

研究报告

羧基荧光素脂质体的制备及其与病原菌的响应行为

孙宁 倪赢 陈仕艳 王华平*

(东华大学纤维材料改性国家重点实验室 东华大学高性能纤维及制品教育部重点实验室 东华大学材料科学与工程
工程学院 上海 201620)

摘要:【背景】由于目前临床上检测细菌感染的方法既耗时又昂贵,所以开发快速简便的鉴别方法势在必行。【目的】通过在脂质体膜材料中添加不同的稳定剂,研究它们对于脂质体稳定性的影响,并探究荧光素脂质体与病原菌之间的响应情况。【方法】以磷脂酰胆碱和胆固醇为主要原料,1,2-棕榈酰磷脂酰甘油[1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol), DPPG]、十八胺和10,12-二十三二炔酸(10,12-Tricosadiyonic acid, TCDA)为稳定剂,采用薄膜分散-超声法制备羧基荧光素脂质体。利用病原菌能够分泌毒力因子造成脂质体渗漏的原理,将病原菌菌液和上清液分别与荧光素脂质体孵育,检测从脂质体渗漏的羧基荧光素的荧光强度,反映病原菌的毒性程度。【结果】DPPG和TCDA都能增加脂质体的稳定性,而十八胺的添加则导致脂质体稳定性的降低。与金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和铜绿假单胞菌 PAO1 菌液和上清液共同孵育的脂质体荧光强度大量增加,与大肠杆菌 DH5 α 和 PBS 缓冲液共同孵育的脂质体荧光强度几乎不变。【结论】能够分泌外毒素的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌都能对脂质体产生响应,而不分泌外毒素的大肠杆菌则不会对脂质体产生响应。

关键词: 羧基荧光素, 脂质体, 稳定剂, 金黄色葡萄球菌, 铜绿假单胞菌

Preparation of carboxyfluorescein liposomes and their response to pathogenic bacteria

SUN Ning NI Ying CHEN Shi-Yan WANG Hua-Ping*

(State Key Laboratory of Modification of Fiber Materials, Key Laboratory of High Performance Fibers and Products, Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: [Background] According to the clinical detection of wound infection is time-consuming and expensive, fast and convenient identification is imperative. [Objective] We investigated the stability of the liposomes by adding different components to the liposomal membranes, and their response to bacterial. [Methods] Liposome encapsulated carboxyfluorescein were prepared with phosphocholine (PC) as a main lipid constituent, cholesterol, 10,12-tricosadiyonic acid (TCDA),

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (51573024); Fundamental Research Funds for the Central Universities of China; Distinguished Young Professor Program of Donghua University

*Corresponding author: Tel: 86-21-67792950; E-mail: wanghp@dhu.edu.cn

Received: October 12, 2017; Accepted: January 24, 2018; Published online (www.cnki.net): March 22, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(51573024); 中央高校基本科研业务费专项资金; 东华大学励志人才计划

*通信作者: Tel: 86-21-67792950; E-mail: wanghp@dhu.edu.cn

收稿日期: 2017-10-12; 接受日期: 2018-01-24; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-22

1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG), octadecylamine as stabilizing agents by thin-film and rehydration method. The bacterial suspensions and respective supernatants were incubated with fluorescent liposome to obtain the fluorescence increments according to the interaction between toxins and liposomes. **[Results]** DPPG and TCDA increased the stability of the liposome, and octadecylamine decreased it. When incubated with bacterial suspensions and its supernatants of *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, the obvious increase of the fluorescence intensity was observed, while incubated with *Escherichia coli* DH5 α and PBS, the fluorescence intensity almost unchanged. **[Conclusion]** *S. aureus* and *P. aeruginosa* which release exotoxins can lyse liposomes but not by *E. coli*.

Keywords: Carboxyfluorescein, Liposome, Stabilizing agent, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

每年全球约有 40%–50% 的人死于由细菌感染导致的并发症, 如败血症、过敏性休克等, 细菌感染已经逐渐成为威胁人类健康的首要原因。目前临床上鉴定细菌感染的方法通常是使用棉签刮取伤口分泌物进行培养, 然后鉴别伤口处的细菌种类。这种方法不仅耗时(24–48 h), 而且受限于医务人员的专业知识与技能, 取样的不完全性也会导致诊断的不可靠性增加。已发展起来的分子生物检测技术如聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)和荧光原位杂交技术(Fluorescent *in situ* hybridization, FISH)等虽然提高了准确性, 但是由于仪器昂贵及繁琐的核酸提取过程等原因无法被大众使用。所以, 开发准确而又简单快速的细菌检测方法很有必要。

