

# 等离子体活化水协同白及多糖制备水凝胶的抗菌性能及相容性

任文雪<sup>1</sup>, 程 诚<sup>2</sup>, 韩 伟<sup>3</sup>, 刘涛峰<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> 安徽中医药大学第一临床医学院, 合肥 230001; 中国科学院合肥物质科学研究院<sup>2</sup> 等离子体物理研究所、<sup>3</sup> 健康与医学技术研究所, 合肥 230031; <sup>4</sup> 安徽中医药大学第一附属医院皮肤科, 合肥 230001)

**摘要** **目的** 探究将等离子体活化水(PAW)和白及多糖(BSP)相结合制备成新型水凝胶的抗菌性能及相容性。**方法** 实验按照水凝胶的组成成分划分为: 去离子水(DW) - 卡波姆 940(CBM<sub>940</sub>) - 羧甲基壳聚糖(CMCS)水凝胶组(H组)、PAW-CBM<sub>940</sub>-CMCS水凝胶(PAH)组、DW-BSP-CBM<sub>940</sub>-CMCS水凝胶(BSPH)组、PAW-BSP-CBM<sub>940</sub>-CMCS水凝胶(PA/BSPH)组。通过测试失水率和水蒸气透过率评估各组水凝胶的物理性能; 利用酶标仪、电子自旋共振谱仪(ESR)检测各组水凝胶的活性物质含量; 采用氢离子浓度指数(pH)计和氧化还原电位(ORP)电极检测各组水凝胶的 pH 值及 ORP 值; 基于细菌生物膜完整性解析各组水凝胶的抑菌机制; 通过抑菌圈实验评估各组水凝胶的抗菌性能; 采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法进行细胞毒性测试, 并结合细胞划痕实验, 共同评估各组水凝胶对细胞生物相容性及迁移能力的影响。**结果** PA/BSPH 组水凝胶的失水率和水蒸气透过率分别为  $(32.3 \pm 2.3)\%$  和  $(2228.2 \pm 181.1) \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ ; 与 H 组相比较: PAH 组和 PA/BSPH 组水凝胶中过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )及羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )含量增高( $P < 0.05$ )、抑菌圈直径增加( $P < 0.05$ ); PAH 组水凝胶细胞存活率降低( $P < 0.05$ ), PA/BSPH 组显示细胞无毒性且细胞迁移率更高( $P < 0.05$ )。**结论** PA/BSPH 组水凝胶的抑菌机制与 PAW 中的活性物质  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$  密切相关。BSP 的加入优化了伤口敷料的保水性和透气性, 同时显著降低了 PAW 的细胞毒性, 使水凝胶具备良好的生物安全性并促进细胞增殖, 具有潜在的临床应用价值, 有望为临床慢性感染性伤口治疗提供新思路。

**关键词** 等离子体活化水; 白及多糖; 水凝胶; 伤口愈合; 抗菌; 细胞毒性

**中图分类号** R 632

**文献标志码** A **文章编号** 1000 - 1492(2025)11 - 1996 - 09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2025.11.002

皮肤受损形成伤口时, 细菌感染常导致其愈合延迟, 引发多重耐药细菌传播甚至形成慢性难愈性伤口, 严重影响患者身心健康<sup>[1]</sup>。传统治疗药物抗生素存在致细菌耐药的弊端<sup>[2]</sup>。因此, 开发有效治疗细菌感染并促进伤口愈合的新方法, 成为关系国家和社会健康发展的重大挑战。

相关研究<sup>[3]</sup>表明, 等离子体活化水(plasma-activated water, PAW)中含有大量的活性物质, 包括过氧化氢(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、亚硝酸根离子(nitrite ion,  $\text{NO}_2^-$ )、羟基自由基(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )和单线态氧(singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ ); 其虽能高效杀菌, 却存在易氧化过度产生细胞毒性的问题<sup>[4]</sup>, 不利于伤口愈合; 中药有效成分白及多糖(bletilla striata polysaccharide, BSP)对创面具有抗氧化及促

进细胞生长的作用<sup>[5]</sup>; 该研究旨在利用 PAW 作为溶剂结合 BSP 和水凝胶材料制备一种新型水凝胶, 将其作用于金黄色葡萄球菌(*staphylococcus aureus*, *S. aureus*)和小鼠成纤维细胞 L929, 以期其解决 PAW 毒性高和 BSP 抗菌弱的局限性, 为临床治疗细菌感染性创面提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** BSP(货号: 20230327)购自陕西正禾药业生物工程有限公司; 卡波姆 940(Carbomer 940, CBM<sub>940</sub>)(货号: C13665313)购自上海麦克林生物有限公司; 羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)(货号: 1026K022)购于北京索莱宝科技有限公司; 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide, DMPO)试剂(货号: H2209374)、2,2,6,6-四甲基哌啶(2,2,6,6-Tetramethylpiperidine, TEMP)试剂(货号: H2217779)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;  $\text{H}_2\text{O}_2$ 检测试剂盒(货号: S0038)、一氧化氮检测试剂盒(货号: S0021S)、细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8,

2025 - 09 - 25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: U20A20372)

作者简介: 任文雪, 女, 硕士研究生;

刘涛峰, 男, 主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: azytlf@163.com

CCK-8)(货号:C0005)购于上海碧云天生物技术股份有限公司;细菌活性荧光染色试剂盒(货号:L7012)购自美国 Molecular Probes 公司; *S. aureus* (菌株编号 NCTC-8325)由安徽医科大学第二附属医院馈赠;小鼠成纤维细胞(细胞株编号:L929)购自中国科学院上海细胞库。

**1.2 主要仪器与装置** 电子自旋共振谱仪(electron spin resonance, ESR)(型号:Bruker EMX plus 10/12)购于美国 Bruker 公司;酶标仪(型号:Varioskan LUX)、二氧化碳培养箱(型号:Heracell 150i)购于美国 Thermo 公司;氢离子浓度指数(potential of hydrogen, pH)计(型号:PB-10)、氧化还原电位(oxidation-Reduction Potential, ORP)电极(型号:PYTO)购于德国 Sartorius 公司;电热恒温培养箱(型号:DHP-9052)购于上海一恒科学仪器有限公司;倒置荧光显微镜(型号:DMIL)购于德国 Leica 公司;高频电源(型号:CTP-2000K)由中科院合肥物质研究院等离子体物理研究所馈赠;电流探头(型号:P6021)、高压探头(型号:P6015A)、数字示波器(型号:MSO 5104)购于美国 Tektronix 公司。

