



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

## 《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 酸响应纳米复合物 RYR@ZIF-8 的制备及其对单核细胞增生李斯特菌的抑菌性能

作者： 孙艳，裴子轩，黄保嘉，杜婷，杜欣军

DOI： 10.13364/j.issn.1672-6510.20250077

收稿日期： 2025-04-17

网络首发日期： 2026-01-29

引用格式： 孙艳，裴子轩，黄保嘉，杜婷，杜欣军. 酸响应纳米复合物 RYR@ZIF-8 的制备及其对单核细胞增生李斯特菌的抑菌性能[J/OL]. 天津科技大学学报. <https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250077>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250077

# 酸响应纳米复合物 RYR@ZIF-8 的制备及其对单核细胞增生李斯特菌的抑菌性能

孙 艳, 裴子轩, 黄保嘉, 杜 婷, 杜欣军

(食品营养与安全国家重点实验室, 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

**摘 要:** 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种常见的食源性致病菌, 具有较强的环境适应性和致病性。针对现有抗菌策略存在耐药性增强、副作用大等问题, 开发高效、安全且环境响应型的新型抗菌材料成为研究的热点。通过一步法制备 ZIF-8 金属有机骨架材料包载红曲 (RYR) 的复合材料 (RYR@ZIF-8), 利用透射电子显微镜 (TEM)、扫描电子显微镜 (SEM)、X 射线衍射 (XRD)、X 射线光电子能谱 (XPS)、吸附比表面测试法 (BET) 等对纳米材料的结构和形貌、官能团、表面组成等进行表征和分析。对单核细胞增生李斯特菌的抑菌活性实验结果表明, 在 RYR@ZIF-8 复合材料质量浓度为 1.25 mg/mL 时, 抑菌率高达 84.6%。对 RYR@ZIF-8 复合材料的抑菌机理研究发现, 单核细胞增生李斯特菌在增殖过程中会产酸, 使溶液呈微酸性, 而 RYR@ZIF-8 具有酸响应特性, 微酸性条件会破坏其框架结构而释放出  $Zn^{2+}$  和 RYR, 通过实验证明二者协同对菌体细胞膜产生氧化损伤, 使膜结构破裂释放出内容物, 导致单核细胞增生李斯特菌的死亡。这表明 RYR@ZIF-8 在抗菌领域有良好的应用前景。

**关键词:** 单核细胞增生李斯特菌; 酸响应; 抑菌; 膜损伤

中图分类号: TB383.1; TQ127.11

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

## Preparation of Acid-Responsive RYR@ZIF-8 Nanocomposite and Its Antibacterial Activity Against *Listeria monocytogenes*

SUN Yan, PEI Zixuan, HUANG Baojia, DU Ting, DU Xinjun

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** As a common foodborne pathogen, *Listeria monocytogenes* (LM) has strong environmental adaptability and pathogenicity. In response to the problems of increased drug resistance and side effects of existing antimicrobial strategies, the development of novel antimicrobial materials that are efficient, safe and environmentally responsive has become a hot research topic. The composite of ZIF-8 metal-organic framework material encapsulated with red yeast (RYR) (RYR@ZIF-8) was prepared by a one-step method and the structure and morphology of the nanomaterials, functional groups, and surface compositions were characterised and analysed using transmission electron microscope (TEM), scanning electron microscope (SEM), X-ray diffraction, X-ray photo-electron spectroscopy (XPS) and BET method. The experimental results of the antibacterial activity of RYR@ZIF-8 against *Listeria monocytogenes* showed that the antibacterial rate of RYR@ZIF-8 composite was as high as 84.6% when the concentration of RYR@ZIF-8 composite was 1.25 mg/mL. The inhibition mechanism of RYR@ZIF-8 composites was found that *Listeria monocytogenes* would produce acid during the proliferation process, making the solution slightly acidic, and RYR@ZIF-8 has acid-responsive properties, and the slightly acidic conditions would destroy its framework structure to release  $Zn^{2+}$  and RYR, which were proved to synergistically oxidatively

收稿日期: 2025-04-17; 修回日期: 2025-06-06

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (2024M762373)

作者简介: 孙 艳 (1999—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生; 通信作者: 杜欣军, 教授, xjdu@tust.edu.cn

damage the cell membrane of the bacterium, rupture the membrane structure to release the contents, which would in turn lead to the death of *Listeria monocytogenes*. The above results indicate that RYR@ZIF-8 has a good application prospect in the antibacterial field.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; acid response; antibacterial; membrane damage

皮肤是保护身体免受病原体侵害的第一道屏障。在日常生活中,皮肤组织不可避免地受到外界因素的损伤,受到细菌感染<sup>[1-3]</sup>。单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是革兰氏阳性短杆菌,兼性厌氧、无芽孢,一般不形成荚膜,但在营养丰富的环境中可以形成荚膜<sup>[4]</sup>。该菌广泛存在于自然界中,对外界环境的抵抗力很强,通常可以在土壤、腐烂的植物、污水、青贮饲料、粉尘和水中长期存活,因此很容易通过口腔-粪便的途径传播<sup>[5]</sup>。李斯特菌病是一种与食用受污染食品有关的感染,关于李斯特菌病爆发的大量报告与奶和奶制品、肉和肉制品以及新鲜农产品有关<sup>[6]</sup>。这种细菌可以适应任何环境和压力条件,使其成为主要食源性疾病的主要病原体。因此人们在接触被李斯特菌污染的食物时,细菌就可通过手部伤口侵入并在局部组织中生长繁殖,引发炎症反应,继而导致伤口出现红肿、疼痛、化脓等感染症状。20世纪初抗生素被发现以来,使细菌感染得到有效抑制<sup>[7]</sup>,但是抗生素的广泛滥用导致耐药菌的出现<sup>[8]</sup>,导致细菌感染引起的发病率和死亡率上升<sup>[9]</sup>。伤口愈合是一个复杂的过程,需要避免慢性炎症或继发感染<sup>[10]</sup>。由于伤口感染初期的pH为酸性,因此金属有机骨架沸石咪唑骨架-8(ZIF-8)的pH响应特性引起人们的关注,并将其用作在酸性环境中释放治疗剂的药物载体<sup>[11-13]</sup>。ZIF-8独特的多孔结构使其具有高孔隙率和大比表面积,在抗菌领域发挥重要作用<sup>[14]</sup>。由锌离子和2-甲基咪唑组装的ZIF-8<sup>[15]</sup>,通过释放锌离子而表现出抗菌特性<sup>[16]</sup>。ZIF-8在正常生理条件下稳定,在酸性条件下分解,可以作为一种pH响应性药物载体或抗炎治疗剂。ZIF-8的抗菌功效受到其在无光条件下缓慢作用的限制<sup>[17]</sup>,因此开发增强ZIF-8抗菌能力的复合材料至关重要。

红曲提取物是由红曲分泌产生的次级代谢产物,红曲霉属的一些菌种被用作天然食用色素,可用来酿造红米酒、豆制品及肉制品<sup>[18]</sup>。红曲霉在生长过程中会产生红曲,红曲及其衍生物具有一定的抗菌活性<sup>[9]</sup>,但由于其不溶于水的特性,大大限制了其应用研究。金属有机骨架(MOF)是由金属和有机配体组成的具有良好多孔结构的金属有机骨架

