第41卷第2期 高分子材料科学与工程 Vol.41, No.2
2025年2月 POLYMER MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING Feb. 2025

http://pmse.scu.edu.cn

基于表面化学修饰构建高效抗菌功能化的胶原基角膜修复材料

刘慧玉[1,2], 任 天[3], 刘 杨[1,2,3]

(1.常州大学 医学与健康工程学院,江苏 常州 213164;2. 常州大学 药学院生物与食品工程学院,江苏 常州 213164;
3. 常州大学 生物医学工程与健康科学研究院,江苏 常州 213164)

摘要:胶原蛋白因其具有良好的理化性能、卓越的生物相容性、低免疫原性等优点而被用于构建角膜修复材料。但其在应用过程中易产生细菌感染的问题,限制了其在临床上的应用。针对这一问题,文中提出了一种新型的合成抗菌胶原基薄膜用于角膜修复,该材料以I型胶原蛋白为原料,利用1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 为交联剂,有效地将氨基糖苷类抗生素庆大霉素分子接枝到胶原膜表面。利用红外光谱和扫描电镜对庆大霉素/胶原基薄膜的结构进行了表征,同时对庆大霉素/胶原基薄膜(GM/Col)上的庆大霉素的药物负载量进行了研究,并且通过金黄色葡萄球菌和大肠杆菌对该改性膜的抗菌性能进行了评价。结果表明,GM/Col膜上负载庆大霉素的质量约占其总质量的2.33%±0.54%。庆大霉素的成功接枝显著提高了胶原膜的抗菌性能。此外,庆大霉素/胶原基薄膜具有良好的理化性质和卓越的生物相容性。因此,这种新型GM/Col膜在角膜组织工程中具有潜在的应用前景。

关键词:胶原蛋白;细菌;薄膜;生物相容性;组织工程

中图分类号:R318.08 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7555(2025)02-0134-10

角膜疾病是引起致盲的主要原因之一[1]。目前,角膜移植是治疗角膜缺损最有效的方法[2]。但是,同种异体角膜组织的严重缺乏限制了其在临床上的应用[3]。为了解决角膜供体短缺的问题,国内外研究人员致力于利用天然生物材料开发角膜修复材料[4~6]。良好的生物相容性、高透明度[7]和合适的力学性能[8]是角膜修复材料维持正常生理功能的必要条件。在这些天然聚合物中,胶原蛋白作为结缔组织的主要承重成分[9, 10],具有良好的理化性能和卓越的生物相容性[11]。因此,胶原蛋白被广泛的用作构建角膜修复材料的原材料[12, 13]。

虽然胶原基支架在替代受损角膜组织方面具有许多优势,但在应用过程中易产生细菌感染的问题[14, 15]。针对这个问题,目前在临床上主要有2种解决方法。一是通过频繁滴加药物来预防或治疗,但是这种传统的方法很难控制药物的使用量和治疗效果。频繁加药不仅十分低效,而且还会造成药物的极大浪费。二是通过对组织修复材料负载抗菌药物从而实现药物缓释治疗[16~18]。目前,较为常见的药物负载方式主要有物理吸附(或包裹)和改性两大类。遗憾的是,物理载药往往会对角膜修复材料的透光性能造成较大的影响[19]。角膜与人体其他组织不同,是一种均匀的透明薄层组织,良好的光学性能对角膜发挥正常生理功能至关重要[20]。因此,上述物理吸附载药在应用于角膜修复材料时存在一定的局限性。

鉴于此,本文在不改变胶原基材料良好的理化性能和卓越的生物相容性能的基础上,以I型胶原蛋白为原料,利用1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 作为交联剂,

doi: 10.16865/j.cnki.1000-7555.2025.0010
收稿日期:2024-01-15
基金项目:国家自然科学基金资助项目(81900814)
通讯联系人:刘杨,主要从事生物医用材料研究,E-mail: liuyang@cczu.edu.cn

有效地将氨基糖苷类抗生素庆大霉素分子接枝到胶原膜表面,从而为提升胶原基角膜修复材料的抗菌性能提供了一种有效可行的方法。其中,庆大霉素是一种抑制细菌蛋白合成的广谱抗生素,对大多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有有效的抗菌作用。结果表明,庆大霉素成功接枝至胶原基薄膜表面,负载量约为2.33%±0.54%。同时,经庆大霉素改性后的薄膜仍然保持了其良好的理化性能和卓越的生物相容性能。因此,这种具有抗菌功能的胶原基材料在角膜修复领域展现出良好的应用潜力。

1　实验部分

1.1　主要原料

庆大霉素(GM):阿拉丁(上海);I型胶原:从牛肌腱中提取(广州HM生物技术有限公司);乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS):GL生物化学有限公司(上海);磷酸盐缓冲盐水(PBS):由片剂形式(德国钙生物化学公司)制备;去离子水:从水净化系统(法国)Millipore S.A.S. 获得;冰醋酸:上海申博化工有限公司。细胞培养中使用的所有试剂均来自Sigma化学公司(美国)。

1.2　实验过程

首先,将胶原海绵溶解在100 mol/L的醋酸溶液中,形成浓度为7.5 g/L的胶原蛋白溶液。将庆大霉素粉末溶于去离子水中形成浓度为2 g/L的庆大霉素溶液。其次,将EDC和NHS加入胶原蛋白溶液中,形成EDC、NHS和胶原海绵按照质量比1:1:6组合,进行为期6 h的充分交联。将一定体积的胶原蛋白溶液转移至与天然角膜形状相似的半球形塑料模具中,在20 ℃和45%的恒温湿度下自然风干形成胶原膜(Col)。最后,将交联剂EDC和催化剂NHS加入至庆大霉素溶液中,形成EDC,NHS和Col质量比1:1:6的组合,并且将Col薄膜转移至庆大霉素溶液中进行为期6 h的充分交联,用去离子水冲洗3次。在20 ℃和45%的恒温湿度下自然风干形成庆大霉素/胶原基薄膜(GM/Col)。Fig.1为Col膜经化学修饰为GM/Col膜的化学反应路线。

