

文章编号: 1008-9357(2025)05-0420-10

DOI: 10.14133/j.cnki.1008-9357.20250428001

季铵盐阳离子聚合物对耐甲氧西林与敏感金黄色葡萄球菌的抗菌选择性

黄睿^{1,2}, 刘治国¹, 钟柳¹, 饶静一²

(1. 西华大学理学院, 成都 610039; 2. 华中科技大学化学与化工学院, 武汉 430074)

摘要: 通过可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合和烷基化反应制备了季铵化聚二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯(PQDMA), 并系统评估其抗菌活性、生物被膜清除性能以及血液、细胞相容性。季铵盐阳离子聚合物 PQDMA 展现出区别于阳离子抗生素庆大霉素的抗菌选择性: 相较于普通金黄色葡萄球菌(*S. aureus*), PQDMA 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)具有更强的膜极化效应, 并对 MRSA 生物被膜具有更强的渗透性。这种反常的抗菌选择性可能源于 MRSA 耐药相关的膜结构重塑, 增强了阳离子聚合物与细菌细胞膜的结合亲和力。

关键词: 季铵化聚二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 选择性杀菌; 杀菌机理; 生物相容性

中图分类号: O63

文献标志码: A

Antibacterial Selectivity of Quaternary Ammonium Cationic Polymers against Methicillin-Resistant and Susceptible *S. aureus*

HUANG Rui^{1,2}, LIU Zhiguo¹, ZHONG Liu¹, RAO Jingyi²

(1. School of Science, Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Quaternized poly(dimethylaminoethyl methacrylate) (PQDMA) was synthesized via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization and alkylation reactions. Its antibacterial activity, biofilm clearance capacity, hemocompatibility, and cytocompatibility were systematically evaluated. The results revealed that PQDMA, a quaternary ammonium cationic polymer, exhibited antibacterial selectivity distinct from the cationic antibiotic gentamicin. The minimum bactericidal concentration (MBC) of PQDMA against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was reduced to 16 $\mu\text{g/mL}$, a quarter of that against wild-type *S. aureus* (64 $\mu\text{g/mL}$). PQDMA also showed stronger membrane depolarization effects and superior permeability against MRSA biofilms. This paradoxical selectivity may stem from MRSA's membrane structural remodeling during resistance development, which potentially enhances the binding affinity between the cationic polymer and the bacterial membrane. Furthermore, PQDMA demonstrated excellent biocompatibility: its minimum

收稿日期: 2025-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(52473132)

作者简介: 黄睿(2002—), 女, 四川泸州人, 硕士生, 主要研究方向为生物医用材料。E-mail: 204674368@qq.com

通信联系人: 钟柳, E-mail: zhongl@xhu.edu.cn; 饶静一, E-mail: jrao@hust.edu.cn

引用格式: 黄睿, 刘治国, 钟柳, 饶静一. 季铵盐阳离子聚合物对耐甲氧西林与敏感金黄色葡萄球菌的抗菌选择性 [J]. 功能高分子学报, 2025, 38(5): 420-429.

Citation: HUANG Rui, LIU Zhiguo, ZHONG Liu, RAO Jingyi. Antibacterial Selectivity of Quaternary Ammonium Cationic Polymers against Methicillin-Resistant and Susceptible *S. aureus* [J]. Journal of Functional Polymers, 2025, 38(5): 420-429.

concentration causing 10% hemolysis (HC₁₀) exceeded 1 024 µg/mL, and its half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was 128 µg/mL, indicating favorable hemocompatibility and cytocompatibility within its effective bactericidal range. This study offers novel insights for developing cationic polymer materials with structural targeting for antibiotic-resistant bacteria.

Key words: quaternized poly(dimethylaminoethyl methacrylate); MRSA; selective bactericidal activity; bactericidal mechanism; biocompatibility

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是临床常见的耐药菌株之一,常引发术后感染,具有传播快、毒力强、耐药谱广等特点^[1-5]。普通的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)在健康个体中多以共生状态存在,广泛定植于皮肤、鼻腔及消化道等部位^[6,7]。*S. aureus*作为条件致病菌虽然具有致病潜力,但可通过“占位保护效应”抑制其他高毒力病原菌的定植,且对生物机体免疫发育和皮肤屏障维持等过程具有重要的生态意义^[8]。在新型抗菌材料设计中,如果能实现对MRSA的精准识别与清除,就有利于降低菌群失衡和继发感染风险^[9]。

阳离子抗菌聚合物通过扰乱细胞膜实现杀菌,不依赖特定靶点,因此不易诱导细菌产生耐药性^[10-13]。然而,阳离子抗菌聚合物的非特异性破膜杀菌特性使其难以区分普通细菌与耐药菌,易破坏正常菌群,甚至诱发炎症反应^[14]。阳离子聚合物具有优异的结构调控潜力,通过电荷与疏水基团结构,有望实现对耐药菌膜结构的“界面匹配”,为提升其抗耐药菌选择性、突破传统非特异性杀菌机制提供新思路^[15-18]。

本文基于活性聚合反应制备了季铵化聚二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯(PQDMA),结果表明其对耐药菌MRSA的抗菌活性显著优于普通*S. aureus*。这一反常趋势与传统阳离子抗生素(如庆大霉素)对MRSA抗菌活性显著下降的经典耐药模式相反^[19],表明PQDMA的作用机制可能不仅限于非特异性静电作用,还可能与MRSA特有的膜结构或细胞壁成分存在更强的界面耦合或作用稳定性有关。进一步通过膜电位检测、膜通透性变化及细胞染色实验,验证了PQDMA在与MRSA作用时可诱导更剧烈的膜极化作用。本研究旨在系统探讨PQDMA对耐药菌株MRSA的抗菌机制与生物被膜渗透能力,揭示其与耐药细菌膜结构耦合的潜在作用模式,并评估其靶向耐药菌感染治疗中的应用前景,为高选择性抗耐药菌聚合物的结构设计与功能优化提供理论基础和借鉴。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMA)、4-氰基-4'-(十二烷基硫烷基硫羰基)戊酸(CDTPA)、偶氮二异丁腈(AIBN)、碘甲烷、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、结晶紫、戊二醛、硫酸庆大霉素(Gent)、2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)、1,4-二氧六环、四氢呋喃(THF)、二氯甲烷、正己烷、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、乙醚、甲醇、乙腈、无水乙醇、叔丁醇:北京伊诺凯科技有限公司;3,3'-二丙基硫杂二羰花青碘化物(DiSC₃(5)):上海懋康生物科技有限公司;碘硝基氯化四氮唑(INT):大连美仑生物科技有限公司;碘化丙啶(PI)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、DMEM高糖培养基:赛默飞世尔科技有限公司;胰蛋白胨大豆琼脂(TSA):杭州百思生物技术有限公司;胰酪大豆胨液体培养基(TSB):广东中山百微生物技术有限公司;水解酪蛋白肉汤(MHB):青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;活/死细菌染色试剂盒(SYTO9/PI):上海阿拉丁试剂有限公司;CCK-8细胞计数试剂盒:上海碧云天生物有限公司;三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒:美国MCE生物科技有限公司;绵羊血红细胞:广州鸿泉生物科技有限公司;*S. aureus*(ATCC 6538)、MRSA(ATCC 43300)、大肠杆菌(*E. coli*, ATCC 25922)、耐药大肠杆菌(*ESBL-E. coli*, ATCC 35218)和小鼠胚胎成纤维细胞(3T3):上海迈威生物科技有限公司。所有化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与表征

