

研究快报

一种新型网膜对 SARS 冠状病毒的抑制作用*

韩伟^{1,4)} 张泮河²⁾ 曹务春²⁾ 杨东玲¹⁾SHIGEHARU TAIRA³⁾ YOSHIO OKAMOTO³⁾ JUN-ICHIRO ARAI³⁾ 阎锡蕴¹⁾**⁽¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ⁽²⁾军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100085;⁽³⁾Daikin Industries, LTD. Osaka 5918511, Japan; ⁽⁴⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 利用光触媒钛羟基磷灰石网膜 (PTAF) 具有吸附和酶催化的特点, 研究其对 SARS 病毒的抑制作用. 实验结果表明在紫外照射条件下, PTAF 膜对 SARS 冠状病毒的抑制率为 100%. 在没有紫外照射的条件下, PTAF 膜对 SARS 冠状病毒的抑制率为 99.99%, 与对照组相比, PTAF 膜抑制病毒的效率是 HAF 膜的 1 000 倍以上. 研究结果提示, PTAF 在预防 SARS 冠状病毒及其他病毒性流行病方面有潜在的应用价值.

关键词 光触媒钛羟基磷灰石网膜, SARS 冠状病毒, 光催化作用

学科分类号 Q939.403, TB383

严重急性呼吸道综合症 (SARS), 又称非典型肺炎, 是由 SARS 冠状病毒引起的一种传染性呼吸系统疾病^[1]. 该病一经爆发, 迅速波及世界 30 多个国家或地区, 总发病人数 8 422 人, 死亡率高于 10%, 其中我国的 SARS 发病病例最多, 仅大陆地区就超过 5 000 人 (http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/). 虽然该病流行结束后一直在严密监控下, 但 2004 年再次出现一些散在病例, 并造成个别病例死亡. 由于 SARS 冠状病毒具有较高的传染性, 加之病毒可以通过近距离接触以飞沫等方式传播^[2], 因此, 如何阻断该病毒在空气中的传播成为流行病学中预防和控制该病扩散和复发的研究热点. 与传统的化学消毒剂相比, 一些具有表面酶催化活性的材料在预防传染性流行病在空气和物体表面传播方面更具优越性, 表现为无污染、高效能和应用范围广等特点^[3]. 前期研究已经发现一些特殊光触媒材料可以在与细菌接触的过程中对其催化氧化, 并起到灭菌的作用^[4]. 然而, 这类材料是否具有抑制病毒的作用, 目前鲜有研究报告. 本研究应用一种新型光触媒材料——光触媒钛羟基磷灰石网膜 (photocatalytic apatite filter, PTAF), 观察其对 SARS 冠状病毒的吸附灭活作用. 我们发现 PTAF 膜对 SARS 冠状病毒的抑制率为对照组 HAF 膜的 1 000 倍以上. 这一研究结果提示, PTAF 不仅能用于预防 SARS 冠状病毒传播

和流行, 而且在预防其他病毒性流行病方面都具有潜在的应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料

DAIKIN 公司提供光触媒钛羟基磷灰石网膜 (PTAF)、水化羟基磷灰石网膜 (HAF)、紫外灯和紫外测定仪. 军事医学科学院微生物流行病学研究所提供 SARS 冠状病毒株 BJ01 和非洲猴肾细胞 VERO E6. 细胞培养基 RPMI 1640 购自 GIBCO 公司; 小牛血清购自 HYCLONE 公司; 细胞培养板购自 COSTAR 公司.

1.2 方法

1.2.1 病毒株增毒培养: 在实验前 2~3 天对 Vero E6 细胞进行传代, 待细胞形成单层后接种病毒. 当传代病毒的细胞出现典型病变, 且病变细胞 >75% 时再传代一次, 测定病毒滴度, 病毒培养液滴度达到 7.0/ml 以上时收获病毒液, 再进行病毒滴度测定后为病毒培养原液 (有关 SARS 冠状病毒实验均在 P3 实验室进行, 下述同).

* 国家重点基础研究发展规划项目 “SARS 防治基础研究专项” (2003CB514114).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888583, E-mail: yanxy@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2004-09-18, 接受日期: 2004-10-15

1.2.2 实验网膜 PTAF 的准备: 实验前将 PTAF 和 HAF 网膜裁剪成 3 cm × 3 cm 大小, 分组放入培养皿, 加包装材料后 121℃ 灭菌 20 min, 室温放置过夜。

1.2.3 紫外线照射强度调整: 调整紫外线 (UV) 灯与照射平面的高度, 以紫外强度检测仪测定紫外照射强度, 使受照射平面接受的 UV 照射强度达 1 mW/cm²。

