

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 1 月 9 日 (09.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/007745 A1

(51) 国际专利分类号:
D04H 1/728 (2012.01) *D01F 9/00* (2006.01)
D04H 1/4326 (2012.01) *C12N 5/074* (2010.01)
D01D 5/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/100091

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 19 日 (19.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310808155.7 2023年7月3日 (03.07.2023) CN

(71) 申请人: 五邑大学 (WUYI UNIVERSITY) [CN/CN];
中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号,
Guangdong 529000 (CN)。

(72) 发明人: 陈敏 (CHEN, Min); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。高月 (GAO, Yue); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。昂松 (ANG, Song); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。冯雁贤 (FENG, Yanxian); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。赵丽娟 (ZHAO, Lijuan); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。李文希 (LI, Wenxi); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。蔡宾 (CAI, Bin); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。卢婉婷 (LU, Wanting); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。孔雯婷 (KONG, Wenting); 中国广东省江门市蓬江区东成村 22 号, Guangdong 529000 (CN)。

(54) Title: ACETYLATED GLUCOMANNAN ELECTROSPUN MEMBRANE, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜及其制备方法与应用

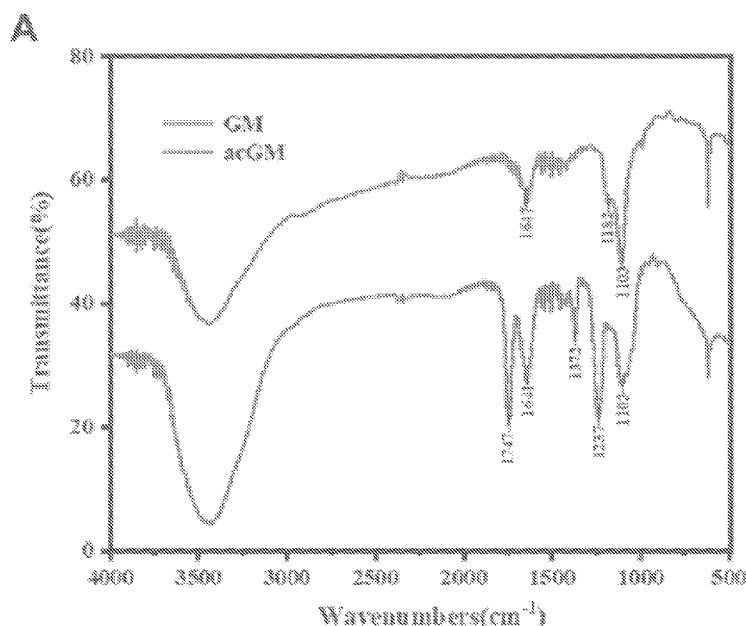


图 1

(57) Abstract: The present application discloses an acetylated glucomannan electrospun membrane, and a preparation method therefor and a use thereof. The preparation method for an electrospun membrane of the present application comprises: first adding glucomannan into a mixed solution of pyridine and acid anhydride, carrying out solid-liquid separation after the reaction, collecting a solid phase, adding ethanol for precipitation, and collecting the precipitate to obtain acetylated glucomannan; then dissolving the acetylated glucomannan in a mixed solution of chloroform and N,N-dimethylformamide, and carrying out ultrasonic treatment to obtain an electrospun-

林佩雯(LIN, Peiwen); 中国广东省江门市蓬江区东成村22号, Guangdong 529000 (CN)。

(74) 代理人: 广州嘉权专利商标事务所有限公司(JIAQUAN IP LAW); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西100号富力盈泰广场A栋910, Guangdong 510627 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

ning solution; and finally, using the electrospinning solution as a raw material, and carrying out electrospinning to obtain an acetylated glucomannan electrospun membrane.

(57) 摘要: 本申请公开了一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜及其制备方法与应用。本申请的静电纺丝膜制备方法包括: 首先在吡啶和酸酐的混合溶液中加入葡甘聚糖, 反应后固液分离, 收集固相并加入乙醇进行沉淀, 收集沉淀即得到乙酰化葡甘聚糖; 然后将乙酰化葡甘聚糖溶解于氯仿和N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液, 经超声处理后得到电纺丝溶液; 最后以电纺丝溶液为原料, 经静电纺丝后即得到乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜。

一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜及其制备方法与应用

技术领域

本申请涉及生物材料技术领域，尤其是涉及一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜及其制备方法与应用。

背景技术

在生物体内，哺乳细胞主要依赖细胞外基质之间的相互作用，产生连接和信号转导，为了在体外模拟细胞培养过程，2D 细胞培养是一种传统的且操作简单的培养方式，但只能形成扁平的细胞形态，甚至改变细胞的基因表达。而 3D 细胞培养由于其能够更好地模拟体内细胞生长环境逐渐成为主流培养方式，采用该方式培养出来的细胞组织常用于研究细胞的代谢及组织再生。

在相关技术中，小鼠软骨肉瘤细胞分泌的细胞外基质（Matrigel）被广泛使用于细胞 3D 培养系统中，该基质主要包括胶原、粘层蛋白、明胶、纤维蛋白、透明质酸等多种成分，有利于细胞的生长和粘附。然而，这类的细胞外基质通常是动物来源的，含有疾病相关的成分，当将其作为细胞 3D 培养组分时，其疾病相关成分可能会对细胞培养造成不利影响，并且由于细胞外基质成分的不确定性导致其培养的重复性和可控性较差。

为解决上述问题，本申请提供了一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜及其制备方法与应用。

发明内容

本申请旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此，本申请提出了一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜及其制备方法与应用。本申请的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜制备方法简单，制得的乙酰化葡甘聚糖分子链上富含大量的乙酰基（ $-\text{COCH}_3$ ），制得的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜纤维直径为 $905 \pm 283 \text{ nm}$ ，无明显的串珠结构，纤维之间相互交错成网状，形成互相通联的空隙，将其应用于细胞培养，能够很好地模拟细胞外基质的结构，有利于促进细胞黏附和增殖。

本申请还提出一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜。

本申请还提出一种细胞培养用组合物。

本申请还提出一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜或细胞培养用组合物在细胞增殖和/或细

胞分化培养中的应用。

本申请的第一方面，提供了一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的制备方法，包括以下步骤：

步骤 S1：在吡啶和酸酐的混合溶液中加入葡甘聚糖，反应后固液分离，收集固相并加入乙醇进行沉淀，然后收集沉淀即得到乙酰化葡甘聚糖；

步骤 S2：将所述乙酰化葡甘聚糖溶解于氯仿和 N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液，经超声处理后得到电纺丝溶液；

步骤 S3：以所述电纺丝溶液为原料，经静电纺丝后即得到乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜。

根据本申请实施例的制备方法，至少具有如下有益效果：

本申请乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的制备方法简单，首先通过吡啶、酸酐和葡甘聚糖的混合反应，经醇沉后得到乙酰化葡甘聚糖（acGM），其有机官能团的分析结果表明，制得的 acGM 分子链上存在大量的乙酰基（ $-\text{COCH}_3$ ），其乙酰度达到 3.0；进一步地，本申请将制得的乙酰化葡甘聚糖与氯仿和 N,N-二甲基甲酰胺混合反应，经超声处理后得到电纺丝溶液，然后以电纺丝溶液为原料，经静电纺丝处理后得到乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜。该制备方法简单，无需额外添加助溶性物质，成本低，适用于工业化生产。

