基于聚谷氨酸囊泡的抗菌水凝胶*

宋 涛 奚悦静 杜建忠**

(先进土木工程材料教育部重点实验室 同济大学材料科学与工程学院 上海 201804)

摘 要 通过开环聚合(ROP)合成了两亲嵌段共聚物聚己内酯-聚谷氨酸(PCL-*b*-PGA)，并将其自组装成囊泡，然后利用聚谷氨酸的羧基原位沉积纳米银颗粒，得到了抗菌囊泡. 最后，将抗菌囊泡与普朗尼克F127基体混合，制备了抗菌水凝胶. 实验结果表明抗菌囊泡对典型革兰氏阴性菌如大肠杆菌和典型革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌的MIC_{90}(抑制90%菌株生长的最低浓度)分别为10和20 μg mL^{-1}. 平板菌落计数法表明抗菌水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC_{50}(抑制50%菌株生长的最低浓度)为30 μg mL^{-1}，MIC_{90}为60 μg mL^{-1}. 外敷法抗菌实验也证明了水凝胶具有优异的抗菌效果，其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC_{50}为7.5 μg mL^{-1}，MBC(最小杀菌浓度)为30 μg mL^{-1}.

关键词 囊泡，聚氨基酸，抗菌，水凝胶，自组装

水凝胶可大量吸收水和生物组织液，常被用作医疗辅料[1~6]，如包载抗生素治疗细菌感染[7]. 当前，抗生素的滥用所引起的细菌耐药性问题日趋严峻，所产生的“超级细菌”已严重威胁人类健康，因此急需研发能高效抗菌且无耐药性的新型抗菌剂[8~10]. 纳米银可广谱抗菌且不易使细菌产生耐药性[11~17]，具有优异的抗菌效果. 另外，对传统抗生素而言，为了达到理想抗菌效果，通常需要频繁口服或者注射，易导致抗菌效果不佳或者治疗失败. 因此开发具有长效抗菌效果且无耐药性的生物医用材料如抗菌水凝胶具有重要意义.

聚氨基酸是氨基酸单体通过酰胺键连接而成的聚合物，在酶的作用下能降解成小分子氨基酸，被人体代谢和吸收，具有良好的生物相容性及可降解性，是重要的生物医用材料[18~21]. 另外，利用聚氨基酸和其它高分子链段形成的共聚物可克服单一材料的不足，实现更多的功能[22~24]，如功能化的药物载体等[25, 26]. 目前，采用*α*-氨基酸的*N*-羧基内酸酐(NCA)开环聚合，可合成不同种类的聚氨基酸以及氨基酸-非氨基酸共聚物. 该方法具有简便、高效及产率高等优点，且聚合物分子量及分子量分布可控[21, 27, 28]. 另外，聚合物囊泡在近年来受到了广泛关注[29~33]. 而基于聚氨基酸的囊泡由于具有降解性好、生物相容、易修饰等优点，有望应用于生物医药领域.

本文中，我们设计并合成了一种两亲嵌段共聚物聚己内酯-聚谷氨酸，通过自组装形成囊泡(见图1和2). 其中聚谷氨酸是亲水段，聚己内酯是疏水段. 由于谷氨酸带有羧基，其可以和银离子通过静电作用相互结合，然后利用硼氢化钠将银离子还原为纳米银颗粒，即可得到具有优异抗菌性能且无耐药性的载银囊泡[34]. 最后，将载银囊泡与普朗尼克F127水凝胶基体复合[35, 36]，制备了抗菌水凝胶，以实现长效抗菌效果.

1 实验部分

1.1 主要原料

L-谷氨酸-*γ*-苄酯(≥ 98%，上海瀚鸿科技股份有限公司)；*ε*-己内酯(≥ 99%)、*N*-(叔丁氧羰基)乙

* 聚氨基酸专辑；2017-08-17收稿，2017-09-13修稿；国家自然科学基金(基金号 21611130175，21374080，21674081)、上海市科委国际合作项目(项目号 15230724500)、上海千人计划(项目号 SH01068)和中央高校基本科研业务费(项目号 1500219107)资助.

** 通讯联系人，E-mail: jzdu@tongji.edu.cn

本文附有电子支持材料，与正文一并刊载在本刊网站http://www.gfzxb.org
doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2018.17229

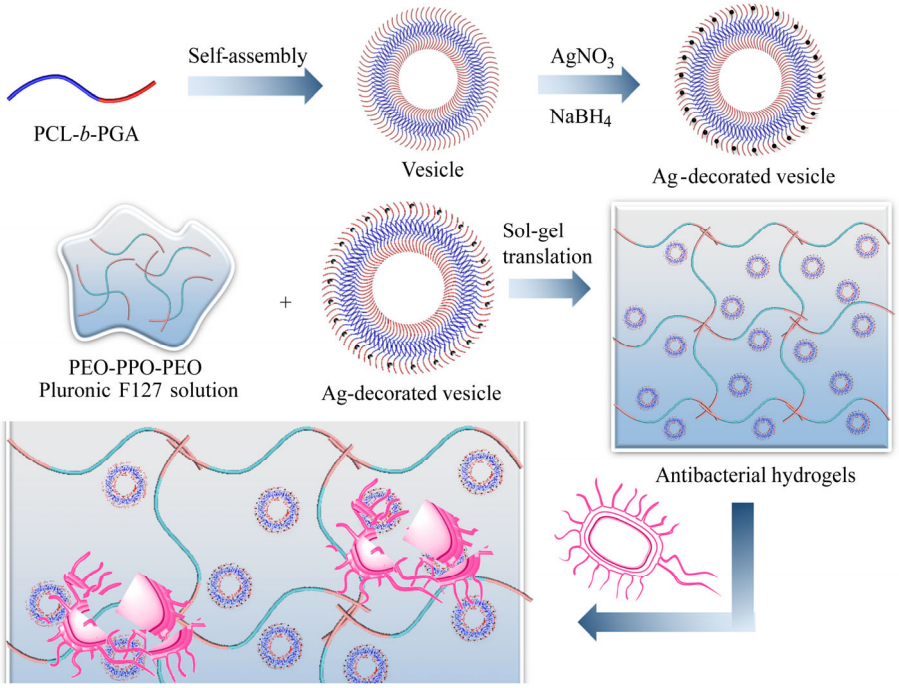

Fig. 1 Preparation of antibacterial hydrogels with Ag-decorated poly(glutamic acid)-based vesicles and Pluronic F127