1.3　测试与表征

1.3.1　化学结构表征:利用傅里叶变换红外衰减全

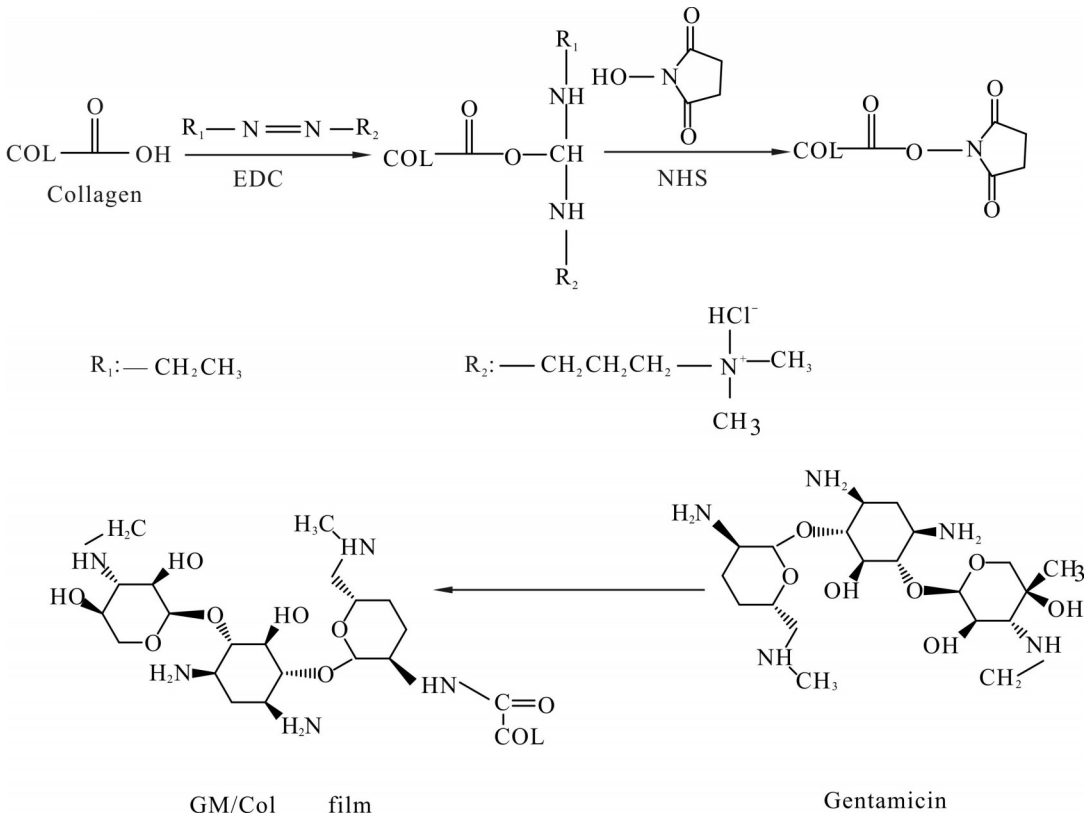

Fig. 1 Chemical reaction mechanism between collagen and gentamicin

反射红外光谱仪(iS50，美国Thermo-Nicolet Co)对Col和GM/Col膜的官能团信息进行分析。首先，将薄膜剪切成尺寸为2 cm×2 cm的方形样品。然后，将样品固定在ATR模块上。去除背景后，在500~4000 cm^{-1}的波数范围内获得薄膜的FTIR-ATR谱。分辨率为2 cm^{-1}，扫描次数为3次。

1.3.2 形貌表征：使用放大倍数为200×的扫描电子显微镜(SUPRA 55，德国Zeiss)观察和拍摄Col和GM/Col膜的微观形态。将薄膜剪切成合适的尺寸放置在载玻片上。然后，将样品用真空镀金1 min，通过SEM观察Col和GM/Col膜的表面形态，每种取5个样品进行平行实验。

1.3.3 吸水性能测试：采用磷酸盐缓冲溶液(PBS，pH=7.4)对Col和GM/Col膜的含水量进行测试。首先，测量膜的初始质量(m_0)。然后，将薄膜置于PBS溶液中吸水至饱和，再用填充纸轻轻擦拭膜表面以去除膜表面的水分，立即测量膜的质量(m_t)，每种取5个样品进行平行实验。薄膜的饱和吸水率记为W_s，通过式(1)计算

$$W_s = (m_t - m_0)/ m_t \tag{1}$$

1.3.4 透光率测试：将Col和GM/Col膜置于PBS溶液中吸水至饱和后，使用紫外-可见分光光度计(上海UNICO)测量材料在400~800 nm的可见光范围内的透光率。每种取5个样品进行平行实验。

1.3.5 体外降解试验：Col和GM/Col膜的体外降解性能利用PBS溶液(pH=7.4)进行分析。将膜置于37 ℃的PBS缓冲液(pH=7.4)中，浸泡至溶胀平衡后称量，记为M_s。然后，将吸水饱和的胶原基薄膜继续浸泡在PBS溶液中42 d。最后，在预定时间(1 d，3 d，7 d，11 d，16 d，21 d，28 d，35 d和42 d)将样品从PBS溶液中取出，用填充纸轻轻擦拭膜表面以除去水分，并称量为M_t，每种取5个样品进行平行实验。体外降解率记为M_v，通过式(2)来计算

$$M_v = (M_s - M_t)/ M_s \tag{2}$$

1.3.6 力学性能测试：将薄膜裁剪成长2.0 cm、宽1.0 cm的长条状并浸泡在PBS溶液中6 h。在35 ℃，用生物材料力学性能试验机(ELF3200，美国Bose)检测样品的力学性能。测试速度为0.5 mm/s，每种取5个样品进行平行实验。

