



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110680949 B

(45) 授权公告日 2021.06.29

(21) 申请号 201910994497.6

A61L 26/00 (2006.01)

(22) 申请日 2019.10.18

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

US 2008195065 A1, 2008.08.14

申请公布号 CN 110680949 A

审查员 梁玉平

(43) 申请公布日 2020.01.14

(73) 专利权人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号

(72) 发明人 吴钧 洗彩虹 顾志鹏 刘桂廷

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 李小婷

(51) Int. Cl.

A61L 15/40 (2006.01)

A61L 15/44 (2006.01)

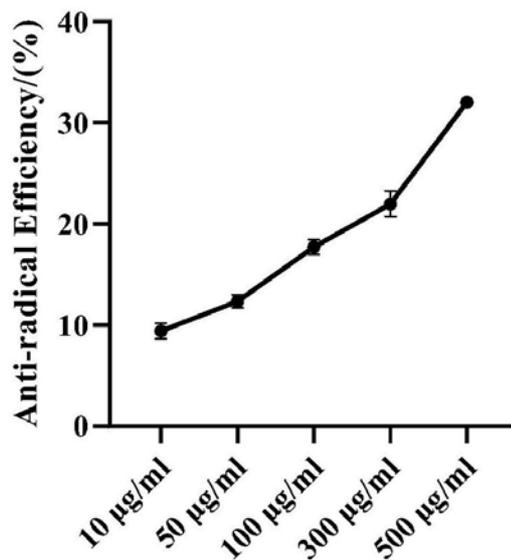
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54) 发明名称

一种基于母乳的创伤敷料的制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于母乳的创伤敷料的制备方法和应用。本发明提供了一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,包括以下步骤:S1.将母乳冻干后,溶解于生物相容性溶剂中,得到母乳溶液;其中,步骤S1所述母乳溶液的浓度大于或等于1 μg/mL;S2.将步骤S1得到的母乳溶液过滤除菌,即可得到所述创伤敷料。该创伤敷料具有较低的免疫原性,不会导致机体产生额外的炎症反应;能够清除羟基自由基和细胞内活性氧,提高细胞的增殖率,促进成纤维细胞和内皮细胞的迁移,增强内皮细胞成血管能力;调控巨噬细胞的M2表型,促进毛囊再生,使得愈合伤口正常化。另外,创伤敷料的材料来源于食物母乳,绿色安全,且制备工艺简便,具有广阔的推广应用前景。



1. 一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 将母乳冻干后,溶解于生物相容性溶剂中,得到母乳溶液;

S2. 将步骤S1得到的母乳溶液过滤除菌,即可得到所述创伤敷料;

步骤S2中,将步骤S1得到的母乳溶液过滤后,再将其加入至生物相容性基质中,灭菌,即得;

步骤S1所述母乳溶液的浓度为1~10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$;步骤S1所述冻干的时间为2~8d;所述冻干的温度为-50 $^{\circ}\text{C}$ ~-30 $^{\circ}\text{C}$;

步骤S1所述生物相容性溶剂选自水、PBS缓冲液或液体培养基中的一种或几种,所述水为自来水、去离子水、蒸馏水或超纯水中的一种或几种;所述PBS缓冲液的pH值为6.5~7.5;所述液体培养基选自DMEM液体培养基、MEM液体培养基、RPMI 1640液体培养基、F12液体培养基或IMDM液体培养基中的一种或几种。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S2所述生物相容性基质为医用纱布、医用海绵、医用泡沫或水凝胶中的一种或几种。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S2所述过滤除菌为用针头除菌过滤器进行过滤除菌;所述针头除菌过滤器的滤头为0.1~0.8 μm 的微孔除菌过滤膜。

4. 权利要求1~3任一所述方法制备得到的基于母乳的创伤敷料。

5. 权利要求4所述创伤敷料在作为或制备促进创伤修复和/或减少瘢痕组织形成的产品或制品中的应用。

一种基于母乳的创伤敷料的制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域。更具体地,涉及一种基于母乳的创伤敷料的制备方法和应用。

背景技术

[0002] 皮肤是人体最大的器官,其功能包括抵御微生物和调节体温等。因此,皮肤一旦受伤,有必要迅速加快伤口愈合以避免进一步形成慢性伤口。更重要的是,皮肤修复有一个相当大的缺陷,即严重受损的皮肤可以愈合、但不能再生,并会形成瘢痕;这些瘢痕的形成不仅仅是外观上的缺陷,还会妨碍人体的正常运动,使人体因缺少汗腺而阻止身体降温,导致人体的体温升高、代谢紊乱。虽然瘢痕看起来比正常皮肤厚,但实际上其弹性较正常皮肤的差,严重妨碍了皮肤组织的正常功能。幸运的是,一旦在皮肤伤口处长出毛囊,皮肤就会趋向于正常化。因此,在加快伤口愈合的同时,促进皮肤组织重建和伤口处的毛囊再生,在促进创伤修复和减少瘢痕组织形成方面起到了至关重要的作用。

[0003] 现有的治疗创伤的药物,西药常使用有消炎、抗菌和镇痛等作用的药物,如抗生素、银盐等,主要以消炎止痛抗菌为主;但由于存在副作用较大,对深度创面的促进肌肤组织再生能力差,瘢痕修复效果不理想和价格昂贵等缺点,所以其临床应用存在一定的局限性。而中药常使用有消炎、生肌和去热毒等作用的创伤膏,如京万红、美愈伤膏、宝湿润烧伤膏等;但它们均有不少自身的不足,如主要为祖传秘方或临床验方,有较久的使用历史,主要凭借用药经验,缺乏系统的药理研究实验数据论证疗效。当前市场也有一些用于治疗瘢痕的药物,如激素类药物、抗肿瘤药物、P物质抑制剂、细胞因子和免疫抑制剂等;但是这些药物价格昂贵,制作过程繁琐,效果不一,且存在一定程度的不良反应。

[0004] 因此,亟需研究开发更多的药物或生物材料,以为促进创伤修复和减少瘢痕组织形成提供更加有效的途径。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有治疗创伤的药物的缺陷和不足,提供一种基于母乳的创伤敷料及其制备方法和应用。

[0006] 本发明研究了基于母乳的创伤敷料对创伤修复三个阶段(炎症期、增殖期和重塑期)的影响,发现其具有较低的免疫原性,不会额外加重炎症反应,具有良好的生物相容性;在创伤修复的炎症期,可促进内皮细胞迁移,具有抗氧化性质,能清除自由基和细胞应激产生的活性氧,为加快愈合提供支持,同时可调节M2型巨噬细胞表型,促进后期毛囊形成,对抑制瘢痕组织的形成发挥积极作用;在增殖期,能提高炎症期造成氧化应激细胞的增殖率,促进成纤维细胞迁移和血管形成,为加快伤口愈合做贡献;在重塑期,促进胶原蛋白和胺聚糖的合成,为结构重塑做准备,也可促进巨噬细胞向M2型转化,使形成的胶原纤维整齐排列,促进创面组织修复,且抑制或减少瘢痕的形成。

