

T403-Arg@CuNCs 拟肽物双多糖高效绿色抗菌水凝胶

曲菲菲

东北林业大学化学化工与资源利用学院，黑龙江省哈尔滨市，150040；

摘要：细菌感染被公认为人类健康和生命的杀手，抗生素的滥用造成了很严重的耐药性(AMR)危机，引起了世界各国的注意，迫切寻找抗生素的有力替代者。防御素激发的抗菌肽(AMPs)由于其独特的膜破坏机制脱颖而出，然而，稳定性差、制备难、价格高等不足，阻碍抗菌肽的临床应用。本文以抗菌肽模拟修饰为出发点，验证氨基酸残基修饰聚醚胺(T403)的星型拟肽结构能否抗菌，并验证是否为膜破坏抗菌机制，为了提高稳定性、减少抗菌剂用量、防止突释的细胞毒性构建双糖凝胶体系，并且加入铜纳米簇协同抗菌并且加强交联的致密程度的L-精氨酸-T403@CuNCs 双糖 pH 响应水凝胶(ATCOH)。该水凝胶具有抗菌活性强、抑菌时间长、溶血率低、亲肤水润易贴敷易清除能自愈等综合性能。伤口 pH 范围内不成型赋予其能够按需释放、多次利用的可能性，为智能绿色的非抗生素水凝胶的设计提供了新思路。

关键词：抗菌肽模拟物；天然多糖；抗菌水凝胶；生物相容性；绿色

DOI: 10. 69979/3029-2808. 25. 07. 043

引言

众所周知，细菌感染会威胁公众健康，原因主要在于细菌感染会导致伤口附近菌群失衡，增加炎症反应导致伤口愈合失败^[1]，金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和厌氧菌等是伤口常见病原菌。预防感染首要使用抗菌伤口敷料^[2]临床最常用仍是抗生素，但因此导致耐药菌出现伤口更难愈合^[3]，每年全球超过 700 万人死于耐药细菌感染，高于疟疾和 HIV/AIDS，预测到 2050 年，将增至 1000 万。而多重微生物在伤口协同产生生物膜，传统抗生素非膜破坏抗菌思路，无法应对愈加复杂的治疗过程^[4]。抗菌肽(AMPs)与传统抗生素完全不同的独特膜活性抗菌不易耐药备受关注，可能替代传统抗生素却因为造价昂贵、不稳定易溶血难直接应用。自组装多肽水凝胶因其良好的生物相容性、制备简单、结构可调、结构修饰和新型递送衍生的抗菌肽模拟物又称拟肽物 APM，如氨基酸置换模仿保留抗菌肽结构等^[5]。传统伤口敷料效果有限如静电纺丝纳米纤维等保水性差移除拉扯不适等阻碍愈合过程^[6]。水凝胶可掺入治疗剂、组成多功能水凝胶基质，天然材料相较于化学合成材料更价廉易得，绿色无毒，反复利用已被开发用于伤口治疗^[7]。如天然多糖结构容易改性、动态交联策略更赋予其刺激响应等更丰富功能^{[8][9]}。可控地释放加快创面愈合进程，当皮肤受损创面区域 pH 先碱性(pH7.5-8.9)逐渐转变为酸性，金属纳米团簇(MN

Cs)本身具备抗菌活性，体积小易代谢难残留，部分还可与传统抗菌药协同如铜纳米簇如包埋抗菌因子如铜离子的水凝胶^[10]，多糖水凝胶与金属纳米簇结合抗菌协同增强了我们创造非抗生素抗菌敷料的信心^[11]。

本文通过结构设计，基于阳离子/疏水平衡原则，天然精氨酸和聚醚胺进行脱水缩合，以酰胺键相连制备得到一种模拟肽结构的抗菌剂并探究其抗菌活性，选择天然绿色的抗菌多糖壳聚糖和葡聚糖，因二者结合成型与 pH 有关，引入动态硼酸键进行改性使交联更致密，引入铜纳米簇减少刺激同时水凝胶自修复能力加强 1s 复原的 pH 响应性的星型结构肽模拟物@双糖抗菌水凝胶，形成一种具有长期稳定抗菌兼具自修复的多功能绿色抗菌水凝胶。

