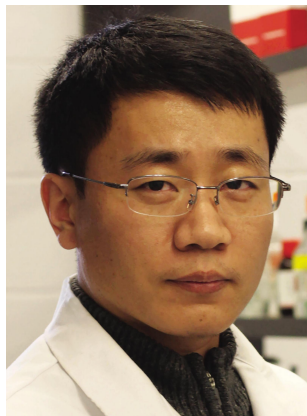




高利增, 扬州大学教授, 博士生导师, 江苏省特聘教授, 江苏省双创人才。入选第十二批千人计划青年项目。2006年毕业于中国科学院生物物理研究所, 2006~2015年分别在美国匹兹堡大学、康奈尔大学和宾夕法尼亚大学从事博士后研究工作, 2015年加入扬州大学医学院。主要从事纳米生物医学工程研究, 包括纳米酶的开发与生化机制, 纳米酶在抗菌、龋齿防治等领域的应用。主要文章发表在 *Nature Nanotechnology*, *Angewandte Chemie*, *ACS Nano*, *Biomaterials*, *Theranostics* 等杂志, 相关研究成果获得 2010 年北京市科学技术进步一等奖(排名第二)和 2015 年国际牙医协会口腔护理创新奖。

纳米酶的抗菌机理与应用*

唐燕 仇智月 许卓斌 高利增**

(扬州大学医学院转化医学研究院, 江苏省非编码 RNA 基础与临床转化重点实验室, 扬州 225001)

摘要 细菌耐药性和抗生素滥用是一个世界性难题, 需要开发新型抗菌剂, 既能够高效杀菌, 又能避免耐药性问题并具有较好的生物和环境相容性。纳米酶具有调控 ROS 自由基的能力, 可以高效杀死多种革兰氏阳性和阴性致病菌以及顽固性生物膜; 同时纳米酶具有较好的稳定性、生物相容性、可回收再利用等优点, 在促进伤口愈合、龋齿防治和环境防污方面具有重要的应用前景。

关键词 纳米酶, ROS, 细菌, 耐药性, 生物膜

学科分类号 Q811, Q814

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0462

目前抗生素导致细菌耐药(antibiotic-resistant bacteria)已成为一个世界性的问题, 是威胁全球公众健康的主要隐患^[1]。全球每年约 70 万人的死亡都与细菌耐药性相关, 如不采取有效措施, 到 2050 年这一数字将增长到 1 000 万。在中国抗菌药物滥用现象尤为严重^[2], 常导致耐药菌乃至“超级细菌”的产生, 比如常见的绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等。此外抗生素滥用还在中国造成严重的环境污染^[3]。针对耐药菌需要不断开发新的抗菌药物或材料, 但对滥用问题帮助不大。因此开发高效杀菌、环境友好并避免耐药性产生的新型抗菌剂迫在眉睫。

纳米材料和技术的发展为开发新的抗菌药物提供了契机^[4-5]。已经有报道纳米银^[6]、二氧化钛、氧化铜等纳米材料具有良好的抗菌活性^[7-8]。有些纳米材料抗菌可以避免细菌耐药性的产生^[9-10], 比如小分子修饰的金纳米颗粒, 具有优良的抗菌活性, 而且与现有抗生素相比很难诱导细菌产生耐药性^[11-12]。主要是因为纳米材料杀伤作用是多方面的, 细菌难以产生有针对性的抗药性^[7, 13]。

* 国家自然科学基金面上项目(81671810)和江苏省科技项目基础研究计划(自然科学基金)面上项目(BK20161333)。

** 通讯联系人。

Tel: 0514-87797090, E-mail: lzgao@yzu.edu.cn

收稿日期: 2017-12-15, 接受日期: 2018-01-18

但大多数纳米材料生物相容性不够理想. 比如抗菌效果较好的纳米银材料, 甚至已加入一些抗菌卫生产品中使用, 但是具有严重的生物安全性问题, 容易引发细胞毒性, 不适合人体使用, 并且会污染环境^[14-15]. 在 2015 年 8 月 *Nature Nanotechnology* 专门发表了一篇评论(Quick lessons on environmental nanotech), 认为纳米银是一种对环境有害的纳米材料, 建议停止使用. 而与之相反, 四氧化三铁纳米材料则具有相对较高的生物安全性和环境友好性^[16]. 因此, 纳米材料用于杀菌的同时需要关注其生物相容性.

纳米酶是一类具有类酶催化活性的纳米材料, 能够在生理条件下催化天然酶的底物并遵循相似的反应动力学行为^[17-20]. 这一类酶催化活性来自于纳米酶自身所具有的特殊纳米结构, 无需额外引入催化功能基团或者天然酶. 纳米酶相对于天然酶或其他人工模拟酶具有催化活性高、稳定性好、成本低、多功能等优点, 因此在许多领域具有重要的应用潜力^[21], 包括疾病诊断和治疗、生物传感器、抗菌、环境处理、工业催化等^[22-24]. 本文将重点介绍纳米酶抗菌的机理, 尤其是针对不同细菌的耐药形

式, 发展相应的抗菌策略, 应用于多种疾病预防和治疗.

1 纳米酶与 ROS

活性氧(reactive oxygen species, ROS)在机体防御病原体侵袭中发挥着重要作用, 而纳米酶具有调节 ROS 自由基水平的能力, 正是这种能力赋予了纳米酶抗菌的功能.

1.1 ROS 与机体防御

众所周知, ROS 在机体防御中发挥重要的作用, 是防御病原体侵袭的第一道防线^[25-27]. 在哺乳动物细胞中, 免疫系统的巨噬细胞和中性粒细胞可以直接吞噬外源的病原体^[28], 通过吞噬作用进入吞噬囊泡最终与溶酶体融合(图 1a), 在溶酶体中具有多种氧化酶和过氧化物酶, 可以借助溶酶体内的酸性微环境催化产生大量的活性氧自由基 ROS, 包括超氧自由基、双氧水、羟基自由基(图 1b), 这些 ROS 可以攻击核酸、蛋白质、多糖、脂类等生物分子造成其失去功能, 最终杀死和分解细菌, 细菌死后的产物经细胞排放后进一步引发后续的免疫应答(图 1). 植物体系中也利用 ROS 来防御病原体的

