

· 医药生物技术 ·

负载噬菌体内溶素 Lys84 水凝胶的制备及性能表征

李晓妍, 林洪, 王静雪*

中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266000

李晓妍, 林洪, 王静雪. 负载噬菌体内溶素 Lys84 水凝胶的制备及性能表征[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3876-3886.

LI Xiaoyan, LIN Hong, WANG Jingxue. Preparation and properties of hydrogels loaded with phage endolysin Lys84[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3876-3886.

摘要: 探究聚(N-异丙基丙烯酰胺)[poly(N-isopropylacrylamide)]基互穿网络(interpenetrating polymer network)温敏水凝胶(记作: IPNT)作为噬菌体内溶素 Lys84 递送载体的可行性, 及载药水凝胶作为抗菌材料的应用潜力。以海藻酸钠和 N-异丙基丙烯酰胺为原材料, 通过自由基聚合的方法制备互穿网络温敏水凝胶, 采用干态浸泡法负载金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)噬菌体内溶素 Lys84 获得载药水凝胶(IPNT-Lys84)。通过红外光谱仪、扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)、差示扫描量热仪(differential scanning calorimetry, DSC)对水凝胶载药前后的物理性能进行表征, 并研究水凝胶溶胀、退溶胀以及内容素 Lys84 释放情况、在不同温度及不同浓度药液浸泡的抗菌性能。结果表明, IPNT-Lys84 水凝胶孔洞均匀, 低临界溶解温度(lower critical solution temperature, LCST)为 32 °C; 水凝胶平衡溶胀度为 30 g/g, 退溶胀时失水率为 88%; 在 37 °C 时内容素释放率在 6 h 内达到 70%以上; IPNT-Lys84 水凝胶杀菌率达 99.9%以上。研究表明, 采用 IPNT 递送内容素 Lys84 具有可行性, IPNT-Lys84 水凝胶有望成为针对多重耐药金黄色葡萄球菌的有效抗菌材料。

关键词: 内容素 Lys84; N-异丙基丙烯酰胺; 海藻酸钠; 水凝胶; 抗菌性能

Preparation and properties of hydrogels loaded with phage endolysin Lys84

LI Xiaoyan, LIN Hong, WANG Jingxue *

College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, Shandong, China

Abstract: This study investigated the application of poly(N-isopropylacrylamide)-based

资助项目: 国家自然科学基金(31870166); 国家现代农业产业技术体系专项经费资助项目(CARS-47)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31870166) and the National Modern Agricultural Industrial Technology System Special Funding Project of China (CARS-47).

*Corresponding author. E-mail: snow@ouc.edu.cn

Received: 2022-11-17; Accepted: 2023-01-17; Published online: 2023-01-20

interpenetrating network temperature-sensitive hydrogels (notation: IPNT) as the delivery vehicle for phage endolysin Lys84 and the potential of drug-loaded hydrogels as antimicrobial materials. Interpenetrating network temperature-sensitive hydrogels were prepared by free radical polymerization of sodium alginate and N-isopropylacrylamide. Drug-loaded hydrogels (IPNT-Lys84) were obtained by dry soaking method with the endolysin Lys84 of *Staphylococcus aureus* phage. The physical properties of the hydrogels with and without drug loading were characterized by infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and differential scanning calorimetry. The swelling and deswelling of the hydrogels as well as the release of endolysin Lys84 were investigated. Moreover, the antibacterial properties of IPNT-Lys84 hydrogels at different temperatures and concentrations of the drug solution were studied. The results showed that IPNT-Lys84 hydrogel had uniform pores and a low critical solubility temperature (LCST) of 32 °C. The equilibrium swelling of the hydrogel was 30 g/g, and the water loss rate was 88% upon deswelling. The release rate of endolysin reached more than 70% within 6 h at 37 °C. The bactericidal rate of IPNT-Lys84 hydrogel was over 99.9%. The research results showed the feasibility of using IPNT to deliver the endolysin Lys84, and IPNT-Lys84 hydrogel might be an effective antimicrobial material against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*.

Keywords: endolysin Lys84; N-isopropylacrylamide; sodium alginate; hydrogel; antibacterial properties

金黄色葡萄球菌是导致皮肤和软组织感染的主要致病菌, 严重感染时可进一步引发败血症、感染性心内膜炎、骨髓炎等^[1]。针对该致病菌的治疗措施主要依赖于抗生素的广泛使用, 因此造成细菌耐药性问题不断加剧^[2]。其中, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)具有多重耐药性, 几乎对所有非糖肽类药物具有耐药性^[3], 其高感染率及死亡率加剧了治疗难度及成本, 亟需替代治疗方案。

噬菌体内溶素是一种裂解性蛋白质, 为噬菌体侵染宿主菌后期所释放的一种可以裂解细菌细胞壁肽聚糖的水解酶^[4]。噬菌体内溶素来源广泛, 具有抗菌活性强、发挥作用快、特异性高、不易产生耐药性等优势, 是理想的抗生素替代物^[5]。已有诸多研究证明内溶素对目标菌株具有高抗菌活性^[6]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体内溶素 Lys84 源于本课题组获取

的烈性噬菌体 qdsa002^[7], 已被证明对包括 MRSA 在内的多数金黄色葡萄球菌具有抗菌活性, 并且对成熟的 MRSA 生物被膜具有良好的清除和抑制作用^[8]。然而, 内溶素在体外条件下不稳定, 对环境压力敏感且活性易丧失, 导致其生物利用度低, 造成内溶素实际治疗效果受限^[9]。采用水凝胶递送内溶素是有前途的解决方案。

水凝胶是一类具有三维网状结构的高分子聚合物, 其独特的孔隙结构为药物的递送提供可能, 在生物医药等领域发挥很大的应用价值, 如药物缓释、组织工程材料、新型伤口敷料等^[10]。聚(N-异丙基丙烯酰胺) (poly(n-isopropylacrylamide), PNIPAM)是一种热敏高分子材料, 作为药物控释载体得到广泛研究^[11]。其低临界溶解温度 (lower critical solution temperature, LCST) 在 32 °C 附近。在 LCST 以下, 负载的药物通过物理扩散缓慢释放, 高于 LCST, 水凝胶体积收缩

