

氧化石墨烯纳米银复合物对变异链球菌抗菌作用的研究

诸晓丹¹, 何剑亮², 唐子圣³, 漆正楠⁴, 石雨婷³, 夏文君³, 沈妙莲⁵, 邹岩³, 吕敏⁶

[摘要] 目的 探讨氧化石墨烯纳米银复合物(GO-Ag)对变异链球菌(*S.mutans*)的抗菌作用及其对生物膜形成的抑制作用。方法 采用菌落形成单位计数法、流式细胞术及活死菌染色法检测 GO-Ag 对浮游状态变异链球菌的抗菌作用;采用结晶紫染色法测定经 GO-Ag 作用后变异链球菌生物膜的形成量。数据采用单因素方差分析和 Dunnett's *t* 检验进行统计分析。结果 各浓度组的 GO-Ag 对浮游状态变异链球菌的抗菌作用与对照组间均有统计学差异($P < 0.05$)。经过不同浓度的 GO-Ag 处理后,变异链球菌生物膜形成量与对照组间同样具有统计学差异($P < 0.05$)。结论 GO-Ag 对变异链球菌有明显的抗菌作用,并能有效地抑制其形成生物膜。

[关键词] 氧化石墨烯; 纳米银; 变异链球菌; 抗菌性

[中图分类号] R783.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-9872(2020)10-0874-05

[doi] 10.13591/j.cnki.kqyx.2020.10.002

A study of antibacterial effect of graphene oxide-silver nanocomposites on *Streptococcus mutans*

ZHU Xiaodan, HE Jianliang, TANG Zisheng, QI Zhengnan, SHI Yuting, XIA Wenjun, SHEN Miaolian, ZOU Yan, LYU Min. (Department of Stomatology, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201700, China)

Abstract: **Objective** To investigate the antibacterial effect of graphene oxide-silver nanocomposites (GO-Ag) on *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) and its inhibition effect on biofilm formation. **Methods** Colony forming units counting method, flow cytometry and live/dead staining method were used to detect the antibacterial effect of graphene oxide-silver nanocomposites on *S.mutans*. The biomass of GO-Ag-treated *S.mutans* biofilm was tested by crystal violet assay. The data were analyzed by One-Way ANOVA and Dunnett's *t* test. **Results** The results of antibacterial effect of GO-Ag tested by all these methods had significant difference with the control group ($P < 0.05$). Comparing with the control group, the biomass of GO-Ag-treated *S.mutans* biofilm was greatly reduced and had statistical significance with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Graphene oxide-silver nanocomposites (GO-Ag) exhibit great antibacterial effect on *S.mutans* and can effectively inhibit biofilm formation on it.

Key words: graphene oxide; silver nanoparticles; *Streptococcus mutans*; antibacterial property

Stomatology 2020 40(10): 874-877 915

变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S.mutans*)是口腔内主要的致龋菌,其强致龋性与其产酸、耐酸及其对牙面的选择性粘附能力有关。在口腔环境内,菌斑生物膜是细菌粘附于牙面,并在其上进行复杂代谢从而导致口腔疾病的一个独立的微生态系统。菌斑生物膜是造成龋病的始动因子。因此,探寻一

种能有效抗菌并抑制生物膜形成的抗菌剂是目前龋病防治中的重点和热点。

银被用作抗菌剂已有悠久历史,纳米银(silver nanoparticles, AgNPs)因其特殊的纳米材料特性而具有更好的物理抗菌性^[1-2]。然而,AgNPs不稳定,易发生氧化和自身团聚而影响其抗菌性能^[3-4]。氧化石墨烯(graphene oxide, GO)是石墨烯的衍生物之一,其本身具有一定的抗菌性^[5-7]并且能够负载多种抗菌材料,如纳米银、纳米铜和纳米氧化锌等形成各种纳米复合物,这些复合物具备更强的抗菌性能^[8-10]。已有研究发现,氧化石墨烯纳米银复合物(graphene oxide-silver nanocomposites, GO-Ag)对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S.aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)等多种细菌均有良好的抗菌作用^[11-13],但其作用于口腔致龋菌的研究较少。

