

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530142

自供氧全氟己烷纳米体系联合光热/光动力抑菌
的性能及机制研究

Performance and Mechanism of Self-oxygenated
Perfluorohexane Nanosystem for Combined
Photothermal/Photodynamic Bacterial Inhibition

学生姓名: 董林瑞

指导教师: 葛飞(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：

The image shows a handwritten signature in black ink on a light yellow rectangular background. The signature is written in a cursive style and appears to read '黄彬彦' (Huang Binyan).

日期：2024年5月30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。

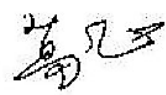
本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：



指导教师签名：



日期：2024 年 5 月 30 日

日期：2024 年 5 月 30 日

自供氧全氟己烷纳米体系联合光热/光动力抑菌的性能 及机制研究

摘要

多重耐药细菌是全球人类健康的威胁。大多数耐药菌感染(>80 %)都与细菌生物被膜的形成有关,生物被膜可以防止抗生素等药物的渗透,避免宿主免疫系统的攻击。伤口被多重耐药菌感染后,易形成生物膜导致传统抗生素的治疗效果不理想。近年来,光热疗法(PTT)和光动力疗法(PDT)治疗手段迅速发展,尤其是多种手段联合治疗的方法成为热点。本研究针对生物膜微环境的特点(乏氧、低pH),设计构建自供氧全氟己烷纳米体系,逆转生物膜微环境乏氧特性,明确 PDT/PTT 联合抑制耐药菌活性并阐明其抑菌机制,探究该纳米体系促伤口愈合能力。该类型纳米粒子的设计为实现新型可替代抗生素的光疗纳米药物临床应用做出一定理论工作基础。

(1) 设计了一种载氧纳米系统,通过逆转生物膜乏氧环境,结合 PDT/PTT 联合作用,清除耐药菌生物膜,达到高效抑菌活性。该纳米载氧体系的设计是通过在卵磷脂(SL)上负载 Meso-四(4-羧基苯基)卟吩(TCPP),进一步包覆全氟己烷(PFH),最终在纳米颗粒的外层修饰聚多巴胺(PDA),形成 PFH/TCPP@SL@PDA 纳米颗粒。该纳米颗粒通过负载氧气缓解生物膜微环境的缺氧特性,从而促进 PDT 治疗效果。通过 PFH/TCPP@SL@PDA 抑菌试验,明确该纳米粒子对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的抑制率超过 95 %,同时清除了

90 %以上的生物膜。转录组分析结果显示, CRP/FNR 家族转录调节因子的表达下调。这可能导致对细菌聚集的抑制, 并且是影响生物膜形成的原因之一。PDA 可进行相对温和的 PTT, 同时促进了 PDT 的反应过程。通过生物安全性试验明确了 PFH/TCPP@SL@PDA 具有良好的生物相容性, 低生物毒性。在促伤口愈合小鼠试验中, 该纳米体系可有效缓解小鼠模型炎症症状, 加快伤口愈合。

(2) PDA 作为纳米外壳和光热剂, 具有一定的作用, 但是其光热效果不是很理想, 因此在本论文的后续研究是希望进一步优化纳米载氧体系。将 TCPP 和 SL 制成薄膜, 然后将 PFH 和 Au NPs 包裹在内, 得到 PAT@SL 纳米粒子, 通过将 PAT@SL 水凝胶化, 最终得到 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶。研究表明, PAT@SL 具有良好的光热性能; 体外抑菌实验结果呈现出对耐药菌高抑菌活性, 对于 MDR *E.coli* 和 MDR *S. aureus* 的杀菌率达到 95 %以上; 生物膜消融实验对于两种耐药菌的生物膜清除率达到了 90 %以上。本文探究了 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶的力学性能, 水凝胶体现出良好的稳定性以及自愈性能, 且水凝胶可有效避免局部过热的问题。

结果表明, 所合成的载氧纳米粒子具有良好的光热/光动力、广谱抑菌、清除生物膜、促伤口愈合、生物相容性的效果。所制备的水凝胶有良好的临床应用前景, 对设计构建新的纳米体系来应对多耐药菌提供新的思路。

关键词: 光热疗法, 光动力疗法, 载氧, 协同抗菌, 清除生物

膜，水凝胶

Performance and Mechanism of Self-oxygenated Perfluorohexane Nanosystem for Combined Photothermal/Photodynamic Bacterial Inhibition

ABSTRACT

Multidrug-resistant bacteria are a threat to human health around the world. Most drug-resistant bacterial infections ($> 80\%$) are related to the formation of bacterial biofilm, which can prevent the penetration of antibiotics and other drugs and avoid the attack of host immune system. After the wound is infected by multi-drug resistant bacteria, it is easy to form biofilm, which leads to the unsatisfactory treatment effect of traditional antibiotics. In recent years, photothermal therapy (PTT) and photodynamic therapy (PDT) have developed rapidly, especially the method of combined therapy with multiple means has become a hot spot. In this study, according to the characteristics of biofilm microenvironment (hypoxia and low pH), a self-supplied perfluorohexane nano-system was designed and constructed to reverse the anoxic characteristics of biofilm microenvironment, clarify the inhibitory activity of PDT/PTT combined with drug-resistant bacteria and clarify its bacteriostatic mechanism, and explore the ability of this nano-system to promote wound healing. The

design of this type of nanoparticles lays a theoretical foundation for the clinical application of new phototherapy nano-drugs that can replace antibiotics.

(1) An oxygen-carrying nano-system was designed. By reversing the anoxic environment of biofilm and combining with PDT/PTT, the biofilm of drug-resistant bacteria was removed, and high-efficiency antibacterial activity was achieved. The design of the nano-oxygen carrier system is to load Meso- tetra (4- carboxyphenyl) porphine (TCPP) on lecithin (SL), further coat perfluorohexane (PFH), and finally modify poly-dopamine (PDA) on the outer layer of nanoparticles to form PFH/TCPP@SL@PDA nanoparticles. The nanoparticles alleviate the anoxic characteristics of biofilm microenvironment by loading oxygen, thus promoting the therapeutic effect of PDT. Through the bacteriostasis test of PFH/TCPP@SL@PDA, it is clear that the inhibition rate of the nanoparticles on MDR *E. coli* and MDR *S. aureus* is over 95%, and more than 90% of biofilm is removed. Transcriptome analysis showed that the expression of CRP/FNR family transcription regulators was down-regulated. This may lead to the inhibition of bacterial aggregation and is one of the reasons that affect the formation of biofilm. PDA can carry out relatively mild PTT and promote the reaction process of PDT. Through the biological safety test, it is confirmed that PFH/TCPP@SL@PDA has good biocompatibility and low biological toxicity. In the experiment of

promoting wound healing in mice, the nano-system can effectively alleviate the inflammatory symptoms of mouse model and accelerate wound healing.

(2) PDA as a nano-shell and photothermal agent, plays a certain role, but its photothermal effect is not ideal, so the follow-up research in this paper is to further optimize the nano-oxygen-carrying system. TCPP and SL were made into thin films, and then PFH and Au NPs were wrapped inside to obtain PAT@SL nanoparticles. PAT@SL @ BSP-SF hydrogel was finally obtained by hydrogelizing PAT@SL. The results show that PAT@SL has good photothermal performance. The results of antibacterial experiments in vitro showed high antibacterial activity against drug-resistant bacteria, and the bactericidal rate against MDR *E. coli* and MDR *S. aureus* reached over 95 %. Biofilm ablation experiments showed that the biofilm clearance rate of two drug-resistant bacteria reached more than 90 %. We explored the mechanical properties of PAT@SL@BSP-SF hydrogel. The hydrogel showed good stability and self-healing performance, and the hydrogel could effectively avoid local overheating.

The results show that the synthesized oxygen-loaded nanoparticles have good photothermal/photodynamic effects, broad-spectrum bacteriostasis, biofilm removal, wound healing and biocompatibility. The prepared hydrogel has a good clinical application prospect, which provides

a new idea for designing and constructing a new nano-system to deal with multidrug-resistant bacteria.

KEY WORDS: Photothermal therapy, Photodynamic therapy, Oxygen loading, Synergistic antibacterial, Biofilm removal, Hydrogel

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 耐药性细菌感染.....	2
1.2.1 耐药性细菌感染产生原因.....	2
1.2.2 生物膜的形成及其微环境.....	2
1.3 耐药性细菌感染治疗策略.....	4
1.3.1 传统治疗手段.....	4
1.3.2 光热疗法(PTT).....	4
1.3.3 光动力学疗法(PDT).....	6
1.3.4 声动力学疗法(SDT).....	8
1.4 PFH 载药体系及在耐药性细菌感染的应用.....	10
1.4.1 PFH(全氟己烷).....	10
1.4.2 PFH 纳米材料的应用.....	10
1.5 课题设计及主要研究内容.....	12
1.5.1 课题设计思路.....	12
1.5.2 主要研究内容.....	13
第 2 章 光热/光动力联合治疗的载氧纳米平台的构建及抗菌活性研究.....	14
2.1 引言.....	14
2.2 实验材料与设备.....	15
2.2.1 实验材料.....	15
2.2.2 实验仪器.....	15
2.3 实验方法.....	16
2.3.1 PFH/TCPP@SL@PDA 纳米材料制备及表征.....	16
2.3.2 光热性能评估.....	17
2.3.3 载氧率与活性氧检测.....	17
2.3.4 细胞内光热和光动力检测.....	18
2.3.5 体外抗菌实验.....	18

2.3.6 体外生物膜模型及消融试验	18
2.3.7 Live-Dead 试验检测细胞凋亡率	19
2.3.8 细胞形态学观察	19
2.3.9 转录组测序分析	19
2.3.10 促伤口愈合动物模型	19
2.3.11 生物毒性实验	20
2.4 实验结果与讨论	20
2.4.1 PFH/TCPP@SL@PDA 的表征	20
2.4.2 PFH/TCPP@SL@PDA 的光热性能	22
2.4.3 PFH/TCPP@SL@PDA 增强型光动力检测	24
2.4.4 体外抑菌活性	25
2.4.5 生物膜清除能力	28
2.4.6 抗菌活性统计学分析	29
2.4.7 细胞的形态特征	31
2.4.8 抑菌机制分子	32
2.4.9 体内实验	34
2.4.10 安全性评价	36
2.5 本章小结	37
第 3 章 用于生物膜清除的自供氧全氟己烷水凝胶的制备和性能研究	39
3.1 引言	39
3.2 实验试剂与设备	39
3.2.1 实验试剂	39
3.2.2 实验仪器	40
3.3 实验方法	40
3.3.1 PFH-Au/TCPP@SL(PAT@SL) 纳米材料的合成与表征	40
3.3.2 PAT@SL 的光热性能评估	41
3.3.3 PAT@SL 的光动力性能检测	41
3.3.4 PAT@SL 的体外抑菌试验	41
3.3.5 PAT@SL 的生物膜的消融实验	41
3.3.6 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶的制备和形态观察	41
3.3.7 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶的溶血性能	41
3.4 结果与讨论	42

3.4.1 PAT@SL 的表征结果分析.....	42
3.4.2 PAT@SL 的光热性能分析.....	43
3.4.3 PAT@SL 的光动力性能分析.....	44
3.4.4 PAT@SL 的体外抑菌结果.....	44
3.4.5 PAT@SL 的生物膜的清除能力.....	45
3.4.6 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶形态观察	46
3.4.7 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶安全性评价	47
3.5 本章小结	48
第 4 章 结论与展望	49
4.1 结论	49
4.2 展望	50
参考文献.....	51
攻读硕士学位期间学术论文发表情况.....	59
致谢.....	60

第 1 章 绪论

1.1 引言

在过去的几十年里，临床和环境中的多药耐药(MDR)细菌的数量显著增加，也被称为超级细菌^[1,2]。在这方面尤其有问题的是人类的主要病原体，例如金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和肠杆菌属等。此外，在兽医病原体中，特别是与畜牧业和家禽生产有关的病原体中，耐药率有所增加。其中一些细菌，如肠道沙门氏菌和弯曲杆菌，也是重要的人畜共患病病原体^[3,4]。

生物膜是嵌入自身产生的细胞外基质微生物联合体。生物膜结构阻碍了抗生素的渗透，并可能降低抗生素在整个生物膜中积累。此外，营养物质和氧气在生物膜内的分散梯度会产生不同的细胞代谢状态，并有利于抗生素耐受性。此外，细菌耐药性可能通过多种机制在生物膜内形成。深入了解生物膜导致抗生素耐药及耐药机制有助于开发耐药菌感染新策略^[5-7]。

基于纳米材料的光热疗法(PTT)、光动力疗法(PDT)、声动力疗法(SDT)等治疗手段成为抗菌治疗的研究热点。光疗因其出色的抗菌活性、非侵入性和较少的细菌产生细菌耐药性而成为一种新型抗菌策略。高温介导的光热治疗(PTT)和活性氧自由基(ROS)介导的光动力治疗(PDT)是目前应用最广泛的两种治疗细菌感染的光疗方法。PTT 的基本机理取决于光热剂(PTA)在理想光源照射下的光热转化能力，由于 PTA 对细菌的非侵入性，与那些使用抗生素杀菌相比，细菌对高温杀菌从而产生抗药性的可能性非常小。此外，该策略中通常使用的光源是 700-1400 nm 之间的近红外(NIR)光，由于其波长较长，显示出良好的组织穿透能力。因此，它可以透入深层组织中进行 PTT 治疗。此外，高温可破坏生物膜结构，促进化学抑菌试剂穿透生物膜基质，有效杀灭细菌。这种局部热疗介导的广谱抗菌活性策略具有潜在的临床应用价值，在 PDT 中，光响应材料受到光能的照射，产生 ROS，并迅速杀灭细菌。然而，单一的光动力制剂需要大量的 ROS 来满足 PDT 的要求并杀灭细菌。如果 PTT 与 PDT 一起使用，PTT 杀菌的较高温度要求可以降低，因为 PDT 过程中产生的 ROS 会损害细菌，并减少

PTT 高温产生的负担。遵循类似的策略和协同机制, PTA 的较高剂量需求可以减少。协同策略增强了抗菌潜力, 保留了每个过程的潜在优势, 并弥补了每个策略的不足, 对于应对多耐药细菌感染有着极大的应用前景^[8-15]。

1.2 耐药性细菌感染

1.2.1 耐药性细菌感染产生原因

细菌抗菌素耐药性 (AMR) 是指细菌对抗生素不敏感, 这是 21 世纪的主要公共卫生威胁之一。据报道, 到 2050 年, 每年将有 1000 万人因耐药菌感染而死亡。随着细菌耐药性变得越来越普遍, 耐药细菌感染的预防和治疗变得更加重要。

细菌中的耐药性主要分为两种: 固有耐药性和获得性耐药性。固有耐药性是指对某些抗生素不敏感的细菌。它通常由染色体抗性基因介导, 通常不会改变。获得性耐药性是指某些种类的细菌会改变其代谢途径, 以确保它们不会被抗生素杀死。耐药菌的获得性耐药性可以通过基因突变获得。此外, 这些细菌可用于通过耐药基因的传递、转移和变异产生多种耐药性^[16,17]。

1.2.2 生物膜的形成及其微环境

细菌生物膜是指细菌粘附于固体或有机腔道表面, 形成微菌落, 并分泌细胞外多糖蛋白复合物将自身包裹其中而形成的膜状物, 生物膜微环境具有乏氧、低 pH 的特点。当细菌以生物被膜形式存在时耐药性明显增强, 抗生素应用不能有效清除生物膜, 还可诱导耐药性产生。

生物膜的形成是一个动态的过程, 经过一系列连续的步骤。它是由细菌与表面的相互作用引发的^[18,19]。浮游细胞暴露在由抗生素、饥饿或其他不利环境条件引起的压力下, 可以通过激活基因表达来启动生物膜的形成。此外, 参与细胞间通讯的分子在高细胞密度下积累。这些分子, 通常被称为自体诱导剂, 可以激活和调节这一过程, 并允许种群成员的协调反应, 这被称为群体感应(QS)。生物膜形成的第一步是细菌与底物的黏附。这一过程通常是由从细菌细胞表面伸出的长的、蛋白质类的丝状纤维, 如鞭毛、菌毛或菌毛。在最初的相互作用建立后, 较短的细胞表面暴露结构与底物相互作用, 从而增加细菌与底物之间的接触。大肠杆菌和沙门氏菌产生的

卷曲菌毛既能调节细胞与底物的相互作用，也能调节细胞与细胞的相互作用。其他蛋白质，如表皮葡萄球菌中的 Bap 家族蛋白或铜绿假单胞菌中的 CDRA 都是与细胞外基质成分和细菌细胞表面相互作用从而增强基质的大型蛋白质^[20]。自体转运蛋白是许多革兰氏阴性细菌通过 V 型分泌系统分泌的蛋白质，通常在细菌间的相互作用中发挥作用。然后，细菌分泌细胞外基质成分，并增殖形成一个微菌落。ECM 作为一种粘合剂，有助于稳定细菌间的相互作用。微菌落内的细菌在空间上进行交流和组织。IV 型菌毛作用于细胞之间的交界处，形成微菌落，也有助于细菌在生物膜内的重组。细胞间的通讯，包括 QS 和依赖细胞接触的通讯系统，似乎与这一过程有关。在这个阶段，形成细胞外基质的基因表达增加，与早期生物膜阶段相比，生物膜变得不那么容易受到抗生素的影响(图 1-1)。

感染部位聚集的细菌群落产生细胞外聚合物物质(EPS)，主要由细胞外多糖以及细菌 DNA 和蛋白质组成。EPSs 与封闭细菌形成具有一定机械强度的生物膜。生物膜通过多种机制保护细菌，例如抗生素降解酶的存在、低 pH 值和不同的离子强度，以及抗生素渗透减慢和驻留细菌外层中高表达的抗生素外排泵。一旦感染部位形成生物膜，周围的健康组织将因局部温度升高、pH 值降低以及生物膜分泌的酶而逐渐受损。此外，细菌不断漂浮在生物膜的外层，成为细菌持续传播的来源。事实上，在抗生素的压力下持续存在的细菌，往往是抗药性和感染复发的罪魁祸首。这些细菌不是突变体，而是休眠的在群体中随机产生的细菌，它们的形成机制在很大程度上仍不清楚。与浮游细菌相比，具有细胞群生理异质性的生物膜似乎促进了更高形式的持久性。细菌感染微环境的不断演变使得抗菌药物的治疗更加困难，并且与抗生素耐药性的产生密切相关^[21,22]。

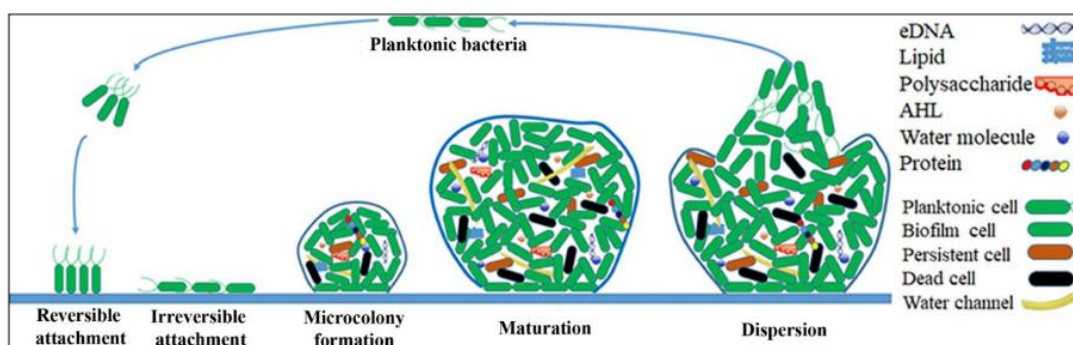


图 1-1. 生物膜形成的步骤。多步骤生物膜的形成始于浮游微生物在表面的附着，可分为可逆和不可逆附着，然后微生物分裂形成微菌落。微菌落经过成熟，其特征是特定的成分、形状和结构，然后分散生物膜重复这个循环。

Figure 1-1. Steps of biofilm formation. The multi-step biofilm formation starts with the attachment of planktonic microorganisms to the surfaces which is subdivided into reversible and irreversible attachment followed by microbial division to form micro colonies. Micro colonies undergo maturation characterized by specific composition, shape, and architecture followed by dispersion of biofilm to repeat the cycle^[22].

1.3 耐药性细菌感染治疗策略

1.3.1 传统治疗手段

抗生素是传统抑菌治疗中最常用的化学药物之一。它们通过抑制细菌的生长和复制，或者直接杀灭细菌，来治疗细菌感染。例如，青霉素类抗生素可以破坏细菌细胞壁，而氨基糖苷类抗生素可以干扰细菌的蛋白质合成。然而，由于细菌的快速适应和抗药性的增加，一些菌株已经对某些抗生素产生了耐药性。因此，在抗生素治疗中需要谨慎使用，并且在临床实践中需要进行细菌的耐药性监测和合理的抗生素选择。

除了抗生素治疗，还可以其他方法来抑制和杀灭细菌。物理方法包括热疗、冷疗、紫外线照射和激光治疗等。这些方法可以通过改变细菌的环境条件、破坏细菌的结构或抑制细菌的生物活性来实现抑菌效果。还有例如抑菌剂可以通过干扰细菌的代谢途径或酶系统来抑制细菌的生长和复制。此外，免疫增强剂可以增强机体的免疫功能，帮助机体更好地对抗细菌感染。

然而，随着细菌抗药性的增加和治疗效果的限制，进一步研究新型抗生素、开发新的治疗手段，以及加强细菌耐药性监测和合理用药的实施显得尤为重要。

1.3.2 光热疗法(PTT)

PTT 是一种具有前景的治疗方法，在 PTA 被外部光源照射后，光能转化为热能，如近 NIR。这种转化后的热能可以通过细胞膜破裂、细胞液蒸

发、蛋白质/酶降解、细胞空化等多种热效应有效杀灭细菌^[23,24]。目前,大量研究人员利用 PTT 进行抗菌活性和促伤口愈合研究,取得了大量的科研成果。PTT 是一种无创、副作用小、特异性高的技术。由于这些有益的特性,PTT 已成为对抗 MDR 病原体感染的一种有前途的策略^[25-29]。

PTT 已成为治疗多耐药病原体潜在解决方案和抗生素可行替代品,这是因为以下优点:(1) PTT 所使用的光源(例如近红外)的穿透能力强,无论膜结构如何,对革兰氏阴性(G-)细菌和革兰氏阳性(G+)细菌都具有广谱抗菌作用;(2) 基于常用的近红外光源(700-1400 nm),具有良好组织渗透能力,不会造成组织损伤,从而提高了细菌治疗的成功率;(3)通过局部升温降低抗菌剂活性,以降低损害正常细胞的风险;(4)通过加温促进抗菌剂渗透到生物膜内;(5)非侵入性、非接触性机制,最大限度地减少细菌获得抗药性的机会。尽管 PTT 有诸多优势,但在 PTT 完全应用于实际应用之前,仍然存在巨大的障碍。首先,PTT 通常需要高温($\geq 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)来杀灭细菌。这种持续的高温会杀死细菌细胞,并对细菌感染部位周围的正常组织造成热损害。因此,需要更具战略性的设计来优化条件,例如,在较低温度($\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$)下处理时间较短。此外,正常组织可能会受到高激发光功率和高 PTA 剂量的必要性的严重影响;这些方面需要迅速关注,以确保光热疗法更安全有效^[30-32]。

近年来,有机化合物基纳米材料作为无机基纳米材料的潜在替代品受到越来越多的关注,被广泛利用来制备具有适当抗菌活性的抗菌剂^[33-37]。作为光热剂,这些化合物通常吸收近红外辐射产生的光子,并通过非辐射弛豫路径产生热量。有机光热纳米材料的类别通常由共轭聚合物基纳米材料(即聚苯胺、聚吡咯)、结晶型多孔性有机聚合物(如共价有机骨架)和聚合物功能化纳米材料代表(图 1-2),各种具有光热活性的光热剂,如锌基纳米材料、银基纳米材料、金基纳米材料、金属有机骨架(MOF)、铜基纳米材料和石墨烯基纳米材料已被研究用于对抗耐药细菌。纳米磷酸银(Ag_3PO_4)修饰缺陷的黑海胆状二氧化钛($\text{BU-TiO}_2\text{X/Ag}_3\text{PO}_4$)呈纳米棒状,在光照下对大肠杆菌(99.76 %)和金黄色葡萄球菌(99.85 %)显示出较高的抗菌效率。同样,氧化锌碳点修饰的石墨碳氮化物纳米复合材料

(ZnO/CDots/g-C₃N₄)在可见光照射下显示出对金黄色葡萄球菌(99.97%)和大肠杆菌(99.99%)的高抗菌率。据报道称, PDA 是一种具有优异的 PTT 的近红外光介导的抗菌活性的材料。PDA 具有制备工艺简单、易于功能化、优良的光热性能、生物相容性和生物可降解性等优点, 已成为一些基于 PDA 的生物医学研究的热点^[38-40]。

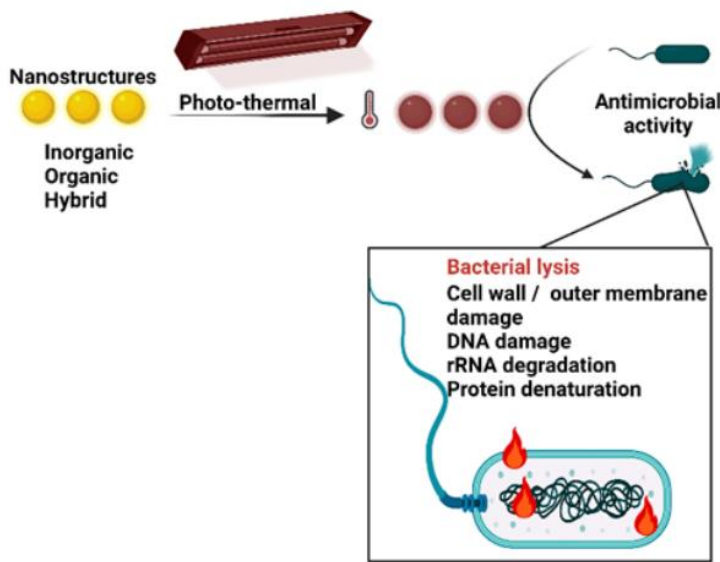


图 1-2.光热纳米结构的光热抗菌机理示意图。

Figure 1-2. Schematic photothermal antimicrobial mechanism of PTAs nanostructures^[40].

