

# 抗菌抗炎 SL/PVA 纳米纤维膜的制备及其在结膜下炎症干预中的应用

宁清云<sup>1</sup> 安柏源<sup>1</sup> 孙雪<sup>2</sup> 石军<sup>1</sup> 栗占荣<sup>2</sup> 李景果<sup>2</sup>

<sup>1</sup>郑州大学材料科学与工程学院, 郑州 450003; <sup>2</sup>河南省立眼科医院 河南省人民医院眼科  
郑州大学人民医院, 郑州 450003

通信作者: 李景果, Email: lijingguo@zzu.edu.cn

**【摘要】** 目的 通过制备结构稳定的磺酸化木质素(SL)/聚乙烯醇(PVA)纳米纤维膜,构建兼具内源性抗氧化与抗菌活性的眼部生物基载体,验证其在结膜下炎症干预中的作用。方法 以天然木质素为原料,通过磺酸化反应引入-SO<sub>3</sub>H 基团以提升其亲水性和溶解性,获得适用于电纺的 SL。将 SL 与 PVA 按质量比 25:75 配制溶液,采用共电纺技术制备 SL/PVA 纳米纤维膜。采用扫描电子显微镜、傅里叶变换红外光谱、X 射线光电子能谱和拉伸试验表征膜的形貌结构、化学组成及力学性能;采用 DPPH 自由基与羟基自由基(OH)清除实验评价抗氧化性能;采用细胞计数试剂盒-8 与 Calcein-AM/碘化丙啶(PI)活死染色评价细胞相容性;通过活/死菌染色法评估其对金黄色葡萄球菌的抑菌活性;采用 DCFH-DA 探针法检测其对 CCL-20.2 细胞活性氧簇(ROS)的清除能力;采用免疫荧光染色法检测其对 RAW264.7 小鼠巨噬细胞炎症因子白细胞介素(IL)-8、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  表达的调节作用。构建大鼠结膜下损伤模型,观察造模后不同时间点 SL/PVA 纳米纤维膜处理结膜下充血和水肿评分变化;造模后第 7 天采用苏木精-伊红染色评估结膜下组织炎性细胞浸润、组织结构破坏等情况,验证其体内抗炎效果。结果 SL/PVA 纳米纤维膜呈现均匀、连续的纳米纤维结构,具有良好的力学性能和成膜稳定性。傅里叶变换红外光谱及 X 射线光电子能谱结果证实-SO<sub>3</sub>H 基团的成功引入和 SL 与 PVA 间的相互作用。SL/PVA 纳米纤维膜浸提液对 DPPH 自由基的清除率和 OH 的清除率在 0.1、0.2、0.4 和 0.8 mg/ml 浓度范围内随浓度升高而增加(其中 OH 清除率在 0.4 mg/ml 后趋于稳定)。SL/PVA 纳米纤维膜与细胞共培养 24、36 和 48 h,细胞存活率均>90%。SL/PVA 组细胞 ROS 水平明显低于高渗培养组和 PVA 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。活/死菌染色结果显示,对照组、PVA 组和 SL/PVA 组细菌存活率分别为(93.82 $\pm$ 2.15)%、(83.23 $\pm$ 2.42)%和(8.63 $\pm$ 0.84)%,总体比较差异有统计学意义( $F=1727.47, P<0.001$ ),其中 SL/PVA 组细菌存活率明显低于对照组和 PVA 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.001$ )。免疫荧光染色结果显示,SL/PVA 组细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 IL-1 $\beta$  平均荧光强度均明显弱于脂多糖组和 PVA 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.001$ )。大鼠造模后 7 和 14 d,SL/PVA 组结膜下充血与水肿评分均低于对照组,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ );造模后 7 d,SL/PVA 组结膜组织中炎性细胞密度明显低于对照组和 PVA 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。结论 本研究成功制备了结构稳定、功能多样的 SL/PVA 纳米纤维膜,其表现出优异的抗氧化、抗菌及生物相容性,可显著下调炎症因子表达并缓解结膜下炎症反应,具备作为眼科生物活性载体材料的潜力。

**【关键词】** 木质素;磺酸化改性;纳米纤维膜;电纺技术;结膜下炎症

基金项目:国家自然科学基金(52173143)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20250609-00192

## Preparation of an antibacterial and anti-inflammatory sulfonated lignin/poly(vinyl alcohol) nanofiber membrane and its application in subconjunctival inflammation intervention

Ning Qingyun<sup>1</sup>, An Baiyuan<sup>1</sup>, Sun Xue<sup>2</sup>, Shi Jun<sup>1</sup>, Li Zhanrong<sup>2</sup>, Li Jingguo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Materials Science and Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China; <sup>2</sup>Henan Eye Hospital, Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Li Jingguo, Email: lijingguo@zzu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To prepare a structurally stable sulfonated lignin (SL)/poly(vinyl alcohol) (PVA) composite nanofiber membrane as a bio-based ocular carrier material with intrinsic antioxidant and antibacterial activities, and verify its role in the intervention of subconjunctival inflammation. **Methods** SL suitable for

electrospinning was prepared from natural lignin by sulfonation to introduce  $-SO_3H$  groups, thereby improving the hydrophilicity and solubility. SL and PVA were blended at a mass ratio of 25 : 75 and processed into SL/PVA composite nanofiber membrane by co-electrospinning. Morphology, chemical composition, and mechanical properties of the membrane were characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, and tensile testing. Antioxidant capacity of the membrane was assessed using DPPH radical- and hydroxyl radical (OH)-scavenging assays. Cytocompatibility was evaluated by cell counting kit-8 and Calcein-AM/propidium iodide (PI) live/dead staining. Antibacterial activity of the membrane against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was examined using live/dead bacterial staining. Intracellular reactive oxygen species (ROS) in CCL-20.2 cells were measured using the DCFH-DA probe. The expression of interleukin (IL)-8, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  in RAW264.7 macrophages was determined by immunofluorescence staining. A rat subconjunctival injury model was established to evaluate conjunctival congestion and edema scores at different time points after the membrane implantation. Hematoxylin-eosin (HE) staining on post-modelling day 7 was used to assess inflammatory cell infiltration and tissue damage in subconjunctival tissues. All animal experiments complied with the Regulations on the Management of Laboratory Animals and relevant ethical regulations, and had been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Henan Eye Hospital (No. HNEECA-2024-18). **Results** The SL/PVA nanofiber membrane exhibited a uniform and continuous nanofibrous architecture with favorable mechanical performance and structural stability. Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy confirmed successful incorporation of  $-SO_3H$  groups and interactions between SL and PVA. SL/PVA membrane extracts showed concentration-dependent scavenging of DPPH radical and OH over 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mg/ml, with OH scavenging reaching a plateau beyond 0.4 mg/ml. After co-culture with the membrane for 24, 36, and 48 hours, cell viability remained greater than 90%. The SL/PVA group showed significantly lower intracellular ROS levels than the hyperosmotic model and PVA groups (both  $P < 0.05$ ). Live/dead bacterial staining results showed that the bacterial survival rates in the control group, PVA group and SL/PVA group were  $(93.82 \pm 2.15)\%$ ,  $(83.23 \pm 2.42)\%$  and  $(8.63 \pm 0.84)\%$ , respectively, with a significant overall difference ( $F = 1\ 727.47$ ,  $P < 0.001$ ). The bacterial survival rate in SL/PVA group was significantly lower than that in the control group and PVA group (both  $P < 0.001$ ). Immunofluorescence analysis showed significantly reduced mean fluorescence intensities of TNF- $\alpha$ , IL-8, and IL-1 $\beta$  in the SL/PVA group compared with the lipopolysaccharide group and PVA group (all  $P < 0.001$ ). *In vivo*, rat conjunctival congestion and edema scores in the SL/PVA group were significantly lower than those in the control group on postoperative days 7 and 14 (all  $P < 0.01$ ), and inflammatory cell counts in subconjunctival tissues were significantly reduced in comparison with the control group and PVA group on postoperative day 7 (both  $P < 0.01$ ). **Conclusions** A structurally stable and multifunctional SL/PVA composite nanofiber membrane with excellent antioxidant activity, antibacterial performance, and cytocompatibility has been successfully developed. The membrane can downregulate pro-inflammatory cytokine expression and alleviate subconjunctival inflammatory responses *in vivo*, indicating its potential as a bioactive carrier material for ophthalmic applications. The membrane can significantly down-regulate the expression of inflammatory factors and relieve subconjunctival inflammatory reactions.

**[Key words]** Lignin; Sulfonation modification; Nanofiber membrane; Electrospinning technology; Subconjunctival inflammation

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (52173143)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250609-00192

结膜作为眼部重要的免疫屏障组织,其慢性炎症状态(如结膜下炎症)在多种眼表疾病中普遍存在,常表现为持续性结膜充血、眼部异物感和泪膜不稳定,严重时可引发角膜上皮损伤、眼表重建失败等并发症,显著影响视觉功能<sup>[1]</sup>。在结膜下炎症的发病机制中,氧化应激与炎症因子的协同过度表达被认为是驱动结膜下组织破坏和修复延迟的核心环节<sup>[2-4]</sup>。

目前临床主要通过局部糖皮质激素及非甾体类抗炎药物治疗结膜下炎症。该类药物虽可在短期内缓解结膜下炎症症状,但存在明显的局限性,如眼局部给药

(如滴眼液)时,滴眼液在结膜囊停留时间短、易受泪液冲刷清除,且经结膜/巩膜途径的有效递送效率有限,导致生物利用度不足(通常 $< 5\%$ ),需频繁给药以维持疗效,进而降低患者依从性<sup>[5]</sup>。此外,长期使用糖皮质激素易引发角膜上皮毒性、高眼压,甚至继发性青光眼<sup>[6]</sup>;非甾体类抗炎药物在少数患者中存在诱发角膜溶解或穿孔的风险<sup>[7]</sup>。因此,构建一种具备靶向调控能力,同时毒副作用较小的新型递药系统,成为提升结膜下炎症治疗效果的重要策略。近年来,多项研究证实,以纳米粒子、水凝胶或微结构薄膜为载体的控

