

一氧化氮供体的合成及其抗菌性能研究

陆秋仙¹, 陈涛¹, 毛雯¹, 吕涛²

(1. 南京诺令生物科技有限公司研发部, 南京 211800;

2. 清华大学附属北京清华长庚医院(清华大学临床医学院)妇产科, 北京 102218)

摘要: 一氧化氮供体 S-亚硝基-N-乙酰基-DL-青霉胺(SNAP)对微生物生长具有显著的抑制效果。为了进一步验证 SNAP 对微生物抗抑作用,本文通过亚硝化反应制备得到 SNAP 固体,并基于不同 SNAP 浓度验证其抗菌性能。结果表明:(1)通过核磁和紫外表征,我们成功制备得到 SNAP;(2)SNAP 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌(耐药/非耐药)和淋球菌均表现出明显的抑制作用且具有浓度依赖性,表明 SNAP 具有广谱抗菌特性。SNAP 优良的抗菌特性使其及一氧化氮供体在抗抑菌领域有着广阔的应用前景。

关键词: SNAP; 合成; 抗菌; 耐药; 浓度依赖性

中图分类号: O622; R378 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.055002

Study on the synthesis and antibacterial properties of nitric oxide donor

LU Qiu-Xian¹, CHEN Tao¹, MAO Wen¹, LÜ Tao²

(1. Department of Research and Development, Novlead Biotechnology Co. Ltd, Nanjing 211800, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Tsinghua Changgung Hospital,

School of Clinical Medicine, Tsinghua University, Beijing 102218, China)

Abstract: S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), a nitric oxide donor, has a significant inhibitory effect on the growth of microorganisms. In order to further verify the antibacterial effect of SNAP on microorganisms, SNAP solids were first prepared through nitrification in this paper, and their antibacterial properties were verified based on different SNAP concentrations. The results showed that: (1) SNAP has been successfully prepared by ¹H NMR and UV characterization; (2) SNAP has obvious inhibitory effects on Escherichia coli, Staphylococcus aureus (resistant/non-resistant) and Neisseria gonorrhoeae, and the inhibitory effect is concentration-dependent. The results indicates that SNAP has broad-spectrum antibacterial properties. With excellent antibacterial properties SNAP and nitric oxide donors have broad application prospects in the antibacterial field.

Keywords: SNAP; Synthesis; Antibacterial; Drug-resistance; Concentration-dependent

1 引言

以单细胞为主的细菌是地球上存在数量最多的一种生命形式,具有传播快速,繁殖迅速,诱发病

症复杂等特点。作为人类健康最大的威胁,在过去的数十年内,微生物和细菌诱发的疾病和重症已经成为低收入国家致死率最高的诱因之一^[1, 2]。正因此,抗菌抑菌始终是人类健康发展的重要研究课

收稿日期: 2022-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(12016A1003)

作者简介: 陆秋仙(1992-),女,研发工程师,研究方向为制剂配方。E-mail: qiuxian.lu@novlead.com

通讯作者: 吕涛。E-mail: lta00821@btch.edu.cn

题之一。

近年来,科研工作者针对抗抑菌做了大量的研究工作。目前有两种抗抑菌方法受到人们的广泛关注:第一种,通过金属(银离子、铜离子等)离子灭菌杀菌,但银等金属离子对人体同样有较大的危害^[3];第二种,通过抗生素药物对细菌内部结构破坏,从而达到抗菌灭菌的效果。然而,抗生素的长期和不正当使用导致细菌产生耐药性,使抗生素的抗菌性逐步变差^[4, 5]。细菌耐药机制复杂,因此,一种能有效杀菌而又不会令细菌产生耐药的药物是目前的主要研究目标。

一氧化氮(NO)是一种内源性合成的气体小分子物质,广泛存在于人体各种组织和细胞中,参与调节各种生理过程^[6-8]。NO 结构中存在孤对电子,具有高度活性,可快速扩散通过细胞膜,体内半衰期短(3~5 s),作用过程中不易产生耐药性和毒副作用。基于以上特点,针对 NO 抗菌性能的研究受到了广泛关注。但是,NO 自身气体及半衰期短的性质不利于存储和实际使用,极大地限制了其应用。亚硝基硫醇(RSNO)是一类 NO 供体,其结构上巯基被亚硝基键合,该类化合物可在适宜条件(如光照、水汽、铜离子等)刺激下,释放 NO。本文主要论述了一种 NO 供体 S-亚硝基-N-乙酰基-DL-青霉胺(SNAP)的合成及其表征,初步研究该供体对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、淋球菌的抑菌性能,并推测该供体的抑菌机制。

