

· 论 著 ·

本文亮点:

- (1) 利用蛋黄卵磷脂脂质体复合聚六亚甲基双胍盐酸盐(PHMB),同时引入茶树精油,形成卵磷脂脂质体-茶树精油-PHMB复合物(Lip-TTO-PHMB),从而降低PHMB的毒性。
- (2) 证实 Lip-TTO-PHMB 在保持抗菌活性的同时具有良好的生物相容性,为高效低毒抗菌生物材料的开发提供了新思路。

Highlights:

- (1) Egg yolk lecithin liposomes were compounded with polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB), and tea tree oil was introduced simultaneously to form a lecithin liposome-tea tree oil-polyhexamethylene biguanide hydrochloride complex (Lip-TTO-PHMB), so as to reduce the toxicity of PHMB.
- (2) It was confirmed that Lip-TTO-PHMB had good biocompatibility while retaining antibacterial activity, which provided a novel strategy for developing high-efficiency, low-toxic antibacterial biomaterials.



Lip-TTO-PHMB 的制备及其体外抗菌活性与生物相容性评价

崔力凡¹ 金剑² 吴宏伟¹

¹东华大学化学与化工学院,上海 201620;²上海迪派生物科技有限公司,上海 201900

通信作者:吴宏伟,Email:wuhongwei@dhu.edu.cn

【摘要】 目的 制备卵磷脂脂质体-茶树精油-聚六亚甲基双胍盐酸盐复合物(Lip-TTO-PHMB),探讨其体外抗菌活性及生物相容性。 方法 该研究为包含成组设计、析因设计及重复测量设计的实验研究。采用薄膜水合法制备 Lip-TTO-PHMB。通过单因素实验结合 Box-Behnken 响应面法明确 Lip-TTO-PHMB 的最优制备条件为卵磷脂与胆固醇质量比 3.77:1.00、茶树精油体积分数 0.64%、聚山梨酯 80 体积分数 0.13%,模型预测包封率为 51.035%。按最优制备条件制备 Lip-TTO-PHMB,采用超速离心紫外法测量其包封率。取小鼠成纤维细胞 L929,分为分别采用卵磷脂脂质体-聚六亚甲基双胍盐酸盐(Lip-PHMB)、Lip-TTO-PHMB、聚六亚甲基双胍盐酸盐(PHMB)处理的 Lip-PHMB 组、Lip-TTO-PHMB 组、PHMB 组,均依次将其中的 PHMB 终质量浓度调整为 62.5、31.3、15.6 $\mu\text{g/L}$,培养 24 h 后,采用噻唑蓝法检测细胞存活率;另取 L929 细胞,同前分组并采用相应材料处理(PHMB 终质量浓度均为 15.0 $\mu\text{g/L}$),培养 24 h 后,采用活/死细胞染色法检测细胞存活率。前述实验样本数均为 4。取人永生角质形成细胞(HaCaT 细胞),分为仅用无血清 MEM 培养基培养的对照组及分别用 PHMB、Lip-TTO-PHMB 处理的 PHMB 组和 Lip-TTO-PHMB 组(PHMB 终质量浓度均为 15.0 $\mu\text{g/L}$),行划痕试验检测划痕后 24、48 h 的细胞迁移率(样本数为 3)。采用微量肉汤二倍稀释法测定 PHMB 对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 和大肠埃希菌 ATCC 8739 的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC),样本数为 5。 结果 Lip-TTO-PHMB 的实测包封率为(52.35 $\pm$ 0.24)%,与模型预测

DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20250406-00167

收稿日期 2025-04-06

引用本文:崔力凡,金剑,吴宏伟. Lip-TTO-PHMB 的制备及其体外抗菌活性与生物相容性评价[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2026, 42(9): 1-10. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20250406-00167.

Cui Lifan, Jin Jian, Wu Hongwei. Preparation of Lip-TTO-PHMB and evaluation of its *in vitro* antibacterial activity and biocompatibility[J]. Chin J Burns Wounds, 2026, 42(9): 1-10. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20250406-00167.



包封率相近。噻唑蓝法检测结果显示,培养 24 h 后,PHMB 终质量浓度为 62.5、31.3、15.6 $\mu\text{g/L}$ 时, Lip-PHMB 组与 Lip-TTO-PHMB 组 L929 细胞存活率均显著高于 PHMB 组 ($P<0.05$), Lip-PHMB 组 L929 细胞存活率均显著高于 Lip-TTO-PHMB 组 ($P<0.05$)。活/死细胞染色法检测结果显示,培养 24 h 后,PHMB 组 L929 细胞存活率显著低于 Lip-PHMB 组和 Lip-TTO-PHMB 组 (P 值均 <0.05)。划痕后 24、48 h, Lip-TTO-PHMB 组 HaCaT 细胞迁移率均显著高于 PHMB 组 ($P<0.05$); 划痕后 48 h, 对照组 HaCaT 细胞迁移率显著高于 PHMB 组 ($P<0.05$)。Lip-PHMB、Lip-TTO-PHMB 及 PHMB 对金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 31.3、15.6、15.6 $\mu\text{g/mL}$, 对大肠埃希菌的 MIC 分别为 31.3、15.6、7.8 $\mu\text{g/mL}$ 。Lip-PHMB、Lip-TTO-PHMB 及 PHMB 对金黄色葡萄球菌的 MBC 分别为 20、10、15 $\mu\text{g/mL}$, 对大肠埃希菌的 MBC 分别为 30、20、20 $\mu\text{g/mL}$ 。 **结论** 成功制备 Lip-TTO-PHMB, 该材料在保留优异抗菌活性的同时, 具备良好生物相容性。

【关键词】 生物相容性材料; 细胞迁移分析; 卵磷脂脂质体; 聚六亚甲基双胍盐酸盐; 茶树精油; 细胞毒性; 抗菌活性

基金项目: 国家重点研发计划(2024YFC2420800)

Preparation of Lip-TTO-PHMB and evaluation of its *in vitro* antibacterial activity and biocompatibility

Cui Lifan¹, Jin Jian², Wu Hongwei¹

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China;

²Shanghai Dipai Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201900, China

