

Preliminary Evaluation of Bacterial Cellulose-Loaded Rifampicin and Its Efficacy

Yiying Wang, Xiang Li, Zhenrong Xiong, Yuying Guo, Zaichang Yang*

College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang Guizhou
Email: *yangzaichang@126.com

Received: Oct. 22nd, 2018; accepted: Nov. 5th, 2018; published: Nov. 14th, 2018

Abstract

Skin tuberculosis and leprosy are infectious diseases with skin lesions. Burns, hot scald and mechanical damage are common surgical diseases that cause skin dysfunction. However, there are no effective skin-repairing preparations currently. In this study, rifampicin-cellulose film was prepared by boiling method based on bacterial cellulose. The results showed that rifampicin was mainly loaded in the matrix of bacterial cellulose. The weight of the drug-loaded cellulose membrane was 6 mg per cm². The drug loading was 5100 µg/cm². Animal tests have shown that the drug-loaded cellulose membrane fills the skin in a natural fusion and acts as a natural skin. Therefore, this study laid the foundation for the further development of a broad-spectrum skin-repairing preparation.

Keywords

Bacterial Cellulose, Skin, Rifampin

细菌纤维素荷载利福平的方法及药效初步评价

王译莹, 李 想, 熊桢榕, 郭玉莹, 杨再昌*

贵州大学药学院, 贵州 贵阳
Email: *yangzaichang@126.com

收稿日期: 2018年10月22日; 录用日期: 2018年11月5日; 发布日期: 2018年11月14日

摘 要

皮肤结核和麻风是以皮肤病变为主的传染病, 烧伤、烫伤和机械破损是造成皮肤功能障碍的常见外科病, 目前缺乏有效的皮肤修复制剂。本试验以细菌纤维素为材料, 采用煮沸法荷载利福平, 得到利福平纤维

*通讯作者。

素膜。结果表明,利福平主要荷载于细菌纤维素的基质中,每 cm^2 载药纤维素膜的质量为6 mg,载药量为 $5100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。动物试验显示,药片以自然融合的方式填补皮肤破损,发挥天然皮肤的作用。本试验为进一步研发广谱皮肤修复制剂奠定了基础。

关键词

细菌纤维素, 皮肤, 利福平

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

传统治疗皮肤创伤的方法是使用敷料覆盖创口,比较常用的创伤敷料是纱布和脱脂棉,覆盖伤口防止感染,对创伤治疗可以起到一定的作用,但是覆盖在伤口上的纱布在愈合过程中易引起粘连,拆除纱布时会造成二次创伤,创面的积液也会引起细菌感染,增加换药次数和患者痛苦。因此,开发一种新型的创伤敷料已成为科研工作者的主要研究方向之一。

细菌纤维素(BC)具有超细微三维网状结构[1],可以将药物载于其网状结构中,既可以达到良好的载药效果,也可以起到缓释药物的作用。BC纯度高,持水性能好,有较高的保湿作用,可以保证创口的湿润,同时能使受伤的皮肤与外界进行气体交换,有利于患者康复[2]。BC可生物降解,生物相容性好[3],同时诱导受损上皮细胞修复。

利福平是一种广谱抗生素,对结核杆菌、麻风分枝杆菌有较强抗菌作用,对其它革兰氏阳性或阴性细菌也有杀菌作用。麻风是由麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)引起的一种慢性传染病,主要病变在皮肤和周围神经。治疗麻风主要依靠口服利福平等药物,但是针对麻风病人的皮肤病变,缺乏有效的局部制剂。皮肤烧伤、烫伤和机械损伤是常见的外科疾病,一般愈合后会形成明显的瘢痕,皮肤功能不能恢复,目前没有可靠的治疗方法。本实验的目的是以细菌纤维素作为载体,将利福平荷载于细菌纤维素,利用细菌纤维素与皮肤存在高亲和性的特点,结合利福平广谱抗菌的优势,为治疗皮肤结核、麻风病皮肤病变和皮肤损伤提供新型制剂。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 药品与试剂

