

聚赖氨酸抗菌肽改性明胶多功能水凝胶的构建与应用

江云静, 黄童黛, 曹玉玉, 白荣先, 吴杰, 王祖曦, 孙红梅

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 发酵工程教育部重点实验室,
国家细胞调控与分子药物“111”引智基地, 工业微生物湖北省重点实验室,
湖北省工业发酵协同创新中心, 武汉 430068)

摘要 将 ϵ -聚赖氨酸(EPL)抗菌肽接枝到明胶上, 合成 ϵ -聚赖氨酸改性明胶(GEL-E)后, 以GEL-E、羧甲基壳聚糖(CMC)和氧化硫酸软骨素(OCS)为原料, 制备了一种具有可注射性、自愈合性及抗菌性的多功能快速凝胶化水凝胶——GEL-E/CMC/OCS水凝胶。该水凝胶具有较高的储能模量、弹性形变性能、自愈合性能、可注射性能以及抗菌性能。将甘草酸二钾(DG)载入水凝胶, 赋予水凝胶抗炎特性以及促伤口愈合能力。初步评价了水凝胶的释药行为。结果表明, 药物释放可达100%。同时, 评价了载药后水凝胶的细胞相容性以及促细胞迁移能力, 发现水凝胶对细胞的毒性很低, 且可以促进细胞迁移。研究结果表明, 该水凝胶具有良好的力学性能、生物相容性以及促细胞迁移能力, 在促进伤口愈合领域具有广阔的应用前景。

关键词 多功能水凝胶; 聚赖氨酸; 抗菌肽; 伤口敷料

中图分类号 O636

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20230312

Construction and Application of Polylysine Peptide Modified Gelatin Multifunctional Hydrogel

JIANG Yunjing, HUANG Tongdai, CAO Yuyu, BAI Rongxian,

WU Jie, WANG Zuxi, SUN Hongmei*

(Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), HBUT National “111” Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, Key Laboratory of Industrial Microbiology in Hubei, Hubei Province Cooperative Innovation Center for Industrial Fermentation, School of Bioengineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract The ϵ -polylysine (EPL) antibacterial peptide was grafted onto gelatin to synthesize EPL-modified gelatin (GEL-E), afterwards, a multifunctional hydrogel, GEL-E/CMC/OCS hydrogel, with injectable, self-healing and antibacterial properties was prepared using GEL-E, carboxymethyl chitosan (CMC) and chondroitin oxysulfate (OCS). The experimental results showed that the hydrogel prepared has high energy storage modulus, elastic deformation, self-healing, injectable and antibacterial properties. Dipotassium glycyrrhizinate (DG) was loaded into hydrogel, which endowed the hydrogel with anti-inflammatory properties and wound healing ability. The results showed that the drug release rate could reach 100%. Meanwhile, the cell compatibility and the ability of promoting cell migration were evaluated, the results showed that the hydrogels presented very low cytotoxicity and could promote cell migration. All the above results indicated that the GEL-E/CMC/OCS hydrogel has good mechanical properties,

收稿日期: 2023-07-04. 网络首发日期: 2023-10-19.

联系人简介: 孙红梅, 女, 博士, 副教授, 主要从事新型医用材料构建方面的研究. E-mail: hmsunqi@163.com

基金项目: 湖北工业大学国家细胞调控与分子药物“111”引智基地青年项目(批准号: XBTK-2022007)资助.

Supported by the HBUT National “111” Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, China (No. XBTK-2022007).

biocompatibility and ability to promote cell migration, and has broad application prospects in the field of promoting wound healing.

Keywords Multifunctional hydrogel; Polylysine; Antimicrobial peptide; Wound dressing

伤口敷料在促进伤口愈合过程中发挥着重要作用^[1]. 传统的伤口敷料, 例如纱布、海绵等^[2], 因为伤口环境的复杂性和多样性, 无法满足多种类伤口愈合的需求^[3]. 因此, 迫切需要开发一种多功能伤口敷料, 以适应不同种类的伤口.

在新型伤口敷料中, 水凝胶伤口敷料由于保水量高、生物相容性好等优势而被广泛研究^[4-6]. 在各类新型水凝胶伤口敷料中, 越来越多的可注射、自愈水凝胶被开发出来^[7,8]. 具有可注射性的水凝胶能够填充不同形状和深度的不规则伤口, 且原位形成的水凝胶具有高区域药物浓度、缓释特性、低毒性和生物相容性, 利于伤口愈合^[9-11]; 具有自愈性的水凝胶能够及时修复敷料, 避免运动时敷料由于伤口的拉伸而破损, 防止伤口暴露于外界环境而感染^[12]. 基于席夫碱反应形成的水凝胶能够同时满足可注射和自愈两种特性^[13]. 硫酸软骨素是人体组织细胞外基质中最丰富的糖胺聚糖, 具有良好的生物相容性和生物降解性, 氧化后的硫酸软骨素含有醛基, 可以与含有丰富氨基的羧甲基壳聚糖形成席夫碱键. 另外, 通常慢性伤口容易被外界细菌侵入, 造成伤口感染. 开发具有抗菌功能的水凝胶伤口敷料显得尤为重要^[14-17]. ϵ -聚赖氨酸(EPL)作为一种天然抗菌肽^[18], 是一种理想的抗菌材料.