释系统可有效延长药物滞留时间,提高透膜效率,并降低给药频率与药物不良反应。例如,基于聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒子封装布洛芬的递药系统,显著提升药物经结膜-巩膜途径的透过效率与组织滞留时间,同时有效减少毒副作用<sup>[8]</sup>。此外,RCI001 等新型抗氧化小分子在眼部化学损伤模型中,通过靶向抑制 Rac1/NLRP3 炎症通路,表现出优于糖皮质激素的疗效<sup>[9]</sup>。

在眼表慢性炎症(如结膜下炎症)中,细菌感染,尤其是金黄色葡萄球菌常导致创面迁延不愈。抗生素虽为细菌感性眼表疾病的一线治疗手段,但随着耐药菌株的增加及长期用药的毒性累积,限制了其临床持续应用<sup>[10]</sup>。因此,开发兼具抗菌活性并可改善局部炎症微环境的新型生物材料,已成为提升结膜下炎症治疗效果的重要方向。抗菌聚合物是一种相对安全的抗菌策略。有研究显示,木质素与细菌接触后,通过其多酚结构裂解并穿透细胞壁,从而对细菌造成损伤<sup>[11]</sup>。此外,木质素作为一种天然酚类聚合物,具有良好的生物可降解性、生物相容性及内源性抗氧化活性,近年逐步被应用于眼科再生与炎症调控等研究领域<sup>[12-14]</sup>。然而,溶解性差、力学性能不足,限制了其在精细材料加工中的应用<sup>[15]</sup>。聚乙烯醇[poly(vinyl alcohol), PVA]作为临床常用生物材料,具备良好的力学支撑与生物相容性,与木质素复配可增强纤维结构稳定性及递药能力<sup>[16-18]</sup>。因此,本研究采用磺酸化修饰策略,在木质素分子结构中引入亲水性-SO<sub>3</sub>H 基团,获得具有良好成膜性和溶解性的磺酸化木质素(sulfonated lignin, SL),并通过共电纺技术将其与 PVA 构建为 SL/PVA 纳米纤维膜。本研究拟对 SL/PVA 纳米纤维膜的结构和物理性能进行系统表征,并通过微量稀释法和活/死菌染色法评估其抗菌能力;结合体外细胞实验,探讨其在调节氧化应激水平及炎症因子表达方面的作用机制;同时通过大鼠结膜下损伤模型评估 SL/PVA 复合纳米纤维膜对结膜下炎症反应的缓解及组织修复效果,从而系统揭示其在慢性眼表炎症疾病治疗中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验细胞及动物来源** RAW264.7 小鼠巨噬细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司;人脐肉成纤维细胞(human pterygium fibroblasts, HPFs)和结膜上皮细胞 CCL-20.2 由河南省立眼科医院提供。选取 18 只 8 周龄、体质量 180~220 g、雌性 SD 大鼠,购自

河南希诺谷生物科技有限公司[生产许可证编号:SYXK(豫)2023-0007]。所有大鼠均饲养在室温、光照/黑暗循环 12 h 的环境中,给予充足的食物和水。所有动物实验均遵循《实验动物管理条例》及相关伦理规范,并经河南省立眼科医院实验动物伦理委员会批准(批文号:HNEECA-2024-18)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 脱碱木质素(北京百灵威科技有限公司);PVA(1799 型,上海麦克林试剂有限公司);亚硫酸、浓硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、无水三氯化铁(FeCl<sub>3</sub>)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(上海阿拉丁试剂有限公司);2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯探针(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)、Calcein-AM/PI 细胞活/死染色试剂盒、活/死菌染色试剂盒(L7012)(北京索莱宝科技有限公司);细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK)-8 细胞活力检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司);金黄色葡萄球菌(河南省立眼科医院微生物室提供);兔源白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)抗体、兔源肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)抗体(美国 Affinity Bioreagents 公司);兔源 IL-1β 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。ECLIPSE 8i 荧光显微镜、EnVision 型酶标仪(日本 Nikon 公司);OMS-90 手术显微镜(日本 Topcon 公司);扫描电子显微镜(Zeiss Auriga, 德国 Zeiss 公司);傅里叶变换红外光谱仪(Bruker ALPHA II, 德国 Bruker 公司);X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)仪(Axis Supra, 英国 Kratos Analytical 公司);光学显微镜(BX53, 日本 Olympus 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 SL 制备** 称取 5.0 g 木质素和 3.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 加入到 0.2 mol/L NaOH 溶液中,在室温下持续磁力搅拌,使其形成均一反应体系。由于体系初始碱性较强,为在磺化反应过程中兼顾反应活性与木质素结构稳定性,使用 0.2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液缓慢滴加调节体系 pH 至 10.0(维持弱至中等碱性环境),以促进磺化反应并减少强碱条件下的结构破坏。随后加入 0.06 mol/L FeCl<sub>3</sub> 催化剂 5 ml,将反应体系置于 90~100 °C 温控反应器中反应 2 h。反应结束后,继续用 0.2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液缓慢调节体系 pH 至 4.0,使 SL 沉淀析出。将体系以离心半径 14 cm、8 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,弃去上清;沉淀用去离子水洗涤至上清近中性后,置于 40 °C 真空干燥至恒重,得到 SL 粉末备用。

**1.2.2 电纺制备 SL/PVA 纳米纤维膜** 按照磷酸盐

缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)与 DMSO 体积比为 80:20 制备混合溶剂。按照预先优化确定的质量比 SL:PVA = 25:75, 以配制 10 ml 电纺溶液为例, 精确称取 SL 0.25 g 与 PVA 0.75 g [总固含量为 10% (w/v)], 同时加入到混合溶剂中, 室温下连续磁力搅拌 1~2 h, 直至形成均一溶液。采用超声波处理设备对溶液进行处理, 超声时间为 30 min, 温度不超过 40 ℃, 以防止因局部过热引起成分降解或溶液粘度异常。超声结束后, 将溶液置于室温下静置约 30 min, 使气泡充分逸出。观察溶液颜色、透明度和黏度, 确保无明显颗粒或沉淀产生。将无气泡的溶液缓慢注入 10 ml 注射器中, 确保操作过程中不引入额外气泡。设置电纺参数进行静电纺丝: 针头规格为 22 G; 注射速度为 0.000 3 mm/s; 针头与收集板间距离为 15 cm; 环境条件为温度 30 ℃, 相对湿度 45%~50%。在高电场作用下, 溶液从针头喷出, 并在飞行过程中迅速固化, 最终纤维均匀地沉积于铝制接收板上, 形成纳米纤维膜。小心地将形成的纤维膜从收集板上剥离, 置于预设真空干燥条件下的干燥箱内, 进行过夜干燥, 从而获得 SL/PVA 纳米纤维膜。

**1.2.3 SL/PVA 纳米纤维膜的结构表征** 采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察纤维膜的表面形貌, 统计纤维直径分布, 并分析纤维的排列状态和孔隙结构, 以评估电纺工艺对纤维微观结构的影响。采用傅里叶变换红外光谱仪对样品进行检测, 通过对比磺酸基特征吸收峰的变化, 验证木质素磺酸化改性效果。采用 XPS 技术对纤维膜表面元素及其化学状态进行定性与定量分析, 进一步确认磺酸基团的引入和木质素改性效果。利用万能材料试验机对纤维膜进行拉伸试验, 测定其拉伸强度、断裂伸长率等关键指标, 评估膜材的机械稳定性和延展性。

**1.2.4 比色法评估 SL/PVA 纳米纤维膜的体外自由基清除能力** (1) DPPH 自由基清除活性 参照文献[19], 准确称取 1.97 mg DPPH 置于 50 ml 容量瓶中, 无水乙醇定容, 制备成浓度为 100 μmol/L 的 DPPH 乙醇溶液; 将各组纤维膜裁剪成直径 1.4 cm 的小圆片, 每片称重 0.02 g, 再各自放入 10 ml 无水乙醇中, 恒温振荡 24 h 获得膜浸提原液。随后以无水乙醇将浸提原液稀释配制制成不同质量浓度的膜浸提液(0.1、0.2、0.4、0.8 mg/ml), 分组设置: 实验组(SL/PVA 组)采用不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.8 mg/ml)的 SL/PVA 膜浸提液; 空白对照组采用 2 ml DPPH 乙醇溶液+2 ml 无水乙醇; 膜对照组采用 2 ml 膜浸提液+2 ml 无水乙醇

[用于扣除膜浸提液自身吸光度(absorbance, A)值)。按上述分组分别取样: 取 2 ml DPPH 乙醇溶液与 2 ml 无水乙醇混合作为空白对照样品; 取 2 ml 膜提取液与 2 ml DPPH 乙醇溶液混合作为实验组; 将 2 ml 膜提取液与 2 ml 无水乙醇混合作为膜对照组; 均在室温下避光温育 0.5 h; 利用紫外可见分光光度计在 517 nm 处测定各混合液的 A 值, 每组样品均重复测量 5 次, 取平均值。计算 DPPH 自由基清除率, DPPH 自由基清除率 =  $[1 - (A_s - A_b) / A_c] \times 100\%$ , 其中  $A_s$ 、 $A_b$ 、 $A_c$  分别代表实验组、膜对照组、空白对照组的测定 A 值。(2) 羟基自由基(hydroxyl radical, OH)清除活性 参照文献[20], 采用 Fenton 反应体系评价 SL/PVA 复合纳米纤维膜浸提液对 OH 的清除能力。分别配制 FeSO<sub>4</sub> 溶液(9 mmol/L)、水杨酸溶液(9 mmol/L, 以无水乙醇配制)及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液(8.8 mmol/L, 现配现用)。将纤维膜按 2 mg/ml 加入去离子水(或 PBS)中, 于恒温振荡器中振荡浸提 24 h 获得浸提原液, 并进一步稀释配制为 0.1、0.2、0.4、0.8 mg/ml 不同浓度的 SL/PVA 膜浸提液作为待测物质。反应时在 10 ml 离心管(或比色管)中依次加入 1.0 ml FeSO<sub>4</sub> 溶液、1.0 ml 水杨酸溶液和 1.0 ml 不同浓度的膜浸提液, 混匀后加入 1.0 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液启动反应, 于 37 ℃ 水浴反应 30 min 后在 510 nm 处测定 A 值。设置空白对照组(以去离子水/PBS 替代膜浸提液, 其余试剂相同)、样品组(加入膜浸提液)及扣除组(与样品组相同但不加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 以等体积去离子水/PBS 替代)以扣除体系本底 A 值。计算 OH 清除率, OH 清除率 =  $[1 - (A_x - A_{x_0}) / A_0] \times 100\%$ , 其中  $A_0$ 、 $A_x$ 、 $A_{x_0}$  分别表示空白对照组、添加待测物后和未加入显色剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时所获得的 A 值。

