

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530140

功能化纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6 及其抗耐
药菌研究

Study on chlorin e6 loaded on functionalized nano-silk
fibroin carrier and drug-resistant bacteria

学生姓名: 许飞杨

指导教师: 陶玉贵 (教授)

专 业: 生物与医药

研究方向: 生物载体材料

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：

许飞杨

日期：2024年6月3日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：

许飞杨

指导教师签名：

1812

日期： 2024 年 6 月 3 日

日期： 2024 年 6 月 3 日

功能化纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6 及其抗耐药菌研究

摘要

抗生素耐药性是一个日益严重的问题，所有已知的抗生素都存在耐药性，多重耐药性（MDR）细菌正变得越来越普遍。此外，细菌生物膜的出现大大降低了抗生素的治疗效果。因此，需要开发新的抗菌策略来对抗多重耐药性细菌和消除生物膜，以延缓耐药性的出现。主要研究内容及研究结果如下：

（1）研究以丝素蛋白（SF）为载体负载二氢卟吩 e6（Ce6）的纳米复合材料。Ce6/SF 由 Ce6 和 SF 中的氨基酸残基之间的共价相互作用形成。SF 的无毒、良好的生物相容性和水溶性可以解决光敏剂 Ce6 的疏水问题。此外，我们选择壳聚糖季铵盐（HTCC）对 SF 进行改性，赋予 SF 阳离子特性，使其更好地渗透生物膜并与细菌结合，如此形成的纳米复合材料定义为 Ce6/HSF。因此，带正电的 Ce6/HSF 很容易通过静电吸附与 MDR 细菌结合并渗透到生物膜中。同时在 Ce6 近红外激光（NIR）照射下释放出大量的单线态氧，从而实现了生物膜的消融和对细菌的杀灭。通过紫外（UV-Vis），红外（FT-IR），粒径，Zeta 电位和扫描电镜等一系列表征证明 Ce6/HSF 的成功合成，体外抑菌实验和生物膜实验证明 Ce6/HSF 具有优异的抗菌和消除生物膜效果，对 MDR 金黄色葡萄球菌和 MDR 大肠杆菌的抑制率在 99.2 %和 97.1 %，小鼠伤口在第 11 天有明显愈合趋势证

明 Ce6/HSF 具有良好的治疗效果，溶血实验和细胞毒性实验证明 Ce6/HSF 的生物安全性。本研究为抗菌纳米复合材料的发展提供了新的视角，旨在为抗 MDR 细菌提供有价值的参考。

(2) 为了进一步增强材料对耐药菌的效果，我们选择用 PDA 代替 HTCC 在丝素蛋白表面形成涂层。PDA 作为光热材料可以赋予材料优异的光热效果，形成的纳米复合材料定义为 Ce6/SF-PDA。新合成的 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料通过光热和光动力联合进行抗菌。通过紫外、红外、粒径、Zeta 电位等表征手段证明 Ce6/SF-PDA 的成功合成。光热性能实验表明材料具有较高的光热效果，光热转换能力为 29.3 %。光动力实验显示 Ce6/SF-PDA 具有良好的产活性氧能力。体外抑菌实验显示 Ce6/SF-PDA 对 MDR 金黄色葡萄球菌和 MDR 大肠杆菌的抑制率均在 97 % 以上，溶血实验和细胞毒性实验证明 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料具有良好的生物安全性。

综上所述，我们设计出了一种功能化纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6，利用其光动力产生的活性氧消除生物膜的同时还可以抑制耐细菌。此外使用不同的材料修饰丝素蛋白赋予其不同的功能，以此增强杀菌效果。本研究为抗菌纳米复合材料的开发提供了一个新的视角，旨在为对抗 MDR 细菌提供宝贵的经验。

关键词：丝素蛋白，纳米粒子，光动力疗法，抗耐药菌，生物安全性

STUDY ON CHLORIN E6 LOADED ON FUNCTIONALIZED NANO-SILK FIBROIN CARRIER AND DRUG-RESISTANT BACTERIA

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a growing problem due to the prevalence of multidrug-resistant (MDR) bacteria and the reduced efficacy of antibiotics caused by bacterial biofilms. Therefore, novel antimicrobial strategies are needed to combat MDR bacteria and eliminate biofilms in order to delay the emergence of drug resistance.

(1) A nanocomposite was prepared using silk fibroin (SF) as a carrier for chlorin e6 (Ce6), resulting in the formation of Ce6/SF through covalent interactions between Ce6 amino acid residues and SF. The non-toxicity, biocompatibility, and water solubility of SF address Ce6's hydrophobicity issue. Additionally, quaternary ammonium salt chitosan (HTCC) was used to modify SF into Ce6/HSF with cationic properties that enable better penetration into biofilms and binding to bacteria. This positively charged nanocomposite can easily bind to MDR bacteria and penetrate biofilms via electrostatic adsorption. Under near-infrared laser irradiation, Ce6 releases singlet oxygen for biofilm ablation and bacterial killing. UV-Vis, FT-IR,

particle size analysis, Zeta potential measurement, scanning electron microscopy confirmed successful synthesis of Ce6/HSF. In vitro experiments demonstrated excellent antibacterial effects with 99.2 % inhibition rate against MDR *S aureus* and 97.1 % against MDR *E coli*. Wound healing in mice further validated therapeutic efficacy.

(2) To enhance material effectiveness against drug-resistant bacteria, we replaced HTCC with PDA coating on silk fibroin surface forming Ce6/SF-PDA nanocomposite which combines photothermal and photodynamic therapy for antibacterial action. Successful synthesis was confirmed through various characterization methods including UV-Vis infrared spectroscopy analysis. High photothermal effect at 29.3 % conversion ability was observed along with good reactive oxygen species production capability during photodynamic experiments. More than 97 % inhibition rate against MDR *S aureus* and MDR *E coli* were achieved in vitro without compromising biological safety based on hemolysis test results.

In summary, we have developed a novel nano-silk fibroin protein carrier for photosensitizer e6 delivery aimed at inhibiting bacterial resistance and destroying biofilms through photodynamic generation of reactive oxygen species (ROS). Furthermore, different modifications were applied to silk fibroin enhancing its bactericidal effect.

KEY WORDS: Silk fibroin, nanoparticles, photodynamic therapy, drug-resistant bacteria, biological safety

目录

摘要.....	I
ABSTRACT	III
第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 细菌感染的治疗方法	1
1.2.1 传统治疗方法	1
1.2.2 基于纳米材料的生物膜感染治疗方法	2
1.3 丝素蛋白纳米载体及其治疗细菌感染的应用	4
1.3.1 丝素蛋白的概述	4
1.3.2 丝素蛋白纳米载体在细菌感染治疗方面的应用	5
1.4 课题设计及主要研究内容	7
1.4.1 课题设计思路	7
1.4.2 主要研究内容	7
第 2 章 季铵化纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6 的光动力抗耐药菌研究	9
2.1 引言	9
2.2 实验材料与方法	10
2.2.1 实验材料	10
2.2.2 实验方法	11
2.3 实验结果与讨论	16
2.3.1 材料的表征	16
2.3.2 光动力性能分析	19
2.3.3 体外抗菌实验分析	21
2.3.4 体外生物膜消除实验分析	25
2.3.5 细菌形态学分析	26
2.3.6 体内抗菌实验分析	27
2.3.7 生物安全性评估	28
2.4 本章小结	31
第 3 章 光热型纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6 的光热/光动力联合抗耐药菌研究 ..	33
3.1 引言	33

3.2 实验材料与方法	34
3.2.1 实验材料	34
3.3.1 实验方法	35
3.4 结果与讨论	36
3.4.1 材料的表征	36
3.4.2 光热性能分析	39
3.4.3 光动力性能分析	40
3.4.4 体外抗菌实验分析	40
3.4.5 生物安全性评估	41
3.5 本章小结	42
第 4 章 结论与展望	43
4.1 结论	43
4.2 展望	43
参考文献	45
攻读硕士学位期间学术论文发表情况	51
致谢	52

第 1 章 绪论

1.1 引言

当前，细菌感染是全球最为严重感染问题之一，每年导致数以万计的患者失去生命^[1-6]。此外，由于抗生素的大量滥用，细菌出现了耐药性，使得抗生素对细菌的治疗效果降低，甚至无法治愈^[7]。根据世卫组织的报告，大约 80 % 的多重耐药或广泛耐药微生物是由于滥用和过度使用抗生素造成的，这些感染与严重的不良反应有关^[8]。尽管多年来医疗技术不断提高，但细菌耐药性依然成为医学界重要的难题之一。

多重耐药的另一个原因是生物膜的形成^[9-11]。尽管并非所有的多重耐药菌都能形成生物膜，但生物膜本身对抗生素和其他几种抗感染策略具有固有的耐药性^[12]。近年来，基于纳米技术的新型抗菌剂已被设计用于杀死浮游、抗生素耐药细菌，但必须满足额外的要求，而不仅仅是杀死悬浮细菌，以对抗生物膜感染^[13]。尽管开发出许多新型抗菌剂，但治疗与生物膜相关的伤口感染的成本和复杂性仍然是一个严重的挑战^[14]。因此，需要开发出一种新的方法来消除生物膜，以应对日益增长的细菌耐药性。

1.2 细菌感染的治疗方法

1.2.1 传统治疗方法

抗生素在对抗细菌感染方面显示出了卓越的效果，自从它们首次商业化以来，它们已将预期寿命延长了二十年^[15-18]。然而由于人们对抗生素的滥用，导致了多药耐药性的增长^[19]。抗生素耐药性是一个狭义的术语，因为它是指对治疗细菌感染的药物的耐药性^[20]。抗生素耐药性已成为 21 世纪人类健康的重大挑战^[21]。除了这些影响之外，对抗生素的持续需求增加还导致抗生素耐药性随着时间的推移而增长。抗生素耐受性主要通过外排泵和生物膜在这些细菌中进化^[22]。此外，考虑到新抗微生物药物产量的稳步增长，以及大多数与卫生有关的政策旨在实施有效的治疗预防政策这一事实，对抗微生物药物耐药性进行长期投资至关重要^[23]。最近，纳米材料被证明对具有临床重要性的抗生素耐药性病原菌菌株非常有效^[24-26]。因此，

纳米材料可以成为有前途的药物递送载体，由于其更好的生物利用度、更低的毒性、可控释放和特异性靶向，有可能解决当前的医学技术挑战。纳米材料用于多种目的，包括抗生素的递送。此外，它们还具有很高的抗菌、抗真菌、抗病毒和抗寄生虫活性。抗生素通过纳米材料递送至感染部位是一种潜在的治疗方法，特别是对于受控药物释放，可减少产生临床效果所需的量^[27-29]。

1.2.2 基于纳米材料的生物膜感染治疗方法

随着纳米技术的进步，纳米材料具有较高的比表面积和多样化的表面结构，在细菌生物膜根除方面产生了意想不到的效果。此外，多功能纳米材料通过化学动力疗法（CDT）^[30, 31]、光动力疗法（PDT）^[32, 33]、电力疗法（EDT）^[34, 35]、声动力疗法（SDT）^[36, 37]和光热疗法（PTT）^[38, 39]等先进治疗方法。其中光热疗法（PTT）和光动力疗法（PDT）在解决抗生素耐药性感染方面显示出巨大的潜力。

（1）光热疗法（PTT）

光热疗法（Photothermal therapy, PTT）是一种创新的治疗方法，它利用光吸收剂在暴露于特定波长的光时选择性地产生局部热量^[40]。这种局部加热效应可用于各种医疗应用，包括癌症治疗、和细菌感染管理^[41]。在细菌感染的背景下，PTT 与传统的细菌感染治疗策略相比具有多种优势。首先，PTT 可以提供精确和局部的治疗，最大限度地减少对周围健康组织的损害，适用于细菌性伤口感染的治疗^[42]。其次，PTT 不太可能导致抗生素耐药性，因为它不依赖于抗生素靶向的机制，使其成为传统治疗失败时的潜在替代方案。因此，PTT 有望成为解决细菌感染的创新和有效策略，在精确度、减少抗生素使用以及在抗生素耐药病例中的潜在适用性方面具有优势。

（2）光动力疗法（PDT）

光动力疗法（photodynamic therapy, PDT）具有广泛的抗菌谱，在治疗细菌感染方面显示出巨大的潜力，特别是在多药耐药治疗中^[43]。作为一种广泛应用的癌症治疗方法，光动力疗法（PDT）是一种非侵入性治疗方法，它依靠光敏剂和光之间的相互作用来诱导局部化学损伤^[44]。据报道，

PDT 的最终产物活性氧 (ROS) 可以破坏生物膜和细菌代谢 (例如蛋白质、核酸、脂质等), 而不会引发耐药性。作为 PDT 的关键成分之一, 光敏剂 (PS) 可以利用光和氧气产生 ROS, 从而决定抗菌活性的效率。然而, PS 目前的性能仍然不尽如人意, 例如水溶性差和治疗渗透不足。开发合适的 PS 并达到足够的治疗渗透率对提高 PDT 的抗菌活性具有重要意义。

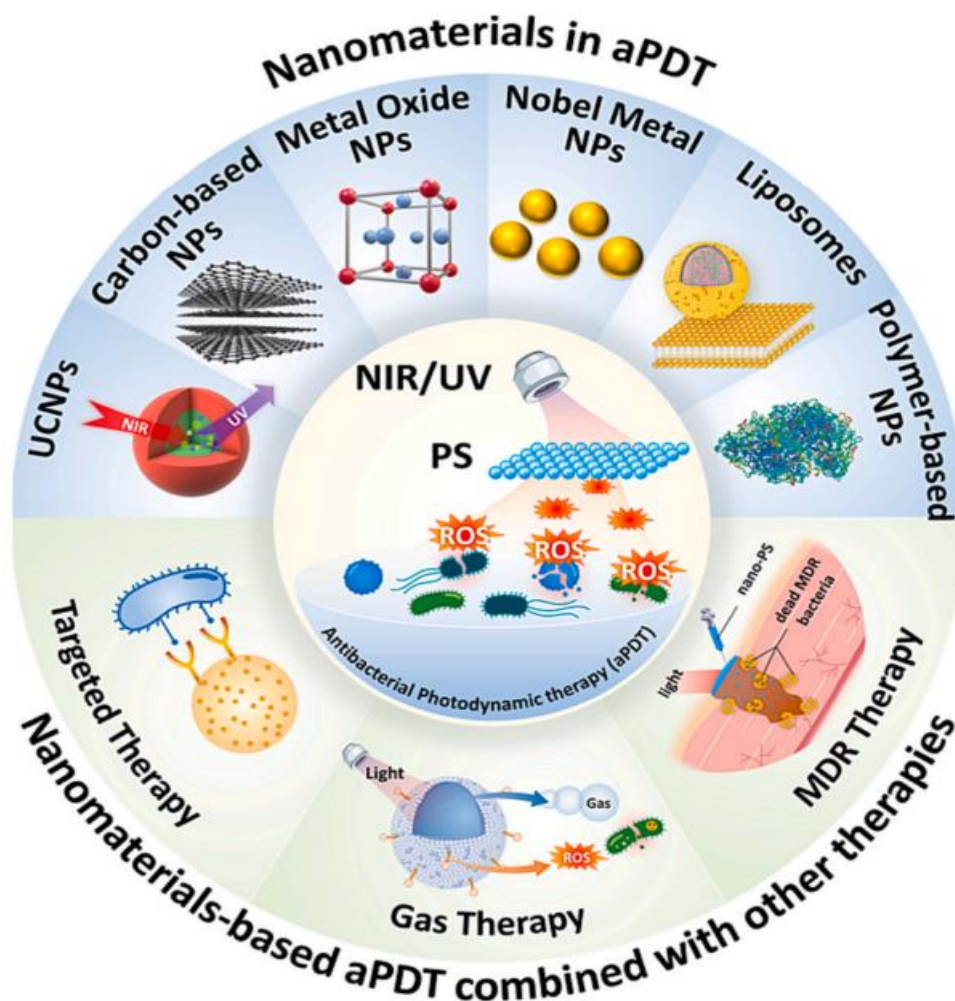


图 1-1. 抗菌治疗中基于纳米材料的光动力疗法示意图。

Figure 1-1. Schematic illustration of nanomaterials-based PDT in antibacterial treatment^[45].

(3) 两种或多种疗法联合治疗

在 PDT 中, 光响应材料受到光能的照射, 产生 ROS, 并迅速杀死细菌。然而, 单一的光动力需要大量的 ROS 来满足 PDT 的要求并杀死细菌。在这种情况下, 主要缺点是大量的 ROS 也会导致正常细胞出现问题, 例如

炎症和纤维化。为了解决这个问题，PTT 可以与 PDT 一起使用，以提高两个过程的效率^[46, 47]。PTT 产生的热量可以降低细菌的细胞活性，使它们对 ROS 更敏感，从而相应地减少所需的 ROS 量。同样，如果与 PDT 一起使用，则可以降低 PTT 杀死细菌的较高温度要求，因为 PDT 过程产生的 ROS 会损害细菌并减少 PTT 产生的高温负担。另外，使用 PTT 可以改善 ROS 的弱渗透能力。

例如，Mei 等人利用 cos 功能化的 GQDs 在 450 nm 可见光下短期暴露后杀死大肠杆菌和金黄色葡萄球菌(图 1-2)。纳米复合材料还显示出良好的血液相容性和低细胞毒性，有助于感染伤口愈合^[48]。

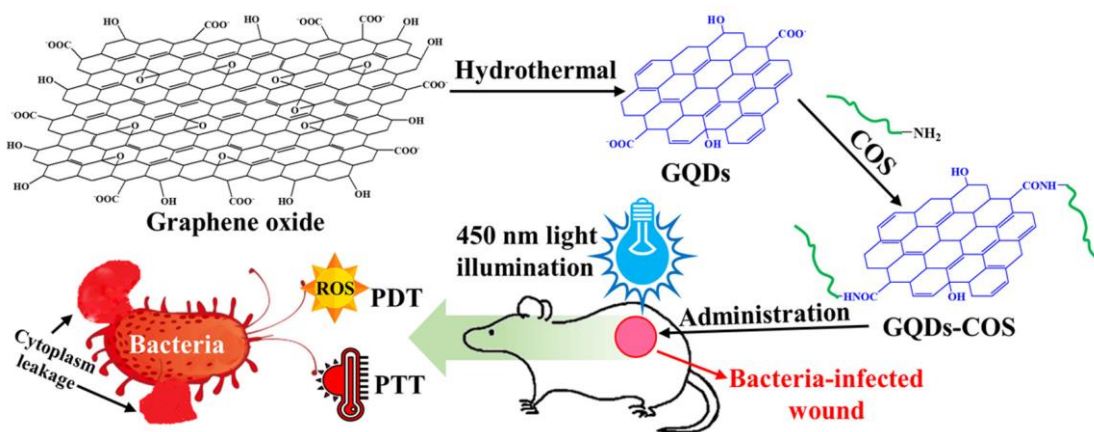


图 1-2. 石墨烯量子点 (GQDs) -壳寡糖 (COS) 的合成及其基于 PTT 和 PDT 的协同抗菌伤口愈合的示意图。

Figure 1-2. Schematic illustration of graphene quantum dots (GQDs)-chitosan oligosaccharide (COS) synthesis and its PTT- and PDT-based synergistic antibacterial wound healing.

