

改性桑枝韧皮纤维素纳米协同抗菌剂的研究

王小燕¹, 刘利², 曾秀¹, 谷山林¹, 马群忠¹, 熊定奎¹, 王海燕¹

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 重庆市计量质量检测研究院第三分院, 重庆 402160)

摘要: 为了克服无机抗菌剂纳米银易团聚的缺点,有效改善四环素长期使用产生的耐药性及副作用问题,以废弃桑枝韧皮为原料,采用化学方法去除果胶、木质素和半纤维素制备桑枝韧皮纤维素,用氯乙酸反应对桑枝韧皮进行表面改性,并将四环素以化学键形式牢固修饰在纤维素表面,纳米银成功负载在纤维素中,创造性地制备了载银改性桑枝韧皮纤维素(Ag-T-CMC)协同抗菌剂。试验结果表明:Ag-T-CMC呈现出优异的抗菌性能和较好的协同抗菌性,载银量在1.5%时抗菌性能最优;且对动物细胞无细胞毒性,有望实现在伤口敷料上的应用。

关键词: 桑枝韧皮;纤维素;纳米银;抗生素;耐药性;协同抗菌

中图分类号:TS102.1;TQ352.4 文献标志码:A 文章编号:1001-7003(2018)12-0032-05 引用页码:121106

Study on synergistic antibacterial agent of Ag-carried tetracycline-mulberry bast carboxymethyl cellulose

WANG Xiaoyan¹, LIU Li², ZENG Xiu¹, GU Shanlin¹, MA Qunzhong¹, XIONG Dingkui¹, WANG Haiyan¹

(1. Chongqing Academic of Animal Science, Chongqing 402460, China; 2. Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection of Third Branch, Chongqing 402160, China)

Abstract: In order to overcome the shortcoming of inorganic antibacterial agent nano-Ag easy to agglomerate, and effectively solve the drug resistance and side effects caused by the long-term use of tetracycline, Ag-modified mulberry bast fiber (Ag-T-CMC) synergistic antibacterial agent was creatively prepared by the following method and materials: discarded mulberry bast was used as the raw material, and pectin, lignin and hemicellulose were removed chemically to prepare mulberry bast cellulose; chloroacetic acid was used to modify mulberry bast, and tetracycline is firmly modified on cellulose surface in the form of chemical bond to successfully load nano-Ag in cellulose. The results showed that Ag-T-CMC exhibited excellent antibacterial properties and good synergistic antibacterial properties. The antibacterial property was optimal when the Ag-loaded quantity was 1.5%. Besides, it is not cytotoxic to animal cells, so it is expected to be applied to wound dressings.

Key words: mulberry bast; cellulose; nano-Ag; antibiotic; drug resistance; synergistic antiseptic

四环素是一种广谱抗生素^[1],有较强的抗菌作用,但四环素进入人体内会产生很多副作用^[2],如导致牙黄和影响胃肠功能,并且长期使用容易使细菌

产生耐药性^[3];无机纳米抗菌剂较传统抗生素不存在耐药性问题^[4]。其中纳米银抗菌效果最好,但是纳米银有易团聚的特点,且纳米银单独使用具有细胞毒性。为了克服单一抗菌剂的缺点,LIU等^[4]首次制备出载银有机膦酸锆有机-无机协同抗菌剂,创造性地组合了有机抗菌剂和无机抗菌剂的优点,但其价格昂贵难以从应用上得到推广。

桑枝为桑园冬管的大宗副产物,量大且是制浆、制板的良好材料,其韧皮还可以提取纤维素进一步制备纳米纤维素。纳米纤维素具有较大的比表面

收稿日期:2018-04-19;修回日期:2018-10-25

基金项目:重庆市科研院所绩效激励引导专项项目(cstc2017jxjl80049);重庆市基础科研应用开发计划项目(16439);重庆市现代山地特色效益农业(蚕桑)技术体系多元化发展研究室项目(18304)

