

氧化石墨烯/二氧化锰异质结的抗菌性能评价及其抗菌机理研究

廉晓克¹, 陈玥¹, 李文浩¹, 邓怡², 何苗苗^{1*}, 杨为中¹

(1. 四川大学生物医学工程学院, 四川 成都 610065; 2. 四川大学化学工程学院, 四川 成都 610065)

摘要:传统的化学动力学疗法(Chemodynamic therapy, CDT)往往依靠内源性 H₂O₂ 产生·OH 来对抗细菌,但是产生的·OH 难以达到对细菌的彻底清除。此外,细菌内部遭受活性氧攻击时会产生大量的还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH),抑制活性氧(ROS)对细菌的杀伤作用,增加清除细菌的难度。因此,设计并开发了一种由氧化石墨烯(Graphene oxide)/二氧化锰(MnO₂)组成的生物异质结(Biological heterojunction, Bio-HJs)平台。在近红外光照射下,Bio-HJs 不仅具有光热效应,还能催化 H₂O₂ 与 Mn²⁺ 氧化生成高致死性活性氧;同时,生成的 Mn⁴⁺ 离子可以大量消耗细菌内的谷胱甘肽,破坏其防御系统。细菌实验进一步证实,制得的 Bio-HJs 具有强大的抗菌能力,可以有效根治细菌感染。

关键词:氧化石墨烯;二氧化锰;生物异质结;抗感染;皮肤修复

中图分类号:TB34

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2023)09-0130-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.09.027

Evaluation of antibacterial properties of graphene oxide/manganese dioxide heterojunction and study on its antibacterial mechanism

LIAN Xiao-ke¹, CHEN Yue¹, LI Wen-hao¹, DENG Yi², HE Miao-miao^{1*}, YANG Wei-zhong¹

(1. College of Biomedical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Traditional Chemodynamic Therapy (CDT) often relies on endogenous H₂O₂ to generate ·OH to fight bacteria, but the generated ·OH is difficult to clear bacteria completely. In addition, the bacteria can generate a large amount of reduced glutathione (GSH) when they are attacked by reactive oxygen species, which inhibits the killing effect of reactive oxygen species (ROS) on bacteria and increases the difficulty in removing bacteria. Therefore, a biological heterojunction (Bio-HJs) platform composed of graphene oxide/manganese dioxide (MnO₂) is designed and developed. Under near-infrared irradiation, Bio-HJs have photothermal effects, and also catalyze the oxidation of H₂O₂ and Mn²⁺ to generate highly lethal reactive oxygen species. Meanwhile, the resulted Mn⁴⁺ can deplete glutathione in bacteria in large quantities, disrupting their defense system. It is further verified by bacterial experiments that Bio-HJs have strong antibacterial ability and can effectively cure bacterial infections.

Key words: graphene oxide; manganese dioxide; biological heterojunction; anti-infection; skin repair

目前,每年都有数千万患者死于细菌感染,细菌感染成为了人类亟待解决的难题。细菌感染主要通过手术切除和抗生素治疗^[1]。然而,术后细菌残留往往导致二次感染;长期使用抗生素可能会导致超级耐药细菌的出现^[2]。因此,迫切需要一种既能避免相关缺陷,又能实现长期稳定的杀菌药物。

近年来,光治疗因具有毒副作用小、能有效避免病原体耐药等特点,将近红外光与纳米材料相结合应用于生物医学领域受到极大关注^[3]。目前碳纳米材料和聚合物纳米材料等在近红外光的激发下具有优异的抗菌能力^[4]。纳米材料介导的光治疗抗

菌机制主要包括光热治疗(photothermal therapy, PTT)和光动力治疗(PDT)。光热疗法是指光热剂在近红外光的激发下产生局部高温,从而达到抗菌的目的。光动力疗法是指在近红外光的激发下,光敏剂可以促进电子和空穴的分离,导致氧和水被催化产生有毒的活性氧(ROS),破坏DNA、酶等物质,最终达到杀灭细菌的目的^[5]。然而,目前的纳米材料不能很好的兼具光热效应和光动力效应,杀菌效率较低。尤其是面对细菌独特的微环境—丰富的内源性抗氧化谷胱甘肽(GSH)时,杀菌效果较差。因此,兼备光热/光动力效果和GSH响应的抗菌材料

收稿日期:2022-11-10;修回日期:2023-06-29

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81801848)

