

抗菌 PLGA 薄膜的初步研究

王梦露, 潘文文

(郑州大学 生命科学学院, 河南 郑州 450001)

摘要:以不含端羧基的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)薄膜为材料,分别采用氢氧化钠处理和紫外线处理使其加上端羧基,利用原子力显微镜对处理后的 PLGA 薄膜表面进行表征,并对其亲水性能进行检测.运用碳化二亚胺两步接枝法在含有端羧基的 PLGA 薄膜表面接枝活性蛋白杆菌肽,分别采用吖啶橙荧光染色法和 MTT 法来检测接枝前后 PLGA 薄膜的抗菌性能.结果表明:分别经氢氧化钠处理和紫外线处理后的 PLGA 薄膜表面化学结构均发生了明显变化;与空白薄膜对比,经氢氧化钠处理的 PLGA 薄膜的亲水性变大;与未接枝杆菌肽的 PLGA 薄膜进行对比,接枝后的 PLGA 薄膜具有一定的抗菌作用,且抗菌性随杆菌肽接枝浓度的增加而逐渐减弱.

关键词:PLGA 薄膜;杆菌肽;接枝;抗菌性能

中图分类号:R318.08 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2015.5/6.008

The preliminary research on the antibacterial PLGA membrane

WANG Meng-lu, PAN Wen-wen

(School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Taking the thin film of PLGA without carboxyl end group as the material, sodium hydroxide and ultraviolet ray were adopted respectively to make it with carboxyl end group. Atomic force microscopy was used to characterized the thin film of PLGA after treatment, and its hydrophilicity was tested. Then grafting the active protein bacitracin through the carbodiimide sequential method, and the antibacterial performance of the thin film of PLGA before and after grafted was tested respectively by the methods of acridine orange fluorescence staining and MTT method. The results showed that the chemical structure of the thin film of PLGA dealt with sodium hydroxide and ultraviolet ray changed obviously. Compared with the blank thin film, the hydrophilicity of the thin film of PLGA after treatment became bigger. Compared with the thin film of PLGA without grafting, the thin film of PLGA after grating had the certain antibacterial performance, and the antibacterial performance gradually decreased as the grating concentration increased.

Key words: PLGA film; Bacitracin; graft; antibacterial performance

0 引言

随着科学技术的快速发展、医疗水平的不断提高,生物材料在临床上的应用越来越广泛.生物材料植入人体后,常由于细菌感染而造成整个治疗的失败,故生物材料的染菌问题正制约着生物材料的

应用和发展.可降解生物材料,顾名思义,是在体内或其他生物环境中可以被降解或者被吸收的一种生物材料^[1].聚乳酸是一种被广泛应用的生物高分子材料,在人工器官等方面的临床应用较普遍,但其应用过程中引发的细菌性感染等问题不容小觑^[2].聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)作为一种聚乳酸类共

聚物,是合成类可生物降解的高分子生物材料,在组织学和生物材料医学等方面应用广泛,是临床生物材料中的中流砥柱^[3]。

临床生物体植入物遭受细菌等的侵入,往往是二次手术的主要原因,严重时甚至造成重大医疗事故。生物体感染常见菌种有葡萄球菌、假单胞菌、变形杆菌、大肠杆菌等^[4]。生物医用材料表面的抗菌性能研究现已成为热点问题。治疗法和防止细菌生物膜构成的方法是当前避免生物原材料遭受体内感染的常用的两种路径,其中治疗法暂不可彻底根除已形成的细菌生物膜。现多使用避免生物膜构成的方式,从理化性质考虑,对生物原材料表面进行改造,以避免细菌生物膜的形成。减少细菌在生物原材料表面粘附生长的常用方法有气相沉淀法、等离子体法、化学接枝法等^[5]。据报道,通过化学接枝法,可在蚕丝素蛋白膜上接枝抗菌肽,使丝素蛋白膜具有抗菌性能^[6]。活性蛋白杆菌肽对革兰氏阳性菌较为敏感,能抑制金黄色葡萄球菌等生长。本文拟采用碳化二亚胺(EDC-NHS)两步接枝法在加羧基的 PLGA 薄膜表面接枝杆菌肽,用金黄色葡萄球菌检测接枝杆菌肽后薄膜的抗菌性能,并运用 MTT 法检测接枝后的 PLGA 薄膜的抗菌性,以期为生物材料表面的抑菌方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