作者简介:王小燕(1989—),女,助理研究员,主要从事蚕桑资源综合利用的研究。通信作者:王海燕,副研究员,632685419@qq.com。

积^[5] 故具有较大的吸附能力,能够吸附纳米银等纳米颗粒,因此,纳米纤维素可以作为纳米银的载体。且纳米纤维素分子具有较多羟基官能团,能够用氯乙酸进行表面修饰得到化学活性更好的羧甲基纳米纤维素^[6],进而能够在纤维素表面修饰具有抗菌功能的官能团。制备出有机-无机协同抗菌剂,该抗菌剂既拥有有机抗菌剂的广谱抗菌性和无机抗菌剂的长效性等优点,能有效解决四环素长期使用产生的耐药性、副作用和无机抗菌剂易团聚的问题。

1 试验

1.1 材料与试剂

桑枝(重庆市畜牧科学院蚕业研究所),无水乙醇、异丙醇、甲基异丙酮、氯乙酸、硝酸银、葡萄糖均为国产分析纯 AR(成都市科龙化工试剂厂),牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉为生化试剂 BR(北京奥博星生物技术有限责任公司),金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(青岛海博生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司),SHZ-D 循环真空泵和 DF-401S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司),THC-10B 数控超声波提取机(济宁天华超声电子仪器有限公司),Nicolet170SX 傅立叶变换红外光谱仪(美国 Madison 公司),XRD-3D X 射线衍射仪(北京普析通用仪器有限公司)。

1.3 羧甲基化纤维素的制备

将桑枝韧皮干燥后粉碎过 60 目筛,称取桑枝韧皮粉 60 g,加甲基异丙酮 300 mL,95% 乙醇 192 mL,异丙醇 60 mL,去离子水 48 mL,于 1 000 mL 圆底烧瓶中。在温度 60 °C,功率 600 W 提取 120 min,40 °C 恒温水浴保温 3 h,待完全沉淀后抽滤,95% 乙醇洗涤去杂质,取滤饼 50 °C 干燥得桑枝韧皮纤维素,取 10 g 桑枝韧皮纤维素,400 mL 异丙醇,10 mL 50% 氯乙酸乙醇溶液于 1 000 mL 圆底烧瓶中,80 °C 恒温水浴 2 h,抽滤,无水乙醇洗涤去杂质,50 °C 干燥得羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose,CMC)。

1.4 改性桑枝韧皮纤维素纳米协同抗菌剂的制备

取 10 g 上述羧甲基化纤维素,加 600 mL 95% 乙醇于 1 000 mL 圆底烧瓶中,待磁力搅拌分散均匀后,加入 5 g 四环素,于室温条件下避光反应 6 h,抽滤,烘干得四环素-羧甲基韧皮纤维素(tetracycline-car-

boxymethyl cellulose T-CMC);取 5 g 上述四环素-羧甲基韧皮纤维素于 500 mL 圆底烧瓶中,加 250 mL 95% 乙醇,磁力搅拌分散均匀后加入 0.1 g 硝酸银,室温搅拌反应 2 h 后加入 1 mL 0.05 g/mL 的抗坏血酸乙醇溶液,搅拌反应 0.5 h 后过滤干燥即得载银改性桑枝韧皮纤维素(Ag-tetracycline-carboxymethyl cellulose,Ag-T-CMC)协同抗菌材料。

1.5 抗菌性能评价

取具有代表性的两种细菌进行抗菌试验:即金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠杆菌 ATCC25922。

抗菌性能测试通过二倍稀释法在 96 孔板上完成,由紫外-可见分光光度计来测试细菌生长状况,波长 600 nm 测 OD 值,每个组重复测 3 次,结果取平均值。其中最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)是指目标化合物可以杀死 99% 的细菌的最低浓度,通常以美国国家实验室标准委员会推荐的方法为标准^[7]。选用革兰氏阳性、阴性菌各一种:即金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠杆菌 ATCC25922 评价制备的改性桑枝韧皮纤维素纳米协同抗菌材料的抗菌活性。

