



靶向 α -酮戊二酸脱氢酶增强纳米银的抗菌作用

何雨婧, 杜华茂*

西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715

何雨婧, 杜华茂. 靶向 α -酮戊二酸脱氢酶增强纳米银的抗菌作用[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2277-2294.

HE Yujing, DU Huamao. Targeting alpha-ketoglutarate dehydrogenase enhances antibacterial activity of silver nanoparticles[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2277-2294.

摘要: 【目的】纳米银(silver nanoparticles, AgNPs)的生物安全性一直受业界诟病, 扩大纳米银的治疗窗将为治疗人和动物多耐药性细菌感染提供有效的备选药物。本研究拟用三羧酸循环的重要成员 α -酮戊二酸(alpha-ketoglutaric acid, AKG)对纳米银进行表面修饰以提高其抗菌的生物安全性。

【方法】芦丁在常温下合成纳米银, 用全波长分光光度计、粒度仪及透射电镜进行表征。加 1 mmol/L 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)作为稳定剂(PVP-AgNPs), 另加 10 mmol/L AKG 作为封端剂(PVP-AgNPs@AKG), 比较 2 种纳米银的抗菌性及对人正常宫颈上皮细胞(human cervical epithelial cells, HCerEpic)的毒性作用, 再分析 2 种纳米银对大肠杆菌(*Escherichia coli*) BW25113 能量代谢、抗氧化应激和无氧呼吸相关基因表达等的影响。【结果】PVP-AgNPs@AKG 对多株革兰阳性细菌和革兰阴性细菌的最小抑菌浓度(minimal inhibit concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)均比 PVP-AgNPs 低 50%或 50%以上, 而对 HCerEpic 细胞的毒性无显著差异。与 PVP-AgNPs 相比, PVP-AgNPs@AKG 在 MIC 浓度下对 *E. coli* α -酮戊二酸脱氢酶活性的抑制作用增强, AKG 蓄积, ATP 水平显著降低, 同时活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平显著升高, *soxS* 表达上调, 但是, 厌氧呼吸相关的 *arcA*、*fnr*、*fdnH* 基因表达上调的程度显著降低。【结论】AKG 修饰纳米银能通过靶向 α -酮戊二酸脱氢酶抑制细菌的能量代谢, 使其对氧化损伤更敏感, 从而获得更强的抗菌能力, 是一种扩大纳米银治疗窗的有效手段。

关键词: 纳米银; α -酮戊二酸; 抗菌作用; 治疗窗

*Corresponding author. E-mail: duhmao@swu.edu.cn

Received: 2023-10-22; Accepted: 2024-03-25; Published online: 2024-03-27

Targeting alpha-ketoglutarate dehydrogenase enhances antibacterial activity of silver nanoparticles

HE Yujing, DU Huamao*

College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] The biosafety of silver nanoparticles (AgNPs) has been a subject of concern due to the narrow therapeutic window. Expanding the therapeutic window could facilitate the application of AgNPs in the treatment of multi-drug resistant bacterial infections in humans and animals. This study aimed to enhance the biosafety of AgNPs by modifying their surface with alpha-ketoglutaric acid (AKG), a crucial component of the tricarboxylic acid cycle. [Methods] Silver ion was reduced to AgNPs by rutin at room temperature, and then AgNPs were stabilized with 1 mmol/L polyvinylpyrrolidone (PVP) solution to generate PVP-AgNPs. AKG (10 mmol/L) was added to generate PVP-AgNPs@AKG. The prepared AgNPs were characterized by a full-wavelength spectrophotometer, a particle size analyzer, and a transmission electron microscope. The antibacterial activities of PVP-AgNPs and PVP-AgNPs@AKG were evaluated based on minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), time-kill curve, and post-antibiotic effect. The cytotoxicity of the prepared AgNPs to human cervical epithelial cells (HCerEpic) was examined by the MTT assay and flow cytometry. Furthermore, the effects of the prepared AgNPs on the energy metabolism, oxidative stress, and expression of genes involved in anaerobic respiration of *Escherichia coli* BW25113 were studied. [Results] The MIC and MBC of PVP-AgNPs@AKG against Gram-positive and Gram-negative bacteria were 50% or above 50% lower than those of PVP-AgNPs. PVP-AgNPs@AKG and PVP-AgNPs showed no significant difference in the cytotoxicity to HCerEpic cells. Compared with PVP-AgNPs, PVP-AgNPs@AKG at the MIC showed significantly enhanced inhibitory effect on the α -ketoglutarate dehydrogenase in *Escherichia coli*, increased accumulation of AKG, lowered ATP level, and elevated reactive oxygen species level. Moreover, PVP-AgNPs@AKG significantly up-regulated the expression of *soxS* and down-regulated the expression of genes involved in anaerobic respiration, such as *arcA*, *fnr*, and *fdnH*. [Conclusion] The findings suggested that PVP-AgNPs@AKG disrupted the energy metabolism by targeting α -ketoglutarate dehydrogenase, rendering bacteria more vulnerable to oxidative damage. Modifying with AKG would be a potential method to expand the therapeutic window of AgNPs.

Keywords: silver nanoparticles; alpha-ketoglutaric acid; antibacterial effect; therapeutic window

由于多耐药性细菌日益泛滥，含银制剂又重新受到业界和学界的重视，特别是纳米银 (silver nanoparticles, AgNPs) 因其强效广谱的抗

菌特性和可修饰性得到更深入的研究^[1]。Appapalam 等报道 AgNPs 对多重抗生素耐药性糖尿病足溃疡衍生的细菌分离株具有良好的抗

菌效果^[2], Ismail 等报道用 AgNPs 治愈了多耐药菌引起的皮肤癣^[3]。纳米银水凝胶已应用于烧伤和妇科的感染疾病, 对多耐药的肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[4]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[5]、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)^[6]、白色念珠菌(*Candida albicans*)^[7]等有明显治疗效果。产生活性氧(reactive oxygen, ROS)是金属纳米粒子和某些抗生素实现抗菌作用的重要机制之一^[8], 除此以外, AgNPs 还能与含巯基的酶结合并使之失活, 但由于微生物本身已有较为完备的胁迫应对机制, 如外排系统^[9]、抗氧化系统^[10]、特异性吸附蛋白^[11]、生物膜^[12]等, 在某些条件下仍能对重金属纳米粒子产生耐性。大肠杆菌中的 *cusABC* 基因簇编码产物形成外排泵, 将进入胞内的 Ag^+ 、 Cu^{2+} 排出胞外而表现出耐受性^[13]; 因 Ag^+ 产生的抗性也能诱导大肠杆菌对 AgNPs 产生耐受性^[13-14]。Panáček 等研究发现大肠杆菌经亚致死剂量纳米银处理 13 代后, 纳米银对其的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值从 3.38 mg/L 升高至 108.00 mg/L, 对铜绿假单胞菌的 MIC 也从 1.69 mg/L 提升到了 54.00 mg/L, 二者均上升 30 倍以上^[15]。Gluga 等研究发现亚致死水平的 Ag^+ 和 AgNPs 暴露改变了细胞膜结构(饱和脂肪酸的顺式/反式异构化), 增强了恶臭假单胞菌对 AgNPs 的抗性^[16]。Kaweeteerawat 等发现细菌暴露于亚致死剂量的 AgNPs 中, 5 d 后对 AgNPs 的耐受性增加, 其中大肠杆菌的半数最大抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})值从 11.89 mg/L 增加到 17.59 mg/L, 金黄色葡萄球菌的 IC_{50} 值从 6.98 mg/L 增加到 18.09 mg/L^[17]。此外, 细菌代谢方式发生改变也可能导致其耐受 AgNPs, 如 $\Delta narH$ 单基因缺失株能在含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米银(8 MIC 值)琼脂平板上生长^[18]。这些发现使纳米

银的临床应用不得不慎重考虑。

纳米银的细胞毒性、遗传毒性和神经毒性与其形状、粒径、表面电荷、表面修饰相关, 也与细胞的种类、细胞亚类有关, 这些数据经常因实验的方案不同而异, 但毒副作用的剂量依赖性是一致的^[19-21], 这种毒性作用主要表现为 DNA 损伤、细胞滞留于 G2/M 期^[22]。Ćurlin 等对小鼠连续 28 d 复用纳米银(0.1 mg/kg-b.w.), 亚急性毒性试验虽未导致小鼠死亡, 但研究发现纳米银在雌鼠脏器的蓄积高于雄鼠, 雌鼠的氧化应激反应高于雄鼠^[23]。纳米银的大量生产与广泛应用必然导致大量排放, 产生基于蓄积量的环境毒性。纳米银在上述生物安全性方面的问题很大程度上源于治疗窗窄^[24], 如何增强纳米银的抗菌、抗病毒、抗癌作用成为研究热点。

对纳米银的尺寸、形状、表面修饰物或封端剂等进行改造可以增强其抗菌作用。例如 Ajitha 等利用 pH 变化控制 AgNPs 粒径能增强其抗菌活性^[25], Kumari 等通过控制各项物理参数, 用生物控制剂绿色木霉合成了不同形状的 AgNPs, 这些 AgNPs 展现出了不同的抗菌活性^[26]; 用寡核苷酸修饰的 AgNPs 可加速伤口愈合、抵抗细菌感染^[27]; 各类表面修饰能影响 AgNPs 的生物学活性, 但对其影响机制的研究并不明确。