等离子体发生装置主要由高频电源和自制等离子体射流装置两部分组成,如图 1 所示。等离子体射流装置外壁是一个外直径 8 mm、长 180 mm、壁厚 1 mm 的圆柱形石英玻璃管,其侧壁有一个直径为 6

mm 的通气管,用于通入工作气体(工作气体为氩气)。高压电极为一个直径 2 mm、长 250 mm 圆柱形的不锈钢,且通过聚四氟乙烯套件将高压电极与石英玻璃管同轴固定。高压电极与高压电源连接,其下端与等离子体射流喷口相距 5 mm。接地电极为一直径 2 mm、长 150 mm 铜棒,并直接插入被处理液体中。通过配有电流探头和高压探头的数字示波器测得电源放电电压峰值约为 3.6 kV、电流峰值为 170 mA 以及频率约为 38 kHz。见图 1。

**1.3 水凝胶的制备与分组** 将 10 ml 去离子水(deionized water, DW)置于反应器中,等离子体装置喷口置于水面以下 30 mm 处,工作气体为氩气,气体流速为 40 L/h;当电压足够激发放电时,会在高压电极与水面之间形成气液相等离子体(图 1)。放电 15 min 即获得相对应时间的 PAW。将 BSP 分别与 DW、PAW 充分混合,制备成浓度为 4% 的两种混合溶液。DW、PAW 及两种混合溶液分别先与 CBM<sub>940</sub> 以 100 : 1 的比例充分溶解,加入等量 CMCS,震荡 5 min,以 1 500 r/min 的速度离心 5 min 脱泡,获得质地均匀的四种水凝胶。将四种水凝胶按照其组成成分划分为四组:DW-CBM<sub>940</sub>-CMCS 水凝胶组(H 组)、PAW-CBM<sub>940</sub>-CMCS 水凝胶(PAH)组、DW-BSP-CBM<sub>940</sub>-CMCS 水凝胶(BSPH)组、PAW-BSP-CBM<sub>940</sub>-CMCS 水凝胶(PA/BSPH)组。

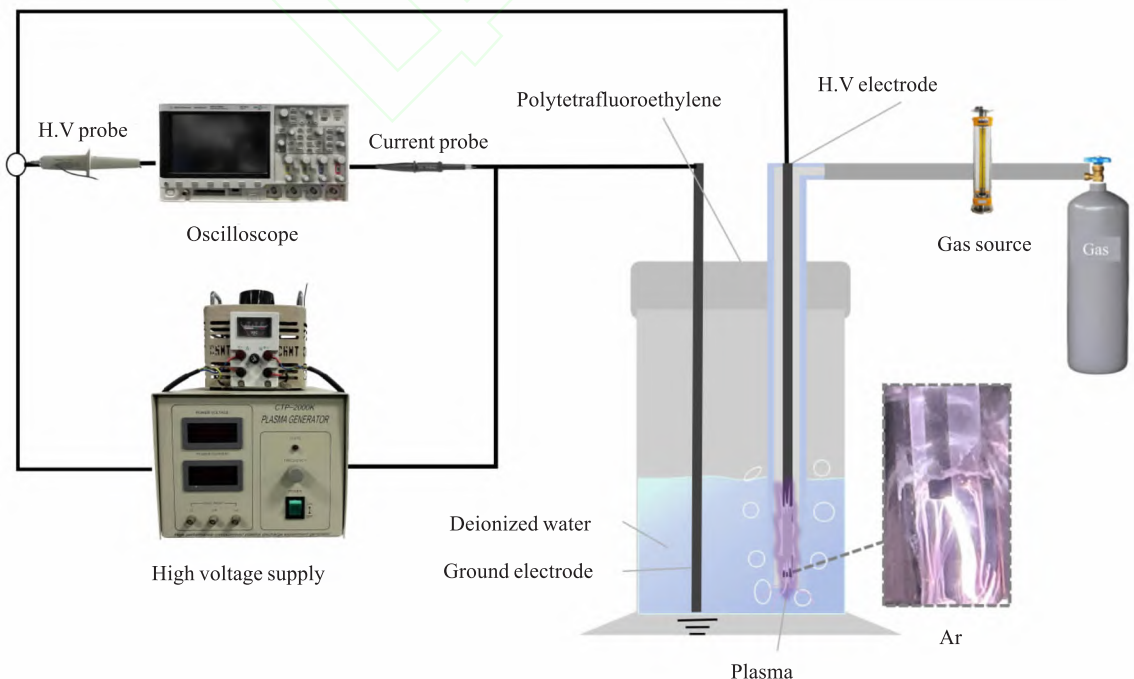


图 1 等离子体发生装置工作原理图

Fig. 1 Schematic diagram of the working principle of the plasma generation device

**1.4 水凝胶失水率和水蒸气透过率** 称取水凝胶初始质量( $m_0$ )置于 5 mL EP 管内,将水凝胶放入 37 °C 电热恒温培养箱内,每隔一段时间称取质量,直至水凝胶重量不再变化,记为最终质量( $m_1$ ),失水率( $\%$ ) =  $(m_0 - m_1)/m_0 \times 100\%$ 。采用美国材料测试协会(ASTM) E96/E96M-24 水法检测水蒸气透过率。将去离子水装至圆颈塑料试管(瓶口直径为 16 mm)3/4 处,瓶口覆盖一层纱布,边缘用 PU 膜密封,取 1 mL 水凝胶均匀涂抹在上方并称重( $m_a$ ),将样品放置在恒温培养箱 7 d 取出,称其质量( $m_b$ ),水蒸气透过率 $[g/(m^2 \cdot d)] = (m_a - m_b)/(t \times A)$ ( $t$ : 天数; $A$ :瓶口面积)。

**1.5 检测  $H_2O_2$  和  $NO_2^-$  含量** 将 600  $\mu$ L 水凝胶静置于 96 孔板中加入纯水浸泡 1 h,过 0.22  $\mu$ m 滤膜制备浸提液,采用  $H_2O_2$  检测试剂盒及一氧化氮检测试剂盒通过酶标仪测定,测量方法按照说明书操作。

