

氧化亚铜纳米微粒与金黄色葡萄球菌的相互作用

沈成灵^{①②}, 李原芳^①, 祁文静^①, 黄承志^{①③*}

① 西南大学化学化工学院 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715

② 西南大学生命科学学院, 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715

③ 西南大学药学院, 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715

* 联系人, E-mail: chengzhi@swu.edu.cn

收稿日期: 2008-09-13; 接受日期: 2008-09-22

国家自然科学基金(批准号: 30570465, 20425517)资助项目

摘要 在十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)保护下制得 30~50 nm 的氧化亚铜(Cu_2O)微粒, 在此基础上以常见的致病菌金黄色葡萄球菌(*S.a*)为模型研究了 Cu_2O 纳米微粒对细菌的毒副作用. 通过测定 Cu_2O 纳米微粒对 *S.a* 的最小抑菌浓度(MIC), 用流式细胞术(FCM)研究其对金黄色葡萄球菌形态的改变及杀菌作用, 并通过暗场显微成像和扫描电镜图对照揭示了氧化亚铜纳米微粒抑菌杀菌的可能机理. 结果表明, Cu_2O 纳米微粒通过吸附在金黄色葡萄球菌表面破坏细胞壁致使细胞结构发生严重变化, 从而影响其形态与功能, 再进一步损伤膜结构导致通透性的改变从而达到抑菌杀菌的作用.

关键词

氧化亚铜纳米微粒
金黄色葡萄球菌
最小抑菌浓度
流式细胞术

纳米科学技术的飞速发展为我们的生产和生活方式带来了革新与希望^[1,2]. 在生物医学领域中将药物研磨成纳米状态以利于吸收; 通过磁性纳米颗粒靶向给药以治疗病变部位而不影响正常组织和器官^[3]. 此外利用纳米技术解决普遍存在的微生物对抗生素的耐药以及药效提高等领域均取得了一些积极成果^[4]. 就在人们逐渐认识纳米科学技术的优点和其潜在的巨大市场时, 一个新的问题也随之诞生——纳米生物负效应即纳米毒理学, 它涉及到纳米材料与生物体相互作用后可能产生的生物安全问题^[5~8]. 目前的研究对象主要集中在碳纳米材料、磁纳米颗粒、脂质体以及半导体荧光量子点等生物负效应方面, 所涉及到的生物体有原核细胞, 真核细胞以及动物个体, 如二氧化钛与单壁碳纳米管对大肠杆菌的损伤作用^[9,10], 量子点的细胞毒性^[7]以及单壁碳纳米管对小鼠肺部毒性研究^[11]等.

纳米氧化亚铜是一种新型的半导体光催化材料, 属于典型的金属缺位P型半导体, 很容易在太阳光的辐射下引发光催化反应^[12], 将来可能成为新型潜在的光催化材料而被广泛应用. 然而其与生物体将会发生如何的作用我们知之甚少^[13]. 本文利用模式生物金黄色葡萄球菌(*S.a*)为研究对象, 通过生物学的试验方法和化学的表征手段对它们的相互作用进行了探讨.

1 主要仪器

流式细胞仪(BECMAN COULTER Epics XL 型), 扫描电镜(HITACHI S-4800), 暗场显微镜(OLYMPUS BX51), SPX 型智能生化培养箱(宁波东南仪器有限公司), 台式冷冻恒温振荡器(太仓市实验设备厂), 漩涡振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司).

2 实验部分

2.1 氧化亚铜纳米微粒的合成

根据文献[14~16], 在 1.6×10^{-3} mol/L 的 CuSO_4 溶液中, 控制 CTAB 浓度为 0.016 mol/L, 加入还原剂 NaBH_4 使其终浓度为 0.028 mol/L, 漩涡混匀, 27°C 反应 16~18 h 得到粒径为 30~50 nm 的氧化亚铜纳米微粒.

