

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2020.02.007

pH 敏感性可注射型醛基瓜尔豆胶-托普霉素 自愈抗菌水凝胶及其性质

程 淼¹, 王怀生¹, 程 霜²

(1.聊城大学化学化工学院, 山东 聊城 252000)

(2.聊城大学农学院, 山东 聊城 252000)

[摘要] 微生物感染是当今严重危害人类健康、威胁人类安全的公共卫生问题之一,有效抑制微生物感染特别是抑制其耐药性是当今研究热点,抗生素水凝胶作为一种新型生物响应医学材料,能实现缓释靶位给药,达到清除微生物的目的.本研究以氧化瓜尔豆胶作为生物相容性好的可降解天然多糖为骨架,通过席夫碱反应(可逆亚胺键)接枝托普霉素制备了一种可自愈、原位注射成型的酸敏感性抗菌水凝胶,并研究了它们的流变学、自愈能力、可注射性、pH 响应性、生物相容性和体外抗菌性能.结果表明,凝胶能负载相当量的托普霉素,凝胶具有优异的自愈性能、良好的切稀和可注射性,呈现酸敏给药模式.扫描电镜显示所得水凝胶成多孔网络结构,适合药物、细胞或生物大分子的运载,适于微创抗感染治疗手术的实施,具有潜在的应用价值.

[关键词] 醛基瓜尔豆胶,托普霉素,水凝胶,流变学,可注射,自愈,pH 敏感性,抗菌活力

[中图分类号]TS201.7 [文献标志码]A [文章编号]1001-4616(2020)02-0034-09

Injectable pH-sensitive Antibacterial Hydrogel Based on Aldehyde-Guar and Tobramycin and Its Properties

Cheng Miao¹, Wang Huai sheng¹, Cheng Shuang²

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China)

(2.College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China)

Abstract: Microbial infection is one of the underlying causes of death in the world, which imposes the threat to the public health. To fight against infection and overcome the resistance of microbial has drawn great research interest in materials science and engineering. Polymer hydrogels based on antibiotics have been highly pursued due to the excellent antimicrobial ability, biocompatibility, biodegradability and negligible toxicity. The stimuli-responsive characteristic, bio-inspired functions and rheological properties of the hydrogel which was facilely prepared simply by fabricating aldehyde-guar gum and tobramycin in situ deposition, with its antibacterial ability against *E. coli* and cytocompatibility were extensively evaluated in this paper. The results reveal that the smart injectable self-healing hydrogel prepared through the dynamic Schiff base possesses satisfactory rheological properties and sufficient drug loading capability, which presents a self-healing acid sensitive tobramycin sustained release profile after inject in situ and can be used as a practical platform for drug-delivery with distinct applications of antimicrobial. The composite hydrogel is exceptionally propitious to accelerate treatment potential of infection for its porous microstructure, it also is the appropriate biocarrier for cell, drug and macromolecules delivery in the biomedical field.

Key words: aldehyde-guar, tobramycin, composite hydrogel, rheological characteristics, injectable, self-healing, pH-sensitive, antibacterial activity

收稿日期:2019-09-06.

基金项目:国家自然科学基金项目(21375055).

通讯联系人:王怀生,教授,研究方向:生物电分析化学. E-mail:hswang@lcu.edu.cn;程霜,教授,研究方向:食品与药物安全. E-mail:chengshuang@lcu.edu.cn

21 世纪以来,微生物感染仍然是一个难以解决的难题^[1],尽管抗生素治疗是一种更有效的病原菌控制方法,但由于抗生素穿透性、依从性较差,有一定副毒作用,且被动扩散的传统给药方式限制了抗生素作用的发挥.特别是在过去 10 年里,滥用抗生素所致的细菌耐药性成为影响人类健康的全球性公共卫生问题,重新出现的病原微生物所致感染性疾病也给研究人员和公共卫生体系带来了严峻的挑战^[2],针对这一极具挑战性的医学难题,迫切需要开发抗菌新材料和新方法^[3].一方面,研究人员通过不断努力寻求开发具有新作用机制的新型抗生素和各类抗菌生物材料,以抵抗日益严重的多药阻滞^[4];另一方面,需要优化抗生素的药代动力学和药效学,改变抗菌素的使用模式,以提高治疗效果,降低毒性和产生耐药性的风险.由于新型抗菌素的开发周期较长,难于满足现实需求;新型药物给药系统(DDSs)具有合适的位点特异性和控制药物释放特征,吸引人们使用新型药物给药系统等潜在的药物工具.对现有药物的应用拓展进行研究有助于克服抗生素耐药问题,因而高分子生物膜、抗菌疫苗、纳米材料、水凝胶等生物材料^[5]受到了科研人员的青睐.

水凝胶是一类亲水性的高分子网络体系,物理特性类似于软组织,有诸多独特的优点,在各个领域,特别在生物医学用途领域受到越来越多的关注.水凝胶具有良好的生物相容性、药物分散增溶性、靶向药物输送和药物缓释等特征,可用于靶向递送药物和其他生物活性分子的持续局部长时间给药,达到控制性治疗的目标^[6-8].考虑到生物安全性,相比合成水凝胶,天然材料基质水凝胶在生物医学领域受到了更为广泛的关注^[9],天然多糖作为一类可再生、环保、可降解的生物材料,在药物运载应用领域备受青睐,大多数多糖本质上是生物相容的,具备灵活的加工性能,可作特定部位靶向性给药系统天然赋形剂,且部分多糖具有包括光、热、酶、pH 等应激响应特征,可通过应激触发孤立链和交联链的相变,提供在受影响的组织或细胞中特异性释放药物的可能性,并/或使释放谱适应疾病的演变或特定的生理事件,可构建对其作用微环境应激响应的智能生物材料,特别是具有自愈功能的多糖水凝胶极具吸引力和应用前景^[5,10-12].

