DOI:10.16016/j.1000-5404.201604011



石墨烯材料抗菌活性机制研究
——终结抗生素滥用的曙光

罗　阳,杨永军　　(400038 重庆,第三军医大学西南医院综合实验研究中心)

[关键词]　石墨烯材料;抗菌活性;机制
[中图法分类号]　R914.5;R978　　[文献标志码]　A

Mechanisms of antimicrobial activities of graphene materials: new dawn in stopping abuse of antibiotics

Luo Yang, Yang Yongjun (Medical Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Abuse of antibiotics has become a troublesome issue for clinical medicine, and the researches on new antimicrobial agents such as graphene materials (GMs) have attracted more concerns with the progress of nanomedicine. GMs are considered as a kind of new nanomaterials with efficient antimicrobial activities, and have promising applications in medical frontiers such as biosensors and biotherapy. This article discussed the physicochemical properties of GMs, experimental surroundings, selected microorganisms, and interaction between GMs and selected microorganisms to explore controversial antimicrobial activities. In addition, several mechanisms of the antimicrobial activities of GMs were deeply analyzed, and the prospects and probable challenges of GMs in the field of antibacterial agents were also proposed.

[**Key words**] graphene materials; antimicrobial activities; mechanisms

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81572079, 81371899) and the Science Foundation for Outstanding Young Scholars of Chongqing (CSTC2014jcyjjq10007). Corresponding author: Luo Yang, Tel:86-23-68754435, E-mail:luoyang@tmmu.edu.cn

[基金项目]　国家自然科学基金面上项目(81572079,81371899);重庆市杰出青年科学基金(CSTC2014jcyjjq10007)

[通信作者]　罗　阳,男,博士,副主任医师,副教授,博士研究生导师。担任全军检验医学专业委员会青年委员,美国临床化学学会(AACC)和美国化学协会(ACS)会员等。主持国家自然科学基金,重庆市杰出青年基金等省部级以上课题17项,其中国家自然科学基金青年项目1项,面上项目2项,国家"863"计划重点项目子课题1项,国家自然科学基金重点项目分题1项。荣获国家科技进步二等奖、"十一五"军队医学科技重大成果奖、军队科技进步二等奖、两届大学生"挑战杯"全国特等奖、重庆市优秀博士学位论文等表彰奖励22项,其中4次作为国内唯一获得美国临床化学年会国际大奖。获批国内外专利21件。入选国家"万人计划"青年拔尖人才计划。荣获重庆市"五四"青年奖章,享受军队优秀专业技术人才岗位津贴,获评原中国人民解放军总后勤部"三星"优秀青年人才扶持对象,荣立个人三等功1次。以第一作者和通信作者发表SCI论文20余篇,主编或参编专著5部。主要从事检验医学与纳米医学方面的研究。电话:(023)68754435,E-mail:luoyang@tmmu.edu.cn

[优先出版]　http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160414.1056.001.html (2016-04-14)

抗生素滥用是困扰临床用药的一大难题。随着纳米医学研究的不断进步,以石墨烯材料(graphene materials,GMs)为代表的新型抗菌剂的研发成为人们关注的焦点[1-2]。GMs被认为是一种极具潜力的新型纳米材料,在生物传感器和生物治疗等领域具有广阔的应用前景。关于纳米材料的最新研究显示,GMs能够在更多医学前沿领域得到广泛应用。GMs主要包括石墨烯、氧化石墨烯(GO)和还原氧化石墨烯(rGO),具有独特的电子学、力学、热学、光学以及自身结构特性[3-4]。特别值得注意的是GMs在某些环境中可对多种细胞(包括细菌和部分正常细胞等)的生存能力产生影响。这使得石墨烯被认为可能具有一定的抗菌活性而具有应用于微生物感染治疗的潜力。

研究表明,GMs的抗菌活性取决于其独特的物理化学特性、独特的形态、大小和表面功能基团,且环境、微生物类型以及GMs与不同微生物成分之间的相互作用也会对其抗菌活性造成一定的影响[5-7]。随着GMs抗菌活性的研究的发展,目前几个主要的抗菌活

性机制假说得到广泛认可,主要包括:物理切割假说,氧化应激假说以及包裹捕获假说等[5-7]。然而,在这些研究中也存一些问题,如:在不同研究中相同的机制被用来解释相反的实验结果;而同一种实验现象可被几种不同的假说所解释。这使得 GMs 的抗菌活性机制研究也存在许多争议。本述评主要分析了 GMs 抗菌活性的主要原因、影响因素和几种主要抗菌活性机制,以揭示不同实验研究中出现分歧的原因,全面解读这几种机制的优势和劣势,并提出了未来 GMs 在抗菌药物领域研究的前景和可能面临的挑战,为以 GMs 为基础构建有效抗菌剂提供新思路。