2.2 氧化亚铜纳米微粒对 *S.a* 的最小抑菌浓度

S.a 的培养: 从活化的 *S.a* 固体培养基平板上挑取单菌落接种到肉汤培养基中, 在恒温摇床里以 37°C , 200 r/min 培养 6~8 h, 加入氧化亚铜微粒, 参考抗生素倍比稀释的抑菌方法[17]确定氧化亚铜微粒对 *S.a* 的最小抑菌浓度(MIC), 37°C 培养 24 h 左右以肉眼观察没有细菌生长的最低氧化亚铜浓度为 MIC.

2.3 流式细胞术测定氧化亚铜纳米微粒及 CTAB 与 *S.a* 的作用

流式细胞术的测定: 在 6 支离心管中分别加入 1 mL 已培养好的 *S.a* 菌液, 2000 r/min 离心 5 min, 将各管分别编号, 图 1(a) 是阴性对照, 图 1(b) 加入 75% 乙醇杀死细菌作为阳性对照, 图 1(d) 与图 1(f) 各加入 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ Cu_2O 微粒, 图 1(c) 与 (e) 加入 (d)(f) 对应浓度的 CTAB, 以上各管均于恒温摇床 37°C , 200 r/min 反应 1.5 h 后加入 PI (1 mg/mL) 染料, 最终 PI 的标记浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 在 4°C 冰箱中暗染 10 min. 随后对染色完毕的细菌进行流式细胞仪的检测. 流式细胞仪每次检测 10000 个细菌.

2.4 氧化亚铜纳米微粒与 *S.a* 作用后的显微成像

暗场显微及扫描电镜的细胞成像观察: 将与氧化亚铜微粒共同孵育 1.5 h 的 *S.a* 细菌悬液直接进行暗场显微成像观察. 扫描电镜样品需脱水处理. 方法为: 首先加入 25% 的戊二醛水溶液使其终浓度为 2.5%, 37°C 固定 30 min 后用 PBS 漂洗细菌两次; 然后沿管壁小心加入梯度酒精 (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 无水乙醇,) 和叔丁醇 (50%, 70%, 90%, 95%, 100%) 进行脱水固定, 最后将固定好的细菌悬液直接滴到铝片上, 放入 -20°C 无霜冰箱干燥 1 h 使叔丁醇挥发即得到电镜样品; 将样品喷金 30 s, 上电镜观察. 观察电压 5 kV.

3 结果与讨论

3.1 氧化亚铜纳米微粒对 *S.a* 的 MIC

最小抑菌浓度是抗菌物质能够抑制病原微生物生长繁殖的最小浓度. 最初用于抗生素类药物抑菌实验之中, 研究如何合理的使用抗生素类药物, 包括最低的使用剂量, 给药时间以及给药方法等从而达到良好的治疗目的[18], 通过抑菌实验了解药物是否可以抑菌以及抑菌性能从而给出合理的用药剂量和方法. 本实验借鉴抗生素最小抑菌浓度的方法来测定氧化亚铜纳米微粒对金黄色葡萄球菌的抑制作用, 以肉眼观察得出 Cu_2O 微粒对 *S.a* 的 MIC 约为 1 $\mu\text{g/mL}$, 即小于 1 $\mu\text{g/mL}$ 时金黄色葡萄球菌有生长现象而大于此浓度时则不会生长, 说明在最小抑菌浓度试验中氧化亚铜微粒显示出了较强的抑菌性能.

