

纳米银温敏喷雾凝胶的毒性试验研究

陈美婉^{1,3}, 余思琴^{1,2}, 杨志文^{1,2}, 沈飞海¹, 黄芝瑛¹, 吴传斌^{1,2*}

1. 中山大学 药学院, 广东 广州 510006

2. 中山大学 药物制剂工程研究开发中心, 广东 广州 510006

3. 澳门大学 中华医药研究院, 澳门 999078

摘要: **目的** 为确定用于治疗妇女细菌性阴道炎的纳米银温敏喷雾凝胶的安全性, 对其体内外毒性进行研究, 为进一步研发提供依据。**方法** 采用小鼠急性毒性上下法评价纳米银温敏喷雾凝胶的体内毒性。采用倒置显微镜观察细胞的生长状况(定性)和噻唑蓝(MTT)比色法(定量)检测不同质量浓度的纳米银温敏喷雾凝胶对小鼠成纤维细胞 L-929 的体外细胞毒性, 并评价相对增殖率。**结果** 纳米银温敏喷雾凝胶 ig 给药对小鼠半数致死量(LD₅₀) > 5.0 g/kg, 表明纳米银温敏喷雾凝胶的急性毒性较低。纳米银温敏喷雾凝胶质量浓度低于 7.0 µg/mL 时, 对细胞的生长无明显抑制作用, 但随着剂量的加大和作用时间的延长, 对细胞生长的抑制作用越来越明显, 并有一定的剂量依赖趋势, 同时细胞在形态学上也出现了一系列变化。**结论** 纳米银温敏喷雾凝胶无明显毒性。

关键词: 纳米银温敏喷雾凝胶; 上下法; MTT 法; L-929 细胞; 毒性研究

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)03-0174-05

Toxicity of temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles

CHEN Mei-wan^{1,3}, YU Si-qin^{1,2}, YANG Zhi-wen^{1,2}, SHEN Fei-hai¹, HUANG Zhi-ying¹, WU Chuan-bin^{1,2}

1. College of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

2. Research and Development Center of Pharmaceutical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

3. Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macau 999078, China

Abstract: **Objective** To evaluate the toxicity of temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles which was used for the treatment of women bacterial vaginosis. **Methods** The acute toxicity study was conducted using main test of up-and-down procedure. The cytotoxicity of this agent on rat's fibroblast L-929 cells was examined with MTT method. MTT assay was performed to observe the toxicity of temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles in different dose levels and to evaluate the cell proliferation. The morphologic changes of the cells were observed by inverted microscope. **Results** The study demonstrated that LD₅₀ value was above 5 000 mg/kg, which showed low acute toxicity of this gel. No significant inhibitive effect on the growth of L-929 cells was observed from inverted microscopy when the concentration of gel was less than 7.0 µg/mL. With increasing dose levels of temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles and longer interaction time between this agent and L-929 cells, the inhibitive effect on the growth of L-929 cells was increased and showed the tendency of dose dependent. Meanwhile, the morphologic changes of the cells were significant. **Conclusion** No significant toxicity *in vivo* and *in vitro* is found in temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles.

Key words: temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles; up-and-down procedure; MTT assay; L-929 cells; toxicity study

纳米银是伴随着纳米技术和纳米材料研究的兴起应运而生的一种全新的超微尺寸材料, 由于其结构单元尺寸介于宏观物质与微观原子和分子之间, 表现出特别的表面效应、小尺寸效应、量子尺寸效

应和宏观量子隧道效应, 可以轻易地进入病原体^[1], 全面充分接触并攻击病原体, 从而发挥更强的生物效应, 具有安全性高, 抗菌范围广, 持续杀菌时间长等优点^[2]。此外, 纳米银的抗菌性能(尤其是对致

收稿日期: 2011-01-25

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B03070400)

作者简介: 陈美婉(1981—), 女, 博士研究生, 研究方向为缓控释与靶向制剂。Tel: (020)39943117 E-mail: chenmeiwan81@163.com