1.3.7 药物负载量测定：利用UV3802紫外-可见分光光度计测定加入庆大霉素的药物总含量和交联反应后剩余药物的含量。庆大霉素在Col膜上的药物负载量通过加入药物总含量(T_0)与交联反应后剩余药物的含量之差来测定。交联后剩余的药物包括反应后溶液中的药物含量(T_s)和冲洗GM/Col膜的去离子水中的药物含量(T_t)之和，每种取5个样品进行平行实验。药物负载量记为T_v，通过式(3)来计算

$$T_v = T_0 - (T_s + T_t) \tag{3}$$

1.3.8 缓释性能分析：利用UV3802紫外-可见分光光度计评估GM/Col膜在PBS溶液中的药物释放。首先，将100 mg的GM/Col膜浸泡在15 mL的PBS (pH=7.4) 溶液中，放置在37 ℃的培养箱中进行药物缓释。然后，按规定的时间间隔(分别为1 h，2 h，5 h，8 h，13 h，15 h，25 h，50 h，80 h，110 h，140 h和170 h)收集3 mL PBS上清液。最后，利用UV3802紫外-可见分光光度计测量庆大霉素溶液的浓度，每种取5个样品进行平行实验。

1.3.9 抗菌性能分析：本文选择金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌对Col和GM/Col膜的抗菌性能进行评价。首先，将50 μL浓度为(3~8)×10^8 cfu/mL的细菌溶液加入到含有Col和GM/Col膜的48孔板(英国康宁)中。然后，在37 ℃，将这些培养皿轻轻旋转24 h。将细菌悬液稀释后，每个样品取10 μL悬液分散在琼脂板上涂布均匀。最后，将带有菌落的琼脂板放在37 ℃的细菌培养箱中孵育24 h，测定总CFU，每种取5个样品进行平行实验。

1.3.10 细胞毒性和组织切片试验：采用甲基噻唑四唑法(MTT)来分析Col和GM/Col膜对角膜上皮细胞(HCECs)产生的细胞毒性。首先，将薄膜剪切成合适的尺寸放入96孔板中。然后，薄膜经75%乙醇浸泡和紫外线照射1 h后，用无菌PBS置换洗涤3次。灭菌后，将细胞以每平方厘米2500个的密度接种于薄膜表面。孵育1 d，3 d，5 d和7 d后，每个小孔中加入100 μL的二甲亚砜，在低速台上避光10 min，测定波长为490 nm处的吸光度值，每种取10个样品进行平行实验。其次，采用苏木精-伊红(HE)染色法观察角膜上皮细胞与GM/Col膜表面的黏附情况。将细胞接种到GM/Col膜上生长7 d后，在室温用7%的多聚甲醛将细胞固定在薄膜上1 h，用乙醇逐步脱水，石蜡包埋。最后，将包埋样品切成6~8 μm的切片并且

进行染色。将获得的石蜡切片染色后,用直立光学显微镜(NISElents-F,日本)观察角膜上皮细胞在GM/Col膜表面的黏附情况。

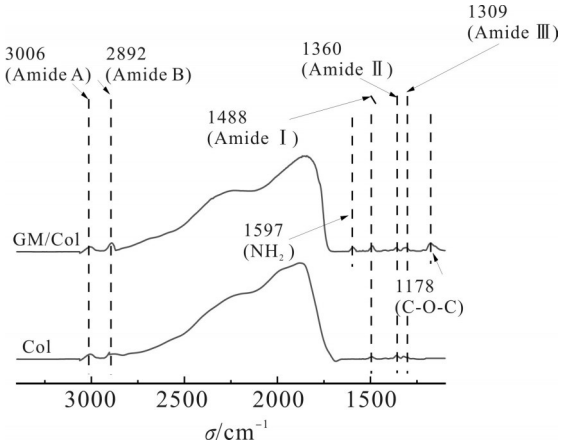

Fig. 2 ATR-FTIR spectra of the Col and GM/Col film

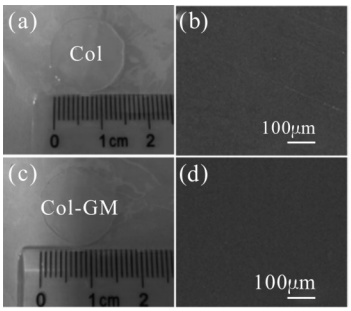

Fig. 3 Morphology of the Col and GM/Col film: digital photographs of the wet Col and GM/Col film are shown in (a) and (c); SEM images of the Col and GM/Col film are shown in (b) and (d)

2 结果与讨论

2.1 Col和GM/Col膜的化学组成

Col和GM/Col膜的结构表征如Fig.2所示。在3020 cm^{-1}处观察到的酰胺A,对应于N—H的拉伸。在2892 cm^{-1}处观察到酰胺B对应于不对称伸缩振动峰。在1488 cm^{-1}处观察到的酰胺I,对应于C═O的拉伸。在1360 cm^{-1}处观察到的酰胺II,对应于C—N的拉伸。在1309 cm^{-1}处观察到的酰胺III,对应于N—H拉伸。这些条带归因于胶原蛋白结构中的酰胺基团。此外,在GM/Col膜中还检测到与庆大霉素相关的主要特征条带,例如在1178 cm^{-1}处的C—O—C峰和1597 cm^{-1}处的氨基峰。结果表明,庆大霉素被成功地接枝到胶原基薄膜的表面。

2.2 Col和GM/Col膜的微观形貌

Col和GM/Col膜的表面形貌如Fig.3所示。其中,Fig.3(a)和Fig.3 (c)表明,这2种胶原基薄膜的表面均是透明和光滑的。Fig.3(b)和Fig.3 (d)分别为Col和GM/Col膜的扫描电镜照片。可以发现,Col和GM/Col膜表面均光滑,且没有任何相分离。此外,大量的胶原纤维平行排列在膜的表面,说明Col和GM/Col膜仍然保持了良好的物理结构和完整性。因此,庆大霉素分子对胶原基薄膜表面的化学修饰没有显著改变其微观结构。

