

基于介孔纳米碳球接枝聚胍类化合物协同光热抗菌策略的研究

张审^a 冯闪^a 马陇豫^a 杨莹莹^a

刘超群^a 宋宁宁^{*a} 杨彦伟^{*b}

(^a 河南大学药学院 纳米材料工程研究中心 开封 475004)

(^b 河南大学第一附属医院 开封 475100)

摘要 细菌感染是严重威胁着人们生命健康的主要问题之一。与传统抗生素疗法相比,新型抗菌策略光热疗法(PTT)展现出可控、微创及不易使细菌产生耐药性的优良性能。然而单模形式下 PTT 疗法并不理想,且高温下通常伴随着炎症反应等副作用,联合抗菌策略可有效解决这一问题。本研究制备了富含羧基的氧化介孔纳米碳球(OMCN),通过酰胺化反应,共价接枝聚六亚甲基双胍(PHMB),得到 OMCN-PHMB 纳米平台。实验结果表明,OMCN 的光热性能具有良好的浓度与近红外光照功率依赖性。在 808 nm 激光照射下,OMCN-PHMB 的体内外联合光热治疗效果显著优于单一模式下的其它治疗组,且组织学分析结果表明,该纳米平台对小鼠的主要器官没有产生明显的毒性,具有较高的生物相容性。

关键词 细菌感染;光热疗法(PTT);聚六亚甲基双胍(PHMB);联合治疗;抗菌

Research of Synergistic Photothermal Antibacterial Strategy Based on Polymeric Guanidine Derivative Grafted on Mesoporous Carbon Nanospheres

Zhang, Shen^a Feng, Shan^a Ma, Longyu^a Yang, Yingying^a

Liu, Chaoqun^a Song, Ningning^{*a} Yang, Yanwei^{*b}

(^a Engineering Research Center for Nanomaterials, School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004)

(^b The First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475100)

Abstract Bacterial infection is one of the major problems that seriously threaten people's life and health. In recent years, photothermal therapy (PTT), which uses photothermal conversion nanomaterials to convert optical energy into thermal energy for sterilization under specific wavelength laser irradiation, has aroused wide interest of researchers. Compared with traditional antibiotic therapy, the new anti-bacterial strategy photothermal therapy shows the excellent performance of controllable, minimally invasive and less bacterial resistance. However, monomodal PTT therapy is not ideal because it is often associated with side effects such as inflammatory reaction. Therefore, it is necessary to develop novel photothermal antibacterial system with high biocompatibility and safety to fight bacterial infection. Combined antibacterial strategy can effectively solve this problem. In this work, mesoporous carbon nanospheres (MCN) were prepared and oxidized by the mixed acid to obtain carboxyl-rich oxidized mesoporous carbon nanospheres (OMCN) with high biocompatibility and photothermal properties. Then, OMCN-PHMB nano-antibacterial platform was obtained by grafting the antimicrobial agent poly(hexamethylene biguanide)hydrochloride (PHMB) onto the surface of OMCN with amide covalently. The photothermal properties of the system were evaluated and the results showed that the photothermal performance of OMCN had a good dependence on the concentration and power density of near-infrared light. Similar to the OMCN, the obtained OMCN-PHMB exhibited excellent performance of photothermal controllability and photothermal stability. *In vivo* and *in vitro* antibacterial experiments showed that the therapeutic effect of OMCN-PHMB under 808 nm laser irradiation was significantly better than that of other treatment groups under the single mode, which confirmed the excellent antibacterial effect of OMCN-PHMB combined with photothermal therapy. In addition, histological analysis showed that the nanoplateform had no significant toxicity to the major organs of mice, indicating OMCN-PHMB had a high biocompatibility. To sum up, the photothermal synergistic nano-antibacterial platform constructed in this study is expected to serve as a safe and controllable biomedical platform to combat various diseases caused by bacterial infection, providing a new antibacterial strategy for clinical treatment of bacterial infection diseases.

Keywords bacterial infection; photothermal therapy (PTT); poly(hexamethylene biguanide)hydrochloride (PHMB); combination therapy; antibacterial

* E-mail: songning@henu.edu.cn; pyywei@163.com

Received December 6, 2021; published January 21, 2022.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the Natural Youth Science Foundation of China (No. 52105180), the Key Technologies R&D Program of Henan Province (No. 212102210125), the Academic Key Research Project of Henan Province (Nos. 21A150013, 22A350014) and the Fellowship of China of Postdoctoral Science Foundation (No. 2021M690895).

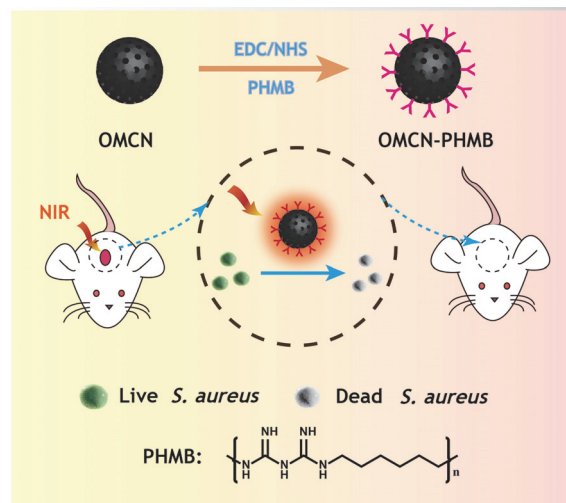
项目受国家自然科学基金青年项目(No. 52105180)、河南省重点研发与推广项目(科技攻关)(No. 212102210125)、河南省高等学校重点科研项目(Nos. 21A150013, 22A350014)及中国博士后科学基金面上项目(No. 2021M690895)资助。

1 引言

细菌感染引起的疾病对人们的生命健康造成了严重的危害^[1-5],目前临床主要的治疗手段为抗生素疗法,然而近些年随着抗生素的大量使用与滥用,致使多种耐药型细菌出现,显著提高了细菌感染的病发率与致死率^[6-10].目前,科研人员致力于研发新型抗菌策略来解决细菌耐药性问题,如纳米银,尽管它展现出优良的广谱抗菌性,然而,其释放的银离子会产生细胞毒性^[11],甚至可能会导致患者死亡.因此,开发具有优良抗菌性能和生物安全性的新型抗菌疗法迫在眉睫.