2 实验

2.1 实验原料与设备

N-乙酰基-DL-青霉胺(NAP, 98%, Adamas),亚硝酸钠、盐酸、浓硫酸、丙酮、甲醇、四氢呋喃,均购自国药试剂。银离子布,DC99 铜离子口罩,头孢西丁(FOX,阿拉丁), (LZD, 泰坦),红霉素(E,阿拉丁),大观霉素药敏纸片(上海桥星),头孢曲松药敏纸片(上海桥星),大肠杆菌菌株(ATCC 25922)购自于青岛海博。金黄色葡萄球菌:非 MRSA 标准株(ATCC 25923、ATCC 29213)、MRSA 标准株(ATCC 1026)、MRSA 临床株(YC 2018032、HA 208015)、非 MRSA 临床株(HA208008)和淋球菌均来自南京疾控中心。除非特殊说明,否则实验使用水均为超纯水。

数显磁力搅拌器(上海互佳),涡旋振荡器(Vortex-5,其林贝尔),生物安全柜(山东博科),生化培养箱(上海一恒),紫外可见分光光度计(UV-Vis, Thermo fisher),核磁共振氢谱(¹H NMR)由 400 MHz 超导核磁共振谱仪(Unity Invoa, 瓦里安)测得,氘代二甲亚砜(DMSO-*d*₆)为溶剂,其中化学位移以溶剂峰作为参考标准。

2.2 S-亚硝基-N-乙酰基-NL-青霉胺(SNAP)的合成与表征

SNAP 是通过 N-乙酰基-DL-青霉胺(NAP)亚硝化反应制备得到的(图 1 所示)^[9]。具体过程为:0.025 mol NAP 粉末溶解于 50 mL 甲醇溶液中,于搅拌状态下加入 24 mL 2N 盐酸和 4.78 mL 浓硫酸,用恒压滴液漏斗缓慢滴加 50 mL 1 mol/L 亚硝酸钠溶液,整个体系避光反应。4 h 后,溶液由白色变为深绿色,将反应液温度降至-10~-20 ℃,通过真空过滤分离 SNAP 晶体,然后用冰水冲洗晶体以除去盐副产物,最后,用丙酮清洗晶体以促进干燥。

SNAP 化学结构主要通过 HNMR 和 UV-Vis 来表征。核磁样品制备:取适量 SNAP 粉末溶于 DMSO-*d*₆,通过 Vortex 使样品充分溶解,用干净的核磁共振专用样品管于 293 K 下进行检测。UV-Vis 样品制备:取少量 SNAP 粉末溶于 HEPES(pH 7.4, 10 mmol/L)缓冲液,浓度为 0.1 mg/mL,通过 Vortex 震荡充分溶解,HEPES 溶液作为空白对照组,用 UV-Vis 测 200~600 nm 范围内的吸收值。

N-乙酰基-DL-青霉胺

S-亚硝基-N-乙酰基-DL-青霉胺

图 1 S-亚硝基-N-乙酰基-DL-青霉胺(SNAP)合成示意图
Fig. 1 Schematic diagram of S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) synthesis

2.3 SNAP 抗菌性能研究

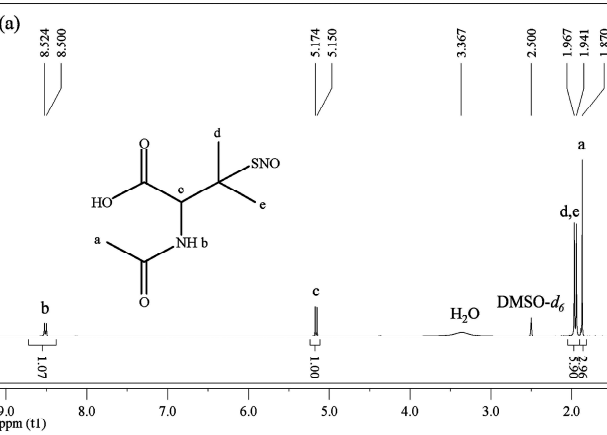
SNAP 抗菌性能的研究选用了以下三类细菌:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌(耐药/非耐药)和淋球菌。检测方法为 K-B 纸片法。抗菌实验操作以金黄色葡萄球菌为实施范例。

