

消杀型纳米催化剂抗病毒作用的研究

桂芳^{1,2}, 张卓然^{1**}, 郑丛龙¹, 周大勇¹, 李岩¹, 杨淑凤¹, 许国旺³,
明平文³, 刘中和³, 杨凌³

(1. 大连医科大学微生物学教研室, 辽宁大连 116027; 2. 湖南省怀化医学高等专科学校, 湖南怀化 418000; 3. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁大连 116023)

Study of Nanometer Catalyst on Antiviral Action

GUI Fang^{1,2}, ZHANG Zhuo-ran^{1**}, ZHEN Cong-long¹, ZHOU Da-yong¹,
LI Yan¹, YANG Shu-feng¹, XU Guo-wang³, MING Ping-wen³, LIU Zhong-he³, YANG Ling³
(1. Department of Microbiology of Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Hunan Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China; 3. Dalian Chemistry and Physical Institute of Chinese Science Academy, Dalian 116023, China)

Abstract : In order to investigate the antiviral activity of 112 kinds of nanomaterials and give theoretical gist for developing new antiviral nanomaterials, we used various nanometer catalysts inhibitory to Parainfluenza virus, Herpes simplex virus types 1, Adenoviruses types 1 and 5 in given time and examined their sorption and virucidal activity through the haemagglutination test and CPE reduction respectively. We also observed their sorption and virucidal activity to viruses under the electron microscope. We found that in the 112 nanometer catalysts tested, the strong, moderate and weak sorption nanometer catalysts were 29, 36 and 47 respectively by the haemagglutination test. Among them there were 13 sorts of strong sorption nanometer catalysts whose sorption rate were between 87.5% to 93.75% on parainfluenza virus, and the best was AB-24.

Key words : Nanometer catalyst; Virus; Sorption; Virucidal

摘要: 本文探讨 112 种消杀型纳米催化剂吸附与灭活病毒的功效, 为开发新型抗病毒纳米材料提供理论依据。我们将各种纳米催化剂与副流感病毒、人疱疹病毒 1 型、腺病毒 1 型及 5 型作用一定时间后, 分别以血凝试验及观察 CPE 变化的方法判断纳米材料对各种病毒的吸附与灭活作用, 并在电子显微镜下观察纳米材料对病毒的吸附情况。结果在所检测的 112 种纳米催化剂中, 用血凝试验分别筛选出强吸附力催化剂 29 种、中吸附力催化剂 36 种、弱吸附力催化剂 47 种。其中, 13 种强吸附力催化剂对副流感病毒的吸附率在 87.5% ~ 93.75% 之间, 并以 AB-24 的抗病毒效果最好。

关键词: 纳米催化剂; 病毒; 吸附; 灭活

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)01-0070-05

自从 1984 年德国物理学家 Gleiter 成功研制纳米金属材料以后, 人们发现纳米材料具有许多鲜为人知的奇异特性, 纳米材料学随后成为物理学与材料学领域的一个研究热点。由于纳米材料具有许多优异的性能, 因此在科学研究中的应用十分广泛。其中有利用纳米载银等抗菌材料制成的水性建筑涂料和溶剂型透明涂料, 将之涂刷或喷涂在墙体或家具等物体表面, 能起到快速消毒、杀菌的作用, 并保

持长时间的抗菌效果^[1]。此外还有运用纳米技术为基础研制而成的纳米消毒剂、抗菌陶瓷、玻璃、地板等多种类型的纳米抗菌材料, 抗菌能力强、杀菌范围广, 甚至具有分解毒素的作用, 而且安全稳定, 显示出纳米抗菌材料良好的开发和应用前景。

目前关于纳米材料抗病毒方面的研究较少, 而且主要集中于对有包膜病毒的检测, 本实验以中国科学院大连化学物理研究所研制的 112 种消杀型纳

收稿日期: 2004-06-14, 修回日期: 2004-10-27

作者简介: 桂芳 (1971-), 女, 江西鹰潭籍, 讲师, 硕士, 主要从事微生物学基础研究。

** 通讯作者。 Corresponding author. Tel: 0411-84720049, E-mail: zsr1941577@sohu.com

米催化剂为研究对象,探讨其抗多种病毒的功效和机理,为开发新型抗病毒纳米材料提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

