

负载盐酸万古霉素的聚多巴胺纳米粒的制备及其联合光热的抗菌作用研究[△]

潘梨花^{1,2*}, 刘斌³, 江霞云², 周小鹏^{2#}(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 丽水市人民医院药学部, 浙江丽水 323000; 3. 丽水市中心医院骨科, 浙江丽水 323000)

中图分类号 R917;R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)15-1887-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.15.12



摘要 目的 制备负载盐酸万古霉素(VH)的聚多巴胺(PDA)纳米粒(即VH@PDA纳米粒),并研究其联合光热的抗菌作用。方法 以PDA为载体负载VH,制备VH@PDA纳米粒(同法制备PDA纳米粒)。采用激光粒度仪、透射电子显微镜、紫外-可见吸收光谱仪等对VH@PDA纳米粒进行表征,并测定该纳米粒的载药量和包封率。通过近红外激光照射考察该纳米粒的光热性能;以金黄色葡萄球菌为研究对象,采用琼脂平板法、活/死细菌染色法、结晶紫染色法考察该纳米粒联合光热的体外抗菌作用。以L929细胞为研究对象,考察不同质量浓度(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μg/mL)VH@PDA纳米粒对细胞活力的影响,以考察生物相容性。结果 VH@PDA纳米粒成功负载VH,其粒径(约为300 nm)均一、孔径明显,呈球形结构;载药量为11.34%,包封率为32.00%;光热转化效率为23.55%,且具有稳定的光热性能。联合光热的抗菌作用结果显示,当不以近红外激光照射处理时,VH、PDA纳米粒、VH@PDA纳米粒的抗菌效果不明显,而以近红外激光照射处理时,VH@PDA纳米粒表现出明显的抗菌效果。细胞实验结果显示,不同质量浓度VH@PDA纳米粒处理后,细胞存活率均高于80%。结论 本研究成功制备VH@PDA纳米粒,该纳米粒具有稳定的光热性能,联合光热的抗菌作用明显,且具有良好的生物相容性。

关键词 万古霉素;聚多巴胺;纳米粒;光热治疗;抗菌;生物相容性

Preparation of vancomycin hydrochloride-loaded polydopamine nanoparticles and their antimicrobial effect in combination with photothermal therapy

PAN Lihua^{1,2}, LIU Bin³, JIANG Xiayun², ZHOU Xiaopeng²(1. School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Dept. of Pharmacy, Lishui People's Hospital, Zhejiang Lishui 323000, China; 3. Dept. of Orthopaedics, Lishui Municipal Central Hospital, Zhejiang Lishui 323000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare vancomycin hydrochloride (VH)-loaded polydopamine (PDA) nanoparticles (VH@PDA nanoparticles), and study their antimicrobial effect in combination with photothermal therapy. **METHODS** Using PDA as the carrier, VH was loaded to prepare VH@PDA nanoparticles (PDA nanoparticles were prepared using the same method). The nanoparticles were characterized with laser particle size analyzer, transmission electron microscope, and UV visible absorption spectrometer; the drug loading capacity and encapsulation efficiency of the nanoparticles were determined. The near-infrared laser irradiation was adopted to determine their photothermal ability. Taking *Staphylococcus aureus* as the research object, the bactericidal properties of the nanoparticles in combination with photothermal therapy *in vitro* were clarified through plate colony coating method, live/dead staining analysis, crystal violet staining. Using L929 cells as the research object, the effects of VH@PDA nanoparticles at different mass concentrations (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μg/mL) on cell viability were investigated to assess their biocompatibility. **RESULTS** VH@PDA nanoparticles were successfully loaded with VH, exhibiting uniform particle size (approximately 300 nm), distinct pore size, and a spherical structure. The drug loading capacity was 11.34%, the encapsulation efficiency was 32.00%, the photothermal conversion efficiency reached 23.55%, and they demonstrated stable photothermal performance. The antibacterial effect results of the combined photothermal therapy demonstrated that without near-infrared laser irradiation, the antibacterial effects of VH, PDA nanoparticles, and VH@PDA nanoparticles were not significant. However, when subjected to near-infrared laser irradiation, VH@PDA nanoparticles exhibited a pronounced antibacterial effect. The results of the cell experiments revealed that after treatment with VH@PDA nanoparticles at various

