

付超,常静林,姜轩,等. 响应性聚集金纳米粒子体系用于细菌的体外热疗研究[J].中国实验动物学报, 2019, 27(3):278-285.

Fu C, Chang JL, Jiang X, et al. Responsive aggregation of gold nanoparticles system for photothermal therapy of bacteria in vitro [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3):278-285.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.03.002

响应性聚集金纳米粒子体系用于细菌的体外热疗研究

付超^{1,2}, 常静林², 姜轩¹, 张从柔², 张玉民², 褚丽萍², 赵瑞利^{1*}

(1. 天津农学院 动物科学与动物医学学院, 天津 300384; 2. 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192)

【摘要】 目的 利用发生响应性聚集后的金纳米粒子体系的较强的光热特性,研究其对细菌的体外光热杀伤作用。**方法** 通过 Au-S 键反应将合成好的多肽 A 和多肽 B 分别修饰到金纳米粒子(GNPs)表面,然后等比例混合组成 GNPs system。首先利用动态光散射(DLS)和透射电镜(TEM)研究其在弱酸性条件下的响应性聚集情况,利用多功能酶标仪研究其在弱酸性条件下的紫外吸收变化;然后为了了解该纳米粒子在菌液中的光热转换情况,分别测定其在弱酸性条件下溶液内和与细菌作用后的温度变化曲线;进一步考察其体外抗菌效果。**结果** DLS 检测到合成的 GNPs system 在弱酸性条件下粒径由 16 nm 增大到 900 nm 左右,并在 TEM 下可见明显的聚集体,并且在 650~900 nm 的紫外吸收信号明显增高。在模拟细菌的弱酸性环境下,GNPs system 在激光照射条件下均实现了溶液和细菌混合溶液的快速升温,且最高温度可达 69.8℃,与对照组 GNPs-PEG2000 相比具有显著的统计学差异;体外抗菌实验结果显示,GNPs system 对金黄色葡萄球菌的杀伤力最强,50 μg/mL 浓度时就可杀死约 50% 的细菌;浓度为 200 μg/mL 时基本上可以完全杀死,与对照组 GNPs-PEG2000 相比较具有显著的统计学差异。**结论** 本研究为 GNPs 的设计提供了新的思路,为 GNPs 用于光热治疗提供了新的方法。

【关键词】 金纳米粒子;响应性聚集;细菌;光热治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 03-0278-08

Responsive aggregation of gold nanoparticles system for photothermal therapy of bacteria *in vitro*

FU Chao^{1,2}, CHANG Jinglin², JIANG Xuan¹, ZHANG Congrou², ZHANG Yumin², CHU Liping², ZHAO Ruili^{1*}

(1. College of Animal Science and Animal Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China.
2. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192)
Corresponding author: ZHAO Ruili. E-mail: zhaoruili1109@126.com

【Abstract】 Objective To study the photothermal killing effect on bacteria means of the strong photothermal properties of gold nanoparticles system (GNPs system) after responsive aggregation. **Methods** Synthesized peptides A and B were modified at their surface by gold nanoparticles (GNPs) through the Au-S bond reaction, and then mixed at equal

[基金项目] 国家自然科学基金项目(51703247, 31201886, 31572492);天津市高校“中青年骨干创新人才培养计划”项目;天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目(14JCYBJ30000、18JCYBJC30100);天津市“131”创新型人才资助项目。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (51703247, 31201886, 31572492), Tianjin Young and Middle-aged Innovative Talents Training Program for Universities, Tianjin Applied Basic and Frontier Technology Research Program General Project (14JCYBJ30000, 18JCYBJC30100), and Tianjin “131” Innovative Talents Project.

[作者简介] 付超(1990—),男,硕士,主要从事动物病原学与免疫学方面的研究。Email: 18393813292@163.com

[通信作者] 赵瑞利(1979—),女,博士,副教授,主要从事分子病原细菌学方面的研究。Email: zhaoruili1109@126.com

proportions to form the GNPs system. First, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) were used to assess the responsive aggregation under weakly acidic conditions. UV absorption changes under weakly acidic conditions were measured by a multifunction microplate reader. In order to understand the photothermal conversion of the nanoparticles in the bacterial suspension, their temperature curves in the solution under weakly acidic conditions and after treated with bacteria were measured, respectively. Finally, the antibacterial effect was tested *in vitro*. **Results** The particle size of the synthesized GNPs system was increased from 16 nm to 900 nm as detected by DLS under weakly acidic conditions. Obvious aggregates were observed by TEM, and the UV absorption signal was significantly increased at 650~900 nm. Under the weakly acidic conditions of simulated bacteria, the GNPs system achieved a rapid temperature rise of the solution with mixed bacterial under laser irradiation conditions. The highest temperature was 69.8°C, significantly different from the control group of GNPs-PEG2000. The result of antibacterial experiments *in vitro* showed that the GNP system had the strongest killing effect against *Staphylococcus aureus*, which was 50% and 100% killing of the bacteria at concentration of 50 and 200 µg/mL, respectively, showing a significant difference compared with the control group of GNPs-PEG2000. **Conclusions** This study provides a new approach for the design of GNPs and a new method to apply GNPs to photothermal therapy.

