

Preparation of Antimicrobial Silk Hydrogels for Surgical Dressings*

Xilong Wu¹, Yiyun Shen², Shan Sun¹, Xiu Zhang¹, Shenzhou Lu^{1#}

¹National Engineering Laboratory for Modern Silk, College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou

²College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou

Email: #lushenzhou@suda.edu.cn

Received: Jun. 25th, 2012; revised: Jul. 5th, 2012; accepted: Jul. 12th, 2012

Abstract: Using quaternary ammonium salts (QAS) as initiating agents, silk fibroin aqueous solutions were induced to gel rapidly. The structure, zeta-potential change and thermal stability properties of QAS-induced silk gel were characterized by means of X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (IR), scanning electron microscopy (SEM), zeta-potential measurements and differential thermal analysis (DTA). The results show that QAS-induced silk gelation is accompanied by the formation of β -sheets and less negative zeta-potential values. With the observation of SEM, the internal morphology of gel exhibited a porous three-dimensional network structure. *In vitro* degradation and DTA analysis revealed that QAS-induced fibroin gel was not quite stable and disintegrated more easily in the enzyme solution. Also, QAS is amorphous or metastable crystal state in silk gel and thus easy to release and diffuse. The antibacterial test *in vitro* suggested that silk-QAS gel showed distinctly antibacterial activities against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *In situ* antimicrobial silk hydrogel is expected to be used for a surgical dressing.

Keywords: Silk Fibroin; Hydrogel; Quaternary Ammonium Salt; Antibacterial Materials; *In-Situ* Gelation

抗菌丝素蛋白水凝胶敷料的制备*

吴锡龙¹, 沈漪云², 孙 姗¹, 张 秀¹, 卢神州^{1#}

¹苏州大学纺织与服装工程学院, 现代丝绸国家工程实验室, 苏州

²苏州大学医学部药学院, 苏州

Email: #lushenzhou@suda.edu.cn

收稿日期: 2012年6月25日; 修回日期: 2012年7月5日; 录用日期: 2012年7月12日

摘 要: 季铵盐类抗菌剂作为凝胶促进剂, 诱导丝素蛋白水溶液快速原位凝胶化从而制备抗菌性丝素水凝胶敷料。利用 X 射线衍射、红外光谱、扫描电镜、zeta 电位分析、差热分析等手段对所制丝素水凝胶的结构、zeta 电位、热稳定、降解性及其抗菌性能进行了表征。研究表明, 季铵盐会引起丝素颗粒负电位值下降, 由此促发形成的丝素水凝胶为 β -折叠片层结构, 凝胶内部形貌为多孔的三维网状结构, 且对革兰氏阳性菌和阴性菌都有很明显的抗菌效果。同时由体外降解、差热分析结果可知, 季铵盐引发丝素蛋白溶液快速形成水凝胶, 蛋白酶可以在体外降解水凝胶。季铵盐在水凝胶中主要以无定形或亚稳态晶体状态存在, 容易扩散释放, 达到较好的抗菌效果。抗菌性原位丝素蛋白水凝胶预计可以用于外科伤口敷料。

关键词: 丝素蛋白; 水凝胶; 季铵盐; 抗菌材料; 原位凝胶化

*资助信息: 江苏省高校自然科学基金项目(10KJB540002); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目。

