

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.01.09

固体脂质纳米增强抗菌药物对胞内金黄色葡萄球菌活性的研究进展

李露萍, 杨雨婷, 张雪花, 程古月, 谢书宇*

(华中农业大学国家兽药残留基准实验室(HZAU), 国家兽药安全评价实验室(HZAU), 农业部畜禽产品质量安全风险评估实验室, 武汉 430070)

[收稿日期] 2021-07-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 01-0062-09 [中图分类号] S859.79

[摘要] 金黄色葡萄球菌导致的乳房炎是危害奶牛养殖业最严重的疾病之一。抗菌药在胞内极易排出或失活, 导致奶牛金黄色葡萄球菌乳房炎治疗效果差且容易复发。纳米粒子具有在巨噬细胞和上皮细胞等多种细胞中积累的能力, 可提高药物在胞内的浓度和胞内停留时间, 这使得它们可用于治疗细胞内感染。本文对固体脂质纳米抗金黄色葡萄球菌感染的研究进展进行综述, 以指导和推动固体脂质纳米在治疗金黄色葡萄球菌乳腺炎方面的应用。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 抗菌药; 固体脂质纳米; 胞内转运; 抗菌活性

Research Progress of Solid Lipid Nanoparticles Enhancing Antibacterial Activity against Intracellular *Staphylococcus aureus*

LI Lu - ping, YANG Yu - ting, ZHANG Xue - hua, CHENG Gu - yue, XIE Shu - yu*

(Hua Zhong Agricultural University National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues(HZAU), MOA Key Laboratory for the Detection of Veterinary Drug Residues(HZAU), MOA Laboratory for Risk Assessment of Quality and Safety of Livestock and Poultry Produce, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: XIE Shu - yu, E - mail: snxsy1@126.com

Abstract: Mastitis caused by *Staphylococcus aureus* is one of the most serious diseases affecting dairy cattle breeding. Antibacterials are easily discharged or inactivated in cells, which leads to poor therapeutic effects and easy recurrence of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. Nanoparticles have the ability to accumulate in macrophages, epithelial cells and other cells, which can improve the intracellular concentration and intracellular residence time of drugs, which makes them useful for treating intracellular infections. In order to guide and promote the application of solid lipid nanoparticles in the treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis, the research progress of solid lipid nanoparticles against *Staphylococcus aureus* infection is reviewed in this paper.

Key words: *Staphylococcus aureus*; antibacterials; solid lipid nanoparticles; intracellular transport;

基金项目: 湖北省自然科学基金项目壳聚糖纳米凝胶对胞内金黄色葡萄球菌的靶向传递及调控研究(2020CFB531)

作者简介: 李露萍, 硕士研究生, 从事纳米载药系统研究。

通讯作者: 谢书宇。E - mail: snxsy1@126.com

antibacterial activity

金黄色葡萄球菌是引起奶牛乳腺炎的主要病原体之一,对大多数国家的奶业生产造成了巨大的经济损失。原料乳中存在的金黄色葡萄球菌也是贯穿整个食物链的公共卫生问题。奶牛乳腺炎在我国的发病率为 20% ~ 70% 左右,其中隐性乳腺炎的发病率高达 50%^[1],以金黄色葡萄球菌奶牛乳腺炎的发病率和危害最为严重。很多证据表明,金黄色葡萄球菌可以在细胞内存活,诸如乳腺上皮细胞和巨噬细胞,使其能够逃避免疫识别,避免与抗生素接触,导致奶牛乳腺炎长期发病且反复感染^[2]。金黄色葡萄球菌被吞噬细胞吞噬后,被包含在吞噬体内,通过宿主多种抗菌防御机制而被大量的清除。尽管大多数金黄色葡萄球菌被吞噬细胞清除,但因金黄色葡萄球菌具有通过调节其内体微环境而在吞噬过程中存活的能力,而仍然有部分细菌能在细胞内存活^[3]。金黄色葡萄球菌也可通过内体逃逸来抵御吞噬溶酶体恶劣环境的杀灭作用。相比于志贺氏菌、李斯特菌和立克次氏体在侵入后几分钟内即分泌破坏膜的毒力因子从吞噬体逃逸到宿主细胞胞质中^[4],金黄色葡萄球菌在相当晚的时间点逃逸到细胞质^[5]。由此,胞内金葡菌主要寄居在内体、吞噬体和细胞质。应用传统的抗菌药物治疗金葡菌感染时,抗菌药物不易进入细胞,难以到达内体和吞噬体,且进入细胞内的抗菌药物的浓度较低,这就需要频繁给药或增加剂量以达到治疗效果。但这又会增加治疗成本、造成动物不便、副作用、动物可食用组织中的药物残留和细菌耐药性。