1.3 丝素蛋白纳米载体及其治疗细菌感染的应用

1.3.1 丝素蛋白的概述

丝素蛋白 (SF) 是一种从蚕丝或蜘蛛丝中提取的纤维蛋白，自 2008 年以来已被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于生物医学应用^[49]。它具有许多所需的特性，例如优异的生物相容性、生物降解性、低免疫原性、可调的机械性能和应用灵活性^[50]。

丝素蛋白可以与不同的添加剂混合形成具有新性能的支架^[51]。其中，

由丝聚合物和纳米颗粒（NPs）组成的纳米复合材料因其不同于块状材料的优异性能而受到越来越多的关注^[52]。因此，丝素-NPs 纳米复合材料的发展引起了学术界和工业界越来越多的兴趣。将丝素蛋白材料的优点与 NPs 材料的优点相结合，可以获得由相同大块材料组成的“经典”复合材料无法获得的新性能。

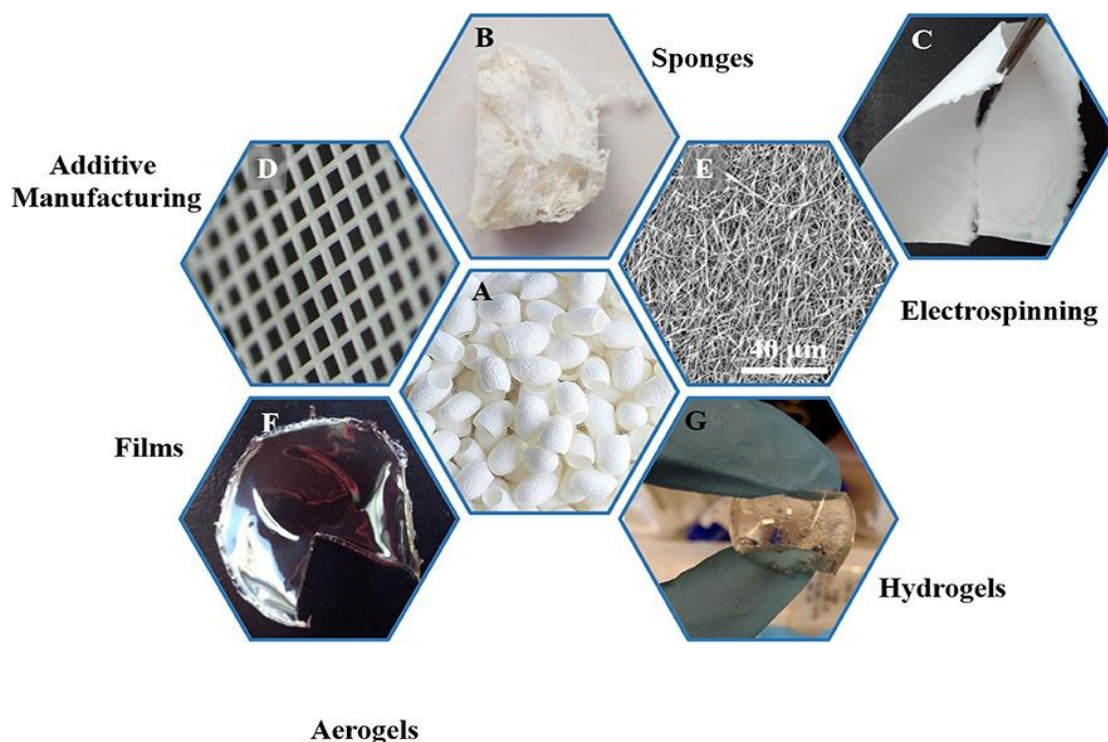


图 1-3. 从蚕茧中提取的丝素蛋白获得的各种生物材料概述。(A) 蚕茧，(B) 海绵，(C, E) 电纺丝垫的宏观和微观图像，(D) 3D 打印结构，(F) 薄膜，(G) 水凝胶，(H) 气凝胶。

Figure 1- 3. Overview of the various biomaterials obtained from of silk fibroin extracted from silk cocoons. (A) Silk cocoons, (B) sponges, (C, E) macroscopic and microscopic images of electrospun mats, (D) 3D printed structures, (F) films, (G) hydrogels, and (H) aerogels.

人们一直在追求将丝素蛋白和 NPs 结合起来设计具有定制特性和功能的生物纳米复合材料的有前途的潜力。纳米复合材料可以呈现出在具有相同材料的经典复合材料中无法实现的新性能。

1.3.2 丝素蛋白纳米载体在细菌感染治疗方面的应用

丝素蛋白与有机化合物和聚合物的混合物已被广泛报道。研究最多的天然聚合物是纤维素、琼脂糖、几丁质、壳聚糖、硫酸软骨素、胶原蛋白

和透明质酸^[53]。同样，丝素蛋白已与合成聚合物混合，包括聚乙烯亚胺（PEI）^[54]，聚乙烯醇（PVA）^[55]，聚乙烯吡咯烷酮（PVP）^[56]，聚环氧乙烷（PEO）^[57]，聚己内酯（PCL）^[58]，聚丙烯酰胺（PAM）^[59]，酸性聚乳酸乙醇酸（PLGA）^[60]，聚氨酯（PU）^[61]和聚乳酸（PLA）^[62]等。

基于丝素蛋白的纳米载体已对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌进行了检测，包括敏感和耐药菌株，如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌，以及白色念珠菌和耐氟康唑白色念珠菌（FRCA）等真菌^[53]。此外，Eivazzadeh-Keihan 等人证明，用氢氧化镁纳米颗粒功能化的丝素蛋白基敷料可以防止生物膜的形成。这在慢性伤口中尤为重要，因为生物膜的形成会增加抗生素耐药性，并严重影响组织再生和重塑过程^[63]。

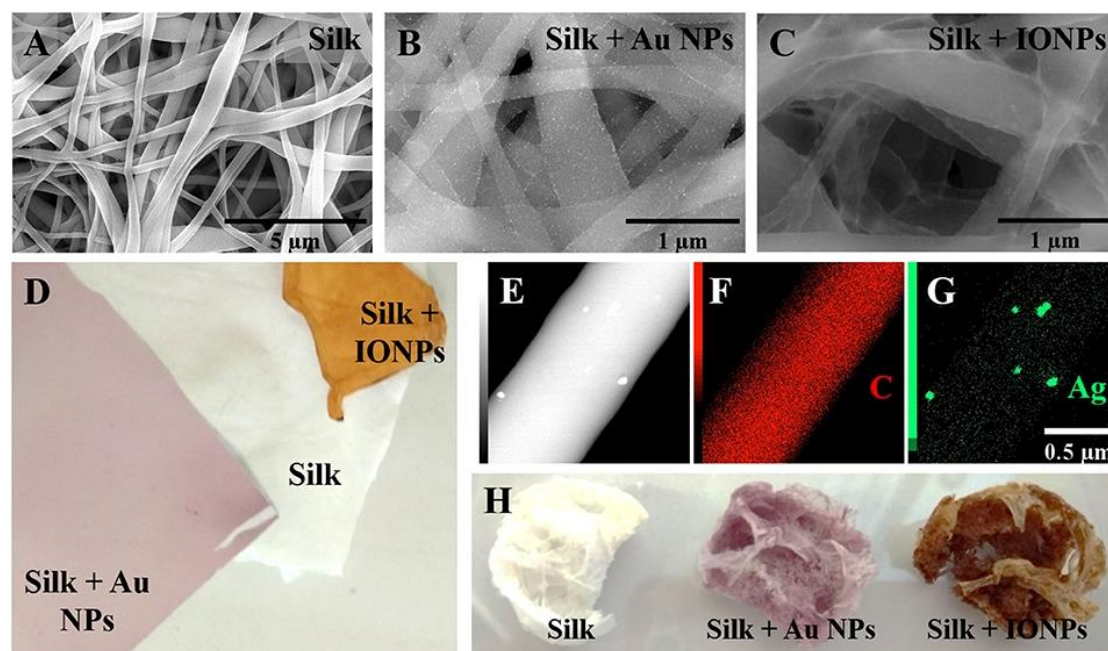


图 1-4. 丝素生物纳米复合材料的例子。（A）电纺丝纤维与（B）金纳米粒子、（C）氧化铁纳米粒子或（E-G）银纳米粒子[STEM-EDS 与元素映射]的扫描电镜图。（D）含金纳米粒子和氧化铁纳米粒子的电纺丝支架和（H）海绵的宏观视图。

Figure 1-4. Examples of silk bionanocomposites. Scanning Electron Microscopy view of (A) electrospun silk fibers with (B) gold nanoparticles and (C) iron oxide nanoparticles or (E-G) silver nanoparticles [STEM-EDS with elemental mapping]. Macroscopic view of (D) electrospun scaffolds and (H) sponges with gold and iron oxide nanoparticles.

图 1-4 展示出一系列丝素生物纳米复合材料的例子。丝素生物纳米复合材料因其生物相容性和生物降解特性而主要用于抗菌和组织工程应用。抗菌特性使纺织品的保护和伤口免受感染。此外，丝素蛋白的多功能性以及与纳米成分的组合非常适合组织工程中的许多应用。

1.4 课题设计及主要研究内容

1.4.1 课题设计思路

抗生素耐药性是一个日益严重的问题。所有已知的抗生素都存在耐药性，多重耐药性（MDR）细菌正变得越来越普遍。用于对抗耐药菌的新抗菌剂越来越少。抗菌纳米颗粒的最新发展为对抗耐药菌开辟了新的可能性。纳米颗粒具有独特的物理化学特性，可以靶向递送和增强抗菌剂的生物利用度。纳米颗粒特性，如小尺寸、高表面积体积比和表面电荷，可以用于开发新型抗菌剂，以克服传统抗生素的局限性。此外，纳米颗粒可以穿透生物膜并破坏细菌膜，使它们对浮游生物和生物膜相关细菌都有效。丝素蛋白作为载体具有良好的生物相容性和优异的力学性能，在对抗耐药菌方面可以作为一个良好的载体。

因此，我们设计了以丝素蛋白为载体的抗菌药物体系。本研究利用丝素蛋白作为载体负载二氢卟吩 e6（Ce6），利用丝素蛋白无毒，良好的生物相容性，易溶于水等特点解决二氢卟吩 e6 疏水性的问题。另外，我们选择壳聚糖季铵盐（HTCC）修饰丝素蛋白，赋予丝素蛋白阳离子特性，使其能够更好的渗透生物膜和与细菌结合。以此形成的 Ce6/HSF 纳米复合材料通过静电吸附作用与多重耐药性细菌结合，并且渗透到生物膜中，在近红外激光（NIR）的照射下 Ce6 释放大量的单线态氧，从而实现生物膜的消融和杀死细菌。

为了进一步增强纳米复合材料的抗菌效果，我们选择在丝素蛋白表面包裹一层聚多巴胺（PDA），赋予材料光热能力，最终制备成 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料。其中负载的 Ce6 在 660 nm 的激光作用下产生大量的单线态氧，外层的 PDA 在 808nm 的激光作用下温度升高，以此来消除生物膜，实现 PTT 和 PDT 协同抗菌。

1.4.2 主要研究内容

本课题主要是通过丝素蛋白作为纳米载体负载 Ce6，对丝素蛋白表面进行功能化修饰，以赋予其不同的功能来对抗多重耐药细菌感染带来的严重危害。主要研究内容如下：

（1）季铵化纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6 的光动力抗菌研究

通过去溶剂法制备 Ce6/SF 纳米球，并用 HTCC 修饰丝素蛋白表面，最后制备出 Ce6/HSF 纳米复合材料用于消除生物膜和杀死多重耐药菌，并促进伤口愈合。首先通过扫描电镜、紫外、红外、粒径、Zeta 电位等表征手段证明材料的成功合成；其次通过 CFU、流式、荧光染色等实验评价材料的抑菌效果，接着通过生物膜消除实验了解材料对耐药菌生物膜的消除效果；然后通过体内抑菌实验观察材料对小鼠伤口周围耐药菌的抑制效果和促伤口愈合效果；最后通过细胞毒性实验，溶血实验和血清生化指标检测来证明材料的生物安全性。

（2）光热型纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6 的光热/光动力联合抗耐药菌研究

通过去溶剂法制备 Ce6/SF 纳米球，其表面通过 Tris 溶液连接 PDA，使得材料具有光热能力，最后制备出的 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料通过联合 PTT 和 PDT 消除生物膜和杀死多重耐药菌。首先通过扫描电镜、紫外、红外、粒径、Zeta 电位等表征手段证明材料的成功合成；其次通过光热性能检测和光动力性能检测来评价材料的光热和光动力效果；接着通过 CFU 等实验评价材料的抑菌效果；最后通过溶血实验和细胞毒性实验来验证材料的生物安全性。

第 2 章 季铵化纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6 的光动力 抗耐药菌研究

2.1 引言

目前,MDR 细菌感染仍然是一个严重的公共卫生威胁,并可能对受影响器官的正常功能产生持久影响^[64-69]。消除细菌感染的常见临床方法严重依赖抗生素治疗。然而,由于抗生素的不合理和滥用,不可避免地削弱了治疗效果,并增加了细菌耐药性^[70-72]。此外,大多数致病菌通常不以个体生物或浮游状态存在于人类环境中。相反,它们倾向于形成称为生物膜的群体,使小分子抗菌剂难以有效渗透,最终导致对抗菌剂不敏感。因此,迫切需要开发一种针对耐药菌形成的生物膜的新型抗菌纳米材料。

为了提高对生物膜的治疗效果,已经研究了各种策略。这些策略不仅包括化疗方法,如脂质/聚合物纳米颗粒(NPs)^[73, 74]、抗菌肽^[75, 76]、阳离子材料^[77, 78]和抗菌涂层^[79, 80],还包括非化疗方法,如光动力疗法(PDT)和光热疗法(PTT)。PDT 因其毒性低、创伤小、广谱杀菌、可控性好、杀菌效果好而受到广泛关注。抗菌 PDT 虽然可以避免耐药性的产生,但其去除生物膜的效果并不理想;这可能是由于光敏剂(PS)的渗透作用有限。此外,PS 还存在水溶性差、扩散距离有限的缺点。因此,我们考虑将 PS 与纳米技术相结合。纳米载体与 PS 的结合可以增强 PS 的水溶性和扩散距离,使其在感染部位有效聚集。这增强了光动力活性的功效。此外,带正电的细菌也受到了极大的关注,因为它们可以通过强静电吸附选择性地靶向带负电的细菌膜^[81-83]。因此,制备小尺寸、低毒性的阳离子纳米载体 PS 在理论上是可行的。

本研究以丝素蛋白(SF)为载体,负载二氢卟吩 e6(Ce6)。Ce6/SF NPs 是由 Ce6 和 SF 中氨基酸残基之间的共价相互作用形成的。SF 的无毒性、良好的生物相容性和水溶性可以解决光敏剂 Ce6 的疏水问题^[84]。此外,我们选择壳聚糖季铵盐(HTCC)对 SF 进行改性,使其具有阳离子性质,能够更好地穿透生物膜并与细菌结合。由此形成的纳米复合材料定义为 Ce6/HSF。因此,带正电的 Ce6/HSF 可以很容易地通过静电吸附与 MDR 细菌结合并渗透到生物膜中。

Ce6 在近红外激光（NIR）照射的作用下，释放出大量的单线态氧，从而达到对生物膜的烧蚀和杀死细菌的目的。本研究为开发新的治疗伤口的多功能纳米平台提供了新的思路。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagent

试剂名称	生产厂家
丝素蛋白（SF）	上海麦克林生化科技股份有限公司
二氢卟吩-e6（Ce6）	上海麦克林生化科技股份有限公司
壳聚糖季铵盐（HTCC）	上海麦克林生化科技股份有限公司
2，7-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
磷酸盐缓冲液（PBS）	武汉赛维尔生物科技有限公司
DCFH-DA（C ₂₄ H ₁₆ Cl ₂ O ₇ ）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
溴化钾（KBr）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
1，3-二苯基异苯并呋喃（DPBF，97%）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
活死染色测定试剂盒	赛默飞科技（中国）有限公司
琼脂粉	北京索莱宝科技有限公司
酵母提取物	上海生工生物工程有限公司
胰蛋白胨	国药集团化学试剂有限公司
丙酮	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠 AR	国药集团化学试剂有限公司

2.2.1.2 实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental equipment

仪器名称	型号	生产厂家
冷冻干燥机	FD8-3	美国 SIM 公司
恒温磁力搅拌器	SZCL-2	上海岐耀设备有限公司
紫外可见分光光度计	UV-3600	日本岛津公司

傅立叶红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
流式细胞仪	CytoFLEX	贝克曼有限公司
荧光显微镜	DM2500 LED	德国莱卡公司
高速冷冻离心机	Z 326k	德国赫姆勒公司
超净工作台	BJ-2CD	上海博迅医疗生物有限公司

2.2.1.3 细菌及小鼠来源

金黄色葡萄球菌（ATCC25923）、大肠杆菌（ATCC11303）、耐药大肠杆菌（BNCC358268）和耐药金黄色葡萄球菌（BNCC358301）购自北纳创联生物科技有限公司。

本研究使用的小鼠来自南京大学模式动物研究中心。所有动物都获得了动物研究的伦理批准（批准号:202010A415），确保符合《动物福利法》和《实验动物护理和使用指南》协议。

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 材料的合成与表征

（1）Ce6/HSF 纳米复合材料合成及应用示意图

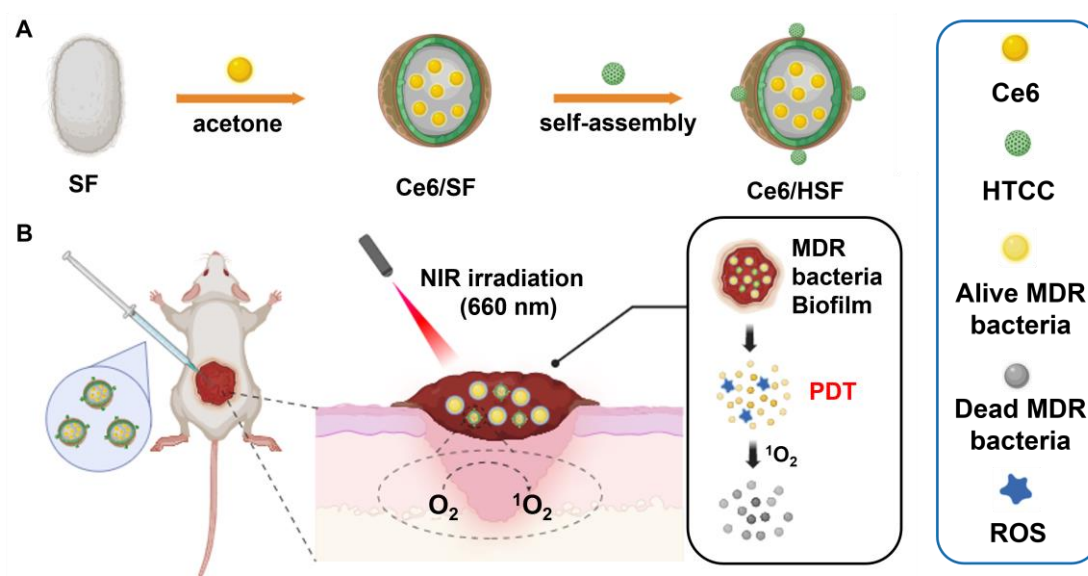


图 2-1. 示意图说明了（A）Ce6/HSF 纳米复合材料的制备和（B）纳米复合材料在光照下实现快速杀菌和长期抗菌活性的过程。

Figure 2-1. Schematic illustrating (A) the preparation of Ce6/HSF nanocomposites and (B) the process by which nanocomposites achieve rapid bacterial killing and long-term antibacterial

activity upon light irradiation.