近些年随着纳米技术的高速度发展,涌现了多种高效杀菌的抗菌体系^[12-15].其中新兴的光热疗法(PTT)因具有时空可控性、较高的组织穿透性和微创性等优良性能^[16],在抗菌领域得到了广泛研究^[17-19].PTT抗菌即光热转换材料在特定波长激光照射下,将光能转换成热能,利用物理热破坏细菌细胞膜和相关蛋白从而杀死细菌的新型疗法^[20].与传统抗生素疗法相比,PTT具有广谱抗菌性,且不易使细菌产生耐药性^[21-22].然而单模形式下的PTT依赖长时间的高热环境和高功率的激光照射才能达到理想杀菌效果,这通常会造成正常组织细胞产生热损伤和炎症反应^[23-24],限制了其在临床中的广泛使用.而通过开发协同抗菌体系,联合多种抗菌机制,有望解决这一问题^[25-26].聚合物胍类化合物,可通过与细菌膜相互作用,导致细菌内容物泄露,从而达到杀菌的效果^[27],其化学稳定性好,且可长时间保持抗菌性能,是一种生物毒性较小的广谱抗菌剂^[28].其中聚六亚甲基双胍盐(PHMB)已被广泛应用于表面抗菌涂层,Zhi等^[29]构建了一种以PHMB为基础的嵌段共聚物涂层用于预防生物材料相关的细菌感染,Li等^[30]开发出了一种纳米粒PAA-co-PFDA/PHMB,具有防污、抗菌和pH响应释放等多种功能,在生物医学领域具有广阔的应用前景,故胍类PHMB可作为一种理想的光热抗菌联合剂,来增强PTT的抗菌效果.

基于以上结果,本研究采用氧化后的介孔碳纳米球(OMCN)为载体,通过酰胺共价结合接枝PHMB,构建了一种协同光热抗菌的纳米平台(OMCN-PHMB),用于小鼠细菌感染创面的治疗(Scheme 1).选用介孔碳纳米球(MCN)是由于其作为一种非金属的光热转换纳米材料,具有优越的光热转换性能和较高的生物安全性^[31-32].实验结果表明,该体系通过联合双重杀菌机制,在温和条件下即可达到高效杀菌效果,有效解决了单一模式下PTT疗效不足的问题.此外,噻唑蓝(MTT)和苏木精和伊红染色法(H&E)染色结果表明该复合材料具有良好的生物相容性.该协同光热抗菌平台为临床治疗细菌感染疾病提供了一种新的抗菌思路.



图式 1 OMCN-PHMB 制备工艺示意图及其在协同光热抗菌治疗中的应用

Scheme 1 Schematic illustration of preparation process of OMCN-PHMB and its application in synergistic photothermal antibacterial therapy

2 结果与讨论

2.1 MCN、OMCN 和 OMCN-PHMB 的表征

首先,采用扫描电子显微镜(SEM)对 MCN 和 OMCN 的形貌进行了观察,如图 1a 和 1b 所示,MCN 为大小分布均匀的介孔球状体,粒径约在 180~250 nm 之间,且氧化处理得到 OMCN 形貌未发生明显改变.随后,采用 X 射线衍射图谱(XRD)对它们的结构进行了分析,如图 1c 和 1d 所示,在 2θ 处出现典型的(002)和(100)特征峰,分别为 21.5° 和 43.2° ,与文献报道一致^[33],表明了 MCN 的成功合成,且经氧化处理后晶型没有发生改变.为了证实 PHMB 的成功结合,进行了 FT-IR 光谱分析,如图 1e 所示,与 MCN 相比,OMCN 在 1723 cm^{-1} 处则出现一条新的吸收峰,为 COOH 的伸缩振动,表明了 MCN 的氧化成功.在 OMCN-PHMB 红外光谱中,2934 和 2855 cm^{-1} 处吸收峰变强,这归因于亚甲基的大量引入,3295 和 3182 cm^{-1} 处为 N—H 的伸缩振动峰,1610 和 1346 cm^{-1} 分别为 N—H 弯曲振动和 C—N 的伸缩振动峰^[34],以上结果表明 PHMB 被成功接枝到 OMCN 的表面.随后,采用马尔文激光粒度对 MCN 和 OMCN 的粒径进行了测试,如图 1f 所示,大小分别为 192 和 204 nm,与 SEM 结果相符.最后,对 MCN、OMCN 以及 OMCN-PHMB 的 Zeta 电位进行了测定,如图 1g 所示,相比于 MCN (-15 mV),OMCN 的 Zeta 电位值降为 -27 mV ,这是由于经混酸处理后,OMCN 的表面增加了大量的羧基;而在接枝 PHMB 后,其 Zeta 电位值变为了 $+37\text{ mV}$,这源于正电性 PHMB 的成功负载,