研究表明,纳米颗粒可显著增强抗菌药物在细胞内的积累,增加抗菌药对耐药菌株的抗菌活性,还能通过内吞作用和吞噬作用进入细胞,到达内体和吞噬体^[6]。通过网格蛋白介导的内吞的纳米粒子,由于内体和吞噬体内的低 pH 和多水解酶的影响,大部分的纳米粒子在这里被破坏,包裹的药物被迅速释放,瞬时释放的高浓度药物能够有效的杀灭内体和吞噬体内的金葡菌。此外,部分纳米粒子

能够从内体和吞噬体逃逸或以囊胞蛋白介导的方式进入细胞质,在细胞质释放的药物能够有效治疗细胞质内的金葡菌感染。例如,Xie 等制备的生物相容性好、载药量高和生产成本低,在兽医临床极具应用前景的山嵛酸固体脂质纳米能使恩诺沙星在 RAW. 264. 7 细胞内的浓度提高 27. 06 ~ 37. 71 倍且药物停留时间显著延长,可显著提高药物抗胞内金黄色葡萄球菌的活性,为解决奶牛金黄色葡萄球菌乳腺炎的治疗难题提供了契机^[7]。因此,本文拟介绍固体脂质纳米胞内传递效率,抗胞内金黄色葡萄球菌的活性及其影响因素,为开发治疗金黄色葡萄球菌乳腺炎的固体脂质纳米提供新的思路和指导。

1 金葡菌感染的奶牛乳腺炎危害和治疗

金黄色葡萄球菌是引起牛乳腺炎的主要病原体,对大多数国家的奶业生产构成极大挑战^[8]。奶牛乳腺炎的高发病率会造成巨大的经济损失,包括奶业收入的下降,引起生殖并发症导致兽医用药费用的增加以及因更换受污染的牛奶和扑杀受感染动物而产生的费用^[9-12]。此外,受金黄色葡萄球菌感染的奶牛所产出的牛奶中含有多种毒素和酶,可导致严重的食源性疾病^[13]。金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺炎对全球奶农造成的经济损失约 350 亿^[14]。其中,中国每年的总损失估计超过 800 万美元,这还不包括由于牛奶质量下降而导致的乳业企业的经济损失^[15]。全球各国由于金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺炎的检出率也很高,例如,在埃塞俄比亚奶牛乳腺炎患病率约为 62. 6%,其中 51. 2% 的牛奶样品中分离出金黄色葡萄球菌^[16]。在孟加拉国由金黄色葡萄球菌引起的乳腺炎总体流行率约为 72. 7%,并且亚临床乳腺炎是所有病例中的主要类型^[17]。Wang 等调查了中国北京两个奶牛场的生乳,在 195 份样品中,46. 2% 被检测出含有金黄色葡萄球菌^[18]。

目前,临床上奶牛乳腺炎的治疗以抗生素为主。大多数常规抗菌药物以外的药物,包括抗炎

药、生物制剂、中药等,对奶牛乳腺炎的治疗效果与常规抗菌药物相比,没有显著优势^[19]。而在众多抗生素中,恩诺沙星对于金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺炎有较好的治疗效果。例如,Viveros 采用乳房内注射新型二重结晶的恩诺沙星的方式对金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺炎进行治疗,结果发现其治愈率高达 95.06%,高于头孢噻呋 67.69%^[20]。Schoevers 在体外研究发现恩诺沙星能够在猪吞噬细胞内积累,并对金黄色葡萄球菌呈现较好的杀灭作用^[21]。Kamaruzzaman 用 15 mg/L 的恩诺沙星杀死了 42%~92% 的细胞内金黄色葡萄球菌^[22]。这是由于氟喹诺酮类药物是一种广谱杀菌药,对金黄色葡萄球菌有较高的抗菌活性,且能以较高的浓度渗透入细胞内,抵抗细胞内细菌感染。但是恩诺沙星在胞内的作用时间较短,且无法在胞内金葡菌寄居部位达到有效杀菌浓度,所以,延长其在胞内金葡菌寄生部位的作用时间十分关键,可通过寻找一种合适的药物载体以帮助其靶向胞内寄生部位并延长其作用时间,提高治疗效果。

2 固体脂质纳米治疗胞内感染的研究进展

固体脂质纳米粒 (SLN) 是以天然脂质或合成的类脂为载体材料,将药物包裹或内嵌于类脂核中制成的固体胶粒给药系统,因其生物相容性、生物可降解性、稳定性、低成本和易于大规模生产而日益受到关注。Uner 等制备了维生素 C 棕榈酸固体脂质纳米,对其在不同温度下贮存稳定性进行了研究,结果发现该纳米粒子在 4℃ 条件下贮存很稳定,贮存 3 个月后检测该纳米粒子中有 (71.1% ± 1.4%) 没有发生降解,而将维生素 C 制成纳米乳后,同样在 4℃ 条件下贮存 3 个月,检测到其中大部分发生了降解。这说明 SLN 比纳米乳液更稳定^[23]。Kalhapure 等增加万古霉素在固体脂质纳米颗粒中的包封率,测得其最小抑菌浓度为 31.25 μg/mL,显著提高了万古霉素对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌的活性^[24]。Silva 等开发载有维甲酸和月桂酸的固体脂质纳米颗粒,并评估了维甲酸-月桂酸负载的脂质纳米粒对金黄色葡萄球菌的体外抑制活性^[25]。Xie 等制备的恩诺沙星山嵛

