

姜黄素@ZIF-8 复合体抗菌性能及其抑制 *S. aureus* 生物被膜的转录组学分析

麦基好, 吴千慧, 江绮桃, 许俊聪, 梁刚强, 宋贤良, 罗树灿, 司徒文贝*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 食源性致病菌生物被膜抗性强, 传统抗菌手段难以根除。为明确姜黄素@ZIF-8 复合体 (CCM@ZIF-8) 对金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*) 及生物被膜清除效果及其作用机制。该研究通过不同方法合成 CCM@ZIF-8, 经 BET、SEM 分析筛选出具有最佳性能的材料, 利用转录组技术探究其对 *S.aureus* 及生物被膜的抑制机制。结果表明, 常温一步法合成的 CCM@ZIF-8-RT-1S 具有最佳的负载性能和孔隙结构, 对 *S.aureus* 表现出优异的抑菌 (76.34%) 与生物被膜清除 (71.46%) 活性。转录组分析筛选出 1 267 个差异表达基因, 并经 GO 和 KEGG 分析发现, 差异基因显著富集于氧化磷酸化通路, 编码电子传递链关键酶的基因 (*sdh*、*qox*、*cyoE*) 以及 ATP 合酶操纵子表达水平呈整体显著下调趋势。SrrAB 双组分系统部分基因、控制细胞裂解和 eDNA 释放的关键基因 *cidA* 表达水平也呈现下调趋势。这说明 CCM@ZIF-8 影响了 *S.aureus* 的呼吸链功能、ATP 合成能力及环境压力感知能力, 最终抑制菌体和被膜生长。研究明确了 CCM@ZIF-8 对 *S.aureus* 生物被膜的分子抑制靶点, 为 ZIF-8 基抗菌材料在食源性致病菌生物被膜防控中提供理论支撑。

关键词: ZIF-8 材料; 抗菌性能; 生物被膜; 金黄色葡萄球菌; 转录组学分析

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.5.0316

Antibacterial Activity of Curcumin@ZIF-8 Complex and Transcriptomic Analysis of Its Inhibition Against *S.aureus* Biofilm

MAI Jihao, WU Qianhui, JIANG Qitao, XU Juncong, LIANG Gangqiang, SONG Xianliang, LUO Shucan, SITU Wenbei*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Foodborne pathogenic bacteria form biofilms that are highly resistant, making them difficult to eradicate using conventional antimicrobial methods. To elucidate the efficacy and mechanism of Curcumin@ZIF-8 composite (CCM@ZIF-8) against *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) and its biofilms, CCM@ZIF-8 was synthesized via various methods. Materials with optimal performance were selected through BET and SEM analysis, and the inhibitory mechanism against *S.aureus* and its biofilms was investigated using transcriptomic technology. It was indicated that CCM@ZIF-8-RT-1S, synthesized via the one-step room-temperature method, possessed optimal loading capacity and pore structure. Outstanding antibacterial (76.34%) and biofilm removal (71.46%) activities against *S.aureus* were observed. A total of 1 267 differentially expressed genes (DEGs) were identified through transcriptome analysis, which were found to be significantly enriched in oxidative phosphorylation pathways by GO and KEGG analyses. The expression levels of genes encoding key enzymes in the electron transport chain (*sdh*, *qox*, *cyoE*) and the ATP synthase operon were consistently and significantly down-regulated. Furthermore, partial genes of the SrrAB two-component system and *cidA* were also down-regulated. It was demonstrated that the respiratory chain function, ATP synthesis capacity, and environmental stress perception of *S.aureus* were impaired by CCM@ZIF-8, ultimately inhibiting bacterial and biofilm growth. Molecular inhibition targets were identified, providing theoretical support for the application of ZIF-8-based antimicrobial materials in controlling foodborne pathogenic biofilms.

Key words: ZIF-8 Material; antibacterial properties; biofilm; *Staphylococcus aureus*; transcriptomic analysis

收稿日期: 2026-03-04; 修回日期: 2026-05-21; 接受日期: 2026-05-21

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2025A1515012209); 广东省普通高校省级特色创新项目 (自然科学类) (2022KTSCX015); 中央引导地方科技发展专项资金项目 (202507AC040004)

作者简介: 麦基好 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 抗菌/抗生物被膜材料设计与应用, E-mail: mai_jihao@163.com

通讯作者: 司徒文贝 (1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 物理加工技术及其食品应用研究, E-mail: situwenbei@scau.edu.cn.

食源性致病菌是引发食源性疾病最为常见的原因之一^[1], 为应对其造成的影响, 研发新型抗菌材料并应用于食品包装以保护食品免受细菌污染, 是当下食品抗菌防护研究的有效途径之一^[2]。同时, 天然抗菌剂具备环保性、安全性和生物相容性等诸多优势, 已经成为目前抗菌食品包装研究的热点领域之一^[3]。

姜黄素 (Curcumin, CCM) 作为一种存在于姜科和天南星科植物中的多酚类化合物, 具有天然抗氧化和抗菌功效^[3]。Hassan 等^[4]研发出姜黄素负载胶束, 在 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度条件下, 该胶束对 DPPH 自由基清除率达到 $99.27\%\pm 0.02\%$, 对大肠杆菌 (*E.coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*) 的抑菌圈直径分别为 25.18 mm 和 28.37 mm, 显著优于游离 CCM。Alkhursani 等^[5]借助固相分散法制备了 PVP-姜黄素复合物 (PVP/CCM), 实验发现 PVP/CCM 对 *E.coli* 和 *S.aureus* 的抑菌圈直径为 24~29.00 mm。此外, 在非理想储存条件下, 经 PVP/CCM 处理的桃子, 其微生物腐败变质现象得到显著抑制, 从而将果实保质期延长了 12~24 天。

沸石咪唑酸骨架 (Zeolitic Imidazolate Frameworks, ZIFs) 是结构独特的金属有机骨架材料之一, 由 Zn^{2+} 和 2-甲基咪唑配位自组装形成的沸石咪唑酸盐框架-8 (ZIF-8), 属于典型的 ZIFs 材料^[6]。ZIF-8 具备较高的孔隙率, 生物相容性良好, 且在生理条件下结构稳定^[2,7]。另外, ZIF-8 能够跨越细菌膜运输 Zn^{2+} 阳离子, 利用 Zn^{2+} 破坏细胞膜, 并在内化后触发活性氧物种形成, 是抗菌、抗氧化的重要材料^[8]。作为纳米载体, ZIF-8 与功能化合物结合, 为提高生物利用度提供了一种具有优良前景的方法。例如, Amur 等^[9]采用一步合成法将天然化合物龙胆碱 (GPS) 封装在 ZIF-8 中, 制备出 GPS@ZIF-8, 其对 *S.aureus* 和 *E.coli* 的抑菌圈直径分别为 $25\pm 0.01\ \text{mm}$ 和 $22\pm 0.02\ \text{mm}$, 约为游离 GPS 抗菌效果的两倍。Geng 等^[10]将姜黄素负载到 ZIF-8, 并合成的 Cur-ZIF-8/CS/玉米醇溶蛋白复合物不仅展现出优异的抗菌和抗氧化性能, 还通过增强稳定性与生物利用度, 延长了荔枝果实的保质期 ($>8\ \text{d}$)。

