

氧化石墨烯的片层尺寸对抗菌活性的影响

SPM-016

摘要： 抗生素治疗面临着来自耐药性的巨大挑战，而氧化石墨烯（graphene oxide, GO）具有非抗生素依赖的抗菌活性，因而具有重要意义。然而，GO 的尺寸大小与抗菌活性的关系及其对抗菌的机制调节仍然未知。本文通过制备四种不同尺寸的 GO 悬浮液，结合生物实验，证明了 GO 尺寸与其对革兰氏阳性致龋菌变形链球菌的抗菌活性的影响呈抛物线关系，其中通过使用岛津扫描探针显微 SPM-9600 对 GO 的尺寸进行准确表征以确保该实验结果的准确性和可重复性。另外还发现了 GO 尺寸对基于纳米生物相互作用的物理抗菌机制的调节作用，这对于指导 GO 在临床抗菌中的设计和开发具有重要意义。

关键词： 氧化石墨烯 尺寸大小 抗菌活性

氧化石墨烯（graphene oxide, GO）是石墨烯的氧化物，仍保持石墨的层状结构，但在每一层的石墨烯单片上引入了许多含氧官能团，这些官能团赋予 GO 良好的亲水性、分散性和生物相容性，使得 GO 在生物医学领域具有广阔的应用前景，如生物成像、生物传感器、生物安全性、药物传送和抗菌材料。

GO 的一般抗菌机制比较清楚，但 GO 的片层大小如何影响其抗菌活性及相关机制尚不清楚。据推测，GO 的基于纳米生物相互作用的物理机制（切割效应和细胞截留效应）可能会因其尺寸大小而异。相同数量

下，尺寸越小的 GO，边缘密度越高，切削效果越强；相反，尺寸较大的 GO 具有更宽的横向尺寸，因此可能具有更高的捕获细菌细胞的潜力。基于此，四川大学华西口腔医院科研团队通过制备四种不同尺寸的 GO 悬浮液，同时将 GO 暴露浓度精确控制在同一水平，使用病原体变形链球菌（变形链球菌）为模型，研究了 GO 尺寸对其整体抗菌活性的影响，并揭示了 GO 片层尺寸与其抗菌活性的关系。在该研究中使用岛津扫描探针显微 SPM-9600 对 GO 的尺寸进行准确表征，确保了测试结果的准确性和可重复性。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津扫描探针显微镜 SPM-9600



图 1 岛津 SPM-9600

1.2 分析条件

功能模式：相位模式

探针：弹性系数 42 N/m

扫描器：30 m x 30 m x 5 m

■ 结果与讨论

2.1 GO 的制备及尺寸大小的确认

首先通过 Hummers 方法制备 GO 悬浮液，然后进行冷冻干燥获得 GO 粉末。将一定量的 GO 粉末加入到蒸馏水中，通过水浴超声处理获得了均匀的 GO 原液悬浮液（1 mg/mL）。用水稀释至 200 $\mu\text{g/mL}$ 后，将 GO 悬浮液分成四份以制备不同尺寸的 GO 悬浮液，并分别命名为 GO-1、GO-2、GO-3 和 GO-4。其中 GO-1 和 GO-2 分别在 100 W 下通过探头超声处理 15 分钟和 5 分钟获得，GO-3 是通过在 50 W 下进行 1 秒的探头超声处理获得，GO-4 是通过水浴超声处理 1 分钟获得。使用动态光散射（DLS）对四种 GO 悬浮液的流体动力学尺寸进行测定，并使用岛津扫描探针显微镜 SPM-9600 对其尺寸进行快速而准确的测量。

扫描探针显微镜测试的制样方法：将四种 GO 悬浮液稀释至 20-80 $\mu\text{g/mL}$ ，并分别将稀释后的 GO 悬浮液滴于干净的云母片上。待溶剂完全挥发后，使用岛津 SPM-9600 的相位模式，在大气环境中通过简便的操作，快速而准确的获得了四种 GO 样品的形貌，测试结果如图 2 所示。从图中可以看出，四个样品均为片状结构，且 GO-1、GO-2、GO-3、GO-4 的片层尺寸逐渐增大。

