

功能化介孔碳纳米球负载银离子的光热协同抗菌研究

马陇豫, 冯 闪, 张 审, 胜金金, 刘超群*

(河南大学药学院, 河南 开封 475004)

摘要: 耐抗生素菌株的出现严重降低了传统抗生素疗法的效率。开发一种有效消除这种细菌感染的新替代抗生素疗法变得至关重要。光热治疗 (PTT) 具有组织渗透性、时空可控性、不产生耐药性且能广谱抗菌等优点, 但 PTT 的高效杀菌效果通常需要极高温度 (55~65 °C), 此过程不可避免会对正常组织造成损伤。银纳米粒子 (AgNPs) 被用作广谱抗菌剂, 其抗菌活性主要来源于银离子 (Ag⁺) 的释放。然而, 过量的 AgNPs 不仅会对机体产生毒性, 而且还会造成贵金属的浪费。本课题采用氧化后的介孔碳纳米球 (OMCN) 作为光热材料负载 Ag⁺ 制备复合材料 OMCN-Ag⁺。该体系不仅具有高效抗菌活性, 还能减少贵金属 Ag 的浪费及降低毒副作用, 此外, 精确控制的温和光热可克服传统光热抗菌过程中温度过高对正常组织造成的损伤。该抗菌治疗体系在体内和体外都有良好的生物相容性, 且能有效清除小鼠伤口感染部位的细菌, 从而促进小鼠伤口愈合。本研究中的动物实验均按照河南大学动物实验伦理委员会批准的指导方针进行。

关键词: 光热治疗; 纳米药物; 银; 抗菌; 协同治疗

中图分类号: R943 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2022)04-1155-08

A synergistic photothermal antibacterial system based on silver-infused functionalized mesoporous carbon nanospheres

MA Long-yu, FENG Shan, ZHANG Shen, SHENG Jin-jin, LIU Chao-qun*

(College of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: The emergence of antibiotic-resistant strains seriously reduces the efficiency of traditional antibiotic therapy. The development of a new alternative antibiotic method to effectively eliminate this bacterial infection has become a critical issue. Photothermal therapy (PTT) has shown many advantages in tissue penetration, spatiotemporal specificity, no drug resistance and broad-spectrum antimicrobial ability. However, extremely high temperature (55–65 °C) is needed to achieve highly efficient bactericidal effect during PTT treatment process. Thus, this procedure will inevitably cause collateral damage to normal tissues. Silver nanoparticles (AgNPs) are one of the most commonly used broad-spectrum antimicrobial agents. Its antimicrobial activity is mainly derived from the release of silver ions (Ag⁺). However, excessive AgNPs not only would cause toxic to the body, but also waste precious metals. In this study, oxidized mesoporous carbon nanospheres (OMCN) were used as photothermal materials to prepare OMCN-Ag⁺ composites. The composite material can improve the antibacterial activity, reduce the waste of metal Ag and decrease the toxic and side effects. Moreover, the precisely controlled mild heat can overcome the shortcoming such as the damage to normal tissue caused by the excessive temperature during traditional photothermal antimicrobial process. The antimicrobial treatment system exhibits a good biocompatibility both *in vitro* and *in vivo*. Specially, the designed nanosystem can effectively eliminate the

收稿日期: 2021-07-13; 修回日期: 2021-08-13.

基金项目: 河南省青年科学基金项目 (202300410061); 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) 项目 (212102310231); 河南省高等学校重点科研项目 (21A430006).

*通讯作者: Tel / Fax: 86-371-23832100, E-mail: cqliu@henu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1037

bacteria from the infected wound, subsequently promoting the process of wound healing. All animal experiments were carried out with approval of the Animal Experiment Ethics Committee of Henan University.

Key words: photothermal therapy; nanomedicine; silver; antibacterial; combined therapy

在全球范围内, 细菌感染已成为人类健康的巨大威胁。长期以来, 抗生素是治疗细菌感染性疾病最为广泛使用的疗法, 然而抗生素的滥用导致耐药菌的不断增加, 迫切需要开发新的非抗生素策略来快速杀灭细菌^[1,2]。近几年, 光热治疗 (photothermal therapy, PTT) 作为一种治疗细菌感染的非侵入性治疗方法引起了人们的广泛关注^[3]。PTT 是在近红外激光 (near-infrared light, NIR, 700~1 400 nm) 照射下, 利用光热纳米材料将光能转化为热能, 使局部温度升高, 导致细菌细胞膜破坏、蛋白质变性和生物被膜分散^[4]。PTT 具有组织渗透性、时空可控性、广谱抗菌及不产生耐药性等优点^[5,6]。目前已有各种各样的光热纳米材料被开发用于抗菌治疗, 包括石墨烯衍生物、碳基纳米共轭物、以金银为主的贵金属纳米材料、过渡金属二硫化物、纳米复合材料及聚合物等^[7]。其中, 介孔碳纳米球 (mesoporous carbon nanospheres, MCN) 以合成简单、特殊的三维结构、较高的光热转换效率和良好的生物相容性而备受关注^[8,9]。Meng 等^[10]构建了一个 PTT 与基因疗法协同抗癌的平台, 通过将聚乙烯亚胺接枝在具有光热转换性能的 MCN 上, 实现光热抗癌治疗。但是实现 PTT 的高效杀菌效果需要极高温度 (55~65 °C), 不可避免对正常细胞造成损伤。而温和的温度不足以在短时间内完全根除顽固性细菌感染^[11]。因此, 单一 PTT 在治疗细菌性感染中并不如预期的有效。这些问题突出了对联合治疗和低温 PTT 治疗体系的需求。