纳米技术的研究和发展给这种思路提供了可能。目前已经有多项研究通过细菌与纳米材料的特异性反应开发出准确、简单、快速的比色法用于检测病原菌的存在。通过简单的仪器, 如多功能酶标仪、分光光度计等检测颜色的改变或者是荧光效应的强弱就可以辨别伤口的感染程度。目前主要可用于细菌比色检测的纳米颗粒主要包括金纳米粒子^[1]、量子点^[2]、脂质体等^[3–4]。其中, 脂质体由于无毒性及生物相容性好, 可以包封多种亲油性或亲水性荧光染料, 并且同时能够靶向释放, 因而最有希望被应用在临床医疗中。

脂质体可以通过环境中的 pH、温度、光等条

件触发而释放内容物, 达到靶向释放的目的。目前脂质体主要应用在药物的靶向递送, 在伤口环境中用于受激释放的研究还很少。Zhou 等^[5]证明脂质体被金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌分泌的外毒素裂解, 这使其在刺激响应系统和微生物递送中具有潜在的应用前景。

为了制备稳定性良好的脂质体, 本文探讨了不同磷脂膜材料组成的脂质体在模拟伤口环境以及储存环境下的稳定性, 并且探究了脂质体对不同细菌的反应。

1 材料与方法

1.1 菌株、主要试剂和仪器

金黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 PAO1 和大肠杆菌 DH5 α 均来自本实验室。SPC (Soybean phosphatidylcholine, 95%)、DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、DPPG [1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)]和胆固醇(Cholesterol, CH)均购于上海艾韦特医药科技有限公司; TCDA (10,12-Tricosadiyonic acid) 和 5(6)-羧基荧光素购于美国 Sigma 公司; Sephadex-G50 凝胶购于北京 Biotopped 生物技术有限公司; 其他试剂均购于上海国药集团有限公司。

旋转蒸发仪, 德国艾卡仪器设备有限公司; 真空泵, 美国圣斯特有限公司; 探头式细胞粉碎机, 上海比朗仪器有限公司; 多功能酶标仪, 美国 Biotek

公司。

1.2 荧光素脂质体的制备

制备脂质体时,精密移取处方量的溶液于茄型瓶中,置于旋转蒸发器减压蒸发,使混合溶液在茄形瓶内壁形成均匀的薄膜,所得薄膜于真空烘箱中过夜以除去痕量的有机溶剂。将 5(6)-羧基荧光素溶于 PBS 溶液中配成 50 mmol/L 浓度的荧光素溶液,升高温度至 60 °C 水化 1 h。将脂质体混悬液转移至干净的试管中,于 100 W 条件下冰浴探头超声 10 min (超声 10 s, 停 20 s)。通过滤器来均一脂质体的粒径。用孔径为 0.45 μm 和 0.22 μm 的滤器分别过滤 3 次,得到粒径均一的脂质体。所得脂质体悬液在 Sephadex-G50 型凝胶柱中用 PBS 缓冲液洗脱。

1.3 脂质体的粒径及电位测定

脂质体的平均粒径和电势通过动态光散射 (Dynamic light scattering, DLS) 测定。将脂质体溶液稀释至 1 mmol/L 后移入比色皿中,室温下保持 1 min。测定粒径时,将装有荧光素脂质体的比色皿按要求插入卡槽中,盖上样品仓的保护盖。同时设定折射率为 1.333 和粘度为 1.020。每个样品平行测定 3 次,取平均值。测定电势时,将上述荧光素脂质体滴加到配有金电极的样品池 (DT1070) 中,使溶液没过金电极的上表面。按照指定方向插入卡槽中进行测定。每个样品平行测定 3 次,取平均值。

1.4 脂质体的稳定性研究

为了探讨脂质体在可能的使用环境与储存环境中的稳定性,将制备得到的脂质体分别置于 4、25 和 37 °C 放置 7 d, 7 d 后测定脂质体溶液的荧光值。引入稳定值 S 来表征脂质体的稳定性:

$$S = \frac{F_t - F_i}{F_f - F_i}$$

式中, F_f 是在加入 Triton X-100 裂解脂质体后的最大荧光值, F_t 是在脂质体存放 7 d 后的荧光值, F_i 是脂质体起始的荧光值。在本实验中默认 Triton