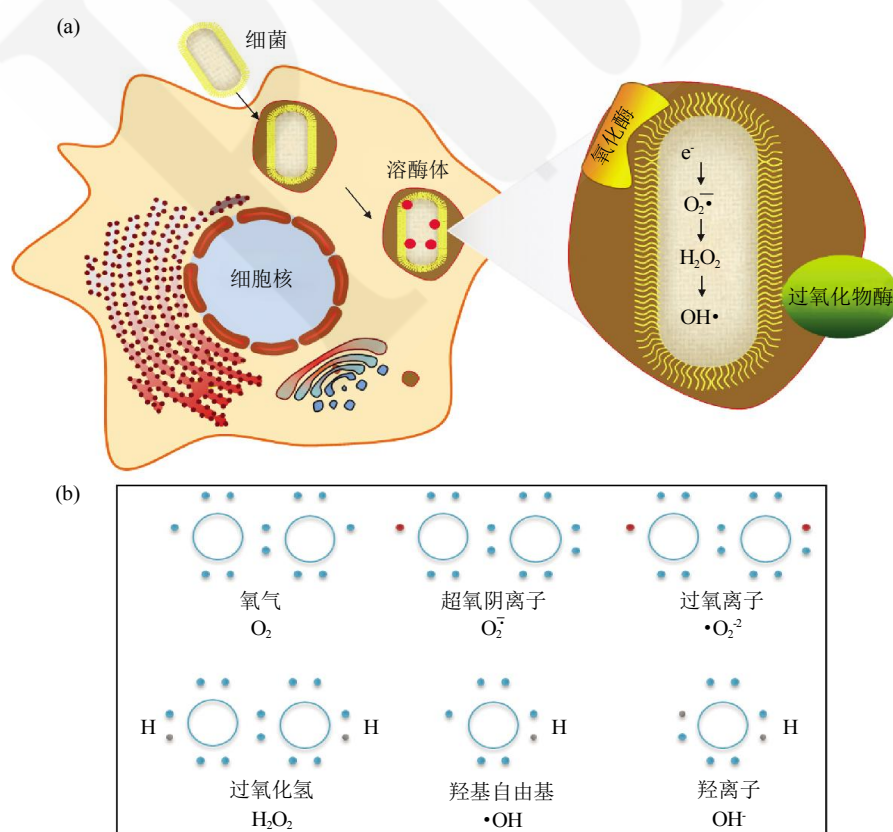


Fig. 1 Host defense to kill pathogen by cellular lysosome (a) and normal ROS formats (b)

图 1 机体细胞通过溶酶体杀死病原体(a)和活性氧自由基的形式(b)

侵袭^[29-30]。所以 ROS 在机体防御中起着至关重要的作用。

尽管 ROS 在机体具有重要的生物学功能，但是过多的 ROS 反而会造成正常细胞的死亡或凋亡。ROS 被形容为一把双刃剑，机体正常生理过程离不开 ROS 的参与，但是积累过多的 ROS 反而不利，因此通常情况下 ROS 在生理条件下维持在一个稳定的水平，保持稳态平衡。而 ROS 水平一旦失衡，则往往会引发疾病。比如在肿瘤中具有较高的 ROS 水平^[31]，肿瘤细胞在快速生长过程中伴随大量自由基和双氧水的累积，使得细胞对 ROS 不再敏感，进而造成化疗效果不佳，因为很多化疗药物是通过产生 ROS 杀伤细胞的。而在流感病毒侵入细胞时会下调 ROS 水平^[32]，是胞内环境更加有利于病毒的复制和包装。因此，通过调节 ROS 水平治疗疾病时需要保持 ROS 的平衡。

1.2 纳米酶调节 ROS

目前发现的纳米酶有 50 多种不同组分和结构的纳米材料，主要包括金属氧化物、金属和碳类纳米材料。虽然发现的纳米酶种类繁多，但大部分纳米酶所介导的催化反应主要是氧化还原反应(图 2)，包括 4 类：a. 氧化酶(oxidase, OXD)，在酸性条件下可以直接催化氧气产生自由基；b. 过氧化物酶(peroxidase, POD)，酸性条件下催化双氧水产生羟基自由基；c. 过氧化氢酶(catalase, CAT)，中性条件下将双氧水分解为氧气和水；d. 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，中性或碱性条件下将超氧自由基氧化为氧气或双氧水。氧化酶和过氧化物酶催化产生自由基，表现为提高 ROS 水平；而过氧化氢酶和超氧化物歧化酶清除自由基，表现为降低 ROS 水平。因此纳米酶具有调节 ROS 水平的能力。

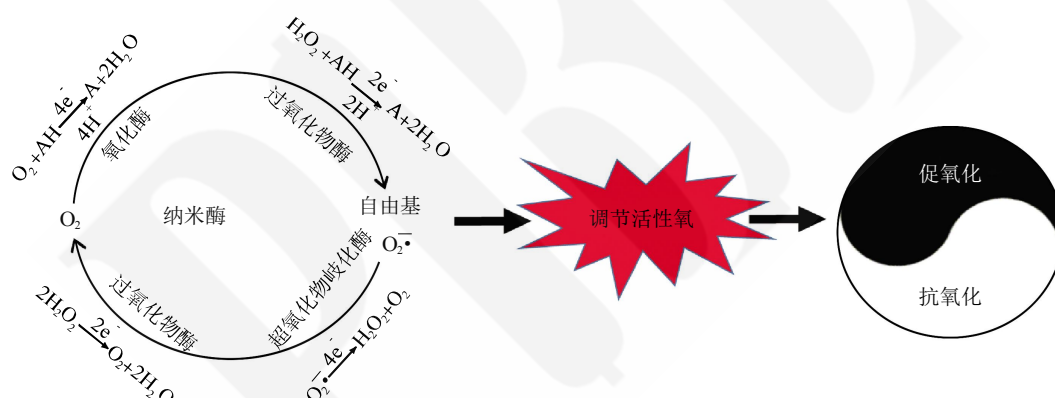


Fig. 2 Nanozymes regulate ROS balance by their intrinsic redox reactions

图 2 纳米酶氧化还原活性调节 ROS 平衡

目前报道的纳米酶一般具有多种氧化还原酶活性，比如纳米氧化铁同时具有过氧化物酶和过氧化氢酶活性^[33-34]。纳米氧化铈具有氧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶 4 种催化活性。金纳米颗粒经修饰后具有葡萄糖氧化酶活性，此外还具有过氧化氢酶活性。所以在实际使用时要充分考虑到每种纳米酶所具有的活性及其相应的催化特点，保证它进入细胞后能够发挥其预想的效果。比如纳米氧化铁进入细胞后，如果进入溶酶体酸性环境中，它将以过氧化物酶活性为主，提高 ROS 水平。而如果进入细胞质中性环境区域，将以过氧化氢酶活性为主，表现为降低 ROS 水平。因此可以基于实验目的的需要将纳米酶运送到相应的细胞内微环境中。

此外，纳米酶调节 ROS 具有多种优点(图 3)，主要体现在以下方面。a. 纳米酶活性具有可调节性，可以通过控制纳米酶的尺寸、结构、表面形貌、组分、表面修饰等因素优化提高其催化活性，或者将多种纳米酶复合在一起进一步提高催化活性^[35-36]。b. 纳米酶同时是纳米材料，因此可以将能够特异识别病原体的小分子如抗体、多肽、适配体(Aptamer)、核酸探针等组装到纳米酶上，实现靶向胞内运输或者靶向杀菌。也可以将药物或者酶组装到纳米酶上，将 ROS 与其他杀菌方式结合起来。c. 许多纳米酶除了自身的类酶催化活性之外，还具有磁性、光热、荧光等特点，因此可以将这些功能与其催化活性联合应用，实现可控和可检测的 ROS 调节和高效杀菌。