【Keywords】 gold nanoparticles; responsive aggregation; bacteria; photothermal therapy

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近些年,由于一些国家对于抗生素的滥用,大量病原体出现了极强的多药耐药性,细菌感染逐渐成为世界上死亡的重要原因,对于人类健康构成极大的威胁。其中金黄色葡萄球菌致病力强,耐药谱广,该菌的感染较为常见,尤其受到人们的关注^[1-3]。

为了解决日益严重的金黄色葡萄球菌的感染问题,有许多的抑菌策略相继被提出来,这些策略不仅涉及到使用抗生素、抗菌肽、化疗药物等化疗法,而且也涉及到了非化疗法,比如近些年兴起的光动力治疗、光热治疗等^[4-6]。与化疗相比较而言,光热疗法可以通过物理热效应破坏细菌的生物膜结构,从而杀死细菌而达到治疗细菌感染的目的^[7]。激光照射出的近红外射线在 700~1100 nm 波长范围内,具有较强的组织穿透能力,并且局部照射对周围健康组织的伤害极小^[8-9]。近年来随着抗菌治疗研究的逐渐深入和治疗经验的逐渐丰富,金纳米粒子(GNPs)由于其良好的光热特性,在用于光热抗菌治疗中受到了广泛的关注^[10]。为了提高 GNPs 的光热特性,科学家们以 GNPs 为基础制备了不同形状的金纳米材料,例如金纳米棒、金纳米棱柱等,但是在合成的过程中,不免引入了大量的有毒性的有机试剂,例如溴化十六烷基三甲铵(CTAB)^[11-12],由此导致了金纳米材料较低的生物相容性并限制了其应用和进一步的发展。

本课题组经过研究,提供了一种新的、具有响应性的提高 GNPs 光热性能的一种方法,制备的 GNPs system 能够在模拟细菌的弱酸性环境下发生响应性的聚集,形成的大尺寸的聚集体能够明显的

提高其光热转换效率,进而能够在激光照射下使体外溶液和细菌混合溶液的温度快速地升高至 70°C,获得并证明了高效的抗菌能力。为 GNPs 用于光热治疗提供了一个新的方法,鉴于 GNPs 的良好的生物学性能,也给 GNPs 的其他的方向提供了新的思路和新的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要样品与试剂

金纳米粒子(GNPs),巯基化聚乙二醇(mPEG2000-SH),多肽 A(NH₂-KKKKKC-COOH),多肽 B(NH₂-DDDDDC-COOH),2,3-二甲基马来酸酐(DA),柠檬酸钠,氢氧化钠,醋酸,普通琼脂粉,TSB 培养基,生物自发光金黄色葡萄球菌(*S. aureus* Xen 36,由中国医学科学院放射医学研究所核医学应用研究室保存备用)。

1.1.2 主要仪器

高速台式冷冻离心机、透射电子显微镜、动态光散射、立式压力蒸汽灭菌锅、热电偶温度计、近红外热成像仪、紫外可见分光光度计、恒温培养振荡器、酶标仪、荧光显微镜、生物光学成像系统。

1.2 方法

1.2.1 材料的制备

(1)GNPs system 的制备

首先将适量氯金酸溶液与超纯水混匀,120°C 油浴加热煮沸,加入适量柠檬酸钠溶液,溶液变为酒红色后继续煮沸 30 min,后冷却至室温即可得到 GNPs。将多肽 A 与 DA(2,3-二甲基马来酸酐)以

适当比例在 pH 8.0 的水溶液中混匀,室温搅拌过夜,透析冻干后得到 K(DA)K(DA)K(DA)K(DA)K(DA)C,将该冻干品在 pH 8.0 条件下通过 Au-S 键修饰到 GNPs 上即得到 GNPs-A。再将多肽 B 通过 Au-S 键修饰到 GNPs 上即得到 GNPs-B。然后将 GNPs-A 和 GNPs-B 按照 1:1 (v:v) 混合,充分混匀后即可得到 GNPs system。

(2) GNPs-PEG2000 的制备

按照上述制备 GNPs system 的类似方法制备 GNPs-PEG2000,即将 mPEG2000-SH 修饰到 GNPs 表面,超速离心纯化后即得到 GNPs-PEG2000。

1.2.2 材料的表征

(1) 粒径

首先测定 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 (180 $\mu\text{g/mL}$) 在 pH 7.4 的粒径和电镜下的形态,随后为考察 GNPs system 的响应性聚集,将 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 溶液环境调至为 pH 6.5。作用 5 min 后测定 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 的粒径和电镜下的形貌变化。

(2) 紫外吸收

参照 1.2.2 (1) 的对 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 的处理方法,利用多功能酶标仪测定二者在 pH 7.4 和 pH 6.5 中的紫外吸收变化,测定波长范围为 350~900 nm。