作者简介:廉晓克(1994-),男,硕士研究生,研究方向为生物抗菌材料,jasonbluk@163.com;何苗苗(1993-),女,博士研究生,研究方向为生物医用材料,通讯联系人,hemmiao@scu.edu.cn。

亟待被开发。

异质结由2种具有不同能级和带隙的半导体组成,在催化、储能等方面具有广阔的应用前景^[6]。异质结材料最重要的特点是可以调制2个半导体元件的结构来实现高效的电子转移^[7]。因此,选择了典型的半导体材料氧化石墨烯(GO)和二氧化锰(MnO₂)。GO制备成单层后可获得良好的光电性能和电子传递能力。而且,比表面积大的单层材料可以获得更强的光热转换能力,降低与其他材料结合的难度^[8]。MnO₂作为一种广泛应用的氧化物和催化材料,已进一步扩展到生物医学领域^[9]。Mn²⁺具有过氧化物酶(POD)活性,可将过氧化氢(H₂O₂)转化为·OH,并被氧化为Mn⁴⁺。此外,Mn⁴⁺可将GSH氧化为氧化型谷胱甘肽(GSSG),同时被还原为Mn²⁺。这个循环过程可显著降低GSH水平,显著提高细菌中的ROS水平^[10]。而将MO与GO结合后形成的异质结可以将PTT、PDT、CDT等多种抗菌途径结合起来,实现了对致病菌完全杀伤。鉴于此,该异质结材料在生物医学领域的应用值得进一步探索。

1 材料与试剂

1.1 实验试剂

高锰酸钾(KMnO₄,分析纯)、硫酸锰(MnSO₄,分析纯)、氧化石墨烯(Graphene Oxide,分析纯)、盐酸(HCl,分析纯)、氯化钠(NaCl,分析纯)和琼脂(分析纯),成都科隆试剂(中国)公司生产;蛋白胨和牛肉提取物,北京澳宝生物技术公司(中国)生产;Tris-HCl缓冲溶液,北京太阳生物科技公司(中国)生产。

1.2 实验仪器

场发射扫描电子显微镜(SEM,S-3400N,日立,日本);红外激光器(RB635-30G3,日诚,西安);Zeta电位仪;紫外-可见吸收光谱仪(UV-Vis,UV-1800PC,翱艺,上海)。

2 实验方法

2.1 样品的制备

首先,制备单层氧化石墨烯。将多层GO分散于适量去离子水中,冰浴超声10h。超声后的材料用去离子水清洗离心(5000r/min)并重复5次。最后,收集的材料在冷冻干燥机中干燥。将干燥的单层GO与去离子水混合,放入磁力搅拌器上方的烧杯中。将KMnO₄溶液和MnSO₄溶液缓慢滴加在烧

杯中。搅拌1h后,将混合物反复清洗和离心。收集到的异质结材料命名为GO/MnO₂(GOM),烘干备用。

2.2 样品的表征

利用场发射扫描电子显微镜(SEM,S-3400N,日本日立)测试样品的表面微观结构和组成。利用红外激光器(RB635-30G3,西安日诚)对材料施加近红外光辐照。利用Zeta电位仪检测材料的表面电位。利用紫外-可见吸收光谱仪(UV-Vis,UV-1800PC,上海翱艺)检测溶液吸光度的变化。利用SEM和能谱仪(EDS)测量样品的化学和元素组成。

2.3 材料光热试验

2.3.1 不同材料光热

在室温条件下将二氧化锰、氧化石墨烯、氧化石墨烯/二氧化锰粉体用去离子水配置成质量浓度为400μg/mL的溶液。将上述制备的溶液各取1mL到R=1cm的孔板中,取808nm的近红外光在1.5W/cm²的功率密度下照射上述孔位各10min。伴随上述光照过程记录下不同材料的温度变化。

2.3.2 不同近红外光功率下的光热性能评价

将实验制备的GOM溶液置于孔板中。用功率密度为0.5、1.0、1.5W/cm²的近红外光照射孔板10min并记录不同近红外光功率下的温度变化。

2.3.3 不同浓度的材料光热性能评价

在室温条件下将GOM用去离子水配置成质量浓度分别为400、300、200μg/mL的溶液。按照上述试验步骤记录温度。

2.3.4 材料的光热稳定性

将实验制备的GOM(400μg/mL)溶液置于孔板中。用功率密度为1.5W/cm²的近红外光照射孔板10min,再去掉近红外光使材料静置10min,记录该过程中材料的温度变化。重复上述步骤3次。

