

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学号: 2210520117

基于 L-精氨酸为供体近红外响应释放一氧化氮纳米
粒子的构建及抑制耐药菌的研究

**Construction of Nitric Oxide Nanoparticles Released
by Donor in Near-infrared Response Based on L-
arginine and Study on Inhibition to Drug-resistant
Bacteria**

学生姓名: 崔婷

指导教师: 陶玉贵 (教授)

专 业: 生物工程

研究方向: 生物载体材料工程

论文答辩日期: 2024 年 05 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：崔婷

日期：2024年06月03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：崔婷

指导教师签名：1812

日期：2024年06月03日

日期：2024年06月03日

基于 L-精氨酸为供体近红外响应释放一氧化氮纳米粒子的 构建及抑制耐药菌的研究

摘 要

耐药菌感染仍然是全球最紧迫的健康挑战之一，传统的抗菌方法存在着靶向分布不均、利用率较低和耐药性增加等问题，同时还受到了微生物屏障穿透能力下降、对胞内细菌清除效果不理想以及潜在系统毒副作用等因素的干扰。近年来，一些研究已经验证了一氧化氮（Nitric oxide, NO）这种分子的杰出抑菌特性，并且其引发耐药性的可能性较低。因此基于 NO 的气体疗法被视为一种新兴的治疗方案，可以有效抑制耐药菌。然而，目前 NO 抗菌治疗所面临的主要难题在于如何有效地传递具有较短半衰期和扩散距离限制的 NO。因此，在本课题中，我们将 L-精氨酸（L-arginine, L-Arg）作为 NO 释放供体，制备响应性 NO 释放纳米复合材料，实现 NO 的可控释放，并将其与光热疗法（Photothermal therapy, PTT）/光动力疗法（Photodynamic therapy, PDT）联合，研究复合材料抑制耐药菌的效果。具体研究内容如下：

（1）在碱性条件下合成 CaO_2 纳米颗粒，随后以此为载体利用氧化自聚合在其表面合成聚多巴胺（Polydopamine, PDA），再利用席夫碱反应或迈克尔加成将 L-Arg 与外层 PDA 相接，最终合成出可以有效清除耐药菌感染及促伤口愈合的纳米复合材料。在扫描电镜下 A-

Ca@PDA 形貌均一,大小均匀;经粒径仪检测,CaO₂ 的尺寸约为 130.4 ±2.17 nm,在 PDA 和 L-Arg 负载后,其大小增加至大约 198.73±1.85 nm。对其光热性能进行实验验证,发现 A-Ca@PDA 的光热转换效率达到了 45.6%,展现出卓越且持久稳定的光热特性。根据 MIC 检测结果,A-Ca@PDA 在低浓度 32 μ g/mL 下仍然对 Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* (MDR *S. aureus*) 表现出抑菌效果。体外生物膜消融实验表明纳米颗粒对耐药菌生物膜的消融率可达到 90%以上。在溶血实验和细胞毒性实验中,A-Ca@PDA 展现出优异的生物相容性。在体内抑菌实验中,A-Ca@PDA 具有显著的抑制小鼠伤口周围的细菌感染的能力,并有效地促进伤口愈合。

(2) 为了降低大功率激光对正常细胞的损伤,我们选用了具有更高光热转换效率的材料来代替 PDA。通过水热法合成 MoS₂ 纳米花,通过静电吸附作用在其表面负载 NO 供体 L-Arg 和光敏剂 IR780,实现 NO 联合 PTT/PDT 抑制耐药菌。在 SEM 下,AI-MoS₂ 展现出均一的形貌,通过粒径仪检测,AI-MoS₂ 的大小为 221.03±2.41 nm。光热性能试验表明在 MoS₂ 和 IR780 双重光热剂的作用下,AI-MoS₂ 的光热转换效率高达 65.4%。在用 DPBF 检测活性氧生成时,AI-MoS₂ 的吸光度大幅下降,说明材料产生了活性氧。选用 Multidrug-Resistant *Escherichia coli* (MDR *E. coli*) 和 MDR *S. aureus* 为模型细菌,在 CFU、荧光染色等实验中 AI-MoS₂ 也表现出显著的抗菌效果,在生物膜消融实验中在经激光照射后,也显示出 AI-MoS₂ 对耐药菌生物膜的

较好的消融效果。此外，在溶血实验中材料也表现出优良的生物相容性。

综上所述，我们以 L-Arg 为 NO 供体，设计了一系列具有 NO 释放功能的纳米颗粒。这些纳米颗粒可以在外界刺激下实现对 NO 的可控释放，并联合 PTT/PDT 疗法，有效地消融耐药菌生物膜，抑制和清除耐药菌，并促进伤口愈合。经实验证明，我们成功合成了安全且高效的纳米颗粒，有望成为具备潜力地新方法，用于处理因耐药菌感染而导致的创伤。

关键词：一氧化氮，光热治疗，光动力治疗，L-精氨酸，耐药细菌

Construction of Nitric Oxide Nanoparticles with L-arginine as Donor Near-Infrared Response and Study on Inhibition to Drug-Resistant Bacteria

ABSTRACT

Drug-resistant bacterial infections remain one of the most urgent global health challenges. Traditional antibacterial methods have problems such as uneven target distribution, low utilization rate and increased drug resistance. At the same time, they are also interfered by factors such as decreased ability to penetrate microbial barriers, unsatisfactory clearance effect of intracellular bacteria and potential systemic toxic effects. In recent years, some studies have verified the excellent antibacterial properties of nitric oxide (NO) molecule, and its low likelihood of causing drug resistance. Therefore, NO-based gas therapy is regarded as an emerging treatment option, which can effectively combat drug-resistant bacteria. However, the main challenge of NO antibacterial therapy is how to effectively deliver NO with short half-life and limited diffusion distance. Therefore, in this study, we used L-arginine (L-Arg) as NO release donor to prepare responsive NO-releasing nanocomposites to achieve controlled release of NO, and combined it with photothermal (PTT)/photodynamic (PDT) therapy to study the effect of composites on drug-resistant bacteria.

The specific research content is as follows:

(1) The CaO_2 nanoparticles were synthesized under alkaline conditions, and then used as carriers to synthesize polydopamine (PDA) on their surfaces through self-oxidation polymerization. L-Arg was then attached to the outer layer of PDA through a Schiff base reaction or Michael addition, resulting in the synthesis of a nano-composite material that can effectively eliminate drug-resistant bacterial infections and promote wound healing. The A-Ca@PDA morphology was uniform and the size was consistent under SEM electron microscopy. Through DLS detection, the size of CaO_2 particles was approximately 130.4 ± 2.17 nm, which increased to about 198.73 ± 1.85 nm after loading with PDA and L-Arg. The successful synthesis of the nanoparticles was confirmed by various characterization methods such as FT-IR, Zeta potential, and XPS. Experimental verification of the photothermal performance revealed that the photothermal conversion efficiency of A-Ca@PDA reached 45.6%, demonstrating excellent and long-lasting stability in photothermal properties. According to the MIC test results, A-Ca@PDA still exhibited antibacterial effects against MDR *S. aureus* at a low concentration of $32 \mu\text{g/mL}$. *In vitro* biofilm eradication experiments showed that the nanoparticles achieved a biofilm eradication rate of over 90% against drug-resistant bacteria. A-Ca@PDA exhibited excellent biocompatibility in hemolysis and cytotoxicity tests. In *in vivo* antibacterial experiments, A-Ca@PDA demonstrated a significant ability to inhibit bacterial infections around mouse wounds and effectively promote wound healing.

(2) In order to reduce the damage of high-power lasers to normal cells, we chose a material with higher photothermal conversion efficiency to replace PDA. A MoS_2 nanoflower was synthesized by hydrothermal method, and L-Arg and photosensitizer IR780 were loaded on its surface

through electrostatic adsorption to achieve NO-mediated combined PTT and PDT to combat drug-resistant bacteria. Under SEM, AI-MoS₂ showed a uniform morphology. The size of AI-MoS₂ was determined to be 221.03±2.41 nm through DLS detection. The successfully synthesized AI-MoS₂ was confirmed and characterized by TEM, UV-Vis, FT-IR, Zeta potential, and other means to determine its structural characteristics. Photothermal performance experiments showed that under the dual photothermal effect of MoS₂ and IR780, the photothermal conversion efficiency of AI-MoS₂ reached 65.4%. Through DPBF detection of reactive oxygen species generation, the absorbance of AI-MoS₂ significantly decreased, indicating the production of reactive oxygen species by the material. We selected MDR *E. coli* and MDR *S. aureus* as model bacteria. In colony formation unit and fluorescence staining experiments, AI-MoS₂ showed significant antibacterial effects. In biofilm elimination experiments, after laser irradiation, AI-MoS₂ exhibited a good ablative effect on drug-resistant bacterial biofilms. In addition, in hemolysis experiments, the material also showed excellent biocompatibility.

In brief, we have formulated a range of nanoparticles based on L-Arg that possess the capability to release NO upon external stimuli. These nanoparticles demonstrate regulated NO release and when combined with PTT and PDT, they effectively eliminate drug-resistant bacterial biofilms, hinder and eradicate drug-resistant bacteria, as well as enhance wound healing. Our experimental findings validate the successful development of safe and efficient nanoparticles that hold immense potential as an innovative approach for treating wounds caused by bacterial infections.

KEY WORDS: nitric oxide, photothermal therapy, photodynamic therapy, L-Arginine, multidrug-resistant bacteria

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 耐药细菌感染治疗方法	2
1.2.1 光热疗法 (PTT)	2
1.2.2 光动力疗法 (PDT)	3
1.2.3 气体疗法 (GT)	5
1.3 NO 及其生物应用	7
1.3.1 NO 供体	7
1.3.2 NO 的检测方法	11
1.3 NO 的生物应用	13
1.4 选题设计及研究内容	15
1.4.1 课题设计思路	15
1.4.2 主要研究内容	16
第 2 章 基于 L-Arg 为供体释放 NO 联合光热抗耐药菌研究.....	18
2.1 引言	18
2.2 实验材料	19
2.2.1 实验试剂	19
2.2.2 实验仪器	20
2.2.3 菌株及小鼠来源	21
2.3 实验方法	21
2.3.1 材料合成与表征	21
2.3.2 体外性能表征	23
2.3.3 体外抑菌实验	24
2.3.4 体外生物相容性实验	26
2.3.5 小鼠伤口感染模型的构建及生物安全评估	27
2.4 实验结果与讨论	27

2.4.1 材料的合成与表征	27
2.4.2 体外性能研究	30
2.4.3 体外抑菌实验	33
2.4.4 体外生物相容性评价	40
2.4.5 体内抑菌实验	41
2.4.6 体内生物安全性评价	42
2.5 本章小结	43
第 3 章 基于 L-Arg 为供体释放 NO 联合光热/光动力抑制耐药菌研究.....	45
3.1 引言	45
3.2 实验试剂与仪器	46
3.2.1 实验试剂	46
3.2.2 实验仪器	46
3.2.3 菌株及小鼠来源	46
3.3 实验方法	47
3.3.1 材料合成与表征	47
3.3.2 体外性能研究	48
3.3.3 体外抑菌实验	48
3.3.4 体外生物相容性评价	49
3.4 结果与讨论	49
3.4.1 材料的合成与表征	49
3.4.2 体外性能研究	50
3.4.3 体外抗菌实验	54
3.4.4 体外生物相容性评价	57
3.5 本章小结	58
第 4 章 总结与展望.....	59
4.1 结论	59
4.2 展望	60
参考文献.....	61
攻读硕士学位期间学术论文发表情况.....	76
致谢.....	77

第1章 绪论

1.1 引言

细菌感染作为一种常见的医学问题,一直以来都是威胁公共卫生的重要因素。在日常生活和医疗实践中,细菌感染可能导致各种疾病,如肺炎、腹泻、败血症等,对人们的健康造成严重危害^[1]。抗生素作为广泛应用于临床治疗的药物,可以抑制或杀灭细菌,治疗由细菌感染引起的各种疾病。然而,抗生素的过度使用和滥用也带来了一系列问题,如细菌耐药性的产生、药物不良反应的发生等,使得原本可以治疗的感染变得更加难以治愈^[2-5]。在过度使用抗生素的情况下,不仅会选择性地消灭有益细菌,还会导致对抗生素产生耐药性的细菌群体残留,并且进一步发展出以黏附和多细胞结构为特征的生物膜^[6, 7]。

生物膜是在细菌适应自然环境后由细菌微生物及其分泌物的积累形成的。Costerton 等人首次将生物膜定义为“一个结构化的细菌细胞群落,被封闭在自产的聚合物基质中,粘附在表面上”^[8]。生物膜主要由胞外聚合物 (Extracellular Polymeric Substance, EPS) 组成,其中多糖、蛋白质、胞外 DNA 和脂质占据 90%^[9]。当细菌形成生物膜时,它们可以增加对宿主免疫系统的抵抗能力,并降低抗生素的治疗效果^[10, 11]。此外,生物膜还可以促进细菌之间的交流和协作,从而增加细菌的适应性和生存能力,进一步增加感染的治疗难度^[12]。异质性微环境如缺氧和营养限制导致了在生物膜内部细菌的缓慢增长或休眠,并对许多抗生素表现出高度耐药性^[13]。考虑到对于复杂且严重感染而言传统抗生素清除效果有限,迫切需要开发新型治疗策略来解决这一问题^[14]。

随着纳米技术的蓬勃发展,越来越多的纳米材料在治疗耐药菌相关感染方面显示出巨大潜力。由于其具备体积小、比表面积大、高载药量和刺激响应性释放等优点^[15],纳米材料能够规避现有的耐药机制,并提高抗生物膜效率^[16]。基于改善药物代谢动力学、增强药理活性以及降低有效载荷的副作用等优点,纳米体系被视为治疗耐药细菌感染最具前景的策略^[17-19]。如图 1-1 所示,研究人员已经开发了各种抗菌材料,如天然抗菌材料^[20, 21]、碳基纳米材料^[22-27]、石墨烯及其衍生物^[28, 29]、金属基材料^[30, 31]、金属有机骨架^[32-34]、水凝胶^[35-38]、聚合物材料^[39-41]以

及通过光辐照激活抗菌性能的纳米材料等^[42]。新型抗菌药物的杀菌机制更为复杂和多样化,细菌很难通过单一的遗传变异来抵抗^[43]。此外,新型抗菌药物还有许多其他优点。例如,它们对细菌的杀灭作用更为特异,对宿主的毒副作用更小。同时,许多新型抗菌药物还具有广谱抗菌作用,可以同时对抗多种不同类型的细菌感染^[44, 45]。这些优点使得新型抗菌药物在对抗细菌感染方面具有更大的优势和潜力。

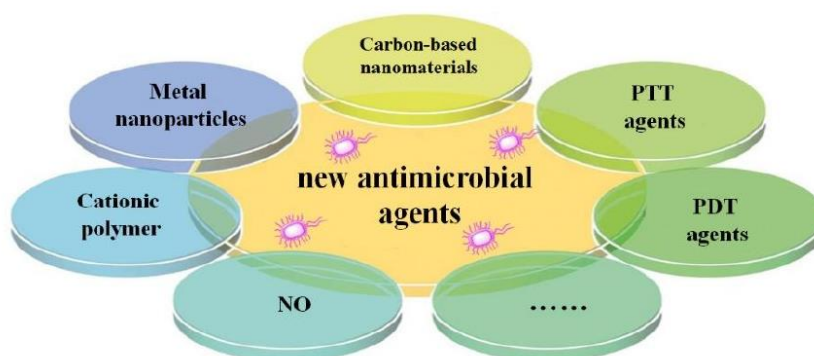


图 1-1.新型非抗生素类抗菌药物^[46]

Figure 1-1. New non-antibiotic antimicrobial agents

1.2 耐药细菌感染治疗方法

1.2.1 光热疗法 (PTT)

热疗是一种利用外部能量源,如近红外 (Near-Infrared, NIR) 光和高频交变磁场,来激活纳米颗粒,对生物膜和细菌造成不可逆的热损伤的治疗方法^[47]。热疗的主要作用之一是直接损害生物膜中的 EPS 基质,从而破坏浮游生物和生物膜驻留的细菌^[48]。通过施加适当温度的热疗,可以破坏这种 EPS 基质,导致生物膜结构的破坏。这样做不仅对浮游生物有杀灭作用,还能够消除生物膜中的驻留细菌。同时,热疗在破坏生物膜的同时,还能促进治疗剂的渗透,从而产生协同抗生物膜效应^[49, 50]。生物膜的存在会限制抗菌药物的渗透和作用效果,使得治疗变得困难。利用热疗的温度效应,可以改变生物膜的结构和通透性,使得治疗剂更容易渗透到生物膜内部,并发挥抗菌作用。因此,在热疗与抗菌药物联合应用时,能够产生协同效应,增强对生物膜的抗菌效果。

光热疗法 (Photothermal therapy, PTT) 是一种利用吸光纳米材料作为光热

转化剂,以提高病变组织的局部温度,并促进治疗药物渗透的治疗方法^[51]。PTT能够在不引发耐药性的情况下根除细菌,并在时间和空间上实现热疗^[52, 53]。PTT具有广谱和高杀菌效率,被认为是消除生物膜的可行方法^[54]。光热材料在现代科技领域具有重要的应用价值,其性能优势主要体现在高吸收强度、高光热转化效率以及良好的光热稳定性等方面^[55]。

目前,常用的光热材料可以分为三大类:小分子的有机材料、有机/无机纳米材料。其中,小分子的有机材料主要包括 ICG^[56]和 IR780 等,它们具有较高的光热转化效率和良好的生物相容性,因此在生物医学领域具有广泛应用。此外,有机共轭聚合物^[57, 58](如聚吡咯、聚苯胺、聚多巴胺(Polydopamine, PDA)等)也备受关注,通过改变聚合物结构可调控其光热性能以满足不同应用需求。无机纳米材料在光热领域表现出卓越性能。金属硫化物(如硫化铜^[59]、硫化钼^[60]等)因其高光热转化效率、良好的热稳定性和较低的成本而被广泛关注。与小分子有机或者有机纳米材料相比,无机纳米材料具备更佳稳定性且易于改造,并且制备过程更加简便,这使得无机纳米材料在实际应用中更灵活可靠。

Luo 等人利用金银合金纳米颗粒携带庆大霉素,并用 PDA 包裹其表面^[61]。在 NIR 光激发下,金银合金纳米颗粒和 PDA 都会产生光热效应,并同时触发庆大霉素和 Ag^+ 的释放。这个过程会导致原位升温(达到 47°C),并释放抗菌分子。这种组合释放的抗菌分子和药物可以协同作用,对抗生物膜具有更好的效果。

Yan 等人报道了一种用于持续发光成像引导的细菌感染精确光热疗法的核壳纳米材料^[62]。这种纳米材料的制备是通过在持续发光纳米颗粒(PLNPs)表面接枝聚苯胺(PANI)和乙二醇壳聚糖(GCS)来实现的。PLNPs 作为核心,PANI 和 GCS 两种功能性外壳层被修饰在其表面上。该纳米材料具有 pH 依赖的光热转换特性,这意味着当处于酸性环境中时,它能够高效地转化光能为热能,并对细菌感染区域产生显著的热效应。这种特性使得 PLNP@PANI-GCS 能够在酸性区域中精确地进行光热治疗,同时最大程度地减少对正常组织的损伤。

1.2.2 光动力疗法(PDT)

光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)是一种新兴的非侵入性治疗方法,在近年来的细菌感染治疗领域引起了广泛关注。该治疗方法具有高度选择性、无

创性、广谱抗菌活性、低毒性以及几乎可以忽略不计的耐药性，因此备受研究人员青睐^[63, 64]。PDT 主要由两个组成部分构成：激发光源和光敏剂 (Photosensitizer, PS) ^[65]。

光敏剂需要与匹配波长的光相互作用，以产生 PDT 所需的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) ^[66, 67]。ROS 是一类具有高度氧化活性的物质，包括超氧阴离子 ($O_2 \cdot^-$)、羟基自由基 ($\cdot OH$)、过氧化氢 (H_2O_2) 和单线态氧 (1O_2) ^[68]。光敏剂在吸收光子后，从基态单线态转变为高能激发态，并通过两种不同机制启动光化学反应 (图 1-2) ^[69]。在 I 型 PDT 中，被激活的光敏剂直接与邻近的生物基质 (如核酸、蛋白质、脂质或水分子) 相互作用，导致 $O_2 \cdot^-$ 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 生成^[68, 70, 71]。而 II 型 PDT 则涉及从激发的光敏剂向附近分子氧进行能量转移，进而产生高毒性的 1O_2 ，这被认为是主要治疗 ROS 的途径^[72-74]。

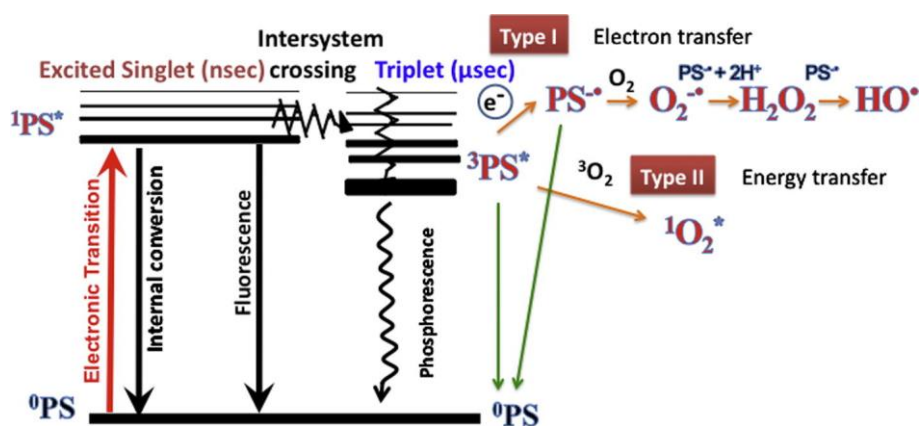


图 1-2. 激发单重态和三重态 PS，II 型能量转移形成 1O_2 ，I 型电子转移形成 $O_2 \cdot^-$ 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ ^[75]

Figure 1-2. The excitation singlet and triplet states PS, with type II energy transfer forming 1O_2 and type I electron transfer forming $O_2 \cdot^-$, H_2O_2 and $\cdot OH$

光敏剂本身对细胞或生物体没有毒性，但它能够吸收光子并与氧分子或水反应，通过能量转移或电子转移机制产生 ROS^[64, 76, 77]。在生物系统中，ROS 起着至关重要的作用，可以保护细胞免受外部入侵者的破坏^[68]。正常情况下，生物体内存在着氧化和抗氧化系统之间的平衡。然而，如果 ROS 浓度增加，这种平衡就会被打破。高水平的 ROS 能够破坏细菌细胞膜，增加膜通透性^[78, 79]，并且与细菌细胞内的蛋白质和核酸反应，导致其结构和功能的损伤，最终导致细菌死亡^[80-82]。

Biel 等人在研究中采用亚甲基蓝作为 PS，使用 670 nm 的非热激活光照射后，发现铜绿假单胞菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的微生物生物膜减少了超过 99%^[83, 84]。此外，Anju 等人报道了孔雀石绿与多壁碳纳米管的偶联，通过产生 ROS 显著破坏了铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的生物膜^[85]。

1.2.3 气体疗法 (GT)

气体疗法 (Gas therapy, GT) 作为一种创新的治疗方法，在近年来的各类疾病治疗中受到了广泛的关注。其中，一些具有生理意义的气体如一氧化氮 (NO)、一氧化碳 (CO)、二氧化硫 (SO₂)、硫化氢 (H₂S) 和氢气 (H₂) 等气体已被开发成为新型的抗菌疗法^[86] (图 1-3)。这些气体之所以能发挥抗菌作用，主要得益于它们超低的分子量，使得它们可以自由地扩散到细菌细胞或生物膜内部，对其产生影响。此外，长期以来，这些气体在哺乳动物和细菌细胞中被认为是重要的活性物质，它们不仅可以调节心脏功能和血管，还充当多功能的细胞信使^[87-89]。具体来说，NO 可以扩张血管、降低血压，并具有抑制细菌生长的效果^[90-93]；CO 能够促进血液循环和细胞再生^[94, 95]；SO₂ 具有抗氧化、抗炎和抗菌的作用^[96-98]；H₂S 能够保护组织器官免受损伤^[99, 100]；而 H₂ 则可具有抗氧化、抗炎和减少细胞死亡的作用^[101, 102]。

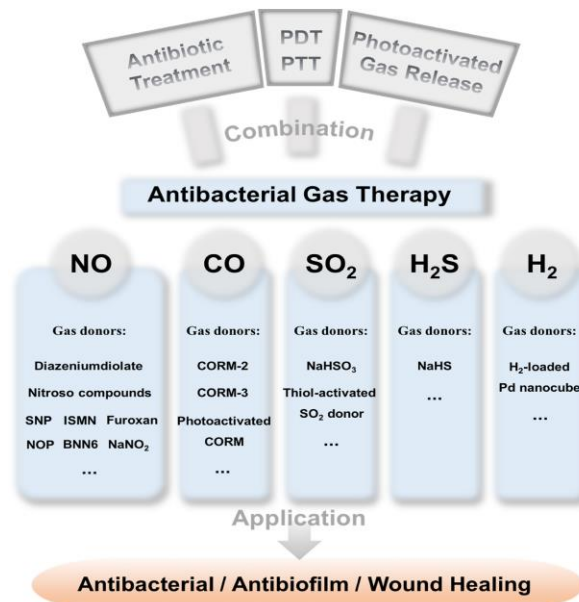


图 1-3.用于抗菌气体疗法和气体联合疗法的典型气体和相应的气体供体^[86]

Figure 1-3. Typical gases and corresponding gas donors for antimicrobial gas therapy and gas combination therapy

在这些气体中, NO 是研究最广泛的内源性气体分子, 在抗感染方面发挥着关键作用。细菌的复杂细胞壁结构使得常规化学药物或纳米药物很难渗透到其内部。然而, NO 具备强大的跨膜能力, 可以进入细菌内部并产生理想的杀菌效果。低浓度下, NO 作为信号分子可以促进免疫细胞的活性; 在高浓度下, 它可以与病原体的 DNA、蛋白质或脂质共价结合以抑制它们^[103]。因此, 很少有细菌能够逃脱 NO 的抗菌作用。此外, 将 GT 与常见的抗菌策略如 PDT、PTT 或抗生素治疗相结合, 可能会提高治疗效果。直接输送外源性气体分子是施用 GT 的最简单方法。然而, 由于这些气体的毒性和不可控性, 在实际生理条件下应用时可能会出现问题。一旦高浓度的气体扩散到空气中, 它们将不可避免地对呼吸系统甚至正常组织造成损害^[104]。因此, 开发可控且有针对性的气体输送系统是必要的, 以确保气态分子的释放在治疗中是安全有效的。