核磁共振氢谱(¹H-NMR):采用德国Bruker公司Avance III型核磁共振波谱仪,400 MHz,氘代氯仿(CDCl₃)和重水(D₂O)为溶剂;凝胶渗透色谱(GPC):采用美国Agilent公司Agilent 1260型凝胶渗透色谱仪,以聚苯乙烯作为标样,流动相为THF;多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司FlexStation 3型);荧光分光光度计(日本岛津公司RF-6000型);扫描电子显微镜(SEM,日本日立公司SU8010型);生物荧光显微镜(广州浩康生物

科技有限公司 HF3000 型)。

1.3 实验步骤

1.3.1 PQDMA 的合成 在 20 mL 聚合管中依次加入 DMA(1.009 g, 6.36 mmol)、AIBN(2.1 mg, 0.0127 mmol)、CDTPA(51.8 mg, 0.127 mmol)和 1, 4-二氧六环(1 mL), 进行 3 次冻融循环后封闭聚合管, 在 70 °C 下搅拌反应 24 h。反应完成后, 加入少量二氯甲烷进行稀释, 并在正己烷中沉淀, 离心去除上清液后, 沉淀物用二氯甲烷溶解后再次沉淀, 重复此操作 3 次。将最终沉淀置于 40 °C 的真空干燥箱中干燥 24 h, 得到聚甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(PDMA)均聚物。随后, 在圆底烧瓶中依次加入 PDMA(402 mg, 2.5 mmol)、碘甲烷(800 μ L, 12.7 mmol)和 DMF(5 mL), 室温避光反应 48 h。反应完成后, 将溶液在乙醚中进行沉淀, 离心去除上清液后, 沉淀物用甲醇与乙腈的混合液(甲醇与乙腈的体积比 1:1)溶解, 再次沉淀, 重复操作 3 次。将最终沉淀溶解于去离子水中, 随后在 0.1 mol/L NaCl 溶液中透析(截留分子量(MWCO)为 3000)以置换反离子为氯离子, 接着用去离子水透析去除小分子盐。最后, 将透析后的溶液冻干, 得到聚合物 PQDMA。

1.3.2 最低杀菌浓度(MBC)测试 取 10 μ L 细菌冻存液于 10 mL TSB 中, 置于 37 °C 水培箱中孵育 16 h。用 MHB 将细菌稀释至 2×10^6 CFU/mL, 随后采用等倍稀释的方法用 MHB 配制质量浓度为 0.125~256 μ g/mL 的 PQDMA 与 Gent 溶液。分别取 100 μ L 细菌溶液和 100 μ L 不同浓度的聚合物或抗生素溶液于 96 孔板中, 轻轻吹打混匀, 同时设置阳性对照(100 μ L 菌液与 100 μ L MHB)和阴性对照(200 μ L MHB), 每组设置 3 个平行样。将 96 孔板放置于 37 °C 水培箱孵育 24 h 后, 从每个孔中各取 10 μ L 用 MHB 稀释 10 倍后均匀涂布到 TSA 板上, 涂布完成后将 TSA 板置于 37 °C 水培箱培养 24 h, 然后观察菌落形成情况, 将实现活菌数量对数减少值不小于 9 的最低聚合物或抗生素浓度定为最低杀菌浓度(MBC)。

1.3.3 溶血测试 取 4 mL 无菌绵羊红细胞, 离心(1500 r/min, 3 min)去除上清液, 加入等量 PBS 洗涤 3 次后, 将浓缩后的红细胞重悬到 200 μ L PBS 中待用。用 PBS 将质量浓度为 10 mg/mL 的 PQDMA 溶液分别稀释到 256、512、1024 μ g/mL。随后, 将 490 μ L 待测溶液与 10 μ L 红细胞悬液混合均匀, 同时设置阳性对照组(490 μ L 去离子水与 10 μ L 红细胞悬液)与阴性对照组(490 μ L PBS 与 10 μ L 红细胞悬液), 混匀后室温放置 2 h 后离心(1500 r/min, 3 min), 取 100 μ L 上清液于 96 孔板中, 用酶标仪测定每孔在 540 nm 波长下的吸光度(OD₅₄₀)。通过公式(1)计算溶血率(Hemolysis), 并进一步确定 HC₁₀ 值(致使 10% 绵羊红细胞裂解所需聚合物的最低质量浓度)。

$$\text{Hemolysis} = \frac{\text{OD}_{540}(\text{sample}) - \text{OD}_{540}(\text{negative control})}{\text{OD}_{540}(\text{positive control}) - \text{OD}_{540}(\text{negative control})} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 细胞毒性测试 将小鼠胚胎成纤维细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种至 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L DMEM 培养基, 置于培养箱孵育过夜。随后, 用 DMEM 培养基将 10 mg/mL 的 PQDMA 溶液分别稀释到 64、128、256 μ g/mL。去除 96 孔板中原有培养基, 加入 100 μ L 待测溶液, 同时设置阳性对照组(接种细胞, 100 μ L DMEM)和阴性对照组(未接种细胞, 100 μ L DMEM)。孵育 24 h 后, 去除孔内溶液, 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入用 DMEM 培养基新鲜配制的体积分数为 10% 的 CCK-8 溶液, 孵育 1~2 h。用酶标仪在 450 nm 波长下测定每孔的吸光度(OD₄₅₀)。通过公式(2)计算细胞存活率(Cell viability), 并进一步确定 IC₅₀ 值(抑制半数 3T3 细胞增殖所需聚合物的最低质量浓度)。

