



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Antimicrobial Resistance—Article

用于精准和响应性治疗胞质耐药菌的刚性药物递送系统

曲少奇^a, 黄晓勇^a, 宋祥彬^a, 吴逸潘^a, 马晓激^a, 沈建忠^{a,b}, 朱奎^{a,b,*}

^a National Center for Veterinary Drug Safety Evaluation, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

^b Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2021

Revised 26 September 2021

Accepted 24 December 2021

Available online 12 April 2022

关键词

抗菌药物

细菌

介孔二氧化硅

磷脂

刚性

摘要

随着细菌耐药性的快速出现和广泛传播,导致抗菌药物对致命性细菌病原体的疗效逐渐降低。目前新型抗菌药物的发现和开发进展十分缓慢,因此迫切需要新的治疗策略来对抗多重耐药(multidrug-resistant, MDR)细菌,尤其是宿主细胞中的病原菌。功能性纳米颗粒作为细胞内药物递送系统具有良好发展潜力,主要优点为高生物相容性和可调节的表面修饰。基于纳米颗粒刚性可增强细胞摄取,制备了涂有细菌响应性磷脂的刚性功能化纳米颗粒(rigidity-functionalized nanoparticles, RFN)以促进内吞作用,从而增加细胞内抗菌药物累积。以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)和致病性蜡样芽孢杆菌为模型,RFN在4 h内清除了99%的MDR细菌,证明了其精准递送和高抗菌疗效。另外,通过改变表面的磷脂成分来调节静电效应,实现了RFN精准靶向溶酶体和重新编程其在细胞内分布。最后,RFN在由MRSA引起的伤口感染和菌血症动物模型中显示出高疗效。综上所述,本研究提供了一个易于调控的刚性递送系统,该系统具有响应释放特性,并且通过抗菌药物胞内重分布提升抗菌疗效,为未来针对胞质细菌感染的精准治疗提供新思路。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

细菌耐药性是全球关注的公共卫生问题[1],例如,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*),尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)会引起慢性和复发性感染,从而使人类和动物遭受严重疾病和死亡威胁[2]。此外,细菌通过多种进化策略来抵御抗菌药物杀伤,如抗菌药物耐受性的出现[3–4],抗菌药物耐受性还可以促进体内细菌耐药性的快速发展[3]。令人担忧的是,由宿主介导的抗菌药物耐受性是普

遍存在的,并且对于不同种类的胞外菌来说,这一现象在很大程度上被严重低估[5–7]。例如,*S. aureus*可以在巨噬细胞或上皮细胞中持续存在和复制,以耐受高水平的抗菌药物(因为大多数抗菌药物的细胞渗透性差)。进一步发现细胞内病原体作为“特洛伊木马”(Trojan horses)加剧了细菌耐药性危机[8]。另外,自20世纪80年代后期以来,美国食品药品监督管理局(FDA)几乎没有批准任何新类别的抗生素[9–10]。因此迫切需要替代干预策略通过恢复现有抗菌药物的疗效来对抗胞质病原菌感染。

纳米颗粒是一种很有前景的递送系统,可通过表面修

* Corresponding author.

E-mail address: zhuk@cau.edu.cn (K. Zhu).

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 15(8): 57–66

引用本文: Shaoqi Qu, Xiaoyong Huang, Xiangbin Song, Yifan Wu, Xiaowei Ma, Jianzhong Shen, Kui Zhu. A Rigid Nanoplatform for Precise and Responsive Treatment of Intracellular Multidrug-Resistant Bacteria. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.12.021>

饰或调整粒径大小来增加细胞内药物累积[11–12]。介孔二氧化硅纳米颗粒（mesoporous silica nanoparticles, MSN）作为药物递送载体具有高比表面积、良好生物相容性和可生物降解性等优势，从而引起广泛关注[13]。然而，MSN的力学性能在很大程度上被忽略。同时，对于MSN等固有刚性纳米颗粒如何调控细胞摄取尚不清楚[14]。最近研究表明，纳米颗粒的刚性在将药物分选并集中到不同的亚细胞区室中起着至关重要的作用[15]。因此，刚性调节递送系统具有靶向宿主胞质细菌的应用潜力。此外，环境响应型药物递送系统通过减少抗菌药物选择性压力和提高抗菌效率来改善治疗效果，具有良好的发展前景[16]。例如，纳米凝胶、自组装纳米颗粒和仿生材料等通过识别内源性刺激用于可控药物释放，已经取得了很大进展[17–19]。因此，精准治疗与刚性调节细胞摄取的结合为未来设计智能抗菌药物递送系统以对抗MDR细菌病原体提供启示。

本研究设计了易于合成且具有高生物相容性的磷脂涂覆二氧化硅纳米颗粒，用于实现刚性增强细胞摄取和装载抗菌药物的胞内重分布。MSN作为刚性功能化纳米颗粒（rigidity-functionalized nanoparticles, RFN）递送系统的核心骨架，在装载抗菌药物后，经过磷脂涂覆后形成响应性

外膜，由此获得RFN（图1）。RFN通过刚性增强细胞摄取和抗菌药物响应性释放的功能，达到精准对抗细菌病原体目的。此外，通过调节RFN的磷脂成分来实现抗菌药物的胞内重分布，从而提高抗菌效率。RFN可以很容易地具备精准识别、刚性增强内吞作用和重新编程胞内分布的能力。因此RFN为未来对抗胞质细菌感染提供了有潜力的递送系统。

2. 材料与方法

2.1. 材料

硅酸四乙酯（TEOS）和三乙醇胺（TEA）购自阿拉丁公司（中国）。磷脂酶 A_2 （PLA $_2$, P9279）和磷脂酶C（PLC, P6621）购自Sigma-Aldrich公司（美国）。二硬脂酰磷脂酰甘油（PG）、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（PC）和胆固醇购自艾伟拓医药科技有限公司（中国）。荧光亲油染料3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate（Dio）和1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate（DiI）购自碧云天生物技术公司（中国）。利福平（RIF）购自中国兽医药品监察所。使用Milli-Q Plus过滤系统（美国）生产去离子水。

