

特约专栏

抗菌多肽改性杂萘联苯聚芳醚腈酮研究

刘文韬¹, 柳承德^{1,2}, 刘程^{1,2,3}, 王锦艳^{1,2,3}, 蹇锡高^{1,2,3}

(1. 大连理工大学 高分子材料系, 辽宁 大连 116024)

(2. 大连理工大学 精细化工国家重点实验室, 辽宁 大连 116024)

(3. 大连理工大学 辽宁省高性能树脂工程技术研究中心, 辽宁 大连 116024)

摘要: 人工生物材料容易引起各种各样的细菌感染。抗菌多肽因其优异的抗菌性能及不易产生耐药性细菌等优点, 被应用于表面改性生物材料。杂萘联苯聚芳醚腈酮 (PPENK) 因具有优良的力学性能及易于消毒等特点, 有望作为聚芳醚类生物材料。采用表面化学改性的方法在 PPENK 表面固定阳离子抗菌多肽, 可赋予其抗菌性能, 拓展杂萘联苯聚芳醚材料在生物医用领域的应用范围。采用伯胺引发氨基酸环内酸酐开环聚合的方法, 合成结构不同的两种多肽, 然后利用点击化学的原理, 将多肽固定到 PPENK 表面。通过核磁共振氢谱表征所合成聚合单体及多肽的结构。利用傅里叶变换衰减全反射红外光谱 (ATR-FTIR) 及 X 射线光电子能谱 (XPS) 分别表征材料表面化学结构、元素及含量变化。通过表面接触角测试材料的亲疏水性。采用 MTT 法对表面接枝抗菌多肽的 PPENK 进行细胞毒性测试。使用大肠杆菌及金黄色葡萄球菌对表面接枝抗菌多肽的 PPENK 进行抑菌活性测试。结果表明, 点击化学的方法可以将多肽成功固定在 PPENK 表面, 多肽的引入可以提高 PPENK 材料的亲水性。细胞毒性测试表明, 细胞的存活率均超过 80%; 抑菌活性测试说明, 在 PPENK 表面引入阳离子抗菌多肽后, 可以提高材料对细菌的抑制作用, 从而达到抗菌的效果。

关键词: 杂萘联苯聚芳醚腈酮; 阳离子多肽; 表面改性; 细胞相容性; 抗菌活性

中图分类号: O633.5; Q939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2019)10-1009-07

Antimicrobial Surface Functionalization of Poly(arylene ether nitrile)s Containing Phthalazinone Moieties with Polypeptides

LIU Wentao¹, LIU Chengde^{1,2}, LIU Cheng^{1,2,3}, WANG Jinyan^{1,2,3}, JIAN Xigao^{1,2,3}

(1. Department of Polymer Materials, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

(2. State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

(3. Liaoning Province Engineering Research Centre of High Performance Resins, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Antimicrobial functionalization is an effective way to inhibit bacterial growth on biomedical materials. Antimicrobial polypeptides have several features such as high antimicrobial activity and low cytotoxicity. Poly(arylene ether nitrile)s containing phthalazinone moieties (PPENK) is a promising polyarylether biomaterials owing to its mechanical properties and

being easy to sterilize. Antimicrobial surface functionalization of PPENK with polypeptides can expand the application of poly(phthalazine aryl ether)s in biomedical field. Two kinds of polypeptides were synthesized by N-carboxy anhydride ring opening polymerization induced by primary amine. Then, the cationic antimicrobial polypeptides were immobilized on PPENK surface by click chemistry method. The monomer and synthesized polypeptides were characterized by NMR spectra. The samples were characterized by ATR-FTIR, XPS measurements and contact angle. The cell viability of MC3T3-E1 preosteoblast cells on samples were evaluated by MTT assay, and the antimicrobial activity was tested by escherichia coli and staphylococcus aureus. The results showed that the cationic antimicrobial polypeptides

收稿日期: 2019-08-03 修回日期: 2019-09-03

基金项目: 大连市科技创新基金项目(2018J11CY007, 2018J12GX055); 国家自然科学基金项目(51503025); 国家重点研发计划项目(2017YFB0307600)

第一作者: 刘文韬, 男, 1990 年生, 博士研究生

通讯作者: 蹇锡高, 男, 1946 年生, 中国工程院院士,

博士生导师, Email: jian4616@dlut.edu.cn

柳承德, 男, 1983 年生, 副教授, 硕士生导师,

Email: liucd@dlut.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.201906029

were successfully immobilized on PPENK surface. The viability of cells cultured with extracts from polypeptides grafted PPENKs was more than 80%. The introduction of cationic antimicrobial polypeptides on the surface of PPENK could inhibit the growth of bacteria.