银纳米粒 (AgNPs) 已成为纺织行业、食品储存、容器和个人护理中最吸引人的商业化纳米材料之一, 表现出广谱抗菌活性, 且不引起细菌耐药性^[12]。然而, 过量的 AgNPs 可能导致人类的腹痛 (如痉挛、胃肠失调), 甚至死亡^[13]。为了避免 AgNPs 过度使用的问题, 研究需专注于高抗菌效率和最低剂量的 Ag⁺, 而不是直接使用 AgNPs。银离子 (Ag⁺) 在无机抗菌剂中占有主导地位, 其抗菌机制: 一种是 Ag⁺ 与细菌蛋白质和酶的相互作用, 导致细菌细胞膜的严重结构变形; 另一种可能是高活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生^[14,15]。因此, 迫切需要开发一种具有高效抗菌活性而减少贵金属 Ag 浪费, 以及良好生物相容性的 Ag⁺ 传递系统。

基于以上研究, 本课题拟采用氧化后的介孔碳纳米球 (oxidized mesoporous carbon nanospheres, OMCN) 作为光热材料负载 Ag⁺ 制备复合材料用于实现高效的

体内外抗菌效果 (OMCN 的使用是为了提高 MCN 分散性), 如图 1 所示。

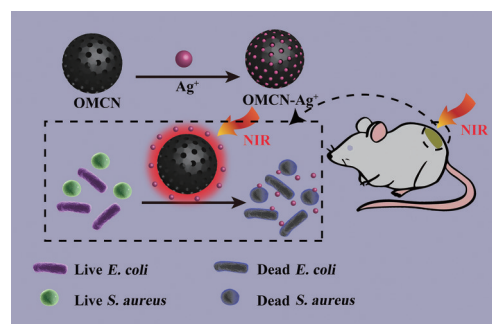


Figure 1 Preparation of oxidized mesoporous carbon nanospheres-Ag⁺ (OMCN-Ag⁺) and its application in photothermal therapy (PTT) for local bacterial infection

材料与方法

药品与试剂 苯酚 (开封市德恩化学试剂有限公司); 甲醛、氢氧化钠 (天津市福晨化学试剂厂); 硫酸、硝酸 (开封化学试剂总厂); 甲醇 (天津市富宇精细化工有限公司); 聚(乙二醇)-block-聚(丙二醇)-block-聚(乙二醇) (Pluronic F-127)、噻唑蓝染料 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 硝酸银 (部关科亚精细化工有限公司); 溴化钾 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 营养琼脂 (北京陆桥技术有限责任公司); 蛋白胨、酵母浸粉 (山东王宝生物科技有限公司); 二乙酸荧光素 (fluorescein diacetate, FDA)、碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (北京索莱宝科技有限公司)。

仪器 Nano-ZS90 型激光粒度及电位分析仪 (英国马尔文仪器有限公司); JEM-2100 型扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、JEM-F200 型透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) (日本 JEOL 公司); Quadrasorb SI-4 型比表面及孔隙度分析仪 (美国康塔仪器公司); DX-2700B 型 X 射线衍射仪 (X-ray diffraction, XRD, 丹东浩元仪器有限公司); UV-2600 型紫外可见分光光度计 (UV-Vis, 日本岛津公司); VERTEX70 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR, 德国布鲁克公司); iCAP-7200 型 ICP 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-MS, 美国热电公司); ECLIPSE Ti2 型倒置荧光显微镜 (日本尼康公司)。

动物 昆明小鼠, SPF 级, 雄性, 6~8 周, 体重 20~

25 g, 购自山东斯科贝斯生物科技股份有限公司。合格证号: 410983211100001483, 生成许可证号: SCXK (豫) 2020-0005。本研究的全部动物实验按照河南大学动物实验伦理委员会的指导方针进行 (HUSOM 2021-304)。

MCN 的制备 取苯酚 0.6 g 和 NaOH 溶液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 15 mL) 混合均匀, 再逐滴加入甲醛溶液 (37 wt%, 2.1 mL), 置于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌 30 min。之后再逐滴加入 Pluronic F-127 ($0.064 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 15 mL, 2 h 后, 加入蒸馏水 50 mL, 充分反应 18~20 h。待反应结束, 量取反应液以一定比例进行稀释, 转移至反应釜中, 温度 $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, 持续 24 h。随后, 冷却至室温并用蒸馏水洗涤 3~5 次, 再进行冷冻干燥。冻干产物冷却至室温, 蒸馏水洗涤 3~5 次, 冷冻干燥。产物在通氮气、 $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下持续碳化 3 h, 即可获得 MCN 粉末^[16]。

OMCN 的制备 将制备的 MCN 溶解在蒸馏水中, 超声处理 2 h, 然后在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下, 加入硫酸和硝酸体积比为 3:1 的混合酸溶液反应 5 h。用蒸馏水多次洗涤除去过量的酸后, 冷冻干燥, 即可获得 OMCN 粉末。

OMCN-Ag⁺ 的制备 精确称取 5 mg OMCN 粉末溶解在 10 mL 去离子水中, 超声分散 30 min 后, 缓慢加入盛有 AgNO_3 (1 mL , $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 溶液的三口烧瓶中。避光保温搅拌数小时, 以避免 Ag^+ 被氧化。待反应完全结束后, 自然冷却至室温, 取出产物。用去离子水和乙醇进行洗涤, 直至无游离的 Ag^+ 。真空干燥, 室温保存, 即可获得 OMCN-Ag⁺ 粉末。

MCN、OMCN 和 OMCN-Ag⁺ 的表征 取 MCN 和 OMCN 溶液各 10 μL 滴于硅片上, 真空干燥过夜, 采用 SEM 观察 MCN 与 OMCN 的形貌; 取 MCN、OMCN 和 OMCN-Ag⁺ 溶液各 10 μL 滴于铜网上, 真空干燥过夜, 用 TEM 观察 MCN 与 OMCN 的形态及 OMCN-Ag⁺ 的元素分布; 取适量的 MCN、OMCN 干燥粉末分别平铺在样品台上, 通过 XRD 测定 MCN 与 OMCN 的晶型; 取适量干燥的 OMCN 粉末, 用比表面及孔隙度分析仪测定 OMCN 的孔径大小、比表面积和孔径分布; 取适量的 MCN 和 OMCN 的溶液, 用 UV-Vis 测定溶液的吸收光谱图; 取适量干燥的 MCN 和 OMCN 粉末, 分别加入溴化钾并研磨 (质量比为 1:100), 压片, 用 FTIR 分析样品的化学键和官能团; 取适量的 MCN、OMCN 和 OMCN-Ag⁺ 溶液, 用激光纳米粒度仪测定其粒径分布和 zeta 电位; 取 OMCN-Ag⁺ (10 mg) 干燥粉末分散在磷酸盐缓冲液中 (PBS, pH 7.4), 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌混合物, 并在不同时间点取出 1 mL 溶液, 用 ICP-MS 测定银离子的释放量; 取适量干燥的 OMCN-Ag⁺ 粉末铺在导电胶上, 用扫描电镜能谱 (energy dispersive spectrometer, EDS) 进行检测分析 OMCN-Ag⁺ 的元素组成。