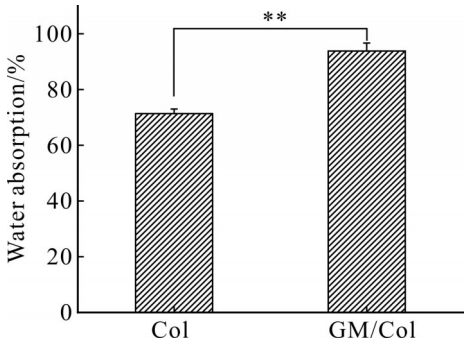

Fig. 4 Water absorption of the Col and GM/Col film.: $p < 0.05$**

2.3 Col和GM/Col膜的吸水性能

良好的吸水性能对于眼表组织能够维持一个较为稳定的湿润状态至关重要,并且能够促进细胞所需营养物质的代谢和代谢产物的扩散,从而为细胞在薄膜表面的生长和黏附提供良好的环境。如Fig.4所示,在PBS中浸泡24 h后,2种薄膜的饱和吸水率趋于稳定。Col和GM/Col膜的饱和吸水率分别约为70%和90%。与Col薄膜相比,GM/Col膜的饱和吸水率得到提高。这归因于庆大霉素分子中存在大量的羧基、氨基等亲水基团,其引入提升了GM/Col膜的吸水性能,从而为角膜上皮细胞提供一个合适的生存环境。

2.4 Col和GM/Col膜的透光性能

角膜组织是眼表无血管的透明组织,较好的透光率是角膜修复材料的关键指标之一。为了满足修复后视力的需要,角膜修复材料应在可见光范围内具有较高的光学特性。Col与GM/Col膜在400~800 nm波长范围内的透光率如Fig.5(a)所示。样品的厚度约为(130±10) μm。随着波长的增加,薄膜的透光率随之增加,但两者无明显差异。随着波长的增加,GM/Col膜的可见光透过率超过90%。Col与GM/Col膜在7 d内的平均透光率如Fig.5(b)所示。随着时间的延长,Col与GM/Col膜的平均透光率没有明

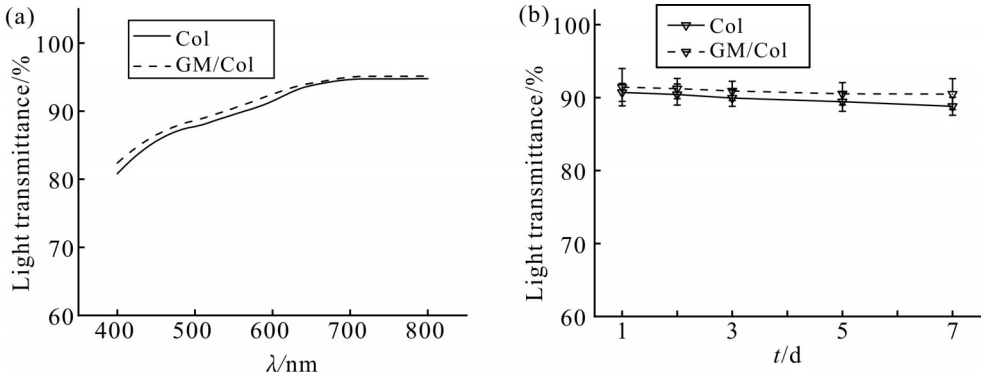

Fig. 5 (a) Light transmission of the Col and GM/Col film over the wavelength range of 400~800 nm; (b) average light transmission of the Col and GM/Col film in one week

显的下降。在第7天的时候，GM/Col膜的平均透光率为90.48%±2.12%，超过90%。结果表明，GM/Col膜具有良好的光学性能，庆大霉素被接枝到胶原基薄膜上对其光学性能没有明显的影响。

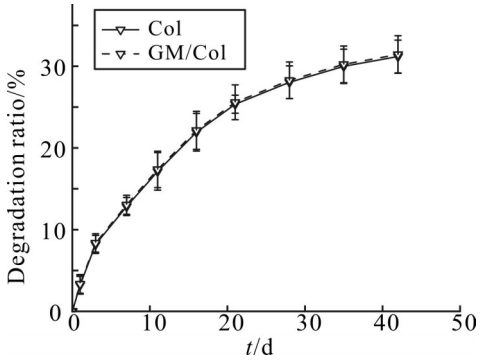

Fig. 6 In vitro degradation rate of the Col and GM/Col membrane in PBS

2.5 Col和GM/Col膜的体外降解性能

合适的降解特性对于Col和GM/Col膜维持正常的角膜形状是非常重要的。Fig.6所示为Col和GM/Col膜的体外降解情况。随着时间的延长，样品的降解率随之增加，并无明显差异。在第42天时，Col和GM/Col膜的降解率分别为31.19%±2.00%和31.44%±2.29%。结果表明，这2种薄膜在PBS中具有类似且合适的降解性能。

2.6 Col和GM/Col膜的力学性能

众所周知，当角膜组织的力学性能下降时，眼内的扩张压力就无法得到平衡，从而导致眼内组织变形。因此，用于角膜再生的生物材料具备良好的力学性能至关重要。Fig.5(a~c)分别为Col和Col-GM薄膜的拉伸强度，断裂伸长率和弹性模量。其中，Col和GM/Col膜的拉伸强度分别为（8.82±1.45）MPa和10.4±1.24 MPa，而2种材料的断裂伸长率分别为50.55%±2.56%和47.54%±3.46%。Col和GM/Col膜对应的弹性模量分别为（17.49±3.48）MPa和（22.63±3.58）MPa。相比于Col薄膜，GM/Col膜的拉伸强度和弹性模量略提升，这是由于庆大霉素分子的引入增强了分子之间的相互作用，增加了分子运动的空间效应，增加了分子链运动所需的能量，从而提高了薄膜的拉伸强度和弹性模量。