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{OD}_{450}(\text{sample}) - \text{OD}_{450}(\text{negative control})}{\text{OD}_{450}(\text{positive control}) - \text{OD}_{450}(\text{negative control})} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.5 膜电位去极化实验 使用 DiSC₃(5) 进行 PQDMA 与 Gent 的膜电位去极化实验。取复苏后的 *S. aureus* 和 MRSA 各 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 离心去除上清液, 用 PBS 洗涤 2 次, 再用 200 μ L HEPES 缓冲液重悬待用。随后依次加入细菌悬液、DiSC₃(5)(1 μ mol/L)、质量浓度为 0.5MBC~2MBC 的聚合物或抗生素溶液, 分别以 625、670 nm 为激发波长和发射波长, 测定加入聚合物或抗生素 120 s 后的荧光强度, 以仅含 HEPES 缓冲液的菌悬液(10^8 CFU/mL)作为阴性对照, 通过计算实验组与阴性对照组的荧光强度变化率, 评估不同质量浓度 PQDMA 与 Gent 对细菌膜电位的影响。

1.3.6 膜完整性实验 将细菌悬液与质量浓度为 0.5MBC~2MBC 的聚合物或抗生素溶液共孵育 20 min 后, 加入 PI 染料(10 μ g/mL), 分别以 535、635 nm 为激发波长和发射波长测定 PI 染色 60 s 后的荧光强度, 以仅含

HEPES 缓冲液的菌悬液(10^8 CFU/mL)作为阴性对照,通过计算实验组与阴性对照组的荧光强度变化率,评估不同质量浓度 PQDMA 与 Gent 对细菌膜完整性的影响。

1.3.7 内膜呼吸链活性 分别取 *S. aureus* 和 MRSA 细菌悬液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中,离心去除上清液,用 PBS 洗涤 2 次后,加入 1 mL PBS 重悬待用。用 PBS 配制质量浓度为 0.5MBC~2MBC 的 PQDMA 和 Gent 溶液,向 96 孔板中依次加入细菌悬液、聚合物或抗生素溶液以及 INT 染料(1 mmol/L),以不加任何聚合物或抗生素的菌悬液(10^8 CFU/mL)为对照,每组设置 3 个平行样,在 37 °C 水培箱中孵育 60 min 后,于 492 nm 波长下测定各孔的吸光度(OD_{492}),计算实验组孵育 60 min 后的 OD 变化值(ΔOD)相对于对照组的倍数变化值,以此评价不同质量浓度 PQDMA 与 Gent 对细菌代谢活性的抑制效果。

1.3.8 胞内活性氧(ROS)含量变化 将细菌悬液与质量浓度为 0.5MBC~2MBC 的 PQDMA 或 Gent 溶液及 DCFH-DA 探针(10 μ mol/L)混合后,于 37 °C 条件下共孵育 1 h。随后以 488 nm 为激发波长,测定 450~600 nm 范围内的荧光发射强度。以不含药物、仅含 HEPES 缓冲液的细菌悬液(10^8 CFU/mL)作为阴性对照,通过计算实验组最大荧光强度相对于对照组的倍数变化值,评估不同质量浓度 PQDMA 与 Gent 对细菌胞内 ROS 含量的影响。

1.3.9 胞内 ATP 含量变化 将细菌悬液与质量浓度为 0.5MBC~2MBC 的 PQDMA 或对照抗生素 Gent 溶液在 37 °C 条件下孵育 1 h,随后加入裂解液裂解细胞。离心 5 min(12000 r/min),取上清液作为待测样品。向 96 孔板中分别加入 100 μ L ATP 检测工作液与 100 μ L 待测上清液,轻柔混匀后使用多功能酶标仪测定发光强度。以未添加聚合物或抗生素处理的细菌悬液(10^8 CFU/mL)为阴性对照,每组设 3 个平行样,通过计算实验组相对于对照组的发光强度倍数变化值,评估不同质量浓度 PQDMA 与 Gent 对细菌胞内 ATP 含量的影响。

1.3.10 扫描电子显微镜 将等体积的质量浓度为 4MBC 的 PQDMA 或 Gent 溶液与 10^8 CFU/mL 的 *S. aureus* 或 MRSA 细菌悬液混合均匀后置于 37 °C 水培箱中共孵育 24 h,同时设置 10^8 CFU/mL 的 *S. aureus* 或 MRSA 细菌悬液为对照。孵育结束后离心除去上清液,加入体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液在 4 °C 下固定过夜。随后离心除去戊二醛,依次加入体积分数为 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇溶液以及叔丁醇进行脱水处理,将样品加到硅片上,在室温条件下进行真空干燥,利用 SEM 观察细菌的微观形貌。

1.3.11 活/死细菌荧光染色 将等体积的质量浓度为 4MBC 的 PQDMA 或 Gent 溶液与 10^8 CFU/mL 的 *S. aureus* 或 MRSA 细菌悬液于 37 °C 水培箱中共孵育 24 h,同时设置 10^8 CFU/mL 的 *S. aureus* 或 MRSA 细菌悬液为对照。孵育结束后离心去除上清液,用 PBS 洗涤菌体后待用。将菌液与 SYTO9/PI 混合染料避光共孵育 20 min 后,利用荧光显微镜观察细菌存活情况。

1.3.12 生物被膜清除 将复苏后的 *S. aureus* 和 MRSA 用 TSB 稀释至 10^7 CFU/mL,取 200 μ L 细菌悬液于 96 孔板中,在 37 °C 水培箱中孵育 3 d,每 24 h 更换 1 次新鲜 TSB。待生物被膜养成后,去除上层 TSB,用无菌 PBS 洗 2~3 次以去除浮游细菌。随后向培养好的生物被膜加入质量浓度为 8~128 μ g/mL 的 PQDMA 溶液,置于 37 °C 水培箱中共孵育 24 h,每组 3 个平行样。孵育结束后去除上清液,用无菌 PBS 清洗 1~2 次以去除浮游细菌,随后每孔加入 200 μ L 体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液固定 1 h。固定结束后,去除戊二醛溶液,加入 200 μ L 质量分数为 0.1% 的结晶紫溶液染色 30 min,待染色完成后去除结晶紫溶液,水洗 2~3 次后拍摄生物被膜的照片。随后,每孔加入 200 μ L 体积分数为 90% 的乙醇溶液,孵育 1 h 后,测定 600 nm 波长下各孔的吸光度(OD_{600})。通过公式(3)计算生物被膜的剩余生物量(Biomass)。

$$\text{Biomass} = \frac{OD_{600}(\text{sample}) - OD_{600}(\text{negative control})}{OD_{600}(\text{positive control}) - OD_{600}(\text{negative control})} \times 100\% \quad (3)$$

