



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116808237 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 29

(21) 申请号 202310790876.X

(22) 申请日 2023.06.29

(71) 申请人 湖北工业大学

地址 430068 湖北省武汉市洪山区南李路
28号

(72) 发明人 刘明星 詹一丰 黄晓江

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

专利代理师 常海涛

(51) Int. Cl.

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 47/60 (2017.01)

A61K 41/00 (2020.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C01B 33/12 (2006.01)

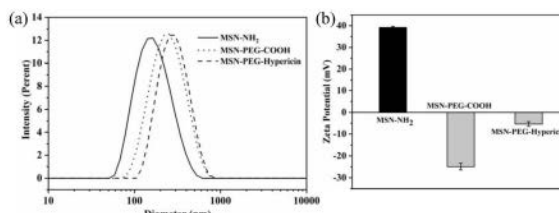
权利要求书2页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

金丝桃素介孔硅纳米载药体系及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种金丝桃素介孔硅纳米载药体系及其制备方法和应用,金丝桃素介孔硅纳米载药体系包括PEG修饰的介孔二氧化硅和金丝桃素,所述金丝桃素与所述PEG修饰的介孔二氧化硅的质量比1:(15~20)。本发明先对MSN-NH₂进行PEG修饰,然后通过共价偶联的方式接枝金丝桃素,得到金丝桃素介孔硅纳米载药体系。介孔二氧化硅具有良好的分散性和生物相容性,PEG修饰后可进一步改善其分散性和生物相容性以及金丝桃素的水溶性,由此,制备的金丝桃素介孔硅纳米载药体系对细胞的毒性低,取得了安全高效的抗菌效果。



1. 一种金丝桃素介孔硅纳米载药体系,其特征在于,包括PEG修饰的介孔二氧化硅和金丝桃素,所述金丝桃素与所述PEG修饰的介孔二氧化硅的质量比1:(14~20)。

2. 根据权利要求1所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系,其特征在于,所述PEG修饰的介孔二氧化硅通过如下步骤制备得到:

1) PEG与马来酸酐反应,纯化,得到两端羧基修饰的聚乙二醇;

2) 正硅酸四乙酯与3-氨丙基三乙氧基硅烷反应,得到氨基修饰介孔二氧化硅;

3) 将步骤1)得到的两端羧基修饰的聚乙二醇和步骤2)得到的氨基修饰介孔二氧化硅混合,调节体系pH至碱性,反应,得到所述PEG修饰的介孔二氧化硅。

3. 根据权利要求2所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系,其特征在于,所述步骤1)中,PEG与马来酸酐的摩尔比为1:(3~6);

优选地,所述步骤1)包括:取PEG加入反应容器中,加入DMF,通入保护气体,PEG溶解后,加入马来酸酐,搅拌,加入吡啶,反应,除去DMF,将所得油状物透析后,浓缩,冻干,得到两端羧基修饰的聚乙二醇。

4. 根据权利要求2所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系,其特征在于,所述步骤2)中,3-氨丙基三乙氧基硅烷与正硅酸四乙酯的体积比为1:(6~8)。

5. 根据权利要求2所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系,其特征在于,所述步骤2)包括:将水、乙醇和十六烷基三甲基溴化铵加入反应容器中,加入三乙醇胺,搅拌,加入正硅酸四乙酯,继续搅拌,加入3-氨丙基三乙氧基硅烷,反应,冷却,离心,用乙醇、水洗涤,将所得的固体分散于乙醇和浓盐酸的混合溶剂中,回流,离心,用乙醇和去离子水洗涤,得到氨基修饰介孔二氧化硅;

优选地,乙醇、水与三乙醇胺的的体积比为1:(6~8):(1~1.1);十六烷基三甲基溴化铵与水的质量比为1:(22~28);混合溶剂中浓盐酸与乙醇的体积比为1:(8~10)。

6. 根据权利要求2所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系,其特征在于,所述步骤3)中,氨基修饰介孔二氧化硅与两端羧基修饰的聚乙二醇的质量比为1:(1.5~2);调节体系pH至8.5~9;

优选地,所述步骤3)包括:将两端羧基修饰的聚乙二醇加入反应容器中,加入水,溶解,加入EDC,搅拌,加入NHS,反应,将氨基修饰介孔二氧化硅加入反应体系中,用三乙胺调节体系pH至碱性,反应,离心,用水洗涤,得到PEG修饰的介孔二氧化硅;

优选地,两端羧基修饰的聚乙二醇、EDC与NHS的摩尔比为1:(2~3):(1~1.5)。

7. 一种权利要求1-6任一项所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系的制备方法,其特征在于,包括将PEG修饰的介孔二氧化硅与金丝桃素避光反应,纯化,得到所述金丝桃素介孔硅纳米载药体系。

8. 根据权利要求7所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系的制备方法,其特征在于,包括取PEG修饰的介孔二氧化硅,加入DMF,搅拌,加入EDC,继续搅拌,加入DMAP,继续搅拌,将金丝桃素溶于DMF中,加入反应体系中,避光反应,离心,乙醇洗涤2~3次,得到金丝桃素介孔硅纳米载药体系;

优选地,EDC与DMAP的摩尔比为(1~1.5):1;PEG修饰的介孔二氧化硅与EDC的质量比为(2.5~3.5):1。

9. 一种权利要求1~6任一项所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系在制备革兰氏阳性

菌金黄色葡萄球菌和/或革兰氏阴性菌大肠杆菌抑制剂中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在於,金丝桃素纳米载药体系在制备革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌抑制剂时,金丝桃素的浓度为 $2.5\sim 5\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制剂抑制革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌光动力条件为:光照时间为 $4\sim 8\text{min}$,孵育时间为 $8\sim 12\text{h}$;

金丝桃素纳米载药体系在制备革兰氏阴性菌大肠杆菌抑制剂时,金丝桃素浓度为 $5\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制剂抑制革兰氏阴性菌大肠杆菌的光动力条件为:光照时间为 $4\sim 8\text{min}$,孵育时间为 $8\sim 12\text{h}$ 。

金丝桃素介孔硅纳米载药体系及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明专利涉及生物医药技术领域,尤其是指一种金丝桃素介孔硅纳米载药体系及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 抗菌药物的长期使用会导致细菌的耐药性,限制了它们的广泛使用,因此,开发新型抗菌剂得到了广泛关注。金丝桃素作为一种天然光敏剂,其在590~595nm光的作用下,可以产生活性氧,破坏细菌内的蛋白质、核酸及其结构,导致细菌死亡,且不易产生耐药性,但是金丝桃素溶解度低,在水溶液中容易发生聚集,从而不能发挥其光动力活性。

