

锰离子掺杂灵芝碳点的制备、表征与协同光热抑菌性能研究

余梦竹^{1,2}, 罗坤顺¹, 肖吕浪^{1,2}, 朱月^{1,2,3}, 任得强¹, 周英^{1,3}, 汪祖华^{1,2,3*}

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 中药制剂与大健康产品开发贵州省科技创新领军人才工作站, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州省现代中药创制全省重点实验室, 贵州 贵阳 550025

摘要:目的 从白及 *Bletilla striata*、刺梨 *Rosa roxburghii*、灵芝 *Ganoderma lucidum* 和天麻 *Gastrodia elata* 中筛选出抑菌效果最佳的中药碳点, 系统探究锰离子掺杂灵芝碳点 (manganese-doped *Ganoderma lucidum* carbon nanodots, Mn-GLCDs) 的理化性质、光热性能、抗菌活性与机制。方法 采用水热法制备白及、刺梨、灵芝和天麻 4 种中药碳点, 通过抑菌活性筛选出性能最优的中药碳点, 并对其锰掺杂中药碳点的形貌、结构、体外光热性能进行表征。通过抑菌圈、细菌共培养以及生物膜抑制和破坏实验, 评价其在近红外 (near infrared, NIR) 光照射下对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 的抑菌性能。通过细菌内活性氧荧光检测 [2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯探针 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)] 初步探究其抗菌机制。以溶血实验及细胞毒性试验评估其生物安全性。结果 GLCDs 的抑菌作用显著优于白及、刺梨和天麻碳点。Mn-GLCDs 粒径约为 5 nm, 表面富含 -OH、-NH₂、C=O、C-N-C 及 C-O-C 等亲水官能团。X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、电感耦合等离子体质谱 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 证实 Mn²⁺ 质量分数为 0.83%, 以配位形式稳定存在于碳点骨架中。UV-Vis 吸收峰红移及拉曼光谱 D 峰与 G 峰强度比 (intensity ratio of D-band to G-band, I_D/I_G) > 1 表明, Mn²⁺ 的掺杂缩小了能带隙并增加了结构缺陷密度。光热性能评价结果显示, Mn-GLCDs 在 808 nm 激光 (1.5 W/cm²) 照射下能迅速升温, 光热转换效率为 35.03%; 6 次循环升温稳定性测试中最高温度波动小于 6%, 表明其具有良好的光热稳定性。荧光性能测试结果表明, 荧光量子产率为 20.51%, 具有激发波长依赖性。体外抑菌实验结果表明, 与 GLCDs 相比, Mn-GLCDs 在 NIR 光照射下, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 2 种细菌的抑菌作用最佳, 能显著抑制、破坏细菌生物膜。细菌内活性氧检测结果显示, Mn-GLCDs 在 NIR 光照射下, 可使金黄色葡萄球菌和大肠杆菌内活性氧水平分别升高至阴性对照组的 6.75 倍和 5.44 倍。安全性评价显示, Mn-GLCDs 在抑菌浓度范围内溶血率低于 5%, 对小鼠成纤维细胞 (L929, NCTC clone 929)、小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW 264.7) 细胞均无明显毒性。结论 首次构建了 Mn-GLCDs, 显著提升其光热转换能力与抑菌活性, 其机制与其诱导细菌内活性氧相关, 为新型中药纳米抗菌剂开发提供了实验依据。

关键词: 中药; 灵芝; 碳量子点; 锰离子掺杂; 光热性能; 细菌生物膜; 白及; 刺梨; 天麻; 抗菌活性; 金黄色葡萄球菌; 大肠杆菌; 溶血; 细胞毒性; 生物安全性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)13-5054-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.010

Preparation, characterisation and synergistic photothermal antibacterial performance of manganese ion-doped ganoderma carbon dots

YU Mengzhu^{1,2}, LUO Kunshun¹, XIAO Lyulang^{1,2}, ZHU Yue^{1,2,3}, REN Deqiang¹, ZHOU Ying^{1,3}, WANG Zuhua^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Guizhou University of traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Provincial Leading Talent Workstation for Traditional Chinese Medicine Formulations and Health Product Development, Guiyang 550025, China

3. Guizhou Provincial Key Laboratory for Modern Traditional Chinese Medicine Innovation, Guiyang 550025, China

收稿日期: 2026-03-08

基金项目: 中药制剂与大健康产品开发贵州省科技创新领军人才工作站 (黔科合平台 KXJZ[2025]042); 贵州省现代中药创制全省重点实验室 (黔科合平台[2025]019); 贵州中医药大学纳米药物技术研究中心 (贵中医 ZX 合字[2024]070)

作者简介: 余梦竹, 女, 硕士研究生, 研究方向为纳米创新药物制剂开发。E-mail: 18185205412@163.com

*通信作者: 汪祖华, 男, 博士生导师, 研究方向为纳米创新药物制剂开发。E-mail: wangrui551601@163.com

Abstract: Objective To screen for the most effective antimicrobial carbon dots from the traditional Chinese medicines Baiji (*Bletilla striata*), Cili (*Rosa roxburghii*), Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) and Tianma (*Gastrodia elata*), and to systematically investigate the physicochemical properties, photothermal performance, antibacterial activity and mechanism of manganese-doped *G. lucidum* carbon dots (Mn-GLCDs). **Methods** Four kinds of herbal carbon dots derived from *B. striata*, *R. roxburghii*, *G. lucidum* and *G. elata* were prepared by a conventional hydrothermal method. The carbon dots with optimal antibacterial activity were screened out, and the morphology, structure and *in vitro* photothermal performance of the manganese-doped carbon dots were characterized. The antibacterial performance against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under near-infrared (NIR) irradiation was evaluated through zone of inhibition assays, bacterial co-culture experiments, and biofilm inhibition and disruption tests. The antibacterial mechanism was preliminarily investigated by intracellular active oxygen fluorescence detection using a DCFH-DA probe. Biosafety was assessed by hemolysis assay and cytotoxicity test. Intracellular reactive oxygen species (ROS) fluorescence measurement using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe was adopted to preliminarily elucidate its antibacterial mechanism. Hemolysis assays and cytotoxicity evaluations were conducted to verify their biological safety. **Results** GLCDs possessed remarkably stronger antibacterial activity than carbon dots prepared from *B. striata*, *R. roxburghii* and *G. elata* carbon dots. Mn-GLCDs had a particle size of approximately 5 nm, and their surfaces were rich in hydrophilic functional groups including -OH, -NH₂, C=O, C-N-C and C-O-C. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) confirmed that the mass fraction of Mn²⁺ reached 0.83%, and Mn²⁺ was stably present in the carbon dot framework in a coordinated form. The red shift of the UV-Vis absorption peak and the Raman $I_D/I_G > 1$ indicated that Mn²⁺ doping narrowed the bandgap and increased the density of structural defects. Photothermal performance evaluation showed that Mn-GLCDs could rapidly heat up under 808 nm laser irradiation (1.5 W/cm²), with a photothermal conversion efficiency of 35.03%. The maximum temperature fluctuation in six cycles of heating-cooling stability test was less than 6%, indicating good photothermal stability. Fluorescence performance test showed a fluorescence quantum yield of 20.51% and excitation-dependent fluorescence emission. *In vitro* antibacterial experiments demonstrated that, compared with undoped *G. lucidum* carbon dots, Mn-GLCDs exhibited the strongest antibacterial effect against *S. aureus* and *E. coli* under near-infrared irradiation, and could significantly inhibit and disrupt bacterial biofilms. Intracellular active oxygen detection showed that upon near-infrared irradiation, Mn-GLCDs elevated the active oxygen levels in *S. aureus* and *E. coli* to 6.75-fold and 5.44-fold of the negative control group, respectively. Biosafety evaluation showed that the hemolysis rate of Mn-GLCDs was below 5% within the antibacterial concentration range, and Mn-GLCDs exhibited no obvious toxicity to L929 and RAW264.7 cells. **Conclusion** This study constructs for the first time Mn-GLCDs, which significantly enhance the photothermal conversion capability and antibacterial activity. The mechanism is related to the induction of intracellular active oxygen. This work provides an experimental basis for the development of novel traditional Chinese medicine-based nanoscale antibacterial agents.

Key words: traditional Chinese medicines; *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; carbon quantum dots; manganese ion doping; photothermal properties; bacterial biofilms; *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; *Rosa roxburghii* Tratt.; *Gastrodia elata* Bl.; antibacterial activity; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; hemolysis; cytotoxicity; biological safety

近年来, 细菌感染已成为全球公共卫生领域的重大挑战^[1], 传统抗生素的滥用导致细菌耐药性不断蔓延, 急需开发新型、高效、低毒的抗菌策略^[2]。碳量子点 (carbon quantum dots, CQDs) 作为一种零维荧光纳米材料, 因其优异的生物相容性、低毒性、易于表面功能化及独特的光物理性质, 在生物成像、药物递送及抗菌治疗等领域展现出巨大的应用潜力^[3-4]。以天然中药材为碳源制备的中药碳点, 不仅能有效保留原药材的核心药理活性成分, 还具有纳米材料的小尺寸效应、高比表面积及易表面修饰等特性^[5-6]。已有研究表明, 多种中药碳点自身具备一定的抑菌能力, 其机制可能与诱导细菌氧化应激、破坏细胞膜完整性有关^[7-8]。然而, 单一中药碳点的抗菌能力往往有限, 难以满足高效治疗的需

求。过渡金属离子掺杂已被证实可有效调控碳点的电子结构和表面态^[9]。其中, 锰离子 (Mn²⁺) 不仅能通过类芬顿反应催化产生活性氧, 增强材料的氧化损伤能力, 还可缩小碳点的能带隙、增加结构缺陷, 从而显著提升其对近红外 (near infrared, NIR) 光的吸收和光热转换效率 (η)^[10-11]。光热疗法作为一种非侵入性物理抗菌手段, 可通过局部热效应快速杀灭敏感菌和耐药菌, 且不易诱发耐药性^[12-13]。因此, 开发兼具光热性能与化学动力活性的锰掺杂中药碳点, 有望实现“光热-化学动力学”协同抗菌。

本研究选择白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.、刺梨 *Rosa roxburghii* Tratt.、灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.、天麻 *Gastrodia elata* Bl. 4种贵州道地药材作为碳源, 主要是基于化学成