[0007] 本发明的目的是提供一种基于母乳的创伤敷料。

- [0008] 本发明的另一目的是提供所述基于母乳的创伤敷料的制备方法。
- [0009] 本发明的再一目的是提供所述创伤敷料在作为或制备促进创伤修复和/或减少瘢痕组织形成的产品或制品中的应用。
- [0010] 本发明上述目的通过以下技术方案实现：
- [0011] 本发明首先提供了一种基于母乳的创伤敷料，包括以下步骤：
- [0012] S1. 将母乳冻干后，溶解于生物相容性溶剂中，得到母乳溶液；其中，步骤S1所述母乳溶液的浓度大于或等于 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ；
- [0013] S2. 将步骤S1得到的母乳溶液过滤除菌，即可得到所述创伤敷料。
- [0014] 优选地，步骤S2中，将步骤S1得到的母乳溶液过滤后，再将其加入至生物相容性基质中，灭菌，即得。
- [0015] 优选地，步骤S1所述母乳溶液的浓度为 $1\sim 10000\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- [0016] 更优选地，步骤S1所述母乳溶液的浓度为 $10\sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- [0017] 更进一步优选地，步骤S1所述母乳溶液的浓度为 $100\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- [0018] 再进一步优选地，步骤S1所述母乳溶液的浓度为 $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- [0019] 优选地，步骤S1所述冻干的时间为 $2\sim 8\text{d}$ 。
- [0020] 当冻干的时间过长(大于 8d)时，效率低；当冻干的时间过短(小于 2d)时，母乳溶液还不能完全冻干成粉末状。
- [0021] 更优选地，步骤S1所述冻干的时间为 5d 。
- [0022] 优选地，步骤S1所述冻干的温度为 $-50^{\circ}\text{C}\sim -30^{\circ}\text{C}$ 。
- [0023] 当冻干的温度过高(大于 -30°C)时，冻干效果不好，需要更长的冻干时间；当冻干的温度过低(小于 -50°C)时，冻干机冻干最低温度受自身性能限制。
- [0024] 更优选地，步骤S1所述冻干的温度为 -45°C 。
- [0025] 优选地，步骤S1所述生物相容性溶剂选自水、PBS缓冲液或液体培养基中的一种或几种。
- [0026] 所述水的来源没有特殊限制，可以是自来水、去离子水、蒸馏水或超纯水等。
- [0027] 更优选地，所述PBS缓冲液的pH值为 $6.5\sim 7.5$ 。
- [0028] 更进一步优选地，所述PBS缓冲液的pH值为7。
- [0029] 更优选地，所述液体培养基选自DMEM液体培养基、MEM液体培养基、RPMI 1640液体培养基、F12液体培养基或IMDM液体培养基中的一种或几种。
- [0030] 优选地，步骤S2所述基质为医用纱布、医用海绵、医用泡沫或水凝胶中的一种或几种。
- [0031] 更优选地，所述水凝胶为通过物理作用形成的水凝胶，例如聚丙烯酰胺与聚丙烯酸共混形成的凝胶等；水溶性高分子与金属离子相互作用形成的凝胶，例如海藻酸钠、壳聚糖分别与钙离子、磷酸根形成海藻酸钠、壳聚糖水凝胶等；聚阳离子电解质与聚阴离子电解质相互作用形成的水凝胶，例如海藻酸与壳聚糖相互作用形成海藻酸-壳聚糖水凝胶等；高分子链聚合形成水凝胶，例如明胶与琼脂等。
- [0032] 更进一步优选地，所述水凝胶为普兰尼克(Pluronic F-127)。
- [0033] 优选地，步骤S2所述过滤除菌为用针头除菌过滤器进行过滤除菌。
- [0034] 更优选地，所述针头除菌过滤器的滤头为 $0.1\sim 0.8\mu\text{m}$ 的微孔除菌过滤膜。

[0035] 更进一步优选地,所述针头除菌过滤器的滤头为0.22 μ m的微孔除菌过滤膜。

[0036] 另外,本发明还提供了上述方法制备得到的基于母乳的创伤敷料。

[0037] 所述创伤敷料在作为或制备促进创伤修复和/或减少瘢痕组织形成的产品或制品中的应用,也应在本发明的保护范围之内。

[0038] 优选地,所述应用是指创伤敷料能够清除羟基自由基和细胞内活性氧,提高细胞的增殖率。

[0039] 优选地,所述应用是指创伤敷料能够促进成纤维细胞和内皮细胞的迁移,增强内皮细胞的成血管能力。

[0040] 优选地,所述应用是指创伤敷料能够调控巨噬细胞的M2表型,促进毛囊再生,减少瘢痕组织形成,使得愈合伤口正常化。

[0041] 本发明具有以下有益效果:

[0042] 本发明提供了一种基于母乳的创伤敷料的制备方法和应用。本发明制备得到的基于母乳的创伤敷料具有较低的免疫原性,不会额外加重炎症反应,具有良好的生物相容性;在创伤修复的炎症期,可促进内皮细胞迁移,具有抗氧化性质,能清除自由基和细胞应激产生的活性氧,为加快愈合提供支持,同时可调节M2型巨噬细胞表型,促进后期毛囊形成,对抑制瘢痕组织的形成发挥积极作用;在增殖期,能提高炎症期造成氧化应激细胞的增殖率,促进成纤维细胞迁移和血管形成,为加快伤口愈合做贡献;在重塑期,促进胶原蛋白和胺聚糖的合成,为结构重塑做准备;也可促进巨噬细胞向M2型转化,使形成的胶原纤维整齐排列,促进创面组织修复,且抑制或减少瘢痕的形成。

[0043] 另外,所述创伤敷料的材料来源于食物母乳,且制备工艺简便,绿色安全,易于实现;因此,本发明提供的创伤敷料在作为或制备促进创伤修复和/或减少瘢痕组织形成的产品或制品中具有广阔的推广应用前景。

附图说明

[0044] 图1是不同浓度母乳溶液免疫原性细胞因子TNF- α 表达检测结果。

[0045] 图2是不同浓度母乳溶液的羟基自由基清除性能测试结果。

[0046] 图3是不同浓度母乳溶液对细胞内活性氧的清除效果。

[0047] 图4是不同浓度母乳溶液对氧化条件下细胞增殖率的影响结果。

[0048] 图5是不同浓度母乳溶液对内皮细胞迁移的影响结果。

[0049] 图6是不同浓度母乳溶液对内皮细胞迁移率的影响定量结果。

[0050] 图7是不同浓度母乳溶液对成纤维细胞迁移的影响结果。

[0051] 图8是不同浓度母乳溶液对成纤维细胞迁移率的影响定量结果。

[0052] 图9是不同浓度母乳溶液对细胞成血管能力的影响结果。

[0053] 图10是不同浓度母乳溶液对巨噬细胞M2表型的影响结果。

[0054] 图11是本发明制备得到的基于母乳的创伤敷料对大鼠皮肤背部创面组织修复影响的HE染色、Masson染色和免疫组织化学染色结果图。

具体实施方式

[0055] 以下结合具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的

限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0056] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0057] 实施例1基于母乳的创伤敷料的制备

