

新型自乳化纳米乳抗菌制剂的设计与机制研究

中国人民解放军陆军军医大大学：蔡丁一*，张泽琰*，冯子琪，宋建业，曾小强，
涂亚涛，赵世博，罗兴，孙存，刘雪松，杨赞，
邹全明[#]，曾浩[#]，孙红武[#]

作者单位：中国人民解放军陆军军医大学药学与检验医学系微生物与生化药学教研室，重庆，400038。

*该研究已发表于 *Biomaterials Advance*(Materials Science and Engineering: C) IF=8.457/Q1 Accepted on 10 July 2022

指导教师：孙红武教授，博士生导师；曾浩教授，博士生导师。

中文摘要：皮肤创伤多重耐药铜绿假单胞菌感染会严重延迟伤口愈合，面临无药可用境界，对人类健康造成极大威胁。现实，急需需要一种安全、高效可用于抗多重耐药铜绿假单胞菌的皮肤创伤愈合制剂。因此，我们用纳米技术，成功解决抗铜绿假单胞菌的醋酸洗必泰难溶性问题，设计出一种可促进皮肤创伤感染愈合的新型自乳化纳米乳制剂，但其增效作用机制仍需要进一步研究。我们经过大量的处方筛选，利用低能乳化法成功制备出质量稳定、粒径为 15.27nm 的自乳化纳米乳制剂 (CSN)。通过 MIC、MBC 和杀菌动力学发现，该纳米制剂具有更好更快的抗菌效果，通过破坏细胞膜，影响细胞膜通透性和细胞膜代谢，促进抑制生物膜的形成和清除成熟的生物膜，从而加速铜绿假单胞菌感染后的皮肤伤口愈合。上述结果充分证实，这新型自乳化纳米乳可有效抗多药耐药菌引起的皮肤创伤感染，为临床治疗提供坚实的理论基础和科学依据。

Abstracts: Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection can seriously delay wound healing and pose a great threat to human health. Reality, urgently needs a safe and efficient skin wound healing preparation that can be used against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, with nanotechnology, we successfully solved the problem of chlorhexidine acetate refractory against *P. aeruginosa* and designed a novel self-emulsion nanoemulsion preparation that can promote the healing of skin trauma infection, but the mechanism of synergistic effect still needs further investigation. After extensive prescription screening, we successfully prepared a self-emulsified nanoemulsion preparation (CSN) with stable quality and 15.27nm particle size. MIC, MBC and bactericidal kinetics revealed that this nanopreparation has better and faster antibacterial effect, accelerating skin wound healing after infection by damaging cell membrane, affecting cell membrane permeability and cell membrane metabolism, promoting inhibitory biofilm formation and removal of mature biofilm. The above results fully confirm that this new self-emulsified nanoemulsion can effectively resist the skin trauma infection caused by multidrug-resistant bacteria, providing a solid theoretical and scientific basis for clinical treatment.

关键词：自纳米乳化制剂，抗菌增效作用，生物膜，伤口愈合，铜绿假单胞菌

国家大学生创新创业训练计划支持项目（项目批准号：202090031021）

作者简介：蔡丁一（2000-），女，辽宁阜新人，口腔医学，2018 级，纳米药物制剂

一、前言

2017年世界卫生组织(WHO)发布《全球抗生素耐药细菌优先性列表》强调:全世界每年约有70万人死于耐药性感染,如果不采取行动,估计到2050年死于这种感染的人将达到1000万。同时将危害严重的铜绿假单胞菌列为第1级(最危急级别)。铜绿假单胞菌是一种能引起广泛严重感染的G-耐药杆菌,它常常可从伤口中分离出来,也会形成生物膜和各种组织破坏毒力因子,延缓创伤愈合,现阶段,对其治疗大部分为口服或局部给药抗生素,但随着多重耐药菌株的不断出现,抗生素的研发速度远远赶不上细菌产生耐药的速,极大地提高了世界各地的医疗成本。

