

研究简报

环丙沙星-聚氨酯抗菌材料的水解和酶解初步研究

温志国¹, 李春艳², 胡从从², 黄剑华³, 董声雄^{*1,3}

(1. 福州大学, 化学化工学院, 福州 350108; 2. 福建医科大学, 药学院, 福州 350108;

3. 宁德师范学院, 化学与环境科学系, 宁德 352100)

摘要:生物材料周围的感染和组织损伤是材料表面的黏附细菌引起的。为了阻止感染的发生, 将环丙沙星共价结合到聚氨酯骨架中合成了环丙沙星-聚氨酯(CFPU)抗菌材料。在37℃, pH=7.4的PBS缓冲溶液条件下, 研究了CFPU的降解情况, 并对降解液的抗菌性能及细胞毒性进行了初步研究。研究表明, 合成的CFPU在模拟正常体液环境下一个月的药物损失在2%以内, 较好地保留了药物。在胆固醇酯酶存在的条件下, 药物的释放量明显大于空白实验, 并且酶浓度的提高加剧了CFPU中药物的释放, 基本达到了控制释放的效果。抗菌实验结果显示, 只有酶降解液具有抗菌活性, 最低抑菌浓度(MIC)为0.376 μg/mL。细胞毒性实验表明降解液呈弱毒性, 可以用于体内进行进一步的研究。

关键词:抗菌; 控制释放; 聚氨酯; 环丙沙星; 降解; 胆固醇酯酶

随着生物医学的发展, 对植入用生物医用材料的要求也越来越高, 植入材料所面临的感染问题也是研究者致力解决的重要问题之一。引起感染发生的主要原因是细菌的黏附和细菌生物膜的形成。将具有抗菌效果的离子和抗菌药物引入到高分子材料中, 使其具有抗细菌黏附和杀菌性能是制备抗菌材料的常用方法。聚氨酯材料具有良好的物理、化学性质、生物相容性及力学性能, 而且通过对其合成过程的设计可以得到具有各种不同性质的材料, 是一种理想的高分子载体材料。通过物理^[1~4]、化学^[5~11]和复合改性^[12~15]的方法将抗菌剂与聚氨酯结合在一起, 制备了各种具有抗菌性能的聚氨酯材料。

目前, 将抗感染药物——环丙沙星(CF)与高分子材料以共价键形式结合的研究还不多^[5, 7, 11, 16], 本课题组已经合成了环丙沙星-聚氨酯(CFPU)材料^[17, 18]。本文对合成的聚氨酯材料进行了酶降解和水解的初步研究, 讨论了材料在模拟人体液环境的缓冲溶液条件下稳定性, 通过研究不同酶浓度条件下的降解释放情况, 了解该材料控制释放环丙沙星的可行性。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

金黄色葡萄球菌(ATCC25923), 福建省疾病预防控制中心; 人胃癌细胞(SGC7901), 福建医科大学药理实验室; RPMI1640培养基干粉, Gibco公司; 胎牛血清, 天津H&Y公司, 澳大利亚原装进口分装; 四甲偶氮唑蓝(MTT), 杭州四季清公司; 胆固醇酯酶(CE), 美国Sigma公司; SHP-250型生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; BB5060型CO₂培养箱, 上海贺利氏公司; Mod550全自动酶标仪, 美国伯乐公司; 2450PC紫外可见分光光度仪, 上海光谱仪器有限公司; 透析袋(R-25-8K), 山东济南皓博生物技术有限公司。

1.2 样品制备

样品采用两步溶液聚合的方法合成, 具体合成方法见文献[18]。

收稿: 2011-01-17; 修回: 2011-04-29;

基金项目: 福建省科技厅资助省属高校项目(2008F50502);

作者简介: 温志国(1984-), 男, 博士研究生, 研究方向为生物医用高分子材料;

*通讯联系人: E-mail: sxdong2004@163.com.