α -酮戊二酸(alpha-ketoglutaric acid, AKG)与柠檬酸同为三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)的成员, 柠檬酸是生成纳米银的还原剂和良好的稳定剂^[28-30], 但并未见其增强纳米银抗菌性能的报道。AKG 不仅是连接生物体内碳循环和氮循环的关键物质, 同时还能作为 α -酮戊二酸依赖性双加氧酶家族的限速底物, 是一种具有多效活性的代谢物, 参与细菌的多个抗氧化反应过程^[31]。我们推测用 AKG 修饰纳米银可引导其对 AKG 参与代谢的重要酶促反应产生干扰或抑制作用。本研究用 α -酮戊二

酸修饰纳米银以增强其抗菌作用,通过测定时间-杀菌曲线、检测细菌对纳米银的摄取、对几种关键代谢物浓度进行测定,并结合基因表达检测探究了其增强机理,同时为确定其生物安全性,用人正常宫颈上皮细胞(human cervical epithelial cells, HCErEpic)进行了细胞毒性检测。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂

芦丁购自生工生物工程(上海)股份有限公司;硝酸银和聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)均购自成都市科龙化工试剂厂; α -酮戊二酸购自上海毕得医药科技股份有限公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT)细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;高纯总 RNA 快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; α -酮戊二酸脱氢酶购自 Sigma-Aldrich 公司; ATP 含量检测试剂盒以及还原型谷胱甘肽含量检测试剂盒均购自金克隆(北京)生物技术有限公司;微生物活性氧簇检测试剂盒购自江苏酶免实业有限公司;细菌 α -酮戊二酸脱氢酶活性试剂盒、细菌 α -酮戊二酸检测试剂盒以及细菌谷氨酸检测试剂盒均购自上海优选生物科技有限公司。

1.2 菌株和细胞

大肠杆菌(*Escherichia coli*) K-12 BW25113 购自 CGSC (the Coli Genetic Stock Center); *E. coli* 8099 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538 购自上海鲁微科技有限公司;铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 1118 和鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) TY-19 由山西省中医院王晓玲博士惠赠,该 2 株菌均为

临床分离株,对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、磺胺类等多种类型的抗生素均不敏感。人正常宫颈上皮细胞(HCErEpic)购自青旗(上海)生物技术发展有限公司。

1.3 纳米银的合成与表征

用芦丁作为还原剂在 pH 11.0 条件下制备纳米银^[32],经 2 次离心去除大颗粒和银离子,加入终浓度为 1 mmol/L PVP 作为稳定剂。在 200 μ g/mL PVP-AgNPs 胶体溶液中加入 20 mmol/L AKG,于 37 $^{\circ}$ C 避光过夜,用去离子水洗涤后得到 PVP-AgNPs@AKG。采用超微量分光光度计(ThermoFisher Scientific 公司)、透射电子显微镜(FEI 公司)、纳米粒度电位仪(Malvern 公司)、酸度计[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]对 2 种纳米银进行表征。

1.4 纳米银的抗菌作用

按文献[33]的方法在 96 孔板中检测 PVP-AgNPs 和 PVP-AgNPs@AKG 对 *E. coli* BW25113、*E. coli* 8099、*S. aureus* ATCC6538、*P. aeruginosa* 1118 和 *A. baumannii* TY-19 这 5 株细菌的最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC),以及对 *E. coli* BW25113 和 *S. aureus* ATCC6538 的时间-杀菌曲线和抗生素后效应,其中细菌终浓度均为 1×10^6 CFU/mL, MIC 和 MBC 值的检测中纳米银终浓度依次为 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 μ g/mL,时间-杀菌曲线和抗生素后效应中对 *E. coli* 使用的纳米银浓度统一为 6.25 μ g/mL,对 *S. aureus* 使用的纳米银浓度统一为 12.50 μ g/mL。每次实验设 3 个平行重复,实验重复 3 次。

1.5 纳米银的细胞毒性

将 HCErEpic 细胞培养至对数生长期(按细胞铺满瓶底的 80%计),PBS 洗涤后用 DMEM 基础培养基重悬细胞,转至 96 孔细胞培养板,约

8 000 个细胞/孔(每孔 100 μL), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 18 h, 用浓度分别为 20、40、80、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PVP-AgNPs 和 PVP-AgNPs@AKG 处理 2 h, 弃去含纳米银的培养液并用 PBS 洗涤 1 次。按 MTT 法测定细胞增殖及细胞毒性。

将 HCrEpic 细胞按 1×10^6 个细胞/孔铺板, 培养 24 h 后分别用 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PVP-AgNPs 和 PVP-AgNPs@AKG 处理 12 h, 按说明书用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒对细胞进行染色, 染色完成后在流式细胞仪(BD Biosciences 公司)上检测细胞坏死、凋亡情况。

1.6 纳米银释放银离子

将浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.563 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PVP-AgNPs@AKG 溶液加入截流值为 10 kDa 的超滤管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times g$ 离心 15 min 后, 按 1.4 的方法在 96 孔板中测定超滤前后的 PVP-AgNPs@AKG *E. coli* BW25113 的 MIC 和 MBC 值。同时测定浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.563 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AgNO_3 溶液和浓度为 20、15、10、5、2.5 mmol/L 的 AKG 溶液对 *E. coli* BW25113 的 MIC 和 MBC 值作为对照。

1.7 检测细菌的纳米银摄入量

将 4×10^5 CFU/mL *E. coli* BW25113 用纳米银处理 15 min 和 30 min 后, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗涤 3 次后用 1 mL 65% 浓硝酸于 80 $^{\circ}\text{C}$ 处理 2 h, 完全消解后用 ddH₂O 定容至 5 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后使用电感耦合等离子体质谱仪(PerkinElmer 公司)检测溶液中的银含量, 并换算为纳米银的质量, 即为细菌的摄入量。

纳米银进入细菌内部的质量百分比计算公式: 百分比($\% \times 10^6$ CFU)=(测得进入细菌内的纳米银含量 \times 细菌消解液体积)/(纳米银浓度 \times 纳

米银体积 \times 菌液浓度 \times 菌液体积) $\times 100$ 。

1.8 代谢物浓度的测定

检测纳米银处理后 *E. coli* BW25113 胞内 ATP、ROS、AKG 以及谷氨酸(Glu)的含量及浓度变化。用 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PVP-AgNPs、PVP-AgNPs@AKG 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 mL 4×10^5 CFU/mL *E. coli* BW25113 15 min 和 30 min 后, 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体并用 PBS 洗涤, 随后用 2 mL 超声缓冲液重悬菌体, 将样品管置于冰水浴中进行超声破碎, 条件为功率 100 W, 工作 1.5 s, 停 2.5 s, 共处理 10 min。分别用肌酸激酶法测定细菌内 ATP 含量, 用 ELISA 法检测细菌内 ROS 含量, 具体测定步骤按试剂盒说明书进行。用相同方法处理 4×10^5 CFU/mL *E. coli* BW25113 12 h 和 24 h, 取 10 μL 菌液进行平板活菌计数, 收集其余菌体, 加入 200 μL 放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)强裂解液, 混匀后冰上静置 2 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times g$ 离心 10 min, 取 25 μL 上清液用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)法测定 AKG 和 Glu 的浓度。每个处理设 3 个细胞孔, 实验重复 3 次。根据标准品绘制标准曲线, 计算样品中的各代谢物浓度。

1.9 纳米银抑制 α -酮戊二酸脱氢酶活性

用 ddH₂O 稀释 α -酮戊二酸脱氢酶(α -ketoglutarate dehydrogenase, α -KGDC)至约 400 IU/L, 分别配制浓度为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纳米银溶胶。将二者等体积混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育 1 h。孵育完成后立即置于冰上, 用 α -KGDC 活性 ELISA 试剂盒按说明书方法检测酶活。

将 1 mL 4×10^5 CFU/mL *E. coli* BW25113 菌液用 MIC 浓度纳米银处理 15 min、30 min、12 h 和 24 h, 取少量菌液进行平板活菌计数, 收集其

余菌体加入 200 μL RIPA 强裂解液，混匀后冰上静置 2 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times g$ 离心 10 min 后，取 25 μL 上清液用 ELISA 法测定细菌内 α -KGDC 活性。

1.10 检测细菌内关键基因的表达水平

用实时荧光定量 PCR 检测 2 种纳米银处理 *E. coli* 后 *arcA*^[34-37]、*fnr*^[38-39]、*fdnH*^[40-41]、*soxS*^[42-43] 和 *sucB*^[44] 5 个基因的转录水平变化，以三磷酸甘油醛脱氢酶的编码基因 *gapA* 作为内参，所用引物序列见表 1 (引物由 Primer 5 软件设计)。*E. coli* BW25113 经 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米银处理 15 min 和 30 min。

用总 RNA 快速提取试剂盒提取 RNA，每组 3 个平行重复，总 RNA 重复提取 3 次。反转录反应体系(20 μL): 5 \times TRUEscript RT MasterMix 4 μL ，gDNA Remover 1 μL ，RNA (10 ng/ μL) 15 μL 。混合各管中液体后置于 PCR 仪，设置反应程序：25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min，42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min，85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。所得的 cDNA 产物用 NanoDrop 检测浓度和纯度后分装，保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。在 96 孔 PCR 板中依次加入 ddH₂O 8 μL ，UltraSYBR Mixture 10 μL ，上、下游引物各 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，cDNA 80 ng。反应程序：

95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s，共 40 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。最后进行熔解曲线分析。

1.11 数据分析

所有数据采用 SPSS v21.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)，进行组间比较：若 Leven's 检验方差齐，采用最小显著性差异法 (least significant difference, LSD) 检验进行两两比较；若方差不齐，改用 Dunnett's T3 检验。用 *表示差异显著($P < 0.05$)，**表示差异非常显著($P < 0.01$)，***表示差异极其显著($P < 0.001$)。图形绘制由 Origin 软件完成。流式细胞仪检测数据采用 FlowJo v10.6.2 进行分析。