纳米催化剂 112 种:ASC 系列 01-60(金属"钛、锌"等氧化物)、AB 系列 01-35(纳米银等加分子筛)、DSA 系列 01-10(活性炭类纳米催化剂)、其他系列 HR1~3,HR-AL,HR-Y,HR-MW,HR-Z,AR7,QA1~7,MA2~5,LP-1,LM-22,L Ti,RA-1,K2-J09-1A,K209-1(贵金属"金、银、铂"等加氧化物)。对样品:活性炭与玻璃粉。以上均由中国科学院大连化学物理研究所研制并提供。

副流感病毒(Parainfluenza Virus, PIV, 血凝效价为 1 640~1 1280)、人疱疹病毒型(Herpes Simplex Virus type 1, HSV 1)、腺病毒 1 型及 5 型(Adenovirus type 1 and 5)(均为本室保存毒种);9~11 日龄鸡胚;Hela 细胞(为本室保存并传代培养);RPMI1640 培养液;0.5% 鸡红细胞悬液;透射电子显微镜(型号 JEM-2000EX);倒置显微镜等。

1.2 纳米催化剂吸附 PIV 效果的筛选试验

{WT 分别取 0.2g 催化剂与 0.3mL PIV 互相作用 30min,加入 1mL 生理盐水,离心取洗脱液用血凝试验检测 PIV 病毒活性,并计算病毒吸附率。

1.3 纳米催化剂对 PIV 的吸附灭活

经筛选试验选择出强吸附力纳米催化剂进行下列试验:

将副流感病毒接种 9~11 日龄鸡胚,37 培养 3d,收获尿囊液,并检测血凝效价。取血凝效价为 1 640~1 2560 的副流感病毒 0.3mL 分别与各种灭菌后的纳米材料 0.2g 在无菌试管中充分作用 30min,并设病毒对照。加 1mL 无菌生理盐水,1500r/min 离心 10min,取上清液(即洗脱 1 液)进行血凝试验,同时取洗脱 1 液接种 9-11 日龄鸡胚两只。分别 2 次用 1mL 无菌盐水洗脱已吸附病毒的催化剂,1500r/min 离心 10min,取上清分别为洗脱 2 液和 3 液,用血凝试验检测洗脱 2 液和洗脱 3 液中的病毒活性,同时将洗脱 3 液接种鸡胚 2 只,3 天后收获鸡胚尿囊液进行血凝试验。计算病毒吸附率与灭活率。

1.4 纳米催化剂对腺病毒及人疱疹病毒的吸附灭活

从强吸附力纳米催化剂中选择部分催化剂进行下列试验:

病毒致 50% 组织培养感染量(TCID₅₀)的测定

按文献进行^[2]。称取各种纳米材料粉末 0.2g 装于小试管中,121 高压蒸汽灭菌 10min,烤干备用。取 100TCID₅₀ 的病毒液 0.3mL 分别与各种无菌纳米材料充分混匀,在室温下作用 30min,同时设病毒对照、玻璃粉对照、活性炭对照。用 0.3mL 无菌 PBS 洗下未吸附的病毒,以 1500r/min 离心 5min,分别取上清液 0.1mL 接种至 Hela 细胞 24 孔板,37 下吸附 1h,用 PBS 洗涤各孔,然后每孔加入维持液 1mL。逐日观察 CPE,当细胞对照孔无 CPE 而病毒对照出现“+”CPE 时作为试验终点,以 CPE 出现“+”数的变化表示抑制活性,计算病毒抑制率。

1.5 形态学检测

包括光学显微镜观察 CPE 及电子显微镜观察纳米催化剂对病毒的吸附。电镜材料的制备方法:取 0.3mL 100TCID₅₀ 的疱疹病毒液与 0.2g 无菌纳米催化剂 AB-24 作用 30min,然后加入 2.5% 戊二醛固定,按透射电子显微镜的样品制备程序进行处理,制成超薄切片,同时设病毒对照。