光热性能检测 制备不同浓度 (40 、 60 、 $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) OMCN 溶液, 分别使用不同功率的激光 (808 nm , 1.0 、 1.5 、 $2.0 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 进行照射, 以 PBS 作为对照, 通过温度的变化来评估 OMCN 的光热转换性能, 辐照过程中使用红外热成像仪记录溶液的温度变化。

细菌培养 所有抗菌实验采用的模型菌为革兰阳性菌金葡萄菌 (*S. aureus*) 和革兰阴性菌大肠杆菌 (*E. coli*)。将这两种菌培养基 (蛋白胨、酵母浸粉、NaCl) 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中培养, 然后将菌悬液稀释至约 $1\times 10^4 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度。

材料抗菌活性 以 *S. aureus* 和 *E. coli* 为研究对象, 将适量的 OMCN、 Ag^+ 及 OMCN-Ag⁺ 分别与这两种菌悬浮液 ($1\times 10^4 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混合, 共分为 8 组: PBS、PBS + NIR、OMCN、OMCN + NIR、 Ag^+ 、 Ag^+ + NIR、OMCN-Ag⁺ 和 OMCN-Ag⁺ + NIR。PBS 作为空白对照组, 光照组首先进行 NIR (808 nm , $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) 照射, 随后置于摇床恒温孵育 6 h ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$); 非光照组不进行 NIR 光照, 与细菌孵育 10 min 后直接置于摇床。孵育结束后, 分别吸取上述细菌悬浮液各 100 μL , 进行平板涂布, 并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h, 计数并记录菌落数量。在细菌活/死染色实验中, 将 FDA ($10 \mu\text{L}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 PI ($5 \mu\text{L}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 分别加入上述菌悬液 (1 mL) 中, 在黑暗条件下孵育 0.5 h, 通过倒置荧光显微镜观察细菌的染色情况。

体外生物相容性实验 采用 MTT 法测定 OMCN 和 OMCN-Ag⁺ 对人体正常肝细胞 HL-7702 的细胞毒性。首先, 将 HL-7702 细胞接种在 96 孔板中 (每孔 1×10^4 个细胞) 并孵育 24 h。随后弃去培养基, 分别加入 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OMCN 和 OMCN-Ag⁺ 的培养基溶液, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进一步孵育 24 h。为了检测细胞活性, 首先去除培养基, 接着用 PBS 洗涤, 然后向每个孔中加入 MTT 溶液 100 μL , 并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 4 h, 随后, 在 96 孔板中加入 100 μL DMSO 溶解细胞。最后, 以 630 nm 为参比波长, 在 490 nm 处测定每孔的吸光度值, 计算细胞存活率。

体内抗菌实验 用生理盐水制备 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 OMCN 和 OMCN-Ag⁺ 两种抗菌溶液。将 40 只雌性小鼠分为 8 组 (PBS、PBS + NIR、OMCN、OMCN + NIR、 Ag^+ 、 Ag^+ + NIR、OMCN-Ag⁺ 和 OMCN-Ag⁺ + NIR), 每组 5 只。麻醉后, 在小鼠背部通过手术形成直径为 5 mm 的创面, 用 *E. coli* 悬液 ($1\times 10^4 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 感染创面。24 h 后, 在相应组的创面处分别滴加 OMCN 和 OMCN-Ag⁺ 溶液, 10 min 后, 光照组采用 NIR ($1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 照射创面 10 min, 非光照组不进行照射。随后, 自制无菌棉创可贴覆盖在伤口上, 每隔 24 h 更换 1 次。每天拍摄 1 次

伤口, 治疗 5 天后, 切除创面组织进行组织病理学检查。此外, 为了检测体内抗菌活性, 手术后 24 h, 每组的细菌样本均用无菌拭子从创面处采集, 放入 5 mL 液体培养基中, 在 37 °C 下摇匀 8 h。采用 100 μ L 细菌悬液的培养液涂布在琼脂培养板, 在 37 °C 孵育 18 h 形成细菌菌落。最后, 剪切小鼠的伤口感染部位, 用 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋切片, 进行苏木精和伊红 (H&E) 染色分析。

生物安全性评价 将上述实验中各组小鼠的主要器官 (心、肝、脾、肺和肾) 用 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋切片, 进行 H&E 染色后, 在光学显微镜下观察组织病理变化^[17]。

统计学分析 所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 至少 3 个样本。各组之间采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

结果与讨论

1 OMCN 与 OMCN-Ag⁺ 的表征

首先, 采用 SEM 观察了 MCN 与 OMCN 的形貌, 如图 1A、B 所示, MCN 和 OMCN 的尺寸在 200~300 nm, 呈现均匀分散的球形, 表明氧化后 MCN 的形貌没有发生明显改变。然后, 采用 TEM 进一步分析 MCN 和 OMCN 的形貌, 如图 1C、D 所示, 其直径大小与 SEM 结果相对应, 且具有明显的介孔结构, 说明氧化过程没有对 MCN 形貌产生影响。然后, 采用动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 法对 MCN 和 OMCN 的粒径进行分析 (图 1E), 结果表明氧化后的 OMCN 粒径大小并未发生较大改变, 而且分散性良好。采用 XRD 对其结构进行分析的结果见图 1F、G, MCN 与 OMCN 在 2θ 值处的峰分别为 21.5° 和 43.2°, 对应 MCN 特征晶型为 002 和 100, 表明氧化后的 OMCN