2 结果与分析

2.1 PVP-AgNPs@AKG 的合成与表征

芦丁在碱性条件下将 Ag^+ 还原为单质银，溶液从无色逐渐变为淡黄色、黄色、棕色，全波长扫描可见 404 nm 处有单一吸收峰，说明有纳米银生成^[46-47] (图 1A)。透射电镜观察可见纳米银呈球形，粒径分布在 6–22 nm，平均粒径 13.2 nm (图 1B、1D)；平均 ζ 电位为 -17.1 mV，

表 1 关键基因功能及引物序列

Table 1 The oligonucleotide sequences of primers and the functions of related genes

| Gene | Primer sequences (5'→3') | Product length (bp) | Function of gene product | References |
|-------------|---|---------------------|---|------------|
| <i>arcA</i> | F: ATGCAGACCCCGCACATTC R: TTAATCTTCAGATCACCGCAGA | 717 | Anoxic redox control, mediating the metabolic transition from aerobiosis to anaerobiosis | [34-37] |
| <i>fnr</i> | F: TCAGGCAACGTTACGCGTATG R: ATGATCCCGGAAAAGCGAA | 753 | Global transcription factor, managing the distribution of RNA polymerase in response to oxygen starvation | [38-39] |
| <i>fdnH</i> | F: ATGGCTATGGAAACGCAGGA R: TTACTCATGATGATCCTCCTCGTC | 885 | Functions in the formate-nitrate respiratory chain, rich of Fe-S cluster | [40-41] |
| <i>soxS</i> | F: ATGTCATCAGAAAATTATTCAGG R: TTACAGGCGGTGGCGATAAT | 324 | Activator of superoxide stress | [42-43] |
| <i>sucB</i> | F: ATGAGTAGCGTAGATATTCTGGTCCC R: CTACACGTCCAGCAGCAGACG | 1 218 | Alpha-ketoglutarate dehydrogenase, TCA cycle enzyme | [44] |
| <i>gapA</i> | F: ATGACTATCAAAGTAGGTATCAACGGTT R: TTATTTGGAGATGTGAGCGATCA | 996 | GADPH, universal reference sequences | [45] |

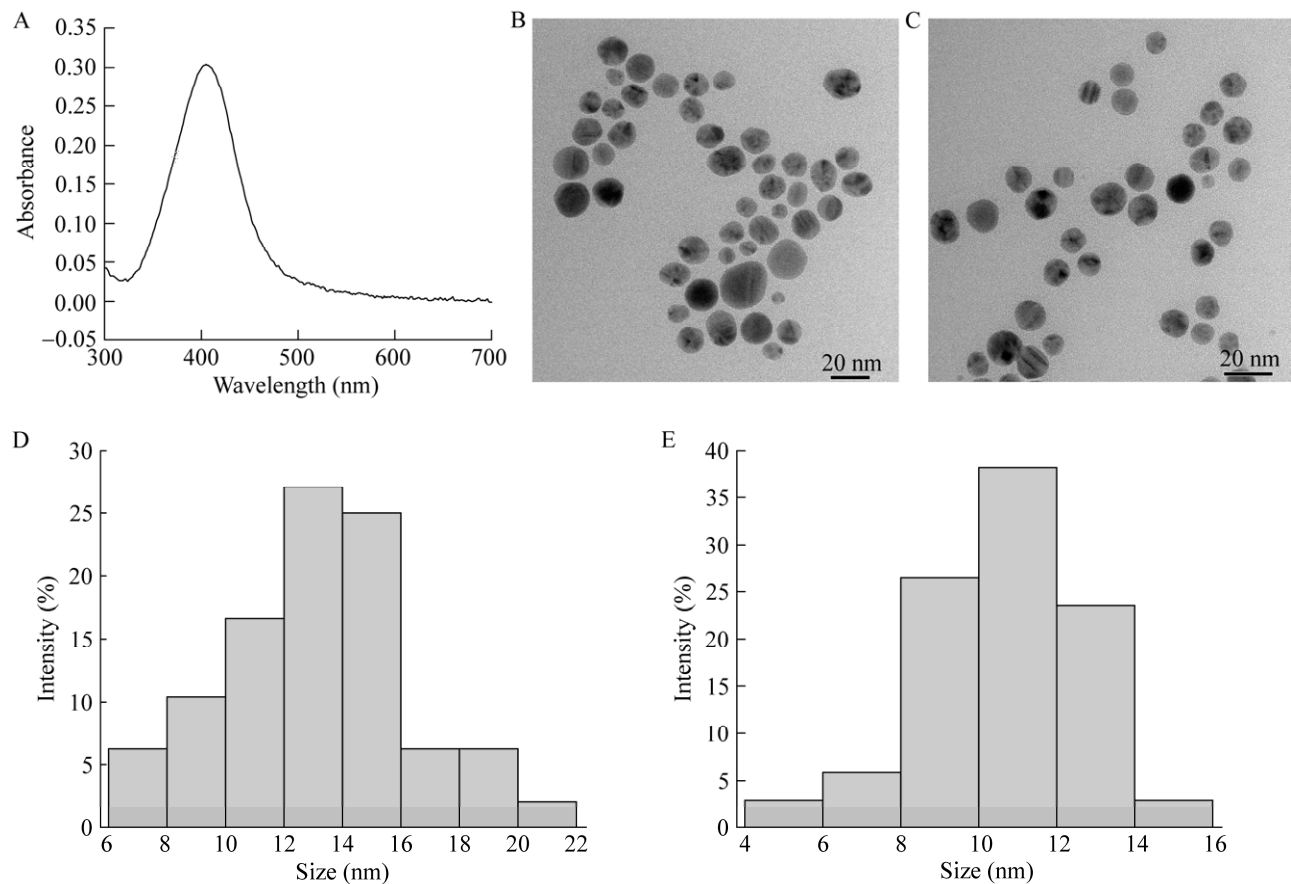


图 1 纳米银的表征

Figure 1 Characterization of silver nanoparticles. A: UV-Vis absorption spectra of AgNPs. B: PVP-AgNPs under transmission electron microscope (TEM) observation. C: PVP-AgNPs@AKG under TEM observation. D: Size distribution histogram of PVP-AgNPs. E: Size distribution histogram of PVP-AgNPs@AKG.

水合半径为 39.23 nm。加入 20 mmol/L AKG 作封端剂后纳米银形貌未发生改变, 粒径分布在 4–16 nm, 平均粒径 10.6 nm (图 1C、1E); 平均 ζ 电位 -3.58 mV, 水合粒径为 89.61 nm。PVP-AgNPs 和 PVP-AgNPs@AKG 胶体溶液的 pH 值分别为 5.5 和 2.3。

2.2 AKG 增强纳米银的抗菌作用

PVP-AgNPs 和 PVP-AgNPs@AKG 对 *E. coli* BW25113、*E. coli* 8099、*S. aureus* ATCC6538、*P. aeruginosa* 1118 和 *A. baumannii* TY-19 的 MIC 和 MBC 值见表 2, 结果表明 AKG 封端后对 5 株细菌的 MIC 值均降低 50%; 除 *A. baumannii* TY-19

的 MBC 值保持不变以外, 其余菌株 MBC 值均降低 50% 或 50% 以上。

用 6.25 $\mu\text{g/mL}$ PVP-AgNPs@AKG 处理 *E. coli* BW25113 9 h 后活菌数量下降 3 个数量级 (图 2A), 用 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度处理 *S. aureus* ATCC6538 能下降 1 个数量级 (图 2C), 而未封端纳米银在相同浓度下对 2 株细菌仅表现为抑制作用。抗生素后效应结果显示, 即使在 1 MIC 浓度下, AKG 封端纳米银处理后 BW25113 株恢复生长延迟 0.79 h, ATCC6538 株的恢复生长延迟 0.07 h (图 2B、2D)。总体来看, AKG 修饰纳米银后抗菌性增强。

表 2 PVP-AgNPs 和 PVP-AgNPs@AKG 对 5 种细菌的 MIC 和 MBC 值

Table 2 MIC and MBC values of PVP-AgNPs and PVP-AgNPs@AKG against five bacteria

| Strains | Silver nanoparticles | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | MBC ($\mu\text{g/mL}$) | MBC/MIC |
|---------------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|---------|
| <i>Escherichia coli</i> BW25113 | PVP-AgNPs | 12.50 | 25.0 | 2.0 |
| | PVP-AgNPs@AKG | 6.25 | 12.5 | 2.0 |
| <i>E. coli</i> 8099 | PVP-AgNPs | 12.50 | 25.0 | 2.0 |
| | PVP-AgNPs@AKG | 6.25 | 12.5 | 2.0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 | PVP-AgNPs | 25.00 | 50.0 | 2.0 |
| | PVP-AgNPs@AKG | 12.50 | 25.0 | 2.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1118 | PVP-AgNPs | 50.00 | >100.0 | >2.0 |
| | PVP-AgNPs@AKG | 25.00 | 50.0 | 2.0 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> TY-19 | PVP-AgNPs | 50.00 | 100.0 | 2.0 |
| | PVP-AgNPs@AKG | 25.00 | 100.0 | 4.0 |

