

分类号：Q81

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2210530128

载药纳米粒靶向抗白色念珠菌
及其生物膜的研究

STUDY ON PREPARATION OF POLYGONATUM
POLYSACCHARIDE AND ITS APPLICATION IN
ANTIBACTERIAL MATERIALS

论 文 作 者： 郑鹏

校 内 导 师： 钱森和副教授

校 外 导 师： 吴杰

专 业 类 别： 生物与医药

研 究 方 向： 生物制药工程

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：

郑鹏

日期： 2024 年 3 月 27 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：

郑鹏

指导教师签名：

钱新红

日期：2024 年 05 月 30 日

日期：2024 年 05 月 30 日

载药纳米粒靶向抗白色念珠菌 及其生物膜的研究

摘要

氟康唑（Fluconazole, FLUCZ）和抗菌肽（LLKKLLKKLLKK, AMP）具有良好的抗白色念珠菌（*Canidia albicans*, *C.albicans*）的生物活性，但易产生耐药性和较低生物相容性限制了其广泛应用。本研究通过聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)和聚乙二醇（Polyethylene glycol, PEG）分别结合包载 FLUCZ 和 AMP，并在表面修饰靶向适配体 AD1，制备具有良好稳定性、抑菌活性和生物相容性的 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米粒。其主要研究内容如下。

（1）采用 W/O/W 多重乳化-溶剂挥发法制备了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米粒，并对其进行了表征。结果表明，AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 载药率分别为 $5.89\pm0.07\%$ 和 $11.73\pm0.21\%$ ，包封率分别为 $84.51\pm0.18\%$ 和 $86.33\pm0.24\%$ 。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 粒径均为 390 nm 左右，其 Zeta 电位分别为 -30.45 mV 和 -29.31 mV。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 在浓度 $32\text{ }\mu\text{g/mL}$ （8 倍 MIC）时溶血率分别为 4.64% 和 3.97%；其细胞存活率分别为 78.51% 和 75.58%，表明其均具有较好的生物相容性。

（2）研究了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的体外抑菌活性和抑制生物膜活性。抑菌活性结果表明，在 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的浓度下 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的抑菌圈大于对照和其他处理组；其 MIC 均为 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，表明其对 *C.albicans* 具有较强的抑制活性。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的生长的

影响表现为延长了生长滞后期和减少了对数生长期。PI/ STYO-9 荧光染色结果显示, AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的杀伤率均最高, 这有效的论证了 AD1 适配体对 *C.albicans* 细胞壁的识别能力。SEM 表征分析发现, AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组的细胞表面均附着了大量纳米颗粒; 且相对于其他处理组, *C.albicans* 细胞的表面出现了更为严重的破损和坍塌。生物膜的结晶紫染色结果表明, AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组对 *C.albicans* 生物膜的抑制效果较其他处理组更为明显, 且 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组基本抑制住了 *C.albicans* 细胞生物膜的形成。随着 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 浓度的降低, 其对 *C.albicans* 生物膜的抑制活性越来越弱, 表明其对 *C.albicans* 生物膜的抑制作用均具有浓度依赖性。

(3) 构建了 *C.albicans* 小鼠感染模型, 研究了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 感染小鼠的治疗效果。研究表明, 采用 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 组和 AD1-PLGA-PEG-AMP 治疗的小鼠组体重恢复速度较其他处理组快, 在治疗第 14 d 时恢复到了感染 *C.albicans* 前体重; 且小鼠食欲明显较之前增大, 其活动也更加频繁, 精神状态大幅改善。采用 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 治疗的小鼠血清 CRP 含量为 28700.47 ng/mL 和 27372.73 ng/mL, 接近未感染组 (control (-)), 表明其体内炎症基本已经清除。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 治疗的小鼠血清的 ALT 和 AST 浓度相对其他处理组较低, 表明其结合 *C.albicans* 后, 导致 FLUCZ 和 AMP 缓慢释放, 减弱了对肝脏细胞的损伤。各处理组的 BUN 和 CR 浓度未发生显著升高, 表明其对肾脏细胞的损伤较小。心、肝、脾、肺和肾组织的 HE 染色结果表明, *C.albicans* 感染主要为肺脏组织, 经 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 治疗后, 可以看到正常的肺泡、肺内支气管和间质小动脉以及正常厚度的肺泡间隔, 表明其均具有较好的治疗效果。采用小鼠活体成像系统检测了各药物的靶向作用, 结果表明, AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组的小鼠体内荧光代谢时间较其他处理组长, 且 24 h 后仍有荧光聚集, 表明 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的靶向作用减缓了机体对其的代谢, 延长治疗时间。另外, AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 D1-P

LGA-PEG-AMP 处理组在肝脏和肾脏中的荧光强度较强，且肺脏组织有明显聚集，表明其成功的发挥了靶向作用。

综上，AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 具有较好的靶向作用，并对其具有较好的杀伤作用，有望为开发新型抗 *C.albicans* 的制剂提供新的方法。

关键字：白色念珠菌，氟康唑，抗菌肽，靶向抗菌，小鼠模型，生物相容性

STUDY ON DRUG-LOADED NANOPARTICLES TARGETING CANDIDA ALBICANS AND ITS BIOFILM

ABSTRACT

Fluconazole (Fluconazole,FLUCZ) and antimicrobial peptides (LLKKLLKKLLKK,AMP) have good bioactivity against *Canidia albicans* (*C.albicans*), but their wide application is limited by drug resistance and low biocompatibility.In this study, poly (lactic acid-glycolic acid) copolymer (poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA) and polyethylene glycol (Polyethylene glycol ,PEG) were used to encapsulate FLUCZ and AMP,and the targeted aptamer AD1 was modified on the surface to prepare AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP with good stability,antibacterial activity and biocompatibility.

(1)The main results are as follows: AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP nanoparticles were prepared by W/O/W multiple emulsification-solvent evaporation method and characterized.The results showed that the drug loading rates of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP were $5.89 \pm 0.07\%$ and $11.73 \pm 0.21\%$,respectively, and the entrapment efficiency were $84.51 \pm 0.18\%$ and $86.33 \pm 0.24\%$,respectively.The particle sizes of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP are about 390 nm, and their Zate potentials are-30.45 mV and-29.31 mV,respectively.The hemolysis rates of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP at 32 $\mu\text{g/mL}$ (8 times MIC) were 4.64% and 3.97%, respectively, and the cell survival rates were 78.51% and 75.58%, respectively, indicating that both of them had good biocompatibility.

(2)The in vitro bacteriostatic activity and biofilm inhibitory activity of

AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP against *C.albicans* were studied. The results of bacteriostatic activity showed that at the concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$, the bacteriostatic circle of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP against *C.albicans* was higher than that of the control and other treatments, and their MIC was 4 $\mu\text{g/mL}$, indicating that they had strong inhibitory activity against *C.albicans*. The effects of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP on the growth of *C.albicans* showed that the growth lag period was prolonged and the logarithmic growth period was reduced. The results of PI/STYO-9 fluorescence staining showed that both AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP had the highest killing rate to *C.albicans*. This effectively demonstrated the recognition ability of AD1 aptamer to *C.albicans* cell wall. SEM characterization analysis showed that a large number of nanoparticles were attached to the surface of cells treated with AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP, and the surface of *C.albicans* cells was more seriously damaged and collapsed than other treatment groups. The crystal violet staining of biofilm showed that the inhibitory effect of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP on *C.albicans* biofilm was more obvious than that of other treatment groups, and the biofilm formation of *C.albicans* cells was basically inhibited by AD1-PLGA-PEG-AMP treatment. With the decrease of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP concentration, its inhibitory activity on *C.albicans* biofilm became weaker and weaker, indicating that its inhibitory effect on *C.albicans* biofilm was concentration-dependent.

(3) The infection model of *C.albicans* mice was established, and the therapeutic effects of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP on *C.albicans* infected mice were studied. The results showed that the body weight of the mice treated with AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP recovered faster than that of other groups, and recovered to the body weight before *C.albicans* infection on the 14th day after treatment, and the appetite of mice was significantly increased, their

activities were more frequent, and their mental state was greatly improved. The serum CRP content of the mice treated with AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP was 28700.47 ng/mL and 27372.73 ng/mL, which was close to that of the uninfected group (control (-)), indicating that the inflammation in the body had been basically cleared. The concentrations of ALT and AST in the serum of mice treated with AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP were lower than those of other treatment groups, indicating that the combination of *C.albicans* led to the slow release of FLUCZ and AMP and weakened the damage to liver cells. The concentrations of BUN and CR in each treatment group did not increase significantly, indicating that the damage to renal cells was less. The results of HE staining in heart, liver, spleen, lung and kidney showed that *C.albicans* infection was mainly in lung tissue. Normal alveoli, bronchi and interstitial arterioles and normal thickness of alveolar septum could be seen after AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP treatment. The targeting effect of each drug was detected by in vivo imaging system in mice. the results showed that the fluorescence metabolism time of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP treatment group was longer than that of other treatment groups, and there was fluorescence accumulation 24 hours later, indicating that the targeting effect of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP slowed down their metabolism and prolonged the treatment time. In addition, the fluorescence intensity of AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and D1-PLGA-PEG-AMP treatment group was stronger in liver and kidney, and there was obvious aggregation in lung tissue, indicating that it successfully played a targeting role.

The targeting ability of AD1-PLGA-PEG-AMP was also tested by fluorescence detection. In summary, both AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-AMP have good anti-*C.albicans* cell ability, which is expected to provide ideas for the development of anti-*C.albicans* preparations.

KEYWORDS: Candida albicans, fluconazole, antimicrobial peptides, targeted antibacterial, mouse model, biocompatibility

目录

目录

摘要	I
ABSTRACT	IV
目录	VII
第 1 章 绪论	1
1.1 真菌	1
1.1.1 真菌简介	1
1.1.2 真菌感染现状	1
1.2 白色念珠菌	2
1.2.1 白色念珠菌简介	2
1.2.2 <i>C.albicans</i> 感染机理	2
1.2.3 治疗 <i>C.albicans</i> 感染现状	3
1.3 抗 <i>C.albicans</i> 药物研究进展	3
1.3.1 氟康唑治疗 <i>C.albicans</i> 概述	3
1.3.2 多肽治疗 <i>C.albicans</i> 概述	4
1.3.2.1 多肽简介	4
1.3.2.2 多肽的合成	4
1.3.2.3 抗菌肽治疗 <i>C.albicans</i> 的机理	5
1.4 纳米材料治疗真菌感染研究进展	5
1.4.1 纳米材料的制备	5
1.4.2 纳米材料的抑菌机制	6
1.4.3 聚乳酸羟基乙酸共聚物-聚乙二醇简介	6
1.4.4 适配体简介	6
1.5 课题的研究意义及内容	7
1.5.1 研究意义	7
1.5.2 研究内容	7
第 2 章 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米材料的合成表征以及生物相容性分析	9
2.1 引言	9
2.2 实验材料	10
2.2.1 实验材料	10
2.2.2 实验试剂与仪器	10
2.3 实验方法	11
2.3.1 材料的合成	11
2.3.2 载药率以及包封率的计算	12

2.3.3 粒径及 Zeta 电位表征	12
2.3.4 SEM 以及 FT-IR 表征	13
2.3.5 溶血活性分析	13
2.3.6 细胞毒性分析	14
2.3.7 统计分析	15
2.4 结果与分析	15
2.4.1 载药率和包封率的检测	15
2.4.2 粒径与 Zeta 电位表征	16
2.4.3 SEM 和 FT-IR 分析	18
2.4.5 溶血活性	20
2.4.6 细胞毒性	23
2.5 本章小结	25
第 3 章 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米粒子的抑菌活性测定	26
3.1 引言	26
3.2 实验材料	27
3.2.1 试验菌株	27
3.2.2 实验试剂与仪器	27
3.3 实验方法	28
3.3.1 抑菌能力分析	28
3.3.2 最小抑菌浓度 (MIC) 测定	28
3.3.3 生长抑制曲线的测定	29
3.3.4 细胞荧光染色	29
3.3.5 细胞形态结构的 SEM 分析	29
3.3.6 生物膜生长动力学分析	30
3.3.7 生物膜生长抑制的定性分析	30
3.3.8 生物膜生长抑制的定量分析	30
3.3.9 统计分析	31
3.4 结果与分析	32
3.4.1 抑菌圈分析	32
3.4.2 最小抑菌浓度 (MIC) 分析	34
3.4.3 生长抑制曲线分析	35
3.4.4 细胞荧光染色分析	38
3.4.5 细胞形态 SEM 分析	39
3.4.6 <i>C.albicans</i> 生物膜生长动力学分析	42
3.4.7 <i>C.albicans</i> 生物膜生长抑制的定性分析	42
3.4.8 生物膜生长抑制的定量分析	44
3.5 本章小结	46
第 4 章 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米材料的体内抑菌活性探究	48
4.1 引言	48
4.2 实验材料	49
4.2.1 试验菌株	49
4.2.2 实验试剂与仪器	49
4.3 实验方法	50
4.3.1 <i>C.albicans</i> 生物膜 C57 小鼠皮下感染模型的建立与给药治疗	50

4.3.2 CRP 含量测定	51
4.3.4 HE 染色分析.....	51
4.3.5 肺部 CFU 检测分析	52
4.3.6 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的靶向检测.....	52
4.3.7 统计分析.....	52
4.4 结果与分析.....	52
4.4.1 <i>C.albicans</i> 生物膜 C57 小鼠模型体重分析	52
4.4.2 CRP 的测定	55
4.4.3 ALT、AST、BUN 和 CR 的检测分析.....	56
4.4.4 HE 染色分析.....	59
4.4.5 肺部 CFU 检测分析	62
4.4.6 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的靶向检测.....	63
4.5 本章小结.....	68
第 5 章 结论与展望.....	70
参考文献.....	72
致谢	79

第 1 章 绪论

1.1 真菌

1.1.1 真菌简介

真菌（Fungus）是一种属于藻菌植物中真菌超纲的真核生物。在微生物中，只有真菌具有完整的细胞器和真正的细胞核，因此也被称为真核细胞型微生物。除了各种蕈类外，霉菌和酵母也属于真菌范畴。目前已经确认存在七万多种真菌，但据估计这只是它们全部存在数量的一小部分。大多数真菌起始被归类为动植物之一，而现在它们已成为自己独立的界，并分为四门一类^[1, 2]。

真菌在自然界分布广泛，绝大多数对人类有益。它们在食品工业中用于酿造酒类和发酵食品，如制作酱料、味精等；在农业领域可用于发酵饲料、生物肥料的制备；在药学和保健品行业中，真菌提供了丰富的药用资源，如灵芝、茯苓、抗生素等；另外，在环境修复方面也有着重要作用。总之，真菌不仅是自然界中重要的组成部分，还为人类社会提供了诸多实际应用价值^[3]。人类致病的真菌可分为浅部真菌和深部真菌。浅部真菌主要侵犯皮肤、毛发和指甲，通常是慢性的，并且治疗起来比较顽固，但对身体影响较小。而深部真菌则可以侵犯全身内脏，严重情况下可能导致死亡。此外，一些真菌寄生在粮食、饲料和食品中，产生毒素引起中毒性真菌病。由真菌引起的这些疾病统称为真菌病^[4]。

1.1.2 真菌感染现状

真菌感染对全球公共卫生的威胁越来越大。全世界有 600 多万种真菌，但已知感染人类的真菌不到 1 %。这些真菌感染大多是表面性的，影响头发、皮肤和指甲，但有些真菌感染能够导致危及生命，其中最常见的包括新生隐球菌、烟曲霉和白色念珠菌。这些真菌一般情况下是无害的，甚至是人类微生物群的一部分，但如果这些病原体在人体内传播，它们可以引起致命的感染，且每年

在全球范围内造成 100 多万人死亡^[5]。

1.2 白色念珠菌

1.2.1 白色念珠菌简介

白色念珠菌 (*Canidia albicans*, *C.albicans*) 是常见的念球菌之一, 感染率在所有常见病原菌中居第三位, 是医院感染的第四大原因。在自然界中共有酵母态、假菌丝态和菌丝态三种存在形式。*C.albicans* 这三种形态之间能够随着内环境的变动而互相转化, 且这种转换能力与其毒力密切相关^[6]。当前用于治疗 *C.albicans* 感染的主流药物有唑类、多烯类、棘白菌素三种, 但长期使用这些药物治疗使念珠菌菌株对唑类和棘白素类药物产生耐药性, 大大增加了医疗成本。

1.2.2 *C.albicans* 感染机理

C.albicans 致病性由多种致病因子造成, 而形态可塑性被认为是 *C.albicans* 的关键毒性因子。通常情况下, *C.albicans* 处于酵母态, 不会造成真菌感染引起疾病; 但部分假菌丝态和菌丝态白色念球有可能引起一种称为念珠菌的血流感染, 当感染扩散到内部器官时可发展成播散性念珠菌病, 其发病率约占重症监护室医院感染的 25-50%, 占医院感染总数的 8-15%; 且调查记录表明, *C.albicans* 感染的死亡率在 30-50 %之间, 是医院感染的第二常见的死因^[7]。*C.albicans* 的形态转换受多种环境因素和信号转导途径调控, 如 Cek-MAPK 途径, cAMP-PKA 途径以及 pH 应答途径等^[8]。根据菌丝生长阶段的不同, 可分为两个阶段: 第一个阶段是在短期内建立和保持菌丝生长能力; 第二个阶段是依赖营养物质、维持菌丝生长能力并避免宿主免疫攻击^[9]。在 *C.albicans* 的发病过程中, *C.albicans* 的菌丝转变是真菌细胞深入宿主组织并建立感染的重要形态特征^[10]。另外, 由于 *C.albicans* 可以形成生物膜, 它对现有抗真菌药物的耐药性近年来有所增加^[11]。研究表明, *C.albicans* 生物膜的形成是其耐药性产生的主要原因之一^[12]。生物膜是一种附着于组织或生物表面, 由大量菌丝相细胞、少量酵母相细胞以及由菌体分泌的基质共同构成的复杂的三维聚合网状结构^[13]。致密的生物膜形成一层天然屏障, 使得抗真菌药物难以进入菌体内部而发挥杀菌作用, 导致了 *C.a*

lbicans 对多种抗真菌药物都有耐药性，也是造成临床感染日益增加的一个重要原因^[14]。因此，*C.albicans* 生物膜的耐药性造成的相关感染对公众健康构成越来越大的威胁，迫切需要寻求解决 *C.albicans* 生物膜耐药性的有效方法。

1.2.3 治疗 *C.albicans* 感染现状

C.albicans 是临床上最常见的条件致病性真菌，能够引起浅表皮肤、黏膜感染、深部内脏感染乃至全身的真菌菌血症。目前，临床上治疗体内真菌感染主要采用传统的抗真菌药物治疗，但是随着抗生素的滥用及新耐药株的出现，*C.albicans* 对抗真菌药物的敏感性大大降低，增加了临床上 *C.albicans* 感染的治疗难度。而纳米材料药物作为新兴的抗 *C.albicans* 感染药物，国内外研究员对此也大多停留在实验室阶段。近年来，由于各种侵袭性诊疗技术的普遍开展，抗菌药物、激素和免疫抑制剂在临床上的广泛使用，*C.albicans* 的感染率和死亡率虽有下降趋势，但也成为临床上不可忽视的真菌感染。

1.3 抗 *C.albicans* 药物研究进展

尽管药物作用靶点多种多样，但目前只有三类有效的抗真菌药物可用于治疗真菌感染：①唑类，抑制麦角甾醇的生物合成并导致有毒甾醇的积累；②多烯，不可逆地与麦角甾醇结合，导致细胞裂解；③棘白菌素抑制真菌(1-3)- β -D-葡聚糖合酶，进而导致细胞壁生物合成缺陷^[15]。其中，唑类是临床医生用于治疗白色念珠菌的最主要的抗真菌药物。长期的药物治疗使念珠菌菌株对唑类药物产生耐药性。研究表明，显性 *Erg11p* 残基突变和过表达与 *C.albicans* 临床菌株中的唑类耐药性高度相关^[4, 16]。

1.3.1 氟康唑治疗 *C.albicans* 概述

氟康唑（Fluconazole, FLUCZ）属于唑类抗真菌药，其机制为可干扰真菌细胞中麦角甾醇的生物合成，使真菌细胞膜缺损，增加膜通透性，破坏真菌细胞壁的完整性、进而抑制真菌生长或使真菌死亡^[15, 17]。长期使用 FLUCZ 会导致大部分的敏感菌株被杀死，而耐药菌株会迅速增加，取代敏感菌株，从而导致

细菌对这种药物的耐药性增加，减弱 FLUCZ 的抗菌能力^[18]。

1.3.2 多肽治疗 *C.albicans* 概述

1.3.2.1 多肽简介

多肽是一种化合物，是肽键连接起来的一种氨基酸化合物，它具有与蛋白质相同的连接方式，一般来说，氨基酸数量不足一百的一般称作多肽，而把氨基酸数量在一百以上的称作蛋白质。

近年来，多肽的研究和应用取得了长足进步，吸引了许多研究者的兴趣^[19]。到目前为止，已经在人体内发现了数十上百种多肽，其中通过人工合成多肽具有重要的研究意义和经济价值，已成为医学和分子生物学的重点对象。世界各先进国家都投入巨资建立各种规模的多肽研究中心，以期取得突破性进展。如今具有生物活性的多肽已广泛应用于临床检测、医学研究、疾病预防和治疗等领域。在未来，人们可以期待更多关于多肽及其应用领域方面的创新与突破^[20]。

多肽与蛋白质两者没有特别较大的区别，只是在结构上只有肽链长度长短的差异与蛋白质对比，多肽拥有空间结构简单、较为稳定、免疫原性不高或没有免疫原性等优势。多肽是生物活性很高的物质，他主要控制生物体各种细胞功能，并参与生物体的各项生命活动，如激素调控、神经传导、细胞生长和繁殖等方面^[21]。伴随着生物技术的快速发展，多肽已成为我国科学家继基因之后生命科学理论领域研究的又一重要领域。现在，多肽产品广泛用于各种常见领域，例如药物，食品，保健产品，化妆品，生物材料和生物农药等。

1.3.2.2 多肽的制备

当前，多肽药物制备方法主要包括三种：化学合成，基因重组和从动植物中提取。由于生物体内肽含量非常低，提取时的纯度不足，限制了从动植物中提取的肽类药物的临床应用。基因重组是指通过断裂和连接不同的 DNA 链来交换和重组 DNA 片段以形成新的 DNA 序列的过程。基因重组主要用于制备肽类药物的长肽。根据肽药物的作用和分泌，它们可分为血管加压素及其衍生物，催产素及其衍生物，促肾上腺皮质激素及其衍生物，下丘脑-垂体肽激素和胃肠

激素和其他激素等活性肽。

化学合成多肽的方法主要有固相法合成和液相法合成两种方式。液相法合成主要用于短肽的合成，但存在中间体纯化操作复杂、后处理操作繁琐、合成周期长等缺陷。1963 年，Merrifield 首次提出了固相合成的概念，并发展了 Boc（叔丁氧羰基）和 Bzl（苄基）两种保护基策略，从而实质性地推动了多肽合成技术的进步，并因此在 1984 年获得诺贝尔化学奖^[22]。1972 年，Lou Carpino 首次将 Fmoc（9-芴甲氧羰基）用于保护 α -氨基^[23]，在反应条件温和的情况下迅速得到广泛应用，目前超过 85% 的多肽药物都是通过固相合成技术制备得到。

1.3.2.3 抗菌肽治疗 *C.albicans* 的机理

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMP)是一类具有广谱抗菌和免疫调节作用的多肽。这些抗菌肽对侵染性细菌、病毒和真菌等具有活性，因此已被定义为针对病原微生物的新型治疗策略的有效候选药物。AMP 通常由 12 到 50 个氨基酸组成，其一般结构特点带有正电荷并具有两亲性，这能够与细胞膜发生相互作用从而可以使 *C.albicans* 的细胞膜破损，杀死 *C.albicans* 细胞^[24, 25]。此外，AMP 在序列和结构方面非常多样化，并可表现出 α -螺旋、 β -折叠、环状或延伸结构等不同类型。由于抗菌肽特殊结构和功能，使其可能成为未来治疗 *C.albicans* 感染的重要工具。

目前大多数抗真菌药物主要是通过与病原微生物的膜结合，或者抑制某些生物合成来靶向膜上的麦角固醇。而 AMP 则是通过破坏细胞膜的完整性来杀死 *C.albicans*。显然，与传统的抗真菌药物相比，AMP 的作用机制具有非特异性，这种特性有望限制病原微生物产生耐药性^[26]。

1.4 纳米材料治疗真菌感染研究进展

1.4.1 纳米材料的制备

纳米技术是 21 世纪的新兴领域之一。许多新设备和申请专利的技术都基于纳米材料（NMs）。纳米材料在各个领域的应用与其结构和合成方法有关^[27]。通过不同的机制与技术合成的纳米材料，其结构和形态也不同，因此可以应用

于不同的领域。例如，使用等离子体磁控溅射技术很容易合成非晶体纳米结构薄膜，但使用热蒸发过程可能难以获得类似的结构。而使用 W/O/W 多重乳化-溶剂挥发法合成纳米材料^[28]，其合成的纳米粒子具有稳定性好、粒径分布较窄、载药量和包封率较高等优点，且该方法副反应少，工艺简单，易于操作。

1.4.2 纳米材料在抑菌上的应用

因为纳米材料不属于真菌的天然防御库，因此纳米材料对真菌来说是一种新型的抗菌方法。基于纳米材料的本身特性，可以解决耐药菌和生物膜感染问题，其既可以作为固有疗法，也可以作为抗菌剂的纳米载体。纳米材料独特的物理化学性质，如大小、形状和比表面积等因素，都会影响其治疗的活性^[29]。综上所述，纳米技术为制定耐药真菌的治疗战略提供了一个新的工具。

1.4.3 聚乳酸羟基乙酸共聚物-聚乙二醇简介

近年来，随着纳米科学技术的快速发展，纳米技术在医学领域的应用产生了深远影响，尤其是纳米粒子在药物输送方面的应用。将药物载入纳米粒子这一新型载体中，可以实现药物在靶组织部位的定向释放，从而提高药物疗效、减少用量并降低毒副作用，因此在抗菌治疗方面具有巨大潜力。这种针对性强、效果显著的治疗方法为未来医学领域带来了新的希望，并且已经取得了一些成果^[30, 31]。聚乳酸羟基乙酸（PLGA）是一种生物相容性良好的可降解材料，被广泛应用于药物递送系统中。然而，由于其具有疏水表面特性，PLGA 纳米粒在体内易受到网状内皮系统的清除作用^[32]。为了克服这一问题，常采用聚乙二醇（Polyethylene glycol, PEG）对 PLGA 纳米粒表面进行修饰改性。PEG 能够形成亲水层来掩盖 PLGA 纳米粒的疏水性，并使其能够逃避体内网状内皮系统的清除作用且在体内实现长时间循环，以提高药物在体内的稳定性和有效浓度^[33]。因此，在药物递送领域中利用 PEG 化的 PLGA 纳米粒具有重要意义，并为开发更有效、持久且安全的药物治疗方案提供了新思路。

1.4.4 适配体简介

近年来，许多创新抗菌方法应用于抗菌治疗，特别是主动靶向抗菌治疗展

现出良好的发展前景。主动靶向抗菌治疗是在纳米粒表面连接上各种靶分子如抗体、肽或适配体等来增加纳米粒的特异性，更好地靶向目标部位^[34]。其中，适配体是一种具有高度选择性和亲和性的单链 DNA 或 RNA，已被广泛应用于癌症治疗。基于将药物精准地送达肿瘤以提高耐受性和治疗效果的假设，适配体修饰的纳米粒子药物递送系统正在被引入到靶向抗菌治疗中^[35]。这一新兴领域为开发更有效的抗菌治疗提供了新的思路。

1.5 课题的研究意义及内容

1.5.1 研究意义

真菌感染对人类健康构成越来越大的威胁，特别是在临床上影响重症或免疫功能改变的患者，导致感染发病率和死亡率居高不下。随着药物治疗的进行，脱靶毒性和耐药真菌问题变得更加严峻。生物材料和纳米技术在生物医药领域广泛应用，已为抗真菌药物的研究提供了新思路。通过纳米载体结构及其微观的物理化学特性可以降低抗真菌药物的毒副作用、提高稳定性，并改善其在体内的利用效率。此外，通过特异性结构修饰（适配体）可以实现对组织和细胞的选择性作用，并降低真菌对药物的耐受能力，从而增强抑制真菌生长的能力，在临床上具有重要意义。

1.5.2 研究内容

1、AD1 修饰载 FLUCZ 的 PLGA-PEG 纳米粒子（AD1-PLGA-PEG-FLUCZ）和 AD1 修饰载 AMP 的 PLGA-PEG 纳米粒子（AD1-PLGA-PEG-AMP）的制备及特性检测。采用 W/O/W 多重乳化-溶剂挥发法制备载 FLUCZ 和 AMP 纳米粒子，碳二亚胺法将适配体 AD1 修饰在纳米粒表面，通过检测纳米粒子的粒径、电位、包封率、载药量及电镜、红外等基本特性验证纳米粒的有效性和稳定性。