在本申请的一些实施方式中，步骤 S1 中，所述葡甘聚糖与吡啶和酸酐的混合溶液的重量体积比为(0.8 - 1.2) g: 100 mL。

在本申请的一些实施方式中，所述混合溶液中吡啶和酸酐的体积比为 1: 0.8 - 1.2。

在本申请的一些实施方式中，步骤 S1 中，所述反应的温度为 45°C 至 60°C；

优选地，所述反应的时间为 48 h 至 96 h。

在本申请的一些实施方式中，步骤 S1 中，所述固相与乙醇的质量体积比为 1 g: (2 - 10) mL。

在本申请的一些实施方式中，所述乙醇为分析纯乙醇，具体的，所述乙醇为预冷的分析纯乙醇。

在本申请的一些实施方式中，所述乙酰化葡甘聚糖的乙酰度为 3.0。

在本申请的一些实施方式中，步骤 S2 中，所述乙酰化葡甘聚糖与氯仿和 N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液的重量体积比为(150 - 250) mg: 1 mL。

在本申请的一些实施方式中，所述氯仿和 N,N-二甲基甲酰胺的体积比为 1.8 - 2.5: 1。

根据本申请的一些实施方式，添加一定含量的 N,N-二甲基甲酰胺有助于防止氯仿过快挥发。

在本申请的一些实施方式中，所述静电纺丝的参数包括：进样速度为 0.6 mL/h 至 1 mL/h，

针头内径为 0.33 mm 至 0.51 mm，针头外径为 0.64 mm 至 0.81 mm。

优选地，所述静电纺丝的参数为：进样速度为 0.8 mL/h，针头内径为 0.41 mm，针头外径为 0.64 mm 至 0.81 mm。

在本申请的一些实施方式中，所述针头可以为扁平针头。

根据本申请的一些实施方式，由于电纺丝溶液含有机溶剂并且带一定的黏性，采用扁平针头有利于避免被腐蚀堵住。

在本申请的一些实施方式中，所述静电纺丝过程中，针头处的电压为+10 kV 至+15 kV，接收板处的电压为-2 kV 至-4 kV，针尖与采集板之间的距离为 8 cm 至 12 cm。具体的，所述针头处的电压为+12 kV，接收板处的电压可以为-3 kV。

在本申请的一些实施方式中，所述静电纺丝过程中，所述温度为 40°C 至 45°C，相对湿度为 8% 至 12%。具体的，所述静电纺丝过程中，所述温度可以为 40°C，相对湿度可以为 10%。

本申请的第二方面，提供了一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜，采用第一方面所述的制备方法制得。

根据本申请实施例的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜，至少具有如下有益效果：

采用本申请制备方法制得的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的纤维形貌主要为细圆柱状，其构成乙酰化葡聚糖静电纺丝膜的纤维直径为 905 ± 283 nm ($n=10$)，且无明显的串珠结构。

此外，本申请制备方法制得的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜纤维之间相互交错成网状，形成互相通联的空隙，能够更好地模拟细胞外基质的结构，有利于细胞黏附和增殖。

在本申请的一些实施方式中，所述乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的纤维直径为 500 nm 至 1300 nm；

优选地，所述乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的纤维直径为 905 ± 283 nm。

本申请的第三方面，提供了一种细胞培养用组合物，包括第二方面的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜和明胶。

根据本申请实施例的细胞培养用组合物，至少具有如下有益效果：

本申请的细胞培养用组合物包括乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜和明胶，其在细胞培养过程中作为包被物质，能够显著减少细胞死亡，促进细胞不断增殖，具有明显的协同增效效果。

在本申请的一些实施方式中，所述明胶的添加比例为 0.05% 至 0.2%。

具体的，所述明胶的添加比例可以为 0.1%。

在本申请的一些实施方式中，所述细胞培养用组合物是通过将乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜浸泡于 0.05% 至 0.2% 明胶溶液中制得。

具体的，所述浸泡的时间为 6 h 至 10h。

本申请的第四方面，提供了上述第二方面的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜或上述第三方面的细胞培养用组合物在细胞增殖和/或细胞分化培养中的应用。

根据本申请实施例的应用，至少具有如下有益效果：将本申请的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜或细胞培养用组合物应用于细胞增殖和/或细胞分化培养，能够显著减少细胞死亡，促进细胞不断增殖，此外，促 NILB-hiPSCs 细胞定向分化结果显示，其能够显著促进 NILB-hiPSCs 进一步散开，神经突触不断延长，细胞核变小，形成神经元样的细胞。

在本申请的一些实施方式中，所述细胞包括全能干细胞、多能干细胞或单能干细胞。

具体的，所述干细胞可以为人诱导多能干细胞；

更具体的，所述干细胞可以为运动神经元定向分化的人诱导多能干细胞。

在本申请的一些实施方式中，所述细胞分化培养包括人诱导多能干细胞的定向分化培养；

具体的，所述定向分化的细胞类型为神经元样细胞；

更具体的，所述定向分化培养的培养基是在 Neurobasal medium 的基础上添加 1×B27 添加剂（ThermoFisher）、1×N2 添加剂（ThermoFisher）、0.5×双抗（Gibco）、BDNF（10 ng/mL，Alomone Lab）、GDNF（10 ng/mL，Alomone Lab）和 NT3（10 ng/mL，Alomone Lab）。

本申请的其它特征和优点将在随后的说明书中阐述，并且，部分地从说明书中变得显而易见，或者通过实施本申请而了解。

附图说明

下面结合附图和实施例对本申请做进一步的说明，其中：

图 1 为本申请实施例 1 乙酰化葡甘聚糖与葡甘聚糖的红外光谱图。

图 2 为本申请实施例 1 乙酰化葡甘聚糖与葡甘聚糖的核磁共振氢谱图。

图 3 为本申请乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的形貌观察结果图。

图 4 为本申请干细胞在乙酰化葡甘聚糖（acGM）静电纺丝膜上培养的荧光显微图。

图 5 为本申请不同生长时期干细胞在乙酰化葡甘聚糖（acGM）静电纺丝膜上的定向分化结果图，其中图 5 中的 A 图为诱导分化流程图，图 5 中的 B 图为第三天和第 5 天的定向分化结果图。

图 6 为本申请分化培养至第 7 天的神经元通用标志物 TUJ1 的表达情况图。

图 7 为本申请分化培养至第 7 天的运动神经元特异性标志物 HB9 的表达情况图。

图 8 为本申请分化培养至第 14 天的神经元通用标志物 TUJ1 和标志物 MAP2 的表达情况图。

具体实施方式

以下将结合实施例对本申请的构思及产生的技术效果进行清楚、完整地描述，以充分地理解本申请的目的、特征和效果。显然，所描述的实施例只是本申请的一部分实施例，而不是全部实施例，基于本申请的实施例，本领域的技术人员在不付出创造性劳动的前提下所获得的其他实施例，均属于本申请保护的范围。

本申请的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本申请的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

实施例 1

本实施例提供了一种乙酰化葡甘聚糖（acGM）静电纺丝膜的制备方法，包括以下步骤：

（1）乙酰化葡甘聚糖（acGM）的制备

称取定量 1 g 的葡甘聚糖（GM）充分溶胀在 200 mL 水中，冷冻干燥后使用，将 100 mL 的吡啶和酸酐的混合物（1: 1, V/V）在 50°C 下搅拌 30 min 后，将其缓慢倒入带有 GM 的圆底烧瓶中搅拌反应 72 h，将反应溶液过滤后，将滤渣与含有 100 mL 的吡啶和酸酐的混合物（1: 1, V/V）混合，在 50°C 的圆底烧瓶中搅拌 72 h，将反应溶液过滤后，收集滤渣并加入三倍体积的无水乙醇沉淀过夜，过滤，收集滤渣，用乙醇反复重悬，再离心 5 次，产物透析 2 天后，冷冻干燥后获得最终的反应产物乙酰化葡甘聚糖。