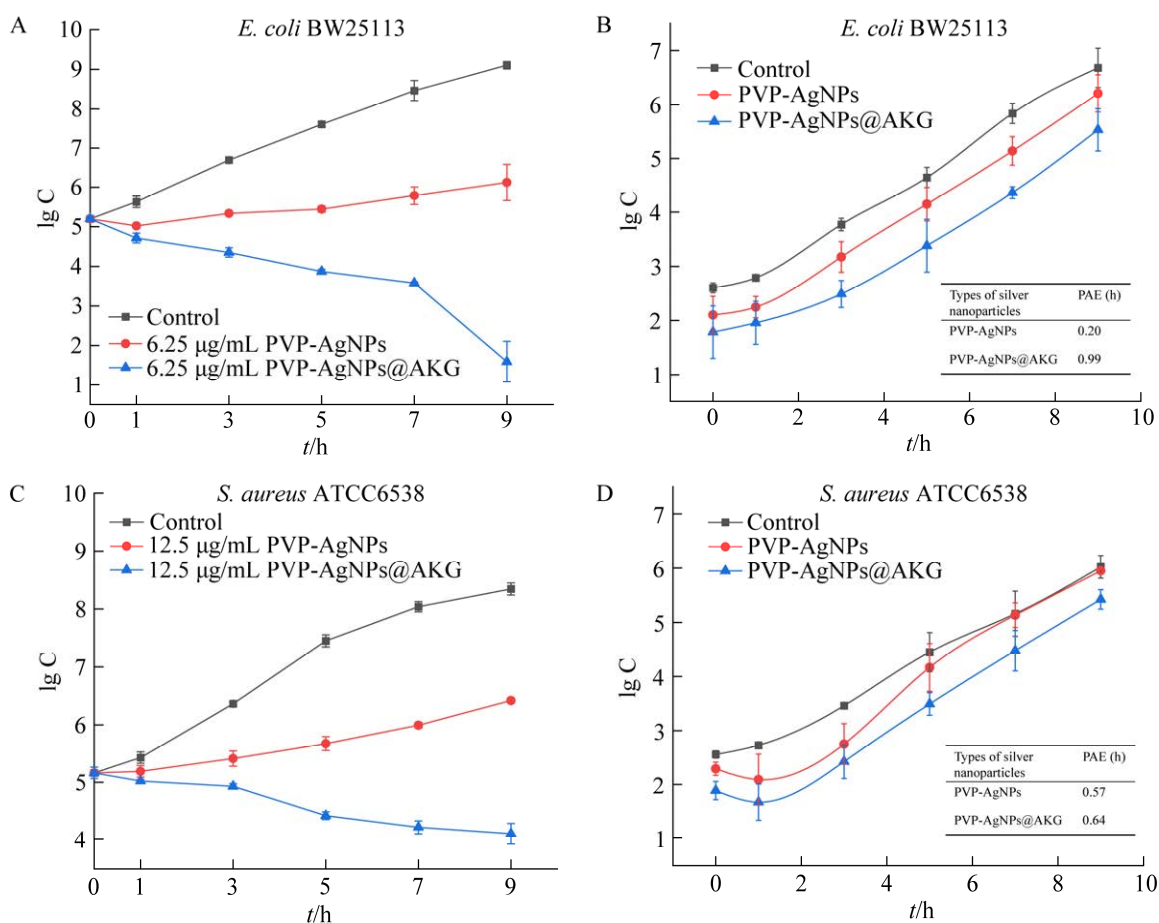


图 2 比较 AKG 封端前后 AgNPs 的抗菌活性

Figure 2 Comparison of antibacterial activity of AgNPs. A: The time-killing curves of AgNPs for *Escherichia coli* BW25113 within 9 hours treatment. B: The post-antibiotic effect of AgNPs on *Escherichia coli* BW25113 under the concentration of 1 MIC. C: The time-killing curves of AgNPs for *Staphylococcus aureus* ATCC6538 within 9 hours treatment. D: The post-antibiotic effect of AgNPs on *S. aureus* ATCC6538 under the concentration of 1 MIC.

2.3 AKG 未增强对正常细胞的毒性作用

用 MTT 法检测纳米银处理 2 h 的细胞毒性, 结果显示 2 种纳米银的细胞毒性均表现出剂量的依赖性, AKG 封端前后对人正常细胞 HCerEpic 的毒性无显著改变, IC₅₀ 值分别为 104.39 μg/mL 和 100.82 μg/mL (图 3A), 远大于上文检测的细菌 MIC 值。经流式细胞仪检测 2 种纳米银处理 12 h 后细胞凋亡和坏死情况, 结果表明 AKG 封端前后相同浓度纳米银处理组间无显著差异, 均主要诱导细胞凋亡(12.5 μg/mL: 65.74% vs. 62.40%; 50.0 μg/mL: 50.24% vs. 51.12%), 少数细胞发生坏死(12.5 μg/mL: 0.23% vs. 0.14%; 50.0 μg/mL: 0.31% vs. 0.15%) (图 3B–3I)。

2.4 AKG 未提升 Ag⁺的释放

PVP-AgNPs@AKG 溶胶的 pH 值为 2.3, 可能促进银离子的释放从而增强抗菌作用。本研究将系列浓度 PVP-AgNPs@AKG 溶液用截流值为 10 kDa 的超滤管过滤分离出银离子, 仅 200 μg/mL 浓度下所得滤过液对 *E. coli* 有抑制作用, 这相当于 1.563 μg/mL AgNO₃ 的抑菌效果, 说明在 PVP-AgNPs@AKG 胶体溶液中银离子的释放量低于 1%。研究还发现 AKG 对 *E. coli* 的 MIC 值为 15 mmol/L, 而本研究中即使所有 AKG 分子结合纳米银(100 μg/mL PVP-AgNPs 溶液中加入 10 mmol/L AKG), 当纳米银稀释到 *E. coli* 的 MIC 值时, AKG 浓度仅 0.625 mmol/L。这些结果说明 AKG 封端后纳米银抗菌作用增强与酸性条件促进银离子释放无关。

2.5 AKG 未提高细菌纳米银摄入量

为检测 AKG 是否促进细菌摄入纳米银, 用 ICP-MS 测定了处理不同时间后菌体内的总银量(表 3)。用 2 种纳米银处理 *E. coli* 15 min 和 30 min 后, 菌体内(按 10⁶ CFU 计)的银含量分别增加 3.91% 和 15.44%, 总银占比提升幅度

分别为 0.31% 和 1.24%, 12.50 μg/mL PVP-AgNPs 处理组增加量最多, 但差异无统计学意义。PVP-AgNPs@AKG 处理组在不同剂量和不同时间点上, 菌体内的总银量均低于 PVP-AgNPs, 说明 AKG 未促进菌体摄入更多纳米银。

2.6 对三羧酸循环的抑制作用

ATP 耗竭是纳米银抗菌的一个显著特征^[48], 本研究结果显示, 6.25 μg/mL PVP-AgNPs 处理 15 min 后 *E. coli* ATP 含量下降 15.32%, 而相同浓度 PVP-AgNPs@AKG 导致 *E. coli* ATP 下降 45.97%; 在 12.50 μg/mL 浓度下, 2 种纳米银分别导致 ATP 含量下降 30.65% 和 61.30%。12.50 μg/mL PVP-AgNPs 处理 30 min 也仅下降 51.94%, PVP-AgNPs@AKG 组无显著变化(图 4A)。考虑到 AKG 未增强银离子的释放, 也不增强细菌摄入更多纳米银, 而细菌的 ATP 亏耗更严重, 我们推测 PVP-AgNPs@AKG 可能靶向于 AKG 相关的酶, 比如三羧酸循环的 α-KGDC, 它是 TCA 的限速酶。体外试验显示该酶对纳米银极其敏感, 1 μg/mL PVP-AgNPs@AKG 使酶活降低 39.43%, 相同浓度 PVP-AgNPs 使其活性降低 28.89%, 说明 AKG 封端的纳米银对 α-KGDC 的抑制作用更强, 这种抑制程度在低浓度时表现得更加明显, 在高浓度时逐渐趋于饱和状态(图 4B)。PVP-AgNPs@AKG 对菌体内 α-KGDC 也表现出更强的抑制作用: 经 MIC 浓度处理大肠杆菌 12 h 后, AKG 封端纳米银处理组的酶活为 PVP-AgNPs 组的 84.04% (0.569 IU/CFU vs. 0.677 IU/CFU), 到 24 h 时仅为 52.17% (0.276 IU/CFU vs. 0.529 IU/CFU) (图 4C)。经荧光定量 PCR 检测发现, 纳米银处理大肠杆菌 15–30 min 后, *sucB* 基因转录水平降低, PVP-AgNPs@AKG 处理组的下降程度显著程度高于 PVP-AgNPs 处理组(图 4D), 暗示这种抑