基于上述研究背景, 本文构建了以EPL改性明胶(GEL-E)、羧甲基壳聚糖(CMC)和氧化硫酸软骨素(OCS)为原料的水凝胶(GEL-E/CMC/OCS水凝胶). 首先, 将具有抗菌作用的EPL接枝到明胶上, 合成GEL-E, 赋予水凝胶固有的抗菌活性; 然后, 基于OCS的醛基分别与GEL-E以及CMC中的氨基缩合形成亚氨键(席夫碱键), 构成双交联的GEL-E/CMC/OCS水凝胶网络; 最后, 在GEL-E/CMC/OCS水凝胶中包载抗炎药物甘草酸二钾(DG)^[19], 以实现在抗菌的同时消除由于细菌感染导致的伤口炎症, 促进肉芽组织的生长, 加快伤口愈合的进程.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

明胶、 ϵ -聚赖氨酸、硫酸软骨素、高碘酸钠、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 上海麦克林生化科技有限公司; 磷酸盐缓冲液(PBS), 赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司.

HAAKE RheoStress 6000型旋转流变仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司; UV-1800型紫外-可见(UV-Vis)分光光度计, 岛津仪器(苏州)有限公司; Thermo Scientific Nicolet iN10型傅里叶变换红外光谱仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司.

1.2 实验过程

1.2.1 GEL-E的制备 在40 °C下, 将0.3 g明胶溶解于20 mL水中; 向上述明胶溶液中加入0.36 g EDC和0.42 g NHS, 反应1 h; 然后向上述反应液中加入2 mL浓度为5 mg/mL的EPL溶液; 将混合溶液在40 °C下充分搅拌反应24 h; 得到的产物在超纯水中用透析袋(MWCO=8000~14000)透析3 d, 冷冻干燥24 h, 得到GEL-E.

1.2.2 OCS的制备 参照文献^[20]方法制备OCS. 在室温、黑暗条件下, 向10 mL硫酸软骨素(5%, 质量分数)中加入0.35 g高碘酸钠; 剧烈搅拌6 h后, 加入20 mL无水乙醇, 继续搅拌20 min, 随后终止反应; 静置1 h后, 将反应得到的白色絮状产物透析(MWCO=8000~14000)透析, 冷冻干燥, 得到白色泡沫材料OCS.

1.2.3 水凝胶的制备 在室温条件下, 在PBS(0.1 mol/L, pH=7.4)缓冲溶液中分别配制CMC溶液(6%, 质量分数)、GEL-E溶液(10%, 质量分数)和OCS溶液(10%, 质量分数). 将0.5 mL CMC溶液加入0.5 mL GEL-E溶液中, 搅拌均匀后再加入0.5 mL OCS溶液, 约30 s后形成GEL-E/CMC/OCS水凝胶. 类似地, 将OCS溶液加入至CMC溶液中, 得到CMC/OCS水凝胶. 将CMC溶液加入GEL-E/DG混

合溶液中搅拌均匀后再加入 OCS 溶液, 得到 GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶(DG 在水凝胶中的浓度为 10 mg/mL).

1.2.4 水凝胶的流变性能测试 在室温、固定恒定应变为 0.5% 的条件下, 对 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶进行频率扫描(角速度范围为 0.1~100 rad/s), 测定 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶的模量变化以及黏度变化; 在室温、固定恒定频率为 1 Hz 的条件下, 对 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶进行应变范围为 0.01%~1000% 的扫描, 测定 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶的模量变化.

1.2.5 水凝胶的药物释放性能测试 首先绘制 DG 标准曲线, 然后将 GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶置于透析袋(MWCO=8000~14000)中透析, 透析液为 100 mL pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液, 温度设置为 37 °C. 在 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10 和 12 h 各取 2 mL 透析液, 用于测试紫外吸光度, 并补充等量新鲜透析液. 待紫外吸收值不再增加时, 停止透析, 并根据 DG 的标准曲线计算出取出的透析液的药品浓度, 根据浓度计算释放药品质量. 释放药品的总质量与载药量的比值即为累积释药率.

1.2.6 水凝胶的体外抗菌性能评价 采用涂布平板法评价水凝胶的体外抗菌性能. 在样品瓶中制备 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶, 将 100 μ L 稀释后的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)菌悬液(1×10^6 CFU/mL)与水凝胶混合, 在 37 °C 的培养箱中共孵育 24 h; 加入 1 mL 无菌 PBS 缓冲溶液来重悬存活菌; 然后取 100 μ L 该菌液加入至平板中, 用三角涂布棒涂布均匀后, 于 37 °C 恒温培养箱中培养 24~48 h, 观察各组琼脂平板的细菌生长情况. 空白对照组的菌悬液中不含任何样品.

1.2.7 水凝胶的血液相容性评价 用无菌 PBS 稀释枸橼酸钠抗凝兔血, 并离心数次, 收集纯兔红细胞. 将得到的兔红细胞用 PBS 稀释成 5% (体积分数) 的红细胞悬浮液. 同时, 向 CMC/OCS 水凝胶、GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶中加入 PBS 缓冲液, 于 37 °C 下浸泡 24 h, 得到水凝胶的样品提取液. 将 200 μ L 兔红细胞悬浮液加入到 800 μ L 不同水凝胶的样品提取液中作为样品组; 将 200 μ L 兔红细胞悬浮液加入到 800 μ L 无菌 PBS 缓冲液中作为阴性对照组; 将 200 μ L 兔红细胞悬浮液加入到 800 μ L 0.2% Triton X-100 中作为阳性对照组. 于 37 °C 下共孵育 3 h, 使各组发生溶血; 溶血完成后, 在 1000 r/min 的转速下离心 10 min, 各组取 100 μ L 上清液置于 96 孔板中, 用酶标仪在 540 nm 处测其吸光度(A)值. 溶血率(HR, %)按下式计算:

$$HR = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{negative}}}{A_{\text{positive}} - A_{\text{negative}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_{sample} , A_{negative} 和 A_{positive} 分别为样品组、阴性对照组和阳性对照组的吸光度值.

