

纳米抗菌敷料的构筑及抗耐药菌性能

谢克难¹, 何雨家², 张 琦³, 谢 璐⁴, 何 帅^{5*}

(1. 四川大学锦江学院 白酒学院, 四川 眉山 620860; 2. 石家庄医学高等专科学校, 河北 石家庄 050500; 3. 四川剑南春酒厂有限公司, 四川 绵竹 618200; 4. 口腔疾病研究国家重点实验室 四川大学 华西口腔医院修复科, 四川 成都 610041; 5. 四川大学 化学工程学院, 四川 成都 610065)

摘要: 将均采用液相分层法制备的黑磷 (BP) 和单层 MXene (V_2CT_x) 纳米片混合, 通过水热法制备了 MXene/BP 复合物 (AC), 采用 SEM、TEM、XRD、多角度粒度与高灵敏度 Zeta 电位分析仪对其进行了表征。将 AC 与聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 共混, 利用静电纺丝技术制得了纳米抗菌敷料 (PLGA-AC), 通过 SEM、光学接触角测量仪对其进行了测试, 采用体外抗菌实验、体外细胞培养实验、溶血实验评价了 PLGA-AC 的活性氧 (ROS) 生成能力、抗菌性能和生物相容性。结果表明, 单层 MXene 纳米片均匀分布在 BP 表面上, 两者通过范德华力结合在一起; PLGA-AC 具有优异的亲水性能, 其水接触角为 $52.05^\circ \pm 0.49^\circ$; PLGA-AC 在超声作用下具有优异的 ROS 生成能力, 对大肠杆菌的清除率 $>99\%$; PLGA-AC 具有良好的生物相容性和血液相容性, 对兔红细胞的溶血率仅为 0.97% 。

关键词: MXene; 黑磷; 复合物; 静电纺丝; 抗菌性; 医药原料

中图分类号: TB383.1; R318.08; TQ340.64 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 04-0878-08

Construction and antimicrobial performance of nano-dressing against drug-resistant bacteria

XIE Kenan¹, HE Yujia², ZHANG Qi³, XIE Lu⁴, HE Shuai^{5*}

(1. School of Liquor-Brewing Engineering, Sichuan University Jinjiang College, Meishan 620860, Sichuan, China; 2. Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050500, Hebei, China; 3. Jiannanchun Distillery Co., Ltd., Mianzhu 618200, Sichuan, China; 4. Department of Restoration, State Key Laboratory of Oral Disease Research, West China School/Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China; 5. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan, China)

Abstract: MXene/black phosphorus composite (AC) was prepared from hydrothermal reaction of black phosphorus (BP) and MXene (V_2CT_x) nanosheets, both of which were prepared by liquid phase stratification method, and characterized by SEM, TEM, XRD and multi-angle particle size and high sensitivity Zeta potential analyzer. Nano antibacterial dressing (PLGA-AC) was then synthesized via electrospinning technique by blending AC with polylactic acid-hydroglycolic acid (PLGA), analyzed by SEM and optical contact angle measuring instrument, and evaluated by *in vitro* antibacterial experiment, *in vitro* cell culture experiment and hemolysis experiment for assessment on its reactive oxygen species (ROS) generation ability, antibacterial activity and biocompatibility. The results indicated that monolayer MXene was uniformly distributed on the surface of BP and both connected together through van der Waals forces. PLGA-AC showed excellent hydrophilic properties with a water contact angle of $52.05^\circ \pm 0.49^\circ$. Furthermore, PLGA-AC exhibited good excellent ROS generating ability under ultrasonic action, with the clearance rate of drug-resistant *E. coli* $>99\%$. PLGA-AC also displayed good blood compatibility, with a hemolysis rate only 0.97% .

收稿日期: 2024-03-22; 定用日期: 2024-04-19; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240246

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (52002255)

作者简介: 谢克难 (1963—), 男, 教授, E-mail: xiekenan63@163.com。联系人: 何 帅 (1998—), 男, 博士, E-mail: heshuaiscu@foxmail.com。

Key words: MXene; black phosphorus; composites; electrospinning; antibacterial performance; drug materials

过去几十年, 抗生素治疗一直是细菌感染的主要应对方式^[1-2], 因此, 其滥用导致了耐药细菌的出现, 使公众健康受到严重威胁。耐药菌对大多数抗生素的耐药性严重限制了人体感染后的治疗选择^[3-4]。尽管已发现了针对不同耐药菌的新抗生素, 但其应用可能会加剧细菌突变, 并导致耐药菌株的进化^[5]。因此, 亟需开发有效的非抗生素策略, 以实现感染耐药菌伤口的抗菌治疗。

在治疗感染性创面方面, 开发无抗生素策略抗菌已成为近年来研究的焦点, 这归因于无抗生素药物具有低耐药性及优越的抗菌性能^[6]。目前, 光动力疗法(PDT)作为一种外源性方法已被广泛研究。通过使用特定波长的光源激活光敏剂产生活性氧(ROS), ROS具有抗菌作用, 可杀死细菌^[7-9]。然而, 由于光在体内的穿透深度有限, PDT仅限于表面组织治疗, 其应用受到严重限制。近年来, 声动力学治疗(SDT)已成为一种很有前途的技术, 超声波诱导的压电场是一种无创可控的外部刺激, 特别是在深度感染治疗应用中, 超声波可深入组织的能力使SDT适合深层皮肤创面的治疗^[10-11]。由于空化效应, 超声可诱导空化气泡作为外部物理触发因素, 在气泡破裂时释放大量的局部应力^[12]。压电材料暴露于空化气体破裂产生的应力可快速产生内置电场和表面压电势。机械能可通过形成的表面压电势移动, 允许载流子移动通过压电材料表面或溶液界面, 并引发不同氧化还原反应^[13-14]。超声能量转换过程可与纳米酶催化过程结合, 使环境物质, 即氧分子, 转化为ROS, 并根除细菌。