*通讯作者 吴传斌, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为缓控释与靶向制剂。E-mail: cbwu2000@yahoo.com

病的杆菌、球菌、丝菌的杀灭作用)远远高于传统的银离子杀菌剂(如硝酸银和磺胺嘧啶银)^[3],还可杀死细菌、真菌、支原体和衣原体等致病微生物^[4-5]。

纳米银温敏喷雾凝胶是一种新型的用于治疗妇女细菌性阴道炎的凝胶^[6]。该凝胶是将纳米银室温下以液体方式喷入阴道,在阴道的生理环境下形成半固体状的凝胶,使纳米银均匀分布和持久滞留在阴道的炎症病变部位处,大大延长了药物的作用时间,提高了纳米银的生物利用度,增加了患者的顺应性。纳米银温敏喷雾凝胶具备一定的物理、化学性能,还必须具备良好的生物安全性。本研究通过小鼠急性毒性上下法(up and down procedure, UDP)和体外细胞毒性试验,初步考察了纳米银温敏喷雾凝胶的毒性特征,为其进一步研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品和试剂 纳米银温敏喷雾凝胶由中山大学药学院药剂教研室研制。

RPMI 1640 培养液(美国 GIBCO, 31800-022), 0.25%胰酶消化液(美国 DIFCO), 噻唑蓝(MTT, 美国 Sigma), PBS(武汉博士德, AR0030), 胎牛血清(杭州四季青生物有限公司), 二甲基亚砷(上海金山化工厂)。

1.1.2 实验动物 SPF 级昆明小鼠, 雌性, 体质量 18~22 g, 由中山大学试验动物中心提供, 动物合格证号: SYXK(粤)2007-0081。

1.1.3 实验细胞 小鼠成纤维细胞 L-929 由中山大学药学院赵春顺老师提供。实验用细胞为传代 48 h 生长旺盛的细胞, 用细胞培养液配制为 $1.0 \times 10^6/L$ 的细胞悬液。

1.1.4 实验器材 DG23022 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-tek), 超净工作台(SW—CJ—2FD 型, 苏净集团安泰公司制造), 离心机(德国 Eppendorf), 微量加样器(德国 Eppendorf), 电子分析天平(Mettler tdedo, AB104—S), 二氧化碳培养箱(美国 Thermo, HEPA class 100)

1.2 体内小鼠毒性试验

1.2.1 上下法^[7-8] 受试药纳米银温敏喷雾凝胶使用 5.0 g/kg 开展限度试验。每次给药 1 只动物, 若 48 h 后该动物存活, 第 2 只动物给予高一级剂量, 若 48 h 后该动物死亡, 第 2 只动物给予低一级剂量。当出现在最高剂量下有连续 3 只动物存活, 或在 6

只动物中有 5 只连续发生生死转换等情况时, 停止试验, 用最大可能性法计算 LD₅₀ 值。

1.2.2 观察和记录 给药期间观察动物的中毒症状并记录症状出现、消失的时间及死亡情况。当动物濒临死亡时将其处死, 按中毒死亡统计处理。对试验过程中死亡的动物、因濒死而处死的动物及试验结束时仍存活的动物进行大体解剖。

1.2.3 数据处理 每次的给药剂量及动物结果均输入 AOT425 统计软件, 程序将自动给出试验的终点剂量, 并计算 LD₅₀ 和 95%置信区间。

1.3 体外细胞毒性试验

1.3.1 细胞培养 将小鼠成纤维细胞 L-929 置于 37 ℃、5% CO₂ 空气培养箱内培养, 当细胞生长满培养瓶底面 80%时, 用 0.25%胰蛋白酶消化, 用全培养基制成悬浮液, 细胞密度为 $1.0 \times 10^6/L$ 。

1.3.2 细胞形态学观察 光镜下细胞形态学观察: 纳米银温敏喷雾凝胶溶解于培养基, 作用于 L-929 细胞, 使终质量浓度为 56、28、14、7、3.5 μg/mL, 同时设溶媒对照组。在纳米银温敏喷雾凝胶处理的前后, 采用倒置显微镜观察和比较 L-929 细胞的形态和生长情况并拍照。