X-100 能够最大程度地裂解脂质体。

1.5 细菌培养及细菌与脂质体的响应

选取的细菌为金黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 PAO1 和大肠杆菌 DH5α。将保存于 -80 °C 的甘油菌用接种环蘸取少量于琼脂培养基中划线(其中金黄色葡萄球菌使用 TSB 培养基,铜绿假单胞菌和大肠杆菌使用 LB 培养基),于 37 °C 静置培养 48 h。用接种环刮取单菌落于 10 mL 相应的培养基中,37 °C、120 r/min 振荡培养 18 h。将培养 18 h 后的菌液 10 000 r/min 离心 10 min,小心移取上清液于灭菌试管中,用 0.22 μm 的滤器过滤除菌,置于 4 °C 备用;菌体沉淀用灭菌后的 PBS 缓冲液洗涤 3 次,并将所得到的菌液用 PBS 缓冲溶液稀释至 OD_{620} 为 0.1, 10 000 r/min 离心 10 min 后重悬于同体积液态培养基中。在菌液与脂质体的响应实验中,50 μL 脂质体(5 mmol/L)与 150 μL 细菌菌液混合均匀,移入 96 孔板中;在上清液与脂质体的响应实验中,脂质体(5 mmol/L)与细菌菌液各 100 μL 于 96 孔板中混合均匀,将 96 孔板置于多功能酶标仪中测定荧光强度。其中金黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 PAO1 的菌液和上清液以及 Triton X-100 作为阳性对照组,大肠杆菌 DH5α 和 PBS 缓冲液作为阴性对照组。每个样品重复 6 次,测平均值。

1.6 数据处理

采用 Origin 8.0 对实验数据进行分析。如无特殊说明,所有实验平行测定 3 次,结果以平均值±标准差来表示。

2 结果与分析

2.1 5(6)-羧基荧光素的浓度淬灭

5(6)-羧基荧光素在高浓度下会自聚形成二聚体,导致产生自淬灭的特性,使得其荧光强度大幅度减弱^[6]。从图 1 可以看出,当 5(6)-羧基荧光素溶液浓度为 50 mmol/L 以上时,荧光素的荧光基本被淬灭。因此,实验采用的荧光素浓度为 50 mmol/L。

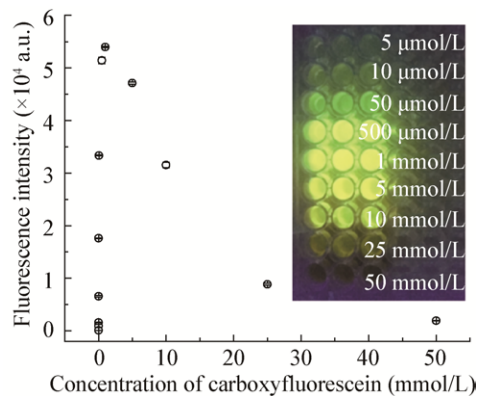


图1 5(6)-羧基荧光素的浓度淬灭特性
Figure 1 Concentration self-quenching of carboxyfluorescein

2.2 不同配方脂质体性质研究

通过测定在不同条件下脂质体储存 7 d 后的荧光强度, 定量说明材料在不同 pH (5.4、6.4、7.4) 和不同温度(4、25、37 °C)下的稳定性。脂质体中由于包封高浓度下自淬灭的羧基荧光素, 荧光强度微弱。一旦脂质体受外界条件影响变得不稳定, 羧基荧光素释放到周围环境中, 其浓度就会降低, 引起荧光强度的增加。

2.2.1 胆固醇含量对脂质体稳定性的影响

胆固醇广泛存在于哺乳动物细胞的细胞膜中, 是真核细胞膜的重要组成部分。胆固醇在真核细胞膜中所占的比例在 20%–50% 不等。它能够通过诱导脂质体膜中的“脂筏”区域产生“液体有序相”(处于凝胶相和液晶相之间的相态)调节脂质双层的流动性。在脂质膜中添加适量的胆固醇能够增加脂质膜的刚性。由图 2 可知, 由大豆卵磷脂为主要膜材的脂质体稳定性总体小于 DPPC 脂质体的稳定性, 归因于大豆卵磷脂的相变温度(<0 °C)低于 DPPC 的相变温度(约 41 °C)^[7], 在 37 °C 下 SPC 脂质体的脂质膜处于液体无序相, 内水相更容易通过脂质膜泄漏到外水相中。然而当胆固醇量增加至 50% 时, 脂质体膜的通透性以及膜的亲水性增加, 导致系统易被破坏, 使得稳定性降低。