[0058] 一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,包括以下步骤:

[0059] S1.在冻干温度为-45℃、冻干时间为5d的条件下将母乳冻干,冻干后的母乳溶解于PBS中,得到母乳溶液;

[0060] S2.用滤头为0.22 μ m的微孔除菌过滤膜的针头除菌过滤器对步骤S1得到的母乳溶液进行过滤除菌,将上清液吸附至Pluronic F-127基质中,即可得到所述创伤敷料;其中,步骤S1所述母乳溶液的浓度为500 μ g/mL。

[0061] 实施例2基于母乳的创伤敷料的制备

[0062] 一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,包括以下步骤:

[0063] S1.在冻干温度为-50℃、冻干时间为2d的条件下将母乳冻干,冻干后的母乳溶解于水中,得到母乳溶液;

[0064] S2.用滤头为0.1 μ m的微孔除菌过滤膜的针头除菌过滤器对步骤S1得到的母乳溶液进行过滤除菌,将上清液吸附至纱布中,灭菌,即可得到所述创伤敷料;其中,步骤S1所述母乳溶液的浓度为1 μ g/mL。

[0065] 实施例3基于母乳的创伤敷料的制备

[0066] 一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,包括以下步骤:

[0067] S1.在冻干温度为-30℃、冻干时间为8d的条件下将母乳冻干,冻干后的母乳溶解于DMEM液体培养基中,得到母乳溶液;

[0068] S2.用滤头为0.8 μ m的微孔除菌过滤膜的针头除菌过滤器对步骤S1得到的母乳溶液进行过滤除菌,将上清液吸附至海绵中,灭菌,即可得到所述创伤敷料;其中,步骤S1所述母乳溶液的浓度为10 μ g/mL。

[0069] 实施例4基于母乳的创伤敷料的制备

[0070] 一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,包括以下步骤:

[0071] S1.在冻干温度为-48℃、冻干时间为7d的条件下将母乳冻干,冻干后的母乳溶解于MEM液体培养基中,得到母乳溶液;

[0072] S2.用滤头为0.3 μ m的微孔除菌过滤膜的针头除菌过滤器对步骤S1得到的母乳溶液进行过滤除菌,将上清液吸附至泡沫中,灭菌,即可得到所述创伤敷料;其中,步骤S1所述母乳溶液的浓度为100 μ g/mL。

[0073] 实施例5基于母乳的创伤敷料的制备

[0074] 一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,包括以下步骤:

[0075] S1.在冻干温度为-32℃、冻干时间为3d的条件下将母乳冻干,冻干后的母乳溶解于RPMI 1640液体培养基中,得到母乳溶液;

[0076] S2.用滤头为0.5 μ m的微孔除菌过滤膜的针头除菌过滤器对步骤S1得到的母乳溶液进行过滤除菌,将上清液吸附至纱布中,灭菌,即可得到所述创伤敷料;其中,步骤S1所述母乳溶液的浓度为500 μ g/mL。

[0077] 实施例6基于母乳的创伤敷料的制备

[0078] 一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,包括以下步骤:

[0079] S1.在冻干温度为-30℃、冻干时间为8d的条件下将母乳冻干,冻干后的母乳溶解于F12液体培养基中,得到母乳溶液;

[0080] S2.用滤头为0.7μm的微孔除菌过滤膜的针头除菌过滤器对步骤S1得到的母乳溶液进行过滤除菌,将上清液吸附至海绵中,灭菌,即可得到所述创伤敷料;其中,步骤S1所述母乳溶液的浓度为1000μg/mL。

[0081] 实施例7基于母乳的创伤敷料的制备

[0082] 一种基于母乳的创伤敷料的制备方法,包括以下步骤:

[0083] S1.在冻干温度为-45℃、冻干时间为5d的条件下将母乳冻干,冻干后的母乳溶解于IMDM液体培养基中,得到母乳溶液;

[0084] S2.用滤头为0.6μm的微孔除菌过滤膜的针头除菌过滤器对步骤S1得到的母乳溶液进行过滤除菌,将上清液吸附至泡沫中,灭菌,即可得到所述创伤敷料;其中,步骤S1所述母乳溶液的浓度为10000μg/mL。

[0085] 应用例1母乳溶液免疫原性细胞因子TNF-α表达情况测试

[0086] 1、实验方法

[0087] (a) RAW 264.7巨噬细胞接种在12孔板中,加入含血清的培养基待贴壁;

[0088] (b) 去除旧培养基,分别加入5个含不同浓度(10μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、300μg/mL和500μg/mL)母乳溶液的血清培养基共培养1天,对照组加入含血清的培养基;

[0089] (c) 去除旧培养基,用PBS溶液清洗细胞2遍,每个样品加入1mL Trizol溶液,吹打均匀,收于1.5mL EP管中室温静置5min;

[0090] (d) 每管加入200μL氯仿,剧烈震荡15s,室温静置3min,4℃,14000g,离心15min;取200~400μL上清于新EP管,再每管加入0.5mL异丙醇,室、室温放置10min,4℃,14000g,离心15min;弃上清,加入冰预冷75%乙醇(DEPC水配)洗涤2次,12000g,离心5min;弃上清,室温自然干燥5~10min,再用20μL DEPC水溶解RNA;

[0091] (e) 用核酸蛋白检测仪检测RNA的纯度和浓度;

[0092] (f) 每20μL体系取1μg RNA进行逆转录;

[0093] (g) 使用PCR仪进行qRT-PCR反应,检测细胞因子TNF-α的表达情况。

[0094] 2、实验结果

[0095] 不同浓度母乳溶液对细胞因子TNF-α表达的影响结果如图1所示,可以看出,RAW 264.7巨噬细胞在不同浓度的母乳溶液环境中孵育1天后,与对照组相比,TNF-α表达无差异;当母乳溶液的浓度低于300μg/mL时,TNF-α表达较对照组少,但无明显差异;当母乳溶液的浓度大于等于300μg/mL时,TNF-α表达较对照组多,但无显著性差异。以上结果表明,母乳溶液不会刺激细胞产生炎症反应,具有低免疫原性。

[0096] 应用例2母乳溶液的羟基自由基清除性能测试

[0097] 1、实验方法

[0098] (a) 配置8mM FeSO₄溶液(超纯水溶解)、2mM H₂O₂(超纯水稀释)、4mM的水杨酸钠溶液(无水乙醇溶解)、以及5个不同浓度(10μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、300μg/mL和500μg/mL)的母乳溶液(用超纯水浸泡稀释);