分的代表性、产地地域特色及实验筛选的必要性等综合考虑。通过比较不同化学特征中药碳点的抗菌活性,筛选出最优碳源,为后续锰掺杂提供明确的对照基础。灵芝作为传统名贵中药材,富含多糖、三萜等活性成分,具有免疫调节、抗肿瘤等药理作用^[14]。以灵芝为碳源制备碳点已有报道^[15],但灵芝碳点(*G. lucidum* carbon dots, GLCDs)经锰掺杂后的理化性质、光热性能及抗菌活性的变化目前尚无研究报道,且关于锰掺杂是否影响碳点的生物安全性以及锰掺杂增强抑菌作用是否确实与活性氧水平升高直接相关,仍缺乏实验证据。基于此,本研究首先比较了白及、刺梨、灵芝和天麻4种常用中药来源碳点的体外抑菌活性,筛选出抗菌性能最优的GLCDs。进而制备锰离子掺杂的灵芝碳点(Mn-GLCDs),并系统表征其形貌、表面官能团、元素组成、光学性质及光热性能。在此基础上,通过抑菌圈、细菌共培养及生物膜抑制与破坏实验,综合评价其在NIR光照射下对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的协同光热抑菌作用。采用DCFH-DA荧光探针检测细菌内活性氧水平,直接验证锰掺杂对活性氧生成能力的影响。此外通过溶血实验和细胞毒性实验,评估Mn-GLCDs在抑菌浓度范围内的生物安全性。以期开发安全、高效、机制明确的金属掺杂中药碳基纳米抗菌剂提供实验依据与理论参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

WH-25A型台式干燥箱,北京中兴伟业世纪仪器有限公司;Xinyi-12型真空冷冻干燥机,宁波新艺超声设备有限公司;HH-4型数显恒温水浴锅,常州天瑞仪器有限公司;DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器,上海秋佐科学仪器有限公司;AE124型万分之一电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;GS-223A+型千分之一电子天平,上海奔普仪器有限公司;H-020S型数码超声波清洗机,广州繁花科技有限公司;BECKMAN DelsaMax PRO型纳米粒度/Zeta电位分析仪,美国贝克曼库尔特公司;UV-2700型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;F98型荧光分光光度计,上海棱光技术有限公司;Nicolet iS5 FTIR型傅里叶红外光谱仪,美国赛默飞公司;Escalab Xi+ X型射线光电子能谱(XPS),美国赛默飞公司;Rigaku Ultima IV型X射线衍射仪(XRD),日本理学公司;LabRAM HR Evolution型激光共聚焦拉曼光谱仪(Raman),Horiba Scientific

公司;HT7820型低电压透射电镜(TEM),日本日立公司;ZF-20D型暗箱式紫外分析仪,上海宝山顾村电光仪器厂;HM-TPK20-3A QF/W型手持测温热像仪,杭州海康微影传感科技有限公司;LDP型光纤激光器,西安赫胥尔镭得激光科技有限公司;HPD-4型数显恒温水浴摇床,常州市华普达教学仪器有限公司;FD50SA型立式压力蒸汽灭菌锅,厦门致微仪器实验室;LKTC-B2-T型电热恒温培养箱,天津塞得利斯实验分析仪器制造厂;Thermo Scientific Varioskan Flash 3001型全波长多功能酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 材料

柠檬酸(一水),优级纯GR,质量分数99.8%,阿拉丁试剂(上海)有限公司;乙二胺盐酸盐、氯化锰(四水),国药集团化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS)、LB营养琼脂、LB肉汤、细胞计数试剂盒-8(cell counting Kit-8, CCK-8),北京索莱宝科技有限公司;活性氧试剂盒、结晶紫染色液,上海碧云天生物技术有限公司;戊二醛,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

实验所用白及、刺梨、灵芝、天麻均购于中国北京同仁堂有限责任公司,经贵州中医药大学王志威教授鉴定,分别为兰科白及属植物白及*B. striata* (Thunb.) Reichb. f.的干燥块茎,蔷薇科蔷薇属植物刺梨*R. roxburghii* Tratt.的干燥果实,多孔菌科灵芝属真菌赤芝*G. lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.的干燥子实体以及兰科天麻属植物天麻*G. elata* Bl.的干燥块茎,均符合《中国药典》2025年版的相关规定。

供试菌种大肠杆菌*Escherichia coli* (T. Escherich 1885)、金黄色葡萄球菌*Staphylococcus aureus* Rosenbach,供试细胞小鼠成纤维细胞(L929)和小鼠巨噬细胞(RAW264.7)均由浙江大学药学院提供。

1.3 动物

SD雌性大鼠,体质量250~300 g,购于贵州中医药大学动物研究所,许可证号SCXK(黔)2021-0003,动物实验已获得贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号为20250718001。

2 方法与结果

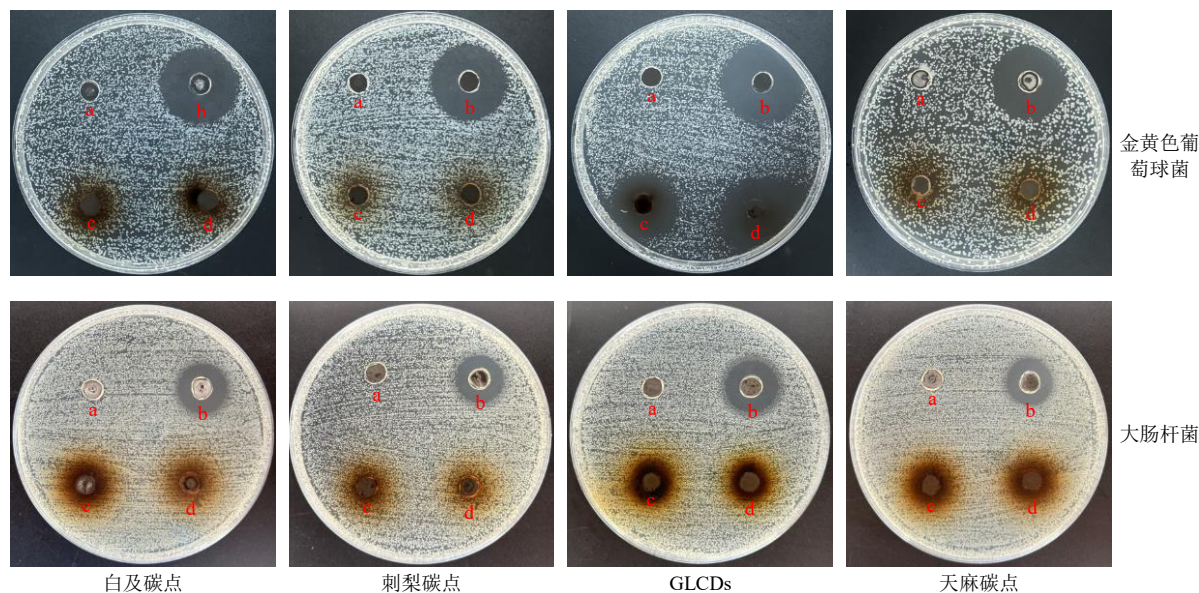
2.1 4种中药碳点的制备与抑菌活性筛选

2.1.1 4种中药碳点的制备 采用水热法^[15-18]制备4种中药碳点。以灵芝为例:称取灵芝50.02 g,研磨成粉,加入100 mL蒸馏水浸泡0.5 h,80 °C水浴

提取 2 h。而后静置浸提 20 h，滤过（先用纱布，再用 0.45、0.22 μm 滤膜滤过至澄清，有明显丁达尔效应）得 30 mL 提取液，冻干得提取物 5.354 g，冷藏备用。取提取物 0.161 g、柠檬酸 2.409 g、乙二胺盐酸盐 0.667 g，溶于 30 mL 去离子水，超声溶解，200 °C 水热反应 10 h，冷却后溶液变为黑棕色，表明碳点形成。滤过后透析 24 h [截留相对分子质量 (molecular weight cut-off, M_w) 500，每 6 小时换液]，冷冻干燥得碳点粉末，即得 GLCDs。白及、刺梨、天麻碳点按相同工艺制备。

2.1.2 抑菌活性筛选 将实验所用金黄色葡萄球菌与大肠杆菌，分别于 LB 固体培养基的培养皿中接种划线。37 °C 培养 18 h 后，取无菌试管 2 支，分别加入 LB 液体培养基 5 mL，用接种环挑取一环单菌落于试管中，放置于水浴摇床，在 37 °C、220 r/min 条件下振荡培养至对数生长期 [600 nm 波长处吸光度 (A_{600}) ≈ 0.6]。之后用 PBS 将菌液稀释至 1×10^6 CFU/mL 的工作浓度。

采用牛津杯扩散法测定了 4 种中药碳点对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用。用 L 型涂布棒将 500 μL 的菌悬液 (1×10^6 CFU/mL) 均匀涂布到 LB 固体琼脂平板上。生理盐水为空白对照组，硫酸庆大霉素 (25 μg/mL) 为阳性对照组。4 种中药碳点为实验组，808 nm NIR 激光照射 10 min (功率密度为 1.5 W/cm² 或激光不照射)。将牛津杯 (内径 7 mm) 放置在 LB 固体培养板上进行打孔，在每个孔中加入 100 μL 的液体实验样品，转移到设置条件为 37 °C 的恒温培养箱中培养 18 h，观察并测量抑菌圈的直径。每种菌株做 3 组平行实验，所有实验的材料和工具都经过高压灭菌，整个操作都在超净工作台中进行。结果如图 1 所示，在相同浓度下，与其他 3 种碳点相比，GLCDs 对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌均展现出最好抑菌效果，且联合 NIR 光照射后抑菌效果进一步增强。白及、天麻碳点展现出微弱的抑菌能力，刺梨碳点几乎没有抑菌效果。故选用 GLCDs 进行锰离子掺杂以开展后续实验。



a-空白对照组; b-阳性对照组; c-各中药碳点组; d-各中药碳点+NIR 组。

a-blank control group; b-positive control group; c-carbon dot group of each traditional Chinese medicine; d-carbon dot of each traditional Chinese medicine + NIR group.