（2）电纺丝溶液的制备

称取 200 mg 上述制得的乙酰化葡甘聚糖溶解于 1 mL 混合试剂（氯仿：DMF=2: 1）中，充分搅拌，以至于完全溶解，将溶液静置超声使气泡全部析出，即可得到均一透明的电纺丝溶液。

（3）静电纺丝膜的制备

将上述电纺丝溶液转移到带有扁平 22 G 针头的 2.5 mL 塑料注射器中，固定在静电纺丝装置上，进行静电纺丝膜的制备，即得到乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜，其中静电纺丝参数为：电压：15 kV，其中针头处的电压为+12 kV，接收板处的电压为-3 kV；进样速度为 0.8 mL/h；

针尖与采集板之间的距离为 10 cm；温度为 40°C，相对湿度（R.H.）为 10%。

实施例 2

本实施例提供了乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜，该乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜由上述实施例 1 的方法制备得到。

实施例 3

本实施例提供了一组细胞培养用组合物，包含上述实施例 1 制得的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜和 1% 的 Gelatin（购于 STEMCELL technologies 公司）。

检测例：乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的性能表征

1、实验方法

（1）乙酰化葡甘聚糖有机官能团的鉴定：分别将实施例 1 中葡甘聚糖（GM）原料和乙酰化葡甘聚糖（acGM）产物与溴化钾按照 1/200 的质量比混合后研磨成粉压片，在红外光谱仪（FI-IR）下检测，扫描范围为 $4000-450\text{ cm}^{-1}$ ，观察羰基（ -C=O ）的特征峰在 1735 cm^{-1} 处的变化；所得产物或原料（10 mg）充分溶于氘代氯仿（600 μL ）中，所得产物或原料（10 mg）充分溶于氘代氯仿（600 μL ）中，观察核磁 ^1H NMR 在 $\delta=2.1\text{ ppm}$ （ -COCH_3 ）处的变化。

（2）乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的扫描电子显微镜（SEM）：分别取微量实施例 1 中葡甘聚糖（GM）原料和乙酰化葡甘聚糖（acGM）产物直接粘到导电胶上，并使用溅射镀膜仪（Quorum SC7620）对样品进行表面镀金处理，使用扫描电子显微镜（SEM, TESCAN MIRA LMS）在加速电压为 3 kV 时拍摄样品电纺丝纤维的图像。使用 ImageJ DiameterJ 软件分析纤维的直径分布。

2、实验结果与分析

（1）乙酰化葡甘聚糖有机官能团的分析

通过红外光谱仪表征结构，其中葡甘聚糖和乙酰化葡甘聚糖的红外光谱图如图 1 所示，从图中可看出乙酰化葡甘聚糖在 1747 cm^{-1} 附近出现了强的吸收峰为羰基伸缩振动峰，在 1372 cm^{-1} 附近有明显的吸收峰，此处为甲基吸收峰。在 1237 cm^{-1} 附近出现强吸收峰，为饱和酯基的吸收峰，则证明了 acGM 分子链上存在大量的乙酰基（ -COCH_3 ）。

通过核磁共振仪检测，结果如图 2 所示，由图 2 的核磁 ^1H NMR 图可知在 $\delta=2.1\text{ ppm}$ （ -COCH_3 ）范围出峰，也说明乙酰化成功。

（2）乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的形貌

采用扫描电子显微镜（SEM）观察其电纺丝膜形貌，结果如图 3 所示，其中可观察到所得出的纤维形貌主要为细圆柱状，其构成乙酰化葡聚糖静电纺丝膜的纤维直径为 $905 \pm 283\text{ nm}$

(n=10)，均无明显的串珠结构，纤维之间相互交错成网状，形成互相通联的空隙，能够更好地模拟细胞外基质的结构，有利于促进细胞黏附和增殖。

应用例 1：乙酰化葡甘聚糖 (acGM) 静电纺丝膜在促进干细胞生长中的应用

1、实验方法

(1) 将实施例 1 制得的 acGM 静电纺丝膜剪成 10*10mm 正方形大小，放入 24 孔细胞培养板中，加入 75%酒精浸泡 2 h；弃去 75%酒精后，培养板放在生物安全柜中，紫外照射 30 min，进一步消毒。

(2) 完成消毒的 24 孔细胞培养板，吸干水分后，分成 3 组，分别包被 0.1% Gelatin、acGM 静电纺丝膜 (实施例 2 制得) 和同时包被 Gelatin+acGM 静电纺丝膜 (实施例 3 制得)，其中 Gelatin+acGM 静电纺丝膜是用 0.1% Gelatin 浸泡 acGM 静电纺丝膜得到的，将培养孔板放入细胞培养箱 (37℃，5% CO₂) 中，包被过夜。

(3) 弃去包被溶液后，将实验室已构建成功的运动神经元定向分化的人诱导多能干细胞 (NILB-hiPSCs，该细胞系在药物强力霉素 dox 诱导下，条件性表达运动神经元特异性转录因子 Ngn2、Isl1 和 Lhx3；同时过表达抗凋亡基因 Bcl-xl 和绿色荧光 GFP) 接种在培养孔板中，加入含有抗凋亡小分子 Y27632 (MCE, 10 μM) 的干细胞培养基 mTeSR (购买于 STEMCELL technologies 公司)，在细胞培养箱 (37℃，5% CO₂) 中，过夜培养。

(4) 次日，弃掉培养基，换成新鲜不含 Y27632 的干细胞培养基 mTeSR，继续培养，隔天换液，显微镜下观察细胞形态。

(5) 培养至第 6 天，荧光显微镜拍照。

2、实验结果

上述实验结果如图 4 所示，其中 Gelatin 组中的 NILB-hiPSCs 呈现半贴壁状态，培养过程中极易脱落和死亡，细胞数很少，并没有形成克隆；培养在 acGM 静电纺丝膜中的 NILB-hiPSCs 细胞数量比 Gelatin 组稍多一些，但是仍然较少，且大量变圆的细胞，提示细胞发生死亡；接种在 Gelatin+acGM 静电纺丝膜中的 NILB-hiPSCs 在培养过程中，细胞死亡较少，能不断增殖，并形成了干细胞克隆状态，提示细胞状态良好，细胞数量明显多于 Gelatin 组和 acGM 静电纺丝膜组。

上述结果表明，acGM 静电纺丝膜优于 Gelatin 包被效果，其中以 Gelatin 和 acGM 静电纺丝膜共同包被的效果最佳，可以用于干细胞培养。

应用例 2：乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜在促进干细胞定向分化中的应用

1、实验方法

(1) 按照上述应用例 1 中的方法, 在第 0 天, 将 NILB-hiPSCs 接种在 Gelatin+acGM 静电纺丝膜中, 接种密度为 5×10^4 个/孔 (24 孔板)。

(2) 然后按照图 5 中的 A 实验流程图诱导分化, 具体为第 1 天, Dox ($1 \mu\text{g/mL}$, 5 days) 加入运动神经元诱导培养基中 (培养基配方为: neurobasal medium+B27 添加剂+双抗+glutamax+NEAA+DAPT $5 \mu\text{M}$ +SU5402 $5 \mu\text{M}$), 诱导 NILB-hiPSCs 进行运动神经元的定向分化。

(3) 诱导 5 天, 每天半量换液。

(4) 第 6 天开始, 换成运动神经元成熟培养基 (neurobasal medium+B27 添加剂+N2 添加剂+双抗+BDNF+GDNF+NT3), 继续培养至 14 天。

2、实验结果

上述细胞分化结果如图 5 中的 B 所示, 结果显示 Dox 处理 3 天后, NILB-hiPSCs 由克隆状散开, 克隆边缘出现神经突触; Dox 处理 5 天后, NILB-hiPSCs 进一步散开, 神经突触不断延长, 细胞核变小, 形成神经元样的细胞。