将药物迅速释放。因此,利用 PNIPAM 这一特性并将其应用于水凝胶敷料,可达到调控药物释放的目的。海藻酸钠是天然多糖类聚合物,具有生物相容性、可生物降解性及低免疫原性,是制备水凝胶敷料的优势材料^[12]。由 PNIPAM 和海藻酸钠制得的互穿网络温敏水凝胶可极大地提高水凝胶的机械强度,并且可以形成稳定的三维网状结构,为药物的负载和控释提供条件^[13]。该水凝胶作为外伤敷料不仅能为局部损伤组织提供湿润的愈合环境,而且可将药物稳定输送至特定部位,并延长药物作用时间、减少给药次数,以期达到更好的治疗效果。

在本研究中,我们采用 N-异丙基丙烯酰胺和海藻酸钠制备了一种具有温度敏感性的互穿网络水凝胶;在内溶素 Lys84 抗菌活性测定的基础上,将内溶素 Lys84 负载于水凝胶递送系统中,对其载药前后的物理性能进行表征,分析载药水凝胶中内溶素 Lys84 的累计释放情况,并研究负载内溶素 Lys84 的水凝胶对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌活性及杀菌动力学。旨在为内溶素 Lys84 有效递送系统提供理论研究,并探究其作为抗菌材料的应用潜力。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

N-异丙基丙烯酰胺(n-isopropylacrylamide, NIPAM)、四甲基乙二胺(n,n,n',n'-tetramethylethylenediamine, TEMED)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(n,n'-methylenebisacrylamide, MBA),均购自麦克林生化科技有限公司;海藻酸钠[分子量 216.121、黏度(200±20) mPa·s],购自阿拉丁试剂有限公司;过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)、无水氯化钙、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾,均购自国药集团化学试剂有限公司;本研究所用试剂均为分

析纯。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 43300 和 ATCC 6538 (以下简称 43300 和 6538),由本实验室提供;1×PBS 缓冲液(8 g/L 氯化钠,0.2 g/L 磷酸二氢钾,2.17 g/L 磷酸氢二钠,0.2 g/L 氯化钾;pH 7.4),自制。

JEM-1200EX 透射电子显微镜,JEOL 公司; Nicolet iS10 傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞公司; DSC 200PC 差示扫描量热仪,NETZSCH 公司; QUANTA FEG250 扫描电子显微镜,FEI 公司。

1.2 内溶素 Lys84 抗菌性能测定

1.2.1 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)及最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)测定

参照 Ning 等^[8]的方法获取内溶素 Lys84。参照 Wiegand 等^[14]的方法测定 MIC 和 MBC。采用 PBS 缓冲液对内溶素溶液进行二倍稀释,获得不同浓度内溶素储备液(2–300 μg/mL);在无菌 96 孔板中,将 100 μL 内溶素溶液与 100 μL 营养肉汤混合;再将培养至对数生长期的金黄色葡萄球菌 43300 和 6538 分别加入至 96 孔板中,使菌液终浓度为 1×10⁵ CFU/mL;于 37 °C 孵育 18 h 后检测 OD₆₀₀;将孔板中未显示肉眼可见细菌生长的样品进行平板涂布,当 99.9% 的细菌被杀死时,称其为 MBC 终点。PBS 缓冲液用作不含内溶素的阴性对照,纯营养肉汤用作空白对照。

1.2.2 透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察

参照 Li 等^[15]的方法稍作调整后进行。选用金黄色葡萄球菌 43300 作为指示菌。准备对数期菌液(1×10⁸ CFU/mL);分别加入等体积内溶素 Lys84 (终浓度为 150 μg/mL)和 PBS 缓冲液(作为对照);涡旋混匀后,37 °C、200 r/min 孵育 2 h;对细胞培养物进行取样,并加入 2.5% 戊二醛固定液,室温固定 2 h 后采用透射电子显微镜进行拍照观察。

1.2.3 Lys84 杀菌动力学测定

参照 Li 等^[15]的方法并稍作修改。选用金黄色葡萄球菌 43300 作为指示菌。内溶素 Lys84 的测试浓度分别为 18.8、37.5、75.0、150.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以不含内溶素的 PBS 缓冲液作为阴性对照；金黄色葡萄球菌 43300 的菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL；将菌液与不同浓度的内溶素溶液等体积混合，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 共孵育；培养至 0、5、10、20、30、60、90、120 min 后取样进行菌落计数；对菌落数进行统计分析并绘制杀菌动力学曲线。

1.3 IPNT-Lys84 的制备

参照 Gu 等^[16]的方法稍作调整后进行。将 NIPAM 单体加入 10 mL 去离子水中，制备成浓度为 2.5% (质量分数)、5.0%、7.5%、10.0% 的溶液；再分别加入 0.1 g 海藻酸钠和 MBA (1.0%，摩尔分数，NIPAM)，在室温下搅拌至完全溶解；氮气吹扫除氧 30 min 后，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 加入 500 μL APS (0.087 mol/L) 和 10 μL TEMED 剧烈搅拌引发聚合；将形成的预凝胶置于 1% (质量体积分数) 氯化钙溶液 24 h，形成 PNIPAM-Alg 互穿网络温敏水凝胶，分别记作 IPNT_{2.5}、IPNT_{5.0}、IPNT_{7.5}、IPNT_{10.0}；在室温下透析 3 d 以去除残留的单体，在添加内溶素之前进行冷冻干燥处理。采取干态浸泡法负载内溶素，即取冷冻干燥后的水凝胶样品浸泡于不同浓度的内溶素溶液，直至达到溶胀平衡状态，获得的载药水凝胶记作 IPNT-Lys84，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，直至进一步测试。

