

壳聚糖负载莫西沙星复合物的抑菌活性*

曹晋静, 苏艳丽**

(贵阳护理职业学院, 贵州 贵阳 550081)

[摘要] **目的:** 通过构建壳聚糖(CHIT)负载莫西沙星载药系统,探索新型喹诺酮类抗菌药物的抑菌效果。**方法:** 采用共价键偶联法构建 CHIT 负载莫西沙星复合物,采用紫外吸收光谱和 origin 软件评价 CHIT 负载莫西沙星复合物负载效果;以单纯莫西沙星为对照,采用滤纸片法和琼脂二倍稀释法考察 CHIT 载药复合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌及枯草芽孢杆菌的抑菌活性,扫描电镜观察抑菌后细菌形态。**结果:** 在波长 293 nm 处莫西沙星及 CHIT 负载莫西沙星复合物有最大的特征吸收峰,CHIT 在这个范围没有吸收峰,origin 软件线性拟合所得的 293 nm 处的线性方程为 $Y=0.5X+0.02$ (Y 为吸光度值, X 为药物浓度),相关系数(r) = 0.999 8;滤纸片法结果显示,随着 CHIT 负载莫西沙星复合物药物浓度的增加,抑菌作用逐渐加强,同浓度 CHIT 负载莫西沙星复合物对大肠杆菌的抑菌效果最强,其次为金黄色葡萄球菌,对鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌作用较弱;琼脂二倍稀释法结果显示单独使用莫西沙星对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)值为 1.12 mg/L、对鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值为 2.24 mg/L,CHIT 载药复合物对大肠杆菌的 MIC 值为 0.28 mg/L、金黄色葡萄球菌为 0.56 mg/L、鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌为 1.12 mg/L;扫描电镜下可见,CHIT 负载莫西沙星复合物作用于细菌后,细菌细胞出现部分破裂。**结论:** CHIT 负载莫西沙星复合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌抑菌效果优于单独使用莫西沙星。

[关键词] 壳聚糖; 喹诺酮类; 莫西沙星; 共价偶联; 药物载药系统; 抑菌; 扫描电镜

[中图分类号] TQ460.1; R944 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)05-0540-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.05.010

Antimicrobial Activity of Chitosan Loaded Moxifloxacin Complex

CAO Jinjing, SU Yanli

(Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang 550081, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antimicrobial effect of new quinolones by constructing a chitosan loaded moxifloxacin drug carrier system. **Methods:** The chitosan loaded moxifloxacin complex was constructed by covalent bond coupling method. The effect of chitosan loaded moxifloxacin complex was evaluated by UV absorption spectrum and origin software. The antimicrobial activity of chitosan complex against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* and *Bacillus subtilis* was investigated by filter paper and Agar dilution. The morphology of bacteria after bacteriostasis was observed by scanning electron microscope. **Results:** At the wavelength of 293 nm, moxifloxacin and chitosan loaded moxifloxacin complex had the largest characteristic absorption peak, and the linear equation of chitosan at 293 nm with no absorption peak at 293 nm was $Y=0.5X+0.02$ (Y for absorbance value, X for drug concentration) and correlation coefficient(r) = 0.999 8. The results of filter paper showed that with the increase of the concentration of chitosan loaded moxifloxacin complex, the bacteriostatic effect of the same concentration of chitosan loaded moxifloxacin complex was strengthened, and the bacteriostatic effect of the same concentration of chitosan loaded moxifloxacin complex

*[基金项目] 贵州省科学技术厅基金项目[黔科合 LH 字(2015)7330,黔科合 LG 字(2012)009]

