

李星星,左涵琪,李春巧,等.氧化石墨烯基二维复合纳米片对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究[J].华中农业大学学报,2024,43(3):267-274.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.03.028

氧化石墨烯基二维复合纳米片对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究

李星星,左涵琪,李春巧,杜婷,杜欣军

天津科技大学食品科学与工程学院/食品营养与安全国家重点实验室,天津 300457

摘要 为研发抗动物源性病毒感染的新型广谱纳米材料,将氧化石墨烯(GO)与二氧化锰纳米片(MnO_2 NSs)通过 π - π 堆叠作用制备合成二维复合纳米片材料(GO- MnO_2 NSs),分别通过TEM、XRD、XPS对GO- MnO_2 NSs的形貌、结构、结晶度和元素价态进行表征,并采用MTT法对GO- MnO_2 NSs的细胞毒性进行测试。结果显示,625 $\mu g/mL$ GO- MnO_2 NSs的细胞存活率超过85%;以猪流行性腹泻病毒(PEDV)作为冠状病毒的模式病毒, EC_{50} 、间接免疫荧光和Western blot试验结果证实GO- MnO_2 NSs对PEDV感染具有显著的抗病毒活性。研究表明,GO- MnO_2 NSs能够清除由病毒感染引起的活性氧过表达并抑制细胞凋亡,同时还能上调细胞内干扰素和干扰素刺激基因(ISGs)等抗病毒因子的表达,从而有效抑制病毒感染。

关键词 氧化石墨烯; 二氧化锰纳米片; 猪流行性腹泻病毒; 抗病毒活性; 纳米治疗平台

中图分类号 TB383.1; TQ127.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)03-0267-08

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是一种由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)感染引起的接触性肠道传染病,该病具有高发病率、高死亡率、能感染任何年龄及生产阶段的猪等特点^[1]。PEDV属于尼多病毒目、冠状病毒科、冠状病毒属,是一种有包膜的单链正向RNA病毒^[2]。近年来,冠状病毒在全球范围内的大暴发引起了广泛关注。纳米颗粒因其独特的物理、化学和生物学特性,如比表面积增大、表面活性增强、反应特性更好、易于控制药物释放和靶向药物输送等^[3],在抗病毒研究应用中取得了快速进展。利用纳米材料本身特性损伤或杀死病毒^[4-5];将抗病毒药物负载到纳米颗粒中,不仅提高了药物的生物利用程度,降低了药物毒性,还可以实现靶向药物递送、精准释放、药效延长^[6];功能化的纳米颗粒可以特异靶向光热杀灭特定的病毒^[7]等。这些研究成果为开发抗病毒感染的新型广谱纳米治疗平台拓展了思路。

氧化石墨烯(graphene oxide, GO)是由石墨烯氧化剥离得到^[8],具有锋利边缘带负电荷的单层片状结构,表面带有大量活性氧化基团,包括环氧基、羟基、

羰基和羧基,材料的亲水性和生物相容性提高,易于功能化修饰。此外,GO已被证实具有抗病毒活性,其作用机制主要涉及3个方面:一是GO能通过静电力作用和氧化还原反应吸附和破坏病毒^[9],对一些带正电荷,或者衣壳蛋白富含精氨酸且带正电荷结构域的病毒具有抗病毒活性^[10];二是GO具有锋利边缘的单层结构,可直接对病毒造成物理破坏,如Ye等^[5]以PEDV和PRV为病毒模型,证实了GO具有广谱抗病毒的活性且效果显著,并指出GO的抗病毒活性可能取决于其特殊的具有锋利边缘的单层结构和表面电荷;三是GO还具有优异的光催化活性,能够增强ROS的生产,从而直接作用于捕获的病毒,表现出良好的抗病毒效果。Hu等^[11]利用GO的光催化特性,制备石墨烯-适配体纳米片捕获并杀死噬菌体,证实了GO光催化活性的抗病毒作用。

二氧化锰纳米片(MnO_2 nanosheets, MnO_2 NSs)是一种二维片状的功能性纳米材料,具有稳定性好、光学性质优异、比表面积大、生物相容性好等特点^[12]。目前对 MnO_2 NSs的研究主要集中在催化、电池以及生物医学领域的生物传感器、药物输送控

收稿日期: 2023-11-02

基金项目:国家自然科学基金项目(31902304)

李星星, E-mail: Lxx0202028@163.com

通信作者: 杜欣军, E-mail: xjdu@tust.edu.cn

释以及生物成像等方面,但MnO₂对食源性致病菌和动物源性病原体的抑制作用研究较少。本研究将GO与MnO₂ NSs复合,保留了2种原材料的本身特性,以期产生协同增效的抗病毒效果,为抗动物源性病毒新型材料的研发提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

氯化锰(AR)、无水乙醇(AR)、甲醇(AR),购于天津市百世化工有限公司;单层氧化石墨烯粉末,购于南京先丰纳米材料科技有限公司,4%多聚甲醛(AR),购于国药集团化学试剂有限公司;噻唑蓝(MTT, BR)、牛血清白蛋白(BSA, BR)、脱脂奶粉、总RNA提取试剂、RIPA组织/细胞裂解液、JC-1试剂盒,购于北京索莱宝科技有限公司;四甲基氢氧化铵(AR)、二甲基亚砷(DMSO, AR),购于美国Aladdin公司;FITC-羊抗鼠二抗、HRP-羊抗鼠二抗,购于武汉艾美捷科技有限公司;DMEM培养基(BR),购于美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 GO-MnO₂ NSs的制备