1.4 水凝胶物理性能测定与表征

1.4.1 红外光谱仪(fourier transform infrared spectoscopy, FTIR)表征

将 PNIPAM、海藻酸钠、IPNT 水凝胶和 IPNT-Lys84 水凝胶样品通过红外光谱仪对其特征官能团进行表征，扫描范围为 4 000–500 cm^{-1} ，扫描次数为 64 次。

1.4.2 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)表征

将 IPNT 水凝胶和 IPNT-Lys84 水凝胶冷冻干燥处理；切取部分样品，对其表面溅射镀金；通过扫描电子显微镜进行成像观察。

1.4.3 差示扫描量热仪(differential scanning calorimeter, DSC)表征

采用差示扫描量热仪进行测试。称取溶胀平衡的水凝胶样品约 8 mg，在氮气氛围下，以 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的加热速度进行升温，升温范围为 20–50 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4.4 IPNT 溶胀性能测定

溶胀度测定：将冷冻干燥后的 IPNT 水凝胶样品称重，记作 W_0 ；在 25 $^{\circ}\text{C}$ 于 PBS 缓液中溶胀，于特定时间取出，擦干表面水分后进行称重，记作 W_t ；直至水凝胶溶胀平衡后结束。计算溶胀度 SR (公式 1)：

$$\text{SR (g/g)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad (1)$$

退溶胀度测定：将在室温下溶胀平衡的 IPNT 水凝胶样品转移至 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中，定时取出称重，记作 W_t ，至其恒重后结束；水凝胶溶胀度根据公式(1)计算。

水凝胶平衡溶胀度测定：将溶胀平衡的 IPNT 水凝胶样品转移至不同温度下的恒温水浴锅中，平衡溶胀 12 h 后取出，称重为 W_e ，根据公式(1)计算此时溶胀度。

所有实验均重复 3 次，取平均值。

1.5 IPNT-Lys84 中 Lys84 释放曲线测定

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ ，以 100 r/min 的转速振荡，以 PBS 缓冲液作为释放介质进行内溶素 Lys84 累计释放曲线的测定。将负载内溶素的 IPNT-Lys84 水凝胶置于缓冲液中，定时移取上清液，并补充等体积新鲜的 PBS 缓冲液，测定内溶素 Lys84 的累计释放量，并绘制内溶素 Lys84 累计释放曲线。

1.6 IPNT-Lys84 抗菌性能测试

1.6.1 琼脂扩散法

将 100 μL 菌液(1×10^8 CFU/mL 金黄色葡萄球

菌 43300)加入 5 mL 营养琼脂半固体培养基中, 涡旋混匀, 倒入含有营养琼脂培养基的培养皿中制得双层平板; 将浸泡于 4×MBC 内溶素溶液所制得的 IPNT-Lys84 无菌水凝胶(直径为 10 mm、厚度为 1.5 mm)样品置于平皿中心, 以空白水凝胶作阴性对照; 在 37 °C 和 25 °C 培养 24 h 后, 测量并记录水凝胶周围的细菌生长抑制区。

1.6.2 细菌计数

将 IPNT 水凝胶浸泡于不同浓度(0.5×、1×、2×、4×、8×MBC)的内溶素溶液获得 IPNT-Lys84 水凝胶; 将 10 μL 的菌液(1×10⁸ CFU/mL 金黄色葡萄球菌 43300)接种于不同浓度药液制备的 IPNT-Lys84 水凝胶(直径 10 mm)表面, 在 37 °C 和 25 °C 孵育 1 h, 以空白水凝胶作阴性对照; 使用 1 mL PBS 缓冲液回收全部菌体, 进行菌落计数^[17]。每个实验重复 3 次, 取其平均值。通过公式(2)和(3)分别计算对数减少值及杀菌率。

$$\text{对数减少值} = \log_{10} \frac{\text{CFU}_{\text{对照组}}}{\text{CFU}_{\text{实验组}}} \quad (2)$$

$$\text{杀菌率}(\%) = \frac{\text{CFU}_{\text{对照组}} - \text{CFU}_{\text{实验组}}}{\text{CFU}_{\text{对照组}}} \times 100 \quad (3)$$

1.6.3 杀菌动力学

水凝胶杀菌动力学测定在 1.6.2 的基础上进行。采用浓度为 4×MBC 的内溶素溶液浸泡制备 IPNT-Lys84 水凝胶。将 10 μL 菌液(1×10⁸ CFU/mL 金黄色葡萄球菌 43300)接种于 IPNT-Lys84 水凝胶表面, 以空白水凝胶作阴性对照; 在指定时间(0、0.25、0.5、1、2、4、6、8 h)取出样品, 使用 PBS 缓冲液进行连续稀释, 在营养琼脂平板上进行涂布计数。所有实验重复 3 次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 内溶素 Lys84 的抗菌活性分析

通过测定内溶素 Lys84 最小抑菌浓度、最小杀菌浓度、细菌的形态变化及 Lys84 的杀菌动力

学, 从而评价其抗菌活性。Lys84 的 MIC 和 MBC 测定结果为: 以金黄色葡萄球菌 43300 为指示菌时, MIC 和 MBC 均为 37.5 μg/mL; 以金黄色葡萄球菌 6538 为指示菌时, MIC 和 MBC 分别为 75.0 和 150.0 μg/mL。图 1 为 TEM 结果图。如图 1A 所示, 在对照条件下孵育的金黄色葡萄球菌 43300, 呈现出光滑的球形, 为典型的金黄色葡萄球菌的形态。暴露于内溶素 Lys84 的菌体形貌如图 1B 所示, 观察到细菌形态发生显著变化, 菌体细胞壁被破坏, 导致细胞内容物释放出来, 最后细胞质被清空。图 2 为游离内溶素 Lys84 的杀菌动力学曲线。在对

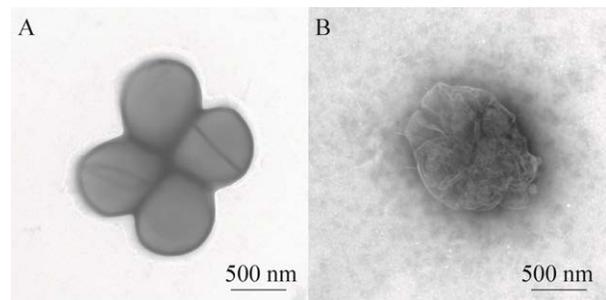


图 1 内溶素 Lys84 未处理(A)和处理(B)金黄色葡萄球菌 43300 的 TEM 图

Figure 1 TEM images of endolysin Lys84 untreated (A) and treated (B) *Staphylococcus aureus* 43300.