Corresponding author: Wu Hongwei, Email: wuhongwei@dhu.edu.cn

【Abstract】 Objective To prepare a lecithin liposome-tea tree oil-polyhexamethylene biguanide hydrochloride complex (Lip-TTO-PHMB) and to investigate its *in vitro* antibacterial activity and biocompatibility. **Methods** This study was an experimental research including group design, factorial design, and repeated measurement design. Lip-TTO-PHMB was prepared by the thin-film hydration method. Through single-factor experiments combined with the Box-Behnken response surface methodology, the optimal preparation condition for Lip-TTO-PHMB was determined as follows: mass ratio of lecithin to cholesterol of 3.77: 1.00, volume fraction of tea tree oil of 0.64%, and volume fraction of polysorbate 80 of 0.13%. The model-predicted encapsulation efficiency was 51.035%. Lip-TTO-PHMB was prepared under the optimal preparation condition and its encapsulation efficiency was measured. Mouse fibroblasts L929 were divided into lecithin liposome-polyhexamethylene biguanide hydrochloride (Lip-PHMB) group, Lip-TTO-PHMB group, and polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) group treated with the corresponding materials, with the final mass concentrations of PHMB adjusted to 62.5, 31.3, and 15.6 $\mu\text{g/L}$, and the cell viability was detected by the thiazolyl blue tetrazolium bromide assay. Another batch of L929 cells were divided into the same groups as before and treated with the corresponding materials with the final mass concentration of PHMB at 15.0 $\mu\text{g/L}$, and the cell viability was detected by live/dead cell staining. The sample size for the above experiments was 4. Human immortalized keratinocytes (HaCaT) were divided into control group cultured with serum-free MEM medium, and PHMB group and Lip-TTO-PHMB group treated with the corresponding materials with the final mass concentration of PHMB at 15.0 $\mu\text{g/L}$. The scratch test was performed to detect the cell migration rates at 24 and 48 h after scratch (with the sample size of 3). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of PHMB against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 8739 were determined by the broth microdilution twofold dilution method, with the sample size of 5. **Results** The measured encapsulation efficiency of Lip-TTO-PHMB was (52.35 $\pm$ 0.24)%, which was close to the model-predicted value. After 24 h of culture, at PHMB final mass concentrations of 62.5, 31.3, and 15.6 $\mu\text{g/L}$, the viability of L929 cells in Lip-PHMB group and Lip-TTO-PHMB group was significantly higher than that in PHMB group ($P<0.05$), and the viability of L929 cells in Lip-PHMB group was significantly higher than that in Lip-TTO-PHMB group ($P<0.05$). After 24 h of culture, the viability of L929 cells in PHMB group was significantly lower than that in Lip-PHMB group and Lip-TTO-PHMB group (with P values both <0.05). At 24 and 48 h after scratch, the migration rates of HaCaT cells in Lip-TTO-PHMB group were significantly higher than those in PHMB group ($P<0.05$); at 48 h after scratch, the migration rate of HaCaT cells in control group was significantly higher than that in PHMB group ($P<0.05$). The MICs of Lip-PHMB, Lip-TTO-PHMB, and PHMB against *Staphylococcus aureus* were 31.3, 15.6, and 15.6 $\mu\text{g/L}$.

mL, respectively, and those against *Escherichia coli* were 31.3, 15.6, and 7.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The MBCs of Lip-PHMB, Lip-TTO-PHMB, and PHMB against *Staphylococcus aureus* were 20, 10, and 15 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and those against *Escherichia coli* were 30, 20, and 20 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Conclusions The prepared Lip-TTO-PHMB can retain excellent antibacterial activity and possess favorable biocompatibility.

【Key words】 Biocompatible materials; Cell migration assays; Lecithin liposomes; Polyhexamethylene biguanide hydrochloride; Tea tree oil; Cytotoxicity; Antibacterial

Fund program: National Key Research and Development Program of China (2024YFC2420800)

细菌感染是全球公共卫生领域的重大挑战, 2019 年全球因细菌感染死亡人数超过 750 万^[1]。随着医院获得性感染和耐药菌株的广泛传播^[2-5], 开发兼具高效抗菌活性与低细胞毒性的新型抗菌制剂成为当前研究重点。

聚六亚甲基双胍盐酸盐 (polyhexamethylene biguanide hydrochloride, PHMB) 是一种典型的阳离子高分子抗菌剂, 由双胍基团和亚甲基链段构成, 具有广谱抗菌活性且不易诱导耐药性^[6], 多项研究将其应用于创面抗菌领域^[7-10]。PHMB 杀菌机制为通过所带正电荷与细菌细胞膜上带负电荷的磷脂结合, 干扰离子通道和破坏膜结构, 导致细菌细胞膜完整性受损并引发细胞质外泄^[11]。目前 PHMB 已被应用于环境消毒^[12-13]、纺织品抗菌整理^[14]及棘阿米巴角膜炎治疗^[15-16]等。然而, PHMB 对哺乳动物细胞膜存在潜在毒性^[10], 限制了其在黏膜及高敏感组织部位的推广应用^[17]。卵磷脂脂质体作为类生物膜结构^[18-20]的纳米递送系统^[21-24], 可有效包载药物并降低其细胞毒性^[25]。卵磷脂脂质体磷脂酰胆碱头部的负电荷与 PHMB 分子中双胍阳离子之间的静电结合, 虽有利于药物负载, 却可能部分屏蔽 PHMB 的阳离子活性位点, 从而削弱其对细菌细胞膜的静电吸附能力^[26]。茶树精油富含松油烯-4-醇等单萜类化合物, 具有抗菌、抗病毒和抗氧化特性^[27-31], 其疏水性和挥发性则限制了其直接应用。若将植物精油包载于卵磷脂脂质体中^[32], 既可弥补 PHMB 抗菌活性的下降^[33-34], 又能改善茶树精油的稳定性^[35-36]。

基于上述研究背景, 本研究构建载茶树精油的复合卵磷脂脂质体与 PHMB 结合形成的卵磷脂脂质体-茶树精油-PHMB 复合物 (lecithin liposome-tea tree oil-polyhexamethylene biguanide hydrochloride, Lip-TTO-PHMB), 借助卵磷脂脂质体降低 PHMB 的细胞毒性, 并利用茶树精油的抗菌活性维持复合体系的抑菌性能。通过优化制备工艺并评价该复合体系的物理化学性质、细胞毒性及抗菌性能, 旨在

为高效低毒抗菌生物材料的开发提供理论与实践依据。

1 材料与方法

本研究为包含成组设计、析因设计及重复测量设计的实验研究。

1.1 细胞和细菌及主要试剂与仪器来源

小鼠 Fb 细胞系 L929、人永生化 KC (HaCaT 细胞系)、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 和大肠埃希菌 ATCC 8739 购自北京百欧博伟生物技术有限公司。PHMB 购自天津科维津宏环保科技有限公司, 蛋黄卵磷脂购自湖北汉达飞生物科技有限公司, 胆固醇、聚山梨酯 80 购自上海麦克林生化科技有限公司, 茶树精油购自广州物源精油有限公司, MEM 培养基购自格来赛生命科技(上海)有限公司, 噻唑蓝购自北京索莱宝科技有限公司, 钙黄绿素-乙酰氧基甲酯/碘化丙啶活/死细胞染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 胰蛋白胍大豆琼脂培养基与营养肉汤培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

RE-52AA 型旋转蒸发仪购自上海亚荣生化仪器厂, UV-1800 型紫外分光光度计购自上海科雅生物技术有限公司, ZS 型纳米粒度仪购自英国马尔文帕纳科公司, SU8100 型透射电子显微镜购自日本日立高新技术公司, DM IL LED Fluo 型倒置荧光显微镜购自德国徕卡显微系统公司, Multiskan FC 型酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司, Leica DMI1 型倒置显微镜购自上海启步生物技术有限公司。

1.2 Lip-TTO-PHMB 的制备和制备条件优化及包封率测定

1.2.1 制备及制备条件优化 采用薄膜水合法制备 Lip-TTO-PHMB。称取蛋黄卵磷脂与胆固醇, 置于圆底烧瓶中, 加入茶树精油后, 加入氯仿和甲醇 (体积比 4:1) 混合溶剂, 通过超声辅助溶解, 于旋转蒸发仪上旋干溶剂, 形成均匀薄膜并用烘箱干燥。向干燥薄膜中加入聚山梨酯 80 和 PBS (总体积