1.2.8 水凝胶的细胞相容性评价 在含有胎牛血清(10%)和青霉素-链霉素(1%)的 DMEM 完全培养基中培养 L929 细胞. 将所有细胞保存在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中, 采用 MTT 法检测水凝胶的细胞相容性. 向灭菌后的 CMC/OCS 水凝胶、GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶中分别加入 DMEM 完全培养基, 超声后于 37 °C 下浸泡 24 h, 得到各组水凝胶的样品浸出液; 在 96 孔板的部分孔中分别加入 PBS 缓冲溶液和不含有细胞的 DMEM 完全培养基, 设为 PBS 组和调零组, 其它孔各加入 100 μ L 浓度为 1×10^5 cell/mL 的 L929 细胞, 于 37 °C 下孵育 24 h; 取出 96 孔板, 吸出部分含有 L929 细胞的孔中的 DMEM 完全培养基, 将不同组的样品浸出液加入至 96 孔板中, 设为实验组; 其它含有细胞不含样品浸出液的孔设为对照组; 分别培养 12 及 24 h 后, 吸出所有实验组的 DMEM 完全培养基, 加入 PBS 缓冲液洗涤一次, 再添加新鲜的 DMEM 完全培养基; 黑暗环境下, 依次向调零组、对照组和实验组的每个孔中加入 20 μ L MTT, 然后于 37 °C 下培养 4 h; 将 96 孔板取出, 吸出除 PBS 组外的所有组的液体, 再向除 PBS 组外的所有组中加入 150 μ L 二甲基亚砜溶液, 于 100 r/min 转速下振荡 10 min 后, 用酶标仪检测在 490 nm 处的吸光度值. 细胞存活率(CV, %)按下式计算:

$$CV = \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{zero}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{zero}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $A_{\text{experiment}}$, A_{zero} 和 A_{control} 分别为实验组、调零组和对照组的吸光度值.

1.2.9 水凝胶的促细胞迁移能力研究 向灭菌后的 CMC/OCS 水凝胶、GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶中分别加入无血清培养基，超声后于 37 °C 下浸泡 24 h，得到各组水凝胶的样品浸出液。将处于对数期增殖的 L929 细胞接种至 12 孔板中，用 DMEM 完全培养基培养，待细胞铺满孔板后，吸出培养基，用 10 μ L 枪头划伤细胞表面，并用 PBS 缓冲液轻轻冲洗划痕处的死细胞，实验组加入样品浸出液，对照组加入无血清培养基，在培养箱中孵育，然后在 0, 12 和 24 h 置于显微镜下成像并拍照。采用 imageJ 软件测量划痕区域面积，根据下式计算各时间点的细胞迁移率(MR, %)：

$$MR(\%) = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中： C_0 (cm^2)为细胞划痕 0 h 后的划痕面积； C_t (cm^2)为细胞在划痕 12 和 24 h 后的划痕面积。在细胞划痕实验中使用无血清培养基，从而可以忽略细胞增殖及血清成分对实验的影响。

2 结果与讨论

2.1 水凝胶的构建

GEL-E/CMC/OCS 水凝胶以 GEL-E, CMC 和 OCS 为原料，通过席夫碱反应连接形成。由图 1 可见，与硫酸软骨素相比，OCS 在 1720 cm^{-1} 处出现新的红外吸收峰，对应 C=O 的伸缩振动带，说明有醛基形成，证实了 OCS 的成功制备。与明胶相比，GEL-E 在 3291 cm^{-1} 处的透过率降低，表明 GEL-E 的酰胺基峰吸收增强，EPL 的羧基和明胶的氨基反应形成了酰胺基。在 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶的红外图谱中，OCS 在 1720 cm^{-1} 处对应醛基的吸收峰消失，GEL-E 在 3291 cm^{-1} 处的酰胺基吸收峰和酰胺 I, II 和 III 带的吸收峰均减弱，这归因于水凝胶中动态亚胺键的形成^[21,22]。

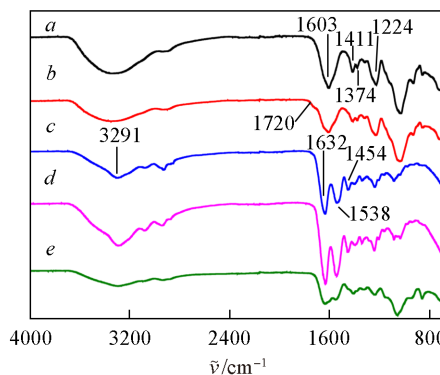


Fig. 1 FTIR spectra of chondroitin sulfate(a), OCS(b), gelatin(c), GEL-E(d) and GEL-E/CMC/OCS hydrogel(e)