#通讯作者。

1. 引言

水凝胶是一种三维的交联网孔结构并具有超过90%的水含量^[1]，因其良好的生物相容性在临床医学领域具有广泛的应用，可作为隐形眼镜，生物传感器薄膜，人工皮肤，药物释放载体等^[1,2]。其中，作为外科伤口敷料，水凝胶因其自身结构特性而具有独特的优势：能允许气体交换、吸收伤口多余渗液并保持创面的湿润、止痛和减少炎症、更换方便、能控制药物缓慢释放以使伤口局部达到适宜的药物浓度等^[3-5]。而蚕丝是一种具有优良生物相容性的天然高分子材料，作为外科手术缝合线已经使用了近百年，对机体无过敏或免疫反应^[6]。然而，水凝胶类敷料对于细菌的隔离作用不强，会选择性允许革兰氏阴性菌生长^[7]。对于皮肤表层伤口、烧伤、软组织挫伤的创面等外科伤口而言，细菌在伤口处的生长繁殖会加重伤口感染、疼痛，从而阻碍伤口的痊愈。因此开发具有一定抗菌效果的水凝胶材料可以弥补这个缺点，对于拓宽丝素水凝胶的临床应用也具有极为重要的意义。季铵盐类抗菌剂是一类研究较多的阳离子活性杀菌剂，广泛应用于外科手术和医疗器械的消毒，如新洁尔灭等，其主要是通过吸附于细菌表面，穿透细胞壁并对其有裂解作用，导致菌体团聚和分裂从而达到较好的杀菌效果^[8,9]。本文采用丝素蛋白作为水凝胶基质材料，以季铵盐类抗菌剂作为凝胶促进剂，促使丝素蛋白溶液快速原位凝胶化，同时改善丝素凝胶的抗菌性能，利用扫描电镜、X射线衍射、红外光谱、zeta电位测试和差热分析(DTA)等手段对凝胶结构、热学性能及其体外降解性能进行了研究。

2. 材料与方法

2.1. 材料制备

将家蚕生丝在0.02 M Na₂CO₃中煮沸30 min并用去离子水漂洗以除去丝胶蛋白，然后将脱胶丝溶解于9.3 M LiBr水溶液中，并将其置于截留分子量为8~10 kD的透析袋中透析三天，经离心过滤得到4.0 wt%浓度的丝素溶液。

将三种常见的季铵盐类(QAS)抗菌剂十二烷基二甲基乙基溴化铵(EDDAB)、洁尔灭(BC)、杜尔芬(DB)配制成10 wt%的水溶液，再分别以10/90、5/95、1/99

的比例与丝素溶液充分混合均匀，室温下迅速形成一系列具有不同季铵盐浓度的丝素凝胶。用打孔模具将其制成一定尺寸的样品，用作体外降解和抗菌测试，并分别以纯丝素凝胶作为对照。

2.2. 凝胶结构表征

将按上述方法制备的其中三种季铵盐/丝素(5/95)凝胶样品、纯丝素凝胶和丝素溶液分别冷冻干燥，并研磨成微小的粉末颗粒，用80目筛子筛选出的微粒用于X射线衍射(XRD)测试，采用铜靶，超能探测计数器记录 $2\theta = 5^\circ - 45^\circ$ 之间的衍射强度曲线。红外吸收光谱(FTIR)测定采用KBr压片法，测试400~4000 cm⁻¹的吸光度。

将丝素水凝胶放入液氮中，速冻固定，真空干燥，扫描电镜观察凝胶的截面形貌。

2.3. Zeta 电位变化

将新鲜丝素溶液分别以100/0、95/5、90/10、85/15、80/20的比例与10%的EDDAB水溶液共混，并在液体快速混合器上快速涡旋混合充分，立即吸取1 ml置于样品池中，在常温下测其zeta电位值。每个样品各进行五次测试，去除两个较大偏差值，取中间值的平均值为最终的测试结果。

2.4. 体外模拟降解

用模具制备尺寸为 5 ± 2 mm(直径) × 5 mm(高)的丝素/EDDAB(95/5)凝胶块并将其分别浸入含5 U/ml蛋白酶X IV的PBS溶液(浴比为1/10)、PBS和纯水中，以纯丝素凝胶作为对照样品。所有试样放置于37℃的恒温培养箱中降解，每24 h换液一次。在特定时间点6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h时，分别取出相应样品、擦干、称重、计算降解重量剩余率。每个样品测定3个平行样，取平均值。