黑磷(BP)作为一种新型二维声压材料, 受到了人们的广泛关注^[15-16]。BP具有生物相容性和生物降解产物等特性, 已成为一种有吸引力的二维声压材料候选者。BP因其压电特性, 在超声作用下可诱导产生ROS, 达到抗菌的目的^[17-18]。然而, 纯BP的电子/空穴分离效率低、ROS收率较低, 严重限制了其在抗菌领域的应用。HE等^[19]和JIN等^[20]采取了不同方式提升其催化性能, 如形貌调控、元素掺杂和构筑异质结等。具有不同能级和带隙成分(半导体或金属)的两种不同复合物构建的复合物可通过协调两者的带结构和化学成分实现综合SDT治疗^[21]。

近年来, 皮肤再生技术领域取得了巨大进展, 水凝胶、微球、3D打印和静电纺丝支架等许多技术和材料已应用于制备皮肤再生敷料中^[22]。其中, 具有大比表面积和高孔隙率的静电纺丝支架在伤口愈

合方面显示出巨大的潜力。电纺敷料与细胞外基质结构在各方面具有诸多相似之处, 可为伤口再生提供有利的生理环境。此外, RNJAK-KOVACINA等^[23]研究发现, 通过静电纺丝技术制成的多孔支架可以促进细胞附着生长。

本文拟采用水热技术来制备由BP和单层MXene(V_2CT_x)组成的智能纳米抗菌复合物(AC), 用于通过超声治疗快速产生ROS抗菌, 并通过静电纺丝技术将AC与聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)结合制成复合伤口敷料。以期制备具有优异生物相容性和杀菌性能的伤口敷料, 为抗菌治疗提供一种新思路 and 理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

耐药性大肠杆菌(Drug-resistant *Escherichia coli*, DEC, ATCC.25922), 武汉华尔纳生物科技有限公司; 蛋白胨、牛肉提取物, 北京澳宝生物技术有限公司; 小鼠成纤维细胞(L929), 美国典型培养物保藏中心; DMEM培养基(含质量分数10%胎牛血清), 美国赛默飞世尔科技公司; 免疫染色通透液(Triton X-100, 体积分数为0.1%的PBS溶液), 上海碧云天生物技术股份有限公司; 异硫氰酸荧光素(FITC)修饰鬼笔环肽、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、兔红细胞、PLGA〔数均相对分子质量(M_n)为80000〕、HCl(AR)、LiF(AR), 北京索莱宝科技有限公司; $V_2CT_x \cdot MAX$ (V_2AlC , MXene的前驱体)、BP、NaCl、LB培养基(琼脂), 成都科隆化学有限公司; Tris-HCl缓冲溶液, 北京太阳生物科技有限公司; 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)、亚甲基蓝(MB)溶液(质量浓度100 mg/L)、戊二醛水溶液(质量浓度25 mg/L)、无水乙醇, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; OsO_4 (质量浓度10 mg/L)、乙酸铈酰, 默克化工技术(上海)有限公司成都分公司; 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=8.5)、体积分数为4%的多聚甲醛, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 实验用水为去离子水, 自制。

JSM-7610F型场发射扫描电子显微镜(SEM)、JEM-F200型场发射透射电子显微镜(TEM), 日本电子株式会社; XRD-7000S型X射线衍射仪(XRD), 日本Shimadzu公司; MultiMode 8-HR型原子力显微镜(AFM), 德国Bruker公司; SL200B型光学接触角测量仪, 美国KINO科技仪器公司;

UV 1800PC 型紫外-可见分光光度计, 上海奥析科学仪器有限公司; TCS SP8 型激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM), 德国 Leica 公司; Omni 型多角度粒度与高灵敏度 Zeta 电位分析仪, 美国 Brookhaven 仪器公司。

1.2 制备方法

1.2.1 复合物的制备

通过液相分层法制备 BP 纳米片。将 BP (30 mg) 在 N_2 气氛下分散在去离子水 (100 mL) 中, 并对分散液进行超声处理 12 h。随后, 以 3000 r/min 持续 3 min 离心, 获得 BP 纳米片悬浮液, 其质量浓度约为 0.2 g/L。

单层 MXene (V_2CT_x) 纳米片参照文献[24]方法制备。将 1 g $V_2CT_x \cdot MAX$ 用 LiF (1 g) 盐酸混合物 (9 mol/L, 20 mL) 处理。混合液在 40 °C 下持续搅拌 24 h。之后, 将预处理的 MXene 粉末冲洗并离心多次, 然后在 -20 °C 下冷冻干燥 12 h, 得到单层 MXene 纳米片。

采用水热法制备复合物。将 2 mg 单层 MXene 纳米片放入到 100 mL 上述制备 BP 纳米片悬浮液中, 搅拌溶液 1 h, 然后转移到 100 mL 高压反应器中, 在 120 °C 下进行 3 h 的水热处理。将获得的粉末在 -20 °C 的真空中清洗并冷冻干燥 12 h, 得到最终黑色复合物粉末约 15 mg, 记为 AC。

1.2.2 纳米敷料的制备

将 200 mg 复合物粉末和 1 g PLGA 在 10 mL HFIP 中混合 12 h。静电纺丝气隙距离设定 20 cm, 电纺混合液体的注入速率设定 0.02 mL/min, 电压调整为 15.0 kV。室温下, 以 1 mm/min 的速率在圆柱形收集器上获得电纺丝纤维, 即得电纺敷料 PLGA, 记为 PLGA-AC。

采用上述方法和步骤, 分别使用 BP 纳米片、单层 MXene 纳米片代替复合物粉末, 制备得到对照样品, 分别记为 PLGA-BP、PLGA-MXene; 不加入复合物, 制备电纺敷料纯 PLGA, 记为 PLGA 敷料。

