氧化铁基纳米粒子对铜绿假单胞菌生物膜的作用及其机制研究

丁利红[1,2]，王德玫[1]，谢建君[1,3]，杨　旭[1]，付廷明[1*]

（1. 南京中医药大学药学院，中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室，江苏南京 210023；2. 淮安市妇幼保健院，江苏淮安 223001；3. 三明市中西医结合医院，福建三明 365001）

摘要：细菌生物膜是难治性感染与耐药性的核心屏障，传统抗菌药难以渗透胞外基质，亟需探索新型干预措施。该研究采用共沉淀法制备了 3 种氧化铁基纳米粒子［α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 与 α-FeO(OH)］，并探究了其对铜绿假单胞菌生物膜的清除作用。体外药效学试验结果显示，3 种纳米粒子对铜绿假单胞菌生物膜均具有显著的清除作用，有效浓度为 6.25 ～ 12.5 μg/mL；均通过拆解被膜致密结构、降低细菌黏附，协同催化 H_2O_2 产生 • OH 等活性氧破坏生物膜的机制产生抗菌效应。此外，氧化铁基纳米粒子可协同增强抗菌药头孢他啶的生物膜清除效果，并逆转亚抑菌浓度下抗菌药诱导的生物膜促生长效应。作用机制研究表明，α-Fe_2O_3 可下调铜绿假单胞菌群体感应系统（*rhlI*、*pqsA*）及毒力因子（*phzM*、*pslA*、*lasA*）的基因表达，上调 *N*- 酰基高丝氨酸内酯酰化酶编码基因 *pvdQ*，干扰铁稳态与绿脓菌素分泌，多途径抑制生物膜形成，为开发新型抗生物膜感染的治疗策略提供了新思路。

关键词：氧化铁基纳米粒子；铜绿假单胞菌；生物膜；抗菌药物；活性氧

中图分类号：R978.1；R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)08-0910-12

引用：丁利红, 王德玫, 谢建君, 等. 氧化铁基纳米粒子对铜绿假单胞菌生物膜的作用及其机制研究[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(8): 910-921. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.08.005

Study on the Effects and Mechanism of Iron Oxide-based Nanoparticles on the Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*

DING Lihong[1,2], WANG Demei[1], XIE Jianjun[1,3], YANG Xu[1], FU Tingming[1*]

(*1. State Key Lab. on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; 2. Huai'an Maternal and Child Health Care Hospital, Huai'an 223001; 3. Sanming Integrated Medicine Hospital, Sanming 365001*)

ABSTRACT: This study employed a co-precipitation method to prepare three types of iron oxide-based nanoparticle (IONP), namely α-Fe_2O_3, Fe_3O_4 and α-FeO(OH), and investigated their biofilm eradication effects against *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). The results of *in vitro* pharmacodynamic experiments showed that all three IONP exhibited significant biofilm eradication activity against *P. aeruginosa* biofilms at effective concentrations ranging from 6.25 to 12.5 μg/mL. They were able to disrupt the dense biofilm architecture, reduce bacterial adhesion, and synergistically catalyze H_2O_2 to generate reactive oxygen species, such as ·OH, to damage the biofilm. Furthermore, the IONP synergistically enhanced the biofilm eradication efficacy of the antibiotic ceftazidime and reversed the biofilm-promoting effect induced by antibiotics at sub-inhibitory concentrations. Mechanistic studies revealed that α-Fe_2O_3 downregulated the expression of genes involved in the quorum sensing system (*rhlI*, *pqsA*) and virulence factors (*phzM*, *pslA*, *lasA*) in *P. aeruginosa*, while upregulating the expression of *pvdQ*, the gene encoding *N*-acyl homoserine lactone acylase. This disrupted iron homeostasis and pyocyanin secretion, thereby inhibiting biofilm formation through multiple pathways. In summary, the IONP possessed promising anti-biofilm activity, providing new insights for the development of novel therapeutic strategies against biofilm-associated infections.

Key Words: iron oxide-based nanoparticle; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; antimicrobial agent; reactive oxygen species

铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*，*P. aeruginosa*）是常见感染菌，易附着、定植在物体表面形成生物膜，导致药物疗效降低[1-2]。因此，*P. aeruginosa* 常被作为研究生物膜形成的模式微生物[3]。铁元素对细菌生理状态具有双重调控作用：一方面，细菌内的许多酶类含铁，所以铁缺乏可阻碍细菌生物膜的正常发育[4]，如外源性铁螯合剂（如乳铁蛋白）通过剥夺细菌必需的营养，刺激菌毛蹭行运动并阻碍微菌落形成，从而抑制生物膜发育[5]；另一方面，细胞内铁过载会触发芬顿反应，催化惰性 ROS 转化为高毒性的羟基自由基（·OH），诱导脂质过氧化和氧化损伤，从而导致细菌死亡[6]。因此，维持铁稳态对细菌至关重要。前期研究[4]结果显示，不同于仅作为营养物质存在的游离铁离子，氧化铁基纳米粒子（iron oxide-based nanoparticle，IONP）固有的纳米酶活性可催化 ROS 生成·OH 的反应，从而干扰哺乳动物细胞的生理平衡。然而，其对 *P. aeruginosa* 及其生物膜的影响仍然有待阐明。

含铁矿物药［如氧化铁基矿物药代赭石 α-Fe_2O_3、磁石 Fe_3O_4、禹余粮 α-FeO(OH)］具有不良反应小、疗效确切、来源广泛、价格低廉、不易导致耐药性的优点，已在临床上广泛使用。此类药物活性成分丰富，可通过多靶点、多途径影响细菌生物膜的形成与生长，为临床细菌生物膜感染性疾病的防治带来新的用药思路[7-10]。值得注意的是，自然界中的氧化铁矿物药均混有多种其他金属元素，可能对细菌生物膜有抑制作用。为了排除其他元素的影响，本研究基于 α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 和 α-FeO(OH) 合成了 3 种 IONP，并采用结晶紫染色、扫描电镜和激光共聚焦显微镜来观察 IONP 对 *P. aeruginosa* 生物膜的作用效果，探讨其对 *P. aeruginosa* 生物膜的作用机制，继而通过定量反转录 PCR（quantitative reverse transcriptase-mediated PCR，qRT-PCR）等手段加以验证，旨在揭示自然界氧化铁对 *P. aeruginosa* 生物膜的影响及其机制，为氧化铁基矿物药的临床应用奠定基础。

收稿日期：2025-09-05

基金项目：江苏省自然科学基金面上项目（BK20241912）、南京中医药大学中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室创新项目（NZYSKL240205）

作者简介：丁利红，主管中药师，硕士研究生，专业方向：中药药剂学。

通信作者：付廷明，教授，博士生导师，从事中药药剂学—中药活性成分提取分离与新型给药系统方面的研究工作。

1 仪器与试药

EnVision 型多功能酶标仪（美国 Perkin Elmer 公司）；S1000 型梯度 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）；LightCycler 96 型荧光定量 PCR 仪（瑞士 Roche 公司）；Hitachi-7800 型透射电镜（日本 Hitachi 公司）；QUANTA 250 FEG 型场发射扫描电镜（美国 Thermo Fisher 公司）；TCS SP8 型激光共聚焦显微镜（德国 Leica 公司）；Triple Q-TOF 5600 型 LC-MS/MS 电喷雾飞行时间高分辨质谱仪（美国 AB SCIEX 公司）；LC-20ADXR 型快速液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司）；D8 Advance 型 XRD 仪（德国 Bruker 公司）。