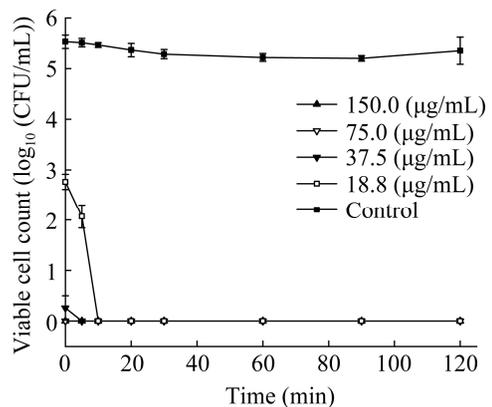


图 2 内溶素 Lys84 对金黄色葡萄球菌 43300 的杀菌动力学曲线

Figure 2 Bactericidal kinetic profile of endolysin Lys84 against *Staphylococcus aureus* 43300.

对照组,金黄色葡萄球菌在 2 h 内细胞数量保持稳定生长情况,表现为典型的滞后期。在不同浓度内溶素的作用下,观察到金黄色葡萄球菌无明显生长,活细胞的数量随着时间的增长出现显著下降。在 10 min 后均未观察到活细胞。结果表明,内溶素 Lys84 具有高杀菌活性且杀菌迅速。

2.2 IPNT-Lys84 的制备

水凝胶的高溶胀度为大量负载内溶素提供了可能。研究不同 NIPAM 浓度对水凝胶成胶及溶胀度的影响,筛选出合适的原料用量进行后续相关实验。将水凝胶反应溶液静置形成的预凝胶(PNIPAM 凝胶网络)于氯化钙溶液浸泡后获得互穿网络温敏水凝胶(图 3A),水凝胶均为无色透明状。PBS 缓冲液为内溶素 Lys84 的缓冲体系,故选用 PBS 缓冲液测定 4 种水凝胶的溶胀度。图 3B 为 IPNT_{2.5}、IPNT_{5.0}、IPNT_{7.5}、

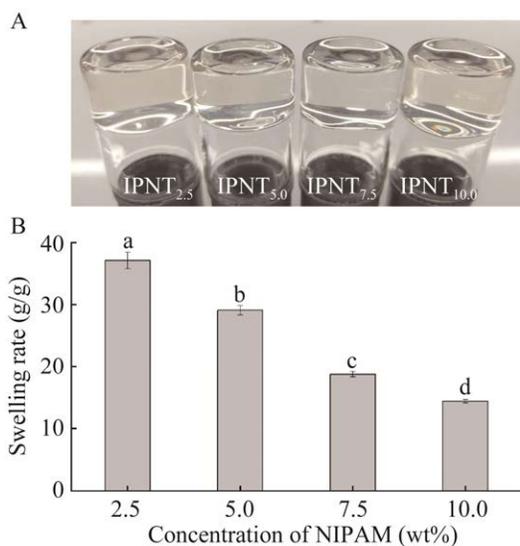


图 3 水凝胶成品图(A)和不同 NIPAM 浓度的水凝胶溶胀度(B) 图 B 中不同小写字母表示差异显著($P<0.01$)

Figure 3 Diagram of the finished hydrogel (A) and the swelling of the hydrogel at different NIPAM concentrations (B). Different lowercase letters in graph B indicate significant differences ($P<0.01$).

IPNT_{10.0} 的平衡溶胀度,结果为 37、30、19、14 g/g。IPNT_{2.5} 的 PNIPAM 含量低,交联度差,溶胀后易破碎。尽管 IPNT_{2.5} 溶胀度最高,综合考虑后选择 IPNT_{5.0} (之后记作 IPNT)进行后续载药水凝胶的制备及性能表征。为保证内溶素 Lys84 的活性,故采用温和的干态浸泡法进行负载从而获得载药水凝胶 IPNT-Lys84。

2.3 FTIR 分析

对海藻酸钙(calcium alginate)、PNIPAM、IPNT 和 IPNT-Lys84 水凝胶的红外光谱进行测定。结果如图 4 所示。海藻酸钙在 1 417 cm^{-1} 和 1 596 cm^{-1} 处出现-COO-的对称和反对称伸缩振动峰,3 243 cm^{-1} 处为-OH 的伸缩振动峰;PNIPAM 在 3 304 cm^{-1} 处出现 N-H 的伸缩振动峰,1 651 cm^{-1} 和 1 538 cm^{-1} 处存在酰胺 I 带和酰胺 II 带的特征吸收峰,1 386 cm^{-1} 和 1 367 cm^{-1} 为异丙基[-CH(CH₃)₂]的特征吸收峰;海藻酸钙和 PNIPAM 的特征吸收峰在 IPNT 中清晰可见。IPNT-Lys84 具有和 IPNT 一致的特征吸收峰。因此,FTIR 分析结果证实 IPNT 样品中存在 PNIPAM 和海藻酸钙两种聚合物网络,并且 Lys84 的加入不改变其特征官能团的结构。

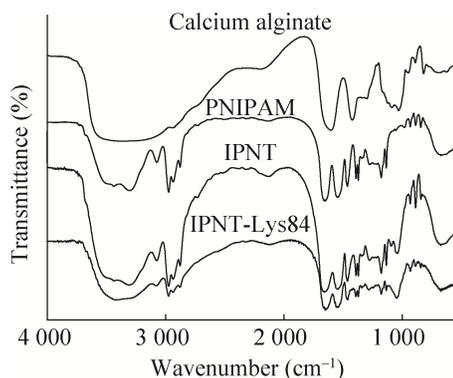


图 4 海藻酸钙、PNIPAM、IPNT 和 IPNT-Lys84 的 FTIR 谱图

Figure 4 FTIR spectra of calcium alginate, PNIPAM, IPNT and IPNT-Lys84.