主要试剂及材料:PLGA(相对分子量约为3.3万),上海甄准生物科技有限公司产;二甲基亚砜,天津市科密欧化学试剂公司产;三氯甲烷,天津富宇精细化工公司产;MTT(噻唑蓝),Sigma 公司产;青链霉素,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCL),MES 生物缓冲液,杆菌肽,均购自北京索莱宝生物科技有限公司;N-羧基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),苏州昊帆生物科技有限公司产。

主要仪器:SE202F 型电子天平,奥豪斯仪器有限公司产;Solver p4T-pro 原子力显微镜(针尖曲率半径 $r < 10 \text{ nm}$),俄罗斯 NT-MDT 公司产;KQ-50 型超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司产;SZ-93 型自动纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂产;DHP-9012 型电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 PLGA 薄膜的制备 向 10 mL 三氯甲烷中加入 1 g PLGA,使其溶解,放置 5 ~ 10 h,待多余三氯甲烷挥发后,在小玻璃圆片(直径 15 mm)上滴加

0.1 mL PLGA 三氯甲烷混合液,使其覆盖整个玻璃片,避免产生气泡。将玻璃片置于通风橱中室温干燥 24 h,真空干燥箱(50 °C)中干燥 1 h,将所制备的 PLGA 薄膜为空白薄膜,放置于干燥器中备用。

1.2.2 生物材料加羧基

1.2.2.1 氢氧化钠处理加端羧基法 配置 0.1 mol 氢氧化钠溶液;取若干片已经制备好的空白薄膜,立于 24 孔板中,用吸管吸取少量碱液,使其覆盖薄膜一半,将 24 孔板置于 50 °C 恒温箱中处理 1 h;同时在室温条件下,用相同的碱液处理相同的时间,作为对比,然后用等质量分数的 HCl 溶液中和氢氧化钠溶液,最后用大量三蒸水冲洗干净,吹干,备用。

1.2.2.2 紫外处理加端羧基法 在空白薄膜上加 30% 过氧化氢溶液,使其覆盖薄膜,254 nm 紫外下照射 30 min。然后吸去过氧化氢溶液,并用三蒸水清洗,滴加 5% 的 MTT,紫外照射 1.5 h,最后用三蒸水清洗若干次,吹干,备用。

1.2.3 杆菌肽抑菌检测 取两种细菌悬液(10^9 CFU/mL)各 0.1 mL,分别匀称涂布于牛肉膏蛋白胨平板上,按图 1 所示放置牛津杯,然后将按梯度稀释的细菌悬液各 120 μL 滴入牛津杯中,阴性对照为生理盐水,阳性对照为青霉素,将牛肉膏蛋白胨平板放置于 37 °C 恒温培养箱中培养 20 ~ 24 h 后观察并测量,记下抑菌圈直径,每个浓度均做 3 个平行^[8]。

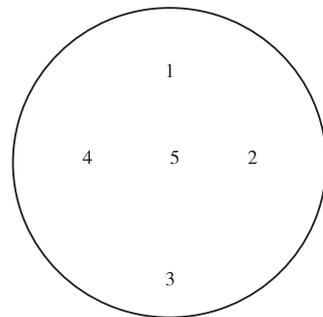


图 1 牛津杯位置分布示意图

1.2.4 杆菌肽的接枝 采用 EDC-NHS 两步接枝法:取有端羧基的 PLGA 薄膜,其处理示意图如图 2 所示,其端羧基在图 2 的 1,2 半侧,在该半侧滴加 EDC·HCL 溶液,活化 20 min;丢弃活化后的缓冲液,用 MES 溶液洗涤 3 次,完全去除残余的 EDC·HCL;吸取 1 mL NHS 于洁净平皿,再加入 1 mL 杆菌肽溶液,将 2,3 侧放入平皿中,反应 2 h,反应时确保 PLGA 膜 2,3 半侧完全浸泡在溶液中,反应过程需注意防尘;弃除反应后的溶液,用大量三蒸水反复冲洗,以洗去残留的杆菌肽溶液,洗后超声 2 min,去除吸附在 PLGA 薄膜表面的活性蛋白。