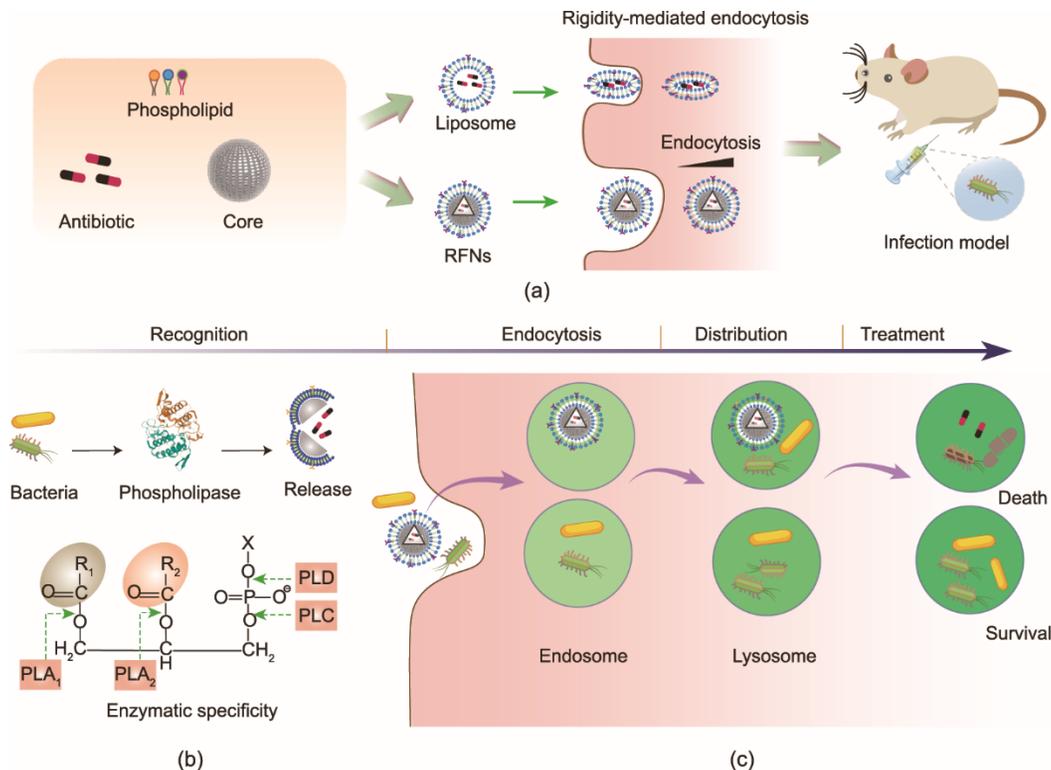


图1. RFN通过内吞作用靶向溶酶体中的细菌进行精准治疗的示意图。(a)通过增加纳米颗粒的刚性增强其细胞摄取以实现精准治疗。将抗生素封装在涂有磷脂的MSN中，用于增强胞质递送以提高对胞质细菌的治疗效率。(b)具有特异性识别功能的RFN磷脂酶响应释放和磷脂酶的作用位点示意图。磷脂酶敏感的RFN可使抗生素在感染部位快速释放，以响应MDR细菌分泌的磷脂酶。(c)通过内吞途径内化RFN后杀灭胞质细菌。

2.2. 刚性功能化纳米颗粒制备

将PG、PC和胆固醇以8:2:1的质量比混合溶解在氯仿中。将含有1 mg磷脂的溶液在室温下蒸发干燥过夜。然后将得到的薄膜与5 mg MSN水合共挤出。使用两个孔径为200 nm的聚碳酸酯膜(Whatman, 美国)进行挤出并重复22次。通过Microcon-30 kDa离心过滤装置(EMD Millipore, 美国)以4000g离心15 min纯化RFN。使用相同的方法制备Dio和Dil标记的RFN。

2.3. 药物装载

通过共孵育法将RIF装载到MSN中[19]。简而言之, RIF以 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度溶解在甲醇中, 并与浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MSN一起孵育30 min, 在 4°C 下10 000g离心15 min获得装载RIF的MSN, 收集上清液, 采用分光光度法测定未装载的RIF的浓度, 将已装载RIF但未进行磷脂涂覆的MSN定义为NP。

2.4. 体外药物释放

将含有500 μg RIF的NP和RFN在1 mL磷酸盐缓冲液(PBS)中于 37°C 下孵育, 然后通过Microcon-10 kDa离心过滤装置在4000g、 4°C 条件下离心15 min。为了研究PLC触发的药物释放, 将 $1 \text{ unit} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的PLC与样品一起孵育。D609 ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)是一种特异性PLC抑制剂, 用于抑制PLC酶活性。通过使用多功能酶标仪(Infinite M Plex, Tecan, 瑞士)在474 nm处测量上清液的吸光度来测定释放的RIF的浓度。纳米颗粒放置于培养箱中, 在每个时间点(0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、16 h和24 h)取样检测释放。

2.5. 杀菌曲线

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, *B. cereus*) MHI241在脑心浸出液肉汤中培养过夜, 37°C 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡以达到指数生长期。将微生物溶液的浓度调整为麦氏浊度0.5, 然后将该溶液进一步稀释10倍。细菌悬液中加入RIF ($1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、NP ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)或RFN ($160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 浓度相当于最小抑制浓度(MIC)的10倍。在 37°C 下摇动($200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)孵育, 在预定时间点(0 h、2 h、4 h、8 h和24 h)从每个孔中取出细菌样品, 进行一系列稀释, 将稀释的细菌悬液($100 \mu\text{L}$)均匀涂在胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)平板上, 继续在 37°C 下孵育16~20 h。进行菌落计数并计算每毫升的菌落形成单位(CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.6. 细胞培养

将哺乳动物细胞培养在含有10%热灭活胎牛血清(FBS; Invitrogen, 美国)和1% (浓度)青霉素-链霉素(Sigma-Aldrich, 美国)的改良培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Gibco, 美国)中, 培养于温度 37°C 和含有5% CO_2 的湿润条件下。

2.7. 细胞内分布

在24孔板中的14 mm圆形盖玻片上接种 5×10^5 个细胞, 生长至70%~80%融合度时, 加入NP或RFN ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)在 37°C 和5% CO_2 中孵育1 h。孵育后, 用PBS洗涤细胞三次, 以去除未被吸收的纳米颗粒。将细胞在4%多聚甲醛中固定10 min, 采用PBS洗涤5 min, 并用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)和Actin Green 488试剂(高亲和力F-actin探针)染色。加入抗淬灭剂后, 在载玻片上覆盖盖玻片, 干燥并避光保存, 直到用Leica TCS SP8共聚焦激光扫描显微镜(CLSM, 德国)进行成像检查。

RAW 264.7细胞用RFN ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和荧光标记的*B. cereus* [感染复数(MOI) = 40]处理, 并在 37°C 和5% CO_2 下孵育2 h。孵育完成后, 用PBS (pH = 7.4)洗涤细胞三次, 以去除未被吸收的纳米颗粒和细菌。用Lyso-Tracker Deep Red ($50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Invitrogen)对细胞进行染色。样品避光保存, 直到用CLSM进行检查。

2.8. PG调节细胞摄取

制备含有不同磷脂成分(PG百分比: 0%、20%、40%、60%、80%和100%)的RFN以调节细胞摄取。将由纳米颗粒处理的RAW 264.7细胞在 37°C 和5% CO_2 中孵育1 h。孵育后, 用PBS洗涤三次, 以去除未被吸收的颗粒, 将细胞在4%多聚甲醛中固定10 min, 然后再用PBS洗涤三次。细胞用DAPI和Actin Green 488试剂进行染色并通过CLSM观察。

2.9. 细胞摄取途径

将RAW 264.7细胞与RFN ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和荧光标记的*B. cereus* (MOI = 40)共同处理, 分别在 37°C 和5% CO_2 中孵育0.5 h和1 h。孵育后, 用PBS (pH = 7.4)洗涤三次, 以去除未被吸收的RFN和细菌。通过免疫荧光检测细胞中的早期和晚期内体。一抗包括兔抗Rab7和鼠抗EEA1抗体(Abcam, 英国), 二抗是山羊抗兔和山羊抗鼠抗体(碧云天生物技术公司), 制备的样品避光保存, 采用CLSM检测。

2.10. 体外抗菌试验

蜡样芽胞杆菌用 pHrodo Red (Life Technologies, 美国) 在 37 °C 条件下染色 15 min, 以 MOI = 40 感染 RAW 264.7 细胞, 同时加入 10 倍 MIC 的 RIF、NP 或 RFN 在 37 °C、5 % CO₂ 条件下培养 4 h, 然后用 100 μg·mL⁻¹ 庆大霉素处理后, 用 PBS (pH = 7.4) 洗涤三次。将细胞在室温下用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 再加入含有 0.1% Triton X-100 的 PBS (pH = 7.4) 透化细胞 10 min, 样品用 DAPI 和 Actin Green 488 染色, 用 CLSM 进行荧光测定。

B. cereus (MOI = 40) 感染 RAW 264.7 细胞, 然后用 10 倍 MIC 的 RIF、NP 或 RFN 处理 4 h。庆大霉素 (100 μg·mL⁻¹) 用于杀死胞外细菌, 用 PBS 洗涤三次后, 加入 1% Triton X-100 裂解细胞 2 min, 将稀释的裂解液 (100 μL) 涂在 TSA 平板上, 在 37 °C 下孵育 16~20 h。进行菌落计数计算每毫升的菌落形成单位。