Rouillard 等人报道了一种替代传统抗生素的 NO 释放壳聚糖寡糖(COS/NO)^[105]。该系统采用了 N-二氮二酸一氧化氮供体, 在生理 pH 条件下可以分解为 NO, 并且生成的 NO 还可以进一步转变为一氧化氮自由基 ($\text{NO}\cdot$)、一氧化二氮自由基 ($\text{NO}_2\cdot$)、过氧亚硝酸 (ONOO^-) 和二氧化二氮 (N_2O_2), 通过亚硝酸盐化和氧化应激来扰乱细菌膜结构 (图 1-4)。COS/NO 不仅在游离态和生物膜形态的细菌中表现出满意的抗菌效果, 还增加了细菌对两种传统抗生素 Tobramycin 和 Colistin 的敏感性, 并减缓了抗生素耐药性的发展。这项研究表明, 联合使用 NO 和抗生素可能改善难治性和多重耐药感染的治疗效果。

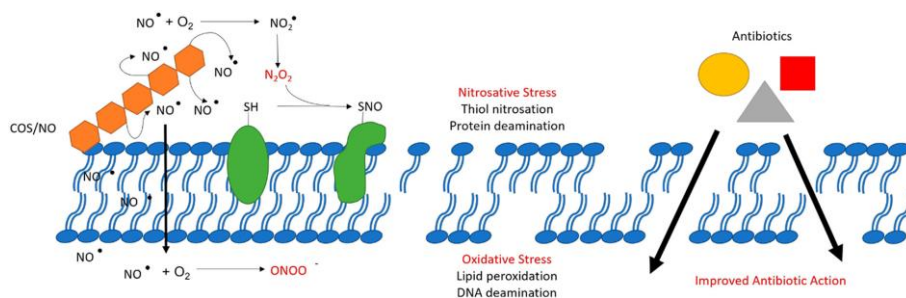


图 1-4.COS/NO 的抗菌效果^[105]

Figure 1-4. Antibacterial effect of COS/NO

1.3 NO 及其生物应用

1.3.1 NO 供体

尽管 NO 被证明可有效杀死细菌和破坏生物膜，但直接将气态 NO 递送至细菌感染部位在治疗上时困难的^[106]。此外，由于外源性气态 NO 具有较短（3-4 s）的半衰期^[107, 108]，因此在抗菌治疗的实际应用中需要不断增加剂量以弥补运输过程中的损失^[109]在过去几十年中，科学家们致力于研究 NO 供体分子，并成功开发数百种 NO 供体分子，在生物学领域得到广泛应用^[86]。这些 NO 供体分子的进展从最初无法控制释放行为逐渐转变为后来更加稳定，在特定条件诱导下才会实现 NO 释放的形式。其中，受到人们广泛关注的是那些在光、X 射线、超声等外部刺激以及 H_2O_2 、 H^+ 、一氧化氮合酶（iNOS）和谷胱甘肽（GSH）等内部刺激下降解产生 NO 的 NO 供体分子。

1.3.1.1 酶响应型 NO 供体

偶氮鎓二醇盐（Diazeniumdiolates, NONOate）是一种在生物医学领域具有重要应用价值的 NO 供体物质^[106]。其化学性质稳定，能够在常温下长时间储存，这为其实用性提供了重要的保障^[106]。偶氮二醇烯酸盐是 NONOate 的核心官能团，具有易于进行化学修饰的特点。通过化学修饰，可以改变其性质，从而延长其半衰期，从几小时到几十小时不等^[110]。这种特性使得 NONOate 能够在体内缓慢释放 NO，从而提高其供体的稳定性。此外，偶氮二醇烯酸盐中含有的二酸酯基团，在与水接触后可以自发地释放两分子 NO^[111]。这种释放量相较于其他供体而言有所增加，这使得偶氮鎓二醇盐在 NO 释放方面具有更高的效率^[106]。这种特性使得 NONOate 在血管扩张、神经保护、免疫调节等方面具有广泛的应用前景。

Reynolds 和 Hibbard 等人合成了一组硝基芳香族保护的哌嗪二氮二酸盐衍生物（253-255），作为新型抗菌酶活化前药（图 1-5）。这些二氮二酸盐被细菌硝基还原酶激活，加速了一氧化氮的释放速率。他们还评估了合成化合物对大肠杆菌的抗菌性能，并发现细菌数量减少了 94%。这项研究结果表明了抗生素 NO 释放前药的潜在应用^[112]。

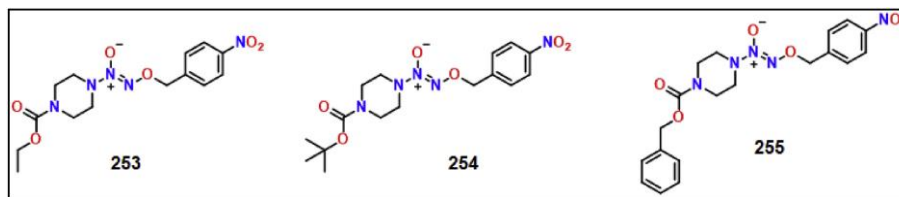


图 1-5.不同的酶激活 NO 供体 (253-255) [112]

Figure 1-5. Activation of NO donors by different enzymes (253-255)

1.3.1.2 H₂O₂ 响应型 NO 供体

L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 是一种来源于自然界的 NO 供体物质, 具有显著的生物活性和生物相容性。在人体内, 通过一氧化氮合酶 (NOS) 的作用, L-Arg 可以转化为无毒的 L-瓜氨酸和 NO^[113]。与 NONOate 相比较而言, L-Arg 具备明显优势, 因为它不会产生任何有毒副产物。此外, 当与高氧化性物质如 H₂O₂ 和单线态氧 ¹O₂ 发生反应时, L-Arg 能够产生 NO^[114]。这种反应在生物体内具有重要意义, 因为它有助于维持细胞内部的氧化还原平衡, 并保护细胞免受氧化应激损伤。利用 L-Arg 为供体制备的 NO 释放纳米材料可在细菌生物膜微环境下作用, 产生高浓度 NO 可高效的杀灭耐药细菌^[115]。

Yu 及其同事报道了一种包埋 L-Arg 和 H₂O₂ 的水凝胶 (L-Arg@Hydrogel/H₂O₂), 用于治疗细菌感染和促进伤口愈合^[116]。这种水凝胶是通过将 N¹-(4-硼代苯基)-N³-(4-硼代苯基)-N¹,N¹,N³,N³-四甲基-1,3-丙二氨 (TSPBA)、聚乙烯醇 (PVA) 和 L-Arg 混合而成的。在 H₂O₂ 的刺激下, L-Arg 能持续产生 NO。研究表明, 产生的 NO 不仅可以引导巨噬细胞和成纤维细胞趋向伤口, 还能促进胶原合成, 从而实现伤口的快速愈合和皮肤再生。

1.3.1.3 光响应型 NO 供体

光作为外部刺激源具有非侵入性、低成本和实用性等优势, 尤其是 NIR 光, 它具有较小的毒副作用并能更深地穿透组织^[117, 118]。由于生物组织对 NIR 光吸收和散射相对较弱, 在进行 NIR 光区域成像时可以有效减少背景干扰, 因此备受研究人员青睐^[119, 120]。

通过利用光刺激来触发供体分子释放 NO, 可以实现对生物体内 NO 含量的精确调控。这种方法不仅能够实现时空可控的准确释放, 还可以通过调节光照时间和强度来控制 NO 的释放速率和数量, 为生物医学研究和临床治疗提供了新的

可能性。光响应性 NO 供体主要包括硝基类化合物、金属亚硝酰类化合物和亚硝胺类化合物等。其中，硝基类化合物如 6-硝基苯并芘、2,6-二甲基硝基苯衍生物以及邻位带有大位阻基团（如甲基、三氟甲基）的邻硝基三氟甲苯衍生物，在受到光照后会发非平面扭转构象，并在分子内部进行重排生成亚硝酸酯结构。随后，通过 O-N 键裂解反应释放出 NO^[121]。

Fukuhara 等人合成了一种光不稳定的 6-硝基苯并[α]吡啶，(6-硝基 BaP)(48)，在可见光照射下释放 NO（图 1-6）^[122]。然而，这种 NO 供体通过裂解 DNA 而成为诱变性或致癌性。Miyata 等人开发了一种具有扩展 π 共轭体系的 4-取代-2,6-二甲基硝基苯衍生物(49-64)在紫外线和可见光照射下可以有效释放 NO^[123-127]。

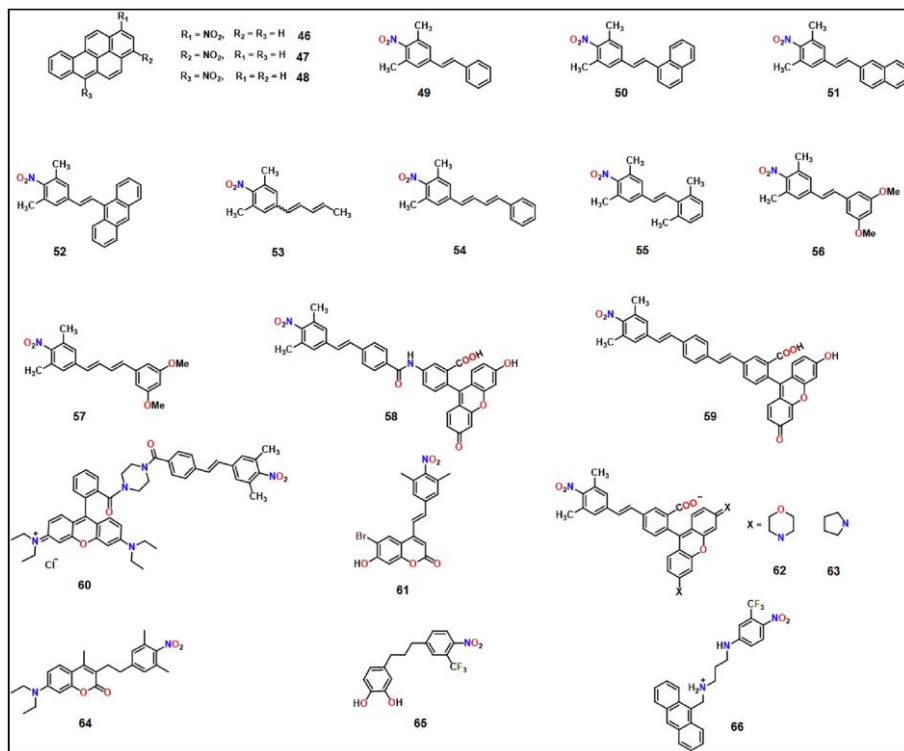


图 1-6.光响应硝基苯衍生物（46-66）在紫外光和可见光下释放 NO 的示意图

Figure 1-6. Schematic diagram of nitrobenzene derivatives (46-66) releasing NO under UV and visible light

1.3.1.4 pH 响应型 NO 供体

细菌在生物膜内部形成的微环境是高度酸性的，这种环境能够促进细菌的存活和繁殖。当细菌处于这种微环境中时，它们会通过产生酸性代谢物来维持自身的生存。这些代谢物会在生物膜内部积累，并且由于生物膜的缺氧特性，它们很

难被氧化或分解。因此，这些代谢物会持续存在于生物膜内部，并且会进一步增加生物膜内部的酸浓度。利用生物膜与正常环境中 pH 的差别，设计合成酸性 pH 响应的 NO 供体^[128]。

Lee 等人通过将酸响应性 NO 供体亚硝基谷胱甘肽 (GSNO) 加载到以酸响应性碳酸钙 (CaCO_3) 为内核的纳米粒子中，成功实现了一种新型纳米载体的构建。在这个纳米粒子中，GSNO 作为主要活性成分，可以在酸性环境下被有效地释放和活化。具体来说，当这种纳米粒子进入酸性环境后，由于 CaCO_3 的溶解，GSNO 会随之被释放。GSNO 在酸性条件下可以生成 NO。通过调节 CaCO_3 的酸响应性能，可以实现对 GSNO 释放的精确控制，从而为 NO 在特定生理环境和疾病治疗中的精确调控提供了可能^[129]。Ren 等人通过在 CuS/CaCO_3 核/壳纳米颗粒上覆硝酸异山梨酯 (ISDN)，开发了一种智能 pH 响应型一氧化氮纳米发生器 (图 1-7)。该纳米平台利用 CaCO_3 的酸性分解和涉及 CuS 纳米颗粒的酶模拟氧化还原过程，针对感染糖尿病细胞内部的酸性环境，协助 ISDN 实现了 pH 响应型 NO 释放。这种材料不仅可以有效灭活生物膜细菌，还能促进血管生长和组织再生，在加速糖尿病创面愈合方面具有潜力^[130]。

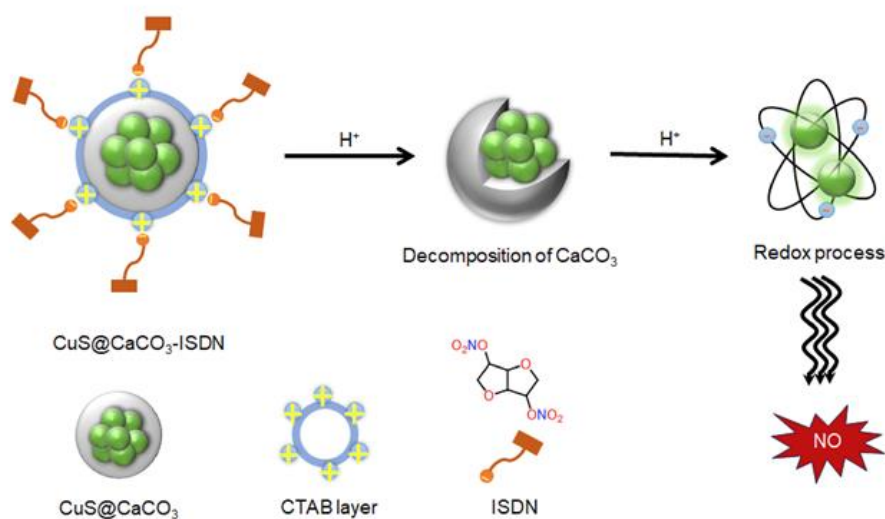


图 1-7.核/壳纳米发电机 $\text{CuS}@\text{CaCO}_3\text{-ISDN}$ 的 pH 敏感型一氧化氮释放^[130]

Figure 1-7. pH-sensitive nitric oxide release from the core/shell nanogenerator $\text{CuS}@\text{CaCO}_3\text{-ISDN}$

1.3.2 NO 的检测方法

对于 NO 供体, 需要使用定性分析方法检测其存在和释放特性。常见的检测技术包括 Griess 试剂法、荧光探针法和化学发光法等。

1.3.2.1 Griess 试剂检测

由于 NO 极易被氧气氧化成二氧化氮 (NO_2), 这导致了对 NO 的检测变得困难。进一步地, NO_2 与 NO 溶于水生成亚硝酸根离子 (NO_2^-), 这使得直接检测 NO 几乎不可能。在实验室中, 通常使用 Griess 试剂来间接检测 NO^[131]。在这种方法中(图 1-8), 首先将 NO_2^- 在酸性介质中与重氮试剂(如磺胺(SA))反应, 生成瞬态重氮盐。然后, 将该中间体与偶联试剂 N-萘乙二胺(NED)进行反应, 形成稳定的偶氮化合物^[132], 整个反应过程如图 1-8 所示^[133]。该偶氮化合物在波长为 540 nm 处的吸光度与样品中亚硝酸盐浓度呈线性正比关系^[134]。待测样品进入实验环境后, 通过比较其吸光度与标准曲线的吸光度来定量待测样品中的 NO 含量。此外, 在进行测试过程中, NO 和 O_2 的反应可能会生成一些其他衍生物, 如硝酸盐 (NO_3^-), 由此可能导致测试结果显示较低^[135]。然而, Griess 试剂检测法由于其低成本和简便操作等优势, 依然是一种被广泛应用的检测方法。

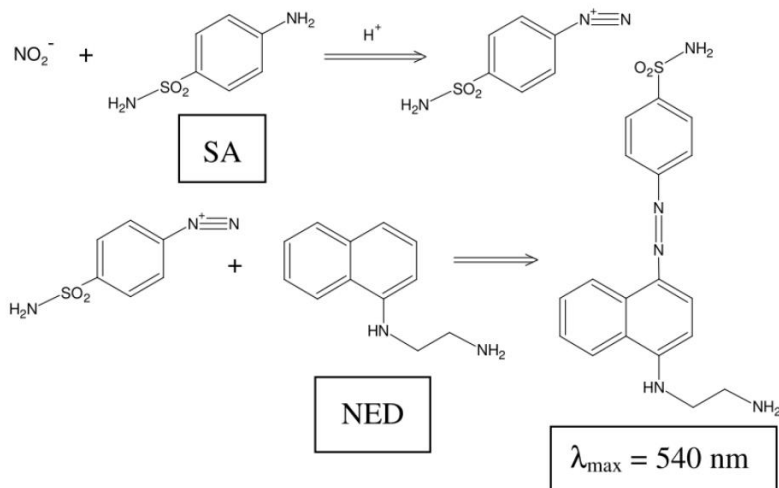


图 1-8. Griess 试剂检测的反应过程^[133]

Figure 1-8. Reaction process detected by Griess reagent

1.3.2.2. 荧光探针检测

目前, 荧光探针检测法也已成为许多实验室首选方法, 因其相较于传统试剂

检测法拥有更高的灵敏度和更广泛的应用范围^[136]。与 Griess 试剂检测法相比，荧光探针检测法展现出更高的灵敏度。NO 荧光探针能够实时、准确地检测生物体内 NO 的浓度和分布情况^[137]。NO 荧光探针本身不具备荧光特性，但当它与 NO 氧化产物（如 N_2O_3 ）发生反应时，会出现荧光增强的现象，这使得我们能够清晰地观察到 NO 的生成和代谢过程^[135]。通过这种荧光增强现象，我们可以有效地监测和研究 NO 在生物体内的时空分布以及其参与的生理生化过程。

最常用的荧光试剂是 2,3-二氨基萘（DAN），它通过与 NO 反应结构发生变化生成 N-硝化剂 2,3-萘三唑，从而产生荧光信号^[135, 138]。这个荧光信号可以被用来监测和测量样品中的 NO 含量，荧光信号的强度与 NO 的浓度成正比，因此可以利用荧光信号的变化来确定 NO 的浓度^[139, 140]。

另一种名为 4,5-二氨基荧光素（DAF）的荧光试剂也被证明在检测 NO 方面同样有效^[141]。与 DAN 相似，DAF 经历 NO 介导的结构改变和反应，并且在这个过程中发出荧光信号。在这类分子中，两个氨基起到电子给体的作用；当氧化剂存在时，NO 可以对氨基团进行氧化，形成一种荧光衍生物三唑荧光素（DAF-2T）^[142, 143]。DAF-2T 的荧光发射波长位于可见光谱范围内^[144]，因此可以通过荧光显微镜或荧光分析仪来测量其荧光信号强度，以研究 NO 在细胞和生物系统中的时空动态变化。

1.4.2.3. 化学发光法

与 Griess 试剂检测法相比，化学发光检测法在时间分辨率和检测限方面表现更出色，这使得该方法成为纳摩尔浓度级别下检测 NO 的黄金标准^[145]。其测试原理的核心过程可以概括为：臭氧（ O_3 ）与 NO 发生化学反应，生成激发态的 NO_2 ，当它衰变回其基本低能态时，它就会自发的发射光子^[146]。具体来说，这个过程中涉及到惰性气体的作用，例如氮气、氩等，在其载带下将 NO 样品输送至 O_3 位置。在此处，NO 与 O_3 反应生成激发态的 NO_2 。然后通过弛豫过程释放一个光子最终回到基态。在此过程中可利用光电倍增管检测所发出之光信号范围介于 600-875 nm 之间^[134]。值得注意的是检测信号强度与样品中存在的 NO 量成正比关系，即通过测量信号强度我们能准确了解样品中 NO 含量。

化学发光法是一种高度敏感且实时监测 NO 的方法，具有快速而可靠的结果

[138]。然而，该方法并不适用于体内监测 NO 的情况。另外，O₃ 气流可能会对检测过程产生干扰，因为 O₃ 发生器无法提供稳定而可重复的气流环境[138]。

1.3 NO 的生物应用

NO 作为一种微量的气体信号分子，广泛存在于人体的各个组织和细胞中[147]。由于其独特的生物学功能和广泛的应用前景，1992 年，《Science》杂志将其评选为明星分子。NO 参与多种生理过程，包括血管生成[148]、抗凋亡、抗炎症[149-151]、血小板活化[152, 153]、抗血栓形成、血管舒张[154-156]和免疫反应[157-159]。然而，虽然 NO 对人体具有重要作用，但其功能受浓度的影响，过量的 NO 可能对人体产生不良影响[160]。因此，对 NO 的研究和应用需要更加深入和精细化，以实现其生物学功能的最大化利用。

1.3.1 抗菌

NO 在免疫系统中扮演着重要角色，协助机体对抗细菌感染。它与 O₂ 或 ROS 中间体（如超氧化物或 H₂O₂）发生反应，产生一系列具有氧化或亚硝化作用的物质，如过硝酸盐、NO₂、三亚硝基五环戊二烯等。这些活性物质能够与细菌的蛋白质、DNA 和代谢酶相互作用，从而导致细菌结构和功能的严重破坏，最终达到抑制和杀灭细菌的目的。

NO 的抗菌作用机制非常复杂多样，首先 NO 可以引起细菌 DNA 的化学变化，如诱导 DNA 碱基修饰和断裂，干扰细菌的遗传信息传递和复制过程。其次，NO 能够抑制 DNA 修复酶的活性、进一步削弱细菌修复受损 DNA 的能力。此外，NO 还能够引发细菌膜的脂质过氧化，破坏细菌膜完整性，导致细胞内部物质泄漏。此外，NO 与血红素的相互作用也可导致细菌的氧合反应受阻，降低细菌的能量代谢活性。通过这些多重抗菌机制，NO 能够耗尽细菌内部的铁元素，削弱细菌的生存能力。由于 NO 的抗菌机制相对复杂，并且攻击细菌的多个关键目标，细菌很难产生对 NO 的耐药性。因此，NO 被认为是一种有前景的抗菌治疗药物，可以有效应对传统抗菌药物所面临的耐药性问题[161-164]。

Howlin 及其同事的研究结果表明，在亚微摩尔浓度下，NO 能有效治疗囊性纤维化中铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa*）感染，并显著降低 *P. aeruginosa* 对 Tobramycin 和 Tobramycin 联合 Ceftazidime 的耐药性[165]。这项研究为囊性纤

维化患者提供了一种新的治疗方案。通过适量使用 NO，可以有效控制感染，减少耐药性的发生。

生物膜是由微生物构成的复杂结构，常存在于感染部位。胞外多糖是生物膜中的重要成分之一，提供保护作用，并增强微生物对抗药物的耐药性。然而，Huang 等人的研究发现，使用 NO 对生物膜进行预处理后，可以减少生物膜胞外多糖的含量，削弱生物膜的保护作用，使得 Ofloxacin 等治疗药物更容易渗透到感染部位，提高治疗效果^[165]。

1.3.2 伤口愈合

伤口愈合是一个复杂而井然有序的过程，涉及多个步骤和细胞类型的相互作用，包括炎症反应、细胞增殖、细胞外基质的沉积和组织重塑^[166, 167]。NO 在皮肤创面愈合和组织再生中具有重要作用，其浓度对其功能起决定作用^[160]。在人类角质形成细胞的原代细胞培养中，低浓度的 NO 可以促进细胞增殖，并抑制细胞分化。相反，较高浓度的 NO 则会抑制角质形成细胞的增殖，并诱导其分化。通过类似实验在人类皮肤成纤维细胞上进行研究发现，NO 浓度的增加与细胞增殖能力的下降相关^[168]。此外，NO 还能直接调节胶原合成代谢^[169, 170]，且不受基质金属蛋白酶（MMP）和金属蛋白酶组织抑制物（TIMP）活性的影响。因此，抑制酶促 NO 合成会显著减少大鼠的胶原合成，从而延缓创面收缩。相反，在健康大鼠体内转染诱导型一氧化氮合酶互补 DNA（iNOS-cDNA）会导致皮肤创面中胶原积累增加，因为这会增加 NO 的生成^[171]。

根据 Albina 等人的研究发现，在创面愈合过程中，L-Arg 的代谢会显著增加，因为 L-Arg 会分解为 NO 和瓜氨酸^[172]。考虑到 Albina 等人的研究，一些研究人员在创面上使用补充 Arg 的治疗方法，发现这种治疗可以加速创面愈合过程^[173]。另外的研究中，Smith 等人观察到，受损大鼠的尿液中硝酸盐的含量显著增加，这与创面愈合过程中 NO 的生成有关^[174]。Bulgrin 等人的研究结果也支持了这一观点^[175]。他们发现给大鼠喂食低量的 Arg 会导致硝酸盐生成减少，从而降低 NO 的含量。然而，给大鼠喂食高浓度的 Arg 富集饮食可以在整个创面愈合过程中保持较高水平的硝酸盐，进一步证实了 NO 与创面有关。Shi 等人对糖尿病大鼠进行的实验也证实了 L-Arg 对创面愈合的促进作用，并增加了创面液中硝酸盐/亚

硝酸盐的产生^[176]。

Xu 等人设计了一种纳米平台，用于协同释放 NO 和铜离子 (Cu^{2+})，以加速糖尿病创面的愈合^[177]。制备的纳米复合材料可以在创面部位进行释放 NO，从而促进血管生成、胶原沉积和内皮细胞生长。这些过程的加速有助于提高糖尿病创面的愈合速度。与此同时，这种纳米平台的释放过程不会引发炎症反应，因此具有较好的生物相容性^[178]。该研究为糖尿病创面治疗提供了一种新的方法。

Yeh 等人研究了一种负载 NO 的普鲁士蓝纳米立方体 (PBNO)^[179]。通过多次向创面注射 PBNO 胶体，并在接下来的治疗中使用 NIR 光照射，成功改善了创面的血液灌注情况。这种治疗方法可实现对血液灌注的可控改善，进而有效促进血管生成和胶原沉积。这项研究为创面治疗提供了一种新的策略，有望在促进创面修复和愈合过程中发挥重要作用。

1.4 选题设计及研究内容

1.4.1 课题设计思路

细菌感染疾病作为一项严重的公共卫生问题，已经在全球范围内引起广泛关注。由于其高发病率和高死亡率，这类疾病对人类健康构成了巨大威胁。传统抗生素给药模式在治疗细菌感染时面临着一系列问题，这些问题严重影响了治疗效果并给患者带来了不必要的风险和不适。此外，传统抗生素在已形成的生物被膜内渗透性较差，这使得它们难以渗透到感染部位，无法有效地消灭细菌。因此，迫切需要开发具有小剂量、长疗效和优异生物相容性的高效抗生素替代品，以减轻抗生素耐药性增加。