胰蛋白胨大豆琼脂（tryptone soybean agar，TSA）培养基（批号 1015T032）、胰酪大豆胨液体培养基（tryptic soy broth，TSB）培养基（批号 211C031）、头孢他啶（ceftazidime，CAZ，批号 1026D032）、2.5%结晶紫染色液均购于北京索莱宝科技有限公司；L- 半胱氨酸（批号 BCNP1335V）、甲酸（批号 G2122151）、甲醇（批号 20210215）、乙醇（批号 20211012）、乙腈（批号 11223729233）均购于南京晚晴化玻仪器有限公司；FastPure® 细胞 / 组织总 RNA 提取试剂盒、HiScript® Ⅱ反转录试剂盒、ChamQ SYBR qPCR 反应试剂盒均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司；水系 0.45 μm 微孔滤膜（聚醚砜材质，德国 Merck Millipore 公司）；定性滤纸（Whatman 1 级，英国 Whatman 公司）。

所有引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

2 方法与结果

2.1 IONP 的合成与表征

α-Fe_2O_3 的合成参照文献[12]方法。取 1.5 mol/L 氢氧化钠溶液 100 mL，缓慢滴至新配的 0.2 mol/L 氯化铁溶液 400 mL 中，室温［若无特殊说明，均指 (25±2) ℃］、500 r/min 下搅拌 2 h，经 0.45 μm 滤膜过滤，沉淀用超纯水反复洗涤，直到滤液用 0.1 mol/L 硝酸银溶液检测无白色沉淀产生。滤饼于 50 ℃减压干燥，于 200 ℃煅烧 2 h，研磨后过 9 号筛（孔径 75 μm），即得。

Fe_3O_4 的合成参照文献[11]方法。将 1.5 mol/L 氢

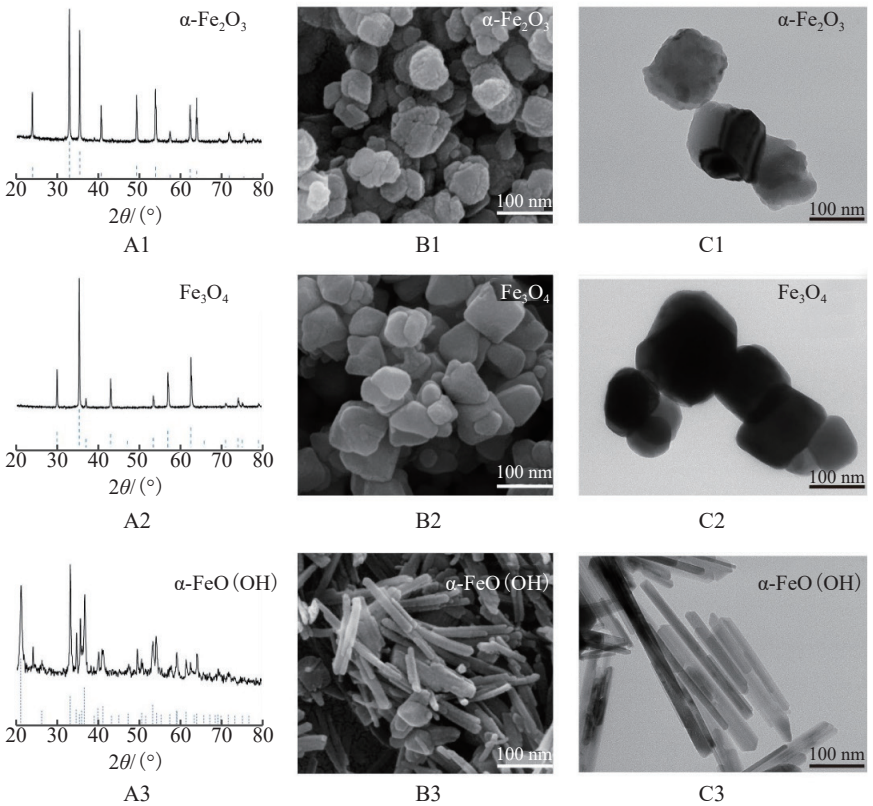
氧化钠溶液缓慢滴至新配的含 0.1 mol/L 氯化铁与 0.05 mol/L 硫酸亚铁的混合溶液 300 mL 中，室温、500 r/min 下搅拌 2 h，经 0.45 μm 滤膜过滤，沉淀用超纯水反复洗涤，直至滤液分别用 0.1 mol/L 的硝酸银溶液和氯化钡溶液检测均无白色沉淀产生。滤饼于 50 ℃减压干燥，研磨后过 9 号筛（孔径为 75 μm），即得。

α-FeO(OH) 的合成参照文献[12]方法。在室温、500 r/min 下，将 2 mol/L 硝酸钾溶液 5 mL 和 1 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL 加至 0.03 mol/L 硝酸铁溶液（用九水合硝酸铁配制）40 mL 中，混匀，于 80 ℃反应 16 h，经 0.45 μm 滤膜过滤，沉淀用超纯水和无水乙醇洗涤，再于 60 ℃减压干燥，研磨后过 9 号筛（孔径为 75 μm），即得。

上述 3 种 IONP 均贮存于干燥器（相对湿度为 10%～20% RH）中，室温避光保存。

分别取上述 3 种自制 IONP 适量，采用 XRD 仪进行检测，设置扫描步长为 0.02°，扫描速率为 5 (°)/min；并采用 TEM 和 SEM 观察其微观形态。结果如图 1 所示。

自制 α-Fe_2O_3 和 Fe_3O_4 的 XRD 图谱与 α-Fe_2O_3［粉末衍射标准联合委员会（Joint Committee on Powder Diffraction Standards，JCPDS）卡片编号 33-0664］、Fe_3O_4（JCPDS 卡片编号 00-019-0629）标准图谱的对应关系良好，说明二者均为纯相，晶型完整；而自制 α-FeO(OH) 与其标准图谱（JCPDS 卡片编号 00-029-0713）略有不同，表明其结晶度较低。SEM 和 TEM 图像显示，自制 α-Fe_2O_3 为类球型，粒径约为 100 nm；自制 Fe_3O_4 为类球型，略方，粒径为 50～100 nm；自制 α-FeO(OH) 为长棒状，长度约为 100 nm。综上所述，3 种自制 IONP 的粒径为 50～100 nm，结晶度良好，可用于后续试验。



A1～A3—α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 和 α-FeO(OH) 的 XRD 图谱；B1～B3—α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 和 α-FeO(OH) 的 SEM 照片（×50 000）；C1～C3—α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 和 α-FeO(OH) 的 TEM 照片（×100 000）。

图 1　3 种自制 IONP 的表征

Fig.1　Characterization of Three Self-made IONPs

2.2 IONP 对 *P. aeruginosa* 生长的影响

取对数生长期的 *P. aeruginosa* 菌液，调整 OD_{600} 值为 0.1（约 1×10^8 CFU/mL），用 TSB 培养基以 1∶100 稀释；取稀释菌液 1 mL，加至 TSB 培养基 100 mL 中，再分别加入不同质量浓度的 α-Fe_2O_3、Fe_3O_4、α-FeO(OH)，使 IONP 终质量浓度为 100、50、25、12.5 μg/mL，并设置加入等量 PBS 的空白模型组，于 37 ℃、200 r/min 振荡培养。分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 h 时取样适量，采用酶标仪检测 OD_{600} 值，绘制生长曲线，评估不同质量浓度药物对细菌生长的抑制作用。