细胞形态学分析标准^[9]如下, (1) 无毒: 细胞形态正常, 贴壁生长好, L-929 细胞呈梭形或不规则三角形; (2) 轻微毒性: 细胞贴壁生长好, 但可见少数细胞圆缩, 偶见悬浮死细胞; (3) 中等毒性: 细胞贴壁生长不佳, 细胞圆缩较多, 达 1/3 以上, 见悬浮死细胞; (4) 严重毒性: 细胞基本不贴壁, 90%以上为悬浮死细胞。

1.3.3 噻唑蓝(MTT)比色法^[10] 将制备好的单细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 每组 4 孔, 置于 37 ℃、5% CO₂ 空气培养箱内培养 24 h 后, 吸弃原液, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 加入上述各质量浓度的纳米银温敏喷雾凝胶 100 μL, 空白组加入 100 μL 新鲜培养液, 作用 3 h 后终止培养, 采用 MTT 比色法评价细胞存活能力, 每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后吸弃上清, 每孔加入 200 μL 二甲基亚砷(DMSO), 振荡 10 min 至晶体完全溶解, 置酶标仪上, 在 490 nm 波长下测各孔吸光度(A)值。

1.3.4 不同质量浓度的纳米银温敏喷雾凝胶对细胞的毒性作用 依“1.3.3”项下方法进行试验, 加入不同质量浓度纳米银温敏喷雾凝胶(56、28、14、7、3.5 μg/mL), 同时设溶媒对照组, 考察不同质量浓

度的纳米银温敏喷雾凝胶对细胞的毒性作用。

1.3.5 纳米银温敏喷雾凝胶对细胞作用不同时间的毒性作用 依“1.3.3”项下方法进行试验,作用时间分别为 3、6、12 h,考察纳米银温敏喷雾凝胶对细胞作用不同时间的毒性作用。

1.3.6 纳米银温敏喷雾凝胶对不同接种密度细胞的活性影响 依“1.3.3”项下方法进行试验,细胞接种密度分别为 0.5×10^6 、 1×10^6 、 2×10^6 /L,考察纳米银温敏喷雾凝胶对不同接种密度细胞的活性影响。

1.3.7 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS13.0 统计软件处理。经方差齐性检验后,方差齐同的采用 Bonferroni 法,方差不齐用 Tamhane's 法,以检验各组间差异的显著性;若差异有显著意义再做两两比较。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 体内小鼠毒性试验

采用上下法检测纳米银温敏喷雾凝胶的急性毒性。其体内急性毒性试验最高剂量已达 5.0 g/kg,给药后实验小鼠均无死亡现象,也未观察到明显的毒性症状。统计分析显示,纳米银温敏喷雾凝胶对小鼠的 $LD_{50} > 5.0$ g/kg。表明纳米银温敏喷雾凝胶的急性毒性较低。

2.2 细胞形态学观察

细胞与不同质量浓度纳米银温敏喷雾凝胶接触 3 h 后,用倒置显微镜经观察各组细胞的生长情况,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,3.5、7.0 $\mu\text{g/mL}$ 纳米银温敏喷雾凝胶组与溶媒对照组相比,细胞都呈贴壁良好生长、形态正常,胞质向外伸出长短不一的突起,主要呈梭形或不规则三角形。随着纳米银温敏喷雾凝胶质量浓度的增加,14、28、56 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞逐渐出现胞体肿胀、变圆、结构不清,最终细胞呈悬浮而坏死。