宏观的溶胶-凝胶相变过程如图 2(A) 所示。将 GEL-E, CMC 和 OCS 溶液混合均匀后，置于室温环

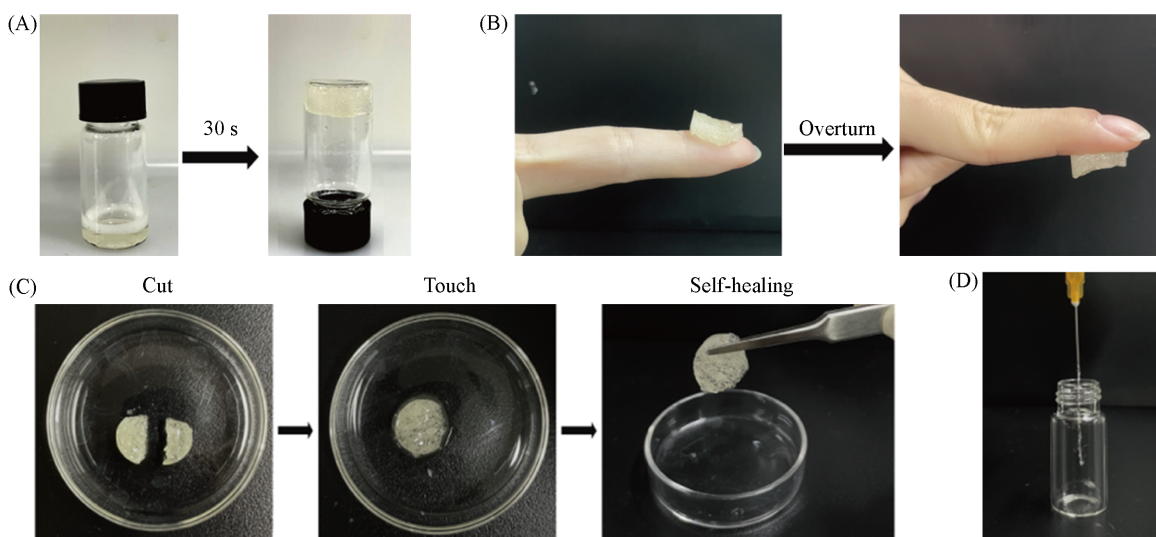


Fig. 2 Images showing the formation(A), adhesiveness(B), self-healing process(C) and injectability(D) of GEL-E/CMC/OCS hydrogel

境下, 约 30 s 能形成水凝胶, 并且形成的水凝胶呈现无色透明的形态, 这一特点使其作为伤口敷料能够很直观地透过水凝胶观察到伤口愈合的过程, 对于临床治疗至关重要. 皮肤黏附实验结果表明, GEL-E/CMC/OCS 水凝胶能够黏附在皮肤表面且倒置也不掉落, 这可能是由于水凝胶中未发生席夫碱反应的醛基与皮肤上的氨基作用形成化学键^[23], 从而产生黏附性[图 2(B)].

当伤口处于运动状态时, 伤口敷料容易因为伤口运动产生的拉伸和应力而出现破损, 从而使伤口暴露于外界环境中, 容易造成伤口的二次感染, 延缓伤口愈合的进程^[12,24]. 具有自愈性能的水凝胶伤口敷料能够解决这一难题. 由图 2(C) 可见, 将一块完整的 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶切成两个半圆形, 再将两个半圆形水凝胶相互接触, 于室温下放置 30 min 后, 两个半圆形水凝胶通过自愈合恢复为初始的圆形, 用镊子夹起水凝胶, 在重力作用下水凝胶也不会再次破损, 表明 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶具有良好的自愈合性能. 接下来对水凝胶的注射性能进行了评价. 由图 2(D) 可见, GEL-E/CMC/OCS 水凝胶能够从规格为 1 mL 的注射器的针头中连续且不断裂地挤出, 这表明该水凝胶具有良好的可注射性能.

图 3 示出 CMC/OCS 和 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶的 SEM 照片. 可见, 冻干后的水凝胶呈现出多孔结构, 且两种水凝胶在形貌上有区别. 由于 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶[图 3(B)]具有双交联网络, 因此显示出比 CMC/OCS 水凝胶[图 3(A)]更小的孔径.

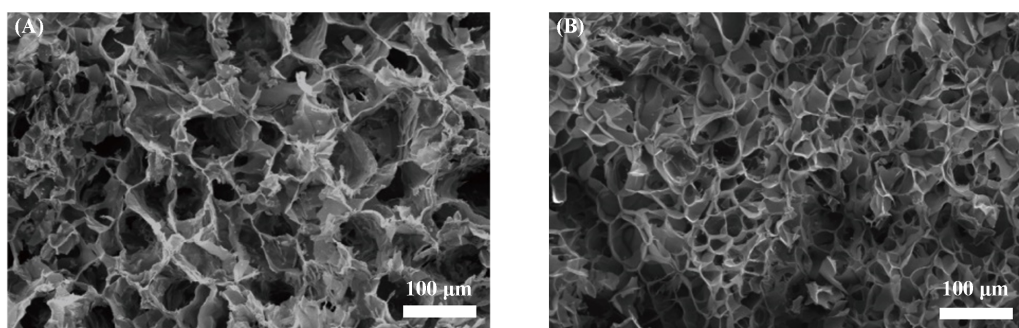


Fig. 3 SEM images of CMC/OCS hydrogel(A) and GEL-E/CMC/OCS hydrogel(B)