我们设计了以 L-Arg 为 NO 供体的抑菌药物体系。以 CaO_2 为核，在其表面通过自聚合包裹形成一层 PDA，最后再利用席夫碱反应或迈克尔加成在其表面吸附 L-Arg，最终形成了 L-Arg- CaO_2 @PDA (A-Ca@PDA) 纳米复合材料。PDA 具有酸敏性，在生物膜酸性微环境中可以裂解，释放其中的 CaO_2 ， CaO_2 在酸性环境中与水反应释放 H_2O_2 ，随后 H_2O_2 催化 L-Arg 生成 NO。同时 PDA 还有优良的光热效果，经 808 nm 激光照射后可以达到较高的温度。最终实现 NO 联合光热疗法共同治疗耐药菌感染。

为了进一步增强纳米材料中 L-Arg 的 NO 释放效果，我们选择了可以产生更

多 ROS 的光敏剂 IR780 来进行实验。以 MoS₂ 纳米花为载体, 通过静电吸附作用在其表面吸附 L-Arg 和 IR780, 最终制备出了 L-Arg/IR780@MoS₂ (AI-MoS₂) 纳米复合材料。IR780 和 MoS₂ 都对 808 nm 激光很敏感, IR780 经 808 nm 激光照射后可以产生 PTT 和 PDT 效果, MoS₂ 经 808 nm 激光照射后也会呈现出较好的光热效果。而 MoS₂ 纳米花具有尖锐的棱角, 在于细菌接触时可以对其细胞膜造成损伤。IR780 经 808 nm 激光照射后会迅速产生 ROS, 有效催化 L-Arg 产生 NO。最终 AI-MoS₂ 在 808 nm 激光作用下, 实现 NO 联合 PTT 和 PDT 协同抑制耐药菌。

1.4.2 主要研究内容

细菌耐药性的发展使得一些抗生素对其的作用效果减弱, 尤其是耐药菌的不断进化, 还会形成低 pH、高谷胱甘肽、缺氧的生物膜微环境来保护细菌, 削弱抗生素的治疗效果。纳米材料凭借其尺寸小, 治疗方法多样等优势, 有望克服抗生素耐药所面临的障碍。本文基于可以释放 NO 的 L-Arg 为核心, 并将 NO 疗法与光热疗法和光动力疗法相结合, 设计了两种纳米复合材料, 并选用典型的革兰氏阴性菌-多重耐药大肠杆菌 (MDR *E. coli*) 和革兰氏阳性菌-多重耐药金黄色葡萄球 (MDR *S. aureus*) 菌来检测它们的抗菌效果。主要研究内容如下:

(1) 基于 L-Arg 为供体释放 NO 联合光热抑制耐药菌研究

在碱性环境下 CaCl₂ 与 H₂O₂ 反应合成 CaO₂ 纳米颗粒, 随后利用氧化自聚合在 CaO₂ 表面包裹上一层 PDA, 再利用席夫碱反应或迈克尔加成将 L-Arg 与外层 PDA 相接, 最终合成出可以有效清除耐药菌感染及促伤口愈合的纳米复合材料。使用 SEM、TEM、FT-IR、粒径、Zeta 电位、XPS 等手段证明纳米颗粒成功合成并表征其结构特点。以 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 为模型细菌, 使用 CFU、MIC、荧光染色、流式细胞术等试验评估 A-Ca@PDA 的抑菌效果, 通过 SEM 观察纳米颗粒对细菌细胞的破损情况, 通过生物膜实验评估纳米颗粒对耐药菌生物膜的消融效果。通过溶血实验和细胞毒性实验评估纳米颗粒的生物相容性后进行体内抑菌实验, 评估纳米颗粒对小鼠伤口周围感染细菌的抑制效果和促伤口愈合效果。

(2) 基于 L-Arg 为供体释放 NO 联合光热/光动力抑制耐药菌研究

通过水热法合成 MoS_2 纳米花，利用静电吸附作用负载 NO 供体 L-Arg 和光敏剂 IR780，实现 NO 联合温和 PTT/PDT 进行杀菌。通过 SEM、TEM、UV-Vis、FT-IR 等手段表明纳米颗粒的合成并表征其结构特点。以 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 为模型细菌，使用 CFU、荧光染色等试验评估 A-Ca@PDA 的抗菌效果，通过生物膜实验评估纳米颗粒对耐药菌生物膜的消融效果。通过细胞毒性和溶血实验评估纳米颗粒的生物相容性。

第 2 章 基于 L-Arg 为供体释放 NO 联合光热抗耐药菌研究

2.1 引言

近年来, 抗生素的过度使用和滥用, 使得细菌对这些药物的耐药性不断增强, 新型耐药细菌不断出现, 这使得原本已经缓解的细菌感染问题再次变得严重起来^[180]。这种迅速升级的威胁促使人们迫切需要创造新的治疗策略和具有多种抗菌功能的抗菌材料来对抗耐药细菌^[181, 182]。近年来, 基于纳米材料的 NIR 介导的光疗因具有减轻组织验证的优点而被认为是一种很有前途的抑菌策略^[183]。由于 NIR 介导的光疗仍处于发展阶段, 单一的治疗方法会耐药菌抗菌治疗的效果并不理想, 因此需要采用一些联合的方式来实现有效抑菌。

NO 作为一种内源性气体分子, 具有显著的杀菌特性, 同时还能保持正常组织的完整性, 防止其遭受破坏。即使在浓度较低的情况下, 一氧化氮的抗菌活性也十分显著, 使其成为传统抗生素的一种有前景和可行的替代品。研究显示, L-Arg 可以通过与 ROS 反应产生 NO 和 L-瓜氨酸, 从而有效对抗生物膜, 其在体内的有效性和特异性均得到了显著提高。然而生物膜微环境中无法提供足够的 ROS 氧化 L-Arg。为解决这个问题, 引入了 CaO_2 纳米粒子, 它能够在生物膜酸性环境下能够发生水解, 并释放出具有强氧化性的过氧化氢, 以此来实现 NO 的产生。

本章合成了一种名为 L-Arg- CaO_2 @PDA (A-Ca@PDA) 的新型纳米复合材料, 该材料对 NIR 光和 pH 变化具有极高的敏感度。当纳米颗粒处于生物膜微环境时, PDA 外壳对 pH 的敏感性会导致其降解, 从而使 CaO_2 暴露于该环境中。 CaO_2 的水解释放出 H_2O_2 , 进而催化 L-Arg 转化为 NO 气体。这种 NO 气体的产生能够有效破坏生物膜的完整性, 削弱其保护性胞外聚合物物质机制对细菌的保护作用, 从而使细菌更容易受到外部条件的影响。此外, 当 A-Ca@PDA 纳米颗粒受到 NIR 光照射时, 会诱导局部热疗, 从而加速 NO 的释放。这种 NO 气体的释放与 PTT 相结合, 具有显著的抑菌特性, 能够有效消融生物膜, 并清除浮游细菌。

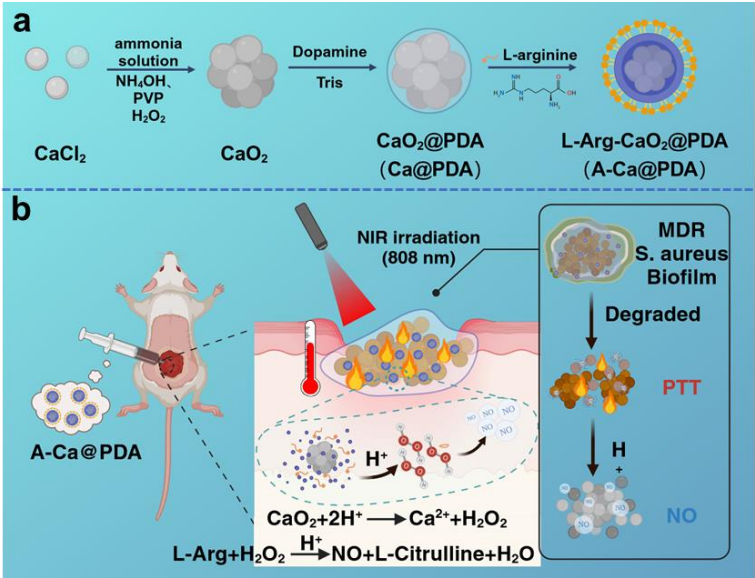


图 2-1.A-Ca@PDA 合成及其生物被膜微环境中 NO 释放及光热联合抑菌治疗示意图

Figure 2-1. A-Ca@PDA synthesis and NO release in the biofilm microenvironment and photothermal combined antibacterial therapy diagram

2.2 实验材料

2.2.1 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagent

试剂名称	生产厂家
无水氯化钙 (CaCl_2)	阿拉丁生化科技有限公司
聚乙烯吡咯烷酮	阿拉丁生化科技有限公司
氨水 ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28wt.%)	阿拉丁生化科技有限公司
过氧化氢 (H_2O_2 , 30wt.%)	阿拉丁生化科技有限公司
聚乙二醇-200 (PEG-200)	阿拉丁生化科技有限公司
盐酸多巴胺 ($\text{DA} \cdot \text{HCl}$)	阿拉丁生化科技有限公司
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	阿拉丁生化科技有限公司
L-精氨酸 (L-Arg)	阿拉丁生化科技有限公司
溴化钾 (KBr)	阿拉丁生化科技有限公司
活/死细菌检测试剂盒	阿拉丁生化科技有限公司

无水甲醇

国药集团化学试剂有限公司

无水乙醇

国药集团化学试剂有限公司

2.2.2 实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental equipment

仪器名称	型号	生产厂家
冷冻干燥机	FD8-3	美国 SIM 公司
恒温磁力搅拌器	SZCL-2	上海岐耀设备有限公司
紫外可见分光光度计	UV-3600	日本岛津公司
荧光分光光度计	RF-5301PC	日本岛津公司
傅立叶红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
透射电子显微镜	HT-7800	日本日立公司
流式细胞仪	CytoFLEX	贝克曼有限公司
激光粒度仪	Mastersizer 3000	美国 Malvern 公司
荧光显微镜	DM2500 LED	德国莱卡公司
X 射线衍射仪	D8 Advance	德国布鲁克公司
X 射线光电子能谱仪	AXIS ULTRA OLD	日本岛津公司
高速冷冻离心机	Z 326k	德国赫姆勒公司
超净工作台	BJ-2CD	上海博迅医疗生物有限公司

2.2.3 菌株及小鼠来源

表 2-3.菌株来源

Table 2-3. Sources of strains

类别	非耐药细菌	耐药细菌	公司
革兰氏 阴性菌	<i>E. coli</i> ATCC11303	<i>E. coli</i> MG1655	商城北纳创联生 物科技有限公司
革兰氏 阳性菌	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> NCTC8325	商城北纳创联生 物科技有限公司

实验小鼠来自南京大学模型动物研究中心，品系为昆明小鼠。所有实验动物的饲养和处理均按照苏州大学（位于中国苏州）的动物护理批准号：202310A415的要求进行，并且符合《动物福利法》和《实验动物护理和使用指南》的相关协议。

2.3 实验方法

2.3.1 材料合成与表征

2.3.1.1 材料合成

（1）合成 CaO₂

CaO₂ 的合成采用了一种先前记录技术的改进版本。^[184]在这个方法中，CaCl₂ 和 H₂O₂ 在 PVP 作为稳定剂的情况下反应。为了保持均匀性，将 75.00 mgCaCl₂ 和 35.00 mgPVP 溶解在 15.00 mL 无水乙醇中，然后进行 5 min 的超声波处理。随后，通过加入 1 mLNH₄OH（0.80 M）并充分搅拌，形成碱性环境。通过离心，以 9000 r/min 的速度离心 15 min，收集所得沉淀。之后用无水乙醇进行三次洗涤，以 12,000 r/min 的速度离心 10 min，获得最终产品。最终，将沉淀物在 50℃ 的温度下真空干燥约 4-6 h，获得 CaO₂ 纳米粒子。

（2）合成 CaO₂@PDA

采用氧化自聚合方法，通过在碱性条件下将 PDA 包覆在 CaO₂ 表面，成功制备出了一种具有优异性能的 CaO₂@PDA（Ca@PDA）复合材料。^[185]首先，将 20.00 mg CaO₂ 在 100 mL 的无水乙醇中充分溶解，以保证后续反应的顺利进行。为了调节溶液的 pH 值加入 0.50 mg 的 Tris，通过充分搅拌，确保 Tris 能均匀分散在

溶液中。接着，加入 10.00 mg 盐酸多巴胺，在室温下，搅拌 12 h。通过多巴胺的氧化自聚合，将其牢固地包覆在 CaO_2 表面，形成 Ca@PDA 复合材料。通过离心过程，在 12,000 r/min 下离心 10 min，成功获得 Ca@PDA 复合材料。随后，用无水乙醇洗三次，50℃下真空干燥 4 h，以确保其最大纯度和完全干燥。

(3) 合成 A- Ca@PDA

在 PDA 层的外表面通过希夫碱反应或迈克尔加成法使用 L-Arg 进行化学修饰。首先，将 10.00 mg L-Arg 溶解在 Tris-盐酸 (pH 8.5, 10.00 mM) 缓冲液中，这样可以保证反应环境的稳定和适宜。接着，将 5.00 mg Ca@PDA 分散到溶液中，这样可以使 Ca@PDA 与 L-Arg 充分接触，提高反应效率。在室温下，将混合溶液搅拌 12 h 后，以 12000 r/min 的速度离心 10 min。随后进行三次水和乙醇洗涤，这样可以去除杂质和未反应的物质，提高产物的纯度。洗涤完成后，在 50℃ 真空条件下进行干燥，得到 A- Ca@PDA 。

2.3.1.2 材料表征

(1) 扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM) 表征

用移液枪分别吸取少量 CaO_2 、A- Ca@PDA NPs 水溶液，滴加到硅片上，自然晾干后，通过 SEM 对制得的样品进行形貌分析。

(2) 透射电镜 (Transmission electron microscopy, TEM) 表征

取适量分散均匀的 A- Ca@PDA 纳米颗粒溶液，将铜网准备好并放置在平坦的表面上，确保其干净且无任何杂质，用滴管其滴在铜网上，将铜网置于室温下，自然风干后进行 TEM 表征分析。

(3) 动态光散射粒径及 Zeta 电位表征

分别称取少量 CaO_2 、PDA、L-Arg、 Ca@PDA 、A- Ca@PDA NPs 粉末，超声使其均匀分散在超纯水中。将 2.00 mL 的样品按顺序分别注入样品池，并使用动态光散射激光纳米粒度仪测量其颗粒尺寸和 Zeta 电位。

(4) 傅里叶红外光谱 (Fourier Transform infrared spectroscopy, FT-IR) 表征

使用红外分光光度计采集 FT-IR 数据，波长范围扫描为 $3600\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ 。将适量的 KBr 粉末加入已经擦拭烘干的玛瑙研钵中，并与 CaO_2 、L-Arg、 Ca@PDA 和 A- Ca@PDA NPs 分别混合后细致地碾磨成均匀颗粒的粉末。然后，采用压片法制

备适中厚度且透明的样品片进行检测。

(5) X 射线衍射 (X-ray Diffraction, XRD) 表征

在玛瑙研钵中对干燥的 CaO_2 进行了研磨处理, 然后将其转移到测试皿中, 使用 XRD 对材料的结构进行测试。

2.3.2 体外性能表征

2.3.2.1 光热性能分析

为了深入探究 A-Ca@PDA NPs 的光热性能, 首先在激光功率密度为 1.5 W/cm^2 的 808 nm NIR 光下照射 6 min , 每隔 30 s 拍摄记录。通过观察温度变化情况, 绘制不同浓度 (0 、 50 、 100 、 150 、 200 、 $300 \mu\text{g/mL}$) A-Ca@PDA NPs 悬浮液的升温曲线, 以此分析光热效应与浓度的关系。为了进一步揭示 A-Ca@PDA NPs 的光热性能与激光功率密度之间的关联, 对 A-Ca@PDA NPs 分别使用 808 nm 不同功率密度 (0 、 0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 W/cm^2) 的 NIR 光照射 6 min , 每 30 s 拍摄一次记录。根据以上结果绘制温度升高和降低的曲线, 通过对比分析不同功率密度下光热效应的差异, 可以更加准确地评估 A-Ca@PDA NPs 的光热性能。利用现行方法计算 A-Ca@PDA NPs 的光热转换效率^[186, 187]:

$$\eta = \frac{hS(T_{\max} - T_{\text{amb}}) - Q_{\text{dis}}}{I(1 - 10^{-A_{808}})} \quad \text{公式 (1)}$$

$$hS = \frac{mC_{\text{water}}}{\tau_s} \quad \text{公式 (2)}$$

$$\tau_s = -\frac{t}{\ln \theta} \quad \text{公式 (3)}$$

$$\theta = \frac{T - T_{\text{amb}}}{T_{\max} - T_{\text{amb}}} \quad \text{公式 (4)}$$

式中, h : 热传递系数, $\text{W}/(\text{m}^2 \cdot \text{K})$; S : 石英皿的表面积, mm^2 ; $T_{\max}$: 平衡温度, $^{\circ}\text{C}$; T_{amb} : 周围环境温度, $^{\circ}\text{C}$; Q_{dis} : 石英皿和水在单位时间内吸收的能量, mW ; I : NIR 光密度, mW ; A_{808} : 已知浓度 A-Ca@PDA NPs 悬浮液在 808 nm 处的吸光值; C_{water} : 水的比热容。

2.3.2.2 NO 释放表征

使用 NaNO_2 (6.25 、 12.50 、 25.00 、 50.00 、 $100.00 \mu\text{M}$) 建立 NO 的标准曲线, 使用 Griess 试剂 (0.10%) 测定 NO 的产生情况。在实验设计中, 设置了三个变量, 分别是不同的 pH 环境、是否经 808 nm 激光照射和溶液浓度。通过改变这

三个变量,可以在不同溶液 pH 环境下,测定同一 A-Ca@PDANPs 浓度 (150 μ g/mL) 在激光或不加激光照射下的 NO 产量。在同一激光功率 (1.5 W/cm²) 刺激下,测定不同 A-Ca@PDANPs 浓度 (100、150、200 μ g/mL) 在 5 h 内的 NO 产量。将 A-Ca@PDANPs 均匀分散在 PBS 中,激光照射后迅速加入 Griess 试剂, Griess 试剂与 NO 反应,形成重氮化合物,从测量 524 nm 处的吸光值。

2.3.3 体外抑菌实验

2.3.3.1 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

对 *E. coli*、MDR *E. coli*、*S. aureus* 和 MDR *S. aureus* 的最小抑菌浓度 (MIC) 采用微量二倍稀释法测定。使用无菌的 96 孔板,在每孔加入 100 μ L TSB 培养基。在第一孔中加入配置好的试剂 (A-Ca@PDA 浓度为 600 μ g/mL),混匀后进行梯度稀释,使最后一孔的浓度为 9.38 μ g/mL,接下来,将 100 μ L 预先稀释好的细菌悬液 (浓度为 10⁶ CFU/mL) 分别注入到每个孔中。设定初始浓度为 50.00 μ g/mL 的 Ampicillin 和 Kanamycin 为阳性对照,空白组作为阴性对照。将 96 孔板放置于 37℃ 的培养箱中进行 12-24 h 时的培养,并使用酶标仪来检测 OD600 值。每个组别进行三次重复实验,最终结果取平均值。

2.3.3.2 标准平板计数 (CFU) 抑菌实验

采用平板涂布法探究 A-Ca@PDA 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的抗菌效果。将培养至对数生长期的 MDR *E. coli* 的细菌悬浮液稀释至 10⁶ CFU/mL 然后,分别添加不同浓度的 A-Ca@PDANPs (0、100、200、300 μ g/mL), A-Ca@PDA 悬浮液与细菌悬浮液的体积比为 1:1,非照射组不进行任何特殊处理,照射组经过 6 min 808 nm 激光照射处理。孵育 2 h 后,在 TSB 琼脂培养基上均匀地覆盖微生物悬浮液,并在 37℃ 恒温培养 12-24 h,记录琼脂平板上微生物生长量 (每组实验三个平行),按照以下公式计算细菌的相对活力:

$$\text{细菌相对活力}(\%) = \frac{\text{材料组细菌数量}}{\text{空白组细菌数量}} \times 100\% \quad \text{公式 (5)}$$

2.3.3.3 胞内光热性能表征

为了研究 A-Ca@PDA 在体外细菌生长环境中的光热效应,将菌液 (10⁶ CFU/mL) 与 A-Ca@PDA (0、100、200、300、400、600 μ g/mL) 1:1 混合,

使用 808 nm 激光以 1.5 W/cm^2 的功率密度进行照射，用光热成像仪观察 0 min, 2 min, 4 min, 6 min 的温度变化情况。

2.3.4.4 细菌形态表征

将细菌悬液 (10^6 CFU/mL) 与预先配制好的材料液以 1: 1 比例充分混合。使用 1.5 W/cm^2 的 808 nm 激光对混合液照射 6 min。在 37°C 、200 r/min 条件下培养 12-24 h。将相同浓度的其他材料处理的细菌作为处理组，未经任何处理的细菌作为空白组。培养结束后，在 5000 r/min、5 min 条件下用 PBS 离心清洗三次，以去除培养基和其它污染物。然后将离心后得到细菌重悬于 2.50%戊二醛固定液中，在 4°C 静置过夜，以保持其形态稳定。在 5000 r/min、5 min 条件下离心清洗三次后，使用 30%-100%的乙醇溶液对细菌进行梯度脱水，每个梯度处理 15 min，并确保整个过程在 4°C 低温环境下进行。最后，对收集到的细菌样本进行冷冻干燥处理。利用 SEM 对经过上述处理的细菌样本进行形貌特征表征。

2.3.3.5 细菌活/死染色实验

将细菌悬液 (10^6 CFU/mL) 与预先配备好的材料液以 1: 1 比例充分混合。使用 1.5 W/cm^2 的 808 nm 激光对混合液照射处理 6 min。之后，采用 5000 r/min, 5 min 离心收集细菌。离心的速度和时间既能保证细菌的收集，又能避免细菌被破坏。将细菌用 0.9%的生理盐水进行离心洗涤，采用 5000 r/min、5 min 条件，重复操作三次，以去除培养基和其他污染物。将洗涤后的细菌重新悬浮于 $997.00 \mu\text{L}$ 0.90%的生理盐水中。将绿色荧光核酸染料 (SYTO 9) 和红色荧光核酸染料 (PI) 混合均匀，并加入到细菌悬浮液中，避免阳光暴晒并静置染色 15 min，以使荧光染料渗透入细菌细胞。使用 0.90%的生理盐水洗 4-6 次，以去除未被固定的荧光染料。最后将细菌悬浮液适当稀释后滴在载玻片上，避光风干。用荧光显微镜观察不同处理的染色细胞，设置 PBS、 CaO_2 、PDA、 Ca@PDA 、 A-Ca@PDA 五个组别。并使用软件处理来获得共定位图像结果。在收集到细菌细胞并按照上述方法进行相应处理及 10 倍稀释之后，使用流式细胞仪检测其凋亡情况，并分析结果。通过流式细胞仪，可以对细菌细胞的荧光信号进行精确测量和分析，以评估细菌细胞的状态和凋亡程度。

2.3.3.6 生物膜消融性能

采用结晶紫生物膜染色法评估 A-Ca@PDA 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 生物膜的消融效果。将菌液浓度调整至 10^6 CFU/mL, 取 100 μ L 预制备的菌液加入 96 孔板中, 将孔板置于 37°C 恒温 1-3 天。分别加入 A-Ca@PDA 溶液 (终浓度为 50、100、150 μ g/mL), 充分混合后, 用 1.5 W/cm^2 的 808 nm 激光照射 6 min, 在 37°C 培养 12-24 h。作为对照组, 使用不含材料的 PBS 于菌液混合。在培养结束后, 小心吸去孔板中的液体培养基, 并用 PBS 轻轻洗涤 1~2 次以去除残留的培养基和浮游细菌。加入 4.00% 多聚甲醛固定样品, 固定时间为 30 min。之后弃去多聚甲醛并用无菌水洗涤和风干处理。使用 0.10% 结晶紫染色 30 min, 用 PBS 洗涤去除残留染料, 使用拍摄电子显微镜和照相机视野下获取两份生物膜样品的图片。待样品风干后, 加入 33% 乙酸溶解生物膜, 并利用酶标仪在 570 nm 处测量吸光度值, 通过测量吸光度值可以评估生物膜的消融情况。

2.3.4 体外生物相容性实验

2.3.4.1 细胞毒性实验

将 L929 细胞再 12 孔板中培养 12 h 后, 用含有不同浓度的 A-Ca@PDA (0、25、50、100、150、200 μ g/mL) 的新鲜培养基替换之前的培养基。随后, 将细胞暴露于 NIR 激光 (808 nm, 1.5 W/cm^2) 下照射 6 min。在 37°C 含 5.00% CO_2 的潮湿培养箱中孵育 24 h 后, 吸去溶液并用 PBS 洗涤细胞。随后, 用 CCK-8 试剂对细胞染色 30 min, 并测量 450 nm 处的吸光度值。

2.3.4.2 溶血实验

新鲜获取的大鼠红细胞 (RBC) 经过三次 PBS 缓冲液洗涤, 然后在 PBS 缓冲液中重悬, 以获得约 4.00% 体积/体积比的悬浮液。将 1 mL 的 RBC 悬浮液与不同浓度 A-Ca@PDA (25、50、100、150、200 μ g/mL) 混合。随后, 将混合溶液在 NIR 激光 (808 nm, 1.5 W/cm^2) 下照射或不照射 6 min。接着, 将混合悬浮液在 37°C 下孵育不同时间 12 h。离心 5000 r/min 5 min 后, 收集上清并转移到 96 孔板中。使用酶标仪在 540 nm 波长下测定样品吸光度。阴性对照和阳性对照 (NC 和 PC) 通过在含有 Triton-X 的 PBS 中培养 0.10% 体积/体积浓度的 RBC 悬浮液来获得。溶血百分比可通过以下公式计算:

$$\text{溶血百分比} = \frac{\text{样品吸光度} - \text{NC 吸光度}}{\text{PC 吸光度} - \text{NC 吸光度}} \times 100\% \quad \text{公式 (6)}$$

2.3.5 小鼠伤口感染模型的构建及生物安全评估

2.3.5.1 小鼠伤口感染模型的构建

本研究使用了来自南京大学模型动物研究中心(位于中国南京)的实验小鼠。所有实验动物的饲养和处理均按照苏州大学(位于中国苏州)的动物护理批准号: 202310A415 的要求进行, 并且符合《动物福利法》和《实验动物护理和使用指南》的相关协议。在本实验中, 我们用 MDR *S. aureus* 为模型菌建立了伤口模型, 并设置了五个不同的处理组别, 包括 Blank 组、CaO₂ 组、PDA+NIR 组、Ca@PDA+NIR 组和 A-Ca@PDA+NIR 组, 每个组别有三个平行实验。首先, 在每只小鼠的背部制作一个直径约 1 cm 的圆形伤口, 并利用浓度为 10⁶ CFU/mL 的 MDR *S. aureus* 进行感染。接下来, 对伤口进行愈合治疗。每天使用相应的材料处理伤口, 光照组使用 808 nm 激光照射 6 min。同时, 使用光热成像仪记录光照过程中的温度变化情况。在治疗的第 0、2、4、6、8 和 12 天分别拍摄伤口照片, 并测量伤口的尺寸变化情况。此外, 还记录小鼠的体重变化情况。当治疗结束后, 对小鼠进行安乐死处理。切下伤口处的皮肤组织, 并将其保存在 4.00%多聚甲醛中以进行后续的 H&E 染色和 Masson 染色分析, 以便对皮肤组织的结构和细胞变化进行观察和评估。