1.3 工作曲线绘制及药物含量测定

精确称取一定量的标准品盐酸环丙沙星溶于磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=7.4), 配成一系列浓度的 CF 标准溶液。以 271nm 处溶液吸光度为纵坐标, CF 标准溶液浓度为横坐标, 可得到 CF-缓冲溶液标准工作曲线。

取适量浓度的样品溶液, 在 271nm 处测定溶液的吸光度, 通过工作曲线计算出溶液中的药物浓度。

1.4 CFPU 水解实验

取三个不同载药率的 CFPU(CFPU-1、CFPU-2、CFPU-3) 各约 0.5g, 置于锥形瓶中, 加入 100mL PBS 溶液, 在 37℃培养箱中培养。每天从各瓶中取出上清液 3mL 测定其药物含量, 并补充 3mL 新鲜 PBS 溶液。绘制 CF 累积释放浓度与时间的关系曲线。

1.5 酶降解实验

由于 CE 酶是大分子蛋白质, 分子量 54KDa, 为了消除 CE 酶对降解液药物浓度测定的影响, 利用截留分子量为 8k 的透析袋进行酶降解实验, 具体方法如下。

称取合成的 CFPU-3 约 6mg, 置于透析袋内, 加入 0.1mL CE 溶液用 PBS 缓冲液补足至 3mL, 扎牢, 浸入装有 5mLPBS 的试管中, 并以不加 CE 的 CFPU 组为空白对照, 置于 37℃恒温水浴中振荡(108r/min) 降解 32d。每天在透析袋中加入 100μL CE 溶液以维持酶活性, 每隔 3 天更换试管中的 PBS 缓冲液。

1.6 抗菌实验

用试管二倍稀释法测定两种降解液的抗菌活性及最低抑菌浓度(MIC)。取 8 根准备好的装有 1mL 肉汤的试管, 在第 1 试管中加入 1mL 的降解液, 混匀从中取 1mL 到第 2 试管中, 依次类推, 第 8 试管中的 1mL 弃去。在 8 根试管中都加入 0.1mL 菌液, 并用环丙沙星原料药做阳性对照编号为第 9 管, 空白肉汤管为阴性对照编号为第 10 管。于生化培养箱中 37℃培养 24h, 观察记录并分析结果。

1.7 细胞毒性实验

1.7.1 细胞与细胞培养 人胃癌细胞 SGC7901, 在 37℃、饱和 5%CO₂ 的培养箱中培养。培养液为含 10%小牛血清, 青霉素 100IU/mL、链霉素 100μg/mL 的 RPMI 1640 培养液。

1.7.2 CFPU 降解液的处理 取 CFPU-3 的降解液, 用 0.22μm 滤膜过滤, 每种降解液用纯血清配置成 3 个浓度, 每个浓度 3 份, 供体外实验用。

1.7.3 CFPU 降解液对细胞生长的抑制作用 MTT 法检测 CFPU-3 降解液的细胞毒作用。取对数生长期 SGC7901 细胞, 以全培养液稀释成 5×10^4 /mL 单细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板, 每个浓度复种 4 孔, 每孔 190μL, 降解液组每孔加不同浓度药液 10μL, 对照组加等量 RPMI 1640 培养液, 共培养 48h, 反应结束前 4h, 每孔加入 50μL 的 MTT 溶液(1mg/mL)。继续培养 4h, 小心吸尽上清, 每孔加入 200μL DMSO 充分溶解 MTT 还原产物。酶标仪检测 570nm 波长下的光密度并按式(1)计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组的 OD 值} - \text{药物组的 OD 值}}{\text{对照组的 OD 值}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果讨论

CFPU-1、CFPU-2 及 CFPU-3 样品各组分含量见表 1。

表 1 CFPU 样品各组分载药率
Table 1 Drug contents of CFPU samples

样品	原料比例(HDI:PCL:CF)	载药率/%	理论药物含量/%
CFPU-1	1:0.6:0.4	12.8	12.6
CFPU-2	1:0.66:0.34	8.3	10.2
CFPU-3	2:1:1	16.6	17.3