1 实验材料与器械

本研究以实验合成所使用的试剂包括天然氨基酸、脱水试剂、各种胺类试剂以及后处理和提纯试剂等为上海泰坦有限责任公司购买。生物测试所使用细菌类型为医院常用感染病菌。制备设备包括磁力搅拌器、循环水式真空泵、离心机、压力蒸汽灭菌器超净工作台等。

1.1 材料表征方法

1.1.1 傅里叶变换红外光谱 (FTIR)

将待测样品光谱溴化钾研磨混匀后进行压片处理，恒温 25℃，波长 500~4500cm⁻¹ 区间扫描后得到红外光谱图，以判断肽模拟物的合成与水凝胶的制备是否成功。

1.1.2 核磁共振氢谱 (1HNMR)

由 BrukerAVANCEIII-400 核磁共振仪进行测试分析样品分子结构。测试溶剂为氘代重水、氘代二甲基亚砜, 测试温度 25℃时, 扫描次数 16 次 (聚合物扫描增加 4 倍) 以确 ARG 合成。

1.1.3 扫描电子显微镜 (SEM)

使用 ThermoScientific 公司的 ApreoSLoVac, 20k V, 倍数 100~20000, 单晶硅基底, 喷金 8nm 后上机, 观察由对照组 PBS 缓冲液、ARGT、水凝胶 ATCOH 处理后的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌形貌变化。

1.1.4 荧光电子显微镜 (FEM)

通过活细菌/死细菌双染试剂盒 (N01 和 PI), 对细菌进行染色, 采用 NIKON 荧光显微镜 (FEM) 测试。激发波长 488nm, 发射波长 617nm。本文使用 FEM 观察对照组 PBS 缓冲液、ARGT、水凝胶 ATCOH 处理后的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌荧光染色情况。

1.1.5 紫外分光光度计 (UV)

根据朗伯比尔定律, 计算特定吸收峰吸光度与细菌浓度、细胞浓度间的线性关系, 使用日本岛津公司的 UV-2500 紫外分光光度计。本文测定对照组 PBS 缓冲液、ARGT、水凝胶 ATCOH 处理后的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的吸光度并绘制吸光度随时间变化曲线, 测试波长 490nm。

1.1.6 酶标仪 (MR)

本文使用 MindrayMR-96A 酶标仪 (MR) 测试菌液的吸光度, 测试波长为 630nm。

1.1.7 流式细胞仪 (FC)

用 ThermoFisherAttuneNxT 流式细胞仪 (488nm 激发波长) 结合 PI 染色法, 定量测定 ARG 处理组诱导大肠杆菌凋亡的比率。实验设置 PBS 缓冲液作为阴性对照, 通过荧光信号强度差异评估抗菌效果。

1.2 合成和生物实验方法

(1) 星型氨基酸聚醚酰胺的合成:

1. 在氮气保护下利用 Boc 保护基团, 通过酰胺键脱水缩合将精氨酸接枝到骨架聚醚胺 T403 上, 利用预冷盐酸-乙酸乙酯混合液 (25mL, 1.00mol/L), 室温搅拌 12h 完成脱保护, 通过乙醚洗涤去除残余杂质真空干燥后即得目标产物 ARG。

