

光动力联合抗生素治疗大鼠创伤感染

赵占娟¹, 徐泽华², 郝仪铭², 商亚贞³, 刘天军^{4*}

¹河北大学医学院, 河北 保定 071002;

²河北大学预防医学与卫生事业管理系, 河北 保定 071002;

³河北大学附属医院, 河北 保定 071002;

⁴中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津 300192

摘要 探讨了新型卟啉类光敏剂 PA1 介导的光动力抗菌(PACT)联合抗生素治疗重度创伤感染大鼠的效果并简要探讨其机制。健康雄性 Wistar 大白鼠 24 只(清洁级)作为实验对象,建立大面积创伤感染模型,随机分成模型对照组、PACT 治疗组、抗生素治疗组、PACT 联合抗生素治疗组,每组 6 只,共治疗 8 d。检测不同时间点各组创面下的菌落数和创面愈合率,并采用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测创面周边组织碱性成纤维因子(bFGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白介素 6(IL-6)的表达。结果表明 PACT 联合抗生素治疗与模型对照组相比能显著减轻大鼠创伤组织的炎症,减少创面组织中细菌的数量,加快创面愈合速率,缩短创面愈合时间;同时还能提高创面组织中 bFGF 的含量,抑制组织中炎症相关因子 TNF- α 和 IL-6 的表达,其效果优于单用 PACT 的治疗组和单用抗生素的治疗组。结果表明 PACT 联合抗生素可以治疗大面积创伤感染。

关键词 医用光学; 光动力抗菌疗法; 创伤感染; 光敏剂; 卟啉衍生物

中图分类号 O43; Q631; R641 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP54.031701

Photodynamic Therapy Combined with Antibiotics for Treatment of Massive Traumatic Infection in Rats

Zhao Zhanjuan¹, Xu Zehua², Hao Yiming², Shang Yazhen³, Liu Tianjun⁴

¹Medical College, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China;

²Department of Preventive Medicine and Health Management, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China;

³Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China;

⁴Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Abstract To investigate the treatment effect of new porphyrin photosensitizer PA1 mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) combined with antibiotics on the rat model with severe massive traumatic infection and the mechanism of the combination treatment, 24 healthy male (clean grade) Wistar rats were used to create the massive trauma infection model. Rats were randomly divided into four groups: model control group, PACT group, antibiotic treatment group and PACT+antibiotic treatment group. There were six rats in each group. The wound healing rate and the number of bacterial colonies were detected at different time points in each experimental group during 8 d treatment. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the peripheral tissues of the wound. The results show that PACT combined with antibiotic therapy can significantly reduce inflammatory reaction and bacterial colonies in rat trauma tissues, accelerate the wound healing, shorten the wound healing time, increase the content of basic fibroblast factor, and inhibit the expression of

收稿日期: 2016-08-22; **收到修改稿日期:** 2016-11-07

基金项目: 天津市重大科技支撑项目(12ZCZDSY11900)、河北大学医学学科建设项目(2015A2001)、河北大学大学生创新训练计划(2016149)

作者简介: 赵占娟(1975—),女,博士,副教授,主要从事激光光动力治疗方面的研究。E-mail: zhaozhanjuanv@163.com

* **通信联系人.** E-mail: Tianjunliu@hotmail.com

inflammatory cytokines TNF- α and IL-6. The treatment effect of PACT combined with antibiotic therapy is better than antibiotic therapy or PACT therapy alone. It suggests that PACT combined with antibiotics can treat large area traumatic infection.