1.2.4 病毒灭活及残余活病毒滴定: 取病毒培养原液 300 μl, 用加样器均匀涂布并浸润到网膜中, 在 30 min 内涂完。UV 照射组网膜放置于紫外灯下照射, 非 UV 照射组避光存放。在预定的时间用生理盐水分别淋洗 PTAF 和 HAF 膜共 3 次, 收集淋洗液, 取 50 μl 按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 稀释后, 取单层的 Vero E6 细胞, 分别滴加洗脱的病毒稀释液用于组织细胞半数感染量 (TCID₅₀) 测定, 每个稀释度接种 4 孔细胞, 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养。病毒培养液 300 μl 室温放置相同时间后, 取 50 μl 系列稀释, 分别接种细胞测定病毒滴度, 作为原始病毒滴度对照。从接种后的次日开始观察并记录细胞病变, 连续观察 6 天, 根据细胞病变平均值计算病毒滴度。

1.2.5 病毒灭活率: 根据 3 次实验结果平均值计算 PTAF 对 SARS 冠状病毒的灭活率。计算公式: 病毒灭活率 = 100 × (1 - 10^β/10⁴)。10⁴ 指 SARS 冠状病毒感染宿主产生 TCID₅₀ 时的最大稀释倍数。

10^β 指 SARS 冠状病毒经网膜灭活处理再感染宿主产生 TCID₅₀ 时的最大稀释倍数。

2 结 果

2.1 PTAF 膜在不同条件下对 SARS 冠状病毒的灭活作用

首先观察 PTAF 膜在 UV 照射条件下对 SARS 病毒的抑制作用。将 SARS 病毒原液 300 μl 分别涂布在 PTAF 膜和 HAF 网膜上, 然后室温 UV 照射 6 h。用生理盐水分别淋洗 PTAF 和 HAF 膜, 收集洗脱液并接种 Vero E6 细胞。次日开始观察洗脱液中残余 SARS 病毒致病作用 (cytopathogenic effect, CPE) 并测定病毒滴度。结果发现在 UV 照射条件下, 无论是从 PTAF 或 HAF 网膜上洗脱下来的 SARS 冠状病毒都不再具有感染 VERO E6 细胞的能力。结果如图 1a 所示, 洗脱原液中的 SARS 病毒接种 Vero E6 细胞培养 6 天, 观察期内测定残余病毒滴度均为零, 而未经网膜处理的病毒滴度则逐日增加, 在第 6 天恢复至 6.3/ml。为了进一步确定 UV 照射条件下, 网膜处理后的 SARS 冠状病毒被完全灭活, 我们取第一代病毒接种的 VERO E6 细胞进行第二代增殖培养, 仍未发现任何病毒致病作用。这一结果说明吸附在 PTAF 或 HAF 网膜表面的 SARS 病毒, 在 UV 照射 6 h 后均被灭活而不能检测出残存活病毒, 灭活率为 100%。

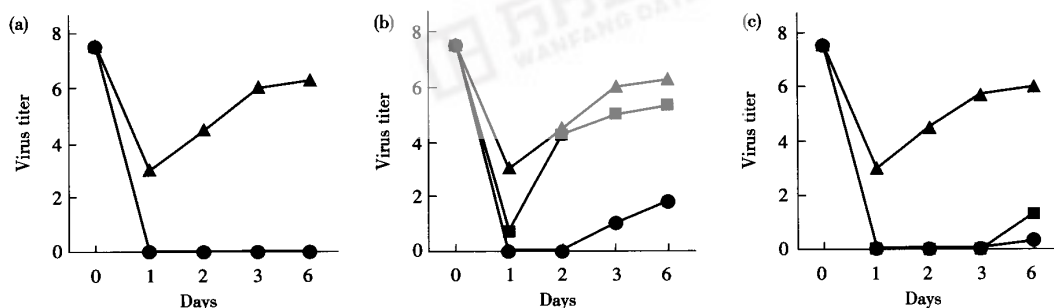


Fig. 1 Evaluating the activity of SARS virus eluted from either PTAF or HAF membranes and co-cultured with Vero E6 cells for 6 days

(a) SARS virus reacted 6 h with the membranes under UV irradiation. (b) SARS virus reacted 6 h with the membranes without UV irradiation. (c) SARS virus reacted 24 h with the membranes without UV irradiation. ●—●: PTAF; ■—■: HAF; ▲—▲: Virus alone.

