DOI:10.16016/j.2097-0927.202405117

新型中性粒细胞响应性发光纳米胶束的构建及其在小鼠烧伤模型成像中的应用

胡 涛[1],郭嘉伟[2],张建祥[3] [1]重庆大学生物工程学院,重庆;陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系:[2]药物分析学教研室;[3]药剂学教研室,重庆

[摘要] **目的** 基于发光材料鲁米诺(Luminol)构建中性粒细胞响应性发光纳米胶束,并考察其在小鼠烧烫伤模型早期炎症中的成像能力。**方法** 以六氯三聚磷腈(hexachlorotripolyphosphazene,HCCP)为骨架材料,化学键合鲁米诺(Luminol)和聚乙二醇(polyethylene Glycol,PEG)合成两亲性发光材料LHP,并采用红外光谱、核磁氢谱等方法对LHP的化学结构进行表征;将LHP溶于去离子水自组装形成纳米胶束LHP NM,同时测定其粒径大小和电位,并采用透射电镜(transmission electron microscope,TEM)观察纳米胶束的形态;使用光纤光谱仪、微弱发光测量仪和小动物活体成像仪对纳米胶束的光谱学性质、化学发光规律和体外发光成像能力进行详细评价。使用70、80和90 ℃热水按简单随机抽样法分组对雌性Balb/c小鼠进行烫伤处理以建立Ⅰ度至深Ⅱ度小鼠烧烫伤模型,各组样本数n=10,通过H&E染色结果判断模型小鼠皮肤烫伤深度,采用荧光定量qPCR测定烫伤皮肤组织TNF-α,IL-1β、IL-6和髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)的mRNA表达水平,ROS检测试剂盒考察烧伤小鼠皮肤组织活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平随烫伤时间和深度变化的情况;采用FITC-Ly6G抗体标记中性粒细胞,观察模型小鼠皮肤组织中性粒细胞数量的变化;使用小动物活体成像系统考察纳米胶束LHP NM在小鼠烧烫伤模型中的成像能力,分析发光强度改变与中性粒细胞募集数量变化的相关性,对发光纳米胶束在小鼠烧烫伤模型早期炎症反应监测及烧烫伤深度能力诊断中的效果进行评价。**结果** 核磁谱图解析证实一个HCCP分子上约键合了5个鲁米诺单元和一个聚乙二醇(PEG)链,TEM和粒径测定结果表明所制备纳米胶束形态呈空心球形,粒径约为120.000 nm。体外发光实验中,在不同浓度活性氧和MPO条件下,纳米胶束能实现高亮且持续的化学发光,发光强度与活性氧水平及纳米胶束浓度呈现良好的剂量依赖性。细胞实验表明纳米胶束能够实现中性粒细胞响应性成像,发光强度与中性粒细胞数量和LHP NM剂量呈正相关,线性相关系数分别为r=0.98、0.99。动物实验结果表明,烧烫伤模型小鼠皮肤损伤组织中的中性粒细胞数量和活性氧水平显著升高(P<0.05)。实验发现,在24 h时间点,80 ℃与70 ℃处理组对比,中性粒细胞募集数量增加约86.4%,发光成像强度增加约71.5%,证明烧伤深度与损伤局部中性粒细胞募集数量具有相关性,且LHP NM可在模型小鼠中实现中性粒细胞响应性成像,其成像强度变化与皮肤损伤组织中的中性粒细胞数量和活性氧水平密切相关。**结论** 成功构建中性粒细胞响应性发光纳米胶束LHP NM,基于LHP NM可实现小鼠烧烫伤模型皮肤损伤组织的响应性成像,其发光强度可准确反映烧烫伤模型中的中性粒细胞浸润程度及ROS水平变化,从而实现小鼠烧烫伤模型早期炎症反应的实时监测,并为烧烫伤深度的诊断提供方法和策略。

[关键词] 烫伤;纳米胶束;中性粒细胞;活性氧

[中图法分类号] R363.2;R644 [文献标志码] A

[基金项目] 重庆市研究生导师团队建设项目2022

[通信作者] 张建祥,E-mail:jxzhang@tmmu.edu.cn

郭嘉伟,E-mail:breakhp@16.com

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:胡涛,郭嘉伟,张建祥.新型中性粒细胞响应性发光纳米胶束的构建及其在小鼠烧伤模型成像中的应用[J].陆军军医大学学报,2025,47(04):335-349.DOI:10.16016/j.2097-0927.202405117.

Citation:HU T,GUO J W,ZHANG J X.Preparation of novel luminescent nanomicelles responsive to neutrophils and their imaging application in mouse burn model[J].J Army Med Univ,2025,47(04):335-349.DOI:10.16016/j.2097-0927.202405117.

Preparation of novel luminescent nanomicelles responsive to neutrophils and their imaging application in mouse burn model

HU Tao[1], GUO Jiawei[2], ZHANG Jianxiang[3] [1]College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing; [2]Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry; [3]Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Objective To prepare neutrophil-responsive luminescent nanomicelles based on self-luminating compound, luminol, and investigate their imaging capability for a mouse burn model at early stage of inflammation. Methods Hexachlorotripolyphosphazene (HCCP) was utilized as the skeleton material to synthesize amphiphilic LHP luminescence materials through chemical synthesis of luminol and polyethylene glycol (PEG). The chemical structure of LHP was characterized using infrared spectrum and nuclear magnetic hydrogen spectrum. Nanomicelle LHP NM was formed by self-assembly of LHP in deionized water, and then its particle size and potential were measured. Transmission electron microscopy (TEM) was applied to observe the morphology of nanomicelles. Optical fiber spectrometer, weak luminescence measuring instrument, and small animal living imager were employed to evaluate the spectroscopic properties, chemiluminescence rules, and *in vitro* luminescence imaging ability of the nanomicelles. After that, female Balb/c mice were subjected to scalding with hot water at temperatures of 70 ℃, 80 ℃, and 90 ℃, respectively to establish a mouse burn model ranging from degree I to degree II burns. The depth of skin scalds in the model mice was determined through HE staining, while the expression levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 and myeloperoxidase (MPO) in the scalded skin tissues were assessed with fluorescence quantitative qPCR. The changes in reactive oxygen species (ROS) levels over time and burn depth in the skin tissues were determined with ROS detection kit. Additionally, the neutrophils within the skin tissues of model mice were labeled with FITC-Ly6G antibody to count the neutrophil number. Finally, a small animal imaging system was utilized to examine the imaging capability of nanomicelle LHP NM in a mouse burn model to analyze the correlation between luminous intensity and number of recruited neutrophil in order to evaluate the effectiveness of luminous nanomicelles for monitoring early inflammatory response and diagnosing burn depth in a mouse burn model. Results Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy confirmed the bonding of approximately 5 luminol units and a polyethylene glycol (PEG) chain to 1 HCCP molecule. TEM and particle size determination results demonstrated that the prepared nanomicelles were spherical, hollow structures in a diameter of around 120 nm. *In vitro* luminescence experiments revealed that the nanomicelles exhibited high brightness and sustained chemiluminescence under varying concentrations of ROS and MPO levels, with luminescence intensity dependent on both ROS level and nanomicelle concentration. The *in vitro* cellular experiments demonstrated that the nanomicelles exhibited neutrophil-responsive imaging capability. The luminescence intensity was positively correlated with both the number of neutrophils and the dose of LHP NM, with a linear correlation coefficient (r) of 0.98 and 0.99, respectively. *In vivo* animal study revealed a significant increase ($P<0.05$) in the count of neutrophils and ROS level in the skin tissue of burned and scalded mice. Notably, at the time point of 24 h, compared to the 80 ℃ and 70 ℃ treatment groups, the number of recruited neutrophils was increased by 86.4%, and the luminescent imaging intensity rose by 71.5%. These findings indicated that the severity of burns was correlated with the extent of neutrophil recruitment in the injured area, and LHP NM could effectively achieve neutrophil-responsive imaging in model mice. The changes in imaging intensity were closely associated with the number of neutrophils and the level of ROS in the injured skin tissue. Conclusion The neutrophil-responsive luminescent nanomicelle LHP NM is successful prepared, and the nanomicelles enable responsive imaging of skin damage in mouse burn model. The luminescence intensity

accurately reflects the neutrophil infiltration and ROS level, allowing for real-time monitoring of early inflammatory responses in mouse burn model. Additionally, this study provides methods and strategies for diagnosing burn depth.