利福平(湖北九洲康达生物科技有限公司),甲醇、无水乙醇、氢氧化钠等为市售分析纯。

2.1.2. 仪器

紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)。

2.1.3. 实验动物

灰兔(15日龄,雌性)。

2.2. 木醋杆菌纤维素膜的制备

培养基组成为:蛋白胨 2 g、牛肉浸膏 1 g、氯化钠 0.5 g、蔗糖 1 g、麦芽糖 1 g,加入纯水 100 ml,

溶解后调整 pH 值为 7.0，置于 500 ml 三角烧瓶中高压灭菌 30 分钟，冷却后接种木醋杆菌(ATCC23767，本实验室保存) (10^8 CFU/ml) 1 ml。37℃静置培养 10 天，可见白色细菌纤维素膜形成。取出纤维素膜，用 5% (W/V) 氢氧化钠溶液浸泡，置摇床震荡(120 r/min)洗涤 2 小时，再用纯水洗至中性，置 4℃冰箱备用。

2.3. 利福平-木醋杆菌纤维素载药膜的制备

将无水乙醇置于锥形瓶中水浴加温至 90℃~100℃，密封，取一定量的利福平原料药溶于无水乙醇，形成过饱和溶液，在煮沸的乙醇溶液中放入 BC，保持沸腾 40 min，利福平被载入 BC。然后将锥形瓶从加热套中取出，在 25℃恒温条件下中静置沉降 24 h 后倾去上清液，取出载药膜放在干净表面皿中。放置冰箱中(4℃) 24 h，用蒸馏水冲洗表面，得到载药木醋杆菌纤维素膜。使用前用显微镜观察细菌生物膜表面特征。

2.4. 细菌纤维素膜中利福平的载药测定

2.4.1. 标准液的配制

精密称取利福平原料 50 mg，将其溶于 5 ml 的甲醇溶液中，13 min 后精密吸取其 5 ml 至 100 ml 量瓶中，用蒸馏水稀释定容到 100 ml，避光保存备用。再分别精密吸取 0.2、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 上述溶液加至 10 ml 量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，配成 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 $\mu\text{g/ml}$ 的系列标准溶液，测定 OD_{473} 值。

2.4.2. 标准直线方程的建立

以吸光度为纵坐标(OD)、质量浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标(C)，绘制标准直线(图 1)。得线性回归方程 $Y = 0.028X - 0.058 (n = 5), R^2 = 0.998$ 。

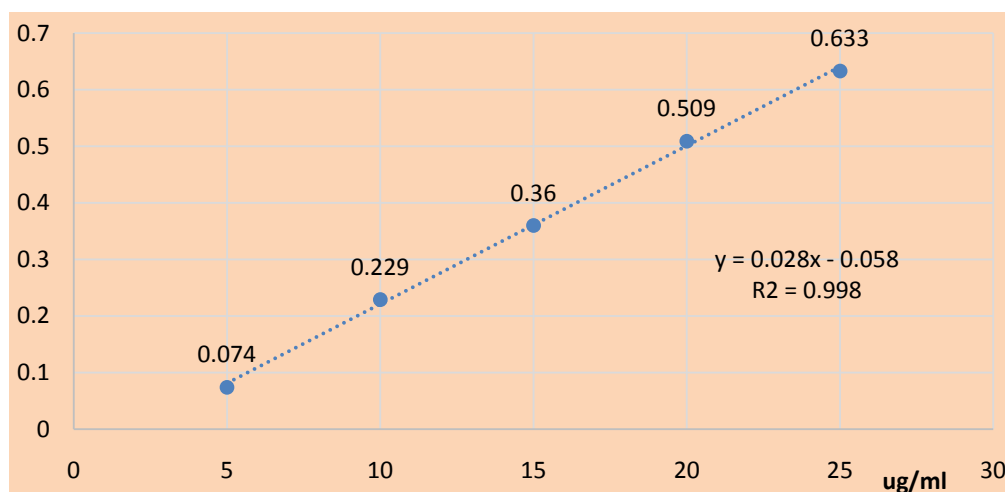


Figure 1. Standard straight line of rifampin
图 1. 利福平标准直线

2.4.3. 载药量测定

取载药细菌纤维素膜，切割成 1 cm^2 的正方形方块，将载药方块分别置于 8 份 5 ml 的甲醇溶液中，等体积稀释 5 倍，形成均匀的利福平甲醇溶液后，用紫外分光光度计测定其吸光度，进而求出药物的浓度，根据公式 $MS = C \times V \times S$ (设 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 载药量为 MS ，测量药物的浓度为 C ，体积为 V ，其中溶液稀释倍数为 32) 计算出载药量。