2.11. 道德声明

所有动物试验操作均按照中华人民共和国国务院批准的《实验动物管理条例》(发布日期: 1988年11月14日) 进行。实验方案和细节得到了中国农业大学实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 的批准 (批准号: AW50301202-2-1)。雄性 Wistar 大鼠 (5 周龄) 和雌性 BALB/c 小鼠 (18~20 g) 被饲养在受控的 12 h 光照/12 h 黑暗循环的环境中, 并且给大鼠和小鼠提供充足的食物和水。环境保持在恒定温度 (23 ± 2) °C 和湿度 (60% ± 5%) 条件下。

2.12. 大鼠皮肤伤口感染模型

为了评估 RFN 对临床分离株 MRSA T144 的治疗效果, 使用大鼠皮肤伤口感染模型。大鼠通过腹腔 (*i.p.*) 注射水合氯醛 (0.5 mL, 质量分数为 10%) 进行麻醉, 并在手术前用酒精 (体积分数为 75%) 擦拭消毒背部皮肤, 小心地去除每只大鼠背部的皮毛, 并造成直径 1 cm 的全层伤口, 在伤口处加入 50 μL PBS (pH = 7.4) 菌悬液 (每个伤口 1 × 10⁸ CFU) 进行感染。将所有动物分为 4 组: PBS (pH = 7.4)、万古霉素 (Van; 5 mg·kg⁻¹)、NP (相当于 2 mg·kg⁻¹ RIF) 和 RFN (相当于 2 mg·kg⁻¹ RIF)。在治疗后的不同时间点 (0 d、3 d、6 d、9 d 和 13 d) 测试伤口的大小和细菌载量, 收集伤口组织于 -20 °C 下储存, 最后将伤口组织加入 1 mL 无菌 PBS 均质, 对获得的匀浆液进行 10 倍系列稀释, 然后接种在 *S. aureus* 显色琼脂培养基 (CHRO Magar, 法国) 中, 37 °C 下孵育 16~20 h。此外, 记录所有动物的体重和伤口完全愈合时间。在第 3 天采集

大鼠血清于 -80 °C 储存, 使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (碧云天生物技术公司) 分析肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和白细胞介素-1β (IL-1β) 的浓度。第 13 天, 切除伤口组织并固定在 4% 多聚甲醛固定液, 然后将所有组织包埋在石蜡中, 制备 4 μm 切片用于传统的苏木精和伊红 (H&E) 和 Masson 染色。

2.13. 小鼠菌血症模型

雌性 BALB/c 小鼠被随机分为 4 组: PBS (pH = 7.4)、Van (5 mg·kg⁻¹)、NP (相当于 2 mg·kg⁻¹ RIF) 和 RFN (相当于 2 mg·kg⁻¹ RIF)。通过尾静脉注射 100 μL PBS 菌悬液 (7.5 × 10⁷ CFU), 感染后 1 h 通过静脉注射对小鼠进行治疗。连续监测小鼠 48 h, 一旦小鼠死亡, 立即收集其心脏、肝脏、脾、肺和肾脏组织并储存在 -20 °C 条件下。存活的小鼠在 48 h 后通过颈椎脱臼法安乐死, 然后收集不同的器官。在 1 mL 无菌 PBS 中制备器官匀浆液并连续稀释, 然后均匀涂覆在 *S. aureus* 显色琼脂培养基上, 37 °C 下孵育 16~20 h。测定不同器官中的细菌载量并计算各组生存率。

2.14. 统计数据

使用 GraphPad Prism 7.0 确定统计显著性, 所有数据均表示为平均值 ± 标准偏差 (SD)。所有 *P* 值的计算均使用非配对 *t* 检验或单向方差分析 (ANOVA) 和其他特殊分析方法。

3. 结果

3.1. RFN 表现出高选择性和有效性

通过 MSN 表面功能化修饰来制造带有可生物降解磷脂涂层的 RFN, 从而主动识别磷脂酶阳性细菌, 实现以按需方式释放抗生素, 最终精准杀伤目标病原菌 [图 2 (a)]。基于扫描电子显微镜 (SEM) 和动态光散射 (DLS) 分析, 发现十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 作为致孔剂可成功诱导微孔结构 [20], 获得了具有高分散性和球形均匀的 MSN [图 2 (b)、(c)]。通过透射电子显微镜 [TEM; 图 2 (b)] 进一步观察到 MSN 具有微小孔径, 并通过氮气 (N₂) 吸附-脱附技术测得孔径大小为 3.8 nm [图 2 (c)、(d)]。MSN 的密度泛函理论 (DFT) 表面积和孔体积分别为 490.2 m²·g⁻¹ 和 0.92 cm³·g⁻¹ [图 2 (e)], 表明形成了微孔结构。同时, 优化 CTAB 的浓度获得具有适当粒径大小 (130 nm) 和最高 RIF 负载量 (9.7% ± 0.9%; 见附录 A 中的图 S1) 的 MSN。此外通过液相色谱-

串联质谱（见附录A中的图S2）分析了RFN中的CTAB残留量为 $67.1 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，满足后续实验要求。

为了将磷脂涂覆在MSN表面，使用水合/挤出法通过非共价键作用方式将磷脂包覆在MSN表面[18]。MSN被PG和PC包裹形成了具有磷脂酶响应性的RFN用于控制药物释放。PG和PC按8:2的质量比混合，有效防止药物泄漏以及在血液循环期间保持生物相容性。通过TEM观察到RFN具有明显的核壳结构[见图2(b)及附录A中的图S3]，表明磷脂成功转移到MSN表面。此外，磷脂双层涂覆后，MSN的粒径增加，也表明磷脂封装成功（见附录A中的图S4）。在474 nm处观察到RIF成功加载到RFN中[图2(f)]，并使用傅里叶变换红外光谱的特征吸收进行了确认（见附录A中的图S5）。最后观察到RFN在 -80°C 保存长达30 d后依然具有稳定的流体动力学直径和

表面zeta电位（见附录A中的图S6）。

假设由细菌衍生的磷脂酶催化的磷脂水解可能导致RFN中的孔结构暴露，从而释放负载的抗菌药物。为了评价磷脂酶响应性RFN的抗菌效率，首先使用*B. cereus*来源的PLC和*S. aureus*来源的PLA₂评估了RFN在体外释放试验中的响应性。孵育24 h后，与无磷脂酶条件下仅释放20% RIF相比，在PLC存在下超过60% RIF从RFN中释放[图2(g)]。而在特异性PLC抑制剂[$1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, D609; 图2(g)]存在下，RIF释放度降低。这一结果提示RFN持续释放RIF可通过延长作用时间从而提高治疗效果。不同的药物释放动力学也表明RFN孔结构被磷脂涂层覆盖，这与TEM观察到的核壳结构一致[图2(b)]。另外，RFN孵育8 h后可以减少99.9%的*B. cereus* [见图2(g)和附录A中的图S7]，并且对MRSA也表现出强大的