1.6 安全性评价

1.6.1 四环素释放测试

取 1 g 抗菌性能最佳的 Ag-T-CMC 样品于半透膜中,将半透膜置于烧杯中,加入 100 mL、pH7.4 的缓冲溶液搅拌,每隔 1 h 用紫外-可见分光光度计在波长为 350 nm 处测试溶液中四环素的浓度。

1.6.2 细胞毒性试验

T-CMC 和 Ag-T-CMC 体外细胞毒性试验测试细胞选用人肺腺癌细胞(A549)。用细胞计数(cell counting Kit-8, CCK-8)法分析^[8],当有活细胞存在时 CCK-8 的主要成分 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二噻基苯)-2H-四唑单钠盐(WST-8)会被还原为水溶性的黄色的甲臞产物,生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比,细胞的存活率通过紫外分光光度计在波长为 450 nm 处的 OD 值检测。

2 结果与分析

2.1 结构分析

2.1.1 红外数据分析

桑枝韧皮纤维素、羧甲基化纤维素(CMC)、四环素-羧甲基韧皮纤维素(T-CMC)的傅里叶红外光谱如图 1 所示。由图 1 可知,波长在 3 430 cm⁻¹处有较强

的吸收峰,对应纤维素—OH 伸缩振动吸收峰, 2900 cm^{-1} 处的峰对应—C—H 伸缩振动吸收峰, 1635 cm^{-1} 处的峰对应—C—O 吸收峰, 1060 cm^{-1} 处的峰对应—C—O 伸缩振动吸收峰, 668 cm^{-1} 处的峰对应—OH 变形振动峰,以上共同构成了纤维素的红外光谱图。图1中, T-CMC在1320 cm^{-1} 处出现了特征吸收峰,该峰对应四环素中—C—N 吸收峰,证明成功合成了四环素-羧甲基韧皮纤维素。

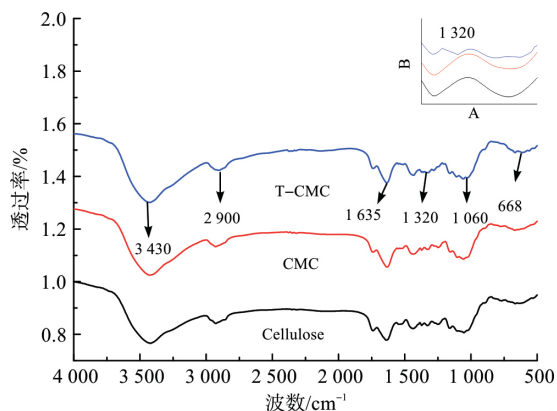


图1 桑枝韧皮纤维素、CMC、T-CMC 的红外光谱

Fig.1 FTIR spectrum of mulberry bast cellulose, CMC and T-CMC

2.1.2 X射线衍射分析(XRD)

桑枝韧皮纤维素、T-CMC、Ag-T-CMC 的 X 射线衍射如图2所示。由图2可知,在 2θ 角为 22.7° 处有共同衍射峰,该峰对应纤维素[002]晶面衍射峰;图2中,Ag-T-CMC在 2θ 角为 38.3° 处出现一个较强的衍射峰,对应纳米银的[111]晶面的衍射峰,证明纳米银被成功负载。