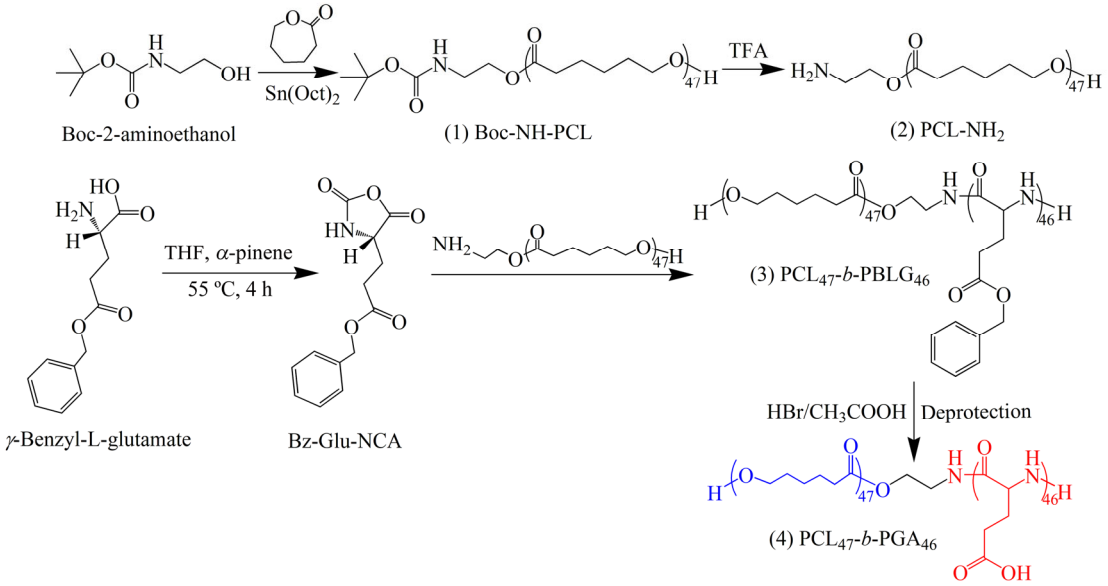

Fig. 2 Synthetic route of PCL-*b*-PGA diblock copolymer

醇胺(≥ 96%)、*α*-蒎烯(≥ 98%)、辛酸亚锡(≥ 95%)、三氟乙酸(≥ 99%)、三光气(≥ 99%)、*N*,*N*-二甲基酰胺(≥ 99%)、HBr/CH_3COOH (33%)、磷钨酸(≥ 99%)等购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；氢溴酸醋酸溶液(33%，百灵威科技有限公司)；氘代DMSO (99.8%)、氘代氯仿(99.8%)、脂肪酶(1000 ~ 2000 BAEE units/mg)和普朗尼克F127购于Sigma Aldrich公司；四氢呋喃、乙醚、二氯甲烷、甲醇、二甲基亚砜、甲苯、丙酮、无水乙醇等试剂购于国药集团化学试剂有限公司，分析纯. LB肉汤(99%)和LB琼脂(96%)购于青岛日水生物技术有限公司；大肠杆菌(ATCC35218)和金黄色葡萄球菌(ATCC29213)购于南京便诊生物科技有限公司.

1.2 表征

1.2.1 核磁共振氢谱

采用美国Brucker公司AV400 MHz的核磁共振仪测试核磁共振氢谱(^{1}H-NMR). 测试温度为

20 ºC，溶剂为DMSO-d_6和$CDCl_3$[37].

1.2.2　透射电子显微镜

透射电子显微镜(TEM)设备型号为JEOL JEM-2100F，加速电压200 kV，配以Gatan 894 Ultrascan 1k CCD照相机[38]. 制样时，先将囊泡溶液稀释到200 μg mL^{-1}，取4 μL滴加到铜网表面，在室温下自然晾干. 之后用1%中性磷钨酸溶液(PTA)染色1 min，室温下晾干.

1.2.3　原子力显微镜

原子力显微镜(AFM)设备型号为Seiko (SPA-300HV)，在敲击模式下测试样品，驱动频率为200 ~ 400 kHz. 制样时，先将囊泡溶液稀释到100 μg mL^{-1}，再将1滴溶液滴加到硅片表面，室温下自然晾干[39].

1.2.4　动态光散射

动态光散射(DLS)主要用于表征水溶液中聚合物囊泡的流体力学直径(D_h)及粒径分布，设备型号为ZETASIZER Nano series instrument (Malvern Instruments ZS 90). 散射角固定在90º. 利用Cumulant法处理实验得到的相关函数并通过斯托克斯-爱因斯坦方程计算流体力学直径.

1.3　PCL_{47}-*b*-PGA_{46}嵌段聚合物的合成

1.3.1　L-谷氨酸-*γ*-苄酯氨基酸环内酸酐Bz-Glu-NCA的合成

将5.00 g L-谷氨酸-*γ*-苄酯和14.33 g *α*-蒎烯加入到三颈瓶中，再加入25 mL四氢呋喃. 将2.50 g三光气溶解在10 mL四氢呋喃中，通过常压漏斗逐滴加入到三颈瓶中或直接将其导入到三颈瓶中，在55 ºC下反应4 h，回流冷凝，然后在正己烷中沉淀，抽滤后再将产物用四氢呋喃溶解，沉淀2次，旋蒸除去正己烷后，置于25 ºC恒温真空干燥箱中干燥48 h[40]. 产率为76%.

1.3.2　聚己内酯(PCL_{47}-NH-Boc)的合成

在圆底烧瓶中加入*ε*-己内酯(10.00 g, 87.61 mmol)和甲苯(100 mL)，140 ºC回流，用分水器收集蒸出液体约80 mL后，密封冷却，通氩气鼓泡30 min以除氧. 在氩气保护下加入辛酸亚锡(0.0190 g, 0.0442 mmol)、*N*-(叔丁氧羰基)乙醇胺(0.424 g, 2.63 mmol)，并于110 ºC反应48 h. 旋蒸除去甲苯，用二氯甲烷溶解，在甲醇中沉淀3次，得到白色粉末. 置于25 ºC真空干燥箱中干燥过夜，冷冻保存. 产率为73%.

1.3.3　PCL_{47}-NH_2合成

将PCL_{47}-NH-Boc样品(7.30 g)加入二氯甲烷(10 mL)中充分溶解，然后加10 mL三氟乙酸，室温下搅拌4 h，然后将产物逐滴加入到甲醇中充分搅拌，洗涤、沉淀、旋干，再将产物溶解在DMF中，用截留分子量为3500的透析袋在5%的碳酸氢钠水溶液透析48 h，然后冷冻干燥，得到白色固体产物，冷冻保存. 产率为70%.