**1.2.5 共培养法评估 SL/PVA 纳米纤维膜的体外生物安全性** (1) CCK-8 法 将 CCL-20.2 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板中, 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜, 待细胞贴壁。将 SL/PVA 纳米纤维膜裁剪为与孔径匹配的小圆片(直径约 6 mm), 置于超净台内经紫外照射消毒(30 min/面, 两面各照射 1 次), 无菌 PBS 冲洗后轻置于孔内, 将其与细胞进行直接共培养。分别培养 12、24、36、48 h 加入 10 μl CCK-8 试剂孵育 2 h, 在 450 nm 波长下测定 A 值, 计算细胞相对活力值。细胞活力值(%) =  $(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ , 其中 A 空白为仅含培养基与 CCK-8 的空白孔, A 对照为未加入膜材料的细胞孔。(2) 活/死细胞染色 将 HPFs 以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 待贴壁后加入经紫外消毒的 SL/PVA 膜圆片(直径约 14 mm)进行共孵育 48 h。采

用 Calcein-AM/PI 双染试剂盒避光染色 30 min, PBS 清洗后在荧光显微镜下观察并拍照, 绿色荧光标记为活细胞, 红色荧光标记为死细胞。

**1.2.6 DCFH-DA 探针法检测 SL/PVA 纳米纤维膜对活性氧簇的清除能力** 参照文献[21], 将 CCL-20.2 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中过夜; 按 2 mg/ml 将 PVA 膜和 SL/PVA 膜分别加入无血清 DMEM/F12 中,  $37^\circ\text{C}$  振荡浸提 24 h 获得膜浸提原液; 使用时将浸提原液与无血清 DMEM/F12 按 1:1 混合, 使膜浸提液终浓度为 1 mg/ml。细胞分组如下: 等渗对照组 (常规培养基)、高渗模型组 (高渗培养基处理)、高渗模型+SL/PVA 组 (先用含 SL/PVA 膜浸提液的无血清培养基预处理 2 h 后再进行高渗处理)。随后, 将除等渗对照组外的细胞转移至含 90 mmol/L 氯化钠、渗透压约 500 mOsm 的高渗培养基中继续培养 24 h, 等渗对照组在等渗条件下培养 24 h。处理结束后 PBS 洗涤 2 次。将细胞置于含  $10 \mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 的探针工作液中, 于  $37^\circ\text{C}$  暗环境中孵育 30 min; 孵育后 PBS 洗涤 3 次以去除游离探针, 在荧光显微镜下采集各组细胞荧光图像。采用 ImageJ 软件对荧光图像进行定量分析, 每组随机选取 5 个视野 ( $200\times$ ) 计算平均荧光强度, 以等渗对照组归一化后比较各组活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 每组至少进行 3 次独立重复实验。

**1.2.7 活/死菌染色法评估 SL/PVA 纳米纤维膜的体外抑菌能力** 解冻冻存的金黄色葡萄球菌菌株并接种至血平板,  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱内培养过夜。利用接种环选取单一菌落, 转种至 4 ml 的 LB 培养基中, 并在 220 r/min 的摇床条件下培养 10 h, 以获取处于指数生长阶段的菌液。采用比浊法 ( $\text{OD}_{600}$  法) 进行测试, 应用酶标仪测量浓度为  $1.5 \times 10^7$  CFU/ml 样本的 A600 值为 0.1。为评价材料的抑菌活性, 采用纤维膜浸提液处理细菌, 将 PVA 膜与 SL/PVA 膜分别按 2 mg/ml 加入无菌 PBS 中, 于  $37^\circ\text{C}$  振荡浸提 24 h, 获得 PVA 膜浸提液与 SL/PVA 膜浸提液 (浸提介质为 PBS)。取  $500 \mu\text{l}$  新鲜的细菌悬浮液, 置于 1.5 ml 离心管中, 分为对照组、PVA 组和 SL/PVA 组, 分别加入  $500 \mu\text{l}$  无菌 PBS、PVA 膜浸提液以及 SL/PVA 膜浸提液, 混合均匀后, 在  $37^\circ\text{C}$  培养箱中处理 4 h, PBS 洗涤 3 次, 以离心半径 7 cm、4 000 r/min 离心 5 min。在避光环境下, 应用活/死菌染色试剂盒对细菌进行 15 min 的染色程序。离心清除多余的染料, 取  $10 \mu\text{l}$  染色的细菌悬浮液精确滴加至载玻片上, 在荧光显微镜下观察并采集图像, 采用图像计数法统计细菌存活情况。每份样本

随机选取 5 个视野 ( $400\times$ ), 分别计数绿色荧光 (活菌) 与红色荧光 (死菌) 细菌数量, 计算存活率。存活率 (%) = 活菌数量 / (活菌数量 + 死菌数量)  $\times 100\%$ 。每组至少进行 3 次独立重复实验。

**1.2.8 免疫荧光染色观察 SL/PVA 纳米纤维膜对细胞炎症因子表达的影响** 将 RAW264.7 小鼠巨噬细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于含细胞爬片的 6 孔板中, 分为对照组、脂多糖组、PVA 组和 SL/PVA 组 4 个组, 在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中于  $37^\circ\text{C}$  培养箱内过夜。对照组每日仅更换 1 次新鲜完全培养基; 脂多糖组直接以 500 ng/ml 脂多糖刺激 16 h; PVA 和 SL/PVA 组则分别先用相应的膜浸提液处理 24 h, 再以 500 ng/ml 脂多糖刺激 16 h。PBS 反复冲洗各组细胞, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min。将固定后的爬片置于载玻片上, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 随后滴加  $200 \mu\text{l}$  的 0.1% Triton 破膜液, 室温破膜 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加  $200 \mu\text{l}$  山羊血清, 室温下封闭 30 min; 滴加按比例稀释后的一抗 (IL-8、TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  均按 1:200 稀释), 并于  $4^\circ\text{C}$  下孵育过夜, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 滴加  $200 \mu\text{l}$  与一抗种属相匹配的 FITC 标记荧光二抗 (按 1:500 稀释), 在湿盒内常温下孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 采用 DAPI 进行核染色并完成封片。在荧光显微镜下对样本进行观察, 采集图像, 并采用 ImageJ 软件对荧光强度进行定量分析。

**1.2.9 炎症评分和苏木精-伊红染色评估 SL/PVA 纳米纤维膜的在体抗炎能力** 采用随机数字法将 18 只大鼠随机分为模型对照组 (建立结膜下损伤模型但不植入任何材料)、PVA 组和 SL/PVA 组, 为避免双眼相关性干扰, 每只大鼠仅取右眼建立模型并作为统计分析对象, 左眼不处理。用角膜剪沿颞侧 1/2 角膜缘切开并钝性分离球结膜组织, 分离深度约 3 mm, 宽度约 6 mm<sup>[22]</sup>。根据分组将  $1.5 \text{ mm} \times 5.0 \text{ mm}$  的 PVA 膜、SL/PVA 膜植入结膜下, 无需缝合。术后, 加替沙星眼用凝胶点眼每日 3 次, 防止侵袭。于术后第 3、7 和 14 天, 使用裂隙灯显微镜观察大鼠眼部炎症表现, 包括结膜充血、水肿及分泌物等情况, 并进行弥散光拍照记录。参照文献[22]的结膜下炎症评分标准对各组炎症反应程度进行盲法定量评分。结膜充血评分分为 0~4 分, 0 分为无充血; 1 分为轻度充血, 范围不超过 2 个钟点; 2 分为轻度至中度充血, 范围在 2~4 个钟点; 3 分为中度充血, 范围在 4~6 个钟点; 4 分为重度充血, 范围超过 6 个钟点。结膜水肿按严重程度分为 0~3 分, 0 分为无水肿; 1 分为轻度水肿, 结膜透明、巩膜血

管清晰可见;2分为中度水肿,巩膜血管仍可见但不清晰;3分为重度水肿,巩膜血管不可见。各项评分由不知分组信息的观察者完成,并用于后续统计分析。术后第7天每组随机取3只大鼠的结膜组织进行苏木精-伊红染色及炎性细胞浸润定量分析。组织固定于4%多聚甲醛中24h,常规石蜡包埋、4  $\mu\text{m}$ 切片,进行苏木精-伊红染色。光学显微镜下观察并评估炎性细胞浸润、组织结构破坏等情况,并采用ImageJ软件对炎性细胞密度进行图像定量分析,在每张切片的损伤区域随机选取5个高倍视野(400 $\times$ ),使用细胞计数功能统计炎性细胞数量,计算炎性细胞密度(个/ $\text{mm}^2$ );每只动物至少分析2张相邻切片,取平均值。

### 1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。计量资料分别采用Shapiro-Wilk检验和Brown-Forsythe检验进行正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布且方差齐的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用Tukey检验。不符合正态分布数据以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,多组间结膜水肿评分和结膜充血评分总体比较采用Kruskal-Wallis  $H$ 检验,事后两两比较采用Dunn检验。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SL/PVA 纳米纤维膜的表征

SEM结果显示,所制备的纤维膜呈现出较为均一和连续的纤维形貌(图1A)。大部分纤维表面光滑,无明显珠状缺陷,纤维之间排列较为紧密,整体结构具有良好的连贯性。纤维平均直径为 $(0.414\pm 0.077)\mu\text{m}$ (图1B),表明预设的SL与PVA质量比和电纺参数对纤维成形具有较好的控制作用。