2.3.5.2 体内生物安全评价

为了进一步评估材料在体内的毒性, 对小鼠进行眼眶出血采血, 将血液以 800 r/min 离心 20 min, 分离出血清。对血清中的白蛋白 (ALB)、碱性磷酸酶 (ALP)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷氨酰转移酶 (GGT)、尿素 (UREA)、肌酐 (CREA) 和尿酸 (UA) 这七个指标进行检测。这些指标能够反映出小鼠体内的肝功能、肾功能和代谢水平等方面的变化情况。另外, 还采用了 H&E 染色法对小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏等五个主要器官进行组织学分析。

2.4 实验结果与讨论

2.4.1 材料的合成与表征

A-Ca@PDANPs 的制备方法如图 2-1a 所示。首先, 通过 CaCl₂ 和 H₂O₂ 进行

碱性反应来合成 CaO_2 NPs。之后，在碱性溶液中将 CaO_2 NPs 与盐酸多巴胺均匀分散，通过连续的聚合和聚集过程，合成了 Ca@PDA NPs。最终在碱性条件下，利用 Michael 加成或 Schiff 碱反应使得 L-Arg 与 Ca@PDA 相连接，从而得到 A- Ca@PDA NPs。

据 XRD 检测结果显示（图 2-2a），在 $2\theta=30.2^\circ$ 、 35.6° 、 47.4° 、 53.0° 和 60.4° 处观察到了与 CaO_2 匹配的清晰衍射峰。这些峰被鉴定为来自 CaO_2 晶面（002）、（110）、（112）、（103）和（202）的反射，表明了 CaO_2 的成功合成，这个结论基于 JCPDS 文件 No.03-0865 的参考数据进行了验证。为了确认 CaO_2 和 PDA 组分成功合成以及 L-Arg 的修饰，研究采用了 FTIR 进行分析（图 2-2b）。在 CaO_2 样品中，观察到了位于 875 cm^{-1} 处的一个明显峰，证明 CaO_2 的成功合成。对于 Ca@PDA 和 A- Ca@PDA 样品，在 1630 cm^{-1} 处观察到了一个特征峰，该峰是由 PDA 诱导的 N-H 键弯曲振动引起的。在 A- Ca@PDA 上还观察到 1496 cm^{-1} 处的胍基 C=N 特征振动和 1676 cm^{-1} 处的 PDA 形成的羰基与 L-Arg 的氨基结合吸收峰，这一现象验证了 L-Arg 成功固定化在样品中。

通过 SEM 图像可以看出，合成的 CaO_2 和 A- Ca@PDA 尺寸均一、形貌均匀，在 SEM 图像中呈现出均匀的分布（图 2-2c, d）。TEM 图像（图 2-2e）进一步确认了 A- Ca@PDA 的结构形态。使用 HAADF-STEM 捕获的 Mapping 图像验证了它们的化学结构，该图像显示 A- Ca@PDA 中 C、O、N 和 Ca 元素均匀分布（图 2-2f）。DLS 分析结果显示， CaO_2 和 Ca@PDA 颗粒相对较小（图 2-3a）。 CaO_2 的平均尺寸为 $130.41\pm2.17\text{ nm}$ ，而 Ca@PDA 的平均尺寸为 $172.13\pm2.46\text{ nm}$ 。这表明经过包裹处理后， CaO_2 NPs 被 PDA 层成功封装。A- Ca@PDA 的平均尺寸为 $198.73\pm1.85\text{ nm}$ ，这表明 L-Arg 成功与 Ca@PDA 相连接。此外，Zeta 电位的测量结果也提供了进一步的证据（图 2-3b）。在 CaO_2 经过 PDA 层包裹之前，其 Zeta 电位为正值 $+17.61\pm0.49\text{ mV}$ ，显示出阳性电荷。而在 PDA 包裹后， CaO_2 颗粒的 Zeta 电位变为负值 $-9.86\pm0.32\text{ mV}$ ，验证了封装处理的成功进行。进一步引入 L-Arg 修饰后，观察到 A- Ca@PDA 的 Zeta 电位增加至 $+13.21\pm0.30\text{ mV}$ ，表明 L-Arg 修饰对 A- Ca@PDA 的表面电荷产生了影响。

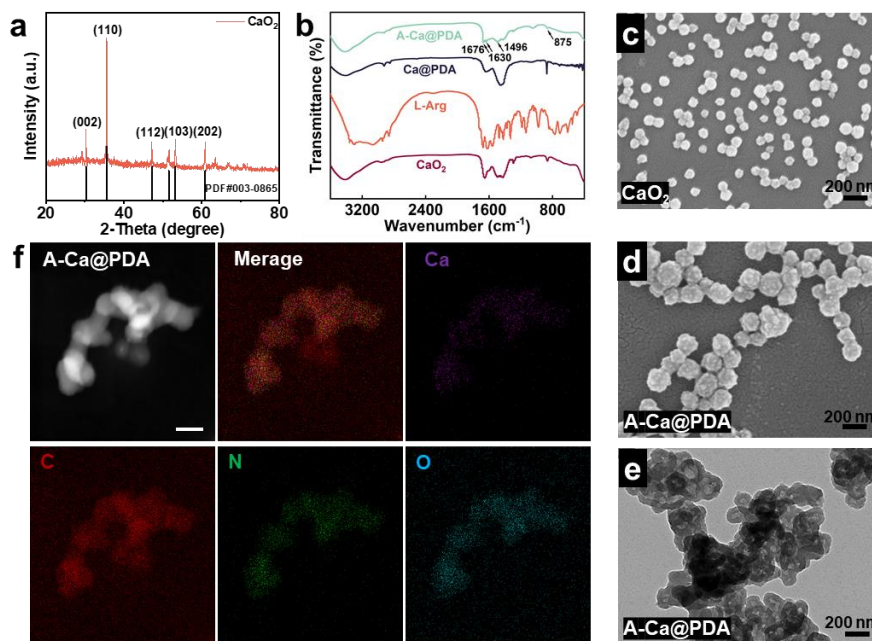


图 2-2. (a) CaO_2 的 XRD 图谱; (b) CaO_2 , L-Arg, Ca@PDA 和 A-Ca@PDA 的红外图谱; (c) CaO_2 的 SEM 图片; (d, e) A-Ca@PDA 的 SEM 和 TEM 图片; (f) A-Ca@PDA 的元素映射图片

Figure 2-2. (a) XRD spectrum of CaO_2 ; (b) Infrared spectra of CaO_2 , L-Arg, Ca@PDA , and A-Ca@PDA ; (c) SEM image of CaO_2 ; (d, e) SEM and TEM images of A-Ca@PDA ; (f) Elemental mapping image of A-Ca@PDA

XPS 测试进一步证实 L-Arg 成功固定在 Ca@PDA 上 (图 2-3c-f)。根据高分辨率光谱分析, 在 288.5、286.1、285.3、284.8 和 284.1 eV 的峰被确定为对应于 C=O 、 C-O 、 C-N 、 C-C 和 C=C 。此外, 由于 PDA 和 L-Arg 之间建立了新的键, A-Ca@PDA 在 286.9 eV 处出现了新的 C=N 键。

综上所述, 通过以上几种分析方法, 可以得出 A-Ca@PDA 具有一致的结构形态, 且颗粒尺寸在纳米尺度下。封装处理成功使得 CaO_2 颗粒被 PDA 层包裹, 并且 L-Arg 修饰对 A-Ca@PDA 的表面电荷产生了影响。

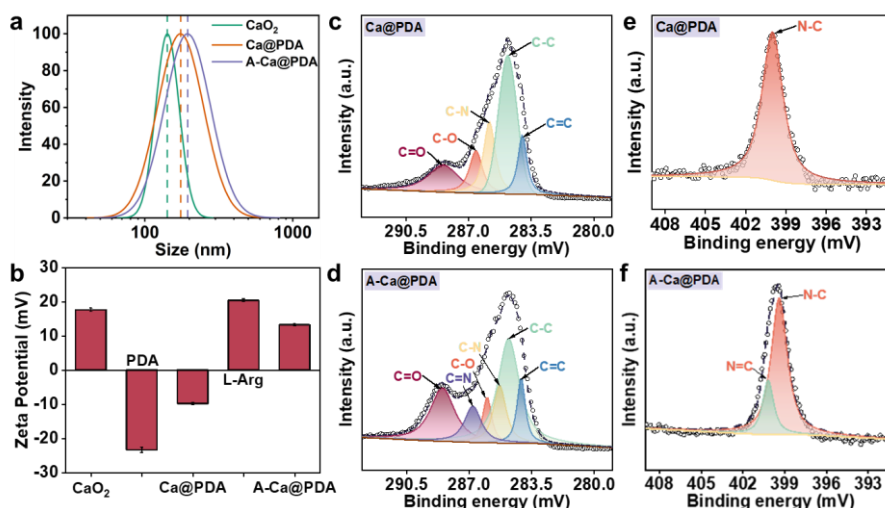


图 2-3. (a) CaO₂, Ca@PDA 和 A-Ca@PDA 的粒径分布; (b) CaO₂、PDA、L-Arg、Ca@PDA 和 A-Ca@PDA 的电位; (c-f) Ca@PDA 和 A-Ca@PDA 的 XPS 图谱

Figure 2-3. (a) Particle size distribution of CaO₂, Ca@PDA, and A-Ca@PDA; (b) Potentials of CaO₂, PDA, L-Arg, Ca@PDA, and A-Ca@PDA; (c-f) XPS spectra of Ca@PDA and A-Ca@PDA

2.4.2 体外性能研究

2.4.2.1 光热性能分析

由于 PDA 具有高效的光热转换能力, 因此广泛应用于纳米材料的光热转换剂。因此, 本部分旨在对 A-Ca@PDA 的光热性能进行系统评估。图 2-4a 和 b 显示了 A-Ca@PDA 的光热效率与其浓度和激光功率之间存在强相关性。在 1.5 W/cm² 功率密度下连续 6 min 的激光照射下, A-Ca@PDA (150 μg/mL) 显示了显著的温度上升至 58.10℃, 而水在相同条件下温度保持不变。图 2-4c 中的热图像直观展示了 A-Ca@PDA 在 808 nm、功率密度为 1.5 W/cm² 的激光照射下观察到的显著光热效应, 并且具有良好的稳定性 (图 2-4c)。此外, 对 A-Ca@PDA 浓度为 150 μg/mL 的温度-冷却曲线数据进行线性回归分析, 计算结果显示, 在暴露于 1.5 W/cm² 激光功率密度下时, 其光热转换效率 (η) 约为 47.50% (图 2-4d)。体外实验中, 在激光照射下将细菌溶液置于孵育 48 孔板中, 并捕获到达到有效抑制所需治疗温度的结果 (图 2-5)。经过 6 min 的激光照射和材料处理后, MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* (A-Ca@PDA 浓度为 150 μg/mL) 的温度超过 55℃。这些结果表明, A-Ca@PDA 具有显著的光热转换效率和卓越的光热稳定性, 使其能够在实际治疗过程中达到有效的杀菌温度。

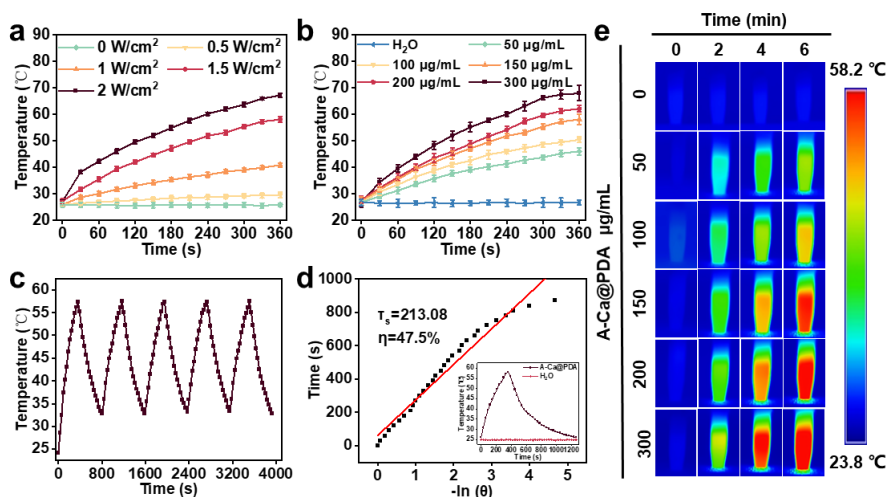


图 2-4. (a) 150 $\mu\text{g/mL}$ 的 A-Ca@PDA 在不同功率下的温度变化; (b) 1.5W/cm² 时 A-Ca@PDA 不同浓度的温度变化; (c) A-Ca@PDA 的升温降温曲线; (d) A-Ca@PDA 的光热转换效率; (e) 近红外相机下的不同浓度 A-Ca@PDA 的温度变化

Figure 2-4. (a) Temperature changes of 150 $\mu\text{g/mL}$ A-Ca@PDA at different power; (b) Temperature changes at different A-Ca@PDA and different concentrations at 1.5W/cm²; (c) temperature rise and temperature fall curve of A-Ca@PDA; (d) Photothermal Conversion Efficiency of A-Ca@PDA; (e) Temperature changes at different concentrations A-Ca@PDA under the NIR camera

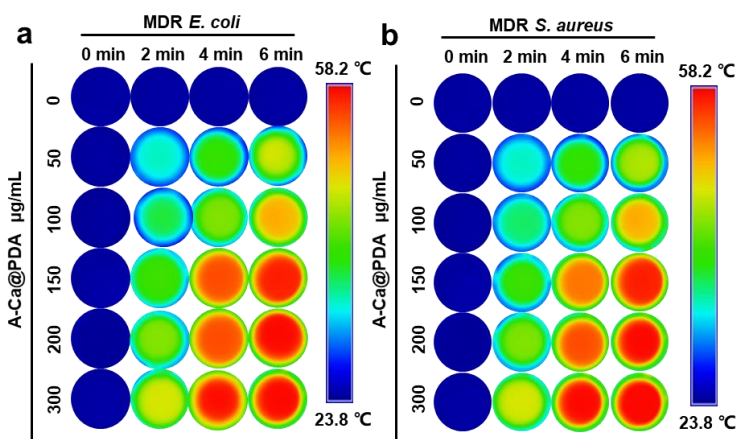


图 2-5. (a) 与 MDR *E. coli* 共孵后的近红外相机拍摄的图片; (b) 与 MDR *S. aureus* 共孵后的近红外相机拍摄的图片

Figures 2-5. (a) images taken by near-infrared camera after co-incubation with MDR *E. coli*; (b) Images taken with a NIR camera after co-incubation with MDR *S. aureus*

2.4.2.2 NO 释放行为

近年来,人们对于 iNOS、NADPH 以及各种 ROS (H_2O_2 , $^1\text{O}_2$) 介导的 L-Arg 转化为一氧化氮和 L-瓜氨酸的生物化学或催化反应在生物医学领域引起了广泛关注。因此, NIR 辐照下的 A-Ca@PDA 为同时实现 PTT 和 pH 值触发的 NO 释放提供了一种灵活且可控的方法。在水溶液中, NO 会生成亚硝酸盐, 亚硝酸盐可以与 Griess 试剂反应形成紫色偶氮化合物, 通过测量在 546 nm 处的吸光度进行定量分析。因此, 采用 Griess 试剂实现对 NO 释放量的定量测定。通过标准曲线法, 可以测量产生的 NO (图 2-6a), 标准曲线方程为 $y = 0.0071x + 0.0574$ 。

首先, 研究了溶液 pH 对 NO 释放的影响。在 pH 5.5 和 pH 7.4 的 PBS 中, 检测了 A-Ca@PDA 在 5 h 内释放的 NO 量。如图 2-6b 所示, 在酸性条件下 (pH 5.5), 30 min 内开始释放 2.401 μM 浓度的 NO。随后, 其逐渐增加, 并在孵育 5 h 后最终达到 8.124 μM 的浓度, 表明 PDA 层在酸性环境中发生降解。相反, 在中性 pH (pH 7.4) 下, 由于 A-Ca@PDA 表面形成一个松散粘附的 PDA 保护层阻碍了进一步反应有效进行, 因此观察到仅有少量 NO 被释放出来。因此可以得出结论: A-Ca@PDA 表现出对溶液 pH 响应型 NO 释放行为, 在微酸性环境 (如 pH 5.5) 中具有显著提高效能。

此外, 研究还发现激光 NIR 辐照对 NO 释放有显著影响。图 2-6c 显示, 在 pH 值为 5.5 时, 使用 808 nm 激光 (1.5 W/cm^2) 持续 6 min 会产生浓度为 11.729 μM 的 NO。而在相同的 NIR 激光条件下, 当 pH 值设置为 7.4 时, NO 释放水平降至 3.729 μM 。与未经过激光辐照的情况相比, 这种增加归因于 PDA 表现出的高效光热转换效率: 升高的温度不仅破坏了 L-Arg 和 PDA 分子之间的相互作用, 还促进了 PDA 降解速度, 并提升了分子内部热运动和药物反应速率。此外, 图 2-6d 清晰展示了 A-Ca@PDA 释放 NO 能力与其浓度之间存在明显的相关性。A-Ca@PDA 纳米颗粒表现出 pH 响应性和 NIR 激光响应性, 显著释放 NO 并具备高效杀菌能力, 因此在治疗耐药细菌方面具有巨大潜力。

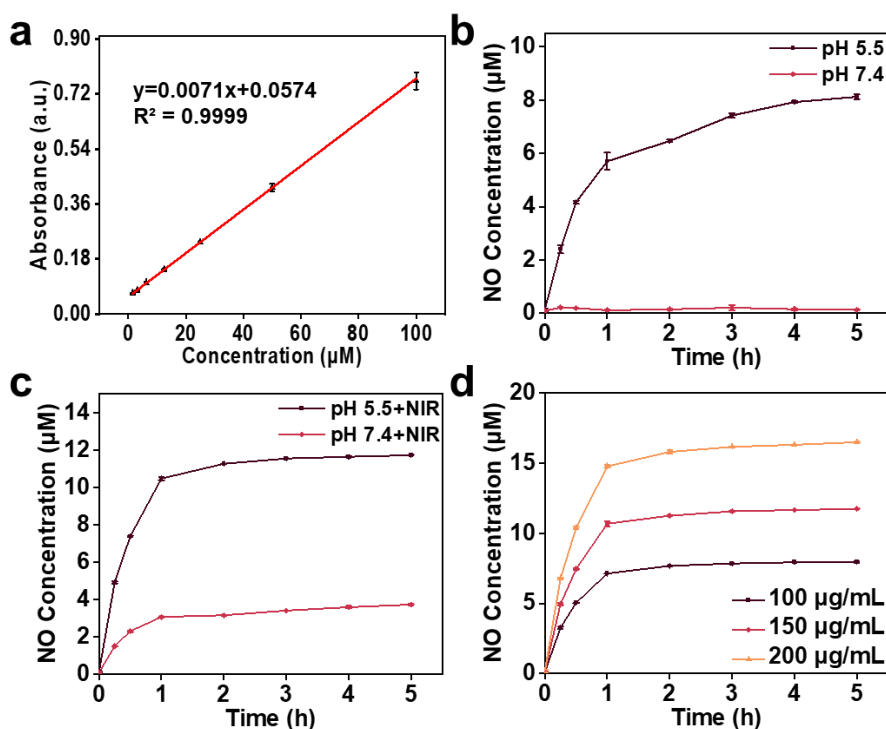


图 2-6. (a) NO 释放的标准曲线; (b) 不同 pH 条件并不加激光照射下的 NO 释放; (c) 不同 pH 条件并且在激光照射下的 NO 释放; (d) 不同 A-Ca@PDA 浓度在 pH5.5 及激光照射下的 NO 释放

Figure 2-6. (a) Standard curve of NO release; (b) NO release under different pH conditions without laser irradiation; (c) NO release under different pH conditions and laser irradiation; (d)

NO release under different A-Ca@PDA concentrations at pH5.5 and laser irradiation

2.4.3 体外抑菌实验

2.4.3.1 MIC 测定及 CFU 抑菌实验

根据纳米材料对几种常见细菌的 MIC 值 (表 2-4), 我们发现相较于 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus*, A-Ca@PDA 对普通细菌具有更显著的抑制效果。A-Ca@PDA 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的最低抑菌浓度分别为 28、32 $\mu\text{g/mL}$ 。我们研究了不同浓度下 A-Ca@PDA 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的抗菌效果, 并通过 CFU 结果显示, 在经过激光照射处理后, 细菌存活率明显降低 (图 2-7a, c)。在 NIR 光照处理下, 150 $\mu\text{g/mL}$ A-Ca@PDA 对细菌的存活率仅为 5%, 表明了纳米复合材料优异的抗耐药菌效果。在相同浓度处理条件下, A-Ca@PDA 对两种细胞系均表现出明显高于其他处理方式的抗微生物活性 (图

2-7b, d)。同时, 通过培养基上形成菌落实验也证实了 A-Ca@PDA 的剂量依赖性细胞抑制作用 (图 2-8)。

以上实验结果表明, A-Ca@PDA 具有潜在的应用前景, 可以作为一种有效的抑制微生物的材料, 尤其适用于抑制耐药细菌。

表 2-4. 不同材料的 MIC (+NIR ($\mu\text{g/mL}$))

Table 2-4. Measurement of MIC (+NIR ($\mu\text{g/mL}$))

Bacteria	CaO ₂	PDA	Ca@PDA	A-Ca@PDA	Kanamycin	Ampicillin
<i>E. coli</i>	120 $\pm$ 10	61 $\pm$ 10	42 $\pm$ 10	15 $\pm$ 2	1.5 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.5
<i>S. aureus</i>	120 $\pm$ 10	70 $\pm$ 10	50 $\pm$ 10	21 $\pm$ 2	2 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.5
MDR <i>E. coli</i>	>120	87 $\pm$ 10	72 $\pm$ 10	28 $\pm$ 2	10 $\pm$ 0.5	12 $\pm$ 0.5
MDR <i>S. aureus</i>	>120	95 $\pm$ 10	79 $\pm$ 10	32 $\pm$ 2	11 $\pm$ 0.5	15 $\pm$ 0.5

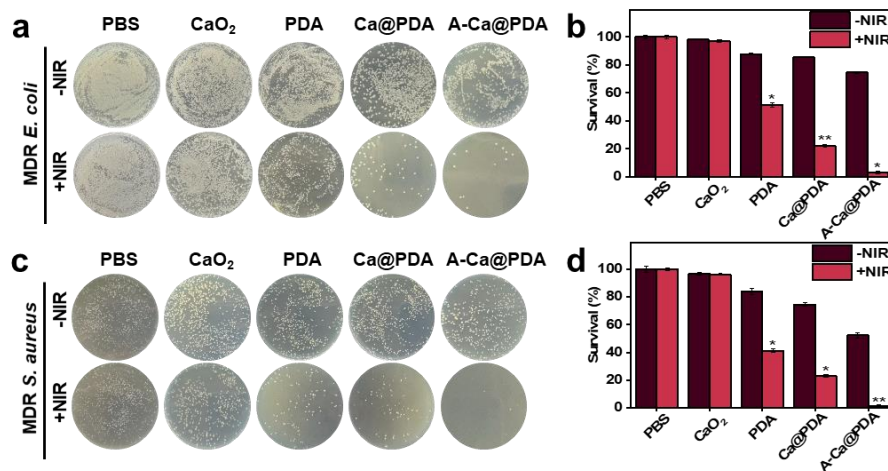


图 2-7. (a) MDR *E. coli* 在琼脂平板上生长的示例图像。水平实验组包括 PBS、CaO₂、PDA、Ca@PDA 和 A-Ca@PDA。垂直对照组包括+NIR 和-NIR。(b, d) 计数平板菌落数与细菌的相对存活率呈直接相关。(c) MDR *S. aureus* 的代表性平板照片

Figures 2-7. (a) Illustrative images of MDR *E. coli* growth on agar plates. The horizontal experimental groups include PBS, CaO₂, PDA, Ca@PDA, and A-Ca@PDA. The vertical controls consist of +NIR and -NIR. (b, d) The number of counted plate colonies exhibited a direct correlation with the relative survival rate of bacteria. (c) Representative plate photographs of

MDR *S. aureus*

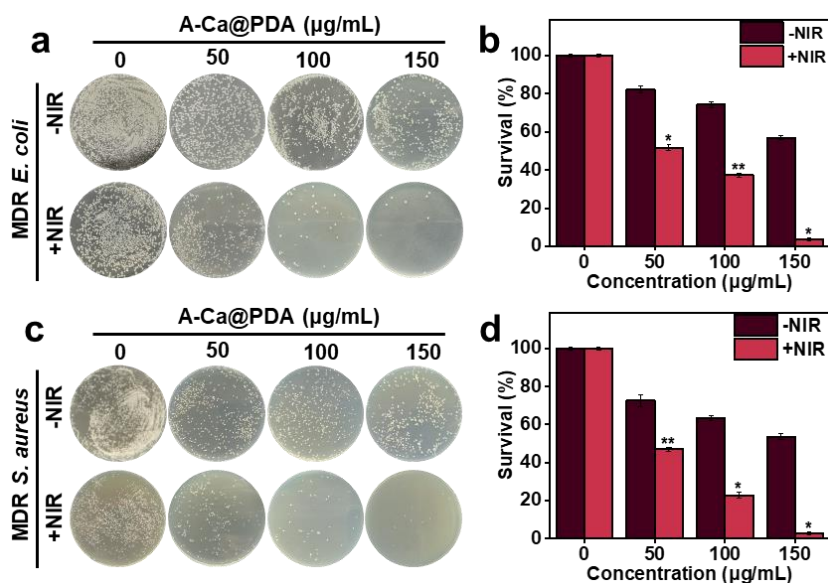


图 2-8. (a) MDR *E. coli* 在琼脂平板上生长的示例图像。水平实验组不同浓度的 A-Ca@PDA。垂直对照组包括+NIR 和-NIR。(b, d) 计数平板菌落数与细菌的相对存活率呈直接相关。(c) MDR *S. aureus* 的代表性平板照片

Figures 2-8. (a) Illustrative images of MDR *E. coli* growth on agar plates. The horizontal experimental groups include different concentrations of A-Ca@PDA. The vertical controls consist of +NIR and -NIR. (b, d) The number of counted plate colonies exhibited a direct correlation with the relative survival rate of bacteria. (c) Representative plate photographs of MDR *S. aureus*

