

近红外光响应的双相抗菌介孔生物活性玻璃 复合支架的制备及抗菌性能研究

张 博¹, 付一敏¹, 陈 政^{1,2}, 石 澳¹, 朱 敏¹

(1. 上海理工大学 材料与化学学院, 上海 200050; 2. 泰州学院 医药与化学化工学院, 泰州 225300)

摘 要: 骨植入材料易感染且具有高发性、迟发性和复发性。然而, 目前常见的抗菌手段通常缺乏选择性, 容易在杀菌的同时对正常组织和细胞造成损害。基于此, 本研究以介孔生物活性玻璃(MBG)为原料, 结合 S-NO 键的近红外(NIR)光热响应释放 NO 自由基及 Cu²⁺ 抗菌性能, 采用氨基化偶联 S-亚硝基硫醇(RSNO)制备了 MBG-RSNO 粉体以供给 NO·, 并通过多巴胺聚合及 Cu²⁺ 螯合合成了 PMBG@Cu 粉体。将上述两种粉体材料经 3D 打印得到 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合抗菌支架。该支架具有 NIR 光热响应特性, 在 808 nm 激光脉冲辐照条件下, 支架持续释放的一氧化氮自由基(NO·)含量高达 113.71 μg/100 mg MBG-RSNO, 且光热作用将温度升高至约 40 °C, 有利于实现高效灭菌。进一步使用金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*) 评估复合支架在有/无外部 NIR 刺激条件下的抗菌效果。实验结果显示, PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架对两种菌种的抗菌效率均达到了 99.9%。综上所述, PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架为解决骨植入材料的感染问题并实现骨缺损修复提供了一种潜在的解决方案。

关 键 词: 介孔生物活性玻璃; 抗菌; 一氧化氮; 光热效应

中图分类号: TQ171 文献标志码: A 文章编号: 1000-324X(2025)10-1137-08

Near-infrared Responsive Biphasic Antibacterial Mesoporous Bioactive Glass Composite Scaffolds: Preparation and Antibacterial Performance

ZHANG Bo¹, FU Yimin¹, CHEN Zheng^{1,2}, SHI Ao¹, ZHU Min¹

(1. School of Materials and Chemistry, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200050, China; 2. School of Pharmacy and Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou 225300, China)

Abstract: Bone implant-related infections are characterized by a high risk of delayed incidence or recurrence. Current antibacterial strategies often lack selectivity, leading to collateral damage to normal tissues and cells during bacterial eradication. To address this, mesoporous bioactive glass (MBG) was used as a base material in this study. By leveraging the near-infrared (NIR) photothermal response of S-NO bonds to release NO radicals and the antibacterial properties of Cu²⁺, MBG-RSNO powder was synthesized through amino-functionalized conjugation of S-nitrosothiols (RSNO) for nitric oxide free radicals (NO·) delivery, while PMBG@Cu powder was prepared via dopamine polymerization and Cu²⁺ chelation. These two powder materials were further processed through 3D printing to fabricate a

收稿日期: 2025-01-20; 收到修改稿日期: 2025-02-24; 网络出版日期: 2025-07-16

基金项目: 国家自然科学基金(52072246)

National Natural Science Foundation of China (52072246)

作者简介: 张 博(1999-), 男, 硕士研究生. E-mail: 15993162824@163.com

ZHANG Bo (1999-), male, Master candidate. E-mail: 15993162824@163.com

通信作者: 朱 敏, 副研究员. E-mail: mzhu@usst.edu.cn

ZHU Min, associate professor, E-mail: mzhu@usst.edu.cn

PMBG@Cu/MBG-RSNO composite antibacterial scaffold. This scaffold demonstrated a strong NIR photothermal response, with pulsed 808 nm laser irradiation enabling the sustained release of $\text{NO}\cdot$ up to $113.71\ \mu\text{g}$ per 100 mg of MBG-RSNO and increasing the temperature to approximately $40\ ^\circ\text{C}$, facilitating efficient bacterial elimination. Antibacterial performance of the scaffold was evaluated using *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) as representative Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively, with and without external NIR stimulation. The results revealed that the PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold achieved an antibacterial efficiency of 99.9% against both bacterial strains. In summary, the PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold offers a promising solution to address infection challenges in bone implant materials and supports bone defect repair.

Key words: mesoporous bioactive glass; antibacterial; nitric oxide; photothermal effect

由创伤、肿瘤、先天畸形、骨质疏松和骨关节炎等引起的骨缺损,需植入物辅助修复。为克服同/异种移植供体有限及免疫排斥、感染等问题^[1],新型合成材料将逐渐替代传统材料^[2-4]。其中,MBG 具有较大的比表面积、可调的孔径分布与表面化学性质以及优异的生物活性,能够诱导材料自身与周围组织结合并引导骨组织再生,是一种优良的骨修复人工合成材料。目前,MBG 植入材料往往通过模板复制、静电纺丝、3D 打印等技术以 3D 多孔支架形式填充骨缺损,不仅能够提供机械支撑、保持周围组织形态和完整性^[5-7],而且其支架多级孔道结构还便于担载不同尺寸的药物分子,实现植入部位的原位缓释^[8-9],从而抵御可能发生的感染风险,进一步提升安全性。

然而,抗生素缓释应对植入物细菌感染可能引发细菌耐药性^[10],构成更高的公共卫生安全威胁。因此,开发并选择新型抗菌剂和抗菌策略十分必要。 $\text{NO}\cdot$ 是一种内源性自由基,通过亚硝化和氧化应激作用破坏细菌膜并干扰其细胞功能,从而实现抗菌^[11]。聚碳酸酯氨基甲酸酯-硅橡胶薄膜可释放 NO ,因而在其表面的活细菌数量减少了 99%以上^[12]。引入少量 NO 可显著增强抗菌剂对生物膜的作用效力^[13]。但是,如何可持续地供应并输运 NO 至感染部位仍面临挑战^[14]。RSNO 类物质是 NO 供体类物质,其分子稳定性较高,合成过程较简单,且 RSNO 可通过二价铜离子、抗坏血酸盐以及光照等方式催化释放 NO ,避免了释放时间短和流失过快的问题^[15-16]。以 RSNO 作为 NO 供体,用于治疗内皮功能障碍相关的心血管疾病,显示出显著的疗效^[17]。Shen 等^[18]通过光氧化还原催化,在(深)红光照射下实现了 NO 的局部递送,将其用于治疗皮肤脓肿感染,表现出显著的抗菌效果并可加速伤口愈合。Dong 等^[19]则利用 NIR 远程控制 NO 释放,有效清除耐药细菌形成的生物膜。这表明光热疗法可有效辅助支架抗菌。铜(Cu)作为人体必需元素,无论以金属形式还是化