生物被膜是细菌为适应外界环境, 粘附物体表面后, 被自身产生的胞外基质物包裹形成的细菌群体, 其“生长-成熟-脱落分化”是一个循环的过程^[11]。与游离菌体相比, 生物被膜更难清除^[12]。CCM、ZIF-8 及其复合材料 (CCM@ZIF-8) 具有优异的抗菌和抗氧化特性, 针对顽强的生物被膜, CCM@ZIF-8 是否同样实现食源性致病菌生物被膜的高效清除? 其作用机制又是如何? 本研究以 *S.aureus* 为研究对象, 在前期 CCM@ZIF-8 复合材料设计的基础上, 进一步对 CCM@ZIF-8 抑制 *S.aureus* 生长的分子机制进行探究, 系统分析 CCM@ZIF-8 的分子结构、抗菌、抗生物被膜活性及相互作用规律, 并采用 RNA 转录组学和生物信息学分析技术, 深入探究 CCM@ZIF-8 对 *S.aureus* 基因转录及代谢通路的影响。研究也为新型抗菌材料的开发以生物被膜绿色防治提供新思路。

1 实验材料及方法

1.1 实验材料

姜黄素, 国药集团化学试剂有限公司; 六水合硝酸锌, 广州化学试剂厂; 2-甲基咪唑, 上海麦克林生化科技有限公司; 金黄色葡萄球菌 ATCC 10071 (临床分离野生株), 由华南理工大学徐振波老师惠赠; 胰蛋白胨大豆肉汤、酵母提取粉, 广东环凯微生物科技有限公司, 分析纯。其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

UV-6100S 紫外可见分光光度仪, 上海美普达有限公司; Verios 460 电子扫描显微镜, Thermo Fisher 公司; ASAP2020 全自动比表面及孔隙分析仪, 麦克默瑞提克 (上海) 仪器有限公司; H/T16MM 高速离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; 101-1A 电鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 CCM@ZIF-8 的制备与表征

参考相关文献^[13]并略作改动, 分别采用高温法和常温法制备四种复合材料。(1) 高温一步法 (HT-1S): 将 0.66 g 2-甲基咪唑、0.23 g 六水合硝酸锌与 0.01 g CCM 溶于乙醇并搅拌均匀, 置于聚四氟乙烯内衬反应釜中 $120\ ^\circ\text{C}$ 加热 24 h, 冷却后经离心 ($8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)、甲醇洗涤 3 次及干燥, 即得 CCM@ZIF-8-HT-1S; 若体系中不加 CCM, 其余条件不变, 则制得空载 ZIF-8-HT。(2) 高温分步法 (HT-2S): 按 CCM 与 ZIF-8-HT 质量比 1.5:1, 将空载 ZIF-8-HT 加入溶于 CCM 的甲醇中, 搅拌后在 $120\ ^\circ\text{C}$ 条件下孵育 24 h, 经离心、洗涤与干燥制得 CCM@ZIF-8-HT-2S。(3) 常温一步法 (RT-1S): 将含 2.93 g 六水合硝酸锌与含 6.49 g 2-甲基咪唑的甲醇溶液 (各

200 mL) 迅速混合, 并加入 2.00 g CCM, 室温搅拌 1 h 并孵育 24 h, 离心洗涤后干燥即得 CCM@ZIF-8-RT-1S; 若体系中不加 CCM, 其余条件不变, 则制得空载 ZIF-8-RT。(4) 常温分步法 (RT-2S): 按 CCM 与 ZIF-8-RT 质量比 1.5:1, 将空载 ZIF-8-RT 加入溶于 CCM 的甲醇中, 室温搅拌 1 h 并孵育 24 h, 离心、洗涤并干燥后制得 CCM@ZIF-8-RT-2S。

同时, 电子扫描显微镜及全自动比表面及孔隙分析仪等分析材料的分子结构。

1.3.2 抗菌及清除生物被膜性能分析

采用平板计数法评估材料的抗菌性能。将 0.1 g 不同形式的 CCM@ZIF-8 复合材料与 1 mL *S.aureus* 菌液混合作为实验组, 以纯菌液为对照组。各组于 37 °C 共培养 2 h 后, 取 100 μ L 稀释液均匀涂布于固体培养基, 37 °C 倒置培养 12~24 h 进行菌落计数。抗菌率 (R) 计算公式如下:

$$R = \frac{N_0 - N_k}{N_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R——抗菌率, %;

N_0 ——对照组菌落数, 个;

N_k ——实验组菌落数, 个。

采用结晶紫 (CV) 染色法进行清除生物被膜性能检测, 将对数生长期 *S.aureus* 经测定至 $OD_{600\text{ nm}}$ 约 0.10, 接种于 96 孔板 (200 μ L/孔), 37 °C 培养 24 h 以构建生物被膜。弃去培养液, 生理盐水洗涤 3 次除去游离菌。实验组加入 200 μ L CCM@ZIF-8 溶液 (0.01 g·L⁻¹); 对照组加入 200 μ L 生理盐水作用 24 h。随后, 各孔经甲醇固定 15 min, 晾干。加入 0.01wt.% 结晶紫染液染色 15 min, 无菌水洗涤两次后, 用 95% (φ) 乙醇洗脱附着的染料。吸取 125 μ L 洗脱液于新酶标板, 测定 540 nm 处的吸光值 (OD)。实验设置 8 个平行孔, 独立重复 3 次。清除率 (BR) 计算:

$$BR = \frac{OD_c - OD_s}{OD_c} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

BR——生物被膜清除率, %;

OD_c ——空白组吸光度;

OD_s ——实验组吸光度。

1.3.3 RNA 的提取、文库构建及测序及转录组分析

所有操作均在无菌超净台中进行。将 CCM@ZIF-8 粉末分散于无菌水中, 配制成 0.01 g L⁻¹ 的材料悬液。同时, 配制浓度为 1×10^6 cfu·mL⁻¹ 的菌液, 与 CCM@ZIF-8 溶液室温下混合培养 3 h 左右, 取 1 mL 处于对数期 ($OD_{600\text{ nm}}=0.50-0.80$) 的细菌悬液于 1.5 mL 无酶管中, 在温度为 4 °C, 转速 1 000 r min⁻¹ 下离心 2 min, 充分去除上清液, 重复几次离心操作或分多管离心收集。之后将菌体迅速置于液氮中冷冻 15 min, 液氮保存后送至南京奥维森基因技术有限公司进行 RNA 测序。

采用 Trizol 法对 CCM@ZIF-8 处理菌和正常菌样品进行总 RNA 提取。使用 Agilent 2100 生物分析仪验证 RNA 的完整性; 采用 NanoDrop-2000 测定 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 和 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ 的吸光度比, 符合要求的 RNA 样本送到南京奥维森基因技术有限公司进行构建文库和测序, 构建文库采用链特异性建库方法, 转录组测序在 Illumina 高通量测序平台 (HiSeqTM2500/4000) 进行。

基因表达量分析获得基因的 Read Counts 数后, 采用 DESeq2 进行样本间基因差异表达分析, 鉴定出差异表达的基因。每个样本中的基因表达水平根据基因的长度计算每百万片段中来自某一基因每千碱基长度的片段 (Fragments Per Kilobases per Millionreads, FPKM) 计算。其中 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 且 $q\text{value} < 0.05$ 的基因被认为是差异表达的基因。采用 Goseq 软件开展 GO (<http://www.geneontology.org/>) 富集分析, 计算差异基因富集于各 GO 术语的概率。同时, 通过 KEGG (<http://www.kegg.jp>) 富集分析对差异表达基因涉及的通路进行分析。