2、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米粒子对 *C.albicans* 细胞以及其生物膜的体外杀菌作用。采用抑菌圈实验、MIC、时间生长抑菌曲线检测载药纳米粒对 *C.albicans* 的抑菌活性；并采用扫描电镜以及荧光显微镜检测载药纳米粒对 *C.albicans* 形态结构的影响。建立 *C.albicans* 体外生物模型，采

用结晶紫染色、XTT 实验等验证纳米粒子对 *C.albicans* 生物膜的杀伤作用。

3、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米粒子对 *C.albicans* 的体内杀菌作用。建立小鼠 *C.albicans* 感染模型，统计小鼠在感染和治疗时期的体重变化；采用 HE 染色检测了载药纳米粒对小鼠的心、肝、脾、肺和肾组织的病理影响；通过小鼠的血清检测了治疗后的恢复情况，并对 *C.albicans* 感染后的肺脏进行了 CFU 检测；另外，通过小鼠荧光检测验证了载药纳米粒子的靶向能力。

第 2 章 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米材料的合成表征以及生物相容性分析

2.1 引言

聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)是一种生物相容性高且生物可降解性的聚合物,具有良好的物理化学性质,因此被广泛应用于聚合物纳米颗粒的制备。聚乙二醇(PEG)修饰 PLGA 纳米粒具有许多优点,如:(1)提高 PLGA 纳米粒及其疏水性物质的水溶性;(2)增加 PLGA 纳米粒的表面电荷和空间位阻,从而延长纳米粒的稳定性和减少其聚集;(3)通过抑制电离效应而产生隐形效应,延长药物的体循环时间;(4)促进药物从聚合物基质中释放^[25]。因此,许多研究采用 PLGA-PEG 纳米粒作为各种天然生物活性化合物、多肽、蛋白质或疫苗的纳米载体。

研究发现,在 *C.albicans* 生物膜形成期间,细胞外基质中的(1,3)- β -D-葡聚糖与生物膜的耐药性有关,推断葡聚糖可能是 *C.albicans* 生物膜的有用内源靶标。基于这一观点,Tang^[36]等人选择出针对(1,3)- β -D-葡聚糖的单链脱氧核糖核酸(ssDNA)的适配体 AD1,结果显示 AD1 与来自 *C.albicans* 细胞壁的(1,3)- β -D-葡聚糖有高结合亲和力。因此,使用适配体 AD1 修饰载药纳米粒用于药物靶向递送,探索一种新型的靶向治疗方法,对于 *C.albicans* 生物膜感染的治疗具有重要临床意义。

唑类抗真菌药物尤其是 FLUCZ,凭借其安全、有效、价廉和低毒的特性一直是预防和治疗 *C.albicans* 感染的首选药物。然而,随着 FLUCZ 在临床治疗中的频繁使用,*C.albicans* 对 FLUCZ 的耐药现象也日益严重^[37]。研究发现,FLUCZ 对 *C.albicans* 生物膜的杀伤效果有限,生物膜内的 *C.albicans* 比浮游菌对 FLUCZ 的耐药性高达 1000 倍以上,一旦形成生物膜,相较浮游态更难清除,并且引起的疾病也是慢性和难治性的。因此,寻找一种能够有效治疗 *C.albicans* 生物膜引起的难治性感染性疾病的新型治疗方法是临床亟待解决的问题。

AMP 作为新兴抗 *C.albicans* 的药物之一。它们对病毒、细菌和真菌都具有活性。然而,AMP 毒性和对蛋白酶降解的敏感性限制了其作为天然抗菌剂的应用。为了克服这些困难,本文通过纳米技术对 AMP 进行包裹,从而提升其生物

相容性，增强对 *C.albicans* 的杀伤能力。

2.2 实验材料

2.2.1 实验材料

小鼠成纤维细胞（NCTC clone 929, L929, 国家资源库）；抗菌肽（LLKKLLKKLLKK, AMP, 实验室合成）；AD1 适配体（AD1: Kd=103.7 nM, 5'-GCGGAA TTCGAACAGTCCGAGCCCACACGTGTGAGAAGGGTGTTATCATGTATTTTCG TGTTCCTTTTCGTCATTCCTTTGTCTGGGGTCAATGCGTCATAGGATCCCGC-3', 3' 修饰氨基, 生工生物工程有限公司）

2.2.2 实验试剂与仪器

表 2-1 主要实验材料

Table 2-1 Main experimental materials

药品名称	级别	生产厂家
聚乳酸-羟基乙酸-聚乙二醇	分析纯	西安瑞禧生物科技有限公司
氟康唑	分析纯	上海麦克林
适配体 AD1	分析纯	上海生工生物
蛋白胨	分析纯	国药集团
葡萄糖	分析纯	国药集团
无水乙醇	分析纯	国药集团
2-N-吗啉代乙磺酸	分析纯	国药集团
聚乙烯醇	分析纯	国药集团
1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺	分析纯	国药集团
三氯甲烷	分析纯	国药集团
N-羟基琥珀酰亚胺	分析纯	国药集团
沙保氏培养基	微生物用	杭州百思
无菌脱纤维绵羊血	无菌纯	河南跃驰生物科技有限公司
溴化钾	分析纯	阿拉丁
戊二醛	分析纯	阿拉丁

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental equipment

仪器名称	仪器型号	生产厂家
循环水式多用真空泵	SHB-III	郑州长城科工贸有限公司
粒度仪	NanoDLS	美国布鲁克海文有限公司
台式低速离心机	TG16-W	湖南湘仪有限公司
双光束紫外分光光度计	UV-8000	上海精密有限公司
恒温磁力搅拌器	H01-1A	上海众越仪器有限公司
数显恒温水浴锅	HH.2	上海博讯实业有限公司
精密分析天平	HZK-FA110S	华志电子科技有限公司
双人单面净化工作台	SW-CJ-2D	江苏通净净化设备有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-100A	上海博讯实业有限公司
隔水式培养箱	GHP-9160	宁国沙鹰科学仪器有限公司
组合式摇床	HYL;-C	太仓市强乐实验设备有限公司
全自动酶标仪	1510	美国赛默飞世尔科技公司
傅里叶变换红外光谱仪	IR Prestige-21	上海巴贯仪器科技有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 材料的合成

取 20 mg 的 PLGA-PEG(-COOH)溶于 2 mL 三氯甲烷，待充分溶解后分别加入 400 μ L 的 FLUCZ 溶液（2 mg/mL）和 400 μ L 的 AMP 溶液（2 mg/mL），震荡均匀后用超声波细胞粉碎仪 80 %功率超声 2 min 形成初乳。加入 1 %的聚乙烯醇溶液 4 mL，继续超声 5 min 形成复乳。然后在冰浴条件下搅拌 4 h 挥发有机溶剂，加入 5 mL 双蒸水在 8000 rpm 离心 5 min，反复洗涤 3 次，收集纳米粒冻干即可得到 PLGA-PEG-FLUCZ 和 PLGA-PEG-AMP^[38]。将 FLUCZ 或 AMP 替换成无菌水即可得到空白纳米粒 PLGA-PEG。

分别取 20 mg 的 PLGA-PEG-FLUCZ 和 PLGA-PEG-AMP 分别重悬于 2 mL pH=5.5 的 2-N-吗啉代乙磺酸（2-N-Morpholino ethanesulfonic Acid, MES）缓冲液，加入 40 mg 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺（1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-3

-ethylcarbodiimide hydrochloride , EDC) 预孵育 10 min 后再加入 40 mg 的 N-羧基琥珀酰亚胺 (N-Hydroxy succinimide , NHS) 温和搅拌反应 2 h, 加入 5 mL 双蒸水在 8000 rpm 离心 5 min, 反复洗涤 3 次, 去除未反应的 EDC 和 NHS^[39]。再次重悬于 pH=8 的 MES 缓冲液中, 各加入 0.5 mM 的适配体 AD1 (3' 端修饰 -NH₂), 4℃ 条件下反应 12 h, 加入 5 mL 双蒸水在 8000 rpm 离心 5 min, 反复洗涤 3 次除去未连接上的适配体^[36], 即可得到 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP, 收集纳米粒并冻干保存。

2.3.2 载药率以及包封率的计算

包封率是指被包裹的药物在悬液中占药物总量的百分量。它是纳米粒质量控制的一个重要的指标, 反映了药物被载体包封的程度。载药率是指单位重量或单位体积微球所负载的药量, 其中能释放的药量为有效载药率, 载药率可看成是微球的含药量。用无水乙醇配制不同浓度的 FLUCZ 和 AMP 标准溶液, 使用双光束紫外可见分光光度计对 300 µg/mL、400 µg/mL、500 µg/mL、600 µg/mL 和 700 µg/mL 的 FLUCZ 以及 250 µg/mL、500 µg/mL、750 µg/mL、1000 µg/mL 和 1250 µg/mL 的 AMP 标品溶液进行全波长扫描, 绘制标准曲线。加入 3 mL 的超纯水重悬并用超声波细胞粉碎仪破碎纳米粒, 于双光束紫外分光光度计检测后, 通过标曲计算得出载药量和包封率, 公式如下:

$$\text{载药率}(\%) = \frac{\text{纳米材料中药物质量}}{\text{纳米材料质量} + \text{纳米材料中药物质量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{纳米材料中药物质量}}{\text{药物总量}} \times 100\%$$

2.3.3 粒径及 Zeta 电位表征

各取 2 µg/mL 的 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 以及 PLGA-PEG 的溶液 2 mL 于比色皿中, 采用粒度仪测定粒子粒径及 Zeta 电位^[40]。

2.3.4 SEM 以及 FT-IR 表征

采用扫描电子显微镜采集分析 PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 以及 PLGA-PEG 表面形态结构^[41]。将冻干的 PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 和 PLGA-PEG 粉末和溴化钾混合压片，采用傅里叶变换红外光谱仪收集 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} 波数范围内的红外光谱^[42]。

2.3.5 溶血活性分析

取无菌脱纤维绵羊血 5 mL，用 PBS 重复洗涤和离心直到上清液不呈现红色。取 200 μL 下层红细胞，加入 PBS 稀释至 10 mL，配置 2 % (v:v) 红细胞溶液。分别取不同浓度的 FLUCZ 0.5 mL 与 0.5 mL 2 % 红细胞溶液混合使其终浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 、128 $\mu\text{g/mL}$ 、256 $\mu\text{g/mL}$ 和 512 $\mu\text{g/mL}$ ；PLGA-PEG-FLUCZ 0.5 mL 与 0.5 mL 2 % 红细胞溶液混合使其终浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$ ；AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 0.5 mL 与 0.5 mL 2 % 红细胞溶液混合使其终浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 和 32 $\mu\text{g/mL}$ ，使 FLUCZ、PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 终浓度为各自的 MIC、2 MIC、4 MIC 和 8 MIC；

再分别取不同浓度的 AMP 0.5 mL 与 0.5 mL 2 % 红细胞溶液混合使其终浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ 、64 $\mu\text{g/mL}$ 、128 $\mu\text{g/mL}$ 和 256 $\mu\text{g/mL}$ ；PLGA-PEG-AMP 0.5 mL 与 0.5 mL 2 % 红细胞溶液混合使其终浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$ ；AD1-PLGA-PEG-AMP 0.5 mL 与 0.5 mL 2 % 红细胞溶液混合使其终浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 和 32 $\mu\text{g/mL}$ ，使 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 终浓度为各自的 MIC、2 MIC、4 MIC 和 8 MIC，再取 PLGA-PEG 0.5 mL 与 0.5 mL 2 % 红细胞溶液混合使其终浓度为 64 $\mu\text{g/mL}$ 、128 $\mu\text{g/mL}$ 、256 $\mu\text{g/mL}$ 和 512 $\mu\text{g/mL}$ 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 3 h 后 1000 rpm 离心 10 min。取上清液检测 OD_{570} 吸光值，记为 $\text{OD}_{\text{样}}$ ，以加蒸馏水组为阳性对照，记为 $\text{OD}_{\text{阳}}$ ，加 PBS 组作为阴性对照，记为 $\text{OD}_{\text{阴}}$ ^[39]。溶血率超过 5 % 即发生溶血反应。

$$\text{溶血率}\% = \frac{\text{OD}_{\text{样}} - \text{OD}_{\text{阴}}}{\text{OD}_{\text{阳}} - \text{OD}_{\text{阴}}} \times 100\%$$

2.3.6 细胞毒性分析

采用 CCK-8 试剂盒测定分析 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 以及 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 和 PLGA-PEG 对 L929 细胞活性的影响。取浓度为 5×10^4 CFU/mL 细胞悬液 90 μ L 接种到 96 孔板中, 然后再向每孔中分别加入 10 μ L 的 FLUCZ、PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 溶液, 使 FLUCZ 的浓度分别为 32 μ g/mL、64 μ g/mL、128 μ g/mL、256 μ g/mL 和 512 μ g/mL; 使 PLGA-PEG-FLUCZ 的浓度分别为 4 μ g/mL、8 μ g/mL、16 μ g/mL、32 μ g/mL 和 64 μ g/mL; 使 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的浓度分别为 2 μ g/mL、4 μ g/mL、8 μ g/mL、16 μ g/mL 和 32 μ g/mL, 使 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 终浓度分别为各自 1/2 MIC、MIC、2 MIC、4 MIC 和 8 MIC, 使 PEG-PLGA 终浓度分别为 16 μ g/mL、32 μ g/mL、64 μ g/mL、128 μ g/mL 和 256 μ g/mL。

在相同操作, 取浓度为 5×10^4 CFU/mL 细胞悬液 90 μ L 接种到 96 孔板中, 然后再向每孔中分别加入 10 μ L 的 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 溶液, 使 AMP 的浓度分别为 16 μ g/mL、32 μ g/mL、64 μ g/mL、128 μ g/mL 和 256 μ g/mL; 使 PLGA-PEG-AMP 的浓度分别为 4 μ g/mL、8 μ g/mL、16 μ g/mL、32 μ g/mL 和 64 μ g/mL; 使 AD1-PLGA-PEG-AMP 的浓度分别为 2 μ g/mL、4 μ g/mL、8 μ g/mL、16 μ g/mL 和 32 μ g/mL, 使 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 终浓度分别为各自 1/2 MIC、MIC、2 MIC、4 MIC 和 8 MIC, 置于 CO₂ 培养箱中孵育 12 h 后加入 CCK-8 试剂, 继续孵育 4 h 后测定 OD₄₅₀ 吸光值^[43]。

$$Cell\ vitality = \frac{OD_{samples} - OD_{blank}}{OD_0 - OD_{blank}} \times 100\%$$

OD_{samples}: 具有培养基、细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光值。

OD_{blank}: 具有培养基、CCK-8 溶液、药物溶液, 没有细胞的孔的吸光值。

OD₀: 具有培养基、培养基、CCK-8 溶液, 没有药物溶液的孔的吸光值。

2.3.7 统计分析

所有的试验至少重复三次，使用 Excel 2019 软件对实验数据进行整理，并使用 Origin 2018 绘制图形。数据以平均值 $\pm$ SD 表示。

2.4 结果与分析

2.4.1 载药率和包封率的检测

(1) AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 载药率和包封率的检测

如图 2-1 A 所示可以看出，FLUCZ 在 261 nm 和 267 nm 的波长处有最大吸收，在 264nm 的波长处有最小吸收，符合 2010 年版药典二部附录 IVA 测定的结果^[44]。根据图 2-1 A 的 OD₂₆₁ 数值绘制的标准曲线如图 2-1 B 所示，得到 FLUCZ 吸光值与浓度公式为：

$$y = 0.0417 + 0.0020557x$$

其中 x 为 FLUCZ 浓度，y 为 OD₂₆₁ 数值

通过计算得出 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的载药率 $5.89 \pm 0.07\%$ ，包封率为 $84.51 \pm 0.18\%$ ，如图 2-1 C 所示。

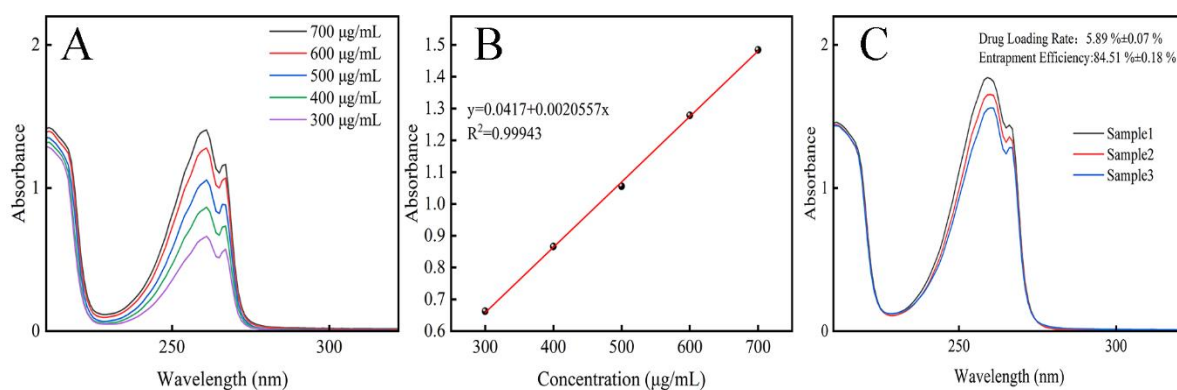


图 2-1 FLUCZ 紫外扫描、AMP 含量标曲以及载药量和包封率的检测

Fig. 2-1 Determination of FLUCZ UV and AMP content, drug loading and entrapment efficiency

(2) AD1-PLGA-PEG-AMP 载药率和包封率的检测

如图 2-2 A 所示可以看出，AMP 在 216 nm 的波长处有最大吸收，而肽键的

主要吸收峰为 216 nm，因此选择 216 nm 作为测定条件。根据图 2-2 A 的 OD₂₁₆ 数值绘制的标准曲线如图 2-2 B 所示，得到 AMP 吸光值与浓度公式为：

$$y = 0.02609 + 0.00095756x$$

其中 x 为 AMP 浓度，y 为 OD₂₁₆ 数值

通过公式计算得出 AD1-PLGA-PEG-AMP 的载药率 $11.73 \pm 0.21\%$ ，包封率为 $86.33 \pm 0.24\%$ ，如图 2-2 C 所示。

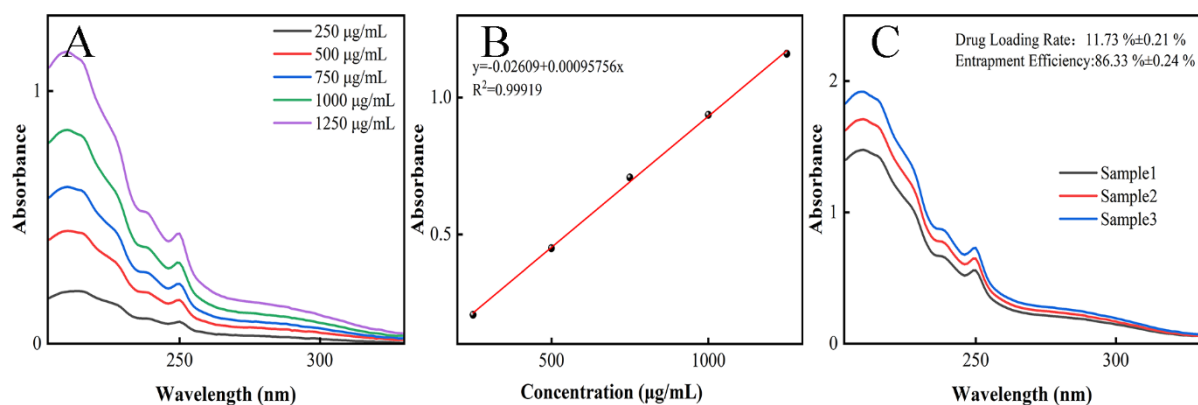


图 2-2 AMP 紫外扫描、AMP 含量标曲以及载药量和包封率的检测

Fig. 2-2 Determination of AMP UV and AMP content, drug loading and entrapment efficiency

2.4.2 粒径与 Zeta 电位表征

(1) FLUCZ 组粒径与 Zeta 电位表征

从图 2-3 A 可以看出，空载纳米粒 PLGA-PEG 的粒径为 280 nm，而 PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 粒径为 390 nm（图 2-3 B, C），表明包载 FLUCZ 能够增大 PLGA-PEG 的粒径。然而，PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的 PDI 明显小于 PLGA-PEG，表明他们的溶液分散性优于 PLGA-PEG。图 2-3 D 为 Zeta 电位图，由图可以看出，PLGA-PEG 纳米粒的 Zeta 电位为 -19.91 mV，而 PLGA-PEG-FLUCZ 的 Zeta 电位为 -36.75 mV，表明 PLGA-PEG 包载 FLUCZ 后其稳定性有所提升。然而，PLGA-PEG-FLUCZ 连接 AD1 适配体后的 Zeta 电位出现了上升，为 -30.45 mV，这可能是因为适配体 AD1 表面的氨基与 PLGA-PEG-FLUCZ 结合后析出了部分正电荷，导致 Zeta 电位升高^[45]。

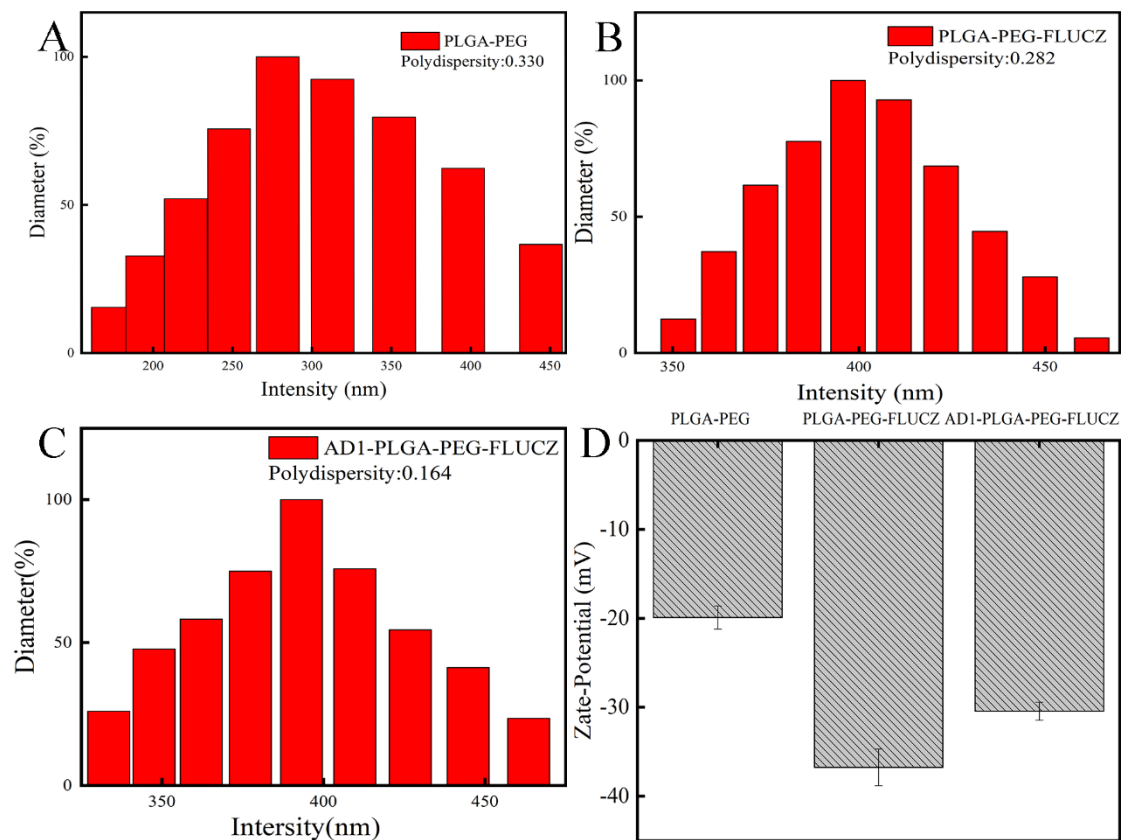


图 2-3 PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的粒径与电位表征

Fig. 2-3 Characterization of particle size and potential of PLGA-PEG, PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ

(1) AMP 组粒径与 Zeta 电位表征

从图 2-4 A 可以看出，空载纳米粒 PLGA-PEG 的粒径为 280 nm，而 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 粒径为 390 nm（图 2-4 B、C），表明包载 AMP 能够增大 PLGA-PEG 的粒径。然而，PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的 PDI 明显小于 PLGA-PEG，表明他们的溶液分散性优于 PLGA-PEG，其结果和 FLUCZ 相类似。由图 2-4 D 可以看出，PLGA-PEG 纳米粒的 Zeta 电位为 -19.91 mV，而 PLGA-PEG-AMP 的 Zeta 电位为 -37.71 mV，表明 PLGA-PEG 包载 AMP 后其稳定性有所提升。PLGA-PEG-AMP 连接适配体 AD1 后的 Zeta 电位同样出现了上升，为 -29.31 mV。

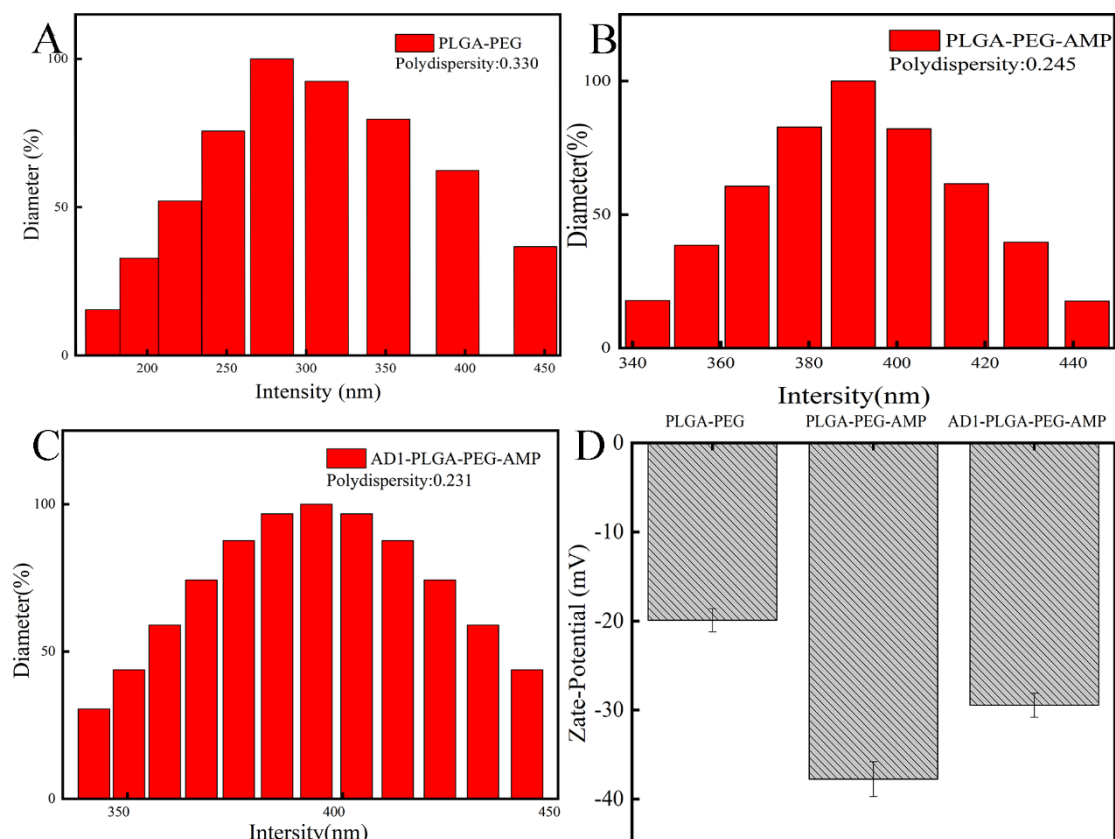


图 2-4 PLGA-PEG、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的粒径与电位表征

Fig. 2-4 Characterization of particle size and potential of PLGA-PEG, PLGA-PEG-A
MP and AD1-PLGA-PEG-AMP

2.4.3 SEM 和 FT-IR 分析

(1) FLUCZ 组 SEM 和 FT-IR 分析

图 2-5 A 为 PLGA-PEG 的 SEM 图，为粒径 280 nm 左右的球形粒子。图 2-5 B 和图 2-5 C 分别为 PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的 SEM 图。可以看出，包载 FLUCZ 后纳米粒子大小有所增加，大约增大至 390 nm 左右，这与粒径检测结果相一致。

图 2-5 D 为 FLUCZ、PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的 FT-IR 图谱。从图可以看出，FLUCZ 在 3078 cm^{-1} 和 3116 cm^{-1} 处均有强吸峰，这是由 FLUCZ 苯环上的 C-F 键和 C-N 键旋转振动产生的吸收峰^[46, 47]。由于 PLGA-PEG 末端修饰了 -COOH，因此，在 1740 cm^{-1} 和 3400 cm^{-1} 处检测出 C=O 和 -OH 的吸收峰^[48]。PLGA-PEG-FLUCZ 与 PLGA-PEG 的红外吸收光谱类似，也在 1740 cm^{-1} 和 3400 cm^{-1} 处出现了由 C=O 和 -OH 伸展振动产生的吸收