合物形式存在,均展现出广谱抗菌特性^[20-22]。值得注意的是, Cu^{2+} 因具有刺激血管生成、促进成骨等特点而备受关注。Cordeiro 等^[23]合成的 Cu 负载膜展现出良好的抗菌性能与生物相容性。Taylor-Edinbyrd 等^[24]通过分子动力学模拟,研究了 Cu 催化剂调控 RSNO 释放 NO 的机制,进一步验证了其在调节 NO 释放中的作用。因此,将 Cu^{2+} 作为抗菌剂和 RSNO 释放 NO 催化剂具有可行性。

本研究针对骨植入材料易感染且迟发复发的问題,设计了螯合 Cu^{2+} 和表面偶联 NO 供体两种抗菌材料的复合支架(PMBG@Cu/MBG-RSNO),探索了杀菌性 Cu^{2+} 持续释放和光热响应 $\text{NO}\cdot$ 释放的协同抗菌作用机制(图 1),并探讨了复合支架的形貌与结构、光热响应与 $\text{NO}\cdot$ 释放性能、体外抗菌性能之间的规律,以期复合支架材料应用于抗感染骨修复提供依据。

1 实验方法

1.1 MBG 及其改性粉体的制备

根据文献[25]使用溶胶-凝胶法合成 MBG 粉体材料后,进一步进行多巴胺修饰和氨基功能化改性,具体过程如下。

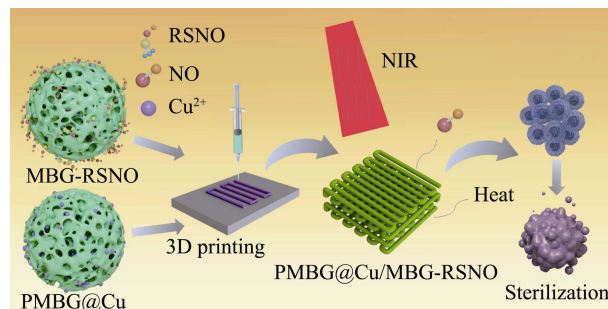


图 1 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架的制备及抗菌机制示意图

Fig. 1 Schematic diagram of preparation and antimicrobial mechanism of PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold

多巴胺修饰的 MBG 粉体的制备: 将 1 g MBG 与 0.5 g 多巴胺盐酸混合在 250 mL Tris-HCl 缓冲溶液(0.01 mol/L, pH 8.5)中, 搅拌 6 h, 清洗干燥得到 PMBG; 接着, 将 1 g PMBG 粉体加入 250 mL Cu^{2+} 水溶液(80 mmol/L)中, 搅拌 5 h, 冲洗、干燥得到 PMBG@Cu 粉末。

氨基功能化改性的 MBG 粉体的制备: 取 1 g MBG, 加入 300 mL 乙醇, 在 80 °C 下加入 0.5 mL 3-三乙氧基硅丙胺, 油浴回流 24 h, 乙醇洗涤三次后, 干燥得氨基功能化的介孔氧化硅(MBG-NH₂)。

将乙酸和无水吡啶按 1 : 1 的体积比混合制得 A 溶液, 将 2.45 g *N*-乙酰-DL-青霉素溶解于 5 mL 吡啶制得 B 溶液, 将 B 溶液全部加入到 10 mL A 溶液中, 搅拌 24 h, 并在 80 °C 旋转蒸发 1 h。将黄色油状生成物溶解于氯仿中, 使用 HCl 洗涤三次, 随后再旋转蒸发 30 min, 得到硫代内酯。将 92 mg 硫代内酯加入 30 mL 二氯甲烷溶液中, 随后加入 112 mg MBG-NH₂, 在 25 °C 氮气环境中反应 5 h。之后用二氯甲烷进行洗涤、干燥, 得到硫代内酯修饰功能化的 MBG-NAP。

在 4 mL 甲醇中依次加入 120 mg MBG-NAP 和 2 mL HCl, 再缓慢滴加亚硝酸钠溶液(68 mg 亚硝酸钠与 2 mL 去离子水), 在 0 °C 黑暗条件下反应 30 min 后, 用甲醇洗涤三次, 干燥得到 MBG-RSNO。

1.2 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架的制备

将 PMBG@Cu 和 MBG-RSNO 按照一定比例混合过筛后, 以左旋聚乳酸(PLLA)为黏结剂, 制备打印浆料并按照下述打印参数进行 3D 打印: 压力为 2.0~4.5 bar (1 bar=0.1 MPa), 速度为 3~6 mm/s, 打印针头直径为 400 μm , 打印出的相邻线条间距为 0.5 mm, 打印层面夹角为 60°。其中粉体与 PLLA 的质量比为 1 : 0.75, 得到的复合支架样品命名为 PMBG@Cu/MBG-RSNO。

1.3 MBG 及改性粉体表征

采用比表面积测试仪(Micromeritics Tristar 3020)对粉体比表面积进行测试; 采用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Perkin Elmer, SPECTRUM 100)对粉体的官能基团和化学键进行定性分析; 采用场发射透射电子显微镜(TEM, FEI Talos F200X G2)对 MBG 粉体的孔道结构进行分析。

1.4 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的形貌表征

使用扫描电子显微镜(SEM, FEI Quanta 450)对 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架进行表征, 观察其表面形貌。