[△] 基金项目 浙江省医药卫生科技计划项目(No.2022KY458, No. 2025KY1989);丽水市百千青年博硕成长计划项目(No.2023047923)

* 第一作者 药师。研究方向:药物新剂型与新技术。E-mail: 578620979@qq.com

通信作者 药师, 硕士。研究方向:药物新剂型与新技术。E-mail: shopchou@163.com

mass concentrations, the cell viability rates remained above 80%. **CONCLUSIONS** VH@PDA nanoparticles are successfully prepared, which exhibit stable photothermal properties, significant antibacterial effects when combined with photothermal therapy, and good biocompatibility.

KEYWORDS vancomycin; polydopamine; nanoparticles; photothermal therapy; antibacterial; biocompatibility

抗生素自被发现以来,就成为了治疗细菌感染的主要药物^[1]。然而,抗生素的广泛、持续使用也会导致耐药细菌(如“超级细菌”)的出现^[2]。研究显示,超过80%的细菌可通过产生一种聚合物基质,使细菌附着于感染部位并形成一层高度耐药的生物膜,从而阻止抗生素穿透,降低治疗效果^[3]。

光热治疗(photothermal therapy, PTT)作为一种非侵入性治疗方式,具有可控性强、副作用小、抗菌谱广、可避免细菌耐药等优点,是抗菌治疗的潜在替代方案。聚多巴胺(polydopamine, PDA)具有良好的生物相容性及自组装特性,是理想的光热材料,且具有潜在的光热协同抗菌能力^[4]。然而,单独的PTT需要使用较高的温度,而高温可能通过热传导效应导致周围正常组织损伤,并且近红外激光在穿透目标组织时强度会衰减,导致其对深处细菌的抗菌能力减弱^[5]。因此,临床常将PTT与抗生素、气体疗法等结合使用,以实现协同治疗,提高疗效。

盐酸万古霉素(vancomycin hydrochloride, VH)对多种革兰氏阳性菌具有抗菌活性,其可通过直接与细菌细胞壁中的肽聚糖结合、干扰肽聚糖前体的交叉联结等方式,阻止细菌细胞壁形成三维空间结构,进而发挥抗菌作用;此外,VH还可通过损伤细菌细胞膜和抑制细菌RNA合成,发挥抗菌作用^[6-7]。然而,VH具有一定的肾毒性、耳毒性,一般不推荐大剂量使用^[8]。基于此,本研究拟以PDA为载体负载VH,制备VH@PDA纳米粒,然后利用透射电子显微镜等手段对该纳米粒进行表征,并考察该纳米粒的光热性能、生物相容性及其联合光热的抗菌活性,以期为临床治疗感染性疾病提供新的治疗策略。

1 材料

1.1 主要仪器

TecnaiG2F20型透射电子显微镜购自美国FEI公司;Litesizer500型激光粒度仪购自英国Malvern公司;VU4802型紫外-可见吸收光谱仪购自中国海特光电有限责任公司;Varioskan LUX型多功能酶标仪购自美国Molecular Devices公司;EVOS M500型倒置荧光显微镜购自美国Thermo Fisher Scientific公司等。

1.2 主要药品与试剂

盐酸多巴胺(批号D806618)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;甲氧基聚乙二醇-巯基、VH原料药(纯度大于99%)(批号分别为P824241、V105495)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;均三甲苯、氨水(批号分别为A21310、A112081)购自国药集团化学试剂有限公司;泊洛沙姆F127(批号P2443)购自美国Sigma公司;卢里亚-贝尔塔尼琼脂培养基(LB)(批号分别为L8290)购自上海吉至生化科技有限公司;活/死染色试剂盒及死细胞核染色试剂PI(批号CA1630)购自北京索莱宝科技有限公司;结晶紫(批号B46828)购自北京伊诺凯凯科技有限公司;DMEM培养基(批号C11330500BT)购自美国Gibco公司;胎牛血清(批号6021061)购自美国BI公司;青-链霉素溶液(批号15140-122)购自美国Hyclone公司;DAPI、CCK8试剂盒(批号分别为S2110、K1018)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 细胞及细菌