[**Key words**] burn; nanomicelles; neutrophil; reactive oxygen species

Supported by the Project of 2022 Postgraduate Tutor Team Construction of Chongqing. Corresponding author: ZHANG Jianxiang, E-mail: jxzhang@tmmu.edu.cn; GUO Jiawei, E-mail: breakhp@16.com

烧伤是指皮肤、黏膜及皮下组织在受到高温液体、化学物质或放射线等作用后引起的组织损伤,是一项全球性的公共卫生问题。据统计,在我国每年约有2 000万不同程度的烧伤患者,发病率达1.5%~2.0%,其中住院率高达5%[1]。在烧伤病例中,组织的损伤情况复杂,目前临床上常依据损伤皮肤深度的差异将其划分为Ⅰ度烧伤、浅Ⅱ度烧伤、深Ⅱ度烧伤、Ⅲ度烧伤和Ⅳ烧伤[2]。Ⅰ度烧伤或浅Ⅱ度烧伤病例中,组织损伤以表皮层为主,治疗手段多为保守治疗,可较短时间恢复且无瘢痕形成,Ⅲ度烧伤和Ⅳ度烧伤涉及真皮乳头层、肌肉层甚至损伤体内脏器,需及时手术切除烧伤皮肤组织并进行皮肤移植。深Ⅱ度烧伤需医生结合烧伤面积及治疗过程恢复情况,判断是否需要手术治疗。目前对烧伤深度的临床诊断手段多以医生经验结合创面组织情况进行临床评估,准确率只能达到50%~75%[3-4]。高估烧伤深度会造成患者遭受过度治疗甚至多余手术,而低估损伤深度会造成组织感染、延长治疗时间及增加治疗成本的后果[5]。一些光学方法已经在烧伤的深度评估领域得到应用,包括激光开普勒分析检测真皮浅层的血细胞速度、温度记录法监测和一些皮肤镜检查技术等,但由于患者的烧伤情况复杂,随时间和空间变化快,以上的检测方法存在实时性差和检测步骤复杂等缺点[6]。因此,针对烧烫伤创面深度诊断,更加准确、高效和简易的诊断方案亟待开发。

研究证实,烧伤早期在损伤皮肤组织局部常伴随着剧烈的炎症,且中性粒细胞在急性炎症中扮演重要角色[7-8]。在病原体入侵机体或组织损伤发生时,中性粒细胞受趋化物质的影响,通过其表面的多种特异性受体与内皮细胞上的配体结合,从骨髓穿过内皮细胞进入血液并迁移到炎症部位,及时参与该部位的抗菌和组织修复过程[9-11]。但研究发现,作为第一类到达炎症部位的免疫细胞,中性粒细胞在一些病理环境中会维持有害或病理性的炎症,因此,此类情况下,中性粒细胞的募集数量及相关分子的表达量常被作为疾病严重程度的标志物[12-14]。因此,准确考察烧伤早期损伤皮肤局部中性粒细胞募集数量变化可作为烧伤深度诊断的潜在依据。

发光成像作为一种无创、快速的检测方法常用于评估诊断各种疾病的疾病进程。髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)在中性粒细胞中表达丰富,其可以与过氧化氢共同作用,催化卤素离子产生氧化剂参与免疫应答和病原体清除,如催化Cl^-生成ClO^-[15-16]。课题组早期研究发现,小分子探针鲁米诺依靠MPO-H_2O_2-卤素原子体系可以产生波长400~425 nm的光信号,因此其具备在中性粒细胞介导的炎症相关疾病中成像的应用潜力[17-18]。但研究发现,鲁米诺作为小分子材料,存在发光时间短且易被机体快速代谢排出等缺陷。开发基于鲁米诺的纳米递送平台是改善其在机体内的发光成像能力的有效方式。

综上,本研究拟设计合成了一种用于评估烧伤深度的响应性自发光材料LHP。这种材料以六氯磷腈为骨架,键合鲁米诺作为发光单元,期望其凭借鲁米诺单元响应中性粒细胞中MPO-H_2O_2-卤素原子体系发光的能力,以实现在小鼠烧烫伤模型中响应中性粒细胞的特异性成像。本研究通过动物实验考察不同深度中性粒细胞浸润存在的差异,并以此建立发光信号强度与局部的中性粒细胞募集程度的相关性,为烧伤深度的诊断提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 200只雌性Balb/c小鼠(10周龄,体质量18~22 g)均购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司。实验动物饲养与SPF及动物实验中心,饲养期间小鼠自由饮水、饮食湿度恒定,温度控制在24~26 ℃。

1.1.2 实验试剂及耗材 氨基端聚乙二醇(NH_2-mPEG2000)购自西安瑞禧生物科技公司;无水二甲基亚砜(DMSO)、无水二氯甲烷(DCM)、鲁米诺(Luminol)及鲁米诺钠盐购自北京百灵威(J&K)公司;氯化钠(NaCl)、三乙胺(TEA)、丙酮、苊、六氯三聚磷腈(hexachlorotripolyphosphazene,HCCP)均购自上海麦克林有限公司;次氯酸钠(NaClO)、过氧化氢(H_2O_2)购自

成都科隆公司;佛波酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、髓过氧化物酶(MPO)购自美国MedChem Express公司;磷酸盐平衡生理盐水(PBS),多聚甲醛,ROS检测荧光探针(DCFH-DA)购自中国Beyotime公司;组织ROS检测试剂盒购自上海贝博公司;异氟烷购于中国瑞沃德生命科技有限公司;FITC-Ly6G抗体购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 中性粒细胞响应发光材料LHP的合成和表征 称取HCCP 104 mg和NH_2-mPEG2000 500 mg分别溶于5 mL DCM,在HCCP溶液中加入200 μL TEA并将PEG溶液缓慢滴加入HCCP溶液中,在0 ℃匀速搅拌反应6 h,该反应体系严格氮气保护。以上反应后的产物充分悬干,将得到的固体溶于10 mL DMSO,加入600 μL TEA。称取372 mg鲁米诺溶于5 mL DMSO加入以上溶液,在65 ℃匀速搅拌反应48 h,透析,冻干得到目标产物LHP。称取适量产物进行核磁、红外光谱和紫外吸收光谱检测。

1.2.2 发光纳米胶束LHP NM的制备、表征及稳定性评价 取5 mg LHP纳米材料溶于10 mL去离子水,室温超声溶解10 min,静置30 min得到中性粒细胞响应纳米胶束(LHP NM)。通过激光粒度仪(DLS)测定胶束粒径大小、分布和表面电位。采用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察胶束形貌。

采用DMEM培养基,按以上方法制备LHP NM,室温静止,分别于0、2、6、12、24、48和72 h时间点测定其粒径变化情况;采用PBS溶液,按以上方法制备LHP NM,室温保存静止,分别于1、2、3、4、5、6、7 d时间点测定其粒径变化。

通过芘探针法测定其最低胶束浓度:称取芘溶于丙酮配制浓度为6.0×10^{-5} mol/L的标准溶液,并取10 μL标准溶液于玻璃瓶中,待丙酮完全挥发后,取1 mL不同浓度的LHP样品溶液(浓度为0.000 01~1.000 00 mg/mL)加入玻璃瓶中,芘终浓度为6.0×10^{-7} mol/L。所得溶液50 ℃孵育10 h,室温冷却10 h。荧光光谱仪扫描390 nm激发光光谱。扫描条件如下:扫描范围300~360 nm,狭缝宽度2.5 nm,计算临界胶束浓度。

1.2.3 发光纳米胶束LHP NM的体外发光性能评价 采用光纤光谱仪分别考察MPO、Cl^-和H_2O_2浓度变化,纳米胶束浓度变化对LHP NM学发光强度及发光光谱的影响。反应条件分别为:①鲁米诺钠盐(1 mg/mL)与LHP NM(3 mg/mL)在NaClO(0.5 mmol/L)条件下化学发光光谱对比,对照组为同体积去离子水,积分计算时间2 s;②考察在H_2O_2(10 mmol/L)条件下,MPO、Cl^-对LHP NM化学发光强度及发光光谱的影响,按表1配制反应体系,积分计算时间300 s;③考察H_2O_2浓度(1~10 mmol/L)对LHP NM(5 mg/mL)化学发光光谱的影响,积分计算时间100 s;④考察在H_2O_2(10 mmol/L)条件下,LHP NM浓度(溶于PBS,1.25~10.00 mg/mL)对其化学发光光谱的影响,对照组为同体积PBS,积分计算时间300 s;⑤考察在NaClO(0.5 mmol/L)条件下,LHP NM浓度变化(溶于PBS,0.625~5.000 mg/mL)对其化学发光光谱的影响,对照组为同体积PBS,积分计算时间2 s。

采用BPCL-2-KGC微弱发光测量仪分别考察MPO、Cl^-和MPO抑制剂4-ABAH,ROS清除剂Tempol,H_2O_2浓度变化,纳米胶束浓度变化对纳米胶束化学发光的影响。反应条件分别为:①在H_2O_2(10 mmol/L)条件下比较游离的鲁米诺钠盐(1 mg/mL)与LHP NM(3 mg/mL)在H_2O_2(10 mmol/L)条件下的化学发光规律,扫描时间3 600 s;②考察H_2O_2剂量(0~10 mmol/L)对LHP NM(5 mg/mL)化学发光规律的影响,扫描时间90 s;③在H_2O_2(10 mmol/L)条件下,考察LHP NM浓度(溶于PBS,0.37~2.50 mg/mL)化学发光规律的影响,空白对照设置为同体积PBS,扫描时间90 s;④在H_2O_2(10 mmol/L)条件下,考察MPO、Cl^-对LHP NM化学发光光谱的影响,按表1配制反应体系,扫描时间90 s,⑤考察NaClO(0.25,0.50,1.00 mmol/L)浓度变化对LHP NM(5 mg/mL)化学发光光谱的影响,扫描时间40 s。

通过Vilber(德国)小动物活体成像仪,分别考察MPO、Cl^-和H_2O,H_2O_2浓度变化,纳米胶束浓度变化对纳米胶束化学发光成像功能的影响。在96孔黑色孔板中配置成像体系,反应体系分别为:①比较鲁米诺钠盐(1 mg/mL)与LHP NM(3 mg/mL)在H_2O_2(10 mmol/L)条件下的化学发光成像;②考察H_2O_2剂量(0~10 mmol/L)对LHP NM(5 mg/mL)化学发光成像的影响;③在H_2O_2(10 mmol/L)条件下,考察LHP NM浓度(溶于PBS,2~5 mg/mL)化学发光成像的影响;④考察MPO剂量(终浓度6.7~33.3 mU/mL)对LHP NM(5 mg/mL)在H_2O_2(10 mmol/L)条件下在化学发光成像的影响;⑤在H_2O_2(10 mmol/L)条件下,考察MPO(400 mU/mL)、Cl^-(400 mmol/L)对LHP NM(5 mg/mL)化学发光成像的影响,按表1配制反应体系,表中各组分体积均减少至1/3。溶液配制完成后立即于小动物活体成像系统进行成像,成像条件为:binning=16,曝光时间5 min。Kuant软件处理成像结果。