2.5. 差热分析

利用差热分析法(DTA)研究EDDAB分布在丝素凝胶中的晶体状态。分别取纯EDDAB、丝素/EDDAB(95/5)凝胶冻干样品、纯丝素冻干凝胶和EDDAB的物理混合物(EDDAB成分重量占5%)各约5 mg，在35℃~400℃范围内，以10℃/min的升温速率加热，在氮气流下进行DTA分析。

2.6. 抗菌性能测试

测试方法参照抗菌性能评价标准(GB/T 20944.1-2007), 采用琼脂平皿扩散法并加以改进。将培养好的两种试验菌液(大肠杆菌和金黄色葡萄球菌)以 2×10^8 CFU/ml 的菌浓度用涂布方式接种到琼脂培养基上, 然后将尺寸为 10 ± 2 mm(直径) \times 5 mm(高)的凝胶小块分别均匀地按压在琼脂培养基上, 立即放入 37°C 的恒温培养箱中培养 24 h, 测定抑菌带宽度并用显微镜观察试样下面与琼脂接触区域的细菌繁殖情况。为便于观察比较, 对于相同种类并含不同浓度季铵盐的丝素凝胶试样及其对照样置于同一个培养皿中, 并相间 90°左右放置。

3. 结果与讨论

3.1. 季铵盐引发丝素结构变化

由三种季铵盐引发的丝素结构变化如图 1 所示。

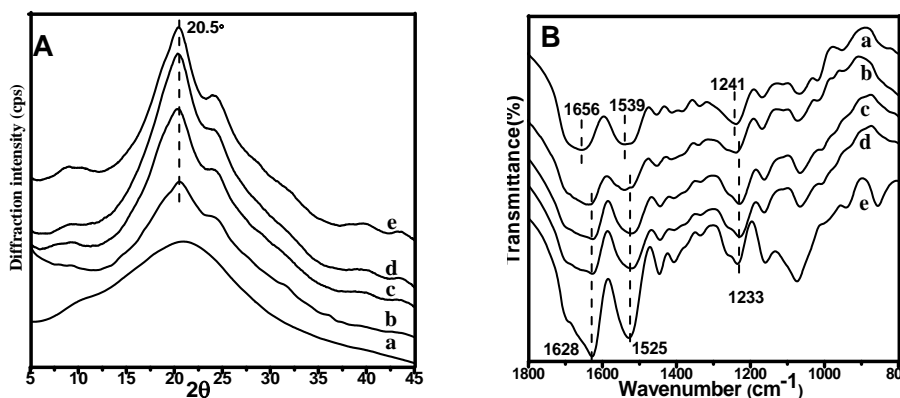


Figure 1. WAXD curves (A) and FTIR data (B) collected from (a) Silk solution; (b) Pure silk gel and QAS-induced silk gels; (c) Silk-DB gel; (d) Silk-BC gel; (e) Silk-EDDAB gel. All the concentrations of QAS in silk gels are 5 wt%, the concentration of fibroin was 4 wt%

图 1. 丝素/季铵盐水凝胶的结构, X-射线衍射曲线(A)和红外光谱图(B): (a) 纯丝素溶液; (b) 纯丝素凝胶; (c) 丝素-杜灭芬凝胶; (d) 丝素-洁尔灭凝胶和; (e) 丝素-EDDAB 凝胶(季铵盐占总质量的 5%, 丝素蛋白浓度为 4 wt%)

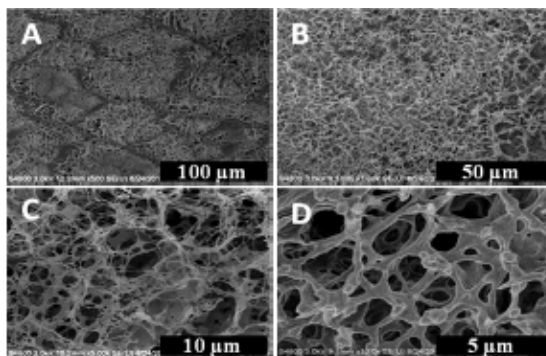


Figure 2. SEM images for freeze-dried silk hydrogels prepared with 5% EDDAB
图 2. 丝素/EDDAB(95/5)冻干凝胶的截面形貌