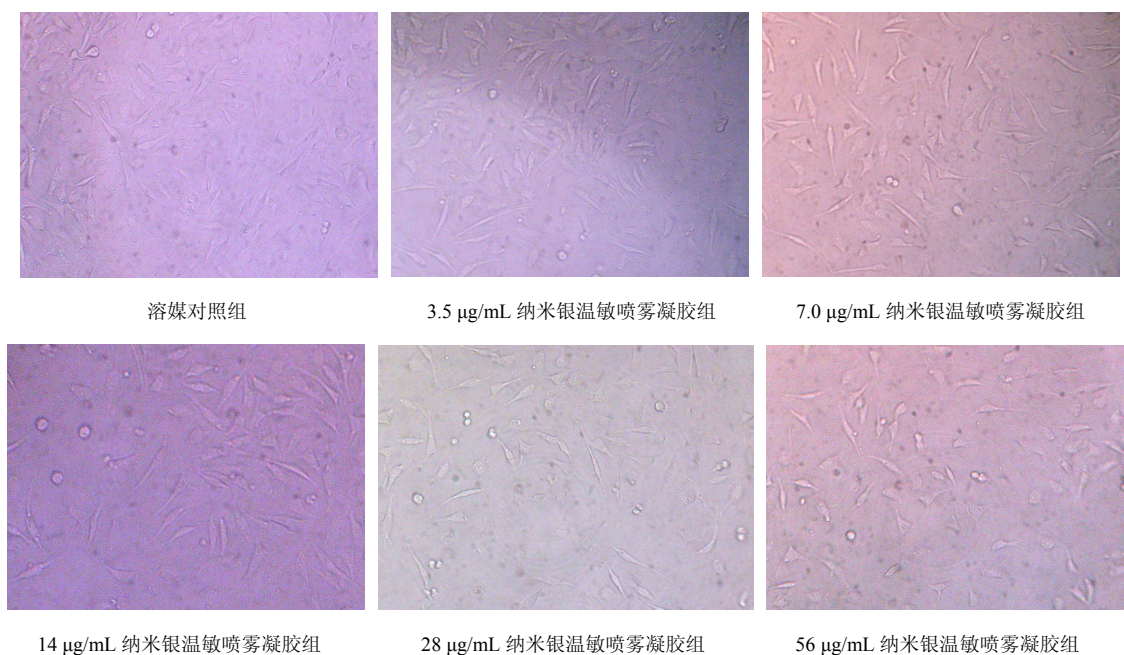


图 1 不同质量浓度纳米银温敏喷雾凝胶对 L-929 细胞的作用

Fig. 1 Morphology of temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles to L-929 cell at different concentrations

2.3 MTT 实验结果

2.3.1 不同质量浓度纳米银温敏喷雾凝胶对细胞的毒性作用 3.5、7.0 $\mu\text{g/mL}$ 纳米银温敏喷雾凝胶组培养 3 h 后,吸光度与溶媒对照组相比不存在显著性差异 ($P > 0.05$),对细胞活性没有影响;而高于 7.0 $\mu\text{g/mL}$ 的纳米银温敏喷雾凝胶组同对照组比较,差异具有统计学意义,且这 3 组之间差异显著

($P < 0.05$),显示对细胞有毒性作用(图 2)。

2.3.2 纳米银温敏喷雾凝胶对细胞作用不同时间的毒性作用 结果见表 1,方差分析表明,在细胞密度相同的情况下,药物浓度同药物作用时间之间存在交互作用(交互项 $F=68.807$, $P < 0.001$),即在药物作用不同时间之后,药物浓度与被测指标之间的关系有差异。进一步做简单效应分析,结果表明,