表1 LHP NM体外化学发光实验条件分组

组别	LHP NM(5 mg/mL)	MPO(400 mU/mL)	H_2O_2(10 mmol/L)	NaCl(400 mmol/L)	PBS
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	-	+
3	+	-	+	-	+
4	+	-	-	-	+

表2 LHP NM细胞成像对比实验分组

组别	LHP NM (0.3 mg/mL)	Luminol-Na (0.1 mg/mL)	中性粒细胞 (5×10^5个)	PMA (100 ng/mL)
1	+	-	+	+
2	+	-	+	-
3	-	+	+	+
4	-	+	+	-

表3 LHP NM细胞成像实验条件分组

组别	LHP NM (0.3 mg/mL)	4-ABAH (5 μmol/L)	Tempol (20 μmol/L)	中性粒细胞 (5×10^5个)
1	+	-	+	+
2	+	+	-	+
3	+	-	-	+
4	+	-	-	+
5	-	-	-	+

1.2.4 发光纳米胶束LHP NM在中性粒细胞中的成像能力评价

1.2.4.1 腹腔中性粒细胞的提取及其PMA刺激活化前后活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平测定

配制3%巯基乙酸盐溶液,并取1 mL对实验小鼠进行腹腔注射,刺激4 h后,小鼠用异氟烷气体麻醉后,颈椎脱臼处死,75%酒精浸泡5 min,取出小鼠,腹腔注射5 mL无菌PBS,5 min后抽取腹腔灌洗液于10 mL离心管中,在25 ℃下以500×*g*离心8 min,取下层沉淀,2 mL PBS重悬,移液枪吹打清洗,清洗2次,每次3 min,随后3 mL PBS重悬。取12孔板,每孔放置灭菌玻片,各孔按接种细胞数量5×10^5个,进行细胞培养,37 ℃孵育10 min,加入PMA(终浓度100 ng/mL),刺激1 h,孵育后的细胞用DCFH-DA染色,封片后激光共聚焦观察拍照,Zen软件处理图像。

1.2.4.2 LHP NM在中性粒细胞的体外发光成像 通过小动物活体成像系统观察LHP NM在中性粒细胞中的发光行为。取上述1.2.4.1得到的中性粒细胞于12孔板中培养,加入LHP NM后立即在小动物活体成像系统中成像。成像方案分别为:①比较LHP NM与Luminol-Na在中性粒细胞中成像能力对比,在细胞培养12孔板中,按表2中分组情况,配制细胞成像体系,各组样本数*n*=4;②考察中性粒细胞(0~5×10^5个)对LHP NM(终浓度0.5 mg/mL)化学发光成像的影响,各组样本数*n*=4;③考察LHP NM浓度(终浓度0~1 mg/mL)对其在PMA活化的中性粒细胞(5×10^5个)中化学发光成像的影响,样本数设置为*n*=4;④考察MPO抑制剂4-ABAH和ROS清除剂Tempol对LHP NM在中性粒细胞中成像的影响,按表3于细胞培养12孔板中配制成像体系。成像条件为:binning=16,曝光时间5 min。Kuant软件处理成像结果。

1.2.5 LHP NM在小鼠烧烫伤模型中发光成像能力研究

1.2.5.1 小鼠烧烫伤模型的建立 取Balb/c雌性小鼠60只,简单随机抽样法为3组,每组20只,用脱毛膏去除小鼠背部毛发,暴露小鼠背部皮肤面积2~3 cm^2。小鼠腹腔注射1.5%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉并固定,在预热的西林瓶(底部直径为1 cm)中分别加入70、80、90 ℃的热水,并立即将瓶底部紧贴小鼠暴露皮肤,同时计时10 s。对照组用加入常温水的西林瓶进行相同条件处理。

1.2.5.2 小鼠烧伤模型损伤皮肤H&E染色切片 简单随机抽样法选取1.2.5.1中各组小鼠15只,及正常对照小鼠(仅脱去毛发,不做烫伤处理)5只,于造模后24 h时间点,通过异氟烷呼吸麻醉后脱颈处死,取损伤处2~3 cm^2全层皮肤,PBS冲洗去多余油脂,放入4%多聚甲醛固定,送塞维尔生物服务公司(中国武汉)做H&E染色切片,得到结果后,显微镜下观察,判定烧伤深度。

1.2.5.3 冰冻切片免疫荧光染色测定小鼠烧烫伤模型皮肤组织中性粒细胞浸润 简单随机抽样法选取1.2.5.1中各组小鼠15只,并将各组进一步按简单随机抽样法分为3组,每组5只,分别于造模后6、12、24 h时间点使用异氟烷通过呼吸麻醉,并脱颈处死小鼠,取各组小鼠背部烫伤处全层皮肤,低温PBS洗净,滤纸吸干水分,OCT包埋,冰冻切片机沿皮肤横切面切片并于载玻片上展片,厚度10 μm。取载有皮肤切片的载玻片PBS清洗10 min,去除OCT包埋剂,FITC-Ly6G染色,DAPI复染,封片后激光共聚焦观察。

1.2.5.4 小鼠烧烫伤模型皮肤组织ROS水平测定 取各组小鼠背部全层皮肤50 mg,组织匀浆仪匀浆3次,每次60 s,频率70 Hz。在4 ℃下以500×*g*离心10 min取上清。用上海贝博组织ROS检测试剂盒检测ROS水平。

1.2.5.5　LHP NM纳米胶束在小鼠烧烫伤模型中的成像　小动物活体成像系统观察LHP NM纳米胶束在小鼠烧烫伤模型中的成像：将40只10周龄Balb/c雌性小鼠简单随机抽样法分为10组：对照组（未造模组，n=4）；造模组：70 ℃组，80 ℃组，90 ℃组，各造模组再随机分组为6 h组，12 h组，24 h组，各模型组样本数n=4。各组造模后在对应时间点通过局部注射100 μL LHP NM（5 mg/mL）进行成像，成像条件：binning=16，曝光时间5 min。Kuant软件处理成像结果。

1.3　统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件分析，定量数据以$\bar{x}\pm s$表示。两组比较采用t检验法进行统计学分析，多组比较进行单因素方差分析。检验水准α=0.05。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2　结果

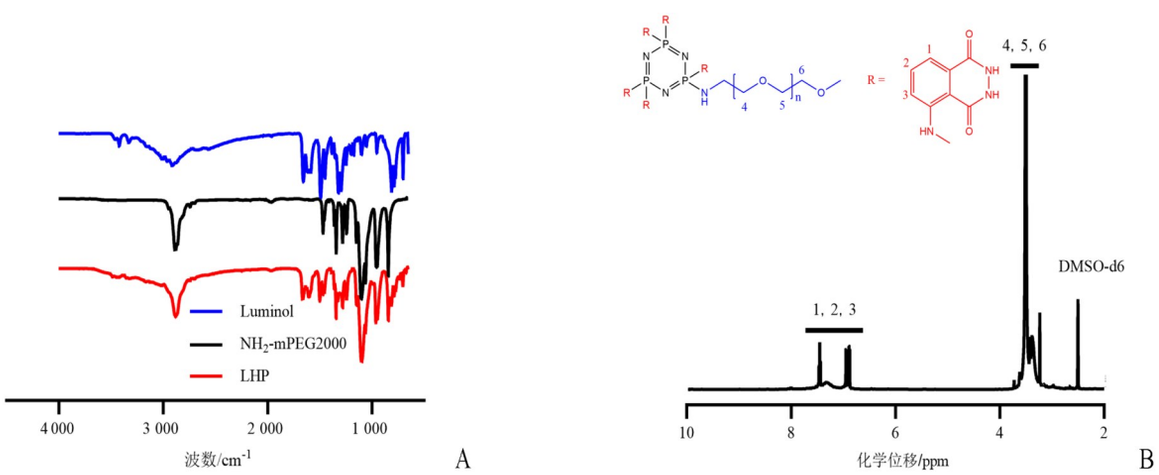
2.1　中性粒细胞响应发光材料LHP的合成及纳米发光胶束LHP NM的制备

以六氯环三聚磷腈为骨架，利用其上6个氯活性位点，通过亲核取代反应，偶联氨基端聚乙二醇（NH_2-mPEG2000）作为亲水端，引入鲁米诺发光单元并作为疏水段，合成两亲性发光材料LHP。傅里叶红外光谱（图1A）（FT-IR）和核磁氢谱（图1B）共同证实了聚乙二醇和鲁米诺单元在HCCP上偶联成功。据核磁氢谱中，氢特征峰积分计算可得，每个HCCP骨架上约键合了5个米诺发光单元和一个聚乙二醇（PEG）链。

本研究采用在去离子水中超声自组装的方法，制备了基于发光材料LHP的纳米胶束LHP NM，动态光散射测量结果显示，LHP NM平均粒径为（121.000±7.957）nm，分散度为0.281（图2A），Zeta电位约为-16 mV，透射电子显微镜（TEM）观察到纳米胶束呈空心球形（图2B）。利用芘荧光探针法测量LHP NM的最低胶束浓度约为0.076 3 mg/mL（图2C、D）。TEM中观察到胶束粒径尺寸较测量数据偏小可能原因是在测量是环境干燥，而LHP NM在湿润环境中会溶胀。考察了纳米胶束在去离子水和10%胎牛血清中的稳定性，结果证实LHP NM纳米胶束在以上两种环境中，即分别可在7 d或72 h内维持稳定的胶束结构，具有良好稳定性（图2E、F）。