酸固体脂质纳米显著提高了恩诺沙星在小鼠 RAW264.7 单核巨噬细胞的蓄积能力,有效延长了抗胞内沙门氏菌的抗菌时间^[7]。根据以上文献报道,固体脂质纳米可有效提高胞内金葡菌所致奶牛乳腺炎的治疗效果。

表 1 固体脂质纳米增强抗菌药物治疗胞内感染的研究实例
Tab 1 Research examples of SLN enhanced antibacterial drugs for intracellular infection

药物	效果	参考文献
维生素 C	SLN 比纳米乳液更稳定	[23]
万古霉素	增强了对金葡菌的抗菌活性	[24]
维甲酸和月桂酸	增强了该药对金黄色葡萄球菌的治疗效果。	[25]
恩诺沙星	增加药物在细胞内的积累	[7]

3 固体脂质纳米入胞方式及其影响因素

纳米颗粒进入细胞主要通过内吞作用。内吞作用主要分为两种途径:吞噬作用和胞饮作用。其中,胞饮作用与液相摄取相关,包括巨胞饮作用,网格蛋白介导的内吞作用 (CME),细胞膜穴样内陷介导的内吞作用 (CvME) 和网格蛋白和细胞膜穴样内陷非依赖性内吞作用。

吞噬作用能够摄取大颗粒^[26-27],是吞噬细胞吸收纳米颗粒的主要机制。纳米粒子的吞噬作用需要与特定的细胞表面受体结合,包括 Fcγ 受体 (FcγRs),补体受体 (CRs),清道夫受体和 Toll 样受体^[27]。吞噬作用通过细胞膜动力学以类似拉链的方式包裹材料,产生细胞内空泡,称为吞噬体。吞噬体经历系列裂变和融合过程即吞噬体成熟,包括与早期吞噬体和晚期吞噬体融合,最终产生吞噬溶酶体^[28]。Rab 5, Rab 7, Rab 20, Rab 34 和 Rab 35 等参与吞噬体成熟的调节。Rab35 调节吞噬体形成, Rab 34 具有粒径依赖性机制。由于低 pH 和水解酶的作用,纳米颗粒可在吞噬溶酶体中发生降解。

巨胞饮作用是一种大规模的非特异性液体摄取过程,它是来自质膜的肌动蛋白驱动的突起形成杯状圆形褶边,当皱褶闭合时,它将细胞外物质转运到巨噬细胞中的细胞内部。巨胞饮作用形成的

内吞囊泡(0.2 ~ 5 μm),称为巨胞饮体,其成熟受磷酸肌醇和几种 Rab GTP 酶的调节。Rab 5 和 Rab 34 参与其形成,Rab 5,Rab 20,Rab 21 和 Rab 7 参与其成熟。研究报道,负载核酸的纳米粒子和表面涂层的银纳米粒子被发现使用巨胞饮作用进入肺癌细胞(NCI - H292)和神经干细胞^[29]。

网格蛋白介导的内吞作用(CME)是真核细胞弯曲其质膜的小区域以形成将纳米颗粒携带到细胞内的运输过程。在哺乳动物细胞的研究发现,在约 200 nm 的蛋白质帮助下,球形内吞膜内陷形成约 100 nm 的囊泡。CME 是一个多因子参与的复杂过程,超过 50 种不同的蛋白质在质膜中动态组装以形成复合物。CME 包括以下过程,网格蛋白涂层组装,膜弯曲,断裂和囊泡脱落。大多数蛋白质参与该过程的分子机制是清楚的。据报道,自乳化纳米脂质体,阳离子聚合物,SLN 等均可利用网格蛋白介导的内吞途径进入胃癌阴性乳腺癌细胞,HeLa 细胞和人脑胶质瘤细胞^[30 - 32]。

细胞膜穴样内陷(Caveola)是指在特定哺乳动物细胞的质膜中可以找到的具有 50 ~ 100 nm 的烧瓶状内陷^[33]。这些结构在平滑肌、内皮细胞和脂肪细胞中含量丰富,覆盖了质膜面积的大约三分之一。细胞膜穴样内吞作用(CvME)的发生需要发夹膜蛋白 caveolin - 1 的存在。由于这种蛋白质,细胞膜穴样内陷呈现出一种特征性的瓶状结构(60 ~ 80 nm),可以吞噬表面结合的药物分子和颗粒。除了 caveolin - 1 之外,大多数细胞中还存在其他同类型因子如 caveolin - 2 或 caveolin - 3。细胞膜穴样内陷内吞机制的其他参与因子还包括 cavin, dynamin,以及囊泡相关膜蛋白(VAMP2)和突触体相关蛋白(SNAP)(介导随后的囊泡融合)等^[34]。