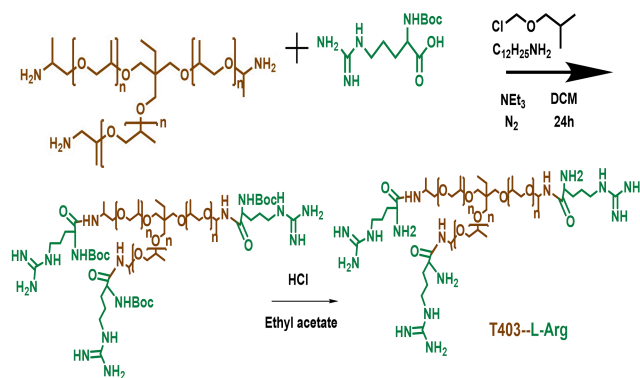


图 2-1 所使用氨基酸的化学结构及氨基酸聚醚酰胺的合成路线图

2 最小抑菌浓度测试

选取单一菌落进行活化培养至对数生长期, 将菌悬液经 0.5 麦氏比浊度校准后梯度稀释。在 96 孔板中构建 0.63-1250 μ g/mL 的二维浓度梯度抗菌剂体系 (ARG), 37℃ 静态培养 24h 后通过浊度法判定最低抑菌浓度, 实验设置三组生物学重复。

3 溶血活性实验

溶血活性实验, 待测抗菌剂为氨基酸聚醚酰胺。采用 MTT 比色法评估材料血液相容性, 实验组设 5 个浓度梯度 (62.5-1000 μ g/mL), 分别与阴性对照 (PBS) 和阳性对照 (蒸馏水) 共同孵育 (37±0.5℃)。动态监测溶血进程, 取上清液于 540nm 波长测定吸光度值, 按溶血率公式进行定量分析。

4 生物被膜抑制和破坏实验

结晶紫定量法: 参照 2.6.2.1 方法制备菌悬液, 在 6 孔板中建立生物被膜模型 (金葡菌 24h/大肠杆菌 72h, 每 12h 更换培养基)。分别施加 16-128 μ g/mL ARG 作用 2h 后, 经 0.1% 结晶紫避光固定染色, PBS 清洗后获取生物膜染色相机拍照。

2 星型聚醚酰胺结构表征及生物活性

2.1 星型聚醚酰胺的结构分析

L-精氨酸聚醚酰胺 (ARG) 产物为黄色黏稠液体, 产率为 70.1%。FT-IR 光谱分析可知在 3371cm⁻¹ 为精氨酸的胍基上 N-H 的伸缩振动峰, 1640—1680cm⁻¹ 和 1100—1150cm⁻¹ 确认了酰胺键和聚醚链的存在, 说明了酰胺键的生成。核磁氢谱结果中, 1HNMR 谱中, 化学位移 6.5~8.0ppm 和 3.5~4.5ppm 之间的峰为酰胺和与酰胺键

相邻的氢，说明 T403 与 L-精氨酸的偶联反应成功。

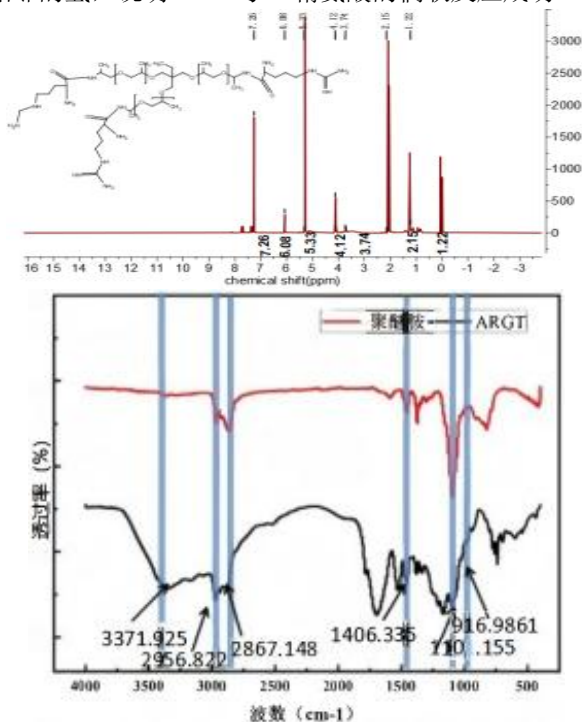


图 3-1 氨基酸聚醚酰胺的核磁共振氢谱与聚醚酰胺的 FTIR 红外光谱图

2.2 体外抗菌活性及溶血测试

通过测试 MIC 研究 ARGT 对几种病原菌的体外抗菌活性。表 3.1 列出了星型氨基酸聚醚酰胺对 ESKAPE 病原菌的 MIC 值，值越低说明抗菌效果越好，表 3-1HC50 值，值越高反映对哺乳动物安全性越高，说明 ARGT 具有优异的抗菌活性和选择性抗菌能力，具有良好的血液相容性。