Key words medical optics; photodynamic antimicrobial therapy; traumatic infection; photosensitizer; porphyrin derivative

OCIS codes 170.1420; 170.4730; 170.5180; 170.6930

1 引言

损伤引起的皮肤破损性疾病在临床治疗上比较棘手。由于抵御微生物侵袭的皮肤屏障受到破坏,细菌由痂内向深部侵袭,当自身抵抗力下降、细菌毒力增强时会引起深部组织感染。尤其皮肤深度创伤后,创面及其周边组织毛细血管扩张,导致毛细血管通透性增加,体液渗出,局部组织水肿,这种改变恰好又成为细菌良好的培养基,因此深度创面感染几乎不可避免。常见的深度创面感染菌群主要有以抗药性金黄色葡萄球菌(MRSA)为代表的革兰阳性细菌及以铜绿假单胞菌、大肠埃希菌为代表的革兰阴性细菌^[1]。其中 MRSA 是一种临床上常见的毒性较强的耐药细菌,MRSA 感染几乎遍及全球,已成为院内感染的重要病原菌之一^[1-2]。铜绿假单胞菌和大肠埃希菌都是致病力较低但抗药性较强的杆菌,在烧伤或创伤部位感染中常见^[3],能引起化脓性病变,也可引起心内膜炎、胃肠炎、脓胸甚至败血症^[4]。近年来,抗生素的滥用使得细菌的耐药性越来越强,由细菌感染造成的死亡率越来越高^[5],对人类健康构成了严重的威胁。

光动力抗菌疗法(PACT)是基于激光、氧和光敏剂 3 种因素共同作用的氧化损伤机制的一种抗菌疗法,很难使细菌产生耐药性^[6]。研究表明卟啉类光敏剂可用于局部抗菌^[7],与正常组织相比,细菌对该类光敏剂具有良好的吸收性,且短时间吸收即可达到饱和^[8-9]。大面积深度创伤发生时,由于屏障系统被破坏,细菌很容易穿透屏障导致败血症。PACT 可外用,但体内需靠自身免疫系统清除细菌,若其感染程度超过自身免疫承受范围,便容易引起败血症等疾病。基于此,将 PACT 和抗生素的优势结合起来,利用 PACT 清除体表细菌的同时使用抗生素清除体内细菌,使用少量抗生素即可起到疗效。本课题组前期实验表明新型卟啉类光敏剂 PA1 对革兰阴性菌及阳性菌均有很好的杀伤性,筛选出了治疗效果较好的剂量。本文将抗生素与 PACT 最佳剂量结合共同治疗大鼠重度创伤感染模型,旨在研究抗重度感染的临床治疗方法,为 PACT 的临床应用提供实验依据。

2 材料与方方法

2.1 试剂与仪器

试剂采用卟啉类光敏化合物 PA1 和头孢唑林。卟啉类光敏化合物 PA1 为自行合成,紫红色粉末,其结构如图 1 所示。体外实验用二甲基亚砜(DMSO)配制浓度为 10^{-2} mol/L,动物实验用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)配制到合适浓度使用。

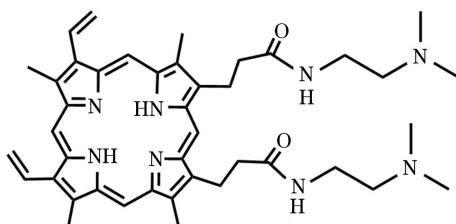


图 1 化合物 PA1 的结构图

Fig. 1 Chemical structural formula of PA1

头孢唑林由华北制药股份有限公司生产。使用时用无菌生理盐水稀释,按照说明将人的给药剂量折算成大鼠的给药剂量。

实验采用的仪器有半导体激光器(7404, Intense 公司,美国,650 nm 光纤输出);多功能酶标仪(Thermofisher 公司,美国);细菌培养箱(SANYO,日本);酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(北京中杉金桥有限公司)。

2.2 实验菌株

标准质控菌株大肠埃希菌(ATCC 25922),MRSA(临床分离菌株),铜绿假单胞菌(ATCC 27853),由解放军 307 医院惠赠。

从复苏的 3 种菌株固体培养基中,各挑取一个菌落于 40 mL 无菌肉汤中,放置在 35 °C,250 r/min 振荡 24 h,然后各取一定量离心(9000g,1 min),去上清,用 PBS 清洗 1 次,然后再用 PBS 稀释,体内实验最后按照比例将混合菌定量为 MRSA 10^{10} mL⁻¹,大肠埃希菌 5×10^9 mL⁻¹,铜绿假单胞菌 5×10^9 mL⁻¹。