1.5 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的光热性能表征

在干态和湿态(磷酸盐缓冲溶液, PBS, pH 6.2)

条件下, 使用 808 nm 激光辐照(光斑直径 10 mm, 激光头距离支架 70 mm)测试 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架的光热效应。调整激光功率分别为 0.50、0.75 和 1.00 W/cm², 持续照射 5 min, 分别记录复合支架周围环境的温度变化。为评估复合支架光热性能的循环稳定性, 本实验在湿态环境下, 以 1.00 W/cm² 激光功率对支架进行 5 次光照循环测试, 记录升温变化。

1.6 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的 NO· 释放量测定

使用 2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧代-1-氧(PTIO)作为捕捉剂, 分别在持续光照和脉冲光照两种模式下, 检测 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架的 NO· 释放量。在持续光照模式下, 分别在光照 15 和 60 min 时定量检测 NO·。在脉冲光照模式中, 激光每次照射 3 min, 间隔 11.25 min, 循环照射 5 次, 收集 5 个时间点 NO· 的释放数据。实验以黑暗条件下的复合支架为空白对照, 并根据复合支架中 MBG-RSNO 的组分比例计算 NO· 释放量。

1.7 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的体外抗菌实验

选用 *S. aureus* 和 *E. coli* 研究 PMBG@Cu/MBG-RSNO 在有/无 NIR 条件下的抗菌性能。以 *E. coli* 为例, 将复合支架置于 24 孔板中并加入菌液(10⁹ CFU/mL; CFU: Colony-forming Unit), 保证支架与菌液的比例为 15 mg : 0.75 mL。实验分为空白组(无支架、无光照)、PMBG@Cu/MBG-RSNO 组和 PMBG@Cu/MBG-RSNO+NIR 组, 其中光照组采用 808 nm 激光脉冲模式(1.00 W/cm², 光照 3 min, 间隔 3 min, 循环至总光照时间 15 min)。共培养 24 h 后, 用平板计数法检测细菌存活率。每组支架设置 3 个平行样。

此外, 采用荧光染色和生物 SEM 表征细菌状态。分别用 SYTO-9(5 $\mu\text{mol/L}$)和 PI(2 $\mu\text{g/mL}$)工作液对菌体进行活/死染色, 并用激光共聚焦显微镜观察细菌活性。对共培养后的支架进行固定, 使用 2.5% 戊二醛固定 12 h, 体积分数 1% 锇酸固定 1~2 h, 并用梯度乙醇溶液进行脱水处理。随后对样品进行临界点干燥和镀膜后, 利用 SEM 观察细菌的形态变化。

2 结果与讨论

2.1 MBG 粉体材料的孔道及其改性分析

首先对 MBG 及其改性粉体的孔道结构、化学组成进行表征分析(图 2)。TEM 照片显示 MBG 的介孔孔道呈二维六方构型(图 2(a)), 与文献报道一致^[26]。介孔孔径约为 4.4 nm, 有利于后续硅烷偶联剂改性、Cu²⁺ 吸附和 RSNO 嫁接。FT-IR 谱图(图 2(b))显示, MBG-RSNO 在 1515 cm⁻¹ 处出现了 -N=O 基团

的振动吸收峰^[27], 证明 MBG 通过亚硝化成功偶联了 RSNO。比较 MBG、PMBG 和 PMBG@Cu 的 FT-IR 谱图发现, PMBG 和 PMBG@Cu 在 3446 cm^{-1} 处的氨基伸缩振动峰源于聚多巴胺氨基上的氢原子; 而 1636 和 1094 cm^{-1} 处的吸收峰分别归因于聚多巴胺苯环上的 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动和 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动。这些结果证实了 MBG 成功螯合了 Cu^{2+} 并偶联了 RSNO。

N_2 吸附-脱附实验显示所有样品均表现出 IV 型等温线(图 2(c)), 同时 p/p_0 在 $0.4\sim 0.8$ 范围内出现明显的吸附和脱附曲线分离, 表明 MBG 及改性材料均具有较均匀孔道^[28], 有利于抗菌因子持续稳定的释放。MBG-RSNO 的等温线上出现微弱突跳, 说明氨基改性后部分孔道被占据, 进一步偶联 RSNO 后孔道被占据更多, 导致比表面积和孔径逐渐减小。通过 Barrett-Joyner-Halenda(BJH)模型计算 MBG 及其改性粉体的比表面积, 结果显示 MBG、MBG- NH_2 和 MBG-RSNO 的比表面积分别为 374.3 、 291.1 和 $46.5\text{ m}^2/\text{g}$, 偶联 RSNO 后比表面积显著下降。对比 MBG、PMBG 和 PMBG@Cu 发现, 比表面积从 $376.2\text{ m}^2/\text{g}$ 下降至 $276.6\text{ m}^2/\text{g}$, 并且螯合 Cu^{2+} 后进一步下降至 $200.3\text{ m}^2/\text{g}$, 表明偶联与螯合过程中孔道被占据是导致比表面积下降的主要原因。如图 2(d) 所示, MBG 粉体偶联与螯合前后的孔径均集中在 $3\sim 4\text{ nm}$ 范围内, 进一步证明所制备材料为介孔材料, 与 TEM 及 N_2 吸附-脱附实验结果一致。

2.2 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的结构与光热响应性能

图 3 显示了 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的 SEM 照片。3D 打印支架呈现三维连通的规则有序大孔结构, 有利于后续细胞附着、增殖、分化以及氧气和营养物质的传输。各打印层平行排列, 层间夹角约为 60° , 打印直径约为 $400\text{ }\mu\text{m}$, 间距约为 $600\text{ }\mu\text{m}$, 与软件设定基本一致。由图 3 展示的微观尺度下的 PMBG@Cu/MBG-RSNO 表面形貌可见, 支架表面较为粗糙且均匀, 颗粒呈黏连状态, 不同相 MBG 不存在分界面。