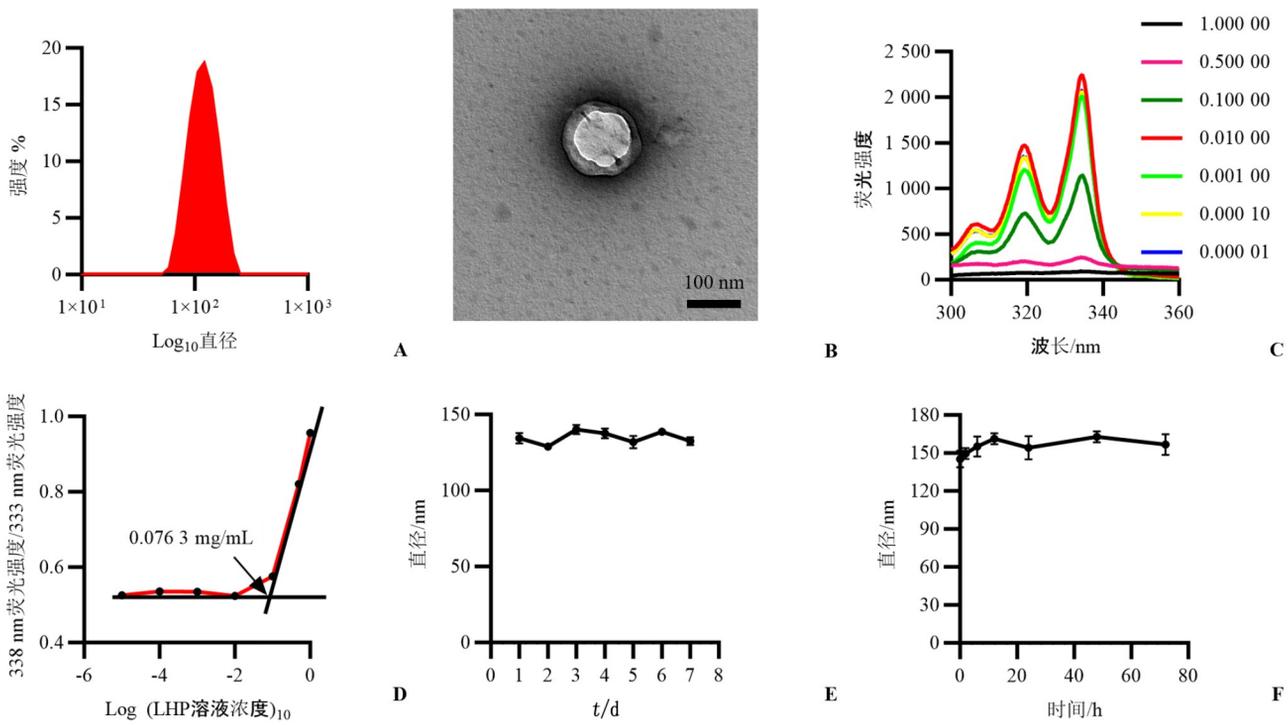
2.2　LHP NM的体外化学发光性能评价及其在中性粒细胞中的发光成像能力研究

进一步研究了LHP NM的发光性能。光纤光谱仪测量结果证明，LHP NM与小分子鲁米诺具有相似的化学发光波长（图3A），在相同的0.5 mmol/L NaClO条件下，前者发光信号强度高于后者1.5倍，且LHP NM的化学发光强度与NaClO的浓度呈正相关（图3F）。在考察LHP NM的持续发光能力的实验中，同相同剂量的小分子鲁米诺对比，LHP NM最大发光强度增强约2.1倍，发光时长约延长2倍（图3G），这一现象在体外化学发光成像实验中也得到验证（图4A、B）。在不同剂量的H_2O_2刺激下，LHP NM的发光信号强度随H_2O_2的浓度增加而线性增强（图3D、H、I，4E）；而在氧化剂浓度确定时，LHP NM的发光强度也随自身浓度上升而线性增强且化学发光光谱最大发射峰波长位置基本不变（图3B、E、K、L，4F）。MPO对LHP NM化学发光影响的实验结果证实，LHP NM的发光强度会随着MPO水平的提高而增加（图4G），且在Cl^-存在条件下，化学发光强度进一步增强（图3C、J，4C、D）。



A：LHP的红外谱图；B：LHP的核磁氢谱图；

图1　LHP两亲性发光材料LHP的表征



A:LHP NM的粒径分布图;B:LHP NM的透射电镜照片;C:不同浓度的LHP中的芘探针的激发光谱;D:芘激发光光谱中的波长338 nm与333 nm处强度比值变化;E:LHP NM在去离子水中7 d内各时间点的粒径变化图;F:LHP NM在含10%胎牛血清中的DMEM培养基中72 h内各时间点粒径变化图

图2 LHP NM纳米胶束的表征及稳定性评价

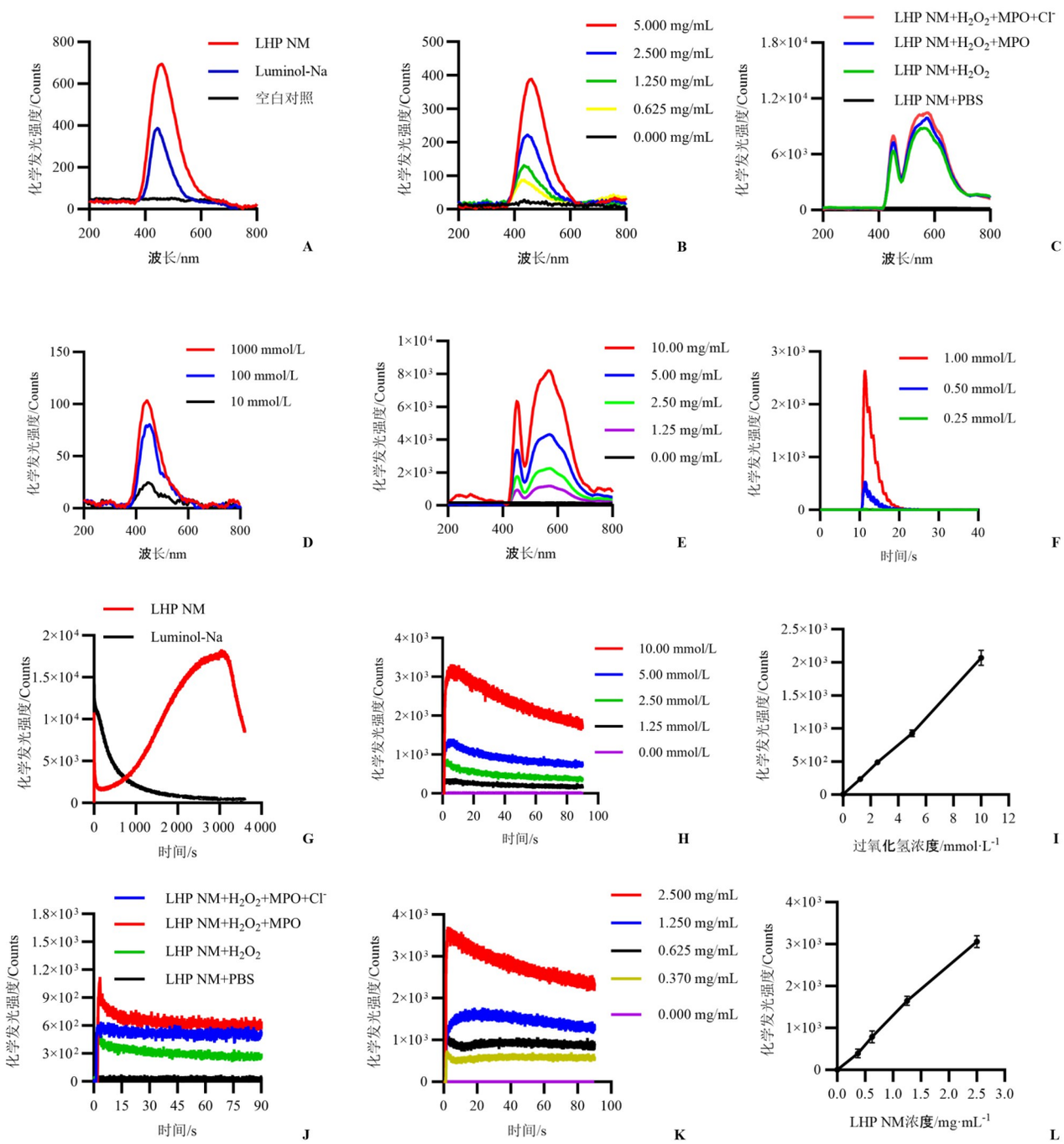
本研究进一步考察了LHP NM在可同时分泌MPO和ROS的中性粒细胞中的成像能力。本研究通过对小鼠腹腔注射巯基乙酸盐(3%),诱导其腹腔浸润大量中性粒细胞并提取到体外进行细胞培养及进一步的成像实验。利用荧光探针(DCFH-DA)对提取的中性粒细胞进行染色,并通过激光共聚焦显微镜进行观察,结果显示,标记荧光探针后的中性粒细胞在佛波酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate,PMA)激后出现产生了明显的荧光信号,即PMA可刺激中性粒细胞后产生了大量ROS(图5A)。同时,LHP NM在PMA刺激后的中性粒细胞中可产生了明显的发光信号,而在未用PMA刺激的中性粒细胞中仅产生微弱的发光信号,LHP NM仅对活化后的中性粒细胞表现出持续且强烈的发光信号,而游离的鲁米诺的发光强度衰减较快(图5B、F)。4-ABAH和Tempol的干预能明显降低LHP NM在中性粒细胞中的发光强度(图5C、G)。在中性粒细胞中,LHP NM的发光强度与中性粒细胞数量和自身剂量表现出良好的相关性,相关系数分别为r=0.98、0.99(图5D、E、H、I)。

2.3 小鼠烧烫伤模型的体内发光成像

建立并表征小鼠烧伤模型,并测试LHP NM在此模型中的成像能力。模型表征结果表明,在模型建立24 h时间点,H&E染色病理切片显示,70 ℃组烫伤小鼠皮肤损伤仅涉及表皮层,符合Ⅰ度烫伤情况;80 ℃组小鼠伤及整个表皮层和部分真皮乳头层,符合浅Ⅱ度烧伤特点;90 ℃组小鼠烫伤伤及真皮乳头层及以下,且影响部分皮肤附件(汗腺、毛囊等),残留部分真皮网状层,出现层间分层不明显,符合深Ⅱ度烧伤情况(图6A)。且同对照组正常小鼠对比,各组模型小鼠的烫伤组织中TNF-α,IL-1β和IL-6炎性因子的表达量均显示出显著升高(P<0.05,6B~D)。