2.3 动物模型的制备

健康雄性(清洁级)Wistar 大鼠,体重 210~230 g,鼠龄 7 周,均由北京华阜康实验动物中心提供,动物合格证编号为 SCXK(京)2009-0004。实验前 1 周将大鼠置于实验环境中饲养,室温 20~25 °C。分别采用中度感染模型和重度感染模型进行实验,中度感染模型共 24 只大鼠,随机分成模型对照组、PACT 治疗组、抗生素治疗组、PACT+抗生素治疗组共 4 组,每组 6 只;重度感染模型共 50 只大鼠,随机分成模型对照组、PACT 治疗组、抗生素治疗组、PACT+抗生素治疗组和空白对照组共 5 组,每组 10 只。

2.3.1 中度感染模型制备

采用改良全层皮肤缺损法^[10]制成创伤感染性动物体表溃疡模型。实验当日大鼠禁食,腹腔注射 10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,固定大鼠呈俯卧位,背部剃毛,剃毛面积约 7 cm×5 cm,常规消毒,无菌条件下,选择距肩胛骨以下 2 cm、背中部脊柱两侧 1 cm 处用直径 15 mm 的环钻垂直于皮肤压出 4 个圆形痕迹,即背部两侧各制备 2 个创面(1.77 cm²/个),沿压痕用无菌弯手术剪剪去全层皮肤(剔除部分深筋膜),制成圆形全层皮肤缺损创面,伤口止血备用。充分止血后在伤口表面覆盖与创面大小相仿的圆形纱布,每块纱布表面滴入 50 μL 新配制的 MRSA(10^{10} mL⁻¹)、大肠埃希菌(5×10^9 mL⁻¹)、铜绿假单胞菌(5×10^9 mL⁻¹) 3 种菌株混悬液,然后用纱布包扎固定。动物分笼饲养,给予充足的水和食物。采用 Meeh-Rubner 公式计算,4 个创面面积达 7.07×10^{-4} m²,约占大鼠体表面积的 21%。

2.3.2 重度感染模型制备

进一步改进中度感染的造模方法。1) 增加创伤面积。在上述致伤部位,用直径 18 mm 的环钻垂直于皮肤压出 1 个圆形痕迹(2.55 cm²),使用无菌弯手术剪沿压痕剪去全层皮肤(剔除深筋膜),制成圆形全层皮肤缺损创面,止血备用。每只大鼠制备 4 个创面,采用 Meeh-Rubner 公式计算,4 个创面面积达 1.02×10^{-3} m²,约占大鼠体表面积的 31.6%。2) 增加创伤表面滴加的混合细菌的量。制备的大鼠 4 个创面上每个创面滴加 100 μL 新配制的 MRSA(10^{10} mL⁻¹)、大肠埃希菌(5×10^9 mL⁻¹)、铜绿假单胞菌(5×10^9 mL⁻¹) 3 种菌株混悬液。其余操作同中度感染模型制备。空白对照组只制作创面,不加细菌。

2.4 治疗方案

创伤感染 48 h 后,模型对照组每个创面各滴加 50 μL(共 200 μL)生理盐水;抗生素组对每只大鼠经尾静脉注射头孢唑林 0.8 mL(剂量换算后);PACT 组:每个创面各滴加 50 μL(共 200 μL)光敏剂 PA1 溶液(187.5 μmol/L)+激光治疗;PACT+抗生素组:每个创面各滴加 50 μL(共 200 μL)PA1 溶液(187.5 μmol/L)+激光治疗+尾静脉注射抗生素 0.8 mL 共同治疗。