在细胞摄取后,纳米粒子通常被传递到早期内体,这是内吞作用的主要分选站。在早期的内体中,一些纳米颗粒与受体一起被转运到再循环的内体中,随后被排出体外。保留在早期内体中的其他物质沿着微管缓慢移动到细胞内部并与晚期内体融合,最后晚期内体与溶酶体融合^[35]。通过不同途径进入细胞的纳米粒子可能在细胞内会经历不

同的转运途径。细胞膜穴样内陷介导的内吞作用的纳米粒子,可以绕过内体和溶酶体的优点而受到很多关注^[36]。通过吞噬作用的纳米粒子将不经过早期内体,因此可能更难以通过回收内体途径回到细胞外部。此外,通过巨胞饮作用进入细胞的纳米粒子可能不经过早期内体,直接被转运到晚期内体或溶酶体^[37]。

4 固体脂质纳米治疗胞内金黄色葡萄球菌感染的影响因素

纳米粒介导的抗菌药物传递是一个复杂多样的体内动态过程,包括吸收、分布、代谢、排泄和药物释放。这一动态过程会影响纳米颗粒及其有效载荷药物的吸收速率。因此,深入研究纳米粒子在细胞中的动态过程和其靶向性是研发合适的纳米粒子用于有效治疗金黄色葡萄球菌感染的前提,关于这一方面的研究有极大的意义。纳米粒子在治疗胞内感染时受多种因素的影响,其粒径、表面电荷等被认为是重要的决定因素^[38]影响纳米颗粒的细胞摄取,细胞内转运。

4.1 粒径 粒径不仅影响细胞吸收纳米颗粒的方式,还影响其吸收效率。随着纳米颗粒粒径的增加,观察到内化趋势减小^[39]。但是近年来,研究发现粒径太小或太大都不能很好的进入细胞。例如,Chithrani 和 Jin 都发现金纳米粒子在 50 nm 处的摄取比其他粒径更多^[40 - 41]。不同大小的粒子摄入细胞的差异可能是由膜包裹纳米粒子的效率不同导致的。对于直径小于最佳粒径的纳米粒子,它们必须聚集在一起才能进入细胞,因此需要很长时间来聚集纳米离子。对于较大粒径的纳米颗粒,它们需要延长的包裹期,甚至很少发生内吞作用。对于吞噬细胞而言,最大化摄取纳米的粒径大小也可能具有差异。例如,与具有 150 nm 的纳米颗粒相比,具有 500 nm 的聚合物纳米颗粒显示出显著的吞噬效率^[42]。

纳米颗粒的粒径也会影响细胞摄取途径。Saw 等发现最小粒径(30 nm)的纳米颗粒被网格蛋白和细胞膜穴样内陷介导的内吞作用内化,但其他 3 种粒径(60,80 和 100 nm)则仅用网格蛋白介导的内

吞作用进行摄取^[39]。同样, Zhu 等人研究表明, 307.6 nm 的二氧化硅纳米粒子(SNPs)主要被网格蛋白依赖的内吞作用摄入细胞,而对于 167.8 和 55.6 nm 等较小的 SNP 主要通过网格蛋白和细胞膜穴样内陷介导的内吞作用^[43]。可以发现,较小粒径的纳米粒子利用细胞膜穴样内陷介导的内吞作用,较大的粒子利用网格蛋白介导的内吞作用^[44-45]。

细胞内转运也受到纳米粒子粒径的影响,例如, Aoyama 等发现直径小于 100 nm 的二氧化硅纳

米粒子在 A549 细胞中比大于 100 纳米的纳米粒子移动分布更快^[46]。与沿微管移动的 70 纳米和 300 纳米的纳米粒子相比,1000 纳米的粒子不依赖于快速微管依赖性运输。此外,内吞途径也可能影响纳米粒子在细胞内的转运。Aoyama 等发现小粒径的二氧化硅纳米粒子主要位于 A549 细胞的溶酶体中,而较大的粒子大多位于早期内体和晚期内体^[46]。Yue 等发现 13 nm 金纳米粒子停留在内体中,而 50 nm 纳米粒子则分布在内吞囊泡之外^[47]。纳米粒子在细胞内的最终目的地跟粒径大小密切相关^[48]。