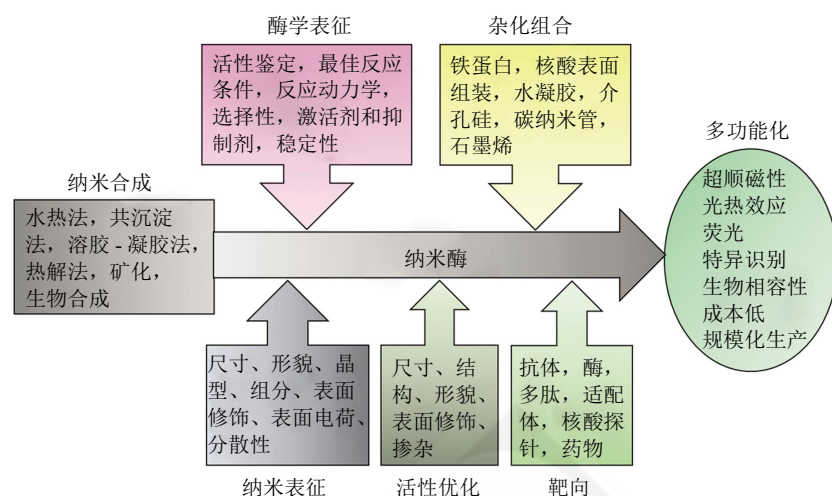


Fig. 3 Advantages of nanozymes from preparation to multifunctional applications

图3 纳米酶从制备到功能化应用的优势

借助纳米酶调节 ROS 的能力实现抗菌的思路正是模拟了机体防御病原体侵袭的原理。在体外可以有效借助其过氧化物酶活性催化外源性的双氧水, 充分提高双氧水的杀菌效率, 或者单独使用双氧水无法杀灭的耐药菌; 在体内可以利用生理微环境在局部病灶部位提高 ROS 水平, 提高机体的抗菌能力。因此, 许多纳米酶抗菌的应用都是利用了上述原理, 纳米酶催化产生自由基风暴, 打破 ROS 平衡, 进而破坏细胞膜的完整性, 降解核酸, 使多种蛋白质失活, 最终引发细菌形态发生剧烈变化并导致死亡。

1.3 其他机制

除了通过调控 ROS 途径杀菌和清除生物膜, 还可以通过其他非 ROS 途径, 尤其是针对生物膜。生物膜更加复杂, 生长过程中基质需要多种生物分子包括蛋白质、核酸和多糖的参与, 同时需要群体感应分子调节生物膜的生长。具有降解生物分子活性的纳米酶或者作用于群体感应小分子的纳米酶也可以起到预防和清除生物膜的作用。

2 纳米酶抗菌应用

细菌耐药性的状态是多样化的, 浮游态 (planktonic) 细菌通过自身突变或外来基因水平转移获得耐药性^[37], 有些细菌可以通过形成细菌生物膜 (biofilm)^[38-40] 以及胞内寄生 (intracellular bacteria)^[41] 等提高耐药性。许多药物包括抗生素和其他抗菌材料主要对浮游状态细菌或早期生物膜比较有效, 而对成熟生物膜或躲藏在细胞内的细菌则效果不佳, 因

为这些药物或材料无法突破生物膜基质屏障到达内部细菌。利用纳米酶则可以有效杀灭多种耐药形式的细菌。

2.1 纳米酶抗耐药菌

许多致病性病原体都会产生耐药性, 其中最常见的是细菌。根据世界卫生组织最新发布的世界上最具耐药性的、最能威胁人类健康的“超级细菌”结果, 主要有 12 种耐药性细菌, 按照危险程度分为“严重致命、高度致命、中度致命”三类。其中严重致命的细菌包括鲍氏不动杆菌、绿脓杆菌和肠杆菌, 这些细菌都是革兰氏阴性菌, 具有双层细胞膜, 常引发包括肺炎、血液和伤口感染等严重的疾病。高度耐药菌包括金黄色葡萄球菌、沙门氏杆菌等, 容易引发食物中毒等常见感染性疾病。因此开发针对这些引发重要疾病耐药菌的抗菌剂十分迫切。

基于纳米酶所具有的氧化酶和过氧化物酶活性, 可以通过催化氧气或双氧水在短时间内产生大量的自由基(自由基风暴), 可以有效杀死多种耐药性细菌。王浩课题组发现在低浓度过氧化氢 (13.5 mg/L) 存在时, 微量的氧化铁纳米酶即可杀灭 100% 大肠杆菌 (图 4), 而单独使用过氧化氢杀菌效率低于 15%^[42]。曲晓刚课题组利用石墨烯量子点 (graphene quantum dots) 催化双氧水可以有效杀灭革兰氏阴性的大肠杆菌和革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌 (图 4), 其中所需的双氧水浓度仅为 100 $\mu\text{mol/L}$, 这种杀菌能力可以用于预防伤口感染, 促进伤口愈合^[43]。此外, 这一课题组还发现负载金纳米颗粒的

石墨烯碳化氮纳米酶(AuNPs with graphitic carbon nitride, $g\text{-C}_3\text{N}_4\text{@AuNPs}$, CNA)具有很高过氧化物酶活性,也可以催化生理水平的双氧水用于杀灭具有耐药性的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,有效预防细菌生物膜的形成和加速感染性疮口的愈合,更为重要的是,CAN 纳米酶可以注射到老鼠体内用于治疗肺部耐药菌的感染,其杀菌效果与万古霉素(vancomycin)相当^[44].他们进一步将金纳米颗粒负载到介孔硅(mesoporous silica supported gold nanoparticles, MSN-AuNPs)后发现该复合材料具有氧化酶和过氧化物酶活性,这两种酶活性协同增强了产生自由基的能力,不仅可以预防大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生物膜的形成,还可以破坏已经形成的生物膜^[45].在这些工作的基础上该课题组还设计了具有相应需求(on demand)能力的化学-光热(Chemo-photothermal)协同抗菌体系^[46],以三明治状的石墨烯-介孔硅纳米片(sandwich-like graphene-mesoporous silica nanosheet, GS)为载体,将前体药物(prodrug)抗坏血酸(ascorbic acid, AA)装载到GS介孔中并用透明质酸-多巴胺(hyaluronic acid-dopamine, HA)封装,然后在外表面组装万古霉素修饰的氧化铁纳米酶.万古霉素可以将抗体系统靶向到革兰氏阴性或阳性细菌表面,一旦接触到细菌后利用细菌分泌的透明质酸酶(hyaluronidase)可以将HA-DA降解将抗坏血酸释放出来,氧化铁纳米酶将抗坏血酸催化产生自由基最终杀灭细菌,石墨烯的光热效应还可以进一步提高抗菌效果,利用这

一系统可以有效清除顽固性的生物膜,预防体内移植假体引发的感染.