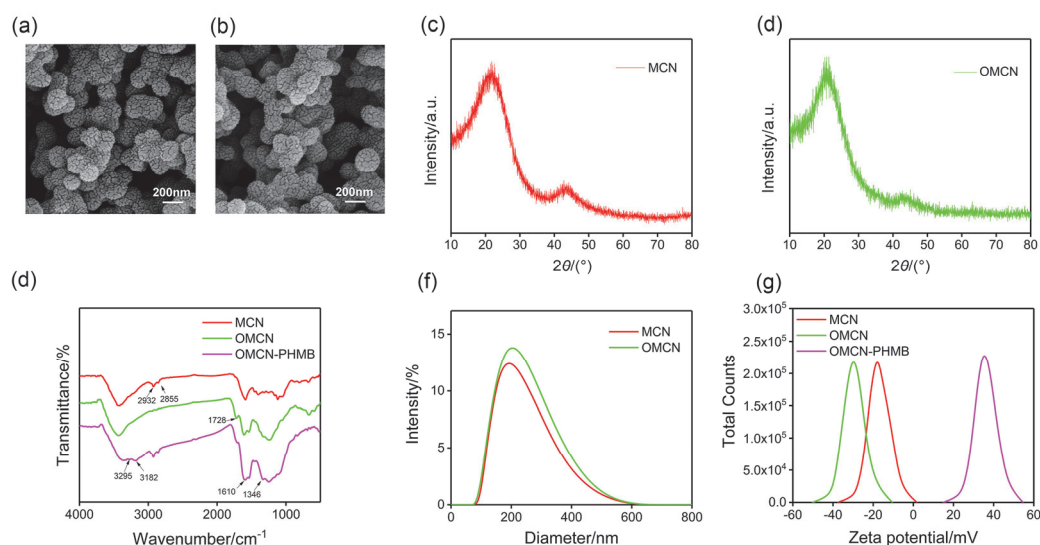


图1 (a) MCN 和(b) OMCN 的 SEM 图像、(c) MCN 和(d) OMCN 的 XRD 图谱、(e) MCN、OMCN 和 OMCN-PHMB 的 FTIR 图谱、(f) MCN 和 OMCN 的粒径大小分布图以及(g) MCN、OMCN 和 OMCN-PHMB 的 Zeta 电位分布图

Figure 1 SEM images of (a) MCN and (b) OMCN, XRD patterns of (c) MCN and (d) OMCN, (e) FTIR spectra of MCN, OMCN and OMCN-PHMB, (f) size distribution of MCN and OMCN, and (g) Zeta potential of MCN, OMCN and OMCN-PHMB

以上结果进一步证实了 OMCN 的成功氧化和 OMCN-PHMB 的成功制备. 此外, 通过热重分析测试确定了 PHMB 在 OMCN 表面的结合量为 $w=5.2\%$ (图 S1).

2.2 光热性能分析

紫外-可见-近红外吸收光谱表明, OMCN 在 808 nm 处具有良好的吸收, 且同浓度下强于 MCN(图 2a), 这是由于氧化后的 MCN 的水分散性得到了提高, 如图 2a 中插图所示, OMCN 在水中分散均匀, 无不溶性颗粒沉积, 而 MCN 则出现了颗粒团聚现象. 随后, 采用近红外 808 nm 激光照射研究了 OMCN 的光热性能, 如图 2b 和 2d 所示, 溶液温度的改变具有良好的浓度与近红外光照功率依赖性, 突出了 OMCN 优良的可控光热性能, 图 2c 和 2e 分别为相对应的热红外像图. 光热性能测试结果表明, 当 $P=1.5 \text{ W/cm}^2$, 浓度为 $55 \mu\text{g/mL}$, 激光照射 10 min 后, 温度即可达 55°C , 达到杀菌的条件. 在经过五次循环照射后, OMCN 的光热性能未发生明显改变(图 2f), 表明纳米颗粒具有良好的光稳性. 此外, 进一步评估了 OMCN-PHMB 的光热性能, 结果表明, 共价接枝 PHMB 对 OMCN 的光热性能和光热稳定性不会产生明显影响.

2.3 体外抗菌测试分析

首先, 利用平板涂布法初步评估了 OMCN-PHMB 的光热协同抗菌效果, 以金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC29213)为例, 图 3a 为不同组的抗菌平板图, 结果显示, OMCN 在无近红外光(NIR)的照射处理下, 与空白磷酸缓冲液(PBS)组菌落生长结果一致, 而经近红外光照射处理 10 min 后, 菌落数量明显降低, 但不足以彻底杀菌, PHMB 与 PHMB+NIR 组均有大量菌落出现, 而

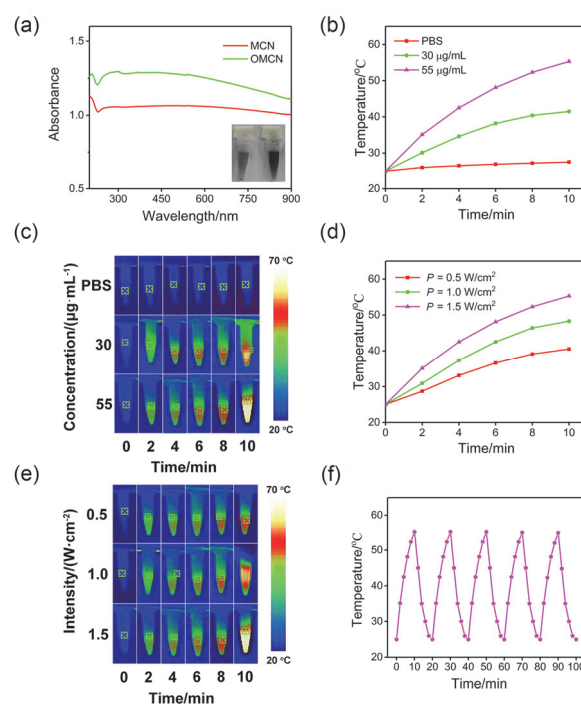


图2 (a) MCN 和 OMCN 的紫外-可见-近红外吸收光谱(插图为对应的水分散性图片)、(b)不同浓度 OMCN 在 808 nm 激光(1.5 W/cm^2)照射下温度的变化和(c)相应的热红外图、(d) OMCN ($55 \mu\text{g/mL}$)在不同功率强度 808 nm 激光照射下温度的变化和(e)相应的热红外图以及(f) OMCN ($55 \mu\text{g/mL}$)经过五次循环激光照射(1.5 W/cm^2)的光热稳定性