瓜尔豆胶是一种水溶性中性多糖,来源于草本抗旱植物豆科植物瓜尔豆(*Cyamopsis tetragonolobus*)种子,具有独特的分子结构特点,由线性链 β -D-(1 \rightarrow 4)半乳糖苷(mannopyranosyl)和 α -D-(1 \rightarrow 6)甘露糖苷(galactopyranosyl)构成^[13].天然瓜尔胶溶于热水形成高粘度胶体和凝胶结构,与其他膳食纤维一样,对口腔、胃和小肠中的酶降解有抗性,但对结肠中的微生物降解很敏感,这一独特特征极其有利于瓜尔豆胶作为功能性药物生物材料提供靶向药物运载^[14].本研究利用瓜尔豆胶原料构建可注射性 pH 敏感型水凝胶用作载体运载模型抗生素—托普霉素,并考察其流变学性能以及抗菌效果.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

瓜尔豆胶,购自上海生工工程公司,托普霉素,购自 TCI;NaIO₄ MTT、乙二醇、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄ 购自 sigmaaldrich, LB 琼脂和 LB 肉汤培养基购自 USB,鸡 *Escherichia coli* (*E. coli*) 由动物科学与医学实验室提供, Hep G-2 细胞系购自中科院上海细胞库. Discovery RH-1 流变仪,美国 TA 公司;Ti 荧光倒置显微镜,日本尼康公司;UV-2700 紫外可见光光度计,日本岛津公司.

1.2 实验方法

1.2.1 醛基-瓜尔豆胶的制备

利用高碘酸盐氧化法制备醛基瓜尔豆胶.具体为:1.0 g (2.5 mmol) 瓜尔豆胶分散于 60 °C 的 100 mL 超纯水中配成 10 mg/mL 的胶液,瓜尔豆胶完全溶解后加入氧化剂 NaIO₄ 溶液,混合液不断搅拌,在室温下避光反应 12 h,然后加入竞争抑制剂乙二醇 2.0 mL 继续搅拌 2 h 中和未反应的 NaIO₄,所得溶液用超纯水透析 3 天(MWCO 8 000~14 000),其间频繁换水,达到彻底透析,冻干获得白色蓬松海绵状产物,采用三硝基苯磺酸盐(TNBS)法测定聚合物中醛基的数量,以确定瓜尔豆胶的氧化程度.

1.2.2 交联水溶胶的制备

将 Tobramycin 和醛基瓜尔豆胶粉末分别溶于 0.1 mol/L 的不同 pH 缓冲液中,在室温下简单混合,涡流震荡,确保溶液混合均匀,控制醛基瓜尔豆胶中醛基和 Tobramycin 氨基的不同比例组合,可以制取得到不同的水凝胶.

1.2.3 水凝胶的流变学性能

凝胶在流变仪上进行流变性能测试,使用的平行板直径 40 mm,由珀耳帖温控单元控制合适的温度,间隙:1 000 μm ,平板周围加以低粘度(5 mPa·s)的非挥发性硅油密封试样,以减少溶剂蒸发。

为了研究不同配比的醛基瓜尔豆胶对共价交联水凝胶机械性能的影响,采用动态流变学方法对不同配比的水凝胶进行了测试。频率扫描仅在线性粘弹区(LVE)范围内使用剪切应力值进行;对于与角频率相关的流变学实验,在 1%应变下,角频率从 0.1 rad/s 扫到 100 rad/s;在 1%应变和 10 rad/s 角频率下进行与时间和温度相关的流变学测量;在应变流变学中,角频率为 10 rad/s 的水凝胶振幅变化范围为 0.1%~1 000%,确定水凝胶处于 sol 与 gel 过渡状态附近的临界点。

水凝胶以固定的角频率 10 rad/s 测量,室温下进行应变振幅扫描($\gamma=0.1\% \sim 1\,000\%$),确定溶胶-凝胶相变应力临界点,通过对凝胶的连续应变测量,研究凝胶的触变性,流变仪对其愈合性能进行定量评价:振幅振荡压力从微小应变($\gamma=1\%$, 120 s)和大应变($\gamma=400\%$, 120 s)交替连续扫描,此崩解与复原过程重复多个周期,以量化水凝胶的自愈能力。

将罗丹明 B 和亚甲蓝分别染色的两快水凝胶切成两半,将不同颜色的半水凝胶小块拼接在一起,置于室温下,无需任何其他干预,用相机记录水凝胶表面变化,对水凝胶自愈能力进行定性。注射实验通过 26 G 针头的注射器,在室温下,罗丹明 B 染色水凝胶被挤压到盛水玻璃小瓶中,观察挤出液的形态;通过流变仪对剪切应力对粘度的变化进行扫描,确定其相关性,并采用高剪切和低剪切分别对凝胶进行连续梯度扫描,考察粘度稳定性。

1.2.4 水凝胶的体外药物释放动力学

为研究水凝胶键合的托普霉素释放特征,取 2 mL 凝胶置于 pH 3.0, 5.5, 6.8, 7.4 缓冲液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 100 rpm 恒温震荡,在预定时间,离心吸取上清,参照文献[15]测定上清释放的托普霉素含量,以托普霉素标准曲线为对照绘制释放动力学曲线。