傅里叶变换红外光谱图显示,SL与木质素在 $3385.47\text{ cm}^{-1}$ 处均观察到明显的吸收峰,其可能归属为苯环上羟基的伸缩振动; $2937.01\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰与木质素脂肪烃链上C-H键的伸缩振动相对应; $1605.05\text{ cm}^{-1}$ 、 $1452.15\text{ cm}^{-1}$ 及 $1420.84\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰对应芳香环骨架振动的特定模式,表现为一个强烈的对称伸缩振动峰及一个较弱的弯曲振动峰。相较于木质素样品,SL样品 $1139.26\text{ cm}^{-1}$ 和 $1042.02\text{ cm}^{-1}$ 处分别出现了与磺酸基团相关的吸收峰,分别对应一个强对称伸缩振动和一个弱弯曲振动,而 $621.27\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰则归属于磺酸基团中S-O键的弯曲振动(图2)。磺酸基团特征峰的出现证明了

木质素磺酸化改性反应成功。

XPS测试结果显示,纤维膜表面出现明显的S 2p信号峰,其结合能约为 $164.04\text{ eV}$ ,表明 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基团成功引入到木质素分子结构中,并且该峰的强度显示磺酸基团含量较为丰富;C 1s峰可分解出多个组分,包括C-C/C-H( $\sim 280.9\text{ eV}$ )、C-O( $\sim 281.88\text{ eV}$ )、C=O( $\sim 284.80\text{ eV}$ )等,与木质素和PVA的分子结构相匹配;O 1s信号显示氧化和含氧官能团羟基(-OH)及羰基(C=O)成分具有较高的结合能(图3)。

通过应力-应变曲线可见,SL/PVA纳米纤维膜在拉伸过程中表现出更高的最大应力,说明SL的引入有效增强了纤维间的相互作用力,使膜在相同拉伸条件下能承受更大的外力;同时,其峰值应力后的下降速率相对较缓,表明该膜在大变形区仍具备较好的结构完整性与承载能力(图4)。由应力-应变曲线计算,SL/PVA膜的抗拉强度约为 $0.5\text{ MPa}$ ,断裂伸长率约为28%。

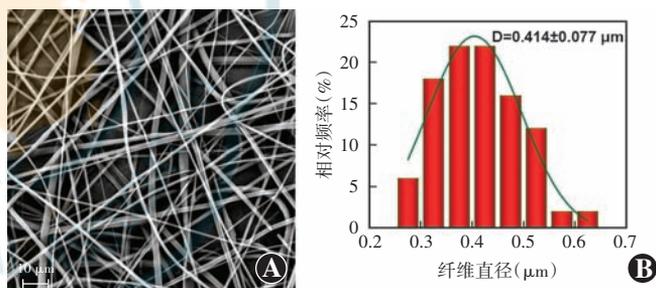


图1 SL/PVA纳米纤维膜形貌和直径分布 A:SEM图像(标尺=10  $\mu\text{m}$ ) B:直径分布统计直方图 SL/PVA:磺酸化木质素/聚乙烯醇;SEM:扫描电子显微镜

Figure 1 Morphology and fiber diameter distribution of SL/PVA nanofiber membranes A: SEM image (scale bar = 10  $\mu\text{m}$ ) B: Fiber diameter distribution histogram SL/PVA: sulfonated lignin/poly(vinyl alcohol); SEM: scanning electron microscopy

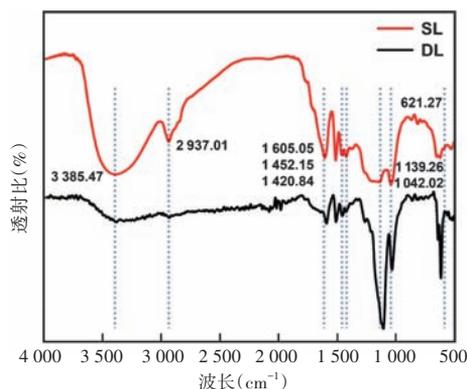
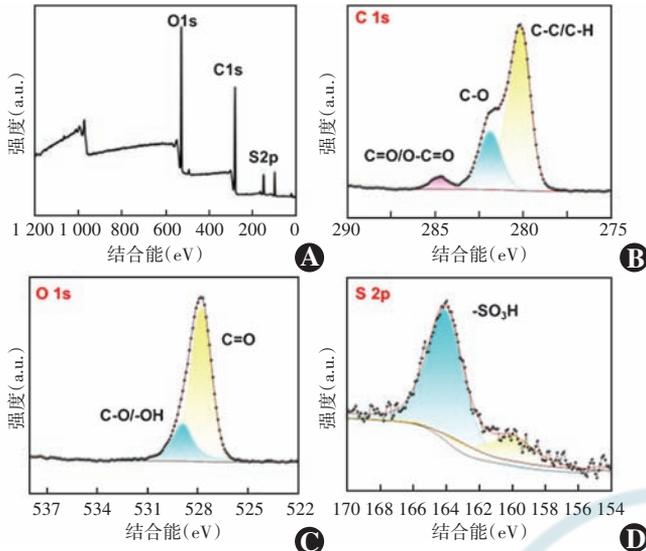
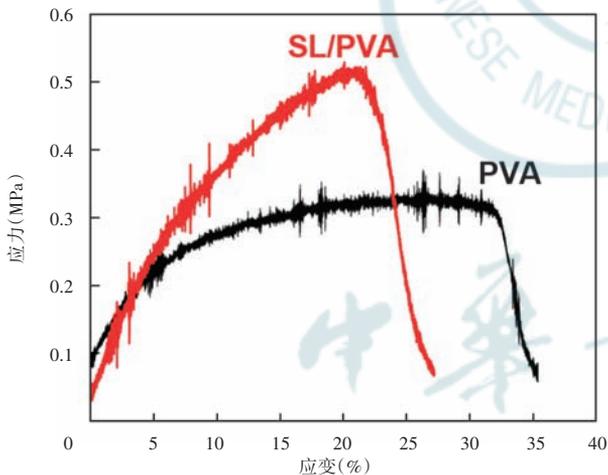


图2 SL与DL的傅里叶变换红外光谱图 SL:磺酸化木质素;DL:脱碱木质素

Figure 2 Fourier transform infrared spectra of SL and DL SL: sulfonated lignin; DL: dealkali lignin



**图 3 SL/PVA 纳米纤维膜的 XPS 分析** A: XPS 全谱图 B: C 1s 高分辨率谱图 C: O 1s 高分辨率谱图 D: S 2p 高分辨率谱图 SL/PVA: 磺酸化木质素/聚乙烯醇; XPS: X 射线光电子能谱  
**Figure 3 X-ray photoelectron spectroscopy analysis of SL/PVA nanofiber membranes** A: Survey spectrum B: High-resolution C 1s spectrum C: High-resolution O 1s spectrum D: High-resolution S 2p spectrum SL/PVA: sulfonated lignin/poly(vinyl alcohol); XPS: X-ray photoelectron spectroscopy

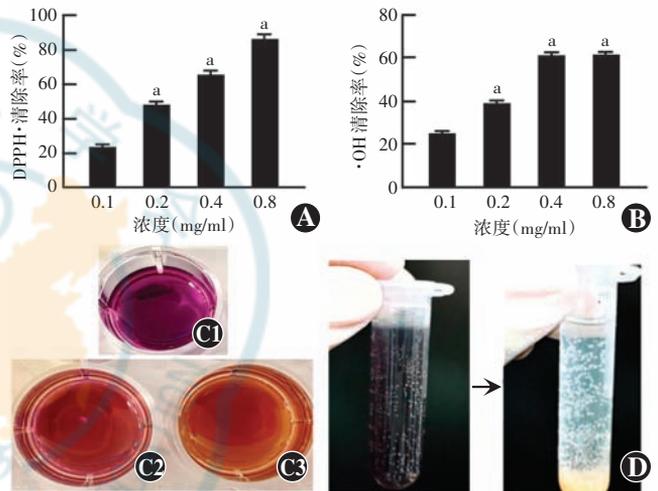


**图 4 SL/PVA 纳米纤维膜的典型应力-应变曲线** SL: 磺酸化木质素; PVA: 聚乙烯醇  
**Figure 4 Typical stress-strain curve of SL/PVA nanofiber membranes** SL: sulfonated lignin; PVA: poly(vinyl alcohol)

**2.2 SL/PVA 纳米纤维膜体外自由基清除能力评估**

SL/PVA 纳米纤维膜浸提液对 DPPH 自由基的清除率随浸提液浓度升高而增加, 在 0.1、0.2、0.4 和 0.8 mg/ml 浓度下, DPPH 自由基的清除率分别为 (23.70±1.33)%、(48.50±1.63)%、(66.00±1.93)% 和 (86.40±2.70)%, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 550.13, P < 0.001$ ) (图 5A)。

SL/PVA 纳米纤维膜浸提液对 OH 的清除率也随浓度升高而增加, 并在 0.4 mg/ml 后趋于稳定, 在 0.1、0.2、0.4 和 0.8 mg/ml 浓度下 OH 的清除率分别为 (25.20±0.92)%、(39.20±1.27)%、(61.50±1.20)% 和 (61.60±1.11)%, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 747.89, P < 0.001$ ) (图 5B)。此外, 在加入 0.8 mg/ml SL/PVA 纳米纤维膜浸提液后, DPPH 溶液由紫色明显变浅 (图 5C), OH 体系也由深色逐步澄清, 反映了自由基与膜材料中活性基团反应后被消耗 (图 5D)。



**图 5 不同浓度 SL/PVA 纳米纤维膜浸提液对 DPPH 和 OH 自由基的清除效果** A: 对 DPPH 自由基的清除率比较  $F = 550.13, P < 0.001$ . 与 0.1 mg/ml 比较,  $^*P < 0.05$  (单因素方差分析, Tukey 检验;  $n = 3$ ) B: 对 OH 自由基的清除率比较  $F = 747.89, P < 0.001$ . 与 0.1 mg/ml 组比较,  $^*P < 0.05$  (单因素方差分析, Tukey 检验;  $n = 3$ ) C: 加入 0.8 mg/ml 膜浸提液后 DPPH 溶液颜色变化示意图 C1: DPPH 乙醇溶液+无水乙醇; C2: DPPH 乙醇溶液+PVA 无水乙醇膜浸提液; C3: DPPH 乙醇溶液+SL/PVA 无水乙醇膜浸提液 D: 加入 0.8 mg/ml SL/PVA 膜浸提液后 Fenton 反应体系颜色变化示意图 SL/PVA: 磺酸化木质素/聚乙烯醇; DPPH: 2,2-二苯基-1-苦基肼自由基; OH: 羟基自由基