小鼠成纤维细胞L929(CL-0137)购自武汉普诺赛生物技术有限公司;金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)由丽水市人民医院感染科提供。

2 方法与结果

2.1 PDA纳米粒的制备

将0.1 g泊洛沙姆F127、0.15 g盐酸多巴胺和0.4 mL均三甲苯分散在50%乙醇中,超声2 min以形成乳液;在500 r/min搅拌条件下,将0.15 mL氨水缓慢滴加到上述乳液中,2 h后离心收集PDA颗粒,用水和乙醇分别洗涤3次,即得PDA纳米粒。

2.2 VH@PDA纳米粒的制备

将200 μ L甲氧基聚乙二醇-巯基水溶液(5 mg/mL)和200 μ L PDA纳米粒溶液(15 mg/mL,临用时用乙醇重悬)混合于5 mL乙醇中,搅拌过夜;以16 000 r/min离心10 min,收集沉淀,即得PDA-聚乙二醇纳米粒。将PDA-聚乙二醇纳米粒重悬于1 mL乙醇中,并在搅拌条件下缓慢滴加1 mL VH水溶液(0.1 mg/mL),再以800 r/min搅拌过夜,离心、洗涤、冻干后,即得VH@PDA纳米粒。

2.3 VH@PDA纳米粒的表征

取20 μ L VH@PDA纳米粒溶液分散于纯水中,采用激光粒度仪测量粒径;将VH@PDA纳米粒溶液滴在铜网上,室温下干燥后,采用透射电子显微镜观察该纳

米粒的形态特征;采用紫外-可见吸收光谱仪检测 VH、PDA 纳米粒、VH@PDA 纳米粒的特征吸收峰。结果显示, VH@PDA 纳米粒的粒径均一、孔径明显,呈现出直径约为 300 nm 的球形结构(图 1A、图 1B);进一步分析发现,相比于 PDA 纳米粒, VH@PDA 纳米粒在 281 nm 波长处出现 VH 的吸收峰,表明该纳米粒成功负载 VH(图 1C)。

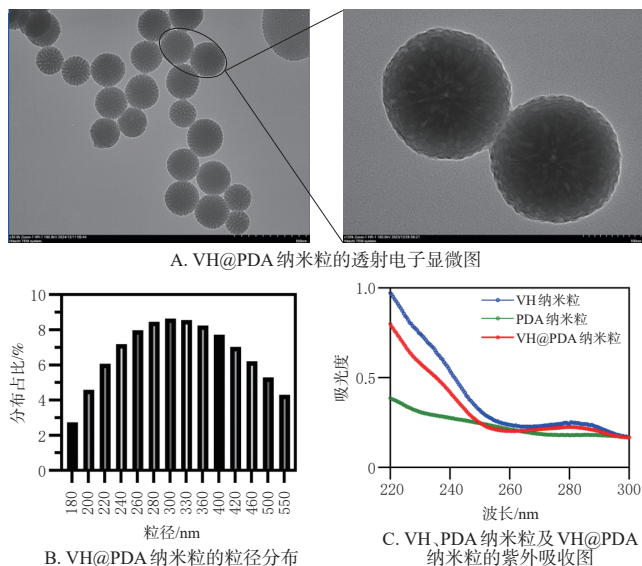


图 1 VH@PDA 纳米粒的表征结果

2.4 VH@PDA 纳米粒的载药量与包封率检测

取 VH 原料药溶于纯水中,配制一系列不同质量浓度的 VH 对照品溶液,然后采用紫外-可见吸收光谱法建立 VH 的标准曲线^[9]。取“2.2”项下 VH@PDA 纳米粒适量,以 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,根据标准曲线检测上清液中游离 VH 的含量,然后计算 VH@PDA 纳米粒的包封率及载药量。其中,载药量=(药物总量-游离药物含量)/(载体总量+药物总量-游离药物含量)×100%,包封率=(药物总量-游离药物含量)/药物总量×100%。结果显示,VH 的线性方程为 $y=0.0037x+0.0007$ ($r=0.9991$); VH@PDA 纳米粒的载药量为 11.34%,包封率为 32.00%。

