



纳米银的制备及其对犬皮肤伤口感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的治疗效果

龚佳豪¹, 潘垚垚¹, 王慧欣¹, 白鑫然¹, 王达锋¹, 董颖波¹, 陈侠², 高倩¹,
高修歌¹, 郭大伟^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要: 本研究旨在制备纳米银并评价其对犬皮肤伤口感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的治疗效果。利用灵芝提取物(40%多糖含量)为还原剂, 聚乙烯吡咯烷酮为稳定剂, 通过生物合成法制备纳米银, 之后通过紫外-可见吸收光谱、透射电子显微镜与动态光散射技术对纳米银进行表征。随后, 通过测定最小抑菌浓度以评价纳米银的体外抗菌活性。最后, 选用体重10 kg左右的比格犬12只, 随机分为3组, 每组4只, 分别为生理盐水对照组、恩诺沙星阳性对照组和纳米银组。在建立伤口感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的模型后, 连续治疗12 d后对伤口愈合情况、载菌量、组织病理学形态、胶原纤维与血管生成、巨噬细胞极化水平进行检测分析。结果表明, 制备的纳米银在433 nm处有最大吸收波长, 颗粒呈球形, 分布均匀, 粒子尺寸为 (20.01 ± 6.99) nm, ζ 电位为 (-2.56 ± 0.32) mV。纳米银对含耐甲氧西林金黄色葡萄球菌在内的常见皮肤感染致病菌均具有良好的抗菌活性, 最小抑菌浓度为 $16 \sim 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。体内试验结果显示, 纳米银能够有效降低伤口组织的载菌量, 促进胶原沉积与血管生成, 改善伤口免疫微环境, 进而促进感染伤口的愈合。综上所述, 制备的纳米银能有效治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起的犬皮肤伤口感染, 为其转化并应用于宠物皮肤感染的临床治疗奠定了物质与实践基础。

关键词: 纳米银; 皮肤感染; 伤口愈合; 耐药菌; 抗菌; 免疫调节

中图分类号: S859.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-1087-12

Preparation of Nanosilver and Its Therapeutic Effect on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Canine Skin Wounds

GONG Jiahao¹, PAN Yaoyao¹, WANG Huixin¹, BAI Xinran¹, WANG Dafeng¹, DONG Yingbo¹,
CHEN Xia², GAO Qian¹, GAO Xiuge¹, GUO Dawei^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This work aimed to prepare nanosilver and evaluate its therapeutic effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in canine skin wounds. The nanosilver was prepared by biosynthesis method using *Ganoderma lucidum* extracts (40% polysaccharide content) as reducing agent and polyvinylpyrrolidone as stabilizing agent, followed by characterization using ultraviolet visible absorption spectroscopy, transmission electron microscopy and dynamic light scattering. Subsequently, the *in vitro* antimicrobial activity of nanosilver was evaluated by determining the

收稿日期: 2025-05-09

基金项目: 西藏自治区科技计划项目区域科技协同创新专项(QYXTZX-RKZ2024-03-2)

作者简介: 龚佳豪, 主要从事兽用抗菌纳米材料的研发工作, E-mail: gongjh365@163.com

* 通信作者: 郭大伟, 主要从事新兽药创制与评价, E-mail: gdawei0123@njau.edu.cn

minimum inhibitory concentration. Finally, 12 Beagles weighing about 10 kg were randomly divided into 3 groups of 4 dogs each, namely, saline control group, enrofloxacin positive control group and nanosilver group. After establishing the model of wound infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, wound healing, bacterial load, histopathological morphology, collagen fibers and angiogenesis, and macrophage polarization levels were tested and analyzed after 12 consecutive days of treatment. The results showed that the prepared nanosilver had a maximum absorption wavelength at 433 nm, and were spherical and uniformly distributed, with a particle size of (20.01 ± 6.99) nm and ζ potential of (-2.56 ± 0.32) mV. Nanosilver exhibited good antibacterial activity against common skin infection causative organisms containing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, with a minimum inhibitory concentration of $16-32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The results of *in vivo* experiment showed that nanosilver could effectively reduce the bacterial load of wound tissues, promote collagen deposition and angiogenesis, and improve the immune microenvironment of wounds, which in turn promoted the healing of infected wounds. The results suggested that the prepared nanosilver can effectively treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced canine skin wounds infections, laying a material and practical foundation for its translation and application to the clinical treatment of pet skin infections.

Keywords: nanosilver; skin infection; wound healing; drug-resistant bacteria; antibacterial; immunoregulation

* **Corresponding author:** GUO Dawei, E-mail: gdawei0123@njau.edu.cn

皮肤作为覆盖人类和动物身体表面的器官,是先天免疫系统的重要组成部分,具有感受外部刺激,调节体温并保护机体免受外部损害的功能^[1]。然而,皮肤很容易因机械性因素作用而受损害,导致皮肤完整性丧失,产生开放性伤口。值得注意的是,伤口极易被外界致病菌如大肠杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌等入侵,引起局部炎症反应,导致皮肤创伤愈合延迟,严重者甚至出现败血症等全身性症状,极大威胁人类与动物健康^[2]。目前,抗生素仍旧是治疗细菌感染疾病的首选药物。然而,随着抗生素的广泛使用与细菌多药耐药性的问题日益严峻,迫切需要研发新型具有高效抗菌活性、不易耐药且兼具有促愈合作用的抗生素替代药物以用于治疗皮肤伤口感染。

银以其高效、广谱抗菌特性而闻名,例如金属银、硝酸银、磺胺嘧啶银等均被用于治疗细菌引起的伤口感染^[3]。纳米银是指尺寸在1~100 nm的金属银单质,相较于块状银或银离子,其具有不易耐药且具有高生物相容性的特性^[4-5]。有研究报道,纳米银能有效促进感染伤口的表皮生成与无疤痕愈合^[6-7]。此外,笔者前期工作表明纳米银能通过改善炎症细胞浸润,促进成纤维细胞增殖与胶原纤维合成,进而促进大鼠感染伤口的愈合^[8-9]。然而,其对

犬皮肤伤口细菌感染的疗效未知。基于此,本试验的目的是验证纳米银对犬皮肤伤口感染的疗效,旨在为纳米银转化并应用于宠物皮肤感染的临床治疗奠定物质与实践基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

灵芝提取物(陕西承乾,多糖含量40%)、硝酸银(国药,10018461)、聚乙烯吡咯烷酮K30(阿拉丁,P110607)、恩诺沙星(索莱宝,E8761)、生理盐水(江苏恒瑞医药,H32025238)、胰蛋白胍大豆肉汤(海博生物,HB4114)、Baird-Parker琼脂基础(海博生物,HB4115)、亚碲酸盐卵黄增菌液(海博生物,HB4116-1)、一抗 Anti-CD31 Rabbit pAb(英国 abcam,ab182981)、Anti-TGF- β Rabbit pAb(英国 abcam,ab215715)、Anti-VEGF Rabbit pAb(英国 abcam,ab32152)、Anti-CD86 Rabbit pAb(上海埃必威,P42081)和 Anti-CD206 Rabbit pAb(美国 Immunoway,PT0527R)、二抗 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(丹麦 DAKO,K5007)、DAPI(碧云天,C1005)。