而非抗生素类药物则可以很好地解决这一问题,它们可以穿透生物膜,清除坏死组织。国内外研究表明,醋酸洗必泰(Chlorhexidine, CAA)是一种非抗生素类广谱抗菌药,它对生物膜有显著的抗菌作用,被广泛用于各种器械及手术的消毒,但是其溶解度低,往往只能和其他药联合使用。

而现代新型纳米乳技术可极大提高药物溶解度,增加载药量、药物溶解度和生物利用度,越来越受到广泛关注。基于此,课题组利用新型纳米技术成功制备出质量稳定安全,粒径为15.27nm的自乳化纳米乳制剂(CSN),但其是否对广泛且高度耐药的铜绿假单胞菌有抗菌增效作用仍需进一步研究。

因此,我们研究CSN对铜绿假单胞菌的体内外抗菌增效作用:用扫描电镜,原子显微镜和激光共聚焦显微镜研究其对生物膜抑制和生物膜清除能力;建立小鼠皮肤创伤感染铜绿假单胞菌模型后,研究其体内抗菌增效作用、促进创伤愈合能力以及降低炎症因子水平。利用TMT蛋白质组学技术进一步探讨CSN对铜绿假单胞菌蛋白质组学差异的影响,希望为临床治疗提供坚实的理论基础和科学依据。

二、方法与结果

(一) CSN 的制备及理化表征

利用低能乳化法制备出浓度为5mg/ml的亲脂性醋酸洗必泰新型自纳米乳化体系(CSN)。我们发现CAA是一种悬浮液和混浊液体,而CSN是一种透明、透明的溶液,如图1A所示。这一结果证实了该新配方可以提高5倍的溶解度。透射电镜形貌图像,液滴呈暗色,周围液体呈明亮色,粒径主要分布在1-100nm范围内,没有任何液滴堆积(图1B)。此外,AFM图像的超微结构显示,大部分液滴呈球形,分散性良好(图1C)。CSN具有良好的物理化学表征,小粒径为 15.27 ± 5.584 纳米(图1D),多分散性指数PdI值为0.169,(PdI小于0.3)和稳定性zeta值为 -3.66 ± 2.89 mV(Zeta绝对值小于30mV,图1E)。通过DSC、TG和FITR检测其物理状态和药物相互作用的稳定性发现,在73.37°C时,在热图中观察到明显的CAA峰,但在CSN中完全没有(图1F)。此外,在CSN中出现了86.06°C的峰值,表明新制剂的封装导致了峰值偏移。在图1G中,最高率分别为73.78°C和87.86°C。我们发现FITR分析中,CAA和CSN出现了三个相似的主峰(1640nm、2090nm和3430nm)(图1H)。这些数据表明,醋酸洗必泰在该新体系中是非常稳定的。