3.2. Zeta 电位的变化

利用 zeta 电位分析仪测得丝素溶液 zeta 电位值随 EDDAB 加入浓度的变化情况如图 3 所示, 纯丝素溶液 zeta 电位为 (-4.32 ± 0.08) mV ($n = 3$), 随着 EDDAB 浓度的提高, 季铵盐会抵消丝素蛋白颗粒所带的净负电荷, 混合溶液体系中 zeta 电位会变大(趋向于零), 表明整个丝素溶液体系向零电位趋近, 导致丝素蛋白大分子间易发生凝聚, 也为纤维状丝素蛋白分子链间的缔合创造条件, 这可能与丝素溶液的快速凝胶化有一定关系。

3.3. 凝胶的体外降解

季铵盐(EDDAB)引发的丝素凝胶样品在水、PBS(pH = 7.4)、蛋白酶 XIV 液中降解 3 天(如图 4(A)), 酶液中前 12 h 降解较快, 12 h 时降解剩余至 60%, 而后降解速率明显减缓, 36 h 时达 50%左右, 最终 72 h 内降解剩余 38.6%; 而在 PBS 和纯水中也有一定程度的降解, PBS 中前 36 h 内降解较缓, 此后降解速度加快, 在 72 h 内降解剩余率为 60.3%, 在纯水中最终降

解剩余率为 71%。而纯丝素凝胶降解 7 天(如图 4(B)), 在 PBS 和纯水中都未有显著的降解, 而在酶液中剩余率还有 83%左右。可见, 由季铵盐(EDDAB)快速诱发形成的丝素凝胶与纯丝素凝胶相比, 更容易被降解, 而且降解的速度也比较快。

3.4. 凝胶的热学性能

由差热分析(图 5(a))可知, EDDAB 的熔化吸热峰在 194℃, 分解峰在 251℃左右。丝素凝胶与 EDDAB 物理混合物的吸热峰叠加, 丝素蛋白的分解峰出现在 290℃附近(图 5(b)), 同时 192℃、248℃附近出现 EDDAB 的熔化峰和分解峰, 说明物理混合状态下 EDDAB 的物理状态并没有发生改变。而丝素 - EDDAB 凝胶中没有出现 EDDAB 的吸收峰(图 5(c)), 只有丝素凝胶的吸热分解峰(296℃), 说明 EDDAB 在丝素凝胶中其结晶状态发生了变化, 可能以无定形或亚稳晶体状态存在, 与丝素蛋白分子间形成一定的相互作用力; 另外也可以看出丝素 - EDDAB 凝胶热稳定性比纯丝素凝胶高(分解峰 296℃ > 290℃)。

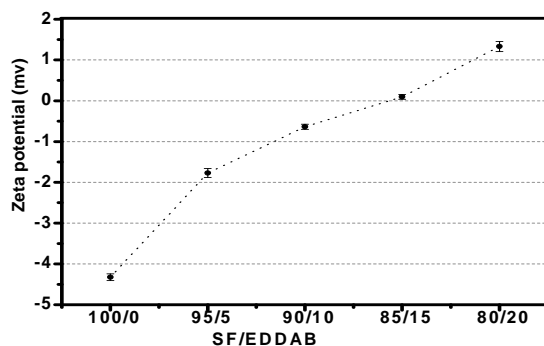


Figure 3. Zeta potentials for 4 wt% SF solutions with different concentrations of EDDAB ($n = 3$)