采用上述方法培养 *S. aureus* 和 MRSA 的生物被膜,加入质量浓度为 8~128 μ g/mL 的 PQDMA 溶液,同时设置阳性对照组(仅加入 200 μ L MHB 培养基,不含 PQDMA),置于 37 °C 水培箱中孵育 24 h。孵育完成后,去除上清液,用无菌 PBS 洗涤 2~3 次后,加入 200 μ L PBS 超声 15 min 以分散溶液。用 PBS 稀释 10^4 倍后,吸取 100 μ L 均匀涂布到 TSA 板上,在 37 °C 水培箱中孵育 24 h 后,对 TSA 板上的菌落数量进行统计。

1.3.13 统计学分析 统计数据以平均值 \pm 标准差表示。所有数据均为至少 3 次独立重复实验的平均值,组间统计学差异的显著性采用非配对 t 检验和单因素方差分析进行评估。统计学显著性差异定义为:** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;无统计学显著性差异则标记为 n.s.。

2 结果与讨论

2.1 PQDMA 的合成与结构表征

通过可逆加成-断裂链转移(RAFT)聚合方法^[20],以 CDTPA 为链转移剂合成了 PDMA 均聚物。GPC 测试结果显示,所得 PDMA 的数均分子量(M_n)为 5000,分子量分布(D)为 1.32,表明该反应具有良好的可控聚合特征(表 1)。随后,PDMA 经与碘甲烷的季铵化反应,生成目标聚合物 PQDMA。¹H-NMR 谱图(图 1)验证了季铵化反应的成功:与叔胺基团连接的 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ 对应的 c、d 特征峰分别从化学位移 4.08 和 2.58 移动至 4.40 和 3.72;而叔胺上甲基($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, e)峰则从 2.30 向低场移动至 3.16。通过特征峰的积分面积计算,其季铵化程度超过 99%,证实了 PQDMA 均聚物的成功制备。

表 1 PQDMA 和 Gent 的生物活性
Table 1 Biological activities of PQDMA and Gent

Sample	Precursor polymer		MBC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		HC ₁₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Selectivity ²⁾		IC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Therapeutic index ³⁾	
	M_n ¹⁾	D ¹⁾	<i>S. aureus</i>	MRSA		<i>S. aureus</i>	MRSA		<i>S. aureus</i>	MRSA
PQDMA	5000	1.32	64	16	>1024	>32	>64	128	4	8
Gent	/	/	0.25	256	>1024	>4096	>8	>1024	>4096	>8

1) Determined by GPC measurements; 2) Selectivity is calculated as HC₁₀/MIC, where MIC (minimum inhibitory concentration) represents the lowest mass concentration to inhibit more than 90% bacterial growth; 3) Therapeutic index is calculated as IC₅₀/MIC

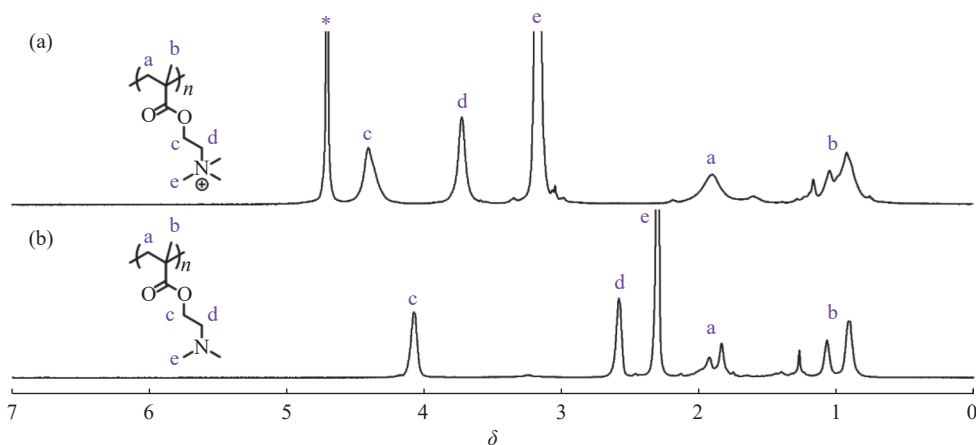


图 1 (a)PQDMA 及其(b)前体 PDMA 的¹H-NMR 谱图(溶剂分别为 D₂O 和 CDCl₃)

Fig. 1 ¹H-NMR spectra of (a) PQDMA and (b) its precursor PDMA (recorded in D₂O and CDCl₃, respectively)

2.2 PQDMA 的抗菌选择性

PQDMA 与 Gent 的抗菌活性评估结果如图 2 所示。PQDMA 对普通 *S. aureus* 的 MBC 为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表现出中等杀菌活性;而对 MRSA 的 MBC 则显著降至 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,为普通 *S. aureus* 的 1/4,显现出对耐药菌株更高的敏感性。作为对照,Gent 对普通 *S. aureus* 的 MBC 为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但对 MRSA 的 MBC 却急剧升高至 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。PQDMA 对 *E. coli* 及其耐药株 *ESBL-E. coli* 的 MBC 均高于 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明该聚合物对阴性菌的抗菌活性较弱,而作为对照的阳离子型抗生素 Gent 对 *E. coli* 和 *ESBL-E. coli* 都展现出良好的杀菌效果,其 MBC 分别为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。PQDMA 阳离子聚合物展现出与阳离子型抗生素 Gent 截然不同的抗菌选择性:PQDMA 对 *S. aureus* 阳性菌的抗菌活性要优于阴性菌,且对耐药菌株 MRSA 具有反常增强的杀菌能力。

2.3 PQDMA 的抗菌选择性机理

为了深入了解 PQDMA 聚合物对普通 *S. aureus* 和 MRSA 抗菌活性的差异,采用荧光探针法对其与细菌细胞膜的相互作用机制进行了系统研究,并以临床常用阳离子型抗生素 Gent 作为对照。首先,利用膜电位敏感性荧光探针 DiSC₃(5) 检测细菌膜的膜电位去极化程度^[21]。DiSC₃(5) 探针在膜极化状态下可通过静电作用

聚集于细菌细胞膜的磷脂双分子层内, 荧光被猝灭; 当细菌膜去极化发生时, 使 DiSC₃(5) 探针离开磷脂双分子层进入溶液, 荧光信号显著增强^[22]。如图 3 所示, 经 PQDMA 处理后, 普通 *S. aureus* 中的膜电位发生了轻微变化, 荧光强度与未处理的对照组相比, 提高了 1~2 倍; 而对于 MRSA, 其荧光强度则升高了 3~5 倍, 表明 PQDMA 虽然与 2 种细菌细胞膜均产生了明显的相互作用, 但对耐药菌株细胞膜的去极化作用更强。相比之下, Gent 处理后的 2 种细菌的 DiSC₃(5) 荧光强度均无明显变化, 说明该阳离子型抗生素并非依赖膜电位扰动发挥杀菌作用。