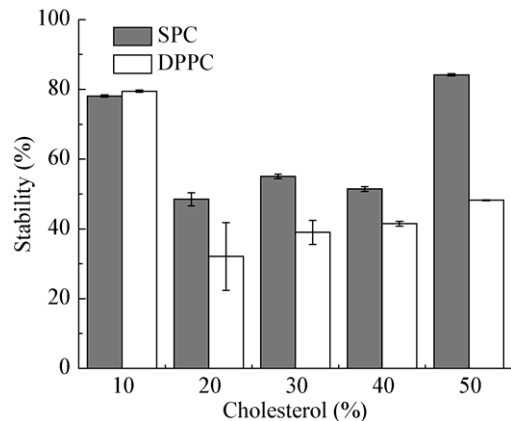


图2 胆固醇的添加量对荧光脂质体稳定性的影响
Figure 2 Effect of cholesterol on stability of liposomes

2.2.2 十八胺含量对脂质体稳定性的影响

影响脂质体间稳定性的另一主要因素是微粒的表面电势。如果脂质体的表面电势绝对值小于 15 mV, 脂质体间的静电排斥力较小, 会加速脂质体之间的聚集; 如果表面电势绝对值在 30 mV 以上时, 脂质体间距离较大, 不容易发生聚沉现象^[8]。然而, 在该类脂质体中, 虽然表面电势都大于 15 mV (约 22 ± 0.5 mV), 但在储存 7 d 后, 荧光泄漏量都大于 50% (图 3)。磷脂酰胆碱属于圆柱形脂质, 而十八胺作为稳定剂也是以“正锥型”插入到脂质膜中, 脂质之间通过“肩并肩”方式互相排列, 分子间排列不紧密。另外, 羧基荧光素呈现负电性, 氨基与羧基互相吸引造成径向的应力增大, 使得脂质体稳定性下降。

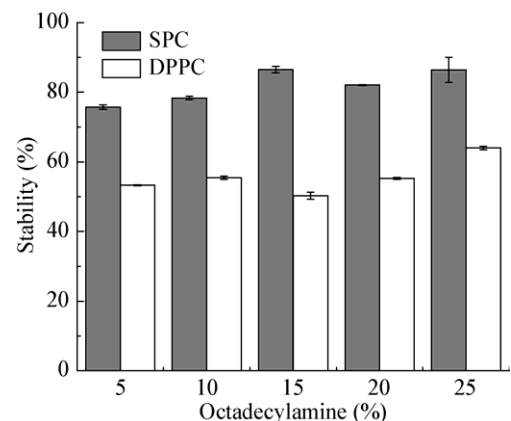


图3 十八胺的添加量对荧光脂质体稳定性的影响
Figure 3 Effect of octadecylamine on stability of liposomes

2.2.3 DPPG 含量对脂质体稳定性的影响

为了形成负电荷的脂质体, 通常选择在脂质体膜材料中添加磷脂酰甘油(Phosphatidylglycerole, PG)、磷脂酰磷脂酸(Phosphatidic acid, PA)和磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)等脂质。Alonso-Romanowski 等^[9]发现 DPPG 存在于甘油中, 在生物环境中可以加速聚集并提高脂质体的稳定性。DPPG 作为膜材料插入磷脂双分子层中时, 其带有负电荷的端基能够较均匀地分布在膜表面, 分子间的紧密结合会使系统的稳定性增高。如图 4 所示, DPPG 的添加量对 SPC 脂质体和 DPPC 脂质体的稳定性影响不大, 可见即使少量的 DPPG 插入磷脂双分子中也足以维持表面的负电荷, 达到稳定脂质体的目的。

2.2.4 TCDA 含量对脂质体稳定性的影响

TCDA 是一种两亲性脂质, 它能够通过紫外光作用自聚合成脂质体, 并且在肉眼观察下会发生蓝色-红色的颜色变化。已经有很多学者据此来研究

PDA 脂质体用于检测细菌^[3]。另有研究表明^[10], 在低温下储存一段时间的 TCDA 脂质体, 其脂质膜中的液体有序相会转变为凝胶相, 从而使 TCDA 分子链能够以完全伸展的状态紧密排列在“脂筏”中, 有助于 TCDA 分子链的侧向交联, 限制了膜内外离子的相互渗透。由图 5 可知, TCDA 含量在 25% 时, 脂质体的荧光泄漏量最小(约 25%), 这和文献[11]的报道几乎一致, 而且 25% TCDA 含量的脂质体也同时被证明能够对细菌做出最大的响应。

