

## 治疗放烧复合伤合并细菌感染的3D打印蛭弧菌水凝胶

郭婉婷<sup>1,2#</sup>, 贾学丽<sup>1,3#</sup>, 胡亚丹<sup>1</sup>, 王可<sup>1</sup>, 刘岩<sup>1</sup>, 金义光<sup>1,2\*</sup>

(1. 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850; 2. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006;  
3. 海军军医大学药理学系, 上海 200433)

**摘要:** 电离辐射损伤和皮肤烧伤同时或相继发生可导致放烧复合伤 (combined radiation and burn injury, CRBI)。放烧复合伤发生后机体免疫力降低, 易引起耐药细菌感染, 伤口难以愈合。蛭弧菌及其类似物 (*Bdellovibrio*-and-like organisms, BALO) 是天然掠食性细菌, 能进入大多数革兰阴性菌周质空间, 降解宿主细胞内生物大分子。本研究以明胶、海藻酸钙和活化后的蛭弧菌悬液作为生物墨水, 利用3D打印技术制备蛭弧菌水凝胶 (three dimensional-printed BALO-loaded hydrogel, TDBG), 用于皮肤CRBI合并耐药鲍曼不动杆菌 (multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, MRAB) 感染的治疗。3D打印水凝胶冻干后呈三维网状结构, 内部附着明胶薄膜, 具有良好的可打印性和生物黏附性。可打印性使其能根据伤口形状进行适应性打印, 为感染伤口提供个性化治疗; 三维网络结构能为蛭弧菌的生存和游动提供条件, 利于发挥高效掠食活性。所有动物实验经军事科学院军事医学研究院批准且实验均按照相关指导原则和规定进行 (批准号: IACUC-DWZX-2022-834)。经TDBG治疗后, CRBI合并MRAB感染小鼠伤口闭合速率加快, 伤口部位炎症细胞因子表达水平降低, 胶原沉积增加, 伤口修复效果好。本研究拓宽了活体生物药的应用范围, 为其研发和临床应用提供参考。

**关键词:** 放烧复合伤; 耐药鲍曼不动杆菌; 蛭弧菌; 水凝胶; 3D打印

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1262-10

## 3D-printed *Bdellovibrio bacteriovorus* hydrogel for treatment of infected combined radiation and burn injury

GUO Wan-ting<sup>1,2#</sup>, JIA Xue-li<sup>1,3#</sup>, HU Ya-dan<sup>1</sup>, WANG Ke<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, JIN Yi-guang<sup>1,2\*</sup>

(1. Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China;

2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3. Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** Combined radiation and burn injury (CRBI) is induced by simultaneous or sequential ionizing radiation damage and skin burns. CRBI weakens the immune ability, leading to drug-resistant bacterial infections and delayed wound healing. *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) are naturally predatory bacterium that can prey on most Gram-negative bacteria by entering the periplasmic space of their prey and degrading the biomolecules of host cells. In this study, we combined gelatin, calcium alginate, and activated BALO water samples to form bio-inks to three-dimensional (3D)-print BALO-loaded hydrogels (TDBG) for the treatment of CRBI combined with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MRAB) infection. The freeze-dried 3D-printed hydrogel exhibited a 3D network structure attached with gelatin films, and owned good printability and biocompatibility. The printability improved adaptation to wound shapes for the personalized treatment of infected wounds. The 3D network structure allowed the surviving and motion of BALO, favoring its high predatory activity. All animal

收稿日期: 2024-09-10; 修回日期: 2025-03-19.

#共同第一作者.

\*通讯作者 E-mail: jinyg@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1258

experiments were approved by the Ethics Committee of Academy of Military Medical Sciences, and the experiments were conducted in accordance with relevant guidelines and regulations (approval number: IACUC-DWZX-2022-834). TDBG treatment improved wound healing by accelerating the mouse wound closure rate of CRBI combined with MRAB infection, reducing the expression of pro-inflammatory cytokines in the wound tissues, and increasing collagen deposition. This study expands the application scope of live biological products and provides a basis for their development and clinical applications.

**Key words:** combined radiation and burn injury; drug-resistant *Acinetobacter baumannii*; *Bdellovibrio-and-like organism*; hydrogel; 3D printing

放射复合伤 (combined radiation and burn injury, CRBI) 是指放射性损伤与烧伤同时或相继发生的复合型皮肤损伤<sup>[1,2]</sup>。放射损伤严重影响机体免疫能力, 细胞 mRNA 表达延迟, 细胞凋亡加剧, 中性粒细胞和血小板明显减少<sup>[3]</sup>, 促炎细胞因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) 表达增加, 加剧免疫损伤, 增加对感染的易感性<sup>[4]</sup>。烧伤后创面的存在是病原体入侵的重要途径。烧伤后皮肤失去屏障作用, 无法阻止有害细菌入侵, 易造成伤口感染, 进一步加重组织损伤, 加大治疗难度, 伤口不及时处理甚至会引发危及生命的菌血症<sup>[5,6]</sup>。因此 CRBI 的抗感染治疗是需要重点关注的问题。抗生素是治疗各种类型伤口感染的首选方式, 但抗生素的广泛使用甚至滥用导致大量耐药菌出现。当伤口部位发生耐药菌感染时, 治疗和伤口愈合变得更加困难<sup>[7,8]</sup>。因此, 迫切需要开发一种不同于当前抗生素耐药机制的新抗菌方法。

蛭弧菌及其类似物 (*Bdellovibrio-and-like organisms*, BALO) 为小型革兰阴性菌, 能捕食多种致病菌尤其是革兰阴性菌<sup>[9,10]</sup>。蛭弧菌在鞭毛推动下进行随机碰撞, 进入特定宿主菌周质空间摄取内部生物大分子<sup>[11]</sup>, 同时自身增殖并形成蛭质体, 产生的水解酶破坏宿主菌细胞膜结构, 使宿主菌裂解, 并释放出蛭弧菌, 继续侵染其他宿主, 被认为是一种“活抗生素”<sup>[12-14]</sup>。因为蛭弧菌只作用于具有细胞壁结构的微生物, 所以它对真核细胞是非常安全的<sup>[15]</sup>。蛭弧菌具有不受细菌耐药性影响的杀菌机制, 可成为有潜力的抗生素替代疗法。低温微针载蛭弧菌可有效抑制啮齿动物角膜感染模型中的细菌增殖, 而水凝胶载蛭弧菌在治疗皮肤创伤弧菌感染中疗效显著<sup>[15,16]</sup>。这些研究成果为新型蛭弧菌抗菌制剂的开发奠定了理论基础。然而, 直接使用蛭弧菌混悬液治疗 CRBI 皮肤伤口感染存在易流失和失活的问题, 并且蛭弧菌的生长需要合适的环境, 包括需提供必要的猎物、湿润的环境和空气。因此, 目前蛭弧菌尚未被作为有效的抗菌剂应用于临床。