(3) 温度曲线

利用光热成像仪器测定 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 在 pH 6.5 条件下的升温曲线。利用 808 nm 近红外激光器 (0.45 W/cm²) 对 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 (pH 6.5) 进行光照,然后利用光热成像仪器连续测定溶液的温度,并绘制温度变化曲线。

1.2.3 生物实验

(1) 细菌孵育

将冷藏保存的生物自发光金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*.Xen.36) 在 TSB 琼脂平板上进行划线培养,37℃ 培养 24 h 后,挑取单菌落接种于 TSB 液体培养基中,37℃ 预培养 24 h,后再将该菌扩大培养 16 h。然后将细菌培养液离心洗涤 2 次后,用 PBS 将细菌重悬,并将菌液浓度调整为 10⁸ cfu/mL 待用。

(2) 细菌材料共混液升温曲线

分别取 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 (200 $\mu\text{g/mL}$, pH 6.5) 与细菌悬液按 1:4 (v:v) 共 1 mL 加入 2 mL 离心管中,静置待其初始温度与环境温度一

致时,开始使用 808 nm NIR 激光器 (0.45 W/cm²) 照射 5 min。同时在此过程中,使用近红外热成像仪实时拍照记录温度变化。

(3) 抑菌实验

将制备得到的 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 分别配成一系列梯度浓度 (0、1、5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$),将 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 与菌液按 1:4 (v:v) 的比例分别混合于 96 孔板中,将细菌溶液的 pH 值调至 6.5,37℃ 条件下孵育 1 h。然后使用 808 nm NIR 激光器 (0.45 W/cm²) 照射 5 min,后 37℃ 孵育 24 h。使用多功能酶标仪于 600 nm 处测量其 OD 值,同时使用生物光学成像系统对其进行成像。

(4) Calcein-AM/PI 双染法测定细菌存活

分别取 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 与菌液按 1:4 (v:v) 的比例分别混合于 96 孔板中,将细菌溶液的 pH 值调至 6.5,37℃ 条件下孵育 1 h。然后使用 808 nm NIR 激光器 (0.45 W/cm²) 照射 5 min,后 37℃ 孵育 24 h。再将 96 孔板中的菌液全部转移至 1.5 mL 离心管中,然后使用 1×Assay buffer 离心洗涤 2 次,再用 Calcein-AM/PI 染料于 37℃ 避光孵育 30 min。然后从各样品中均取 10 μL 分别涂在载玻片上,并盖上盖玻片。待其固定后,在荧光显微镜下观察,并进行细菌计数。

1.3 统计学分析

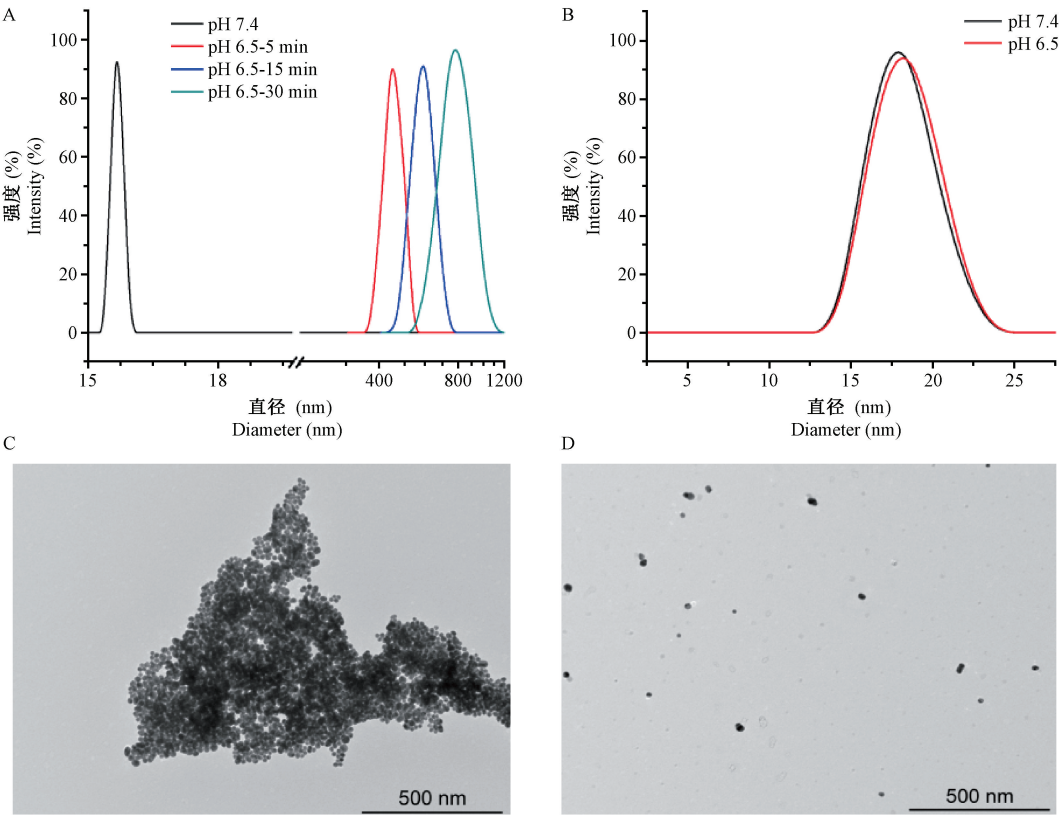
所有数据均使用 Microsoft Excel 以及 Origin、Image J 等软件进行处理分析,数据结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 值。使用双尾 *t* 检验判别组间差异显著性, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 材料的制备及表征