基金项目: 国家自然科学基金(81870749); 中国科学院重大科技基础设施开放研究项目; 上海交通大学医学院“3D 滚雪球”项目(GXQ201803)

作者单位: 1 复旦大学附属中山医院青浦分院口腔科, 上海(201700); 2 浙江大学医学院附属第二医院口腔科, 浙江杭州(310009); 3 上海交通大学医学院附属第九人民医院牙体牙髓科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 国家口腔疾病临床研究中心, 上海(200011); 4 上海市口腔病防治院口腔内科, 上海(200001); 5 上海市嘉定区中心医院口腔科, 上海(201800); 6 中国科学院上海应用物理研究所, 上海(201800)

通信作者: 唐子圣, Tel: (021) 23271699

E-mail: tangzisheng163@163.com

因此,本研究主要探讨 GO-Ag 对变异链球菌的

抗菌作用及其对生物膜形成的抑制作用,为其将来能应用于口腔龋病防治提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

GO-Ag 由中科院上海应用物理研究所制备提供。使用改良 Hummers 法^[14] 制备 GO。将 3.6 mmol/L 硝酸银在不断搅拌下加入到 0.5 g/L 的 GO 中混匀,将混合物与 1 mL 1% 的柠檬酸钠在超声下混匀,缓慢加入硼氢化钠溶液(0.2 mol/L, 60 mL),用 0.5 mol/L 氢氧化钠调整 pH 值为 11 后进行离心,将沉淀物置于无菌去离子水中进行超声分散后得到所需的 GO-Ag 悬浊液。原液浓度为 0.45 g/L。将 GO-Ag 原液置于紫外光中消毒 4 °C 保存备用。

1.2 菌液配制

国际标准菌株 *S. mutans* (UA159) 由上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔微生物实验室提供。将冻存的菌株接种于胰蛋白大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA) 培养基上,37 °C 厌氧(N₂ 80%, H₂ 10%, CO₂ 10%) 培养 24 h。取单菌落置于 5 mL 胰蛋白大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB) 培养基中培养,绘制细菌生长曲线,取对数生长期菌液,配制初始浓度为 1×10⁷ CFU/mL 的菌液备用。

1.3 GO-Ag 对浮游状态变异链球菌的抗菌作用

1.3.1 菌落形成单位(colony forming unit, CFU) 计数法 取制备的菌液 250 μL 加入无菌生理盐水及 GO-Ag 原液,配制形成 500 μL 含有 GO-Ag 终浓度分别 5、10 和 20 mg/L 的菌液,同时以无菌生理盐水作为阴性对照组,每个浓度组重复 3 次,37 °C 厌氧培养 2 h。取适量菌液进行 10 倍梯度稀释后涂布于 TSA 培养基表面,37 °C 厌氧培养 48 h 后进行菌落计数,计算抗菌率。

1.3.2 流式细胞术(flow cytometry, FCM) 检测活菌浓度 取制备的菌液 250 μL 加入无菌生理盐水及 GO-Ag 原液,配制形成 500 μL 含有 GO-Ag 终浓度分别 5、10 和 20 mg/L 的菌液,并以无菌生理盐水作为阴性对照组,每个浓度组重复 3 次,37 °C 厌氧培养 2 h。使用活菌/死菌荧光染色试剂盒(LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits) 中的 SYTO9 和 PI 染色剂进行荧光染色后,置于流式细胞仪中检测。

1.3.3 活死菌荧光染色法 取制备的菌液 250 μL,加入无菌生理盐水及 GO-Ag 原液,形成 500 μL 含有 GO-Ag 终浓度为 20 mg/L 的菌液,同时以无菌生理盐水作为阴性对照组,每组重复 3 次,37 °C 厌氧

培养 2 h。按照活菌/死菌荧光染色试剂盒说明进行染色后,置于激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM) 下观察。

1.4 GO-Ag 抗变异链球菌生物膜作用

1.4.1 体外变异链球菌生物膜的培养 将制备的含有 1% 蔗糖的菌液与 GO-Ag 混匀,形成含有 GO-Ag 终浓度分别 5、10、20 mg/L 的菌液,并以无菌生理盐水作为阴性对照组,吸取 100 μL 加入 96 孔板中,每个浓度组重复 3 次,37 °C 厌氧培养 24 h。