上述结果表明, 与 Gelatin 共同包被后的 acGM 静电纺丝膜可以用于运动神经元的定向分化。

应用例 3: 乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜在鉴定运动神经元中的应用

1、实验方法

按照应用例 2 中的方法, 分别在第 7 天和第 14 天采用细胞免疫荧光染色技术对 Gelatin+acGM 静电纺丝膜中的运动神经元进行鉴定, 其中细胞免疫荧光的实验步骤包括:

(1) 在含有 Gelatin+acGM 静电纺丝膜 24 孔板中, 每个孔先用 $500 \mu\text{L}$ DPBS 清洗细胞 3 次后, 每孔加 $300 \mu\text{L}$ 4%PFA, 室温固定 15 min 至 20 min。

(2) 吸去 4% PFA, 每孔用 $500 \mu\text{L}$ DPBS 洗 3 次, 每次洗 15 min。

(3) 封闭通透: 每孔加入 $500 \mu\text{L}$ 组织封闭液, 室温封闭 1 h 至 2 h。

(4) 一抗孵育: 弃去封闭液, 加入 $400 \mu\text{L}$ 封闭液稀释好的一抗, 4°C 孵育过夜。

(5) 次日, 弃去一抗, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 15 min。

(6) 二抗孵育: 洗涤完毕后, 根据一抗的属性选择相应的荧光二抗, 经 3% BSA 稀释后, 每片加入 $300 \mu\text{L}$ 稀释好的二抗, 室温避光孵育 1 h 至 2 h。

(7) 吸去二抗, PBS 清洗 3 遍, 每次 15 min。

(8) 滴加 DAPI 工作液, 每孔加入 $400 \mu\text{L}$, 室温避光孵育 5 min, 然后用 PBS 洗涤 5 min。

(9) 吸去 PBS, 将膜转移至载玻片, 滴加 50% 甘油 ($50 \mu\text{L}$ /片), 从一端甘油的位置盖

上盖玻片，防止气泡产生，挤掉多于甘油，并擦干玻片。

(10)封片完毕后，避光保存，并置于 Zeiss710 NLO 共聚焦显微镜下进行 3D 多层扫描。

2、实验结果

细胞免疫荧光实验结果如图 6 至 8 所示，结果表明 NILB-hiPSCs 定向分化的运动神经元分散在 Gelatin+acGM 静电纺丝膜中，分化至第 7 天的时候，大量表达神经元通用标志物 TUJ1（如图 6 所示），以及运动神经元特异性标志物 HB9（如图 7 所示）。继续培养至 14 天，神经元进一步成熟，并表达成熟标志物 MAP2（如图 8 所示）。

以上结果表明，基因修饰的 NILB-hiPSCs 可以在 Gelatin+acGM 静电纺丝膜进行 3D 培养，并在药物诱导下发生定向分化，形成运动神经元。这些诱导出来的神经元大量表达运动神经元相关标志物。

综上所述，本申请提供了一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜及其制备方法与应用，其制备方法包括：首先通过吡啶、酸酐和葡甘聚糖的混合反应，经醇沉后得到乙酰化葡甘聚糖(acGM)，其有机官能团的分析结果表明，制得的 acGM 分子链上存在大量的乙酰基 ($-\text{COCH}_3$)，其乙酰度达到 3.0；进一步地，将本申请制得的乙酰化葡甘聚糖与氯仿和 N,N-二甲基甲酰胺混合反应，经超声处理后得到电纺丝溶液，然后以电纺丝溶液为原料，经静电纺丝处理后得到乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜。该制备方法简单，无需额外添加助溶性物质，成本低，适用于工业化生产。

进一步的，实验表明采用本申请制备方法制得的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的纤维形貌主要为细圆柱状，其构成乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的纤维直径为 $905 \pm 283 \text{ nm}$ ($n=10$)，且无明显的串珠结构，纤维之间相互交错成网状，形成互相通联的空隙，能够相对更好地模拟细胞外基质的结构，对促进细胞黏附和增殖具有重要作用。

此外，将本申请制得的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜应用于干细胞培养，结果表明其能够减少细胞死亡，并促进细胞增殖和定向分化。进一步地，将本申请制得的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜应用于神经元的定向分化培养，结果表明其能够定向分化。

上面对本申请实施例作了详细说明，但是本申请不限于上述实施例，在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内，还可以在不脱离本申请保护的前提下作出各种变化。此外，在不冲突的情况下，本申请的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

权 利 要 求 书

1. 一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 S1：在吡啶和酸酐的混合溶液中加入葡甘聚糖，反应后固液分离，收集固相并加入乙醇进行沉淀，然后收集沉淀即得到乙酰化葡甘聚糖；

步骤 S2：将所述乙酰化葡甘聚糖溶解于氯仿和 N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液，经超声处理后得到电纺丝溶液；

步骤 S3：以所述电纺丝溶液为原料，经静电纺丝后即得到乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 S1 中，所述葡甘聚糖与吡啶和酸酐的混合溶液的重量体积比为(0.8 - 1.2) g: 100 mL；所述混合溶液中吡啶和酸酐的体积比为 1: 0.8 - 1.2。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 S1 中，所述反应的温度为 45°C 至 60°C；

优选地，所述反应的时间为 48 h 至 96 h。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 S2 中，所述乙酰化葡甘聚糖与氯仿和 N,N-二甲基甲酰胺的混合溶液的重量体积比为(150 - 250) mg: 1 mL。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于，步骤 S2 中，所述氯仿和 N,N-二甲基甲酰胺的体积比为 1.8 - 2.5: 1。

6. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 S3 中，所述静电纺丝的参数包括：进样速度为 0.6 mL/h 至 1 mL/h，针头内径为 0.33 mm 至 0.51 mm，针头外径为 0.64 mm 至 0.81 mm。

7. 一种乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜，其特征在于，采用权利要求 1 至 6 任一项所述的制备方法制得。

8. 一种细胞培养用组合物，其特征在于，包含权利要求 7 所述的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜和明胶。

