

http://pmse.scu.edu.cn

pH响应型抗菌水凝胶伤口敷料的制备及促愈合性能

尹祖秀^{1,2}, 黄婷婷¹, 王建英², 祁永浩¹, 解莹莹^{1,2}, 王光¹, 刘会茹¹, 王娟¹

(1. 石家庄学院 河北省纤维材料技术创新中心, 河北 石家庄 050035; 2. 河北科技大学 化学与制药工程学院, 河北 石家庄 050018)

摘要:文中利用衣康酸(IA)、丙烯酰胺(AM)和烯丙基三甲基氯化铵(TAAC)为原料发生进行交联, 负载抗菌药物聚六亚甲基盐酸胍(PHMG), 一锅法制备了pH敏感性抗菌水凝胶IA/AM/TAAC@PHMG。对水凝胶的力学性能、溶胀性能、释药性能、抗菌性能、生物相容性及促感染伤口愈合性能进行了研究。结果表明, TAAC能增加水凝胶的柔韧性, 使水凝胶的断裂伸长率提高了88%; 水凝胶具有pH响应性, 能积极响应伤口pH, 控制和延长PHMG的释放, PHMG在碱性条件下(pH 8.2)的释放率(60.65%)优于酸性条件(pH 3.2)下的释放率(14.97%); IA/AM/TAAC@PHMG对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率大于99.98%; 水凝胶组(320 $\mu\text{g/mL}$)的细胞相对存活率高于75.08%, 细胞溶血率小于4%, 抗菌水凝胶具有良好的生物相容性; 组织学分析证明IA/AM/TAAC@PHMG载药水凝胶能通过创造湿润低氧利于肉芽生长的环境和优异的抗菌性能, 使炎性因子减少, 促进胶原和皮肤再生, 加速伤口愈合。

关键词:水凝胶; pH敏感性; 药物释放; 聚六亚甲基盐酸胍; 抗菌性能

中图分类号: TQ427.2⁶

文献标识码: A

文章编号: 1000-7555(2024)04-0029-11

水凝胶是一种具有亲水性、且在水中只溶胀不溶解的三维交联网络聚合物, 在当今生物医学和材料科学中发挥着重要作用^[1]。水凝胶敷料能吸收伤口的渗出液并保持组织愈合所需的湿润环境, 作为药物缓释系统, 既能控制药物释放速率, 又能促进伤口愈合^[2]。pH敏感性水凝胶是一类含有响应pH变化的酸性或碱性基团的智能材料^[3], pH作为外部刺激条件是影响其溶胶-凝胶化转变、溶胀、药物释放等行为的重要因素^[4], pH响应性水凝胶可用作药物载体在特定位置实现药物的靶向持续释放^[5]。

伤口感染会触发身体的免疫反应, 引发炎症和组织损伤的同时还会导致愈合过程减缓, 给患者带来巨大的痛苦和经济负担^[6]。目前, 用于治疗伤口感染的抗菌药物主要有抗生素、金属离子和抗菌肽, 而过度使用抗生素会使细菌产生耐药性, 金属离子和抗菌肽又对身体存在潜在的毒害^[7]。抗菌药物通过

物理混合作用于伤口, 会使得药物爆裂释放, 不仅抗菌效果短暂, 高剂量带来的毒副作用还可能影响伤口部位的正常组织。因此, 开发具有良好抗菌性能和智能响应型可持续释放的抗菌敷料已成为当今生物医学领域的研究热点。聚六亚甲基盐酸胍(PHMG)是一种含胍基的阳离子抗菌剂, 其结构中呈正电的胍基易吸附呈负电的细菌和病毒, 抑制细胞分裂繁殖, 具有良好的抑菌活性, 且不易产生耐药性, 已得到广泛的应用^[8]。汪煜强等^[9]通过PHMG与单宁酸发生Michael加成反应, 将其固定在聚丙烯酰胺水凝胶中制得一种力学性能良好的长效抗菌水凝胶。Feng等^[10]利用透明质酸(HA)修饰PHMG, 以泊洛沙姆为基质, 制备的低毒性缓释抗菌水凝胶具有良好的抗菌性, 能快速愈合伤口。Chen等^[11]以羧甲基壳聚糖(CMC)与PHMG修饰的醛F108(PFC)进行希夫碱反应, 制备了一种可注射性、ROS/pH双响应

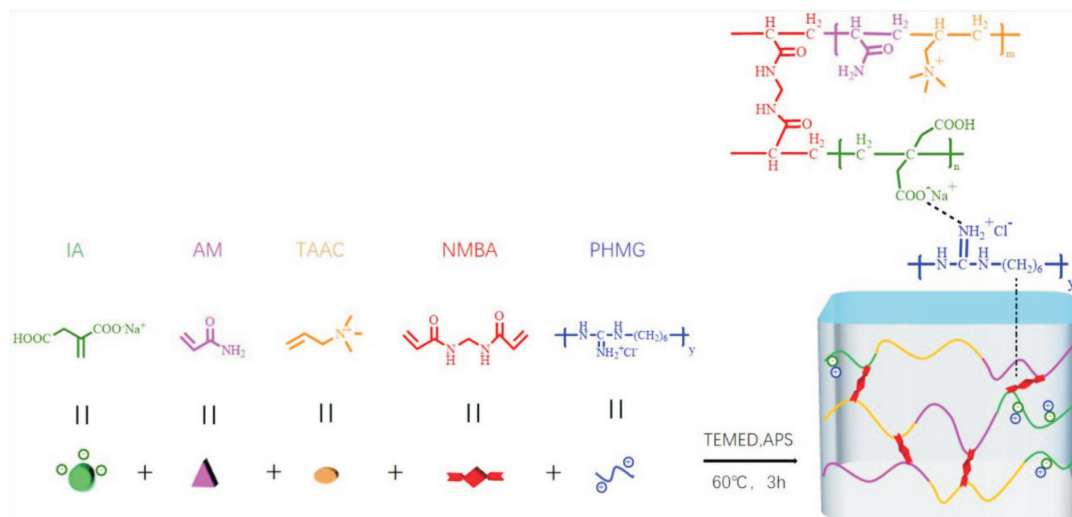
doi: 10.16865/j.cnki.1000-7555.2024.0070

收稿日期: 2023-12-31

基金项目: 石家庄重点研发计划(231490112A)

通讯联系人: 刘会茹, 主要从事有机功能材料研究, E-mail: huiruliu16@163.com;

王娟, 主要从事生物医药和纤维材料的开发与应用研究, E-mail: wangjuantju@126.com



Scheme 1 Synthesis route of IA/AM/TAAC@PHMG hydrogel

性和可释放 H_2S 的多功能水凝胶,在糖尿病伤口治疗中显示出巨大的潜力。但是,目前关于 PHMG 在 pH 缓控释水凝胶系统中的研究较少。

本文采用丙烯酰胺(AM)为水凝胶基体,主链连接对 pH 敏感的衣康酸(IA)以及带正电荷的季铵盐烯丙基三甲氯化铵(TAAC)为侧链合成了 pH 敏感性抗菌水凝胶,PHMG 与水凝胶基体中的一 $-COOH$ 通过静电吸附作用负载到水凝胶中。以红外光谱、扫描电镜、拉伸性能、流变性能等方法测定了水凝胶结构和力学性能,通过研究水凝胶的 pH 响应性、药物缓释性、抗菌活性、生物相容性以及伤口愈合效果,以期获得一种安全高效的 pH 响应性抗菌水凝胶。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

