

表面功能化

基于贻贝灵感和点击化学构建的高效抗菌涂层

钱继东¹, 郭远来¹, 王星浩¹, 牟小辉¹, 杨志禄^{1,3},
熊开琴^{1,2}, 黄楠¹, 涂秋芬¹

(1.西南交通大学 材料科学与工程学院 材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031;

2.复旦大学 聚合物分子工程国家重点实验室, 上海 200438;

3.南方医科大学附属东莞医院 东莞市人民医院, 广东 东莞 523059)

摘要: **目的** 通过对材料表面进行改性, 形成一层具有抗菌肽 (ABP) 分子的涂层, 使得材料具有高效抗菌的功能。**方法** 利用多巴胺 (DA) 邻苯二酚结构的黏附能力以及己二胺 (HD) 的多胺化学结构, 将 DA 与 HD 按照一定的配比混合, 通过简单的一步分子自组装, 在材料表面构建多巴胺-己二胺 (DA/HD) 基底涂层。通过 DA/HD 涂层表面丰富的氨基与叠氮化的 NHS (NHS-N₃) 发生酰胺反应, 从而在 DA/HD 涂层表面引入叠氮基团, 得到 N₃ 涂层。再通过点击反应在 N₃ 涂层表面接枝 ABP, 得到 ABP 涂层。通过在多种不同材质表面制备 DA/HD 涂层与进行氨基量密度测定, 对 DA/HD 涂层的广谱适用性进行分析。利用水接触角测量仪 (WCA)、傅里叶变换红外仪 (FTIR)、X 射线光电子能谱仪 (XPS)、耗散型石英晶体微天平 (QCM-D) 以及椭圆偏振光谱仪等, 对涂层亲疏水性、成分及结构等进行检测分析。通过细菌试验检测以及与多种已报道抗菌涂层的抗菌率进行综合比较来评价 ABP 涂层的抗菌性能。**结果** 在多种不同材质表面都能成功制备 DA/HD 涂层, 且具有较高的氨基量密度, 表明 DA/HD 涂层具有广谱的适用性。通过 WCA、FTIR、XPS、QCM-D 以及椭圆偏振光谱仪的检测结果, 证实了基于 DA/HD 基底涂层的 ABP 涂层制备成功且接枝量高达 352.7 ng/cm²。表面抗菌试验以及与多种抗菌涂层的抗菌率比较结果表明, ABP 涂层对大肠杆菌和表皮葡萄球菌都具有高效的抗菌率, 且抗菌率分别高达 (89.0±9.9)% 和 (97.3±1.7)%。**结论** DA/HD 涂层具有广谱的适用性。对基底表面进行改性后, 成功在其表面形成一层具有高效抗菌功能的 ABP 涂层。该涂层与细菌直接接触, 能够破坏菌膜, 对革兰氏阴性菌和阳性菌具有高效的抑制作用。

关键词: 表面改性; 贻贝灵感化学; 点击反应; 抗菌肽; 血液接触器械

中图分类号: TB34; TB324 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2023)05-0257-11

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2023.05.025

收稿日期: 2022-03-14; 修订日期: 2022-06-02

Received: 2022-03-14; **Revised:** 2022-06-02

基金项目: 国家自然科学基金 (82072072); 南方医科大学附属东莞医院高层次人才支持与发展计划 (K202102); 四川省国际科技创新合作项目 (2021YFH0056)

Fund: National Natural Science Foundation of China (82072072); the High-level Talents Research and Development Program of Affiliated Dongguan Hospital (K202102); the International Cooperation Project by Science and Technology Department of Sichuan Province (2021YFH0056)

作者简介: 钱继东 (1996—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物材料及器件的表面改性。

Biography: QIAN Ji-dong (1996-), Male, Postgraduate, Research focus: biological materials and surface engineering.

通讯作者: 熊开琴 (1973—), 女, 博士, 工程师, 主要研究方向为生物材料生物相容性、人工器官和植入介入器械表面改性等。

Corresponding author: XIONG Kai-qin (1973-), Female, Doctor, Engineer, Research focus: biocompatibility of biomaterials, surface modification of artificial organs and implantable/interventional devices.

引文格式: 钱继东, 郭远来, 王星浩, 等. 基于贻贝灵感和点击化学构建的高效抗菌涂层[J]. 表面技术, 2023, 52(5): 257-267.

QIAN Ji-dong, GUO Yuan-lai, WANG Xing-hao, et al. Mussel-inspired and Click Chemistry Engineered Surface Strategies for Constructing Efficient Antibacterial Coating[J]. Surface Technology, 2023, 52(5): 257-267.

Mussel-inspired and Click Chemistry Engineered Surface Strategies for Constructing Efficient Antibacterial Coating

QIAN Ji-dong¹, GUO Yuan-lai¹, WANG Xing-hao¹, MOU Xiao-hui¹, YANG Zhi-lu^{1,3},
XIONG Kai-qin^{1,2}, HUANG Nan¹, TU Qiu-fen¹

(1. Key Laboratory of Advanced Technology of Materials of Education Ministry, School of Materials Science and Engineering, Southwestern Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Fudan University, Shanghai 200438, China; 3. Dongguan People's Hospital, Affiliated Dongguan Hospital, Southern Medical University, Guangdong Dongguan 523059, China)

ABSTRACT: It is an advanced surface modification technology that can provide the highly effective antibacterial properties to the substrate material surfaces of the blood contact devices without altering the physical properties of the substrate material by constructing a coating with antibacterial peptide (ABP) molecules on the surface of substrate material. Current substrates for blood contact devices have poor antibacterial properties and are at risk of local or systemic infection after use. In this paper, we investigated the highly effective antibacterial properties of ABP coatings based on mussel-inspired and click chemistry constructs.

As a substrate material for the study, 316L stainless steel was prepared as a disc of 1 cm diameter and 2 mm thickness, smoothed and polished with sandpaper and cleaned with anhydrous ethanol and distilled water, and finally the samples were dried. Firstly, the samples were immersed in Tris-base buffer (10 mM, pH=8.5) containing dopamine (1 mg/mL) and hexanediamine (2.44 mg/mL) at 25 °C for 24 hours. The material with deposits on the surface was then washed by ultrasonication with distilled water and dried under nitrogen to obtain a dopamine-hexanediamine (DA/HD) base coating. Then, the dried DA/HD coated samples were immersed in a PBS buffer solution of NHS-N₃ (1 mg/mL) and submerged for 24 hours at 25 °C. The material was then ultrasonically washed with distilled water and removed and dried with nitrogen to obtain the azidized DA/HD coating (N₃ coating). Finally, the N₃ coating was immersed in a PBS buffered solution of DBCO-ABP (1 mg/mL) for 24 hours at 25 °C. The material was then washed ultrasonically with distilled water and removed and dried with nitrogen to obtain the ABP coating.

Broad-spectrum applicability of DA/HD coatings was analyzed by preparing DA/HD coatings on a variety of different material surfaces and performing amine groups density measurements. The thickness of the coating was calculated through Cauchy model analysis with an ellipsometric polarisation spectrometer (M-2000V). The hydrophile of the material was determined with a water contact angle goniometer (DSA 100). The structural composition of the coating was analyzed with Fourier infrared absorption spectroscopy (Nicolet 5700) and X-ray photoelectron spectroscopy (K-Alpha). The number of ABP molecules grafted on the surface of the N₃ coating was quantified in real time with a dissipative quartz crystal microbalance (Q-sense). The surface morphology of the specimens was observed with a scanning electron microscope (JSM-6390). Finally, the antimicrobial performance of ABP coatings was evaluated by antimicrobial experiments of *E. coli* and *S. epidermidis* and comparison of antimicrobial rates of various antimicrobial coatings.