**Figure 5 In vitro radical-scavenging activity of SL/PVA nanofiber membrane extracts at different concentrations on DPPH and OH**

A: Comparison of DPPH radical-scavenging activity  $F = 550.13, P < 0.001$ . Compared with 0.1 mg/ml,  $^*P < 0.05$  (One-way ANOVA, Tukey test;  $n = 3$ ) B: Comparison of OH-scavenging activity  $F = 747.89, P < 0.001$ . Compared with 0.1 mg/ml,  $^*P < 0.05$  (One-way ANOVA, Tukey test;  $n = 3$ ) C: Representative photographs showing the color change of DPPH solution after reaction with 0.8 mg/ml membrane extracts C1: DPPH ethanol solution+absolute ethanol; C2: DPPH ethanol solution + PVA membrane extracts; C3: DPPH ethanol solution + SL/PVA membrane extracts D: Representative photographs showing the color change of the Fenton reaction system after adding 0.8 mg/ml SL/PVA membrane extract SL/PVA: sulfonated lignin/poly(vinyl alcohol); DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; OH: hydroxyl radical

### 2.3 SL/PVA 纳米纤维膜体外生物安全性评估

与空白对照组及 PVA 组相比,SL/PVA 组培养 12、24、36 和 48 h 时细胞相对活力均保持在 90% 以上。空白对照组、PVA 组和 SL/PVA 组培养 12、24、36 和 48 h 时细胞相对活力值比较差异均无统计学意义 ( $F=1.24, 0.77, 0.03, 1.71$ , 均  $P>0.05$ ), 表明该材料对细胞活性无明显抑制作用(图 6)。活/死细胞染色结果显示,SL/PVA 组细胞以绿色荧光为主,红色荧光信号极少,细胞形态完整,与空白对照组相近(图 7)。

### 2.4 SL/PVA 纳米纤维膜的 ROS 清除能力评估

等渗对照组、高渗模型组、PVA 组和 SL/PVA 组

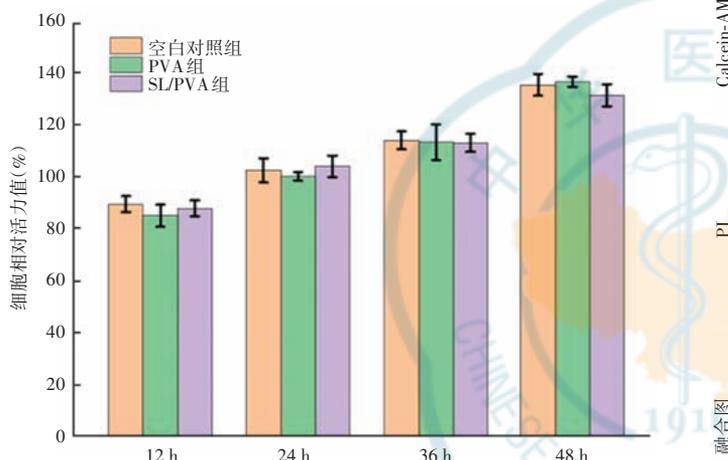


图 6 SL/PVA 纳米纤维膜与 CCL-20.2 细胞共孵育不同时间点细胞活力比较 12 h:  $F=1.24, P=0.355$ ; 24 h:  $F=0.77, P=0.502$ ; 36 h:  $F=0.03, P=0.971$ ; 48 h:  $F=1.71, P=0.258$ (单因素方差分析,  $n=3$ ) PVA: 聚乙烯醇; SL: 磺酸化木质素

Figure 6 Cell viability of CCL-20.2 cells co-incubated with PVA or SL/PVA nanofiber membranes at different time points 12 h:  $F=1.24, P=0.355$ ; 24 h:  $F=0.77, P=0.502$ ; 36 h:  $F=0.03, P=0.971$ ; 48 h:  $F=1.71, P=0.258$ (One-way ANOVA,  $n=3$ ) PVA: poly(vinyl alcohol); SL: sulfonated lignin

DCF 平均荧光强度分别为  $28.16 \pm 1.51, 89.06 \pm 1.39, 88.07 \pm 2.44$  和  $43.65 \pm 1.94$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F=690.70, P<0.001$ ), 其中 SL/PVA 组 DCF 平均荧光强度显著低于高渗模型组和 PVA 组, 差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )(图 8)。

### 2.5 SL/PVA 纳米纤维膜体外抗菌性能评估

对照组与 PVA 组以绿色荧光(活菌)为主, 红色荧光(死菌)信号较弱, 而 SL/PVA 组红色荧光信号明显增强。对照组、PVA 组和 SL/PVA 组细菌存活率分

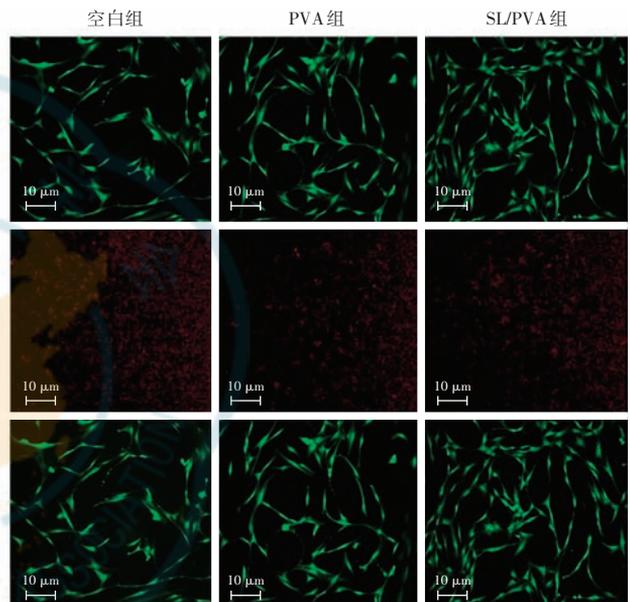


图 7 HPFs 与 PVA 和 SL/PVA 纳米纤维膜共孵育 48 h 后活/死细胞染色图(标尺 = 10 μm) HPFs: 人脐肉成纤维细胞; PVA: 聚乙烯醇; SL: 磺酸化木质素; PI: 碘化丙啶

Figure 7 Live/dead staining of HPFs after co-incubation with PVA or SL/PVA nanofiber membranes for 48 hours (scale bar = 10 μm) HPFs: human pterygium fibroblasts; PVA: poly(vinyl alcohol); SL: sulfonated lignin; PI: propidium iodide

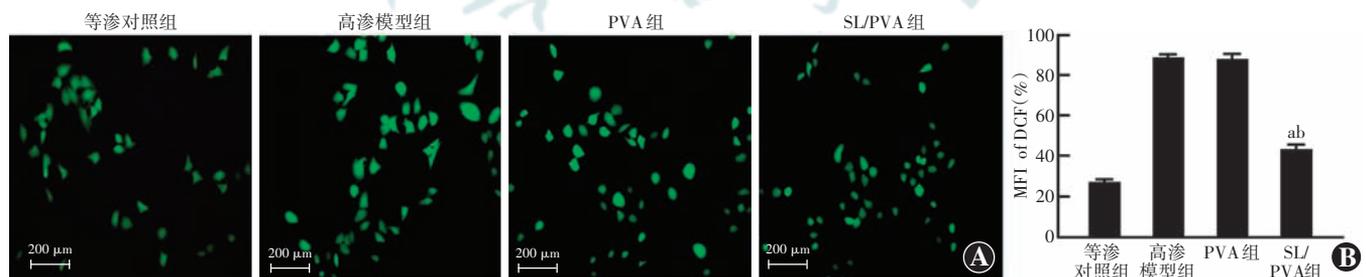


图 8 DCFH-DA 荧光探针检测各组细胞内 ROS 水平 A: 各组细胞 DCFH-DA 荧光染色图(标尺 = 200 μm) B: 各组 DCF 平均荧光强度比较  $F=690.700, P<0.001$ . 与高渗模型组比较,  $^a P<0.05$ ; 与 PVA 组比较,  $^b P<0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验;  $n=3$ ) DCFH-DA: 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯; ROS: 活性氧; DCF: 2', 7'-二氯二氢荧光素; SL: 磺酸化木质素; PVA: 聚乙烯醇; MFI: 平均荧光强度

Figure 8 Intracellular ROS detection using the DCFH-DA fluorescent probe in different groups A: Representative fluorescence images of DCF signals in different groups (scale bar = 200 μm) B: Comparison of quantitative analysis of mean fluorescence intensity of DCF  $F=690.700, P<0.001$ . Compared with the hyperosmotic model group,  $^a P<0.05$ ; compared with the PVA group,  $^b P<0.05$  (One-way ANOVA, Tukey test;  $n=3$ ) DCFH-DA: 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; ROS: reactive oxygen species; DCF: 2', 7'-dichlorofluorescein; SL: sulfonated lignin; PVA: poly(vinyl alcohol); MFI: mean fluorescence intensity

别为  $(93.82 \pm 2.15)\%$ 、 $(83.23 \pm 2.42)\%$  和  $(8.63 \pm 0.84)\%$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F=1\,727.47, P<0.001$ ), 其中 SL/PVA 组细菌存活率明显低于对照组和 PVA 组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.001$ ) (图 9)。

## 2.6 SL/PVA 纳米纤维膜的体外抗炎性能评估

对照组细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 IL-1 $\beta$  平均荧光强度分别为  $16.31 \pm 1.31$ 、 $21.12 \pm 0.63$  和  $23.42 \pm 1.49$ , 脂多糖组分别为  $67.02 \pm 1.70$ 、 $78.89 \pm 1.33$ 、 $59.74 \pm 1.22$ , PVA 组分别为  $65.03 \pm 1.69$ 、 $80.56 \pm 1.29$  和  $57.41 \pm 1.83$ , SL/PVA 组分别为  $20.21 \pm 1.40$ 、 $29.89 \pm 1.50$  和  $25.77 \pm 1.47$ , 总体比较差异均有统计学意义 ( $F=530.90, 977.90, 239.60$ , 均  $P<0.001$ ), 其中 SL/PVA 组 TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 IL-1 $\beta$  平均荧光强度均明显低于脂多糖组和 PVA 组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ ) (图 10)。