图 1 4 种中药碳点对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌抑菌圈图

Fig. 1 Antibacterial zone diagrams of four herbal carbon dots against *S. aureus* and *E. coli*

2.2 Mn-GLCDs 的制备与理化表征

2.2.1 Mn-GLCDs 的制备 以灵芝为碳源，四水合氯化锰为锰源，采用水热法制备 Mn-GLCDs。方法如下：称取灵芝提取物 0.506 g 和四水氯化锰 0.253 g，加入 10 mL 蒸馏水溶解。称取柠檬酸 5.042 g 和乙二胺盐酸盐 1.037 g，加入 20 mL 蒸馏水溶解。将

上述溶液混合，加入去离子水补足到 70 mL，室温条件下将混合溶液在超声波清洗器 (40 kHz、200 W) 中超声处理 10~30 min (冰浴)，期间每 5 分钟观察 1 次，直至固体完全溶解。将混合物转移到高压反应釜中，200 °C 水热反应 10 h，自然冷却至室温。将溶液以 10 000 r/min 离心 (离心半径 9.19 cm)

10 min, 取上清液用 M_w 500 透析袋透析纯化 72 h, 冻干后得到棕色粉末状固体, 放入 4 °C 冰箱中, 备用。相同条件制备无 Mn 掺杂的 GLCDs 作为对照。

2.2.2 Mn-GLCDs 的形貌观察与粒径测定 取一定浓度的 Mn-GLCDs, 采用动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 技术测定其平均粒径与多分散系数 (polydispersity coefficient, PDI), 通过透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 评价其形态、大小和分布。外观考察结果如图 2 所示, 冻干后的 Mn-GLCDs 为棕色粉末状固体, 复溶后溶液均匀透明, 呈棕色并具有明显的丁达尔效应。DLS 结果如图 3 所示, 测得 Mn-GLCDs 水合平均粒径为 (4.48 ± 0.16) nm, PDI 为 0.25 ± 0.02 , 表明其尺寸分布均一。TEM 图像 (图 4) 显示, Mn-GLCDs 呈类球形, 分散性良好。

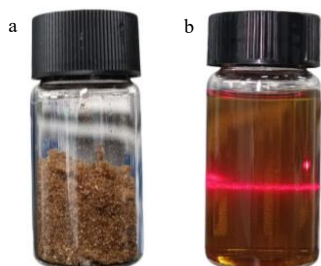


图 2 冻干后 Mn-GLCDs 外观 (a) 及其复溶后的外观和丁达尔效应 (b)

Fig. 2 Appearance of Mn-GLCDs after freeze-drying (a) and their appearance and Tyndall effect after re-dissolution (b)

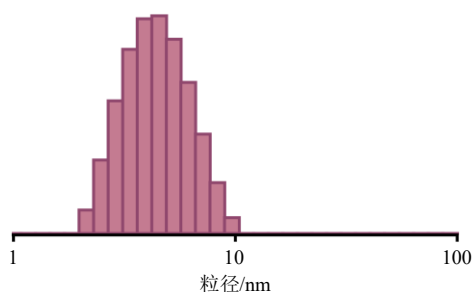


图 3 基于 DLS 技术的 Mn-GLCDs 粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of Mn-GLCDs based on DLS technology

2.2.3 紫外-可见 (UV-Vis) 吸收光谱测定 采用 UV-Vis 技术分别测定 Mn-GLCDs 和 GLCDs 在 200~800 nm 下的 UV-Vis 吸收光谱。结果如图 5 所示, Mn-GLCDs 在 213、340 nm 处有 2 个特征吸收峰, 分别对应芳香族 sp^2 结构的 $\pi-\pi^*$ 跃迁和 $n-\pi^*$ 跃迁。与 GLCDs 吸收峰 (212、339 nm) 相比, Mn-

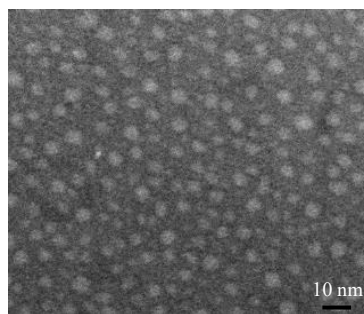


图 4 Mn-GLCDs 的 TEM 图

Fig. 4 TEM of Mn-GLCDs

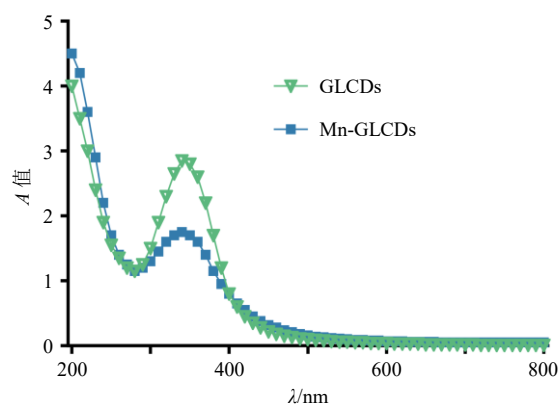


图 5 Mn-GLCDs 和 GLCDs 的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 5 UV-Vis absorption spectra of Mn-GLCDs and GLCDs

GLCDs 的吸收峰发生轻微红移, 表明锰离子的掺杂改变了碳点的电子结构, 缩小了能带隙。

2.2.4 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析 利用傅里叶红外光谱仪对 Mn-GLCDs 的表面官能团进行了表征。结果如图 6 所示, 3402.63 cm^{-1} 处的宽吸收峰归属为 -OH 和 -NH₂ 的伸缩振动; 1635.68 cm^{-1} 处的吸收峰对应 C=O 键的伸缩振动; 1395.44 cm^{-1} 处的特征吸收为 C-N 的伸缩振动; 1221.47 cm^{-1} 处的吸收

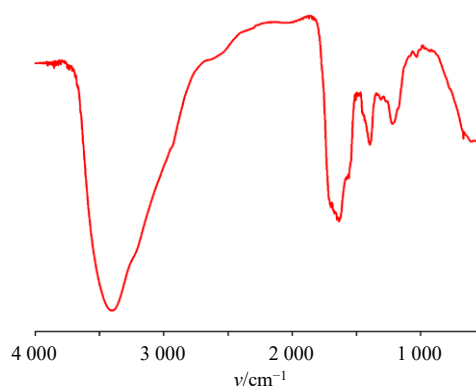


图 6 Mn-GLCDs 的 FTIR

Fig. 6 FTIR of Mn-GLCDs

峰为 C-O-C 的伸缩振动; 604.94 cm^{-1} 处的吸收峰可能来自苯环的 C-H 面外弯曲振动。

2.2.5 X 射线衍射 (X ray diffraction, XRD) 分析 采用 X 射线衍射仪对 Mn-GLCDs 的晶体结构进行分析。结果如图 7 所示, Mn-GLCDs 在 $2\theta=22.5^\circ$ 附近呈现 1 个宽泛且弥散的衍射峰, 对应石墨化碳的 (002) 晶面。根据布拉格方程 $n\lambda=2d \sin\theta$, 其中 $\lambda=0.15406 \text{ nm}$, $n=1$ 计算得晶面间距 $d=0.395 \text{ nm}$ 。与理想石墨的 $d_{(002)}=0.335 \text{ nm}$ 相比, Mn-GLCDs 的层间距明显增大, 表明碳层中存在大量结构缺陷和无序排列, 宽化的峰形进一步证实锰离子的掺杂扰乱了碳层的短程有序结构, 使材料呈现典型的无定形碳特征。

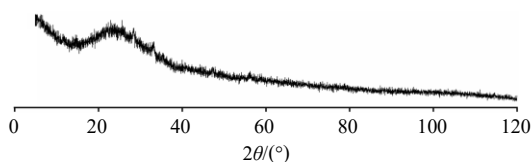


图 7 Mn-GLCDs 的 XRD 图谱
Fig. 7 XRD pattern of Mn-GLCDs

2.2.6 拉曼光谱分析 拉曼光谱测结果如图 8 所示。位于 $1330\sim1360 \text{ cm}^{-1}$ 的 D 峰和 $1540\sim1580 \text{ cm}^{-1}$ 的 G 峰清晰可见。D 峰与 G 峰的比值大于 1, 进一步证实 Mn-GLCDs 内核中无序的 sp^3 杂化碳原子的振动占优势, 结构缺陷密度较高。

2.2.7 X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、电感耦合等离子体质谱 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 分析 为了进一步分析 Mn-GLCDs 的表面元素组成, 采用 XPS 技术对 Mn-GLCDs 的表面元素组成进行了表征。结果如图 9 所示, XPS 全谱扫描在 284.6 eV (C 1s)、 399.6 eV (N 1s)、 531.6 eV (O

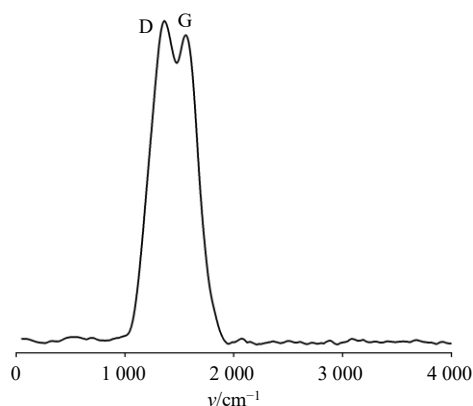


图 8 Mn-GLCDs 的拉曼光谱图
Fig. 8 Raman spectrum of Mn-GLCDs

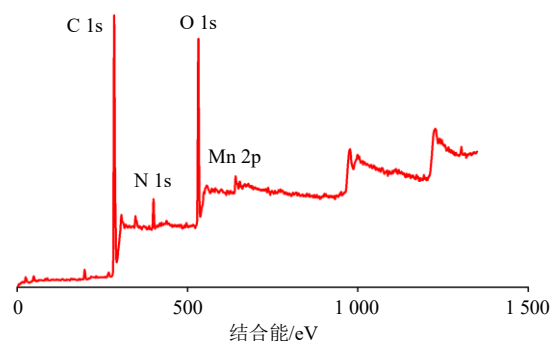


图 9 Mn-GLCDs 的 XPS
Fig. 9 XPS of Mn-GLCDs

1s) 和 641.3 eV (Mn 2p) 处出现特征峰, 表明 Mn-GLCDs 中含有 C、N、O 和 Mn 4 种元素。元素含量分析结果显示, C、N、O 的原子百分比分别为 74.09%、5.51% 和 20.40%, Mn 元素含量较低。为进一步确定 Mn^{2+} 的精确含量, 采用 ICP-MS 技术进行定量分析, 测得 Mn-GLCDs 中 Mn^{2+} 的质量分数为 0.83%。结合 XPS 中 Mn 2p 峰的存在及 ICP-MS 结果, 证实锰离子已成功掺杂至碳点结构中。已有研究表明, 碳点中的 N、O 官能团可与 Mn^{2+} 形成配位键^[19-20]。与无锰掺杂的 GLCDs 相比^[15], 若 Mn^{2+} 仅位于 Mn-GLCDs 表面, 则发射峰不应发生如此变化。因此 Mn^{2+} 以配位形式稳定存在于 Mn-GLCDs 骨架中, 而非简单物理吸附于表面。

2.2.8 荧光性能考察 以硫酸奎宁 ($5 \mu\text{g/mL}$) 为标准参比, 测定 Mn-GLCDs 的荧光量子产率。激发波长 $300\sim500 \text{ nm}$, 记录其发射光谱。结果如图 10 所示, Mn-GLCDs 的荧光量子产率为 20.51%。荧光光谱分析结果表明, Mn-GLCDs 表现出典型的激发波长依赖性特征。当激发波长从 300 nm 增加至 390 nm 时, 发射峰强度逐渐增强, 在 390 nm 处达到最大 (图 10-A); 当激发波长继续增加至 $400\sim490 \text{ nm}$ 时, 荧光强度逐渐减弱 (图 10-B)。上述结果表明, Mn-GLCDs 适合在近紫外至蓝光区域激发。