3.2 流式细胞术测定氧化亚铜纳米微粒及 CTAB 与 *S.a* 作用后荧光与散射光谱的变化

流式细胞仪获得的信息主要来自特异性荧光信号及非荧光的散射信号[19]. 从图 1 可以看出, 在未处理过的阴性对照中 *S.a* 的自然死亡率约为 15.7% (图 1(a)), 用强杀菌剂 75% 乙醇杀死后的阳性对照细菌死亡率检测到的为 93.4%, 列出了两个浓度对细菌有显著杀伤作用的氧化亚铜纳米微粒溶液, 分别为 5 与 10 $\mu\text{g/mL}$, 并设两个 CTAB 的对照 (氧化亚铜合成过程中引入了一定量的 CTAB, 其作为一种表面活性剂对细菌有一定的损伤作用). 两种浓度氧化亚铜作用之后的细菌死亡率为 71.8% (图 1(d)) 与 96.6% (图 1(f)), 而对应浓度单纯 CTAB 的杀菌率为 21.1% (图 1(c)) 与 31.0% (图 1(e)), 只比阴性对照 15.7% 略高一些, 证明在实验中 CTAB 对 *S.a* 有一定影响, 但起主要作用的是 Cu_2O 微粒.

散射光的强度及其空间分布与细胞的大小、形态、质膜和细胞内部结构密切相关, 未遭受任何损坏的细胞对光线都具有特征性的散射. 在流式细胞术测量中, 常用前向角 (即 0 度角) 散射 (FSC) 以及侧向散射 (SSC) 两种散射光, 一般而言前者与细胞的大小有关, 对同种细胞群体随着细胞截面积的增大而增大; 而后者主要用来获取有关细胞内部颗粒性质的有关信息.

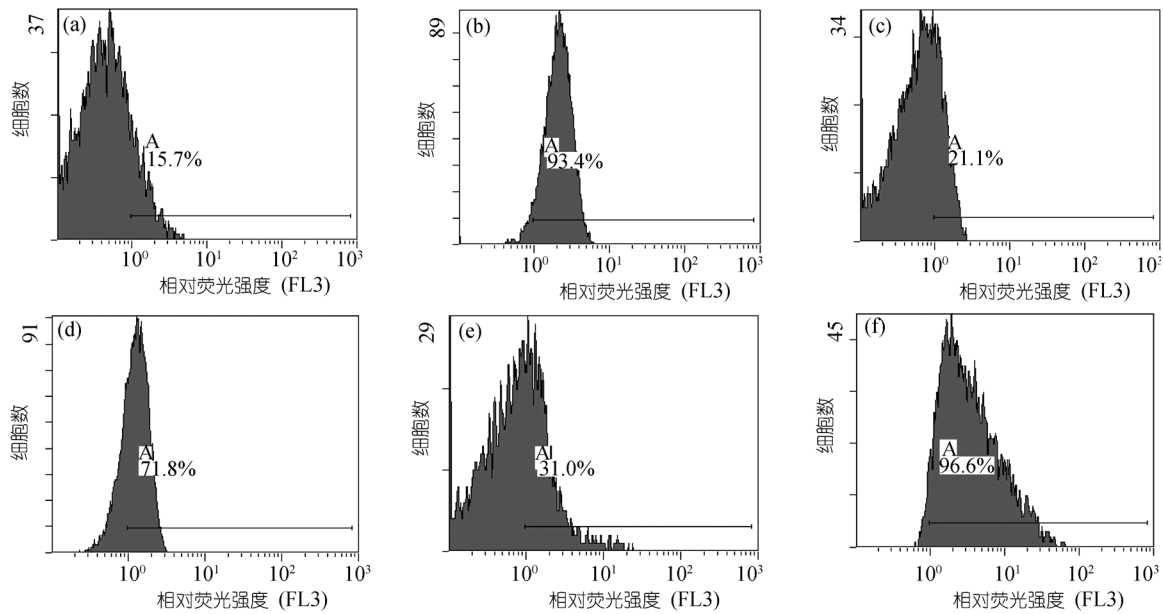


图1 金黄色葡萄球菌与氧化亚铜纳米微粒及对应浓度的CTAB作用的流式细胞图

横坐标表示FL3荧光通道PI染料的相对荧光强度的对数值,纵坐标表示对应荧光强度细菌的数目。(a)金黄色葡萄球菌的阴性对照;(b)阳性对照(75%乙醇杀死);(d),(f)为*S.a*经5与10 μg/mL氧化亚铜纳米微粒处理1.5 h;(c),(e)分别为(d),(f)对应浓度的CTAB处理相同时间

