



三苯基膦柱[5]芳烃的制备及其对金黄色葡萄球菌的抑制

张玉君, 吴惠香, 陈浩, 周依榆, 黄建颖*

浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310018

张玉君, 吴惠香, 陈浩, 周依榆, 黄建颖. 三苯基膦柱[5]芳烃的制备及其对金黄色葡萄球菌的抑制[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4869-4881.

ZHANG Yujun, WU Huixiang, CHEN Hao, ZHOU Yiyu, HUANG Jianying. Synthesis of triphenylphosphine pillar[5]arene with inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4869-4881.

摘要:金黄色葡萄球菌是引起感染的最常见病原菌之一, 较易黏附在介质或植入物表面形成生物被膜, 使其较难清除和产生抗生素耐药性, 给临床治疗带来极大挑战。因此研发新型的抑菌剂是非常急需的。柱[5]芳烃是一类新型的超分子大环宿主, 因其高度刚性和对称的结构, 以及可控的腔体尺寸, 为创造具有不同官能团和生物活性的各种抗菌剂提供了无限的可能性。【目的】合成三苯基膦柱[5]芳烃(triphenylphosphine pillar[5]arene, TPP), 以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、金黄色葡萄球菌亚种(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *S.* subsp. *aureus*) ATCC 29213 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) ATCC 43300 为供试菌, 进行抑菌性能和耐药性的探究。【方法】通过最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimal bacteriocidal concentration, MBC)的确定, 来评估化合物的抑菌活性。进一步通过结晶紫染色定量分析 TPP 对细菌生物被膜的形成及采用苯酚硫酸法测定生物被膜中胞外多糖的含量, 最后进行亚抑制浓度传代培养对 TPP 的耐药性进行了研究。【结果】TPP 对 3 种菌株均表现出较好的抑菌和杀菌活性, 其对 3 种菌株的 MIC 均为 15.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 对 *S. aureus* 和 *S. subsp. aureus* 的 MBC 都为 125.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 TPP 即使在 125.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下也不能杀死 MRSA。另外, TPP 在 MIC 下对 3 种菌株的生物被膜抑制率分别为 72.9%、69.2%和 71.8%; 生物被膜中胞外多糖含量随着 TPP 浓度的增加呈现下降的趋势; 抗性发展实验结果表明, TPP 对金黄色葡萄球菌在 20 次传代培养后均未产生耐药性。【结论】本研究结果明确了 TPP 的抑菌性能, 为其在新型抑菌剂开发领域提供了一定的理论依据。

资助项目: 浙江省自然科学基金(LY20B040001)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY20B040001).

*Corresponding author. Tel: +86-571-28877777, E-mail: huangjy@zjgsu.edu.cn

Received: 2024-07-18; Accepted: 2024-09-30; Published online: 2024-10-09

关键词：柱[5]芳烃衍生物；抑菌性能；生物被膜；耐药性

Synthesis of triphenylphosphine pillar[5]arene with inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*

ZHANG Yujun, WU Huixiang, CHEN Hao, ZHOU Yiyu, HUANG Jianying*

Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: *Staphylococcus aureus* is one of the common pathogens causing infections. It can attach media or implant surfaces to form biofilms, which makes it difficult to be tackled and leads to the generation of drug resistance, posing a great challenge to clinical treatment. Therefore, it is urgent to develop novel antimicrobials. Pillar[5]arenes, a new class of supramolecular macrocyclic hosts, attracting wide attention due to their highly rigid and symmetrical architectures and controllable cavity sizes, which afford the limitless possibility to create antimicrobial agents with various functional groups and biological activities. **[Objective]** To synthesize triphenylphosphine pillar[5]arene (TPP) and determine its antibacterial activities and drug resistance with *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (*S. subsp. aureus*) ATCC 29213, and methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 43300. **[Methods]** The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bacteriocidal concentration (MBC) were determined to evaluate the antibacterial activity of TPP. The effects of TPP on biofilm formation were quantified by crystal violet staining, and the content of extracellular polysaccharides in the biofilm was determined by the phenol-sulfuric acid assay. The strain resistance to TPP was examined. **[Results]** TPP exhibited inhibitory effects on the three strains tested, with a MIC of 15.63 $\mu\text{g/mL}$ for the three strains and a MBC of 125.00 $\mu\text{g/mL}$ for both *S. aureus* and *S. subsp. aureus*. However, TPP was unable to kill MRSA even at a concentration of 125.00 $\mu\text{g/mL}$. The biofilm inhibition rates of TPP at MIC were as high as 72.9%, 69.2%, and 71.8% for the three strains, respectively. The content of extracellular polysaccharides decreased with the increase in the concentration of TPP. *S. aureus* did not develop resistance to TPP after 20 generations. **[Conclusion]** This study clarified the antibacterial performance of TPP, providing a theoretical basis for the further development and utilization of TPP in the medicine field.

Keywords: pillar[5]arene derivatives; antibacterial performance; biofilm; drug resistance

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种分布广泛的病原体，可引起一系列与皮肤

和其他软组织感染、肺炎以及菌血症等相关的临床症状。在介质表面，金黄色葡萄球菌，尤

其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), 能够形成生物被膜, 使其具有高度的耐药性和逃避清除的能力^[1]。生物膜是细菌黏附于接触物表面, 生长并分泌的多糖、蛋白质和脂质等大分子物质, 将其自身包裹其中而形成的多细胞微生物群落; 当前人们频繁使用抗生素进行抗菌治疗, 这种频繁使用显著增强了细菌的耐药性, 进而使得细菌生物被膜的形成和稳定性增强, 变得更加难以通过清洗和紫外线技术等常规手段彻底清除, 从而限制了治疗效果的发挥^[2]。鉴于这一严峻形势, 我们迫切需要开展针对浮游细菌以及更为棘手的细菌生物被膜的新型化合物研究策略。然而, 抗生素的广泛滥用和误用导致了抗生素耐药细菌的出现^[3-4], 严重威胁人类健康。因此, 开发能够有效抑制和清除生物被膜且不产生耐药性的新型抗菌剂至关重要。