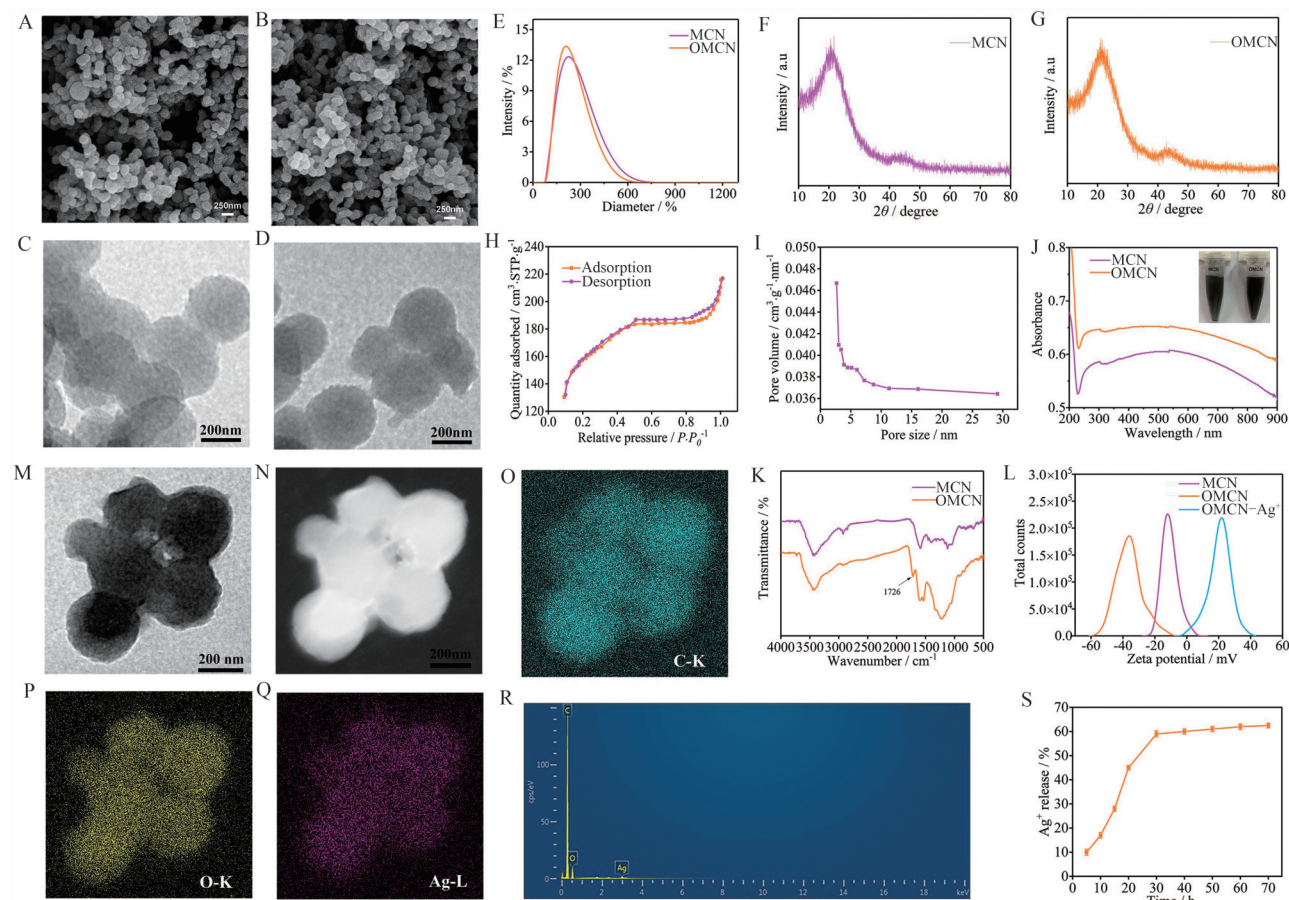


Figure 1 Scanning electron microscope (SEM) images of mesoporous carbon nanospheres (MCN, A) and oxidized mesoporous carbon nanospheres (OMCN, B). Transmission electron microscope (TEM) images of MCN (C) and OMCN (D). E: Size distribution of MCN and OMCN. F, G: X-ray diffraction (XRD) patterns of MCN and OMCN. H: N_2 adsorption-desorption isotherms of OMCN. I: Pore-size distribution curve of OMCN. J: Ultraviolet and visible spectrophotometry (UV-Vis) spectra and corresponding dispersity photo of MCN and OMCN at a concentration of 40 μ g·mL⁻¹. K: Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) spectra of MCN and OMCN. L: Zeta potential of MCN and OMCN. TEM images of OMCN-Ag⁺ (M). Dark-field TEM image of OMCN-Ag⁺ (N), and corresponding TEM elemental mappings of C-K (O), O-K (P), and Ag-L (Q) edge signals. R: Energy dispersive spectrometer (EDS) spectrum of OMCN-Ag⁺. S: Cumulative silver ion release profiles from OMCN-Ag⁺ samples. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