** 通信作者 E-mail: 839984134@qq.com

网络出版时间: 2018-05-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180517.1756.020.html>

on *Escherichia coli* was the strongest. The second was *Staphylococcus aureus*, which had weak bacteriostatic effect on *Acinetobacter baumannii* and *Bacillus subtilis*. The results of Agar double dilution showed that moxifloxacin alone was used in *Escherichia coli*; the minimum inhibitory concentration (MIC) of *Staphylococcus aureus* was 1.12 mg/L; the MIC value for *Acinetobacter baumannii* and *Bacillus subtilis* was 2.24 $\mu\text{g/mL}$; the MIC of chitosan-loaded complex to *Escherichia coli* was 0.28 $\mu\text{g/mL}$; *staphylococcus aureus* was 0.56 $\mu\text{g/mL}$; *acinetobacter baumannii* and *Bacillus subtilis* were 1.12 $\mu\text{g/mL}$. Scanning electron microscope (SEM) showed that the bacterial cells were partially ruptured after the action of the chitosan-loaded moxifloxacin complex. **Conclusion:** The inhibitory effect of chitosan loaded moxifloxacin complex on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* and *Bacillus subtilis* is better than that on moxifloxacin alone.

[**Key words**] chitosan; quinolones; moxifloxacin; covalent coupling; drug loading system; bacteriostat; scanning electron microscope

莫西沙星是一种新型的喹诺酮类药物,对细菌等原核细胞型微生物均具有良好的抗菌效果,其抗菌活性依赖于对 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶 IV 与 DNA 结合,从而抑制 DNA 复制,是目前常用的广谱抗菌药之一,主要应用于呼吸道感染的治疗^[1]。近年来,不但有莫西沙星耐药菌株出现,同时患者在使用莫西沙星时也出现一定的毒副作用^[2]。药物载药系统负载药物,不仅能够提高药物的抑菌活性,提高治疗效果,还可以减少药物副作用对人体的伤害,是目前开发新药研究的热点^[3-4]。用做药物载体的材料很多,如多糖类及合成的纳米微球、莫纳米凝胶等材料,天然多糖由于其性质稳定,安全无毒,易于修饰和降解,成为了优良的载药材料之一^[5],壳聚糖(chitosan, CHIT)是一种由甲壳素经 N-脱乙酰作用后唯一呈碱性的天然多糖。近年来研究表明,CHIT 及衍生物在体外黏膜上皮细胞、或大分子药物载体,而被广泛使用^[6],但是否作用小分子药物载体的研究报道较少,本文利用 CHIT 分子中的伯氨基与莫西沙星通过共价键进行偶联实现对莫西沙星的负载,并对 CHIT 负载莫西沙星复合物进行抗菌活性实验。

1 材料与方法

1.1 材料与菌株

莫西沙星(moxifloxacin hydrochloride,德国拜耳公司)、EDC[1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐,阿拉丁公司]、CHIT(chitosan 脱乙酰度为 92, sigma 公司)及透析袋(MWCO 3500 型),大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC25922)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, ATCC9372)、鲍曼不动杆菌

(*Acinetobacter baumannii*, ATCC19606)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)均购于中国药品生物制品检定所。

1.2 方法

1.2.1 CHIT 负载药物莫西沙星^[7] 在 10 mL (0.1 mol/L)莫西沙星溶液中加入 EDC(1 mol/L)溶液 1 mL,60 °C 水浴搅拌 1 h,加入 CHIT(10 g/L, pH5.0)溶液 1 mL,持续搅拌 3 h。将反应液进行透析,空白液中加入 200 μL 冰醋酸调至 pH 5.0 进行,透析 24 h,分离未反应的药物及 EDC。所得的复合物置于 4 °C 冰箱保存。

1.2.2 药物莫西沙星负载量测定^[7] 配制 pH 5.0 的 8 个浓度的标准莫西沙星溶液(0.5×10^{-5} 、 1.0×10^{-5} 、 1.5×10^{-5} 、 2.0×10^{-5} 、 2.5×10^{-5} 、 3.0×10^{-5} 、 3.5×10^{-5} 及 4.0×10^{-5} mol/L),根据药物吸收光谱图中特征吸收峰处的吸收光度值与标准浓度药物溶液线性拟合,得到莫西沙星浓度与吸收光度的标准曲线。