赵宇亮课题组发现聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰的二硫化钼(molybdenum disulfide, MoS_2)纳米花通过类过氧化物酶活性催化低浓度的双氧水产生羟基自由基可以有效杀灭耐药菌,通过与该材料的光热效应相结合,在近红外光照射下可以高效杀死氨苄抗性的大肠杆菌(革兰氏阴性)和炭疽芽孢杆菌(Endospore-forming *Bacillus subtilis*, 革兰氏阳性),促进伤口的愈合^[47].中国台湾新竹清华大学宋信文(Hsing-Wen Sung)课题组发现还原型石墨烯(graphene oxide, rGO)与氧化铁纳米颗粒复合材料(rGO-IONP)也可以通过类似催化和光热协同效应高效杀死甲氧苯青霉素耐药的金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus*),协同杀菌效率达到80%,显著高于单独的催化(35%)或光热杀菌(60%),可以用于促进伤口愈合^[48].王琛和杨蓉课题组发现铂银合金八面体(octahedra)纳米颗粒(Pt/Ag nanoparticles)通过其氧化酶和过氧化物酶活性可以杀灭90%以上的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌^[49].

目前利用纳米酶杀菌所针对的耐药菌主要包括大肠杆菌和金黄色葡萄球菌(图4),对其他细菌的抗菌效果及相应的抗菌谱需要进一步探索,而且抗菌应用主要集中在皮肤表面的伤口愈合,体内治疗的研究较少,需要进一步探索和评价其在体内抗感染治疗应用中的效果、安全性和可行性.

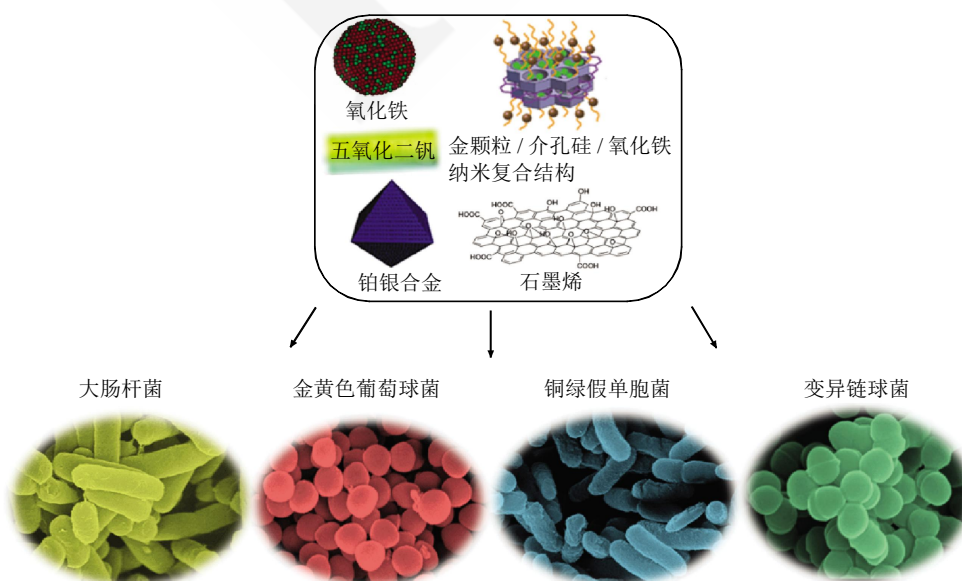


Fig. 4 Antibacterial applications of nanozymes

图4 纳米酶抗菌应用

2.2 纳米酶清除生物膜

生物膜(biofilm)是指由细菌、真菌等微生物吸附于固体表面形成的结构化群落, 主要由多糖、蛋白质、核酸、脂类等胞外多聚物质(exopolymer substance, EPS)组成生物膜基质(biofilm matrix)将细菌或真菌包埋在内部^[50-51]. 许多菌类感染相关的慢性疾病都有生物膜的参与, 如龋齿和牙龈感染, 肺部囊性纤维变性、尿路感染、呼吸道感染、伤口反复感染、植入性医疗器械引发的感染等^[52-53]. 研究表明, 生物膜在龋病和牙周病的形成和发展过程中扮演着关键角色, 其内细菌利用摄入口腔的多糖等营养成分生长形成生物膜, 代谢产酸腐蚀牙齿表面形成龋齿, 并引发牙周组织感染.

生物膜相关疾病的临床治疗通常面临的难题之一是: 药物很难杀灭由胞外基质包裹在生物膜内的细菌^[54], 由此造成生物膜形态的细菌具有更高的耐药性^[55]. 与未形成生物膜的游离细菌相比, 对抗生素、过氧化氢和其他抑菌剂的抗性可以高达数百倍. 临床上生物膜一旦形成, 彻底清除和杀灭相关细菌变得极其困难^[56]. 在致龋性生物膜中, 细菌通常包埋在由胞外多糖为主要成分组成的基质中, 细菌代谢产酸形成大量的酸性微环境, 溶解牙齿表面的钙质, 造成牙齿脱矿最终形成龋齿.

变异链球菌(*Streptococcus mutans*)生物膜是致龋性生物膜的一个典型代表^[57], 虽然这种细菌在整个口腔微生物中所占比例并不高, 但却是引发龋齿的主要因素. 究其原因是变异链球菌可以在唾液包

覆的牙齿表面快速形成生物膜, 尤其是当频繁接触蔗糖等营养物质时^[58], 可以在牙齿和细菌表面同时合成大量的多糖, 促进细菌的黏附和生物膜基质的快速形成^[59]. 与此同时, 生物膜内的变异链球菌利用蔗糖发酵产酸, 在牙齿表面形成高度酸化的微环境. 这种酸性环境反过来促进多糖基质的合成, 保持变异链球菌的生长优势, 抑制其他不耐酸细菌的生长, 同时会溶解牙齿表面结构, 造成牙齿脱矿, 最终引发龋齿等相关疾病. 口腔致龋性生物膜的清除非常困难, 主要是因为: a. 药物很难穿过生物膜基质杀灭内部的细菌; b. 生物膜基质内形成结构性的酸性微环境抵抗外部干扰并促进内部细菌生存; c. 采用局部治疗(topical treatment)的药物在口腔中清除快, 很难在牙齿表面或者生物膜上形成有效存留. 所以, 要想提高生物膜清除效率, 新的策略必须使药物能够有效结合到牙齿生物膜上, 并适合在酸性环境下发挥功能, 破坏生物膜基质结构进而杀灭内部细菌.