峰, 并且 FLUCZ 的特征峰均已隐匿, 推测 FLUCZ 可能是被 PLGA-PEG 物理包载^[49]。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 红外光谱除了在 1740 cm^{-1} 和 3400 cm^{-1} 处产生吸收峰外, 还在 3301 cm^{-1} 处出现了由 O=N 键产生的吸收峰, 推测适配体 AD1 可能是通过 O=N 键与 PLGA-PEG-FLUCZ 相结合^[50]。

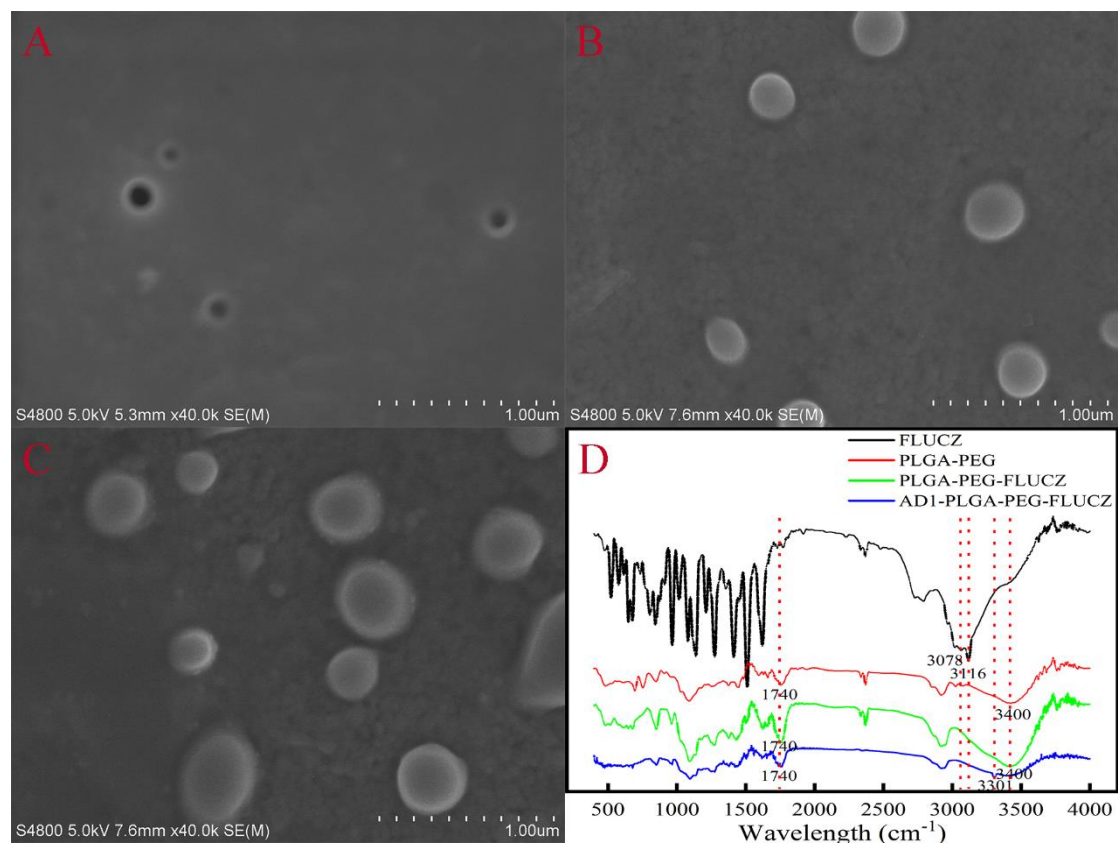


图 2-5 PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的 SEM 和 FT-IR 分析

Fig. 2-5 SEM figure of PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ and FT-IR analysis of FLUCZ、PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ

(2) AMP 组 SEM 和 FT-IR 分析

图 2-6 A 为 PLGA-PEG 的 SEM 图, 图 2-6 B 和图 2-6 C 分别为 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的 SEM 图。可以看出, 包载 AMP 后纳米粒子大小有所增加, 且大小形态相对统一, 说明其分散性较有提升, 这和粒径和 PDI 结果检测相一致。

图 2-6 D 为 AMP、PLGA-PEG、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的 FT-IR 图谱。从图可以看出, AMP 在 1543 cm^{-1} 和 1670 cm^{-1} 处产生有强吸收峰, 1543 cm^{-1} 可能是由于 L 赖氨酸的-COOH 羧酸的弯曲振动产生的吸收峰, 1670 cm^{-1} 处的吸收峰可能是由于-NH-CO-亚胺基振动产生的, 其为氨基酸缩合产

生的基团^[51],可作为 AMP 的特征峰。由于 PLGA-PEG 末端修饰了 -COOH,因此,在 1740 cm^{-1} 和 3400 cm^{-1} 处检测出 C=O 和 -OH 的吸收峰。PLGA-PEG-AMP 与 PLGA-PEG 的红外吸收光谱类似,也在 1740 cm^{-1} 和 3400 cm^{-1} 处出现了由 C=O 和 -OH 伸展振动产生的吸收峰^[48],并且 AMP 的特征峰均已隐匿,这与 FLUCZ 的结果相互印证,可以推测 AMP 可能是被 PLGA-PEG 物理包载^[49]。AD1-PLGA-PEG-AMP 红外光谱除了在 1740 cm^{-1} 和 3400 cm^{-1} 处产生吸收峰外,还在 3301 cm^{-1} 处出现了由 O=N 键产生的吸收峰,这与 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 结果相一致。

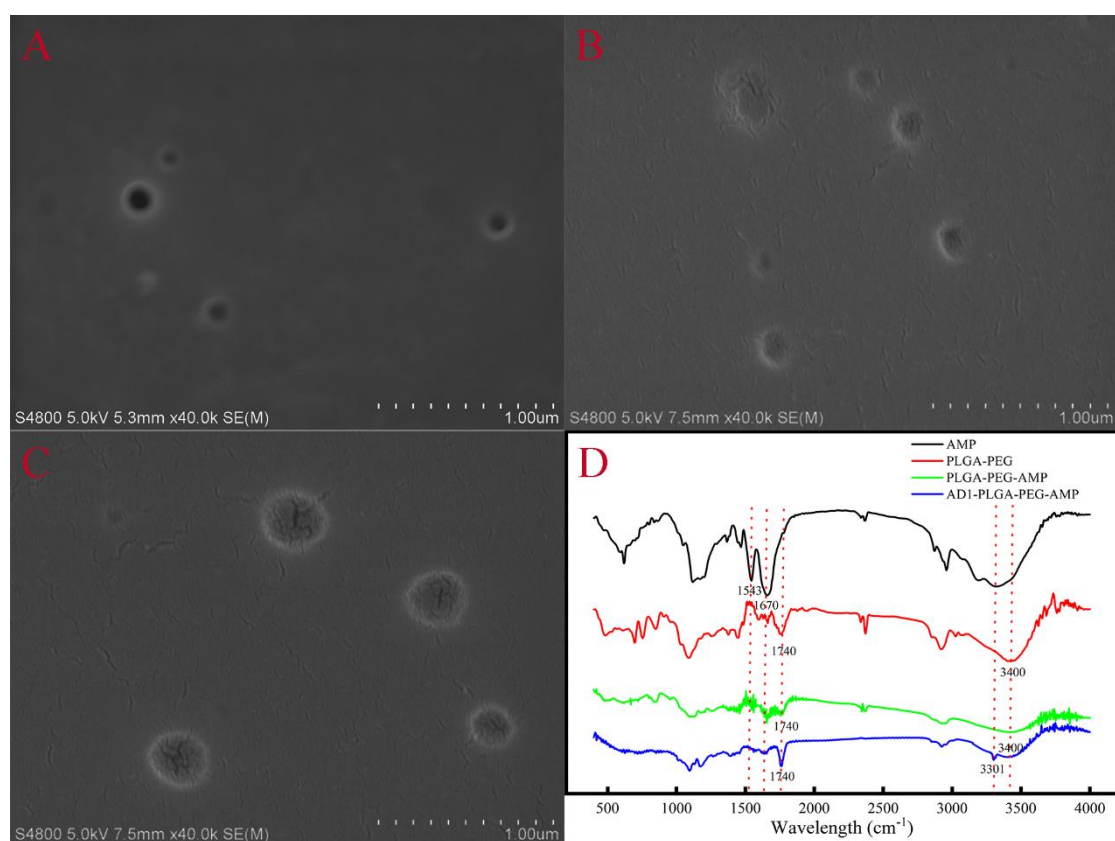


图 2-6 PLGA-PEG、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的 SEM 和 FT-IR 分析

Fig. 2-6 SEM figure of PLGA-PEG、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP and FT-IR analysis of AMP、PLGA-PEG、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP

2.4.5 溶血活性

(1) FLUCZ 组溶血活性分析

生物相容性是影响纳米材料在生物领域中广泛应用的一个重要因素。溶血性是红细胞被溶解并释放血红蛋白的过程，一般要求药物造成红细胞的溶血率不能超过 5 %^[52, 53]。由图 2-7 A 可看出，PLGA-PEG 未产生溶血反应。FLUCZ 和 PLGA-PEG-FLUCZ 在浓度分别为 256 $\mu\text{g/mL}$ （4 倍 MIC）和 64 $\mu\text{g/mL}$ （8 倍 MIC）时发生了溶血反应，其溶血率分别为 7.43 %和 6.45 %（图 2-7 B, C）。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 在浓度 32 $\mu\text{g/mL}$ （8 倍 MIC）时溶血率为 4.64 %。这些造成溶血反应的药物剂量远远小于实际治疗剂量，表明 PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 具有较好的血液相容性，具有用于静脉给药的潜在可行性^[54]。

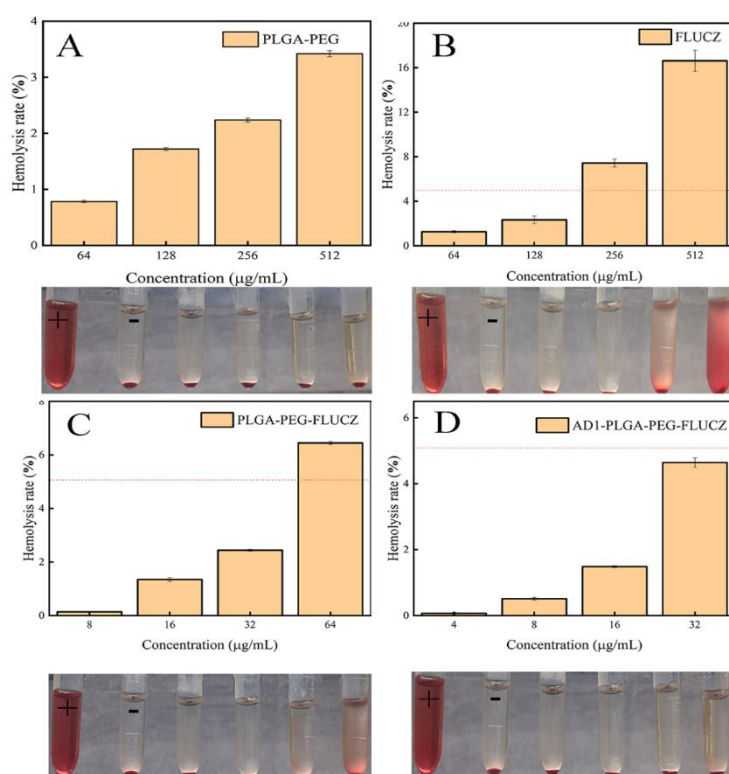


图 2-7 溶血活性分析

注：A、B、C 和 D 分别为 PLGA-PEG、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的溶血活性图

Fig. 2-7 Hemolytic activity analysis

Note: A, B, C and D are hemolytic activity diagrams of PLGA-PEG, FLUCZ, PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ, respectively.

(2) AMP 组溶血活性分析

由图 2-8 A 可看出, PLGA-PEG 未产生溶血反应。AMP 和 PLGA-PEG-AMP 在浓度分别为 128 $\mu\text{g/mL}$ (4 倍 MIC) 和 64 $\mu\text{g/mL}$ (8 倍 MIC) 时发生了溶血反应, 其溶血率分别为 6.42 % 和 7.84 % (图 2-8 B, C)。AD1-PLGA-PEG-AMP 在浓度 32 $\mu\text{g/mL}$ (8 倍 MIC) 时溶血率为 3.97 %, 表明 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 具有较好的血液相容性。

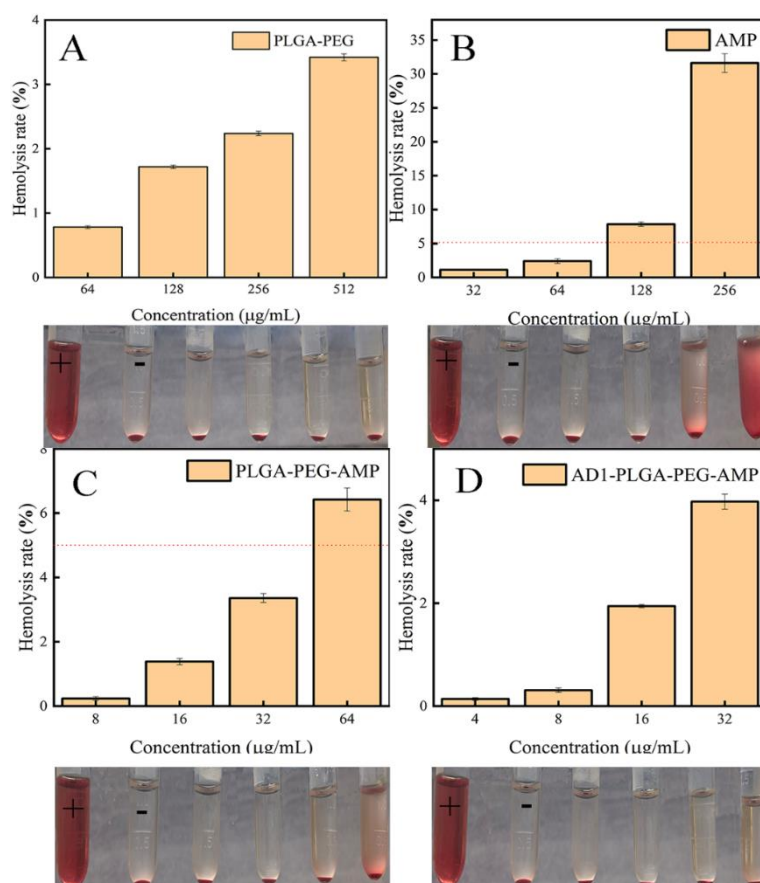


图 2-8 溶血活性分析

注: A、B、C 和 D 分别为 PLGA-PEG、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的溶血活性图

Fig. 2-8 Hemolytic activity analysis

Note: A, B, C and D are hemolytic activity diagrams of PLGA-PEG, AMP, PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP, respectively.

2.4.6 细胞毒性

(1) FLUCZ 组细胞毒性分析

CCK-8 试剂盒常常被用来检测药物的细胞毒性。一般认为,当细胞存活率达到 80 %以上,认为药物对细胞没有毒性^[55]。试验结果表明,PLGA-PEG 均未对 L929 细胞产生毒性,其细胞存活率均达到 96 %以上(图 2-9 B)。FLUCZ 和 PLGA-PEG-FLUCZ 浓度分别为 512 $\mu\text{g/mL}$ (8 倍 MIC) 和 32 $\mu\text{g/mL}$ (4 倍 MIC) 时,细胞存活率分别为 73.67 %和 79.76 % (图 2-9 A, C)。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ (8 倍 MIC) 时,细胞存活率为 78.51 % (图 2-9 D),出现了细胞毒性。然而,AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的正常治疗剂量会低于 8 倍 MIC,因此,在使用时一般不会产生细胞毒性。

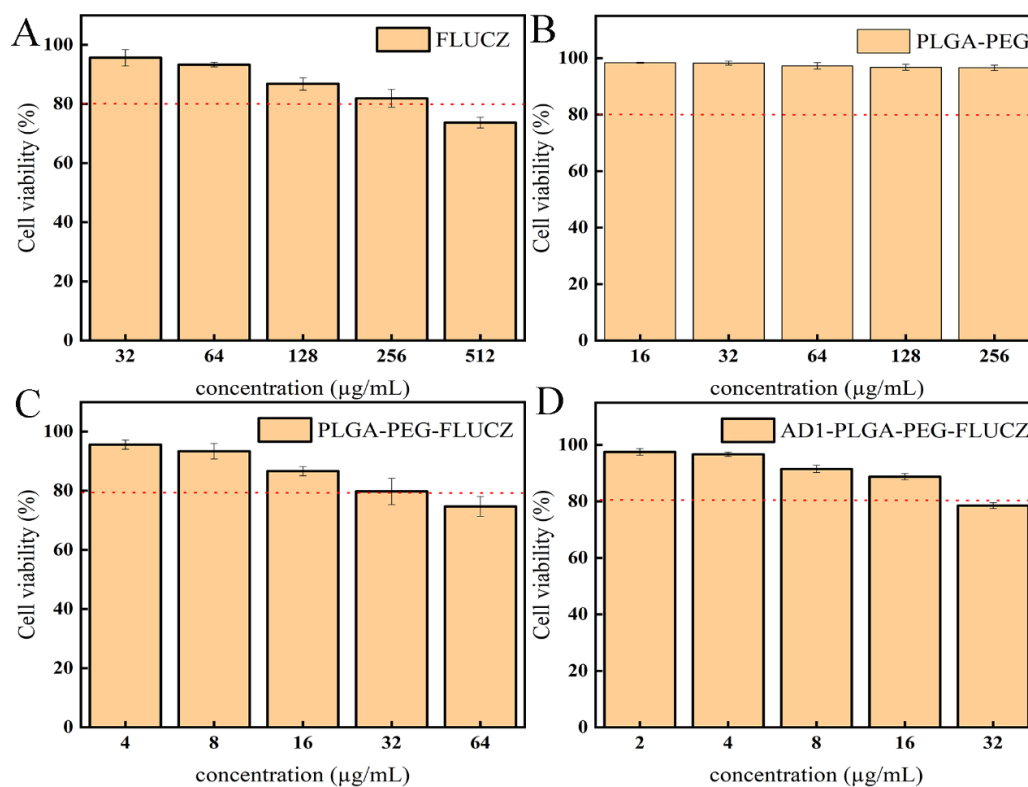


图 2-9 细胞毒性分析

注: A、B、C 和 D 分别为 FLUCZ、PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ

Fig. 2-9 Cell viability assay

Note: A, B, C and D were FLUCZ, PLGA-PEG, PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ, respectively

(2) AMP 组细胞毒性分析

从图 2-10 可以看出, AMP 和 PLGA-PEG-AMP 浓度分别为 128 $\mu\text{g/mL}$ (4 倍 MIC) 和 32 $\mu\text{g/mL}$ (4 倍 MIC) 时, 细胞存活率分别为 73.89 %和 75.58 % (图 2-10 A、C)。AD1-PLGA-PEG-AMP 的浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ (8 倍 MIC) 时, 细胞存活率为 75.58 %, 出现了细胞毒性。结果表明 AMP 对细胞的损伤要高于类似 FL UCZ 常见抗生素, 这也是限制其发展的主要原因。然而用纳米粒子对其进行封装, 极大的减少了 AMP 对细胞的损伤, 拓宽了 AMP 的适用范围。在治疗时, AD1-PLGA-PEG-AMP 的使用剂量会远低于 8 倍 MIC。

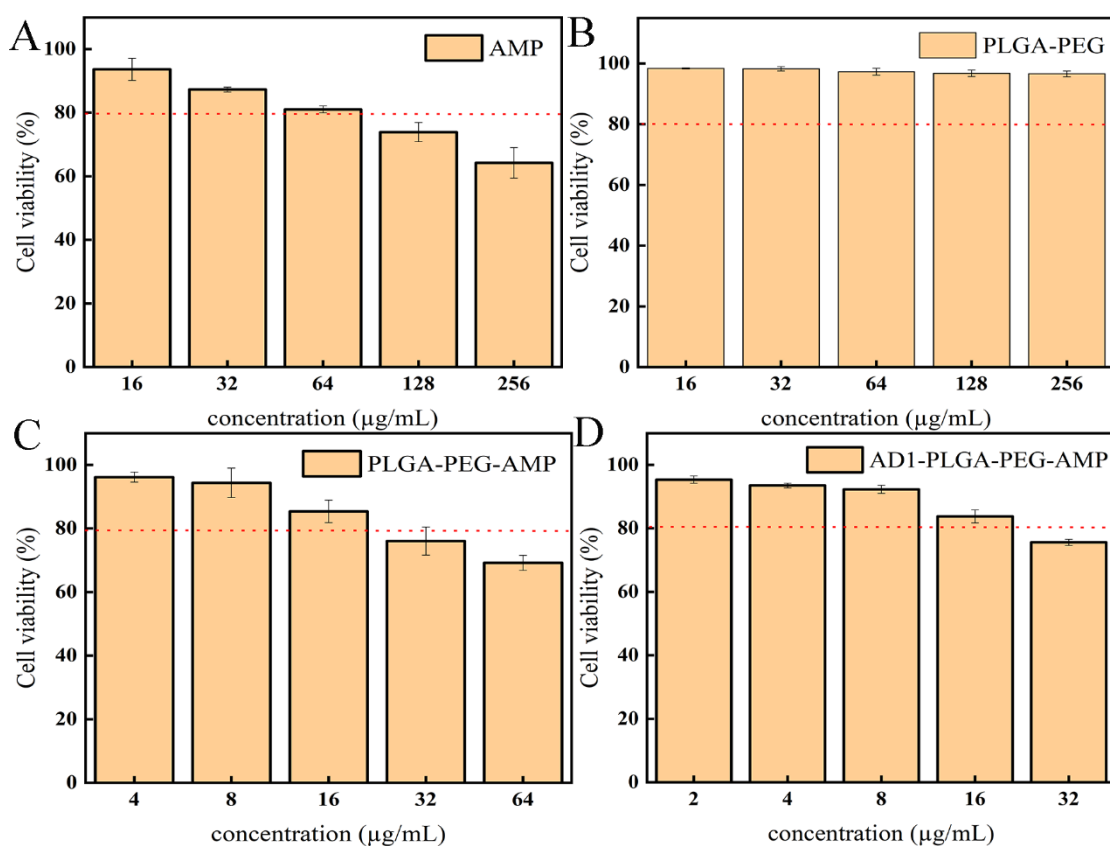


图 2-10 细胞毒性分析

注: A、B、C 和 D 分别为 AMP、PLGA-PEG、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP

Fig. 2-10 Cell viability assay

Note: A, B, C and D were AMP, PLGA-PEG, PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP, respectively

2.5 本章小结

在本章工作中，合成了 PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米粒子，通过粒径检测空载纳米粒 PLGA-PEG 的粒径为 280 nm，PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 粒径为 390 nm 左右，通过电位测试 PLGA-PEG 纳米粒的 Zate 电位为-19.91 mV，而 PLGA-PEG-FLUCZ 的 Zate 电位为-36.75 mV，表明 PLGA-PEG 包载 FLUCZ 后其稳定性有所提升。PLGA-PEG-FLUCZ 连接 AD1 适配体后的 Zate 电位出现了上升，为-30.45 mV；PLGA-PEG-AMP 的 Zate 电位为-37.71 mV，PLGA-PEG-FLUCZ 连接适配体 AD1 后的 Zate 电位同样出现了上升，为-29.31 mV。还通过 SEM 验证了粒径结果。在溶血试验中 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 在浓度 32 $\mu\text{g/mL}$ （8 倍 MIC）时溶血率为 4.64 %，未发生溶血。AD1-PLGA-PEG-AMP 在浓度 32 $\mu\text{g/mL}$ （8 倍 MIC）时溶血率仅为 3.97 %，表明 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 具有较好的血液相容性，在细胞毒理实验中 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ （8 倍 MIC）时，细胞存活率为 78.51 %，AD1-PLGA-PEG-AMP 的浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ （8 倍 MIC）时，细胞存活率为 75.58 %，出现了细胞毒性，在治疗时，药物的使用剂量会远低于 8 倍 MIC，因此，在使用时一般不会产生细胞毒性。至于纳米粒子的抗菌活性和其他生物学活性还有待于进一步研究。

第3章 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米粒子的抑菌活性测定

3.1 引言

由于世界范围内抗生素耐药性的上升, 针对真菌感染的标准治疗正在变得无效。传统的开发新抗菌剂的方法不足以满足目前的流水线, 因此, 目前正在制定新的抗菌策略。*C.albicans* 的感染方式和生物膜可以保护它们减少宿主免疫反应和抗生素的影响, 因此给全球医学界带来了巨大的治疗挑战。此外, *C.albicans* 耐药性的增加也导致了治疗的困难。

近年来, 纳米颗粒载体被报道为改善其有效载荷药物透过细胞膜的潜在措施之一。纳米粒子具有纳米尺寸、表面电荷大、比表面积大等特点, 可在某些器官和感染部位被动蓄积^[56]。修饰后的纳米粒子也可以通过主动靶向实现宿主细胞和细菌细胞的受体来进一步提高其有效荷载药物的跨膜性能^[57]。目前, 许多抗菌剂被掺入或与纳米载体结合, 以增强对 *C.albicans* 的药理活性, 并减少药物的毒副作用。因此, 纳米药物传递系统是克服我们所面临的 *C.albicans* 感染挑战的理想武器。

PLGA-PEG 聚合物可以通过水解降解, 并通过代谢途径(如三羧酸循环)排出乳酸和乙醇酸等副产物从而从体内清除。本研究选择 PLGA-PEG, 是因为它作为 FDA 批准的可降解医用植入材料已有很长时间的使用历史, 并且在临床上具有良好的安全性(例如: 低细胞毒性和良好的生物相容性)^[58]。本研究将 PLGA-PEG 作为纳米骨架, 包载 FLUCZ 和 AMP 来验证其对 *C.albicans* 的治疗情况。针对 *C.albicans* 生物膜上的独有的(1,3)- β -D-葡聚糖, 添加适配体 AD1 对其进行特异性识别, 从而增强了纳米粒子的靶向能力, 从而更有力地清除 *C.albicans*。

综上, 本章主要探究纳米粒子对 *C.albicans* 的抗菌性能, 以期开发新型抗菌剂提供新的策略。

3.2 实验材料

3.2.1 试验菌株

白色念珠菌 (*Candida albicans*, *C.albicans*) CMCC(F)98001 (上海鲁微科技有限公司)

3.2.2 实验试剂与仪器

表 3-1 主要实验材料

Table 3-1 Main experimental materials

药品名称	级别	生产厂家
聚乳酸-羟基乙酸-聚乙二醇	分析纯	西安瑞禧生物科技有限公司
氟康唑	分析纯	上海麦克林
适配体 AD1	分析纯	上海生工生物
蛋白胨	分析纯	国药集团
葡萄糖	分析纯	国药集团
无水乙醇	分析纯	国药集团
三氯甲烷	分析纯	国药集团
沙保氏培养基	微生物用	杭州百思
溴化钾	分析纯	阿拉丁
戊二醛	分析纯	阿拉丁

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental equipment

仪器名称	仪器型号	生产厂家
循环水式多用真空泵	SHB-III	郑州长城科工贸有限公司
荧光显微镜	NexcopeNIB600	上海巴贯仪器科技有限公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立有限公司
台式低速离心机	TG16-W	湖南湘仪有限公司
恒温磁力搅拌器	H01-1A	上海众越仪器有限公司
数显恒温水浴锅	HH.2	上海博讯实业有限公司
精密分析天平	HZK-FA110S	华志电子科技有限公司

续表 3-2 实验仪器

Add Table 3-2 Experimental equipment

双人单面净化工作台	SW-CJ-2D	江苏通净净化设备有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-100A	上海博讯实业有限公司
隔水式培养箱	GHP-9160	宁国沙鹰科学仪器有限公司
组合式摇床	HYL;-C	太仓市强乐实验设备有限公司
全自动酶标仪	1510	美国赛默飞科技公司

3.3 实验方法

3.3.1 抑菌能力分析

采用沙保氏培养基将 *C.albicans* 对数生长期细胞稀释到 10^5 CFU/mL，取 100 μ L 细胞溶液涂布到固体沙保氏培养基上。采用滤纸片抑菌检测法检测 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 以及 PLGA-PEG 的抑菌能力^[59]。以 PBS 溶液为阴性对照，控制所有样品浓度均为 2 μ g/mL。将平板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温恒湿培养箱培养 12 h 观察结果。

3.3.2 最小抑菌浓度（MIC）测定

取 *C.albicans* 对数生长期细胞，用沙保氏培养基将其稀释到 10^5 CFU/mL。在 96 孔板的每个小孔中加入细胞溶液 100 μ L，然后在第一小孔中加入 FLUCZ 或 PLGA-PEG-FLUCZ 或 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 或 PLGA-PEG 溶液 100 μ L，并用等 2 倍梯度稀释法对其浓度进行稀释^[60]。AMP 组的 MIC 按照相同方法测定，于 96 孔板中的每个小孔加入沙保氏培养基稀释的 10^5 CFU/mL 的 *C.albicans* 对数生长期细胞 100 μ L，并在第一个小孔中加入 AMP 或 PLGA-PEG-AMP 或 AD1-PLGA-PEG-AMP 溶液 100 μ L，并用等 2 倍梯度稀释法对其浓度进行稀释。最后于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后测定 OD₆₀₀ 处的吸光值，计算 MIC 值。

