·实验研究·

基于木质素自组装的万古霉素纳米载药系统构建与抗菌性能评价

刘　斌[1],王华富[2],李岳亭[2],周小鹏[2*]

(1 丽水市人民医院脊柱外科,丽水 323000; 2 丽水市人民医院药学部,丽水 323000)

[**摘要**]　**目的:**构建负载万古霉素的木质素自组装纳米递药系统,并评估其体外抗菌性能及生物相容性。**方法:**通过自组装法制备木质素纳米载体并负载万古霉素,采用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)和透射电子显微镜(transmission electron microscopy,TEM)表征纳米粒的粒径与形貌,质谱仪测定载药量、包封率及药物释放行为;以金黄色葡萄球菌为模型菌株,通过微量二倍稀释法测定抗菌活性;结合平板涂布法、结晶紫染色、活/死细菌染色及细菌扫描电镜(scanning electron microscopy,SEM),分析纳米粒对细菌生物膜及细胞膜的破坏作用;采用 CCK-8 法检测纳米粒对 HeLa 细胞的生物相容性。**结果:**成功制备粒径约 100 nm 且分布均匀的木质素-万古霉素纳米复合物,其在弱酸性环境(pH = 5.5)中表现出更快的药物释放速率。抗菌实验显示,该纳米粒能有效破坏细菌生物膜结构及细胞膜完整性。CCK-8 实验证实其具有良好的生物相容性,具备进一步体内研究的潜力。**结论:**木质素自组装纳米递药系统可高效负载并缓释万古霉素,通过破坏细菌膜结构增强抗菌效果,且安全性良好,为细菌感染治疗提供了新型候选策略。

[**关键词**]　木质素;万古霉素;自组装纳米粒;细菌感染;体外抗菌

[**中图分类号**] R945　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003 - 3734(2026)10 - 1063 - 09

Construction and antibacterial evaluation of vancomycin-loaded lignin self-assembled nano-drug delivery system

LIU Bin[1], WANG Hua-fu[2], LI Yue-ting[2], ZHOU Xiao-peng[2*]

(1 *Department of Orthopedics, Lishui Central Hospital, Lishui* 323000, *China*; 2 *Department of Pharmacy, Lishui People's Hospital, Lishui* 323000, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To construct a lignin-based self-assembled nanodrug delivery system loaded with vancomycin and evaluate its *in vitro* antibacterial performance and biocompatibility. **Methods**: Vancomycin-loaded lignin nanoparticles (NPs) were prepared via self-assembly. The particle size and morphology were characterized using dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), while drug loading capacity, encapsulation efficiency, and release profile were determined by mass spectrometry. Staphylococcus aureus was used as a model strain to assess antibacterial activity via the microdilution broth method. The antibacterial mechanisms, including biofilm disruption and membrane damage, were investigated through colony counting, crystal violet staining, live/dead bacterial staining, and scanning electron microscopy (SEM). Biocompatibility was evaluated using the CCK-8 assay on HeLa cells. **Results**: Uniform lignin-vancomycin nanocomposites (~100 nm) were successfully prepared. The NPs exhibited pH-responsive drug release, with faster release under weakly acidic conditions (pH = 5.5). Antibacterial tests demonstrated effective biofilm destruction and bacterial membrane

[**基金项目**]　浙江省医药卫生科技计划资助项目(2022KY458);丽水市百千青年博硕成长计划资助项目(2023047923)

[**作者简介**]　刘斌,男,主任医师,主要从事骨修复材料及其功能化递送系统研究。E-mail:doctorliubin@163.com。

[**通讯作者**]　*周小鹏,男,硕士,药师,主要从事药物新剂型研究。E-mail:shopchou@163.com。

[**DOI**]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.10.008

disruption. CCK-8 assays confirmed excellent biocompatibility, supporting potential *in vivo* applications. **Conclusion**: The lignin-based self-assembled nanocarrier efficiently loads and sustains vancomycin release, enhances antibacterial efficacy via membrane-targeting mechanisms, and shows favorable biosafety. This system provides a promising strategy for treating bacterial infections.

[**Key words**] lignin; vancomycin; self-assembled nanoparticles; antimicrobial resistance; *in vitro* antibacterial

作为人类医学发展的重要里程碑,抗生素的发现为感染性疾病治疗带来了一把“利剑”,彻底扭转了人类面对病原微生物的被动局面[1]。然而,随着抗生素的大量广泛应用,“利剑”的双刃作用越来越难以忽视,细菌耐药(antimicrobial resistance, AMR)已成为当今威胁全球健康的最主要危险因素之一[2]。据统计,到 2050 年细菌耐药将超过艾滋病、结核以及疟疾等传统传染性疾病,成为主要的传染性死亡原因[3]。在众多耐药细菌中,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus,MRSA)等革兰阳性耐药菌引起的感染尤为复杂,其高致病性和多重耐药性使传统抗生素的临床疗效显著降低[4]。万古霉素(vancomycin hydrochloride, VH)作为治疗 MRSA 感染的最后一道防线,近年来也因细菌耐药性增强而面临疗效下降的问题,耐 VH 金黄色葡萄球菌引发的感染早有报道[5-7]。除了本身可产生耐药性外,多数细菌还能通过合成一种聚合物基质,附着于感染部位并形成一层高度耐药的生物膜(extracellular polymeric substances, EPS),该膜物理阻隔抗生素穿透,进一步降低感染部位疗效[8-10]。因此,寻找一种能有效抑制细菌感染同时又能减轻不良反应的新的抗菌药物给药途径尤为重要。