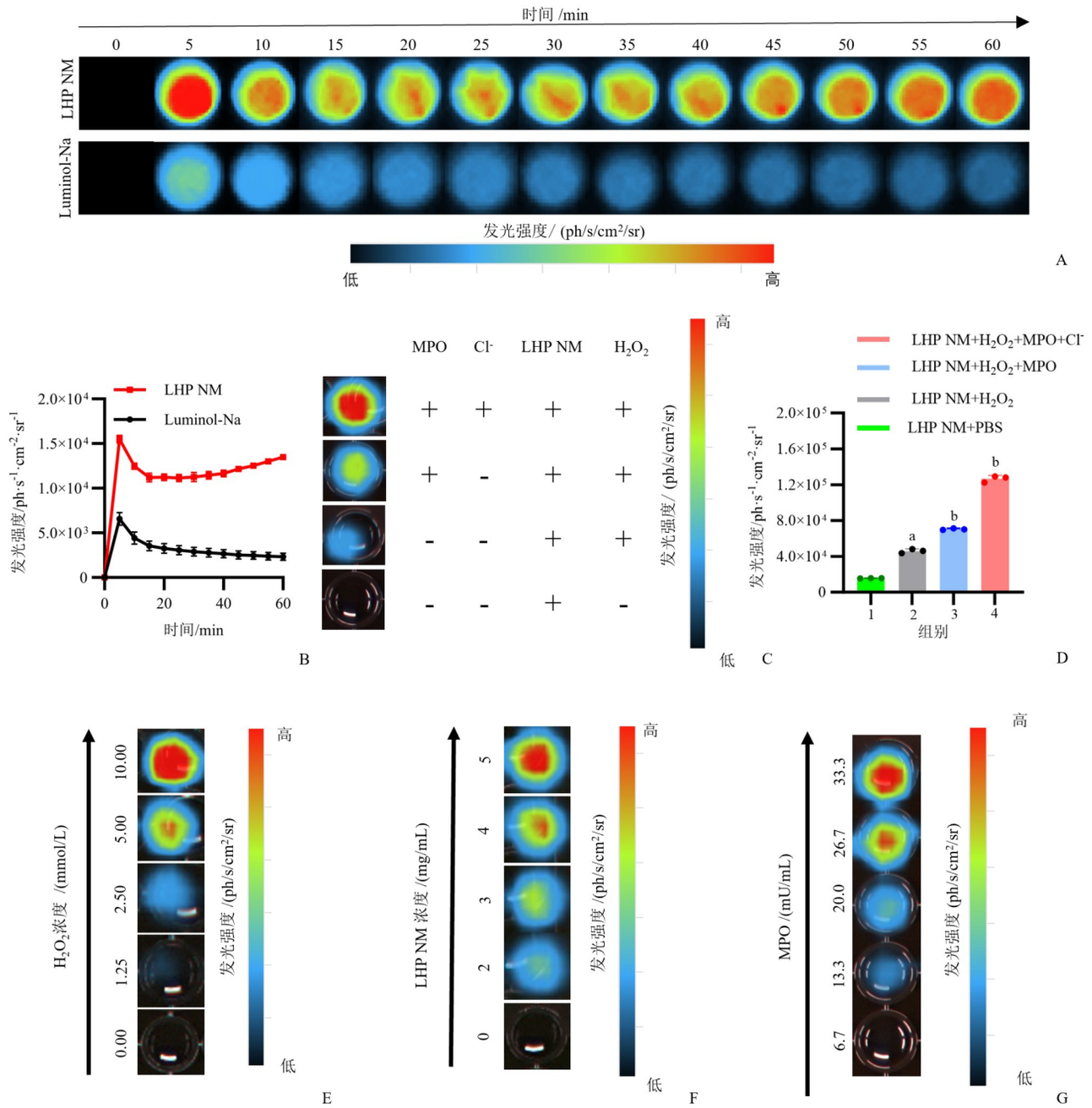
后续实验进一步考察了3种模型造模后24 h时间点,MPO、ROS及中性粒细胞的浸润情况。结果发现在24 h后,MPO、ROS和中性粒细胞浸润数量均为浅Ⅱ度烫伤(80℃)组最高,Ⅰ度(70 ℃)次之,深Ⅱ度(90 ℃)最低(图6E~H)。同Ⅰ度(70 ℃)组小鼠对比,浅Ⅱ度烫伤(80 ℃)组中性粒细胞募集数量提升约86.4%。

本研究进一步考察了小分子鲁米诺和LHP NM在等鲁米诺剂量时,在80 ℃小鼠烫伤模型中的成像效果。结果表明,对比小分子鲁米诺,LHP NM表现出发光信号强度更高(图7A、B),成像持续时间更长的成



A:LHP NM(3 mg/mL)和Luminol-Na(1 mg/mL)在NaClO(0.5 mmol/L)条件下的化学发光光谱图;B:不同剂量LHP NM在NaClO(0.5 mmol/L)下的化学发光光谱图;C:LHP NM在不同条件(MPO+Cl^-+ H_2O_2,MPO+ H_2O_2,H_2O_2,PBS)刺激下的化学发光光谱;D:LHP NM(5 mg/mL)在不同剂量H_2O_2刺激下的化学发光光谱图;E:不同剂量LHP NM在H_2O_2(10 mmol/L)刺激下的化学发光光谱图;F:LHP NM(5 mg/mL)在不同剂量NaClO条件刺激下随时间变化曲线;G:LHP NM(3 mg/mL)和Luminol-Na(1 mg/mL)在H_2O_2(10 mmol/L)条件下发光强度随时间变化曲线;H:LHP NM(5 mg/mL)在不同剂量H_2O_2条件刺激下随时间变化曲线;I:LHP NM(5 mg/mL)在不同剂量H_2O_2条件刺激50 s时发光强度随H_2O_2剂量变化曲线;J:LHP NM(5 mg/mL)在不同条件(MPO+Cl^-+ H_2O_2,MPO+ H_2O_2,H_2O_2,PBS)刺激下发光强度随时间变化曲线;K:不同剂量LHP NM在H_2O_2(10 mmol/L)条件刺激下随时间变化曲线;L:不同剂量LHP NM在H_2O_2(10 mmol/L)条件刺激下50 s时发光强度随自身剂量变化曲线