3.3.3 生长抑制曲线的测定

试验根据 Molleroda 等的方法^[61]，并稍作修改。采用浓度为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 PLGA-PEG，2.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 分别处理处于对数生长期的 *C.albicans* 细胞，空白组仅含有培养基^[62]。AMP 组按照相同的实验方法，采用浓度为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 PLGA-PEG，2.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 分别处理处于对数生长期的 *C.albicans* 细胞，空白组仅含有培养基，然后将 *C.albicans* 细胞置于恒温振动培养箱中（150 rpm，37 $^{\circ}\text{C}$ ）培养，每 3 小时取样，测定其 OD₆₀₀ 的吸光值。

3.3.4 细胞荧光染色

取对数生长期的 *C.albicans* 细胞 3 mL 于 3500 rpm 离心 10 min，PBS 缓冲液洗涤 3 次后弃上清。试验组分别加入 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 溶液使其药物终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ，空白组为 PBS，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。离心弃上清后分别加入 100 μL 的 PI (50 μM) 和 100 μL 的 STYO-9 染色液在黑暗中染色 10 min，然后点样到载玻片，用荧光显微镜进行观察拍照^[63, 64]。

3.3.5 细胞形态结构的 SEM 分析

采用 SEM 分析 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 细胞形态结构的影响。将对数生长期的 *C.albicans* 细胞离心后，分别加入 2 $\mu\text{g/mL}$ FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP，震荡培养（150 rpm，37 $^{\circ}\text{C}$ ）3 h 后，4000 rpm 离心 10 min，收集细胞沉淀，PBS 清洗 2 次，戊二醛固定 12 h，乙醇梯度洗脱后用丙酮清洗，滴于硅片，干燥后喷金，采用 SEM 观察其细胞形态^[65]。以 PBS 处理的细胞作为对照组。

3.3.6 生物膜生长动力学分析

取 1 cm×1 cm 的无菌盖玻片，于 10 %的胎牛血清溶液在 4 °C 下浸泡 12 h，后转移至六孔板中，加入 3 mL 处于对数生长期的 *C.albicans* 菌液于 37 °C 孵育 90 min。盖玻片用 PBS 清洗浮菌后转移至含有沙保氏培养基 3 mL 的六孔板中，于 37 °C 下分别培养 0、4、8、12、24、48 和 72 h。取出盖玻片用 PBS 清洗 3 次后转移至新的六孔板中并加入 3 mL 的 PBS，再加入 0.5 mg/mL 的 XTT 检测试剂 50 μ L 和 1 μ mol/L 的甲萘醌-丙酮溶液混合 4 μ L，于 37 °C 避光孵育 4 h。取溶液 6000 r/min 离心 5 min，检测上清液于 490 nm 吸光值^[66]。

3.3.7 生物膜生长抑制的定性分析

在无菌的 10 mL 玻璃试管装入 1mL 沙保氏培养基，接种 1 %的对数生长期的 *C.albicans* 菌液，再分别加入 1/2 MIC 的 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP，空白组加入同体积的 PBS 缓冲液。于恒温振动培养箱中（150 rpm，37 °C）培养 48 h。培养结束后弃置菌液，加入 PBS 缓冲液洗涤 3 次，然后采用 5 %的结晶紫染色 1 min，之后用 95 %的乙醇进行脱色至洗脱液无色，观察并拍照细胞膜生成量^[67]。

3.3.8 生物膜生长抑制的定量分析

取 1 cm×1 cm 的无菌盖玻片，用 10 %的胎牛血清溶液于 4 °C 浸泡 12 h，PBS 洗涤 3 次后将盖玻片转移到六孔板中，加入 3 mL 对数生长期的 *C.albicans* 菌液 37 °C 孵育 90 min^[68]，用 PBS 洗涤 3 次后加入沙保氏培养基 3 mL，再分别加入 1/2 MIC、1/4 MIC、1/8 MIC 的 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP。将 *C.albicans* 细胞置于恒温振动培养箱中（150 rpm，37 °C）培养 48 h，用 PBS 清洗 3 次后加入 50 μ L 0.5 mg/mL 的 XTT 试剂和 4 μ L 的 1 μ mol/L 的甲萘醌-丙酮溶液，混匀后于 37 °C 孵育 4 h，然后 6000 rpm 离心 5 min^[69]，取上清液检测 OD₄₉₀ 的吸光值^[70]。

3.3.9 统计分析

所有的试验至少重复三次，使用 Excel 2019 软件对实验数据进行整理，并使用 Origin 2018 绘制图形。数据以平均值 $\pm$ SD 表示。

3.4 结果与分析

3.4.1 抑菌圈分析

(1) FLUCZ 组抑菌圈分析

图 3-1 为 PLGA-PEG、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对 *C.albicans* 的生长抑菌圈。由图 3-1 A 和 E 可以看出，PBS 和 PLGA-PEG 对 *C.albicans* 生长无抑制作用。而 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ（图 3-1 B、C 和 D）均对 *C.albicans* 的生长产生了一定的抑制作用，且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的抑菌圈最大，表明其抑制活性最强。可能是由于适配体 AD1 的靶向作用，增强了 FLUCZ 对 *C.albicans* 的抑制能力^[71]。

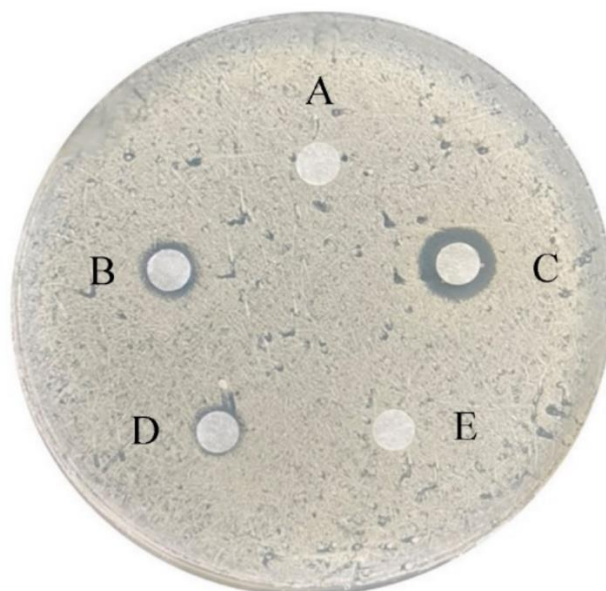


图 3-1 PLGA-PEG、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的抑菌圈

图

注：A、B、C、D 和 E 分别为 PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ、FLUCZ 和 Control（PBS）的抑菌圈图

Fig. 3-1 The bacteriostatic circle diagram of PLGA-PEG、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ

Note: The bacteriostatic circle diagram of A, B, C, D and E is PLGA-PEG、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ、FLUCZ and Control（PBS）, respectively

(2) AMP 组抑菌圈分析

PLGA-PEG、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的生长抑菌圈如图 3-2 所示。由图 3-2 A 和 E 可以看出，PBS 和 PLGA-PEG 对 *C.albicans* 的生长无抑制作用；而 AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP（图 3-2 B、C 和 D）均对 *C.albicans* 的生长产生了一定的抑制作用，且在 $2\mu\text{g/mL}$ 的浓度下 AD1-PLGA-PEG-AMP 的抑菌圈最为明显，表明其抑制能力最强。这表明将 AMP 用纳米粒子 PLGA-PEG 进行包载可以提升其抗 *C.albicans* 的能力。

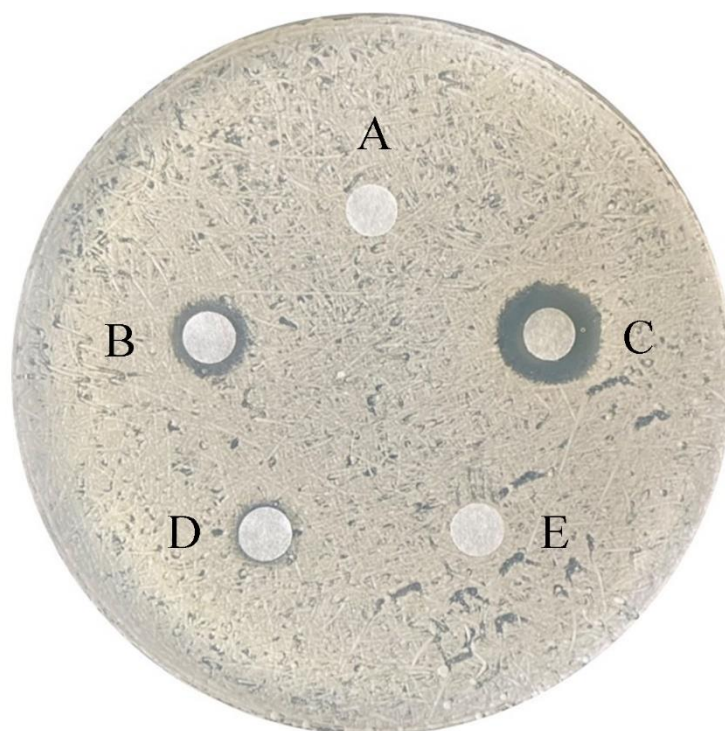


图 3-2 PLGA-PEG、AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 的抑菌圈图

注：A、B、C、D 和 E 分别为 PLGA-PEG、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP、AMP 和 Control（PBS）的抑菌圈图

Fig. 3-2 The bacteriostatic circle diagram of PLGA-PEG、AMP、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP

Note: The bacteriostatic circle diagram of A, B, C, D and E is PLGA-PEG、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP、AMP and Control（PBS）, respectively

3.4.2 最小抑菌浓度（MIC）分析

（1）FLUCZ 组最小抑菌浓度（MIC）分析

PLGA-PEG、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对 *C. albicans* 的最小抑菌浓度如表 3-3 所示。结果表明，PLGA-PEG（64 mg/mL）对 *C. albicans* 无抑制作用，而 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对 *C. albicans* 的 MIC 分别为 64 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ ，表明 PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对 *C. albicans* 的生长具有较强的抑制作用，且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对其作用更强，这可能是由于适配体 AD1 能够特异性识别 *C. albicans* 所致^[36, 72]。

表 3-3 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 最小抑菌浓度

Table 3-3 minimal inhibitory concentrations of FLUCZ, PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ

concentration ($\mu\text{g/mL}$)	<i>C. albicans</i>
PLGA-PEG	-
FLUCZ	64
PLGA-PEG-FLUCZ	8
AD1-PLGA-PEG-FLUCZ	4

（2）AMP 组最小抑菌浓度（MIC）分析

表 3-4 为 PLGA-PEG、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C. albicans* 的最小抑菌浓度。结果表明，AMP 对 *C. albicans* 的 MIC 为 32 $\mu\text{g/mL}$ ，而 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C. albicans* 的 MIC 分别为 8 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ ，表明 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C. albicans* 的生长具有较强的抑制作用。相比较可知，AD1-PLGA-PEG-AMP 的 MIC 相较于未用纳米粒子包载的 AMP 提升了 8 倍，表明采用 AD1 修饰 PLGA-PEG 包载的 AMP，可以明显的提高其对 *C. albicans* 的抑菌活性。

表 3-4 AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 最小抑菌浓度

Table 3-4 minimal inhibitory concentrations of AMP, PLGA-PEG-AMP and A

D1-PLGA-PEG-AMP	
concentration ($\mu\text{g/mL}$)	<i>C.albicans</i>
PLGA-PEG	-
AMP	32
PLGA-PEG-AMP	8
AD1-PLGA-PEG-AMP	4

3.4.3 生长抑制曲线分析

(1) FLUCZ 组生长抑制曲线分析

先前的研究表明, *C.albicans* 的增殖受到 FLUCZ 的影响, 其表现为增加了生长滞后期和减少了对数生长期^[73, 74]。从图 3-3 生长抑制曲线可以看出, $4 \mu\text{g/mL}$ 的 PLGA-PEG 对 *C.albicans* 无抑菌作用。浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$ 的 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理的 *C.albicans* 分别在 6 h、15 h 和 18 h 从滞后区进入跳跃性增长的指数区, 表明 PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 抑制作用均好于 FLUCZ, 且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的抑制作用大于 PLGA-PEG-FLUCZ。在浓度为 $4 \mu\text{g/mL}$ 时, FLUCZ 和 PLGA-PEG-FLUCZ 处理的 *C.albicans* 分别在 6 h 和 18 h 进入跳跃性增长区, 而 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组的 *C.albicans* 生长基本被抑制, 表明 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 相比较于 FLUCZ 和 PLGA-PEG-FLUCZ, 对 *C.albicans* 的生长具有更强的抑制作用。

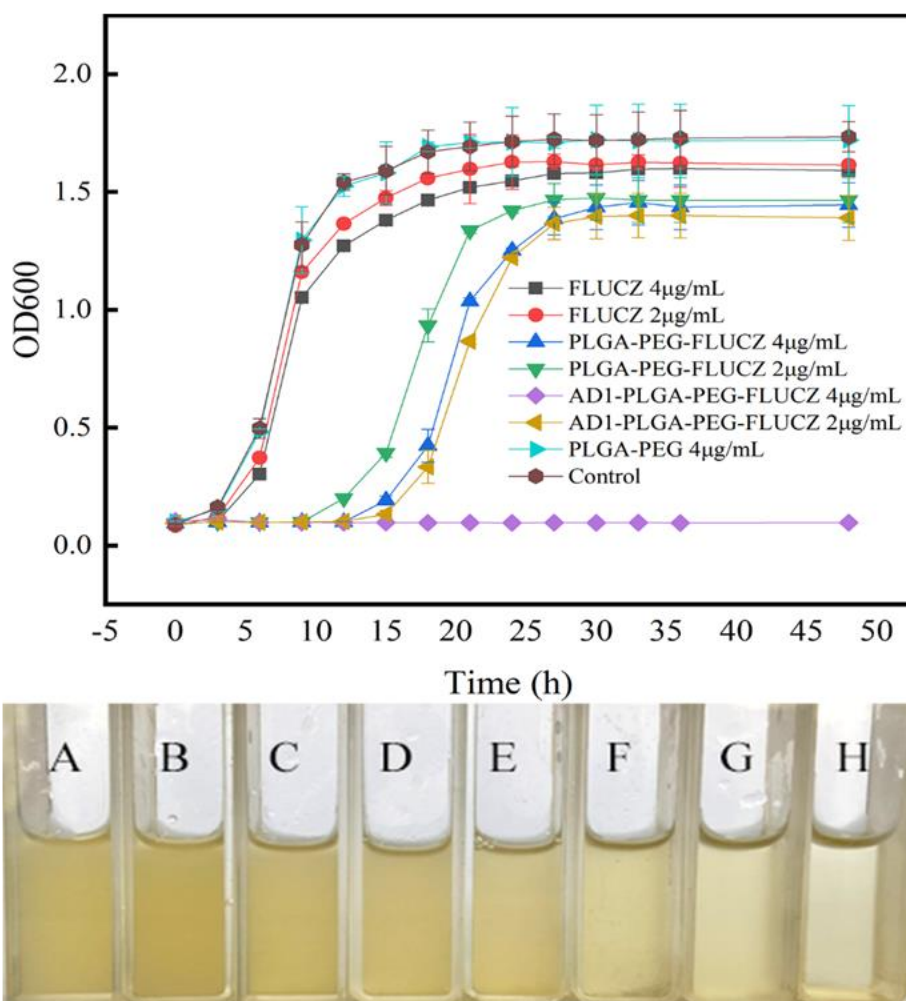


图 3-3 生长抑制曲线分析

注：A、B、C、D、E、F、G 和 H 分别为 Control、PLGA-PEG 4 μ g/mL、FLUCZ 2 μ g/mL、FLUCZ 4 μ g/mL、PLGA-PEG-FLUCZ 2 μ g/mL、PLGA-PEG-FLUCZ 4 μ g/mL、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 2 μ g/mL 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 4 μ g/mL

Fig. 3-3 Growth inhibition curve analysis

Note: A, B, C, D, E, F, G and H are Control, PLGA-PEG 4 μ g/mL, FLUCZ 2 μ g/mL, FLUCZ 4 μ g/mL, PLGA-PEG-FLUCZ 2 μ g/mL, PLGA-PEG-FLUCZ 4 μ g/mL, AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 2 μ g/mL and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 4 μ g/mL, respectively

(2) AMP 组生长抑制曲线分析

由图 3-4 可以看出，浓度为 2 μ g/mL 的 AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理的 *C.albicans* 分别在 6 h、12 h 和 18 h 从滞后区进入跳跃性增长的指数区，表明在相同浓度下，由纳米粒子包载和连接适配体的 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的抑制作用明显大于 PLGA-PEG-AMP 和 AMP。在浓

度为 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, AMP 和 PLGA-PEG-AMP 处理的 *C.albicans* 分别在 6 h 和 18 h 进入跳跃性增长区, 而 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组的 *C.albicans* 生长基本被抑制。可以看出, AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的生长抑制具有浓度依赖性。

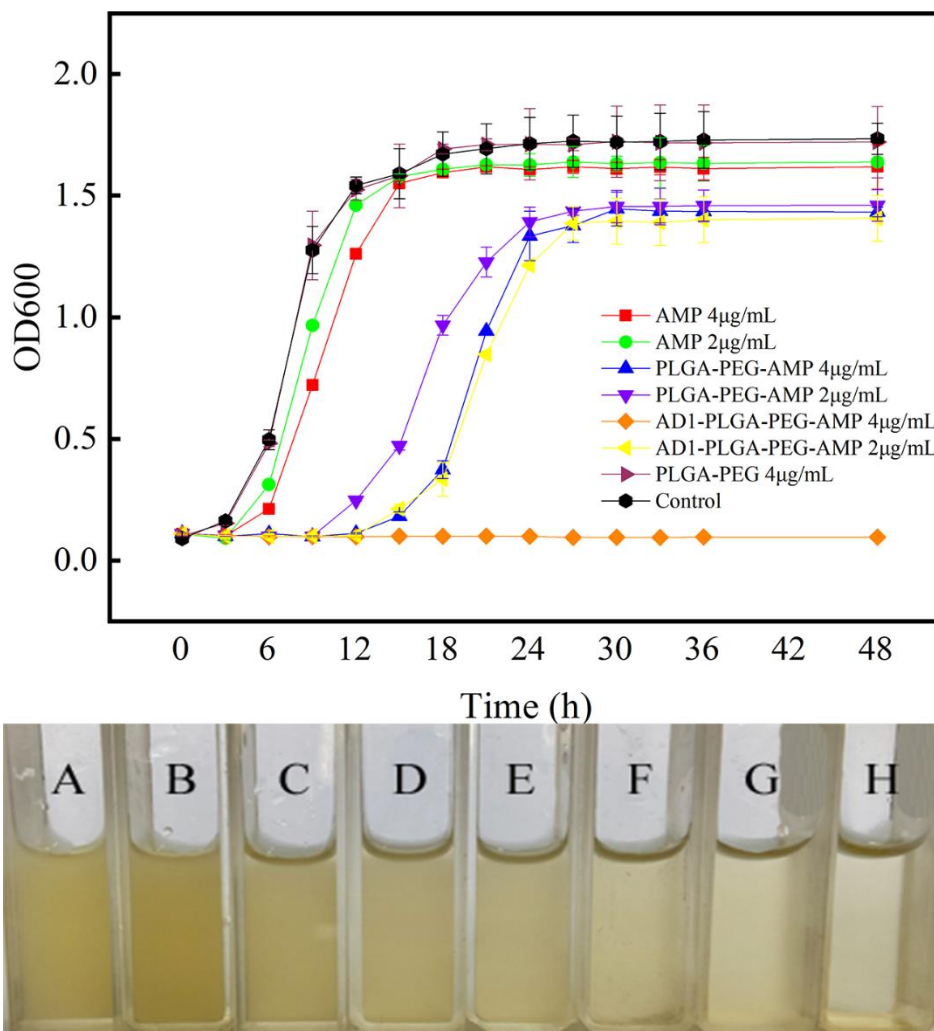


图 3-4 生长抑制曲线分析

注: A、B、C、D、E、F、G 和 H 分别为 Control、PLGA-PEG $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、AMP $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、AMP $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、PLGA-PEG-AMP $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、PLGA-PEG-AMP $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、AD1-PLGA-PEG-AMP $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP $4\text{ }\mu\text{g/mL}$)

Fig. 3-4 Growth inhibition curve analysis

Note: A, B, C, D, E, F, G and H are Control, PLGA-PEG $4\text{ }\mu\text{g/mL}$, AMP $2\text{ }\mu\text{g/mL}$, AMP $4\text{ }\mu\text{g/mL}$, PLGA-PEG-AMP $2\text{ }\mu\text{g/mL}$, PLGA-PEG-AMP $4\text{ }\mu\text{g/mL}$, AD1-PLGA-PEG-AMP $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ and AD1-PLGA-PEG-AMP $4\text{ }\mu\text{g/mL}$, respectively

3.4.4 细胞荧光染色分析

(1) FLUCZ 组细胞荧光染色分析

图 3-5 为 PLGA-PEG、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理的 *C.albicans* 细胞的荧光染色图。由图可以看出，在浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$ 时，FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组均出现了红色细胞，且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组中红色细胞所占的比例相对较高，表明三种药物对 *C.albicans* 细胞均有杀伤作用，且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的杀伤率最高。这有效的论证了 AD1 适配体对 *C.albicans* 细胞壁的识别能力^[64, 75]。

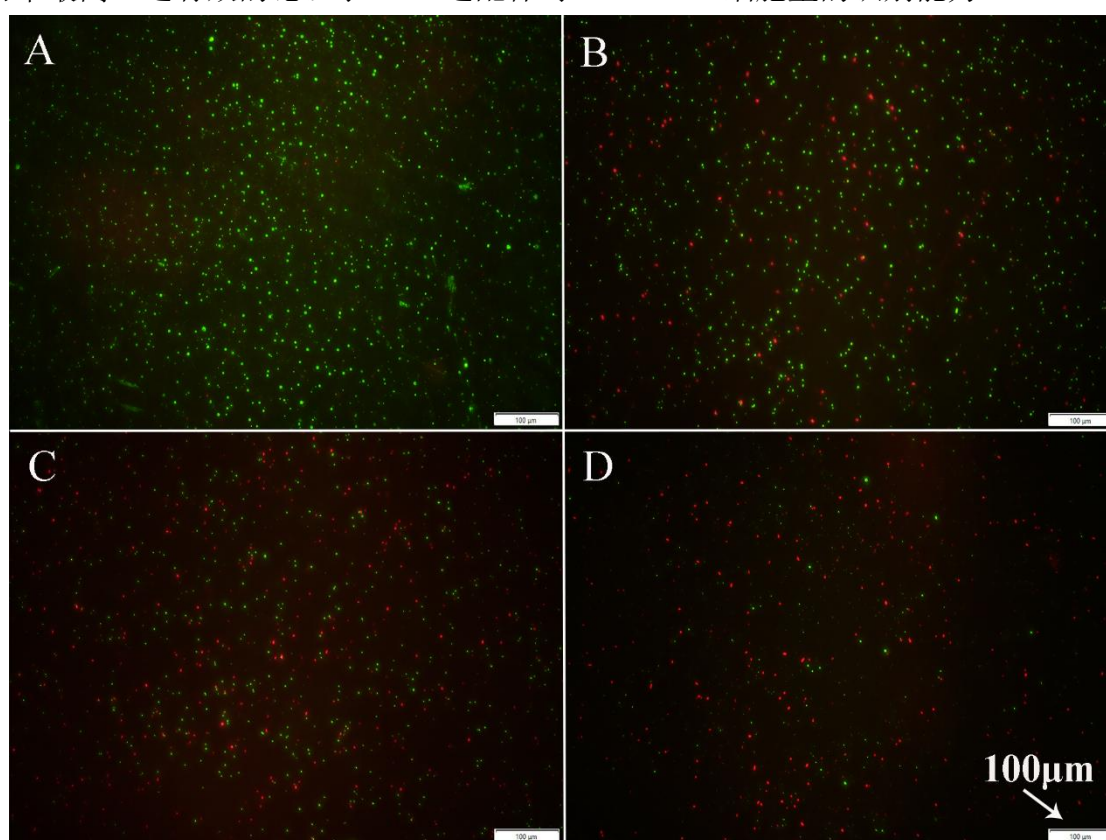


图 3-5 细胞荧光染色分析

注：A、B、C 和 D 分别为 CONTROL、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的荧光图谱

Fig. 3-5 Cell fluorescence staining analysis.

Note: The fluorescence spectra of A, B, C and D are CONTROL、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ respectively.

(2) AMP 组细胞荧光染色分析

PLGA-PEG、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理的 *C.albicans* 细胞的荧光染色如图 3-6 所示。由图 3-6 B 可以看出，在浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$ 时，AMP 处理的 *C.albicans* 细胞有少量呈现红色，表明有少量细胞死亡。PLGA-PEG-AMP 处理组（图 3-6 B）的红色 *C.albicans* 细胞明显增多，表明将 AMP 包载后对 *C.albicans* 细胞的杀伤能力有所增强。而由图 3-6 C 可以看出，存活的 *C.albicans* 细胞（绿色荧光）明显少于其他处理组，表明 AD1-PLGA-PEG-AMP 的对 *C.albicans* 细胞的杀伤率最高。

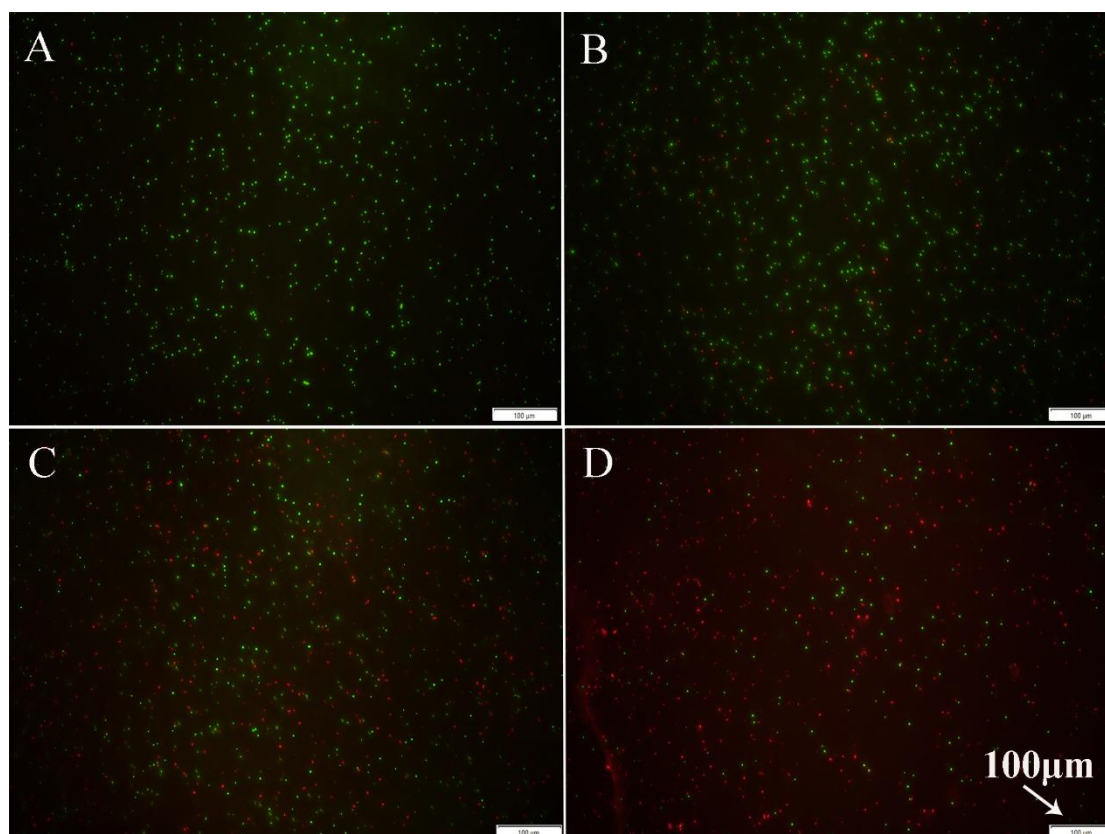


图 3-6 细胞荧光染色分析

注：A、B、C 和 D 分别为 CONTROL、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的荧光图谱

Fig. 3-6 Cell fluorescence staining analysis.

Note: The fluorescence spectra of A, B, C and D are CONTROL、AMP、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP respectively.

