纳米二氧化硅和纳米金刚石对果蝇肠道共生菌的影响

刘利英^{①②}, 孙丽^{①②}, 宋海云^{①②*}

① 中国科学院食品安全重点实验室; 中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031

② 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021

*通讯作者, E-mail: hysong@sibs.ac.cn

收稿日期: 2015-06-02; 接受日期: 2015-07-02; 网络版发表日期: 2015-09-16

doi: 10.1360/N032015-00082

摘要 纳米材料和纳米科技已经被广泛应用于生物学和生物医学等领域. 有研究表明, 许多纳米材料具有抗菌特性, 然而这些研究主要针对纳米材料对有害病原菌在体外生长的抑制作用, 而针对纳米材料在体内对肠道共生菌的作用研究较少. 本实验表明, 纳米二氧化硅(SiO_2)能够在体外抑制肠道共生菌的生长, 而同样剂量的纳米 SiO_2 在果蝇体内的环境中对肠道共生菌的生长没有影响; 在体外不影响肠道共生菌的纳米金刚石在体内也未表现出对肠道共生菌的影响. 因此, 纳米材料在体内与体外有可能对肠道共生菌产生不同的效应. 相比体外环境, 肠道可以为共生菌提供更好的生长环境, 保护肠道共生菌免受外来纳米材料的影响.

关键词

纳米二氧化硅
纳米金刚石
抑菌
肠道共生菌

1 引言

纳米材料已经被广泛地应用于生物学和生物医学等领域. 其中, 纳米粒子、纳米片和纳米管, 以及基于 DNA 结构的纳米材料, 可以用于定量检测蛋白质、DNA 和一些小分子物质^[1-5], 或者将生物分子运送到细胞和动物体内^[6-9]. 另外一些纳米材料的物理和化学特性使得它们拥有抗菌活性^[10-14]. 例如, 石墨烯和氧化石墨烯能够溶解磷脂, 从而破坏细菌细胞膜的完整性^[10]. 纳米银能够通过产生带正电荷的银离子抑制细菌生长^[12]. 纳米氧化锌和纳米二氧化钛具有光催化活性, 能够产生活性氧和超氧化物^[13]. 但目前大家对于纳米材料抗菌的分子机制还缺少清楚的认识.

以前对纳米材料的抗菌研究主要集中在病原菌上, 纳米材料对共生菌(共生细菌或有益菌)的作用还

鲜有报道. 肠道中的共生菌对于宿主的生长发育、代谢、免疫和寿命都极其重要^[15-21]. 最近的研究表明, 肠道菌群失调与代谢疾病(如糖尿病和肥胖)存在紧密联系^[22,23]. 纳米材料越来越广泛地应用于药品和食品行业, 因此有必要了解纳米材料对肠道共生菌的影响. 之前关于纳米材料抗菌性能的实验主要是在体外进行的, 它们在宿主体内是否也发挥同样的作用还有待研究.

本实验主要探究了纳米二氧化硅(SiO_2)和纳米金刚石对果蝇肠道共生菌的作用. 目前对纳米 SiO_2 粒子的研究是比较热门的方向. 纳米 SiO_2 被广泛应用于塑料工程、生物医学工程、杀菌剂、食品加工等领域, 大大增加了人体与它接触的机会. 相对于普通的 SiO_2 , 纳米 SiO_2 粒子的理化特性发生了巨大改变, 其生物学效应的性质和强度也可能发生质的变化, 因此它对人体健康和生态环境的潜在影响已经引起了

极大的关注.

纳米金刚石作为碳纳米材料家族中的一个重要成员, 其独特的物理和化学性质以及表面基团的多样性, 使得科研人员关注到其在生物医学领域研究与应用的价值. 其应用范围从起初的润滑油、涂料、聚合物添加剂等领域扩展到药物传输、基因治疗、生物标签、癌症诊断与治疗等生物医学领域. 对于纳米金刚石抗菌方面的研究却少有报道, 本实验着重研究了纳米金刚石对肠道共生菌的影响.