1) 二氧化锰纳米片(MnO₂ NSs)的制备。在剧烈搅拌下,15 s内将10 mL 0.3 mol/L氯化锰(MnCl₂·4H₂O)溶液注入到20 mL含有0.6 mol/L四甲基氢氧化铵和3% H₂O₂的混合水溶液中,溶液立即变成深棕色,表明Mn²⁺被氧化为Mn⁴⁺。将深棕色悬浮液于室温下剧烈搅拌过夜,离心、洗涤、干燥后得到块状MnO₂,利用超声制备MnO₂ NSs,剩余块状MnO₂于常温放置,备用。

2) GO-MnO₂ NSs的制备。参照文献[13]并加以改进合成GO-MnO₂ NSs。将0.2 g单层氧化石墨烯粉末分散于30 mL去离子水中,超声处理20 min,将0.25 mmol MnCl₂·4H₂O在搅拌中慢慢加入,超声处理1 h,用四甲基氢氧化铵溶液调节pH值至8.5。

在上述2种溶液中,快速搅拌下滴加0.55 mL的30% H₂O₂溶液,搅拌30 min后,离心、洗涤,将最终产物烘干,常温放置,备用。

1.3 细胞毒性的测定

将Vero细胞接种到96孔板中,培养至单层后弃去上清液。使用0.22 μm一次性无菌滤膜将GO-MnO₂ NSs过滤除菌,将细胞与不同质量浓度(1 250、625、313、156 μg/mL)的GO-MnO₂ NSs分别培养24、48 h,每孔加入20 μL MTT试剂(5.0 mg/mL),继续培养4 h后弃去上清,加入二甲基亚砷(DMSO)轻

轻振荡使甲瓚完全溶解。用酶标仪测定OD_{490 nm}的吸光值,根据公式(1)计算细胞存活率(cell survival rate, CSR)。根据试验结果选择细胞毒性低的GO-MnO₂ NSs进行后续试验。

$$CSR = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, A_s表示实验孔吸光度(含细胞、培养基、MTT溶液和GO-MnO₂ NSs); A_b表示空白孔吸光度(含培养基、MTT溶液,但不含细胞和GO-MnO₂ NSs); A_c表示对照孔吸光度(含细胞、培养基、MTT溶液,但不含GO-MnO₂ NSs)。

1.4 半数效应浓度(EC₅₀)的测定

EC₅₀是能够抑制50%病毒感染引起的细胞病变的药物有效浓度。将Vero细胞接种到96孔板中,培养至单层后弃去上清液,向100TCID₅₀的PEDV中分别加入625、313、156、78、39 μg/mL GO-MnO₂ NSs,同时设置细胞对照组和病毒对照组。置于37℃ 5%的CO₂培养箱中分别培养至侵染后12、24、36、48 h,在倒置显微镜下观察细胞病变情况,直至细胞病变不再进展,记录并按照Reed-Muench法^[14]计算EC₅₀。

1.5 间接免疫荧光实验

将Vero细胞接到24孔板中,培养至单层,将病毒PEDV与625 μg/mL GO-MnO₂ NSs在4℃预混1 h后加入24孔板中于37℃下培养1 h,同时设置阳性对照组及阴性对照组, PBS冲洗后,用DMEM(补充10 μg/mL胰蛋白酶)分别培养至侵染后12、24、36、48 h。参照文献[15]方法,先用4%多聚甲醛室温固定,用-20℃预冷的甲醇透化,并用5% BSA室温封闭后,加入一抗(抗PEDV N蛋白小鼠单克隆抗体)温育1 h,然后加入二抗(FITC标记的羊抗鼠二抗)温育45 min,最后加入DAPI染料避光染色, PBS冲洗3遍后,使用倒置荧光显微镜对FITC所呈现的绿色荧光和DAPI所呈现的蓝色荧光进行拍摄。

1.6 蛋白免疫印迹(Western blot)实验

将Vero细胞接种到6孔板中,培养至单层,将病毒PEDV与625 μg/mL GO-MnO₂ NSs在4℃预混1 h后加入6孔板中,在37℃下培养1 h,同时设置阳性对照组及阴性对照组,先用PBS冲洗后,加入DMEM(补充10 μg/mL胰蛋白酶)分别培养至侵染后12、24、36、48 h;然后使用150 μL裂解缓冲液收获细胞,通过12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳解析裂解的样品,并将样品转移到PVDF膜上,参照文献[16]的方法,最后使用化学发光成像仪进行显色分析。

1.7 细胞因子表达水平的测定

干扰素刺激基因(ISGs)作为由干扰素(IFNs)诱导表达的基因,在宿主抵抗病毒感染中发挥着重要作用。将Vero细胞接种到24孔板中,培养至单层。每孔加入625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GO-MnO₂ NSs,同时设置细胞对照组,各3个复孔,培养至侵染后24 h,每孔加入1.0 mL的Trizol试剂,通过Trizol法^[16]提取细胞样品的总RNA,采用实时荧光定量PCR检测I型干扰素(*IFN- α* 、*IFN- β*)和干扰素刺激基因(*ISG-20*、*ISG-54*)2种抗病毒因子的表达水平,进而评估GO-MnO₂ NSs对抗病毒因子表达水平的影响。