水凝胶具有三维网络空间结构, 具有高生物相容性, 应用于伤口后, 可提供适当的湿度和吸收伤口渗出物, 加速伤口愈合<sup>[17-20]</sup>。因此, 水凝胶被广泛用于促进组织修复和再生<sup>[21,22]</sup>。水凝胶特殊的结构和性质能为蛭弧菌提供适宜的生存环境。本实验室前期研究表明载蛭弧菌水凝胶可用于治疗创伤弧菌引起的伤口感染和铜绿假单胞菌引起的角膜炎<sup>[15,23]</sup>。作者设想将蛭弧菌载入水凝胶用于 CRBI 伤口感染治疗。考虑到 CRBI 伤口形状和深度等复杂情况, 对患者进行个性化医疗成为获得最佳治疗效果的关键, 但普通水凝胶制剂不能适应伤口形状, 难以满足个性化治疗需求。

3D 打印也被称为增材制造<sup>[24-26]</sup>, 是将打印材料按照设计打印成各种各样的形态。3D 打印技术为个性化治疗提供了无限可能。将活细胞掺入打印基质中得到生物墨水, 用 3D 打印技术制备功能性材料称为生物 3D 打印<sup>[27-29]</sup>。生物 3D 打印已被广泛用于构建皮肤、血管、心脏等诸多组织和器官原型<sup>[30]</sup>。在创伤修复方面, 基于脂肪细胞外基质的生物墨水可用于打印仿生多层植入物, 植入伤口后可以正常存活并参与伤口修复<sup>[31]</sup>; 3D 打印球形皮肤类器官可以模拟真实的皮肤结构在大规模伤口中拥有促愈合作用<sup>[32]</sup>。水凝胶具有网状和湿润的微环境, 可供细胞或细菌生长, 是最常见的生物 3D 打印材料<sup>[33,34]</sup>。本实验室前期研究通过生物 3D 打印技术构建的辐射响应工程菌水凝胶成功用于辐射检测<sup>[35]</sup>。但目前尚无使用生物 3D 打印技术装载活菌治疗 CRBI 合并感染的报道。

本研究设计了一种 3D 打印蛭弧菌水凝胶 (three-dimensional-print BALO-loaded hydrogels, TDBG) 用于 CRBI 合并细菌感染的治疗。研究详细探讨了水凝胶的可打印性和蛭弧菌负载的适用性, 考察了掺入蛭弧菌后 3D 打印水凝胶的抗菌活性。本研究中用于打印 TDBG 的生物墨水包括明胶、海藻酸钠和蛭弧菌悬液。明胶和海藻酸钠交联形成的水凝胶具有可打印性, 并且内部湿润环境和三维网络空间结构能为蛭弧菌生长提供适当的环境。构建 CRBI 合并多药耐药鲍曼

不动杆菌 (multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, MRAB) 感染小鼠模型考察 TDBG 对感染创面的治疗效果和抗菌机制。TDBG 在皮肤保留时间长, 能适应不同的伤口形状, 可有效减少蛭弧菌的流失。本研究为活体生物药的开发提供了新思路。

## 材料与方法

**药物与试剂** 海藻酸钠 (批号: C13658884, 上海麦克林生化科技有限公司); 无水氯化钙 (批号: 1804131, 西陇科学股份有限公司); 明胶 (批号: WXBD2999V, 赛国生物科技有限公司); 硫酸链霉素 (5220726003, 北京索莱宝科技有限公司); 蛭弧菌悬液 (批号: 20230814, 宿州龙纪元生态养殖专业合作社); 无菌自来水 (制备方法: 自来水煮沸, 静置冷却后弃沉淀, 纱布过滤, 调 pH 至 7.2, 121 °C 灭菌 20 min)。

**仪器** <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐射装置 (军事医学研究院); 超纯水仪 (Smart-N15, 上海力康科学仪器有限公司); 电动搅拌器 (SESCO, 上海申生科技有限公司); 台式超级控温烫伤仪 (YLS-5Q, 上海科隆科技发展有限公司); 生物 3D 打印机 (Regenova Sparrow, 杭州捷诺飞生物科技有限公司); 扫描电子显微镜 (Hitachi Reguius8100, 株式会社日立制作所); 临界点干燥仪 (Quorum k850, 英国 Quorum 公司); 多功能酶标仪 (SPARK, 奥地利 Tecan 有限公司); 高速组织研磨仪 (KZ-III, 武汉索莱宝生物科技有限公司); 倒置荧光显微镜 (U-LH100G, 日本 Olympus 有限公司)。

**菌株和动物** 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*, ATCC 25922); MRAB (ATCC 17978, 美国菌种保藏中心)。ICR 小鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 22~24 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2021-0006。实验期间自由给予水和食物。动物实验经军事科学院军事医学研究院伦理委员会批准, 且实验均按相关指导原则和规定进行, 批准号: IACUC-DWZX-2022-834。

**菌群多样性分析** 淡水生活的蛭弧菌需要水体中的钙、镁离子等微量元素和中性条件下才能生存, 所以使用无菌自来水活化蛭弧菌悬液后进行菌群多样性分析。使用无菌自来水调节 *E. coli* 至 OD<sub>600</sub> 约 0.3<sup>[36]</sup>, 取该 *E. coli* 悬液 25 mL 于试管中, 加入 500  $\mu$ L 蛭弧菌悬液, 37 °C 培养活化水样中的蛭弧菌。活化后的水样 4 °C、3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后, 上清于 12 000 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 20 min, 取沉淀进行菌群多样性分析。

**天然水样抑菌活性考察** 使用双层平板法考察天然水样中蛭弧菌的抑菌活性。用无菌自来水调节 *E. coli* 至 600 nm 处的光密度 (OD<sub>600</sub>) 大于 1.0, 取该 *E. coli*

悬液 500  $\mu$ L, 加入稀释 10 倍后的蛭弧菌悬液 100  $\mu$ L, 混匀后加至 3 mL 自来水配置的上层半固体培养基中, 充分混匀后倒入已经铺好并凝固的下层固体培养基上, 37 °C 恒温培养, 观察噬菌斑形成情况。