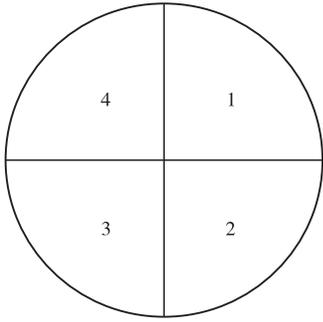


图2 PLGA 薄膜处理示意图

1.2.5 接枝后 PLGA 薄膜抗菌性能的检测 采用 MTT 法和吡啶橙荧光染色法来鉴定 PLGA 薄膜在接枝前后的抗菌性能:将接枝后 PLGA 薄膜与加端羧基但未接枝的 PLGA 薄膜放入 24 孔板中,每孔加入 1 mL 10^8 CFU/mL 金黄色葡萄球菌菌悬液,37 °C 恒温培养 12 h;膜取出后放入另一 24 孔板中,每孔加 110 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液,37 °C 恒温培养 4 h;小心将膜从孔中取出,用大量 PBS 缓冲液冲洗,放入新孔;加入 833 μ L DMSO,570 nm 下测其吸光度.

2 结果与讨论

2.1 PLGA 薄膜表征分析

2.1.1 PLGA 薄膜表面的检测 图 3—图 5 分别为原子力显微镜对 PLGA 空白薄膜、氢氧化钠处理后 PLGA 薄膜及紫外线处理后 PLGA 薄膜扫描结果.由图 3—图 5 可知,16 nm 深的孔洞证明此表面为 PLGA 薄膜,空白薄膜表面平均起伏小于 1 nm;氢氧化钠处理后的 PLGA 薄膜表面粗糙,表面平均起伏 150 nm,经紫外线处理后 PLGA 薄膜表面出现明显孔洞,表面平均起伏 650 nm,说明处理后的 PLGA 薄膜表面化学结构发生明显改变.综合考虑实验过程及结果,后续实验采用的加羧基薄膜为经氢氧化钠处理后的 PLGA 薄膜.

2.1.2 亲水性检测 图 6 为亲水性检测实验结果示意图(左侧为 PLGA 空白薄膜,右侧为氢氧化钠处理的 PLGA 薄膜).由图 6 可以看出,经过氢氧化钠处理的 PLGA 薄膜的亲水性发生了改变,因为其具有了端羧基,故亲水性变大.

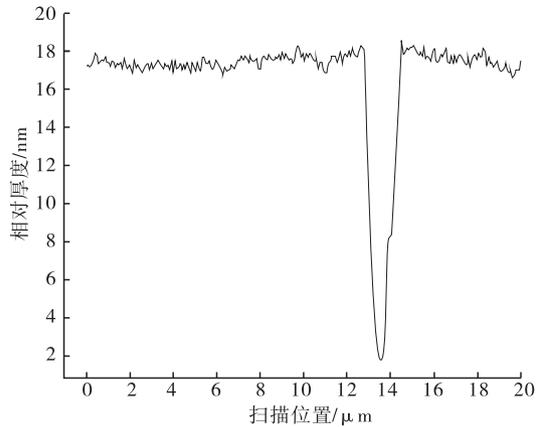
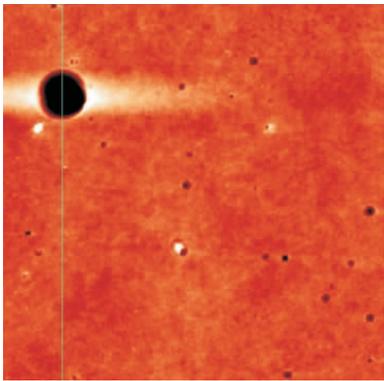


图3 原子力显微镜对空白薄膜的扫描结果(20 μ m)