1.8 活性氧水平的测定

将Vero细胞接种到24孔板中,培养至单层,将病毒PEDV与625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GO-MnO₂ NSs在4 $^{\circ}\text{C}$ 预混1 h后加入24孔板中,同时设置阳性对照组和阴性对照组,37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养1 h,PBS冲洗后,用DMEM(补充10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶)分别培养至侵染后12、24、36、48 h。然后加入10 mmol/L 2',7'-二氯荧光二乙酸酯(DCFH-DA),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色30 min,PBS洗掉多余染料后,通过倒置荧光显微镜观察细菌细胞荧光强度,测定细胞内ROS水平。

1.9 线粒体膜电位的测定

线粒体膜电位的降低常作为细胞凋亡早期的标志。将Vero细胞接种到玻底细胞培养皿中,培养至单层,将PEDV病毒与625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GO-MnO₂ NSs在4 $^{\circ}\text{C}$ 预混1 h后加入24孔板中,同时设置病毒感染组、CCCP阳性对照组和无处理的细胞阴性对照组,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养1 h,PBS冲洗后,用DMEM(补充10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶)进一步培养至侵染后12 h,参照JC-1试剂盒说明进行操作处理,最后用共聚焦激光扫描显微镜观察,以JC-1荧光探针从红色荧光到绿色荧光的转变作为细胞凋亡早期的检测指标。

1.10 数据统计分析

采用完全随机设计,每项试验至少重复3次,结果以“平均值 \pm 标准差”表示。采用 t -检验方法进行数据统计分析。在 $\alpha=0.05$ 水平进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 GO-MnO₂ NSs的透射电子显微镜表征

利用透射电子显微镜(TEM)对GO-MnO₂ NSs的表面形貌进行表征(图1)。MnO₂ NSs与氧化石墨烯薄层之间紧密结合,合成的GO-MnO₂ NSs呈典型的片状二维结构,能提供更多的吸附结合位点。

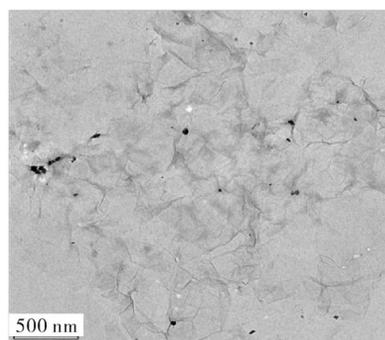


图1 GO-MnO₂ NSs的TEM图

Fig.1 TEM image of GO-MnO₂ NSs

2.2 GO-MnO₂ NSs的XRD表征

通过X射线衍射(XRD)测定GO、MnO₂ NSs和GO-MnO₂ NSs的结晶度,结果见图2。GO在10.76 $^{\circ}$ 处的特征峰对应(111)晶面,MnO₂ NSs在18.42 $^{\circ}$ 、36.62 $^{\circ}$ 和65.22 $^{\circ}$ 处的特征峰分别对应于(101)、(006)和(119)晶面。GO-MnO₂ NSs在10.68 $^{\circ}$ 处出现与GO的(111)晶面对应的特征峰,且在17.96 $^{\circ}$ 、36.12 $^{\circ}$ 、64.7 $^{\circ}$ 处的特征峰分别与MnO₂ NSs的(101)、(006)、(119)晶面对应,证明GO-MnO₂ NSs复合纳米片材料的成功制备。