3.4.5 细胞形态 SEM 分析

(1) FLUCZ 组细胞形态 SEM 分析

细胞形态的完整性是细胞存活的关键，细胞形态的破坏影响到细胞膜的完整性，从而导致细胞内容物泄露，引起细胞死亡^[76]。图 3-7 为 PLGA-PEG、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理的 *C.albicans* 形态 SEM 图。由图 3-7 A 可以看出，CONTROL 组的 *C.albicans* 细胞表面光滑，具有完整的细胞形态结构。FLUCZ 处理的 *C.albicans* 细胞出现了少量的孔洞和皱缩（图 3-7 B）。PLGA-PEG-FLUCZ 处理的 *C.albicans* 细胞的塌陷程度明显大于比 FLUCZ 处理组（图 3-7 C）^[77]。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组的细胞表面有很多纳米颗粒附着，几乎大部分细胞的表面都出现了破损和坍塌，而且破损程度明显大于 PLGA-PEG-FLUCZ 处理组（图 3-7 D）。

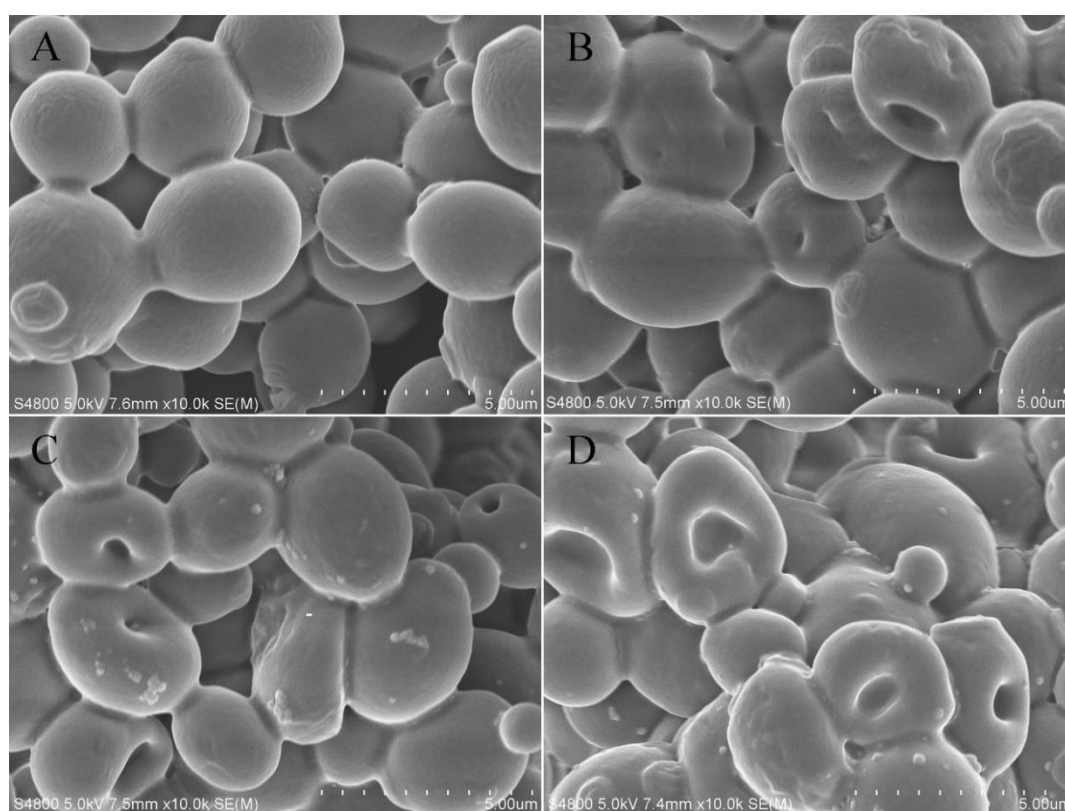


图 3-7 细胞形态的 SEM 分析

注：A、B、C 和 D 分别为 CONTROL、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组

Fig. 3-7 SEM Analysis of Cell Morphology.

Note: The processing group of A, B, C and D are CONTROL、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ respectively.

（2）AMP 组细胞形态 SEM 分析

AMP 主要通过破坏细胞膜的完整性从而杀死病原微生物。而细胞形态的完整性是细胞存活的关键，细胞膜的完整性一旦被破坏，就会引起细胞死亡^[76]。图 3-8 为 PLGA-PEG、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理的 *C.albicans* 形态 SEM 图。由图 3-8 B 可以看出，AMP 处理的 *C.albicans* 细胞出现了小的孔洞和皱缩，且有少量 *C.albicans* 细胞受损。由图 3-8 C 可以看出，PLGA-PEG-AMP 处理的 *C.albicans* 细胞的塌陷程度和受损数量明显大于 AMP 处理组，其表面也有少量纳米粒子附着。图 3-8 D 为 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组，可以看出，*C.albicans* 细胞表面有很多纳米颗粒附着，几乎大部分细胞膜的完整性都出现了被破坏的情况，其细胞表面也出现破损和坍塌，而且破损程度明显大于 PLGA-PEG-AMP 处理组。这也表明连接适配体 AD1 提升了 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 细胞的靶向能力。

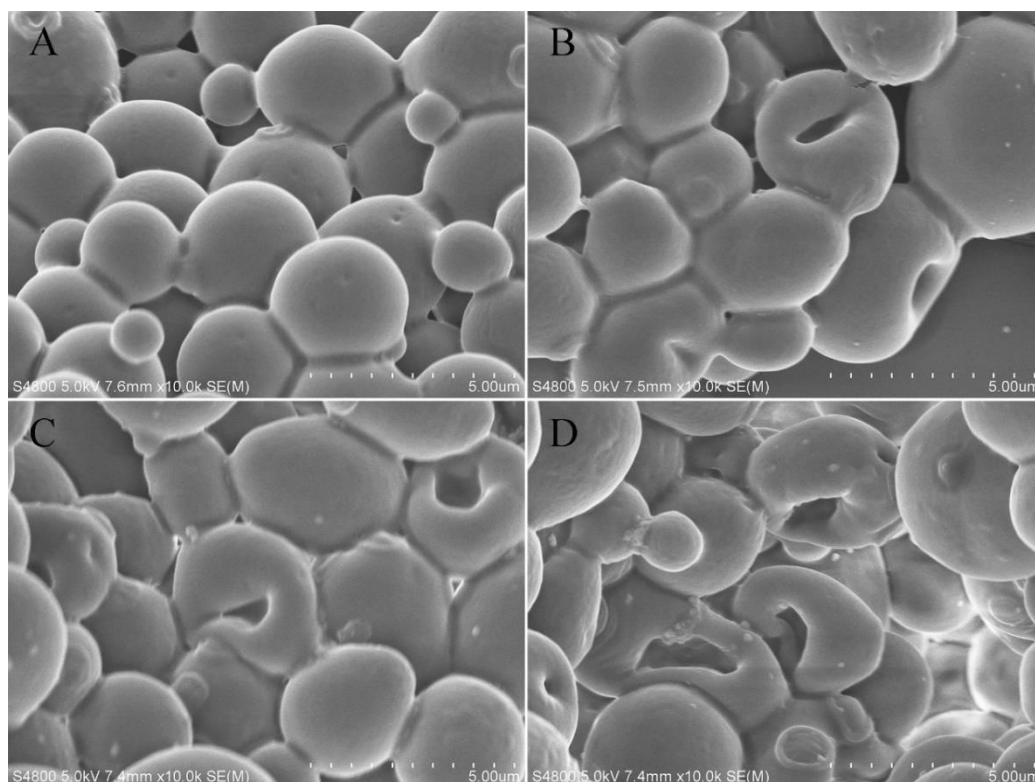


图 3-8 细胞形态的 SEM 分析

注：A、B、C 和 D 分别为 CONTROL、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组

Fig. 3-8 SEM Analysis of Cell Morphology.

Note: The processing group of A, B, C and D are CONTROL、AMP、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP respectively.

3.4.6 *C.albicans* 生物膜生长动力学分析

C.albicans 的生物膜是其对药物产生抗性的主要原因^[10, 78]。图 8 为 XTT 减低法检测的 *C.albicans* 生物膜的生长情况。由图可以看出, *C.albicans* 的生物膜的生成量在 12 h 时进入快速生长期, 之后快速生长至 48 h 后生长变缓, 进入成熟期。

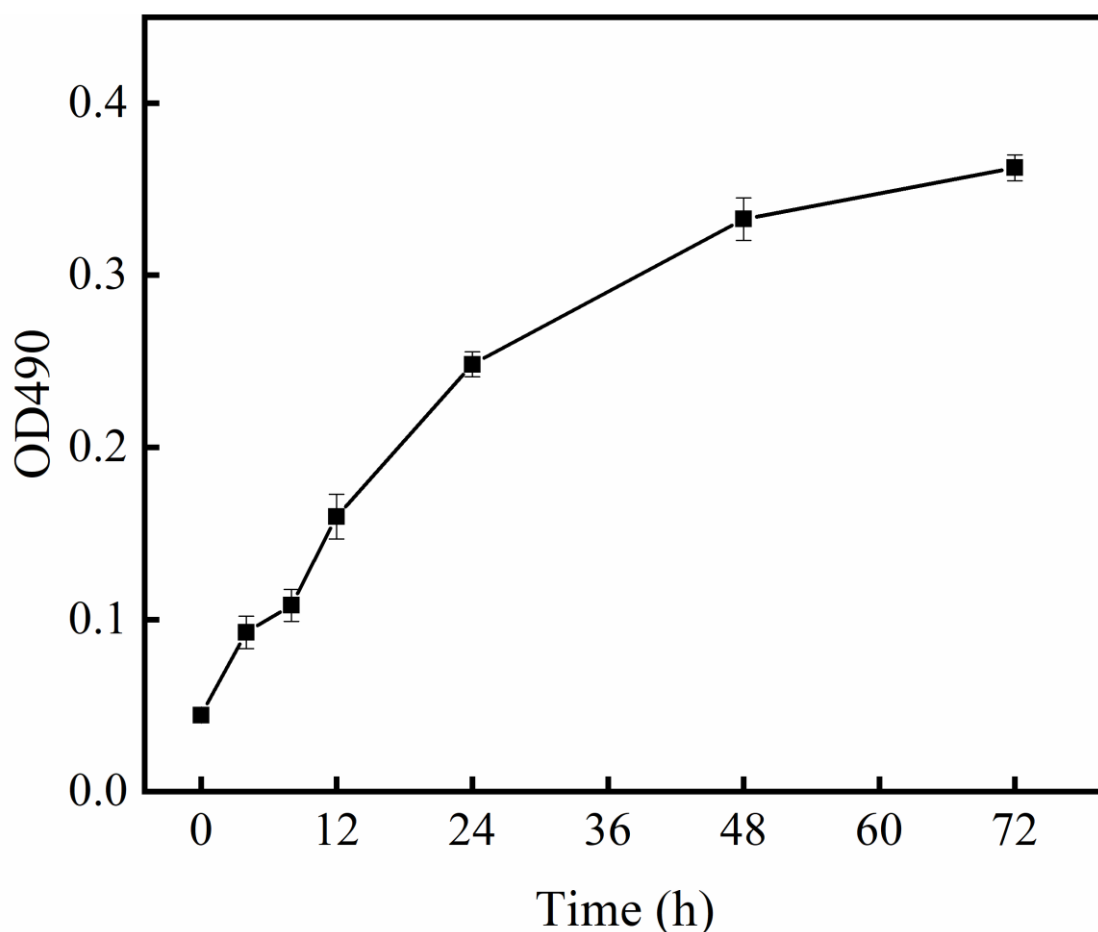


图 3-9 *C.albicans* 生物膜生长动力学分析图

Fig. 3-9 Kinetic analysis diagram of *C.albicans* biofilm growth

3.4.7 *C.albicans* 生物膜生长抑制的定性分析

(1) FLUCZ 组 *C.albicans* 生物膜生长抑制的定性分析

C.albicans 细胞感染可以在体内生成生物膜, 生物膜的形成可以增强 *C.albicans* 细胞抵抗药物的能力, 因此抵抗生物膜的形成是很重要的药理活性。结晶紫能够对 *C.albicans* 的生物膜进行染色, 因此, 可以比较直观的观察生物膜的生成量^[79]。图 3-10 为 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对

C.albicans 生物膜的影响。可以看出, CONTROL 组的试管壁有大量的生物膜生成, 且蔓延至试管的底部(图 3-10 A)。FLUCZ 处理组的生物膜生成量略少于 CONTROL 组, 同样从试管壁慢慢延伸至试管底。然而, PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组的生物膜生成量明显减少(图 3-10 C、D), 试管壁表面有少量生成。且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组对 *C.albicans* 生物膜的抑制效果更为明显。葡聚糖是 *C.albicans* 细胞壁的一种保护屏障, 当适配体 AD1 与其结合, 能够破坏其保护功能的同时将 FLUCZ 递送到细胞膜, 从而抑制或破坏细胞膜的形成^[80]。

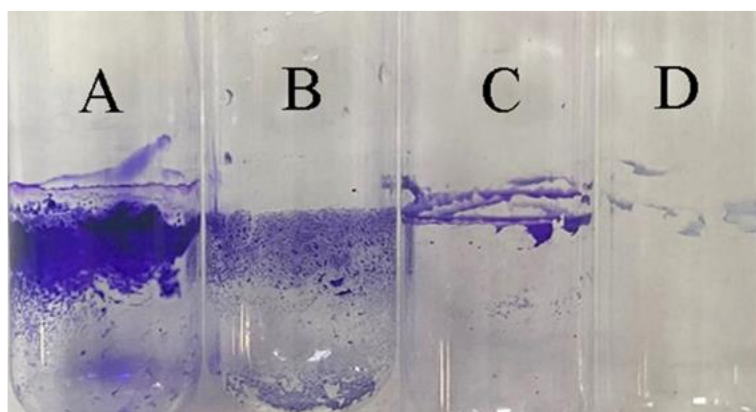


图 3-10 *C.albicans* 生物膜生长抑制分析

注: A、B、C 和 D 分别为 CONTROL、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组

Fig. 3-10 Analysis of growth inhibition of *C.albicans* biofilm.

Note: The processing group of A, B, C and D are CONTROL、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ respectively.

(2) AMP 组 *C.albicans* 生物膜生长抑制的定性分析

图 3-11 为 AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 生物膜的影响。由图 3-11 B 可知, AMP 处理组的生物膜生成量略少于 CONTROL 组, 但也同样生成较多生物膜附着在试管壁上。而 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组的生物膜生成量明显减少(图 3-11 C、D), 仅 PLGA-PEG-AMP 组在液面附近生成少量生物膜, 且无向下扩张的趋势; AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组基本抑制住了 *C.albicans* 细胞生物膜的形成, 只在试管壁表面有微

量生物膜产生。

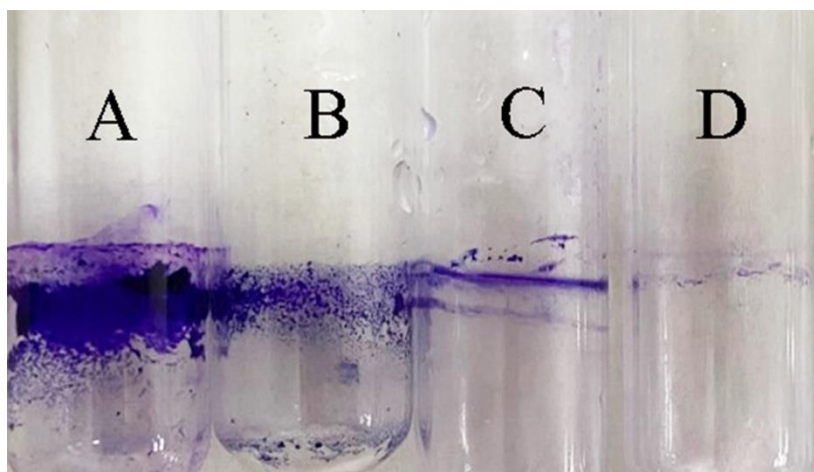


图 3-11 *C.albicans* 生物膜生长抑制分析

注：A、B、C 和 D 分别为 CONTROL、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组

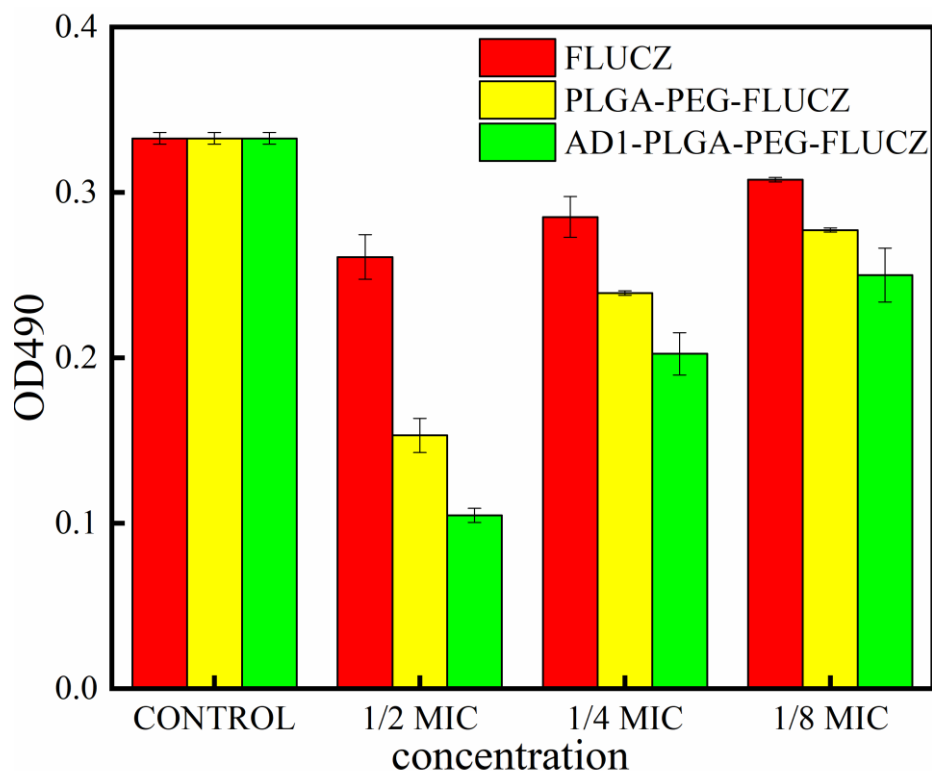
Fig. 3-11 Analysis of growth inhibition of *C.albicans* biofilm.

Note: The processing group of A, B, C and D are CONTROL、AMP、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP respectively.

3.4.8 生物膜生长抑制的定量分析

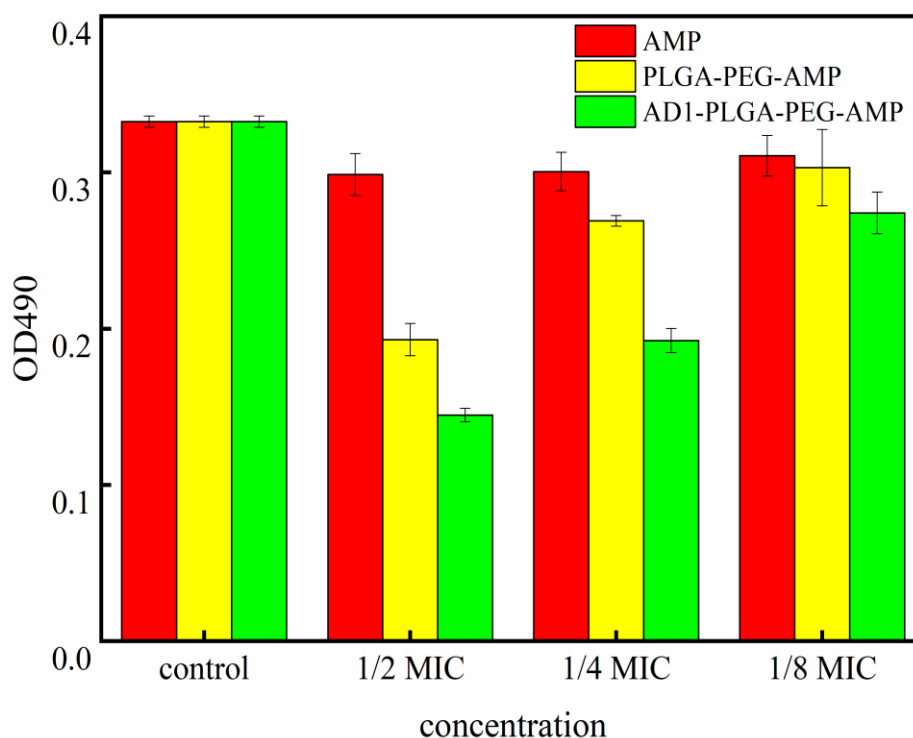
(1) FLUCZ 组生物膜生长抑制的定量分析

XTT 是线粒体脱氢酶的作用底物，可以被活细胞还原成可溶于水的橙黄色甲瓚。当 XTT 与甲萘醌联合应用时，其所产生的水溶性的甲瓚产物的吸光度与活细胞的数量成正比，因此可以用作定量检测 *C.albicans* 生物膜生成量^[81]。图 3-12 为三种药物对 *C.albicans* 生物膜的抑制活性。从图 3-12 可以看出，在三种浓度条件下，AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对 *C.albicans* 生物膜的抑制作用最强，其次为 PLGA-PEG-FLUCZ，而 FLUCZ 抑制作用最弱。另外，随着药物浓度的降低，其对 *C.albicans* 生物膜的抑制活性越来越弱，表明 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对 *C.albicans* 生物膜的抑制作用具有浓度依赖性^[69, 82]。

图 3-12 *C.albicans* 生物膜生长抑制的定量分析Fig. 3-12 Quantitative analysis of growth inhibition of *C.albicans* biofilm

(2) AMP 组生物膜生长抑制的定量分析

图 3-13 为 AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 生物膜的抑制活性。由图 3-13 可以看出，在 1/2 MIC 浓度下，AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 生物膜的抑制作用最强，随着浓度的下降，AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 生物膜的抑制活性也随之下下降，表明 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 生物膜的抑制活性可能具有浓度依赖性。在三种浓度条件下，AMP 组对 *C.albicans* 生物膜的抑制活性最弱，其结果表明将 AMP 进行包载可以提升其抑制 *C.albicans* 生物膜的作用。

图 3-13 *C.albicans* 生物膜生长抑制的定量分析Fig. 3-13 Quantitative analysis of growth inhibition of *C.albicans* biofilm

3.5 本章小结

在本章工作中，检测了 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 的抑菌活性，抑菌圈实验中 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的抑菌圈最大，表明其抑制 *C.albicans* 活性最强。在 2 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下 AD1-PLGA-PEG-AMP 得到同样结果。MIC 测定得到 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对 *C.albicans* 的 MIC 分别为 64 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ ，AMP 对 *C.albicans* 的 MIC 为 32 $\mu\text{g/mL}$ ，而 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的 MIC 分别为 8 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ 。在荧光检测中发现在浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时，FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组均出现了红色细胞，且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组中红色细胞所占的比例相对较高，表明三种药物对 *C.albicans* 细胞均有杀伤作用，且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的杀伤率最高。这有效的论证了

AD1 适配体对 *C.albicans* 细胞壁的识别能力。AMP 组处理也得到相似结论。SEM 实验中发现对照组的 *C.albicans* 细胞表面光滑，具有完整的细胞形态结构；而 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组的细胞表面有很多纳米颗粒附着，几乎大部分细胞的表面都出现了破损和坍塌，而且破损程度明显大于 PLGA-PEG-FLUCZ 处理组和 PLGA-PEG-AMP 处理组，这也表明连接适配体 AD1 提升了 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 细胞的靶向能力。检测 *C.albicans* 的生物膜的生长周期发现 *C.albicans* 的生物膜的生成量在 12 h 时进入快速生长期，之后快速生长至 48 h 后生长变缓，进入成熟期。在药物处理后的 48 h 后，对生物膜进行结晶紫染色发现 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组对 *C.albicans* 生物膜的抑制效果更为明显。而 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组基本抑制住了 *C.albicans* 细胞生物膜的形成，只在试管壁表面有微量生物膜产生。生物膜生成定量检测发现，随着药物浓度的降低，其对 *C.albicans* 生物膜的抑制活性越来越弱，表明 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 生物膜的抑制作用具有浓度依赖性。至于纳米粒子的在体内的抗菌活性和其他生物学活性还有待于进一步研究。

第 4 章 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米材料的体内抑菌活性探究

4.1 引言

PLGA-PEG 聚合物纳米粒子系统由于其高度的生物相容性而被广泛应用于实验室研究和临床环境中, PLGA 其降解产生乳酸最后经代谢途径产生水和二氧化碳, 这是在正常生理条件下体内各种代谢途径的副产物, 而 PEG 在体内不会被分解, 会随着代谢途径被排出体外, 因此 PLGA-PEG 对人体并无影响。基于 PLGA-PEG 纳米粒子的递送系统在具有各种功能和工程上易于修改以适应细胞尺寸, 在药物输送和植入式医疗器械方面具有明显的优势, 例如但不限于在实现药效的同时减少药物用量、最大限度地减少副作用、保护药物不被降解、以及增强药物稳定性等^[83]。这些纳米粒子可以通过细小的毛细血管深入组织, 或者利用渗漏的血管系统来改善深层组织的药物输送, 通常被细胞有效地吸收^[84]。在纳米粒子递送系统中, 能否凭借其安全高效的的优势, 将药物运送至感染区域是我们要验证的问题, 因此本章为了探究 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 在体内的抗 *C.albicans* 活性, 构建了 *C.albicans* 的小鼠模型。

小鼠成为最常用的实验动物之一, 主要是因为小鼠的基因组计划已经完成。这意味着大量基因组序列信息可供研究人员使用, 从而有助于研究基因功能、表达调控、胚胎发育以及人类疾病的分子机制。这些信息为学术界提供了条件和技术支持, 使得小鼠成为理想的实验模型动物^[85]。小鼠生理生化 and 发育过程和人类相似, 基因组和人类 98 %同源^[86], 因此, 许多小鼠疾病模型可以准确地模拟人类疾病的发病过程以及对药物的反应, 为医学和药物研究提供了重要的实验工具。小鼠基因改造技术已经日趋成熟, 自上世纪七八十年代诞生以来, 该技术在构建小鼠模型方面取得了显著进展^[87]。由于小鼠具有强大的繁殖能力、早期性成熟、体型小巧且易于管理, 因此在实验中使用起来更加便捷快速。综上所述, 小鼠作为模式生物与人类亲缘关系近且体型小、繁殖速度快, 生命周期相对较短。还完成了全基因组测序, 遗传背景清晰等等。因此本章选用小鼠作为体内抗 *C.albicans* 的动物模型。

4.2 实验材料

4.2.1 试验菌株

白色念珠菌（*Candida albicans*, *C.albicans*）CMCC(F)98001（上海鲁微科技有限公司）；C57BL/6 雄性黑鼠(3 周)（南京青龙山动物养殖场）；BALB/c 雌性裸鼠（3 周）（南京大学（中国南京）模型动物研究所）。

4.2.2 实验试剂与仪器

表 4-1 主要实验材料

Table 4-1 Main experimental materials

药品名称	级别	生产厂家
聚乳酸-羟基乙酸-聚乙二醇	分析纯	西安瑞禧生物科技有限公司
氟康唑	分析纯	上海麦克林
适配体 AD1	分析纯	上海生工生物
蛋白胨	分析纯	国药集团
葡萄糖	分析纯	国药集团
无水乙醇	分析纯	国药集团
地塞米松	分析纯	国药集团
聚乙烯醇	分析纯	国药集团
多聚甲醛	分析纯	国药集团
二甲苯	分析纯	国药集团
苏木素	分析纯	国药集团
沙保氏培养基	微生物用	杭州百思
盐酸	分析纯	阿拉丁
氨水	分析纯	阿拉丁
戊二醛	分析纯	阿拉丁
磷酸缓冲液	分析纯	阿拉丁
生理盐水	分析纯	阿拉丁

表 4-2 实验仪器

Table 4-2 Experimental equipment

仪器名称	仪器型号	生产厂家
循环水式多用真空泵	SHB-III	郑州长城科工贸有限公司
荧光显微镜	NexcopeNIB600	上海巴贯仪器科技有限公司
台式低速离心机	TG16-W	湖南湘仪有限公司
全自动生化仪	Chemray 240	深圳雷杜生命科技有限公司
恒温磁力搅拌器	H01-1A	上海众越仪器有限公司
数显恒温水浴锅	HH.2	上海博讯实业有限公司
精密分析天平	HZK-FA110S	华志电子科技有限公司
双人单面净化工作台	SW-CJ-2D	江苏通净净化设备有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-100A	上海博讯实业有限公司
隔水式培养箱	GHP-9160	宁国沙鹰科学仪器有限公司
组合式摇床	HYL;-C	太仓市强乐实验设备有限公司
全自动酶标仪	1510	美国赛默飞世尔科技公司
小动物活体光学成像系统	IVIS Series III	京仪科技有限公司

4.3 实验方法

4.3.1 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠皮下感染模型的建立与给药治疗

挑选稳定饲养两周后的 30 只 4-6 周龄，体重 20 g 左右的 SPF 级 C57 BL/6 雄性黑鼠。配制 1 mg/L 的地塞米松溶液对所有正常 C57 小鼠进行免疫抑制 72 h^[8]。然后在第 4 日取对数生长期的 *C.albicans* 菌液 200 μ L 局部注射到实验组小鼠臀部，空白阳性对照组局部注射等量 *C.albicans* 菌液 200 μ L 到小鼠臀部，空白阴性对照组注射等量 PBS^[89]，持续观察并每日记录体重。在此期间给与小鼠标准饮食，并保持温度恒定 24 $^{\circ}$ C 和湿度恒定 55 %。