使用无菌自来水调节 MRAB 至 OD<sub>600</sub> 约 0.3, 取该 MRAB 悬液 15 mL 于 50 mL 离心管, 加入 1 mL 的蛭弧菌悬液, 于 37 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 培养至外观明显澄清。取澄清菌液 5  $\mu$ L, 磷钨酸染色, 透射电镜观察蛭弧菌噬菌现象; 剩余菌液于 6 000 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 5 min, 沉淀用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 3 次后用无水乙醇处理, 干燥喷金后在扫描电子显微镜下观察。

**载蛭弧菌水凝胶的制备** 使用无菌自来水将蛭弧菌悬液稀释 8 倍, 取该稀释后蛭弧菌悬液 8 mL, 加入 0.15 g 海藻酸钠粉末, 得蛭弧菌海藻酸钠溶液; 取 1.2 g 明胶于 4 mL 无菌自来水中, 50 °C 加热溶解, 得明胶溶液。将明胶溶液加入到蛭弧菌海藻酸钠溶液中, 37 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 摇床中混匀 15 min, 室温下 4 000 r·min<sup>-1</sup>、5 min 离心去除气泡, 浸泡在 1% 的 CaCl<sub>2</sub> 中固化 2 min, 得载蛭弧菌海藻酸钙水凝胶 (BALO-loaded hydrogels, BG)。使用无菌自来水代替蛭弧菌悬液稀释液同法制备空白水凝胶; 使用 600  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 硫酸链霉素溶液代替蛭弧菌悬液稀释液制备载链霉素水凝胶 (streptomycin-loaded hydrogel, SMG)。

**载蛭弧菌水凝胶的形貌** BG 于液氮中脆断并冻干, 小心切成薄片, 粘贴于导电胶, 表面喷金, 扫描电镜观察凝胶内部形貌特征, 电压设置为 20 kV。将样品直接粘到导电胶上, 并使用溅射镀膜仪喷金 45 s, 喷金为 10 mA; 随后使用扫描电子显微镜拍摄样品形貌、能谱 mapping 等测试, 形貌拍摄时加速电压为 3 kV, 能谱 mapping 拍摄时加速电压为 15 kV, 探测器为 SE2 二次电子探测器。

**水凝胶可打印性考察** 使用未经 CaCl<sub>2</sub> 固化的空白水凝胶作为生物墨水测试可打印性。未固化的空白水凝胶转移至 5 mL 的打印料筒中, 选用 0.16 mm 孔径直式针头, 使用 BioPrinter 软件设计模型 (直径为 10 mm, 高 3 mm 的圆形图案), 使用生物 3D 打印机打印 (料筒温度为 35 °C, 针头温度为 24 °C, 气压为 0.6 MPa, 打印速度为 30 mm·s<sup>-1</sup>)。打印好的材料浸泡在 1% CaCl<sub>2</sub> 中固化 2 min。同法以未固化的载蛭弧菌水凝胶作为生物墨水制备 TDBG。

**载蛭弧菌水凝胶活性考察** 使用无菌自来水调节 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) 悬液至 OD<sub>600</sub> 约 0.3。取该 EcN 悬液 10 mL, 分别加入 1 mL 载蛭弧菌水凝胶和空白水凝胶置于摇床中 37 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 培养, 观察菌液在 600 nm 处的 OD 值变化。吸取 100  $\mu$ L 摇床培

养后的菌液均匀涂于营养琼脂平板上,放入培养箱37 °C培养24 h记录平板上细菌数量。

**放烧复合伤合并MRAB感染动物模型建立** ICR小鼠背部脱毛后,使用直径1 cm的金属柱烫伤仪100 °C烫伤6 s。采用<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 射线对小鼠进行全身照射,总剂量为5 Gy,剂量率为0.72 Gy·min<sup>-1</sup>。在接受辐照后,ICR小鼠背部脱毛,使用直径1 cm的金属柱烫伤仪100 °C烫伤6 s,伤口处用20  $\mu$ L MRAB,使用医用无菌透明敷料覆盖伤口,3天后造模完成,即为Day 0。造模完成后,立即对小鼠进行药物治疗,每2天给药1次,持续至第21天。正常组的小鼠则不进行任何特殊处理。

**伤口闭合率计算** 以第1次给药时间作为第0天,拍照记录第0、7、14天的小鼠伤口外观,使用ImageJ软件进行伤口拟合,计算伤口闭合率。

**病理切片和免疫组化分析** 小鼠给药后第21天麻醉处死小鼠,取伤口处皮肤组织,经4%多聚甲醛固定、脱水、包埋、切片后进行苏木素-伊红(Hematoxylin and eosin, H&E)及Masson染色,以及免疫组化标记小鼠巨噬细胞标志物F4/80的表达。

**炎症因子** 造模后第7、14天,分别取以伤口中心为圆心、直径为1 cm的皮肤组织样本,称重后剪碎,加入9倍组织重量的生理盐水,使用高速组织研磨仪在60 Hz的频率下研磨240 s,使组织充分破碎。随后,在4 °C的条件下,以5 000  $\times$ g离心10 min,以分离出上清液。按照ELISA试剂盒的说明书进行操作,使用上清液来测定伤口组织中IL-6及TNF- $\alpha$ 的含量。

**溶血试验** 通过溶血实验考察水凝胶的血液相容性。大鼠腹主动脉取血,2 000 r·min<sup>-1</sup>低温离心10 min收集红细胞,生理盐水洗涤3遍,将红细胞稀释至2%的浓度。分别将蛭弧菌悬液、空白水凝胶、3D打印蛭弧菌水凝胶置于1 mL红细胞混悬液中,轻微晃动后置于37 °C水浴中孵育2 h,取10  $\mu$ L于显微镜下观察红细胞形态。2 000 r·min<sup>-1</sup>低温离心10 min,观察上清颜色并检测其在540 nm处的OD值,计算溶血率。以生理盐水作为阴性对照,1% Triton X-100溶液作为阳性。

**统计学分析** 采用GraphPad Prism 8.0.2软件通过单因素方差分析对数据进行统计学分析。数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;比较组间差异, $P < 0.05$ 表示

具有显著性差异。

## 结果

### 1 蛭弧菌悬液抑菌效果

水样中共发现4种蛭弧菌门生物(表1),其中3种为蛭弧菌科生物(Bacterioviraceae),一种为Oligoflexaceae科。据报道,该4种蛭弧菌门生物均具有掠食能力<sup>[37]</sup>。蛭弧菌悬液与*E. coli*共培养3天后出现噬菌斑,第6天时噬菌斑数量增多,体积增大(图1A),证明水样中的蛭弧菌具有高的掠食活性。水样中蛭弧菌的高活性是蛭弧菌具有高效杀菌功能的前提,因此判断蛭弧菌悬液适合用于后续抗菌研究。