Figure 2 (a) UV-Vis-NIR spectrum of MCN and OMCN (Inset: photographs of MCN and OMCN dispersed in deionized water), (b) temperature changes of OMCN at different concentrations illustrated with an 808 nm laser (1.5 W/cm^2) and (c) corresponding infrared thermal images, (d) temperature changes of OMCN ($55 \mu\text{g/mL}$) after irradiated by an 808 nm laser with different power intensities and (e) corresponding infrared thermal images, and (f) recycling-heating profiles of OMCN dispersion ($55 \mu\text{g/mL}$) irradiated for five on/off cycles (1.5 W/cm^2)

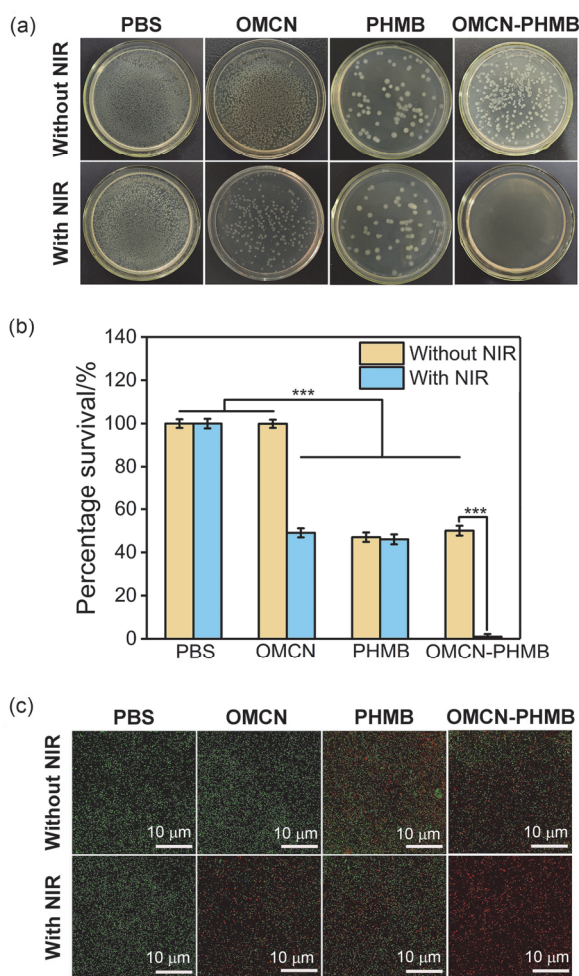


图3 (a) PBS (pH 7.4)、OMCN (55 μg/mL)、PHMB (2.86 μg/mL)和 OMCN-PHMB (55 μg/mL)在有近红外激光(808 nm, 1.5 W/cm², 10 min)照射处理后的金黄色葡萄球菌在 LB 琼脂平板上的菌落照片、(b) 有无激光照射下(808 nm, 1.5 W/cm², 10 min)的金黄色葡萄球菌存活率[通过测量 600 nm 处的光密度值确定; 误差条表示标准差($n=3$), 星号表示有统计学意义的差异($\bar{x} \pm s$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)]以及(c) PBS (pH 7.4)、OMCN (55 μg/mL)、PHMB (2.86 μg/mL)和 OMCN-PHMB (55 μg/mL)在有近红外(808 nm, 1.5 W/cm², 10 min)照射下处理金黄色葡萄球菌的活/死荧光染色结果

Figure 3 (a) Photographs of *S. aureus* colonies on an LB agar plate after treated with PBS (pH 7.4), OMCN (55 μg/mL), PHMB (2.86 μg/mL) and OMCN-PHMB (55 μg/mL) with or without NIR irradiation (808 nm, 1.5 W/cm², 10 min), (b) *S. aureus* survival ratio for the different groups with or without laser irradiation (808 nm, 1.5 W/cm², 10 min) [determined by measuring the optical density at 600 nm; Error bars represent the standard deviation ($n=3$). Asterisks indicate statistically significant differences ($\bar{x} \pm s$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$)], and (c) LIVE/DEAD fluorescent staining results of *S. aureus* after treated with PBS (pH 7.4), OMCN (55 μg/mL), PHMB (2.86 μg/mL) and OMCN-PHMB (55 μg/mL) with or without NIR irradiation (808 nm, 1.5 W/cm², 10 min)

OMCN-PHMB 组在光照处理下几乎无菌落出现, 说明了 OMCN-PHMB 具有良好的协同光热杀菌效果。随后, 采用细菌生长抑制实验进一步评价了该体系的联合抗菌能力, 通过测定各组细菌在 600 nm 处的光密度值进

而评估细菌的存活率, 如图 3b 所示, 光照条件下 OMCN 与 PHMB 组的细菌存活率分别为 53.0%与 49.0%, 显著高于 OMCN-PHMB 组, 结果表明 OMCN-PHMB 的联合抗菌效果显著优于单一抗菌的模式。最后, 采用二乙酸荧光素(FDA)和碘化丙啶(PI)染液对细菌进行了活/死染色实验, 其中活细菌被 FDA 染为绿色, 死细菌被 PI 染为红色, 如图 3c 所示, 近红外激光照射下, OMCN-PHMB 组红色荧光明显强于 OMCN 与 PHMB 治疗组, 与上述结果相一致。此外, 进一步评估了该体系对大肠杆菌(*E. coli*, CMCC44102)的杀菌效果, 结果显示, 在近红外激光照射下, OMCN-PHMB 对 *E. coli* 同样展现出较强的联合杀菌效果, 其中 OMCN-PHMB+NIR 组的细菌存活率为 2.5%, 略高于 *S. aureus*, 这归因于革兰氏阴性菌 *E. coli* 具有更为复杂的外膜结构^[35]。PHMB 的抗菌机制主要是与细菌膜表面的磷脂结合, 破坏细菌膜的完整性, 最终导致细菌死亡^[36]。细菌膜的破坏会导致 DNA 和 RNA 的泄露, 由于 DNA 和 RNA 在 260 nm 处具有特征吸收, 通过测定 OD₂₆₀ 可评估细菌膜的完整性^[35,37], OMCN-PHMB+NIR 组的 OD₂₆₀ 值最高, 说明了该组细菌膜的破坏程度最强, 与上述抗菌结果相一致。