在建立 *C.albicans* 感染模型的第 4 日（总时间的第 8 日）给与实验组小鼠尾端静脉注射 6 mg/kg（临床剂量）^[90, 91]的 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP，空白对照组（+和-）注射等量 PBS，持续观察小鼠状况并每日记录其体重。

4.3.2 CRP 含量测定

采用 Mouse C-Reactive Protein (CRP)ELISA Kit 试剂盒测定分析治疗后 C57 小鼠血液中 CRP 的含量^[92]。使用二倍稀释法在无菌 96 孔板中加标准品 100 μL /孔，室温振荡 2 h 后洗涤 5 次拍干，加入检测抗体工作液 100 μL /孔，室温振荡 1 h 后洗涤 5 次后拍干，加入 SA-HRP 工作液 100 μL /孔，室温振荡 30 min 后洗涤 5 次拍干，加如 TMB 底物 90 μL /孔，室温避光孵育 10-30 min 后加入终止液 50 μL /孔，并立即于 450nm 波长处检测 OD 值，根据标准品的浓度和 OD₄₅₀ 值绘制标准曲线。

在给药治疗一周后处死小鼠，无菌环境提取小鼠血液，室温放置 1 h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 3000 r/min 离心 15 min，取上清用稀释液稀释 20000 倍后立即检测，根据标准曲线方程计算出样本的 CRP 浓度。

4.3.3 ALT、AST、BUN 和 CR 的检测分析

在无菌环境中，通过小鼠眼眶取血，室温放置 1 h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 3000 r/min 离心 15 min，取上清后放入全自动生化仪测定分析各指标。

4.3.4 HE 染色分析

在无菌环境中摘取治疗后 C57 小鼠的心、肝、脾、肺和肾，采用多聚甲醛进行固定后用乙醇对组织样本进行梯度脱水，再经过透明和浸蜡后完成包埋处理。将预冷的蜡块固定在石蜡切片机上，使蜡块的切面与刀口成平行方向，刀的倾斜度通常 15 $^{\circ}\text{C}$ ，转动轮转推进器，调节切片厚度为 4 μm ，切成厚度均匀的切片。再依次将石蜡切片放入二甲苯、无水乙醇、90 %乙醇、80 %乙醇、70 %乙醇、50 %乙醇梯度脱蜡至水。将石蜡切片放入 1 %苏木素染 1 min，自来水漂洗，1 %盐酸酒精分化 20 s，自来水漂洗，然后用 1 %氨水溶液返蓝 1 min，流水冲洗 20 s，放入 0.5 %伊红染液中染色 30 s，流水漂洗。再将石蜡切片依次放入 75 %乙醇、85 %乙醇、无水乙醇和二甲苯中至透明，将切片从二甲苯拿出来用中性树胶封片。并用中性树胶封片^[93]。采用倒置荧光显微镜镜检，图像采集分析。

4.3.5 肺部 CFU 检测分析

在无菌环境下取治疗后 C57 小鼠的肺脏组织适量，加入 9 倍体积的生理盐水，制备 10 % 的组织匀浆，再以生理盐水稀释至 1 % 后接种于沙保氏固体培养基中，于 37 °C 恒温培养 24 h 后，观察并记录肺脏组织匀浆中的活菌数^[94]。

4.3.6 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的靶向检测

选用 BALB/c 雌性裸鼠作为此实验的实验用鼠，因为其为无毛裸鼠，更易实验观察，构建 *C.albicans* 皮下感染模型小鼠方法同 4.3.1。

用 PBS 配置 3 mg/mL 的荧光试剂 CY5，然后分别与等浓度的 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 室温混合，匀速搅拌 12 h，5000 rpm 离心 10 min，弃上清，冻干保存，去除未连接上的荧光试剂 CY5^[95]。然后将上述药物分别重悬于 PBS 中，通过尾静脉注射于 *C.albicans* 皮下感染模型小鼠，使其浓度控制为 6 mg/kg（临床剂量），对照组注射等量的 CY5 PBS 溶液。使用小动物活体光学成像系统分别在 0、1、4、12 和 24 h 分别检测荧光强度，并在 24 h 后处死小鼠，检测其心、肝、脾、肺和肾的荧光强度，采集图像并分析。

4.3.7 统计分析

所有的试验至少重复三次，使用 Excel 2019 软件对实验数据进行整理，并使用 Origin 2018 绘制图形。数据以平均值 $\pm$ SD 表示。

4.4 结果与分析

4.4.1 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠模型体重分析

（1）FLUCZ 组 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠模型体重分析

图 4-1 为 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠模型体重变化图，可以看出，在前 72 h 免疫抑制期间，小鼠体重呈现缓慢增长的趋势，表明免疫抑制剂地塞米松可

能对小鼠体重并无影响。在 72 h 后建立 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠模型，可以看出，除阴性对照组（control（-））以外，实验组的小鼠体重均有不同程度的下降。观察实验组 C 57 小鼠在注射 *C.albicans* 后，小鼠食欲明显减少，运动量较之前也大大缩减，可能是 *C.albicans* 感染导致小鼠体内炎症的产生致使体重下降。在第 8 d 对小鼠注射药物之后，相比较于注射等量 PBS 的未治疗组（control（+）），小鼠体重下降趋势均有减弱，其中 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 组体重恢复效果最好，且在第 14 d 恢复到感染 *C.albicans* 前体重。另外，PLGA-PEG-FLUCZ 处理组小鼠体重也略有恢复，而 FLUCZ 组恢复效果最差。综上结果表明，AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对小鼠体重恢复效果最好，可能是由于其对 *C. albicans* 抑制效果最优，从而抑制了 *C.albicans* 在小鼠体内的增殖。

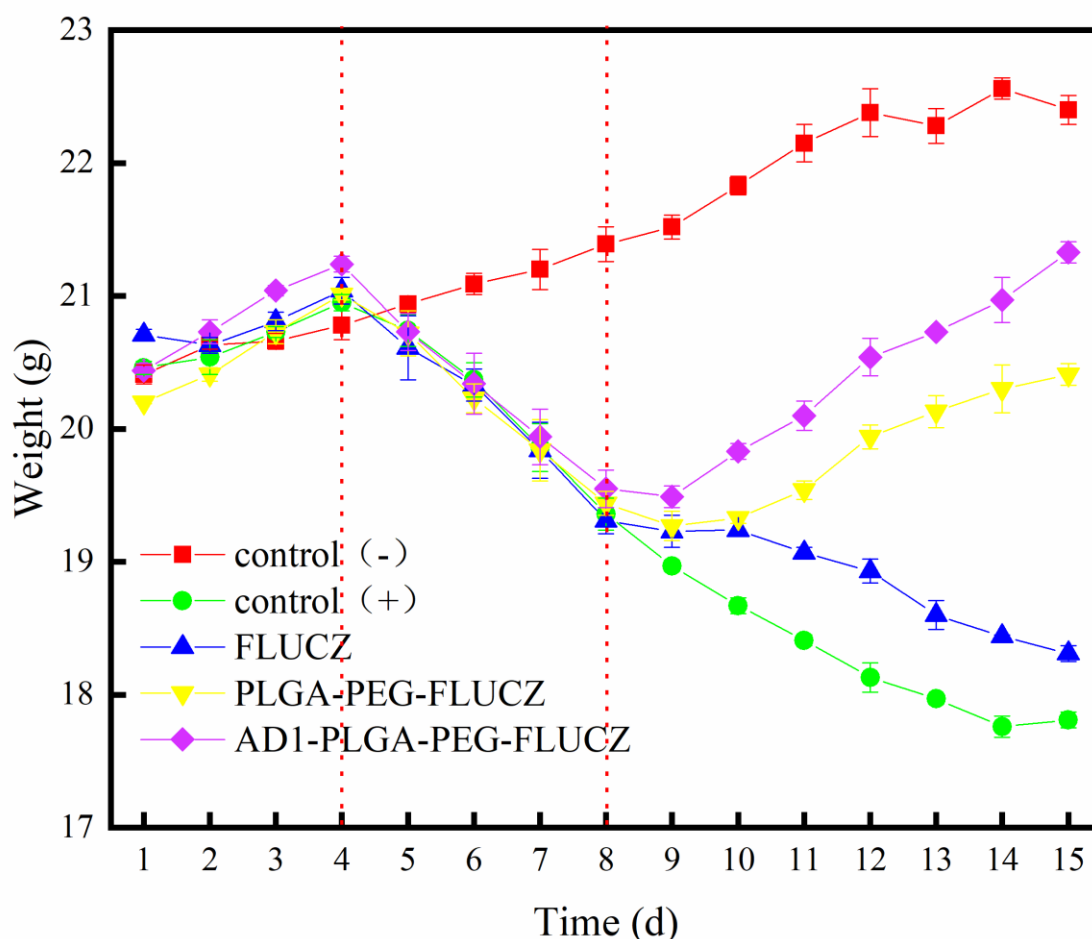
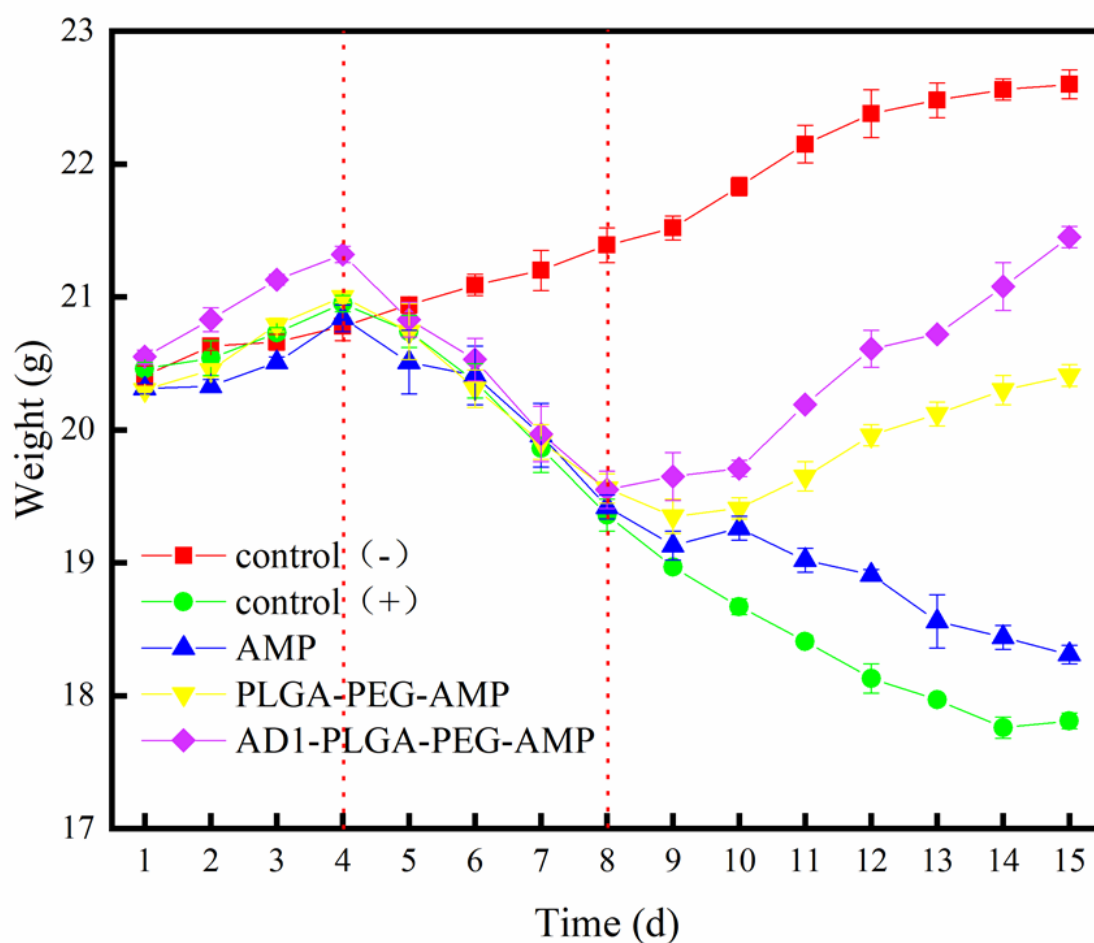


图 4-1 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠模型体重变化图

Fig. 4-1 Body weight change of *C.albicans* biofilm C57 mouse model

(2) AMP 组 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠模型体重分析

图 4-2 为 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠模型体重变化图。可以看出，在 8 d 前 AMP 组与 FLUCZ 组小鼠模型表现基本类似，前 72 h 免疫抑制期间，小鼠体重缓慢增长，表明免疫抑制剂地塞米松可能对小鼠体重并无影响。在 72 h 后除对照组（control (-)）以外，实验组的小鼠体重均有不同程度的下降。可以看出，相比较于注射等量 PBS 的未治疗组（control (+)），在注射药物的第 8 d，小鼠的体重均有不同程度的回升，其中注射 AMP 的小鼠体重在下降后略有上升，可能是 AMP 杀伤了少部分 *C.albicans* 细胞，而注射 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的小鼠体重均有回升，且 AD1-PLGA-PEG-AMP 体重回复速度很快，可能是由于 AD1-PLGA-PEG-AMP 快速识别并杀伤了 *C.albicans* 细胞，另外观察发现注射 AD1-PLGA-PEG-AMP 药物的小鼠食欲明显较之前增大，其活动也更加频繁，精神状态大幅改善。

图 4-2 *C.albicans* 生物膜 C57 小鼠模型体重变化图Fig. 4-2 Body weight change of *C.albicans* biofilm C57 mouse model

4.4.2 CRP 的测定

(1) FLUCZ 组 CRP 的测定

CRP 是一种急性炎症反应蛋白,当机体发生炎症或组织损伤时,由肝细胞生成的 CRP 含量迅速升高,因此,可以通过检测血清中 CRP 含量来分析小鼠 *C.albicans* 感染情况^[96,97]。根据图 4-3 的 CRP 的标准曲线,并通过测定不同实验组小鼠血清 OD₄₅₀ 值,可以计算得到小鼠血清中 CRP 含量。从表 4-3 可知,感染未治疗组 (control (+)) CRP 含量为 58363.56 ng/mL,约为未感染组 (control (-)) 的两倍。FLUCZ 和 PLGA-PEG-FLUCZ 处理组 CRP 含量分别为 46341.24 ng/mL 和 36019.43 ng/mL;而 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组的血清 CRP 含量最低,为 28700.47 ng/mL。因此,可以认为,通过 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 治疗,已基本清除由 *C.albicans* 造成的体内炎症。

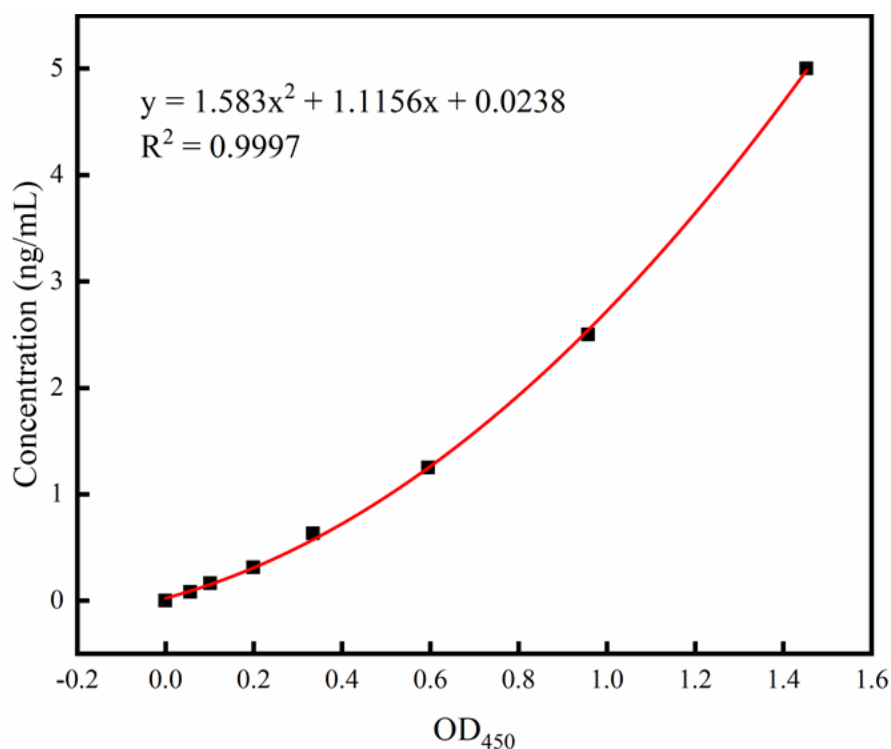


图 4-3 CRP 的标准曲线

Fig. 4-3 Standard curve of CRP

表 4-3 FLUCZ 组小鼠血清 CRP 含量分析

Table 4-3 Analysis of serum CRP content of mice in FLUCZ group

Simple	Optical Density	Concentration (ng/mL)	±SD
Control (+)	1.0453	58363.56	-0.0082
Control (-)	0.5967	25038.98	-0.0132
FLUCZ	0.9021	46341.24	0.0068
PLGA-PEG-FLUCZ	0.7646	36019.43	-0.0103
AD1-PLGA-PEG-FLUCZ	0.6558	28700.47	0.0068

(2) AMP 组 CRP 的测定

从表 4-4 可知, 感染未治疗组 (control (+)) CRP 含量为 58363.56 ng/mL, 约为未感染组 (control (-)) 的两倍。AMP 和 PLGA-PEG-AMP 处理组 CRP 含量分别为 50847.74 ng/mL 和 33985.55 ng/mL, AMP 处理的小鼠血清的 CRP 含量很接近感染未治疗组 (control (+)), 表明其治疗效果较弱; 而 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组的血清 CRP 含量最低, 为 27372.73 ng/mL, 接近未感染组 (control (-)), 表明体内炎症基本已经清除。综上可知, AD1-PLGA-PEG-AMP 可以治疗小鼠体内由 *C.albicans* 造成的炎症。

表 4-4 AMP 组小鼠血清 CRP 含量分析

Table 4-4 Analysis of serum CRP content of mice in AMP group

Simple	Optical Density	Concentration (ng/mL)	±SD
Control (+)	1.0453	58363.56	-0.0082
Control (-)	0.5967	25038.98	-0.0132
AMP	0.9572	50847.74	-0.0106
PLGA-PEG-AMP	0.7351	33985.55	0.0046
AD1-PLGA-PEG-AMP	0.6344	27372.73	0.0028

4.4.3 ALT、AST、BUN 和 CR 的检测分析

(1) FLUCZ 组 ALT、AST、BUN 和 CR 的检测分析

ALT 和 AST 分别指谷丙转氨酶和谷草转氨酶, 当肝细胞受到损伤就会导致小鼠血液中谷丙转氨酶和谷草转氨酶数值升高, 提示肝细胞损害^[98], 因此, 可以检测 ALT 和 AST 活性, 分析 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PE

G-FLUCZ 处理对小鼠肝脏细胞是否造成损伤。由图 4-4 A, B 可以看出, FLUCZ (c) 处理组 ALT 和 AST 浓度明显上升, 可能是由于代谢 FLUCZ 造成了肝脏细胞的损伤^[99]。而 PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ (d 和 e) 处理组的 ALT 和 AST 浓度相对较低, 可能是由于其结合 *C.albicans* 后缓慢释放 FLUCZ, 从而减弱了 FLUCZ 对肝脏细胞的损伤。

BUN 和 CR 分别为尿素氮和肌酐, 在肾功能受损, 肾小球滤过率作用下降时, 血中尿素氮和肌酐浓度明显上升^[100]。因此, 通过检测血清中 BUN 和 CR 含量可以判断 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对小鼠肾脏细胞是否造成损伤。由图 4-4 C, D 可以看出, 各处理组的 BUN 和 CR 浓度未发生显著升高, 表明药物对肾脏细胞的损伤较小。

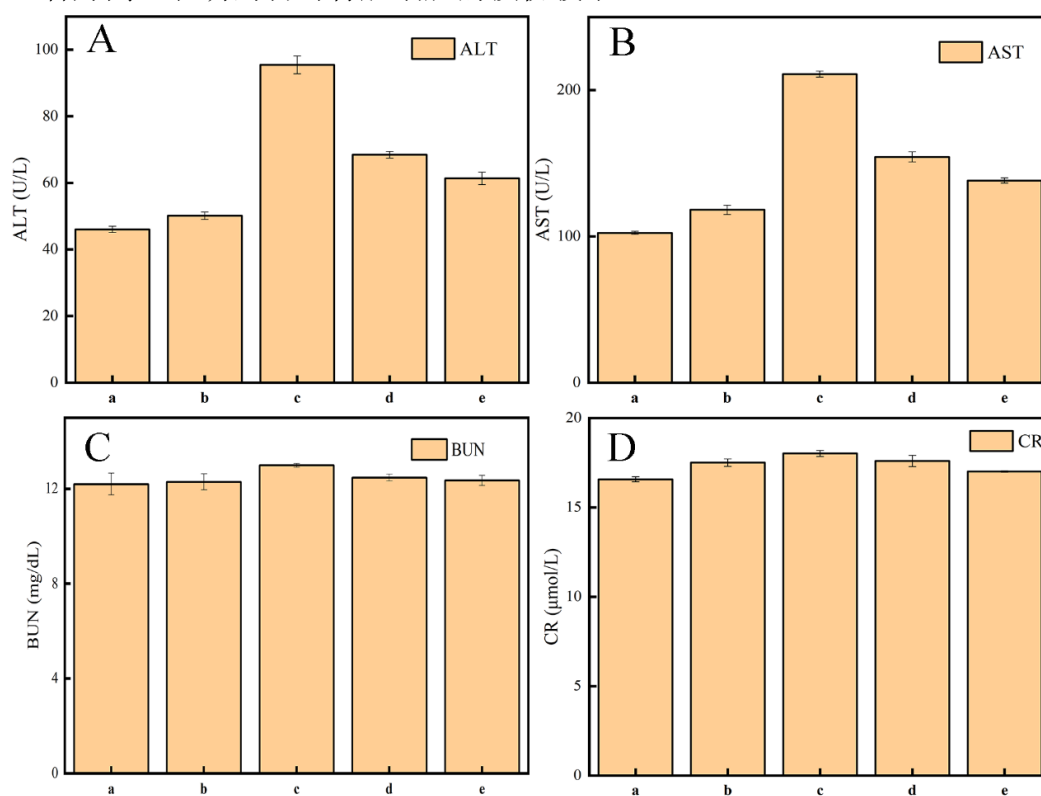


图 4-4 小鼠血清 ALT、AST、BUN 和 CR 含量分析

注: a、b、c、d 和 e 分别为 Control (+)、Control (-)、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理

Fig. 4-4 Analysis of serum

Note: ALT、AST、BUN and CR contents in mice (The processing group of a, b, c, d and e are Control (+)、Control (-)、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ respectively.)

(2) AMP 组 ALT、AST、BUN 和 CR 的检测分析

由图 4-5 A, B 可以看出, AMP (c) 处理组 ALT 和 AST 浓度明显上升, 可能代谢 AMP 对小鼠的肝脏细胞造成了损伤^[99]。而 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP (d 和 e) 处理组的 ALT 和 AST 浓度相对较低。

由图 4-5 C, D 可以看出, 除 AMP (c) 处理组略有轻微升高以外, 其他各处理组的 BUN 和 CR 浓度未发生显著升高, 表明除 AMP 外的其他药物对肾脏细胞的损伤较小。

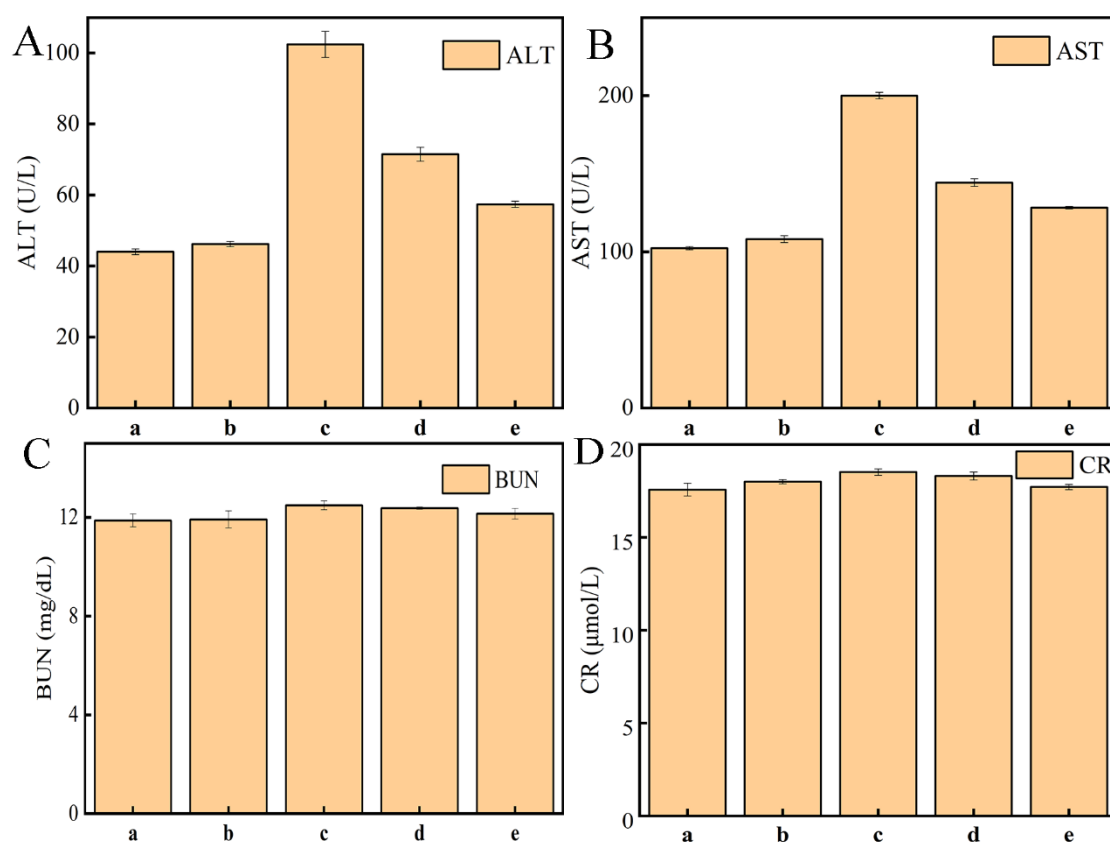


图 4-5 小鼠血清 ALT、AST、BUN 和 CR 含量分析

注: a、b、c、d 和 e 分别为 Control (+)、Control (-)、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理)

Fig. 4-5 Analysis of serum

Note: ALT、AST、BUN and CR contents in mice (The processing group of a, b, c, d and e are Control (+)、Control (-)、AMP、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP respectively).

4.4.4 HE 染色分析

(1) FLUCZ 组 HE 染色分析

图 4-6 为 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理的小鼠心、肝、脾、肺和肾组织的 HE 染色图。从心脏组织的 HE 染色图 (A-E) 可以看出, 其呈现出梭形的正常心肌细胞, 并无炎症细胞的浸润, 也未出现明显的心脏纤维化, 表明 Control (+)、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 均不会对小鼠心脏组织造成病理学的改变。对于肝组织, FLUCZ 处理组中可以看到少量肝细胞的细胞核明显大于对照组 (Liver A) 的正常肝细胞, 并出现了少量肝巨噬细胞, 表明 FLUCZ 会造成肝细胞的损伤。而 Control (+)、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组的肝组织中, 可以清楚的看到肝小叶中央静脉产生的空洞和正常大小的肝细胞核, 未发现明显的肝脏组织病理学变化。在脾脏组织的 HE 染色图中 (图 Spleen A-Spleen E), 可以看到密集的淋巴细胞和少量的巨噬细胞及交错突细胞, 未发现有明显病理学改变。在肺脏组织 HE 染色图中, Control (+) 组 (B) 出现了不规则的肺泡间隔增厚、水肿和出现大量的炎症细胞等真菌性肺炎的症状, 表明 *C.albicans* 对肺脏组织造成了侵染。FLUCZ (Lung C)、PLGA-PEG-FLUCZ (Lung D) 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ (Lung E) 对 *C.albicans* 造成的感染均有不同程度的治疗效果。尤其是在图 Lung E 中可以看到正常的肺泡、肺内支气管和间质小动脉以及正常厚度的肺泡间隔, 表明 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 具有较好的治疗效果。图 Kidney A- E 为肾脏组织 HE 染色图, 从中可以看到正常的肾皮质部的由毛细血管组成肾小球及其周围肾小管, 球囊腔也清晰可见。而 FLUCZ 组 (图 Kidney C) 肾小球附近出现少量炎症细胞浸润, 可能是由于代谢 FLUCZ 造成的轻微肾毒性。综上, AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 不仅提升了对 *C.albicans* 感染的治疗效果,

而且通过靶向作用降低了 FLUCZ 的组织毒性。

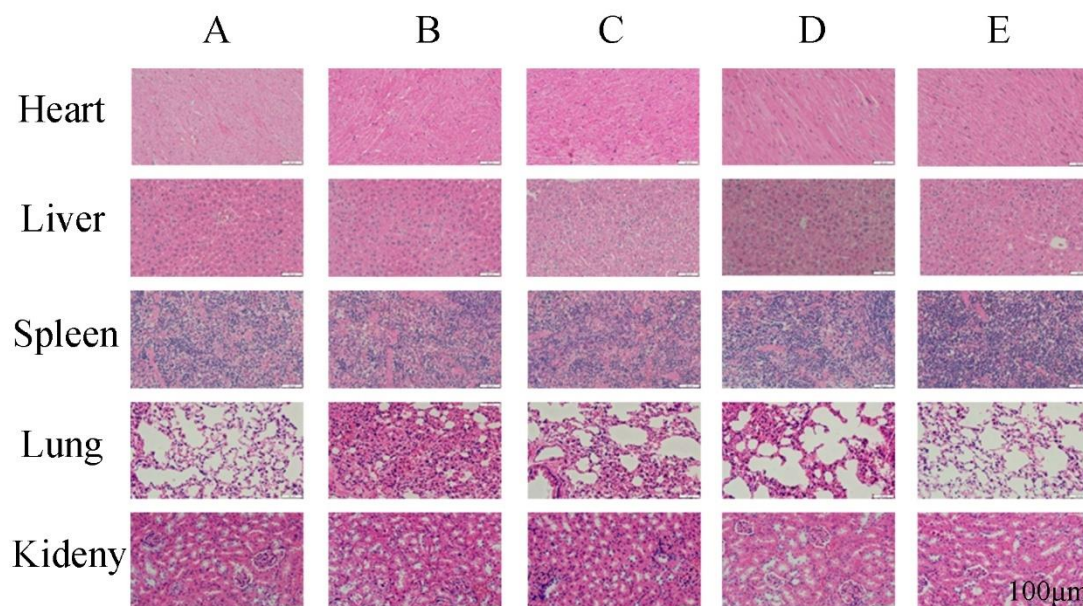


图 4-6 小鼠心、肝、脾、肺和肾组织的 HE 染色图

注：A、B、C、D 和 E 分别为 Control (-)、Control (+)、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ

Fig. 4-6 HE staining of heart, liver, spleen, lung and kidney in mice treated

Note: A, B, C, D and E are Control (-)、Control (+)、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ respectively.