图3 LHP NM体外化学发光光谱学研究和化学发光行为学研究

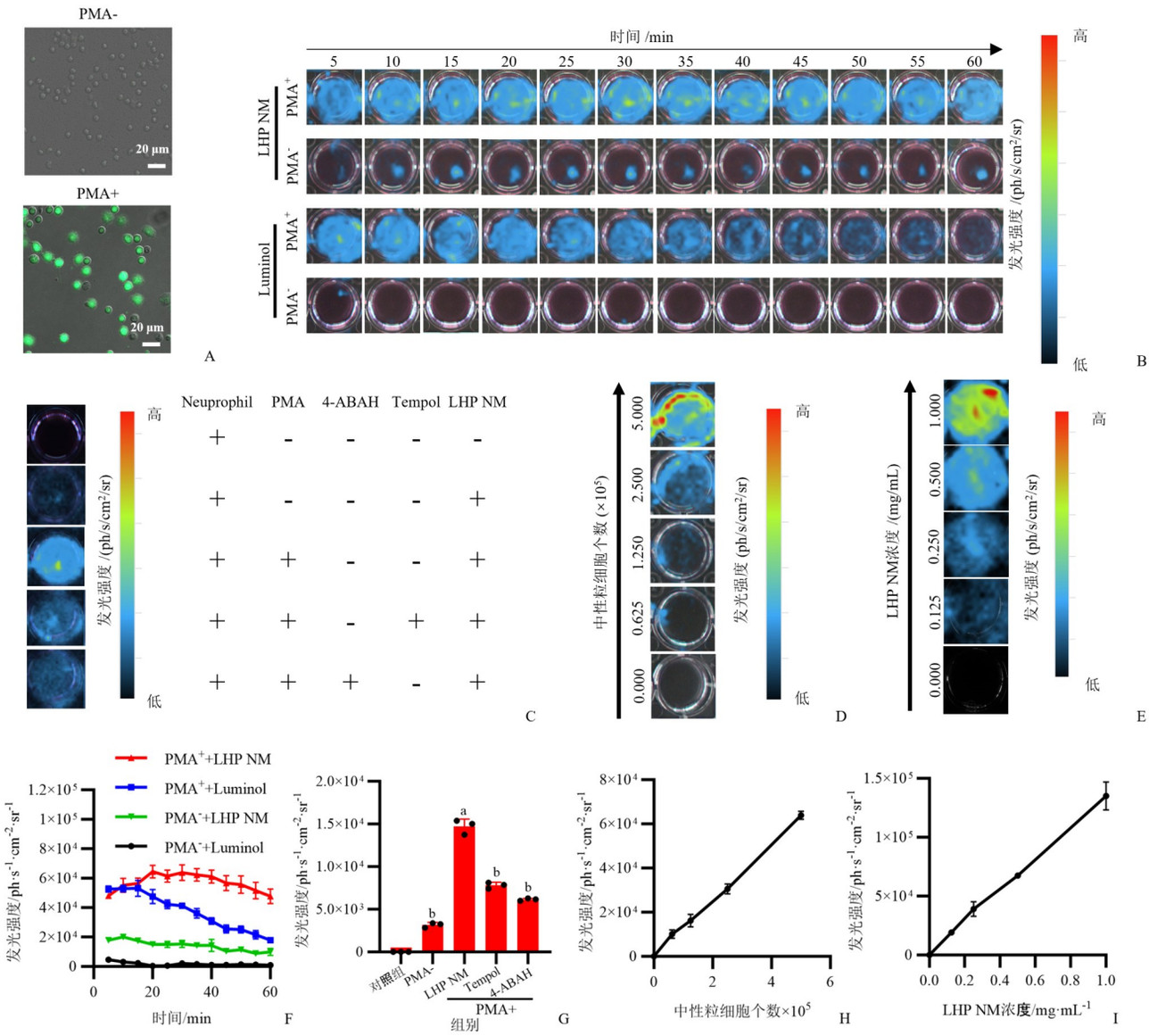


A:LHP NM(3 mg/mL)和 Luminol-Na(1 mg/mL)在 H_2O_2(10 mmol/L)条件下 60 min 内各时间点化学发光成像图;B:LHP NM(3 mg/mL)和 Luminol-Na(1 mg/mL)在 H_2O_2(10 mmol/L)条件下 60 min 内成像强度随时间变化曲线;C:LHP NM 在不同条件(MPO+Cl^-+ H_2O、MPO+ H_2O、H_2O、PBS)刺激下的化学发光成像图;D:LHP NM 在不同条件(MPO+Cl^-+ H_2O、MPO+ H_2O、H_2O、PBS)刺激下的化学发光成像强度统计 a:P<0.05,与 LHP NM+PBS 组对比;b:P<0.05,与 LHP NM+ H_2O_2 组对比;E:LHP NM(5 mg/mL)在不同剂量 H_2O_2 条件刺激下的化学发光成像图;F:不同剂量 LHP NM 在 H_2O_2(10 mmol/L)条件刺激下化学发光成像图;G:LHP NM(5 mg/mL)在 H_2O_2(1 mmol/L)和不同剂量 MPO 条件刺激下的化学发光成像图

图4 LHP NM 的体外化学发光成像能力研究

像能力。LHP NM 在不同烫伤深度的小鼠烧伤模型的成像实验结果证实,局部皮下注射 LHP NM 后,正常小鼠组表现出可忽略不计的发光强度,80 ℃组较 70 ℃组发光强度显著上升(P<0.05),增强约 71.5%,而 90 ℃组发光信号较弱(图 7C、D)。以上结果与 ROS、中性粒细胞浸润及 MPO 水平测定结果呈现良好的相关性。

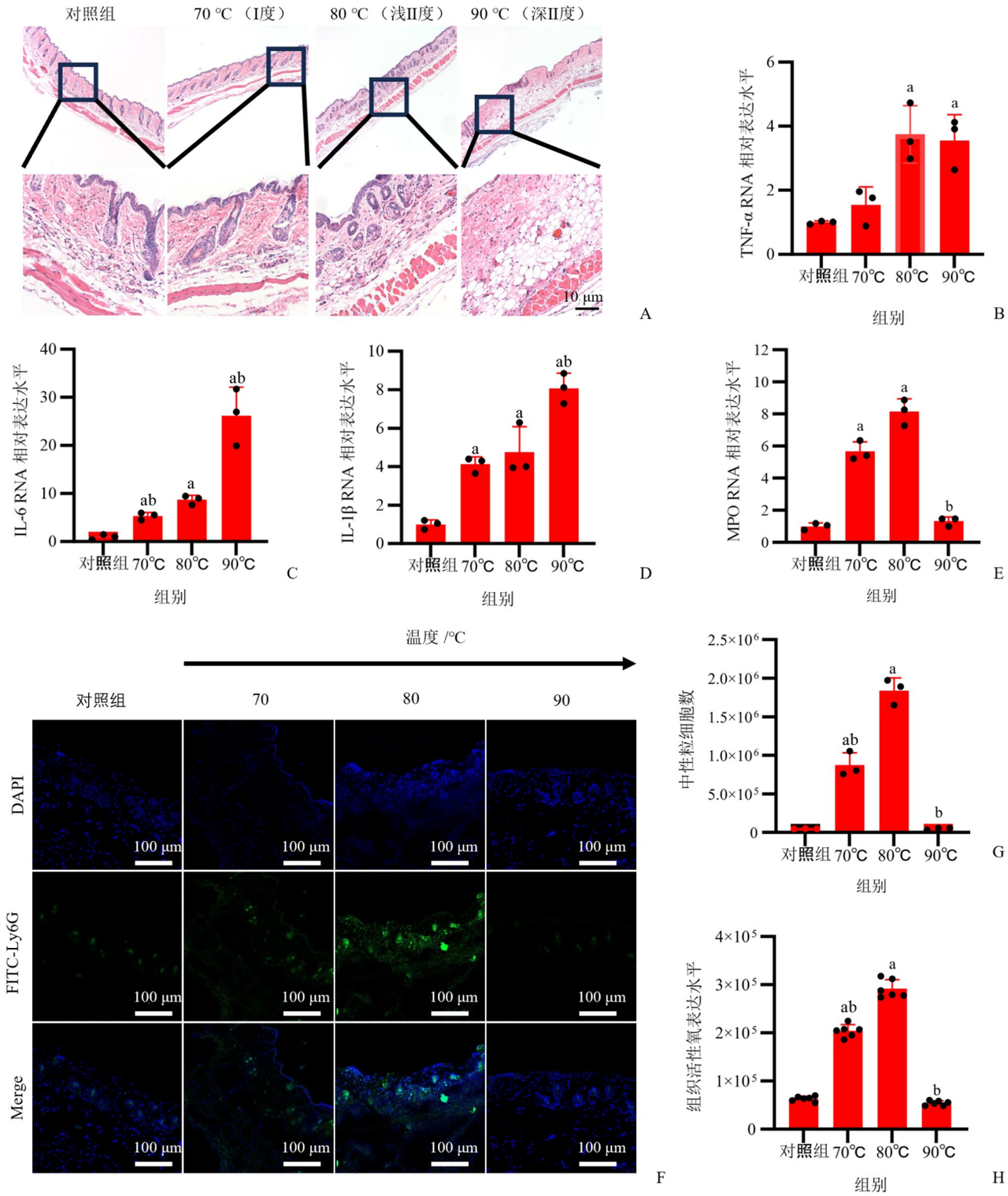
为更准确评估 LHP NM 的成像结果同小鼠烧伤模型的烧伤深度相关性,本研究进一步利用 LHP NM 跟



A:中性粒细胞在PMA刺激前后DCFH-DA探针的荧光照片;B:LHP NM(0.3 mg/mL)和Luminol-Na(0.1 mg/mL)在中性粒细胞中(PMA⁺组和PMA⁻组)60 min内各时间点成像图;C:LHP NM(0.5mg/mL)在中性粒细胞中不同条件干预下的成像图;D、H:LHP NM(0.5 mg/mL)在不同数量中性粒细胞中的成像图和成像强度随中性粒细胞剂量变化曲线;E、I:不同剂量LHP NM在中性粒细胞中(5×10^5)的成像图和成像强度随LHP NM剂量变化曲线;F:LHP NM(0.5 mg/mL)和Luminol-Na(0.1 mg/mL)在中性粒细胞中(PMA+组和PMA-组)60 min内各时间点成像强度随时间变化曲线;G:LHP NM(0.5 mg/mL)在中性粒细胞中不同条件干预下的成像强度统计 a:$P<0.05$,与对照组对比;b:$P<0.05$,与PMA⁺+LHP NM组对比

