

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2020.01.001

具有抗菌功能的聚乳酸基纳米纤维膜的构建及生物学评价

罗炜, 林夏洁, 李玉林, 刘昌胜

华东理工大学 材料学院, 教育部医用生物材料工程研究中心, 材料生物学与动态化学前沿科学中心
(上海, 200237)

【摘要】 材料表面改性技术是实现材料性能可控制备, 赋予其功能的关键。该研究采用喷纺技术制备了以聚乳酸(PLA)为基体的纳米纤维可吸收高分子生物膜, 并通过等离子体处理技术引入氨基, 经过戊二醛将单宁酸接枝至纤维表面, 有效提高了PLA膜的亲水性能。利用单宁酸的还原功能将纳米银原位沉积到纳米纤维膜表面, 有效提高了纤维膜的抗菌性能。体外细胞学评估表明该材料具有良好的细胞相容性, 有望作为抗菌功能可吸收生物膜用于抗感染皮肤创面修复。

【关键词】 聚乳酸; 单宁酸; 纳米银; 抗菌; 纳米纤维生物膜**【中图分类号】** R318.08**【文献标志码】** A

文章编号: 1674-1242(2021)01-0001-04

Construction and Biological Evaluation of Polylactic Acid-based Nanofibrous Membranes with Antibacterial Properties

LUO Wei, LIN Xiajie, LI Yulin, LIU Changsheng

Engineering Research Center for Biomedical Materials of Ministry of Education, Frontiers Science Center Materiobiology and Dynamic Chemistry, School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology (Shanghai, 200237)

【Abstract】 The interface modification technology of material surface is crucial for realizing the controllable preparation of material properties and endowing its biological functions. In this study, a biodegradable polylactide (PLA)-based nanofibrous biofilm was prepared by an air-brushing approach, and amino groups were introduced through plasma processing technology, followed by grafting tannic acid onto the fiber surface in the presence of glutaraldehyde, which effectively improved the hydrophilicity of the modified biofilm. Furthermore, the reducibility of tannic acid allowed for in situ deposition of silver nanoparticles on the film surface, which effectively improved the antibacterial capacity of the biofilm. *In vitro* biological evaluation with fibroblasts as a kind of model cells showed that the material had good cytocompatibility. The functional biofilm is expected to act as a kind of self-antibacterial biodegradable film for skin wound healing.

【Key words】 polylactide, tannic acid, silver nanoparticles, antibacterial, nanofibrous membrane

0 引言

由于伤口、创伤、烧伤、衰老和手术引起的皮肤损失和功能障碍可能导致截肢或其他威胁生命的

后果, 从而极大地影响人类健康^[1]。自体移植、同种异体移植和人工植入是皮肤再生的一般方法。自体移植的来源有限, 会造成不可避免的损伤和移植部位的并发症; 同种异体移植则存在免疫排斥和病毒诱导的风险^[2]。因此, 如何开发具有高生物活性和生物安全性的人造移植物是现代再生医学领域中皮肤再生的关键问题。近年来, 壳聚糖^[3], 胶原蛋白^[4], 聚(乳酸-羟基乙酸)^[5], 聚(ε-己内酯)^[6],

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFB0309300, 2018YFE0201500)

国家自然科学基金(51973060, 81772317)

上海市国际科技合作基金(15520721200)

作者简介: 罗炜, E-mail: kevin0713@126.com

通信作者: 李玉林, E-mail: yulinli@ecust.edu.cn

刘昌胜, E-mail: liucs@ecust.edu.cn

和聚乳酸^[7]等高分子材料被用于研制不同形式的医用敷料,并取得了一定的修复效果。尽管如此,在创面修复过程中,感染是导致皮肤修复失败的主要原因^[6]。因此,结合原位杂化技术掺杂抗菌剂于伤口敷料中,能够阻挡外来病菌或者避免微生物滋生,这是一种高效管理抗菌剂的策略。