为了研究 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的光响应产热性能, 本实验在干态和湿态环境下对比了光热效应(图 4(a, b))。在激光功率为 $1.00\text{ W}/\text{cm}^2$ 条件下, 干态环境中支架的平均温度在 5 min 内从 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 升至约 $54\text{ }^\circ\text{C}$, 湿态环境中平均温度从 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 升高至 $44\text{ }^\circ\text{C}$ 。湿态温度升高较慢, 主要是液相快速将热量分散至周围环境所致。升温原理是当聚多巴胺材料吸收光能时, 其内部结构会发生变化, 从而引发温度升高。当达到一定温度时, 材料发生热膨胀, 并引发热响应。对于 RSNO 而言, $\text{S}-\text{N}$ 键因键能较低, 在 $44\text{ }^\circ\text{C}$ 环境温度下就能断裂, 从而释放 NO 。^[29]此外, 细菌对温度较为敏感, $44\text{ }^\circ\text{C}$ 能抑制细菌生长并辅助杀灭细菌。这些结果证明了 PMBG@Cu/MBG-

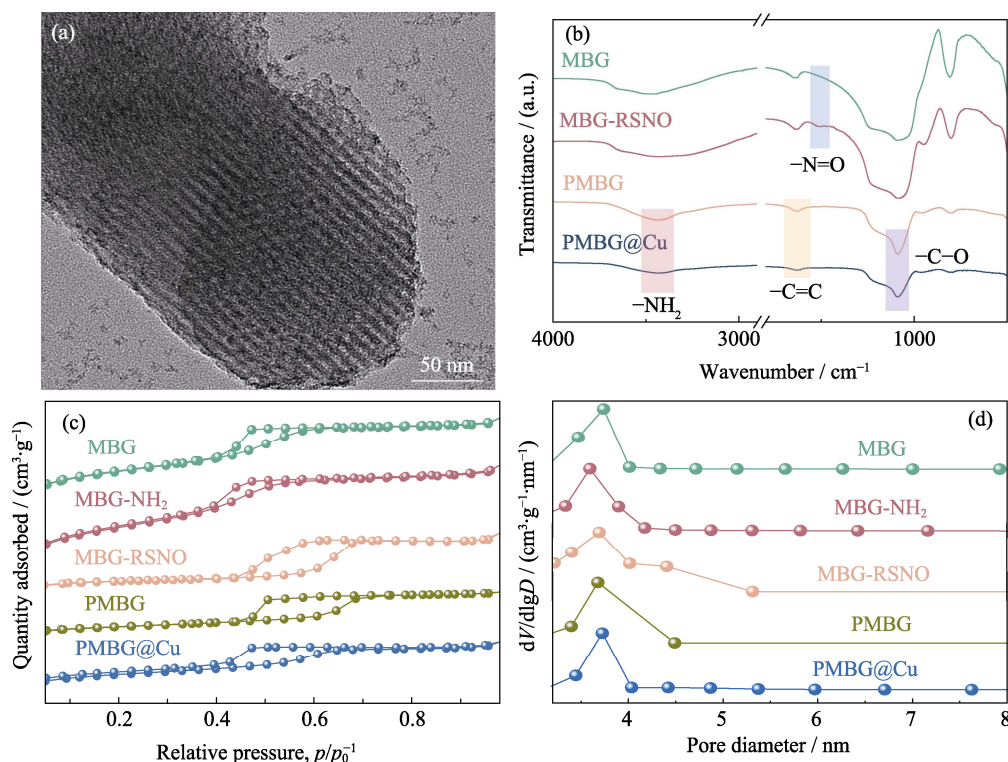


图 2 MBG 及其改性粉体的理化性能表征

Fig. 2 Physicochemical properties of MBG and modified powders

(a) TEM image of MBG; (b) FT-IR spectra; (c) N_2 adsorption-desorption isotherm curves; (d) Pore size distributions

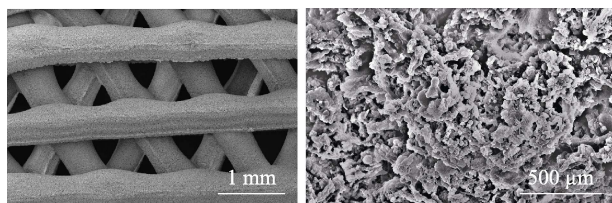


图 3 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架在不同放大倍数下的 SEM 照片

Fig. 3 SEM images of PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold at different magnifications

RSNO 复合支架具有良好的抗菌性能。

进一步研究 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的光热循环稳定性(图 4(c)), 发现经过多次激光照射后, 其最高平衡温度始终维持在 $(40.0 \pm 0.3)^\circ\text{C}$, 升温趋势未出现明显衰减, 证实该复合支架具有优异的光热转换稳定性^[30], 为其在长期光热治疗中的应用奠定了基础, 并具备持续近红外光照射下的抗菌潜力。

图 4(d~f)为 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架在干态环境下分别以 0.50、0.75 和 1.00 W/cm² 功率激光照射的热成像图。结果显示, 支架中心区域温度最高, 温度从中心向外依次递减, 直观展现了支架在 NIR 照射下的温度分布。

2.3 PMBG@Cu/MBG-RSNO 释放 NO[·]性能

采用电子顺磁共振(EPR)研究了 808 nm 激光照射下复合支架的 NO[·]释放性能。将 MBG-RSNO 粉末与 PTIO 混合并在黑暗条件下检测, 结果显示