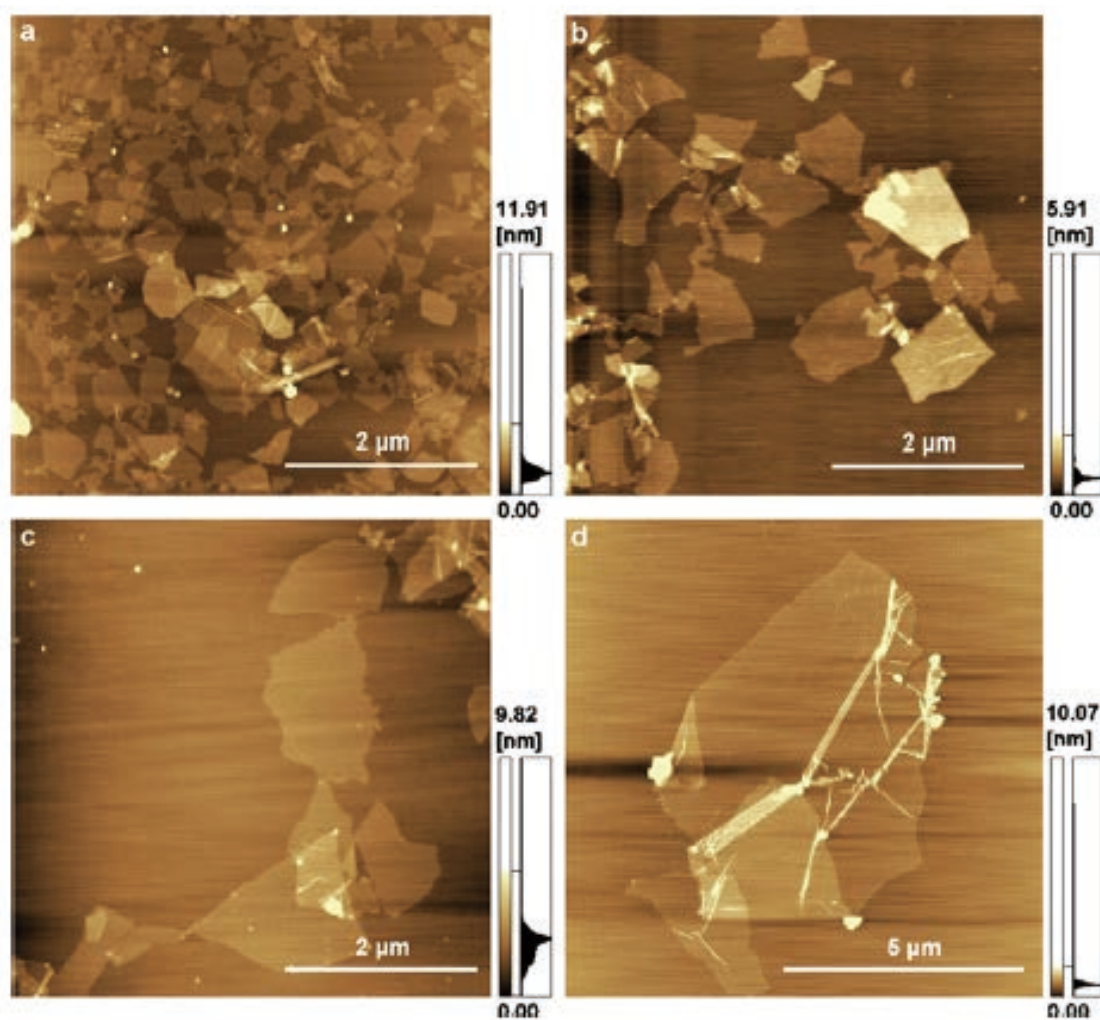


图 2 四种 GO 样品的 SPM 形貌图 (a, GO-1; b, GO-2; c, GO-3; d, GO-4)

2.2 GO 和变形链球菌之间的纳米生物相互作用

将变形链球菌悬置入营养液中并在正常培养条件 (10 % H₂、5 % CO₂、85 % N₂ 和 37°C) 下放入厌氧室中孵育。将细菌悬浮液用生长培养基稀释 200 倍并培养 12-16 小时直至指数期。分别将四种 GO 悬浮液 (25 μg/mL) 与变形链球菌细胞 (1×10⁷ CFU/mL) 混合 10 秒, 而后立即在 2.5% 戊二醛中固定 12 小时 (4°C), 然后用 PBS 洗涤和不同体积分数的乙醇 (50%、75%、95% 和 100%) 进行梯度脱水 10 分钟。待样品干燥后, 使用扫描电子显微镜 (SEM) 进行观察, 结果如图 3 所示。图 3a 显示了变形链球菌细胞的正常形态, 清晰地呈现出光滑的细胞壁、完整的细胞形状和细胞分裂环 (Z 形环, 白色空心箭头)。在与 GO 短暂作用后, 细胞从细长形状变为球形, 并且细胞壁变得皱缩 (图 3b-e)。有趣的是, 在 GO-1 和 GO-2 的小尺寸组中也发现了细胞 Z 环 (白色空心箭头, 图 3b-c), 但该现象在 GO-3 和 GO-4 的大尺寸组中未出现 (图 3d-e)。此外, 细胞截留效应是公认的 GO 物理抗菌机制之一, 在最小的 GO-1 中未发现 (3b), 但在 GO-2、GO-3 和 GO-4 中明显观察到 (白色实心箭头, 图 3c-e)。上述结果表明, 变形链球菌细胞和 GO 之间的纳米生物相互作用发生得非常快, 细胞形态的不同变化也意味着 GO-细菌相互作用模式会根据 GO 大小而变化。