2.2 水凝胶的流变性能

在宏观自愈合实验的基础上, 从流变学角度, 以 CMC/OCS 水凝胶作为对照, 对 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶的自愈合性能进行了测试. 由图 4(A) 可见, 在应变扫描测试中, 当应变上升至接近 400% 时, 水凝胶的储能模量(G')与损耗模量(G'')相等, 此时两种水凝胶达到最大临界应变, 处于固液之间的状态, 当应变大于或等于 400% 之后, 水凝胶的结构完全被破坏. 因此, 通过水凝胶的流变行为检测水凝胶的自愈合性能时, 将连续循环应变设置为 1%~400%[图 4(B)]. 在 1% 的应变下, 水凝胶的 G' 大于 G'' , 表明此时水凝胶还是黏弹性固体, 结构完好; 当应变上升至 400% 时, 水凝胶的 G' 小于 G'' , 此时水凝胶的结构已经被完全破坏; 当应变再次恢复至 1% 时, 水凝胶的 G' 和 G'' 能够恢复至初始值, 且 G' 大于 G'' , 表明水凝胶的结构已经通过自愈合恢复至初始状态. 水凝胶在经过 3 个应变循环后, G' 和 G'' 仍能恢复至初始值, 表明水凝胶具有快速、稳定且高效的自愈能力. 宏观自愈合结果和流变恢复行为均证明 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶具有优秀的自愈合能力.

为了分析水凝胶的流变性能, 在室温及固定应变下对 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶在 0.1~100 rad/s 的角速度范围内进行扫描, 测定 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶在振荡频率下的模量变化及黏度变化[图 4(C)]. 结果表明, GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶的 G' 均高于 G'' , 表明水凝胶为黏弹性固体. 并且 GEL-E 的加入使水凝胶的 G' 和 G'' 增大, 说明 GEL-E/CMC/OCS 水凝胶的力学性能增强. 这是由于 GEL-E 和 CMC 的氨基都与 OCS 的醛基缩合形成了亚氨键, 从而形成了动态双交联网络. 由剪切速率扫描测试结果[图 4(D)]可以看出, GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 CMC/OCS 水凝胶的黏度随着剪切速率的增加而明显降低. 这证实了典型的水凝胶的剪切稀

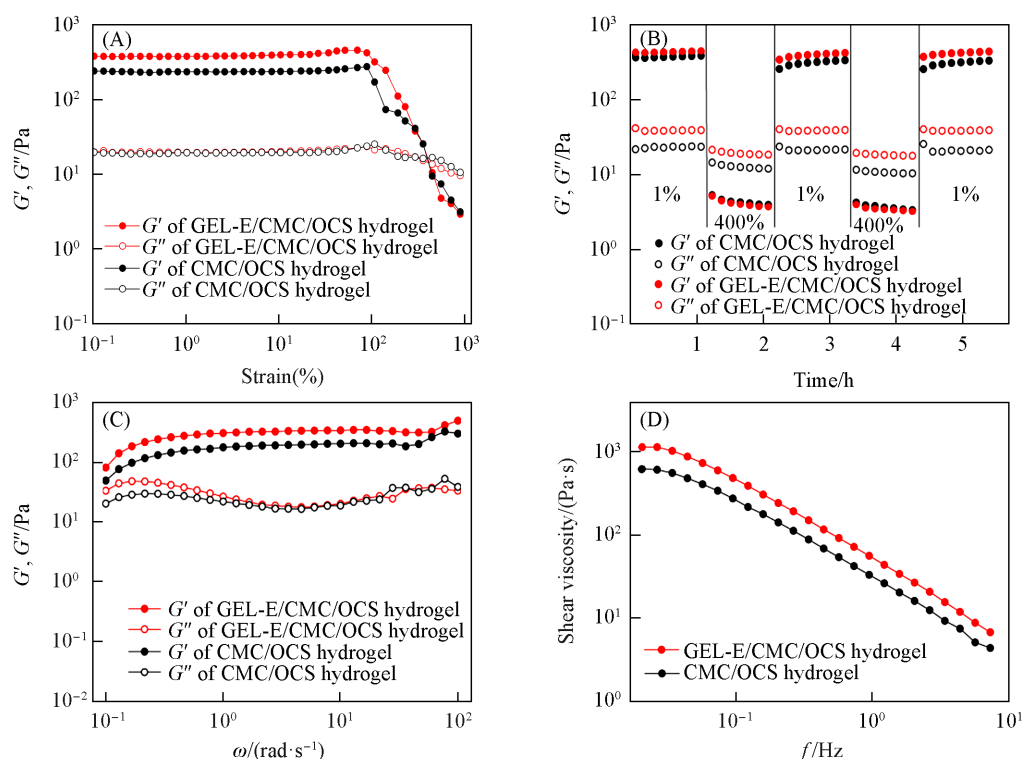


Fig. 4 Rheological behavior of hydrogels

(A) Storage modulus of hydrogels under stress scanning; (B) storage modulus ($n=3$) of hydrogel during destructive shear (strain increase from 1% to 400%) and recovery (1% strain); (C, D) storage modulus (C) and shear viscosity (D) of hydrogel under oscillatory frequency scanning.

化行为。

2.3 水凝胶的释药行为

DG是从甘草中分离出来的甘草酸的一种水溶性盐,具有抗炎、解毒、促进肉芽组织生长等多种功效^[25].为了赋予GEL-E/CMC/OCS水凝胶的抗炎能力,将DG包载于水凝胶中,并评价了水凝胶在生理环境下的体外药物释放能力.由DG的标准曲线[图5(A)]可见,药物的紫外吸光度随浓度的增加而增加,并显示出线性关系,相关系数达到0.999,表明两个变量之间具有很好的相关性.