## 2.7 SL/PVA 纳米纤维膜的体内抗炎性能评估

造模后第 7 天, 对照组、PVA 组和 SL/PVA 组结膜水肿评分分别为 2(2,3)、3(2,3) 和 1(1,2) 分, 结膜下充血评分分别为 3(2,3)、3(2,3) 和 1(1,2) 分, 总体比较差异均有统计学意义 ( $H=11.35, 10.36$ , 均  $P<0.01$ ), 其中 SL/PVA 组水肿评分和充血评分均低于对照组和 PVA 组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。造模后第 14 天, 对照组、PVA 组和 SL/PVA 组结膜水肿评分分别为 2(1,2)、1.5(1,2) 和 0.5(0,1) 分, 结膜下充血评分分别为 2(1,2)、2(1,2) 和 0(0,1) 分, 总体

比较差异均有统计学意义 ( $H=9.81, 10.36$ , 均  $P<0.05$ ), 其中 SL/PVA 组水肿评分低于对照组、充血评分低于对照组和 PVA 组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ ) (图 11)。

苏木精-伊红染色结果显示, 造模后第 7 天 SL/PVA 组结膜下炎性细胞浸润较对照组明显减少。对照组、PVA 组和 SL/PVA 组炎性细胞密度分别为  $(285.7 \pm 7.0)$ 、 $(289.7 \pm 6.7)$  和  $(131.0 \pm 4.0)$  个/视野, 总体比较差异有统计学意义 ( $F=671.80, P<0.001$ ), 其中 SL/PVA 组炎性细胞密度明显低于对照组和 PVA 组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.01$ ) (图 12)。

## 3 讨论

近年来, 眼表组织工程与炎症干预领域对功能化生物基载体的需求日益增长。构建具备抗氧化、抗炎特性的生物支架是提高眼部损伤修复效率的关键方向<sup>[23]</sup>。结膜下损伤往往伴随显著的氧化应激和炎症反应, 而传统的聚合物载体如 PVA 薄膜虽具有良好的成膜性和生物相容性, 但缺乏固有的抗氧化、抗炎功能, 难以满足高效修复的需求<sup>[24]</sup>。木质素作为一种天然酚类聚合物, 因其丰富的酚羟基结构具备良好的自由基清除能力与抗炎活性, 近年来在构建功能型组织工程材料方面受到广泛关注<sup>[25]</sup>。已有研究证实, 将木质素掺入 PCL 等可电纺基质中, 可显著提升材料的 ROS 清除效率, 并有效抑制炎症因子的分泌<sup>[26]</sup>。但值

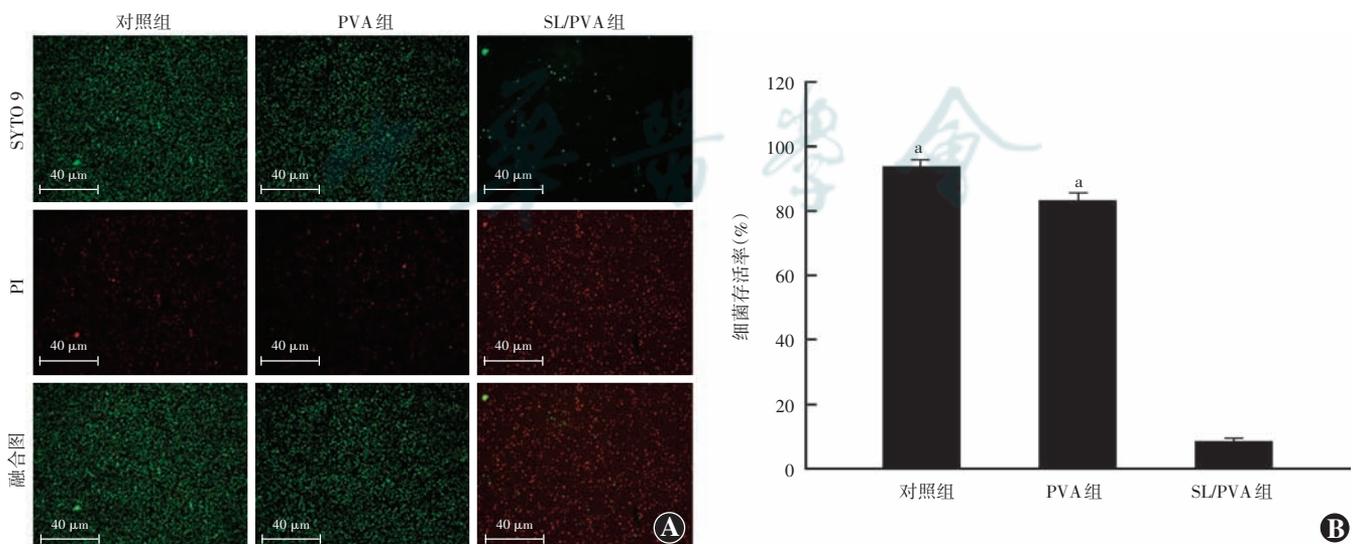
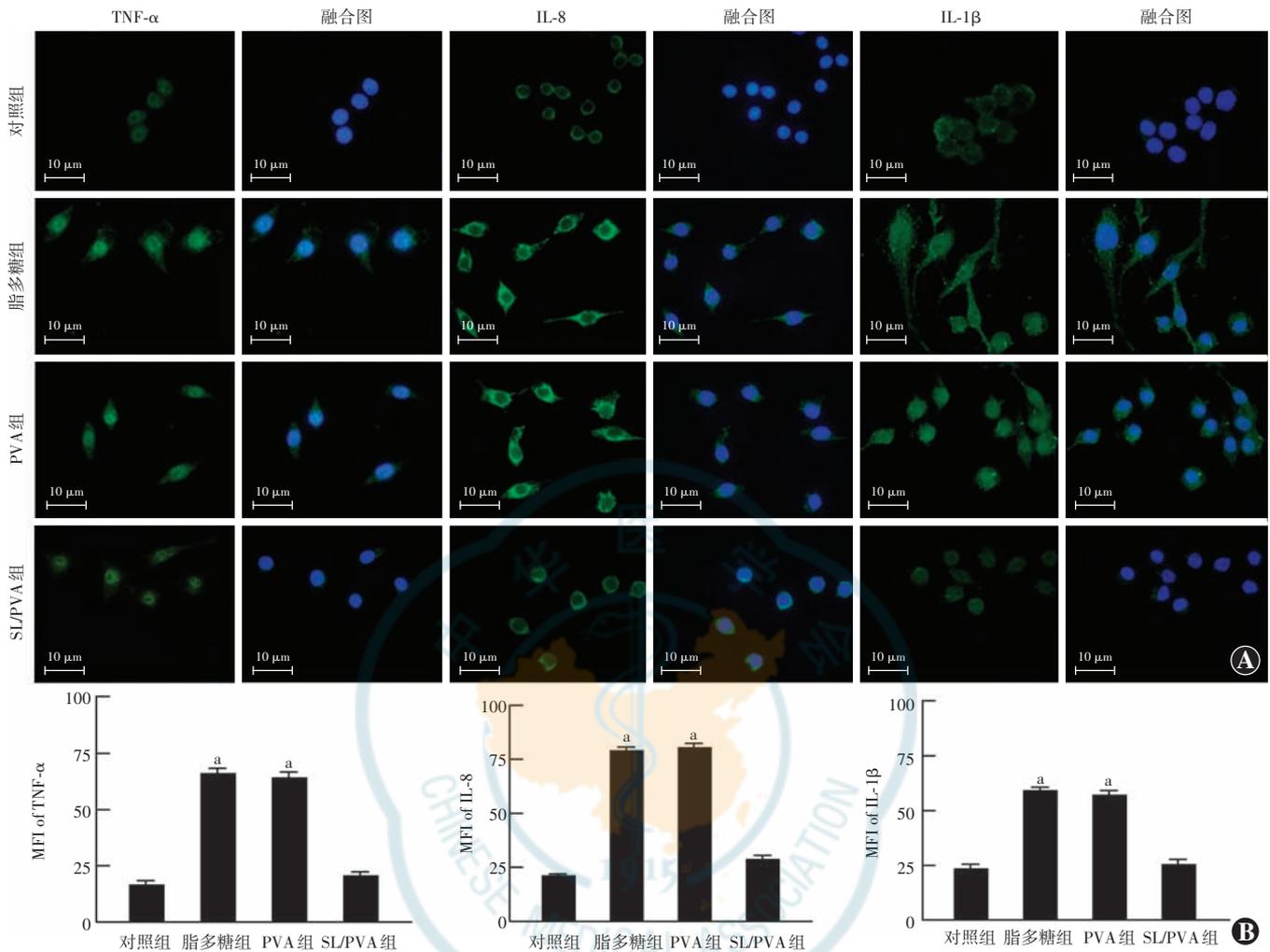


图 9 各组体外抗金黄色葡萄球菌性能评估 A: 各组活/死菌荧光染色代表性图像 (标尺 =  $40\ \mu\text{m}$ ) 绿色荧光示活菌; 红色荧光示死菌 B: 各组细菌存活率比较  $F=1\,727.47, P<0.001$ 。与 SL/PVA 组比较,  $^{\#}P<0.001$  (单因素方差分析, Tukey 检验;  $n=3$ ) SL: 磺酸化木质素; PVA: 聚乙烯醇; PI: 碘化丙啶

Figure 9 *In vitro* antibacterial activity of different treatments against *S. aureus* A: Representative staining images of live/dead *S. aureus* (scale bar =  $40\ \mu\text{m}$ ) Green for live; red for dead B: Comparison of bacterial survival rates among different groups  $F=1\,727.47, P<0.001$ . Compared with the SL/PVA group,  $^{\#}P<0.001$ ; (One-way ANOVA, Tukey test;  $n=3$ ) SL: sulfonated lignin; PVA: poly(vinyl alcohol); PI: propidium iodide