1.2.5 细胞抗菌能力评价

E. coli 接种到含 LB 琼脂和肉汤培养基中,加入相应的凝胶共培养既定时间,分光光度法测定细菌浓度,测定抑菌圈直径,评价凝胶的抗菌性能,扫描电镜观察多聚甲醛固定的干预前后细菌形态学变化。

1.2.6 细胞毒力评价

HepG-2 细胞接种至含 100 μL DMED 培养基的 12 孔板中,细胞密度为 5×10^3 细胞/孔,培养 4 h 后,加入相应的凝胶抽提物共培养,继续培养 24 h,倒置荧光显微镜观察,比较干预细胞和对照组形态学变化,评价凝胶的细胞毒性。

2 结果与讨论

2.1 凝胶形成动力学

以托普霉素和醛基瓜尔豆胶为原料,由于原料中存在醛基和氨基,利用希夫碱反应(可逆亚胺键)接枝技术,将托普霉素和醛基-瓜尔豆胶溶液简单混合,无需添加任何化学物质和外界应激,即可自交联形成水凝胶,如图 A 所示。通过流变学分析,从存储模量 G' 和损耗模量 G'' 随时间的测量值相交点得到凝胶时间,凝胶时间受原料组份比例调控,同样水凝胶模量变化也受这一比例的显著影响,醛基瓜尔豆胶占比增加导致 G' 增加,凝胶速度加快,但胶凝时间过短,容易形成粘弹性性能较差易碎的非均匀水凝胶,难于实现靶向运载;过慢的凝胶速度将增加组分泄漏的风险,可能导致治疗失败,更有可能因药物外泄伤及靶位外周组织。水凝胶的机械性能是决定水凝胶应用领域的重要因素,作为药物传递基质水凝胶在提供治疗药物的过程中需要保持其物理一致性,通过改变交联度,可以达到水凝胶的目标机械性能,适当的配比可以满足应用要求,在 A-Guar 与 tobramycin 的配比约为 1:40 时,凝胶机械性能达到比较理想的状态(表 1),此时,在此浓度下能形成了理想的交联网络,适合操作的胶凝时间约 92 s(图 1B),有利于临床给药,后续研究以此为例进行。此外,凝胶过程非常简洁,无需任何额外的添加剂和应激,是绿色合成,结果表明,通过对凝胶配方的调整优化,可以控制凝胶的水凝胶模量、凝胶化时间和网络结构得到理想的醛基瓜尔豆胶-托普霉素抗菌水凝胶。

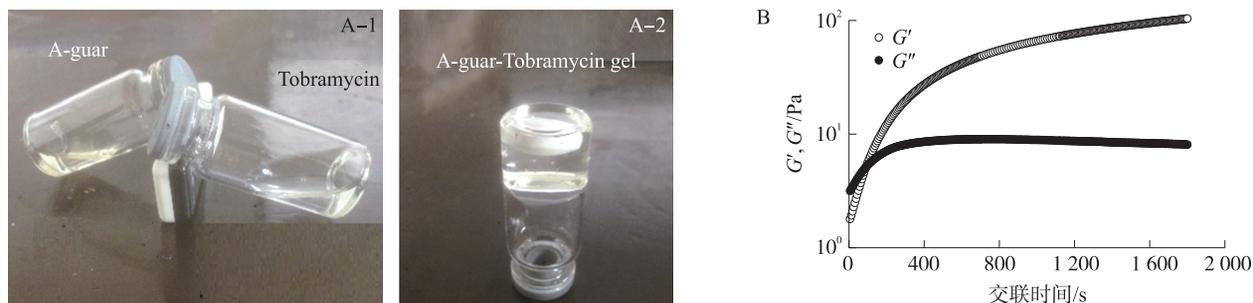
图 1 与醛基-瓜尔豆胶(A₁)水凝胶(A₂)形成过程示意及水凝胶形成过程的模量变化

Fig. 1 Schematic diagram of the formation process of aldehyde-guar hydrogel and the modulus change of the formation process of composite hydrogel

表 1 凝胶前体比例对凝胶时间的影响

Table 1 Influence of gel precursor ratio on gel time

凝胶号	10 mg/mL 托普霉素/mL	15% 醛基瓜尔豆胶/mL	凝胶时间/s
T-Ag(1/80)	0.1	8	36
T-Ag(1/40)	0.1	4	92
T-Ag(1/20)	0.1	2	212

注:T表示托普霉素,Ag表示30%氧化程度醛基瓜尔豆胶,括号内数字表示二者体积比

2.2 水凝胶的形态学

水凝胶微观结构对于水凝胶功能能够起决定性作用,发挥加强高分子水凝胶网络结构的规整度、提高交联结构自由度及发挥高分子链的柔韧性是提高水凝胶力学性能的3种有效设计策略^[16],本研究对水凝胶的截面形貌进行了电镜扫描,如图2所示,SEM图像显示凝胶呈现明显的连续多孔的均匀网络结构,水凝胶浓度的增加使孔尺寸相应减小,可能因聚合物链间距离的减小和交联密度的增加所致.调节空间网络结构提高高分子水凝胶力学性能的有效方法之一,网络空隙有助于效应分子渗透性进入,增强药物分子的释放和效应分子与敏感键的相互作用,使得药物分子可以在三维网络中自由扩散,促进药物按照既定模式释放,实现预期治疗目标.