2.3 不同储存环境下脂质体的稳定性

荧光脂质体在不同温度下的荧光泄漏率如表 1 所示。从表 1 可知, 荧光脂质体在低温下储存时稳定性都很高, 这主要归因于较低的温度导致膜中“脂筏”区域呈现凝胶相, 限制了内外水相之间的离子渗透, 从而提高了脂质体的稳定性; 但随着储存温度的升高, 脂质体的荧光泄漏率也逐渐升高。

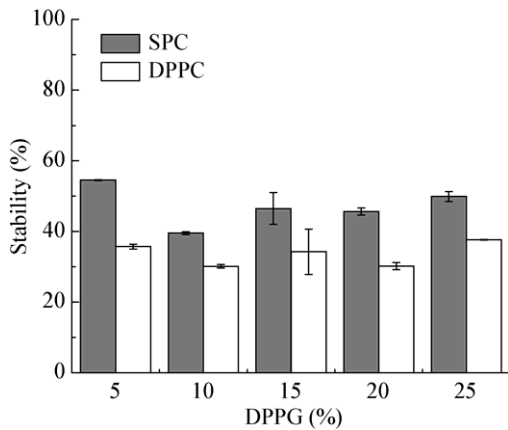


图 4 DPPG 的添加量对荧光脂质体稳定性的影响
Figure 4 Effect of DPPG on stability of liposomes

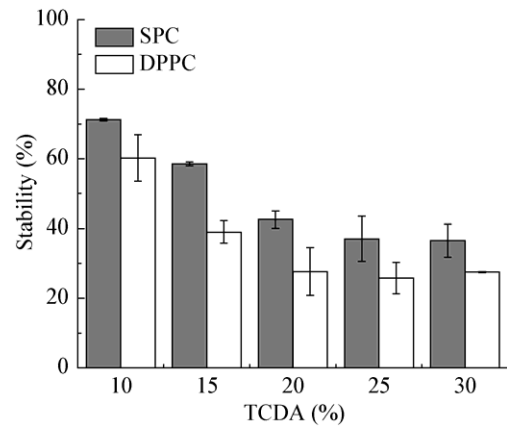


图 5 TCDA 的添加量对荧光脂质体稳定性的影响
Figure 5 Effect of TCDA on stability of liposomes

表 1 不同配方荧光脂质体在不同储存环境中的稳定性

Table 1 Stability of different types of liposomes in different storage situation

样品名称 Sample names	4 °C	25 °C	37 °C	37 °C LB	37 °C TSB
A	0.083±0.001	0.247±0.046	0.321±0.013	0.336±0.061	0.345±0.041
B	0.171±0.042	0.541±0.069	0.554±0.003	0.707±0.017	0.689±0.103
C	0.077±0.023	0.243±0.046	0.30±0.051	0.352±0.019	0.334±0.061
D	0.059±0.004	0.201±0.036	0.258±0.045	0.276±0.036	0.296±0.041
E	0.053±0.003	0.186±0.006	0.226±0.036	0.231±0.049	0.255±0.017

Note: A: DPPC:CH=8:2; B: DPPC:CH:ODA=7:2:1; C: DPPC:CH:DPPG=7:2:1; D: DPPC:CH:TCDA=5.5:2:2.5; E: DPPC:CH:TCDA:DPPG=4.5:2:2.5:1.

2.4 脂质体的粒径及电势

荧光素脂质体的外部介质为 PBS 缓冲溶液, 所以用 PBS 缓冲溶液稀释荧光素脂质体至合适浓度, 然后用 Malvin 粒径仪进行平均粒径及分布测定, 结果见图 6, 脂质体的平均粒径分布较均匀, 粒径分别为 76.41 ± 10.66 、 104.61 ± 21.58 、 149.3 ± 12.00 和 87.35 ± 5.45 nm, 分布较窄。

将荧光素脂质体稀释一定倍数测定脂质体的 Zeta 电位。测定参数为 He-Ne 激光, 测定角度为 90° , 温度为室温, 电场强度为 2 V/cm , 其中以胆固醇和 TCDA 为主要稳定剂的脂质体电势为 $-7.23 \pm 1.32 \text{ mV}$ 和 $-4.17 \pm 0.19 \text{ mV}$, 主要是因为羧基荧光素在中性条件下显示负电荷^[12], 所以脂质体整体的电势呈负电。添加了十八胺的脂质体由于十八