1.4.2 变异链球菌生物膜形成量的测定 将上述培养了 24 h 的变异链球菌生物膜弃去上清,使用无菌去离子水洗涤 3 次,每孔加入 150 μL 0.1% 的结晶紫溶液,室温下染色 15 min,吸去染液,加入无菌去离子水洗涤 3 次,自然干燥后每孔加入 200 μL 95% 的乙醇,振荡溶解 15 min,使用酶标仪测定 590 nm 处的吸光度,计算生物膜形成量减少率。

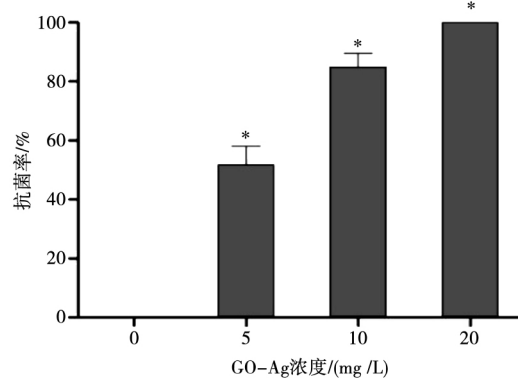
1.5 统计学方法

应用 SAS 8.2 统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA) 及 Dunnett's *t* 检验比较各实验组分别与对照组间的差异,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 GO-Ag 对浮游状态变异链球菌的抗菌作用

采用 CFU 计数法检测 GO-Ag 对变异链球菌的抗菌作用,结果见图 1。当 GO-Ag 浓度为 5、10、20 mg/L 时,其对变异链球菌的抗菌率分别为(51.82±6.21)%、(84.94±4.67)%、100%,与对照组间的差异均具有统计学意义($P<0.05$),并且抗菌作用随着 GO-Ag 的浓度增大而增强。



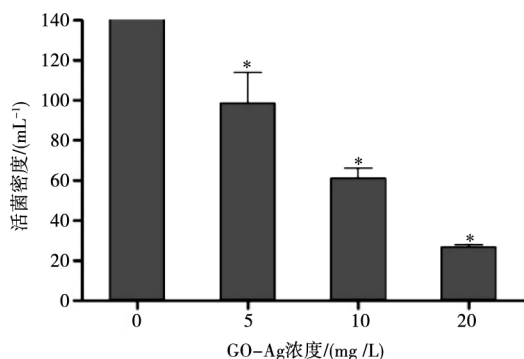
* : $P<0.05$

图 1 GO-Ag 对变异链球菌的抗菌率

Fig.1 The antibacterial rate of GO-Ag to *S. mutans*

采用 FCM 检测经过 GO-Ag 作用后变异链球菌的活菌浓度结果,见图 2。当 GO-Ag 浓度为 5、10、

20 mg/L 时,其活菌密度分别为(98.66±15.21) /mL、(61.35±4.83) /mL、(26.93±1.09) /mL,而对照组的活菌密度为(215.40±33.09) /mL,各实验组与对照组间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

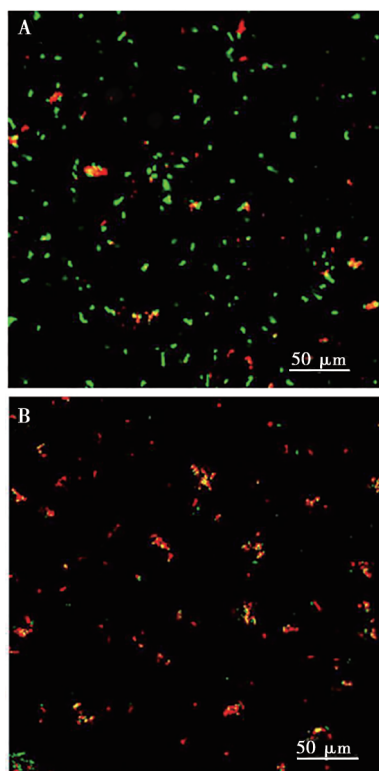


* : $P < 0.05$

图2 GO-Ag 作用后变异链球菌的活菌密度

Fig.2 Live cell concentration of *S.mutans* after being treated by GO-Ag

采用活死菌荧光染色在 CLSM 下观察 GO-Ag 作用下变异链球菌的生存状态,见图3,其中绿色荧光代表活菌,红色荧光代表死菌。图中可见经过 20 mg/L 的 GO-Ag 处理 2 h 后的变异链球菌,红色荧光比例与对照组相比明显增加。