2.1.1 GNPs system 的响应性聚集

首先如图 1A 和图 1B 所示,GNPs system 和 GNPs-PEG2000 在 pH 7.4 条件下的粒径均为约 16 nm 的单分散的球形结构。二者在体积和外形上没有明显差异,如图 1C 所示;然而当 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 被置于弱酸性条件下时 (pH 6.5),GNPs system 在 DLS 的检测下显示其尺寸增大至 900 nm,而且在 TEM 下明显观察到大尺寸的、称度更高的金纳米粒子聚集体 (GNPs aggregates)。而 GNPs-PEG2000 在 pH 6.5 条件下,其尺寸仍是 16 nm 左右,且形貌没有发生明显的变化,如图 1D 所示。



注:A,GNPs system 在不同 pH 条件下的粒径。B,GNPs-PEG2000 在不同 pH 条件下的粒径。C 和 D,GNPs system 的透射电镜图像。

图 1 GNPs system 和 GNPs-PEG2000 在不同 pH 条件下的粒径

Note. A. GNPs system. B. GNPs-PEG2000. C and D. the TEM images of the GNPs system.

Figure 1 Particle diameter of the GNPs system and GNPs-PEG2000 at different pH conditions

2. 1. 2 紫外吸收变化

随着 GNPs system 在弱酸性条件下发生的响应性聚集,其紫外吸收光谱也发生了明显的变化,如图 2B 所示,原本处于 520 nm 的吸收峰发生明显的红移,重要的是,其在近红外区域(650~900 nm)的紫外信号发生了成倍的增长。如图 2A 所示,对照组 GNPs-PEG2000 的紫外吸收光谱在加酸前后并未发生明显的变化。

2. 1. 3 升温曲线

升温曲线结果如图 3 所示,在 NIR 照射的情况下,PBS 组在 10 min 之内仅仅升高了 10℃左右,而作为单分散的金纳米粒子 GNPs-PEG2000,也仅仅升高了 25℃左右。然而,在酸性条件下的 GNPs system,在近红外激光的照射下,实现了快速地、明显的温度提升,其最高温度可达近 70℃,温度升高了 50℃左右。该温度能够充分满足对细菌的光热治疗。

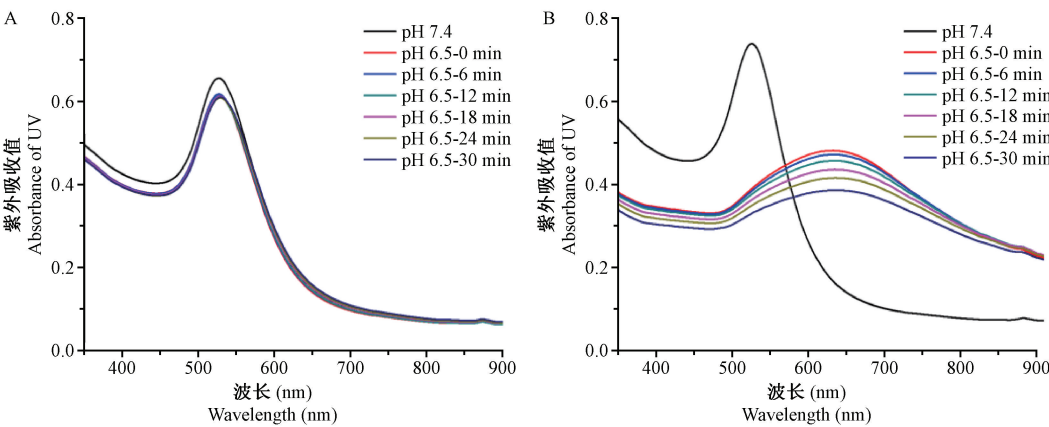
2. 2 GNPs system 抗菌实验

2. 2. 1 细菌材料共混液升温曲线

为了评价体外杀菌效果,我们首先验证了 GNPs system 在与 *S.aureus.Xen36* 菌液混合后的生物效果,结果如图 4 所示。经激光照射后,根据温度曲线显示,在 NIR 照射的情况下,与 PBS 和 GNPs-PEG2000 相比较,GNPs system 与细菌的共混液在最初的 3 min 之内的升温效果明显,具有更为显著的升温性能,最高温度可达近 50℃,温度升高约 25℃。而作为对照,PBS 组和 GNPs-PEG2000 并没有显示出 GNPs system 的良好升温性能,与 GNPs system 统计学分析比较差异显著。