Key words: PPENK; cationic polypeptide; surface modification; cytocompatibility; antimicrobial activity

1 前言

随着社会的发展,患创伤、骨质疏松症、骨癌等疾病的病患数量以及所需的整形手术量迅速增加,故需要使用大量的骨植入材料等生物医用材料。以骨植入材料为例,其平均感染率高达 2%~5%^[1],植入器械引发的细菌感染已经成为最严重的并发症之一,是临床迫切需要解决的重要问题^[2]。抗菌材料是解决生物材料细菌感染的有效途径,在医疗领域中,口腔^[3,4]、骨科^[5]、皮肤科^[6]等每年都需要大量的抗菌材料。通常情况下,一种抗菌材料在杀灭细菌的同时,也会将细胞杀死,所以在考虑是具有抗菌活性还是生物安全性上出现很大的争论^[7]。另外,抗菌的定义很模糊,是要将所有的细菌杀死,还是让活细菌保持一个稳定的状态,不能继续增殖,是一个值得讨论的问题。因此,既可以抑制细菌增殖,又具有很高生物相容性的材料,应用前景十分广阔。表面改性是提高现有骨植入材料表面性能的重要途径,已经被广泛应用。将抗菌多肽通过物理或化学方法修饰在植入材料表面,使其具有抗菌功能,可有效抑制细菌增殖、降低细菌感染,是近年来研究的热点之一。

杂萘联苯聚芳醚腈酮(PPENK)材料作为新型热塑性耐高温工程塑料,特殊的分子结构使其溶解性能比已经商业化的骨植入材料——聚醚醚酮(PEEK)更加优异。另外,与 PEEK 相比,由于强极性侧基氰基的引入,PPENK 更易于被改性,使其有望被开发为骨植入材料^[8]。氰基为 PPENK 材料提供了反应活化位点,通过活化位点可以使材料表面连接上许多不同的功能性化合物,从而可以根据需求来改性 PPENK。比如刘志勇等通过在碱性条件下水解氰基得到具有亲水性的树脂,研究不同水解时间下氰基的转化率、玻璃化转变温度、溶解性能以及热失重温度等,从而调节 PPENK 的亲水性,以获得既耐高温又亲水的涂料树脂^[9]。

人工生物材料能够引起各种各样的细菌感染,比如植入后细菌感染^[10]。使用抗生素虽然可以降低感染率,但由于抗生素的大量使用,会导致微生物产生很高的耐药性。电磁场具有抗菌和诱导成骨的作用^[11,12],利用其可以设计得到表面电势可控且具有较高界面电势的阳离子界面,从而达到抑菌效果,也能解决因抗生素的大量使用而导致的耐药性问题。

本文采用氨基酸环内酸酐开环聚合的方法,设计合

成了两种多肽,通过点击化学的方法将多肽固定到 PPENK 材料表面,采用三氟乙酸法去除多肽结构中的叔丁氧羰基(Boc)保护基,得到具有抗菌活性的阳离子表面。利用傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)和 X 射线光电子能谱(XPS)等方法对材料的表面化学结构进行表征,验证 PPENK 材料表面多肽的固定情况。通过接触角测试,探究多肽的固定对 PPENK 材料亲疏水性的影响。分别采用 MTT 法和平板菌落计数法测试材料的细胞毒性和抑菌性能。

2 实验

2.1 实验材料

杂萘联苯聚芳醚腈酮(PPENK)购买自大连宝利摩新材料有限公司,叔丁氧羰基-L-赖氨酸(Boc-L-Lys)、苯丙氨酸(L-Phe)、半胱胺盐酸盐($\text{SH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$)、聚乙二醇-2000(PEG_{2000})、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)等试剂均购买自阿拉丁(上海)试剂有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 聚合单体的合成

按照文献[13]和[14]方法合成聚合单体叔丁氧羰基-赖氨酸-N-羧基环内酸酐(Boc-L-Lys-NCA)和苯丙氨酸-N-羧基环内酸酐(L-Phe-NCA)。Boc-L-Lys-NCA 的合成步骤为:向三口瓶中加入 2.46 g(10 mmol)Boc-L-Lys 和 15 mL 无水四氢呋喃,加热至 55 °C 后,加入 1.29 g(4.3 mmol)三光气,反应 4 h 后冷却到室温,将反应液滴入 50 mL 正己烷中,析出白色固体,过滤、干燥得到 Boc-L-Lys-NCA。按照同样的方法制得 L-Phe-NCA。

2.2.2 多肽的合成

如图 1a 所示,以 $\text{SH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ 或由 PEG_{2000} 为原料合成的 $\text{SH}-\text{PEG}_{2000}-\text{NH}_2$ ^[15] 作引发剂,通过开环聚合的方法合成两种多肽^[16,17]。

