

# 基于贻贝仿生构建高效抗菌及良好血液相容性的聚胺-酚表面

孟昊天<sup>1a</sup>, 李鹏程<sup>1a</sup>, 魏嘉佳<sup>1a</sup>, 王文轩<sup>1a</sup>, 李天瑀<sup>1a</sup>,  
黄楠<sup>1a</sup>, 涂秋芬<sup>1a,1b</sup>, 熊开琴<sup>1b</sup>, 杨志禄<sup>2\*</sup>

(1.西南交通大学 a. 材料科学与工程学院 材料先进技术教育部重点实验室  
b. 医学院 生物医学工程研究院, 成都 610031;  
2.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 赋予血液接触类材料优异的表面抗菌性能。方法 受天然贻贝黏附现象的启发, 通过多巴胺 (Dopamine, DA)、 $\epsilon$ -聚赖氨酸 ( $\epsilon$ -Poly-L-lysine,  $\epsilon$ -PL)、高碘酸钠 (Sodium Periodate, NaIO<sub>4</sub>) 构建一种简易、快速的聚胺-酚涂层 ( $\epsilon$ -PL@PDA), 同时利用  $\epsilon$ -PL 丰富的氨基质子化形成的阳离子, 实现表面高效抗菌的目的。其中 DA 和  $\epsilon$ -PL 通过共价交联形成酚胺聚合物, 酚胺共同介导基底材料黏附形成涂层。通过傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、X 射线光电子能谱 (XPS)、场发射扫描电镜 (SEM)、椭圆偏光、氨基定量、水接触角 (WCA) 等材料学表征评价  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层的理化性能; 通过菌落计数法、细菌活/死染、液体法等细菌实验评价涂层抗菌性能; 通过内皮细胞黏附与增殖实验评价其细胞相容性; 通过血小板黏附与激活及半体内血液循环实验验证其血液相容性。结果 材料学表征结果证明,  $\epsilon$ -PL@PDA 富氨基涂层成功制备, 同时  $\epsilon$ -PL 的浓度大小会影响涂层的沉积过程; 细菌实验表明,  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层具备优异的抗菌性能, 当  $\epsilon$ -PL 质量浓度为 3 mg/mL 时, 对大肠杆菌和表皮葡萄球菌的抑制率高达 91%; 细胞实验和血液相容性实验表明, 相较于 316 不锈钢 (316L SS),  $\epsilon$ -PL 的质量浓度为 3、30 mg/mL 时, 涂层均不会促进细胞毒性增强、血小板黏附和激活以及血栓形成。结论  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层能够在不影响细胞相容性和血液相容性的基础上有效提高表面抗菌能力, 因此, 该高效便捷且适用性强的表面抗菌策略或有助于解决临床血液接触类器械细菌感染等问题。

**关键词:** 贻贝仿生; 多巴胺 (DA);  $\epsilon$ -聚赖氨酸 ( $\epsilon$ -PL); 表面改性; 抗菌

**中图分类号:** TB34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-3660(2024)08-0173-11

**DOI:** 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2024.08.016

## Mussel Mimicking Polyamine-Phenol Surface with Efficient Antibacterial Properties and Good Hemocompatibility

MENG Haotian<sup>1a</sup>, LI Pengcheng<sup>1a</sup>, WEI Jiajia<sup>1a</sup>, WANG Wenxuan<sup>1a</sup>, LI Tianyu<sup>1a</sup>,  
HUANG Nan<sup>1a</sup>, TU Qiufen<sup>1a,1b</sup>, XIONG Kaiqin<sup>1b</sup>, YANG Zhilu<sup>2\*</sup>

(1. a. Key Laboratory of Advanced Technology of Materials of Education Ministry, School of Materials Science and Engineering, b. Institute of Biomedical Engineering, College of Medicine, Southwest Jiaotong University,

收稿日期: 2023-04-01; 修订日期: 2023-05-09

Received: 2023-04-01; Revised: 2023-05-09

引文格式: 孟昊天, 李鹏程, 魏嘉佳, 等. 基于贻贝仿生构建高效抗菌及良好血液相容性的聚胺-酚表面[J]. 表面技术, 2024, 53(8): 173-183.  
MENG Haotian, LI Pengcheng, WEI Jiajia, et al. Mussel Mimicking Polyamine-Phenol Surface with Efficient Antibacterial Properties and Good Hemocompatibility[J]. Surface Technology, 2024, 53(8): 173-183.

\*通信作者 (Corresponding author)

Chengdu 610031, China; 2. Dongguan People's Hospital, Affiliated Dongguan Hospital, Southern Medical University, Guangdong Dongguan 523059, China)

**ABSTRACT:** In recent years, blood contact devices have brought great convenience to clinical treatments, but they are severely restricted due to bacterial-related infections. Bacteria-related infections not only lead to partial dysfunction of the devices, but also cause a series of complications such as bacteremia and inflammations, which may threaten the patient's life. For purpose of enhancing the antibacterial properties of the blood-contact materials, a simple and rapid polyamine-phenol coating ( $\epsilon$ -PL@PDA) was constructed by dopamine (Dopamine, DA),  $\epsilon$ -Poly-L-lysine ( $\epsilon$ -PL), and sodium periodate (Sodium period,  $\text{NaIO}_4$ ) on the basis of the natural mussel adhesion phenomenon and mechanism in this study. At the same time, the  $\epsilon$ -PL@PDA coating utilized the cations formed by the protonation of abundant amino groups of  $\epsilon$ -PL to realize the purpose of high-efficiency antibacterial properties. DA and  $\epsilon$ -PL formed phenolic amine polymers through covalent crosslinking, and then jointly mediated the adhesion of substrate materials to form the coating.

Firstly, the base material (316L SS) was soaked in ammonia water, hydrogen peroxide, and hot water for 1 hour according to the volume ratio of 1 : 1 : 3, and then washed by RO, UP, and absolute ethyl alcohol respectively. DA (3 mg/mL),  $\text{NaIO}_4$  (3 mg/mL) were prepared with UP, and  $\epsilon$ -PL was configured in proportions of 0.3, 3, and 30 mg/mL. They were mixed uniformly according to the volume ratio of 1 : 1 : 1, then immersed in the surface of the 316L SS, and reacted for 3 hours at room temperature to obtain the  $\epsilon$ -PL@PDA coating. According to the different feeding ratios of  $\epsilon$ -PL, they were named as  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA,  $\epsilon$ -PL/3@PDA,  $\epsilon$ -PL/30@PDA coatings respectively.

The physical and chemical properties of  $\epsilon$ -PL@PDA coatings were evaluated by material characterizations such as FTIR, XPS, SEM, ellipsometry, amino group quantification, and WCA. The antibacterial properties were evaluated by the colony counting method, liquid method and fluorescent staining of live/dead bacteria. The adhesion and proliferation of endothelial cells were used for evaluating the cytocompatibility. The adhesion and activation of platelets, as well as the semi-in vivo blood circulation assay were used to confirm the hemocompatibility.

The material characterization results of FTIR, XPS, WCA and amino group quantification demonstrated the successful construction of the  $\epsilon$ -PL@PDA coatings, and they contained richer amino groups than the PDA coating. The results of ellipsometry test indicated that the concentration of  $\epsilon$ -PL could affect the efficiency of reaction, and the high concentration might interfere with the deposition of the coating. Relevant bacterial experiments certified that different concentrations of  $\epsilon$ -PL@PDA coatings exhibited excellent antibacterial properties. When the concentration of  $\epsilon$ -PL was 3 mg/mL, the antibacterial rates on *E.coli* and *S.epidermidis* exceeded 91%, which could beneficially reduce the incidence rate of bacterial infections. The results of the adhesion and proliferation experiments of endothelial cells demonstrated that with the increase of the concentration of  $\epsilon$ -PL, the coatings displayed no significant toxic and side effects, possessing great cytocompatibility. The adhesion and activation of platelets and semi-in vivo blood circulation experiment results indicated that the coatings could not aggravate coagulation and formation of thrombus at the concentrations of 3 and 30 mg/mL, compared to 316L SS. The  $\epsilon$ -PL@PDA coating can significantly improve the antibacterial ability without affecting the cytocompatibility and hemocompatibility. Therefore, this effective, practical, and applicable surface antibacterial strategy may assist in resolving the issues of bacterial infections of clinical blood contact devices.