材料,是药物输送的理想载体。基于MOF的比表面积大以及高孔隙率的特性,将红曲包载在合成的金属有机骨架材料中,一方面可以解决红曲的水溶性差的问题,另一方面可以通过酸响应调控红曲的缓释,实现红曲与Zn<sup>2+</sup>的协同杀菌作用<sup>[20-21]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、试剂与仪器

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC 19115 由本实验室保藏。

甲醇、六水合硝酸锌、2-甲基咪唑,天津市江天化工技术股份有限公司;琼脂,英国OXOID公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、无水乙醇,天津市化学试剂一厂;超微量总ATP酶试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,南京建成生物工程研究所。

DHP-2042BS型电热恒温培养箱、MR-96A型酶标仪、ICAPQ电感耦合等离子体质谱仪、Talos G2 200X透射电子显微镜,美国Thermo公司;UV-2600型紫外-可见分光光度计、IS50型傅里叶变换红外光谱扫描仪,德国Eppendorf公司;TGL-16B型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;HS3120型超声波清洗仪,天津市兰博实验仪器设备有限公司;XRD-6100型X射线衍射仪,日本岛津公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 RYR@ZIF-8 纳米材料的制备及其表征

##### (1) RYR@ZIF-8 纳米材料的制备

ZIF-8 纳米材料的制备: 150 mg 六水合硝酸锌溶于 5.0 mL 去离子水中; 330 mg 2-甲基咪唑加入含有 10 mL 甲醇的圆底烧瓶中并置于磁力搅拌器上, 500 r/min 充分搅拌; 将六水合硝酸锌溶液缓慢滴加到圆底烧瓶中, 持续搅拌 5 min。对产物用去离子水离心洗涤, 烘干后得到 ZIF-8 纳米材料。

RYR@ZIF-8 的制备: 150 mg 六水合硝酸锌溶于 5 mL 去离子水中; 330 mg 2-甲基咪唑和 5.0 mg 红曲粉末(RYR)溶于加有 10 mL 甲醇的圆底烧瓶中, 将烧瓶置于磁力搅拌器上, 500 r/min 充分搅拌; 将六水合硝酸锌溶液缓慢滴加到圆底烧瓶中, 全部加入后, 搅拌反应 1 min, 随后离心。用甲醇以 10000 r/min 转速洗涤 3 次, 真空干燥后得到固体样品

RYR@ZIF-8。

## (2) RYR@ZIF-8 纳米材料的表征

通过透射电子显微镜 (TEM) 对 RYR@ZIF-8 的形貌进行表征。用去离子水配制纳米材料悬浮液并在超声中分散均匀,取少许样品滴于超薄碳网支持膜上,室温下自然干燥,用 TEM 观察两种纳米材料的形貌。

使用紫外-可见分光光度计表征 ZIF-8 及 RYR@ZIF-8 的特征吸收峰。利用超声获得两种分散均匀的纳米溶液,分别取 200  $\mu\text{L}$  样品加至石英皿内,测定两种材料在 200~800 nm 的吸收峰。

利用傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR) 表征材料的表面官能团。取适量 ZIF-8、RYR@ZIF-8 及 RYR 干燥后的粉末置于研钵中,与溴化钾混合研磨,压片后测定,扫描区间为 400~4000  $\text{cm}^{-1}$ 。

X 射线衍射 (XRD) 是利用 X 射线在不同晶体物质中的衍射效应,分析其衍射图谱,测定物质晶体结构与物相组成。干燥 ZIF-8 及 RYR@ZIF-8 粉末通过 XRD 分析其晶体结构,设置  $\lambda=0.15406$  nm,扫描速度 5  $^\circ/\text{min}$ ,扫描范围 5~80 $^\circ$ ,工作电压 40 kV。

X 射线能谱仪 (XPS) 测定样品的元素化学价态和化学组成成分。由全谱图中峰的位置可以得知样品材料所含元素的信息,经过分析与分峰,确定出元素的价态。

吸附比表面测试法 (BET) 是指单位质量物料所具有的总面积。ZIF-8 为介孔纳米材料,通过氮气吸附比表面测试法测定红曲霉素 (RYR) 是否包载到金属框架结构中。

配制 0、2、4、6、8、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RYR 乙醇标准溶液,用紫外分光光度计测定 505 nm 处的吸光度,绘制标准曲线。将 RYR@ZIF-8 溶解于 2.0 mol/L 盐酸中取上清液,测定 505 nm 处的吸光度,代入 RYR 标准曲线,计算 RYR@ZIF-8 中 RYR 的负载率。

### 1.2.2 最低抑菌浓度的测定

向 96 孔板中每孔中加入  $10^7$  CFU/mL 单核细胞增生李斯特菌,然后加入 100  $\mu\text{L}$  RYR@ZIF-8 纳米溶液,使终质量浓度分别为 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078  $\text{mg}/\text{mL}$ ,将 96 孔板置于 37 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 恒温摇床培养 4~5 h。采用二倍稀释法测定 RYR@ZIF-8 纳米复合物的最低抑菌浓度 (MIC)。

### 1.2.3 平板涂布实验

取对数期菌液离心后梯度稀释,取  $10^3$  CFU/mL 菌液分别与不同浓度的 ZIF-8 及 RYR@ZIF-8 混合均匀,即为实验组,以不含材料的菌液为对照组,每组设 3 个平行。将各组在 4  $^\circ\text{C}$  冰箱中孵育 2 h 后涂

板,并将平板置于 37  $^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养过夜。细菌存活率为实验组与对照组的菌落数的比值。

### 1.2.4 电感耦合等离子质谱 (ICP-MS) 测定

将 100  $\mu\text{L}$   $10^7$  CFU/mL 对数期菌液分装至 EP 管中,添加 RYR@ZIF-8 (终质量浓度为 1.25  $\text{mg}/\text{mL}$ ) 至终体积 200  $\mu\text{L}$ 。在 4  $^\circ\text{C}$  冰箱中孵育 2 h,将 200  $\mu\text{L}$  体系加到 9.8 mL LB 液体培养基中,37  $^\circ\text{C}$  摇床培养,将培养不同时间的菌液分别过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜,收集滤液,通过电感耦合等离子质谱仪 (ICP-MS) 测定各个时间点锌离子的释放量。配制锌离子溶液 (终质量浓度分别为 30、60、90、120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),测定抗菌活性。

### 1.2.5 抑菌生长曲线的测定

100  $\mu\text{L}$   $10^7$  CFU/mL 对数期菌液分别添加 100  $\mu\text{L}$  RYR@ZIF-8,使材料终质量浓度分别为 1.25、0.625、0.313、0.156  $\text{mg}/\text{mL}$ ,在 4  $^\circ\text{C}$  冰箱孵育 2 h,将该体系加到 9.8 mL LB 液体培养基中,各组设置 3 个平行,37  $^\circ\text{C}$  摇床培养,每隔 1 h 各取 200  $\mu\text{L}$  菌液,在 600 nm 处测定各实验组与空白组的吸光度,记录实验数据并绘制抑菌生长曲线。