2.7 GM/Col膜中庆大霉素的负载量与缓释过程

角膜移植术后的7 d内易发生细菌感染，从而导致角膜移植失败。因此，如何提升角膜修复材料的抗菌性能显得至关重要。本文对庆大霉素在Col膜上的负载量进行了测定，结果表明，GM/Col膜上负载庆大霉素的质量约占其总质量的2.33%±0.54%。

GM/Col膜表面层交联分子发生水解的过程如Fig.8所示。GM/Col膜表面在磷酸盐缓冲溶液的浸泡和不断冲刷的作用下，部分吸附在胶原基材料表面以及以氢键的方式与胶原膜结合的庆大霉素分子快速释放出来。随后，伴随着GM/Col膜的缓慢降解，材料表面悬挂的庆大霉素分子与胶原分子之间的酰胺键逐渐断裂，负载的庆大霉素分子也随之从GM/Col膜表面缓慢释放出来。薄膜内的庆大霉素药物释放如Fig.9所示呈指数趋势，大致上可以划分为2个阶段：第1阶段为突释阶段，发生在前8 h内，GM/Col膜中释放出来的庆大霉素的药量约占总药物的40%。随后，随着GM/Col膜的缓慢降解，膜表面的庆大霉素分子呈现一个缓慢释放的过程。此外，GM/Col膜浸泡7 d后，总释放量超过96%。结果表明，GM/Col膜内的庆大霉素的药物释放可持续7

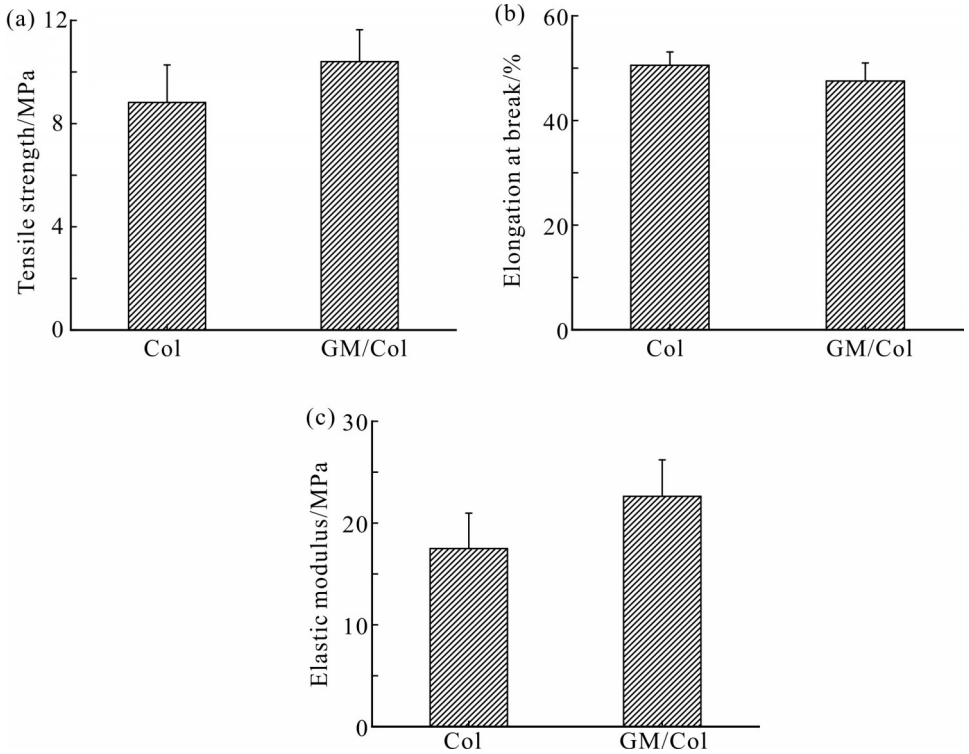

Fig. 7 Mechanical properties of the Col and GM/Col film: (a) tensile strength; (b) elongation at break; (c) elastic modulus

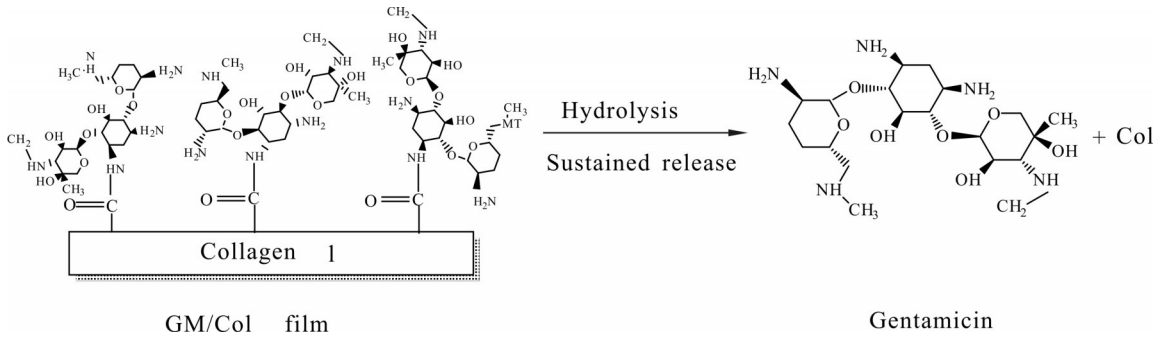

Fig. 8 Mechanism of gentamicin molecular sustained release process from the GM/Col film

d以上,GM/Col膜的药物释放基本满足术后需要频繁点药的周期要求。

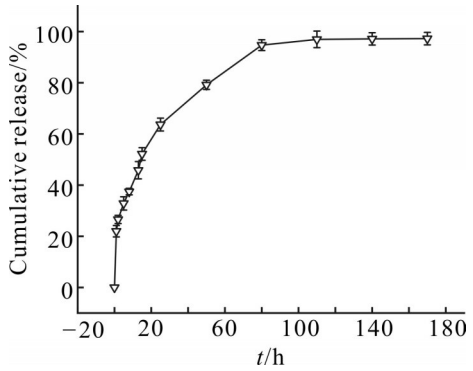

Fig. 9 Cumulative release of gentamicin from the GM/Col film during the first week