IA:分析纯,山东优索化工科技有限公司;AM:分析纯,上海吉至生化科技有限公司;TAAC、四甲基乙二胺(TEMED):分析纯,上海 MACKLIN 生化科技股份有限公司;PHMG:分析纯,中国阿拉丁生化科技股份有限公司;N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(NMBA):分析纯,天津科密欧化学科技有限公司;过硫酸铵(APS):分析纯,上海源叶生物科技有限公司;金黄色葡萄球菌(CMCC(B)26003)、大肠杆菌(ATCC 25922):上海 RHAWN 化学试剂公司。

傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR):VECTOR-22 型,德国 BRUKER 公司;扫描电子显微镜(SEM):S-

4800,日本 Hitachi 公司;万能试验机:UH6502,上海优鸿测控技术有限公司;旋转流变仪:安东帕 MCR302,奥地利 Anton Paar 公司;医用洁净工作台: BIOBASE,济南鑫贝西生物科技有限公司;振荡培养箱:BS-1EA,常州国华电器有限公司;紫外-可见分光光度计:TU-1901 型,北京普析通用公司;酶标仪: Infinite M200Pro 型,瑞士 TECAN 公司。

1.2 水凝胶的制备

将 0.57 g IA 溶于 15 mL 1.70% (质量分数,下同)的 NaOH 溶液中,在冰水浴中进行预处理,使原料的中和度为 75%;将 2.8 g AM, 0.94 g TAAC, 0.02 g NMBA, 0.03 g APS, 0.15 g TEMED 和 0.1 g PHMG 加入到 IA 预处理液中。超声振荡 5 min, 获得均匀分散的反应液,将溶液转移至聚四氟乙烯模具中,放入 60 °C 干燥箱反应 3 h, 得到无色透明水凝胶。

1.3 测试与表征

1.3.1 FT-IR 分析:采用 FT-IR 对冻干后的水凝胶进行衰减全反射扫描,扫描范围是 500~4000 cm^{-1} 。

1.3.2 SEM 分析:用液氮速冻并脆断水凝胶,在 -80 °C 冻干水凝胶 24 h, 利用 SEM 观察其形貌。

1.3.3 水凝胶拉伸性能测试:将水凝胶样品均制备成条状(长 10 cm×宽 1 cm×厚 0.2 cm),在 25 °C 条件下,使用万能试验机以 20 mm/min 的速率进行应力-应变测试,测试水凝胶的拉伸性能。

1.3.4 水凝胶流变性能分析:将水凝胶制成直径 20 mm、高度约 6 mm 的圆柱体,置于 25 mm 平行板间,

间距 1000 μm , 在 25 $^{\circ}\text{C}$, 设置恒定应变 5%, 角频率 0.1~100 rad/s , 使用流变仪测试水凝胶的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'')。

1.3.5 水凝胶 pH 响应性分析: 采用称重法测定冻干水凝胶的 pH 响应性能, 称取 0.5 g 冻干后的水凝胶, 记作 W_0 , 分别浸泡在 500 mL pH 3.2, pH 7.2 和 pH 8.2 的 PBS 溶液中。在预定的时间间隔内, 取出水凝胶样品, 用滤纸擦干表面水分, 测量湿重, 记作 W_t , 直至溶胀平衡。

水凝胶的平衡溶胀度 (ESR) 按式(1)计算

$$ESR = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad (1)$$

式中: ESR ——平衡溶胀度, g/g ; W_0 ——干凝胶质量, g ; W_t —— t 时刻水凝胶湿态质量, g 。每组平行测试 3 次。

1.3.6 水凝胶药物释放性能分析: 将载药水凝胶分别放入 pH 3.2, pH 7.2 和 pH 8.2 的 PBS 缓冲溶液中, 放置到 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上, 在固定的时间间隔内移取 3 mL 溶液, 通过 UV-Vis 测量溶液在 193 nm 处的吸光度值, 再加入相同体积的 PBS 缓冲液。根据药物标准曲线推算缓冲液体系中 PHMG 浓度, 以式(2)计算药物累积释放率 (D)

$$D = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i + C_n V}{W} \quad (2)$$

式中: C_i, C_n ——该时刻溶液中 PHMG 浓度; V_i ——每次移取缓冲液的体积; V ——缓冲液总体积; W ——水凝胶中 PHMG 的含量。

1.3.7 水凝胶抗菌性能分析: 以代表革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*) 和代表革兰氏阴性菌的大肠杆菌 (*E.coil*) 为测试菌种, 测试水凝胶的抗菌活性。采用抑菌圈法表征水凝胶的抑菌性能, 将直径 1 cm 的水凝胶圆片在紫外灯下灭菌 1 h。取 100 μL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 的菌液将其均匀分散至琼脂板上, 用无菌镊子将水凝胶圆片平铺在琼脂板表面后, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱中孵育 24 h, 观察有无抑菌圈形成。

通过平板菌落计数法测定水凝胶的抗菌性能, 取浓度为 1×10^9 CFU/mL 的菌液将其稀释为 1×10^7 CFU/mL, 将 0.1 g 干凝胶与 10 mL 1×10^7 CFU/mL 的

菌液共混放入试管中, 置于恒温培养摇床上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 以 120 r/min 的转速培养 4 h。取出与水凝胶共混培养后的菌液稀释至 1×10^5 CFU/mL, 取 100 μL 菌液涂布至琼脂板表面, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱中孵育 24 h。抗菌率按式(3)计算

$$R = \frac{A - B}{A} \quad (3)$$

式中: R ——抗菌率, %; A ——空白对照组菌落数; B ——水凝胶样品菌落数。

1.3.8 水凝胶细胞毒性测试: 配制浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$, 160 $\mu\text{g/mL}$ 和 320 $\mu\text{g/mL}$ 的水凝胶分散液, 通过 CCK-8 实验评估水凝胶样品的细胞毒性。将 LO2 人正常肝细胞以每孔 6.0×10^3 个细胞的密度 200 μL 接种到 96 孔板中, 接着在含 10% 胎牛血清 (BI) 的 1640 培养基中培养 24 h, 使细胞贴壁正常生长。然后加入不同浓度的凝胶浸泡液 (0~320 $\mu\text{g/mL}$), 孵育 24 h。孵育结束后, 每孔加入 5 mg/mL 的 CCK-8 溶液 20 μL 再孵育 3 h。用移液枪移去 CCK-8 溶液后加入 150 μL 二甲基亚砜进行甲瓩晶体的溶解, 15 min 后将 96 孔板用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。以用水凝胶样品处理和未处理的 LO2 细胞培养基分别为实验组和对照组, 体外细胞毒性计算公式如式(4)

$$\text{Cell survival rate} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \quad (4)$$