1.6 纳米材料对 Hela 细胞的细胞毒作用检测

分别取 0.2g 待检材料装于小试管中高压灭菌,加入无菌 PBS 0.6mL 充分混匀,室温下作用 30min,1500r/min 离心 5min,分别取上清液 0.1mL 接种至 Hela 细胞 24 孔板,37 下吸附 30min,然后每孔加入维持液 1mL,同时设未加纳米材料的阴性对照。逐日在显微镜下观察细胞的生长情况。

2 结果

2.1 112 种纳米催化剂的筛选结果

根据血凝试验的筛选将纳米催化剂对 PIV 的吸附力分为三级:

强吸附力催化剂(HA 效价 1:20,相当于吸附率为 93.75%),共 29 种,包括:ASC-1,2,3,4,24,28,59,DSA-1~DSA-10,RA-1,AB-2-1,5,8,17,18,22,24,26,35,RA-1,MA-5。

中吸附力催化剂(HA 效价 1:20~1:160,相当于吸附率为 93.75%~75%),共 36 种,包括:ASC-5,11,17,27,29,31,32,36,38,39,40,43,44,50,51,52,57,58,AB-1,1-1,2,3,4,5-2,8,12,QA-1,2,5,MA-2,3,K2-J09-1A,KZ09-1,HR-3,HR-AL,L Ti。

弱吸附力催化剂(HA 效价 1:320~1:1280,相当于吸附率为 50%~0),共 47 种,包括:ASC-6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,19,20,21,22,23,25,26,30,33,34,35,37,41,42,45,46,47,48,49,53,54,

55,56,60,AB-7-2,HR-Z,HR-Y,HR-MW,HR-2,LP-1,QA-3,4,6,7,MA-4,LM-22,AR-7。

2.2 纳米催化剂对副流感病毒的吸附及灭活效果

通过进一步的强吸附力纳米催化剂吸附与灭活 PIV 试验,发现有 13 种纳米催化剂对 PIV 的吸附率在 87.5%~93.75%之间,灭活率均为 99.61%,它们是:ASC-1、ASC-2、ASC-4、ASC-28、DSA-6、DSA-7、DSA-8、DSA-10、AB-2、AB-7、AB-17、AB-24、AB-26(见表 1)。

表 1 强吸附力纳米催化剂对 PIV 的吸附率与灭活率

Table 1 The sorption rate and virucidal rate of strong sorption nanometer catalysts against parainfluenza virus

Nanometer catalysts	Sorption rate (%)			Virucidal rate (%)	
	wash water 1	wash water 2	wash water 3	wash water 1	wash water 3
ASC-1	87.50	93.75	93.75	99.61	99.61
ASC-2	87.50	93.75	93.75	99.61	99.61
ASC-4	87.50	93.75	93.75	99.61	99.61
ASC-28	93.75	93.75	93.75	99.61	99.61
DSA-6	93.75	93.75	93.75	99.61	99.61
DSA-7	87.50	93.75	93.75	99.61	99.61
DSA-8	87.50	87.50	87.50	99.61	99.61
DSA-10	87.50	93.75	93.75	99.61	99.61
AB-2	87.50	93.75	93.75	99.61	99.61
AB-7	93.75	93.75	93.75	99.61	99.61
AB-17	93.75	93.75	93.75	99.61	99.61
AB-24	93.75	93.75	93.75	99.61	99.61
AB-26	93.75	93.75	93.75	99.61	99.61

Nanometer catalysts: ASC-1, 2, 4, 28 are oxide of titanium, zinc and so on. AB-2, 7, 17, 24, 26 are nanometer silver and molecule sieve. DSA-6, 7, 8, 10 are nanometer catalysts of active carbon.