2.5. 皮肤缺损家兔模型的治疗实验

将家兔背部毛发剃除, 并使用剪刀剪出两块 0.5 cm^2 的创面, 记作创口 1 和创口 2, 在创面处分别滴一滴甘油, 创口 1 处敷载药细菌纤维素膜, 创口 2 处敷未载药细菌纤维素膜, 使用除去药棉的创可贴固定, 并用医用纱布包扎(图 2)。一周后观察伤口的愈合情况。

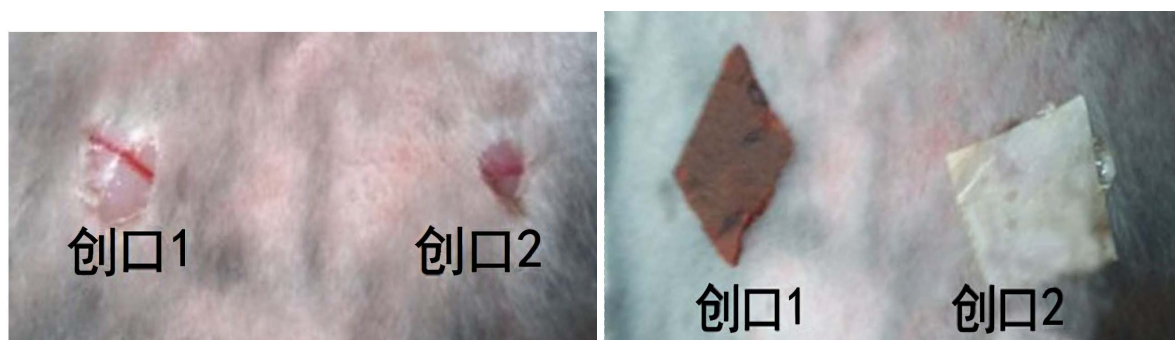


Figure 2. The wounds before treatment, and wounds treated with cellulose

图 2. 治疗前的创口与纤维素膜处理后的创口

3. 结果

从图 3 看出, 在显微镜(100×16)下, 未载药细菌纤维素可见纤维素交叉排列, 纤维素网眼填充着细胞外基质。载药后, 可见利福平主要被荷载于细胞外基质内。

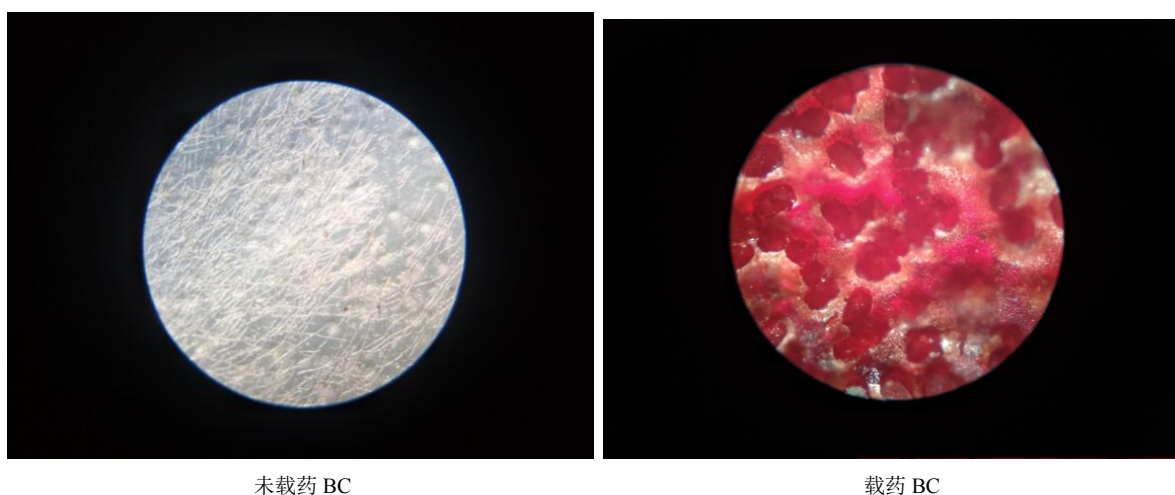


Figure 3. Microscope images of cellulose (100×16)

图 3. 细菌纤维素像图(100×16)

细菌纤维素载药后, 片重及载药量见表 1。根据表 1, 计算出片重为 $0.006300 \pm 0.000515 \text{ g}$ (平均值 \pm 标准差), 即载药纤维素膜的质量为 6 mg/cm^2 , 每片载药量为 $5140.0000 \pm 539.4559 \mu\text{g/cm}^2$, 即 $5100 \mu\text{g/cm}^2$ 。