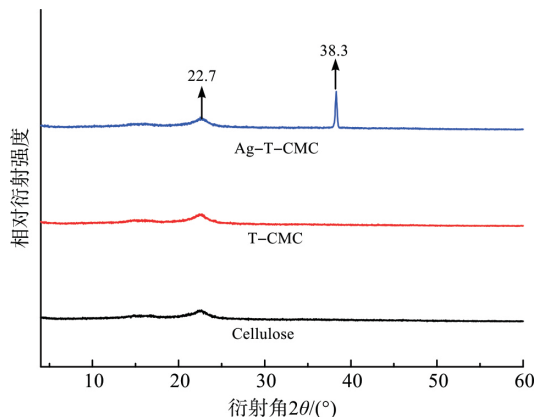


图2 桑枝韧皮纤维素、T-CMC、Ag-T-CMC 的 X 射线衍射

Fig.2 XRD patterns of mulberry bast cellulose, T-CMC and Ag-T-CMC

2.1.3 透射电镜分析(TEM)

Ag-T-CMC 的 TEM 表征如图3所示。从图3可以看见,纳米银颗粒均匀分布在纤维素之间,与 X 射

线衍射分析相对应,证明成功负载了纳米银,纳米银平均尺寸约为20 nm。

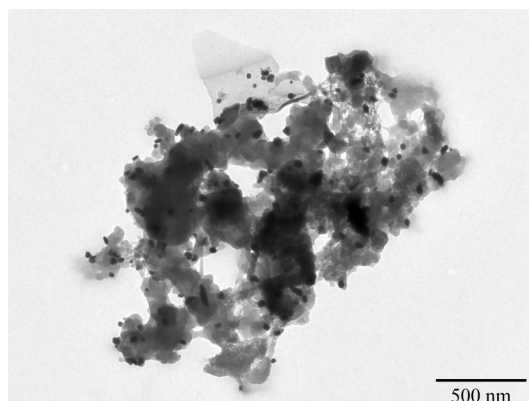


图3 Ag-T-CMC 的透射电镜显示

Fig.3 TEM image of Ag-T-CMC

2.2 抗菌性能表征

2.2.1 MIC 值

抗菌性能采用 MIC 值判定,纳米银、T-CMC、Ag-T-CMC 的 MIC 值如表1所示,纳米银对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别是 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[9], Ag-T-CMC 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别是 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比单独的纳米银和 T-CMC 的抗菌性能强。为了探索 Ag-T-CMC 中的最佳纳米银比例,做了不同纳米银含量的 Ag-T-CMC 的 MIC 值,结果如图4所示,随着纳米银含量的增大, MIC 值先

表1 纳米银、T-CMC、Ag-T-CMC 的 MIC 值

Tab.1 MIC values of nano-Ag, T-CMC and Ag-T-CMC

样品	最小抑菌浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)	大肠杆菌 (ATCC25922)
纳米银	64	128
四环素-羧甲基韧皮纤维素	64	128
载银改性桑枝韧皮纤维素	8	16

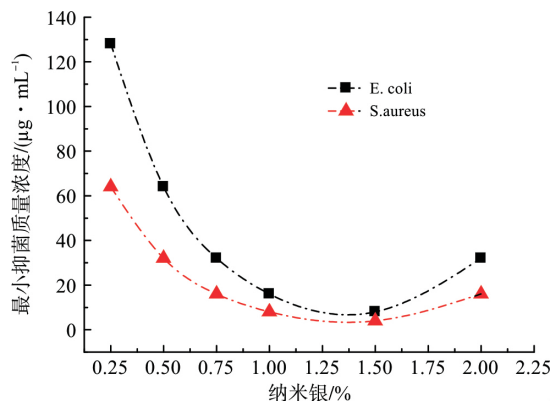


图4 不同纳米银含量的 Ag-T-CMC 的 MIC 值

Fig.4 MIC values of Ag-T-CMC with different nano-Ag content

减小后增大,当纳米银含量在1.5%时达到最低。出现这种结果的原因,分析认为:开始,随着纳米银含量的增加,Ag-T-CMC的协同抗菌性能增强;但随着纳米银含量的增大,大于1.5%时,纳米银的尺寸变大,Ag-T-CMC的抗菌效果减弱。