[0003] 因此,研发一种增加金丝桃素水溶性和分散性,使其更好的发挥光动力抗菌作用的制剂显得很有必要。

发明内容

[0004] 发明人在研究过程中,发现介孔二氧化硅因其良好的生物相容性与分散性、弱毒性、易于合成、可调孔径、孔体积大、比表面积大和易进行表面修饰等特性而引起了广泛关注。聚乙二醇具有良好的水溶性和生物相容性,通常被用于修饰纳米颗粒和难溶性化合物,以提高其分散性、生物相容性和溶解度。抗菌光动力疗法(aPDT)是治疗细菌感染的一种新兴策略,该技术具有选择性、无痛、侵入性小等特点。这种策略的抗菌效果依赖于光敏剂暴露在特定波长的光下时产生的活性氧(ROS),ROS可作用于多种细胞靶点,通过破坏脂质、蛋白质、核酸和细菌结构,导致病原体死亡。基于金丝桃素的光动力抗菌活性及介孔二氧化硅和聚乙二醇的优良特性,创新性设计并制备了一种金丝桃素纳米载药体系,在抗菌领域具有潜在的应用前景。

[0005] 本发明旨在至少在一定程度上解决现有技术中存在的技术问题之一,由此,在本发明的第一方面,本发明提供金丝桃素介孔硅纳米载药体系,包括PEG修饰的介孔二氧化硅和金丝桃素,所述金丝桃素与所述PEG修饰的介孔二氧化硅的质量比1:(14~20)。

[0006] PEG为聚乙二醇。

[0007] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述PEG修饰的介孔二氧化硅通过如下步骤制备得到:

[0008] 1) PEG与马来酸酐反应,纯化,得到两端羧基修饰的聚乙二醇(HOOC-PEG-COOH);

[0009] 2) 正硅酸四乙酯(TEOS)与3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)反应,得到氨基修饰介孔二氧化硅(MSN-NH₂);

[0010] 3) 将步骤1)得到的两端羧基修饰的聚乙二醇(HOOC-PEG-COOH)和步骤2)得到的氨基修饰介孔二氧化硅(MSN-NH₂)混合,调节体系pH至碱性,反应,得到所述PEG修饰的介孔二氧化硅(MSN-PEG-COOH)。

[0011] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述步骤1)中,PEG与马来酸酐的摩尔比为1:(3~6);

[0012] 优选地,PEG为PEG-2000,即数均分子量为2000的聚乙二醇。

[0013] 优选地,所述步骤1)包括:取PEG加入反应容器中,加入DMF,通入保护气体,PEG溶解后,加入马来酸酐,搅拌,加入吡啶,反应,除去DMF,将所得油状物透析后,浓缩,冻干,得到两端羧基修饰的聚乙二醇(HOOC-PEG-COOH)。

[0014] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述步骤2)中,APTES与TEOS的体积比为1:(6~8)。

[0015] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述步骤2)包括:将水、乙醇和CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)加入反应容器中,加入TEA(三乙醇胺),搅拌,加入正硅酸四乙酯(TEOS),继续搅拌,加入3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),反应,冷却,离心,用乙醇、水洗涤,将所得的固体分散于乙醇和浓盐酸的混合溶剂中,回流(除去模板剂CTAB),离心,用乙醇和去离子水洗涤,得到氨基修饰介孔二氧化硅(MSN-NH₂)；

[0016] 优选地,乙醇、水与三乙醇胺的的体积比为1:(6~8):(1~1.1);CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)与水的质量比为1:(22~28);所述步骤2)中,混合溶剂中浓盐酸与乙醇的体积比为1:(8~10)。

[0017] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述步骤3)中,氨基修饰介孔二氧化硅(MSN-NH₂)与两端羧基修饰的聚乙二醇(HOOC-PEG-COOH)的质量比为1:(1.5~2);调节体系pH至8.5~9;

[0018] 优选地,所述步骤3)包括:将HOOC-PEG-COOH加入反应容器中,加入水,溶解,加入EDC,搅拌,加入NHS,反应,将MSN-NH₂加入反应体系中,用三乙胺调节体系pH至碱性,反应,离心,用水洗涤,得到PEG修饰的介孔二氧化硅(MSN-PEG-COOH)；

[0019] 优选地,两端羧基修饰的聚乙二醇(HOOC-PEG-COOH)、EDC与NHS的摩尔比为1:(2~3):(1~1.5)。

[0020] 在本发明的第二方面,本发明提供一种在本发明第一方面所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系的制备方法,包括将PEG修饰的介孔二氧化硅(MSN-PEG-COOH)与金丝桃素避光反应,纯化,得到所述金丝桃素介孔硅纳米载药体系。

[0021] 在本发明的一个或多个实施方案中,金丝桃素介孔硅纳米载药体系的制备方法,包括,取PEG修饰的介孔二氧化硅(MSN-PEG-COOH)加入反应容器中,加入DMF,搅拌,加入EDC,继续搅拌,加入DMAP,继续搅拌,将金丝桃素溶于DMF中,加入反应体系中,避光反应,离心,乙醇洗涤2~3次,得到金丝桃素介孔硅纳米载药体系(MSN-PEG-Hypericin)；

[0022] 优选地,EDC与DMAP的摩尔比为(1~1.5):1;PEG修饰的介孔二氧化硅(MSN-PEG-COOH)与EDC的质量比为(2.5~3.5):1。

[0023] 在本发明的第三方面,本发明提供一种在本发明第一方面所述的金丝桃素介孔硅纳米载药体系在制备革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和/或革兰氏阴性菌大肠杆菌(*E.coli*)抑制剂中的应用。

[0024] 在本发明的一个或多个实施方案中,金丝桃素纳米载药体系在制备革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌抑制剂时,金丝桃素的浓度为2.5~5μg/mL,抑制剂抑制革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌光动力条件为:光照时间为4~8min,孵育时间为8~12h;

[0025] 金丝桃素纳米载药体系在制备革兰氏阴性菌大肠杆菌抑制剂时,金丝桃素浓度为5~10μg/mL,抑制剂抑制革兰氏阴性菌大肠杆菌的光动力条件为:光照时间为4~8min,孵

育时间为8~12h。

[0026] 本发明的有益效果在于：

[0027] 1、本发明提供一种金丝桃素介孔硅纳米载药体系的制备方法，先对MSN-NH₂进行PEG修饰，以增加其稳定性和分散性，然后通过共价偶联的方式接枝金丝桃素，得到MSN-PEG-Hypericin。介孔二氧化硅具有良好的分散性和生物相容性，PEG修饰后可进一步改善其分散性和生物相容性以及金丝桃素的水溶性，因此制备的MSN-PEG-Hypericin具有良好的分散性和生物相容性，在产生抗菌作用时，对细胞的毒性低，达到了安全高效的抗菌目的。