1.3 表征方法和性能测试

XRD 测试: 靶材 Cu, 管电压 40 V, 管电流 40 mA, K_α 射线波长 (λ) 0.15444 nm, 扫描速率 10 (°)/min, 扫描范围 3°~90°。SEM 测试: 电压 10 kV, 喷金后测试。TEM 测试: 将制备的样品分散液滴在铜网上, 工作电压 200 kV。

声动力性能测试: 通过 MB 的紫外-可见分光光度计测量羟基自由基的生成。将不同敷料加入到 200 μ L MB 溶液 (质量浓度 100 mg/L) 中, 先在静默状态下孵育 15 min, 再超声 15 min, 随后离心并通过紫外-可见分光光度计检测不同样品在波长 450~750 nm 处的吸收光谱曲线。

1.4 体外抗菌活性测定

1.4.1 DEC 耐药性评估

通过使用不同质量浓度阿莫西林与耐药性大肠杆菌 (即 DEC) 共培养通过涂布平板法以确定 DEC 的耐药性。具体而言, 用 LB 培养基将 DEC 溶液稀释为 1×10^4 CFU/mL 的细菌悬浮液。将 500 μ L 细菌悬浮液转移到 48 孔板中, 然后分别在每孔中以质量浓度 0、50.0、125.0、250.0、312.5 mg/L 向孔板中加入抗生素阿莫西林并孵育 15 min。随后, 从每个孔中提取 35 μ L 经处理的细菌悬浮液, 均匀地铺展在 LB 琼脂板上, 然后在 37 °C 下孵育 24 h 以产生可见的菌落单位。

1.4.2 平板涂布培养法

使用耐药性大肠杆菌测定电纺敷料体外抗菌性能。PLGA 敷料、PLGA-MXene、PLGA-BP 和 PLGA-AC 的抗菌能力首先由平板涂布培养法进行评估。将所有敷料切割成 1 cm $\times$ 1 cm 的尺寸, 并放置在 48 孔板中, 分为超声组和静默组。用 LB 培养基将大肠杆菌溶液稀释为 1×10^5 CFU/mL 的细菌悬浮液。将 500 μ L 细菌悬浮液转移到每个孔中, 然后进行各项处理: 超声组在 1.5 W/cm² 的功率密度下用超声处理 15 min; 静默组在孔板中孵育 15 min。随后, 从每个孔中提取 35 μ L 经处理的细菌悬浮液, 均匀地铺展在 LB 琼脂板上, 然后在 37 °C 下孵育 24 h 以产生可见的菌落单位。

1.4.3 细菌形态学观察

通过 TEM 观察经不同处理后耐药菌的变化。收集上述用不同敷料处理的 1 mL 耐药菌培养物 (分为超声组和静默组), 并以 8000 r/min 离心 10 min。然后用体积分数 2.5% 戊二醛水溶液预固定生物体持续 2 h, 然后用 OsO_4 (质量浓度 10 mg/L) 固定。接着, 将微生物在不同体积分数 (30%、50%、70%、90% 和 100%) 乙醇水溶液中脱水 10 min, 然后用乙酸铀酰处理切片。最后, 将切片安装在铜格栅上进行 TEM 测试。

1.5 体外生物相容性评价

1.5.1 细胞培养

L929 细胞在 DMEM 培养基中温度 37 °C, 相对湿度为 90%, 体积分数 5% 的 CO_2 气氛的培养箱中培养至细胞铺展面积达 85% 可进行实验操作。

1.5.2 细胞结构和细胞骨架观察

L929 细胞在 48 孔板中与不同敷料共培养 24 h (1×10^4 个/孔) 后进行形态学分析。在 500 μ L 体积分数 2.5% 的戊二醛水溶液中固定 2 h 后, 细胞经体积分数 30%、50%、70%、90% 和 100% 乙醇水溶液连续循环脱水 20 min。自然干燥后, 使用 SEM 对样品进行测试。

细胞骨架状态通过免疫荧光标记法检测 L929 细胞。在包括玻璃盖玻片的 48 孔板中培养体积为 500 μL 的 L929 细胞,细胞密度为 1×10^4 个/孔。在使用 PBS 冲洗前,将细胞在 500 μL 体积分数为 4% 的多聚甲醛中固定 0.5 h。然后,将预固定的细胞在 Triton X-100 (体积分数为 0.1% 的 PBS 溶液) 中透化 20 min,然后用 PBS 清洗。使用 FITC 修饰鬼笔环肽对细胞骨架进行染色,同时使用 DAPI 对细胞核进行染色。通过 CLSM 拍摄所有的样品,获得荧光图片。

1.6 溶血活性测定

将不同敷料与兔红细胞孵育,并计算其溶血率。首先,将不同敷料 (1 cm $\times$ 1 cm) 置于 1.5 mL 的 EP 管中。然后,将 50 μL 红细胞悬浮液 (体积分数 5% 的 PBS) 加入到每管中, PBS 作为阴性对照,去离子水作为阳性对照。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h 后,以 3500 r/min 离心 10 min,在 540 nm 处测量吸光度。根据式 (1) 计算溶血率 (%),评价辅料的溶血活性。

$$\text{溶血率}/\% = (A - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100 \quad (1)$$

式中: A 、 A_0 和 A_{100} 分别为样品、阴性对照和阳性对照的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 复合物的设计、制备和表征