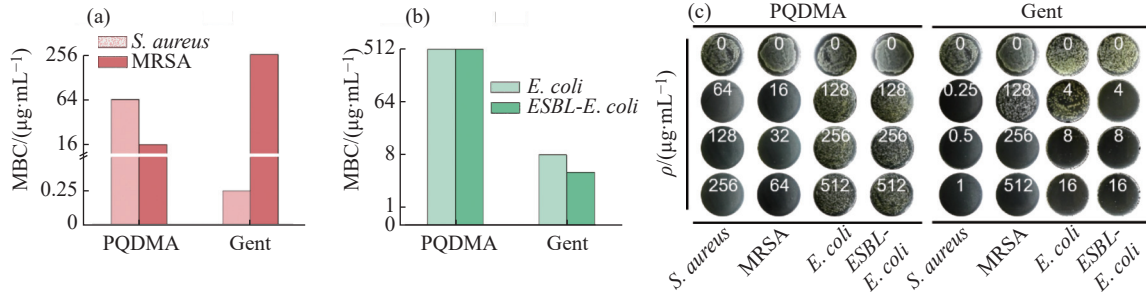


图 2 PQDMA 和 Gent 对 (a) *S. aureus*、MRSA 和 (b) *E. coli*、*ESBL-E. coli* 的 MBC 比较; (c) 经过不同质量浓度的 PQDMA 或 Gent 处理后细菌的存活情况

Fig. 2 Comparison of MBC of PQDMA and Gent against (a) *S. aureus*, MRSA and (b) *E. coli*, *ESBL-E. coli*; (c) Viable bacteria after treatment with varying mass concentrations of PQDMA or Gent

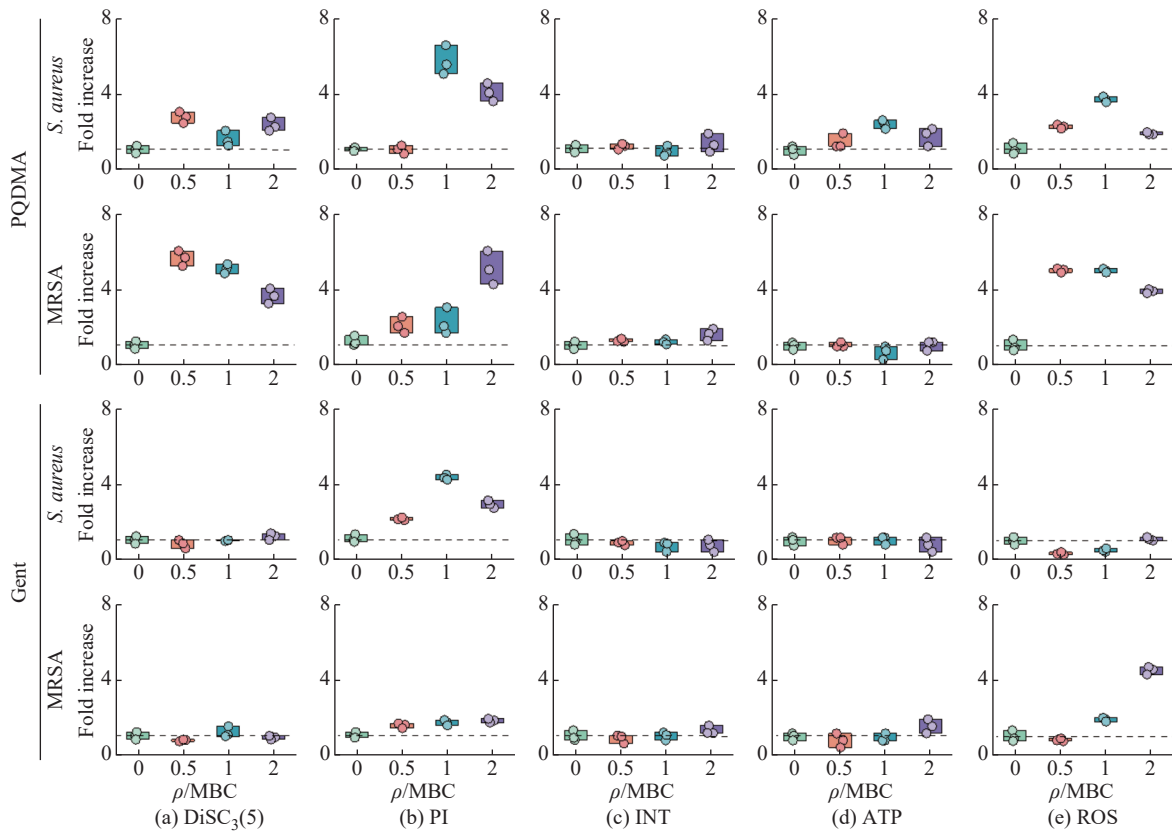


图 3 PQDMA 与 Gent 对 *S. aureus* 及 MRSA 的 (a) 膜电位、(b) 膜完整性、(c) 代谢活性、(d) ATP 含量和 (e) ROS 含量的影响 (数据显示为平均值±s.d., n = 3)

Fig. 3 Effects of PQDMA and Gent on (a) membrane potential, (b) membrane integrity, (c) metabolic activity, (d) ATP content and (e) ROS content of *S. aureus* and MRSA (Data are shown as mean ± s.d., n = 3)

采用 PI 探针进一步验证了 PQDMA 对细菌细胞膜完整性的破坏作用。对于完整细胞膜, PI 分子无法进入, 因此在活细胞中无荧光信号; 而当细胞膜受损或细胞死亡时, PI 才可进入胞内与 DNA 结合, 从而发出强烈的红色荧光, 反映出膜通透性的改变^[23]。如图 3 所示, PQDMA 对 *S. aureus* 与 MRSA 的膜破坏作用均呈现