[0028] 2、本发明将金丝桃素接枝到纳米载体表面，不仅增加了其水溶性，而且增加了金丝桃素与细菌表面的相互接触，光动力效应产生的活性氧可以近距离损害细菌，破坏细菌结构，导致细菌死亡。此外，将金丝桃素接枝到纳米载体表面，改善了其容易发生聚集的特性，与游离的金丝桃素相比，制备的MSN-PEG-Hypericin在相同的条件下，可以产生更多的活性氧，产生更好的光动力抗菌作用。

[0029] 3、本发明提供金丝桃素介孔硅纳米载药体系的制备方法制备得到的金丝桃素介孔硅纳米载药体系是通过光动力效应产生的活性氧发挥抗菌作用，与传统的抗生素相比，减少了耐药菌的发生，为治疗细菌感染提供了一种新的策略。

附图说明

[0030] 图1为MSN-NH₂、MSN-PEG-COOH和MSN-PEG-Hypericin的粒径分布和Zeta电位比较图；

[0031] 其中，图1(a)为MSN-NH₂、MSN-PEG-COOH和MSN-PEG-Hypericin的粒径分布；图1(b)为MSN-NH₂、MSN-PEG-COOH和MSN-PEG-Hypericin的Zeta电位。

[0032] 图2为MSN-PEG-Hypericin的扫描电镜图和透射电镜图；

[0033] 其中，图2(a)为MSN-PEG-Hypericin的扫描电镜图，图2(b)为MSN-PEG-Hypericin的透射电镜图。

[0034] 图3为在有酯酶(using esterase)和无酯酶(absense of esterase)条件下，MSN-PEG-Hypericin中金丝桃素的体外释放结果比较图。

[0035] 图4为不同时间间隔(0min、0.5min、1min、2min、4min、8min、12min)590nm光照射后不同(Control,Hypericin,MSN-PEG-Hypericin)溶液中DPBF紫外吸收光谱随时间的变化；

[0036] 其中，图4(a)为对照组溶液(control)中DPBF紫外吸收光谱随时间的变化，图4(b)为游离金丝桃素溶液(Hypericin组)中DPBF紫外吸收光谱随时间的变化，图4(c)为MSN-PEG-Hypericin溶液(MSN-PEG-Hypericin组)中DPBF紫外吸收光谱随时间的变化。

[0037] 图5为不同浓度游离Hypericin和MSN-PEG-Hypericin对小鼠成纤维细胞L929的细胞毒性检测。

[0038] 图6为MSN-PEG-Hypericin抗S.aureus光动力条件优化结果图。

[0039] 图7为MSN-PEG-Hypericin抗E.coli光动力条件优化结果图。

[0040] 图8为TTC法评价游离Hypericin和MSN-PEG-Hypericin光动力抗菌效果结果图。

[0041] 图9为游离Hypericin和MSN-PEG-Hypericin光动力治疗后S.aureus和E.coli菌悬液中核酸含量测定结果。

具体实施方式

[0042] 以下结合具体实施例和附图对本发明作进一步说明,但下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。以下实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行,使用的方法如无特别说明,均为本领域公知的常规方法,使用的耗材和试剂如无特别说明,均为市场购得。除非另有说明,本文中使用的专业与科学术语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法或材料也可应用于本发明中。

[0043] 实施例1

[0044] 金丝桃素纳米载药体系的制备:

[0045] (1) 两端羧基修饰聚乙二醇的制备

[0046] 称取4g PEG-2000加入三口烧瓶中,加入20mL的DMF,通入氮气保护,升温搅拌使之完全溶解。当PEG-2000完全溶解后,加入0.981g马来酸酐继续搅拌5min,然后加入200 μ L吡啶,维持60 $^{\circ}$ C继续反应24h。反应毕,减压蒸馏除去DMF,将所得油状物透析24h后,浓缩,冻干,即得两端羧基修饰聚乙二醇(HOOC-PEG-COOH)。

[0047] (2) MSN-NH₂的制备

[0048] 将16mL去离子水、2.5mL乙醇和0.64g CTAB加入圆底烧瓶中,再加入适量2.6mL TEA,快速搅拌15min,然后升温至60 $^{\circ}$ C,维持30min,然后逐滴滴加1.45mL TEOS,继续搅拌15min后,缓慢加入200 μ L APTES,维持60 $^{\circ}$ C继续反应2h。反应毕,冷却至室温,离心,分别用乙醇和水各洗一次,将所得的固体重新分散于45mL乙醇和5mL浓盐酸,在60 $^{\circ}$ C下回流4h(除去模板剂CTAB),离心,用乙醇和去离子水各洗涤3次,分散于去离子水中备用,即得氨基修饰介孔二氧化硅(MSN-NH₂),其粒径及Zeta电位图分别见附图1(a)、图1(b)。

[0049] (3) MSN-PEG-COOH的制备

[0050] 将180mg HOOC-PEG-COOH加入圆底烧瓶中,加入10mL去离子水,搅拌使之溶解。称取40mg EDC加入到反应溶液中,室温搅拌30min。然后加入24mg NHS,继续在室温下反应2h。将100mg MSN-NH₂加入到反应体系中,用三乙胺调节pH至9,然后在室温下反应24h。反应毕,离心,用去离子水洗涤3次,分散于去离子水中备用,即得PEG修饰的介孔二氧化硅(MSN-PEG-COOH),其粒径及Zeta电位图见附图1(a)、图1(b)。

[0051] (4) MSN-PEG-Hypericin的制备

[0052] 取35mg MSN-PEG-COOH加入单口烧瓶中,加入8mL DMF搅拌使之分散。然后加入12.8mg EDC,室温下搅拌30min后,加入8mg DMAP,继续搅拌1.5h。将2mg金丝桃素溶于2mL DMF中,缓慢滴加到反应体系中,继续室温避光反应24h。反应毕,离心,乙醇洗涤2~3次,即得MSN-PEG-Hypericin,其粒径及Zeta电位图见附图1(a)、图1(b),SEM和TEM表征见附图2。

[0053] 实施例2

[0054] 金丝桃素纳米载药体系的制备:

[0055] (1) 两端羧基修饰聚乙二醇的制备

[0056] 称取4g PEG-2000加入三口烧瓶中,加入20mL的DMF,通入氮气保护,升温搅拌使之完全溶解。当PEG-2000完全溶解后,加入0.981g马来酸酐继续搅拌5min,然后加入200 μ L吡啶,维持60 $^{\circ}$ C继续反应24h。反应毕,减压蒸馏除去DMF,将所得油状物透析24h后,浓缩,冻干,即得两端羧基修饰聚乙二醇(HOOC-PEG-COOH)。