图 3. 不同浓度 EDDAB 对丝素溶液 zeta 电位的影响

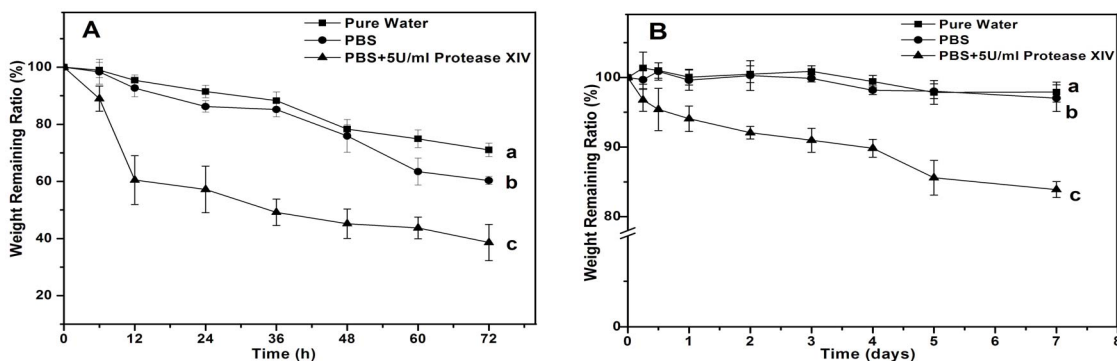


Figure 4. Degradation of silk/EDDAB (95/5) gel (A) and pure silk gel (B) *in vitro* (incubated at 37°C)

图 4. 丝素 - EDDAB 凝胶(95/5)(A)和纯丝素凝胶(B)的体外降解(37°C)

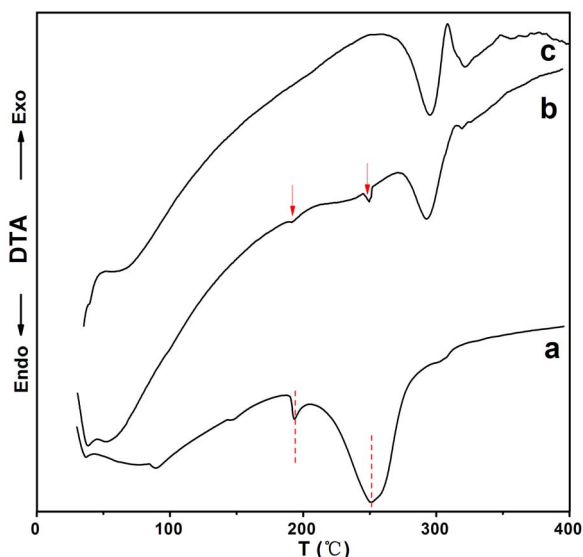


Figure 5. DTA thermograms of (a) Pure EDDAB; (b) Physical mixture of pure silk gel and EDDAB and (c) Silk-EDDAB gel
图 5. 差热分析(DTA): (a) 纯 EDDAB; (b) 冻干丝素凝胶和 EDDAB 的物理混合物; (c) 丝素 - EDDAB 凝胶

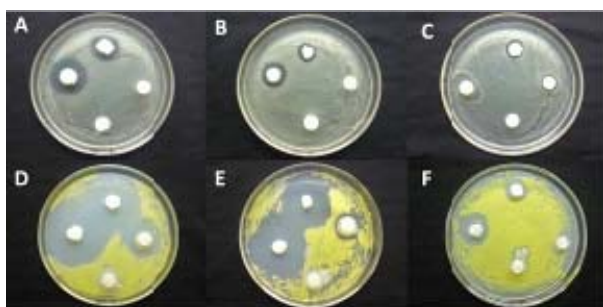


Figure 6. Inhibition zone assay on agarose plates with *E. coli* (upper panels) and *S. aureus* (down panels). The concentrations of quaternary ammonium salts in gels (A, D, Silk-EDDAB Gel; B, E, Silk-BC Gel; C, F, Silk-DB Gel) were 10%, 5%, 1%, 0%, respectively, from the left to a clockwise direction
图 6. 抑菌性能测试(上排: 大肠杆菌; 下排: 金黄色葡萄球菌)。凝胶中季铵盐浓度从左逆时针方向依次为 10%, 5%, 1%, 0% (A, D, EDDAB; B, E, 洁尔灭; C, F, 杜灭芬)