2.4.3.2 细菌活/死染色分析

为了更全面地评估 A-Ca@PDA 的抑菌性能，我们进行了 Live-Dead 实验。根据图 2-9 的结果显示，未经处理的细菌未观察到明显的细菌死亡，绿色荧光大片出现，几乎没有红色荧光的出现。然而，经过 CaO_2 、PDA、Ca@PDA 和 A-Ca@PDA 处理后，细菌的存活率均有所下降。与其他材料相比，A-Ca@PDA 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的抑菌效果更为明显，红色荧光强度也更高。此外，如图 2-10 所示，在实验中观察到随着 A-Ca@PDA 浓度的增加，红色荧光也相应增加，其对细菌的清除能力逐渐提高。当 A-Ca@PDA 浓度达到 150 $\mu\text{g/mL}$ 时，细菌几乎全部死亡，表明细菌几乎全部死亡（图 2-10），这说明 A-Ca@PDA 在抑制生物膜形成以及杀灭细菌方面表现出很好的潜力。利用流式细胞仪测量细胞的荧光信号来定量分析存活细菌细胞和死亡细菌细胞的数量，根据图 2-11 的结果可知，当 A-Ca@PDA 的浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 时，MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus*

的死亡率均超过 95%，这意味着 A-Ca@PDA 在此浓度下能够有效地清除绝大部分细菌，与 CFU 实验中观察到的结果相一致。这为我们认识和评估 A-Ca@PDA 对细菌的抑菌效果提供了可靠的依据。

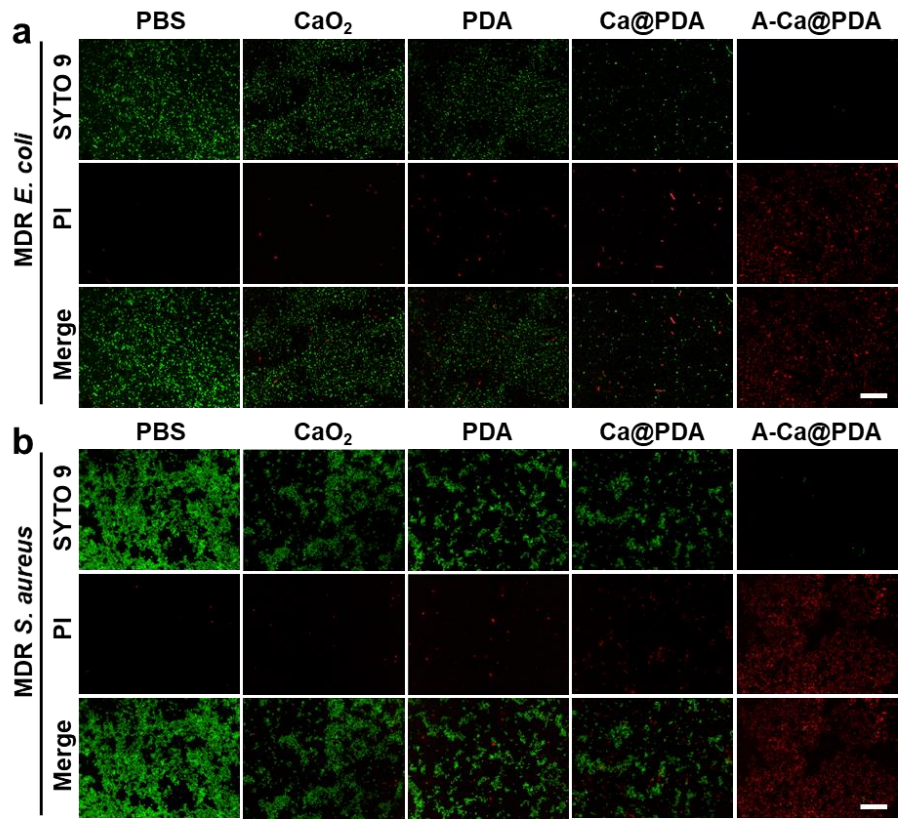


图 2-9. (a) 不同材料在激光照射后对 MDR *E. coli* 处理后的活/死荧光染色图片；(b) 不同材料在激光照射后对 MDR *S. aureus* 处理后的活/死荧光染色图片，标尺：10 μ m

Figure 2-9. (a) live/dead fluorescence staining images of MDR *E. coli* treated with different materials after laser irradiation; (b) live/dead fluorescence staining pictures of different materials treated with MDR *S. aureus* after laser irradiation, Scale bar: 10 μ m

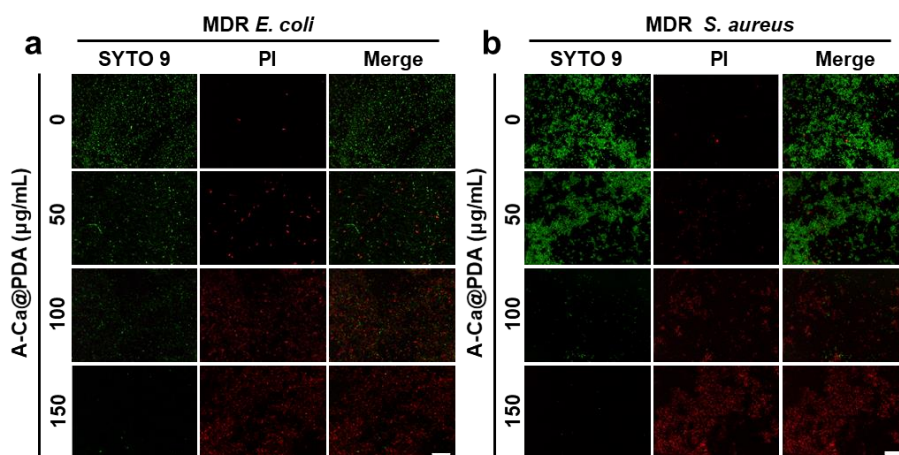


图 2-10. (a) 不同 A-Ca@PDA 浓度在激光照射后对 MDR *E. coli* 处理后的活/死荧光染色图片；(b) 不同 A-Ca@PDA 浓度在激光照射后对 MDR *S. aureus* 处理后的活/死荧光染色图片，标尺：10 μm

Figure 2-10. (a) live/dead fluorescence staining images of MDR *E. coli* treated with different A-Ca@PDA concentrations after laser irradiation; (b) live/dead fluorescence staining pictures of MDR *S. aureus* treated with different A-Ca@PDA concentrations after laser irradiation, Scale bar: 10 μm

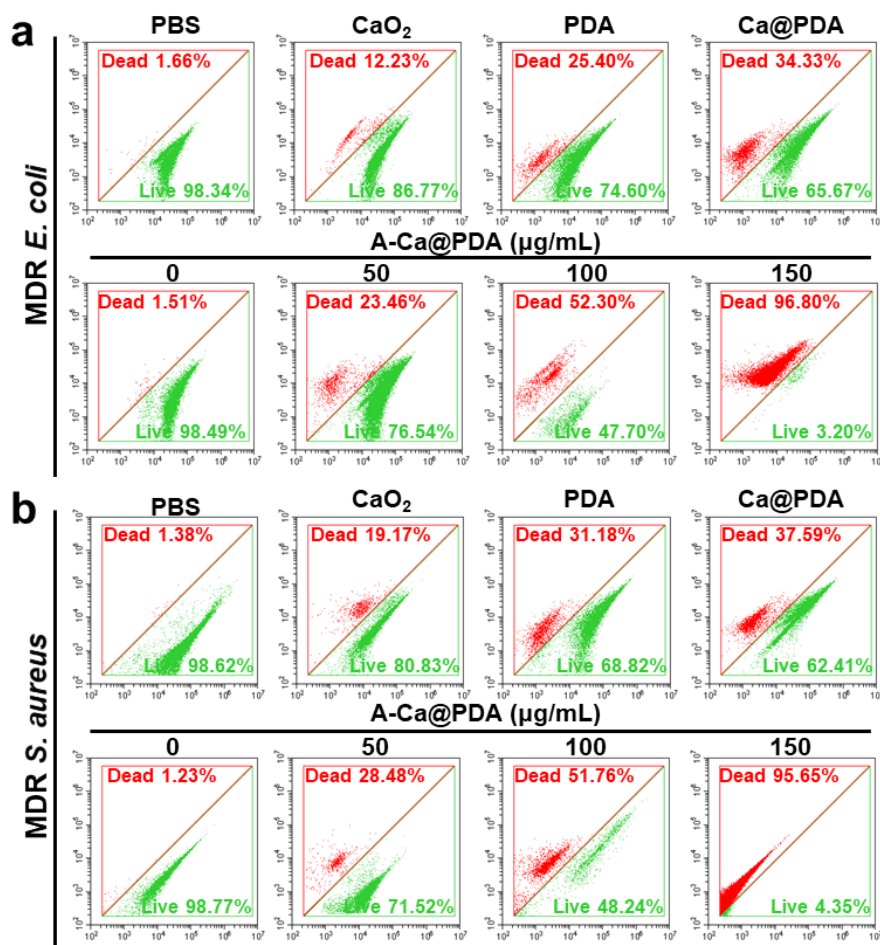


图 2-11. (a) 不同材料在激光照射后对 MDR *E. coli* 处理后的流式细胞术图片；(b)

不同材料在激光照射后对 MDR *S. aureus* 处理后的流式细胞术图片

Figure 2-11. (a) Flow cytometry images of MDR *E. coli* treated with different materials after laser irradiation; (b) Flow cytometry pictures of different materials treated with MDR *S. aureus* after laser irradiation

2.4.3.3 细菌形态研究

利用 SEM 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的形态进行检测，以更直观地研究 A-Ca@PDA 的抑菌活性（图 2-12）。未经任何处理的 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 显示出典型的棒状和球状形态，表面光滑且形态完整。CaO₂ 和 Ca@PDA 处理后，并未对细菌细胞造成明显损伤，仍有较多细胞保持良好的形态。然而，经过 A-Ca@PDA（150 µg/mL）的处理后，MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的细胞膜被破坏，细胞质泄露，表面呈现明显的塌陷。同时，观察不同浓度 A-Ca@PDA 处理后的细菌形态变化，也表明该材料的抑菌活性具有浓度依赖性。综上所述，

A-Ca@PDA 通过 PTT 和释放 NO 的双重效应展现了较强的抑菌活性。

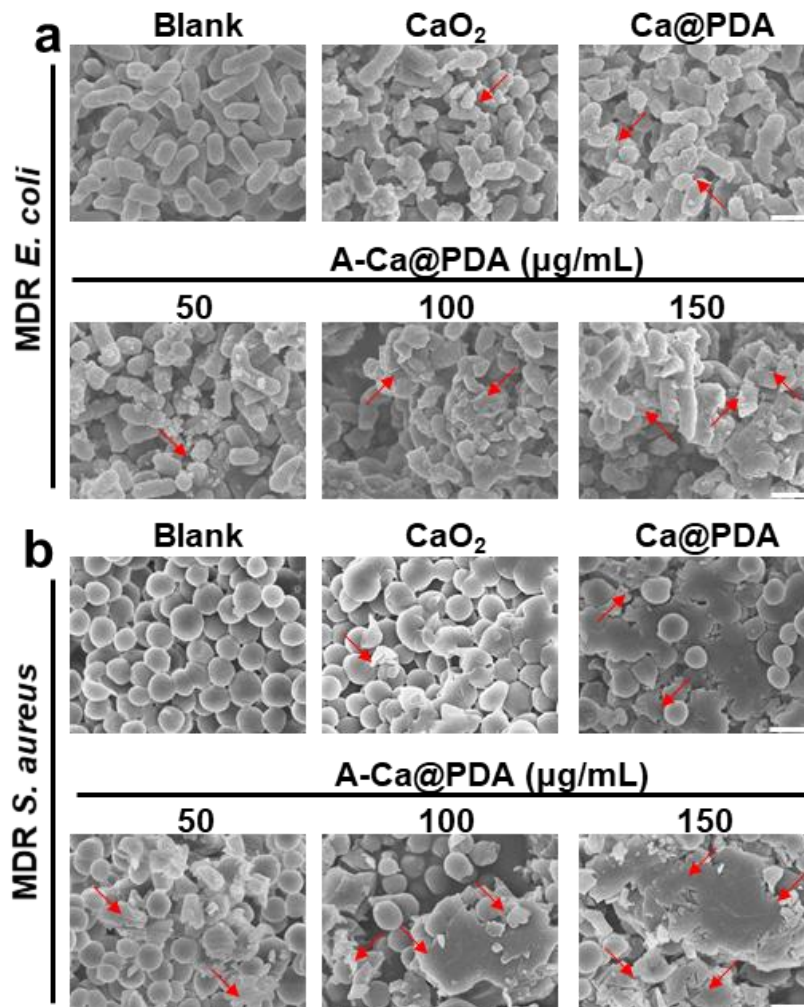


图 2-12. (a) 不同材料在激光照射后对 MDR *E. coli* 处理后的细菌细胞形态图片；(b) 不同材料在激光照射后对 MDR *S. aureus* 处理后的细菌细胞形态图片，标尺：1.5 μm

Figure 2-12. (a) Pictures of bacterial cell morphology of MDR *E. coli* treated with different materials after laser irradiation; (b) Pictures of bacterial cell morphology of MDR *S. aureus* treated with different materials after laser irradiation, Scale bar: 1.5 μm

2.4.3.4 生物膜消融性能

用不同浓度 A-Ca@PDA 处理后 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的结晶紫色生物膜均有明显变化（图 2-13）。当使用浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 的 A-Ca@PDA 处理后，观察到显著的生物被膜消融效果，MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的生物膜质量分别减少到 8.0%和 9.2%（图 2-13b, d）。随着 A-Ca@PDA 浓度的增加，染色生物膜的质量逐渐减少（图 2-13a, c）。这些结果证明了 A-Ca@PDA 对 MDR *E.*

coli 和 MDR *S. aureus* 的生物膜具有显著的消融作用。

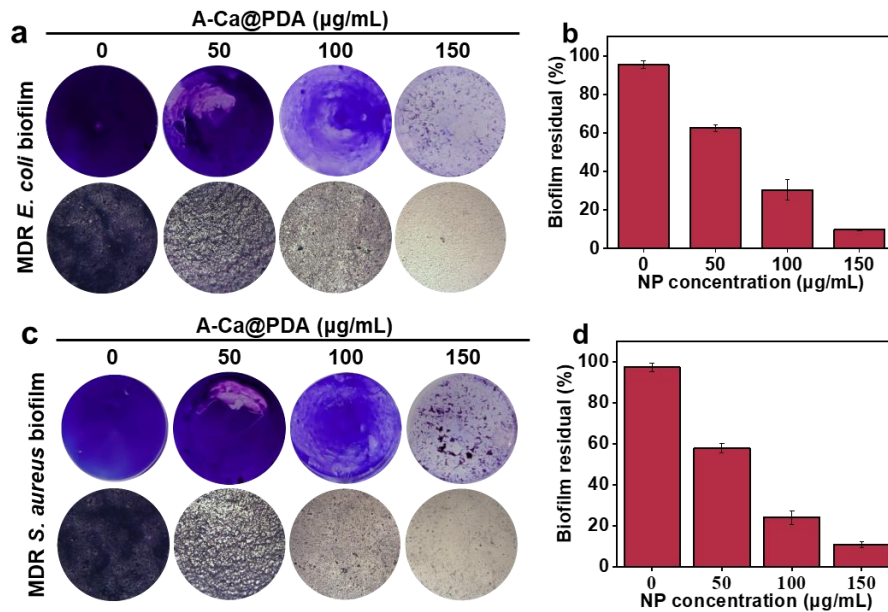


图 2-13. (a) 不同 A-Ca@PDA 浓度在激光照射后对 MDR *E. coli* 处理后的生物膜消融图片；(b) 不同 A-Ca@PDA 浓度在激光照射后对 MDR *S. aureus* 处理后的生物膜消融图片

Figure 2-13. (a) Pictures of biofilm ablation of MDR *E. coli* treated with different A-Ca@PDA concentrations after laser irradiation; (b) Pictures of the ablated biofilms of MDR *S. aureus* treated with different A-Ca@PDA concentrations after laser irradiation

2.4.4 体外生物相容性评价

采用细胞毒性试验和血液相容性试验相结合的方法评价 A-Ca@PDA 的体外生物相容性。研究 A-Ca@PDA 纳米粒子在近红外照射和非照射条件下对 L929 小鼠成纤维细胞的细胞毒性作用。图 2-14a 中所示结果表明，在 25-200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 A-Ca@PDA 纳米粒子暴露 24 h 后，L929 细胞表现出高水平的活力(>85%)。L929 细胞经 A-Ca@PDA 处理并经近红外照射后，细胞活力始终保持较高水平，于未照射组相比无显著差异。这一结果可能归因于纳米颗粒的 NIR 诱导的 NO 释放^[188, 189]。值得注意的是，NO 于促进成纤维细胞、内皮细胞和角质细胞的生长有关，因此，它部分减轻了光热效应对正常组织造成的损害。这些发现明确地枪带哦了 A-Ca@PDA 优异地生物相容性。

为了进一步了解 A-Ca@PDA 的血液相容性，进行了溶血分析，评估近红外激光照射和非照射下 A-Ca@PDA 对大鼠红细胞的溶血活性。如图 2-14b 所示，

实验组和阳性对照（Triton-X）在图中有明显的颜色变化。值得注意的是，所有实验组仅表现出最低水平的溶血（<5%）。这些结果表明 A-Ca@PDA 具有良好的血液相容性。

综上所述，这些结果表明 NO 可以在一定程度上改善光热治疗引起的组织损伤，并且 A-Ca@PDA 具有良好的生物相容性，使其成为后续伤口感染治疗的有前途的候选材料。

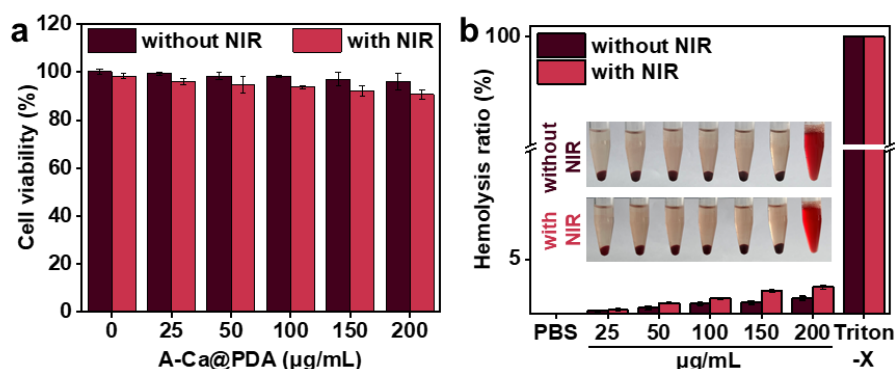


图 2-14. (a) 在不同浓度 A-Ca@PDA 下，用/不用 NIR 照射孵育 24 h 后的 L929 细胞的存活率。(b) 不同浓度 A-Ca@PDA 处理后，在有或无 NIR 照射的情况下孵育 12 h 的溶血率。不同样本照片的插图

Figure 2-14. (a) Survival rate of L929 cells incubated for 24 h with/without NIR laser treatment at different concentrations A-Ca@PDA. (b) The hemolysis rate of A-Ca@PDA at different concentrations after incubation for 12h with or without NIR irradiation. Illustrations for different sample photos

2.4.5 体内抑菌实验

基于 A-Ca@PDA 的体外实验结果，我们采用小鼠耐药菌感染创面模型来评价 A-Ca@PDA 作为创面敷料的伤口愈合效果。在该实验中，我们使用了 150 µg/mL 浓度的 A-Ca@PDA，并感染了 MDR *S. aureus* 菌株。创面模型是通过在小鼠背部制造全层皮肤创面来建立的。研究结果显示，A-Ca@PDA 对 MDR *S. aureus* 具有显著的体内光热效应，在 2 min 内温度迅速达到 40℃ 以上，并持续上升，在处理 6 min 时温度达到 58℃；而空白对照组则没有明显的温度变化(图 2-15a,c)。此外，在激光治疗后，与 CaO₂、PDA 和 Ca@PDA 相比，经过第 2 天、第 4 天、第 6 天、第 8 天和第 12 天观察发现，A-Ca@PDA 处理后的创面明显较小，并且

在第 12 天基本愈合（图 2-15b,d）。最后，在经过 12 天治疗后，五组小鼠的体重保持动态平衡，这表明纳米材料对小鼠没有明显毒副作用（图 2-15c）。此外，治疗进行了 12 天后，我们使用 H&E 和 Masson 染色，对小鼠的创面组织进行了处理（图 2-15e）。与对照组相比，A-Ca@PDA 治疗组显示出了鳞状上皮细胞厚度增强、毛细血管增加以及新的毛囊形成。此外，蓝色染色显示胶原纤维逐渐增加，表明 A-Ca@PDA 显著促进了感染创面的愈合过程。

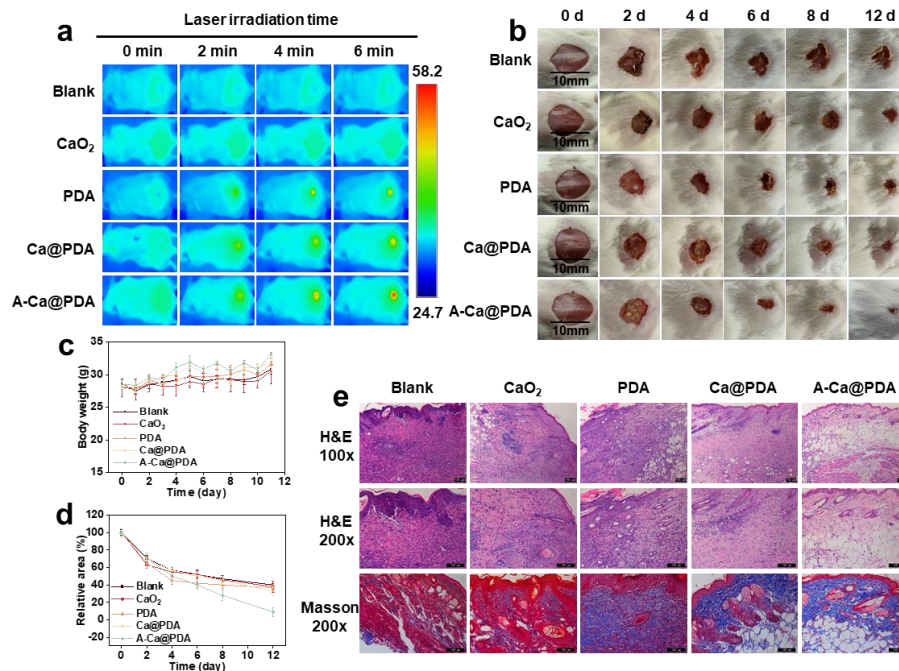


图 2-15. (a) 不同材料在小鼠伤口出的光热效果图片；(b) 不同材料处理后的小鼠伤口愈合情况；(c) 小鼠体重变化；(d) 小鼠伤口愈合面积变化；(e) 小鼠伤口部位 H&E 染色和 Masson 染色

Figure 2-15. (a) Photothermal effects of different materials on mouse wounds; (b) wound healing of mice treated with different materials; (c) changes in body weight; (d) changes in wound healing area of mice; (e) H&E staining and Masson staining of the wound sites of mice

2.4.6 体内生物安全性评价

针对实验小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏等主要器官进行了 H&E 染色（见图 2-16h）。实验结果显示，无论是对照组还是实验组的小鼠器官组织，在 H&E 染色下都未观察到明显的组织损伤和炎症反应。这说明 A-Ca@PDA 在体内具有非常低的细胞毒性，并且不会对机体造成明显伤害。在治疗进行了 12 天后，

我们采集了各组小鼠的血样，并测定了其肝肾功能指标（见图 2-16a-g）。作为肾功能的指标，各治疗组的 BUN、CREA 和 UA 水平均处于正常范围内，并且与对照组没有显著差异。此外，作为主要评估肝功能的指标，ALT、ALB、ALP 和 GGT 的浓度也都在参考范围内。综上所述，A-Ca@PDA 与生物体的相容性良好，没有引起明显的免疫反应或组织损伤。这表明该材料在体内使用时，不会对生物体产生不良的影响。此外，A-Ca@PDA 材料经过体内实验后，没有显示出任何毒性或有害效应。这意味着该材料具有低风险性，可以被安全地应用于治疗抗耐药菌感染的伤口。

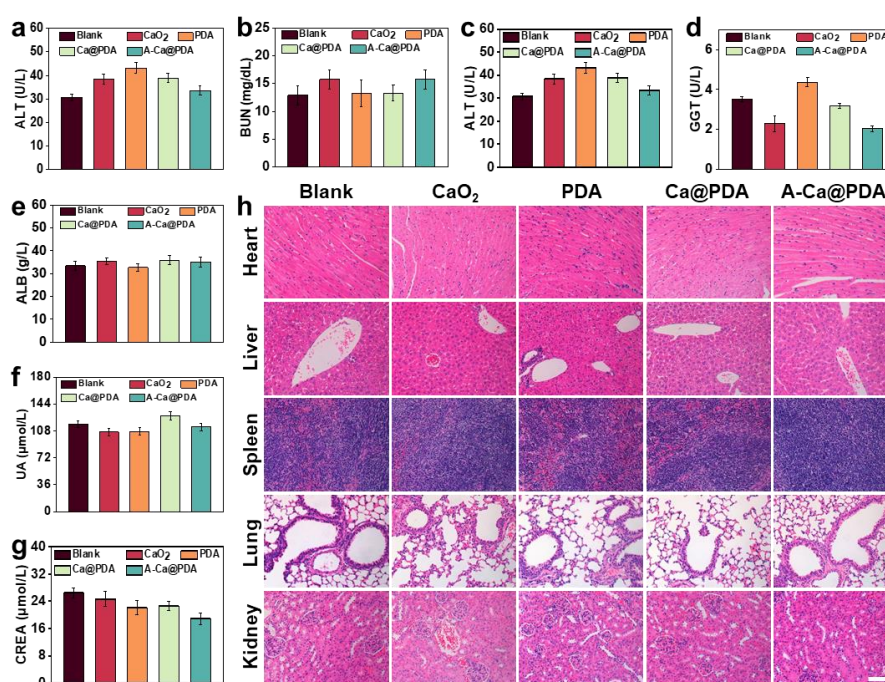


图 2-16. (a-g) 小鼠血液生化检测；(h) 小鼠的心、肝、脾、肺、肾切片的 H&E 染色

Figure 2-16. (a-g) Blood biochemical tests in mice; (h) H&E staining of sections of heart, liver, spleen, lung, and kidney from mice

2.5 本章小结

本研究提出了一种光热联合 NO 气体抑制耐药菌的纳米颗粒 A-Ca@PDA NPs。所得的 A-Ca@PDA NPs 尺寸均匀，具有良好的生物相容性，并且表现出 NIR 和 pH 响应性，在感染区域能够有效地避免过早释放 NO 并保持较长时间滞留。具体而言，A-Ca@PDANPs 不仅可以在酸性生物膜微环境中水解产生 H₂O₂，催化 L-Arg 生成 NO 气体，从而消散生物膜，使细菌处于更加敏感状态；同时，