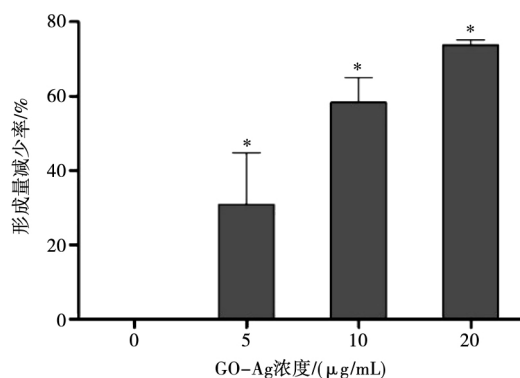


A: 对照组; B: 20 μg/mL GO-Ag 处理组

图3 GO-Ag 作用后变异链球菌的 CLSM 图像

Fig.3 CLSM images of *S.mutans* after being treated by GO-Ag

采用结晶紫染色法测定变异链球菌 24 h 生物膜的形成量,结果见图4。与对照组比较,经过 5、10、20 μg/L 的 GO-Ag 处理后,变异链球菌生物膜形成量分别减少了(30.92 ± 13.94) %、(58.39 ± 6.73) %、(73.82 ± 1.32) %,均有统计学差异($P < 0.05$)。



* : $P < 0.05$

图4 GO-Ag 对变异链球菌生物膜形成量的抑制作用

Fig.4 The inhibition effect of GO-Ag on the biomass of *S.mutans* biofilm

3 讨论

龋病是一种慢性细菌感染性疾病,是人类两大口腔疾病之一。变异链球菌与龋病的发生发展密切相关,因此探寻有效抑制或杀灭变异链球菌的抗菌剂一直以来都是龋病防治领域的重要研究方向。近年来,面对传统抗菌剂带来的不良反应和耐药问题,新型无机纳米抗菌剂受到广泛关注和研究。

过去已有许多研究都报道了 GO-Ag 具有显著的抗菌性,如 De Moraes 等^[15] 研究发现 15 μg/mL 的 GO-Ag 分别作用于大肠杆菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 2 h 和 4 h 就能完全杀死细菌; Jaworski 等^[16] 同样报道了 GO-Ag 作用于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, *S. epidermidis*) 24 h 后,其活性分别降低了 88.6%、79.5% 和 76.5%。

此外,有研究报道了使用 GO-Ag 作为钛表面涂层,对变异链球菌和牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 具有有效的抗菌作用,为将来预防种植体周围炎提供了一个新的方向^[17]。另一方面,GO-Ag 还可作为载药系统,将其他抗菌药物,如抗生素等负载于其上,发挥协同抗菌作用,进一步提高抗菌效率^[18]。

本研究结果显示,当 GO-Ag 浓度为 5 mg/L 时,其对变异链球菌即有明显的抗菌作用,抗菌率为

(51.82 ± 6.21)%; 而当其浓度达到 20 mg/L 时, TSA 培养基上未见菌落生长, 抗菌率达到 100%。此外, FCM 的结果显示经过 20 mg/L 的 GO-Ag 作用 2 h 后, 变异链球菌活菌密度为 (26.93 ± 1.09) /mL, 相比于对照组的 (215.40 ± 33.09) /mL 下降了 (87.35 ± 1.48)%。活死菌染色法的检测结果则直观地表明了经过 GO-Ag 作用后, 变异链球菌中的死菌比例明显增多。上述实验结果说明 GO-Ag 对浮游状态的变异链球菌具备良好的抗菌性。