PACT 组和 PACT+抗生素组动物给予 PA1 后需避光饲养 30 min 后进行激光局部照射皮肤表面,光照时间 10 min,激光能量密度 60 J/cm²,光斑直径 1.5 cm;治疗后移至暗室,避光饲养。

抗生素给药方式:每 2 d 给药 1 次;光敏剂给药方式:每 2 d 给药 1 次;激光光照方式:每天照光 1 次。共治疗 8 d,其后各组大鼠常规饲养,直到实验结束。

2.5 检测指标

2.5.1 在体抑菌影响

取无菌棉签蘸取生理盐水,由创面一侧向另一侧滚动均匀涂抹全创面 1 次,立即置入装有 5 mL 生理盐水的无菌试管内。检测时用生理盐水倍比稀释至 10^{-6} ,然后每个稀释梯度各取 100 μL 菌液涂布于普通肉汤琼脂平板,每个梯度涂布两个平板。37 °C 过夜培养,观察菌落形态,并计数菌落形成单位(CFU)。创面接种植物 24 h 后,测定各实验组治疗过程中第 1,4,9,12 d 创面 3 种菌落的总数量。

2.5.2 创面愈合率

建模后,每天观察伤口愈合情况,数码相机拍照,于第 3,6,9,12 d 用游标卡尺测量创面直径,计算创面面积及创面愈合率。创面愈合率($\%$)=(初始创伤面积-未愈合创面面积)/初始创伤面积。

2.5.3 ELISA 检测创面周边组织细胞因子的表达

治疗第 4,8,12 d 取创面新生肉芽组织,用 ELISA 方法检测创面周边组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白介素 6(IL-6)的表达。

2.6 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行数据处理分析。数据用平均数 \pm 标准差表示,多组间比较采用重复测量资料的方差分析。同一时刻不同组间比较采用单因素方差分析,多重比较用最小显著差异法(LSD) t 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 创面愈合率比较(中度创伤感染)

表 1 为各组第 3、6、9、12 d 伤口愈合率。由表 1 可见,治疗 3 d 时,PACT 组、抗生素组、PACT+抗生素组愈合率均大于模型对照组($P < 0.05$)。PACT 治疗组创面愈合率高于抗生素组($P < 0.05$),PACT+抗生素组的创面愈合率也高于抗生素组但差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗 6~9 d 时各组创面愈合率均增加,PACT 治疗组、抗生素组、PACT+抗生素组愈合率均明显高于模型对照组($P < 0.05$)。其中 PACT 治疗组创面愈合率依然高于抗生素组($P < 0.01$)。治疗 12 d 时,PACT+抗生素组创面几乎全部愈合,愈合率高于 PACT 组和抗生素组($P < 0.01$)。

表 1 不同治疗时间后各组伤口愈合率比较

Table 1 Wound healing rate of the four groups after treatment for different period

Group	Healing rate /%			
	3 d	6 d	9 d	12 d
Control	10.1 \pm 5.2	50.3 \pm 9.8	75 \pm 11	81.3 \pm 9.2
Cefazolin	33.4 \pm 8.9 [▲]	68.8 \pm 8.5 [▲]	89.2 \pm 4.9 [▲]	95.2 \pm 2.8 [▲]
PACT	42.3 \pm 8 ^{▲*}	75 \pm 8.3 [▲]	91.8 \pm 4.0 [▲]	98.2 \pm 1.8 [▲]
PACT+cefazolin	38.4 \pm 7.7 [▲]	71.3 \pm 11 [▲]	92 \pm 4.2 [▲]	99.3 \pm 1.5 ^{▲*}

Notes: [▲] compared with control group, $P < 0.05$; * compared with cefazolin group; $P < 0.05$

3.2 不同时间点创面下菌落数的比较(中度创伤感染)