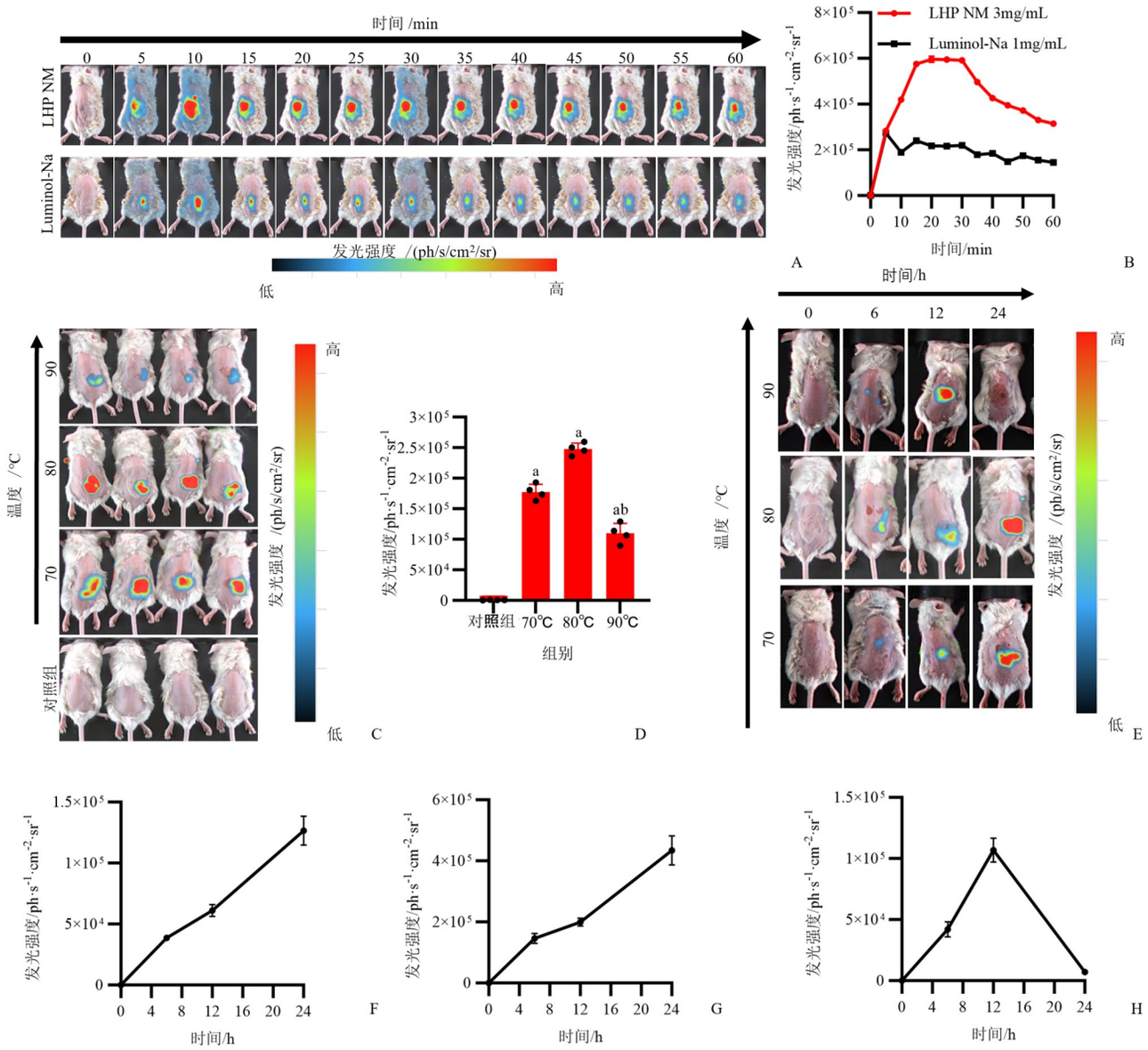
图5 LHP NM在中性粒细胞中的成像

踪考察了各组小鼠烫伤模型24 h内的组织损伤的动态发展。在造模后,70 ℃组和80 ℃组在24 h内各时间点观察到随时间增强的发光信号,发光强度变化同组织中性粒细胞免疫荧光结果中烫伤皮肤组织的中心粒细胞各时间点的浸润情况变化一致,与组织ROS的水平检测结果也呈现较好的相关性;而90 ℃组对比于70 ℃组和80 ℃组,发光信号强度的峰值约在12 h,随后迅速下降,这一结果可能与90 ℃烫伤后,局部组织在彻底坏死前有更强烈的炎性浸润有关(图7E~H)。皮肤组织冰冻切片免疫荧光染色和ROS水平检测结果进一步验证了LHP NM可通过成像发光信号的变化趋势准确的定量不同烧伤深度的皮肤组织中中性粒细胞的募集数量和ROS水平变化(图8)。



a:$P<0.05$,与对照组对比;b:$P<0.05$,与80℃组对比 A:小鼠烧烫伤模型损伤皮肤组织的H&E染色切片;B~E:荧光定量qPCR检测小鼠烧烫伤模型损伤皮肤组织的炎症因子(TNF-α,IL-1β,IL-6,MPO)的统计结果;F:不同烫伤温度的小鼠烧烫伤模型中性粒细胞免疫荧光图;G:不同烫伤温度的小鼠烧烫伤模型中性粒细胞免疫荧光中FITC荧光信号定量统计;H:小鼠烧烫伤模型24 h时间点皮肤组织ROS水平统计图

图6 不同烫伤温度的小鼠烧烫伤模型的建立及表征



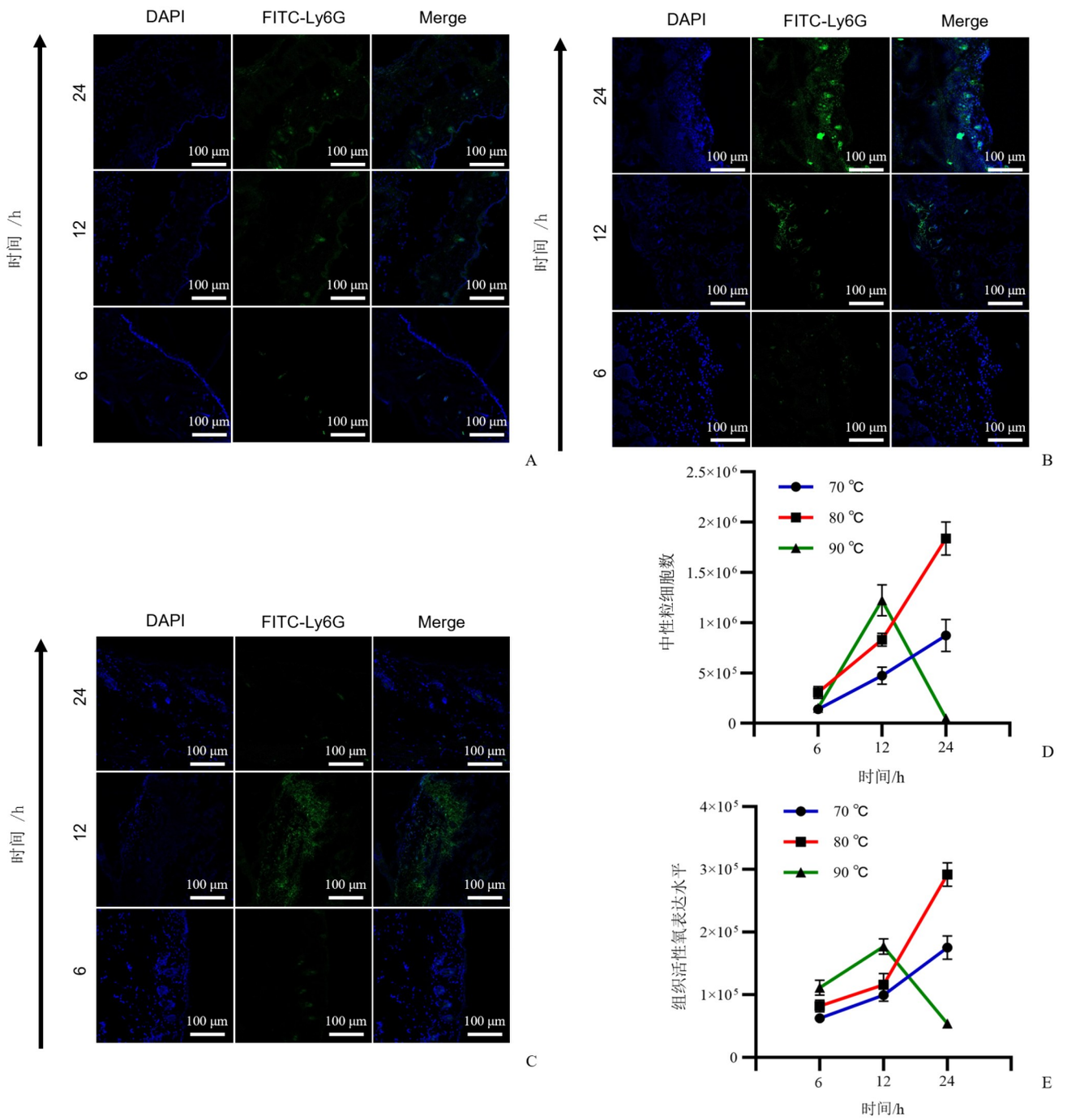
a:$P<0.05$,与对照组对比;b:$P<0.05$,与80℃组对比 A、B:LHP NM(3 mg/mL)和Luminol-Na(1 mg/mL)在80℃烫伤小鼠24 h时间点时60 min内各时间点的活体成像对比图及成像强度随时间变化曲线;C、D:LHP NM(5 mg/mL)在小鼠烧烫伤模型24 h时间点的活体成像对比图及成像强度统计;E~H:LHP NM(5 mg/mL)在小鼠烧烫伤模型(70 ℃组,80 ℃组,90 ℃组)各时间点的活体成像图和各温度组成像强度随时间变化曲线

图7 LHP NM在小鼠烧烫伤模型中的成像

3 讨论

3.1 烧伤临床诊断方案的局限与需求

前期调研发现,烧伤作为一项公共卫生问题,其在全球范围内拥有庞大的患者群,据统计,每年仅死亡病例数超过18万,大多数发生在低收入或中等收入国家[19]。因此,烧伤病情的诊断与治疗一直受到广泛关注。社区调查结果证实,高收入地区将预防策略与完善的医疗条件结合,可大大降低烧伤的患病率与死亡率,而低收入地区以上措施往往存在局限。烧伤病情的诊断对患者治疗方案的制定有着重要的指导意义,高估病情将造成患者遭受手术等过度治疗,而低估病情会增加患者感染、病情恶化甚至造成生命卫星[20]。目前临床上,烧伤的常见诊断方法常是临床观察结合医生个人经验进行诊断,综合准确率低至60%,此类问题在低收入地区尤为突出[21]。烧伤的早期干预对病情的治疗具有重要的意义,合理的早期治疗可明显降低患者病情恶化风险,提高治愈率,减少



A~C:不同温度(70、80、90 ℃)小鼠烧烫伤模型不同时间点皮肤组织中性粒细胞免疫荧光图;D:FITC-Ly6G标记的中性粒细胞荧光强度统计曲线;E:不同温度小鼠烧烫伤模型不同时间点皮肤组织ROS水平随时间变化曲线

图8 小鼠烧伤皮肤组织中性粒细胞免疫荧光染色

治疗时间及成本,甚至可降低斑痕残留风险,保护患者身心健康[22]。因此,低成本,高效,准确的烧伤诊断方案亟待开发。

3.2 烧伤早期炎症发展情况可作为诊断参考依据

近来研究发现,烧伤早期损伤部的病情发展伴随着强烈的炎症反应[23],为进一步确证烧伤严重程度与炎症发展的关联性,本研究选择了Balb/c小鼠通过不同热水处理建立了小鼠背部烧烫伤模型。以HE染色切片结果为依据,确证了70、80及90 ℃热水处理后分别成功建立了Ⅰ度,浅Ⅱ度及深Ⅱ度烧伤模型。后续通过模型表征发现,小鼠烧伤局部在24 h内会出现明显的炎性浸润,IL-6,IL-1β、TNF-α及MPO炎性因子表