我们课题组发现四氧化三铁纳米酶在酸性条件下可以催化双氧水高效降解 DNA、蛋白质和多糖等生物分子(图 5a), 单独使用双氧水则无法降解这些成分^[60]. 在口腔生物膜基质中, 恰恰以这三类分子为主, 其中又以多糖所占比例最高. 纳米酶介导的催化反应降解生物膜基质成分, 从而能够破坏生物膜基质结构, 高效杀灭内部细菌. 在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)生物膜的测试结果表明四氧化三铁纳米酶催化双氧水可以破坏生物膜基

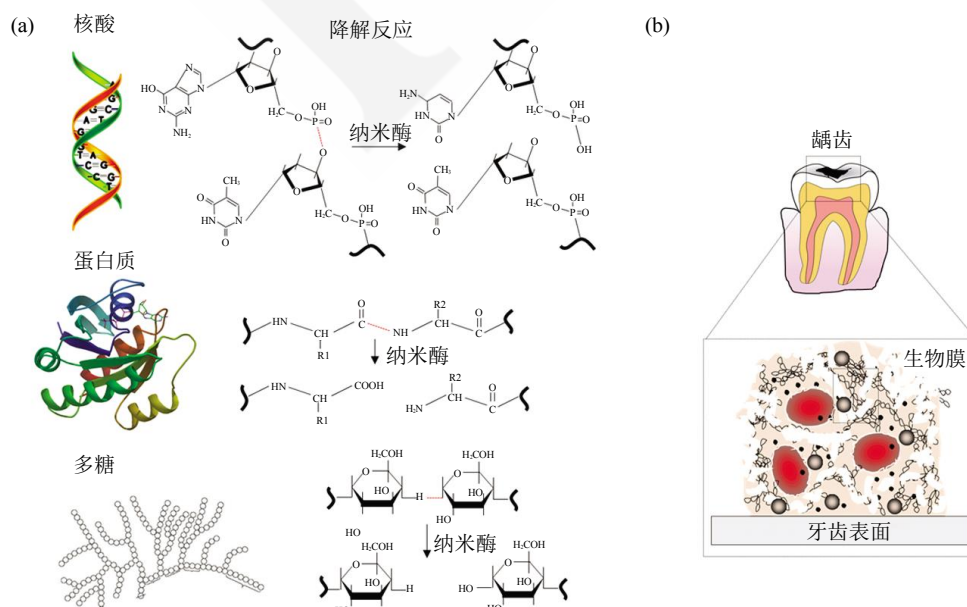


Fig. 5 Biomolecules degradation and caries prevention using nanozymes

图 5 纳米酶降解生物分子和预防龋齿

质, 杀菌效果与单独使用双氧水相比提高 10 倍以上. 这些研究基础表明过氧化物纳米酶具有突破生物膜基质屏障和杀灭内部细菌并促进清除生物膜的潜力.

如果将该纳米酶应用于口腔生物膜清除和预防龋齿, 其优势是四氧化三铁纳米酶适合在口腔生物膜环境下工作. 口腔生物膜尤其是变异链球菌形成的致龋性生物膜有一个特殊的生理特性, 即在生物膜内部形成高度酸化的微环境. 而过氧化物纳米酶正是在酸性环境下具有最佳的催化效率, 生物膜内的酸性环境不仅不会使其丧失活性, 反而会促进其降解生物膜基质和杀菌的效果, 有助于高效清除生物膜. 体外生物膜和动物龋齿实验表明纳米酶具有清除口腔生物膜和预防龋齿的效果(图 5b). 体外生物膜实验发现过氧化物纳米酶在几分钟内既可结合到生物膜上, 并催化双氧水高效杀灭内部细菌(从 10^8 杀到 10^2 CFU/biofilm). 远高于单独双氧水的杀菌效率(从 10^8 杀到 10^6 CFU/biofilm). 而且所需的双氧水浓度(0.5%)远低于目前临床上使用的浓度(3%或更高). 这一催化反应还可以高效降解生物膜内的多糖, 而单独双氧水无此降解能力. 动物实验显示过氧化物纳米实验意外发现是氧化铁纳米酶自身即可降低龋齿的严重程度, 并可以抑制酸引发的羟基磷灰石溶解, 提示这一材料具有防止牙齿脱矿的作用. 这些前期实验发现表明过氧化物纳米酶在清除口腔生物膜和预防龋齿中具有多重作用^[61].

此外, 曲晓刚课题组还设计了一种模拟 DNA

酶的人工酶(DNase-mimetic artificial enzyme, DMAE), 将钝化的(passivated)含四价铈的金纳米颗粒组装到磁性四氧化三铁/二氧化硅核壳胶体颗粒表面, 该复合材料具有类 DNA 酶活性, 可以剪切降解 DNA 分子, 其活性中心是四价铈. 与天然 DNase I 相比, 具有稳定、可重复使用、成本低等显著优势. 将这一纳米酶涂层于表面, 可以降解金黄色葡萄球菌生物膜基质中的胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA), 生物膜测试结果表明这一材料可以有效预防 90% 以上的细菌黏附和抑制早期生物膜生长, 生物膜基质中的 eDNA 是未处理生物膜中的 1/5, 同时它还可以降解成熟生物膜(matured biofilm)中的 eDNA, 破坏生物膜结构的完整性, 使其变得更加松散, 如果同时配合抗生素使用, 更加有利于抗生素进入生物膜内部, 杀灭细菌效率达到 2 个 lg(CFU/well), 与 DNase I 相比效果更加显著^[62].

2.3 纳米酶防污(antifouling)

除了抗致病菌和致病性生物膜之外, 纳米酶还可以用于预防和清除环境中的微生物, 防止微生物在材料表面黏附生长造成的侵蚀和破坏作用. 德国 Wolfgang Tremel 课题组^[63]发现五氧化二钒具有卤代过氧化物酶(vanadium haloperoxidase)活性的五氧化二钒纳米线可以有效抑制生物膜(biofilm)的形成(图 6). 在过氧化氢存在时, 可以将溴离子氧化产生次溴酸(HOBr)和单线态氧(1O_2), 后者具有很强的抗菌活性. 将五氧化二钒纳米线涂于不锈钢表面,