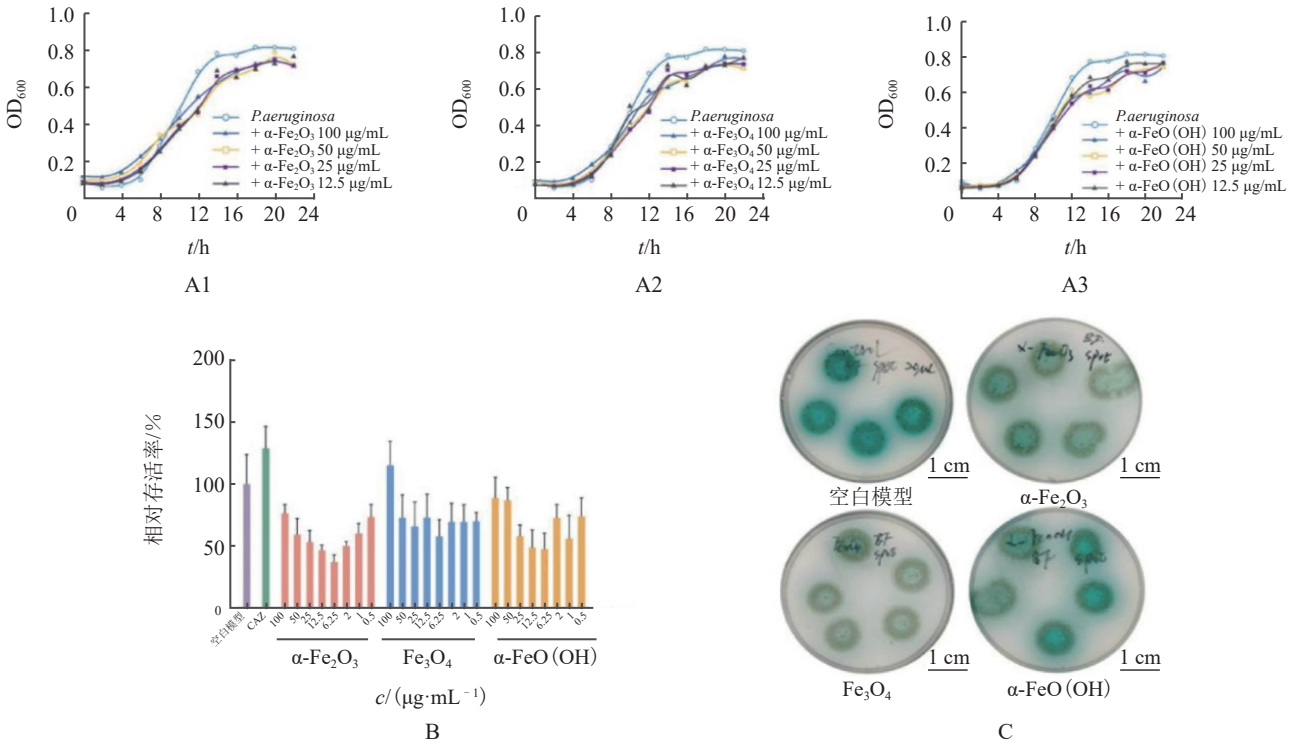
结果（图 2A）显示，空白模型组 *P. aeruginosa* 生长状态良好，16 h 后进入平台期，数量保持相对稳定；不同质量浓度 α-Fe_2O_3 处理组细菌在平台期之前未见明显差异，但随时间推移，细菌的生长速率放缓，最终数量相较于空白模型组有所下降；Fe_3O_4 和 α-FeO(OH) 处理组呈现出与 α-Fe_2O_3 处理组细菌相同的趋势。综上所述，3 种 IONP 均对 *P. aeruginosa* 的生长有一定抑制作用，但抑制效应较弱，且不同质量浓度的纳米粒子之间无显著差异。

2.3 IONP 对 *P. aeruginosa* 生物膜的影响

采用结晶紫染色法检测 α-Fe_2O_3、Fe_3O_4、α-FeO(OH) 对 *P. aeruginosa* 生物膜的清除作用。

生物膜形成：取对数生长期 *P. aeruginosa* 菌液（1×10^8 CFU/mL），用 TSB 培养基 1∶100 稀释，每孔 200 μL，加至 96 孔 U 型细胞培养板（或 96 孔板）中，于 37 ℃培养 24 h，更换一半体积新鲜 TSB 培养基，继续培养 24 h，可形成成熟的生物膜。

结晶紫染色法：取上述 96 孔 U 型细胞培养板，弃去上清，剩余物用 PBS 洗涤（每孔 200 μL×2）；分别加入 3 种 IONP（每孔 200 μL），使其终质量浓度为 100、50、25、12.5、6.25、2、1、0.5 μg/mL，作



A1 ～ A3—α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 和 α-FeO(OH) 作用下细菌的生长曲线（n=6）；B—细菌的存活率（n=6）；C—平板培养试验（α-Fe_2O_3、Fe_3O_4、α-FeO(OH) 质量浓度均为 6.25 μg/mL；标尺为 1 cm）。

图 2 3 种 IONP 对 *P. aeruginosa* 及其生物膜的影响

Fig.2 Effects of Three Types of IONP on *P. aeruginosa* and Its Biofilm

为试验组；另设置模型组（每孔加入 PBS 200 μL）及阳性药物组［每孔加入 CAZ 溶液 200 μL（终质量浓度为 12.5 μg/mL）］。各组设置 6 个复孔，于 37 ℃培养 24 h；弃去药液，剩余物用 PBS 洗涤（每孔 200 μL×3）后室温干燥，采用结晶紫染色法[13]染色并测定 OD_{590} 值。

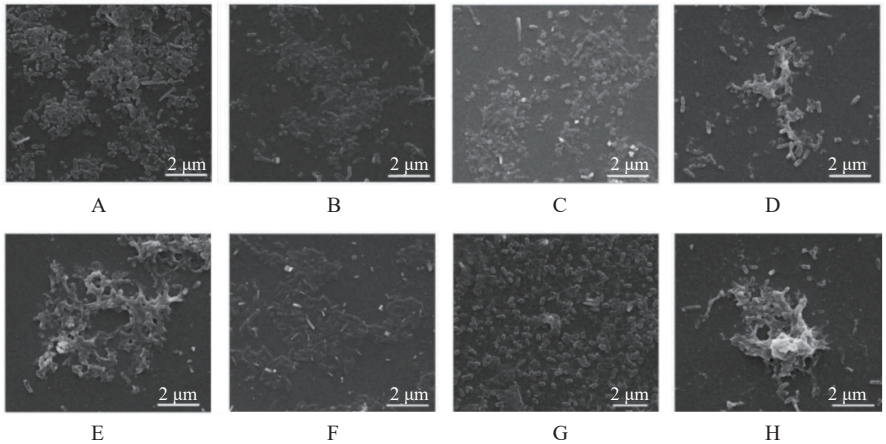
数据采用 GraphPad Prism 9.0 分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组比较用单因素方差分析，组间两两比较（采用 Tukey 事后检验，P<0.05 表示差异有统计学意义）。