1.3.4　PCL_{47}-*b*-$PBLG_{46}$的合成

将合成好的1.50 g谷氨酸NCA单体和0.600 g PCL_{47}-NH_2大分子引发剂加入DMF溶液中，抽真空状态下于40 ºC反应48 h，用旋转蒸发仪除去大部分DMF(体系呈黏稠状)，然后加大量水于反应烧瓶中洗涤8次，得到粗产物后将水旋蒸除去，在25 ºC恒温干燥24 h，然后冷冻保存. 产率为67%.

1.3.5　PCL_{47}-*b*-PGA_{46}嵌段聚合物的合成

将上一步得到的产物2.0 g加入圆底烧瓶中，然后加入15 mL 33% (体积)HBr的醋酸溶液，在室温下反应5 h后，将反应液浓缩，然后逐滴加入到300 mL乙醚中沉淀，洗涤3次，再将产物用旋蒸仪旋干，然后用DMF溶解并转移到透析袋中，用5%碳酸氢钠水溶液透析24 h后，冷冻干燥. 产率为54%.

1.4　聚合物自组装形成囊泡

将PCL_{47}-*b*-PGA_{46} (10 mg)加入到3 mL的DMF中，再加入10 μL三氟乙酸使其溶解，然后用蠕动泵在10 min内将6 mL水逐滴滴加到聚合物溶液中，搅拌2 h后，先用碳酸氢钠水溶液透析约12 h，再用去离子水透析约48 h，每3 h换1次透析液.

1.5　囊泡负载纳米银

取10 mL囊泡水溶液(0.562 mg mL^{-1})，在25 ºC条件下加入105 μL硝酸银水溶液(10 mg mL^{-1})，避光搅拌40 min后，加入60 μL 现配$NaBH_4$水溶液(10 mg mL^{-1})，避光条件下搅拌4 h. 然后透析24 h，每3 h换1次水.

1.6　体外酶降解实验

降解程度用动态光散射进行实时监测. 分别取500 μg mL^{-1}的纯聚合物囊泡溶液和500 μg mL^{-1}的载银囊泡溶液，然后再加入脂肪酶溶液，配成脂肪酶浓度为300 μg mL^{-1}，囊泡溶液为450 μg mL^{-1}

的混合溶液，将其放置于动态光散射样品池中进行测定(37 ºC)，整个降解过程放置于37 ºC摇床中进行，每隔一定的时间对其进行检测[27].

1.7 水凝胶的制备

将纳米银含量为63.2 μg mL^{-1}的载银囊泡溶液稀释为60，30，15，7.5 μg mL^{-1} 4组. 用移液枪分别取2.0 mL置于不同样品瓶中，然后将0.5 g普朗尼克F127加入到样品瓶中. 对照组中加2.0 mL水于样品瓶中，然后加入0.5 g普朗尼克固体. 在4 ºC低温恒温槽中搅拌约2 h，使普朗尼克固体完全溶解，置于4 ºC冰箱中保存.

1.8 平板菌落计数法表征载银囊泡和抗菌水凝胶的抗菌性能

平板菌落计数法是指将待测样品稀释适当倍数后，取一定量样品涂在固体培养基上. 经过培养，每个细菌形成一个菌落. 根据菌落个数及稀释倍数，可以计算出待测样品细菌量. 通过对比对照组与测试组，表征样品的抗菌性能[39, 41].

最低抑菌浓度(MIC)是表征抗菌活性大小的一个重要指标[42, 43]. 本文分别测试了上述载银囊泡样品和抗菌水凝胶对革兰氏阴性菌(大肠杆菌, *E. coli*, ATCC35218)和革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌, *S. aureus*, ATCC29213)的抗菌效果.

将LB肉汤固体(10 g)溶于500 mL去离子水中，120 ºC灭菌20 min待用. 取2支灭过菌的离心管加入10 mL LB肉汤，分别滴加1滴大肠杆菌、金黄色葡萄球菌细菌母液，置于37 ºC培养箱活化细菌8 ~ 12 h (*E. coli*，3 × 10^7 cfu mL^{-1}；*S. aureus*, 5 × 10^7 cfu mL^{-1}).

将载银囊泡和细菌悬浊液(*E. coli*, 3 × 10^4 cfu mL^{-1}；*S. aureus*, 5 × 10^4 cfu mL^{-1})混合，配成纳米银浓度为40，20, 10, 5, 2.5 μg mL^{-1}及空白对照组6组样品，37 ºC条件下培养 24 h，用梯度稀释法稀释各样品，分别在培养皿中加入10 mL LB固体培养基与100 μL不同稀释倍数的细菌液，混合均匀后静置. 待培养基凝固完全，倒扣培养皿, 48 h后观察菌落生长情况.

对于抗菌水凝胶样品，分别取不同纳米银浓度的水凝胶样品(60，30，15 μg mL^{-1})及空白对照组样品加入到5 mL样品瓶中，37 ºC下水凝胶从液态快速转变为凝胶状态. 在每个样品上滴加10 μL稀释的细菌悬浊液(*E. coli*，3 × 10^4 cfu mL^{-1}; *S. aureus*，5 × 10^4 cfu mL^{-1}). 37 ºC条件下培养2 h后用PBS洗涤水凝胶表面，并用梯度稀释法稀释细菌液，之后步骤与上述测量载银囊泡相同.

1.9 外敷法表征抗菌凝胶的抗菌性能

外敷法的基本操作与传统牛津杯法相同，但由于我们的抗菌水凝胶是固态的，并且其中的囊泡为高分子较难扩散，无法形成明显的抑菌圈来显示抗菌性，于是我们是将抗菌水凝胶与已接种细菌的固体琼脂培养基充分接触. 经过一段时间的培养，抗菌物质所接触部分的细菌生长受到抑制. 进而通过观察所接触部位的细菌菌落数来表征水凝胶抗菌性能，菌落数越少，抗菌性能越好[44, 45]. 这种外敷法根据产物的性质在传统牛津杯法的基础上加以拓展，既能定性又能定量地表达我们抗菌水凝胶的抗菌效果，具有科学性. 具体步骤如下：

将LB固体培养基灭菌后冷却至45 ºC，在培养皿中倒入10 mL，并加入100 μL稀释的细菌液(*E. coli*，3 × 10^4 cfu mL^{-1}；*S. aureus*，5 × 10^4 cfu mL^{-1})，摇匀固化. 用镊子夹取高温灭菌后的牛津杯(外径8.0 mm、内径6.0 mm、高10 mm)垂直放置在培养基表面，使其与培养基表面无缝接触. 在各个牛津杯中加入30，15，7.5 μg mL^{-1} 3组以及不含有载银囊泡的水凝胶至将牛津杯填满，在37 ºC条件下培养24 h，然后观察接触区域的细菌菌落数数目来判定抗菌性能，并且计算出抗菌水凝胶的MIC值.