的晶型没有发生改变。利用比表面及孔隙度分析仪测定OMCN比表面及孔体积大小结果见图1H,I,在 P/P_0 0.6~0.9处吸附分支有明显的跳跃,表明OMCN具有介孔结构,通过布鲁诺-埃梅特-特勒法可知OMCN的比表面积为 $490.371 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$,孔径为 3.157 nm ,孔容积为 $0.319 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 。采用UV-Vis测定MCN与OMCN溶液的吸收光谱及对纳米材料的水分散性进行拍摄(图1J),相比MCN,OMCN在 808 nm 处有更强的吸收,为OMCN的光热性能研究打下基础。此外,水分散性结果表明,氧化后的MCN分散性得到提高。根据文献报道^[18],氧化后MCN的FTIR有较明显的羧基峰的出现。本实验对MCN和OMCN进行了FTIR分析,结果见图1K。OMCN在 1723 cm^{-1} 处则出现一条吸收峰,为 $-\text{COOH}$ 的伸缩振动,表明了MCN的氧化成功。图1L是MCN、OMCN及OMCN- Ag^+ 的zeta电位分析,结果显示MCN氧化后的电位明显降低,表明MCN表面大量的羟基基团转化为带负电荷的羧基基团,所以测得的电位为负值,但负载 Ag^+ 后,OMCN- Ag^+ 的电位得到了大幅度提高,这是因为 Ag^+ 中和了OMCN所带的负电荷,表明银离子成功负载在OMCN上。银离子与OMCN的结合机制可归于OMCN表面大量带负电荷

的羧基与带正电荷的银离子的作用。根据ICP-MS结果,复合材料OMCN- Ag^+ 中 Ag^+ 的包封率和载药量分别为1%和 $20.13 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。采用TEM对OMCN- Ag^+ 的形貌及元素映射进行分析(图1M),负载 Ag^+ 的OMCN形貌及大小并没有发生改变,与此同时,TEM元素分布结果表明了OMCN- Ag^+ 中C、O、Ag的存在(图1O~Q),进一步验证该复合材料的成功制备。另外,采用EDS对OMCN- Ag^+ 进行了元素分析(图1R),检测出了C、O、Ag信号,充分说明OMCN- Ag^+ 复合材料的成功制备。

2 Ag^+ 的释放行为研究

为了评估负载到OMCN上 Ag^+ 是否能被充分利用,对 Ag^+ 在水中的释放情况进行了研究,采用ICP-MS分析了 Ag^+ 含量,结果如图1S所示,70 h内 Ag^+ 的释放量约62.5%。OMCN- Ag^+ 的释放机制可能是由于 Ag^+ 本身为亲水性,较易溶解在水相介质中,而OMCN与 Ag^+ 仅通过静电作用结合,两者作用的叠加实现了对 Ag^+ 的缓释^[19,20]。

3 OMCN的光热性能测定

根据UV-Vis测试结果,OMCN在 808 nm 处有良好吸收现象(图1J),因此采用 808 nm 激光($P = 1.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$)对OMCN进行辐照,测试其光热性能。如图2A所示,

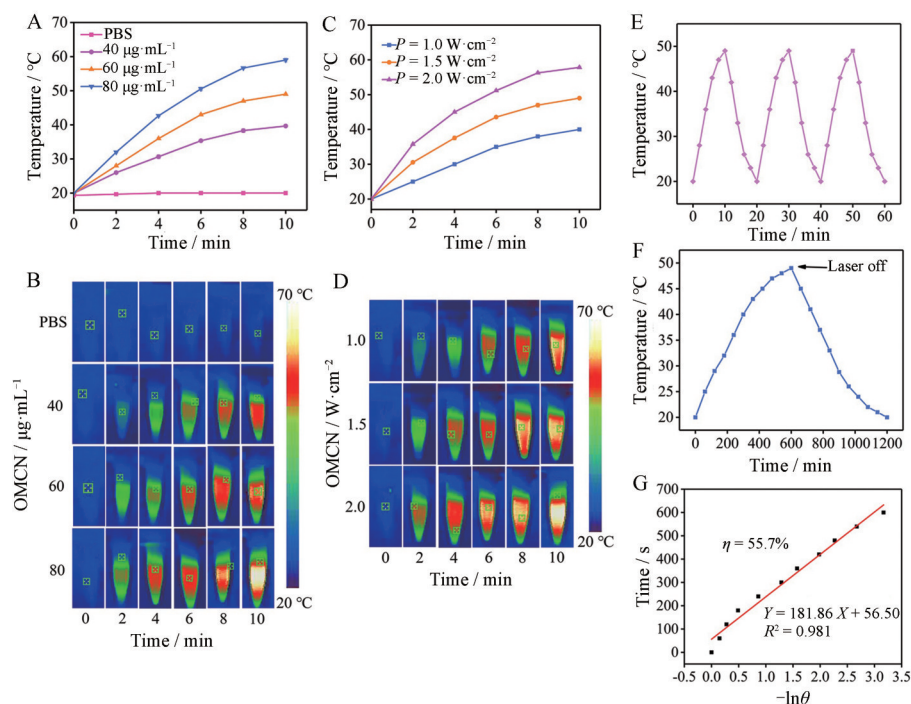


Figure 2 Photothermal effect of OMCN. A: Photothermal curves of OMCN at different concentrations ($40, 60,$ and $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) irradiated with near infrared light (NIR) laser ($808 \text{ nm}, 1.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$); B: Corresponding infrared thermal images; C: Photothermal curves of OMCN ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) irradiated with NIR laser by different power intensities ($808 \text{ nm}, 1.0, 1.5, 2.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$); D: Corresponding infrared thermal images; E: Recycling-heating profiles of OMCN dispersion ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) irradiated for three on/off cycles; F: The photothermal response of the OMCN aqueous solution ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 600 s with an NIR laser ($808 \text{ nm}, 1.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) and then the laser was shut off; G: Linear time data vs $-\ln\theta$ obtained from the cooling period of E. Time constant (τ_c) for heat transfer from OMCN was determined to be 181.86 s by applying the linear time data from the cooling period (after 600 s) vs negative natural logarithm