在 NIR 照射下还展示出优异的光热转换效果。NIR 照射后，局部高温和 NO 爆发共同促进了生物膜崩溃和细菌死亡。A-Ca@PDA NPs 在体内外对耐药菌都显示出有效的生物膜消融效果。此外，这种增强型 PTT 策略不仅能够有效杀灭耐药细菌，并且由于其通过物理破坏和多种细胞过程作用模式实现作用而非特定靶点诱导抗药性形成。总之，我们成功制备了一种 pH 和 NIR 双响应型纳米颗粒以实现 NO 与 PTT 联合应用，并为抑制耐药细菌感染提供了新策略。

第3章 基于 L-Arg 为供体释放 NO 联合光热/光动力抑制耐药菌研究

3.1 引言

过度使用和滥用抗生素对细菌产生了巨大的影响，导致细菌基因发生改变，出现了耐药菌株甚至多重耐药性。细菌通过从头突变或从其他生物体获取基因来对传统抗生素展示耐药性，并使许多抗生素对其失去了效果，严重威胁治疗效果。一些细菌能够集体嵌入自分泌的胞外聚合物基质中形成三维的生物膜，这种结构可以保护细菌并进一步提高其对抗生素的耐药性。因此，我们需要采取措施减少抗生素的不必要使用和滥用，加强感染控制措施，以防止耐药菌株的进一步传播和演变。

某些细菌具有较高的抗热性，可以耐受高温环境并继续生存繁殖，因此单独使用 PTT 可能对耐热细菌无效。幸运的是，PDT 和 PTT 的协同作用可以有效克服耐热细菌物种的 PTT 无效问题。Qi 和同事将 S-亚硝基硫醇（SNO）和吲哚菁绿（ICG）负载到涂层金纳米棒（GNRs）上的介孔二氧化硅（mSiO₂）上，制备了 NIR 光触发型纳米颗粒（即 GNRs@mSiO₂-SNO/ICG），具有抗菌和抗炎能力，并可用于牙周疾病治疗^[190]。在单次 808 nm 激光照射下，不仅可以通过 SNO 释放 NO，还可以通过 PTT 触发生物膜消融以及 PDT 诱导产生的细菌杀灭作用共同实现了协同抑菌效果。

本章以 MoS₂ 纳米花为载体，负载 L-Arg 为 NO 供体，负载 IR780 为光热剂和光敏剂，通过 NO 气体疗法/PTT/PDT 三种治疗方式联合来对抗耐药菌。MoS₂ 在作为载体的同时，也有光热转换能力，MoS₂ 和 IR780 两种光热剂联合，能够使 AI-MoS₂ 具有良好的光热转换能力。此外，最终合成的纳米颗粒是类似纳米花的结构，它具有锋利的棱角，在于细菌接触时也能够对细菌细胞膜造成物理损伤。本章区别于之前漫长的级联反应，AI-MoS₂ 结构简单，反应迅速，在激光照射后 IR780 产生的 ROS 会直接催化 L-Arg 反应生成 NO，在短时间内实现高浓度的 NO 释放，较高的光热转换能力，以及可观的 ROS 生成能力，抑制耐药菌，实现

对耐药菌生物被膜的有效消融。

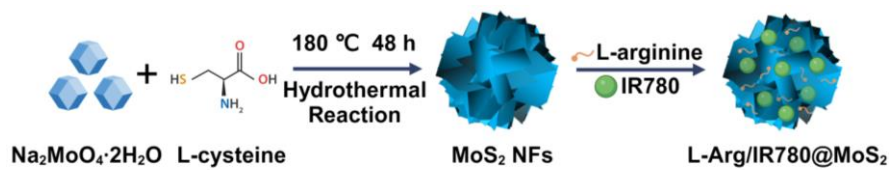


图 3-1. L-Arg/IR780@MoS₂ 的合成示意图

Figure 3-1. Synthesis of L-Arg/IR780@MoS₂

3.2 实验试剂与仪器

3.2.1 实验试剂

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagent

试剂名称	生产厂家
钼酸钠·二水合物 (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, 99.5%)	阿拉丁生化科技有限公司
硫代乙酰胺 (C ₂ H ₅ NS)	阿拉丁生化科技有限公司
IR780	阿拉丁生化科技有限公司
L-精氨酸 (L-Arg)	阿拉丁生化科技有限公司
Tris-盐酸缓冲液 AR	阿拉丁生化科技有限公司
溴化钾 (KBr)	阿拉丁生化科技有限公司
1,3-二苯基异苯并呋喃 (DPBF, 97%)	阿拉丁生化科技有限公司
SYTO9/PI 活/死细菌检测试剂盒	阿拉丁生化科技有限公司
无水甲醇	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司

3.2.2 实验仪器

同表 2-2 实验仪器部分。

3.2.3 菌株及小鼠来源

同表 2-3 菌株及小鼠来源部分

3.3 实验方法

3.3.1 材料合成与表征

3.3.1.1 材料合成

(1) 合成 MoS_2 纳米花

采用水热法制备 MoS_2 纳米花。具体操作是将 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (18.54 g) 和 $\text{CN}_2\text{H}_4\text{S}$ (7.99 g) 这两种化合物完全溶解于 300 mL 去离子水中，在强力搅拌下搅拌 30 min。接着，将上述混合物转移到 300 mL 的特氟隆衬里不锈钢高压釜中，在 180°C 下反应 48 h。冷却至室温后，以 12000 r/min 离心 10 min，用超纯水反复洗涤 3 次，以去除杂质和未反应的化合物，达到纯化产物的目的。最后，在真空下 60°C 干燥过夜，得到纯净的 MoS_2 纳米花。

(2) 合成 A- MoS_2

将 L-Arg 按照 1 mg/mL 的浓度加入到 pH 值为 8.5、浓度为 50 mM 的 Tris 缓冲液中。之后，将 L-Arg 溶液与适量的 MoS_2 NFs 混合均匀，常温下搅拌 24 h。随后，使用超纯水对混合溶液进行反复离心洗涤，离心条件为 12000 r/min、10 min，重复操作 3 次。完成洗涤后，得到 A- MoS_2 NFs。最后，在 -45°C 下进行冷冻干燥处理，持续时间为 24 h。

(3) 合成 AI- MoS_2

将 A- MoS_2 NPs 均匀分散在超纯水中，将 5 mg 的 IR780 溶解在 100 μL 的 DMSO 中，然后将该溶液滴加到 A- MoS_2 溶液中，常温下搅拌 12 h。之后，使用超纯水对混合溶液进行 3 次离心洗涤，离心条件为 12000 r/min、10 min。完成洗涤后，得到 AI- MoS_2 。最后，在 -45°C 下进行冷冻干燥处理，并保存备用。

3.3.1.2 材料表征

(1) SEM 表征

SEM 的实验方法见 2.3.2.2 材料表征 SEM 部分。

(2) TEM 表征

TEM 的实验方法见 2.3.2.2 材料表征 TEM 部分。

(3) 粒径及 Zeta 电位分析

粒径及 Zeta 电位分析的实验方法见 2.3.2.2 材料表征粒径及 Zeta 电位分析部

分。

(4) FT-IR 分析

FT-IR 的实验方法见 2.3.2.2 材料表征 FT-IR 部分。

(5) 紫外可见光谱 (UV-Vis) 分析

分别称取一定量的 MoS₂ NFs 和 AI-MoS₂ NPs 粉末并超声使其均匀分散在超纯水中,使用 UV-3600 紫外可见分光光度计测定不同样品的紫外可见吸收光谱。

3.3.2 体外性能研究

3.3.2.1 光热性能分析

光热性能分析的实验方法见 2.3.3.1 光热性能分析部分。此处分组:浓度为 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 AI-MoS₂; NIR 激光功率为 0, 0.5, 1.0, 1.5 W/cm²。

3.3.2.2 ROS 检测

采用 ROS 探针 DPBF 对 PDT 效应产生的单线态氧 (¹O₂) 进行检测。DPBF 可以与 ¹O₂ 发生不可逆反应并导致 DPBF 降解。将 1 mL DPBF (20 $\mu\text{g/mL}$, 溶于 DMSO) 添加到 IR780、MoS₂、L-Arg 和 AI-MoS₂ 分散液 (20 $\mu\text{g/mL}$, 1 mL) 中,并用功率密度为 1.0 W/cm² 的 808 nm 激光照射不同时间。记录 DPBF 在 410 nm 处的吸收峰,并以 DPBF 作为阴性对照。所有的操作都是在黑暗中进行的。

3.3.2.3 NO 释放表征

NO 释放表征见 2.3.3.2 NO 释放表征。此处分组:浓度为 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 AI-MoS₂; NIR 激光功率为 0, 0.5, 1.0, 1.5 W/cm²。时间为测量 20 min 内的 NO 释放。以及在 75 μM 维生素 C (VC) 存在的条件下,检测预设时间下 Griess 试剂与 AI-MoS₂ NPs 混合物。

3.3.3 体外抑菌实验

3.3.3.1 CFU 抑菌实验

方法见 2.3.4.2 的 CFU 抗耐药菌实验。

3.3.3.2 细菌活/死染色实验

方法见 2.3.4.3 细菌活/死染色实验。

3.3.3.3 生物膜消融性能

实验方法见 2.3.4.6 抗生物膜性能。

3.3.4 体外生物相容性评价

AI-MoS₂ 对 RBC 的溶血检测见 2.3.5.2 溶血实验。

3.4 结果与讨论

3.4.1 材料的合成与表征

采用 SEM 和 TEM 对制备的纳米材料进行表征。如图 3-2a 和 c 所示, MoS₂ 纳米片堆叠在一起, 呈现出约 150 nm 大小的花状结构, 证明了 MoS₂ 纳米花的成功合成。从图 3-2b 和 d 可以看出 MoS₂ 纳米花被 L-Arg 和 IR780 覆盖。图 3-2e 为 AI-MoS₂ 的元素映射图谱。可以观察到 Mo、S、I、Cl、C、N 和 O 元素均匀分布。通过动态光散射测量 AI-MoS₂ 纳米颗粒的平均流体动力学直径大于单纯的 MoS₂ 纳米花的直径, 其大小从 176.31 ± 1.53 nm 增大至 221.03 ± 2.41 nm, 这说明了 L-Arg 和 IR780 有效负载在 MoS₂ 纳米花表面 (图 3-3a)。如图 3-3b 所示, MoS₂ 纳米花的 Zeta 电位为 -30.8 mV, 负载 L-Arg 和 IR780 后 AI-MoS₂ 的 Zeta 电位变为 -10.3 mV, 进一步表明 L-Arg 和 IR780 的负载。如图 3-3c 所示, 红外光谱在 720 cm^{-1} 处出现 C-Cl 伸展, 在 1176 cm^{-1} 处出现 CN 伸展, 在 1550 cm^{-1} 处出现 C=C 伸展, 表明了 IR780 的特征。在 1496 cm^{-1} 处观察到胍基 C=N 伸展, 表明了 L-Arg 的特征。此外, 如图 3-3d 所示, 紫外吸收峰的变化也证明了终材料 AI-MoS₂ 的合成成功。通过以上多种表征方法证明成功合成了形貌均一, 良好稳定性的 AI-MoS₂ 纳米颗粒。

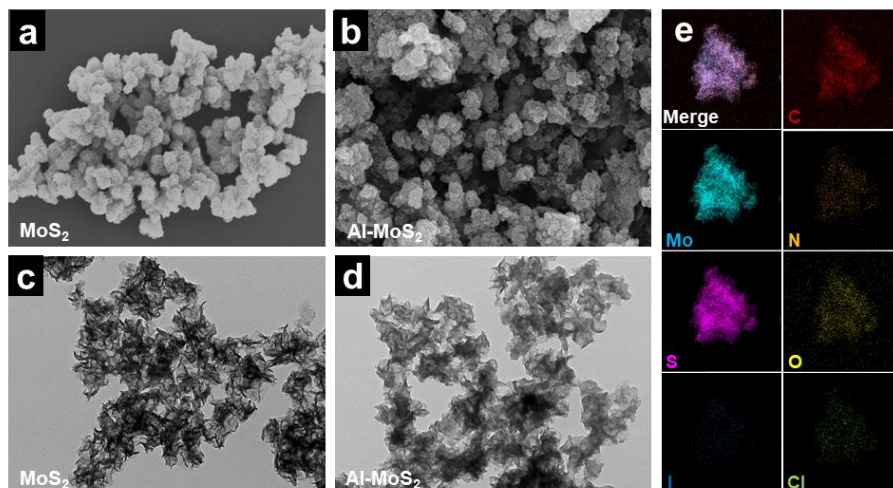


图 3-2. (a, b) MoS₂ 纳米花和 Al-MoS₂ 纳米花的 SEM 图片; (c, d) MoS₂ 纳米花和 Al-MoS₂ 纳米花的 TEM 图片; (e) Al-MoS₂ 纳米花的 Mapping 图片

Figure 3-2. (a, b) SEM images of MoS₂ nanoflowers and Al-MoS₂ nanoflowers; (c, d) TEM images of MoS₂ nanoflowers and Al-MoS₂ nanoflowers; (e) Mapping image of Al-MoS₂ nanoflowers

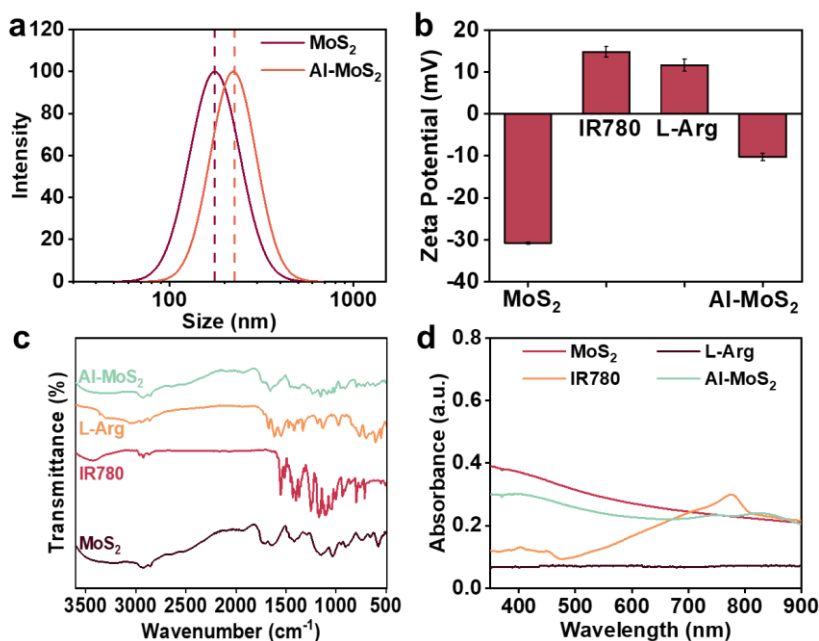


图 3-3. (a) MoS₂ 和 Al-MoS₂ 的粒径; (b) MoS₂、IR780、L-Arg 和 Al-MoS₂ 的电位; (c, d) MoS₂、IR780、L-Arg 和 Al-MoS₂ 的红外图谱和紫外图谱

Figure 3-3. (a) particle size of MoS₂ and Al-MoS₂; (b) potential of MoS₂, IR780, L-Arg and Al-MoS₂; (c, d) FT-IR and UV-Vis spectra of MoS₂, IR780, L-Arg and Al-MoS₂

3.4.2 体外性能研究

3.4.2.1 光热性能分析

IR780 作为一种典型的七甲基菁染料, 具有 NIR 吸收、荧光性质和光热效应, 在治疗临床前癌症和感染模型方面显示出良好的前景^[191]。此外, 808 nm NIR 激光由于其在 NIR 光谱中的优异吸收性能而被广泛用于 IR780 介导的治疗中^[192, 193]。为了研究 Al-MoS₂ 的 PTT 效率, 用红外相机记录了激光照射 (808 nm, 0.5-1.5 W/cm², 6 min) 下的温度变化 (0-200 μg/mL)。如图 3-4b 和 e 所示, 随着 Al-MoS₂ 表现出温度对浓度的依赖性, 在功率密度为 1.0 W/cm² 时, Al-MoS₂ 温度从 25.7°C 迅速上升到 55.9°C (200 μg/mL), 25.0°C 迅速上升到 53.9°C (150 μg/mL)。

g/mL)。此外,温度也随着功率密度的不同而变化,呈现出功率密度相关的光热性能(图 3-4a)。在 $0-1.5 \text{ W/cm}^2$ (808 nm, 6 min) 功率密度范围内, $150 \mu\text{g/mL}$ AI-MoS₂ 的极限温度从 25.4°C 迅速上升到 61.4°C 。AI-MoS₂ ($150 \mu\text{g/mL}$) 的循环加热-冷却曲线在 808 nm 激光照射 6 min (激光打开) 下保持不变,然后自然降温(激光关闭) 3 个“开-关”循环(图 3-4c)。这证明了 AI-MoS₂ 光热转化过程的高效性和稳定性。根据加热-冷却曲线和热时间常数 ($T_s=176.67$) (图 3-4d), 可以计算出光热转换效率为 65.4%, 是 PTT 的优良候选材料。

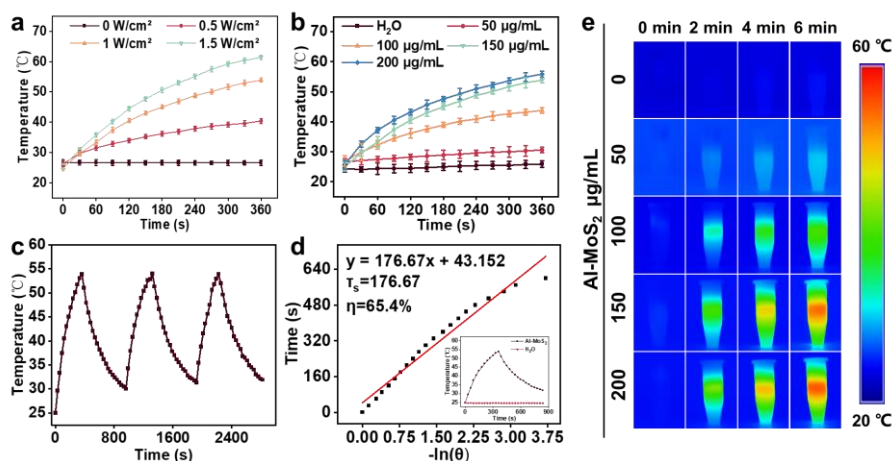


图 3-4. (a) 150 µg/mL 的 AI-MoS₂ 在不同功率下的温度变化; (b) 1 W/cm² 时 AI-MoS₂ 不同浓度的温度变化; (c) AI-MoS₂ 的升温降温曲线; (d) AI-MoS₂ 光热转换效率; (e) 近红外相机下的不同浓度 AI-MoS₂ 的温度变化

Figure 3-4. (a) Temperature changes of 150 µg/mL AI-MoS₂ at different power; (b) Temperature changes at different concentrations of AI-MoS₂ at 1 W/cm²; (c) heating and cooling curves of AI-MoS₂; (d) photothermal conversion efficiency of AI-MoS₂; (e) Temperature changes of different concentrations of AI-MoS₂ under near-infrared camera

3.4.2.2 ROS 检测

为了验证在光动力抗菌效应中起决定性作用的 AI-MoS₂ 的产单线态氧的能力, 利用 DPBF 作为探针来测定单线态氧的生成。一般来说, DPBF 的特征峰可以在 410 nm 处观察到, 当 ¹O₂ 存在时其吸光度会发生不可逆衰减^[194]。当 DPBF 和 IR780 一起孵育时, 在用 NIR 激光照射不同时间段后, 410 nm 出的紫外吸收强度呈现规律性降低, 表明其具有良好的单线态氧生成能力。将 DPBF 与不同的纳米颗粒一起孵育, 如图 3-5a, b 和 c 所示, 在激光照射下, 游离的 MoS₂ 和 L-Arg 的吸光度呈极弱的下降趋势, 说明它们产生单线态氧的能力几乎可以不计, 表明这两种材料没有光动力效应。而负载 IR780 后, AI-MoS₂ 的吸光度在 808 nm 激光照射下显著减低, 证明单线态氧的产量在增加和有效的光动力效应 (图 3-5e)。从图 3-5f 可以看出, 虽然 AI-MoS₂ 的单线态氧一开始要弱于 IR780, 这是由于 IR780 的一定负载量所致。在照射 6 min 后, AI-MoS₂ 的上升趋势比 IR780 更明显, 说明游离 IR780 加载到 A-MoS₂ 后光稳定性增强, 这在抗菌过程中起着决定性作用。

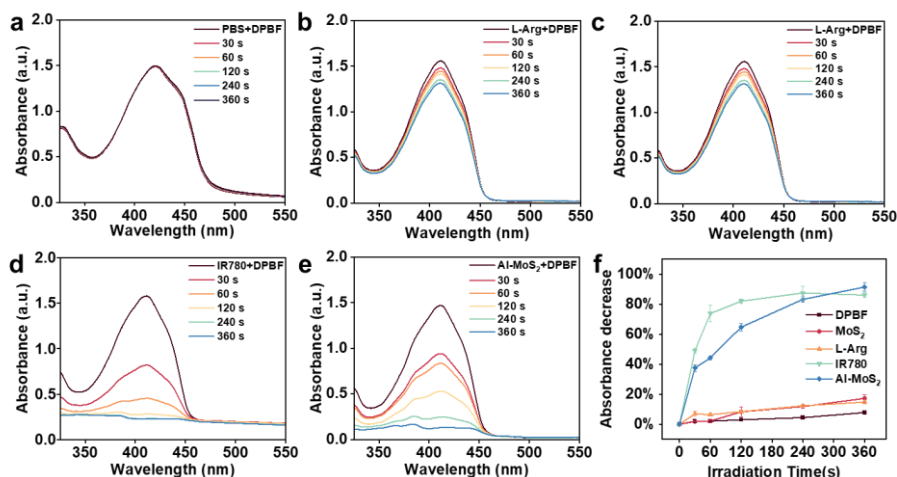


图 3-5. (a-e) PBS、MoS₂、L-Arg、IR780 和 AI-MoS₂ 的活性氧释放；(f) 不同材料在激光照射后 DPBF 的吸光度变化

Figure 3-5. (a-e) Reactive oxygen species release from PBS, MoS₂, L-Arg, IR780, and AI-MoS₂;

(f) Absorbance changes of DPBF in different materials after laser irradiation

3.4.2.3 NO 释放行为

近年来, iNOS、NADPH 和几种 ROS ($^1\text{O}_2$, H_2O_2) 催化 L-Arg 转化为 NO 的生物或催化反应在生物医药领域引起了广泛的关注。因此, NIR 诱导的 AI-MoS₂ 为同时实现 PDT 和 ROS 触发的 NO 释放提供了一种新的灵活的策略。采用 Griess 试验, 借助标准曲线检测 NO 的释放量 (图 3-6a)。如图 3-6b 和 c 所示, AI-MoS₂ 纳米颗粒的 NO 释放表现出功率密度依赖性和浓度依赖性。在没有 NIR 照射的情况下, 几乎不产生 NO 气体, 这说明了 NIR 照射的重要性。当用 1 W/cm^2 NIR 激光照射 $150 \mu\text{g/mL}$ 的 AI-MoS₂ NPs 时, 在 10 min 时可检测到 NO 的总生成量为 $3.8 \mu\text{M}$ 。正如预期的那样, AI-MoS₂ NPs 导致光动力效应的连锁反应, 从而实现有效的 ROS 和级联 NO 气体释放。当向混合物中加入还原剂 VC ($75 \mu\text{M}$) 后, 可以观察到 NO 的释放明显减少。这是因为 VC 能有与 ROS 发生反应, 降低了 ROS 的浓度, 进而减少了 ROS 与 L-Arg 之间的转化反应, 导致了 NO 的释放减少, 进一步证明了 NO 是通过 ROS 对 L-Arg 的转化产生的。(图 3-6d)。

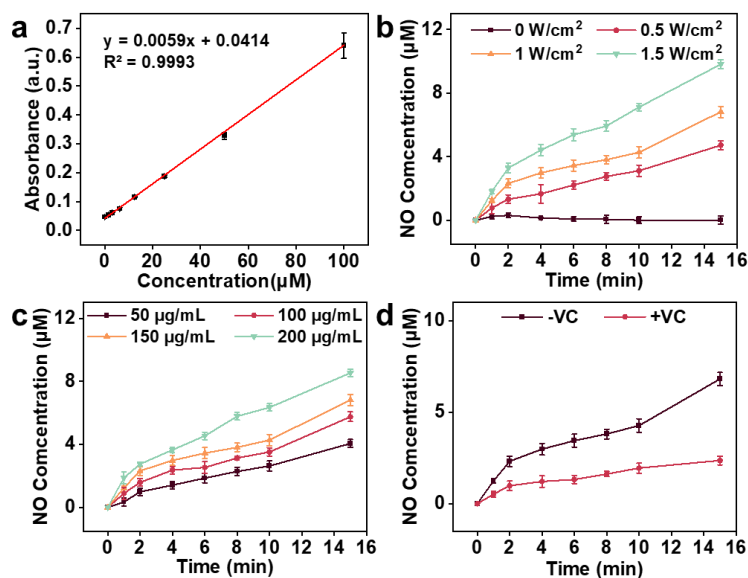


图 3-6. (a) NO 标准曲线; (b) 不同不同功率激光照射下的 NO 释放; (c) 不同 AI-MoS₂ 浓度在激光照射下的 NO 释放; (d) 加或不加 VC 后在激光照射下的 NO 释放

Figure 3-6. (a) NO standard curve; (b) NO release under different laser power; (c) NO release under laser irradiation with different AI-MoS₂ concentrations; (d) NO release under laser irradiation with or without VC

3.4.3 体外抗菌实验

3.4.3.1 CFU 抑菌实验

验证 AI-MoS₂ 在 808 nm 激光照射下对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的抑性能, 探讨其抑菌效果。如图 3-7 所示, 采用平板计数法定量测定 AI-MoS₂ 及其对照 (PBS、MoS₂, IR780 和 IR780-MoS₂) 在 NIR 激光照射或不照射下对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抑菌效果。在没有 NIR 激光的情况下, 没有一个组显示出较强的抗菌效果。在 NIR 激光照射 (808 nm, 1.0 W/cm^2 , 6 min) 下, AI-MoS₂ 处理组 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的细菌存活率分别为 2.9% 和 2.3%。结果表明, AI-MoS₂+NIR 对浮游的 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的抑制率超过 95%, 表明 PTT、PDT 和 NO 具有协同作用, 具有很强的抑菌活性。