1.3.3 光动力学疗法(PDT)

光动力疗法(PDT)结合了光响应材料, 如光催化剂和光敏剂(PSs)和光源来杀灭细菌细胞。目前, 光动力疗法主要应用于癌症, 作为治疗非侵袭性肿瘤的一种临床治疗方法。它被认为是抗癌应用的重要一步, 包括手术、化疗和放射治疗。此外, PDT 还被应用于其他难以治疗的疾病, 如类风湿性关节炎、光化性角化病和细菌感染。研究人员已将 PDT 用于抗菌活性, 因为其毒性低, 耐药几率可忽略不计, 不良反应轻微, 且具有良好的抗菌潜力。与传统的化疗、放疗和手术相比, PDT 具有微创、不受耐药性影响、治疗区域可控等优点^[41-49]。

光动力疗法通常需要三个主要成分: 光, 光敏剂, 还有氧气, 它们一起发生光动力学反应并产生具有细胞毒性的 ROS。如图 1-3 所示, 当暴露

于特定波长的激光时，处于基态的光敏剂吸收激光能量并将其转换为单重态。单重态光敏剂由于长寿命衰变，通过跨系统过程形成三重态光敏剂。三重态光敏剂将能量传递给附近的氧分子，形成单态氧($^1\text{O}_2$)。产生 $^1\text{O}_2$ 的光疗过程称为 II 型光动力疗法。此外，三重态光敏剂可以直接将一个质子或一个电子转移到底物(细胞膜或分子)上，分别形成自由基阴离子或自由基阳离子。这些自由基中间体与含氧物质反应生成 ROS，如超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$) 和过氧化氢(H_2O_2)。I 型和 II 型光动力疗法通常同时发生，反应的程度取决于光敏剂类型、底物种类和氧气浓度。值得注意的是，某些现有研究已经指出，在光动力过程中，II 型光动力学通常占主导地位，因为它需要较低的激发能量才能产生 $^1\text{O}_2$ 。目前，临床实践中使用的大多数类型的光敏剂都是基于 II 型 PDT 过程。因此，改进的光动力疗法，特别是传统的 II 型光动力疗法的战略设计对于精确的光疗具有重要意义^[50]。

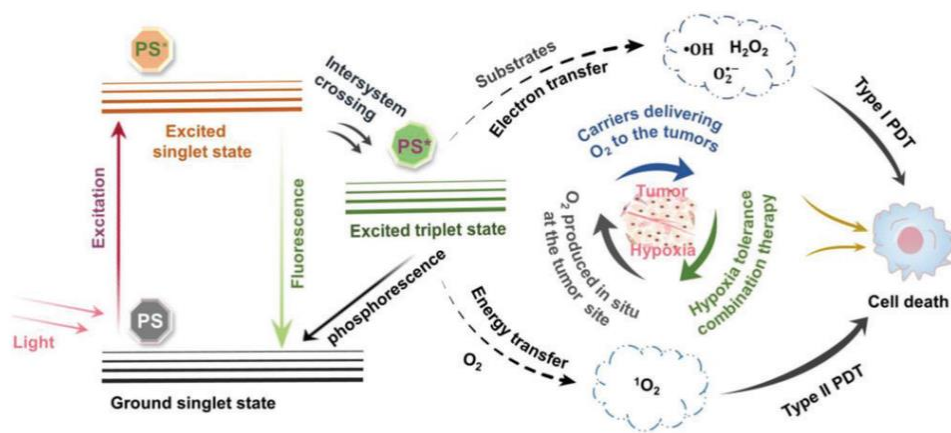


图 1-3. 光化学反应示意图。

Figure 1-3. Schematic illustration for the photochemical reactions of PDT^[50].

与 PTT 类似，由于其光源机制，细菌对 PDT 产生抗药性的可能性非常小。多年来，PDT 的光响应材料的生物相容性已经通过各种类型的功能化进行了优化，以获得更多和更有效的抗菌活性，从而为临床应用提供了更大的潜力。然而，在该策略可以在临床上充分利用之前，需要解决诸如 PDT 的短波长光穿透能力弱和 ROS 的活性寿命等限制。值得注意的是，由于不同的膜结构和有限的限制，光动力疗法对 G-细菌的效果不如对 G+细

菌 ROS 的穿透能力；这也需要进一步的研究。因此，在进一步应用于实际应用之前，需要充分解决 PDT 的局限性。

PSs 还与 PTA 一起使用，以实现 PDT 与 PTT 的协同作用。例如，石墨烯纳米带(GNRs)作为 PTA，与聚阳离子卟啉(Pp4N)作为 PS 应用于高温产生，以及阳离子 Pp4N 与带负电的细菌细胞之间的静电相互作用，以实现广谱抗药性抗菌活性。将新型的多氟烷基取代的硅酞菁和单壁碳纳米管(SWNTs)一起用于光照射后的生热和 ROS 的产生，并显示出协同的抗菌活性。类似地，将吡啶青绿(ICG)负载三氨丙基硅烷包裹的超顺磁性氧化铁纳米颗粒(APTMS@SPIONs)应用于浮游细胞和 G-(大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌)和 G+(表皮葡萄球菌)细菌的浮游细胞和生物膜上，研究了它们基于 PTT 和 PDT 的协同抗菌活性。将 ICG 和五甲基溴锰($\text{MnBr}(\text{CO})_5$)包裹到基于 2,2'-联吡啶-4-羧酸(BPY)修饰的多肽树枝状大分子的纳米凝胶(G3KBPY)中，用于 ICG&CO@G3KBPY 纳米复合材料，该复合材料被实验通过协同 PTT 和 PDT 来治疗生物被膜感染^[51-56]。

1.3.4 声动力学疗法(SDT)

声动力疗法(SDT) 是近年来一种治疗各种疾病的新的临床方法。SDT 被认为是一种很有前途的非侵入性癌症治疗方法。它涉及到通过使用超声振动和被称为声敏剂的超声敏感剂来产生活性氧(ROS)。这些试剂可以被超声波(US) 激活，进而触发 ROS 的产生，显示出细胞毒效应。与 PDT 等其他疗法相比，SDT 因其组织渗透率高、对周围正常组织的损伤最小以及使用 US 局部控制功能的能力而受到科学家的青睐。根据公认的空化效应理论，SDT 中使用的超声波可以诱导各种现象，如热效应、紫外线发光和由形成的微泡坍塌引起的物理爆炸。一般而言，有效的能量转换对于由外部激发激活的疗法至关重要，这使得声敏剂对 SDT 至关重要。声敏剂可以显著影响 ROS 的产生，从而影响整体治疗结果。研究人员已经开发了从有机分子到无机材料的各种声敏剂，展示了它们在消除肿瘤方面的出色治疗效果(图 1-4)^[57,58]。

然而，尽管声敏剂最近取得了进展，但 SDT 仍有需要改进的领域。低氧已被认为是以肿瘤细胞为靶点的 SDT 策略的主要挑战。与健康细胞不同，

肿瘤细胞的恶性增殖需要丰富的营养物质来支持它们的生长，导致线粒体介导的代谢活动增加。此外，肿瘤血管的不规则形成会导致血管或毛细血管的卷曲，由于血管内皮生长因子(VEGF) 表达增加等影响因素，会进一步减少氧气的利用，从而导致氧供需失衡。在正常细胞中，氧可以被装载到血红素上并运输到肿瘤细胞的线粒体中，在那里它可以用来产生三磷酸腺苷(ATP)。一种不稳定的高能化合物，在水解时提供能量。虽然正常细胞中的氧气水平可以维持供需平衡，但低氧的 TME 可以促进肿瘤细胞为资源探索和生存而采取侵略性状态，导致代谢失衡。总的来说，与 SDT 相关的氧气供应不足和快速耗氧在肿瘤组织中的广泛分布可能会削弱其治疗效果。

为了应对 SDT 治疗中的低氧挑战，已经开发了各种策略来提高氧浓度并防止恶性肿瘤内进一步的低氧(图 1-5)。这些策略旨在通过促进氧的可获得性来提高 SDT 的治疗效果，包括以线粒体耗氧为目标，防止缺氧恶化，以及补充外部氧源等方法。肿瘤细胞表现出韧性、快速增殖和转移潜能等侵袭性特征，这使得仅靠 SDT 就可以彻底根除肿瘤细胞。因此，SDT 与其他治疗方式的结合，即所谓的多模式治疗，得到了越来越多的关注。这些多模式方法提供了优越的肿瘤抑制能力，并具有临床应用的潜力^[59,60]。

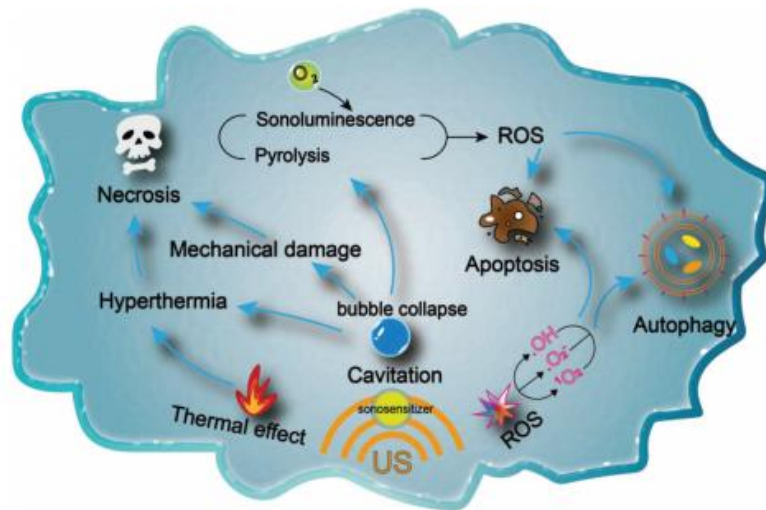


图 1-4. SDT 在疾病治疗中的治疗效果的潜在机制。

Figure1-4. Illustration of the mechanisms underlying the therapeutic effects of SDT in disease treatment^[60].

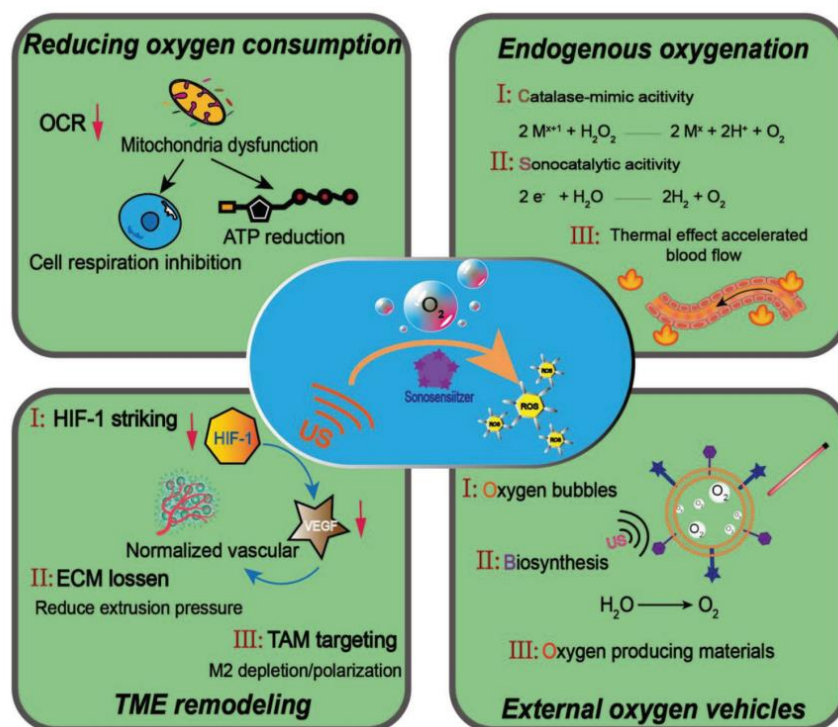


图 1-5.提出了缓解缺氧和提高 SDT 诱导的 ROS 的有效性新策略。这些策略主要集中在氧循环的不同方面，包括减少氧气消耗，促进内源性氧合，利用外部氧气载体，以及 TME 的重塑。

Figure1-5. The emerging strategies proposed to alleviate hypoxia and the enhanced efficacy of the SDT-induced ROS. These aforementioned strategies focusing primarily on different aspects of the oxygen cycle, including the reduction of oxygen consumption, the promotion of the endogenous oxygenation, the utilization of the external oxygen vehicles, and the remodeling of the TME^[60].

1.4 PFH 载药体系及在耐药性细菌感染的应用

1.4.1 PFH(全氟己烷)

全氟己烷(PFH) 是一种生物相容化合物，在室温下是液体，具有较高的蒸气压和相对较低的沸点。在化学和生物方面都是惰性的，作为氧气载体没有毒性。PFH 的应用领域是声学(治疗学和诊断学)^[61,62]。

1.4.2 PFH 纳米材料的应用

PFH 有许多诊断和治疗应用，包括癌症治疗、细胞治疗和医学成像等。全氟己烷纳米粒子用于超声和核磁共振，用于标记细胞，靶向肿瘤中的不同表位，

监测治疗效果，量化肿瘤特征，并检测肿瘤周围环境的变化。由于 PFH 的纳米粒子溶解大量的气体，具有因氧化肿瘤和增强抗癌治疗的效果而闻名，因为它是肿瘤缺氧的氧气载体^[63-75]。

在广泛的情况下，PFH 用作血液替代品时耐受性良好，尽管一些研究报道了体外模型中的毒性或不良免疫反应。在氧气输送期间，以 PFH 为基础的乳剂在改善肺损伤或缺氧动物的氧合方面是有效的。然而，基于 PFH 的氧气载体的长期安全性和有效性尚未得到全面证实^[76-80]。

目前，PFH 是一种潜在的医疗应用工具，但还需要进一步的研究来充分了解它们的生物兼容性，并指定这些材料的最适用途。

(1) PFH 在成像中的应用

PFH 纳米粒子是一种用于临床成像的新型成像技术。多个 PFH 纳米粒子检测和成像病理和生理变化。PFH 纳米粒子的长期系统半衰期允许与配体长期结合，这使得 PFH 适合于成像。这些分子成像探针主要用于磁共振成像，以标记细胞，靶向肿瘤中的特定表位，监测治疗效果，量化肿瘤特征，并检测肿瘤周围环境的变化。

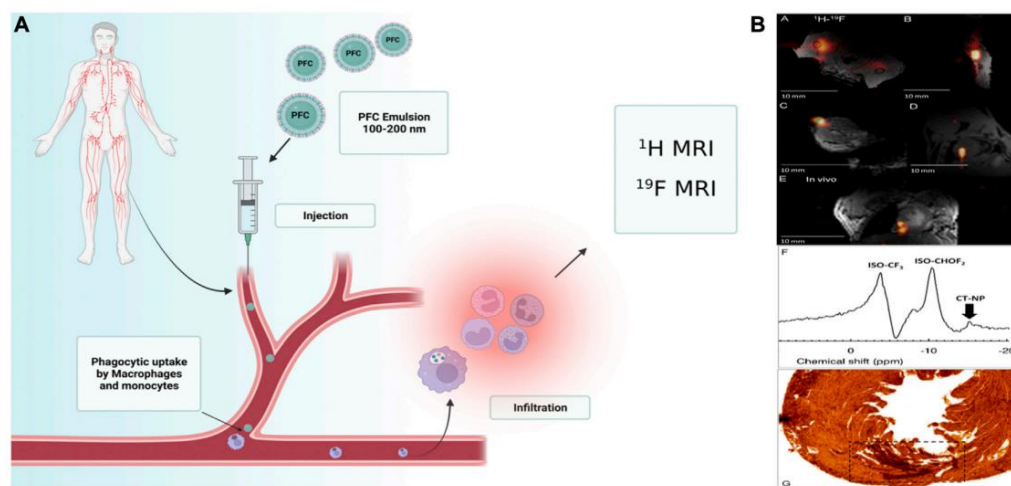


图 1-6.(A) 多功能液态全氟化碳纳米乳剂(100-200 nm) 示意图，可使用另一种货物进行改性靶向配体如适体和多糖，静脉注射，然后通过循环或局部吞噬作用指导细胞摄取，免疫细胞，如单核细胞和巨噬细胞；MRI 检测这些细胞的聚集。(B) 心肌内注射 CPC 后的死后和体内鼠心脏 ^{19}F MRI。

Figure 1-3. (A) Schematic illustration of a multifunctional liquid perfluorocarbon nanoemulsions (100–200 nm) which can be modified with another cargo targeting ligands such as aptamers and polysaccharides, intravenous injection, and then directs cellular uptake by circulating or provincial

phagocytic, immune cells such as monocytes and macrophages; MRI detects the collection of these cells. (B) Post-mortem and in vivo murine cardiac 19F MRI following intramyocardial CPC injections^[81].

(2) PFH 克服 PDT 和 RT 中的缺氧技术

当 PS 吸收光中的光子时，它从基态变为瞬变状态。这种不稳定状态选择两条路径中的一条。它通过发射荧光或能量损失从单线态返回到基态。第二条路径通过系统内的交叉点从单重态变为长寿命三元组状态。这种三重态模式通过两种机制将能量传递给氧分子。

当 PS 与有机分子反应时，自由基物种通过重新定位氢或电子来构建。最后，自由基物种可以与氧反应生成活性氧。在第二种机制中，处于激发态的 PSS 将能量直接传递给氧分子，导致活化的单线态氧的产生。这些 RO 氧化亚细胞器并破坏血管。它最终会导致光诱导的细胞死亡。在 PDT 技术中，PFH 中单线态氧的寿命比细胞环境和水的寿命更长，这导致了该技术的长期效应。放射治疗(RT) 利用电离辐射(X 射线或 γ 射线) 产生自由基，这些自由基直接或间接地损伤 DNA，对其他细胞成分造成 DNA 损伤，并诱导癌细胞死亡。在低氧条件下，这些损伤会立即愈合。这种方法在临床上用于治疗癌症。这种辐射的一小部分能量被肿瘤细胞所吸引。大多数这种能量会损害正常组织；这种方法是特异性的。但放射治疗过程中的氧分子会形成更具破坏性和问题的自由基过氧化氢，从而使细胞修复和 DNA 损伤无法稳定。电离辐射对细胞的损伤在很大程度上取决于细胞的氧气水平(图 1-6) ^[81,82]。

与健康细胞相比，肿瘤周围的环境是低氧的，生物膜微环境与肿瘤细胞周围环境有很多相似之处，因此 PFH 被广泛用于缓解微环境中乏氧的特点。

1.5 课题设计及主要研究内容

1.5.1 课题设计思路

本课题拟构建一个光热疗法和增强光动力效果的载氧纳米平台。

(1)针对耐药菌的生物膜微环境(乏氧、低 pH) 的特性，设计策略来解决耐药性问题。全氟己烷(PFH) 具有优异的生物相容性和载氧能力，可作为氧载体，但溶解性差；采用卵磷脂包裹解决疏水性问题，且卵磷脂与细胞膜结构类似，生物相容性好；缓解乏氧环境，释放氧气；利用光敏剂 TCPP，解决了光动力反

应中氧气不足的缺陷，增强了光动力效果；微环境低 pH, 前体材料稳定性；采用聚多巴胺(PDA) 作为纳米外壳，在中性及弱碱性条件下稳定，具有良好的光热效果，温度上升促进反应进程进行。

(2) 为了更好的将如何将 PFH/TCPP@SL@PDA 纳米材料应用广泛，将其应用到水凝胶，为了解决 PDA 在材料中作为纳米外壳和光热引发剂，光热效果不是很理想的问题，将光热材料替换为光热效果更好且毒性低的 Au NPs，将纳米材料置于水凝胶中解决了纳米粒子稳定性的问题，同时水凝胶还能防止局部过热造成热损伤。

1.5.2 主要研究内容

(1) 光热/光动力联合治疗的载氧纳米平台的构建及抗菌活性研究

通过在大豆卵磷脂(SL) 上负载 Meso-四(4-羧基苯基) 卟吩(TCPP)，进一步包覆全氟己烷(PFH)，最后在外层包覆聚多巴胺(PDA) 合成，合成 PFH/TCPP@SL@PDA (PTS@PDA) 纳米粒子。对材料进行一些列表征实验，包括 UV-vis、IR、SEM、DLS、Zeta 电位、EDS 等；根据材料特性还需要对进行活性实验，光热评估、GSH 消耗及活性氧检测，包括 CFU 实验、MIC 测定、细胞摄取实验、转录组学分析；利用 SEM 观察材料对于细胞形态的影响；生物膜消融评估，建立小鼠伤口模型，通过伤口愈合程度来评估药物的抑菌性能，观察结束后，取出小鼠主要器官和伤口组织切片的进行 H&E 染色来评估材料的生物安全性。

(2) 自供氧全氟己烷水凝胶联合光热/光动力抗菌活性研究

将 TCPP 和 SL 制成薄膜，然后将 PFH 和 Au NPs 包裹在内，即合成 PAT@SL 纳米粒子，再将 PAT@SL 加入到水凝胶的合成过程中去，最终得到 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶。对 PAT@SL 纳米粒子进行表征实验验证材料是否成功合成；以及光热光动力检测证明具有良好的体外活性，对纳米粒子进行体外抑菌实验证明材料是否具有良好的抑菌活性，将纳米粒子制成水凝胶后验证其力学性能以及其生物安全性。