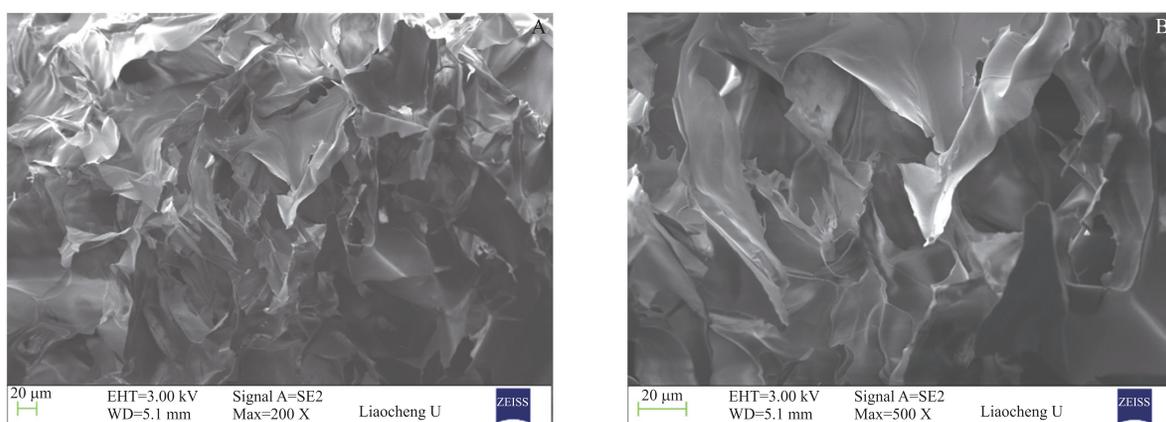


图 2 水凝胶的 SEM 图像

Fig. 2 SEM image of composite hydrogel

2.3 复合水凝胶的自愈性能

部分水凝胶存在重构能力弱和刺激响应较差等缺点,构建具有某些独特性质,如可自恢复响应性等性质的水凝胶具有广泛的应用.自修复性能是原位输送药物可注射水凝胶的关键参数之一,自愈能力确保了水凝胶在被外力损坏后仍可以恢复其内在的力学特性.具有注射和自愈能力的水凝胶可衍生出多种更安全、更耐用的产品,可构建原位上载药物的多功能可持续释放药物载体,延长药物的作用时间.本文对合成凝胶的自愈性能进行了研究,目测法对水凝胶的自愈性进行了评价:将罗丹明 B 和溴酚蓝分别染色的两块水凝胶切开,使不同切块轻轻接触,在无外界应力干预的情况下,2 h 后两种水凝胶的界面消

失,色素相互扩散明显(图 3A₁-A₃),表明独立的两块水凝胶完全融合成为一体,形象地证实了水凝胶的自愈行为.切口愈合过程是生理条件下瞬态网络的快速重构,微观过程复杂,涉及多种物理、化学反应,多种因素可能涉及此步骤中,其中醛类与胺类反应产物形成的席夫碱键的瞬间动态平衡^[17],可以认为是伪共价连接,动态亚胺交联是提高恢复率不可或缺的因素之一,凝胶网络中亚胺键的断开和偶联同步发生,导致水凝胶网络中可逆键的融合,表现为凝胶的自愈行为,水凝胶之间的氢键簇作用也对水凝胶网络的恢复重构提供力量,为药物提供更好的保护^[18].

通过应变幅度扫描测试流变恢复实验进一步量化了水凝胶的自愈合行为,确认水凝胶自我修复能力,随着应变的增加至 270%时,G'值急剧增加后又急速下降,G''逐步增大,表明此时水凝胶网络被破坏,扫描发现溶胶和凝胶状态之间的应力临界点为 325%.采用连续阶跃应变法量化流变恢复能力,当 400%应变作用于水凝胶时,由于聚合物网络的崩解,G'值从原来的(98.37±3.68)Pa 急剧下降至(35.78±1.97)Pa,而 G''值则由(8.15±0.32)Pa 增至(47.08±2.19)Pa.然而,一旦应变撤除,随着水凝胶结构的恢复,G'、G''几乎可以恢复到原值,多次循环,水凝胶的溶胶(sol 状态)和恢复行为(gel 状态)交替反复,说明水凝胶具有高效、显著的自愈能力(图 3B).

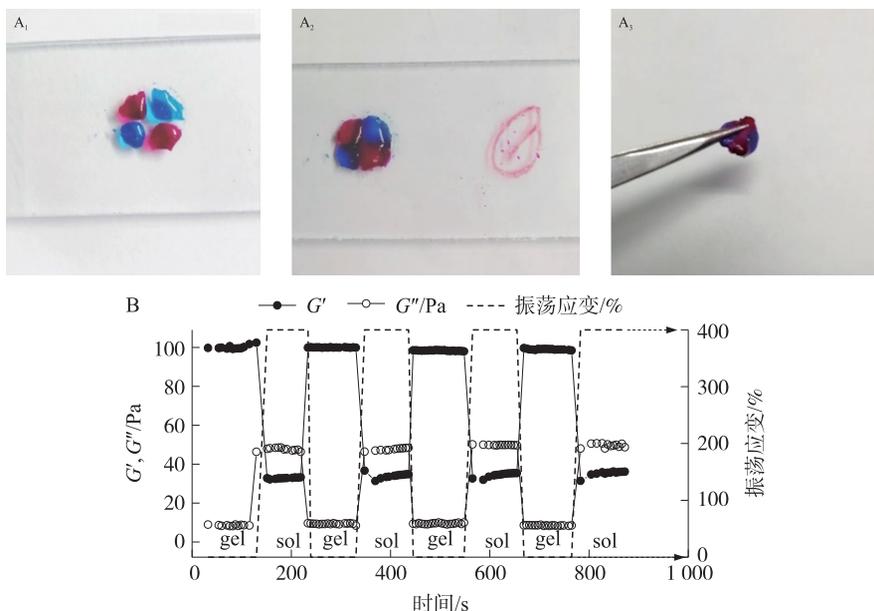


图 3 水凝胶的自愈特性. A₁-A₃. 水凝胶自愈能力示意图;

B. 小应变(1%)到后续大应变(400%)的交替阶跃应变扫描试验,固定角频率(10 rad/s)下,每个应变间隔 120 s

Fig. 3 A₁-A₃)Self-healing properties of composite hydrogel. B) scanning test of alternating step strain from small strain(1%) to subsequent large strain(400%), at a fixed angular frequency(10rad/s), each strain interval is 120 s