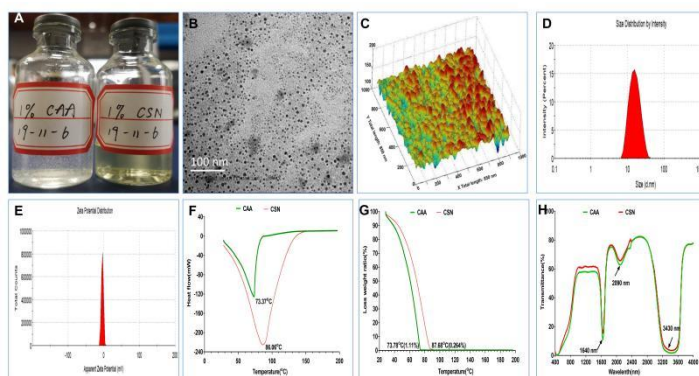


图 1 CSN 的制备及理化表征

(二) 体外抗菌增效作用

体外抗菌增效作用见图 2。

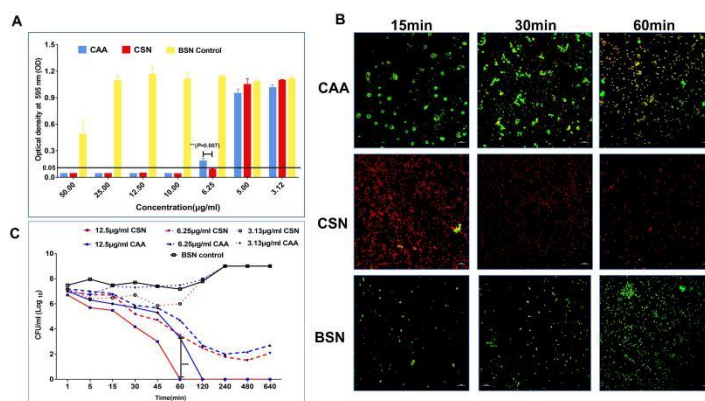


图 2 体外抗菌增效作用图

MIC 和 MBC 发现, CSN 对 PA 的 MIC(图 2A)为 $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$, MBC 为 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。CAA 的 MIC 值是 CSN 的 1.6 倍, MBC 值是 CSN 的 2 倍。细菌染色可以区分活细菌(绿色)和死亡细菌(红色)。如图 2B 所示, 与 CAA 相比, CSN 均表现出较强的红色荧光和绿色荧光, 表明其作用后细菌活力较低。经 CAA 处理后, 死细菌/活细菌比为 40.52%, 53.22%和 58.84%。杀菌动力学结果如图 2C 所示, $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ CSN 在 60 min 内杀死所有 PA, 而此时 CAA 组只导致 68%的细菌死亡, 其在 2 h 才杀死所有 PA。 $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CSN 使细菌的存活能力降低 90%, 只需 60 min。而 CAA 组需 120 min。 $3.13 \mu\text{g}/\text{mL}$ 下的 CSN, 1h 内有抑菌作用, 而 CAA 无作用。这些数据表明 CSN 比相同浓度下的 CAA 的抗菌活性更长, 对铜绿假单胞菌具有更有效、持久和快速的抗菌活性。

(三) 扫描电镜及激光共聚焦显微镜观察生物膜抑制和清除作用

观察结果见图 3。

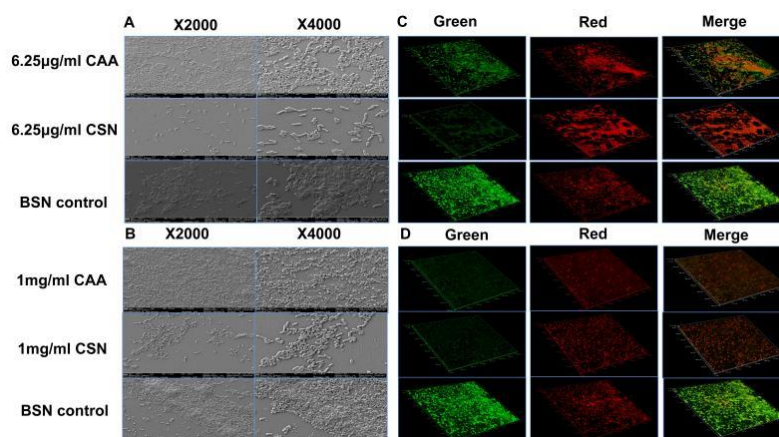


图 3 扫描电镜及激光共聚焦显微镜观察生物膜抑制和清除作用

扫描电镜图像如图 3AB 所示：CSN 处理组生物膜被分散和破坏，细菌的数量明显减少，并且比 CAA 组密度低得多的。相反，CAA 组细菌间交联程度高，聚集形成较完整生物膜，有明显立体空间结构。CAA 处理后的细菌生物膜表现出轻微的抑制：生物膜的整个结构仍然完整，但在细菌表面变形。这些结果表明，CSN 在抑制生物膜形成比 CAA 更有效。

