



负载环丙沙星及利福平的聚合物 胶束制备及其抗菌性能分析

何清玲¹, 陈柳婷¹, 孙泽月¹, 刘飞², 卢嘉驹¹, 孔祥东¹

(1. 浙江理工大学材料科学与工程学院, 杭州 310018; 2. 浙江省中西医结合医院骨科, 杭州 310003)

摘要: 为提高抗生素在病灶感染处的渗透与富集能力, 减少单一抗生素的使用剂量, 降低细菌耐药性的风险, 采用化学偶联法合成聚乳酸羟基乙酸-透明质酸的两亲性嵌段共聚物用于封装抗生素。该共聚物在水中可自组装为内部疏水、外部亲水的胶束 (Micelles, MS), 以透析法将疏水药物环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP) 和利福平 (Rifampicin, RFP) 封装在 MS 中, 构建了 CIP@MS 的单一载药胶束及 CIP/RFP@MS 的双载药胶束; 对合成物质的结构、形貌、临界胶束浓度以及载药率进行测试与表征, 将 MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 与金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 和大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 共培养以探索载药胶束的体外抗菌作用, 与人脐静脉内皮细胞共培养以评估载药胶束的体外细胞毒性。结果表明: 聚乳酸羟基乙酸-透明质酸聚合物在水中可自组装约为 142 nm 大小的球形胶束, 载药后粒径增大为 194 nm; CIP 在 CIP@MS 中的载药率为 1.42%, CIP 和 RFP 在 CIP/RFP@MS 中的载药率分别为 1.09% 和 1.41%; CIP@MS 对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抗菌率分别为 27.7% 和 99.9%, CIP/RFP@MS 对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抗菌率分别达到 85.4% 和 100.0%。该研究为双载药胶束的制备方法及应用提供了一定的实验基础和理论依据。

关键词: 聚乳酸羟基乙酸; 透明质酸; 胶束; 环丙沙星; 利福平; 抗菌

中图分类号: TB324

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2024)09-0579-09

引文格式: 何清玲, 陈柳婷, 孙泽月, 等. 负载环丙沙星及利福平的聚合物胶束制备及其抗菌性能分析[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2024, 51(5): 579-587.

Reference Format: HE Qingling, CHEN Liuting, SUN Zeyue, et al. Preparation and antibacterial activity analysis of ciprofloxacin and rifampicin-loaded polymer micelles[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2024, 51(5): 579-587.

Preparation and antibacterial activity analysis of ciprofloxacin and rifampicin-loaded polymer micelles

HE Qingling¹, CHEN Liuting¹, SUN Zeyue¹, LIU Fei², LU Jiaju¹, KONG Xiangdong¹

(1. School of Materials Science & Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hangzhou 310003, China)

Abstract: To improve the penetration and accumulation ability of antibiotics in treating infected lesions while minimizing dosage of single antibiotics, and reducing the risk of bacterial resistance, an amphiphilic block copolymer comprising poly(lactic acid-co-glycolic acid) and hyaluronic acid was synthesized via chemical conjugation for the encapsulation of antibiotics. This copolymer forms self-assembling micelles (MS) in water, featuring a hydrophobic core and a hydrophobic shell. Hydrophobic drugs, such as ciprofloxacin (CIP) and rifampicin (RFP) were encapsulated within these micelles by using dialysis method, resulting in ciprofloxacin-loaded micelles (CIP@MS) and ciprofloxacin/rifampicin-loaded micelles (CIP/RFP@MS). The synthesized materials were tested and characterized for structure, morphology,

收稿日期: 2024-01-16 网络出版日期: 2024-03-13

基金项目: 浙江理工大学科研启动基金(11112932612002)

作者简介: 何清玲(1997-), 女, 云南昭通人, 硕士研究生, 主要从事生物医用材料方面的研究。

通信作者: 卢嘉驹, E-mail: jiaju_lu@zstu.edu.cn

critical micelle concentration, and drug loading efficiency. *In vitro* studies involved co-culturing MS, CIP@MS, and CIP/RFP@MS were co-cultured with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) to access antibacterial effects, in as well as evaluating cytotoxicity with human umbilical vein endothelial cells. The results showed that the copolymer of poly(lactic-co-glycolic acid)-hyaluronic acid could self-assemble into uniform spherical micelles in water with a size of approximately 142 nm, increasing to 194 nm post-drug loading. The drug loading efficiency of CIP in CIP@MS was 1.42%, while for in CIP/RFP@MS, it was 1.09% for CIP and 1.41% for RFP, respectively. The antibacterial rates of CIP@MS against *S. aureus* and *E. coli* were 27.7% and 99.9%, respectively, while for CIP/RFP@MS, rates reached 85.4% and 100.0%, respectively. This study establishes an experimental basis and theoretical basis for the preparation and the application of dual drug-loaded micelles in antibacterial aspects in some degree.

Key words: poly (d, l-lactide-coglycolide); hyaluronic acid; micelles; ciprofloxacin; rifampicin; antibacterial

0 引言

环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)是一种喹诺酮类广谱抗生素,通过干扰阻止 DNA 合成和复制来抑制细菌生长,广泛用于治疗各种感染和细菌源性疾病^[1]。但 CIP 的溶解度和渗透性较差,静脉注射单一高剂量的 CIP 可能会引起严重的不良反应并诱导细菌产生耐药性^[2-5]。联合使用具有协同效应的 2 种或 2 种以上抗生素可以覆盖更为广泛的抗菌谱,显著提高抗生素的抑菌作用,从而降低使用高剂量抗生素产生的不良反应和耐药性风险^[6-9]。利福平(Rifampicin, RFP)是一种聚酮类药物,通过抑制细菌 RNA 的合成达到抗菌作用,在抗结核菌一线用药中占有重要地位^[8]。喹诺酮类药物联合 RFP 可显著提高抗菌效果,降低细菌耐药风险^[10-12]。然而,因血液供应不足以及抗生素在感染部位的积累不足等原因,CIP 联合 RFP 的抗菌疗效仍然有限^[12-13]。