2.4 复合水凝胶的可注射性能

为进一步考察凝胶的实用性,本文研究了复合水凝胶的黏度行为,在恒定温度、固定频率和应变下对粘胶进行扫描,随着剪切速率由 0.01 s⁻¹增加至 200 s⁻¹,黏度逐渐降低(图 4A).在较大剪切变形条件下,黏度显著降低,表现出典型的切稀特性,原因是高剪切破坏了凝胶内部网络,这一特性揭示了水凝胶是假塑性流体.当注射器柱塞连续挤压水凝胶通过 26G 注射器时,凝胶液能顺利通过不锈钢针而不堵塞(图 4C),说明凝胶在注射器内承受高应力时已成为溶胶状态,黏度降至足够低,可以通过 26G 针头顺利流动.凝胶的黏度稳定性通过应力梯度连续扫描考察,发现凝胶黏度与应力成显著负相关性,高应力对应低黏度,一旦应力降低,黏度迅速增加(图 4A),提示所得凝胶为非牛顿流体.与此同时,从注射后瞬间发生的凝胶化现象也可以看出,自愈重建过程非常快,在应力消失后,离散水凝胶可以快速重组交联网络.结果显示,该凝胶具有良好的剪切减薄和自愈特性,黏度梯度应力扫描试验显示水凝胶的黏度能经受多个应力突变而保持良好状态(图 4B),与之前考察的连续梯度应力扫描结果相一致,表明该凝胶作为可注射药物上载材料非常适合于将靶药运载至难以抵达的部位,这些特性为水凝胶微创术运载药物提供了一种现实可行性,由于其快速的原位胶凝特性,可以显著增加疾患靶向治疗的成功率.

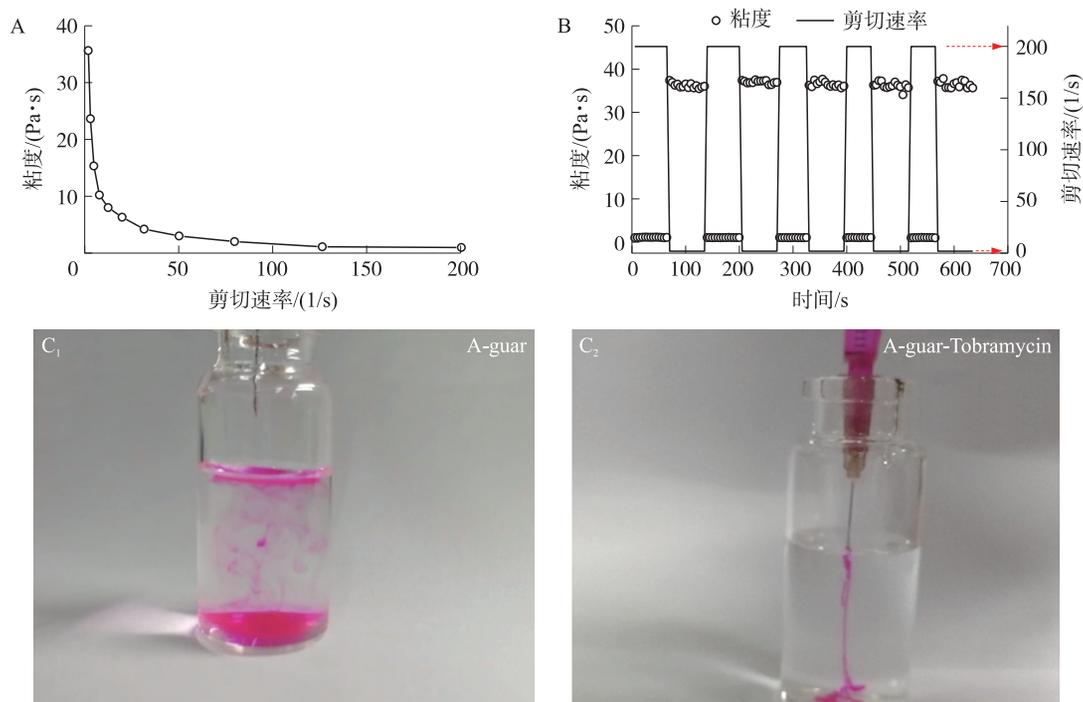


图4 水凝胶的切稀性能和可注射性。A) 黏度对剪切速率的响应; B) 黏度对应变(1%和200%)

交替阶跃应变扫描响应,每一应变间隔60 s,固定角频率(10rad/s); C₁-C₂)和醛基-瓜尔豆胶及复合水凝胶注射性能示意图。

Fig. 4 Shear thinning properties and injectability of hydrogels. A) the response of viscosity to shear rate; B) the viscosity responds to the alternating step strain scanning of the strain (1% and 200%), with each strain interval of 60 seconds and a fixed angular frequency (10 rad/s); C) schematic diagram of injection performance of aldehyde-guar gum and composite hydrogel