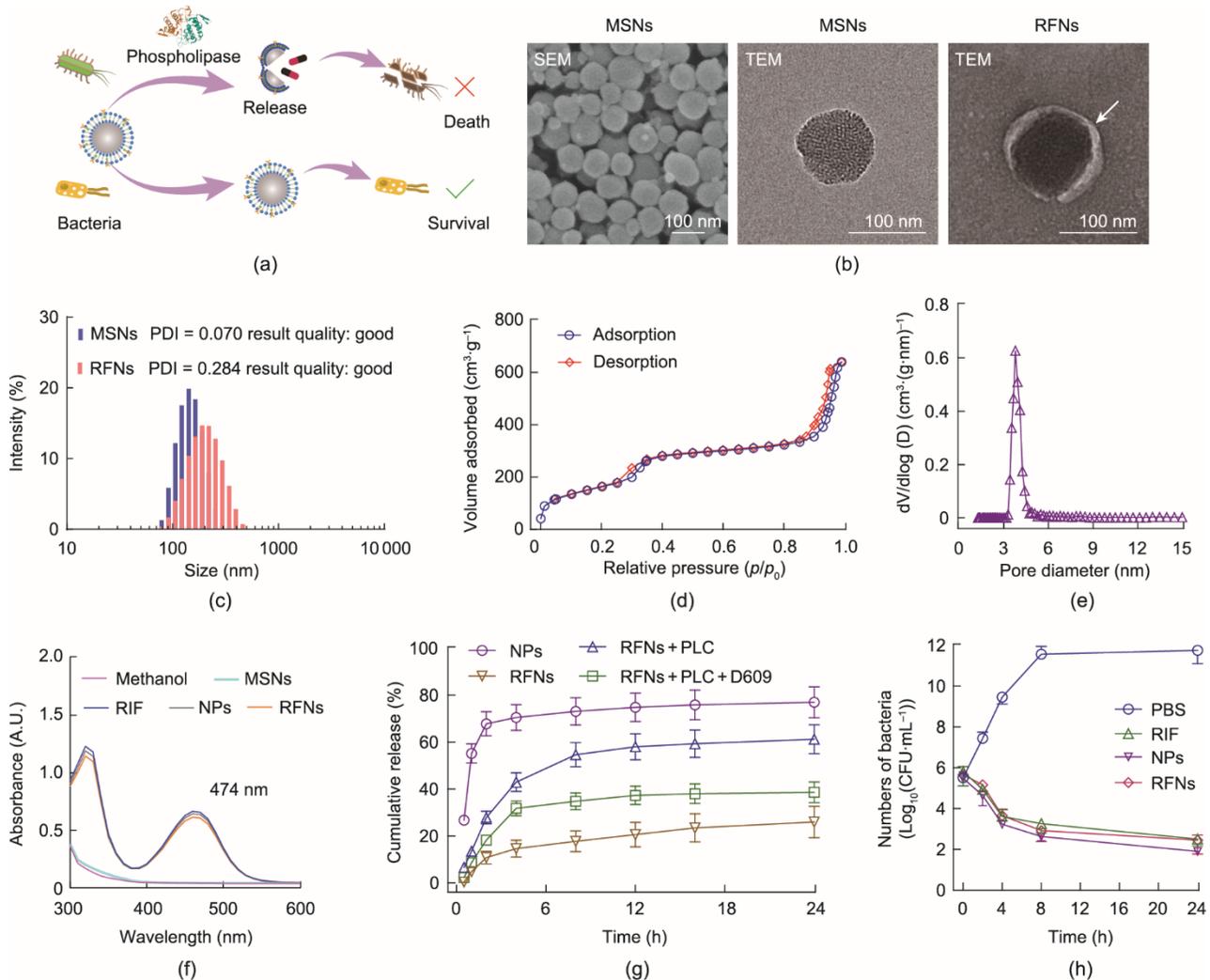


图2. RFN以高选择性方式有效杀伤磷脂酶阳性细菌。(a) RFN高选择性杀灭多重耐药细菌示意图。(b) 涂有磷脂的RFN和MSN的代表性图像。箭头表示磷脂涂层。比例尺：100 nm。(c) 使用动态光散射确定涂覆磷脂后RFN尺寸的增加。氮气吸附-解吸等温线(d)和MSN的相应孔径分布(e)。(f) RIF在不同条件下的吸收光谱，波长为474 nm时最大。(g) 磷脂酶C引起RIF从RFN中特异性释放并且可以被D609抑制，其中D609是磷脂酶C的特异性抑制剂。(h) 10倍MIC的RIF、NP和RFN处理指数生长的蜡样芽孢杆菌的杀菌动力学。

抗菌活性（见附录 A 中的图 S8），表明涂层被磷脂酶破坏，从而加速了 RIF 从 RFN 中的释放。总的来说，这些结果表明 RFN 对磷脂酶阳性细菌高度敏感，可作为有效的药物递送系统来提升抗菌药物的选择性和抗菌效率。

3.2. RFN 通过调整磷脂成分靶向溶酶体

由于抗菌药物进入宿主细胞的能力差，限制了其对胞质细菌的治疗效果[21]。抗菌药物在哺乳动物细胞中的分布对杀伤胞质细菌起关键作用[5]。本文探究了 RFN 进入细胞内的途径及其靶点，阐明了含有不同磷脂成分的 RFN 在 RAW 264.7 细胞中的分布规律。研究发现纳米颗粒的化学成分和表面特性对其细胞摄取、胞内分布和治疗效果至关重要[22–23]。RFN 表面的 PG/PC 含量显著影响了 RFN 的细胞内分布[见图 3 (a) 和附录 A 中的图 S9]。含有 80% PC 的 RFN 在细胞内呈现广泛分布状态，表明涂层中的高 PC 含量会导致纳米颗粒从溶酶体逃逸到细胞质中。相反，含有 20% PC 的 RFN 则在细胞内呈现点状分布状态，表明 RFN 可能被困在溶酶体中。值得注意的是，在肺癌细胞 A549 中也观察到了类似的趋势（见附录 A 中的图 S10）。同时，RFN 在溶酶体中累积的增加与 PG/PC 含量呈剂量依赖性[图 3 (b)]。带正电荷的磷脂和人源磷脂降低了 RFN 在溶酶体中的累积（见附录 A 中的图 S11），这与之前报道的由正电荷引发的内体膜不稳定的研究结果一致[24]。然而，尚不清楚磷脂的相变温度是否参与了它们的分布调节[25]。总之，这些发现表明可以通过改变磷脂成分来精确调节 RFN 的亚细胞分布，并且高 PG/PC 比率有助于靶向溶酶体过程。

鉴于许多胞质细菌病原体最终被困在溶酶体中[6]，因此提高抗菌药物在溶酶体中的累积对于杀伤胞质细菌病原体至关重要。研究发现 RFN 可与细菌和溶酶体共定位，表明 RFN 和细菌定位在同一个亚细胞区室中[图 3 (c)]，并且可以借助细菌分泌的磷脂酶有效水解 RFN 涂层以激活抗菌药物释放，达到高效杀伤细菌病原体的目的[25–26]。此外，基于 PC 与 *B. cereus* 细胞壁中的主要成分磷壁酸之间的静电相互作用，观察到 RFN（绿色）与 *B. cereus*（蓝色）的广泛结合[图 3 (c)] [27]。含有高 PG/PC 比率的 RFN 不仅可以靶向溶酶体，还可以捕获亚细胞区室中的细菌病原体。为了进一步确定 RFN 的细胞摄取途径，在 *B. cereus* 感染期间对 RFN 进行胞质可视化定位，采用内体标记技术对感染 *B. cereus* 的 RAW 264.7 细胞进行染色。处理 1 h 后，发现 RFN 和 *B. cereus* 与早晚期内体共定位[图 3 (d)、(e)]，表明 RFN 和细菌可能通过内吞作用进入细胞，这与大多数聚合物纳米颗粒的内化作用一致

[28]。在 *S. aureus* 模型中也观察到类似的结果，表明 RFN 潜在的可行性和多功能性（见附录 A 中的图 S12）。综上所述，成功制备一种易于调节的药物递送系统，该系统具有抗菌药物重分布从而靶向胞质细菌病原体的潜力[图 3 (f)]。