[0057] (2)MSN-NH₂的制备

[0058] 将15mL去离子水、2.5mL乙醇和0.67g CTAB加入圆底烧瓶中,再加入适量2.5mL TEA,快速搅拌15min,然后升温至60℃,维持30min,然后逐滴滴加1.2mL TEOS,继续搅拌15min后,缓慢加入200μL APTES,维持60℃继续反应2h。反应毕,冷却至室温,离心,分别用乙醇和水各洗一次,将所得的固体重新分散于40mL乙醇和5mL浓盐酸,在60℃下回流4h(除去模板剂CTAB),离心,用乙醇和去离子水各洗涤3次,分散于去离子水中备用,即得氨基修饰介孔二氧化硅(MSN-NH₂)。

[0059] (3)MSN-PEG-COOH的制备

[0060] 将150mg H₀₀C-PEG-COOH加入圆底烧瓶中,加入10mL去离子水,搅拌使之溶解。称取40mg EDC加入到反应溶液中,室温搅拌30min。然后加入24mg NHS,继续在室温下反应2h。将100mg MSN-NH₂加入到反应体系中,用三乙胺调节pH至8.5,然后在室温下反应24h。反应毕,离心,用去离子水洗涤3次,分散于去离子水中备用,即得PEG修饰的介孔二氧化硅(MSN-PEG-COOH)。

[0061] (4)MSN-PEG-Hypericin的制备

[0062] 取35mg MSN-PEG-COOH加入单口烧瓶中,加入8mL DMF搅拌使之分散。然后加入12.8mg EDC,室温下搅拌30min后,加入8mg DMAP,继续搅拌1.5h。将2.5mg 金丝桃素溶于2mL DMF中,缓慢滴加到反应体系中,继续室温避光反应24h。反应毕,离心,乙醇洗涤2~3次,即得MSN-PEG-Hypericin。

[0063] 实施例3

[0064] 金丝桃素纳米载药体系的制备:

[0065] (1)两端羧基修饰聚乙二醇的制备

[0066] 称取4g PEG-2000加入三口烧瓶中,加入20mL的DMF,通入氮气保护,升温搅拌使之完全溶解。当PEG-2000完全溶解后,加入0.981g 马来酸酐继续搅拌5min,然后加入200μL 吡啶,维持60℃继续反应24h。反应毕,减压蒸馏除去DMF,将所得油状物透析24h后,浓缩,冻干,即得两端羧基修饰聚乙二醇(H₀₀C-PEG-COOH)。

[0067] (2)MSN-NH₂的制备

[0068] 将20mL去离子水、2.5mL乙醇和0.72g CTAB加入圆底烧瓶中,再加入适量2.75mL TEA,快速搅拌15min,然后升温至60℃,维持30min,然后逐滴滴加1.6mL TEOS,继续搅拌15min后,缓慢加入200μL APTES,维持60℃继续反应2h。反应毕,冷却至室温,离心,分别用乙醇和水各洗一次,将所得的固体重新分散于50mL乙醇和5mL浓盐酸,在60℃下回流4h(除去模板剂CTAB),离心,用乙醇和去离子水各洗涤3次,分散于去离子水中备用,即得氨基修饰介孔二氧化硅(MSN-NH₂)。

[0069] (3)MSN-PEG-COOH的制备

[0070] 将200mg H₀₀C-PEG-COOH加入圆底烧瓶中,加入10mL去离子水,搅拌使之溶解。称取40mg EDC加入到反应溶液中,室温搅拌30min。然后加入24mg NHS,继续在室温下反应2h。将100mg MSN-NH₂加入到反应体系中,用三乙胺调节pH至9,然后在室温下反应24h。反应毕,离心,用去离子水洗涤3次,分散于去离子水中备用,即得PEG修饰的介孔二氧化硅(MSN-PEG-COOH)。

[0071] (4)MSN-PEG-Hypericin的制备

[0072] 取35mg MSN-PEG-COOH加入单口烧瓶中,加入8mL DMF搅拌使之分散。然后加入12.8mg EDC,室温下搅拌30min后,加入8mg DMAP,继续搅拌1.5h。将1.75mg金丝桃素溶于2mL DMF中,缓慢滴加到反应体系中,继续室温避光反应24h。反应毕,离心,乙醇洗涤2~3次,即得MSN-PEG-Hypericin。

[0073] 实施例4

[0074] 金丝桃素纳米载药体系中金丝桃素的体外释放研究:

[0075] 分别取2mL MSN-PEG-Hypericin的PBS溶液(pH=7.4,含金丝桃素0.422mg),装入透析袋中(MW=3500),一组加入2mg的酯酶,另一组不加酯酶,将透析袋封口后放入50mL锥形瓶中,加入20mL的PBS溶液(pH=7.4)使之浸没,盖上瓶塞,置于摇床中,设置温度为37℃,转速为150r/min,分别于1h,3h,5h,7h,9h,12h,24h,36h和48h取出2mL的释放介质,避光保存,然后补充2mL新鲜的释放介质。在590nm处测定不同时间取出样品的紫外吸光度值,计算金丝桃素的释放量,以时间(h)为横坐标,金丝桃素的累积释放量(E_t)为纵坐标,绘制金丝桃素的累积释放率曲线。累计释放量的计算公式如下:

$$[0076] \quad Er(\%) = \frac{c_n v_0 + \sum_{i=1}^{n-1} c_i v}{m_0} \times 100\%$$

[0077] 其中, c_n :第n次取样释放介质中金丝桃素的浓度(mg/L); v_0 :释放介质的总体积(mL); c_i :第i次取样时释放介质中金丝桃素的浓度(mg/L); v :每次取样的体积(2mL)

[0078] n :取样次数; m_0 :纳米粒子所载药物的总质量(0.422mg)。

[0079] 在有酯酶(using esterase)和无酯酶(absense of esterase)条件下,金丝桃素体外释放结果如图3所示,在无酯酶和酯酶存在的条件下,MSN-PEG-Hypericin在48h内分别释放了11%和40%的金丝桃素,表明酯酶可以加快MSN-PEG-Hypericin中金丝桃素的释放,且金丝桃素纳米载药体系具有缓慢释药的效果,为其发挥光动力抗菌作用提供了保障。

[0080] 实施例5

[0081] 金丝桃素纳米载药体系的光动力性能测定:

[0082] 为了评价MSN-PEG-Hypericin的活性氧产生能力,采用DPBF(1,3-二苯基异苯并咪喃)作为活性氧指示剂,测定其在410nm处的紫外吸光度值。当有活性氧产生时,会消耗DPBF,导致410nm处紫外吸收值降低。具体实验步骤如下:

[0083] (1) 配制1mg/mL的DPBF乙醇溶液,然后用去离子水稀释得到50 μ g/mL DPBF溶液。

[0084] (2) 对照组(control):取2mL 50 μ g/mL DPBF溶液,590nm光分别照射0,0.5,1,2,4,8和12min,记录其410nm处紫外吸收值变化。

[0085] (3) 实验组:取1.9mL 50 μ g/mL DPBF溶液,分别加入100 μ L游离金丝桃素溶液(Hypericin组)、MSN-PEG-Hypericin溶液(MSN-PEG-Hypericin组)(金丝桃素浓度均为50 μ g/mL),混匀后,590nm光分别照射0,0.5,1,2,4,8和12min,记录其410nm处紫外吸收值变化。

[0086] 附图4为不同时间间隔(0min、0.5min、1min、2min、4min、8min、12min) 590nm光照射后不同(Control,Hypericin,MSN-PEG-Hypericin)溶液中DPBF紫外吸收光谱随时间的变化;

[0087] 其中,图4(a)为对照组溶液(control)中DPBF紫外吸收光谱随时间的变化,图4(b)为游离金丝桃素溶液(Hypericin组)中DPBF紫外吸收光谱随时间的变化,图4(c)为MSN-PEG-Hypericin溶液(MSN-PEG-Hypericin组)中DPBF紫外吸收光谱随时间的变化。

[0088] 由附图4可知,活性氧探针DPBF在410nm处有特征吸收峰,当有活性氧产生时,它能与活性氧发生不可逆的反应导致其降解,DPBF吸光度的下降速率与活性氧的产生成正比。与对照组DPBF相比,游离金丝桃素和MSN-PEG-Hypericin组DPBF的吸光度随着照射时间的推移逐渐降低,说明它们均能产生活性氧,且MSN-PEG-Hypericin组产生的活性氧更多,说明金丝桃素纳米载药体系可以增加金丝桃素的分散性与水溶性,使其在光照条件下可以产生更多的活性氧,从而加剧对致病菌的氧化损伤。

[0089] 实施例6

[0090] MTT法评价金丝桃素纳米载药体系的细胞相容性:

[0091] 首先培养得到浓度为 $8\sim 10\times 10^4$ 个/mL的细胞悬液,在96孔板中,上下两排的24个孔各加入100 μ L PBS溶液,空白组加入100 μ L完全培养基,对照组和实验组各加入100 μ L细胞悬液,加料完毕后,盖上盖子,轻轻晃动,将96孔板小心放入恒温培养箱中培养,细胞贴壁后,用移液枪吸出代谢培养基,分别加入100 μ L游离Hypericin和MSN-PEG-Hypericin的金丝桃素浓度不同的给药培养基(金丝桃素浓度依次为1.25、2.5、5、10和20 μ g/mL),然后继续在恒温培养箱中培养24h。吸出代谢培养基,每孔加入100 μ L新鲜培养基,然后在避光条件下向空白组、对照组和实验组各加入20 μ L MTT溶液,加毕,盖上盖子,轻轻晃动,将96孔板小心放入恒温培养箱中培养4h。用注射器吸取对照组、空白组和实验组中的液体,然后每孔加入150 μ L DMSO。加毕,盖上盖子,轻轻晃动,转移至摇床振荡15min,用酶标仪在490nm处测定各孔的吸光度值。

[0092] Hypericin和MSN-PEG-Hypericin对小鼠成纤维细胞(L929)的细胞毒性结果如附图5所示,不同浓度的MSN-PEG-Hypericin作用于细胞24h后,细胞存活率均高于80%。即使MSN-PEG-Hypericin的浓度高达1120 μ g/mL(金丝桃素的浓度为40 μ g/mL),细胞存活率仍高于80%,表明MSN-PEG-Hypericin具有良好的细胞相容性。在Hypericin组(游离金丝桃素组)中,金丝桃素的浓度为5 μ g/mL时,细胞存活率为87%,继续增加浓度,细胞存活率急剧下降。当金丝桃素浓度为40 μ g/mL时,细胞存活率仅为16%左右,说明游离金丝桃素对L929细胞有一定的细胞毒性且呈现浓度依赖性,也说明用PEG对金丝桃素进行修饰,在增加其溶解度的同时,也增加了其细胞相容性。

[0093] 实施例7

[0094] MSN-PEG-Hypericin抗S.aureus光动力条件优化:

[0095] (1)光照时间对抗菌活性的影响

[0096] 在超净工作台,配制含MSN-PEG-Hypericin的给药培养基(金丝桃素含量为2.5 μ g/mL)。在灭菌后的离心管中加入1mL给药培养基,然后加入100 μ L S.aureus菌悬液(10^8 CFU/mL),避光孵育8h后,依次用590nm光照射0,0.5,1,2,4和8min,不加MSN-PEG-Hypericin且避光作为空白对照组,不加MSN-PEG-Hypericin 590nm光照4min作为光照对照组。光照后,取100 μ L菌悬液均匀的涂布在琼脂平板上,将培养皿在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光培养24h。菌落生长情况如图6所示,图6为MSN-PEG-Hypericin抗S.aureus光动力条件优化结果图。

[0097] 结果表明,光照对照组590nm光照无抗菌作用,且给药组随着光照时间的增加,抗菌效果逐渐增强,最佳光照时间为8min。

[0098] (2)孵育时间对抗菌活性的影响

[0099] 参照(1)中的步骤,配制给药培养基并加入菌悬液,依次避光孵育0,1,2,4,8和

12h, 孵育后用590nm光照射(光照时间为(1)中最佳光照时间), 不加MSN-PEG-Hypericin且避光作为空白对照组。光照后, 取100 μ L菌悬液均匀的涂布在琼脂平板上, 将培养皿在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光培养24h。菌落生长情况如图6所示, 图6为MSN-PEG-Hypericin抗*S. aureus*光动力条件优化结果图。结果表明, 随着孵育时间的增加, 抗菌效果逐渐增强, 最佳孵育时间为8h。

[0100] (3) 金丝桃素浓度对抗菌活性的影响

[0101] 配制含MSN-PEG-Hypericin的给药培养基(金丝桃素含量为0, 0.625, 1.25, 2.5, 5和10 μ g/mL)。参照(1)中的步骤, 配制给药培养基并加入菌悬液, 避光孵育一段时间(孵育时间为(2)中的最佳孵育时间), 孵育完成后用590nm光照射(照射时间为(1)中最佳光照时间), 光照后, 取100 μ L菌悬液均匀的涂布在琼脂平板上, 将培养皿在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光培养24h。菌落生长情况如图6所示, 图6为MSN-PEG-Hypericin抗*S. aureus*光动力条件优化结果图。结果表明, 随着金丝桃素浓度的增加, 抗菌效果逐渐增强, 最佳给药浓度为2.5 μ g/mL。

