

• 研究论文 •

酶响应型纳米抗生素的制备及其抗细菌生物被膜性能研究

纪文科¹, 胡雪琪¹, 赵耀¹, 诸致远², 饶静一^{1*}

(1. 华中科技大学化学与化工学院, 武汉 430074; 2. 南方科技大学台州研究院, 台州 318000)

摘要:为解决疏水性抗生素清除细菌生物被膜效果差的问题, 本文设计并制备了一种含偶氮苯的诺氟沙星抗生素前药, 将其与低聚 α -环糊精通过包结络合作用构筑纳米抗生素, 并通过核磁氢谱、粒度分析仪、紫外分光光度计和扫描电镜对其响应性降解和抗细菌生物被膜性能进行了详细表征。该纳米抗生素不仅对浮游的革兰氏阴性菌大肠杆菌与革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌展现出了优异的广谱抗菌活性, 同时具有良好的亲水性, 可在细菌生物被膜中有效渗透, 并在过量表达的偶氮还原酶作用下使其中的偶氮键发生响应性降解, 从而实现诺氟沙星对细菌生物被膜的高效清除, 大大降低了抗生素药物的用量。本文报道的酶响应型纳米药物在治疗细菌感染相关疾病方面具有良好的应用前景。

关键词: 细菌生物被膜清除; 偶氮还原酶响应; 偶氮苯; 纳米抗生素; 响应性释放

Preparation and Bacterial Biofilm Eradication Properties of Enzyme-responsive Nano-antibiotics

JI Wen-ke¹, HU Xue-qi¹, ZHAO Yao¹, ZHU Zhi-yuan², RAO Jing-yi^{1*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

2. Taizhou Research Institute, Southern University of Science and Technology, Taizhou 318000, China)

Abstract: To improve the poor activity of hydrophobic antibiotics in eradicating bacterial biofilms, a nano-antibiotic was constructed *via* the inclusion complexation between an azobenzene-conjugated norfloxacin prodrug and oligo- α -cyclodextrin. The enzyme-responsive degradation and biofilm eradication properties were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), dynamic light scattering (DLS), ultraviolet-visible spectrometer (UV-Vis spectrometer), and scanning electron microscope (SEM). The nano-antibiotics showed excellent broad-spectrum antibacterial activity against the planktonic Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, as well as effective deep penetration in bacterial biofilms due to the good water solubility. In the presence of overexpressed azoreductase in bacterial microenvironment, the azobenzene motif could be responsively degraded, leading the high efficiency in biofilm eradication of norfloxacin, which significantly reduced antibiotic dose. The enzyme responsive nanomedicine reported in this report provided a promising insight to combat the bacterial infection-related diseases.

Keywords: Bacterial biofilm eradication; Azoreductase responsive; Azobenzene; Nano-antibiotics; Responsive release

近年来, 全球性急性传染病疫潮频繁发生, 因病原微生物感染而导致的死亡已位居各种死因的

前列。据世界卫生组织统计, 全世界每年约有 70 万人死于细菌感染带来的疾病, 其中 60% 以上的

收稿: 2023-05-16; 修回: 2023-06-11

基金项目: 国家自然科学基金 (52003096)

* 通讯联系人: 饶静一 (1982-), 女, 研究员, 研究方向为生物医用材料。E-mail: jrao@hust.edu.cn

doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2023.11.013

感染是由细菌生物被膜导致^[1,2]。细菌生物被膜是由细菌及其胞外聚合物基质积聚而成的结构复杂的微生物群落,它不仅使细菌免受宿主先天免疫细胞的侵害,还严重阻碍了抗生素,尤其是疏水性抗生素的渗透,极大地增加了治疗难度^[3~5]。在临床上,需要增加剂量和延长治疗周期以确保治疗效果,但这无疑加速了细菌耐药性的发展^[6,7]。因此,针对疏水性抗生素进行递药载体设计对于治疗细菌生物被膜感染相关疾病至关重要^[8,9]。

细菌生物被膜中存在大量纳米尺度孔径的水通道,使得亲水性的纳米粒子能够在细菌生物被膜中有效的渗透^[10]。而细菌微环境具有低 pH 值、乏氧、活性氧和过量表达酶等特性^[11~14],因此针对细菌微环境设计的响应型纳米递药粒子有望实现疏水性的抗菌药物在细菌生物被膜中的有效递送,在细菌生物被膜清除方面具有巨大的应用潜力。其中,酶响应的纳米粒子已经大量应用在肿瘤、急性脑梗、糖尿病、结肠炎等疾病的治疗中,但用于细菌感染治疗的报道却很少^[14]。偶氮苯是一类具有酶响应的化合物,可以与细菌分泌的偶氮还原酶在细菌微环境中发生降解反应^[15~19]。 α -环糊精是一种具有中空圆筒结构的环状多糖分子,具有良好的溶解性和生物相容性,其空腔可以与偶氮苯基团形成包结络合的主客体^[20,21]。因此,将偶氮苯基团与 α -环糊精联用可构筑具有酶响应性的亲水性超分子组装体,这类特殊的高分子材料有望改善疏水性化合物在细菌生物被膜中的递送效率^[22,23]。

为此,本文设计合成了一种偶氮苯和诺氟沙星抗生素(Nor)偶联的前药(azo-Nor),通过偶氮苯和低聚 α -环糊精(oligo- α -CD)空腔的络合作用制备偶氮还原酶响应型纳米药物(azo-Nor/CD NPs,图 1)^[24],并通过紫外-可见分光光度法,粒径测试、核磁共振测试、抗菌活性和生物相容性测试对 azo-Nor/CD 纳米抗生素的制备、降解、抗菌活性、细胞毒性和抗细菌生物被膜性能进行了详细的研究。

1 实验部分

1.1 试剂

偶氮苯苄醇(azo-OH)、 N,N' -羰基二咪唑(CDI)、诺氟沙星(Nor)、 α -环糊精(α -CD)、环氧氯丙烷、三乙胺、连亚二硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)、结晶紫、

戊二醛、氢氧化钠、无水硫酸镁、胰蛋白胍大豆琼脂、胰酪大豆胍液体培养基(TSB)、PBS 缓冲液、无水四氢呋喃、无水 N,N -二甲基甲酰胺、二甲基亚砷和乙酸乙酯,均购于伊诺凯科技有限公司;绵羊红细胞、大肠杆菌(*E. coli*, ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC 6538)和小鼠胚胎成纤维细胞(3T3)购自迈威生物科技有限公司。

1.2 测试与表征

1.2.1 核磁表征

以氕代氯仿为溶剂,在核磁共振光谱仪(Avance III, 400 MHz, 德国 Bruker 公司)记录核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)。