**KEY WORDS:** mussel mimicking; dopamine(DA);  $\epsilon$ -poly-L-lysine( $\epsilon$ -PL); surface modification; antibacterial function

细菌相关感染是血液接触类器械发展的一大限制因素, 涉及植入设备、留置医疗设备和体外回路装置等<sup>[1-2]</sup>。细菌等微生物中的蛋白质成分易与器械材料表面发生非特异性吸附, 进而导致生物膜的形成<sup>[3]</sup>。同时一些植入器械外表面会覆盖凝血酶层, 纤维蛋白、胶原蛋白、层粘连蛋白等物质会进一步促使潜在的微生物病原体附着并在表面繁殖<sup>[4]</sup>。目前临床上为防治植入器械细菌感染, 主要采用抗生素封闭疗法或全身抗生素疗法<sup>[5-6]</sup>, 然而长期使用抗生素会诱导细

菌耐药性和相关并发症的产生<sup>[7-8]</sup>。因此, 赋予血液接触类器械表面良好的抗菌性能具有重要意义。

表面改性技术能够通过调节材料的亲/疏水性、抗菌性和相容性等性能来消除血液接触类材料自身的一些缺陷<sup>[9]</sup>。根据作用机制的不同, 目前抗菌表面可分为接触杀菌、释放抗菌、抑制细菌黏附的抗污表面<sup>[10]</sup>等。材料表面的抗菌设计可以在很大程度上减少因过度使用抗生素带来的毒副作用, 并有效减少细菌黏附、定植以及生物膜的形成<sup>[11]</sup>。

$\epsilon$ -PL 最早被发现于丝状放线菌的培养过滤液中, 是一种由 25~30 个赖氨酸残基构成的、带有正电荷氨基的聚阳离子肽<sup>[12-13]</sup>。作为天然阳离子抗菌肽,  $\epsilon$ -PL 具有广谱抗菌性能, 能够抑制多种类型的细菌、真菌、病毒等微生物<sup>[14-16]</sup>, 同时具有良好的水溶性、热稳定性及生物相容性<sup>[17-19]</sup>。一般来说, 富含阳离子的  $\epsilon$ -PL 通过离子吸附与带负电荷的细胞表面发生静电相互作用<sup>[20]</sup>, 破坏细胞壁或剥离细胞膜, 引起细胞质异常分布, 最终分解微生物细胞<sup>[21-24]</sup>。对于金黄色葡萄球菌,  $\epsilon$ -PL 还会干扰其代谢机制, 低浓度  $\epsilon$ -PL 能抑制糖酵解途径, 高浓度  $\epsilon$ -PL 可直接抑制中心碳代谢<sup>[25]</sup>。此外,  $\epsilon$ -PL 能够显著抑制指状青霉的菌丝体生长和孢子发芽率, 并对菌丝体形态和质膜造成严重破坏<sup>[22]</sup>。需要注意的是, 高密度的阳离子基团可能会影响血液相容性<sup>[26]</sup>, 引发安全问题。因此, 进一步探究不同浓度  $\epsilon$ -PL 的抗菌性能和血液相容性。

受贻贝黏附现象的启发及对其机理的研究, Lee 等<sup>[27]</sup>设计出聚多巴胺 (PDA) 贻贝仿生酚胺涂层。该涂层作为一种简易的功能化表面, 具有良好的生物相容性和适应性, 被广泛应用于生物医用材料、能源材料、环境材料等多种领域<sup>[28-29]</sup>。但在传统的 PDA 涂层制备工艺中, DA 苯环上的酚羟基及氨基会被大量消耗, 导致涂层黏附性不足, 无法在强酸和强碱环境下长期稳定存在<sup>[30-31]</sup>。本研究在 PDA 涂层的基础上引入  $\epsilon$ -PL, 补充体系中的氨基, 同时增强涂层的抗菌

性。DA 的酚羟基首先经高碘酸钠氧化为醌基, 再通过迈克尔加成、西弗碱反应与  $\epsilon$ -PL 中的氨基形成长链的氨基化合物骨架。该结构利于聚合涂层发展为高度交联的网络结构, 以更加稳定的链状化学交联取代传统酚类低聚体的物理组装。同时,  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层与 PDA 涂层相比具备更丰富的氨基反应位点, 为进一步的功能修饰提供了便利。

综上, 本文选用 DA、 $\epsilon$ -PL、NaIO<sub>4</sub>, 通过迈克尔加成、西弗碱反应在 316L SS 表面快速构建  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层, 赋予基底材料优异的抗菌性能, 同时探究该涂层的表面结构、理化性能及血液相容性。

## 1 试验

### 1.1 涂层制备

$\epsilon$ -PL@PDA 涂层制备流程如图 1 所示。首先将基底材料 316L SS 用氨水、过氧化氢、热水, 按照体积比 1:1:3 的比例浸泡 1 h, 再分别用 RO 水、UP 水、无水乙醇超声清洗 3~5 次, 每次 10 min。用 UP 水分别配制 DA (3 mg/mL)、NaIO<sub>4</sub> (3 mg/mL),  $\epsilon$ -PL 按照 0.3、3、30 mg/mL 配制。随后通过“一步法”将三者按照相同体积比混合均匀, 浸没 316L SS 样品表面, 于室温放置 3 h 得到  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层。按照  $\epsilon$ -PL 的不同投料比分别将其命名为  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA、 $\epsilon$ -PL/3@PDA、 $\epsilon$ -PL/30@PDA 涂层。

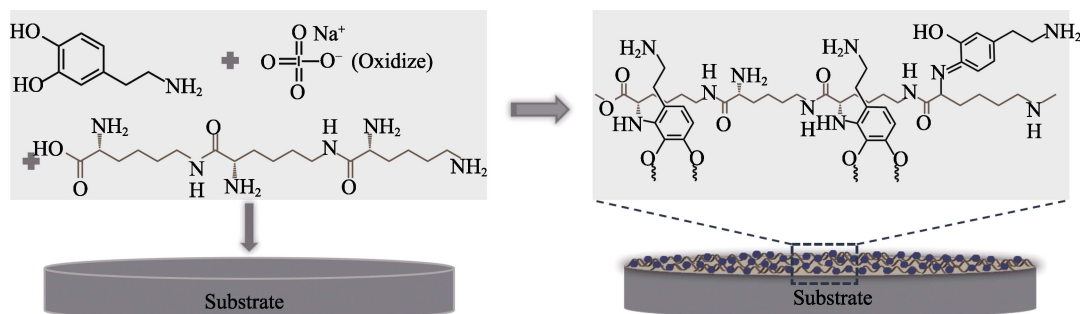


图 1  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of  $\epsilon$ -PL@PDA coating construction

### 1.2 $\epsilon$ -PL@PDA 涂层材料学表征

1) 采用场发射扫描电子显微镜 (SEM, JSM 7800F Prime, JEOL, Japan) 观察涂层形貌。

2) 采用傅里叶变换红外光谱 (FTIR, Nicolet 5700) 检测涂层化学成分和结构。

3) 采用光谱椭偏仪 (M-2000V, J.A. Woolam) 测量 316L SS 圆片 ( $\phi$ 1 cm) 表面涂层厚度, 并通过 Complete EASE 软件分析数据。

4) 采用酸性橙染色法测定不同浓度  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层的表面氨基量。

5) 采用水接触角测量仪 (DSA 100 Mk2, Germany) 检测涂层表面亲疏水性变化, 并在水滴

(5  $\mu$ L) 稳定后成像拍照。

6) 采用 X 射线光电子能谱仪 (XPS, AXIS Supra, Kratos Analytical Inc, Japan) 检测涂层表面化学成分和元素含量变化。

### 1.3 $\epsilon$ -PL@PDA 涂层抗菌性能检测

菌落计数法: 选用革兰氏阳性表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 和革兰氏阴性大肠杆菌 (*E. coli*) 进行细菌实验。首先活化细菌, 取 2 种菌液均匀涂布到琼脂固体培养基上, 于 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后取菌落中的单克隆细菌, 置于细菌营养液中, 经 37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后梯度稀释菌液, 获得  $5 \times 10^5$  CFU/mL 的标准菌液。

随后每个样品表面加入 150  $\mu\text{L}$  的标准菌液, 在孔板孔隙中加入生理盐水防止液体蒸发过快, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱中培养 24 h。随后分别加入 1 mL 生理盐水吹打均匀, 并吸取 20  $\mu\text{L}$  菌液均匀涂布到对应的固体琼脂培养基, 再次孵育 24 h 后拍照观察细菌生长状况。同时将剩余菌液吸出, 用戊二醛 (2.5%) 固定样品 24 h 后通过 SEM 拍摄细菌数量和形态。抗菌率如 (1) 式所示。

$$R = (T_c - T) / T_c \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $R$  为抗菌率;  $T_c$  为对照组菌落数;  $T$  为实验组菌落数。