2.3 纳米催化剂对腺病毒 1 型的抑制试验

表 2 结果显示 AB-24 和 DSA-6 二种纳米催化剂的病毒抑制率最高,均为 83.33%,与活性碳对照组相比有非常显著性差异($P < 0.01$)。但 DSA-8 的抑制率较低,仅为 33.33%,与活性碳对照组无显著性差异($P > 0.05$)。另外,AB-2 及 ASC-28 二个样本的 CPE 出现时间均早于病毒对照,故认为这种细胞病变是样品对细胞的直接毒性作用,对另二种病毒的检测也出现类似情况。

2.4 纳米催化剂对腺病毒 5 型的抑制试验

表 3 结果显示 AB-24 的病毒抑制率最高,达 83.33%,与活性碳对照组相比有非常显著性差异($P < 0.01$)。其次是 DSA-6,病毒抑制率为 62.5%,比活性碳稍高,但二者无显著性差异($P > 0.05$)。DSA-8 的病毒抑制率最低,仅为 33.33%,与活性碳对照组无显著性差异($P > 0.05$)。

2.5 纳米催化剂对人疱疹病毒 型的抑制试验

结果显示 AB-24 的病毒抑制率最高,达 91.67%,

表 2 纳米催化剂对腺病毒 1 型的 CPE 抑制情况

Table 2 The CPE condition of nanometer catalysts inhibition to adenovirus type 1

AB	DSA	DSA	AB	ASC	Frosting	Active carbon	Virus control	Cell control
-24	-6	-8	-2	-28				
+	+	2+	4+	4+	4+	2+	4+	-
+	-	3+	4+	4+	4+	3+	4+	-
+	+	3+	4+	4+	4+	2+	4+	-
-	+	2+	4+	4+	4+	3+	4+	-
-	-	3+	4+	4+	4+	2+	4+	-
+	+	3+	4+	4+	4+	2+	4+	-
Inhibitory rate (%)								
83.33*	83.33*	33.33	-	-	0	41.67	-	-

*:Compared with active carbon control ($P < 0.01$). Nanometer catalysts: ASC-28 is oxide of titanium. AB-2 and AB-24 are nanometer silver and molecule sieve. DSA-6 and DSA-8 are nanometer catalysts of active carbon. Cytopathic effects(CPE) appeared after inoculated 10~24 hours, at the same time the virus control was no CPE. It was considered that the result was the direct toxicity of sample to cells. The next tables were the same as it, so the two samples were omitted. The classification of CPE: " - " There are no CPE cells. " + " The proportion of CPE cells are 5%~25%. " 2+ " The proportion of CPE cells are 26%~50%. " 3+ " The proportion of CPE cells are 51%~75%. " 4+ " The proportion of CPE cells are 76%~100%.

表 3 纳米催化剂对腺病毒 5 型的 CPE 抑制情况

Table 3 The CPE condition of nanometer catalysts inhibition to adenovirus type 5

AB	DSA	DSA	Frosting	Active carbon	Virus control	Cell control
-24	-6	-8				
+	2+	2+	4+	3+	4+	-
-	2+	3+	4+	3+	4+	-
+	+	3+	4+	2+	4+	-
+	+	2+	4+	+	4+	-
+	+	3+	4+	2+	4+	-
-	2+	3+	4+	2+	4+	-
Inhibitory rate (%)						
83.33*	62.50	33.33	0	45.83	-	-

*:Compared with active carbon control ($P < 0.01$). Nanometer catalysts: AB-24 is nanometer silver. DSA-6 and DSA-8 are nanometer catalysts of active carbon. The classification of CPE is the same as table 2.

与活性碳对照有非常显著性差异($P < 0.01$)。其次是 DSA-6,病毒抑制率为 50%,稍高于活性碳,但二者无显著性差异($P > 0.05$)。DSA-8 的病毒抑制率最低,仅为 16.67%,与活性碳组无显著性差异($P > 0.05$) (见表 4)。

2.6 形态学观察结果

将腺病毒与纳米催化剂 AB-24 作用后接种至 HeLa 细胞,4 天后大部分($> 75%$) HeLa 细胞仍保持正常形态;当人疱疹病毒 型与纳米催化剂 AB-24 作用后接种至 HeLa 细胞,3 天后绝大部分($> 90%$) HeLa 细胞仍保持正常形态。

在电镜下可见病毒颗粒约 180~200nm 大小,HeLa 细胞核浓缩,核浆分离(图 1A)。图 1B 中见 AB-24 是由大量直径约 500nm 的微粒组成,将疱疹