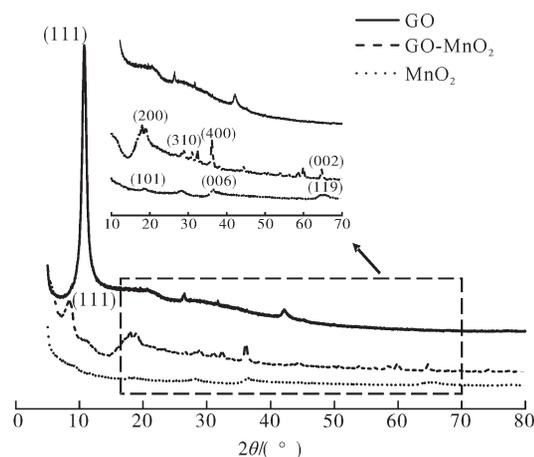


图2 GO-MnO₂ NSs的XRD谱图

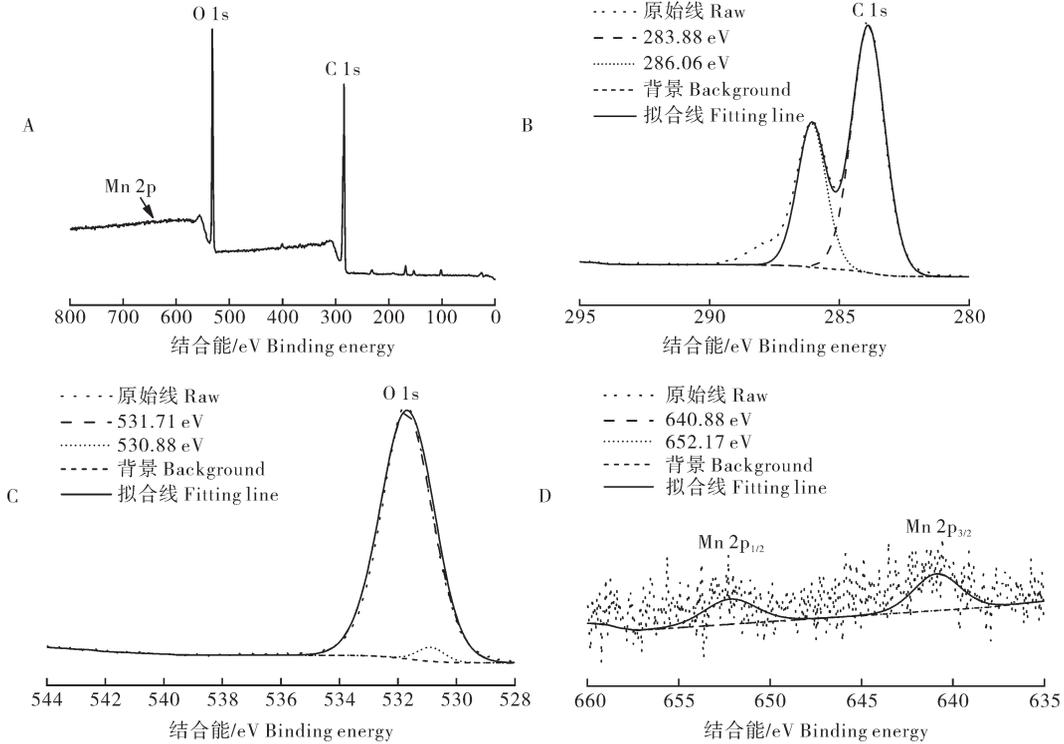
Fig.2 XRD patterns of GO-MnO₂ NSs

2.3 GO-MnO₂ NSs的XPS表征

通过X射线光电子能谱(XPS)光谱测定GO-MnO₂ NSs的元素和表面化学状态。图3A为GO-MnO₂ NSs的XPS总谱图,在284.78、532.59、641.48 eV处有3个峰,分别对应C 1s、O 1s、Mn 2p。图3B为GO-MnO₂ NSs的C 1s光谱,在283.88、286.06 eV处分别归属于C—C键和C—O键。图3C中O 1s光谱中在531.71和530.88 eV处显示出2个拟合峰分别

归属于Mn—O键和O—H键。图3D的Mn 2p光谱中,在结合能640.88和652.17 eV处显示出2个拟合

峰,分别对应Mn 2p_{3/2}、Mn 2p_{1/2}。这些结果均表明GO-MnO₂ NSs的制备完成。



A是GO-MnO₂ NSs的总谱;B、C、D分别对应C 1s、O 1s和Mn 2p的高分辨率谱图。A is overall spectrum of GO-MnO₂ NSs;B,C and D responded to high-resolution spectra of C 1s, O 1s and Mn 2p, respectively.

图3 GO-MnO₂ NSs的XPS谱图

Fig.3 XPS spectra of GO-MnO₂ NSs

2.4 GO-MnO₂ NSs对细胞毒性的影响

采用MTT法测定不同浓度GO-MnO₂ NSs对Vero细胞的细胞毒性的影响,结果见图4。以1 250 μg/mL GO-MnO₂ NSs为最大质量浓度,分别与Vero细胞孵育不同时间后,625 μg/mL GO-MnO₂ NSs细胞存活率均在85%以上,说明此浓度的GO-MnO₂ NSs细胞毒性小,生物相容性良好。因此选用625 μg/mL GO-MnO₂ NSs进行后续试验。

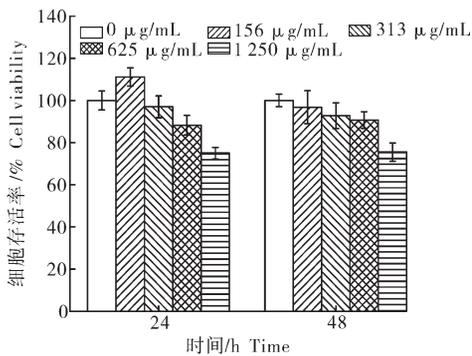


图4 GO-MnO₂ NSs不同处理时间下的细胞存活率

Fig.4 Cell viability by GO-MnO₂ NSs treatment for different time

2.5 GO-MnO₂ NSs的半数效应浓度(EC₅₀)

由图5可知,EC₅₀为140 μg/mL,即GO-MnO₂ NSs为140 μg/mL时已经能够抑制半数病毒感染引起的细胞病变效应,表明采用625 μg/mL GO-MnO₂ NSs能够有效抑制PEDV引起的细胞病变。