细菌活/死染: 使用生理盐水清洗经菌液孵育的样品, 并按细菌活性检测试剂盒使用说明配制染料。样品表面加入 300  $\mu\text{L}$  染料, 避光孵育 15 min 后通过激光共聚焦显微镜 (A1+, NIKON, Japan) 拍摄, 观察样品上活/死细菌的分布情况。

液体法: 将样品表面的菌液吸出, 依次加入等量的液体培养基。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h 后吸出 180  $\mu\text{L}$  培养基置于 96 孔板, 使用酶标仪测量 600 nm 处的吸光度值 (OD)。最后将剩余菌液全部吸出置于玻璃瓶中, 拍照对比各组菌液浑浊度。抗菌率如 (2) 式所示。

$$R = (V_{ODs} - V_{ODm}) / (V_{ODs} - V_{ODc}) \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $R$  为抗菌率;  $S$  为 316L SS 对照组;  $M$  为实验组;  $C$  为液体培养基对照组。

本研究除了聚焦于探究  $\epsilon\text{-PL@PDA}$  涂层的抗菌性能, 还注重其用于血液接触类器械的可行性。因材料表面与血液或组织直接接触, 不可避免地会引起宿主的排斥反应, 产生细胞毒性、激活血小板或促进血栓形成。为此, 分别通过内皮细胞的黏附与增殖、血小板的黏附与激活、半体内血液循环等实验进行验证。

## 1.4 内皮细胞的黏附与增殖

通过人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的培养探究涂层表面细胞活性, 细胞均在细胞培养箱 (5% (体积分数)  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ ) 中培养。将密度为  $2.5 \times 10^4$  cells/mL 的 HUVECs 接种至样品表面, 并加入适量培养基, 分别培养 24 和 72 h。随后用生理盐水清洗 3 次, 使用 CCK-8 试剂盒定量检测细胞活力, 并加入戊二醛 (2.5%均以质量分数计) 固定液将样品固定 24 h 以上。清洗干净后加入罗丹明 123 染色, 采用荧光显微镜 (CKX53, OLYMPUS, Japan) 观察细胞生长状况。

## 1.5 血液相容性检测

血小板黏附与激活: 新西兰白兔全血与柠檬酸三钠按照 9:1 (体积比) 混合后, 离心 15 min (1500 r/min) 获取富血小板血浆 (PRP)。分别在各组样品表面滴加 300  $\mu\text{L}$  PRP, 并置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴孵育 2 h。随后用生理盐水清洗 3 次, 加入戊二醛 (2.5%)

固定 24 h 以上。采用乙醇梯度脱水, 每次脱水时长 30 min, 干燥后用 SEM 拍摄。

半体内血液循环实验: 首先配制质量浓度为 30 mg/mL 的戊巴比妥钠麻药, 按照 1 mL/kg 用量将实验兔 (2.5~3.0 kg) 全身麻醉, 分离兔左颈动脉及右颈静脉使其充分暴露。随后将装有样品的导管与套管连接, 形成闭合体外回路 (ECC)。血液循环 2 h 后, 取出样品用生理盐水清洗。称取循环前后导管质量计算生成血栓质量, 同时拍摄导管横截面和铺展图以计算堵塞率, 并在相同压力状态下, 测试循环结束后各导管的血流速率。最后用戊二醛 (2.5%) 固定、保存样品, 脱水后通过 SEM 观察血栓情况。

## 1.6 统计学分析

所有实验结果均使用平均值 $\pm$ 标准差表示。通过 GraphPadPrism8.0 中的 One-Way ANOVA 或  $t$ -tests 检验进行统计学显著性分析。

# 2 结果及分析

## 2.1 $\epsilon\text{-PL@PDA}$ 涂层材料学表征分析

为了验证  $\epsilon\text{-PL@PDA}$  涂层的成功制备并探究涂层表面性质, 分别对 316L SS、PDA、 $\epsilon\text{-PL}/0.3\text{@PDA}$ 、 $\epsilon\text{-PL}/3\text{@PDA}$ 、 $\epsilon\text{-PL}/30\text{@PDA}$  涂层进行 SEM 形貌、FTIR、XPS、氨基定量、涂层厚度、水接触角等实验检测。

涂层形貌结果如图 2a 所示。沉积 PDA 涂层后, 316L SS 表面失去原有的金属光泽而呈现出金黄色, 随着  $\epsilon\text{-PL}$  投料浓度的增加, 颜色逐渐变浅, 但与 316L SS 相比仍有颜色差异。同时 PDA 涂层的表面存在分布均匀的颗粒, 其数量随着  $\epsilon\text{-PL}$  的引入有所增加, 而尺寸随着  $\epsilon\text{-PL}$  浓度增加而减小。形貌的变化结果暗示了  $\epsilon\text{-PL}$  投料浓度与涂层的形成密切相关, 推测这可能是由于  $\epsilon\text{-PL}$  的引入增加了其与 DA 的聚合, 进而影响涂层的形成效率。涂层厚度和氨基定量结果如图 2b~c 所示, PDA、 $\epsilon\text{-PL}/0.3\text{@PDA}$ 、 $\epsilon\text{-PL}/3\text{@PDA}$ 、 $\epsilon\text{-PL}/30\text{@PDA}$  涂层厚度分别为 (87.95 $\pm$ 0.99)、(66.17 $\pm$ 0.60)、(53.67 $\pm$ 1.29)、(7.61 $\pm$ 0.15) nm, 氨基量分别为 (5.60 $\pm$ 0.28)、(8.37 $\pm$ 0.33)、(13.70 $\pm$ 0.15)、(16.54 $\pm$ 0.40) nmol/cm<sup>2</sup>, 而 316L SS 表面检测出极少量氨基可能是由于金属材料表面存在难以避免的非特异性痕量吸附, 染料会部分附着在表面。上述结果表明, 涂层的厚度随着  $\epsilon\text{-PL}$  浓度的增加而逐渐降低, 浓度过高会使得  $\epsilon\text{-PL}$  和 DA 聚合增加, 进而导致涂层不易沉积。同时  $\epsilon\text{-PL}$  的引入使得涂层中的氨基量显著增加, 为后续性能优化提供了更丰富的反应位点。水接触角结果如图 2d 所示, 各涂层表面水接触角分别为 (57.8 $\pm$ 0.2) $^{\circ}$ 、(60.1 $\pm$ 0.6) $^{\circ}$ 、(49.4 $\pm$ 0.3) $^{\circ}$ 、(45.9 $\pm$ 0.4) $^{\circ}$ 、(53.3 $\pm$ 0.2) $^{\circ}$ 。在  $\epsilon\text{-PL}$



质量浓度为 0.3 和 3 mg/mL 时接触角略有降低, 可能是由于表面氨基量增加, 亲水性增强。当质量浓度为 30 mg/mL 时或许因涂层过薄, 导致表面结构不完整, 比表面积增大, 最终引起水接触角小幅度增加。

FTIR 检测结果如图 3a 所示。随着  $\epsilon$ -PL 的浓度增大, 红外吸收光谱中的吸收峰减弱, 这可能是由于涂层变薄, 测量光斑获取的信号值减少所致。此外, 不同浓度的  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层均在  $3\ 328\sim 3\ 395\ \text{cm}^{-1}$

出现 DA 苯环上的酚羟基 ( $-\text{OH}$ ) 以及氨基 ( $-\text{NH}_2$ ) 的伸缩振动峰, 在  $1\ 622\ \text{cm}^{-1}$  附近出现苯环  $\text{C}=\text{C}$ , 以及在反应体系中  $-\text{OH}$  被氧化为醌 ( $-\text{C}=\text{O}$ ) 的伸缩振动峰, 证明了  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层的成功构建。同时, 不同浓度的  $\epsilon$ -PL@PDA 在  $1\ 396\ \text{cm}^{-1}$  处均出现了质子化氨基 ( $-\text{NH}_3^+$ ) 的伸缩振动峰, 进一步证明了涂层的成功制备。