嵌段多肽 Poly₁的合成:准确称取 1.192 g(4.38 mmol)Boc-L-Lys-NCA 加入到 50 mL 史莱克瓶中,再加入 15 mL 无水 N,N-二甲基甲酰胺(DMF),待溶解后再加入 0.0163 g(0.146 mmol) $\text{SH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ 作为引发剂,在真空下室温搅拌 72 h 后加入 0.8366 g(4.38 mmol)L-Phe-NCA,补加 5 mL DMF,继续在真空下室温搅拌 48 h,反应结束后将反应液在搅拌下缓慢滴入无水乙醚中,抽滤、烘干得到嵌段多肽 Poly₁。以 $\text{SH}-\text{PEG}_{2000}-\text{NH}_2$ 为引

发剂采用上述方法制得嵌段多肽 Poly₂。

2.2.3 PPENK 的粉料水解

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.5 g PPENK 粉料, 按照三因素二水平正交实验设定的反应温度、催化剂氢氧化钾的浓度以及反应时间(表 1), 将 PPENK 粉末进行水解。水解完成后, 冷却至室温, 将 6 mol/L 的盐酸溶液滴入烧瓶中, 直至溶液呈酸性。超声振荡 5 min 后, 全部转移至离心管中, 转速为 4000 r/min, 离心 5 min。弃去上层液体, 加入去离子水, 反复振荡, 清洗, 烘干后得到羧基改性的 PPENK (HPPENK)。

表 1 因素水平

Table 1 Factor level range

	Temperature/°C	c(KOH)/(mol/L)	Time/h
1	100	1	6
2	85	4	12

2.2.4 PPENK 板的制备及表面阳离子抗菌多肽的固定

PPENK 表面阳离子抗菌多肽的制备过程如图 1b 所示。将 PPENK 粉末经过热压成型后, 切割成 10 mm×10 mm×1 mm 的 PPENK 板, 依次使用去离子水、丙酮、

乙醇、去离子水清洗材料表面, 烘干备用。然后将 PPENK 板加入到 4 mol/L 氢氧化钾溶液中, 100 °C 下回流 12 h 后, 再浸入 1 mol/L 盐酸溶液中进行酸化, 经过水洗烘干, 得到表面羧基化的 PPENK (HPPENK), 将其浸入到 20 mL 含有 4 mol/L EDC 和 1 mol/L NHS 的混合溶液中, 室温搅拌 1 h 对羧基进行活化。随后, 将 HPDENK 板取出, 吸干表面残留的水分。再将经过活化的 HPDENK 板浸入体积分数为 1% 的乙二胺溶液中, 室温搅拌 24 h, 得到表面氨基化的 PPENK 板 (PPENK-NH₂)。反应完毕后, 用乙醇、去离子水反复清洗, 再次烘干后将 PPENK-NH₂ 板浸入含有 1 mg/mL 碘乙酸 N-羟基琥珀酰亚胺的 DMF 溶液中反应 6 h, 依次用 DMF、丙酮、乙醇、去离子水清洗、烘干, 得到改性的 PPENK 板 (PPENK-I)^[18, 19]。

将合成的两种多肽分别配制成 1 mg/mL 的磷酸缓冲盐 (PBS) 溶液, 并将 PPENK-I 分别浸入到两种多肽的 PBS 溶液中, 反应过夜后, 用新鲜的 PBS 溶液清洗材料并烘干, 得到 PPENK-g-Poly₁ 及 PPENK-g-Poly₂。然后, 将它们浸入体积分数为 5% 的三氟乙酸水溶液中, 在冰水浴中反应 2 h。用去离子水洗涤 3 次, 干燥后分别得到 PPENK-g-Poly₁⁺ 及 PPENK-g-Poly₂⁺。

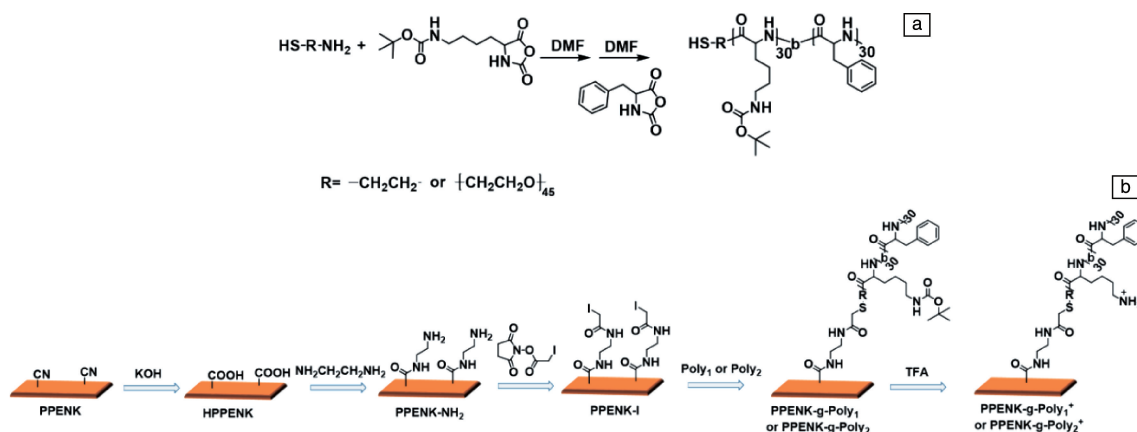


图 1 多肽的合成步骤(a)和 PPENK 表面阳离子抗菌多肽的制备过程(b)