1.2.2 粒径表征

以去离子水为溶剂,在百特激光粒度分析仪(BT-9300S, 丹东百特仪器有限公司)测量纳米颗粒的粒径。

1.2.3 紫外-可见吸收光谱表征

以去离子水为溶剂,使用紫外-可见分光光度计(T-5, 浩天晖仪器有限公司)记录紫外-可见吸收光谱,扫描波长范围 350~600 nm,狭缝宽度 5 nm。

1.2.4 SEM 表征

对脱水后的细菌菌膜进行喷金处理后,采用场发射扫描电镜(SU8010, 日本 Hitachi 公司)对细菌的形貌进行观测。

1.2.5 吸光度表征

采用微孔板检测器(Infinite M200 Pro, 瑞士 TECAN 公司)对吸光度值(OD)进行测定。

1.3 环糊精-偶氮苯-诺氟沙星纳米药物(azo-Nor/CD NPs)的制备

1.3.1 偶氮苯-诺氟沙星前药(azo-Nor)的合成

azo-CDI^[25]:向圆底烧瓶通氮气 10 min,加入无水四氢呋喃 6 mL 及 azo-OH (319.8 mg, 1.5 mmol),再加入 CDI (490 mg, 3 mmol),室温避光反应 2 h。然后用 10 mL 超纯水淬灭反应,再用乙酸乙酯萃取 2 次,有机相加入无水硫酸镁干燥,抽滤,浓缩除去溶剂,最后柱层析分离纯化产物(洗脱剂为乙酸乙酯:正己烷=1:2, V:V, 下同),得到橘黄色固体,产率:94.2%。

azo-Nor^[26]:向圆底烧瓶中加入 Nor(576 mg, 8 mmol),再加入 25 mL 无水 N,N -二甲基甲酰胺,充分溶解后,加入 azo-CDI (274.9 mg, 0.9 mmol)及 500 μL 三乙胺(3.6 mmol),室温避光

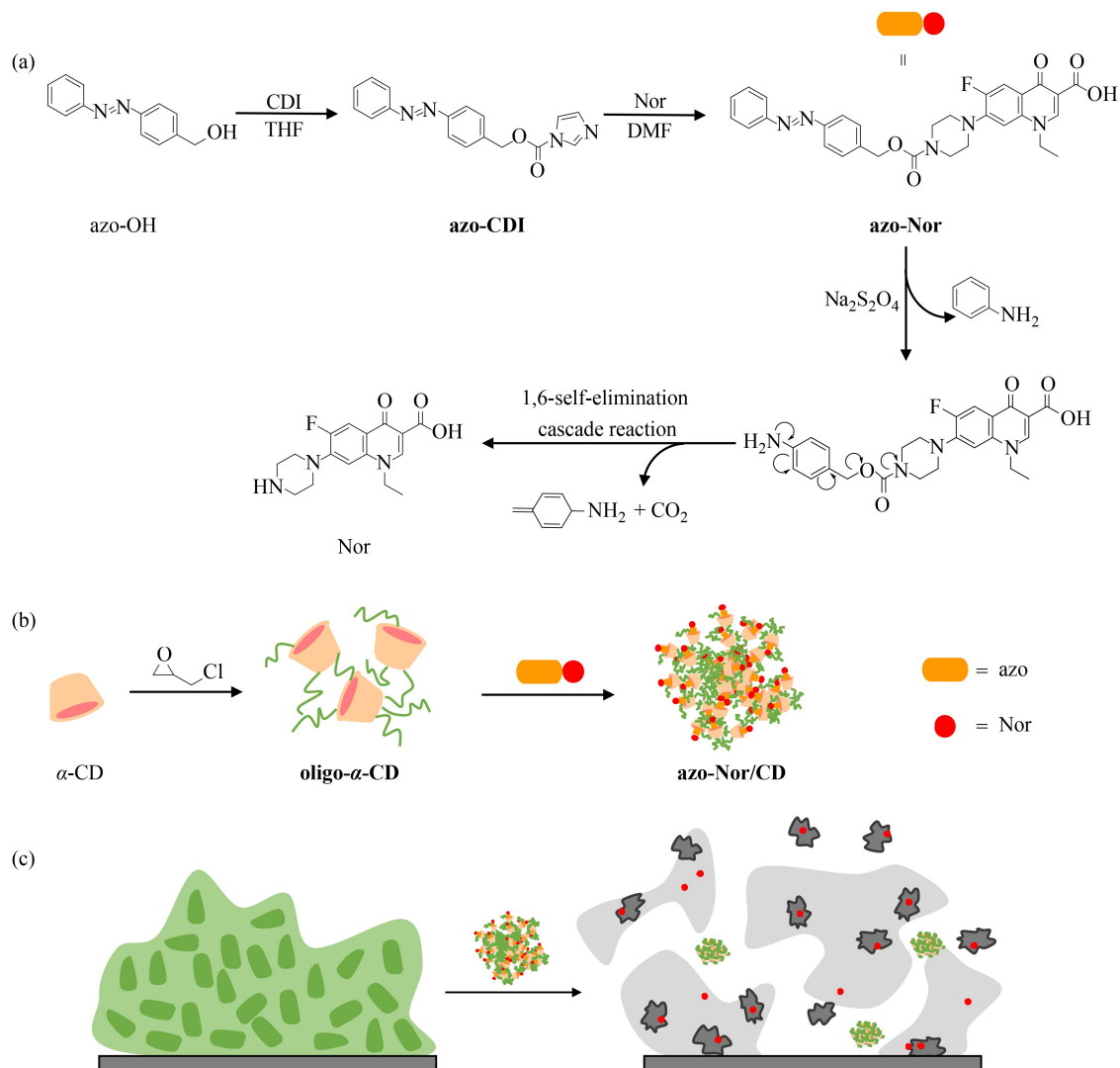


图1 (a) **azo-Nor** 前药和(b) **azo-Nor/CD** 纳米抗生素的制备示意图;(c) **azo-Nor/CD** 纳米抗生素清除细菌生物被膜的机理示意图

Figure 1 Schematic representation for the preparation of (a) **azo-Nor** and (b) **azo-Nor/CD** NPs; (c) Schematic representation for the biofilm eradication of **azo-Nor/CD** NPs

过夜反应。反应结束后,加入 30 mL 盐酸(1 mol/L),用二氯甲烷萃取三次,收集有机相。用盐酸洗涤三次后,有机相用无水硫酸钠干燥,抽滤,浓缩除去溶剂,柱层析分离纯化产物(洗脱剂为乙酸乙酯:正己烷=2:1),得到橘黄色固体,产率为 44.9%。

1.3.2 α-环糊精低聚物(oligo-α-CD)的制备

称取 α-环糊精(7 g, 7.2 mmol)于圆底烧瓶中,加入 8 mL 质量分数为 20% 的 NaOH 溶液,在 60 °C 下,逐滴加入环氧氯丙烷(5.6 mL, 72 mmol)。反应 24 h 后,向其中加入 50 mL 丙酮和乙醇的混合溶剂(体积比 4:1),离心,除去上清液,收集白色固体,用去离子水再次溶解,然后转移至透析袋(MWCO:3500 Da)中透析 48 h,冷冻

干燥后得到产物 **oligo-α-CD**^[27]。

1.3.3 azo-Nor/CD NPs 的制备

将 **oligo-α-CD** 与 **azo-Nor** 分别溶解于二甲基亚砜溶液中,配制浓度分别为 200、4 mg/mL 的溶液,然后取等体积的 **oligo-α-CD** 和 **azo-Nor** 溶液在室温下混合,静置半小时后,在超声条件下将混合液加入去离子水中。最后,将混合溶液置于透析袋(MWCO:3500 Da)中去除有机溶剂和游离小分子。**azo-Nor/CD** NPs 溶液中 **azo-Nor** 的浓度通过紫外-可见吸收光谱中 430 nm 的偶氮苯特征吸收信号的强度来标定。