2 结果与讨论

2.1 聚合物的合成与表征

首先利用叔丁基氧羰基保护的乙醇胺引发己内酯开环聚合合成聚己内酯，然后将叔丁基氧羰基保护的聚己内酯脱保护，再利用NCA开环聚合反应接上聚谷氨酸苄酯嵌段，最终脱保护得到聚己内酯-聚谷氨酸两嵌段聚合物. 利用^{1}H-NMR表征单体、聚合物的结构、聚合度等. 相关单体和中间产物的核磁共振氢谱图以及峰面积计算参见电子支持信息图S1 ~ S5.

2.2 载银前后聚合物囊泡的制备与表征

上述聚合物在DMF与水体积比1∶2的条件下自组装可得到囊泡，最低囊泡形成浓度CVC为5.27 μg mL^{-1}(见电子支持信息图S6)[27, 39]. 利用透

射电镜对聚合物囊泡的形貌进行观测，如图3(a)和3(b)所示. 可以看到空心球状囊泡结构，粒径约为270 nm. 其中图3(a)为囊泡被正染所得图像，图3(b)为囊泡被负染所得图像，图3(a)中清晰地展现了囊泡的膜结构. 动态光散射(DLS)研究表明，囊泡的Z均直径约207 nm，分散性为0.029，组装液照片和DLS结果如图4所示. 透射电镜所得囊泡粒径略大，这是在TEM制样过程中囊泡塌陷所致. 这种由于囊泡膜的柔软性和流动性导致的塌陷还被原子力显微镜(AFM)证实. 如图3(c)所示，图中标记部分的囊泡宽度为203 nm，高度值11 nm，其比值为18. 综合DLS、TEM和AFM结果，可证明囊泡的空心结构[27, 46].

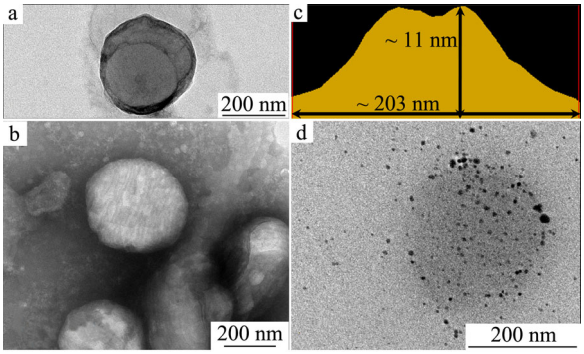

Fig. 3　(a, b) TEM images of polymer vesicles (pH = 7, stained by 1% phosphotungstic acid solution); (c) AFM image of a polymer vesicle; (d) TEM image of a polymer vesicle decorated with silver nanoparticles

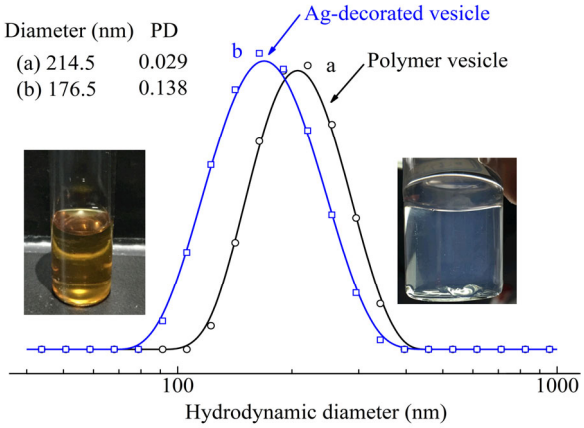

Fig. 4　DLS results of polymer vesicles before (a) and after (b) Ag decoration

通过在囊泡的晕层上原位沉积生成银纳米颗粒制备了载银囊泡. 由于PGA链段上的羧基可吸附Ag^+，加入硼氢化钠还原后，纳米银就在囊泡的晕层原位生成. 透射电镜结果如图3(d)所示，虽然囊泡没有染色，但仍可观察到囊泡轮廓. 因为纳米银粒子衬度高，当其负载在囊泡表面时，会使得囊泡本身衬度变低. 图3(d)中的黑色小颗粒即为Ag纳米粒子.

另外载银前后的聚合物囊泡的zeta电位值及pH值如表1所示. 聚合物囊泡在透析过程中采用了$NaHCO_3$水溶液，呈现弱碱性(pH = 8.45). 由于部分聚谷氨酸羧基在弱碱性条件下以羧酸根的形式存在，因此其zeta电位为–33.6 mV. 载银后的囊泡溶液pH降为5.57，zeta电位则降为–15.2 mV. 这是由于吸附了带正电的银离子，且硝酸银水溶液本身呈酸性，使得聚谷氨酸主要以羧基－COOH而非羧酸根－COO^-的形式存在，加上银离子与羧酸根的吸附作用(摩尔比约为1∶4)，因此载银囊泡仍具有一定的负电位，为–15.2 mV. 如果利用更多羧基以增加载银量，则纳米银容易发生团聚而呈黑色颗粒析出. 如果利用羧基量过少，则纳米银含量较低，载银囊泡的抗菌效果较差[34, 47]. 通过实验比较了不同浓度的载银效果和抗菌效果后，我们选择利用约1/4的羧基来沉积纳米银.

Table 1　pH and zeta potentials of vesicle solutions with and without Ag-decoration

	pH	ζ (mV)
Vesicles without Ag	8.45	–33.6
Ag-decorated vesicles	5.57	–15.2

2.3　体外酶促囊泡生物降解

聚谷氨酸-聚己内酯共聚物囊泡里的聚谷氨酸因含有肽键，在酶的作用下可降解为小分子[48]. 而且，聚谷氨酸的羧基可使共聚物溶胀比变大，重量保持率变小，从而加快囊泡的生物降解速度[49]. 聚己内酯是FDA批准的可生物降解的生物医用材料. 所以，我们制备的抗菌囊泡有望具有良好的可降解性. 为了验证这一结论，根据DLS的count rate值来评估囊泡降解效果[50]. 如图5所示，没有添加脂肪酶的对照组在经过48 h的观察后，没有降解迹象. 2个实验组中，在脂肪酶催化下，载银和不载银囊泡均快速降解，6 h内囊泡发生快速降解，6 h后，降解比较缓慢，这可能是因为聚合物和脂肪酶的浓度下降. 最终48 h后，2个实验组中均有大量囊泡发生降解，其中没有载银的囊泡降解程度更大一些，这可能是因为纳米银

可以与蛋白质的巯基相互作用进而抑制蛋白质活性，所以其一定程度上会使得脂肪酶活性降低[51].