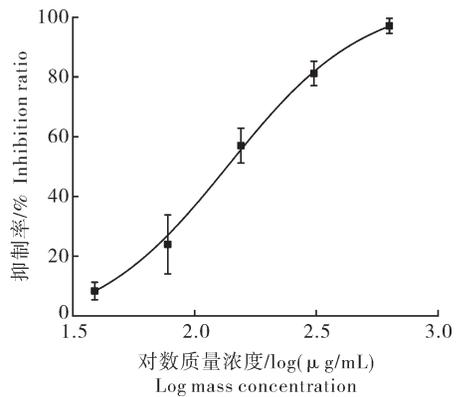


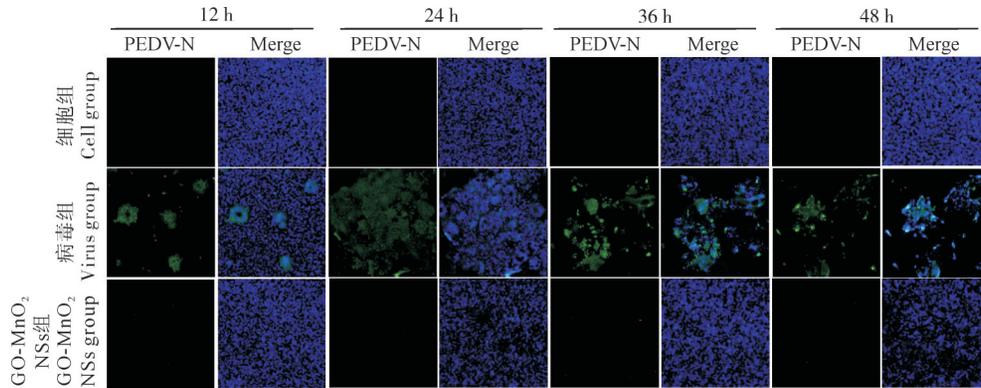
图5 GO-MnO₂ NSs的EC₅₀分级剂量反应曲线 (EC₅₀=140 μg/mL)

Fig.5 The EC₅₀ graded dose response curve GO-MnO₂ NS(EC₅₀=140 μg/mL)

2.6 间接免疫荧光实验结果

不同处理时间的 GO-MnO₂ NSs 间接免疫荧光结果如图 6 所示。由图 6 可见, 与阳性对照组 (PEDV 病毒感染组) 相比, 经 GO-MnO₂ NSs 处理

12、24、36 和 48 h 后, 试验组的细胞绿色荧光信号明显降低, 即 PEDV N 蛋白 (FITC-羊抗鼠抗体标记) 的表达量下降, 这说明 GO-MnO₂ NSs 可以抑制病毒感染细胞。



蓝色荧光为活细胞(DAPI染色),绿色荧光为PEDV N蛋白(FITC-羊抗鼠抗体标记)。比例尺:200 μm。Blue is live cells (DAPI staining), green fluorescence is PEDV-N protein (labeled with FITC-goat anti-mouse antibody).Scale bar: 200 μm.

图 6 GO-MnO₂ NSs 不同时间段的间接免疫荧光示意图

Fig.6 Indirect immunofluorescence images of GO-MnO₂ NSs at different time periods

2.7 Western blot 实验结果

Western blot 实验结果如图 7 所示, 与阳性对照组 (PEDV 感染组) 相比, 经过 625 μg/mL GO-MnO₂ NSs 处理后, PEDV N 蛋白的表达量在 12、24、36 和 48 h 均明显下调, 说明 GO-MnO₂ NSs 可以有效抑制病毒的复制, 具有较好的抗病毒活性。

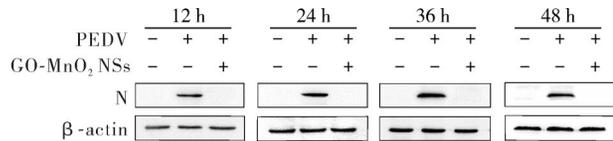
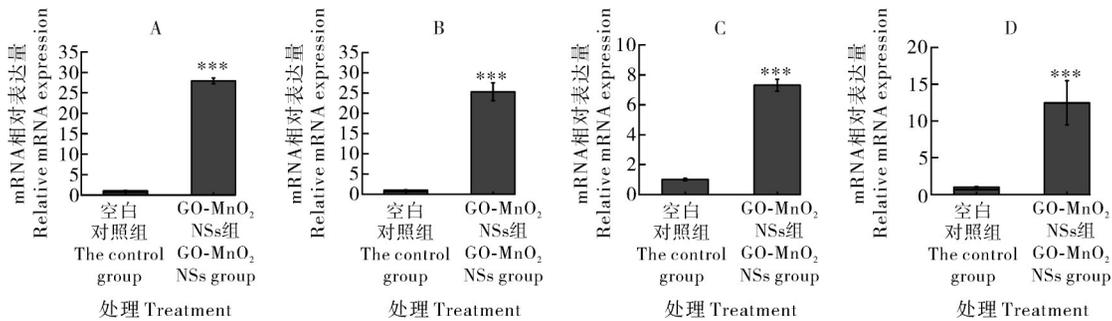


图 7 625 μg/mL GO-MnO₂ NSs 处理后不同感染时间 PEDV N 蛋白的表达水平

调, 表明 GO-MnO₂ NSs 可以通过刺激细胞中 I 型干扰素和干扰素刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs) 的 mRNA 表达水平上调来抑制病毒感染。

2.8 GO-MnO₂ NSs 对抗病毒因子表达的影响

GO-MnO₂ NSs 对抗病毒因子表达的影响如图 8 所示, 与阴性对照组相比, GO-MnO₂ NSs 处理后 IFN-α、IFN-β、ISG-20、ISG-54 的表达水平明显上



A:IFN-α; B:IFN-β; C: ISG-20; D:ISG-54。***,P < 0.001.