为 9 mL) 水化, 通过超声使薄膜完全分散, 加入 10.0 g/L PHMB 溶液 1 mL, 充分混匀后, 经孔径为 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得 Lip-TTO-PHMB。为优化 Lip-TTO-PHMB 的制备条件, 首先通过单因素实验分别探究卵磷脂与胆固醇质量比(1.00:1.00~5.00:1.00)、茶树精油体积分数(0.20%~1.20%)、聚山梨酯 80 体积分数(0.05%~0.25%)对包封率的影响(样本数为 3)。在此基础上, 以卵磷脂与胆固醇质量比值(X_1)、茶树精油体积分数(X_2)、聚山梨酯 80 体积分数(X_3)为自变量, 以包封率(Y)为响应值, 采用 Design-Expert v8.0.6 软件的 Box-Behnken 响应面法设计进行三因素三水平响应面优化(共 17 次实验, 含 5 次中心点重复)。各因素水平如下: X_1 为 3、4、5, X_2 为 0.20%、0.60%、1.00%, X_3 为 0.05%、0.15%、0.25%, 均对应编码为 -1、0、1。经响应面优化, 得出 Lip-TTO-PHMB 的最优制备条件。记录模型预测包封率。

1.2.2 包封率测定 按上述最优制备条件采用薄膜水合法制备 Lip-TTO-PHMB, 采用超速离心-紫外法测量其包封率。取 3 mL Lip-TTO-PHMB, 以离心半径 7.7 cm、12 000 r/min 离心 30 min 后取上清液, 加入甲醇破乳, 静置 30 min 后, 测定波长 265 nm 处游离茶树精油的吸光度(A_1)。另取等量 Lip-TTO-PHMB, 不进行离心, 同法测定茶树精油的总吸光度(A_0)。按以下公式计算包封率: 包封率 = $(A_0 - A_1) \div A_0 \times 100\%$ 。本实验样本数为 3。

1.3 材料的表征

同 1.2.1 方法制备不含茶树精油和 PHMB 的空白卵磷脂脂质体(卵磷脂和胆固醇质量比为 4.00:1.00), 按最优制备条件制备 Lip-TTO-PHMB, 用 PBS 按 1:100 比例稀释后, 采用动态光散射纳米粒度仪测定 2 种材料的粒径、多分散性指数(polydispersity index, PDI)及 Lip-TTO-PHMB 的 Zeta 电位。

取按最优制备条件制备的 Lip-TTO-PHMB, 用 PBS 按 1:10 比例稀释后, 滴于铜网上, 干燥后滴加 10 g/L 磷钨酸负染, 于透射电子显微镜 50 000 倍放大倍数下观察其微观形貌并采集图像。

取 PHMB、同 1.2.1 方法制备的卵磷脂和胆固醇质量比为 4.00:1.00 的空白卵磷脂脂质体以及卵磷脂脂质体-PHMB (lecithin liposome-polyhexamethylene biguanide hydrochloride, Lip-PHMB), 分别与光谱纯溴化钾混合, 研磨后压制

成透明锭片。采用傅里叶变换红外光谱仪在波数 400~4 000 cm^{-1} 范围内进行扫描, 分析特征吸收峰变化以判断 PHMB 与卵磷脂脂质体间是否存在相互作用。

1.4 材料的细胞毒性检测

1.4.1 噻唑蓝法检测细胞存活率 取 L929 细胞, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 MEM 培养基(以下简称完全培养基)培养, 待细胞生长至 70%~80% 融合时, 以每孔约 1×10^4 个接种到 96 孔板中培养至对数生长期。将细胞分为 Lip-PHMB 组、Lip-TTO-PHMB 组、PHMB 组, 分别加入 Lip-PHMB、Lip-TTO-PHMB、PHMB, 均用 MEM 完全培养基依次将其中的 PHMB 终质量浓度调整为 62.5、31.3、15.6 $\mu\text{g/L}$ 。在摇床中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下以 60 r/min 培养 24 h, 于倒置显微镜 100 倍放大倍数下观察细胞存活情况。按照噻唑蓝说明书, 每孔加 100 μL 异丙醇孵育 4 h 后用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度, 并根据说明书计算细胞存活率。本实验样本数为 4。

1.4.2 活/死细胞染色法检测细胞存活率 取 L929 细胞, 以每孔 1×10^4 个接种至 24 孔板中, 用含体积分数 10% 胎牛血清和常规浓度青霉素与链霉素的 MEM 培养基培养, 将细胞分为 Lip-PHMB 组、Lip-TTO-PHMB 组、PHMB 组, 分别加入 PHMB 终质量浓度均为 15.0 $\mu\text{g/L}$ 的 Lip-PHMB、Lip-TTO-PHMB、PHMB。培养 24 h 后, 按照活/死细胞染色试剂盒说明书加入适量钙黄绿素-乙氧基甲酯/碘化丙啶处理, 于倒置荧光显微镜 20 倍放大倍数下观察细胞存活情况(活细胞呈绿色荧光, 死细胞呈红色荧光)。采用 ImageJ 1.46r 软件(美国国立卫生研究院)计算细胞存活率。细胞存活率 = 活细胞数 $\div$ (活细胞数 + 死细胞数) $\times 100\%$ 。本实验样本数为 4。

1.5 细胞迁移实验

取 HaCaT 细胞, 以浓度约 1×10^5 个/mL 接种至 6 孔板中, 用含体积分数 10% 胎牛血清和常规浓度青霉素与链霉素的 MEM 培养基培养至对数生长期。将细胞分为对照组、PHMB 组和 Lip-TTO-PHMB 组, 用规格 200 μL 灭菌移液器枪头沿底部标记线垂直均匀划痕。对照组细胞仅用无血清 MEM 培养基培养, PHMB 组和 Lip-TTO-PHMB 组细胞分别用 PHMB 终质量浓度均为 15.0 $\mu\text{g/L}$ 的 PHMB 和 Lip-TTO-PHMB 培养。分别于划痕后 0(即刻)、24、48 h, 于倒置显微镜 200 倍放大倍数下观察划痕愈

合情况,用 ImageJ 1. 46r 软件测量划痕宽度,并计算细胞迁移率。细胞迁移率=(初始划痕宽度-各时间点划痕宽度)÷初始划痕宽度×100%。本实验样本数为 3。

1. 6 MIC 及最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 检测

采用微量肉汤二倍稀释法测定 PHMB 对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、大肠埃希菌 ATCC 8739 的 MIC 和 MBC^[37]。将上述 2 种细菌过夜培养物分别用新鲜营养肉汤培养基稀释至约 1×10^6 CFU/mL 备用。分别取无菌 96 孔板,向第 1 孔加入 100 μ L PHMB 或按最优制备条件制备的 Lip-PHMB、Lip-TTO-PHMB (PHMB 的初始质量浓度均为 500. 0 μ g/L); 向第 2~8 孔各加 100 μ L 营养肉汤培养基,随后分别加入 100 μ L 上述 3 种材料,自第 2 孔起倍比稀释至第 8 孔 (PHMB 的质量浓度依次为 250. 0、125. 0、62. 5、31. 3、15. 6、7. 8、3. 9 μ g/L)。最后分别向第 1~8 孔各加入 100 μ L 金黄色葡萄球菌或大肠埃希菌,于 35 $^{\circ}$ C 培养 22 h,用酶标仪测定 600 nm 处吸光度。由于高浓度卵磷脂脂质体与肉汤产生的沉淀会干扰吸光度测定,另设不含菌液的平行对照孔以去除干扰。与相邻孔 (PHMB 质量浓度更低的孔) 相比,吸光度值出现显著下降 ($P < 0. 05$) 的最低样品浓度为 MIC。蘸取各孔培养液,涂于胰蛋白胨大豆琼脂培养基上,于 35 $^{\circ}$ C 培养 3 d,观察菌落生长情况以判定 MBC。MBC 定义为平板上无菌落生长的最低样品浓度。本实验样本数为 5。