1 GMs 的抗菌活性取决于其独特的物理化学特性

与富勒烯和碳纳米管相比,二维 GMs 主要采用合成方法得到,具有许多独特的物理化学特性[12]。在各类 GMs 合成方法中,化学气相沉积法和外延生长法可以创造出一个完美的 GMs 晶体结构,而其他方法产生 GMs 通常具有一定缺陷[13]。在出现的这些缺陷中,GMs 基底面和表面含氧基团的缺损可能为 GMs 与其他分子、离子和材料之间的相互作用提供了作用位点[14]。此外,GMs 这些缺陷还改变了其固有的物理化学特性,如尺寸、层数、表面修饰的官能团和分散性等[15]。越来越多的研究结果推测或是证实 GMs 的抗菌特性与其理化性质和结构特征有着十分紧密的关系[5,7,16],不同类型 GMs 抗菌活性的研究结果汇总在表 1。

GMs 的尺寸是影响其抗菌活性的主要因素之一,GMs 的尺寸可以极大的影响材料的吸附能力、分散性和边角的锋利程度。这些物理特性对于 GMs 和微生物的相互作用十分的重要[17]。研究结果表明,具有更多层数的 GO 分散剂或其大尺寸的石墨烯衍生物因含有更高的表面能量其吸附能力比一般尺寸的 GMs 强,因而具有更高的抗菌活性[10]。但也有研究表明,尺寸越小的 GMs 在合成的过程中出现缺陷的概率更大,而这些缺陷的数量越多则观察到的 GMs 抗菌活性越强[8]。在一项检测不同尺寸的 GO 薄膜和 *E. coli* 相互作用的实验中,当 GO 膜面积从 0.65 减小到 0.01 μm^2,*E. coli* 的存活率显著降低[4]。这与另一项采用人类干细胞微研究对象的研究结果相一致,当 GO 膜面积从 0.65 减到 0.01 μm^2,干细胞的存活率显著降低,研究者推测小尺寸的 GMs 可能更容易穿透细胞的磷脂双分子层,进而对细胞内部结构造成破坏[18]。GMs 的层数和边缘锋利程度也会影响其抗菌活性,当 GMs 的层数增加时,其厚度也随之增加。这从一定程度上降低 GMs 的分散性。GMs 在和微生物发生相互作用时大多处于凝结状态,不利于抗菌活性的发挥。但是一项采用 LB 法增加结合于 PET 上的 GMs 膜层数的研究结果表明,GMs 膜层数的增加可以显著增强其边缘的锋利程度,进而增强其抗菌活性[11]。GMs 的抗菌活性还与聚集和分散程度相关,GMs

表 1 GMs 的基本抗菌特性

特性	细菌/哺乳动物细胞	石墨烯类型	抗菌活性
尺寸	*E. coli*	不同大小的 GO 分散剂	GO 膜的厚度越大抗菌活性更强
	E. coli	不同大小的 GO 薄膜	GO 膜面积从 0.65 减小到 0.01μm^2,细菌存活率显著降低
	人类干细胞	不同大小的 rGONP 分散系	1.0 μg/mL(11 ± 0.44) nm rGONPs 能够显著破坏细胞,100 μg/mL(3.8 ± 0.4) nm rGONPs 表现出显著细胞毒性
石墨烯的边缘与层数	*E. coli*	LB 法增加结合于 PET 上的石墨烯膜层数	层数越多抗菌活性越强
	E. coli,*S. aureus*	具有锋利边缘的 GONWs 和 RGNWs	GONWs 和 RGNW 因为锋利边缘有很强的抗菌活性,*E. coli* 较*S. aureus*具有更强的抵抗能力
	P. aeruginosa,*S. aureus*	石墨烯薄膜不同的边缘长度和角度	光滑边缘的石墨烯薄膜对 *P. aeruginosa* 和 *S. aureus* 具有杀菌作用,粗糙石墨烯只对 *P. aeruginosa* 有杀菌作用
表面修饰	*E. coli*,*S. aureus*	GONWs 和 rGNWs 不同含氧官能团峰面积比较	rGNWs 较 GONWs 表现出更强的抗菌活性
	E. coli	含氧 69% 官能团的 GO 膜和 rGO 膜的抗菌作用	GO 膜与微生物的生物相容性较好,但是 rGO 表现出抑制细菌出芽生殖的作用
	E. coli,*B. aureus*	BSA 和 Trp 对 GO 分散性的影响	GO 因为表面吸附了 BSA 和 Trp 表现出更低的抗菌活性
聚集和分散	*E. coli*	Gt,GtO,GO 和 rGO 分散体系	GO 分散体系的抗菌活性较高,而后依次为 rGO、Gt 和 GtO
	E. coli	GO 分散系和 rGO 分散系	对 *E. coli* 来说 rGO 比 GO 表现出更强的杀菌能力