[0102] 实施例8

[0103] MSN-PEG-Hypericin抗*E. coli*光动力条件优化:

[0104] (1) 光照时间对抗菌活性的影响

[0105] 在超净工作台中, 配制含MSN-PEG-Hypericin的给药培养基(金丝桃素含量为5 μ g/mL)。在灭菌后的离心管中加入1mL给药培养基, 然后加入100 μ LE. coli菌悬液(10^7 CFU/mL), 避光孵育8h后, 依次用590nm光照射0, 0.5, 1, 2, 4和8min, 不加MSN-PEG-Hypericin且避光作为空白对照组, 不加MSN-PEG-Hypericin590 nm光照4min作为光照对照组。光照后, 取100 μ L菌悬液均匀的涂布在琼脂平板上, 将培养皿在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光培养24h。菌落生长情况如图7所示, 图7为MSN-PEG-Hypericin抗*E. coli*光动力条件优化结果图。由图可知, 最佳光照时间为8min。

[0106] (2) 孵育时间对抗菌活性的影响

[0107] 参照(1)中的步骤, 配制给药培养基并加入菌悬液, 依次避光孵育0, 1, 2, 4, 8和12h, 孵育完成后用590nm光照射(照射时间为(1)中最佳光照时间), 不加MSN-PEG-Hypericin且避光作为空白对照组。光照后, 取100 μ L菌悬液均匀的涂布在琼脂平板上, 将培养皿在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光培养24h。菌落生长情况如图7所示, 图7为MSN-PEG-Hypericin抗*E. coli*光动力条件优化结果图。由图可知, 最佳孵育时间为8h。

[0108] (3) 金丝桃素浓度对抗菌活性的影响

[0109] 配制含MSN-PEG-Hypericin的给药培养基(金丝桃素含量为0, 1.25, 2.5, 5, 10和20 μ g/mL)。参照(1)中的步骤, 配制给药培养基并加入菌悬液, 避光孵育一段时间(孵育时间为(2)中的最佳孵育时间), 孵育完成后用590nm光照射(照射时间为(1)中最佳光照时间), 光照后, 取100 μ L菌悬液均匀的涂布在琼脂平板上, 将培养皿在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中避光培养24h。菌落生长情况如图7所示, 图7为MSN-PEG-Hypericin抗*E. coli*光动力条件优化结果图。由图可知, 最佳给药浓度为5 μ g/mL。

[0110] 实施例9

[0111] TTC法评价金丝桃素纳米载药体系的抗菌活性:

[0112] 采用三苯基四氯化四氮唑(TTC)法测定细菌活力。首先, 对浮游细菌细胞(10^8 CFU/

mL) 进行光动力治疗:Hypericin(游离金丝桃素)和MSN-PEG-Hypericin组中金丝桃素浓度均为 $2.5\mu\text{g/mL}$,孵育时间为8h,Hypericin(L-)为不经过光照的游离金丝桃素组,Hypericin(L+)为经过光照的游离金丝桃素组,MSN-PEG-Hypericin(L-)为不经过光照的MSN-PEG-Hypericin组,MSN-PEG-Hypericin(L+)为经过光照的MSN-PEG-Hypericin组,光照条件为光照(590nm)时间为8min。暴露后,将经过光照和不经过光照的样品在 37°C 孵育18h,对照组不添加Hypericin和MSN-PEG-Hypericin。Control(L-)为不经过光照的对照组,Control(L+)为经过光照的对照组,然后用无菌PBS洗涤样品,以 8000r/min 离心10min,然后用无菌PBS重悬。在所有样品中加入 $100\mu\text{L}$ 体积的 0.5% TTC试剂,在 37°C 下孵育30min。用紫外-可见光谱仪在490nm处测量了由此形成的甲瓖,计算存活率。

[0113] 图8为TTC法评价游离Hypericin和MSN-PEG-Hypericin光动力抗菌效果结果图。由附图8可知,在避光条件下,金丝桃素几乎无法发挥抗菌作用。在相同条件下,MSN-PEG-Hypericin的光动力抗菌效果更明显,这是由于金丝桃素制备成纳米载药体系后,可以减少金丝桃素的聚集,增加金丝桃素的水溶性和分散性,从而更好的发挥其光动力抗菌作用。此外,实验结果表明,金丝桃素纳米载药体系产生的光动力抗*S.aureus*效果优于*E.coli*,说明革兰氏阳性菌对光动力治疗敏感性更高。

[0114] 实施例10

[0115] 核酸含量测定考察金丝桃素纳米载药材料的抗菌机制:

[0116] 核酸是细菌细胞的重要组成部分,当细菌的结构被破坏时,由于细胞内容物的泄露,会释放出核酸大分子。为了阐明MSN-PEG-Hypericin的抗菌机制,采用核酸的释放量来进行评价。取 $100\mu\text{L}$ 菌悬液(10^8CFU/mL),加入 0.9mL 含药PBS溶液(金丝桃素浓度均为 $2.5\mu\text{g/mL}$),孵育8h后,Control(L-)为不经过光照的对照组,Control(L+)为经过光照的对照组,Hypericin(L-)为不经过光照的游离金丝桃素组,Hypericin(L+)为经过光照的游离金丝桃素组,MSN-PEG-Hypericin(L-)为不经过光照的MSN-PEG-Hypericin组,MSN-PEG-Hypericin(L+)为经过光照的MSN-PEG-Hypericin组,光照条件为590nm光照射8min,继续在 37°C 恒温培养箱培养24h。然后将菌悬液离心(8000rpm ,5min),取上清液,在260nm处测定其紫外吸光度值。

[0117] 通过测定260nm处的紫外吸光度值,判断光动力治疗对细菌结构破坏的情况。附图9为游离Hypericin和MSN-PEG-Hypericin光动力治疗后*S.aureus*和*E.coli*菌悬液中核酸含量测定结果,展示了光动力治疗后*S.aureus*和*E.coli*的核酸泄露情况。如附图9所示,Hypericin处理样本的核酸泄漏量低于MSN-PEG-Hypericin,这表明在相同的条件下,MSN-PEG-Hypericin具有更强的光动力抗菌活性。此外,光动力治疗后,*S.aureus*的核酸泄漏量较*E.coli*高,这也同样证明了革兰氏阳性菌相较于革兰氏阴性菌对光动力抗菌有更高的敏感性。光动力治疗后核酸的泄露,表明MSN-PEG-Hypericin的光动力抗菌作用是通过破坏细菌结构,从而导致内容物泄露来实现的。