### 1.2.6 细胞膜完整性的测定

将对数期的菌液 ( $10^7$  CFU/mL) 与 RYR@ZIF-8 (终质量浓度为 1.25  $\text{mg}/\text{mL}$ ) 充分混匀,该组设为实验组,未添加纳米材料的菌液设为对照组,将各组 4  $^\circ\text{C}$  孵育 2 h,多次离心洗涤,收集菌体沉淀加入 2.5% 戊二醛固定过夜;用去离子水洗涤,将样品用不同体积分数 (30%、50%、70%、80%、90%、100%) 的乙醇梯度洗脱,离心 10 min,将菌体溶于适量 100% 乙醇中。将样品滴加在铜网和盖玻片上自然风干,用透射电子显微镜 (TEM) 和扫描电子显微镜 (SEM) 观察。

### 1.2.7 荧光显微镜成像

将对数期菌液与 RYR@ZIF-8 充分混匀为实验组,以不含材料的菌液为对照组,4  $^\circ\text{C}$  孵育 2 h,离心去上清,将菌体重悬于 1.0 mL PBS 中,加入 100  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  碘化丙啶 (PI),暗处染色 15 min,加入 80  $\mu\text{L}$  5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  二脒基苯基吡啶 (DAPI),暗处复染 15 min。用 PBS 多次离心去除多余染料,将样品滴加在载玻片上制样后,在倒置荧光显微镜下观察。

### 1.2.8 活性氧 (ROS) 的测定

将对数期菌液 ( $10^7$  CFU/mL) 与 RYR@ZIF-8 充分混匀为实验组,以不含材料的菌液为对照组,4  $^\circ\text{C}$  孵育 2 h,离心洗涤。将菌体重悬于 1.0 mL 无菌水中,加入荧光染料 2',7'-二氯荧光素二酯 (DCFH-DA) 使其终浓度为 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,充分混匀后

暗处孵育 1 h, 再将混合物多次洗涤, 去除多余染料, 在倒置荧光显微镜下观察。

### 1.2.9 蛋白质泄漏测定

将对数期菌液 ( $10^7$  CFU/mL) 与 RYR@ZIF-8 充分混匀为实验组, 以不含材料的菌液为对照组,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 h, 离心后取沉淀, 根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各组蛋白质含量。

### 1.2.10 菌液电导率的测定

将对数期菌液稀释至  $10^4$  CFU/mL 并进行分管, 以不添加材料的组为对照组, 其余各组分别加入不同浓度 RYR@ZIF-8,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 h, 所有组 6000 r/min 离心 5 min, 使用电导率仪测定上清液电导率。

### 1.2.11 细菌抗氧化指标的测定

将对数期菌液 ( $10^7$  CFU/mL) 与 RYR@ZIF-8 充分混匀为实验组, 以不含材料的菌液为对照组,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 h, 离心去上清液, 沉淀用 PBS 多次洗涤。将得到的菌体重悬于 4.0 mL PBS 中并破碎处理, 利用超微量总 ATP 酶试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒进行测定。

### 1.2.12 细胞毒性的测定

在 96 孔细胞培养板中每孔接入 100  $\mu\text{L}$  生长状态良好的非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞), 每孔  $10^3\sim 10^4$  个, 置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h, 直至细胞长满单层, 弃掉培养基。将 ZIF-8 及 RYR@ZIF-8 分别用细胞培养液稀释成不同浓度, 依次加入 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 在细胞培养箱中培养 12 h 和 24 h 后, 避光加入 5.0 mg/mL MTT 试剂 (20  $\mu\text{L}$ /孔), 继续培养 4 h 后终止培养, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (DMSO), 将紫色结晶物甲瓩充分溶解。测定 490nm 处吸光度, 以无细胞为对照组, 细胞存活率为实验组与对照组吸光度的比值。

## 1.3 数据分析

采用 GraphPad 软件分析数据, 实验结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。采用  $t$  检验分析差异显著性, 用\*、\*\*、\*\*\*和\*\*\*\*表示组间差异显著 ( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$  和  $P<0.0001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 RYR@ZIF-8 纳米材料的表征

#### 2.1.1 透射电子显微镜的表征结果

RYR@ZIF-8 纳米材料的透射电子显微镜图及元素映射图像如图 1 所示。材料直径约为 100 nm。RYR@ZIF-8 为均匀的菱形十二面体颗粒。EDS 元素图谱显示了 C、N、O 和 Zn 元素的存在和每种元素

的含量。TEM 元素映射结果显示, C、N、O 和 Zn 元素的均匀分布, 表明成功合成 RYR@ZIF-8。

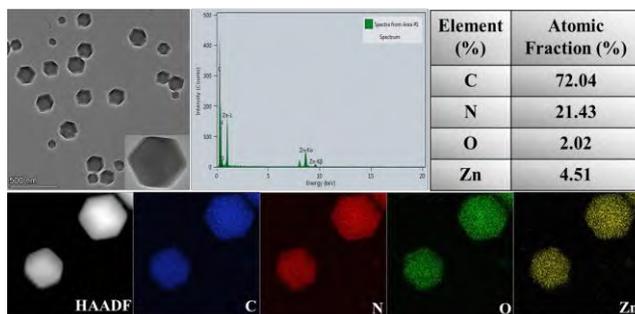


图 1 RYR@ZIF-8 纳米材料的透射电子显微镜图及元素映射图像

Fig. 1 TEM characterization and mapping of RYR@ZIF-8 nanoparticles

#### 2.1.2 紫外-可见分光光度计表征结果

ZIF-8、RYR@ZIF-8 及 RYR 的紫外-可见吸收光谱如图 2 所示。ZIF-8 在 200~300 nm 范围内存在 1 个较强的吸收峰, 红曲 (RYR) 在 505 nm 处有较为明显的特征吸收峰, 而合成的 RYR@ZIF-8 在 200~300 nm 处的强吸收峰仍然存在, 并且在 505 nm 处存在 1 个较弱的吸收峰, 说明 RYR@ZIF-8 复合材料制备成功。

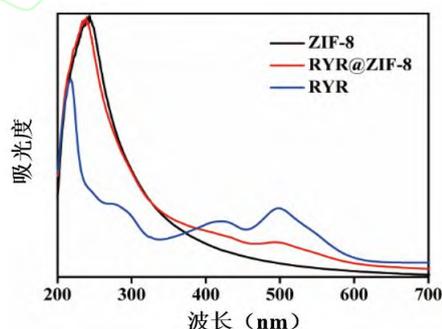


图 2 ZIF-8、RYR@ZIF-8 及 RYR 的紫外-可见吸收光谱

Fig. 2 UV-vis adsorption spectrum characterization of ZIF-8, RYR@ZIF-8 nanoparticles and RYR

#### 2.1.3 FTIR 的表征结果

ZIF-8、RYR@ZIF-8 及 RYR 傅里叶变换红外光谱图如图 3 所示。1584  $\text{cm}^{-1}$  为 C=N 伸缩振动, 是 ZIF-8 的特征吸收峰, 与 ZIF-8 结构吻合<sup>[22]</sup>。在 760  $\text{cm}^{-1}$  和 1145  $\text{cm}^{-1}$  处为 Zn-N 伸缩振动峰, 表明 RYR 成功封装进 ZIF-8 内。