1.4 azo-Nor 的降解

取 1200 μL 2 mg/mL 的 **azo-Nor**,加入 900 μL

新鲜配制的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液 (20 mg/mL), 吹打混匀, 静置 1 min 后, 以 **azo-Nor** 和 Nor 为对照, 使用紫外-可见分光光度计检测偶氮苯化合物在近紫外区特征吸收峰的变化。用乙酸乙酯萃取上清液, 并用纯水洗涤有机层后, 加入无水硫酸镁干燥, 浓缩除去溶剂, 柱层析分离纯化产物, 洗脱剂为乙酸乙酯: 正己烷 = 2: 1 (V: V), 得到白色固体用于核磁分析^[28]。

1.5 azo-Nor/CD NPs 的降解

取 1200 μL 2 mg/mL 的 **azo-Nor/CD** NPs, 加入 900 μL 新鲜配制的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液 (20 mg/mL), 吹打混匀, 静置 1 min 后, 使用紫外-可见分光光度计检测偶氮苯化合物在近紫外区的特征吸收峰的变化。最后将上层清液置于透析袋 (MWCO: 3500 Da) 中透析, 检测其粒径分布。

1.6 生物活性测试

1.6.1 最低抑菌浓度 (MIC) 测试

在 TSB 培养基中将样品稀释至 2 倍待测浓度, 细菌用 TSB 稀释至 2×10^6 CFU/mL。后各取 100 μL 样品溶液和菌液加入 96 孔细胞培养板中。以 TSB 中无样品, 也无细菌的实验组作为阴性对照; 以 TSB 中无样品, 但有细菌的实验组作为阳性对照。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养 24 h 后, 使用酶标仪测试波长 600 nm 处样品的吸光度, 每个样品设置 3 个复孔。最后计算与阳性对照相比, 抑制至少 90% 细菌生长的最低聚合物浓度, 即为样品对该细菌的 MIC。细菌抑制率的计算如公式 (1) 所示:

细菌抑制率 % =

$$\frac{\text{OD}_{600}(\text{阳性对照组}) - \text{OD}_{600}(\text{样品组})}{\text{OD}_{600}(\text{阳性对照组}) - \text{OD}_{600}(\text{阴性对照组})} \times 100\%$$

(1)

1.6.2 溶血测试

取 1 mL 无菌绵羊红细胞离心 (1500 r/min, 3 min) 后, 用 PBS 重新分散, 重复 3 次。然后, 用 PBS 将 10 mg/mL 的样品稀释成 1 mL 不同浓度的待测溶液, 加入重新分散后的 20 μL 红细胞悬液, 以 PBS 中无样品的实验组作为阴性对照, 以去离子水中无样品的实验组作为阳性对照。混匀后置于室温下孵育 2 h。2 h 后离心 (1500 r/min, 3 min) 取上层清液 200 μL 于 96 孔细胞培养板中, 用酶标仪测量其在波长 540 nm 处的吸光度 (OD_{540})。溶血率 (Hemolysis%) 的计算如公

式 (2) 所示:

溶血率 % =

$$\frac{\text{OD}_{540}(\text{样品组}) - \text{OD}_{540}(\text{阴性对照组})}{\text{OD}_{540}(\text{阳性对照组}) - \text{OD}_{540}(\text{阴性对照组})} \times 100\%$$

(2)

1.6.3 细胞毒性测试

使用 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒研究不同浓度的 Nor、azo-Nor 与 **azo-Nor/CD** NPs 对 3T3 细胞的毒性。将 3T3 细胞以 1×10^4 个细胞/孔接种到 96 孔板内, 每孔加入 100 μL DMEM 完全培养基, 在细胞培养箱培养过夜。在 DMEM 基础培养基中配置样品溶液, 去除 96 孔板内旧培养基, 加入样品溶液, 每孔 100 μL 。孵育 24 h 后, 去除孔内培养液, 换用含 10% CCK-8 的 DMEM 基础培养基孵育 1 h, 用酶标仪测量样品在 450 nm 处的吸光度 (OD_{450}), 每个样品设置 3 个复孔。细胞存活率的计算如公式 (3) 所示:

细胞存活率 % =

$$\frac{\text{OD}_{450}(\text{样品组}) - \text{OD}_{450}(\text{阴性对照组})}{\text{OD}_{450}(\text{阳性对照组}) - \text{OD}_{450}(\text{阴性对照组})} \times 100\%$$

(3)

1.7 抗细菌生物被膜测试

1.7.1 细菌生物被膜的培养

将 *E. coli* 和 *S. aureus* 细菌接种于 TSB 培养基中, 培育 6 h 直至对数生长期。接着在 TSB 培养基中重新悬浮得到浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌液, 在 96 孔板中, 每孔加入 200 μL 稀释后的菌液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。每隔 24 h 去除孔内旧培养基, 补充 200 μL 新鲜 TSB 培养基。连续培养三天后获得成熟细菌生物被膜, 最后用 PBS 缓冲液清洗三次。

1.7.2 细菌生物被膜的清除测试

在 TSB 培养基中将 Nor 和 **azo-Nor/CD** NPs 稀释至目标浓度, 随后, 加入到备用的成熟细菌生物被膜孔板内, 每孔加 200 μL , 阳性对照组加入 200 μL 新鲜的 TSB 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。孵育结束后, 去除悬浮液, 用 PBS 缓冲液清洗三次, 接着加入 2.5% 的戊二醛溶液, 避光固定 1 h。除去戊二醛溶液后, 加入 0.1% 的结晶紫溶液染色 30 min, 用无菌去离子水清洗三次后, 加入 95% 的乙醇, 处理 1 h。最后使用酶标仪上测量其在 600 nm 处的吸光度 (OD_{600}), 细菌生物被膜生物量的计算如公式 (4) 所示:

细菌生物量 % =

$$\frac{OD_{600}(\text{样品组}) - OD_{600}(\text{阴性对照组})}{OD_{600}(\text{阳性对照组}) - OD_{600}(\text{阴性对照组})} \times 100\% \quad (4)$$

1.7.3 细菌生物被膜残余细菌存活率测试

按上述相同的方法培养成熟的细菌生物被膜,接着去除孔内悬浮液,用 PBS 缓冲液清洗三次,在 TSB 培养基中稀释 Nor 和 **azo-Nor/CD NPs** 至相应浓度,再分别加 200 μL 溶液于成熟细菌生物被膜孔板内,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h。孵育结束后用 PBS 缓冲液清洗孔板两次,然后加入 200 μL PBS 缓冲液,超声 15 min,再用 PBS 缓冲液稀释至 10000 倍,吸取 100 μL 均匀涂覆在琼脂板上,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水培箱内培养 24 h。最后计算琼脂板上菌落数,以上每项实验均设置三个复孔。

2 结果与讨论

2.1 azo-Nor 前药的合成

如图 1(a)所示,azo-OH 首先经 N,N' -羰基

二咪唑(CDI)活化,再与 Nor 偶联以制备 **azo-Nor** 前药。具体来说,首先是在无水四氢呋喃中,azo-OH 和 CDI 于常温下发生取代反应,核磁氢谱中属于咪唑特征峰($\delta = 7.08 \sim 7.26$ 和 8.18)的出现表明 azo-CDI 的成功合成(图 2A)。随后,在无水 N,N -二甲基甲酰胺中,azo-CDI 和 Nor 在常温下偶联制备 **azo-Nor**。如图 2(B)所示,Nor 的特征峰($\delta = 1.77, 4.33 \sim 3.30, 8.67$ 和 15.01)的出现和咪唑的特征峰消失均表明咪唑基团已被 Nor 成功取代^[29]。