第 2 章 光热/光动力联合治疗的载氧纳米平台的构建及抗菌活性研究

2.1 引言

生物膜是大多数细菌感染的原因，严重威胁人类健康。设计有效且危害较小的材料来抑制和去除生物膜仍然是一个重大挑战。复杂的生物膜结构使常规抗生素治疗无效，近年来，光热治疗(PTT)和光动力治疗(PDT)因其能有效治疗耐药细菌感染而备受关注。因此，协同纳米抗菌系统(PFH/TCPP@SL@PDA)通过光热和光动力治疗增强了疗效。通过在大豆卵磷脂(SL)上负载 Meso-四(4-羧基苯基)卟吩(TCPP)，进一步包覆全氟己烷(PFH)，最后在外层包覆聚多巴胺(PDA)合成。设计的纳米抗菌系统通过负载氧气缓解生物膜微环境的缺氧特性，增强 PDT 产生更多活性氧(ROS)的作用。它显著增强了生物膜的渗透性并改善了抗菌性能，对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 菌的抑制率超过 95%，同时抑制并去除了 90% 以上的生物膜。PDA 不仅起到了良好的纳米壳的作用，而且诱导出了相对温和的 PTT，促进了 PDT 的反应过程。PFH/TCPP@SL@PDA 具有良好的生物相容性，溶血试验显示红细胞溶血率低于 5%，有效缓解小鼠模型炎症症状，加快伤口愈合。总之，本研究为细菌抑制、抑制和生物膜去除提供了一种有效、安全的联合治疗策略。

在本研究中，提出了一种载氧纳米系统，通过结合光热和增强光动力治疗来根除细菌生物膜(图 2-1)。PFH 强氧吸附能力的启发，PFH 和 TCPP 与大豆卵磷脂(SL)共负载，外层包覆 PDA 外壳，表示为 PFH/TCPP@SL@PDA (PTS@PDA)。PTS@PDA 具有良好的稳定性和光热效率。PTS@PDA 缓解了缺氧微环境，降低了细菌间的群体感应，提高了 PDT 的效率，实现了 PTT 与 PDT 的协同治疗。本文研究了 PTS@PDA 的特性、PTS@PDA 的光热和光动力效应，并使用体外细菌抑制、生物膜去除实验和体内小鼠实验研究了协同抑制机制。PTS@PDA 具有良好的体内外活性，为新型抗菌材料的进一步开发研究提供了实践参考。

2.2 实验材料与设备

2.2.1 实验材料

中-四(4-羧基苯基) 卟吩(TCPP)、卵磷脂(SL)、全氟己烷(PFH)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、多巴胺(DA)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二氯甲烷(CH_2Cl_2)、DCFH-DA ($\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_7$)、溴化钾 (KBr)、细菌细胞活性测定试剂盒、无水甲醇、无水乙醇、磷酸盐缓冲液 (PBS)、氯化钠、TSB 培养基 SYTO9/PI 活/死细菌检测试剂盒均购自阿拉丁生化科技有限公司, 中国上海; 多耐药金黄色葡萄球菌 (MDR *S. aureus*, CCUG46147)、多耐药大肠杆菌(MDR *E. coli*, CCUG58542)均购自北纳创联生物科技有限公司。

2.2.2 实验仪器

表 2-1 实验仪器

Table 2-1 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
荧光分光光度计	RF-5301PC	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
X 射线光电子能谱仪	Thermo Scientific K-Alpha	赛默飞世尔科技公司
顺磁共振波谱仪	Bruker EMXplus-6/1	布鲁克生物科技公司
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

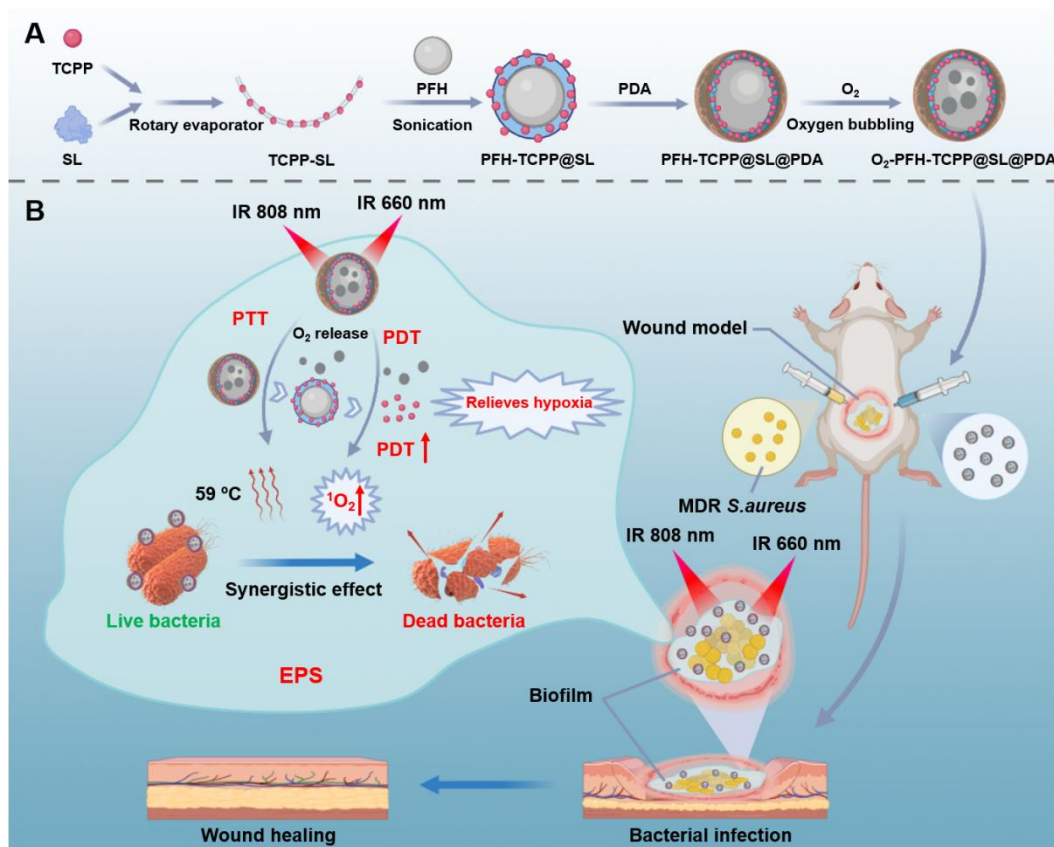


图 2-1.(A) PFH/TCPP@SL@PDA 合成示意图, (B) 通过 PTT 和 PDT 的协同作用向生物膜微环境输送氧气并去除生物膜。

Figure 2-1. (A) Schematic diagram of PFH/TCPP@SL@PDA preparation. (B) Oxygen delivery to hypoxic biofilm and biofilm removal by combined treatment of PTT and PDT.

2.3 实验方法

2.3.1 PFH/TCPP@SL@PDA 纳米材料制备及表征

(1) 制备 PFH/TCPP@SL@PDA

制备 PFH/TCPP@SL 纳米微滴: 将 TCPP (10 μg) 和 SL (100 μg) 溶解在二氯甲烷溶液中后倒入一个圆底烧瓶中, 然后使用旋转蒸发法除去溶剂, 得到透明的脂质膜。然后用 2 mL Tris (10 mM, pH 8.5) 缓冲液将脂质膜水合, 随后进行超声处理 20 min (开启 10 s, 关闭 5 s)。将分散体(10 mg/mL) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷却后, 向冰水浴中加入 100 μL PFH, 然后使用探针进行超声处理 5 min。合成载有 PFH 的纳米粒子(PFH/TCPP@SL)。

制备 PFH/TCPP@SL@PDA 纳米材料: 将获得的 PFH/TCPP@SL 转移至小

瓶中，然后在冰水浴下加入 PVP (100 mg/mL Tris 缓冲液) 和 100 μ L 氯化铁(20 mM)。搅拌 10 min 后，将 DA 溶于 Tris 缓冲液中并分别加入，最终浓度均为 0.5 mg/mL。在冰水浴中搅拌 12 小时后，将沉淀物(PFH/TCPP@SL@PDA，以下简称 PTS@PDA) 以 12000 rpm 的转速离心 10 min，用去离子水洗涤 3 次，并在 4 摄氏度下储存，直至再次使用。

(2) PFH/TCPP@SL@PDA 的表征

为了验证 PTS@PDA 的成功合成，使用紫外-可见分光光度计 UV-3600(日本岛津) 和傅里叶红外光谱仪 IR pressure-21(日本岛津) 获得了 PFH、TCPP、PDA、SL、TCPP-SL、PFH/TCPP@SL 和 PTS@PDA 的光谱。PFH/TCPP@SL 和 PTS@PDA 的光谱是通过使用激光粒度分析仪 Mastersizer 3000 (Malvern,UK) 测量粒径和 Zeta 电位。为了研究 PTS@PDA 的稳定性，连续七天进行了粒径测量。此外，使用扫描电子显微镜(JEM-2010 HR, Nippon Electron Co, Ltd.) 观察 PFH/TCPP@SL 和 PTS@PDA 的形貌。

2.3.2 光热性能评估

使用红外热成像系统(FOTRIC) 评估了 PTS@PDA 的 PTT 性能。将不同浓度的 PTS@PDA 放入 1.5 mL 离心管中，用 1.5 W/cm² 功率的 808 nm 激光照射不同时间；将 150 μ g/mL PTS@PDA 置于 1.5 mL 离心管中，用不同功率的激光照射。每隔 1 min 采集一次溶液的热成像和温度值。绘制了加热-冷却曲线，利用以下公式确定了光热转换效率(η)，其中 τ_s (223.17) 是通过冷却曲线的线性回归分析获得的。 M_d 和 C_d 是 PTS@PDA 溶液的质量(> 1 g) 和热容量(4.2 J/g*k)。不含光热试剂的背景能量输入表示为 Q_0 ，而水的稳态最高温度(37 °C) 表示为 $T_{\max \text{ water}}$ ， T_{surr} 表示环境室温(26 °C)。 $T_{\max}$ 值表示 PTS@PDA 溶液达到的稳定最高温度(58.6 °C)，其中 I 表示激光功率， A_{808} 对应于 PTS@PDA 在 808 nm 处的吸光度。

$$\tau_s = m_d C_d / h S$$

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

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

2.3.3 载氧率与活性氧检测

用溶解氧试剂盒测量不同分组(H_2O 、PTS@PDA 和 O_2 -PTS@PDA) 的溶液中的溶解氧含量, 并使用碘量法分析溶解氧含量的差异。

用 1, 3-二苯基异苯并呋喃(DPBF) 探针检测 ROS 的存在。向含有 $150 \mu\text{g/mL}$ PTS@PDA 和 O_2 -PTS@PDA 的悬浮液中加入 $10 \mu\text{L}$ DPBF 溶液(5 mg/mL)。每隔 1 min 记录溶液的紫外-可见光谱, 同时用强度为 0.4 W/cm^2 的 660 nm 近红外激光连续照射 5 min 。(在下文中, PTS@PDA 为 O_2 -PTS@PDA。)

2.3.4 细胞内光热和光动力检测

本文进一步研究了材料在体内的光热和光动力行为验证其性能。取不同浓度的 PTS@PDA 与不同菌液孵育 4 h 后, 用功率 1.5 W/cm^2 808 nm 近红外激光照射, 用光热成像仪记录结果。取分组分别为 PBS, TCPP, PTS@PDA 与不同菌液孵育 4 h 后, 细菌离心除去材料, 加入 $10 \mu\text{M}$ 的 $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ 探针, 孵育 30 min 。然后用 0.4 W/cm^2 660 nm 的近红外激光对其进行治疗, 用正置荧光显微镜观察并记录结果。

2.3.5 体外抗菌实验

首先在两个平行组中测定 PTS@PDA 的最小抑制浓度(MIC): NIR 组(2.0 W/cm^2 , 5 min) 和正常(无 NIR) 组。在 96 孔板加入 $100 \mu\text{L}$ 灭菌后的 TSB 培养基, 然后将 PTS@PDA ($200 \mu\text{g/mL}$) 进行梯度稀释。最后, 向每个孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 细菌稀释液($1 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$)。将平板在 37°C 中 孵育 12 h , 使用酶标记在 600 nm (OD_{600}) 测量吸光度。用抗生素氨苄青霉素和硫酸卡那霉素作为对照。

采用细菌群落计数法检测 PTS@PDA 对 MDR *E.coli* 和 MDR *S. aureus* 的体外抗菌活性。简而言之, 这两种细菌首先放在 37°C 的液体培养基(TSB) 中培养过夜, -二次活化等待细菌生长到对数期, 然后将得到的菌液与 PFH@SL, TCPP, PDA, PFH/TCPP@SL, PTS@PDA(浓度为 $150 \mu\text{g/mL}$) 与细菌孵育 2 h , 非光组(-NIR) 置于黑暗环境中, 见光组(+NIR) 分别用 1.5 W/cm^2 的 808 nm 和 0.4 W/cm^2 的 660 nm 近红外激光照射 5 min (下文记作近红外激光照射 5 min) , 取 $100 \mu\text{L}$ 均匀涂在培养皿上, 37°C 孵 12 h , 对 CFU 进行计数并用相机记录。

2.3.6 体外生物膜模型及消融试验

将处于对数期的 MDR *E. coli* $200 \mu\text{L}$ ($1.0 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$) 加入到 96 孔板中, 在 37°C 培养 48 h , 形成生物膜。(注:每个测试梯度有 2 个重复)。从每个孔

中取出上清液，加入 200 μL 不同浓度 PTS@PDA 的溶液，用近红外激光照射 5 min，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。用 100 μL 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 μL 结晶紫(0.2 %)染色 30 min。用生理盐水清洗样品三次，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 %的乙酸溶液使生物膜完全溶解。使用酶标仪测量 OD_{492} 值。MDR *S. aureus* 的生物被膜的抑制实验如上所述。

2.3.7 Live-Dead 试验检测细胞凋亡率

为了探究不同组分对于细菌的影响，将细菌二次活化以及稀释到 1.0×10^6 CFU/mL，分别与 PBS、PFH@SL、TCPP、PDA、PFH/TCPP@SL、PTS@PDA 混匀后孵育 2 h，用近红外激光照射 5 min 后孵育 4 h，孵育结束后用活/死菌双重染色试剂 SYTO9 和 PI 在黑暗环境中染色 20 min，染色结束时，除去多余的染液，再用纯水清洗三次，最后将细菌悬浮在 1.5 mL 纯水中，取 400 μL 在载玻片上烘干，观察其荧光共定位，剩余菌液用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.3.8 细胞形态学观察

将对数期耐药性细菌与 PBS、PFH@SL、TCPP、PDA、PFH/TCPP@SL、PTS@PDA 混匀后孵育 2 h，用近红外激光照射 5 min，继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 下培养 10 h。离心收集细菌(5000 rpm，5 min)并用 PBS 洗涤两次。用 2.5 wt%戊二醛处理后再用 PBS 洗涤两次。收集的细菌用乙醇进行梯度(35、50、70、80、95 和 100 wt%)脱水，每个梯度处理 15 min。将收集的细菌冻干，最后通过扫描电子显微镜(SEM) 观察细胞形态。

2.3.9 转录组测序分析

研究了不同组分对于 MDR *E. coli* 转录过程的影响。样本分为 Blank，PDA，TCPP 和 PTS@PDA，分别记作 Blank，PTT，PDT 和 PTDT。样本经过提取 total RNA，去除 rRNA 并富集 mRNA，随后按照链特异性建库方式建库。然后进行 RNA-seq 分析，使用统计学方法，比较两个条件或多个条件下的基因表达差异，从中找出与条件相关的特异性基因，然后进一步分析这些特异性基因的生物意义^[83,84]。

2.3.10 促伤口愈合动物模型

实验动物(KM 小鼠，雌性，4 周) 获自南京大学模型动物研究中心(中国南

京), 均经苏州大学(中国苏州) 动物护理批准, 且按《动物福利法》和《实验动物护理和使用指南》协议进行饲养。小鼠按体重进行分组, 每组 5 只, 小鼠房间始终保持适宜温度(20 ± 2 °C) 和湿度 (50-60 %), 喂养无菌水和小鼠专用饲料, 观察 5 天并记录体重变化^[85]。之后建立伤口模型, 分不同组分, 每组 3 个平行实验。每只小鼠背部切开直径约 12.5 mm 的伤口, 接种 MDR *S. aureus*(1.0×10^8 CFU/mL)。每天用不同组分材料处理, 光照组用近红外激光光照 5 min。记录小鼠体重, 测量伤口大小。在处理期间, 用光热成像仪拍摄并记录处理过程。将小鼠处死后, 切下伤口皮肤组织以及心肝脾肺肾保存在 4 %多聚甲醛中, 之后进行 H&E 分析, 同时对伤口皮肤组织进行 Masson 染色分析。

2.3.11 生物毒性实验

对 PTS@PDA 进行一系列安全性评价。取新鲜羊血加入 EDTA 处理后获得红细胞, 将不同浓度 PTS@PDA(50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$), 阳性对照为 H_2O , 阴性对照为 PBS, 与红细胞液混合, 37 °C 水浴 1, 12, 24 h 后 1000 r/min 离心 5 min 后取 200 μL 于 96 孔板在 570 nm 处检测。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)

将人巨噬细胞铺板培养 24 h, 吸去培养基, 用 PBS 缓冲液洗两次, 加入不同浓度的 PTS@PDA, 每组设置 9 个浓度梯度(0、12.5、25、50、100、150、200、300 $\mu\text{g/mL}$), 各自设置三个平行。孵育 24 h 后弃去上清液, 用 PBS 清洗一遍。每孔加入 100 μL CCK-8 孵育 1 h, 用酶标仪检测 OD_{450} 。

为了研究纳米材料的安全性, 动物实验结束后, 取出小鼠主要心肝脾肺肾和伤口组织并保存在 4 %多聚甲醛固定液中, 进行 H&E 染色, 伤口组织额外进行 Masson 染色, 观察组织切片, 分析不同实验组别小鼠心肝脾肺肾等器官的生理变化, 评估材料的体内生物安全性。

2.4 实验结果与讨论

2.4.1 PFH/TCPP@SL@PDA 的表征

本研究将光敏剂 TCPP 与 SL 制成薄膜, 通过薄膜分散超声处理制备 PFH/TCPP@SL, 然后将 PDA 包裹在外层形成 PTS@PDA。通过动态光散射 (DLS) 检测纳米颗粒的水化尺寸。结果表明, 包裹 PFH 后 TCPP@SL 薄膜的水化尺寸约为 228 nm, 外层包裹一层 PDA 后约为 274 nm(图 2-2 a)。水化尺寸在

一周内保持稳定, 表明 PTS@PDA 具有良好的胶体稳定性(图 2-2 b)。根据 TCP 标准曲线, TCP 在 PTS@PDA 中的负载率为 26 % (图 2-3), 合成过程中材料电位为负, 但强度一直在变化, 表明材料可能合成成功(图 2-2 c)。透射电镜照片显示, PFH/TCP@SL、PTS@PDA 形貌均一, 纳米粒子大小均匀, 大小在 200 ~ 300 nm 之间(图 2-2 d, e)。TCP 在 400 nm 附近有较强的 Soret 带, 归因于卟啉环轨道 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收, 紫外-可见光谱证实了 TCP 的成功负载, 200 ~ 300 nm 之间不同强度的吸收峰可以反映 PFH 和 PDA 的成功负载(图 2-2 f)。TCP 红外光谱特征峰在 1590-1300 cm^{-1} 范围内, 1590-1300 cm^{-1} 为 C=N 伸缩振动峰, 1000 cm^{-1} 左右为卟啉骨架振动峰, 3550-3300 cm^{-1} 为 N-H 伸缩振动峰, 970-960 cm^{-1} 为 N-H 面内变形峰(图 2-2 g, h ①②)。C-F 特征峰位于 1250 cm^{-1} , 结果表明 PFH 成功包封, 在 1660-1700 cm^{-1} 区域出现酮基, 代表聚多巴胺中存在酮基。在 1700-1750 cm^{-1} 区域出现羧酸拉伸振动, 表示聚多巴胺中存在羧酸基团, 表明 PDA 成功包裹在芯材外层(图 2-2 g, h ③④)。一系列表征实验表明, PTS@PDA 已经成功合成。

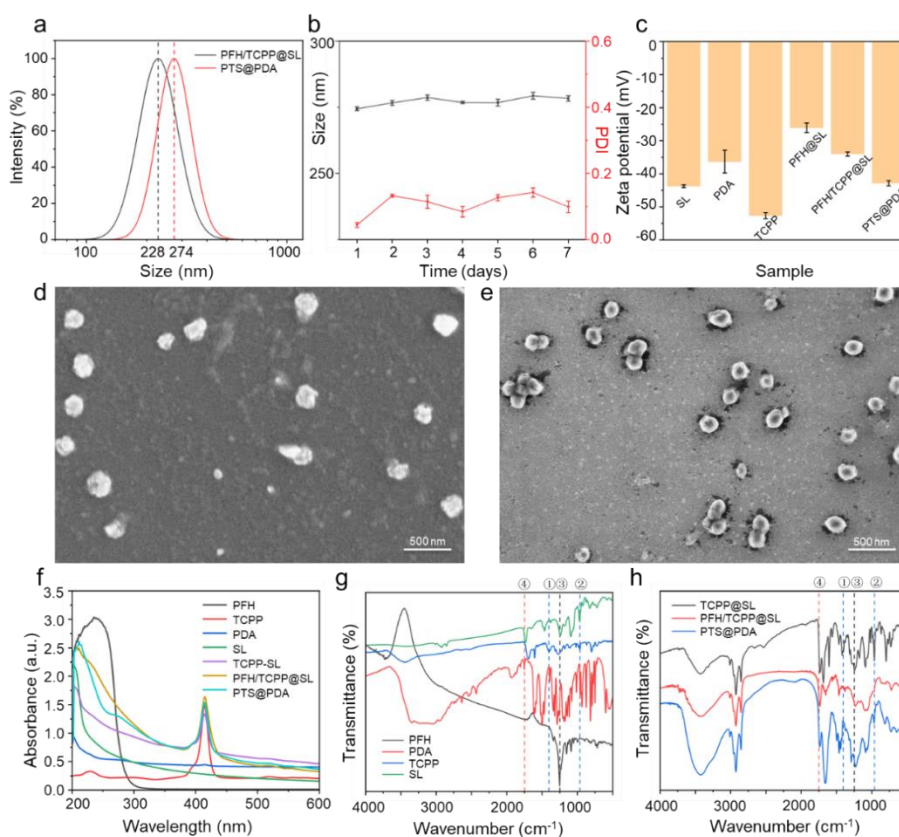


图 2-2. (a) PFH-TCP@SL、PTS@PDA 的粒径; (b) PBS 中 PTS@PDA 的粒子稳定性; (c)

PFH、TCPP、PDA、SL、TCPP@SL、PFH-TCPP@SL、PTS@PDA 的 ζ 电位；(d) PFH-TCPP@SL 的 SEM 图像；(e) PTS@PDA 的扫描电镜图像；(f) UV-Vis 光谱，(g) PFH(③)、PDA(④)、TCPP(①②)、SL 的 IR 光谱；(h) TCPP@SL(①②)、PFH-TCPP@SL(①②③)、PTS@PDA(①②③④) 的红外光谱。

Figure 2-2. (a) Particle sizes of PFH-TCPP@SL, PTS@PDA; (b) particle stability of PTS@PDA in PBS; (c) zeta potentials of PFH, TCPP, PDA, SL, TCPP@SL, PFH-TCPP@SL, PTS@PDA; (d) SEM images of PFH-TCPP@SL; (e) SEM images of PTS@PDA; (f) UV-Vis spectra, (g) IR spectra of PFH(③), PDA(④), TCPP(①②), SL; (h) IR spectra of TCPP@SL(①②), PFH-TCPP@SL(①②③), PTS@PDA(①②③④).