1.2 试验仪器

紫外-可见分光光度计(日本岛津,UV-1900);

透射电子显微镜(日本 Hitachi, H-7650);激光粒度电位仪(英国 Malvern, Zetasizer Nano ZSE);原子吸收光谱仪(日本 Hitachi, Z2000);恒温培养箱(上海森信, GZX-9240 MBE);水平摇床(美国赛诺捷克, SLK-O3000-S);酶标仪(瑞士 Tecan, Infinite M200 Pro);高通量多样品组织研磨仪(上海万柏, wonbio-48P);正置生物显微镜(德国徕卡, DM750);倒置荧光显微镜(美国赛默飞, EVOS FL)。

1.3 试验菌株

大肠杆菌(*E. coli* ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC29213)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa* ATCC9027)保存于本实验室,假中间葡萄球菌(*S. pseudintermedius* NJLLQ1)从南京流浪犬基地患病犬皮肤样品分离获得,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA ATCC43300)由南京农业大学动物医学院兽医生物化学课题组许媛媛教授馈赠。

1.4 纳米银的制备

配制 50 L 的 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 灵芝提取物溶液(含 $4.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多糖),置于蒸汽加热型搅拌锅中, 80°C 加热并搅拌 15 min 后,将同等体积的硝酸银溶液($5\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)倒入上述灵芝提取物溶液中, 80°C , $70 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌反应 1 h 后,往溶液中投入聚乙烯吡咯烷酮(PVP),使之终浓度为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,充分混匀后用 $0.8 \mu\text{m}$ 聚醚砜(PES)滤膜过滤,即制得纳米银。

1.5 纳米银的表征

1.5.1 紫外可见吸收光谱(UV-vis)测定 将样品用单蒸水稀释 20 倍,取 3 mL 稀释样品加入石英比色皿。以单蒸水为参比,于 300~700 nm 波长进行 UV-vis 扫描,观测表面等离子体共振(SPR)吸收峰的强度及其位置。

1.5.2 透射电子显微镜(TEM)观察颗粒形态 取 $10 \mu\text{L}$ 纳米银滴于铜网,吸附 2 min。用定性滤纸吸去多余液体,室温风干,镜检。借助 Nano Measurer 软件对至少 300 个纳米粒进行粒径分析。

1.5.3 水合粒径(HD)、多分散系数(PDI)和 ζ 电位(ZP)测定 用动态光散射技术测定纳米银的 HD、PDI 与 ZP。取 1 mL 纳米银加入样品皿, 25°C 平衡 2 min,测定 HD 与 PDI;取 0.85 mL 纳米银置于毛细管样品皿,测定 ZP。

1.6 菌株复苏与培养

使用接种环沾取细菌冻存液,划线于胰蛋白胨大豆琼脂培养基, 37°C 过夜培养。挑取单菌落于胰

蛋白胨大豆肉汤培养基, 37°C , $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至对数生长期中后期,测定 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 并涂板计数。

1.7 最小抑菌浓度(MIC)测定

采用微量肉汤稀释法测定 MIC。细菌悬液用 MH 培养基调整至 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,将一系列浓度灵芝提取物、纳米银与上述稀释菌液于 37°C 孵育 24 h,读数,培养液澄清透明孔所对应浓度即为 MIC。

1.8 犬伤口感染 MRSA 模型的建立及疗效评价

1.8.1 试验动物 雄性比格犬 12 只,体重为 10 kg 左右,购自江苏泰斯特生物科技有限公司(生产许可证号:SCXK(苏)2021-0010),饲养于南京农业大学实验动物中心,所有动物实验符合动物福利与伦理规范(NJAU. No20250407065)。试验犬维持饲料(20-SM250401213)购自江苏协同医药生物工程公司。

1.8.2 感染模型的建立 在比格犬背侧部用电动剃毛刀剪除毛发,形成 $8 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$ 的方形无毛区域。在无毛区域皮下注射 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 利多卡因溶液($0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行局部浸润麻醉,并辅助涂抹 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 利多因凝胶加强局麻效果。麻醉后使用直径 2 cm 的皮肤活检打孔器创建伤口,穿过皮肤并进入皮下组织。使用梅氏剪沿着破坏皮肤的边缘剪掉整块圆形皮肤,制造直径 2 cm 的圆形伤口。在伤口表面滴加 0.2 mL 的 MRSA 菌液($10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$),用伤口敷料覆盖伤口以防止其他细菌感染。持续感染 3 d 后,取犬伤口处脓液样品,划线于 Baird-Parker 琼脂平板(金黄色葡萄球菌分离平板), 37°C 培养箱培养。若出现黑色菌落,则代表建模成功。

1.8.3 纳米银对犬感染伤口愈合的影响 如图 1 所示,犬伤口感染模型建立后,将比格犬随机分成 3 组,每组 4 只,于第 3—14 天将不同药液($0.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 生理盐水、 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 恩诺沙星和 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米银)喷洒 0.5 mL 在感染伤口上,每天 2 次,每次 1 喷。每天拍照记录伤口状态。使用 Image J 软件对伤口面积进行定量。

1.8.4 伤口组织的载菌量测定 于第 15 天用直径 8 mm 的皮肤组织活检打孔器采集伤口处皮肤组织 20 mg,置于装有 1 mL 无菌生理盐水与匀浆珠的灭菌离心管中,用组织匀浆机进行匀浆,匀浆液使用生理盐水倍比稀释后,取 0.1 mL 稀释液在 Baird-Parker 琼脂平板上涂布均匀, 37°C 培养 24 h,统计平板内菌落数,计算皮肤伤口组织的载菌量。

1.8.5 伤口皮肤组织的病理学分析 于第 15 天



图1 建立伤口感染模型和整体实验过程的示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the establishment of wound infection model and the overall experimental process

用直径8 mm的皮肤组织活检打孔器采集伤口处皮肤,置于 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛组织固定液中固定过夜,随后通过苏木精-伊红染色与马松染色对伤口组织进行病理学分析。

1.8.6 免疫组织化学染色 对第15天采集的皮肤组织样品蜡块进行切片,切片经梯度乙醇脱水,先后孵育一抗CD31、TGF- β 与VEGF与羊抗兔二抗,DAB显色和中性树胶封片后,显微镜镜检,并使用Image J软件对阳性结果表达水平进行半定量分析。