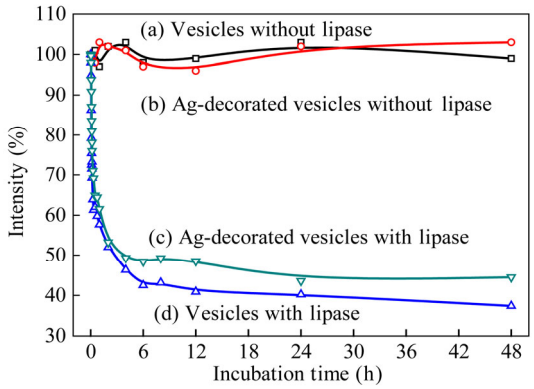

Fig. 5 Count rate variation of PCL-*b*-PGA copolymer vesicles during enzyme catalyzed degradation
The concentration of vesicles is 450 μg mL^{-1}; the concentration of lipase is 300 μg mL^{-1} (if any).

2.4 平板菌落计数法表征载银囊泡抗菌性

随着载银囊泡样品浓度升高，大肠杆菌、金黄色葡萄球菌菌落数均明显减少，表明载银囊泡对2种细菌均具有较好的杀灭抑制作用.

大肠杆菌的生长情况如图6所示. 样品浓度为5 μg mL^{-1}时，培养皿内菌落数基本和空白对照组一致. 当样品浓度为10 μg mL^{-1}时，大肠杆菌菌落数量相对于对照组的菌落数量减少90% 以上(表2). 据此判断载银囊泡对大肠杆菌的MIC$_{90}$为10 μg mL^{-1}. 当样品浓度为20 μg mL^{-1}时，涂板结果显示没有菌株，所以载银囊泡对大肠杆菌的MBC为20 μg mL^{-1}.

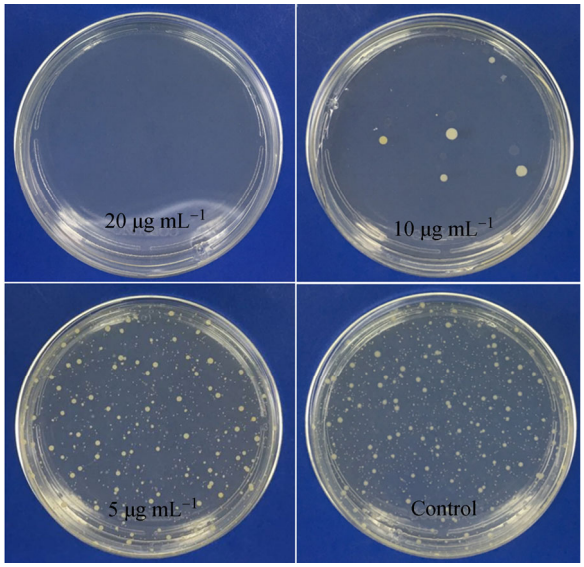

Fig. 6 Antibacterial effect of Ag-decorated vesicles against *E. coli* by spread plate method

金黄色葡萄球菌的生长情况如图7所示. 样品浓度为10 μg mL^{-1}时，菌落数比对照组有所减少，但减少数不及对照组的1/2. 当样品浓度为20 μg mL^{-1}时，金黄色葡萄球菌落数量相对于对照组的菌落数量减少90%以上(表2). 据此判断囊泡对金黄色葡萄球菌的MIC$_{90}$为20 μg mL^{-1}. 当样品浓度为40 μg mL^{-1}时，涂板结果显示没有菌株，所以载银囊泡对大肠杆菌的MBC为40 μg mL^{-1}.

Table 2 Antibacterial properties of Ag-decorated vesicles: antibacterial rate and lg*R*

Bacteria	Vesicle concentration (μg mL^{-1})	Antibacterial rate [a] (%)	lg*R* [b]
E. coli	10	98.75	1.9
	20	99.99	4
S. aureus	20	97.72	1.6
	40	99.99	4

[a] Antibacterial rate = 1 − *B*/*A*; [b] lg*R* = lg*A* − lg*B*
A is the number of surviving colonies in the control, and *B* is that in the sample in the presence of antibacterial Ag-decorated vesicles. *R* is a variable to present the number of killed colonies.

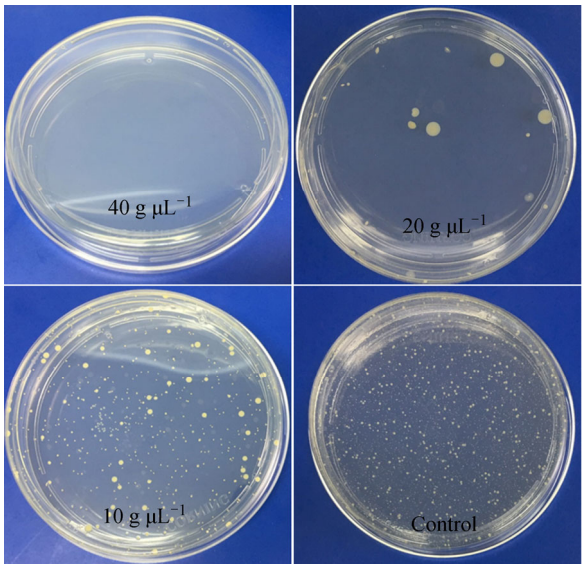

Fig. 7 Antibacterial effect of Ag-decorated vesicles against *S. aureus* by spread plate method

2.5 平板菌落计数法表征抗菌水凝胶抗菌性

纯普朗尼克F127水凝胶本身没有抗菌效果，但是当其和载银囊泡混合后，水凝胶就具有了抗

菌作用. 由于普朗尼克F127水凝胶是物理凝胶, 加入溶液后，溶液和水凝胶的表面接触，会逐层解体，因此测定其抗菌性能时不能将抗菌水凝胶和细菌悬浊液作用时间过久，本实验中作用时间为2 h (见电子支持信息图S7).