Dopamine (DA), which contained an adhesion-capable catechol structure, and hexanediamine (HD), which had a polyamine chemical structure, were mixed in a certain ratio to construct a DA/HD substrate coating on the surface of the material in a simple one-step molecular self-assembly. The N₃ coating was obtained by introducing azide group on the surface of the DA/HD coating through the amide reaction between the abundant amino groups on the surface of the DA/HD coating and the azidized NHS (NHS-N₃). The ABP coating was obtained by grafting ABP on the surface of the N₃ coating by click reaction. The successful preparation of DA/HD coatings with a high amine groups density on a wide range of different material surfaces demonstrated the broad spectrum applicability of DA/HD coatings. The results of WCA, FTIR, XPS, QCM-D and ellipsometric polarisation spectroscopy confirmed that ABP coatings based on DA/HD substrate coatings were successfully prepared, the ABP graft on the ABP coating was as high as 352.7 ng/cm². The results of surface antibacterial experiments and comparison of antimicrobial rates of various antimicrobial coatings showed that the ABP coating was highly effective against both *E. coli* and *S. epidermidis* with antibacterial rates of (89.0±9.9)% and (97.3±1.7)% respectively.

The DA/HD coating has a broad spectrum of applicability. ABP coatings with highly effective antibacterial properties is successfully prepared on the surface of the substrate after modification. The coating is in direct contact with bacteria and is able

to provide highly effective inhibition of Gram-negative and positive bacteria by disrupting the bacterial film.

KEY WORDS: surface modification; mussel-inspired chemistry; click reaction; antibacterial peptide; blood contact devices

血液接触类器械是指以植入、半植入、体外循环或离体的方式与血液直接接触的器械, 如储血袋、体外循环氧合系统 (ECMO)、中心静脉导管 (CVC) 和心脏起搏器 (PM) 等器械。器械材料与血液接触时被认定为异物, 血液蛋白会迅速在材料表面吸附, 而激活凝血因子, 还会导致血小板和纤维蛋白原不同程度的激活与黏附, 最终产生因表面诱导而形成的凝血。此外手术操作过程中因器械表面携带细菌或在使用过程中细菌定植在器械表面, 这都可能引发局部或系统性感染的风险。目前, 临床上预防和治疗因器械导致的栓塞或感染常用抗生素和抗凝剂等试剂, 但使用传统的抗生素会造成耐药性副作用, 而使用抗凝剂可能会发生系统性的出血等并发症。因此赋予血液接触性器械抗菌抗凝血功能, 对于降低器械诱导的不良事件发生具有重要意义。

表面改性是解决该类血液接触器械表面问题的有效手段, 通过提高材料表面的抗菌抗凝血性能, 可以大大减少全身系统性给药量, 减小药物带来的副作用。非抗生素类抗菌物质的使用, 也可以有效避免耐药菌相关问题, 使得表面改性策略具有良好的应用前景。尽管目前众多抗凝物质及抗菌物质已被大量研究出来, 适用于各种材质表面的通用化改性技术却寥寥无几, 极大地限制了表面抗菌抗凝多功能改性的发展。

受 2007 年发现的聚多巴胺涂层技术的启发^[1], 在过去十几年中, 使用儿茶酚胺、植物多酚和金属酚对材料表面进行化学改性的方式引起了人们极大的兴趣, 并极大地推动了该方式的广泛应用, 尤其是在生物医学工程领域^[2-6]。这种表面改性技术不仅不依赖材料类别, 而且对宏观到纳米尺度的散装材料的表面改性都是通用的^[7-15]。根据儿茶酚胺表面化学改性方法, 已有研究通过简单的“一锅”共聚反应开发了多巴胺-己二胺 (DA/HD) 涂层技术, 且该涂层表面大量的活性氨基可接枝带有羧基的生物功能分子^[16-17]。

由 Sharpless 等^[18]提出的点击化学 (Click-Chemistry) 反应作为一个基础技术, 具有产率高、反应条件简单、合成反应快速、副产物无害、生物相容性和环境友好性等特殊优势^[19], 使点击化学在表面改性、化学合成、药物开发、生物医学等诸多领域被广泛使用, 将会成为一项理想而又强大的新技术。点击化学反应主要有 4 种类型: 环加成反应、亲核开环反应、非醇醛的羰基化学反应以及碳碳多键的加成反应。其中, 因叠氮-炔基 Huisgen 环加成反应 (Azide-Alkyne Cycloaddition) 的反应温度范围较广、纯物质容易获得、对 pH 不敏感等优势^[20], 是目前应用最广泛、研究最多的一种类型。叠氮-炔基 Huisgen 环加成

反应生成区域选择性的 1,4-二取代-1,2,3-三氮唑^[20]。

抗菌肽 (Antibacterial Peptide, ABP) 是一类具有抗菌活性的碱性多肽物质^[21], 由不同数量 (从 5 到 100) 的氨基酸组成的寡聚肽。到目前为止, 已经发现或合成了超过 5 000 余种抗菌肽。在原核生物 (如细菌) 和真核生物 (如原生动物、真菌、植物、昆虫和动物) 中都存在天然的 ABP^[22-23]。目前根据 ABP 的二级结构, 大多数 ABP 可以分为 4 种类型^[24]: β -折叠、 α -螺旋、扩展型、环状。但常见的是 α -螺旋和 β -折叠, 目前又以 α -螺旋 ABP 的研究最多, 本研究选择 α -螺旋 ABP 为研究对象。

抗菌肽的抗菌机理目前有多种不同的解释, 细菌膜和细菌内是 ABP 抗菌作用的主要部位。由于细菌膜带负电荷, 会吸引并掺入具有净正电荷的抗菌肽, 然后通过环形孔形成 (Toroidal Pore Formation)、地毯形成 (Carpet Formation) 和桶壁形成 (Barrel Stave Formation) 3 种可能的机制引起细菌膜破坏^[25-26]。尽管每种抗菌机制的细节各不相同, 但都提出了因为抗菌肽的诱导使得细菌膜破裂, 导致细菌因细胞质漏出而死亡。然而, 近年来的很多研究揭示了抗菌肽抑菌与发挥抗菌活性的更多途径, 如抗菌肽作用于细菌内充当代谢抑制剂; DNA、RNA 和蛋白质合成的抑制剂; 细胞壁合成或隔膜形成的抑制剂等^[27]。更复杂的是, 一些 ABP 并不直接抑制细菌的生长, 而是通过趋化因子诱导组胺释放、血管生成调节等机制与宿主免疫系统协同作用^[28]。由于传统抗生素与抗菌肽的抑菌机制截然不同, 使得抗菌肽在应对耐药性问题方面具有良好的发展前景, 在某些领域更有可能成为抗生素治疗与预防的替代方案。

本工作中, 以 316L 不锈钢 (316L SS) 为基底材料, 在其表面制备操作简单、表面具有大量能生物接枝的氨基且结合牢固的 DA/HD 基底涂层^[16-17], 并利用生物相容性好、不影响 ABP 生物活性^[19]的点击化学在 DA/HD 基底涂层上构建 ABP 涂层, 给予基底材料高效的抗菌功能, 同时研究了 ABP 涂层的表面微观形貌、化学结构和抗菌性能。

1 试验

1.1 涂层的制备

ABP 涂层制造工艺示意图如图 1 所示, 首先采用一步“浸涂”工艺在 316L SS (由成都 Derbo 钢铁有限公司加工) 材料表面制备获得 DA/HD 涂层。具体步骤为: 将样品浸入含有 DA (1 mg/mL)、HD (2.44 mg/mL) 的 Tris-HCl 缓冲液 (10 mmol/L,

pH=8.5) 中, 浸没 24 h, 然后将表面有沉积物的材料用蒸馏水超声洗净, 取出用氮气干燥, 即可获得 DA/HD 涂层。

DA/HD 涂层表面有大量的氨基, 利用化学偶联方法, 让 DA/HD 涂层表面的氨基与叠氮化的 N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS-N₃) 的 NHS 发生酰胺缩合反应, 使 DA/HD 涂层表面引入大量叠氮官能团, 从而得到叠氮化的 DA/HD 涂层 (N₃ 涂层), 其反应机理如图 2a 所示。