在 808 nm 激光照射不同浓度的 OMCN 悬浮液, 温度随辐照时间延长和 OMCN 浓度的增加而升高, 而 PBS 组的温度在相同条件下几乎没有变化, 这一结果与热红外成像记录的数据 (图 2B) 相一致, 结果表明 OMCN 良好的光热性能具有浓度依赖性。为了进一步评价 OMCN 的光热效应, 采用不同的激光功率进行测试, 结果如图 2C 所示, 在辐射相同时间内, OMCN ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的温度随激光功率的增加而升温, 图 2D 所示的热红外成像数据也与之相对应, 表明 OMCN 的光热性能具有激光功率依赖性。此外, 还通过光热性能循环实验评估了 OMCN 的光热稳定性^[21], 如图 2E 所示, 经过 3 次激光开/关后, 温度升高幅度没有明显衰减, 说明 OMCN 能承受长时间的激光重复照射, 具有较高的光热稳定性。最后, 通过监测光热转换过程的温度来计算过热转换效率, 如图 2F、G 所示, OMCN 光热转换效率为 55.7%, 这表明 OMCN 具有将 808 nm NIR 快速高效转化为热能的能力。

4 颗粒抗菌检测

利用平板涂布法和细菌生长抑制实验来评估复合材料 OMCN-Ag⁺ 对革兰阳性菌金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 和革兰阴性菌大肠杆菌 (*E. coli*) 体外抗菌性能。如图 3A、B 所示, 只有在 NIR 照射下, OMCN 才对 *S. aureus* 和 *E. coli*

具有抗菌效果, 表现出广谱抗菌作用, 但杀菌率都仅为 50% 左右, 说明在温和的温度条件下难以达到高效的抗菌效果。而在非光照条件下, OMCN 则完全没有抗菌作用, 此外, 无论是否具有光照条件, Ag⁺ 都表现出一定的抗菌效果。OMCN-Ag⁺ 在非光照的条件下杀菌率可达到 47% 以上, 证明 Ag⁺ 的释放具有杀菌作用, 且 OMCN-Ag⁺ 在 NIR 照射下对两种菌的杀菌率都达到了 99%。此外, 细菌生长抑制实验 (图 3C、D) 进一步评价了该体系联合抗菌能力, 结果证明协同杀菌的效果远高于单一抗菌作用。为了进一步解释上述体外抗菌作用, 采用活/死细菌细胞染色法来表征体外光热协同抗菌效果 (图 3E、F), 此结果与平板涂布法结果 (图 3A、B) 相一致, 更加充分验证了该体系具有较强的抗菌作用。

5 体内生物相容性实验

生物相容性是 OMCN-Ag⁺ 在体内应用的先决条件。因此, 在 OMCN-Ag⁺ 用于体内细菌感染治疗之前, 需评估其生物相容性。以不加纳米材料的细胞为空白对照, 测定 OMCN-Ag⁺ 在抗菌浓度下 ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 人体正常肝细胞 HL-7702 的细胞毒性。如图 4 所示, OMCN-Ag⁺ 对 HL-7702 细胞无细胞毒性。

6 体内抗菌活性

在小鼠背部创建 *E. coli* 感染的创面模型, 评估所

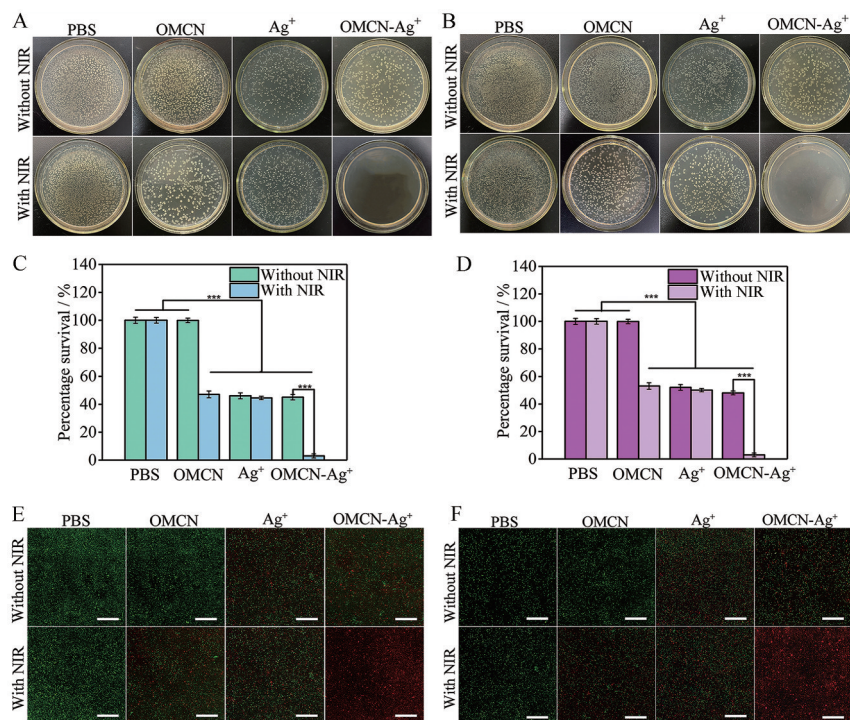


Figure 3 Photographs of bacterial colonies formed by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, A) and *Escherichia coli* (*E. coli*, B) after exposed to PBS, PBS + NIR, OMCN, OMCN + NIR, Ag⁺, Ag⁺ + NIR, OMCN-Ag⁺ and OMCN-Ag⁺ + NIR. Concentration: $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Percentage survival of *S. aureus* (C) and *E. coli* (D) after incubation with PBS, OMCN ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), OMCN-Ag⁺ ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 10 min without or with NIR laser irradiation (808 nm, $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min), determined by measuring the optical density at 600 nm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$. E, F: The fluorescence images of live/dead staining assay of *S. aureus* and *E. coli*. Scale bars are 10 μm

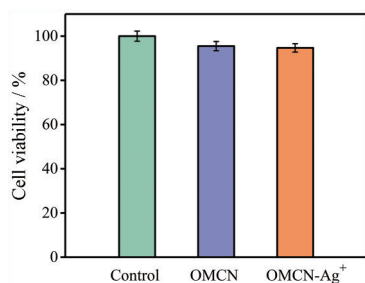


Figure 4 *In vitro* cell viability of HL-7702 cells after treating with OMCN, OMCN-Ag⁺ respectively. $n = 3, \bar{x} \pm s$

