

埃洛石纳米管/葡萄糖酸氯己定复合抗菌剂的制备及其抗菌性能研究

吴 雨 杨勇涛 陈 云 田卫群*

(武汉大学基础医学院生物医学工程系, 武汉 430071)

摘 要 通过埃洛石纳米管(HNTs)负载葡萄糖酸氯己定(CG)制备新型的 HNTs/CG 复合抗菌剂。采用透射电镜表征 HNTs 的形貌结构, 红外光谱表征 HNTs/CG 复合物的结构, 抑菌圈法测试 HNTs/CG 复合抗菌剂的抗菌性能, 扫描电镜观察金黄色葡萄球菌与 HNTs/CG 复合物作用后形态的变化情况, 并通过急性经口毒性实验评价 HNTs/CG 复合物的短期毒副作用。结果表明: CG 药物成功负载在 HNTs 管腔中, HNTs/CG 复合抗菌剂对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有良好的抑制效果; 金黄色葡萄球菌与 HNTs/CG 复合物作用后, 导致细胞壁破裂而死亡, 另外, 不同剂量的 HNTs/CG 复合抗菌剂均未引起小鼠脏器各组织的病理学改变。因此, HNTs/CG 复合抗菌剂是一种无毒的新型纳米抗菌复合材料。

关键词 埃洛石纳米管, 葡萄糖酸氯己定, 复合抗菌剂, 抗菌活性

Preparation and antibacterial activity of HNTs/CG composite

Wu Yu Yang Yongtao Chen Yun Tian Weiqun

(Department of Biomedical Engineering, School of Basic Medical Sciences,
Wuhan University, Wuhan 430071)

Abstract An antibacterial drug chlorhexidine gluconate (CG) was introduced to the lumen of halloysite nanotubes (HNTs) to prepare a new antibacterial composite. Transmission electron microscopy (TEM) was used to analyze the morphology of HNTs, the structure of HNTs/CG composite was characterized by fourier transform-infrared (FT-IR), the antibacterial effect was tested by inhibition zone test. The morphology of *S.aureus* was observed by scanning electron microscopy (SEM) after incubation with HNTs/CG. The acute oral toxicity test was conducted to evaluate the toxic side effects of HNTs/CG in the short term. The results showed that the drug was successfully loaded on HNTs, and the HNTs/CG showed excellent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) and *Escherichia coli* (*E.coli*). The cell wall of *S.aureus* incubated with HNTs/CG which disrupted and killed the bacterial. In addition, HNTs/CG did not cause histopathologic changes to the various organs of tested mice. The results suggested that HNTs/CG was a non-toxic new nanoantibacterial composite material.

Key words halloysite nanotube, chlorhexidine gluconate, antibacterial composite, antibacterial activity

葡萄糖酸氯己定(CG)是一种双胍氯苯类消毒剂, 具有广谱抗菌活性。目前, 葡萄糖酸氯己定被广泛应用于口腔医疗, 对于预防牙槽骨炎的发生有良好效果。有研究表明, 葡萄糖酸氯己定在皮肤的消毒上具有持续抗菌活性^[1]。氯己定盐是阳离子表面活性剂, 碱性物质如肥皂、阴离子表面活性剂、某些银离子药物能降低其杀菌效果^[2]。因此需要一种抗菌剂载体去保护抗菌剂不受外界物质破坏。

埃洛石纳米管 $[\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}]$ 是一

种天然来源的硅铝酸盐矿物, 具有典型的中空管状结构, 由于其多层片状结构, 纳米管具有独特的理化特性^[3-4]。纳米管外表面是 S—O—Si 基团, 含有少量羟基, 内表面是 Al—OH。埃洛石纳米管长 0.5~1 μm , 外径 50nm, 内径 15nm^[5]。埃洛石纳米管管腔特殊, 可以负载各种活性分子(药物^[6-7]、核酸^[8]、金属离子^[9-10]), 形成一种核壳结构能够阻止活性分子与外界基质直接接触^[11]。埃洛石纳米管来源丰富, 价格低廉(4 美元/kg), 其每年全球供应成千上