2.8 GM/Col膜的抗菌性能

手术中或手术后的细菌感染非常普遍,对于角膜修复材料而言降低术中或术后的细菌感染的风险至关重要。本文利用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌这2种代表性菌株,研究了Col和GM/Col膜在7 d内的抗菌效果,如Fig.10和Fig.11所示。在Col膜样品的琼脂板上存在大量的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌(Fig.10(a~h)和Fig.11(a~h)),表明Col薄膜没有明显的抗菌作用。其次GM/Col膜对应的琼脂板中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的数量远低于Col膜组。这是由于庆大霉素被成功接枝到Col膜表面,提高了其抗菌性能。此外,与Fig.10(a~h)和Fig.11(a~h)中不同

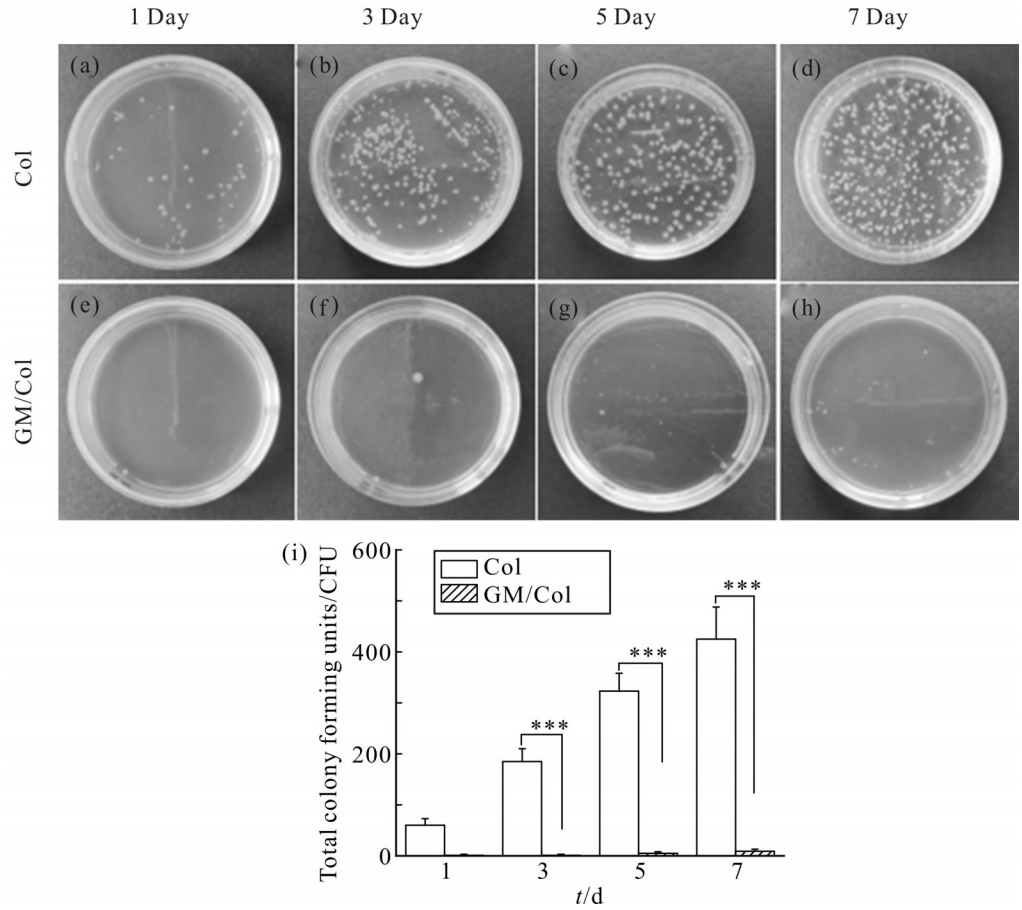

Fig. 10 Following the cultivation of Escherichia coli using the Col and GM/Col samples, pictures of the agar culture dish were taken (a~h), and a quantitative evaluation of the number of surviving colonies was performed (i). ***: $p < 0.01$

时间点细菌在琼脂板上生长的照片相对应，Fig.10(i)和Fig.11(i)分别为Col膜和GM/Col膜2种材料针对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌实验的定量结果。Col膜对于大肠杆菌没有抗菌效果，大量的大肠杆菌在其对应的琼脂板上生长。第1，3，5，7天的研究结果均表明，在GM/Col膜浸泡过的菌液在琼脂板上形成的菌落数量远低于Col膜样品。相对于对照组Col膜，GM/Col膜几乎可以杀死与之共培养的全部细菌。与药物缓释研究结合起来，结果表明，GM/Col膜中的药物缓释时间超过7 d，且在7 d内具有较好的抗大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的效果。

2.9 Col和GM/Col膜的细胞毒性和组织切片

除了具有良好的理化性能外，卓越的生物相容性对于角膜修复材料在角膜组织工程中的应用也至关重要。Fig.12(a)为Col和GM/Col膜对角膜上皮细胞 (HCECs) 所产生的细胞毒性的定量结果。随着时间的延长，2种胶原基薄膜所对应的吸光度值均有所升高。此外，与Col膜相比，GM/Col膜随对应的吸光度值略微升高，说明该薄膜具有优异的生物相容性。这归因于庆大霉素分子使薄膜能够通过化学键或氢键与蛋白质连接。因此，GM/Col膜的表面更有利于细胞黏附蛋白的结合和随后细胞的黏附，从而加速了细胞的增殖过程。GM/Col膜与细胞的黏附程度如Fig.12(b)所示：细胞核呈蓝紫色，而细胞基质和细胞外基质是粉红色的。此外，经过脱水和石蜡固定等一系列的物理操作后，细胞和材料之间没有明显的相分离。结果表明，角膜上皮细胞 (HCECs) 能在GM/Col膜表面黏附和生长。