近年来,聚合物胶束因其具有被动菌靶向、副作用小、药溶性增强和药代动力学改善等突出优势,在抗菌材料领域得到了广泛的研究与开发^[14]。载药胶束的纳米尺寸性质有利于其在炎症部位的内皮外泄及在病灶感染处有效积累,并且纳米载体具有较高的表面积,能够解决药物因溶解度低而遇到的递送障碍问题^[15-16]。另外,胶束可以保护药物免受酶的降解,增加半衰期和稳定性,最大限度地减少药物副作用,将抗生素药物封装到载体中可以增强抗生素的生物利用度和有效性^[17-18]。Chen 等^[19]制备了负载槲皮素和 RFP 的聚(ε-己内酯)-单甲氧基聚乙二醇胶束(QRMs),评价了其耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌活性,发现 QRMs 可以有效地穿透和去除耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的生物膜,加速

细菌中活性氧的积累以达到持续的抗菌效果。

聚乳酸羟基乙酸(Poly (d, l-lactide-coglycolide), PLGA)是一种人工合成的可生物降解共聚物,已被批准用于药物递送;此外,透明质酸(Hyaluronic acid, HA)是一种亲水性的天然多糖,具有无毒、无免疫原性和可生物降解等优点^[20]。在各种药物递送系统中,基于 PLGA 的药物载体已被深入研究,例如:Gheffar 等^[21]使用纳米沉淀法合成负载 CIP 的 PLGA 聚合物基纳米粒子用于金黄色葡萄球菌的抗菌活性研究;Wu 等^[22]使用乳化溶剂蒸发法将亲水性 HA 与含有多黏菌素 B(PMB)的 PLGA 结合形成 HA@PLGA-PMB 纳米粒子用于雾化治疗肺部感染;Hlaing 等^[23]将姜黄素封装于 HA 偶联的 PLGA 纳米颗粒中用于治疗溃疡性结肠炎。尽管将 HA 和 PLGA 结合的纳米粒子作为抗菌剂的药物递送系统已进行了大量研究,但将它们结合形成胶束并负载双抗生素抗菌的研究报道较少。

本文利用具有良好生物相容性的材料 PLGA 和 HA,通过还原胺化法将 HA 连接于 PLGA 上合成 PLGA-b-HA 的两亲性嵌段共聚物,PLGA-b-HA 在水中可自组装为内部疏水、外部亲水的胶束(Micelles, MS),并以透析法将疏水药物 CIP 及 RFP 封装在 MS 中,构建了 CIP@MS 的单一载药胶束及 CIP/RFP@MS 的双载药胶束,评价了胶束的形态、粒径分布、载药率、包封率、抗菌性能及其对细胞的毒性,并探讨了单一载药及双载药胶束的抗菌性能,为双载药胶束的制备方法及抗菌方面的应用提供了一定的理论基础。

1 实验部分

1.1 实验材料及仪器

实验材料:PLGA 购自上海源叶生物科技有限公

司;HA(分子量 7 kDa)、氰基硼氢化钠和 N,N 二异丙基乙胺均购自上海易恩化学技术有限公司;丁二胺购自上海麦克林生化科技股份有限公司;N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、1-(3 二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCL)、RFP 和 CIP 均购自阿拉丁试剂有限公司;透析袋(截留分子量 8 kDa)购自上海亿欣生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)来源于 CICC 库 10384 菌株,大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)来源于 CICC 库 10389 菌株。

实验仪器:傅里叶变换红外光谱仪(Nicolte 5700, 美国);核磁共振波谱仪(Avance AV 400 MHz, 瑞士);动态光散射仪(Zetasizer Nano ZS, 英国);透射电子显微镜(JEM-2100, 日本);扫描电子显微镜(ZEISS Gemini 500, 德国);紫外-可见光分光光度计(P7 Double Beam Spectrophotometer, 上海美谱达仪器有限公司);荧光分光光度计(Fluoromax, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 PLGA-b-HA 嵌段共聚物的制备

PLGA-b-HA 制备方法参考文献[24],具体方法如下:

a)HA-NH₂ 合成。取 2.0 g HA 溶解于 60 mL 乙酸盐缓冲液(pH 值为 5.6),在磁力搅拌下将 2 mL 的丁二胺添加到 HA 溶液中,在 50 °C 下搅拌 24 h 形成亚胺,并加入 1.2 g 氰基硼氢化钠搅拌 72 h;反应结束后,将反应溶液装入透析袋中,在去离子水中透析 3 d,每 6 h 更换一次透析液,透析结束后将袋内溶液冻干待用。

b)PLGA-NHS 合成。取 1.0 g 的 PLGA 溶解于 10 mL 的二氯甲烷中,分别加入 48 mg 的 NHS 和 80 mg 的 EDC·HCL,在室温下密封并磁力搅拌 24 h,反应结束后用冰冷的乙醚析出沉淀产物,再用

冰冷的乙醚/甲醇(50/50, *v/v*)混合液洗涤 3 次以去除过量的 NHS 和 EDC·HCL,最后将纯化后的产物真空干燥待用。

c)PLGA-b-HA 合成。取 0.5 g 的 PLGA-NHS 和 0.5 g 的 HA-NH₂,分散到 20 mL 的 DMSO 中,再加入 20 μL 的 N,N-二异丙基乙胺,在 50 °C 下磁力搅拌 48 h。反应结束后将该溶液装入透析袋中,在去离子水中透析 3 d 以纯化产物,平均每 6 h 更换一次透析液,透析结束后将袋内溶液冻干待用。