基金项目: 国家自然科学基金(81471789)

作者简介: 吴雨(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事纳米材料及其应用研究。

联系人: 田卫群, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事纳米生物材料及其控释给药系统研究。

万吨,相比于产量低下、价格昂贵(500 美元/kg)的碳纳米管来说,埃洛石纳米管更容易实现大规模工业化应用^[12]。

本研究以无机埃洛石纳米管为抗菌剂载体负载有机抗菌剂葡萄糖酸氯己定,结合二者的优点,制备了一种新型核壳结构的抗菌复合物,具有应用于生物医疗领域或工业领域的潜能。

1 实验部分

1.1 材料

埃洛石纳米管[HNTs,主要成分为 $\text{Al}_2(\text{OH})_4\text{-Si}_2\text{O}_5$],郑州金阳光陶瓷有限公司;葡萄糖酸氯己定(CG, $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{14}$),武汉荆楚陈氏医药化工有限公司;金黄色葡萄球菌、大肠杆菌,中国典型培养物保藏中心;其他试剂均为分析纯;实验室所用水均为去离子水。

1.2 HNTs/CG 复合抗菌剂的制备

采用真空抽吸方式产生的负压将小分子药物CG引入到HNTs中。称取0.05g HNTs加入到药物的饱和溶液中,在真空泵下边抽真空边磁力搅拌,真空维持30min后,恢复室压5min,为了获得最佳负载率,上述过程重复2次。负载过程完成之后,将HNTs/CG混悬液在9000r/min条件下离心10min,然后用去离子水清洗2次以除去未结合的药物。最后将获得的沉淀放在50℃烘箱干燥后即可得到HNTs/CG复合抗菌剂。

1.3 测试与表征

将HNTs粉末分散于无水乙醇后,超声30min后制成样品悬浮液。将悬浮液滴到镀碳铜网上,干燥后在透射电镜(TEM, Tecnai12型,美国FEI公司)下观察,加速电压为120kV;采用傅里叶红外光谱仪(FT-IR, TNZ1-5700型,美国Nicolet公司)表征HNTs和HNTs/CG复合抗菌剂的结构,扫描范围 $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$;将金黄色葡萄球菌分别与纯HNTs和HNTs/CG复合抗菌剂共培养后,收集菌体,用2.5%的戊二醛固定4h后干燥,然后在离子溅射仪喷金后,用扫描电镜(SEM, VEGA3型,捷克TESCAN公司)观察金黄色葡萄球菌的形态变化,加速电压为10~20kV。

1.4 抑菌圈实验

配制LB液体培养基,121℃灭菌30min。挑取2环菌种于5mL无菌液体培养基,在37℃恒温摇床震荡24h后,将菌悬液稀释至浓度为 10^5CFU/mL 。在LB液体培养基中加入琼脂配制LB固体培养基,

取100 μL 菌悬液涂布在固体平板上,然后在平板中央打一个直径为8mm的孔,分别取0.02g纯HNTs与HNTs/CG复合抗菌剂加入到孔中,再用无菌水润湿。将此平板放到37℃恒温培养箱中倒置培养24h后观察结果。

1.5 急性经口毒性实验

健康昆明小鼠40只,体重为18~22g,雌雄各半,随机分成4组,每组10只,分为3组不同剂量组(1000mg/kg体重、3000mg/kg体重和5000mg/kg体重)和空白对照组(生理盐水)。实验组采用灌胃方式以一次20mL/kg体重对小鼠灌胃。灌胃后小鼠需禁食1~2h。给予受试物后,在观察期内记录动物死亡数、死亡时间及中毒表现等现象。在实验开始和结束时称取并记录动物体重,并且在观察期每周至少称取动物体重1次。在观察期结束后,将受试动物的组织器官心、肝、脾、肺和肾取出做病理组织切片,评估可能毒作用的靶器官。