以往研究报道 GO-Ag 的抗菌性强于 GO 与 Ag-NPs^[19-20]。本课题组研究发现 20 mg/L 的 GO 对变异链球菌的抗菌率为 (55.9 ± 10.7)%, 明显小于 GO-Ag^[21]。Song 等^[22] 研究认为 GO-Ag 的抗菌性并不是 GO 与 AgNPs 抗菌作用的简单相加, 而是二者发挥协同抗菌作用, 主要是通过破坏细菌细胞膜和介导氧化应激进行抗菌。GO 具有较大的比表面积和大量含氧官能团, 使 AgNPs 稳定分散在其表面, 大大增加了与细菌的接触, 进一步增强了抗菌性。

细菌生物膜由细菌群体和胞外物质组成, 具有特殊三维立体结构, 其比浮游状态的细菌抗药性更强、危害更大。本研究采用结晶紫染色法测定 GO-Ag 对变异链球菌 24 h 生物膜形成量的影响。结果表明经过 5、10、20 mg/L 的 GO-Ag 处理后, 变异链球菌生物膜形成量分别比对照组减少 (30.92 ± 13.94)%、(58.39 ± 6.73)%、(73.82 ± 1.32)%, 说明 GO-Ag 能有效地抑制变异链球菌生物膜的形成。实验结果与以往相关研究一致^[23]。然而, 目前对于 GO-Ag 对细菌生物膜的作用机制尚无定论。Liu 等^[24] 认为 GO-Ag 能够通过调节铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 生物膜的胞外基质而有效抑制其生物膜形成。Kulshrestha 等^[23] 则认为 GO-Ag 是通过杀灭浮游的阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*, *E. cloacae*) 而抑制其形成生物膜的; GO-Ag 抑制变异链球菌形成生物膜则是通过调节与变异链球菌形成生物膜相关基因的表达实现的。

综上所述, 本研究结果显示 GO-Ag 对变异链球菌有明显的抗菌作用, 并能有效地抑制其形成生物膜。然而, GO-Ag 的抗菌机制及其对细菌生物膜的作用还需更进一步研究, 为其将来能够应用于临床提供更多依据。

[参 考 文 献]

[1] Juan J, Zhimin Z, Anchun M, et al. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect [J]. Int J Nano-

- medicine, 2010, 5: 261-267.
- [2] Keshari AK, Srivastava R, Singh P, et al. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum* [J]. J Ayurveda Integr Med, 2020, 11(1): 37-44.
- [3] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles [J]. Nanotechnology, 2005, 16(10): 2346-2353.
- [4] Tian Y, Qi J, Zhang W, et al. Facile, one-pot synthesis, and antibacterial activity of mesoporous silica nanoparticles decorated with well-dispersed silver nanoparticles [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6(15): 12038-12045.
- [5] Hu W, Peng C, Luo W, et al. Graphene-based antibacterial paper [J]. ACS Nano, 2010, 4(7): 4317-4323.
- [6] Yu CH, Chen GY, Xia MY, et al. Understanding the sheet size-antibacterial activity relationship of graphene oxide and the nano-bio interaction-based physical mechanisms [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020, 191: 111009.
- [7] Fallatah H, Elhaneid M, Ali-Boucetta H, et al. Antibacterial effect of graphene oxide (GO) nano-particles against *Pseudomonas putida* biofilm of variable age [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(24): 25057-25070.
- [8] Jankauskaitė LV, Vitkauskienė LA, Lazauskas A, et al. Bactericidal effect of graphene oxide/Cu/Ag nanoderivatives against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Int J Pharm, 2016, 511(1): 90-97.
- [9] Kulshrestha S, Khan S, Meena R, et al. A graphene/zinc oxide nanocomposite film protects dental implant surfaces against cariogenic *Streptococcus mutans* [J]. Biofouling, 2014, 30(10): 1281-1294.
- [10] Zhong L, Liu H, Samal M, et al. Synthesis of ZnO nanoparticles-decorated spindle-shaped graphene oxide for application in synergistic antibacterial activity [J]. J Photochem Photobiol B, 2018, 183: 293-301.
- [11] Shao W, Liu X, Min H, et al. Preparation, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticle-decorated graphene oxide nanocomposite [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(12): 6966-6973.
- [12] Zhang HZ, Zhang C, Zeng GM, et al. Easily separated silver nanoparticle-decorated magnetic graphene oxide: Synthesis and high antibacterial activity [J]. J Colloid Interface Sci, 2016, 471: 94-102.
- [13] Tang J, Chen Q, Xu L, et al. Graphene oxide-silver nanocomposite as a highly effective antibacterial agent with species-specific mechanisms [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5(9): 3867-3874.
- [14] Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, et al. Improved synthesis of graphene oxide [J]. ACS Nano, 2010, 4(8): 4806-4814.
- [15] De Moraes AC, Lima BA, De Faria AF, et al. Graphene oxide-silver nanocomposite as a promising biocidal agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 6847-6861.