聚乳酸的生物相容性好,可生物降解易加工等优点使其广泛用于生物医学领域,通过制成薄膜^[8]、纳米片^[9]、纳米颗粒^[10]等不同形式用于各种医用敷料的开发,然而其疏水性和生物惰性仍然是限制其生物医学应用的主要因素。单宁酸作为一种植物来源的天然多酚,由中央葡萄糖分子和没食子酰基组成^[11],分子中独特的多酚结构赋予其良好的抗氧化性和一定的抗菌活性^[12]。单宁酸可以通过氢键作用与细菌的细胞膜上蛋白质结合,破坏了细胞膜的完整性,从而实现抗菌作用^[13]。据报道单宁酸可作为还原剂,能够简便、环保且具有成本效益低在室温下制备银纳米颗粒(AgNP)^[14]。AgNP尺寸小、比表面积大,通过直接与细菌细胞壁接触,便可释放有毒金属离子或生成活性氧(ROS)来发挥杀菌作用,因此呈现出对多种菌株的杀菌活性。此外,AgNP能将药物的不良副作用降至最低,并且不触发微生物的耐药性^[15]。将AgNP与聚乳酸纳米纤维膜复合,有望构建具有高抗菌性能的可吸收生物纤维膜。

鉴于此,本研究首先通过喷气纺丝的方式,构建具有模拟胞外基质结构的纳米纤维膜基底。利用氨等离子体技术在膜表面引入氨基,并通过戊二醛将单宁酸修饰到纳米纤维表面,利用单宁酸的还原性成功地将纳米银修饰到纤维膜表面,有效改善了所制备生物膜的亲水性能和抗菌活性。该抗菌生物膜有望作为具有生物活性的功能膜用于皮肤创面愈合修复。

1 实验部分

1.1 实验材料

本文所用的主要试剂如下:聚乳酸(PLLA, $[\eta]=4.1$ dL/g,自制);单宁酸、硝酸银(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);二氯甲烷、乙醇及其他试剂(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);DMEM培养基、胰蛋白酶(美国Hyclone公司);MTT粉末、FITC染色剂(Sigma-Aldrich

(上海)贸易有限公司)。

1.2 纳米杂化纤维膜的制备

1.2.1 聚乳酸纳米纤维膜的制备

将1 g聚乳酸溶于二氯甲烷/乙醇的混合溶剂(95:5, v/v),制得均一溶液(30 mg/mL)。利用溶液喷纺法(气流压力0.2 MPa,接收距离20 cm,喷嘴口径0.5 mm)制备PLLA纳米纤维膜。所得纤维膜真空干燥60℃ 24 h后备用,得干燥样品备用。

1.2.2 纳米杂化纤维膜的等离子体表面处理

将纤维膜放置于等离子体表面活性仪(Femto A, Diener electronic GmbH)的腔体内,对纤维膜进行表面等离子体处理(氦气,30 s,处理功率50 W)。将最后处理后的纤维膜命名为PLLA-N纤维膜。

1.2.3 抗菌聚乳酸纳米纤维膜的制备

将一定质量PLLA-N纤维膜(5 mm×5 mm)浸入10 mL 7.5%戊二醛溶液中,37℃下反应2 h。之后加入2 mL单宁酸溶液(13 mg/mL)进行反应。6 h后,将纤维膜取出,用超纯水洗涤纤维膜表面未反应的戊二醛及单宁酸,之后分别加入10 mL 1.0 mg/mL和2.0 mg/mL硝酸银溶液中,避光37℃下反应6 h。随后取出纤维膜,真空干燥24 h,将最后制备所得的纤维膜分别命名为PLLA-1.0Ag和PLLA-2.0Ag膜。

1.3 表征

1.3.1 X射线光电子能谱(XPS)

使用通过X射线光电子能谱(ESCALAB 250Xi,美国Thermo Fisher公司)对纳米纤维膜的表面元素进行表征。

1.3.2 亲水性表征

使用接触角测量仪(JC2000D2,上海中晨数字技术设备有限公司)测定纤维膜的水接触角以表征其亲水性。

1.3.3 X射线衍射(XRD)

使用X射线衍射仪(D/max2550VB,日本理学电机)测定对纳米杂化纤维膜进行表征。衍射仪扫描速度为3°/min,0.02°/step,测试角度为10°~80°。