利用点击反应, 让 N₃ 涂层表面的叠氮官能团与二苯基环辛炔-抗菌肽 (DBCO-ABP, 分子结构如图 2c 所示) 的 DBCO 官能团发生点击反应, 形成稳定而强有力的 1,4-二取代-1,2,3-三氮唑, 将 ABP 成功接枝到 N₃ 涂层表面, 最终得到具有抗菌功能的涂层 (ABP 涂层), 其点击反应机理如图 2b 所示。

1.2 结构分析及性能测试

将 DA/HD 涂层制备在 316L 不锈钢 (316L SS)、聚氯乙烯 (PVC)、二氧化钛 (TiO₂)、铜 (Cu)、单晶硅 (Si)、硅橡胶 (SR)、聚氨酯 (PU)、玻璃 (Glass) 等不同材质表面, 再在不同材质及不同材质上的 DA/HD 涂层表面滴加 300 μL 的 1.75 mg/mL 酸性橙 II (AO II) 溶液 (溶剂为 pH=4 的盐酸溶液), 37 °C 下反应 8 h。然后用 pH=4 的盐酸溶液清洗 3 次并干燥, 再加入 300 μL 的氢氧化钠溶液 (0.4 mg/mL), 室温下反应 30 min。反应后吸取 250 μL 的反应液置于 96 孔板中, 在 485 nm 处测定吸光度值, 最后根据标准曲线换算成氨基密度值。同时也制备一系列梯度浓度的 AO II 溶液 (溶剂为 0.4 mg/mL 氢氧化钠溶液), 测定并绘制标曲。

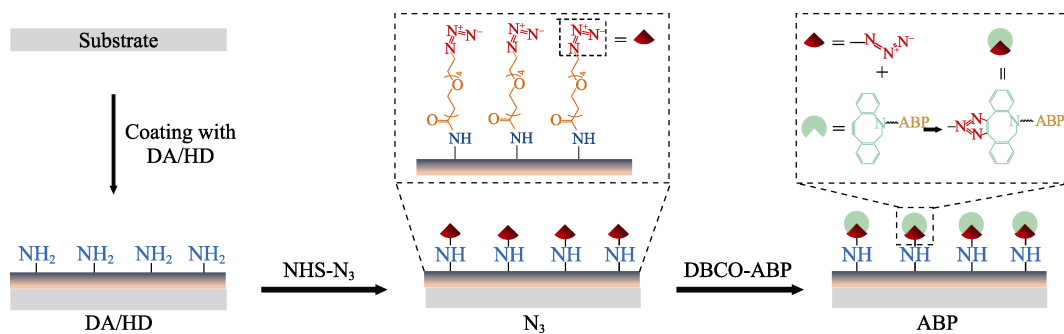
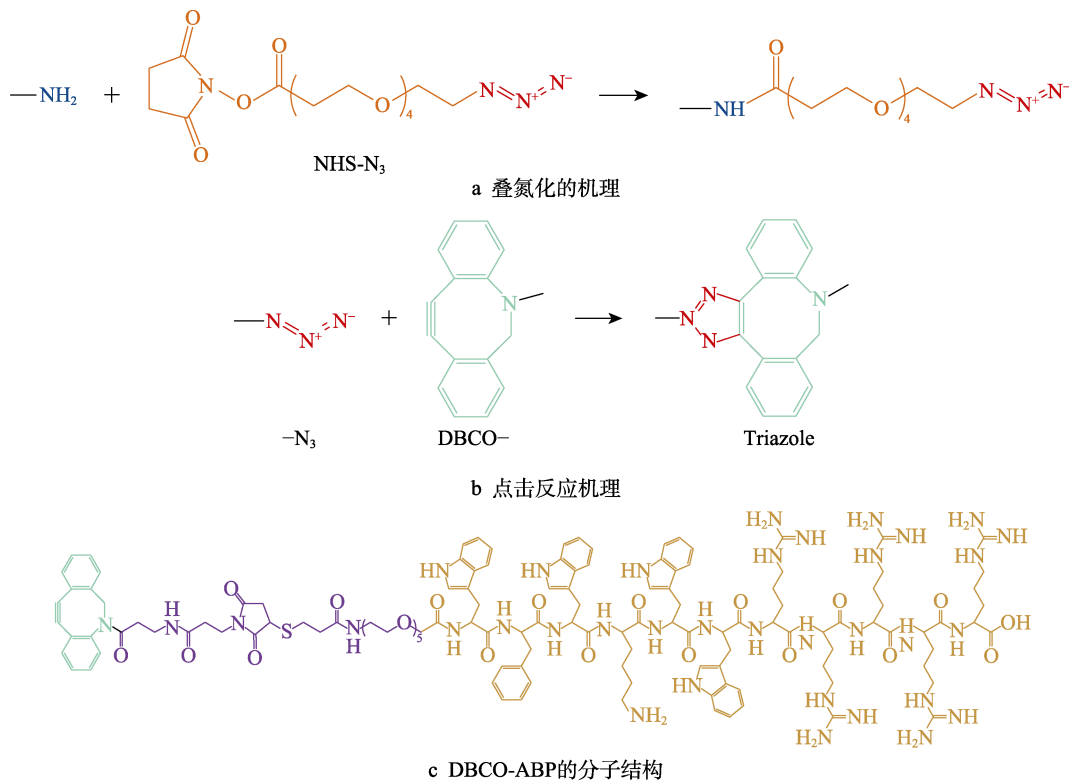


图 1 ABP 涂层制造工艺示意图

Fig.1 Schematic diagram of ABP coating fabrication process



c DBCO-ABP 的分子结构

图 2 反应机理及涂层的分子结构示意图

Fig.2 Schematic diagram of reaction mechanism (a, b) and molecular structure (c) of the coating

通过椭圆偏振光谱仪 (M-2000V, USA) 在波长 370~1 000 nm 内测定出 Δ 和 Ψ 值, 采用 Cauchy 模型分析计算出涂层的厚度。

采用水接触角测量仪 (DSA 100 Mk 2, Germany) 测定材料亲疏水性, 室温下, 在各种涂层上滴加少量超纯水 (5 μ L), 稳定 3 s 后进行成像, 然后使用 DSA 1.8 软件对水接触角 (WCA) 进行定量分析。每组分析 4 个样品, 每个样品测试 3 个区域。

应用傅里叶红外吸收光谱仪 (Nicolet 5700, USA)、X 射线光电子能谱仪 (K-Alpha, USA) 检测分析涂层的结构组成。

采用耗散型石英晶体微天平 (Q-sense Analyzer, Sweden) 实时定量检测 N_3 涂层表面接枝的 ABP 分子的数量。在石英晶片 (ϕ 1 cm, 5 MHz) 工作表面预先制好 N_3 涂层, 并正确安装在耗散型石英晶体微天平 (QCM-D) 腔室中。然后, 以 50 μ L/min 的流量将磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 缓冲溶液 (pH=7.4) 泵入腔室, 并记录石英晶体的频率变化。频率达到平台期后, 将 10 μ g/mL DBCO-ABP (溶解于 PBS 中) 泵入腔室, 直到频率稳定, 然后泵入 PBS 溶液 (pH=7.4) 以去除物理吸附的 DBCO-ABP, 待频率稳定后, 暂停运行并保存数据。最后, 利用 Q-Tools 软件采用索方程将频率变化转换为质量变化^[29]。

采用扫描电镜 (JSM-6390, Japan) 对试样进行表面形貌观察, 拍摄倍数选择是 5 000 倍、10 000 倍。

本次试验采用革兰氏阴性菌的典型菌种大肠杆菌 (*E. coli*), 以及革兰氏阳性菌的典型菌种表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)。试验步骤及内容如下:

1) 细菌在固体培养基 (酵母提取物 5 g/L, 胰蛋白酶 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, 琼脂 15 g/L, 用超纯水溶解) 中 37 $^{\circ}$ C 下预培养 24 h, 并进行 2 次传代培养, 使其成为单克隆细菌。用接种环摘取固体培养基上的新鲜细菌菌落 (1~2 环), 用 0.2% 液体培养基/99.8% NaCl (液体培养基: 酵母提取物 5 g/L, 胰蛋白酶 10 g/L, NaCl 10 g/L, 用超纯水溶解) 溶解。将上述细菌溶液分别加在样品表面, 用五角膜覆盖以保持湿润, 进行 10 倍递增的顺序稀释, 浓度调整为 $5.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^6$ CFU/(200 mL)。所有样品在 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中放置 24 h, 之后将表面细菌冲洗干净并溶解在盐水中 (20 mL)^[30]。

2) 平板计数及抗菌率计算: 将 200 μ L 上述细菌溶液加入固体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h 后, 对固体培养基上的菌落进行拍照并计数 (必要时使用 ImageJ 软件辅助统计)。该试验对照组为 316L SS, 试验组记为 sample, 设 2 组样品表面的菌落数分别为 $N_{316L SS}$ 、 N_{sample} , 则试验组的抗菌率 R 计算公式见式 (1)。数据以平均值 \pm SD 表示, 并通过单因素方差分析 ($n=4$, *** $p<0.001$)。

$$R = [(N_{316L SS} - N_{sample}) / N_{316L SS}] \times 100\% \quad (1)$$

3) 细菌的形态及数量 SEM 拍摄: 将 100 μ L 步骤 1 的细菌溶液滴加到样品涂层表面, 并覆盖 PE 膜使菌液在整个表面浸润。保持湿润, 在 37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱孵育 24 h 后, 用 2.5% 戊二醛固定 12 h, 然后分别依次用 25%、50%、75%、90%、100% 酒精进行脱水处理, 再真空干燥 12 h。利用扫描电子显微镜 (SEM) 对干燥好的样品拍摄, 拍摄倍数选择 5 000 倍、20 000 倍。

2 结果与讨论

2.1 DA/HD 涂层的广泛适用性

本研究选取 316L SS、PVC、TiO₂、Cu、Si、SR、PU、Glass 多种材质, 研究 DA/HD 涂层是否都能在这些基底上制备以及是否具有的一致性。将 DA/HD 涂层制备在各涂层表面, 并对各材质及各材质表面的 DA/HD 涂层进行氨基量密度测定, 结果如图 3 所示。

图 3a 是在不同材质表面制备 DA/HD 涂层前后的图片, 不同材质在制备涂层前后颜色变化较为明显, 表明将 DA/HD 涂层都成功制备在各材质表面。图 3b 是吸光度值-氨基量密度的关系标准曲线, 其关系可用式 (2) 表示, 其中 y 是氨基量密度, x 是吸光度值。

$$y = 45.7x - 1.8 \quad (2)$$

图 3c 是不同基底表面制备 DA/HD 涂层前后的氨基量密度, 可看出在各裸基底表面的氨基都极低, 几乎接近为零, 能被测出一定量的氨基量, 其原因可能是表面物理吸附的 AO II 被测定出来。与裸基底相比, 各基底表面制备的 DA/HD 涂层都有密度较高的氨基量, 均在 10 nmol/cm² 以上, 体现了化学上的一致性, 同时也表明 DA/HD 涂层能在不同基底表面成功制备, 并具有广泛适用性。

2.2 涂层的表征及分析

本研究选取 316L SS 基材为研究对象, 316L SS 和各涂层的照片、厚度和水接触角的变化如图 4 所示。如图 4a 所示, 所得的 DA/HD、 N_3 和 ABP 涂层都显示出典型的棕褐色, 但与 DA/HD 涂层相比, 基于 DA/HD 涂层叠氮化所得到的 N_3 涂层以及接枝 ABP 得到的 ABP 涂层的颜色变化不明显。其原因可能是 DA/HD 涂层的叠氮化以及 N_3 涂层的 ABP 接枝, 在可见光程度对 DA/HD 涂层的遮蔽作用不强。

为进一步验证观察到的现象, 首先用椭圆偏光仪对涂层厚度进行检测, 结果如图 4b 所示, 随着 316L SS 表面沉积 DA/HD 涂层后, DA/HD 涂层的叠氮化到 ABP 分子的接枝, 使得 DA/HD 涂层的厚度从 (59.2 \pm 3.3) nm 增加到 (63.1 \pm 0.9) nm, 然后增加到 (67.8 \pm 1.9) nm, 表明 DA/HD 涂层的叠氮化以及最后 ABP 分子的接枝都是成功的。

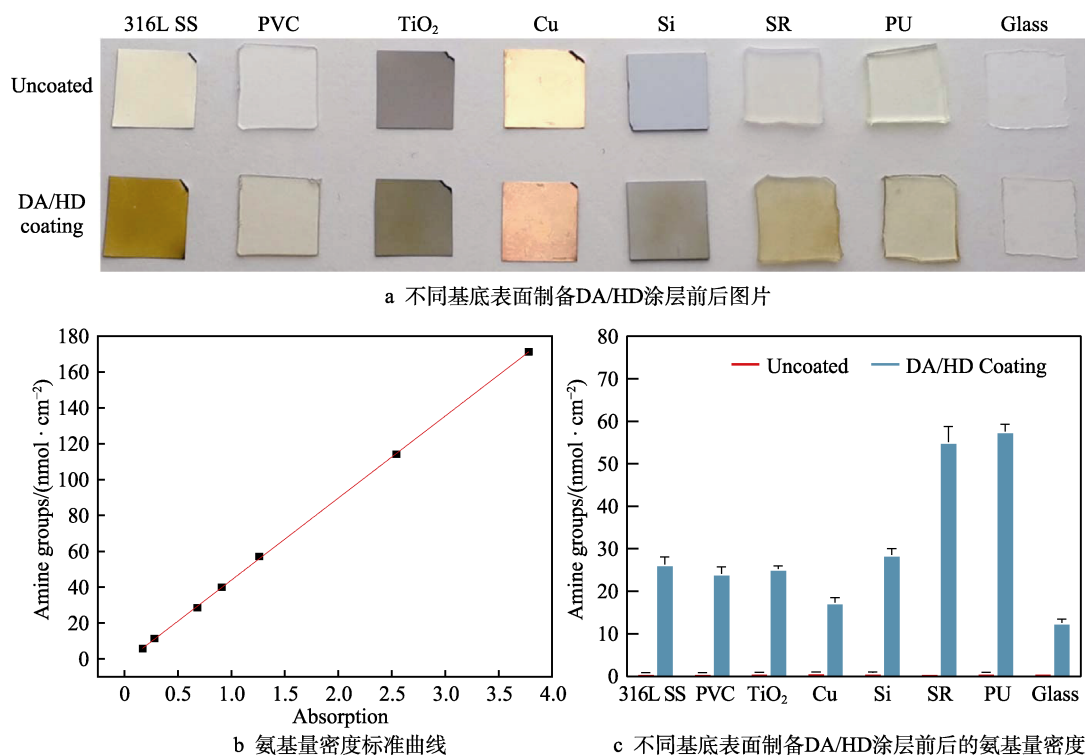


图3 不同基底表面制备DA/HD涂层前后的图片与氨基量密度以及氨基量密度标准曲线
Fig.3 Images (a) and amine groups density (c) before and after preparation of DA/HD coatings on different substrates, and standard curves of amine groups densities (b)