[0118] 综上所述,本发明成功制备了一种载金丝桃素的PEG修饰的介孔二氧化硅纳米载药体系,改善了金丝桃素溶解度低,容易聚集的缺点,增强了其体外产生活性氧的能力,且明显强于游离金丝桃素。MSN-PEG-Hypericin不仅具有良好的生物相容性,同时展现出良好的光动力抗菌效果。抗菌实验结果表明,MSN-PEG-Hypericin对*S.aureus*和*E.coli*均展现出良好的光动力抗菌效果,且明显优于游离金丝桃素。因此,本发明制备的金丝桃素纳米载药

体系在抗菌领域具有潜在的应用前景。

[0119] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型,均应包含在本发明的保护范围之内。

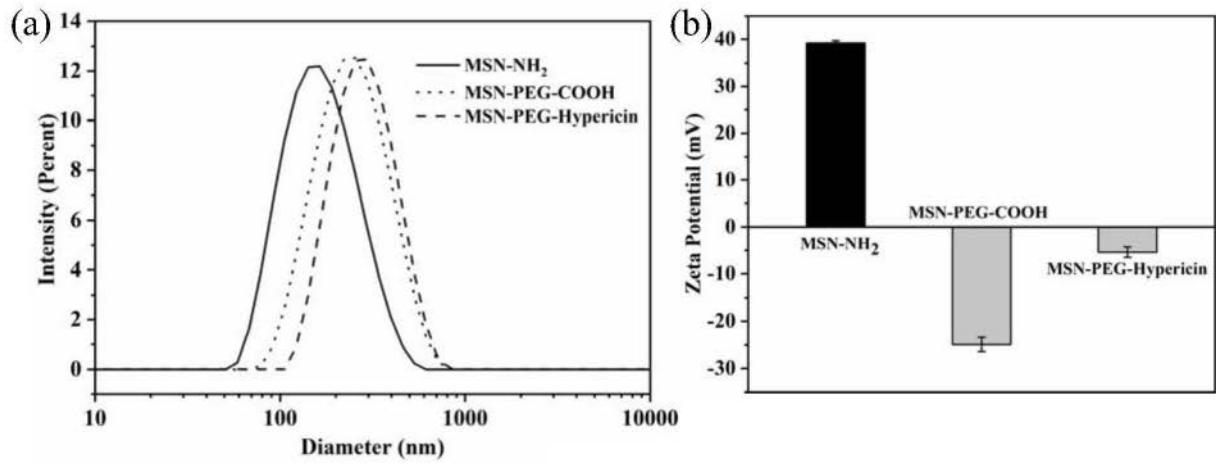


图1