2.3.1 抗菌纸片的制备

通过打孔器制备得到直径为 6.0 mm 的圆形纸片,配制 SNAP 浓度为 100 mg/mL 的四氢呋喃溶液,分别圆形纸片上滴加不同体积的供体溶液,四氢呋喃避光挥发,使得纸片表面分别附着有 0.5、1.0、1.5 及 2.0 mg 供体。其

中空白对照组为四氢呋喃处理过的纸片, 阳性对照组为头孢西丁, 利奈唑胺, 红霉素处理过的纸片.

2.3.2 抗菌实验 挑选单菌落, 接种在选择性培养基平板上, 四区划线, 37℃培养 18~20 h. 用一次性接种环挑取新鲜菌落, 悬浮于无菌生理盐水中, 校正菌悬液浓度至 1.5×10^8 CFU/mL. 取平板置室温备用, 用无菌棉拭子蘸取菌悬液后, 在试管壁处旋转挤压几次, 除去多余的菌液, 用棉拭子均匀涂布于整个培养基表面反复数次, 每次将平板作 60°旋转, 最后沿平板周边绕两圈, 保证平板涂布均匀. 待表面的水分被琼脂完全吸收后贴加已经室温平衡的药敏纸片. 用无菌镊子取一张药敏纸片, 平贴于培养基表面, 用镊尖轻压纸片以保证与平板表面完全接触. 贴好药敏纸片的平皿放置 15 min, 再将平板反转倒置, 在 37℃、60%~70%湿度环境中培养 16~20 h 后观察结果.



3 结果讨论

3.1 SNAP 结构表征

SNAP 是由 NAP 通过亚硝化作用合成得到的. 氢核磁谱图是表征 NO 供体结构的有效手段, SNAP 核磁谱图中显示有明显的特征峰, ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 1. 870 (s, 3H), 1. 941/1. 967(s, 6H), 5. 162(d, 1H, 9. 60 Hz), 8. 512(d, 1H, 9. 60 Hz), 且各特征峰积分面积比均符合 SNAP 结构上氢的比值(图 2a), 这表明已经成功制备得到 SNAP. 此外, 紫外可见吸收也是表征 NO 供体的一种有效手段, 其在 340~350 nm 波长处会出现吸收峰. 结合紫外图谱可以看到其在 345 nm 处具有特征吸收峰(图 2b), 表明了 SNAP 的成功制备.

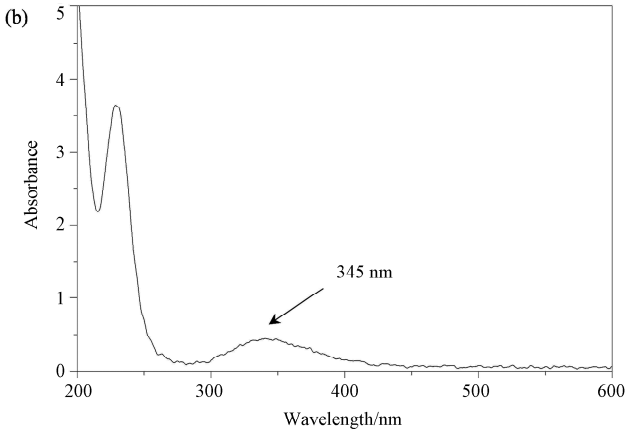


图 2 (a) SNAP 核磁图谱; (b) SNAP 紫外可见吸收图谱
Fig. 2 (a) HNMR spectrum of SNAP; (b) UV-Vis absorption spectrum of SNAP

3.2 SNAP 抗菌性能研究

3.2.1 SNAP 抑大肠杆菌结果分析 SNAP 抑制大肠杆菌实验结果由图 3 所示, 其中空白对照组为未处理纸片, 阳性对照组为银离子布和 DC99 铜离子熔喷布. 结果显示: 表面附着有 SNAP 供体的抗菌纸片在涂覆有大肠杆菌的培养皿中具有显著的

抑菌圈, 且结合表 1 数据可知, 抑菌圈直径具有浓度依赖性, 随着表面附着的供体量增加, 抑菌圈直径变大. 值得注意的是, 当熔喷布表面附着 1 mg 供体时, 其抑菌圈直径高达 12. 4 mm, 高于银离子布和 DC99 铜离子熔喷布(抑菌圈直径分别为 9. 9 mm 和 0 mm).