结果（图 2B）显示，CAZ 促进了 *P. aeruginosa* 生物膜的生长，可能是因为亚抑菌浓度的抗菌药诱导细菌产生应激反应，胞外多糖分泌增加，增强了生物屏障。3 种 IONP 质量浓度为 6.25 和 12.5 μg/mL 时，均表现出较强的细菌生物膜清除效果，生物膜清除效果强弱为 α-Fe_2O_3>α-FeO(OH)>Fe_3O_4。各 IONP 均在质量浓度为 6.25 μg/mL 时对生物膜的清除效果较好；当 α-Fe_2O_3 和 α-FeO(OH) 质量浓度超过 6.25 μg/mL 时，生物膜清除效果反而有所下降，可能是因为高浓度时，过量铁触发了细菌铁稳态代偿机制。

取模型组和 3 种 IONP 处理组的 *P. aeruginosa* 生物膜，重悬后滴在琼脂板上培养 24 h，均长出细菌菌落，但 α-Fe_2O_3 组和 Fe_3O_4 组的菌落颜色显著浅于模型组，α-FeO(OH) 处理组的颜色也比模型组稍浅（图 2C）。这一现象表明 IONP（尤其是 α-Fe_2O_3 和 Fe_3O_4）能有效清除生物膜并抑制 *P. aeruginosa* 的生长。

取对数期 *P. aeruginosa* 菌液（1×10^8 CFU/mL），用 TSB 培养基 1 ∶ 100 稀释，每孔 2 mL 加至 12 孔细胞培养板，每孔放入无菌细胞爬片，于 37 ℃静置培养 48 h；弃去菌液，爬片用 PBS 轻轻冲洗 2 次，分别加入含 6 和 12 μg/mL IONP 的新鲜 TSB 培养基，继续培养 24 h；弃去药液，爬片用 PBS 缓慢清洗 3 次，加入 2.5%戊二醛电镜固定液，于 4 ℃固定 4 h，再用 PBS 清洗 3 次，每次 10 min；随后依次用 30%、50%、70%、90%、95%和 100%乙醇进行梯度脱水，每个浓度处理 10 ～ 15 min，最后经室温干燥后喷金，置扫描电镜下观察生物膜形貌。设置空白模型（PBS）组和阳性药物（12.5 μg/mL CAZ）处理组，同法处理并观察。根据所得 SEM 照片，分析不同药物处理后生物膜的厚度、结构完整性及细菌分布，定性评估药物对生物膜的破坏程度及形态变化。

结果（图 3）显示，模型组的生物膜大多互相黏附，且较为致密。CAZ 处理组的细菌黏附较模型组弱，但仍呈现较密集的生物膜层。各 IONP 处理



A—空白模型组；B—CAZ（12.5 μg/mL）处理组；C—α-Fe_2O_3（12 μg/mL）处理组；D—Fe_3O_4（12 μg/mL）处理组；E—α-FeO(OH)（12 μg/mL）处理组；F—α-Fe_2O_3（6 μg/mL）处理组；G—Fe_3O_4（6 μg/mL）处理组；H—α-FeO(OH)（6μg/mL）处理组。

图 3　IONP 对 *P. aeruginosa* 生物膜形态的影响（×50 000）

Fig.3　Effect of IONP on the Morphology of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm（×50 000）

组的生物膜则呈现小团状，表明 IONP 破坏了细菌间的黏附和结合。从细菌密度来看，模型组的细菌密度较大，而其他处理组的细菌数量均有所减少。α-Fe_2O_3(12 μg/mL) 处理组的生物膜呈现较为分散且疏松的状态，而 α-Fe_2O_3(6 μg/mL) 处理组则较为紧密；Fe_3O_4(12 μg/mL) 处理组的生物膜多为单独分散状态，而 Fe_3O_4(6 μg/mL) 组则较为集中；2 个质量浓度 α-FeO(OH) 处理组的生物膜均表现为小团状分散。α-FeO(OH) 的长棒状结构使其易沿生物膜基质的长轴穿插，但可能因空间位阻限制了深层渗透，导致其生物膜清除效果比 α-Fe_2O_3 略差。总体而言，多机制协同（物理分散+ROS 生成+基因调控）作用，仍保证了 α-FeO(OH) 具有一定的生物膜清除效力。上述结果表明，6 μg/mL 的 α-Fe_2O_3 或 α-FeO(OH) 对 *P. aeruginosa* 生物膜的清除作用较 12 μg/mL 时更显著，而 Fe_3O_4 对 *P. aeruginosa* 生物膜的清除作用则是在 12 μg/mL 时较显著。

2.4 IONP 协同抗菌药对 *P. aeruginosa* 生物膜的作用

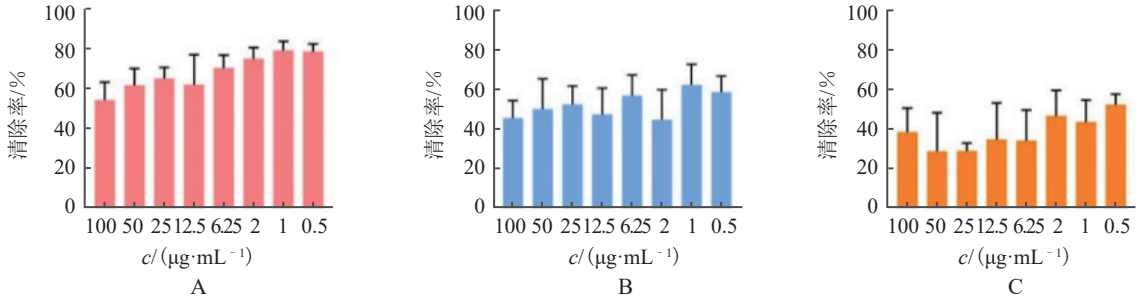
将 3 种 IONP 与抗菌药 CAZ 联合使用，采用结晶紫染色法评价其对 *P. aeruginosa* 生物膜的清除作用。按“**2.3**”项下方法培养 *P. aeruginosa*，形成生物膜，更换含药培养基。联合用药组中，CAZ 的终质量浓度为 12.5 μg/mL，α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 或 α-FeO(OH) 的终质量浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、2、1、0.5 μg/mL。另设置空白模型 (PBS) 组，阳性对照 CAZ(12.5 μg/mL) 处理组，按“**2.3**”项下方法进行结晶紫染色，采用酶标仪测定 OD_{590} 值，按式①计算清除率 (CL)。

$$CL=[1-OD_{模型组}/OD_{药物组}]\times100\% \quad ①$$

结果（图 4）显示，与空白模型组相比，联合用药处理可显著增强对 *P. aeruginosa* 生物膜的清除效果 (P<0.01)。值得注意的是当 α-Fe_2O_3 质量浓度为 0.5 ～ 6.25 μg/mL 时，即可显著增强 CAZ 对生物膜的清除效果 (P<0.01)，表明二者在清除生物膜方面具有协同作用。

为进一步明确 α-Fe_2O_3 的单药作用特征及其与抗菌药的互补关系，本研究采用活死细胞染色法评价生物膜结构变化。按“**2.3**”项下方法培养 *P. aeruginosa*，形成生物膜，更换为含 CAZ 或 α-Fe_2O_3 的含药培养基（终质量浓度为 12.5 μg/mL）。另设置空白模型 (PBS) 组，同法操作。生物膜经 PBS 清洗后，按活死细胞染色试剂盒说明书进行染色，采用共聚焦激光扫描显微镜观察生物膜结构变化。