柱[n]芳烃拥有一组独特的性质, 其对称管状结构可以很容易地在 2 个边缘用各种官能团进行功能化^[5-6]。柱芳烃大环化合物是后续超分子化学的新主角, 因其试剂廉价、易重结晶、产量高等优点, 而被广泛应用于生物学以及材料科学等多个领域^[7]。柱[5]芳烃与多肽、阳离子和两性离子等结合后, 显示出抑菌或抗生物被膜活性^[8]。两性离子柱[5]芳烃衍生物可以清除大肠杆菌的生物被膜^[9]; 带有胍基和双胍基团的阳离子两亲化合物可以防止枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌菌株生物被膜的形成^[10]; Joseph 等^[11]研究发现, 带有磷鎓基团的水溶性柱[5]芳烃衍生物和季铵基团阳离子柱[5]芳烃均可以有效抑制革兰氏阳性病原体生物被膜的形成。此外, 三苯基膦因具有较大的疏水表面积和离域电荷分布, 这使得它们能够轻松穿过生物被膜, 阳离子三苯基膦络合物对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有显著的抗菌活性^[12]。因此本研

究在溴代柱[5]芳烃上取代 2 个溴原子并引入三苯基膦阳离子基团, 得到三苯基膦柱[5]芳烃(triphenylphosphine pillar[5]arene, TPP)。以金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、金黄色葡萄球菌亚种(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *S. subsp. aureus*) ATCC 29213 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC 43300 细菌菌株为供试菌, 研究了 TPP 的抑菌性能及其耐药性, 旨在为开发新型有效的抑菌剂提供更多的可能性和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株和主要试剂

菌株 *S. aureus* ATCC 6538、*S. subsp. aureus* ATCC 29213 和 MRSA ATCC 43300 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。

胰蛋白胍大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)和胰酪蛋白胍大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)购自北京陆桥技术股份有限公司, 其他常用试剂购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.2 主要仪器

Bruker AVANCE III 500 NMR 超导核磁共振仪, Bruker 公司; 酶标仪, TECAN 集团公司; UV-2600 紫外可见光分光光度计, SHIMADZU 公司。

1.3 三苯基膦柱[5]芳烃的合成及表征

在氮气保护下, 于三颈烧瓶中加入对苯二酚(30 mmol)、无水碳酸钾(120 mmol)和丙酮(250 mL), 搅拌溶解后加入 1,4-二溴丁烷(180 mmol), 60 °C 反应, 薄层色谱分析(thin-layer chromatography, TLC)监测反应进程。待反应结束, 真空抽滤, 得到反应液经二氯甲烷萃取、无水硫酸钠干燥和真空浓缩后, 经柱层析得到化合物 1。将化合物 1 (3.48 g,

10 mmol)、对苯二甲醚(5.53 g, 40 mmol)、多聚甲醛(1.50 g, 50 mmol)和 1,2-二氯乙烷(250 mL)加入到 500 mL 的圆底烧瓶中, 室温搅拌 10 min 后, 加入三氟化硼乙醚络合物(7.10 g, 50 mmol), TLC 监测反应结束后, 加入去离子水淬灭反应, 分别经二氯甲烷(3×100 mL)萃取, 无水硫酸钠干燥, 真空浓缩, 柱层析得到化合物 **2**。最后, 将化合物 **2** (0.50 g, 0.50 mmol)和三苯基膦(0.29 g, 1.11 mmol)置于 50 mL 三颈烧瓶中, 氮气置换 3 次, 加入 10 mL 乙腈, 回流反应。TLC 监测反应后将反应液冷却至室温, 搅拌滴加无水乙醚, 析出的白色固体经洗涤和干燥得到最终产物化合物 **3** (三苯基膦柱[5]芳烃)(图 1)。

1.4 抑菌活性的测定

参考 Yang 等^[13]的方法并稍作修改, 将保藏在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的甘油管 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 菌株放置于无菌操作台中, 分别用接种环将菌株划线至添加有 1%葡萄糖的胰酪蛋白胨大豆琼脂(TSA)平板上, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 24 h 后, 再用接种环将典型单菌落分别接种于添加有 1%葡萄糖的胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth, TSB)中, 并将其放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 振荡培养 24 h。经 2 次活化的菌液使用酶标仪测定 OD_{600} 下的吸光度值来确定细菌浓度, 以确保浓度约为 10^8 CFU/mL 后待用(该菌落数已通过平板菌落计数法进行确定)。