胺的正电性所以电势为 $22.03 \pm 1.31 \text{ mV}$, 而添加了负电荷磷脂 DPPG 的脂质体电势为 $-25.40 \pm 0.70 \text{ mV}$ 。

2.5 细菌与脂质体之间的响应

2.5.1 血琼脂板鉴定细菌毒性

大量研究显示, 在慢性伤口类疾病中, 皮肤破损处存在大量病原菌, 尤其以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌为主。这些病原菌通过分泌外毒素(如溶血素、脂酶等)导致细胞坏死或凋亡, 摧毁人体的免疫系统^[13-14]。脂质体也是由磷脂双分子层组成, 与人体细胞膜有着极其类似的结构。若细菌分泌的毒力因子能够裂解脂质体膜, 则能间接说明该细菌的致病性。为了验证所选取的细菌能够分泌相关的毒力因子, 将细菌菌液接种在哥伦比亚血琼脂板上, 观察溶菌环的形成情况。

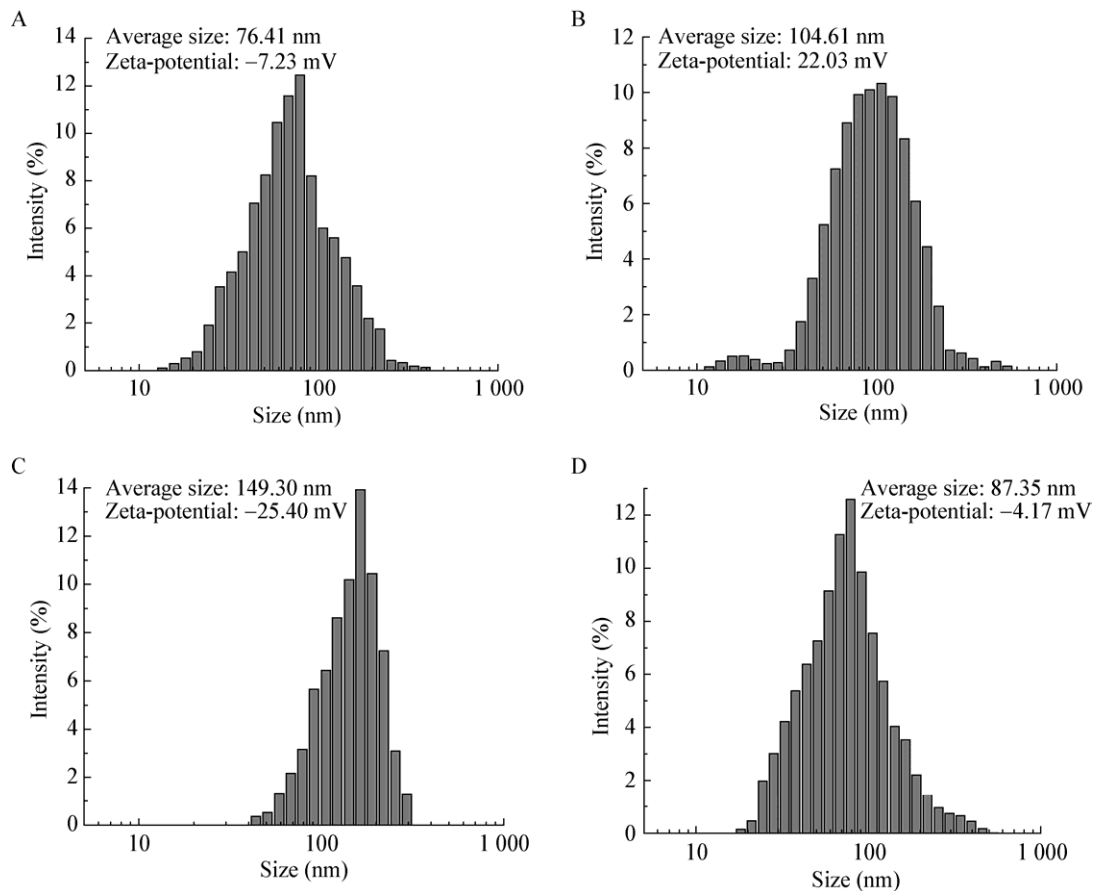


图 6 不同配方脂质体的粒径分布及电势

Figure 6 Size and zeta-potential measurement of types of liposomes

从图 7 可以看到, 金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌都能在血琼脂板上形成清晰的溶血环, 证明该菌能够分泌使细胞裂解的毒力因子。事实上, 大部分金黄色葡萄球菌都会分泌不同类型的外毒素, 其中包括溶血素家族(α , β , γ)、白细胞介素和表皮剥落毒素等。这些毒素通过在细胞膜表面致孔来破坏膜的完整性, 从而达到裂解细胞膜的目的。铜绿假单胞菌能够分泌磷脂酶和鼠李糖脂, 磷脂酶能够水解磷脂头组, 而鼠李糖脂作为两亲性的糖脂可以起到表面活性剂的作用。大肠杆菌 DH5 α 作为阴性对照组不会分泌毒力因子, 因此在血琼脂平板上不会产生溶血环。