纳米药物递送系统具有独特的尺寸及表面特性,在改善药物性能方面展现出巨大优势。近年来,各类纳米载体如脂质体、聚合物纳米粒、无机纳米材料等被广泛研究用于抗生素递送,其中以非共价键自组装制备的纳米复合材料最为常见[11-12]。然而,人工合成纳米材料可能存在生物相容性差、制备工艺复杂、成本高昂等问题,因此绿色环保可持续的天然高分子材料成为药物递送的理想载体。木质素(lignin)作为自然界中储量仅次于纤维素的可再生芳香族聚合物,其主要成分为木质素磺酸盐(lignosulfonate,LS),结构中的磺酸基(-SO_3H)、碳基和酚羟基(-OH)在适当的反离子(钠、钙、镁、铵根等)存在下为 LS 提供了良好的水溶性[13-14]。此外,因 LS 良好的生物降解性、生物相容性、复合性、自组装性和成本较低等特点,近年来在纳米材料领域得到了广泛应用,包括抗氧化剂、抗微生物剂、伤口愈合材料和黏合剂等方面[15-16]。本课题组前期工作表明,LS 可以在不同的阴离子溶液(盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐)和 pH 条件下,合成不同形态的自组装纳米复合物(self assembled nanocomposites, SANCs),包括纳米球、不同的纳米体、纳米八面体和纳米分支等,具有良好的自组装特性[17]。此外,LS 可通过 π-π 堆积、氢键等作用高效负载疏水性药物[18]。基于此,为降低 VH 的不良反应发生率并增强其抗菌疗效与生物安全性,本研究创新性地提出一种绿色可持续的纳米递送策略——利用 LS 的自组装特性构建 VH 负载型纳米复合系统(VH@ LS NPs)。通过综合运用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)、透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)、质谱仪等先进表征技术,系统考察 VH@ LS NPs 的理化性质,同时对其细胞相容性及抗菌效能进行多维度评价,旨在为临床感染性疾病的治疗提供一种兼具高效性与安全性的新型纳米治疗平台。

材料与方法

1 仪器

HT7800 型透射电子显微镜、SU8600 型扫描电子显微镜(日本日立公司);Litesizer 500 型激光粒度仪(奥地利 Anton Paar 公司);NE-4000-AS 型双通道程控注射泵(美国 New Era Pump Systems 公司);FE28-Micro 型酸度计(瑞士 Mettler Toledo 公司);Xevo TQD 型质谱仪(美国 Waters 公司);EVOS M500 型倒置荧光显微镜(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 试剂

盐酸万古霉素(批号:C2303160,纯度 > 99%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);木质素(批号:MKCN6474,纯度 > 99%,德国 merck);氢氧化钠(批号:C13525235,纯度 ≥ 96%,北京伊诺凯科技有限公司);胰酪胨大豆肉汤培养基 TSB(批号:2511030001,北京索莱宝科技有限公司);LB 营养琼脂(批号:1117I022,北京索莱宝科技有限公司);

金黄色葡萄球菌(批号:ATCC-29213,丽水市人民医院感染科提供);活/死染色试剂盒(批号:MA0361-2-May-24J,大连美仑生物技术有限公司);结晶紫(批号:IBHGP15,上海麦克林生化科技股份有限公司);抗荧光衰减封片剂(含 DAPI,批号:A405260212,上海碧云天生物技术有限公司);He-la 细胞(批号:CL-0101,武汉普诺赛生物科技有限公司) ;胎牛血清(批号:B3262156RP,美国赛默飞公司);DMEM 培养基(批号:3293468,美国赛默飞公司);青-链霉素溶液(批号:WHAB25C251,武汉普诺赛生物科技有限公司);CCK8 检测试剂盒(批号:25006K1018,美国 APExBIO 公司);再生纤维素透析袋(批号:20231118,美国 MYM Biological Technology 公司)。

3 VH@LS 纳米粒的制备

将 LS 溶解于 pH = 9 的 NaOH 溶液中,配制浓度为 5 mg·mL^{-1}的 LS 溶液。随后,在室温搅拌条件下,使用注射泵以 1.5 mL·min^{-1}的恒定速率将 1 mg·mL^{-1}的 VH 水溶液缓慢滴加至 3 mL 上述 LS 溶液中。通过实时监测反应体系 pH 值,当溶液 pH 降至 7 时,立即停止 VH 溶液的滴加,并继续搅拌反应 6 h 使组装完全。反应完成后,将混合溶液在 4 000 r·min^{-1}转速下离心 20 min 以收集沉淀,随后用去离子水洗涤 3 次以去除未反应的游离组分,经冷冻干燥处理即获得 VH@LS 纳米粒。

4 VH@LS 纳米粒的表征

采用 DLS 测定纳米颗粒的粒径分布和 Zeta 电位,所有样品(n = 3)均用超纯水稀释至适宜浓度后,于 25 ℃恒温条件下进行测定;通过 TEM 技术对纳米粒的表面形貌进行表征观察。