Table 1. Inhibition zone diameters of antimicrobial silk gels
表 1. 抗菌丝素凝胶抑菌圈直径

Gel	<i>E. coli</i> (mm)				<i>S. aureus</i> (mm)			
	10%	5%	1%	0%	10%	5%	1%	0%
EDDAB	11	7.5	0	0	18.5	14.5	11.5	0
BC	8	5.5	0	0	16.5	12.5	4	0
DB	7.5	4.5	0	0	8.5	6	1.9	0

3.5. 凝胶的抗菌性能

从抑菌照片(图 6)上看, 总体上对于两种细菌而言, 纯丝素凝胶均未产生抑菌圈。显微镜下观察样品

与琼脂接触区域的细菌繁殖情况, 菌落直径相比周围区域减少接近一半, 说明纯丝素凝胶本身抗菌效果有限; 而三种季铵盐 - 丝素凝胶与琼脂接触区域均无细菌繁殖, 说明均有较好的抗菌效果, 且随着季铵盐浓度的提高, 凝胶抑菌圈宽度也在逐渐增加, 说明在形成丝素凝胶的过程中三种季铵盐仍保持抑菌性能, 且随其浓度增大而不断地扩散释放, 使得抗菌效果愈加显著。

抑菌圈直径由表 1 可知, 在相同季铵盐浓度下, 混有 EDDAB 和洁尔灭的丝素凝胶对两种革兰氏细菌的抗菌效果都明显优于杜灭芬/丝素凝胶, 这可能与不同季铵盐的扩散释放程度和其自身抗菌性能差异有关。总体上, 三种丝素 - 季铵盐水凝胶对金黄色葡萄球菌的抗菌效果相对更好。特别地, 当各自浓度为 1% 时, 对于大肠杆菌均未产生明显的抑菌带, 而对于金黄色葡萄球菌抑菌效果则比较显著。

4. 结论

1) 季铵盐能够促发丝素凝胶原位成型, 且与自然形成的纯丝素凝胶相比更容易降解。

2) 季铵盐在丝素凝胶中是以无定形或亚稳态晶型存在, 较容易地向外扩散释放, 季铵盐 - 丝素凝胶对革兰氏阳性菌和阴性菌都有很明显的抗菌效果。

参考文献 (References)

- [1] L. Yu, J. Ding. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(8): 1473-1481.
- [2] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, 50(1): 27-46.
- [3] M. Kokabi, M. Sirousazar and Z. Hassan. PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal*, 2007, 43(3): 773-781.
- [4] B. Balakrishnan, M. Mohanty, A. C. Fernandez, et al. Evaluation of the effect of incorporation of dibutyl cyclic adenosine monophosphate in an *in situ*-Forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*, 2006, 27(8): 1355-1361.
- [5] B. Balakrishnan, M. Mohanty, P. R. Umashankar, et al. Evaluation of an *in situ* forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*, 2005, 26(32): 6335-6342.
- [6] P. G. Chao, S. Yodmuang, X. Wang, et al. Silk hydrogel for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2010, 95(1): 84-90.
- [7] 朱圆, 曹伟新. 外科伤口敷料的选择[J]. 解放军护理杂志, 2005, 22(4): 56-58.
- [8] 卢滇楠, 周轩榕, 邢晓东等. 表面接枝季铵盐型聚合物的纤维素纤维——灭菌机理研究[J]. 高分子学报, 2004, 1: 107-113.
- [9] 周轩榕, 卢滇楠, 邵曼君等. 表面接枝季铵盐型高分子材料

抗菌丝素蛋白水凝胶敷料的制备

- 抗菌过程的特性研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(6): 1131-1135.
- [10] X. Chen, W. Li and T. Yu. Conformation transition of silk fibroin induced by blending chitosan. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 1997, 35(14): 2293-2296.
- [11] 周文, 陈新, 邵正中. 红外和拉曼光谱用于对丝蛋白构象的研究[J]. *化学进展*, 2006, 18(11): 1514-1522.