1.3.4 RT-qPCR 验证

为了进一步验证转录组测序数据的可靠性, 本研究采用双重筛选标准选取了 15 个显著差异表达基因进行实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 验证。其中, 包含 9 个氧化磷酸化通路关

键基因，以及 6 个来源于其他代谢通路的代表性基因。使用 Primer Premier 5.0 软件对基因引物进行设计，如表 1 所示，引物序列由南京奥维森基因技术有限公司合成，用于 RT-qPCR。以 16S rRNA 作为内参基因，使用 7500 Real-Time PCR System 进行 RT-qPCR 反应，反应程序如下：在 95 ℃ 下进行 2 min 的预变性，在 95 ℃ 下进行 15 s 的变性，在 60 ℃ 下进行 30 s 的退火，在 72 ℃ 下进行 30 s 延伸。循环周期为 40，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 3 个生物重复中测试基因的相对表达水平。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因座编号	基因名称	引物方向	引物序列 (5' to 3')	产物大小/bp
A8Q82_RS00150	A8Q82_RS00150	上游引物	GCCAGGACAAACGGCATATC	203
		下游引物	TACCAGCGTCAAAGCCCAGT	
A8Q82_RS00155	A8Q82_RS00155	上游引物	GGTCACTCAATGGGAAACTT	185
		下游引物	GGTTGATTTCATTCGACTTGG	
A8Q82_RS00200	A8Q82_RS00200	上游引物	GGTGCTGGTGTATCTGTTGC	249
		下游引物	TTGCGTGATGACACCTAATG	
A8Q82_RS00635	A8Q82_RS00635	上游引物	GGTGCCACAGCATTATCTAT	162
		下游引物	TGTTGGACTACCCATTTCAG	
A8Q82_RS00905	A8Q82_RS00905	上游引物	ATTCACGCAATTTGACAGG	160
		下游引物	GTGGCCCACCATGATCTTTA	
A8Q82_RS06650	A8Q82_RS06650	上游引物	AGAGCATAATAAGCGTCCAG	200
		下游引物	CTCTTAATGCGTCCTCTGTA	
A8Q82_RS06815	cydB	上游引物	TGGGTGCAGTTACTATTAAGCC	174
		下游引物	GATAATCATCGGTGGCCCTA	
A8Q82_RS06820	cydA	上游引物	GACAGCCTTGATTGTTTCGT	200
		下游引物	TTCTCCTCCTTGCTTCTTGG	
A8Q82_RS11250	ndhF	上游引物	CTTGGAATCAAATGGTAGCC	247
		下游引物	ACCGCAAAGCCTTAGAGTA	
A8Q82_RS12565	atpF	上游引物	CTTTCATCGTGTTACTTGCG	115
		下游引物	TTAGCTTGTTCTGCGTCATC	
A8Q82_RS12570	atpH	上游引物	GTATTCAAGGCGTTCCAAAG	215
		下游引物	CCATCTAATACAGTTGTGCC	
A8Q82_RS12575	atpA	上游引物	GCCCCAAACCTTGAAGAGTC	106
		下游引物	GTACTTCCATGATACGACCA	
A8Q82_RS12580	atpG	上游引物	ATGCAACACGTATGACTGCG	100
		下游引物	ATTTCTGCTTGCTCTCGCTCT	
A8Q82_RS12585	atpD	上游引物	CCTATCCATCGTCAAGCACC	209
		下游引物	GCGAATACAGAAATACCACCGT	
A8Q82_RS12590	atpC	上游引物	GGACATATTCCAAGTGTAGC	202
		下游引物	GCCAGGACAAACGGCATATC	
16S	16S rRNA (内参基因)	上游引物	CCTACGGGAGGCAGCAG	197
		下游引物	ATTACCGCGGCTGCTGG	

1.3.5 数据处理

各项实验均独立重复 3 次，采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行数据分析，数据差异性采用单因素方差分析处理， $P<0.05$ 表示具有显著差异，用 Origin 2024 对分析数据作图。

2 结果与讨论

2.1 不同制备方法对 CCM@ZIF-8 结构/性能的影响

表 2 四种复合材料的结构参数

Table 2 Structure parameters of four composite materials				
样品名称	CCM@ZIF-8-HT-1S	CCM@ZIF-8-HT-2S	CCM@ZIF-8-RT-1S	CCM@ZIF-8-RT-2S
CCM 包载率/(wt.%)	89.19	65.62	52.73	41.11
比表面积 BET/(m ² ·g ⁻¹)	1 171.96	201.84	8.66	707.53
孔体积/(cm ³ ·g ⁻¹)	0.478 4	0.068 4	0.001 0	0.274 7

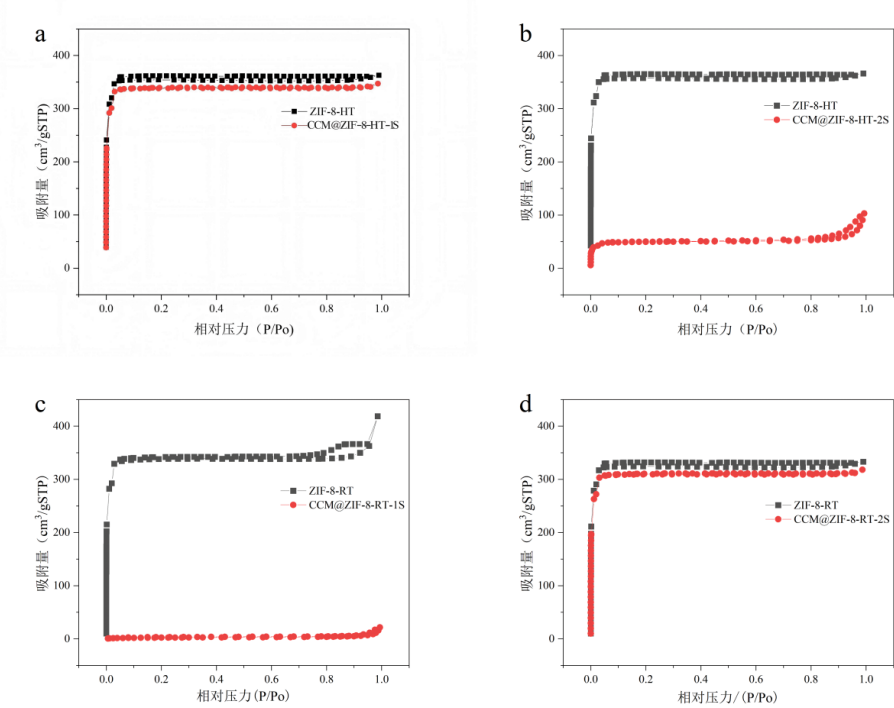


图 1 不同形式 CCM@ZIF-8 的 BET 分析

Fig.1 BET analysis of different forms of CCM@ZIF-8

注: a: ZIF-8-HT 与 CCM@ZIF-8-HT-1S; b: ZIF-8-HT 与 CCM@ZIF-8-HT-2S; c: ZIF-8-RT 与 CCM@ZIF-8-RT-1S; d: ZIF-8-RT 与 CCM@ZIF-8-RT-2S。