1.2.3 菌种活化培养及菌液的制备^[8] 将贮存的菌液接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基中,37 °C 下培养 24 h;将培养后的菌种再接种于液体培养基中,制成菌悬液,37 °C 培养 24 h,待用。

1.2.4 抑菌实验 根据药物浓度标准曲线计算所得产物中的药物含量,配制同浓度的 CHIT 载药复合物为实验组,莫西沙星药液作为对照组。以 0.5 标准麦氏比浊液,配制菌悬液。无菌条件下,向平板中加入 0.4 mL 菌液,涂布均匀。将直径为 8 mm 的滤纸片干热灭菌,分别后置于 CHIT 载药复合物溶液或莫西沙星药液中浸泡后 0.5 h,取出,阴干,贴于含菌培养基中,37 °C 倒置培养 24 h,用十字交叉法测量抑菌圈直径,试验重复 3 次取平均值。制

备含药琼脂平板,以一定量的培养基与二倍稀释法得到各浓度梯度的药液混匀即得。采用琼脂稀释法测定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),取相同体积的菌悬液均匀涂布于平板上,37℃倒置培养24 h 观察细菌生长情况,采用MIC 评价药物负载 CHIT 前后抑菌活性的变化^[9]。

1.2.5 扫描电镜检测 取相同浓度的菌液分别放在50 mL 三角锥瓶中,37℃过夜培养。实验组加入CHIT 负载莫西沙星复合物药液,对照组加相同浓度莫西沙星,37℃培养2 h。取出后用戊二醛脱水固定,室温干燥^[10]。扫描电镜观察2 组的细菌形态变化。

2 结果

2.1 CHIT 负载莫西沙星复合物的光谱特征

如图1,药物莫西沙星的紫外吸收光谱在293 nm 处有最大的特征吸收峰,CHIT 在这个范围没有吸收峰。当CHIT 成功负载上莫西沙星后,复合物具有莫西沙星在293 nm 处的特征最大吸收峰,表明通过共价偶联的方式可以实现CHIT 对莫西沙星的负载。当莫西沙星的浓度在标准药物溶液范围内时,特征吸收峰强度随药物浓度的增加成线性增强,用origin 软件进行线性拟合,如图2,293 nm 处拟合所得的线性方程为: $Y = 0.5X + 0.02$ (Y 为吸光度值, X 为药物浓度),相关系数(r) = 0.999 8。为了使负载反应取得最适效果,对共价偶联反应的pH、温度等条件进行了优化,考察了不同pH3~6 及不同温度25℃~70℃条件下,药物负载量的变化,研究发现随着酸度减少负载量会增大;同时随着反应温度的增大负载量也会增大。但是由于CHIT 溶解度及稳定性的影响,负载条件在pH 5.0 及温度60℃时,负载效果最好。

2.2 CHIT 负载莫西沙星复合物抑菌活性

用滤纸片法和琼脂二倍稀释法考察药物对供试细菌的抑菌活性,抑菌实验的药物浓度依据标准曲线测定,最大药物浓度为17.92 mg/L,浓度范围为0.14~17.92 mg/L。通过滤纸片法结果显示,随着CHIT 负载莫西沙星复合物药物浓度的增加,抑菌作用逐渐加强;同浓度对不同菌株的抑菌作用不同,对大肠杆菌的抑菌效果最强,其次为金黄色葡萄球菌,对鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌作用较弱。通过琼脂二倍稀释法测定莫西沙星与壳聚糖负载莫西沙星复合物的MIC 结果显示,单