我们过去溶剂法制备处 Ce6/SF 纳米颗粒，再通过自组装将 HTCC 修饰到 Ce6/SF 纳米颗粒表面，形成 Ce6/HSF 纳米复合材料。合成的材料在 660 nm 的近红外激光照射下可以产生大量的活性氧，以此来消除生物膜和杀死耐药菌。

(2) Ce6/HSF 纳米复合材料的合成

1) Ce6/SF 的合成：在本研究中，Ce6/SF 纳米颗粒通过去溶剂化方法制备^[85]。为此，将 1 mL SF 溶液 (15 mg mL^{-1}) 滴加到 9 mL 含 Ce6 的丙酮溶液 ($150 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) 中，剧烈搅拌 5 min，用细胞粉碎机超声处理 30 s (每 2 s 停止 2 s)，并置于通风橱中持续搅拌过夜。通过以 12000 rpm 的速度离心 15 min 收集固体，用超纯水反复洗涤，最终分散在超纯水中，并储存在 4 °C 的冰箱中^[86]。

2) Ce6/HSF 的合成：将 HTCC 以 3:97 的比例溶于水中，得到质量分数为 3 % 的 HTCC 水溶液。然后，将 1 mL HTCC 水溶液与 9 mL SFC NPs ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) 溶液混合，持续搅拌 12 小时。搅拌后，将混合物以 12000 rpm 离心 15 min，并用超纯水洗涤五次，以获得 Ce6/HSF NPs。将 Ce6/HSF 纳米粒子分散在超纯水中，并储存在 4 °C 冰箱中备用。

(3) 材料的表征

1) 扫描电镜 (SEM) 表征

使用扫描电子显微镜观察 Ce6/HSF 的微观结构。将 1 mg Ce6/HSF 并溶解于超纯水中，超声 10 min。然后将 10 μL Ce6/HSF 溶液滴加到硅片上并风干，制样三组以保证结果的真实性，最后置于导电胶上进行扫描电镜测试。

2) 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 表征

利用 FT-IR 进一步确定材料的化学结构。将 SF、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 HT/@Ce6/SF 样片烘干，去除水分带来的误差，然后将样品与溴化钾按 1: 200 的质量比充分混合，研磨成粉末状后压片制样，并使用仪器进行测试。

3) 紫外可见光谱 (UV-Vis) 表征

利用紫外可见光谱对样品进行表征。将 SF、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 制备成水溶液。分别取 3 mL 上述溶液加入到比色皿，使用仪器进行记录并分析。

4) Zeta 电位和粒径表征

通过材料表面电性的变化和粒径大小来证明材料的合成情况。将 SF、

HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 分别溶于超纯水，然后取 3 mL 样品进行测量并记录，实验重复 3 次，取平均值。

5) Ce6 释放检测

将相同浓度的 Ce6/HSF 分散在 2 mL pH 为 5.5 和 7.4 的 PBS 中，并用透析袋（MWCO=5000 Da）密封溶液。然后，将透析袋浸入 PBS 溶液中，并在室温下在黑暗中旋转。此外，每隔一定时间抽取 3 mL 样品，使用紫外-可见（UV-Vis）分光光度计在 660 nm 处测量吸光度。使用标准曲线获得 Ce6 含量。

药物释放速率（%）=（药物在 PBS 中的重量）/（药物在纳米颗粒中的初始重量）

2.2.2.2 光动力性能检测

（1）胞外活性氧检测

我们选择 1, 3-二苯基异苯并呋喃（DPBF）作为荧光探针来测量 Ce6/HSF NPs 产生的活性氧物质（ROS）。之所以选择 DPBF，是因为它对单线态氧具有高度特异性，并且与氧的结合是不可逆氧化的，这导致其在 UV-Vis 范围（410 nm）内的吸收强度迅速降低，从而达到测量目的^[87]。对照组（PBS）用于比较 SF、Ce6、HTCC 和 Ce6/HSF 的效果。在 2 mL DMSO 中制备含有 10 μ L DPBF（5mg mL⁻¹）的溶液，并在暴露于波长为 660 nm、强度为 0.5 W cm⁻² 的近红外激光时进行紫外-可见光谱分析。将相同浓度的 Ce6/HSF 分散在 2 mL pH 为 5.5 和 7.4 的 PBS 中，并用透析袋（MWCO = 5000 Da）密封溶液。然后，将透析袋浸入 PBS 溶液中，并在室温下在黑暗中旋转。此外，每隔一定时间抽取 3 毫升样品，使用紫外-可见（UV-Vis）分光光度计在 400 nm 处测量吸光度。使用标准曲线获得 Ce6 含量。

（2）胞内活性氧检测

使用 H2DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 的产生。MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌溶液与 PBS、Ce6 和 Ce6/HSF 溶液一起孵育过夜。随后将溶液以 4000 rpm 离心 5 min，然后除去上清液并用超纯水洗涤三次。随后将样品暴露于 10 μ M H2DCFH-DA 探针并孵育 30 min。使用波长

为 660 nm、功率密度为 0.5 W cm^{-2} 的 NIR 激光器照射样品 5 min。在荧光显微镜下观察之前，用超纯水冲洗除去多余的探针。

2.2.2.3 体外抗菌实验

(1) MIC 值测定

采用微量二倍稀释法测定最小抑菌浓度。在 96 孔板中制备浓度为 300、150、75、37.5、18.75 和 $9.38 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的药物溶液。每个孔用含有细菌的细菌稀释液处理，浓度为 $1 \times 10^6 \text{ CFU mL}^{-1}$ ，体积为 $100 \mu\text{L}$ 。然后将平板在 37°C 下孵育 16 小时，这被视为最低抑菌浓度 (MIC)。酶标记用于测量 OD_{595} 值。

(2) CFU 实验

CFU 实验更好地展示了抗菌效果。简单地说，稀释 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌样本，随后用 PBS、HTCC、HSF、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 处理。-NIR 组不接受光照射，而+NIR 组接受光照射 5 min。此外，选择不同浓度的 Ce6/HSF 处理 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌样本，并将各组暴露于近红外光下 5 min。确定 CFU 计数，并获得平板的照片。

(3) 流式细胞检测

以 PBS 为空白组，设置 Ce6、HTCC、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 四组平行对照。通过处理收集细菌细胞，染色（步骤如 LIVE-DEAD 染色），然后通过流式细胞仪检测凋亡。

(4) LIVE-DEAD 染色

将 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌与药物共培养。孵育结束后，在黑暗条件下使用活/死细菌染色试剂盒对细胞染色 30 min。染色结束后，用 PBS 洗涤三次，除去多余的染色溶液。将样品制备，并用荧光显微镜观察图像中的荧光共定位。

2.2.2.4 体外生物膜消除实验

稀释 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌过夜培养物，将 $200 \mu\text{L } 1 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$ 的 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌加入到 96 孔板中，在 37°C 培养 48 小时，形成生物膜。向不同孔板中分别加入浓度为 $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的 PBS、Ce6、HTCC、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 溶液。在 37°C 培养箱中孵育过夜，之后用 $100 \mu\text{L } 4\%$ 多聚甲醛固定样品 10 min，然后除去每个孔的上清液，接着用 $50 \mu\text{L}$ 结晶

紫（0.2 %）染色 30 min。用生理盐水清洗样品三次后，通过显微镜观察染色后的生物膜分布图像。自然风干后，加入 33 %乙酸溶液使生物膜完全溶解。使用酶标仪测量 OD₄₉₂ 值。

2.2.2.5 细菌形态学观察

使用扫描电子显微镜（SEM）拍摄用不同材料处理的细菌图像，以观察细菌细胞形态。与 Ce6/HSF 溶液孵育 1 小时，然后在 37℃进一步孵育 12 小时。用 2.5 %戊二醛将细胞固定过夜，第二天用 PBS 洗涤两次。然后将收集的细胞在乙醇梯度（35、50、70、80、95 和 100 %）中脱水，每次 15 min，整个处理过程在 4 °C 的低温下进行。将收集的细胞冷冻干燥。用扫描电镜（SEM）观察细胞形态。

2.2.2.6 体内抗菌实验

根据体重将体重约 30 ± 2 g 的八周大小鼠分成三组。它们被放在一个温度为 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，湿度为 50 %–60 %，有无菌水和专门饲料的房间里。观察他们 7–12 天，以监测他们体重的任何变化。在不同的实验组中建立创伤模型，包括 PBS 组、HTCC 组、Ce6 组、Ce6/SF 组和 Ce6/HSF 组，每组进行三个平行实验。在每只小鼠的背部造成直径约 1 cm 的圆形伤口。随后，将 100 μL MDR 金黄色葡萄球菌（ 10^8 CFU mL^{-1} ）样品加入到圆形伤口中。每天用浓度为 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 PBS、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 溶液处理小鼠伤口。然后用 660 nm 的激光照射伤口区域 5 min，在整个过程中记录体重的变化。在第 0、2、4、6、8 和 11 天拍摄伤口图像，以测量伤口大小随时间的变化。治疗完成后，对所有小鼠实施安乐死。

2.2.2.7 生物安全性检测

（1）细胞毒性

将 RAW264.7 细胞培养 24 小时后用 PBS 冲洗 2 次，随后去除培养液，分别加入不同浓度（0、12.5、25、50、100、150、200、300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）的培养液。再孵育 24 小时后，将溶液抽吸并丢弃。随后用 PBS 洗涤细胞，加入适量 CCK-8 染色液作用 30 min，最后用酶法测定吸光度值。

（2）HE 和 Masson 染色

通过解剖小鼠进一步证实了该材料的体内毒性，提取伤口部位的皮肤组织

和主要器官（心肝脾肺肾）并使用多聚甲醛固定剂保存。HE 和 Masson 染色结果用于评估材料的体内生物安全性。

（3）溶血实验

用 EDTA 和不同浓度的 Ce6/HSF 溶液（50、100、200、400、800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）处理绵羊新鲜血液，以 H_2O 为阳性对照，PBS 为阴性对照。将红细胞溶液与处理后的红细胞混合，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 1000 rpm 离心 5 min。96 孔板离心后，每孔提取 200 μL ，孵育 1、12、24 小时，在 570 nm 波长下检测。溶血率计算公式为：溶血率 = （样品吸光度 - 阴性对照吸光度） / （阳性对照吸光度 - 阴性对照吸光度）。

（4）血清生化指标

通过摘除小鼠眼球来获取血液，然后以 3000 rpm 离心 15 min，收集上清液，使用试剂盒进行检测。

2.3 实验结果与讨论

2.3.1 材料的表征

（1）SEM 分析

SEM 能够直观的反映纳米复合材料的形状。如图 2-2 所示，在 SEM 下，Ce6/HSF 纳米复合材料显示出近似球形的形状，这符合我们的预期设计，表明 Ce6/HSF 纳米复合材料的成功合成。

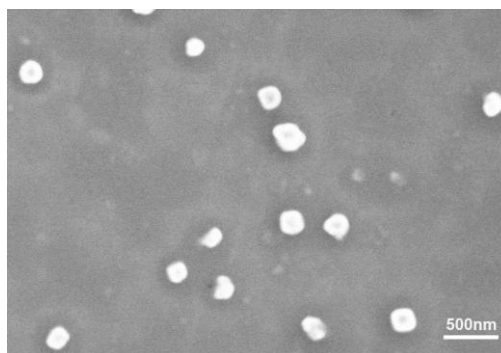


图 2-2. Ce6/HSF 的 SEM 图像。

Figure 2-2. SEM image of Ce6/HSF.

（2）紫外可见光（UV-Vis）分析

图 2-3 显示了 Ce6 在 405、505 和 656 nm 处出现特征吸收峰，而 Ce6/SF 在 220 nm 处出现吸收峰，这与 SF 的吸收峰一致。这证明 Ce6 成功

地与 SF 结合。Ce6/HSF 纳米复合材料在 375 nm 处具有蓝移的特征峰，在 514 和 671 nm 处具有红移的特征峰，表明 Ce6 成功地结合到 SF 和壳聚糖季铵盐上。

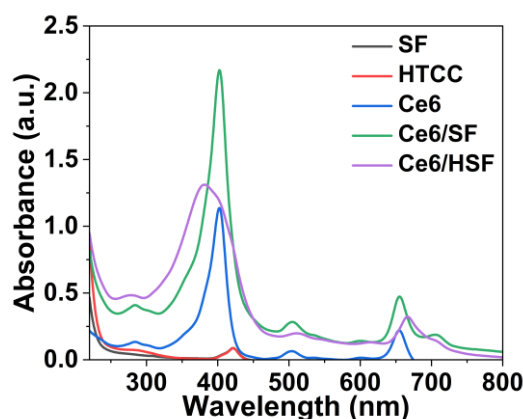


图 2-3. SF、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 的紫外-可见光谱。

Figure 2-3. UV-Vis spectra of SF, HTCC, Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF.

(3) 傅立叶红外光谱 (FT-IR) 分析

如图 2-4 所示，SF 在 1622 和 1514 cm^{-1} 的伸缩振动带分别属于酰胺 I 和酰胺 II 域。此外，Ce6 的 C-H 和 C-O 伸缩振动分别由 2926 和 1711 cm^{-1} 处的峰指示，1600 和 1238 cm^{-1} 处的峰分别归因于 Ce6 吡咯环的 N-H 和 C-N 伸缩振动。SF 与 Ce6 的成功结合由 2926 和 1622 cm^{-1} 处的特征峰证明。HTCC 在 1651 和 1485 cm^{-1} 的峰分别归因于 C-O 和 C-H 伸缩振动。与 Ce6/SF 相比，Ce6/HSF 在 1651 cm^{-1} 处的宽峰可能是由于季铵化离子与 Ce6/SF 的相互作用，证明 HTCC 成功地结合到 Ce6/SF 上。

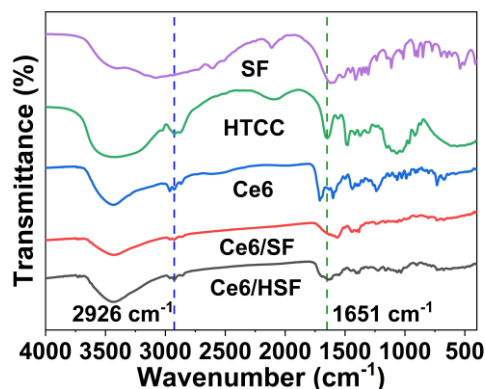


图 2-4. SF、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 的 FT-IR 光谱。

Figure 2-4. FT-IR spectrum of SF, HTCC, Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF.

(4) Zeta 电位分析

如图 2-5 所示, Ce6/HSF 纳米复合材料的 ζ 电势约为 49.78 mV, 这有利于带正电荷的纳米材料通过静电吸附与带负电荷的细菌表面接触, 从而增强 Ce6 对细菌的杀灭效果。

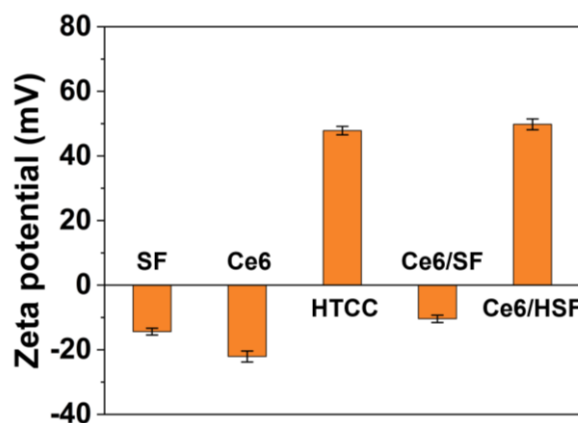


图 2-5. SF、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 的 Zeta 电位。

Figure 2-5. Zeta-potential of SF, HTCC, Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF.

(5) 粒径分析

如图 2-6 所示, Ce6/HSF 纳米复合材料的尺寸范围约为 250 至 300 nm。Ce6/HSF 纳米复合材料的流体动力学尺寸和分散系数在 7 天内没有显著变化, 这表明它们具有溶液稳定性。

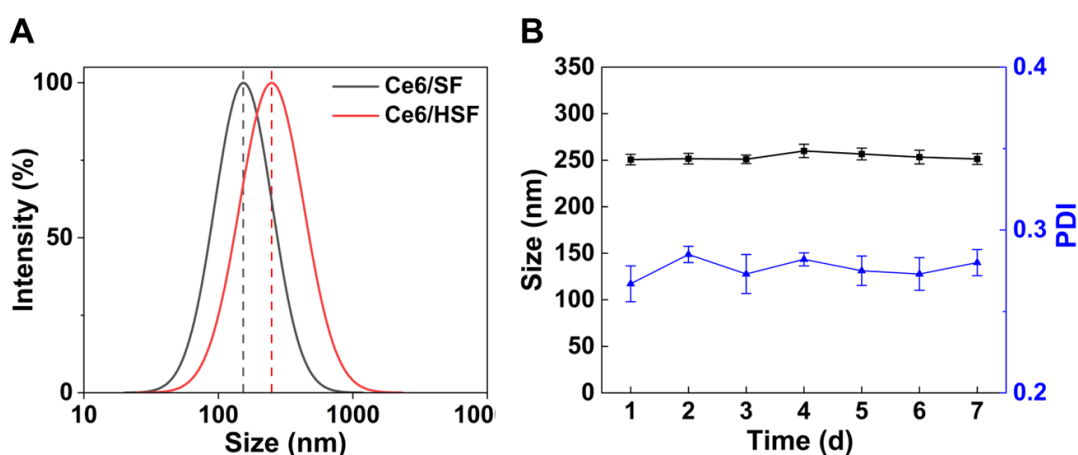


图 2-6. (A) Ce6/SF 和 Ce6/HSF 的尺寸。(B) HSF @ Ce6 在水溶液中 7 天的尺寸和分散系数。

Figure 2-6. Size of Ce6/SF and Ce6/HSF. (B) The size and dispersion coefficient of Ce6/HSF

inaqueous solution for 7 days.

(6) Ce6 的释放分析

Ce6 的释放量会影响材料的光动力效果。为了验证纳米颗粒的释放效率，将相同浓度的 Ce6/HSF 分散在 pH 7.4 和 5.5 的 PBS 中。图 2-7 显示 Ce6/HSF 的释放速率在 8 小时后达到最大值。此外，pH 5.5 的释放速率略高于 pH 7.4，这证明 Ce6/HSF 具有较弱的 pH 响应，可以在微酸性环境中释放更多的 Ce6。

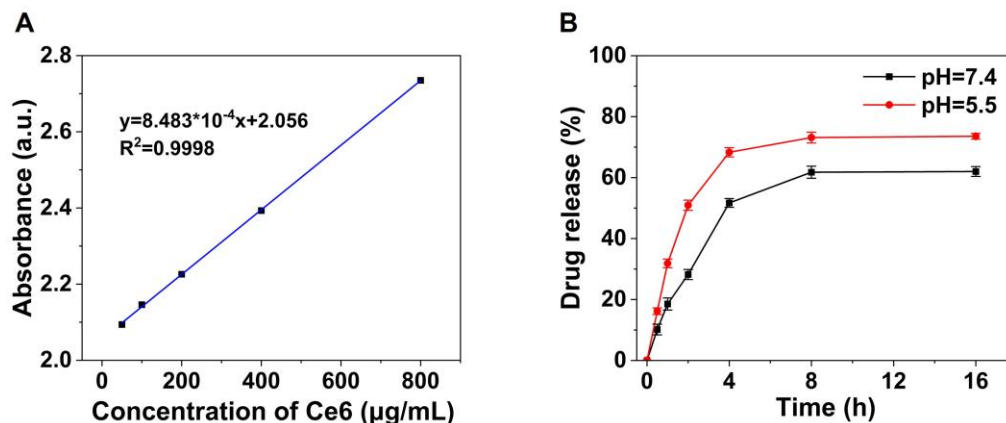


图 2-7. (A) Ce6 标准曲线。(B) Ce6/HSF 在 pH 为 7.4 和 5.5 的 PBS 中的药物释放。

Figure 2-7. (A) standard curve of Ce6. (B) Drug release of Ce6/HSF in PBS with pH 7.4 and 5.5.