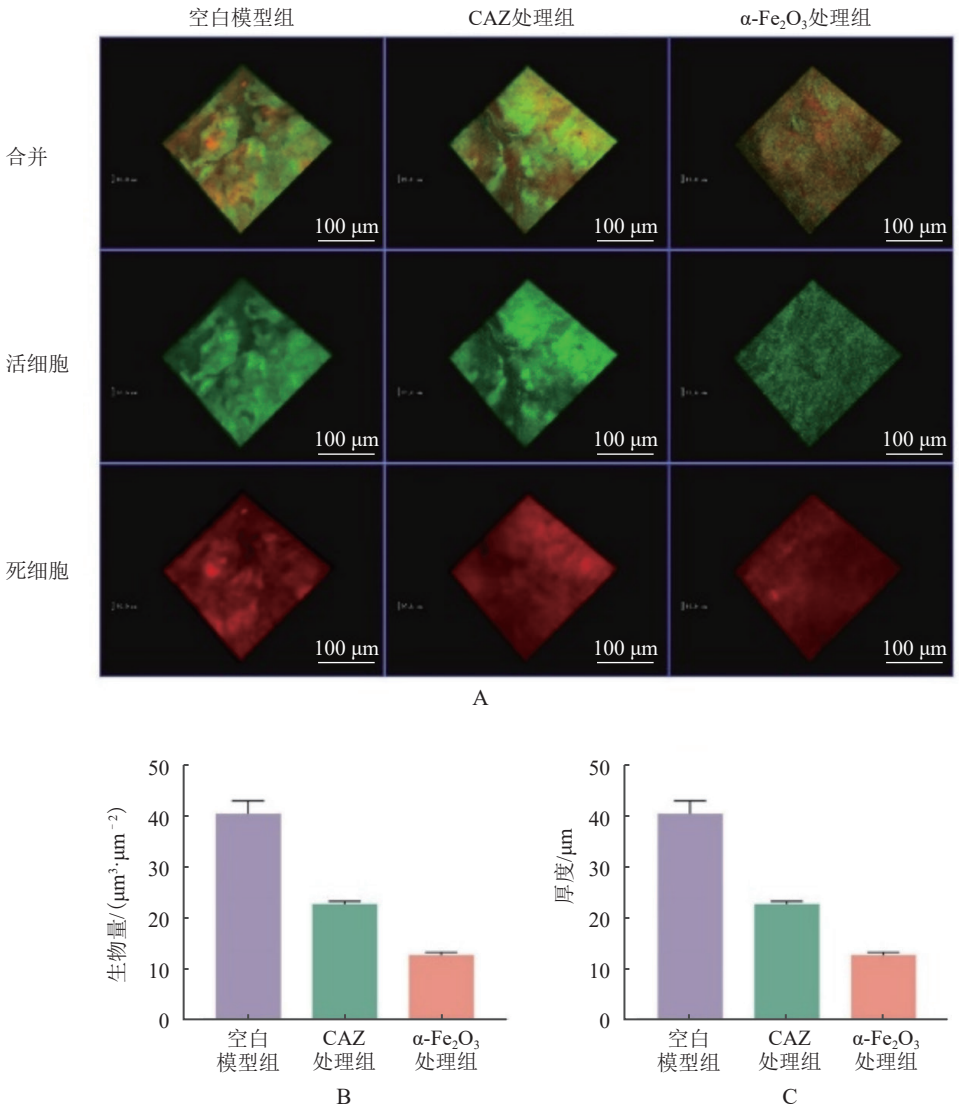
结果（图 5）显示，经过 24 h 处理后，空白模型组形成了厚约 40 μm 的生物膜，活细胞（绿色荧光）密集，死细胞（红色荧光）较少；CAZ 处理组中红色荧光显著增强，表明抗菌药发挥了杀菌作用，但绿色荧光（活菌）密度变化不大，提示生物膜屏障未被有效破除。α-Fe_2O_3 处理组中的红绿色荧光均显著减弱，绿色荧光呈零星点状分布。采用 ImageJ 1.53e 软件进行定量分析，结果显示 α-Fe_2O_3 处理组生物膜的生物量和厚度较空白模型组分别降低了 (62.4±5.1)% 和 (58.7±4.9)% (P<0.01)，说明其对生物膜的清除效果显著优于 CAZ 单药组 (P<0.05)。上



A—α-Fe_2O_3 与 CAZ 联合用药；B—Fe_3O_4 与 CAZ 联合用药；C—α-FeO(OH) 与 CAZ 联合用药。

图 4 3 种 IONP 协同 CAZ 用药对 *P. aeruginosa* 生物膜的清除率 (n=6)

Fig.4 The Eradication Rates of *P. aeruginosa* Biofilms Treated with Three IONPs Combined with CAZ (n=6)



A—共聚焦显微照片；B—*P. aeruginosa* 的生物量（n=3）；C—*P. aeruginosa* 的生物膜厚度（n=3）。

图 5　CAZ 和 α-Fe_2O_3 对 *P. aeruginosa* 生物膜的作用

Fig.5　Effects of Ceftazidime and α-Fe_2O_3 on *P. aeruginosa* Biofilm

述结果进一步验证了 α-Fe_2O_3 对生物膜的分散与清除能力，为二者的协同作用提供了机制依据。

2.5　IONP 与 ROS 对 *P. aeruginosa* 生物膜的影响

少量 ROS 可作为信号分子调节细菌的生理活动，而过量 ROS 将破坏细胞膜，抑制细菌生长[14-15]。文献[16]报道 IONP 可催化内源性 H_2O_2 生成 •OH。因此，本研究将 IONP 与 H_2O_2 联合给药，并采用结晶紫染色法与活死细胞染色法，结合激光共聚焦显微镜，评价其对生物膜的清除作用。