Fig. 1 The synthetic route of polypeptides (a), and process for preparing cationic antimicrobial polypeptides on PPENK surface (b)

2.3 表征测试

采用核磁共振波谱仪 (Bruker AVANCE III 500) 分析合成的聚合单体及多肽的结构。采用薄膜法制样, 通过红外光谱测试技术表征各组 PPENK 粉末水解后的产物。利用 ATR-FTIR 及 XPS 测试, 分析 PPENK 改性前后表面基团结构、元素及含量变化。分别使用水和二碘甲烷作溶剂, 测量改性前后 PPENK 的接触角并计算其表面能, 探究多肽的固定对 PPENK 材料亲疏水性的影响。

采用 MTT 法, 在 96 孔板中对材料进行细胞毒性测试。将材料在细胞培养基中浸泡 24 h 后, 得到材料的浸提液, 使用不同稀释比例的浸提液与小鼠胚胎成骨细胞

前体细胞 (MC3T3-E1 细胞) 培养 3 d, 然后加入 10 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 4 h 后吸出 96 孔板中所有的液体, 加入 100 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 震荡混匀后, 测试其在 490 nm 波长下的吸光度 (OD) 值, 计算细胞相对增殖率^[20]。

采用平板菌落计数法, 以 PPENK 抑制细菌的菌落数为对照组, 对 PPENK-g-Poly₁⁺ 及 PPENK-g-Poly₂⁺ 抑制大肠杆菌 (革兰氏阴性菌, escherichia coli) 和金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性菌, staphylococcus aureus) 进行测试, 并根据公式计算其抑菌效率 (antibacterial efficiency) = $(1 - \text{CFU}_{\text{Sample}} / \text{CFU}_{\text{PPENK}}) \times 100\%$ ^[21]。

3 结果与分析

3.1 核磁共振氢谱分析

3.1.1 聚合单体的核磁共振氢谱分析

聚合单体 Boc-L-Lys-NCA 为白色固体, 产率 85%。以 CDCl_3 为溶剂进行核磁共振氢谱测试, 结果如图 2a 所示, 具体分析如下: $\delta = 6.79$ (s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$); $\delta = 4.65$ (s, 1H, $-\text{CH}-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$); $\delta = 4.32$ (dd, 1H, $J = 6.70, 4.85$ Hz, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$); $\delta = 3.13$ (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$); $\delta = 2.00 \sim 1.80$ (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); $\delta = 1.60 \sim 1.36$ (m, 13H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ and Boc)。

聚合单体 L-Phe-NCA 为白色固体, 产率 81%。以 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂进行核磁共振氢谱测试, 结果如图 2b 所示, 具体分析如下: $\delta = 9.07$ (s, 1H, $-\text{CH}-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$); $\delta = 7.18 \sim 7.33$ (m, 5H, Ph); $\delta = 4.79$ (t, 1H, $J = 4$ Hz, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{C}=\text{O}$); $\delta = 3.04$ (d, 2H, $J = 4$ Hz, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$)。

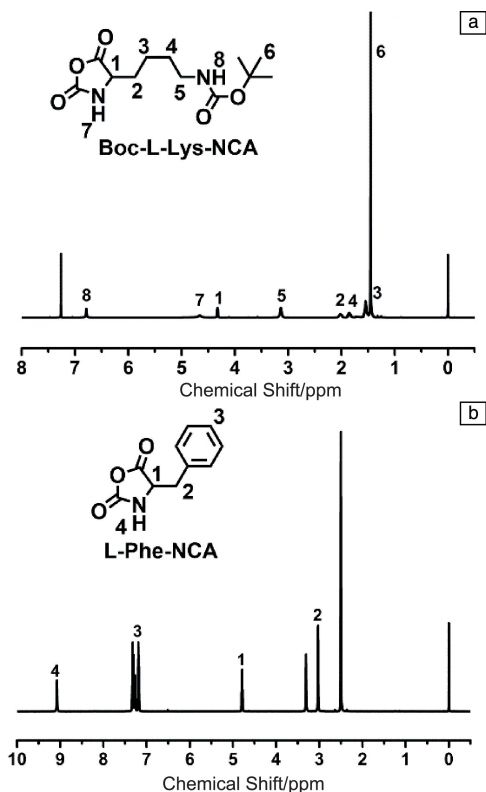


图 2 Boc-L-Lys-NCA (a) 和 L-Phe-NCA (b) 的核磁共振氢谱

Fig. 2 ^1H NMR spectra of Boc-L-Lys-NCA (a) and L-Phe-NCA (b)