蛭弧菌捕食MRAB的动力学研究发现,单独的MRAB样品在42 h内外观呈现浑浊,28 h内OD<sub>600</sub>基本维持不变,28 h后OD<sub>600</sub>略有增加,可能是水分挥发(图1B);而加入蛭弧菌后,MRAB的OD<sub>600</sub>值在12 h开始下降,37 h后降至0.1以下,且外观逐渐变澄清,其原因可能为体系中的MRAB逐渐被悬液中的蛭弧菌杀灭(图1B)。由此,可以推测悬液中的蛭弧菌对MRAB具有较强的抑制能力。

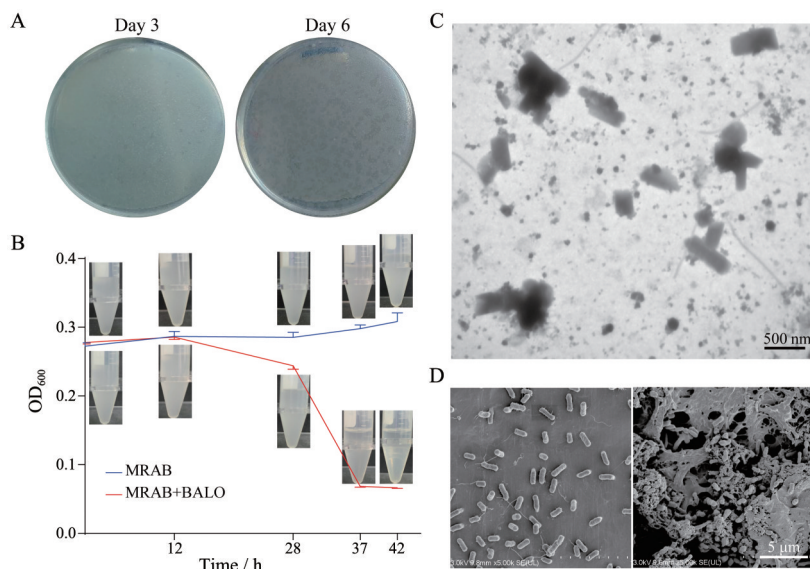
为了深入探索蛭弧菌捕食MRAB的过程,进一步通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察蛭弧菌对MRAB的捕食行为。蛭弧菌与MRAB混合孵育后,TEM下可以明显观察到水样中的蛭弧菌附着在MRAB表面,并能穿透MRAB细胞壁(图1C)。在SEM下观察经蛭弧菌作用后,MRAB的细胞壁和细胞膜的完整性被破坏(图1D),MRAB结构发生明显改变,直接证明蛭弧菌具有裂解MRAB的作用。通过上述实验可以推断,蛭弧菌在捕食过程中,首先与MRAB接触,然后破坏MRAB细胞壁,钻入MRAB的周至空间并进行繁殖,导致MRAB的裂解和死亡。该结果证实了水样中蛭弧菌对MRAB的捕食行为。

### 2 3D打印蛭弧菌水凝胶的性质及体外噬菌活性

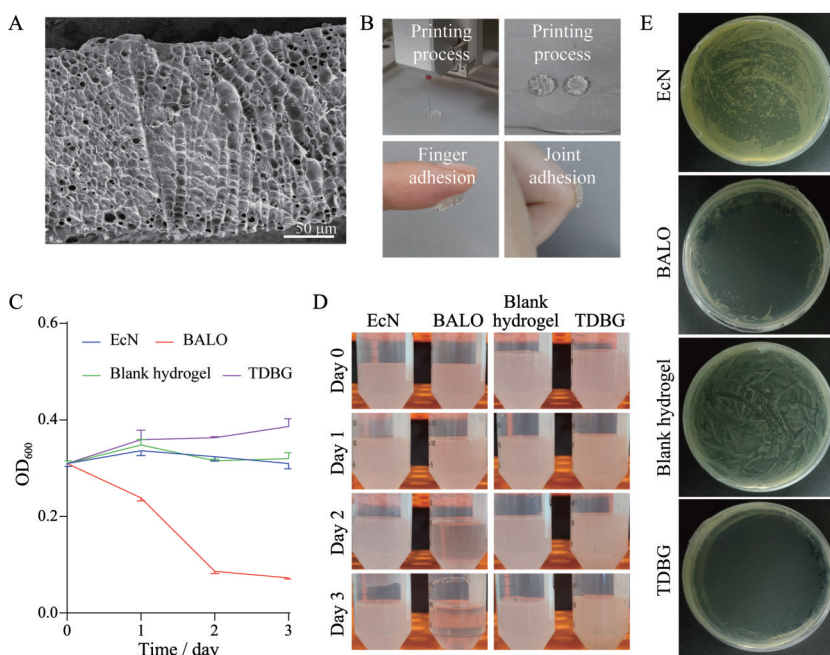
冻干后的水凝胶具有类似于海绵的多孔结构(图2A)。水凝胶的多孔结构可以很好地吸收伤口渗出物,保持适当的湿润状态,有利于伤口修复。此外,多孔水凝胶的孔径(大于5  $\mu$ m,图2A)远大于蛭弧菌尺寸(约

**Table 1** Bdellovibrio-and-like organisms (BALO) in *B. bacteriovorus*-contained suspension

Species sequence	Phyla	Class	Order	Family
6 257	Bdellovibrionota	Bdellovibrionia	Bacteriovirales	Bacterioviraceae
204	Bdellovibrionota	Oligoflexia	Oligoflexales	Oligoflexaceae
58	Bdellovibrionota	Bdellovibrionia	Bacteriovirales	Bacterioviraceae
11	Bdellovibrionota	Bdellovibrionia	Bacteriovirales	Bacterioviraceae



**Figure 1** Bactericidal ability of BALO. A: Plaque formation in the MRAB plate after the addition of BALO; B: OD<sub>600</sub> values and appearance of MRAB suspensions and the mixture suspensions of BALO and MRAB depending on time; C: Transmission electron microscope (TEM) images of *B. bacteriovorus* invading MRAB; D: Scanning electron microscope (SEM) images of MRAB before and after adding BALO. MRAB: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*



**Figure 2** Characteristics of 3D-printed hydrogels and the bactericidal ability of TDBG. SEM images of the BG (A), and the initial adhesive and printability (B) of the 3D-printed hydrogels; OD<sub>600</sub> values (C) and appearance (D) of EcN suspensions without or with processing; E: CFU counting of MRAB after processing for 3 days with various formulations. TDBG: Three dimensional-printed BALO-loaded hydrogel; BG: BALO-loaded hydrogel; EcN: *Escherichia coli* Nissle 1917