5 VH@LS 纳米粒的载药量(drug loading,DL)和包封率(encapsulation efficiency,EE)测定

为测定 VH@LS 纳米粒的 EE 和 DL,采用以下方法:按照"**3**"项下方法平行制备 2 份 1 mL VH@LS 的纳米粒水溶液,其中一份溶液经 10 000 r·min^{-1}高速离心后取上清液用于测定游离 VH 含量;另一份溶液经冷冻干燥后,用 DMSO 充分溶解以确保 VH 完全释放,用于测定 VH 总量。测试前,取 10 μL 样品溶液用色谱级甲醇稀释 100 倍并充分混匀,随后采用高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)测定 VH 浓度,并根据测定结果计算 EE 和 DL,计算公式如下:

$$EE = \frac{药物总量 - 游离药物含量}{药物总量} \times 100\% \quad 公式(1)$$

$$DL = \frac{药物总量 - 游离药物含量}{载体总量 + 药物总量 - 游离药物含量} \times 100\% \quad 公式(2)$$

6 VH@LS 纳米粒的药物释放

采用动态透析法研究 VH@LS 纳米粒在不同 pH 条件下的药物释放行为,具体操作如下:将 2 mL VH@LS 水溶液装入截留分子量为 3.5 kDa 的透析袋中,随后将透析袋置于含有 30 mL 释放介质(pH 7.4 的 PBS 或 pH 5.5 的醋酸盐缓冲液)的 50 mL 离心管中。将样品置于 37 ℃恒温振荡培养箱中,以 100 r·min^{-1}的转速进行持续振荡。在预设时间点(0、0.5、1、2、4、5、6、12、24、72 h)分别取样 1 mL(同时补充等温等体积新鲜介质),采用 HPLC-MS 测定各时间点的 VH 浓度,并计算累积释放率。所有实验均在避光条件下进行,每组实验平行 3 次。

7 金黄色葡萄球菌的培养

在无菌操作条件下,使用灭菌接种环挑取单一菌落接种于 1 mL TSB 液体培养基中,置于 37 ℃恒温振荡培养箱以 220 r·min^{-1}转速培养 12 ~ 16 h。次日,将过夜培养的菌液按 1∶100 比例转接至新鲜 TSB 培养基中,继续振荡培养 3 h。采用紫外分光光度计监测菌液浓度,待 600 nm 处吸光度(OD_{600})值达到(0.5 ± 0.05)时终止培养,此时细菌处于对数生长期。后续实验均使用此对数期菌悬液进行相关研究,所有操作均在生物安全柜中完成以确保无菌条件。

8 VH@LS 纳米粒的体外抗菌活性

8.1 VH@LS 纳米粒抑菌浓度及抑菌率测定 采用 96 孔板微量二倍稀释法进行药物敏感性测试,具体操作如下:在无菌 96 孔板中,第 1 ~ 11 列每孔加入 100 μL TSB 液体培养基;第 1 列加入 100 μL 待测药物溶液,使用移液枪吹吸混匀 5 ~ 6 次后,吸取 100 μL 转移至第 2 列,重复此操作直至第 10 列,从第 10 列弃去 100 μL 混合液,确保各孔液体体积均为 100 μL。经此梯度稀释后,各列药物终浓度分别为 6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5 mg·mL^{-1}。随后,每孔加入 100 μL OD_{600}值为 0.5 的金黄色葡萄球菌菌悬液(第 11 列作为阴性对照仅加入培养基)。每组设置 3 个复孔,同时设 2 个不含菌的药物空白对照孔。将 96 孔板置于 37 ℃培养箱中孵育 16 h 后,通过肉眼观察细菌生长情况(所有操作均在生物安全柜中无菌条件下完成),使用酶标仪测定 630 nm 处吸光度(OD_{630})。数据处理

时,采用以下公式计算抑菌效果:

校正 OD_{630} 值 = 实验组 OD_{630} 值 − 空白对照组 OD_{630} 值　　公式(3)

$$抑菌率 = \frac{阴性对照组\ OD_{630}值 - 校正\ OD_{630}值}{阴性对照组\ OD_{630}值} \times 100\%$$　　公式(4)

8.2　平板涂布法观察菌落数　采用平板菌落计数法评价不同药物对金黄色葡萄球菌的体外抑菌效果,具体方法如下:取对数生长期(OD_{600} = 0.5)的细菌悬浮液,分别与空白对照(Control)、VH 水溶液、LS 水溶液及 VH@LS 纳米粒溶液共培养于 37 ℃摇床 12 h。培养结束后,将各组菌液进行适当稀释后均匀涂布于 TSB 琼脂平板上,37 ℃恒温培养箱中过夜培养。次日使用高清数码相机拍摄记录各平板菌落生长情况,通过比较实验组与对照组的菌落数量及形态变化,综合评价 VH、LS 及 VH@LS 纳米粒的体外抗菌活性。实验全程设置 3 组独立重复实验以确保结果可靠,所有操作均在生物安全柜中无菌条件下完成。

8.3　体外细菌细胞膜完整性实验　采用扫描电子显微镜(scanning electron microscopy,SEM)观察金黄色葡萄球菌在不同处理条件下的形态学变化,具体实验步骤如下:收集对数生长期细菌悬浮液,经 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤 3 次后,分别用 VH 溶液和 VH@LS 纳米粒处理 1、2 和 4 h。处理完成后,立即用预冷(4 ℃)的 2.5% 戊二醛溶液固定 4 h。固定后的样品经 PBS 漂洗 3 次去除残留固定剂,随后依次采用 30%、50%、70%、80%、90% 和 100% 乙醇梯度脱水,每个浓度处理 15 min。将样品置于临界点干燥仪中干燥,喷金处理后使用场发射扫描电镜观察细菌表面超微结构变化,重点考察细胞膜完整性及形态损伤程度。所有实验均设置未处理组作为阴性对照,每组实验重复 3 次以确保结果的可靠性。