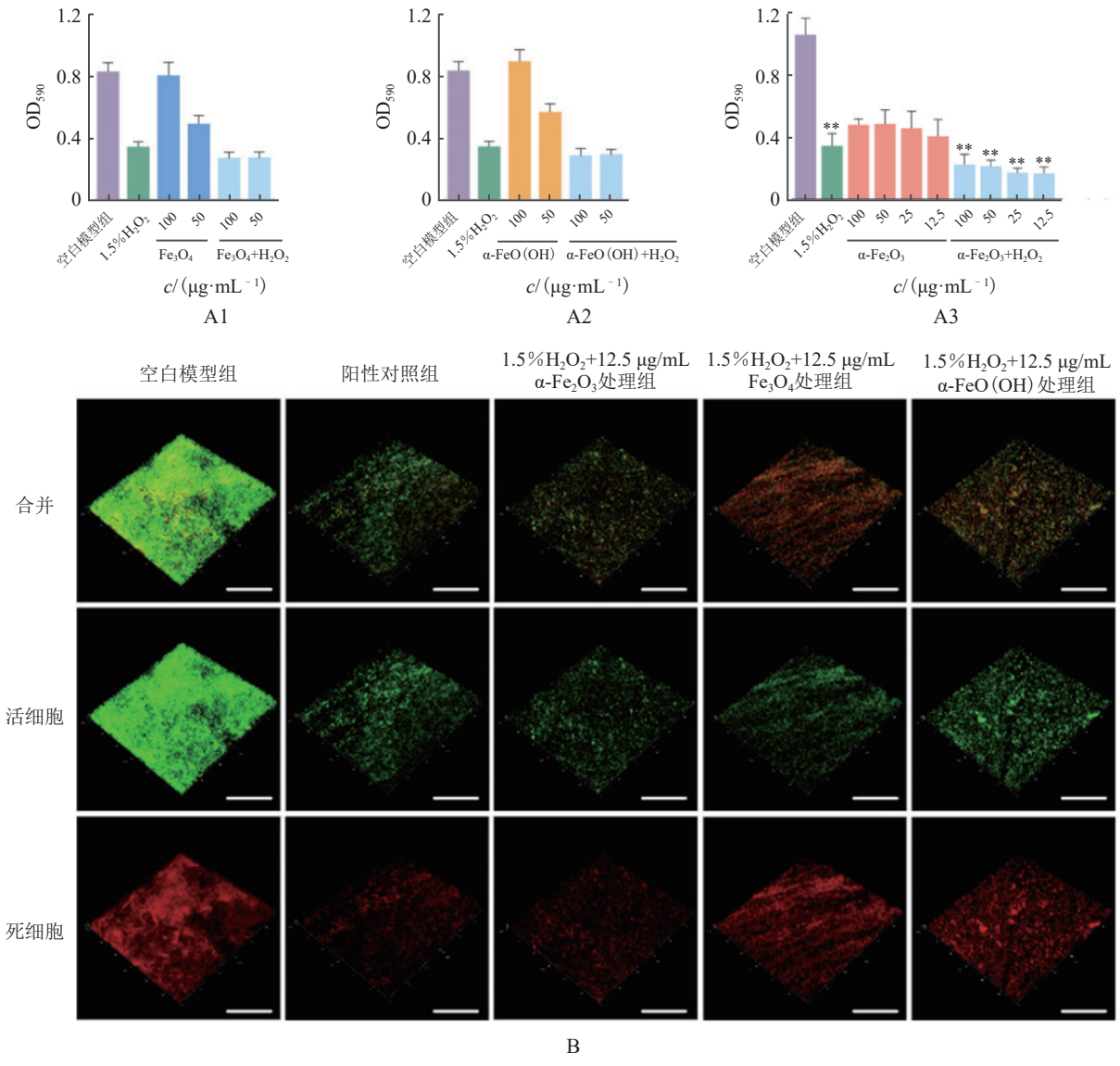
细菌培养与分组：按“**2.3**”项下方法培养 *P. aeruginosa*，形成生物膜；更换含药培养基，联合用药组中 H_2O_2 终浓度为 1.5%，3 种 IONP 的终质量浓度分别为 100、50、25、12.5 μg/mL。另设置 PBS 处理组为空白对照，以 1.5% H_2O_2 单独处理组为阳性对照，以及用等质量浓度 IONP（不加 H_2O_2）处理组为 IONP 对照。继续孵育 24 h，然后按“**2.3**”项下方法洗涤、结晶紫染色，采用酶标仪测定 OD_{590} 值。按“**2.4**”项下方法，洗涤、活死细胞染色，采用共

聚焦激光扫描显微镜观察。

结果（图 6）显示，阳性对照组对生物膜的清除效果显著（P<0.01），Fe_3O_4 和 α-FeO(OH) 与 H_2O_2 联合使用时的清除率与阳性对照组相比，无统计学差异（P>0.05），而 α-Fe_2O_3 不仅具有良好的生物膜清除效果，还能显著增强 H_2O_2 的作用（P<0.01）。

2.6 IONP 对 *P. aeruginosa* 分泌绿脓菌素（pyocyanine，PYO）的影响

PYO 作为电子传递中间体，可在生物膜内外传递电子[17]。在有氧条件下，还原性 PYO 将电子供给 O_2，转变为氧化态 PYO，并穿过生物膜进入缺氧区；氧化态 PYO 接收电子后恢复为还原性 PYO，再次穿过生物膜与 O_2 发生电子传递，完成氧化还



A1 ～ A3—H_2O_2 联合 α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 或 α-FeO(OH) 处理对生物膜的影响（n=6；与阳性对照组相比，** 表示 P<0.01）；B—IONP 与 H_2O_2 对 *P. aeruginosa* 生物膜影响的共聚焦显微镜照片（标尺为 100 μm）

图 6 3 种 IONP 与 H_2O_2 联用对 *P. aeruginosa* 生物膜的影响

Fig.6 Effects of Three IONPs Combined with H_2O_2 on *P. aeruginosa* Biofilm

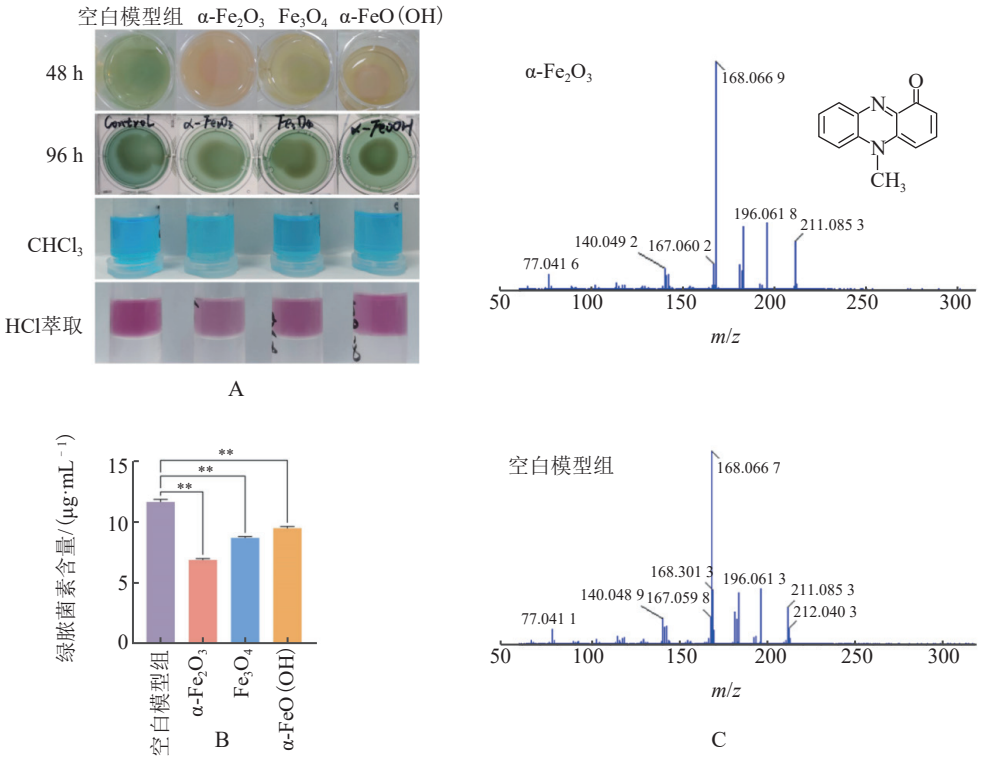
原循环[18]。本研究使用三氯甲烷萃取和 HCl 反萃取方法，结合紫外分光光度计测定 OD_{520} 数值，计算 PYO 浓度，评估氧化铁基纳米粒子对 PYO 分泌的抑制作用。取对数生长期的 *P. aeruginosa* 菌液（1×10^8 CFU/mL）50 mL，分别加入终浓度为 12.5 μg/mL 的 α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 或 α-FeO(OH)，于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 5 d，每隔 24 h 取培养液 5 mL，4 ℃离心（3 000×*g*）10 min，取上清，用三氯甲烷 3 mL 萃取，再加入 0.1 mol/L 盐酸 0.11 mL 反萃取 PYO，酸层呈现红色，用紫外分光光度计测定 OD_{520} 值。以不加 IONP 的菌液作为对照组，每组设置 3 个生物学重复。按式②计算 PYO 的质量浓度（*c*）。

$$c=OD_{520}\times17.072 \qquad ②$$

式中：17.072 为 PYO 在 520 nm 处的换算系数。

为观察药物对细菌固体培养表型及 PYO 分泌的影响，采用平板法进行评价。将经高压灭菌的 TSA 培养基倾倒于 6 孔板中，每孔 5 mL，冷却凝固后，每孔铺设 1 片 0.45 μm 聚碳酸酯膜。取对数生长期 *P. aeruginosa* 菌液（1×10^8 CFU/mL）20 μL，滴于膜中央，室温、避光干燥，于 37 ℃倒置培养 96 h。设置给药组［含 12.5 μg/mL 的 α-Fe_2O_3、Fe_3O_4 或 α-FeO(OH)］与对照组（不加药物），观察并拍照记录菌落形态及培养基显色变化。结果（图 7A、B）显示，3 种 IONP 均显著降低了 *P. aeruginosa* 的 PYO 分泌量，其中 α-Fe_2O_3 组的抑制效果具有极显著差异（$P<0.01$）。