2.5 VH@PDA 纳米粒的光热性能考察

取 VH@PDA 纳米粒适量,以纯水稀释成不同质量浓度(0、37.5、75、150、300 $\mu\text{g/mL}$)的 VH@PDA 纳米粒溶液;用 808 nm 近红外激光(1 W/cm^2)照射纯水和上述不同质量浓度 VH@PDA 纳米粒溶液 300 s,记录温度变化;再用不同功率(2、1.5、1 W/cm^2)的 808 nm 近红外激光照射 300 $\mu\text{g/mL}$ 的 VH@PDA 纳米粒溶液 300 s,记录温度变化。取上述 300 $\mu\text{g/mL}$ VH@PDA 纳米粒溶液适量,用 808 nm 近红外激光(1 W/cm^2)照射 300 s 后关闭光源令其自然降温冷却,记录降温过程中温度随时间的变

化,然后根据相关公式^[10]绘制光热转化效率拟合图,并计算光热转化效率;以上相同过程重复升温、降温 3 次,绘制开关实验温度变化曲线,以验证该纳米粒的光热稳定性。结果显示,经 808 nm 近红外激光照射 300 s 后,37.5、75、150、300 $\mu\text{g/mL}$ 的 VH@PDA 纳米粒溶液温度分别为 36.3、49.0、61.1、68.4 $^{\circ}\text{C}$ (图 2A);300 $\mu\text{g/mL}$ 的 VH@PDA 纳米粒溶液随着近红外激光功率的增加,温度也逐渐增加,300 s 后温度可达 45 $^{\circ}\text{C}$ (此温度下可破坏细菌细胞壁结构^[11])以上(图 2B);根据图 2C 并通过相关公式^[10]计算出 VH@PDA 的光热转化效率为 23.55%;由开关实验温度变化曲线(图 2D)可知, VH@PDA 纳米粒的光热性能稳定。

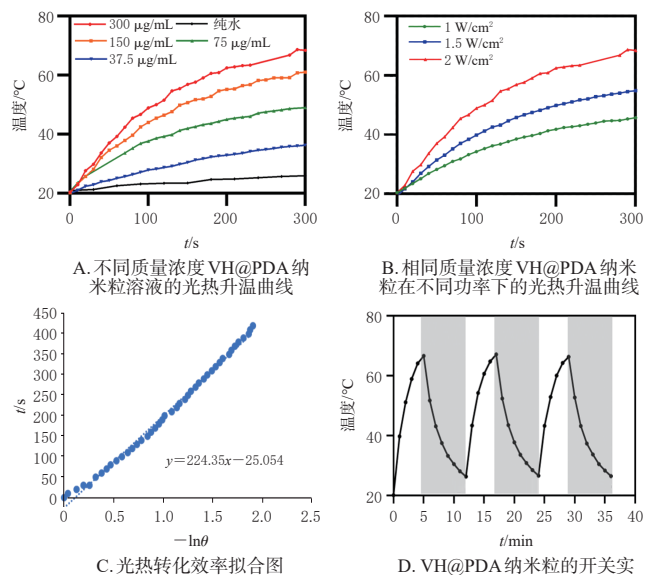
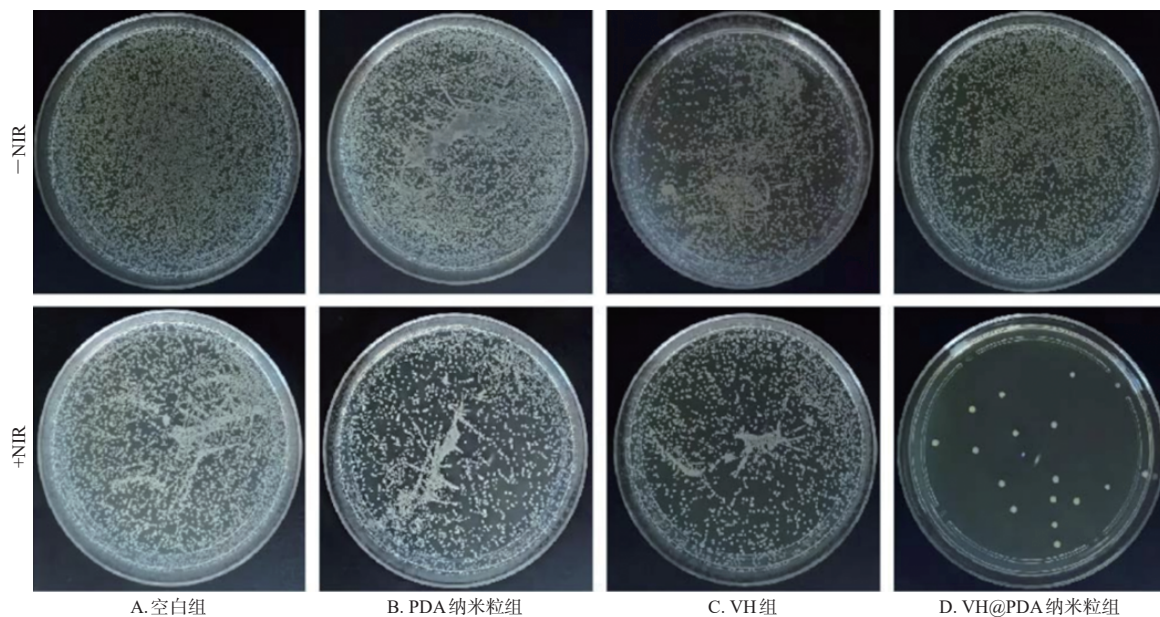