8.4　结晶紫染色　采用结晶紫染色法定量分析金黄色葡萄球菌生物膜形成能力,具体方法如下:在无菌 96 孔板中,每孔加入 95 μL TSB 培养基和 50 μL 金黄色葡萄球菌悬液(OD_{600} = 0.5),37 ℃静置培养 48 h 以促进生物膜形成。培养结束后,轻柔吸弃培养液,用预冷 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤 3 次以去除游离浮游菌。随后每孔加入 200 μL 无水甲醇固定 15 min,室温风干后,加入 200 μL 1% 结晶紫溶液染色 15 min。染色完成后,用去离子水反复冲洗至洗脱液无色,37 ℃烘干后,使用倒置荧光显微镜系统采集生物膜图像。每组实验设置 8 个复孔,同时设立不含菌液的培养基作为空白对照。

8.5　活/死染色　采用荧光双染法检测细菌细胞膜完整性变化,具体操作如下:将经不同药物处理的细菌悬液以 5 000 r·min^{-1}离心 5 min 收集菌体,弃上清后用无菌生理盐水洗涤 3 次以去除残留药物。随后用 500 μL 生理盐水重悬菌体,加入 1.5 μL 预先配制的 DAPI/PI 混合染液(体积比 1∶1)。样品每隔 5 min 轻柔振荡混匀,室温避光孵育 30 min 使染料充分结合。染色完成后,取 5 μL 菌悬液均匀涂布于洁净载玻片上,覆盖盖玻片后静置 10 min。使用倒置荧光显微镜观察并采集图像,其中 DAPI 激发波长设为 358 nm(蓝色荧光标记活菌),PI 激发波长设为 535 nm(红色荧光标记死菌)。每组样品设置 3 个平行实验,图像采集时保持相同曝光参数以确保结果可比性。

9　VH@LS 纳米粒的生物相容性

采用 CCK-8 法评估纳米材料对 HeLa 细胞的体外细胞毒性,具体实验过程如下:将处于对数生长期的 HeLa 细胞以 1 × 10^4 个·孔$^{-1}$的密度接种于 96 孔培养板中,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,使细胞充分贴壁。待细胞贴壁完成后,弃去原培养液,分别加入含不同浓度纳米材料的新鲜培养基,继续培养 24 h。随后按照 CCK-8 试剂盒说明书操作,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续孵育 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔吸光度值。实验设置空白对照组(仅含培养基)、阴性对照组(未处理细胞)及 3 个平行复孔,细胞相对活力通过比较实验组与对照组的吸光度值计算得出。所有实验均在无菌条件下重复 3 次,以保证结果的可靠性。

结　果

1　VH@LS 纳米粒的制备流程[18]

VH@LS 纳米粒的制备流程图见图 1。

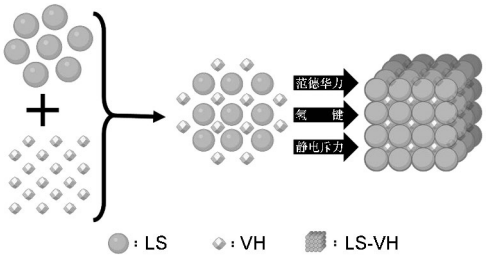
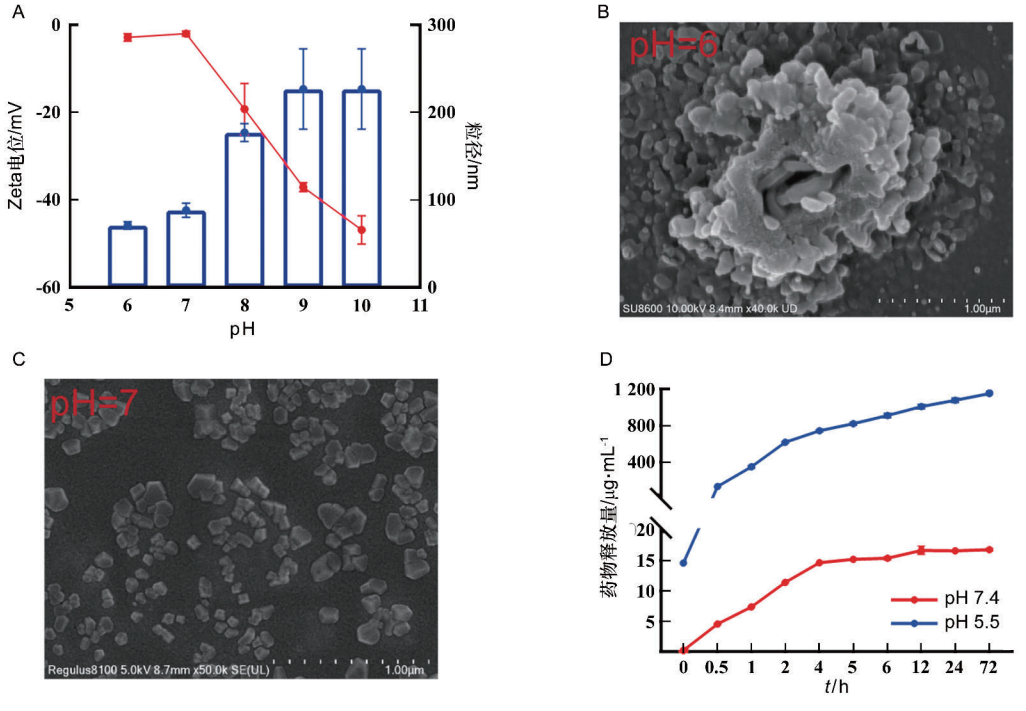