GO:氧化石墨烯;rGONP:还原氧化石墨烯纳米薄膜;GONWs:氧化石墨烯纳米薄膜;rGO:还原氧化石墨烯;GT:石墨;GTO:氧化石墨

在和微生物相互作用时越分散则其抗菌活性越好,这是因为分散的 GMs 和凝结状态相比具有更多的机会接触各种胞内分子(如 DNA 和蛋白质等),更利于 GMs 和这些胞内分子发生反应[3]。此外,具有不同表面修饰基团的 GMs 也具有不同的抗菌活性,这一方面是由于通过共价或非共价的方式对 GMs 修饰后可以增强 GMs 在反应体系中的分散性,另一方面表面修饰的官能团也可以增强 GMs 的吸附能力,使其与各类微生物更容易发生相互作用[6]。

2 实验环境和微生物类型对抗菌活性的影响

除了 GMs 的固有特性外,研究表明,GMs 的抗菌活性很大程度上受实验环境和微生物类型的影响[19]。实验环境包括液体或固体、好氧或缺氧以及体外或体内环境,微生物类型包括革兰阳性菌、革兰阴性菌、圆形或棒状菌等。有研究发现当在反应体系中加入培养基、牛血清白蛋白或色氨酸时,GO 的抗菌活性受到明显的抑制[16]。实验环境对 GMs 抗菌活性的影响还主要表现在实验体系的 pH 值、光、电、磁场和超声处理条件上[6,10,17,20],但目前少有明确的研究结果表明这些反应条件是如何深入影响 GMs 抗菌活性的。此外,不同的微生物类型对 GMs 的反应也不尽相同,例如,革兰阴性菌(如大肠杆菌和铜绿假单胞菌)在内外层细胞膜之间有一层很薄的肽聚糖(2 ~ 3 nm),而革兰阳性菌(如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌)有较厚的肽聚糖层(20 ~ 80 nm),肽聚糖层的差异造成了它们对 GMs 不同的敏感性[5,7,16,21]。

3 GMs 与微生物成分相互作用研究

GMs 的抗菌作用主要体现在其抑制微生物各项功能的能力上,在与 GMs 的接触过程中微生物的灭活很大程度上是由于其胞内的脂类、蛋白质和核酸/核糖核酸同 GMs 发生相互作用进而引起生理功能的变化的结果。微生物细胞壁与细胞膜的主要成分是磷脂双分子层和肽聚糖蛋白,一旦肽聚糖前体和细胞跨膜蛋白的合成及转运被干扰,就会导致细胞壁完整性被破坏,导致细菌死亡;同时胞内 DNA/RNA 损伤也会抑制微生物的生长与繁殖,使其生存能力受到抑制。GMs 在进入微生物内部后可以与脂类、蛋白质和 DNA/RNA 通过氢键,π-π 堆积,静电吸附等相互作用引起脂质和蛋白质的破坏、活性氧(ROS)代谢机制的异常等,导致微生物的死亡或失活[1,7]。因此,GMs 之间和微生物各种成分之间的相互作用对其抗菌活性有着非常重要的影响。

4 GMs 的抗菌机制

2010 年 GMs 的抗菌活性被首次发现,GMs 就被人们认为具有构建新一代抗菌剂的潜力。目前 GMs 的抗菌机制研究仍处于起步阶段,尽管已有大量的研究致力于探索 GMs 抗菌活性的机制,但这些实验的结果目前并未得出令人信服的结论。因此,迫切需要对 GMs 介导的抗菌活性机制进行一个系统的阐述。GMs 的抗菌活性取决于其独特的物理化学特性并受到实验环境、微生物类型以及 GMs 之间和微生物各种成分之间相互作用等因素的影响。根据最近的研究发现,GMs 的抗菌活性机制可主要由三大假说解释,即“纳米刀”的物理切割作用,氧化应激反应介导细胞内 ROS 的产生,以及 GMs 的柔性薄膜的结构对细菌进行的包裹作用。下面我们将试图全面说明每一个假设,并提供一些 GMs 通过物理化学性质变化,调节抗菌活性的可能线索。