图 2 VH@PDA 纳米粒的光热性能考察结果

2.6 VH@PDA 纳米粒联合光热的体外抗菌作用

2.6.1 琼脂平板法考察

取对数生长期($\text{OD}_{600}=0.5$)的金黄色葡萄球菌,用磷酸盐缓冲液调整其浓度为 10^6 cfu/mL 。将上述菌液分为空白组(水)、PDA 纳米粒组(2.27 $\mu\text{g/mL}$)、VH 组(0.28 $\mu\text{g/mL}$)、VH@PDA 纳米粒组(0.28 $\mu\text{g/mL}$,以 VH 计),加入相应药液/水(各组给药剂量根据预实验结果设置),以近红外激光(功率 2 W/cm^2 ,波长 808 nm;下同)照射 300 s 后取 50 μL 菌液涂布在琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后观察菌落数;同样按上述方法分组、给药,但不进行近红外激光照射,将菌液直接涂布到 LB 琼脂平板上过夜培养,观察菌落数。结果(图 3)显示,当不以近红外激光照射处理时,各组抗菌效果不明显;而以近红外激光照射处理时,PDA 纳米粒组和 VH@PDA 纳米粒组均表现出抗菌效果,但 VH@PDA 纳米粒组的菌落数明显减少,表明其抗菌作用更强。



-NIR: 无近红外激光照射; +NIR: 有近红外激光照射。

图3 琼脂平板法考察结果

2.6.2 活/死细菌染色法考察

将金黄色葡萄球菌按“2.6.1”项下方法分组、给药,以近红外激光照射300 s后,以5 000 r/min离心5 min,取沉淀;经生理盐水洗涤3次后,用500 μ L生理盐水重悬,加入1.5 μ L混合染料(DAPI与PI以1:1混合),每隔5 min振荡混匀,于室温下避光培养30 min;取5 μ L滴在载玻片上,盖上盖玻片静置10 min后,使用倒置荧光显微镜观察,统计死细菌和活细菌的荧光强度(死细菌被染成红色),并计算死细菌比例(死细菌比例=死细菌数/细菌总数 \times 100%)。每组重复3次。采用GraphPad Prism 9.5.1软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果(图4)显示,与空白组(5.29 ± 1.27)%相比,PDA纳米粒组、VH组和VH@PDA纳米粒组死细菌比例[分别为(17.90 ± 6.53)%、(24.86 ± 6.13)%和(57.93 ± 0.64)%]均显著升高($P < 0.05$);与PDA纳米粒组、VH组相比,VH@PDA纳米粒组死细菌比例显著升高($P < 0.05$)。