PTIO 的 EPR 信号未发生变化, 表明 NO[·]没有提前泄漏, 证明 PMBG@Cu/MBG-RSNO 具有优异的稳定性和安全性。随后采用三种不同照射程序对混合粉末进行测试。结果表明, 无论是持续照射还是脉冲照射, EPR 图谱均由五重峰转变为七重峰^[31-33], 证明 NO[·]可成功释放(图 5(a, b)), 同时也说明了复合支架具有可控的光热响应性能。此外, 通过定量计算技术测定不同光照时间点的 NO[·]释放量发现, 在持续照射 15 和 60 min 条件下, 每 100 mg MBG-RSNO 产生的 NO[·]含量分别为 68.32 和 113.73 μg, 而脉冲照射累计总时长达到 15 min 时, NO[·]释放量为 113.71 μg(图 5(c))。对比三种照射程序, 发现脉冲照射 15 min 的平均释放速率为 7.58 μg/min, 持续照射 15 和 60 min 的平均释放速率为 4.55 和 1.90 μg/min。此脉冲模式下的瞬时释放速率显著高于持续释放, 且 NO[·]释放量与持续照射 60 min 相似, 消耗的能量更少, 因此脉冲照射的效果优于持续照射。这表明脉冲模式在光控 NO[·]释放中具有潜在优势, 可利用不同光照模式来精准控制局部 NO[·]的释放量, 确保 NO[·]释放的安全可控性。

2.4 PMBG@Cu/MBG-RSNO 体外抗菌性能

本实验采用平板计数法估算抗菌效果, 以研究 PMBG@Cu/MBG-RSNO 在有/无外部 NIR 刺激下的抗菌性能(图 6(a, b))。在无支架、无光照的空白组中, 观察到产生大量菌落; 而在 PMBG@Cu/MBG-

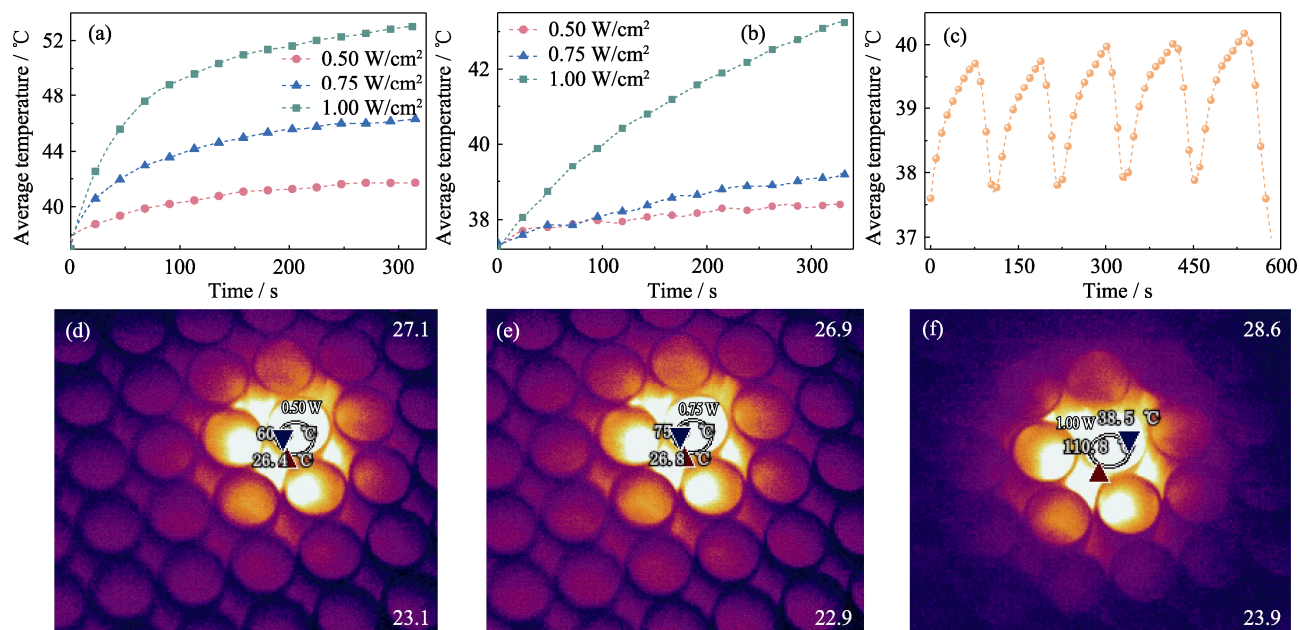


图 4 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架的光热响应性能

Fig. 4 Photothermal response performance of PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold

(a, b) Photothermal curves in (a) dry state environment and (b) wet state environment; (c) Photothermal cycling curves under 1.00 W/cm² laser irradiation in dry state environment; (d-f) Thermal images under dry state environment at power densities of (d) 0.50, (e) 0.75 and (f) 1.00 W/cm²

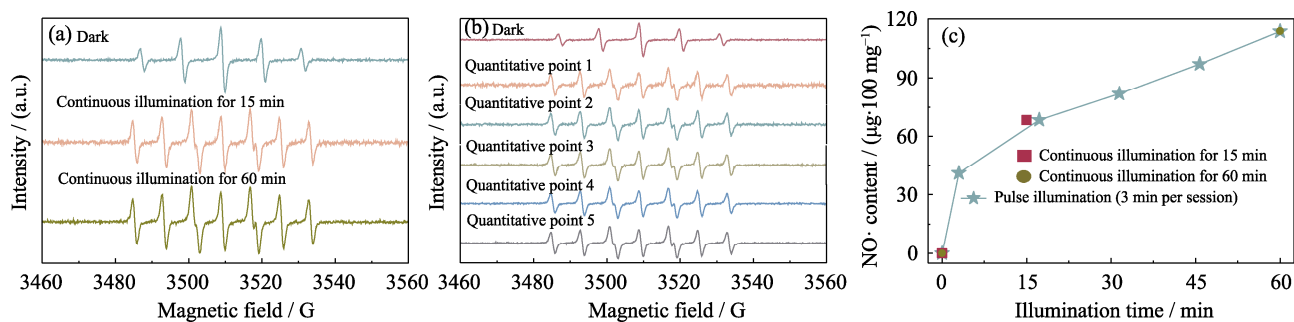


图 5 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架释放 NO· 的性能分析

Fig. 5 Analysis of NO· release from PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold

(a) EPR spectra under continuous illumination for 15 and 60 min; (b) EPR spectra with a cumulative total illumination time of 15 min within 60 min under pulsed illumination; (c) Released content of NO·