图 8 625 μg/mL GO-MnO₂ NSs 处理前后抗病毒因子表达水平

Fig.8 Expression levels of antiviral factors before and after 625 μg/mL GO-MnO₂ NSs treatment

2.9 GO-MnO₂ NSs 对活性氧的影响

病毒侵染后细胞会产生大量的活性氧, 而过量的活性氧 (ROS) 会导致细胞 DNA 的损伤。如图 9 所示, 阳性对照组 (病毒感染组) 绿色荧光明显, 且随着病毒侵染时间加长, 绿色荧光增强。而 GO-MnO₂

NSs 处理组的绿色荧光明显减弱, 说明 GO-MnO₂ NSs 能够抑制 PEDV 感染后引起的 ROS 过量产生。

2.10 GO-MnO₂ NSs 对线粒体膜电位的影响

如图 10 所示, 在没有 GO-MnO₂ NSs 的情况下, PEDV 侵染 Vero 细胞后, 经染色可以观察到强烈的

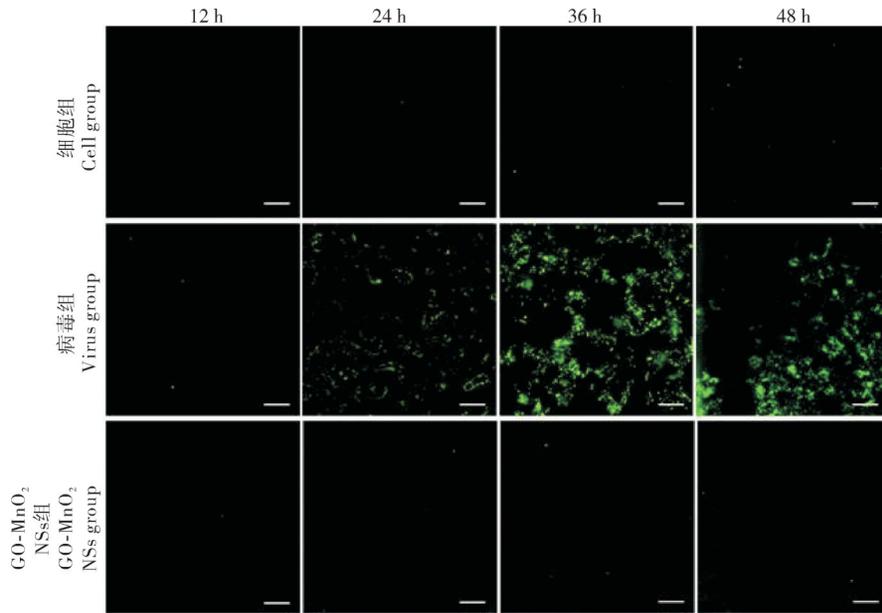


图9 不同时间段GO-MnO₂ NSs处理后活性氧的变化(比例尺:200 μm)

Fig.9 Changes of reactive oxygen species expression levels after GO-MnO₂ NSs treatment at different time periods (scale bar: 200 μm)

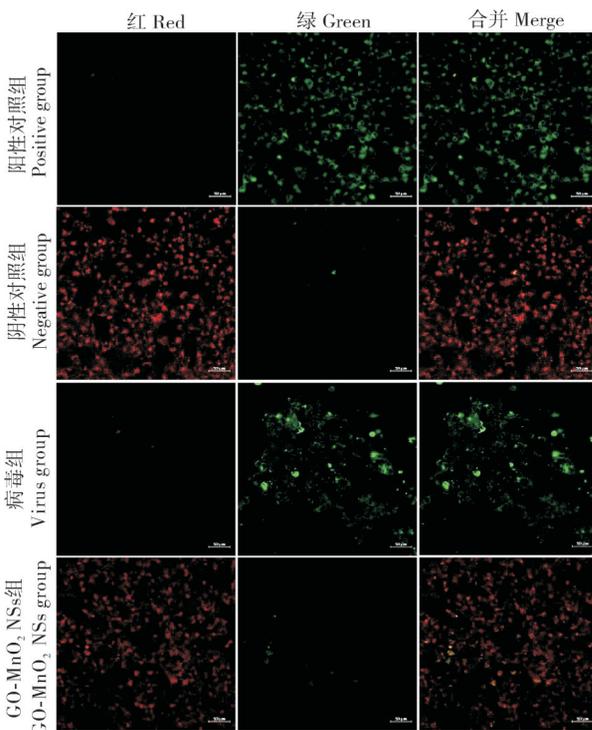


图10 625 μg/mL GO-MnO₂ NSs处理前后线粒体膜电位的变化(比例尺:50 μm)

Fig.10 Changes in mitochondrial membrane potential with and without 625 μg/mL GO-MnO₂ NSs treatment(scale bar: 50 μm)

绿色荧光,表明病毒感染会导致线粒体膜电位下降。而经GO-MnO₂ NSs处理的试验组中绿色荧光明显降低,表明经GO-MnO₂ NSs处理能够减少被感染细

胞的线粒体膜电位降低的情况。以上结果表明GO-MnO₂ NSs能够通过抑制细胞凋亡来减轻PEDV的感染。

3 讨论

近年来,许多功能性纳米颗粒已被证实具有显著的抗病毒作用,如量子点、金/银纳米颗粒、纳米团簇、碳点、氧化石墨烯、硅材料、聚合物和树枝状聚合物^[17]。作为潜在的抗病毒候选物,尽管在抗病毒机制和抑制效果方面存在差异,但这些功能性纳米颗粒具有各自的突出特征。与其他具有不同结构和尺寸的功能材料相比,二维纳米材料凭借超大的比表面积,已成为抗病毒药物递送的优良载体之一。