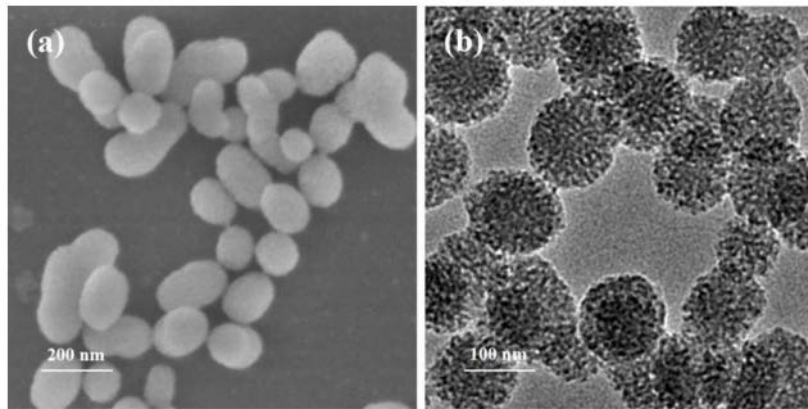


图2

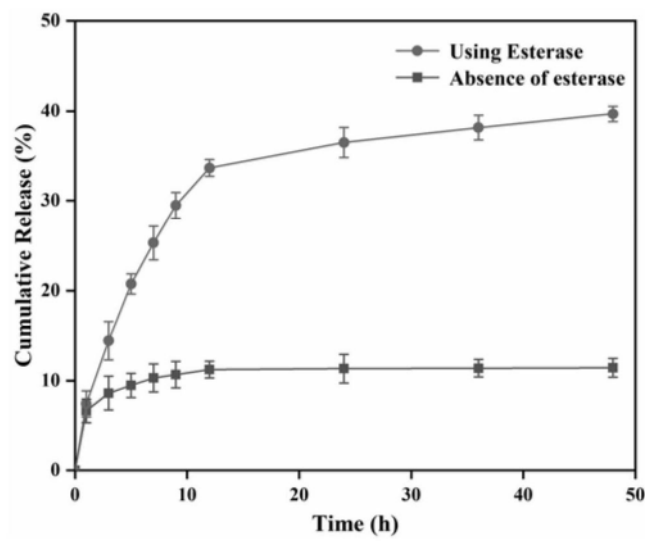


图3

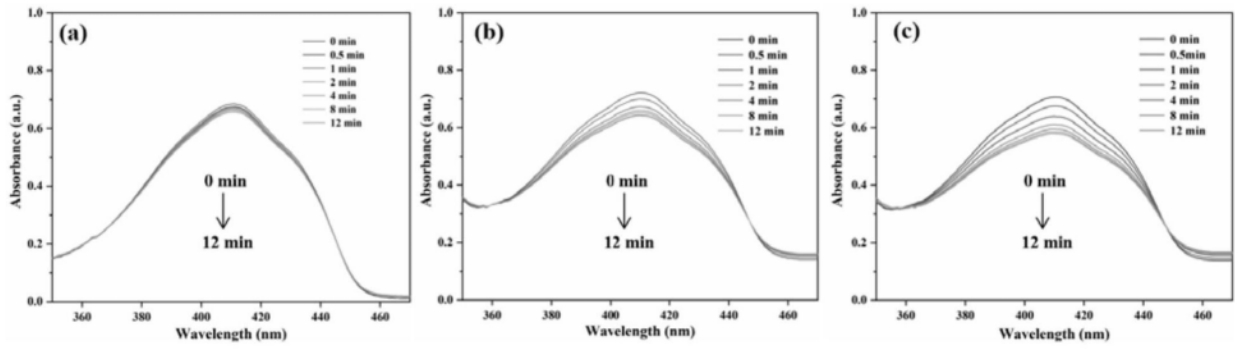


图4

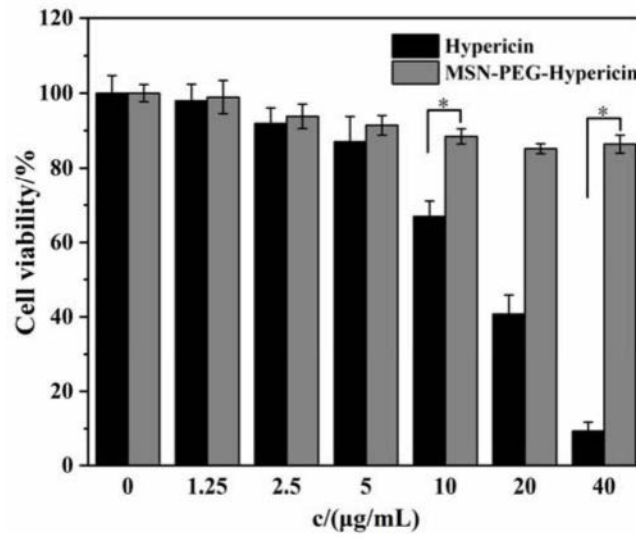


图5

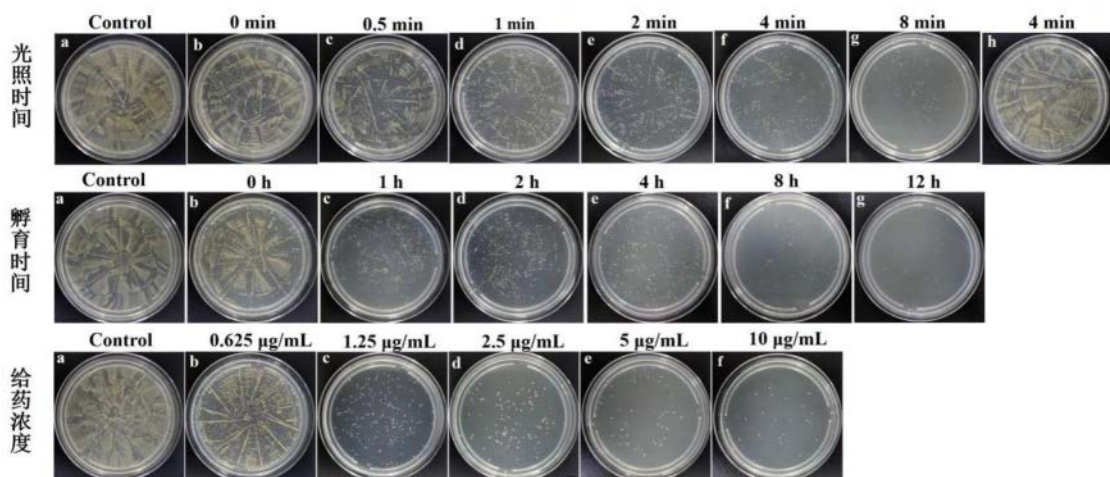


图6

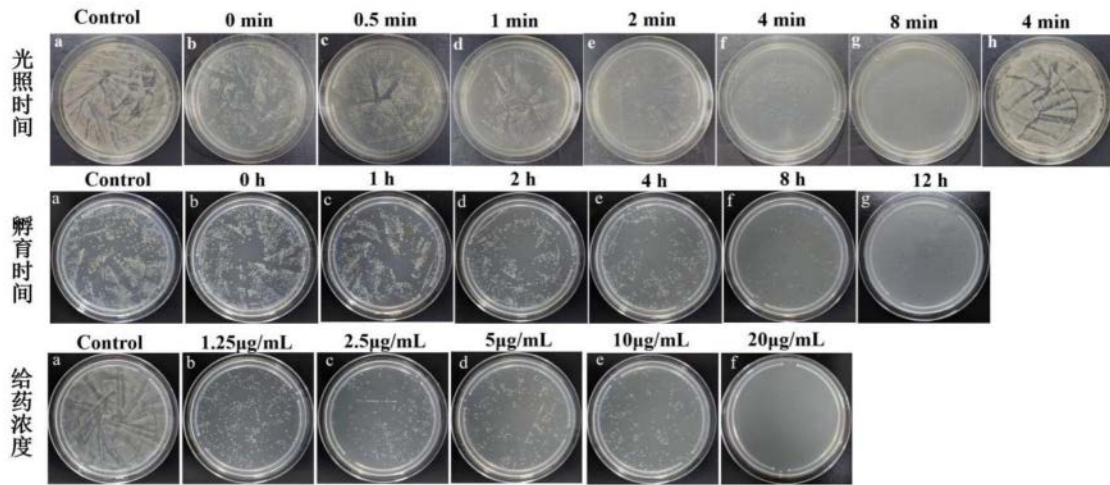


图7

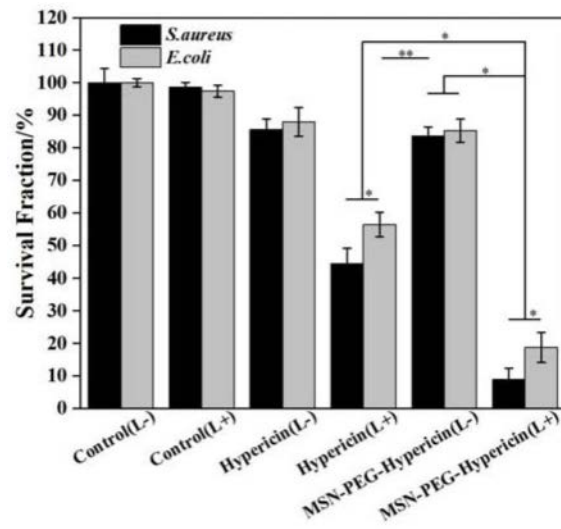


图8

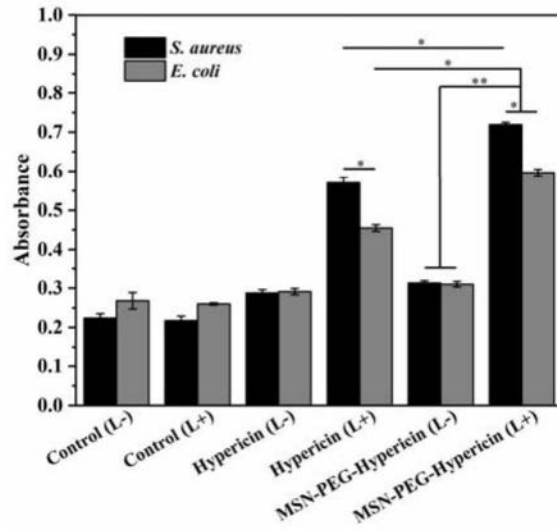


图9