2.4 SEM 分析

对 IPNT 和 IPNT-Lys84 水凝胶的形貌结构进行 SEM 表征及分析, 结果如图 5 所示。由图 5A 和 5B 可知, IPNT 水凝胶内部呈现多孔蜂窝状结构; 由图 5C 和 5D 所示, IPNT-Lys84 水凝胶可以观察到原本光滑的孔隙表面附着大量白色粉末状物质, 可以推测其为内溶素的蛋白质粉末。由以上结果可知, 水凝胶的这种多孔三维网状结构可成功负载内溶素药液。

2.5 DSC 分析

采用差示扫描量热仪对 PNIPAM、IPNT 及 IPNT-Lys84 的低临界溶解温度进行测定, 结果如图 6 所示。PNIPAM、IPNT 和 IPNT-Lys84 水凝胶均在 32 °C 附近出现明显的吸热峰, 峰值即发生体积相转变的温度。由结果可知, 海藻酸盐的存在及药液的负载并不影响 PNIPAM 原本所具有的温度敏感性, 其 LCST 未发生改变。

2.6 IPNT 溶胀特性分析

水凝胶溶胀曲线的结果如图 7A 所示。在最初的 10 h 内, 水凝胶溶胀度增长快速, 随后速度减慢, 最终在 42 h 后趋于溶胀平衡, 溶胀度最高可达 30 g/g。水凝胶退溶胀曲线如图 7B

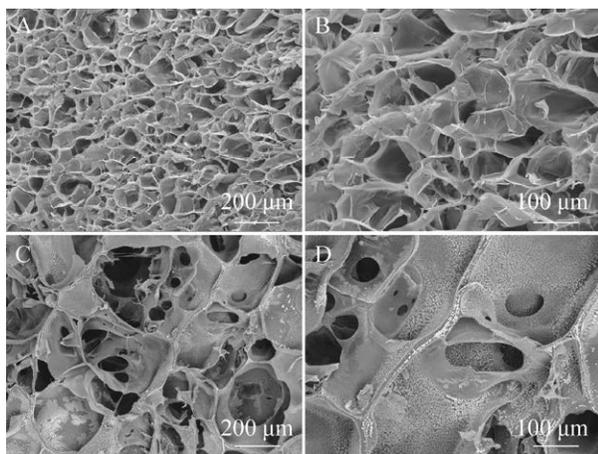


图 5 IPNT (A、B)和 IPNT-Lys84 (C、D)断面形貌
Figure 5 Cross-sectional profiles of IPNT (A, B) and IPNT-Lys84 (C, D).

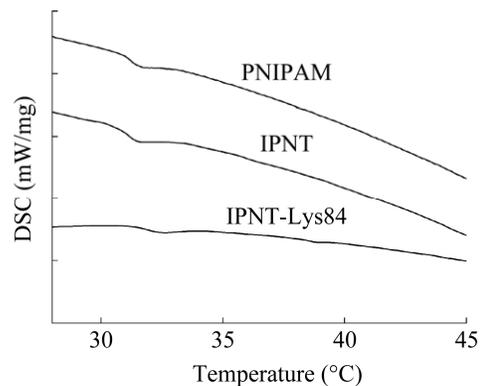


图 6 PNIPAM、IPNT 和 IPNT-Lys84 低临界溶解温度

Figure 6 Low critical solution temperatures of PNIPAM, IPNT and IPNT-Lys84.

所示。将溶胀平衡的水凝胶转移至 45 °C (高于 LCST)环境温度时, 水凝胶的溶胀度迅速下降, 从最初的接近 30 g/g 下降至 5 g/g 以下, 并在 1 h 后达到退溶胀平衡状态, 水凝胶失水率为 88%。图 7C 为水凝胶在不同温度下的平衡溶胀度。随着温度靠近 LCST 附近, 水凝胶溶胀度迅速降低, 结果表明了水凝胶平衡溶胀度对温度的依赖性。

2.7 IPNT-Lys84 中 Lys84 的累计释放曲线

分别在 37 °C 和 25 °C 研究 IPNT-Lys84 水凝胶中的内溶素累积释放情况, 结果如图 8 所示。环境温度为 37 °C 时, 内溶素 Lys84 在最初的 30 min 内快速释放, 累计释放率为 40%; 随后药物释放速度放缓, 在 6 h 后累计释放率达到 75%左右。环境温度为 25 °C 时, 内溶素 Lys84 在最开始的 30 min 内累计释放率为 20%, 随后缓慢释放, 在 24 h 后累计释放率接近 70%。这些结果表明, IPNT 水凝胶可以针对温度变化做出响应, 从而控制药液的释放。

2.8 抗菌性能测试

IPNT-Lys84 水凝胶抑菌圈结果如图 9 所示。空白对照组水凝胶在不同温度条件下均无抑菌区域的形成。在 37 °C (高于 LCST)时, 载

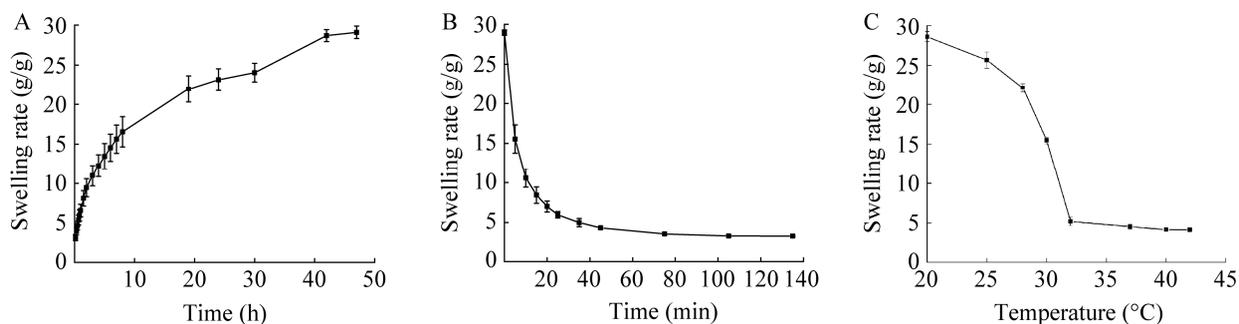


图 7 溶胀曲线(A)、退溶胀曲线(B)和平衡溶胀曲线(C)

Figure 7 Dissolution curve (A), deconsolidation curve (B) and equilibrium swelling curves (C).