图 1 为 AC 和 PLGA-AC 的制备路线及声致抗菌示意图。

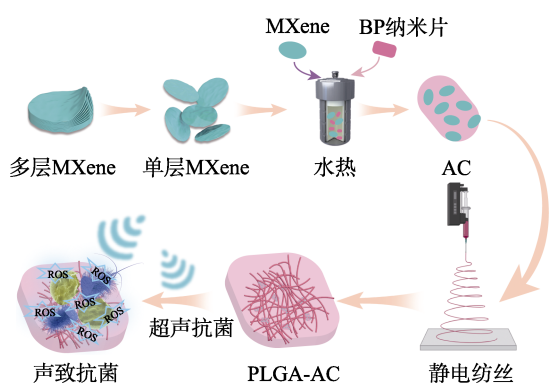
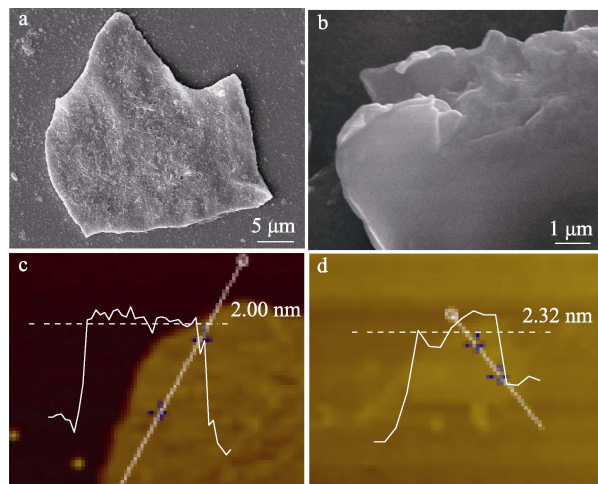


图 1 AC 和 PLGA-AC 的制备路线及声致抗菌示意图

Fig. 1 Schematic diagram of synthesis route and sonogenic antibacterial process of AC and PLGA-AC

从图 1 可见,将通过液相分离法制备的单层 MXene 转移到反应釜内,与 BP 纳米片在液相中充分接触,两者通过范德华力结合形成 AC。随后,通过静电纺丝技术将 AC 负载至纺丝膜中形成纳米抗菌敷料。制得的膜可在超声作用下释放出大量的 ROS,从而可有效根除耐药菌。

图 2 为 BP、MXene 的 SEM 图和 AFM 图。



a、c—MXene; b、d—BP

图 2 MXene 和 BP 的 SEM (a、b) 和 AFM 图 (c、d)
Fig. 2 SEM (a, b) and AFM (c, d) images of MXene and BP

从图 2a、b 可见, MXene 和 BP 具有片状单层结构。从图 2c、d 可见, MXene 和 BP 纳米片的高度分别约为 2.00 和 2.32 nm, 接近其理论值 (1.50 和 2.00~5.00 nm)。

图 3 为 AC 的 SEM 图和 EDS 元素分布图。

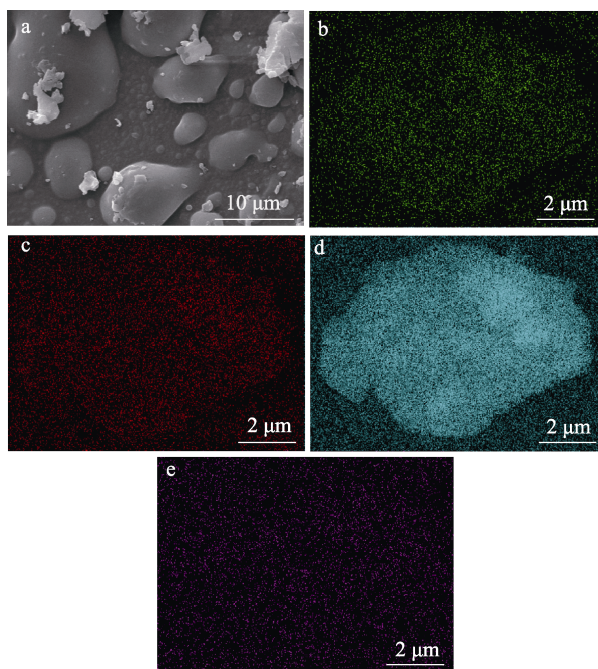


图 3 AC 的 SEM 图 (a) 和 O (b)、C (c)、P (d)、V (e) 的 EDS 元素分布图

Fig. 3 SEM image of AC (a) and EDS element distribution Mapping of O (b), C (c), P (d), V (e)

从图 3 可以看出, AC 表面上均匀分散着 MXene 和 BP 纳米片, 形成了比表面积较大的结构, 存在 O、C、P 和 V 元素, 表明 MXene 纳米片均匀分布在 BP 表面上。

图 4 为 MXene、BP 和 AC 的 XRD 谱图。

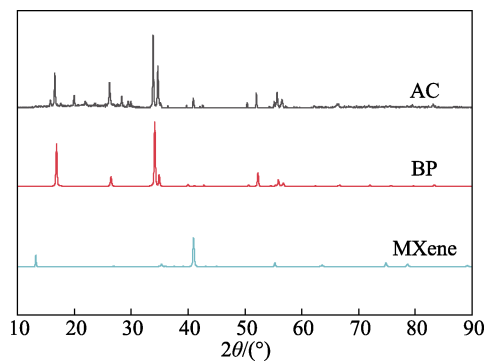


图 4 MXene、BP 和 AC 的 XRD 谱图

Fig. 4 XRD patterns of BP, MXene and AC

从图 4 可以看出, AC 的特征衍射峰 $2\theta=34.202^\circ$ 、 35.000° 、 56.852° 和 40.951° 对应于 BP 的 (040)、(111)、(132) 晶面和 MXene 的 (102) 晶面, 表明 AC 的成功制备, 并且 MXene 与 BP 的组合不会影响 AC 的晶体结构, 可以排除晶体结构影响 AC 催化活性的可能性。