病毒与 AB-24 作用后,可见有吸附病毒的颗粒(a)及未吸附病毒的颗粒(b)。

表4 纳米催化剂对人疱疹病毒型的 CPE 抑制情况

Table 4 The CPE condition of nanometer catalysts inhibition to herpes simplex virus

AB-24	DSA-6	DSA-8	Frosting	Active carbon	Virus control	Cell control
-	2+	3+	4+	2+	4+	-
+	2+	4+	4+	3+	4+	-
-	2+	3+	4+	3+	4+	-
-	2+	3+	4+	2+	4+	-
+	2+	4+	4+	3+	4+	-
-	2+	3+	4+	3+	4+	-
Inhibitory rate (%)						
91.67*	50.00	16.67	0	33.33	-	-

*: Compared with active carbon control ($P < 0.01$). Nanometer catalysts: AB-24 is nanometer silver. DSA-6 and DSA-8 are nanometer catalysts of active carbon. The classification of CPE is the same as table 2.

2.7 纳米材料的细胞毒性作用观察

经检测,ASC 及 AB-2 对细胞有较强的毒性作用,接种后 10~24h 即出现明显的细胞病变,表现为细胞颗粒增多,边界模糊,细胞膜溶解并破裂,此现象出现于病毒致细胞病变之前。

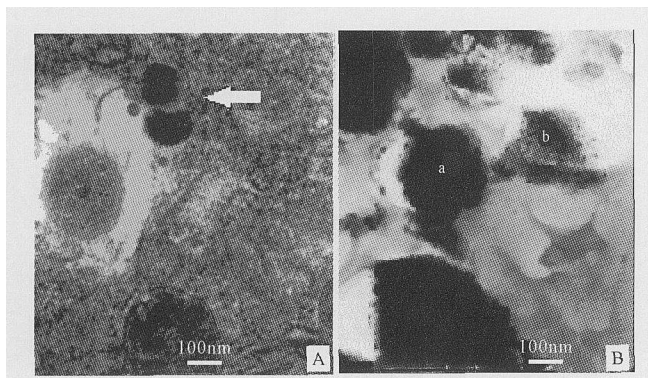


图1 AB-24 与疱疹病毒作用后的形态

Fig. 1 AB-24 inhibitory to herpes simplex virus in the electron microscope.

A, Herpes simplex virus control Arrow shows HSV; B: a indicates the nanometer particle with viruses, b indicates the nanometer particle with no virus.

3 讨论

目前关于纳米抗菌材料对病毒的吸附灭活作用研究较少,多数研究认为纳米材料主要有胞膜病毒的作用效果较好,如疱疹病毒、流感病毒、埃博拉病毒等^[3-6],有些抗病毒纳米乳剂甚至在体内实验中也具有良好的抑病毒作用,而且对皮肤粘膜无毒副反应^[7]。本试验以三种常见的病毒作为观察对象,发现某些纳米材料具有抗多种病毒的作用,包括有胞膜病毒(副流感病毒、人疱疹病毒型)和无胞膜病毒(腺病毒 1 型及 5 型)。在所检测的 112 种纳

米催化剂中,经血凝试验筛选出 29 种对副流感病毒具有强吸附力的纳米催化剂,其中 13 种强吸附率催化剂对副流感病毒的吸附率在 87.5%~93.75%之间;再通过对腺病毒和人疱疹病毒型的吸附灭活试验,发现 AB-24 对病毒的吸附与灭活能力最强,对副流感病毒的平均吸附率为 93.75%,灭活率为 99.61%,对腺病毒 1 型、5 型以及人疱疹病毒型的 CPE 抑制率分别为 83.33%、83.33%、91.67%。其次是 DSA-6,对副流感病毒的平均吸附率为 93.75%,灭活率为 99.61%,对腺病毒 1 型、5 型及人疱疹病毒型的 CPE 抑制率分别为 83.33%、62.50%、50.00%,并且对细胞无毒性作用,是值得开发应用的二种纳米抗病毒材料。