[0099] (b) 实验组At:往200μL的FeSO₄溶液加入200μL 5个不同浓度的母乳溶液、200μL H₂O₂溶液以及200μL水杨酸钠溶液,振荡静置30min;

[0100] 空白组Ac:往200 μ L的FeSO₄溶液加入200 μ L的母乳溶液、200 μ L超纯水以及200 μ L水杨酸钠溶液,振荡静置30min;

[0101] 本底组Ab:往200 μ L的FeSO₄溶液加入200 μ L超纯水、200 μ L H₂O₂溶液以及200 μ L水杨酸钠溶液,振荡静置30min。

[0102] (c) 实验组At、空白组Ac和本底组Ab的每个样品分别取200 μ L混合液于96孔板,设定酶标仪波长为510nm,测定每孔的光吸收值,按照公式:AA[%] = [1 - (At - Ac) / Ab] \times 100%,计算出清除率。

[0103] 2、实验结果

[0104] 不同浓度母乳溶液的羟基自由基清除性能测试结果如图2所示,可以看出,随着母乳溶液浓度的提高,其羟基自由基清除率不断提高;母乳溶液的浓度分别为10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、300 μ g/mL和500 μ g/mL时,对应的羟基自由基清除率分别为9.5%、12.6%、17.7%、22%和32%,呈现出浓度依赖性的特征。

[0105] 应用例3母乳溶液对细胞内活性氧的清除效果

[0106] 1、实验方法

[0107] (a) NIH 3T3细胞(小鼠胚胎成纤维细胞)接种在24孔板中,加入含血清的培养基待贴壁;

[0108] (b) 去除旧培养基,分别加入5个不同浓度(10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、300 μ g/mL和500 μ g/mL)的母乳溶液,共培养24h,阳性对照组和阴性对照组分别加入含血清的培养基;

[0109] (c) 去除旧培养基,加入5个不同浓度的母乳溶液和H₂O₂溶液(5 μ g/mL),共培养24h,阳性对照组加入含血清的培养基和H₂O₂溶液(5 μ g/mL),阴性对照组加入含血清的培养基和与H₂O₂溶液体积相同的PBS溶液;

[0110] (d) 去除旧培养基,用PBS溶液清洗细胞2遍,每孔孵育300 μ L DCFH-DA探针20min;

[0111] (e) 去除探针溶液,再用PBS溶液清洗细胞2遍,把孔板放置在倒置荧光显微镜下观察荧光强度。

[0112] 2、实验结果

[0113] 不同浓度母乳溶液对细胞内活性氧(ROS)的清除效果如图3所示,可以看出,母乳溶液具有显著的清除细胞内活性氧的能力,且清除率呈现出浓度依赖性的特征;其中,图(1)表明在细胞没有任何刺激(阴性对照组)的情况下,细胞内ROS水平较低;细胞在经过5 μ g/mL的H₂O₂溶液(阳性对照组)预处理后,细胞内ROS水平显著增加;图(2)中可观察到强烈的荧光;但由图(3)~(5)可知,细胞在分别经过10 μ g/mL、50 μ g/mL和100 μ g/mL的母乳溶液预处理后,荧光强度依次明显降低;当细胞经过浓度大于或等于100 μ g/mL的母乳溶液预处理过后,细胞中几乎没有发现荧光,即细胞内基本没有ROS。以上结果表明,母乳溶液具有良好的细胞内抗氧化活性,且该细胞内活性氧的清除结果与以上自由基清除的结果相符合。

[0114] 应用例4母乳溶液对氧化条件下细胞增殖率的影响

[0115] 1、实验方法

[0116] (a) NIH 3T3细胞(小鼠胚胎成纤维细胞)接种在96孔板中(5000/孔),加入含血清的培养基过夜待贴壁;

[0117] (b) 去除旧培养基,实验组分别加入5个不同浓度(10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、300 μ g/mL和500 μ g/mL)的含母乳溶液的血清培养基,阳性对照组和阴性对照组分别加入含

血清的培养基,共培养24h;

[0118] (c) 去除旧培养基,每孔加入100 μ L 5个不同浓度的含母乳溶液的血清培养基和H₂O₂溶液(5 μ g/mL),阳性对照组加入含血清的培养基和H₂O₂溶液(5 μ g/mL),阴性对照组加入含血清的培养基和与H₂O₂溶液体积相同的PBS溶液,设置5个复孔;

[0119] (d) 共培养24h、48h和96h后,每孔加入20 μ L MTT溶液,孵育4h;

[0120] (e) 去培养液,每孔加100 μ L DMSO溶解晶体,摇床振荡8~10min,再把孔板放置在酶标仪上,采用490nm波长检测吸光值。

[0121] 2、实验结果

[0122] 不同浓度母乳溶液对氧化条件下细胞增殖率的影响结果如图4所示,可以看出,当细胞在氧化剂环境中时,细胞增殖率会大幅度降低;但经过母乳溶液预处理后,细胞增殖率有上升趋势,并且细胞增殖率随着母乳溶液浓度的提高而提高,呈现出浓度依赖性的特征。

[0123] 应用例5不同浓度母乳溶液对内皮细胞和成纤维细胞迁移的影响

[0124] 1、实验方法

[0125] (a) 铺板,6孔板(每孔 25×10^4),待细胞长满;

[0126] (b) 用200 μ L枪头在每个孔板上划3条直线,去旧液,用PBS轻柔清洗孔板1~2次,再加不含血清的培养基,拍照,再放回培养箱培养;

[0127] (c) 每隔12h观察划痕的迁移情况,并拍照,待某一组迁移完成即可结束实验。

[0128] 2、实验结果

[0129] 不同浓度母乳溶液对内皮细胞迁移的影响结果如图5所示,可以看出,10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、300 μ g/mL和500 μ g/mL的母乳溶液均可促进内皮细胞迁移,并且也呈现出浓度依赖性的特征。不同浓度母乳溶液对内皮细胞迁移率的影响定量结果如图6所示,可以看出,从低到高浓度,12h后,内皮细胞的迁移率分别为61%,62%,66%,82%和78%,而对照组仅为38%;24h后,内皮细胞的迁移率分别为85%,84%,88%,98%和100%,而对照组仅为60%,与对照组相比较,通过计算,表现出显著性差异。这一结果表明了母乳溶液可促进内皮细胞的迁移。

[0130] 不同浓度母乳溶液对成纤维细胞迁移的影响结果如图7所示,可以看出,10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、300 μ g/mL和500 μ g/mL的母乳溶液均可促进成纤维细胞迁移。不同浓度母乳溶液对成纤维细胞迁移率的影响定量结果如图8所示,由图8可知,从低到高浓度,12h后,成纤维细胞的迁移率分别为52%,48%,46%,66%和60%,而对照组仅为31%;24h后,成纤维细胞的迁移率分别为88%,95%,94%,98%和96%,而对照组仅为76%,与对照组相比较,通过计算,表现出显著性差异。这一结果表明了母乳溶液可促进成纤维细胞的迁移。