激光共聚焦显微镜观察结果：红色荧光代表死亡细菌，绿色荧光代表活细菌。生物膜抑制（图 3C）中，CAA 组红色和绿色荧光分布均匀，覆盖将近 50% 的视野，而 CSN 的红色荧光覆盖 100% 视野，绿色荧光呈弥漫性分布。CSN 的细菌死/活比（110.23%）是 CAA（86.33%）的 1.28 倍。生物膜清除（图 3D）中，BSN 绿色荧光覆盖了整个视野，而 CSN 组红色荧光占了几乎整个视野，而几乎没有绿色荧光。CAA 组死活比为 99.11%，而 CSN 组为 CAA 的 2.1 倍。CLSM 表明，经 CSN 处理后，细菌的死活比的比例显著增加，表现出更强的抗生物膜清除和抑制能力。

（四）原子力显微镜观察生物膜抑制和清除作用

原子力显微镜观察结果见图 4。用 6.25 µg/mL CAA 和 CSN 处理 48 h 后，检测物膜的平均高度。在灰阶图和彩色图(图 4A)中，CAA 的生物膜的平均高度高于 CSN。Ra、Rq、Rz、Rsk 和 Rku 在 CSN 和 CAA 处理后参数为 19.006nm、31.8383m、213.93、3.080 和 16.170；41.200nm、53.983nm、500.333nm、2.524 和 9.910(P=0.014；P=0.026；P=0.015)。如图 4B 所示，1mg/mL CAA 的生物膜灰阶图和彩色图中的平均高度均高于 CSN。CSN 和 CAA 的生物膜的 Ra、Rq、Rz、Rsk 和 Rku 分别为 50.691nm、68.314nm、68.314nm、429.933nm、2.327 和 3.484；104.706nm、122.289 nm、569.533 nm、1.593 和 2.072(P=0.0003；P=0.0116；P=0.0002)。因此，CSN 生物膜的清除能力高于相同浓度下的 CAA。