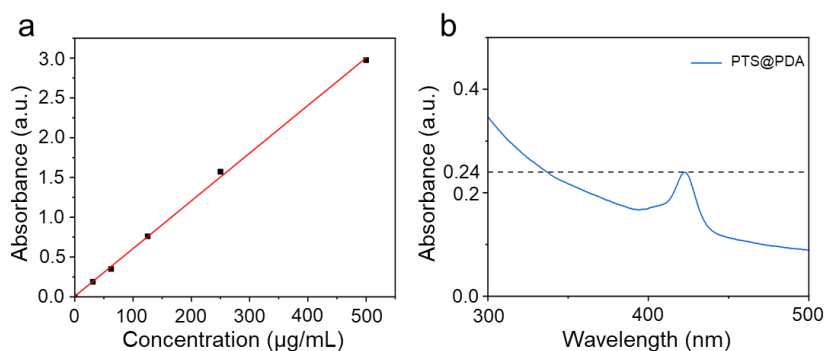


图 2-3. TCPP 的标准曲线；(b) 150 μg/mL PTS@PDA 的紫外-可见光谱。

Figure 2-3. (a) the standard curve of TCPP; (b) The ultraviolet-visible spectrum of 150 μg/mL PTS@PDA.

2.4.2 PFH/TCPP@SL@PDA 的光热性能

探索了 PTS@PDA 的光热性能。图 2-4 a、图 2-4 b 分析了不同 PTS@PDA 浓度、不同激光照射功率下的光热升温曲线。图 2-4 c、图 2-5 a 的热像更直观地反映了 PTS@PDA 的升温变化，反映了 PTS@PDA 优越的光热性能。照射后 9 min, PTS@PDA 在 150 μg/mL 浓度下的温度和 PTS@PDA 在 1.5 W/cm² 808 nm 激光照射下的温度分别从 26 °C 和 26.5 °C 快速升高至 60.8 °C 和 60.6 °C。在 96 孔板上光处理加标菌液的热图像显示了体外细菌抑制的最佳治疗温度(图 2-5 b)。经过 6 min 的光照和物质处理后, MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* (PTS@PDA 浓度 150 μg/mL) 的菌液温度均达到 60 °C, 与实际治疗所需的有效治疗温度相对应。计算的光热转换效率(η) 为 39.1 %, 进一步验证了其优异的光热性能(图 2-4

d, e)。值得注意的是, 经过四次激光冷热循环后, PTS@PDA 光热稳定性良好, 如图所示(图 2-4 f)。

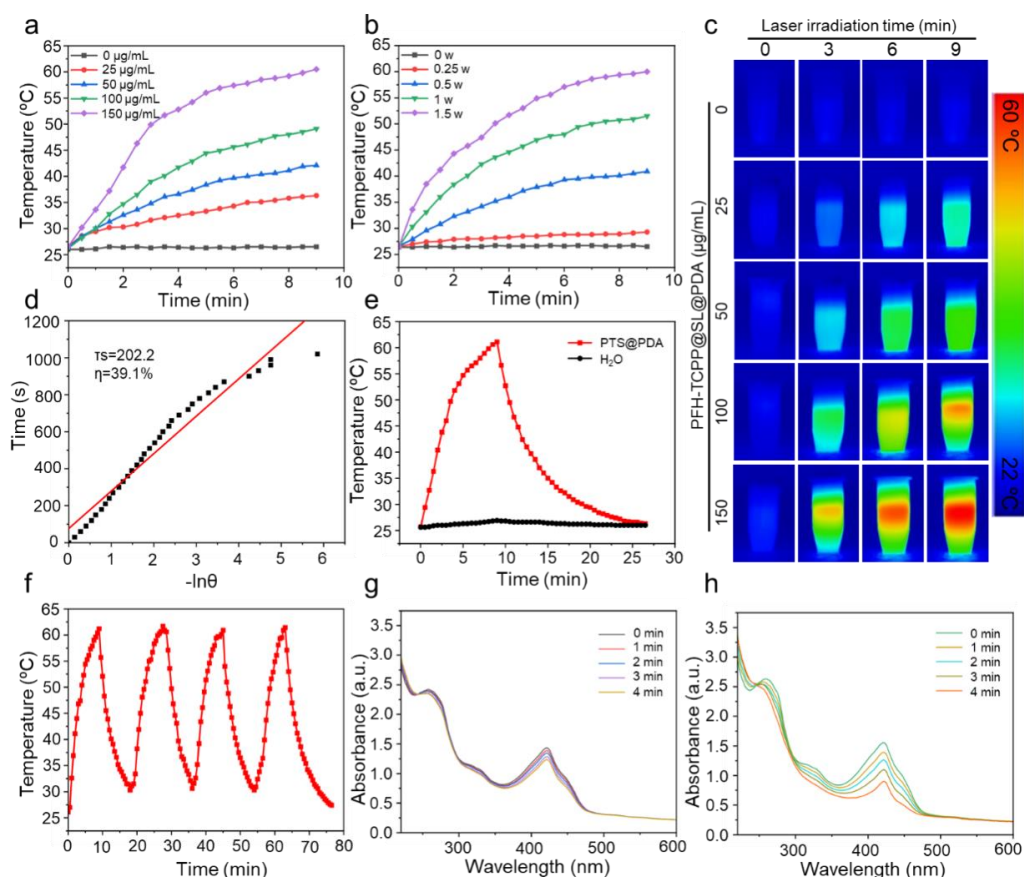


图 2-4. PTS@PDA 的光热和光动力特性。(a) 在近红外光照射(1.5 W/cm^2 , 808 nm) 下不同浓度(0 、 25 、 50 、 100 和 150 g/mL) PTS @ PDA 的光热升温曲线; (b) 不同 NIR 激光强度 (0 、 0.25 、 0.5 、 1.0 和 1.5 W/cm^2) 下 PTS@PDA (150 g/mL) 的光热转换曲线; 用近红外光 (1.5 W/cm^2 , 808 nm) 照射的不同 PTS@PDA 浓度(0 、 25 、 50 、 100 和 150 g/mL) 的热成像图像; (d) 时间与 $-\ln(\theta)$ 的线性回归曲线; (PBS 和 PTS@PDA (150 g/mL) 溶液在 1.5 W/cm^2 近红外辐射强度下的升温 and 降温曲线; (f) PTS @ PDA(150 g/mL) 在近红外光照射(1.5 W/cm^2 , 808 nm) 下连续四个开/关循环的升温 and 降温曲线。PTS@PDA (g) 对比 O_2 -PTS@PDA (h) ROS 产生量(浓度: 150 µg/mL)。

Figure 2-4. Photothermal and photodynamic properties of PTS@PDA. (a) Photothermal warming curves of PTS@PDA at different concentrations (0 , 25 , 50 , 100 , and 150 µg/mL) under near-infrared light irradiation (1.5 W/cm^2 , 808 nm); (b) Photothermal ramp-up curves of PTS@PDA (150 µg/mL) at different NIR laser intensities (0 , 0.25 , 0.5 , 1.0 , and 1.5 W/cm^2); (c) Thermal imaging images of different PTS@PDA concentrations (0 , 25 , 50 , 100 , and 150 µg/mL) irradiated

with near-infrared light (1.5 W/cm^2 , 808 nm); (d) Linear regression curve of time versus $-\ln(\theta)$; (e) Warming and cooling curves of PBS and PTS@PDA ($150 \text{ }\mu\text{g/mL}$) solution at NIR irradiation intensity of 1.5 W/cm^2 ; (f) Heat-up and cool-down curves of PTS@PDA ($150 \text{ }\mu\text{g/mL}$) under near-infrared light irradiation (1.5 W/cm^2 , 808 nm) for four consecutive on/off cycles. PTS@PDA (g) versus O_2 -PTS@PDA (h) ROS production (concentration: $150 \text{ }\mu\text{g/mL}$).

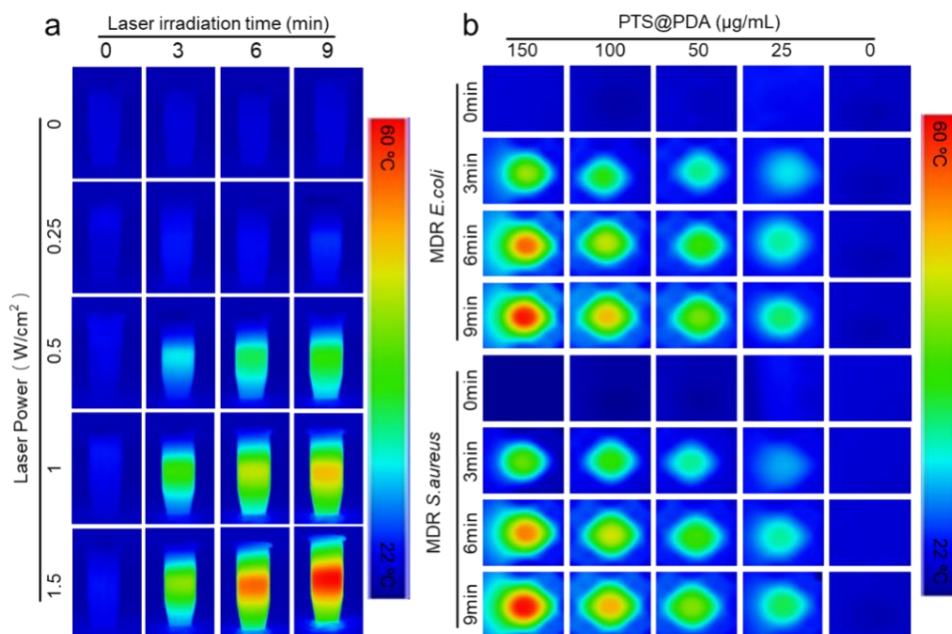


图 2-5.(a) 在不同的近红外激光强度(0 、 0.25 、 0.5 、 1.0 和 1.5 W/cm^2) 下对 $150 \text{ }\mu\text{g/mL}$ PTS@PDA 的热成像图片; (b) 与菌液混合孵育一段时间后的 PTS@PDA 的热成像图片。

Figure 2-5. (a) Thermal imaging of $150 \text{ }\mu\text{g/mL}$ PTS@PDA under different near-infrared laser intensities (0 , 0.25 , 0.5 , 1.0 , and 1.5 W/cm^2); (b) Thermal imaging of PTS@PDA mixed with bacterial liquid after incubation for a period of time.

2.4.3 PFH/TCPP@SL@PDA 增强型光动力检测

以往报道已经证实, TCPP 在工作中具有良好的光动力性能。在增强 TCPP 光动力效应的同时, 联合负载 O_2 的 PFH 和 TCPP 可缓解微环境缺氧问题。表 2-3 用 Image J 分析了(图 2-6 a) 的光强。结果表明, O_2 -PTS@PDA 比 H_2O 多 3 mg/L (图 2-6 a)。稀释样本梯度后, 对获得的拟合曲线进行分析, 还发现 O_2 -PTS@PDA 比 H_2O 更容易加载氧气(图 2-6 b)。溶解氧实验结果表明, O_2 -PTS@PDA 比 PTS@PDA 和 H_2O 具有更强的溶解氧能力。将活性氧的生产量与 DPBF 的消费量进行比较。载氧 O_2 -

PTS@PDA 比 PTS@PDA 产生更多的 ROS(图 2-4 g, h)。细胞内 ROS 结果显示, $H_2DCFH-DA$ 可与 1O_2 反应生成带荧光的 DCFH-DA(图 2-9 d)。光和物质处理后的细菌细胞均显示 PTS@PDA 和 TCPP 均产生 ROS, 因而产生较强的绿色荧光, 说明 PTS@PDA 在实际处理过程中能够产生大量的 ROS 物种, 且光动力效应明显。

表 2-3. 用 Image J 分析图 2-6.(a) 的光强

Table 2-3. Analyze the light intensity of Figure 2-6. (a) with Image J.

	1	2	3	4	5	6
Area	1080	1080	1080	1080	1080	1080
IntDen	146123	160290	174987	104586	112103	118669
Mean	135.30	148.42	162.03	96.84	103.80	109.88
7	8	9	10	11	12	13
1080	1080	1080	1080	1080	1080	1080
126520	135056	142540	152072	159682	169970	198977
117.15	125.05	131.99	140.81	147.85	157.38	184.24

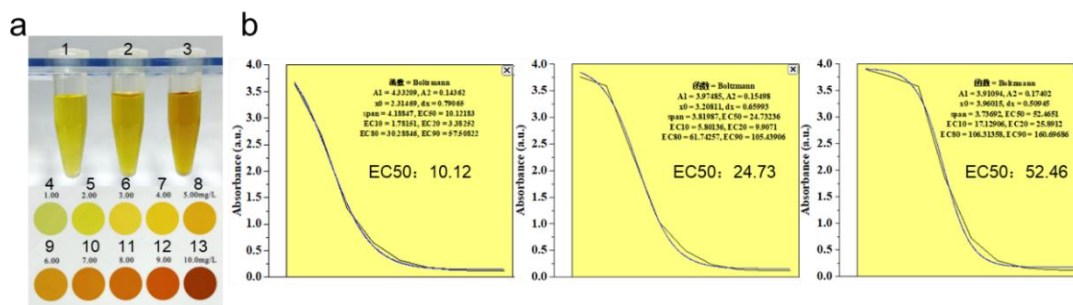


图 2-6. (a)分别用溶解氧试剂处理 H_2O 、PTS@PDA 和 O_2 -PTS@PDA, 然后与色卡图像进行比较; (b)稀释样品梯度后, 通过测量 280 nm 处的吸光度将获得的数据拟合成曲线, 分析并比较 EC50 大小以比较氧负荷。

Figure 2-6. (a) H_2O , PTS@PDA, O_2 -PTS@PDA were treated with dissolved oxygen reagent respectively, and then compared with the images of color cards; (b) After diluting the sample gradient, the obtained data were fitted into a curve by measuring the absorbance at 280 nm,

Analyze and compare EC50 size to compare oxygen load.

2.4.4 体外抑菌活性

根据 PTS@PDA 对两种耐药细菌的 MIC 值分析, 确定 PTS@PDA 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的 MIC 值分别约为 50 和 60 $\mu g/mL$ 。结果见表 2-4。

使用标准平板计数评估了纳米材料对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的抗菌作用。不同处理后培养板的图像及统计见图 2-7。TCPP 和 PDA 单剂

治疗对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的抗菌作用最小。然而，当 PFH 负载氧时，PFH/TCPP@SL 处理比 TCPP 处理能杀死更多的细菌，这归因于 PFH 中负载的氧促进 ROS 的产生；此外，进一步与 PDA 相结合，PTS@PDA 光热以及增强的光动力处理从几乎所有菌株中消除了细菌。PTS@PDA 的细菌抑制活性与其浓度呈正相关(图 2-8)。这些结果表明 PTS@PDA 纳米材料具有良好的广谱抗菌活性。

表 2-4 最低抑菌浓度值的测量(+NIR, $\mu\text{g/mL}$)Table 2-4 Measurement of MIC value (+NIR, $\mu\text{g/mL}$)

Materials	Bacteria	
	MDR <i>E. coli</i>	MDR <i>S. aureus</i>
TCPP	>150	>150
PDA	>150	>150
PFH/TCPP@SL	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10
PTS@PDA	50 $\pm$ 10	60 $\pm$ 10
Kanamycin	4 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2
Ampicillin	7 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2

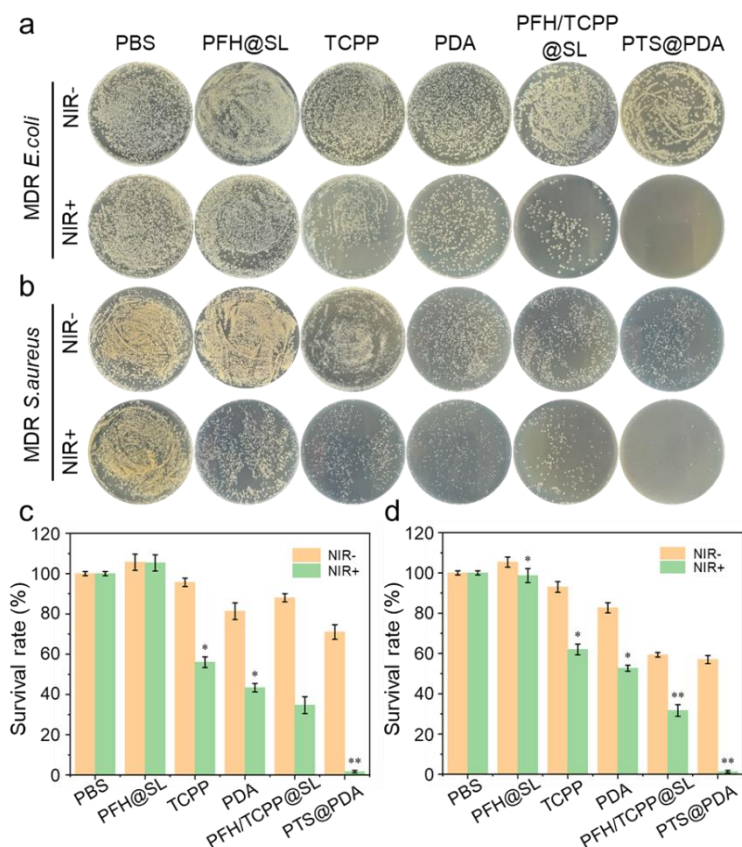


图 2-7. 体外抗菌活性。(a) 150 $\mu\text{g/mL}$ 不同组分在有光或无光条件下对 MDR *E. coli* 存活率影响的平板照片；(b) 150 $\mu\text{g/mL}$ 不同组分在有光或无光条件下对 MDR *S. aureus* 小鼠存活率影响的平板照片；(c) 150 $\mu\text{g/mL}$ 不同组分在有光或无光条件下对 MDR *E. coli* 存活率影响的柱状图；(d) 150 $\mu\text{g/mL}$ 不同组分在有光或无光条件下对 MDR *S. aureus* 存活率影响的柱状图。

活率影响的平板照片；(c) 细菌存活率对应于(a) 中的平板菌落数；(d) 细菌存活率对应于(b) 中的平板菌落数。结果表示为平均 SD, $n = 3$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 2-7. Antibacterial activity *in vitro*. (a) Plate photos of the effects of 150 $\mu\text{g/mL}$ of different components on the survival rate of MDR *E. coli* with or without light; (b) Plate photos of the effects of 150 $\mu\text{g/mL}$ of different components on the survival rate of MDR *S. aureus* with or without light; (c) The survival rate of bacteria corresponds to the number of plate colonies in (a); (d) The survival rate of bacteria corresponds to the number of plate colonies in (b). The results were expressed as the average SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

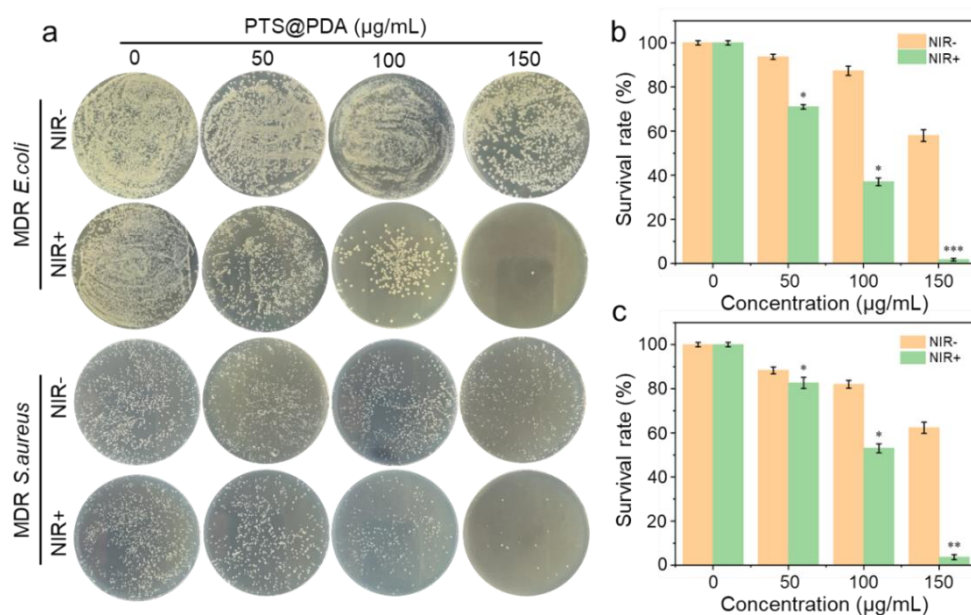


图 2-8. (a) 在有光或无光的情况下不同浓度的 PTS@PDA 对 MDR *E. coli* 存活率的影响的平板照片；(b) 细菌存活率对应于(a) 中的平板菌落数；(c) 在有光或无光的情况下不同浓度的 PTS@PDA 对 MDR *S. aureus* 存活率的影响的平板照片；(d) 细菌的存活率对应于(c) 中的平板菌落数。结果以平均值±标准差表示, $n = 3$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 2-8. (a) Plate photographs of the effect of different concentrations of PTS@PDA on the survival rate of MDR *E. coli* in the presence or absence of light; (b) The survival rate of bacteria corresponds to the number of plate colonies in (a); (c) Plate photographs of the effect of different concentrations of PTS@PDA on the survival rate of MDR *S. aureus* in the presence or absence of light; (d) The survival rate of bacteria corresponds to the number of plate colonies in (c). Results are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4.5 生物膜清除能力

结晶紫染色评价 PTS@PDA 对生物上皮膜的抑制作用, 见(图 2-9 a)。空白为未处理的生物上皮膜, 呈较深的紫色, 表明形成的生物上皮膜较厚, 且随着 PTS@PDA 浓度的增加。伴有颜色变淡, 表明生物上皮膜厚度逐渐变薄, 而图 2-9 b 为光镜下观察到的生物上皮膜。定量结果(图 2-9 c) 显示, 随着生物膜变薄, 特定波长处的吸光度变低。上述结果表明, PTS@PDA 具有去除生物膜并抑制其形成的作用。

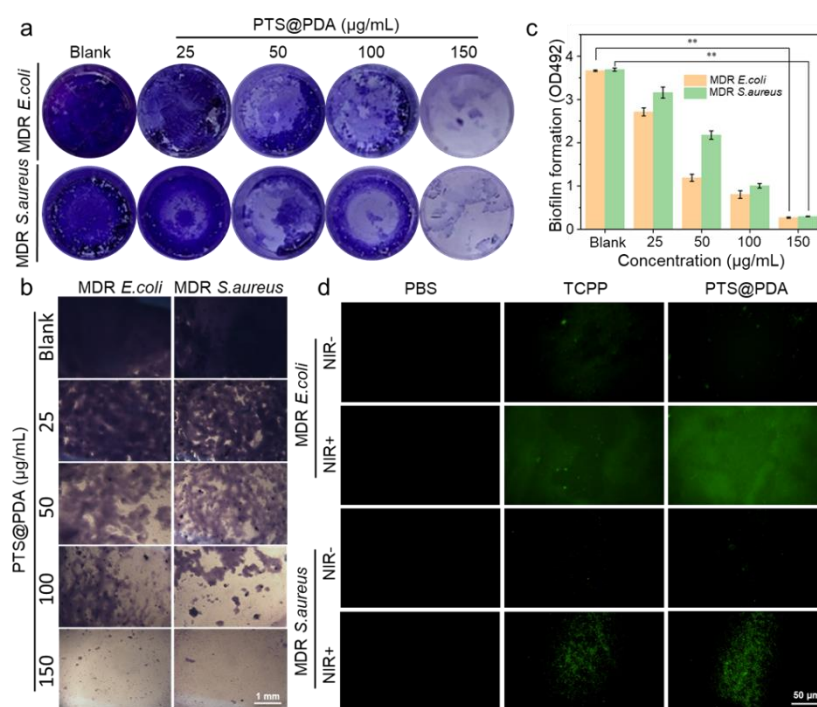


图 2-9. 不同浓度 PTS@PDA 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 菌的生物膜消融作用。(A) 用结晶紫染色的 96 孔板中 PTS@PDA+NIR 处理的生物膜的数码照片；(b) 光学显微镜下观察生物膜；(c) 结晶紫染色生物膜在 492 nm 处的紫外-可见吸收强度。结果表示为平均 SD, $n = 3$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(d) 在有或无光照的情况下, MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 氏菌中产生活性氧。

Figure 2-9. Biofilm ablation of MDR *E. coli* and MDR *S. aureus* by different concentrations of PTS@PDA. (a) A digital photograph of a biofilm treated by PTS@PDA+NIR in a 96-well plate stained with crystal violet; (b) Biofilm observed under an optical microscope; (c) UV-vis absorption intensity of crystal violet dyed biofilm at 492 nm. The results were expressed as the average SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (d) The production of ROS in MDR *E. coli* and MDR *S. aureus* with or without light.