1.2.2 MS 制备

将 10 mg PLGA-b-HA 溶解于 1 mL 的 DMSO 中搅拌 15 min,缓慢滴加 3 mL 的去离子水,再搅拌 15 min 后,将溶液装入透析袋在去离子水中透析 6 h 除去多余的有机溶剂,最终加去离子水定容至 5 mL,获得质量浓度为 2 mg/mL 的 MS。

1.2.3 CIP@MS 制备

将 CIP 溶于 HAc 中配成质量浓度为 1 mg/mL 的 CIP 溶液,在烧杯中加入 10 mg 的 PLGA-b-HA 和 1.0 mL 的 DMSO,磁力搅拌下缓慢滴加 0.5 mL 的 CIP 溶液和 1.0 mL 的去离子水于烧杯中继续搅拌 15 min,转入透析袋中透析 6 h 制备的胶束过 0.45 μm 的滤膜除去未包载的 CIP,然后加去离子水定容至 5.0 mL 得到质量浓度为 2 mg/mL 的 CIP@MS。

1.2.4 CIP/RFP@MS 制备

将 CIP 和 RFP 分别溶于 HAc 和 DMSO 中配成质量浓度均为 1 mg/mL 的 CIP 和 RFP 溶液,各取 0.5 mL 得到 1.0 mL 的混合溶液。在烧杯中加入 10 mg 的 PLGA-b-HA 和 1.0 mL 的 DMSO,磁力搅拌下缓慢滴加 1.0 mL 的混合溶液和 1.0 mL 的去离子水于烧杯中继续搅拌 15 min,后续操作与 CIP@MS 载药胶束的制备方法相一致,PLGA-b-HA 载药示意图如图 1 所示。

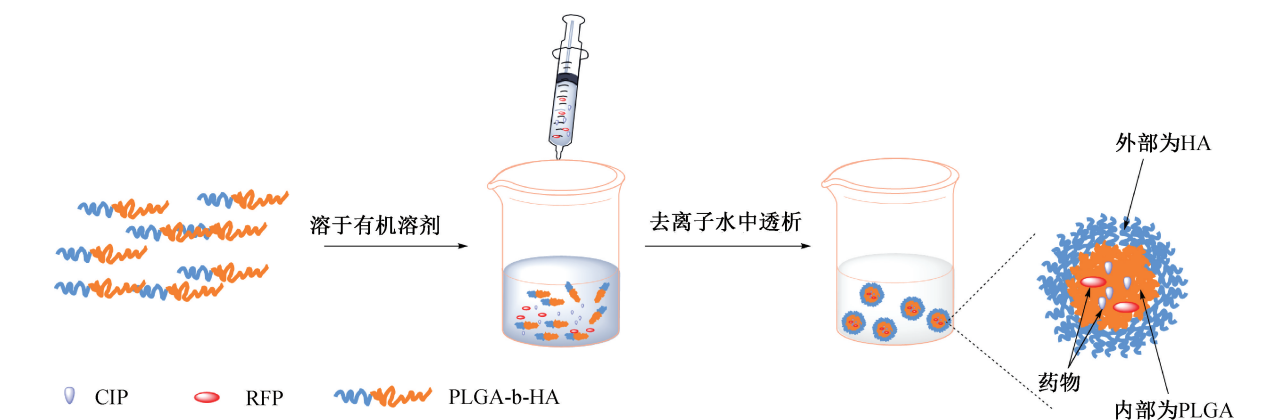


图 1 PLGA-b-HA 载药示意图

1.3 测试与表征

1.3.1 核磁共振氢谱测试

将 HA 溶于 DMSO-d₆, PLGA-b-HA 分别溶于 DMSO-d₆ 和 D₂O 中,使用核磁共振波谱仪进行核磁共振氢谱(¹H Nuclear magnetic resonance spectra, ¹H NMR)测试。

1.3.2 傅里叶变换红外光谱测试

使用傅里叶变换衰减全反射红外光谱(Attenuated total internal reflectance fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR)仪对 HA-NH₂、PLGA-NHS、PLGA-b-HA 材料进行测试,设置波长范围为 4000~500 cm⁻¹。

1.3.3 临界胶束浓度测试

采用芘荧光探针法测定 PLGA-b-HA 嵌段共聚物的临界胶束浓度(Critical micelle concentration, CMC),荧光分光光度计的激发光谱测定条件为:固定发射波长 390 nm,检测激发波长 300~360 nm。将聚合物质量浓度分别调制为:5×10⁻⁵、1×10⁻⁴、5×10⁻⁴、1×10⁻³、2×10⁻³、5×10⁻³、8×10⁻³、1×10⁻²、2×10⁻²、5×10⁻² mg/mL 和 10×10⁻² mg/mL 进行测试。以芘在 336 nm 和 334 nm 处的荧光强度比值(I_{336}/I_{334})对 LogC 作图,突变点的计算采用 Origin 进行分段线性模拟,2 条直线的交点处即为 PLGA-b-HA 的 CMC。