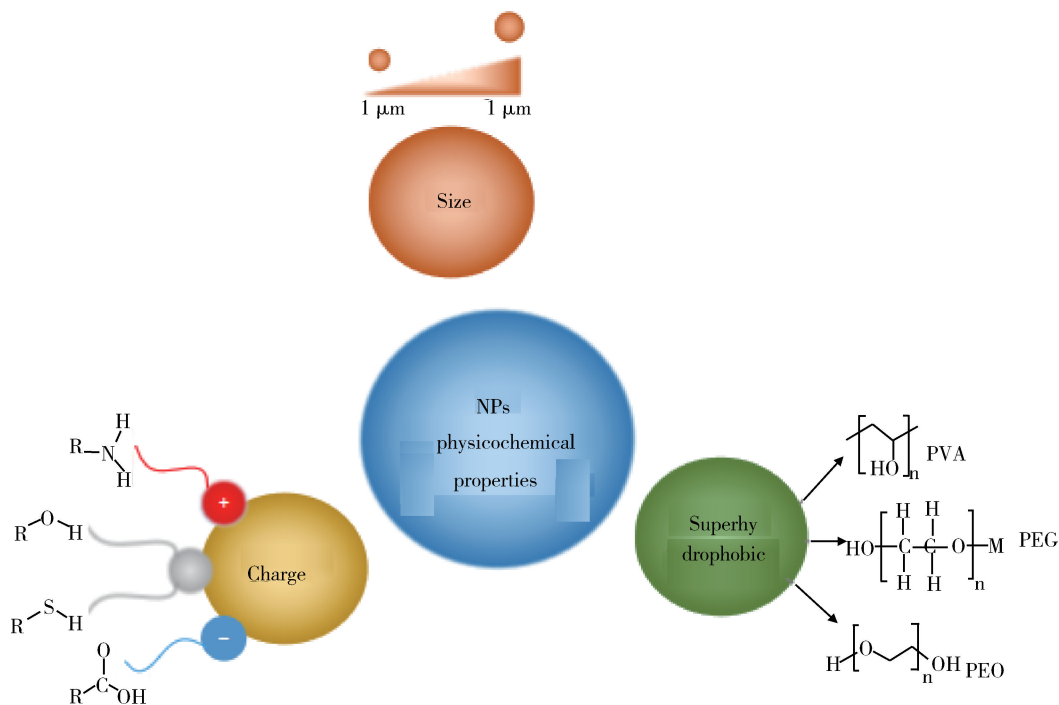


图 1 影响纳米粒子细胞摄取的物理化学因素

Fig 1 Physical and chemical factors affecting cell uptake of nanoparticles

4.2 表面电荷 不同表面电荷的纳米颗粒表现出不同的内化和细胞内运输能力,其中,阳离子纳米粒子显示出更有效的细胞内化,因为阳离子纳米粒子倾向于粘附到具有负电荷的细胞膜^[49-52]。而带负电荷的纳米粒子,所带的负电荷越低表现出更高的细胞内化能力^[53]。近年来,结合两种相反电荷的纳米粒子各自的优点,电荷反转纳米粒子受到越来越多的关注^[54]。例如,电荷反转纳米粒子可以在中性或碱性组织中维持负电荷,并且当纳米粒子到达酸性肿瘤组织以增强细胞摄取时,表面电荷可

以转变为正电荷^[55]。

阳离子纳米颗粒不仅高度内化,而且在细胞中累积时间更长。Soenen 等发现阳离子脂质体不易被细胞排出并保留在细胞内^[56]。阳离子纳米颗粒可以长时间停留在细胞内是由于它们可以通过内体逃逸到细胞质中。另外,阳离子纳米颗粒具有优异的核靶向功能,例如与负电荷和中性电荷纳米粒子相比,带正电荷的超支化聚合物的核积累显著增强^[57]。阳离子纳米粒子的核积累也与内体逃逸有关。Yue 等观察到阳离子壳聚糖基纳米粒子从

内体逃逸并表现出显著的核积累,而中性和阴离子纳米粒子更喜欢保留在内体和溶酶体中^[58]。

4.3 表面疏水性 纳米颗粒的表面疏水结构易于与细胞质膜快速接触,导致疏水纳米颗粒表现出更高的内化效率。疏水涂层纳米粒子显示出更高效的细胞摄取和较高的肝细胞吸收^[59-61]。为了增强体内纳米颗粒的稳定性并控制药物的释放,已经使用许多亲水性聚合物如 PEG, PVA 和葡聚糖来改性纳米颗粒表面的亲疏水性。研究发现涂有聚(环氧乙烷)(PEO)的纳米颗粒显著延迟了巨噬细胞的摄取效率和时间^[62]。Du 等发现纳米粒子在体内的循环时间随着表面 PEG 密度的增加而延长^[63]。小分子表面修饰的纳米颗粒通过减少了其与吞噬细胞的清除剂受体的相互作用而呈现出较低的摄取效率^[64]。亲水/疏水比为 1.7 ~ 2.0 的聚合物胶束表现出最佳的细胞摄取效率^[65]。

疏水性不仅影响纳米颗粒的内吞效率,而且还影响细胞内的命运。疏水增强的乙二醇壳聚糖纳米粒子在整个细胞中的分布增强。另外,疏水性纳米颗粒在细胞器中积累也呈现增强。陷入溶酶体的疏水修饰的淀粉纳米粒子倾向于迁移到细胞核,PEG 修饰增强了碳纳米管在线粒体中蓄积的可能性^[66-67]。Yu 等比较了 MDCK 细胞中不同疏水改性胶束的内吞作用和胞吐作用^[68],结果表明,PEG-DSPE 胶束由于其较高的疏水性而具有更快的内吞作用和胞吐作用。