3 结论

本文通过在具有层状仿生结构和光学透明的胶原基角膜修复材料中引入眼科手术中的常用的抗菌剂氨基糖苷类小分子庆大霉素，采用化学方法对材料表面进行药物负载构建从角膜移植术后到伤口

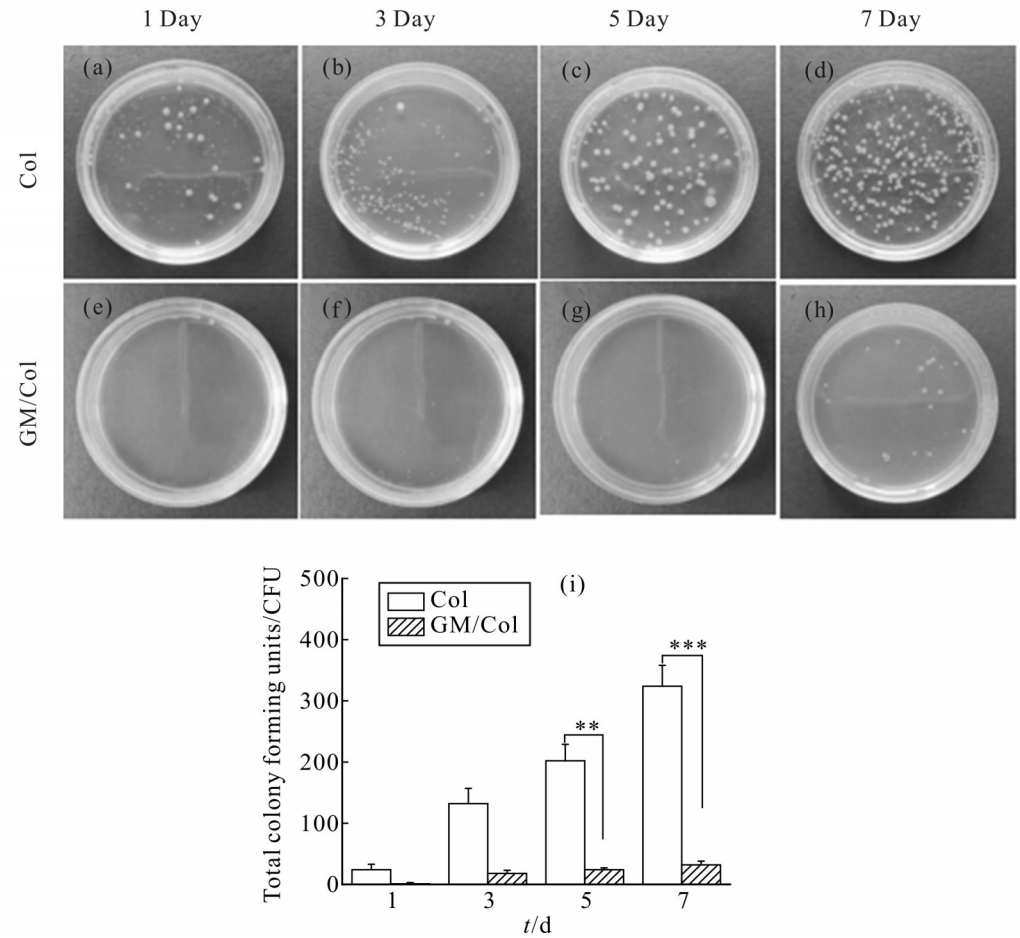

Fig. 11 Following the cultivation of Staphylococcus aureus using the Col and GM/Col samples, pictures of the agar culture dish were taken (a~h), and a quantitative evaluation of the number of surviving colonies was performed (i).: $p < 0.05$; ***: $p < 0.01$**

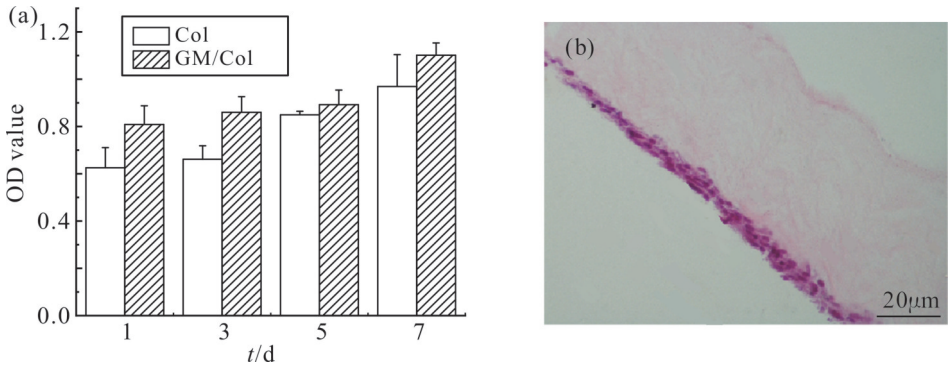

Fig. 12 (a) MTT quantitative analysis to identify the human corneal epithelial cells growth on the Col and GM/Col film; (b) H&E staining section of HCECs constructs grown on the GM/Col film

愈合期间内具有抗菌效果的角膜修复材料,从而有效降低或抑制角膜移植中发生细菌感染的风险。研究结果显示,庆大霉素分子成功地接枝至胶原基薄膜材料的表面,负载庆大霉素的量约占其总质量的2.33%±0.54%。此外,经过庆大霉素的药物负载,胶原基薄膜仍然保持了90%以上的透光性能,同时满足角膜组织所需的环境和力学性能要求。庆大霉素的成功接枝改善了胶原基薄膜表面的细胞黏附和细胞外基质沉积,显著提高了其生物相容性。综上所述,庆大霉素对胶原膜的化学修饰使得胶原基薄膜的抗菌性能得到了明显的提升,并在角膜修复领域具有良好的应用前景。在本文的基础上,将来可以

进一步优化薄膜材料表面的载药方法，为胶原基载药材料的个性化制备和可控释放提供研究思路。

参考文献：

[1] Mohan R R, Kempuraj D, D'souza S, *et al*. Corneal stromal repair and regeneration[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 2022, 91: 101090.