1. 7 统计学处理

采用 Design-Expert v8. 06 软件对 Box-Behnken 响应面设计的数据行二次回归建模与二次回归模型方差分析。采用 SPSS 26. 0 统计软件进行数据处理,计量资料数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对噻唑蓝法检测的细胞存活率和细胞迁移率组间总体比较,分别采用析因设计方差分析和重复测量方差分析;活/死细胞染色法检测的细胞存活率总体比较,采用单因素方差分析。组间两两比较采用 Tukey HSD 法。所有统计学检验为双侧检验,以 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2. 1 Lip-TTO-PHMB 的最优制备条件

单因素实验显示,在固定其他条件时,Lip-TTO-PHMB 的包封率随 X_1 、 X_2 、 X_3 的升高均呈先

升高后降低的趋势,分别在卵磷脂与胆固醇质量比 4. 00: 1. 00、茶树精油体积分数约 0. 80%、聚山梨酯 80 体积分数约 0. 10% 时达峰值。

经过二次回归拟合,得出包封率与各影响因素之间关系的拟合方程式: $Y = -115. 5145 + 53. 1885X_1 + 54. 51188X_2 + 432. 89750X_3 + 8. 24375X_1X_2 + 1. 625X_1X_3 - 49. 125X_2X_3 - 6. 76950X_1^2 - 63. 6950X_2^2 - 1319. 2X_3^2$, 包封率在 21. 78%~51. 72% 之间。

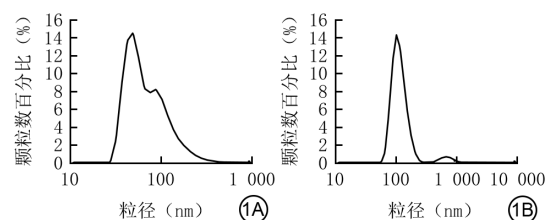
二次回归模型方差分析显示,模型整体具有统计学意义 ($F=18. 010, P < 0. 001$),说明所选模型能够较好地解释实验数据。其中一次项 X_1 对包封率具有显著影响 ($F=13. 250, P < 0. 001$), X_2 和 X_3 对包封率的影响无统计学意义 (F 值分别为 1. 360、1. 490, P 值分别为 0. 282、0. 262)。3 个二次项 X_1^2 ($F=17. 930, P < 0. 001$)、 X_2^2 ($F=40. 960, P < 0. 001$)、 X_3^2 ($F=68. 080, P < 0. 001$) 对包封率的影响呈非线性关系,存在最佳包封率。

Lip-TTO-PHMB 的最优制备条件为卵磷脂与胆固醇质量比 3. 77: 1. 00、茶树精油体积分数 0. 64%、聚山梨酯 80 体积分数 0. 13%, 模型预测包封率 51. 04%。实测包封率为 (52. 35±0. 24)%, 与模型预测包封率相近。

2. 2 材料的表征

空白卵磷脂脂质体粒径为 32. 7~3 090. 0 nm, 平均粒径为 50. 7 nm, PDI 为 0. 359, 粒径分布峰较宽。Lip-TTO-PHMB 粒径为 37. 8~2 670 nm, 平均粒径为 106. 0 nm, PDI 为 0. 274, Zeta 电位为 +0. 319 mV, 呈弱正电性,与 PHMB 结构中双胍基团的阳离子特性相符。见图 1。

透射电子显微镜观察显示, Lip-TTO-PHMB 呈较均一的球形囊泡,双分子层清晰可见,囊泡内部



注: Lip-TTO-PHMB 为卵磷脂脂质体-茶树精油-聚六亚甲基双胍盐酸盐复合物;该图为横坐标数据经过 lg 处理后的描记图

图 1 空白卵磷脂脂质体和 Lip-TTO-PHMB 的粒径分布。
1A. 空白卵磷脂脂质体; 1B. Lip-TTO-PHMB

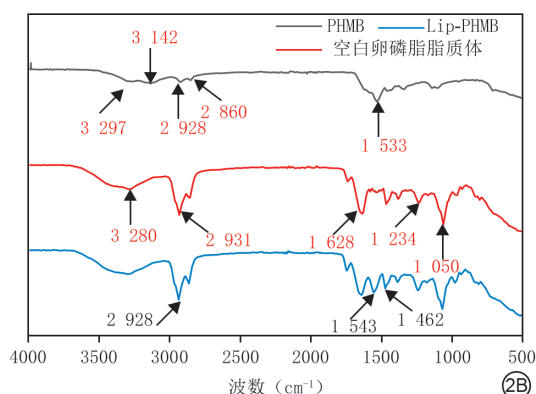
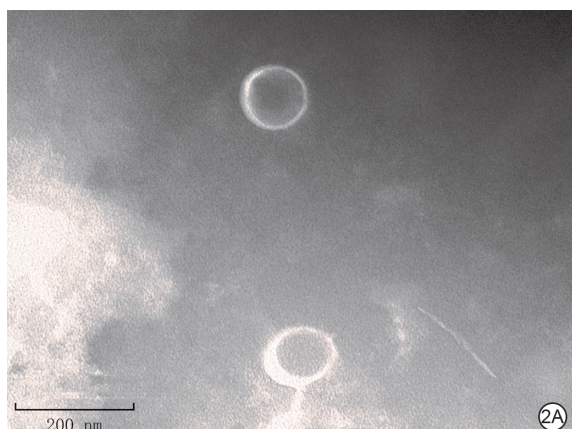
Figure 1 The particle size distributions of empty lecithin liposomes and Lip-TTO-PHMB

可见电子致密阴影,见图 2A。

PHMB 的红外光谱在 $3\,297$ 、 $3\,142\text{ cm}^{-1}$ 处出现氨基伸缩振动峰,在波数 $2\,928$ 、 $2\,860\text{ cm}^{-1}$ 处出现亚甲基伸缩振动峰,在波数 $1\,533\text{ cm}^{-1}$ 处出现氨基弯曲振动峰。空白卵磷脂脂质体在波数 $3\,280\text{ cm}^{-1}$ 处出现磷脂酰胆碱羟基伸缩振动峰,在波数 $2\,931\text{ cm}^{-1}$ 处出现甲基、亚甲基伸缩振动峰,在波数 $1\,628\text{ cm}^{-1}$ 处出现季铵盐基团弯曲振动峰,在波数 $1\,234\text{ cm}^{-1}$ 处出现磷酸酯基振动峰,在波数 $1\,050\text{ cm}^{-1}$ 处出现胆固醇 C-O 伸缩振动峰。与 PHMB 相比,Lip-PHMB 中归属于 PHMB 的 C=N 伸缩振动峰由 $1\,533\text{ cm}^{-1}$ 蓝移至 $1\,543\text{ cm}^{-1}$;与空白卵磷脂脂质体相比,Lip-PHMB 在 $1\,234\text{ cm}^{-1}$ 处的磷酸酯基振动峰的峰形发生改变。见图 2B。

