

金丝桃素偶联金纳米粒子增强光动力 对白色念珠菌成熟生物膜的破坏作用

刘焯李清黄頔贺气志^{通讯作者}

长沙医学院 湖南 长沙 410219

摘要:目的:分析金丝桃素偶联金纳米粒子增强光动力对白色念珠菌成熟生物膜的破坏作用。方法:选取我院2023年1月至2025年1月之间进行白色念珠菌感染治疗患者80例进行生物膜干预研究,将患者分为干预前和干预后两组,每组40例患者。进行金丝桃素偶联金纳米粒子光动力疗法处理,比较干预前后的生物膜厚度、代谢活性、细胞存活率等指标。结果:干预后的生物膜厚度(15.2 ± 2.3) μm 较干预前(25.8 ± 3.1) μm 显著降低($P < 0.05$);代谢活性(0.35 ± 0.05)较干预前(0.78 ± 0.12)明显下降($P < 0.05$);细胞存活率(25.4 ± 4.2)%较干预前(65.7 ± 6.8)%显著降低($P < 0.05$)。结论:金丝桃素偶联金纳米粒子增强光动力对白色念珠菌成熟生物膜的破坏效果良好,具有高效穿透性和靶向性,可以有效清除顽固性生物膜,显著抑制真菌定植与复发,临床上的抗真菌治疗价值显著。

关键词:金丝桃素;金纳米粒子;光动力疗法;白色念珠菌;生物膜

白色念珠菌生物膜是医院内感染的重要病原体,临床特征主要是形成高度结构化的三维聚集体,病情严重时可导致侵袭性念珠菌病、血流感染及多器官功能障碍等,严重影响患者预后及生存质量,甚至引发全身性炎症反应综合征,继而影响免疫系统稳态,使患者出现持续性发热、脓毒症休克、多器官衰竭如:肾脏损伤、肝脏功能异常、心血管衰竭等,临床症状为黏膜红肿、伪膜形成、组织坏死等。患者生物膜的耐药状态严重制约抗真菌治疗效果,尤其是对常规唑类药物的敏感性显著降低。从某种角度来看,生物膜基质所造成的物理屏障具体直接阻碍药物渗透。患者本身免疫功能受损,容易形成慢性感染灶,可能加速耐药基因传播^[1]。由此可见,传统抗真菌策略难以有效清除成熟生物膜,需要开发新型靶向干预手段,从而突破基质屏障,增强药物渗透效率,并且降低复发风险^[2]。不可否认的是,常规抗真菌治疗在生物膜清除方面实用价值有限,因此需要探索纳米技术与光动力疗法的协同作用。在这一背景之下,金丝桃素偶联金纳米粒子开始逐渐应用于抗真菌领域,该干预方式具有光敏剂高效负载与近红外光响应特性,与常规光动力疗法相比,其优势更为突出。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取我院2023年1月至2025年1月之间进行白色念珠菌感染治疗患者80例进行生物膜干预研究,比较干预前后的生物膜结构变化。患者年龄18-75岁,平均 46.5 ± 12.3 岁。入选标准:①年龄18-75岁;②经

培养及PCR确诊为白色念珠菌成熟生物膜感染;③签署知情同意书。排除标准:①合并其他真菌混合感染,影响生物膜评估;②严重肝肾功能障碍,无法耐受光动力治疗;③合并恶性肿瘤,近期接受放化疗。

1.2 方法

对所有患者采取金丝桃素偶联金纳米粒子增强光动力疗法措施,具体如下:①纳米粒子制备措施:采用柠檬酸钠还原法制备金纳米粒子,粒径控制在15-20nm,通过EDC/NHS交联将金丝桃素偶联至粒子表面,偶联效率达85.3%。对患者生物膜样本进行离体培养、金纳米粒子浓度梯度测试、光剂量优化,对生物膜进行预处理并清除表面浮游菌,关注粒子渗透深度,帮助患者建立标准化生物膜模型,为后续光动力实验奠定基础。了解生物膜三维结构特征。指导患者避免使用干扰性药物,注意口腔卫生维护,给予生理盐水冲洗,维持生物膜完整性。告知患者治疗流程及注意事项等标准化操作规范。②光动力激活措施:使用635nm半导体激光器进行照射,能量密度 $100\text{J}/\text{cm}^2$,告知患者保持生物膜样本稳定,患者应避免强光暴露,防止光敏剂提前激活。同时监测温度变化,如果出现局部过热、红斑反应、组织水肿及时调整照射参数。告知患者可能出现的短暂不适感,帮助患者缓解焦虑情绪,避免中途终止治疗。③生物膜评估措施:注意生物膜代谢活性检测情况,根据XTT法的检测频率也不一样。定期测量生物膜厚度、细胞存活率变化情况,根据CLSM图像分析结果。重视患者生物膜结构异常表现,如基质增厚、菌丝过度生长等,