2.4 体外生物相容性实验

高生物相容性和低细胞毒性是 OMCN-PHMB 纳米平台生物应用的必要条件, 故在评价体内抗菌性能之前, 本工作研究了 OMCN-PHMB 的细胞相容性, 采用人正常肝细胞 HL-7702 进行了 MTT 细胞实验, 评价了细胞与不同浓度的 OMCN 和 OMCN-PHMB 孵育 24 h 后的细胞活力, 如图 4 所示, 共价接枝 PHMB 后会对 OMCN 的细胞相容性产生微弱的影响, 但即使 OMCN-PHMB 的浓度达到 100 μg/mL 时, 细胞的存活率仍高达

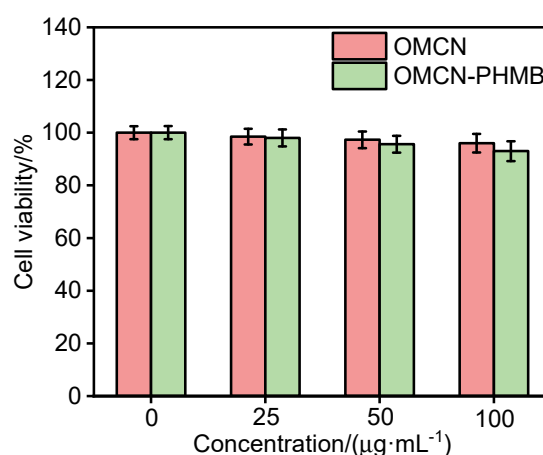


图4 HL-7702 细胞分别与不同浓度 OMCN 和 OMCN-PHMB 孵育后的细胞活力[误差条表示标准差($n=3$)]

Figure 4 Cell viability of HL-7702 cells after incubation with different concentration of OMCN and OMCN-PHMB, respectively [Error bars represent the standard deviation ($n=3$)]

93.0%, 说明该体系在使用剂量范围内对人体正常细胞不会产生明显毒性(细胞存活率大于 90%)^[28,38], 具有良好的体外生物相容性。

2.5 体内抗菌实验与组织学分析

通过构建小鼠创面金黄色葡萄球菌感染模型评估了 OMCN-PHMB 的体内抗菌治疗效果。如图 5a, 小鼠在感染 24 h 后于伤口表面分别注射 PBS、OMCN、PHMB 和 OMCN-PHMB 溶液进行治疗, 不同处理组的小鼠伤口创面大小如图 5b 所示, OMCN-PHMB+NIR 治疗组的小鼠在光照 5 d 后, 伤口基本完全愈合, 无明显脓肿炎症状况, 其它治疗组均可明显观察到皮肤炎症和溃疡现象。随后, 采用平板涂布法评估了各组小鼠伤口部位的细菌感染情况, 相比于其它治疗组, 可观察到 OMCN-

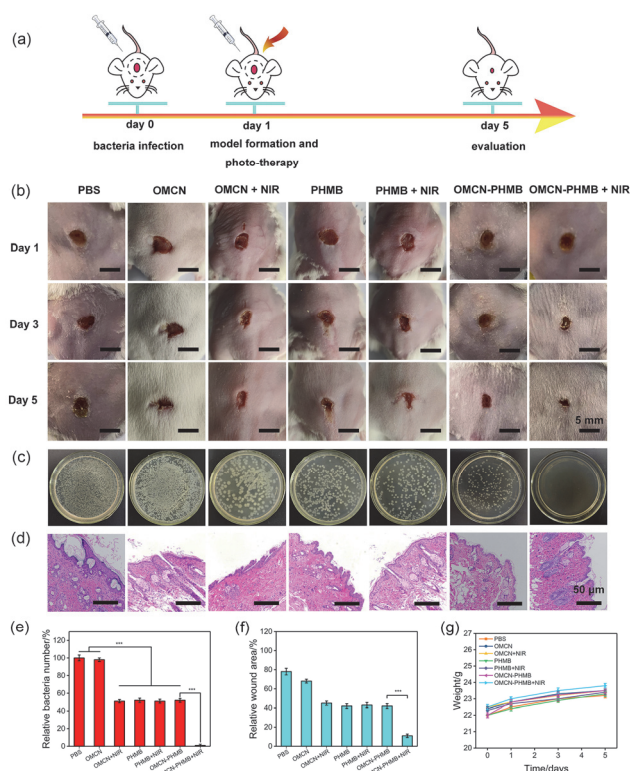


图 5 (a)小鼠感染创面的形成及后续处理的示意图、(b)不同组治疗 1、3、5 d 后的伤口感染照片、(c)第 5 d 从小鼠创面分离细菌(置于 LB 琼脂平板培养)、(d)分别于第 5 d 对各组创面组织切片进行 H&E 染色、(e)不同治疗组组织处菌落的定量分析、(f)第 5 d 不同治疗组创口相对面积的定量分析以及(g)不同组治疗 1、3、5 d 后的小鼠体重变化情况[误差条表示标准差($n=3$), 星号表示有统计学意义的差异($\bar{x} \pm s$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)]

Figure 5 (a) Schematic diagram of infected wound formation in mice and the following treatments, (b) photographs of infected wounds after different treatments for 1, 3 and 5 d, (c) bacteria isolated from the mice wounds on day 5 and cultured on LB agar plates, (d) H&E-stained tissue slices from the wound areas of different groups on day 5, (e) quantitative analysis of bacterial colonies from tissues of different treatment groups, (f) quantitative analysis of relative wound area of different treatment groups on day 5, and (g) body weight variation among infected mice after different treatments for 1, 3 and 5 d [Error bars represent the standard deviation ($n=3$). Asterisks indicate statistically significant differences ($\bar{x} \pm s$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)]