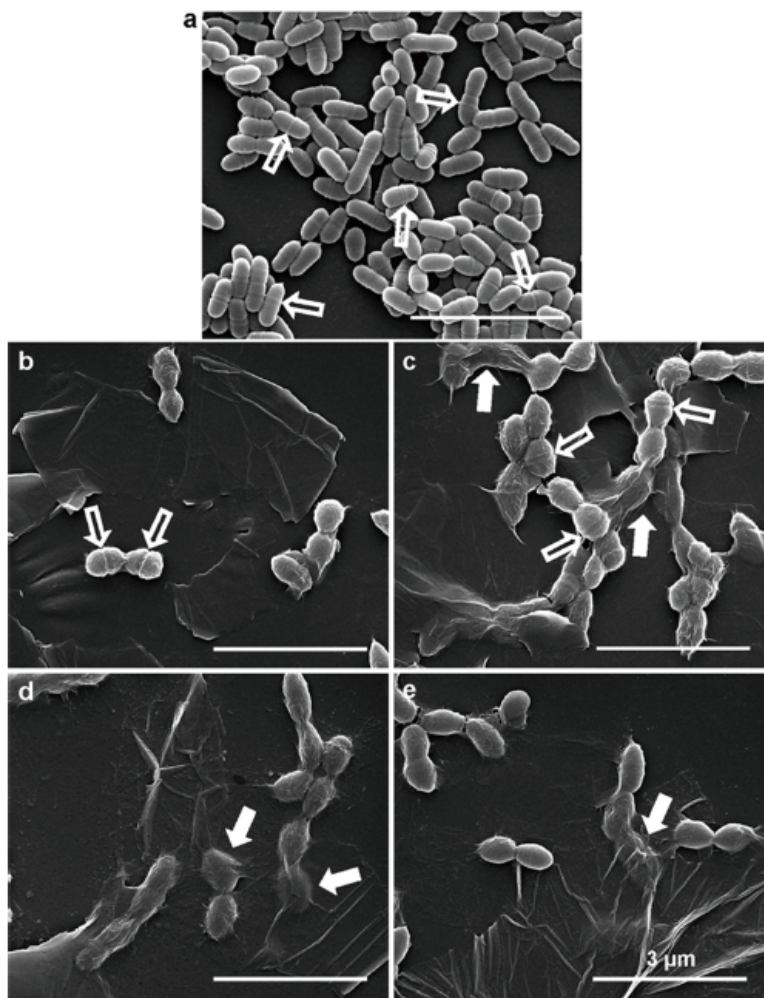


图 3 变形链球菌细胞与不同尺寸 GO 相互作用后的 SEM 图

a) 变形链球菌细胞; b-e) 变形链球菌细胞分别与 b) GO-1、c) GO-2、d) GO-3 和 e) GO-4 孵育 10 秒。

白色空心箭头表示细胞分裂环 (Z 环), 白色实心箭头表示被 GO 片包裹的变形链球菌细胞。

2.3 GO 对变形链球菌的抗菌活性

革兰氏阳性菌通常被认为是龋齿的主要病原体，被用作模型细菌，并通过菌落形成单位（CFU）计数法检测了不同尺寸 GO 的抗菌活性。使用四种不同浓度的 GO 悬浮液与革兰氏阳性致龋菌变形链球菌作用，其结果如图 4 所示。在图 4a 中可以较明显的观察到 GO 在孵育 30 分钟后显著降低了细菌 CFU 数（图 4a）。具体而言，与 GO-1、GO-2、GO-3 和 GO-4 作用后的平均 CFU 分别为初始值的 40.84%、20.53%、55.41% 和 61.81%。由 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GO-1、GO-2、GO-3 和 GO-4 引起的细菌活力损失（与对照组相比）分别为 57%、78%、41% 和 35%（图 4b），这些结果表明 GO 的抗菌活性具有尺寸依赖性。延长孵育时间并进一步增加 GO 浓度可以显著增强 GO 的抗菌活性（图 4b, c, d），表明 GO 的抗菌作用具有浓度和时间依赖性。另外，在这项工作中，首次证明了 GO 的大小与其抗菌活性呈抛物线关系。将 GO 尺寸从 1295 nm（GO-1）增加到 2015 nm（GO-2）显著增强了抗菌活性（CFU 从 40.84% 降低到 20.53%），但当进一步增加尺寸到 3074 nm（GO-3）、和 4544 nm（GO-4）时，抗菌活性又显著降低（CFU 分别增加到 55.41% 和 61.81%）。换言之，GO-2（约 2015 nm）的尺寸最佳，对变形链球菌的抗菌活性最高。