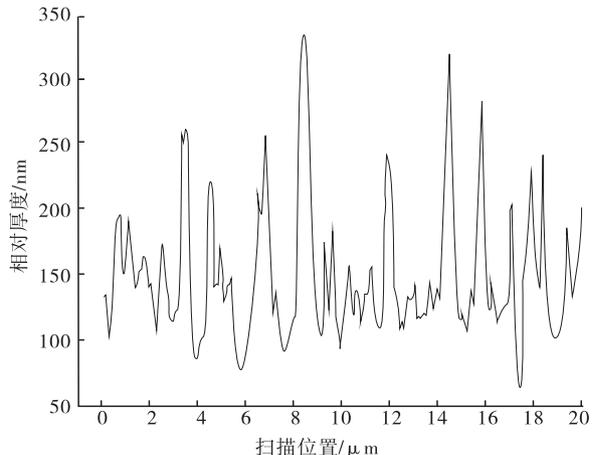
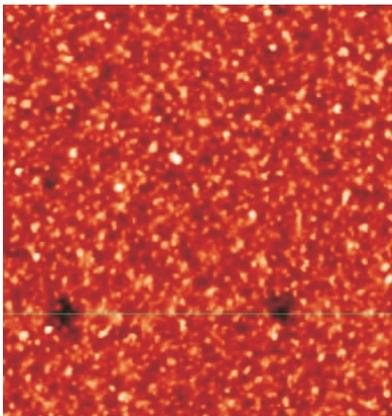


图4 原子力显微镜对氢氧化钠处理后薄膜的扫描结果(20 μ m)

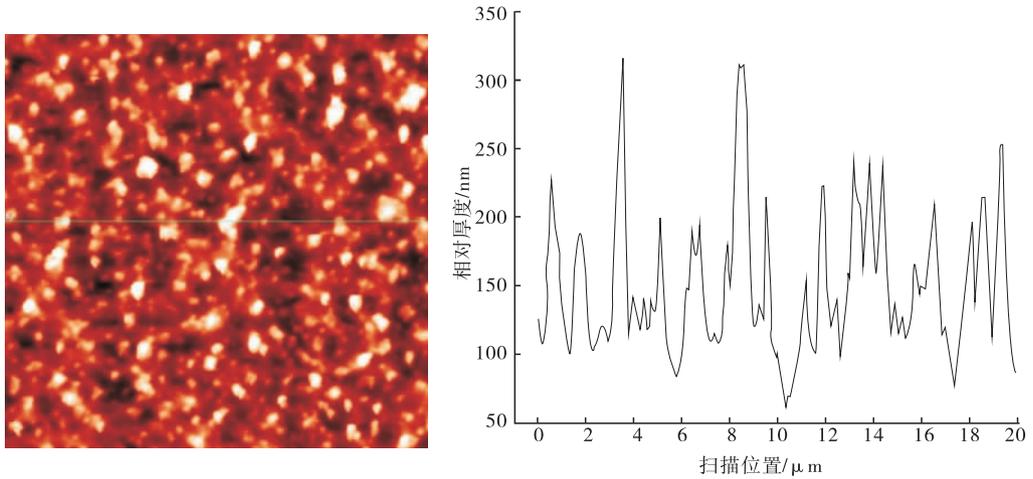


图5 原子力显微镜对紫外线处理后薄膜扫描结果(20 μm)