其中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长情况分别如图8和9所示. 抗菌水凝胶对二者的MIC_{50}均为30 μg mL^{-1}. 随着样品浓度升高，二者菌落数均明显减少，说明抗菌水凝胶对其均具有较好的杀灭抑制作用，尤其是当纳米银浓度为60 μg mL^{-1}时，二者的生长均受到较强的抑制. 虽然菌水凝胶对二者的MIC_{90}均为60 μg mL^{-1}，但是相对于相同浓然抗度的载银囊泡来说，抗菌水凝胶的抗菌效果没有抗菌囊泡好，这是因为水凝胶和细菌悬浊液接触时只有表面进行接触，而载银囊泡可以和细菌悬浊液均匀混合而抗菌，2种不同的接触方式决定其抗菌性能上有所差别. 在实验方法上，载银囊泡和细菌作用时间只有2 h, 这也使得抗菌水凝胶的MIC_{90}值高于载银囊泡.

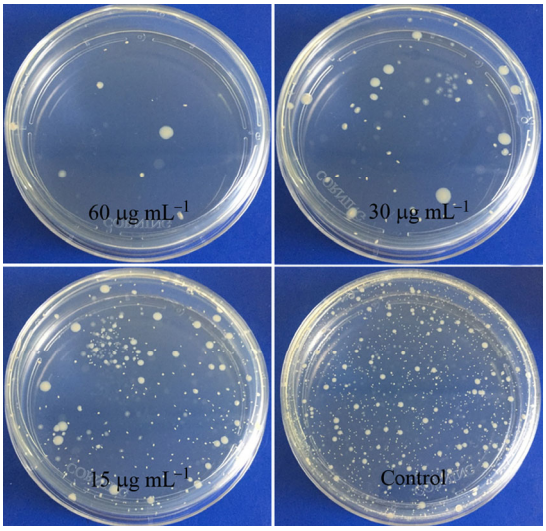

Fig. 8　Antibacterial effect of hydrogels containing different amounts of Ag against *E. coli* by spread plate method

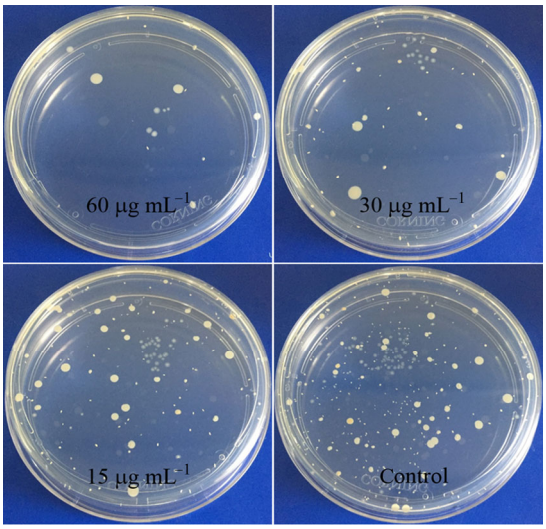

Fig. 9　Antibacterial effect of hydrogels containing different amounts of Ag against *S. aureus* by spread plate method

2.6　外敷法抗菌实验

平板菌落计数法测定了当水凝胶和细菌短时间作用后，细菌受抑制的情况. 外敷法则是将水凝胶长时间作用在细菌表面，再观察其对细菌生长的抑制情况. 水凝胶中的载银囊泡主要由高分子构成，与传统抗菌小分子有所区别，无法有效扩散至四周形成抑菌圈并依据抑菌圈大小来评价抗菌效果。但是，牛津杯区域内的抗菌水凝胶对细菌有抑制作用，依据该区域内细菌菌落生长情况，既可定性评价其抗菌效果，又可通过数菌落的方法确定其MIC值。外敷法对大肠杆菌的抑制效果如图10所示，其中a皿是纯普朗尼克F127水凝胶外敷在培养基表面24 h后的图片，红色圆圈内即为水凝胶外敷的部位.

从图10中可以看出，纯普朗尼克F127水凝胶并无抗菌效果，其牛津杯内大肠杆菌的生长情况

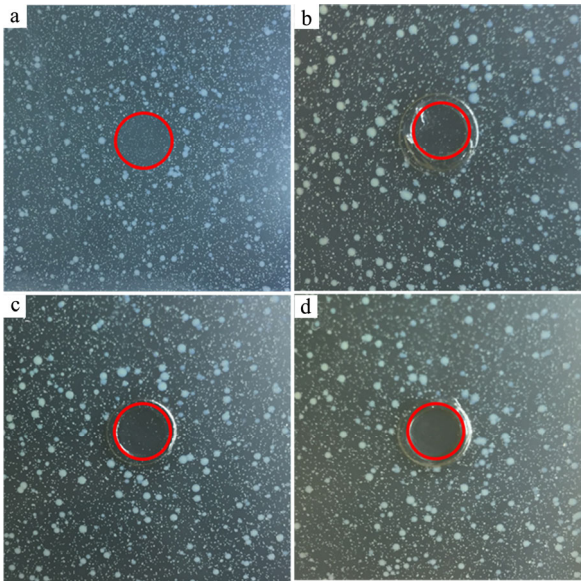

Fig. 10　Antibacterial effect of hydrogels with different amounts of Ag against *E. coli* by oxford cup method
(a) Pure Pluronic F127 hydrogels; (b – d) Antibacterial hydrogels whose concentrations of nano-silver are 7.5 μg mL^{-1} (b), 15 μg mL^{-1} (c) and 30 μg mL^{-1} (d). The circle shows the position of the oxford cup.

和圈外基本一致，并没有受到抑制. b ~ d皿分别是纳米银浓度从7.5，15，30 μg mL^{-1}的抗菌水凝胶外敷于大肠杆菌培养基表面的图片，从图中可以明显看出，随着银含量的增加，抗菌水凝胶作用部位的细菌菌落数明显减少，到30 μg mL^{-1}时，没有大肠杆菌菌落生长，所以抗菌水凝胶对大肠杆菌的MIC$_{50}$为7.5 μg mL^{-1}，MBC为30 μg mL^{-1}.

水凝胶外敷法对金黄色葡萄球菌的抑制效果如图11所示. 其中a皿是纯水凝胶外敷在培养基表面24 h后的图片，红色圆圈内即为水凝胶外敷的部位. 从图11中可以看出，对于金黄色葡萄球菌，纯普朗尼克F127水凝胶也无抗菌效果. b ~ d皿分别是纳米银浓度从7.5，15，30 μg mL^{-1}的抗菌水凝胶外敷于金黄色瓶葡萄球菌培养基表面的图片，其作用效果和作用规律与大肠杆菌基本一致. 随着银含量的增加，细菌菌落数明显减少，到30 μg mL^{-1}时，没有金黄色葡萄球菌生长. 因此抗菌水凝胶对金黄色葡萄球菌的MIC$_{50}$为7.5 μg mL^{-1}，MBC为30 μg mL^{-1}.