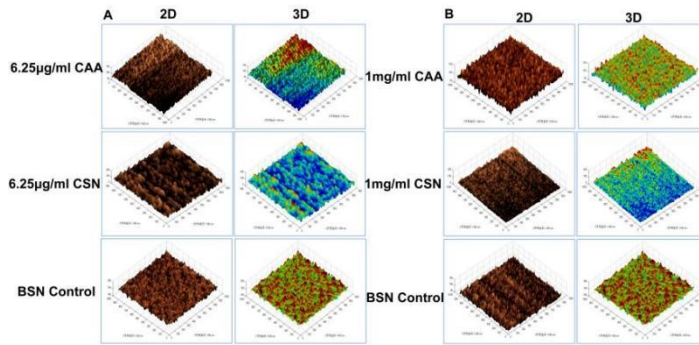


图 4 原子力显微镜观察生物膜抑制和清除作用

(五) 体内抗菌增效和促进创伤愈合作用

体内抗菌增效促进创伤愈合作用结果见图 5。

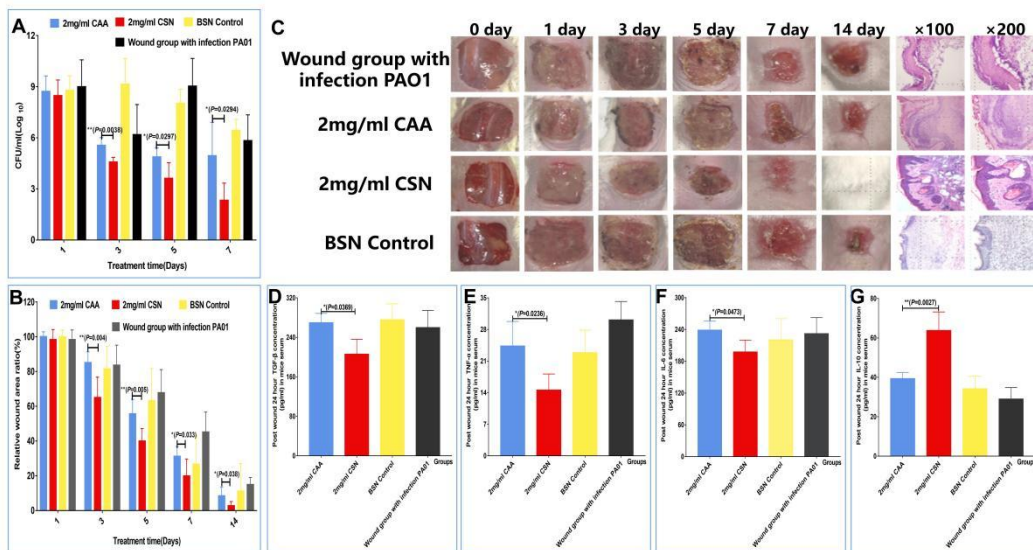


图 5 体内抗菌增效作用结果

2mg/mL CSN 的创伤部位细菌量低于 CAA(图 5A)。治疗 3 天内, 2mg/mL CSN 的较原始细菌量减少了 46%, 而 CAA 减少 36%。图 5B 所示, 第 3d, 2mg/mL 的 CSN 的愈合率 (34.98%) 比 CAA(14.86%) 高 2.35 倍。第 5 天, CSN 的 (60.07%) 也显示出比 CAA (44.33%) 更快的愈合速度。第 7d, 与 CSN 组 (80.12%) 相比, CAA 组的创伤愈合延迟。14d 后, CSN 的愈合率接近 100%, 而 CAA 约为 91%。图 5C 所示, 治疗 3d 和 5d 时, CSN 组的创伤面积比 CAA 组、BSN 组和创伤感染组都要小。第 7d 后, 与 CAA 比, CSN 的创伤明显缩小。第 14d 后, CSN 创伤完全愈合。图 5C 所示, H&E 染色发现, CSN 组则皮肤连续性较好, 可见完整 3 层结构, 显示出轻微的炎症反应, 。图 5D-F 所示, CSN 可显著减轻小鼠炎症感染, 降低小鼠血清中 TGF- β (转化生长因子)、TNF- α (肿瘤坏死因子) 和 IL-6 (白细胞介素-6) 的水平。同时, 与 CAA 相比, CSN 组 IL-10 的细胞因子水平显著升高(图 5G)。综上所述, CSN 对铜绿假单胞菌具有良好的抗菌活性, 更有效抗炎作用, 显著减少了细菌感染, 促进创伤愈合。

(六) 透射电镜和扫描电镜观察细菌细胞结构的损伤

透射电镜和扫描电镜观察细菌细胞结构的损伤结果如图 6 所示。

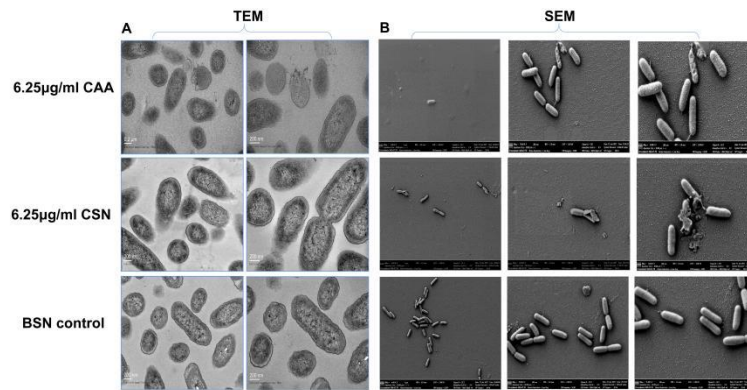


图 6 透射电镜和扫描电镜观察细菌细胞结构的损伤

透射电镜观察发现（图 6A），CSN 处理后细胞膜形态改变，由于细胞质的破坏导致胞内物质的丢失。扫描电镜进一步研究发现（图 6B）经 BSN 处理后的 PA01 细菌表面光滑。然而，经过 CAA 和 CSN 处理后，细菌表面变得粗糙。CSN 的作用使 PA01 细胞膜的完整性降低。CSN 处理后，细胞膜被破坏，暴露细胞质。这些结果表明，CSN 促进铜绿假单胞菌的细胞膜破坏并改变其形态。