2.3 材料的细胞毒性

2.3.1 噻唑蓝法检测的细胞存活率 培养 24 h



注:Lip-TTO-PHMB 为卵磷脂脂质体-茶树精油-聚六亚甲基双胍盐酸盐复合物,PHMB 为聚六亚甲基双胍盐酸盐,Lip-PHMB 为卵磷脂脂质体-PHMB

图 2 Lip-TTO-PHMB 的微观形貌及 3 种材料的傅里叶变换红外光谱。2A.Lip-TTO-PHMB 的微观形貌 透射电子显微镜 $\times 50\,000$;2B.3 种材料的红外光谱

Figure 2 Microscopic morphology of Lip-TTO-PHMB and infrared spectra of three materials

后,Lip-PHMB 组与 Lip-TTO-PHMB 组 L929 细胞大部分存活且形态正常,PHMB 组 L929 细胞大部分死亡且存活细胞体积显著缩小。PHMB 终质量浓度为 62.5 、 31.3 、 $15.6\text{ }\mu\text{g/L}$ 时,Lip-PHMB 组与 Lip-TTO-PHMB 组 L929 细胞存活率均显著高于 PHMB 组 ($P<0.001$),Lip-PHMB 组 L929 细胞存活率均显著高于 Lip-TTO-PHMB 组 ($P<0.001$)。见图 3。

2.3.2 活/死细胞染色法检测的细胞存活率 培养 24 h 后,Lip-PHMB 组与 Lip-TTO-PHMB 组均以活细胞为主,死细胞稀少;PHMB 组活细胞较另外 2 组显著减少。PHMB 组 L929 细胞存活率显著低于 Lip-PHMB 组和 Lip-TTO-PHMB 组 (P 值分别为 0.001 、 0.004);Lip-PHMB 组与 Lip-TTO-PHMB 组 L929 细胞存活率比较,差异无统计学意义 ($P=0.924$)。见图 4。

2.4 细胞迁移情况

划痕后 24 h,Lip-TTO-PHMB 组 HaCaT 细胞迁移率与对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.180$)但显著高于 PHMB 组 ($P=0.028$);对照组与 PHMB 组 HaCaT 细胞迁移率比较,差异无统计学意义 ($P=0.110$)。划痕后 48 h,Lip-TTO-PHMB 组 HaCaT 细胞迁移率与对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.057$)但显著高于 PHMB 组 ($P=0.001$),对照组 HaCaT 细胞迁移率显著高于 PHMB 组 ($P=0.003$)。见图 5。

2.5 MIC 和 MBC

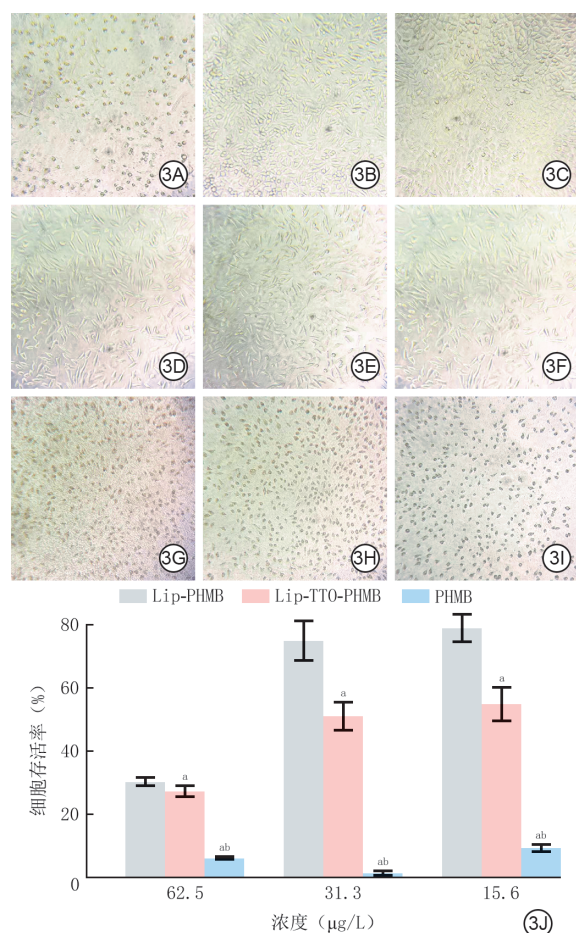
Lip-PHMB、Lip-TTO-PHMB 及 PHMB 对金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 31.3 、 15.6 、 $15.6\text{ }\mu\text{g/mL}$,对大肠埃希菌的 MIC 分别为 31.3 、 15.6 、 $7.8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

Lip-PHMB、Lip-TTO-PHMB 及 PHMB 对金黄色葡萄球菌的 MBC 分别为 20 、 10 、 $15\text{ }\mu\text{g/mL}$,对大肠埃希菌的 MBC 分别为 30 、 20 、 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

本研究构建了一种以蛋黄卵磷脂脂质体为载体,包封茶树精油并与 PHMB 结合的复合体系——Lip-TTO-PHMB,旨在保持抗菌活性的前提下降低 PHMB 的细胞毒性。

采用薄膜水合法制备 Lip-TTO-PHMB 的过程中,卵磷脂与胆固醇的质量比是决定卵磷脂脂质体膜性质的关键因素。单因素实验结果显示,卵磷脂与胆固醇质量比为 $4.00:1.00$ 左右时,

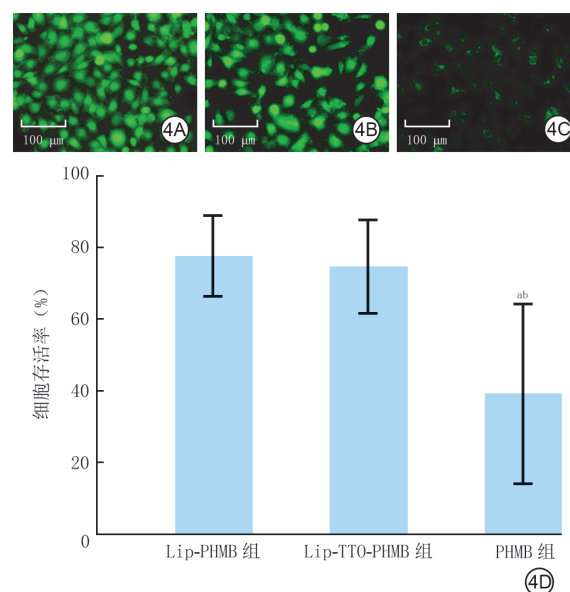


注: PHMB 为聚六亚甲基双胍盐酸盐; 分组因素主效应, $F=151.206, P<0.001$; 浓度因素主效应, $F=36.667, P<0.001$; 两者交互效应, $F=33.277, P<0.001$; 与卵磷脂脂质体-PHMB (Lip-PHMB) 组比较, $^aP<0.05$; 与卵磷脂脂质体-茶树精油-聚六亚甲基双胍盐酸盐复合物 (Lip-TTO-PHMB) 组比较, $^bP<0.05$

图3 3组小鼠成纤维细胞L929培养24 h经含不同终质量浓度PHMB的材料处理后的细胞存活情况。3A、3B、3C. 分别为用PHMB终质量浓度为62.5、31.3、15.6 μg/L的Lip-PHMB处理的Lip-PHMB组 噶唑蓝 $\times 100$; 3D、3E、3F. 分别为用PHMB终质量浓度为62.5、31.3、15.6 μg/L的Lip-TTO-PHMB处理的Lip-TTO-PHMB组, 图3A、3B、3C存活细胞多于图3D、3E、3F 噶唑蓝 $\times 100$; 3G、3H、3I. 分别为用终质量浓度为62.5、31.3、15.6 μg/L的PHMB处理的PHMB组, 图3A、3B、3C与图3D、3E、3F存活细胞多于图3G、3H、3I 噶唑蓝 $\times 100$; 3J. 细胞存活率条图($\bar{x} \pm s$, 样本数为4)