2.3.2 光动力性能分析

(1) 胞外活性氧分析

我们使用 DPBF 探针监测 Ce6/HSF 纳米复合材料在 410 nm 下不同照射时间的吸光度变化，以验证 Ce6/HSF 纳米复合材料的单线态产氧能力，这在光动力抗微生物效果中起决定性作用。吸光度的下降速率与单线态氧的产生成正比。如图 2-8 所示，PBS、SF 和 HTCC 的吸光度显示出极弱的下降趋势，表明没有光动力效应。光敏剂 Ce6 的吸光度随着照射时间的增加而逐渐降低，表明光敏剂 Ce6 在单线态下具有良好的产氧能力。在 660 nm 激光照射下，Ce6/HSF 的吸光度显著降低，显示出与 Ce6 相似的 DPBF 消耗率。图 2-8F 显示 Ce6/HSF 的单线态氧产生速率在辐照 10 min 后与 Ce6 的几乎相同，这表明即使加入 HTCC 改性的 SF 也不会影响材料的整体单线态氧产生能力。

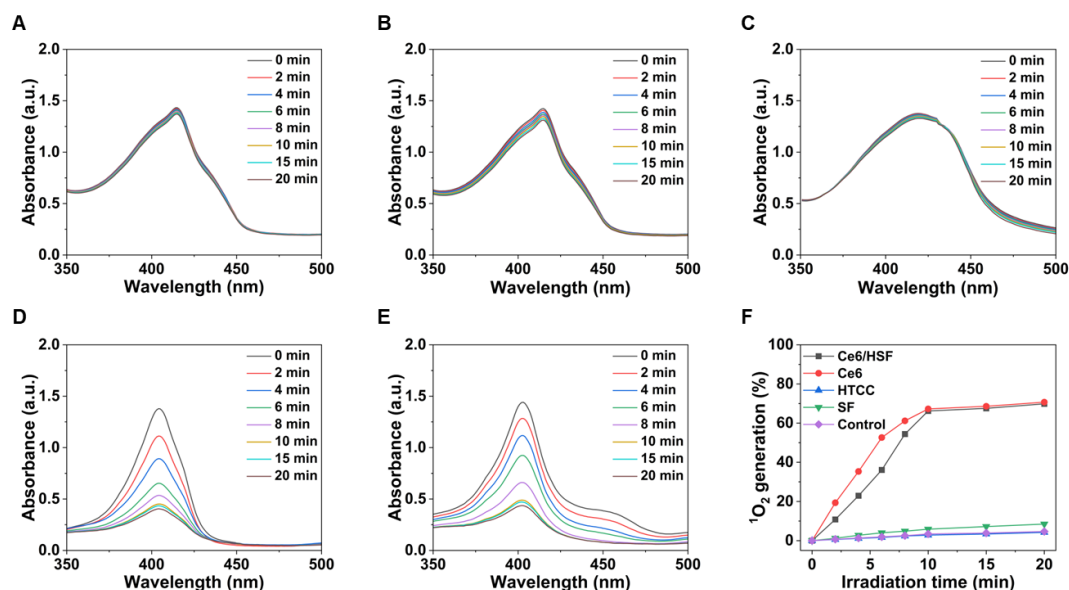


图 2-8.光触发产生 $^1\text{O}_2$ 。(A) PBS, (B) SF, (C) HTCC, (D) Ce6, (E) Ce6/HSF 纳米复合材料在 660 nm 激光下照射 20 min 的 DPBF 的紫外可见光谱和 (F) 各组单线态氧的生成百分比。

Figure 2-8. Photo-triggered generation of $^1\text{O}_2$. UV-Vis spectra of DPBF in (A) PBS, (B) SF, (C) HTCC, (D) Ce6 and (E) Ce6/HSF nanocomposites exposed to 660-nm laser for 20 min. (F) Percentage of singlet oxygen generation in each group.

(2) 胞内活性氧分析

Ce6 作为一种常用的光敏剂, 具有产生单线态氧的优异能力。此外, H2DCFH-DA 可以与单线态氧反应生成具有绿色荧光的 DCFH-DA, 从而证明了细菌中 ROS 的产生。图 2-9 中的对照组没有显示绿色荧光, Ce6 组显示最小的绿色荧光, 而 Ce6/HSF 组显示绿色荧光显著增加。这一观察证明 Ce6/HSF 可以在细菌细胞内产生大量的 ROS, 从而导致它们被根除。因此, 我们认为 Ce6/HSF 可以进入细胞, 在光照下积累并产生大量 ROS, 导致细菌死亡。

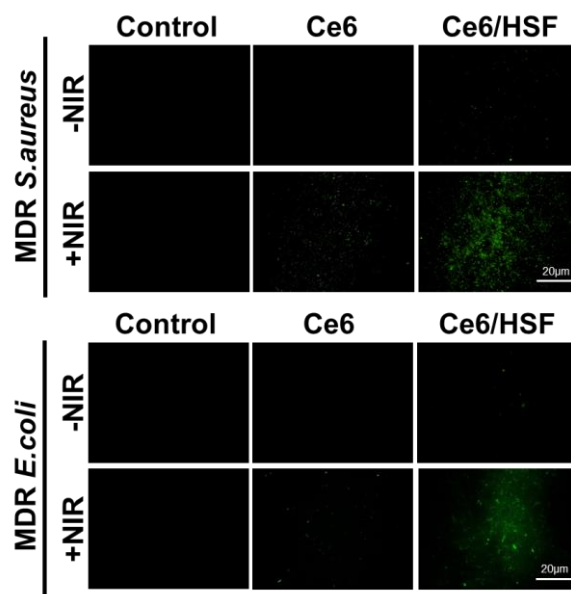


图 2-9. 荧光显微图像显示了在有光的情况下暴露于 PBS、Ce6 和 Ce6/HSF 的细菌中活性氧物种的存在。H₂DCFH-DA 探针与 ¹O₂ 反应，导致 DCFH-DA 的产生和绿色荧光的发射。

Figure 2-9. Fluorescence microscopic images illustrate the presence of reactive oxygen species within bacteria exposed to PBS, Ce6 and Ce6/HSF in the presence of light. The H₂DCFH-DA probe reacted with ¹O₂, resulting in the generation of DCFH-DA and emission of green fluorescence.

2.3.3 体外抗菌实验分析

(1) MIC 值分析

鉴于 Ce6/HSF 具有优异的产活性氧能力，我们通过体外抗菌实验来评估该材料的抗菌效果。表 2-3 显示了纳米材料对几种常见细菌的基本最低抑菌浓度。与 MDR 大肠杆菌相比，Ce6/HSF 对 MDR 金黄色葡萄球菌具有更好的效果。

表 2-3 不同材料的 MIC 值 (μg mL⁻¹)

Table 2-3 MIC values of different materials (μg mL⁻¹).

Bacteria	Ce6	Ce6/SF	Ce6/HSF	Kanamycin	Ampicillin
<i>E. coli</i>	>150	100±10	60±10	2±2	4±2
<i>S. aureus</i>	100±10	80±10	40±10	3±2	3±2
MDR <i>E. coli</i>	>150	110±10	70±10	7±3	6±3
MDR <i>S. aureus</i>	120±10	90±10	50±10	3±3	6±3

(2) CFU 分析

使用常规涂片法^[88]评估 Ce6/HSF 对 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌的光动力抗菌效果 (图 2-10A 和 B)。当用 Ce6/HSF ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) 加光 (0.5 W cm^{-2} , 10 min) 处理 MDR 细菌时, 在平板上几乎没有发现菌落, 但在相同光条件下用 Ce6 处理的 MDR 细菌中约有一半存活。在没有光照的情况下, Ce6/HSF 和游离 Ce6 组中的菌落显示出极弱的杀菌作用, 这可能是由于纳米颗粒本身的物理抗菌作用。此外, 我们评估了 HTCC、HSF 和 Ce6/SF 处理的 MDR 菌的生存能力, 以验证其他材料的杀菌潜力。观察到 HTCC 和 HSF 在有光或无光的情况下没有显示出显著的杀菌效果, Ce6/SF 的杀菌效果也低于 Ce6/HSF。结果显示 Ce6/HSF 在光照条件下可杀死 99.2 % 的 MDR 金黄色葡萄球菌和 97.1 % 的 MDR 大肠杆菌 (图 2-10C 和 D)。此外, $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Ce6/HSF 与 50 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 相比具有明显的抑菌效果 (图 2-11)。

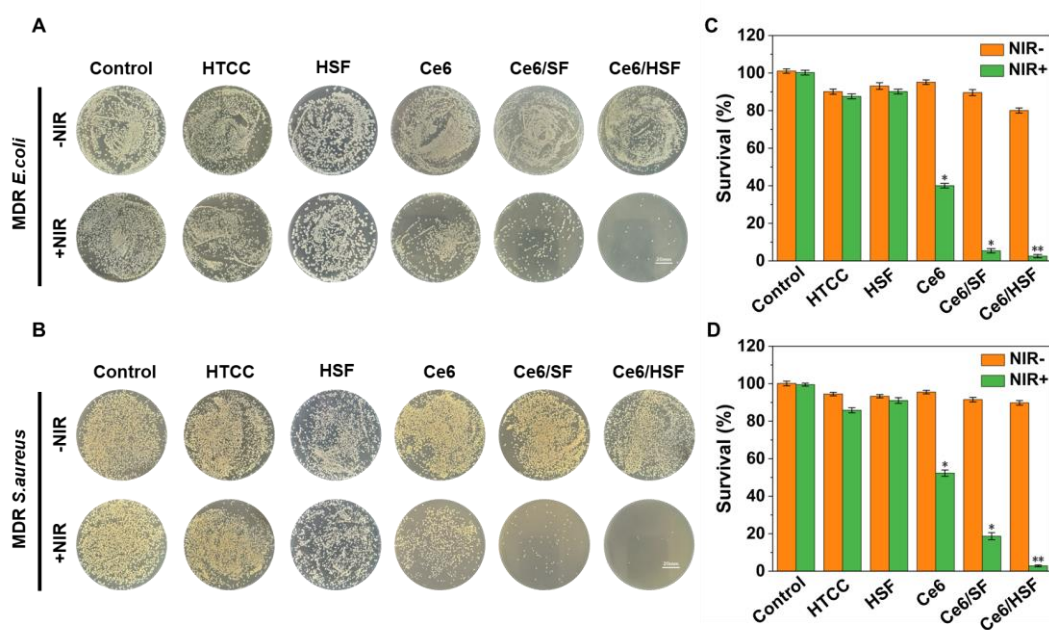


图 2-10. 体外抗菌活性。PBS、HTCC、HSF、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 在黑暗或光照条件下 (0.5 W cm^{-2} , 10 min) 处理 (A) MDR 大肠杆菌和 (B) MDR 金黄色葡萄球菌获得的平板图片以及 (C) MDR 大肠杆菌和 (D) MDR 金黄色葡萄球菌的相对存活数据。数据表示为平均标准偏差, $n = 3$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 2-10. In vitro antibacterial activity. PBS, HTCC, HSF, Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF were used to treat (A) MDR *E. coli* and (B) MDR *S. aureus* in the dark or under light exposure (0.5 W cm^{-2} , 10 min). The corresponding relative survival data of (C) MDR *E. coli* and (D) MDR *S.*

aureus were obtained. The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.005$.

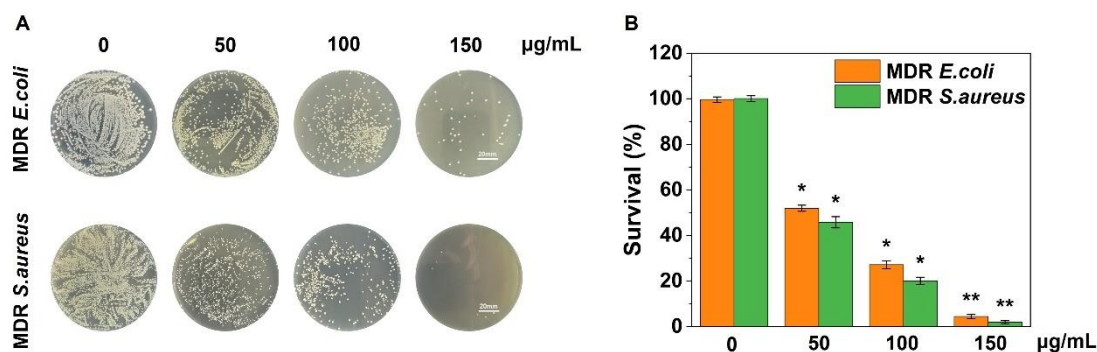


图 2-11. 体外抗菌活性。(A) 使用不同浓度的 Ce6/HSF 在黑暗或光照下 (0.5 W cm^{-2} , 10min) 处理 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌。(B) 获得了 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌的相应相对存活率数据。数据表示为平均标准偏差, $n = 3$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 2-11. In vitro antibacterial activity. (A) Different concentrations of Ce6/HSF were used to treat MDR *E. coli* and MDR *S. aureus* in the dark or under light exposure (0.5 W cm^{-2} , 10 min). (B) The corresponding relative survival data of MDR *E. coli* and MDR *S. aureus* were obtained.

The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.005$.

(3) 流式细胞分析

流式细胞仪用于量化存活和死亡细菌的数量, 并验证 CFU 计数结果。如图 2-12 所示, 经 Ce6/HSF 处理后, MDR 金黄色葡萄球菌和 MDR 大肠杆菌的死亡率分别为 97.86 %和 94.85 %, 表明 Ce6/HSF 纳米复合材料具有优异的抗菌效果。

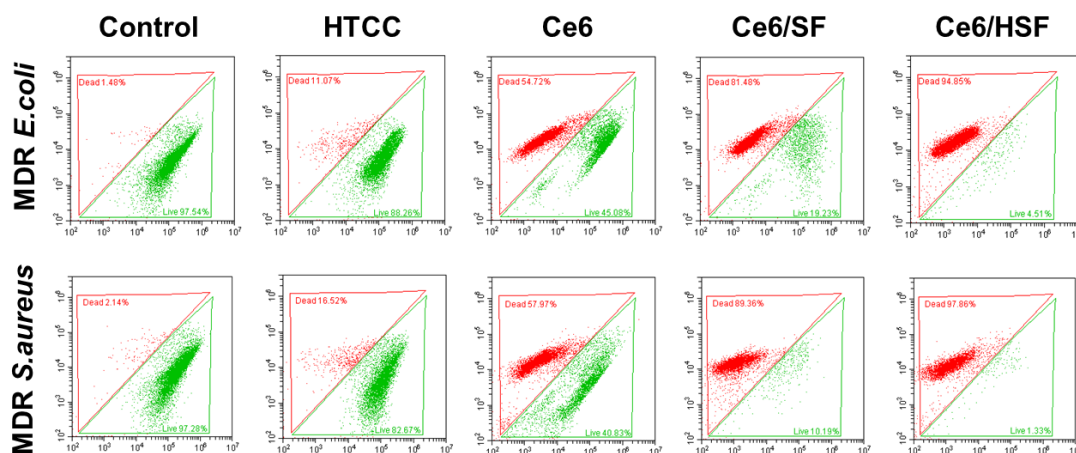


图 2-12. 流式细胞仪分析细胞凋亡结果。PBS 为空白组，HTCC、Ce6 为对照组，Ce6/SF、Ce6/HSF 为实验组，所有组均接受 NIR 照射。

Figure 2-12. Analysis of apoptosis results using flow cytometry. PBS served as the control group, whereas HTCC, Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF were the experimental groups. All groups were irradiated with NIR.

(4) LIVE-DEAD 染色分析

基于先前的相关发现，我们考虑使用活/死染色法来评估 Ce6/HSF 纳米复合材料的抗菌活性。如图 2-13A 所示，对照组主要呈现绿色荧光，表明在没有药物干预的情况下细菌的生存力保持不变。HTCC 组表现出与对照组相似的情况，而作为对照组的 Ce6 给药表现出显著的红色荧光和有限的绿色荧光。这一观察结果可归因于 Ce6 产生活性氧的非凡能力。当用 Ce6/HSF 处理时，几乎没有绿色荧光出现，表明 Ce6/HSF 纳米复合材料表现出良好的杀菌效果。此外，Ce6/HSF 纳米复合材料对 MDR 金黄色葡萄球菌表现出类似的杀菌效果（图 2-13B）。

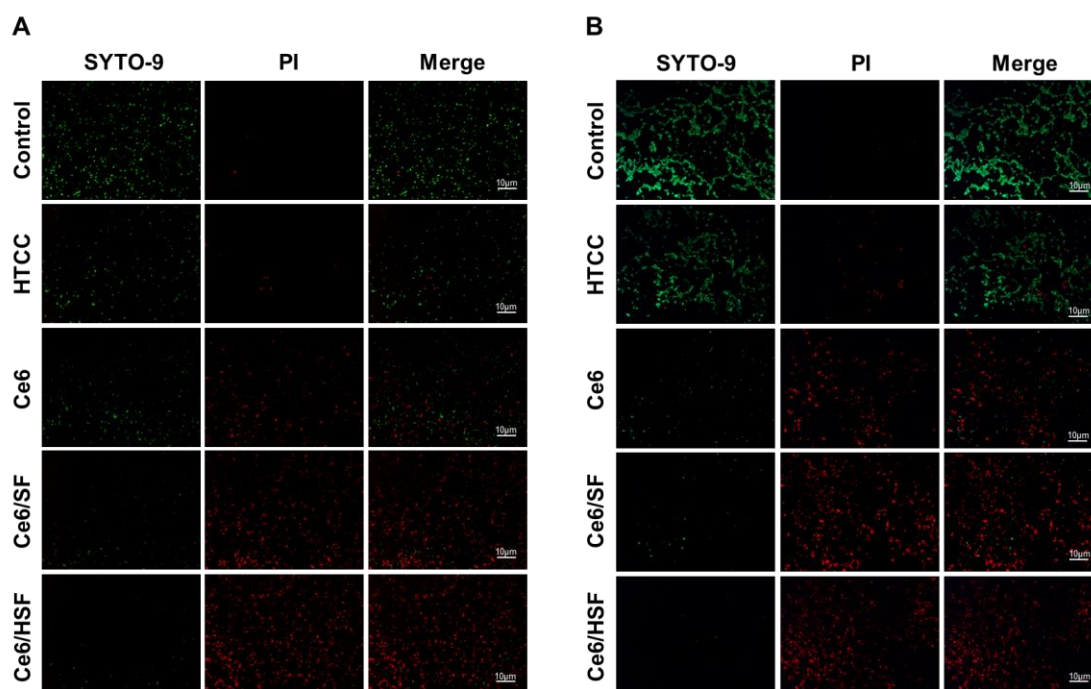


图 2-13. (A) MDR 大肠杆菌和 (B) MDR 金黄色葡萄球菌的细胞荧光显微图像。在光照 (0.5 W cm^{-2} , 5 min) 下用 PBS、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 处理的细菌用 SYTO9/PI 染色。

Figure 2-13. Cell fluorescence microscopic image of (A) MDR *E. coli* and (B) MDR *S. aureus*.