2 材料和方法

2.1 实验动物和试剂

实验所用果蝇品系为 *w1118*, 来自 Bloomington (美国) 果蝇库存中心. 果蝇放置于温度为 25℃, 湿度为 60% 的恒温恒湿培养箱中培养. 果蝇食物配方(1 L) 为: 40 g 蔗糖、30 g 酵母、70 g 玉米粉、8 g 大豆粉、6 g 琼脂粉、45 g 麦芽糖、1 g 苯甲酸钠、7 mL 正丙酸、0.25 g 尼泊金甲酯. 纳米材料在食物凝结前加入, 搅拌混合. 纳米 SiO₂ (30 nm) 和纳米金刚石(5 nm) 购自北京 DK 纳米科技有限公司(中国). 氨苄青霉素和卡纳霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司(中国). 磷酸盐缓冲液(PBS, 货号 T900)购于 TAKARA 公司(日本).

2.2 筛选培养基及共生菌培养

醋酸菌(*Acetobacteria*)的液体培养基包含 25 g/L D-甘露糖醇、5 g/L 酵母提取物、3 g/L 蛋白胨; 配制固体培养基时加入 15 g/L 琼脂. 肠杆菌(*Enterobacteria*)的液体培养基成分为 10 g/L 胰蛋白胨、1.5 g/L 酵母提取物、10 g/L 葡萄糖、5 g/L 氯化钠; 配制固体培养基时加入 12 g/L 琼脂. 乳酸菌(*Lactobacilli*)的培养采用 70 g/L MRS 培养基(Sigma, 美国), 其固体培养基中含有 12 g/L 琼脂^[24]. 体外培养的肠道共生菌稀释 10 倍后涂平板, 倒置于 30℃ 培养箱中培养. 36~48 h 后, 统计每个平板上的菌落数(CFU), 根据 4 组样品的统计结果计算平均菌落数.

2.3 果蝇肠道共生菌的体外培养

取 4 只果蝇三龄幼虫, 75% 酒精消毒 30 s, PBS 清洗 3 遍, 于显微镜下用镊子取出果蝇完整肠道, 放入含有 100 μL PBS 的 EP 管中, 研磨匀浆. 加入 900 μL

PBS 混匀, 取 50 μL 上述混匀液体加入新的含有 950 μL PBS 的 EP 管中稀释, 再取 100 μL 涂到分别适合醋酸菌、乳酸菌或肠杆菌生长的固体筛选培养基上, 于 30℃ 培养箱中倒置培养 36~48 h. 统计每个平板上的菌落数(CFU), 根据 4 组样品的统计结果计算平均菌落数.

3 结果

3.1 抗生素对果蝇肠道共生菌的影响

为了客观地比较纳米材料在体外和体内对肠道共生菌生长的影响, 采用能够抑制细菌生长的抗生素作为阳性对照. 首先, 将体外培养的果蝇肠道共生菌生长在对照固体培养基, 或含 150 μg/mL 氨苄青霉素和 250 μg/mL 卡纳霉素的固体培养基上, 通过统计形成的共生菌的菌落数量衡量其生长状况. 结果表明, 两种抗生素的结合使用能够显著抑制醋酸菌的生长(图 1(a, d)). 同样条件下, 抗生素对乳酸菌(图 1(b, e))和肠杆菌(图 1(c, f))的抑制作用虽不如对醋酸菌的作用强, 但也显示出明显的抑制效应.