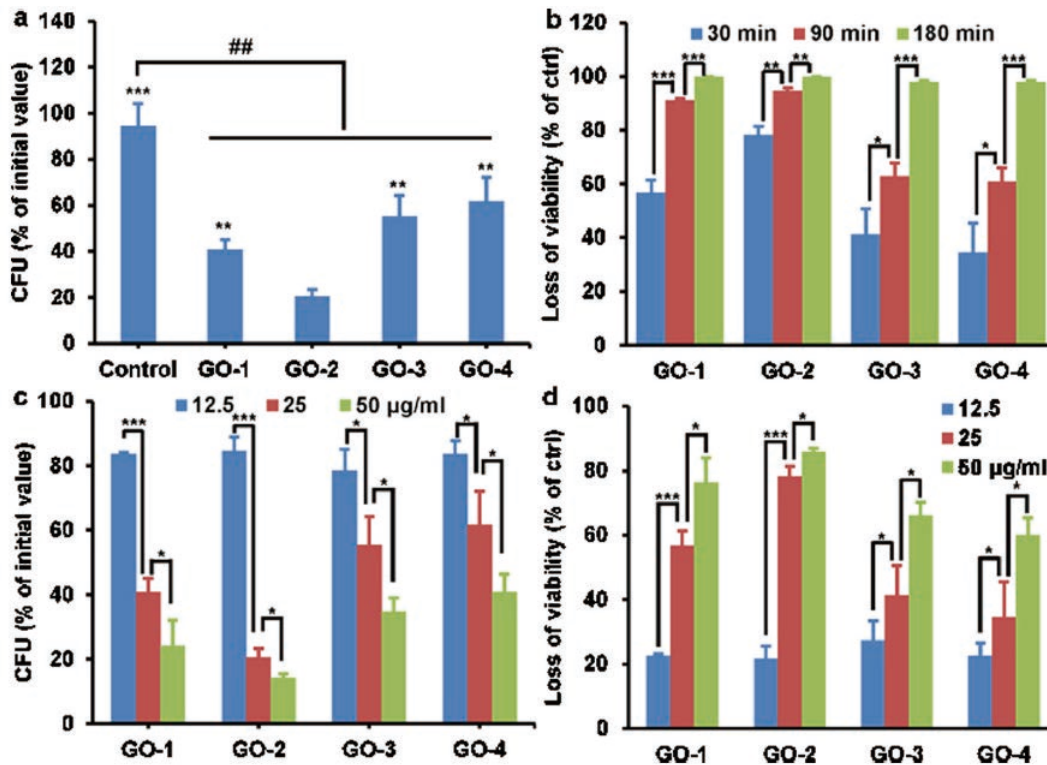


图 4 通过菌落形成单位（CFU）计数测定法检测 GO（25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）对变形链球菌的抗菌活性。a) GO 在孵育 30 分钟后的尺寸依赖性抗菌活性。GO-1: 1295 nm; GO-2: 2015 nm; GO-3: 3074 nm; GO-4: 4544 nm。统计学意义: ** (vs GO-2) $p < 0.01$; *** (与 GO-2 相比) $p < 0.001$; ## $p < 0.01$ 。b) GO 的时间依赖性抗菌活性由细胞活力的丧失呈现。c-d) GO 的浓度依赖性抗菌活性由 c) 相对 CFU 数（与初始值相比）和 d) 细胞活力的丧失表示。统计学意义: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。数据表示为平均值 \pm 标准差 ($n = 3$)。

■ 结论

GO 的抗菌机制包括切割作用、细胞包埋作用和氧化应激作用，其独立于抗生素的作用机制，是一种很有前途的抗菌剂，其自身尺寸大小可会影响其与细胞的作用，从而影响其抗菌能力。本文通过研究四种不同尺寸的 GO 悬浮液分别与变形链球菌细胞相互作用，证明了 GO 尺寸与其抗菌活性之间的抛物线关系。同时，进一步揭示了 GO 的片层尺寸对 GO 基于纳米生物相互作用的物理抗菌机制的调节。该工作有望指导 GO 在临床抗菌中的设计和开发。在该研究中，使用岛津 SPM-9600 可以在大气环境中快速而准确的获得 GO 的尺寸大小，从而为实验结果的准确性和可重复性保驾护航。

以上内容来源于以下文章

1. Chen-Hao Yu, Ge-Yun Chen, et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 191, 111009.

岛津应用云



岛津企业管理(中国)有限公司 – 分析中心
Shimadzu (China) Co., LTD. – Analytical Applications Center