Bacteria treated with PBS, HTCC, free Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF under illumination (0.5 W cm^{-2} , 5 min) were stained with SYTO9/PI.

(5) 细胞摄取分析

使用波长为 561 nm 的激光激发 Ce6 中的红色荧光。DAPI 透过细胞膜并与细胞内的 DNA 结合，产生强烈的蓝色荧光。观察到的粉红色荧光源于共焦蓝光和红光的合并。图 2-14 显示了从细胞摄取实验中获得的激光共聚焦图像。在对照组中没有检测到红色荧光，而在 Ce6 组中发现了大量表现出强蓝色荧光的活细菌细胞。Ce6 的掺入导致突出的粉红色荧光，表明成功的细胞摄取。Ce6/HSF 组在与蓝色荧光结合后出现红色荧光，证明 Ce6/HSF 被细胞吸收。

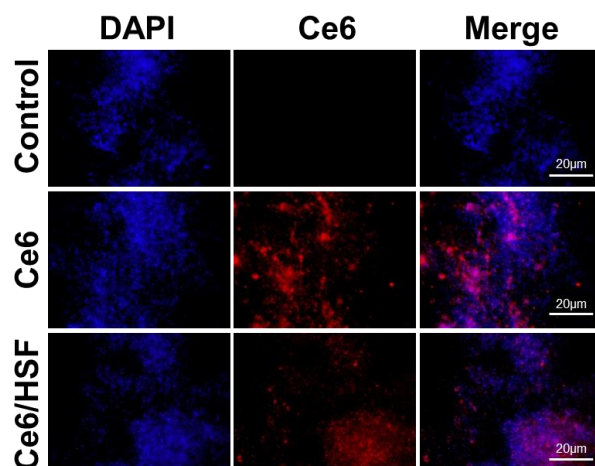


图 2-14. 用 PBS、Ce6 和 Ce6/HSF 处理的 MDR 金黄色葡萄球菌细胞的荧光显微图像。

Figure 2-14. Fluorescence micrograph of MDR *S aureus* cells after treatment with PBS, Ce6 and Ce6/HSF.

2.3.4 体外生物膜消除实验分析

生物膜作为细菌对抗外来药物的固有防御机制发挥作用，根除生物膜代表了对抗细菌耐药性的高效策略。采用 CV 染色^[89]评估 Ce6/HSF 抑制生物膜形成的潜力。如图 2-15A 显示，对照组（PBS）呈现深紫色，表明形成了更大量的生物膜。HTCC 组没有显示出抑制作用。Ce6 和 Ce6/SF 组显示出微弱的生物膜消除。与其他处理相比，用 Ce6/HSF 处理的生物膜显示出优越的生物膜消除。这可能是由于 Ce6 可以在光的存在下将氧转化为活性氧，杀死生物膜表层的活性细菌并加剧生物膜的厌氧状态，从而有效地从生物膜内部去除细菌并抑制生物膜的再生长。图 2-15B 和 C 所示的结果表明 Ce6/HSF 纳米复合材料对 MDR 大

肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌形成的生物膜表现出显著的抑制效果。

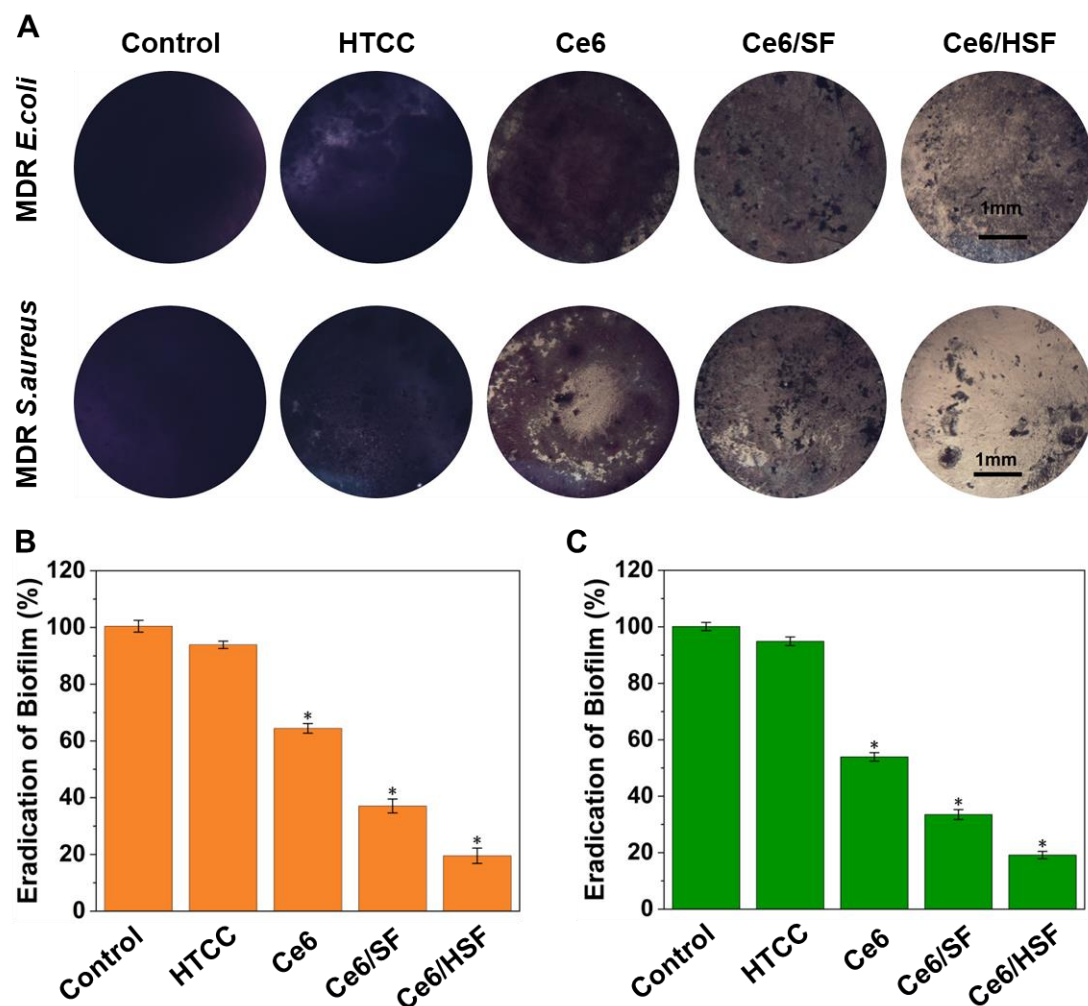


图 2-15. (A) 在光照条件下，对使用 PBS、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 处理的 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌的生物膜进行了代表性图像拍摄 (0.5 W cm^{-2} , 10 min)。

(B 和 C) 是相应的生物膜消除率。数据表示为平均标准偏差， $n = 3$ 。* $P < 0.05$ ，

** $P < 0.01$ 。

Figure 2-15. (A) Under light conditions, representative images of biofilm of MDR *Escherichia coli* and MDR *Staphylococcus aureus* treated with PBS, HTCC, Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF were taken (0.5 W cm^{-2} , 10 min). (B and C) Corresponding biofilm elimination rates. The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$, * $P < 0.05$.

2.3.5 细菌形态学分析

用扫描电镜观察细菌细胞的形态变化。图 2-16 显示，未处理的细菌细胞主要保持其结构完整性，而那些暴露于 Ce6 处理的细菌细胞显示出轻微的分裂，

这表明 Ce6 对细菌的有害影响。相比之下，用 Ce6/HSF 处理的细菌细胞显示出更明显的细胞膜物理破裂和裂解，导致形态显著变形。这可能归因于带正电荷的 Ce6/HSF 与带负电荷的细菌细胞膜发生相互作用，导致细胞损伤和随后内源性物质的释放。这有助于减少生物膜中的缺氧，并使 PDT 更有效。因此，Ce6/HSF 纳米复合材料表现出良好的杀菌效果，这可能是通过破坏细胞膜实现的。

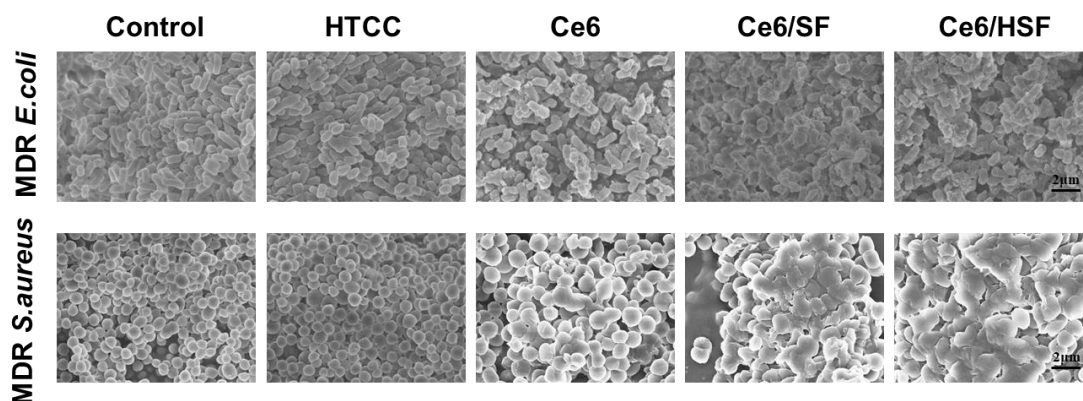


图 2-16. 在光照 (0.5 W cm^{-2} , 10 min) 下用 PBS、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 处理的 MDR 大肠杆菌和 MDR 金黄色葡萄球菌的 SEM 图像。

Figure 2-16. SEM images of MDR *E. coli* and MDR *S. aureus* treated with PBS, HTCC, Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF under illumination (0.5 W cm^{-2} , 10 min).

2.3.6 体内抗菌实验分析

小鼠的伤口图像用于评估纳米材料的抗菌和伤口愈合效果。如图 2-17A 所示，经过 11 天的治疗后，对照组小鼠的伤口变化很小。相反，HTCC 和 Ce6 组的小鼠表现出改善的迹象；然而，在治疗周期结束时仍然观察到残余伤口区域。相反，与对照组相比，接受 Ce6/HSF 的小鼠表现出显著增强的伤口愈合。此外，与对照组相比，所有治疗组都表现出优异的伤口愈合效果，Ce6/HSF 显示出优异的结果。如图 2-17B 所示，治疗 11 天后，所有五组小鼠的体重都保持稳定，表明纳米材料对小鼠没有明显的毒副作用。图 2-17C 显示了伤口面积的变化曲线，表明经过 11 天的药物和光照治疗后，伤口愈合取得了实质性进展。值得注意的是，Ce6/HSF 组的伤口面积显著减少了约 89.93 %。

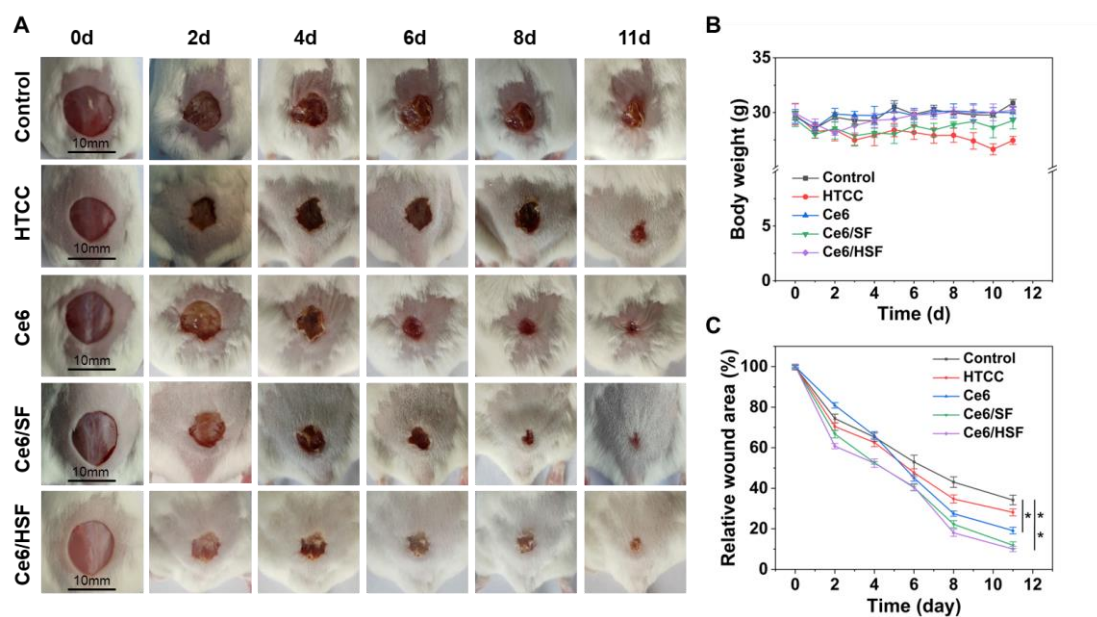


图 2-17. 小鼠伤口感染的治疗。(A) 在光存在下用 PBS、HTCC、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 处理的伤口的图像。(B) 治疗期间的体重变化。(C) 小鼠相对伤口面积的改变。数据表示为平均标准偏差, $n = 3$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 2-17. Treatment of wound infection in mice. (A) Images of wounds treated with PBS, HTCC, Ce6, Ce6/SF and Ce6/HSF in the presence of light. (B) Weight changes during treatment. (C) Modifications in the relative wound area of mice. The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$, * $P < 0.05$.

2.3.7 生物安全性评估

(1) 细胞毒性

材料的生物安全评估是任何医疗应用中最重要方面。根据我们的 CCK-8 结果 (图 2-18), 我们发现 Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/HSF 在 $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的浓度下测试时对 RAW264.7 细胞没有表现出明显的毒性。

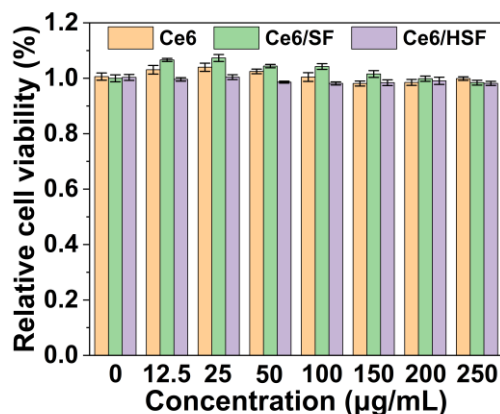


图 2-18. 在 RAW264.7 细胞中加入不同材料的毒性评估。

Figure 2-18. Toxicity evaluation of different materials added to RAW264.7 cells.

(2) H&E 和 Masson 染色

根据小鼠伤口组织的 H&E 染色结果（图 2-19）显示，对照组中存在明显的蓝紫色区域，这表明存在炎性细胞^[90]。与对照组相比，在 HTCC 组中观察到相似比例的炎性细胞，而 Ce6 和 Ce6/SF 组均表现出炎症减轻和炎性细胞减少。重要的是，在 Ce6/HSF 组中没有检测到可辨别的炎性细胞，表明创伤组织完全恢复到其正常状态。在 Ce6/HSF 组中，Masson 染色显示出更强烈的蓝色，表明胶原纤维形成增强和真皮含量增加。此外，损伤部位的胶原沉积也有显著改善。这些发现表明使用 Ce6/HSF 纳米复合材料可以有效地促进疤痕再生和加快伤口愈合。

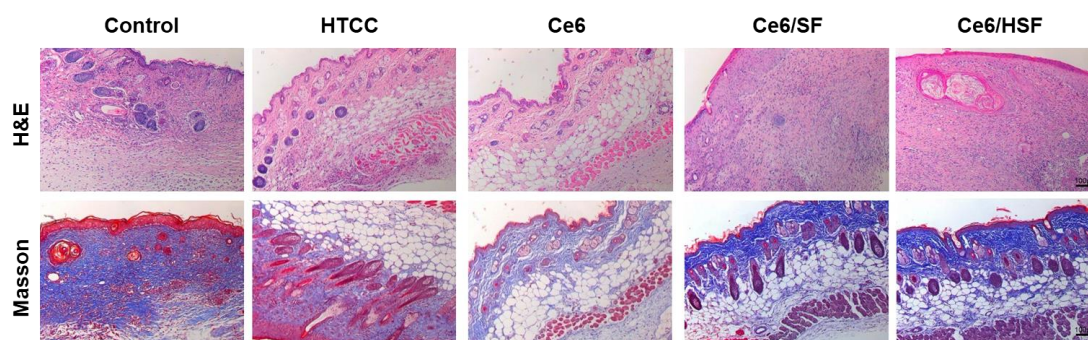


图 2-19. 小鼠伤口组织的 H&E 和 Masson 染色的结果。

Figure 2-19. H&E and Masson staining results of wound tissue in mice.

图 2-20 显示了接受材料治疗的小鼠的主要器官的组织病理学染色结果，包括心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏。在对照组和实验组中都没有观察到明显的组织损伤或炎症反应。这些发现表明 Ce6/HSF 在体内表现出最小的细胞毒性，并且不会对小鼠造成显著伤害。

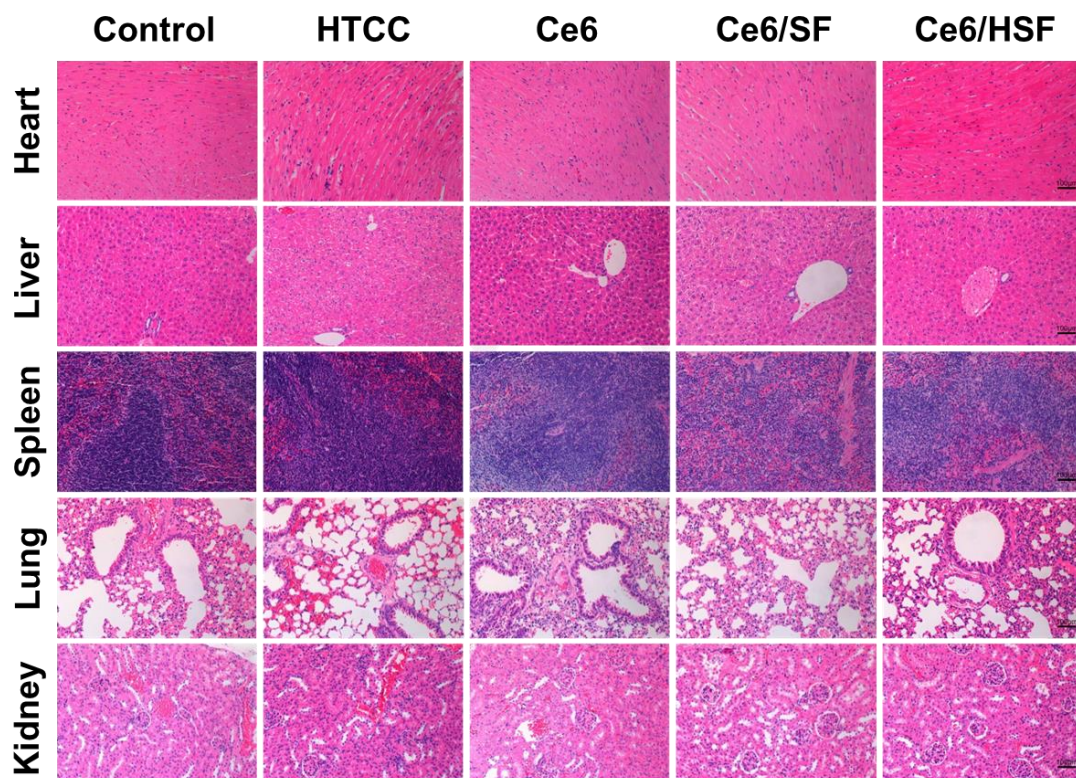


图 2-20. 用不同材料处理的小鼠的心、肝、脾、肺和肾的 H&E 染色结果。

Figure 2-20. Results of H&E staining of heart, liver, spleen, lung and kidney of mice treated with different materials.