2 结果与讨论

2.1 TEM 分析

HNTs的TEM图见图1。由图可知,HNTs呈均匀的中空管状结构,两端开口不封端,中间管腔清晰可见。HNTs长0.2~1 μm ,内径10~20nm,外径20~50nm。它的天然管状结构为药物的负载提供了可能,使其成为一种优良的功能材料载体。

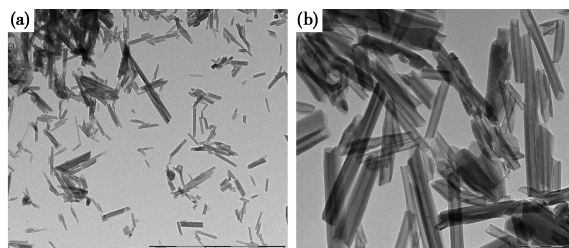


图1 不同分辨率下HNTs的TEM图
[(a)2 μm ;(b)200nm]

2.2 FT-IR 分析

为了判断药物是否成功负载到纳米管上,利用FT-IR进行分析,结果见图2。由图2曲线(a)可知,3694和3622 cm^{-1} 处为内表面 Al_2OH 的伸缩振动吸收峰,一个—OH连接两个Al原子。1638 cm^{-1} 处为HNTs内部结合水的弯曲振动吸收峰。911和536 cm^{-1} 处分别为内部—OH和Si—O的弯曲振动吸收峰。对比于HNTs,HNTs/CG复合抗菌剂不仅具有其特征吸收峰,还在1579和1492 cm^{-1} 处具有药物分子苯环骨架的振动吸收峰。

所以可以判断药物分子成功负载在 HNTs 上。

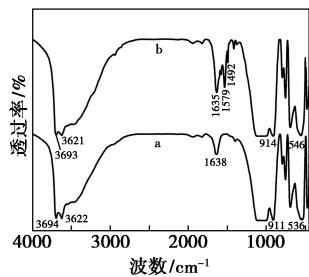


图 2 HNTs(a)和 HNTs/CG 复合抗菌剂(b)的 FT-IR 谱图

2.3 抑菌圈实验

HNTs 和 HNTs/CG 复合抗菌剂的抑菌圈实验结果见图 3。由图可知,HNTs 对金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和大肠杆菌(*E.Coli*)都没有形成抑菌圈,而 HNTs/CG 复合抗菌剂周围出现明显的抑菌圈。结果表明,HNTs 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌没有抗菌效果,而 HNTs/CG 复合抗菌剂表现出显著的抗菌性,也进一步证明了抗菌药物成功负载到了 HNTs 上。纯纳米管材料没有抗菌活性,当抗菌药物负载到纳米管中后,抗菌药物可以从管腔中缓慢释放与细菌作用从而起到杀菌的作用^[13]。

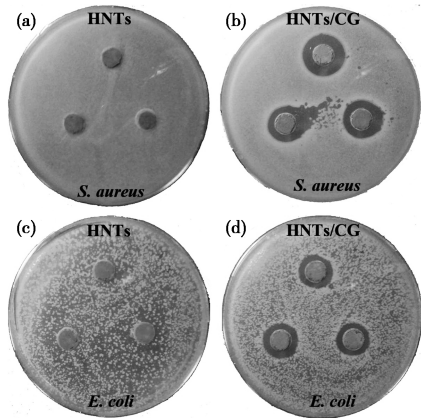


图 3 HNTs 和 HNTs/CG 复合抗菌剂的抑菌圈实验结果示意图

[HNTs 的抑菌圈实验:(a)金黄色葡萄球菌,(b)大肠杆菌; HNTs/CG 复合抗菌剂的抑菌圈实验:(c)金黄色葡萄球菌,(d)大肠杆菌]

2.4 SEM 分析

为了初步探索 HNTs/CG 复合抗菌剂的抗菌机理,使用 SEM 观察金黄色葡萄球菌与 HNTs 和 HNTs/CG 复合抗菌剂作用后细菌的形态变化情况,结果见图 4。由图可知,与 HNTs 共培养后的细菌细胞形态保持完整,而与 HNTs/CG 作用后的金黄色葡萄球菌细胞失去完整性,细菌细胞壁破裂,内