1.8.7 组织免疫荧光 对第15天采集的皮肤组织样品蜡块进行切片,切片后样品立即固定,放于一 20°C 冰箱保存。对固定后样品进行抗原修复,随后进行CD86和CD206抗体的免疫荧光染色。使用荧光显微镜拍摄荧光图像,通过Image J软件对荧光进行半定量分析。

1.9 数据分析

试验数据经Excel软件整理后,结果均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。采用Graphpad Prism 9、Origin2021、Image J等软件进行作图,使用Graphpad Prism9软件进行单因素方差分析,使用Turkey法进行多重比较,分析数据间是否存在显著性差异。使用字母法进行显著性标记,凡有相同标记字母的即为差异不显著($P>0.05$),凡有不同标记字母的即为差异显著($P<0.05$)。

2 结果

2.1 纳米银的制备及其表征

本研究以灵芝提取物为还原剂,PVP为稳定剂,绿色生物合成纳米银。如图2A所示,样品呈现

纳米银的特征性表面等离子体共振(SPR)峰,在433 nm处有最大吸收波长,结合反应前后溶液颜色的明显变化,证实了纳米银的形成。从图2B可知,纳米银呈球形,尺寸均一,分布均匀,无明显聚集现象。对该视野中至少300个颗粒进行粒径统计并拟合,结果见图2C,发现颗粒尺寸呈正态分布,平均尺寸为 $(20.01\pm 6.99)\text{ nm}$ 。利用动态光散射技术测定纳米银的水合粒径(HD)、 ζ 电位(ZP)与多分散系数(PDI),分别为 $(282.00\pm 3.40)\text{ nm}$ 、 $(-2.56\pm 0.32)\text{ mV}$ 和 0.312 ± 0.039 ,水合粒径和 ζ 电位分布图如图2D、E所示,可知水合粒径和 ζ 电位呈正态分布,表明制备的纳米银分布均匀,体系稳定。

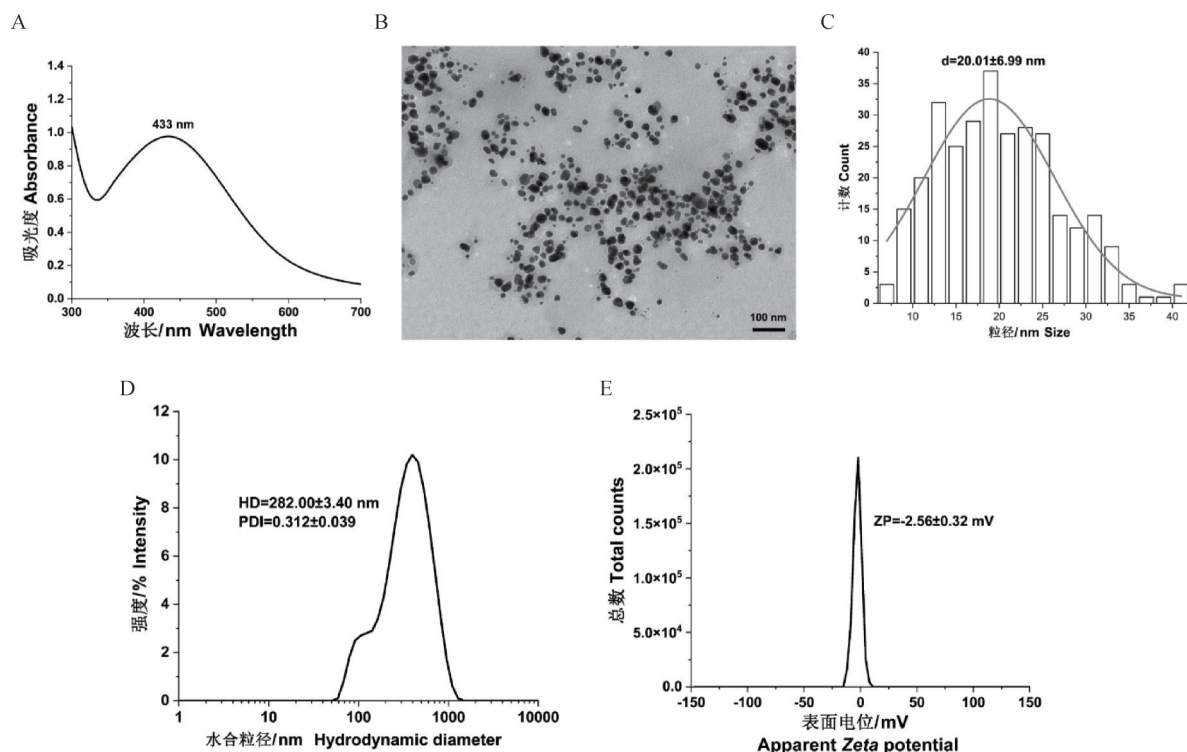
2.2 纳米银的体外抗菌活性

图3展示了纳米银对常见皮肤伤口感染致病菌如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、假中间葡萄球菌与铜绿假单胞菌等的最小抑菌浓度(MIC)值。值得注意的是,反应原料灵芝提取物在设置的浓度范围内无抗菌活性,而纳米银对所有受试菌包括多重耐药菌MRSA均具有抗菌活性,MIC值为 $16\sim 32\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。整体来看,纳米银对革兰阴性菌的抗菌作用更强。

2.3 纳米银对犬皮肤金黄色葡萄球菌感染的疗效

在犬持续感染MRSA 3 d后,采集犬皮肤脓液样品并划线于Baird-Parker琼脂平板(金黄色葡萄球菌分离平板),过夜培养结果如图4所示,发现各组平板均有黑色金属光泽的菌落形成,表明各组犬只的皮肤伤口均成功感染MRSA,可进行后续治疗试验。

在治疗周期内,不同处理组的犬感染伤口随时间的愈合情况如图5A、B所示。前3 d未给药时,三



A. 紫外吸收光谱; B. 透射电子显微镜图像; C. 尺寸分布图; D. 水合粒径分布; E. ζ 电位分布

A. Ultraviolet visible absorption spectrum; B. Transmission electron microscopy image; C. Size distribution diagram; D. HD distribution; E. ZP distribution