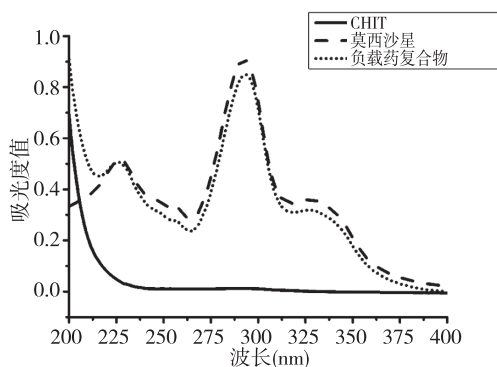


图1 CHIT、莫西沙星及负载复合物的紫外吸收光谱
Fig.1 Ultraviolet absorption spectra of chitosan, moxifloxacin and the complexes

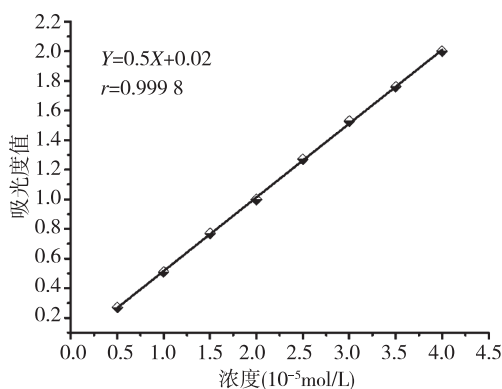


图2 药物浓度与紫外吸收峰的标准曲线($\lambda = 293$ nm)
Fig.2 Standard curve of drug concentration and UV absorption peak

独使用莫西沙星对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的MIC 值为1.12 mg/L,对鲍曼不动杆菌、枯草芽孢杆菌的MIC 值为2.24 mg/L。CHIT 载药复合物对大肠杆菌的MIC 值为0.28 mg/L,对金黄色葡萄球菌的MIC 值为0.56 mg/L,对鲍曼不动杆菌、枯草芽孢杆菌的MIC 值为1.12 mg/L,都比单独药物的MIC 小,说明CHIT 作为药物载体使得药物活性得到改善,共价偶联后抑菌作用得到增强。见表1、图3。