2. 2. 2 GNPs system 抑菌效果观察

为了测定 GNPs system 的体外抗菌效果,对于其细菌生物发光强度以及 600 nm 处的 OD 值进行测量。在生物发光强度测量的方法中,由于活细菌具有良好的生长增殖能力,而死细菌不再生长增殖,因此细菌数量越少则该菌的生物发光强度越小,细菌数量越多则该菌的生物发光强度越大。同理,在细菌 OD₆₀₀ 值的测量中,OD₆₀₀ 值的大小亦与细菌的数量多少呈一定的正相关关系。如图 5A 和 5B

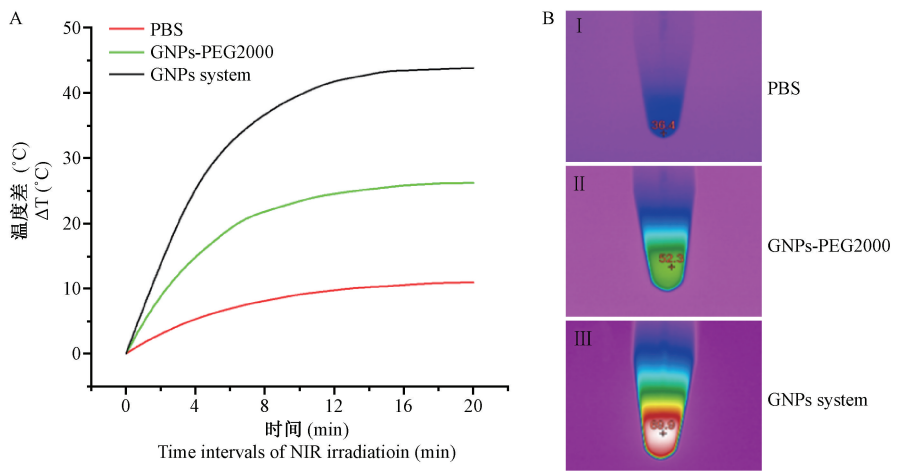


注:A,GNPs-PEG2000 在不同 pH 条件和不同时间点的紫外吸收。B,GNPs system 在不同 pH 条件和不同时间点的紫外吸收。

图 2 GNPs-PEG2000 和 GNPs system 在不同 pH 条件下的紫外吸收

Note. A. GNPs-PEG2000 under different pH conditions and at different time points. B. GNPs system under different pH conditions and at different time points.

Figure 2 UV absorption of the GNPs system and GNPs-PEG2000 at different pH conditions



注:A,经 NIR 照射时,PBS、GNPs-PEG2000 和 GNPs system 的温度变化。B,经 NIR 照射时,热成像结果。

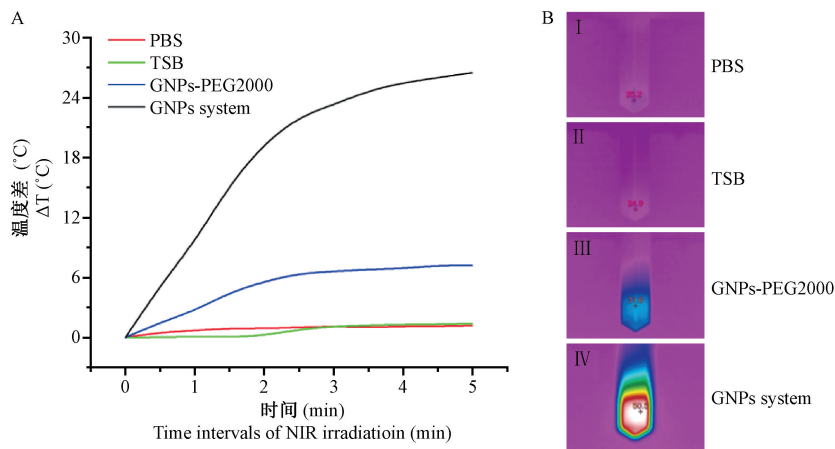
图 3 GNPs-PEG2000 和 GNPs system 经 NIR 照射后的温度变化

Note. A. The temperature changes of PBS, GNPs-PEG2000 and GNPs system when irradiated with NIR. B. The thermographic results of PBS, GNPs-PEG2000 and GNPs system when irradiated with NIR.

Figure 3 Temperature changes of GNPs-PEG2000 and GNPs system after NIR irradiation