1.3.4 粒径及电位测试

使用动态光散射仪(Dynamic light scattering, DLS)测定胶束载药前后的粒径及电位变化。

1.3.5 透射电子显微镜表征

使用透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM)观察经过磷钨酸负染色液处理后的胶束微观形貌。

1.3.6 紫外-可见光分光光度计测试

分别配制质量浓度为 10 μg/mL 的 CIP 溶液和 100 μg/mL 的 RFP 溶液,梯度稀释后分别测量 CIP 在波长为 280 nm 处的吸光度和 RFP 在 344 nm 处的吸光度,绘制 CIP 和 RFP 的标准曲线,得出标准曲线方程。将冻干后的 PLGA-b-HA 嵌段共聚物、负载 CIP 的 PLGA-b-HA 嵌段共聚物以及负载 CIP/RFP 的 PLGA-b-HA 嵌段共聚物溶于 DMSO 中进行紫外吸收光谱曲线测量,参照 CIP 和 RFP 的标准曲线,依据式(1)和式(2)计算包封率和载药率:

$$X/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

其中: X 为胶束中药物的包封率,%; m_1 为载入胶束 b 的药物质量,g; m_2 为投入的药物总质量,g。

$$Y/\% = \frac{m_1}{m} \times 100 \quad (2)$$

其中: Y 为胶束中药物的载药率,%; m_1 为载入胶束的药物质量,g; m 为载入胶束的药物质量与胶束载体质量之和,g。

1.3.7 抗菌性能测试

抗菌测试方法参考文献[10]和文献[25],将 *S. aureus* 和 *E. coli* 分别接种于 Luria-Bertani(LB)培养液中,置于 37 °C 震荡培养箱振荡培养过夜,用紫外-可见光分光光度计调整菌液吸光度(OD₆₀₀)为 0.1,并用 LB 稀释至 1×10⁶ 个/mL 的浓度备用。取 100 μL 质量浓度均为 20 μg/mL 的 MS、CIP@MS 和 CIP/RFP@MS 分别与 100 μL 的 *S. aureus* 和 *E. coli* 于 96 孔板中共培养 4 h 后进行 SEM 表征;继续共培养 24 h 后,分别稀释 10⁵ 和 10⁴ 倍进行平板涂布测试,将细菌与磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS)共培养设置为空白对照组,最终使用图像处理软件(ImageJ, NIH, USA)进行平板菌落计数,并计算抗菌率。

1.3.8 细胞毒性测试

以人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为细胞模型,将生长状态良好的细胞以 10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔板中,在细胞培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁;将不同质量浓度的 MS、CIP@MS 和 CIP/RFP@MS 与 HUVEC 共培养 24 h,使用 MTT 法评估材料对细胞的毒性。

2 结果与讨论

2.1 PLGA-b-HA 嵌段共聚物的表征与分析

图 2(a)为 HA 溶于 DMSO-d₆、PLGA-b-HA 分别溶于 DMSO-d₆ 和 D₂O 中的¹H NMR 图。图 2(a)显示:图谱中 0 为 DMSO-d₆ 溶剂峰,1~3 为 PLGA 中的特征峰,4 和 5 为 HA 的特征峰,6 为 D₂O 溶剂峰;当 PLGA-b-HA 溶解在 DMSO-d₆ 中时,同时出现 PLGA 和 HA 的特征峰,而当其溶解到 D₂O 中时 PLGA 的特征峰消失,出现 HA 的特征峰,这是由于 PLGA-b-HA 在重水中形成了核-壳结构的纳米粒,PLGA 的疏水核心被 HA 外壳所屏蔽^[24],¹H NMR 结果初步证明 PLGA-b-HA 嵌段共聚物的合成。为进一步验证 PLGA-b-HA 的结构,对 PLGA-NHS、HA-NH₂ 和 PLGA-b-HA 进行

ATR-FTIR 测试,结果如图 2(b)所示。由图 2(b)可知:HA-NH₂ 在 3353 cm⁻¹ 和 2888 cm⁻¹ 处出现宽峰,对应于 O—H 伸缩振动峰和 C—H 伸缩振动峰,PLGA-NHS 在 1742 cm⁻¹ 处出现明显的尖峰,对应于 C=O 伸缩振动峰。合成的 PLGA-b-HA 在图中表现为 HA-NH₂ 和 PLGA-NHS 的混合光

谱,在 1742 cm⁻¹ 处的羰基伸缩振动峰与 3353 cm⁻¹ 处的羟基伸缩振动峰在图谱中同时出现,且羟基伸缩振动峰相较于 PLGA 的明显增强,在 1084 cm⁻¹ 处对应于 C—O—C 的伸缩振动峰相较于 HA 的明显增强^[26-27]。以上结果表明成功合成 PLGA-b-HA 嵌段共聚物。

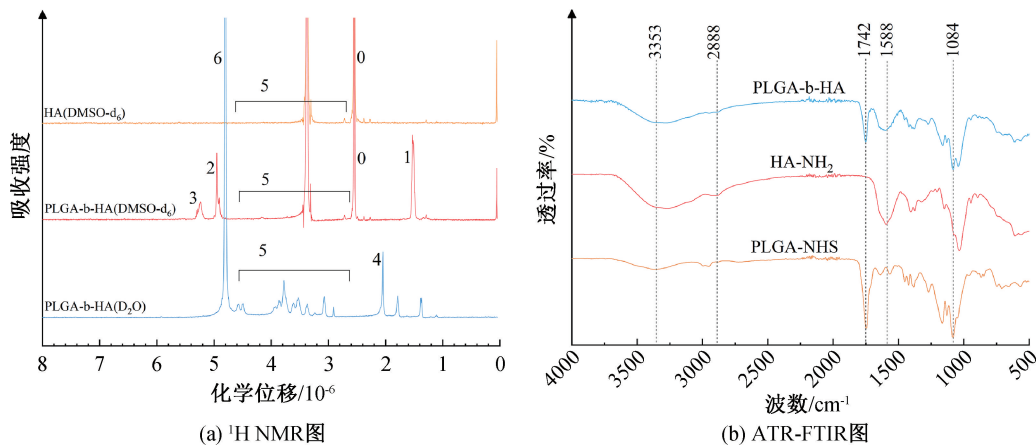


图 2 PLGA-b-HA 嵌段共聚物的表征分析图

2.2 胶束的合成表征及分析

图 3(a)为 PLGA-b-HA 质量浓度对 I_{336}/I_{334} 的关系图,随着 PLGA-b-HA 质量浓度的增大,苝荧光激发波长从 334 nm 红移到 336 nm,两条直线交点处为 CMC 的值:0.2 mg/L,低 CMC 值表明 PLGA-b-HA 在较低的质量浓度下可形成胶束并保持良好的稳定性,具备成为载药聚合物胶束的潜质。图 3(b)为 MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 的粒径图,MS 的平均粒径为 142 nm,负载 CIP 后的