（七）细胞膜的 DNA 和蛋白泄漏

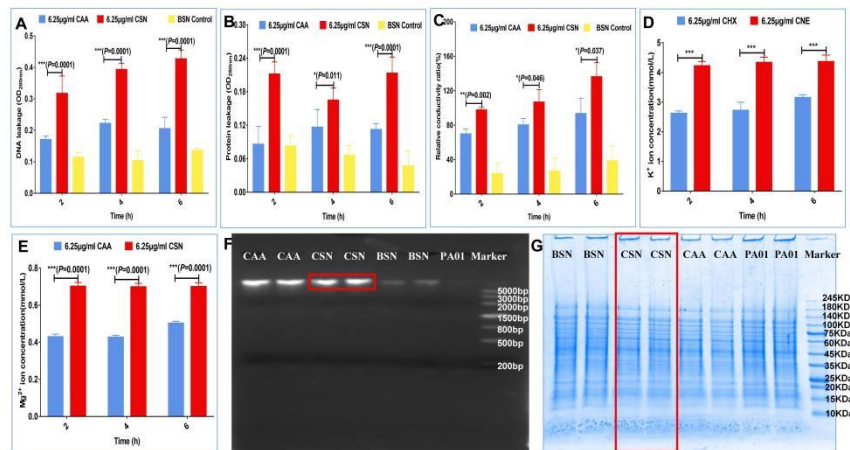


图 7 细胞膜的 DNA 和蛋白泄漏

图 7A 为在 260nm 处测量的 OD 值，这表明了 DNA 的泄漏情况。用 CSN 处理后，细胞悬液的 OD 值分别为 0.317、0.393 和 0.427，其值分别为相同条件下 CAA 的 2.1 倍、2.77 倍和 2.08 倍。同样的，在 280nm 处测量的 OD 值表明蛋白质泄漏情况。用 6.25µg/mL CSN 及 CAA 孵育 2h、4h 及 6h 后，样品的 OD 值分别是 CAA 处理的样品的高 2.47 倍、1.42 倍和 1.90 倍。以上数据表明，CSN 处理后胞膜的完整性降低，能更有效地促进 DNA 和蛋白质泄漏。CSN 组细菌的相对电导率值分别为 97.62%、106.89%和 129.63%，显著高于相同浓度的 CAA 处理的细菌(图 7C)。如图 7D 和 E 所示，CSN 处理后的 K⁺和 Mg²⁺浓度明显高于 CAA。如图 7F 所示，CSN 组细菌 DNA 的迁移量高于 CAA 组和对照组。SDS-PAGE 定量评价表明，CSN

组样品中 100kDa 的蛋白带明显清晰于 CAA 组、BSN 对组和阴性对照组(图 7G)。综上所述, 定性和定量评价表明, CSN 通过破坏细胞膜的完整性来发挥其杀菌作用, 导致细胞质内物质、DNA 和蛋白的释放和泄漏。