图 5 为 MXene、BP 和 AC 的 Zeta 电位测试结果。

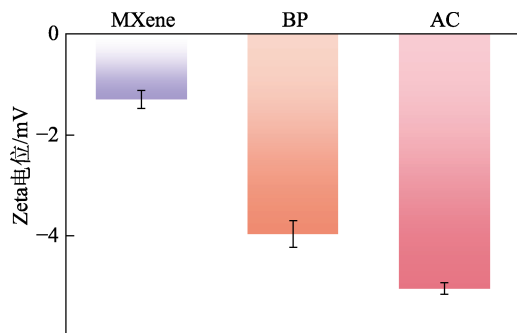


图 5 MXene、BP 和 AC 的 Zeta 电位

Fig. 5 Zeta potential of BP, MXene and AC

从图 5 可以看出, MXene 表面带负电荷, 这是因为, MXene 表面具有牢固的端基。AC 的 Zeta 电位约为 MXene 与 BP 的 Zeta 电位之和, 可能原因是 MXene 和 BP 通过范德华力紧密连接, 同时, MXene 纳米片均匀地分布在 BP 表面上。

2.2 抗菌敷料的表征及亲水性能分析

图 6 为 PLGA 敷料、PLGA-BP、PLGA-MXene 和 PLGA-AC 的 SEM 图。

从图 6 可以看出, 所有纤维都是随机取向的, 具有光滑的外观、连接的多孔结构和相似的直径; BP、MXene 和 AC 分别分散于 PLGA-BP、PLGA-MXene 和 PLGA-AC 中。

创面修复材料的亲水性在促进细胞增殖和组织再生方面发挥着关键作用。水接触角 (WCA) 可用于评估材料的水化性能。图 7 为 PLGA 敷料、PLGA-BP、PLGA-MXene 和 PLGA-AC 的 WCA 测试结果。

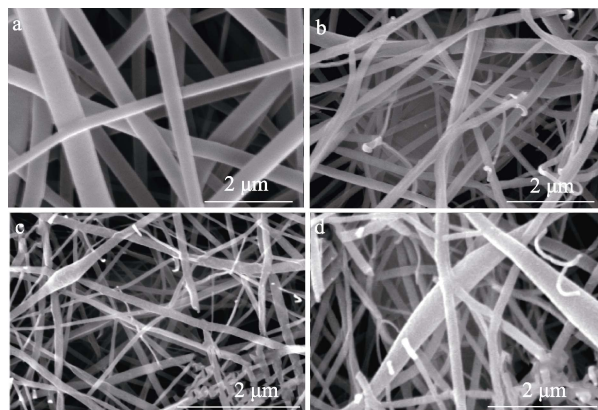


图 6 PLGA 敷料 (a)、PLGA-BP (b)、PLGA-MXene (c) 和 PLGA-AC (d) 的 SEM 图

Fig. 6 SEM images of PLGA dressing (a), PLGA-BP (b), PLGA-MXene (c) and PLGA-AC (d)

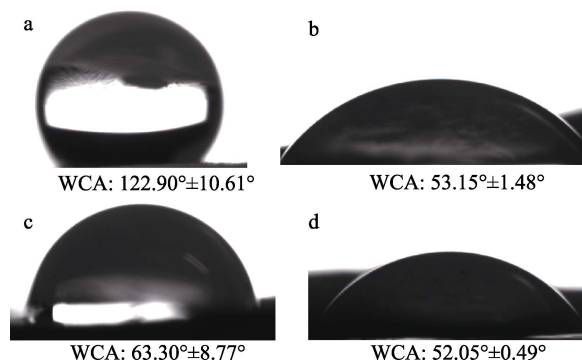


图 7 PLGA 敷料 (a)、PLGA-BP (b)、PLGA-MXene (c) 以及 PLGA-AC (d) 的水接触角

Fig. 7 Water contact angle of PLGA dressing (a), PLGA-BP (b), PLGA-MXene (c) and PLGA-AC (d)

从图 7 可以看出, PLGA 敷料显示出 $122.90^\circ \pm 10.61^\circ$ 的相对疏水性 WCA (图 7a); 经过 BP 或 MXene 修饰后, PLGA-BP 和 PLGA-MXene 的 WCA 显著降低, 分别为 $53.15^\circ \pm 1.48^\circ$ 和 $63.30^\circ \pm 8.77^\circ$; PLGA-AC 的 WCA 最低, 为 $52.05^\circ \pm 0.49^\circ$, 这在很大程度上归因于亲水性磷以及钒的引入。结果表明, PLGA-AC 具有亲水性表面, 可进一步促进成纤维细胞的附着和分化, 具有促进创面修复的潜力。

2.3 抗菌敷料的 ROS 生成性能分析

MB 可定性测定 ROS 的生成量, 原因在于 ROS 可与 MB 结合使其脱色, 生成的产物在 660 nm 左右处吸光度下降。在 MB 测试中, 羟基自由基可与 MB 阳离子反应生成 OH^- 和 MB 自由基阳离子^[25]。由于 MB 阳离子的颜色是深蓝色, 而 MB 自由基阳离子是无色的。因此, MB 与羟基自由基反应会导致颜色从深蓝色变为无色, 吸光度降低, 从而定量确定 ROS 的含量^[26]。图 8 为 PLGA 敷料、PLGA-BP、PLGA-MXene 和 PLGA-AC 在超声作用下 MB 的 UV-Vis 吸收光谱。

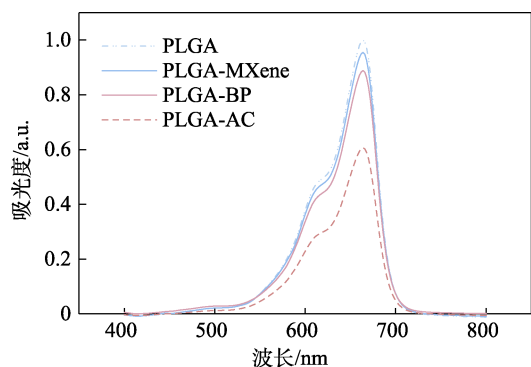


图8 PLGA敷料、PLGA-BP、PLGA-MXene和PLGA-AC在超声作用下MB的UV-Vis吸收光谱

Fig. 8 UV-Vis adsorption spectra of MB of PLGA dressing, PLGA-BP, PLGA-Mxene and PLGA-AC under ultrasound