图2 纳米银的物理化学表征

Fig. 2 Physical and chemical characterization of nanosilver

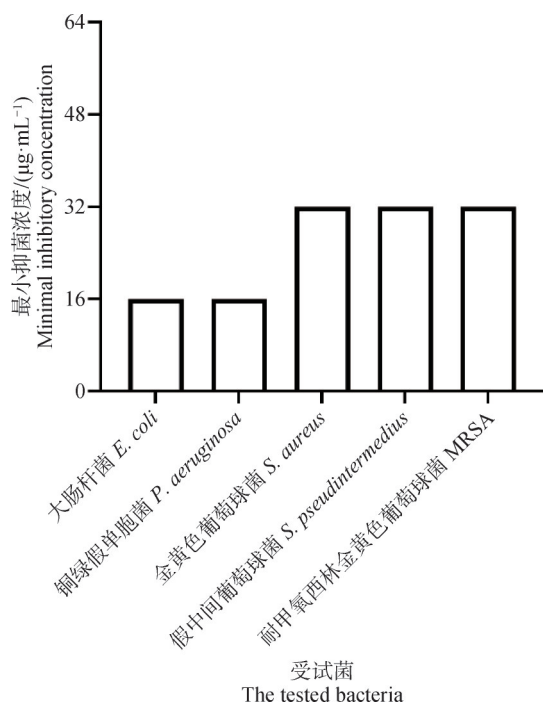


图3 纳米银对受试菌的MIC值

Fig. 3 MIC values of nanosilver against the tested bacteria

组犬的伤口闭合速度相同。而在第6天(连续给药3 d)后,用纳米银和阳性对照恩诺沙星治疗的犬皮肤伤口闭合率显著高于对照组(图5C)。在第15天给药结束后,纳米银组的相对伤口区域面积百分比为 $10.55\% \pm 2.19\%$,显著低于恩诺沙星组($16.03\% \pm 2.37\%$),表明纳米银相较恩诺沙星能更快促进犬皮肤感染伤口的闭合。

为评价纳米银的体内抗菌性能,收集犬皮肤伤口组织并匀浆涂板以测定其载菌量。细菌培养结果如图6A所示,在治疗周期结束后,对照组仍有大量菌落存在,而纳米银与恩诺沙星组菌落形成单位明显减少。菌落计数统计结果如图6B所示,发现纳米银与恩诺沙星能显著减少伤口载菌量,且两者无显著性差异,表明纳米银在犬皮肤伤口感染模型上的抗菌效力不亚于阳性对照恩诺沙星。

为进一步研究纳米银促进犬感染伤口愈合的机制,首先进行了组织病理学检查。苏木精-伊红染色结果如图7所示,对照组表皮缺失,胶原纤维较

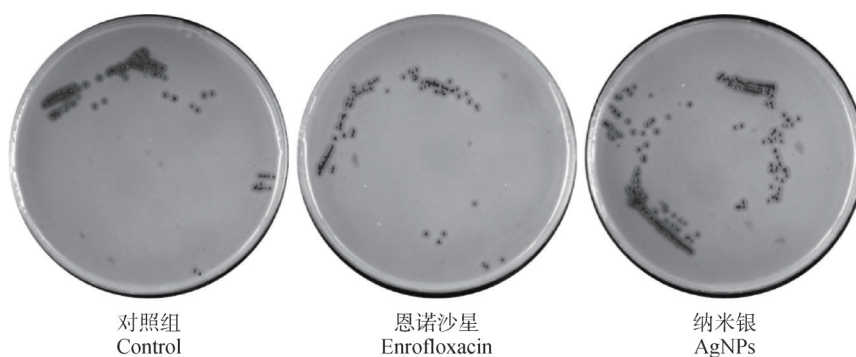
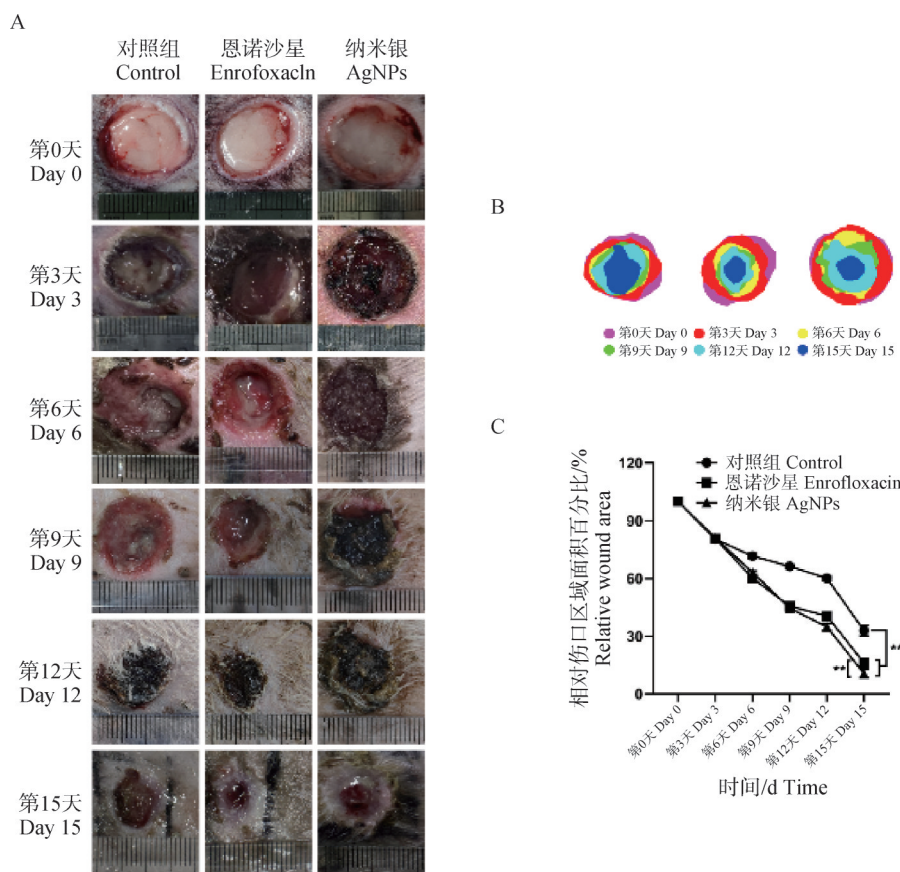