XPS 的全谱及 C、O、N 3 种特征元素含量的统计学结果分别如图 3b~c 所示。从图 3b 可知, 4 组涂

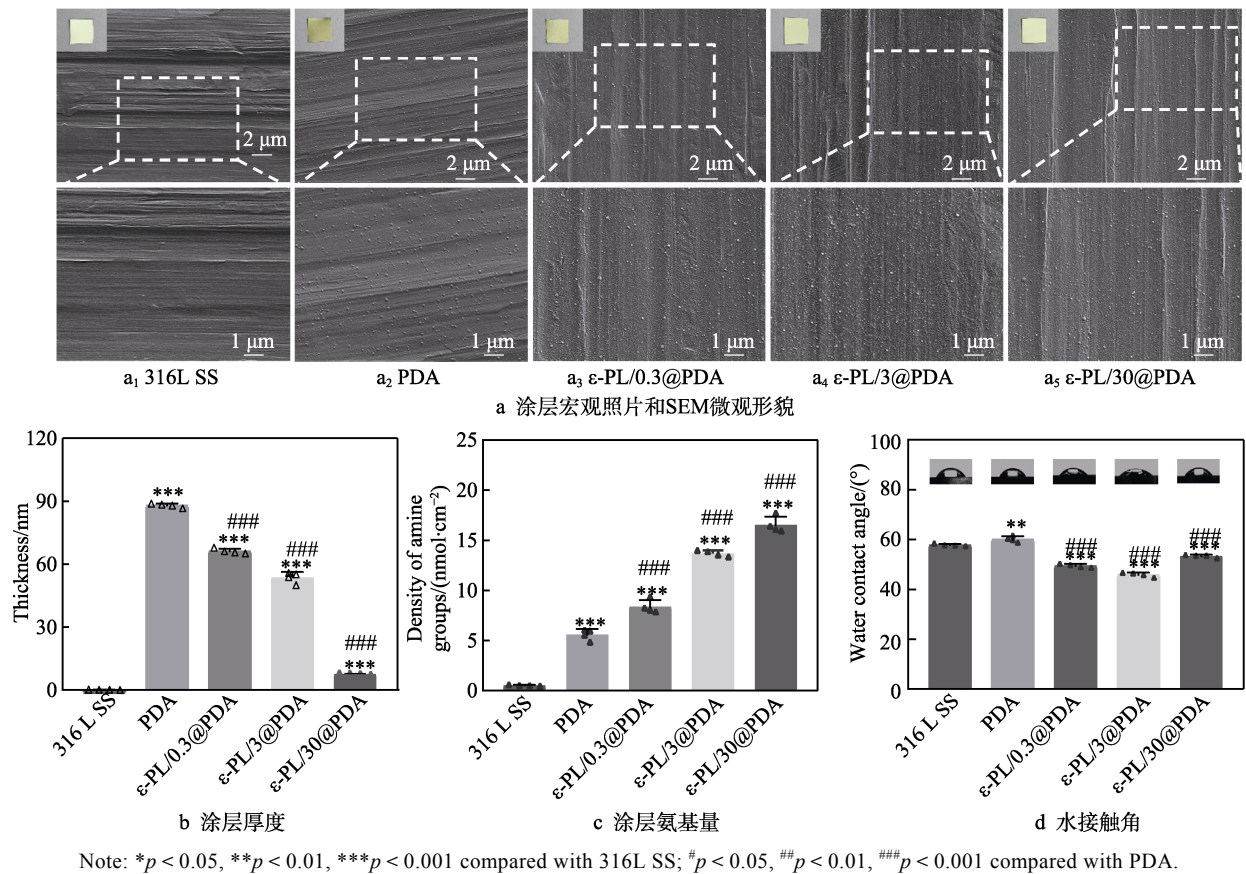


图 2 涂层理化性能表征

Fig.2 Physico-chemical property characterization: a) macroscopic image and SEM microscopic morphology; b) thickness of the coatings; c) amino group concentration of the coatings; d) water contact angle and schematic diagrams

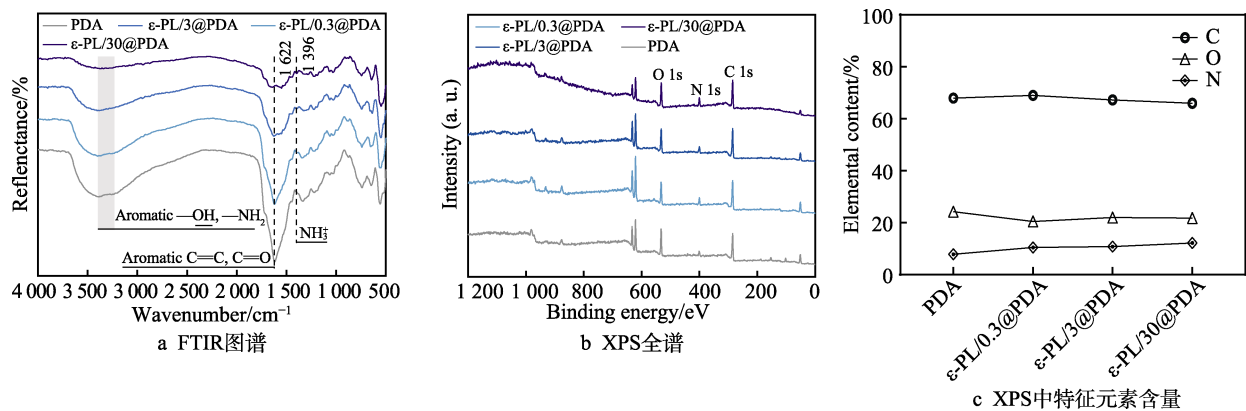


图 3 涂层化学组成及结构表征

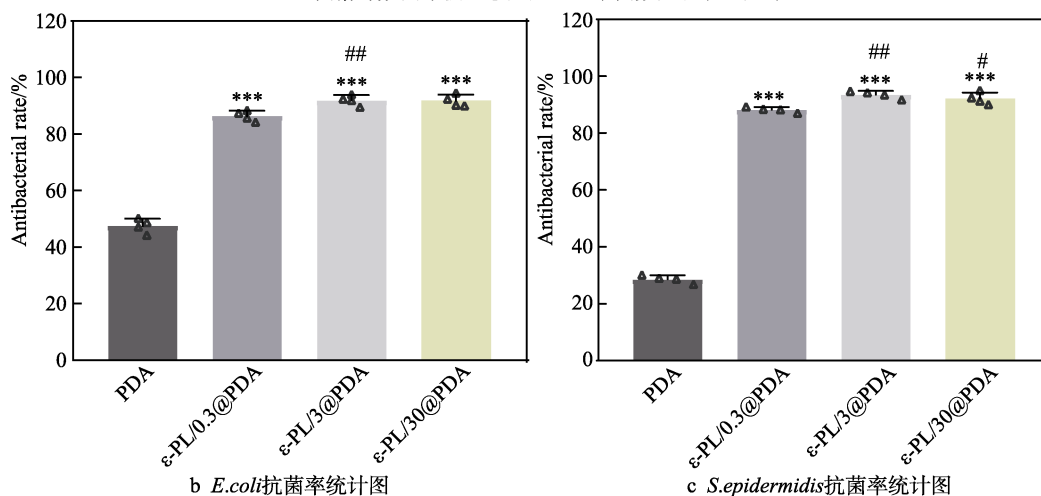
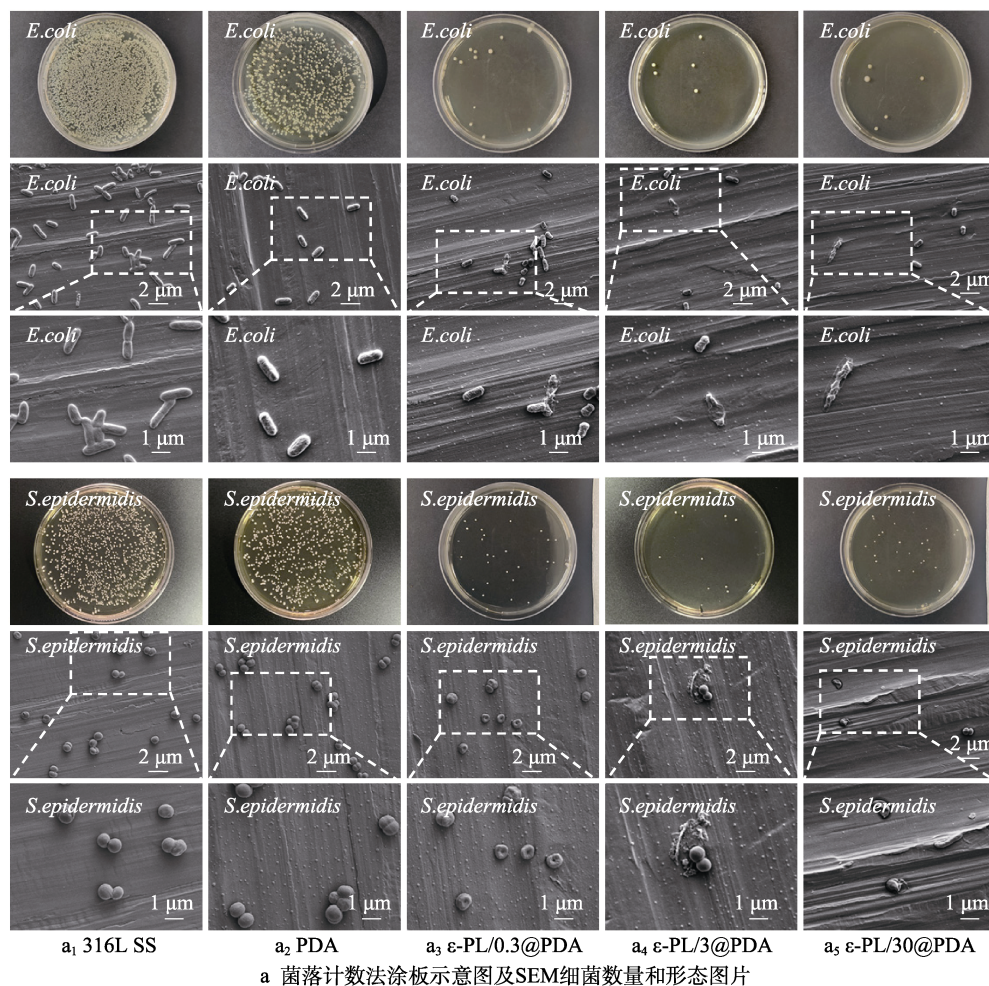
Fig.3 Chemical composition and structural characterization: a) FTIR analysis; b) XPS analysis; c) content of characteristic elements