1.3.4 微观形貌

使用扫描电子显微镜(SEM, S-4800N,日本日立公司)对纳米膜进行形貌表征。样品喷金50 s,加速电压15 kV。

1.4 体外细胞相容性评价

通过MTT法评价纤维膜的细胞相容性:将成

纤维细胞 (L929) 与纤维膜共培养 (2 万 / 孔, 24 孔板) 1 d 和 3 d 之后, 每孔中加入 300 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 放入培养箱孵育 4 h。到达时间后, 吸去 DMEM 细胞培养基, 每孔加入 500 μL 二甲基亚砜溶液, 使用酶标仪 (SPECTRA max 384, 美国 Molecular Devices 公司) 对溶液进行吸光度测定 (检测波长 492 nm)。细胞增殖率计算公式为:

$$\text{细胞增殖率}(\%) = \frac{OD_{\text{样品}}}{OD_{\text{空白}}} \times 100\%$$

1.5 抗菌性能评价

使用大肠杆菌对纳米膜进行抗菌性评价: 将纳米膜 (PLLA, PLLA-1.0Ag, PLLA-2.0Ag) 纤维膜放置于 24 孔板内, 紫外照射灭菌后, 在每孔中加入大肠杆菌 (1.0×10^6 cfu/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h。从每孔中取出 100 μL 共培养液均匀涂抹在琼脂板上, 继续培养 24 h, 观察琼脂板上菌落情况。

2 结果与讨论

2.1 PLLA-N 纤维膜的 X 射线光电子能谱表征结果

PLLA-N 纤维膜的 XPS 谱图 (图 1) 能够准确表明纤维膜表面含 N 官能团的存在, 分析得到该纤维膜表面氮元素的含量为 2.2%。即表明在经过氨等离子体处理后, 纤维膜表面 C-N-H 和 C=N-C 等含 N 基团增加。

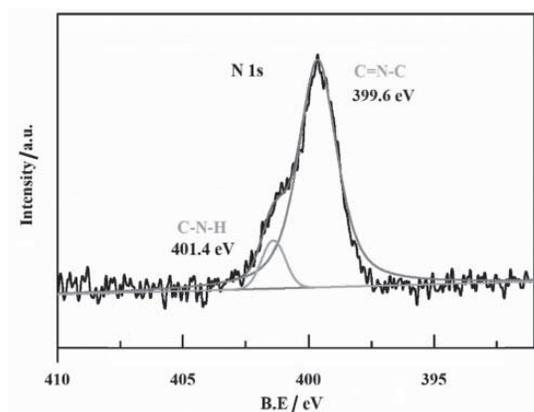


图 1 PLLA-N 纤维膜的 XPS 氮元素扫描能谱图

Fig.1 XPS scanning spectra of the PLLA-N membrane

2.2 PLLA-N 纤维膜的亲水性表征结果

为了评估氨等离子体技术对纤维膜亲水性的影响, 测量得出氨等离子体处理前 PLLA 膜的水接触角为 $131.9^{\circ} \pm 3.4^{\circ}$, 处理后的 PLLA-N 膜的水接触

角为 $83.3^{\circ} \pm 8.5^{\circ}$, 接触角降低了 36.8%, 亲水性大幅度提高。由于含氮的官能团的存在提高了聚乳酸表面亲水基团的比例, 通过改善材料润湿性可以提高材料与细胞间的亲和力, 改善细胞黏附^[16]。

2.3 PLLA-Ag 纤维膜的微观形貌

使用扫描电镜对 PLLA-2.0Ag 样品膜的微观形貌进行表征, 结果如图 2 所示, 可以直观地观察到纤维表面纳米粒子的存在, 其粒径范围在 30 ~ 60 nm, 平均粒径 (45.9 ± 9.7) nm, 这说明 AgNP 在纤维膜的纤维上成功沉积。