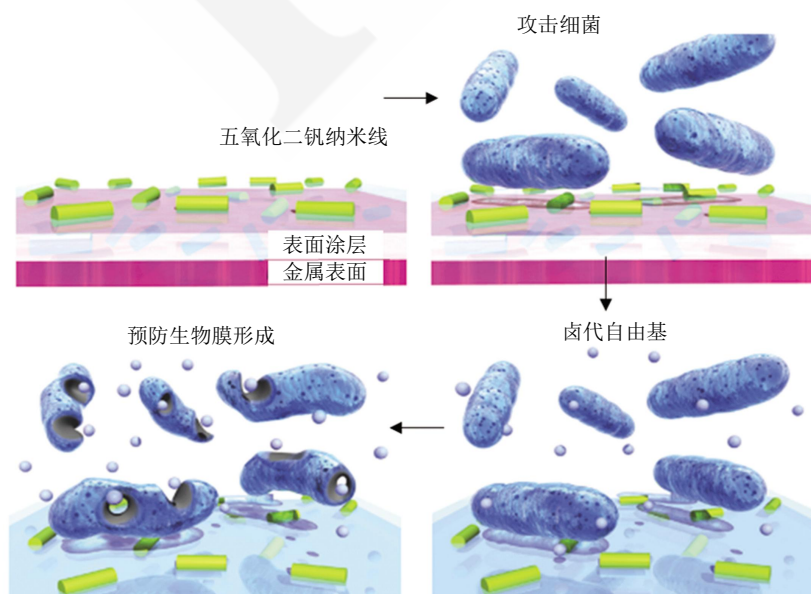


Fig. 6 Antifouling with nanozymes^[63]

图 6 纳米酶用于环境防污处理^[63]

在海水中可以抑制微生物黏附, 有效防止生物膜的形成, 在轮船外壳防污(antifouling)方面具有潜在的应用价值. 该课题组进一步发现氧化铈(CeO_{2-x})纳米棒也具有类似的卤代过氧化物酶催化功能可以用于海水防污^[64]. 氧化铈纳米棒表面 $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ 介导的氧化还原反应可以利用双氧水将海水中的溴离子(Br^-)氧化为高活性的 HOBr , 可以与生物膜中的群体感应(quorum sensing)分子如 *N*-acyl homoserine lactones 反应. 根据这一工作原理, 氧化铈纳米涂层可以有效预防细菌等微生物在其表面的结合, 效果好于目前常用的氧化亚铜(Cu_2O)材料, 可以用作

新型海水防污处理替代材料.

3 总结与展望

目前纳米酶在抗菌方面展示了较好的应用潜力. 纳米酶通过自身所具有的氧化还原酶的催化活性可以调节 ROS 自由基水平, 产生高强度的自由基进入细菌内可以切断核酸, 使蛋白质失活, 破坏细胞膜完整性, 在生物膜基质中可以降解多种分子包括多糖、蛋白质、胞外 DNA 和脂类, 从而杀灭多种耐药菌和清除生物膜(图 7), 可以应用于伤口愈合、龋齿防治和环境防污等方面.

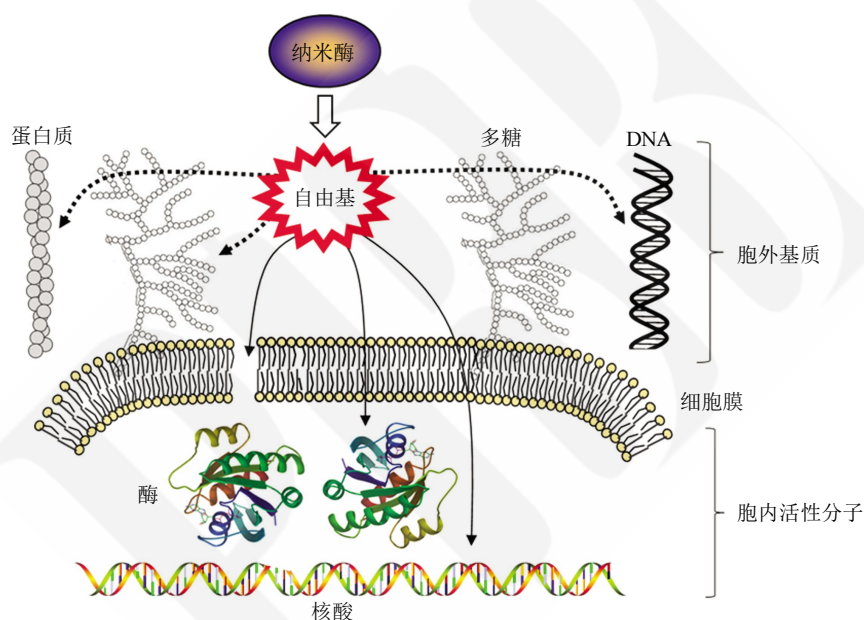


Fig. 7 Nanozymes regulate ROS to destroy bioactive molecules and degrade the substances in biofilm matrix

图 7 纳米酶通过调控自由基破坏生物活性分子和降解生物膜基质

同时, 相对于传统的抗生素或生物抗菌剂, 纳米酶作为新型抗菌剂, 具有诸多优势. 纳米酶主要通过化学合成, 制备快速简单成本低, 稳定性好; 通过控制纳米尺度的要素可以调节和优化纳米酶的活性; 纳米酶之间可以协同工作增强抗菌效果; 功能化修饰和多种纳米效应联用进一步增强其杀菌能力.

但是纳米酶抗菌应用的研究刚刚起步, 其相关机理和应用需要进一步探索. 主要包括如下方面:

a. 纳米酶抗菌谱. 目前纳米酶抗菌主要针对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓芽孢杆菌、变异链球菌等致病菌(表 1), 对其他细菌的杀菌效果尚不清楚; 对于其他致病性微生物如病毒、支原体、衣原体、真菌、寄生虫等是否具有灭杀能力需要进

一步探索.

b. 纳米酶杀菌是否引发耐药性. 目前抗生素引发的耐药性问题比较受关注, 相关机理研究比较多. 纳米酶主要通过 ROS 来灭活细菌, 是否能够引发新的抗药性需要进一步评估.

c. 纳米酶杀菌是否具有特异性. 抗生素杀菌具有特定的抗菌谱, 是因为抗生素可以抑制特定细菌内蛋白质或酶的活性. 纳米酶介导的 ROS 攻击目标是随机的, 选择性较差. 能否通过修饰或优化实现纳米酶的特异性杀菌有待进一步开发和探索.

d. 纳米酶的生物安全性评估. 纳米酶虽然具有较好的杀菌能力, 但目前的应用大多局限于体外或者皮肤表面, 体内应用的研究较少. 需要评估纳米酶体内杀菌效率和生物安全性.