达量较对照组显著升高($P<0.05$),这与之前的报道一致[24]。烧伤深度与炎性因子表达和中性粒细胞数量存在关联性,在浅Ⅱ度烧伤以前随烧伤深度的加深,炎性浸润和中性粒细胞募集数量增多,但深Ⅱ度烧伤甚至更严重的病例中,由于损伤组织会在短时间内彻底坏死,炎性浸润及中性粒细胞的募集路径被阻断,因此其发展呈现炎症快速发展后快速衰减的趋势,此研究中90 ℃处理组相关研究结果可确证这一结论。以上实验结果及分析结论为通过炎症监测诊断烧伤病情提供了理论依据。

3.3 LHP NM具备响应中性粒细胞实现相关炎症发光成像的能力

据文献调研,一些光学方法因具有实时性高,无创,准确等优点已经被应用于烧伤的诊断研究中[25]。此研究中,基于光学成像的方案,选择鲁米诺作为发光单元成功构建了中性粒细胞响应性发光纳米胶束LHP NM,通过体外发光实验证实,LHP NM较好地保留了鲁米诺可在炎症环境中依赖MPO-H_2O_2-Cl^-体系产生的强氧化剂ClO^-响应性发光的高效成像能力,且与小分子鲁米诺对比,其发光时间和发光强度均得到明显优化。本研究通过体外发光实验证实了LHP NM通过化学发光成像强度变化可准确定量反应体系中ROS和MPO的水平。在细胞水平,LHP NM能够响应PMA活化的中性粒细胞而实现发光成像,通过4-ABAH和Tempol的干预实验有力反向确证了其发光行为同细胞环境中ROS和MPO的表达量密切相关。同时实验表明,LHP NM可以作为一种高效的荧光探针用于中性粒细胞的选择性成像,成像强度同中性粒细胞数量呈现出良好的相关性,此为LHP NM在中性粒细胞参与的炎症相关疾病成像中的应用提供了理论基础。

3.4 LHP NM可通过成像反映不同烧伤深度小鼠模型的早期炎症差异

基于以上实验基础,本研究进一步将LHP NM应用于小鼠烧伤模型的成像。通过模型表征结果推断,烧伤局部早期募集的大量中性粒细胞和炎性浸润可为LHP NM成像提供理想的响应靶点,成像实验结果也验证了这一猜想,LHP NM在小鼠烧伤模型中可在损伤部位实现特异性发光成像。通过关注了烧伤早期24 h内不同烧伤深度模型小鼠损伤皮肤局部组织炎症发展的时程变化。在24 h内,3种烫伤深度的模型小鼠成像同样存在着明显差异,成像结果与炎症相关表达因子的检测结果基本相符,Ⅰ度烫伤(70 ℃)成像强度显著低于浅Ⅱ度烫伤(80 ℃)组,而深Ⅱ度(90 ℃)组成像强度会在12 h时间点达到峰值,并随后迅速衰减,这是局部组织及血管的坏死而阻碍炎性细胞的募集,且损伤深度的共同影响的结果。综合以上实验结果分析,LHP NM凭借成像结果能较好地定量不同烫伤深度的小鼠模型皮肤组织在各时间点的中性粒细胞数量和ROS水平,准确反应不同烧伤深度模型在24 h内炎症发展时程变化情况的差异。因此,此研究开发的发光纳米胶束LHP NM可作为诊断烧伤深度情况的可靠工具用于烫伤模型中无创、简单和实时的生物成像,为烫伤模型的早期炎症的检测、烫伤深度判断和治疗提供准确重要的参考信息。

3.5 LHP NM具备作为烧伤诊断工具的研究潜力

综上所述,本研究通过自发光纳米探针LHP NM的发光成像强度变化以判断烧烫伤深度的诊断方法能较好地满足烧伤诊断中,实时、无创、及时、准确和便捷的诊断方案要求,具备满足庞大烧烫伤患者群诊断需求的研究潜力。其可为解决目前临床中以医生经验为主的诊断方法准确率较低的问题提供了新思路和策略,为不同烧烫伤患者定制更合理且高效的治疗方案提供可靠的参考信息。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] EMING S A, MARTIN P, TOMIC-CANIC M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(265): 265sr6. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009337.

[2] SERRANO C, BOLOIX-TORTOSA R, GÓMEZ-CÍA T, *et al*. Features identification for automatic burn classification[J]. Burns, 2015, 41(8): 1883-1890. DOI: 10.1016/j.burns.2015.05.011.

[3] SHARMA V P, O'BOYLE C P, JEFFERY S L A. Man or machine? The clinimetric properties of laser Doppler imaging in burn depth assessment[J]. J Burn Care Res, 2011, 32(1): 143-149. DOI: 10.1097/BCR.0b013e3182033346.

[4] JASKILLE A D, SHUPP J W, JORDAN M H, *et al*. Critical review of burn depth assessment techniques: Part I. Historical review[J]. J Burn Care Res, 2009, 30(6): 937-947. DOI: 10.1097/BCR.0b013e3181c07f21.

[5] WANG Y W, BEEKMAN J, HEW J, *et al*. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 123: 3-17. DOI: 10.1016/j.addr.2017.09.018.

[6] LOTTER O, HELD M, SCHIEFER J, *et al*. Utilization of laser Doppler flowmetry and tissue spectrophotometry for burn

depth assessment using a miniature swine model[J]. Wound Repair Regen, 2015, 23(1): 132-136. DOI: 10.1111/wrr.12246.

[7] SUMAGIN R. Phenotypic and functional diversity of neutrophils in gut inflammation and cancer[J]. Am J Pathol, 2024, 194(1): 2-12. DOI:10.1016/j.ajpath.2023.10.009.

[8] CARNEVALE S, CEGLIE I D, GRIECO G, *et al*. Neutrophil diversity in inflammation and cancer [J]. Front Immunol, 2023, 26: 14: 1180810. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1180810.

[9] GORDON S. Phagocytosis: an immunobiologic process[J]. Immunity, 2016, 44(3): 463-475. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.026.

[10] SATO T, HONGU T, SAKAMOTO M, *et al*. Molecular mechanisms of -Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D Is dispensable [J]. Mol Cell Biol,2013,33(1):136-45. DOI: 10.1128/MCB.00869-12.

[11] MANTOVANI A, CASSATELLA M A, COSTANTINI C, *et al*. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(8): 519-531. DOI:10.1038/nri3024.

[12] FILEP J G. Targeting neutrophils for promoting the resolution of inflammation [J]. Front Immunol, 2022, 16: 13:866747. DOI: 10.3389/fimmu.2022.866747.

[13] LIEW P X, KUBES P. The neutrophil's role during health and disease[J]. Physiol Rev, 2019, 99(2): 1223-1248. DOI:10.1152/physrev.00012.2018.

[14] ZHAO Y, ZHANG H G, ZHANG Q X, *et al*. Research progress of neutrophil-mediated drug delivery strategies for inflammation-related disease [J]. Pharmaceutics, 2023, 15(7):1881. DOI: 10.3390/pharmaceutics15071881.

[15] PENNATHUR S, BERGT C, SHAO B H, *et al*. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species[J]. J Biol Chem, 2004, 279(41): 42977-42983. DOI:10.1074/jbc.M406762200.

[16] WINTERBOURN C C, KETTLE A J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome [J]. Antioxid Redox Sign, 2013, 18(6): 642-60. DOI: 10.1089/ars.2012.4827.

[17] NAKAZONO M. Development of highly selective and sensitive fluorescent and chemiluminescent reagents [J]. Yakugaku Zasshi, 2008, 128(6): 919-924. DOI:10.1248/yakushi.128.919.

[18] VLADIMIROV Y A, PROSKURNINA E V. Free radicals and cell chemiluminescence [J]. Biochemistry, 2009, 74(13): 1545-1566. DOI:10.1134/s0006297909130082.

[19] JASKILLE A D, RAMELLA-ROMAN J C, SHUPP J W, *et al*. Critical review of burn depth assessment techniques: part II. Review of laser Doppler technology[J]. J Burn Care Res, 2010, 31(1): 151-157. DOI:10.1097/BCR.0b013e3181c7ed60.

[20] WONGKIETKACHORN A, SURAKUNPRAPHA P, WINAIKOSOL K, *et al*. Indocyanine green dye angiography as an adjunct to assess indeterminate burn wounds: a prospective, multicentered, triple-blinded study [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2019, 86(5): 823-828. DOI: 10.1097/TA.0000000000002179.

[21] HUANG C, DONG L L, ZHAO B H, *et al*. Anti-inflammatory hydrogel dressings and skin wound healing [J]. Clin Transl Med, 2022,12(11):e1094. DOI: 10.1002/ctm2.1094.

[22] HUANG Y, MU L, ZHAO X, *et al*. Bacterial growth-induced tobramycin smart release self-healing hydrogel for *Pseudomonas aeruginosa*-infected burn wound healing[J]. ACS Nano, 2022, 16(8): 13022-13036. DOI: 10.1021/acsnano.2c05557.

[23] JESCHKE M G, VAN BAAR M E, CHOUDHRY M A, *et al*. Burn injury[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 11. DOI:10.1038/s41572-020-0145-5.

[24] ROWAN M P, CANCIO L C, ELSTER E A, *et al*. Burn wound healing and treatment: review and advancements[J]. Crit Care, 2015, 19: 243. DOI: 10.1186/s13054-015-0961-2.

[25] XUE E Y, CHANDLER L K, VIVIANO S L, *et al*. Use of FLIR ONE smartphone thermography in burn wound assessment[J]. Ann Plast Surg, 2018, 80(4 Suppl 4): S236-S238. DOI:10.1097/SAP.0000000000001363.

(收稿:2024-05-31;修回:2025-01-05)

(编辑 刘秋池)