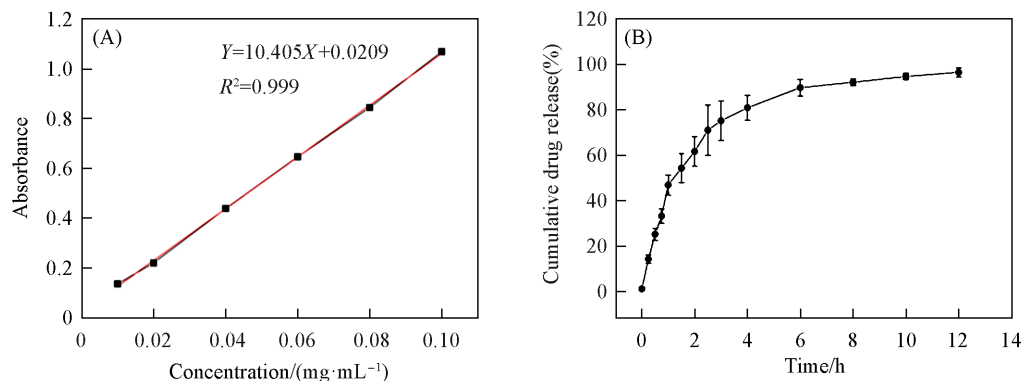


Fig. 5 Standard curve of DG(A) and cumulative release rate curve of DG from GEL-E/CMC/OCS/DG hydrogel(B)

将DG载入GEL-E/CMC/OCS水凝胶后,将载药的GEL-E/CMC/OCS/DG水凝胶放置在透析袋中,透析液模拟生理环境($\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液, $37\text{ }^\circ\text{C}$),在特定时间取样并测定紫外-可见吸收值.根据测得的紫外吸收值对照标准曲线计算出释放药品质量后,用释放药品总质量与载药量的比值得到累积释药率.以时间为横坐标,累积释药率为纵坐标绘制累计药物释放曲线.由图5(B)可见,DG在0~1 h内

迅速释放, 在 1~4 h 内释放速率减缓, 在达到 4 h 之后释放速率明显减缓, 累积释放药物速率逐渐达到平台期. GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶表现出缓释行为.

2.4 水凝胶的抗菌性能

S. aureus 是革兰氏阳性球菌, 通常被认为是伤口细菌感染的主要原因^[19]. 当伤口感染 *S. aureus* 后, 会出现黄色脓性分泌物. 为了评价水凝胶的抗菌性能, 采用涂布平板法进行了抗菌实验, 实验结果见图 6. 空白对照组的琼脂平板上长了大量菌落; CMC/OCS 组的琼脂平板上的菌落稍显减少, 其抗菌作用可能是来自于羧甲基壳聚糖残留的氨基; GEL-E/CMC/OCS 水凝胶组和 GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶组的琼脂平板上的菌落数明显减少, 这是由于水凝胶中接枝的抗菌肽 EPL 能够作用于细菌细胞膜, 破坏细胞膜的完整性, 使细胞内外屏障丧失, 从而杀灭细菌^[26,27]. 以上结果表明, GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶具有良好的抗菌性能.

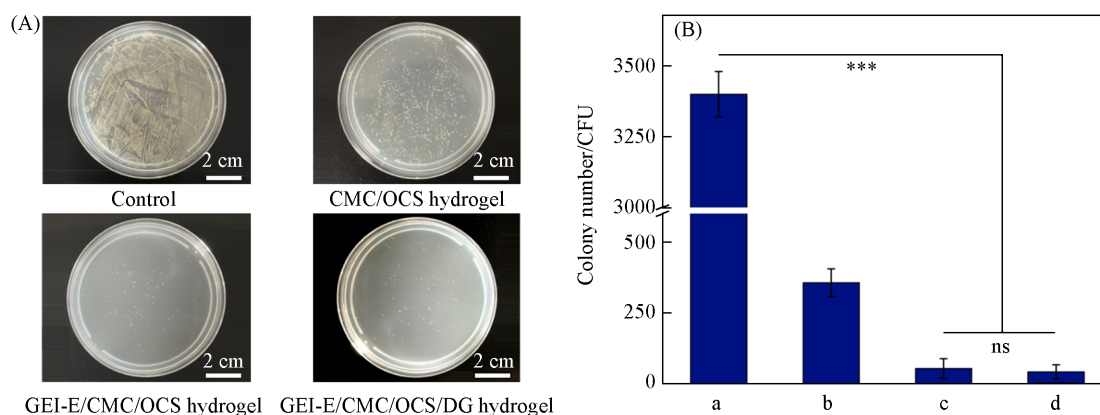


Fig. 6 Images of *S. aureus* colony formation after treatment with different hydrogels(A) and quantization results(B)

(B) a. Control; b. CMC/OCS hydrogel; c. GEL-E/CMC/OCS hydrogel; d. GEL-E/CMC/OCS/DG hydrogel.

2.5 水凝胶的生物相容性

水凝胶伤口敷料作为生物材料, 必须具有良好的生物相容性. 由图 7 可见, CMC/OCS 水凝胶、GEL-E/CMC/OCS 水凝胶和 GEL-E/CMC/OCS/DG 水凝胶的溶血率均小于 2%, 显示出高度血液相容性. 插图中的电子照片也显示出水凝胶与 PBS 组相似, 上清液澄清, 没有表现出明显的溶血现象, 而阳性对照组 TritonX-100 则产生明显溶血, 且溶血率高达 100%. 以上实验结果表明制备的水凝胶具有良好的血液相容性.