为了明确 PTAF 膜对 SARS 病毒的灭活作用, 我们在非 UV 照射的条件下, 以 HAF 膜为对照重

复了上述实验, 目的是观察网膜本身的抗病毒作用。具体操作是将不同稀释度的病毒洗脱液分别滴

加在 PTAF 和 HAF 网膜上, 室温放置 6 h 或 24 h 后分别洗脱病毒, 并接种 Vero E6 细胞, 检测洗脱液中 SARS 病毒的活性. 同时设立未经网膜处理的病毒源液作为对照, 观察病毒的自然灭活现象. 结果显示这两种网膜抑制 SARS 病毒的作用明显不同. PTAF 网膜处理后洗脱的残存病毒为 1.8/ml, 而 HAF 处理后洗脱的残存病毒滴度为 5.5/ml (图 1b), 显示 PTAF 网膜对 SARS 病毒的抑制作用是 HAF 网膜的 $10^{3.3}$ 倍. 我们进一步观察这两种网膜与 SARS 病毒作用 24 h 后的情况, 洗脱病毒液接种细胞后病毒滴度测定结果显示, 观察期中的前 3 天, PTAF 和 HAF 网膜处理后残余病毒滴度均为 0, 至第 6 天残存病毒滴度分别为 0.33/ml 和 1.0/ml (图 1c), 然而未经膜处理的对照组病毒滴度随培养时间延长滴度上升, 第 6 天恢复至 6.0/ml. 这一现象说明延长网膜与病毒作用时间能提高网膜灭活病毒的效果.

2.2 PTAF 抑制 SARS 病毒致病变作用

在 PTAF 膜上涂布 $10^{7.5}$ pfu/ml SARS 病毒, 在非 UV 照射条件下作用 6 h, 洗脱并系列稀释病毒, 分别接种 Vero E6 细胞, 培养观察残存病毒的致病变作用. 结果显示, PTAF 网膜的洗脱液接种 Vero E6 细胞 24 h 后, 细胞生长正常、未出现细胞肿胀、圆缩、或死亡脱落 (图 2a), 而同样条件 HAF 处理的洗脱病毒液 (图 2b) 与未经膜处理的病毒原液 (结果未显示) 均引起细胞明显圆缩或死亡. 这些结果说明 PTAF 有效地抑制病毒的致宿主细胞病变作用.

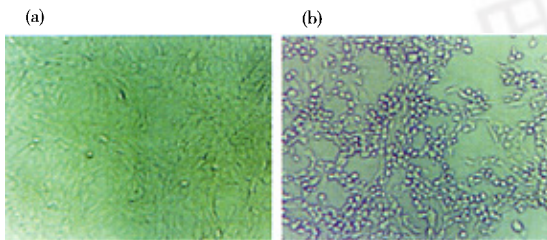


Fig. 2 Cytopathogenic effect of the Vero E6 cells infected with SARS virus eluted from PTAF (a) and HAF (b) after 24 h incubation (400 ×).

3 讨 论

光触媒是利用光能进行催化反应的催化剂. 随着纳米二氧化钛制备技术的发展, 以二氧化钛为触

媒的材料在应用研究上取得突破^[5]. 光触媒材料不仅在环境净化中具有广泛应用价值, 也可被用在除菌消毒, 肿瘤治疗等领域^[6,7]. 已有研究表明, 将大肠杆菌涂在具有氧化钛涂层的培养皿, 紫外照射 1 h 后细菌能够 100% 被杀死, 而在没有氧化钛涂层培养皿中的对照组细菌, 紫外照射 4 h 后细菌仍有 50% 存活^[8,9]. 本实验中使用的钛羟基磷灰石网膜是一种基于水化羟基磷灰石网膜研制的新材料, 它是将水化羟基磷灰石网膜中的部分钙原子替换为钛原子, 使膜的吸附和分解能力提高了 2.5 倍, 实现了可见光激发的光触媒活性, 使其不仅具备了羟基磷灰石的高吸附能力, 而且还具备氧化钛的杀菌能力. 已经有研究表明 PTAF 对流感病毒具有很强的吸附灭活作用, 扫描电镜显示流感病毒与膜接触后即被吸附在膜上不易洗脱, 复层膜网可有效过滤清除雾化的流感病毒并使空气完全得到净化 (学术交流, 结果尚未发表).

我们的研究是以 PTAF 对 SARS 冠状病毒致病性病毒株 BJ01 直接作用, 在 P3 实验室观察残余病毒引起的细胞病变, 分析对比 PTAF 和参考膜 HAF 对感染性 SARS 病毒的灭活作用, 其方法直接、简单、有效. 并且为保证结果的可靠性, 每组实验重复 3 次, 以 3 次实验均值作结果终值. 结果表明, PTAF 网膜在 UV 激发下 6 h 内能杀灭全部 SARS 病毒, 在非紫外照射条件下或暗处, 6 h 内灭活病毒 99.99%. 为进一步说明 PTAF 对 SARS 冠状病毒的灭活作用, 实验以 HAF 为参照, 在非紫外照射条件下网膜作用病毒 6 h, 可以观察到两种网膜对病毒的作用明显不同, PTAF 在非紫外线照射条件下抑制病毒活性强于对照 HAF 膜 1 000 倍以上.