明显的浓度依赖性。尤其当聚合物质量浓度高于 MBC 时, PI 信号显著增强, 说明 2 种细菌的细胞膜均受到严重破坏。相比之下, Gent 在相同条件下虽然都可诱导 PI 荧光增强, 但在 MRSA 中荧光信号明显减弱, 表明该阳离子抗生素药物对耐药菌株的膜作用效应相对有限。SEM 和细菌活/死染色法进一步证实了其破膜特性。如图 4 所示, 经质量浓度为 4MBC 的 PQDMA 及 Gent 处理后, 2 种细菌的细胞表面均出现明显的皱缩、破裂及胞内内容物外泄现象, 表明细胞膜结构完整性受损。活/死染色荧光图像(图 5)显示, 处理后的 *S. aureus* 与 MRSA 的绿色荧光(SYTO9, 标记活细胞)基本消失, 大量红色荧光信号(PI, 标记死细胞)显现, 进一步证实了细胞膜受到严重破坏。

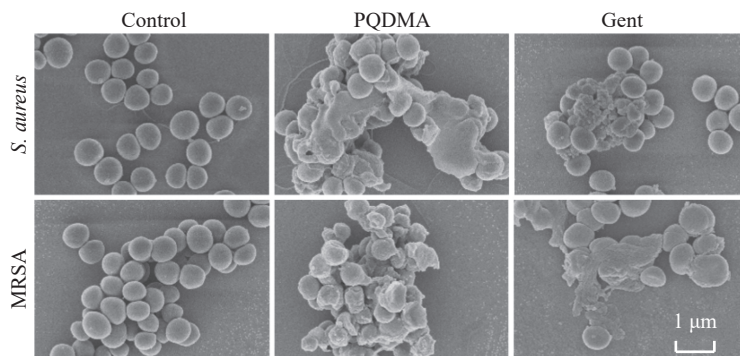


图 4 *S. aureus* 和 MRSA 细菌经质量浓度为 4MBC 的 PQDMA 与 Gent 处理后的 SEM 图像

Fig. 4 SEM images of *S. aureus* and MRSA bacteria after treatment with PQDMA and Gent at a mass concentration 4MBC

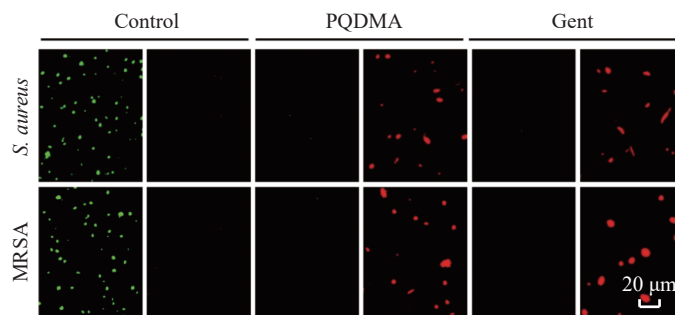


图 5 经质量浓度为 4MBC 的 PQDMA 和 Gent 处理后, *S. aureus* 与 MRSA 细菌的活/死染色荧光图像

Fig. 5 Live/dead fluorescence images of *S. aureus* and MRSA after treatment with PQDMA and Gent at a mass concentration 4MBC

采用 INT 探针和 ATP 检测试剂盒评估 PQDMA 对 *S. aureus* 与 MRSA 细胞代谢活性及胞内 ATP 水平的影响。INT 是一种可被呼吸链中活性酶(如 NADH 脱氢酶)还原的电子受体, 其还原产物为红色甲臃沉淀, 可作为细菌氧化代谢活性的间接指标^[24]。同时, ATP 通过与荧光素和荧光素酶反应发出荧光, 荧光强度在一定质量浓度范围内与 ATP 含量成正比, 可用于反映细胞的能量状态。PQDMA 与 Gent 处理均未显著影响 2 种菌株的 INT 还原水平及胞内 ATP 含量(图 3), 提示两者对细菌能量代谢的直接干扰较弱。进一步使用 DCFH-DA 检测 PQDMA 处理后细菌胞内 ROS 含量的变化。该探针可透过细胞膜, 在胞内被酯酶水解为无荧光的 DCFH, 后者可被活性氧氧化生成具有荧光的 DCF, 其荧光强度可反映胞内 ROS 水平^[25]。结果表明, PQDMA 处理显著提升了 *S. aureus* 和 MRSA 的胞内 ROS 含量, 尤其在 MRSA 中, 荧光强度升高约 4~5 倍, 说明其可诱导较强的氧化应激反应, 可能通过破坏细菌氧化还原稳态发挥杀菌作用。

杀菌机制研究表明, PQDMA 主要通过作用于细菌细胞膜发挥杀菌活性: 其阳离子基团首先与带负电的细菌膜表面发生静电吸附, 继而导致膜电位耗散和去极化, 破坏膜结构完整性, 最终诱导胞内 ROS 累积并触发氧化应激反应, 导致细胞裂解和死亡。值得注意的是, 虽然 PQDMA 对 *S. aureus* 与 MRSA 的杀菌机制相同, 但其对耐药菌株细胞膜的去极化作用更强, 杀灭 MRSA 效果显著优于 *S. aureus*。我们推测这一反常现象可能与 MRSA 细胞膜表面结构特征改变有关, 譬如其 β -内酰胺耐药机制诱导的膜结构重塑或载脂蛋白表达增强, 进而增强了 PQDMA 对耐药菌株细胞膜结构的结合亲和力与破坏效率。

2.4 PQDMA 的抗细菌生物被膜性能

临床研究表明, 约 80% 的慢性感染与细菌生物被膜的形成密切相关^[26, 27]。本研究进一步评估了

PQDMA 对 *S. aureus* 及 MRSA 成熟生物被膜的清除能力。首先采用结晶紫染色法检测不同质量浓度的 PQDMA 处理后生物被膜的残留量。如图 6(a) 所示, 随着 PQDMA 质量浓度升高, 2 种菌株的生物被膜残留量逐渐降低。其中, MRSA 生物被膜对阳离子聚合物更为敏感: 当 PQDMA 质量浓度达到 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, MRSA 生物被膜残留量下降幅度超过 50%, 而 *S. aureus* 生物被膜残留量仅下降 30% 左右。通过琼脂平板计数法检测处理后生物被膜内部存活的细菌数。结果显示, 当 PQDMA 质量浓度升至 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 可杀灭超过 50% 的 MRSA 生物被膜内细菌, 明显优于对 *S. aureus* 生物被膜的清除率(图 6(b))。PQDMA 未能完全清除细菌生物被膜, 这可能与胞外聚合物基质(EPS)阻碍了阳离子聚合物的深入扩散有关, 但其对耐药菌 MRSA 成熟生物被膜的穿透与杀菌效果仍明显优于非耐药菌株 *S. aureus*, 进一步验证了其对于耐药菌株所展现出的抗菌选择性。