层均在 285、531、399 eV 附近检测出 C、O、N 3 种元素的特征峰,并且各涂层元素含量略有不同。其中 PDA 涂层表面 C、O、N 原子数占比分别为 68%、24.2%、7.8%,  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA 表面分别为 69.07%、20.51%、10.41%,  $\epsilon$ -PL/3@PDA 表面分别为 67.27%、21.98%、10.75%,  $\epsilon$ -PL/30@PDA 表面分别为 65.99%、

21.81%、12.19%。由此可见,  $\epsilon$ -PL 浓度的增加使涂层表面 N 元素含量出现一定程度的增加,这与氨基定量的结果是相似的,同时也说明了各涂层的成功制备。

## 2.2 $\epsilon$ -PL@PDA 涂层抗菌性能评价

菌落计数法抗菌实验及对应的 SEM 如图 4a 所示,



Note: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with PDA; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  compared with  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA

图 4 细菌实验结果

Fig.4 Results of bacterial experiments: a) coating plate diagram of colony counting method and SEM images of bacteria quantity and morphology; b) *E. coli* antibacterial rate statistics; c) *S. epidermidis* antibacterial rate statistics



$\epsilon$ -PL 质量浓度为 0.3、3、30 mg/mL 时, 涂层表面的 *E.coli* 和 *S.epidermidis* 数量与 316L SS、PDA 涂层相比明显减少。同时  $\epsilon$ -PL 的引入使得细菌的生长状态明显受到抑制, *E.coli* 的长度变短, 皱缩程度增大, *S.epidermidis* 表面向内凹陷, 甚至出现破碎, 内容物流出。而  $\epsilon$ -PL 浓度越大, 细菌皱缩及破碎越明显。抗菌率统计结果如图 4b~c 所示, 其中  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA 涂层对 2 种细菌的抗菌率分别为  $(86.43 \pm 0.93)\%$ 、 $(88.25 \pm 0.45)\%$ ,  $\epsilon$ -PL/3@PDA 涂层抗菌率分别为  $(91.98 \pm 0.95)\%$ 、 $(93.53 \pm 0.67)\%$ ,  $\epsilon$ -PL/30@PDA 涂层抗菌率分别为  $(91.85 \pm 1.05)\%$ 、 $(92.18 \pm 1.05)\%$ , 均与 PDA 涂层存在显著性差异。

细菌活/死染的结果如图 5 所示, 可明显观察到  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA、 $\epsilon$ -PL/3@PDA、 $\epsilon$ -PL/30@PDA 3 组涂层表面的死细菌数量显著增加, 且细菌总量相比 316L SS 和 PDA 来说较少。由此可见,  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层与未改性涂层相比具有更加优异的杀菌性能, 并且该涂层的抗菌效果受  $\epsilon$ -PL 浓度影响。

图 6a 为液体法细菌实验菌液示意图及吸光度值, 最左侧为未染菌的液体培养基对照组, 菌液澄清透明, 316L SS 组菌液最为浑浊, 而  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA、 $\epsilon$ -PL/3@PDA、 $\epsilon$ -PL/30@PDA 3 组与 316L SS 相比清澈度明显增加。图 6b 为通过公式 (2) 计算得到的抗菌率统计结果, 进一步验证了  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层的优异抗菌性能。

## 2.3 内皮细胞的黏附与增殖

涂层的内皮细胞增殖情况 (24、72 h) 如图 7a 所示。培养 24 h 后各组内皮细胞数量均较少且比较相近, 没有明显差异。培养 72 h 后各涂层表面细胞数量显著增加, 密度增大, 且部分细胞呈现出梭形, 同时 PDA 和  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA 涂层表面的细胞相较于其他组别有所减少。CCK-8 结果 (图 7b~c) 表明, 培养 24 h 的内皮细胞在各组涂层表面上的细胞活性没有表现出显著性差异, 培养 72 h 后 PDA 以及  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA 涂层的细胞活性与 316L SS 相比有少

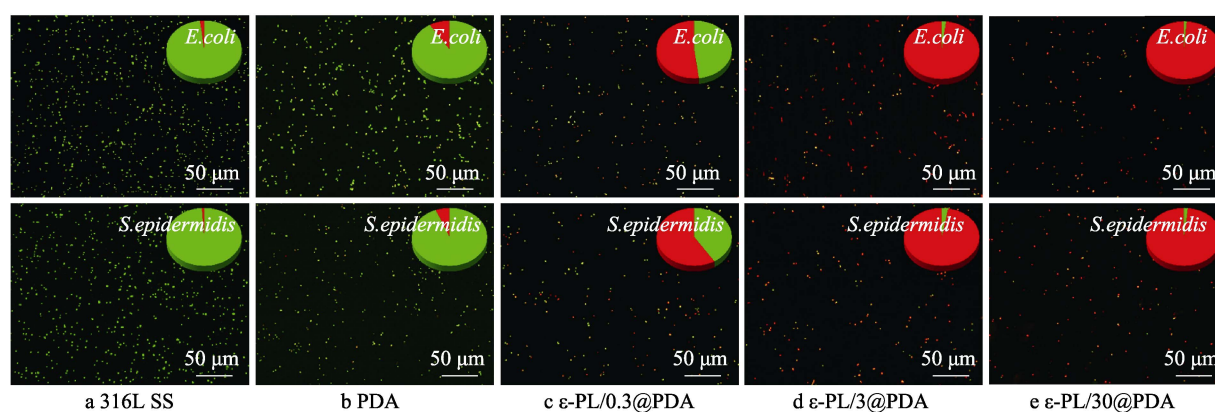


图 5 细菌活/死染荧光示意图 (右上角饼状图为活/死细菌比例, 绿色代表活细菌, 红色代表死细菌)  
Fig.5 Schematic diagram of fluorescence of live/dead bacteria (the pie charts on the top right represent the ratio of live/dead bacteria; and green represents live bacteria, red represents dead bacteria)