胶束平均粒径增大为 190 nm,共同负载 CIP 和 RFP 后的胶束平均粒径为 194 nm,载药后的胶束粒径逐渐增大,但大部分的胶束粒径小于 200 nm,有利于胶束在感染病灶处的渗透富集。图 3(c)显示 CIP、RFP、MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 的 Zeta 电位依次为: -7.8、-2.5、-28.7、-30.0 mV 和 -29.0 mV,胶束在载药前后的电位变化不明显,其原因可能是药物含量较低,对胶束的电位影响较小。

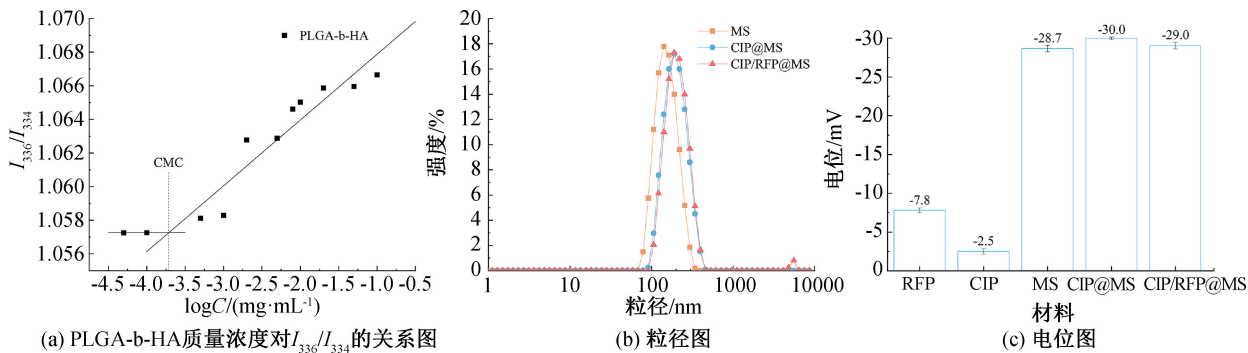


图 3 合成胶束的表征分析图

图 4 为 MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 的 TEM 图。从图 4 可以看出:3 种胶束均具有球状形貌和明显的双层结构,大小均在 200 nm 以内;MS 的分散性较好,CIP@MS 的大小较均一,CIP/RFP@MS 的粒径较大,其差异的原因可能是在载药过程中,药物、溶剂和载体之间形成了一定的相互作用;胶束的形成及稳定可以通过丁达尔效应侧面印证,当光束

通过含有纳米颗粒的胶体分散体系时,从垂直入射光方向可以观察到体系中出现一条光亮的“通路”,该现象被称为丁达尔效应^[28]。图 4 的右上方插图分别为 MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 丁达尔效应示意图,在 3 个体系中均出现明显的光通路,进一步说明 MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 体系中均形成胶束,且具有良好的稳定性。

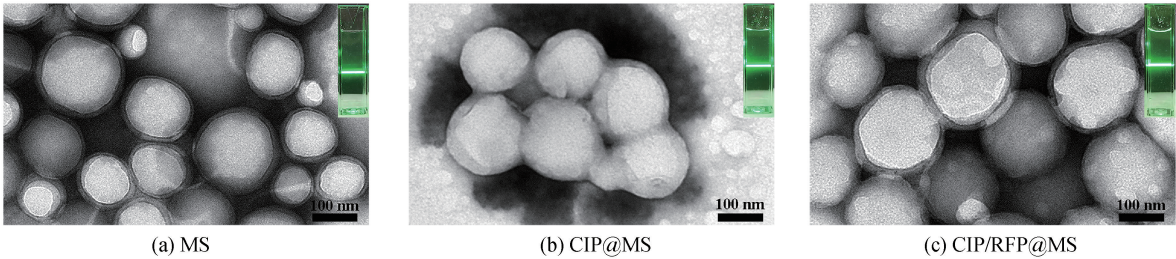


图 4 MS、CIP@MS 和 CIP/RFP@MS 的 TEM 图与丁达尔效应图

2.3 药物标准曲线及胶束载药率测定

通过紫外-可见分光光度计测试获得了 CIP 和 RFP 的标准曲线以及冻干后负载药物聚合物的紫外吸收光谱图,结果如图 5 所示。图 5(a)和图 5(b)显示:CIP 和 RFP 在各自的质量浓度范围内具

有较好的线性关系。由图 5(c)紫外吸收峰的变化可知:药物成功负载,CIP 在 CIP@MS 中的载药率为 1.42%,包封率为 28.30%;CIP 和 RFP 在 CIP/RFP@MS 中的载药率分别为 1.09%和 1.41%,包封率分别为 21.80%和 28.10%。