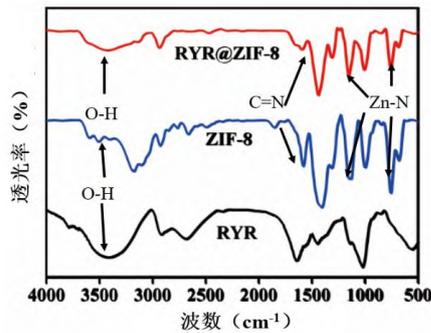


图3 ZIF-8、RYR@ZIF-8及RYR傅里叶变换红外光谱图

Fig. 3 FTIR spectrum characterization of ZIF-8, RYR@ZIF-8 nanoparticles and RYR

#### 2.1.4 X射线衍射表征结果

ZIF-8及RYR@ZIF-8的X射线衍射表征图谱如图4所示。在X射线衍射谱中可以观察到特征峰分别位于 $7.35^\circ$ 、 $10.45^\circ$ 和 $12.8^\circ$ 处,分别对应于ZIF-8晶体衍射面的(011)、(002)和(022)晶面<sup>[23]</sup>。RYR@ZIF-8与ZIF-8的图谱几乎相同。

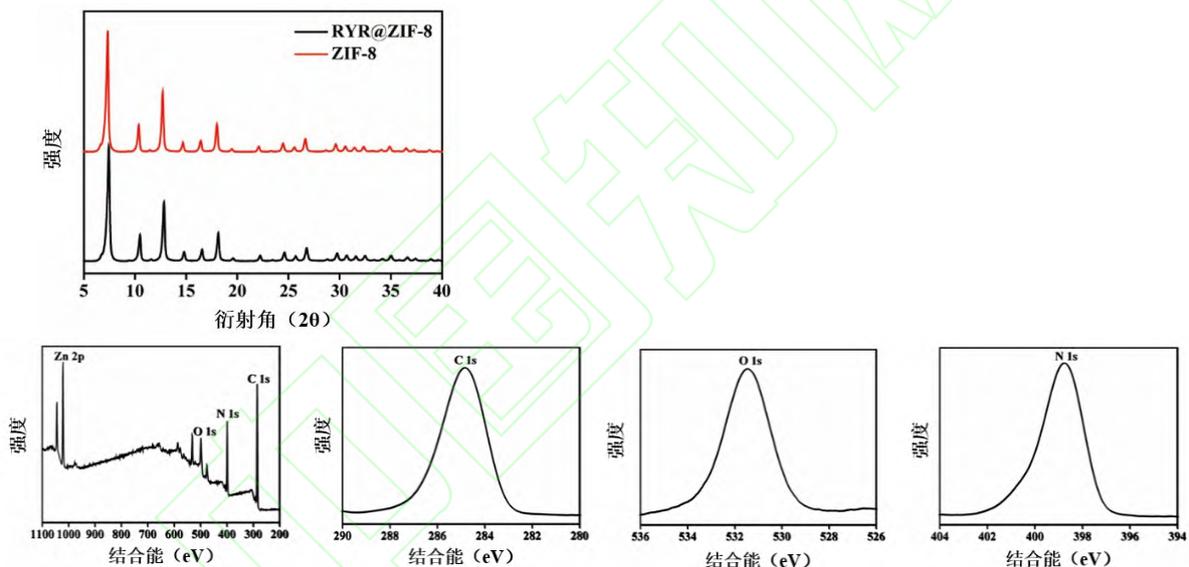


图5 ZIF-8及RYR@ZIF-8的X射线能谱仪表征

Fig. 5 XPS spectra of ZIF-8 and RYR@ZIF-8

#### 2.1.6 BET表征结果

RYR@ZIF-8纳米材料的比表面积见表1。负载前后的ZIF-8孔径没有发生变化,相比于ZIF-8,RYR@ZIF-8比表面积明显减小,表明RYR成功负载进ZIF-8框架中。

表1 RYR@ZIF-8纳米材料的比表面积

Tab. 1 BET of RYR@ZIF-8 nanoparticles

	比表面积(m <sup>2</sup> /g)	孔径(nm)
ZIF-8	2105.2013	3.058
RYR@ZIF-8	1076.763	3.057

#### 2.2 最低抑菌浓度的测定结果

采用单核细胞增生李斯特菌作为代表性细菌,

图4 ZIF-8及RYR@ZIF-8的X射线衍射表征图谱

Fig. 4 XRD spectrum characterization of ZIF-8 and RYR@ZIF-8 nanoparticles

#### 2.1.5 X射线能谱仪表征结果

ZIF-8及RYR@ZIF-8的X射线能谱仪表征如图5所示。由图5可知,RYR@ZIF-8纳米粒子主要由碳、氮、氧和锌原子组成。全谱中的4个尖锐的峰,其结合能分别是1021.47、531.75、398.78、284.81 eV,分别对应于Zn 2p、O 1s、N 1s和C 1s的光电子能量。对所含元素的化学态进行分析,Zn 2p光谱的1021.38 eV (Zn 2p 3/2)和1044.63 eV (Zn 2p 1/2)处的特征峰源自ZIF-8<sup>[24]</sup>。C 1s峰为284.81 eV,与398.78 eV的N 1s对应C=N基团,与FTIR结果一致。O 1s在531.75 eV处的峰对应OH基团。以上结果都证明了RYR@ZIF-8的成功加载。

在0~1.25 mg/mL范围内检测RYR@ZIF-8在单核细胞增生李斯特菌中的最低抑菌浓度。在不添加抗菌材料的阴性对照组培养后为浑浊状态,添加RYR@ZIF-8复合纳米材料组培养基未见浑浊且吸光度小于0.1时,此时浓度为材料的最低抑菌浓度。RYR@ZIF-8对单核细胞增生李斯特菌的最低抑菌浓度为0.156 mg/mL。

#### 2.3 平板涂布实验结果

基于RYR@ZIF-8优异的抗菌性能,采用琼脂平板计数法,以单核细胞增生李斯特菌作为革兰氏阳性菌的模型菌株,评价RYR@ZIF-8复合纳米材料的抗菌活性,结果如图6所示。

RYR@ZIF-8 在 0.31~1.25 mg/mL 范围内, 单核细胞增生李斯特菌的存活率随着 RYR@ZIF-8 质量浓度的升高而逐渐降低, 当材料浓度为 1.25 mg/mL 时, RYR@ZIF-8 对单核细胞增生李斯特菌的抑菌率可达 84.6%, 表明 RYR@ZIF-8 纳米粒子能够有效抑制细菌生长, 具有一定的剂量依赖性。从图 6 (b) 中可以看出, RYR@ZIF-8 具有较强的抑菌能力, 并且随着 RYR@ZIF-8 浓度的升高菌落数逐渐减少。