3.3. RFN 体外高抗菌疗效

宿主细胞内存活的细菌病原体可以使这些感染的细胞充当“特洛伊木马”，导致感染复发[29]。鉴于 RFN 具有将抗菌药物递送到宿主细胞中的独特能力，进一步研究了 RFN 对胞质 *B. cereus* 和 *S. aureus* 的抗菌效果。结果表明，RFN 有效减少了 RAW 264.7 胞质 *B. cereus* 的数量[见图 4 (a) 和附录 A 中的图 S13]。进一步分析发现，同样处理 4 h，RFN 组细胞中 *B. cereus* 的数量约是 RIF 组的数量的 1% [图 4 (b)]。RFN 有效杀伤胞质细菌的效果在 *S. aureus* 模型中也得到证实（见附录 A 中的图 S14），这可归因于抗菌药物靶向递送。因此 RFN 通过靶向亚细胞区室方式展示了它们对抗胞质细菌感染的潜力。

鉴于 RFN 具有杀伤胞质细菌病原体的潜力，测试了经 RFN 处理的 *B. cereus* 的生化变化，观察到膜通透性呈剂量依赖性增加[见附录 A 中的图 S15 (a)] 和细胞内大分子的释放，如 β -半乳糖苷酶[$M_w = 130$ kDa；见附录 A 中的图 S15 (b)] 和腺嘌呤核苷三磷酸[ATP；见附录 A 中的图 S15 (c)]。进一步分析膜去极化，结果显示，在 RFN 处理后 *B. cereus* 膜电位的耗散呈现剂量依赖性增加[图 4 (c)]，膜电位的去极化会损害膜上发生重要生化反应，包括细菌中 ATP 的产生[6]。因此测定了细胞内 ATP 的累积。RFN 治疗果然导致了 *B. cereus* 细胞内 ATP 减少[图 4 (d)]。此外，内源性活性氧（reactive oxygen species, ROS）的累积对细菌清除至关重要[30]，本研究观察到 *B. cereus* 中 ROS 累积随着 RFN 浓度的升高而增加[图 4 (e)]。总之，这些结果说明膜损伤和氧化损伤对于 RFN 抗菌活性至关重要。

3.4. RFN 有效对抗动物体内 MRSA 感染

为了确定 RFN 在体内对抗细菌感染的能力，使用由 MRSA T144 感染的两种动物模型评估了其治疗潜力[图 5 (a)]。在药效学评估之前，测试了 RFN 对细胞活力（见附录 A 中的图 S16）和溶血率（见附录 A 中的图 S17）的影响，发现即使在 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度下，RFN 也表现出良好的生物相容性，这是在体内无法达到的耐受剂量。根据之前报道的方法，大鼠皮肤伤口感染 MRSA T144（每个伤口 10^8 CFU），并在感染后 1 h 对受伤部位进行治疗

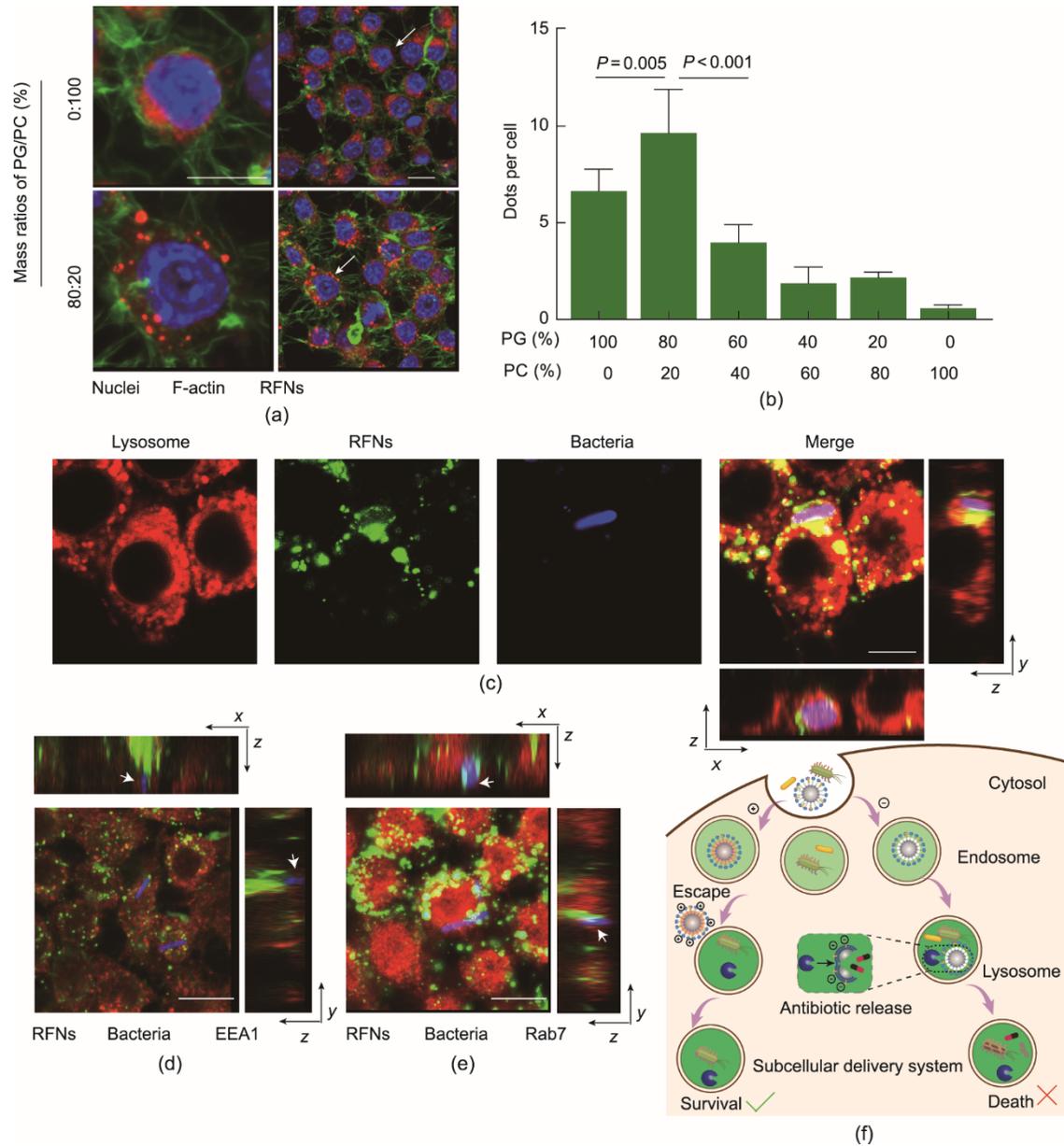


图3. 不同 PG/PC 含量调节 RFN 的细胞摄取。(a) 磷脂 PG/PC 的比例增加介导 RAW 264.7 细胞中 RFN 的点状分布。RFN 与 RAW 264.7 细胞孵育 1 h 的代表性共聚焦图像。细胞用 DAPI (蓝色) 和肌动蛋白绿 488 (Actin Green 488) (绿色) 染色。比例尺: 10 μm 。(b) 用 PG/PC 含量增加的 RFN 处理 RAW 264.7 细胞后观察到每个细胞的点数增加。(c) 用 RFN ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和蜡样芽孢杆菌 MHI241 [感染复数 (MOI) = 40] 处理 2 h 的 RAW 264.7 细胞的代表性图像。溶酶体 (红色)、细菌 (蓝色) 和 RFN (绿色) 共定位。比例尺: 8 μm 。(d)、(e) 用 RFN ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (d) 和蜡样芽孢杆菌 MHI241 (MOI = 40) (e) 处理 RAW 264.7 细胞 0.5 h 和 1 h。细胞用 EEA1 (早期内体) 和 Rab7 (晚期内体) 的特异性抗体染色。比例尺: 10 μm 。(f) RFN 通过靶向亚细胞区室来杀灭胞质细菌。