PHMB+NIR 组平板上无菌落出现(图 5c), 对细菌菌落进行定量分析, 如图 5e, 说明了 OMCN-PHMB 在体内展现出优良的协同光热抗菌效果。由于炎症反应与组织损伤、修复和再生密切相关, 采用 H&E 染色对小鼠的创面部位进行了组织学分析, 进一步评价了创面的炎症反应和组织修复情况, 如图 5d 所示, PBS 对照组创面组织出现大量炎性细胞和肉芽组织紊乱; 与 PBS 组相比, OMCN-PHMB 组炎症细胞数量减少, 但上皮和结缔组织仍然有缺损出现; OMCN-PHMB+NIR 组则表现出层次化的上皮结构和有序的肉芽组织, 表明小鼠的伤口创面部位正逐渐生长愈合。对各组小鼠第 5 d 的伤口面积进行定量分析, 如图 5f 所示, OMCN-PHMB+NIR 组小鼠的相对伤口面积降低至 11.2%, 明显低于 OMCN+NIR 和 PHMB+NIR 治疗组。以上结果表明, 在近红外光照射下, OMCN-PHMB 纳米平台具有良好的协同抗菌效果。此外, 各组小鼠在治疗过程中体重均无明显变化(图 5g), 说明该体系对小鼠不会产生明显的机体毒性。

2.6 体内生物安全性评价

在小鼠创面感染治疗 5 d 后, 采用 H&E 染色法对小鼠的主要器官进行了组织学分析, 来评价该抗菌体系在体内的生物安全性, 如图 6 所示, 各组小鼠的心、肝、脾、肺、肾均未见明显的组织学改变或严重损伤, 说明了该体系在体内具有良好的生物安全性。

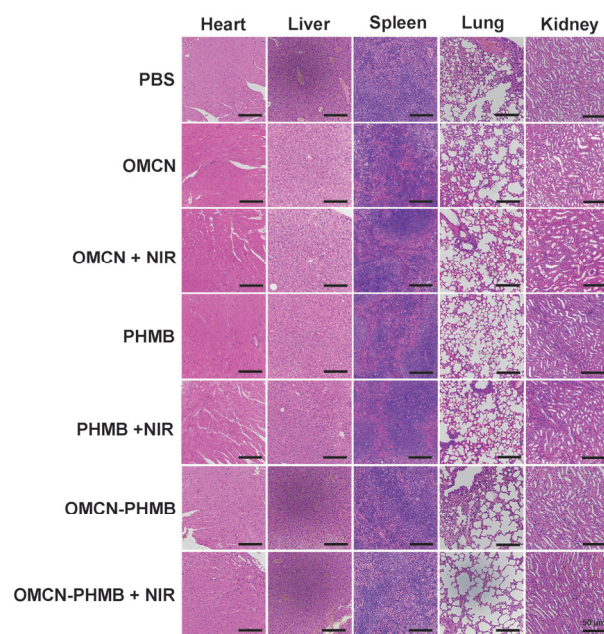


图 6 对各组小鼠主要脏器(心、肝、脾、肾和肺)H&E 染色进行组织学分析

Figure 6 Histology analysis of major organs (heart, liver, spleen, kidney and lung) in different groups by H&E staining

3 结论

细菌感染问题一直备受人们的广泛关注, 本研究通

过氧化处理 MCN 赋予其大量的功能基团(COOH)得到 OMCN, 并通过共价结合方式接枝 PHMB, 构建出一种新型纳米抗菌平台(OMCN-PHMB). 在近红外光的照射下, 该体系能够将光能转换成热能, 通过联合 PHMB, 有效增强了单一模式下的 PTT 疗法, 实现在低剂量(55 $\mu\text{g/mL}$)、低功率条件下(1.5 W/cm^2)即可达到理想的杀菌效果. 该平台在体内外抗菌实验中均表现出优良的协同抗菌性, 且展现出较高的生物相容性, 故有望作为一种安全可控的生物学平台来对抗各种细菌感染引起的相关疾病.

4 实验部分

4.1 MCN 和 OMCN 的制备

称取 0.6 g 苯酚于三颈烧瓶, 后加入 NaOH 水溶液(0.1 mol/L, 30 mL)和甲醛水溶液($w=37\%$, 2.1 mL), 超声混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温磁力搅拌反应 30 min. 后将 0.96 g 的 F-127 溶于 15 mL 蒸馏水, 加入上述反应液, 继续反应 2 h, 后加入 50 mL 蒸馏水连续反应 18 h. 取 17.7 mL 反应液并将其转移至高温反应釜中, 蒸馏水(56 mL)稀释, 130 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24 h. 将反应液离心去上清, 蒸馏水洗涤 5 次, 冷冻干燥, 后 700 $^{\circ}\text{C}$ 通氮气碳化 3 h, 即得到 MCN.

取 10 mg 的 MCN 于圆底烧瓶, 加蒸馏水 10 mL 超声 3 h, 后加入 8 mL 体积比 3:1 的浓硫酸与硝酸, 60 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 4 h. 取反应液离心去上清, 蒸馏水多次洗涤, 冷冻干燥, 即得到 OMCN.

4.2 OMCN-PHMB 的制备

取 10 mg 的 OMCN 超声分散于 10 mL 的 PBS 缓冲液中(pH 5.5), 加入乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)各 100 mg, 后放于摇床(180 r/min)活化羧基 2 h, 蒸馏水洗涤三次. 将活化后 OMCN 分散于 10 mL 的 PBS 缓冲液中(pH 7.4), 加入 PHMB 溶液(1 mL, $w=20\%$), 充分混合后置于摇床(180 r/min)反应 4 h, 最后取反应液离心去上清, 去离子水洗涤三次, 冷冻干燥, 即得 OMCN-PHMB.