表 3-1ARGT 的最小抑菌浓度和半数溶血率 ($\mu\text{g/mL}$)

Entry	Compound	MIC($\mu\text{g/mL}$)				HC50($\mu\text{g/mL}$)
		S.a	MRSA	E.coli	P.a	
1	ARGT(L)	4	4	8	16	>1000

2.3 生物被膜破坏实验

为评估精氨酸聚醚酰胺接枝的抗菌肽模拟物 (ARGT) 是否也是通过破坏细菌细胞膜而发挥抗菌作用。利用直接观察法，结晶紫染色颜色深浅变化验证膜抗菌机制。细菌 SEM 图像验证细菌生物膜被破坏。

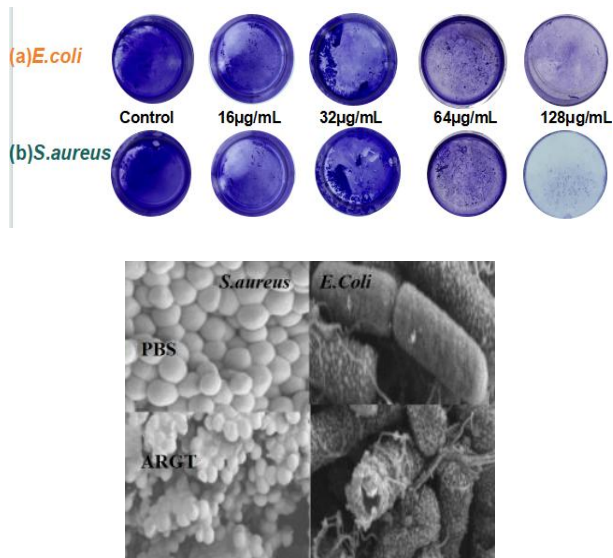


图 3-2 (a) (b) 不同浓度 ARGT 处理金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的结晶紫染色图和 (a) (b) PBS 和 (c) (d) ARGT 处理后 SEM 图

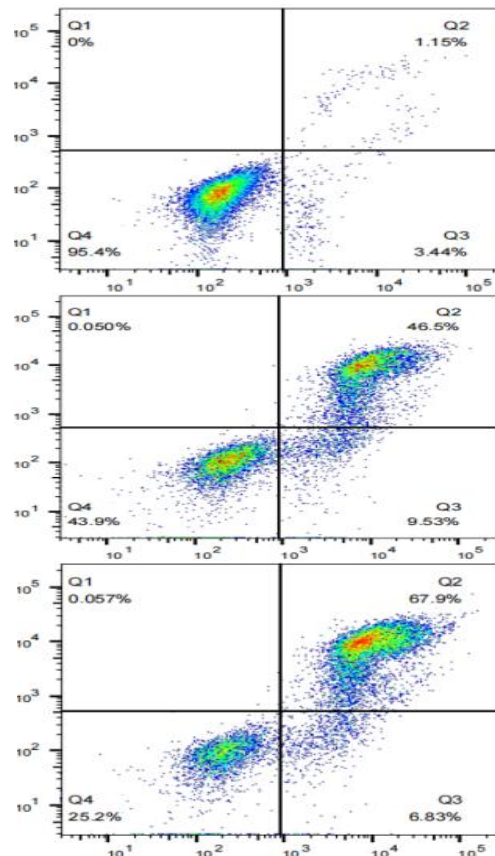


图 3-3 不同浓度 ARGT 处理后的大肠杆菌的凋亡率 (a) PBS; (b) $1 \times \text{MIC}$; (c) $2 \times \text{MIC}$