2.4 材料光动力试验

首先将预先配置好的1,3-二苯基异苯并咪喃(DPBF)、亚甲基蓝(MB)、罗丹明(RhB)溶液与不同材料混合成质量浓度为400μg/mL的混合液。将上述混合液放置在功率为1.5W/cm²的近红外光下辐照10min,收集上清液,用UV-Vis光谱仪检测上清液在不同波段的吸收情况。

2.5 体外抗菌试验

选用典型的革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)进行体外抗菌实验。用涂板法验证质量浓度为400μg/mL的不同材料(MnO₂、GO、GOM)对上述2种菌群的杀伤能力。将菌液与材料溶液按1:1

的体积比混合后在 1.5 W/cm^2 的近红外光下照射 10 min 后,取 $50 \mu\text{L}$ 混合液涂布在琼脂板上,24 h 后观察菌群情况。

2.6 谷胱甘肽消耗实验

谷胱甘肽 (GSH) 在细菌的微环境中是过量表达的。因此,利用材料对 GSH 的消耗来进一步验证材料的抗菌能力。将质量浓度为 $400 \mu\text{g/mL}$ 的不同材料 (MnO_2 、GO、GOM) 与 GSH 溶液 (2 mg/mL) 共培养 1 h 后在近红外光 (1.5 W/cm^2) 下辐照 10 min。取上述混合溶液的上清液在酶标仪上检测吸光度。

3 结果与讨论

3.1 材料的设计、制造和表征

材料的 SEM、EDS 图及其电位图如图 1 所示。

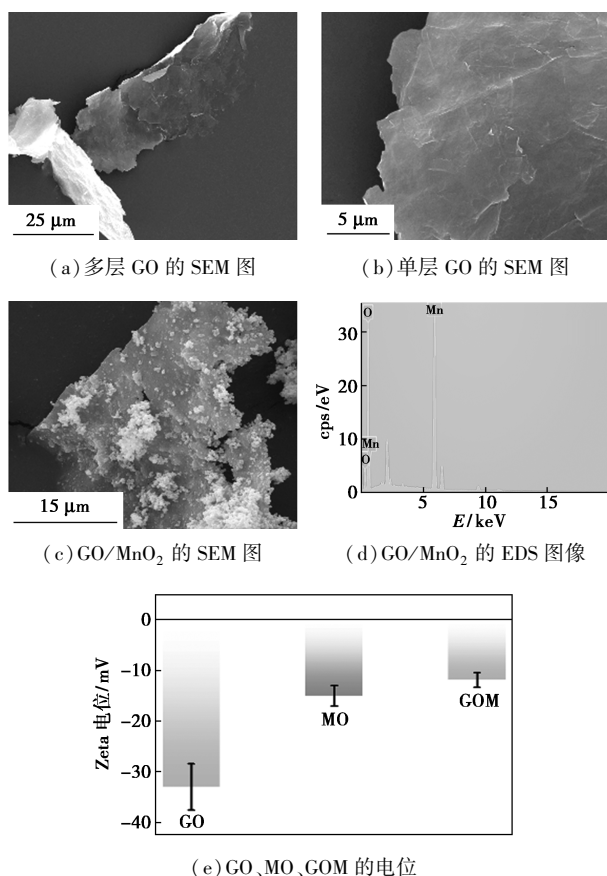


图 1 材料的 SEM、EDS 图及其电位图

从图 1(a) 中可以看出,初始的 GO 由大量片层重叠在一起。为了获得更高的比表面积,将材料制备成如图 1(b) 所示的单层结构。相比多层材料,单层的材料可以更好地与二氧化锰结合,并且提高材料的光热以及光动力效果^[11]。从图 1(c) 中可以看出,通过化学自组装构成的异质结材料是由大量

MO 包裹在 GO 表面。从图 2(d) 中可以看出,材料的元素组成符合预期且分布均匀。从图 1(e) 中可以看出,Zeta 电位表明 MO 和 GO 并不是简单的静电结合。

3.2 光热性能表征

通过 808 nm 近红外光激发验证了材料的光热性能,结果如图 2(a)~图 2(c) 所示。从图 2(a)~图 2(c) 中可以看出,不同材料 (MO、GO、GOM) 被近红外光辐照 10 min 后,材料的温度得到了明显的提