(3) 溶血实验

图 2-21A 显示了 Ce6/HSF 在 1、12 和 24 小时后的溶血状态。图 2-21B 显示了相应的溶血率。在进行实验后，我们观察到 Ce6/HSF 在 $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的浓度下孵育 12 小时后的溶血率略高于 5 %。同样，在 $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的浓度下孵育 24 小时后的溶血率接近但不超过 5 %，进一步证明了 Ce6/HSF 纳米复合材料的生物安全性。

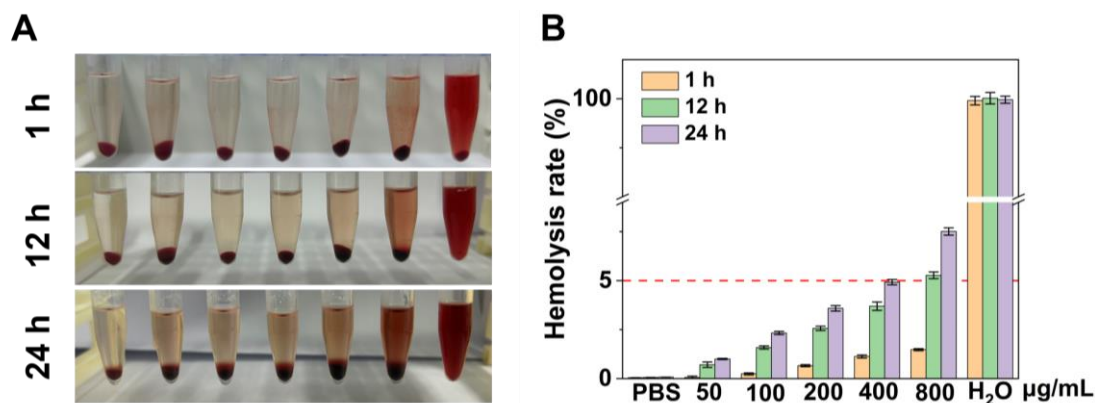


图 2-21. (A) 在 24 小时内用不同浓度的 Ce6/HSF 处理的绵羊红细胞的溶血的图像，和

(B) 相应的溶血率。

Figure 2-12. (A) images of hemolysis of sheep red blood cells treated with different concentrations of Ce6/HSF within 24 hours, and (B) corresponding hemolysis rate.

(4) 血清生化指标

图 2-22 显示小鼠各项血清生化指标均处于正常范围内，无明显异常。这项研究中产生的纳米材料显示出与活生物体的优异兼容性，并为未来的探索 and 实际应用提供了巨大的潜力。

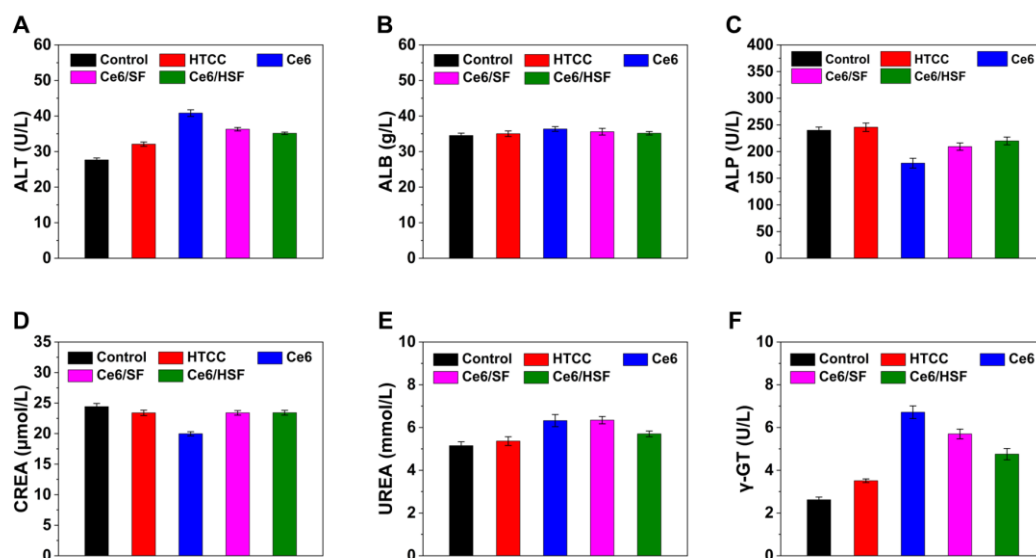


图 2-22. 用不同材料处理的雌性大鼠的常规血液检查，包括材料对肝功能指数 (A) ALT、(B) ALB、(C) ALP 的影响，对肾功能指数 (D) CREA、(E) UREA 的影响，以及对 (F) γ -GT 的影响。

Figure 2-22. Routine blood tests of female rats treated with different materials include the effects of materials on liver function indexes (A) ALT, (B) ALB and (C) ALP, renal function indexes (D) CREA and (E) UREA, and (F) γ -GT.

2.4 本章小结

我们成功合成了一种包含光动力和阳离子聚合物的纳米复合材料，用于有效根除耐药细菌和生物膜。合成的 Ce6/HSF 纳米复合材料不仅具有良好的分散性和均匀的尺寸 (245-300 nm)，而且具有产生单线态氧的优异能力。此外，Ce6/HSF 纳米复合材料可以消除生物膜并通过静电吸附与细菌表面接触。这增强了 PS 的靶向效果，使 Ce6/HSF 能够迅速进入耐药细菌并产生 ROS 以杀死暴

露在光线下的 MDR 细菌。在感染 MDR 金黄色葡萄球菌的小鼠身上进行的实验证明了 Ce6/HSF 纳米复合材料的抗菌效果和促伤口愈合特性。溶血、血清生化指标等实验表明该纳米复合材料具有良好的生物安全性。总之，本研究中合成的 Ce6/HSF 纳米复合材料可有效抵抗耐药 MDR 细菌感染并消除生物膜，显示出临床应用的潜力。

第3章 光热型纳米丝素蛋白载体负载二氢卟吩 e6 的光热/光动力联合抗耐药菌研究

3.1 引言

细菌感染继续构成重大的全球健康挑战，MDR 细菌和生物膜的出现使治疗方案进一步复杂化。泛耐药细菌的兴起，加上新抗生素的缓慢发展，凸显了对新治疗策略的迫切需求。近年来据有关统计数据显示，人类疾病和死亡的很大一部分是由细菌性疾病引起的，细菌生物膜和细菌耐药性造成的损害是社会经济和公共卫生的主要负担。作为一种生存策略，大多数细菌在合适的条件下会形成生物膜^[91]。生物膜状态的细菌比游离状态的细菌对药物的耐药性更强，这是临床难治性感染的主要原因之一^[92]。因此，开发一种能够有效清除耐药菌形成的生物膜的新型抗菌纳米材料就显得非常急迫。

基于生物膜微环境下，我们在上一章构建了负载二氢卟吩 e6 的 Ce6/HSF 纳米复合材料，研究了其光动力消除耐药菌和生物膜作用。然而上述材料在进行光动力治疗时，对于 MDR 大肠杆菌的治疗效果没有像 MDR 金黄色葡萄球菌一样优异。为了更提高对耐药菌的抑制效果，我们选择在纳米载体表面添加光热能力，以增强对 MDR 大肠杆菌的抗菌效果。用聚多巴胺（PDA）代替壳聚糖季铵盐，在丝素蛋白载体表面包裹一层聚多巴胺。PDA 可以作为光热剂，为材料增加光热能力。

PDA 作为一种以贻贝为灵感材料，具有制备工艺简单、光热转移效率高、生物相容性优异、药物结合能力强、粘接性能强等众多有利性能特点，在生物医学领域显示出巨大的潜力^[93-95]。光敏剂 Ce6 可以产生大量的活性氧来抑制耐药菌，但是单一的 PDT 疗法难以达到理想的抑菌效果。因此，我们选择将 PTT 与 PDT 两种疗法联合来对抗细菌感染。在本研究中，我们合成了 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料，利用 PTT 产生的高温和 PDT 产生的 ROS 来抑制耐药菌并消除生物膜。本研究为开发抗菌纳米复合材料提供了一个新的参考，以期后续的研究提供参考价值。

3.2 实验材料与方法

3.2.1 实验材料

3.2.1.1 实验试剂

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagent

试剂名称	生产厂家
丝素蛋白 (SF)	上海麦克林生化科技股份有限公司
二氢卟吩-e6 (Ce6)	上海麦克林生化科技股份有限公司
盐酸多巴胺 (DA·HCl)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
Tris-盐酸缓冲液 AR	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
1, 3-二苯基异苯并呋喃 (DPBF, 97 %)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
溴化钾 (KBr)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
琼脂粉	北京索莱宝科技有限公司
酵母提取物	上海生工生物工程有限公司
胰蛋白胨	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠 AR	国药集团化学试剂有限公司
丙酮	国药集团化学试剂有限公司

3.2.1.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental equipment

仪器名称	型号	生产厂家
恒温磁力搅拌器	SZCL-2	上海岐耀设备有限公司
紫外可见分光光度计	UV-3600	日本岛津公司
傅立叶红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
高速冷冻离心机	Z 326k	德国赫姆勒公司
超净工作台	BJ-2CD	上海博迅医疗生物有限公司

3.2.1.3 细菌来源

细菌来源同 2.2.1.3。

3.3.1 实验方法

3.3.1.1 材料的合成与表征

(1) Ce6/SF-PDA 纳米复合材料合成图

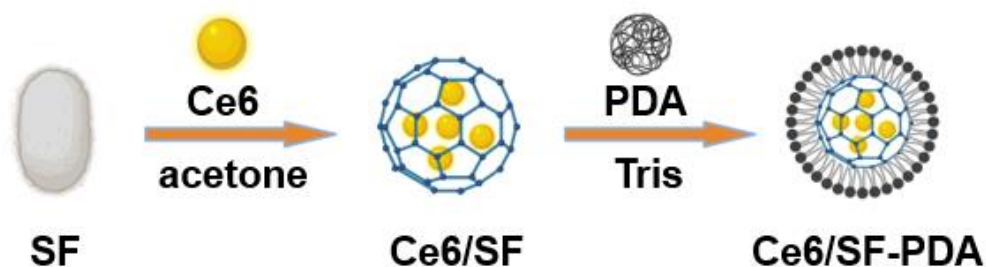


图 3-1. Ce6/SF-PDA 的合成图。

Figure 3-1. Synthetic diagram of Ce6/SF-PDA.

(2) Ce6/SF-PDA 纳米复合材料的合成

1) Ce6/SF 的合成：合成方法如 2.3.1 所述。

2) Ce6/SF-PDA 的合成：将 5 mg Ce6/SF 置于含有 2 mg mL⁻¹ 多巴胺的 tris-HCl 溶液（10 mM, pH 8.5）中。搅拌 12 小时后，在 12000 rpm 下离心 20 min，用超纯水反复洗涤 3 次后，获得 Ce6/SF-PDA。将 Ce6/SF-PDA 纳米粒子分散在超纯水中，并储存在 4 °C 冰箱中备用。

(3) Ce6/SF-PDA 纳米复合材料的表征

1) 扫描电镜（SEM）表征

步骤同 2.2.2（1）。

2) 傅立叶变换红外光谱（FT-IR）表征

步骤同 2.2.2（2）。

3) 紫外可见光谱（UV-vis）表征

步骤同 2.2.2（3）。

4) Zeta 电位和粒径表征

步骤同 2.2.2（4）。

3.3.1.2 光热性能评估

(1) 浓度对温度变化的影响

用波长为 808 nm，强度为 1.5 W cm^{-2} 的激光照射不同浓度的 Ce6/SF-PDA 溶液（50、100、150、200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）10 min，每隔 1 min 记录一次温度变化。

（2）功率对温度变化的影响

用不同功率（0.5、1、1.5、2 W cm^{-2} ）的 808 nm 激光照射 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 Ce6/SF-PDA 溶液 10 min，每隔 1 min 记录一次温度变化。

我们通过以下方程计算 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料转换效率（ η ），其中 τ_s 从冷却曲线的线性回归分析中获得。 M_d 和 C_d 是 Ce6/SF-PDA 溶液的质量和比热容。没有光热剂的背景能量输入表示为 Q_0 ，而水的稳态最高温度由 $T_{\max, \text{water}}$ 表示， T_{surr} 指的是室温^[96]。 $T_{\max}$ 代表 Ce6/SF-PDA 溶液达到稳定时的最高温度， I 表示激光功率， A_{808} 对应于 Ce6/SF-PDA 在 808 nm 处的吸光度。

$$\tau_s = M_d C_d / hS$$

$$Q_0 = hS (T_{\max, \text{water}} - T_{\text{surr}})$$

$$\eta = hS (T_{\max} - T_{\text{surr}}) - Q_0 / I(1 - 10^{-A_{808}})$$

3.3.1.3 光动力性能评估

实验步骤如 2.3.2 所述。

3.3.1.4 体外抗菌实验

实验步骤如 2.3.3 所述。

3.3.1.5 生物安全性检测

（1）细胞毒性实验

实验步骤如 2.3.6 所示。

（2）溶血实验

实验步骤如 2.3.6 所示。

3.4 结果与讨论

3.4.1 材料的表征

（1）扫描电镜（SEM）分析

如图 3-2 所示，所合成的 Ce6/SF-PDA 呈现近似球状，表面包裹了一层粘性的 PDA，尺寸在 190 nm 左右，这与我们的预期设计较为符合。

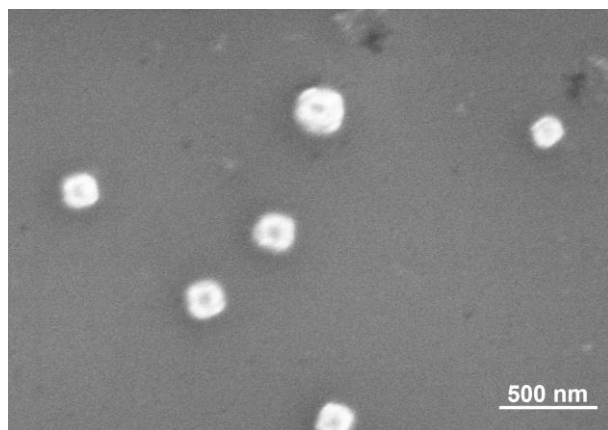


图 3-2. Ce6/SF-PDA 的扫描电镜图片。

Figure 3-2. SEM image of Ce6/SF-PDA.

(2) 紫外可见光 (UV-Vis) 分析

图 3-3 显示, Ce6/SF-PDA 在 300-400 nm 范围内有着强烈的吸收峰, 这是来自 Ce6 的峰。在 200 nm 处显示了向上的趋势, 这是由于其键位发生了改变所引起的, 说明 PDA 与 Ce6/SF 之间成功结合。

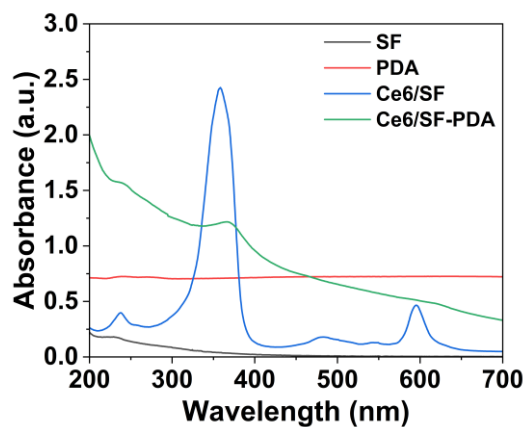


图 3-3. SF、PDA、Ce6/SF 和 Ce6/SF-PDA 紫外可见光谱。

Figure 3-3. UV-vis of SF, PDA, Ce6/SF and Ce6/SF-PDA.

(3) 傅立叶红外光谱 (FT-IR) 分析

图 3-4 显示, Ce6/SF-PDA 和 SF 在 1585 cm^{-1} 中出现相同的峰, 这是由 SF 中的酰胺 II 区域伸缩振动引起。同时, 在 1443 cm^{-1} 处显示了 PDA 的特征峰, 表明 PDA 成功修饰在 Ce6/SF 表面。因此, 由傅立叶红外光谱得出 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料成功合成。

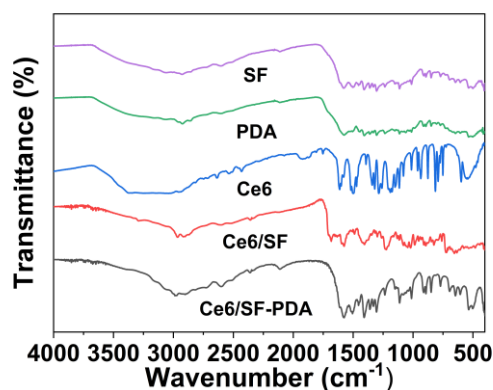


图 3-4. SF、PDA、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/SF-PDA 的红外图谱

Figure 3-4. FT-IR of SF, PDA, Ce6, Ce6/SF and Ce6/SF-PDA.

(4) Zeta 电位分析

如图 3-5 所示，单独的 PDA 和 Ce6 表面电性均为负值，丝素蛋白包裹 Ce6 后电荷发生变化。加入 PDA 后，其电位从 -11.43 mV 下降到了 -18.06 mV，说明 PDA 成功与 Ce6/SF 结合。

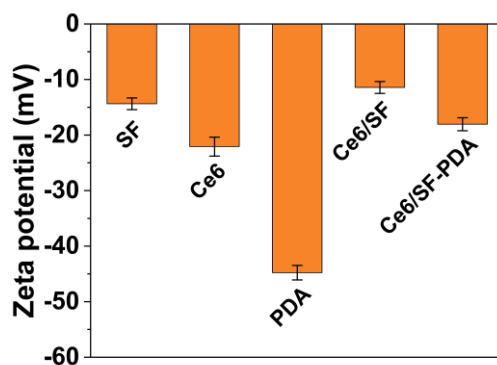


图 3-5. SF、PDA、Ce6、Ce6/SF 和 Ce6/SF-PDA 的 Zeta 电位。

Figure 3-5. Zeta potential of SF, PDA, Ce6, Ce6/SF and Ce6/SF-PDA.

(5) 粒径分析

使用粒径仪测量了 Ce6/SF-PDA 的尺寸，图 3-6 显示出 Ce6/SF 纳米颗粒的尺寸为 152 nm，这与之前的结果保持了一致。Ce6/SF-PDA 的尺寸为 191 nm，符合扫描电镜的结果。

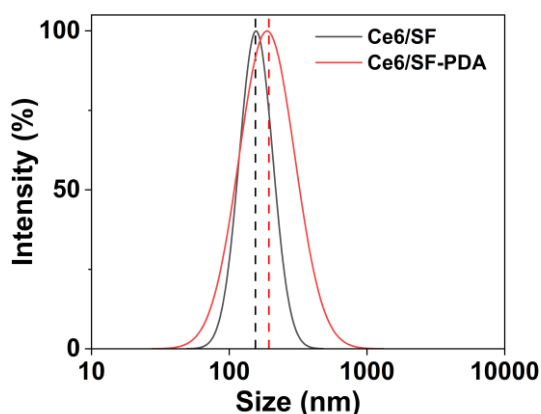


图 3-6. Ce6/SF-PDA 的粒径

Figure 3-6. Particle size of Ce6/SF-PDA.