表 1 不同样品材料的抑菌圈直径

Tab. 1 Diameter of inhibition zone of different sample materials

材料	Cu^{2+}	银离子布	表面附着有不同 SNAP 量的抗菌纸片			
			0. 5 mg	1. 0 mg	1. 5 mg	2. 0 mg
抑菌圈/mm	0	$9. 9 \pm 0. 5$	$8. 7 \pm 1. 3$	$12. 4 \pm 1. 3$	$14. 0 \pm 0. 6$	$15. 3 \pm 0. 6$

大肠杆菌是常见的菌株以及被人类研究最多的一种菌, 大多数不致病. 但出于防御意识, 市场上已

有五花八门的抗菌类产品, 如银离子抹布, 很少的载入量就足以抑制生活中微生物, 达到清洁的功

能. 从上面的抗菌效果图可知,微量的一氧化氮供体与银离子的抗菌也能达到银离子的抗菌效果.

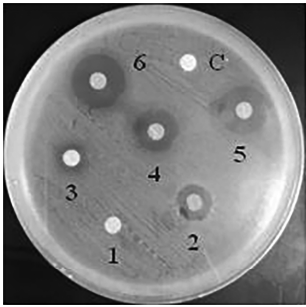


图 3 SNAP 抑大肠杆菌效果图
C:表面无任何处理的纸片; 1: DC99 铜离子熔喷布; 2: 银离子布; 3~6: 附有 0.5、1.0、1.5 及 2.0 mg SNAP 的抗菌纸片
Fig. 3 The effect of SNAP on Escherichia coli
C: Paper without any treatment on the surface; 1: DC99 copper ion melt blown cloth; 2: silver ion cloth; 3~6: antibacterial paper with 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg NO donor attached respectively

3.2.2 SNAP 抑金黄色葡萄球菌结果分析
SNAP 抑金黄色葡萄球菌实验结果如表 2 所示. 低浓度 SNAP 对于金黄色葡萄球菌抑制效果不明显,随着浓度增加仍表现出浓度依赖性; SNAP (1.0 mg)及以上浓度对金黄色葡萄球菌,尤其是 MRSA 菌株的敏感性优于三种抗生素(头孢西丁,利奈唑胺,红霉素); SNAP 对 MRSA 和非 MRSA 抑制效果无明显差异,说明一氧化氮供体 SNAP 对耐药性金黄色葡萄球菌也有较强的抗菌效果.
当金黄色葡萄球菌产生耐药或部分产生耐药,不产生耐药的部分则被抗生素消除,而剩下的部分耐药菌则会快速繁殖. 当形成耐药菌株时,对于大部分抗生素也会产生耐药性,所以应尽量减少耐药的发生. 而一氧化氮对于耐药与非耐药的菌株均

有抑制作用,可作为待开发的新生抗菌药与抗生素联合使用,减少菌株产生的耐药性.

表 2 表面附着有不同抑菌剂纸片对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径(mm)

Tab. 2 Diameter (mm) of inhibition zone of Staphylococcus aureus with different bacteriostatic agents

抗菌物质	ATCC 25923	ATCC 29213	ATCC 1026	YC 2018015	HA 2018015	HA 2018008
SANP (0.2 mg)	0	0	0	0	0	0
SANP (0.5 mg)	9.0	7.0	0	7.0	7.0	7.0
SANP(1.0 mg)	8.0	8.0	7.0	8.0	8.0	8.0
SANP(1.5 mg)	12.0	9.0	8.0	10.0	9.0	8.0
SANP(2.0 mg)	11.0	9.0	12.0	11.0	10.0	8.0
THF	0	0	0	0	0	0
FOX (30 μg)	0	21.0	0	0	0	0
LZD (30 μg)	0	0	0	0	0	0
E (15 μg)	8.0	0	0	0	0	0