5 展 望

固体脂质纳米由于其独特的生物学性能而被用作抵抗金黄色葡萄球菌胞内感染的有效载体,而且比传统制剂更具优势。但是,针对金黄色葡萄球菌感染的纳米系统的研究还不完善,面临的主要挑战有固体脂质纳米在胞内的动态过程和靶向性,各种理化因素对其胞内转运过程皆会产生影响。由于纳米粒子在细胞内转运的复杂性和不可预测性,影响药物吸收速率,关于固体脂质纳米粒子的临床疗效仍值得怀疑,应加强其临床评价。可针对胞内金黄色葡萄球菌研究纳米颗粒在细胞水平上的转运机制来开发智能纳米粒子,以提高金黄色葡萄球

菌胞内感染疾病的治疗效果。

参考文献:

- [1] 刘德权. 奶牛乳腺炎的预防与治疗[J]. 现代畜牧兽医, 2012 (4): 40-42.
Liu D Q. Prevention and treatment of mastitis in dairy cows[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, (4): 40-42.
- [2] Chengxiang Zhang, Weiyou Zhao, Cong Bian, *et al.* Antibiotic-Derived Lipid Nanoparticles to Treat Intracellular *Staphylococcus aureus* [J]. ACS Applied Bio Materials, 2019, 2 (3): 1270-1277.
- [3] Thwaites G E, Gant V. Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? [J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(3): 215-22.
- [4] Hybiske K, Stephens R S. Exit strategies of intracellular pathogens[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(2): 99-110.
- [5] Mukherjee S, Ray S, Thakur R. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system[J]. Indian J Pharm Sci, 2009, 71: 349.
- [6] Xie S, Tao Y, Pan Y, *et al.* Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents[J]. J Control Release, 2014. 187: 101-17.
- [7] Xie S, Yang F, Tao Y, *et al.* Enhanced intracellular delivery and antibacterial efficacy of enrofloxacin-loaded docosanoic acid solid lipid nanoparticles against intracellular *Salmonella* [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41104.
- [8] Monistero V, Graber H, Pollera C, *et al.* *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes [J]. Toxins, 2018, 10: 247.
- [9] Hogeveen H, Huijps K, Lam T. Economic aspects of mastitis: new developments[J]. N Z Vet J, 2011, 59: 16-23.
- [10] Deb R, Kumar A, Chakrabort S, *et al.* Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review[J]. Pak J Biol Sci, 2013, 16: 1653-61.
- [11] Botaro B G, Cortinhas C S, Dibbern A G, *et al.* *Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows[J]. Trop Anim Health Prod, 2015, 47: 61-6.
- [12] Gomes F, Henriques M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches [J]. Curr Microbiol, 2016, 72 (4): 377-82.
- [13] Johler S, Tichaczek - Dischinger P S, Rau J, *et al.* Outbreak of