由表 2 可见,治疗 1 d 时,各治疗组的菌落数与模型对照组相比无统计学意义($P > 0.05$);治疗 4 d 时,各组创面下菌落数开始降低,PACT 组和 PACT+抗生素组创面下菌落数少于模型对照组和抗生素组,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗 12 d 时,模型对照组创面下菌落数依然很多,抗生素组创面下菌落数少于模型对照组,PACT 治疗组对 3 种菌的抑制高于抗生素组($P < 0.05$),PACT+抗生素组创面下菌落数最少。PACT+抗生素组对 3 种菌的抑制效果最好。

表 2 不同治疗时间后各组之间菌落数比较

Table 2 CFU of the four groups after treatment for different period

Group	CFU /mL ⁻¹			
	1 d	4 d	9 d	12 d
Control	581667 \pm 277878	212667 \pm 216007	13425 \pm 22007	1022 \pm 541
Cefazolin	840000 \pm 184391	84333 \pm 32010	7483 \pm 3681	57 \pm 20 [*]
PACT	1126667 \pm 563371	670 \pm 302 ^{*▲}	230 \pm 181 [▲]	6 \pm 4.5 ^{*▲}
PACT+cefazolin	918333 \pm 468377	932 \pm 663 ^{*▲}	46 \pm 27 ^{▲★}	4.5 \pm 3.2 ^{*▲}

Notes: [▲] compared with control group, $P < 0.05$; * compared with cefazolin group, $P < 0.05$; [★] compared with PACT group, $P < 0.05$

3.3 创面周边组织 bFGF、TNF- α 、IL-6 含量变化(中度创伤感染)

图 2 为创面周边组织 bFGF、TNF- α 、IL-6 的表达量。* 号表示与对照组相比具有统计学意义($P < 0.05$)。由图 2(a)可见,在整个愈合过程中,各治疗组诱导 bFGF 的表达水平均高于模型对照组($P < 0.05$);治疗 8 d 时,PACT+抗生素组诱导 bFGF 的表达水平最高,显著高于模型对照组和其他治疗组($P < 0.05$),在治疗后期(12 d),PACT 组诱导 bFGF 的表达水平高于抗生素组。PACT+抗生素组能诱导 bFGF 的高水平表达,且以创伤愈合中期(8 d 左右)的表达水平最高,因而认为 PACT 联合抗生素治疗创伤感染能显著上调 bFGF 的表达来发挥其促愈作用。由图 2(b)可见,治疗 4 d 时,各组大鼠创面组织 TNF- α 含量都很高,模型对照组大鼠组织 TNF- α 含量最高,PACT+抗生素组大鼠组织 TNF- α 含量最低(与模型对照组相比具有统计学意义, $P < 0.05$)。治疗后第 8 天和第 12 天,各组大鼠创面组织 TNF- α 含量均降低,其中 PACT+抗生素组 TNF- α 含量最低(与模型对照相比具有统计学意义, $P < 0.05$)。

由图 2(c)可见,整个创伤恢复过程中,各组创伤组织中 IL-6 含量均逐渐降低。治疗 4 d 时,模型对照组大鼠组织 IL-6 含量最高,PACT+抗生素组最低。治疗后 8 天,各组大鼠创伤组织中 IL-6 含量降低,模型对照组大鼠组织 IL-6 含量显著高于其他各治疗组($P < 0.05$)。治疗后 12 天,PACT+抗生素组创伤组织中 IL-6 含量最低,与模型对照组相比具有统计学意义($P < 0.05$)。