图 1 抗生素在体外对果蝇肠道共生菌的影响. 对照培养基与添加抗生素的培养基中醋酸菌(a)、乳酸菌(b)和肠杆菌(c)的菌落数量统计. 根据 4 组样品的统计结果计算平均菌落数. ***: $P < 0.001$; *: $P < 0.05$. (d-f) 图(a-c)的代表性示意图. 统计的菌落数标于各个图形的右下角

为测试抗生素的体内抑菌效果, 我们给刚孵化的果蝇幼虫喂食对照食物, 或含 150 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 250 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的食物, 直至幼虫发育到三龄晚期, 解剖其肠道, 在筛选培养基上培养后统计肠道内三种共生菌的数量. 与体外结果一致的是, 抗生素在果蝇肠道内也发挥了抗菌的作用, 虽然对共生菌的抑制强度与体外稍有不同. 在体内环境下, 两种抗生素结合后对醋酸菌、乳酸菌和肠杆菌的抑制作用(图 2)比体外实验(图 1)的效果有了一定的增强.

3.2 纳米 SiO_2 和纳米金刚石在体外对果蝇肠道共生菌生长的影响

为了测试纳米 SiO_2 和纳米金刚石在体外对果蝇肠道共生菌的影响, 我们将体外培养的三种肠道共生菌分别在含有纳米 SiO_2 、纳米金刚石、或对照培养基上培养. 200 $\mu\text{g/mL}$ 的纳米 SiO_2 对醋酸菌、乳酸菌和肠杆菌都表现出一定的抑制作用. 当其浓度提高到 2 mg/mL 时, 对三种共生菌的抑制作用更加显著(图 3). 由此可见, 纳米 SiO_2 在体外对肠道共生菌的生长具有抑制作用, 其抑菌效果具有剂量依赖性, 但不具有菌种特异性.

与纳米 SiO_2 的抑菌效果截然不同, 含有 200 $\mu\text{g/mL}$ 或 2 mg/mL 纳米金刚石的培养基对醋酸菌、乳酸菌和肠杆菌的体外生长未产生影响(图 4). 在此剂量范围内, 纳米金刚石在体外不能抑制果蝇肠道共生菌的生长.

3.3 纳米 SiO_2 和纳米金刚石在果蝇体内肠道内对共生菌生长的影响

实验检测了通过食物摄入体内的纳米 SiO_2 或纳米金刚石对果蝇肠道内共生菌的影响. 我们给刚孵化的果蝇幼虫喂食含纳米 SiO_2 或纳米金刚石的食物,

图 2 抗生素在体内对果蝇肠道共生菌的影响. 喂食对照食物与添加抗生素的食物后果蝇肠道内醋酸菌(a)、乳酸菌(b)和肠杆菌(c)的菌落数量统计. 根据 4 组样品的统计结果计算平均菌落数. **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$

图 3 纳米 SiO_2 在体外对果蝇肠道共生菌的影响. 对照培养基与添加纳米 SiO_2 (200 $\mu\text{g/mL}$ 或 2 mg/mL) 的培养基中醋酸菌(a)、乳酸菌(b)和肠杆菌(c)的菌落数量统计. 根据 4 组样品的统计结果计算平均菌落数. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$

图 4 纳米金刚石在体外对果蝇肠道共生菌的影响. 对照培养基与添加纳米金刚石(200 $\mu\text{g/mL}$ 或 2 mg/mL) 的培养基中醋酸菌(a)、乳酸菌(b)和肠杆菌(c)的菌落数量统计. 根据 4 组样品的统计结果计算平均菌落数. n.s.表示无显著性差异

或对照食物, 至幼虫发育到三龄晚期时解剖肠道, 在筛选培养基上培养和统计肠道内三种共生菌的数量. 实验结果显示, 纳米 SiO_2 虽然在体外对醋酸菌、乳酸菌和肠杆菌的生长都表现出显著的抑制作用(图 3), 但是同样剂量的纳米 SiO_2 (200 $\mu\text{g/mL}$ 或 2 mg/mL) 通过食物摄入后, 没有对果蝇肠道内这三种共生菌的生长产生影响(图 5); 通过食物摄入的纳米金刚石对肠道共生菌的影响与体外实验结果一致; 摄食纳米金刚石(200 $\mu\text{g/mL}$ 或 2 mg/mL) 的果蝇肠道内共生菌的数量与对照组相比, 没有发生显著性变化(图 6). 这些结果表明, 在此剂量范围内, 通过食物摄入的纳

图5 纳米SiO₂在体内对果蝇肠道共生菌的影响. 喂食对照食物与添加纳米SiO₂ (200 µg/mL或2 mg/mL)的食物后果蝇肠道内醋酸菌(a)、乳酸菌(b)和肠杆菌(c)的数量统计. 根据4组样品的统计结果计算平均菌落数. n.s.表示无显著性差异

米SiO₂和纳米金刚石在肠道内不能抑制共生菌的生长.