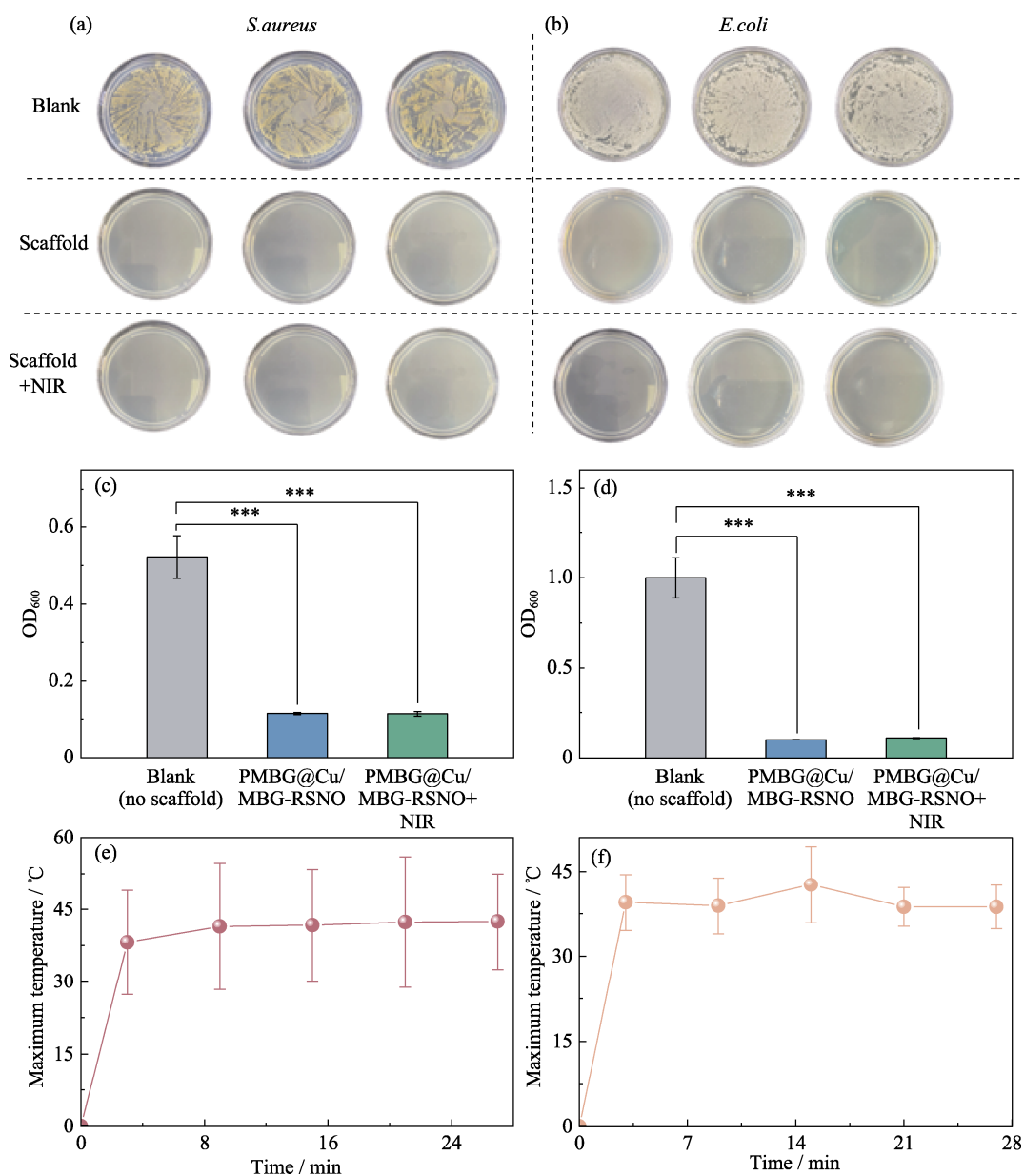


图 6 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架的体外抗菌效果及光热温度分析

Fig. 6 *In vitro* antibacterial effect and photothermal temperature analysis of PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold

(a, b) Photos of (a) *S. aureus* group and (b) *E. coli* group; (c, d) OD values of (c) *S. aureus* and (d) *E. coli* under UV-Vis with asterisks indicating statistically significant difference of treatments vs. untreated culture (***) indicates $p < 0.001$; (e, f) The highest temperature of (e) *S. aureus* and (f) *E. coli* under 5 times pulsed illumination by 808 nm laser at a power density of 1.00 W/cm^2

RSNO 组和 PMBG@Cu/MBG-RSNO+NIR 组中, 无论是否有光照刺激, 两者均表现出显著的抗菌效果。在黑暗条件下, PMBG@Cu/MBG-RSNO 中的 Cu^{2+} 在体液环境中缓慢释放, 通过改变细胞膜结构来破坏细菌代谢与生理功能, 阻碍细菌获取能量, 从而实现抗菌效果。在光照情况下, 复合支架释放的 $\text{NO}\cdot$ 可与氧气反应自发产生活性氮氧化物 (RNOS), 随后通过改变 DNA、抑制酶活性和诱导脂质过氧化等对细菌细胞造成氧化和亚硝化损伤, 同时维持局部温度在 $40\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内, 可使细菌膜蛋白变性, 抑制细菌生长, 辅助抗菌。另外, Cu^{2+} 的持续释放也起到抗菌效果。值得注意的是, 使用 UV-Vis 测试细菌在 600 nm 处的吸光度 (OD_{600} , 图 6(c, d)) 进一步证实了无论是否有光照刺激, 复合支架均能表现出显著的抗菌效果^[34]。

在脉冲照射条件下对 *S. aureus* 组和 *E. coli* 组的最高温度变化进行分析 (图 6(e, f))。结果显示, 在 30 min 内进行 5 次脉冲照射后, *S. aureus* 组和 *E. coli* 组的平均最高温度均达 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。由于支架完全浸没在菌液中, 光热效应产生的热量快速扩散至液相, 使最高温度稳定在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右。这一温度能够有效杀死细菌^[35], 且不会对正常细胞造成损伤。