4.1 “纳米刀”锋利边缘的切割作用

GMs 具有锋利的边缘,因此经常被人们形象的称为“纳米刀”。目前大多数的观点认为 GMs 的锋利边缘是影响其抗菌性能的关键因素。这种锋利的边缘具有切割作用可以对微生物的细胞壁或细胞膜造成一定的影响。已有研究证实 GMs 会穿透微生物的细胞膜造成胞内物质泄漏,并最终导致局部物理破坏甚至是微生物的死亡。这一机制被称为“纳米刀”锋利边缘的切割作用,有时也被称为“切入模式”或“渗透模式”[23]。早在 2010 年初,Akhavan 和 Ghaderi 对 GONWs 和 RGNWs 抗菌活性进行了初步研究,结果发现 GONWs 和 RGNWs 的锋利边缘在与细菌的相互作用中,会导致细菌细胞膜完整性的缺失和 RNA 泄漏,使细胞内的核酸流出。以上研究结果表明当细菌直接接触 GMs 时,其锋利的边缘可以产生明显的类似于刀具的切割作用,细菌的细胞膜因此以物理方式被切割开,这与 Liu 等[3]通过 GO、rGO、Gt 和 GtO 对细菌的抗菌活性系统的研究发现结果相一致。

已有分子动力学模拟实验证实,GMs 可以通过物理切割作用穿透过磷脂双分子层,石墨烯薄膜具有氧化性和横向切割作用,可跨越整个细胞膜,形成一个类似三明治的结构[18]。而进一步研究显示,边缘氧化程度高的 GMs 能形成一种跨膜纳米构型,厚度较小的 GMs 则以近似垂直的方式形成跨膜构型[18,24]。另外,石墨烯纳米薄膜能够制造出一定的方向角度,研究表

明方向角度为37°的GMs对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌可展现出有效的抗菌作用[5]。因此,方向角度是另一个决定抗菌性能的参数。结合理论研究证据认为石墨烯不仅仅是通过简单物理接触发挥其抗菌活性,而是通过一定角度的切割作用在细胞膜上诱导孔隙的形成,从而引起渗透不平衡和细胞死亡。然而,有研究者提出GMs的抗菌性能取决于其基面而并非薄片的边缘特性。利用LB膜技术将整个GO薄片边缘嵌入到PET基质中可排除边缘所产生的杀菌效果,但出乎意料的是GO仍然能够使部分大肠杆菌失活,这表明GMs的边缘切割对于其抗菌活性来讲不是必需的[11]。另外,在GO表面非共价吸附牛血清白蛋白或色氨酸后能够降低GO对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抗菌活性,据此可以推断GO的基面也是重要的抗菌活性位点[16]。

理论模拟实验表明GMs可以平行附着于细胞表面,当石墨烯的厚度可降低到与细胞膜一样时与以往近似垂直的构型相比,平行于脂质双分子层的构型更加的稳定。较大的石墨烯薄片可以平铺在脂质双分子层上,进而破坏细胞膜和上层的磷脂双分子层。以上观察表明石墨烯膜的边缘可协助GMs的入膜过程,对于GMs的杀菌活性来讲是不可缺少的。

4.2 ROS或非ROS介导的氧化应激

GMs诱导氧化应激发生是一种被广泛认可的抗菌机制假说,胞内氧化应激过程能干扰细菌的基本代谢并破坏其基本的细胞功能,最终导致细胞失活甚至细胞死亡。氧化应激过程主要通过ROS或非ROS依赖性途径产生,前者由胞内ROS(如超氧化物,过氧化氢,羟自由基或单线态氧)的过度累积所诱导。大量文献表明ROS能诱导胞内蛋白失活、脂质过氧化反应、线粒体功能障碍、胞膜降解,最终导致细胞坏死或凋亡[25]。而非ROS依赖性氧化应激则是指在不产生ROS情况下细胞重要结构或胞内组分的破坏或氧化过程。这可能是通过电荷从细胞膜向GMs转移的方式诱导的,在整个非ROS依赖性氧化应激过程中,GMs在其中充当了“电子泵”的角色[7]。

4.2.1 ROS依赖性的氧化应激

已有研究表明,GMs可通过特异性位点和边缘的缺陷对氧气进行吸附,从而介导ROS的产生[8,26-27]。在分别与GO和rGO反应后的细菌胞内可发现比未处理组高3.8倍和2.7倍的ROS水平[28]。这与GO表面大量含氧官能团(如–COOH和–OH)促进ROS产生,增强其抗菌性能有关。此外,更小的GO片材具有更高的缺失密度,可对氧化性物质进行更好的吸附,因此较小面积的GO薄片具有更高的抗菌活性。这些结果均表明氧化应激在GMs的抗菌活动中发挥着重要的作用。另有研究表明,过氧化反应产生的自由基可通过细胞膜传导氧化损伤,而维生素E可在脂质过氧化反应中清除自由基,将维生素E与大肠杆菌预孵育后再与GO薄片反应可在一定程度上降低其抗菌性能[31]。这说明脂质过氧化反应可能参与了ROS介导的GO抗菌过程。