4.3 材料的相关表征

采用扫描电子显微镜(SEM)分别观测 MCN 与 OMCN 的形貌; 通过 XRD 分析 MCN 与 OMCN 的晶体结构; 将 MCN, OMCN, OMCN-PHMB 超声分散于去离子水中, 使用马尔文 ZS90 型激光粒度及 Zeta 电位分析仪分别测定粒子的粒径分布及 Zeta 电位; 采用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)对所制备纳米颗粒进行红外光谱分析; 采用热重分析仪分析 OMCN 与 OMCN-PHMB 样品质量随温度的热失重变化.

4.4 光热性能测试

取 1 mL 含不同浓度的 OMCN 和 OMCN-PHMB 溶

液, 采用 808 nm 近红外激光仪照射($P=1.5 \text{ W/cm}^2$, 10 min), 分析温度随材料浓度时间变化情况; 取 1 mL 浓度为 55 $\mu\text{g/mL}$ 的 OMCN 和 OMCN-PHMB 溶液, 采用不同功率激光照射($P=0.5$ 、1.0、1.5 W/cm^2 , 10 min), 分析温度随照射功率变化情况, 采用热红外成像仪监测. 此外, 通过每次近红外激光照射 10 min, 然后自然冷却至室温, 过程循环重复五次, 来评价 OMCN 与 OMCN-PHMB 的光热稳定性能.

4.5 体外抗菌测试

以金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC29213)和大肠杆菌(*E. coli*, CMCC44102)为研究对象, 实验分为 PBS、OMCN、PHMB、OMCN-PHMB、PBS+NIR、OMCN+NIR、PHMB+NIR、OMCN-PHMB+NIR 八组, 将细菌悬浮液分别与上述材料接触, 菌液最终浓度为 $1.0 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$, 其中 PBS 组为空白对照, PHMB 的浓度为 2.86 $\mu\text{g/mL}$, OMCN 与 OMCN-PHMB 的浓度为 55 $\mu\text{g/mL}$, 光照组用 808 nm 激光照射处理(1.5 W/cm^2 , 10 min). 随后, 将细菌悬浮液 150 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 6 h. 吸取 100 μL 各细菌悬浮液进行平板涂布, 密封并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒湿培养箱孵育 24 h, 观察细菌生长状况, 拍照记录, 通过细菌生长抑制实验进一步评估了该体系的抗菌能力^[39](具体细节详见 Supporting information).

4.6 细菌的活/死染色实验

首先离心收集上述各组孵育后的细菌, 然后重悬于 1 mL 的 PBS 缓冲液中, 分别加入 FDA (10 μL , 10 mg/mL)和 PI (5 μL , 1 mg/mL)染料, 黑暗条件下孵育 0.5 h. 随后 3500 r/min 离心, PBS (pH 7.4)洗涤三次去除多余染料, 获得染色细菌. 最后采用荧光倒置显微镜观察细菌染色情况.

4.7 体内抗菌测试

将麻醉后的小鼠随机分为七组(PBS、OMCN、OMCN+NIR、PHMB、PHMB+NIR、OMCN-PHMB、OMCN-PHMB+NIR), 在每只小鼠背部形成直径约为 5 mm 的圆形皮肤伤口创面, 并于伤口部位注射 20 μL 的 *S. aureus* 悬浮液(10^5 CFU/mL), 感染 24 h 从而建立小鼠背部细菌伤口感染模型. 将各治疗组溶液 PBS、OMCN (55 $\mu\text{g/mL}$)、PHMB (2.86 $\mu\text{g/mL}$)、OMCN-PHMB (55 $\mu\text{g/mL}$)分别注射到伤口感染部位, 其中光照组于第一天采用 808 nm 激光照射处理(1.5 W/cm^2 , 10 min), 随后所有小鼠伤口处用医疗纱布进行包扎. 每天观察记录各组小鼠伤口生长状况和体重变化. 此外, 为了进一步评价体内抗菌活性, 小鼠在治疗 5 d 后处死, 采用无菌拭子从创面处采集各组细菌样本, 放于 5 mL 的液体培养基中, 150 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 8 h. 随后将细菌悬浮液稀释 10 倍, 吸取 100 μL 涂布于固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 24 h, 拍照记录, 并对菌落进行定量分析^[40].

4.8 组织学分析

采集治疗组 5 d 后伤口感染部位组织标本用多聚甲醛($w=4\%$)固定 1 h, 然后包埋石蜡, 切成 4 μm 厚的薄片, 再用苏木精和伊红染色法(H&E)染色, 并用显微镜拍照, 分析评价创面表皮再生和炎症状况, 进一步评价 OMCN-PHMB 的抗菌能力. 小鼠心、肝、脾、肺、肾组织按上述同样方法处理, 以评价抗菌体系的生物安全性.

4.9 统计学分析

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 并至少通过 3 个独立实验得到类似结果. 各组之间采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性的统计学差异.