[22,31], 发现用 RFN (相当于 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ RIF) 治疗的感染伤口在 13 d 内几乎 100% 愈合[图 5 (b)、(c)], 而 Van 组 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 治愈率仅为 75%。在临床上, Van 一直被用作治疗 MRSA 感染的金标准[32]。已有研究报道了抗体偶联物对抗 MRSA 感染比 Van 更有效, 主要是由于 Van 对胞质细菌的疗效不佳[6]。RFN 促进细胞内抗菌药物的累积, 从而杀伤更多的 MRSA 并加速伤口愈合[图 5 (d)]。以上结果表明, RFN 在对抗 MRSA 感染和促进伤口愈合

方面更有效。

为了进一步评估 RFN 在促进伤口愈合过程中的作用, 在第 13 天使用 H&E 和 Masson 三色染色对伤口进行组织学检查, RFN 可以显著增加上皮间隙厚度以促进伤口再上皮化[图 5 (e)、(f)]。此外, 通过促进细胞外基质重组, RFN 治疗组中胶原沉积增加, 加速了再上皮化和组织重塑[图 5 (e)]。这些结果与促进伤口愈合过程中急性伤口的生理恢复和再生一致[33]。与 PBS 治疗相比, RFN 治疗

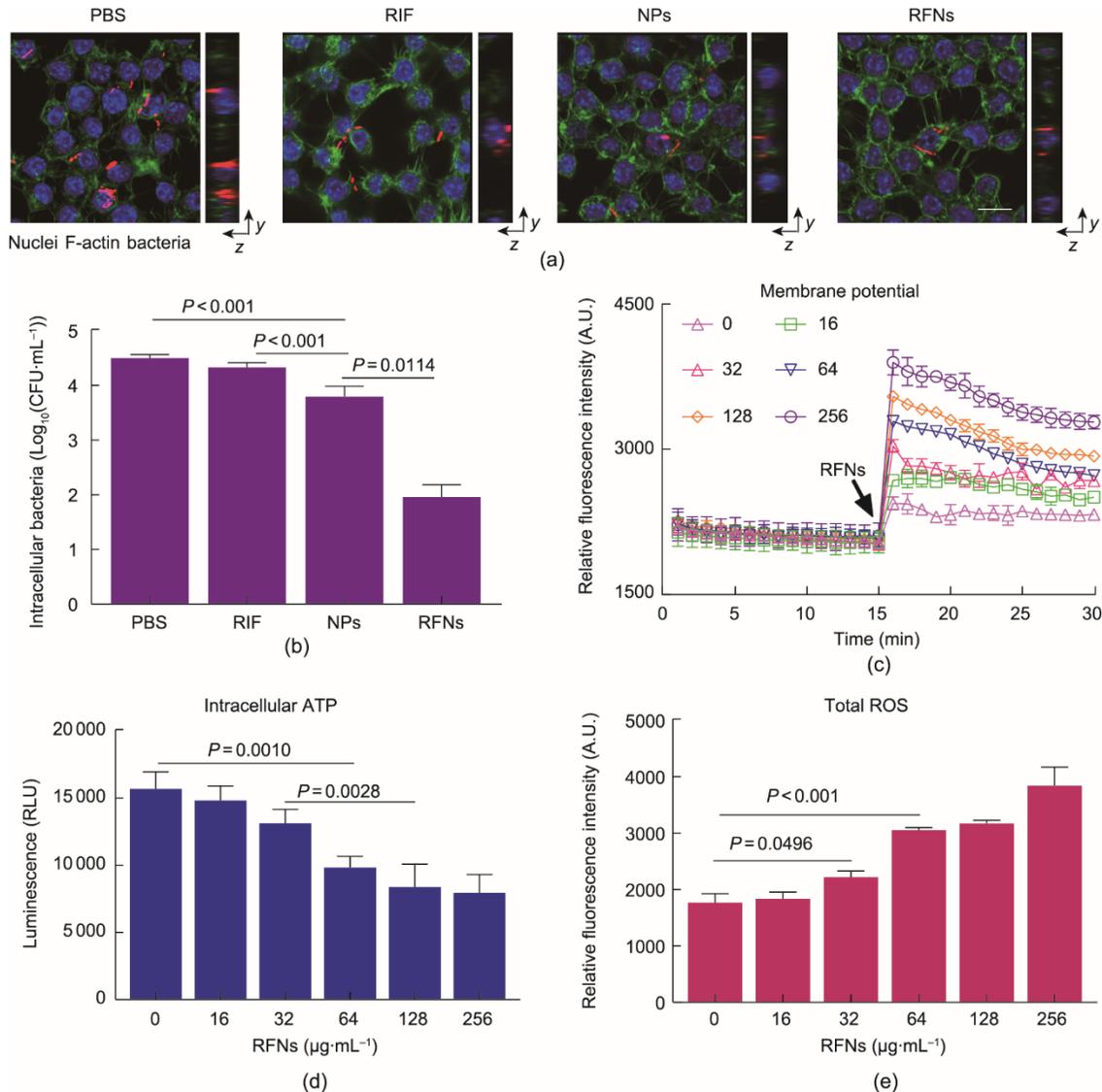


图4. RFN在体外有效杀伤胞质MDR细菌。(a) 感染蜡样芽孢杆菌(红色)的RAW 264.7细胞在用RIF、NP或RFN处理4 h后的共聚焦图像。细胞核(蓝色)和肌动蛋白(绿色)分别用DAPI和肌动蛋白绿488染色。比例尺: 10 µm。(b) 10倍MIC药物处理RAW 264.7细胞4 h后的胞质细菌载量。(c) 用不同浓度RFN (0 µg·mL⁻¹、16 µg·mL⁻¹、32 µg·mL⁻¹、64 µg·mL⁻¹、128 µg·mL⁻¹和256 µg·mL⁻¹)处理的蜡样芽孢杆菌中耗散的膜电位, 用DiSC₃(5) (622 nm/670 nm的激发/发射波长)染色。(d) RFN处理的蜡样芽孢杆菌中三磷酸腺苷(ATP)的细胞内积累减少。(e) RFN处理后, 通过测量2',7'-二氯荧光素二乙酸盐(激发/发射波长为488 nm/525 nm)的荧光强度来确定蜡样芽孢杆菌中活性氧(ROS)的累积。

后创面闭合时间显著缩短了三天, 第13天体重明显增加, 进一步证明了RFN具有更好的创伤愈合能力和效率(见附录A中的图S18)。与模型组相比, 局部RFN治疗后炎症因子降低了50%(见附录A中的图S19), 这与RFN的高抗菌效率密切相关。以上结果表明, RFN具有良好的生物相容性, 并且对治疗急性伤口感染非常有效。

在菌血症小鼠模型中进一步评估了RFN对抗细菌感染的能力。通过尾静脉向小鼠注射MRSA T144 (7.5×10^7 CFU)。感染一小时后, 用RFN(相当于2 mg·kg⁻¹ RIF)处理的小鼠的存活率(90.0%)较PBS处理组(存活率为40.0%)明显提高[图5(g)]。此外, 静脉注射

RFN两天后, 不同器官(心脏、肝脏、脾、肺和肾脏)的细菌载量显著下降[见图5(h)和附录A中的图S20], 小鼠的器官组织病理学充分证实了RFN强大的抗菌活性, 接受RFN治疗的小鼠没有明显的病理变化, 如无创伤性脾出血或肾脏病变(见附录A中的图S21)。以上结果表明RFN作为抗菌药物递送系统具有高效对抗MDR细菌感染的良好发展前景。