图2显示了*S.a*与氧化亚铜纳米微粒作用的流式细胞散射信号分析结果,横坐标表示前向角散射光相对强度的数值,纵坐标表示侧向散射光强度的相

对值。由图2((a),(b))可以看出,阴性对照和浓度较低的5 μg/mL Cu₂O作用后细菌的散射比较集中,图2((c),(d))所示随着Cu₂O浓度的增大,偏离红色区域

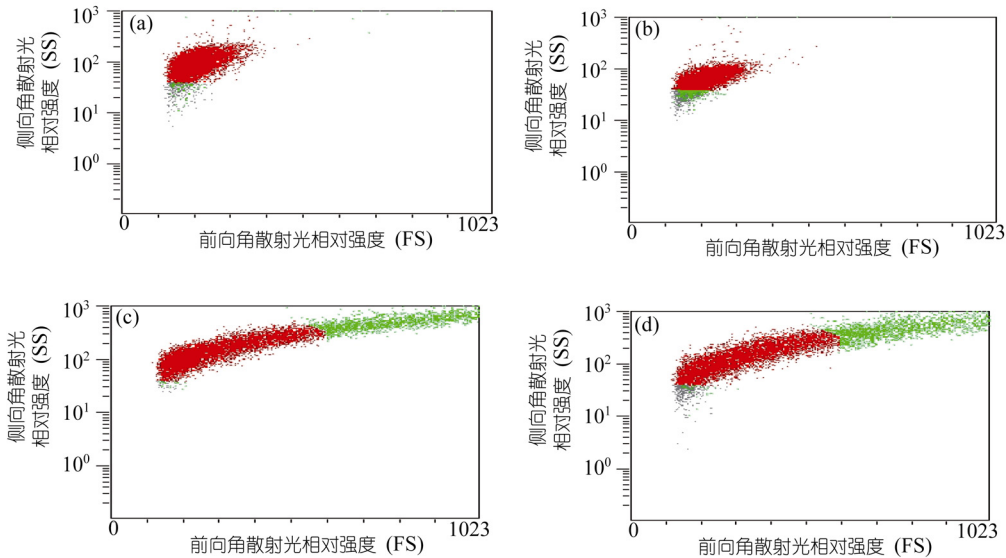


图2 金黄色葡萄球菌与氧化亚铜纳米微粒作用的流式细胞散射图

横坐标表示前向角散射光相对强度的数值,纵坐标表示侧向散射光强度的相对值。(a)阴性对照;(b)~(d)分别为5,10与15 μg/mL氧化亚铜纳米微粒与*S.a*作用1.5 h的图谱

的细菌就越多, 其前向散射和侧向散射的强度也随之增加, 表明了细菌的大小以及颗粒性发生了改变. 推断原因很可能是由于氧化亚铜附着于细菌细胞的表面破坏了细胞壁及细胞膜, 从而导致渗透压的改变而进入水使得细胞膨胀因而增大了前向散射, 与此同时氧化亚铜颗粒也进入细胞内使得侧向散射也得以增加.

3.3 氧化亚铜纳米微粒与 *S.a* 作用的显微成像分析

为证明氧化亚铜是否能够吸附在细胞表面, 我们还进行了暗场显微成像分析以及扫描电镜分析. 暗场显微镜利用的视野是暗场照明, 可分辨 $0.004\ \mu\text{m}$ 以上微粒的存在和运动, 这是普通显微镜(最大分辨率为 $0.2\ \mu\text{m}$)所不具有的特性, 故可用以观察活细胞的结构和细胞内微粒的运动等.