3.4.2 光热性能分析

我们使用 808 nm 近红外激光 (1.5 W cm^{-2}) 连续照射材料 9 min, 并记录温度变化, 制成温度变化曲线。图 3-7A 显示, 当 Ce6/SF-PDA 的浓度从 $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 增加到 $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时, 温度从 43.4°C 提高到 57°C 。图 3-7B 显示, 当 Ce6/SF-PDA 的浓度保持不变 ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) 时, 温度会随着激光功率的增加而升高, 表明 Ce6/SF-PDA 复合纳米材料具有优异的光热转化能力。图 3-7C 中的热图像更直观地反映了 Ce6/SF-PDA 的升温变化。图 3-7D 显示了 Ce6/SF-PDA 在 $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, 1 w 条件下的光热转换效率为 29.3%, 基本满足了光热的需求。此外, 三次光热循环曲线显示 Ce6/SF-PDA 具有优异的光热稳定性 (图 3-7E)。

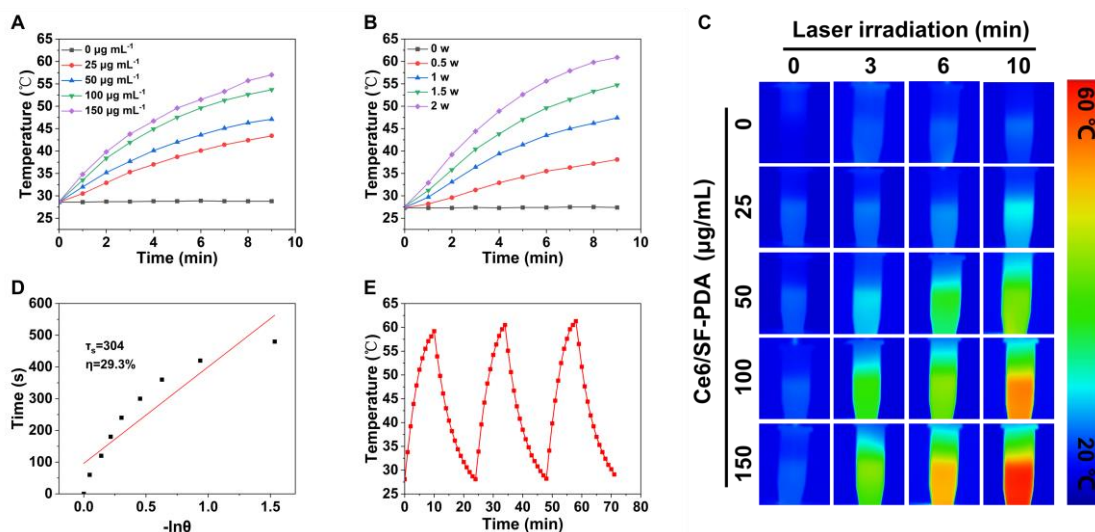


图 3-7. (A) 在近红外光照射 (1.5 W cm^{-2} , 808 nm) 下不同浓度的 Ce6/SF-PDA 的光热升温曲线。(B) 在不同的 NIR 激光强度下 Ce6/SF-PDA ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) 的光热升温曲

线。(C) 不同浓度 Ce6/SF-PDA 的热成像图像。(D) 时间对 $-\ln\theta$ 的线性回归曲线。(E) Ce6/SF-PDA ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) 在近红外光照射 (1.5 W cm^{-2} , 808 nm) 下连续三个光热循环曲线。

Figure 3-7. (A) Photothermal heating curves of Ce6/SF-PDA with different concentrations under near-infrared light irradiation (1.5 W cm^{-2} , 808 nm). (B) Photothermal temperature rise curve of Ce6/SF-PDA ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) at different NIR laser intensities. (C) Thermal imaging images of Ce6/SF-PDA with different concentrations. (D) Linear regression curve of time versus $-\ln\theta$. (E) Ce6/SF-PDA ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) has three continuous photothermal cycle curves under the irradiation of near infrared light (1.5 W cm^{-2} , 808 nm).

3.4.3 光动力性能分析

据图 3-8A 所示, 在近红外激光的照射下, 对照组在紫外光谱中没有出现明显变化, 而加入 DPBF 的 Ce6/SF-PDA 复合纳米材料则在 410 nm 处发生了下降, 这说明 Ce6/SF-PDA 复合纳米材料可以产生大量的活性氧。

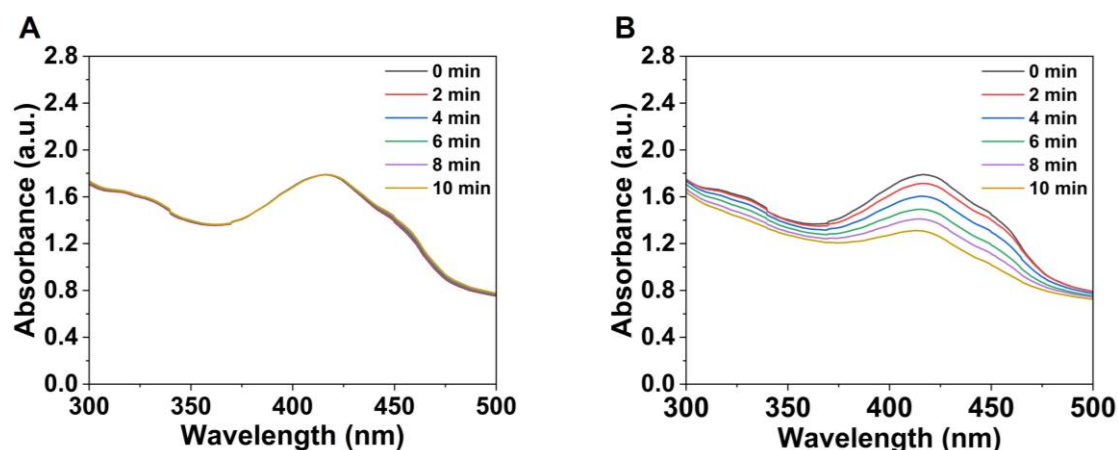


图 3-8. (A) PBS, (B) Ce6/SF-PDA 纳米复合材料在 660 nm 激光下照射 10 min 的 DPBF 的紫外可见光谱。

Figure 3-8. (A) PBS, (B) UV-Vis spectrum of DPBF of Ce6/SF-PDA nanocomposites irradiated by 660 nm laser for 10 min .

3.4.4 体外抗菌实验分析

体外抗菌试验能够评估材料的抗菌性能。图 3-9 显示, 在近红外激光的照射下, Ce6/SF-PDA 组比单独的 PTT 组和 PDT 组有着更优秀的抗菌能力, 说明 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料实现了 PTT 和 PDT 的联合抗菌。

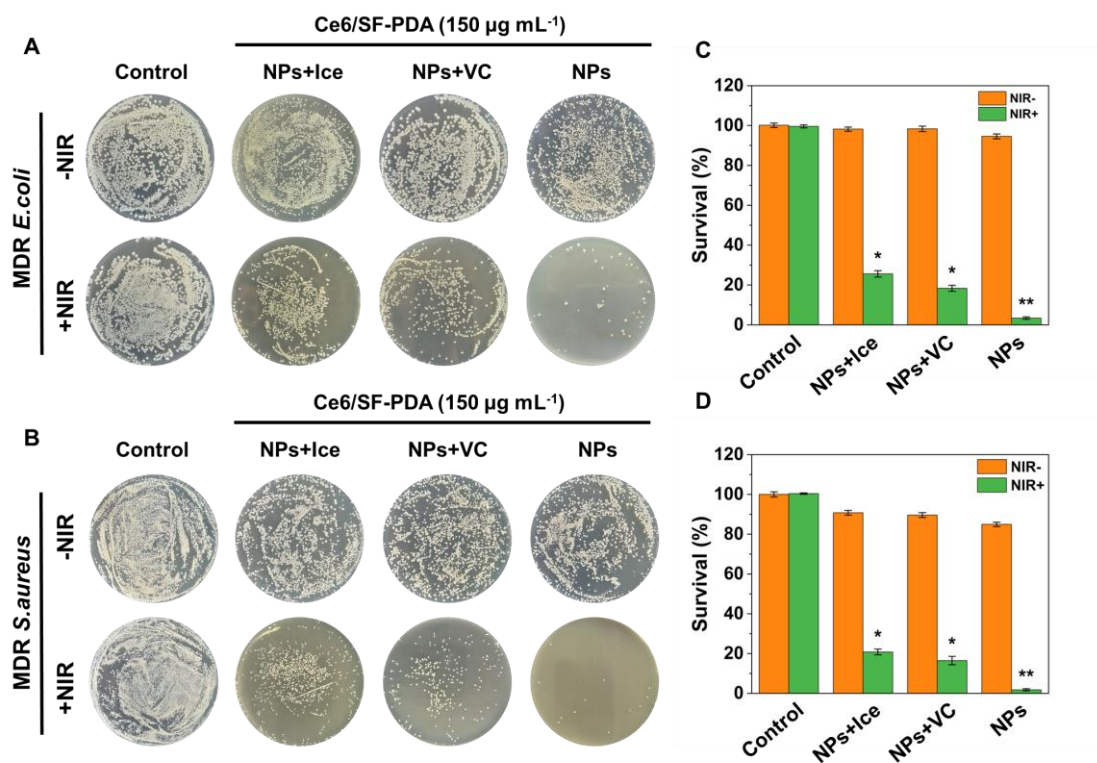


图 3-9. 不同处理组的 CFU 结果和相应的存活率。

Figure 3-9. CFU results and corresponding survival rates in different treatment groups.

3.4.5 生物安全性评估

(1) 细胞毒性

生物安全性是材料是进行临床应用的基础。据图 3-10 显示，我们发现 PDA 和 Ce6/SF-PDA 在 $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的浓度下对 RAW264.7 细胞没有表现出明显的毒性。

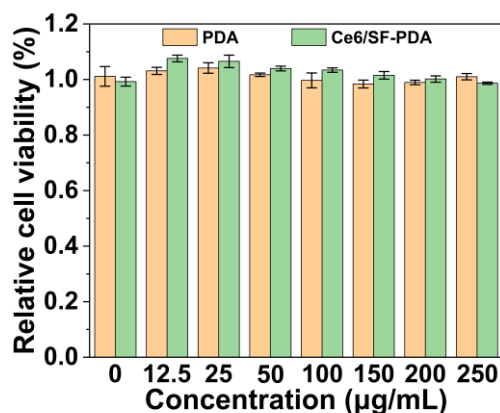


图 3-10. 在 RAW264.7 细胞中加入不同材料的毒性评估。

Figure 3-10. Toxicity evaluation of different materials added to RAW264.7 cells.

(2) 溶血

图 3-11A 显示了 Ce6/SF-PDA 在 1、12 和 24 小时后的溶血状态，我们发现没有明显的溶血表现。据图 3-11B 显示。Ce6/SF-PDA 在 $400\ \mu\text{g mL}^{-1}$ 浓度下的溶血率在 24 小时内没有超过 5%，但是在 $800\ \mu\text{g mL}^{-1}$ 的浓度下孵育 12 小时后的溶血率就会高于 5%。我们所使用的浓度在 $150\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ，这远小于 5% 的临界线。因此，我们合成的 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料具有良好的生物安全性。

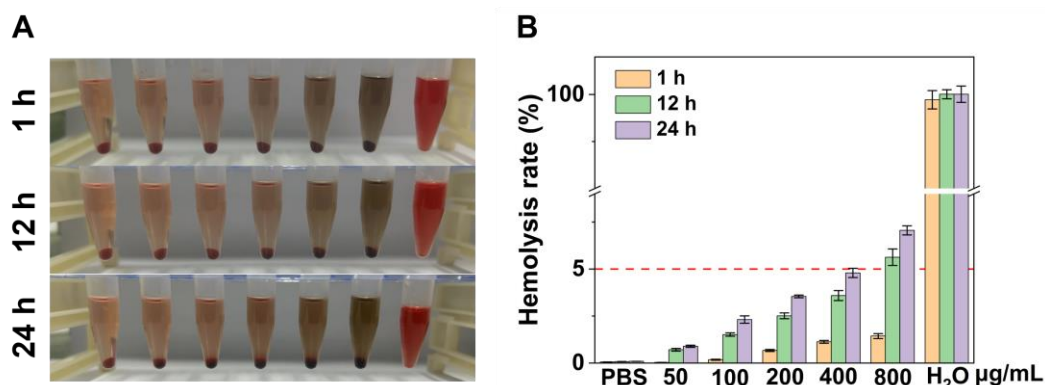


图 3-11. (A) 在 24 小时内用不同浓度的 Ce6/SF-PDA 处理红细胞的溶血图像，和 (B) 相应的溶血率。

Figure 3-11. (A) the hemolytic images of red blood cells were treated with Ce6/SF-PDA with different concentrations within 24 hours, and (B) the corresponding hemolysis rate.

3.5 本章小结

我们成功制备了一种包含光动力和光热效果的纳米复合材料，用于消除耐药细菌。制备的 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料具有均匀的尺寸 ($191\ \text{nm}$)，并且具有良好的光热转换能力 (29.3%) 和优异的产活性氧能力。此外，通过体外抑菌实验我们发现 PTT 和 PDT 联合疗法比单一的 PTT 或 PDT 具有更好的抑菌效果。最后通过溶血实验、细胞毒性实验证明该纳米复合材料具有良好的生物安全性。总之，本研究中制备的 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料能够有效抑制耐药细菌的生长，在临床中具有一定的应用潜力。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

本文以丝素蛋白为载体负载二氢卟吩 e6，利用 HTCC 修饰丝素蛋白，赋予其阳离子特性，以此构建出 Ce6/HSF 复合纳米材料，通过静电吸附作用到达多重耐药菌表面，在激光的照射下产生大量的活性氧，最终消除生物膜和杀死多重耐药菌。然而上述材料在进行光动力治疗时，对革兰氏阴性菌的抑菌效果没有革兰氏阳性菌效果好。因此，为了增强对革兰氏阴性菌的抑制效果，我们选择使用 PDA 来替代 HTCC 修饰丝素蛋白，形成光热型丝素蛋白纳米载体，并通过光热与光动力疗法联合实现抗耐药菌。具体研究如下：

(1) 通过去溶剂法制备 Ce6/SF 纳米球，并用 HTCC 修饰丝素蛋白表面，最后制备出 Ce6/HSF 纳米复合材料用于消除生物膜和耐药菌，并促进伤口愈合。首先通过扫描电镜、紫外、红外、粒径、Zeta 电位等表征手段证明材料的成功合成；其次通过 CFU、流式、荧光染色等实验评价材料的抑菌效果，接着通过生物膜消除实验了解材料对耐药菌生物膜的消除效果；然后通过体内抑菌实验观察材料对小鼠伤口周围耐药菌的抑制效果和促伤口愈合效果；最后通过细胞毒性实验，溶血实验和血清生化指标检测来证明材料的生物安全性。

(2) 在 Ce6/SF 纳米球表面通过 Tris 溶液连接 PDA，使得材料具有光热能力，最后制备出的 Ce6/SF-PDA 纳米复合材料通过联合 PTT 和 PDT 消除生物膜和杀死多重耐药菌。首先通过扫描电镜、紫外、红外、粒径、Zeta 电位等表征手段证明材料的成功合成；其次通过光热性能检测和光动力性能检测来评价材料的光热和光动力效果；接着通过 CFU 等实验评价材料的抑菌效果；最后通过溶血实验和细胞毒性实验来验证材料的生物安全性。

4.2 展望

综上所述，本文构建了以丝素蛋白为载体负载二氢卟吩 e6 的纳米复合材料，通过不同材料的修饰赋予丝素蛋白不同的功能，并应用于细菌感染和促进伤口愈合。研究结果显示，两种纳米复合材料在针对耐药菌和生物膜上都具有

良好的抑制效果。然而，本文所构建的复合材料合成过程较为复杂且成本较高，这在一定程度上限制了材料的应用与发展。一方面，我们所构建的纳米复合材料需要较高的浓度和激光功率，这可能会影响伤口周围健康的组织；另一方面，虽然我们确定的所构建的纳米复合材料的短期生物安全性，但是其长期生物安全性还有待研究。因此，我们希望在后续的应用中能够优化材料的浓度和激光功率，使其能够在安全标准下发挥更好的抗菌效果。总之，我们希望本研究可以为开发新型抗菌纳米复合材料提供一种新的思路。

参考文献

- [1] ZHOU Y Y, XU L L, SUN X B, et al. *In situ* peptide assemblies for bacterial infection imaging and treatment [J]. *Nanoscale*, 2024, 16(7): 3211-3225.
- [2] SANTOS J V D, DA COSTA S D, MEDEIROS S, et al. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains [J]. *Curr Microbiol*, 2022, 79(6): 175.
- [3] CRUZ-LOPEZ F, MARTINEZ-MELENDZ A, MORFIN-OTERO R, et al. Efficacy and In Vitro Activity of Novel Antibiotics for Infections With Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:884365.
- [4] WANG Z H, WU A H, CHENG W, et al. Adoptive macrophage directed photodynamic therapy of multidrug-resistant bacterial infection [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7251.
- [5] WANG L, ZHU J, CHEN L, et al. Cefiderocol: Clinical application and emergence of resistance [J]. *Drug Resist Update*, 2024, 72:101034.
- [6] WANG L, FAN X, MORENO M G, et al. Photocatalytic Quantum Dot-Armed Bacteriophage for Combating Drug-Resistant Bacterial Infection [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(17):e2105668.
- [7] BO L T, SUN H D, LI Y D, et al. Combating antimicrobial resistance: the silent war [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1347750.
- [8] ZHANG L, YE B W, CHEN Z, et al. Progress in the studies on the molecular mechanisms associated with multidrug resistance in cancers [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(3): 982-997.
- [9] YAO S J, HAO L Y, ZHOU R Q, et al. Multispecies biofilms in fermentation: Biofilm formation, microbial interactions, and communication [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2022, 21(4): 3346-3375.
- [10] GUO H A, TONG Y C, CHENG J H, et al. Biofilm and Small Colony Variants-An Update on *Staphylococcus aureus* Strategies toward Drug Resistance [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1241.
- [11] HATHROUBI S, MEKNI M A, DOMENICO P, et al. Biofilms: Microbial Shelters Against Antibiotics [J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(2): 147-156.
- [12] SIKDER A, CHAUDHURI A, MONDAL S, et al. Recent Advances on Stimuli-Responsive Combination Therapy against Multidrug-Resistant Bacteria and Biofilm [J]. *ACS applied bio materials*, 2021, 4(6): 4667-4683.
- [13] SUBHASWARAJ P, SYED A, SIDDHARDHA B. Novel Nanotherapeutics as Next-generation Anti-infective Agents: Current Trends and Future Prospectives [J]. *Current drug discovery technologies*, 2020, 17(4): 457-468.
- [14] 王善义. 活性氧响应性二硫化钼光疗纳米载体构建及抗菌促伤口愈合研究 [D], 安徽工程大学, 2023.
- [15] BHARDWAJ S, MEHRA P, DHANJAL D S, et al. Antibiotics and Antibiotic Resistance- Flipsides of the Same Coin [J]. *Curr Pharm Design*, 2022, 28(28): 2312-2329.
- [16] SANTACROCE L, DI DOMENICO M, MONTAGNANI M, et al. Antibiotic Resistance and Microbiota Response [J]. *Curr Pharm Design*, 2023, 29(5): 356-364.
- [17] TARIN-PELLÓ A, SUAY-GARCÍA B, PÉREZ-GRACIA M T. Antibiotic resistant bacteria: current situation and treatment options to accelerate the development of a new antimicrobial arsenal [J]. *Expert Rev Anti-Infect Ther*, 2022, 20(8): 1095-1108.
- [18] NWOBODO D C, UGWU M C, ANIE C O, et al. Antibiotic resistance: The challenges and some