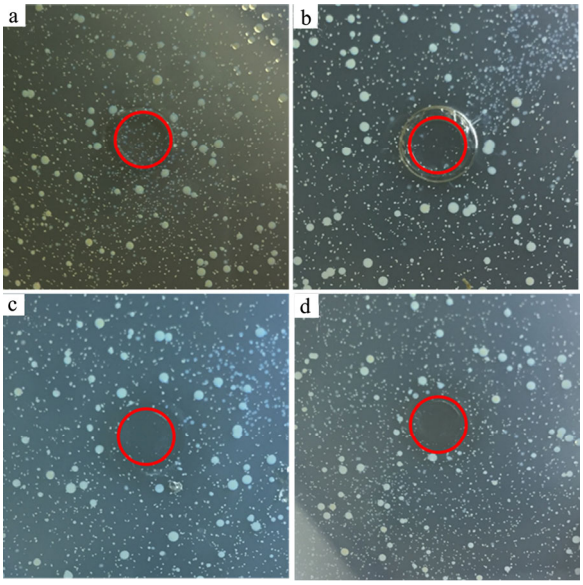

Fig. 11 Antibacterial effect of hydrogels with different amount of Ag against *S. aureus* by oxford cup method
(a) Pure Pluronic F127 hydrogels; (b – d) Antibacterial hydrogels whose concentrations of nano-silver are 7.5 μg mL^{-1} (b), 15 μg mL^{-1} (c) and 30 μg mL^{-1} (d). The circle shows the position of the oxford cup.

3 结论

本文通过将载纳米银的基于聚谷氨酸的聚合物囊泡与普朗尼克F127凝胶基体复合，制备了一种抗菌水凝胶，通过^{1}H-NMR, DLS, TEM, AFM等进行了表征，并通过多种方法测试了抗菌性能. 载银囊泡对大肠杆菌的MIC$_{90}$为10 μg mL^{-1}，对金黄色葡萄球菌的MIC$_{90}$为20 μg mL^{-1}. 平板菌落计数法抗菌实验表明所制备的抗菌水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC$_{50}$为30 μg mL^{-1}，MIC$_{90}$为60 μg mL^{-1}. 外敷法抗菌实验同样证明了所制备水凝胶优异的抗菌效果，其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC$_{50}$为7.5 μg mL^{-1}，MBC为30 μg mL^{-1}. 这种复合了聚合物囊泡的抗菌水凝胶有望在抗菌、药物缓释等领域得到应用.

REFERENCES

1 Yu L, Ding J D. Chem Soc Rev, 2008, 37: 1473 – 1481
2 Kuen Y L, Mooney D J. Chem Rev, 2001, 101: 1869 – 1879
3 Peppas N A, Huang Y, Torreslugo M, And J H W, Zhang J. Annu Rev Biomed Eng, 2000, 2: 9 – 29
4 Chen L, Li X Q, Cao L P, Li X L, Meng J R, Dong J, Yu L, Ding J D. Chinese J Polym Sci, 2016, 34: 147 – 163
5 Huang Q T, Zou Y J, Arno M C, Chen S, Wang T, Gao J Y, Dove A P, Du J Z. Chem Soc Rev, 2017, 46: 6255 – 6275
6 Shi Jiezhong(史杰中), Jia Haoyang(贾昊旸), Liu Dongsheng(刘冬生). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2017, (1): 135 – 142
7 Lane D D, Fessler A K, Goo S, Williams D L, Stewart R J. Acta Biomater, 2017, 50: 484 – 492
8 Chen J, Wang F Y K, Liu Q M, Du J Z. Chem Commun, 2014, 50: 14482 – 14493
9 Liu R H, Chen X Y, Chakraborty S, Lemke J J, Hayouka Z, Chow C, Welch R, Weisblum B, Masters K S, Gellman S H. J Am Chem Soc, 2014, 136: 4410 – 4418
10 Xu D F, Cai J, Zhang L N. Chinese J Polym Sci, 2016, 34: 1281 – 1289
11 Feng Q L, Wu J, Chen G Q, Cui F Z, Kim T N, Kim J O. J Biomed Mater Res, 2000, 52: 662 – 668
12 Marambio-Jones C, Hoek E M V. J Nanopart Res, 2010, 12: 1531 – 1551