氧化亚铜微粒的合成实验操作容易实现, 且合成的球形 Cu_2O 纳米颗粒粒径比较均一, 分散性好, 而且实验中合成的 Cu_2O 微粒显示蓝色, 因而可以作为很好的光散射探针, 应用于暗场显微成像分析^[20]. 图 3(b)为氧化亚铜溶液以 $12000\ \text{r/min}$ 离心 $15\ \text{min}$ 后的暗场显微照片, 可以看出黑暗背景下蓝色氧化亚铜颗粒的聚集物; 图 3(c)为未经处理的 *S.a*, 图 3(d)为 *S.a* 与氧化亚铜作用之后的暗场显微成像图, 可以看出, *S.a* 被氧化亚铜作用后表面不再是如图 3(c)中的淡黄色, 而是被蓝色的光环环绕, 说明氧化亚铜颗粒吸附到了细菌细胞的表面.

扫描电镜进一步观察发现正常对照细胞表面较光滑平整, 纳米氧化亚铜与 *S.a* 作用后的细菌细胞不

仅部分发生了形态变化而且表面也聚集沉淀了大量氧化亚铜颗粒, 如图 4(b)所示, 更有个别细菌细胞发生了严重的形变如图 4(c).

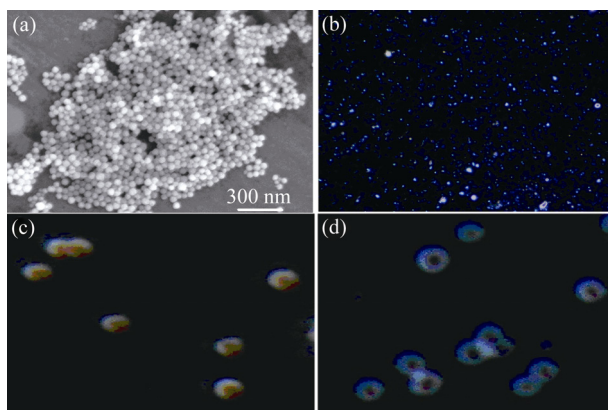


图 3 氧化亚铜纳米微粒与 *S.a* 作用的显微成像分析

(a),(b)氧化亚铜纳米微粒的扫描电镜及暗场显微成像; (c): *S.a* 对照的暗场显微成像图; (d)与 $10\ \mu\text{g/mL}$ 氧化亚铜纳米微粒作用 $1.5\ \text{h}$ 后的 *S.a* 暗场显微成像图

4 结语

通过化学方法合成的氧化亚铜纳米微粒, 我们对微生物学中模式生物之一的 *S.a* 进行了试验, 利用微生物学中细菌的培养, 测定最小抑菌浓度的方法, 并结合光学分析中散射与荧光以及显微成像的表征手段, 得出氧化亚铜纳米微粒具有较强的抑菌杀菌的能力, 其可能的作用机理为通过吸附在细菌表面破坏细胞壁导致细胞结构发生变化从而影响其形态与功能, 再进一步损伤膜结构导致通透性的改变从而达到抑菌杀菌的作用.