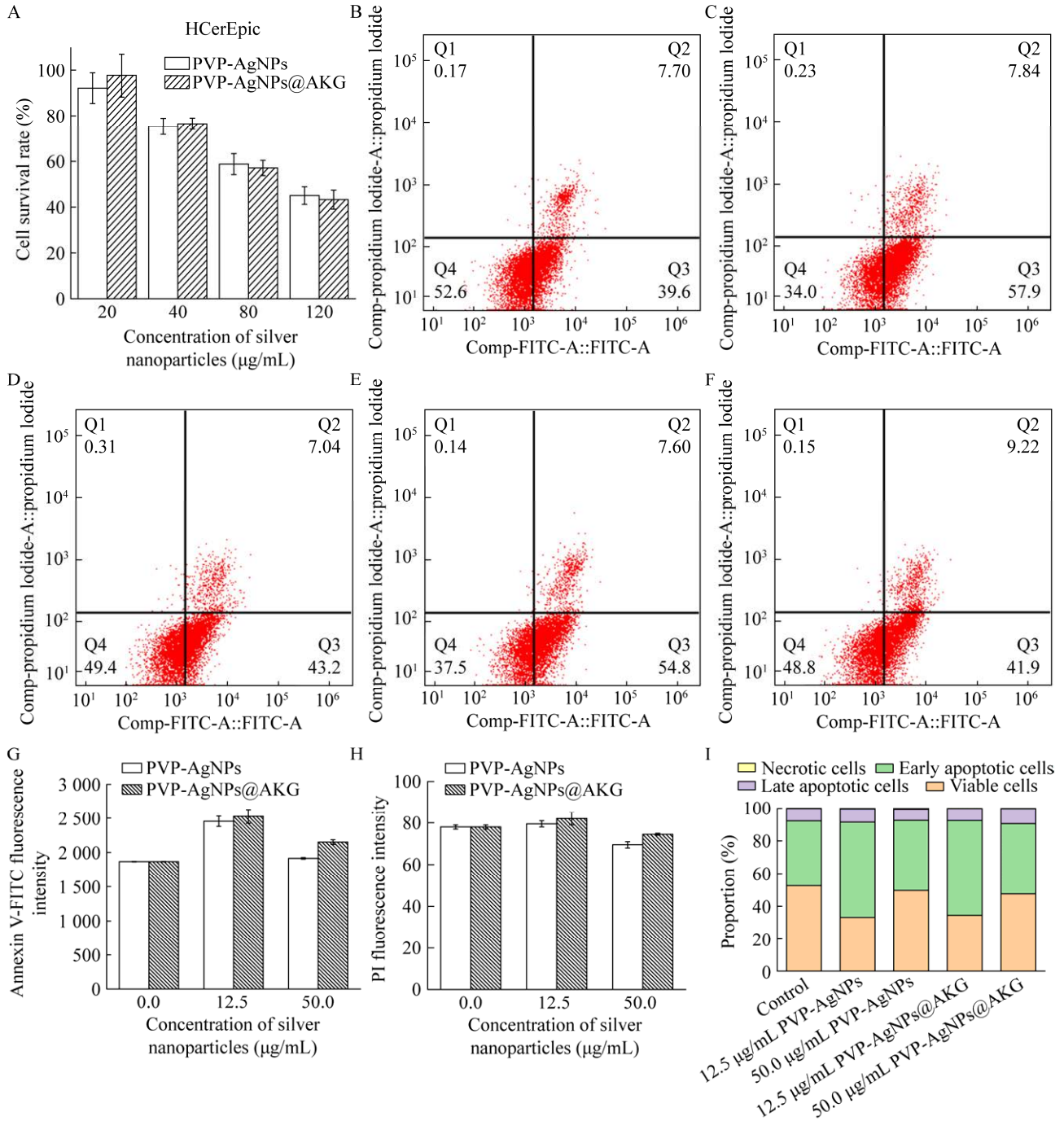


图 3 比较 2 种纳米银对 HCErEpic 细胞的毒性作用

Figure 3 Comparison of the cytotoxicity of HCErEpic cells induced by AgNPs. A: The cytotoxicity of HCErEpic cells by MTT assay after treatment of AgNPs for 2 hours. B–F: Respectively as normal control group, 12.5 µg/mL PVP-AgNPs, 50.0 µg/mL PVP-AgNPs, 12.5 µg/mL PVP-AgNPs@AKG, and 50.0 µg/mL PVP-AgNPs@AKG treated HCErEpic cells for 12 hours were detected by flow cytometry. G: Fluorescence intensity of Annexin V-FITC dye in cells. H: Fluorescence intensity of PI dye in cells. I: Column analysis based on B–F flow cytometry raw data.

表 3 纳米银进入大肠杆菌的量

Table 3 The amount of silver nanoparticles entering *Escherichia coli*

| Silver nanoparticles | Concentration (μg/mL) | The amount of silver* (μg) | | The ratio of silver (%) | |
|----------------------|-----------------------|----------------------------|-----------|-------------------------|--------|
| | | 15 min | 30 min | 15 min | 30 min |
| PVP-AgNPs | 6.25 | 2.70±0.01 | 2.92±0.02 | 15.37 | 16.60 |
| | 12.50 | 2.85±0.02 | 3.29±0.02 | 8.11 | 9.35 |
| PVP-AgNPs@AKG | 6.25 | 2.63±0.01 | 2.76±0.03 | 14.93 | 15.67 |
| | 12.50 | 2.81±0.02 | 2.92±0.02 | 8.00 | 8.31 |

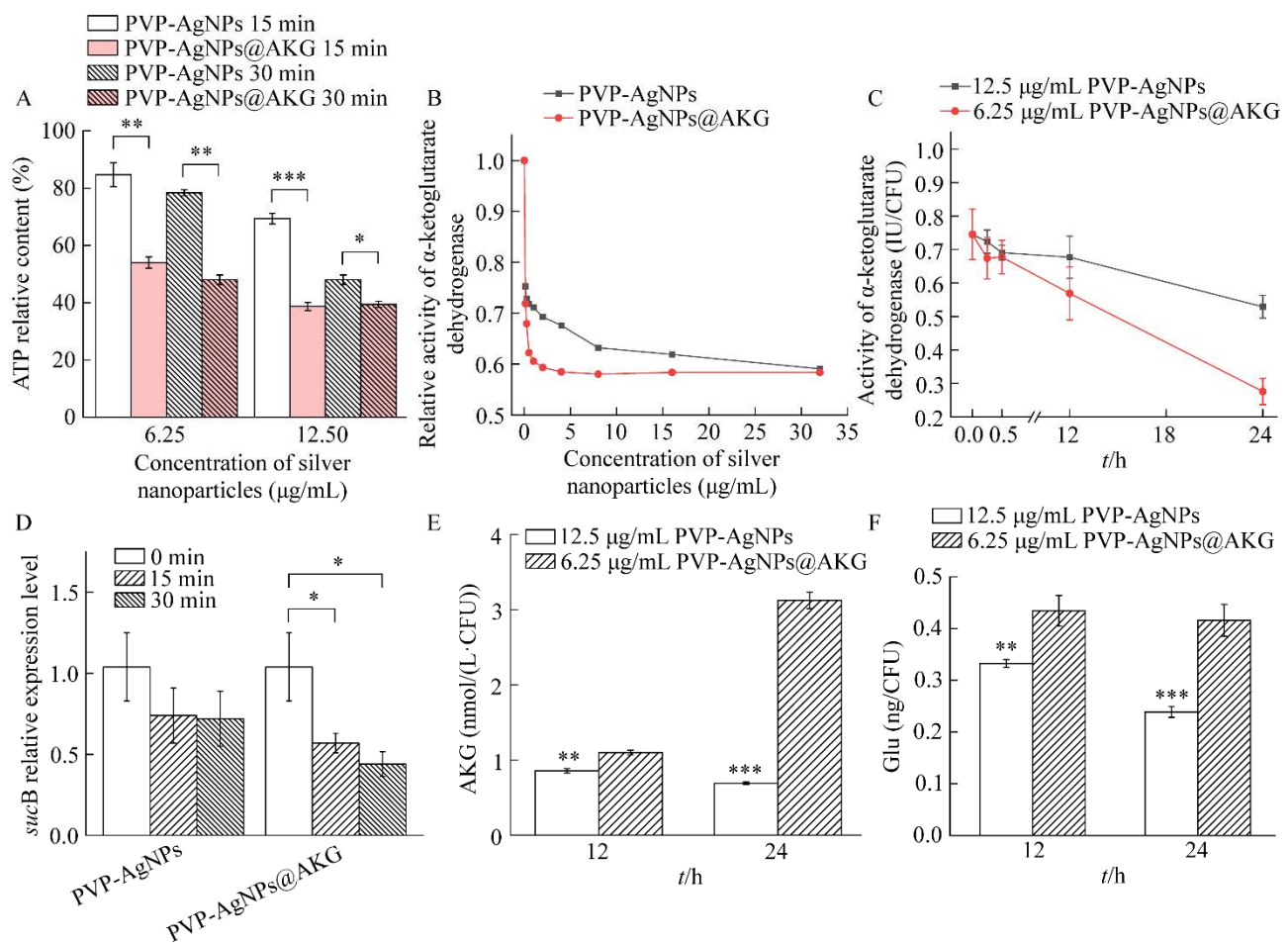
* : 计算为每 10⁶ CFU *E. coli* 中的总银量*: Calculated as the total amount of silver per 10⁶ CFU *Escherichia coli*.