2.4.6 抗菌活性统计学分析

使用 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 作为模型细菌，通过活/死染色实验验证了 PTT 和纳米材料增强的 PDT 杀菌效果。在 PI 染色下，已死亡的细菌会发出红色荧光；在 SYTO9 染色下，活菌会发出绿色荧光。图 2-10 中的结果显示，用 PBS 和 PFH@SL 处理的细菌发出明显的绿色荧光，表明大多数细菌仍然存活，与单独用 TCP 和 PDA 处理的细菌相反，后者表现出不同程度的细菌凋亡，可能是因为 PTT 反应产生的热量以及由 PDT 产生的 ROS 形成了一定程度的细菌杀灭效果。与 TCP 组相比，PFH/TCP@SL 治疗后的死亡细菌更多，可能是因为 PFH 所负载的氧气可通过 TCP 发生的光动力作用产生更多的 ROS，导致大多数细菌死亡。值得注意的是，增添 PTT 策略后，经 PTS@PDA 处理的细菌发出更多的红色荧光信号，表明具有显著的杀菌效果。流式细胞术定量活细胞与死细胞的数量及比值，并验证与菌落计数法检测的抗菌活性一致。根据流式细胞术结果(图 2-11)得出，PTS@PDA 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的致死率超过 95%，这表明 PTS@PDA 可能是未来抗菌治疗的一种有前景的 PTT/PDT 抗菌药物。

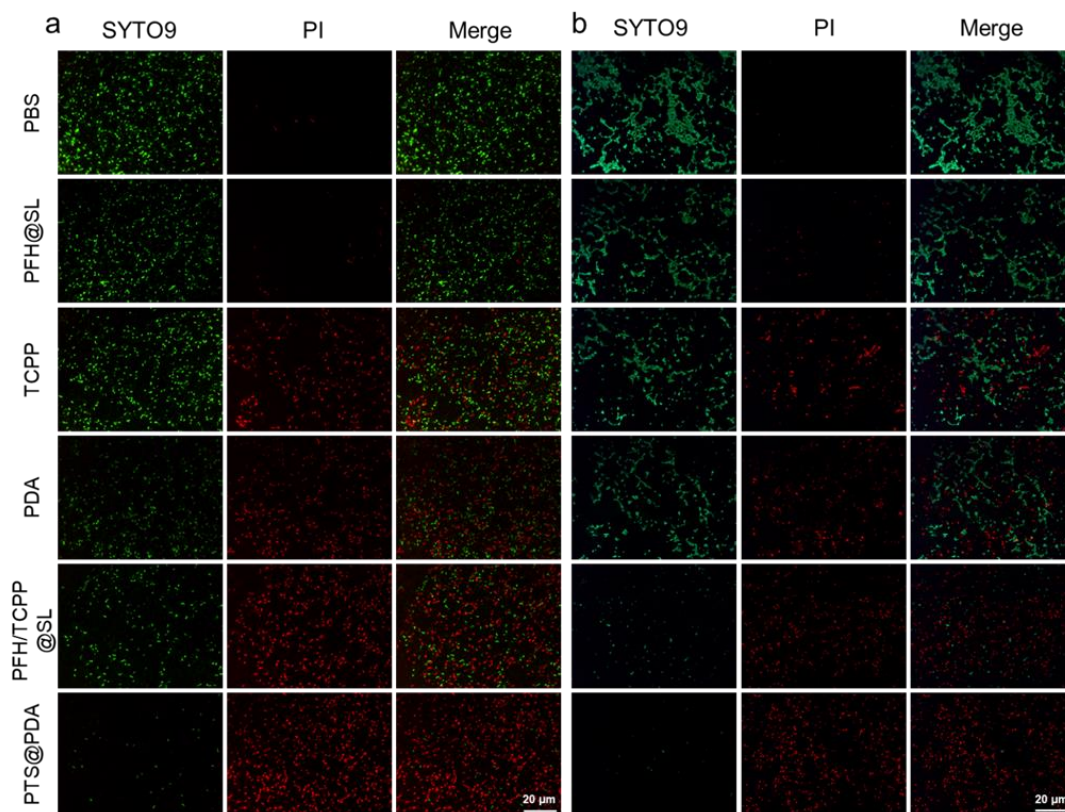


图 2-10. MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的荧光染色图像。将经 NIR+处理的细菌用

SYTO9/PI 染色。SYTO9 染色的活细胞显示绿色荧光；PI 染色的死亡细胞显示红色荧光。

(a) MDR *E. coli* 的荧光图像；(b) MDR *S. aureus* 的荧光图像。

Figure 2-10. Fluorescent staining images of MDR *E. coli* and MDR *S. aureus*. The bacteria treated by NIR+ were stained with SYTO9/PI. SYTO9-stained living cells showed green fluorescence; PI-stained dead cells showed red fluorescence. (a) the fluorescence image of MDR *E. coli*; (b) Fluorescence image of MDR *S. aureus*.

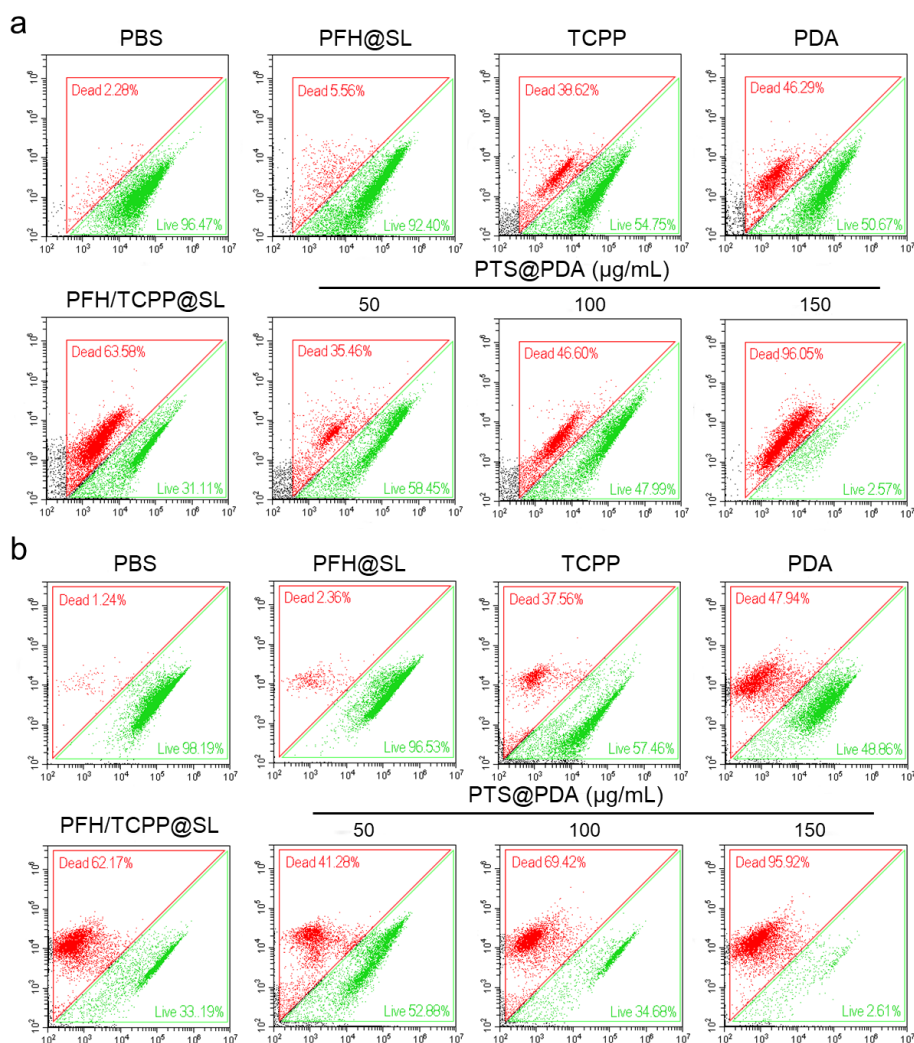


图 2-11. 流式细胞术检测细胞凋亡结果。将经 NIR+处理的细菌用 SYTO9/PI 染色。(a)

MDR *E. coli* 凋亡。(b) MDR *S. aureus* 细胞凋亡。

Figure 2-11. Apoptosis results were shown by flow cytometry. The bacteria treated by NIR+ were stained with SYTO9/PI. (a) Apoptosis of MDR *E. coli*. (b) Apoptosis of MDR *S. aureus*.

2.4.7 细胞的形态特征

使用 SEM 观察了 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的形态(图 2-12)。用 PBS 和 PFH@SL 处理的细菌显示出良好的细菌形态，而单独用 TCPP 和 PDA 处理的细菌显示出轻微的破损，可能是因为高温使细胞膜破裂。而且光动力作用产生的 ROS 改变了细胞膜的通透性，导致内源性物质外流，导致细胞裂解，表明 TCPP 和 PDA 对细菌有特异的杀伤作用。PFH/TCPP@SL 显示出比单独使用 TCPP 更深的破损，因为载有 PFH 的氧气可以增强光动力产生的 ROS，导致细胞裂解。值得一提的是，在 PTS@PDA 处理的细菌中，细胞壁破裂，细胞不再处于完整的形态，表明 PTT 和增强型 PDT 联合抑菌具有良好的效果，为设计新型抑菌材料提供了新的思路。

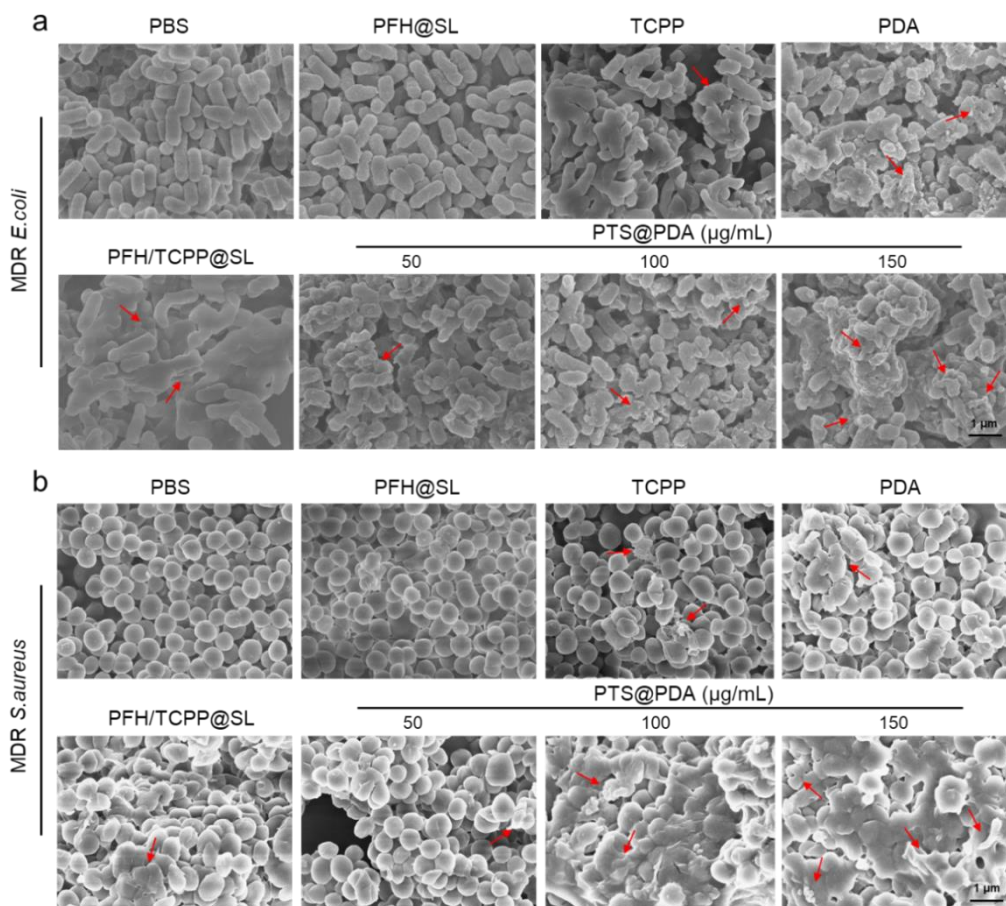


图 2-12. 材料+NIR 处理的(a) MDR *E. coli* 和(b) MDR *S. aureus* 的 SEM 图像。空白组用 PBS 治疗。

Figure 2-12. SEM images of (a) MDR *E. coli* and (b) MDR *S. aureus* processed by material +NIR. The blank group was treated with PBS.

2.4.8 抑菌机制分子

为了进一步探索不同形貌氧化锌的抗菌机制，设置了空白组、PTT 组、PDT 组和 PTDT 组，并分别与空白组进行转录组分析。图 2-13 a 显示了不同样品的表达水平密度曲线，所有基因表达的概率密度分布。图中水平坐标为 $\log 2(\text{RPKM}+1)$ ，数值越大表示基因表达量越高；垂直坐标是基因的核密度值。密度曲线的峰值表示样本中基因表达最集中的区域。结果表明，各成分基因表达均符合正常水平，可用于后续分析。对样本进行了其他样本关系分析，其中一项分析旨在证明所涉及的生物学实验操作不是偶然的，而是可再现的。另一个目的是确保随后的差异基因分析得到更可靠的结果。图表中的水平和垂直坐标(图 2-13 b)是样本的名称，并且不同位置处的颜色块表示对应位置处的样本之间的相关系数的幅度，红色表示强相关，蓝色表示弱相关。PTT、PDT、PTDT 与空白组的相关系数分别为 0.60、0.89、0.66，这归因于不同处理对基因表达的影响程度不同^[86]。

GO 术语基本上分为 3 类：生物过程(BP)、分子功能(MF) 和细胞成分(CC)。结果如图所示。图 2-13 c 表明，PTDT 导致了所有三种不同组分(BP、MF 和 CC) 的遗传差异。这可能是由于光热反应产生大量热量，以及光动力反应产生活性氧，破坏细胞膜结构，导致内部损伤，影响细菌遗传过程所致。KEGG 富集图如图所示(图 2-13 d)。横轴表示富集因子，即富集至特定 KEGG 途径的差异基因数量与通过测序获得的背景基因数量之比；垂直坐标表示 KEGG 途径富集的功能。图中(图 2-13 e)的颜色表示该组样本中的基因表达量($\log_{10}$ FPKM)，红色表示该基因在该样本中表达更高，蓝色表示表达较低。左侧是基因聚类的谱系图；两个基因分支彼此越接近，它们的表达就越接近。根据分析获得的结果，选择了几种最富集的途径进行分析(p 值阈值为 0.05)。氨基酸生物合成(ko01230)、碳代谢(ko01200)、氮代谢(ko00910)、组氨酸代谢(ko00340) 是受到显著影响的途径，主要是在生物代谢方面。结果表明，实验组硝酸还原酶、ATP 磷酸核糖转移酶、组氨酸脱氢酶、磷酸调节子传感器组氨酸激酶 PhoR 等基因表达明显增强，影响能量物质的代谢和物质的转运。值得注意的是，当细菌接受 PTS@PDA 治疗时，CRP/FNR 家族转录调节因子的表达下调。这可能导致对细菌聚集的抑制，并且是影响生物膜形成的原因之一，与以前的抗菌结果一致^[87,88]。

总体而言，自供氧全氟己烷纳米系统具有良好的抗菌性，可抑制生物膜的形成。在到达生物膜微环境时，PDA 的存在促进了光热反应，该光热反应有效地触发氧释放，从而减轻微环境内的缺氧并为随后的光动力反应提供充足的氧供应。在光热光动力的共同作用下，细胞膜受损破裂，细胞代谢、细胞进程、遗传信息处理、环境信息处理等方面受到影响，细胞存活率降低。

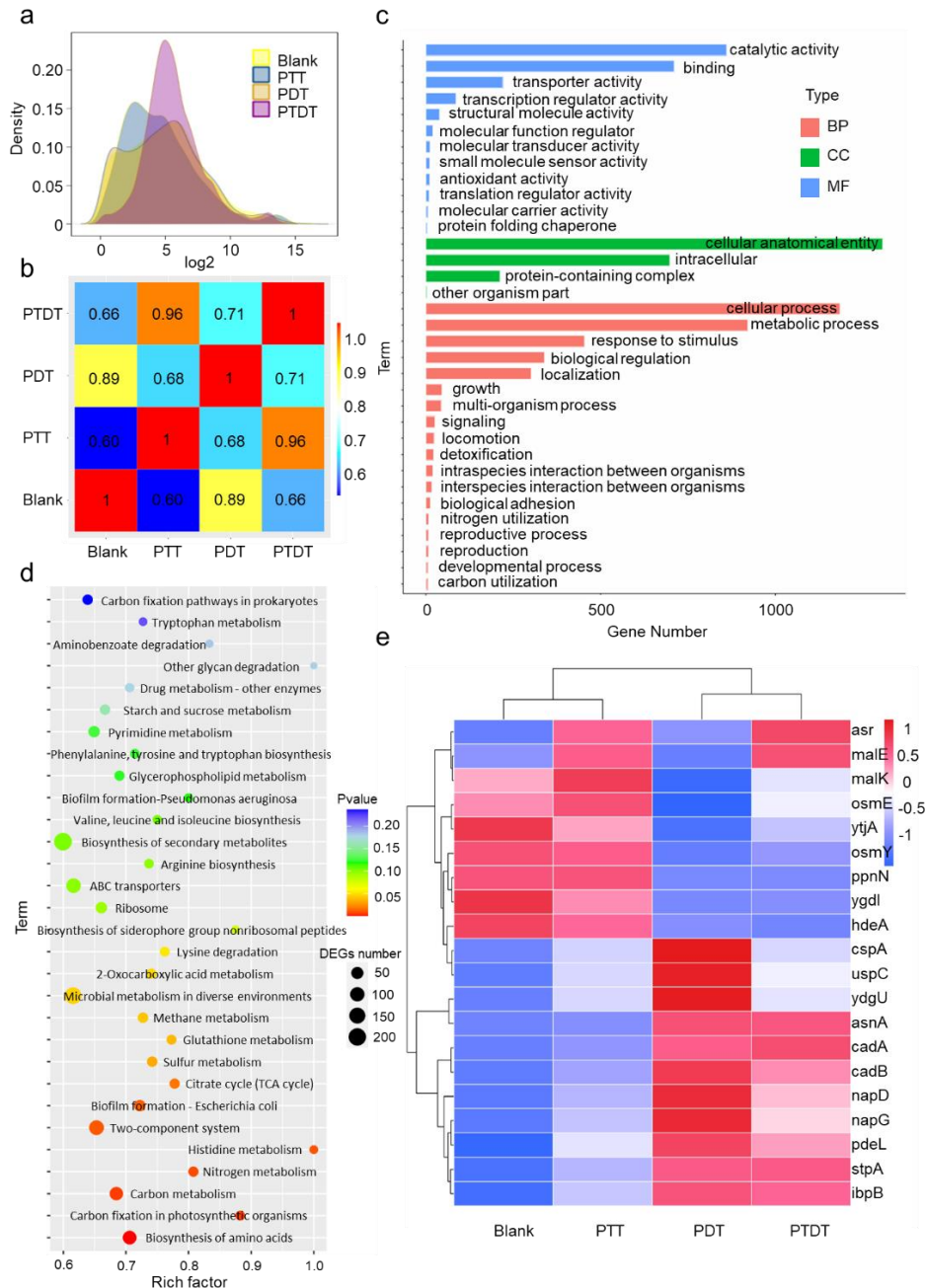


图 2-13. (a) 不同样本(空白、PTT、PDT、PTT) 表达水平的密度剖面图；(b) 基因表达相关性热图；(c) 空白与 PTDT 的 GO 富集分析直方图；(d) 空白与 PTDT 的 GO 富集分析散点图。图中的水平坐标表示 KEGG 途径中注释的差异基因数量与差异基因总数的比率。垂直

坐标表示 KEGG 路径。点的大小表示注释到 KEGG 途径的基因数量。从红色到紫色的颜色表明了富集的显著程度；差异基因簇的热图。热图中的颜色用于横截面比较，红色表示高基因表达，蓝色表示低基因表达。

Figure 2-13. (a) Density profiles of expression levels of different samples (Blank, PTT, PDT, PTDT); (b) Heat map of gene expression correlation; (c) Histogram of GO enrichment analysis of Blank vs PTDT; (d) Scatterplot of GO enrichment analysis for Blank vs PTDT. The horizontal coordinate of the graph represents the ratio of the number of differential genes annotated to the total number of differential genes in the KEGG pathway. The vertical coordinate represents the KEGG pathway. The size of the dot indicates the number of genes annotated to the KEGG pathway. The colors from red to purple suggest the degree of significance of the enrichment; (e) Heat map of differential gene clusters. The colors in the heat map are used for cross-sectional comparison, with red indicating high gene expression and blue indicating low gene expression.