为了进一步评估 PMBG@Cu/MBG-RSNO+NIR 对细菌细胞活力和形态的影响, 本实验对细菌作了活/死染色和共聚焦电镜观察。图 7(a, b, d, e, g, h) 为 *S. aureus* 的共聚焦显微照片。通过对比图 7(a, d, g) 发现, 空白组中显示出显著绿色活细菌信号, 而在 PMBG@Cu/MBG-RSNO 和 PMBG@Cu/MBG-RSNO+NIR 组中, 观察到显著的红色死细菌信号 (图 7(e, h))。结果表明, 复合支架在有/无 NIR 照射情况下都能够有效杀死细菌^[36]。对比有/无 NIR 照射对抗菌活性的影响, 发现两者的绿色信号相差较少, 说明两者的抗菌效果相似, 这与上述结论相符。由于双相中 Cu^{2+} 的占比较高, 有无 NIR 照射下抗菌性能无明显差异, 但 Cu^{2+} 的持续释放会产生安全性问题, 因此本研究为后续可控响应支架组分比例提供了理论依据。图 7(c, f, i) 分别为空白组、无光照组和 NIR 照射组在与 *S. aureus* 共培养后的 SEM 照片。从图中可见, 后两者的细菌由完整形态变为皱缩破裂状态^[37] (白色箭头所示), 细胞质泄漏导致细菌死亡。这一结果从微观角度进一步证实了 PMBG@Cu/MBG-RSNO 的优异抗菌性能。

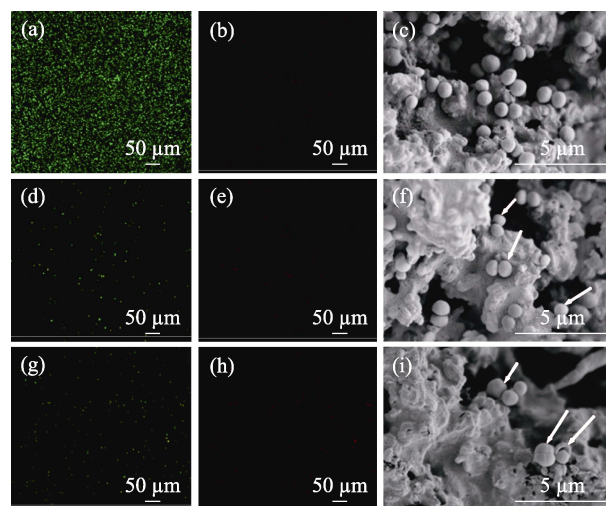


图 7 PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架在有/无 NIR 照射下的抗菌性能及 SEM 照片

Fig. 7 Antimicrobial properties and SEM images of PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold with and without NIR illumination

(a, b) Confocal images of (a) SYTO-9 and (b) PI staining for the blank group of *S. aureus*; (d, e) Confocal images of (d) SYTO-9 and (e) PI staining for PMBG@Cu/MBG-RSNO group of *S. aureus*; (g, h) Confocal images of (g) SYTO-9 and (h) PI staining for PMBG@Cu/MBG-RSNO+NIR group of *S. aureus*; (c, f, i) SEM images of PMBG@Cu/MBG-RSNO composite scaffold with and without NIR illumination

3 结论

本研究通过整合双相抗菌因子, 构建了具有治疗特性的多功能骨修复支架。该支架通过负载 Cu^{2+} 离子与 RSNO, 并借助 3D 打印技术赋予了支架三维贯通大孔结构, 实现了双相协同抗菌。该复合支架在 NIR 照射下具有良好的热稳定性; 在脉冲照射 15 min 时比相同时间持续照射的 $\text{NO}\cdot$ 释放量更高, 且光热效应最高温度稳定在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右, 在避免高温损伤正常组织的同时增强细菌膜的通透性。体外抗菌实验证实, 该复合支架通过破坏细菌膜完整性, 对革兰氏阳性和阴性菌均展现出大于 99.9% 的广谱杀菌效果。综上所述, PMBG@Cu/MBG-RSNO 复合支架通过化学动力治疗、气体治疗与光热调控相结合的策略, 可使其在骨缺损修复领域拥有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] SZOSTAKOWSKI B, DEMAIO M. Ideal xenograft or a perfect bone substitute?—A retrospective review and analysis of the historical concept of ivory implants in orthopaedics. *International Orthopaedics*, 2020, **44**(5): 1003.
- [2] NGUYEN T T, JANG Y S, KIM Y K, et al. Osteogenesis-related