[0131] 应用例6不同浓度母乳溶液对细胞成血管能力的影响

[0132] 1、实验方法

[0133] (a) 4 $^{\circ}$ C解冻matrigel,待matrigel解冻完成,在ibidi 96孔板上加10 μ L matrigel;

[0134] (b) 放37 $^{\circ}$ C培养箱凝固30min;

[0135] (c) 与此同时,制备 1×10^4 /50 μ L细胞悬浮液;

[0136] (d) 30min后,分别每孔加入50 μ L的细胞悬浮液;

[0137] (e) 30min后,细胞全部沉在matrigel上,再轻柔地把培养液吸走,分别加入含材料

的培养基；

[0138] (f) 2h, 4h, 6h, 8h, 10h后观察管状形成情况, 并拍照。

[0139] 2、实验结果

[0140] 不同浓度母乳溶液对细胞成血管能力的影响结果如图9所示, 可以看出, 母乳溶液不仅可以促进官腔结构的形成, 还可以促进管道数量的形成; 与对照组相比, 母乳溶液组在2h后即可形成明显的官腔, 能更早形成管状结构; 并且随着时间的迁移, 4h后管状结构越来越明显, 管道数量越来越多。以上结果表明, 母乳溶液可以促进官腔结构的形成和管道数量的形成, 且不同浓度母乳溶液对管状数量的形成没有太大的区别。

[0141] 应用例7不同浓度母乳溶液对巨噬细胞M2表型的影响

[0142] M2型巨噬细胞分泌IL-10细胞因子, 故以IL-10细胞因子表达证明巨噬细胞M2表型, 具体的实验方法和实验结果如下:

[0143] 1、实验方法

[0144] (a) RAW 264.7巨噬细胞接种在12孔板中, 加入含血清的培养基待贴壁;

[0145] (b) 去除旧培养基, 分别加入5个含不同浓度母乳溶液的血清培养基共培养3天, 对照组加入含血清的培养基;

[0146] (c) 去除旧培养基, 用PBS溶液清洗细胞2遍, 每个样加入1mL Trizol溶液, 吹打均匀, 收于1.5mL EP管中室温静置5min;

[0147] (d) 每管加入200 μ L氯仿, 剧烈震荡15s, 室温静置3min, 4 $^{\circ}$ C, 14000g, 离心15min; 取200~400 μ L上清于新EP管, 再每管加入0.5mL异丙醇, 室、室温放置10min, 4 $^{\circ}$ C, 14000g, 离心15min; 弃上清, 加入冰预冷75%乙醇(DEPC水配) 洗涤2次, 12000g, 离心5min; 弃上清, 室温自然干燥5~10min, 再用20 μ L DEPC水溶解RNA;

[0148] (e) 用核酸蛋白检测仪检测RNA的纯度和浓度;

[0149] (f) 每20 μ L体系取1 μ g RNA进行逆转录;

[0150] (g) 使用PCR仪进行qRT-PCR反应, 检测细胞因子IL-10的表达情况。

[0151] 2、实验结果

[0152] 不同浓度母乳溶液对巨噬细胞M2表型的影响结果如图10所示, 可以看出, RAW 264.7巨噬细胞在不同浓度的母乳溶液环境中孵育3天后, 与对照组相比, 经过浓度为10 μ g/mL和50 μ g/mL的母乳溶液预处理后, IL-10表达无差异; 当母乳溶液的浓度升高为100 μ g/mL时, IL-10表达显著升高; 当母乳溶液的浓度升高为500 μ g/mL时, IL-10表达继续显著升高; 说明在母乳溶液浓度为100 μ g/mL和500 μ g/mL条件下巨噬细胞向M2型转化。以上结果表明, 当母乳溶液的浓度大于或等于100 μ g/mL时, 能够显著促进IL-10表达。

[0153] 应用例8基于母乳的创伤敷料对创伤修复的影响

[0154] 1、实验方法

[0155] (1) 皮肤伤口造模

[0156] (a) 选取体重200~230g的雄性SD大鼠为研究对象, 所有小鼠随机分为两组;

[0157] (b) 给所有大鼠背部剃毛, 再通过腹腔注射水合氯醛(10wt%, 0.3mL/100g) 麻醉, 全层切除大鼠背部1.5cm圆形皮肤;

[0158] (2) 基于母乳的创伤敷料的制备

[0159] (a) 称取20g Pluronic F 127基质溶解在80g PBS中, 4 $^{\circ}$ C过夜搅拌;

[0160] (b) 按照质量体积比,称取一定质量的母乳粉末溶解在Pluronic F 127基质中,使得基质中母乳浓度为100 μ g/mL,室温下成胶,获得基于母乳的创伤敷料。

[0161] (3) 创口上药

[0162] 对照组伤口处贴上商用敷料(3M公司),实验组伤口处涂上100 μ g/mL本发明制备得到的基于母乳的创伤敷料,每天上药并拍照。

[0163] 2、实验结果

[0164] 本发明制备得到的基于母乳的创伤敷料对大鼠皮肤背部创面组织修复影响的HE染色、Masson染色和免疫组织化学染色结果如图11所示,可以看出,基于母乳的创伤敷料可以促进伤口形成更丰富的血管,使得胶原纤维聚集呈平行排列,还可促进皮肤附属物毛囊的形成;由HE染色、Masson染色结果可以看出,与对照组相比,基于母乳的创伤敷料组的伤口肉芽组织程度较高,血管分布丰富,有丰富的毛囊出现,与正常皮肤结构非常相似;由免疫组织化学染色结果可以看出,与对照组相比,基于母乳的创伤敷料组增加了血管数量,可促进毛细血管新生,改善血管微循环,有助于伤口愈合和减少瘢痕组织的形成。