从图8可以看出,在超声辐射刺激后,与PLGA敷料相比,PLGA-MXene几乎未产生变化,PLGA-BP和PLGA-AC的吸光度也远低于PLGA敷料。这是因为,复合材料中电子与空穴有效分离,并被空气中的氧捕获产生了ROS。值得注意的是,在相同的超声作用下,PLGA-AC的高吸光度略低于PLGA-BP,表明复合物AC的形成可进一步提高ROS生成量。这是因为,ROS主要来源于复合物AC中的BP组分,作为一种声压电材料,在超声波作用下,BP的导带(CB)边缘向负电位偏移,而价带(VB)边缘向上偏移,导致其氧化还原能力增强^[27],复合物AC的另一组分MXene不仅具有大的比表面积,而且具有类金属的高导电特性,可促使表面电子的快速转移^[28]。因此,声激发的电子可快速从BP转移到MXene,同时促进带负电的电子和带正电的空穴的大量产生,这一过程同时诱导ROS的快速产生,增加了抗菌复合物的ROS产率,因此,复合物AC的构建有利于促进超声作用下ROS的产生。

2.4 抗菌敷料的抗耐药菌性能分析

图9为DEC耐药性的测试结果。

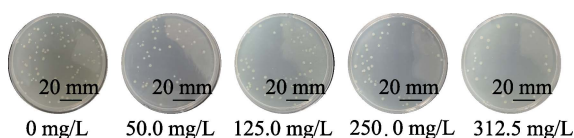


图9 经不同质量浓度阿莫西林共培养后的DEC的菌落图片

Fig. 9 Bacterial colony pictures of DEC after co-cultured by amoxicillin with different mass concentrations

从图9可以看出,将不同质量浓度的阿莫西林与DEC共培养后,在阿莫西林质量浓度为312.5 mg/L下仍存在大量菌落,表明DEC具有耐药性^[29]。

图10为PLGA敷料、PLGA-BP、PLGA-MXene和PLGA-AC的超声组和静默组抗菌平板涂布法测

试结果。

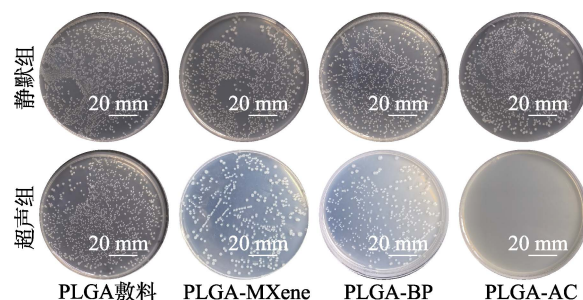


图10 经不同敷料处理后的DEC的细菌菌落图片

Fig. 10 Bacterial colony pictures of DEC treated with different dressings

从图10可以看出,PLGA敷料的超声组和静默组菌落生长情况相似,表明PLGA敷料不具备杀菌能力;PLGA敷料、PLGA-MXene、PLGA-BP和PLGA-AC的静默组没有明显区别,说明其在无超声刺激的情况下并不能抑制DEC的生长。在超声作用15 min后,PLGA-BP和PLGA-AC的超声组显示菌落形成单位(CFU)显著减少,表明在超声作用下,PLGA-AC可以通过产生大量ROS有效杀死DEC,进一步证实,ROS主要来源于复合物AC中的BP组分,与图8结果一致。在无抗生素的环境下,PLGA-AC对耐药菌DEC具有持续性的清除活性,抗菌率>99%。

图11为PLGA敷料静默组和PLGA-AC超声组的DEC内外部结构及细胞器的TEM图。

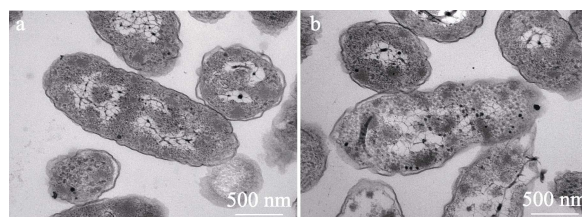


图11 PLGA敷料静默组(a)和PLGA-AC超声组(b)DEC的TEM图

Fig. 11 TEM images of DEC after contact PLGA dressing without ultrasound (a) and P-AC with ultrasound (b)

从图11可以看出,PLGA敷料静默组的DEC细胞壁和细胞质保持了完整的形态,具有紧凑的细胞内结构(DNA、细胞质);PLGA-AC超声组的DEC表现出严重的损伤和变形,其细胞壁被破坏,导致细胞质泄漏,胞内转变为泡状结构,DNA完全被破坏。结果证明,当暴露于超声辐射下,PLGA-AC具有强大的病原微生物根除潜力,这与平板涂布法的评估结果一致。可能是因为,细菌可被抗菌纳米纤维的表面黏附,随后在超声刺激下其结构完整性

遭到破坏。

2.5 抗菌敷料的细胞相容性评估

除了强力的杀菌能力外,创面修复材料的生物相容性也是很重要的指标。图 12、13 为 PLGA-BP、PLGA-MXene 和 PLGA-AC 上孵育的 L929 细胞的 SEM 图和 CLSM 图。

从图 12 可以看出,与 PLGA-BP、PLGA-MXene 和 PLGA-AC 共培养 24 h 后, L929 细胞表现出铺展结构,并通过丝状伪足与所有样品紧密连接(如紫色星号所示),表明细胞附着性强。特别是在 PLGA-AC 组(图 12c)中,样品的多孔性质为细胞黏附提供了有利的锚定位点。