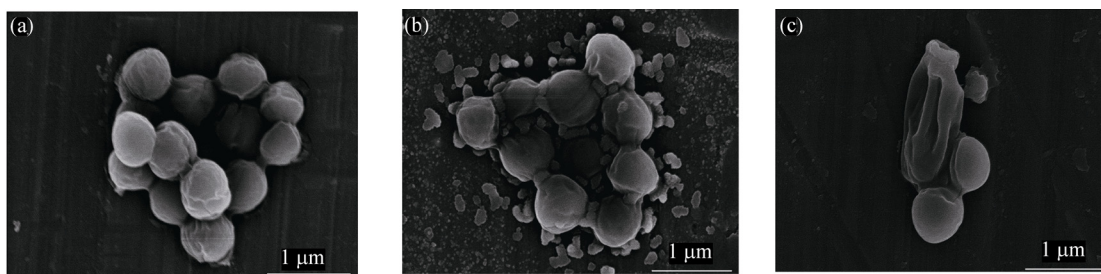


图 4 扫描电镜对氧化亚铜纳米微粒与 *S.a* 作用后的细菌细胞成像

(a) *S.a* 对照; (b),(c) 为 $10\ \mu\text{g/mL}$ 氧化亚铜纳米微粒处理后的 *S.a*

参考文献

- 1 Kelly K L. Nanotechnology grows up. *Science*, 2004, 304(18): 1732—1734[DOI]
- 2 Dufour P, Hassan M H A. Nanotechnology for development. *Issues Sci Technol*, 2005, 22(1): 15—16
- 3 Nadine W S K, Michael O C, Jeffrey A W, Dai H J. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporers and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(33): 11600—11605[DOI]
- 4 Xiao S J, Li Y F, Huang C Z. Detection of antibacterial activity of berberine hydrochloride by multiwalled carbon nanotubes. *Chem Lett*, 2007, 36(6): 798—799[DOI]
- 5 Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity. *Science*, 2003, 300(11): 243—243[DOI]
- 6 Brumfiel G. Nanotechnology: A little knowledge... *Nature*, 2003, 424(17): 246—248[DOI]
- 7 Kirchner C, Liedl T, Kudera S, Pellegrino T, Javier A M, Gaub H E, Stölzle S, Fertig N, Parak W J. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett*, 2005, 5(2): 331—338[DOI]
- 8 Meng H, Chen Z, Xing G M, Yuan H, Chen C Y, Zhao F, Zhang C C, Zhao Y L. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: Explanation of oral toxicity of nano-copper particles. *Toxicol Lett*, 2007, 175: 102—110[DOI]
- 9 Lu Z X, Zhou L, Zhang Z L, Shi W L, Xie Z X, Xie H Y, Pang D W, Shen P. Cell damage induced by photocatalysis of TiO₂ thin films. *Langmuir* 2003, 19(21): 8765—8768[DOI]
- 10 Kang S, Pinault M, Pfefferle L D, Elimelech M. Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. *Langmuir*, 2007, 23(17): 8670—8673[DOI]
- 11 Lam C W, James J T, McCluskey R, Hunter R L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*, 2004, 77(1): 126—134[DOI]
- 12 魏明真, 霍建振, 伦宁, 马西骋, 温树林. 一种新型的半导体光催化剂—纳米氧化亚铜. *材料导报*, 2007, 21(6): 130—133
- 13 Thai C K, Dai H X, Sastry M S R, Sarikaya M, Schwartz D T, Baneyx F. Identification and characterization of Cu₂O- and ZnO-binding polypeptides by *Escherichia Coli* cell surface display: Towards and understanding of metal oxide binding. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 87(2): 129—137[DOI]
- 14 Gou L F, Catherine J. Murphy solution-phase synthesis of Cu₂O nanocubes. *Nano Lett*, 2003, 3(2): 231—234[DOI]
- 15 Ng C H B, Wai Y F. Shape evolution of Cu₂O nanostructures via kinetic and thermodynamic controlled growth. *J Phys Chem B*, 2006, 110(42): 20801—20807[DOI]
- 16 Yin M, Wu C K, Lou Y B, Clemens B, Jeffrey T K, Zhu Y M, Stephen O'B. Copperoxidenanocrystals. *J Am Chem Soc*, 2005, 127, 9506—9511[DOI]
- 17 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement. NCCLS, 1997, 17(2): 13214
- 18 胡天佑, 郭华平. 抗生素后效应与合理使用抗生素. *中国药业*. 2004, 13(12): 5—6
- 19 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用. 北京: 北京师范大学出版社, 1992. 8—25
- 20 Zhang H, Ren X, Cui C. Shape-controlled synthesis of Cu₂O nanocrystals assisted by PVP and application as catalyst for synthesis of carbon nanofibers. *J Crys Growth*, 2007, 304(1): 206—210[DOI]