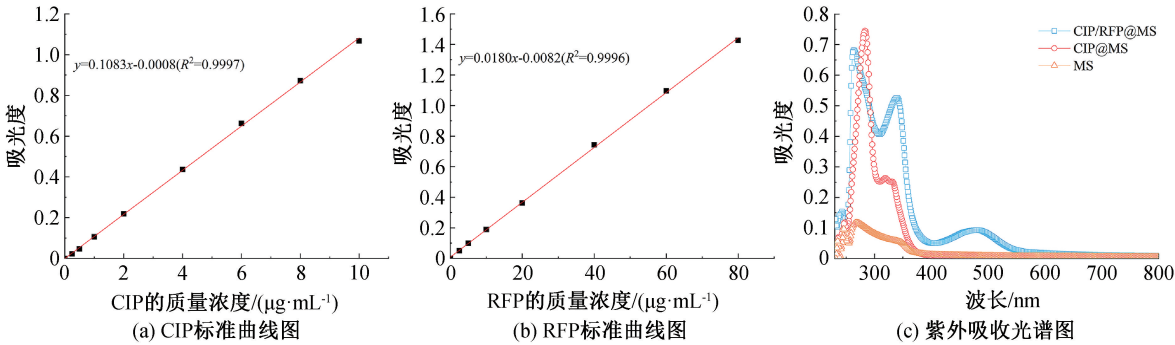


图 5 CIP、RFP 的标准曲线图与 MS、CIP@MS 和 CIP/RFP@MS 的紫外吸收光谱图

2.4 抗菌测试表征及分析

图 6 为 *S. aureus* 和 *E. coli* 分别与不同载药胶束共培养 4 h 的 SEM 图,其中红色箭头标识为被破坏的细菌。与图 6(a)PBS 组相比,图 6(b)MS 组中 2 种细菌的形貌基本没有发生变化,均具有独立、完整的形貌结构,MS 未表现出对细菌细胞膜的破坏;图 6(c)CIP@MS 组中大多数 *S. aureus* 形貌仍保持为原来的球形完整结构,小部分 *S. aureus* 的膜结构出现了破损现象,部分 *E. coli* 细胞膜出现融合现象,其膜结构界限不再清晰分明;图 6(d)CIP/RFP@MS 组中可以明显的观察到 *S. aureus* 和 *E. coli* 的形貌和结构均出现了严重破损,大量的 *S. aureus* 已不具有完整的球型结构,大量的 *E. coli* 出现了更为严重的膜融合现象,细菌结构坍塌;相对于 CIP@MS, CIP/RFP@MS 对 2 种细菌膜结构的破坏作用更为显著,表现出显著的杀菌作用。*E. coli* 对 CIP 较为敏感,CIP 通过靶向细菌 DNA 旋转酶,抑制细菌 DNA 的合成,达到抗菌效果;*S. aureus* 对 RFP 较为敏感,RFP 通过与细菌的 RNA 聚合酶结合抑制细菌生长^[29-31]。在本文的载药体系中,药物封装于胶束内部,胶束与细菌共培养时,药物从胶束中释放并作用于细

菌,抑制细菌 DNA 或 RNA 合成,促使细胞膜破裂,最终实现抗菌作用。

为进一步分析载药胶束的抗菌性能,将载药胶束与细菌继续共培养 24 h 后进行平板涂布测试,结果如图 7 和表 1 所示。与图 7(a)PBS 组相比,图 7(b)MS 组中 *S. aureus* 和 *E. coli* 的菌落个数与 PBS 组的菌落个数相差都较小,几乎没有表现出抗菌效果;在载药胶束中,图 7(c)CIP@MS 组对 *S. aureus* 具有一定的抗菌效果,抗菌率达到 27.7%,对 *E. coli* 表现出显著的杀菌效果,抗菌率达到 99.9%;图 7(d)CIP/RFP@MS 组的抗菌效率较为明显,对 *S. aureus* 的抗菌率达到 85.4%,对 *E. coli* 的抗菌率达到了 100.0%。CIP@MS 对 *E. coli* 的抗菌率明显高于对 *S. aureus* 的抗菌率,而 CIP/RFP@MS 对 2 种细菌的抗菌效果优于 CIP@MS,载药胶束中 CIP 与 RFP 表现出协同作用。由图 6 和图 7 的结果可知,当 *S. aureus* 和 *E. coli* 分别与不同载药胶束共培养 4 h 和 24 h 时,MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 在对细菌的破坏作用上具有一致性,*S. aureus* 对 RFP 较为敏感,*E. coli* 对 CIP 较为敏感,2 种药物共同负载于胶束载体中,可拓宽抗生素谱,减少单一药物剂量。