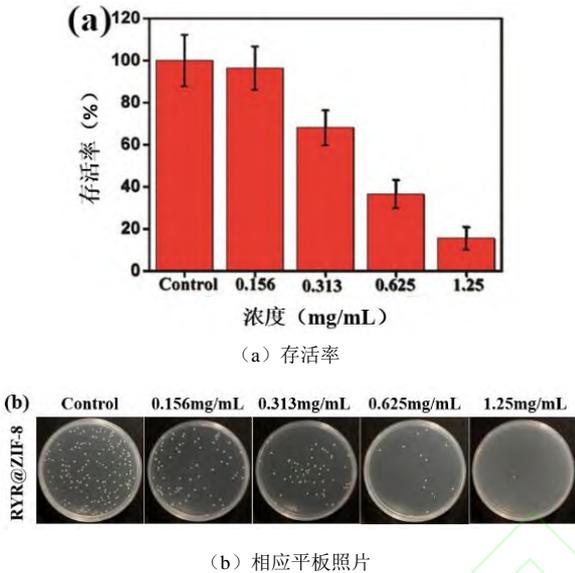
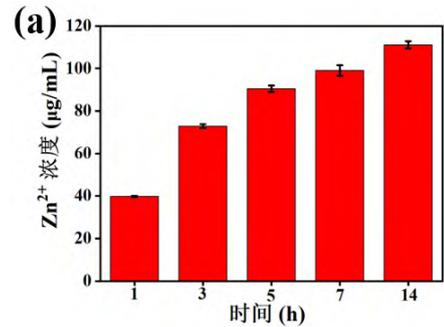


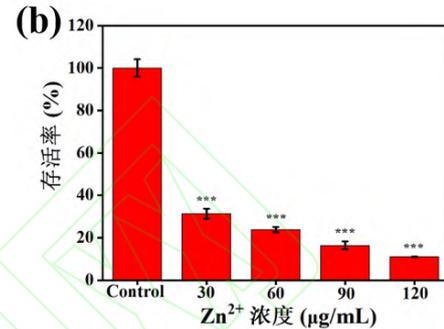
图 6 RYR@ZIF-8 对单核细胞增生李斯特菌存活率的影响  
Fig. 6 Effect of survival rate of *Listeria monocytogenes* with RYR@ZIF-8

#### 2.4 电感耦合等离子质谱 (ICP-MS) 测定结果

单核细胞增生李斯特菌在生长过程中会产生酸性物质, 由于 ZIF-8 具有酸响应性质, 当环境呈微酸性时, 其框架结构会被破坏, 从而释放出  $Zn^{2+}$ 。电感耦合等离子质谱 (ICP-MS) 测定结果如图 7 所示。如图 7 (a) 利用 ICP-MS 测定其与 RYR@ZIF-8 孵育 1 h 至 14 h 锌离子的释放量, 随着时间的增加, 锌离子的释放量呈正相关, 当 14 h 时整个体系中锌离子浓度达到 0.11 mg/mL。如图 7 (b), 当锌离子浓度处于 30  $\mu\text{g/mL}$  至 120  $\mu\text{g/mL}$  时, 细菌存活率均在 20% 左右, 说明锌离子具有一定的抑菌作用, 从而间接反映出 RYR@ZIF-8 具有强的抗菌活性可能是由于  $Zn^{2+}$  的作用。图 7 (c) 涂布照片也能看出随着锌离子浓度的升高, 抑菌效果呈现剂量依赖性。



(a) RYR@ZIF-8 与单核细胞增生李斯特菌孵育后锌离子的释放量



(b) 经过不同浓度锌离子处理后单核细胞增生李斯特菌的抑菌定性实验

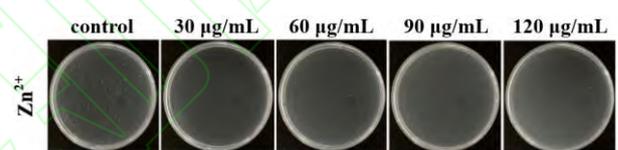


图 7 电感耦合等离子质谱测定结果

Fig. 7 Test results of inductively coupled plasma mass spectrometry

#### 2.5 抑菌生长曲线测定结果

细菌的生长繁殖主要包括延滞期、对数期、稳定期以及衰亡期 4 个时期。当细菌生长环境发生变化时, 细菌的生长曲线也会发生变化, 以此可以判断细菌生长繁殖所受影响的程度。因此, 在确定材料具有抑菌作用后, 评估 RYR@ZIF-8 对李斯特菌生长抑制作用, 结果如图 8 所示。与对照组相比, 各实验组的细菌在与 RYR@ZIF-8 共培养 2 h 开始, 生长繁殖明显受到抑制, 材料质量浓度越高, 对单核细胞增生李斯特菌的抑制越明显。这表明 RYR@ZIF-8 具有良好的抗菌活性。

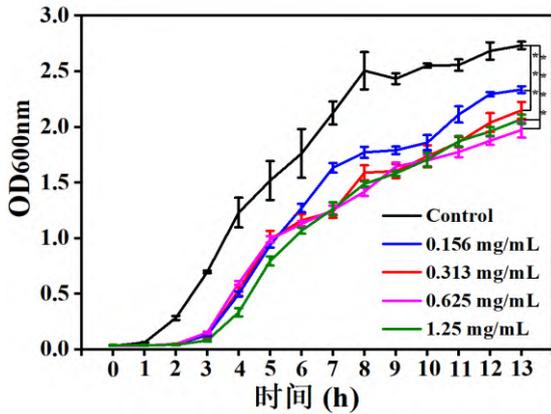


图8 RYR@ZIF-8对单核细胞增生李斯特菌生长曲线的影响

Fig. 8 Effect of growth curve of *Listeria monocytogenes* with RYR@ZIF-8

## 2.6 细胞膜完整性

为进一步研究 RYR@ZIF-8 的抑菌机制,使用透射电子显微镜对材料作用菌体前后的形貌进行表征,结果如图 9 所示。随着 RYR@ZIF-8 与单核细胞增生李斯特菌作用时间的延长,RYR@ZIF-8 的形貌发生了明显的变化,十二面体结构逐渐变形,失去原有的形态,最终被破坏。从图 9 (b) 可以看到,对照组的单核细胞增生李斯特菌呈现出正常的棒状短杆,细菌细胞膜表面光滑、结构完整;在 RYR@ZIF-8 作用 7 h 时,菌膜已经被破坏,细胞内容物外泄;RYR@ZIF-8 作用 14 h 后,细菌被材料包裹着,菌体通透。材料及菌体相互作用后的形貌变化,表明 RYR@ZIF-8 对单核细胞增生李斯特菌的抑制是由于李斯特菌在生长过程中产酸使 ZIF-8 外壳溶解,释放出的锌离子和红曲反作用于菌体,破坏菌膜,从而抑制其生长繁殖。