图4 感染后 MRSA 的分离结果

Fig. 4 Isolation results of MRSA after infection

A. 伤口外观图; B. 伤口愈合模拟图; C. 相对伤口区域面积百分比, **, $P < 0.01$

A. The photographs of wound; B. The diagram of wound healing simulation; C. Percentage of relative wound area

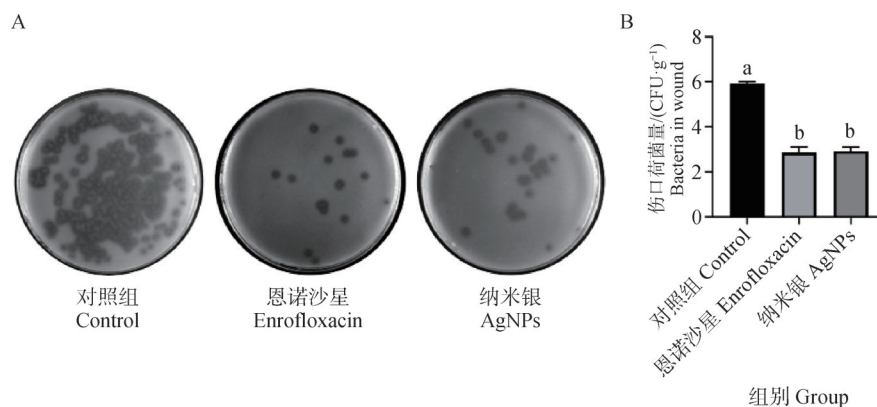
图5 纳米银对犬皮肤感染伤口愈合速度的影响

Fig. 5 Effect of nanosilver on the wound healing rate in canine skin infections

少,局部可见较多的炎性细胞浸润;恩诺沙星组可见表皮增厚,但存在断裂现象,胶原纤维较多,局部可见较多的炎性细胞浸润;而纳米银组可见表皮明显增厚,局部角化层可见肉芽组织,胶原纤维较多,可见少量炎性细胞浸润。总之,纳米银能够有效减少炎性细胞浸润,促进表皮结构与肉芽组织的生成以及胶原沉积,进而具有良好的促伤口愈合作用。

此外,通过马松染色进一步判断伤口组织中胶原纤维的生成情况。结果如图8所示,恩诺沙星与纳米银组犬皮肤伤口胶原纤维含量显著高于对照组,且两者间无显著差异。表明纳米银能通过加速胶原纤维沉积进而促进犬皮肤伤口的愈合。

为探究纳米银促进犬皮肤伤口愈合的分子机制,通过免疫组织化学染色分析犬皮肤伤口组织中



A. 细菌平板图;B. 伤口荷菌量。相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

A. Photographs of bacterial plates; B. Bacteria in wounds. The same letters indicate no significant difference ($P>0.05$), different letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same as below

图6 纳米银对犬皮肤伤口组织荷菌量的影响

Fig. 6 Effect of nanosilver on the amount of bacterial load in canine skin wound tissue

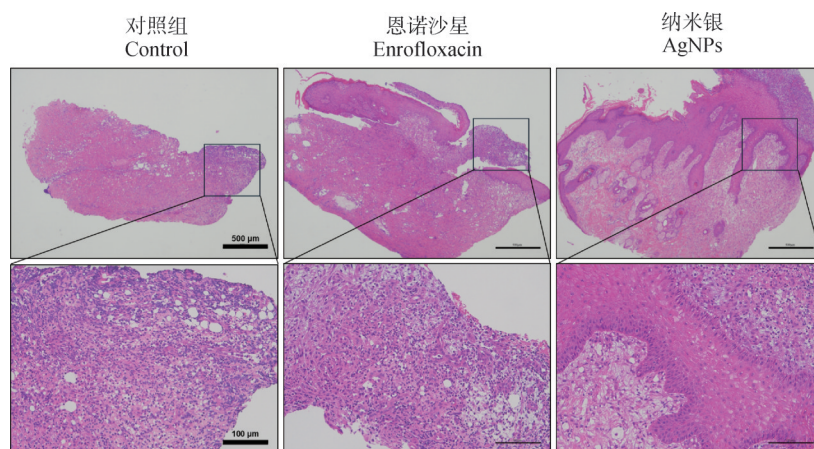
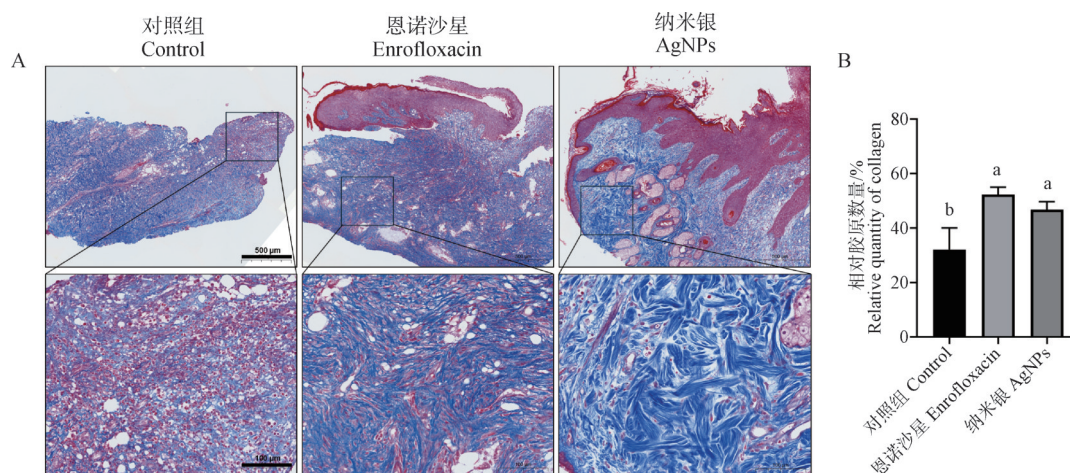


图7 第15天犬皮肤伤口组织的HE染色结果(标尺:500 μm;100 μm)

Fig. 7 HE staining results of canine skin wound tissue on day 15 (Scale bar: 500 μm; 100 μm)



A. 马松染色结果;B. 胶原纤维定量

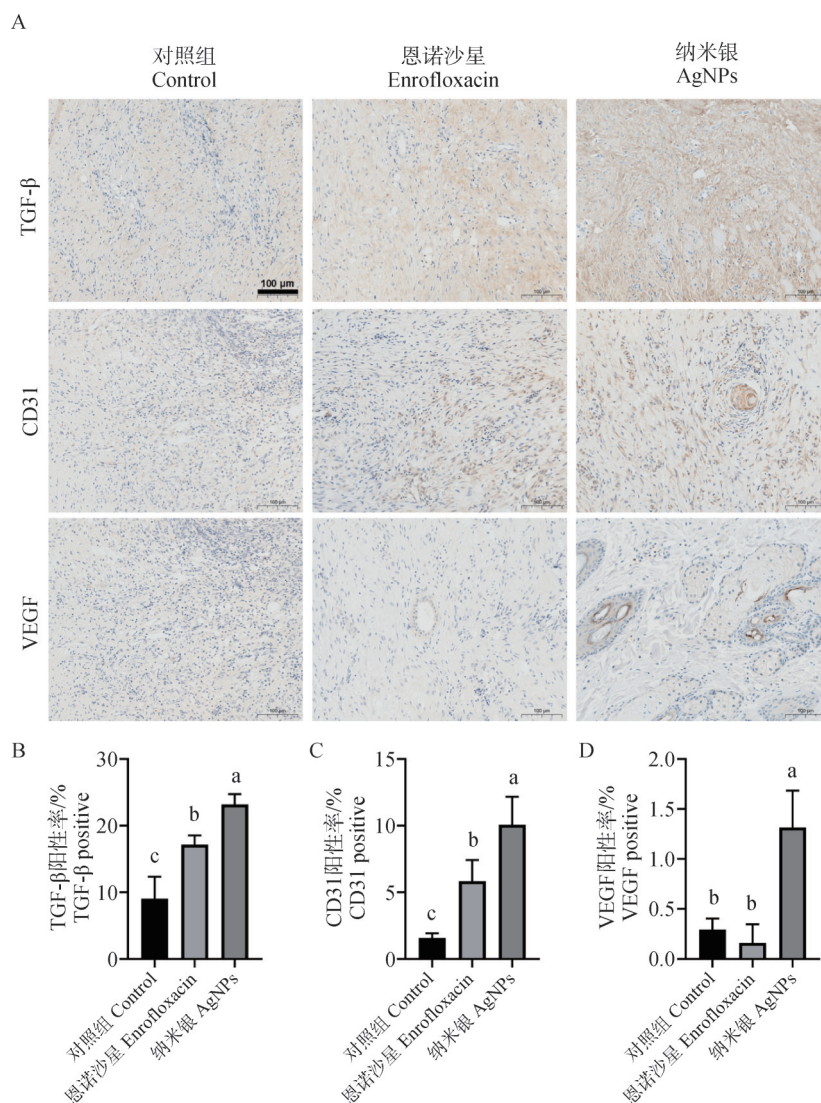
A. Masson staining results; B. The quantification of collagen fibers