含物外渗,从而使细胞失去活性。抗菌药物的杀菌机理可能是由于葡萄糖酸氯己定带正电荷,可以吸附到细菌表面带负电荷的磷酸基团,并逐渐渗入细胞浆的类脂层和蛋白质层,从而改变细胞膜的通透性,使细胞内含物外渗,导致微生物死亡^[14]。

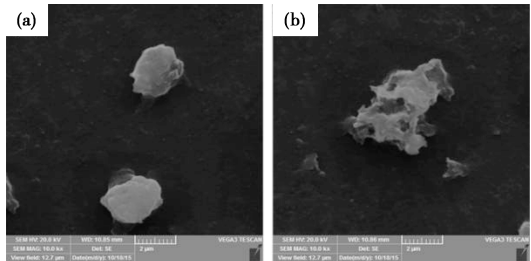


图 4 金黄色葡萄球菌与 HNTs(a)和 HNTs/CG 复合抗菌剂(b)共培养后的 SEM 图

2.5 急性经口毒性实验

HNTs/CG 复合抗菌剂在实际应用之前必须考虑到它的安全性问题。急性经口毒性实验用来评价 HNTs/CG 复合抗菌剂短期内在昆明小鼠体内出现的毒副作用,结果见表 1。由表可知,灌胃不同剂量受试物的昆明小鼠在两周内既没有死亡,也没有出现体重下降的情况。在观察的两个星期内,小鼠进食、饮水和活动状态都没有受到影响。表明该复合抗菌剂对昆明小鼠的经口急性毒性 LD₅₀ 在 5000mg/kg 体重者以下范围,是属于低毒的范围。

表 1 HNTs/CG 复合抗菌剂的急性经口毒性实验

剂量/ (mg·kg ⁻¹)	数量	质量/g		
		0d	7d	14d
1000	10	27.32±2.77	31.15±3.60	37.35±3.80
3000	10	26.13±1.86	29.87±4.99	36.60±3.47
5000	10	26.10±1.79	26.94±1.58	32.77±1.68

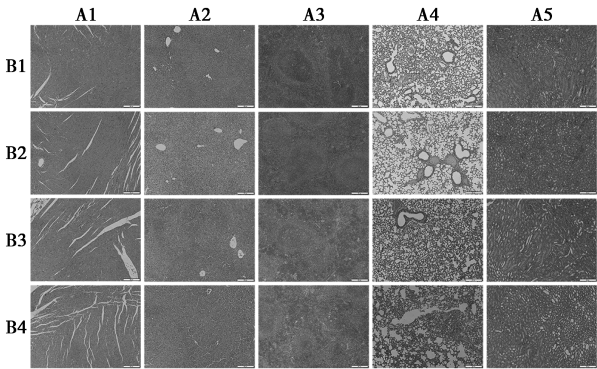


图 5 观察期结束后不同剂量组(B1:空白对照;B2: 1000mg/mL;B3: 3000mg/mL;B4: 5000mg/mL)的昆明小鼠的各种组织器官(A1:心;A2:肝;A3:脾;A4:肺;A5:肾)HE 染色图

在观察期结束后,取出各剂量组的实验昆明小鼠的心、肝、脾、肺和肾,进行测试,其 HE 染色图见图 5。由图可知,与对照组昆明小鼠相比,受试动物的各组织也没有出现明显的病理学变化,表明即使高剂量 HNTs/CG 复合抗菌剂组也没有损伤小鼠的各组织器官。该结果初步显示 HNTs/CG 复合抗菌剂是一种无毒的新型复合物,但是关于纳米材料的长期安全性问题在未来还需要更多的体内或体外实验去证明。