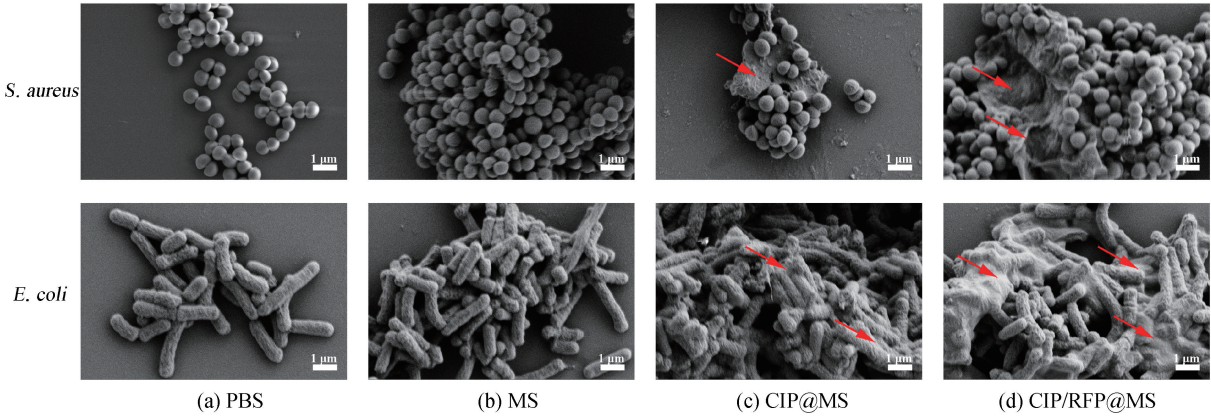


图 6 *S. aureus* 和 *E. coli* 分别与不同载药胶束共培养 4 h 的 SEM 图

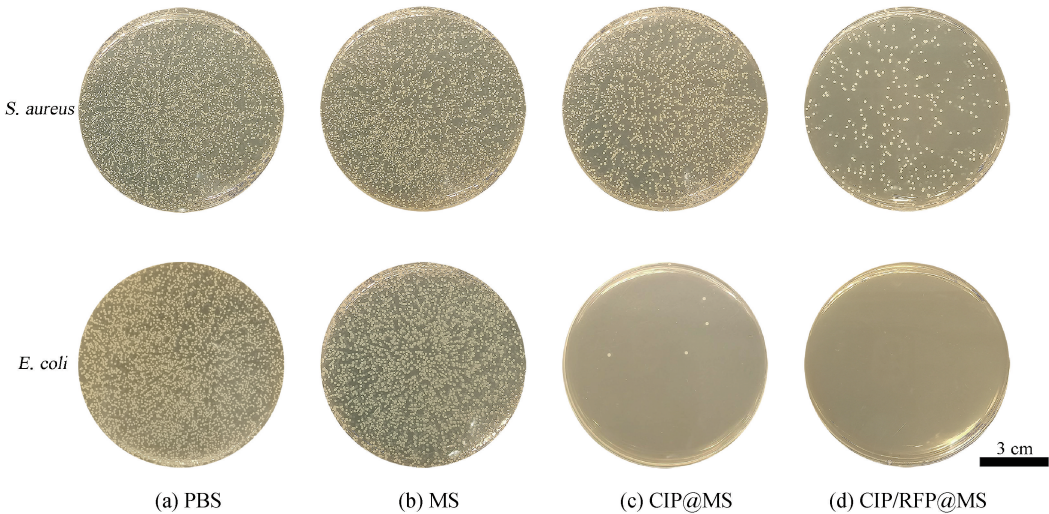


图 7 *S. aureus* 和 *E. coli* 分别与不同载药胶束共培养 24 h 的抗菌效果图

| 样品种类 | 不同载药胶束的菌落数及抗菌率 | | | |
|------------|------------------|-----------|----------------|-----------|
| | <i>S. aureus</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | 菌落数/ 个 | 抗菌率/ % | 菌落数/ 个 | 抗菌率/ % |
| PBS | 2776 | | 2850 | |
| MS | 2757 | 0.7 | 2744 | 3.7 |
| CIP@MS | 2008 | 27.7 | 4 | 99.9 |
| CIP/RFP@MS | 405 | 85.4 | 0 | 100.0 |

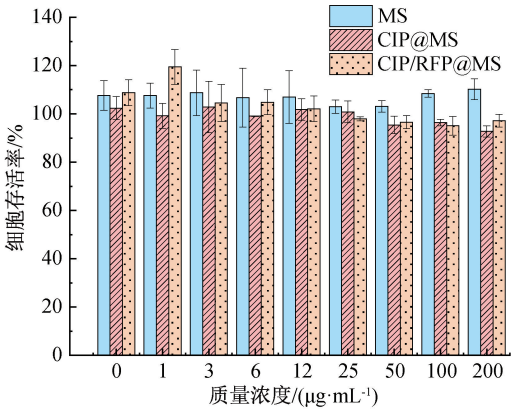


图 8 MS、CIP@MS 及 CIP/RFP@MS 与 HUVEC 共培养 24 h 的细胞存活率

2.5 细胞毒性测试表征及分析

将不同质量浓度的 MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 与 HUVEC 共培养 24 h,测定细胞活性,结果如图 8 所示。由图 8 可知:随着 MS、CIP@MS、CIP/RFP@MS 质量浓度的不断增加,MS 组的细胞存活率无明显下降,质量浓度增加到 200 μg/mL 时,CIP@MS 组和 CIP/RFP@MS 组细胞存活率略有下降,但均保持在 95% 以上,表明 3 种胶束对 HUVEC 的细胞毒性较小,具有潜在的临床转化应用。

3 结 论

本文将 PLGA 和 HA 改性后通过缩聚反应合成了 PLGA-b-HA 两亲性嵌段共聚物,制备了可同时负载 CIP 和 RFP 的载药纳米胶束,探讨了 MS、CIP@MS 和 CIP/RFP@MS 对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抗菌性能,并评估了胶束对 HUVEC 的体外细胞

毒性, 所得结论如下:

a) PLGA-b-HA 嵌段共聚物在水溶液中自组装形成胶束的 CMC 较低, 胶束呈圆球状形貌, 表面具有一定负电荷, 粒径分布于 100~200 nm 之间, 具有良好的分散性和稳定性;

b) 双载药胶束对 *S. aureus* 的抗菌率达到 85% 以上, 对 *E. coli* 的抗菌性能达到 100%, 载药胶束中 CIP 与 RFP 表现出协同抗菌作用;

c) MS、CIP@MS 和 CIP/RFP@MS 对 HUVEC 的体外细胞毒性较小, 具有潜在的临床转化应用。

参考文献:

- [1] 史玉敏, 严恒, 王俊, 等. 氟喹诺酮类杂合体的抗耐药菌活性[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(11): 1273-1280.
- [2] Zhang L L, Bao M, Liu B, et al. Effect of andrographolide and its analogs on bacterial infection: A review[J]. Pharmacology, 2020, 105(3/4): 123-134.
- [3] Gao W W, Thamphiwatana S, Angsantikul P, et al. Nanoparticle approaches against bacterial infections[J]. Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2014, 6(6): 532-547.
- [4] Lu C B, Xiao Y, Liu Y Y, et al. Hyaluronic acid-based levofloxacin nanomicelles for nitric oxide-triggered drug delivery to treat bacterial infections[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115479.
- [5] Douafer H, Andrieu V, Phanstiel O, et al. Antibiotic adjuvants: Make antibiotics great again! [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 62(19): 8665-8681.
- [6] Coates A R M, Hu Y, Holt J, et al. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: Synergy, rejuvenation and resistance reduction[J]. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2020, 18(1): 5-15.
- [7] Sullivan G J, Delgado N N, Maharjan R, et al. How antibiotics work together: Molecular mechanisms behind combination therapy[J]. Current Opinion in Microbiology, 2020, 57: 31-40.
- [8] Hardie K R, Fenn S J. JMM profile: Rifampicin: A broad-spectrum antibiotic [J]. Journal of Medical Microbiology, 2022, 71(8): 1566-1571.
- [9] Qiao Z W, Yuan Z, Zhang W P, et al. Preparation, *in vitro* release and antibacterial activity evaluation of rifampicin and moxifloxacin-loaded poly (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres[J]. Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology, 2019, 47(1): 790-798.
- [10] Kang Y R, Chung D R, Ko J H, et al. Comparing the