3.1.2 多肽的核磁共振氢谱分析

所合成的两种多肽 Poly_1 与 Poly_2 的核磁共振氢谱如图 3 所示。对比 Poly_1 与 Poly_2 , 各个位置的峰均有所归

属, 而且相同化学环境的氢的出峰位置相似。其中 Poly_2 在 $\delta = 3.51$ 处是 PEG_{2000} 的亚甲基氢的化学位移, 而 Poly_1 引发剂 $\text{SH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ 的亚甲基氢的化学位移也在 $\delta = 3.50$ 处左右, 但峰面积很小。从核磁共振氢谱可以确定已经成功合成多肽 Poly_1 与 Poly_2 。

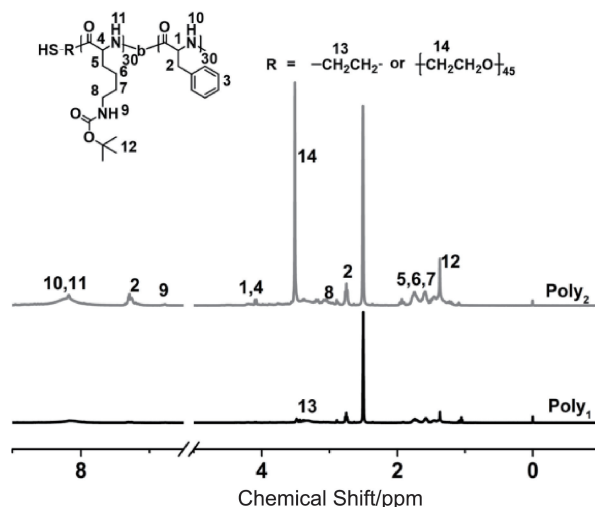


图 3 Poly_1 和 Poly_2 的核磁共振氢谱

Fig. 3 ^1H NMR spectra of Poly_1 and Poly_2

3.2 PPENK 水解程度分析

为了探究不同反应条件下 PPENK 的水解程度, 采用 2.2.3 节中表 1 所示的因素水平表, 设计 4 组实验进行水解反应。用透射法对水解后的 PPENK 进行红外测试, 测试结果如图 4 所示。水解反应的实验条件及正交实验结果如表 2 所示。

红外光谱中, 2230 cm^{-1} 处为氰基 ($-\text{CN}$) 特征峰, 850 cm^{-1} 处为苯环特征峰 (Ph), 采用量高法, 计算氰基特征峰峰高 ($H_{-\text{CN}}$) 与苯环特征峰峰高 (H_{Ph}) 的比值, 并与未经水解的样品进行比较, 可以得到不同水解条件下样品的水解程度^[9]。PPENK 样品中 $H_{-\text{CN}}/H_{\text{Ph}}$ 为 0.286, 4 组 HPENK 样品与 PPENK 样品相比, 氰基特征峰与苯环特征峰峰高比值均有所下降, 说明 PPENK 结构中有一部分氰基转变为羧基, PPENK 被成功水解。由水解后样品水解度的正交分析可知, 各因素对 PPENK 水解反应产生影响大小的顺序为: 反应时间 > 氢氧化钾的浓度 > 反应温度。还可得出, PPENK 水解反应的最佳反应条件为: 反应时间为 12 h, 氢氧化钾溶液的浓度为 4 mol/L, 反应温度为 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 。后续以此条件对 PPENK 板进行水解。

3.3 ATR-FTIR 测试

对 PPENK 及表面抗菌多肽接枝的 PPENK 材料进行 ATR-FTIR 测试, 结果如图 5 所示。从红外光谱中可以看到, 当 PPENK 表面固定多肽后, 在 3500 cm^{-1} 左右处出

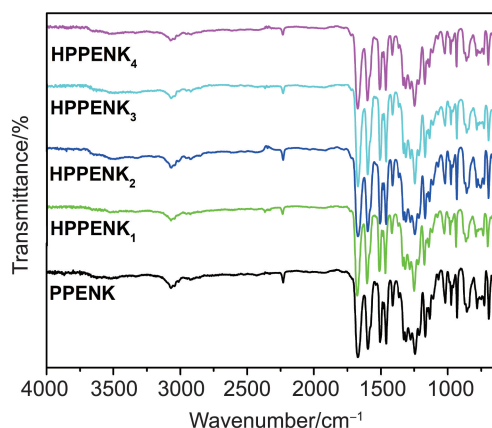


图 4 水解改性 PPENK 的红外光谱

Fig. 4 FTIR spectra of the hydrolyzed PPENK

表 2 正交实验结果极差分析

Table 2 Range analysis of orthogonal test

	Temperature /°C	$c(\text{KOH})$ /(mol/L)	Time /h	H_{CN} / H_{Ph}	Hydrolysis efficiency/%
1	85	1	6	0.264	7.69
2	100	4	6	0.254	11.19
3	100	1	12	0.251	12.24
4	85	4	12	0.235	17.83
M_1	25.52	19.93	18.88	—	—
M_2	23.43	29.02	30.07	—	—
K_1	12.76	9.97	9.44	—	—
K_2	11.72	14.51	15.04	—	—
R	1.04	4.54	5.60	—	—