3 结论

制作了一种新型 HNTs/CG 复合抗菌剂,研究发现其具有优良的抗金黄色葡萄球菌和大肠杆菌效果,其作用机理是通过抗菌剂破坏细菌细胞壁结构,使细胞内含物外渗,导致细菌死亡;急性经口毒性评价结果表明 HNTs/CG 复合抗菌剂是一种无毒的新型纳米抗菌复合材料,具有应用于生物材料和工业领域的潜力。

参考文献

- [1] Bhavien H, Kapadia M D, Randa K, et al. A randomized, clinical trial of preadmission chlorhexidine skin preparation for lower extremity total joint arthroplasty[J]. The Journal of Arthroplasty, 2016, 31(12): 2856-2861.
- [2] 邱凯. 氯己定类消毒剂的研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2010, 27(4): 460-462.
- [3] Lecouvet B, Gutierrez J G, Sclavons M, et al. Structure-property relationships in polyamide 12/halloysite nanotube nanocomposites[J]. Polymer Degradation and stability, 2011, 96(2): 226-235.
- [4] Guo B, Chen F, Lei Y, et al. Styrene-butadiene rubber/halloysite nanotubes nanocomposites modified by sorbic acid[J]. Applied Surface Science, 2009, 255(5): 7329-7336.
- [5] Fix D, Andreeva D V, Lvov Y M, et al. Application of inhibitor-loaded halloysite nanotubes in active anti-corrosive coatings[J]. Advanced Functional Materials, 2009, 19(11): 1720-1727.
- [6] Xue J J, Niu Y Z, Gong M, et al. Electrospun microfiber membranes embedded with drug-loaded clay nanotubes for sustained antimicrobial protection[J]. ACS Nano, 2015, 9(2): 1600-1612.
- [7] Lvov Y M, Shchukin D G, Möhwald H, et al. Halloysite clay nanotubes for controlled release of protection agents[J]. ACS Nano, 2008, 2(5): 814-820.
- [8] Shi Y F, Tian Z, Zhang Y, et al. Functionalized halloysite nanotube-based carrier for intracellular delivery of antisense oligonucleotides[J]. Nanoscale Research Letters, 2011, 6(1): 608.
- [9] Abdullayev E, Abbasov V, Tursunbayeva A, et al. Self-healing coatings based on halloysite clay polymer composites for protection of copper alloys[J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2013, 5(10): 4464-4471.
- [10] Abdullayev E, Sakakibara K, Okamoto K, et al. Natural tubule clay template synthesis of silver nanorods for antibacterial composite coating[J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2011, 3(10): 4040-4046.
- [11] Shchukin D G, Lamaka S V, Yasakau K A, et al. Active anticorrosion coatings with halloysite nanocontainers[J]. Journal of Physical Chemistry C, 2008, 112(4): 958-964.
- [12] Yuan P, Tan D, Annabi-Bergaya F. Properties and applications of halloysite nanotubes: recent research advances and future prospects[J]. Applied Clay Science, 2015, 112-113: 75-93.
- [13] Meng N, Zhou N L, Zhang S Q, et al. Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 382(1): 45-49.
- [14] Fraser N S, Johnson A K, Wilborn R, et al. Evaluation of chlorhexidine hydrochloride treatment on endometrial health of normal mares[J]. Theriogenology, 2017, 88: 61-66.

收稿日期: 2017-02-24

我国在太平洋发现大面积富稀土

据悉,“向阳红 01”科考船已经圆满完成中国首次环球海洋综合科学考察第五航段暨中国大洋 46 航次第四航段的科考任务。在该航段的作业中,科考队在东南太平洋海域首次发现了大面积富稀土沉积,刷新了我国和国际上深海稀土资源的调查研究的新纪录。

大洋 46 航次第四航段对东南太平洋约 260 万 km² 范

围内的深海盆地进行了海洋地质调查和环境综合考察,科考队员根据对沉积物现场元素测试数据、浅地层和多波束测量资料的综合分析,在东南太平洋深海盆地内初步划分出了面积约 150 万 km² 的富稀土沉积区。这是国际上首次在东南太平洋海域发现大范围富稀土沉积,为在该区域深入开展深海稀土资源调查和相关环境研究奠定了基础。(新型)