synergistic and antagonistic interactions of ciprofloxacin and levofloxacin combined with rifampin against drug-resistant *staphylococcus aureus*: A time-kill assay[J]. Antibiotics, 2023, 12(4): 711-723.

- [11] Miranda C L, Yus C, Ramirez D G C, et al. Combinatorial wound dressings loaded with synergistic antibiotics in the treatment of chronic infected wounds [J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 476: 146679.
- [12] Yeh Y C, Huang T H, Yang S C, et al. Nano-based drug delivery or targeting to eradicate bacteria for infection mitigation: A review of recent advances[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 286-308.
- [13] Yang X, Domalaon R, Lyu Y F, et al. Tobramycin-linked efflux pump inhibitor conjugates synergize fluoroquinolones, rifampicin and fosfomycin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Clinical Medicine, 2018, 7(7): 158-170.
- [14] Wang S T, Gao Y F, Jin Q, et al. Emerging antibacterial nanomedicine for enhanced antibiotic therapy[J]. Biomaterials Science, 2020, 8(24): 6825-6839.
- [15] Walvekar P, Gannamani R, Govender T. Combination drug therapy via nanocarriers against infectious diseases [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, 127: 121-141.
- [16] Nwabuife J C, Omolo C A, Govender T. Nano delivery systems to the rescue of ciprofloxacin against resistant bacteria "*E. coli*; *P. aeruginosa*; *Saureus*; and MRSA" and their infections [J]. Journal of Controlled Release, 2022, 349: 338-353.
- [17] Wassif R K, Elkayal M, Shamma R N, et al. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis[J]. Drug Delivery, 2021, 28(1): 2392-2414.
- [18] Baptista P V, McCusker M P, Carvalho A, et al. Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria—"a battle of the titans"[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1441-1467.
- [19] Chen Y X, Zhao Q, Han J H, et al. Dual drug loaded pH-sensitive micelles for efficient bacterial infection treatment[J]. Pharmaceutical Research, 2022, 39(6): 1165-1180.
- [20] Klodzinska S N, Wan F, Jumaa H, et al. Utilizing nanoparticles for improving anti-biofilm effects of azithromycin: A head-to-head comparison of modified hyaluronic acid nanogels and coated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles[J]. Journal of Colloid and

- Interface Science, 2019, 555: 595-606.
- [21] Gheffar C, Le H, Jouenne T, et al. Antibacterial activity of ciprofloxacin-loaded poly (lactic-o-glycolic acid)-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* [J]. Particle & Particle Systems Characterization, 2021, 38 (1): 2000253.
- [22] Wu J, Zhai T S, Sun J, et al. Mucus-permeable polymyxin B-hyaluronic acid/poly (lactic-co-glycolic acid)nanoparticle platform for the nebulized treatment of lung infections[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2022, 624: 307-319.
- [23] Hlaing S P, Cao J, Lee J, et al. Hyaluronic acid-conjugated PLGA nanoparticles alleviate ulcerative colitis via CD44-mediated dual targeting to inflamed colitis tissue and macrophages [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(10): 2118-2136.
- [24] Huang J B, Zhang H, Yu Y, et al. Biodegradable self-assembled nanoparticles of poly (d, l-lactide-co-glycolide)/hyaluronic acid block copolymers for target delivery of docetaxel to breast cancer[J]. Biomaterials, 2014, 35(1): 550-566.
- [25] Maurya D K. Colonycountj: A user-friendly image j add-on program for quantification of different colony parameters in clonogenic assay[J]. Journal of Clinical Toxicology, 2017, 7(5): 1-4.
- [26] Lee H, Ahn C H, Park T G. Poly [lactic-co-(glycolic acid)]-grafted hyaluronic acid copolymer micelle nanoparticles for target-specific delivery of doxorubicin [J]. Macromolecular Bioscience, 2009, 9 (4): 336-342.
- [27] Albano C, Gonzalez G, Palacios J, et al. PLLA-HA vs. PLGA-HA characterization and comparative analysis[J]. Polymer Composites, 2013, 34(9): 1433-1442.
- [28] Ghomi A R G, Mohammadi-Khanaposhti M, Vahidi H, et al. Fungus-mediated extracellular biosynthesis and characterization of zirconium nanoparticles using standard penicillium species and their preliminary bactericidal potential: A novel biological approach to nanoparticle synthesis [J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2019, 18(4): 2101-2110.
- [29] Robertson G T, Bonventre E J, Doyle T B, et al. *In vitro* evaluation of CBR-2092, a novel rifamycin-quinolone hybrid antibiotic: Studies of the mode of action in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(7): 2313-2323.
- [30] Piddock L J V, Jin Y F, Ricci V, et al. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999, 43(1): 61-70.
- [31] Weinstein M P, Deeter R G, Swanson K A, et al. Crossover assessment of serum bactericidal activity and pharmacokinetics of ciprofloxacin alone and in combination in healthy elderly volunteers [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991, 35 (11): 2352-2358.

(责任编辑:廖乾生)