**1.6 检测  $\cdot OH$  和  $^1O_2$  含量** 通过对应的自旋捕捉剂 DMPO 试剂和 TEMP 试剂结合 ESR 对水凝胶进行检测。DMPO 可与等离子体放电产生的  $\cdot OH$  反应生成 DMPO-OH,其 ESR 谱图为峰高比为 1 : 2 : 2 : 1 的四重峰。TEMP 与  $^1O_2$  反应生成 TEMPO $\cdot$ ,其 ESR 谱图为峰高比为 1 : 1 : 1 的三重峰,利用上述特征谱图可对  $\cdot OH$  和  $^1O_2$  进行定性分析。其中,DW 获取的 ESR 谱图谱线为基线,将其作为阴性对照。

**1.7 检测 pH 值和 ORP 值** 水凝胶的酸碱性使用 pH 计测量;氧化还原电势的检测采用 ORP 电极结合温度电极,结果皆在 pH 计上显示。

## 1.8 抑菌实验

**1.8.1 观察水凝胶对 *S. aureus* 的抑菌效果** 进行琼脂打孔法抑菌圈试验,取 2 mL *S. aureus* ( $1.34 \times 10^7$  CFU/mL)菌悬液滴加到 200 mL 肉汤培养基中混匀,制备细菌培养皿。用黄枪头压出直径为 6 mm 的圆孔。将 H 组、PAH 组、BSPH 组及 PA/BSPH 组水凝胶分别取 200  $\mu$ L 加入独立孔中,每组设置 3 个平行样本。随后将培养板转移至 37 °C 恒温培养箱中孵育 24 h,通过相机拍摄抑菌圈形态,并采用 Image J 软件定量分析抑菌圈直径。

**1.8.2 观察细菌细胞膜完整性** 采用 LIVE/DEAD<sup>TM</sup> BacLight<sup>TM</sup> 细菌活性荧光染色试剂盒检测 *S. aureus* 的活性状态。将 50  $\mu$ L 碘化丙啶(propidium Iodide, PI)试剂加到 1 mL 经过水凝胶浸提液浸

泡的金黄色葡萄球菌悬浮液(经纯水浸泡的样品作为阴性对照)中,然后在室温下黑暗中孵育 15 min。之后用 PBS 溶液洗去染料,将每个染色样品的 4  $\mu$ L 滴在各自的载玻片上并覆盖,利用显微镜来捕捉荧光图像,成像波长 485 ~ 630 nm。

## 1.9 细胞实验

**1.9.1 制备浸提液** 依据 ISO/EN10993-12 规定,将 H 组、PAH 组、BSPH 组和 PA/BSPH 组水凝胶分别取 0.1 g 与 DMEM 培养基混匀,过 0.22  $\mu$ m 滤膜,制成 100 mg/mL 浸提液。

**1.9.2 CCK-8 法检测细胞毒性** 小鼠成纤维细胞株复苏后用 DMEM 完全基培养至对数生长期后,将细胞种于 96 孔板( $1 \times 10^4$ /孔),培养 12 h,待细胞贴壁后,吸弃培养基,每空加入 100  $\mu$ L 浸提液,采用 DMEM 培养基作为阴性对照,每组设置 3 个重复孔,培养 12 h 后,加入 CCK-8 试剂,培养箱中孵育 40 min,利用酶标仪测量 450 nm 波长下吸光度值。

**1.9.3 细胞划痕实验评估伤口愈合能力** 实验前用记号笔在 6 孔板底部沿直尺方向划下间距和方向一致(约 0.5 ~ 1 cm)的水平平行线(每孔至少 3 条);将细胞种于 6 孔板(50 万/孔),置于 5%  $CO_2$  培养箱 24 h,显微镜下观察细胞丰度达 95% 时,用 10  $\mu$ L 黄色枪头垂直于标记线匀速推动划去细胞后,视产生的划痕与平行线相交的区域为标记区,吸弃培养液,加入浸提液培养;分别在 0、24 h 时,在显微镜下观察标记区并拍照,通过 Image J 软件测量划痕面积并计算愈合率。

**1.10 统计学处理** 所有数据应用 Origin2021 pro 进行统计学分析并作图,实验重复 3 次,实验结果均用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 水凝胶失水率和水蒸气透过率检测** 与 H 组相比较:PAH 组失水率相近,差异无统计学意义;BSPH 组和 PA/BSPH 组失水率降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 BSPH 组相比较,PA/BSPH 组失水率差异无统计学意义。与 H 组相比较,PAH 组水蒸气透过率相近,差异无统计学意义;BSPH 组和 PA/BSPH 组水蒸气透过率降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 BSPH 组相比较,PA/BSPH 组水蒸气透过率差异无统计学意义。见图 2。

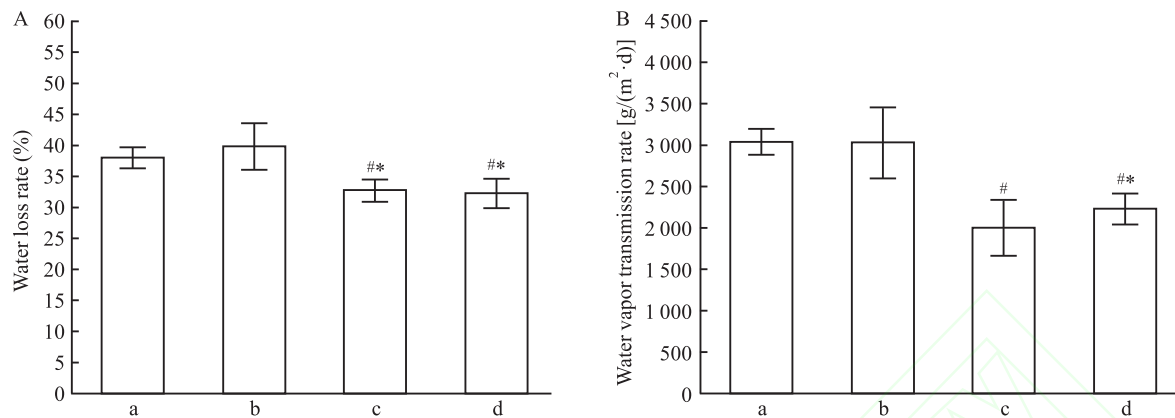


图2 四组水凝胶的失水率(A)和水蒸气透过率(B)比较

Fig.2 Comparison of water loss rate (A) and water vapor transmission rate (B) in four groups of hydrogels

a: H group; b: PAH group; c: BSPH group; d: PA/BSPH group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs H group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs PAH group.