13 Varaprasad K, Mohan Y M, Vimala K, Raju K M. J Appl Polym Sci, 2011, 121: 784 – 796
14 Prabhu S, Poulose E K. Int Nano Lett, 2012, 2: 32 – 42
15 Ghasemzadeh H, Sheikhahmadi M, Nasrollah F. Chinese J Polym Sci, 2016, 34: 949 – 964
16 Khalandi B, Asadi N, Milani M, Davaran S, Abadi A J N, Abasi E, Akbarzadeh A. Drug Res, 2017, 67: 70 – 76
17 Huang A B, Xu S J, Wei G Y, Ma L, Gao C Y. Chinese J Polym Sci, 2009, 27: 865 – 871
18 Rypacek F. Polym Degrad Stab, 1998, 59: 345 – 351
19 Shih I L, Van Y T, Shen M H. Mini-Rev Med Chem, 2004, 4: 179 – 188
20 Li J H, Wang S S, Zhang D B, Ni X X, Zhang Q Q. Chinese J Polym Sci, 2016, 34: 805 – 819
21 Wang Mingzhi(王明智), Du Jianzhong(杜建忠). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2014, (9): 1183 – 1194
22 Lin Z G, Hua W Q, Ming S X, Zhu W T, Ping Z L, Ling G. Polym Mater: Sci Eng, 2006, 22: 10 – 14
23 Tang J H, Zhou J P, Chen F H. J China Pharm Univ, 2011, 42: 284 – 288
24 Sheng Li(盛力), Chen Hong(陈红), Fu Wenxin(符文鑫), Li Zhibo(李志波). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2015, (8): 982 – 988
25 Zhang Jie(张洁), Wu Guolin(伍国琳), Wang Zheng(王铮), Xu Xu(徐旭), Wang Yinong(王亦农), Ma Jianbiao(马建标). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2009, (12): 1179 – 1185
26 Wu L, Pang T, Guan Y B. Chinese J Polym Sci, 2016, 34: 523 – 531
27 Wang M Z, Zhou C C, Chen J, Xiao Y F, Du J Z. Bioconjugate Chem, 2015, 26: 725 – 734
28 Fu X H, Ma Y N, Sun J, Li Z B. Chinese J Polym Sci, 2016, 34: 1436 – 1447
29 Hou Z L, Huang T, Cai C Y, Resheed T, Yu C Y, Zhou Y F, Yan D Y. Chinese J Polym Sci, 2017, 35: 602 – 610
30 Huang T, Hou Z L, Xu Q S, Huang L, Li C L, Zhou Y F. Langmuir, 2017, 33: 340 – 346
31 Zhu Y Q, Yang B, Chen S, Du J Z. Prog Polym Sci, 2017, 64: 1 – 22
32 Li Y M, Liu G H, Wang X R, Hu J M, Liu S Y. Angew Chem Int Ed, 2016, 55: 1760 – 1764
33 Liu Q M, Song L W, Chen S, Gao J Y, Zhao P Y, Du J Z. Biomaterials, 2017, 114: 23 – 33
34 Lu H, Yu L, Liu Q M, Du J Z. Polym Chem, 2013, 4: 3448 – 3452
35 Shachaf Y, Gonenwadmany M, Seliktar D. Biomaterials, 2010, 31: 2836 – 2847
36 Nie S F, Hsiao W W, Pan W S, Yang Z J. Int J Nanomed, 2011, 6: 151 – 166
37 Yuan Kang(袁康), Zhou Xue(周雪), Du Jianzhong(杜建忠). Acta Physico-Chimica Sinica(物理化学学报), 2016, (4): 656 – 660
38 Xiao Y F, Sun H, Du J Z. J Am Chem Soc, 2017, 139: 7640 – 7647
39 Gao J Y, Wang M Z, Wang F Y K, Du J Z. Biomacromolecules, 2016, 17: 2080 – 2086
40 Murakami M, Cabral H, Matsumoto Y, Wu S, Kano M R, Yamori T, Nishiyama N, Kataoka K. Sci Transl Med, 2011, 3: 64ra62
41 Zhu H S, Geng Q R, Chen W Q, Zhu Y Q, Chen J, Du J Z. J Mater Chem B, 2013, 1: 5496 – 5504
42 Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E. Nat Protoc, 2008, 3: 163 – 175
43 Zhou C C, Yuan Y, Zhou P Y, Wang F Y K, Hong Y X, Wang N S, Xu S G, Du J Z. Biomacromolecules, 2017: DOI:10.1021/acs.biomac.1027b01209
44 Tan D F, Qiang C K, Ke C R, Yang Z F. Strait Pharm J, 2005, 17: 128 – 132
45 Wei W, Li S Y, Wang M J, Ma C Y, Hao M M, Song X M. Food Sci Technol, 2013, 38: 22 – 26
46 Zhou C C, Wang M Z, Zou K D, Chen J, Zhu Y Q, Du J Z. ACS Macro Lett, 2013, 2: 1021 – 1025
47 Zou K D, Liu Q M, Chen J, Du J Z. Polym Chem, 2014, 5: 405 – 411
48 Pan S R, Wang Q M, Wu Y. J Funct Biomater, 2000, 31: 215 – 218
49 Pan S R, Shi F, Wang N F, Zhong W F, Wu Y, Yuan Q F. Chin J Biomed Eng, 1993, 12: 162 – 167
50 Xi Y J, Song T, Tang S Y, Wang N S, Du J Z. Biomacromolecules, 2016, 17: 3922 – 3930
51 Louie A Y, Meade T J. Chem Rev, 1999, 99: 2711 – 2734

Antibacterial Hydrogels Incoporated with Poly(glutamic acid)-based Vesicles

Tao Song, Yue-jing Xi, Jian-zhong Du*
(*Key Laboratory of Advanced Civil Engineering Materials of the Ministry of Education, School of Material Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 201804*)

Abstract We designed a hydrogel with durable and excellent antibacterial activity. Amphiphilic block copolymer, polycaprolactone-block-poly(glutamic acid) (PCL-*b*-PGA), was first synthesized by ring-opening polymerization with amine-terminated polycaprolactone (PCL-NH_2) as the macro-initiator and Bz-Glu-NCA as the monomer. This copolymer self-assembled into vesicles in solvent mixture of DMF/water with a critical vesiculation concentration of 5.27 μg mL^{-1}. Antibacterial Ag-decorated vesicles were then prepared by *in situ* deposition of silver nanoparticles in PGA coronas of the vesicles as a result of the electrostatic interaction between carboxyl groups and Ag^+. ^{1}H-NMR analysis revealed the composition of PCL_{47}-*b*-PGA_{46} block copolymer. Dynamic light scattering (DLS) study revealed an intensity-averaged diameter of 215 nm for the vesicles with a polydispersity of 0.029. Transmission electron microscopy (TEM) confirmed a hollow structure of the vesicles with a number-averaged diameter of 270 nm, and the presence of sliver nanoparticles on the vesicles. Atomic force microscopy (AFM) revealed the collapsed surface morphology of vesicles with a width to height ratio of 18, confirming further the hollow structure of the vesicles. Meanwhile, Ag-decorated vesicles were incoporated into Pluronic F127 hydrogels to afford antibacterial hydrogels, showing good degradability at different pH. MIC_{90} (minimum concentration of inhibiting 90% of bacterium) of the antibacterial vesicles was 10 μg mL^{-1} against Gram-negative bacterium *E. coli*, and it was 20 μg mL^{-1} against Gram-positive bacterium *S. aureus*, and measured by spread plate method, which afford the hydrogels excellent antibacterial property. Oxford cup tests confirmed that MIC_{50} of the antibacterial hydrogel against both *E. coli* and *S. aureus* is 7.5 μg mL^{-1} and MBC (minimum bactericidal concentration) against both of them is 30 μg mL^{-1}. The *in vitro* degradation tests confirmed that the vesicle was degraded in the presence of lipase. Overall, we provide a new method for preparation of antibacterial hydrogels, which may have promising biomedical applications requiring a long-acting antibacterial therapy such as inflammation triggered by bacteria infection, wound healing after surgery and sterilization for the implant devices, *etc*.

Keywords Vesicles, Poly(amino acids), Antibacterial property, Hydrogels, Self-assembly

* Corresponding author: Jian-zhong Du, E-mail: jzdu@tongji.edu.cn