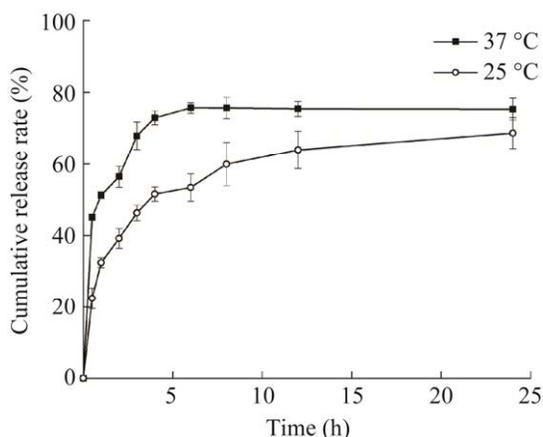


图 8 Lys84 累计释放曲线

Figure 8 Lys84 cumulative release curve.

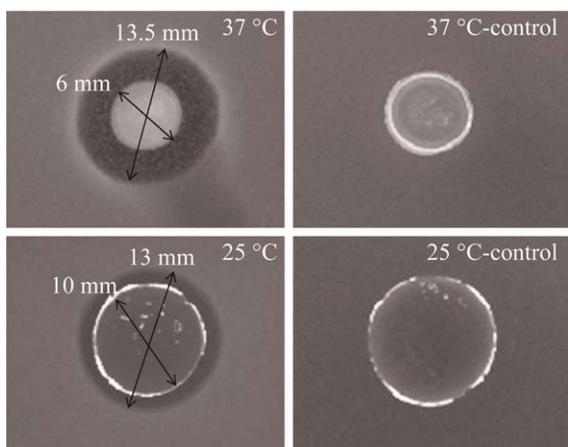


图 9 不同温度下的水凝胶抑菌圈结果

Figure 9 Hydrogel inhibition zones at different temperatures.

药水凝胶抑菌带宽度为 3.75 mm, 25 °C (低于 LCST)时的抑菌带宽度 1.5 mm。结果表明, 负载于水凝胶中的内溶素 Lys84 能够顺利释放并保持其抑菌活性。

通过接触法测定水凝胶体外抗菌性能, 结果如图 10 所示。由图可知, 由 8×MBC 和 4×MBC 内溶素溶液制备的 IPNT-Lys84 水凝胶, 与金黄色葡萄球菌 43300 菌液共孵育 1 h 后, 杀菌率均达 99.9%以上。由 2×MBC、1×MBC 内溶素溶液制得的水凝胶分别具有 90%和 70%以上的杀菌率。随着浸泡药液浓度的降低, 杀菌活性均有所下降。结果表明, 2×MBC 及以上浓度的内溶素溶液所制备的 IPNT-Lys84 水凝胶具有优异的抗菌效果。

进一步评估了 IPNT-Lys84 水凝胶在较短时间内对金黄色葡萄球菌 43300 的抗菌活性。结果如图 11 所示。对照组结果显示, 与空白对照组水凝胶接触的细菌在 8 h 内, 菌落数随着时间的延长而增加。4×MBC 内溶素溶液制备的 IPNT-Lys84 水凝胶在 1 h 内杀菌迅速, 杀菌率达到 99%以上, 随时间延长, 菌落数继续缓慢下降, 6 h 后杀菌率最高可达 99.9%以上。这些结果表明, 水凝胶网络中的内溶素仍保持其高抗菌活性。

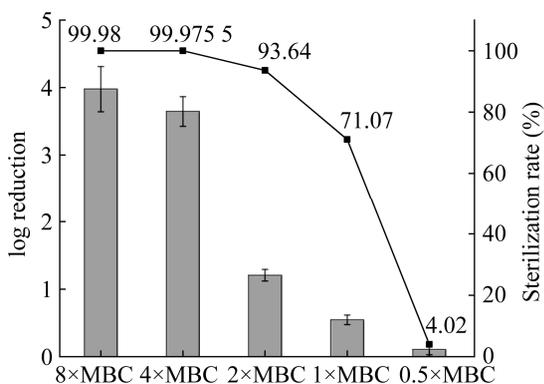


图 10 负载不同浓度内溶素的水凝胶杀菌率
Figure 10 Bactericidal rate of hydrogels loaded with different concentrations of endolysin.

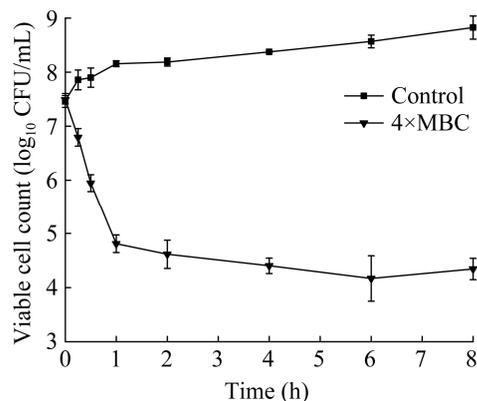


图 11 负载内溶素水凝胶的杀菌动力学
Figure 11 Bactericidal kinetics of endolysin-loaded hydrogels.