2.2.2 协同抗菌性

分级抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)用MIC值通过式(1)计算,当 $FIC \leq 0.5$,为协同作用;当 $0.5 < FIC \leq 1$,为相加作用;当 $1 < FIC \leq 2$,无相关作用;当 $FIC > 2$,为拮抗作用^[10-11]。不同纳米银含量的Ag-T-CMC的FIC值见表2,当纳米银含量为0.25%时Ag-T-CMC中的纳米银和T-CMC无相关作用;随着纳米银含量增加到0.5%时,Ag-T-CMC中的纳米银和T-CMC呈现出相加作用;当纳米银含量进一步增大,Ag-T-CMC中的纳米银和T-CMC呈现出协同抗菌作用,且协同抗菌性变化趋势与抗菌性保持一致。

$$FIC = \frac{MIC_0}{MIC_1} + \frac{MIC_0}{MIC_2} \quad (1)$$

式中: MIC_0 为Ag-T-CMC的MIC值, MIC_1 为T-CMC的MIC值, MIC_2 为Ag NPS的MIC值。

表2 不同纳米银含量的Ag-T-CMC的FIC值

Tab.2 FIC values of Ag-T-CMC with different nano-Ag content

纳米银含量/%	分级抑菌浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	金黄色葡萄球菌(ATCC25923)	大肠杆菌(ATCC25922)
0.250	2.000	2.000
0.500	1.000	1.000
0.750	0.500	0.500
1.000	0.250	0.250
1.500	0.125	0.125
2.000	0.500	0.500

2.3 安全性能表征

2.3.1 四环素释放表征

四环素进入人体会对人造成一定副作用,为了保证抗菌剂的安全性,Ag-T-CMC中的四环素必须牢固负载在纤维素上。为了探究Ag-T-CMC的安全性,模拟人体pH值环境(pH7.4)做四环素释放表征。四环素释放结果如图5所示,在5h前Ag-T-CMC缓慢释放出微量四环素,释放最大浓度为 $0.11 \mu\text{g}/\text{mL}$,当5h后四环素不再被释放。分析认为,这可能是大部分四环素与羧甲基化的纤维素以化学键牢固结合的同时,有微量四环素是被物理表面吸附在纤维素

中,在溶液中微量四环素被释放出来。为了进一步探索四环素释放原因,取出释放24h的样品再次放入100 mL缓冲溶液(pH7.4)中进行释放表征,在新的缓冲溶液中未检测出四环素,进一步证明猜想是正确的。

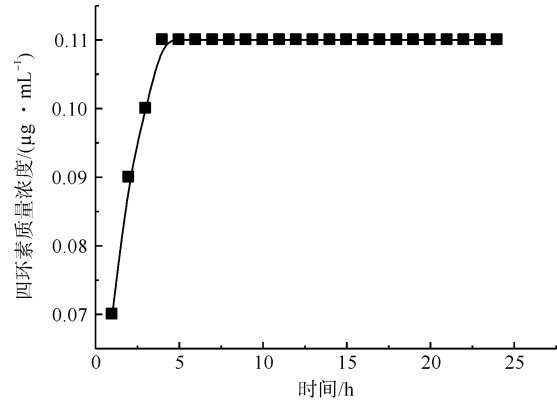


图5 四环素的释放曲线

Fig.5 Release curve of tetracycline

2.3.2 细胞毒性

图6为细胞毒性试验数据。从图6可以看出,当Ag-T-CMC的质量浓度达到 $256 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时A549细胞存活率依然是100%,证明在该浓度下Ag-T-CMC对细胞活性也无毒性,进一步说明在Ag-T-CMC抗菌剂使用量的范围内对人体和动物是无细胞毒性的。