- Staphylococcal food poisoning due to SEA – producing *Staphylococcus aureus*[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10;777 – 81.
- [14] Mushtaq S, Shah A M, Shah A, *et al.* Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure[J]. *Microb Pathog*, 2018, 114;357 – 361.
- [15] Geng H, Zou W, Zhang M, *et al.* Evaluation of phage therapy in the treatment of *Staphylococcus aureus* – induced mastitis in mice [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2020, 65(2):339 – 351.
- [16] Abebe R, Hatiya H, Abera M, *et al.* Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia[J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12(1):270.
- [17] Hoque M N, Das Z C, Rahman ANMA, *et al.* Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh[J]. *Int J Vet Sci Med*, 2018, 6(1):53 – 60.
- [18] Wang W, Lin X, Jiang T, *et al.* Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis in Beijing, China[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9;1123.
- [19] Francoz D, Wellemans V, Roy J P, *et al.* Non – antibiotic approaches at drying – off for treating and preventing intramammary infections: a protocol for a systematic review and meta – analysis [J]. *Anim Health Res Rev*, 2016, 17(2):169 – 175.
- [20] Viveros M, Lopez – Ordaz R, Gutiérrez L, *et al.* Efficacy assessment of an intramammary treatment with a new recrystallized enrofloxacin vs ceftiofur and parenteral enrofloxacin in dairy cows with nonsevere clinical mastitis[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2018, 41(1):e1 – e9.
- [21] Schoevers E J, van Leengoed L A, Verheijden J H, *et al.* Effects of enrofloxacin on porcine phagocytic function. *Antimicrob Agents Chemother*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(9):2138 – 43.
- [22] Kamaruzzaman N F, Chong SQY, Edmondson – Brown K M, *et al.* Bactericidal and Anti – biofilm Effects of Polyhexamethylene Biguanide in Models of Intracellular and Biofilm of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8;1518.
- [23] Uner M, Wissing S A, Yener G, *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for application of ascorbyl palmitate[J]. *Pharmazie*, 2005, 60(8):577 – 82.
- [24] Kalhapure R S, Mocktar C, Sikwal D R, *et al.* Ion pairing with linoleic acid simultaneously enhances encapsulation efficiency and antibacterial activity of vancomycin in solid lipid nanoparticles [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 117;303 – 11.
- [25] Silva E L, Carneiro G, de Araújo L A, *et al.* Solid lipid nanoparticles loaded with retinoic acid and lauric acid as an alternative for topical treatment of acne vulgaris[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015, 15;792 – 9.
- [26] S. – J. Seo, M. Chen, H. Wang, *et al.* Extra – and intra – cellular fate of nanocarriers under dynamic interactions with biology [J]. *Nano Today*, 2017, 14;84 – 99.
- [27] T. – G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies[J]. *Nano Today*, 2011, 6;176 – 185.
- [28] Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers’ entry into the cell: relevance to drug delivery [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009;66(17):2873 – 2896.
- [29] I. M. Pongrac, L. B. Ahmed, H. Mlinaric, *et al.* Surface coating affects uptake of silver nanoparticles in neural stem cells [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018, 50:684 – 692.
- [30] S. Martins, S. Costa – Lima, T. Carneiro, *et al.* Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway[J]. *International journal of pharmaceutics*, 2012, 430;216 – 227.
- [31] A. Li, J. Qiu, B. Zhou, *et al.* The gene transfection and endocytic uptake pathways mediated by PEGylated PEI – entrapped gold nanoparticles[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, 13:2558 – 2567.
- [32] R. K. Khurana, R. Kumar, B. L. Gaspar, *et al.* Clathrin – mediated endocytic uptake of PUFA enriched self – nanoemulsifying lipidic systems (SNELS) of an anticancer drug against triple negative cancer and DMBA induced preclinical tumor model[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 91;645 – 658.
- [33] Kovtun O, Tillu V A, Ariotti N, *et al.* Cavin family proteins and the assembly of caveolae [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(7):1269 – 1278.
- [34] Nabi I R. Cavin fever: regulating caveolae[J]. *Nat Cell Biol*, 2009,11(7):789 – 791.
- [35] Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, *et al.* Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell[J]. *Chem Soc Rev*, 2017,46(14):4218 – 4244.
- [36] Scita G, Di Fiore P P. The endocytic matrix[J]. *Nature*, 2010, 463(7280):464 – 473.
- [37] Y. Egami. Molecular imaging analysis of Rab GTPases in the regulation of phagocytosis and macropinocytosis[J]. *Anatomical Science International*, 2016, 91(1):35 – 42.
- [38] 周凯翔, 李超, 王晓芳, 等. 纳米技术提高抗菌药物治疗疗效