2.3 Mn-GLCDs 体外光热性能研究

2.3.1 光热升温曲线 为了考察 Mn-GLCDs 在近红外激光照射 (1.5 W/cm^2) 下的产热性能, 以 PBS 作为对照, 取相同体积与质量浓度 ($800 \mu\text{g/mL}$) 的 Mn-GLCDs 和 GLCDs 溶液, 分别置于 2 mL 离心管中, 每隔 60 s 使用热成像仪记录 1 次 Mn-GLCDs 和 GLCDs 的温度变化, 直至没有明显变化为止。结果如图 11、12 所示, 在近红外激光照射 10 min 后, Mn-GLCDs 温度比照射前增加了约 $21 \text{ }^\circ\text{C}$, 同等条

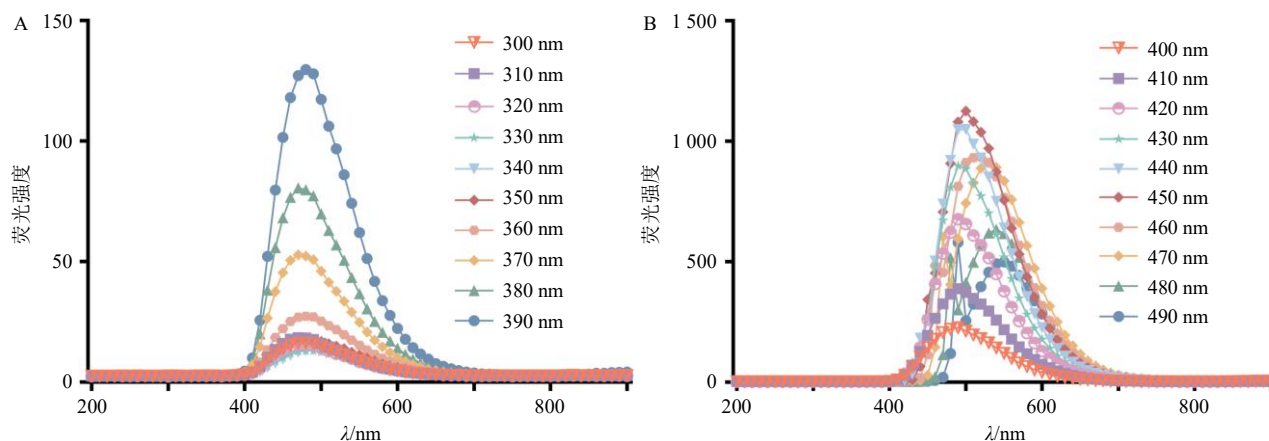


图 10 Mn-GLCDs 在激发波长 300~390 nm (A) 和 400~490 nm (B) 下的荧光发射光谱

Fig. 10 Fluorescence emission spectra of Mn-GLCDs at excitation wavelengths of 300—390 nm (A) and 400—490 nm (B)

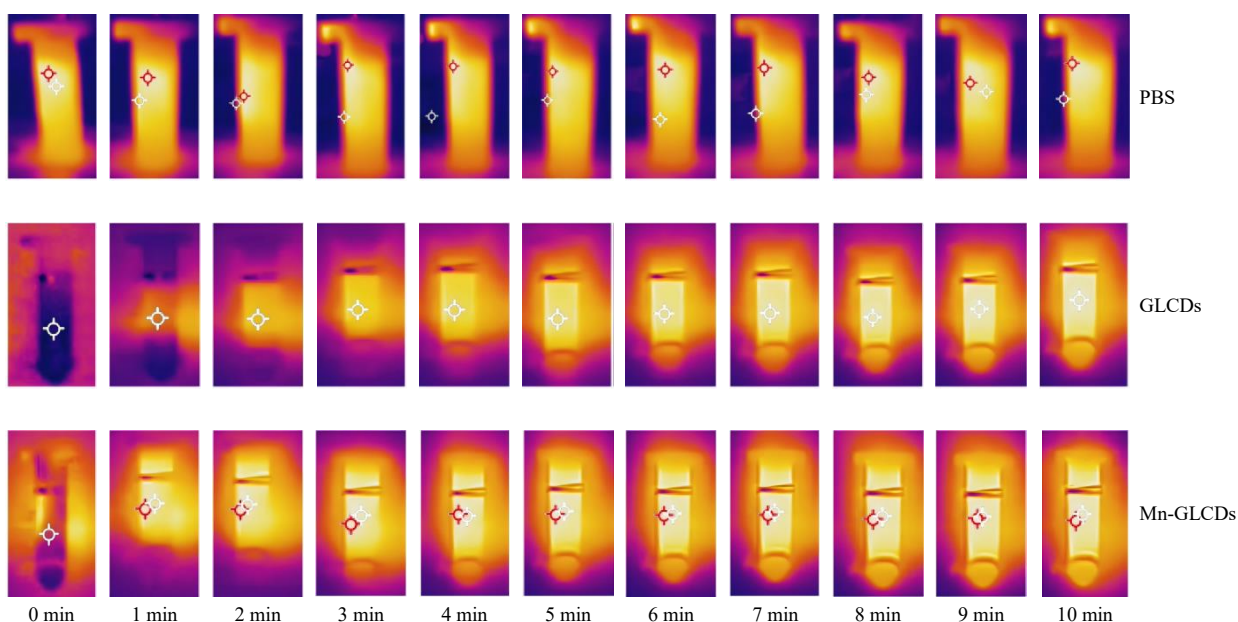


图 11 PBS、GLCDs 和 Mn-GLCDs 在 808 nm 激光照射下的热成像图

Fig. 11 Thermal images of PBS, GLCDs and Mn-GLCDs under 808 nm laser irradiation

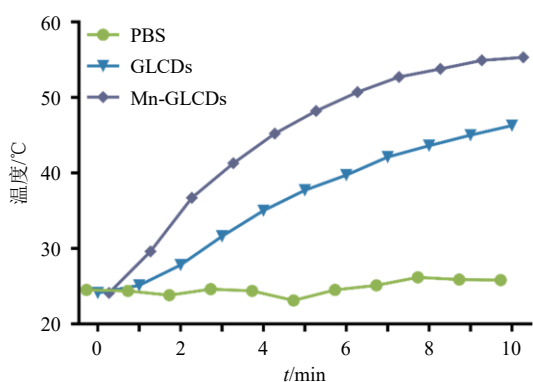


图 12 PBS、GLCDs 和 Mn-GLCDs 在 808 nm 激光照射下的温度变化曲线

Fig. 12 Temperature profiles of PBS, GLCDs and Mn-GLCDs under 808 nm laser irradiation

件下的 GLCDs 增加了约 12 °C，PBS 几乎无变化。结果表明，锰离子的掺杂能显著提升 GLCDs 的光热转换能力，Mn-GLCDs 在 6 min 内即可达到 50 °C 以上的光热杀菌有效温度。

2.3.2 η 计算 取 1 mL 800 $\mu\text{g/mL}$ 的 Mn-GLCDs 溶液置于石英比色皿中，使用 808 nm 激光器（功率密度 1.5 W/cm^2 ）垂直照射，每 60 秒用热成像仪记录 1 次溶液温度。达到样品最高平衡温度时，关闭激光，继续记录样品自然冷却至室温的温度变化，每 60 秒记录 1 次。以同体积 PBS 作为空白对照。

散热系数 (h_A) 通过降温阶段的温度衰减曲线计算。定义温度差 $\theta = T - T_{\text{amb}}$ ，其中， T 为实时温度， T_{amb} 为环境温度。对降温阶段 $\ln\theta$ 与时间 t 进行

线性拟合, 得到斜率 k , 则散热时间常数 (τ_s) = $-1/k$ 。根据牛顿冷却定律, $h_A = mC/\tau_s$, 其中, m 为溶液质量, C 为水的比热容 [$4.1868 \text{ J}/(\text{g}\cdot^\circ\text{C})$]。

Mn-GLCDs 在 808 nm 处的吸光度 (A_{808}) 使用紫外-可见分光光度计测定。PBS 在激光照射下的吸热贡献 (Q_{dis}) 按下式计算: $Q_{\text{dis}} = h_A \times (T_{\text{max,PBS}} - T_{\text{amb}})$, 其中, $T_{\text{max,PBS}}$ 为 PBS 在激光照射下的最高平衡温度。 η 按照公式 (1) 计算。

$$\eta = [h_A(T_{\text{max}} - T_{\text{amb}}) - Q_{\text{dis}}] / [I(1 - 10^{-A_{808}})] \quad (1)$$

T_{max} 为样品最高温度, I 为激光功率

降温阶段 $\ln\theta-t$ 线性拟合结果如图 13 所示, 得到 $Y = -0.0029X + 3.1073$, 其中斜率 $k = -0.0029 \text{ s}^{-1}$, 相关系数 $R^2 = 0.9969$, 表明数据符合指数衰减规律。计算得 $\tau_s = 344.8 \text{ s}$, $h_A = 12.18 \text{ mW}/^\circ\text{C}$ 。测得 Mn-GLCDs 在 808 nm 处的 $A_{808} = 2.475$ 。PBS 的 $Q_{\text{dis}} = 24.36 \text{ mW}$ 。代入公式 (1) 计算得 Mn-GLCDs 的 $\eta = 35.03\%$ 。

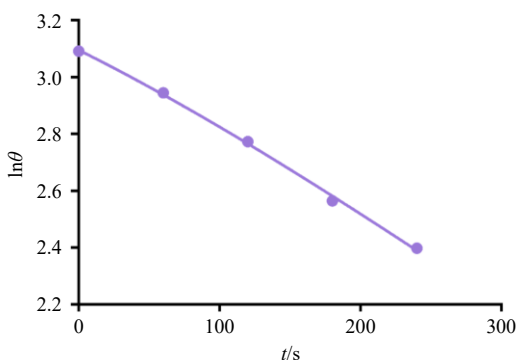


图 13 Mn-GLCDs 降温阶段 $\ln\theta-t$ 线性拟合曲线

Fig. 13 Linear fit of $\ln\theta-t$ curve during cooling phase of Mn-GLCDs

2.3.3 循环升温稳定性测试 取 $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Mn-GLCDs 溶液 1 mL , 使用 808 nm 激光器 (功率密度 $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$) 照射 10 min , 记录温度变化。关闭激光, 使样品自然冷却至室温。重复上述“加热-冷却”循环 6 次, 记录每次循环的最高温度, 以评价 Mn-GLCDs 的光热稳定性。结果如图 14 所示, 每次循环的最高温度分别为 50.2 、 50.7 、 50.9 、 52.7 、 53.1 、 $52.3 \text{ }^\circ\text{C}$, 波动范围小于 6% , 升温曲线基本重合。结果表明, Mn-GLCDs 在多次激光照射下仍能保持稳定的光热升温能力, 具有良好的光热稳定性和可重复使用性。