从图 4 看出, 治疗 7 天后发现, 创口 1 创面平整, 呈红色(利福平纤维素膜为红色), 说明利福平纤维素膜已经覆盖皮肤创面, 与周围皮肤和皮下组织融为一体, 发挥人工皮肤的作用。而创口 2 创面紧缩, 未载药的纤维素膜脱落, 创口以形成瘢痕的方式愈合, 使创面周围形成明显的皱褶。可见, 纤维素载药后可以作为人工皮肤, 修复创面。

Table 1. Determination of the parameters of bacterial cellulose load with rifampicin
表 1. 细菌纤维素荷载利福平的指标测定

| 载药纤维素片编号 | 片重(g) | OD ₄₇₃ 值 | 药物浓度($\mu\text{g/ml}$) | 载药量($\mu\text{g/cm}^2$) |
|----------|--------|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 | 0.0067 | 0.824 | 31.500 | 5040.00 |
| 2 | 0.0058 | 0.864 | 33.929 | 5428.64 |
| 3 | 0.0066 | 0.769 | 29.536 | 4725.76 |
| 4 | 0.0054 | 0.771 | 29.607 | 4737.12 |
| 5 | 0.0064 | 0.693 | 26.821 | 4291.36 |
| 6 | 0.0060 | 0.982 | 37.143 | 5942.88 |
| 7 | 0.0069 | 0.884 | 33.643 | 5382.88 |
| 8 | 0.0066 | 0.917 | 34.821 | 5571.36 |

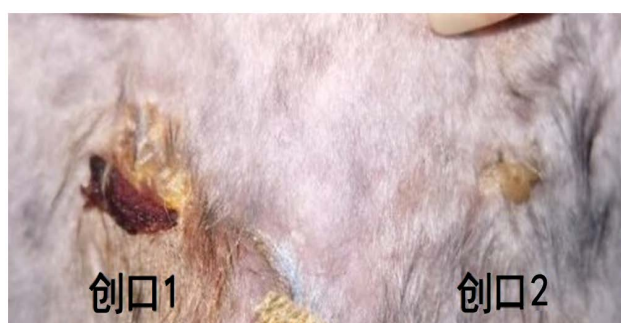


Figure 4. The wounds after treated with cellulose
图 4. 纤维素膜治疗后的创口

4. 讨论

细菌纤维素具有良好的组织相容性，并且不被免疫系统排斥，是构造人工组织的天然材料。采用煮沸法，利福平被荷载到细菌纤维素膜上，从表 1 的数据可以看到，片重与药物荷载量呈正相关。从图 2 看出，利福平主要与纤维素网眼中填充的基质结合，基质的主要成分是多糖、蛋白质和少量核酸，载药机制值得进一步探讨。

皮肤损伤(烧伤、烫伤和机械破坏)和皮肤感染(结核杆菌、麻风分支杆菌)可引起皮肤功能丧失。大面积的皮肤修复仍然是临床医学面临的难题。治疗试验表明，采用利福平细菌纤维素片治疗皮肤机械破坏是有效的，既不出现免疫排斥，又不影响周围组织，药片以自然融合的方式填补皮肤破损，发挥天然皮肤的作用。我们推测，细菌纤维素可能与兔皮下组织发生了连接，纤维素的网眼，为组织细胞、新生血管提供了空间。

需要进一步研究利福平纤维素膜对皮肤感染尤其是分支杆菌感染的治疗效果，下一步我们拟复制动物结核杆菌皮肤感染模型，评价药效，为新剂型研制奠定基础。

基金项目

国家自然科学基金(NSFC 81460531); 国家自然科学基金(NSFC 81760629); 贵州大学 SRT (No. 190) 计划。

参考文献

- [1] 朱清梅, 冯玉红, 林强, 尹学琼. 细菌纤维素改性研究进展[J]. 现代化工, 2009, 29(8): 34-37.

-
- [2] 聂英, 陈春涛, 朱春林, 孙东平. 细菌纤维素面贴膜对营养物质的吸收及释放行为研究[J]. 应用化工, 2014, 43(10): 1767-1770.
- [3] 周伶俐, 孙东平, 吴清杭, 杨加志, 杨树林. 不同培养方式对细菌纤维素产量和结构性质的影响[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 914-917.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2331-8287, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjmce@hanspub.org