图 1　VH@LS 纳米粒制备流程图

2 VH@LS 纳米粒的表征

采用 DLS 技术对 VH@LS 纳米粒在不同 pH 条件下的流体动力学尺寸和表面电位进行系统表征。结果表明,随着溶液 pH 值的升高,纳米粒的粒径呈现逐渐增大的趋势,而表面电位则随之降低(见图 2A)。基于细菌感染微环境通常呈负电性的特点,本研究选取电位相对偏正且粒径较小的 pH 条件(pH 6.0 和 7.0)进行后续实验。通过 TEM 观察发现,pH 6.0 条件下制备的 VH@LS 纳米粒存在明显团聚现象;而在 pH 7.0 条件下,纳米粒呈现均匀分散的多面体结构,平均直径约 100 nm,且粒径分布较窄(见图 2B 和图 2C)。因此,选择 pH 7.0 作为 VH@LS 纳米材料的优化制备条件。进一步通过 HPLC-MS 测定药物含量,计算得出该条件下制备的 VH@LS 纳米粒具有较高的 DL(55.35%)和 EE(75.60%)。为评估纳米粒的药物释放特性,采用透析法考察了 VH 在模拟生理环境(pH 7.4)和感染微环境(pH 5.5)中的释放动力学。结果显示,在弱酸性条件下药物的累积释放量显著高于生理 pH 条件(见图 2D)。这一现象表明 VH@LS 纳米粒具有 pH 响应性释放特性:在细菌感染部位(弱酸环境)可促进药物释放,而在正常生理条件下则保持较低的释放速率,从而实现对感染部位的选择性治疗,同时减少对正常组织的潜在不良反应。



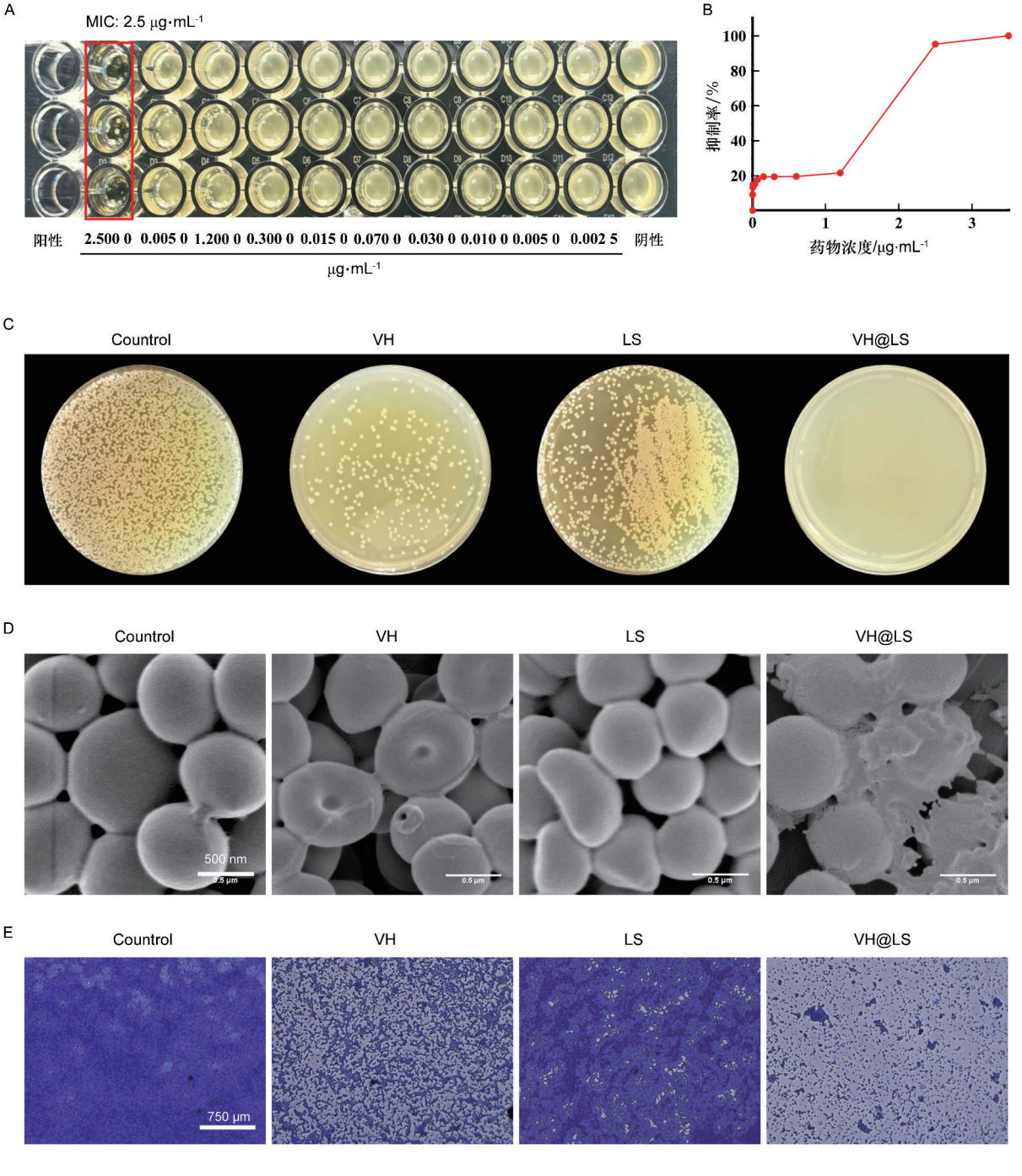
A:不同 pH 条件下的 VH@LS 纳米粒粒径及电位分布图;B:VH@LS 纳米粒在 pH 6 条件下的 TEM 图;C:VH@LS 纳米粒在 pH 7 条件下的 TEM 图;D:VH@LS 纳米粒在模拟不同 pH 环境下(pH 5.5 和 7.4)的药物释放情况