在包载性能方面,如表 2 所示,四种 CCM@ZIF-8 复合体的包载率存在显著差异。由于制备过程中“一步法”的 CCM 会随 ZIF-8 的生成同步完成负载,因而合成的 HT-1S 和 RT-1S 其包载率显著高于分步法。其中,高温一步法合成 CCM@ZIF-8-HT-1S 的包载率达到最高 (89.19 wt.%)。

根据 BET 分析结果可知 (图 1),空载 ZIF-8-HT 与 ZIF-8-RT 均具备较大的比表面积 (>1 200.00 m² g⁻¹) 与孔体积 (>0.50 cm³ g⁻¹)。经负载 CCM 后,各复合体的孔隙参数均出现不同程度的下降,说明 CCM 成功被包载于 ZIF-8 骨架内并占据了骨架孔隙。通过对比发现,CCM@ZIF-8-HT-1S 达到最高包载率的同时,其比表面积 (1 171.96 m² g⁻¹) 与空载体最为相近,说明高温一步法使 CCM 与金属有机骨架实现了良好的内部融合;而常温一步法 CCM@ZIF-8-RT-1S 则表现出与 CCM@ZIF-8-HT-1S 显著不同的特征,其比表面积显著降至 8.66 m² g⁻¹,孔体积接近于零 (0.001 0 cm³ g⁻¹),说明 CCM 几乎完全填满了该金属有机骨架的内部孔隙。

另外,如图 2 所示,经高温和常温合成的空载 ZIF-8 微观形貌均呈形状规则、大小相近、分布均匀的椭圆微粒状。除 RT-1S 外,其余三种复合体负载 CCM 后基本维持了原有的微粒外观。相反,CCM@ZIF-8-RT-1S 的形状发生了明显改变,表面呈现出大量片状结构,主要原因是其表面负载了大量 CCM,这与相关文献记载的情况一致^[14]。结合 BET 数据,CCM@ZIF-8-RT-1S 的比表面积较空载 ZIF-8-RT 显著减小,表明 CCM 几乎完全占据了金属有机骨架的内部孔隙,且其表面也存在大量 CCM,两者可相互印证。

结合上述表征数据分析,不同制备方法决定了材料的结构差异,CCM@ZIF-8-HT-1S 完好的骨架结构为其提供了最优的包载性能,而 CCM@ZIF-8-RT-1S 极度收缩的孔体积与表面片状形貌相互印证,说明在常温一步法下,CCM 不仅占据了骨架内部,更在材料表面形成了大量的附着,有利于材料后续在接触菌体时实现高效杀菌。

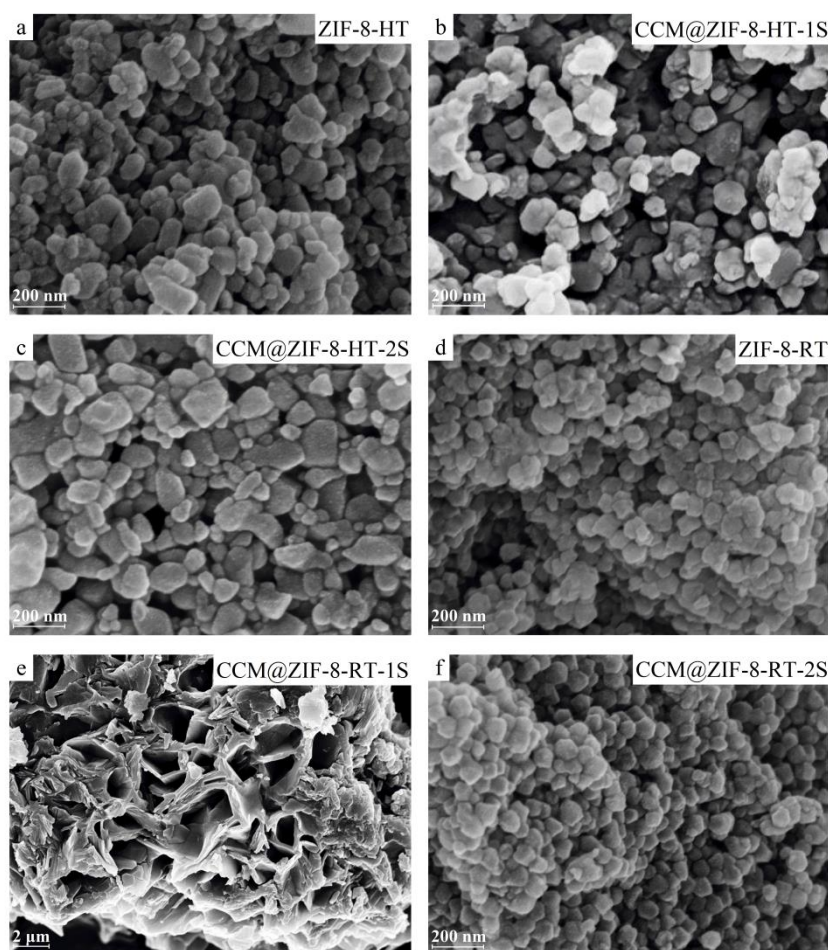


图2 不同形式 CCM@ZIF-8 的 SEM 图

Fig.2 SEM of different forms of CCM@ZIF-8

根据相关文献,CCM 和 Zn^{2+} 均对 *S.aureus* 具有抑制作用^[15-17],然而单一成分在实际应用中存在明显局限。有研究表明^[18,19],CCM 由于呈现高度的疏水性,其在水相介质中的分散度极差、生物利用度低,导致其对 *S.aureus* 的最低抑菌浓度通常高达 $125\sim 250\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,单靠游离的 CCM 很难在低浓度下实现高效杀菌。空载 ZIF-8 (HT/RT) 对 *S.aureus* 虽有一定抗菌效果(图 3A),但由于实验培养基处于 pH 7.0 左右的中性环境,ZIF-8 骨架结构相对稳定,释放的 Zn^{2+} 量较少因而抗菌效果一般。如图 3A 所示,CCM@ZIF-8-HT-1S、CCM@ZIF-8-HT-2S 和 CCM@ZIF-8-RT-2S 三种复合体的抗菌效果不及空载 ZIF-8,原因是 CCM 主要被包载于 ZIF-8 骨架内部,且 Zn^{2+} 通过配位键与 CCM 形成复合物。由于中性环境下骨架难以大量降解,导致内部的抗菌成分难以有效释放。

然而,CCM@ZIF-8-RT-1S 的抗菌率为 76.34%,显著高于其他三种复合体及空载 ZIF-8 ($P<0.05$),这表明常温一步法合成的材料对 *S.aureus* 的抑制作用具有明显优势。结合 BET 与 SEM 结果可知,CCM@ZIF-8-RT-1S 的大部分孔隙包载 CCM 的同时,其表面负载有大量片状 CCM。这种结构使 ZIF-8 起到良好的包载作用,位于表面的 CCM 不受内部骨架释放的限制,直接与菌体接触,发挥高效杀菌作用。同时,中性环境不会破坏 ZIF-8 材料的骨架完整性,从而能保持其稳定的抗菌能力。此外,如图 3B 展示四种不同的 CCM@ZIF-8 复合体对 *S.aureus* 被膜的清除效果,4 种复合体均对 *S.aureus* 被膜具有清除效果,且 CCM@ZIF-8-RT-1S 对 *S.aureus* 被膜清除效果最好,生物被膜清除率为 71.46% (图 3B)。与文献资料进行对比,本实验所设计的 CCM@ZIF-8-RT-1S 有一定的优势。与 Geng 等^[10]制备的 Cur-ZIF-8/壳聚糖/醇溶蛋白复合膜相比,本研究采用的常温一步法制备工艺更为简便绿色,且 CCM 的有效包载量 (52.73wt.%) 高于多组分复合膜体系,有利于在食品包装应用中实现高浓度活性成分缓释。