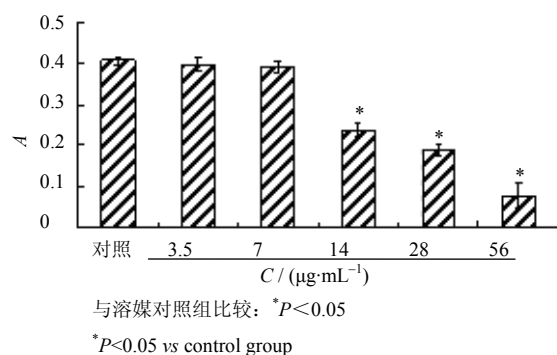


图2 不同质量浓度的纳米银温敏喷雾凝胶对 L-929 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effect of temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles at different concentrations on L-929 cell ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表1 不同孵化时间对 L-929 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effect of temperature-sensitive spray gel containing silver nanoparticles on L-929 cell in different incubation hours ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞活性 (A 值)			F	P
		3 h	6 h	12 h		
溶媒对照	—	0.407 $\pm$ 0.010	0.366 $\pm$ 0.007	0.195 $\pm$ 0.007	297.966	
纳米银温敏喷雾凝胶	3.5	0.398 $\pm$ 0.016	0.360 $\pm$ 0.003	0.189 $\pm$ 0.013	295.311	
	7.0	0.391 $\pm$ 0.014	0.279 $\pm$ 0.013	0.123 $\pm$ 0.008	431.370	
	14.0	0.238 $\pm$ 0.015	0.225 $\pm$ 0.009	0.066 $\pm$ 0.005	219.083	<0.001
	28.0	0.189 $\pm$ 0.016	0.029 $\pm$ 0.005	0.038 $\pm$ 0.022	191.455	
	56.0	0.076 $\pm$ 0.030	0.026 $\pm$ 0.003	0.037 $\pm$ 0.004	16.045	

表2 细胞的接种密度对 L-929 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of cell incubation density on L-929 cell ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞活性 (A 值)			F	P
		$5 \times 10^5 \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \times 10^6 \cdot \text{L}^{-1}$	$2 \times 10^6 \cdot \text{L}^{-1}$		
溶媒对照	—	0.254 $\pm$ 0.012	0.326 $\pm$ 0.010	0.407 $\pm$ 0.010	135.484	
纳米银温敏喷雾凝胶	3.5	0.250 $\pm$ 0.002	0.321 $\pm$ 0.007	0.398 $\pm$ 0.016	125.422	
	7.0	0.136 $\pm$ 0.014	0.240 $\pm$ 0.015	0.391 $\pm$ 0.014	377.688	<0.001
	14.0	0.045 $\pm$ 0.005	0.132 $\pm$ 0.010	0.238 $\pm$ 0.015	214.647	
	28.0	0.040 $\pm$ 0.002	0.069 $\pm$ 0.011	0.189 $\pm$ 0.016	143.501	
	56.0	0.023 $\pm$ 0.006	0.070 $\pm$ 0.014	0.076 $\pm$ 0.030	19.123	

的应用,用于人体之前需要进行一系列生物学性能测试以确保对人体的安全性。笔者研究纳米银温敏喷雾凝胶的毒性试验,旨在为进一步研究提供依据。

上下法由 Dixon 和 Mood 首次提出,1985 年 Bruce 进行了改进,目前是经济合作与发展组织 (OECD) 和美国环境保护局 (EPA) 推荐的方法之一,此方法能够大大节省试验动物,符合全球日益

在每一个质量浓度下,被测指标在不同时间点之间均存在显著差异 ($P < 0.001$)。

2.3.3 纳米银温敏喷雾凝胶对不同接种密度细胞的活性影响 结果见表 2,方差分析表明,在作用时间相同的情况下,药物浓度同细胞密度之间存在交互作用 (交互项 $F = 29.022$, $P < 0.001$),即在不同细胞密度下,药物质量浓度与被测指标之间的关系有差异。进一步做简单效应分析,结果表明,在每一个质量浓度下,被测指标在不同细胞密度组之间均存在显著差异 ($P < 0.001$)。

3 讨论

纳米银无机抗菌剂是近年来受到学者们关注的新型抗菌剂,研制为温敏喷雾新剂型有着更为广泛

重视的动物保护原则,是经典急性毒性试验的一种很好的替代方法。与传统的急性毒性试验方法相比,上下法具有很多明显的优点,主要表现在以下几方面^[11]: 1) 符合维护动物福利的要求; 2) 能够得到 LD₅₀ 的估计值及相应的置信区间; 3) 能够观察毒性表现; 4) 所需的受试物量少; 5) 应用计算机程序进行数据分析,实用性强。该方法分为限度试验