500 nm, 图 1C), 允许蛭弧菌自由游动, 能为蛭弧菌的生存提供营养和氧气, 有利于蛭弧菌接近并捕食目标病原菌。水凝胶的可打印性是其实实现个性化治疗的前提。通过生物墨水的实际打印测试其打印性能。通过生物 3D 打印技术, 成功制备了以明胶为基质的圆形贴

片水凝胶 (图 2B), 说明本研究用水凝胶能够根据需求打印成所需形状, 可以满足不同形状伤口的治疗需求。皮肤给药制剂应具有足够黏附性以保证活性成分能长时间滞留于受损部位。打印好的水凝胶与皮肤接触时, 能很好地黏附于皮肤表面, 包括复杂曲率部位如手

指关节处,且在运动过程中不脱落,展现出良好的皮肤黏附性(图2B)。

3D打印过程以及水凝胶成分可能影响蛭弧菌的掠食活性。因此以EcN为宿主菌进一步考察蛭弧菌载入水凝胶并经3D打印后的掠食活性。单独的蛭弧菌水样与EcN共培养后,OD<sub>600</sub>值快速降低,溶液外观变澄清,说明游离蛭弧菌可以高效捕食EcN,具有高掠食活性(图2C、D);空白水凝胶和TDBG组的OD<sub>600</sub>值始终保持在较高水平且外观浑浊,推测其原因为水凝胶内部明胶融化所致。为验证这一猜想,将与空白水凝胶、TDBG和蛭弧菌混合培养后的EcN菌液接种于LB平板观察菌落形成情况。EcN组和空白水凝胶组在平板上形成大量菌落(图2E),而蛭弧菌组和TDBG组几乎无细菌生长,证明水凝胶材料及3D打印过程不影响水样中蛭弧菌的掠食活性。

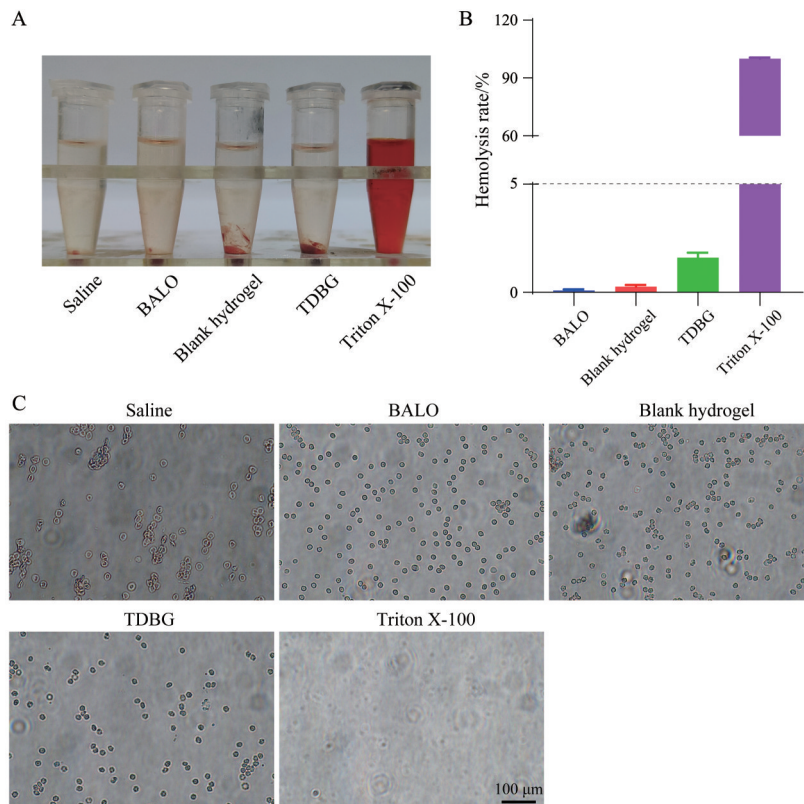
### 3 3D打印蛭弧菌水凝胶的血液相容性

TDBG使用时直接接触受感染伤口,因此其生物安全性非常重要。蛭弧菌组、空白水凝胶组和3D打印蛭弧菌水凝胶组与红细胞接触后,上清液颜色与生理盐水组相似,呈清澈透明状,没有出现明显红色,而对照Triton X-100组上清液明显因溶血而变红(图3A)。

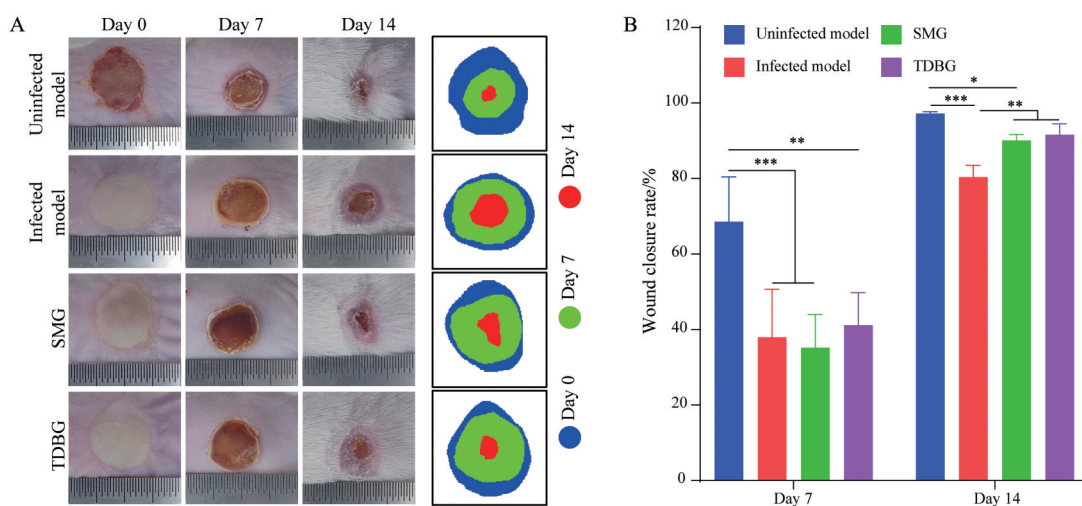
进一步检测上清液在540 nm处的OD值,并计算溶血率。除阳性对照Triton X-100外,其余组的溶血率均低于5%(图3B);同时显微镜下观察除阳性对照Triton X-100外,各组细胞形态与生理盐水组相近(图3C)。因此3D打印蛭弧菌水凝胶不会导致溶血,血液相容性好,适合作为伤口敷料。