2.6.3 结晶紫染色法考察

将金黄色葡萄球菌按“2.6.1”项下方法调整浓度后,加入96孔板中,再按“2.6.1”项下方法分组、给药,每组设3个复孔,以近红外激光照射300 s后,于37 $^{\circ}$ C条件下培养48 h;待孔板中形成生物膜后用磷酸盐缓冲液洗涤,以去除游离菌;加入甲醇固定并自然风干后,每孔加入1%结晶紫溶液染色15 min;洗净多余的结晶紫并置于37 $^{\circ}$ C烤箱中烘干,采用倒置荧光显微镜观察生物膜形态结构(紫色越深表明细菌生物膜越完整,药物抑制作用越小;紫色越浅则表明药物抑制作用越强^[22])。结果(图

5)显示,与空白组相比,PDA纳米粒组、VH组、VH@PDA纳米粒组金黄色葡萄球菌的生物膜形态均被破坏;其中VH@PDA纳米粒组的破坏作用最明显,与琼脂平板法、活/死细菌染色法考察结果相一致。

2.7 VH@PDA纳米粒的生物相容性考察

将L929细胞按 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,分为不同质量浓度(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL,以VH@PDA纳米粒计)VH@PDA纳米粒组,每组设置3个复孔;孵育24 h后,采用CCK8检测试剂盒测定各组细胞活力。结果(图6)显示,随着VH@PDA纳米粒质量浓度的增加,L929细胞存活率虽略有下降,但均高于80%,表明VH@PDA纳米粒具有较好的生物相容性。

3 讨论

目前,治疗细菌感染最大的挑战是细菌耐药,因此,为了避免细菌耐药及提高疗效,临床上常使用多种药物联合治疗细菌感染^[3];除此之外,相关研究也报道了抗生素联合其他方法治疗细菌感染,如活性纳米载体联合抗生素、PTT联合抗生素等治疗策略^[4]。

PTT作为一种新兴的非抗生素抗菌疗法,其利用高光热转化效率的材料在近红外激光诱导下将光能转化为热能,通过产生局部高温而破坏细菌细胞壁以达到抗菌效果^[5]。PDA作为黑色素之一,其吸收波长从紫外光到可见光并一直延伸至近红外区域,相关研究发现,PDA纳米粒的光热转化效率高达40%,已超过公认的金纳米棒的转化效率^[6]。Liu等^[7]通过合成 Fe_3O_4 @PDA纳米粒,再负载热休克蛋白70抑制剂2-苯乙炔磺酰胺,形成新型协同抗菌纳米复合物;将该纳米复合物置于近红外激光下照射,可释放2-苯乙炔磺酰胺,并特异性干扰