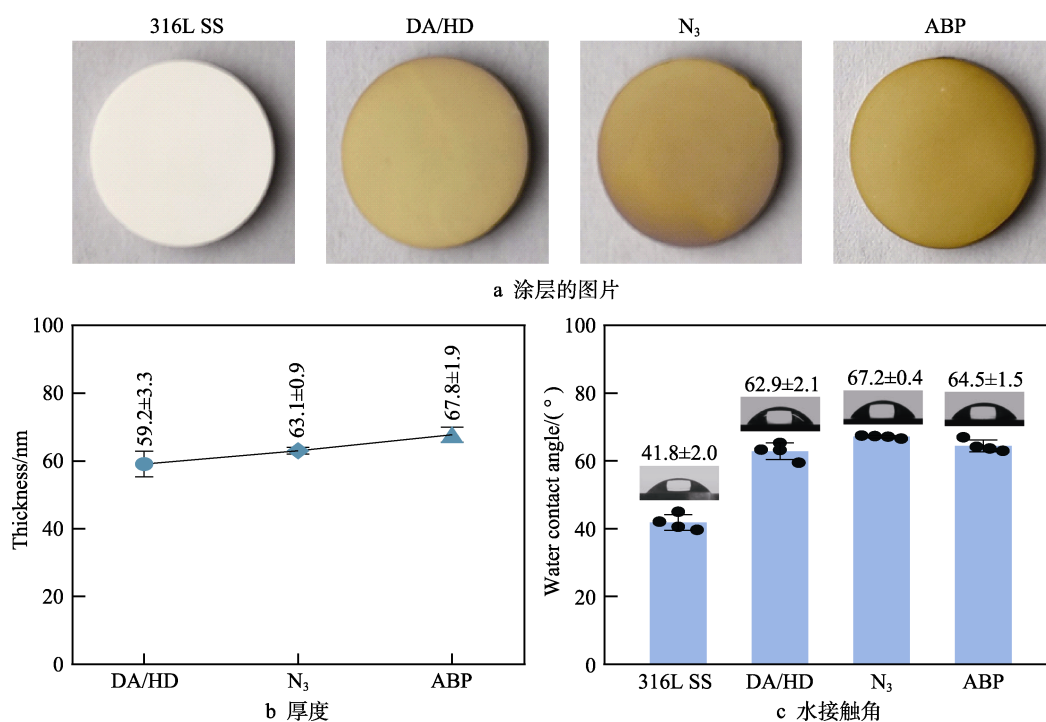


图4 316L SS和涂层的照片、厚度和水接触角的变化

Fig.4 Variation of macroscopic images (a), thickness (b) and water contact angle (c) of 316L SS and the coating

水接触角的大小可以非常直观地体现材料的亲疏水性,而材料的亲疏水性与生物相容性又有着密切的关系^[31]。对材料亲疏水性影响较大的是表面所具有的官能团类型,如氨基、醛基、羟基等都是亲水性较强的官能团,更易形成亲水的水接触角。如图4c所

示,与316L SS的水接触角相比,DA/HD涂层的水接触角由(41.8±2.0)°增加到(62.9±2.1)°,其原因是多种因素发生改变的共同结果,例如可能是制备的DA/HD涂层改变了基底表面的粗糙度,以及该涂层中的羟基被氧化成醛基等多种因素,结果表明,

DA/HD 涂层的沉积是成功的, 才使得水接触角发生较大的变化。而 DA/HD 涂层表面被叠氮化后, 水接触角略微增加至 $(67.2 \pm 0.4)^\circ$, 这是因为 NHS- N_3 的 NHS 官能团与 DA/HD 涂层表面的氨基发生反应, 消耗 DA/HD 涂层表面的亲水官能团氨基, 表明 DA/HD 涂层表面被叠氮化是成功的。DA/HD 涂层被叠氮化后所得的 N_3 涂层上面接枝 ABP 后, 水接触角降低至 $(64.5 \pm 1.5)^\circ$, 其原因是接枝 ABP 分子后, 涂层表面引入了大量较强亲水性官能团的氨基、羧基等, 表明 N_3 涂层表面通过 N_3 官能团与 DBCO-ABP 的 DBCO 活性官能团发生点击反应而接枝 ABP 是成功的。

傅里叶红外吸收光谱仪能定性分析材料表面分子的结构组成及官能团等信息, 本试验检测结果如图 5 所示。从图谱中可看出, DA/HD 在 1650 cm^{-1} 处的吸收峰是 DA 的酚羟基 ($\text{C}-\text{O}$) 氧化成的醌 ($\text{C}=\text{O}$) 结构的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 证实在基材表面成功地自组装了富氨基的 DA/HD 涂层。 N_3 、ABP 涂层在 1650 cm^{-1} 处的吸收峰是酰胺键的酰胺 I 带谱带 ($-\text{C}=\text{O}$) 峰。 1554 cm^{-1} 处的吸收峰是酰胺键的酰胺 II 带谱带 ($-\text{NH}$) 峰和芳环 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动峰。 1091 cm^{-1} 出现的弱峰是 NHS- N_3 、DBCO-ABP 分子中的软段结构中 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 的伸缩振动峰。ABP 涂层在 1124 cm^{-1} 处的特征吸收峰是抗菌肽分子上的仲胺 ($\text{R}_1-\text{NH}-\text{R}_2$) 的 $\text{C}-\text{N}$ 的吸收峰, 在 1735 cm^{-1} 处的特征吸收峰是抗菌肽分子末端羧基的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰, 而且在 1446 、 1238 、 752 cm^{-1} 处出现新的吸收峰, 这些吸收峰的位置正是端叠氮与炔基发生点击反应生成的五元杂环 1,2,3-三氮唑的特征吸收峰波数。以上数据表明, DA/HD 涂层被成功叠氮化, 并得到 N_3 涂层, 同时也表明 ABP 成功接枝到 N_3 涂层上, 即 ABP 涂层构建成功。

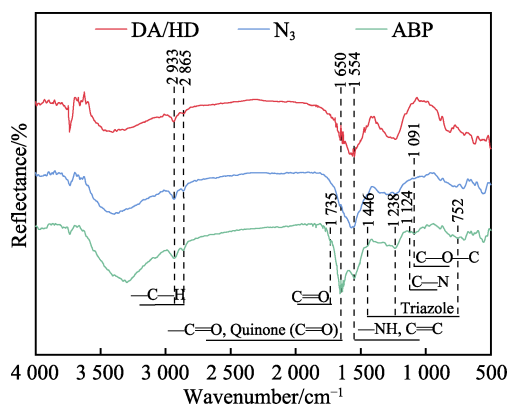


图 5 涂层的 FTIR 光谱
Fig.5 FTIR spectra of coating

本试验分别对 DA/HD、 N_3 和 ABP 涂层表面进行 XPS 检测, 各样品表面全谱图如图 6a 所示, 特征元素含量百分比如图 6b 所示。从图 6 中可知, 样品表面均检测出 C、N、O、S 元素, 且不同样品表面检测

出的 C、N、O、S 的原子含量呈现出不同的趋势变化。因为 NHS- N_3 的 O/C 元素含量比为 45.5%, 相较于 DA/HD 涂层, N_3 涂层的 O/C 元素含量比从 5.7% 增加至 6.8%, 表明成功将 NHS- N_3 分子接枝到 DA/HD 涂层表面。在 N_3 涂层表面接枝 ABP 后, O/C 元素含量比从 6.8% 降低至 5.7%, 因为相较于 NHS- N_3 分子的 O/C 值 45.5%, DBCO-ABP 分子的 O/C 值很低, 为 17.8%, 接枝上 ABP 之后, 涂层的 O/C 值会倾向于 DBCO-ABP 分子的 O/C 值。同时, ABP 涂层相较于 N_3 涂层, S 元素含量明显提高, 其原因是 DBCO-ABP 分子中有 S 元素, 这也表明成功将 ABP 分子接枝到 N_3 涂层表面, 制备得到 ABP 涂层。

如图 6b 所示, DA/HD 涂层中能测出 S 元素, 其原因是 XPS 电子束穿透 DA/HD 涂层导致基体材料 316L SS 中的 S 元素被检出。 N_3 涂层相比于 DA/HD 涂层, S 元素含量显著减少, 因为 ABP 涂层对基底有进一步的覆盖, 间接证实 N_3 涂层制备是成功的。