### 4 3D打印蛭弧菌水凝胶促进感染伤口愈合

伤口闭合是评价伤口恢复情况的关键指标之一。受细菌感染的伤口愈合过程通常比未受感染的伤口要慢,如果可以有效抑制感染,伤口的愈合速度将与未感染伤口相近。在伤口感染第7天时,MRAB感染组、SMG组及TDBG组伤口闭合率均低于50%,而未感染组伤口闭合率达到70%,说明MRAB感染严重阻碍了伤口闭合进程(图4A);同时,在伤口恢复早期,SMG和TDBG均不能明显促进伤口闭合。第14天时,TDBG组的伤口面积与未感染对照组相近,伤口闭合率达92%,与感染模型组(80%)相比有显著性差异(图4B)。以上结果说明,TDBG能明显促进伤口闭合,加速感染伤口愈合。TDBG促进伤口愈合的效果与蛭弧菌高效的抗菌能力和水凝胶独特的网络结构有关。后续研究将通过炎症因子检测和组织病理学分析,进一



**Figure 3** Blood compatibility of BALO, blank hydrogels, and TDBG. Photographs of the supernatants (A), hemolysis rates (B), and photographs of the RBC (C) after RBC co-incubation with saline (negative control), BALO, blank hydrogels, TDBG, and Triton X-100 (positive control).  $n = 3, \bar{x} \pm s$



**Figure 4** Wound healing ability of different formulations. A: Photos and simulated area of the wounds on Day 0, 7, and 14; B: Wound closure rates in different groups. SMG: Streptomycin-loaded hydrogel.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

步验证 TDBG 对感染伤口愈合的促进作用。

### 5 3D 打印蛭弧菌水凝胶减轻炎症并促进伤口皮肤组织修复

细菌内毒素促进促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达, 而促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 参与炎症反应的上调, 阻碍伤口愈合<sup>[38]</sup>。感染模型组的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 在整个伤口修复过程中均保持最高水平 (图 5A、B), 表明伤口在细菌感染后有严重的炎症反应。TDBG 组和 SMG 组的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平始终保持在最低水平, 且在第 7 天和第 14 天显著低于感染模型组甚至低于未感染组 (图 5A、B)。以上研究表明, TDBG 和 SMG 均可通过抑制细菌感染而下调炎症因子表达水平, 对伤口修复具有积极影响。然而, 伤口修复是一个复杂的过程, 仅从炎症因子表达水平高低无法判断修复程度, 需要进一步考察伤口内部皮肤组织中细胞器、毛囊和胶原沉积情况, 综合评价不同治疗方式的促伤口恢复作用。

创面的病理切片显示了伤口愈合的细节。与未感染对照组相比, MRAB 感染模型组和 SMG 组伤口处皮肤组织坏死, 出现大量炎性细胞浸润, 提示细菌感染后炎症反应严重, 链霉素无法满足治疗需求。而经 TDBG 治疗后, 只有少量的炎症细胞浸润, 说明 3D 打印蛭弧菌水凝胶能减轻伤口炎症反应。TDBG 组出现完整且连续的表皮, 角质层变薄, 同时形成大量毛囊和皮脂腺等皮肤附属器, 真皮组织有序, 伤口恢复情况明显好于 SMG 组 (图 5C)。H&E 染色结果也说明 TDBG 具有高效地促进感染伤口修复作用。

皮肤组织中富含胶原纤维, 通过皮肤组织胶原纤维的形成和沉积情况, 可辅助判断感染伤口修复情况。Masson 染色可标记胶原纤维和肌纤维, 染色后胶原纤

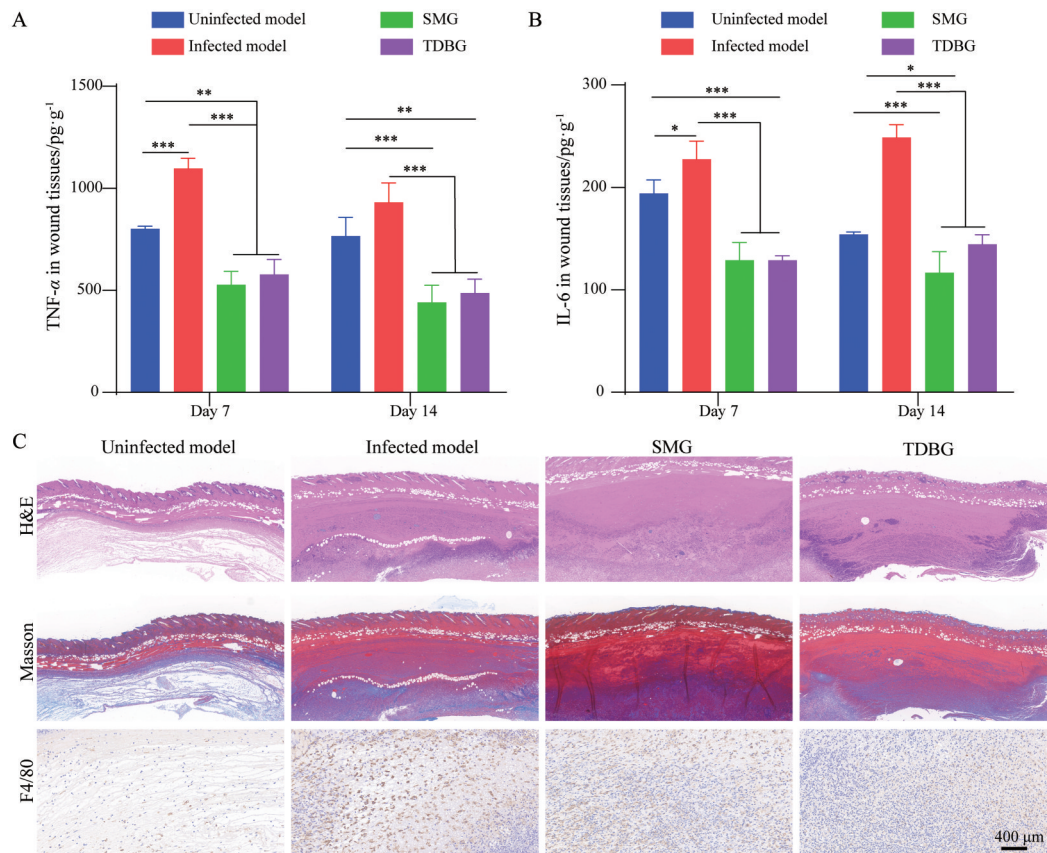
维为蓝色, 而肌纤维显红色。给药后第 7 天, 各组在痂下均出现大面积红色肌纤维, 均表现出严重的纤维化现象 (图 5C), 这意味着在感染和组织损伤过程中, 纤维组织的过度增生和修复。但值得注意的是, 其中 TDBG 组在大量红色肌纤维中出现了蓝色胶原纤维, 说明在感染基本得到控制后, 组织开始进入愈合阶段。胶原纤维的出现是组织修复和愈合过程中的一个重要标志, 对于恢复组织的正常结构和功能至关重要。