Figure 3 Cell viability of three groups of mouse fibroblasts L929 treated with materials with PHMB at different final mass concentrations after 24 h of culture

Lip-TTO-PHMB的包封率最高, 表明在此比例下卵磷脂脂质体膜的流动性与稳定性最佳。胆固醇过多会降低卵磷脂脂质体膜的流动性, 阻碍药物嵌入; 过少则使卵磷脂脂质体膜刚性不足, 易导致药物泄漏。茶树精油体积分数在约0.8%时,



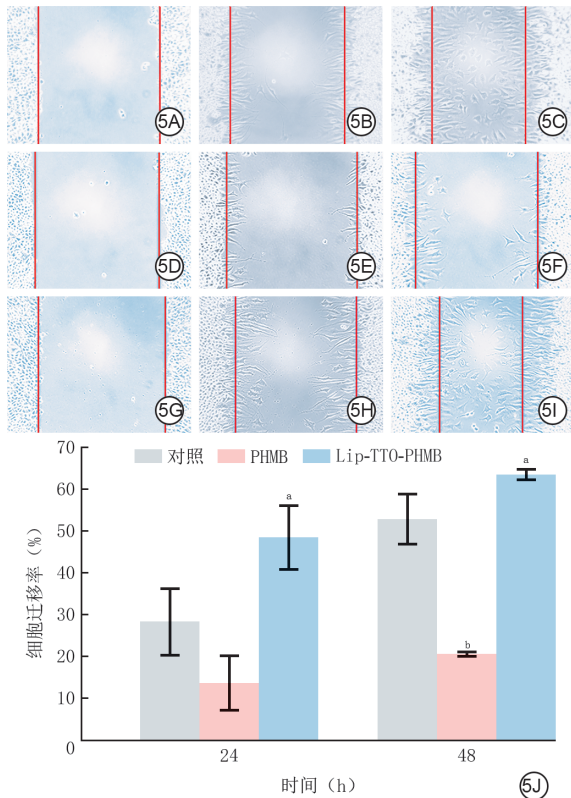
注: 卵磷脂脂质体-聚六亚甲基双胍盐酸盐 (Lip-PHMB) 组、卵磷脂脂质体-茶树精油-聚六亚甲基双胍盐酸盐复合物 (Lip-TTO-PHMB) 组、聚六亚甲基双胍盐酸盐 (PHMB) 组细胞分别用 PHMB 终质量浓度均为 15.0 μg/L 的 Lip-PHMB、Lip-TTO-PHMB、PHMB 处理; 3 组细胞存活率总体比较, 差异有统计学意义 ($F=18.289, P=0.001$); 与 Lip-PHMB 组比较, $^aP<0.05$; 与 Lip-TTO-PHMB 组比较, $^bP<0.05$

图4 3组小鼠成纤维细胞L929培养24 h后细胞存活情况。4A、4B、4C. 分别为Lip-PHMB组、Lip-TTO-PHMB组、PHMB组, 图4B中活细胞数与图4A相近, 图4C中活细胞数显著少于图4A、4B 钙黄绿素-乙氧基甲酯/碘化丙啶 $\times 20$; 4D. 细胞存活率条图($\bar{x} \pm s$, 样本数为4)

Figure 4 Cell viability of three groups of mouse fibroblasts L929 after 24 h of culture

Lip-TTO-PHMB出现包封率峰值, 茶树精油疏水组分在脂质双分子层内形成与药物亲和力良好的微环境, 有利于药物包载; 但茶树精油体积分数过高则会破坏卵磷脂脂质体膜的致密结构。聚山梨酯80体积分数在约0.1%时, Lip-TTO-PHMB的包封率最高, 其分子适度插入卵磷脂脂质体膜可调节膜的流动性和空间稳定性, 而低体积分数聚山梨酯80会降低Lip-TTO-PHMB对细胞的潜在毒性。在上述结果的基础上, 采用Box-Behnken响应面法以包封率为响应值建立二次回归模型且计算的包封率预测结果与实际测量值相对偏差较小, 预测性良好, 为后续细胞毒性及抗菌实验提供了稳定的样品基础。

按照最优制备条件制备的Lip-TTO-PHMB粒径属于大单室脂质体粒径范畴, 为脂质体正常粒径范围, 有利于与动物细胞膜相互作用并改善其生物相容性。Lip-TTO-PHMB的Zeta电位为+0.319 mV, 呈



注:对照组细胞仅用无血清 MEM 培养基培养,聚六亚甲基双胍盐酸盐 (PHMB) 组和卵磷脂脂质体-茶树精油-聚六亚甲基双胍盐酸盐复合物 (Lip-TTO-PHMB) 组细胞分别用 PHMB 终质量浓度为 $15.0 \mu\text{g/L}$ 的 PHMB 和 Lip-TTO-PHMB 培养; 分组因素主效应, $F=28.166$, $P=0.013$; 时间因素主效应, $F=23.838$, $P=0.014$; 两者交互效应, $F=2.608$, $P=0.221$; 与 PHMB 组比较, $^a P<0.05$; 与对照组比较, $^b P<0.05$

图 5 3 组 HaCaT 细胞划痕后各时间点迁移情况。5A、5B、5C. 分别为对照组划痕后 0 (即刻)、24、48 h 倒置显微镜 $\times 200$; 5D、5E、5F. 分别为 PHMB 组划痕后 0、24、48 h 倒置显微镜 $\times 200$; 5G、5H、5I. 分别为 Lip-TTO-PHMB 组划痕后 0、24、48 h, 图 5C 剩余划痕面积小于图 5F, 图 5H、5I 剩余划痕面积分别小于图 5E、5F 倒置显微镜 $\times 200$; 5J. 细胞迁移率条图 ($\bar{x} \pm s$, 样本数为 3)

Figure 5 Cell migration status of three groups of HaCaT cells at different time points after scratch

弱正电性,这主要由 PHMB 分子中双胍基团所带正电荷所致;该正电性有利于卵磷脂脂质体通过静电作用吸附于带负电荷的细菌表面,从而发挥抗菌作用。透射电子显微镜下可见 Lip-TTO-PHMB 呈球形囊泡,双分子层清晰。红外光谱结果显示,与 PHMB 相比,Lip-PHMB 中的 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动峰由 1533 cm^{-1} 蓝移至 1543 cm^{-1} ;同时与空白卵磷脂脂质体相比,Lip-PHMB 在 1234 cm^{-1} 处磷酸酯基振动峰的峰形发生改变。上述光谱变化可能源于 PHMB 分子中双胍阳离子与卵磷脂脂质体磷脂双分子层中磷酸酯

阴离子之间的静电相互作用,该作用改变了氮氢键的振动能级,从而导致特征峰向高波数方向移动。值得注意的是,该相互作用为非共价结合,表明 PHMB 主要依靠静电作用锚定于卵磷脂脂质体膜表面,在维持卵磷脂脂质体整体结构稳定的同时,亦保留了 PHMB 分子中可与细菌表面发生静电吸附的阳离子基团,为其后续抗菌作用提供了结构基础。