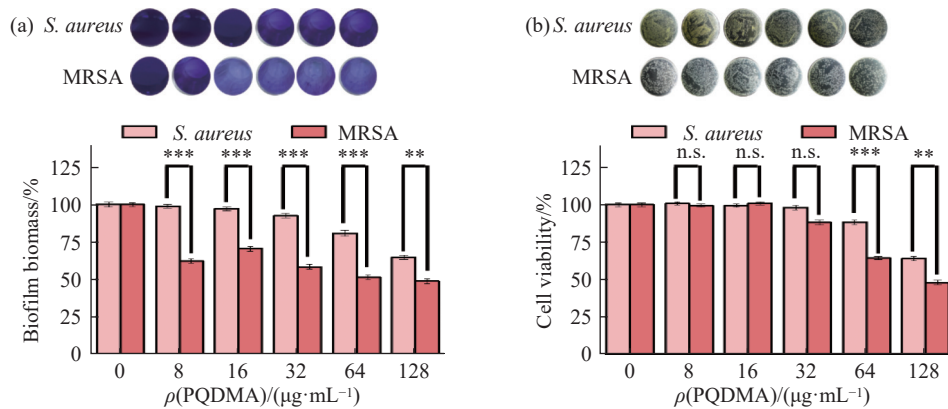


图 6 经 PQDMA 处理后 *S. aureus* 与 MRSA 成熟生物被膜的(a)残留生物量和(b)细菌存活率(数据显示为平均值 \pm s.d., $n = 3$; 通过 P 值评估显著性差异, n.s.不显著, $**P < 0.01$; $***P < 0.001$)

Fig. 6 (a) Biomass and (b) Cell viability of *S. aureus* and MRSA biofilms after the treatment with PQDMA (Data are shown as mean \pm s.d., $n = 3$; statistical significance was assessed by P values, n.s. not significant; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$)

2.5 PQDMA 的生物相容性

通过溶血性与细胞毒性试验系统评估了 PQDMA 的生物相容性。如图 7(a) 所示, PQDMA 的 HC_{10} 值高于 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 展现出与临床常用抗生素 Gent 相当的血液相容性。值得注意的是, PQDMA 对耐药菌株 MRSA 的选择性指数(SI)高于 32~64, 明显优于 Gent, 表明其具备更高的 MRSA 靶向性。此外, PQDMA 与 3T3 细胞共孵育后的 CCK-8 检测结果显示, IC_{50} 值为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如图 7(b) 所示, 在 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下的有效抗 MRSA 浓度范围内, 细胞活力维持在较高水平, 表明该聚合物具有良好的生物安全窗口。从作用机制上看, PQDMA 带有季铵型阳离子基团, 其杀菌作用主要依赖于与带有大量负电荷的细菌细胞膜发生静电吸附, 继而破坏膜结构实现杀菌。哺乳动物细胞表面整体电荷密度较低, 趋于电中性, 因此 PQDMA 与其之间的静电相互作用较弱, 不易引发膜结构破坏, 从而在较低质量浓度下表现出良好的细胞相容性和较低的细胞毒性^[28]。

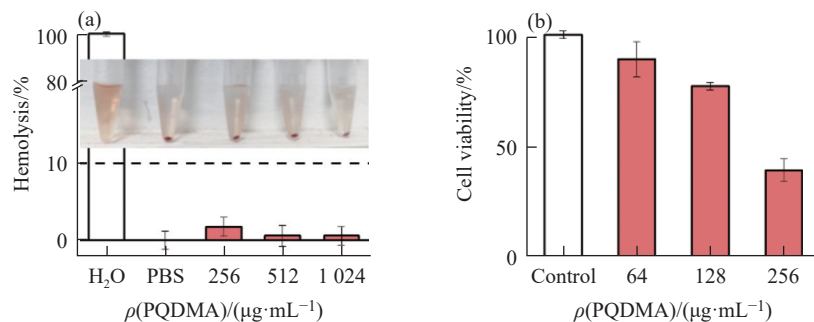


图 7 经 PQDMA 处理后的(a)绵羊红细胞的溶血率以及(b)3T3 细胞的存活率(数据显示为平均值 \pm s.d., $n = 3$)

Fig. 7 (a) Hemolysis of sheep red blood cells and (b) viability of 3T3 cells after incubation with PQDMA (Data are shown as mean \pm s.d., $n = 3$)

3 结 论

(1)季铵盐阳离子聚合物 PQDMA 展现出区别于阳离子抗生素 Gent 的抗菌选择性,对革兰氏阳性菌的抗菌活性优于阴性菌,且在耐药菌株 MRSA 中表现出较普通 *S. aureus* 更强的杀菌效应。

(2)PQDMA 在 MRSA 中的膜去极化和结构破坏效应更为显著,可能与其耐药相关的膜结构重塑增强了阳离子聚合物与膜的结合亲和力有关,同时赋予其更强的 MRSA 生物被膜穿透与杀菌能力,体现出对耐药菌株 MRSA 的结构选择性。

(3)PQDMA 在有效杀菌浓度范围内具有良好的血液和细胞相容性,具有明确的生物安全窗口和对耐药菌株 MRSA 的靶向潜力。

参考文献:

- [1] LIU H, WEI X M, PENG H G, YANG Y, HU Z, RAO Y F, WANG Z F, DOU J X, HUANG X N, HU Q W, TAN L, WANG Y T, CHEN J, LIU L, YANG Y H, WU J H, HU X M, LU S G, SHANG W L, RAO X C. LysSYL-loaded pH-switchable self-assembling peptide hydrogels promote methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* elimination and wound healing [J]. *Advanced Materials*, 2024, 36(52): 2412154.
- [2] LIU Q Q, ZHANG H J, YI Y P, WANG P P, PU W X, WANG S Y, SHANG R F. Synthesis and evaluation of novel pleuromutilin derivatives targeting the 50S ribosomal subunit for antibacterial ability [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 262: 115882.
- [3] YU C X, WEI B Y, KONG X Q, YANG C G, NAN F J. Synthesis and structure-activity relationships of ring-opened bengamide analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2021, 39: 671-676.
- [4] 赵泽人, 刘鑫, 郑斌. 两亲性氮杂氟化硼二吡咯组装体用于光热抗菌 [J]. *功能高分子学报*, 2025, 38(3): 245-251.
ZHAO Z R, LIU X, ZHENG B. Amphiphilic aza boron-dipyrromethene self-assembly for photothermal antibacterial [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2025, 38(3): 245-251.
- [5] 赵圣兰, 陈嘉, 许月莹, 柳忠佳, 郭宁, 冯肖亚. 负载葡萄糖籽多酚海藻酸钠冻干凝胶的制备及其抗菌止血性能 [J]. *功能高分子学报*, 2024, 37(1): 41-48.
ZHAO S L, CHEN J, XU Y Y, LIU Z J, GUO N, FENG X Y. Preparation of sodium alginate freeze-dried gel loaded with grape seed polyphenols and its properties of antimicrobial and hemostatic [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2024, 37(1): 41-48.
- [6] CHEN J Y, DU W Y, LI Y H, ZHOU H L, OUYANG D J, YAO Z J, FU J J, YE X H. Genome-based model for differentiating between infection and carriage *Staphylococcus aureus* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(10): e00493-24.
- [7] TANG K W, YANG S C, TSENG C H. Design, synthesis, and anti-bacterial evaluation of triazolyl-pterostilbene derivatives [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4564.
- [8] LIU W T, CHEN E Z, YANG L, PENG C, WANG Q, XU Z B, CHEN D Q. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 156: 104915.
- [9] KONG Q S, LI G C, ZHANG F J, YU T, CHEN X T, JIANG Q, WANG Y B. *N*-arylimidazoliums as highly selective biomimetic antimicrobial agents [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(16): 11309-11321.
- [10] CONCILIO M, MASET R G, LEMONCHE L P, KONTRIMAS V, SONG J I, RAJENDRAKUMAR S K, HARRISON F, BECER C R, PERRIER S. Mechanism of action of oxazoline-based antimicrobial polymers against *Staphylococcus aureus*: *In Vivo* antimicrobial activity evaluation [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(29): 2301961.
- [11] GONG Y T, XU X, AQUIB M, ZHANG Y H, YANG W T, CHANG Y X, PENG H, BOYER C, WHITTAKER A K, FU C K. Ammonium, phosphonium, and sulfonium polymers for antimicrobial applications: A comparative study [J]. *ACS Applied Polymer Materials*, 2024, 6(12): 6966-6975.
- [12] SI Z Y, ZHENG W B, PRANANTY D, LI J H, KOH C H, KANG E T, PETHE K, CHAN-PARK M B. Polymers as advanced antibacterial and antibiofilm agents for direct and combination therapies [J]. *Chemical Science*, 2022, 13(2): 345-364.
- [13] YU Q, CAI Q N, LIANG W X, ZHONG K W, LIU J Y, LI H Z, CHEN Y Z, LI H X, FANG S F, ZHONG R C, LIU S P, LIN S M. Design of phenothiazine-based cationic amphiphilic derivatives incorporating arginine residues: Potential membrane-active broad-spectrum antimicrobials combating pathogenic bacteria *in vitro* and *in vivo* [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 260: 115733.

- [14] MA J L, HOU S, LU D R, ZHANG B, XIONG Q R, CHAN-PARK M B, DUAN H W. Caging cationic polymer brush-coated plasmonic nanostructures for traceable selective antimicrobial activities [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2022, 43(10): 2100812.
- [15] GRACE J L, HUANG J X, CHEAH S E, TRUONG N P, COOPER M A, LI J, DAVIS T P, QUINN J F, VELKOV T, WHITTAKER M R. Antibacterial low molecular weight cationic polymers: Dissecting the contribution of hydrophobicity, chain length and charge to activity [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(19): 15469-15477.
- [16] JI W H, KOEPEL R R, MURATA H, ZADAN S, CAMPBELL A S, RUSSELL A J. Bactericidal specificity and resistance profile of poly(quaternary ammonium) polymers and protein-poly(quaternary ammonium) conjugates [J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(8): 2583-2593.
- [17] KANWAL S, AZIZ U B A, QUAAS E, ACHAZI K, KLINGER D. Sulfonium-based polymethacrylamides for antimicrobial use: Influence of the structure and composition [J]. *Biomaterials Science*, 2025, 13(4): 993-1009.
- [18] YANG Y C, CAI Z G, HUANG Z H, TANG X Y, ZHANG X. Antimicrobial cationic polymers: From structural design to functional control [J]. *Polymer Journal*, 2017, 50(1): 33-44.
- [19] ALTAF M, IJAZ M, GHAFAR A, REHMAN A, AVAIS M. Antibiotic susceptibility profile and synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on antibacterial activity of resistant antibiotics (oxytetracycline and gentamicin) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 137: 103755.
- [20] LANG X H, XU Z, LI Q C, YUAN L, THUMU U, ZHAO H. Modulating the reactivity of polymer with pendant ester groups by methylation reaction for preparing functional polymers [J]. *Polymer Chemistry*, 2022, 13(41): 5905-5911.
- [21] SONG M R, LIU Y, LI T T, LIU X J, HAO Z H, DING S Y, PANICHAYUPAKARANANT P, ZHU K, SHEN J Z. Plant natural flavonoids against multidrug resistant pathogens [J]. *Advanced Science*, 2021, 8(15): 2100749.
- [22] WU M H, HANCOCK R E W. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(1): 29-35.
- [23] WANG S S, WANG Y Y, PENG Y, YANG X M. Exploring the antibacteria performance of multicolor Ag, Au, and Cu nanoclusters [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(8): 8461-8469.
- [24] GARCÍA-MARTÍN E E, ARANGUREN-GASSIS M, KARL D M, MARTÍNEZ-GARCÍA S, ROBINSON C, SERRET P, TEIRA E. Validation of the *in vivo* iodo-nitro-tetrazolium (INT) salt reduction method as a proxy for plankton respiration [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 220.
- [25] DE HAAN L R, REINIERS M J, REESKAMP L F, BELKOUZ A, AO L, CHENG S Q, DING B Y, VAN GOLEN R F, HEGER M. Experimental conditions that influence the utility of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) as a fluorogenic biosensor for mitochondrial redox status [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(8): 1424.
- [26] CONG Z H, YAN Z, XIAO X M, LIU L Q, LUO Z J, ZOU J C, CHEN M Z, WU Y M, ZHOU M, LIU R H. Peptide-mimicking poly(2-oxazoline) displaying potent antibacterial and antibiofilm activities against multidrug-resistant gram-positive pathogenic bacteria [J]. *Journal of Materials Science & Technology*, 2025, 214: 233-244.
- [27] XIE Y Z Y, ZHENG W F, JIANG X Y. Near-infrared light-activated phototherapy by gold nanoclusters for dispersing biofilms [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(8): 9041-9049.
- [28] GANEWATTA M S, TANG C B. Controlling macromolecular structures towards effective antimicrobial polymers [J]. *Polymer*, 2015, 63: A1-A29.

(责任编辑: 刘亚萍)