细胞相容性是评价材料的生物相容性的主要方法之一. 以 L929 小鼠成纤维细胞作为模型, 通过 MTT 法和活/死细胞染色法评价了水凝胶的细胞毒性. 图 8 示出了 MTT 法的实验结果. CMC/OCS 水凝

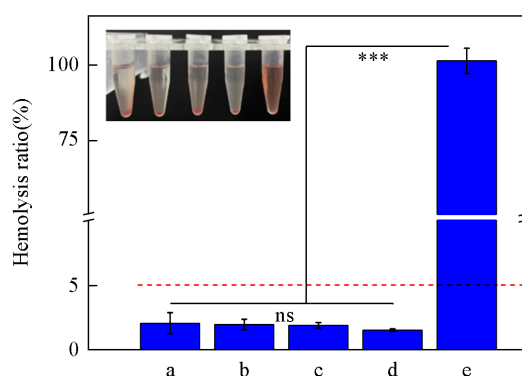


Fig. 7 Hemocompatibility evaluation of different hydrogels

a. PBS; b. CMC/OCS hydrogel; c. GEL-E/CMC/OCS hydrogel; d. GEL-E/CMC/OCS/DG hydrogel; e. TritonX-100.

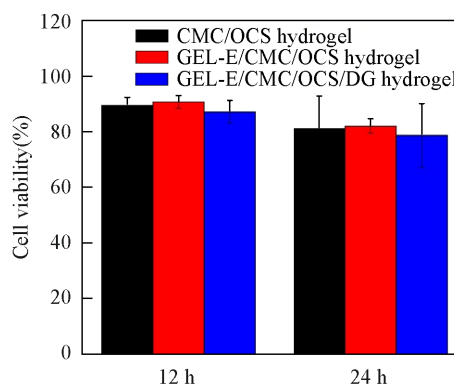


Fig. 8 Cytocompatibility evaluation of different hydrogels

胶、GEL-E/CMC/OCS水凝胶和GEL-E/CMC/OCS/DG水凝胶在与L929细胞共培养12和24 h后,细胞存活率仍能达到约80%,说明所制备水凝胶具有良好的生物相容性.

2.6 水凝胶的促细胞迁移能力

由于DG具有促进肉芽组织生长和成纤维细胞增殖的功能,因此采用细胞划痕实验来验证载DG水凝胶的促伤口愈合能力^[28,29].如图9(A)所示,与空白组和其它水凝胶组相比,GEL-E/CMC/OCS/DG水凝胶组的细胞迁移情况更加显著,在12 h和24 h的划痕区域均最小.

利用ImageJ软件计算了各组细胞在不同时刻的划痕面积,计算出细胞迁移率,量化结果如图9(B)所示.在划痕后的12 h,空白组、CMC/OCS水凝胶组和GEL-E/CMC/OCS水凝胶组的细胞迁移率分别为7.69%,6.04%和4.46%,GEL-E/CMC/OCS/DG水凝胶组的细胞迁移率达到34.96%;在划痕后的24 h,空白组、CMC/OCS水凝胶组、GEL-E/CMC/OCS水凝胶组的细胞迁移率分别39.74%,16.53%和27.92%,而GEL-E/CMC/OCS/DG水凝胶组的细胞迁移率可达65.41%.这是由于GEL-E/CMC/OCS/DG水凝胶中释放的DG促进了细胞的生长和迁移.细胞划痕实验结果表明,GEL-E/CMC/OCS/DG水凝胶具有促进细胞迁移的能力,有望成为促进伤口愈合的创面敷料.

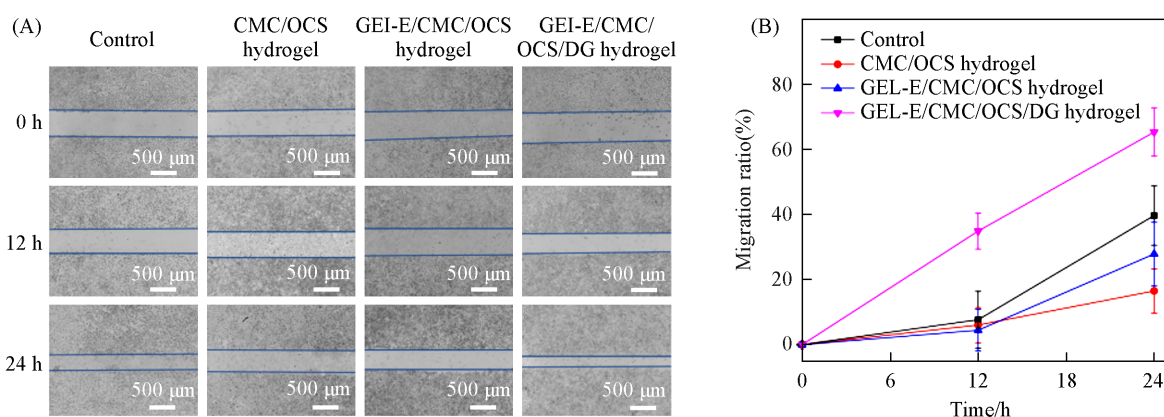


Fig. 9 Photographs showing the cell migration of L929 at different times(A) and quantitative results(B)