- [13] 马婵娟, 轩东英, 王仁飞, 等. 汉族人群硬腭黏膜厚度测量: CBCT 图像分析法和探查法的比较 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 21(24): 3803-3808.
- [14] Ogawa M, Katagiri S, Koyanagi T, *et al.* Accuracy of cone beam computed tomography in evaluation of palatal mucosa thickness [J]. J Clin Periodontol, 2020, 47(4): 479-488.
- [15] Song JE, Um YJ, Kim CS, *et al.* Thickness of posterior palatal masticatory mucosa: the use of computerized tomography [J]. J Periodontol, 2008, 79(3): 406-412.
- [16] Ramesh KSV, Swetha P, Krishna V, *et al.* Assessment of thickness of palatal masticatory mucosa and maximum graft dimensions at palatal vault associated with age and gender—a clinical study [J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(5): ZC09-ZC13.
- [17] Wara-Aswapati N, Pitiphat W, Chandrapho N, *et al.* Thickness of palatal masticatory mucosa associated with age [J]. J Periodontol, 2001, 72(10): 1407-1412.
- [18] Manish K, Geeti G, Komal P, *et al.* Evaluation of thickness of palatal masticatory mucosa in posterior teeth and its relation with age and gender [J]. Indian J Dent Sci, 2017, 9(4): 245.
- [19] Ueno D, Sekiguchi R, Morita M, *et al.* Palatal mucosal measurements in a Japanese population using cone-beam computed tomography [J]. J Esthet Restor Dent, 2014, 26(1): 48-58.
- [20] 薛绯, 张瑞. 上颌腭侧咀嚼黏膜厚度与腭穹窿形态的 CBCT 研究 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2016, 26(11): 667-671.
(修回日期: 2020-06-28)
(本文编辑: 曹丹)

(上接第 877 页) 诸晓丹, 等. 氧化石墨烯纳米银复合物对变异链球菌抗菌作用的研究

- [16] Jaworski S, Wierzbicki M, Sawosz E, *et al.* Graphene Oxide-Based Nanocomposites Decorated with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent [J]. Nanoscale Res Lett, 2018, 13(1): 116.
- [17] Jin J, Zhang L, Shi M, *et al.* Ti-GO-Ag nanocomposite: the effect of content level on the antimicrobial activity and cytotoxicity [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 4209-4224.
- [18] Kooti M, Sedeh AN, Motamedi H, *et al.* Magnetic graphene oxide inlaid with silver nanoparticles as antibacterial and drug delivery composite [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(8): 3607-3621.
- [19] Zhang D, Liu X, Wang X. Green synthesis of graphene oxide sheets decorated by silver nanoprisms and their anti-bacterial properties [J]. J Inorg Biochem, 2011, 105(9): 1181-1186.
- [20] De Faria AF, Martinez DS, Meira SM, *et al.* Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014, 113: 115-124.
- [21] 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.
- [22] Song B, Zhang C, Zeng G, *et al.* Antibacterial properties and mechanism of graphene oxide-silver nanocomposites as bactericidal agents for water disinfection [J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 604: 167-176.
- [23] Kulshrestha S, Qayyum S, Khan AU. Antibiofilm efficacy of green synthesized graphene oxide-silver nanocomposite using Lagerstroemia speciosa floral extract: A comparative study on inhibition of gram-positive and gram-negative biofilms [J]. Microb Pathog, 2017, 103: 167-177.
- [24] Liu S, Cao S, Guo J, *et al.* Graphene oxide-silver nanocomposites modulate biofilm formation and extracellular polymeric substance (EPS) production [J]. Nanoscale, 2018, 10(41): 19603-19611.
(修回日期: 2020-05-09)
(本文编辑: 田慧)