设计体系的体内抗菌能力^[22-24]。将40只小鼠分为8组(PBS、PBS+NIR、OMCN、OMCN+NIR、Ag⁺、Ag⁺+NIR、OMCN-Ag⁺和OMCN-Ag⁺+NIR),观察5天内创面愈合情况。结果如图5A所示,在治疗3天后,对照组和未光照处理组出现明显化脓,在第5天时创面依然处于溃烂状态。而OMCN-Ag⁺+NIR组小鼠创面的面积小,并有恢复的趋势,证明协同抗菌具有良好的治疗效果。利用H&E染色评估该抗菌体系对创面皮肤的治愈情况见图5B,在NIR照射下,与对照组相比,OMCN-Ag⁺+NIR组的小鼠皮肤组织并未观察到较多的炎症细胞及破损表皮。这些结果表明,OMCN-Ag⁺+NIR能有效治疗细菌感染的创面部位。采用平板涂布法及计数法评

估创面感染部位细菌的生长情况见图5C、D,在NIR照射下,OMCN-Ag⁺能有效杀灭细菌,从而促进小鼠伤口的愈合。利用红外热像仪记录小鼠创面感染部位在NIR照射后的温度变化见图5E,在NIR照射10 min后,加入OMCN-Ag⁺创面部位的温度明显升高,而PBS+NIR组的温度无明显变化,结果表明OMCN-Ag⁺在体内仍具有优异的光热转换性能。

7 体内生物安全性评价

为了研究OMCN-Ag⁺的体内生物安全性,在创面感染治疗后,采用H&E染色法对小鼠的主要器官(心、肝、脾、肺和肾)进行组织学分析,结果表明这些器官没有明显的组织学异常或损伤(图6),进一步证明了OMCN-Ag⁺具有良好的生物相容性。

结论

本研究成功构建了一个基于OMCN-Ag⁺的新型光热协同抗菌体系。该复合抗菌材料不仅可有效减少银离子的用量,降低其生物毒性作用,而且精确控制的温和光热可克服传统光热抗菌过程中温度过高对正常组织造成的损伤。体外和体内抗菌实验表明,OMCN-Ag⁺具有显著的协同抗菌作用和良好的生物安全性。研究

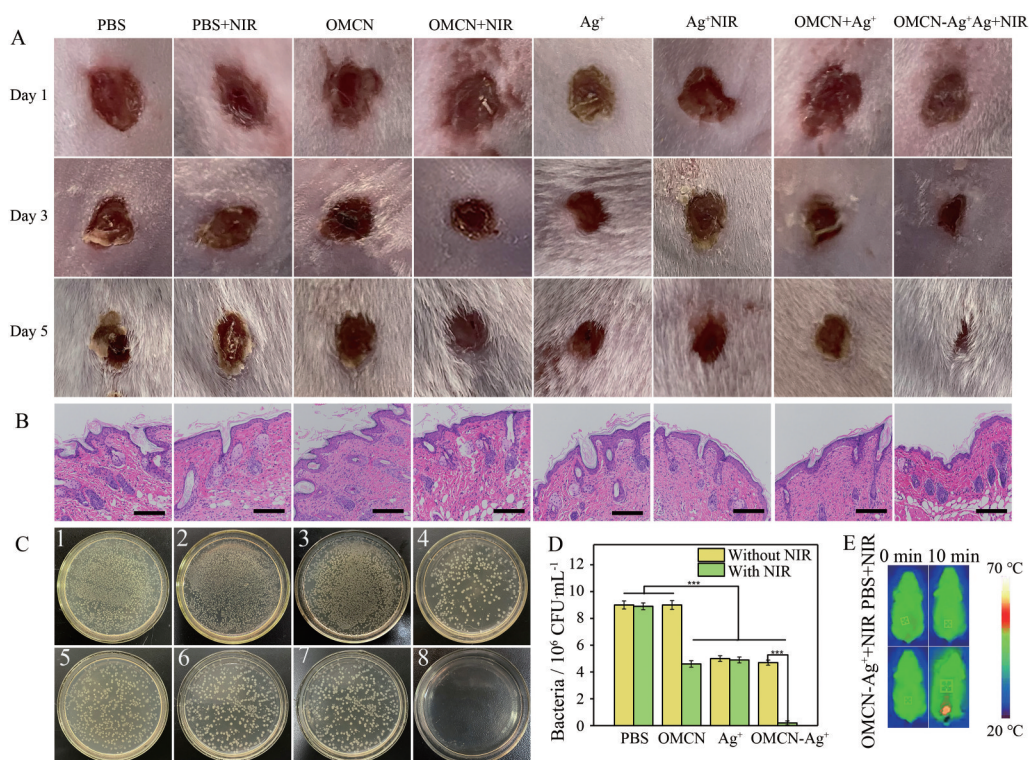


Figure 5 Antibacterial activity *in vivo*. A: Photographs of wound on the mice after different times during the therapeutic process; B: Photomicrographs showing section of skin tissues with H&E staining. Scale bars are 50 μm ; C: The bacteria separated from wound tissue are cultured on agar plates (1. PBS, 2. PBS + NIR, 3. OMCN, 4. OMCN + NIR, 5. Ag⁺, 6. Ag⁺ + NIR, 7. OMCN-Ag⁺, 8. OMCN-Ag⁺ + NIR); D: The counted number of the surviving bacteria in the wound tissue. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$; E: Infrared thermal images of bacterial infected wounds in mice treated with PBS (pH 7.4) and OMCN-Ag⁺ with NIR laser irradiation (808 nm, 1.5 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min)

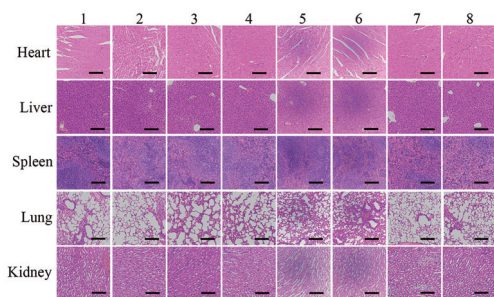


Figure 6 Histological analysis of the organs of mice after 5 days. 1: PBS; 2: PBS + NIR; 3: OMCN; 4: OMCN + NIR; 5: Ag⁺; 6: Ag⁺ + NIR; 7: OMCN-Ag⁺; 8: OMCN-Ag⁺ + NIR. Scale bars are 50 μm