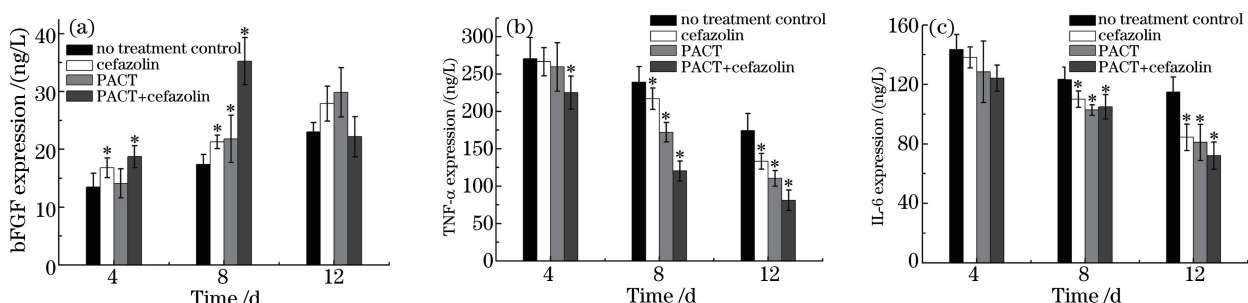


图 2 治疗 4,8,12 d 后的 ELISA 检测结果。(a) bFGF;(b) TNF- α ;(c) IL-6 含量表达

Fig. 2 (a) bFGF; (b) TNF- α ; (c) IL-6 expression determined by ELISA after treatment for 4, 8, 12 d

3.4 各组大鼠生存率分析(重度创伤感染)

图 3 为各组重度感染大鼠生存率。图 3 结果表明,治疗 5 d 时,模型对照组感染大鼠已经大部分死亡,存活率为 40%,抗生素组存活率为 50%,PACT 治疗组存活率为 70%,PACT+抗生素治疗组却有 80%的存活率。实验中还观察到,感染后大鼠显示相似的感染症状:体重减轻,皮毛不光滑,不爱活动,蜷缩等,但经过 PACT+抗生素治疗后大鼠体重开始恢复,变得活泼好动。

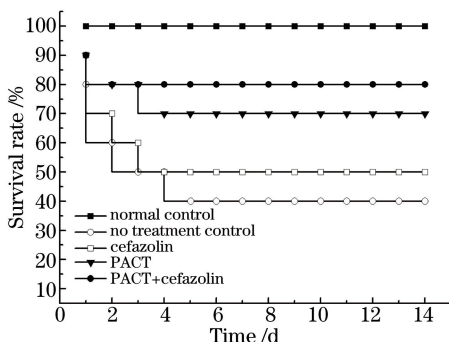


图 3 各组重度感染大鼠生存率随时间的变化

Fig. 3 Survival rates of rats versus time after infection in different groups

4 讨 论

MRSA 是目前院内感染的重要病原菌之一,不仅对 β -内酰胺类抗生素(包括亚胺培南等碳青霉烯类)耐药,而且对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、利福平等均产生不同程度的耐药

性^[11-12]。目前,可供临床治疗 MRSA 的药物非常有限,除传统的糖肽类抗生素(万古霉素)及新研发的抗生素(利奈唑胺及达托霉素)外,其他抗生素的效果均不佳。万古霉素具有严重的肾毒性及耳毒性,而且临床已出现了耐万古霉素的 MRSA 菌株(VRSA)。铜绿假单胞菌和大肠埃希菌也是最常见的机会性致病菌,对多种抗菌药物存在多种耐药机制,治疗由其所致感染可选择的有效抗菌药物甚少^[13]。近年来,由 MRSA 和铜绿假单胞菌、大肠埃希菌所导致的败血症、心内膜炎、骨髓炎、脑膜炎在临床治疗中成为越来越棘手的问题,患者病情往往危急,症状重,抗生素也难以控制^[14]。因此,研制新的抗感染药物尤为迫切。

研究表明,光动力抗菌疗法在治疗耐药菌引起的感染方面具有一定的优势^[15-19]。实验采用大鼠皮肤大面积创伤感染模型,滴加 3 种混合菌株(临床深度创伤组织中最常见的 3 种菌株),模拟临床大面积创伤感染^[20],结果表明 PACT 联合抗生素治疗可以提高大鼠感染创面的愈合率,对创面存在的革兰阴性菌与革兰阳性菌有很好的杀菌作用,治疗创面感染疗效显著,好于单用抗生素或单用 PACT 治疗。