图8 第15天犬皮肤伤口组织的马松染色结果及胶原纤维定量(标尺:500 μm;100 μm)

Fig. 8 Masson staining results and quantification of collagen fibers in canine skin wound tissue on day 15 (Scale bar: 500 μm; 100 μm)

TGF- β 、CD31与VEGF的表达。结果如图9A、B所示,相较于对照组,恩诺沙星与纳米银能促进TGF- β 的表达,且纳米银效果更佳,证明纳米银能通过上调TGF- β 蛋白的表达来增强胶原纤维的生成。CD31的表达情况也与上述情况一致(图9A、C)。

此外,如图9A、D所示,相较于对照组与恩诺沙星组,纳米银组显示出更高的VEGF阳性区域百分比($P<0.05$),综合CD31的表达结果,表明纳米银能有效促进血管生成。



A. 免疫组织化学染色图像; B. TGF- β 阳性率; C. CD31阳性率; D. VEGF阳性率

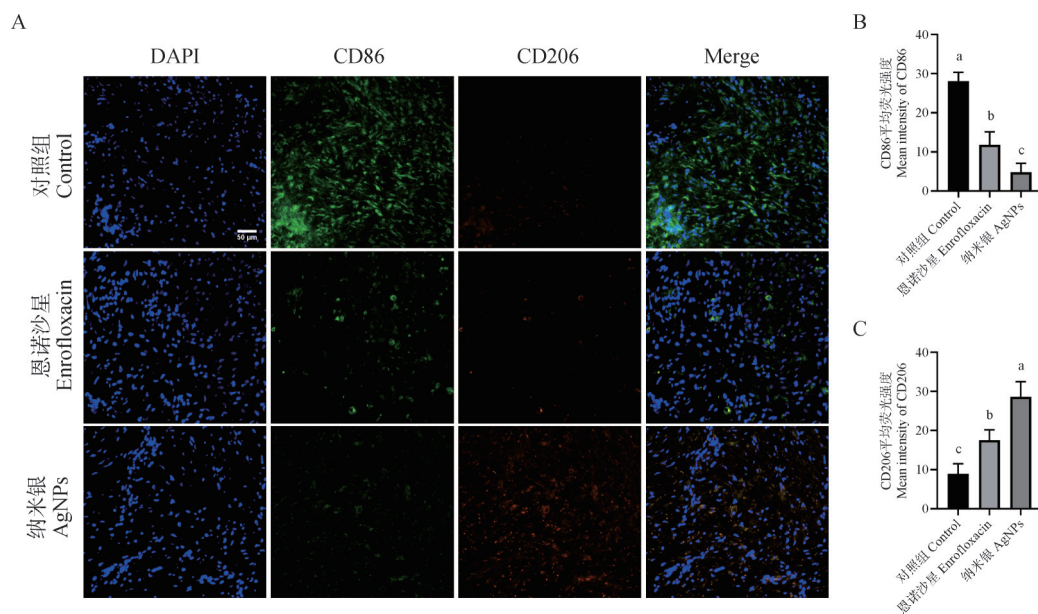
A. Immunohistochemical staining images; B. TGF- β positive rate; C. CD31 positive rate; D. VEGF positive rate

图9 第15天犬皮肤伤口组织的免疫组织化学及阳性区域定量结果(标尺:100 μ m)

Fig. 9 Immunohistochemistry and quantitative results of positive areas in canine skin wound tissue on day 15 (Scale bar: 100 μ m)

为探究纳米银对犬皮肤伤口中巨噬细胞极化与免疫微环境的调控作用,CD86与CD206分别被选为M1促炎型与M2抗炎症巨噬细胞的标记物,通过免疫荧光染色以考察伤口处的炎症情况。结果如图10A、B所示,对照组CD86显示出高表达水平,

而恩诺沙星与纳米银组CD86的荧光强度依次变弱。此外,与对照和恩诺沙星组相比,纳米银组CD206表达显著上调(图10A、C),表明纳米银能够调节巨噬细胞的极化和减轻促炎反应,具有良好的免疫调节与抗炎作用。



A. 免疫荧光图像;B. CD86平均荧光强度;C. CD206平均荧光强度

A. Immunofluorescence images; B. Mean intensity of CD86; C. Mean intensity of CD206

图 10 第 15 天犬皮肤伤口组织的免疫荧光及定量结果(标尺:50 μm)

Fig. 10 Immunofluorescence and quantitative results of canine skin wound tissue on day 15 (Scale bar: 50 μm)

3 讨论

3.1 纳米银的制备及其表征

由于植物原料易得,成本低廉,且具有良好的生物相容性,因此植物提取物介导的纳米银的生物合成法在近些年受研究者们广泛关注^[10-12]。纳米银的生物合成法相较于物理和化学合成法,其主要优势在于制备工艺简单和避免使用昂贵设备和有毒化学试剂,在兽医领域具有广阔的应用前景^[13]。本研究基于前期工作基础,采用灵芝提取物作为还原剂,通过生物合成法实现宏量制备纳米银^[4]。为最大程度改善生物合成法制备的纳米银存在易团聚和稳定性差的问题,本研究在制备好纳米银后,额外加入了稳定剂聚乙烯吡咯烷酮(PVP),并参考文献[14]中纳米银稳定剂的用量,对其进行了适当调整,确定PVP的终浓度为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。紫外可见吸收光谱是表征纳米银的重要工具,配合反应溶液的颜色变化能有效证明纳米银的成功制备。本研究制备的纳米银在433 nm处具有最大吸收波长,归因于银颗粒的表面等离子体共振现象。一项研究显示,纳米银的最大吸收波长位于400~470 nm^[15],表明本试验纳米银的成功制备。为进一步考察纳米银的粒子形态、分布状态与纯度,采用透射电子显微镜进行形貌表征^[16]。结果显示,宏量制备的纳米