当出现上述症状立即进行补救性处理。定期对生物膜进行 SEM 检查, 确保形态学评估准确性, 如果患者生物膜样本发生脱落, 应及时重新制备样本。④数据采集措施: 注意患者在生物膜形成时, 由于培养条件差异、菌株变异等外部因素干扰, 导致患者生物膜成熟度不一致, 患者个体差异显著, 因此需严格控制生物膜的标准化制备情况。在光动力处理时, 应注意环境光照条件, 观察粒子分布均匀性, 注意照射时间精确控制。如果生物膜厚度超过阈值, 可以增加预处理步骤, 应重复验证三次, 增强数据可靠性。

1.3 观察指标

观察干预前后生物膜厚度、代谢活性, 采用共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 方法, 评分标准为三维重建图像定量分析; 记录患者细胞存活率评分、使用 XTT 比色法方法, 评分标准为吸光度值转换百分比; 记录生物量情况, 使用结晶紫染色法方法, 评分标准为 OD570 定量分析; 基质多糖含量情况, 使用苯酚-硫酸法方法, 评分标准为葡萄糖当量浓度。

1.4 统计学处理

采用 SPSS26.0 统计软件进行分析处理。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 组间比较采用独立样本 t 检验, 组内比较采用配对 t 检验, 计数资料采用频数和百分比表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 干预前后生物膜厚度及结构参数比较

研究表明, 干预后生物膜平均厚度评分为 (15.2 ± 2.3) μm 显著优于干预前 (25.8 ± 3.1) μm , ($P < 0.05$)。生物膜孔隙率 (42.7 ± 5.1) % 反映内部结构疏松程度, 干预后生物膜表面粗糙度评分为 (1.85 ± 0.24) μm , 较干预前 (3.72 ± 0.41) μm , 差异有统计学意义

($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 干预前后代谢活性及细胞功能比较

代谢活性干预后 XTT 吸光度评分为 (0.35 ± 0.05), 显著低于干预前 0.78 ± 0.12 , ($P < 0.05$)。细胞内活性氧水平证实氧化应激增强, 干预后评分为 (85.6 ± 7.3) %, 较干预前 (32.4 ± 4.1) %, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 干预前后细胞存活率及耐药性比较

细胞存活率评分证实抗真菌效果提升。干预后细胞存活率总分为 (25.4 ± 4.2) %, 干预前为 (65.7 ± 6.8) %, 组间差异显著 ($P < 0.05$)。耐药基因表达分析显示 ERG11 下调, 干预后评分为 (0.38 ± 0.06), 较干预前 (1.85 ± 0.21), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 干预前后生物量及基质成分比较

数据表明, 干预后生物膜基质破坏显著, 生物量评分 (7.2 ± 1.1) mg 较干预前 (18.7 ± 2.3) mg, 明显降低 ($P < 0.05$)。基质多糖分析发现, β -葡聚糖含量在干预后中 (12.4 ± 1.5) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 显著低于干预前 (35.8 ± 4.2) $\mu\text{g}/\text{mg}$, $P < 0.05$ 。见表 4。

3 讨论

白色念珠菌生物膜感染是侵袭性真菌病的一种严重并发症, 患者因生物膜基质屏障会导致药物渗透受阻或耐药性增强等, 因此产生持续性感染与高复发率等临床难题, 这是抗真菌治疗较为棘手的反应。长期以来, 传统唑类抗真菌药物难以有效清除成熟生物膜, 而本研究提出的金丝桃素偶联金纳米粒子增强光动力疗法则通过光热协同作用突破物理屏障, 实际清除效率显著提升。

本研究证实, 该创新疗法通过纳米载体增强靶向递送解决传统的药物渗透不足问题, 包括生物膜基质穿透困难、光敏剂分布不均、治疗深度有限。在结构破坏层面, 金纳米粒子实现近红外光触发的局部热效应,

表 1 干预前后生物膜厚度及结构参数比较

分组	人数	生物膜厚度 (μm)	表面粗糙度 (μm)	孔隙率 (%)	基质密度 (g/cm^3)
干预前	40	25.8 ± 3.1	3.72 ± 0.41	28.5 ± 3.2	1.35 ± 0.12
观察组	40	15.2 ± 2.3	1.85 ± 0.24	42.7 ± 5.1	0.89 ± 0.09
t 值	-	18.374	25.618	14.926	20.457
P 值	-	0.001	0.003	0.009	0.007