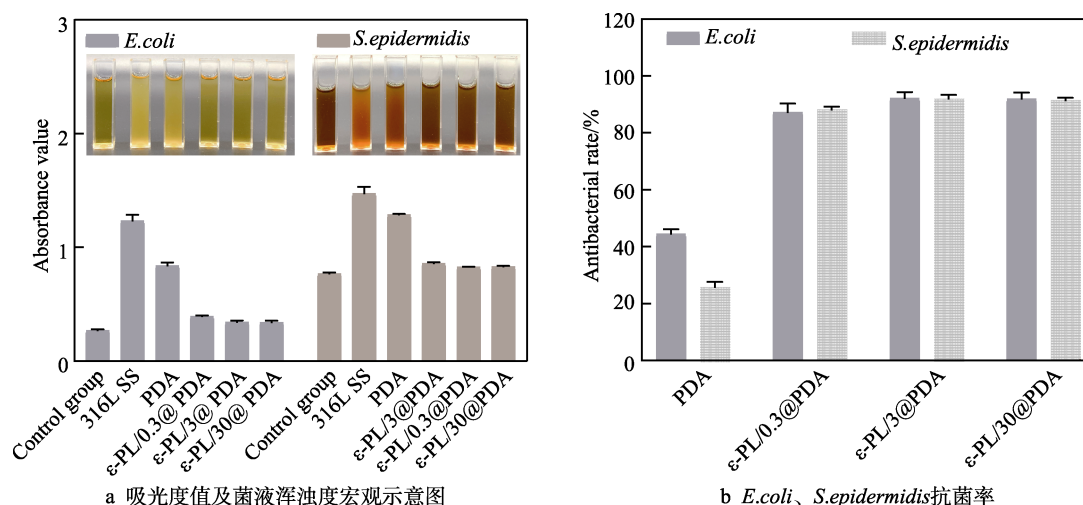
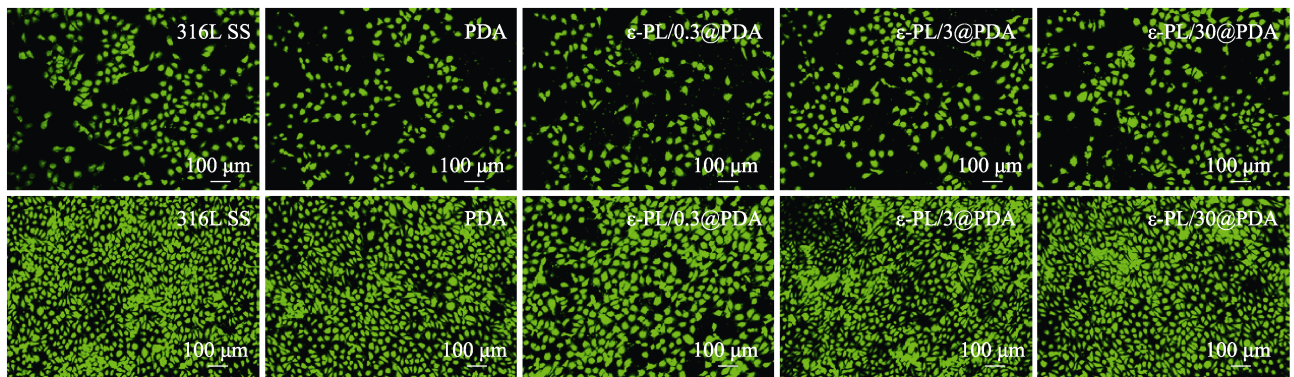
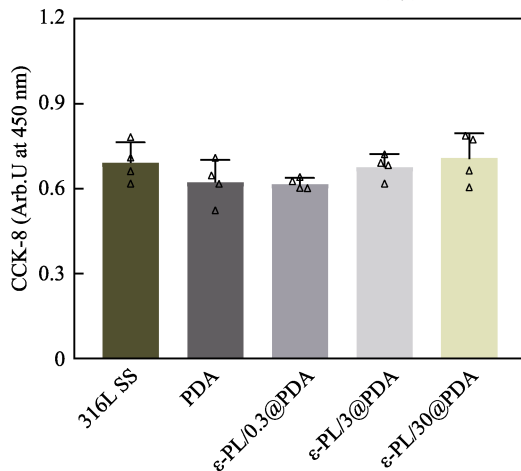


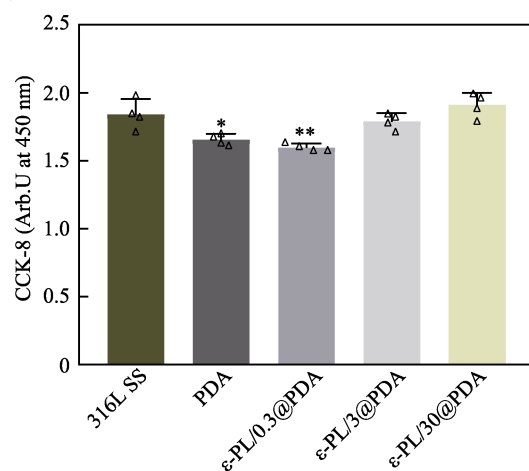
图 6 液体法实验结果  
Fig.6 Experimental results of liquid method: a) absorbance value and macroscopic diagram of the turbidity of bacterial solution; b) antibacterial rate of *E.coli* and *S.epidermidis*



a 培养24、72 h后的内皮细胞荧光染色图



b 培养24 h后的内皮细胞CCK-8试剂检测结果



c 培养72 h后的内皮细胞CCK-8试剂检测结果

Note: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with 316L SS.

图 7 细胞相容性评价

Fig.7 Cytocompatibility evaluation: a) fluorescence images of EC cultured for 24 h and 72 h; b) CCK-8 results of EC cultured for 24 h; c) CCK-8 results of EC cultured for 72 h

许降低,而  $\epsilon$ -PL/3@PDA、 $\epsilon$ -PL/30@PDA 涂层与 316L SS 之间无显著性差异。由此可见,在  $\epsilon$ -PL 的质量浓度低于 30 mg/mL 时,浓度的升高不会对细胞产生毒副作用,展现出良好的细胞相容性和安全性。

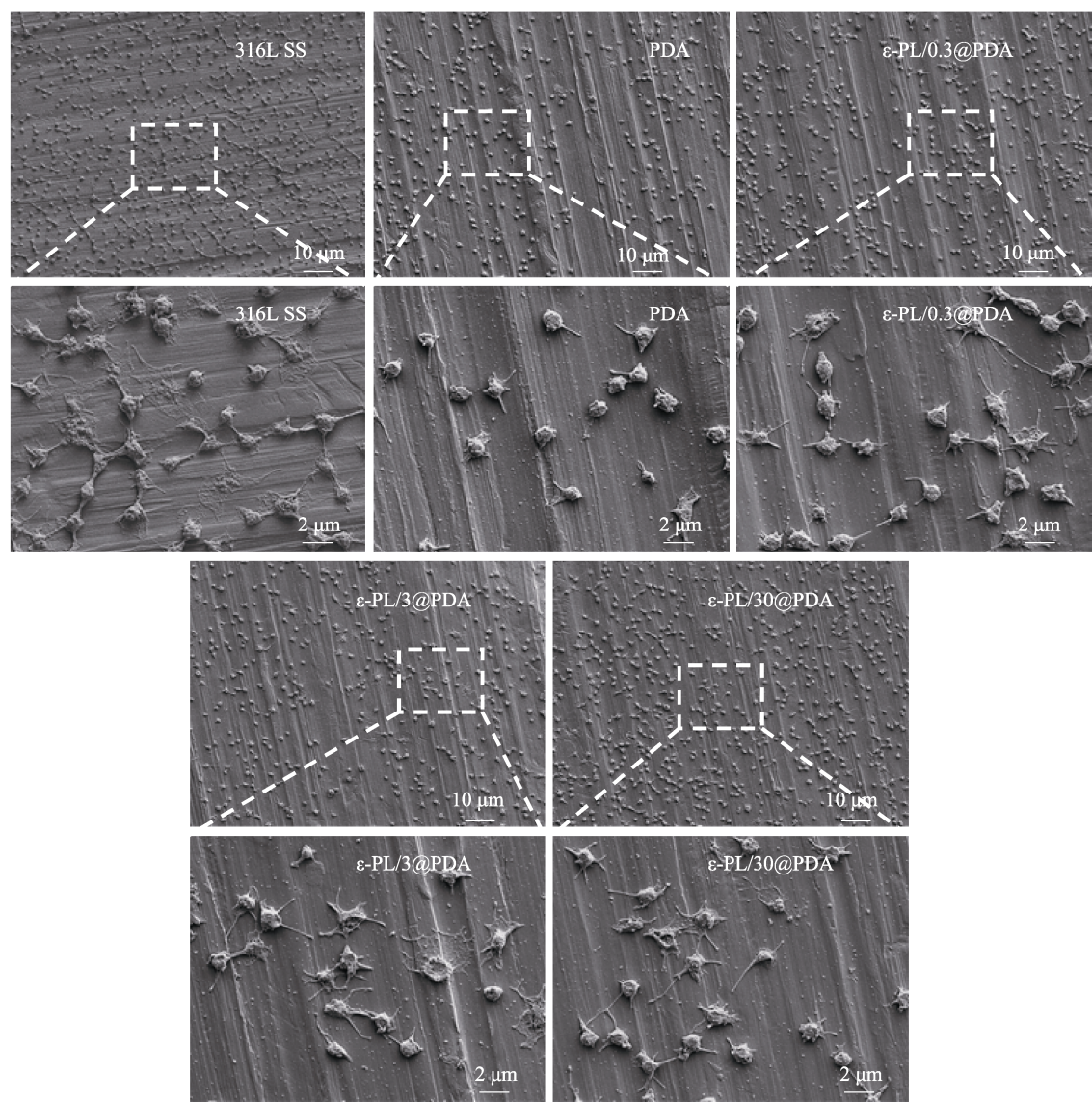
## 2.4 血液相容性评价

SEM 微观示意图、血小板数量和激活率统计学结果如图 8a~c 所示,316L SS 表面存在大量血小板,且激活率高达 80%。PDA 涂层与之相比,血小板数量和激活率有一定程度的降低,这可能是由于该涂层仍存在一定密度带负电的邻苯二酚结构,对血小板起到排斥作用。而  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA、 $\epsilon$ -PL/3@PDA、 $\epsilon$ -PL/30@PDA 3 种涂层表面的血小板黏附量及激活率与 316L SS 表面相似,没有显著性差异,这可能是  $\epsilon$ -PL 的引入使得表面所带的正电荷增多所致。由此可见,与 316L SS 相比  $\epsilon$ -PL 浓度的增加并不会促进血小板的活化,造成更严重的凝血异常现象。