[0165] 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。

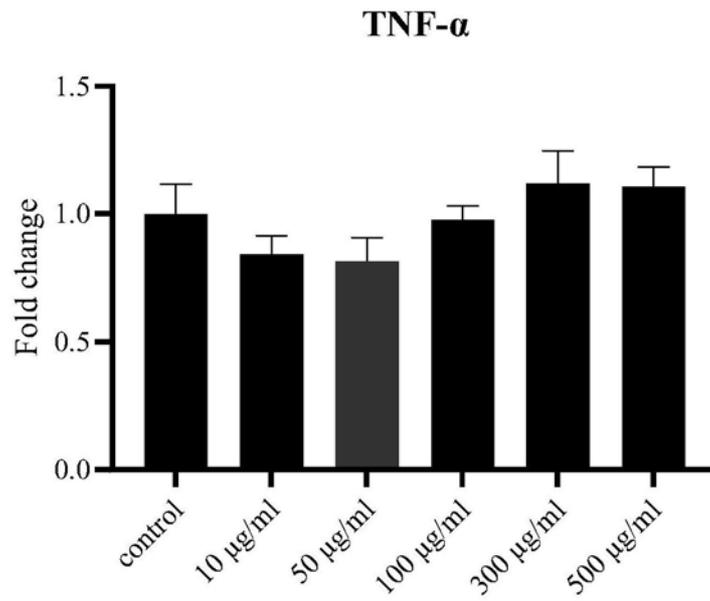


图1

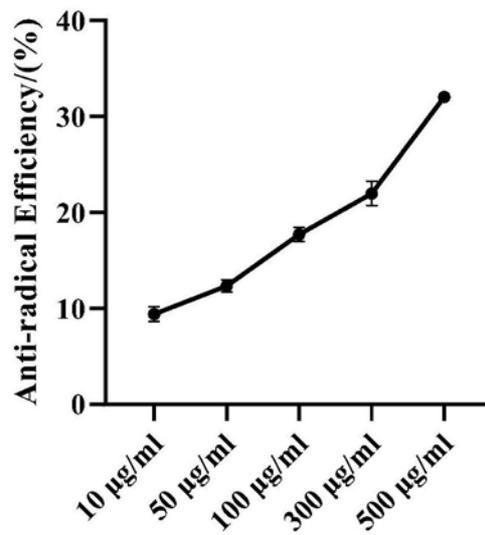


图2

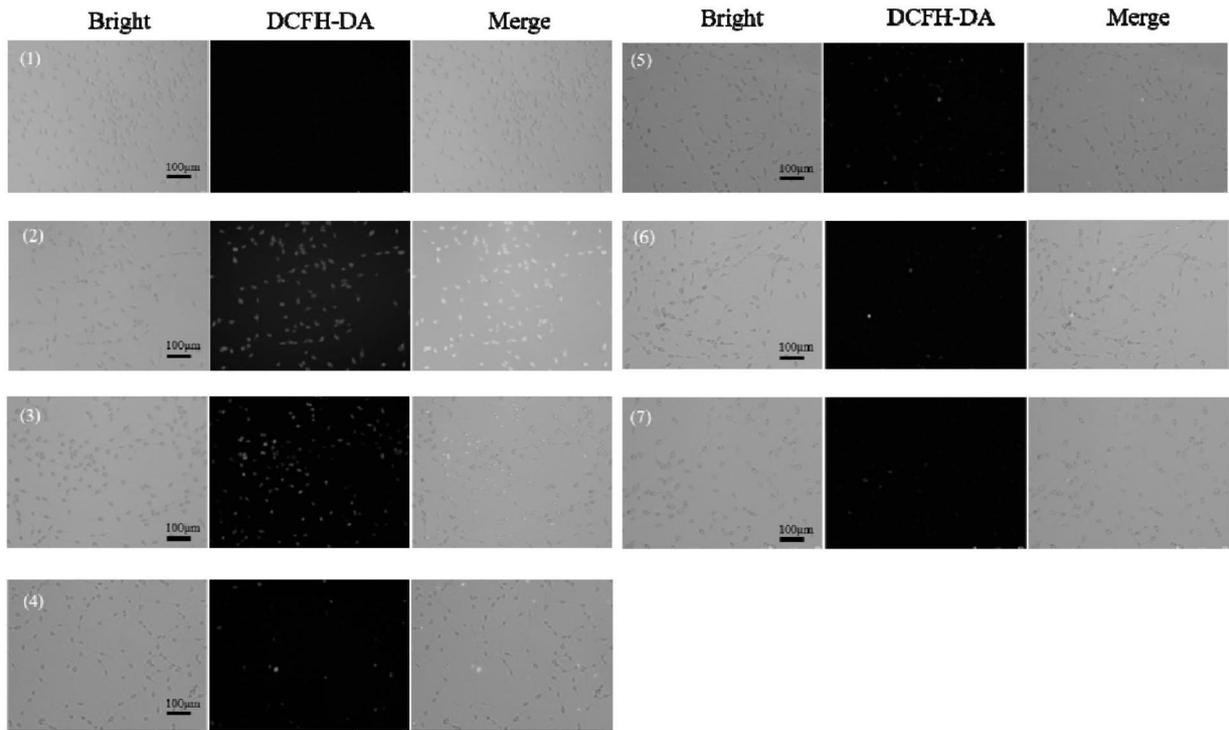