- 内菌感染的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(3):58–66.
- Zhou K X, Li Ch, Wang X F, *et al.* Research progress on nanocarriers technologies improving effect of antibiotic against intracellular bacterial infection[J]. Chinese Journal of Veterinary Durg, 2018, 52(3):58–66.
- [39] Saw W S, Ujihara M, Chong W Y, *et al.* Size – dependent effect of cystine/citric acid – capped confeito – like gold nanoparticles on cellular uptake and photothermal cancer therapy[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 161:365–374.
- [40] Chithrani B D, Chan W C. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein – coated gold nanoparticles of different sizes and shapes [J]. Nano Lett, 2007, 7(6):1542–1550.
- [41] Jin H, Heller D A, Sharma R, *et al.* Size – dependent cellular uptake and expulsion of single – walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles [J]. ACS Nano, 2009, 3(1):149–158.
- [42] He Y, Lu H, Su Y, *et al.* Ultra – photostable, non – cytotoxic, and highly fluorescent quantum nanospheres for long – term, high – specificity cell imaging[J]. Biomaterials, 2011, 32(8):2133–2140.
- [43] Zhu J, Liao L, Zhu L, *et al.* Size – dependent cellular uptake efficiency, mechanism, and cytotoxicity of silica nanoparticles toward HeLa cells[J]. Talanta, 2013, 107:408–415.
- [44] Guo P, Liu D, Subramanyam K, *et al.* Nanoparticle elasticity directs tumor uptake[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):130.
- [45] Sousa de Almeida M, Susnik E, Drasler B, *et al.* Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine[J]. Chem Soc Rev, 2021, 50(9):5397–5434.
- [46] Aoyama M, Yoshioka Y, Arai Y, *et al.* Intracellular trafficking of particles inside endosomal vesicles is regulated by particle size [J]. J Control Release, 2017, 260:183–193.
- [47] Yue J, Feliciano T J, Li W, *et al.* Gold Nanoparticle Size and Shape Effects on Cellular Uptake and Intracellular Distribution of siRNA Nanoconstructs [J]. Bioconjug Chem, 2017, 28(6):1791–1800.
- [48] Oh E, Delehanty J B, Sapsford K E, *et al.* Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell – penetration peptides and particle size[J]. ACS Nano, 2011, 5(8):6434–6448.
- [49] Rovais MRA, Alirezapour B, Moassesi M E, *et al.* Internalization capabilities of gold – 198 nanoparticles: Comparative evaluation of effects of chitosan agent on cellular uptake into MCF – 7[J]. Appl Radiat Isot, 2018, 142:85–91.
- [50] Choi J S, Park J S. Effects of paclitaxel nanocrystals surface charge on cell internalization[J]. Eur J Pharm Sci, 2016, 93:90–96.
- [51] Nairi V, Magnolia S, Piludu M, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles functionalized with hyaluronic acid. Effect of the biopolymer chain length on cell internalization [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 168:50–59.
- [52] Stie M B, Thoke H S, Issinger O G, *et al.* Delivery of proteins encapsulated in chitosan – tripolyphosphate nanoparticles to human skin melanoma cells [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 174:216–223.
- [53] Pensado A, Fernandez – Piñeiro I, Seijo B, *et al.* Anionic nanoparticles based on Span 80 as low – cost, simple and efficient non – viral gene – transfection systems[J]. Int J Pharm, 2014, 476(1–2):23–30.
- [54] Naeem M, Oshi M A, Kim J, *et al.* pH – triggered surface charge – reversal nanoparticles alleviate experimental murine colitis via selective accumulation in inflamed colon regions [J]. Nanomedicine, 2018, 14(3):823–834.
- [55] Miao Y, Qiu Y, Yang W, *et al.* Charge reversible and biodegradable nanocarriers showing dual pH – /reduction – sensitive disintegration for rapid site – specific drug delivery[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 169:313–320.
- [56] Soenen S J, Vercauteren D, Braeckmans K, *et al.* Stable long – term intracellular labelling with fluorescently tagged cationic magnetoliposomes[J]. Chembiochem, 2009, 10(2):257–267.
- [57] Chen L, Simpson J D, Fuchs A V, *et al.* Effects of Surface Charge of Hyperbranched Polymers on Cytotoxicity, Dynamic Cellular Uptake and Localization, Hemotoxicity, and Pharmacokinetics in Mice[J]. Mol Pharm, 2017, 14(12):4485–4497.
- [58] Yue Z G, Wei W, Lv P P, *et al.* Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan – based nanoparticles[J]. Biomacromolecules, 2011, 12(7):2440–2446.
- [59] Sun S, Huang Y, Zhou C, *et al.* Effect of Hydrophobicity on Nano – Bio Interactions of Zwitterionic Luminescent Gold Nanoparticles at the Cellular Level[J]. Bioconjug Chem, 2018, 29(6):1841–1846.
- [60] Kim E, Kim J M, Kim L, *et al.* The effect of neutral – surface iron oxide nanoparticles on cellular uptake and signaling pathways [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11:4595–4607.
- [61] Li H, Zhang Z, Bao X, *et al.* Fatty acid and quaternary ammonium modified chitosan nanoparticles for insulin delivery [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 170:136–143.

- [62] Bartneck M, Keul H A, Singh S, *et al.* Rapid uptake of gold nanorods by primary human blood phagocytes and immunomodulatory effects of surface chemistry[J]. ACS Nano, 2010, 4(6): 3073 – 3086.
- [63] Du X J, Wang J L, Liu W W, *et al.* Regulating the surface poly (ethylene glycol) density of polymeric nanoparticles and evaluating its role in drug delivery in vivo[J]. Biomaterials, 2015, 69: 1 – 11.
- [64] Van Haute D, Liu A T, Berlin J M. Coating Metal Nanoparticle Surfaces with Small Organic Molecules Can Reduce Nonspecific Cell Uptake[J]. ACS Nano, 2018, 12(1):117 – 127.
- [65] Wang D, Zhou Y, Li X, *et al.* Mechanisms of pH – Sensitivity and Cellular Internalization of PEOz – b – PLA Micelles with Varied Hydrophilic/Hydrophobic Ratios and Intracellular Trafficking Routes and Fate of the Copolymer[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(8):6916 – 6930.
- [66] Jiang L, Li X, Liu L, *et al.* Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles [J]. Int J Nanomedicine, 2013, 8:1825 – 34.
- [67] Kim S W, Lee Y K, Kim S H, *et al.* Covalent, Non – Covalent, Encapsulated Nanodrug Regulate the Fate of Intra – and Extracellular Trafficking: Impact on Cancer and Normal Cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):6454.
- [68] Yu C, He B, Xiong M H, *et al.* The effect of hydrophilic and hydrophobic structure of amphiphilic polymeric micelles on their transport in epithelial MDCK cells[J]. Biomaterials, 2013, 34(26):6284 – 6298.

(编辑:侯向辉)