1.3.9 水凝胶血液相容性分析: 将水凝胶配制成浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$, 160 $\mu\text{g/mL}$ 和 320 $\mu\text{g/mL}$ 的分散液, 将小鼠血液离心 (1000 r/min , 10 min) 后获得红细胞, 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次并将红细胞稀释至 10%。以 0.3 mL 不同浓度的凝胶浸泡液与 0.7 mL 红细胞混悬液为实验组, 0.3 mL 的超纯水与 0.7 mL 红细胞混悬液为阳性对照组、0.3 mL PBS 缓冲液与 0.7 mL 红细胞混悬液为阴性对照组。将样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中 1 h, 之后将混合液以 1000 r/min 的转速离心 10 min, 利用 UV-Vis 测定上清液在 540 nm 处的吸光度 (A_s)。溶血率按式(5)计算

$$\text{Hemolysis rate} = \frac{A_s - A_n}{A_p - A_n} \quad (5)$$

式中: A_s, A_n, A_p ——分别为样品、阴性和阳性对照的吸光度值。

1.3.10 小鼠体内愈合实验: 用 10% 乙醚对小鼠进行麻醉, 脱毛处理后, 用 75% 酒精消毒。利用打孔器在

小鼠背部打出2组直径约8 mm的圆形创口,用移液枪在每组伤口处滴加50 μL 1.0×10^7 CFU/mL的金黄色葡萄球菌菌液并浸润1 h,构建感染性伤口模型。将未添加任何敷料的创面设置为空白对照组,将各组水凝胶敷在创面上并用尼龙片固定设置为实验组,3 d替换1次水凝胶敷料。分别在第0,3,7,14天时拍照记录伤口面积,第3天后,收集伤口组织浸入PBS缓冲液4 h后涂板,检测小鼠体内抗菌活性。定义初始伤口面积为 A_0 ,愈合过程中的伤口面积为 A_t ,伤口愈合率计算公式如式(6)

$$\text{Wound healing rate} = \frac{A_t - A_0}{A_0} \quad (6)$$

1.3.11 组织学分析:手术后第7,14天处死小鼠,并收集小鼠的创面组织,将这些组织固定在4%多聚甲醛溶液中,之后再用石蜡包埋,将石蜡块切成5 μm 厚的切片。对切片进行H&E和Masson染色,分析伤口组织在不同时间段的愈合情况,以观察不同愈合时间时组织的病理变化和胶原蛋白的形成。

2 结果与讨论

2.1 化学结构分析

对合成的水凝胶进行结构表征, Fig.1(a)为IA, AM, TAAC和PHMG原料的红外光谱图, Fig.1(b)为IA/AM, IA/AM/TAAC和IA/AM/TAAC@PHMG凝胶的红外光谱图。在IA和AM红外光谱中2850~3200 cm^{-1} , 3200~3420 cm^{-1} 处分别为IA的—OH和AM的—NH₂的伸缩振动宽峰,二者产生缔合效应,吸收峰发生蓝移致使峰形变宽出现IA/AM凝胶红外光谱中3130~3360 cm^{-1} 处的伸缩振动带^[12]; IA/AM红外光谱中1613 cm^{-1} 和1424 cm^{-1} 处分别为IA中C=O的非对称和对称弯曲振动峰, 3337 cm^{-1} 和1660 cm^{-1} 处分别是AM的—NH₂和C=O的吸收峰; IA/AM/TAAC凝胶红外光谱中, 963 cm^{-1} 和894 cm^{-1} 分别为TAAC上C—N的特征吸收峰,与纯PHMG红外光谱相比, IA/AM/TAAC@PHMG凝胶红外光谱也在2940 cm^{-1} 和2870 cm^{-1} 处出现相同位置的C—H伸缩振动峰, C=N特征吸收峰从1640 cm^{-1} 处发生红移到

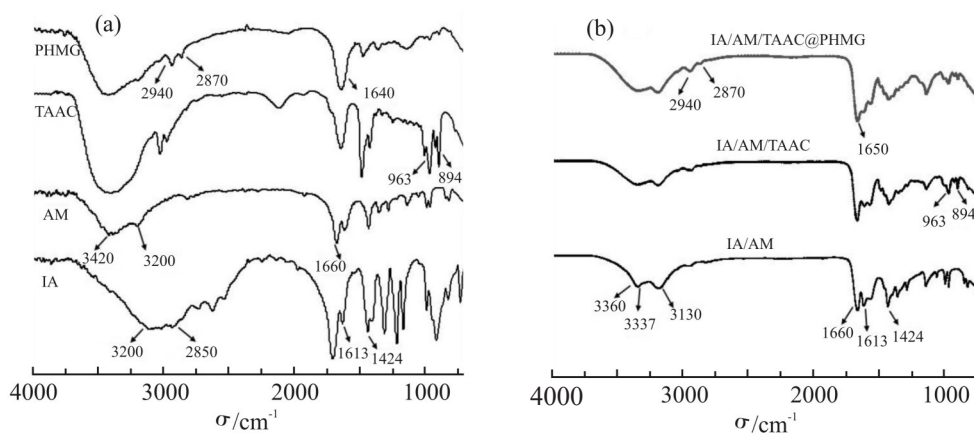


Fig. 1 (a) FT-IR spectra of IA, AM, TAAC, PHMG; (b) FT-IR spectra of IA/AM, IA/AM/TAAC, IA/AM/TAAC@PHMG