Table 1 Types of nanozymes, antibacterial spectrum, mechanism and application

表 1 纳米酶抗菌种类、机理和应用

纳米酶	细菌种类	机理	应用	参考文献
氧化铁纳米颗粒	大肠杆菌	过氧化物酶活性		[41]
石墨烯量子点	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	过氧化物酶活性	预防伤口感染	[42]
金纳米颗粒 / 石墨化碳化氮	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	过氧化物酶活性	预防生物膜形成, 加快伤口愈合; 预防肺部耐药菌感染	[43]
金纳米颗粒 / 介孔硅	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	氧化酶和过氧化物酶活性 协同增强	预防生物膜形成, 破坏已形成的生物膜	[44]
氧化铁纳米颗粒 / 石墨烯 - 介孔硅	大肠杆菌、金黄葡萄球菌	过氧化物酶活性, 光热效应, 药物释放	预防生物膜形成, 破坏已形成的生物膜; 预防假体移植诱发的感染	[45]
二硫化钼纳米米花	大肠杆菌(氨苄抗性), 炭疽芽孢杆菌	过氧化物酶活性, 光热效应	伤口愈合	[46]
氧化铁纳米颗粒 / 还原型石墨烯	金黄色葡萄球菌(甲氧苯青霉素抗性)	过氧化物酶活性, 光热效应	伤口愈合	[47]
铂银合金纳米颗粒	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	过氧化物酶活性		[48]
氧化铁纳米颗粒	大肠杆菌、铜绿假单胞菌、变异链球菌	过氧化物酶活性	预防生物膜形成, 清除已形成生物膜, 预防龋齿	[59-60]
含铈金纳米颗粒 / 四氧化三铁 / 二氧化硅核壳纳米结构	金黄色葡萄球菌	DNA 酶活性降解生物膜基质中的 DNA	预防生物膜形成, 清除成熟生物膜	[61]
五氧化二钒纳米线	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	卤代过氧化物酶活性	预防生物膜形成, 船体表面防污	[62]
氧化铈纳米棒	大肠杆菌	卤代过氧化物酶活性	预防生物膜形成, 船体表面防污	[63]

此外, 纳米酶调节 ROS 的能力并不仅仅局限于杀菌, 人体很多疾病和生理过程都与 ROS 的失衡相关, 比如肿瘤发生、心血管疾病, 神经衰老等, 因此纳米酶在这些重大疾病治疗中也具有重要的应用前景, 需要进一步探索和开发. 纳米酶是一个新兴但快速发展的纳米生物交叉领域, 而纳米酶在抗菌方面的应用研究刚刚开始, 我们相信随着研究的不断深入, 从基础研究向临床转化, 纳米酶作为新型抗菌剂可用于防治多种疾病感染, 帮助解决抗生素耐药和滥用问题, 提高人类健康生活质量.

参 考 文 献

- [1] Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, *et al.* New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microb Anti*, 2013, **12**: 22
- [2] Yezli S, Li H. Antibiotic resistance amongst healthcare-associated pathogens in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, **40**(5): 389-397
- [3] Bu Q W, Wang B, Huang J, *et al.* Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, **262**: 189-211
- [4] Singh R, Smitha M S, Singh S P. The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014, **14**(7): 4745-4756
- [5] Courtney C M, Goodman S M, McDaniel J A, *et al.* Photoexcited quantum dots for killing multidrug-resistant bacteria. *Nature Materials*, 2016, **15**(5): 529-534.
- [6] Duran N, Duran M, De Jesus M B, *et al.* Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*, 2016, **12**(3): 789-799.
- [7] Pelgrift R Y, Friedman A J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, **65**(13-14): 1803-1815
- [8] Qiu Z, Shen Z, Qian D, *et al.* Effects of nano-TiO₂ on antibiotic resistance transfer mediated by RP4 plasmid. *Nanotoxicology*, 2015, **9**(7): 895-904
- [9] Wang L S, Gupta A, Rotello V M. Nanomaterials for the treatment of bacterial biofilms. *Acs Infect Dis*, 2016, **2**(1): 3-4
- [10] Li X N, Robinson S M, Gupta A, *et al.* Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *Acs Nano*, 2014, **8**(10): 10682-10686
- [11] Zhao Y Y, Jiang X Y. Multiple strategies to activate gold nanoparticles as antibiotics. *Nanoscale*, 2013, **5**(18): 8340-8350
- [12] Zhao Y Y, Tian Y, Cui Y, *et al.* Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target gram-negative bacteria. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(35): 12349-12356
- [13] Dwivedi G R, Sanchita, Singh D P, *et al.* Nano Particles: Emerging warheads against bacterial superbugs. *Current topics in Medicinal Chemistry*, 2016, **16**(18): 1963-1975
- [14] Yin Y, Yang X, Zhou X, *et al.* Water chemistry controlled aggregation and photo-transformation of silver nanoparticles in environmental waters. *Journal of Environmental Sciences*, 2015,