与 Alkhursani 等^[5]利用 PVP 结合技术提升 CCM 溶解度的方法相比,本研究制备的 CCM@ZIF-8 不仅通过纳米载体改善了 CCM 的水分散性,更发挥了 ZIF-8 骨架中 Zn²⁺与 CCM 的协同抗菌效应。

结合四种 CCM@ZIF-8 复合体的抗菌及清除生物被膜能力,后续选择 CCM@ZIF-8-RT-1S,进一步利用 RNA 转录组学分析 CCM@ZIF-8 材料抑制 *S.aureus* 及其生物被膜的分子作用机理。

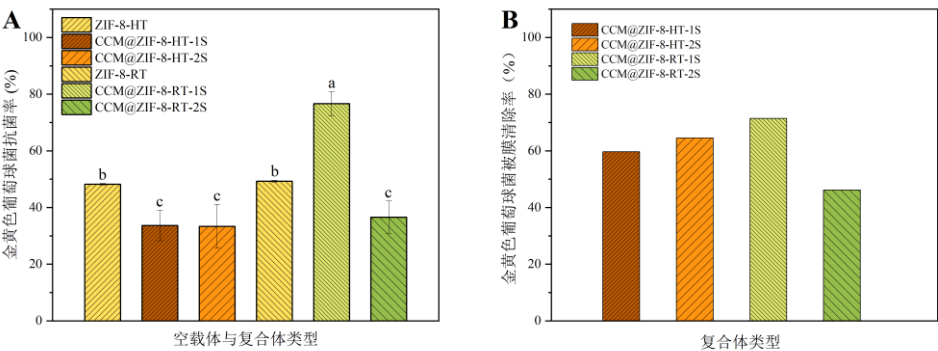


图 3 四种不同 CCM@ZIF-8 复合体对金黄色葡萄球菌抗菌/抗被膜情况

Fig.3 Antibacterial/anti-biofilm activity against *S.aureus* of four different CCM@ZIF-8 complexes

注: A: 抗菌率; B: 生物被膜清除率。图中不同小写字母间表示在水平 $P < 0.05$ 下具有显著性差异。

2.2 CCM@ZIF-8 对金黄色葡萄球菌的分子作用机制分析

2.2.1 转录组测序数据统计分析与 RT-qPCR 验证分析

表 3 样品测序数据质量

Table 3 Sequencing data quality of samples

样品	Raw Reads	Clean Reads	Q20 值/%	Q30 值/%
Blank_1	23 714 140	23 690 398	98.22	94.18
Blank_2	18 624 594	18 605 922	98.22	94.17
Blank_3	21 192 284	21 170 450	98.19	94.10
CCM@ZIF-8_1	17 235 782	17 218 482	98.21	94.14
CCM@ZIF-8_2	21 681 332	21 658 038	98.18	94.06
CCM@ZIF-8_3	20 063 530	20 041 546	97.83	93.23

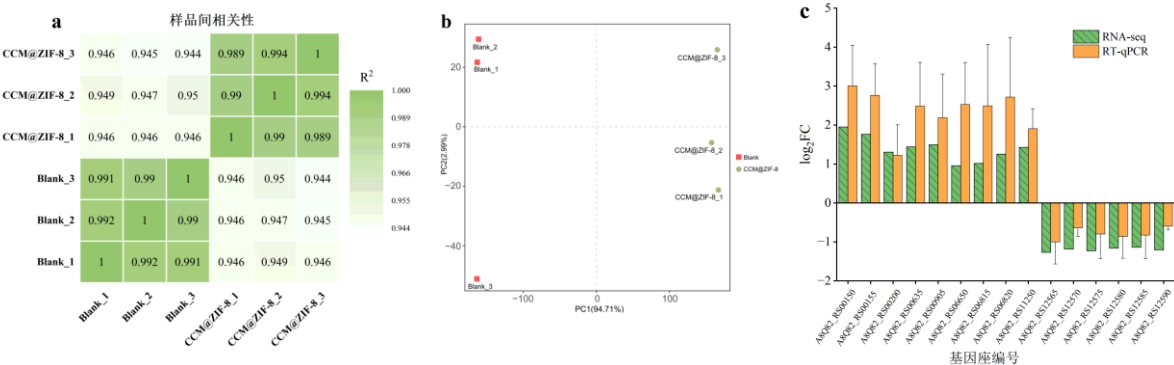


图 4 样本相关性分析与转录组数据的 RT-qPCR 验证

Fig.4 Sample correlation analysis and RT-qPCR validation of transcriptomic data

注: a: 样品相关性热图; b: PCA 图; c: 代表性差异基因的 RT-qPCR 验证。

为了深入了解 CCM@ZIF-8 对 *S.aureus* 的分子作用机制,本实验对正常菌 (Blank) 和处理菌 (CCM@ZIF-8) 样品进行转录组测序,每组均设置 3 个独立的生物学重复样本。由表 3 可知,正常菌和 CCM@ZIF-8 处理菌样品两个组的 Q20 值均大于 97%,Q30 值均大于 93%。结果表明转录组测序数据质量可靠性高,为后续的差异表达基

因分析提供了科学的依据。

同时,为确保后续定量分析的准确性,对3个平行样品进行了样品间相关性检测,结果见图4a。转录组学定量分析要求生物学重复样品间的 R^2 值需大于0.8,从图4a可见,对照样品与试验样品间的 R^2 均大于0.9,满足后续定量分析的要求。PCA分析(图4b)显示,部分样品在第二主成分(PC2)中比较分散,但由于PC1占比为94.71%,PC2占比为2.99%,PC1占比明显大于PC2占比,因此,更注重样本在PC1上的分布,其中组内样品距离较近,组间样本距离分散,表明本试验中样本的基因表达情况符合要求^[20]。

对选取的15个相关基因进行RT-qPCR验证,如图4c所示,所选取的15个基因中上调或者下调的趋势都与RNA组学测序结果变化趋势保持基本一致,充分验证了转录组数据的正确性与可靠性。

2.2.2 差异表达基因分析

为了探讨调控细菌关键基因,本实验正常菌和CCM@ZIF-8处理菌样品(即:空白对照组和处理组)进行了差异表达分析,结果发现,两者含有1 267个差异基因,其中上调基因有655个,下调基因有612个。通过表达量差异火山图(图5a)可以看出,CCM@ZIF-8处理*S.aureus*后,显著上调表达的基因略多于下调表达的基因数量。