此外,从试验结果还可以看出,不同种类的纳米催化剂对三种病毒的抑制率差别较大,例如,AB-24 对人疱疹病毒型的抑制率为 91.67%,而 DSA-8 仅为 16.67%;同时,同一种纳米催化剂对不同病毒的抑制效应也不尽相同,如 DSA-6 对副流感病毒的灭活率为 99.61%,但对人疱疹病毒型的抑制率则为 50.00%。这表明纳米材料的结构是影响其抗菌抗病毒活性的一个重要因素^[8],而且其抗病毒效应存在不同程度的病毒差异性。另外,在试验中我们还观察到,部分纳米催化剂对 Hela 细胞具有不同程度的毒性作用,提示这类材料应避免直接应用于人体。

纳米材料的抗病毒效应机制目前尚未清楚,推测可能是通过两种方式来实现:一是纳米材料对病毒的机械性吸附和固定作用。纳米材料是由大量尺寸为 1~100nm 的纳米微粒凝聚而成,在这些纳米超细颗粒表面覆盖着一层 5~10nm 厚的聚合物,可固定大量蛋白质或酶^[9];此外,纳米粒子的粒径很小,因而具有大量的自由表面,且亲水性强,这使得纳米粒子具有较高的胶体稳定性和优异的吸附性能,并能较快地达到吸附平衡^[10],因此病毒有可能经此途径被吸附,从而使病毒失去生存条件而死亡;二是纳米材料对病毒的直接灭活作用,有可能与其杀灭细菌类似,通过使病毒蛋白质失活、或干扰病毒复制的某个环节等多种不同的方式导致病毒被灭活。本研究发现,当 AB-24 与疱疹病毒作用后,在电子显微镜下可见部分病毒颗粒被吸附于 AB-24 颗粒表面。由于 AB-24 属 Ag^+ 系纳米材料,有可能该材料缓释出来的 Ag^+ 对病毒具有破坏作用,但尚需作进一步试验来证实。另外,有学者在研究某些纳米油水乳剂对革兰阴性菌的杀菌机制时发现,纳米抗菌材料能与细菌细胞表面的二价阳离子螯合,

并通过这种方式内化入菌体细胞,溶解和破坏细菌的细胞壁,从而导致细菌死亡^[11]。纳米抗菌材料杀灭病毒是否也依赖于类似的作用机制还有待于作深入研究。

参考文献

- [1] 丁浩,咸才军,郭保文,等. 纳米材料及其技术在涂料产业中的应用[J]. 中国粉体技术,2001,(专辑):53.
- [2] 张卓然. 实用细胞培养技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1999,104-106.
- [3] 陈国良,李晓山,单菁萱,等. 纳米级二氧化硅 N-1,N-2 抗疱疹病毒 2 型效果的实验观察[J]. 安徽医学,2002,23(6):5-6.
- [4] Myc A, Kukowska-Latallo J F, Bielinska A U, *et al.* Development of immune response that protects mice from viral pneumonitis after a single intranasal immunization with influenza A virus and nanoemulsion[J]. *Vaccine*, 2003, 21(25-26): 3 801-3 814.
- [5] Hamouda T, Myc A, Donovan B, *et al.* A novel surfactant nanoemulsion with a unique nonirritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi[J]. *Microbiol Research*, 2001, 156(1):1-7.
- [6] Chepurinov A A, Bakulina L F, Dadaeva A A, *et al.* Inactivation of Ebola virus with a surfactant nanoemulsion[J]. *Acta Trop*, 2003, 87(3): 315-320.
- [7] Donovan B W, Reuter J D, Cao Z, *et al.* Prevention of murine influenza A virus pneumonitis by surfactant nanoemulsions[J]. *Antivir Chem Chemother*, 2000, 11(1):41-49.
- [8] Myc A, Vanhecke T, Landers J J, *et al.* The fungicidal activity of novel nanoemulsion (X8W60PC) against clinically important yeast and filamentous fungi[J]. *Mycopathologia*, 2002, 155(4):195-201.
- [9] 任建敏. 纳米技术在生物医学中的应用[J]. 第三军医大学学报,2000,22(3):299-300.
- [10] 姜忠义,成国祥. 纳米生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003,22.
- [11] Hamouda T, Baker J R Jr. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli[J]. *J Appl Microbiol*, 2000,89(3):397-403.