2.4 抗菌性能评价

2.4.1 菌悬液的制备 将金黄色葡萄球菌与大肠杆菌接种划线, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 18 h 后, 挑取单菌落至

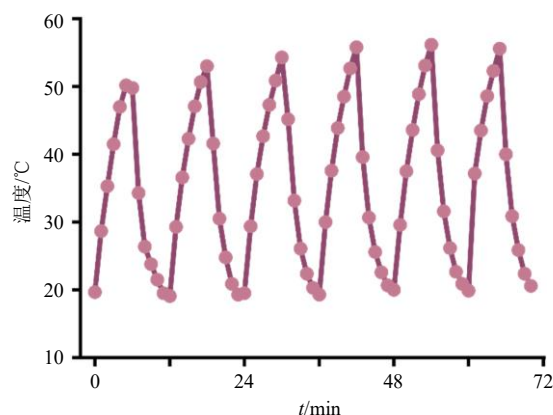
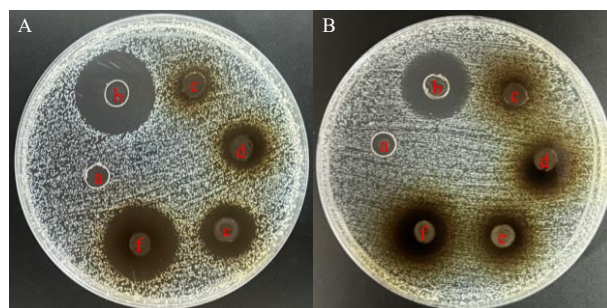


图 14 Mn-GLCDs 在 6 次加热-冷却循环中的温度变化曲线
Fig. 14 Temperature profile of Mn-GLCDs during six heating-cooling cycles

5 mL LB 液体培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $220 \text{ r}/\text{min}$ 振荡培养至对数生长期 ($A_{600} \approx 0.6$), 用 PBS 稀释至 $1 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}$ 。

2.4.2 抑菌圈的测定 采用牛津杯扩散法测定了 Mn-GLCDs 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用。用 L 型涂布棒, 将 $500 \mu\text{L}$ 的菌悬液 ($1 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}$), 均匀涂布到 LB 营养琼脂的固体平板上。生理盐水为空白对照组, 硫酸庆大霉素 ($25 \mu\text{g}/\text{mL}$) 为阳性对照组。实验组为 GLCDs、Mn-GLCDs, 808 nm 激光照射 10 min (功率密度为 $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ 或激光不照射)。将牛津杯 (内径 7 mm) 放置在 LB 固体培养板上进行打孔, 在每个孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 液体实验样品, 转移到设置条件为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 18 h , 观察并测量抑菌圈的直径。每种菌株做 3 组平行实验, 结果如图 15 和表 1 所示。在相同质



a-空白对照组; b-阳性对照组; c-GLCDs 组; d-GLCDs+NIR 组; e-Mn-GLCDs 组; f-Mn-GLCDs+NIR 组。
a-blank control group; b-positive control group; c-GLCDs group; d-GLCDs + NIR group; e-Mn-GLCDs group; f-Mn-GLCDs + NIR group.

图 15 Mn-GLCDs 对金黄色葡萄球菌 (A) 和大肠杆菌 (B) 的抑菌圈

Fig. 15 Antibacterial zones of Mn-GLCDs against *S. aureus* (A) and *E. coli* (B)

表 1 不同实验组对 2 种菌株的抑菌圈直径比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Comparison of diameters of inhibition zones produced by two strains in different experimental groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	抑菌圈直径/mm	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
空白对照	7.00±0.00***	7.00±0.00
阳性对照	23.00±0.17***	16.17±0.57***
GLCDs	8.33±0.33	8.06±0.71
GLCDs+NIR	11.89±0.35***	9.10±0.48
Mn-GLCDs	14.89±0.39***	9.56±0.48*
Mn-GLCDs+NIR	21.19±0.52***	12.69±0.45***

与 GLCDs 组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs GLCDs group.

量浓度下, GLCDs、Mn-GLCDs、GLCDs+NIR、Mn-GLCDs+NIR 对于金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 (8.33±0.33)、(14.89±0.39)、(11.89±0.35)、(21.19±0.52) mm, 对于大肠杆菌的抑菌圈直径分别为 (8.06±0.71)、(9.56±0.48)、(9.10±0.48)、(12.69±0.45) mm。

对于 2 种实验菌株, GLCDs 抑菌圈都较 Mn-GLCDs 小, 表明锰离子的掺杂有增强抑菌的作用。除此之外, GLCDs+NIR 和 Mn-GLCDs+NIR 的抑菌效果较 GLCDs 和 Mn-GLCDs 抑菌圈均明显增强, 进一步表明光热效应可增强抑菌作用。在 NIR 激发下, Mn-GLCDs+NIR 展现出最强的杀菌活性, 这揭示了光热协同效应的关键作用。相比之下, 未加光照的 GLCDs 仅表现出微弱的抑菌能力, 表明 GLCDs 自身固有的抑菌性较为有限。

2.4.3 细菌共培养实验 为考察 GLCDs、Mn-GLCDs 的抑菌效果, 取 15 mL 离心管分别加入 2 mL LB 肉汤培养基、100 μ L 菌以及 100 μ L GLCDs 或 Mn-GLCDs。以 808 nm 激光照射 10 min (功率密度为 1.5 W/cm² 或激光不照射)。以同药物体积的 PBS 作为对照。随后, 将样品放置于水浴摇床, 在 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下振荡培养 24 h, 将菌悬液稀释 1 000 倍后, 取稀释液均匀涂抹在琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h, 计数菌落数。按照公式 (2) 定量评价抗菌效率。

抗菌效率=(对照组细菌数量-实验组细菌数量)/对照组细菌数量 (2)

结果如图 16 所示。在没有 NIR 光照射的情况下, 对照组和 GLCDs 组都表现出最差的抗菌效果。

GLCDs 组对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌效率分别为 (19.03±3.74)%、(20.55±2.53)%。Mn-GLCDs 组的抗菌活性明显高于 GLCDs 组, 仅观察到少数分离菌落, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌效率分别为 (69.29±1.55)%、(87.17±0.19)%。在 NIR 光照射下, GLCDs 对金黄色葡萄球菌的定量抑菌效率为 (55.58±2.62)%, 对大肠杆菌的定量抑菌效率 (40.54±1.68)%。在 Mn-GLCDs+NIR 组中, 几乎没有观察到可见的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌落, 表明抗菌效率接近 100%。结果表明, 在 NIR 光照射下, Mn-GLCDs 的抗菌效率显著提高, 其与 NIR 激光介导下增强的光热效应协同抗菌作用是有效的。

2.4.4 生物膜抑制和破坏实验 将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌稀释为浓度为 1×10^7 CFU/mL, 之后将其接种于 24 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 形成成熟的生物膜。在生物膜抑制试验中, 向 24 孔板中加入 600 μ L 菌液, 之后分别加入 300 μ L 空白 LB 培养基 (对照)、GLCDs、Mn-GLCDs, 设置 808 nm 激光 (功率密度 1.5 W/cm² 或激光不照射) 孵育 10 min。每组 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C 共同培养 24 h。孵育后, 弃液, PBS 洗涤 3 次, 风干, 1% 结晶紫染色 30 min, PBS 洗涤 3 次, 风干, 拍照。然后加入 95% 乙醇溶解结晶紫, 用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度 (A) 值。生物膜抑制率 (biofilm inhibition rate, BIR) 按公式 (3) 计算。

BIR=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值

(3)

结果如图 17 和表 2 所示, 在生物膜形成抑制实验中, 对于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌, GLCDs、Mn-GLCDs 与 GLCDs+NIR、Mn-GLCDs+NIR 组均表现出对生物膜的抑制作用。其中, Mn-GLCDs+NIR 组抑制作用最佳, 对于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 BIR 分别为 (62.42±2.04)% 和 (49.59±0.26)%, 均显著高于其余 3 组。值得注意的是, Mn²⁺ 的掺杂大幅度提高了对金黄色葡萄球菌的抑制作用, 相较于 GLCDs 组 (5.53±2.13)% 的 BIR, Mn-GLCDs 的 BIR 提升到 (32.14±3.23)%。因此认为, Mn²⁺ 与光热的加入, 显著提升了 GLCDs 对细菌生物膜形成的抑制作用。

在生物膜破坏实验中, 将成熟的生物膜分别与空白 LB 培养基、GLCDs 和 Mn-GLCDs 溶液共孵育 48 h, 并设置 808 nm 激光 (功率密度 1.5 W/cm²)