2.1 CFPU 水解实验

在 PBS 溶液中, 三种载药率的 CFPU 药物释放累积浓度曲线见图 1, 最终药物释放情况见表 2。

从图 1 以及表 2 中释药量数据来看, CFPU 在 PBS 中的药物释放量很小。其中 CFPU-1 和 CFPU-3 两种样品, 虽然载药率高, 但一个月内的药物释放量占 CFPU 中所含药物不到 1%, 样品 CFPU-2 的药物释放量为其所含药物量的 2% 以内。以此推测, 若将其应用于体内, 材料在正常体液条件下, 药物可以保留比较长的时间而损失很小。

2.2 酶降解实验

2.2.1 降解液中药物累积浓度曲线 以降解液中药物的累积浓度为纵坐标, 降解天数为横坐标, 绘制降解释药累积曲线见图 2。

表 2 不同载药率 CFPU 的药物释放情况

Table 2 Drug release from CFPUs

	CFPU-1	CFPU-2	CFPU-3
样品质量/g	0.502	0.502	0.501
药物含量/%	12.80	8.30	16.60
药物质量/g	0.0643	0.0417	0.0832
释药质量/g	5.45×10^{-4}	7.82×10^{-4}	7.77×10^{-4}
释药量/%	0.85	1.88	0.93

由图 2 可以看出, CFPU 在 PBS 中也可以缓慢释放出少量的环丙沙星, 但很快就达到平衡, 不再释放药物。在 CE 存在条件下, 环丙沙星的释放量要大于在 PBS 中的释放量, 且随着时间的延长, 释放越多, 逐渐趋于平衡。由图 2 可知, 材料在 CE 存在条件下具有不同于在 PBS 中的释药行为。

2.2.2 不同 CE 酶浓度对 CFPU-3 降解的影响 不同 CE 酶浓度下, CFPU-3 的降解释药累积浓度曲线如图 3 所示。

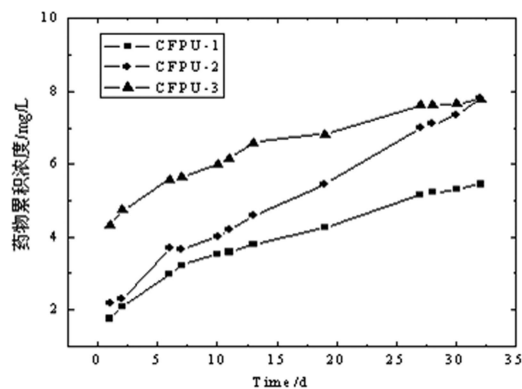


图 1 CFPU 样品药物释放累积浓度曲线

Figure 1 Cumulative drug release curves of CFPUs

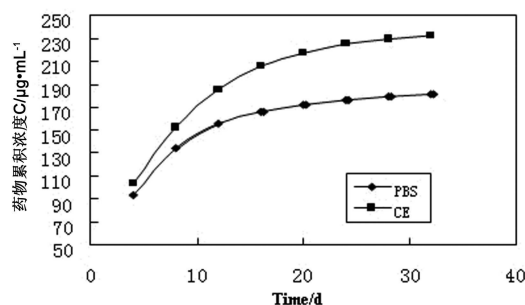


图 2 CFPU-3 降解液的释药累积曲线

Figure 2 The cumulative released curves of degradations of CFPU-3

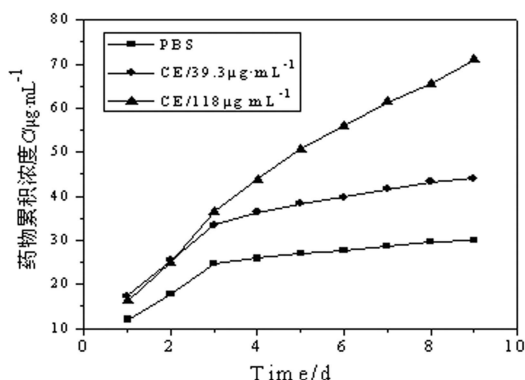


图 3 CFPU-3 在不同酶浓度下降解液的释药累积曲线

Figure 3 Cumulative released curve of degradations of CFPU-3 in different enzyme concentrations