使用荧光染色剂 PI 对大肠杆菌进行染色后，用流式细胞仪检测细菌的凋亡情况。由 $2 \times \text{MIC}$ 的 ARGT 处理后的细菌凋亡率达到 74.8%，说明大肠杆菌在短时间内大量发生凋亡。如图 3-3，这些结果说明，经由 ARGT

处理后,细菌凋亡呈浓度依赖关系,即 ARGT 浓度越高,凋亡率越高。

3 多糖的改造与双多糖凝胶体系构建

多糖修饰图 4.1 为高碘酸钠(NaIO_4)作为氧化剂得氧化葡聚糖(ODex)再经苯硼酸盐修饰得有苯硼酸键的氧化葡聚糖 ODex-PBA (ODP) 具体实验步骤。

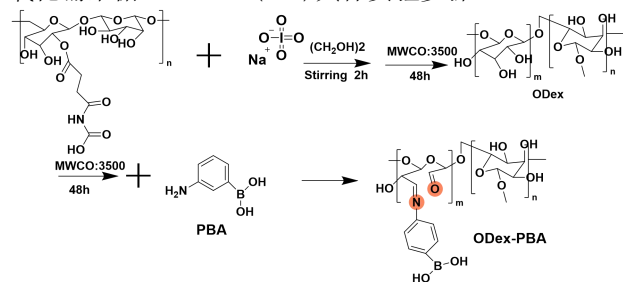


图 4-1 (a) 合成步骤

确定氧化葡聚糖的醛基含量,为了更好地确定多糖凝胶体系构建时两种多糖的使用比例。使用盐酸羟胺法通过化学滴定测试。空白对照为同条件滴定不加样品的盐酸羟胺溶液,本文合成氧化葡聚糖醛基含量约为 85%。反应原理与计算公式: $-\text{CHO} + \text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl} \rightarrow -\text{CH}=\text{N}-\text{OH} + \text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$

醛基含量 (%) = $[(V_{\text{样品}} - V_{\text{空白}}) \times \text{CNaOH} \times 28.01 / m_{\text{样品}}] \times 100\%$ 公式 3-1

铜纳米簇合成:图 4-2 为温和简便的氨基酸氧化法合成铜纳米簇路线,具体步骤如下图。

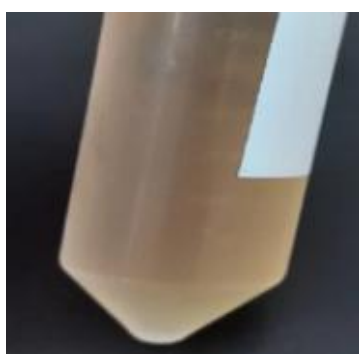
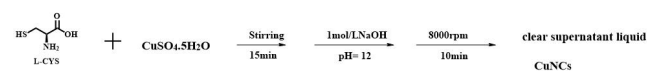


图 4-2CuNCs 制备路线图

3.1 双多糖凝胶体系构建星型精氨酸聚醚酰胺@CuNCs 双糖水凝胶合成

将进行结构修饰后的氧化葡聚糖与壳聚糖进行梯度比例配比,按照^[12]壳聚糖和氧化葡聚糖(氧化程度 85%)的交联原理,ODP: CA 推荐比例为 3: 2,调节 pH 发现

壳聚糖酸性条件溶解度高,配置乙酸溶液(1mM)与 NaOH (1mM) 调节 pH 发现在 pH5-6.5 以内壳聚糖-氧化葡聚糖双多糖水凝胶体系较为稳定,超出此范围水凝胶不成型,pH 调节会该范围能够重新成型,但要考虑料液比,否则需重新加入等比例多糖,成型以 pH5.5 左右最佳,为防止壳聚糖将氧化葡聚糖还原,加入保护剂半胱氨酸。将壳聚糖和苯硼酸修饰的氧化葡聚糖溶液^[13]调节 pH4.5 混合于 50mL 烧杯,加入 1mL 铜纳米簇-抗菌肽复合液(终浓度:铜纳米簇~250 μM ,抗菌肽~50 $\mu\text{g/mL}$),轻柔搅拌 5 分钟,缓慢滴加 0.1MNaOH 调节 pH5.5-6.5 (促进硼酸酯键形成)磁力搅拌 10 分钟将混合液转移至模具中,室温静置 1 小时形成初凝胶,随后置于 4℃ 冰箱 12 小时完成动态交联,4℃ 避光保存。