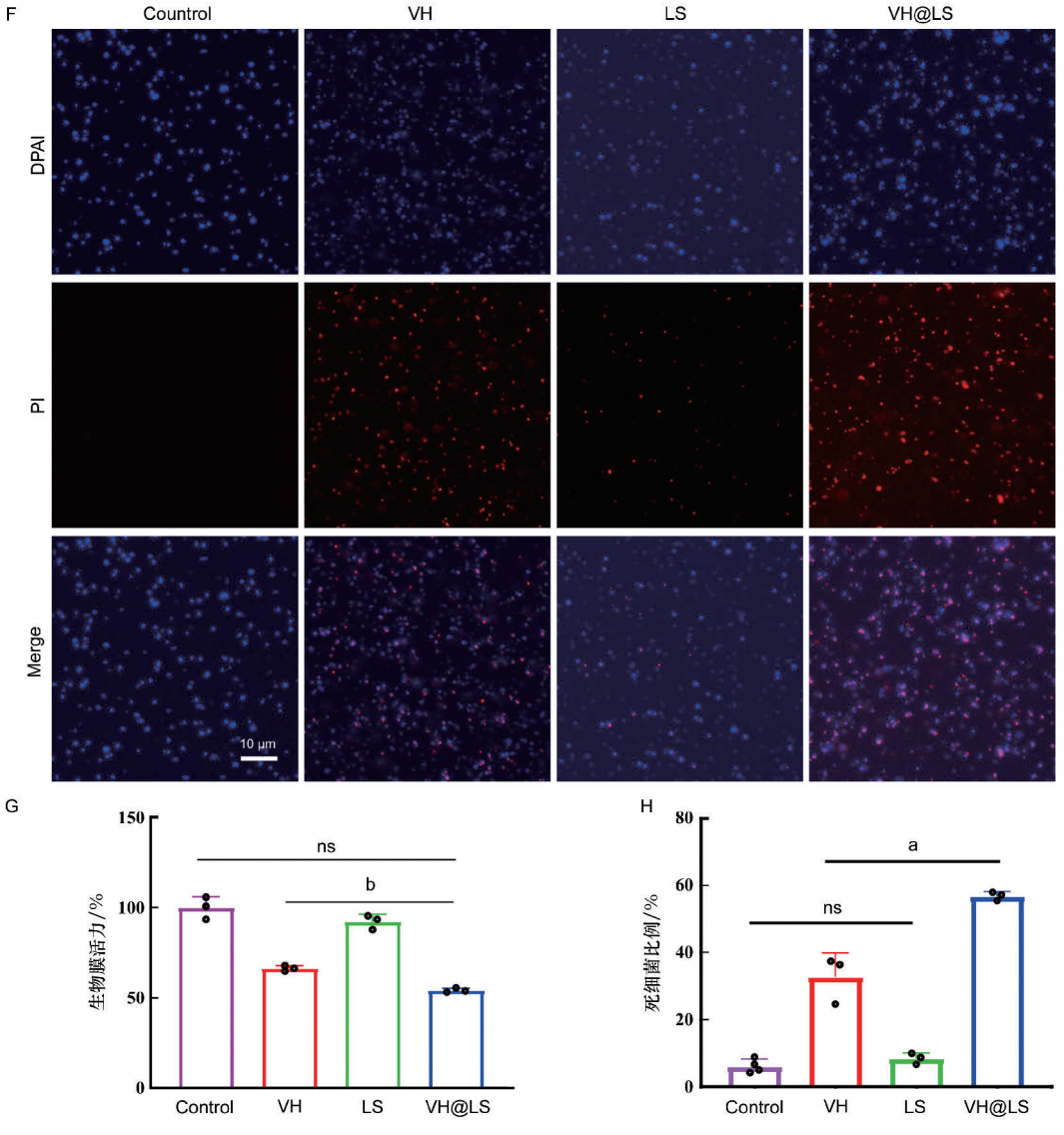
图 2 VH@LS 纳米粒的表征

3 VH@LS 纳米粒的体外抗菌性能

MRSA 作为人体皮肤常见的共生菌,在皮肤屏障完整时通常不表现致病性。然而当皮肤发生损伤时,该菌可迅速转化为导致皮肤及软组织感染(skin and soft tissue infections,SSTIs)的主要病原体。为全面评估 VH@LS 纳米粒的抗菌效能,本研究通过微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC),并结合标准平板菌落计数法进行验证。结果显示,VH@LS 对 MRSA 的抑制作用呈现显著的浓度依赖性(见图 3A)。当药物浓度达到 2.5 μg·mL^{-1}时,抑菌率超过 90%。基于此,选择该 MIC 浓度(2.5 μg·mL^{-1})作为后续实验条件,其中 VH@LS 组包含 VH(1.38 μg·mL^{-1})和 LS(1.12 μg·mL^{-1})的等效剂量(见图 3B)。平板菌落计数结果进一步证实,VH@LS 组的菌落形成单位(colony-forming unit,CFU)显著减少,展现出最优的