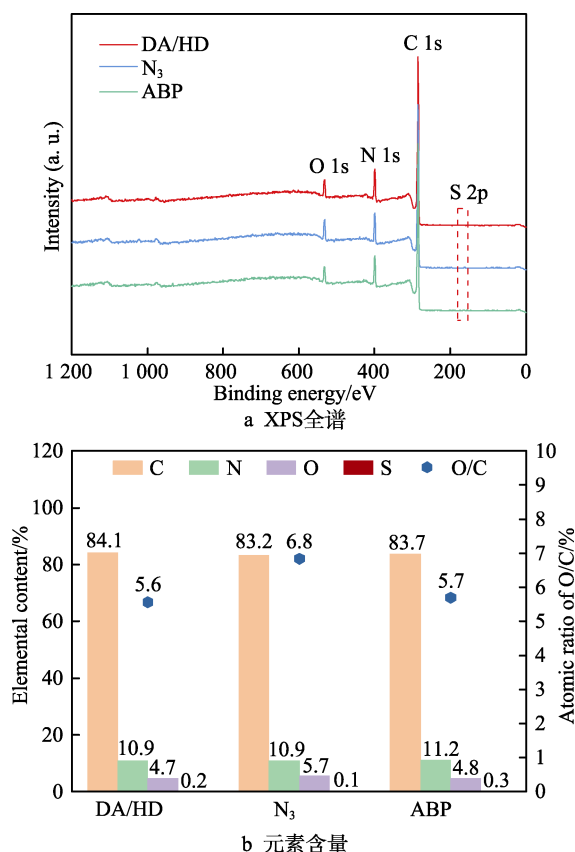


图 6 涂层的 XPS 全谱图以及元素含量图
Fig.6 XPS spectra (a) and element content (b) of coating

2.3 ABP 接枝量结果

耗散型石英晶体微天平 (QCM-D) 以纳米尺度的分辨率检测传感器表面的质量变化, 可实时动态监测分子接枝量变化。本试验的检测结果如图 7 所示, 是 QCM-D 实时检测 ABP 分子在 DA/HD 涂层引入

N_3 官能团涂层上的接枝量变化情况,可以看出,使用 PBS 缓冲液跑平基线后,在 1 h 后通入 DBCO-ABP 反应液, N_3 涂层表面的质量急剧上升,且随着反应时间的增加,ABP 接枝量逐渐趋于平稳。当反应进行约 24 h 后, N_3 涂层表面的 ABP 接枝量几乎不再增加,其接枝量已经近乎饱和,此时将 DBCO-ABP 反应液替换为 PBS 缓冲液,以清洗掉涂层表面物理吸附的 ABP,故曲线在 25 h 时出现略微下降的情况,此后又趋于平缓。该涂层的最终质量即为 ABP 分子的接枝量,约为 352.7 ng/cm^2 。

ABP 的接枝量结果表明,首先可以侧面证明 DA/HD 涂层的叠氮化是成功的,并且 N_3 官能团的密度较高;同时也直接证明了 N_3 涂层上的 ABP 分子接枝是成功的,而且接枝量较高。

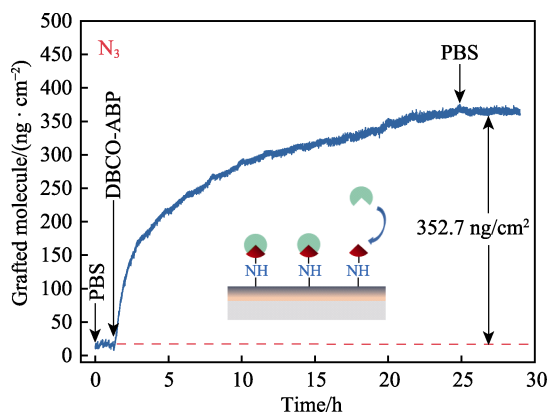


图 7 DBCO-ABP 接枝到 N_3 涂层上的 QCM-D 实时监测
Fig.7 DBCO-ABP grafted to N_3 coating monitored by QCM-D in real time

2.4 涂层的表面形貌

316L SS、DA/HD、 N_3 和 ABP 涂层的表面形貌如图 8 所示,未做改性的 316L SS 表面有存在抛光留下的划痕,在 316L SS 表面沉积 DA/HD 涂层后,能看到 DA/HD 涂层表面有明显的小颗粒,而且基本上没有划痕,其原因是 DA/HD 涂层将 316L SS 表面的

划痕覆盖,证明 DA/HD 涂层制备是成功的。相较于 DA/HD 涂层,叠氮化的 N_3 涂层带来的变化可能通过肉眼看不出来,而依然有明显的小颗粒。接枝 ABP 后的 ABP 涂层相较于 N_3 涂层而言,依然存在小颗粒,但小颗粒略微变小了,其原因可能是拍摄位置不一样,因此表面的分子接枝对表面形貌带来的变化难以通过观察确定。

2.5 表面抗菌试验

抗菌试验测试后进行菌落培养得到的菌落图如图 9a 所示,ABP 涂层的革兰氏阴性菌(大肠杆菌)及阳性菌(表皮葡萄球菌)菌落数量相比于 316L SS、DA/HD 涂层及 N_3 涂层显著降低。如图 9b、图 9c 所示,分别是基于大肠杆菌和表皮葡萄球菌菌落计数的抗菌率统计数据,计算公式为等式(1)。结果表明,ABP 组样品针对大肠杆菌和表皮葡萄球菌的抗菌效率分别高达 $(89.0 \pm 9.9)\%$ 和 $(97.3 \pm 1.7)\%$,而且 ABP 组的抗菌效率与 DA/HD 组及 N_3 组的抗菌效率有显著性差异 ($p < 0.001$)。该试验结果表明了 ABP 涂层可以有效地对革兰氏阴性菌和阳性菌产生抑制。

利用 SEM 可以很好地观察表面黏附细菌的状态,直观观察 ABP 涂层表面与细菌的相互作用。如图 10 所示,ABP 涂层上的抗菌肽明显降低了细菌的黏附数量,而且在大倍数图中还可以看到,大肠杆菌和表皮葡萄球菌的菌体形状及菌膜出现明显异常,大肠杆菌和表皮葡萄球菌的菌膜均出现孔洞结构,表现为皱缩态,这可能与抗菌肽作用于菌膜使其穿孔,细菌内容物流出导致死亡有关。

2.6 抗菌性能对比

通过将本研究涂层的抗菌率与其他报道过的抗菌涂层的抗菌率进行对比,其对比数据如表 1 所示,本研究的 ABP 涂层对大肠杆菌和表皮葡萄球菌的抗菌率分别为 $(89.0 \pm 9.9)\%$ 和 $(97.3 \pm 1.7)\%$,对大肠杆菌的抗菌率比纳米银涂层深静脉导管和抗菌多肽 c-hLF1-11

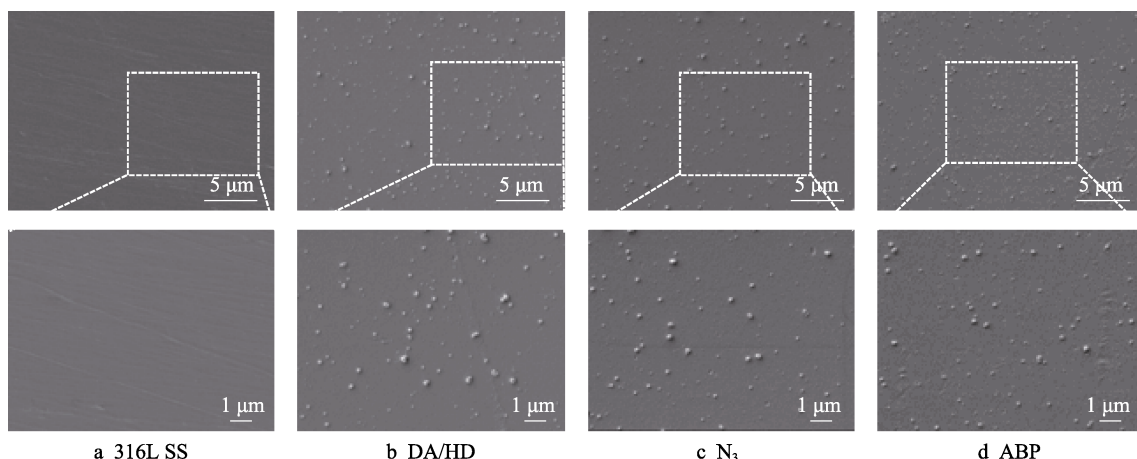


图 8 316L SS 和涂层的 SEM 表面形貌
Fig.8 SEM surface morphology of 316L SS and the coating