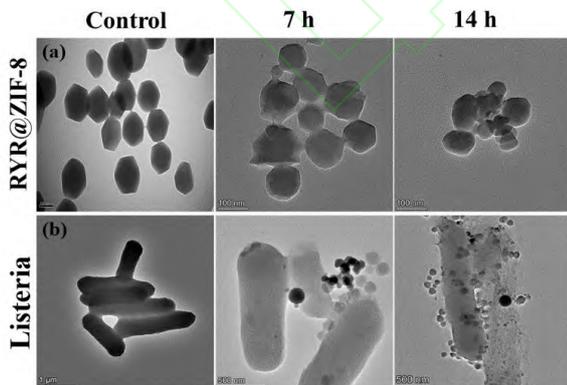


图9 RYR@ZIF-8与单核细胞增生李斯特菌作用后形貌随时间变化的透射电子显微镜图

Fig. 9 TEM analysis of morphology changing with time of RYR@ZIF-8 nanoparticles and *Listeria Monocytogenes*

为了进一步观察 RYR@ZIF-8 对李斯特菌的作

用机制,使用扫描电子显微镜对细菌形态进行观察,结果如图 10 所示。未经材料处理过的单核细胞增生李斯特菌(左图)结构完整,菌体表面光滑,细胞形态无变化,在与 RYR@ZIF-8 共孵育 2 h 后,实验组(右图)菌体表面出现大量褶皱和凹陷,细菌表现出明显的细胞变形,孔洞和内容物泄漏,细胞完整性被破坏。这与透射电子显微镜的结果一致,进一步证实 RYR@ZIF-8 对单核细胞增生李斯特菌的结构造成了严重破坏,从而导致菌体的死亡。

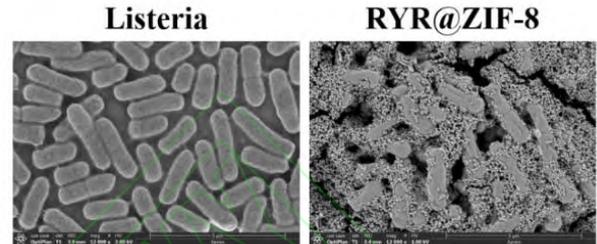


图10 RYR@ZIF-8处理单核细胞增生李斯特菌的SEM图  
Fig. 10 TEM pictures of *Listeria Monocytogenes* treated with RYR@ZIF-8

## 2.7 细菌活/死染色结果

为进一步验证 RYR@ZIF-8 的体外抗菌活性,采用荧光染色法对经过 RYR@ZIF-8 处理后的单核细胞增生李斯特菌的存活情况进行评估。DAPI 是一种能与 DNA 发生强烈结合作用的荧光染料,它能够快速通过完整的活细菌的细胞膜,然后与细胞核中的 DNA 紧密结合,在紫外光的激发下发出蓝色的荧光,用于标记活细胞。PI 不能进入活的完整的细胞膜,但是能够通过损伤或死亡的细胞膜对 DNA 双链进行染色,在绿光的激发下显示出红色荧光。

单核细胞增生李斯特菌的活死染色荧光图像如图 11 所示。未经任何处理的对照组细菌经 DAPI 及 PI 染色后,全部呈现蓝色荧光,说明对照组的单核细胞增生李斯特菌具有完整的壁膜结构。经 RYR@ZIF-8 处理后,只有零星的蓝色荧光,大部分呈现红色的荧光,这表明细胞膜受损使大量细胞死亡。荧光染色的结果与上述 TEM、SEM 的实验结果一致,证实 RYR@ZIF-8 可以通过释放  $Zn^{2+}$  和红曲协同杀菌,破坏绝大部分单核细胞增生李斯特菌细胞膜的完整性致其死亡。

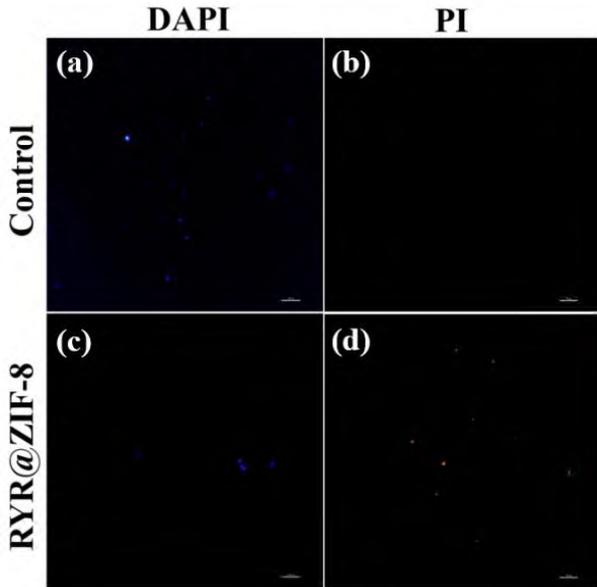
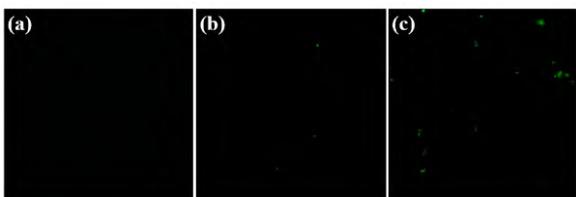


图 11 单核细胞增生李斯特菌的活死染色荧光图像  
 Fig. 11 Fluorescence images of live/dead *Listeria monocytogenes*

2.8 活性氧测定结果

ROS 水平可通过测定荧光指示剂 2',7'-二氯荧光素二脂 (DCFH-DA) 的荧光强度表示。当 DCFH-DA 进入细菌细胞内, 会与细胞内的酯酶相互作用, 使 DCFH-DA 中的两个酯键发生断裂, 从而被水解为 DCFH, 进而被活性氢氧化为二氯荧光素 (DCF), DCF 能够自发荧光。ROS 水平检测结果如图 12 所示。当 RYR@ZIF-8 与 DCFH-DA 共同孵育后, 没有任何荧光产生, 表明纳米材料本身不会与荧光试剂作用, 由此说明实验中所产生的荧光是由细菌细胞内 ROS 含量的增加引起的。经 RYR@ZIF-8 处理后, 细菌 ROS 水平与未经材料处理的对照组相比, 荧光强度明显增强。这表明 RYR@ZIF-8 导致细菌细胞产生了氧化应激损伤, 诱导细胞产生大量 ROS, 进而引发细菌细胞的凋亡。



(a)RYR@ZIF-8(b)单核细胞增生李斯特菌(c)RYR@ZIF-8 处理后的单核细胞增生李斯特菌

图 12 RYR@ZIF-8 处理后 ROS 的产生

Fig. 12 ROS overproduction induced by RYR@ZIF-8 nanoparticles treatment

2.9 蛋白质泄漏测定结果

由于在 TEM 及 SEM 实验结果中能够明显地观察到细菌细胞在 RYR@ZIF-8 的作用下, 细胞膜破裂受损的现象, 因此测定细菌细胞内容物的泄露以蛋白质为参考, 进一步验证细菌细胞膜完整性的破坏, 结果如图 13 所示。在未经任何处理的胞外蛋白质量浓度为 0.97  $\mu\text{g/mL}$ , 而经 RYR@ZIF-8 处理后, 上清液蛋白质量浓度为 2.97  $\mu\text{g/mL}$ , 为对照组的 3.06 倍。蛋白质量浓度的显著升高表明 RYR@ZIF-8 能够改变细胞膜的通透性, 使细菌内容物泄露死亡。这一结果与 TEM、SEM 的观察结果相互验证。