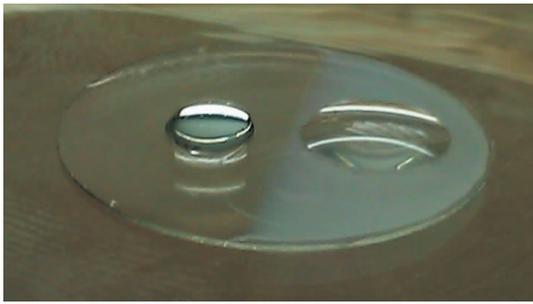


图6 亲水性检测实验结果示意图

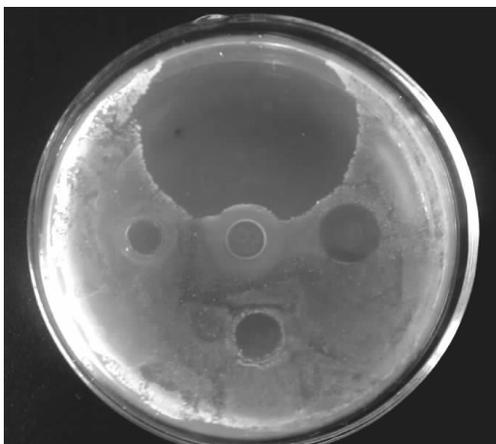
2.2 杆菌肽抑菌活性结果

观察培养 24 h 后的琼脂平板,发现活性蛋白杆菌肽对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均有一定抑制作用,但效果不同,如图 7 所示.表 1 为不同浓度杆菌肽的抑菌活性效果(牛津杯直径 8 mm).结合图 7 和表 1 可知,该杆菌肽对所用的两种菌均有很好的抑菌效果,在相同的杆菌肽浓度下,对金黄色

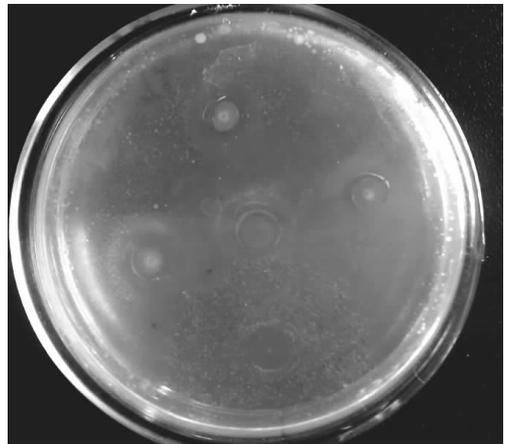
葡萄球菌的抑菌效果较枯草芽孢杆菌更明显,且金黄色葡萄球菌是比较典型的临床细菌常见感染菌株,因此将其作为接枝后的检验用菌株.杆菌肽主要对革兰氏阳性菌作用,可以使焦磷酸酶失活,特异性地抑制细胞壁合成阶段的脱磷酸化作用,影响磷脂的转运和向细胞壁支架输送粘肽,从而抑制细胞壁的合成.

2.3 杆菌肽接枝前后 PLGA 薄膜表面细菌的粘附情况

将按 1.2.4 部分制备的端羧基 PLGA 薄膜在一定浓度金黄色葡萄球菌液中培养 18 h 后,对比空白薄膜部分与接枝杆菌肽薄膜部分细菌粘附情况,光镜观察情况如图 8 所示,吖啶橙荧光染色情况如图 9 所示.结合图 8 和图 9 可以看出,接枝杆菌肽后的 PLGA 薄膜表面细菌粘附量明显少于空白薄膜,且细菌的粘附量随着杆菌肽接枝浓度的增大而减少.



a) 杆菌肽对金黄色葡萄球菌的抑菌效果



b) 杆菌肽对枯草芽孢杆菌的抑菌效果

图7 杆菌肽的抑菌效果

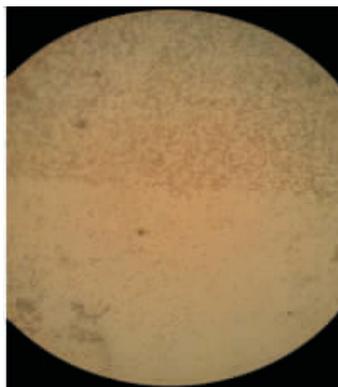
表1 不同浓度杆菌肽的抑菌活性效果 mm

试验菌株	抑菌圈直径		
	2 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL
金黄色葡萄球菌	12	10	9
枯草芽孢杆菌	9	8	—

注:抑菌圈直径越大,抑菌效果越好;“—”表示样品对菌株无抑制作用。

2.4 杆菌肽接枝后 MTT 法检测结果

对比空白 PLGA 薄膜与接枝活性蛋白杆菌肽的 PLGA 薄膜在金黄色葡萄球菌液培养后,MTT 法检测结果如图 10 所示.由图 10 可知,PLGA 膜表面粘附的细菌数量随杆菌肽接枝浓度的增加而逐渐减少,说明杆菌肽成功地接枝到了端羧基 PLGA 薄膜上,且使接枝后的 PLGA 薄膜具备了一定的抑菌性。