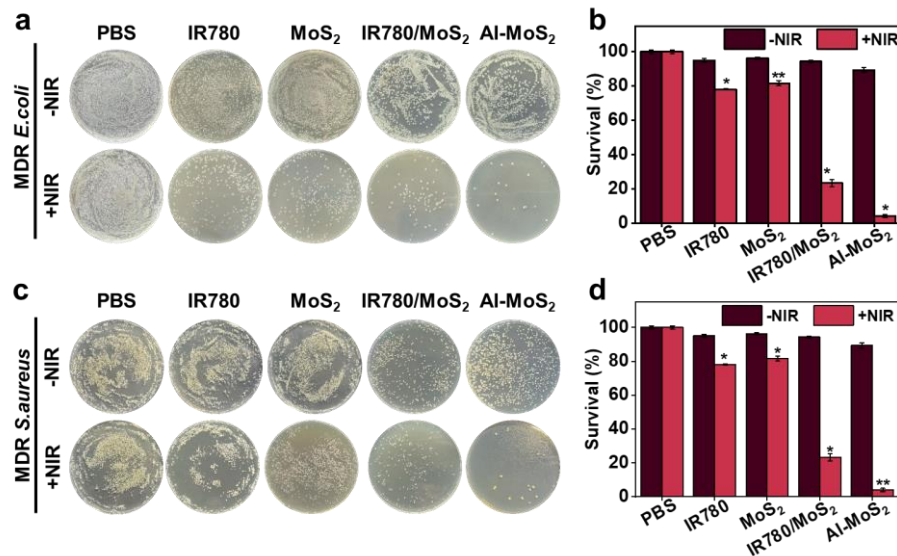


图 3-7. (a) 不同材料在加或不加激光照射时对 MDR *E. coli* 的 CFU 图片；(b) 不同材料处理后 MDR *E. coli* 的存活率；(c) 不同材料在加或不加激光照射时对 MDR *S. aureus* 的 CFU 图片；(d) 不同材料处理后 MDR *S. aureus* 的存活率

Figures 3-7. (a) CFU images of MDR *E. coli* of different materials with or without laser irradiation; (b) the survival rate of MDR *E. coli* treated with different materials; (c) pictures of CFU of MDR *S. aureus* in different materials with or without laser irradiation; (d) survival of MDR *S. aureus* after treatment with different materials

3.4.3.2 细菌活/死染色分析

使用 SYTO9 和 PI 双重荧光染色方法研究纳米颗粒对细菌活性的影响, 通过比较细菌荧光信号的变化, 可以直观地观察到细菌的活性状态是否发生了改变。通过观察细菌在荧光显微镜下的荧光信号, 判断细菌的活死状态并拍摄图片。如图 3-8 所示, 经 Al-MoS₂+NIR (150 μ g/mL) 处理后, 红色荧光的密度和强度都有较高的分布, 并且 Al-MoS₂+NIR 处理对比 IR780 和 MoS₂ 的光热/光动力效应显示出有效的抗菌活性。荧光显微镜图像显示出和稀释平板涂布法趋势一致的抑菌效果, 证实了 Al-MoS₂ 的抑菌性能。

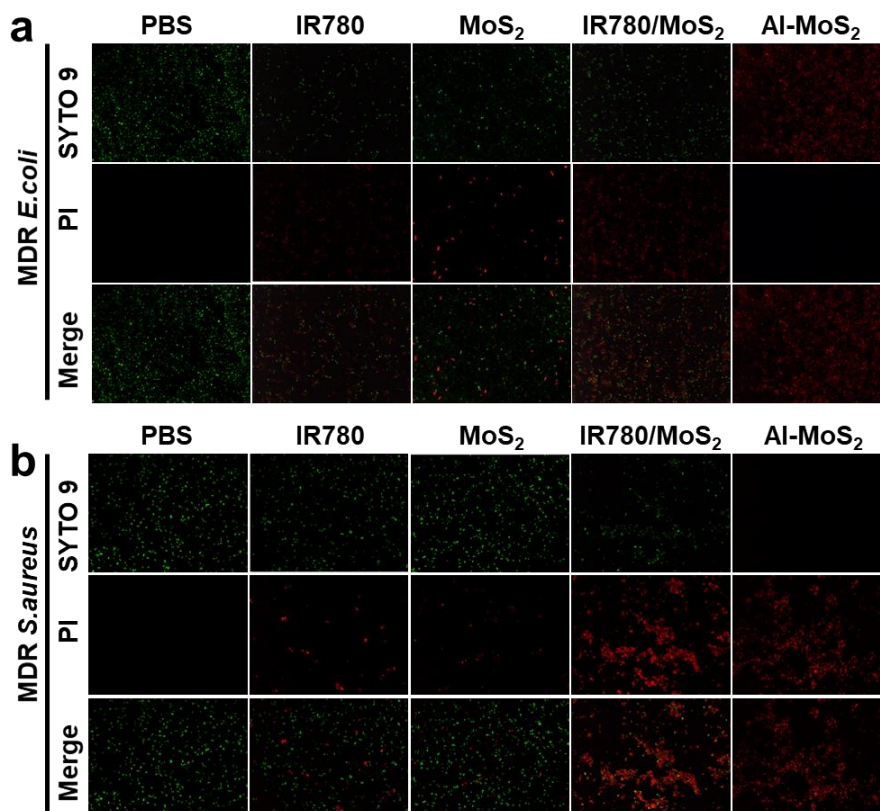


图 3-8. (a) 不同材料在激光照射后对 MDR *E. coli* 处理后的 LIVE-DEAD 荧光染色图片；

(b) 不同材料在激光照射后对 MDR *S. aureus* 处理后的 LIVE-DEAD 荧光染色图片

Figure 3-8. (a) LIVE-DEAD fluorescence staining images and fluorescence quantitative images of MDR *E. coli* treated with different materials after laser irradiation; (b) LIVE-DEAD fluorescence staining images and fluorescence quantitative images of MDR *S. aureus* treated with different materials after laser irradiation

3.4.3.3 生物膜消融性能

细菌生物膜是由细菌聚集在表面形成的复杂结构，它们通过分泌胞外聚合物来粘附在表面并形成保护层。这种生物膜的形成使得细菌对于常规的抗生素治疗和免疫机制更加耐受。其中 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 是生物膜相关感染的主要菌种。因此采用结晶紫染色的方法来评估 Al-MoS₂ 消融生物膜的能力。如图 3-9 所示，经 1 W/cm² 的激光照射处理后，150 μg/mL 的 Al-MoS₂ 对比 PBS 处理的生物膜紫色明显降低。根据相应的定量结果，在 NIR 光照射下，150 μg/mL 的 Al-MoS₂ 对 MDR *E. coli* 和 MDR *S. aureus* 的生物膜表现出明显的消融效果，生物膜残余量分别为 7.52%±1.07 和 6.93%±1.29。这些结果表明，Al-MoS₂ 纳

米颗粒在 NIR 激光照射后产生的 NO 气体、光热和光动力效应联合作用能够有效消融生物膜。

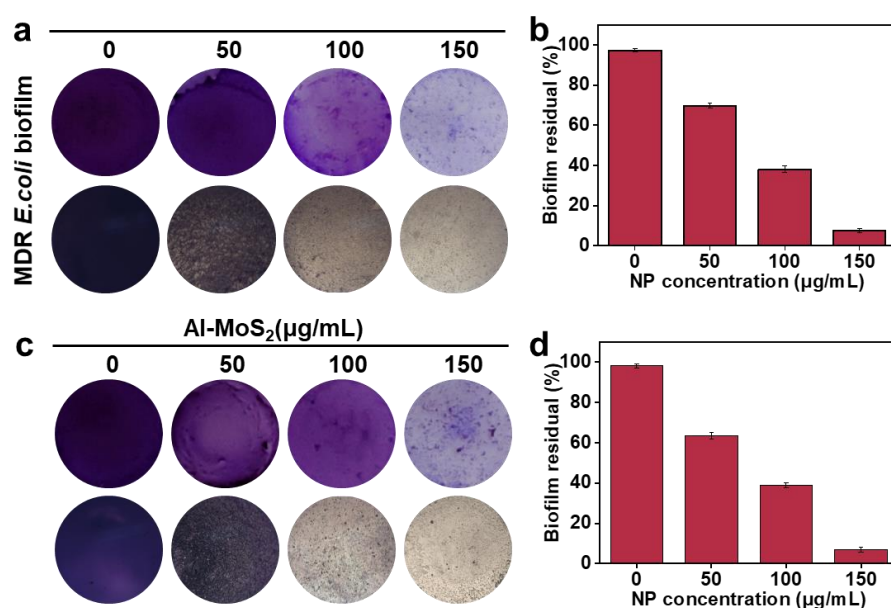


图 3-9. (a) 不同 AI-MoS₂ 浓度在激光照射后对 MDR *E. coli* 处理后的生物膜消融图片；

(b) 不同 AI-MoS₂ 浓度在激光照射后对 MDR *S. aureus* 处理后的生物膜消融图片

Figure 3-9. (a) The ablation images of MDR *E. coli* biofilms treated with different concentrations of AI-MoS₂ after laser irradiation; (b) Pictures of biofilm ablation of MDR *S. aureus* treated with different concentrations of AI-MoS₂ after laser irradiation

3.4.4 体外生物相容性评价

采用细胞毒性试验和血液相容性试验相结合的方法评价 AI-MoS₂ 的体外生物相容性。研究 AI-MoS₂ 在近红外照射和非照射条件下对 L929 小鼠成纤维细胞的细胞毒性作用。图 3-10a 中所示结果表明，在 25-200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 AI-MoS₂ 暴露 24 h 后，L929 细胞表现出高水平的活力(>85%)。L929 细胞经 AI-MoS₂+NIR 处理后，细胞活力始终保持较高水平，与未照射组相比无显著差异。这一结果与 2.4.4 中的结果类似，可能是 NO 部分减轻了 PTT/PDT 效应对正常组织造成的损害。这一结果明确的显示了 AI-MoS₂ 优异的生物相容性。

为了进一步了解 AI-MoS₂ 的血液相容性，进行了溶血分析，评估近红外激光照射和非照射下 AI-MoS₂ 对大鼠红细胞的溶血活性。如图 3-10b 所示，实验组和阳性对照 (Triton-X) 在图中有明显的颜色区别。值得注意的是，所有实验组仅

表现出轻微的溶血 (<5%)。结果显示 AI-MoS₂ 具有良好的血液相容性。

综上所述, 这些结果表明 NO 能够改善 PDT 和 PTT 治疗引起的组织损伤, 使得 AI-MoS₂ 在具有良好的生物相容性的同时, 不会引发明显的免疫反应或其他副作用, 在治疗细菌感染性伤口方面具有重要的潜力。

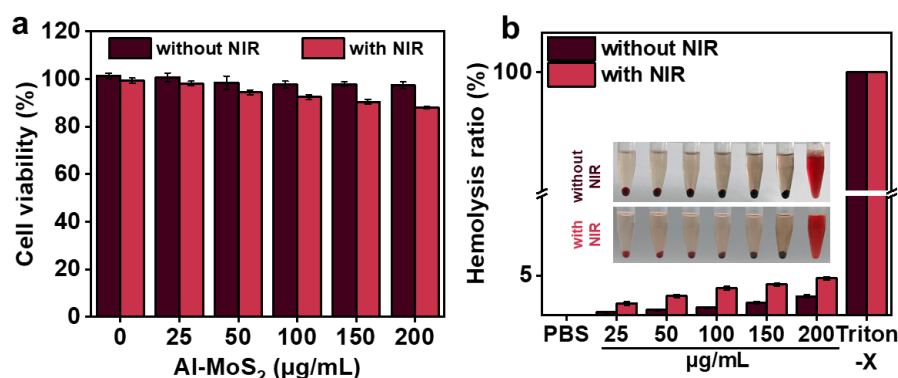


图 3-10. (a) 在不同浓度 AI-MoS₂ 下, 用/不用 NIR 照射孵育 24 h 后的 L929 细胞的存活率。(b) 不同浓度 AI-MoS₂ 处理后, 在有或无 NIR 照射的情况下孵育 12 h 的溶血率;

插图 of 不同样本照片

Figure 3-10. (a) Survival rate of L929 cells incubated for 24 h with/without NIR laser treatment at different concentrations AI-MoS₂. (b) The hemolysis rate of AI-MoS₂ at different concentrations after incubation for 12h with or without NIR irradiation; Illustrations for different sample photos

3.5 本章小结

本章在 NO 联合光热疗法抑制耐药菌的基础上提出了 NO 联合 PTT/PDT 三重疗法并行的 AI-MoS₂ 纳米颗粒。所得的 AI-MoS₂ 尺寸均匀, 形貌良好, 具有良好的生物相容性, 具有 NIR 响应性, 能够避免 ROS 和 NO 过早释放, 增强在感染区域对细菌的抑制效果。具体而言, AI-MoS₂ 可以在较低功率的 NIR 激光照射下实现 PTT/PDT, 在发挥光动力效果产生 ROS 的同时催化 L-Arg 产生 NO, 三重治疗方法并行, 共同促进了细菌死亡。其次, AI-MoS₂ 对耐药菌生物膜也显示出明显的消融效果, 对治疗耐药菌感染提出了新思路。

第 4 章 总结与展望

4.1 结论

本论文通过广泛搜集国内外文献的基础上,引入了一种 NO 释放供体 L-Arg, NO 是一种重要的信号分子,在抑制耐药菌方面具有广泛的应用潜力。L-Arg 是一种常见的氨基酸,可以作为前体物质实现对 NO 的输送。基于以上,本论文设计并制备了多重疗法联合作用的抑制耐药菌纳米材料。这些材料结合了不同的抑菌机制,以实现更强大的抗耐药菌效果。通过对这些抑制耐药菌纳米材料的研究,为解决耐药菌感染带来的人类健康问题提供了新的思路。全文研究内容主要分为以下两个部分:

(1)提出了一种光热联合 NO 气体清除耐药菌的纳米颗粒 A-Ca@PDA NPs。所得的 A-Ca@PDA NPs 尺寸均匀,具有良好的生物相容性,并且表现出 pH 响应性,在感染区域能够有效地避免过早释放 NO 并保持较长时间滞留。具体而言, A-Ca@PDA NPs 不仅可以在酸性生物膜微环境中水解产生 H_2O_2 , 催化 L-Arg 生成 NO 气体,从而消散生物膜,使细菌处于更加敏感状态;同时,在 NIR 光辐射下还展示出优异的光热转换效果。NIR 辐射后,局部高温和 NO 爆发共同促进了生物膜崩溃和细菌死亡。A-Ca@PDA NPs 在体内外对耐药菌都显示出有效的生物膜消融效果。此外,这种增强型 PTT 策略不仅能够有效抑制耐药细菌,并且由于其通过物理破坏和多种细胞过程作用模式实现作用而非特定靶点诱导抗药性形成。总之,我们成功制备了一种 pH 和 NIR 双响应型纳米颗粒以实现 NO 与 PTT 联合应用,并为对抗耐药细菌感染提供了新策略。

(2)在 NO 联合光热疗法抑制耐药菌的基础上提出了 NO 联合光热/光动力三重疗法并行的 AI-MoS₂ 纳米颗粒。所得的 AI-MoS₂ 尺寸均匀,形貌良好,具有良好的生物相容性,具有 NIR 响应性,能够避免 ROS 和 NO 过早释放,增强在感染区域对细菌的抑制效果。具体而言, AI-MoS₂ 可以在较低功率的 NIR 激光照射下实现光热/光动力疗法,在发挥光动力效果产生 ROS 的同时催化 L-Arg 产生 NO,三重治疗方法并行,共同促进了细菌死亡。其次, AI-MoS₂ 对耐药菌生物膜也显示出明显的消融效果,对治疗耐药菌感染提出了新思路。

4.2 展望

本论文采用 NO 供体 L-Arg 为核心，成功制备了一系列响应性纳米复合材料，旨在克服细菌的耐药性、实现广谱抑菌等目标。然而，在处理过程中，NIR 激光的功率对正常细胞仍然存在较大的影响，不利于后期的临床研究。此外，对纳米颗粒的代谢和清除机制以及最佳药物浓度仍了解甚少。在本文中构建的纳米颗粒需要经过多个级联反应才能实现最终的治疗效果，这在一定程度上限制了纳米颗粒的应用与发展。另外，细菌感染疾病的发生情况非常复杂，往往涉及多种耐药方式、多种细菌的交叉感染以及其他并发症的同时发生。因此，在后续的工作中，我们需要设计一种具有简单释放条件、良好生物相容性以及多种细菌和多种感染方式均具有广谱抑菌效果的纳米颗粒。为了解决这些问题，需要进一步研究纳米颗粒的药物代谢和清除机制，明确最佳药物水平，并进行更加深入的临床研究。此外，还需要改进纳米颗粒的设计，使其具有更简化的释放条件、更好的生物相容性，并能够同时针对不同细菌和多种感染方式进行抑菌。对纳米颗粒的进一步优化和完善将有助于提高其在临床治疗中的应用前景，并为解决细菌感染引起的复杂疾病奠定基础。

参考文献

- [1] Alonso B, Perez-Granda M J, Latorre M C, et al. Production of biofilm by *Staphylococcus aureus*: Association with infective endocarditis? [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*, 2022, 40(8): 418-422.
- [2] Cook M A, Wright G D. The past, present, and future of antibiotics [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(657): eabo7793.
- [3] Stokes J M, Lopatkin A J, Lobritz M A, et al. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(2): 251-259.
- [4] Roemhild R, Bollenbach T, Andersson D I. The physiology and genetics of bacterial responses to antibiotic combinations [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(8): 478-490.
- [5] Hall C W, Mah T F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41(3): 276-301.
- [6] Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon [J]. *Pathog Glob Health*, 2015, 109(7): 309-318.
- [7] Lu J, Cokcetin N N, Burke C M, et al. Honey can inhibit and eliminate biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18160.
- [8] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [9] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9): 623-633.
- [10] Weldick P J, Wang A, Halbus A F, et al. Emerging nanotechnologies for targeting antimicrobial resistance [J]. *Nanoscale*, 2022, 14(11): 4018-4041.
- [11] Lebeaux D, Ghigo J M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014, 78(3): 510-543.
- [12] Shineh G, Mobaraki M, Perves Bappy M J, et al. Biofilm Formation, and Related Impacts on Healthcare, Food Processing and Packaging, Industrial Manufacturing, Marine Industries, and Sanitation—A Review [J]. *Applied Microbiology*, 2023, 3(3): 629-665.
- [13] Flemming H C, Wingender J, Szewzyk U, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(9): 563-575.
- [14] Hu D, Zou L, Yu W, et al. Relief of Biofilm Hypoxia Using an Oxygen

- Nanocarrier: A New Paradigm for Enhanced Antibiotic Therapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(12): 2000398.
- [15] Yang N, Sun M, Wang H, et al. Progress of stimulus responsive nanosystems for targeting treatment of bacterial infectious diseases [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2024, 324: 103078.
- [16] Wang Y, Jin Y, Chen W, et al. Construction of nanomaterials with targeting phototherapy properties to inhibit resistant bacteria and biofilm infections [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 358: 74-90.
- [17] Cao J, Huang D, Peppas N A. Advanced engineered nanoparticulate platforms to address key biological barriers for delivering chemotherapeutic agents to target sites [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 167: 170-188.
- [18] Lee J, Oh E T, Yoon H, et al. A mesoporous nanocontainer gated by a stimuli-responsive peptide for selective triggering of intracellular drug release [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(15): 8070-8077.
- [19] Wang X, Wang D, Lu H, et al. Strategies to Promote the Journey of Nanoparticles Against Biofilm-Associated Infections [J]. *Small*, 2024, 20(10): e2305988.
- [20] Zhen N, Wang X, Li X, et al. Protein-based natural antibacterial materials and their applications in food preservation [J]. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(5): 1324-1338.
- [21] Trache D, Thakur V K. Nanocellulose and Nanocarbons Based Hybrid Materials: Synthesis, Characterization and Applications [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(9): 1800.
- [22] Varghese M, Balachandran M. Antibacterial efficiency of carbon dots against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A review [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(6): 106821.
- [23] Wu Y, Li C, Van Der Mei H C, et al. Carbon Quantum Dots Derived from Different Carbon Sources for Antibacterial Applications [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(6): 623.
- [24] Yang J, Zhang X, Ma Y H, et al. Carbon Dot-Based Platform for Simultaneous Bacterial Distinguishment and Antibacterial Applications [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(47): 32170-32181.
- [25] Lin F, Bao Y-W, Wu F-G. Carbon Dots for Sensing and Killing Microorganisms [J]. *C*, 2019, 5(2): 33.
- [26] Yang J, Gao G, Zhang X, et al. One-step synthesis of carbon dots with bacterial contact-enhanced fluorescence emission: Fast Gram-type identification and selective Gram-positive bacterial inactivation [J]. *Carbon*, 2019, 146: 827-839.
- [27] Ran H H, Cheng X, Bao Y W, et al. Multifunctional quaternized

- carbon dots with enhanced biofilm penetration and eradication efficiencies [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(33): 5104-5114.
- [28] Liu S, Zeng T H, Hofmann M, et al. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(9): 6971-6980.
- [29] Sharma V K, McDonald T J, Kim H, et al. Magnetic graphene-carbon nanotube iron nanocomposites as adsorbents and antibacterial agents for water purification [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2015, 225: 229-240.
- [30] Zhang E, Zhao X, Hu J, et al. Antibacterial metals and alloys for potential biomedical implants [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(8): 2569-2612.
- [31] Ran H H, Cheng X, Gao G, et al. Colistin-Loaded Polydopamine Nanospheres Uniformly Decorated with Silver Nanodots: A Nanohybrid Platform with Improved Antibacterial and Antibiofilm Performance [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3(4): 2438-2448.
- [32] Liu Y, Zhou L, Dong Y, et al. Recent developments on MOF-based platforms for antibacterial therapy [J]. *RSC Med Chem*, 2021, 12(6): 915-928.
- [33] Li R, Chen T, Pan X. Metal-Organic-Framework-Based Materials for Antimicrobial Applications [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(3): 3808-3848.
- [34] Yan L, Gopal A, Kashif S, et al. Metal organic frameworks for antibacterial applications [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 435: 134975.
- [35] Chen Y, Wang X, Tao S, et al. Research advances in smart responsive-hydrogel dressings with potential clinical diabetic wound healing properties [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 37.
- [36] Jia X, Dou Z, Zhang Y, et al. Smart Responsive and Controlled-Release Hydrogels for Chronic Wound Treatment [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(12): 2735.
- [37] Kolipaka T, Pandey G, Abraham N, et al. Stimuli-responsive polysaccharide-based smart hydrogels for diabetic wound healing: Design aspects, preparation methods and regulatory perspectives [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 324: 121537.
- [38] Li Y, Han Y, Li H, et al. Antimicrobial Hydrogels: Potential Materials for Medical Application [J]. *Small*, 2024, 20(5): e2304047.
- [39] Luo H, Yin X Q, Tan P F, et al. Polymeric antibacterial materials: design, platforms and applications [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(12): 2802-2815.
- [40] Lin F, Duan Q-Y, Wu F-G. Conjugated Polymer-Based Photothermal Therapy for Killing Microorganisms [J]. *ACS Applied Polymer Materials*, 2020, 2(10): 4331-4344.

- [41] Sun Y D, Zhu Y X, Zhang X, et al. Role of Cholesterol Conjugation in the Antibacterial Photodynamic Therapy of Branched Polyethylenimine-Containing Nanoagents [J]. *Langmuir*, 2019, 35(44): 14324-14331.
- [42] Feng Y, Liu L, Zhang J, et al. Photoactive antimicrobial nanomaterials [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(44): 8631-8652.
- [43] Ouyang B, Wei D, Wu B, et al. In the View of Electrons Transfer and Energy Conversion: The Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Metal-Based Nanomaterials and Their Applications [J]. *Small*, 2024, 20(4): e2303153.
- [44] Ren Q W, Wang Y, Qian J, et al. Biosynthesis of Ag(2)Se nanoparticles as a broad-spectrum antimicrobial agent with excellent biocompatibility [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 465: 133201.
- [45] Bai Y, Lang S, Du Y, et al. Metallic-Polyphenolic Nanoparticles Reinforced Cationic Guar Gum Hydrogel for Effectively Treating Burn Wound [J]. *Macromol Biosci*, 2024, 24(3): e2300396.
- [46] 陈茂华. 多重响应性释药纳米粒子治疗细菌感染的研究 [D]. 四川: 西南交通大学, 2020.
- [47] Li L, Zhang X, Zhou J, et al. Non-Invasive Thermal Therapy for Tissue Engineering and Regenerative Medicine [J]. *Small*, 2022, 18(36): e2107705.
- [48] Li W, Wei W, Wu X, et al. The antibacterial and antibiofilm activities of mesoporous hollow Fe(3)O(4) nanoparticles in an alternating magnetic field [J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(16): 4492-4507.
- [49] Chiang W L, Lin T T, Sureshbabu R, et al. A rapid drug release system with a NIR light-activated molecular switch for dual-modality photothermal/antibiotic treatments of subcutaneous abscesses [J]. *J Control Release*, 2015, 199: 53-62.
- [50] Meeker D G, Jenkins S V, Miller E K, et al. Synergistic Photothermal and Antibiotic Killing of Biofilm-Associated *Staphylococcus aureus* Using Targeted Antibiotic-Loaded Gold Nanoconstructs [J]. *ACS Infect Dis*, 2016, 2(4): 241-250.
- [51] Chen J, Ning C, Zhou Z, et al. Nanomaterials as photothermal therapeutic agents [J]. *Prog Mater Sci*, 2019, 99: 1-26.
- [52] Xu C, Pu K. Second near-infrared photothermal materials for combinational nanotheranostics [J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(2): 1111-1137.
- [53] Zhang Y, Hu X, Shang J, et al. Emerging nanozyme-based multimodal synergistic therapies in combating bacterial infections [J]. *Theranostics*, 2022, 12(13): 5995-6020.

- [54] Han D, Han Y, Li J, et al. Enhanced photocatalytic activity and photothermal effects of Cu-doped metal-organic frameworks for rapid treatment of bacteria-infected wounds [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2020, 261: 118248.
- [55] Li B, Wang W, Zhao L, et al. Multifunctional AIE Nanosphere-Based "Nanobomb" for Trimodal Imaging-Guided Photothermal/Photodynamic/Pharmacological Therapy of Drug-Resistant Bacterial Infections [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(5): 4601-4618.
- [56] Zhou J, Wang W, Zhang Q, et al. Oxygen-supplied mesoporous carbon nanoparticles for enhanced photothermal/photodynamic synergetic therapy against antibiotic-resistant bacterial infections [J]. *Chem Sci*, 2022, 13(23): 6967-6981.
- [57] Zhao Y, Zhang Y H, Zhuge Z, et al. Synthesis of a Poly-L-Lysine/Black Phosphorus Hybrid for Biosensors [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(5): 3149-3155.
- [58] Nam J, Son S, Ochyl L J, et al. Chemo-photothermal therapy combination elicits anti-tumor immunity against advanced metastatic cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1074.
- [59] Wang S, Riedinger A, Li H, et al. Plasmonic copper sulfide nanocrystals exhibiting near-infrared photothermal and photodynamic therapeutic effects [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(2): 1788-1800.
- [60] Mak K F, Lee C, Hone J, et al. Atomically thin MoS₂: a new direct-gap semiconductor [J]. *Phys Rev Lett*, 2010, 105(13): 136805.
- [61] Ran L, Lu B, Qiu H, et al. Erythrocyte membrane-camouflaged nanoworms with on-demand antibiotic release for eradicating biofilms using near-infrared irradiation [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(9): 2956-2968.
- [62] Yan L X, Chen L J, Zhao X, et al. pH Switchable NanoplatforM for In Vivo Persistent Luminescence Imaging and Precise Photothermal Therapy of Bacterial Infection [J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(14): 1909042.
- [63] Xie J, Wang Y, Choi W, et al. Overcoming barriers in photodynamic therapy harnessing nano-formulation strategies [J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(16): 9152-9201.
- [64] Huang L, Zhao S, Wu J, et al. Photodynamic therapy for hypoxic tumors: Advances and perspectives [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 438: 213888.
- [65] Monro S, Colon K L, Yin H, et al. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433 [J]. *Chem Rev*, 2019, 119(2): 797-828.