(2) AMP 组 HE 染色分析

图 4-7 为 AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理的小鼠心、肝、脾、肺和肾组织的 HE 染色图。从心脏组织的 HE 染色图 (A-E) 可以看出, 心脏组织呈现出梭形的正常心肌细胞, 并无炎症细胞的浸润, 也未出现明显的心脏纤维化, 表明 Control (+)、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理均不会对小鼠心脏组织造成病理学的改变。对于肝组织, AMP 处理组中可以看到有部分肝细胞的细胞核明显大于对照组 (Liver A) 的正常肝细胞, 并出现了少量肝巨噬细胞, 表明代谢 AMP 可能造成了肝细胞的损伤。而 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组的肝脏组织中, 可以清楚的看到肝小叶中央静脉产生的空洞和正常大小的肝细胞核, 并未发现明显的肝脏组织病理学变化。在脾脏组织的 HE 染色图中 (图 Spleen A-Spleen E), 可以看到密集

的淋巴细胞和少量的巨噬细胞及交错突细胞，未发现有明显病理学改变。在肺脏组织 HE 染色图中，Control (+) 组 (B) 出现了不规则的肺泡间隔增厚、水肿和出现大量的炎症细胞等真菌性肺炎的症状，表明 *C.albicans* 对肺脏组织造成了侵染。AMP (Lung C)、PLGA-PEG-AMP (Lung D) 和 AD1-PLGA-PEG-AMP (Lung E) 对 *C.albicans* 造成的感染均有不同程度的治疗效果。尤其是在图 Lung E 中可以看到正常的肺泡、肺内支气管和间质小动脉以及正常厚度的肺泡间隔，表明 AD1-PLGA-PEG-AMP 具有较好的治疗效果。图 Kideny A- E 为肾脏组织 HE 染色图，从中可以看到正常的肾皮质部的由毛细血管组成肾小球及其周围肾小管，球囊腔也清晰可见。而 AMP 组 (图 Kideny C) 肾小球附近出现少量炎症细胞浸润，可能是由于代谢 AMP 造成的轻微肾毒性。

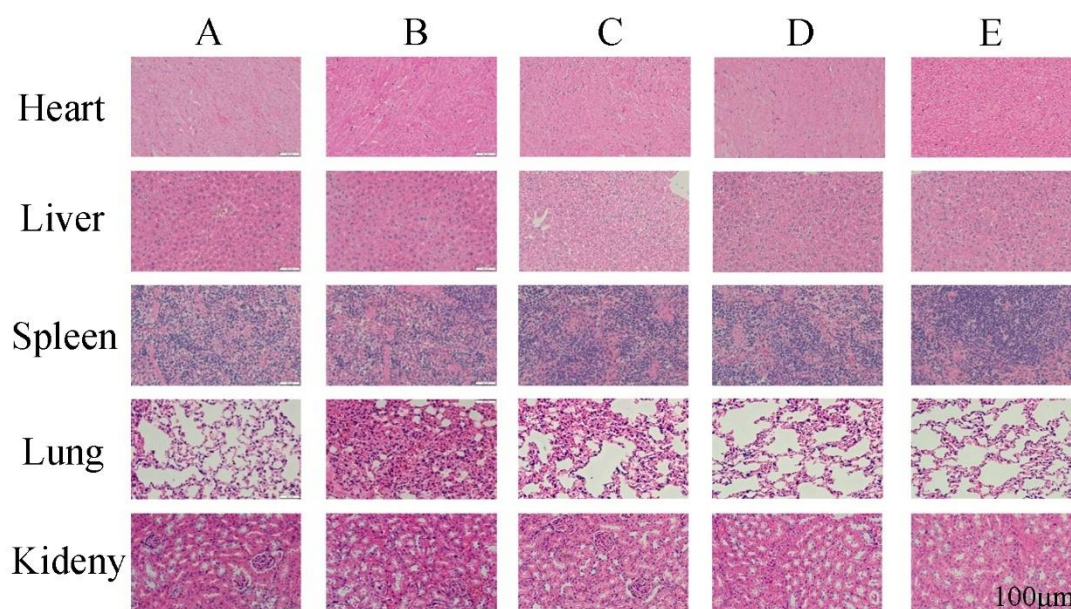


图 4-7 小鼠心、肝、脾、肺和肾组织的 HE 染色图

注：A、B、C、D 和 E 分别为 Control (-)、Control (+)、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP

Fig. 4-7 HE staining of heart, liver, spleen, lung and kidney in mice treated

Note: The processing group of A, B, C, D and E are Control (-)、Control (+)、AMP、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP respectively.

4.4.5 肺部 CFU 检测分析

(1) FLUCZ 组肺部 CFU 检测分析

图 4-8 A 为感染未治疗组 (control (+)) 的肺部组织匀浆 CFU 图, 由图可知, 小鼠肺组织中有大量 *C.albicans* 定殖, 进一步证明了肺部组织的损伤是由于 *C.albicans* 造成。FLUCZ 处理组的 *C.albicans* 数量有所减少 (图 4-8 B), 表明 FLUCZ 对 *C.albicans* 具有一定的抑制作用。而 PLGA-PEG-FLUCZ (图 4-8 C) 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ (图 4-8 D) 处理组的 *C.albicans* 数量少于 FLUCZ 处理组, 且 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组仅有少量 *C.albicans* 存在, 这进一步证明了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 对 *C.albicans* 具有较好的抑制效果。

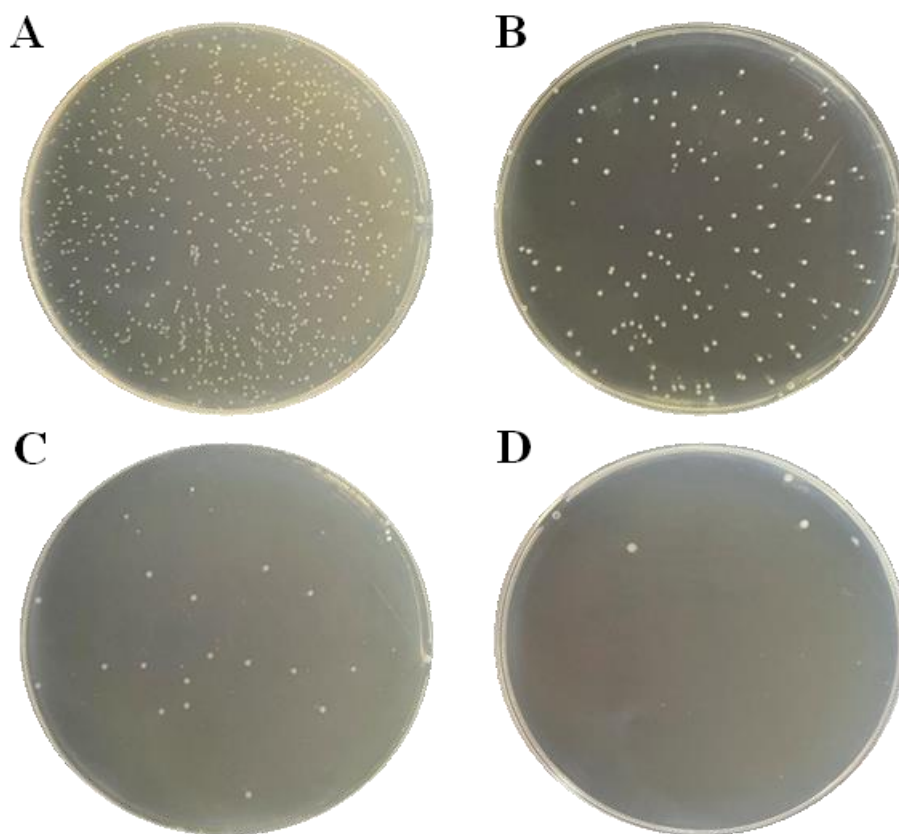


图 4-8 小鼠肺组织的 CFU 检测分析

注: A, B, C 和 D 分别为 control (+), FLUCZ, PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组。

Fig. 4-8 Detection and analysis of CFU in lung tissue of mice.

Note: The processing group of A, B, C and D are control (+), FLUCZ, PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ respectively.

(2) AMP 组肺部 CFU 检测分析

由图 4-9 B 和图 4-9 C 可以看出, AMP 处理组和 PLGA-PEG-AMP 处理组的 *C.albicans* 数量均有所减少, 表明 AMP 和 PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 具有一定的抑制作用; 而 AD1-PLGA-PEG-AMP (图 4-9 D) 处理组的 *C.albicans* 数量很少, 表明绝大部分 *C.albicans* 已被杀伤。

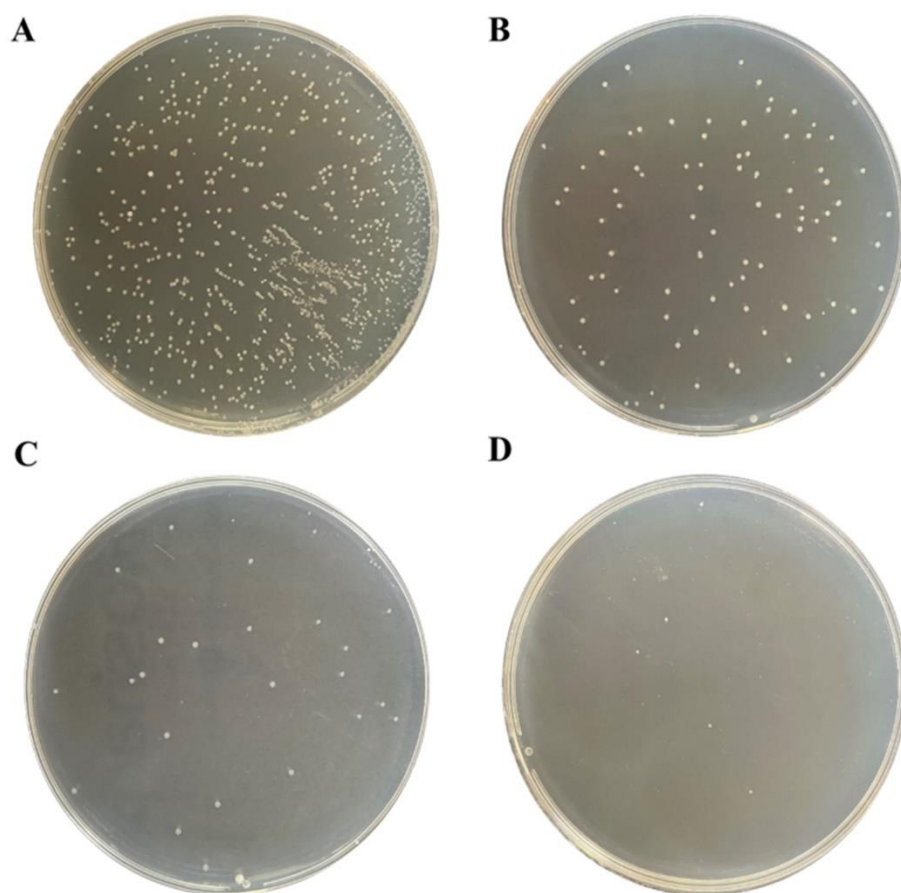


图 4-9 小鼠肺组织的 CFU 检测分析

注: A, B, C 和 D 分别为 control (+), AMP, PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组。

Fig. 4-9 Detection and analysis of CFU in lung tissue of mice.

Note: The processing group of A, B, C and D are control (+), AMP, PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP respectively.

4.4.6 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的靶向检测

(1) AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 的靶向检测分析

图 4-10 为 Control、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 在小鼠体内的荧光强度分布。可以看出，荧光试剂在 1h 后随血液流动散布全身，随后 4 h 达到峰值。Control 组和 FLUCZ 组在 12h 后荧光强度较低，可能是由于药物在小鼠体内代谢排出^[101]。PLGA-PEG-FLUCZ 处理组荧光试剂 12h 后在小鼠臀部感染区有少量聚集，而 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组在臀部感染处有大量聚集，且 24 h 后仍有聚集，可能是由于靶向作用使 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 在 *C.albicans* 感染区聚集，减缓体内对其的代谢作用，从而达到延长治疗时间和降低肝肾代谢强度^[102]。

图 4-11 为 Control、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理的小鼠心、肝、脾、肺和肾组织中 24h 的荧光强度。由图可以看出，Control 组在各组织中的荧光强度很弱，表明荧光试剂已被代谢分解^[101]。FLUCZ 处理组具有少量荧光分布在肝脏和肾脏组织中，可能是肝脏和肾脏组织还未将 FLUCZ 代谢排出。而 PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组在肝脏、肺脏和肾脏均有较强的荧光强度，其中 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组荧光强度较强，且肺脏组织有明显聚集，表明 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 成功的发挥了靶向作用。肝脏和肾脏中的荧光可能是因为 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 *C.albicans* 结合后释放 FLUCZ 较为缓慢，导致在肝脏和肾脏中有残留^[103]。

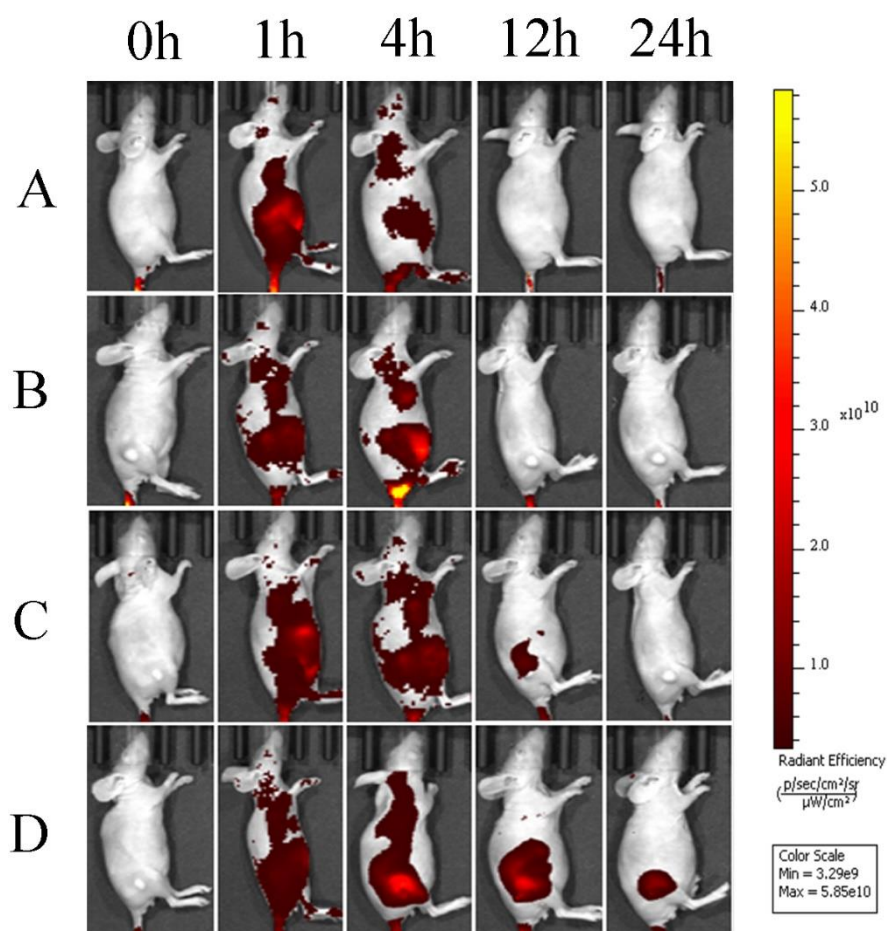


图 4-10 小鼠荧光试剂强度检测分析

注：A, B, C 和 D 分别为 Control, FLUCZ, PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-F
LUCZ 处理组

Fig. 4-10 Detection and analysis of fluorescence reagent intensity.

Note: The processing group of A, B, C and D are Control、FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ respectively.

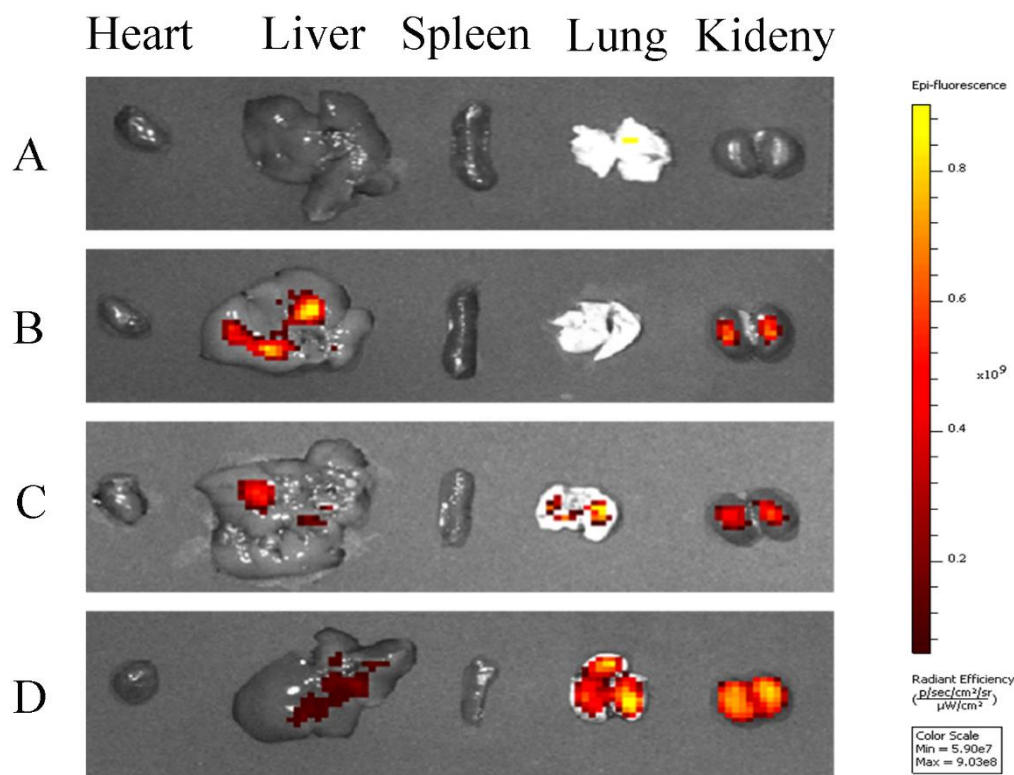


图 4-11 小鼠心、肝、脾、肺和肾组织的荧光强度检测分析

注：A, B, C 和 D 分别为 Control, FLUCZ, PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 处理组

Fig. 4-11 Detection and analysis of fluorescence intensity of heart, liver, spleen, lung and kidney.

Note: The processing group of A, B, C and D are Control, FLUCZ, PLGA-PEG-FLUCZ and AD1-PLGA-PEG-FLUCZ respectively.

(2) AD1-PLGA-PEG-AMP 的靶向检测分析

图 4-12 为 Control、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 在小鼠体内 24 h 的荧光强度分布。由图可以看出，Control 组和 AMP 组在 12 h 后荧光强度基本检测不出，可能是由于荧光试剂和药物被小鼠身体代谢排出^[101]。PLGA-PEG-AMP 处理组荧光试剂 12 h 后在小鼠臀部感染区有少量聚集，而 12 h 后 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组在臀部感染处有大量药物聚集，且 24 h 后仍没有消散，这同样验证了 AD1-PLGA-PEG-AMP 的靶向效果。

图 4-13 为 Control、AMP、PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理的小鼠心、肝、脾、肺和肾组织中 24 h 后的荧光强度。由图可以看出，AMP 处理组具有少量荧光分布在肝脏和肾脏组织中，可能是由于代谢 AMP 是通过

肝脏和肾脏组织，其还未完全将 AMP 代谢排出。而 PLGA-PEG-AMP 和 AD1-P LGA-PEG-AMP 处理组在肝脏、肺脏和肾脏均有较强的荧光强度，其中 AD1-P LGA-PEG-AMP 处理组荧光强度较强，且肺脏组织荧光强度明显高于 PLGA-PEG-AMP 处理组，其结果表明 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 在感染区大量聚集，成功的发挥了靶向作用。

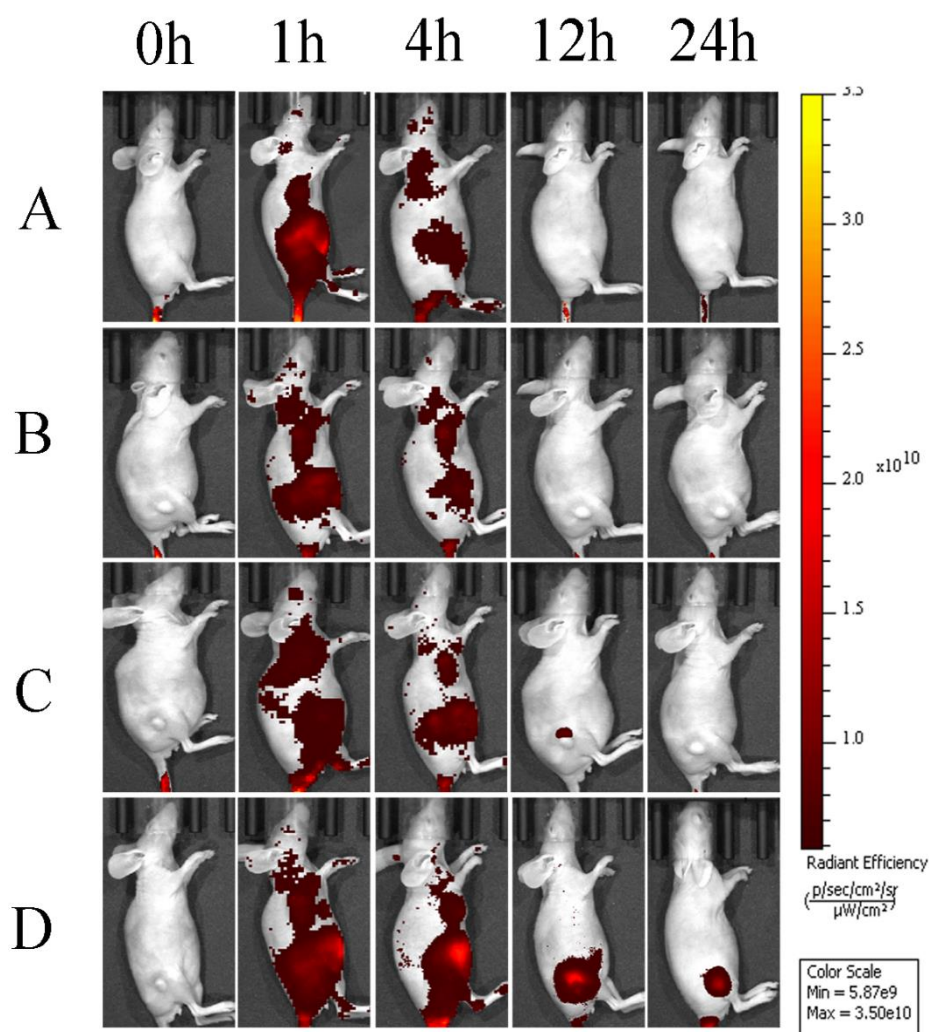


图 4-12 小鼠荧光试剂强度检测分析

注：A, B, C 和 D 分别为 Control，AMP，PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组。

Fig. 4-12 Detection and analysis of fluorescence reagent intensity

Note: The processing group of A, B, C and D are Control、AMP、PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP respectively.

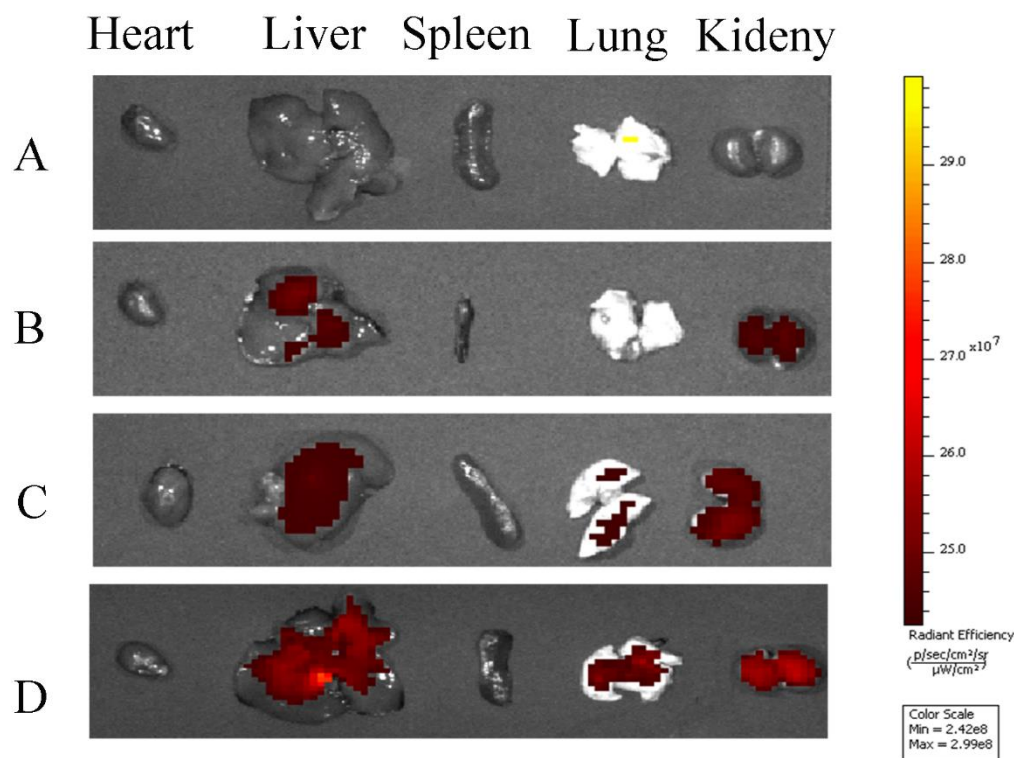


图 4-13 小鼠心、肝、脾、肺和肾组织的荧光强度检测分析

注：A, B, C 和 D 分别为 Control, AMP, PLGA-PEG-AMP 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 处理组

Fig. 4-13 Detection and analysis of fluorescence intensity of heart, liver, spleen, lung and kidney.

Note: The processing group of A, B, C and D are Control, AMP, PLGA-PEG-AMP and AD1-PLGA-PEG-AMP respectively.