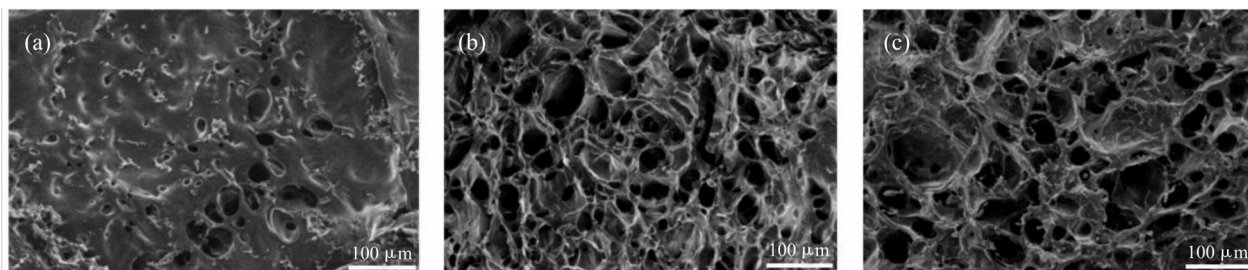


Fig. 2 SEM images of hydrogels (a): pH 3.2; (b): pH 7.2; (c): pH 8.2

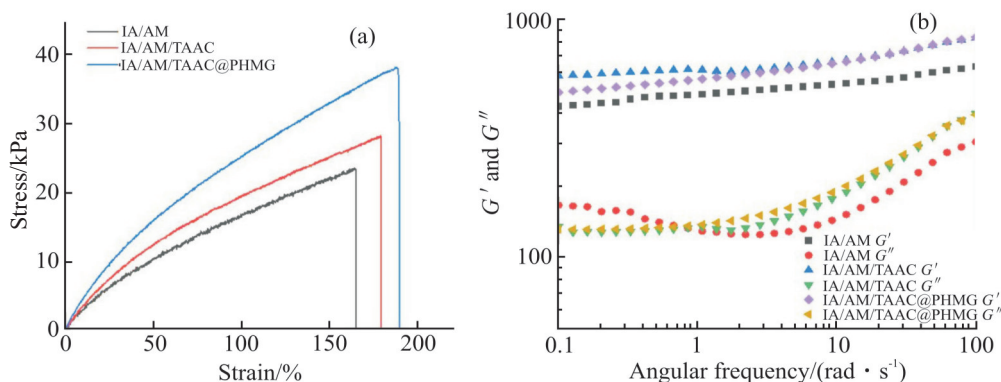


Fig. 3 (a) Tensile and (b) rheological properties of hydrogels

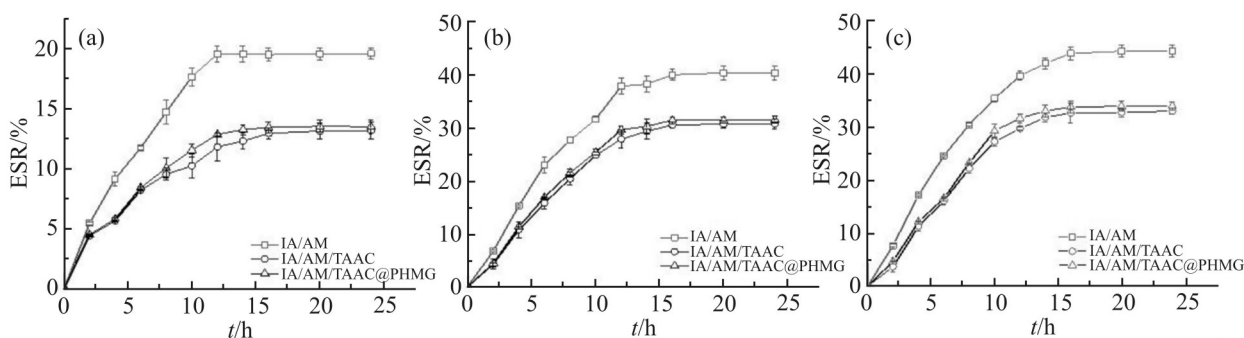


Fig. 4 Swelling property of hydrogels
(a): pH=3.2; (b): pH=7.2; (c): pH=8.2

1650 cm^{-1} 处证明了 PHMG 的存在^[13], 该红移现象推测是反应物中的氢键缔合所致^[14]; 以上这些峰的变化表明, IA/AM/TAAC@PHMG 水凝胶已制备成功。

2.2 形貌分析

Fig.2 显示了 IA/AM/TAAC 水凝胶在 pH 3.2 条件下呈现出的多孔结构, 该多孔结构满足了药物负载和释放的条件。在 pH 7.2 时, 水凝胶吸水膨胀, 三维网状结构更为松散均匀, 孔洞数量和孔径略有增加, 当水凝胶在弱碱性环境 (pH 8.2) 中溶胀时, 水凝胶中的羧基在碱性条件下发生电离, 导致水凝胶网络结构中斥力增大, 形成了更大的孔径呈现出更加明显均一、疏松多孔的网络结构。

2.3 水凝胶的力学性能

良好的柔韧性对水凝胶吸收伤口渗出物和保持一定的力学性能非常重要, 使其不会因运动而发生形变或损坏, 更有利于伤口修复。由 Fig.3(a) 的拉伸性能测试可知, 各组水凝胶均具有良好的力学性能, 其中 IA/AM 水凝胶的拉伸强度为 13 kPa、断裂伸长率为 107.4%, 优于人类皮肤的可延展性 (60%~

75%)。与之相比, IA/AM/TAAC 水凝胶的拉伸强度和断裂伸长率分别为 28 kPa 和 201.9%, 推测是 TAAC 的加入使水凝胶共价键网络交联密度增大, 增加了水凝胶的柔韧性, 使得拉伸性能显著提高。IA/AM/TAAC@PHMG 水凝胶中带正电荷的抗菌药物 PHMG 与带负电荷的水凝胶体系通过共沉淀法发生静电吸引, 以离子键方式增加了分子间的引力, 使水凝胶网络变得更加紧密, 从而提高了水凝胶的力学性能^[15], 使其拉伸强度增大到 37 kPa, 断裂伸长率增大到 271.3%。Fig.3(b) 显示, 当振荡频率从 0.1 rad/s 增加到 100 rad/s 时, 所有水凝胶的 G' 均大于 G'' , 这表明 3 种水凝胶状态稳定且一直处于凝胶状, 不会随着振荡频率的增加而出现溶胶坍塌行为, IA/AM/TAAC 水凝胶的 G' 和 G'' 明显大于 IA/AM 水凝胶, 这表明 TAAC 的加入不仅提高了拉伸强度也增加了水凝胶的流变性能, 在这种体系中, 水凝胶网络具有良好的柔韧性和稳定性, 稳定的力学性能有利于水凝胶材料黏附在皮肤创面促进伤口愈合。

2.4 水凝胶的 pH 响应性

溶胀率是水凝胶最重要的性能之一,其优越的溶胀性能允许营养物质、药物和废物的扩散和交换,提供有利于伤口愈合的潮湿环境,避免换药时的疼痛。Fig.4为水凝胶溶胀性能测试图,3种水凝胶在不同pH环境中迅速吸收水分膨胀,短时间内溶胀度均明显增加。在pH=3.2时,IA/AM水凝胶的平衡溶胀度为19.62 g/g,而IA/AM/TAAC和IA/AM/TAAC@PHMG分别为11.87 g/g和12.91 g/g。猜测是加入TAAC增加了高分子交联度,致使水凝胶内部孔径变小,减弱了吸水性能。当水凝胶IA/AM, IA/AM/TAAC和IA/AM/TAAC@PHMG在pH=7.2时,平衡溶胀度分别增加到40.24 g/g, 30.73 g/g和31.61 g/g,对比在酸性环境中的平衡溶胀度显著增大,这主要是由于IA的 $pK_a=3.5$,当溶液pH值低于聚衣康酸的 pK_a 值时,溶胀的水凝胶会恢复到质子化状态,水凝胶网络结构收缩,变得更加紧致。而聚衣康酸在pH值高于其 pK_a 以上的环境中会脱 H^+ ,水凝胶网络斥力增大,水凝胶吸水溶胀,表现为平衡溶胀度增大。在pH=8.2时,由于水溶液体系碱性更强,故水凝胶IA/AM, IA/AM/TAAC和IA/AM/TAAC@PHMG的平衡溶胀度继续增加到44.23 g/g, 32.93 g/g和34.06 g/g。由上述可知,同一系列的水凝胶在不同pH条件下的溶胀度不同,在弱碱性(pH=8.2)条件下的溶胀度显著大于酸性(pH=3.2)条件下的溶胀度,证明这3种水凝胶均具有pH敏感性,能作为靶向pH响应性药物载体,持续稳定递送药物。