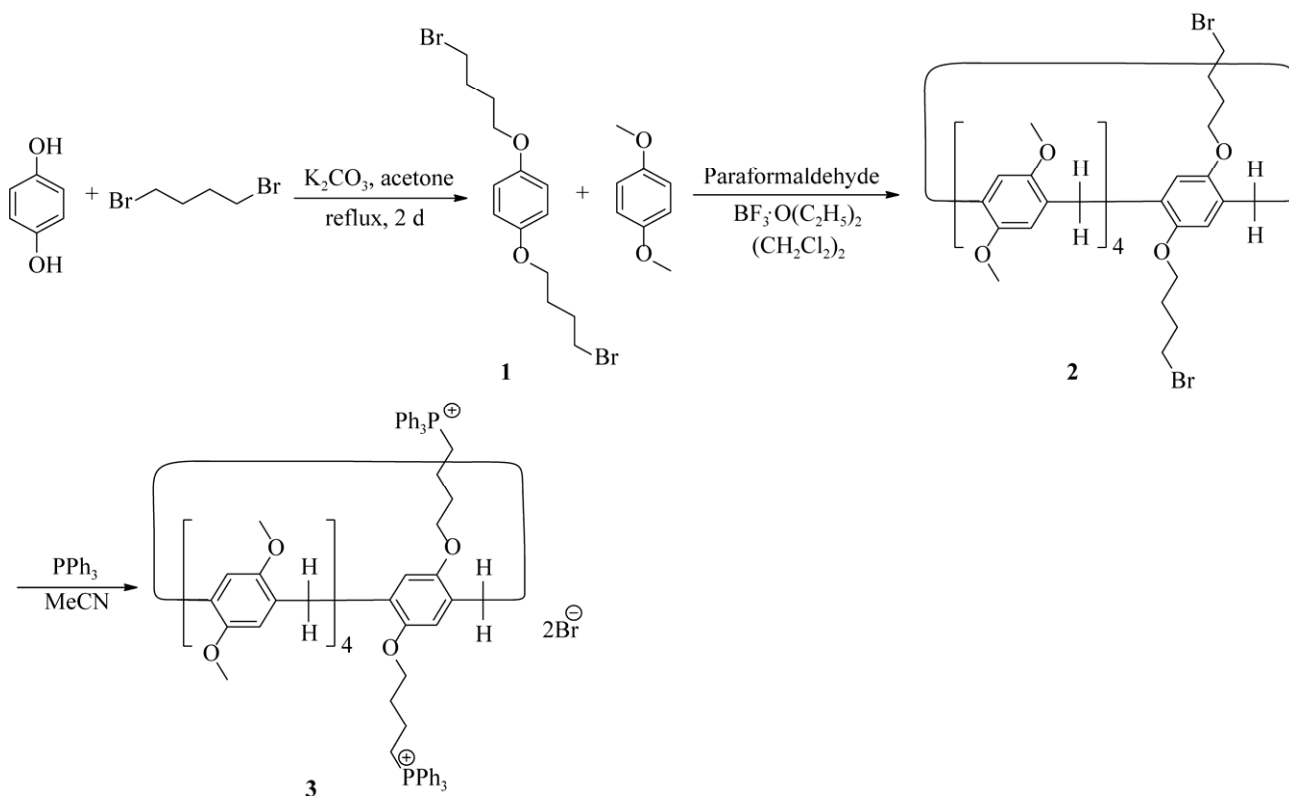


图 1 化合物 1、2 和 3 合成

Figure 1 Synthesis of compounds 1, 2 and 3.

通过微量肉汤稀释法测定化合物 TPP 对 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。将 1 mg 的三苯基膦柱[5]芳烃化合物溶解于 2 mL 的 DMSO, 得到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TPP 溶液, 随后用无菌水对倍稀释配制得到一系列浓度的 TPP 溶液 (0.98–250.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。分别将 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 的细菌菌悬液 (100 μL , 10^5 CFU/mL) 接种于 96 孔板。同时, 分别以 TSB (含 1% 葡萄糖) 的液体培养基为阴性对照, TSB (含 1% 葡萄糖) 的细菌菌悬液无抑制剂为阳性对照。MIC 值记录为能够抑制微生物生长的最低抑菌剂的浓度。

采用琼脂平板法测定抑菌剂对金黄色葡萄球菌的最小杀菌浓度 (minimal bacteriocidal concentration, MBC)。在 MIC 测定之后, 从肉眼可见清晰的 96 孔板中依次吸取 100 μL 菌悬液均匀涂布于 TSA (含 1% 葡萄糖) 平板上。将平板倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后, 观察平板上的细菌生长情况, 完全无菌落生长的浓度即为 MBC。

1.5 金黄色葡萄球菌生长曲线的测定

参考 Diao 等^[14]研究方法, 将 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 培养至对数生长期 ($OD_{600}=0.8$), 收集菌悬液, 并将其稀释制备成浓度为 10^6 CFU/mL 的菌悬液, 加入不同浓度的 TPP 溶液, 使其最终浓度分别为 1/2 MIC 和 1 MIC, 以仅添加 TSB (含 1% 葡萄糖) 的细菌菌悬液无抑制剂为空白对照, 将其放置于恒温振荡摇床中进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养, 分别间隔 2 h 取样, 用酶标仪测定 OD_{600} 值。通过培养时间和 OD_{600} 值绘制生长曲线, 检测 TPP 对 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 生长曲线的变化。

1.6 生物被膜形成抑制

抗生物被膜形成采用 Ersanli 等^[15]方法进行

测定。将 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 菌株在 TSB 培养基里培养过夜, 然后用新鲜的培养基对菌液以 1:100 的量添加到补充有 1% 葡萄糖的新鲜 TSB 培养基中。在 96 孔板中采用梯度稀释法制备无菌水和 TPP 的预混溶液, 再将稀释好的菌悬液吸取 100 μL 分别加入 96 孔板的每个孔之中; 同时制备含有每种测试浓度化合物的无细菌添加的孔及不含化合物的对照孔, 且以含 1% 葡萄糖的 TSB 加细菌菌悬液无抑制剂作为阳性对照组。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 24 h 后, 通过翻转平板去除用过的培养基和自由漂浮的细菌。然后用吸管吸取 200 μL PBS 多次反复洗涤生物被膜以去除浮游细菌。再加入 200 μL 的 0.4% 结晶紫溶液染色 15 min 后, 用 PBS 多次反复冲洗。随后倒置孔板, 轻轻拍打纸巾以除去多余的液体, 风干。每孔中分别加入 200 μL 95% 乙醇, 静置 15 min 后使用酶标仪记录所有样品在 OD_{600} 下的吸光度。每种浓度的化合物都进行了 3 次重复测试和 3 次独立实验。生物被膜的抑制结果采用公式(1)计算, 并以百分率表示。

$$\text{生物被膜抑制率} = \frac{\text{对照组 } OD \text{ 值} - \text{处理组 } OD \text{ 值}}{\text{对照组 } OD \text{ 值}} \times 100\% \quad (1)$$

1.7 胞外多糖(EPS)含量测定

1.7.1 标准曲线的绘制

分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的 0.1 mg/mL 标准葡萄糖溶液, 置于 10 mL 的试管中, 依次添加灭菌的蒸馏水使终体积为 1 mL。随后分别加入 1 mL 5% 苯酚溶液, 振摇混匀, 然后缓慢逐滴加入 5 mL 浓硫酸, 静置 10 min。使用涡旋振荡器使反应液充分混合, 然后将试管放置于沸水浴反应 20 min 后, 于波长 490 nm 处测定吸收度。以葡萄糖浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 作为横坐标, 吸收度 A 作为纵坐标绘制标准曲线。

1.7.2 胞外多糖的提取

采用 Wu 等^[16]的方法,菌液分别在含有 TPP 的 TSB 培养基和不含有 TPP 的空白对照组 TSB 培养基中,37 °C 振荡培养 2 d,菌液 4 000 r/min 离心 10 min,除去上清液,将菌沉淀重悬于 10 mL 的灭菌理盐水中。再加入 50 μL 的 Pronase E,置于 37 °C 恒温培养箱孵育 2 h,加入 200 μL 质量浓度为 10% 的三氯乙酸,冰水放置 30 min,10 000 r/min 离心 30 min。收集上清液加入等体积的乙醇溶液,-20 °C 放置过夜,然后经 12 000 r/min 离心 20 min,除去上清液。沉淀物中分别加 1 mL 的 5% 的苯酚和 5 mL 浓硫酸,沸水浴 10 min,同时设置对照组,在 OD_{490} 下测定吸光值。结果用胞外多糖抑制率表示,见公式(2)。

$$\text{胞外多糖抑制率} = \frac{\text{对照组EPS含量} - \text{处理组EPS含量}}{\text{对照组EPS含量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.8 抗性发展分析