为了排除 α-Fe_2O_3 与 PYO 产生化学转化进而影响含量的情况，进一步研究了 α-Fe_2O_3 对 PYO 稳定性的影响。另取 α-Fe_2O_3 处理组培养上清液，于 4 ℃离心（3 000×*g*）10 min，取上清液，用等体积三氯甲烷



A—培养 5 d 后培养液颜色对比；B—不同时间点培养上清中 PYO 含量变化（与模型组相比，** 表示 $P<0.01$；$n=3$）；C—α-Fe_2O_3 与 PYO 共孵育后的 LC-MS/MS 图。

图 7　3 种含 IONP 的对 *P. aeruginosa* 绿脓菌素分泌的影响

Fig.7　Effects of Three IONP on Pyocin Secretion by *P. aeruginosa*

萃取，待有机相挥干后，残渣用甲醇复溶，经 0.45 μm 滤膜过滤，进行 LC-MS/MS 分析。

色谱条件：色谱柱 Luna Omega Polar C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.6 μm）；流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—2 min，B 35%；2—10 min，B 35%—98%；10—17 min，B 98%；17—18 min，B 98%—35%；18—20 min，B 35%）；流速 0.3 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 5 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾离子源；检测模式 正离子模式；数据采集模式 多重反应监测；质量扫描范围 *m/z* 50 ～ 1 500；离子源温度 320 ℃；脱溶剂温度 500 ℃；毛细管电压 3.0 kV；锥孔电压 30 V；脱溶剂气 高纯氮气；流速 1 000 L/h；锥孔气 高纯氮气；流速 150 L/h；碰撞气 高纯氩气；压力 0.35 Pa；碰撞能量 35 eV(PYO)、30 eV[吩嗪甲酰胺(phenazine-1-carboxamide，PCN)]、32 eV[吩嗪-1-羧酸（phenazine-1-carboxylic acid，PCA)]。

P. aeruginosa 能产生多种电活性吩嗪类化合物，根据文献和数据库推测其中主要的化合物是 PYO[19]、PCN 和 PCA。结果如图 7C 所示，选取含量最高的 PYO 作为代表性物质进行分析，α-Fe_2O_3 与 *P. aeruginosa* 培养上清共孵育后，PYO 特征质谱峰（*m/z* 168.07）及其相对丰度未发生明显变化，表明 α-Fe_2O_3 并不与 PYO 直接发生化学反应，或未显著改变其化学结构。α-Fe_2O_3 更可能通过影响 *P. aeruginosa* 的代谢或调控其功能，降低 PYO 的分泌量，从而影响生物膜的形成与生长。

2.7 IONP 对 *P. aeruginosa* 中 mRNA 表达的影响

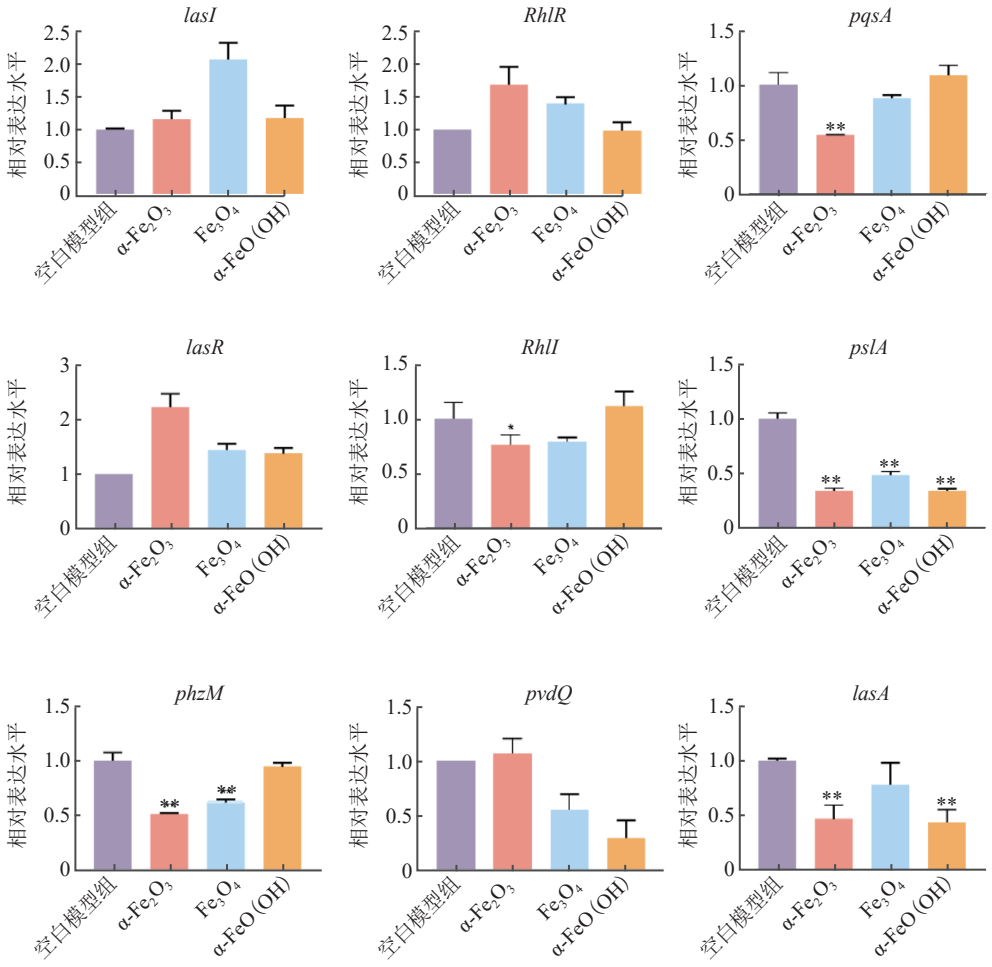
取对数生长期 *P. aeruginosa* 菌液（1×10^6 CFU/mL）6 mL 于摇菌管中，分别加入终质量浓度为 12.5 μg/mL 的 3 种 IONP，共同培养 24 h；另设置为模型组（不加药物、仅加入等体积 PBS)。按总 RNA 提取试剂盒说明书分别提取总 RNA，根据逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA，作为扩增模板，按 SYBR qPCR 试剂盒说明书 RT-qPCR 检测，考察 IONP 对 *P. aeruginosa* 群体感应（quorum sensing，QS）和毒力因子（*phzM*、*psl*、*lasA*）相关 mRNA 表达的影响。