抗菌效果(见图 3C)。通过 SEM 观察发现,Control 组细菌呈现典型的光滑球状形态(见图 3D)。相比之下,VH 处理组细菌出现明显的膜皱缩现象,而 VH@ LS 组则表现出更严重的细胞膜塌陷和内容物泄漏,表明纳米粒可通过破坏细胞膜完整性发挥杀菌作用。鉴于生物膜形成是细菌耐药的重要机制,进一步评估了 VH@ LS 对生物膜的清除能力。结晶紫染色结果显示,VH@ LS 组处理的生物膜显示出较低的结晶紫染色水平,明显低于对照组(见图 3E)。活/死细菌双染色实验结果证实,虽然 LS 和 VH 单药组均表现出一定的杀菌活性,但 VH@ LS 组中死菌(红色荧光)比例最高(见图 3F),这与前述结果一致,共同证明了 VH@ LS 纳米粒的协同抗菌效应。用醋酸(33%)溶解结晶紫染色的生物膜并测定吸光度,VH@ LS 组对生物膜活力的抑制效率(54.31%)优于单独 VH 组(66.44%),见图 3G。细菌活/死染色免疫荧光统计柱状图见图 3H。





A:不同浓度 VH@ LS 纳米粒处理细菌 24 h 孔板图;B:不同浓度 VH@ LS 纳米粒对细菌抑制率统计图;C:不同处理组 MRSA 菌落图像;D:不同处理组 MRSA 的 SEM 图;E:不同处理组 MRSA 的结晶紫染色显微镜图像;F:不同处理组 MRSA 的活/死染色荧光图;G:通过测定 OD_{600} 对结晶紫染色的样本中生物膜进行定量评估;H:细菌活/死染色免疫荧光统计柱状图;两组间比较,a:$P<0.01$,b:$P<0.001$

图 3 VH@ LS 纳米粒的体外抗菌性能

4 VH@LS 纳米粒的生物相容性

为评估 VH@ LS 纳米粒的生物安全性,以 HeLa 细胞为模型,采用 CCK-8 法系统考察了不同浓度(0 ~ 100 μg·mL^{-1})VH@ LS 纳米粒处理 24 h 后的细胞活力。如图 4 所示,尽管随着纳米粒浓度增加,细胞存活率呈现轻微下降趋势,但所有实验组的细胞存活率均维持在 80% 以上。这一结果表明,在实验浓度范围内,VH@ LS 纳米粒表现出良好的生物相容性,满足后续生物医学应用的安全性要求。

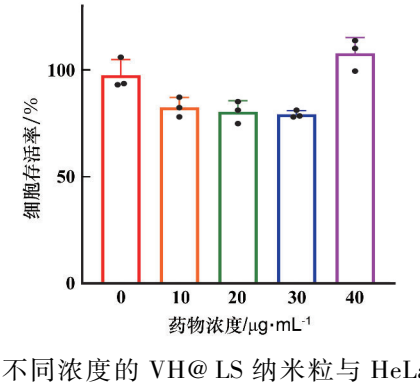


图 4 不同浓度的 VH@ LS 纳米粒与 HeLa 细胞共孵育后的细胞存活率

讨　论

VH 作为糖肽类抗生素的代表,对包括 MRSA 在内的革兰阳性菌感染具有关键疗效。然而,其固有的肾毒性、耳毒性以及日益严峻的耐药性问题,限制了其临床应用的广度和安全性[19-22]。因此,开发能够降低毒性、增强疗效并延缓耐药的新型递送策略具有重要的临床意义。本研究基于绿色可持续的理念,利用 LS 的自组装特性,构建了 VH 纳米递送系统 VH@LS NPs。研究结果表明,该系统不仅能实现药物的高效负载与控释,更展现出显著的体外协同抗菌活性与良好的生物相容性。本研究观察到 VH@LS 纳米粒在模拟细菌感染微环境(pH 5.5)中的药物累积释放量显著高于生理环境(pH 7.4),表现出一定的 pH 响应特性。LS 分子骨架富含酚羟基、磺酸基等可离子化基团,这些基团的质子化程度可在弱酸性条件下发生改变:磺酸基的 pKa 较低,在较宽的 pH 范围内维持离子化状态,提供亲水性和负电性;而酚羟基的 pKa 较高,在酸性环境中质子化比例增加,导致其亲水性下降,分子间的疏水相互作用和 π-π 堆积作用可能增强[23-24]。这种电荷与亲/疏水平衡的动态变化,可能引起纳米粒结构的轻微溶胀或表面孔隙率增加,从而加速包载的 VH 分子扩散释放。这种对感染部位弱酸性微环境的特异性响应,使 VH@LS 纳米粒能够实现感染部位的靶向药物递送,提高局部杀菌浓度,同时减少在正常组织中的非必要释放,为降低全身毒性提供可能。

抗菌实验结果表明,VH@LS 纳米粒对 MRSA 的抑菌效果显著优于同等剂量的游离 VH 或 LS 单体,提示二者存在协同抗菌作用。木质素作为一种广泛应用的潜在基质材料,可以削弱细菌膜并增加细胞的通透性[25]。这种膜干扰作用可能促进了 VH 分子更有效地穿透细胞壁屏障,到达其作用靶点,从而增强其抑制细胞壁合成的效能[26]。此外,结晶紫染色及活/死染色结果表明,VH@LS 能有效减少生物膜生物量并杀死膜内细菌。综上所述,VH@LS 纳米粒不仅通过 pH 响应性释放实现了药物的时空靶向递送,还通过 LS 与 VH 的多机制协同,从破坏膜完整性、增强药物渗透、瓦解生物膜等多个层面共同发力,从而更高效地抑制细菌,并有望对抗传统抗生素面临的耐药性挑战。

本研究成功构建了一种基于天然高分子 LS 的 VH 纳米递送系统,该系统制备工艺绿色简便,具有较高的载药效率、良好的生物相容性、显著的体外协同抗菌活性以及对感染微环境敏感的释药特性,使其成为一种极具潜力的抗耐药菌感染的新型纳米治疗平台。未来研究将集中于深入探究其体内药效学与药动学行为,评估其在动物感染模型中的疗效与安全性,并进一步阐明其分子水平的协同抗菌机制,为最终实现临床转化奠定坚实基础。

[参 考 文 献]

[1] COOK MA, WRIGHT GD. The past, present, and future of antibiotics[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(657): eabo7793.