9. 根据权利要求 8 所述的细胞培养用组合物，其特征在于，所述明胶的添加量为 0.05% 至 0.2%。

10. 一种如权利要求 7 所述的乙酰化葡甘聚糖静电纺丝膜或如权利要求 8 至 9 任一项所述的细胞培养用组合物在细胞增殖和/或细胞分化培养中的应用。

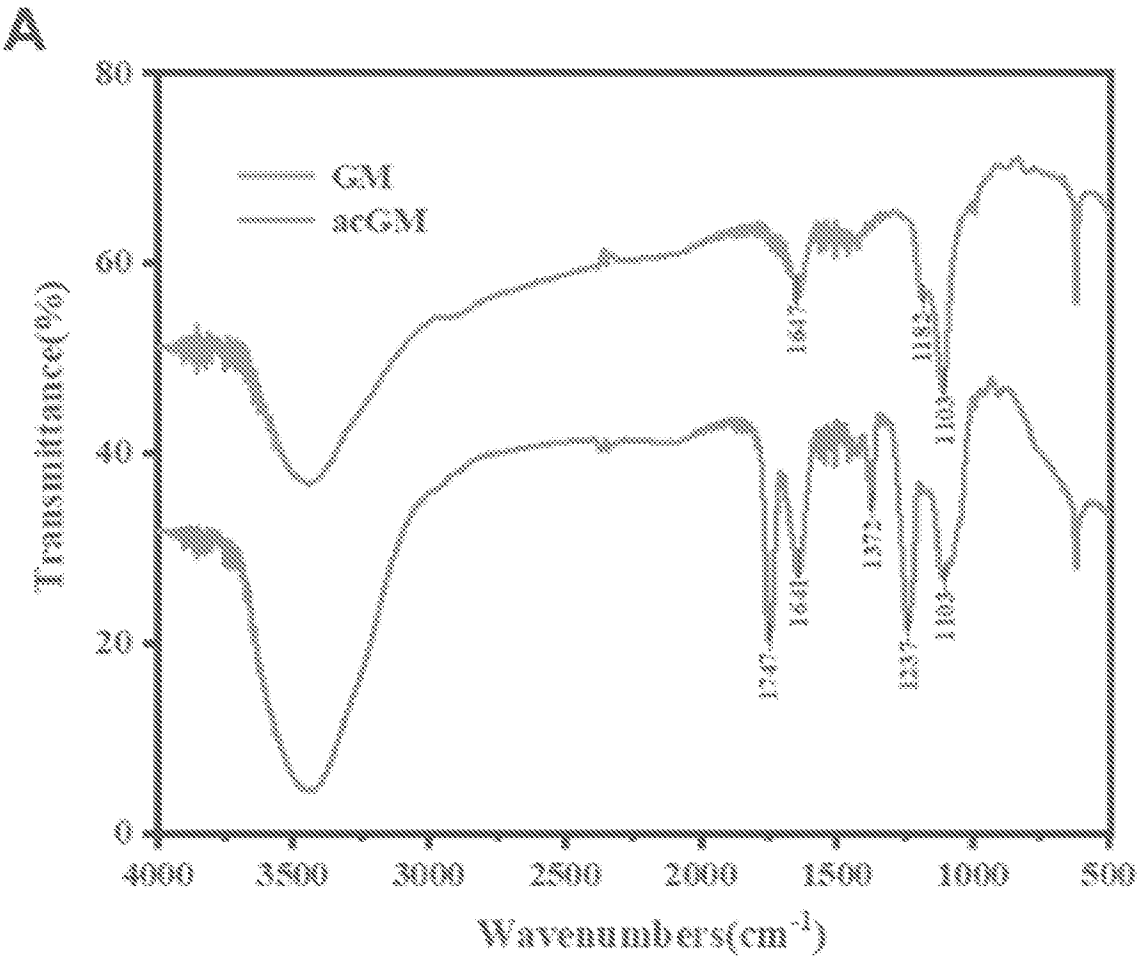


图 1

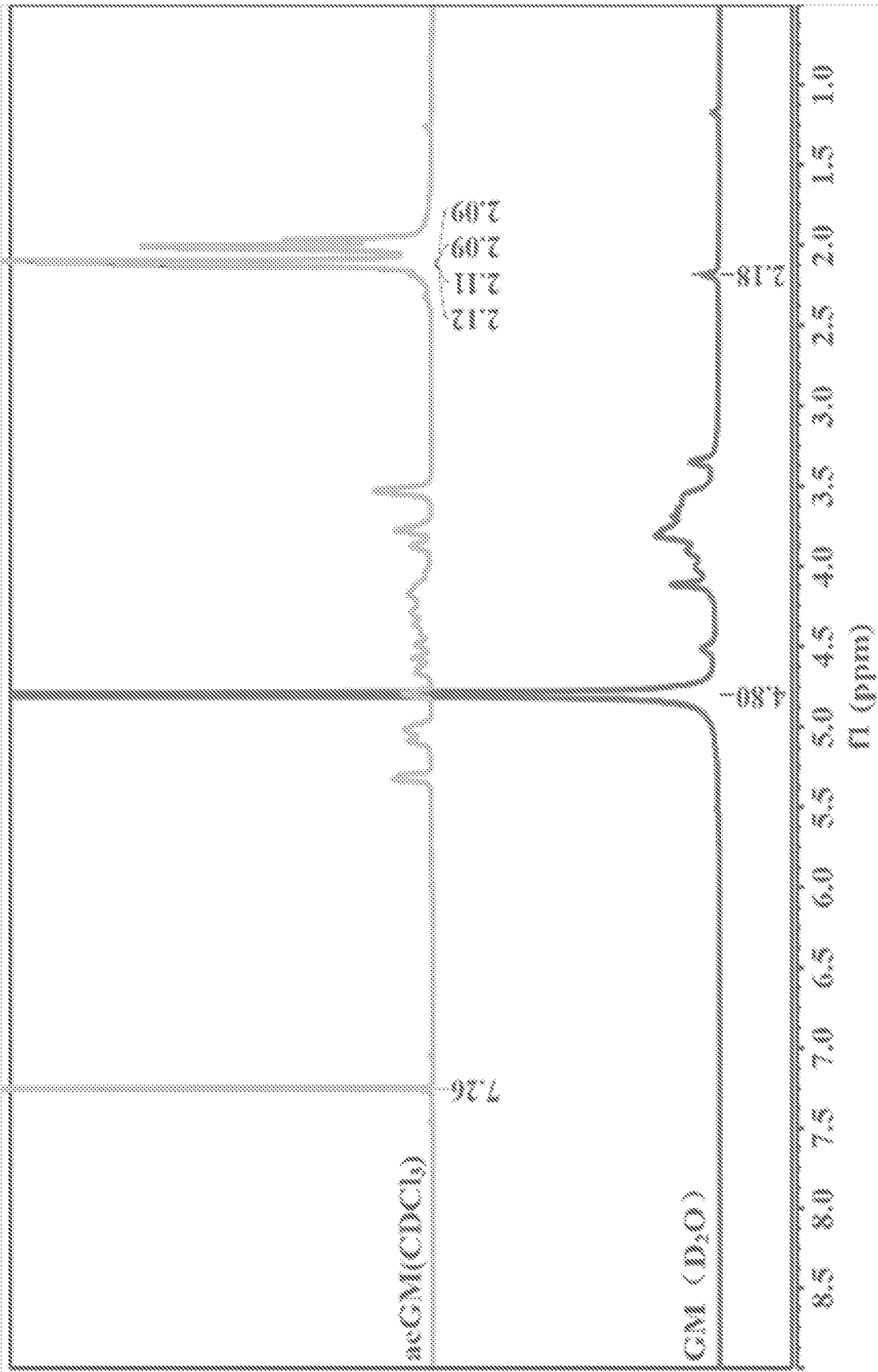


图 2

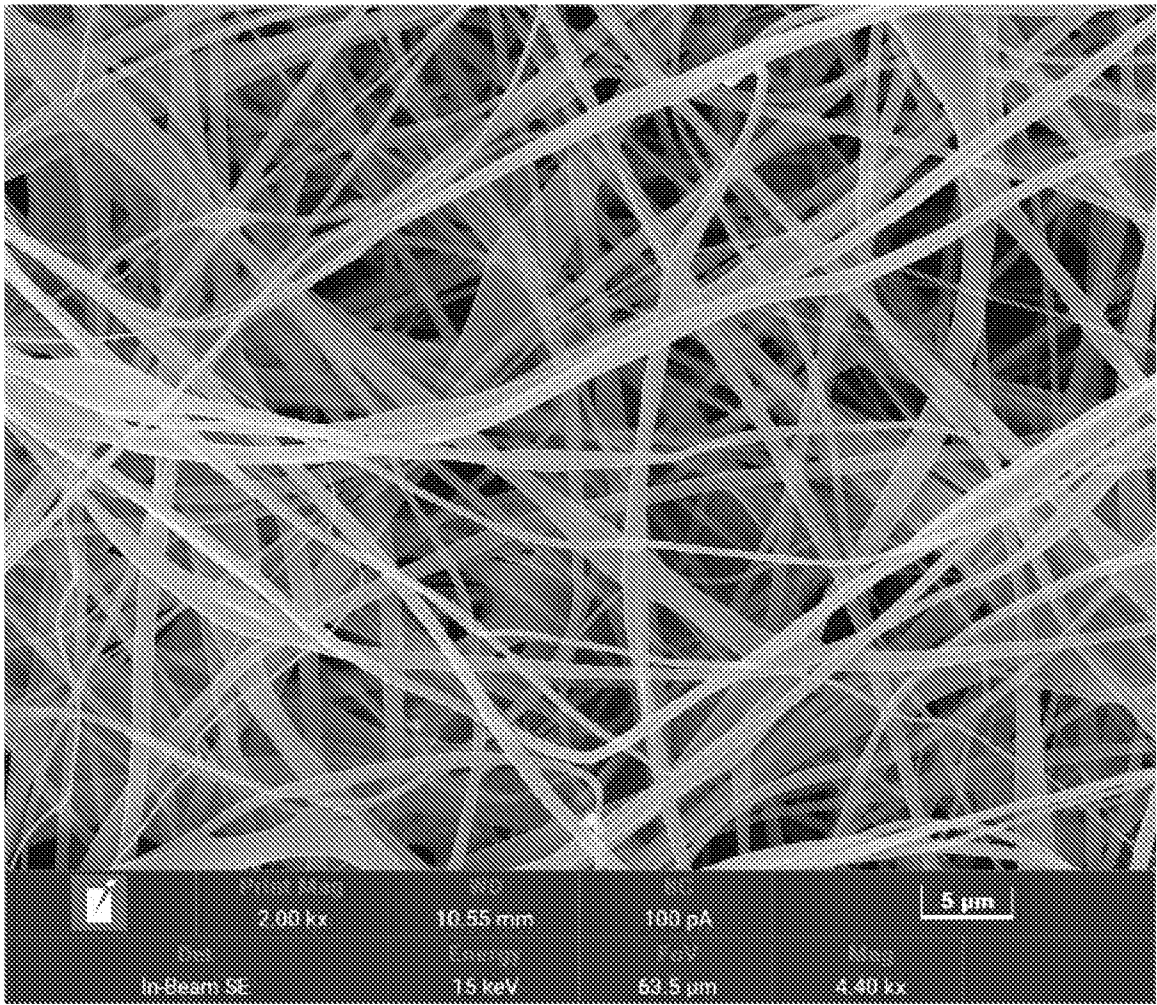


图 3

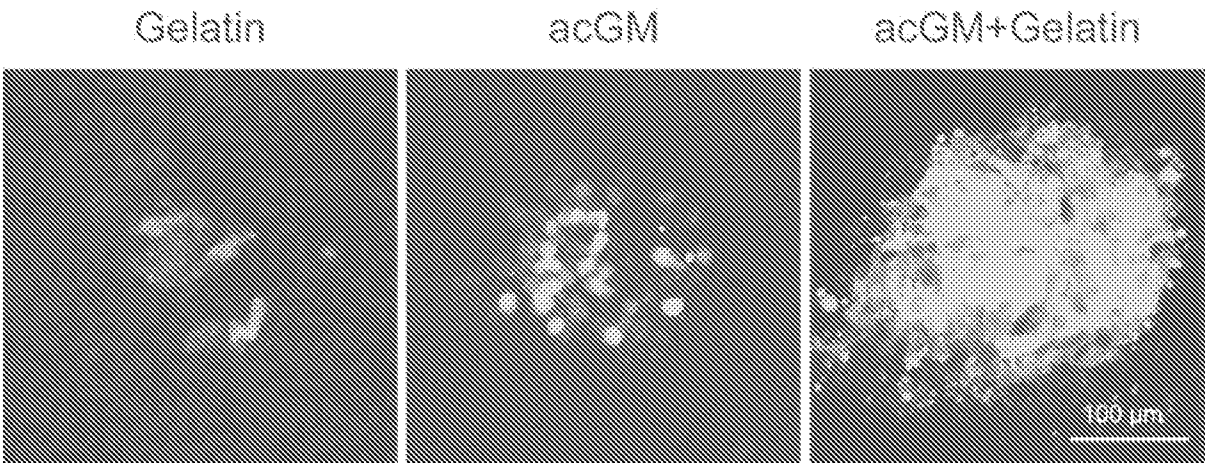


图 4

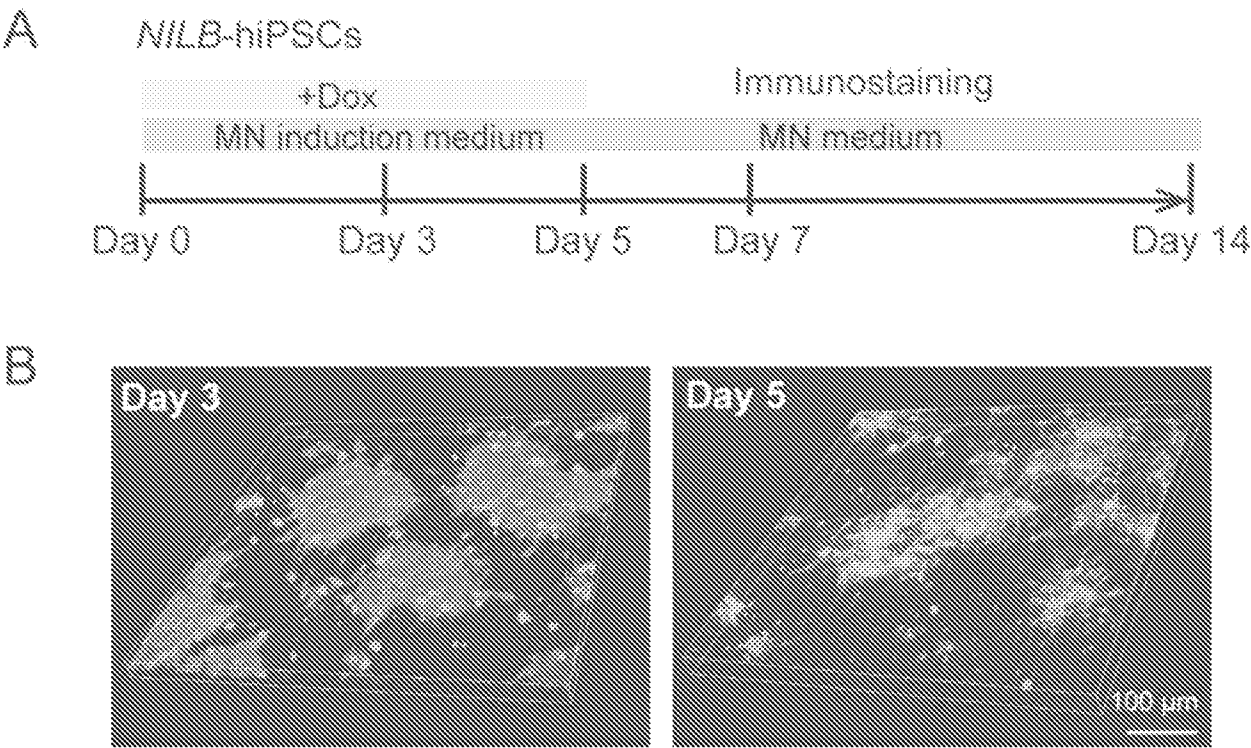


图 5

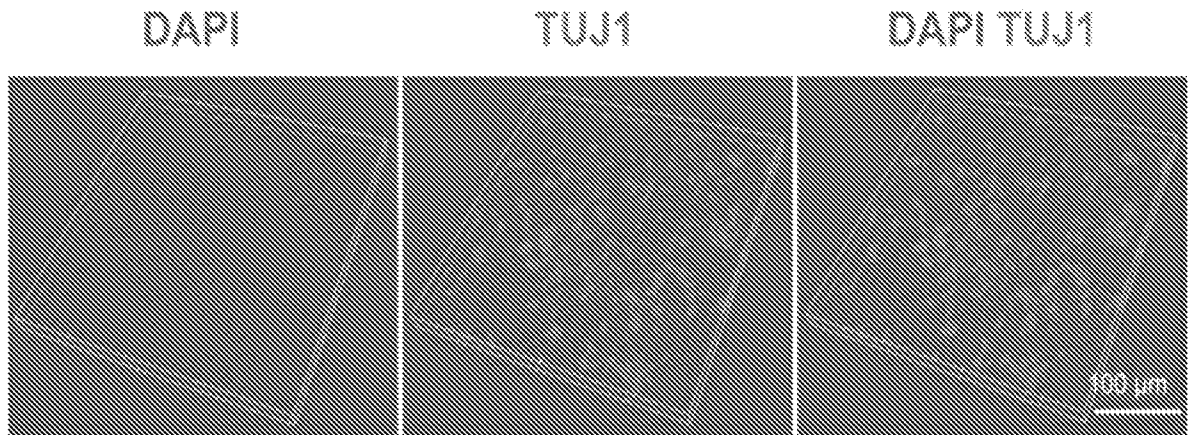


图 6

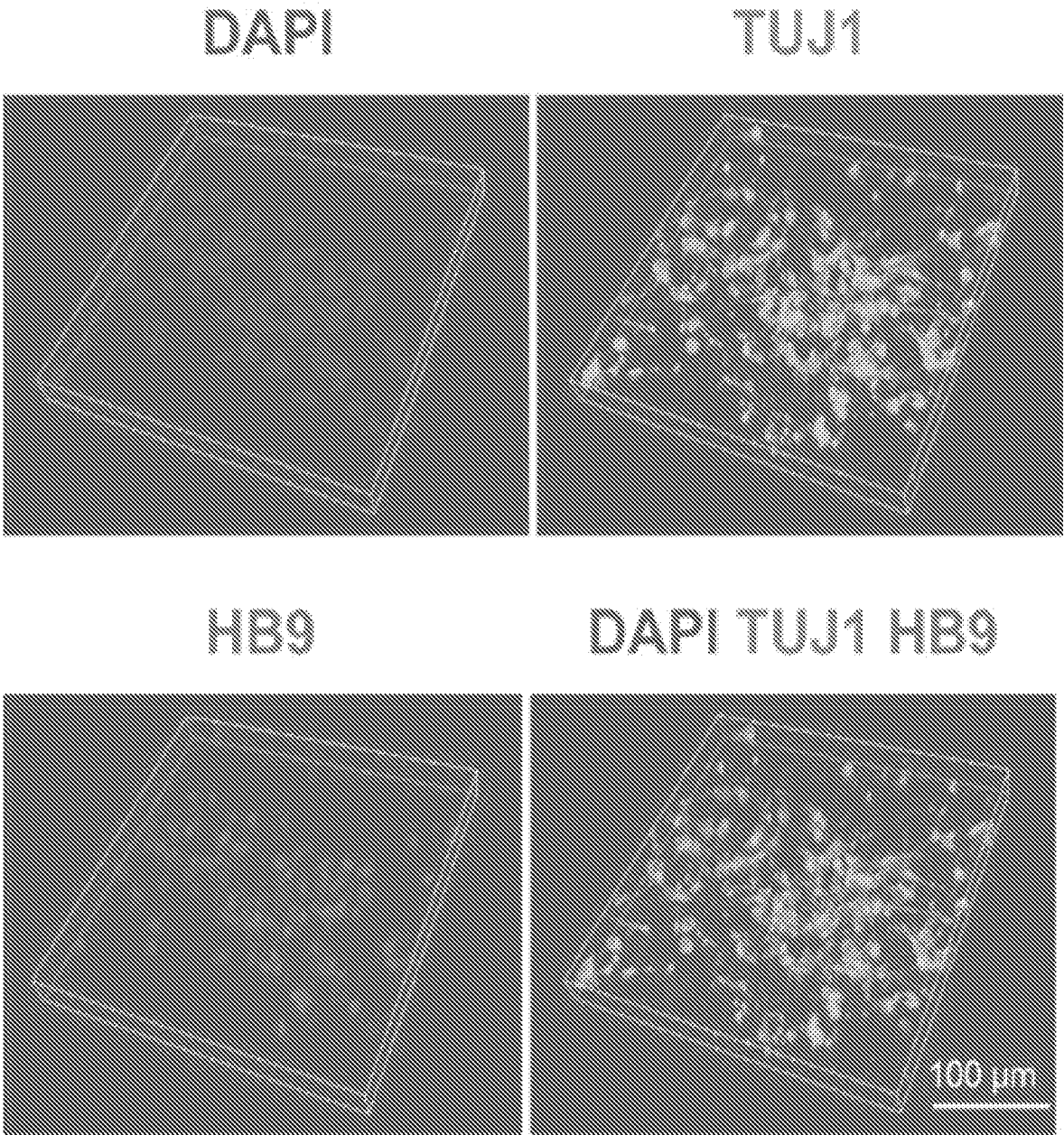


图 7

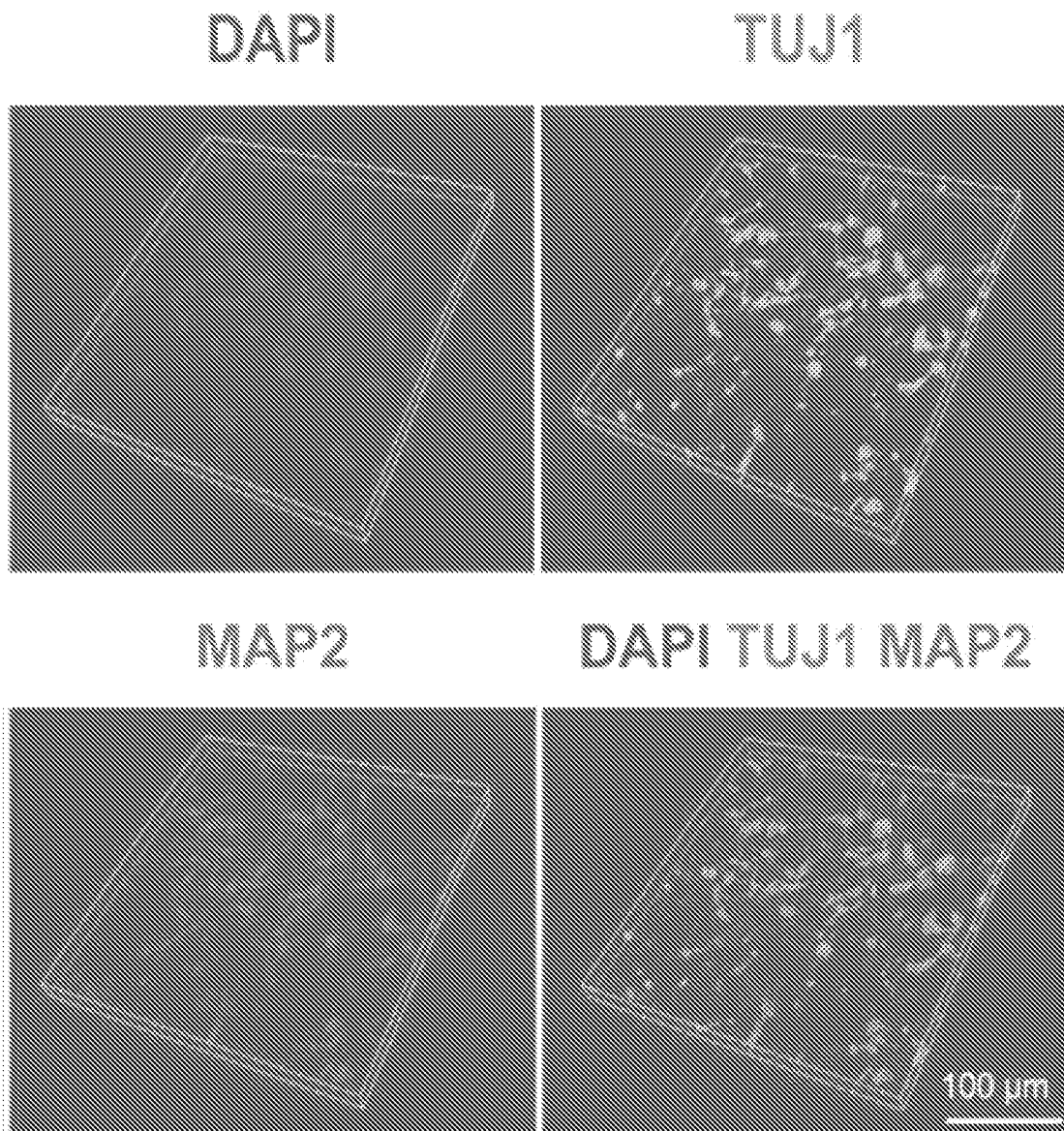


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER D04H1/728(2012.01)i; D04H1/4326(2012.01)i; D01D5/00(2006.01)i; D01F9/00(2006.01)i; C12N5/074(2010.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: D04H,D01D,D01F,C12N5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CJFD, CNTXT, ENTXTC, VEN, CNKI, ISI web of science: 包被, 沉积, 电纺, 纺丝, 纺丝膜, 浸泡, 明胶, 膜, 葡甘聚糖, 葡甘露聚糖, 葡糖苷聚糖, 葡苷聚糖, 葡苷露聚糖, 溶液, 生长, 细胞, 乙酰, 乙酰化, 增殖, 培养, gelatin, KGM, glucomannan, spinning, electrospinning, acetylated, membrane		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 117051537 A (WUYI UNIVERSITY) 14 November 2023 (2023-11-14) claims	1-10
X	王闯 (WANG, Chuang). "乙酰化魔芋葡甘聚糖的制备、生物活性及医学应用研究 (Non-official translation: Research on Preparation, Bioactivity and Medical Application of Acetylated Konjac Glucomannan)" 中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑 (China Doctoral Dissertations Full-Text Database (Basic Sciences)), No. 01, 15 January 2022 (2022-01-15), pages A006-207 ISSN: 1674-022X, paper, pages 20, 27, 71 and 77-80	1-7, 10