[2] Scorcia V, Giannaccare G, Pellegrini M, *et al*. Stromal peeling for deep anterior lamellar keratoplasty in a post- penetrating keratoplasty eye with hematocornea[J]. American Journal of Ophthalmology Case Reports, 2023, 29: 101808.

[3] Mishra S K, Joshi A, Ginu P M, *et al*. Corneal transplantation: a walk to vision[J]. Medical Journal, Armed Forces India, 2023, 79: 645-650.

[4] Foroushani Z H, Mahdavi S S, Abdekhodaie M J, *et al*. A hybrid scaffold of gelatin glycosaminoglycan matrix and fibrin as a carrier of human corneal fibroblast cells[J]. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2021, 118: 111430.

[5] Li M, Wei R, Liu C, *et al*. A T.E.S.T. hydrogel bioadhesive assisted by corneal cross- linking for in situ sutureless corneal repair[J]. Bioactive Materials, 2023, 25: 333-346.

[6] Dong Q, Wu D, Li M, *et al*. Polysaccharides, as biological macromolecule- based scaffolding biomaterials in cornea tissue engineering: a review[J]. Tissue & Cell, 2022, 76: 101782.

[7] Qazi Y, Wong G, Monson B, *et al*. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction[J]. Brain Research Bulletin, 2010, 81: 198-210.

[8] Tsai M C, Daniels J T. The impact of biomechanics on corneal endothelium tissue engineering[J]. Experimental Eye Research, 2021, 209: 108690.

[9] Jen P H S, Wu C H. Echo duration selectivity of the bat varies with pulse- echo amplitude difference[J]. Neuroreport, 2008, 19: 373-377.

[10] 张敏, 郭晨晨, 王瑜, 等. 金红石型纳米二氧化钛/聚二甲基硅氧烷复合改性制备多功能胶原海绵[J]. 高分子材料科学与工程, 2023, 39(2): 26-35.
Zhang M, Guo C C, Wang Y, *et al*. Preparation of multifunctional collagen sponge by composite modification of rutile- type titanium dioxide/polydimethylsiloxane[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2023, 39(2): 26-35.

[11] Redmond J, Mccarthy H, Buchanan P, *et al*. Advances in biofabrication techniques for collagen- based 3D in vitro culture models for breast cancer research[J]. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2021, 122: 111944.

[12] Vijayan V, Kiran M S. Hybrid nanostructured gadolinium oxide-collagen- dextran polymeric hydrogel for corneal repair and regeneration[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 224: 1423-1438.

[13] Liu J, Xu Y, Huang Y, *et al*. Collagen membrane loaded with doxycycline through hydroxypropyl chitosan microspheres for the early reconstruction of alkali- burned cornea[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 244: 125188.

[14] Zhang Q, Tang Q, Yang Y, *et al*. Wound dressing gel with resisted bacterial penetration and enhanced re- epithelization for corneal epithelial- stromal regeneration[J]. Applied Materials Today, 2021, 24: 101119.

[15] Saleem W, Benton A H, Marquart M E, *et al*. Innovative cold atmospheric plasma (iCAP) decreases mucopurulent corneal ulcer formation and edema and reduces bacterial load in pseudomonas keratitis[J]. Clinical Plasma Medicine, 2019, 16: 100093.

[16] Yang X, Sun X, Liu J, *et al*. Photo- crosslinked GelMA/collagen membrane loaded with lysozyme as an antibacterial corneal implant[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 191: 1006-1016.

[17] Hsueh Y H, Cheng C Y, Chien H W, *et al*. Synergistic effects of collagen and silver on the deposition characteristics, antibacterial ability, and cytocompatibility of a collagen/silver coating on titanium[J]. Journal of Alloys and Compounds, 2020, 830: 154490.

[18] Dadashi S, Boddohi S, Soleimani N. Preparation, characterization, and antibacterial effect of doxycycline loaded kefiran nanofibers [J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2019, 52: 979-985.

[19] Wels M, Roels D, Raemdonck K, *et al*. Challenges and strategies for the delivery of biologics to the cornea[J]. Journal of Controlled Release, 2021, 333: 560-578.

[20] Tsai M C, Daniels J T. The impact of biomechanics on corneal endothelium tissue engineering[J]. Experimental Eye Research, 2021, 209: 108690.

High-Efficiency Antibacterial Functional Collagen-Based Corneal Repair Material Based on Surface Chemical Modification

Huiyu Liu[1,2], Tian Ren[3], Yang Liu[1,2,3]

(*1. School of Medical and Health Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. School of Pharmacy, School of Biology and Food Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 3. Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China*)

ABSTRACT: Collagen was used to construct corneal repair materials because of their good physicochemical qualities, excellent biocompatibility, and low immunogenicity. However, the issue of bacterial infection during application process limited their clinical applications. To solve this problem, a novel form of antibacterial collagen-based film for corneal repair was suggested in this study. This membrane took type I collagen as raw material and used 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) as cross-linking agents to effectively incorporate aminoglycoside gentamicin molecules onto the surface of the collagen film. The structure of the gentamicin/collagen (GM/Col) film was characterized by infrared spectrum and scanning electron microscopy (SEM). At the same time, the drug loading of gentamicin on the GM/Col film was studied, and the antibacterial performance of the modified film was evaluated by Staphylococcus aureus and Escherichia coli. The results show that the mass of gentamicin loaded on GM/Col membrane accounts for about 2.33%±0.54% of its total mass. The successful incorporation of gentamicin significantly improves the antibacterial properties of the collagen membrane. In addition, the GM/Col film has good physicochemical qualities and excellent biocompatibility. As a result, there are numerous possible uses of this GM/Col film in corneal tissue engineering.

Keywords: collagen; bacteria; film; biocompatibility; tissue engineering