4 基于精氨酸聚醚酰胺@铜纳米簇@双糖抗菌水凝胶的性能测试方法

4.1 结构表征与形貌分析

在本节中,首先表征化学结构。图 5-1 为 FTIR 谱图,通过与合成抗菌剂对比可以发现,在 1500~1750 cm^{-1} 为酰胺键中羰基和氨基伸缩振动峰,且氧化葡聚糖的醛基伸缩振动也在 1700 cm^{-1} 附近,相比抗菌剂 ARG,空白水凝胶 ODP+CA 与 ATCOH 抗菌水凝胶的 FTIR 谱图在 1010 cm^{-1} 出现的新峰刚好在苯硼酸酯键出峰范围 1000~1300 cm^{-1} ,抗菌凝胶同时具有类似抗菌剂和空白水凝胶的特征峰,表明抗菌剂在保持原有交联状态下与双多糖水凝胶体系偶联反应成功进行,目标抗菌水凝胶化合物成功制备。SEM 图显示冻干后的 ATCOH 水凝胶具有类似于细胞外基质的多孔三维网络结构,且水凝胶的多孔结构规整,孔径大而致密,结构相较于纯水凝胶更加致密复杂,这表明加入抗菌剂后具有更高的交联程度。

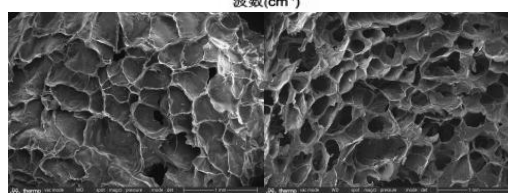
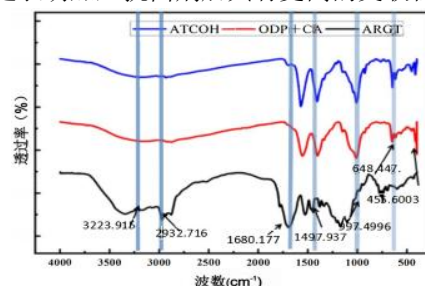


图 5-1ATCOH 抗菌水凝胶和 ODP+CA 与 ARGT 的红外光谱图和 ODP+CA 和 ATCOH 的 SEM 图

4. 2 精氨酸聚醚酰胺水凝胶的抗菌活性

进行抑菌试验研究不同抗菌成分叠加对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的体外抑菌效果。图 5-2a 显示对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制区直径。证实抗菌剂和金属纳米簇结合后，抗菌效果更佳。精氨酸聚醚酰胺模拟物本身与金属纳米簇二者都具有较强的抗菌活性为制备本征型抗菌水凝胶提供了基础。