4. 讨论

由于胞质细菌的高度隐蔽性和抗菌药物耐受性, 使得

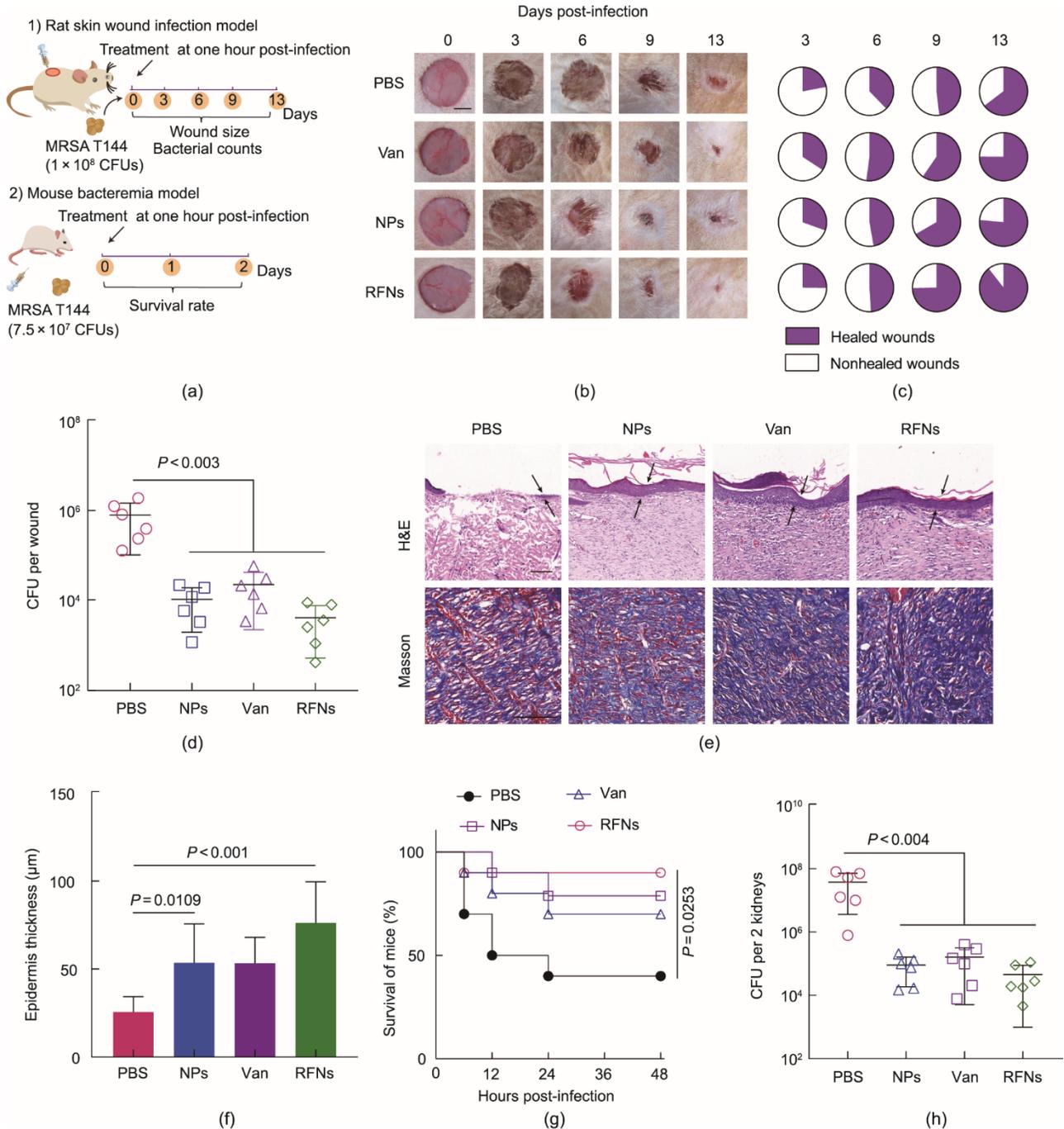


图5. RFN在MRSA感染的两种动物模型中显示高疗效。(a)大鼠皮肤伤口感染模型和小鼠菌血症模型的实验方案示意图。(b)用Van ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、NP或RFN (相当于 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RIF) 治疗MRSA T144 (每个伤口 10^8 CFU) 感染的伤口代表性照片。比例尺: 1 cm。(c)处理后第3、6、9和13天的伤口愈合大小。(d)大鼠伤口感染模型中的细菌载量。在感染后第13天发现RFN治疗的感染伤口中细菌载量减少。(e)伤口皮肤H&E和Masson染色的代表性显微照片。箭头表示表皮。比例尺: $100 \mu\text{m}$ 。(f) RFN治疗伤口的上皮间隙增加。(g) 静脉注射MRSA T144 (7.5×10^7 CFU) 建立菌血症小鼠模型, 用Van ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、NP或RFN (相当于 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RIF) 治疗后的小鼠存活曲线。(h) 对两个肾脏中的MRSA T144进行定量分析。用RFN治疗2 d后, 肾脏中的细菌载量显著降低。

有效杀伤胞质细菌变得十分艰难[34]。已有研究表明亚细胞结构对细菌病原体在细胞内的生存起着重要作用[35–36], 因此开发有效的载体将抗菌药物精确地递送到亚细胞区室至关重要。具有可调节表面修饰和刚性的纳米颗粒有望实现增强细胞摄取和精确靶向亚细胞区室[37–39],

并且脂质纳米颗粒已被广泛用作药物和基因递送系统[40]。调整纳米颗粒的磷脂成分是调节其细胞内化的有效方法[41]。本研究构建了一种刚性抗菌药物递送系统, 将RIF装载到MSN中, 并在颗粒表面涂覆细菌响应性磷脂, 以对抗胞质细菌感染。这些RFN具有脂质纳米材料的特

性，易于调节和修饰，以及通过内吞作用利用介孔二氧化硅核来提供刚性以增强细胞摄取。先前的研究表明纳米颗粒的刚性是控制细胞摄取的关键参数[14]。随着RFN刚性的增加，避免了细胞内吞过程中由形态变化引起的细胞摄取减少[15]。通过调整表面磷脂的比例来调节RFN的静电效应，可以选择性地将装载药物定位于目标亚细胞区室。通过磷脂酶触发抗菌药物释放，最大化实现提升RFN的抗菌效率和安全性。

通过同时实现刚性增加、亚细胞区室靶向性和刺激响应的有机结合，本文构建的刚性功能化药物递送系统成功地规避了抗菌药物对胞质细菌感染的治疗限制。对该系统进行初步总结发现，RFN的抗菌过程应该是逐步进行的，具体如下：①精准识别目标细菌病原体；②刚性增强内吞效率；③可重新编程药物分配；④杀伤胞质细菌病原体。

5. 结论

构建用于胞质抗菌药物精准递送的安全、有效和可调节的递送系统是一项严峻的挑战。本研究证明RFN是一种有效的细胞内递送系统，可通过主动靶向亚细胞区室并触发抗菌药物的按需释放，实现在体内外高效对抗MDR细菌感染的目标。改变RFN的磷脂成分可增强其溶酶体靶向性，从而增加抗菌药物累积来提高疗效，并且细菌分泌的磷脂酶可以水解RFN表面磷脂，以最大程度地减少抗菌药物的副作用和选择压力。因此RFN提供了一种有前途的治疗策略来对抗胞质细菌，为解决医疗保健中的关键问题提供技术手段。

致谢

本研究得到岭南现代农业科学与技术广东省实验室项目(NT2021006)、兽医生物技术国家重点实验室基金项目(SKLVBF202102)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Shaoqi Qu, Xiaoyong Huang, Xiangbin Song, Yifan Wu, Xiaowei Ma, Jianzhong Shen, and Kui Zhu declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.12.021>.