4 结论

纳米二氧化硅(SiO₂)在体外实验中表现出剂量依赖性的抑菌能力,能够抑制果蝇肠道共生菌的生长.然而,同样剂量的纳米SiO₂通过食物摄入果蝇体内后,未能对肠道内共生菌的生长产生抑制作用.以往的研究表明,肠道共生菌可以为宿主提供有益的保

图6 纳米金刚石在体内对果蝇肠道共生菌的影响. 喂食对照食物与添加纳米金刚石(200 µg/mL或2 mg/mL)的食物后果蝇肠道内醋酸菌(a)、乳酸菌(b)和肠杆菌(c)的数量统计. 根据4组样品的统计结果计算平均菌落数. n.s.表示无显著性差异

护作用,而我们的实验结果暗示肠道内环境也能为肠道共生菌提供一定的保护作用.

纳米材料在医学研究领域应用广泛,常被用作药物载体.而这些摄入体内的纳米材料是否会影响肠道共生菌的生长,目前少有研究.肠道中的共生菌对于宿主的生长发育、代谢、免疫和寿命都极其重要^[15-21].本实验表明,一定剂量范围内的纳米SiO₂和纳米金刚石在体内对肠道共生菌没有抑制作用,为它们作为药物载体的安全性提供了参考数据.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(31322039, 31371493)和中国科学院科技服务网络计划(KFJ-EW-STS-099)资助,特此一并感谢.此外,感谢黄庆研究员对本工作的指导和帮助.谨以此文纪念英年早逝的黄庆研究员.

参考文献

- 1 Zhang J, Song SP, Wang LH, Pan D, Fan CH. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA. *Nat Protoc*, 2007, 2: 2888-2895
- 2 Chen N, Jiang L, Song HY, Chao J, Huang Q, Fan CH. Physical and biochemical insights on DNA structures in artificial and living systems. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 1720-1730
- 3 Schmied JJ, Raab M, Forthmann C, Pibiri E, Wünsch B, Dammeyer T, Tinnefeld P. DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy. *Nat Protoc*, 2014, 9: 1367-1391
- 4 Jiang BW, Xiang FW, Zhao XC, Wang LH, Fan CH. Robust and efficient direct multiplex amplification method for large-scale DNA detection of blood samples on FTA cards. *Nucl Sci Tech*, 2013, 24: 030505
- 5 Zheng XX, Wen YQ, Zhang J, Wang LH, Song SP, Zhang H, Fan CH. A nanoresonant gold-aptamer probe for rapid and sensitive detection of thrombin. *Nucl Sci Tech*, 2012, 23: 317-320
- 6 Gu XB, Cai GM, Jiang MJ, Zhou YY, Zhang RJ. Synthesis and biological evaluation of 18F-FB-NGA as a hepatic asialoglycoprotein receptor PET imaging agent. *Nucl Sci Tech*, 2013, 24: 060301
- 7 Sun JL, Chao J, Huang J, Yin M, Zhang H, Peng C, Zhong ZT, Chen N. Uniform small graphene oxide as an efficient cellular nanocarrier for immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Acs Appl Mater Inter*, 2014, 6: 7926-7932