4.2.2 非ROS依赖性的氧化应激

GMs除了可以介导ROS依赖性的氧化应激外,还可以参与非ROS依赖性的氧化应激过程。Liu等[3]采用XTT法来测量GO和rGO分散系中的超氧化物时并未观察到很高的超氧化物水平,随后他们又采用Ellman法是对谷胱甘肽(GSH)的氧化水平进行检测,结果发现多种GMs对GSH均具有氧化能力,这间接验证了GMs可以介导ROS非依赖性的氧化应激理论[3]。同时实验结果还显示rGO具有更强的氧化GSH的能力。这可能是源于rGO比GO具有更高的电导率,因而rGO可以作为跨越绝缘脂质双分子层的电导桥来介导电子从细菌胞内传递到胞外环境,参与非ROS依赖的氧化应激过程[3,29]。

最近有研究表明,GMs的抗菌活性并不依赖于ROS而是由于电子传递过程。实验采用*S. aureus*和*E. coli*来检测铜石墨烯薄膜(Graphene · Cu)、锗半导体(Graphene · Ge)和SiO_2绝缘体(Graphene · SiO_2)的抗菌活性。结果发现铜石墨烯薄膜和锗半导体均能抑制细菌生长,但SiO_2绝缘体却不能。研究者认为这是因为电子在微生物膜、石墨烯膜和下面的导体铜(或半导体锗)基质上通过形成电路可以很容易地传递,然而电子却不能在绝缘体SiO_2基质上进行传递,因此SiO_2绝缘体不能抑制细菌生长。石墨烯在这里发挥电子泵的作用,作为电子受体接受来自于细菌细胞膜上的电子并将其泵出。这说明非ROS依赖性的氧化应激在GMs抗菌活性中也起到重要的作用[7]。

4.3 由石墨烯柔韧的薄膜结构而产生的对细菌膜的包裹或捕获

对细菌胞膜的包裹或捕获是GMs除锋利边缘的切割作用和氧化应激作用之外可能存在的第3种抗菌机制。GMs独特的sp^2杂化连接单层碳原子可排列成六边形的二维晶体结构,可提供一种独特的柔韧屏障将细菌与它们周围的环境隔离开来。已有研究表明,GO和分散性好的PVK-GO纳米复合材料能通过包裹细菌的方式对革兰阳性菌和革兰阴性菌的增殖能力进

行抑制[30]。虽然细菌被 GMs 包裹后仍保持完整的形态,但其胞内代谢水平和细胞活力均出现明显降低。与此同时 GMs 包裹细菌会对细菌细胞膜产生一定程度的破坏[30]。研究发现,GO 薄片一旦接触到病原体后就会将其缠绕,扫描电镜和膜电位检测实验下可观察到病原体膜完整性被破坏,被包裹的细菌胞膜去极化后出现了一系列的结构破坏[31]。模拟实验还发现大于 5.2 nm 的石墨烯纳米片可因为石墨烯与脂质双分子层很强的疏水作用而附着在细菌的膜上,尺寸更大且分散性更好的 GO 纳米片则能轻易地包裹细菌并且阻止胞膜上的活跃位点,从而抑制细菌的增殖,降低其生存能力[9]。

4.4 其他机制

4.4.1 对脂质双分子层的萃取作用 GMs 与细菌的相互作用远比最初预料的复杂,除了锋利边缘的切割作用、氧化应激作用和对细菌胞膜的包裹或捕获作用外,GMs 还可通过其他方式与微生物产生相互作用。最近一项实验和理论研究显示,石墨烯独特的 SP2 杂化碳原子二维结构使石墨烯与膜脂质之间可产生强烈的相互作用。这种作用的吸引力远远超过了膜内脂质分子间的吸引力。因此,大量的磷脂能从脂质双分子层中被有效地萃取到石墨烯表面,最终导致细胞膜完整性损失和细菌死亡。

4.4.2 蛋白-蛋白间相互作用(PPIs)的干扰 生物体内信号转导和胞内代谢都是通过 PPIs 进行调节,强制分离两种功能性的蛋白将会损害正常的 PPIs 活性进而扰乱胞内代谢和触发细胞程序性死亡。已有的大规模分子动力学模拟实验结果证明 GMs 的抗菌活性可能与其破坏微生物胞内的 PPIs 有关。一项利用人 HIV-1 整合酶羧基端 DNA 结合域作为疏水 PPIs 模型的实验研究发现,GMs 能轻易地插入 PPIs 二聚体中干扰正常的 PPIs 过程。这些结果从分子水平上解释了 GMs 的杀菌机制[32]。