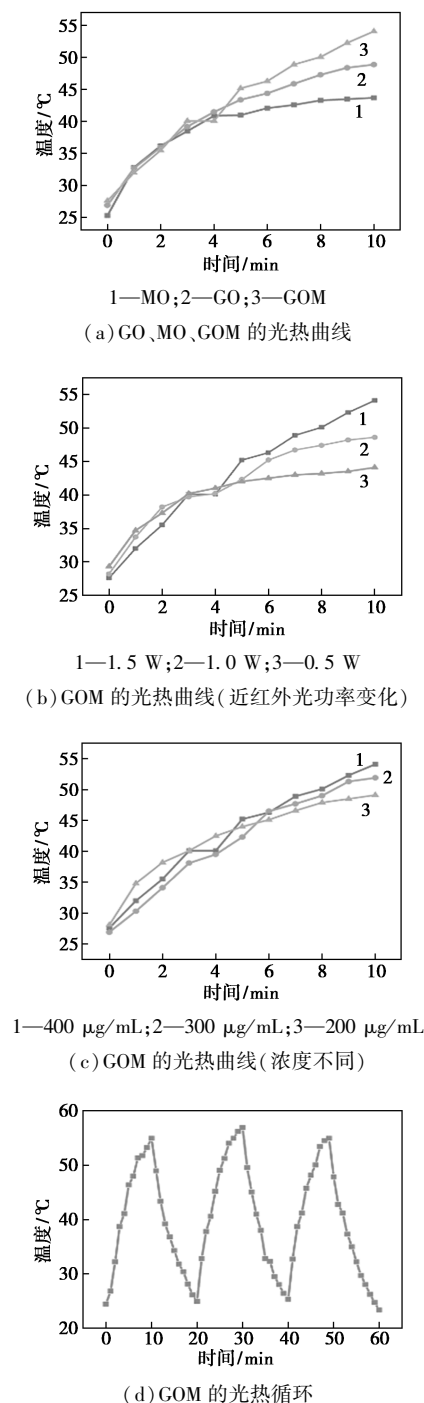
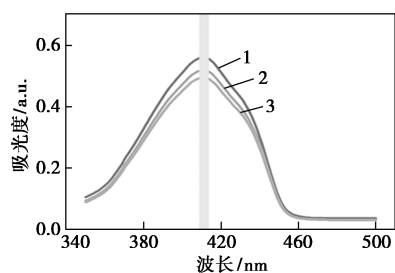


图 2 材料的光热性能

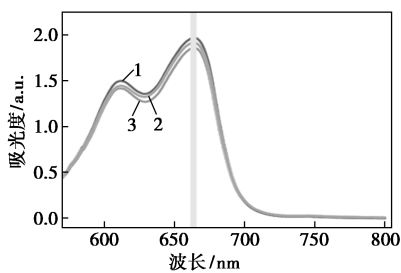
升,其中 GOM 最高可以达到 55℃ 左右。并且对于 GOM,近红外光功率的提高以及材料质量浓度的增大也可以增强光热性能。结果证明异质结的形成可以极大地促进材料的光吸收能力,进而促进光能转化为热能^[12]。从图 2(d)中可以看出,GOM 材料 3 个周期的光热循环实验证明了材料的光热稳定性。

3.3 光催化性能研究

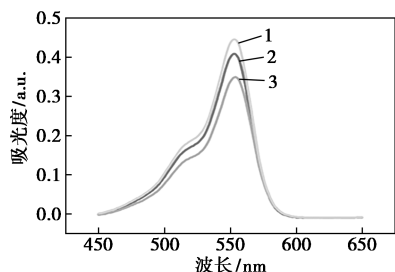
用 1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)检测 $^1\text{O}_2$ 的存在。材料的光动力性能测试结果如图 3 所示。从图 3(a)中可以看出,每组材料暴露在相同功率的近红外光下,MO 组随着照射时间的增加,吸收强度略有下降。相比之下,GOM 组的吸光度随着暴露时间的延长而显著下降。原因是在近红外光的照射下,MO 和 GO 形成的二维肖特基异质结可以极大地促进电子-空穴对的分离,从而促进 ROS 的产生^[13]。结果表明,GOM 具有良好的光动力性能。



(a) GO、MO、GOM 的 DPBF 测试



(b) GO、MO、GOM 的 MB 测试



(c) GO、MO、GOM 的罗丹明测试

1—GO;2—MO;3—GOM

图 3 材料的光动力测试

MB 被认为是优良的 $\cdot\text{OH}$ 捕获剂。 H_2O_2 的分解会产生大量的 $\cdot\text{OH}$,MB 会与 $\cdot\text{OH}$ 发生反应,降低溶