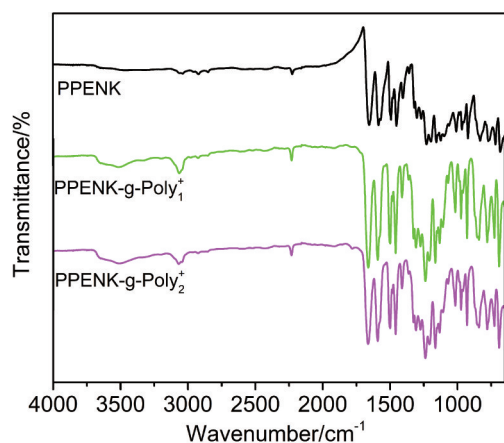


图 5 PPENK 和多肽接枝的 PPENK 的红外光谱

Fig. 5 ATR-FTIR spectra of PPENK and polypeptides grafted PPENKs

现的吸收峰可能来自多肽结构中的氨基，同时在 3080 cm^{-1} 处，饱和 C—H 的伸缩振动吸收峰的强度也明显增加，在 1660 cm^{-1} 处是羰基的伸缩振动吸收峰。结果表明，抗菌多肽被成功固定在 PPENK 表面。

3.4 XPS 分析

对 PPENK、改性处理的 PPENK 和多肽接枝的 PPENK 材料进行 XPS 分析，样品的元素含量及比例如表 3 所示。当 PPENK 表面固定了阳离子抗菌多肽，氮含量与碳含量的比值以及氧含量与碳含量的比值都有一定程度的增加，说明材料表面元素含量发生明显变化，进一步证明抗菌多肽成功键接到材料表面。

表 3 样品的 XPS 数据

Table 3 XPS value of the samples

Sample	Content/at%			N(%) / C(%)	O(%) / C(%)
	C	N	O		
PPENK	81.38	6.43	11.95	0.079	0.147
PPENK-NH ₂	81.76	6.55	11.51	0.080	0.141
PPENK-I	81.70	8.34	9.59	0.102	0.117
PPENK-g-Poly ₁ ⁺	78.46	6.93	14.39	0.088	0.183
PPENK-g-Poly ₂ ⁺	80.21	6.78	12.66	0.085	0.158

3.5 接触角及表面能

对 PPENK、PPENK-I 以及表面多肽接枝的 PPENK 进行接触角测试并计算其表面能，实验结果如表 4 所示。与 PPENK 的水接触角 (94.1 ± 3.7)° 相比，PPENK-I 的水接触角降低到 (70.1 ± 4.2)°，当在材料表面固定多肽后，其水接触角继续降低，亲水性进一步增强，说明通过表面改性改善了材料表面的亲水性。

表面能 (σ_1) 可以分为色散分量 (σ_{1d}) 和极性分量 (σ_{1p})，从表 4 数据可以看出，当在表面固定多肽后，PPENK 的表面极性部分明显增大，而色散部分减小，说明多肽的固定，改变了 PPENK 表面的极性，使其亲水能力增强。

表 4 材料的接触角及表面能

Table 4 Contact angle and surface energy value of the samples

Sample	Contact angle/(°)		SE components/(mN/m)		
	H ₂ O	CH ₂ I ₂	σ_1	σ_{1d}	σ_{1p}
PPENK	94.1 ± 3.7	30.4 ± 4.8	44.4	44.1	0.3
PPENK-I	70.1 ± 4.2	20.9 ± 3.8	48.3	40.7	7.6
PPENK-g-Poly ₁	60.5 ± 4.7	31.0 ± 5.9	48.9	34.2	14.7
PPENK-g-Poly ₁ ⁺	62.4 ± 3.0	34.8 ± 4.4	47.0	32.8	14.2
PPENK-g-Poly ₂	62.1 ± 2.1	28.8 ± 5.4	48.3	35.5	12.8
PPENK-g-Poly ₂ ⁺	59.2 ± 3.2	42.2 ± 3.8	46.5	28.4	18.1

3.6 细胞毒性测试

采用 MTT 法，对材料的细胞毒性进行测试，计算细胞相对增殖率，结果如图 6 所示。当使用不同稀释比例

的浸提液与细胞培养 3 d 后, 细胞的相对增殖率均高于 80%。此外, PPENK-g-Poly₂⁺ 的细胞相对增殖率略高于 PPENK-g-Poly₁⁺, 说明引入 PEG₂₀₀₀ 结构, 会提高材料的细胞相容性。细胞毒性实验表明, 所得到的材料无毒性, 生物安全性良好。