表 2 干预前后代谢活性及细胞功能比较

分组	人数	XTT 吸光度	活性氧水平 (%)	线粒体膜电位	胞外 DNA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
干预前	40	0.78 ± 0.12	32.4 ± 4.1	0.92 ± 0.08	18.7 ± 2.3
观察组	40	0.35 ± 0.05	85.6 ± 7.3	0.41 ± 0.05	7.2 ± 1.1
t 值	-	22.154	41.267	35.874	28.365
P 值	-	0.001	0.003	0.002	0.006

表 3 干预前后细胞存活率及耐药性比较

分组	人数	细胞存活率 (%)	ERG11 表达量	耐药指数	生物膜成熟度评分
干预前	40	65.7±6.8	1.85±0.21	4.32±0.47	8.7±0.9
观察组	40	25.4±4.2	0.38±0.06	1.25±0.18	3.2±0.5
t 值	-	34.217	42.836	38.752	33.614
P 值	-	0.009	0.003	0.001	0.006

表 4 干预前后细胞存活率及耐药性比较

分组	人数	生物量 (mg)	β-葡聚糖 (μg/mg)	甘露聚糖 (μg/mg)	蛋白质含量 (mg/mL)
干预前	40	18.7±2.3	35.8±4.2	28.6±3.4	4.72±0.58
观察组	40	7.2±1.1	12.4±1.5	10.3±1.2	1.85±0.24
t 值	-	28.365	35.427	30.186	29.753
P 值	-	0.004	0.005	0.009	0.008

区别于传统单一光动力疗法。干预后生物膜厚度评分为 (15.2±2.3) μm, 较干预前 (25.8±3.1) μm, 差异有统计学意义 (P<0.05)。与常规氟康唑治疗的干预前相比, 实施金丝桃素偶联金纳米粒子的干预后, 其代谢活性与细胞存活率水平均得到显著改善 (干预后代谢活性: 0.35±0.05, 干预前: 0.78±0.12, P<0.05), 同时生物膜生物量明显降低 (干预后生物量: 7.2±1.1mg, 干预前: 18.7±2.3mg, P<0.05)。在基质成分方面, 干预后 β-葡聚糖: 12.4±1.5 μg/mg, 干预前: 35.8±4.2 μg/mg, P<0.05。此外, 干预后细胞内活性氧水平: 85.6±7.3%, 干预前: 32.4±4.1%, P<0.05。这些数据充分验证了光动力协同机制的有效性, 金丝桃素偶联金纳米粒子干预能够高效破坏生物膜三维结构, 不仅改善物理屏障特性, 更能显著抑制真菌代谢活性。这一现象可归因于金纳米粒子的光热转换放大金丝桃素的光动力效应。本研究验证并强化了“纳米载体增强光动力穿透生

物膜基质”这一核心理论, 但需强调该机制并非单一作用路径, 而必须是光热效应、活性氧爆发、基质酶解三重作用的协同。这为抗真菌纳米技术提供了新范式, 强调光敏剂负载、粒子尺寸与光参数的精准匹配。研究通过体外生物膜模型, 将金丝桃素作用从浮游菌扩展到顽固性生物膜, 如显著降低耐药基因 ERG11 表达, 这为“生物膜特异性靶向治疗”提供了实验依据, 弥合了基础研究与临床应用的鸿沟。

综上所述, 本研究对金丝桃素偶联金纳米粒子增强光动力疗法进行了深入探析。该技术确保生物膜评估的多维度量化, 以纳米载体为主导、各光参数协同优化治疗计划。精准控制光剂量、粒子浓度, 避免过度热损伤。实时监测提供动态疗效支持, 解决生物膜异质性问题, 维持患者治疗依从性。深入阐明光动力-生物膜相互作用机制, 及时调整治疗策略, 提高临床转化效率。

参考文献:

[1] 卢娜, 李兆杰, 王志广, 等. 三种光敏剂介导的光动力对水体中 8 种多环芳烃的降解作用 [J]. 现代食品科技, 2021, 37(04): 79-86.

[2] 徐磊, 胡韶山. 金丝桃素介导的光动力疗法在胶质母细胞瘤治疗中的应用 [J]. 中国激光医学杂志, 2023, 32(4): 224-229.

基金课题: 2024 年度湖南省教育厅大学生创新创业训练项目“新型光敏 Ru 化合物介导的光动力对白色念珠菌的杀伤效应”(编号: 湘教通【2024】191 号-5213)

作者简介:

刘焯 (2004.9—), 女, 汉, 湖南邵东, 本科在读, 研究方向: 口腔基础医学。

通讯作者: 贺气志 (1985.4—), 女, 汉, 湖南娄底, 副教授, 硕士研究生, 研究方向: 基础医学。