Y	王闯 (WANG, Chuang). "乙酰化魔芋葡甘聚糖的制备、生物活性及医学应用研究 (Non-official translation: Research on Preparation, Bioactivity and Medical Application of Acetylated Konjac Glucomannan)" 中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑 (China Doctoral Dissertations Full-Text Database (Basic Sciences)), No. 01, 15 January 2022 (2022-01-15), pages A006-207 ISSN: 1674-022X, paper, pages 20, 27, 71 and 77-80	8-9
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 July 2024		Date of mailing of the international search report 20 August 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100091

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, Chuang et al. "Preparation and Bioactivity of Acetylated Konjac Glucomannan Fibrous Membrane and its Application for Wound Dressing" <i>Carbohydrate Polymers</i> , Vol. 229, 30 September 2019 (2019-09-30), ISSN: 0144-8617, page 2, sections 2.2-2.4 and pages 3-4, sections 3.1-3.3	1-7, 10
Y	WANG, Chuang et al. "Preparation and Bioactivity of Acetylated Konjac Glucomannan Fibrous Membrane and its Application for Wound Dressing" <i>Carbohydrate Polymers</i> , Vol. 229, 30 September 2019 (2019-09-30), ISSN: 0144-8617, page 2, sections 2.2-2.4 and pages 3-4, sections 3.1-3.3	8-9
Y	WO 2006104901 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA et al.) 05 October 2006 (2006-10-05) description, page 4, lines 5-10 and page 18, line 25-pages 26, line 10	8-9