2.2 azo-Nor 前药的降解

细菌的生长繁殖过程中会分泌出大量的还原性酶,如偶氮还原酶,可使偶氮苯基团发生降解^[14,15]。因此,我们采用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 模拟还原环境,以研究 **azo-Nor** 的响应性降解行为。加入过量的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 后,黄色的 **azo-Nor** 溶液迅速转变为无色。经紫外-可见光谱检测,可以观察到 **azo-Nor** 溶液中位于 430 nm 的属于偶氮苯的特征吸收信号随着 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的加入完全消失,表明 **azo-Nor** 中的偶氮苯基团已完全降解(图 3)。

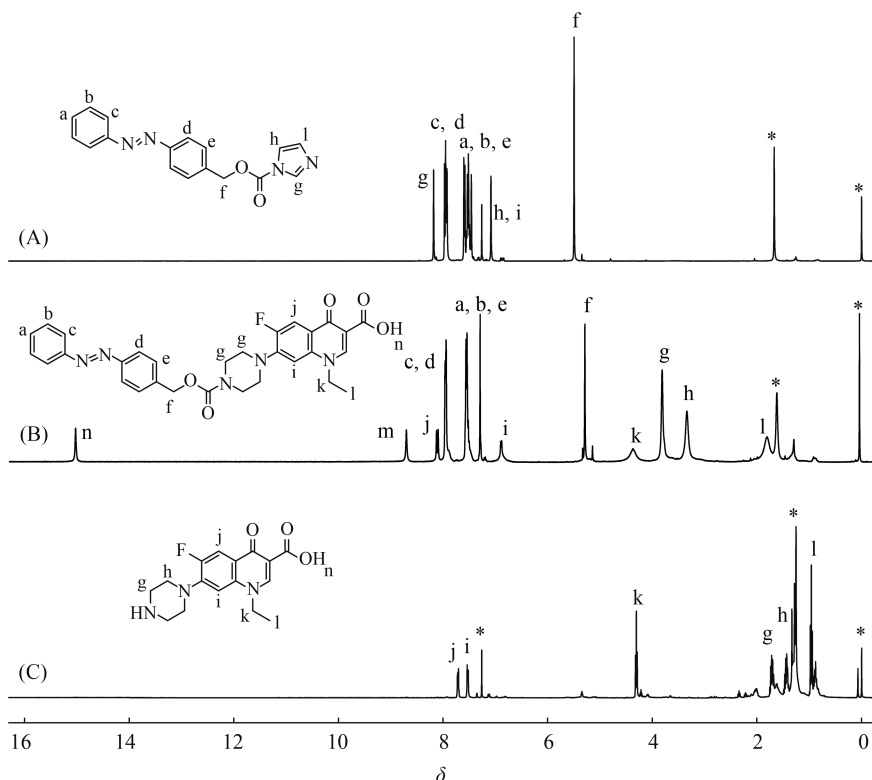


图 2 (A) azo-CDI, (B) **azo-Nor** 与 (C) **azo-Nor** 降解产物的核磁共振氢谱,溶剂为氘代氯仿(星号标记代表的是残留溶剂和 TMS 的特征峰)

Figure 2 ^1H -NMR spectra of (A) azo-CDI, (B) **azo-Nor**, and (C) product from the reduction of **azo-Nor** in CDCl_3 , respectively (Signals arising from CDCl_3 and TMS are marked with asterisks.)

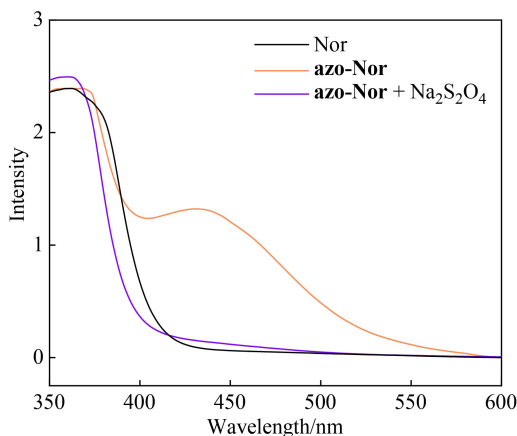


图3 Nor、azo-Nor 与经 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理后的 azo-Nor 的紫外吸收光谱

Figure 3 UV-Vis spectra of Nor, azo-Nor, and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ treated azo-Nor

如图 1(a)所示, azo-Nor 前药中偶氮苯的降解会触发级联反应, 释放出 Nor 抗生素。为了验证 Nor 的释放, 我们对降解溶液进行萃取分离和柱层析分离。所得产物的核磁氢谱如图 2(C)所示, 原 $\delta=8.10\sim 6.85$ 处属于偶氮苯苯环上的特征峰已全部消失(图 2B), 而属于 Nor 叔胺上的亚甲基(g 峰)的化学位移从 $\delta=3.8$ 移至 $\delta=1.72\sim 1.43$ 处, 这证明了偶氮苯基团的完全降解和级联反应的发生。此外, 纯化所得产物与 Nor 的核磁氢谱特征峰一致, 证明 azo-Nor 前药降解后成功释放出了 Nor 抗生素。

2.3 azo-Nor/CD NPs 的制备和降解

azo-Nor 前药具有大共轭结构, 水溶性较差, 不利于其在细菌生物被膜中的渗透。偶氮苯基团

与 α -环糊精(α -CD)的空腔有主客体包结络合作用, 将 azo-Nor 前药增溶在 α -CD 的疏水空腔中构筑成纳米粒子, 可有效提高其水溶性。考虑到低聚环糊精比游离环糊精具有更好的物理稳定性和生物相容性^[30], 我们首先将 α -CD 与环氧氯丙烷在碱性条件下偶联制备得到 α -CD 低聚物(oligo- α -CD)。然后, 通过良溶剂过渡的方法, 将 azo-Nor 与 oligo- α -CD 以 1 : 2 的摩尔比在二甲基亚砜中混合, 并在超声条件下加入去离子水中, 最后通过透析去除有机溶剂和小分子杂质以制备 azo-Nor/CD NPs。在紫外吸收光谱中可以清晰地观察到 azo-Nor/CD NPs 在 430 nm 处具有明显的偶氮苯特征吸收信号(图 4a)。而动态光散射检测到 9 nm 的低聚 α -环糊精与前药络合后尺寸增长至 225 nm, 证实 azo-Nor/CD NPs 的成功制备(图 4b)。

为了进一步验证 azo-Nor/CD NPs 的响应性降解与释放, 我们同样采用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 化学还原剂对其降解行为进行研究。如图 4(a)所示, azo-Nor/CD NPs 经 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理, 黄色的溶液迅速转变为无色, 且紫外吸收光谱中 430 nm 处偶氮苯的特征吸收峰消失, 表明偶氮苯基团已完全降解。动态光散射的测试结果显示, 加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 后粒子尺寸减小至 14 nm 左右, 该尺寸与低聚 α -环糊精的尺寸接近(图 4b)。这些数据表明, 在还原条件下 azo-Nor/CD NPs 可以发生解离并释放出 Nor 抗生素。