银的颗粒尺寸与实验室小试制备的纳米银区别不大,平均粒径均为20 nm左右。然而,动态光散射结果显示纳米银的水合粒径为282 nm,远大于实验室小试制备的纳米银(150 nm),原因可能是电镜样品在制样过程中,样品需干燥后再上机镜检,而动态光散射样品呈水合状态^[17]。考虑到工业化制备条件难以做到实验室级别严苛,故纳米银的粒径会比实验室制备的要大一些,但对其后续的抗菌活性影响不大。 ζ 电位在一定程度上能反映纳米粒在悬浮液中的稳定性。文献报道, ζ 电位绝对值大于25 mV,表明粒子间具有较强的排斥力,因而表现出良好的稳定性^[18-19]。而本研究制备的纳米银,其 ζ 电位为 $(-2.56 \pm 0.32) \text{ mV}$,绝对值远小于25 mV,却具有较好的储存稳定性,表现为4 $^{\circ}\text{C}$ 静置1个月而抗菌活性不变(数据未展示)。笔者推测是高分子聚合物PVP发挥了关键作用,其依靠C=O上的孤对电子与纳米银颗粒相互作用,对抗颗粒间的团聚,从而增强稳定性。然而,上述结论也存在较大的局限性,未来还需根据《兽用化学药物稳定性研究技术指导原则》,系统评估纳米银的稳定性(光、温湿度、长期储存稳定性、加速试验等),为进一步促进其在兽医领域的临床转化提供数据支撑。

3.2 纳米银的体外抗菌活性

在考察纳米银的体内抗菌活性前,首先通过最

小抑菌浓度测定评价了纳米银的体外抗菌活性。结果显示,纳米银对常见引起人类或犬皮肤感染的细菌如金黄色葡萄球菌、假中间葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌均具有抗菌活性。此外,纳米银对耐药金黄色葡萄球菌 MRSA 也具有强效抗菌活性。值得注意的是,纳米银对革兰阴性菌的抗菌作用更强,这与本课题组之前报道的结果相符^[20-21]。国外也有学者利用芦荟提取物生物合成纳米银,发现其对铜绿假单胞菌的抗菌活性强于金黄色葡萄球菌^[22]。造成这种抗菌活性差异的原因是革兰阴性菌与革兰阳性菌的细胞壁结构不同,革兰阴性菌的细胞壁较薄,并且其细胞壁含带负电荷的脂多糖分子,对纳米银释放的银离子具有亲和性,导致革兰阴性菌对银离子的吸收增加并加剧细菌的损伤^[5]。最后,考虑到目前已有关于细菌对纳米银的耐药性报道^[14,23-25],未来还需研究细菌在亚抑制浓度纳米银持续暴露条件下能否发展出耐药性,这对纳米银的优化设计与临床指导用药有重要意义。

3.3 纳米银对犬皮肤金黄色葡萄球菌感染的疗效

确证纳米银的体外抗菌活性后,通过犬皮肤伤口细菌感染模型评价纳米银的治疗潜力。研究表明,MRSA 是全球导致抗微生物耐药性相关死亡的头号细菌^[26]。德国一项流行病学调查结果显示,国内兽医诊所中犬猫的 MRSA 患病率为 17.8%,犬伤口样品中 MRSA 的检出率能达到 32%^[27]。因此,耐药金黄色葡萄球菌 MRSA 被选作感染犬伤口的受试菌。采样的时间点取决于造模后犬的伤口闭合程度。如采样时间较早,未给药犬和给药犬的伤口闭合率均较低,此时用打孔器采样不符合动物伦理,且对动物未愈合的伤口会造成更严重的破坏,影响后续试验结果。故笔者在第 15 天时进行采样,此时间点未给药犬与给药犬的伤口闭合率 $\geq 70\%$,表明犬皮肤伤口已大部分愈合,采样符合动物伦理。疗效试验结果表明制备的纳米银能通过降低皮肤组织的荷菌量,并促进犬皮肤伤口感染的愈合,其愈合机制与我们在大鼠伤口感染模型中发现的基本一致,即通过减少炎性细胞浸润,促进胶原沉积与血管生成,进而促进感染伤口的愈合^[8]。为进一步探究其分子机制,通过免疫组织化学染色考察纳米银治疗后犬伤口组织中 TGF- β 、CD31 与 VEGF 的表达水平。TGF- β 信号通路因与肌纤维生成密切相关,被视为伤口愈合和修复中的关键机制^[28-29]。伤口愈合的另一个关键方面是血管生成,

其能通过提供营养和氧气促进周围组织的再生和修复,清除伤口代谢产物以及减缓炎症以加快愈合^[30-31]。血管内皮生长因子(VEGF)通过刺激内皮细胞增殖和迁移以及增强血管渗透性而在血管新生中起关键作用^[32-33]。同时,CD31 调节细胞黏附和信号转导,以促进血管生成并促进血管内皮细胞之间的互连^[34-35]。免疫组织化学染色结果显示,纳米银具有比对照组、阳性对照恩诺沙星更高的 TGF- β 、CD31 与 VEGF 阳性率,表明纳米银通过促进肌纤维与血管生成,进而发挥促伤口愈合作用。总之,本试验制备的纳米银通过高效抗菌、促进胶原沉积、新生血管生成、调节伤口免疫微环境的多方面作用,具有比阳性对照恩诺沙星更强的对犬皮肤伤口感染的疗效。

4 结 论

本研究利用灵芝提取物为还原剂,聚乙烯吡咯烷酮为稳定剂,通过生物合成法成功实现了纳米银的宏量制备,其呈球形,分布均匀,平均尺寸为 20 nm 左右。纳米银对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、假中间葡萄球菌等常见皮肤感染致病菌均具有高效的体外抗菌活性,最小抑菌浓度为 $16\sim 32\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。体内试验表明纳米银能够有效降低伤口组织的载菌量,促进胶原沉积与血管生成,改善伤口免疫微环境,进而促进犬感染伤口的愈合。上述结果为纳米银转化并应用于宠物皮肤感染的临床治疗奠定了物质与实践基础。

参考文献(References):