创伤修复过程中,bFGF 是最活跃的促血管形成因子^[21],可以促进毛细血管内皮细胞及血管周围的细胞增殖,诱导微血管的形成。还能刺激成纤维细胞增殖、分化和合成新的细胞外基质,促进肉芽组织生长,增加其上皮化^[22-24]。TNF- α 和 IL-6 是具有多种生物学活性的炎性细胞因子,是反映组织炎症程度的灵敏指标^[25-27]。这些因子的表达水平可作为评价创伤愈合速度和愈合质量的指标。实验通过 ELISA 检测了不同时间点创面组织中 bFGF 和 TNF- α 、IL-6 因子的含量变化。结果表明:在整个愈合过程中,治疗组诱导 bFGF 的表达水平均高于模型对照组,PACT 组诱导 bFGF 的表达水平高于抗生素组。PACT+抗生素组诱导 bFGF 的表达水平最高,显著高于模型对照组、PACT 组及抗生素组。创伤恢复过程中,各组创伤组织中 TNF- α 和 IL-6 表达量均逐渐降低,但 PACT+抗生素组创伤组织中 TNF- α 和 IL-6 表达含量最低。以上结果说明 PACT 联合抗生素治疗创伤感染能显著上调 bFGF 的表达来发挥其促愈作用,同时还能抑制创伤组织 TNF- α 和 IL-6 的表达,减弱创伤诱发的过度炎症反应,从而有利于创伤组织的修复。

为了进一步确定 PACT 联合抗生素治疗大面积创伤感染的效果,创建了大面积创伤重度感染模型(创伤面积加大,滴加的混合菌量增加一倍),治疗方法与中度感染相同。结果表明,感染 5 d 后模型对照组大鼠大部分死亡,存活率为 40%,而 PACT+抗生素组却有 80%的存活率。经过 PACT 联合抗生素治疗,存活的大鼠变得活泼,体重开始恢复,表明 PACT 联合抗生素治疗的有效性。

5 结 论

PACT 联合抗生素治疗能显著上调创面组织中 bFGF 的表达,显著降低组织中炎症相关因子 TNF- α 和 IL-6 的表达,能促进大鼠创面纤维合成和重新分布,加快创面愈合速率;还可以减少创面组织中细菌的数量,减少创伤组织的炎症反应,有助于创伤组织的修复。

参 考 文 献

- [1] Duckworth G J. Diagnosis and management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. BMJ, 1993, 307(6911): 1049-1052.
- [2] Moradi N, Javadpou S, Karmostaji A. Reduced sensitivity of *Staphylococcus aureus* to vancomycin[J]. Bimonthly Journal of Hormozgan University of Medical Sciences, 2011, 15(3): 169-177.
- [3] van Delden C, Iglewski B H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Emerging Infectious Diseases, 1998, 4(4): 551-560.
- [4] Gordon S M, Rn J M S, Keys T F, et al. Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit[J]. Annals of Thoracic Surgery, 1998, 65(1): 95-100.
- [5] Ryono R, Oda G, Shankar G, et al. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) distribution within the veterans affairs healthcare system[C]. IDWeek 2014 Meeting of the Infectious Diseases Society of America, 2014: 355.
- [6] Tavares A, Carvalho C M, Faustino M A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment[J]. Marine Drugs, 2010, 8(1): 91-105.
- [7] Polo L, Segalla A, Bertoloni G, et al. Polylysine-porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology, 2000, 59(1-3): 152-158.