2.2.3 GO与KEGG富集分析

为探究CCM@ZIF-8抑制*S.aureus*的整体调控机制,本研究对筛选出的1 267个差异表达基因(其中上调655个,下调612个)进行了全基因组水平的GO和KEGG富集分析。GO富集结果(图5b)显示,差异基因主要参与生物学过程、细胞组成、分子功能。在细胞组分方面,大量差异基因富集于非膜细胞器、核糖体、细胞皮层,表明复合材料不仅影响了细菌的表层结构,还深入干扰了胞内的蛋白质合成机器。同时,参与氧化还原过程的关键抗氧化酶基因呈现显著上调(如烷基过氧化氢还原酶基因 $ahpF$, $\log_2FC=2.58$; 硫氧还蛋白还原酶基因 $trxB$, $\log_2FC=2.00$),表明复合材料诱发了胞内氧化应激(ROS)。此外,与二价金属阳离子转运蛋白相关的基因($A8Q82_RS11660$, $\log_2FC=0.56$)上调,则揭示细菌在感知到ZIF-8释放的 Zn^{2+} 胁迫后,启动了针对金属离子的转运机制以维持胞内离子稳态。KEGG通路富集分析(图5c)清晰地展示了排名前20的显著变化通路,进一步反映了菌体代谢通路的整体变化。结果显示,除了与能量代谢直接相关的氧化磷酸化与三羧酸循环TCA循环通路外,排名前列的显著富集通路高度集中在氨基酸生物合成、碳代谢等基础营养代谢途径。表明上调基因参与了代偿性的营养合成,即能量代谢受阻的条件下,细菌可能通过上调相关氨基酸和碳源的合成基因来进行代谢代偿。

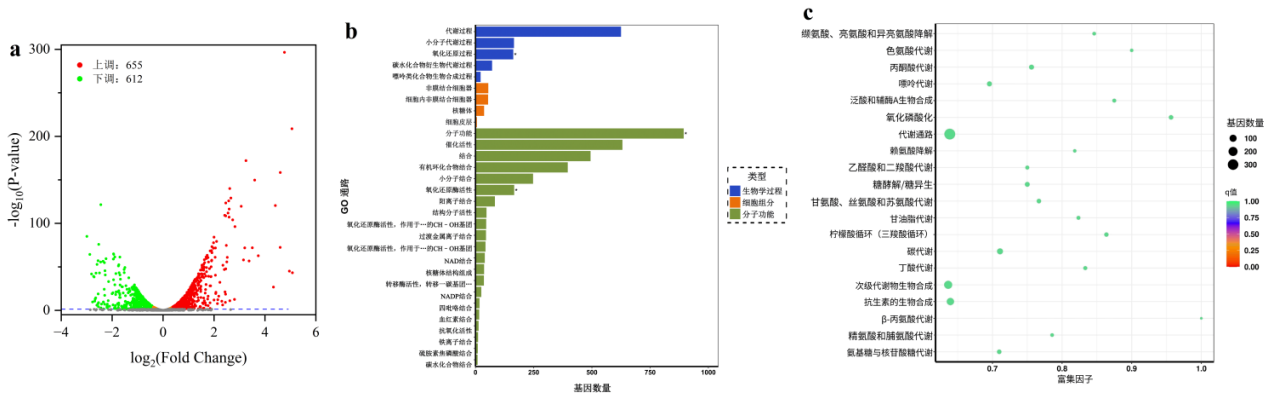


图5 表达差异基因富集分析

Fig.5 Enrichment analysis of DEGs

注: a: 火山图; b: GO 通路富集图; c: KEGG 通路富集图。

2.2.4 氧化磷酸化路径变化

为了进一步研究CCM@ZIF-8对*S.aureus*的影响,将前面筛选到的1 267个差异表达基因匹配到KEGG数据库内的相关通路,差异表达基因显著富集于氧化磷酸化通路(KEGG pathway: sau00190)。本研究发现,CCM@ZIF-8处理后*S.aureus*氧化磷酸化通路中编码电子传递链(Electron Transport Chain, ETC)和ATP合酶的核心基因簇出现了大规模下调,其中包含编码主呼吸链末端氧化酶的基因($qoxABCD$, $ctaB$)、编码琥珀酸脱氢酶的基因($sdhABC$)、负责ATP合成的整个F1Fo ATPase操纵子($atpCDGAHFEB$)。末端氧化酶基因的抑制提示其可能引起电子传递受

阻,无法建立足够的质子动力势(Proton Motive Force, PMF),而 ATP 合酶操纵子的协同下调则预示着 ATP 的产出将受到严重干扰^[21]。同时,在主呼吸链受阻的情况下,细菌显著上调编码细胞色素 *bd* 醌醇氧化酶的 *cydA* 基因,该酶对氧气具有极高亲和力,其上调反映了细菌试图在主呼吸链受损的情况下,利用该应急支路维持基础的 PMF 与膜电势,以保障细胞的基本生存^[22]。另外,涉及精氨酸分解代谢产生的 *arcA* 以及编码无机焦磷酸酶 *ppaC* 基因上调,表明细菌正通过底物水平磷酸化和优化能量水解效率来缓解 ATP 的枯竭。但是,ATP 合酶操纵子相关基因的下调使其功能在转录水平受限,最终促使 *S.aureus* 能量代谢系统的瘫痪。潜在的 ATP 的枯竭不仅直接抑制了细菌的生长,还通过削弱胞外聚合物的合成与外排泵功能,最终促进了生物被膜结构的解体。

另外,氧化磷酸化途径中部分差异表达基因也涉及的双组分系统,其中, *SrrAB* 双组分系统的部分基因(*srrA*, *srrB*)的表达呈现下调趋势,该系统在 *S.aureus* 应对环境应激、维持能量稳态及调节毒力因子中发挥核心作用。已有研究证实, *sdh* 和 *qox* 等呼吸链基因受到 *SrrAB* 的直接转录调控:在环境压力下,磷酸化的 *srrA* 能够特异性结合在 *sdhCAB* 和 *qoxABCD* 操纵子启动子区的共有基序(如 5'-GAAAnnnnAAA-3'样序列)上,从而直接调控这些有氧呼吸相关基因的转录^[23]。因此, *SrrAB* 的下调限制了 *S.aureus* 对 ETC 基因的转录激活作用,在分子层面上削弱细菌维持氧化磷酸化通路完整性的能力。同时,控制细胞裂解和胞外 DNA (eDNA) 释放的关键基因 *cidA* 亦显著下调, eDNA 是 *S.aureus* 生物被膜形成及膜内菌体间通讯的重要成分^[24]。已有研究表明^[25,26], *cidA* 在调控 *S.aureus* eDNA 释放及维持生物被膜结构稳定中发挥着决定性作用。CCM@ZIF-8-RT-1S 能够显著清除成熟生物被膜(清除率 71.46%),且转录组数据中 *cidA* 基因的下调,因此 CCM@ZIF-8 可能抑制了 *cidA* 的表达,阻断了 eDNA 的释放途径,进而削弱了生物被膜的稳定性。

综上,在 CCM@ZIF-8 作用下, *S.aureus* 的呼吸链功能与 ATP 合成能力受到了严重的干扰,环境压力感知能力被破坏,菌体程序性死亡调节功能在转录组学层面出现紊乱,最终对菌体及其生物被膜产生抑制作用。所以,CCM@ZIF-8 作用于 *S.aureus* 及其生物被膜,这一过程并非简单地抑制呼吸作用,而是从综合的能量代谢、环境感知等方面,在基因表达层面上干扰菌体生理代谢的信号传导,从而在机制层面促进了生物被膜的瓦解与菌体的死亡。