2.4 抗菌性能和生物相容性表征

我们选取了两种代表性菌种, 革兰氏阴性菌

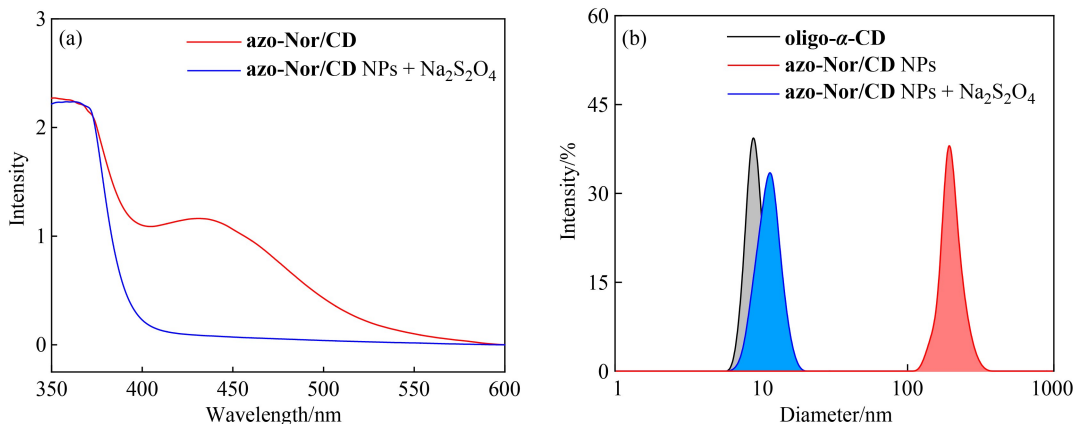


图4 (a) azo-Nor/CD NPs 经 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理前后的紫外吸收光谱; (b) oligo- α -CD 与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理前后的 azo-Nor/CD NPs 的粒径变化

Figure 4 (a) UV-Vis spectra of azo-Nor/CD NPs and treated with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; (b) DLS results of oligo- α -CD, azo-Nor/CD NPs, and azo-Nor/CD NPs treated with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

大肠杆菌(*E. coli*)与革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*),采用微量肉汤稀释法对 **azo-Nor** 前药以及 **azo-Nor/CD** NPs 的 MIC 进行了测定。如表 1 所示,Nor 对于 *E. coil* 和 *S. aureus* 的最小抑菌浓度(MIC)分别为 0.256 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 。而 **azo-Nor** 前药对于 *E. coil* 和 *S. aureus* 的 MIC 均为 16 $\mu\text{g/mL}$,相较于 Nor 抗生素的抗菌活性降低了 16~62.5 倍。我们推测这可能是由于疏水性偶氮苯基团的加入使 **azo-Nor** 前药的溶解性降低,导致它与细菌分泌的偶氮还原酶的接触不充分,从而影响其释放 Nor 抗生素的效率^[31]。而 **azo-Nor/CD** NPs 对于 *E. coil* 和 *S. aureus* 的 MIC 分别为 8 和 4 $\mu\text{g/mL}$,相对 **azo-Nor** 前药,其抗菌性能提升了 2~4 倍。这可能是由于环糊精的加入使其溶解性增强,因此更容易与偶氮还原酶发生作用,从而导致其释放 Nor 的能力增强^[32]。

通过扫描电镜(SEM)对 Nor 抗生素、**azo-Nor** 前药和 **azo-Nor/CD** NPs 的杀菌机理进行了研究。从图 5 可以看到,被自由的 Nor 抗生素杀死的细菌表面基本保持了原本的形貌。这是因为 Nor 是通过阻碍细菌 DNA 的复制来抑制细菌的生长,因此被 Nor 抗生素杀死的细菌表面基本不会产生变化。同样地,被 **azo-Nor** 前药和 **azo-Nor/CD** NPs 杀死的细菌表面也基本不变,说明了他们的杀菌机理与 Nor 抗生素相同,这也反映出 **azo-Nor** 和 **azo-Nor/CD** NPs 是通过释放 Nor 抗生素来抑制细菌生长的。

此外,Nor,**azo-Nor** 以及 **azo-Nor/CD** NPs 的溶血指数(HC_{10})和最低细胞抑制浓度(IC_{50})均大于 1024 $\mu\text{g/mL}$,使得它们对细菌的选择性及治疗指数大于 64~4096。以上结果表明,**azo-Nor** 和 **azo-Nor/CD** NPs 与 Nor 抗生素药物一样,都具有良好的红细胞和组织细胞相容性。

表 1 Nor,**azo-Nor** 和 **azo-Nor/CD** NPs 的生物活性
Table 1 Biological activities of Nor, **azo-Nor**, and **azo-Nor/CD** NPs

Sample	MIC ^a ($\mu\text{g/mL}$)		HC_{10} ^d ($\mu\text{g/mL}$)	Selectivity ^e		IC_{50} ^f ($\mu\text{g/mL}$)	TI ^g	
	EC ^b	SA ^c		EC	SA		EC	SA
Nor	0.25	1	>1024	>4096	>1024	>1024	>4096	>1024
azo-Nor	16	16	>1024	>64	>64	>1024	>64	>64
azo-Nor/CD NPs	8 ^h	4	>1024	>128	>256	>1024	>128	>256

^a MIC:最小抑菌浓度,抑制 90%以上细菌生长的最低药物浓度;^b EC:大肠杆菌, *E. coil*, ATCC 25922;^c SA:金黄色葡萄球菌, *S. aureus*, ATCC 6538;^d HC_{10} :溶血指数,低于 10%红细胞裂解所需的药物浓度;^e Selectivity:选择性,通过 $\text{HC}_{10}/\text{MIC}$ 计算所得;^f IC_{50} :细胞抑制浓度,抑制 50% 3T3 细胞生长的药物浓度;^g TI:治疗指数,通过 $\text{IC}_{50}/\text{MIC}$ 计算所得;^h 按照 **azo-Nor/CD** NPs 中 **azo-Nor** 前药的浓度计算。