4.4.3 “自杀”效果 GO 纳米薄片是一种生物相容性较好的纳米材料,细菌可在其表面附着。但研究发现当细菌与 GO 共同孵育时,活菌可以与 GO 纳米薄片发生还原反应并通过糖酵解途径降低 GO 含氧官能团,在还原 GO 纳米薄片的过程中细菌的增殖情况却受到了抑制[33]。另据报道希瓦氏菌可在需氧和缺氧条件下通过细菌的呼吸作用还原 GO[34]。大肠杆菌在细菌失活过程中能将氧化铜还原成氧化亚铜。这些细菌在与 GO 发生还原反应的过程中被动的抑制了自己的繁殖能力。这个现象被称为“自杀”效果。但目前这种“自杀”效果的具体机制仍不十分清楚。

5 展望

作为一种新型纳米材料,GMs 具有独特的物理化学性质,在特定条件下对微生物产生抑制或灭活作用,被认为在抗菌药物领域研究具有广阔的应用前景。目前针对 GMs 抗菌活性的研究很多,其研究结果初步总结了 GMs 抗菌活性的主要原因和影响因素,但是其结论往往存在不同程度的争议,如不同研究中相同的机制被用来解释相反的实验结果,而一种实验现象可被几种不同的假说所解释,因此对于石墨烯的抗菌机制尤其是以分子机制为基础的抗菌机制仍值得深入研究。

目前关于 GMs 的抗菌机制存在的争议有很多,如锋利边缘的切割作用还是基面的活动主导了 GMs 的抗菌活性? 氧化应激过程是否必须由 ROS 介导? 这些问题对于深入了解 GMs 的抗菌活性具有重要的意义,亟待进一步研究证实。另一方面,由于现存的检测方法,如氧化应激检测可能会由于抗氧化剂或氧化敏感染料的干扰而导致得不到客观的结果从而产生不同的结论,开创新的 GMs 抗菌活性检测方法也成为迫切需要解决的问题。总的来说,GMs 的各种物理作用、锋利边缘的切割作用以及 GMs 所介导的氧化应激均涉及胞膜和胞内组分(如 DNA/RNA、蛋白、脂质和线粒体)的功能紊乱。因此,精细的调控 GMs 的理化属性(如组成、添加物、电子结构和含氧功能团等)可能对调节其抗菌活性有一定的帮助。通过胞膜包裹灭活或杀死细菌是 GMs 区别于其他纳米材料的独特属性,这来自于 GMs 独特的二维层状结构。然而对于石墨烯本身是否具有包裹细菌胞膜的能力和包裹的细菌怎样被灭活或杀死等方面仍存有疑问。另外,GMs 对脂质双分子层的萃取作用、扰乱胞内的 PPIs 和“自杀”效果是最近提出的 3 种新抗菌机制,应当受到进一步关注。

此外,对于 GMs 是否能够选择性的杀死病原微生物而不影响正常的哺乳动物细胞的问题目前仍不清楚。因为涉及 GMs 对细菌和哺乳动物细胞的特异性作用研究数量还很少,而 GMs 对哺乳动物细胞毒性的研究仍存有很大的争议,有关 GMs 明确的细胞毒性机制仍有待于进一步研究。虽然 GMs 在动物模型里的体内抗菌活性还没有被系统的研究过,但是一些研究表明 GMs 作为抗菌材料可能对伤口愈合[35]和牙齿护理有益[36]。另外有研究发现 Ag@ rGO 纳米复合物材料在大鼠皮肤伤口中不会诱导水肿和红斑[37]。这些

结果表明 GMs 可作为一种理想的生物工程材料应用于体内。

为了更好地探索 GMs 的抗菌机制,研究人员对研究检测方法和体内外和理论模拟实验等方面提出了新的要求,未来技术和方法的改进有望为精确的检测 GMs 介导的抗菌活性机制铺平道路。此外,为了使实验结果更具有说服力,未来的研究应考虑更多可能的实验影响因素,如实验条件(pH 值)、GMs 的吸附作用、GMs 的边缘终止和可能存在的杂质影响等。对于 GMs 本身的研究焦点应该聚集在探索 GMs 抗菌活性的特异性研究上。特别是 GMs 对不同细菌种属之间,细菌与正常哺乳动物细胞之间以及正常与不正常人类细胞之间影响程度的区别。最后,研究人员可根据提出的机制合理设计可控的 GMs,将会促进以纳米材料为基础的抗微生物药物和策略的发展,迎来终结抗生素滥用的曙光。