2.5.2 细菌毒素与脂质体之间的响应

为了研究脂质体对细菌的毒性反应, 将脂质体与一定浓度(通过滴板计数法测定)的细菌置于 96 孔板中孵育。结果如图 8 所示, 随着细菌浓度的增加, 细菌分泌的毒力因子通过物理作用(膜表面致孔)或化学作用(降解磷脂头组), 使包封在脂质体内部的高浓度荧光素泄漏到周围环境中, 从而使荧



图 7 不同细菌在血琼脂板上的反应

Figure 7 Response between bacterials and blood agar plate

注: 铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌分泌出的外毒素能够裂解血红细胞, 但是大肠杆菌并无明显反应。

Note: Exotoxins of *P. aeruginosa* and *S. aureus* lyse haemoglobin, but not by *E. coli*.

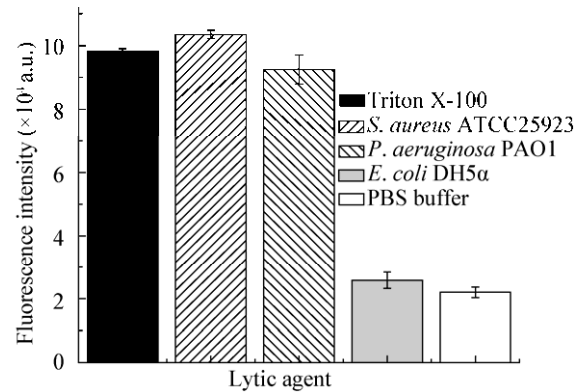


图 8 细菌上清液与脂质体共孵育后的荧光强度(120 min)
Figure 8 Fluorescent response of liposomes after incubated with relative lytic agent (120 min)

光素发出强烈的荧光。通过多功能酶标仪连续测定荧光强度在 20 h (细菌达到生长稳定期)中的增加量, 可以鉴别出细菌与脂质体之间的响应程度。

细菌的生长阶段主要分为迟缓期、指数期、稳定期和衰亡期。细菌特定基因的表达会发生在细菌的不同生长阶段。Laabei 等^[15-16]研究表明, 金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌对脂质体的响应主要发生在细菌生长的稳定期初期, 这一时期细菌生长到一定数量级, 导致群体感应系统(Quorum sensing, QS)的触发, 从而引起一些特定基因在细菌群体中的协同表达。在摇床中培养 18 h 的细菌菌液中含有大量的细菌代谢产物, 将脂质体与细菌上清液混合可以在较短时间内就观察到脂质体与细菌毒力因子的反应结果。图 8 是将细菌上清液和脂质体 1:1 (体积比)混合后于 37 °C 中静置 120 min 得到的荧光增量。由图 8 可知, 金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌上清液对于脂质体的响应程度甚至超过了 Triton X-100 破乳后的荧光强度, 说明细菌分泌的外毒素对脂质体的破坏程度超过了 Triton X-100;而在 PBS 缓冲液和大肠杆菌 DH5 α 的细菌上清液中, 荧光强度增加量很少, 证明脂质体对于不分泌外毒素的系统是不发生裂解反应的。

为了研究脂质体与细菌的反应动力学, 将脂质体与细菌-培养基一起孵育, 观察系统的荧光增量。由图 9 可知, 脂质体在金黄色葡萄球菌 ATCC25923

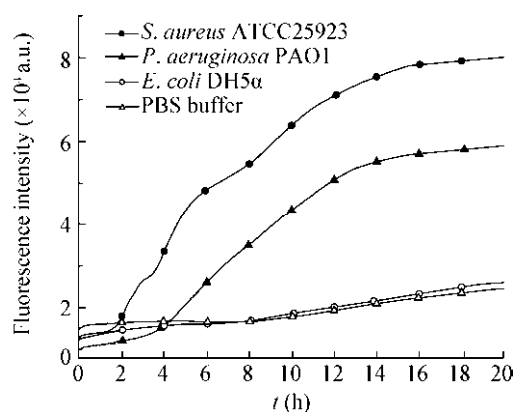


图 9 不同细菌与脂质体共孵育 20 h 荧光强度的变化曲线

Figure 9 The intensity of fluorescence for different bacteria incubated with liposomes for 20 h