图3

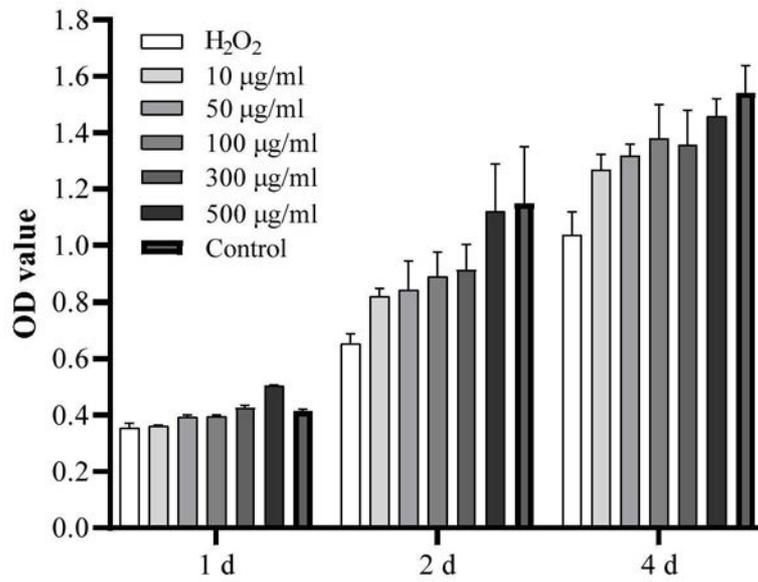


图4

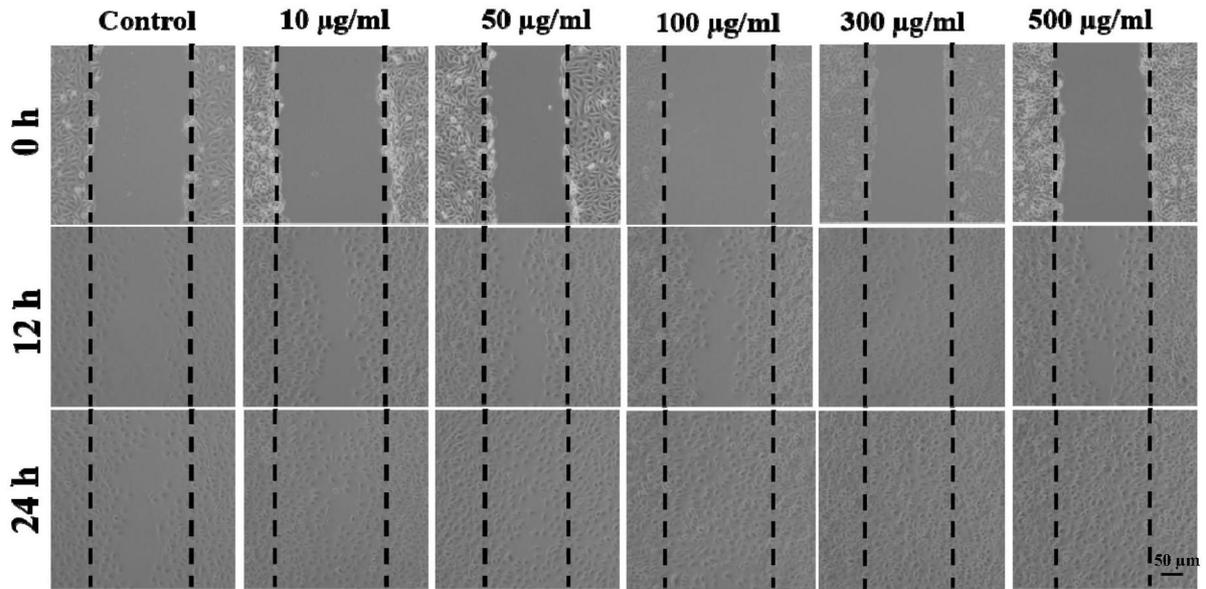


图5

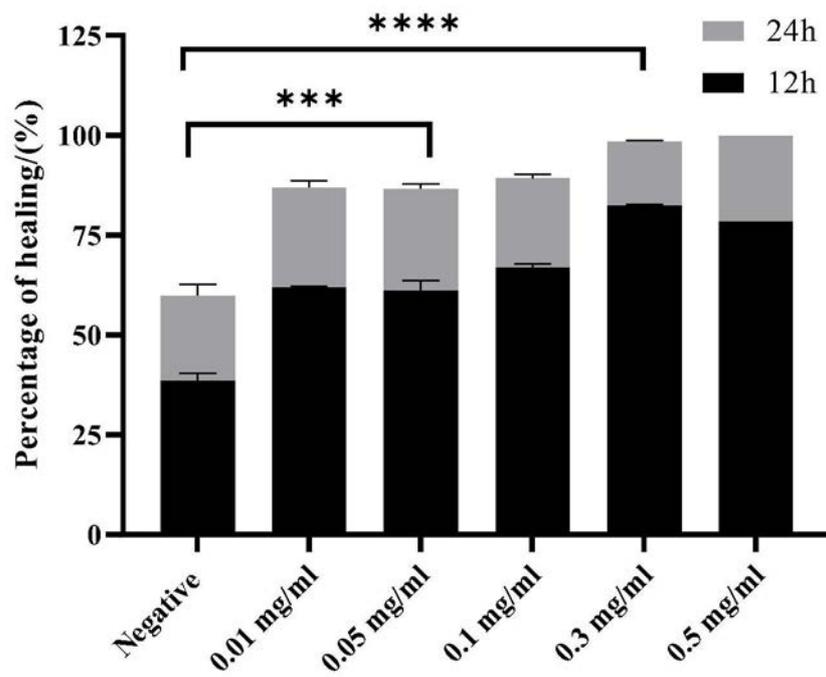


图6

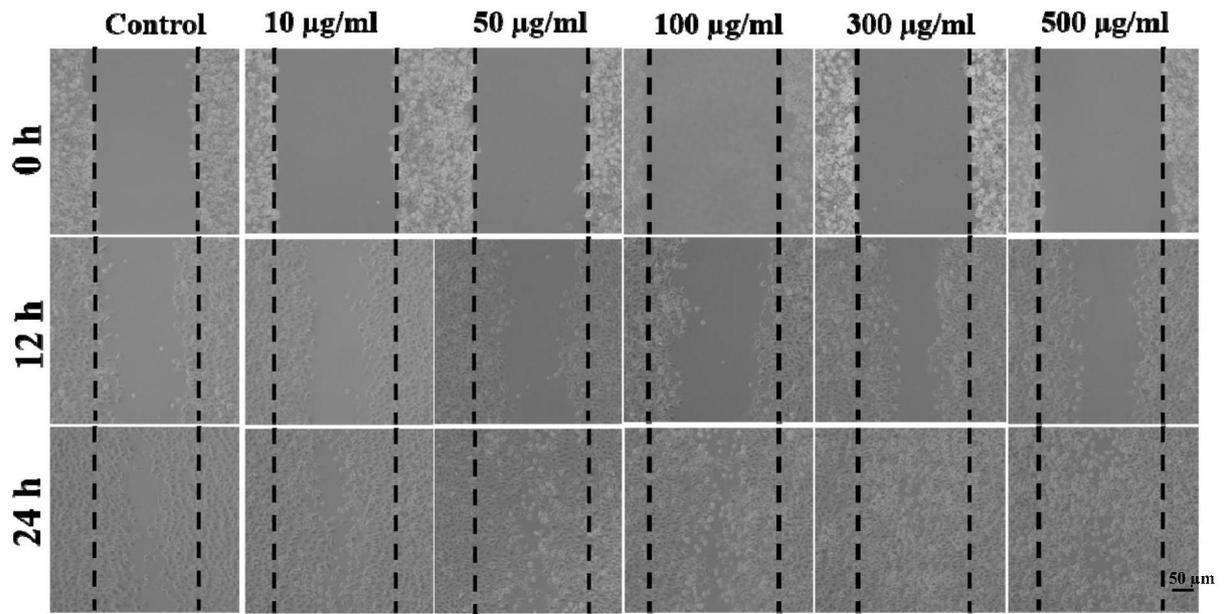