采用 Liu 等^[17]的方法测定 TPP 对 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 的抗性发展研究,进一步评估金黄色葡萄球菌随着时间的变化是否会对 TPP 产生耐药性。细菌在 37 °C 下的 TSB 培养基中培养过夜。取过夜菌 10 μL 加入到 10 mL 的 TSB 培养基进行稀释。随后向不同浓度 TPP/甲氧西林的 96 孔板中加入含菌培养基,在 37 °C 的培养箱里培养 24 h 后,取亚抑制浓度的悬浊液进行培养,在培养后需重新测定其 MIC,重复此操作传代至 20 代,同时利用甲氧西林作为对照。

1.9 数据处理及统计分析

实验中均进行 3 次平行实验,数据采用 Excel 2016 统计分析,Origin 8.0 软件作图,采用单因素方差分析 (One-way analysis of variance) 进行评估,采用 Duncan's test 方法表示均数之间的显著性差异, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义,实验结果以平均值±偏差表示。

2 结果与分析

2.1 三苯基膦柱[5]芳烃的表征结果及分析

化合物 2 的结构表征(图 2A):¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.82–6.70 (m, 10H), 3.80 (t, $J=6.0$ Hz, 4H), 3.78 (d, $J=3.8$ Hz, 10H), 3.67 (dd, $J=14.7, 4.9$ Hz, 24H), 3.20 (s, 4H), 1.84–1.69 (m, 8H)。化合物 3 (TPP) 的结构表征(图 2B):¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.83–7.79 (m, 15H), 7.64–7.60 (m, 15H), 6.73 (m, 10H), 3.95 (m, 10H), 3.74–3.57 (m, 40H), 2.47–1.64 (m, 40H)。

2.2 三苯基膦柱[5]芳烃的抑菌活性

S. aureus、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 经过夜培养后,在 96 孔板中,肉眼观察到的澄清孔即为 MIC (图 3A 红色方框已标注),进一步通过测定 OD 值判断 TPP 对 3 种菌株的 MIC^[18]。从图 3A 可以明显看出,当 TPP 浓度为 15.63 μg/mL 时,*S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 的孔板都是澄清状态,说明 TPP 完全抑制了菌株的生长,从而得到 TPP 对 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 的 MIC 均为 15.63 μg/mL。

图 3B 平板涂布实验结果表明,在浓度达到 MIC 值时,细菌生长只是得到了抑制,再经过夜培养后,细菌仍会生长繁殖形成菌落。随着 TPP 浓度增加,平板上的菌落数量也随之下降。当 TPP 浓度为 125.00 μg/mL 时,*S. aureus* 和 *S. subsp. aureus* 的琼脂平板上无可见菌落生长,而 MRSA 的琼脂平板上仍然有大量菌落生长。因此,可确定 TPP 对 *S. aureus* 和 *S. subsp. aureus* 的 MBC 为 125.00 μg/mL,TPP 即使在 125.00 μg/mL 浓度下都不能杀死 MRSA。

2.3 三苯基膦柱[5]芳烃对金黄色葡萄球菌生长曲线

通过生长曲线进一步测定 TPP 对 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 的影响。如图 4 所示,空白对照组细菌生长呈典型的“S”型生长,在 2 h 后,*S. aureus*、*S. subsp. aureus*

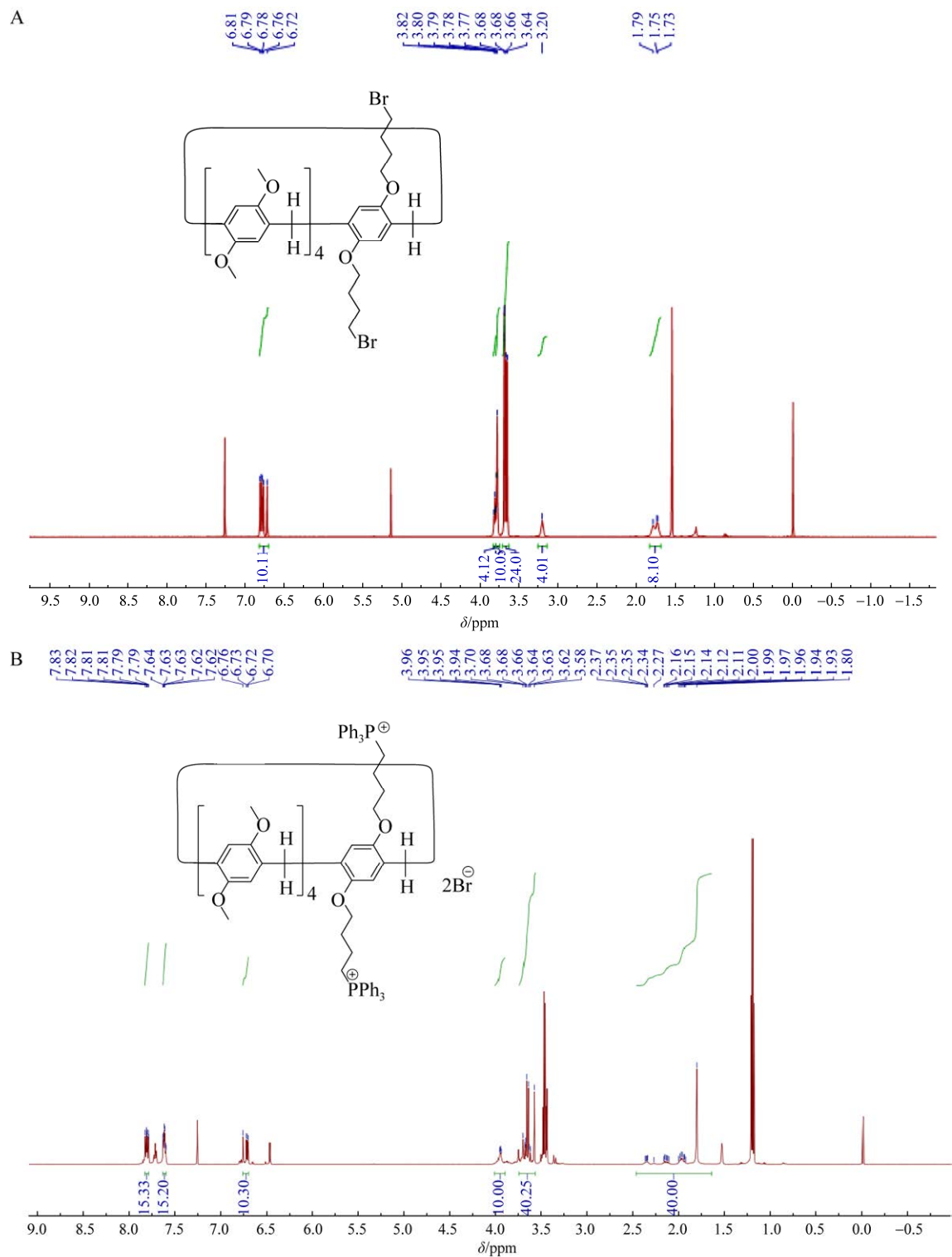


图 2 化合物的表征

Figure 2 Characterization of compounds. A: ^1H NMR of compound 2. B: ^1H NMR of compound 3 (TPP).