3 结 论

通过以聚赖氨酸改性明胶、羧甲基壳聚糖、氧化硫酸软骨素为原料构建了GEL-E/CMC/OCS水凝胶,并将甘草酸二钾载入水凝胶中,探讨了水凝胶的自愈合性能、可注射性能、抗菌性能以及促细胞迁移能力,并评价了水凝胶的生物相容性.实验结果表明,本文开发的水凝胶具有良好的自愈合性能、可注射性能、抗菌性能以及促细胞迁移能力,并且生物相容性良好,毒性很低,在促进运动型伤口愈合领域具有很好的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Tottoli E. M., Dorati R., Genta I., Chiesa E., Pisani S., Conti B., *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, **2020**, *12*(8), 735
- [2] Dong R., Guo B., *Nano Today*, **2021**, *41*, 101290
- [3] Dhiyya S., Padma V. V., Santhini E., *Biomedicines*, **2015**, *5*(4), 24—28
- [4] Klar A. S., *Biomolecules*, **2020**, *10*(8), 1169
- [5] Jiang Q., Wang J., Wang J., Tang R., Zhang D., Wang X., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2016**, *91*, 85—91
- [6] Zeng D., Shen S. H., Fan D. D., *Chin. J. Chem. Eng.*, **2021**, *30*, 308—320
- [7] Liang Y. P., He J. H., Guo B. L., *ACS Nano*, **2021**, *15*(8), 12687—12722
- [8] Hao R. A., Cui Z. Y., Zhang X. D., Tian M., Zhang L. Q., Rao F., Xue J. J., *Front. Chem.*, **2022**, *9*, 839055
- [9] Gao Y. F., Li Z., Huang J., Zhao M., Wu J., *J. Mater. Chem. B*, **2020**, *8*(38), 8768—8780
- [10] Yang J. A., Yeom J., Hwang B. W., Hoffman A. S., Hahn S. K., *Prog. Polym. Sci.*, **2014**, *39*(12), 1973—1986

- [11] Wan J., Geng S., Zhao H., Peng X., Zhou Q., Li H., He M., Zhao Y., Yang X., Xu X., *J. Control. Release*, **2016**, *235*, 328—336
- [12] Li M., Liang Y. P., Liang Y. Q., Pan G. Y., Guo B. L., *Chem. Eng. J.*, **2022**, *427*, 132039
- [13] Zhou Y., Zhai Z. H., Yao Y. M., Stant J. C., Landrum S. L., Bortner M. J., Frazier C. E., Edgar K. J., *Carbohydr. Polym.*, **2023**, *300*, 120213
- [14] Yuwen L. H., Sun Y. T., Tan G. L., Xiu W. J., Zhang Y. Q., Weng L. X., Teng Z. G., Wang L. H., *Nanoscale*, **2018**, *10*(35), 16711—16720
- [15] Khan S. N., Khan A. U., *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*, 174
- [16] Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M., *Trends Microbiol.*, **2001**, *9*(10), 486—493
- [17] Li S. Q., Dong S. J., Xu W. G., Tu S. C., Yan L. S., Zhao C. W., Ding J. X., Chen X. S., *Adv. Sci.*, **2018**, *5*(5), 1700527
- [18] Shen S. H., Fan D. D., Yuan Y., Ma X. X., Zhao J., Yang J., *Chem. Eng. J.*, **2021**, *426*, 130610
- [19] Zhu D. Y., Chen Z. P., Hong Z. P., Zhang L. Y., Liang X. X., Li Y., Duan X. J., Luo H. S., Peng J. P., Guo J. W., *Acta Biomater.*, **2022**, *143*, 203—215
- [20] Dawlee S., Sugandhi A., Balakrishnan B., Labarre D., Jayakrishnan A., *Biomacromolecules*, **2005**, *6*(4), 2040—2048
- [21] Lu X. W., Liu W., Wu Z. Q., Xiong X. H., Liu Q., Zhan W. J., Chen H., *J. Mater. Chem. B*, **2016**, *4*(8), 1458—1465
- [22] Shi J. B., Wang G. B., Chen H. L., Zhong W., Qiu X. Z., Xing M. M. Q., *Polym. Chem.*, **2014**, *5*(21), 6180—6189
- [23] Zhou L., Dai C., Fan L., Jiang Y. H., Liu C., Zhou Z. N., Guan P. F., Tian Y., Xing J., Li X. J., Luo Y., Yu P., Ning C. Y., Tan G. X., *Adv. Funct. Mater.*, **2021**, *31*(14), 2007457
- [24] Li S. X., Wang L., Zheng W. F., Yang G., Jiang X. Y., *Adv. Funct. Mater.*, **2020**, *30*(31), 2002370
- [25] Yang R., Yuan B. C., Ma Y. S., Zhou S., Liu Y., *Pharm. Biol.*, **2017**, *55*(1), 5—18
- [26] Shao Z. P., Yang Y., Fang S., Li Y. H., Chen J., Meng Y. C., *Int. J. Food. Microbiol.*, **2020**, *328*, 108663
- [27] Wang Y. D., Niu W., Qu X. Y., Lei B., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, *14*(4), 4946—4958
- [28] Hu C., Zhang F. J., Kong Q. S., Lu Y. H., Zhang B., Wu C., Luo R. F., Wang Y. B., *Biomacromolecules*, **2019**, *20*(12), 4581—4592
- [29] Wang Y., Wu Y., Long L. Y., Fu D. H., Hu C., Kong Q. Q., Wang Y. B., *ACS. Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, *13*(28), 33584—33599

(Ed.: W, K, M)