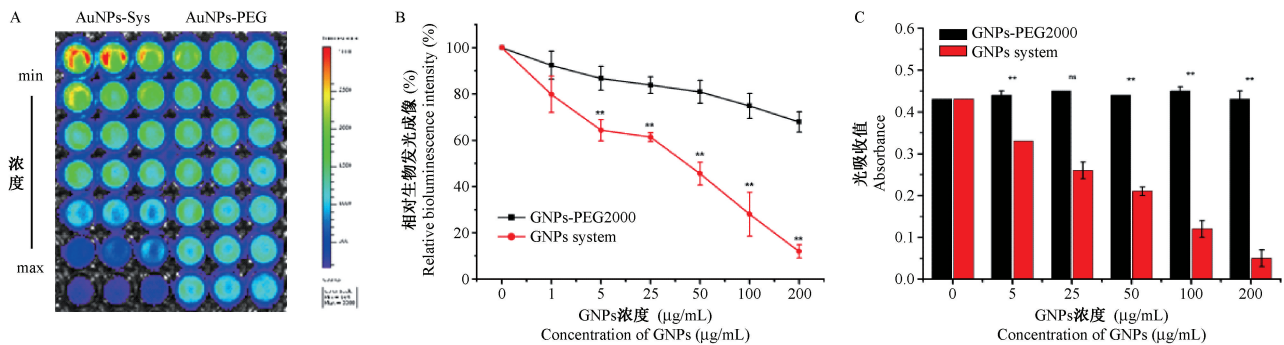
所示,经 NIR 照射后的细菌存活情况,随着 GNPs system 浓度的增大,孔内的光强呈现逐渐减弱的趋势,并且与对照组 GNPs-PEG2000 比较差异明显。该结果表明 GNPs-PEG2000 和 GNPs system 对于 *S. aureus* Xen 36 细菌的生长抑制均呈现出一定的浓度依赖性,即材料浓度与细菌相对生物发光强度呈现一定的正相关,GNPs 的浓度越大,细菌的相对生物发光强度越低,即细菌的存活率越低。当浓度为 5~200 μg/mL 时,GNPs system 组的细菌相对生物发光强度均要极显著地低于 GNPs-PEG2000 组(均 $P \leq 0.01$);当浓度为 1 μg/mL 时,GNPs-

PEG2000 和 GNPs system 两组之间的细菌相对生物发光强度差异无统计学意义。根据图 5C 可知,GNPs-PEG2000 和 GNPs system 对于 *S. aureus* Xen 36 细菌的生长抑制亦均呈现出一定的浓度依赖性,该结果与之前的细菌生物发光强度的结果相一致,即材料浓度与菌液的光吸收值呈现一定的正相关,GNPs 的浓度越大,菌液的光吸收值越低,即就是细菌的存活率越低。当浓度为 5 μg/mL 和 50~200 μg/mL 时,GNPs system 组的细菌的均要极显著地低于 GNPs-PEG2000 组(均 $P < 0.01$);当浓度为 25 μg/mL 时,GNPs-PEG2000 和 GNPs system 两组之间



注:A,经 NIR 照射时,PBS、TSB、GNPs-PEG2000 和 GNPs system 的温度变化。B, PBS、TSB、GNPs-PEG2000 和 GNPs system 分别与细菌共混液的热成像结果。
图 4 GNPs-PEG2000 和 GNPs system 与细菌共混液经 NIR 照射后的温度变化
Note. A. The temperature changes of PBS, TSB, GNPs-PEG2000 and GNPs system when irradiated with NIR. B. Thermal imaging results of PBS, TSB, GNPs-PEG2000 and GNPs system mixed with bacteria, respectively.

Figure 4 Temperature changes of the GNPs-PEG2000 and GNPs system mixed with bacteria after NIR irradiation



注:A,经 NIR 照射时,GNPs-PEG2000 和 GNPs system 在生物光学成像系统下的抑菌光学成像结果。B,抑菌光学成像结果的计数结果,当浓度为 5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时,两组间比较所得 t 值分别为 22.220 **, 11.104 ($P > 0.05$)、40.919 **, 30.829 **, 24.665 ** ($** P < 0.01$)。C,GNPs-PEG2000 和 GNPs system 的抑菌光吸收结果,当浓度为 1、5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时,GNPs system 组与 GNPs-PEG2000 组进行比较,所得 t 值分别为 2.199 ($P > 0.05$)、5.590 **, 9.505 **, 8.734 **, 7.434 **, 18.528 ** ($** P < 0.01$)。

图 5 GNPs-PEG2000 和 GNPs system 经 NIR 照射后的抑菌情况

Note. A. The results of bacteriostatic imaging of GNPs-PEG2000 and GNPs systems under bio-optical imaging systems when irradiated with NIR. B. Counts of bacteriostatic optical imaging results. When the concentrations were 5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$, the t values obtained by comparison between the two groups were 22.220 **, 11.104 ($P > 0.05$), 40.919 **, 30.829 **, 24.665 ** ($** P < 0.01$), respectively. C. The results of bacteriostatic light absorption of GNPs-PEG2000 and GNPs system. When the concentrations were 1, 5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$, the GNPs system group was compared with the GNPs-PEG2000 group, and the obtained t values were 2.199 ($P > 0.05$), 5.590 **, 9.505 **, 8.734 **, 7.434 **, and 18.528 ** ($** P < 0.01$), respectively.