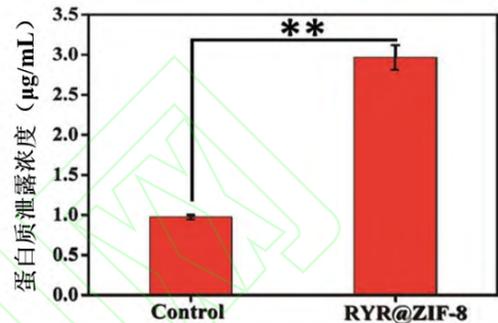


图 13 RYR@ZIF-8 对单核细胞增生李斯特菌上清液蛋白质含量的影响

Fig. 13 Effect of *Listeria monocytogenes* supernatants protein content with RYR@ZIF-8

2.10 细菌抗氧化指标的测定结果

由于 ROS 的爆发性产生可直接破坏细菌的细胞膜<sup>[25]</sup>, 一旦细胞膜被破坏, ATP 和蛋白质就会从细胞中排出, 因此对细菌的总 ATP 酶的酶活性进行检测。ATP 酶又称三磷酸腺苷酶, 存在于细菌细胞膜上, 与细胞的运输、代谢等相关<sup>[26]</sup>。通过对总 ATP 酶酶活性的测定进一步研究 RYR@ZIF-8 纳米粒子的抗菌机理, 结果如图 14 (a) 所示。经 RYR@ZIF-8 纳米粒子处理后的单核细胞增生李斯特菌的总 ATP 酶酶活性显著下降, 进一步验证了 RYR@ZIF-8 对李斯特菌细胞膜结构的破坏。

超氧化物歧化酶 (SOD) 在氧化与抗氧化平衡中起着重要作用, 并能清除超氧阴离子自由基<sup>[27]</sup>。如图 14 (b) 所示, 经 RYR@ZIF-8 处理后, 单核细胞增生李斯特菌细胞内的 SOD 酶活性较对照组提升 24.16 倍, 表明实验组细菌细胞内产生了大量的氧自由基, 因此 SOD 酶活性升高以清除这些自由基, 与 ROS 含量测定结果相呼应。

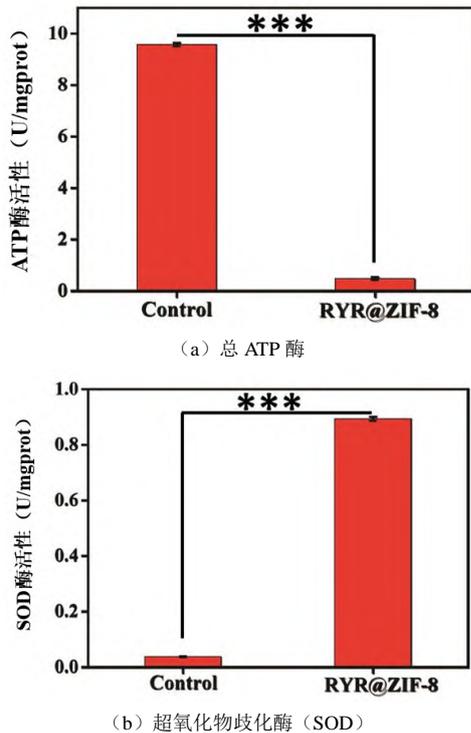


图 14 RYR@ZIF-8 对单核细胞增生李斯特菌总 ATP 酶和超氧化物歧化酶活性的影响

Fig. 14 Effect of RYR@ZIF-8 on the activity of ATP and SOD of *Listeria monocytogenes*

### 2.11 菌液电导率测定结果

以上实验结果证明在细菌细胞膜受到损伤时, 菌体内部的营养物质会泄露出来, 其中也含有电解质, 电解质能够使菌液的电导率上升, 因此电导率的变化也能从另一方面验证细菌细胞膜的完整性。不同浓度 RYR@ZIF-8 处理单核细胞增生李斯特菌后电导率的变化如图 15 所示。经 RYR@ZIF-8 处理的菌液电导率均比空白组高, 且随着纳米材料质量浓度的升高而升高, 实验结果证明细菌细胞膜的损伤程度与 RYR@ZIF-8 相关。

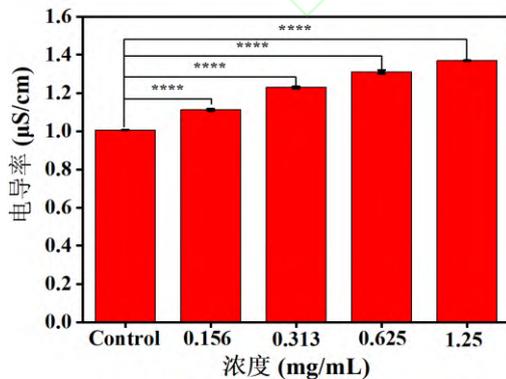


图 15 不同质量浓度 RYR@ZIF-8 处理单核细胞增生李斯特菌后电导率的变化

Fig. 15 Conductivity change of *Listeria monocytogenes*

### treated with different concentration of RYR@ZIF-8

### 2.12 细胞毒性测定结果

抗菌材料不仅要具备高性能的抑菌效果, 还要拥有很低的细胞毒性和良好的生物相容性。为此通过 MTT 实验评估 RYR@ZIF-8 对哺乳动物细胞的毒性, 结果如图 16 所示。当 RYR@ZIF-8 质量浓度为 0.156 mg/mL 时, 分别孵育 12 h 和 24 h 后, Vero 细胞的存活率几乎维持在 100%。随着 RYR@ZIF-8 质量浓度提高到 0.625 mg/mL, 细胞存活率仍能维持在 80% 以上。当 RYR@ZIF-8 质量浓度为 1.25 mg/mL 时, 培养 24 h 后细胞存活率为 70%, 表明 RYR@ZIF-8 纳米粒子在具有高效抑制单核细胞增生李斯特菌的同时, 也具有良好的生物相容性。