GO是目前研究最广泛的一种二维纳米材料。本研究采用室温超声法合成GO-MnO₂ NSs二维复合纳米片材料,在XRD表征结果中,GO的(111)晶面与Chaiyakun等^[18]的研究结果一致;MnO₂ NSs的(101)、(006)和(119)晶面与Peng等^[19]的研究结果一致。在XPS的O 1s光谱图中,531.71和530.88 eV处显示出2个拟合峰,可以归因于晶格氧(Mn—O)和表面吸附的氧物种(如O—H)^[20-21]。XRD和XPS的表征结果证实GO-MnO₂ NSs的制备已完成。

病毒侵入宿主后,宿主的先天免疫系统被触发会迅速诱导产生干扰素(IFN),这些干扰素进一步与相应的受体结合,并诱导干扰素刺激基因(ISGs)表

达,从而使细胞产生抗病毒防御^[22]。本文对GO-MnO₂ NSs处理后*IFN-α*、*IFN-β*、*ISG-20*、*ISG-54*的基因表达水平进行研究,结果显示这些基因均明显上调,与已有相关研究中的变化趋势一致^[22],表明GO-MnO₂ NSs能够诱导细胞内干扰素及干扰素刺激基因等抗病毒因子的表达,从而增强细胞对抗病毒侵染的第一道防线作用。

此外,有诸多研究表明石墨烯相关二维材料与细菌、病毒和真菌之间的相互作用可能产生强大的抗菌和抗病毒活性。例如,氧化石墨烯(GO)衍生物已被证实结合单纯疱疹病毒1型(HSV-1)时与细胞表面受体硫酸乙酰肝素竞争^[23];Donskyi等^[24]合成了一系列具有特定聚甘油硫酸酯和脂肪胺官能团的石墨烯衍生物,研究发现当二维纳米片用C6-和C9-烷基链官能化时,其在Vero E6细胞中显示出对HSV-1的有效抑制,且没有任何明显的毒性,这表明可以通过对石墨烯片的控制和官能化来获得针对HSV-1的抗病毒药物。

综上,本研究以PEDV作为冠状病毒的模式病毒,探索了GO-MnO₂ NSs对PEDV的抗病毒活性和抗病毒机制。结果表明,GO-MnO₂ NSs复合纳米材料的生物相容性较好,对PEDV增殖的体外抑制效果显著,可为冠状病毒的防治提供新的思路 and 基础。此外,基于GO和MnO₂ NSs经近红外照射会产生光热的特性,可进一步探究其光热抗病毒活性及实际应用。

参考文献 References

- [1] 王金玉,上官爱哨,孙玉梅,等.*IL20RB*、*ATP6V0A1*和*STX10*基因对PRRSV和PEDV的增殖作用[J].华中农业大学学报,2022,41(2):176-184.WANG J Y, SHANG-GUAN A S, SUN Y M, et al. Effects of *ATP6V0A1*, *IL20RB* and *STX10* gene on proliferation of PRRSV and PEDV [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2022, 41(2): 176-184 (in Chinese with English abstract).
- [2] VLASOVA A N, MARTHALER D, WANG Q H, et al. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013–February 2014 [J]. Emerging infectious diseases, 2014, 20(10): 1620-1628.
- [3] FAWZY M, KHAIRY G M, HESHAM A, et al. Nanoparticles as a novel and promising antiviral platform in veterinary medicine [J]. Archives of virology, 2021, 166(10): 2673-2682.
- [4] VAZQUEZ-MUÑOZ R, BORREGO B, JUÁREZ-MORENO K, et al. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: does the complexity of biological systems matter? [J]. Toxicology letters, 2017, 276: 11-20.
- [5] YE S Y, SHAO K, LI Z H, et al. Antiviral activity of graphene oxide: how sharp edged structure and charge matter [J]. ACS applied materials & interfaces, 2015, 7(38): 21571-21579.
- [6] PATRA J K, DAS G, FRACETO L F, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects [J/OL]. Journal of nanobiotechnology, 2018, 16(1): 71 [2023-11-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30231877>. DOI: 10.1186/s12951-018-0392-8.
- [7] REN M S, ZHOU J J, SONG Z Y, et al. Aptamer and RVG functionalized gold nanorods for targeted photothermal therapy of neurotropic virus infection in the mouse brain [J/OL]. Chemical engineering journal, 2021, 411: 128557 [2023-11-02]. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128557>.
- [8] SALEEM H, HANEEF M, ABBASI H Y. Synthesis route of reduced graphene oxide via thermal reduction of chemically exfoliated graphene oxide [J]. Materials chemistry and physics, 2018, 204: 1-7.
- [9] CHIMENE D, ALGE D L, GAHARWAR A K. Two-dimensional nanomaterials for biomedical applications: emerging trends and future prospects [J]. Advanced materials, 2015, 27(45): 7261-7284.
- [10] REQUIÃO R D, CARNEIRO R L, MOREIRA M H, et al. Viruses with different genome types adopt a similar strategy to pack nucleic acids based on positively charged protein domains [J/OL]. Scientific reports, 2020, 10: 5470 [2023-11-02]. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62328-w>.
- [11] HU X G, LU K C, MU L, et al. Interactions between graphene oxide and plant cells: regulation of cell morphology, uptake, organelle damage, oxidative effects and metabolic disorders [J]. Carbon, 2014, 80: 665-676.
- [12] WU M Y, HOU P F, DONG L N, et al. Manganese dioxide nanosheets: from preparation to biomedical applications [J]. International journal of nanomedicine, 2019, 14: 4781-4800.
- [13] XIA P F, ZHU B C, CHENG B, et al. 2D/2D g-C₃N₄/MnO₂ nanocomposite as a direct Z-scheme photocatalyst for enhanced photocatalytic activity [J]. ACS sustainable chemistry & engineering, 2018, 6(1): 965-973.
- [14] DU T, ZHANG J Y, LI C Q, et al. Gold/silver hybrid nanoparticles with enduring inhibition of coronavirus multiplication through multisite mechanisms [J]. Bioconjugate chemistry, 2020, 31(11): 2553-2563.
- [15] 蒋晓菡, 张晓桐, 梁建功, 等. DDM-BSA 复合纳米材料的制备及对猪繁殖与呼吸综合征病毒增殖的抑制 [J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(3): 82-88. JIANG X H, ZHANG X T, LIANG J G, et al. Synthesis of DDM-BSA composite nanomaterials and inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(3): 82-88 (in Chinese with English abstract).
- [16] 陶叶杏, 余倩, 刘瑞婷, 等. 广陈皮中黄酮类化合物提取物对