图7

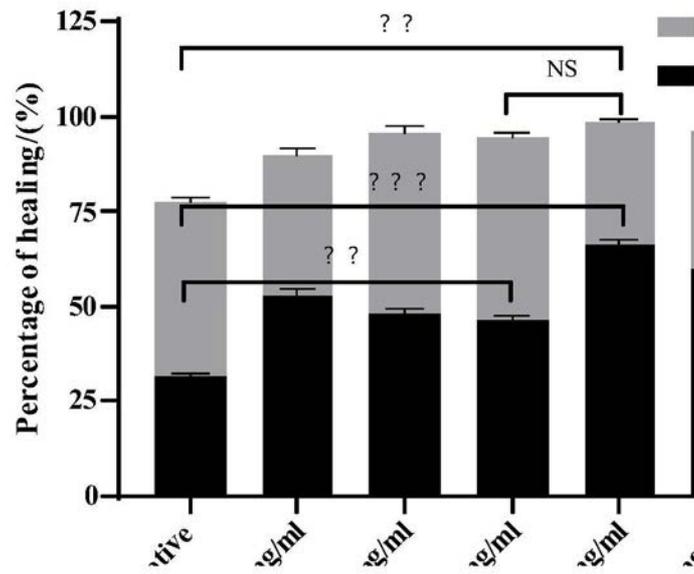


图8

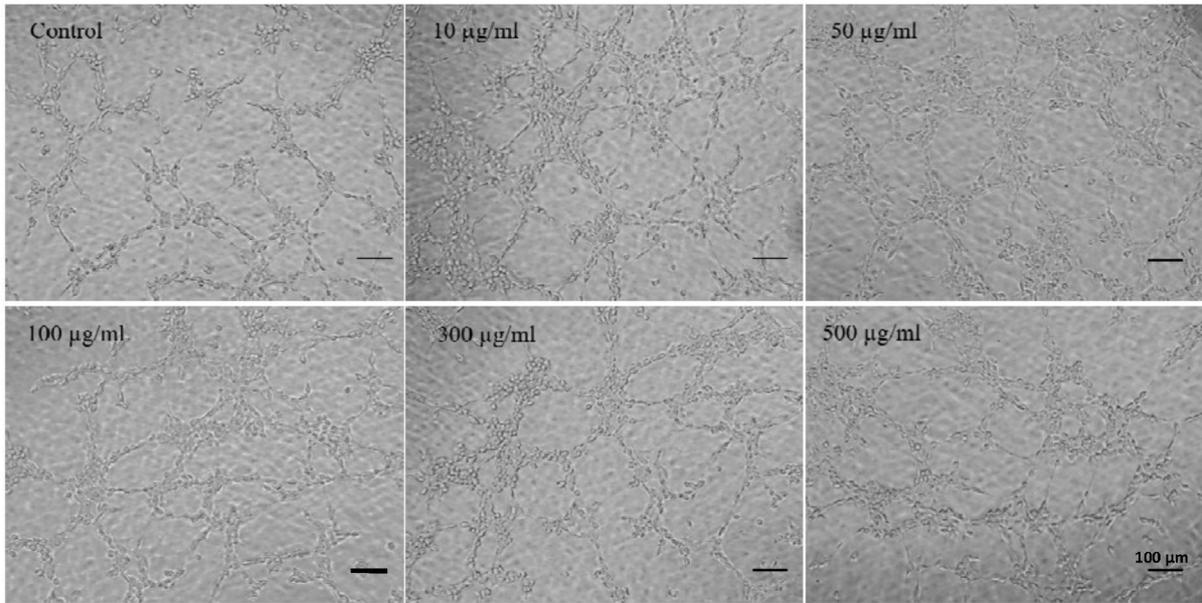


图9

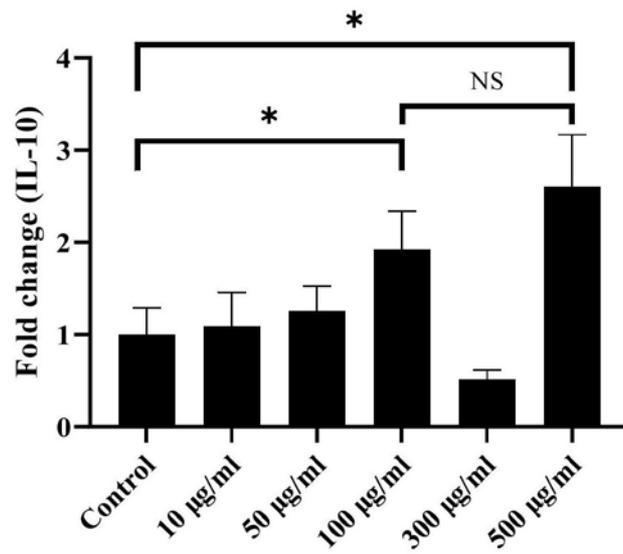


图10

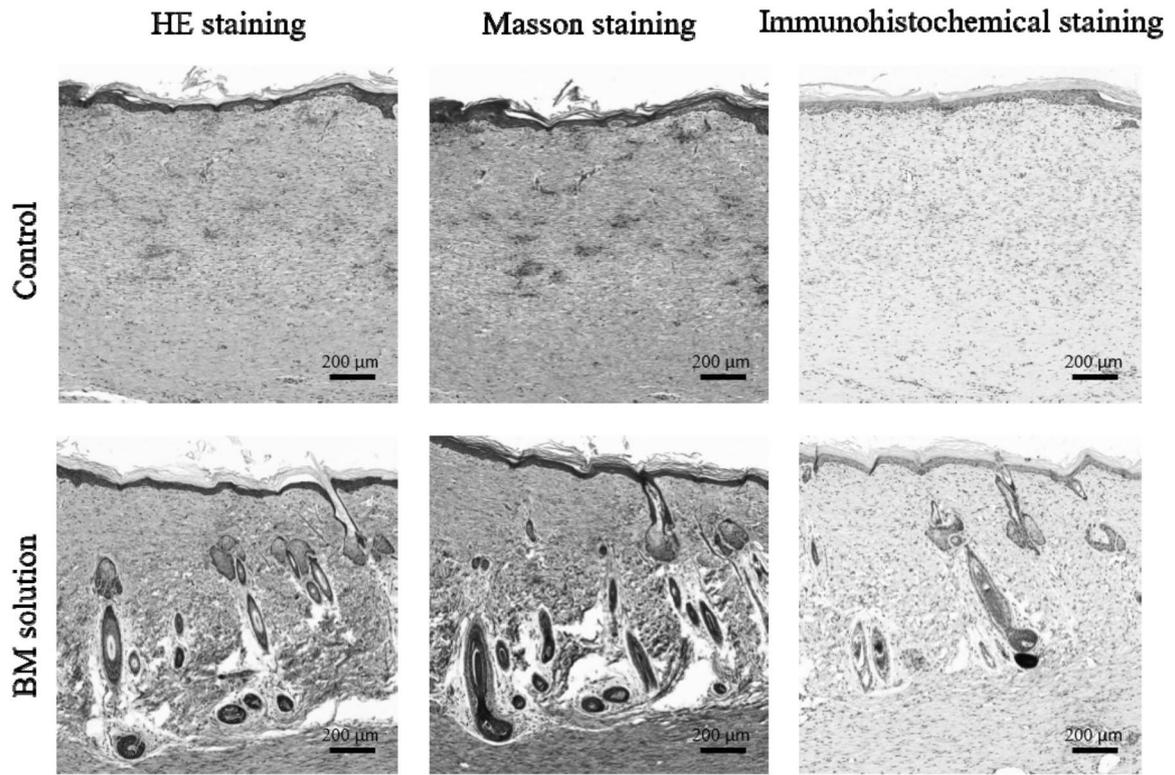


图11