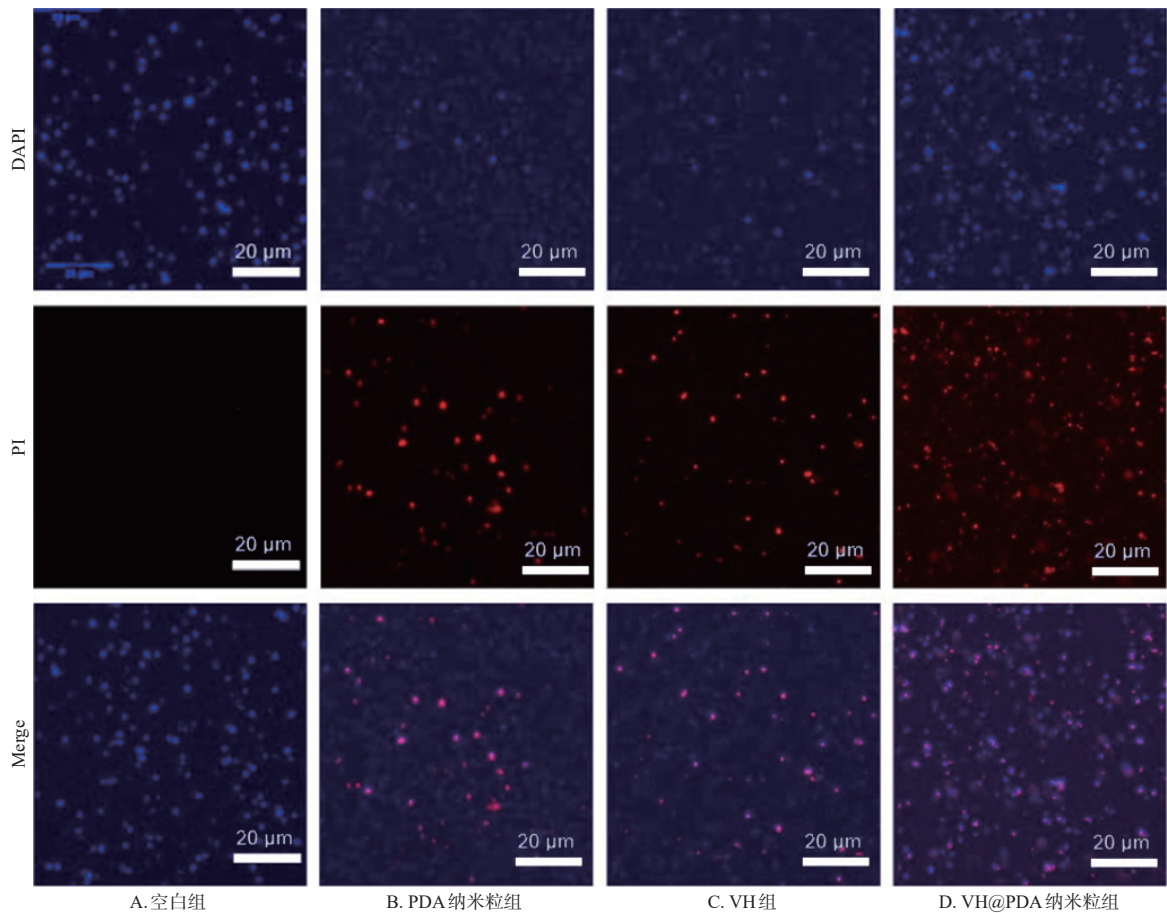


图4 活/死细菌染色法考察结果

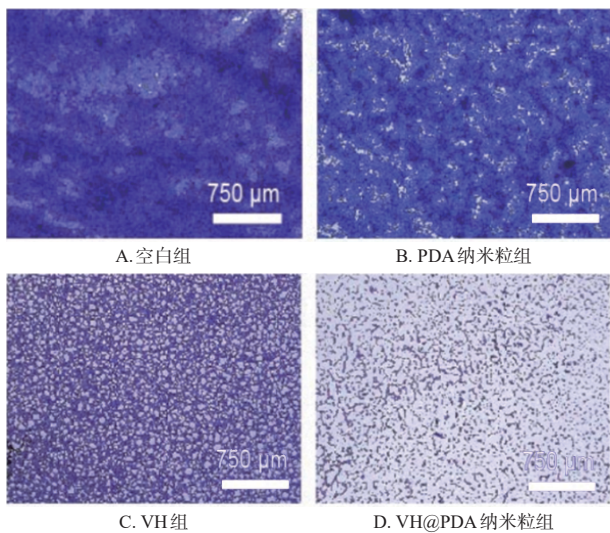


图5 结晶紫染色法考察结果

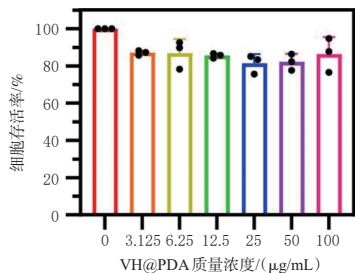


图6 VH@PDA纳米粒的生物相容性考察结果($n=3$)

热休克蛋白70,较单用 Fe_3O_4 @PDA纳米粒提高了抗菌效果。Yu等^[18]利用 Fe_3O_4 @PDA纳米粒作为核心结构连接第3代树突状聚酰胺-胺型高分子PAMAM,制备出 Fe_3O_4 @PDA@PMAA@PAMAM纳米复合物;将该纳米复合物置于近红外激光下照射,可实现一氧化氮的控制释放,从而明显降低细菌活性。由此可知,利用PDA为载体制备具有光热性能的纳米粒具有一定开发前景。