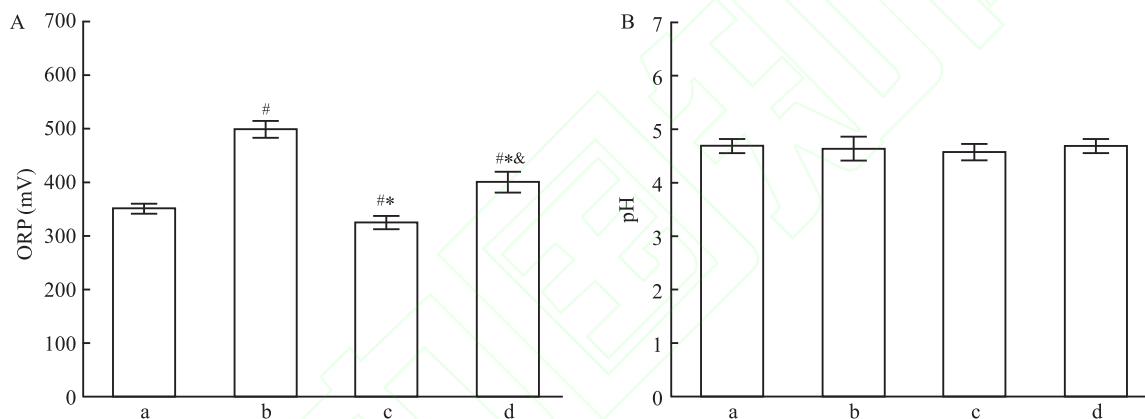


图3 四组水凝胶的ORP值(A)和pH值(B)比较

Fig.3 Comparison of ORP value (A) and pH value (B) in four hydrogel groups

a: H group; b: PAH group; c: BSPH group; d: PA/BSPH group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs H group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs PAH group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs BSPH group.

**2.2 检测水凝胶的 ORP 和 pH 变化** 与 H 组相比较:PAH 组和 PA/BSPH 组的 ORP 值增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );BSPH 组 ORP 值降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 PAH 组相比较,PA/BSPH 组 ORP 值降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。另外,四组水凝胶的 pH 值相比较,差异无统计学意义。见图 3。

**2.3 检测  $\cdot\text{OH}$  和  $^1\text{O}_2$  含量** 与基线相比较:H 组和 BSPH 组关于  $\cdot\text{OH}$  的 ESR 图谱线未出现峰高比为 1:2:2:1 的四重峰,表明 H 组和 BSPH 组不含有  $\cdot\text{OH}$ ;PAH 组和 PA/BSPH 组关于  $\cdot\text{OH}$  的 ESR 图谱线出现峰高比为 1:2:2:1 的四重峰,表明 H 组和 BSPH 组含有  $\cdot\text{OH}$ ;H 组、PAH 组、BSPH 组和 PA/BSPH 组关于  $^1\text{O}_2$  的 ESR 图谱线基本无差别,表明四组水凝胶不含有  $^1\text{O}_2$ 。见图 4。

**2.4 检测  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{NO}_2^-$  含量** 与 H 组相比较:

PAH 组和 PA/BSPH 组的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );BSPH 组  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量差异无统计学意义。与 PAH 组相比较,PA/BSPH 组  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );另外,四组水凝胶的  $\text{NO}_2^-$  含量相比较,差异无统计学意义。见图 5。

**2.5 水凝胶对 *S. aureus* 的抑菌效果** 与阴性对照组相比较:H 组显微镜下红色荧光点无显著差别,BSPH 组红色荧光点则更少,PAH 组和 PA/BSPH 组呈现出一片紧密的红色荧光点。H 组抑菌圈直径为原打孔直径,无抗菌效果;与 H 组相比较:BSPH 组抑菌圈直径差异无统计学意义;PAH 组和 PA/BSPH 组的抑菌圈直径增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且 PAH 组与 PA/BSPH 组的抑菌圈直径相比较,差异无统计学意义。见图 7。

**2.6 水凝胶的生物安全性评价** 与阴性对照组相

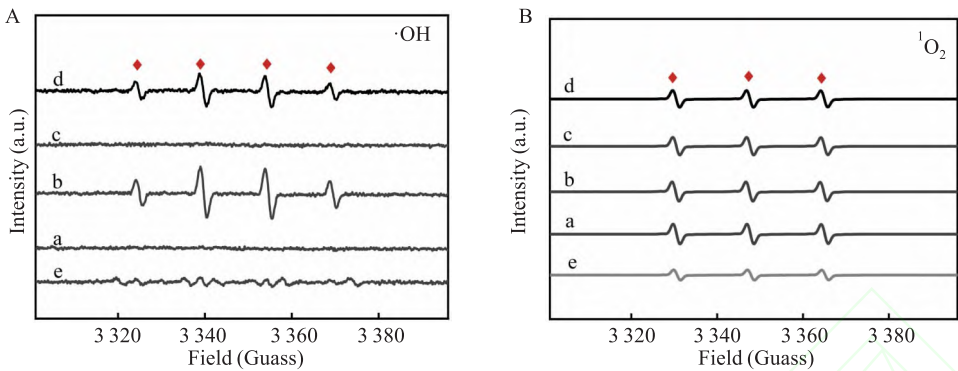


图 4 四组水凝胶的 ·OH (A) 和 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (B) 定性比较

Fig.4 Qualitative comparison of ·OH (A) and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (B) in four hydrogel groups

a: H group; b: PAH group; c: BSPH group; d: PA/BSPH group; e: Baseline was acquired with DW as a negative control.