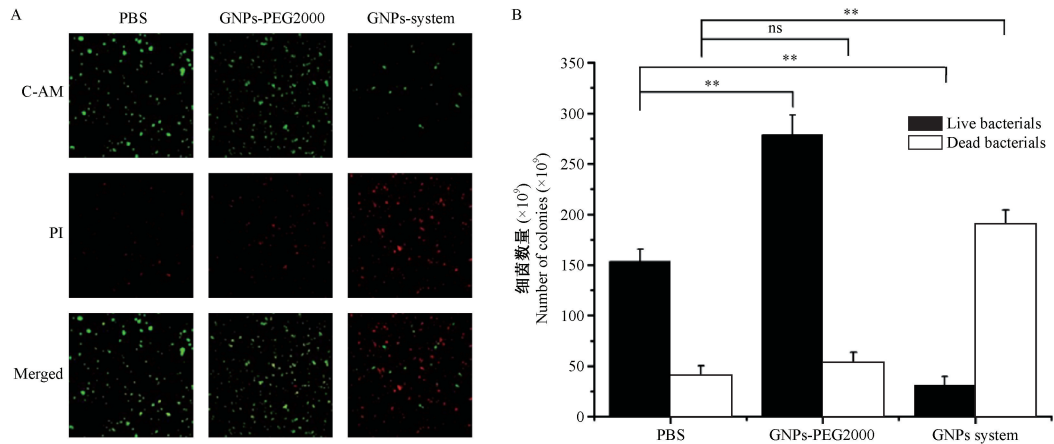
Figure 5 Antibacterial activity of the GNPs-PEG2000 and GNPs system after NIR irradiation

的细菌相对生物发光强度差异无统计学意义。该结果显示,在 NIR 照射后,GNPs system 的杀菌效果呈现浓度依赖趋势,即随着材料浓度的增大,细菌存活率越低。当浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,就可杀死约 50% 的细菌;浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,基本上可以完全

杀死细菌,与对照组 GNPs-PEG2000 相比较,具有显著的统计学差异,杀菌效果明显,生物发光成像实验也显示出了相似的光热抗菌效果。

2.2.3 Calcein-AM/PI 双染法测定细菌存活
为了进一步评估材料的杀菌效果,进行细菌存

活染色测定。在存活染色中,活菌体内由于含有酯酶,且细胞膜完整,所以活菌被染成绿色,死菌将被染成红色。在近红外激光照射下,GNPs system 显示出了更高的抗菌活性。如图 6A 所示,在 GNPs system 组中,基本所有的细菌被染成红色,而在对照组 PBS 和 GNPs-PEG2000 中,杀菌效果并不明显。



注:A,经 NIR 照射时,Calcein-AM/PI 双染法测定细菌存活的荧光显微镜下的结果。B,对 A 的计数结果。当浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,PBS 组与 GNPs system 组、GNPs-PEG2000 组的活细菌数量进行比较,所得 t 值分别为 -7.609^{**} 、 11.759^{**} ($^{**}P < 0.01$),然后 PBS 组与 GNPs system 组、GNPs-PEG2000 组的死细菌数量进行比较,所得 t 值分别为 -1.309 ($P > 0.05$)、 -12.307^{**} ($^{**}P < 0.01$)。

图 6 GNPs-PEG2000 和 GNPs system 经 NIR 照射后的细菌死活染色

Note. A. Results of measuring bacterial survival by calcein-AM/PI double staining after NIR irradiation, observed by fluorescence microscopy. B. Counting of the bacteria in the Figure A. Comparison of the numbers of viable bacteria between the PBS, GNP system and GNPs-PEG2000 groups at concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the obtained t values were -7.609^{**} , 11.759^{**} ($^{**}P < 0.01$). Then, the number of dead bacteria in the PBS group was compared with the GNPs system group and the GNPs-PEG2000 group, and the obtained t values were -1.309 ($P > 0.05$) and -12.307^{**} ($^{**}P < 0.01$), respectively.

Figure 6 Staining of viable and dead bacteria in the GNPs-PEG2000 and GNPs systems after NIR irradiation

3 讨论

首先,我们利用了前期制备的 GNPs system 能够通过细菌微酸性环境下发生响应性聚集,通过提高了近红外区域的紫外吸收信号,进而实现了提高热疗抗菌的效率。在不改变 GNPs 的结构的基础上,首先没有引入任何的有毒性的有机试剂等,使其仍旧保持着较高的生物相容性,这在我们前期的工作中有系统的研究;其次,GNPs system 在细菌微酸性环境内的响应性的聚集,实现了对细菌环境的特异性,即在近红外激光照射下,仅仅在细菌环境中提高热疗的杀伤效率。而在周边正常位置或正常器官中,GNPs system 并不会发生响应性聚集,仍旧以单分散的粒子形式存在。

其次,基于响应性形成的 GNPs aggregates 导致了近红外区域的紫外吸收信号的明显增强,由此实现了快速、稳定的升温,而且在 10 min 之内能提高

图 6B 所示,结果表明 GNPs-PEG2000 和 GNPs system 对于 *S.aureus* Xen 36 细菌均具有一定的杀伤能力,但是 GNPs system 组的活菌数量要显著低于对照组、死菌数量显著高于对照组。因此,GNPs system 具有更好的抑菌作用,该结果与之前的抑菌实验结果基本相一致。