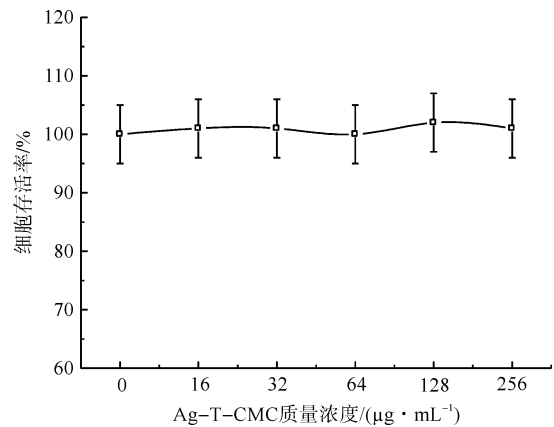


图6 Ag-T-CMC的细胞毒性试验

Fig.6 Cytotoxicity assay of Ag-T-CMC on A549 cells tested by CCK-8 Kit

3 结论

本研究制备的协同抗菌剂载银改性桑枝韧皮纤维素(Ag-T-CMC),载银比例在1.5%时Ag-T-CMC的抗菌性能最佳,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的MIC值分别是 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $16 \mu\text{g}/\text{mL}$,且该比例协同抗菌性最佳(FIC 0.125),四环素以化学键形式与纤

纤维素牢固结合,在 Ag-T-CMC 的质量浓度达到 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时依然对 A549 细胞无细胞毒性。Ag-T-CMC 优异的抗菌性能和良好的生物相容性,使得它在医药卫生领域尤其是伤口敷料上有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] HUSSAIN T, JAMAL M, NIGHAT F, et al. Broad spectrum antibiotics and resistance in non-target bacteria: an example from tetracycline [J]. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 2014, 8(4): 2667-2671.
- [2] GOLUB L M, RAMAMURTHY N S, MCNAMARA T F, et al. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs [J]. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* An Official Publication of the American Association of Oral Biologists, 1991, 2(3): 297.
- [3] RANGASAMY K, ATHIAPPAN M, DEVARAJAN N, et al. Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 105: 153-165.
- [4] LIU L, LIU C, NIE L, et al. Study on the synergistic antibacterial effect of silver-carried layered zirconium alkyl-N,N-dimethylenephosphonate [J]. *Inorganica Chimica Acta*, 2015, 435: 66-72.
- [5] HADDADA R, FERJANI E, ROUDESLI M S, et al. Properties of cellulose acetate nanofiltration membranes: application to brackish water desalination [J]. *Desalination*, 2018, 167(167): 403-409.
- [6] NOSHIRVANI N, GHANBARZADEH B, MOKARRAM R R, et al. Preparation and characterization of active emulsified films based on chitosan-carboxymethyl cellulose containing zinc oxide nano particles [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 99: 530-538.
- [7] 薛峰, 李耘, 吕媛, 等. 头孢硫脒最低抑菌浓度及其影响因素研究 [J]. *中国临床药理学杂志* 2018, 34(1): 25-29. XUE Feng, LI Yun, LÜ Yuan, et al. Study on minimum inhibitory concentrations and its influence factors of cefathiamidine [J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 34(1): 25-29.
- [8] TOWNSEND M, PECK C, MENG W, et al. Evaluation of various glyphosate concentrations on DNA damage in human Raji cells and its impact on cytotoxicity [J]. *Regulatory Toxicology & Pharmacology*, 2017, 85: 79-85.
- [9] AGNIHOTRI S, MUKHERJI S, MUKHERJI S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy [J]. *Rsc Advances*, 2013, 4(8): 3974-3983.
- [10] FRATINI F, MANCINI S, TURCHI B, et al. A novel interpretation of the fractional inhibitory concentration index: the case *origanum vulgare* L and *leptospermum scoparium* J R et G Forst essential oils against *staphylococcus aureus* strains [J]. *Microbiological Research*, 2017, 195: 11-17.
- [11] ALHARBE R, ALMANSOUR A, KWON D H. Antibacterial activity of exogenous glutathione and its synergism on antibiotics sensitize carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2017, 307(7): 409-414.