图 4 AKG 封端纳米银增强对大肠杆菌能量代谢的抑制作用

Figure 4 The enhanced inhibition effect of PVP-AgNPs@AKG on *Escherichia coli* energy metabolism. A: The changes of *Escherichia coli* ATP level after silver nanoparticles treatment. B: The inhibition of *Escherichia coli*-borne alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity by series concentration of silver nanoparticles *in vitro*. C: The inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity of *Escherichia coli* by 1 MIC AgNPs *in vivo*. D: The expression of *Escherichia coli* *sucB* gene after treatment of 12.50 μg/mL silver nanoparticles. E, F: The concentration of AKG and Glu of *Escherichia coli* after treatment of 1 MIC AgNPs for 24 hours, respectively. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

制作用是多水平的。为进一步验证对菌体 α -酮戊二酸脱氢酶的抑制作用,我们还分析了 AKG 的蓄积与 Glu 的生成情况,结果显示在 MIC 浓度下, PVP-AgNPs@AKG 处理 12 h 后 AKG 的浓度显著高于 PVP-AgNPs 处理组, 24 h 后差异更为显著(图 4E)。24 h 后, PVP-AgNPs@AKG 组存活的细菌仅为 PVP-AgNPs 组的 10% (1.0×10^4 CFU/mL vs. 1.5×10^5 CFU/mL), 相应地, 菌体内 Glu 的浓度在两个时间点也显著高于 PVP-AgNPs 处理组(图 4F)。实验结果表明 AKG 封端纳米银严重抑制 TCA 效率, 影响细菌的能量代谢。

2.7 AKG 封端阻碍大肠杆菌向厌氧代谢转变

我们前期研究发现大肠杆菌受 AgNPs 刺激后的适应性反应是从有氧呼吸转变为厌氧呼吸, 缺失 *arcA* 基因将提高大肠杆菌对纳米银的敏感性^[18]。本研究采用 $12.50 \mu\text{g/mL}$ 纳米银处理 *E. coli* BW25113, 荧光定量 PCR 结果显示 PVP-AgNPs 处理后 *arcA* 基因显著上调, 而 PVP-AgNPs@AKG 组 *arcA* 基因表达水平仅略有上升(图 5A)。受此影响, 2 处理组的 *fdnH* 基因在 30 min 后显著上调, PVP-AgNP@AKG 组的上调幅度显著低于 PVP-AgNPs 组(图 5C)。*fnr* 基因表现为先下调再上调, 并且 PVP-AgNP@AKG 组在第 30 min 上调幅度更显著(图 5B)。

2.8 氧化应激反应

氧化应激是纳米银抗菌的另一个机制, 刺激产生的 ROS 打破菌体的氧化还原平衡, 导致生物大分子功能受损^[49]。用 $6.25 \mu\text{g/mL}$ 纳米银处理 30 min 内, *E. coli* 产生 ROS 的量呈上升趋势, 但 PVP-AgNPs@AKG 与 PVP-AgNPs 处理组差异不大(120.41% vs. 121.14%)。在 $12.50 \mu\text{g/mL}$ 浓度下, 纳米银刺激 *E. coli* 产生 ROS 的情况表现为时间依赖性, 30 min 时 AKG 封端前后

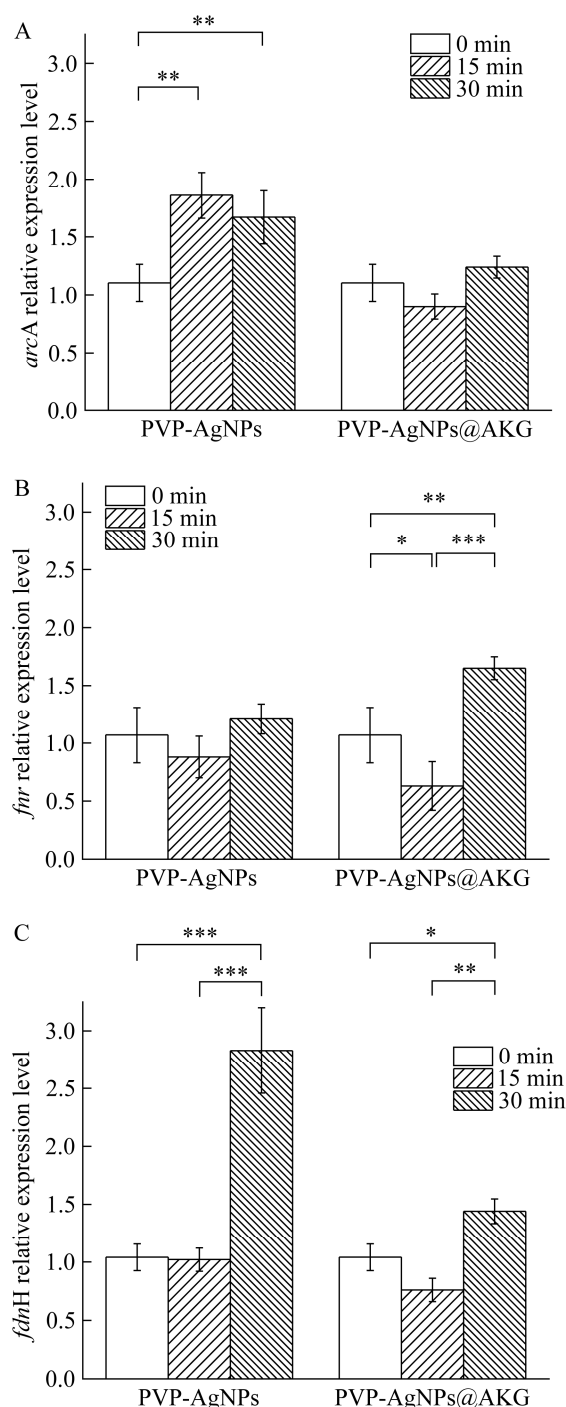


图 5 比较 2 种纳米银对大肠杆菌 *arcA* (A)、*fnr* (B)、*fdnH* (C) 基因表达水平的影响

Figure 5 Comparison of expression levels of *arcA* (A), *fnr* (B), and *fdnH* (C) genes of *Escherichia coli* BW25113 by treatment of two types AgNPs. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

具有显著差异(126.24% vs. 178.72%, $P < 0.001$); 实时荧光定量 PCR 检测显示, 2 种纳米银处理组的 *soxS* 基因表达水平呈上调趋势, 其中 30 min 后 PVP-AgNPs 组基因出现显著上调($P < 0.05$), 而 AKG 封端后该基因上调程度的显著性更高($P < 0.01$) (图 6)。总之, 这些结果说明 AKG 封端后能促进纳米银诱导细菌产生更多 ROS, 引起更强烈的氧化应激反应。

3 讨论与结论

纳米银因其粒径微小而形成的较大比表面积能使它们能够更好地与微生物接触, 因此即使在低浓度下也具有良好的抗菌能力, 并且能对鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、结核分枝杆菌、耐万古霉素肠球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌等多耐药细菌具有抗菌活性^[50]。然而, 随着研究的深入, 近年来发现了细菌对纳米银的耐受问题, 筛选具有高生物相容性的小分子物质对纳米银进行各类表面修饰,

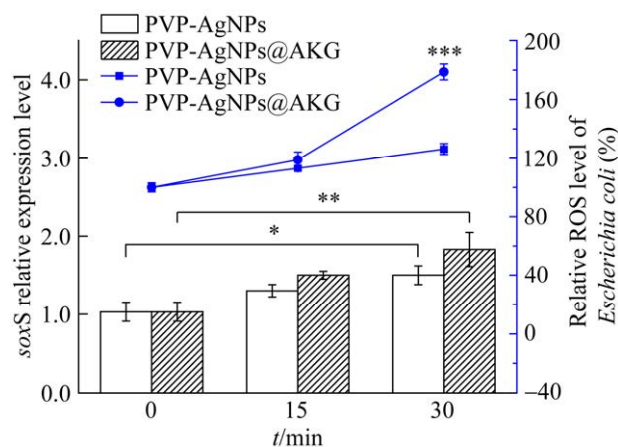


图 6 纳米银引起大肠杆菌氧化应激反应

Figure 6 Silver nanoparticles induce oxidative stress in *Escherichia coli*. Changes of *soxS* gene expression level (the left axis, bar graph) and ROS content (the right axis, line graph) in *Escherichia coli* treated with silver nanoparticles. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

改变其物理化学特性, 进而获得更加优良的生物学活性或将成为主要的解决途径之一^[51-54]。本研究首次使用了具有多效活性的 α -酮戊二酸作为纳米银封端剂, 合成的 PVP-AgNPs@AKG 具有更加优良的抗菌效果, 同时又不改变其细胞毒性大小。PVP-AgNPs 对多耐药菌株 *P. aeruginosa* 1118 和 *A. baumannii* TY-19 的 MIC 值为 50.00 $\mu\text{g/mL}$, 为 PVP-AgNPs@AKG 对它们的 MIC 值的 2 倍(表 2), 该浓度下 PVP-AgNPs@AKG 处理组活细胞仅比对照组降低 4.00% (图 3B、3F), 扩大了纳米银的治疗窗。

通常情况下酸性条件会促进纳米银释放 Ag^+ ^[55-56], 但本研究发现 PVP-AgNPs@AKG 胶体溶液中银离子的释放量低于 1%, 其抗菌性的增强与 Ag^+ 释放无关。本研究还发现 AKG 封端是通过促使纳米银靶向 α -酮戊二酸脱氢酶来增强纳米银的抗菌活性, 并使大肠杆菌向厌氧代谢转变的过程受阻, 诱导更多 ROS 的产生。

本研究提出了 PVP-AgNPs@AKG 的抗菌作用增强机制(图 7)。ROS 一直以来被认为是纳米银介导的细菌和细胞毒性的主要效应分子, Grzelak 等的研究证明 AgNPs 对线粒体呼吸链的破坏会增加 ROS 的生成, 阻断 ATP 的合成, 从而导致 DNA 损伤^[57]; AgNPs 释放的 Ag^+ 也可诱导 ROS 的产生^[58-59]。线粒体的存在是真核细胞和原核细胞的重要差异之一, 真核细胞中有氧呼吸发生在线粒体中。因此, 我们推测 PVP-AgNPs 虽然在细菌中能低浓度下抑制其 TCA 循环中的 α -酮戊二酸脱氢酶, 并进而引发 ROS 水平上升、呼吸方式转变; 但在正常细胞中, 由于线粒体膜的阻隔, 相同浓度下其对该酶的抑制程度远不及在细菌中, 这也是纳米银对细胞 IC₅₀ 值远大于对细菌的 MIC 值的重要原因之一。AKG 的封端使得其对细菌中该酶的抑制程度更加显著, 而在细胞中却远远未达到进