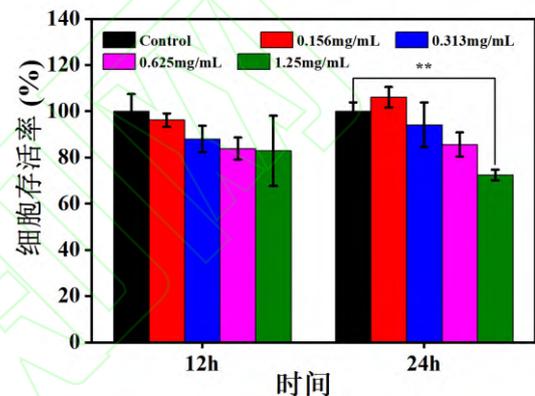


图 16 RYR@ZIF-8 的细胞毒性测定结果

Fig. 16 Cell toxicity test results of RYR@ZIF-8

## 3 结论

本研究通过一步法制备了 RYR@ZIF-8 纳米复合物, 通过 TEM、SEM、紫外-可见吸收光谱、FTIR、XRD 等对材料进行形貌和结构的表征, 通过抑菌实验得到其对单核细胞增生李斯特菌的最低抑菌浓度为 0.156 mg/mL。对 RYR@ZIF-8 纳米复合物的抑菌机理研究发现, 单核细胞增生李斯特菌产酸破坏了 RYR@ZIF-8 的外壳结构, 释放出  $Zn^{2+}$  和 RYR, 二者协同破坏菌体的细胞膜, 使内容物泄露以及诱导菌体产生氧化应激, 从而杀死细胞。现有 ZIF-8 基材料大多负载合成抗生素, 极易使细菌产生耐药性, 且需要较大剂量才可发挥抗菌效果, 可能会产生细胞毒性。本研究将红曲包载在 ZIF-8 内, 不仅保留 ZIF-8 酸响应特性, 同时解决了红曲水溶性差的问题, 利用 ZIF-8 酸响应特性实现红曲的缓释, 有助于延长抗菌作用时间。复合纳米材料 RYR@ZIF-8 可以在较低浓度下实现较好的抗菌效果, 具有良好的生物安全性。

## 参考文献:

- [1] MEI L, ZHU S, LIU Y, et al. An overview of the use of nanozymes in antibacterial applications[J]. Chemical engineering journal, 2021, 418:129431.
- [2] GAO F, SHAO T, YU Y, et al. Surface-bound reactive oxygen species generating nanozymes for selective antibacterial action[J]. Nature communications, 2021, 12(1):745.
- [3] CAO F, ZHANG L, WANG H, et al. Defect-rich adhesive nanozymes as efficient antibiotics for enhanced bacterial inhibition[J]. Angewandte chemie international edition, 2019, 58(45):16236-16242.
- [4] JARVIS N A, O'BRYAN C A, RICKE S C, et al. A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes*[J]. Food control, 2016, 66:256-269.
- [5] ORSI R H, WIEDMANN M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2016, 100:5273-5287.
- [6] RAVINDHIRAN R, SIVARAJAN K, SEKAR J N, et al. *Listeria monocytogenes* an emerging pathogen: a comprehensive overview on listeriosis, virulence determinants, detection, and anti-listerial interventions[J]. Microbial ecology, 2023, 86(4):2231-2251.
- [7] MUTEEB G, REHMAN M T, SHAHWAN M, et al. Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: a narrative review[J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(11):1615.
- [8] CHINEMEREM NWOBODO D, UGWU M C, OLISELOKE ANIE C, et al. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace[J]. Journal of clinical laboratory analysis, 2022, 36(9):e24655.
- [9] ABDELAZIZ ABDELMONEIM S, MOHAMED GHAZY R, ANWAR SULTAN E, et al. Antimicrobial resistance burden pre and post-COVID-19 pandemic with mapping the multidrug resistance in Egypt: a comparative cross-sectional study[J]. Scientific reports, 2024, 14(1):7176.
- [10] JUNG S, CHANG S, KIM N E, et al. ZIF-8 based active wound dressing for pH modulation and pH-responsive delivery of curcumin and Zn<sup>2+</sup>: effect of acidity on the drug release for antibacterial and antioxidant efficacy[J]. Macromolecular materials and engineering, 2023, 308(11):2300141.
- [11] LEE J, JUNG S, PARK H, et al. Bifunctional ZIF-8 grown webs for advanced filtration of particulate and gaseous matters: effect of charging process on the electrostatic capture of nanoparticles and sulfur dioxide[J]. ACS Applied materials & interfaces, 2021, 13(42):50401-50410.
- [12] MARANESCU B, VISA A. Applications of metal-organic frameworks as drug delivery systems[J]. International journal of molecular sciences, 2022, 23(8):4458.
- [13] LIANG W, CHENG J, ZHANG J, et al. pH-responsive on-demand alkaloids release from core-shell ZnO@ ZIF-8 nanosphere for synergistic control of bacterial wilt disease[J]. ACS Nano, 2022, 16(2):2762-2773.
- [14] LIN J, LI Y, GE L, et al. Photothermal enhanced ion release of ZIF-8/Ag/PDA for boosted antimicrobial performance[J]. Inorganic chemistry communications, 2025:114001.
- [15] DING B, CHEN H, TAN J, et al. ZIF-8 nanoparticles evoke pyroptosis for high-efficiency cancer immunotherapy[J]. Angewandte chemie international edition, 2023, 62(10):e202215307.
- [16] LIU J, WU D, ZHU N, et al. Antibacterial mechanisms and applications of metal-organic frameworks and their derived nanomaterials[J]. Trends in food science & technology, 2021, 109:413-434.
- [17] LIU T, HUANG K, YANG Y, et al. An NIR light-driven AgBiS<sub>2</sub>@ ZIF-8 hybrid photocatalyst for rapid bacteria-killing[J]. Journal of materials chemistry b, 2024, 12(14):3481-3493.
- [18] LIU L, ZHAO J, HUANG Y, et al. Diversifying of chemical structure of native *Monascus* pigments[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9:3143.
- [19] ZHAO G, LI Y, YANG J, et al. Antibacterial characteristics of orange pigment extracted from *Monascus* pigments against *Escherichia coli*[J]. Czech journal of food sciences, 2016, 34(3):197-203.
- [20] TAO B, ZHAO W, LIN C, et al. Surface modification of titanium implants by ZIF-8@ Levo/LBL coating for inhibition of bacterial-associated infection and enhancement of in vivo osseointegration[J]. Chemical engineering journal, 2020, 390:124621.

- [21] ZHANG Y, ZHANG X, SONG J, et al. Ag/H-ZIF-8 nanocomposite as an effective antibacterial agent against pathogenic bacteria[J]. *Nanomaterials*, 2019, 9(11):1579.
- [22] YUAN Z, DAI H, LIU X, et al. An electrochemical immunosensor based on Prussian blue@ zeolitic imidazolate framework-8 nanocomposites probe for the detection of deoxynivalenol in grain products[J]. *Food chemistry*, 2023, 405:134842.
- [23] RAHMATI Z, ABDI J, VOSSOUGH M, et al. Ag-doped magnetic metal organic framework as a novel nanostructured material for highly efficient antibacterial activity[J]. *Environmental research*, 2020, 188:109555.
- [24] SHEN Z, QU L, KAN X, et al. Construction of BODIPY functional ZIF-8 with improved visible light-induced antibacterial activity[J]. *Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 2022, 644:128835.
- [25] DWYER D J, KOHANSKI M A, COLLINS J J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance[J]. *Current opinion in microbiology*, 2009, 12(5):482-489.
- [26] GHOSH S, ROY S, BAID N, et al. Host AAA-ATPase VCP/p97 lyses ubiquitinated intracellular bacteria as an innate antimicrobial defence[J]. *Nature microbiology*, 2025(10):1099-1114.
- [27] DU T, XIAO Z, CAO J, et al. NIR-activated multi-hit therapeutic Ag<sub>2</sub>S quantum dot-based hydrogel for healing of bacteria-infected wounds[J]. *Acta biomaterialia*, 2022, 145:88-105.