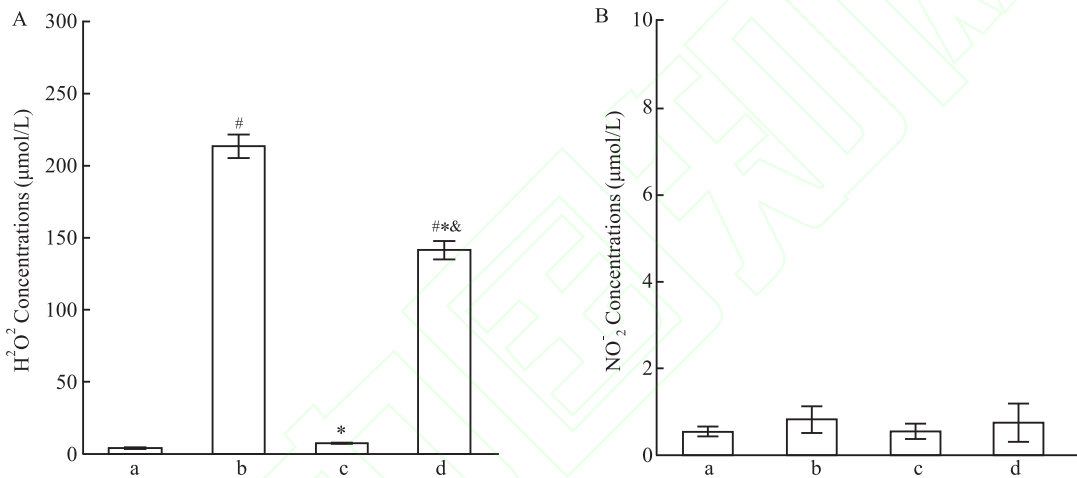


图 5 四组水凝胶的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量 (A) 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量 (B) 比较

Fig.5 Comparison of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (A) and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations (B) in four groups of hydrogels

a: H group; b: PAH group; c: BSPH group; d: PA/BSPH group; # *P* < 0.05 vs H group; \* *P* < 0.05 vs PAH group; & *P* < 0.05 vs BSPH group.

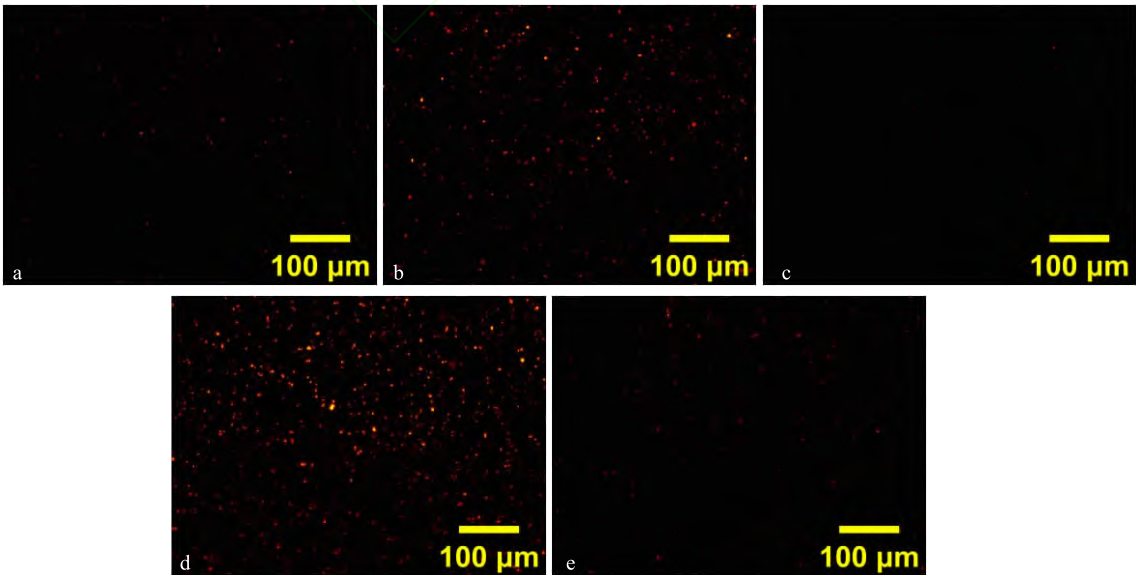


图 6 *S. aureus* 生物膜的 PI 染色荧光显微照片

Fig.6 Fluorescence micrograph of PI-stained *S. aureus* biofilm

a: H group; b: PAH group; c: BSPH group; d: PA/BSPH group; e: DW as a negative control; Scale bar: 100 μm; # *P* < 0.05 vs H group; \* *P* < 0.05 vs PAH group; & *P* < 0.05 vs BSPH group.

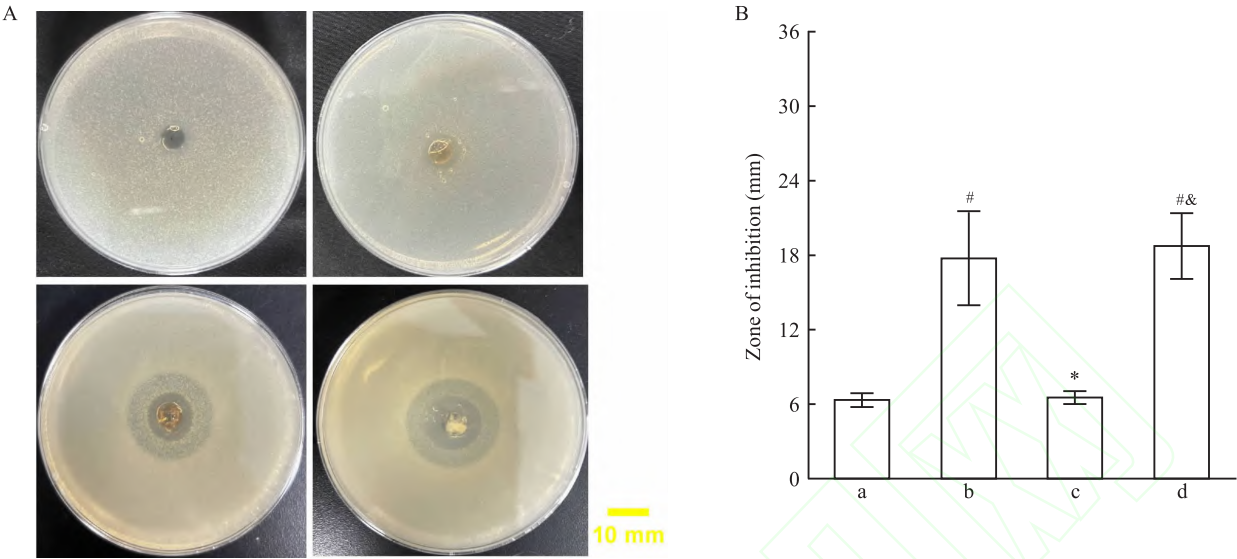


图 7 四组水凝胶对 *S. aureus* 的抑菌效果影响

Fig. 7 The effects of four groups of hydrogels on the antibacterial activity against *S. aureus*

A: Photographs of the zones of inhibition formed around the hydrogels after incubation; Scale bar: 10 mm; B: Zone of inhibition against *S. aureus*; a: H group; b: PAH group; c: BSPH group; d: PA/BSPH group; #  $P < 0.05$  vs H group; \*  $P < 0.05$  vs PAH group; &  $P < 0.05$  vs BSPH group.