液的吸光度。从图 3(b)中可以看出,GO 溶液的吸光度最高,因为其几乎不催化 H_2O_2 的分解。由于 MO 具有促进 H_2O_2 分解的能力,光热效应进一步增强了 H_2O_2 的降解,因此 MO 的吸光度显著降低^[14]。相比之下,GOM 组溶液的吸光度急剧下降,这是由于材料具有较强的光热性能以及光动力性能,可以产生丰富的 $\cdot\text{OH}$ ^[15]。

罗丹明溶液是一种经典的 $\cdot\text{OH}$ 检测试剂^[16]。从图 3(c)中可以看出,GOM 组罗丹明溶液的吸光度急剧下降,进一步验证了异质结材料优秀的 ROS 产生能力。

3.4 体外抗菌能力研究

为了研究 GO/ MnO_2 的杀菌能力,以 *S. aureus* 为代表性病原菌,将材料和菌液的混合液在 LB 琼脂板上培养 24 h 后,细菌菌群情况如图 4 所示。由图 4 可知,在近红外光的照射下 GO/ MnO_2 可以达到很好地抗菌效果。相反,在 GO 以及 MO 组没有达到很好地抑菌效果。由此可知,GO/ MnO_2 异质结材料在近红外光辐照下具有强大的杀菌效果,产生大量热量的同时产生大量活性氧,二者协同作用实现了对细菌的杀灭作用^[17]。

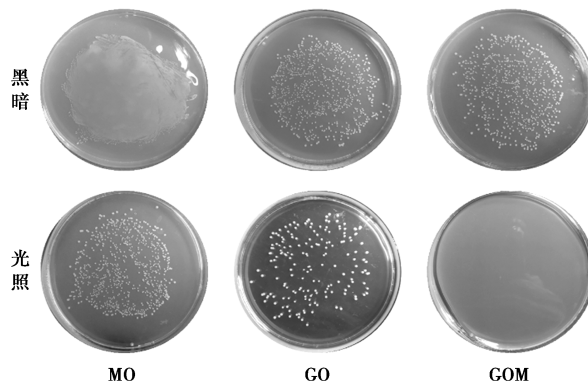


图 4 GO、MO、GOM 的抗菌实验

3.5 谷胱甘肽消耗实验

由于细菌微环境中含有大量的谷胱甘肽(GSH),可将材料对 GSH 的消耗作为抗菌能力的佐证^[18-19]。谷胱甘肽消耗实验如图 5 所示。从图 5

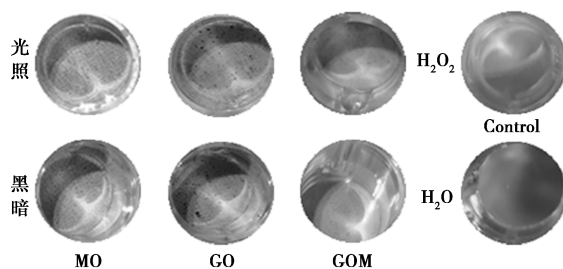


图 5 谷胱甘肽消耗实验

中可以看出,在近红外光的辐照下 GOM 异质结组可以获得更浅的溶液颜色。对于 GO 组,是否有近红外光的辐照对 GSH 的消耗几乎没有影响。因此,异质结材料具有最强的 GSH 消耗能力,主要原因是异质结材料促进了 $\text{Mn}^{4+} + \text{GSH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{Mn}^{2+}$ 过程^[20-21]。

4 结论

通过化学自组装反应成功构建了 GO/MnO₂ 异质结材料。通过 SEM、EDS、Zeta 电位等对材料进行了表征,并评估了其光热和光动力性能,以 *S. aureus* 作为代表病原菌测试了 GO/MnO₂ 的抗菌性能,结果表明:

(1) SEM、EDS、Zeta 电位等一系列表征结果表明 GO/MnO₂ 的成功制备。

(2) 由于 GO/MnO₂ 异质结材料在近红外光的辐照下可以产生大量的热量以及 ROS,并且可以破坏细菌内部的谷胱甘肽,因此其具有优异的抗菌潜力。

(3) 体外抗菌实验表明了生物异质结平台强大的抗菌能力,在细菌感染的治疗中表现出巨大的应用潜力。

参考文献

- [1] Jiang L, Loo S. Intelligent nanoparticle-based dressings for bacterial wound infections [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2021, 4(5): 3849-3862.
- [2] 于挺, 谢闽, 戈梅. 控制抗菌药物滥用: 技术基础、利益结构与政府监管 [J]. *上海经济研究*, 2011, (12): 130-141.
- [3] Zhang X, Wang S, Cheng G H, et al. Light-responsive nanomaterials for cancer therapy [J]. *Engineering*, 2022, 13(6): 18-30.
- [4] Chu X, Wang M, Shi S, et al. A review on properties and antibacterial applications of polymer-functionalized carbon dots [J]. *Journal of Materials Science*, 2022, 57(27): 12752-12781.
- [5] 冯海弟, 赵璐, 白云峰, 等. 纳米金属有机框架在肿瘤靶向治疗中的应用 [J]. *化学进展*, 2022, 34(8): 1863-1878.
- [6] 姜海洋, 刘慧玲. 半导体复合材料光催化还原 CO₂ 的研究进展 [J]. *硅酸盐学报*, 2022, 50(7): 2024-2055.
- [7] Deng Y, Gao X, Shi X, et al. Graphene oxide and adiponectin-functionalized sulfonated poly(etheretherketone) with effective osteogenicity and remotely repeatable photodisinfection [J]. *Chemistry of Materials*, 2020, 32(5): 2180-2193.
- [8] 王昭昭, 谭磊, 肖琪, 等. 二硫化钼及其异质结材料的合成与

光电应用 [J]. *光学与光电技术*, 2022, 20(4): 66-78.

- [9] 靳福娅, 余林, 蓝邦, 等. 水热法制备二氧化锰及在过氧化氢传感器中的应用 [J]. *化工进展*, 2017, 36(9): 3380-3387.
- [10] 俞乙平, 林少华, 钱子姣. 活化 H₂O₂ 的芬顿/类芬顿体系的研究现状 [J]. *应用化工*, 2022, 51(4): 1101-1108+1115.
- [11] Yang Z, Fu X, Ma D, et al. Growth factor-decorated Ti₃C₂ MXene/MoS₂ 2D bio-heterojunctions with quad-channel photonic disinfection for effective regeneration of bacteria-invaded cutaneous tissue [J]. *Small*, 2021, 17(50): 2103993-1~2103993-18.
- [12] Li Z, Li M, Tan B, et al. Green rust (GR) and glucose oxidase (GOX) based Fenton-like reaction: Capacity of sustainable release, promoted conversion of glucose through GOX-iron and pH self-adjustment [J]. *Environmental Research*, 2022, 208: 112656.
- [13] Wu L, Yang X, Chen T, et al. Three-dimensional C₃N₅/RGO aerogels with enhanced visible-light response and electron-hole separation efficiency for photocatalytic uranium reduction [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 427: 131773.
- [14] Zhou Z, Huang J, Zhang Z, et al. Bimetallic PdPt-based nanocatalysts for photothermal-augmented tumor starvation and sonodynamic therapy in NIR-II biowindow assisted by an oxygen self-supply strategy [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 435: 135085.
- [15] Nahla R, Pei Z, Nadia T, et al. Synthesis and evaluation of titanium oxide modified mussel inspired nanoparticles for synergetic photothermal and photodynamic effect [J]. *Iop Conference*, 2018, 389: 012009.
- [16] Zhu C, Wang C, Chen L, et al. A dual-functional Zn(II) coordination polymer for detection of Cr(VI) and photocatalytic degradation of rhodamine B in aqueous solution [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1263(2022): 1-7.
- [17] Guchhait A, Pal A J. Copper-diffused AgInS₂ ternary nanocrystals in hybrid bulk-heterojunction solar cells: near-infrared active nanophotovoltaics [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5(10): 4181-4189.
- [18] Harini K, Pallavi P, Gowtham P, et al. Smart polymer-based reduction responsive therapeutic delivery to cancer cells [J]. *Current Pharmacology Reports*, 2022, 8(3): 205-211.
- [19] Cui T, Li X, Shu Y, et al. Utilizing glutathione-triggered nanoparticles to enhance chemotherapy of lung cancer by reprogramming the tumor microenvironment [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 552(1-2): 16-26.
- [20] Wang D, Li J, Xu Z, et al. Synthesis of g-C₃N₄/NiO p-n heterojunction materials with ball-flower morphology and enhanced photocatalytic performance for the removal of tetracycline and Cr⁶⁺ [J]. *Journal of Materials Science*, 2019, 54(17): 11417-11434.
- [21] Mu Y, Jiang X, Ai Z, et al. Mn²⁺ promoted Cr(VI) reduction with oxalic acid: The indispensable role of In-situ generated Mn³⁺ [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 343(5): 356-363. ■

欢迎订阅《现代化工》杂志, 邮发代号 82—67。