细胞毒性是评价 Lip-TTO-PHMB 能否安全应用的核心指标。噻唑蓝法检测结果显示,在 3 种 PHMB 终质量浓度下,PHMB 组 L929 细胞出现明显的体积缩小、皱缩等死亡形态学改变,Lip-PHMB 组 L929 细胞存活率最高,Lip-TTO-PHMB 组次之,PHMB 组最低。活/死细胞染色法结果与噻唑蓝法结果趋势一致。卵磷脂脂质体的引入减轻了 PHMB 的细胞毒性,这可从卵磷脂脂质体的组成与结构上得到解释:蛋黄卵磷脂的磷脂酰胆碱结构与哺乳动物细胞膜的磷脂双分子层高度相似,卵磷脂脂质体可贴附于细胞膜表面形成“外衣”样保护层,从而降低 PHMB 双胍阳离子对细胞膜的直接破坏作用;同时,卵磷脂脂质体的存在降低了游离 PHMB 与细胞膜的瞬时接触浓度。已有研究表明,空载卵磷脂脂质体与 PHMB 结合可降低 PHMB 的细胞毒性,同时保持其抗菌效果^[38]。本研究在此基础上进一步将蛋黄卵磷脂制备为脂质体并负载茶树精油和 PHMB,制备的 Lip-TTO-PHMB 的细胞毒性较 PHMB 明显降低。茶树精油是一种天然来源的挥发性油,具有广谱抗菌活性和良好的生物相容性^[39]。然而,其挥发性强、易氧化降解且水溶性差,限制了其直接应用的稳定性与有效性^[40]。本研究采用卵磷脂脂质体包载茶树精油,在保留茶树精油原有抗菌活性的基础上,提高体系的稳定性并降低潜在细胞毒性。本研究中,茶树精油的引入未显著增加复合物的细胞毒性,表明在该卵磷脂脂质体递送体系下,茶树精油的包载不影响整体生物相容性。细胞划痕试验结果显示,Lip-TTO-PHMB 组 HaCaT 细胞划痕后 24、48 h 迁移能力均显著高于 PHMB 组,且与对照组比较,差异无统计学意义,表明用卵磷脂脂质体包封可在一定程度上缓解 PHMB 对细胞功能的损伤,恢复细胞的迁移能力。上述结果表明 Lip-TTO-PHMB 具有在创面修复等领域应用的潜力。

抑菌结果显示,Lip-PHMB 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性较 PHMB 有所减弱,这与卵磷脂脂质体

的“养料效应”——卵磷脂脂质体组分本身可作为碳源为细菌生长提供养料,部分抵消了 PHMB 的抑菌作用有关。茶树精油的加入可在一定程度上保持甚至增强体系的抗菌效果:一方面,茶树精油富含松油烯-4-醇等单萜类活性成分,松油烯-4-醇可通过诱导细胞膜结构紊乱、阻碍细胞壁合成,导致胞内物质泄漏,同时抑制生物被膜形成并阻滞细胞周期,最终导致细菌死亡^[41];另一方面,卵磷脂脂质体封装减少了茶树精油的挥发损失,使其有效成分得以保留并持续释放,从而弥补了 PHMB 因静电结合而被部分消耗的抑菌能力^[42]。MBC 结果显示,卵磷脂脂质体的包载会降低游离 PHMB 对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑菌性能,而茶树精油的加入可在一定程度上恢复体系的杀菌活性,进一步印证了茶树精油的协同杀菌作用。对于革兰阴性菌大肠埃希菌,因其细胞壁外膜结构复杂,富含 LPS,对亲水性物质及大分子的跨膜转运具有天然屏障作用^[43],因此 Lip-TTO-PHMB 和游离 PHMB 对大肠埃希菌的杀菌效果差异小于对金黄色葡萄球菌的杀菌效果差异。

综上,本研究创新性地将天然茶树精油引入卵磷脂脂质体协同体系,在保持抗菌活性的同时显著降低细胞毒性,为高效低毒抗菌材料的开发提供了新思路。后续研究可进一步深入探究卵磷脂脂质体的药物释放行为及茶树精油的释放动力学^[32,44],以阐明 Lip-TTO-PHMB 长效抗菌的作用机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 崔力凡:实验操作、论文撰写、统计分析、图片制作;金剑:研究指导、论文修改、经费支持;吴宏伟:研究指导、论文修改

参考文献

- [1] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *Lancet*, 2022, 399(10325): 629-655. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [2] Ye C, Li W, Yang Y, et al. Inappropriate use of antibiotics exacerbates inflammation through OMV-induced pyroptosis in MDR *Klebsiella pneumoniae* infection[J]. *Cell Rep*, 2021, 36(12): 109750. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109750.
- [3] Deussenbery C, Wang Y, Shukla A. Recent innovations in bacterial infection detection and treatment[J]. *ACS Infect Dis*, 2021, 7(4): 695-720. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00890.
- [4] Islam MF, Arka PB, Rohman M, et al. Pooling the complex survey data across the 64 lower and middle-income countries: a study on antibiotic usage in under-five children [J]. *Heliyon*, 2024, 11(1): e41470. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e41470.
- [5] 孟青,周林涛,陈运生,等. 2015-2021 年 CHINET 儿童患者临床分离菌的分布特征和耐药性变迁[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2025, 25(1): 48-58. DOI: 10.16718/j.1009-7708.2025.01.008.
- [6] 金剑. PHMB 修饰的人工真皮的抗菌能力检测[D]. 上海: 海军军医大学, 2018.
- [7] Schuch LF, Kirschnick LB, de Arruda JAA, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumour of the oral and maxillofacial region-a systematic review[J]. *Oral Dis*, 2022, 28(8): 2072-2082. DOI: 10.1111/odi.13982.
- [8] Worsley A, Vassileva K, Tsui J, et al. Polyhexamethylene biguanide: polyurethane blend nanofibrous membranes for wound infection control[J]. *Polymers (Basel)*, 2019, 11(5): 915. DOI: 10.3390/polym11050915.
- [9] Ahani E, Montazer M, Mianehro A, et al. Preparation of long-lasting antibacterial wound dressing through diffusion of cationic-liposome-encapsulated polyhexamethylene biguanide [J]. *React Funct Polym*, 2021, 169: 105092. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105092.
- [10] 赵玉浩,蒋恩社,刘梦瑶,等. 含聚己双胍抗菌剂在慢性伤口治疗与护理中的应用研究进展[J]. *中华医院感染学杂志*, 2025, 35(21): 3355-3360. DOI: 10.11816/cn.ni.2025-246665.
- [11] Sowlati-Hashjin S, Carbone P, Karttunen M. Insights into the polyhexamethylene biguanide (PHMB) mechanism of action on bacterial membrane and DNA: a molecular dynamics study[J]. *J Phys Chem B*, 2020, 124(22): 4487-4497. DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c02609.
- [12] 杨娜,杨彬,孙文魁,等. 皮肤消毒剂开发应用研究进展[J]. *中国消毒学杂志*, 2018, 35(4): 297-300. DOI: 10.11726/j.issn.1001-7658.2018.04.018.
- [13] 王奎涛,王玉亚,任欢欢,等. 聚六亚甲基双胍消毒剂含量测定方法及消毒效果的研究[J]. *应用化工*, 2019, 48(6): 1506-1509. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3206.2019.06.056.
- [14] 俞鑫,王超,夏建明. 聚六亚甲基双胍和季铵盐在羊毛抗菌整理中的应用[J]. *印染*, 2024, 50(5): 51-55. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7658.2024.05.006.
- [15] Bagga B, Gowtham L, Ahirwar LK, et al. Outcome of photodynamic therapy with Rose Bengal in conjunction with topical PHMB and chlorhexidine combination in *Acanthamoeba keratitis*[J]. *J Ophthalmic Inflamm Infect*, 2025, 15(1): 18. DOI: 10.1186/s12348-025-00466-w.
- [16] Franch A, Knutsson KA, Pedrotti E, et al. Treatment of *Acanthamoeba keratitis* with high dose PHMB (0.08%) monotherapy in clinical practice: a case series[J]. *Eur J Ophthalmol*, 2025, 35(4): 1235-1241. DOI: 10.1177/11206721241299470.
- [17] Wang WY, Hu HW, Chiou JC, et al. Poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride (PHMB) -based materials: synthesis, modification, properties, determination, and application [J]. *Polymer Chemistry*, 2023, 14(48): 5226. DOI: 10.1039/d3py01148h.
- [18] Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes) [J]. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1980, 9: 467-508. DOI: 10.1146/annurev.bb.09.060180.002343.
- [19] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4): 261-279. DOI: 10.1038/nrd.2017.243.
- [20] Weissig V. From olive oil emulsions to COVID-19 vaccines: liposomes came first [M]. New York: Humana, 2023: 1-19. DOI: 10.1007/978-1-0716-2954-3_1.
- [21] Šturm L, Poklar Ulrih N. Basic methods for preparation of liposomes and studying their interactions with different compounds, with the emphasis on polyphenols[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6547. DOI: 10.3390/ijms22126547.