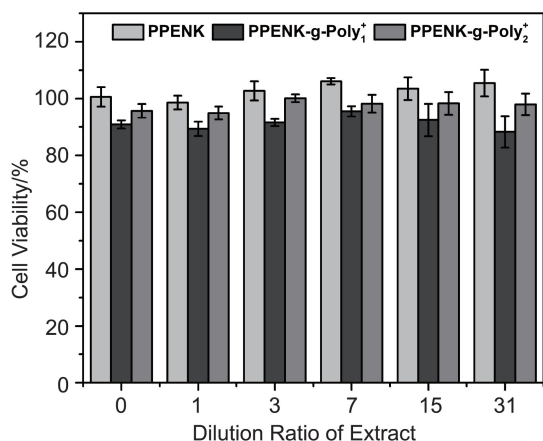


图 6 PPENK 和多肽接枝的 PPENK 材料与 MC3T3-E1 细胞培养的细胞存活率

Fig. 6 Viability of MC3T3-E1 preosteoblasts cells cultured with extracts from PPENK and polypeptides grafted PPENKs

3.7 抑菌性能测试

采用平板菌落计数法对材料的抑菌活性进行测试, 结果如图 7 所示。通过计算, 两种材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效率如表 5 所示。可以看出, 两种材料对细菌的抑制效率均达到 75% 以上, 说明其对细菌均具有较好的抑制效果。两种材料对大肠杆菌的抑制效率大于对金黄色葡萄球菌的抑制效率。同时, 不含 PEG 链段的 PPENK-g-Poly₁⁺ 的抑菌效率大于含 PEG 链段的 PPENK-g-Poly₂⁺ 的抑菌效率, 原因是柔软的 PEG 链将部分阳离子多肽包裹在其中, 导致与细菌接触的阳离子减少,

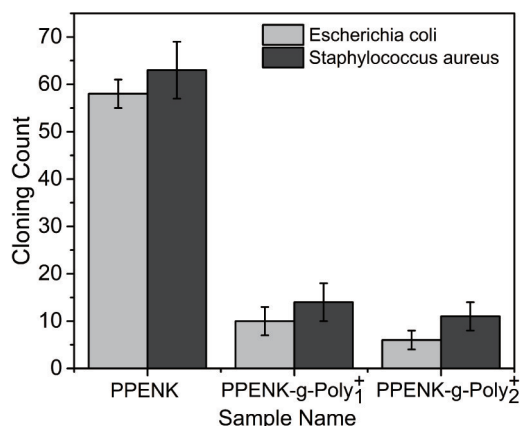


图 7 PPENK 和多肽接枝的 PPENK 材料的细菌菌落数

Fig. 7 Colonies number of PPENK and polypeptides grafted PPENKs

表 5 多肽接枝的 PPENK 材料的抑菌效率

Table 5 Antibacterial efficiency of polypeptides grafted PPENKs

Sample	Antibacterial efficiency/%	
	Escherichia coli	Staphylococcus aureus
PPENK-g-Poly ₁ ⁺	89.65	82.54
PPENK-g-Poly ₂ ⁺	82.75	77.78

所以抑菌能力下降。但 PEG 链段作为防污段, 可有效避免并阻止生物膜的形成, 大大减少了蛋白质和血小板的附着, 因此需要保留 PEG 链段。

4 结 论

采用氨基酸环内酰胺开环聚合的方法, 合成两种抗菌多肽, 通过核磁共振氢谱分析确定了所合成多肽结构与目标分子的结构相符。得到 PPENK 水解的最佳反应条件: 反应时间为 12 h, 氢氧化钾溶液的浓度为 4 mol/L, 反应温度为 100 °C。采用表面改性的方法, 将合成的多肽结构固定到 PPENK 材料表面, 并通过三氟乙酸法, 制得具有阳离子表面的抗菌材料 PPENK-g-Poly₁⁺ 和 PPENK-g-Poly₂⁺。ATR-FTIR 及 XPS 测试结果显示, 多肽接枝前后的 PPENK 材料表面基团发生变化, 同时氮含量与碳含量的比值以及氧含量与碳含量的比值也有明显改变, 从而确定了表面多肽的成功固定。表面接触角及表面能测试结果显示, 经过多肽接枝的 PPENK 亲水能力增强。通过 MTT 法测试多肽接枝的 PPENK 材料的细胞毒性, 细胞相对增殖率均达到 80% 以上, 具有良好的生物安全性。抑菌实验结果显示, 多肽接枝的 PPENK 材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的都有较好的抑制作用, 抑制效率达 75% 以上。综合上述结果, 通过化学链接抗菌多肽可赋予 PPENK 抗菌功能, 对于拓宽其在生物医用材料领域的应用具有重要的理论意义和实际应用价值。