4.5 本章小结

在本章工作中，构造了 *C.albicans* 小鼠感染模型，验证了 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ、AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、PLGA-PEG-AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 的体内活性。实验组 C 57 小鼠在注射 *C.albicans* 后，小鼠食欲明显减少，运动量较之前也大大缩减，可能是 *C.albicans* 感染导致小鼠体内炎症的产生致使体重下降。在治疗后 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 组和 AD1-PLGA-PEG-AMP 组体重恢复效果最好，在第 14 d 恢复到感染 *C.albicans* 前体重，且

AD1-PLGA-PEG-FLUCZ组和AD1-PLGA-PEG-AMP组体重恢复速度很快，可能是由于AD1-PLGA-PEG-AMP快速识别并杀伤了 *C.albicans* 细胞。另外观察发现注射药物的小鼠食欲明显较之前增大，其活动也更加频繁，精神状态大幅改善。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ和AD1-PLGA-PEG-AMP处理组的血清CRP含量分别为28700.47 ng/mL和27372.73 ng/mL，接近未感染组（control (-)），表明体内炎症基本已经清除。AD1-PLGA-PEG-FLUCZ和AD1-PLGA-PEG-AMP处理组的ALT和AST浓度相对较低，可能是因为其结合 *C.albicans* 后缓慢释放药物，从而减弱了药物对肝脏细胞的损伤。各处理组的BUN和CR浓度未发生显著升高，表明药物对肾脏细胞的损伤较小。对各处理组的心、肝、脾、肺和肾进行HE染色，观察损伤情况，发现 *C.albicans* 主要感染肺脏组织，在AD1-PLGA-PEG-FLUCZ和AD1-PLGA-PEG-AMP治疗后，可以看到正常的肺泡、肺内支气管和间质小动脉以及正常厚度的肺泡间隔，表明其具有较好的治疗效果。采用小鼠活体成像系统检测药物的靶向效果，发现AD1-PLGA-PEG-FLUCZ和AD1-PLGA-PEG-AMP处理组在小鼠臀部感染处有大量聚集，且24 h后仍有聚集，可能是由于靶向作用使AD1-PLGA-PEG-FLUCZ和AD1-PLGA-PEG-AMP在 *C.albicans* 感染区聚集，减缓体内对其的代谢作用，从而达到延长治疗时间和降低肝肾代谢强度。此外，AD1-PLGA-PEG-FLUCZ和AD1-PLGA-PEG-AMP在处理组肝和肾中的荧光强度较强，且肺脏组织有明显聚集，表明其成功的发挥了靶向作用。总之，AD1-PLGA-PEG-FLUCZ和AD1-PLGA-PEG-AMP对 *C.albicans* 具有较好的靶向作用和杀伤作用，可以作为抑制 *C.albicans* 感染的一种良好药物。

第 5 章 结论与展望

在这项工作中，成功的制备了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 纳米粒子，并通过粒径和电位检测，发现 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 具有很好的分散性和稳定性，采用红外光谱和扫描电子显微镜等方法验证了其包载药物的成功。通过溶血试验和细胞毒理实验证实纳米材料包载后大大提升了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 的生物相容性。在体外抗 *C.albicans* 实验中，发现 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 都具有良好的抑制效果，抑菌圈和抑制生长曲线测定结果也证实了纳米粒子对 *C.albicans* 的抑制作用；同时使用 XTT 减低法验证证实了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 生物膜的清除作用优于 FLUCZ、PLGA-PEG-FLUCZ 和 AMP、AD1-PLGA-PEG-AMP。通过荧光显微镜和扫描电子显微镜(SEM)的观察，发现扫描电子显微镜发现 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 对 *C.albicans* 细胞具有识别能力，纳米粒子会附着在 *C.albicans* 细胞的表面。此外，本项目还建立了 C57 小鼠 *C.albicans* 生物膜体内模型，验证了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 体内抑制 *C.albicans* 作用，以及通过 AST、ALT、BUN 和 CR 的检测验证其生物相容性的提高，并且经小鼠活体荧光成像观察显示说明适配体修饰的 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 在体内仍对白色念珠菌具有高效靶向性。通过 HE 染色检测了纳米粒子对小鼠的心、肝、脾、肺和肾组织的病理影响，发现在 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 治疗后，肺部感染有明显好转，且肝肾组织相较于未包载的 FLUCZ 和 AMP 有明显的减少损伤，并通过小鼠的血清检测了治疗后的恢复情况，并对 *C.albicans* 感染后的肺脏进行了 CFU 检测，还通过五脏荧光检测验证了 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 靶向能力。总之，这项研究表明 AD1-PLGA-PEG-FLUCZ 和 AD1-PLGA-PEG-AMP 可以作为抑制 *C.albicans* 感染的一种良好药物，其可以作为一种抗 *C.albicans* 试剂，供给临床参考。

目前，越来越多的真菌感染病例出现耐药性问题，需要开发新型药物和技术来解决。然而，新结构药物的研发成本高、周期长，并需要大量人力和物力

投入。因此，纳米生物材料和纳米技术在疾病诊断和药物治疗方面展现出了巨大的活力和应用价值。纳米技术为多功能药物治疗系统提供了满足不同生物学和治疗要求的可能性。纳米技术在真菌药物研究中的应用显示，针对某些药物（如 FLUCZ），可以通过改善其生物利用度、降低毒性并提高靶组织的递药效率来创新治疗方法。与此同时，纳米载体的物理化学特性也为克服真菌耐药性提供了潜在的研究策略。因此，这项工作继续进行时，需要解决许多问题，包括提高纳米载体的物理稳定性、增加药物负载量、实现可控的药物释放、结合靶向治疗和热疗、光动力疗法以及药物输送相结合的多功能体系的研究。这些问题是当前真菌感染治疗领域中亟待解决并且具有重要学术意义的挑战。纳米载体与生物膜、细胞外基质之间的相互作用机制极为复杂，需要进一步深入研究。此外，还需要进行纳米毒理学研究，评估纳米系统在体内动物模型中的药代动力学和药效学特性等方面，以期后续开展更深入的研究。

参考文献

- [1] HAWKSWORTH D L, LUECKING R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species [J]. Microbiology Spectrum, 2017, 5(4):321-324
- [2] SPATAFORA J W, AIME M C, GRIGORIEV I V, et al. The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies [J]. Microbiology Spectrum, 2017, 5(5):4621-4625
- [3] TRESEDER K K, LENNON B J T. Fungal Traits That Drive Ecosystem Dynamics on Land [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2015, 79(2): 243-262.
- [4] CHAVES A F A, XANDER P, ROMERA L M D M, et al. What is the elephant in the room when considering new therapies for fungal diseases? [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2021, 47(3): 275-289.
- [5] SULEYMAN G, ALANGADEN G J. Nosocomial Fungal Infections Epidemiology, Infection Control, and Prevention [J]. Infectious Disease Clinics of North America, 2021, 35(4): 1027-1053.
- [6] ENE L V, BENNETT R J, ANDERSON M Z. Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans* [J]. Current Opinion in Microbiology, 2019, 52: 47-54.
- [7] D'ENFERT C, KAUNE A-K, ALABAN L-R, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives [J]. FEMS microbiology reviews, 2021, 45(3):41-43.
- [8] SHIN D-S, EOM Y-B. Zerumbone inhibits *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2019, 65(10): 713-721.
- [9] CHEN H, ZHOU X, REN B, et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans* [J]. Virulence, 2020, 11(1): 337-348.
- [10] PEREIRA R, DOS SANTOS FONTENELLE R O, DE BRITO E H S, et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance [J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(1): 11-22.
- [11] LOHSE M B, GULATI M, JOHNSON A D, et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(1): 19-31.
- [12] STRICKLAND A B, SHI M. Mechanisms of fungal dissemination [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2021, 78(7): 3219-3238.
- [13] LOHSE M B, GULATI M, JOHNSON A D, et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(1): 19-31.
- [14] FENG Y, LU H, WHITEWAY M, et al. Understanding fluconazole tolerance in *Candida albicans* : implications for effective treatment of candidiasis and combating invasive fungal infections [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2023, 35: 314-321.
- [15] LU H, SHRIVASTAVA M, WHITEWAY M, et al. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2021, 47(3): 323-337.
- [16] LASS-FLORL C, ALASTRUEY-IZQUIERDO A, GUPTA R, et al. Interpretation, pitfalls of biomarkers in diagnosis of invasive fungal diseases [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2022, 40(4): 480-485.

- [17] POSCH W, STEGER M, WILFLINGSIEDER D, et al. Promising immunotherapy against fungal diseases [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2017, 17(7): 861-870.
- [18] SOBEL J D, SOBEL R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species [J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2018, 19(9): 971-977.
- [19] BIN HAFEEZ A, JIANG X, BERGEN P J, et al. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21):31-35
- [20] LE MARQUER M, SAN CLEMENTE H, ROUX C, et al. Identification of new signalling peptides through a genome-wide survey of 250 fungal secretomes [J]. *Bmc Genomics*, 2019, 20:175-179
- [21] GUPTA Y, BARANWAL M, CHUDASAMA B. Immunoinformatics-Based Identification of the Conserved Immunogenic Peptides Targeting of Zika Virus Precursor Membrane Protein [J]. *Viral Immunology*, 2023, 36(8): 503-519.
- [22] BEHRENDT R, WHITE P, OFFER J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis [J]. *Journal of Peptide Science*, 2016, 22(1): 4-27.
- [23] BERILLO D, YESKENDIR A, ZHARKINBEKOV Z, et al. Peptide-Based Drug Delivery Systems [J]. *Medicina-Lithuania*, 2021, 57(11):735-741
- [24] SINHA R, CLARKE J, BENSON A K. Alignment behaviors of short peptides provide a roadmap for functional profiling of metagenomic data [J]. *Bmc Genomics*, 2015, 16:723-726
- [25] NING C, GUO Y, YAN L, et al. On-Demand Prolongation of Peripheral Nerve Blockade through Bupivacaine-Loaded Hydrogels with Suitable Residence Periods [J]. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5(2): 696-709.
- [26] WANG W, LI P, HUANG Q, et al. Functionalized antibacterial peptide with DNA cleavage activity for enhanced bacterial disinfection [J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2023, 228:2-10
- [27] SCARIA J, NIDHEESH P V, KUMAR M S. Synthesis and applications of various bimetallic nanomaterials in water and wastewater treatment [J]. *Journal of Environmental Management*, 2020, 259:42-48
- [28] DING S, SERRA C A, VANDAMME T F, et al. Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective [J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 295: 31-49.
- [29] MAKABENTA J M V, NABAWY A, LI C-H, et al. Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(1): 23-36.
- [30] BAYDA S, ADEEL M, TUCCINARDI T, et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine [J]. *Molecules*, 2020, 25(1):33-39
- [31] RIZZELLO L, CINGOLANI R, POMPA P P. Nanotechnology tools for antibacterial materials [J]. *Nanomedicine*, 2013, 8(5): 807-21.1753-1764
- [32] SU Y, ZHANG B, SUN R, et al. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application [J]. *Drug Delivery*, 2021, 28(1): 1397-1418.
- [33] RAHME K, DAGHER N. Chemistry Routes for Copolymer Synthesis Containing PEG for

- Targeting, Imaging, and Drug Delivery Purposes [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(7).17-33
- [34] DARD-DASCOT C, NAQUIN D, D'AUBENTON-CARAFA Y, et al. Systematic comparison of small RNA library preparation protocols for next-generation sequencing [J]. *Bmc Genomics*, 2018, 19.45-57
- [35] SAITO Y, YIN D, KUBOTA N, et al. A Therapeutically Targetable TAZ-TEAD2 Pathway Drives the Growth of Hepatocellular Carcinoma via ANLN and KIF23 [J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(7): 1279-92.332-351
- [36] TANG X L, HUA Y, GUAN Q, et al. Improved detection of deeply invasive candidiasis with DNA aptamers specific binding to (1→3)-β-D-glucans from *Candida albicans* [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2016, 35(4): 587-595.
- [37] YANG S, PENG X, REN B, et al. Small molecule II-6s synergises with fluconazole against *Candida albicans* [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2023, 62(1).365-370
- [38] ABELHA T F, NEUMANN P R, HOLTHOF J, et al. Low molecular weight PEG-PLGA polymers provide a superior matrix for conjugated polymer nanoparticles in terms of physicochemical properties, biocompatibility and optical/photoacoustic performance [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(33): 5115-5124.
- [39] SU F, WANG Y, LIU X, et al. Biocompatibility and in vivo degradation of chitosan based hydrogels as potential drug carrier [J]. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 2018, 29(13): 1515-1528.
- [40] GHANDFOROUSHAN P, HANAEE J, AGHAZADEH Z, et al. Enhancing the function of PLGA-collagen scaffold by incorporating TGF-β1-loaded PLGA-PEG-PLGA nanoparticles for cartilage tissue engineering using human dental pulp stem cells [J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2022, 12(12): 2960-2978.
- [41] YAN J, PENG X, CAI Y, et al. Development of facile drug delivery platform of ranibizumab fabricated PLGA-PEGylated magnetic nanoparticles for age-related macular degeneration therapy [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2018, 183: 133-136.
- [42] XIE Y, LIU J, CAI S, et al. Setting Characteristics and High Compressive Strength of an Anti-washout, Injectable Calcium Phosphate Cement Combined with Thermosensitive Hydrogel [J]. *Materials*, 2020, 13(24).45-62
- [43] CUI T, LI S, CHEN S, et al. "Stealth" dendrimers with encapsulation of indocyanine green for photothermal and photodynamic therapy of cancer [J]. *International journal of pharmaceutics*, 2021, 600: 120502.264-274
- [44] GHOSH M, MANDAL S, ROY A, et al. Enhanced antifungal activity of fluconazole conjugated with Cu-Ag-ZnO nanocomposite [J]. *Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2020, 106.296-304
- [45] AL-THANI H F, SHURBAJI S, ZAKARIA Z Z, et al. Reduced Cardiotoxicity of Ponatinib-Loaded PLGA-PEG-PLGA Nanoparticles in Zebrafish Xenograft Model [J]. *Materials*, 2022, 15(11).489-504
- [46] FARAMARZI L, DADASHPOUR M, SADEGHZADEH H, et al. Enhanced anti-proliferative and pro-apoptotic effects of metformin encapsulated PLGA-PEG nanoparticles on SKOV3 human ovarian carcinoma cells [J]. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 2019, 47(1): 737-746.
- [47] MARCELINO M Y, BORGES F A, MARTINS COSTA A F, et al. Antifungal activity of

- fluconazole-loaded natural rubber latex against *Candida albicans* [J]. Future Microbiology, 2018, 13(3): 359-367.
- [48] JUSU S M, OBAYEMI J D, SALIFU A A, et al. Drug-encapsulated blend of PLGA-PEG microspheres: in vitro and in vivo study of the effects of localized/targeted drug delivery on the treatment of triple-negative breast cancer [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1):4612-4631
- [49] FATIMA I, RASUL A, SHAH S, et al. Novasomes as Nano-Vesicular Carriers to Enhance Topical Delivery of Fluconazole: A New Approach to Treat Fungal Infections [J]. Molecules, 2022, 27(9):445-449
- [50] CHAUDHARY A K, CHITRIV S P, VIJAYAKUMAR R P. Influence of nitric acid on biodegradation of polystyrene and low-density polyethylene by *Cephalosporium species* [J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(8):4571-4583
- [51] WOHLGEMUTH M, MIYAZAKI M, TSUKADA K, et al. Deciphering environment effects in peptide bond solvation dynamics by experiment and theory [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017, 19(33): 22564-22572.
- [52] MENDOZA-BENITEZ P S, AGUILAR-RUIZ S R, ROMERO-TLALOLINI M D L A, et al. Evaluation of the Interference of Lipemia and Hemolysis in the Detection Limit of Anti-HIV-1 Antibodies [J]. Clinical Laboratory, 2019, 65(8): 1395-1402.
- [53] DUPUY A M, BARGNOUX A S, KUSTER N, et al. Determination of hemolysis cut-offs for biochemical and immunochemical analytes according to their value [J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2020, 58(8): 1232-1241.
- [54] LIANG Q, ZHANG P, ZHANG L, et al. Development of tetracycline-modified nanoparticles for bone-targeted delivery of anti-tubercular drug [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11:655-580
- [55] LIU L, SUN X, GUO Y, et al. Evodiamine induces ROS-Dependent cytotoxicity in human gastric cancer cells via TRPV1/Ca₂ pathway [J]. Chemico-Biological Interactions, 2022, 351:667-680
- [56] NAJAH-MISSAOUI W, ARNOLD R D, CUMMINGS B S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(1):1833-1910
- [57] ANDRIAN T, MUELA Y, DELGADO L, et al. A super-resolution and transmission electron microscopy correlative approach to study intracellular trafficking of nanoparticles [J]. Nanoscale, 2023, 15(35): 14615-14627.
- [58] HE G Z, LIN W J. Peptide-Functionalized Nanoparticles-Encapsulated Cyclin-Dependent Kinases Inhibitor Seliciclib in Transferrin Receptor Overexpressed Cancer Cells [J]. Nanomaterials, 2021, 11(3):5534-5561
- [59] SUN H, LUO D, ZHENG S, et al. Antimicrobial behavior and mechanism of clove oil nanoemulsion [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2022, 59(5): 1939-1947.
- [60] PEI H, LU M, LONG L, et al. Antibacterial mechanism of forsythoside A against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae [J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 173:1478-1493
- [61] MOLLER C O D A, CHRISTENSEN B B, RATTRAY F P. Modelling the biphasic growth of non-starter lactic acid bacteria on starter-lysate as a substrate [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 337:1667-1683
- [62] SOLAIMAN D K Y, ASHBY R D, UKNALIS J. Characterization of growth inhibition of

- oral bacteria by sophorolipid using a microplate-format assay [J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 136: 21-29.
- [63] REWAK-SOROCZYNSKA J, SOBIERAJSKA P, TARGONSKA S, et al. New Approach to Antifungal Activity of Fluconazole Incorporated into the Porous 6-Anhydro- α -l-Galacto- β -d-Galactan Structures Modified with Nanohydroxyapatite for Chronic-Wound Treatments-In Vitro Evaluation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6).7855-7864
- [64] FRICKMANN H, ZAUTNER A E, MOTER A, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2017, 43(3): 263-293.
- [65] KRZYSIAK W, KOSCIELNIAK D, PAPIEZ M, et al. Effect of a *Lactobacillus Salivarius* Probiotic on a Double-Species *Streptococcus Mutans* and *Candida Albicans* Caries Biofilm [J]. Nutrients, 2017, 9(11).244-281
- [66] SIMITSOPOULOU M, CHATZIMOSCHOU A, ROILIDES E. Biofilms and Antifungal Susceptibility Testing [J]. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2016, 1356: 183-197.
- [67] SUN Y, JIANG W, ZHANG M, et al. The Inhibitory Effects of Ficin on *Streptococcus mutans* Biofilm Formation [J]. Biomed Research International, 2021, 2021.1178-1193
- [68] JAFRI H, AHMAD I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* [J]. Journal De Mycologie Medicale, 2020, 30(1).776-791
- [69] WANG Y, PEI Z, LOU Z, et al. Evaluation of Anti-Biofilm Capability of Cordycepin Against *Candida albicans* [J]. Infection and Drug Resistance, 2021, 14: 435-448.
- [70] MANOHARAN R K, LEE J-H, KIM Y-G, et al. Alizarin and Chrysazin Inhibit Biofilm and Hyphal Formation by *Candida albicans* [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7.4644-4681
- [71] MULATU G. Antibacterial Activities of *Calpurnia aurea* against Selected Animal Pathogenic Bacterial Strains [J]. Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences, 2020, 2020: 8840468-.7754-7781
- [72] BOJANG E, DRUMMOND R A, HALL R A. Molecular and Microscopic Methods of Quantifying *Candida albicans* Cell Wall PAMP Exposure [J]. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2022, 2542: 309-321.
- [73] LUISA NAVARRO-PEREZ M, CORONADA FERNANDEZ-CALDERON M, VADILLO-RODRIGUEZ V. Decomposition of Growth Curves into Growth Rate and Acceleration: a Novel Procedure To Monitor Bacterial Growth and the Time-Dependent Effect of Antimicrobials [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(3).22315-22346
- [74] ANAYA-ESPARZA L M, GONZALEZ-SILVA N, YAHIA E M, et al. Effect of TiO_2 - ZnO - MgO Mixed Oxide on Microbial Growth and Toxicity against *Artemia salina* [J]. Nanomaterials, 2019, 9(7).11-18
- [75] ALHEDE M, STAVNSBJERG C, BJARNSHOLT T. The use of fluorescent staining techniques for microscopic investigation of polymorphonuclear leukocytes and bacteria [J]. Apmis, 2018, 126(10): 779-794.
- [76] BARISCH C, HOLTHUIS J C M, COSENTINO K. Membrane damage and repair: a thin

- line between life and death [J]. *Biological Chemistry*, 2023, 404(5): 467-490.
- [77] ROBINSON J R, ISIKHUEMHEN O S, ANIKE F N, et al. Physiological Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Silver Stress [J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(5):44-48
- [78] WALL G, MONTELONGO-JAUREGUI D, BONIFACIO B V, et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 52: 1-6.
- [79] PUMEESEAT P, MUANGKAEW W, AMPAWONG S, et al. *Candida albicans* biofilm development under increased temperature [J]. *New Microbiologica*, 2017, 40(4): 279-283.
- [80] SCORZONI L, DE PAULA E SILVA A C A, MARCOS C M, et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:3354-3376
- [81] MOHAMMADI Z, SAMADI F Y, RAHMANI S, et al. Chitosan-Raloxifene nanoparticle containing doxorubicin as a new double-effect targeting vehicle for breast cancer therapy [J]. *Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 28(2): 433-442.
- [82] SHIN D-S, EOM Y-B. Zerumbone inhibits *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(10): 713-721.
- [83] VARMA L T, SINGH N, GORAIN B, et al. Recent Advances in Self-Assembled Nanoparticles for Drug Delivery [J]. *Current Drug Delivery*, 2020, 17(4): 279-291.
- [84] PAREEK V, BHARGAVA A, BHANOT V, et al. Formation and Characterization of Protein Corona Around Nanoparticles: A Review [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2018, 18(10): 6653-6670.
- [85] GUILLAUDEUX N, BELLEANNEE C, BLANQUART S. Identifying genes with conserved splicing structure and orthologous isoforms in human, mouse and dog [J]. *Bmc Genomics*, 2022, 23(1):31-45
- [86] BULT C J, EPPIG J T, BLAKE J A, et al. Mouse genome database 2016 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D840-D7.164-178
- [87] ACHARYA D, MUKHERJEE D, PODDER S, et al. Investigating Different Duplication Pattern of Essential Genes in Mouse and Human [J]. *Plos One*, 2015, 10(3):446-453
- [88] GILES A J, HUTCHINSON M-K N D, SONNEMANN H M, et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy [J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2018, 6:224-264
- [89] COURTOIS S, BENEJAT L, IZOTTE J, et al. Metformin can inhibit *Helicobacter pylori* growth [J]. *Future Microbiology*, 2018, 13(14): 1575-1584.
- [90] SUZUKI H G, DEWEZ J E, NIJMAN R G, et al. Clinical practice guidelines for acute otitis media in children: a systematic review and appraisal of European national guidelines [J]. *Bmj Open*, 2020, 10(5):1765-1784
- [91] LEROUX S, JACQZ-AIGRAIN E, ELIE V, et al. Pharmacokinetics and safety of fluconazole and micafungin in neonates with systemic candidiasis: a randomized, open-label clinical trial [J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 84(9): 1989-1999.
- [92] ZHOU J, DIAO X, WANG S, et al. Diagnosis Value of Combined Detection of Serum SF, CEA and CRP in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Cancer Management and Research*, 2020, 12: 8813-9.4674-4683
- [93] WICK M R. The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology-An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory [J]. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 2019,

- 36(5): 303-311.
- [94] LONG N, DENG J, QIU M, et al. Inflammatory and pathological changes in *Escherichia coli* infected mice [J]. *Heliyon*, 2022, 8(12): e12533-e.466-481
- [95] LIU S, SONG W, GAO X, et al. Discovery of Nonpeptide, Reversible HER1/HER2 Dual-Targeting Small-Molecule Inhibitors as Near-Infrared Fluorescent Probes for Efficient Tumor Detection, Diagnostic Imaging, and Drug Screening [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(2): 1507-1515.
- [96] BADIMON L, PENA E, ARDERIU G, et al. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9.466-478
- [97] HU L, SHI Q, SHI M, et al. Diagnostic Value of PCT and CRP for Detecting Serious Bacterial Infections in Patients With Fever of Unknown Origin: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2017, 25(8): E61-E9.1166-1172
- [98] SONG H, ZHANG X, ZHAI R, et al. Metformin attenuated sepsis-associated liver injury and inflammatory response in aged mice [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 4598-4609.
- [99] NEUMANN P R, ERDMANN F, HOLTHOF J, et al. Different PEG-PLGA Matrices Influence In Vivo Optical/Photoacoustic Imaging Performance and Biodistribution of NIR-Emitting π -Conjugated Polymer Contrast Agents [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(4).166-173
- [100] XIANG C, YAN Y, ZHANG D. Alleviation of the doxorubicin-induced nephrotoxicity by fasudil in vivo and in vitro [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2021, 145(1): 6-15.
- [101] XIAO W, MA W, WEI S, et al. High-affinity peptide ligand LXY30 for targeting $\alpha_3\beta_1$ integrin in non-small cell lung cancer [J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2019, 12.146-154
- [102] KOLGE H, PATIL G, JADHAV S, et al. A pH-tuned chitosan-PLGA nanocarrier for fluconazole delivery reduces toxicity and improves efficacy against resistant *Candida* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 227: 453-461.
- [103] WANG Y, YANG J, ZHAN H, et al. The potential risk factors of nephrotoxicity during vancomycin therapy in Chinese adult patients [J]. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 2021, 28(E1): E51-E5.55-61

个人科研成果

- 1、 Peng Zheng , Rongyu Li , Fangkai Li, Ruonan Wang, and Senhe Qian.Exploration of Biological Properties and Antibacterial Action against Escherichia coli and Staphylococcus aureus of (LLKK)₃-Derived Peptides, [J] Chemistry Select e202300355-355
- 2、 钱森和;李方凯;屠西猛;郑鹏;王若男;赵世光.牡丹籽多肽微胶囊的制备、表征及缓释性能. [J]中国油脂,2022(10)1228-1229
- 3、 王若男;钱程;郑鹏;李方凯;王洲;王晖;钱森和.黄精发酵液制备工艺优化及其抗氧化活性分析. [J]中国酿造,2022(05)1123-1123
- 4、 钱森和;郑鹏;周炎;胡刘秀;王洲;薛正莲.芝麻粕植酸的超声波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性研究. [J]中国油脂,2020(08)388-389
- 5、 厉荣玉;厉红;郑鹏;杨成;钱森和.酪蛋白 GYLEQ 抗氧化肽——钙螯合物的制备、表征及功能特性. [J]食品与机械,2023(02)327-328
- 6、 管良威;郑鹏;杨子成;韩仔钰;钱森和.牡丹油改性的乳胶膜制备、表征及其功能分析. [J]安徽化工,2023(04)224-225
- 7、 王若男;厉荣玉;郑鹏;钱程;聂光军;钱森和.黄精多糖微生物发酵提取、表征及其抗氧化活性分析. [J]中国食品添加剂,2022(09)1587-1587
- 8、 Wang, Ruonan; Li, Rongyu ; Li, Fangkai ; Zheng, Peng; Wang, Zhou ; Qian, Senhe. Glycerol and Antimicrobial Peptide-Modified Natural Latex for Bacteriostasis of Skin Wounds. [J]ACS Omega. 2022 Dec 28;8(1):1505-1513..
9. Wang, Ruonan ; Li, Rongyu ; Zheng, Peng ; Yang, Zicheng ; Qian, Cheng ; Wang, Zhou; Qian, Senhe Improving Biocompatibility and Infected Wound Bacteriostasis of Silver Nanoparticles Modified by Polygonatum sibiricum Polysaccharide. [J]Journal Of Miciobiology. 2023(04) 543-558

致谢

白驹过隙，硕士生涯转瞬即逝。在这段宝贵的时光里，我满怀感激，收获颇丰。在此，我想向所有给予我帮助和支持的人，表达我最诚挚的谢意。

首先，我要衷心感谢我的导师钱森和老师。导师的博学多才、严谨治学和高尚品德，如明灯照亮我前行的学术道路。在论文创作过程中，导师的悉心指导和严格要求，让我不断进步。他的鼓励与支持，使我在困难与挫折面前，始终保持信心和勇气。在此，我向导师致以最崇高的敬意和深深的感激。

其次，我要感谢我的师兄师姐王若男、李方凯，以及我的同学黎玮、韩肋撒、汪锡武以及师弟师妹杨子成、方旭娟，在学习和研究中，我们相互交流、共同学习、携手进步。我们一同探讨问题、分享经验，共同成长。在遇到困难时，他们给予我帮助和支持，让我感受到友情的力量和温暖。

我还要感谢我的家人，他们是最坚强的后盾和最温暖的港湾。在我求学之路上，他们始终默默支持着我，给予我无尽的爱与关怀。他们的鼓励 and 信任，是我勇往直前的动力。我会永远珍惜与家人共度的美好时光，感激他们的付出和奉献。

还要感谢我的对象，照顾我的生活，给我精神上的支持，让我在学习以及研究的过程中能够坚持不懈。

最后，我要感谢我的母校安徽工程大学，为我提供了优越的学习和研究条件。在这里，我不仅收获了知识和技能，还结识了众多优秀的师长和同学。这段珍贵的经历，将成为我人生的宝贵财富，激励我不断前行。

即将毕业，我将怀着感恩之心，肩负起这份责任与使命，奋勇前行。我将以更加饱满的热情和坚定的信念，迎接未来的挑战，为社会贡献自己的力量。

再次感谢所有在我硕士生涯中给予我帮助和支持的人！