2.5 水凝胶的 pH 敏感性

存在特定官能团的水凝胶往往对邻近环境的应激较为敏感,基于 -NH_2 和 -CHO 间席夫碱反应的三维水凝胶聚合物网络对pH刺激响应非常显著,含有脒键的复合水凝胶在酸性介质呈可逆降解特征。由于含氨基化合物氨基被质子化并带正电荷,使亚胺在低pH值下发生断裂,并表现出体积和形态变化,一旦环境pH增加,处于液体状态的溶胶迅速固化完成相变,重新生成凝胶,通过pH值的波动产生形态变化或相变可以表征溶胶-凝胶变化的能力,这有利于药物传递系统通过调节pH来控制药物的释放方式和时间。本研究中,在极端病理微环境(pH=3.0, PBS)中的凝胶样品因氨基质子化生成 NH_3^+ ,其之间的静电斥力导致亚氨基键断裂,增加凝胶孔隙率,引起快速解聚,水凝胶的网状结构变得更加松散,最终导致凝胶崩解,图5B显示。在模拟肿瘤环境pH 5.5中,凝胶降解速率显著慢于极端病理微环境(pH=3.0, PBS),但快于生理微环境(pH=7.4, PBS)中的样品凝胶,且水凝胶呈现侵蚀性降解。另一方面,药物的释放行为几乎与凝胶降解同步,释放动力学曲线如图5C所示,最初呈爆发式药物释放,原因可解释为由于凝胶网络中承载了部分非共价键合药物,在溶液中形成浓度梯度,凝胶吸水膨胀,空隙增大,扩散速度加快,且多孔的凝胶网络有利于这些物理结合药物的快速释放,所以在最初的一定时间内药物释放成线性模式,一旦非共价键药物释放完毕,键和药物的释放依赖凝胶的降解,呈现缓慢的释放行为,使药物释放与凝胶降解保持同步,药物从凝胶中逐步释放,能在治疗过程中长时间在感染靶位维持足够的药物浓度和毒性,无需频繁给药,有望达到彻底清除病原的目标。在长达两周的释放实验中,凝胶呈现侵蚀性崩解,粘弹性物理特征减弱,60%的药物能保持相当的稳定释放,能实现长时间有效抑制浓度的缓释,确保靶向组织持续给药,而且药物仅在该微环境中缓释,能有效抑制细菌增殖和分化。特别地,由于tobramycin与醛基瓜尔豆胶之间席夫碱网络的碱性,在pH 8.0时凝胶完整性几乎不被破坏,很难检测到明显的药物释放,这一特性不仅有利于药物集中靶向感染部位起作用,而且有利于降低药物对正常组织(较高pH值)的毒性风险,即使含有药物的溶胶从靶组织向正常组织渗漏,在生理pH值环境中溶胶也会快速相变为凝胶,束缚药物于凝胶内,而不至于对正常组织造成危害,这一特性确保了药物释放位点特异性的优势,并减少了系统细胞毒性等副作用。

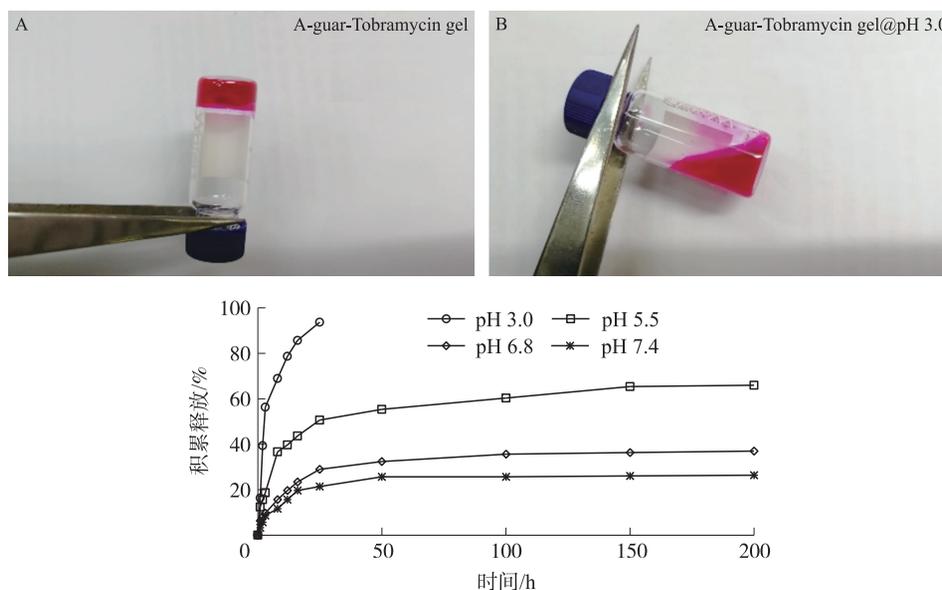


图 5 凝胶的 pH 敏感性和药物释放动力学

Fig. 5 pH sensitivity and drug release kinetics of composite hydrogel

2.6 水凝胶的体外抗菌活性

抗生素多糖水凝胶是一种优秀的生物医学材料,受到了广泛的亲睐,抗菌材料的抑菌性能是其最重要性能,在细菌生长过程依赖细菌微环境应激响应的抗菌材料具有广阔的应用前景^[19],微生物生长过程消耗大量的碳水化合物并促进其原生质酸化,产生酸性分泌物,使得微环境 pH 值降低,随着细菌的增殖,积累的分泌物使其所处微环境的 pH 值进一步下降,以致酸度足以触发席夫碱水凝胶的亚氨基键断裂,促进酸敏性凝胶内涵药物释放. 本文以革兰氏阴性菌—大肠杆菌为模型菌,对复合水凝胶的抗菌特性和抗菌效果进行评价,系列质量水凝胶浸入浓度为 1×10^5 CFU/mL 的细菌悬液中,恒温振荡培养过夜,在既定的时间评判培养液光浊度,以量化相关性,结果显示阴性对照中培养大肠杆菌时浊度急速增加,相比而言,当细菌接种到含复合水凝胶培养基中,浊度变化缓慢,细菌增殖受阻,如图 6A 所示,结果证实水凝胶呈现较强的抑菌效果.