References

- [1] Kupferschmidt K. Resistance fighters. *Science* 2016;352(6287):758–61.
- [2] Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 2019;17(4):203–18.
- [3] Liu J, Gefen O, Ronin I, Bar-Meir M, Balaban NQ. Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. *Science* 2020; 367(6474):200–4.
- [4] Fridman O, Goldberg A, Ronin I, Shoshan N, Balaban NQ. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature* 2014;513(7518):418–21.
- [5] Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 2015; 517(7535):455–9.
- [6] Liu X, Liu F, Ding S, Shen J, Zhu K. Sublethal levels of antibiotics promote bacterial persistence in epithelial cells. *Adv Sci (Weinh)* 2020;7(18):1900840.
- [7] Li Y, Liu F, Zhang J, Liu X, Xiao P, Bai H, et al. Efficient killing of multidrug-resistant internalized bacteria by AIEgens *in vivo*. *Adv Sci (Weinh)* 2021;8(9): 2001750.
- [8] Yang ZQ, Huang YL, Zhou HW, Zhang R, Zhu K. Persistent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a Trojan horse. *Lancet Infect Dis* 2018;18(1): 22–3.
- [9] Durand GA, Raoult D, Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents* 2019;53(4):371–82.
- [10] Lewis K. The science of antibiotic discovery. *Cell* 2020;181(1):29–45.
- [11] Zeng X, Liu G, Tao W, Ma Y, Zhang X, He F, et al. A drug-self-gated mesoporous antitumor nanoplatfrom based on pH-sensitive dynamic covalent bond. *Adv Funct Mater* 2017;27(11):1605985–93.
- [12] Hood RL, Andriani RT, Ecker TE, Robertson JL, Rylander CJ. Characterizing thermal augmentation of convection-enhanced drug delivery with the fiberoptic microneedle device. *Engineering* 2015;1(3):344–50.
- [13] Cheng W, Zeng X, Chen H, Li Z, Zeng W, Mei L, et al. Versatile polydopamine platforms: synthesis and promising applications for surface modification and advanced nanomedicine. *ACS Nano* 2019;13(8):8537–65.
- [14] Sun J, Zhang L, Wang J, Feng Q, Liu D, Yin Q, et al. Tunable rigidity of (polymeric core)-lipid shell nanoparticles for regulated cellular uptake. *Adv Mater* 2015;27(8):1402–7.
- [15] Hui Y, Yi X, Wibowo D, Yang G, Middelberg APJ, Gao H, et al. Nanoparticle elasticity regulates phagocytosis and cancer cell uptake. *Sci Adv* 2020;6(16): eaaz4316.
- [16] Yang X, Qiu Q, Liu G, Ren H, Wang X, Lovell JF, et al. Traceless antibiotic-crosslinked micelles for rapid clearance of intracellular bacteria. *J Control Release* 2022;341:329–40.
- [17] Lin A, Liu Y, Zhu X, Chen X, Liu J, Zhou Y, et al. Bacteria-responsive biomimetic selenium nanosystem for multidrug-resistant bacterial infection detection and inhibition. *ACS Nano* 2019;13(12):13965–84.
- [18] Hu CM, Fang RH, Copp J, Luk BT, Zhang L. A biomimetic nanosponge that absorbs pore-forming toxins. *Nat Nanotechnol* 2013;8(5):336–40.
- [19] Ye M, Zhao Y, Wang Y, Zhao M, Yodsanit N, Xie R, et al. A dual-responsive antibiotic-loaded nanoparticle specifically binds pathogens and overcomes antimicrobial-resistant infections. *Adv Mater* 2021;33(9):2006772.
- [20] Wu W, Yu L, Jiang Q, Huo M, Lin H, Wang L, et al. Enhanced tumor-specific disulfiram chemotherapy by *in situ* Cu²⁺ chelation-initiated nontoxicity-toxicity transition. *J Am Chem Soc* 2019;141(29):11531–9.
- [21] Peyrussou F, Varet H, Nguyen TK, Legendre R, Sismeiro O, Coppée JY, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nat Commun* 2020;11(1):2200.
- [22] Xie Y, Liu Y, Yang J, Liu Y, Hu F, Zhu K, et al. Gold nanoclusters for targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vivo*. *Angew Chem Int Ed Engl* 2018;57(15):3958–62.
- [23] Guo P, Liu D, Subramanyam K, Wang B, Yang J, Huang J, et al. Nanoparticle

- elasticity directs tumor uptake. *Nat Commun* 2018;9(1):130.
- [24] Hu D, Deng Y, Jia F, Jin Q, Ji J. Surface charge switchable supramolecular nanocarriers for nitric oxide synergistic photodynamic eradication of biofilms. *ACS Nano* 2020;14(1):347–59.
- [25] Zhu G, Mock JN, Aljuffali I, Cummings BS, Arnold RD. Secretory phospholipase A₂ responsive liposomes. *J Pharm Sci* 2011;100(8):3146–59.
- [26] Cook AB, Decuzzi P. Harnessing endogenous stimuli for responsive materials in theranostics. *ACS Nano* 2021;15(2):2068–98.
- [27] Iwasaki H, Shimada A, Yokoyama K, Ito E. Structure and glycosylation of lipoteichoic acids in *Bacillus* strains. *J Bacteriol* 1989;171(1):424–9.
- [28] Ramírez-García PD, Retamal JS, Shenoy P, Imlach W, Sykes M, Truong N, et al. A pH-responsive nanoparticle targets the neurokinin 1 receptor in endosomes to prevent chronic pain. *Nat Nanotechnol* 2019;14(12):1150–9.
- [29] Berthold-Pluta A, Pluta A, Garbowska M. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microb Pathog* 2015;82:7–14.
- [30] Brynildsen MP, Winkler JA, Spina CS, MacDonald IC, Collins JJ. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nat Biotechnol* 2013;31(2):160–5.
- [31] Qu S, Liu Y, Hu Q, Han Y, Hao Z, Shen J, et al. Programmable antibiotic delivery to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through precision therapy. *J Control Release* 2020;321:710–7.
- [32] Morrisette T, Alosaimy S, Abdul-Mutakabbir JC, Kebriai R, Rybak MJ. The evolving reduction of vancomycin and daptomycin susceptibility in MRSA—salvaging the gold standards with combination therapy. *Antibiotics* 2020;9(11):762–82.
- [33] Xi Y, Ge J, Guo Y, Lei B, Ma PX. Biomimetic elastomeric polypeptide-based nanofibrous matrix for overcoming multidrug-resistant bacteria and enhancing full-thickness wound healing/skin regeneration. *ACS Nano* 2018;12(11):10772–84.
- [34] Schulz F, Horn M. Intranuclear bacteria: inside the cellular control center of eukaryotes. *Trends Cell Biol* 2015;25(6):339–46.
- [35] Choy A, Dancourt J, Mugo B, O’Connor TJ, Isberg RR, Melia TJ, et al. The *Legionella* effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* 2012;338(6110):1072–6.
- [36] Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol* 2009;17(2):59–65.
- [37] Labib M, Wang Z, Ahmed SU, Mohamadi RM, Duong B, Green B, et al. Tracking the expression of therapeutic protein targets in rare cells by antibody-mediated nanoparticle labelling and magnetic sorting. *Nat Biomed Eng* 2021;5(1):41–52.
- [38] Pesce D, Wu Y, Kolbe A, Weil T, Herrmann A. Enhancing cellular uptake of GFP via unfolded supercharged protein tags. *Biomaterials* 2013;34(17):4360–7.
- [39] Kankala RK, Han YH, Na J, Lee CH, Sun Z, Wang SB, et al. Nanoarchitected structure and surface biofunctionality of mesoporous silica nanoparticles. *Adv Mater* 2020;32(23):1907035.
- [40] Hajj KA, Ball RL, Deluty SB, Singh SR, Strelkova D, Knapp CM, et al. Branched-tail lipid nanoparticles potently deliver mRNA *in vivo* due to enhanced ionization at endosomal pH. *Small* 2019;15(6):1805097.
- [41] Abumanhal-Masarweh H, da Silva D, Poley M, Zinger A, Goldman E, Krinsky N, et al. Tailoring the lipid composition of nanoparticles modulates their cellular uptake and affects the viability of triple negative breast cancer cells. *J Control Release* 2019;307:331–41.