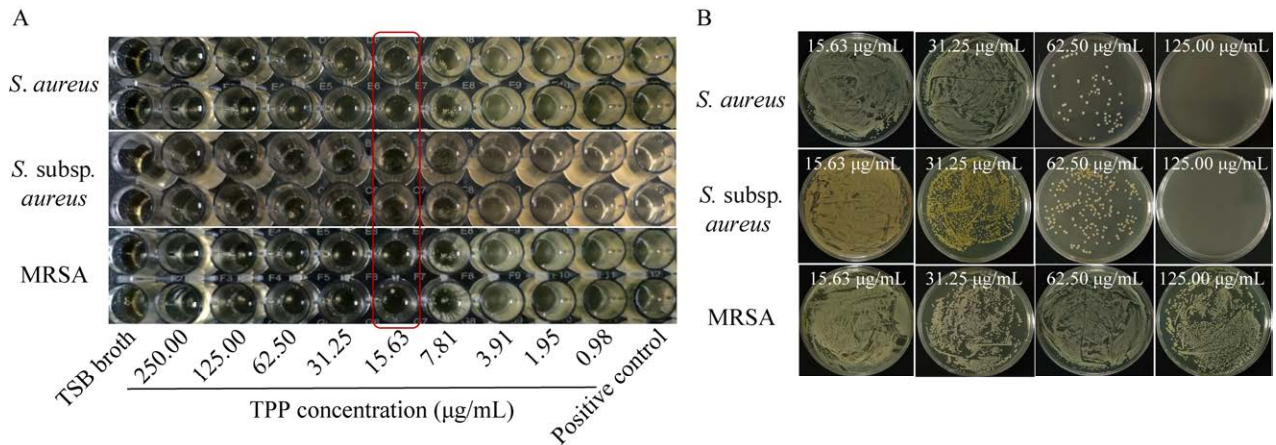


图3 TPP对3种菌株的MIC和MBC结果图

Figure 3 The MIC and MBC results of TPP against three strains. A: Plot of 96-well plate results after 24 h of different concentrations of TPP culture broths. B: MBC plate coating of TPP on three strains. The red box in the figure indicates the first clarification hole, which corresponds to the MIC hole.

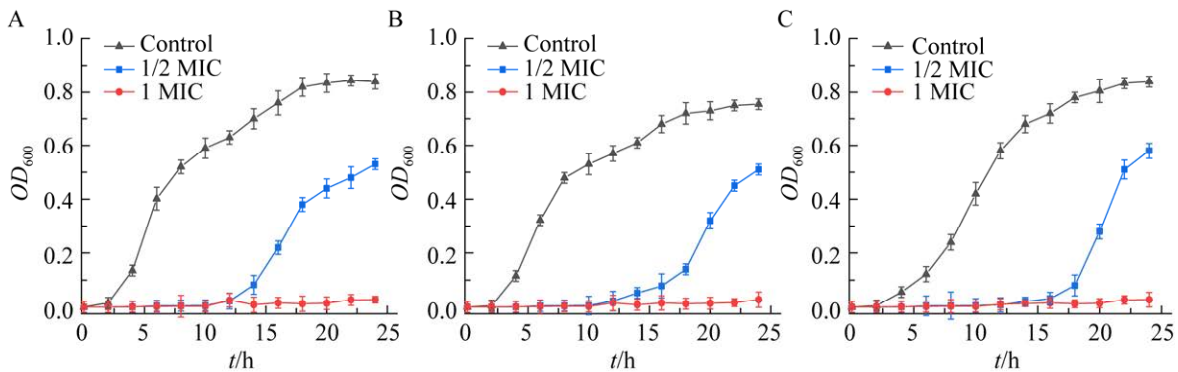


图4 TPP在不同的浓度下对细菌生长动力学的影响

Figure 4 Effect of TPP on bacterial growth kinetics at different concentrations. A: The growth curves of *S. aureus* under different concentrations of TPP. B: The growth curves of *S. subsp. aureus* under different concentrations of TPP. C: The growth curves of MRSA under different concentrations of TPP.

和 MRSA 迅速进入对数生长期,且在 20 h 内呈持续增长趋势,之后进入稳定期,这一现象同文献[14]一致。经 1/2 MIC TPP 处理的 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 均受到抑制。*S. aureus* 和 *S. subsp. aureus* 的生长在 10 h 内处于迟缓期,随后进入对数生长期(图 4A、4B)。从图 4C 可以看出,MRSA 的生长在 12 h 内处于迟缓期,随后进入对数生长期。重要的是 1 MIC 的 TPP 处理完全抑制甚至杀灭了 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA,因此 TPP

对 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 抑菌作用的强弱具有明显的浓度依赖性。此结论与此前 MIC 测定实验所得结论一致。

2.4 生物被膜形成的抑制和胞外多糖含量的测定

通过结晶紫染色测定,发现暴露于 TPP 的 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 的生物被膜形成被显著抑制(图 5A)。研究发现 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 的生物被膜形成的抑制率具有浓度依赖性($P < 0.0001$)。当 1/4 MIC

和 1/2 MIC 的 TPP 处理时, *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 生物被膜的抑制率分别为 29.3%、28.1%、27.7% 和 62.4%、59.2%、59.2%; 在 1 MIC 的 TPP 处理下, *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 生物被膜的抑制率分别高达 72.9%、69.2% 和 71.8% (图 5B)。正电荷的氨基酸可能会通过增加静电相互作用来破坏阴离子细菌膜的表面^[19], 而正电荷也是柱[5]芳烃衍生物抗生物被膜活性的关键^[11]。这也更加证明了接于柱[5]芳烃骨架上的阳离子基团对其抗生物被膜能力至关重要。

胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)的形成可以阻碍抗菌药物的扩散, 使生物被膜内的浮游细菌对抗生素更具有抗性。作为 EPS 形成的参与者, 胞外多糖负责保护细菌细胞结构完整性和存活率^[20]。采用苯酚-硫酸法测

定细菌胞外多糖的含量。首先用苯酚-硫酸法绘制了葡萄糖的标准曲线, 回归方程为: $y=0.06916x+0.1099$, 相关系数 $R^2=0.9973$ (图 5C)。从图 5D 可以看出, 随着 TPP 浓度的增加, 对 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 生物被膜胞外多糖的抑制率呈现上升的趋势($P<0.0001$)。当 1/4 MIC 和 1/2 MIC 的 TPP 处理时, *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 生物被膜中胞外多糖的抑制率分别为 12.5%、14.3%、15.1% 和 35.7%、35.3%、37.1%; 在 1 MIC 浓度下, 对 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 生物被膜胞外多糖的抑制率分别为 66.6%、68.3% 和 67.8%。结果表明, TPP 可以通过降低 *S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA 生物被膜中胞外多糖的含量来分解生物被膜, 从而防止细菌黏附。

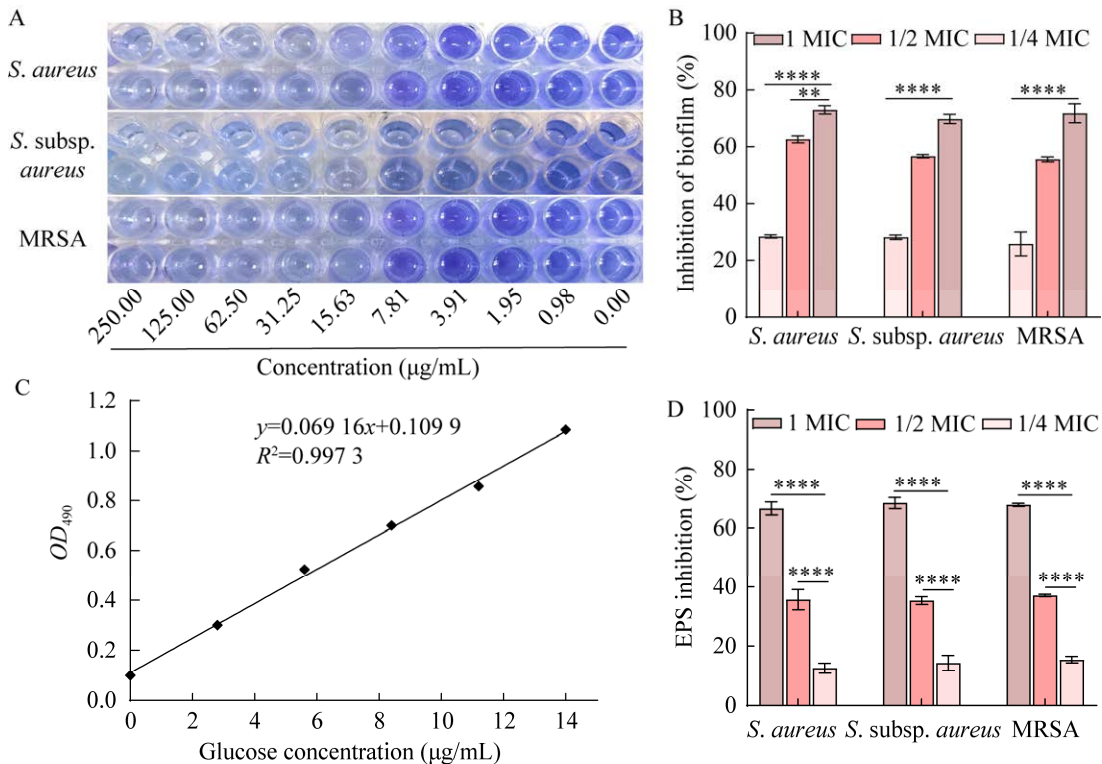


图 5 TPP 对 3 种菌株的生物被膜形成抑制和胞外多糖含量的影响

Figure 5 Effect of TPP on inhibition of biofilm formation and EPS content in three strains. A: Crystal violet staining of the biofilm at different concentrations. B: Inhibition rate of TPP on the biofilm of three strains at 1/4 MIC, 1/2 MIC and 1 MIC concentrations. C: Standard curve of glucose. D: Effect of TPP on extracellular polysaccharides of the biofilm of the three strains. **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$.

2.5 抗性发展分析

根据 MIC 值的变化监测 *S. aureus* 和 *S. subsp. aureus* 耐药性的发展。如图 6 所示, 在 1/2 MIC TPP 存在的情况下连续传代 20 d 后, TPP 对 *S. aureus* 和 *S. subsp. aureus* 的 MIC 值基本保持不变, 均为 15.63 $\mu\text{g/mL}$ 。甲氧西林处理的 *S. aureus* 和 *S. subsp. aureus* 菌株在各自的阳性对照中观察到 MIC 值的显著增加。*S. aureus* 在第 4、6、10 和 14 天的 MIC 值分别增长为 1.56、3.13、6.25 和 12.50 $\mu\text{g/mL}$, 分别是其初始值 (0.78 $\mu\text{g/mL}$) 的 2 倍、4 倍、8 倍和 16 倍。对于 *S. subsp. aureus*, 在第 6、10、12 和 16 天 MIC 值分别增长为 3.13、6.25、12.50 和 25.00 $\mu\text{g/mL}$, 分别是其初始值 (1.56 $\mu\text{g/mL}$) 的 2 倍、4 倍、8 倍和 16 倍。这些结果表明, TPP 在整个研究过程中仍保持活性。

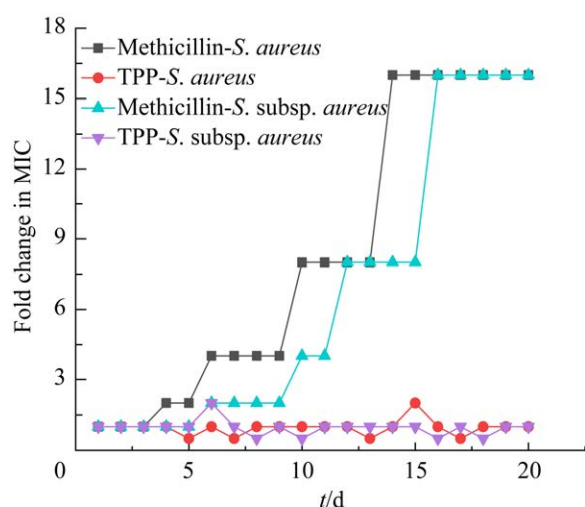


图 6 1/2 MIC 浓度的 TPP 存在下连续传代期间的抗性发展

Figure 6 Development of resistance during successive passages in the presence of TPP at 1/2 MIC concentration. Methicillin was used as a positive control for Gram-positive bacteria.