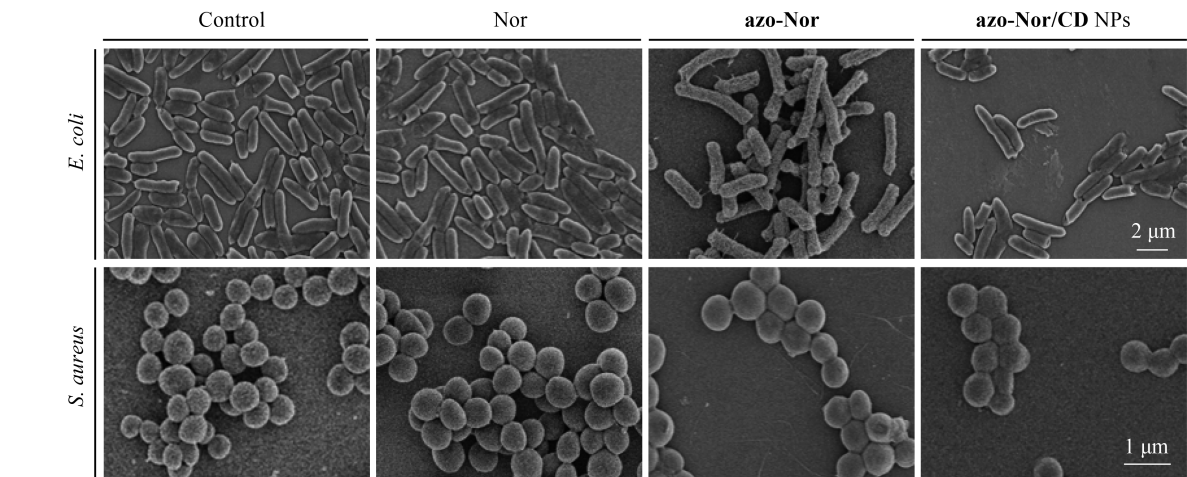


图 5 浮游 *E. coli* 和 *S. aureus* 经过 Nor,**azo-Nor** 和 **azo-Nor/CD** NPs 处理后的扫描电镜照片(抗生素的浓度对 *E. coli* 和 *S. aureus* 分别为 16 和 8 $\mu\text{g/mL}$)
Figure 5 SEM images of *E. coli* and *S. aureus* after incubation with Nor, **azo-Nor** and **azo-Nor/CD** NPs (The antibiotic concentration was fixed at 4 and 8 $\mu\text{g/mL}$ for *S. aureus* and *E. coli*, respectively.)

2.5 细菌生物被膜清除测试

接下来,采用 Nor 抗生素作为对照,进一步评估了 **azo-Nor/CD** NPs 对细菌生物被膜的清除能力。在培育了三天的成熟 *E. coil* 和 *S. aureus* 被膜中,加入不同浓度的 Nor 和 **azo-Nor/CD** NPs 溶液,通过结晶紫染色的方法检测被膜中剩余的细菌含量。为便于比较,对于所有样品均以溶液中含有的 **azo-Nor** 前药的质量浓度进行标定。如图 6(a)所示,对于 *E. coil* 被膜,随着 **azo-Nor/CD** NPs 浓度的提高,被膜中的残余细菌量逐渐降低。当 **azo-Nor/CD** NPs 中 Nor 抗生素浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可清除至少 75%的被膜。而无负载的 Nor 药物浓度达到 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时才能清除约 70%的被膜,相较于 **azo-Nor/CD** NPs 用量提高了 4 倍。如图 6(b)所示,对于 *S. aureus* 被膜,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 **azo-Nor/CD** NPs 能清除 70%以上的被膜,而无负载的 Nor 则需要将用量提高 2 倍,才能达到相近的清除效果。

我们对经 Nor 和 **azo-Nor/CD** NPs 处理后 *E. coil* 和 *S. aureus* 被膜中的细菌存活数也进行了检测。如图 7 所示,对于 *E. coil* 被膜,**azo-Nor/CD** NPs 仅需要 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 就可将其中的细菌完

全杀死($>8-\lg$ 细菌减少量),而 Nor 抗生素则需要将用量提高 4 倍才能达到相近的灭菌效果。对于 *S. aureus* 被膜,**azo-Nor/CD** NPs 和无负载的 Nor 抗生素完全杀死被膜中的细菌时需要的用量分别是 8 和 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。扫描电镜(SEM)显示,在相同浓度下,经 **azo-Nor/CD** NPs 处理后细菌生物被膜只有少量残余,而 Nor 抗生素处理后的被膜还有大量剩余(图 8)。值得一提的是,虽然 **azo-Nor/CD** 纳米抗生素对浮游的 *E. coil* 和 *S. aureus* 细菌的 MIC 要高于未负载的 Nor 抗生素,但它具有良好的水溶性和纳米尺寸效应。直径约为 225 nm 的 **azo-Nor/CD** NPs 可以通过细菌生物被膜中的水通道渗透进入被膜深部,可在细菌生物被膜中实现高效的渗透。在过量表达的偶氮还原酶作用下,纳米粒子中的偶氮苯基团发生还原断裂,经级联消除反应在被膜深部释放出抗生素药物。与疏水性的 Nor 抗生素相比,**azo-Nor/CD** 纳米抗生素更容易渗透进入被膜深部,接触并杀死其中的细菌。因此,**azo-Nor/CD** NPs 相对于无负载的 Nor 抗生素具有更好的细菌生物被膜清除能力,可大大降低抗生素的用量。

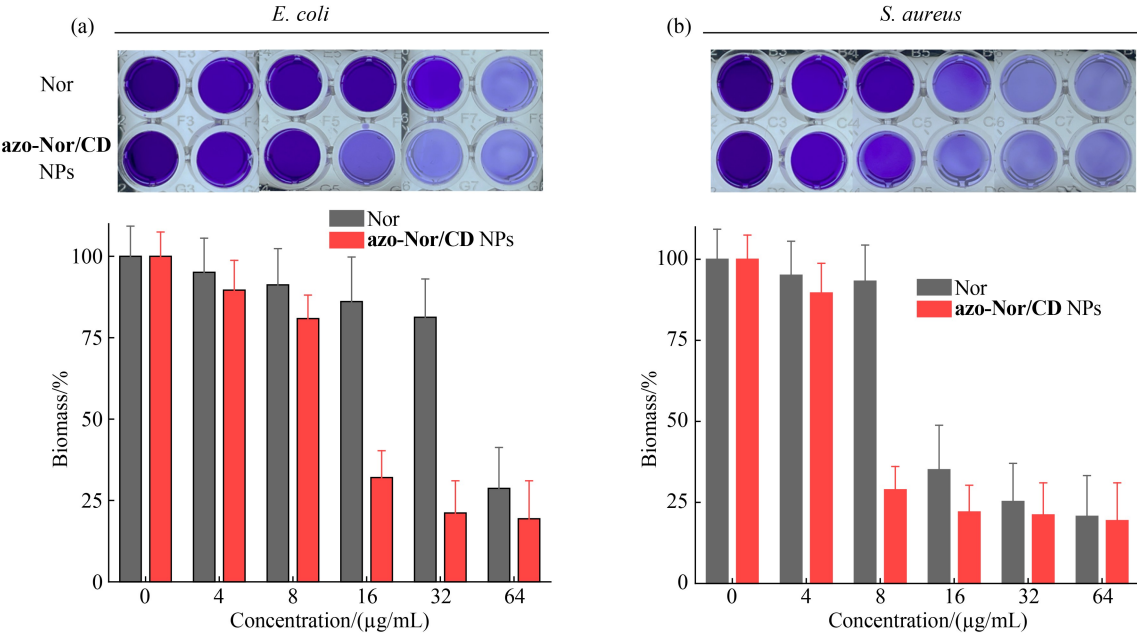


图 6 不同浓度 Nor 和 **azo-Nor/CD** NPs 处理后的(a) *E. coli* 和(b) *S. aureus* 生物被膜的剩余细菌含量

Figure 6 Photographs and histograms showing the biomass reduction of (a) *E. coli* and (b) *S. aureus* biofilms after the treatment with Nor and **azo-Nor/CD** NPs at various concentrations