2.5 水凝胶的药物释放性能

水凝胶材料IA/AM和IA/AM/TAAC的体外药物释放曲线如Fig.5所示。由图可知,IA/AM水凝胶

大概在26 h后药物释放速率趋于平稳,在中性(pH=7.2)和碱性(pH=8.2)条件下药物释放量分别达到67.94%和72.42%,IA/AM/TAAC水凝胶大概在48 h后药物释放速率趋于平稳,在中性和碱性环境中药物释放量分别为49.94%和60.65%。由上所述,载药水凝胶的释放速率与其三维结构密切相关,TAAC的加入使水凝胶交联密度增大,三维网络结构收缩变得更加紧致,延长了药物缓释时间。在酸性环境中(pH=3.2),2种水凝胶的药物缓释速度显著减慢,水凝胶IA/AM和IA/AM/TAAC分别在26 h和48 h达到药物释放量最大值21.8%和14.97%。推测是酸性缓冲液体系中含有大量氢离子与游离状态的羧酸根离子发生可逆结合,增强了水溶液和高分子网络间的氢键作用,导致水凝胶网络更加紧密,从而限制了药物的释放。由药物释放结果可知,2种水凝胶在弱碱性环境中药物释放性能比在弱酸性环境中更好,再次证明了水凝胶具有pH响应性,能在不同pH条件下选择性释放药物,当该载药水凝胶用于呈弱碱性的慢性感染型伤口时,会更快更高效地释放药物,加速伤口的愈合。

2.6 水凝胶的抗菌性能

皮肤伤口需要经历4个伤口愈合阶段,包括止血、炎症、增殖和组织重塑,在伤口愈合的第2阶段,细菌感染和组织破坏是引起不可控炎症的主要因素,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起的皮肤损伤后的细菌感染会加剧皮肤伤口的局部炎症反应,严重的感染可能会引发全身性炎症反应甚至脓毒症,进而阻碍伤口愈合^[6,17],给人体带来巨大的不便和痛苦。因此,研究了水凝胶IA/AM, IA/AM/TAAC和

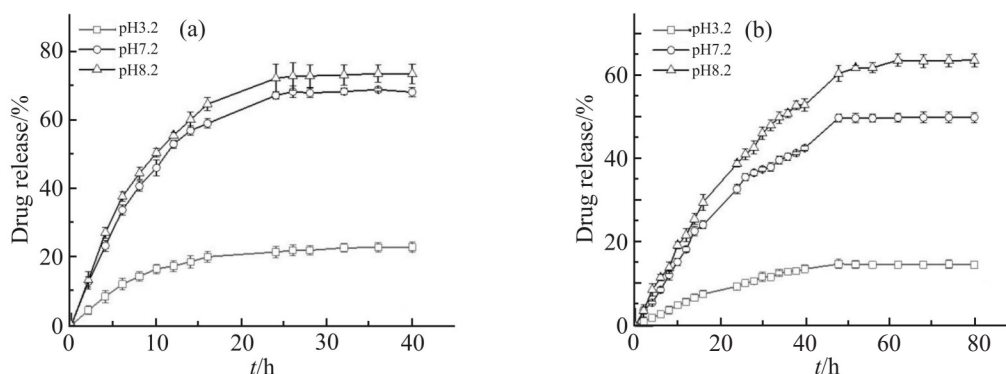


Fig. 5 Drug release properties (a) IA/AM drug carrying water gel at pH 3.2, pH 7.2, pH 8.2; (b) IA/AM/TAAC drug carrying water gel at pH 3.2, pH 7.2, pH 8.2

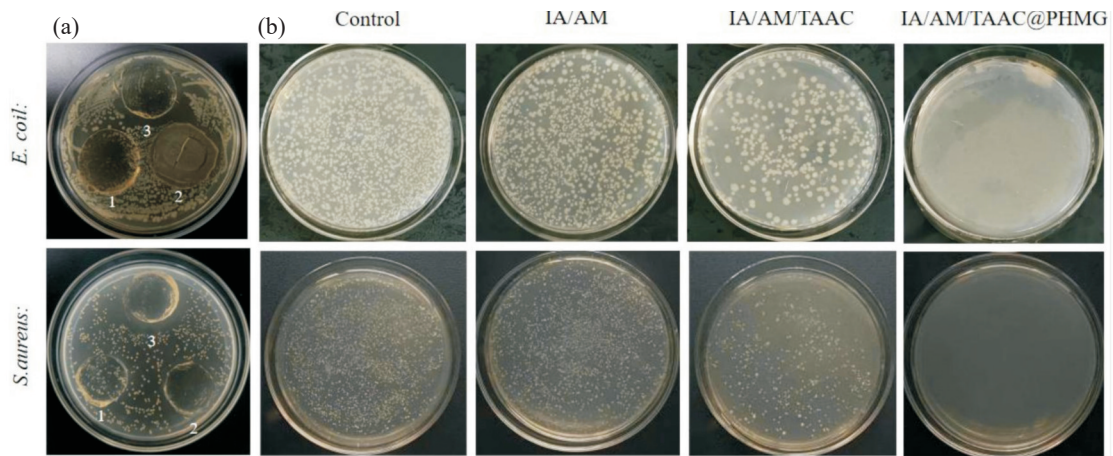


Fig. 6 (a) Bacteriostasis circle experiment of IA/AM, IA/AM/TAAC and IA/AM/TAAC@PHMG hydrogels; (b) antibacterial effect diagram of hydrogels in contact with *E. coli* and *S. aureus* for 24 h

Tab. 1 Antibacterial rate of hydrogel after 24 h treatment with *E. coli* and *S. aureus*

	Antibacterial rate/%			
	Control	IA/AM	IA/AM/TAAC	IA/AM/TAAC@PHMG
<i>E. coli</i>		11.17	78.86	99.92
<i>S. aureus</i>		14.13	82.34	99.99

IA/AM/TAAC@PHMG 的杀菌能力,借助其抗菌特性快速消除炎症,促进组织修复加速伤口愈合。如图6(a)所示,通过抑菌圈实验发现,只有 IA/AM/TAAC@PHMG 水凝胶有清晰的抑菌圈,证明 PHMG 可以从水凝胶载体中被释放出来起到良好的抗菌作用,IA/AM/TAAC 水凝胶没有抑菌圈但表面不长菌说明 IA/AM/TAAC 水凝胶具有一定的抗菌活性,相较之下 IA/AM 水凝胶边缘及表面布满大量菌株说明其没有明显的抗菌活性,如图6(b)所示,与空白对照组相比,负载抗菌药物 PHMG 的 IA/AM/TAAC@PHMG 水凝胶抗菌效果最好基本不长菌,由 Tab.1 可知,IA/AM/TAAC@PHMG 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抗菌率均在 99.9% 以上。其次是水凝胶骨架中带正电荷 TAAC 的 IA/AM/TAAC 水凝胶,这是由于 PHMG 分子中含有易被质子化并带上正电荷的胍基,能与带负电荷的细菌细胞膜依靠静电作用相互吸附结合,破坏细胞质膜和渗透平衡杀灭细菌且使细菌无法产生耐药性。而 TAAC 主链上同样含有带正电荷的季铵盐阳离子,可以与大部分的细菌结合来抑制伤口部位的细菌繁殖^[18],将 TAAC 引入水凝