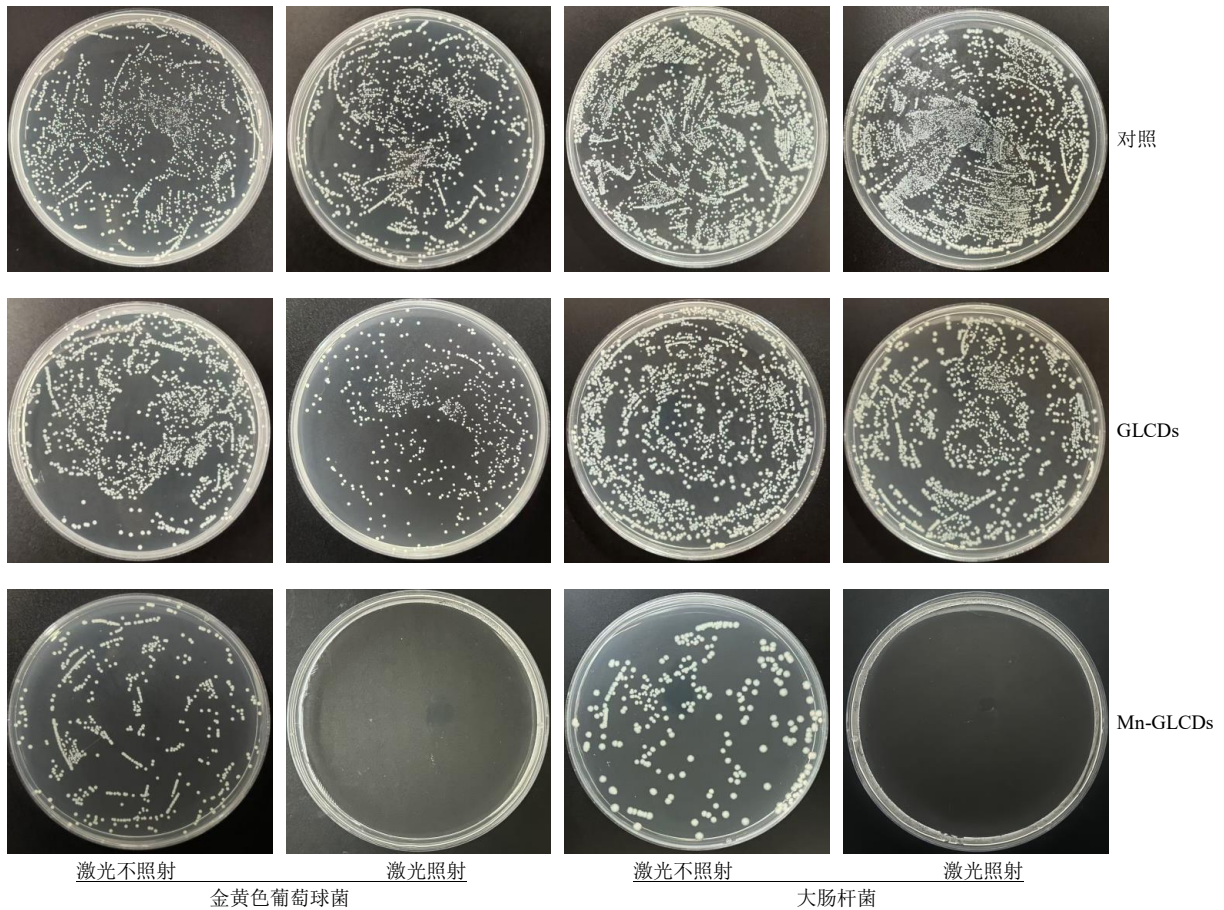


图 16 不同处理 18 h 后的细菌菌落图像

Fig. 16 Images of bacterial colonies 18 h after different treatments

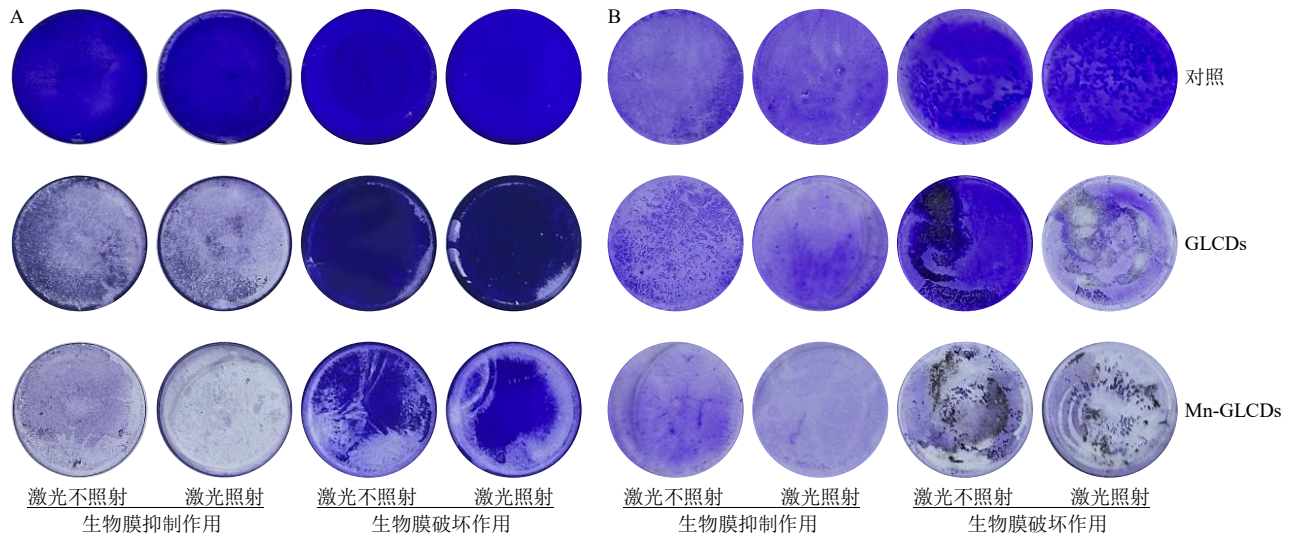


图 17 Mn-GLCDs 对金黄色葡萄球菌 (A) 和大肠杆菌 (B) 生物膜的抑制和破坏作用

Fig. 17 Inhibitory and destructive effects of Mn-GLCDs on biofilms of *S. aureus* (A) and *E. coli* (B)

孵育 10 min。孵育后, 弃液, PBS 洗涤 3 次, 风干, 1%结晶紫染色 30 min, PBS 洗涤 3 次, 风干, 拍照。然后加入 95%乙醇溶解结晶紫, 用酶标仪测定 570 nm 处的 A 值。生物膜破坏率 (biofilm destruction

rate, BDR) 按照公式 (4) 计算。

$$BDR = \frac{[\text{对照组(未经处理的成熟生物膜)} A \text{ 值} - \text{实验组 } A \text{ 值}]}{\text{对照组 } A \text{ 值}} \quad (4)$$

结果如图 17 和表 2 所示, 对于已形成的成熟

表2 Mn-GLCDs对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生物膜的抑制和破坏作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Inhibitory and destructive effects of Mn-GLCDs on biofilms of *S. aureus* and *E. coli* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	BIR/%		BDR/%	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
对照	0	0	0	0
GLCDs	5.53 ± 2.13	21.37 ± 0.21	2.94 ± 0.79	44.33 ± 0.08
GLCDs+NIR	6.55 ± 0.99	35.24 ± 1.52***	28.01 ± 0.41***	62.08 ± 0.33***
Mn-GLCDs	32.14 ± 3.23***	41.46 ± 0.56***	43.26 ± 0.44***	66.40 ± 1.47***
Mn-GLCDs+NIR	62.42 ± 2.04***###	49.59 ± 0.26***###	63.79 ± 0.06***###	76.26 ± 0.36***###

与 GLCDs 组比较: *** $P < 0.001$; 与 Mn-GLCDs 组比较: ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs GLCDs group; ### $P < 0.001$ vs Mn-GLCDs group.

生物膜, 阴性对照组无生物膜清除效果。未光照的 GLCDs 组对金黄色葡萄球菌成熟生物膜几乎无清除作用 [BDR 为 (2.94 ± 0.79) %], 对大肠杆菌的成熟生物膜具有中等清除能力, BDR 可达 (44.33 ± 0.08) %。对于金黄色葡萄球菌, 无光照组 BDR 由 GLCDs 组的 (2.94 ± 0.79) % 提高到 Mn-GLCDs 组的 (43.26 ± 0.44) %, 显著提高了 13.7 倍。光照组的 BDR 也由 GLCDs+NIR 的 (28.01 ± 0.41) % 提高到 Mn-GLCDs+NIR 组的 (63.79 ± 0.06) %, 提高了 1.28 倍。对于大肠杆菌的 BDR, Mn-GLCDs 组、GLCDs+NIR 组及 Mn-GLCDs+NIR 组分别为 (66.40 ± 1.47) %、(62.08 ± 0.33) % 和 (76.26 ± 0.36) %。在大肠杆菌生物膜的破坏能力方面, Mn-GLCDs 组与 GLCDs+NIR 组破膜能力几乎相当, 但 NIR 激光的加入, 也显著地提高了破膜能力。

2.4.5 细菌内活性氧水平检测 采用 DCFH-DA 荧光探针法检测 Mn-GLCDs 联合 NIR 光照射对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌内活性氧水平的影响。将过夜培养的细菌, 按照 1:100 转接至新鲜 LB 培养基, 37 °C、220 r/min 振荡培养至对数生长期 ($A_{600} \approx 0.5 \sim 0.6$)。收集菌液, 6000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用无菌 PBS 洗涤 2 次, 重悬于 PBS 中, 调整 $A_{600} = 0.2$ (约 1×10^8 CFU/mL)。取上述菌悬液分装至 1.5 mL 无菌离心管中, 每管 500 μ L, 分别加入等体积的 PBS (空白对照)、GLCDs 或 Mn-GLCDs, 同时设置阳性对照组 (终浓度 1 mmol/L H_2O_2)。各组于 37 °C 避光孵育 30 min 后, 808 nm 激光照射 10 min (功率密度为 1.5 W/cm² 或激光不照射)。照射结束后, 各管于 4 °C、6000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μ L 10 μ mol/L DCFH-DA 工作液, 重悬细菌, 37 °C 避光孵育 30 min。孵育后, 6000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 洗涤 2 次, 重悬于 200 μ L PBS 中。取 100 μ L 菌悬液转移至黑色 96

孔板中, 使用荧光酶标仪 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm) 测定各孔荧光强度。另取 5 μ L 菌悬液滴于载玻片, 加盖玻片封片, 于荧光显微镜下观察并拍摄图像。每组设置 3 个复孔, 实验独立重复 3 次。结果以相对荧光强度 (空白对照组归一化为 1.00) 表示。结果如表 3 所示, 对于金黄色葡萄球菌, GLCDs 组荧光强度为空白对照组的 (1.46 ± 0.10) 倍, 与空白对照组相比无明显差异。GLCDs+NIR 组的活性氧水平比空白对照组高 (2.51 ± 0.04) 倍, 显著高于 GLCDs 组 ($P < 0.05$), 表明 NIR 光照射可增强 GLCDs 的活性氧诱导能力。Mn-GLCDs 组 [(3.45 ± 0.13) 倍] 的活性氧水平显著高于 GLCDs 组 ($P < 0.001$), 表明锰离子的掺杂给予化学动力学活性。Mn-GLCDs+NIR 组为 (6.75 ± 0.41) 倍, 显著高于 GLCDs 组, Mn-GLCDs 组和 GLCDs+NIR 组 ($P < 0.001$), 与阳性对照组无显著差异。对于大肠杆菌, 结果趋势与金黄色葡萄球菌一致。GLCDs 组 [(1.32 ± 0.13) 倍] 与空白对照无显著差异。

表3 不同处理后细菌内活性氧水平的定量结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Microplate reader quantification of intracellular active oxygen levels in bacteria following different treatments ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
空白对照	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
阳性对照	7.47 ± 0.82***	6.47 ± 0.10***
GLCDs	1.46 ± 0.10	1.32 ± 0.13
GLCDs+NIR	2.51 ± 0.04*	1.59 ± 0.06
Mn-GLCDs	3.45 ± 0.13***	3.50 ± 0.07***
Mn-GLCDs+NIR	6.75 ± 0.41***###	5.44 ± 0.68***###

与 GLCDs 组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与 Mn-GLCDs 组比较: ### $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs GLCDs group; ### $P < 0.001$ vs Mn-GLCDs group.