参考文献:

[1] He S, Song B, Li D, *et al*. A Graphene Nanoprobe for Rapid, Sensitive, and Multicolor Fluorescent DNA Analysis[J]. Adv Funct Mater, 2010, 20(3): 453 – 459. DOI: 10.1002/adfm. 200901639

[2] Viswanathan S, Narayanan T N, Aran K, *et al*. Graphene-protein field effect biosensors: glucose sensing[J]. Materials Today, 2015, 18(9): 513 – 522. DOI: 10.1016/j. mattod. 2015.04.003

[3] Liu S, Zeng T H, Hofmann M, *et al*. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress[J]. ACS Nano, 2011, 5(9): 6971 – 6980. DOI: 10.1021/nn202451x

[4] Akhavan O, Ghaderi E, Akhavan A. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells[J]. Biomaterials, 2012, 33(32): 8017 – 8025. DOI: 10.1016/j. biomaterials.2012.07.040

[5] Pham V T, Truong V K, Quinn M D, *et al*. Graphene Induces Formation of Pores That Kill Spherical and Rod-Shaped Bacteria[J]. ACS Nano, 2015, 9(8): 8458 – 8467. DOI: 10.1021/acsnano.5b03368

[6] Akhavan O, Ghaderi E, Esfandiar A. Wrapping bacteria by graphene nanosheets for isolation from environment, reactivation by sonication, and inactivation by near-infrared irradiation[J]. J Phys Chem B, 2011, 115(19): 6279 – 6288. DOI: 10.1021/jp200686k

[7] Li J, Wang G, Zhu H, *et al*. Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer [J]. Sci Rep, 2014, 4: 4359. DOI: 10.1038/srep04359

[8] Perreault F, de-Faria A F, Nejati S, *et al*. Antimicrobial properties of graphene oxide nanosheets: Why size matters [J]. ACS Nano, 2015, 9(7): 7226 – 7236. DOI: 10.1021/ acsnano.5b02067

[9] Dallavalle M, Calvaresi M, Bottoni A, *et al*. Graphene can wreak havoc with cell membranes[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(7): 4406 – 4414. DOI: 10.1021/am508938u

[10] Liu S, Hu M, Zeng T H, *et al*. Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets[J]. Langmuir, 2012, 28(33): 12364 – 12372. DOI: 10.1021/la3023908

[11] Mangadlao J D, Santos C M, Felipe M J, *et al*. On the antibacterial mechanism of graphene oxide (GO) Langmuir-Blodgett films[J]. Chem Commun (Camb), 2015, 51(14): 2886 – 2889. DOI: 10.1039/c4cc07836e

[12] Zhang W, Zou X, Zhao J. Rapid production of a bulk of porous mesh reduced graphene oxide films using a naked flame[J]. J Mater Chem C, 2015, 3(12): 2788 – 2791. DOI: 10.1039/c5tc00018a

[13] Hao Y, Bharathi M S, Wang L, *et al*. The role of surface oxygen in the growth of large single-crystal graphene on copper[J]. Science, 2013, 342(6159): 720 – 723. DOI: 10.1126/ science.1243879

[14] Zhang W, Zou X, Zhao J. Preparation and performance of a novel graphene oxide sheets modified rare-earth luminescence material[J]. J Mater Chem C, 2015, 3(6): 1294 – 1300. DOI: 10.1039/c4tc02172j

[15] Zhang Y, Hui C, Sun R, *et al*. A large-area 15 nm graphene nanoribbon array patterned by a focused ion beam [J]. Nanotechnology, 2014, 25(13): 135301. DOI: 10.1088/ 0957-4484/25/ 13/135301

[16] Hui L, Piao J G, Auletta J, *et al*. Availability of the basal planes of graphene oxide determines whether it is antibacterial[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6(15): 13183 – 13190. DOI: 10.1021/am503070z

[17] Cai X, Tan S, Lin M, *et al*. Synergistic antibacterial brilliant blue/reduced graphene oxide/quaternary phosphonium salt composite with excellent water solubility and specific targeting capability[J]. Langmuir, 2011, 27(12): 7828 – 7835. DOI: 10.1021/la201499s

[18] Wang J, Wei Y, Shi X, *et al*. Cellular entry of graphene nanosheets: the role of thickness, oxidation and surface adsorption[J]. RSC Adv, 2013, 3(36): 15776 – 15782. DOI: 10. 1039/c3ra40392k