- 34: 116–125
- [15] Wang Z, Xia T, Liu S J. Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects. *Nanoscale*, 2015, **7**(17): 7470–7481
- [16] Toumey C. Quick lessons on environmental nanotech. *Nature Nanotechnology*, 2015, **10**(7): 566–567
- [17] Wei H, Wang E K. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(14): 6060–6093
- [18] Ragg R, Tahir M N, Tremel W. Solids Go Bio: inorganic nanoparticles as enzyme mimics. *Eur J Inorg Chem*, 2016, **2016**(13–14): 1906–1915
- [19] Gao L Z, Yan X Y. Nanozymes: an emerging field bridging nanotechnology and biology. *Sci China Life Sci*, 2016, **59**(4): 400–402
- [20] Lin Y H, Ren J S, Qu X G. Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial Enzymes. *Accounts Chem Res*, 2014, **47**(4): 1097–1105
- [21] 高利增, 阎锡蕴. 纳米酶的发现与应用. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(10): 892–902
- Gao L Z, Yan X Y. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(10): 892–902
- [22] Wang X Y, Hu Y H, Wei H. Nanozymes in bionanotechnology: from sensing to therapeutics and beyond. *Inorg Chem Front*, 2016, **3**(1): 41–60
- [23] Cormode D P, Gao L, Koo H. Emerging biomedical applications of enzyme-like catalytic nanomaterials. *Trends in Biotechnology*, 2018, **36**(1): 15–29
- [24] Wang X, Guo W, Hu Y, *et al.* Nanozymes: Next Wave of Artificial Enzymes: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2016: 1–6
- [25] Fang F C. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *Mbio*, 2011, **2**(5): e00141–11
- [26] Dunnill C, Patton T, Brennan J, *et al.* Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J*, 2017, **14**(1): 89–96
- [27] Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, *et al.* ROS and Innate Immunity. *Anticancer Res*, 2009, **29**(3): 817–821
- [28] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, 2011, **11**(11): 723–737
- [29] Steinberg C E W. Defense means against pathogens and parasites: reactive oxygen species. In: *Stress Ecology*. Springer, Dordrecht, 2012: 47–60
- [30] O'brien J A, Daudi A, Butt V S, *et al.* Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 2012, **236**(3): 765–779
- [31] Ibanez I L, Notcovich C, Catalano P N, *et al.* The redox-active nanomaterial toolbox for cancer therapy. *Cancer Lett*, 2015, **359**(1): 9–19
- [32] To E E, Vlahos R, Luong R, *et al.* Endosomal NOX2 oxidase exacerbates virus pathogenicity and is a target for antiviral therapy. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 69
- [33] Gao L Z, Fan K L, Yan X Y. Iron oxide nanozyme: a multifunctional enzyme mimetic for biomedical applications. *Theranostics*, 2017, **7**(13): 3207–3227
- [34] Chen Z W, Yin J J, Zhou Y T, *et al.* Dual enzyme-like activities of iron oxide nanoparticles and their implication for diminishing cytotoxicity. *Acs Nano*, 2012, **6**(5): 4001–4012
- [35] Fan K L, Wang H, Xi J Q, *et al.* Optimization of Fe₃O₄ nanozyme activity *via* single amino acid modification mimicking an enzyme active site. *Chem Commun*, 2017, **53**(2): 424–427
- [36] Liu B W, Liu J W. Surface modification of nanozymes. *Nano Res*, 2017, **10**(4): 1125–1148
- [37] Cheng V C, Wong S C, Ho P L, *et al.* Strategic measures for the control of surging antimicrobial resistance in Hong Kong and mainland of China. *Emerging Microbes & Infections*, 2015, **4**(2): e8
- [38] Zhou G, Shi Q S, Huang X M, *et al.* The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(9): 21711–21733
- [39] Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, *et al.* Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis*, 2016, **95**: 32–42
- [40] Sun F, Qu F, Ling Y, *et al.* Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*, 2013, **8**(7): 877–886
- [41] Lehar S M, Pillow T, Xu M, *et al.* Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*, 2015, **527**(7578): 323–328
- [42] Zhang D, Zhao Y X, Gao Y J, *et al.* Anti-bacterial and *in vivo* tumor treatment by reactive oxygen species generated by magnetic nanoparticles. *J Mater Chem B*, 2013, **1**(38): 5100–5107
- [43] Sun H J, Gao N, Dong K, *et al.* Graphene quantum dots-band-aids used for wound disinfection. *Acs Nano*, 2014, **8**(6): 6202–6210
- [44] Wang Z, Dong K, Liu Z, *et al.* Activation of biologically relevant levels of reactive oxygen species by Au/g-C₃N₄ hybrid nanozyme for bacteria killing and wound disinfection. *Biomaterials*, 2017, **113**: 145–157
- [45] Tao Y, Ju E G, Ren J S, *et al.* Bifunctionalized mesoporous silica-supported gold nanoparticles: intrinsic oxidase and peroxidase catalytic activities for antibacterial applications. *Adv Mater*, 2015, **27**(6): 1097–1104
- [46] Ji H, Dong K, Yan Z, *et al.* Bacterial hyaluronidase self-triggered prodrug release for chemo-photothermal synergistic treatment of bacterial infection. *Small*, 2016, **12**(45): 6200–6206
- [47] Yin W, Yu J, Lv F, *et al.* Functionalized nano-MoS₂ with peroxidase catalytic and near-infrared photothermal activities for safe and synergetic wound antibacterial applications. *Acs Nano*, 2016, **10**(12): 11000–11011
- [48] Pan W Y, Huang C C, Lin T T, *et al.* Synergistic antibacterial effects of localized heat and oxidative stress caused by hydroxyl radicals mediated by graphene/iron oxide-based nanocomposites. *Nanomedicine-Uk*, 2016, **12**(2): 431–438
- [49] Cai S F, Jia X H, Han Q S, *et al.* Porous Pt/Ag nanoparticles with excellent multifunctional enzyme mimic activities and antibacterial

- effects. *Nano Res*, 2017, **10**(6): 2056–2069
- [50] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 2010, **8**(9): 623–633
- [51] Shi W Y, Zhou X D. Preface for the microbial biofilm issue. *Int J Oral Sci*, 2011, **3**(2): 47–48
- [52] Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**(2): 95–108
- [53] Koo H, Allan R N, Howlin R P, *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*, 2017, **15**(12): 740–755
- [54] Wu H, Moser C, Wang H Z, *et al.* Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*, 2015, **7**(1): 1–7
- [55] Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, **35**(4): 322–332
- [56] Martin C, Low W L, Gupta A, *et al.* Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. *Current pharmaceutical Design*, 2015, **21**(1): 43–66
- [57] Gao L Z, Liu Y, Kim D, *et al.* Nanocatalysts promote *Streptococcus mutans* biofilm matrix degradation and enhance bacterial killing to suppress dental caries *in vivo*. *Biomaterials*, 2016, **101**: 272–284
- [58] Koo H, Allan R N, Howlin R P, *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*, 2017, **15**(12): 740–755
- [59] Xiao J, Klein M I, Falsetta M L, *et al.* The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *Plos Pathog*, 2012, **8**(4): e1002623
- [60] Gao L Z, Giglio K M, Nelson J L, *et al.* Ferromagnetic nanoparticles with peroxidase-like activity enhance the cleavage of biological macromolecules for biofilm elimination. *Nanoscale*, 2014, **6**(5): 2588–2593
- [61] Gao L Z, Koo H. Do catalytic nanoparticles offer an improved therapeutic strategy to combat dental biofilms? *Nanomedicine-Uk*, 2017, **12**(4): 275–279
- [62] Chen Z W, Ji H W, Liu C Q, *et al.* A multinuclear metal complex based DNase-mimetic artificial enzyme: matrix cleavage for combating bacterial biofilms. *Angew Chem Int Edit*, 2016, **55**(36): 10732–10736
- [63] Natalio F, Andre R, Hartog A F, *et al.* Vanadium pentoxide nanoparticles mimic vanadium haloperoxidases and thwart biofilm formation. *Nature Nanotechnology*, 2012, **7**(8): 530–535
- [64] Herget K, Hubach P, Pusch S, *et al.* Haloperoxidase mimicry by CeO_{2-x} nanorods combats biofouling. *Adv Mater*, 2017, **29** (4): 1603823

Antibacterial Mechanism and Applications of Nanozymes*

TANG Yan, QIU Zhi-Yue, XU Zhuo-Bin, GAO Li-Zeng**

(Jiangsu Key Laboratory of Experimental & Translational Non-coding RNA Research,
Institute of Translational Medicine, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract Antibiotic-resistance of bacteria and antibiotics abuse is a global challenge. It is urgent to develop novel bactericide alternative to kill bacteria efficiently but without causing new resistance and biosafety issue. Nanozymes are nanomaterials with intrinsic enzyme-like activities which regulate reactive oxygen species (ROS) by redox reactions. This property can be used to suppress many gram-positive and gram-negative virulent bacteria and biofilms. Meanwhile, nanozymes have high stability, biocompatibility and reusability compared to other biocidal agents. Therefore nanozymes present a promising antibacterial alternative in the application of wound healing, caries prevention and marine antifouling.

Key words nanozymes, ROS, bacteria, antibiotic resistance, biofilm

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0462

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81671810) and The Basic Research Project of Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20161333).

**Corresponding author.

Tel: 86-514-87797090, E-mail: lzgao@yzu.edu.cn

Received: December 15, 2017 Accepted: January 18, 2018