**图 10 各组巨噬细胞 M1 型极化相关炎症因子表达比较** A: TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 IL-1 $\beta$  的免疫荧光染色代表性图像 (DAPI, 标尺 = 10  $\mu$ m) 绿色荧光示目标蛋白; 蓝色荧光示细胞核 B: 各组 TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 IL-1 $\beta$  平均荧光强度定量比较 TNF- $\alpha$ :  $F = 530.90, P < 0.001$ ; IL-8:  $F = 977.90, P < 0.001$ ; IL-1 $\beta$ :  $F = 239.60, P < 0.001$ 。与 SL/PVA 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, Tukey 检验;  $n = 3$ ) PVA: 聚乙烯醇; SL: 磺酸化木质素; TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; IL: 白细胞介素; DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚; MFI: 平均荧光强度

**Figure 10 Comparison of M1 polarization-related inflammatory cytokine expression in macrophages among different groups** A: Representative immunofluorescence images of TNF- $\alpha$ , IL-8, and IL-1 $\beta$  (DAPI, scale bar = 10  $\mu$ m) Green for target proteins; blue for cell nuclei B: Quantitative comparison of mean fluorescence intensity of TNF- $\alpha$ , IL-8, and IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$ :  $F = 530.90, P < 0.001$ ; IL-8:  $F = 977.90, P < 0.001$ ; IL-1 $\beta$ :  $F = 239.60, P < 0.001$ . Compared with the SL/PVA group, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, Tukey test;  $n = 3$ ) PVA: poly(vinyl alcohol); SL: sulfonated lignin; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL: interleukin; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; MFI: mean fluorescence intensity

得注意的是,天然木质素分子间作用强且水溶性低,在未改性状态下难以溶解于常规电纺溶剂体系,其成纤能力有限,这一问题已在水溶性木质素相关研究中得到明确验证<sup>[27]</sup>。

本研究通过磺酸化改性显著提升了木质素的亲水性,使其能够与 PVA 协同共电纺,获得表面光滑、纤维直径均一、力学性能优异的 SL/PVA 纳米纤维膜。SEM、傅里叶变换红外光谱及 XPS 表征结果表明, -SO<sub>3</sub>H 官能团均匀分布于纤维网络中,不仅增强了 SL 与 PVA 的相容性,也为纳米纤维提供了更多的活性位点,有助于自由基的捕获与灭活。本研究中,随着 SL 含量的增加,载体的自由基清除效率明显提升,证明木质素基材料自身抗氧

化能力在复合膜中得到了有效保留与增强。

体外生物相容性实验表明,SL/PVA 纳米纤维膜对结膜细胞无明显毒性,具备良好的细胞适应性。抑菌实验进一步证实,该材料对金黄色葡萄球菌具有显著抑制作用,表现出优异的抗菌活性。在机制层面,SL 中的酚羟基可通过氢原子转移机制清除 ROS,减轻氧化应激引起的细胞损伤;磺酸基团则能有效抑制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等炎症因子的过度分泌,从分子水平干预炎症通路。这种协同作用使得 SL/PVA 复合膜不仅在物理层面为损伤组织提供支架支持,更在化学层面主动调控病理微环境,从而降低炎症负荷并缓解结膜下损伤后的炎症反应。

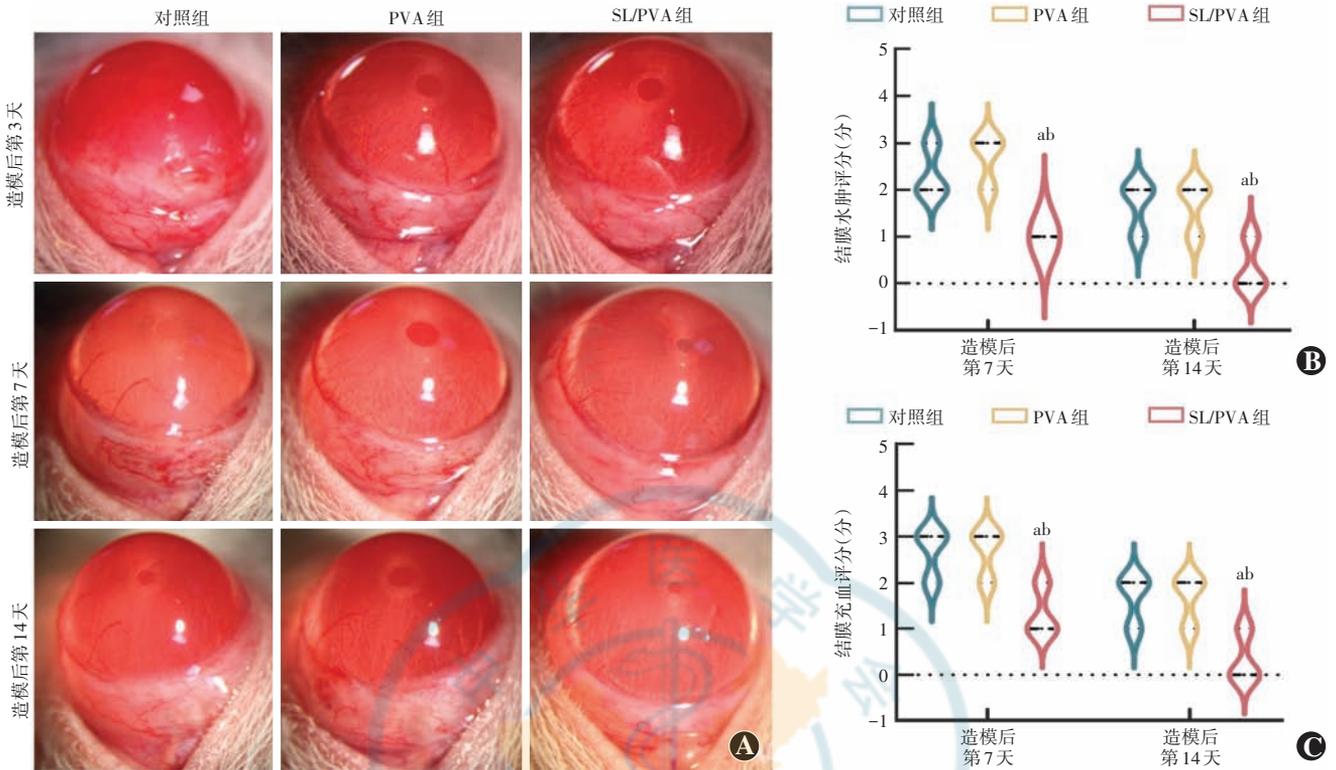


图 11 各组大鼠造模后不同时间点结膜下损伤评分 A: 术后第 3、7、14 天各组大鼠结膜下损伤代表性图像 B: 术后第 7 天与第 14 天结膜水肿评分比较 第 7 天:  $H=11.35, P=0.003$ , 第 14 天:  $H=9.81, P=0.007$ . 与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 PVA 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$  (Kruskal-Wallis  $H$  检验, Dunn 检验;  $n=6$ ) C: 术后第 7 天与第 14 天结膜充血评分比较 第 7 天:  $H=10.36, P=0.006$ , 第 14 天:  $H=10.36, P=0.006$ . 与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 PVA 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$  (Kruskal-Wallis  $H$  检验, Dunn 检验;  $n=6$ ) SL: 磺酸化木质素; PVA: 聚乙烯醇

Figure 11 Rat subconjunctival injury score of different groups at different time points after modelling A: Representative images of subconjunctival injury on postoperative days 3, 7, and 14 B: Comparison of conjunctival edema scores on the 7th and 14th days after surgery 7th day:  $H=11.35, P=0.003$ , 14th day:  $H=9.81, P=0.007$ . Compared with the control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; compared with the PVA group, <sup>b</sup> $P<0.05$  (Kruskal-Wallis  $H$  test, Dunn test;  $n=6$ ) C: Comparison of conjunctival hyperemia scores on the 7th and 14th days after surgery 7th day:  $H=10.36, P=0.006$ , 14th day:  $H=10.36, P=0.006$ . Compared with the control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; compared with the PVA group, <sup>b</sup> $P<0.05$  (Kruskal-Wallis  $H$  test, Dunn test;  $n=6$ ) SL: sulfonated lignin; PVA: poly(vinyl alcohol)

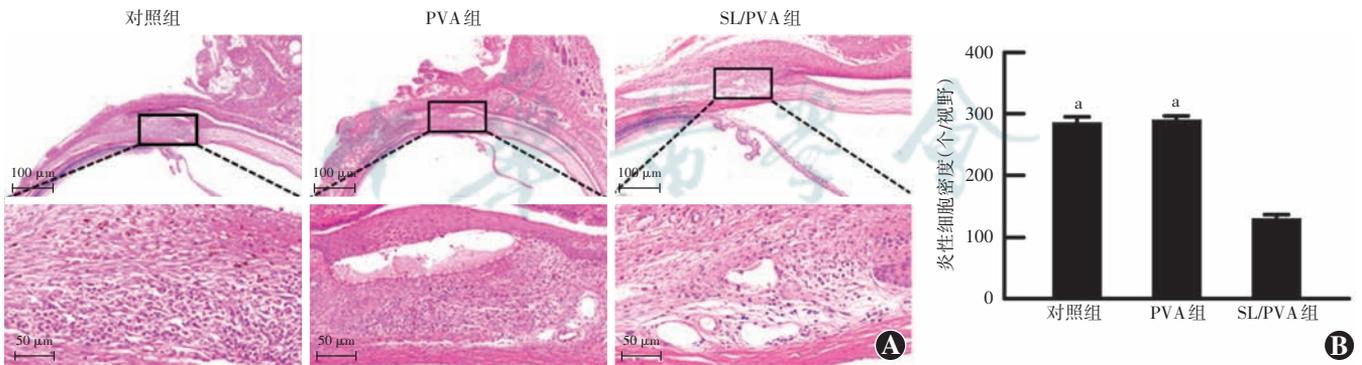


图 12 各组造模后第 7 天结膜下组织苏木精-伊红染色及炎症细胞浸润分析 A: 各组结膜组织苏木精-伊红染色代表性图像 (标尺: 上排 = 100  $\mu\text{m}$ ; 下排 = 50  $\mu\text{m}$ ) 对照组与 PVA 组可见较明显的炎症细胞浸润; SL/PVA 组炎症细胞浸润减少 B: 炎症细胞密度比较  $F=671.80, P<0.001$ . 与 SL/PVA 组相比, <sup>a</sup> $P<0.001$  (单因素方差分析, Tukey 检验;  $n=3$ ) SL: 磺酸化木质素; PVA: 聚乙烯醇