- [1] SUO H N, HUSSAIN M, WANG H, et al. Injectable and pH-sensitive hyaluronic acid-based hydrogels with on-demand release of antimicrobial peptides for infected wound healing[J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(7):3049-3059.
- [2] YANG Z F, HUANG R K, ZHENG B N, et al. Highly stretchable, adhesive, biocompatible, and antibacterial hydrogel dressings for wound healing[J]. *Adv Sci*, 2021, 8(8):2003627.
- [3] RAI M, YADAV A, GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(1):76-83.
- [4] GONG J H, CHENG X X, ZUO J J, et al. Silver nanoparticles combat *Salmonella* Typhimurium: suppressing intracellular infection and activating

- dendritic cells[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, 226:113307.
- [5] 郭大伟, 龚佳豪, 栗 硕, 等. 纳米银: 合成、抗感染与免疫[J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(5): 829-838.
- GUO D W, GONG J H, SU S, et al. Silver nanoparticles: synthesis, anti-infection and immunity [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(5): 829-838. (in Chinese)
- [6] LIU X L, LEE P Y, HO C M, et al. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing [J]. *Chem Med Chem*, 2010, 5(3): 468-475.
- [7] JIJI S, UDHAYAKUMAR S, MAHARAJAN K, et al. Bacterial cellulose matrix with impregnation of silver nanoparticles via catecholic redox chemistry for third degree burn wound healing [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 245: 116573.
- [8] GONG J H, LIU M X, ZUO R, et al. Enrofloxacin-silver composite nano-emulsion as a scalable synergetic antibacterial platform for accelerating infected wound healing[J]. *Int J Pharm X*, 2025, 9: 100330.
- [9] ZUO R N, GONG J H, GAO X G, et al. Using halofuginone-silver thermosensitive nanohydrogels with antibacterial and anti-inflammatory properties for healing wounds infected with *Staphylococcus aureus* [J]. *Life Sci*, 2024, 339: 122414.
- [10] THOMAS S, GONSALVES R A, JOSE J, et al. Plant-based synthesis, characterization approaches, applications and toxicity of silver nanoparticles: a comprehensive review [J]. *J Biotechnol*, 2024, 394: 135-149.
- [11] GONG X Y, JADHAV N D, LONIKAR V V, et al. An overview of green synthesized silver nanoparticles towards bioactive antibacterial, antimicrobial and antifungal applications[J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2024, 323: 103053.
- [12] BARATHI S, RAMALINGAM S, KRISHNASAMY G, et al. Exploring the biomedical frontiers of plant-derived nanoparticles: synthesis and biological reactions [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(7): 923.
- [13] DEVASVARAN K, ALALLAM B, LEE C, et al. Clinacanthus nutans crude polysaccharide extract as a green platform for microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles: optimization, characterization, and evaluation of bioactivities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 278(3): 134893.
- [14] PANÁČEK A, KVÍTEK L, SMÉKALOVÁ M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it[J]. *Nat Nanotechnol*, 2018, 13(1): 65-71.
- [15] HUQ M A, AKTER S. Bacterial mediated rapid and facile synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial efficacy against pathogenic microorganisms [J]. *Materials*, 2021, 14(10): 2615.
- [16] DU J, SINGH H, YI T H. Antibacterial, anti-biofilm and anticancer potentials of green synthesized silver nanoparticles using benzoin gum (*Styrax benzoin*) extract [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2016, 39(12): 1923-1931.
- [17] HUSSEIN S H, ABUDOLEH S M, ABUALASSAL Q I A, et al. Preparation and characterisation of ciprofloxacin-loaded silver nanoparticles for drug delivery [J]. *IET Nanobiotechnol*, 2022, 16(3): 92-101.
- [18] RAJESHKUMAR S, BHARATH L V. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles - a review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 273: 219-227.
- [19] SINGH P, PANDIT S, JERS C, et al. Silver nanoparticles produced from *Cedreia* sp. exhibit antibiofilm activity and remarkable stability [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 12619.
- [20] TANG X N, GUO D W, JIANG S X, et al. Facile preparation of nanosilver particles with excellent antimicrobial activity via release of ionic silver [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2017, 17(2): 1046-1052.
- [21] GUO D W, LIU G, LI X, et al. A facile one-pot green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using lentinan from *Lentinus edodes* [J]. *J Bionanoscience*, 2015, 9(5): 325-329.
- [22] MURARO P C L, PINHEIRO L D S M, CHUY G, et al. Silver nanoparticles from residual biomass: biosynthesis, characterization and antimicrobial activity [J]. *J Biotechnol*, 2022, 343: 47-51.
- [23] STABRYLA L M, JOHNSTON K A, DIEMLER N A, et al. Role of bacterial motility in differential resistance mechanisms of silver nanoparticles and silver ions [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(9): 996-1003.
- [24] SUN R, CUI Y T, WU Y N, et al. Overcoming nanosilver resistance: resensitizing bacteria and targeting evolutionary mechanisms [J]. *ACS Nano*, 2024, 19(1): 1702-1712.
- [25] PANACEK D, HOCHVALDOVÁ L,

- BAKANDRITSOS A, et al. Silver covalently bound to cyanographene overcomes bacterial resistance to silver nanoparticles and antibiotics[J]. *Adv Sci*, 2021, 8(12):2003090.
- [26] MURRAY C J L, IKUTA K S, SHARARA F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10325):629-655.
- [27] FEUER L, FRENZER S K, MERLE R, et al. Prevalence of MRSA in canine and feline clinical samples from one-third of veterinary practices in Germany from 2019-2021[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2024, 79(9):2273-2280.
- [28] HUBCHAK S C, RUNYAN C E, KREISBERG J I, et al. Cytoskeletal rearrangement and signal transduction in TGF-beta1-stimulated mesangial cell collagen accumulation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14 (8) : 1969-1980.
- [29] DING Y W, ZHANG Z W, CUI X Y, et al. ZnCur nanoparticle-enhanced multifunctional hydrogel platform: synergistic antibacterial and immunoregulatory effects for infected diabetic wound healing [J]. *Chem Eng J*, 2025, 503:158387.
- [30] VEITH A P, HENDERSON K, SPENCER A, et al. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146: 97-125.
- [31] KAPLANI K, KOUTSI S, ARMENIS V, et al. Wound healing related agents: ongoing research and perspectives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 129: 242-253.
- [32] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. *Cell*, 2019, 176(6):1248-1264.
- [33] LAWLER J. Counter regulation of tumor angiogenesis by vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86: 126-135.
- [34] YANG M, LI C J, SUN X, et al. MiR-497 ~ 195 cluster regulates angiogenesis during coupling with osteogenesis by maintaining endothelial Notch and HIF-1 α activity[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:16003.
- [35] KIM S W, HOUGE M, BROWN M, et al. Cultured human bone marrow-derived CD31 cells are effective for cardiac and vascular repair through enhanced angiogenic, adhesion, and anti-inflammatory effects [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(16):1681-1694.

(编辑 白永平)