和铜绿假单胞菌 PAO1 中孵育 20 h 后, 荧光强度大约增加了 6 倍, 与 Triton X-100 破乳后的荧光强度相当。同时观察到荧光强度从 4 h 左右增加, 对应于细菌生长的对数期初期, 这与文献给出的时间段不一致^[15-16], 估计是由于本实验中接种的起始细菌浓度较大(约为 1.5×10^8 CFU/mL), 所以细菌毒素的协同表达发生时间提前。

3 结论

本文通过在脂质体膜材中掺入不同的稳定剂研究了荧光脂质体的储存稳定性, 并得到了制备稳定性较高脂质体的制备条件(DPPC:CH:TCDA:DPPG=4.5:2:2.5:1, 体积比)。将该脂质体与代表性细菌进行响应性研究的结果表明, 当该脂质体与分泌毒素的金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和铜绿假单胞菌 PAO1 共同孵育时, 脂质体破裂, 荧光强度大幅度增加, 具有很好的响应性; 对不分泌毒素的大肠杆菌 DH5α, 脂质体荧光与在 PBS 缓冲液中相比没有明显的变化。这说明该脂质体在预测伤口病原菌方面具有潜在的应用价值, 不同菌株的普适性、菌株数量及浓度的相关性研究正在进行。

REFERENCES

[1] Chen JH, Jackson AA, Rotello VM, et al. Colorimetric detection of *Escherichia coli* based on the enzyme-induced metallization of gold nanorods[J]. Small, 2016, 12(18): 2469-2475

[2] Bhattacharya S, Nandi S, Jelinek R. Carbon-dot-hydrogel for enzyme-mediated bacterial detection[J]. RSC Advances, 2017, 7(2): 588-594

[3] Park J, Ku SK, Seo D, et al. Label-free bacterial detection using polydiacetylene liposomes[J]. Chemical Communications, 2016, 52(68): 10346-10349

[4] Haas S, Hain N, Raoufi M, et al. Enzyme degradable polymersomes from hyaluronic acid-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymers for the detection of enzymes of pathogenic bacteria[J]. Biomacromolecules, 2015, 16(3): 832-841

[5] Zhou J, Loftus AL, Mulley G, et al. A thin film detection/response system for pathogenic bacteria[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(18): 6566-6570

[6] Chen RF, Knutson JR. Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers[J]. Analytical Biochemistry, 1988, 172(1): 61-77

[7] Chen CJ, Han DD, Cai CF, et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential[J]. Journal of Controlled Release, 2010, 142(3): 299-311

[8] Liu H, Tang R, He XX, et al. Effects of liposomes formulation and preparation method on the stability of acyclovir palmitate liposomes[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(7): 563-566 (in Chinese)
刘辉, 汤韧, 何晓霞, 等. 脂质体处方和制备方法对阿昔洛韦棕榈酸酯脂质体稳定性的影响[J]. 药学报, 2002, 37(7): 563-566

[9] Alonso-Romanowski S, Biondi AC, Disalvo EA. Effect of carbohydrates and glycerol on the stability and surface properties of lyophilized liposomes[J]. Journal of Membrane Biology, 1989, 108(1): 1-11

[10] Kolusheva S, Shahal T, Jelinek R. Peptide-membrane interactions studied by a new phospholipid/polydiacetylene colorimetric vesicle assay[J]. Biochemistry, 2000, 39(51): 15851-15859

[11] Zhou J, Tun TN, Hong SH, et al. Development of a prototype wound dressing technology which can detect and report colonization by pathogenic bacteria[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 30(1): 67-72

[12] Maherani B, Arab-Tehrany E, Kheiroolmoom A, et al. Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design[J]. Analyst, 2012, 137(3): 773-786

[13] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13(1): 16-34

[14] Liu PV. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Infectious Diseases, 1974, 130(S1): S94-S99

[15] Laabei M, Jamieson WD, Lewis SE, et al. A new assay for rhamnolipid detection — important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(16): 7199-7209

[16] Laabei M, Jamieson WD, Massey RC, et al. *Staphylococcus aureus* interaction with phospholipid vesicles—a new method to accurately determine accessory gene regulator (*agr*) activity[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87270