- 8 Wei M, Chen N, Li J, Yin M, Liang L, He Y, Song HY, Fan CH, Hiang Q. Polyvalent immunostimulatory nanoagents with self-assembled CpG oligonucleotide-conjugated gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 1202–1206
- 9 Malvindi MA, Brunetti V, Vecchio G, Galeone A, Cingolani R, Pompa PP. SiO₂ nanoparticles biocompatibility and their potential for gene delivery and silencing. *Nanoscale*, 2012, 4: 486–495
- 10 Tu YS, Lv M, Xiu P, Huynh T, Zhang M, Castelli M. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8: 594–601
- 11 Zhao JM, Deng B, Lv M, Li JY, Zhang YJ, Jiang HQ, Peng C, Li J, Shi JY, Huang Q, Fan CH. Graphene oxide-based antibacterial cotton fabrics. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2: 1259–1266
- 12 Shao W, Liu XF, Min HH, Dong GH, Feng QY, Zuo SL. Preparation, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticle-decorated graphene oxide nanocomposite. *Acs Appl Mater Inter*, 2015, 7: 6966–6973
- 13 Liu WW, Su PL, Chen S, Wang N, Ma YP, Liu YR, Wang JS, Zhang ZT, Li HY, Webster TJ. Synthesis of TiO₂ nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. *Nanoscale*, 2014, 6: 9050–9062
- 14 Kumar R, Anandan S, Hembram K, Rao TN. Efficient ZnO-based visible -light-driven photocatalyst for antibacterial applications. *Acs Appl Mater Inter*, 2014, 6: 13138–13148
- 15 Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH, Lee WJ. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 2011, 334: 670–674
- 16 Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*, 2008, 319: 777–782
- 17 Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab*, 2011, 14: 403–414
- 18 Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 12974–12979
- 19 Lee KA, Kim SH, Kim EK, Ha EM, You H, Kim B, Kim MJ, Kwon Y, Ryu JH, Lee WJ. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*, 2013, 153: 797–811
- 20 Lee WJ, Brey PT. How microbiomes influence metazoan development: insights from history and *Drosophila* modeling of gut-microbe interactions. *Annu Rev Cell Dev Bio*, 2013, 29: 571–592
- 21 You H, Lee WJ, Lee WJ. Homeostasis between gut-associated microorganisms and the immune system in *Drosophila*. *Curr Opin Immunol*, 2014, 30: 48–53
- 22 Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaïs CA, Maza O, Israeli D4, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, Kuperman Y, Harmelin A, Kolodkin-Gal I, Shapiro H, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 2014, 514: 181–186
- 23 Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, Gewirtz AT. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 2015, 519: 92–96
- 24 Guo LL, Karpac J, Tran SL, Jasper H. PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell*, 2014, 156: 109–122

Effects of silicon dioxide nanoparticles and nanodiamonds on intestinal commensal bacteria

Liyong Liu^{1,2}, Li Sun^{1,2}, Haiyun Song^{1,2*}

1 Key Laboratory of Food Safety Research, Chinese Academy of sciences; Institute for Nutritional Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of sciences, Shanghai 200031, China

2 Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, Beijing 100021, China

*Corresponding author (email: hysong@sibs.ac.cn)

Abstract: Nanomaterials and nanotechnology have been widely applied in biological and biomedical field. Recent studies reveal that many nanomaterials possess antibacterial activities. While most of these studies focus on the ability of nanomaterials to inhibit the growth of pathogenic bacteria *in vitro*, few of them test the effects of nanomaterials on intestinal commensal bacteria. Here, we report that SiO₂ nanoparticles, but not nanodiamonds, can inhibit the growth of *Drosophila* intestinal commensal bacteria *in vitro*. Surprisingly, dietary SiO₂ nanoparticles of same dosage fail to display similar effects in *Drosophila* larvae. These results imply that the antibacterial effect of nanomaterials differs *in vitro* and *in vivo*. Comparing to *in vitro* environment, intestine can provide better environment for the growth of intestinal commensal bacteria and prevent the effects from exogenous nanomaterials.

Keywords: SiO₂ nanoparticles, nanodiamonds, antibacterial activity, commensal bacteria