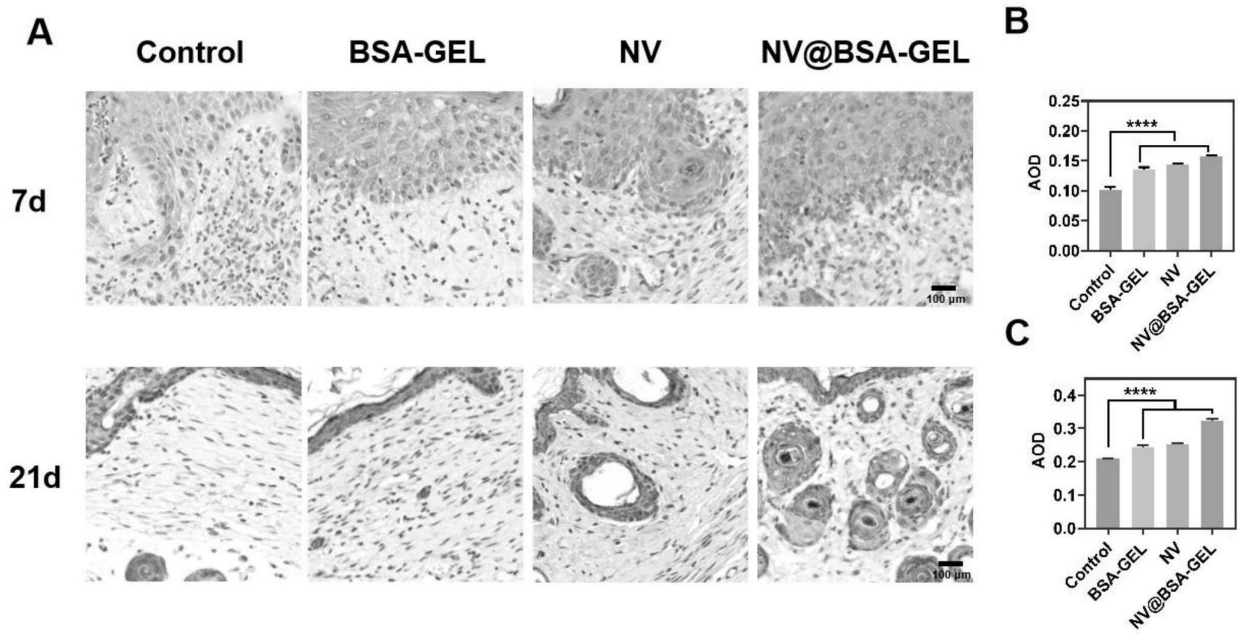


图8

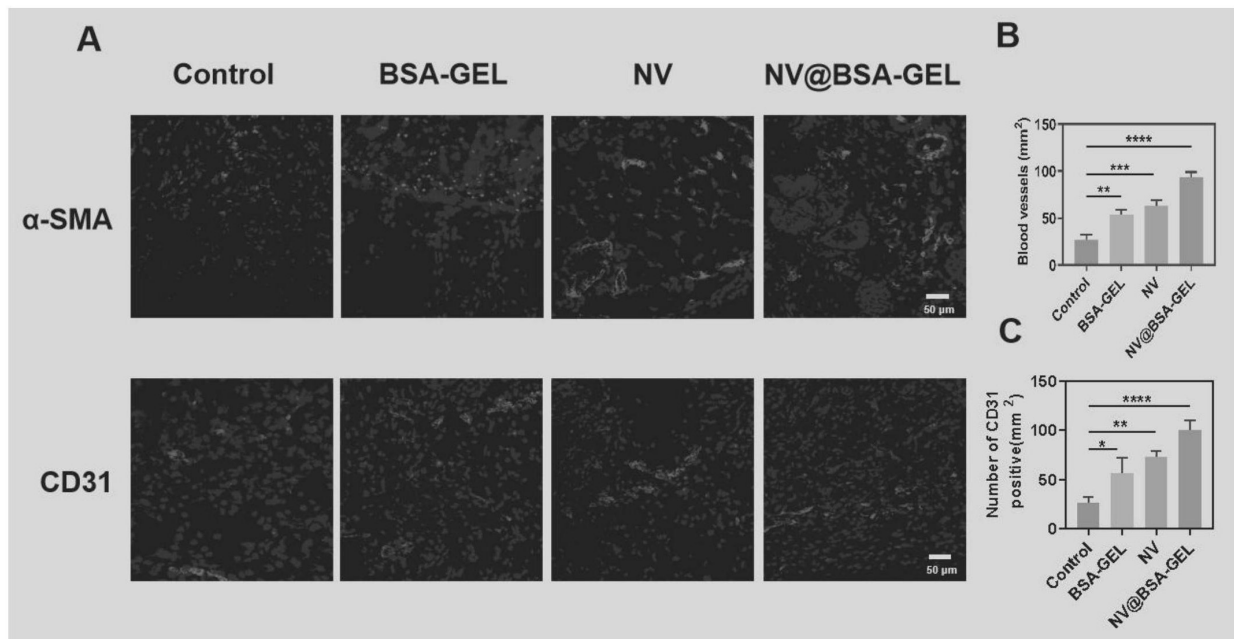


图9