比较,H 组的细胞存活率差异无统计学意义,PAH 组的细胞存活率显著降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );BSPH 组和 PA/BSPH 组的细胞存活率显著增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 8。

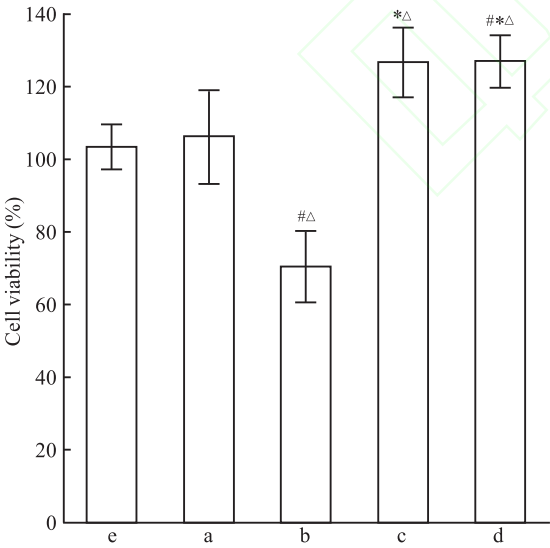


图 8 四组水凝胶对 L929 细胞存活率影响

Fig. 8 The effects of four groups of hydrogels on the viability of L929 cells

a: H group; b: PAH group; c: BSPH group; d: PA/BSPH group; e: DMEM medium was used as a negative control; #  $P < 0.05$  vs H group; \*  $P < 0.05$  vs PAH group; &  $P < 0.05$  vs BSPH group; Δ  $P < 0.05$  vs negative control group.

2.7 水凝胶对细胞增殖、迁移能力的影响 与阴性对照组比较:H 组、BSPH 组和 PA/BSPH 组细胞迁移能力增强,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),PAH 组细胞迁移能力降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与 PA/BSPH 组相比较,H 组、BSPH 组细胞迁移能力降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 9。

### 3 讨论

细菌感染是伤口愈合过程中广泛而棘手的问题,本研究利用等离子体射流装置制备出 PAW,再结合 BSP、CBM<sub>940</sub> 和 CMCS 组成新型水凝胶敷料 (PA/BSPH) 考察其理化性能、抗菌活性和治疗效果。创伤环境中的 pH 值在创伤愈合过程中起着关键作用,碱性环境更利于细菌增殖<sup>[6]</sup>。四组水凝胶是 pH 值都处于 4~6 的微酸性敷料,不仅与正常皮肤酸碱性能相似,对皮肤无刺激性,还可降低细菌定植、减少细菌感染<sup>[7]</sup>,符合临床对伤口敷料 pH 值需求。

水凝胶保水性能实验结果表明 BSP 的引入增强了水凝胶锁水能力。相关研究提到为保证伤口适宜湿度,创面水蒸气透过率在 2 000~2 500 g/(m<sup>2</sup>·d) 之间为佳<sup>[8]</sup>;本研究中,BSPH 组和 PA/BSPH 组水凝胶的水蒸气透过率在此范围内,可以保证伤口与环境间适度的气体交换,保持伤口部位的湿度,避免伤口过度脱水,维持创面“湿性愈合”<sup>[9]</sup>。因

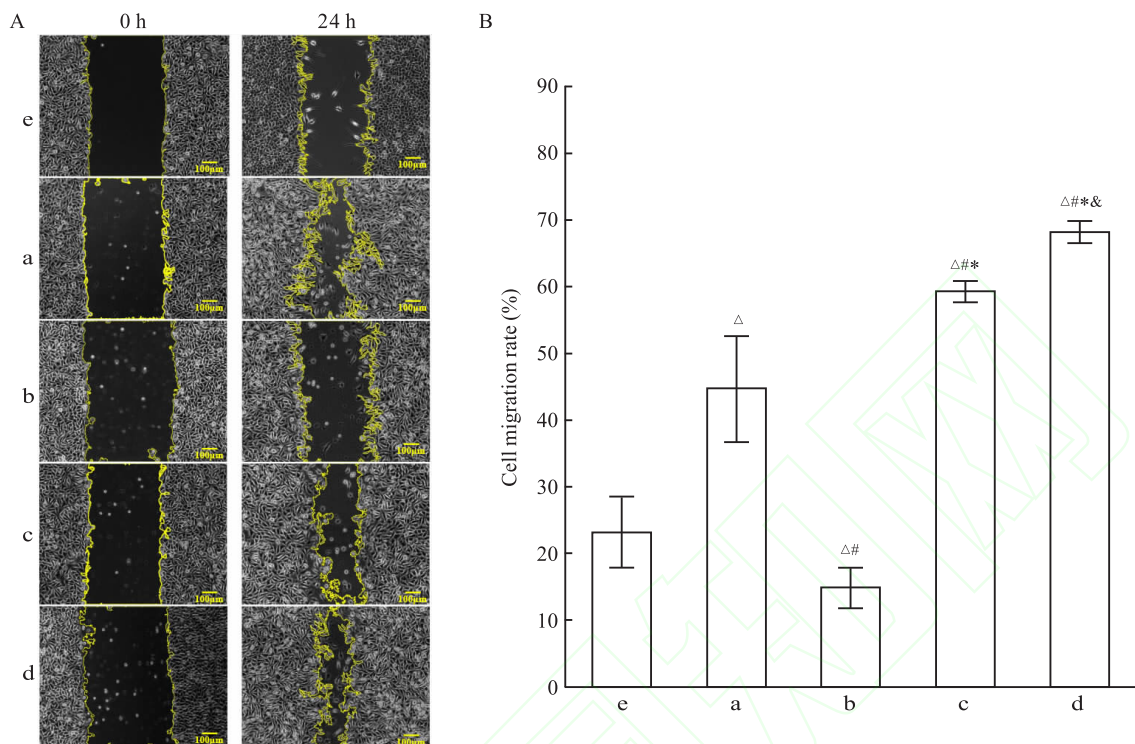


图9 四组水凝胶对 L929 细胞增殖迁移影响

Fig.9 The effects of four groups of hydrogels on the proliferation and migration of L929 cells

A: Optical microscopy images showing fibroblast migration and coverage 24 h after the treatment of hydrogels; Scale bar: 100 μm; B: Migration rate of L929 cells 24 h after the treatment of hydrogels; a: H group; b: PAH group; c: BSPH group; d: PA/BSPH group; e: DMEM medium was used as a negative control; #  $P < 0.05$  vs H group; \*  $P < 0.05$  vs PAH group; &  $P < 0.05$  vs BSPH group; Δ  $P < 0.05$  vs negative control group.