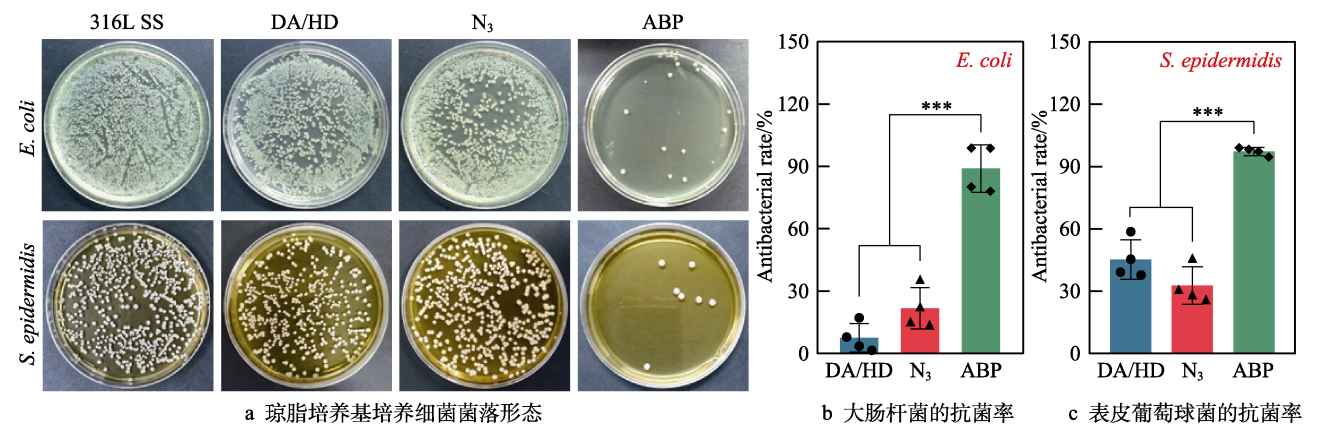


图 9 琼脂培养基培养细菌菌落形态及涂层对大肠杆菌和表皮葡萄球菌的抗菌率
Fig.9 Morphology of bacterial colony cultured in AGAR medium (a), antibacterial rate of coatings against *E. coli* (b) and *S. epidermidis* (c)

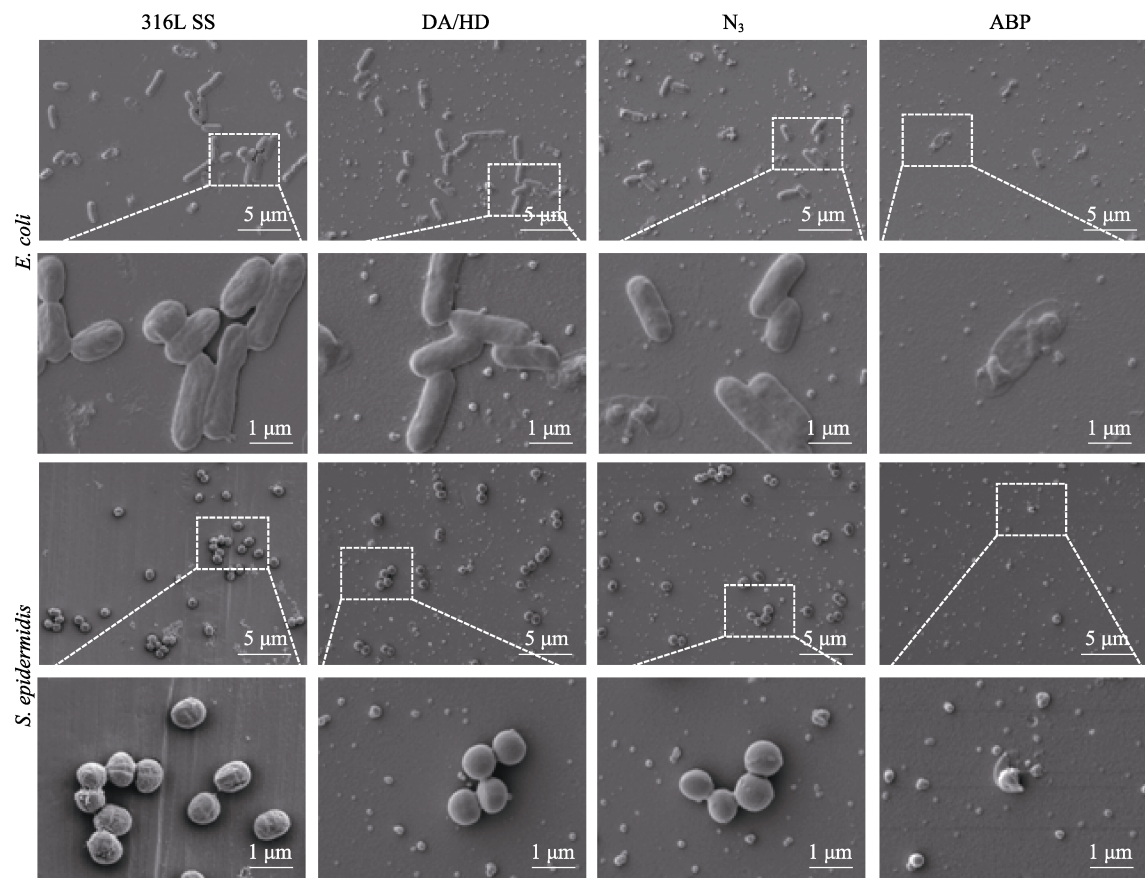


图 10 SEM 表征样品表面细菌形貌
Fig.10 Morphology of bacteria on samples characterized by SEM

表 1 不同抗菌涂层的抗菌率

Coatings	Antibacterial rates (<i>E. coli</i>)	Antibacterial rates (<i>S. epidermidis</i>)	Antibacterial rates (<i>S. aureus</i>)	References
Silver loaded titanium dioxide antibacterial coated endotracheal intubation tube	98.0%	—	—	[32]
Nano-silver coating deep venous catheter	87.4%	91.2%	91.2%	[33]
The titanium surface grafted with antibacterial peptide c-hLF1-11	54.3%	—	49.9%	[34]
Antibacterial polypeptide c-hLF1-11 was grafted onto pure titanium coating with PEG as spacer	90.1%	—	93.1%	[34]

化学接枝在医用钛表面的涂层的抗菌率都高,而且抗表面葡萄球菌效率也比抗菌多肽 c-hLF1-11 化学接枝在医用钛表面的涂层的抗菌率高。与以 PEG 为链接剂将抗菌多肽 c-hLF1-11 接枝到纯钛的涂层相比,ABP 涂层对大肠杆菌的平均抗菌率则略低于 1.1%,但因 ABP 涂层对大肠杆菌的抗菌率的 SD 值为 9.9%,则两者的抗菌率无差异性,但 ABP 涂层的抗表面葡萄球菌效率却高达(97.3±1.7)%。综合而言,本研究的 ABP 涂层具有良好的抗菌性能,在抗菌材料方面具有良好的前景。

3 结论

1) 采用一步分子自组装方法在基底表面制备富含氨基的 DA/HD 涂层,在多种不同基底表面都能成功制备,具有广泛的适用性。

2) 选取 316L SS 为基底并在表面制备 DA/HD 涂层,再利用 NHS-N₃ 将 DA/HD 涂层叠氮化,最后通过点击反应成功高效地接枝 ABP,在基材表面成功地制备了 ABP 涂层。

3) 对制备的 ABP 涂层进行功能验证得出,ABP 涂层对革兰氏阴性菌和阳性菌都能高效地产生抑制效果,对大肠杆菌和表皮葡萄球菌的抗菌率分别高达(89.0±9.9)%和(97.3±1.7)%。