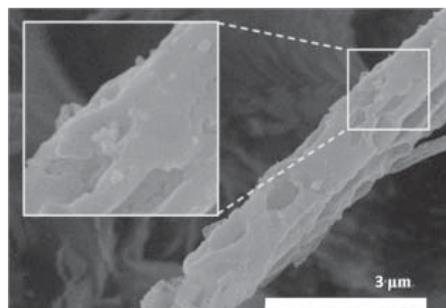


图 2 PLLA-Ag 纤维膜扫描电镜图

Fig.2 SEM micrographs of the PLLA-Ag nanofibrous membrane (scale bar: 3 μm)

2.4 PLLA-Ag 纤维膜的细胞相容性评价结果

使用 MTT 法测量 PLLA-Ag 纤维膜与 L929 细胞共培养 1 d 和 3 d 后的细胞存活率 (如图 3)。PLLA-1.0Ag 和 PLLA-2.0Ag 在 1 d 后的细胞存活率分别为 (103.5 ± 5.7) % 和 (100.0 ± 6.2) %, 而 3 d 后的细胞成活率均大于 90%, 说明材料对 L929 细胞增殖没有明显的抑制作用, 证明 PLLA-Ag 纤维膜的细胞相容性良好。

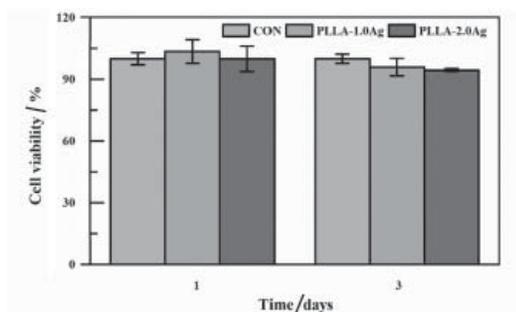


图 3 1天和3天后纤维膜的细胞相容性 (L929 成纤维细胞, CON: PLLA-N)

Fig.3 Cell viability of L929 cells cultured with nanofibrous membranes for 1 d and 3 d (CON: PLLA-N)

2.5 PLLA-Ag 纤维膜的抗菌性能评价结果

在抗菌实验中, 将大肠杆菌与 PLLA、PLLA-1.0Ag 和 PLLA-2.0Ag 纤维膜共培养 24 h, 观察并

记录实验结果。氨基作为活性位点,能够利用戊二醛将单宁酸接枝在纤维膜表面。单宁酸带有多个酚羟基,能够在纤维膜表面原位还原 AgNO_3 , 生成的 AgNP 颗粒赋予了纳米杂化纤维膜良好的抗菌性能。纤维膜的抗菌效果如图 4 所示,从中可以看出, PLLA-Ag 纤维膜表面的 AgNP 含量增加,菌落数量明显减少,说明 PLLA-2.0Ag 有明显的抗菌效果。这是由于纤维膜表面被单宁酸所还原的纳米银含量较多所起到的抗菌作用^[17]。另一方面,纤维膜表面所带有的单宁酸也有可能对细菌有抑制作用^[18]。综上所述, PLLA-Ag 纤维膜拥有作为抗菌敷料的应用潜力。

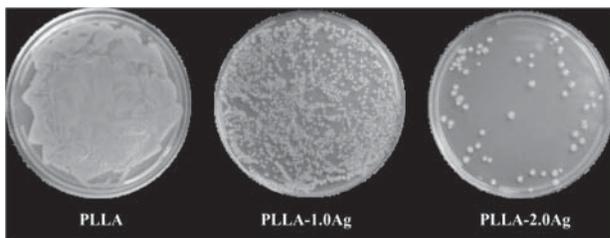


图 4 纤维膜的抗菌图

Fig.4 Antibacterial pictures of nanofibrous membranes

3 结论

本研究文采用喷气纺丝、等离子体改性、接枝改性及原位沉积的方法,制备了具有抗菌功能的可吸收聚乳酸生物膜材料。探讨了在不同的 AgNO_3 浓度下所制备的纳米纤维膜对 L929 细胞的细胞相容性与抗菌性能。结果表明,通过喷气纺丝技术制备得到 PLLA 纤维膜,经氨等离子体处理后成功在其表面引入氨基,氨基改善了膜的表面润湿性提高了 PLLA 纤维膜的应用价值;利用表面带氨基的 PLLA 纤维膜,在其表面成功接枝单宁酸后,并原位还原生成纳米银颗粒,赋予了材料良好的抗菌性能。这一研究成果可以为可吸收抗菌创伤敷料的开发提供新的借鉴。

参考文献

[1] BASU MALLIK S, JAYASHREE B S, SHENOY R R. Epigenetic modulation of macrophage polarization- perspectives in diabetic wounds [J]. *J Diabetes Complicat*, 2018, 32(5): 524-530.