F4/80 作为巨噬细胞的主要标志物, 表明巨噬细胞的成熟和激活<sup>[39]</sup>。伤口感染诱导巨噬细胞的大量增殖和浸润, 活化的巨噬细胞可促进过量的促炎细胞因子的产生, 导致组织损伤<sup>[40]</sup>。棕色染色的 F4/80 表达显示伤口部位有巨噬细胞浸润。TDBG 组 F4/80 低表达, 与未感染对照组水平相当。而感染模型组和 SMG 组 F4/80 高表达。因此, TDBG 降低了巨噬细胞的活化和炎症反应。

### 讨论

放烧复合伤兼具烧伤和辐射损伤的特征, 通常导致机体免疫力降低, 容易遭受细菌侵袭, 同时创面的存在进一步增加了细菌感染的风险, 因此抗感染治疗非常重要<sup>[34]</sup>。临床主要采用传统抗生素进行抗感染治疗, 抗生素的使用容易导致更加严重的耐药菌感染。其他的一些无机抗菌剂, 如银、氧化锌也被用于治疗伤口细菌感染, 但容易引起金属元素进入体内等问题, 存在安全隐患<sup>[41]</sup>。现有药物已不能满足耐药菌感染的治疗需求, 人类一直在积极寻找新的抗菌策略, 但至今仍然没有一种高效安全的方法。

蛭弧菌具有掠食细菌的特性, 已有研究尝试将其



**Figure 5** Microscale changes and healing data of wounds. Expressions of TNF- $\alpha$  (A) and IL-6 (B) in wound tissues; C: H&E staining, Masson's trichrome staining (the blue areas indicate the collagen fibers), and F4/80 immunohistochemical staining of wound tissues on Day 14.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

用于治疗耐药菌感染。本实验室前期研究发现蛭弧菌可高效治疗创伤弧菌引起的皮肤伤口感染以及铜绿假单胞菌引起的眼部感染<sup>[15,23]</sup>。本研究进一步探索将其用于放烧复合伤合并MRAB感染的治疗。通过菌群多样性分析,确定所用“蛭弧菌悬液”中存在4种蛭弧菌门生物(表1),且这4种生物均具备掠食能力。对蛭弧菌悬液抑菌活性的考察实验,如与大肠杆菌共培养出现噬菌斑、对MRAB的捕食动力学研究及电镜观察结果,均证实其具有高掠食活性和高效杀菌功能,具备治疗疾病的潜力。然而,存在的问题是蛭弧菌以水样形式存在,直接用于伤口易流失,因此需要制备成合适的制剂。但作为活菌药物,蛭弧菌的生存需要合适的条件。因此制备成制剂后,蛭弧菌是否能存活也是一个关键问题。同时,考虑到放烧复合伤发生后伤口形状各异,传统敷料不能很好地覆盖伤口,针对不同部位的伤口进行个性化治疗是提高蛭弧菌在伤口滞留时间,增强治疗效果的可行方法。

3D打印技术在本研究中至关重要。放烧复合伤伤口形状复杂多样,传统水凝胶制剂难以适应,无法满足个性化治疗需求。3D打印技术能将含有蛭弧菌的

生物墨水打印成各种形态,使水凝胶紧密贴合不同形状伤口,提高蛭弧菌在伤口部位的滞留时间。实验制备的圆形贴片水凝胶具有良好皮肤黏附性,其三维网络结构为蛭弧菌提供适宜生存环境,有利于蛭弧菌生存、游动,进一步发挥高效掠食活性,这是传统制剂无法实现的优势。伤口敷料需要具有好的黏附性以保证有效成分能长时间滞留于受损部位。本研究制备的TDBG具有高的伤口黏附特性。本研究中用于装载蛭弧菌的水凝胶由明胶和海藻酸钙组成,其中明胶成分保证了TDBG在受损部位的高黏附性。明胶作为一种天然高分子材料,具有独特的温敏性质<sup>[42]</sup>。室温下,明胶分子链之间的相互作用以及水凝胶网络结构的形成使TDBG能稳定成型。因此TDBG在作为外用敷料使用时能保持稳定的形态和结构,从而有效覆盖和保护伤口;当TDBG与皮肤接触后,明胶融化,表现出良好的皮肤黏附性,同时释放蛭弧菌以发挥高效抗菌作用。

TDBG具有三维空间网络结构,同时具有良好保湿性能,能为蛭弧菌的生长提供足够的氧气和水分,并且具有可打印性,满足个性化治疗需求。经验证,TDBG具有较高的生物安全性和对耐药MRAB的良好

抑制能力,且可根据伤口形状和大小进行个性化打印,从而更好地适应不同患者、不同部位、不同形状伤口的治疗需求。本研究使蛭弧菌在个性化治疗耐药细菌感染方面的应用得到了很好的扩展,也为3D打印活体生物药的研究提供了基础。