[19] Ruiz O N, Fernando K A, Wang B, *et al*. Graphene oxide:

a nonspecific enhancer of cellular growth[J]. ACS Nano, 2011, 5(10): 8100-8107. DOI: 10.1021/nn202699t

[20] Yang X, Li Z, Ju E, *et al*. Reduced graphene oxide functionalized with a luminescent rare-earth complex for the tracking and photothermal killing of drug-resistant bacteria [J]. Chemistry, 2014, 20(2): 394-398. DOI: 10.1002/ chem.201303964

[21] Musico Y L F, Santos C M, Dalida M L P, *et al*. Surface Modification of Membrane Filters Using Graphene and Graphene Oxide-Based Nanomaterials for Bacterial Inactivation and Removal[J]. ACS Sustain Chem Eng, 2014, 2(7): 1559-1565. DOI: 10.1021/sc500044p

[22] Lv W, Guo M, Liang M H, *et al*. Graphene-DNA hybrids: self-assembly and electrochemical detection performance [J]. J Mater Chem, 2010, 20(32): 6668-6673. DOI: 10.1039/c0jm01066a

[23] He J, Zhu X, Qi Z, *et al*. Killing dental pathogens using antibacterial graphene oxide[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(9): 5605-5611. DOI: 10.1021/acsami.5b01069

[24] Guo R, Mao J, Yan L T. Computer simulation of cell entry of graphene nanosheet[J]. Biomaterials, 2013, 34(17): 4296-4301. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.02.047

[25] West J D, Marnett L J. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death[J]. Chem Res Toxicol, 2006, 19(2): 173-194. DOI: 10.1021/tx050321u

[26] Liu X, Sen S, Liu J, *et al*. Antioxidant deactivation on graphenic nanocarbon surfaces[J]. Small, 2011, 7(19): 2775-2785. DOI: 10.1002/smll.201100651

[27] Perreault F, Fonseca-de-Faria A, Elimelech M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials[J]. Chem Soc Rev, 2015, 44(16): 5861-5896. DOI: 10.1039/c5cs00021a

[28] Gurunathan S, Han J W, Dayem A A, *et al*. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 5901-5914. DOI: 10.2147/IJN.S37397

[29] Chen J, Wang X, Han H. A new function of graphene oxide emerges: inactivating phytopathogenic bacterium Xanthomonas oryzae pv. Oryzae[J]. J Nanopart Res, 2013, 15(5): 1658. DOI: 10.1007/s11051-013-1658-6

[30] Mejias-Carpio I E, Santos C M, Wei X, *et al*. Toxicity of a polymer-graphene oxide composite against bacterial planktonic cells, biofilms, and mammalian cells[J]. Nanoscale, 2012, 4(15): 4746-4756. DOI: 10.1039/c2nr30774j

[31] Chen J, Peng H, Wang X, *et al*. Graphene oxide exhibits broad-spectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation[J]. Nanoscale, 2014, 6(3): 1879-1889. DOI: 10.1039/c3nr04941h

[32] Luan B, Huynh T, Zhao L, *et al*. Potential toxicity of graphene to cell functions *via* disrupting protein-protein interactions[J]. ACS Nano, 2015, 9(1): 663-669. DOI: 10.1021/nn506011j

[33] Akhavan O, Ghaderi E. Escherichia coli bacteria reduce graphene oxide to bactericidal graphene in a self-limiting manner[J]. Carbon, 2012, 50(5): 1853-1860. DOI: 10.1016/ j.carbon.2011.12.035

[34] Salas E C, Sun Z, Luttge A, *et al*. Reduction of graphene oxide *via* bacterial respiration[J]. ACS Nano, 2010, 4(8): 4852-4856. DOI: 10.1021/nn101081t

[35] Fan Z, Liu B, Wang J, *et al*. A Novel Wound Dressing Based on Ag/Graphene Polymer Hydrogel: Effectively Kill Bacteria and Accelerate Wound Healing[J]. Adv Funct Mater, 2014, 24(25): 3933-3943. DOI: 10.1002/adfm.201304202

[36] He J, Zhu X, Qi Z, *et al*. Killing dental pathogens using antibacterial graphene oxide[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(9): 5605-5611. DOI: 10.1021/acsami.5b01069

[37] Xu W P, Zhang L C, Li J P, *et al*. Facile synthesis of silver @ graphene oxide nanocomposites and their enhanced antibacterial properties[J]. J Mater Chem, 2011, 21(12): 4593-4597. DOI: 10.1039/c0jm03376f

(收稿:2016-04-02;修回:2016-04-12)

(编辑 王 红)