和主实验。限度试验主要用于有资料提示受试物可能没有毒性的情况。根据相关文献报告, 本实验选用试验剂量为 5.0 g/kg 进行限度试验。

细胞毒性试验是一类在离体状态下模拟生物生长环境、检测医疗器械和材料接触机体组织后生物学反应的体外试验, 它可在短期内简便地显示试样对细胞新陈代谢的影响, 是生物安全性实验中较为便捷、客观的实验方法, 费用较低, 是生物学评价实验中的首选项目, 几乎是各种医疗器械和医用材料临床应用前的必选项目, 可作为新材料开发时的筛选实验^[9,12-13]。目前国内外常用的细胞毒性检测方法较多, 如琼脂覆盖法、细胞相对增殖率法、MTT 法等。由于 MTT 法是反映细胞活性最灵敏的指标之一, 结果客观且重复性好^[14], 所以本项实验采用该方法进行体外细胞毒性检测。

本实验对纳米银温敏喷雾凝胶的体内外毒性进行了比较研究, 结果显示, 纳米银温敏喷雾凝胶对小鼠 $LD_{50} > 5.0$ g/kg, 其急性毒性较低。当纳米银温敏喷雾凝胶的质量浓度低于 7.0 $\mu\text{g/mL}$, 其对细胞的生长无明显抑制作用, 无明显毒性, 生物安全性较好, 初步具备人体应用的生物安全性条件, 为进一步深入考察该新剂型的生物相容性研究打下基础。

参考文献

- [1] 张媛媛, 孙 皎. 纳米银作为抗菌材料的生物安全性研究进展 [J]. 中国医疗器械杂志, 2007, 31(1): 36-39.
- [2] 王冬梅, 莫遗盛, 江晓筠. 纳米银临床应用研究进展 [J]. 中国药房, 2007, 18(5): 386-387.
- [3] 张文钰, 王广文. 纳米银抗菌材料研发现状 [J]. 化工新型材料, 2003, 31(2): 42-44.
- [4] 冯乃谦, 严建华, 瞿 凡, 等. 无机抗菌剂、抗菌制品及其测试方法 [J]. 中华预防医学杂志, 1998, 32(5): 315-316.
- [5] 张 宇, 葛存旺, 虞 伟, 等. 无机纳米抗菌剂用于医用无菌纱布的研究 [J]. 东南大学学报, 2001, 31(2): 11-12.
- [6] 陈美婉, 韩 珂, 刘 阳, 等. 纳米银温敏凝胶的制备及质量控制 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(21): 1843-1845.
- [7] *Acute Oral Toxicity Up-and-Down Procedure. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals*, 425 [S]. 2001.
- [8] SFDA. 化学药物急性毒性试验技术指导原则 [S]. GPT1-1. 2005.
- [9] 郝和平. 医疗器械生物学评价标准实施指南 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 100-110.
- [10] Momann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Meth*, 1983, 65: 55.
- [11] 李 佳, 金 晶, 黄芝瑛, 上下法在急性毒性试验中的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18, (6): 70-72.
- [12] 陈有根, 张丽芳, 刘育辰, 等. 桃儿七化学成分和细胞毒性研究 [J]. 中草药, 2010, 41, (10): 1619-1622.
- [13] 何 华, 葛志伟, 刘 雳, 等. 甘草黄酮对阿霉素细胞毒性的影响及其构效关系研究 [J]. 中草药, 2010, 41, (6): 941-945.
- [14] Mockers O, Deroze D, Camp S J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires *in vitro* [J]. *Dent Mater*, 2002, 18 (4): 311-317.

郑重声明

天津**中草药**杂志社(出版《**中草药**》、Chinese Herbal Medicines (CHM, **中草药**英文版)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊)未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议, 凡是以天津**中草药**杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动, 均严重侵害了天津**中草药**杂志社的合法权益, 天津**中草药**杂志社将保留对其采取法律行动的权利, 特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津**中草药**杂志社门户网站“www.中草药杂志社.中国或www.tiprpress.com”, 切勿上当受骗; 若发现假冒天津**中草药**杂志社及所属期刊的情况, 请检举揭发。

电话: 022-27474913 E-mail: zcy@tiprpress.com

天津**中草药**杂志社