胶骨架使其具有了一定的抗菌性能,PHMG 的加入相较于单纯 TAAC 水凝胶,抗菌性能显著提升。此外,各组水凝胶材料的抗菌作用持续时间均可达 26 h 以上,满足伤口愈合的抗感染要求。因此,水凝胶可以减少 PHMG 的突然释放和材料的细胞毒性,延长材料的抗菌时间,防止细菌感染引起的炎症,缩短伤口炎症持续时间,促进伤口更快地进入细胞增殖阶段。

2.7 水凝胶的生物相容性

由于生物医用材料直接与伤口表面接触,因此要求对新生的肉芽组织具有良好的生物相容性和无毒性,以便加速组织的再生。因此,优越的生物相容性是水凝胶敷料的关键。利用 CCK-8 测定法,使用 LO2 细胞对 IA/AM, IA/AM/TAAC 和 IA/AM/TAAC@PHMG 水凝胶的体外细胞毒性进行了评估。如图7(a)所示,IA/AM, IA/AM/TAAC 和 IA/AM/TAAC@PHMG 水凝胶均表现出良好的细胞相容性,在 320 $\mu\text{g/mL}$ 的高浓度下,LO2 细胞的相对存活率 > 75.08%,优于国标参考值 70%,具有极低的细胞毒性。溶血是指红细胞破裂,血红蛋白逸出称为

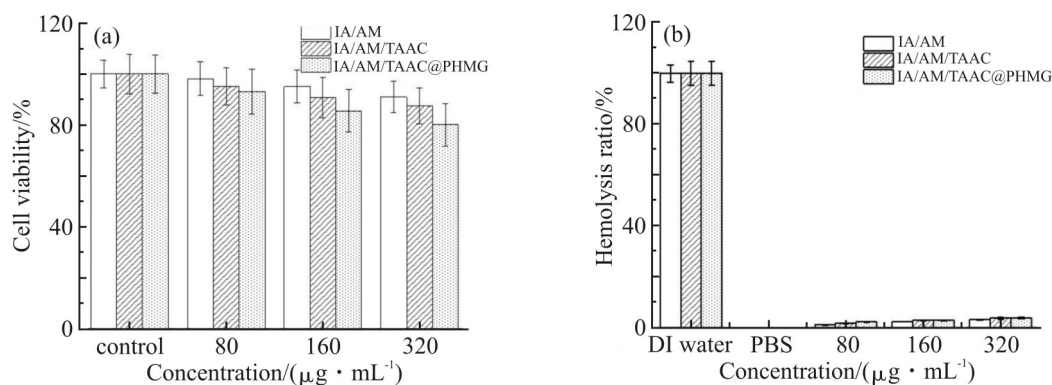


Fig. 7 (a) Cytotoxicity and (b) hemolysis test of hydrogel

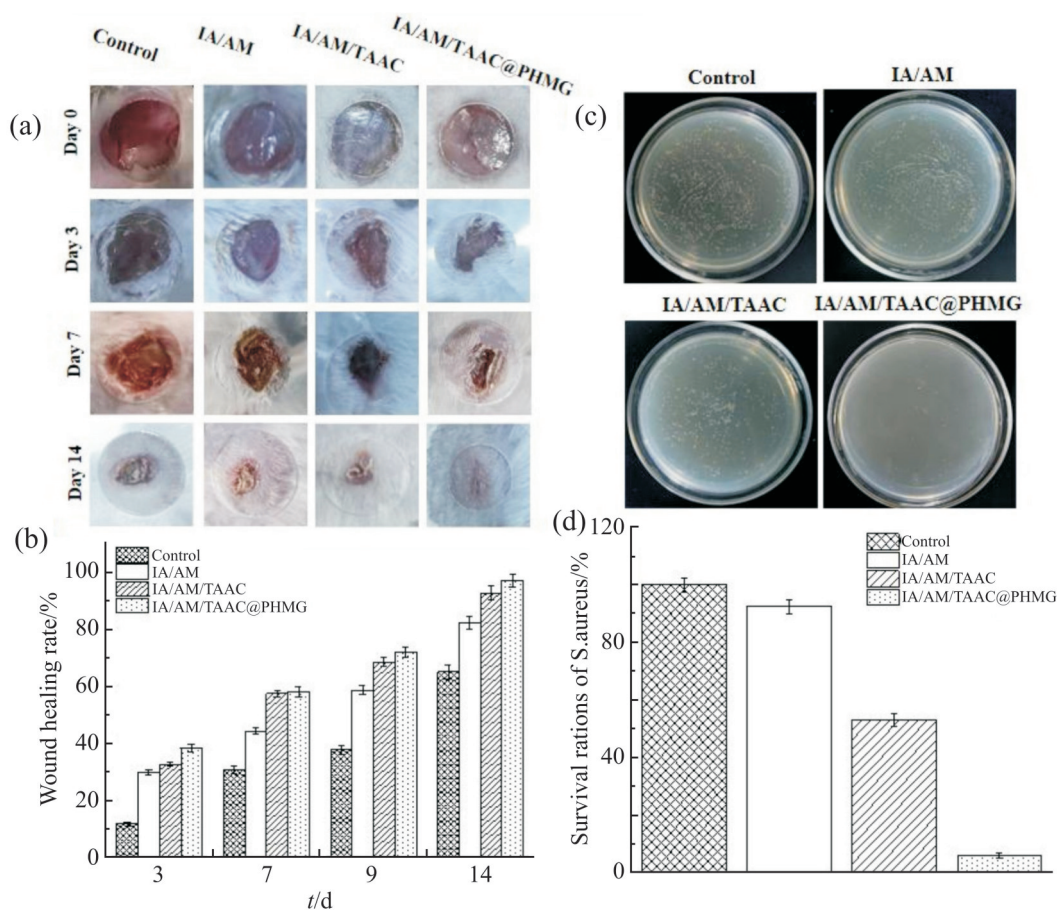


Fig. 8 (a) IA/AM, IA/AM/TAAC, IA/AM/ TAAC@PHMG photos of the wound after the treatment of the hydrogel samples; (b) wound healing rate; (c) CFU photos of *S. aureus* on the third day; (d) CFU count of surviving *S. aureus* on agar plate

红细胞溶解,是评判血液相容性的重要指标。人血浆的等渗溶液为0.9%NaCl溶液,当红细胞与水接触时,细胞内离子通过渗透压流出,显著增加了红细胞的肿胀应力,红细胞膨胀破裂导致血红蛋白逸出;而PBS溶液与红细胞混合时,红细胞内外的渗透压相等,不会发生溶血现象^[19]。因此,分别选择水和PBS

作为阳性对照组和阴性对照组,以红细胞溶血性试验对水凝胶材料的细胞毒性进一步表征,如图7(b)所示,阳性对照组100%溶血率,与之相比,所有水凝胶组皆表现出较低的溶血率,在320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下,溶血率仍低于4%,未发现溶血现象。上述实验结果表明,IA/AM, IA/AM/TAAC和IA/AM/