至近 70℃。这明显改善了单分散的 GNPs 作为热疗增敏剂的增敏效果。同时其升温效率较其他学者开发的金纳米棒或金纳米棱柱相比较,无明显差异^[13]。重要的是我们制备的 GNPs system,只有在到达具有酸性条件下的细菌或肿瘤环境后,响应性的形成较大尺寸的 GNPs aggregates 后,才具有较高效率的光热增敏效果。未到达机体的弱酸性环境时不会发生聚集,在近红外激光照射下温度几乎不升高。也就是说我们制备的 GNPs system 的光热增敏性能具有特异性,进一步的降低了激光对正常组织的热疗损伤。这在此后的动物实验中会展现出良好的优势。

最后,由于获得了较高的光热转换效率,我们制备的 GNPs system 获得了较理想的体外抗菌效果。不同检测抗菌效果的实验结果均表明,由于最初 GNPs aggregates 的产生,进而导致其具有很高的光热转换效率,最终导致了细菌在光热治疗中发生

了严重的抑制和死亡。这与对照组 PBS 和 GNPs-PEG2000 比较展现出了显著的统计学差异。

总之,本研究成功制备的 GNPs system,通过响应性聚集、近红外区域的紫外吸收信号明显增强、明显提高光热转换效率、程序化的实现了热疗对细菌的杀伤效果的提高。并且由于 GNPs aggregates 形成的响应性和敏感性,实现了对特定组织(细菌病灶部位或肿瘤组织)的特异性聚集,高效升温,最终实现了对细菌的特异性光热治疗^[14]。本文所报道的可响应性聚集的 GNPs system 由于具有良好的光热转换性能和 CT 造影性能,可以将其用于多模态成像中探索肿瘤或细菌疾病的发展趋势或跟踪其治疗效果的研究,并希望能够在临床的诊疗领域做出一定的贡献。

参 考 文 献(References)

- [1] Xie Y, Liu Y, Yang J, et al. Gold nanoclusters for targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, 57(15): 3958–3962.
- [2] 杨慧君, 李晓娜, 王艺晖, 等. 金黄色葡萄球菌对大环内酯类药物的耐药性及耐药机制的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(12): 141–144.
Yang HJ, Li XN, Wang YH, et al. Research progress on drug resistance and drug resistance mechanism of *Staphylococcus aureus* to macrolides [J]. J Anim Husbandry Vet Med, 2015, 47(12): 141–144.
- [3] 刘彩林. 金黄色葡萄球菌流行病学及致病机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
Liu CL. Epidemiology and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014.
- [4] Liu YL, Yang M, Zhang JP, et al. Human induced pluripotent stem cells for tumor targeted delivery of gold nanorods and enhanced photothermal therapy [J]. ACS Nano, 2016, 10(2): 2375–2385.
- [5] Zhang Y, Zhan X, Xiong J, et al. Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells [J]. Sci Rep, 2018, 8

(1): 8720.

- [6] Zhao Y, Tian Y, Cui Y, et al. Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target gram-negative bacteria [J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(35): 12349–12356.
- [7] 苏乐, 李华, 陈立军, 等. 浅表肿瘤治疗中光热疗法的应用效果探讨 [J]. 医学信息, 2015, (z1): 183–183.
Su L, Li H, Chen LJ, et al. Discussion on the application effect of photothermal therapy in superficial tumor treatment [J]. Med Inf, 2015, (z1): 183–183.
- [8] Zou X, Zhang L, Wang Z, et al. Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials [J]. J Am Chem Soc, 2016, 138(7): 2064–2077.
- [9] Dong K, Ju E, Gao N, et al. Synergistic eradication of antibiotic-resistant bacteria based biofilms in vivo using a nir-sensitive nanoplatfrom [J]. Chem Commun, 2016, 52(30): 5312–5315.
- [10] 任乐, 陈军, 杨席席, 等. RGDC 肽修饰的金纳米粒子协同光热疗法杀伤胰腺癌细胞的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(11): 59.
Ren L, Chen J Yang XX, et al. RGDC peptide modified gold nanoparticles and photothermal therapy exert synergistic efficacy in pancreatic cells [J]. J Anhui Med Univ, 2018, 53(11): 5–9.
- [11] Kirui DK, Krishnan S, Strickland AD, et al. PAA-derived gold nanorods for cellular targeting and photothermal therapy [J]. Macromol biosci, 2011, 11(6): 779–788.
- [12] Wu X, Ming T, Wang X, et al. High-photoluminescence-yield gold nanocubes: for cell imaging and photothermal therapy [J]. ACS Nano, 2010, 4(1): 113–120.
- [13] Hu D, Li H, Wang B, et al. Surface-adaptive gold nanoparticles with effective adherence and enhanced photothermal ablation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. ACS Nano, 2017, 11(9): 9330–9339.
- [14] Kang S, Bhang SH, Hwang S, et al. Mesenchymal stem cells aggregate and deliver gold nanoparticles to tumors for photothermal therapy [J]. ACS Nano, 2015, 9(10): 9678–9690.

[收稿日期] 2018-12-19