病毒在不适的环境中会自然失活. 我们在实验中观察并测定了 SARS 病毒在室温条件下的自然失活情况. 例如 7.5/ml 的 SARS 病毒经室温 6 h 放置并接种 VERO E6 细胞培养后, 病毒滴度在接种后 24 ~ 72 h 迅速上升, 至第 6 天时病毒滴度恢复至 6.3/ml, 病毒滴度下降 1.2/ml, 表明病毒在自然环境下部分失活, 失活病毒约占 16%. 由于这种失活的病毒与接种病毒总量相比较少, 基本不影响总的结果分析. 另外, 我们观察到 SARS 病毒在室温放置 6 h 与 24 h 的自然失活程度基本一致 (图 1b 和图 1c), 病毒失活没有随着室温放置时间的延长而明显加重, 因而保证了 SARS 病毒与网膜作用随着时间的延长造成滴度明显下降这个结论的可靠性.

综上所述, 研究结果表明 PTAF 膜具有抑制 SARS 病毒的作用, 提示 PTAF 在预防 SARS 冠状病毒或其他病毒性疾病流行方面具有潜在的应用价值. 进一步的研究将深入探讨 PTAF 灭活 SARS 病毒的机理.

参 考 文 献

- 1 Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, **348** (20): 1953 ~ 1966
- 2 Drosten C, Gunther S, Preiser W, *et al.* Identification of a novel corona virus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, **348** (20): 1967 ~ 1976
- 3 薛相美, 潘耀权. 新技术在家用空调器中的应用. 制冷, 2001, **20** (2): 82 ~ 83
Xue X M, Pan Y Q. Refrigeration, 2001, **20** (2): 82 ~ 83
- 4 He H, Dong X P, Yang M, *et al.* Catalytic inactivation of SACS coronavirus, Escherichia coli and yeast on solid surface. *Catalysis Communications*, 2004, **5** (2): 170 ~ 172
- 5 Diebold U. The surface science of Titanium dioxide. *Surface Science Report*, 2003, **48** (4): 53 ~ 229
- 6 Fujishima A, Rao T N, Tryk D N. Titanium dioxide photocatalysis. *J Photochem Photobio*, 2001, **108** (1): 1 ~ 21
- 7 张志琨, 陈红瑞, 李桂村, 等. 纳米 TiO₂ 光触媒及其高分子复合材料得结构与性能. 青岛科技大学学报, 2003, **24** (1): 42 ~ 44
Zhang Z K, Chen H R, Li G C, *et al.* *J Qingdao Sci Technol Uni*, 2003, **24** (1): 42 ~ 44
- 8 Noguchi T, Fijishima A, Sawunryana P, *et al.* Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ film: dynamic view of active oxygen species responsible for the effect. *J Photochem Photobio*, 1997, **106** (1): 51 ~ 56
- 9 Sunada K, Kikuchi Y, Hashimoto K, *et al.* Bactericidal and detoxification effect of TiO₂ thin film photocatalysts. *Environ Sci Technol*, 1998, **32** (3): 726 ~ 728

The Inactivation Effect of Photocatalytic Titanium Apatite Filter on SARS Virus *

HAN Wei^{1,4)}, ZHANG Pan-He²⁾, CAO Wu-Chun²⁾, YANG Dong-Ling¹⁾,
SHIGEHARU TAIRA³⁾, YOSHIO OKAMOTO³⁾, JUN-ICHIRO ARAI³⁾, YAN Xi-Yun¹⁾**

(¹⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; (²⁾ Institute of Microepidemiology, Beijing 100085, China;

(³⁾ Daikin Industries, LTD. Osaka 5918511, Japan; (⁴⁾ Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Photocatalytic titanium apatite filter (PTAF) is a new material that has been reported to have an ability to absorb and inactivate bacteria. The inactivation effect of PTAF on serious acute respiratory syndrome coronary virus (SARS-CoV) was tested. The results showed that PTAF filter inactivated/decomposed SARS CoV up to 99.99% after 6 h interaction under the condition of non-UV irradiation. However, under the condition of UV irradiation, PTAF and HAF both were able to inactivate/decompose SARS CoV completely. The study has provided the first evidences that PTAF could inactivate SARS-CoV virus, suggesting that the PTAF material will be applied for the prevention of SARS-CoV as well as other viruses.

Key words photocatalytic titanium apatite filter (PTAF), serious acute respiratory syndrome coronary virus (SARS CoV), photocatalysis

* This work was supported by The Special Funds for Major State Basic Research of China (2003CB514114).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64888583, E-mail: yanxy@sun5.ibp.ac.cn

Received: September 18, 2004 Accepted: October 15, 2004