References

- [1] Qiao, Y.; Ma, F.; Liu, C.; Zhou, B.; Wei, Q.; Li, W.; Zhong, D.; Li, Y.; Zhou, M. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 193.
- [2] Sun, J.; Fan, Y.; Ye, W.; Tian, L.; Niu, S.; Ming, W.; Zhao, J.; Ren, L. *Chem. Eng. J.* **2021**, *417*, 128049.
- [3] Chen, C.; Chu, G.; Qi, M.; Liu, Y.; Huang, P.; Pan, H.; Wang, Y.; Chen, Y.; Zhou, Y. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 9117.
- [4] Liu, C.; Feng, S.; Ma, L.; Sun, M.; Wei, Z.; Wang, J.; Chen, Z.; Guo, Y.; Shi, J.; Wu, Q. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 38029.
- [5] Li, J.; Li, B.; Wang, J.; He, L.; Zhao, Y. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 238 (in Chinese). (李佳欣, 李蓓, 王纪康, 何蕾, 赵宇飞, 化学学报, **2021**, *79*, 238.)
- [6] Shen, H.; Jiang, C.; Li, W.; Wei, Q.; Ghiladi, R. A.; Wang, Q. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *26*, 31193.
- [7] Yu, X.; He, D.; Zhang, X.; Zhang, H.; Song, J.; Shi, D.; Fan, Y.; Luo, G.; Deng, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 1766.
- [8] Qi, Y.; Ren, S.; Che, Y.; Ye, J.; Ning, G. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 613 (in Chinese). (齐野, 任双颂, 车颖, 叶俊伟, 宁桂玲, 化学学报, **2020**, *78*, 613.)
- [9] Li, J.; Wang, Y.; Yang, J.; Liu, W. *Chem. Eng. J.* **2021**, *420*, 127638.
- [10] Guo, C.; Ma, X.; Wang, B. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 967 (in Chinese). (郭彩霞, 马小杰, 王博, 化学学报, **2021**, *79*, 967.)
- [11] Cao, F.; Ju, E.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Liu, C.; Li, W.; Huang, Y.; Dong, K.; Ren, J.; Qu, X. *ACS Nano* **2017**, *11*, 4651.
- [12] Yan, T.; Liu, J. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 713 (in Chinese). (闫腾飞, 刘俊秋, 化学学报, **2020**, *78*, 713.)
- [13] Yu, Y. T.; Shi, S. W.; Wang, Y.; Zhang, Q. L.; Gao, S. H.; Yang, S. P.; Liu, J. G. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 312.
- [14] Geng, H.; Cui, J.; Hao, J. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 105 (in Chinese). (耿慧敏, 崔基炜, 郝京诚, 化学学报, **2020**, *78*, 105.)
- [15] Aksoy, I.; Kucukkececi, H.; Sevgi, F.; Metin, O.; Hatay Patir, I. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 26822.
- [16] Wang, Y.; Zhu, D.; Yang, Y.; Zhang, K.; Zhang, X.; Lv, M.; Hu, L.; Ding, S.; Wang, L. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 76 (in Chinese). (王英美, 朱道明, 杨阳, 张珂, 张修珂, 吕明珊, 胡力, 丁帅杰, 王亮, 化学学报, **2020**, *78*, 76.)
- [17] Yan, L. X.; Chen, L. J.; Zhao, X.; Yan, X. P. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1909042.
- [18] Liu, Y.; Guo, Z.; Li, F.; Xiao, Y.; Zhang, Y.; Bu, T.; Jia, P.; Zhe, T.; Wang, L. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 31649.
- [19] Jiao, Y.; Zhang, X. *Acta Chim. Sinica* **2018**, *76*, 659 (in Chinese). (焦阳, 张希, 化学学报, **2018**, *76*, 659.)
- [20] Zhao, Y. Q.; Sun, Y.; Zhang, Y.; Ding, X.; Zhao, N.; Yu, B.; Zhao, H.; Duan, S.; Xu, F. J. *ACS Nano* **2020**, *14*, 2265.
- [21] Huang, S.; Liu, H.; Liao, K.; Hu, Q.; Guo, R.; Deng, K. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 28952.
- [22] Wu, Q.; Peng, R.; Luo, Y.; Cui, Q.; Zhu, S.; Li, L. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 5071.
- [23] Hu, D.; Zou, L.; Li, B.; Hu, M.; Ye, W.; Ji, J. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 5169.
- [24] Mei, L.; Gao, X.; Shi, Y.; Cheng, C.; Shi, Z.; Jiao, M.; Cao, F.; Xu, Z.; Li, X. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 40153.
- [25] Zhang, R.; Yu, J.; Ma, K.; Ma, Y.; Wang, Z. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 7168.
- [26] Zhou, K.; Qiu, X.; Xu, L.; Li, G.; Rao, B.; Guo, B.; Pei, D.; Li, A.; He, G. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 26432.
- [27] Yu, H.; Liu, L.; Yang, H.; Zhou, R.; Che, C.; Li, X.; Li, C.; Luan, S.; Yin, J.; Shi, H. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 39257.
- [28] Abri, S.; Ghatpande, A. A.; Ressa, J.; Barton, H. A.; Leipzig, N. D. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 5848.
- [29] Zhi, Z.; Su, Y.; Xi, Y.; Tian, L.; Xu, M.; Wang, Q.; Padidan, S.; Li, P.; Huang, W. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 10383.
- [30] Li, W.; Zhang, H.; Li, X.; Yu, H.; Che, C.; Luan, S.; Ren, Y.; Li, S.; Liu, P.; Yu, X.; Li, X. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 7617.
- [31] Xu, M.; Zhou, H.; Liu, Y.; Sun, J.; Xie, W.; Zhao, P.; Liu, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 32965.
- [32] Wang, S.; Li, C.; Meng, Y.; Qian, M.; Jiang, H.; Du, Y.; Huang, R.; Wang, Y. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 1702.
- [33] Cai, X.; Yan, H.; Luo, Y.; Song, Y.; Zhao, Y.; Li, H.; Du, D.; Lin, Y. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1*, 1165.
- [34] Ng, I. S.; Ooi, C. W.; Liu, B. L.; Peng, C. T.; Chiu, C. Y.; Chang, Y. K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *154*, 844.
- [35] Yu, S.; Li, G.; Liu, R.; Ma, D.; Xue, W. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1707440.
- [36] Peng, J.; Liu, P.; Peng, W.; Sun, J.; Dong, X.; Ma, Z.; Gan, D.; Liu, P.; Shen, J. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *411*, 125110.
- [37] Jia, X.; Ahmad, I.; Yang, R.; Wang, C. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 2459.
- [38] Liu, C.; Wei, Z.; Huo, Z.; Fu, S.; Li, S.; Yang, Y.; Shi, J.; Wu, Q. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 5048.
- [39] Sang, Y.; Li, W.; Liu, H.; Zhang, L.; Wang, H.; Liu, Z.; Ren, J.; Qu, X. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1900518.
- [40] Yin, W.; Yu, J.; Lv, F.; Yan, L.; Zheng, L.; Gu, Z. *ACS Nano* **2016**, *10*, 11000.

(Zhao, C.)