3 讨论

金黄色葡萄球菌是引起伤口感染最常见的细菌，可以通过外用抗生素进行治疗，但大多数 MRSA 菌株对传统抗生素具有耐药性。因此，针对 MRSA 引起的伤口感染亟需新型治疗方案。其中，噬菌体内溶素作为新型抗菌剂引起广泛关注。噬菌体内溶素在感染模型中的治疗有效性已被证实^[18]，是极具潜力的抗生素替代剂。然而，内溶素仍面临在体外条件下化学性质不稳定、抗菌活性易丧失等挑战。因此，我们设计了一种水凝胶网络，可为内溶素提供

外部保护，探究其作为一种抗菌材料应用于伤口感染的潜力。本研究以 N-异丙基丙烯酰胺和海藻酸钠为原材料，通过自由基聚合的方法获得一种互穿网络温敏水凝胶，采用干态浸泡法负载内溶素 Lys84 获得载药水凝胶，并研究载药水凝胶的抗菌效果。

通过红外结果(图 4)可知，IPNT 红外光谱在 $3\ 304\ \text{cm}^{-1}$ 处出现强而宽的特征峰，为海藻酸钙的 -OH 和 PNIPAM 的 N-H 伸缩振动峰的叠加；在 $1\ 651\ \text{cm}^{-1}$ 处海藻酸钙的 -COO- 的反对称特征峰被 PNIPAM 的宽酰胺 II 带特征峰所掩盖^[19]。结果证实 IPNT 样品中存在 PNIPAM 和海藻酸钙两种聚合物网络。由扫描电子显微镜结果(图 5)可知，水凝胶具有三维网状孔隙结构，主要由海藻酸盐 -COO- 之间的静电排斥作用^[20]及 PNIPAM 疏水相互作用共同作用的结果^[21]，为大量负载药液提供了可能。由差示扫描量热仪结果(图 6)可知，IPNT 和 IPNT-Lys84 水凝胶具有与 PNIPAM 一致的 LCST，可能是由于 PNIPAM 水凝胶的 LCST 与疏水基团和亲水基团的相互作用有关，而海藻酸盐和内溶素的存在不足以影响其亲水/疏水平衡，导致 LCST 未发生变化。除此之外，互穿网络水凝胶的两种聚合物通过互穿缠结形成，两者化学结构保持相互独立，从而保证其 LCST 不发生改变。因此，这些结果证明互穿网络温敏水凝胶的成功制备，并且负载内溶素 Lys84 后对其特征官能团及温度敏感性无影响。

根据水凝胶的溶胀特性结果(图 7)可知，水凝胶的溶胀在开始阶段，由于水凝胶与缓冲液之间的内外渗透压之差最高，以及水凝胶中亲水基团的水合作用，使得水分子向水凝胶内部快速扩散，溶胀度增长迅速^[22]；随着时间推移，内外渗透压之差减小，分子链充分伸展，最终达到溶胀平衡状态。水凝胶的退溶胀是由于环

境温度高于水凝胶 LCST 时,水凝胶发生疏水相互作用,导致整体塌陷收缩,从而将凝胶中水分子快速释放^[23]。另外,由于海藻酸钠的加入,削弱了 PNIPAM 水凝胶表面致密的疏水层,使得 IPNT 水凝胶相比于传统 PNIPAM 水凝胶,具有更高的退溶胀度和失水率^[22]。水凝胶的平衡溶胀度随温度的降低而升高,是因为水凝胶主要由氢键及亲水基团发挥作用,表现出明显的亲水作用;当温度升高至 LCST 附近,氢键断裂,疏水作用占主导地位,溶胀度明显下降。结果证实水凝胶的平衡溶胀度对温度的依赖性。由内溶素累计释放曲线的结果(图 8)可知,水凝胶在 37 °C (高于 LCST)时整体发生收缩,将内部的药液通过挤压的方式快速释出,其累计释放率在 6 h 内达到最大值。在 25 °C (低于 LCST)时,水凝胶仍处于溶胀状态,在开始阶段,由于水凝胶内外存在较大的内溶素浓度差,释放速率相对较快,浓度差随着时间的延长而减小,最后达到趋于平衡的状态。因此,结果表明水凝胶具有温度敏感性且能将内溶素顺利释出。

由琼脂扩散法结果(图 9)可知,当水凝胶所处环境温度高于 LCST 时,氢键断裂,疏水作用力增强,水凝胶整体发生收缩,从而将内溶素 Lys84 通过挤压的方式快速释出,达到快速抑菌的效果^[24];当低于 LCST 时,水凝胶仍维持溶胀状态,水凝胶网络中的内溶素 Lys84 具有足够的自由度,从孔隙中缓慢释放,达到持续缓慢抑菌的效果^[25]。通过杀菌率测定结果(图 10)和水凝胶杀菌动力学测定结果(图 11)进一步验证载药水凝胶的抗菌活性。这些结果均表明,水凝胶网络中的内溶素仍保持其高抗菌活性。采用 IPNT 水凝胶作为内溶素递送载体,可通过温度调控内溶素释放的速度,并且有效延长内溶素发挥作用的时间。

本研究证明了 IPNT 水凝胶递送内溶素的

可行性。在确保内溶素活性的前提下,将其稳定输送至特定部位,达到局部可控释放内溶素的目的,并减少给药次数。IPNT-Lys84 对 MRSA 具有高抗菌活性,有望成为针对多重耐药金黄色葡萄球菌的有效抗菌材料。另外,本研究尚未完成细胞毒性实验。在今后的研究中,着重探究 IPNT-Lys84 水凝胶的安全性能评估,致力于获得安全高效并且可用作伤口敷料的抗菌材料。