GLCDs+NIR 组 [(1.59±0.06) 倍] 的活性氧水平略高于 GLCDs 组。Mn-GLCDs 组 [(3.50±0.07) 倍] 显著高于 GLCDs 组 ($P<0.001$)。Mn-GLCDs+NIR 组 [(5.44±0.68) 倍] 显著高于 Mn-GLCDs 组和 GLCDs+NIR 组 ($P<0.001$)。

荧光显微镜进一步观察不同处理后金黄色葡萄球菌和大肠杆菌内活性氧水平, 结果与酶标仪定量趋势一致。结果如图 18 所示, 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌阴性对照组几乎无可见绿色荧光; 阳性对照组均呈现强烈的均匀绿色荧光。图中 GLCDs 组

荧光微弱, 与阴性对照无明显差异; GLCDs+NIR 组可见弱至中等强度的绿色荧光。Mn-GLCDs 组在无光照条件下即显示中等强度绿色荧光, 较多细菌呈阳性染色。Mn-GLCDs+NIR 组荧光最为强烈, 活性氧大量爆发。上述结果表明, Mn-GLCDs 联合 NIR 光照射可高效诱导细菌内活性氧爆发, 这是其协同光热抗菌的关键机制。

2.5 Mn-GLCDs 的安全性评价

2.5.1 血液相容性评价 取 SD 雄性大鼠, 体质量 250~300 g, 以 2% 戊巴比妥钠麻醉后, 经腹主动脉

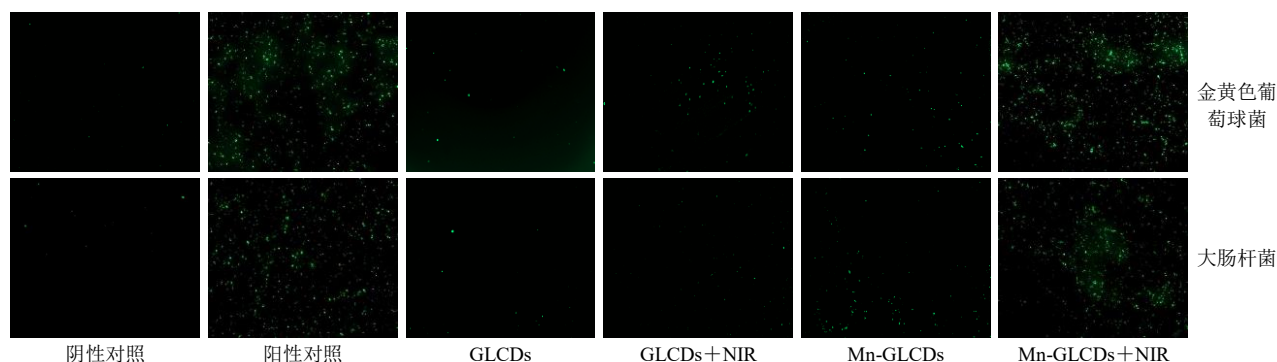


图 18 荧光显微镜观察不同处理后细菌内活性氧水平 (×40)

Fig. 18 Fluorescence microscopy observation of intracellular reactive oxygen species levels in bacteria after different treatments (×40)

采血, 以 3.8% 柠檬酸钠 (1:9) 抗凝。将抗凝全血以 3 000 r/min, 离心 10 min, 弃去血浆及白膜层, 沉淀的红细胞用生理盐水洗涤至上清液清澈透明。取洗涤后的压积红细胞, 用生理盐水稀释至 2% 红细胞悬液。精密称取 Mn-GLCDs, 用生理盐水稀释得到质量浓度为 2.000 0、1.000 0、0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 5、0 mg/mL 的系列溶液, 以 0 mg/mL 作为阴性对照孔, 纯水作为阳性对照孔。在装有 0.5 mL 红细胞悬液的 2 mL EP 管中, 分别加入 0.5 mL 不同质量浓度的 Mn-GLCDs 溶液得到样品, 将样品在 37 °C、100 r/min 的条件下振摇 30 min。4 °C、3 000 r/min, 离心 10 min, 收集每组样品上清液, 每组设置 3 个复孔。因溶液本身有颜色, 故测定不同质量浓度的 Mn-GLCDs+PBS 的 A 值, 以除去溶液本身颜色干扰。用酶标仪检测上清液在波长 540 nm 处的 A 值。溶血率按照公式 (5) 计算。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{样}} - A_{\text{背}} - A_{\text{阴}}) / (A_{\text{阳}} - A_{\text{阴}}) \quad (5)$$

$A_{\text{样}}$ 为实验组 A 值, $A_{\text{背}}$ 为实验组背景 A 值, $A_{\text{阴}}$ 为阴性组 A 值, $A_{\text{阳}}$ 为阳性组 A 值

结果如图 19 和表 4 所示, 阳性对照组 (纯水) 呈完全溶血 (溶血率 100% 左右), 阴性对照组 (生

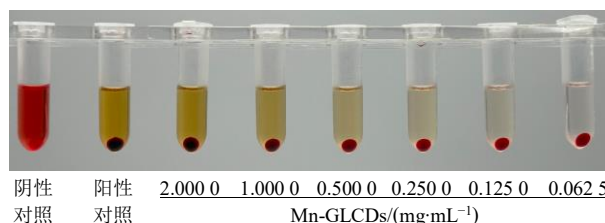


图 19 不同质量浓度 Mn-GLCDs 对红细胞的溶血图

Fig. 19 Haemolysis profile of erythrocytes exposed to Mn-GLCDs at different concentrations

表 4 不同质量浓度 Mn-GLCDs 对红细胞的溶血率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Haemolysis rates of erythrocytes at different mass concentrations of Mn-GLCDs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	溶血率/%
阴性对照	—	0.12±0.14
阳性对照	—	100.49±2.29
Mn-GLCDs	0.062 5	0.59±0.32
	0.125 0	1.54±0.43
	0.250 0	1.28±0.15
	0.500 0	0.72±0.81
	1.000 0	0.62±0.33
	2.000 0	0.02±0.21

理盐水)溶血率低于2%,符合实验要求。不同质量浓度 Mn-GLCDs (0.062 5~2.000 0 mg/mL) 处理红细胞后,溶血率均低于5%。结果表明,Mn-GLCDs 在实验质量浓度范围内无明显的溶血毒性,具有良好的血液相容性。

2.5.2 细胞安全性评价 采用 CCK-8 法评价 Mn-GLCDs 对小鼠成纤维细胞(L929)和小鼠巨噬细胞(RAW264.7)的细胞毒性。细胞培养于含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青霉素-链霉素的1640培养基(L929)或DMEM高糖培养基(RAW264.7)中,置于37℃、5%CO₂培养箱中常规传代。取对数生长期细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,以每孔1×10⁴个细胞(L929)或8×10³个细胞(RAW264.7)接种于96孔板,培养24h至细胞贴壁。弃去旧培养基,分别加入系列不同质量浓度(2.000 0、1.000 0、0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 5、0 mg/mL)的含Mn-GLCDs溶液的新鲜培养基,每个质量浓度设3个复孔。同时设置阴性对照组(未处理细胞,含等体积培养基)和阳性对照组(含10% DMSO的培养基)。加药后细胞培养24h,每孔加入10 μL CCK-8 溶液,37℃孵育1~2h,用酶标仪测定450 nm处A值,实验独立重复3次。按照公式(6)计算细胞存活率。结果如表5所示,不同质量浓度 Mn-GLCDs 处理 L929 和 RAW264.7 细胞 24 h 后, L929 细胞与 RAW264.7 巨噬细胞活力均高于80%。与阴性对照组相比,各质量浓度组均无显著差异。上述结果表明, Mn-GLCDs 在抑菌有效质量浓度下对成纤维细胞 L929 和巨噬细胞 RAW 264.7 均无明显细胞毒性,具有良好的生物安全性。

表5 不同质量浓度 Mn-GLCDs 对 L929 及 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of different mass concentrations of Mn-GLCDs on survival rate of L929 and RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%	
		L929细胞	RAW264.7细胞
阴性对照	-	100.00±3.01	100.00±3.28
阳性对照	-	8.09±0.49	9.72±1.05
Mn-GLCDs	0.062 5	105.39±6.44	102.05±1.08
	0.125 0	96.45±7.42	99.13±3.18
	0.250 0	115.15±11.83	97.72±6.00
	0.500 0	113.75±2.86	100.36±2.81
	1.000 0	85.92±0.98	101.57±6.20
	2.000 0	92.25±3.33	100.03±3.92

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{样}} - A_{\text{背}}) / (A_{\text{阴}} - A_{\text{背}}) \quad (6)$$

A_样为实验组A值, A_背为实验组背景A值, A_阴为阴性对照组A值

2.6 统计学分析

所有实验均独立重复3次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

3 讨论

细菌感染对人类健康威胁日益严峻,开发新型、安全、不易产生耐药性的抗菌材料已成为研究热点^[21]。碳点因生物相容性好、制备简便且抗菌机制以“物理破坏”为主,在应对耐药菌感染方面优势显著^[22]。以天然中药为碳源制备的中药碳点,不仅制备绿色环保,还能保留原药材部分活性成分,稳定性与生物相容性更优^[23]。金属离子掺杂是提升碳点抗菌性能的有效手段,其对革兰阳性、阴性菌均有毒性,且后者更为敏感^[24]。本研究采用水热法制备了白及、刺梨、灵芝、天麻4种中药碳点,并筛选出抑菌效果最优的GLCDs,最终制备Mn-GLCDs。

结果显示,经锰掺杂的灵芝碳点Mn-GLCDs呈类球形,分散性良好,粒径约为5 nm,尺寸较为均一。与GLCDs相比,Mn-GLCDs在紫外下213、340 nm处有2个特征吸收峰,发生了轻微红移,表明锰离子的掺杂改变了碳点原本的电子结构,同时氮元素富集及其共轭体系的扩大,也在一定程度上缩小了碳点的能带隙,使其对光的捕获能力得到增强^[25-26],进而光能向热能的转换效率得以显著提高。此外,红外、X射线衍射和拉曼光谱结果显示,掺杂后的红外C-N键相关吸收峰有所增强,衍射峰的位置和半高宽并未发生剧烈变化,但峰形却发生轻微宽化,而拉曼光谱D峰与G峰的强度比值(I_D/I_G)大于1,表明Mn²⁺可能与表面含氮基团发生了螯合作用,推测其可能以配位形式稳定存在于碳点表面,在一定程度上扰乱了碳层原有的短程有序结构,增加了无定形特性,并促进发生电子转移而且能有效抑制光生电子-空穴对的复合,延长光生载流子的寿命^[27-28]。结合已有文献,推测Mn²⁺并非简单的物理吸附或独立氧化物形式存在,而是通过配位作用占据了碳点中的氧空位,形成了类似于卟啉的M-N/C-O-M稳定结构^[29]。这种化学键的存在不仅保证了Mn²⁺的稳定的锚定,防止金属离子泄漏带来的潜在毒性,同时也为电子在Mn²⁺与碳骨架之间的