注:THF:四氢呋喃; FOX: 头孢西丁; LZD: 利奈唑胺; E: 红霉素

3.2.3 SNAP 抑淋球菌结果分析
SNAP 抑淋球菌实验结果如图 4 所示,其中空白对照为未处理纸片,阳性对照为附着有大观霉素药敏纸片和头孢曲松药敏纸片. 结果显示:随着 SNAP 用量的增加,抑制淋球菌的抑菌圈也随着增大,说明一氧化氮对于淋球菌为浓度依赖型. 淋球菌耐药性的问题目前日趋严重,在通常推荐的治疗方法中,只有第三代头孢菌素,尤其是头孢曲松,保留了它们的疗效,但也出现了对这些抗生素的敏感性降低的情况. 虽然 2.0 mg 的一氧化氮供体 SNAP 的抗菌性能不如大观霉素和头孢曲松,但可通过联合使用或增加其用量达到目标效果.

表 3 不同材料的抗菌性能表
Tab. 3 Antibacterial properties of different materials

材料	空白	大观	头孢	表面附着有不同 SNAP 量的抗菌纸片				
				0.2 mg	0.5 mg	1.0 mg	1.5 mg	2.0 mg
抑菌圈/mm	0	23.0±0.0	39.5 ± 0.5	7.5 ± 0.5	13.5 ± 0.5	17 ± 1	19.5 ± 0.5	23 ± 1

3.3 NO 抗菌机制讨论

表面附着有 SNAP 颗粒的抗菌纸片对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌(耐药/非耐药)和淋球菌表现出良好的抑制效果. SNAP 的抗菌纸片附着在培养基表面,在温度和水的作用下缓慢释放,生成 NO,从而起到抗菌作用^[10],如图 5 所示. NO 抗菌作用主要在于 NO 表现出亚硝化和氧化作用,与氧

或活性氧中间体(如超氧化物或过氧化氢)反应后形成更多的氧化/亚硝化物质,包括过氧亚硝酸盐(HOONO)、亚硝基硫醇(RSNOs)、二氧化氮(NO₂)、三氧化二氮(N₂O₃),而这些活性物质随后可能与微生物蛋白、DNA 和代谢酶相互作用,最终破坏重要的细胞功能和结构,从而产生强大的抗菌功效^[11].

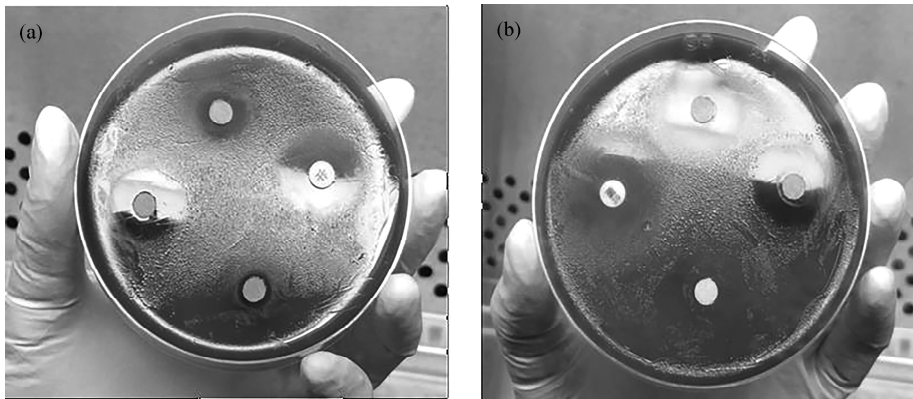


图 4 (a) 0.2, 0.5 和 1.0 mg SNAP 抗菌纸片, 大观霉素纸片; (b) 1.5 和 2.0 mg SNAP 抗菌纸片, 空白对照, 头孢曲松药敏纸片

Fig. 4 (a) 0.2, 0.5, 1.0 mg SANP antibacterial paper, spectinomycin paper; (b) 1.5, 2.0 mg SNAP anti-bacterial paper, control group, ceftriaxone drug sensitive paper piece