Y	CN 102675677 A (CANCER INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 19 September 2012 (2012-09-19) description, paragraphs 0042-0079	8-9
A	CN 102926016 A (SOUTHWEST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 13 February 2013 (2013-02-13) entire document	1-10
A	CN 102926027 A (SOUTHWEST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 13 February 2013 (2013-02-13) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/100091

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	117051537	A	14 November 2023	None			
WO	2006104901	A2	05 October 2006	None			
CN	102675677	A	19 September 2012	CN	102675677	B	16 April 2014
CN	102926016	A	13 February 2013	CN	102926016	B	03 December 2014
CN	102926027	A	13 February 2013	CN	102926027	B	03 December 2014

A. 主题的分类

D04H1/728(2012.01)i; D04H1/4326(2012.01)i; D01D5/00(2006.01)i; D01F9/00(2006.01)i; C12N5/074(2010.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: D04H,D01D,D01F,C12N5

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CJFD,CNTEXT,ENTXTC,VEN,CNKI,ISI web of science:包被,沉积,电纺,纺丝,纺丝膜,浸泡,明胶,膜,葡甘聚糖,葡甘露聚糖,葡糖苷聚糖,葡苷聚糖,葡苷露聚糖,溶液,生长,细胞,乙酰,乙酰化,增殖, 培养, gelatin,KGM, glucomannan, spinning,electrospinning, acetylated, membrane

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 117051537 A (五邑大学) 2023年11月14日 (2023 - 11 - 14) 权利要求书	1-10
X	王闯. "乙酰化魔芋葡甘聚糖的制备、生物活性及医学应用研究" 中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑, 第01期, 2022年1月15日 (2022 - 01 - 15), A 006-207页 ISSN: 1674-022X, 论文第20、27、71、77-80页	1-7, 10