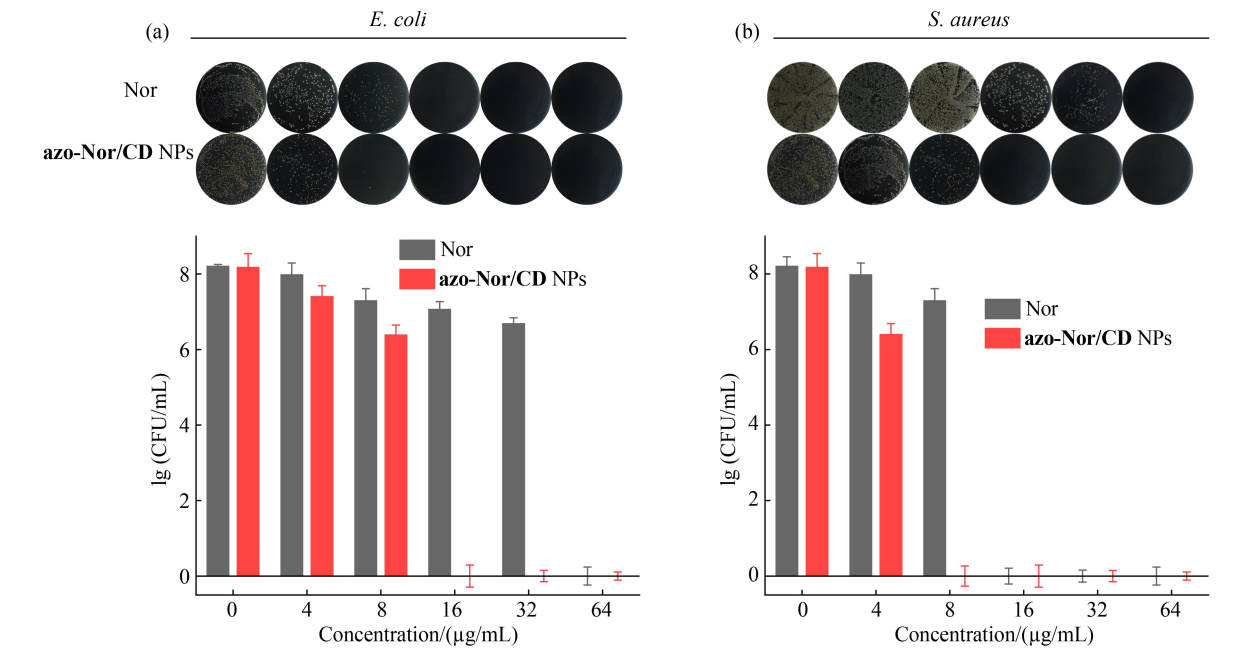


图 7 (a) *E. coli* 和 (b) *S. aureus* 生物被膜经过 Nor 和 azo-Nor/CD NPs 处理后细菌存活数随浓度的变化情况
Figure 7 Photographs and histograms showing the viability of (a) *E. coli* and (b) *S. aureus* biofilms after the treatment with Nor and azo-Nor/CD NPs at various concentrations

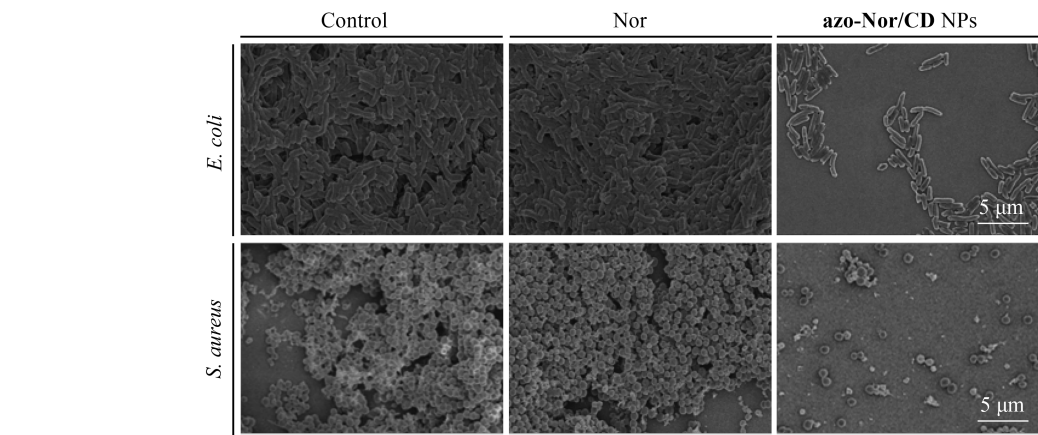


图 8 *E. coli* 和 *S. aureus* 生物被膜经过 Nor 和 azo-Nor/CD NPs 处理后的扫描电镜照片 (其中抗生素对 *E. coli* 和 *S. aureus* 生物被膜的浓度分别为 32 和 16 µg/mL)
Figure 8 SEM images of *E. coli* and *S. aureus* biofilms after incubation with Nor and azo-Nor/CD NPs (The antibiotic concentration was fixed at 32 and 16 µg/mL for *E. coli* and *S. aureus* biofilms, respectively.)

3 结论

针对疏水性抗生素在细菌生物被膜中难渗透的问题,本文设计并合成了一种可以在细菌生物被膜中递送抗生素的酶响应性纳米药物 azo-Nor/CD NPs。在细菌生物被膜分泌的偶氮还原酶作用下,azo-Nor/CD NPs 可降解并释放出 Nor 抗生素,对浮游的革兰氏阴性菌大肠杆菌与革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌展现出了优异的广谱抗菌活性,且对血红细胞和哺乳细胞具有良好的生物相

容性。不仅如此,该纳米抗生素还具有良好的水溶性和纳米尺寸效应,与疏水性的 Nor 抗生素相比,azo-Nor/CD 纳米抗生素更容易渗透进入被膜深部,接触并杀死其中的细菌,在降低抗生素的用量时,展现出优异的细菌生物被膜清除能力。综上所述,本文所制备的酶响应型纳米载体可有效提高疏水性抗生素在细菌生物被膜中的渗透性,为治疗细菌感染相关疾病提供了新的设计思路。

参考文献:

- [1] Hu, D. F.; Deng, Y. Y.; Jia, F.; Jin, Q.; Ji, J. Surface charge switchable supramolecular nano-carriers for nitric oxide synergistic photodynamic eradication of biofilms. *ACS Nano*, **2020**, 14(1), 347-359.
- [2] 张建红, 陈婧婕, 高玲玲, 余骆峰, 冯维, 任攀宇, 叶晓婷, 李鹏, 黄维. 高分子材料在病菌耐药性危机中的机遇与挑战. *高分子通报*, **2019**, (10), 149-162.
- [3] 万春云, 汪庆, 李思敏, 孙岩, 张晓婷, 陈信任, 李双双, 魏贺红. 群体感应对细菌生物膜及细菌耐药性影响的研究进展. *生态毒理学报*, **2023**, 18(1), 149-159.
- [4] 罗欢, 王伟捷, 李玮玮, 郭银莉, 刘伟佳, 卢嵘, 薛云新, 王岱, 赵西林. 细菌生物膜抵抗消毒剂的的研究进展. *中国抗生素杂志*, **2023**, 48(2), 133-143.
- [5] Kasza, K.; Gurnani, P.; Hardie, K. R.; Cámara, M.; Alexander, C. Challenges and solutions in polymer drug delivery for bacterial biofilm treatment: a tissue-by-tissue account. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2021**, 178, 113973.
- [6] Wang, Z.; Liu, X. Y.; Duan, Y. W.; Huang, Y. Infection microenvironment-related antibacterial nanotherapeutic strategies. *Biomaterials*, **2022**, 280, 121249.
- [7] 李弘昊, 温红侠. 细菌生物膜治疗研究新进展. *中国临床研究*, **2022**, 35(12), 1758-1761.
- [8] Birk, S. E.; Boisen, A.; Nielsen, L. H. Polymeric nano- and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2021**, 174, 30-52.
- [9] 寇静, 文雨洁, 刘瑞鸽, 冯江, 彭书锋. 生物膜和生物膜形成菌的研究解析. *科学咨询(教育科研)*, **2021**, (9), 43-44.
- [10] Liu, Y.; Shi, L. Q.; Su, L. Z.; van der Mei, H. C.; Jutte, P. C.; Ren, Y. J.; Busscher, H. J. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, 48(2), 428-446.
- [11] Deng, Q. Q.; Sun, P. P.; Zhang, L.; Liu, Z. W.; Wang, H. A.; Ren, J. S.; Qu, X. G. Porphyrin MOF dots-based, function-adaptive nanoplatform for enhanced penetration and photodynamic eradication of bacterial biofilms. *Adv. Funct. Mater.*, **2019**, 29(30), 1903018.
- [12] Ding, X. K.; Wang, A. Z.; Tong, W.; Xu, F. J. Biodegradable antibacterial polymeric nanosystems: a new hope to cope with multidrug-resistant bacteria. *Small*, **2019**, 15(20), 1900999.
- [13] Qu, S. Q.; Huang, X. Y.; Song, X. B.; Wu, Y. F.; Ma, X. W.; Shen, J. Z.; Zhu, K. A rigid nanoplatform for precise and responsive treatment of intracellular multidrug-resistant bacteria. *Engineering*, **2022**, 15, 57-66.
- [14] Li, J. J.; Hu, Y. Q.; Hu, B.; Wang, W. B.; Xu, H. Q.; Hu, X. Y.; Ding, F.; Li, H. B.; Wang, K. R.; Zhang, X. G.; Guo, D. S. Lactose azocalixarene drug delivery system for the treatment of multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa infected diabetic ulcer. *Nat. Commun.*, **2022**, 13, 6279.
- [15] Zhu, J. D.; Guo, T.; Wang, Z.; Zhao, Y. J. Triggered azobenzene-based prodrugs and drug delivery systems. *J. Control. Release*, **2022**, 345, 475-493.
- [16] Liu, Y. N.; Xie, L.; Gao, M.; Zhang, R. H.; Gao, J. C.; Sun, J. D.; Chai, Q. D.; Wu, T.; Liang, K.; Chen, P.; Wan, Q.; Kong, B. A. Super-assembled periodic mesoporous organosilica frameworks for real-time hypoxia-triggered drug release and monitoring. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13(42), 50246-50257.
- [17] 杨晨曦, 王健, 曹婷婷, 周航. 偶氮苯类衍生物材料性质及其研究进展. *高分子通报*, **2022**, (3), 37-44.
- [18] Hao, D. Y.; Meng, Q. A.; Jiang, B. W.; Lu, S. J.; Xiang, X. J.; Pei, Q.; Yu, H. J.; Jing, X. B.; Xie, Z. G. Hypoxia-activated PEGylated paclitaxel prodrug nanoparticles for potentiated chemotherapy. *ACS Nano*, **2022**, 16(9), 14693-14702.
- [19] Cheng, H. B.; Zhang, S. C.; Qi, J.; Liang, X. J.; Yoon, J. Advances in application of azobenzene as a trigger in biomedicine: molecular design and spontaneous assembly. *Adv. Mater.*, **2021**, 33(26), 2007290.
- [20] Liu, Z. J.; Ye, L.; Xi, J. N.; Wang, J.; Feng, Z. G. Cyclodextrin polymers: structure, synthesis, and use as drug carriers. *Prog. Polym. Sci.*, **2021**, 118, 101408.
- [21] Morin-Crini, N.; Fourmentin, S.; Fenyvesi, É.; Lichtfouse, E.; Torri, G.; Fourmentin, M.; Crini, G. 130 years of cyclodextrin discovery for health, food, agriculture, and the industry: a re-

- view. *Environ. Chem. Lett.*, **2021**, 19(3), 2581-2617.
- [22] Mohamadhoseini, M.; Mohamadnia, Z. Supramolecular self-healing materials *via* host-guest strategy between cyclodextrin and specific types of guest molecules. *Coord. Chem. Rev.*, **2021**, 432, 213711.
- [23] Tu, Y. F.; Peng, F.; Heuvelmans, J. M.; Liu, S. W.; Nolte, R. J. M.; Wilson, D. A. Motion control of polymeric nanomotors based on host-guest interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58(26), 8687-8691.
- [24] Tian, B. R.; Liu, Y. M.; Liu, J. Y. Smart stimuli-responsive drug delivery systems based on cyclodextrin: a review. *Carbohydr. Polym.*, **2021**, 251, 116871.
- [25] Gao, Y. J.; Lam, Y. Synthesis of pyrazolo[5, 1-*d*][1, 2, 3, 5]tetrazine-4(3*H*)-ones. *J. Comb. Chem.*, **2010**, 12(1), 69-74.
- [26] Divandari, M.; Arcifa, A.; Ayer, M. A.; Letondor, C.; Spencer, N. D. Applying an oleophobic/hydrophobic fluorinated polymer monolayer coating from aqueous solutions. *Langmuir*, **2021**, 37(14), 4387-4394.
- [27] Jeong, D.; Joo, S. W.; Shinde, V. V.; Jung, S. Triple-crosslinked β -cyclodextrin oligomer self-healing hydrogel showing high mechanical strength, enhanced stability and pH responsiveness. *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 198, 563-574.
- [28] Eom, T.; Yoo, W.; Kim, S.; Khan, A. Biologically activatable azobenzene polymers targeted at drug delivery and imaging applications. *Biomaterials*, **2018**, 185, 333-347.
- [29] Piplani, M.; Rajak, H.; Sharma, P. C. Synthesis and characterization of N-Mannich based prodrugs of ciprofloxacin and norfloxacin; *in vitro* anthelmintic and cytotoxic evaluation. *J. Adv. Res.*, **2017**, 8(4), 463-470.
- [30] Kim, H.; Han, J.; Park, J. H. Cyclodextrin polymer improves atherosclerosis therapy and reduces ototoxicity. *J. Control. Release*, **2020**, 319, 77-86.
- [31] Mendes, C.; Meirelles, G. C.; Barp, C. G.; Assreuy, J.; Silva, M. A. S.; Ponchel, G. Cyclodextrin based nanosponge of norfloxacin; intestinal permeation enhancement and improved antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 195, 586-592.
- [32] Chen, S. Y.; Chen, M. J.; Yang, J. F.; Zeng, X. Q.; Zhou, Y. B.; Yang, S.; Yang, R. H.; Yuan, Q. A.; Zheng, J. Design and engineering of hypoxia and acidic pH dual-stimuli-responsive intelligent fluorescent nanoprobe for precise tumor imaging. *Small*, **2021**, 17(28), 2100243.