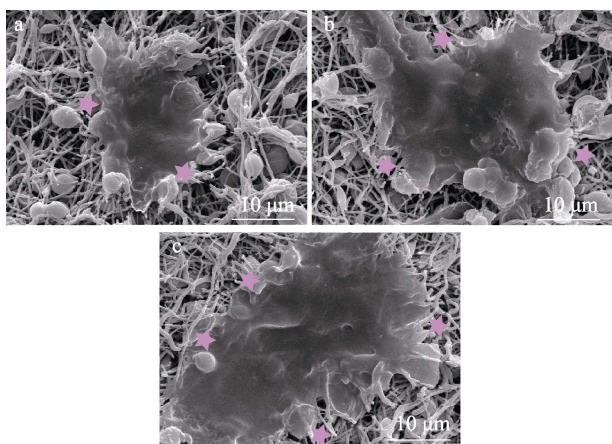


图 12 PLGA-BP (a)、PLGA-MXene (b) 和 PLGA-AC (c) 上孵育的 L929 细胞的 SEM 图

Fig. 12 SEM images of L929 cells incubated on PLGA-BP (a), PLGA-MXene (b) and PLGA-AC (c)

CLSM 图进一步验证了图 12 的结果。图 13 中,细胞核用 DAPI (蓝色)染色,相应的细胞骨架用 FITC 修饰鬼笔环肽 (绿色)染色。

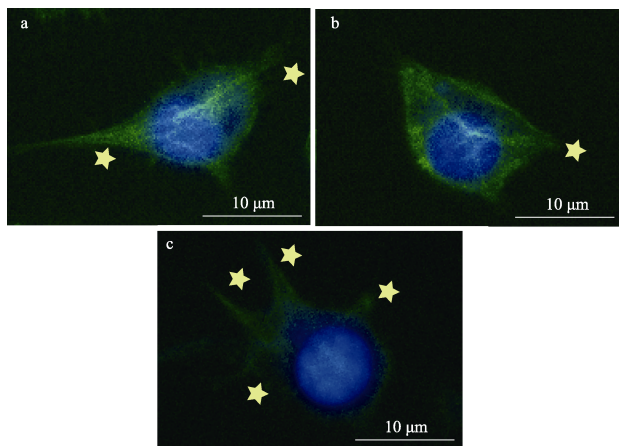


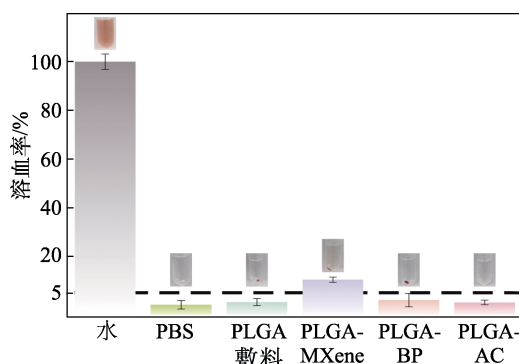
图 13 PLGA-BP (a)、PLGA-MXene (b) 和 PLGA-AC (c) 上孵育的 L929 细胞的 CLSM 图

Fig. 13 CLSM maps of L929 cells incubated on PLGA-BP (a), PLGA-MXene (b) and PLGA-AC (c)

与 PLGA-BP (图 13a)、PLGA-MXene (图 13b) 上的 L929 细胞相比, PLGA-AC (图 13c) 处理后的 L929 细胞扩散良好,并发育出更成熟的 F-肌动蛋白。这可能是因为, PLGA-AC 具有的较高的亲水性和适当的表面粗糙度有助于细胞黏附和增殖。结果表明, PLGA-AC 具有良好的细胞相容性。

2.6 抗菌敷料的血液相容性分析

溶血 (Hemolysis) 是指红细胞 (RBC) 破裂或破坏,导致血红蛋白和其他细胞内容物释放到周围环境中的现象,生物材料的溶血性是其生物安全性的另一个重要指标。图 14 为 PLGA 敷料、PLGA-BP、PLGA-MXene 和 PLGA-AC 的溶血率测试结果。



内插图为对应代表实物照片

图 14 不同敷料的溶血率

Fig. 14 Hemolysis rate of different dressings

从图 14 可以看出,阳性对照组 (水)、阴性对照组 (PBS)、PLGA、PLGA-MXene、PLGA-BP 和 PLGA-AC 组的溶血率分别为 100.00%、0、1.10%、10.34%、1.93% 和 0.97%。红细胞在 PLGA-AC 处理后仍保持非溶血性,与阴性对照组 (PBS) 几乎无明显差异,证明其优异的生物相容性。

3 结论

(1) 通过水热法及静电纺丝技术制备了纳米抗菌敷料 PLGA-AC,纤维具有光滑的外观、连接的多孔结构和相似的直径,具有优异的亲水性 ($WAC=52.05^\circ\pm 0.49^\circ$),有促细胞黏附和增殖的性能。

(2) 在超声作用下, PLGA-AC 可持续释放产生 ROS,从而达到有效抑制病原菌的目的。抗菌测试表明,在无抗生素的环境下, PLGA-AC 对耐药菌 DEC 具有持续性的清除活性,抗菌率 >99%。

(3) 体外细胞实验证明, PLGA-AC 具有良好的生物相容性,在耐药菌感染的皮肤创面治疗中具有强大的应用潜力。

本文制备的纳米抗菌敷料 PLGA-AC 具有优异的抗菌能力与良好的生物相容性,有望用作感染性

皮肤修复敷料。

参考文献:

- [1] WANG J H (王佳豪), TIAN T (田湑), LI J C (李家成), *et al.* Research progress on removal of antibiotic resistant bacteria and genes in water by photochemical AOPs[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(5): 889-897.
- [2] WEI X L, GAO J, WANG F, *et al.* *In situ* capture of bacterial toxins for antivirulence vaccination[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(33): 1701644.
- [3] JANSEN K U, KNIRSCH C, ANDERSON A S. The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(1): 10-19.
- [4] TANG Y L (唐亚丽), WANG L P (王立苹), LU L X (卢立新), *et al.* Research progress of enzymatic biological modified antibacterial materials[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(3): 465-477.
- [5] BLASKOVICH M A, HANSFORD K A, GONG Y, *et al.* Protein-inspired antibiotics active against vancomycin-and daptomycin-resistant bacteria[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 22.
- [6] HUI A P (惠爱平), YANG F F (杨芳芳), KANG Y R (康玉茹), *et al.* High pressure homogenization assisted fabrication of CTAB modified plant essential oil/palygorskite antibacterial composites[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(10): 2019-2024, 2033.
- [7] ZHONG K P, ZHANG Z F, CHENG W Y, *et al.* Photodynamic O₂ economizer encapsulated with dnzyme for enhancing mitochondrial gene-photodynamic therapy[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(5): 2302495.
- [8] CHANG G R (常贯儒), LU X Y (鲁信勇), PEI C (裴春), *et al.* Application of ZnPc loaded macroporous silica nanocarrier in the photodynamic therapy[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2018, 35(3): 388-394.
- [9] ZHOU X, WANG Z, CHAN Y K, *et al.* Infection micromilieu-activated nanocatalytic membrane for orchestrating rapid sterilization and stalled chronic wound regeneration[J]. *Advanced Functional Materials*, 2022, 32(7): 2109469.
- [10] WANG X, DAI X Y, CHEN Y. Sonopiezoelectric nanomedicine and materdicine[J]. *Small*, 2023, 19(29): 2301693.
- [11] WANG R H, LIU Q W, GAO A, *et al.* Recent developments of sonodynamic therapy in antibacterial application[J]. *Nanoscale*, 2022, 14(36): 12999-13017.
- [12] WANG Q Q, TIAN Y, YAO M, *et al.* Bimetallic organic frameworks of high piezovoltage for sono-piezo dynamic therapy[J]. *Advanced Materials*, 2023, 35(41): 2301784.
- [13] SONG X R, ZHANG Q, CHANG M Q, *et al.* Nanomedicine-enabled sonomechanical, sonopiezoelectric, sonodynamic and sonothermal therapy[J]. *Advanced Materials*, 2023, 35(31): 2212259.
- [14] HUA M Y, WU R H, CHEN W Y, *et al.* Ultrasound-activated piezocatalyst triggers sulfate radical production for augmented oxidative tumor suppression[J]. *Small Structures*, 2023, 5(4): 2300461.
- [15] LI Z Y, ZHANG T M, FAN F, *et al.* Piezoelectric materials as sonodynamic sensitizers to safely ablate tumors: A case study using black phosphorus[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2020, 11(4): 1228-1238.
- [16] MA W D, LU J F, WAN B S, *et al.* Piezoelectricity in multilayer black phosphorus for piezotronics and nanogenerators[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(7): 1905795.
- [17] LIU Y J, LI Z Y, FAN F, *et al.* Boosting antitumor sonodynamic therapy efficacy of black phosphorus *via* covalent functionalization[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(20): 2102422.
- [18] ZHANG W H, YU L T, JIANG Y, *et al.* Phycocyanin-functionalized black phosphorus quantum dots enhance PDT/PTT therapy by inducing ROS and irreparable DNA damage[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(15): 5302-5318.
- [19] HE M M, WANG Z Y, YANG H, *et al.* Multi-functional bio-hjzyme: Revolutionizing diabetic skin regeneration with its glucose-unlocked sterilization and programmed anti-inflammatory effects[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(21): 2300986.
- [20] JIN Z L, WANG T, CUI E T, *et al.* Constructing a tandem heterojunction: S-scheme heterojunction and ohmic junction based on graphdiyne, synergistically optimizing photocatalytic hydrogen evolution[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 477: 147210.
- [21] HUANG Y L, HUANG Y X, WANG Z Y, *et al.* Engineered bio-heterojunction with infection-primed H₂S liberation for boosted angiogenesis and infectious cutaneous regeneration[J]. *Small*, 2023, 19(45): 2304324.
- [22] CHOUHAN D, DEY N, BHARDWAJ N, *et al.* Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances[J]. *Biomaterials*, 2019, 216: 119267.
- [23] RNJAK-KOVACINA J, WEISS A S. Increasing the pore size of electrospun scaffolds[J]. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2011, 17(5): 365-372.
- [24] ZHANG J C, GAO X Y, MA D C, *et al.* Copper ferrite heterojunction coatings empower polyetheretherketone implant with multi-modal bactericidal functions and boosted osteogenicity through synergistic photo/fenton-therapy[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 422: 130094.
- [25] WIEDMER D, SAGSTUEN E, WELCH K, *et al.* Oxidative power of aqueous non-irradiated TiO₂-H₂O₂ suspensions: Methylene blue degradation and the role of reactive oxygen species[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2016, 198: 9-15.
- [26] SATOH A Y, TROSKO J E, MASTEN S J. Methylene blue dye test for rapid qualitative detection of hydroxyl radicals formed in a Fenton's reaction aqueous solution[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(8): 2881-2887.
- [27] LI Z Y, ZHANG T M, FAN F, *et al.* Piezoelectric materials as sonodynamic sensitizers to safely ablate tumors: A case study using black phosphorus[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2020, 11(4): 1228-1238.
- [28] LI B, LUO Y, ZHENG Y F, *et al.* Two-dimensional antibacterial materials[J]. *Progress in Materials Science*, 2022, 130: 100976.
- [29] PANDEY A, AFSHEEN A, TIWARI S K. Isolation and characterization of multi drug resistance cultures from waste water[J]. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2011, 13(13): 1-7.