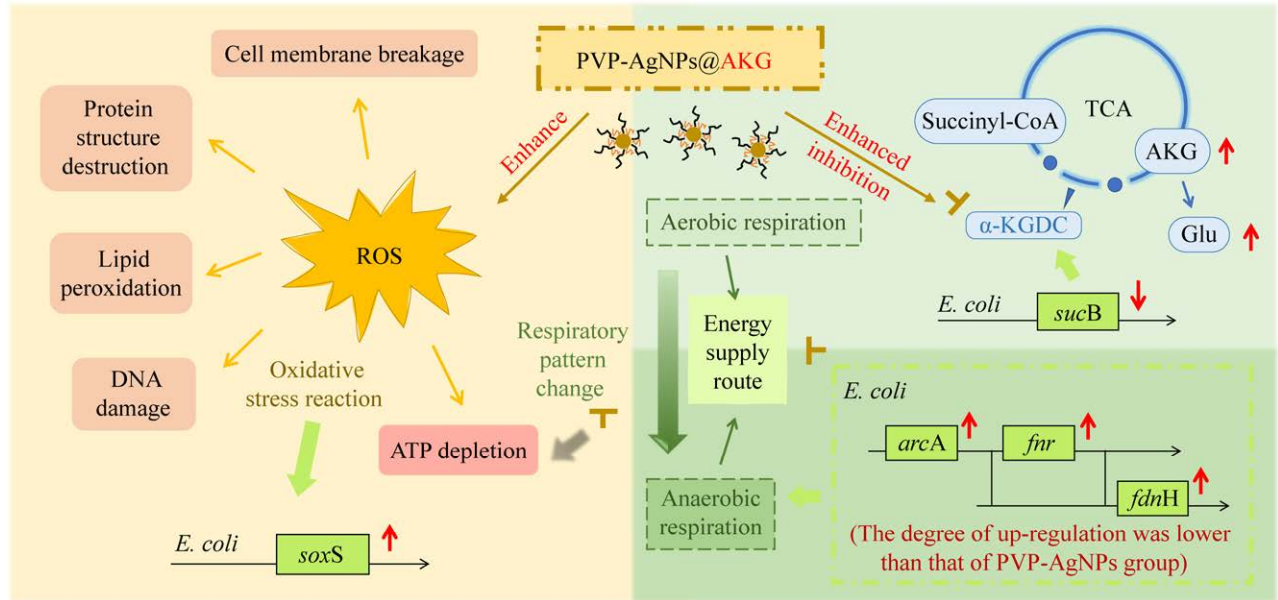


图7 AKG封端增强纳米银抗菌作用机制

Figure 7 The antibacterial enhancement mechanism of AKG coating silver nanoparticles.

入线粒体后产生破坏的浓度阈值。同时，真核细胞中更为完善的抗氧化系统也使得ROS的破坏作用并不如细菌中那样显著。

此外，在生物体中，AKG除作为连接碳代谢与氮代谢的关键节点外^[60-61]，还参与多种信号通路。生物体对环境压力进行响应时，TCA代谢产物水平和代谢通路发生的改变可以解释癌细胞在变化环境中的适应性和可塑性，AKG及其结构类似物(琥珀酸盐、富马酸盐等)参与调控促进致癌的信号通路^[62]。例如，研究表明AKG作为羟化酶的底物，影响脯氨酸/天冬氨酸/赖氨酸羟化，进而调节低氧诱导因子-1 (hypoxic inducible factor-1, HIF-1)的稳定性和胶原合成，而HIF-1是癌症发生和发展中的重要转录因子^[63-64]。以AKG为重要底物的铁(II)/ α -酮戊二酸依赖的双加氧酶(alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, α -OGDDs)是含铁的非血红素加氧酶超家族中最大的亚家族，在许多生物过程中发挥着不同的作用，包括调节缺氧适应，细胞

外基质形成，基因转录的表观遗传调控和细胞代谢的重编程。其中，铁(II)/ α -酮戊二酸依赖性双加氧酶的AlkB家族是一类普遍存在的DNA修复酶，能通过氧化脱烷基作用去除碱基上的烷基加合物^[65]。因此，由于AKG参与的代谢反应众多，未来我们还需要对更多这些与AKG有关的酶类进行研究，深入挖掘PVP-AgNPs@AKG更加优良的作用以及进一步合成和修饰纳米银的改进方向。

致谢

西南大学黄伟博士对该研究提出建设性意见，西南大学李明艳同学协助部分实验，在此一并致以诚挚的感谢。

参考文献

- [1] MATEO EM, JIMÉNEZ M. Silver nanoparticle-based therapy: can it be useful to combat multi-drug resistant bacteria?[J]. Antibiotics, 2022, 11(9): 1205.

- [2] APPAPALAM ST, PAUL B, AROCKIASAMY S, PANCHAMOORTHY R. Phytofabricated silver nanoparticles: discovery of antibacterial targets against diabetic foot ulcer derived resistant bacterial isolates[J]. Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications, 2020, 117: 111256.
- [3] ISMAIL GA, ALLAM NG, GAAFAR RM, EL-ZANATY MM, ATEYA PS. Effect of biologically and chemically synthesized AgNPs on multi-drug resistant (MDR) dermatophyte bacterial isolates[J]. Egyptian Journal of Botany, 2022, 62(3): 687-707.
- [4] CHHIBBER S, GONDIL VS, SINGLA L, KUMAR M, CHHIBBER T, SHARMA G, SHARMA RK, WANGOO N, KATARE OP. Effective topical delivery of H-AgNPs for eradication of *Klebsiella pneumoniae*-induced burn wound infection[J]. AAPS PharmSciTech, 2019, 20(5): 169.
- [5] SINGH K. Antibacterial activity of synthesized silver nanoparticles from *Tinospora cordifolia* against multi drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients[J]. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 2014, 5(2): 1-6.
- [6] EKICI S, BOZKAYA E, BOZKAYA O, CERCI NA, ALUC Y, EKICI H. *Vitex agnus-castus* L. nanoparticles: preparation, characterization and assessment of antimicrobial and anticancer activity[J]. ChemistrySelect, 2023, 8(32): e202302102.
- [7] DUNG TTN, HUNG ND, BUU NQ, van HUNG L, DUNG ND. Bactericidal activity of nanosilver against pathogenic microorganisms which cause peculiar diseases of genital secretion track[J]. Vietnam Journal of Science and Technology, 2019, 57(1): 67.
- [8] LARA HH, AYALA-NÚÑEZ NV, del CARMEN IXTEPAN TURRENT L, RODRÍGUEZ PADILLA C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(4): 615-621.
- [9] GUO JH, GAO SH, LU J, BOND PL, VERSTRAETE W, YUAN ZG. Copper oxide nanoparticles induce lysogenic bacteriophage and metal-resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(27): 22298-22307.
- [10] IVASK A, ELBADAWY A, KAWETEERAWAT C, BOREN D, FISCHER H, JI ZX, CHANG CH, LIU R, TOLAYMAT T, TELESCA D, ZINK JI, COHEN Y, HOLDEN PA, GODWIN HA. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver[J]. ACS Nano, 2014, 8(1): 374-386.
- [11] FAGHIHZADEH F, ANAYA NM, ASTUDILLO-CASTRO C, OYANEDEL-CRAVER V. Kinetic, metabolic and macromolecular response of bacteria to chronic nanoparticle exposure in continuous culture[J]. Environmental Science: Nano, 2018, 5(6): 1386-1396.
- [12] ZHANG YY, LI N, WANG MZ, FENG HJ, XU C, XU F. Interference of non-lethal levels of graphene oxide in biofilm formation and adaptive response of quorum sensing in bacteria[J]. Environmental Science: Nano, 2018, 5(12): 2809-2818.
- [13] NIES DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(2/3): 313-339.
- [14] LI XZ, NIKAIDO H, WILLIAMS KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(19): 6127-6132.
- [15] PANÁČEK A, KVÍTEK L, SMÉKALOVÁ M, VEČEŘOVÁ R, KOLÁŘ M, RÖDEROVÁ M, DYČKA F, ŠEBELA M, PRUCEK R, TOMANEC O, ZBOŘIL R. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it[J]. Nature Nanotechnology, 2018, 13: 65-71.
- [16] GLIGA AR, SKOGLUND S, WALLINDER IO, FADEEL B, KARLSSON HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release[J]. Particle and Fibre Toxicology, 2014, 11: 11.
- [17] KAWETEERAWAT C, UBOL PN, SANGMUANG S, AUEVIRIYAVIT S, MANIRATANACHOTE R. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria mediated by silver nanoparticles[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 2017, 80(23/24): 1276-1289.
- [18] DU HM, LO TM, SITOMPUL J, CHANG MW. Systems-level analysis of *Escherichia coli* response to silver nanoparticles: the roles of anaerobic respiration in microbial resistance[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 424(4): 657-662.
- [19] BAMAL D, SINGH A, CHAUDHARY G, KUMAR M, SINGH M, RANI N, MUNDLIA P, SEHRAWAT AR. Silver nanoparticles biosynthesis, characterization, antimicrobial activities, applications, cytotoxicity and safety issues: an updated review[J]. Nanomaterials, 2021, 11(8): 2086.
- [20] WATSON C, GE J, COHEN J, PYRGIOTAKIS G,