[2] BHARDWAJ S, MEHRA P, DHANJAL DS, *et al*. Antibiotics and antibiotic resistance-flipsides of the same coin[J]. *Curr Pharm Des*, 2022, 28(28): 2312-2329.

[3] PAINTER C, LIMMATHUROTSAKUL D, ROBERTS T, *et al*. Sustainable antimicrobial resistance surveillance: time for a global funding mechanism[J]. *Lancet Infect Dis*, 2025, 25(2): e99-e103.

[4] LAKHUNDI S, ZHANG KY. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(4): e00020-18.

[5] CONG YG, YANG SJ, RAO XC. Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: a review of case updating and clinical features[J]. *J Adv Res*, 2019, 21: 169-176.

[6] BELETE MA, GEDEFIE A, ALEMAYEHU E, *et al*. The prevalence of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2023, 12(1): 86.

[7] NA S, INTANON M, SRITHANASUWAN A, *et al*. Evidence of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus, multidrug-resistant S. aureus, and Enterococcus faecium-causing mastitis in Thailand and Cambodia[J]. *Vet World*, 2025, 18(1): 202-209.

[8] GINDELE JA, MANG S, PAIRET N, *et al*. Opposing effects of *in vitro* differentiated macrophages sub-type on epithelial wound healing[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184386.

[9] VERSEY Z, DA CRUZ NIZERW S, RUSSELL E, *et al*. Biofilm-innate immune interface: contribution to chronic wound formation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 648554.

[10] HAN H, XING L, CHEN BT, *et al*. Progress on the pathological tissue microenvironment barrier-modulated nanomedicine[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, 200: 115051.

[11] ZHANG CY, GAO J, WANG ZJ. Bioresponsive nanoparticles targeted to infectious microenvironments for sepsis management[J]. *Adv Mater*, 2018, 30(43): e1803618.

[12] LEI RY, HOU JC, CHEN QX, *et al*. Self-assembling myristoylated human α-defensin 5 as a next-generation nanobiotics potentiates therapeutic efficacy in bacterial infection[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(6): 5284-5296.

[13] RALPH J, LAPIERRE C, BOERJAN W. Lignin structure and its engineering[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 56: 240-249.

[14] BAHRPAIMA K, FATEHI P. Synthesis and characterization of carboxyethylated lignosulfonate[J]. *Chem Sus Chem*, 2018, 11(17): 2967-2980.

[15] CHANG FC, YEN SH, WANG SH. Developing lignosulfonate-based activated carbon fibers[J]. *Materials (Basel)*, 2018, 11(10): 1877.

[16] PIOMBINO C, LANGE H, SABUZI F, *et al*. Lignosulfonate microcapsules for delivery and controlled release of thymol and derivatives[J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 866.

[17] BAO DD, XIE YT, MA SL, *et al*. Self-assembly of a renewable lignin biopolymer in nanoparticles with multiple morphologies

[J]. *J Appl Polym Sci*, 2019, 136(21): 47482.
[18] ZOU JF, BAO DD, MA R, *et al*. Green and sustainable self-assembly nanocomposite from gentamicin sulfate/lignosulfonate with efficient antibacterial and wound-healing activity[J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2020, 8(12): 4931 – 4940.
[19] SCHEETZ MH. Vancomycin: the pendulum swings[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2020, 77(11): 810 – 811.
[20] STOGIOS PJ, SAVCHENKO A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance[J]. *Protein Sci*, 2020, 29(3): 654 – 669.
[21] PENG Y, LI CY, YANG ZL, *et al*. Adverse reactions of vancomycin in humans: a protocol for meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(38): e22376.
[22] LI G, WALKER MJ, DE OLIVEIRA DMP. Vancomycin resistance in Enterococcus and Staphylococcus aureus[J]. *Microorganisms*, 2022, 11(1): 24.
[23] LIN DR, XIAO LJ, QIN W, *et al*. Preparation, characterization and antioxidant properties of curcumin encapsulated chitosan/lignosulfonate micelles[J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 281: 119080.
[24] YADAV V, BANERJEE S, BAIRAGI S, *et al*. Green synthesis of sodium lignosulfonate nanoparticles using chitosan for significantly enhanced multifunctional characteristics[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 211: 380 – 389.
[25] PERVEEN S, ZHAI R, CHEN XX, *et al*. Synthesis of high-performance antibacterial agent based on incorporated vancomycin into MOF-modified lignin nanocomposites[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 274(Pt 2): 133339.
[26] 李晶, 李娜, 包保全, 等. HPLC-Q-Exactive-MS/MS 快速分析蒙药材悬钩子木中的化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(11): 1447 – 1455.

编辑:姚佳敏/接受日期:2025 – 12 – 19