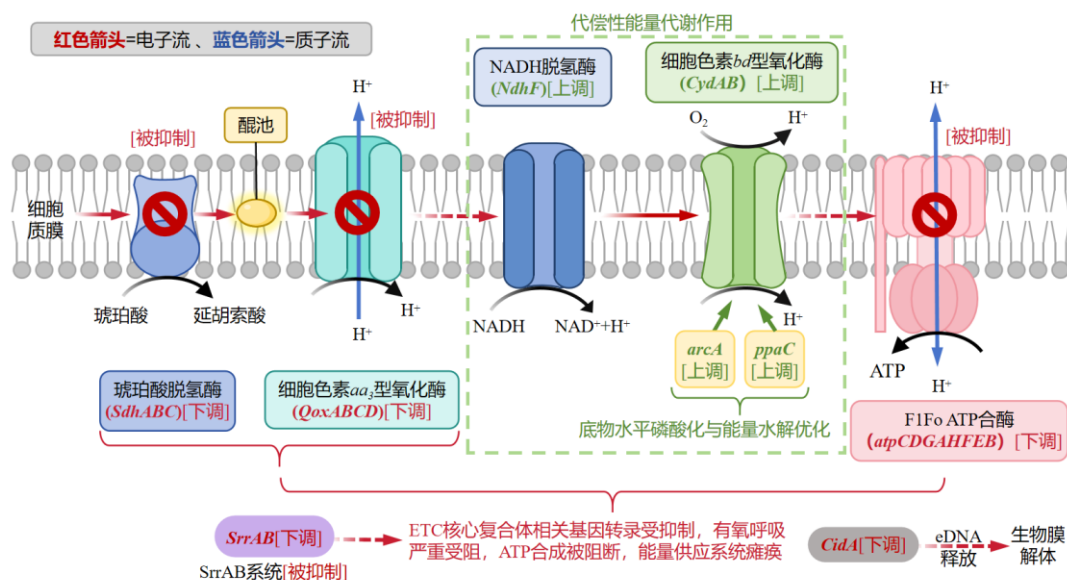


图6 氧化磷酸化途径示意图

Fig.6 Schematic diagram of the oxidative phosphorylation pathway

注: 转录调控中枢 *SrrAB* 双组分系统 (*srrA*, *srrB*) 表达下调, 丧失了对下游呼吸链基因的转录激活作用。同时, 受 *SrrAB* 调控的电子传递链 (*sdh*, *qox*) 及 ATP 合酶操纵子也大规模下调, 导致 ATP 枯竭与能量瘫痪。此外, 关键基因 *cidA* 的抑制阻断了 eDNA 的释放, 加速了成熟生物被膜的解体。

表 4 氧化磷酸化通路中的差异表达基因

Table 4 DEGs in the oxidative phosphorylation pathway

基因 ID	表达量		基因名称	变化	log ₂ FC	p 值	基因描述
	处理组	空白组					
SAUSA300_0425	2 580.14	888.76	<i>ndhF</i>	up	1.54	2.07E-42	NADH 脱氢酶亚基 5
SAUSA300_0986	3 079.42	1 200.70	<i>cydA</i>	up	1.36	3.55E-35	细胞色素 <i>bd</i> 泛醌氧化酶亚基 I
SAUSA300_0987	1 697.52	778.08	<i>cydB</i>	up	1.13	1.15E-22	细胞色素 <i>bd</i> 泛醌氧化酶亚基 II
SAUSA300_1900	9 508.37	5 557.92	<i>ppaC</i>	up	0.77	6.30E-15	锰依赖性无机焦磷酸酶
SAUSA300_0841	2 608.55	2 070.88	<i>arcA</i>	up	0.33	0.0 016 102	NAD(P)/FAD 依赖性氧化还原酶
SAUSA300_1016	2 932.74	3 583.68	<i>ctaB</i>	down	-0.29	0.005 965	血红素 o 合成酶
SAUSA300_1048	1 704.11	2 425.39	<i>sdhB</i>	down	-0.51	1.11E-06	琥珀酸脱氢酶铁硫亚基
SAUSA300_1015	1 110.50	1 904.55	<i>ctaA</i>	down	-0.78	4.30E-12	血红素 A 合成酶
SAUSA300_0961	6 226.96	10 886.44	<i>qoxC</i>	down	-0.81	5.25E-16	细胞色素 <i>aa3</i> 醌氧化酶亚基 III
SAUSA300_1047	1 926.51	3 386.64	<i>sdhA</i>	down	-0.81	1.15E-14	琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基
SAUSA300_0962	22 425.20	43 368.71	<i>qoxB</i>	down	-0.95	3.23E-22	细胞色素 <i>aa3</i> 醌氧化酶亚基 I
SAUSA300_0960	1 183.11	2 315.22	<i>qoxD</i>	down	-0.97	2.89E-08	细胞色素 <i>aa3</i> 醌氧化酶亚基 IV
SAUSA300_2064	2 342.48	4 672.55	<i>atpB</i>	down	-1.00	9.02E-22	F1Fo ATP 合酶 α 亚基
SAUSA300_0963	13 733.16	27 418.53	<i>qoxA</i>	down	-1.00	3.50E-24	细胞色素 <i>aa3</i> 醌氧化酶亚基 II
SAUSA300_2058	10 189.37	20 883.38	<i>atpD</i>	down	-1.04	7.95E-26	F1Fo ATP 合酶 β 亚基
SAUSA300_2059	3 378.59	7 038.87	<i>atpG</i>	down	-1.06	2.56E-25	F1Fo ATP 合酶 γ 亚基
SAUSA300_2061	1 244.62	2 640.27	<i>atpH</i>	down	-1.09	4.43E-23	F1Fo ATP 合酶 δ 亚基
SAUSA300_1046	212.01	453.15	<i>sdhC</i>	down	-1.10	1.46E-12	琥珀酸脱氢酶细胞色素 <i>b558</i> 亚基
SAUSA300_2057	2 725.59	5 835.53	<i>atpC</i>	down	-1.10	3.18E-27	F1Fo ATP 合酶 ϵ 亚基
SAUSA300_2060	7 895.19	17 190.72	<i>atpA</i>	down	-1.12	5.90E-30	F1Fo ATP 合酶 α 亚基
SAUSA300_2062	1 545.11	3 472.48	<i>atpF</i>	down	-1.17	4.13E-28	F1Fo ATP 合酶 <i>b</i> 亚基

2.3 材料应用安全性与局限性探讨

尽管本研究制备的 CCM@ZIF-8 复合材料在体外表现出良好的抑菌及抗生物被膜活性，但将其作为新型抗菌剂真正应用于食品包装领域前，仍需重点考量其理化稳定性和生物相容性。现有文献表明^[27]，CCM 作为天然多酚类提取物，已被证明具有极高的生物安全性；同时，相关毒理学评估证实，ZIF-8 纳米材料在合理浓度范围内对多种正常细胞表现出较低的细胞毒性与良好的体外生物相容性^[28]。

然而，本研究主要聚焦于该复合体系的制备工艺优化及其体外抑菌机制的探讨，在评价手段与应用上仍存在一定局限。在生物被膜评价方面，本研究评价方式单一，未结合激光共聚焦显微镜（CLSM）及活死菌荧光染色等手段研究被膜的结构与菌体活性分布。尽管本课题组前期利用相同材料的透射电镜（TEM）结果已证实了其单体细菌结构的破坏作用^[29]，但更直观的微观被膜破坏情况仍有待补充。同时，关于呼吸链受损与 ATP 合成受阻的机制探讨主要基于转录组学分析，缺乏对菌体内部 ATP 含量以及活性氧（ROS）水平的直接生化定量检测，这些结论在功能代谢层面仍缺乏直接的表型证据支撑。此外，本研究目前尚未对其在复杂食品模拟液（如不同 pH、高脂、高盐环境）中材料的长效稳定性、CCM 泄漏率等进行测试，且生物相容性和针对性的细胞毒理学实验也有待进一步深入探究。