4) 通过与多种抗菌涂层的抗菌性能进行比较,得出 ABP 涂层具有良好的抗菌功能,并因为策略制备操作简便的优势,使得此策略在血液接触材料/装置表面功能修饰领域具有巨大的潜力。

参考文献:

- [1] LEE H, DELLATORE S M, MILLER W M, et al. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings[J]. *Science*, 2007, 318(5849): 426-430.
- [2] LEE J S, LEE J S, LEE M S, et al. Plant Flavonoid-Mediated Multifunctional Surface Modification Chemistry: Catechin Coating for Enhanced Osteogenesis of Human Stem Cells[J]. *Chemistry of Materials*, 2017, 29(10): 4375-4384.
- [3] SCHLAICH C, WEI Qiang, HAAG R. Mussel-Inspired Polyglycerol Coatings with Controlled Wettability: From Superhydrophilic to Superhydrophobic Surface Coatings[J]. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2017, 33(38): 9508-9520.
- [4] SAKIHAMA Y, COHEN M F, GRACE S C, et al. Plant Phenolic Antioxidant and Prooxidant Activities: Phenolics-Induced Oxidative Damage Mediated by Metals in Plants[J]. *Toxicology*, 2002, 177(1): 67-80.
- [5] GUO Jun-ling, WANG Xiao-wei, HENSTRIDGE D C, et al. Nanoporous Metal-Phenolic Particles as Ultrasound Imaging Probes for Hydrogen Peroxide[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2015, 4(14): 2170-2175.
- [6] JU Yi, CUI Ji-wei, SUN Huan-li, et al. Engineered Metal-Phenolic Capsules Show Tunable Targeted Delivery to Cancer Cells[J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(6): 2268-2276.
- [7] SILEIKA T S, BARRETT D G, ZHANG Ran, et al. Colorless Multifunctional Coatings Inspired by Polyphenols Found in Tea, Chocolate, and Wine[J]. *Angewandte Chemie*, 2013, 125(41): 10966-10970.
- [8] FEI Bin, QIAN Bai-tai, YANG Zong-yue, et al. Coating Carbon Nanotubes by Spontaneous Oxidative Polymerization of Dopamine[J]. *Carbon*, 2008, 46(13): 1795-1797.
- [9] KIM J K, LEE H A, LEE H, et al. Phenolic Pyrogallol Fluorogen for Red Fluorescence Development in a PAS Domain Protein[J]. *Chemistry of Materials*, 2018, 30(5): 1467-1471.
- [10] ZHENG Xian-ying, ZHANG Ji-xi, WANG Jie, et al. Polydopamine Coatings in Confined Nanopore Space: Toward Improved Retention and Release of Hydrophilic Cargo[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2015, 119(43): 24512-24521.
- [11] LIU Yan-lan, AI Ke-long, LIU Jian-hua, et al. Dopamine-Melanin Colloidal Nanospheres: An Efficient Near-Infrared Photothermal Therapeutic Agent for in Vivo Cancer Therapy[J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(9): 1353-1359.
- [12] KONG Jun-hua, YEE W A, WEI Yue-fan, et al. Silicon Nanoparticles Encapsulated in Hollow Graphitized Carbon Nanofibers for Lithium Ion Battery Anodes[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(7): 2967-2973.
- [13] KANG S M, RYOU M H, CHOI J W, et al. Mussel- and Diatom-Inspired Silica Coating on Separators Yields Improved Power and Safety in Li-Ion Batteries[J]. *Chemistry of Materials*, 2012, 24(17): 3481-3485.
- [14] RYOU M H, LEE Yong min, PARK J K, et al. Mussel-Inspired Polydopamine-Treated Polyethylene Separators for High-Power Li-Ion Batteries[J]. *Advanced Materials*, 2011, 23(27): 3066-3070.
- [15] GAO Hong-cai, SUN Yi-min, ZHOU Jia-jing, et al. Mussel-Inspired Synthesis of Polydopamine-Functionalized Graphene Hydrogel as Reusable Adsorbents for Water Purification[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5(2): 425-432.
- [16] YANG Ying, QI Peng-kai, DING Yong-hui, et al. A Biocompatible and Functional Adhesive Amine-Rich Coating Based on Dopamine Polymerization[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(1): 72-81.

- [17] 高鹏. 基于一氧化氮催化释放的内皮功能仿生涂层应用于心血管支架研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2020.
- GAO Peng. Application of Endothelial Functional Bionic Coating Based on Catalytic Release of Nitric Oxide in Cardiovascular Stent Research[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2020.
- [18] KOLB DR H C, FINN PROF M G, PROF K S. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a few Good Reactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, 40(11): 2004-2021.
- [19] MCKAY C, FINN M G. Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation[J]. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(9): 1075-1101.
- [20] WORRELL B T, MALIK J A, FOKIN V V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions[J]. *Science*, 2013, 340(6131): 457-460.
- [21] 王为栋, 孙海娟. 抗菌肽生物活性及其作用机理研究进展[J]. *当代畜牧*, 2018(11): 32-34.
- WANG Wei-dong, SUN Hai-juan. Research Progress on Antimicrobial Peptides Bioactivity and Its Mechanism[J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2018(11): 32-34.
- [22] RADEK K, GALLO R. Antimicrobial Peptides: Natural Effectors of the Innate Immune System[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2007, 29(1): 27-43.
- [23] LEIPPE M. Antimicrobial and Cytolytic Polypeptides of Amoeboid Protozoa-Effector Molecules of Primitive Phagocytes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1999, 23(4-5): 267-279.
- [24] POWERS J P S, HANCOCK R E W. The Relationship between Peptide Structure and Antibacterial Activity[J]. *Peptides*, 2003, 24(11): 1681-1691.
- [25] BAHAR A, REN Da-cheng. Antimicrobial Peptides[J]. *Pharmaceuticals*, 2013, 6(12): 1543-1575.
- [26] 邱华. 血液接触器械抗菌抗凝血双功能涂层的构建[D]. 成都: 西南交通大学, 2020.
- QIU Hua. Construction of Dual-Functional Coatings for Surface Tailoring of Blood-Contacting Devices to Prevent Thrombus and Infection[D]. Chengdu: Southwestern Jiaotong University, 2020.
- [27] BROGDEN K A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(3): 238-250.
- [28] DIAMOND G, BECKLOFF N, WEINBERG A, et al. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15(21): 2377-2392.
- [29] OLSSON A L J, VAN DER MEI H C, BUSSCHER H J, et al. Acoustic Sensing of the Bacterium-Substratum Interface Using QCM-D and the Influence of Extracellular Polymeric Substances[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 357(1): 135-138.
- [30] XIAO Yu, WANG Wen-xuan, TIAN Xiao-hua, et al. A Versatile Surface Bioengineering Strategy Based on Mussel-Inspired and Bioclickable Peptide Mimic[J]. *Research*, 2020, 2020: 1233.
- [31] CAI Kai-yong, FRANT M, BOSSERT J, et al. Surface Functionalized Titanium Thin Films: Zeta-Potential, Protein Adsorption and Cell Proliferation[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, 50(1): 1-8.
- [32] JIANG Xu-hong, WANG Y, HUA J, et al. Study on Antibacterial Property of Silver Loaded Titanium Dioxide Antibacterial Coated Endotracheal Intubation Tube[J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2014, 26(5): 343-346.
- [33] 刘衍智. 纳米银涂层深静脉导管的体外抗菌研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- LIU Yan-zhi. Antibacterial Study on Deep Venous Catheter Coated with Nano-Silver in Vitro[D]. Nanchang: Nanchang University, 2013.
- [34] 赵亮. 医用钛表面抗菌多肽 c-hLF1-11 涂层的构建及不同分子量 PEG 对其抗菌性能的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- ZHAO Liang. Construction of Antibacterial Polypeptide c-hLF1-11 Coating on Medical Titanium Surface and the Effect of PEG with Different Molecular Weights on Its Antibacterial Properties[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.

责任编辑: 万长清