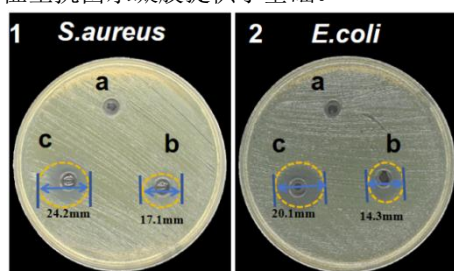


图 5-2 (1) : T403、2: ARGT、c: ARGT+CuNCs 对金黄色葡萄球菌和 (2) 大肠杆菌的抑制区直径

通过菌落计数法能更加直观验证 ATCOH 的抗菌活性。图 3-7 为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌被 ATCOH 水凝胶和 PBS 处理后的铺板菌落计数照片为了更直观感受绘制柱状图。由两图可知，与 ATCOH 水凝胶共培养 8h 后，几乎消灭所有黏附细菌。将 ATCOH 进行长期的抑菌圈测试验证长期抗菌活性，结果如图 3-7c 所示，抗菌水凝胶与细菌共混 24h 后抑制区直径：大肠杆菌 31.4mm，金黄色葡萄球菌：33.4mm。且 7 天内抑制区直径无明显变化。因此 ATCOH 水凝胶具有长期稳定抗菌活性。此后，通过荧光染色剂 N01 和 PI 对 PBS 处理后细菌和与 ATCOH 水凝胶共处后剥离出细菌染色，细菌被抗菌水凝胶处理后细胞膜破裂胞内物质泄漏而被染成红色荧光，对照组刚好与之相反几乎没有红色荧光，证实 ATCOH 水凝胶的确拥有膜破坏杀菌机制。

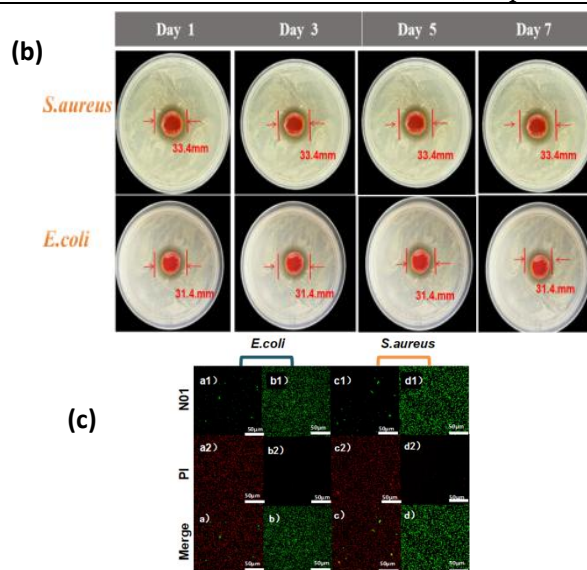
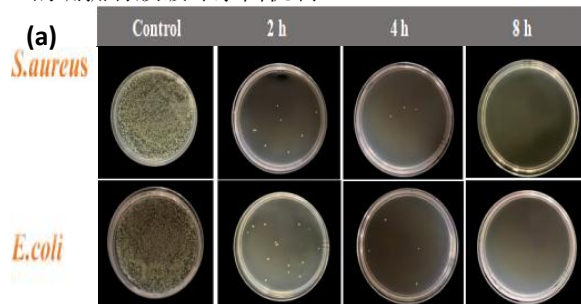


图 5-3 (a) ATCOH 水凝胶和未经处理大肠杆菌和金黄色葡萄球菌照片和 (b) 抑菌圈 (c) FEM 图

4. 3 精氨酸聚醚酰胺水凝胶的自修复和黏附清除性能

通过切割愈合试验验证 ATCOH 自修复力。首先将 ATCOH 水凝胶切断，在室温空气中将两端切口轻轻贴合看是否能够粘贴复原，实验宏观照片如图所示，显而易见，切开的两表面在 1 秒内就能自愈，重新修复成与切割前别无二致的完整凝胶体。右图 a 为 ATCOH 水凝胶形成的各种特定形状，右图 b 为黏附于不同材料表面后的宏观照片表明其对不同材料均有强粘附力。如图 c 所示，将水凝胶附着人体皮肤表面后进行移除，剥离水凝胶后皮肤表面无肉眼可见残留，ATCOH 水凝胶具有良好的黏附力和容易清除的性能。