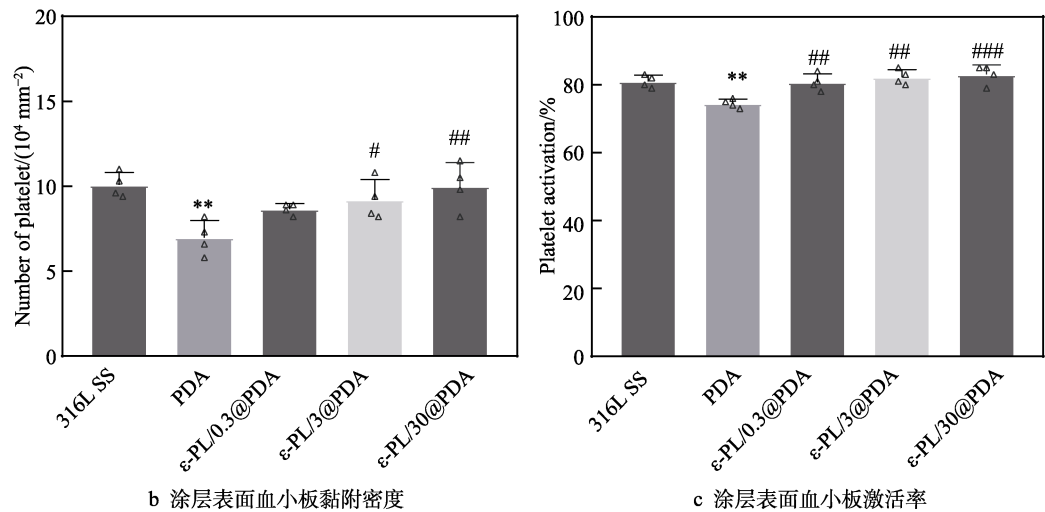
半体内血液循环实验模拟图如图 9a 所示,上部形成闭环回路的红色导管内装有沿内壁卷曲的样品,经血液循环 2 h 后取出样品,拍摄横截面以及内部展

开图,结果如图 9b~c 所示。分别对导管堵塞率(图 9d)、血栓质量(图 9e)、血流率(图 9f)进行统计学分析。装载 316L SS 的导管几乎完全被血栓堵塞,与之相比,PDA 涂层导管内部血栓量轻微减少,堵塞率为  $(65.63 \pm 1.15)\%$ ,血栓质量降至  $(23.00 \pm 0.45)$  mg,血流率为  $(10.5 \pm 0.81)\%$ 。而  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA、 $\epsilon$ -PL/3@PDA、 $\epsilon$ -PL/30@PDA 涂层表面血栓量再次增多,可能是由于  $\epsilon$ -PL 所带的正电荷氨基表现出一定的促凝功能,但各项指标与 316L SS 相似,且不存在显著性差异。为了进一步观察血液循环后各涂层表面的血栓形成情况,采用 SEM 进行微观检测(图 9g)。结果显示,各组涂层表面均形成了大量血栓,且为典型的血小板和红细胞被包裹在纤维蛋白网络中的血栓结构。其中各浓度的  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层表面与 316L SS 相比,血栓形态与结构没有明显变化。由此可见, $\epsilon$ -PL@PDA 涂层的使用并不会减少血栓形成,但同时也未表现出明显的促进作用,后期或许可以考虑通过临床肝素化或装载 NO 催化释放因子等方式进行改善。





a SEM血小板数量及形态示意图



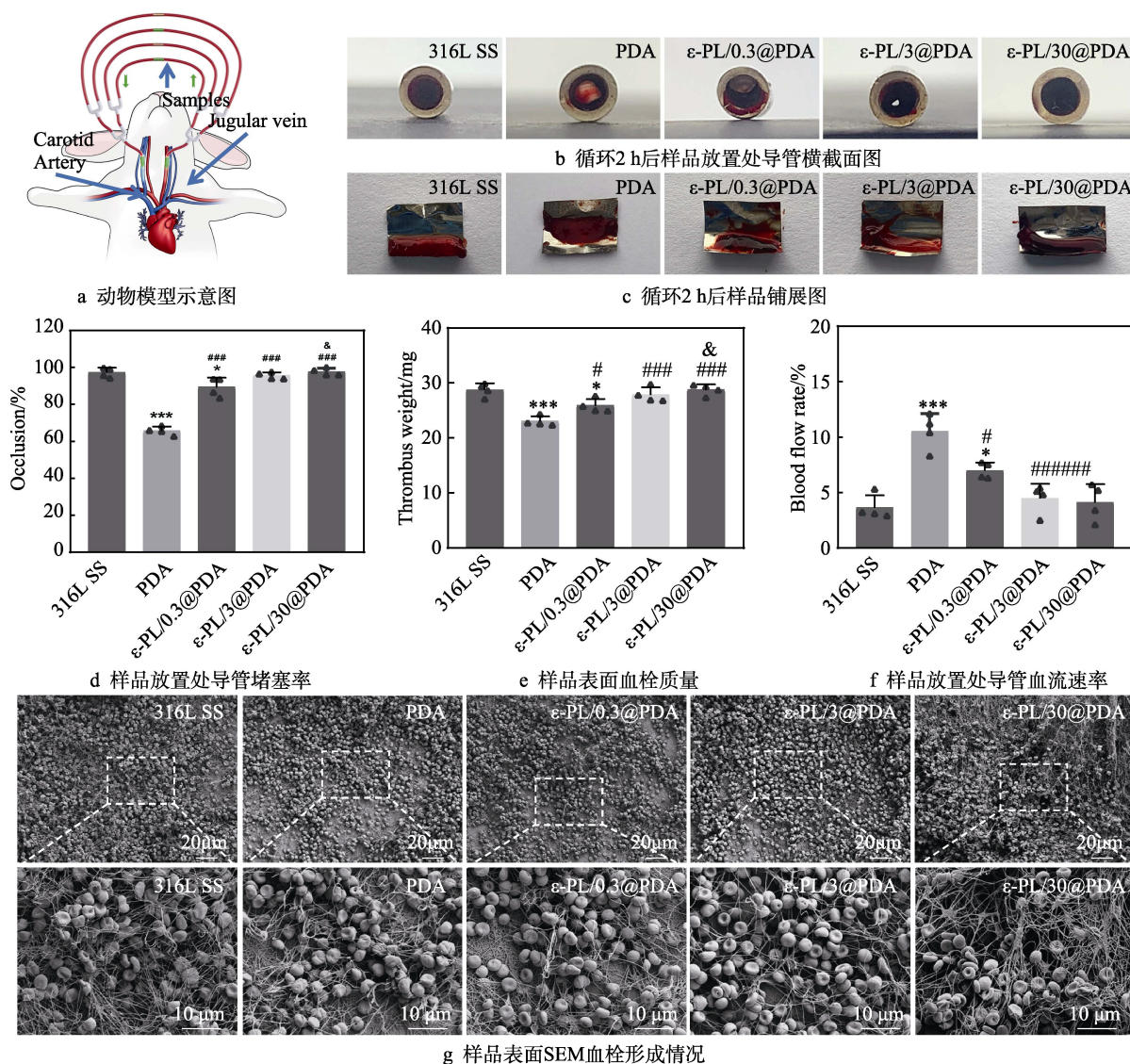
b 涂层表面血小板黏附密度

c 涂层表面血小板激活率

Note: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with 316L SS; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  compared with PDA.

图 8 血小板黏附与激活结果

Fig.8 Results of the adhesion and activation of platelets: a) SEM diagram of platelet number and morphology; b) platelet adhesion density on the coatings; c) platelet activation rate on the coatings



Note: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with 316L SS; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  compared with PDA; & $p < 0.05$ , && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$  compared with  $\epsilon$ -PL/0.3@PDA.