2.4.9 体内实验

在体内进一步评估了 PTS@PDA 的协同抗菌和伤口愈合治疗效果。使用具有耐药性细菌诱导的皮肤创伤的小鼠模型。在每只小鼠背侧切口 12.5 mm 处接种 MDR *S. aureus* 混悬液(1×10^8 CFU/mL)，以建立细菌感染伤口的动物模型。记录伤口处 PTS@PDA 的光热成像(图 2-14 a)，用 808 nm 近红外光处理后，PDA 和 PTS@PDA 的温度分别达到 54 °C 和 51 °C (图 2-14 b)。记录了不同治疗组小鼠在 11 天内的伤口愈合过程(图 2-14 c)，小鼠体重在 11 天内呈现动态平衡(图 2-14 d)，表明 PTS@PDA 无显著毒性。随着时间的推移，所有实验小鼠的伤口大小逐渐减小。空白对照组和 PFH@SL 组的伤口大小分别为 42.5 %和 40.5 %，TCPP 组和 PDA 组分别为 36 %和 35 %，单用 PDT 或 PTT 的杀菌效果平均。而 PFH/TCPP@SL 由于其增强的 PDT 特性而显示出更重要的杀菌能力，伤口大小为 28 %。令人惊讶的是，PTS@ PDA 组由于其独特的氧供应特性，体现了 PTT 和 PDT 协同抗菌特性的优异效果，伤口大小为 21 % (图 2-14 e)，表明 PTS@PDA 具有良好的促进伤口愈合作用。上述结果表明，缓解生物膜缺氧能极大地促进 PDT，载氧策略切实有效。

此外，感染伤口的愈合过程涉及复杂的生物学机制，包括细菌定植、炎症反应、细胞增殖和组织重塑。为了研究材料对上述过程的影响，通过检查组织

学变化和其他相关因素来评估伤口愈合进展。结果如图(图 2-14 f) 所示。H&E 染色显示, 对照组皮肤组织可见大量炎性细胞, PBS 和 PFH@SL 组分可见蓝色异常炎性反应, PTS@PDA 处理的创面组织炎性反应明显低于其他组。使用 Masson 三色染色评估了纳米材料治疗对伤口组织中胶原蛋白水平的影响。治疗后第 11 天, PTS@PDA 组胶原沉积明显高于其他组, 血管直径更为广泛、透明。这些结果表明, PTS@PDA 可促进感染伤口的血管生成。此外, 在激光照射下, PTS@PDA 具有良好的抑菌性能, 显著促进伤口愈合和组织重建。

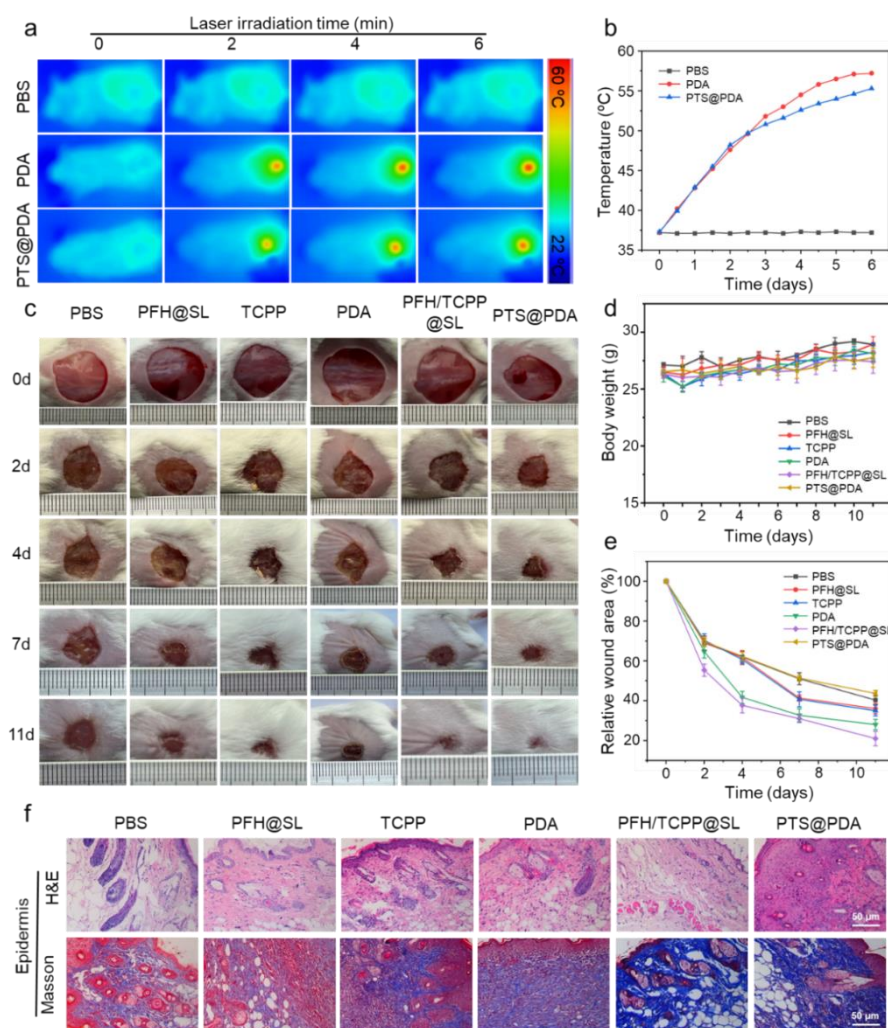


图 2-14. 治疗小鼠感染伤口模型。(a) 近红外激光照射小鼠的热像; (b) 材料+近红外处理后小鼠伤口局部温升曲线; (c) 小鼠伤口照片; (d) 治疗期间小鼠的体重变化; (e) 小鼠伤口面积定量分析; (f) 小鼠伤口组织的 H&E 和 Masson 染色。

Figure 2-14. Treating infected wound model in mice. (a) Thermal images of mice irradiated by NIR laser; (b) Local temperature rise curve of mice wound after material +NIR treatment; (c) Photos of mice wounds; (d) Weight changes of mice during treatment; (e) Quantitative analysis of

wound area in mice; (f) H&E and Masson stain of wound tissue in mice.

2.4.10 安全性评价

抗菌药物的生物相容性对其在体内的实际应用至关重要。溶血实验结果显示(图 2-15 a), PBS 及不同浓度 PTS@PDA (50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$) 处理 1 h 后上清液无明显溶血, H_2O 处理组溶血现象明显。与红细胞接触 24 h 后, PTS@PDA (800 $\mu\text{g/mL}$) 的溶血率仅为 5.13 %, 其余部分均低于 5 % 的临界安全溶血率(图 2-15 b)。在人巨噬细胞中孵育 PTS @ PDA 12 h 后, 结果显示(图 2-15 c), 说明对正常人巨噬细胞没有显著毒性。此外, 还对小鼠进行了血清生化试验。结果显示 11 天肝功能指标(图 2-15 d, e, f, 图 2-16 a) 和肾功能指标(图 2-15 g, h, 图 2-16 b) 均在正常范围内。对实验小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏和伤口组织进行的 H&E 染色显示, 在使用 PTS@PDA 给药的小鼠中没有显著的损伤和炎症反应(图 2-15 i)。上述结果均表明, PTS@PDA 无明显毒副作用。

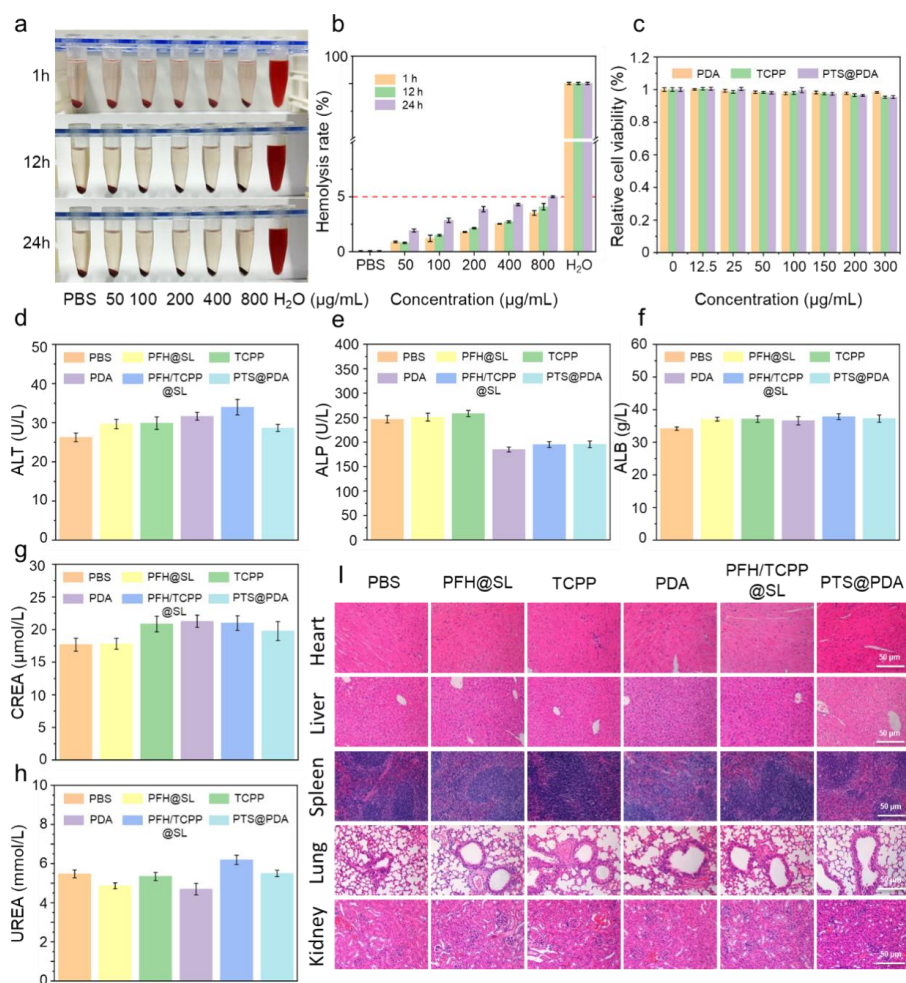


图 2-15. (a) 不同时间 PTS@PDA 不同浓度下绵羊红细胞的溶血图像; (b) 通过测量 570 nm

处的吸光度分析溶血能; (c) 不同浓度的 PDA、TCPP 和 PTS@PDA 对人巨噬细胞的毒性评价; 材料对小鼠肝功能指标(d) ALT (e) ALB (f) ALP 的影响:材料对肾功能指数(g) CREA (h) 尿素的影响; (i) 小鼠心、肝、脾、肺、肾等主要器官切片 H&E 染色结果。

Figure 2-15. (a) Hemolytic images of sheep red blood cells at different concentrations of PTS@PDA at different times; (b) The hemolytic energy was analyzed by measuring the absorbance at 570 nm; (c) Toxicity evaluation of different concentrations of PDA, TCPP, and PTS@PDA on human macrophages; Effects of materials on liver function indexes (d) ALT (e) ALB (f) ALP in mice; Effect of materials on renal function index (g) CREA (h) UREA; (i) H&E staining results of main organ sections of mice such as heart, liver, spleen, lung, and kidney.

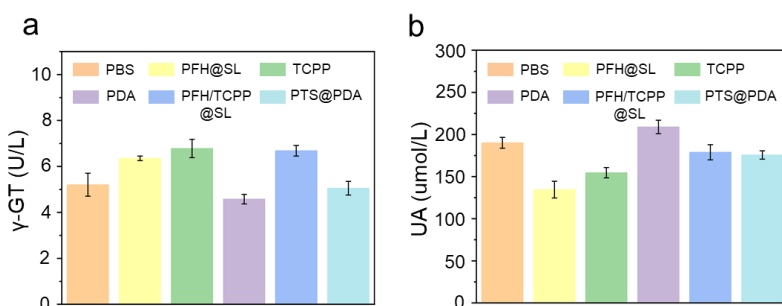


图 2-16. 材料对小鼠肝功能指数(a) γ -GT 的影响:材料对肾功能指数的影响。

Figure 2-16. Effects of materials on the liver function index (a) γ -GT in mice; Effect of materials on renal function index (b) UA.

2.5 本章小结

综上所述, 在本研究中设计并成功合成了一种光热与增强光动力多模式协同抗菌以对抗生物被膜感染的纳米平台, 其中 PFH 负载氧气以缓解缺氧环境以及为 PDT 供氧。而 TCPP 修饰在 SL 上将 PFH 包裹, 最外层为聚多巴胺具有光热效应, 同时具有保护的作用。研究了 PTS@PDA 的联合抗菌活性。PTS@PDA 形貌均匀且具有良好的稳定性, 具有良好的光热转化效应, 光动力实验也证明负载氧气增强了 PDT 的效果, 体外抑菌实验和活/死实验均证明, PTS@PDA 具有良好的广谱抗菌活性, PTS@PDA 可以在 PTT 和 PDT 的作用下产生大量活性氧, 值得注意的是, 产生的活性氧可以改变膜的通透性, 增强 PTT 和 PDT 的抗菌和生物被膜清除性能, 转录组分析结果显示相关基因表达增强, 影响能量物质的代谢和物质的转运, 尤其是影响生物膜形成的 CRP/FNR 家族转录调节因子

的表达下调。PTS@PDA 联合手段治疗减轻细菌感染引发的炎症反应，同时具有良好的生物相容性和低生物毒性。综上所述，PTS@PDA 联合应用 PTT 和 PDT 为有效治疗生物被膜感染提供了一种高效、安全的多模式协同抗菌策略。

第3章 用于生物膜清除的自供氧全氟己烷水凝胶的制备和性能研究

3.1 引言

为了更好的将如何将 PFH/TCPP@SL@PDA 纳米材料应用广泛，将其引入水凝胶方向^[89-97]，为了解决 PDA 在材料中作为纳米外壳和光热引发剂，光热效果不是很理想的问题，将光热材料替换为光热效果更好且毒性低的 Au NPs^[98,99]。

蚕丝因其多功能的机械性能(强度、韧性和弹性)、生物相容性、最小的免疫原性和生物降解性而广泛用于生物医学。蚕丝的主要成分是丝素蛋白(SF)，它是从蚕茧中工业提取的，并以各种方式处理，以生产各种生物医学产品，如支架、水凝胶和纳米颗粒，纯丝素蛋白溶液具有生物相容性、可生物降解性，从蚕茧中提取后可以以不同的方式进行加工，以适应医疗领域的特定应用。它可以直接用于制造丝绸基材料，也可以与其他物质(如壳聚糖或透明质酸)结合以改变其性能。这些产品的范围从紧凑和致密的结构(如膜)到多孔和较软的产品(如支架)。基于丝素蛋白的敷料不仅可以促进快速止血，还可以促进伤口愈合过程。然而，缺乏有效的抗菌活性限制了基于丝素蛋白的生物材料在组织工程中的应用^[100-108]。

白芨是一种传统中药，主要用于治疗烧伤、食管炎、消化道出血和溃疡。现代医学研究发现，白芨多糖(BSP)是中药白芨的有效成分，BSP 具有高生物相容性，无毒性，剂型便于调控等优点，被重点应用于促进伤口愈合的材料制造。由于 BSP 具有葡甘聚糖结构，故其能够参与细胞内的信号传导，体现出免疫调节能力，从而具有减轻炎症反应、促进血管再生的生物活性^[109,110]。

纳米材料负载在水凝胶上，解决了材料不稳定的问题；Au NPs 被整体包裹在水凝胶内，避免直接接触创面在体内聚集，升温更均匀，避免光热反应产生的热量导致局部过热，从而导致创面热损伤。

3.2 实验试剂与设备

3.2.1 实验试剂

中-四(4-羧基苯基) 卟吩(TCPP)；卵磷脂(SL)；全氟己烷(PFH)；聚乙烯吡

咯烷酮 (PVP)；多巴胺(DA)；磷酸盐缓冲液 (PBS)；三羟甲基氨基甲烷(Tris)；二氯甲烷(CH_2Cl_2)；DCFH-DA ($\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_7$)；溴化钾 (KBr)；细菌细胞活性测定试剂盒；无水甲醇；无水乙醇；白芨多糖；京尼平；四氯金酸 (HAuCl_4)；硝酸银(AgNO_3)；十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)；丝素蛋白(SF)等均购自阿拉丁生化科技有限公司，中国上海；多耐药金黄色葡萄球菌 (MDR *S. aureus*, CCUG46147)、多耐药大肠杆菌(MDR *E. coli*, CCUG58542)均购自北纳创联生物科技有限公司。

3.2.2 实验仪器

同表 2-1。

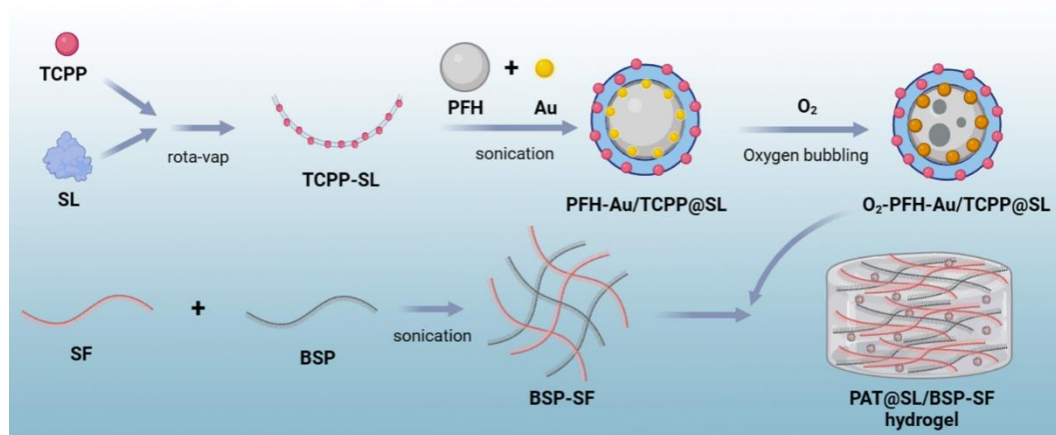


图 3-1. PFH-Au/TCPP@SL/BSP-SF 水凝胶合成示意图

Figure 3-1. Schematic diagram of synthesis of PFH-Au/TCPP@SL/BSP-SF hydrogel.

3.3 实验方法

3.3.1 PFH-Au/TCPP@SL(PAT@SL) 纳米材料的合成与表征

(1) PAT@SL 纳米复合材料的合成

a) 采取传统的晶体模板法制备 Au NPs，首先配置好种子液，将 HAuCl_4 (5 mL; 1.0 mM) 加入到 5 mL 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB; 0.2 M)。将提前预冷的 NaBH_4 (15 μL ; 0.01 M) 快速加入后快速混匀，并在水浴锅中 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h。在此期间，制备生长液，将 HAuCl_4 (50 mL; 1.0 mM) 加入到 50 mL 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB; 0.2 M)。再加入 AgNO_3 (2.50 mL; 10 mM)，并将溶液轻轻摇动。加入 HCl (80 μL , 37%) 以获得 1-1.15 的 pH。然后，将 70 μL 抗坏血酸(78.8 mM) 加入到溶液中，同时轻轻摇动直至溶液澄清。之后加入种子液(150 μL) 注

射到未搅拌的生长溶液中并使其反应 24 h。可获得金纳米粒子。

b) 制备 PAT@SL 纳米微滴：将 TCPP (10 μ g) 和 SL (100 μ g) 溶解在二氯甲烷溶液中后倒入一个圆底烧瓶中，然后使用旋转蒸发法除去溶剂，得到透明的脂质膜。然后用 2 mL Tris (10 mM, pH 8.5) 缓冲液将脂质膜水合，随后进行超声处理 20 min (开启 10 s, 关闭 5 s)。将分散体(10 mg/mL) 在 4 $^{\circ}$ C 下冷却后，向冰水浴中加入 100 μ L PFH 和 Au NPs (10 μ g)，然后使用探针进行超声处理 5 min。这一过程导致了载有 PFH 的纳米粒子(PAT@SL) 的形成，用去离子水洗涤 3 次，并在 4 $^{\circ}$ C 下储存，直至再次使用。

(2) PAT@SL 纳米复合材料的表征

材料表征验证方法同 2.3.1(2)。

3.3.2 PAT@SL 的光热性能评估

光热性能评估方法同 2.3.2。

3.3.3 PAT@SL 的光动力性能检测

活性氧检测方法同 2.3.3。

3.3.4 PAT@SL 的体外抑菌试验

体外抑菌实验方法同 2.3.5。

3.3.5 PAT@SL 的生物膜的消融实验

生物膜消融实验方法同 2.3.6。

3.3.6 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶的制备和形态观察

称取 BSP (0.2g)和 SF (0.25g)加入纯水，在 50 $^{\circ}$ C 下搅拌至溶解，然后将 PAT@SL 加入到 BSP 溶液中，搅拌 2 h，使 BSP-SF 溶液最终浓度为 20 % (w/v)。再将京尼平 (2mg)加入到上述混合溶液中，搅拌 30 min 至完全溶解得到均匀的溶液，将水浴温度调至 37 $^{\circ}$ C，待溶液温度降至 37 $^{\circ}$ C 时，迅速搅匀，得到均匀的预聚体溶液。最后，将预聚体溶液注入到模具中，将其置于 50 $^{\circ}$ C 的烘箱中 1 h，得到 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶。对水凝胶进行了形态观察以及自愈性能测试，研究了水凝胶的性质。

3.3.7 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶的溶血性能

对 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶进行溶血性能评价。取 4 %大鼠红细胞(森贝伽生物科技)，将不同浓度 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶 (PAT@SL 浓度分别为 100，

200, 400 $\mu\text{g/mL}$), 阳性对照为 0.1% (v/v) Triton X-100, 阴性对照为 PBS, 与红细胞液混合, 37°C 水浴 1, 12, 24 h 后 3000 r/min 离心 5 min 后取 200 μL 于 96 孔板在 570 nm 处检测并计算溶血率。

3.4 结果与讨论

3.4.1 PAT@SL 的表征结果分析

首先将光敏剂 TCPP 与 SL 制成薄膜, 将薄膜水合后在溶液中加入 PFH 和 Au NPs, 通过薄膜分散超声处理制备 PAT@SL。将 PAT@SL 纳米复合材料合成之后, 用透射电镜观察材料形态, 如图所示 (图 3-2 a), 形貌均一, 大小均匀。用动态光散射(DLS)检测纳米颗粒的水化尺寸。结果表明 (图 3-2 b), Au NPs 尺寸在 50 nm 左右, 而 PAT@SL 约为 254 nm。TCPP 和 SL 的电位为负电位, Au NPs 表现出较强正电位, PAT@SL 显示出微弱正电位 (图 3-2 c), 表明材料可能成功合成。紫外可见光谱证实了材料的成功负载 (图 3-2 d)。通过 410 nm 左右的 TCPP 特征峰以及 520 nm 左右的 Au NPs 特征峰说明材料的成功合成。通过之前的工作 (1551 cm^{-1} 、 1050 cm^{-1}), 以及结合 Au NPs 的特殊特征峰 (2921 cm^{-1}), 证明 PAT@SL 的成功结合。一系列表征实验表明, PAT@SL 已经成功合成。

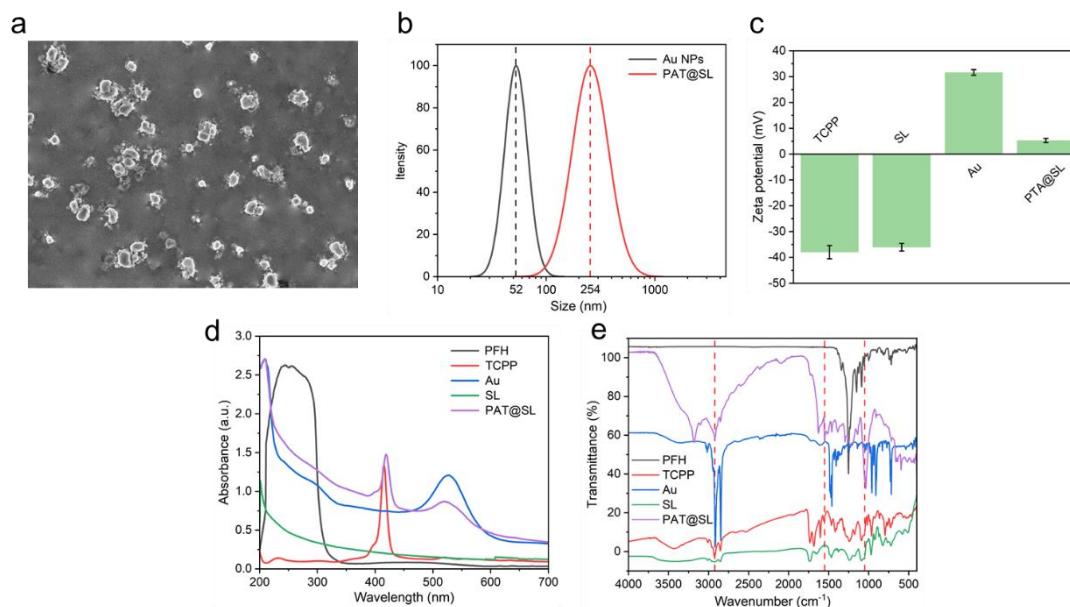


图 3-2. (a) PAT@SL 的扫描电镜图像; (b) Au、PAT@SL 的粒径; (c) TCPP、SL、Au、PAT@SL 的 ζ 电位; (d) PFH、TCPP、Au、SL、PAT@SL 的 UV-Vis 光谱; (e) PFH、TCPP、Au、SL、PAT@SL 的红外光谱。

Figure 3-2. (a) SEM images of PAT@SL; (b) Particle sizes of Au, PAT@SL; (c) ζ -potentials of

TCPP, SL, Au, and PAT@SL; (d) UV-Vis spectra of PFH, TCPP, Au, SL, and PAT@SL; and (e) IR spectra of PFH, TCPP, Au, SL, and PAT@SL.