- [66] Hao Y, Chung C K, Yu Z, et al. Combinatorial Therapeutic Approaches with Nanomaterial-Based Photodynamic Cancer Therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(1): 120.
- [67] Akasov R, Khaydukov E V, Yamada M, et al. Nanoparticle enhanced blue light therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 184: 114198.
- [68] Chen D, Xu Q, Wang W, et al. Type I Photosensitizers Revitalizing Photodynamic Oncotherapy [J]. *Small*, 2021, 17(31): e2006742.
- [69] Abdel Khalek M A, Abdelhameed A M, Abdel Gaber S A. The Use of Photoactive Polymeric Nanoparticles and Nanofibers to Generate a Photodynamic-Mediated Antimicrobial Effect, with a Special Emphasis on Chronic Wounds [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(2): 229.
- [70] Liu Y, Ai K, Ji X, et al. Comprehensive Insights into the Multi-Antioxidative Mechanisms of Melanin Nanoparticles and Their Application To Protect Brain from Injury in Ischemic Stroke [J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(2): 856-862.
- [71] Yang Z, Dai Y, Yin C, et al. Activatable Semiconducting Theranostics: Simultaneous Generation and Ratiometric Photoacoustic Imaging of Reactive Oxygen Species In Vivo [J]. *Adv Mater*, 2018, 30(23): e1707509.
- [72] Aziz B, Aziz I, Khurshid A, et al. An Overview of Potential Natural Photosensitizers in Cancer Photodynamic Therapy [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(1): 224.
- [73] Samuel E L, Marcano D C, Berka V, et al. Highly efficient conversion of superoxide to oxygen using hydrophilic carbon clusters [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(8): 2343-2348.
- [74] Yao J, Cheng Y, Zhou M, et al. ROS scavenging Mn(3)O(4) nanozymes for in vivo anti-inflammation [J]. *Chem Sci*, 2018, 9(11): 2927-2933.
- [75] Garcia-Diaz M, Huang Y Y, Hamblin M R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy [J]. *Methods*, 2016, 109: 158-166.
- [76] Hu X, Zhang H, Wang Y, et al. Synergistic antibacterial strategy based on photodynamic therapy: Progress and perspectives [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 450: 138129.
- [77] Pham T C, Nguyen V N, Choi Y, et al. Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy [J]. *Chem Rev*, 2021, 121(21): 13454-13619.
- [78] Girotti A W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2001, 63(1-3): 103-113.
- [79] Pang X, Li D, Zhu J, et al. Beyond Antibiotics: Photo/Sonodynamic Approaches for Bacterial Theranostics [J]. *Nanomicro Lett*, 2020,

- 12(1): 144.
- [80] Morales E H, Pinto C A, Luraschi R, et al. Accumulation of heme biosynthetic intermediates contributes to the antibacterial action of the metalloid tellurite [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15320.
- [81] Brynildsen M P, Winkler J A, Spina C S, et al. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(2): 160-165.
- [82] Pinegin B, Vorobjeva N, Pashenkov M, et al. The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 3745-3754.
- [83] Cui F, Li T, Wang D, et al. Recent advances in carbon-based nanomaterials for combating bacterial biofilm-associated infections [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 431: 128597.
- [84] Biel M A, Sievert C, Usacheva M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2011, 1(5): 329-334.
- [85] Anju V T, Paramanantham P, Siddhardha B, et al. Malachite green-conjugated multi-walled carbon nanotubes potentiate antimicrobial photodynamic inactivation of planktonic cells and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 3861-3874.
- [86] Wang T Y, Zhu X Y, Wu F G. Antibacterial gas therapy: Strategies, advances, and prospects [J]. *Bioact Mater*, 2023, 23: 129-155.
- [87] Wang R. Gasotransmitters: growing pains and joys [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(5): 227-232.
- [88] Bora P, Chauhan P, Pardeshi K A, et al. Small molecule generators of biologically reactive sulfur species [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(48): 27359-27374.
- [89] Kolluru G K, Shen X, Bir S C, et al. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection [J]. *Nitric Oxide*, 2013, 35: 5-20.
- [90] Zayed O, Hewedy O A, Abdelmoteleb A, et al. Nitrogen Journey in Plants: From Uptake to Metabolism, Stress Response, and Microbe Interaction [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(10): 1443.
- [91] Andrabi S M, Sharma N S, Karan A, et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(30): e2303259.
- [92] Boughaleb H, Lobysheva I, Dei Zotti F, et al. Biological Assessment of the NO-Dependent Endothelial Function [J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7921.
- [93] Shepherd M, Giordano D, Verde C, et al. The Evolution of Nitric Oxide Function: From Reactivity in the Prebiotic Earth to Examples

- of Biological Roles and Therapeutic Applications [J]. *Antioxidants* (Basel), 2022, 11(7): 1222.
- [94] Cheng J, Hu J. Recent Advances on Carbon Monoxide Releasing Molecules for Antibacterial Applications [J]. *ChemMedChem*, 2021, 16(24): 3628-3634.
- [95] Yuan Z, Lin C, Dai L, et al. Near-Infrared Light-Activatable Dual-Action Nanoparticle Combats the Established Biofilms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Its Accompanying Inflammation [J]. *Small*, 2021, 17(13): e2007522.
- [96] Bissleret P, Blanchard N. Taming sulfur dioxide: a breakthrough for its wide utilization in chemistry and biology [J]. *Org Biomol Chem*, 2013, 11(33): 5393-5398.
- [97] Huang Y, Zhang H, Lv B, et al. Sulfur Dioxide: Endogenous Generation, Biological Effects, Detection, and Therapeutic Potential [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 36(4-6): 256-274.
- [98] Zhou D, Zhang Y, Du J, et al. Sulfur Dioxide: An Endogenous Protector Against Myocardial Injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 76(4): 389-396.
- [99] Kolluru G K, Shackelford R E, Shen X, et al. Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(2): 109-125.
- [100] Cirino G, Szabo C, Papapetropoulos A. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs [J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(1): 31-276.
- [101] Li J, Huang G, Wang J, et al. Hydrogen Regulates Ulcerative Colitis by Affecting the Intestinal Redox Environment [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 933-945.
- [102] Obara T, Naito H, Nojima T, et al. Hydrogen in Transplantation: Potential Applications and Therapeutic Implications [J]. *Biomedicines*, 2024, 12(1): 118.
- [103] Schairer D O, Chouake J S, Nosanchuk J D, et al. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents [J]. *Virulence*, 2012, 3(3): 271-279.
- [104] Jin Z, Wen Y, Hu Y, et al. MRI-guided and ultrasound-triggered release of NO by advanced nanomedicine [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(10): 3637-3645.
- [105] Rouillard K R, Novak O P, Pistiolis A M, et al. Exogenous Nitric Oxide Improves Antibiotic Susceptibility in Resistant Bacteria [J]. *ACS Infect Dis*, 2021, 7(1): 23-33.
- [106] Yang L, Feura E S, Ahonen M J R, et al. Nitric Oxide-Releasing Macromolecular Scaffolds for Antibacterial Applications [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(13): e1800155.

- [107] Choi M, Hasan N, Cao J, et al. Chitosan-based nitric oxide-releasing dressing for anti-biofilm and in vivo healing activities in MRSA biofilm-infected wounds [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 142: 680-692.
- [108] Kim J O, Noh J K, Thapa R K, et al. Nitric oxide-releasing chitosan film for enhanced antibacterial and in vivo wound-healing efficacy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 79: 217-225.
- [109] Nichols S P, Storm W L, Koh A, et al. Local delivery of nitric oxide: targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(12): 1177-1188.
- [110] Keefer L K. Nitric oxide (NO)- and nitroxyl (HNO)-generating diazeniumdiolates (NONOates): emerging commercial opportunities [J]. *Curr Top Med Chem*, 2005, 5(7): 625-636.
- [111] Miller M R, Megson I L. Recent developments in nitric oxide donor drugs [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151(3): 305-321.
- [112] Hibbard H A J, Reynolds M M. Synthesis of novel nitroreductase enzyme-activated nitric oxide prodrugs to site-specifically kill bacteria [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 93: 103318.
- [113] Boucher J L, Moali C, Tenu J P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(8-9): 1015-1028.
- [114] Sun M, Sang Y, Deng Q, et al. Specific generation of nitric oxide in mitochondria of cancer cell for selective oncotherapy [J]. *Nano Research*, 2022, 15(6): 5273-5278.
- [115] Jones M L, Ganopolsky J G, Labbe A, et al. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(2): 401-407.
- [116] Li C, Li Y, Wu Q, et al. Multifunctional BODIPY for effective inactivation of Gram-positive bacteria and promotion of wound healing [J]. *Biomater Sci*, 2021, 9(22): 7648-7654.
- [117] Zhang X, Guo Z, Liu J, et al. Near infrared light triggered nitric oxide releasing platform based on upconversion nanoparticles for synergistic therapy of cancer stem-like cells [J]. *Sci Bull (Beijing)*, 2017, 62(14): 985-996.
- [118] Chen X, Zhang Q, Li J, et al. Rattle-Structured Rough Nanocapsules with in-Situ-Formed Gold Nanorod Cores for Complementary Gene/Chemo/Photothermal Therapy [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(6): 5646-5656.
- [119] Su J, Sun H, Meng Q, et al. Bioinspired Nanoparticles with NIR - Controlled Drug Release for Synergetic Chemophotothermal Therapy

- of Metastatic Breast Cancer [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(41): 7495-7506.
- [120] Wang J, Liu Y, Ma Y, et al. NIR - Activated Supersensitive Drug Release Using Nanoparticles with a Flow Core [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(41): 7516-7525.
- [121] Fraix A, Sortino S. Combination of PDT photosensitizers with NO photodonors [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2018, 17(11): 1709-1727.
- [122] Fukuhara K, Kurihara M, Miyata N. Photochemical generation of nitric oxide from 6-nitrobenzo[a]pyrene [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(36): 8662-8666.
- [123] Suzuki T, Nagae O, Kato Y, et al. Photoinduced nitric oxide release from nitrobenzene derivatives [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(33): 11720-11726.
- [124] Ieda N, Hishikawa K, Eto K, et al. A double bond-conjugated dimethylnitrobenzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(16): 3172-3175.
- [125] Kitamura K, Kawaguchi M, Ieda N, et al. Visible Light-Controlled Nitric Oxide Release from Hindered Nitrobenzene Derivatives for Specific Modulation of Mitochondrial Dynamics [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(5): 1271-1278.
- [126] Nakagawa H, Hishikawa K, Eto K, et al. Fine spatiotemporal control of nitric oxide release by infrared pulse-laser irradiation of a photolabile donor [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(11): 2493-2500.
- [127] Kitamura K, Ieda N, Hishikawa K, et al. Visible light-induced nitric oxide release from a novel nitrobenzene derivative cross-conjugated with a coumarin fluorophore [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(24): 5660-5662.
- [128] Suchyta D J, Schoenfisch M H. Anticancer potency of nitric oxide-releasing liposomes [J]. *RSC Adv*, 2017, 7(84): 53236-53246.
- [129] Lee H J, Kim Da E, Park D J, et al. pH-Responsive mineralized nanoparticles as stable nanocarriers for intracellular nitric oxide delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 146: 1-8.
- [130] Zhou Y, Jiang Y, Cai J, et al. A core/shell nanogenerator achieving pH-responsive nitric oxide release for treatment of infected diabetic wounds [J]. *Nanoscale*, 2022, 14(40): 14984-14996.
- [131] Fan J, He Q, Liu Y, et al. Light-Responsive Biodegradable Nanomedicine Overcomes Multidrug Resistance via NO-Enhanced Chemosensitization [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(22): 13804-13811.

- [132] Shen Z, He K, Ding Z, et al. Visible-Light-Triggered Self-Reporting Release of Nitric Oxide (NO) for Bacterial Biofilm Dispersal [J]. *Macromolecules*, 2019, 52(20): 7668-7677.
- [133] Sun J, Zhang X, Broderick M, et al. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay [J]. *Sensors*, 2003, 3(8): 276-284.
- [134] Hunter R A, Storm W L, Coneski P N, et al. Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(3): 1957-1963.
- [135] Hetrick E M, Schoenfish M H. Analytical chemistry of nitric oxide [J]. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2009, 2: 409-433.
- [136] Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, et al. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1998, 46(2): 373-375.
- [137] Woolley J F, Stanicka J, Cotter T G. Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems [J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(11): 556-565.
- [138] Yao D, Vlessidis A G, Evmiridis N P. Determination of Nitric Oxide in Biological Samples [J]. *Microchimica Acta*, 2004, 147: 1-20.
- [139] Kaewphaleuk T, Watanapa W B, Panich U. Ethanol enhances endothelial ionic currents and nitric oxide release via intermediate-conductance calcium-activated potassium channel [J]. *Life Sci*, 2019, 228: 21-29.
- [140] Oliveira M S, Santos K F D N, De Paula R M, et al. Nitric Oxide Detection Using a Chemical Trap Method for Applications in Bacterial Systems [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(9): 2210.
- [141] Markiewicz R, Litowczenko J, Gapinski J, et al. Nanomolar Nitric Oxide Concentrations in Living Cells Measured by Means of Fluorescence Correlation Spectroscopy [J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 1010.
- [142] Huysseune A, Larsen U G, Larionova D, et al. Bone Formation in Zebrafish: The Significance of DAF-FM DA Staining for Nitric Oxide Detection [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(12): 1780.
- [143] Li J, Lobue A, Heuser S K, et al. Using diaminofluoresceins (DAFs) in nitric oxide research [J]. *Nitric Oxide*, 2021, 115: 44-54.
- [144] Kawauchi S, Inaba M, Muramatsu Y, et al. In vivo imaging of nitric oxide in the male rat brain exposed to a shock wave [J]. *J Neurosci Res*, 2023, 101(6): 976-989.
- [145] Coneski P N, Schoenfish M H. Nitric oxide release: part III. Measurement and reporting [J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(10): 3753-3758.
- [146] Hong H, Sun J, Cai W. Multimodality imaging of nitric oxide and

- nitric oxide synthases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(6): 684-698.
- [147] Robbins R A, Grisham M B. Nitric oxide [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(6): 857-860.
- [148] Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(5): 2604-2609.
- [149] Chung H T, Choi B M, Kwon Y G, et al. Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): heme oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO-mediated antiapoptosis and anti-inflammation [J]. *Methods Enzymol*, 2008, 441: 329-338.
- [150] Corti A, Franzini M, Scataglini I, et al. Mechanisms and targets of the modulatory action of S-nitrosoglutathione (GSNO) on inflammatory cytokines expression [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 562: 80-91.
- [151] Fan H, Le J W, Sun M, et al. Pretreatment with S-Nitrosoglutathione Attenuates Septic Acute Kidney Injury in Rats by Inhibiting Inflammation, Oxidation, and Apoptosis [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6678165.
- [152] Gkaliagkousi E, Douma S, Zamboulis C, et al. Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 2009, 27(12): 2310-2320.
- [153] Nong Z, Hoylaerts M, Van Pelt N, et al. Nitric oxide inhalation inhibits platelet aggregation and platelet-mediated pulmonary thrombosis in rats [J]. *Circ Res*, 1997, 81(5): 865-869.
- [154] Marques A A M, Da Silva C H F, De Souza P, et al. Nitric oxide and Ca(2+)-activated high-conductance K(+) channels mediate nothofagin-induced endothelium-dependent vasodilation in the perfused rat kidney [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 327: 109182.
- [155] Liu T, Zhang M, Mukosera G T, et al. L-NAME releases nitric oxide and potentiates subsequent nitroglycerin-mediated vasodilation [J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101238.
- [156] Prause M, Schulz H J, Wagler D. Rechnergestützte Führung von Fermentationsprozessen, Teil 2 [J]. *Acta Biotechnologica*, 2004, 4(2): 143-151.
- [157] Garcia-Ortiz A, Serrador J M. Nitric Oxide Signaling in T Cell-Mediated Immunity [J]. *Trends Mol Med*, 2018, 24(4): 412-427.
- [158] Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(3): 161-178.
- [159] Yapor J P, Gordon J L, Henderson C N, et al. Nitric Oxide-Releasing Emulsion with Hyaluronic Acid and Vitamin E [J]. *RSC*

- Adv, 2019, 9(38): 21873-21880.
- [160] Frank S, Kampfer H, Wetzler C, et al. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator [J]. *Kidney Int*, 2002, 61(3): 882-888.
- [161] Barnes M, Brisbois E J. Clinical use of inhaled nitric oxide: Local and systemic applications [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 422-431.
- [162] Paul S, Pan S, Mukherjee A, et al. Nitric Oxide Releasing Delivery Platforms: Design, Detection, Biomedical Applications, and Future Possibilities [J]. *Mol Pharm*, 2021, 18(9): 3181-3205.
- [163] Wu M, Lu Z, Wu K, et al. Recent advances in the development of nitric oxide-releasing biomaterials and their application potentials in chronic wound healing [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(35): 7063-7075.
- [164] Sun Y, Wen R-L, Yu D, et al. Flexible electrostatic hydrogels from marine organism for nitric oxide-enhanced photodynamic therapy against multidrug-resistant bacterial infection [J]. *Science China Materials*, 2022, 65(10): 2850-2860.
- [165] Howlin R P, Cathie K, Hall-Stoodley L, et al. Low-Dose Nitric Oxide as Targeted Anti-biofilm Adjunctive Therapy to Treat Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(9): 2104-2116.
- [166] Guo S, Dipietro L A. Factors affecting wound healing [J]. *J Dent Res*, 2010, 89(3): 219-229.
- [167] Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jensen P O, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis [J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16(1): 2-10.
- [168] Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, et al. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts [J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 111(2): 286-291.
- [169] Witte M B, Thornton F J, Efron D T, et al. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide [J]. *Nitric Oxide*, 2000, 4(6): 572-582.
- [170] Ishii Y, Ogura T, Tatemichi M, et al. Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2003, 103(2): 161-168.
- [171] Thornton F J, Schaffer M R, Witte M B, et al. Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246(3): 654-659.
- [172] Albina J E, Mills C D, Barbul A, et al. Arginine metabolism in

- p>wounds [J].
- Am J Physiol*
- , 1988, 254(4 Pt 1): E459-467.
- [173] A B, Sa L, Dt E, et al. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans [J]. *Surgery*, 1990, 108(2): 331-336; discussion 336-337.
- [174] Witte M B, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair [J]. *Am J Surg*, 2002, 183(4): 406-412.
- [175] Jeffrey P. Bulgrin M S, Daniel J. Smith. Arginine-free diet suppresses nitric oxide production in wounds [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1993, 4(10): 588-593.
- [176] Shi H P, Most D, Efron D T, et al. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats [J]. *Wound Repair Regen*, 2003, 11(3): 198-203.
- [177] Zhang P, Li Y, Tang Y, et al. Copper-Based Metal-Organic Framework as a Controllable Nitric Oxide-Releasing Vehicle for Enhanced Diabetic Wound Healing [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(16): 18319-18331.
- [178] Malone-Povolny M J, Maloney S E, Schoenfisch M H. Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(12): e1801210.
- [179] Su C H, Li W P, Tsao L C, et al. Enhancing Microcirculation on Multitriggering Manner Facilitates Angiogenesis and Collagen Deposition on Wound Healing by Photoreleased NO from Hemin-Derivatized Colloids [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 4290-4301.
- [180] Schaenzer A J, Wright G D. Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(8): 768-782.
- [181] Gao Q, Zhang X, Yin W, et al. Functionalized MoS₂ Nanovehicle with Near-Infrared Laser-Mediated Nitric Oxide Release and Photothermal Activities for Advanced Bacteria-Infected Wound Therapy [J]. *Small*, 2018, 14(45): e1802290.
- [182] Boehle K E, Gilliland J, Wheeldon C R, et al. Utilizing Paper-Based Devices for Antimicrobial-Resistant Bacteria Detection [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(24): 6886-6890.
- [183] Tan L, Li J, Liu X, et al. In Situ Disinfection through Photoinspired Radical Oxygen Species Storage and Thermal-Triggered Release from Black Phosphorous with Strengthened Chemical Stability [J]. *Small*, 2018, 14(9): 1703197.
- [184] Shen S, Mamat M, Zhang S, et al. Synthesis of CaO(2) Nanocrystals and Their Spherical Aggregates with Uniform Sizes for Use as a Biodegradable Bacteriostatic Agent [J]. *Small*, 2019, 15(36): e1902118.
- [185] Wang X, Du J, Zhou F, et al. Enhanced Nuclear Accumulation of

- Doxorubicin Delivered by pH-Triggered Polydopamine-Shelled Mesoporous Silica for Chemo-Photothermal Therapy [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2022, 24(1): 3.
- [186] Liu Y, Ai K, Liu J, et al. Dopamine-melanin colloidal nanospheres: an efficient near-infrared photothermal therapeutic agent for in vivo cancer therapy [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(9): 1353-1359.
- [187] Ren W, Yan Y, Zeng L, et al. A Near Infrared Light Triggered Hydrogenated Black TiO₂ for Cancer Photothermal Therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2015, 4(10): 1526-1536.
- [188] He J, Li Z, Wang J, et al. Photothermal antibacterial antioxidant conductive self-healing hydrogel with nitric oxide release accelerates diabetic wound healing [J]. *Composites Part B: Engineering*, 2023, 266: 110985.
- [189] Zhang X-M, Zhang M, Xu N-N, et al. Multifunctional polydopamine/hemin-cyclodextrin reinforced chitosan nanocomposite hydrogel: A synergistic platform for wound healing [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 260:
- [190] Qi M, Ren X, Li W, et al. NIR responsive nitric oxide nanogenerator for enhanced biofilm eradication and inflammation immunotherapy against periodontal diseases [J]. *Nano Today*, 2022, 43: 101447.
- [191] Tan Y N, Li Y P, Huang J D, et al. Thermal-sensitive lipid nanoparticles potentiate anti-PD therapy through enhancing drug penetration and T lymphocytes infiltration in metastatic tumor [J]. *Cancer Lett*, 2021, 522: 238-254.
- [192] Wang S, Liu Z, Tong Y, et al. Improved cancer phototheranostic efficacy of hydrophobic IR780 via parenteral route by association with tetrahedral nanostructured DNA [J]. *J Control Release*, 2021, 330: 483-492.
- [193] Cun J E, Pan Y, Zhang Z, et al. Photo-enhanced upcycling H₂O₂ into hydroxyl radicals by IR780-embedded Fe₃O₄@MIL-100 for intense nanocatalytic tumor therapy [J]. *Biomaterials*, 2022, 287: 121687.
- [194] Li S, Cui S, Yin D, et al. Dual antibacterial activities of a chitosan-modified upconversion photodynamic therapy system against drug-resistant bacteria in deep tissue [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(11): 3912-3924.

攻读硕士学位期间学术论文发表情况

- [1] **Cui Ting**, Xu Feiyang, Wang Jun, Li Wanzhen, Gao Yuan, Li Xing, Yang Kai, Zhang Weiwei*, Ge Fei*, Tao Yugui*. Polydopamine Nanocarriers with Cascade-Activated Nitric Oxide Release Combined Photothermal Activity for the Therapy of Drug-Resistant Bacterial Infections [J]. ACS Infectious Diseases, 2024.
- [2] Xu Feiyang, **Cui Ting**, Wang Jun, Li Wanzhen, Gao Yuan, Li Xing, Yang Kai, Zhang Weiwei*, Ge Fei*, Tao Yugui*. Quaternized Silk Fibroin Nanocarriers Loaded with Chlorin e6 for Photodynamic Elimination of Drug-Resistant Bacteria and Biofilms [J]. ACS Applied Nano Materials, 2024, 7(10): 12072-12082.
- [3] Li Xing, Wang Jun, Li Wanzhen, Xu Feiyang, Gao Yuan, **Cui Ting**, Yang Kai, Zhang Weiwei*, Ge Fei*, Tao Yugui*. Combined Photothermal/Combination Chemotherapeutic Approach Using Zif-8-Supported Artesunate and Gold Nanorods [J]. ACS Applied Nano Materials, 2024, 7(10): 11587-11598.
- [4] Gao Yua, Wang Jun, Zhang Weiwei, Ge Fei, Li Wanzhen, Xu Feiyang, **Cui Ting**, Li Xing, Yang Kai, Tao Yugui*.The MOF system loaded with capsaicin and calcium phosphate was utilized for tumor therapy involving calcium overload[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.

致谢

三年一瞬，聚散有时。行文至此，敲下“致谢”二字时，意味着我三年研究生生涯即将画上句点。从未想过来皖读书的我却阴差阳错的与它邂逅，这漫长而短暂的研途之旅让我有机会看到更为广阔的世界，接触到更多优秀的人，这一切我都倍感珍惜。借此对所有陪伴、帮助过我，给我生命中带来光亮的人致以最诚挚的感谢！

“桃李不言，下自成蹊”。首先我要衷心的感谢我的恩师：陶玉贵教授。初次见陶老师时，便从他身上感受到了无形而强大的气场，三年接触下来，陶老师对我产生的影响不仅仅是在学术上要实事求是，同时在为人处事方面也要谦虚谨慎。陶老师以身作则，严于律己的人生态度让我发自内心的敬佩。感谢老师在科学上引导我们丈量科学的深度，在生活上也给予我们极大的帮助，学生不才，承蒙厚爱才得以顺利完成毕业论文，这一切我将铭记于心，我将带着这份感恩之心走向社会，回报社会。同时也要感谢课题组的葛飞老师、张伟伟老师、王军老师、李婉珍老师、宋平老师等给予我三年来的帮助。

“树高千尺不忘根深沃土”。感谢我的爸爸妈妈和一直惦记着我的亲人。感谢你们对我不求回报的付出，尊重着我的每一个决定，为我营造和谐轻松的家庭氛围，让我内心充满着能量。但对我而言何尝不是这样。二十余年的养育之恩，不是一朝一夕，愿你们平安健康，未来我将努力成为你们的依靠。

“山水一程，三生有幸”。感谢课题组的全体同学。尤其感谢课题组的同学们在实验上给予我的帮助。感谢这三年遇到的好朋友让我的研究生生活充满回忆。感谢远方的闺蜜给予的温暖和陪伴，在毕业压力、工作压力接踵而来而感到焦灼不安时给予我最大的耐心和鼓励。

最后，感谢不算聪明但始终保持着乐观的自己以及生命中遇到的所有过客。