此, BSPH 组和 PA/BSPH 组水凝胶更满足临床上用于伤口治疗的水凝胶敷料应具备的物理性能要求。

相关研究提到氙气等离子体和水分子会发生一系列反应,使得 PAW 产生活性物质,其中主要包括稳定性强的长寿命活性物质  $H_2O_2$  和易分解、稳定性差的短寿命活性物质  $\cdot OH$ <sup>[10]</sup>,二者先后分解细菌细胞壁中肽聚糖的化学键及细胞膜中的大分子蛋白,氧化周围的脂质分子<sup>[11]</sup>;破坏了细菌结构完整性,造成了核酸、蛋白和胞质的氧化损伤及泄露<sup>[12]</sup>,最终使微生物失活。

进一步探讨水凝胶的杀菌机制,四组水凝胶的长、短寿命活性物质含量检测及 *S. aureus* 抗菌实验结果表明,PAH 组和 PA/BSPH 组水凝胶因为含有  $H_2O_2$  和  $\cdot OH$  这两种活性物质,所以破坏了细菌结构,使细菌死亡在显微镜下呈现大量致密红色荧光点,达到杀菌效果。H 组和 BSPH 组水凝胶不含有这些活性物质,所以无抗菌作用;其中 BSPH 组水凝胶细菌活性状态最好,可能因为 BSP 作为糖类是重要的能源物质,所以提高了细菌存活量。除此之外,ORP 值越高,氧化能力越强,可以有效破坏生物膜,

发挥杀菌作用<sup>[13]</sup>;PAH 组和 PA/BSPH 组水凝胶的 ORP 值明显高于 H 组和 BSPH 组水凝胶,意味着 PAH 组和 PA/BSPH 组水凝胶是通过氧化机制破坏 *S. aureus* 细胞膜,而 PA/BSPH 组水凝胶的 ORP 值小于 PAH 组水凝胶则可能因为 BSP 抗氧化性能减少了 ORP 的存在<sup>[14]</sup>。

使用 CCK-8 法进行细胞毒性实验评估水凝胶的生物安全性<sup>[15]</sup>,结果显示 PAH 组水凝胶有细胞毒性,不具有生物安全性;这是可能是因为 PAH 组水凝胶中活性物质含量过高造成氧化压迫,导致了细胞衰老或坏死<sup>[16]</sup>;因此,即使 PAH 组水凝胶有良好的杀菌效果,也不适合作为伤口敷料。PA/BSPH 组水凝胶则不仅具有生物安全性,且在细胞划痕试验中表现出最佳迁移能力;由于 PA/BSPH 组水凝胶中  $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$  含量和 ORP 值皆低于 PAH 组水凝胶,因此推测 BSP 凭借其抗氧化特性,有效降低了水凝胶中活性物质水平,消除了 PAW 对细胞的氧化应激损伤<sup>[17]</sup>,进而抵消了其毒副作用,并作为糖类对细胞增殖与迁移产生促进作用。体外实验结果初步表明 PA/BSPH 组水凝胶在感染性及慢性感

染性创面治疗方面具有潜在临床应用价值。

综上所述,该研究成功开发了一种创新型 PAW 协同 BSP 的水凝胶 (PA/BSPH),其具有酸碱性能适中、保水性优、透气性佳的物化性能,适用于处理金黄色葡萄球菌感染性伤口。该水凝胶在体外细胞实验中表现出优异的生物安全性和促进伤口愈合的能力。后续将探讨 PA/BSPH 水凝胶对其他细菌和细菌生物膜的杀伤效果,并建立小鼠细菌感染性全层损伤模型<sup>[18]</sup>验证其在真实创伤环境中的疗效,弥补体外实验无法模拟的复杂调控机制,以开发更加高效、多功能的伤口敷料。