3.4.2 PAT@SL 的光热性能分析

探索了 PAT@SL 的光热性能。图 3-3 a、图 3-3 b 分析了不同 PAT@SL 浓度、不同激光照射功率下的光热升温曲线。照射后 9 min, PAT@SL 在 150 $\mu\text{g/mL}$ 温度下的温度和 PAT@SL 在 1.5 W/cm^2 808 nm 激光照射下的温度分别从 26 $^{\circ}\text{C}$ 和 26.5 $^{\circ}\text{C}$ 快速升高至 70.1 $^{\circ}\text{C}$ 和 70.5 $^{\circ}\text{C}$ 。经过三次激光冷热循环后, PAT@SL 光热稳定性良好, 如图所示(图 3-3 c)。计算的光热转换效率(η) 为 53 %, 进一步验证了其优异的光热性能(图 3-3 d)。图 3-3 e 的热像更直观地反映了 PAT@SL 的升温变化, 反映了 PAT@SL 优越的光热性能。

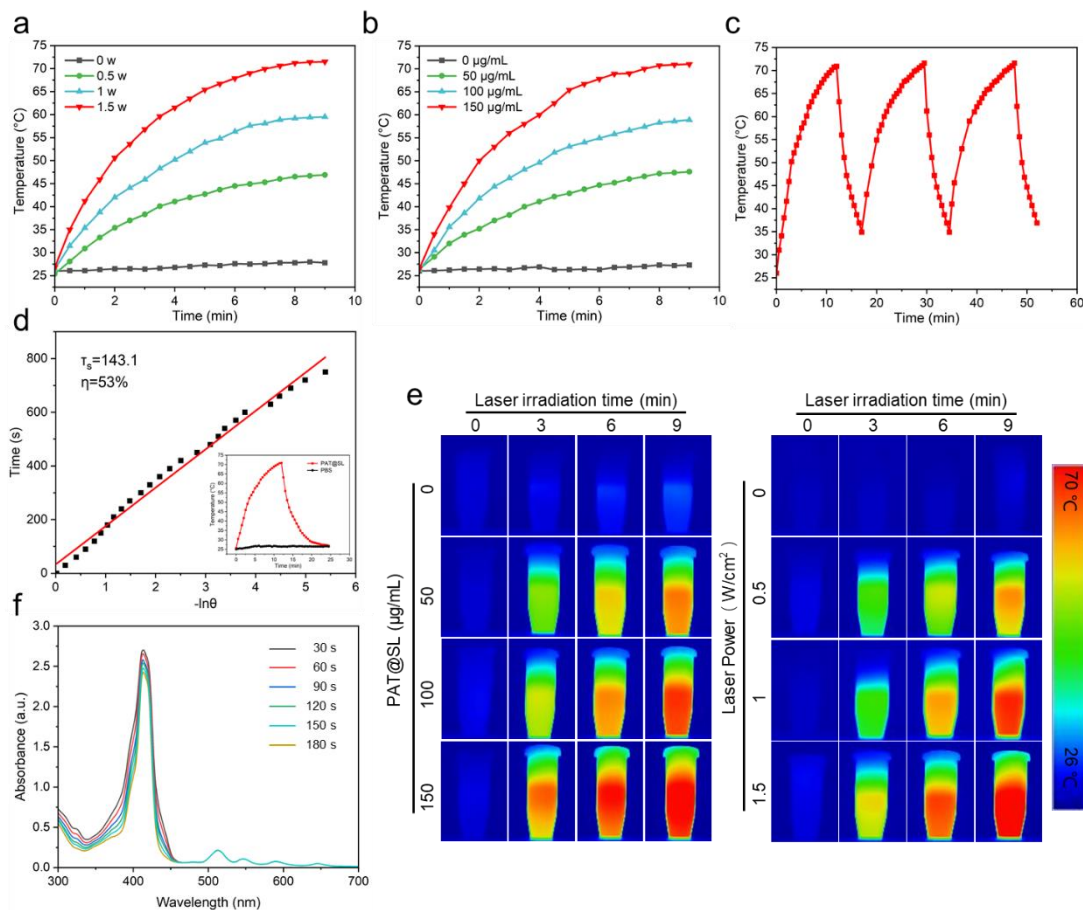


图 3-3. PAT@SL 的光热和光动力特性。(a) 在近红外光照射(1.5 W/cm^2 , 808 nm) 下不同浓度(0、50、100 和 150 g/mL) PAT@SL 的光热升温曲线; (b) 不同 NIR 激光强度(0、0.5、1.0 和 1.5 W/cm^2) 下 PAT@SL (150 g/mL) 的光热转换曲线; (c) PAT@SL (150 g/mL) 在近红外光照射(1.5 W/cm^2 , 808 nm) 下连续三个开/关循环的升温 and 降温曲线; (d) 时间与 $-\ln(\theta)$ 的线

性回归曲线；PBS 和 PAT@SL(150 g/mL) 溶液在 1.5 W/cm^2 近红外辐射强度下的升温 and 降温曲线；(e) 用近红外光(1.5 W/cm^2 , 808 nm) 照射的不同 PAT@SL 浓度(0、50、100 和 150 g/mL) 的热成像图像；在不同的近红外激光强度(0、0.5、1.0 和 1.5 W/cm^2) 下对 $150 \mu\text{g/mL}$ PAT@SL 的热成像图片，(f) O_2 -PAT@SL 存在下 DPBF 的吸光度与光照时间的关系。

Figure 3-3. Photothermal and photo-dynamic characteristics of PAT@SL. (a) The photothermal temperature rise curves of PAT@SL with different concentrations (0, 50, 100 and 150 g/mL) under the irradiation of near infrared light (1.5 W/cm^2 , 808 nm); (b) Photothermal conversion curves of PAT@SL(150 g/mL) at different NIR laser intensities (0, 0.5, 1.0 and 1.5 W/cm^2); (c) The heating and cooling curves of PAT@SL (150 g/mL) under the irradiation of near infrared light (1.5 W/cm^2 , 808 nm) for three consecutive on/off cycles; (d) Linear regression curve between time and $-\ln(\theta)$;

The heating and cooling curves of PBS and PAT@SL(150 g/mL) solution at near infrared radiation intensity of 1.5 W/cm^2 ; (e) Thermal imaging images of different PAT@SL concentrations (0, 50, 100 and 150 g/mL) irradiated by near infrared light (1.5 W/cm^2 , 808 nm); Thermal imaging pictures of $150 \mu\text{g/mL}$ PAT@SL at different near-infrared laser intensities (0, 0.5, 1.0 and 1.5 W/cm^2), (f) Relationship between absorbance of DPBF and illumination time in the presence of

O_2 -PAT @ SL.

3.4.3 PAT@SL 的光动力性能分析

材料和 DPBF 混合后，经 660 nm 近红外光照射后，紫外-可见光吸收光谱图显示出，加入 O_2 -PAT@SL 后的 DPBF 溶液在 410 nm 左右处的特征吸收峰随着时间推移发生明显下降(图 3-3 f)，说明 PAT@SL 产生大量活性氧，具有良好的光动力效应。

3.4.4 PAT@SL 的体外抑菌结果

图 3-4 的结果显示，单独的 PTT (PAT@SL+Ice)和 PDT (PAT@SL+VC)组具有一定的抑菌效果，而联合策略的 PAT@SL+NIR 组处理的耐药菌存活率极低，表明 PTDT 抑菌效果要优于单独的 PTT 或 PDT，单因素 CFU 实验证实了 PAT@SL 纳米抗菌载体具有良好的广谱抗菌活性。

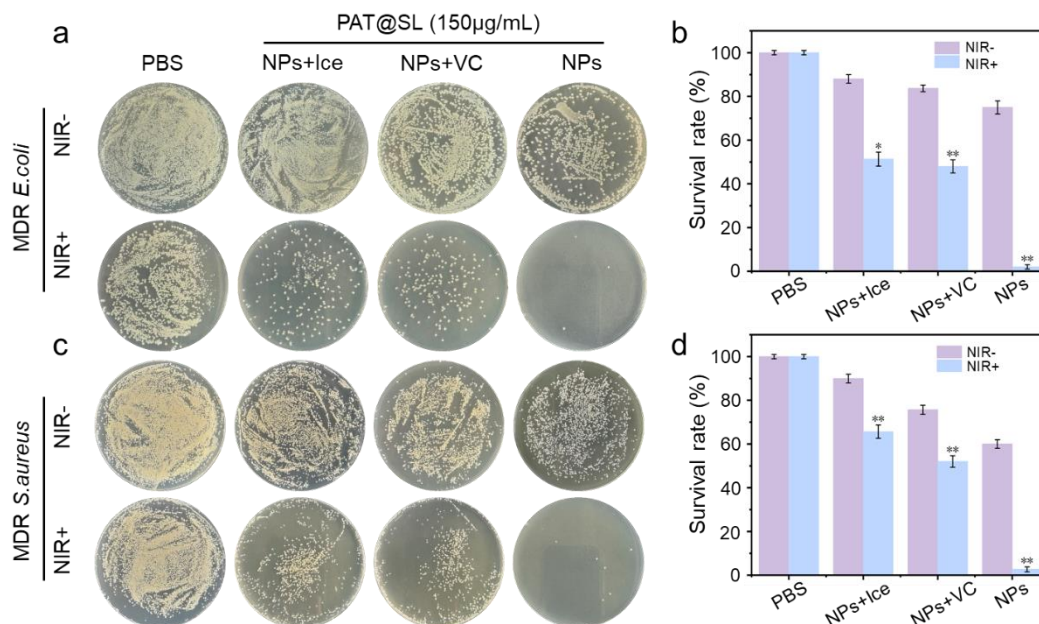


图 3-4. 体外抑菌活性。(a) MDR *E. coli* 的代表性平板照片。横向对照为 PBS、PAT@SL +Ice、PAT@SL +VC 和 PAT@SL，纵向对照为 +NIR 和 -NIR。(b) 平板菌群落数的细菌相对存活率。(c) MDR *S. aureus* 的平板照片。(d) 平板菌群落数的细菌相对存活率。数据表示为平均值 $\pm$ SD, $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.005$ 。

Figure. 3-4. In vitro antibacterial activity. (a) A representative flat photograph of MDR *E. coli*. The horizontal controls were PBS, PAT@SL+Ice, PAT@SL +VC and PAT@SL, and the vertical controls were +NIR and -NIR. (b) The relative survival rate of bacteria in the number of plate bacteria communities. (c) Flat photos of MDR *S. aureus*. (d) The relative survival rate of bacteria in the number of plate bacteria communities. The data is expressed as the average SD, $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.005$.

3.4.5 PAT@SL 的生物膜的清除能力

结晶紫染色评价 PAT@SL 对生物膜的抑制作用，见图 3-5 a。空白为未处理的生物上皮膜，呈较深的紫色，表明形成的生物上皮膜较厚，且随着 PAT@SL 浓度的增加。伴有颜色变淡，表明生物上皮膜厚度逐渐变薄，而图 3-5 b 为光镜下观察到的生物上皮膜。上述结果表明，PAT@SL 具有去除生物膜并抑制其形成的作用。

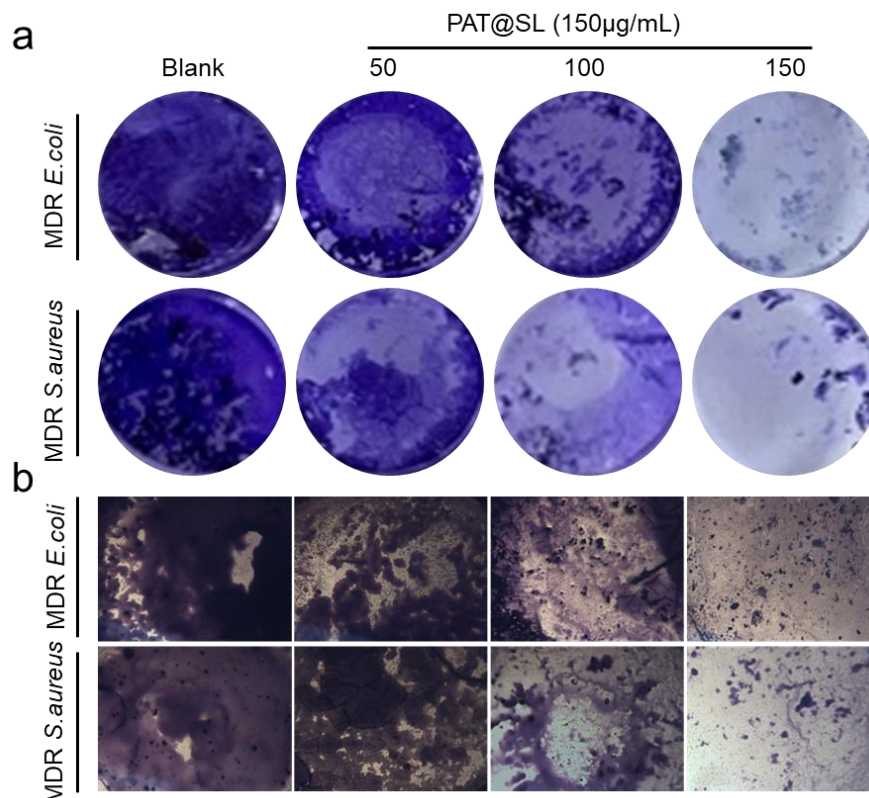


图 3-5. 不同浓度 PAT@SL 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 菌的生物膜消融作用。(a) 用结晶紫染色的 96 孔板中 PAT@SL (+NIR) 处理的生物膜的数码照片；(b) 光学显微镜下观察生物膜。

Figure. 3-5. Biofilm ablation effect of different concentrations of PAT@SL on MDR *E. coli* and MDR *S. aureus*. (a) Digital photos of the biofilm treated by PAT@SL (+NIR) in a 96-well plate stained with crystal violet; (b) Observe the biofilm under an optical microscope.

3.4.6 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶形态观察

覆盖在伤口表面的敷料很容易被皮肤运动损坏，从而无法愈合伤口，甚至导致伤口感染。自愈型水凝胶创面敷料通过自愈行为修复敷料的破损部分，使敷料能够更长时间地治疗和保护伤口。水凝胶按照方法制备完成后，放在瓶中倾斜观察，五分钟后形态无明显变化(图 3-5 a)，说明水凝胶成功制成且形态良好，图 3-5 b 展示了 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶的宏观自愈性能。

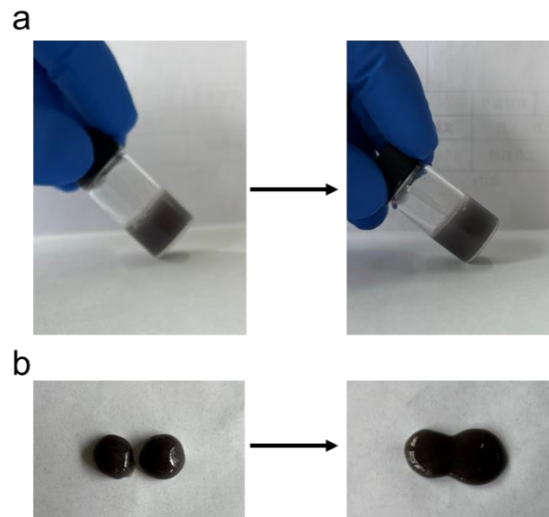


图 3-5. (a)水凝胶的形成图像；(b)水凝胶的自愈合性能。

Figure 3-5. (a) Image of hydrogel formation; (b) Self-healing properties of hydrogel.

3.4.7 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶安全性评价

从生物相容性的角度来看，在伤口治疗期间，敷料会附着在伤口表面，必须具有高水平的血液相容性。采用溶血试验评价水凝胶的血液相容性。图 3-6 中的数据显示，经过 1 h、12 h、24 h，所有水凝胶组(100、200、400 $\mu\text{g/mL}$)的溶血率小于 5%，表明水凝胶具有良好的血液相容性。

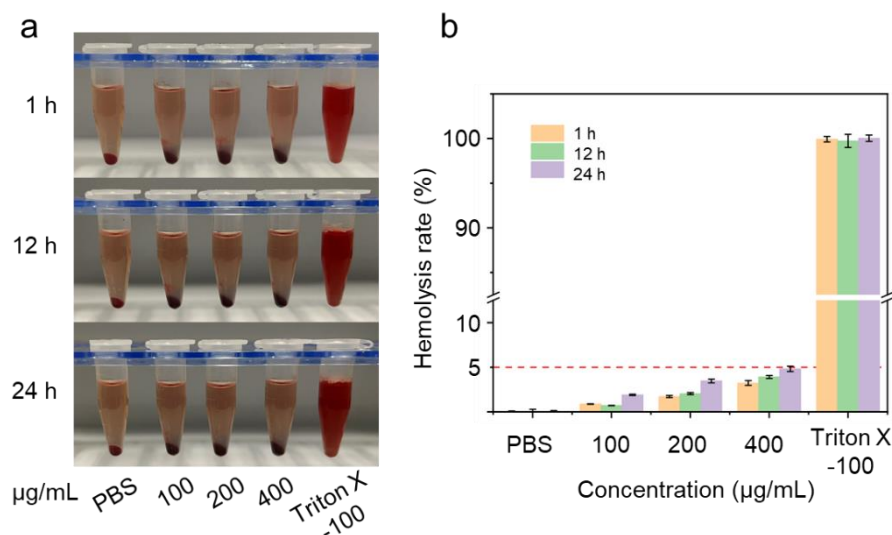


图 3-6. (a) 不同时间 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶不同浓度下大鼠红细胞的溶血图像；(b) 通过测量 570 nm 处的吸光度分析溶血能。

Fig. 3-6. (a) Hemolytic images of rat red blood cells at different time and different concentrations of PAT@SL@BSP-SF hydrogel; (b) The hemolytic energy was analyzed by measuring the absorbance at 570 nm.

3.5 本章小结

在本章研究中，成功合成了 PAT@SL 以及 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶，优化了光热效果，将 TCPP 和 SL 制成薄膜，然后将 PFH 和 Au NPs 包裹在内，即合成 PAT@SL 纳米粒子，再将 PAT@SL 加入到水凝胶的合成过程中去，最终得到 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶。本文研究了 PAT@SL 的基础表征，发现粒径更小，且表面呈现正电位，在微环境中可以更加容易吸附到细菌膜上；研究结果表明，PAT@SL 的光热转化效率为 53%，光热稳定性优异，结果表明，PAT@SL 具有良好的光热性能；体外抑菌实验结果呈现出良好的广谱抑菌活性，对于 MDR *E.coli* 和 MDR *S. aureus* 的杀菌率达到 95 %以上；生物膜消融实验对于两种耐药菌的生物膜清除率达到了 90 %以上，说明 PAT@SL 对于生物膜有明显的消融效果；成功制成 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶后，本文探究了其力学性能，水凝胶体现出良好的稳定性能以及自愈性能，且水凝胶可有效避免局部过热的问题。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

针对多重耐药细菌是对人类和动物健康的全球威胁。然而，它们只是抗生素失效问题的一部分。另一种有助于它们耐受抗菌素能力的细菌策略是形成生物膜。本文分析了耐药性细菌感染产生原因及其生物膜的产生特点，查阅相关文献，总结目前耐药性细菌感染治疗策略，光热疗法(PTT)，光动力疗法(PDT)以及声动力疗法(CDT)，根据生物膜的微环境的特点出发，选定全氟己烷(PFH)作为主要研究对象，PFH 是一种生物相容化合物，在室温下是液体，具有较高的蒸气压和相对较低的沸点。在化学和生物方面都是惰性的，作为氧气载体没有毒性，本文构建了一种载氧纳米系统，通过结合光热和增强光动力治疗，相关研究结果如下：

(1) 设计并成功合成了一种光热与增强光动力多模式协同抗菌以对抗生物被膜感染的纳米平台，其中 PFH 负载氧气以缓解缺氧环境以及为 PDT 供氧。而 TCPP 修饰在 SL 上将 PFH 包裹，最外层为聚多巴胺具有光热效应，同时具有保护的作用。研究了 PTS@PDA 的联合抗菌活性。PTS@PDA 形貌均匀且具有良好的稳定性，具有良好的光热转化效应，光动力实验也证明负载氧气增强了 PDT 的效果，体外抑菌实验和 Live/Dead 实验均证明，PTS@PDA 具有良好的广谱抗菌活性，PTS@PDA 可以在 PTT 和 PDT 的作用下产生大量活性氧，值得注意的是，产生的活性氧可以改变膜的通透性，增强 PTT 和 PDT 的抗菌和生物被膜清除性能，并减轻细菌感染引发的炎症反应，同时具有良好的生物相容性和低生物毒性。综上所述，PTS@PDA 联合应用 PTT 和 PDT 为有效治疗生物被膜感染提供了一种高效、安全的多模式协同抗菌策略。

(2) 针对研究中 PDA 光热效果不理想的问题，本文采用 Au NPs 作为新的光热剂，再将纳米粒子融入到水凝胶中，即解决了纳米粒子外壳不稳定的问题，同时也避免局部过热导致的热损伤问题。成功合成了 PAT@SL 以及 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶，优化了光热效果，将 TCPP 和 SL 制成薄膜，然后将 PFH 和 Au NPs 包裹在内，即合成 PAT@SL 纳米粒子，再将 PAT@SL 加入到水

凝胶的合成过程中去，最终得到 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶。本文研究了 PAT@SL 的基础表征，发现粒径更小，且表面呈现正电位，在微环境中可以更加容易吸附到细菌膜上；研究结果表明，PAT@SL 的光热转化效率为 53%，光热稳定性优异，结果表明，PAT@SL 具有良好的光热性能；体外抑菌实验结果呈现出良好的广谱抑菌活性，对于 MDR *E.coli* 和 MDR *S. aureus* 的杀菌率达到 95 %以上；生物膜消融实验对于两种耐药菌的生物膜清除率达到了 90 %以上，说明 PAT@SL 对于生物膜有明显的消融效果；成功制成 PAT@SL@BSP-SF 水凝胶后，本文探究了其力学性能，水凝胶体现出良好的稳定性能以及自愈性能，且水凝胶可有效避免局部过热的问题。

4.2 展望

本文研究了 PFH 为核心的自供氧全氟己烷纳米体系，该体系联合光热/光动力，具有良好的广谱抑菌性能和消融生物膜的效果，研究了其抑菌机制，并在原先基础上加以改进，将纳米材料应用到水凝胶方面，但是仍有些许问题等待着去解决。例如现如今的纳米材料大多合成方式相对繁琐，仅仅停留在实验室阶段，距离真正广泛应用还有着不小的距离。利用联合杀菌的方法确实比单一疗法治疗效果更为显著，但频繁的利用近红外光照射本身对于周遭健康组织就是一种伤害，未来的目标是采用更加简单的合成方法，更低的光照强度来设计材料体系。另一方面，水凝胶是当前比较热门的一种材料，对于保持伤口的湿润以及促伤口愈合都有着显著的作用，但是对于一些被细菌感染的伤口，制备水凝胶本身的材料会促进细菌的生长，从而降低了抑菌剂的效果，这可能是需要考虑一个问题。希望本文可以对于研究抑制耐药菌的分子机制以及消融生物膜，促伤口愈合提供新的研究思路。