转移提供了更加便利通道^[30],使其具备高效催化活性氧生成,高效破坏细菌结构的潜力。

光热性能测试表明,在 808 nm 激光照射下(1.5 W/cm²),Mn-GLCDs 温度比照射前增加了约 21 °C,同等条件下的 GLCDs 增加了约 12 °C,PBS 溶液几乎无变化。根据 Roper 方法计算得到 Mn-GLCDs 的 $\eta=35.03\%$ 。这一结果归因于锰掺杂缩小了能带隙、增加了结构缺陷,从而增强了非辐射跃迁和光热转换能力。此外,6 次循环升温稳定性测试显示,最高温度波动小于 6%,表明 Mn-GLCDs 具有良好的光热稳定性和可重复使用性。

体外抗菌实验进一步验证了 Mn-GLCDs 的协同光热抗菌活性。经近红外激光照射后,相较于 GLCDs, Mn-GLCDs 的产热性能显著提升,可突破光热杀菌的有效阈值。其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达到(21.19±0.52) mm,抑菌活性显著强于 GLCDs 组,与对大肠杆菌的抑菌趋势基本一致,对 2 种细菌的抗菌效率均接近 100%。以上结果可归因于 Mn-GLCDs 在 NIR 激光介导下增强的光热效应,以及 Mn²⁺和 GLCDs 本身的协同抑菌作用。细菌生物膜清除和抑制实验结果也显示, Mn-GLCDs 在激光照射下可显著破坏金黄色葡萄球菌生物膜[抑制率达(62.42±2.04)%],明显高于未进行光照的 Mn-GLCDs 组[抑制率(32.14±3.23)%],并远超 GLCDs 组[抑制率(5.53±2.13)%]。表明锰离子的引入可极大提高 GLCDs 的生物膜穿透和破坏能力,这可能与 Mn²⁺与细菌膜表面负电荷基团的静电吸附作用有关^[31]。Mn²⁺的配位稳定化不仅保证了材料的安全性,还可能通过静电吸附作用增强对细菌细胞膜的靶向破坏能力,进而高效抑制生物膜的形成。

为阐明其抗菌机制,本研究采用 DCFH-DA 探针检测了细菌内活性氧水平。荧光酶标仪定量结果显示, Mn-GLCDs+NIR 组对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的活性氧水平分别升高至空白对照组的 6.75 倍和 5.44 倍,显著高于 Mn-GLCDs 组和 GLCDs+NIR 组,且与阳性对照组(H₂O₂)无显著差异。荧光显微镜观察进一步直观证实了活性氧的大量生成。上述结果表明, Mn-GLCDs 在 NIR 光照射下可通过光热效应促进电子转移,增强类芬顿反应活性,诱导细菌内活性氧爆发,导致氧化损伤和细胞膜破坏,从而实现高效杀菌。高 η (35.03%)和稳定的循环升温能力为持续高效的活性氧生成提供了能量保障。

安全性评价方面,溶血实验显示, Mn-GLCDs 在 0.062 5~2.000 0 mg/mL 溶血率均低于 5%。CCK-8 实验表明, Mn-GLCDs 在 0.062 5~2.000 0 mg/mL 质量浓度下对 L929 和 RAW264.7 细胞的存活率均高于 80%,无显著细胞毒性。因此, Mn-GLCDs 在有效抗菌质量浓度下具有良好的生物相容性。

综上,本研究首次构建了锰掺杂的中药灵芝碳点 Mn-GLCDs,经 Mn²⁺掺杂后的灵芝碳点 Mn-GLCDs 具有优异的分散性与细菌亲和力,其 η 、活性氧产率和抑菌活性得以显著提升,可在 NIR 光照射下实现物理光热杀伤与化学抑菌活性的协同增效。本研究通过将具有天然抗菌活性的中药有效成分进行纳米化与功能修饰,不仅有助于阐明中药碳点抗生物膜的物质基础与作用机制,更为研发安全、低耐药、多靶点的新型中药纳米抗菌剂提供新思路与新策略,有望为临床耐药菌及生物膜相关感染的防治提供绿色、高效的替代方案,具有重要的科学价值与临床转化前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Marzaman A N F, Roska T P, Sartini S, *et al.* Recent advances in pharmaceutical approaches of antimicrobial agents for selective delivery in various administration routes [J]. *Antibiotics*, 2023, 12(5): 822.
- [2] Gao B, Ye Q H, Ding Y, *et al.* Metal-based nanomaterials with enzyme-like characteristics for bacterial rapid detection and control [J]. *Coord Chem Rev*, 2024, 510: 215799.
- [3] 滕家皇, 邹帅, 彭茂琿, 等. 碳量子点的润滑机制及其作为润滑添加剂的研究进展 [J]. *润滑与密封*, 2024, 49(7): 168-180.
- [4] Gao P L, Xie Z G, Zheng M. Small nanoparticles bring big prospect: The synthesis, modification, photoluminescence and sensing applications of carbon dots [J]. *Chin Chem Lett*, 2022, 33(4): 1659-1672.
- [5] Zhang J W, Zou L J, Li Q L, *et al.* Carbon dots derived from traditional Chinese medicines with bioactivities: A rising star in clinical treatment [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2023, 6(10): 3984-4001.
- [6] Bian Z R, Bao T Z, Sun X Q, *et al.* Machine learning tools to assist the synthesis of antibacterial carbon dots [J]. *Int J Nanomed*, 2024, 19: 5213-5226.
- [7] Vadakkan K, Ghodake G S, Gunasekaran S, *et al.* Carbon dots as nano-pioneers: A critical review on advances in fabrication and antibacterial mechanism [J]. *Inorg Chem*

- Commun*, 2025, 179: 114883.
- [8] Nie R H, Zhang J H, Jia Q Y, *et al.* Structurally oriented carbon dots as ROS nanomodulators for dynamic chronic inflammation and infection elimination [J]. *ACS Nano*, 2024, 18(33): 22055-22070.
- [9] Li X C, Fu Y Z, Zhao S J, *et al.* Metal ions-doped carbon dots: Synthesis, properties, and applications [J]. *Chem Eng J*, 2022, 430: 133101.
- [10] Ding Y, Yang X C, Yu Y Y, *et al.* Construction of Mn-N-C nanoparticles with multienzyme-like properties and photothermal performance for the effective treatment of bacterial infections [J]. *Biomater Sci*, 2024, 12(2): 425-439.
- [11] Jiang X Y, Zeng F W, Li Y, *et al.* Ultrafine-Mn-loaded N, O-doped nanocarbon via Mott-Schottky effect for photo-enhanced antibacterial therapy and wound healing [J]. *Aggregate*, 2025, 6(5): e70002.
- [12] Liu B, Xu F J, Zhang C, *et al.* Endogenous stimuli-activatable photothermal therapy for bacterial infections [J]. *Acta Biomater*, 2025, 204: 109-128.
- [13] Wang X J, He L B, Cai Q Y, *et al.* Photothermal therapy for bacteria-infected wound healing via a cation-anion inverted antiperovskite with full-spectrum solar absorption [J]. *Chem Sci*, 2025, 16(34): 15638-15651.
- [14] 冉靖, 姚遵宝, 徐慧, 等. 灵芝化学成分、药理作用及质量标志物预测分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(5): 172-182.
- [15] 余欢, 罗坤顺, 朱月, 等. 中药灵芝碳点的制备及其对胰腺癌细胞的体外光动力/光热治疗研究 [J]. *药学报*, 2025, 60(11): 3518-3526.
- [16] 丁倩倩, 杨欣茹, 昌盛, 等. 碳点的制备及在医药学领域的应用 [J]. *吉林医药学院学报*, 2022, 43(5): 378-381.
- [17] 郭颖, 黎莹莹, 张伟, 等. 天麻碳量子点的制备及其在铜(II)检测中的应用 [J]. *咸阳师范学院学报*, 2022, 37(4): 20-24.
- [18] 张任春, 付予锦, 王苑, 等. 一种植物源环保荧光碳量子点、其制备方法及应用: 中国, CN108084999A [P]. 2018-05-29.
- [19] Huang M X, Ding R M, Yang J, *et al.* Formation of nitrogen-coordinated metal sites (M = Fe, Co) via solution-phase coordination on nickel- and nitrogen-co-doped carbon templates with metal vacancy- N_x sites [J]. *J Electrochem Soc*, 2022, 169(10): 106507.
- [20] Tuo J Q, Zhu Y H, Jiang H L, *et al.* The effect of the coordination environment of atomically dispersed Fe and N Co-doped carbon nanosheets on CO₂ electroreduction [J]. *Chem Electro Chem*, 2020, 7(23): 4767-4772.
- [21] Wang B, Wang H M, Wang Z, *et al.* Preparation of AgBrNPs@copolymer-decorated chitosan with synergistic antibacterial activity [J]. *Mater Today Commun*, 2023, 37: 107482.
- [22] Wang S S, Wang D P, Wang G L, *et al.* Antibacterial carbon dots [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 30: 101383.
- [23] Zhou X H, Zhou J X, Ren J L, *et al.* Progress in the study of extraction methods and pharmacological effects of traditional Chinese medicine-derived carbon dots [J]. *Molecules*, 2025, 30(19): 4015.
- [24] Jeong H, Jo S, Yang S, *et al.* Determination of the antibacterial activity of various metal-doped carbon quantum dots [J]. *Carbon Lett*, 2024, 34(8): 2183-2193.
- [25] 葛敏. 基于糠醛碳点的光功能复合材料制备与性能研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2024.
- [26] 刘乐乐. 铜掺杂氧化石墨烯量子点的合成、性质调控及其光动力抗菌应用研究 [D]. 合肥: 安徽大学, 2024.
- [27] Singh R D, Kumbhakar P, Pal S, *et al.* Investigating morphology-dependent antibacterial property of ZnO nanoparticles and developing an insight into oxidative stress generation and cellular response [J]. *Biologia*, 2021, 76(4): 1339-1348.
- [28] Luo T, Hou X H, Liang Q, *et al.* The influence of manganese ions doping on nanosheet assembly NiFe₂O₄ for the removal of Congo red [J]. *J Alloys Compd*, 2018, 763: 771-780.
- [29] Voloskiy B, Fei H L, Zhao Z P, *et al.* Tuning the catalytic activity of a metal-organic framework derived copper and nitrogen Co-doped carbon composite for oxygen reduction reaction [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(40): 26769-26774.
- [30] Zhan C Y, Zhu H M, Liang S S, *et al.* Mn²⁺-Mn²⁺ dimers induced robust light absorption in heavy Mn²⁺ doped ZnAl₂O₄ near-infrared phosphor with an excellent photoluminescence quantum yield and thermal stability [J]. *Adv Opt Mater*, 2024, 12(21): 2400574.
- [31] Chen Y Y, Tang F Q, Zhang F, *et al.* Fabrication of 3D flower-shaped MgAl-LDHs with inducing CuMOF for improving its adsorption and antibacterial performance [J]. *J Mol Struct*, 2025, 1322: 140583.

[责任编辑 郑礼胜]