VH由于其耳、肾毒性等不良反应发生率较高,通常不推荐大剂量使用,且仅适用于耐药革兰氏阳性菌所致严重感染。本研究通过制备VH@PDA纳米粒,以实现减少VH剂量并提高抗菌效果的目的。结果显示,VH@PDA纳米粒实现了VH的高效负载,且粒径分布均一;在近红外激光照射下,该纳米粒可有效破坏生物膜形态,抗菌效果比非近红外激光照射效果更好,且具有良好的生物相容性。相比于VH原料药,该纳米粒对金黄色葡萄球菌的抑制作用更强,展现出优异的光热协同抗菌性能。

综上所述,VH@PDA纳米粒具有稳定的光热性能,联合光热的抗菌作用明显,且具有良好的生物相容性。后续本课题组将完善该纳米粒的体内研究,为临床治疗感染性疾病提供可靠策略。

参考文献

- [1] COOK M A, WRIGHT G D. The past, present, and future of antibiotics[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14 (657) : eabo7793.
- [2] COLLABORATORS A R. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *Lancet*, 2022, 399(10325) : 629-655.
- [3] 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.
- [4] FU Y, YANG L, ZHANG J H, et al. Polydopamine antibacterial materials[J]. *Mater Horiz*, 2021, 8 (6) : 1618-1633.
- [5] FU J L, WANG D, TANG Z N, et al. NIR-responsive electrospun nanofiber dressing promotes diabetic-infected wound healing with programmed combined temperature-coordinated photothermal therapy[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1) : 384.
- [6] SCHEETZ M H. Vancomycin: the pendulum swings[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2020, 77(11) : 810-811.
- [7] STOGIOS P J, SAVCHENKO A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance[J]. *Protein Sci*, 2020, 29 (3) : 654-669.
- [8] PENG Y, LI C Y, YANG Z L, et al. Adverse reactions of vancomycin in humans: a protocol for meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(38) : e22376.
- [9] 李标文, 任卓, 宋如, 等. 分光光度法测定万古霉素[J]. *河北化工*, 2006, 29(4) : 45-46.
- [10] YOO D, JEONG H, NOH S H, et al. Magnetically triggered dual functional nanoparticles for resistance-free apoptotic hyperthermia[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52 (49) : 13047-13051.
- [11] HUO J J, JIA Q Y, HUANG H, et al. Emerging photothermal-derived multimodal synergistic therapy in combating bacterial infections[J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50 (15) : 8762-8789.
- [12] FEOKTISTOVA M, GESERICK P, LEVERKUS M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 2016 (4) : pdb. prot087379.
- [13] DAVIS J S, HAL S V, TONG S C. Combination antibiotic treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015, 36(1) : 3-16.
- [14] ZHANG W L, HU E S, WANG Y J, et al. Emerging antibacterial strategies with application of targeting drug delivery system and combined treatment[J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 6141-6156.
- [15] LI B, LUO Y T, LIU G, et al. NIR- II -absorbing NDI polymer with superior penetration depth for enhanced photothermal therapy efficiency of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 6577-6588.
- [16] LIU Y L, AI K L, LIU J H, et al. Dopamine-melanin colloidal nanospheres: an efficient near-infrared photothermal therapeutic agent for *in vivo* cancer therapy[J]. *Adv Mater*, 2013, 25(9) : 1353-1359.
- [17] LIU D D, MA L Y, LIU L D, et al. Polydopamine-encapsulated Fe₃O₄ with an adsorbed HSP70 inhibitor for improved photothermal inactivation of bacteria[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(37) : 24455-24462.
- [18] YU L Z, LUO B, LI Z Y, et al. PAMAM-PMAA brush-functionalized magnetic composite nanospheres: a smart nanoprobe with tunable selectivity for effective enrichment of mono-, multi-, or global phosphopeptides[J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(6) : 1266-1276.

(收稿日期:2025-02-23 修回日期:2025-07-07)

(编辑:唐晓莲)