因此，该复合体系在真实应用场景中的安全性和有效性仍存在一定的局限。全面评估 CCM@ZIF-8 的体外生物相容性、在真实食品体系中的理化稳定性，以及进一步完善抗被膜的微观评价体系并结合生化探针技术对组学推导的代谢通路进行功能验证，将是推动该材料走向实际应用前亟待完善的重要工作。

3 结论

本研究通过不同合成条件制备了 CCM@ZIF-8，利用比表面积分析仪（BET）表征其孔隙结构，并采用平板

计数法与结晶紫染色法筛选出具有最佳抗被膜活性的材料。结果表明, 常温一步法合成的 CCM@ZIF-8-RT-1S 具有最佳性能, 该材料完整保留了 ZIF-8 骨架结构, CCM 负载量达 52.73wt.%, 并对 *S.aureus* 表现出优异的抑菌活性与清除生物被膜性能。经转录组学分析表明, CCM@ZIF-8 作用后, 菌体共有 1 267 个差异表达基因, 其中上调基因有 655 个, 下调基因有 612 个。经 GO 和 KEGG 富集分析发现, 差异基因显著富集于氧化磷酸化通路, 其中, 琥珀酸脱氢酶基因 (*sdh*)、末端氧化酶基因 (*qox*) 显著下调, 提示其引起电子传递中断, 干扰了 PMF 的建立; ATP 合酶操纵子表达亦下调, 预示着 ATP 合成受阻。另外, SrrAB 双组分系统 *srrA*、*srrB* 基因、控制细胞裂解和 eDNA 释放的关键基因 *cidA* 表达水平呈现下调趋势。这表明 CCM@ZIF-8 在转录水平上深度干扰了影响了 *S.aureus* 的呼吸链功能、ATP 合成能力及环境压力感知能力, 最终达到抑制菌体和被膜生长的目的。研究揭示了 CCM@ZIF-8 破坏 *S.aureus* 能量代谢的潜在分子机理, 为金黄色葡萄球菌生物被膜的防控提供了新依据。

参考文献

- [1] 马悦,吴梦洁,李卓思,等.食品接触表面生物被膜形成机制及防控方法研究进展[J].食品科学,2023,44(7):276-285.
- [2] 赵宝财,付建治,仇萌.壳聚糖纳米复合食品包装抗菌材料研究进展[J].化工新型材料,2024,52(5):77-82.
- [3] 郭娟,张进,王佳敏,等.天然抗菌剂在食品包装中的研究进展[J].食品科学,2021,42(9):336-346.
- [4] HASSAN S F, ASGHAR S, ULLAH KHAN I, et al. Curcumin encapsulation in geranium oil microemulsion elevates its antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities [J]. Acs Omega, 2024, 9(5): 5624-5636.
- [5] ALKHURSANI S A, DARWESH R, MADANI M, et al. Enhancing the solubility and pH stability of curcumin through polyvinylpyrrolidone conjugation for improving their bioavailability and use in fruit preservation [J]. Food and Bioproducts Processing, 2025, 154: 249-258.
- [6] JONGERT T K, SLOWINSKI I A, DAO B, et al. Zeta potential and size analysis of Zeolitic Imidazolate Framework-8 nanocrystals prepared by surfactant-assisted synthesis [J]. Langmuir, 2024, 40(12): 6138-6148.
- [7] 孙瑞华,杨卓凡,张芮博,等.多孔材料 ZIF-8 的制备及其对布洛芬的载药性能[J].复合材料学报,2024,41(12):6757-6764.
- [8] WYSZOGRODZKA G, MARSZALEK B, GIL B, et al. Metal-organic frameworks: mechanisms of antibacterial action and potential applications [J]. Drug Discovery Today, 2016, 21(6): 1009-1018.
- [9] AMUR S A, SOOMRO N A, KHUHRO Q, et al. Encapsulation of natural drug gentiopicroside into zinc based Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIF-8): In-vitro drug release and improved antibacterial activity [J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2023, 84: 104530.
- [10] GENG C, LIU X, MA J, et al. High strength, controlled release of curcumin-loaded ZIF-8/chitosan/zein film with excellence gas barrier and antibacterial activity for litchi preservation [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 306: 120612.
- [11] BU F, LIU M, XIE Z, et al. Targeted anti-biofilm therapy: dissecting targets in the biofilm life cycle[Z]. Pharmaceuticals. 2022: 15: 1253.
- [12] 都雪莹,胡欣,冯泽银,等.肉桂醛防控食源性致病菌及其生物被膜的研究进展[J].食品科学,2025,46(1):237-245.
- [13] 梁刚强,周苏斌,许俊聪,等.姜黄素-金属有机骨架复合体的分子结构与抗菌性能:首届松山湖“食品与生命健康”高峰论坛暨 2021 年广东省食品学会年会[Z].中国广东东莞:20216.
- [14] 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.
- [15] 刘迪.姜黄素皮克林乳液淀粉基智能包装膜的研究[D].长春:吉林大学,2021.
- [16] 刘佳佳.基于棉的金属有机骨架 ZIFs 膜的制备及其性能研究[D].上海:东华大学,2021.
- [17] 邱明恒.L-精氨酸姜黄素的合成、表征以及体外评价[D].保定:河北大学,2021.
- [18] ADAMCZAK A, OAROWSKI M, KARPISKI T M. Curcumin, a natural antimicrobial agent with Strain-Specific activity [J]. Pharmaceuticals, 2020: 13, 153.
- [19] HUSSAIN Y, ALAM W, ULLAH H, et al. Antimicrobial potential of curcumin: therapeutic potential and challenges to clinical applications: [J]. Antibiotics, 2022: 11, 322.
- [20] 曹启航.单核细胞增生李斯特菌生物被膜形成过程的转录组学分析[D].兰州:甘肃农业大学,2021.
- [21] BALEMANS W, VRANCKX L, LOUNIS N, et al. Novel antibiotics targeting respiratory ATP synthesis in Gram-Positive pathogenic bacteria [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(8): 4131-4139.

- [22] HAMMER N D, RENIERE M L, CASSAT J E, et al. Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host [J]. *Mbio*, 2013, 4(4): 10-1128.
- [23] KINKEL T L, ROUX C M, DUNMAN P M, et al. [J]. *Mbio*, 2013, 4(6): 10-1128.
- [24] RICE K C, MANN E E, ENDRES J L, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(19): 8113-8118.
- [25] BAYLES K W. The biological role of death and lysis in biofilm development [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(9): 721-726.
- [26] MANN E E, RICE K C, BOLES B R, et al. Modulation of eDNA Release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation [J]. *Plos One*, 2009, 4(6): e5822.
- [27] HEWLINGS S J, KALMAN D S. Curcumin: a review of its effects on human health [J]. *Foods*, 2017: 6, 92.
- [28] MOHAMED A, KORZHIKOV-VLAKH V, ZHANG N, et al. Effect of poly(L-lysine) and heparin coatings on the surface of polyester-based particles on prednisolone release and biocompatibility [J]. *Pharmaceutics*, 2021: 13, 801.
- [29] ZHOU S, SU Y, YANG X, et al. Different molecular structure of zeolite imidazole acid framework with curcumin loading and its antibacterial property [J]. *Food Bioscience*, 2023, 54: 102874.