- ENGELWARD BP, DEMOKRITOU P. High-throughput screening platform for engineered nanoparticle-mediated genotoxicity using CometChip technology[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(3): 2118-2133.
- [21] VECCHIO G, FENECH M, POMPA PP, VOELCKER NH. Lab-on-a-chip-based high-throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials[J]. *Small*, 2014, 10(13): 2721-2734.
- [22] ASHARANI PV, LOW KAH MUN G, HANDE MP, VALIYAVEETIL S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells[J]. *ACS Nano*, 2009, 3(2): 279-290.
- [23] ĆURLIN M, BARBIR R, DABELIĆ S, LJUBOJEVIĆ M, GOESSLER W, MICEK V, ŽUNTAR I, PAVIĆ M, BOŽIČEVIĆ L, PAVIČIĆ I, VINKOVIĆ VRČEK I. Sex affects the response of Wistar rats to polyvinyl pyrrolidone (PVP)-coated silver nanoparticles in an oral 28 days repeated dose toxicity study[J]. *Particle and Fibre Toxicology*, 2021, 18(1): 38.
- [24] CHERNOUSOVA S, EPPEL M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal[J]. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2013, 52(6): 1636-1653.
- [25] AJITHA B, ASHOK KUMAR REDDY Y, SREEDHARA REDDY P. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles with controlled particle size by pH variation[J]. *Powder Technology*, 2015, 269: 110-117.
- [26] KUMARI M, PANDEY S, GIRI VP, BHATTACHARYA A, SHUKLA R, MISHRA A, NAUTIYAL CS. Tailoring shape and size of biogenic silver nanoparticles to enhance antimicrobial efficacy against MDR bacteria[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 105: 346-355.
- [27] KELEŞTEMUR S, KILIC E, USLU Ü, CUMBUL A, UGUR M, AKMAN S, CULHA M. Wound healing properties of modified silver nanoparticles and their distribution in mouse organs after topical application[J]. *Nano Biomedicine and Engineering*, 2012, 4(4): 170-176.
- [28] RANOSZEK-SOLIWODA K, TOMASZEWSKA E, SOCHA E, KRZYCZMONIK P, IGNACZAK A, ORLOWSKI P, KRZYZOWSKA M, CELICHOWSKI G, GROBELNY J. The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2017, 19(8): 273.
- [29] TANG SH, ZHENG J. Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(13): e1701503.
- [30] PARK K, PARK EJ, CHUN IK, CHOI K, LEE SH, YOON J, LEE BC. Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2011, 34(1): 153-158.
- [31] McLAIN AL, SZWEDA PA, SZWEDA LI. α -ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor[J]. *Free Radical Research*, 2011, 45(1): 29-36.
- [32] DU HM, WANG XL, ZHANG HY, CHEN HM, DENG XY, HE YJ, TANG HZ, DENG FC, REN ZH. Serum protein coating enhances the antiseptic efficacy of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Escherichia coli* infections in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 5(14): 1153147.
- [33] 陈学情, 蒋家璇, 任志鸿, 李娟, 张红英, 徐建国, 杜华茂. 纳米银的抗菌特性及对多重耐药菌株的抗菌作用[J]. *微生物学报*, 2017, 57(4): 539-549.
- CHEN XQ, JIANG JX, REN ZH, LI J, ZHANG HY, XU JG, DU HM. Antibacterial activity of silver nanoparticles against multiple drug resistant strains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 539-549 (in Chinese).
- [34] SHALEL-LEVANON S, SAN KY, BENNETT GN. Effect of oxygen, and *ArcA* and FNR regulators on the expression of genes related to the electron transfer chain and the TCA cycle in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(5/6): 364-374.
- [35] ROLFE MD, TER BEEK A, GRAHAM AI, TROTTER EW, ASIF HM, SANGUINETTI G, de MATTOS JT, POOLE RK, GREEN J. Transcript profiling and inference of *Escherichia coli* K-12 *ArcA* activity across the range of physiologically relevant oxygen concentrations[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(12): 10147-10154.
- [36] LEVANON SS, SAN KY, BENNETT GN. Effect of oxygen on the *Escherichia coli ArcA* and FNR regulation systems and metabolic responses[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(5): 556-564.
- [37] BASAN M, HUI S, WILLIAMSON JR. *ArcA* overexpression induces fermentation and results in enhanced growth rates of *E. coli*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11866.
- [38] CRACK JC, STAPLETON MR, GREEN J, THOMSON AJ, Le BRUN NE. Influence of association state and DNA binding on the O₂-reactivity of [4Fe-4S] fumarate and nitrate reduction (FNR)

- regulator[J]. *The Biochemical Journal*, 2014, 463(1): 83-92.
- [39] TOLLA DA, SAVAGEAU MA. Regulation of aerobic-to-anaerobic transitions by the FNR cycle in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(4): 893-905.
- [40] WANG HN, GUNSALUS RP. Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* genes in response to nitrate, nitrite, and formate: roles for NarL and NarP[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(17): 5076-5085.
- [41] BERTERO MG, ROTHERY RA, PALAK M, HOU C, LIM D, BLASCO F, WEINER JH, STRYNADKA NCJ. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2003, 10: 681-687.
- [42] CABISCOL E, TAMARIT J, ROS J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species[J]. *International Microbiology*, 2000, 3(1): 3-8.
- [43] HOLDEN ER, WEBBER MA. *MarA*, *RamA*, and *SoxS* as mediators of the stress response: survival at a cost[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 828.
- [44] SPENCER ME, DARLISON MG, STEPHENS PE, DUCKENFIELD IK, GUEST JR. Nucleotide sequence of the *sucB* gene encoding the dihydrolipoamide succinyltransferase of *Escherichia coli* K12 and homology with the corresponding acetyltransferase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1984, 141(2): 361-374.
- [45] WU YH, WU M, HE GW, ZHANG X, LI WG, GAO Y, LI ZH, WANG ZY, ZHANG CG. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 423(1): 15-22.
- [46] EYA'ANE MEVA F, NTOUMBA AA, BELLE EBANDA KEDI P, TCHOUMBI E, SCHMITZ A, SCHMOLKE L, KLOPOTOWSKI M, MOLL B, KÖKCAM-DEMİR Ü, MPONDO MPONDO EA, LEHMAN LG, JANIAC C. Silver and palladium nanoparticles produced using a plant extract as reducing agent, stabilized with an ionic liquid: sizing by X-ray powder diffraction and dynamic light scattering[J]. *Journal of Materials Research and Technology*, 2019, 8(2): 1991-2000.
- [47] GUPTA A, KOIRALA AR, JOSHI B, KHANAL S, GUPTA B, PARAJULI N. Synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Taraxacum officinale* and their antimicrobial activities[J]. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 2017, 9(3): 221-228.
- [48] GURUNATHAN S, HAN JW, KIM ES, PARK JH, KIM JH. Reduction of graphene oxide by resveratrol: a novel and simple biological method for the synthesis of an effective anticancer nanotherapeutic molecule[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 2951-2969.
- [49] WEI LY, LU JR, XU HZ, PATEL A, CHEN ZS, CHEN GF. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications[J]. *Drug Discovery Today*, 2015, 20(5): 595-601.
- [50] SINGH R, SMITHA MS, SINGH SP. The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014, 14(7): 4745-4756.
- [51] AHAMED M, KARNS M, GOODSON M, ROWE J, HUSSAIN SM, SCHLAGER JJ, HONG YL. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 233(3): 404-410.
- [52] SURESH AK, PELLETIER DA, WANG W, MORRELL-FALVEY JL, GU BH, DOKTYCZ MJ. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types[J]. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2012, 28(5): 2727-2735.
- [53] SAMBERG ME, OLDENBURG SJ, MONTEIRO-RIVIERE NA. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin *in vivo* and keratinocytes *in vitro*[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(3): 407-413.
- [54] SURESH AK, PELLETIER DA, WANG W, MOON JW, GU BH, MORTENSEN NP, ALLISON DP, JOY DC, PHELPS TJ, DOKTYCZ MJ. Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on Gram-negative and Gram-positive bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(13): 5210-5215.
- [55] PERETYAZHKO TS, ZHANG QB, COLVIN VL. Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: kinetics and size changes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(20): 11954-11961.
- [56] FABREGA J, FAWCETT SR, RENSHAW JC, LEAD JR. Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(19): 7285-7290.

- [57] GRZELAK A, WOJEWÓDZKA M, MECZYNSKA-WIELGOSZ S, ZUBEREK M, WOJCIECHOWSKA D, KRUSZEWSKI M. Crucial role of chelatable iron in silver nanoparticles induced DNA damage and cytotoxicity[J]. *Redox Biology*, 2018, 15: 435-440.
- [58] RIAZ AHMED KB, NAGY AM, BROWN RP, ZHANG Q, MALGHAN SG, GOERING PL. Silver nanoparticles: significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of *in vitro* cytotoxicity studies[J]. *Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA*, 2017, 38: 179-192.
- [59] HSIAO IL, HSIEH YK, WANG CF, CHEN IC, HUANG YJ. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(6): 3813-3821.
- [60] JONES C, PALMER TE, GRIFFITHS RD. Randomized clinical outcome study of critically ill patients given glutamine-supplemented enteral nutrition[J]. *Nutrition*, 1999, 15(2): 108-115.
- [61] HIXT U, MULLER J. L-alanyl-glutamine: a glutamine dipeptide for paraenteral nutrition[J]. *Health Perspect*, 1996, 2(1): 1-5.
- [62] RAIMUNDO N, BAYSAL BE, SHADEL GS. Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2011, 17(11): 641-649.
- [63] BRUICK RK, McKNIGHT SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF[J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1337-1340.
- [64] McNEIL B, PAPANDREOU I, DENKO NC. Hypoxic reprogramming of tumor metabolism, matching environmental supply with biosynthetic demand[M]// *Tumor Hypoxia*. Columbus OH: World Scientific, 2016: 147-167.
- [65] FEDELES BI, SINGH V, DELANEY JC, LI DY, ESSIGMANN JM. The AlkB family of Fe(II)- α -ketoglutarate-dependent dioxygenases: repairing nucleic acid alkylation damage and beyond[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(34): 20734-20742.