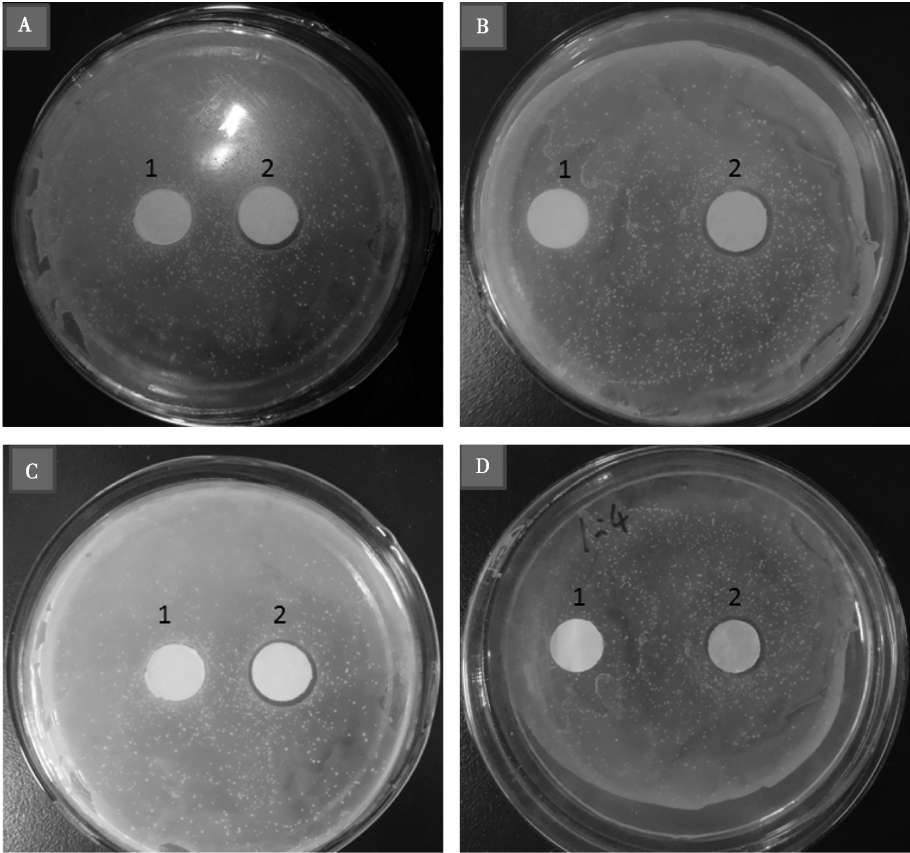
2.3 扫描电镜下细菌形态变化

用扫描电镜观察在相同浓度(0.56 mg/L)的莫西沙星和CHIT 载药复合物药物处理后的细菌形态,莫西沙星作用后,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌表面完整;CHIT 载药复合物作用后,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都出现不同程度的破裂,细胞形态不完整,其中大肠杆菌菌体破裂最严重,提示同样浓度的CHIT 载药复合物对大肠杆菌抑菌效果更好。见图4。

表 1 不同浓度莫西沙星及其复合物的抑菌能力比较
Tab. 1 Comparison of bacteriostasis properties of different drugs

药物浓度 (mg/L)	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌		鲍曼不动杆菌		枯草芽孢杆菌	
	莫西沙星	复合物	莫西沙星	复合物	莫西沙星	复合物	莫西沙星	复合物
0.00	++	++	++	++	++	++	++	++
0.14	++	++	++	++	++	++	++	++
0.28	++	-	++	++	++	++	++	++
0.56	+	-	+	-	++	++	++	++
1.12	-	-	-	-	+	-	+	-
2.24	-	-	-	-	-	-	-	-
4.48	-	-	-	-	-	-	-	-
8.96	-	-	-	-	-	-	-	-
17.92	-	-	-	-	-	-	-	-

注:表中“-”表示培养基中无菌落生长,“+”表示培养基中只有极少数菌落,“++”表示培养基中菌落数量多



注:A 为大肠杆菌(药物浓度为 0.28 mg/L),B 为金黄色葡萄球菌(药物浓度为 0.56 mg/L),C、D 为鲍曼不动杆菌及枯草芽孢杆菌(药物浓度为 1.12 mg/L),1 为莫西沙星,2 为载药复合物