Figure 12 HE staining and inflammatory cell infiltration analysis of subconjunctival tissues in different groups on post-modelling day 7 A: Representative HE images of conjunctival tissues Obvious inflammatory cell infiltration was observed in the control and PVA groups, whereas reduced infiltration was observed in the SL/PVA group (scale bars: 100  $\mu\text{m}$  for top line; 50  $\mu\text{m}$  for bottom line) B: Quantification of inflammatory cell infiltration  $F=671.80, P<0.001$ . Compared with the SL/PVA group, <sup>a</sup> $P<0.001$  (One-way ANOVA, Tukey test;  $n=3$ ) SL: sulfonated lignin; PVA: poly(vinyl alcohol)

尽管在体外验证了 SL/PVA 纳米纤维膜的优越性能,并在动物模型中通过裂隙灯显微镜检查和苏木精-伊红染色初步评估了其抗炎效果,本研究仍存在

一定局限性:动物实验未设置阳性药物对照组(如糖皮质激素组或抗生素组)及单一 SL 膜组,限制了本材料与临床常规治疗手段的直接疗效比较;此外,未系统

评估 SL/PVA 膜的体内降解动力学特征及长期生物安全性。未来本课题组将完善动物实验,从组织学、细胞和分子水平多角度表征该载体的疗效与安全性:一方面,通过免疫组织化学检测炎症因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )在该载体作用下的表达水平变化;另一方面,结合生物分布和降解动力学研究,系统评估 SL/PVA 纳米纤维膜在眼部微环境中的降解行为与组织相容性。为进一步增强修复效果,本课题组还将在 SL/PVA 系统中负载雷公藤红素等小分子药物,借助可控释放实现药物和材料固有活性的双重协同,并重点探讨其对 NOX4 信号通路的调控机制及抗纤维化作用。通过上述综合实验设计,以期从分子到组织层面全面论证该载体在结膜下损伤修复中的治疗潜力及安全性。

总体而言,本研究构建的 SL/PVA 纳米纤维膜兼具“载体-功能”双重角色,填补了传统电纺 PVA 材料在抗氧化及抗炎功能方面的空白,为可再生生物高分子材料在眼科组织工程与药物递送领域的应用提供了新思路。未来,通过结合药物负载、表面改性及多功能化设计,可进一步拓展其在多类型眼部疾病治疗中的临床转化潜力。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 宁清云:参与选题与研究设计、实施研究、收集数据、资料分析和解释、论文撰写及修改;安柏源:参与选题与研究设计、收集数据、资料分析和解释;孙雪:参与研究设计、实施研究、资料分析和解释;石军、栗占荣、李景果:参与选题与研究设计、论文修改及定稿

## 参考文献

- [1] Dammak A, Pastrana C, Martin-Gil A, et al. Oxidative stress in the anterior ocular diseases: diagnostic and treatment[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(2): 292. DOI: 10.3390/biomedicines11020292.
- [2] Chen T, Zhou N, Liang Q, et al. Biochanin A: disrupting the inflammatory vicious cycle for dry eye disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 977: 176583. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176583.
- [3] 潘逸聪, 牟郑林, 邵毅. 蓝光致眼部损伤机制研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2023, 23(2): 208-211. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.2.05.  
Pan YC, Mou ZL, Shao Y. Research progress on the mechanism of ocular damage caused by blue light[J]. *Int Eye Sci*, 2023, 23(2): 208-211. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.2.05.
- [4] Bu J, Liu Y, Zhang R, et al. Potential new target for dry eye disease-oxidative stress[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(4): 422. DOI: 10.3390/antiox13040422.
- [5] Mazet R, Yaméogo J, Wouessidjewe D, et al. Recent advances in the design of topical ophthalmic delivery systems in the treatment of ocular surface inflammation and their biopharmaceutical evaluation[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(6): 570. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060570.
- [6] Apoorva BM, Kiran LJ, Sushma HK, et al. A randomized controlled study to evaluate and compare the effect of prednisolone, dexamethasone, and difluprednate eye drops on intraocular pressure in post-cataract surgery patients[J]. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol*, 2023, 13(11): 2313-2318. DOI: 10.5455/njppp.2023.13.0312202317042023.
- [7] Mikropoulos DG, Kymionis GD, Chatzea MS, et al. Acute corneal melting induced by the concomitant use of a non-steroidal anti-inflammatory agent with an antiseptic eye drop[J]. *Ophthalmol Ther*, 2024, 13(2): 645-649. DOI: 10.1007/s40123-023-00864-0.
- [8] Sánchez-López E, Esteruelas G, Ortiz A, et al. Dexibuprofen biodegradable nanoparticles: one step closer towards a better ocular interaction study[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(4): 720. DOI: 10.3390/nano10040720.
- [9] Kim S, Jang YW, Ku YA, et al. Investigating the anti-inflammatory effects of RCI001 for treating ocular surface diseases: insight into the mechanism of action[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 850287. DOI: 10.3389/fimmu.2022.850287.
- [10] 储丹丹, 陈会营, 李竞帆, 等. 醛基化透明质酸修饰的抗菌碳点滴眼液治疗小鼠细菌性角膜炎效果评估[J]. *中华实验眼科杂志*, 2025, 43(8): 704-712. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20241016-00291.  
Chu DD, Chen HY, Li JF, et al. Efficacy evaluation of aldehyde-modified hyaluronic acid-modified antibacterial carbon dots eye drops for mouse bacterial keratitis[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2025, 43(8): 704-712. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20241016-00291.
- [11] Jia B, Li G, Cao E, et al. Recent progress of antibacterial hydrogels in wound dressings[J]. *Mater Today Bio*, 2023, 19: 100582. DOI: 10.1016/j.mtbio.2023.100582.
- [12] Bragato C, Persico A, Ferreres G, et al. Exploring the effects of lignin nanoparticles in different zebrafish inflammatory models[J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 7731-7750. DOI: 10.2147/IJN.S469813.
- [13] Xu J, Xu JJ, Lin Q, et al. Lignin-incorporated nanogel serving as an antioxidant biomaterial for wound healing[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, 4(1): 3-13. DOI: 10.1021/acssabm.0c00858.
- [14] Pei W, Deng J, Wang P, et al. Sustainable lignin and lignin-derived compounds as potential therapeutic agents for degenerative orthopaedic diseases: a systemic review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 212: 547-560. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.152.
- [15] Kapoor D U, Gaur M, Kumar A, et al. Value-added lignocellulose from waste biomass as a potential source in fabrication of lignin-based composite for multifaceted applications[J]. *Regen Eng Transl Med*, 2025, 11: 1-30. DOI: 10.1007/s40883-024-00357-x.
- [16] Gui T, Xiao LP, Zou S L, et al. Tough and biodegradable C-lignin cross-linked polyvinyl alcohol supramolecular composite films with closed-looping recyclability[J]. *Chem Eng J*, 2024, 491: 151748. DOI: 10.1016/j.cej.2024.151748.
- [17] Xu YH, Li MF, Peng F. Lignin micro/nanoparticles: synthesis, properties, and application to endow polyvinyl alcohol film with multifunctionality[J]. *Chem Eng J*, 2023, 473: 145233. DOI: 10.1016/j.cej.2023.145233.
- [18] An L, Heo J W, Chen J, et al. Water-soluble lignin quaternary ammonium salt for electrospun morphology-controllable antibacterial polyvinyl alcohol/lignin quaternary ammonium salt nanofibers[J]. *J Clean Prod*, 2022, 368: 133219. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.133219.
- [19] Wang L, Zhang X, Xu P, et al. Exploration of sea anemone-inspired high-performance biomaterials with enhanced antioxidant activity[J]. *Bioact Mater*, 2022, 10: 504-514. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.08.021.
- [20] Zhao Z. Hydroxyl radical generations form the physiologically relevant Fenton-like reactions[J]. *FreeRad Biol Med*, 2023, 208: 510-515. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.013.
- [21] Chu D, Zhao M, Rong S, et al. Dual-atom nanozyme eye drops attenuate inflammation and break the vicious cycle in dry eye disease[J]. *Nanomicro Lett*, 2024, 16(1): 120. DOI: 10.1007/s40820-024-01322-7.
- [22] Ning Q, Sun X, Cui H, et al. Dual-corn-derived nanofiber membrane for subconjunctival injury: sequential release of dual-natural products for programmed anti-inflammation and anti-fibrosis[J]. *J Control Release*, 2025, 381: 113577. DOI: 10.1016/j.jconrel.2025.02.073.
- [23] Gao X, Xu Z, Liu G, et al. Polyphenols as a versatile component in tissue engineering[J]. *Acta Biomater*, 2021, 119: 57-74. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.11.004.
- [24] Goonoo N. Modulating immunological responses of electrospun fibers for tissue engineering[J/OL]. *Adv Biosyst*, 2017, 1(8): e1700093 [2025-06-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32646177/>. DOI: 10.1002/adbi.201700093.
- [25] Mohammadipour M, Behzad T, Karbasi S, et al. Optimization and characterization of polyhydroxybutyrate/lignin electro-spun scaffolds for tissue engineering applications[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 218: 317-334. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.139.
- [26] Liang R, Zhao J, Li B, et al. Implantable and degradable antioxidant poly( $\epsilon$ -caprolactone)-lignin nanofiber membrane for effective osteoarthritis treatment[J]. *Biomaterials*, 2020, 230: 119601. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119601.
- [27] Wang R, Zheng L, Xu Q, et al. Unveiling the structural properties of water-soluble lignin from gramineous biomass by autohydrolysis and its functionality as abioactivator (anti-inflammatory and antioxidative)[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 191: 1087-1095. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.124.

(收稿日期:2025-09-24 修回日期:2026-01-29)

(本文编辑:张宇)