参考文献 References

- [1] 林潇, 葛隼, 吴水林, 等. 金属学报[J], 2017, 53(10): 1284-1302.
LIN X, GE J, WU S L, *et al.* Acta Metallurgica Sinica[J], 2017, 53(10): 1284-1302.
- [2] 任玲, 杨春光, 杨柯. 中国医疗设备[J], 2017, 32(1): 1-6.
REN L, YANG C G, YANG K. China Medical Devices[J], 2017, 32(1): 1-6.
- [3] 翁升鑫, 赵旭, 关岳峰, 等. 中国实用口腔科杂志[J], 2016, 9(1): 49-53.
WENG S X, ZHAO X, GUAN Y F, *et al.* Chinese Journal of Practical Stomatology[J], 2016, 9(1): 49-53.
- [4] 李娜, 韩冰, 张乾. 中国组织工程研究[J], 2015, 19(12):

- 1953–1957.
- LI N, HAN B, ZHANG Q. Chinese Journal of Tissue Engineering Research[J], 2015, 19(12): 1953–1957.
- [5] 王湛, 杨军, 李建军. 中国医科大学学报[J], 2014, 43(12): 1142–1144.
- WANG Z, YANG J, LI J J. Journal of China Medical University[J], 2014, 43(12): 1142–1144.
- [6] 李青, 全仁夫, 陈利红, 等. 中国组织工程研究[J], 2018, 22(14): 2157–2161.
- LI Q, QUAN R F, CHEN L H, *et al.* Chinese Journal of Tissue Engineering Research[J], 2018, 22(14): 2157–2161.
- [7] 张维, 刘军, 杨坤, 等. 2018(第三届)抗菌科学与技术论坛论文摘要集[C]. 北京: 全国卫生产业企业管理协会抗菌产业分会, 2018.
- ZHANG W, LIU J, YANG K, *et al.* 2018 (3rd) Antibacterial Science and Technology Forum[C]. Beijing: Chinese Industry Association for Antimicrobial Materials & Produces, 2018.
- [8] 王明晶, 刘程, 阎庆玲, 等. 功能材料[J], 2007, 38(2): 243–245.
- WANG M J, LIU C, YAN Q L, *et al.* Journal of Functional Materials[J], 2007, 38(2): 243–245.
- [9] 刘志勇, 王锦艳, 阎庆玲, 等. 高分子学报[J], 2006(7): 931–936.
- LIU Z Y, WANG J Y, YAN Q L, *et al.* Acta Polymerica Sinica[J], 2006(7): 931–936.
- [10] 孙一鸣, 赵鑫钰, 杜毅. 中国医学创新[J], 2017, 14(28): 145–148.
- SUN Y M, ZHAO X Y, DU Y. Medical Innovation of China[J], 2017, 14(28): 145–148.
- [11] 赵云山, 张西正, 郭勇. 国际生物医学工程杂志[J], 2002, 25(4): 169–173.
- ZHAO Y S, ZHANG X Z, GUO Y. International Journal of Biomedical Engineering[J], 2002, 25(4): 169–173.
- [12] 陈宇雄, 陈贤哲, 倪梦杉, 等. 中国组织工程研究[J], 2017, 21(18): 2828–2833.
- CHEN Y X, CHEN X Z, NI M S, *et al.* Chinese Journal of Tissue Engineering Research[J], 2017, 21(18): 2828–2833.
- [13] PÍCHA J, BUDĚŠÍNSKÝ M, MACHÁČKOVÁ K, *et al.* Journal of Peptide Science[J], 2017, 23(3): 202–214.
- [14] HABRAKEN G J M, PEETERS M, DIETZ C H J T, *et al.* Polymer Chemistry[J], 2010, 1(4): 514–524.
- [15] LIU J, LI Z Z, YANG X L, *et al.* Chemical Communications[J], 2015, 51(69): 13369–13372.
- [16] XI Y J, SONG T, TANG S Y, *et al.* Biomacromolecules[J], 2016, 17(12): 3922–3930.
- [17] SU X K, ZHOU X Y, TAN Z Z, *et al.* Biopolymers[J], 2017, 107(11): e23041.
- [18] GODOY-GALLARDO M, WANG Z J, SHEN Y, *et al.* ACS Applied Materials & Interfaces[J], 2015, 7(10): 5992–6001.
- [19] GODOY-GALLARDO M, MAS-MORUNO C, YU K, *et al.* Biomacromolecules[J], 2015, 16(2): 483–496.
- [20] LIU C D, LIU C, GAO Y, *et al.* Advanced Materials Interfaces[J], 2018, 5(13): 1800003.
- [21] GAO Q, YU M, SU Y J, *et al.* Acta Biomaterialia[J], 2017, 51: 112–124.

(编辑 王 瑶 吴 锐)