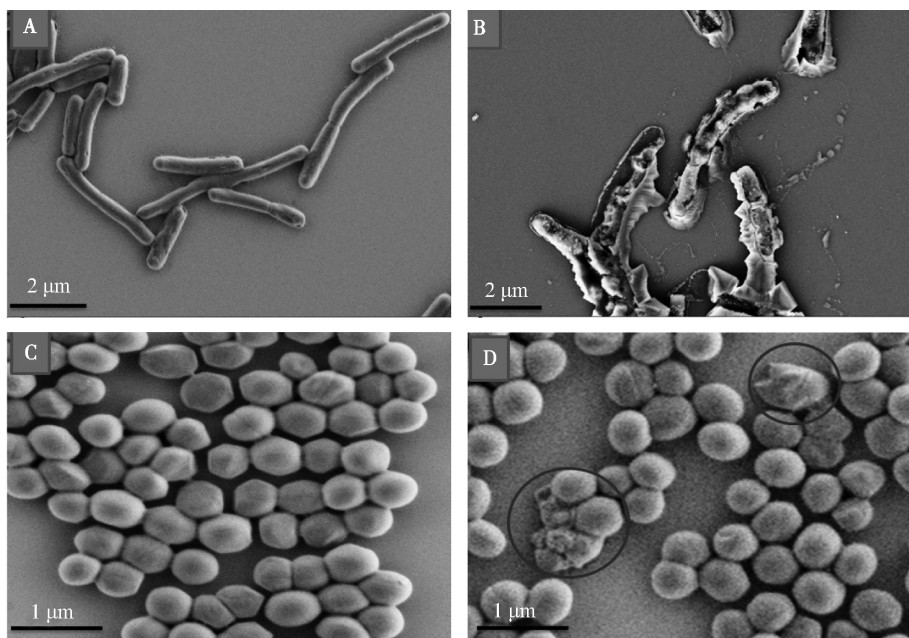
图 3 壳聚糖负载莫西沙星前后抑菌活性

Fig. 3 Antimicrobial activity of moxifloxacin loaded with chitosan

3 讨论

喹诺酮类抗菌药物通过抑制细菌 DNA 合成而

起到杀菌作用。其作用靶位分别为 DNA 旋转酶及拓扑异构酶,这 2 种酶都参与 DNA 的复制。通过作用于这 2 个位点,阻断细菌 DNA 的复制,最终导致细菌 DNA 的降解,细菌菌体死亡。但是一些耐



注:A、B 为大肠杆菌,C、D 为金黄色葡萄球菌,A、C 为莫西沙星处理后,B、D 为 CHIT 负载莫西沙星复合物处理,图 D 圈中为细菌菌体破裂

图 4 CHIT 负载莫西沙星复合物作用前后的电镜结果

Fig. 4 Electron microscopic study on chitosan loaded moxifloxacin complex before and after action

喹诺酮类药物的细菌能够通过外排系统将抗菌药排除体外,减少药物在细胞内的积累^[11-12]。喹诺酮类药物的通透依赖于一定的孔蛋白通道,特定孔蛋白数量减少就极大的降低菌体内喹诺酮类积累速度,因此提高细菌对喹诺酮类药物的通透性,加大药物的累积量,从而达到提高抑菌的效果。莫西沙星作为最新一代喹诺酮类抗菌药物,比之前的药物抗菌性能更强,但是水溶性及稳定性差,吸收快而半衰期短,频繁给药容易引起毒副作用,因此开发莫西沙星的新型药物载体变得十分重要。CHIT具有良好的生物相容性和生物黏附性,能延长药物在吸收部位的滞留时间^[13],能够作为新型药物载体得到广泛使用。它具有的阳离子基团使得 CHIT 能够黏着于带负电的细胞膜及膜蛋白上,增大细胞膜渗透能力,能够更好的提高药物对细菌的渗透性,极大的抑制细菌的外排功能,增加药物进入细菌体内的量,从而提高药效^[14]。CHIT 负载莫西沙星,由 CHIT 黏附在细菌的细胞膜上对莫西沙星药物进行传递,能够很好的抑制细菌外排蛋白的作用,更有效的进入到细菌体内,作用于 DNA 的靶位点,阻断 DNA 的复制,达到更好的抑菌效果。

本研究采用共价键偶联的方法,利用 CHIT 的伯氨基负载喹诺酮类药物莫西沙星,分别用滤纸片

法和琼脂二倍稀释法研究复合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌效果,并通过扫描电镜观察相同浓度的莫西沙星和 CHIT 负载莫西沙星复合物作用于细菌后,细菌的形态变化。滤纸片法结果显示,随着 CHIT 负载莫西沙星复合物药物浓度的增加抑菌作用逐渐加强,同浓度对大肠杆菌的抑菌效果最强,其次为金黄色葡萄球菌,对鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌作用较弱;琼脂二倍稀释法结果显示单独使用莫西沙星对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 1.12 mg/L、对鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值为 2.24 mg/L,壳聚糖载药复合物对大肠杆菌的 MIC 值为 0.28 mg/L、金黄色葡萄球菌为 0.56 mg/L、鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌为 1.12 mg/L;扫描电镜下可见,复合物作用于细菌后,细菌细胞出现部分破裂。CHIT 负载莫西沙星复合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和枯草芽孢杆菌抑菌效果优于单独使用莫西沙星。

4 参考文献

- [1] SE'BASTIEN V V, NGUYEN H A, VAN BAMBEKE F, et al. Contrasting effects of human THP-1 cell differentiation on levofloxacin and moxifloxacin intracellular accumu-

lation and activity against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(3): 518–521.