- emerging strategies for tackling a global menace [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(9):e24655.
- [19] SCHAFER M E, BROWNE H, GOLDBERG J B, et al. Peptides and Antibiotic Therapy: Advances in Design and Delivery [J]. *Accounts Chem Res*, 2021, 54(10): 2377-2385.
- [20] COOK M A, WRIGHT G D. The past, present, and future of antibiotics [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(657):eabo7793.
- [21] LUO Q X, LU P, CHEN Y B, et al. ESKAPE in China: epidemiology and characteristics of antibiotic resistance [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024, 13(1):2317915.
- [22] KONWAR A N, HAZARIKA S N, BHARADWAJ P, et al. Emerging Non-Traditional Approaches to Combat Antibiotic Resistance [J]. *Curr Microbiol*, 2022, 79(11):330.
- [23] UMARJE S C, BANERJEE S K. Non-traditional approaches for control of antibiotic resistance [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2023, 23(11): 1113-1135.
- [24] MINAKSHI P, GHOSH M, BRAR B, et al. Nano-Antimicrobials: A New Paradigm for Combating Mycobacterial Resistance [J]. *Curr Pharm Design*, 2019, 25(13): 1554-1579.
- [25] WANG C D, LI F S, ZHANG T A, et al. Recent advances in anti-multidrug resistance for nano-drug delivery system [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 1684-1697.
- [26] ZHANG C Y, ZHOU X M, ZHANG H Y, et al. Recent Progress of Novel Nanotechnology Challenging the Multidrug Resistance of Cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:776895.
- [27] HABIB ADAM M, TANDON N, SINGH I, et al. The Phytochemical Tactics for Battling Antibiotic Resistance in Microbes: Secondary Metabolites and Nano Antibiotics Methods [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(9):e202300453.
- [28] ELERAKY N E, ALLAM A, HASSAN S B, et al. Nanomedicine Fight against Antibacterial Resistance: An Overview of the Recent Pharmaceutical Innovations [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(2): 142.
- [29] 刘向宇. 碲/头孢噻肟纳米材料的合成及其在 LED/NIR 光照下抗耐药菌的作用研究 [D], 武汉工程大学, 2019.
- [30] JIA C, WU F-G. Antibacterial Chemodynamic Therapy: Materials and Strategies [J]. *BME frontiers*, 2023, 4:0021.
- [31] LI F, ZANG M S, HOU J X, et al. Cascade catalytic nanoplatfrom constructed by laterally-functionalized pillar 5 arenes for antibacterial chemodynamic therapy [J]. *J Mat Chem B*, 2021, 9(25): 5069-5075.
- [32] BADRAN Z, RAHMAN B, DE BONFILS P, et al. Antibacterial nanophotosensitizers in photodynamic therapy: An update [J]. *Drug Discov Today*, 2023, 28(4):103493.
- [33] CLEMENT S, WINUM J-Y. Photodynamic therapy alone or in combination to counteract bacterial infections [J]. *Expert opinion on therapeutic patents*, 2024, 11:1-14.
- [34] SU N Y, SHI Q, MEI H, et al. Efficacy and safety of vonoprazan-based dual therapy and esomeprazole-based dual therapy in eradicating primary *Helicobacter pylori* infection: A propensity score matching analysis [J]. *Helicobacter*, 2023, 28(5):e13003.
- [35] ZHOU Y H, YI Y P, YANG J, et al. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity and safety evaluation of 14-O-(5-ethoxycarbonyl-4,6-dimethylp yrimidine-2-yl) thioacetyl mutilin (EDT) [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):15267.
- [36] WANG R H, LIU Q W, GAO A, et al. Recent developments of sonodynamic therapy in antibacterial application [J]. *Nanoscale*, 2022, 14(36): 12999-13017.
- [37] HUANG B Y, WANG L, TANG K, et al. IR780 Based Sonotherapeutic Nanoparticles to Combat Multidrug-Resistant Bacterial Infections [J]. *Front Chem*, 2022, 10:840598.

- [38] CHEN Y, GAO Y J, CHEN Y, et al. Nanomaterials-based photothermal therapy and its potentials in antibacterial treatment [J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 328:251-262.
- [39] GARCÍA D G, GARZÓN-ROMERO C, SALAZAR M A, et al. Bioinspired Synthesis of Magnetic Nanoparticles Based on Iron Oxides Using Orange Waste and Their Application as Photo-Activated Antibacterial Agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5):4770.
- [40] NASKAR A, KIM K S. Friends against the Foe: Synergistic Photothermal and Photodynamic Therapy against Bacterial Infections [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(4):1116.
- [41] TANG Z M, TIAN W J, LONG H Y, et al. Subcellular-Targeted Near-Infrared-Responsive Nanomedicine with Synergistic Chemo-photothermal Therapy against Multidrug Resistant Cancer [J]. *Mol Pharm*, 2022, 19(12): 4538-4551.
- [42] ZHANG L J, HU C Y, SUN M Z, et al. BODIPY-Functionalized Natural Polymer Coatings for Multimodal Therapy of Drug-Resistant Bacterial Infection [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(14):e2300328.
- [43] YANTEN N, VILCHES S, PALAVECINO C E. Photodynamic therapy for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: A scoping review [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2023, 44:103803.
- [44] FENG Y F, TONON C C, ASHRAF S, et al. Photodynamic and antibiotic therapy in combination against bacterial infections: efficacy, determinants, mechanisms, and future perspectives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 177:113941.
- [45] YAN R, ZHAN M, XU J, et al. Functional nanomaterials as photosensitizers or delivery systems for antibacterial photodynamic therapy [J]. *Biomater Adv*, 2024, 159:213820.
- [46] HUANG X Q, CHEN G J, PAN J L, et al. Effective PDT/PTT dual-modal phototherapeutic killing of pathogenic bacteria by using ruthenium nanoparticles [J]. *J Mat Chem B*, 2016, 4(37): 6258-6270.
- [47] ZHANG Y, LI P Y, SU R X, et al. Curcumin-loaded multifunctional chitosan gold nanoparticles: An enhanced PDT/PTT dual-modal phototherapeutic and pH-responsive antimicrobial agent [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2022, 39:103011.
- [48] MEI L, GAO X R, SHI Y M, et al. Augmented Graphene Quantum Dot-Light Irradiation Therapy for Bacteria-Infected Wounds [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(36): 40153-40162.
- [49] 张明豪. 3D 打印含聚磷酸盐双网络水凝胶支架及其生物性能研究 [D], 华南理工大学, 2022.
- [50] KE X, TANG S X, DONG Z Y, et al. A silk fibroin based bioadhesive with synergistic photothermal-reinforced antibacterial activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 209(Pt A):608-617.
- [51] POLLINI M, PALADINI F. Bioinspired Materials for Wound Healing Application: The Potential of Silk Fibroin [J]. *Materials*, 2020, 13(15):3361.
- [52] KOH L D, YEO J, LEE Y Y, et al. Advancing the frontiers of silk fibroin protein-based materials for futuristic electronics and clinical wound-healing [J]. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl*, 2018, 86:151-172.
- [53] MARÍN C B, FITZPATRICK V, KAPLAN D L, et al. Silk Polymers and Nanoparticles: A Powerful Combination for the Design of Versatile Biomaterials [J]. *Front Chem*, 2020, 8:604398.
- [54] PAN P, LI J, LIU X P, et al. Plasmid containing VEGF-165 and ANG-1 dual genes packaged with fibroin-modified PEI to promote the regeneration of vascular network and dermal tissue [J]. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2023, 224:113210.
- [55] CAO Y, LIU F Q, CHEN Y L, et al. Drug release from core-shell PVA/silk fibroin nanoparticles fabricated by one-step electrospraying [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):11913.
- [56] SUN S W, DING C B, LIU X L, et al. Silk protein/polyvinylpyrrolidone nanofiber membranes loaded with puerarin accelerate wound healing in mice by reducing the inflammatory response [J].

- Biomater Adv, 2022, 135:212734
- [57] SERÔDIO R, SCHICKERT S L, COSTA-PINTO A R, et al. Ultrasound sonication prior to electrospinning tailors silk fibroin/PEO membranes for periodontal regeneration [J]. Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications, 2019, 98:969-981.
- [58] RAJASEKARAN R, DUTTA A, RAY P G, et al. High fibroin-loaded silk-PCL electrospun fiber with core-shell morphology promotes epithelialization with accelerated wound healing [J]. J Mat Chem B, 2022, 10(46): 9622-9638.
- [59] ZHANG H, GUO J H, WANG Y, et al. Stretchable and Conductive Composite Structural Color Hydrogel Films as Bionic Electronic Skins [J]. Adv Sci, 2021, 8(20):e2102156.
- [60] QIAO F, ZHANG J J, WANG J H, et al. Silk fibroin-coated PLGA dimpled microspheres for retarded release of simvastatin [J]. Colloid Surf B-Biointerfaces, 2017, 158:112-118.
- [61] KITPIPAKUN P, SUTUMMAPORN K, KATO K, et al. Silk fibroin/polyurethane patch implantation in hyperglycemic rat model [J]. J Biomater Appl, 2021, 36(4):701-713.
- [62] PROMNIL S, RUKSAKULPIWAT C, NUMPAISAL P O, et al. Electrospun Poly(lactic acid) and Silk Fibroin Based Nanofibrous Scaffold for Meniscus Tissue Engineering [J]. Polymers, 2022, 14(12):2435.
- [63] EIVAZZADEH-KEIHAN R, KHALILI F, KHOSROPOUR N, et al. Hybrid Bionanocomposite Containing Magnesium Hydroxide Nanoparticles Embedded in a Carboxymethyl Cellulose Hydrogel Plus Silk Fibroin as a Scaffold for Wound Dressing Applications [J]. Acs Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(29):33840-33849.
- [64] HE X F, GUO W J, TANG Y X, et al. Chloroplast-boosted photodynamic therapy for effective drug-resistant bacteria killing and biofilm ablation [J]. J Photochem Photobiol B-Biol, 2023, 238:112622.
- [65] JIN W H, SONG P, WU Y J, et al. Biofilm Microenvironment-Mediated MoS₂ Nanoplatfrom with Its Photothermal/Photodynamic Synergistic Antibacterial Molecular Mechanism and Wound Healing Study [J]. Acs Biomaterials Science & Engineering, 2022, 8(10): 4274-4288.
- [66] JIN Y Y, WANG C, XIA Z Y, et al. Photodynamic chitosan sponges with dual instant and enduring bactericidal potency for treating skin abscesses [J]. Carbohydr Polym, 2023, 306:120589.
- [67] LIN S S, CHEN H, WANG R, et al. Hollow silver-gold alloy nanoparticles for enhanced photothermal/photodynamic synergetic therapy against bacterial infection and acceleration of wound healing [J]. Biomaterials Science, 2023, 11(14): 4874-4889.
- [68] WANG C L, CHEN P, QIAO Y B, et al. pH responsive superporogen combined with PDT based on poly Ce6 ionic liquid grafted on SiO₂ for combating MRSA biofilm infection [J]. Theranostics, 2020, 10(11): 4795-4808.
- [69] XU Z, ZHANG C, YU Y, et al. Photoactive Silver Nanoagents for Backgroundless Monitoring and Precision Killing of Multidrug-Resistant Bacteria [J]. Nanotheranostics, 2021, 5(4): 472-487.
- [70] JIANG Z Y, FU L J, WEI C, et al. Antibacterial micro/nanomotors: advancing biofilm research to support medical applications [J]. J Nanobiotechnol, 2023, 21(1):388.
- [71] LIANG H, ZHANG P, YU B, et al. Machine perfusion combined with antibiotics prevents donor-derived infections caused by multidrug-resistant bacteria [J]. Am J Transplant, 2022, 22(7): 1791-1803.
- [72] NEUMANN W, NOLAN E M. Evaluation of a reducible disulfide linker for siderophore-mediated delivery of antibiotics [J]. J Biol Inorg Chem, 2018, 23(7): 1025-1036.
- [73] REN R H, LIM C X, LI S Q, et al. Recent Advances in the Development of Lipid-, Metal-, Carbon-, and Polymer-Based Nanomaterials for Antibacterial Applications [J]. Nanomaterials, 2022,

- 12(21):3855.
- [74] NAZIRIS N, SEKOWSKI S, OLCHOWIK-GRABAREK E, et al. Biophysical interactions of mixed lipid-polymer nanoparticles incorporating curcumin: Potential as antibacterial agent [J]. *Biomater Adv*, 2023, 144:213200.
- [75] XUAN J Q, FENG W G, WANG J Y, et al. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections [J]. *Drug Resist Update*, 2023, 68:100954.
- [76] DUAN H M, ZHANG X M, LI Z, et al. Synergistic effect and antibiofilm activity of an antimicrobial peptide with traditional antibiotics against multi-drug resistant bacteria [J]. *Microb Pathog*, 2021, 158:105056.
- [77] ZHANG H H, LIU N, ZHANG Y T, et al. Croconaine conjugated cationic polymeric nanoparticles for NIR enhanced bacterial killing [J]. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2024, 233:113665.
- [78] EL-NAGGAR N E A, SHIHAA A M, MAHROUS H, et al. Green synthesis of chitosan nanoparticles, optimization, characterization and antibacterial efficacy against multi drug resistant biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):19869.
- [79] LIU D Q, XI Y J, YU S Z, et al. A polypeptide coating for preventing biofilm on implants by inhibiting antibiotic resistance genes [J]. *Biomaterials*, 2023, 293:121957.
- [80] BENETTI G, CAVALIERE E, BANFI F, et al. Antimicrobial Nanostructured Coatings: A Gas Phase Deposition and Magnetron Sputtering Perspective [J]. *Materials*, 2020, 13(3):784.
- [81] HU D F, DENG Y Y, JIA F, et al. Surface Charge Switchable Supramolecular Nanocarriers for Nitric Oxide Synergistic Photodynamic Eradication of Biofilms [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(1): 347-359.
- [82] ECKHART K E, ARNOLD A M, STARVAGGI F A, et al. Tunable, bacterio-instructive scaffolds made from functional graphenic materials [J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(7): 2467-2479.
- [83] ZU G Y, STEINMÜLLER M, KESKIN D, et al. Antimicrobial Nanogels with Nanoinjection Capabilities for Delivery of the Hydrophobic Antibacterial Agent Triclosan [J]. *ACS Appl Polym Mater*, 2020, 2(12): 5779-5789.
- [84] XING X J, HAN Y, CHENG H. Biomedical applications of chitosan/silk fibroin composites: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 240:124407.
- [85] DEBARI M K, KING C I, ALTGOLD T A, et al. Silk Fibroin as a Green Material [J]. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, 2021, 7(8): 3530-3544.
- [86] GAO Y E, HOU S X, CHENG J Q, et al. Silk Sericin-Based Nanoparticle as the Photosensitizer Chlorin e6 Carrier for Enhanced Cancer Photodynamic Therapy [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2021, 9(8): 3213-3222.
- [87] AYE S, ZHANG Z H, YU X, et al. Silk Hydrogel Electrostatically Functionalized with a Polycationic Antimicrobial Peptide: Molecular Interactions, Gel Properties, and Antimicrobial Activity [J]. *Langmuir*, 2021, 38(1):50-61.
- [88] FAROKHI M, MOTTAGHITALAB F, RUI L R, et al. Functionalized silk fibroin nanofiber as drug carriers: Advantages and challenges [J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 321:324-347.
- [89] FREITAS L, LORENZÓN E, CILLI E M, et al. Photodynamic and peptide-based strategy to inhibit Gram-positive bacterial biofilm formation [J]. *Biofouling*, 2019, 35(7):742-757.
- [90] 金伟豪. 生物被膜微环境响应的二硫化钼纳米载体及光疗协同抗耐药菌和促伤口愈合研究 [D], 安徽工程大学, 2023.
- [91] 黄伟. 黄芩苷对氟苯尼考在健康鸡体内药动学影响的研究 [D], 四川农业大学, 2013.
- [92] ESHTIAGHI S, NAZARI R, FASIHI-RAMANDI M. Molecular Docking, Anti-Biofilm & Antibacterial Activities and Therapeutic Index of mCM11 Peptide on *Acinetobacter baumannii*

- Strains [J]. *Curr Microbiol*, 2023, 80(6):191.
- [93] FU Y, YANG L, ZHANG J H, et al. Polydopamine antibacterial materials [J]. *Mater Horizons*, 2021, 8(6): 1618-1633.
- [94] XU Z W, WANG T T, LIU J Q. Recent Development of Polydopamine Anti-Bacterial Nanomaterials [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13):7278.
- [95] SHAO M, CHANG C, LIU Z H, et al. Polydopamine coated hollow mesoporous silica nanoparticles as pH-sensitive nanocarriers for overcoming multidrug resistance [J]. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2019, 183:110427.
- [96] 武向荣. 近红外光触发的一氧化氮释放纳米复合材料补充光动力/光热疗法对牙周生物膜抑制作用的研究 [D], 吉林大学,2023.

攻读硕士学位期间学术论文发表情况

1. Quaternized Silk Fibroin Nanocarriers Loaded with Chlorin e6 for Photodynamic Elimination of Drug-Resistant Bacteria and Biofilms [J]. ACS Applied Nano Materials.一作
2. Polydopamine Nanocarriers with Cascade-activated Nitric Oxide Release Combined Photothermal Activity for the Therapy of Drug-resistant Bacterial Infections [J]. ACS Infectious Diseases.二作
3. Combined Photothermal/Chemotherapeutic Approach Using ZIF-8-Supported Artesunate and Gold Nanorods [J]. ACS Applied Nano Materials.
4. The MOF system loaded with capsaicin and calcium phosphate was utilized for tumor therapy involving calcium overload [J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.
5. 酸敏型 ZIF-8 负载辣椒素/NAADP 载药体系的构建及其抗肿瘤研究.安徽工程大学学报[J].

致谢

不知不觉间，我的校园生活就要结束了。在这三年的学习生活中，要感谢众多老师和同学，谢谢你们的期望与鼓励。提笔写至此处，我不知道该如何表达我内心深处最真挚的谢意。

首先衷心感谢我的导师。真心感谢陶老师给予我的教诲，一直给生活、学习上每一方面的帮助，给我提供了学习的机会。至今，老师严谨的治学态度，授课时的谈笑风生，修改我的学术文章时的认真细致，仍然深深刻印在我脑海中。您传授给我诸多人生的道理不知不觉流淌到我的心灵深处，让我终身受益。

然后感谢帮助我的师弟师妹们。你们在学习和生活中为我提供了很多帮助，这些将是最值得留恋的回忆。

最后，我要感谢我的父母，谢谢你们多年来默默的支持、谢谢你们的理解、信任和期盼，这是我一直前行的动力。

再次感谢我的父母、老师、朋友以及关心我、帮助我的人，祝你们生活幸福、万事如意。