注:上半部分为空白薄膜,下半部分为接枝 20 mg/mL 浓度杆菌肽的薄膜

图 8 金黄色葡萄球菌在 PLGA 薄膜的粘附情况(光镜×400)

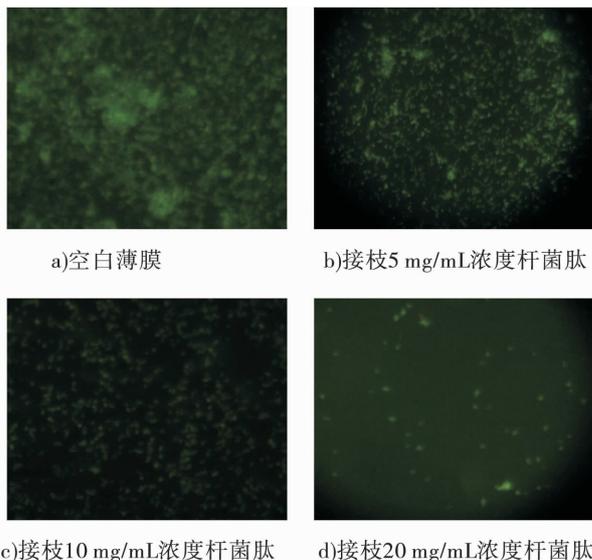


图 9 金黄色葡萄球菌在 PLGA 薄膜表面粘附情况(荧光显微镜×400)

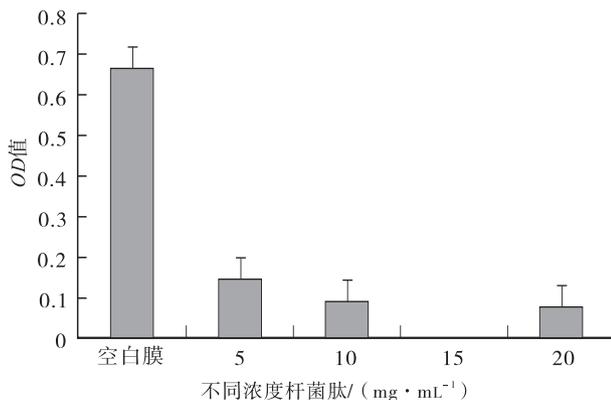


图 10 不同浓度杆菌肽接枝后 MTT 法检测结果

3 结论

本文通 EDC-NHS 两步接枝法将具有抗菌活性的杆菌肽接枝到可降解生物材料——PLGA(含端羧基)的表面,分别采用吡啶橙荧光染色法和 MTT 法来检测接枝前后 PLGA 薄膜的抗菌性能.实验结果证明了接枝后的 PLGA 薄膜具有一定的抗菌作用,且抗菌性随杆菌肽接枝浓度的增加而逐渐减弱。

植入人体的生物材料对抑菌性的要求因部位不同而有所区别,有的需要材料表面抑菌,有的则需要内部抑菌;不同部位的接枝情况也会有所区别,故需要作进一步的研究.本次实验验证了 PLGA 薄膜接枝杆菌肽,可以起到抑菌的作用,今后还可以通过接枝其他活性蛋白,使其对细菌或细胞等产生影响,以推进组织工程材料的进一步发展。

参考文献:

- [1] 陶志凯.可降解生物材料表面改性及生物相容性研究[D].新乡:河南师范大学,2012.
- [2] 奚延斐.生物医用材料现状和发展趋势[J].中国医疗器械信息,2006,12(5):1.
- [3] 王鹏,罗建斌,李洁华,等.抗菌生物材料的研究进展[J].生物技术通讯,2004,15(6):649.
- [4] 罗建斌.抗菌生物材料的研究进展[J].高分子通报,2009(3):57.
- [5] Balazs D J, Triandafillu K, Wood P, et al. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments[J]. Biomaterials, 2004, 25(11):2139.
- [6] 白利强.抗菌肽接枝丝素蛋白膜的制备表征及细胞毒性测试[D].杭州:浙江理工大学,2008.