- [22] Yang J, Boer JC, Khongkow M, et al. The development of surface-modified liposomes as an intranasal delivery system for group A streptococcus vaccines[J]. *Vaccines (Basel)*, 2023, 11(2):305. DOI: 10.3390/vaccines11020305.
- [23] Thi TTH, Suys EJA, Lee JS, et al. Lipid-based nanoparticles in the clinic and clinical trials: from cancer nanomedicine to COVID-19 vaccines[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(4): 359. DOI: 10.3390/vaccines9040359.
- [24] Hou X, Zaks T, Langer R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery[J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(12): 1078-1094. DOI: 10.1038/s41578-021-00358-0.
- [25] Ghosh R, De M. Liposome-based antibacterial delivery: an emergent approach to combat bacterial infections[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(39):35442-35451. DOI:10.1021/acsomega.3c04893.
- [26] 孙艺文. 基于自组装纳米颗粒增强的纤维素基敷料抗菌止血性能研究[D]. 淄博:山东理工大学, 2025.
- [27] Lam NS, Long X, Su XZ, et al. Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its monoterpene constituents in treating protozoan and helminthic infections[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130:110624. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110624.
- [28] Yuan X, Cao D, Xiang Y, et al. Antifungal activity of essential oils and their potential synergistic effect with amphotericin B[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 31125. DOI: 10.1038/s41598-024-82380-0.
- [29] 李炳霞, 张亮. 茶树精油的提取及抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的活性研究[J]. *山东畜牧兽医*, 2021, 42(6):11-13. DOI:10.3969/j.issn.1007-1733.2021.06.004.
- [30] 张瑜, 何华名, 何聪芬. 植物精油抗病毒研究概况[J]. *中国野生植物资源*, 2021, 40(7):48-54. DOI:10.3969/j.issn.1006-9690.2021.07.010.
- [31] 吴克刚, 黄洁虹, 柴向华, 等. 植物精油气相清除 DPPH 自由基的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2013(3):110-113. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2013.03.011.
- [32] Culas SM, Kaur L, Popovich DG, et al. Physicochemical properties, colloidal stability, and encapsulation efficiency of lecithin-based and chitosan-coated liposomes loaded with Cinnamomum zeylanicum bioactives [J]. *Appl Sci*, 2026, 16(8):3754. DOI:10.3390/app16083754.
- [33] Gadani M, Badak S, Upadhyay R. Sunflower lecithin-based liposomal formulations of sesbania grandiflora and acerola cherry extracts: enhancing stability and controlled release [J]. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 2025, 34(5): 186-198. DOI: 10.9734/ijbcr/2025/v34i51049.
- [34] Man Y, Tang H, Wang Y, et al. Casein-liposome complex loading basil essential oil: preparation, antibacterial effect, and preservative effect on braised beef[J]. *Food Chem*, 2026, 511: 148807. DOI:10.1016/j.foodchem.2026.148807.
- [35] Zaman W, Ullah N, Amin A. Rationally engineered essential oil-loaded nanocarriers for acne vulgaris: integrating multiscale molecular modeling, machine learning, and response surface optimization[J]. *J Microencapsul*, 2026, 43(3):282-313. DOI:10.1080/02652048.2026.2695092.
- [36] Kalantari M, Azizi K, Shahheidari R, et al. A stable nanoliposomal carboxymethyl cellulose hydrogel of Pelargonium essential oil: formulation, characterization, and enhanced repellent activity against Anopheles stephensi [J]. *Parasite Epidemiol Control*, 2026, 33: e00490. DOI: 10.1016/j.parepi.2026.e00490.
- [37] 王洁, 陆俊梅, 黄晓辰, 等. 微量 MIC 检测判断结核分枝杆菌药敏的方法学研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(4):315-319. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2010.04.006.
- [38] Ahani E, Montazer M, Mianehro A, et al. Encapsulation of the PHMB with nanoliposome and attachment to wound dressing for long-term antibacterial activity and biocompatibility[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2024, 40(11):361. DOI: 10.1007/s11274-024-04170-0.
- [39] Nguyen HL, Nguyen HMX, Nguyen TBN. Nano-enabled advances in tea tree essential oil (Melaleuca alternifolia): composition, bioactivity, and emerging roles in food protection[J]. *Materials (Basel)*, 2026, 19(13): 2915. DOI: 10.3390/ma19132915.
- [40] Wang H, Zhang H, Wang J, et al. Interfacial co-assembly of CO₂-responsive rosin-based surfactant and CNF in gel emulsions for encapsulation and release of tea tree oil[J]. *Food Chem*, 2026, 509: 148580. DOI: 10.1016/j.foodchem.2026.148580.
- [41] Lin B, Wei W, Cao C, et al. Mechanistic analysis for the inhibition of Staphylococcus aureus by terpinen-4-ol[J]. *Nat Prod Commun*, 2026, 21(1): 1-13. DOI: 10.1177/1934578X251414816.
- [42] de Assis KMA, de A Rêgo RI, de Melo DF, et al. Therapeutic potential of Melaleuca alternifolia essential oil in new drug delivery systems[J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(33): 4048-4055. DOI:10.2174/1381612826666200305124041.
- [43] Alegun O, Pandeya A, Cui J, et al. Donnan potential across the outer membrane of Gram-negative bacteria and its effect on the permeability of antibiotics[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(6):701. DOI:10.3390/antibiotics10060701.
- [44] Yousefi R, Rezaee Y, Bayat F, et al. Molecular docking, molecular dynamics simulation, preparation, and characterization of naltrexone-phospholipid complex: a novel cargo with improved loading into multivesicular liposomes [J]. *Results in Chemistry*, 2024, 9: 101656. DOI: 10.1016/j.rechem.2024.101656.