3 讨论与结论

由致病菌感染引发的安全事件给人们健康带来了严重的危害。近年来, 随着抗生素的大量使用, 病原体在选择性压力下不断进化, 导致新的耐药性致病菌的出现和传播。超耐药 MRSA 菌株的普遍流行, 引发人们的关注。MRSA 菌株易在生物和非生物表面形成生物被膜, 对抗菌药物具有高效的免疫性, 也较难被消毒剂完全清除^[21]。目前, 柱芳烃已经被功能化并探索其作为抗菌材料方面具有巨大的潜力, 柱芳烃大环分子可以携带各种官能团, 这些官能团增加了大环的亲疏水性及其在溶液或膜界面上形成囊泡的自缔合活性。三苯基磷阳离子是研究得最多的亲脂性阳离子, 它可以附着在各种分子上, 并将它们传递到线粒体^[22]。已有研究显示, 阳离子三苯基磷络合物表现出了较高的抑菌活性和细胞毒性, 因其细菌细胞膜和线粒体膜结构相似, 并猜测三苯基磷能够作用于细菌细胞膜, 通过破膜机制发挥抗菌作用^[23]。受此启发, 我们合成了三苯基磷柱[5]芳烃 (TPP), 研究发现 TPP 对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*、*S. subsp. aureus* 和 MRSA) 表现出良好的抗菌活性, 其对 3 种菌株的 MIC 都为 15.63 $\mu\text{g/mL}$, *S. aureus* 和 *S. subsp. aureus* 的 MBC 为 125.00 $\mu\text{g/mL}$, 而 TPP 即使在 125.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下都不能杀死 MRSA; TPP 对 3 种菌株的生物被膜形成具有显著的抑制效果, 生物被膜中胞外多糖含量随着 TPP 浓度的增加呈现下降的趋势且耐药性可忽略不计。

不同官能团修饰的柱芳烃展现的抗菌活性有所不同。如 Subakaeva 等^[24]研究发现含季铵基和磺胺基的柱[5]芳烃衍生物对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的 MIC 为 320.00–650.00 $\mu\text{g/mL}$;

Kaizerman-Kane等^[25]报道的阳离子柱[5]芳烃衍生物对 *S. aureus* (ATCC 33592)和 *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)生物被膜的形成具有良好的抑制效果 [minimal biofilm inhibitory concentration that inhibits 50% of bacterial biofilm (MBIC₅₀)=0.50–32.00 µg/mL]; 我们前期设计合成的阳离子三甲胺对 *S. aureus* (ATCC 6538)和 *Escherichia coli* (DH5α)的 MIC 分别为 250.00 µg/mL 和 500.00 µg/mL, 而吡啶柱[5]芳烃对 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 具有较好的抑菌活性(MIC, 250.00 µg/mL)^[13]。三苯基膦是一种简单重要的有机合成中间体, 目前主要应用于医药、农药、染料等领域。膜靶向三苯基膦功能化的环丙沙星对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有较好的抑制作用^[26]。我们设计合成的 TPP 对 3 种金黄色葡萄球菌菌株表现出较好的抗菌活性, 可能是由于阳离子柱芳烃更容易附着在革兰氏阳性细菌上, 因为它们的典型结构是带负电的磷酸磷壁酸和厚肽聚糖, 而革兰氏阴性细菌细胞壁外有由脂多糖组成的外膜^[27]。阳离子化合物对革兰氏阳性菌的抑菌和抗生物被膜活性与通过静电相互作用结合细菌膜上带负电的肽聚糖的理论相关^[28]。由于柱[5]芳烃与亲脂性阳离子三苯基膦结合, 因此它们可以快速进入细菌膜带负电荷的磷脂双层。三苯基膦的亲脂性和阳离子特性使其能够更容易穿透革兰氏阳性细菌带负电荷的细胞膜, 从而表现出较高的抑菌活性。后续 TPP 对革兰氏阴性菌的抑制性能也需要进一步研究。

抗性发展分析结果表明, 对照抗生素甲氧西林对金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌亚种的抗菌活性, 传代 14 次后, 甲氧西林对金黄色葡萄球菌的 MIC 是初始 MIC 的 16 倍。传代 16 次后, 甲氧西林对金黄色葡萄球菌亚种的 MIC

是初始 MIC 的 16 倍。然而 TPP 对所有测试菌株的每代 MIC 值与原始传代相比基本保持不变, 即使在 20 次传代后仍保持恒定, 初步表明 TPP 在整个耐药研究中均保持活性。

综上所述, 柱[5]芳烃与亲脂性阳离子三苯基膦结合可以有效抑制金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌亚种和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的生长和生物被膜形成, 且耐药性可忽略不计, 本研究可为开发用于治疗耐药细菌的新型抑菌剂提供理论指导。

参考文献

- [1] Achek R, Hotzel H, Nabi I. Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in Algeria[J]. Pathogens, 2020, 9(2): 153.
- [2] 李栋辉, 石玉刚. 浮游态和生物被膜态致病菌的光动力灭菌研究进展[J]. 中国食品学报, 2024, 24(4): 431-443.
LI DH, SHI YG. Research progress on photodynamic inactivation of planktonic and biofilm bacteria[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(4): 431-443.
- [3] ALAM MM, ISLAM M, WAHAB A, BILLAH M. Antimicrobial resistance crisis and combating approaches[J]. Journal of Medicine, 2019, 20(1): 38-45.
- [4] NICOLAS I, BORDEAU V, BONDON A, BAUDY-FLOC'H M, FELDEN B. Novel antibiotics effective against Gram-positive and-negative multi-resistant bacteria with limited resistance[J]. PLoS Biology, 2019, 17(7): e3000337.
- [5] 杨华, 黄建颖, 修丽丽. 柱[5]芳烃衍生物对细菌抗菌活性及生物被膜抑制的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 963-976.
YANG H, HUANG JY, XIU LL. Research progress in antibacterial activity and biofilm inhibition of pillar[5]arene derivatives[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 963-976 (in Chinese).