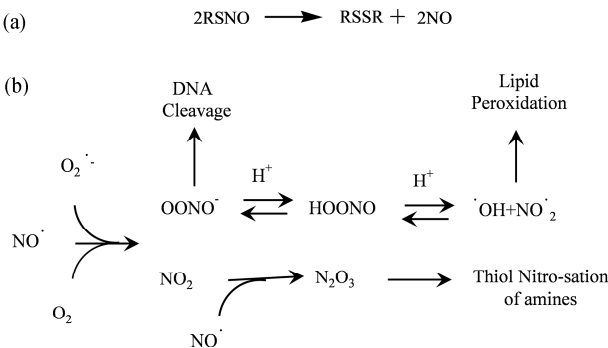


图 5 (a) SNAP 分解示意图; (b) NO 抗菌可能机制

Fig. 5 (a) Decomposition diagram of SNAP; (b) possible mechanism of NO antibacterial activity

4 结 论

本文通过亚硝化反应制备得到 NO 供体 SNAP,通过核磁和紫外进行结构表征,成功制备得到 SNAP 固体粉末,并研究了附着有 SNAP 的抗菌纸片对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌(耐药/非耐药)和淋球菌的抑制效果. 结果表明: (1) 大肠杆菌: SNAP 对大肠杆菌的抑制具有浓度依赖性,当 SNAP 用量为 1.0 mg 时,其抑菌圈直径大于市面上使用的银离子布和 DC99 铜离子熔喷布; (2) 金黄色葡萄球菌: 0.2 mg SNAP 对所有耐药与非耐药金黄色葡萄球均未表现出明显的抑制作用,当 SNAP 量达到 0.5 mg 时对所有金黄色葡萄球菌菌株均起到抑制作用; (3) 淋球菌: 当纸片附着有 0.2 mg SNAP 时就已经产生了抗菌的效果, SNAP 在 0.2~2.0 mg 之间的用量时,抗菌效果随着用量的增大呈正相关上升.

上述结果表明, NO 表现出广谱抗菌性能, 无

论是普通常见菌株如大肠杆菌、非耐药性金黄色葡萄球菌, 还是耐药菌株如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和致病菌株如淋球菌. 基于 NO 独有的广谱抗菌功效和内源性特性为其应用于抗菌领域提供了新的可能, 例如利用涂层技术将 NO 供体负载至导尿管降低尿路感染, 或涂层至口鼻卫生用品, 利用呼出气释放 NO 从而达到抑菌防护作用.

参考文献:

[1] Osrin D, Vergnano S, Costello A. Serious bacterial infections in newborn infants in developing countries [J]. Curr Opin Infect Dis, 2004, 17: 217.

[2] Cherry L, Emi T, Maliwan H, *et al.* Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country [J]. Elife, 2016, 5: e18082.

[3] Niels H, Anoop K S, Katrin L. Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: a review [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2018, 98: 257.

[4] Rayner C, Munckhof W J. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by Staphylococcus aureus [J]. Intern Med J, 2005, 35: S3.

[5] Tapsall J W. Antibiotic resistance in neisseria gonorrhoeae [J]. Clin Infect Dis, 2005, 41: S263.

[6] Xu W M, Liu L Z. Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize Recent progress in nitric oxide research [J]. Cell Res, 1998, 8: 251.

[7] Wang T, Kebir D E, Blaise G. Inhaled nitric oxide in 2003: a review of its mechanisms of action [J].

Can J Anesth, 2003, 50: 839.

[8] Coleman J W. Nitric oxide in immunity and inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1: 1397.

[9] Ketchum A R. Synthesis, spectroscopy, and stability of the nitric oxide donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine: an undergraduate laboratory Experiment [J]. J Lab Chem Edu, 2017, 5: 79.

[10] Colletta A, Wu J, Wo Y, *et al.* S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) impregnated silicone Foley catheters: a potential biomaterial/device to prevent catheter-associated urinary tract infections [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2015, 1: 416.

[11] Carpenter A W, Schoenfisch M H. Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications [J]. Chem Soc Rev, 2012, 41: 3742.

引用本文格式:

中文: 陆秋仙, 陈涛, 毛雯, 等. 一氧化氮供体的合成及其抗菌性能研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 055002.

英文: Lu Q X, Chen T, Mao W, *et al.* Study on the synthesis and antibacterial properties of nitric oxide donor [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 055002.