由图 3 可知, CFPU-3 在 PBS 中保持相对惰性, 而随 CE 浓度增高降解液中的 CF 浓度增大, 说明了 CFPU-3 对 CE 具有响应能力。即当在炎症产生时, CE 的释放可以使 CFPU-3 降解释放出抗菌药物 CF; CE 酶释放越多, 浓度越大, CFPU-3 降解释放出的 CF 越多, 基本符合智能型药物释放系统的要求。

2.3 抗菌实验

CFPU-3 的 PBS 与 CE 降解液对金黄色葡萄球菌的抗菌活性结果见表 3。

表 3 CFPU-3 降解液的抗菌活性结果

Table 3 The antibacterial activity of CFPU-3 degraded solution

菌种	样品	试管编号									
		1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10
金黄色葡萄球菌	PBS 降解液	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	CE 降解液	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

注:“-”表示无细菌生长,“+”表示有细菌生长。

a. PBS 降解液第 1 管浓度为 $36.5 \mu\text{g/mL}$; CE 降解液第 1 管浓度为 $48.128 \mu\text{g/mL}$ 。

从表 3 中可以看出, CFPU-3 在 PBS 中的降解液均没有抗菌作用, 而在 CE 中的降解液有抗菌作用, 其对内植物感染的主要致病菌金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度 MIC 为 $0.376 \mu\text{g/mL}$, 高于原料药 CF 对金黄色葡萄球菌的 MIC^[19] 为 $0.125 \sim 0.25 \mu\text{g/mL}$ 。其原因可能是降解液中除了游离的 CF 外, 还有含有 PCL 或 HDI 部分链段的 CF 衍生物, 这些衍生物中有些并不具有抗菌活性。

结果说明, CFPU-3 在模拟非炎症条件下不释放或释放未达 MIC 浓度的抗菌药物; 在 CE 酶的作用下能降解出有抗菌活性的游离药物, 从而有效地抑制内植物感染的发生, 达到智能可控释放抗菌药物的要求。

2.4 细胞毒性实验

CFPU-3 的降解液对体外培养胃癌细胞 SGC7901 作用 48h 后, 按公式(1)计算的抑制率结果见表 4。

表 4 CFPU-3 降解液的细胞毒性试验结果

Table 4 The cell toxicity results of CFPU-3's degraded solution

样品名称	降解液药物浓度梯度 $\mu\text{g/mL}$	抑制率/%
PBS 降解液	36.50	45.7
	18.25	31.3
	9.125	29.9
	48.128	54.1
CE 降解液	24.064	34.8
	12.032	38.7

从表 4 中可知 CFPU-3 的降解液对体外培养胃癌细胞 SGC7901 的抑制作用较小, 大多抑制率都在 50% 以下, 按照美国药典中细胞相对增殖率与细胞毒性分级的关系可以得出: CFPU-3 降解液的细胞毒性在 1~2 级之间, 属于弱毒性。

3 结论

对所合成的 CFPU 抗菌材料进行的降解实验表明, 材料在正常体液条件下, 药物可以保留比较长的时间而损失很小, 从而在炎症发生的时候有可能释放出足够的药物发挥抗菌消炎作用。这一点可以从酶降解的对照实验可以看出。CFPU 在 CE 存在条件下, 环丙沙星的释放量要大于在 PBS 中的释放量。随着 CE 酶浓度的增加, 环丙沙星的释放也增加, 体现了 CFPU 材料对 CE 的响应释放, 可以作为一种控制释放材料。

抗菌实验结果表明, CFPU 材料只在 CE 酶存在条件下释放出足够浓度的活性药物, 杀死内植物感染的主要致病菌——金黄色葡萄球菌, 其最低抑菌浓度为 $0.376 \mu\text{g/mL}$ 。

CFPU 材料在 PBS 和 CE 条件下的降解液仅有弱毒性, CFPU 材料本身的毒性还有待进一步验证。材料的毒性主要是锡催化剂残留引起的, 因此需要对去除锡残留的方法进行进一步研究。

参考文献:

- [1] Crisante F, Francolini I, Bellusci M. Eur J Pharm Sci, 2009, 36(4 ~ 5): 555 ~ 564
- [2] Phaneuf M D, Bide M J, Szycher M, Gale M B, Huang H, Yang J C, Legerfo F W, Quist W C, Asaio J, 2001, 47(6): 634 ~ 640
- [3] Basak P, Adhikari B, Banerjee I, Maiti T K. J Mater Sci Mater Med, 2009, 20 Suppl 1: S213 ~ S221
- [4] 程莉萍, 胡英, 郑昌琼, 唐小红. 生物医学工程研究, 2004(04).
- [5] Woo G L Y, Yang M L, Yin H Q, Jaffer F, Mittelman M W, Santerre J P. J Biomed Mater Res, 2002, 59(1): 35 ~ 45
- [6] Yang S, Lee Y J, Lin F, Yang J, Chen K. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 2007, 83 B(2): 304 ~ 313
- [7] Woo G L Y, Mittelman M W, Santerre J P. Biomaterials, 2000, 21: 1235 ~ 1246
- [8] Grapski J A, Cooper S L. Biomaterials, 2001, 22(16): 2239 ~ 2246
- [9] 钟达飞, 谢伟, 鲍俊杰, 许戈文. 涂料工业, 2007, 37(9): 37 ~ 39
- [10] 詹媛媛, 李莉, 钟达飞, 许戈文. 中国胶粘剂, 2008, 17(7): 20 ~ 23
- [11] 李进进, 朱南康, 陈国强. 国外丝绸, 2009, 26 ~ 28(3).
- [12] Piozzi A, Francolini I, Occhiperti L, Venditti M, Marconi W. Int J Pharm, 2004, 280(1 ~ 2): 173 ~ 183
- [13] Francolini I, D' Ilario L, Guaglianone E, Donelli G, Martinelli A, Piozzi A. Acta Biomater, 2010, 6(9): 3482 ~ 3490
- [14] 罗建斌, 王鹏, 谭鸿. 四川大学学报(工程科学版), 2005, 37(6): 87 ~ 91
- [15] 周箭, 杨辉, 陈日新. 稀有金属材料与工程, 2004(z1): 262 ~ 264
- [16] Yang M L, Santerre J P. Biomacromolecules, 2001, 2(1): 134 ~ 141
- [17] 温志国, 叶艳秋, 黄剑华, 郑巧燕, 董声雄, 李春艳. 功能材料, 2007, 38(supplement): 1961 ~ 1963
- [18] 李春艳, 出端艳, 单丽, 温志国, 黄剑华. 功能材料, 2010, 41(4): 730 ~ 733
- [19] 刘涤洁, 陈杖榴, 冯淇辉. 中国兽医学报, 22(3): 276 ~ 278

Study on Hydrolyzation and Enzymatic Degradation of Ciprofloxacin-polyurethane

WEN Zhi-guo¹, LI Chun-yan², HU Cong-cong², HUANG Jian-hua³, DONG Sheng-xiong^{1, 3}

(1 College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

2 Faculty of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China;

3 Dept of Chemistry and Environmental Science, Ningde Normal University, Ningde 352100, China)

Abstract: The infection and tissue damage around the biomaterials are mainly caused by the bacterial adherence to the surface of the material. A new kind of antibacterial ciprofloxacin-polyurethane (CFPU) was synthesized in order to prevent the infection. The degradation of CFPU in the phosphate-buffer saline (PBS) (pH = 7.4, 37 °C) was studied. The antibacterial ability and the cytotoxicity of the degradation solutions were assayed. The results showed that ciprofloxacin (CF) was kept effectively in CFPU while the drug loss was below 2 % under the mimetic humoral condition. In the presence of cholesterol esterase (CE), CF release was obviously larger than in the PBS only. Hence, the increase of the concentration of CE accelerated the release of CF, which indicated the control release ability of the material. The enzymatic degradation showed an ability to kill bacteria and the minimum inhibitory concentration (MIC) was measured as 0.376 μg/mL. The degradation solutions were hypotoxicity according to the MTT assay.

Key words: Antibacterial; Control release; Polyurethane; Ciprofloxacin; Degradation; Cholesterol esterase