图9 半体内血液循环实验结果

Fig.9 Results of ex vivo hemocompatibility: a) schematic diagram of animal experiments; b) cross-sectional view of the catheter after circulation for 2 h; c) spreading diagram after circulation for 2 h; d) catheter blockage rate at sample placement; e) thrombus weight on the surface of samples; f) catheter blood flow velocity at sample placement; g) SEM thrombus on the surface of samples

### 3 结论

1) 本研究通过方便、快捷的“一步法”制备的  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层与 PDA 涂层相比富含氨基, 可提供更多的二次接枝活性位点, 有利于后续多功能改性工作的开展。但值得注意的是,  $\epsilon$ -PL 浓度过高可能会影响涂层的反应进程, 导致涂层难以沉积。

2)  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层利用  $\epsilon$ -PL 中阳离子优异的杀菌性能赋予材料高效抗菌的能力。菌落计数法、细菌活/死染、液体法等细菌实验结果证明,  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层可以有效减少细菌黏附并破坏细菌结构, 有助于抵御细菌入侵, 降低细菌相关感染的发生率。

3) 细胞实验及血液相容性实验结果表明,  $\epsilon$ -PL@

PDA 涂层与未改性的 316L SS 相比不会加剧细胞毒性, 同时不会促进血小板的黏附与激活以及血栓形成, 表现出良好的血液相容性和安全性。因此, 本研究提出的  $\epsilon$ -PL@PDA 涂层构建策略对开发环保抗菌型血液接触类器械具有一定的参考意义。

### 参考文献:

- [1] TU Q F, SHEN X H, LIU Y W, et al. A Facile Metal-Phenolic-Amine Strategy for Dual-Functionalization of Blood-Contacting Devices with Antibacterial and Anticoagulant Properties[J]. Materials Chemistry Frontiers, 2019, 3(2): 265-275.
- [2] LI L H, YANG L, LIAO Y B, et al. Superhydrophilic



- Versus Normal Polydopamine Coating: A Superior and Robust Platform for Synergistic Antibacterial and Antithrombotic Properties[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 402: 126196.
- [3] KRIKAVA I, KOLAR M, GARAJOVA B, et al. The Efficacy of a Non-Leaching Antibacterial Central Venous Catheter-a Prospective, Randomized, Double-Blind Study[J]. *Biomedical Papers*, 2020, 164(2): 154-160.
  - [4] RAAD I I, HANNA H A. Intravascular Catheter-Related Infections: New Horizons and Recent Advances[J]. *Archives of Internal Medicine*, 2002, 162(8): 871-878.
  - [5] IRSHAD K, REHMAN K, SHARIF H, et al. Antimicrobial Polymer Coating[J]. *Polymer Coatings: Technology and Applications*, 2020: 347-358.
  - [6] SHEYDAEI M, SHAHBAZI-GANJGAH S, ALINIA-AHANDANI E. An Overview of Antibacterial Materials: Plants, Polymers and Nanoparticles[J]. *International Journal of Medical Reviews*, 2022, 9(3): 333-343.
  - [7] BURY D, TER HEINE R, VAN DE GARDE E M W, et al. The Effect of Neutropenia on the Clinical Pharmacokinetics of Vancomycin in Adults[J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2019, 75(7): 921-928.
  - [8] LIU L, SHI H C, YU H, et al. One-Step Hydrophobization of Tannic Acid for Antibacterial Coating on Catheters to Prevent Catheter-Associated Infections[J]. *Biomaterials Science*, 2019, 7(12): 5035-5043.
  - [9] CHENG W, ZENG X W, CHEN H Z, et al. Versatile Polydopamine Platforms: Synthesis and Promising Applications for Surface Modification and Advanced Nanomedicine[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(8): 8537-8565.
  - [10] TEIXEIRA-SANTOS R, GOMES L C, MERGULHÃO F J M. Recent Advances in Antimicrobial Surfaces for Urinary Catheters[J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2022, 22: 100394.
  - [11] RICARDO S I C, ANJOS I I L, MONGE N, et al. A Glance at Antimicrobial Strategies to Prevent Catheter-Associated Medical Infections[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2020, 6(12): 3109-3130.
  - [12] BADAoui NAJJAR M, KASHTANOV D, CHIKINDAS M L. Natural Antimicrobials E-Poly-L-Lysine and Nisin a for Control of Oral Microflora[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2009, 1(2): 143.
  - [13] DODD A, SWANEVELDER D, ZHOU N, et al. Streptomyces Albulus Yields E-Poly-L-Lysine and other Products from Salt-Contaminated Glycerol Waste[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(12): 1083-1090.
  - [14] PADILLA-GARFIAS F, RÍOS-CIFUENTES L, SÁNCHEZ N S, et al. Study of the Mechanism of E-Poly-L-Lysine as an Antifungal on Candida Albicans and Saccharomyces Cerevisiae[J]. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 2022, 1866(10): 130197.
  - [15] SALMA-ANCANE K, SCEGLOVS A, TRACUMA E, et al. Effect of Crosslinking Strategy on the Biological, Antibacterial and Physicochemical Performance of Hyaluronic Acid and E-Polylysine Based Hydrogels[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 208: 995-1008.
  - [16] CHEN X S, WANG K F, ZHENG G C, et al. Preparation, Characterization and Antimicrobial Activity of E-Poly-L-Lysine with Short Chain Length Produced from Glycerol by Streptomyces Albulus[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 68: 22-29.
  - [17] CHHEDA A H, VERNEKAR M R. A Natural Preservative [Epsilon]-Poly-L-Lysine: Fermentative Production and Applications in Food Industry[J]. *International Food Research Journal*, 2015, 22(1): 23.
  - [18] XU D L, YAO H Q, XU Z X, et al. Production of E-Poly-Lysine by Streptomyces Albulus PD-1 via Solid-State Fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 223: 149-156.
  - [19] PANDEY A K, KUMAR A. Improved Microbial Biosynthesis Strategies and Multifarious Applications of the Natural Biopolymer Epsilon-Poly-L-Lysine[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(3): 496-505.
  - [20] HYLDGAARD M, MYGIND T, VAD B S, et al. The Antimicrobial Mechanism of Action of Epsilon-Poly-L-Lysine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7758-7770.
  - [21] RODRIGUES B, MORAIS T P, ZAINI P A, et al. Antimicrobial Activity of Epsilon-Poly-L-Lysine Against Phytopathogenic Bacteria[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 11324.
  - [22] LIU K W, ZHOU X J, FU M R. Inhibiting Effects of Epsilon-Poly-Lysine ( $\epsilon$ -PL) on *Penicillium Digitatum* and Its Involved Mechanism[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 123: 94-101.
  - [23] WEI M L, GE Y H, LI C Y, et al. Antifungal Activity of E-Poly-L-Lysine on *Trichothecium Roseum* in Vitro and Its Mechanisms[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2018, 103: 23-27.
  - [24] BELLETTI N, NDAGIJIMANA M, SISTO C, et al. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on *Saccharomyces Cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(23): 6932-6938.
  - [25] TAN Z L, SHI Y F, XING B, et al. The Antimicrobial Effects and Mechanism of E-Poly-Lysine Against *Staphylococcus Aureus*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2019, 6(1): 11.
  - [26] FISCHER D, LI Y X, AHLEMEYER B, et al. In Vitro Cytotoxicity Testing of Polycations: Influence of Polymer Structure on Cell Viability and Hemolysis[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(7): 1121-1131.
  - [27] LEE H, DELLATORE S M, MILLER W M, et al. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings[J]. *Science*, 2007, 318(5849): 426-430.
  - [28] CHEN Y L, LIU Q X. Oxidant-Induced Plant Phenol Surface Chemistry for Multifunctional Coatings: Mechanism and Potential Applications[J]. *Journal of Membrane Science*, 2019, 570/571: 176-183.
  - [29] LI X Y, LIU J X, YANG T, et al. Mussel-Inspired "Built-up" Surface Chemistry for Combining Nitric Oxide Catalytic and Vascular Cell Selective Properties[J]. *Biomaterials*, 2020, 241: 119904.
  - [30] DEGEN G D, CUNHA K C, LEVINE Z A, et al. Molecular Context of Dopa Influences Adhesion of Mussel-Inspired Peptides[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2021, 125(35): 9999-10008.
  - [31] XIE L, GONG L, ZHANG J W, et al. A Wet Adhesion Strategy via Synergistic Cation- $\pi$  and Hydrogen Bonding Interactions of Antifouling Zwitterions and Mussel-Inspired Binding Moieties[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019, 7(38): 21944-21952.