- gene expression and guided bone regeneration of a strontium-doped calcium-phosphate-coated titanium mesh. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, **5**(12): 6715.
- [3] PARÉ A, CHARBONNIER B, TOURNIER P, *et al.* Tailored three-dimensionally printed triply periodic calcium phosphate implants: a preclinical study for craniofacial bone repair. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020, **6**(1): 553.
 - [4] NAIR L S, LAURENCIN C T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 2007, **32**(8/9): 762.
 - [5] ZHANG L, YANG G, JOHNSON B N, *et al.* Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomaterialia*, 2019, **84**: 16.
 - [6] JODATI H, YILMAZ B, EVIS Z. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: effects of structural features. *Ceramics International*, 2020, **46**(10): 15725.
 - [7] O'BRIEN F J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 2011, **14**(3): 88.
 - [8] ZHU Y, KASKEL S. Comparison of the *in vitro* bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2009, **118**(1/2/3): 176.
 - [9] DU X, WEI D, HUANG L, *et al.* 3D printing of mesoporous bioactive glass/silk fibroin composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2019, **103**: 109731.
 - [10] SHUKLA R, LAVORE F, MAITY S, *et al.* Teixobactin kills bacteria by a two-pronged attack on the cell envelope. *Nature*, 2022, **608**(7922): 390.
 - [11] WORLEY B V, SLOMBERG D L, SCHOENFISCH M H. Nitric oxide-releasing quaternary ammonium-modified poly(amidoamine) dendrimers as dual action antibacterial agents. *Bioconjugate Chemistry*, 2014, **25**(5): 918.
 - [12] CHUG M K, BACHTIAR E, NARWOLD N, *et al.* Tailoring nitric oxide release with additive manufacturing to create antimicrobial surfaces. *Biomaterials Science*, 2021, **9**(8): 3100.
 - [13] BARRAUD N, HASSETT D J, HWANG S H, *et al.* Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(21): 7344.
 - [14] MIYAHARA Y, NAGAYA N, KATAOKA M, *et al.* Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Medicine*, 2006, **12**(4): 459.
 - [15] ANJU B S, NAIR N R, RAJPUT J, *et al.* Role of ancillary ligands in S-nitrosothiol and NO generation from nitrite-thiol interactions at mononuclear zinc(II) sites. *Chemical Science*, 2024, **15**(43): 18000.
 - [16] DE ALMEIDA H V, BOMEDIANO M P, CATORI D M, *et al.* Integrating 3D printing of biomaterials with nitric oxide release. *Biomaterials Science*, 2025, **13**(4): 858.
 - [17] PERRIN-SARRADO C, ZHOU Y, SALGUES V, *et al.* S-nitrosothiols as potential therapeutics to induce a mobilizable vascular store of nitric oxide to counteract endothelial dysfunction. *Biochemical Pharmacology*, 2020, **173**: 113686.
 - [18] SHEN Z, ZHENG S, XIAO S, *et al.* Red-light-mediated photoredox catalysis enables self-reporting nitric oxide release for efficient antibacterial treatment. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, **60**(37): 20452.
 - [19] DONG K, JU E, GAO N, *et al.* Synergistic eradication of antibiotic-resistant bacteria based biofilms *in vivo* using a NIR-sensitive nanoplatform. *Chemical Communications*, 2016, **52**(30): 5312.
 - [20] REN L, YANG K, GUO L, *et al.* Preliminary study of anti-infective function of a copper-bearing stainless steel. *Materials Science and Engineering: C*, 2012, **32**(5): 1204.
 - [21] WANG S, YANG C, REN L, *et al.* Study on antibacterial performance of Cu-bearing cobalt-based alloy. *Materials Letters*, 2014, **129**: 88.
 - [22] KOYANAGI T, SAKAMOTO M, TAKEUCHI Y, *et al.* Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *Journal of Oral Microbiology*, 2010, **2**(1): 5104.
 - [23] CORDEIRO J M, BARÃO V A R, DE AVILA E D, *et al.* Tailoring Cu²⁺-loaded electrospun membranes with antibacterial ability for guided bone regeneration. *Biomaterials Advances*, 2022, **139**: 212976.
 - [24] TAYLOR-EDINBYRD K, LI T, KUMAR R. Effect of chemical structure of S-nitrosothiols on nitric oxide release mediated by the copper sites of a metal organic framework based environment. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, **19**(19): 11947.
 - [25] ZHU M, ZHANG J H, TAO C L, *et al.* Design of mesoporous bioactive glass/hydroxyapatite composites for controllable co-delivery of chemotherapeutic drugs and proteins. *Materials Letters*, 2014, **115**: 194.
 - [26] DEKA J R, SONG Y, YANG Y C. The influence of isothermal aging, surfactant and inorganic precursors concentrations on pore size and structural order of mesoporous bioactive glass. *Solid State Sciences*, 2018, **84**: 104.
 - [27] BRIGHT L M E, GARREN M R S, DOUGLASS M, *et al.* Synthesis and characterization of nitric oxide-releasing ampicillin as a potential strategy for combatting bacterial biofilm formation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, **15**(12): 15185.
 - [28] LIU Y, ZHANG S, ZHANG X H, *et al.* Porous PLGA/MBG scaffold enhanced bone regeneration through osteoimmunomodulation. *Composites Part B-Engineering*, 2024, **272**: 16.
 - [29] HUANG Y, HUANG J, JIANG M, *et al.* NIR-triggered theranostic Bi₂S₃ light transducer for on-demand NO release and synergistic gas/photothermal combination therapy of tumors. *ACS Applied Bio Materials*, 2019, **2**(11): 4769.
 - [30] WANG Y, WEN Y, QU Y, *et al.* Pillar[5]arene based glyco-targeting nitric oxide nanogenerator for hyperthermia-induced triple-mode cancer therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, **615**: 386.
 - [31] ZHANG Z Q, WU J Y, SHANG Z H, *et al.* Photocalibrated NO release from N-nitrosated naphthalimides upon one-photon or two-photon irradiation. *Analytical Chemistry*, 2016, **88**(14): 7274.
 - [32] DUAN Y T, WANG Y, LI X H, *et al.* Light-triggered nitric oxide (NO) release from photoresponsive polymersomes for corneal wound healing. *Chemical Science*, 2020, **11**(1): 186.
 - [33] GAO L, CHENG J, SHEN Z Q, *et al.* Orchestrating nitric oxide and carbon monoxide signaling molecules for synergistic treatment of MRSA infections. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, **61**(3): 9.
 - [34] NGUYEN T K, SELVANAYAGAM R, HO K K K, *et al.* Co-delivery of nitric oxide and antibiotic using polymeric nanoparticles. *Chemical Science*, 2016, **7**(2): 1016.
 - [35] SUN J, SONG L J, FAN Y, *et al.* Synergistic photodynamic and photothermal antibacterial nanocomposite membrane triggered by single NIR light source. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, **11**(30): 26581.
 - [36] SUN Y, XU W Z, JIANG C, *et al.* Gold nanoparticle decoration potentiate the antibacterial enhancement of TiO₂ nanotubes via sonodynamic therapy against peri-implant infections. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, **10**: 12.
 - [37] WU M Q, ZHANG Z Y, LIU Z R, *et al.* Piezoelectric nanocomposites for sonodynamic bacterial elimination and wound healing. *Nano Today*, 2021, **37**: 12.