参考文献

- [1] Zhang Y, Lin S, Fu J, et al. Nanocarriers for combating biofilms: Advantages and challenges[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133(3): 1273–1287.
- [2] Li B, Mao J, Wu J, et al. Nano–Bio Interactions: Biofilm-Targeted Antibacterial Nanomaterials[J]. *Small*, 2023: 2306135.
- [3] Wang Z, Liu X, Duan Y, et al. Infection microenvironment-related antibacterial nanotherapeutic strategies[J]. *Biomaterials*, 2022, 280: 121249.
- [4] Uruén C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, et al. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance[J]. *Antibiotics*, 2020, 10(1): 3.
- [5] Hu H, Kang X, Shan Z, et al. A DNase-mimetic artificial enzyme for the eradication of drug-resistant bacterial biofilm infections[J]. *Nanoscale*, 2022, 14(7): 2676–2685.
- [6] Tang Y, Xu H, Wang X, et al. Advances in preparation and application of antibacterial hydrogels[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 300.
- [7] Zhang E, Zhao X, Hu J, et al. Antibacterial metals and alloys for potential biomedical implants[J]. *Bioactive Materials*, 2021, 6(8): 2569–2612.
- [8] Wang Y, Lv Q, Chen Y, et al. Bilayer hydrogel dressing with lysozyme-enhanced photothermal therapy for biofilm eradication and accelerated chronic wound repair[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2023, 13(1): 284–297.
- [9] Hu Y, Ruan X, Lv X, et al. Biofilm microenvironment-responsive nanoparticles for the treatment of bacterial infection[J]. *Nano Today*, 2022, 46: 101602.
- [10] Cheng S, Qi M, Li W, et al. Dual-Responsive Nanocomposites for Synergistic Antibacterial Therapies Facilitating Bacteria-Infected Wound Healing[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(6): 2202652.
- [11] Zhang X, Peng F, Wang D. MOFs and MOF-Derived Materials for Antibacterial Application[J]. *Journal of Functional Biomaterials*, 2022, 13(4): 215.
- [12] Yang Y, Li M, Pan G, et al. Multiple Stimuli-Responsive Nanozyme-Based Cryogels with Controlled NO Release as Self-Adaptive Wound Dressing for Infected Wound Healing[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(31): 2214089.
- [13] Xie Y, Zheng W, Jiang X. Near-Infrared Light-Activated Phototherapy by Gold Nanoclusters for Dispersing Biofilms[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(8): 9041–9049.
- [14] Zhong Y, Zheng X T, Zhao S, et al. Stimuli-Activable Metal-Bearing Nanomaterials and Precise On-Demand Antibacterial Strategies[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(12): 19840–19872.
- [15] Wu X, Zhao G, Ruan Y, et al. Temperature-Responsive Nanoassemblies for Self-Regulated Photothermal Therapy and Controlled Copper Release to Accelerate Chronic Wound Healing[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2023, 6(5): 2003–2013.
- [16] Kaur K, Reddy S, Barathe P, et al. Combating Drug-Resistant Bacteria Using Photothermally Active Nanomaterials: A Perspective Review[J]. *Frontiers in*

- Microbiology, 2021, 12: 747019.
- [17] Zhu X, Liang C, Chen J, et al. Phase separation of extracellular polymeric substances induced by bacteria responsive Nano-Antibiotics for drug-resistant bacterial infection management[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 481: 148136.
- [18] 屈常林, 高洪, 赵宝洪, 等. 细菌生物被膜与抗生素耐药机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 1007—5038.
- [19] 涂春田, 汪洋, 易力, 等. 信号分子调控细菌生物被膜形成的分子机制[J]. 生物工程学报, 2019, 35(4): 558—566.
- [20] 王志鹏, 于海英, 马旅雁, 等. 铜绿假单胞菌铁摄取调节子 Fur 诱导表达突变株构建及表型分析[J]. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3253-3267.
- [21] Sharma S, Mohler J, Mahajan S D, et al. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment[J]. Microorganisms, 2023, 11(6): 1614.
- [22] Rather M A, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(4): 1701—1718.
- [23] Fu Y, Yang L, Zhang J, et al. Polydopamine antibacterial materials[J]. Materials Horizons, 2021, 8(6): 1618—1633.
- [24] Wang X, Nakamoto T, Dulińska-Molak I, et al. Regulating the stemness of mesenchymal stem cells by tuning micropattern features[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2016, 4(1): 37—45.
- [25] Li L, Zhu G, Xu W, et al. Construction of mPt/ICG- α A nanoparticles with enhanced phototherapeutic activities for multidrug-resistant bacterial eradication and wound healing[J]. Nanoscale, 2023, 15(33): 13617—13627.
- [26] Naskar A, Kim K. Friends against the Foe: Synergistic Photothermal and Photodynamic Therapy against Bacterial Infections[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(4): 1116.
- [27] Lee H, Kim M A, Lee C-M. Near-Infrared Laser-Responsive Photothermal Bubble-Generating PLA Nanoparticles for Controlled Drug Release[J]. Macromolecular Research, 2021, 29(3): 224—229.
- [28] Cressey P, Bronstein L-G, Benmahmoudi R, et al. Novel liposome-like assemblies composed of phospholipid-porphyrin conjugates with photothermal and photodynamic activities against bacterial biofilms[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 623: 121915.
- [29] Zhou J, Wang W, Zhang Q, et al. Oxygen-supplied mesoporous carbon nanoparticles for enhanced photothermal/photodynamic synergetic therapy against antibiotic-resistant bacterial infections[J]. Chemical Science, 2022, 13(23): 6967—6981.
- [30] Zhao Y, Song W, Wang D, et al. Phase-Shifted PFH@PLGA/ Fe_3O_4 Nanocapsules for MRI/US Imaging and Photothermal Therapy with near-Infrared Irradiation[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(26): 14231—14242.
- [31] Cai X, Tian J, Zhu J, et al. Photodynamic and photothermal co-driven CO-

- enhanced multi-mode synergistic antibacterial nanoplatfrom to effectively fight against biofilm infections[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 426: 131919.
- [32] Overchuk M, Weersink R A, Wilson B C, et al. Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(9): 7979–8003.
- [33] Tang X, Zeng X, Liu H, et al. A nanohybrid composed of MoS₂ quantum dots and MnO₂ nanosheets with dual-emission and peroxidase mimicking properties for use in ratiometric fluorometric detection and cellular imaging of glutathione[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(8): 572.
- [34] Li A, Li L, Zhao B, et al. Antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory PLCL/gelatin nanofiber membranes to promote wound healing[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 914–923.
- [35] He P, Yang G, Zhu D, et al. Biomolecule-mimetic nanomaterials for photothermal and photodynamic therapy of cancers: Bridging nanobiotechnology and biomedicine[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 483.
- [36] Niu H, Chen J, Jin J, et al. Engineering metalloporphyrin-integrated nanosystems for targeted sono-/chemo- dynamic therapy of leptomeningeal carcinomatosis through intrathecal administration[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 437: 135373.
- [37] Li M, Xu Y, Peng X, et al. From Low to No O₂ -Dependent Hypoxia Photodynamic Therapy (hPDT): A New Perspective[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2022, 55(22): 3253–3264.
- [38] Dediu V, Ghitman J, Gradisteanu-Pircalabioru G, et al. *Biology and Life Sciences*, 2023.
- [39] Beytollahi L, Pourhajibagher M, Chiniforush N, et al. The efficacy of photodynamic and photothermal therapy on biofilm formation of *Streptococcus mutans* : An in vitro study[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2017, 17: 56–60.
- [40] Dediu V, Ghitman J, Gradisteanu-Pircalabioru G, et al. Trends in Photothermal Nanostructures for Antimicrobial Applications[R]. *Biology and Life Sciences*, 2023.
- [41] Liang M, Mu X, Li Y, et al. Heptamethine Cyanine-Based Nanotheranostics with Catalase-Like Activity for Synergistic Phototherapy of Cancer[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(37): 2302112.
- [42] Yuan Z, Demith A, Stoffel R, et al. Light-activated doxorubicin-encapsulated perfluorocarbon nanodroplets for on-demand drug delivery in an in vitro angiogenesis model: Comparison between perfluoropentane and perfluorohexane[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 184: 110484.
- [43] Lai X, Liu X, Pan H, et al. Light-Triggered Efficient Sequential Drug Delivery of Biomimetic Nanosystem for Multimodal Chemo-, Antiangiogenic, and Anti-MDSC Therapy in Melanoma[J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(10): 2106682.
- [44] Wu Q, Du Q, Sun X, et al. MnMOF-based microwave-glutathione dual-responsive nano-missile for enhanced microwave Thermo-dynamic

- chemotherapy of drug-resistant tumors[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 439: 135582.
- [45] Shao W, Yang C, Li F, et al. Molecular Design of Conjugated Small Molecule Nanoparticles for Synergistically Enhanced PTT/PDT[J]. Nano-Micro Letters, 2020, 12(1): 147.
- [46] Nasser B, Alizadeh E, Bani F, et al. Nanomaterials for photothermal and photodynamic cancer therapy[J]. Applied Physics Reviews, 2022, 9(1): 011317.
- [47] Mugaka B P, Zhang S, Li R-Q, et al. One-Pot Preparation of Peptide-Doped Metal–Amino Acid Framework for General Encapsulation and Targeted Delivery[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(9): 11195–11204.
- [48] Zhou J, Wang W, Zhang Q, et al. Oxygen-supplied mesoporous carbon nanoparticles for enhanced photothermal/photodynamic synergetic therapy against antibiotic-resistant bacterial infections[J]. Chemical Science, 2022, 13(23): 6967–6981.
- [49] Zhuo X, Liu Z, Aishajiang R, et al. Recent Progress of Copper-Based Nanomaterials in Tumor-Targeted Photothermal Therapy/Photodynamic Therapy[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(9): 2293.
- [50] Zhang C, Hu X, Jin L, et al. Strategic Design of Conquering Hypoxia in Tumor for Advanced Photodynamic Therapy[J]. Advanced Healthcare Materials, 2023, 12(24): 2300530.
- [51] Singh A, Dubey A K. Various Biomaterials and Techniques for Improving Antibacterial Response[J]. ACS Applied Bio Materials, 2018, 1(1): 3–20.
- [52] Wang M, Zhou X, Li Y, et al. Triple-synergistic MOF-nanozyme for efficient antibacterial treatment[J]. Bioactive Materials, 2022, 17: 289–299.
- [53] Kadkhoda J, Tarighatnia A, Nader N D, et al. Targeting mitochondria in cancer therapy: Insight into photodynamic and photothermal therapies[J]. Life Sciences, 2022, 307: 120898.
- [54] Abbas M, Atiq A, Xing R, et al. Silver-incorporating peptide and protein supramolecular nanomaterials for biomedical applications[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9(22): 4444–4458.
- [55] Liu H, Qu X, Tan H, et al. Role of polydopamine’s redox-activity on its pro-oxidant, radical-scavenging, and antimicrobial activities[J]. Acta Biomaterialia, 2019, 88: 181–196.
- [56] 孙静.光动力增强型纳米复合膜的制备及抗菌性能研究 [D].吉林大学,2020.
- [57] Chen H, Wu L, Wang T, et al. PTT/ PDT-induced microbial apoptosis and wound healing depend on immune activation and macrophage phenotype transformation[J]. Acta Biomaterialia, 2023, 167: 489–505.
- [58] Li H, Gong M, Xiao J, et al. Photothermally activated multifunctional MoS₂ bactericidal nanoplatform for combined chemo/photothermal/photodynamic triple-mode therapy of bacterial and biofilm infections[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 429: 132600.
- [59] Wang X, Wang C, Tian H, et al. Tumor Microenvironment-Related Sonodynamic Therapy Mediates Tumor Therapy[J]. Advanced Therapeutics, 2023, 6(12): 2300265.

- [60] Li J, Yue Z, Tang M, et al. Strategies to Reverse Hypoxic Tumor Microenvironment for Enhanced Sonodynamic Therapy[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(1): 2302028.
- [61] Guo J, Liu M, Lei W, et al. Ultrasound Activatable Microbombs via Co-Loading CaO_2 /Perfluorohexane for Cascade Catalytic Biofilm Disruption and Caries Prevention[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(31): 2213729.
- [62] Yuan A, Zhang Y, Fang G, et al. Ultrasmall MoS_2 nanodots-wrapped perfluorohexane nanodroplets for dual-modal imaging and enhanced photothermal therapy[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 205: 111880.
- [63] Bihui Zhu, Liyun Wang, Jianbo Huang et al. Ultrasound-triggered perfluorocarbon-derived nanobombs for targeted therapies of rheumatoid arthritis[J]. *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7, 4581.
- [64] Peng S, Song R, Lin Q, et al. A Robust Oxygen Microbubble Radiosensitizer for Iodine-125 Brachytherapy[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(7): 2002567.
- [65] Sheng W, Wu X, Fu M, et al. A yolk-shell Pd decorated $\text{Au}@\text{CeO}_2$ with Schottky junction for long-lived charge separation and bandgap optimization to enhance sonodynamic therapy[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 470: 144359.
- [66] Calderó G, Rodríguez-Abreu C, González A, et al. Biomedical perfluorohexane-loaded nanocapsules prepared by low-energy emulsification and selective solvent diffusion[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 111: 110838.
- [67] Wang Y, Zhang Z, Ren L, et al. Dual mode imaging guided multi-functional bio-targeted oxygen production probes for tumor therapy[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 142.
- [68] 鞠丰翼. 单宁酸铁包裹的载全氟己烷纳米粒双模态成像的实验研究[D]. 重庆医科大学, 2020.
- [69] Vidallon M L P, Salimova E, Crawford S A, et al. Enhanced photoacoustic imaging in tissue-mimicking phantoms using polydopamine-shelled perfluorocarbon emulsion droplets[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 86: 106041.
- [70] Wu W, Xu M, Qiao B, et al. Nanodroplet-enhanced sonodynamic therapy potentiates immune checkpoint blockade for systemic suppression of triple-negative breast cancer[J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 158: 547–559.
- [71] 薛圆, 梁易, 汪蕾蕾, 等. 二氢卟吩和全氟己烷共载脂质体的制备及其体外性质[J]. *华西药学杂志* 2021, 36(2):143-147.
- [72] Lin X, Wu H, Zhang J, et al. Nucleic acid-MOF nanoparticle conjugates for NIR/ATP-driven synergetic photo-chemotherapy with hypoxia relief[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 480: 147865.
- [73] Ye L, Yang L, Tan X, et al. Oxygen-Loaded Lipid Nanobubbles for Biofilm Eradication by Combined Trimodal Treatment of Oxygen, Silver, and Photodynamic Therapy[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2023, 6(13): 11715–11724.

- [74] Hu D, Zou L, Yu W, et al. Relief of Biofilm Hypoxia Using an Oxygen Nanocarrier: A New Paradigm for Enhanced Antibiotic Therapy[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(12): 2000398.
- [75] Vishwendra Patel, Pallabi Sarkar, Dashiell M. Siegel, The anti-narcolepsy drug modafinil reverses hypoglycemia unawareness and normalizes glucose sensing of orexin neurons in male mice. [J] *Madison Ave. NY, NY 10029*.
- [76] Vidallon M L P, Giles L W, Pottage M J, et al. Tracking the heat-triggered phase change of polydopamine-shelled, perfluorocarbon emulsion droplets into microbubbles using neutron scattering[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, 607: 836–847.
- [77] Zou L, Hu D, Wang F, et al. The relief of hypoxic microenvironment using an O₂ self-sufficient fluorinated nanoplatfrom for enhanced photodynamic eradication of bacterial biofilms[J]. *Nano Research*, 2022, 15(2): 1636–1644.
- [78] Ruan R, Chen S, Su J, et al. Targeting Nanomotor with Near-Infrared/Ultrasound Triggered-Transformation for Polystage-Propelled Cascade Thrombolysis and Multimodal Imaging Diagnosis[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(5): 2302591.
- [79] Ponomar M, Ruleva V, Sarapulova V, et al. Structural Characterization and Physicochemical Properties of Functionally Porous Proton-Exchange Membrane Based on PVDF-SPA Graft Copolymers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(1): 598.
- [80] Xiao H, Li X, Li B, et al. Sono-promoted drug penetration and extracellular matrix modulation potentiate sonodynamic therapy of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 161: 265–274.
- [81] Kakaei N, Amirian R, Azadi M, et al. Perfluorocarbons: A perspective of theranostic applications and challenges[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1115254.
- [82] Wang L, Zhu S, Zou C, et al. Preparation and evaluation of the anti-cancer properties of RGD-modified curcumin-loaded chitosan/perfluorohexane nanocapsules in vitro[J]. *Heliyon*, 2022, 8(7): e09931.
- [83] De Celis M, Belda I, Marquina D, et al. Phenotypic and transcriptional study of the antimicrobial activity of silver and zinc oxide nanoparticles on a wastewater biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strain[J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 826: 153915.
- [84] Qi W, Dong N, Wu L, et al. Promoting oral mucosal wound healing using a DCS-RuB2A2 hydrogel based on a photoreactive antibacterial and sustained release of BMSCs[J]. *Bioactive Materials*, 2023, 23: 53–68.
- [85] 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.
- [86] Jin W, Song P, Wu Y, 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.
- [87] Chung M, Bruno V M, Rasko D A, et al. Best practices on the differential

- expression analysis of multi-species RNA-seq[J]. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 121.
- [88] Zhu X, Wang J, Cai L, et al. Dissection of the antibacterial mechanism of zinc oxide nanoparticles with manipulable nanoscale morphologies[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 430: 128436.
- [89] 王赛楠, 王晓菲, 张莉. 甲基丙烯酰明胶水凝胶作为细胞三维培养支架在骨组织工程中的应用[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(00):0000-0000.
- [90] Qiao L, Liang Y, Chen J, et al. Antibacterial conductive self-healing hydrogel wound dressing with dual dynamic bonds promotes infected wound healing[J]. *Bioactive Materials*, 2023, 30: 129–141.
- [91] Wang Y, Lv Q, Chen Y, et al. Bilayer hydrogel dressing with lysozyme-enhanced photothermal therapy for biofilm eradication and accelerated chronic wound repair[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2023, 13(1): 284–297.
- [92] Hao R, Zhang G, Zhang J, et al. Ultrasmall Au/Pt-loaded biocompatible albumin nanospheres to enhance photodynamic/catalytic therapy via triple amplification of glucose-oxidase/catalase/peroxidase[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2024, 654: 212–223.
- [93] Chen L, Zhong M, Chen J, et al. Preparation of silk fibroin/hyaluronic acid composite hydrogel based on thiol-ene click chemistry[J]. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*, 2023, 52(3): 285–295.
- [94] Wei S, Xu P, Yao Z, et al. A composite hydrogel with co-delivery of antimicrobial peptides and platelet-rich plasma to enhance healing of infected wounds in diabetes[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 124: 205–218.
- [95] Sogawa H, Katashima T, Numata K. A covalently crosslinked silk fibroin hydrogel using enzymatic oxidation and chemoenzymatically synthesized copolypeptide crosslinkers consisting of a GPG tripeptide motif and tyrosine: control of gelation and resilience[J]. *Polymer Chemistry*, 2020, 11(18): 3152–3161.
- [96] Ghalei S, Handa H. A review on antibacterial silk fibroin-based biomaterials: current state and prospects[J]. *Materials Today Chemistry*, 2022, 23: 100673.
- [97] Leonhardt E E, Kang N, Hamad M A, et al. Absorbable hemostatic hydrogels comprising composites of sacrificial templates and honeycomb-like nanofibrous mats of chitosan[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2307.
- [98] Feng Z, Xiang X, Huang J, et al. Intelligent Sonocatalytic Nanoagents for Energy Conversion-Based Therapies[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(45): 2302579.
- [99] He Z, Du J, Miao Y, et al. Recent Developments of Inorganic Nanosensitizers for Sonodynamic Therapy[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(22): 2300234.
- [100] Ke X, Tang S, Dong Z, et al. A silk fibroin based bioadhesive with synergistic photothermal-reinforced antibacterial activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 209: 608–617.
- [101] Eivazzadeh-Keihan R, Khalili F, Aliabadi H A M, et al. Alginate hydrogel-polyvinyl alcohol/silk fibroin/magnesium hydroxide nanorods: A novel scaffold

- with biological and antibacterial activity and improved mechanical properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 1959–1971.
- [102] Chen S, Liu S, Zhang L, et al. Construction of injectable silk fibroin/polydopamine hydrogel for treatment of spinal cord injury[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 399: 125795.
- [103] Wang L, Chen Z, Yan Y, et al. Fabrication of injectable hydrogels from silk fibroin and angiogenic peptides for vascular growth and tissue regeneration[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 418: 129308.
- [104] Eivazzadeh-Keihan R, Ahmadpour F, Aliabadi H A M, et al. Pectin-cellulose hydrogel, silk fibroin and magnesium hydroxide nanoparticles hybrid nanocomposites for biomedical applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 192: 7–15.
- [105] Cui X, Soliman B G, Alcalá-Orozco C R, et al. Rapid Photocrosslinking of Silk Hydrogels with High Cell Density and Enhanced Shape Fidelity[J]. Advanced Healthcare Materials, 2020, 9(4): 1901667.
- [106] Xu Z, Chen T, Zhang K, et al. Silk fibroin/chitosan hydrogel with antibacterial, hemostatic and sustained drug-release activities[J]. Polymer International, 2021, 70(12): 1741–1751.
- [107] Li T-T, Sun L, Zhong Y, et al. Silk fibroin/polycaprolactone-polyvinyl alcohol directional moisture transport composite film loaded with antibacterial drug-loading microspheres for wound dressing materials[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 207: 580–591.
- [108] Zhang X-Y, Liu C, Fan P-S, et al. Skin-like wound dressings with on-demand administration based on *in situ* peptide self-assembly for skin regeneration[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2022, 10(19): 3624–3636.
- [109] 李笑眉. 白芨多糖水凝胶促进糖尿病创面愈合的应用研究[D].大连医科大学, 2021.
- [110] Zeng Q, Qi X, Shi G, et al. Wound Dressing: From Nanomaterials to Diagnostic Dressings and Healing Evaluations[J]. ACS Nano, 2022, 16(2): 1708–1733.

攻读硕士学位期间学术论文发表情况

1. **Linrui Dong**, Weihao Jin, Guoliang Zhang, Wanzhen Li, Jun Wang, Ping Song, Yugui Tao, Weiwei Zhang, Liangjun Yang, and Fei Ge. "Performance and Mechanism of Self-oxygenated Perfluorohexane Nanosystem for Combined Photothermal/Photodynamic Bacterial Inhibition." ACS Appl. Nano Mater. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c06027>.
2. 葛飞, **董林瑞**, 张伟伟, 李婉珍, 王军, 宋平, 陶玉贵; 一种抑菌复合纳米材料及其制备方法和应用; 发明专利
3. Guoliang Zhang, Weihao Jin, **Linrui Dong**, Jun Wang, Wanzhen Li, Ping Song, Yugui Tao, Lin Gui, Weiwei Zhang and Fei Ge. "Photothermal/Photodynamic Synergistic Antibacterial Study of MOF Nanoplatform with SnFe₂O₄ as the Core."
4. Yujia Wu, Mengzhu Xiao, Weihao Jin, **Linrui Dong**, Wanzhen Li, Jun Wang, Kai Yang, Weiwei Zhang, Liangjun Yang, and Fei Ge. "Synthesis of ZIF-8 Coated MnO₂ Functionalized Antibacterial Peptide Nanoparticles and its Antibacterial and Wound-Healing Promotion Studies."

致谢

二十载求学路将尽，行文至此，思绪万千。一路上起起跌跌，研途三载，感悟颇深，从“山穷水尽疑无路”的迷茫，到“柳暗花明又一村”的坦然，竟生出些噫嘘唏的感慨来。

萱草生堂街，游子行天涯。感谢父母，恭敬在心，不在虚语。

桃李人间，师恩难忘。首先感谢我的导师葛飞教授，您待人温和，博学笃行，严谨的学术作风，求实的科学态度无不时刻影响着我。从选定课题到实验指导，从数据分析到论文投稿，一直鼓励帮助我，让我可以坚定步伐的走下去。其次感谢实验室的张伟伟老师，王军老师，李婉珍老师，宋平老师，感谢各位老师老师在实验中以及论文写作中的指导，尤其是张伟伟老师与王军老师，最印象深刻的是大年初二还在麻烦两位老师指导论文。人生之路漫漫，感谢各位老师给予我继续前进的勇气与信心。

愿岁并谢，与友长兮。感谢师兄师姐、师弟师妹们，让我得以遇见一群有趣的人，感谢 21 级的伙伴们，一起“卷”，再一起“摆”，让本是枯燥乏味的学习生活增添几分乐趣。依稀记得组会前一天实验室的空气凝固的让人窒息，而组会后悬着的心终于是不动了。记得一起吃、喝、玩、乐，还有学习...尤其要感谢金伟豪师兄和吴雨佳师姐，实验中总是不厌其烦的直到教会我为止；感谢小许和小崔一起卷我，激励着我前行；感谢马飞飞，实验过程中发现不足及时改正...毕业临近，相信我们都有光明的未来。

青青子衿，悠悠我心。感谢我的女朋友余雁冰小朋友，在我最心灰意冷的时候给我最温暖的力量，一路走来，感谢陪伴。

竹杖芒鞋轻胜马，一蓑烟雨任平生。