通过测定抑菌圈(ZOI)的扩散宽度进一步证实凝胶对大肠杆菌的抑菌效果,如图 6B 所示,在平板内可以观察到生长抑制现象,阴性对照中出现较小的 ZOI,含药凝胶组中,可以观察到相当宽的抑菌圈,从抑菌圈看,凝胶对细菌生长的抑制作用也是浓度依赖性的,相同药物浓度的水凝胶质量越大,抑菌圈越大,与浊度研究结果一致.

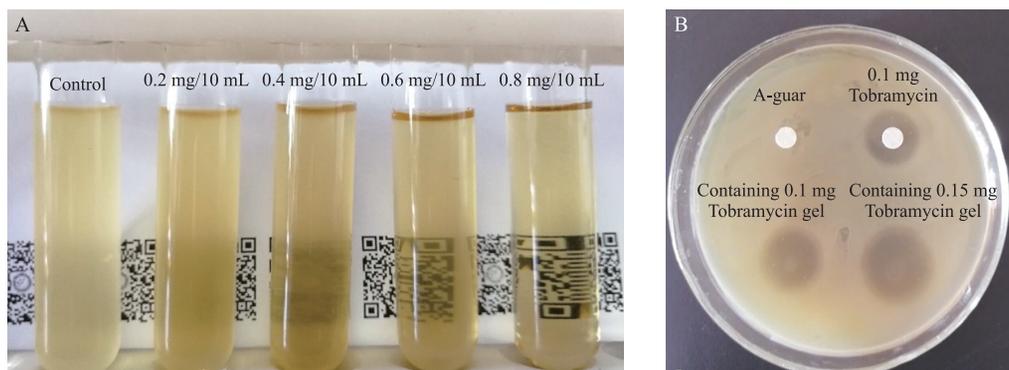


图 6 凝胶的大肠杆菌抑菌性能

Fig. 6 Bacteriostasis of composite hydrogel

2.7 水凝胶对大肠杆菌细胞形态的影响

用扫描电镜(SEM)分析了大肠杆菌细胞的形态学变化,大肠杆菌细胞经过水凝胶的处理后,细胞外表面不规则褶皱、碎裂、收缩,产生受损细胞及细胞碎片,如图 7A 所示,然而,对照细菌细胞呈现规则、光

滑、饱满的杆状形态,大小一致,如图 7B. 这些结果与生长抑制研究结果明显一致,说明水凝胶对大肠杆菌具有较好的抑制作用.

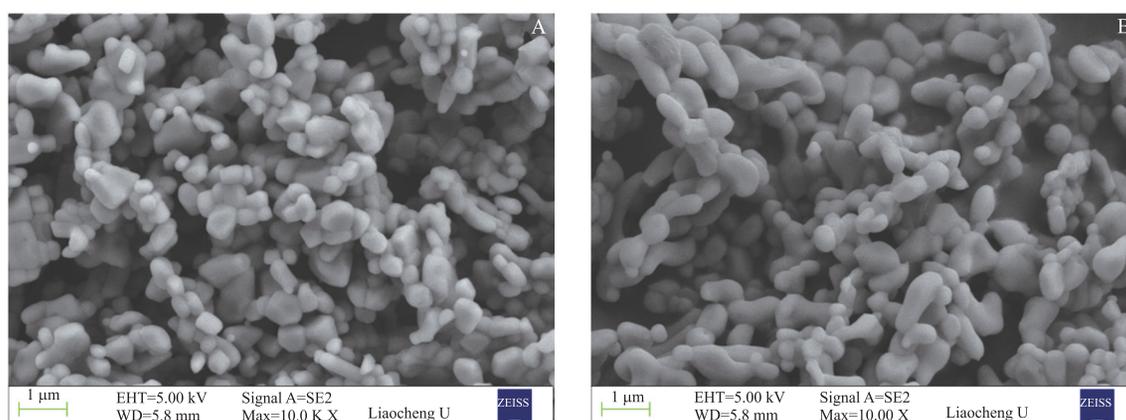


图 7 *E. coli* 扫描电镜图像

Fig. 7 Image of *E. coli* scanning electron microscope

2.8 体外细胞活力评价

细胞毒性是设计构建注射水凝胶给药系统必须要考虑的因素之一,细胞存活率的评估对于任何临床应用的生物材料都极其重要,本文用不同浓度的含药物水凝胶与 HepG-2 细胞进行共培养,评估不同浓度水凝胶对细胞生存率影响,结果显示,即使在更高浓度的 5 mg/mL 凝胶提取物作用下,细胞的存活率也高于 90%,这表明凝胶作为药物传递系统自身基本上没有细胞毒性,不会损伤机体组织,是一种较为理想的药物载体.