(八) CSN 破坏了铜绿假单胞菌的代谢途径

CSN 破坏了铜绿假单胞菌的代谢途径, 见图 8。

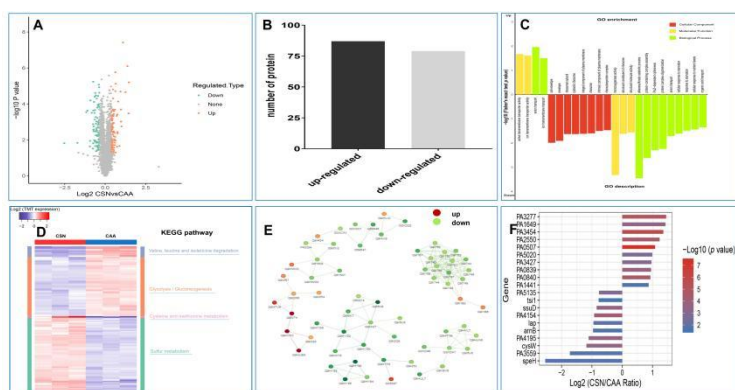


图 8 CSN 破坏了铜绿假单胞菌的代谢途径

通过 TMT 标记的定量蛋白质组学技术, 分析 CSN 和 CAA 处理后的差异, 进一步探讨 CSN 对铜绿假单胞菌蛋白质组学差异的影响。共鉴定出 3855 个蛋白, 其中与多重耐药铜绿假单胞菌相关的有 3511 个。与 CAA 组相比, CSN 组细菌中有 79 个蛋白表达上调, 而 87 个蛋白表达下调($P < 0.05$, 图 8A 和 B)。图 8C 中, 从细胞组分、分子功能和生物过程三个不同角度阐释差异蛋白的 GO 功能差异: 细胞组分分类提示, 差异表达的蛋白主要分布在细胞包膜、核糖体亚基中。在分子功能中提示, 差异表达蛋白与离子跨膜转运体活性相关。对生物过程的富集分析表明, 差异表达的蛋白与离子跨膜转运、含蛋白复合物组装和蛋白复合物寡聚化有关。KEGG 数据分析与 GO 分析一致, 均提示, 大多数差异表达的蛋白与代谢途径相关。多种细胞代谢途径, 包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、蛋氨酸代谢显著富集(图 8D)。为了确定铜绿假单胞菌中差异蛋白之间的相关性, 我们建立了差异表达蛋白的蛋白相互作用网络。如图 8E 所示, 包括脂肪酸、氨基糖、核苷酸糖代谢等代谢途径表现为高度互联的蛋白网络, 表明与细胞膜代谢途径相关的差异蛋白紧密相连。追溯上述蛋白对应的基因表达情况, CSN 组铜绿假单胞菌中酰基辅酶 a 硫醇化酶(PA3277)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(SpeH)的表达水平明显高于对照组, 再次证实代谢相关蛋白与基因发生改变(图 8F)。综上所述能中和细胞膜表面阴离子, 使细胞膜通透性增加, 促使更多的药往进入胞质, 引起细胞代谢紊乱, 导致细胞膜的破坏, 发挥其抗菌增效作用及抗生物膜能力, 促进创伤的愈合。

三、结论

体内外抗菌增效作用研究证实, 新型醋酸洗必泰纳米乳有更好和更快抑菌效果, 促进铜绿假单胞菌感染皮肤创伤愈合, 降低小鼠皮肤创伤部位定植量, 并能降低血清中炎症因子的水平, 调节炎症细胞因子。通过对在皮肤创伤部位形成的、使伤口延迟愈合的生物膜评价发现, 洗必泰纳米乳具有提高生物膜抑制和清除能力。抗菌增效作用机制研究显示, 洗必泰纳米乳可促进细菌细胞膜破坏、改变细菌表面形态, 促使细菌胞内核酸、蛋白质、钾、镁离子等物质泄露。蛋白质组学表明, 它能中和细胞膜表面阴离子, 通过调节

酰基辅酶 a 硫代醇化酶(PA3277)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(SpeH)的表达水平，使细胞膜通透性增加，促使更多的药物进入胞质，引起细胞代谢紊乱，导致细胞膜的破坏，影响细胞膜代谢。总的来说，该新型自乳化纳米乳剂具有显著抗菌增效作用，能促进皮肤伤口愈合，提高抗生物膜能力，可广泛用于多重耐药菌铜绿假单胞菌的皮肤创伤感染。

四、致谢

该研究得到了国家自然科学基金会项目（ No. 32070924, 31670938），重庆自然科学基金会项目（ No.2019 jcyjA-msxmx0159 and No.2014jcyjA0107 ）陆军军医大学专项计划（ No.2020XBK24, No.2020XBK25, No.2020XBK26 and No.2021XBK04 ），全国大学生创新创业计划（ No.202090031021, No.202090031026 No.202090031035 ）等项目资助。

五、参考文献（略）