[2] FREIRE-MORAN L, ARONSSON B, MANZ C, et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria-time to react is now [J]. *Drug Resist Updat*, 2011, 14(2): 118–124.

[3] ZHANGL, PORNATTANANANGKUL D, HU C M J, et al. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery [J]. *CurrMed Chem*, 2010, 17(6): 585–594.

[4] THERESA M A, PIETER R C. Drug delivery systems: entering the mainstream [J]. *Science*, 2004, 303(5665): 1818–1822.

[5] LIU Z, JIAO Y, WANG Y, et al. Polysaccharides – based nanoparticles as drug delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(15): 1650–1662.

[6] RUBIANA M, MAINARDES, LUCIANO P. Drug delivery systems: past, present, and future [J]. *Current Drug Targets*, 2004, 5(5): 449–455.

[7] 曾巧玲,樊小林,赵希娟,等. 壳聚糖与左氧氟沙星的共价偶联载药复合物的抗菌活性研究 [J]. *西南师范大学学报:自然科学版*, 2013, 38(4): 75–79.

[8] 黄秀梨. 微生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 6–8.

[9] 李仲兴,王秀华,孟晓洁. 莫西沙星对 224 株凝固酶阴性葡萄球菌的体外抗菌活性观察 [J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(8): 498–502.

[10] ZHAO Y Y, YE C J, LIU W, et al. Tuning the composition of aseptically bimetallic nanoparticles for antibacterial application. *Angew* [J]. *Chem*, 2014, 53(31): 1–6.

[11] 王重振. 钱利生细菌对喹诺酮类抗菌药的分子耐药机制 [J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(12): 26–30.

[12] EVERETT M J, JIN Y F, RICCI V, et al. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(10): 2380–2386.

[13] 张峻. 壳聚糖的药剂学应用 [J]. *食品与药品*, 2007, 7(8): 29–31.

[14] BERNKOP-SCHNORCH A, DONNHAUPT S. Chitosan-based drug delivery systems [J]. *EurJPharm Biopharm*, 2012, 81(3): 463–469.

(2018-02-02 收稿, 2018-05-02 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 乐 萍

(上接第 539 页)

4 参考文献

[1] 蔡光先. 湖南药物志 [M]. 7 卷. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004: 51–58.

[2] 聂鲁. 彝族药荨麻的应用与开发 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 1999, 41(6): 338–339.

[3] 冀保全, 冯宝民, 史丽颖, 等. 荨麻根中化学成分的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2009, 44(18): 1372–1374.

[4] ZHOU Y, FENG B M, SHI L Y, et al. Two new 3-oxo- α -ionol glucosides from *Urtica laetevirens* Maxim [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25(13): 1219–1223.

[5] FENG B M, QIN H H, WANG H G, et al. Three new secolignan glycosides from *Urtica fissa* E. Pritz [J]. *J Nat Med*, 2012, 66(3): 562–565.

[6] 沈祥春, 支娜, 许立, 等. 大蝎子草乙酸乙酯部位对脂多糖诱导巨噬细胞炎症介质表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(9): 1397–1400.

[7] 李广志, 陈峰, 沈连钢, 等. 石菖蒲根茎的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(7): 808–811.

[8] 张丽娟, 廖尚高, 詹哲浩, 等. 头花蓼酚酸类化学成分研究 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(8): 1946–1947.

[9] 尹淑美, 阎圣刚, 李刚月, 等. 5-硝基愈长木酚的合成 [J]. *广东化工*, 2007, 34(7): 25–26.

[10] 张慧荣, 周围, 王波, 等. UPLC 法测定苹果中 4 种新型植物生长调节剂农药残留 [J]. *分析试验室*, 2014(9): 1097–1100.

(2018-02-01 收稿, 2018-04-29 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 雷 妍