- [8] Odont N S S D, Wilson M, Bsc T B, *et al.* Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis*, evaluated *in vitro* [J]. *Lasers in Surgery & Medicine*, 1996, 18(3): 253-259.
- [9] Dai T, Huang Y Y, Hamblin M R. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art [J]. *Photodiagnosis & Photodynamic Therapy*, 2009, 6(3-4): 170-188.
- [10] 赵京禹, 付小兵, 雷永红, 等. 大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型的制备 [J]. *感染、炎症、修复*, 2008, 9(1): 64.
- [11] Barrett J F. MRSA: status and prospects for therapy? An evaluation of key papers on the topic of MRSA and antibiotic resistance [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2005, 8(6): 515-519.
- [12] Bergerbächi B, Strässle A, Gustafson J E, *et al.* Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 1992, 36(7): 1367-1373.
- [13] Tan Liming, Tang Xiaoyi, Zhao Min, *et al.* The effect of Chinese traditional medicine (coptis, *Scutellaria baicalensis*) on infection wound due to *Pseudomonas aeruginosa* on scald rats [J]. *Journal of Hunan Normal University*, 2011, 8(1): 79-81.
谭黎明, 唐小异, 赵敏, 等. 黄连、黄芩提取物对烫伤后感染铜绿假单胞菌的药效初步观察 [J]. *湖南师范大学学报*, 2011, 8(1): 79-81.
- [14] Haddadin A S, Fappiano S A, Lipsett P A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit [J]. *Postgraduate Medical Journal*, 2002, 78: 385-392.
- [15] Lambrechts S A G, Demidova T N, Aalders M C G, *et al.* Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice [J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2005, 4(7): 503-509.
- [16] Zolfaghari P S, Packer S, Singer M, *et al.* *In vivo* killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent [J]. *BMC Microbiology*, 2008, 9: 27.
- [17] Hamblin M R, Zahra T, Contag C H, *et al.* Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections *in vivo* [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2003, 187(11): 1717-1725.
- [18] Park J H, Ahn M Y, Kim Y C, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6 against *Staphylococcus aureus* Xen29 [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(4): 509-514.
- [19] Ragàs X, Sánchezgarcía D, Ruizgonzález R, *et al.* Cationic porphycenes as potential photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53(21): 7796-7803.
- [20] 葛绳德. 烧伤和创伤后革兰阳性细菌感染 [J]. *国外医学*, 1993, 14(1): 29-33.
- [21] Galeano M, Deodato B, Altavilla D, *et al.* Effect of recombinant adeno-associated virus vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer on wound healing after burn injury [J]. *Critical Care Medicine*, 2003, 31(4): 1017-1025.
- [22] Pierce G F, Tarpley J E, Allman R M, *et al.* Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB [J]. *American Journal of Pathology*, 1994, 145(6): 1399-1410.
- [23] Chen Hongli, Wang Hong, Wang Chao, *et al.* Research of oxidative stress reaction induced by 635 nm/808 nm double wavelength low level laser therapy on CCC-ESF [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2015, 52(8): 081703.
陈洪丽, 王宏, 王超, 等. 635 nm/808 nm 双波长低能量激光对成人成纤维细胞氧化应激反应的研究 [J]. *激光与光电子学进展*, 2015, 52(8): 081703.
- [24] Zhang Haibo, Li Yingxin, Hu Tiantian, *et al.* Impact of laser acupuncture on CIA rat serum IL-1 β , IL-15, IL-17, TNF- α , VEGF and COR [J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(3): 0304002.
张海波, 李迎新, 胡甜甜, 等. 激光针灸对 CIA 大鼠血清 IL-1 β 、IL-15、IL-17、TNF- α 、VEGF 和 COR 的影响 [J]. *中国激光*, 2014, 41(3): 0304002.
- [25] Mcgee G S, Davidson J M, Buckley A, *et al.* Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing [J]. *Journal of Surgical Research*, 1988, 45(1): 145-153.
- [26] Kobayashi E, Yamauchi H. Interleukin-6 and a delay of neutrophil apoptosis after major surgery [J]. *Archives of Surgery*, 1997, 132(2): 209-210.
- [27] Biffi W L, Moore E E, Moore F A, *et al.* Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor [J]. *Journal of Trauma*, 1996, 40(4): 578-579.