结果表明, 通过将Ag⁺的释放与PTT结合, 能获得高效的抗菌活性, 为抗菌剂的开发提供了新的研究思路。

作者贡献: 马陇豫和刘超群提出研究思路及设计研究方案; 马陇豫、冯闪、张审和胜金金负责进行实验; 马陇豫、冯闪和张审采集和分析数据; 马陇豫和胜金金负责论文起草; 刘超群负责最终版本修订。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Yang X, Yang J, Wang L, et al. Pharmaceutical intermediate-modified gold nanoparticles: against multidrug-resistant bacteria and wound-healing application *via* an electrospun scaffold [J]. *ACS Nano*, 2017, 11: 5737-5745.
- [2] Sharma VK, Johnson N, Cizmas L, et al. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes [J]. *Chemosphere*, 2016, 150: 702-714.
- [3] Liu Y, Guo Z, Li F, et al. Multifunctional magnetic copper ferrite nanoparticles as fenton-like reaction and near-infrared photothermal agents for synergistic antibacterial therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 31649-31660.
- [4] Fan X, Yang F, Huang J, et al. Metal-organic-framework-derived 2D carbon nanosheets for localized multiple bacterial eradication and augmented anti-infective therapy [J]. *Nano Lett*, 2019, 19: 5885-5896.
- [5] Wang M, Zhao Y, Chang M, et al. Azo initiator loaded black mesoporous titania with multiple optical energy conversion for synergistic photo-thermal-dynamic therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 47730-47738.
- [6] Su LN, Zhang JX, Deng YH, et al. Black phosphorus loaded with zinc ions for enhanced photothermal therapy of prostate cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1666-1671.
- [7] Xu JW, Yao K, Xu ZK. Nanomaterials with a photothermal effect for antibacterial activities: an overview [J]. *Nanoscale*, 2019, 11: 8680-8691.
- [8] Peng L, Hung CT, Wang S, et al. Versatile nanoemulsion assembly approach to synthesize functional mesoporous carbon nanospheres with tunable pore sizes and architectures [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 7073-7080.
- [9] Qiu H, Pu F, Liu Z, et al. Depriving bacterial adhesion-related molecule to inhibit biofilm formation using CeO₂-decorated metal-organic frameworks [J]. *Small*, 2019, 15: 1902522.
- [10] Meng Y, Wang S, Li C, et al. Photothermal combined gene therapy achieved by polyethyleneimine-grafted oxidized mesoporous carbon nanospheres [J]. *Biomaterials*, 2016, 100: 134-142.
- [11] Yang GG, Zhou DJ, Pan ZY, et al. Multifunctional low-temperature photothermal nanodrug with *in vivo* clearance, ROS-scavenging and anti-inflammatory abilities [J]. *Biomaterials*, 2019, 216: 119280.
- [12] Kim T, Zhang Q, Li J, et al. A gold/silver hybrid nanoparticle for treatment and photoacoustic imaging of bacterial infection [J]. *ACS Nano*, 2018, 12: 5615-5625.
- [13] Wu S, Li A, Zhao X, et al. Silica-coated gold-silver nanocages as photothermal antibacterial agents for combined anti-infective therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 17177-17183.
- [14] Cao F, Ju E, Zhang Y, et al. An efficient and benign antimicrobial depot based on silver-infused MoS₂ [J]. *ACS Nano*, 2017, 11: 4651-4659.
- [15] Li W, Dong K, Wang H, et al. Remote and reversible control of *in vivo* bacteria clustering by NIR-driven multivalent upconverting nanosystems [J]. *Biomaterials*, 2019, 217: 119310.
- [16] Sang Y, Huang Y, Li W, et al. Bioinspired design of Fe³⁺-doped mesoporous carbon nanospheres for enhanced nanozyme activity [J]. *Chem Eur J*, 2018, 24: 7259-7263.
- [17] Wang C, Xiao Y, Zhu W, et al. Photosensitizer-modified MnO₂ nanoparticles to enhance photodynamic treatment of abscesses and boost immune protection for treated mice [J]. *Small*, 2020, 16: 2000589.
- [18] Fang Y, Gu D, Zou Y, et al. A low-concentration hydrothermal synthesis of biocompatible ordered mesoporous carbon nanospheres with tunable and uniform size [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 7987-7991.
- [19] Richter AP, Brown JS, Bharti B, et al. An environmentally benign antimicrobial nanoparticle based on a silver-infused lignin core [J]. *Nat Nanotechnol*, 2015, 10: 817-823.
- [20] Zhang Y, Sun P, Zhang L, et al. Silver-infused porphyrinic metal-organic framework: surface-adaptive, on-demand nanopatform for synergistic bacteria killing and wound disinfection [J]. *Adv Funct Mater*, 2019, 29: 1808594.
- [21] Hu D, Zou L, Li B, et al. Photothermal killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by bacteria-targeted polydopamine nanoparticles with nano-localized hyperpyrexia [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5: 5169-5179.
- [22] Yin W, Yu J, Lv F, et al. Functionalized nano-MoS₂ with peroxidase catalytic and near-infrared photothermal activities for safe and synergistic wound antibacterial applications [J]. *ACS Nano*, 2016, 10: 11000-11011.
- [23] Qiao Y, He J, Chen W, et al. Light-activatable synergistic therapy of drug-resistant bacteria-infected cutaneous chronic wounds and nonhealing keratitis by cupriferous hollow nanoshells [J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 3299-3315.
- [24] Dai X, Zhao Y, Yu Y, et al. Single continuous near-infrared laser-triggered photodynamic and photothermal ablation of antibiotic-resistant bacteria using effective targeted copper sulfide nanostructures [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 30470-30479.