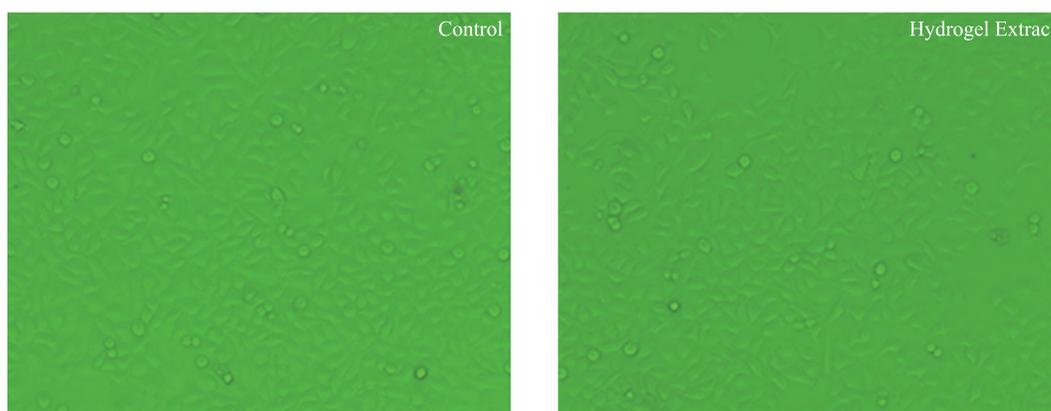


图 8 凝胶的细胞兼容性

Fig. 8 Cytocompatibility of the control and the composite hydrogel

3 结论

本研究利用席夫碱反应这一快速可逆的动态化学反应接枝氧化瓜尔豆胶和托普霉素制备了一种可降解的环保低毒抗菌水凝胶,凝胶具有良好的可注射性和自愈性等流变学性能,可实现原位靶药,同时,凝胶呈现明显的 pH 敏感性,能为病原菌酸性微环境所降解,长时间缓释托普霉素,在病灶部位维持足量的药物浓度,能达到清除感染部位病原微生物的目标,且水凝胶具有良好的细胞亲和性,对机体组织无损伤,是一种良好的抗生素载体,可用于病原菌所致的感染治疗.

[参考文献]

- [1] SUNDIN G W, CASTIBLANCO L F, YUAN X C, et al. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects[J]. Molecular plant pathology, 2016, 17(9): 1506–1518.
- [2] O' HARA L M, THOM K A, PREAS M A. Update to the centers for disease control and prevention and the healthcare infec-

- tion control practices advisory committee guideline for the prevention of surgical site infection(2017): a summary, review, and strategies for implementation[J]. American journal of infection control, 2018, 46(6): 602–609.
- [3] BRUSSOW H. Infection therapy: the problem of drug resistance and possible solutions[J]. Microbial biotechnology, 2017, 10(5): 1041–1046.
- [4] WENCEWICZ T A. New antibiotics from Nature's chemical inventory[J]. Bioorganic medicinal chemistry, 2016, 24(24): 6227–6252.
- [5] HOQUE J, BHATTACHARJEE B, PRAKASH R G, et al. Dual function injectable hydrogel for controlled release of antibiotic and local antibacterial therapy[J]. Biomacromolecules, 2018, 19(2): 267–278.
- [6] PAL A, VERNON B L, NIKKHAH M. Therapeutic neovascularization promoted by injectable hydrogels[J]. Bioactive materials, 2018, 3(4): 389–400.
- [7] NASITHA I A, KRISHNAKUMAR K, DINESHKUMAR B. Hydrogel in pharmaceuticals: a review[J]. Indo American journal of pharmaceutical sciences, 2016, 3(3): 265–270.
- [8] PARHI R. Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: a review[J]. Advanced pharmaceutical bulletin, 2017, 7(4): 515–530.
- [9] AHMAD M, RAI S M, MAHMOOD A. Hydrogel microparticles as an emerging tool in pharmaceutical field: a review[J]. Advances in polymer technology, 2016, 35(2): 121–128.
- [10] DOUGLAS T E L, DZIADEK M, SCHIETSE J, et al. Pectin-bioactive glass self-gelling, injectable composites with high antibacterial activity[J]. Carbohydrate polymer, 2019, 205: 427–436.
- [11] ZHANG H H, NIE W, WANG H K, et al. Preparation and experimental dust suppression performance characterization of a novel guar gum-modification-based environmentally-friendly degradable dust suppressant[J]. Powder technology, 2018, 339: 314–325.
- [12] LIU Y, HSU S H. Synthesis and biomedical applications of self-healing hydrogels[J]. Frontiers in chemistry, 2018, 6: 00449.
- [13] VIDAL C A G, PAWLIK M. Molecular weight effects in interactions of guar gum with talc[J]. International journal of mineral processing, 2015, 138: 38–43.
- [14] PRABAHARAN M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems[J]. International journal of biological macromolecules, 2011, 49(2): 117–124.
- [15] 梁耀东, 陈创前, 李步南. 妥布霉素对刚果红的褪色反应及其分析应用[J]. 西安科技大学学报, 2013, 33(1): 96–100.
- [16] 陈咏梅, 董坤, 刘振齐, 等. 高强度双网络高分子水凝胶: 性能、进展及展望[J]. 中国科学: 技术科学, 2012, 42(8): 859–873.
- [17] LIU H C, SUI X F, XU H, et al. Self-healing polysaccharide hydrogel based on dynamic covalent enamine bonds[J]. Macromolecular materials & engineering, 2016, 301(6): 725–732.
- [18] ZHANG Y L, YANG B, XU L X, et al. Self-healing hydrogels based on dynamic chemistry and their biomedical applications[J]. Acta chimica sinica, 2013, 71(4): 485–492.
- [19] LAKES A L, PEYYALA R, EBERSOLE J L, et al. Synthesis and characterization of an antibacterial hydrogel containing covalently bound vancomycin[J]. Biomacromolecules, 2014, 15(8): 3009–3018.

[责任编辑: 顾晓天]

(上接第 33 页)

- [22] LIU B B, CHENG L, HU P H, et al. Iron-catalyzed oxidative C-C(vinyl) σ -bond cleavage of allylarenes to aryl aldehydes at room temperature with ambient air[J]. Chemical communications, 2019, 55: 4817–4820.
- [23] HU P H, TAN M X, CHENG L, et al. Bio-inspired iron-catalyzed oxidation of alkylarenes enables late-stage oxidation of complex methylarenes to arylaldehydes[J]. Nature communications, 2019, 10: 2425(1–9).
- [24] Enthaler S. The iron-catalyzed oxidation of alkynes-1,2-dione formation versus oxidative cleavage—a matter of temperature[J]. ChemCatChem, 2011, 3(12): 1929–1934.

[责任编辑: 顾晓天]