- [6] OGOSHI T, YAMAGISHI TA, NAKAMOTO Y. Pillar-shaped macrocyclic hosts pillar[n]arenes: new key players for supramolecular chemistry[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(14): 7937-8002.
- [7] TANG RW, YE YP, ZHU SJ, WANG Y, LU B, YAO Y. Pillar[6]arenes: from preparation, host-guest property to self-assembly and applications[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2023, 34(3): 107734.
- [8] ZHANG M, ZHU PP, XIN PY, SI W, LI ZT, HOU JL. Synthetic channel specifically inserts into the lipid bilayer of Gram-positive bacteria but not that of mammalian erythrocytes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(11): 2999-3003.
- [9] GAO LY, LI MJ, EHRMANN S, TU ZX, HAAG R. Positively charged nanoaggregates based on zwitterionic pillar[5]arene that combat planktonic bacteria and disrupt biofilms[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(11): 3645-3649.
- [10] BÖTTCHER T, KOLODKIN-GAL I, KOLTER R, LOSICK R, CLARDY J. Synthesis and activity of biomimetic biofilm disruptors[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(8): 2927-2930.
- [11] JOSEPH R, KAIZERMAN D, HERZOG IM, HADAR M, FELDMAN M, FRIDMAN M, COHEN Y. Phosphonium pillar[5]arenes as a new class of efficient biofilm inhibitors: importance of charge cooperativity and the pillar platform[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(70): 10656-10659.
- [12] NAZAROV PA, KIRSANOV RS, DENISOV SS, KHAILOVA LS, KARAKOZOVA MV, LYAMZAEV KG, KORSHUNOVA GA, LUKYANOV KA, KOTOVA EA, ANTONENKO YN. Fluorescein derivatives as antibacterial agents acting *via* membrane depolarization[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 309.
- [13] YANG H, JIN LQ, ZHAO DQ, LIAN ZF, APPU M, HUANG JY, ZHANG ZB. Antibacterial and antibiofilm formation activities of pyridinium-based cationic pillar[5]arene against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(14): 4276-4283.
- [14] DIAO MM, QI DP, XU MM, LU ZX, LV FX, BIE XM, ZHANG C, ZHAO HZ. Antibacterial activity and mechanism of monolauroyl-galactosylglycerol against *Bacillus cereus*[J]. *Food Control*, 2018, 85: 339-344.
- [15] ERSANLI C, TZORA A, SKOUFOS I, FOTOU K, MALOUPA E, GRIGORIADOU K, VOIDAROU CC, ZEUGOLIS DI. The assessment of antimicrobial and anti-biofilm activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* strains[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(2): 384.
- [16] WU HX, ZHANG YJ, CHEN H, LIU J, XIU LL, HUANG JY. Preparation, antioxidant and antibacterial activities of cryptate copper(II)/sulfonate chitosan complexes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 231: 123200.
- [17] LIU JY, LI HX, LI HZ, FANG SF, SHI JG, CHEN YZ, ZHONG RC, LIU SP, LIN SM. Rational design of dipicolylamine-containing carbazole amphiphiles combined with Zn^{2+} as potent broad-spectrum antibacterial agents with a membrane-disruptive mechanism[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 64(14): 10429-10444.
- [18] van GEELLEN L, KASCHANI F, SAZZADEH SS, ADENIYI ET, MEIER D, PROKSCH P, PFEFFER K, KAISER M, IOERGER TR, KALSCHUEER R. Natural brominated phenoxypheols kill persistent and biofilm-incorporated cells of MRSA and other pathogenic bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(13): 5985-5998.
- [19] CHOU SL, SHAO CX, WANG JJ, SHAN AS, XU L, DONG N, LI ZY. Short, multiple-stranded β -hairpin peptides have antimicrobial potency with high selectivity and salt resistance[J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 30: 78-93.
- [20] DRAGOŠ A, KOVÁCS ÁT. The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(4): 257-266.
- [21] 张鹏飞, 王婷, 钟楠. 食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的形成及相关基因的检测[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(10): 41-49.

- ZHANG PF, WANG T, ZHONG N. Detection of biofilm formation and biofilm-related genes of food-borne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 41-49.
- [22] ZIELONKA J, JOSEPH J, SIKORA A, HARDY M, OUARI O, VASQUEZ-VIVAR J, CHENG G, LOPEZ M, KALYANARAMAN B. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(15): 10043-10120.
- [23] KHAILOVA LS, NAZAROV PA, SUMBATYAN NV, KORSHUNOVA GA, ROKITSKAYA TI, DEDUKHOVA VI, ANTONENKO YN, SKULACHEV VP. Uncoupling and toxic action of alkyltriphenylphosphonium cations on mitochondria and the bacterium *Bacillus subtilis* as a function of alkyl chain length[J]. Biochemistry (Moscow), 2015, 80(12): 1589-1597.
- [24] SUBAKAEVA E, ZELENIKHIN P, SOKOLOVA E, PERGAT A, ALEKSANDROVA Y, SHURPIK D, STOIKOV I. The synthesis and antibacterial properties of pillar[5]arene with streptocide fragments[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(12): 2660.
- [25] KAIZERMAN-KANE D, HADAR M, JOSEPH R, LOGVINIUK D, ZAFRANI Y, FRIDMAN M, COHEN Y. Design guidelines for cationic pillar[n]arenes that prevent biofilm formation by Gram-positive pathogens[J]. ACS Infectious Diseases, 2021, 7(3): 579-585.
- [26] KANG S, SUNWOO K, JUNG Y, HUR JK, PARK KH, KIM JS, KIM D. Membrane-targeting triphenylphosphonium functionalized ciprofloxacin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. Antibiotics, 2020, 9(11): 758.
- [27] KANG HK, SEO CH, LUCHIAN T, PARK Y. Pse-T2, an antimicrobial peptide with high-level, broad-spectrum antimicrobial potency and skin biocompatibility against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018, 62(12): e01493-18.
- [28] ZHAO SY, HUANG WJ, WANG CR, WANG YP, ZHANG YF, YE ZP, ZHANG JH, DENG LD, DONG AJ. Screening and matching amphiphilic cationic polymers for efficient antibiosis[J]. Biomacromolecules, 2020, 21(12): 5269-5281.