### 参考文献

- [1] 方 辉,王陈兵. 黄芩苷结合明胶/壳聚糖同轴静电纺丝膜的制备及其体外研究[J/OL]. 安徽医科大学学报, 2025: 1 – 13. (2025 – 09 – 03). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=YIKE20250902005>.
- [1] Fang H, Wang C B. Preparation and *in vitro* study of baicalin combined with gelatin/chitosan coaxial electrospinning membrane [J/OL]. Acta Univ Med Anhui, 2025: 1 – 13. (2025 – 09 – 03). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=YIKE20250902005>.
- [2] Daeschlein G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management[J]. Int Wound J, 2013, 10(s1): 9 – 14. doi:10.1111/iwj.12175.
- [3] Jung J M, Yoon H K, Jung C J, et al. Cold plasma treatment promotes full-thickness healing of skin wounds in murine models[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2023, 22(1): 77 – 84. doi:10.1177/15347346211002144.
- [4] El-Reda G A, Mahmoud U T, Ali F A Z, et al. Neurobehavioral toxicity of Cold plasma activated water following oral gavage in mice[J]. NeuroToxicology, 2024, 105: 45 – 57. doi:10.1016/j.neuro.2024.08.007.
- [5] Li Y, Hao Y, Yang X, et al. Structure characterization of a Bletilla striata homogeneous polysaccharide and its effects on reducing oxidative stress and promoting wound healing in diabetic rats[J]. Int J Biol Macromol, 2025, 307(Pt 3): 141904. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.141904.
- [6] Han Z, Yuan M, Liu L, et al. pH-Responsive wound dressings: advances and prospects[J]. Nanoscale Horiz, 2023, 8(4): 422 – 40. doi:10.1039/D2NH00574C.
- [7] Das I J, Bal T. pH factors in chronic wound and pH-responsive polysaccharide-based hydrogel dressings[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 279(Pt 1): 135118. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.135118.
- [8] Saba M, Baradar A K, Neda K, et al. Comparative study of collagen and gelatin in chitosan-based hydrogels for effective wound dressing: Physical properties and fibroblastic cell behavior[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 518(4): 625 – 631. doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.102.
- [9] Yu C, Jingyu C, Kunlin C, et al. Preparation and properties of antibacterial composite hydrogels based on polyvinyl alcohol, chitosan, and nano-metal oxide[J]. Cellulose, 2024, 31(6): 3607 – 3622. doi:10.1007/s10570-024-05821-z.
- [10] Tan M, Chen W, Li M, et al. Effect of air, O<sub>2</sub>, Ar, and N<sub>2</sub> plasma-activated water on mildewing activity of moldy pathogen of Gannan navel oranges[J]. Plasma Process Polym, 2024, 21(3): 2300179. doi:10.1002/ppap.202300179.
- [11] Han Q Y, Wen X, Gao J Y, et al. Application of plasma-activated water in the food industry: a review of recent research developments[J]. Food Chem, 2023, 405: 134797. doi:10.1016/j.foodchem.2022.134797.
- [12] Zhang H, Wei J, Xv H, et al. Bactericidal efficacy of plasma-activated water against *Vibrio parahaemolyticus* on *Litopenaeus vannamei*[J]. Front Nutr, 2024, 11: 1365282. doi:10.3389/fnut.2024.1365282.
- [13] 卢新培, 罗婧怡, 聂兰兰, 等. 等离子体医学研究进展[J]. 高电压技术, 2024, 50(8): 3555 – 79. doi:10.13336/j.1003-6520.hve.20240977.
- [13] Lu X P, Luo J Y, Nie L L, et al. Progresses in plasma medicine research[J]. High Volt Eng, 2024, 50(8): 3555 – 79. doi:10.13336/j.1003-6520.hve.20240977.
- [14] Han X, Liu H, et al. The effects of different extraction methods on the structure and antioxidant properties of *Bletilla striata* polysaccharide[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2025, 55(4): 392 – 402. doi:10.1080/10826068.2024.2419862.
- [15] Wang L, Ding X, He X, et al. Fabrication and properties of hydrogel dressings based on genipin crosslinked chondroitin sulfate and chitosan [J]. Polymers, 2024, 16(20): 2876. doi:10.3390/polym16202876.
- [16] 彭胜杰. 大气压低温等离子体诱导肿瘤细胞新型死亡模式及机制研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2024. doi:10.27517/d.cnki.gzkju.2024.001289.
- [16] Peng S J. New types of programmed cell death induced by cold atmospheric plasma[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2024. doi:10.27517/d.cnki.gzkju.2024.001289.
- [17] Jiang G, Kong H, Wang Y, et al. Antioxidant and hepatic fibrosis-alleviating effects of selenium-modified *Bletilla striata* polysaccharide[J]. Int J Biol Macromol, 2025, 301: 140234. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.140234.
- [18] Ruamsap N, Thomas C S, Imerbsin R, et al. Chronic wound infection model of *Acinetobacter baumannii* in outbred mice[J]. Mil Med, 2023, 188(7 – 8): usac020. doi:10.1093/milmed/usac020.

# Antibacterial properties and compatibility of plasma-activated water/bletilla striata polysaccharide composite hydrogel

Ren Wenxue<sup>1</sup>, Cheng Cheng<sup>2</sup>, Han Wei<sup>3</sup>, Liu Taofeng<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>*The First Clinical Medical College of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230001*;

<sup>2</sup>*Institute of Plasma Physics*, <sup>3</sup>*Institute of Health and Medical Technology, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031*; <sup>4</sup>*Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230001*)

**Abstract** **Objective** To investigate the antibacterial properties and biocompatibility of a novel hydrogel fabricated by integrating plasma-activated water (PAW) and bletilla striata polysaccharide (BSP). **Methods** The experiments were carried out by dividing the hydrogels into four groups based on their compositions: the deionized water (DW)-Carbomer 940 (CBM<sub>940</sub>)-carboxymethyl chitosan (CMCS) hydrogel group (H group), the PAW-CBM<sub>940</sub>-CMCS hydrogel (PAH) group, the DW-BSP-CBM<sub>940</sub>-CMCS hydrogel (BSPH) group, and the PAW-BSP-CBM<sub>940</sub>-CMCS hydrogel (PA/BSPH) group. Physical properties of the hydrogels were evaluated by testing water loss rate and water vapor transmission rate. The content of active substances was determined using a microplate reader and an electron spin resonance spectrometer (ESR). The pH and ORP values were measured using a pH meter and an oxidation-reduction potential (ORP) electrode. The antibacterial mechanism was elucidated by analyzing the integrity of bacterial biofilms. Antibacterial activity was evaluated *via* the zone of inhibition assay. Cytotoxicity testing was performed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and combined with the cell scratch assay, to collectively evaluate the effects of the hydrogel on cellular biocompatibility and migration ability. **Results** The water loss rate and water vapor transmission rate of PA/BSPH hydrogel were  $(32.3 \pm 2.3)\%$  and  $(2228.2 \pm 181.1) \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ . Compared with the H group hydrogel, the contents of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) in PAH and PA/BSPH groups significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the diameters of inhibition zones significantly enlarged ( $P < 0.05$ ). The cell viability in PAH group significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The PA/BSPH group showed non-toxicity and a higher cell migration rate ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The antibacterial mechanism of the PA/BSPH hydrogel relies on the reactive species  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\cdot\text{OH}$  in PAW. The incorporation of BSP enhances the water retention and breathability of the wound dressing while significantly reducing the cytotoxicity of PAW. This modification endows the hydrogel with improved biocompatibility and promotes cell proliferation. The PA/BSPH hydrogel demonstrates clinical potential by offering a novel therapeutic strategy for chronic infected wound management.

**Key words** plasma-activated water; bletilla striata polysaccharide; hydrogel; wound healing; antimicrobial; cytotoxicity

**Fund program** National Natural Science Foundation of China (No. U20A20372)

**Corresponding author** Liu taofeng, E-mall: azyltf@163.com