结果（图 8）显示，作用于 *P. aeruginosa* 24 h 后，Fe_3O_4 和 α-Fe_2O_3 处理组细菌的 *lasI* 和 *lasR* 表达上调，*rhlI* 及 *pqsA* 表达下调，主要毒力因子基因亦呈下调趋势；α-FeO(OH) 则显著下调了 *psl* 和 *lasA* 基因表达（$P<0.05$），对其他毒力因子亦有抑制作用，但 *Las*、*Rhl* 和 *Pqs* 系统的关键基因未见显著下调趋势。值得注意的是，*pvdQ* 基因编码 *N*-酰基高丝氨酸内酯酰化酶的相关基因，能降解 *N*-(3-氧代十二烷酰基)-L-高丝氨酸内酯，且其下调也会影响生物膜的 QS 系统调控[20]。相较于 α-FeO(OH) 和 Fe_3O_4 处理组，α-Fe_2O_3 则展现了上调 *pvdQ* 基因的趋势。上述结果表明，3 种 IONP 均对 *P. aeruginosa* 的 QS 和毒力因子表达具有一定的调控作用，但作用靶点不同。α-Fe_2O_3 侧重基因调控、Fe_3O_4 侧重 ROS 催化、α-FeO(OH) 侧重物理分散，但多通路具有协同、叠加效应，故整体对细菌生物膜的清除效果无显著差异。

3 总结与讨论

本文主要研究了 IONP 对 *P. aeruginosa* 及其生物膜的作用效果，通过现代显微技术直接观察到 IONP 对细菌和生物膜的作用，并通过 RT-qPCR 和生理生化等方面的技术方法，间接证明了 IONP 的生物膜清除能力并探讨了其抗菌机制。研究结果显示，自制 IONP 可直接分散生物膜内的细菌，减少细菌间的相互黏附，并阻碍生物膜在物体表面定植。IONP 还能使细菌从生物膜胞外聚合物中暴露，使其更容易被抗菌药抑制。但氧化铁不适宜在生物体内长期暴露，宜优先开发局部给药系统（伤口敷料、导管涂层等），避免全身长期暴露风险。IONP 与传统抗菌药的协同作用为克服生物膜耐药性提供了纳米增效策略。在与 H_2O_2 共同作用于生物膜时，IONP 能催化氧化 H_2O_2，从而增强 H_2O_2 对细菌的杀伤作用。在 3 种自制 IONP 中，α-Fe_2O_3 的作用效果较为突出，不仅能作用于 *P. aeruginosa* 游离菌，改变其形态，还能增强抗菌药的清除生物膜作用。

机制分析表明，α-Fe_2O_3 对 *P. aeruginosa* 生物膜的作用与其抑制 PYO 分泌相关。RT-qPCR 结果表明，α-Fe_2O_3 能显著抑制 PYO 分泌基因 *phz* 的表达，



注：与空白模型组相比，* 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$；纵坐标为以 16S rRNA 为内参的基因相对表达量。

图 8　3 种 IONP 对 *P. aeruginosa* QS 和毒力因子 mRNA 表达的影响（n=3）

Fig.8　Effects of Three IONPs on mRNA Expression of QS and Virulence Factors in *P. aeruginosa* (n=3)

从而抑制 PYO 的分泌。α-Fe_2O_3 可能通过破坏细菌铁稳态，既抑制含铁酶功能，又引发芬顿反应，产生双重抗菌效应。对于生物膜 QS 系统相关基因（*rhl* 和 *pqs* 系统）以及毒力因子相关基因表达也有显著的下调作用。这些结果表明，α-Fe_2O_3 能从直接渗透生物膜、减少氧化还原介导体 PYO、下调生物膜相关基因表达等多个方面清除 *P. aeruginosa* 生物膜。

综上所述，IONP 能有效清除 *P. aeruginosa* 的生物膜，并通过多途径调控 *P. aeruginosa* 的生长、代谢和毒力因子的表达，为开发新型抗生物膜感染的治疗策略提供了重要的试验依据。

参考文献：

[1] 潘威，孔启迪，杨玉社，等．抗革兰阴性菌药物研究进展[J]．中国医药工业杂志, 2021, **52**(6): 742-756.

[2] Flemming H C, Wingender J, Szewzyk U, *et al*. Biofilms: an emergent form of bacterial life [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, **14**: 563-575.

[3] Flemming H C, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, **17**: 247-260.

[4] Qin Y, He Y, She Q, *et al*. Heterogeneity in respiratory electron transfer and adaptive iron utilization in a bacterial biofilm [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 3702.

[5] Lee Y J, Cao D J, Subhadra B, *et al*. Relationship between capsule production and biofilm formation by *Mannheimia haemolytica*, and establishment of a poly-species biofilm with other *Pasteurellaceae* [J]. *Biofilm*, 2024, **8**:100223.

[6] Hodges C, Regan J M, Forsythe B, *et al*. Using fixed-potential electrodes to quantify iron and manganese redox cycling in upland soils [J]. *Biogeochemistry*, 2023, **162**(1): 25-42.

[7] Zhang C F, Li Z L, Pan Q, *et al*. Berberine at sub-inhibitory concentration inhibits biofilm dispersal in *Staphylococcus aureus* [J]. *Microbiology*, 2022, **168**(9): 001243

[8] Li T, Wang P L, Guo W B, *et al*. Natural berberine-based chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application [J]. *Acs Nano*, 2019, **13**(6):6770-6781.

[9] Xie J J, Meng Z P, Han X X, *et al*. Cholesterol microdomain enhances the biofilm eradication of antibiotic liposomes [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, **11**(8): e2101745.

[10] Li S P, Wang Y A, Wang S T, *et al*. *In situ* gelling hydrogel loaded with berberine liposome for the treatment of biofilm-infected wounds [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, **11**: 1189010.

[11] 郭佳宇, 龙海波, 武泽卿, 等. 纳米氧化铁及其复合材料光催化降解性能研究进展[J]. 化工新型材料, 2026, **54**(3): 221-225.

[12] Yang M, Li Y X, Jiang M, *et al*. Identifying phase-dependent electrochemical stripping performance of FeO(OH) nanorod: evidence from kinetic simulation and analyte-material interactions [J]. *Small*, 2020, **16**(7): e1906830.

[13] 朱泽康, 王昭, 聂蓉, 等. Nisin与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物膜的协同抑制作用[J]. 中国食品学报, 2023, **23**(10): 12-22.

[14] Mudaliar S B, Bharath Prasad A S. A biomedical perspective of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*: its applications and challenges [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2024, **40**(3): 90.

[15] 张玲娜, 董丽, 廖红梅. 细菌响应过量活性氧的存活策略及相关研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, **48**(4): 1249-1259.

[16] Liu Y, Huang Y, Kim D, *et al*. Ferumoxytol nanoparticles target biofilms causing tooth decay in the human mouth [J]. *Nano Lett*, 2021, **21**(22): 9442-9449.

[17] Peng Z Y F, Luo X Y, Li X Y, *et al*. Cathepsin L promotes pulmonary hypertension *via* BMPR2/GSDME-mediated pyroptosis [J]. *Hypertension*, 2024, **81**(12): 2430-2443.

[18] Saunders S H, Tse E C M, Yates M D, *et al*. Extracellular DNA promotes efficient extracellular electron transfer by pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. *Cell*, 2020, **182**(4): 919-932.e19.

[19] Ma L Z, Wang D, Liu Y W, *et al*. Regulation of biofilm exopolysaccharide biosynthesis and degradation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2022, **76**: 413-433.

[20] 刘岩, 潘蓓珍, 杨继飞, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌群体感应相关基因表达及其对生物膜形成和耐药性的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2025, **51**(4): 921-928.