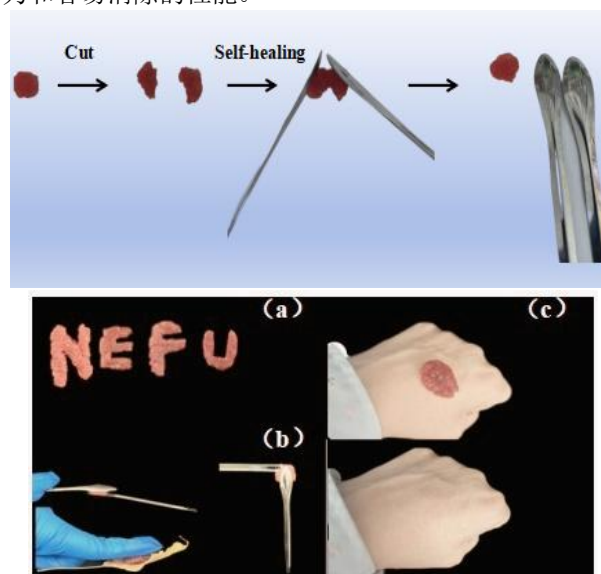


图 5-4ATCOH 水凝胶自修复照片和黏附清除照片

5 结论

设计合成的水凝胶表现出良好的抗菌活性,与水凝胶接触 8h 后几乎杀死了全部的黏附细菌。更重要的是,抗菌水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性能均可以超过 7 天,具有长期稳定抗菌活性且杀菌机制为细菌膜被破坏裂解;该水凝胶在没有外力的影响下就能够快速实现自愈合。此外,自黏性、易清除等综合性能使得该水凝胶有与人体紧密贴合进行治疗的潜力;该水凝胶本身具有优异的抗菌性能与良好的生物相容性可预防细菌的感染,皮肤带有伤口时 pH 刚好在水凝胶体系非稳定范围内,但愈合皮肤正常酸碱度可实现再成型,可起到反复利用、减少过度用药毒性,为智能伤口敷料的设计提供了新的思路。

参考文献

- [1]Robson,MartinC. "Woundinfection:afailureofwoundhealingcausedbyanimbalanceofbacteria. " *SurgicalClinicsofNorthAmerica* 77. 3(1997): 637-650.
- [2]Shi,Chenyu,etal. "Selectionofappropriatewounddressingforvariouswounds. " *Frontiersinbioengineeringandbiotechnology* 8(2020): 182.
- [3]Alduina,Rosa. "Antibioticsandenvironment. " *Antibiotics* 9. 4(2020): 202.
- [4]Boehle,K. E,etal. UtilizingPaper-BasedDevicesforAntimicrobial-ResistantBacteriaDetection. *Agnew[J]. Chem. Int. Edit*, 2017, 56, 6886 - 6890.
- [5]Zhang,Jiaqi,etal. "Strategiestoimprovetheactivityandbiocompatibility:modificationofpeptideantibiotics. " *FoodbornePathogensandDisease* 19. 6(2022): 376-385.
- [6]Liu,J,etal. ProgressinAntibacterialHydrogelDressing[J]. *Gels*, 2022, 8, 50-3.
- [7]B. -D. Zheng, M. -T. Xiao. Polysaccharide-basedhydrogelwithphotothermaleffectforacceleratingwoundhealing. *Carbohydr. Polym.* , 299 (2023), Article 120228.
- [8]M. Abazari, T. Akbari, M. Hasani, E. Sharifikolouei, M. Raoufi, A. Foroumadi, M. Sharifzadeh, L. Firoozpour, M. KhoobiPolysaccharide-basedhydrogelscontainingherbalextractsforwoundhealingapplications*Carbohydr. Polym.* , 294 (2022), Article 119808.
- [9]Mukherjee, I. RecentDevelopmentofPolysaccharide-DerivedHydrogel: Properties, Stimuli-ResponsivenessandBioapplications. *ChemRxiv. CambridgeCambridgeOpenEngag[J].* 2022, 5, 463-567.
- [10]Gao,N,etal. Colorimetricsensingofbiomarkersbasedontheenzyme-mimeticactivityofmetallanoclusters[J]. *ChemicalEngineeringJournal*, 465, Article 142817. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142817>.
- [11]Zhang,Wen,etal. "Responsivemultifunctionalhydrogelsemulatingthechronicwoundshealingcascadeforskinrepair. " *JournalofControlledRelease* 354 (2023): 821-834.
- [12]Yang,Yutong,etal. Bacteria-responsiveprogrammableself-activatingantibacterialhydrogeltoremodelregenerationmicroenvironmentforinfectedwoundhealing[J]. *NationalScienceReview* 11. 4(2024): nwa044.