- t*-BHP 诱导 HepG2 细胞氧化损伤保护作用机制[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(5): 161-168. TAO Y X, YU Q, LIU R T, et al. Protective mechanism of flavonoids extracts from *Pericarpium Citri reticulatae* 'Chachi' on *t*-BHP-induced oxidative damage in HepG2 cells[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2022, 41(5): 161-168 (in Chinese with English abstract).
- [17] LU C, LIANG J. An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents [J/OL]. Materials science & engineering C, 2020, 112(2020): 110924 [2023-11-02]. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110924>.
- [18] CHAIYAKUN S, WITIT-ANUN N, NUNTAWONG N, et al. Preparation and characterization of graphene oxide nanosheets[J]. Procedia engineering, 2012, 32: 759-764.
- [19] PENG L L, PENG X, LIU B R, et al. Ultrathin two-dimensional MnO₂/graphene hybrid nanostructures for high-performance, flexible planar supercapacitors[J]. Nano letters, 2013, 13(5): 2151-2157.
- [20] SINHA A K, PRADHAN M, PAL T. Morphological evolution of two-dimensional MnO₂ nanosheets and their shape transformation to one-dimensional ultralong MnO₂ nanowires for robust catalytic activity[J]. The journal of physical chemistry C, 2013, 117(45): 23976-23986.
- [21] WEI W F, CUI X W, CHEN W X, et al. Phase-controlled synthesis of MnO₂ nanocrystals by anodic electrodeposition: implications for high-rate capability electrochemical supercapacitors [J]. The journal of physical chemistry C, 2008, 112(38): 15075-15083.
- [22] SCHOGGINS J W. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis[J]. Current opinion in virology, 2014, 6: 40-46.
- [23] SAMETBAND M, KALT I, GEDANKEN A, et al. Herpes simplex virus type-1 attachment inhibition by functionalized graphene oxide[J]. ACS applied materials & interfaces, 2014, 6(2): 1228-1235.
- [24] DONSKYI I S, AZAB W, CUELLAR-CAMACHO J L, et al. Functionalized nanographene sheets with high antiviral activity through synergistic electrostatic and hydrophobic interactions[J]. Nanoscale, 2019, 11(34): 15804-15809.

Inhibition effect of oxidized graphene based two-dimensional composite nanosheets on porcine epidemic diarrhea virus

LI Xingxing, ZUO Hanqi, LI Chunqiao, DU Ting, DU Xinjun

*National Key Laboratory of Food Nutrition and Safety/College of Food Science and Engineering,
Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China*

Abstract Two-dimensional composite nanosheet materials (GO-MnO₂ NSs) were prepared by combining graphene oxide (GO) with MnO₂ nanosheets (MnO₂ NSs) through π - π stacking force to develop new broad-spectrum nanomaterials for anti-animal borne virus infections. The morphology, structure, crystallinity and element valences of GO-MnO₂ NSs were characterized by TEM, XRD, XPS. The cytotoxicity of GO-MnO₂ NSs was tested by MTT. The results showed that the cell survival rate of 625 μ g/mL GO-MnO₂ NSs exceeded 85%. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was used as a model virus for coronavirus to study the effect of GO-MnO₂ NSs on PEDV infection through concentration for 50% of maximal effect (EC₅₀), indirect immunofluorescence and western blot. The results showed that GO-MnO₂ NSs had significant antiviral activity. It is indicated that GO-MnO₂ NSs can eliminate the overexpression of reactive oxygen species caused by viral infection and inhibit cell apoptosis, while upregulating the expression of antiviral factors including interferon and interferon stimulating genes (ISGs) in cells as well, effectively inhibiting viral infection.

Keywords graphene oxide (GO); MnO₂ nanosheets (MnO₂ NSs); porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); antiviral activity; nano-therapy platform

(责任编辑:赵琳琳)