[2] LI Y, XIAO Y, LIU C. The Horizon of materiobiology: A perspective on material-guided cell behaviors and tissue engineering [J]. *Chem Rev*, 2017, 117(5): 4376-4421.

[3] MNDLOVU H, DU TOIT L C, KUMAR P, et al. Development of a fluid-absorptive alginate-chitosan bioplatfor for potential

application as a wound dressing [J]. *Carbohyd Polym*, 2019, 222: 114988.

- [4] CHEIRMADURAI K, THANIKAIVELAN P, MURALI R. Highly biocompatible collagen-Delonix regia seed polysaccharide hybrid scaffolds for antimicrobial wound dressing [J]. *Carbohyd Polym*, 2016, 137: 584-593.
- [5] WU JY, LI CW, TSAI CH, et al. Synthesis of antibacterial TiO_2 /PLGA composite biofilms [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10(5): e1097-e1107.
- [6] YANG X, YANG J, WANG L, et al. Pharmaceutical Intermediate-modified gold nanoparticles: against multidrug-resistant bacteria and wound-healing application via an electrospun scaffold [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(6): 5737-5745.
- [7] KOST B, SVYNTKIVSKA M, BRZEZIŃSKI M, et al. PLA/ β -CD-based fibres loaded with quercetin as potential antibacterial dressing materials [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 190: 110949.
- [8] CHITRATTHA S, PHAECHAMUD T. Porous poly(dl-lactic acid) matrix film with antimicrobial activities for wound dressing application [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 58: 1122-1130.
- [9] ITO K, SAITO A, FUJIE T, et al. Sustainable antimicrobial effect of silver sulfadiazine-loaded nanosheets on infection in a mouse model of partial-thickness burn injury [J]. *Acta Biomater*, 2015, 24: 87-95.
- [10] DAVACHI S M, KAFFASHI B. Preparation and Characterization of poly L-lactide/triclosan nanoparticles for specific antibacterial and medical applications [J]. *Int J Polym Mater Po*, 2015, 64(10): 497-508.
- [11] GÜLÇİN İ, HUYUT Z, ELMASTAŞ M, et al. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid [J]. *Arab J Chem*, 2010, 3(1): 43-53.
- [12] TAGURI T, TANAKA T, KOUNO I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(12): 1965-1969.
- [13] 林洁龙, 陈水扶, 卢嘉雯, 等. 表面化学修饰单宁酸制备抗菌羊毛及其抗菌性能研究 [C]. 哈尔滨. 第八届中国功能材料及其应用学术会议论文集, 2013: 115-117.
- [14] ZHANG A, XIAO Y, DAS P, et al. Synthesis, dissolution, and regeneration of silver nanoparticles stabilized by tannic acid in aqueous solution [J]. *J Nanopart Res*, 2019, 21(7): 133.
- [15] YANG Y, QIN Z, ZENG W, et al. Toxicity assessment of nanoparticles in various systems and organs [J]. *Nanotechnol Rev*, 2017, 6(3): 279-289.
- [16] ARIMA Y, IWATA H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(20): 3074-3082.
- [17] WANG B, MOON J R, RYU S, et al. Antibacterial 3D graphene composite gel with polyaspartamide and tannic acid containing in situ generated Ag nanoparticle [J]. *Polym Composite*, 2020, 41(7): 2578-2587.
- [18] LIU L, SHI H, YU H, et al. One-step hydrophobization of tannic acid for antibacterial coating on catheters to prevent catheter-associated infections [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(12): 5035-5043.

(收稿日期: 2020-09-24)