**作者贡献:**郭婉婷负责实验设计、实验操作、数据分析;贾学丽负责实验设计、结果分析和文章撰写;胡亚丹、王可参与实验、文章修改;刘岩参与实验设计;金义光负责课题设计、实验指导、数据分析、文章写作与修改。

**利益冲突:**本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Cheng TM, Chen ZR, Yan YT, et al. Experimental studies on the treatment and pathological basis of combined radiation and burn injury [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115: 1763-1766.
- [2] Guo W, Jia X, Liu Y, et al. Loong oil-lyotropic liquid crystals for the treatment of combined radiation and burn injury [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 1449-1457.
- [3] Foubert P, Doyle-Eisele M, Gonzalez A, et al. Development of a combined radiation and full thickness burn injury minipig model to study the effects of uncultured adipose-derived regenerative cell therapy in wound healing [J]. *Int J Radiat Biol*, 2017, 93: 340-350.
- [4] Palmer JL, Deburghgraeve CR, Bird MD, et al. Development of a combined radiation and burn injury model [J]. *J Burn Care Res*, 2011, 32: 317-323.
- [5] Li YY, Wang JL, Li G, et al. Successful treatment of a case of extensive radiation burns with multiple organ dysfunction syndrome [J]. *J Burn Care Res*, 2013, 34: e104-e109.
- [6] Kiley JL, Greenhalgh DG. Infections in burn patients [J]. *Surg Clin North Am*, 2023, 103: 427-437.
- [7] Thompson T. The staggering death toll of drug-resistant bacteria [J]. *Nature*, 2022. DOI: 10.1038/d41586-022-00228-x.
- [8] de la FuenteNunez C, Cesaro A, Hancock REW. Antibiotic failure: beyond antimicrobial resistance [J]. *Drug Resist Updat*, 2023, 71: 101012.
- [9] Pantanella F, Iebba V, Mura F, et al. Behaviour of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the presence of Gram-positive *Staphylococcus aureus* [J]. *New Microbiol*, 2018, 41: 145-152.
- [10] Findlay JS, Flick-Smith HC, Keyser E, et al. Predatory bacteria can protect SKH-1 mice from a lethal plague challenge [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 7225.
- [11] Płaskowska K, Zakrzewska-Czerwińska J. Chromosome structure and DNA replication dynamics during the life cycle of the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus* [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2023, 47: fuad057.
- [12] Du Toit A. *Bdellovibrio bacteriovorus* finds its prey [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2024, 22: 119.
- [13] Dharani S, Kim DH, Shanks RMQ, et al. Susceptibility of colistin-resistant pathogens to predatory bacteria [J]. *Res Microbiol*, 2018, 169: 52-55.
- [14] Cavallo FM, Jordana L, Friedrich AW, et al. *Bdellovibrio bacteriovorus*: a potential 'living antibiotic' to control bacterial pathogens [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2021, 47: 630-646.
- [15] Liu Y, Zhuang B, Yuan BC, et al. Predatory bacterial hydrogels for topical treatment of infected wounds [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 315-326.
- [16] Cui MY, Zheng MJ, Wiraja C, et al. Ocular delivery of predatory bacteria with cryomicroneedles against eye infection [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8: e2102327.
- [17] Li JF, Shen JT, Zhuang B, et al. Light-triggered on-site rapid formation of antibacterial hydrogel dressings for accelerated healing of infected wounds [J]. *Biomater Adv*, 2022, 136: 212784.
- [18] Gutierrez AM, Frazar EM, X Klaus MV, et al. Hydrogels and hydrogel nanocomposites: enhancing healthcare through human and environmental treatment [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11: e2101820.
- [19] Liang YP, He JH, Guo BL. Functional hydrogels as wound dressing to enhance wound healing [J]. *ACS Nano*, 2021, 15: 12687-12722.
- [20] Zhang Y, Du L, Jin Y. Application of environmentally sensitive hydrogels in drug delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 5: 1314-1331.
- [21] Huang QT, Zou YJ, Arno MC, et al. Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells [J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 6255-6275.
- [22] Liu J, Qu MY, Wang CR, et al. A dual-cross-linked hydrogel patch for promoting diabetic wound healing [J]. *Small*, 2022, 18: e2106172.
- [23] Liu Y, Guo WT, Wang WM, et al. *In situ* forming hydrogel loaded with predatory bacteria treats drug-resistant corneal infection [J]. *J Control Release*, 2023, 364: 393-405.
- [24] Karunakaran R, Ortgies S, Tamayol A, et al. Additive manufacturing of magnesium alloys [J]. *Bioact Mater*, 2020, 5: 44-54.
- [25] Khorsandi D, Fahimipour A, Abasian P, et al. 3D and 4D printing in dentistry and maxillofacial surgery: printing techniques, materials, and applications [J]. *Acta Biomater*, 2021, 122: 26-49.
- [26] Gu DD, Shi XY, Poprawe R, et al. Material-structure-performance integrated laser-metal additive manufacturing [J]. *Science*, 2021, 372: eabg1487.
- [27] Lee A, Hudson AR, Shiwarski DJ, et al. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart [J]. *Science*, 2019, 365: 482-487.
- [28] Ashammakhi N, Hasan A, Kaarela O, et al. Advancing frontiers in bone bioprinting [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8: e1801048.
- [29] Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, et al. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering [J]. *Biomaterials*, 2020, 226: 119536.

- [30] Murphy SV, De Coppi P, Atala A. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4: 370-380.
- [31] Zhang DQ, Lai LY, Fu HJ, et al. 3D-bioprinted biomimetic multi-layer implants comprising microfragmented adipose extracellular matrix and cells improve wound healing in a murine model of full-thickness skin defects [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15: 29713-29728.
- [32] Zhang T, Sheng SH, Cai WH, et al. 3-D bioprinted human-derived skin organoids accelerate full-thickness skin defects repair [J]. *Bioact Mater*, 2024, 42: 257-269.
- [33] Wang ZH, Wang L, Li T, et al. 3D bioprinting in cardiac tissue engineering [J]. *Theranostics*, 2021, 11: 7948-7969.
- [34] Li Q, Yu H, Zhao F, et al. 3D printing of microenvironment-specific bioinspired and exosome-reinforced hydrogel scaffolds for efficient cartilage and subchondral bone regeneration [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10: e2303650.
- [35] Chen ZY, Shen JT, Wei M, et al. 3D-printed engineered bacteria-laden gelatin/sodium alginate composite hydrogels for biological detection of ionizing radiation [J]. *Bio-Des Manuf*, 2023, 6: 439-450.
- [36] Wen CQ. Diversity of *Bdellovibrio*-and-Like Organisms in Mariculture Environments and Biocontrol of Bacteria by *Bacteriovorax* DA5 (海水养殖环境蛭弧菌类生物多样性及噬菌弧菌DA5对细菌的生物控制) [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2009.
- [37] Waite DW, Chuvochina M, Pelikan C, et al. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70: 5972-6016.
- [38] Tang AL, Shi Y, Dong QQ, et al. Prognostic differences in sepsis caused by Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria: a systematic review and meta-analysis [J]. *Crit Care*, 2023, 27: 467.
- [39] Shin AE, Tesfagiorgis Y, Larsen F, et al. F4/80+Ly6Chigh macrophages lead to cell plasticity and cancer initiation in colitis [J]. *Gastroenterology*, 2023, 164: 593-609.
- [40] Privratsky JR, Ide S, Chen YT, et al. A macrophage-endothelial immunoregulatory axis ameliorates septic acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2023, 103: 514-528.
- [41] Wang XY, Nie Y, Xu Y. Industrially produced pullulanases with thermostability: discovery, engineering, and heterologous expression [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 278: 360-371.
- [42] Kéri M, Forgács A, Papp V, et al. Gelatin content governs hydration induced structural changes in silica-gelatin hybrid aerogels – implications in drug delivery [J]. *Acta Biomater*, 2020, 105: 131-145.