Y	王闯. "乙酰化魔芋葡甘聚糖的制备、生物活性及医学应用研究" 中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑, 第01期, 2022年1月15日 (2022 - 01 - 15), A 006-207页 ISSN: 1674-022X, 论文第20、27、71、77-80页	8-9

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年7月29日

国际检索报告邮寄日期

2024年8月20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

卢利清

电话号码 (+86) 020-28950283

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	Chuang Wang 等. "Preparation and bioactivity of acetylated konjac glucomannan fibrous membrane and its application for wound dressing" Carbohydrate Polymers, 第229卷, 2019年9月30日 (2019 - 09 - 30), ISSN: 0144-8617, 第2页2.2-2.4部分以及第3-4页3.1-3.3部分	1-7, 10
Y	Chuang Wang 等. "Preparation and bioactivity of acetylated konjac glucomannan fibrous membrane and its application for wound dressing" Carbohydrate Polymers, 第229卷, 2019年9月30日 (2019 - 09 - 30), ISSN: 0144-8617, 第2页2.2-2.4部分以及第3-4页3.1-3.3部分	8-9
Y	WO 2006104901 A2 (UNIV FLORIDA 等) 2006年10月5日 (2006 - 10 - 05) 说明书第4页第5-10行, 第18页第25行-第26页第10行	8-9
Y	CN 102675677 A (中国医学科学院肿瘤医院) 2012年9月19日 (2012 - 09 - 19) 说明书第0042-0079段	8-9
A	CN 102926016 A (西南科技大学) 2013年2月13日 (2013 - 02 - 13) 全文	1-10
A	CN 102926027 A (西南科技大学) 2013年2月13日 (2013 - 02 - 13) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/100091

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	117051537	A	2023年11月14日	无	
WO	2006104901	A2	2006年10月5日	无	
CN	102675677	A	2012年9月19日	CN 102675677	B 2014年4月16日
CN	102926016	A	2013年2月13日	CN 102926016	B 2014年12月3日
CN	102926027	A	2013年2月13日	CN 102926027	B 2014年12月3日