4 结论

本研究通过自由基聚合的方式制得海藻酸钠/N-异丙基丙烯酰胺互穿网络温敏水凝胶,并成功将内溶素 Lys84 负载于水凝胶中。具有三维网状结构的 IPNT 水凝胶被证实是负载和递送内溶素 Lys84 有效的载体。当环境温度高于 LCST 时,IPNT-Lys84 水凝胶快速释放内溶素,低于 LCST 时,内溶素在水凝胶孔隙中具有足够的自由度,可从基质中缓慢释放。IPNT-Lys84 抗菌实验结果表明,负载于水凝胶中的内溶素 Lys84 可以顺利释放并维持其高抗菌活性,与游离内溶素相比,可有效延长内溶素发挥作用的时间。研究结果表明 IPNT-Lys84 水凝胶可作为一种有前景的抗菌材料,用于多重耐药金黄色葡萄球菌外伤感染的防治。

REFERENCES

- [1] DRYDEN MS. Complicated skin and soft tissue infection[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(suppl_3): iii35-iii44.
- [2] NATHAN C, CARS O. Antibiotic resistance: problems, progress, and prospects[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 371(19): 1761-1763.
- [3] CHRISTIANSEN K. Fusidic acid adverse drug reactions[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999, 12: S3-S9.
- [4] LOESSNER MJ. Bacteriophage endolysins—current state of research and applications[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 480-487.
- [5] FISCHETTI VA. Bacteriophage lysins as effective

- antibacterials[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(5): 393-400.
- [6] SCHMELCHER M, DONOVAN DM, LOESSNER MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials[J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(10): 1147-1171.
- [7] 吕晓倩, 王静雪, 林洪. 金黄色葡萄球菌噬菌体 qdsa001 内溶素的特性预测及克隆表达[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 133-138.
- LÜ XQ, WANG JX, LIN H. Characteristics and expression of endolysin from *Staphylococcus aureus* bacteriophage qdsa001[J]. *Food Science*, 2018, 39(18): 133-138 (in Chinese).
- [8] NING HQ, LIN H, WANG JX, HE XB, LV XQ, JU L. Characterizations of the endolysin Lys84 and its domains from phage qdsa002 with high activities against *Staphylococcus aureus* and its biofilms[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 148: 109809.
- [9] LOH B, GONDIL VS, MANOHAR P, KHAN FM, YANG H, LEPTIHN S. Encapsulation and delivery of therapeutic phages[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 87(5): e01979-e01920.
- [10] FRANCESKO A, PETKOVA P, TZANOV T. Hydrogel dressings for advanced wound management[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2018, 25(41): 5782-5797.
- [11] ASHRAF S, PARK HK, PARK H, LEE SH. Snapshot of phase transition in thermoresponsive hydrogel PNIPAM: role in drug delivery and tissue engineering[J]. *Macromolecular Research*, 2016, 24(4): 297-304.
- [12] ZOU ZH, ZHANG BJ, NIE XQ, CHENG Y, HU Z, LIAO MN, LI SD. A sodium alginate-based sustained-release IPN hydrogel and its applications[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(65): 39722-39730.
- [13] ZHANG M, ZHAO X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 1414-1428.
- [14] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 163-175.
- [15] LI WR, XIE XB, SHI QS, DUAN SS, OUYANG YS, CHEN YB. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*[J]. *BioMetals*, 2011, 24(1): 135-141.
- [16] GU P, LI B, WU BS, WANG JP, MÜLLER-BUSCHBAUM P, ZHONG Q. Controlled hydration, transition, and drug release realized by adjusting layer thickness in alginate-Ca²⁺/poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymeric network hydrogels on cotton fabrics[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020, 6(9): 5051-5060.
- [17] LI P, POON YF, LI WF, ZHU HY, YEAP SH, CAO Y, QI XB, ZHOU CC, LAMRANI M, BEUERMAN RW, KANG ET, MU YG, LI CM, CHANG MW, JAN LEONG SS, CHAN-PARK MB. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability[J]. *Nature Materials*, 2011, 10(2): 149-156.
- [18] ÁLVAREZ A, FERNÁNDEZ L, GUTIÉRREZ D, IGLESIAS B, RODRÍGUEZ A, GARCÍA P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: latest trends and treatments based on bacteriophages[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019, 57(12): e01006-e01019.
- [19] KIM MH, KIM JC, LEE HY, DAI KIM J, YANG JH. Release property of temperature-sensitive alginate beads containing poly(N-isopropylacrylamide)[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 46(1): 57-61.
- [20] ZHANG GQ, ZHA LS, ZHOU MH, MA JH, LIANG BR. Rapid deswelling of sodium alginate/poly(N-isopropylacrylamide) semi-interpenetrating polymer network hydrogels in response to temperature and pH changes[J]. *Colloid and Polymer Science*, 2005, 283(4): 431-438.
- [21] ZAKERIKHOOB M, ABBASI S, YOUSEFI G, MOKHTARI M, NOORBAKHS MS. Curcumin-incorporated crosslinked sodium alginate-g-poly(N-isopropylacrylamide) thermo-responsive hydrogel as an *in situ* forming injectable dressing for wound healing: *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 271: 118434.
- [22] PETRUSIC S, LEWANDOWSKI M, GIRAUD S, JOVANCIC P, BUGARSKI B, OSTOJIC S, KONCAR V. Development and characterization of thermosensitive hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide) and calcium alginate[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2012, 124(2): 890-903.
- [23] STRACHOTA B, STRACHOTA A, ŠLOUF M, BRUS J, CIMROVÁ V. Monolithic intercalated PNIPAm/starch hydrogels with very fast and extensive one-way volume and swelling responses to temperature and pH: prospective actuators and drug release systems[J]. *Soft Matter*, 2019, 15(4): 752-769.
- [24] WU JY, LIU SQ, HENG PWS, YANG YY. Evaluating proteins release from, and their interactions with, thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels[J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 102(2): 361-372.
- [25] CLEOPHAS RTC, SJOLLEMA J, BUSSCHER HJ, KRUIJTZER JAW, LISKAMP RMJ. Characterization and activity of an immobilized antimicrobial peptide containing bactericidal PEG-hydrogel[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(9): 3390-3395.

(本文责编 陈宏宇)