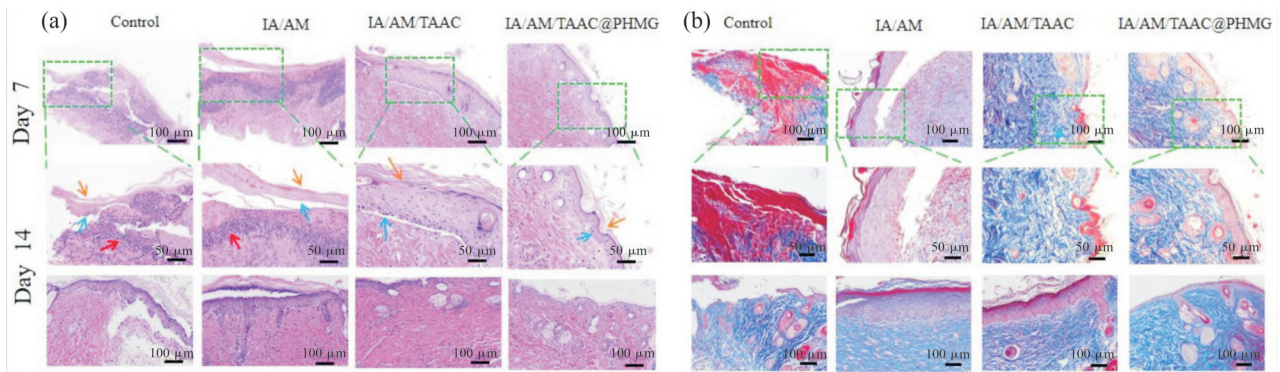


Fig. 9 (a) H&E histological analysis results of newborn skin tissue (with a black scale of 200 μm); (b) Masson trichrome staining micrograph of newborn skin tissue (with a black scale of 200 μm)

TAAC@PHMG水凝胶细胞毒性极低,具有良好的生物相容性,不会对伤口造成损伤,扩大了其在生物学中的应用范围。

2.8 小鼠体内愈合实验

为了验证复合水凝胶在体内促进创面愈合的作用,建立了感染金黄色葡萄球菌的小鼠体内伤口模型,对IA/AM,IA/AM/TAAC和IA/AM/TAAC@PHMG载药水凝胶的伤口愈合效果进行了研究。第0,3,7和14天的伤口愈合情况如图8(a)所示。在术后第7天,空白对照组因细菌感染和炎症的困扰形成了皮下脓肿延缓了创面组织的修复和重塑,导致第14天时伤口不完全愈合。相比之下,各个水凝胶治疗组的伤口面积均明显减小,感染和脓肿情况不明显且愈合程度更高。第14天后,IA/AM/TAAC@PHMG载药水凝胶治疗效果最好,治愈率高达98.81%,IA/AM/TAAC水凝胶治疗组伤口愈合效果仅次之,说明即使没有PHMG,IA/AM/TAAC水凝胶也具有一定的抗菌性能。为进一步证实复合水凝胶在体内的抗菌作用,进一步在伤口感染后第3天用棉签收集伤口渗出液进行细菌培养。如图8(c)所示,与对照组相比,IA/AM/TAAC组抗菌率为72.8%,IA/AM/TAAC@PHMG组为92.47%,再次证明IA/AM/TAAC@PHMG载药水凝胶具有优越的抗菌性能,能缩短伤口组织炎症期,使创面更快地进入细胞增殖期,实现抗菌清创加速创面愈合。

2.9 组织学分析

为了进一步表征伤口愈合过程,在第7天和第14天对各个治疗组的伤口组织进行取样,通过H&E染色对伤口处新长成的皮肤进行了形态学研究,通

过观察炎性细胞的浸润、血管和毛囊的生成、胶原沉积以及新生的上皮组织来反映伤口的愈合情况^[20]。如图9(a)所示,第7天后,空白对照组还有大量炎性细胞,水凝胶治疗组炎性细胞明显减少且均能发现上皮层,IA/AM/TAAC@PHMG水凝胶治疗组伤口完全闭合,新生血管和毛囊较为明显,相比之下,IA/AM/TAAC组的伤口并未完全闭合且表皮较厚,表明其仍处于再上皮化阶段组织丰度较低,血管和毛孔较少。第14天后,所有伤口组织均形成了表皮-真皮层,IA/AM/TAAC组相较IA/AM组再上皮化程度更高,IA/AM/TAAC@PHMG载药水凝胶组能观察到大量毛囊和血管,上皮层界面清晰可见,创面组织恢复的更为致密完整。H&E染色证明IA/AM/TAAC@PHMG载药水凝胶能够持续稳定释放PHMG,更有效地促进伤口愈合。人真皮成纤维细胞(HDFs)是皮肤组织的主要支撑,胶原主要分布于成纤维细胞中,因此,胶原蛋白的表达水平可以在一定程度上反映伤口组织的恢复程度^[21]。通过Masson染色以反映不同实验组伤口皮肤肉芽组织和胶原纤维的形成情况。如图9(b)所示,伤口组织中的蓝色部分代表胶原蛋白沉积层,各水凝胶组伤口组织中的胶原沉积均比对照组明显,IA/AM,IA/AM/TAAC和IA/AM/TAAC@PHMG水凝胶组的胶原堆积密度依次增加,其中,IA/AM/TAAC@PHMG载药水凝胶组最为紧密且有大量血管生成。推测是IA/AM/TAAC@PHMG水凝胶通过延缓PHMG的释放缩短伤口的炎症期,加速伤口进入细胞增殖期,促进内皮细胞增殖和血管生成,改善伤口部位的微环境,增加了纤维细胞数量和胶原沉积程度,更好地促进了创

面愈合和组织重塑。

3 结论

通过主链连接对pH敏感的IA,以带正电荷的季铵盐TAAC为侧链,阳离子抗菌药物PHMG通过与IA的一COOH静电吸附负载到水凝胶中,合成了pH敏感性抗菌水凝胶IA/AM/TAAC@PHMG,载药水凝胶在pH=3.2条件下的PHMG释放率(14.97%)低于pH8.2条件下的60.65%,证明水凝胶具有pH敏感性,能作为靶向pH响应性药物载体,持续稳定递送药物。IA/AM/TAAC@PHMG抗菌水凝胶对*E.coli*和*S.aureus*的抑菌率>99.98%,具有优越的抗菌活性,IA/AM/TAAC@PHMG能有效促进伤口愈合,愈合率达到了96.81%,当抗菌水凝胶应用于弱碱性环境的慢性感染性伤口时,水凝胶中TAAC与表面带负电的细菌结合,抑制伤口部位的细菌感染,pH敏感性水凝胶持续释放抗菌药物PHMG,进一步解决伤口深部组织细菌感染,避免了药物突释对细胞的毒副作用,由上所述,本文中载药水凝胶具有成为医用抗菌敷料的潜力。

参考文献:

- [1] 杨坤妮,潘远凤,蔡平雄,等.氧化还原/pH双响应性蔗渣纤维素基水凝胶的制备及药物缓释性能[J].高分子材料科学与工程,2021,37(10):145-152.
Yang K N, Pan Y F, Cai P X, *et al.* Preparation of redox/pH dual responsive bagasse cellulose based hydrogel and its drug release performance [J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2021, 37(10): 145-152.
- [2] Xu Y L, Chen H L, Fang Y F, *et al.* Hydrogel combined with phototherapy in wound healing[J]. Advanced Healthcare Materials, 2022, 11: 2200494.
- [3] Alqurashi Y, Elsharif M, Hend A, *et al.* Optical hydrogel detector for pH measurements[J]. Biosensors, 2022, 12: 40.
- [4] Avais M, Chattopadhyay S. Waterborne pH responsive hydrogels: synthesis, characterization and selective pH responsive behavior around physiological pH[J]. Polymer, 2019, 180: 121701.
- [5] Qu J, Zhao X, Ma P X, *et al.* Injectable antibacterial conductive hydrogels with dual response to an electric field and pH for localized "smart" drug release[J]. Acta Biomaterialia, 2018, 72: 55-69.
- [6] Li S, Renick P, Senkowsky J, *et al.* Diagnostics for wound infections[J]. Advances in Wound Care, 2021, 10: 317-327.
- [7] Xie X F, Lei H, Fan D D. Antibacterial hydrogel with pH-responsive microcarriers of slow-release VEGF for bacterial infected wounds repair[J]. Journal of Materials Science & Technology, 2023, 144: 198-212.
- [8] 杨连成.聚六亚甲基胍盐酸盐的合成及应用研究进展[J].化工管理,2019(19):104-106.
Yang L C. Research progress in the synthesis and application of polyhexamethylene guanidine hydrochloride [J]. Chemical Management, 2019(19): 104-106.
- [9] 汪煜强,张孜文,杨建军,等.基于聚六亚甲基胍盐酸盐的聚丙烯酰胺/琼脂双网络抗菌水凝胶[J].精细化工,2020,37(7):1393-1399.
Wang Y Q, Zhang Z W, Yang J J, *et al.* Polyacrylamide/agar dual network antibacterial hydrogel based on polyhexamethylene guanidine hydrochloride[J]. Fine Chemical Industry, 2020,37(7): 1393-1399.
- [10] Feng P P, Qiu H F, Luo Y, *et al.* Development of poloxamer hydrogels containing antibacterial guanidine-based polymers for healing of full-thickness skin wound[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2021, 7: 4557-4568.
- [11] Chen J L, Mu Z X, Chen D F, *et al.* H₂S-releasing versatile hydrogel dressing with potent antimicrobial, anti-inflammatory, epithelialization and angiogenic capabilities for diabetic wound healing[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 469: 143985.
- [12] 邓利文.具有良好负载药物的高强水凝胶及其促感染伤口愈合研究[D].杭州:浙江大学,2022.
Deng L W. A tough hydrogel with excellent post-loading of drugs for promoting the healing of infected wounds[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2022.
- [13] Santhamoorthy M, Thirupathi K, Kumar S S D, *et al.* k-Carrageenan based magnetic@ polyelectrolyte complex composite hydrogel for pH and temperature-responsive curcumin delivery[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 244: 125467.
- [14] Wang Y, Yang M, Zhao Z. Facile fabrication of self-healing, injectable and antimicrobial cationic guar gum hydrogel dressings driven by hydrogen bonds[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 310: 120723.
- [15] 杨亮亮.多功能水凝胶基敷料的制备及其在组织损伤修复中的应用研究[D].长春:吉林大学,2023.

- Yang L L. Preparation of multifunctional hydrogel-based wound dressings and their application in tissue repair[D]. Changchun: Jilin University, 2023.
- [16] Xie D, Hu C, Jiang C, *et al.* Incorporating copper-based nanosheets into an injectable self-healing hydrogel enables superb repair of infected diabetic wound[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 476: 146788.
- [17] Tu C, Lu H, Zhou T, *et al.* Promoting the healing of infected diabetic wound by an anti bacterial and nano-enzyme-containing hydrogel with inflammation-suppressing, ROS-scavenging, oxygen and nitric oxide-generating properties[J]. *Biomaterials*, 2022,286: 121597.
- [18] Gan D, Xu T, Xing W, *et al.* Mussel-inspired contact-active antibacterial hydrogel with high cell affinity, toughness, and recoverability[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29: 1805964.
- [19] Wu C, Long L Y, Zhang Y X, *et al.* Injectable conductive and angiogenic hydrogels for chronic diabetic wound treatment[J]. *Journal of Controlled Release*, 2022, 344: 249-260.
- [20] Su J, Li J, Liang J, *et al.* Hydrogel preparation methods and biomaterials for wound dressing[J]. *Life*, 2021, 11: 1016.
- [21] Masri S, Fauzi M B. Current insight of printability quality improvement strategies in natural-based bioinks for skin regeneration and wound healing[J]. *Polymers*, 2021, 13: 1011.

Preparation and Healing Promoting Properties of pH Responsive Antibacterial Hydrogel Wound Dressing

Zuxiu Yin^{1,2}, Tingting Huang¹, Jianying Wang², Yonghao Qi¹, Yingying Xie^{1,2}

Guang Wang¹, Huiru Liu¹, Juan Wang¹

(1. *Technology Innovation Center of Hebei for Fiber Material, Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, China*; 2. *School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China*)

ABSTRACT: Bacterial infections can cause wound inflammation, make wound healing difficult, and there is an urgent need to develop intelligent hydrogel dressings that are highly effective in their antibacterial, anti-inflammatory properties, and can promote re-epithelialization and angiogenesis. The pH sensitive antibacterial hydrogel IA/AM/TAAC@PHMG was prepared by one pot method using itaconic acid (IA), acrylamide (AM) and allyl trimethylammonium chloride (TAAC) as raw materials for covalent cross-linking, loaded with the antibacterial drug polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG). The mechanical properties, swelling properties, drug release properties, antimicrobial properties, biocompatibility, and pro-infectious wound healing properties were tested. The results show that TAAC increases the flexibility of hydrogels and the breaking elongation of hydrogels is increased by 88%; the hydrogels are pH-responsive, can respond positively to wound, pH, control and prolong the release of PHMG, the release rate of PHMG under alkaline conditions (pH 8.2) (60.65%) is better than 14.97% under acidic conditions (pH 3.2); the antibacterial rate of IA/AM/TAAC@PHMG against *E. coli* and *S. aureus* is over 99.98%; the cell relative survival rate in the hydrogel group (320 $\mu\text{g/mL}$) is above 75.08%, the cell hemolysis rate is below 4%, the antibacterial hydrogel has a good biocompatibility; histological analysis prove that the IA/AM/TAAC@PHMG loaded hydrogel can create an environment conducive to granulation growth and excellent antibacterial properties, to reduce the inflammatory factors, promote both collagen and skin regeneration, accelerate wound healing.

Keywords: hydrogel; pH sensitivity; drug release; guanidine hydrochloride; antibacterial properties