

# 纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管的细胞毒性评价\*\*

翟军红<sup>1</sup>, 郭云童<sup>1</sup>, 刘春<sup>1</sup>, 张利<sup>1</sup>, 张雁钢<sup>1</sup>, 张进<sup>2</sup>

## Cytotoxicity evaluation of nano-Ag-SiO<sub>2</sub> urethral catheter

Zhai Jun-hong<sup>1</sup>, Guo Yun-tong<sup>1</sup>, Liu Chun<sup>1</sup>, Zhang Li<sup>1</sup>, Zhang Yan-gang<sup>1</sup>, Zhang Jin<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Antibacterial activated nano-Ag-SiO<sub>2</sub> urethral catheter can reduce the incidence of catheter-associated urinary tract infections obviously. Because of diversification of physical and chemical properties, security should be re-evaluated.

**OBJECTIVE:** Based on comparison of nano-Ag-SiO<sub>2</sub> urethral catheter and ordinary urethral catheter extracts on *in vitro* activity of rabbit epithelial cells, to perform a preliminary evaluation of nano-Ag-SiO<sub>2</sub> urethral catheter biological safety.

**METHODS:** Mechanical separation and enzymatic digestion were used to isolate and culture rabbit urothelial cells to make cell suspension after *in vitro* proliferation. The medium was replaced by immersion nano-Ag-SiO<sub>2</sub> and general catheter tube medium. MTT assay was performed to quantify two extracts and detect *in vitro* cytotoxicity of rabbit urethra epithelial cells. Absorbance values of nano-Ag-SiO<sub>2</sub> and general urinary catheter groups were measured by enzyme-linked immunosorbent assay to calculate the relative growth rate, and compare and perform toxicity evaluation.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Nano-Ag-SiO<sub>2</sub> and general anti-infective urinary catheter were slightly toxic. The relative growth rate had no difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). Nano-Ag-SiO<sub>2</sub> urethral catheter effect on cell growth and reproduction is same as that of general urinary catheter, and there is no or low cytotoxicity that is consistent with the biological evaluation standards of medical devices.

Zhai JH, Guo YT, Liu C, Zhang L, Zhang YG, Zhang J. Cytotoxicity evaluation of nano-Ag-SiO<sub>2</sub> urethral catheter. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(29):5371-5374. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

### 摘要

**背景:** 具有抗菌活性的纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管可有效降低普通医用导尿管相关性尿路感染的发生率, 其物理、化学性质发生很大变化, 所以对其安全性需重新评价。

**目的:** 比较纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管和普通医用导尿管浸提液对兔尿道上皮细胞的体外细胞活性影响, 初步评价纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管的生物安全性。

**方法:** 应用机械分离与酶消化法分离培养兔尿道上皮细胞, 在体外行扩增后制成细胞悬液, 将培养液更换为浸泡纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管及普通导尿管的培养液, 采取四甲基偶氮唑盐比色法量化两组浸提液对兔尿道上皮细胞的体外细胞毒性。用酶联免疫检测仪分别测定两组体外细胞的吸光度值, 并计算其相对增殖率(RGR), 进行毒性评价及比较。

**结果与结论:** 纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管和普通医用导尿管均毒性轻微。纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管与普通医用导尿管相对增殖率均数间差别无显著性意义( $P > 0.05$ )。结果表明, 纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管对细胞的生长繁殖同普通医用导尿管一样影响轻微, 无(或)低细胞毒性, 符合医疗器械生物学评价标准要求。

**关键字:** 纳米Ag-SiO<sub>2</sub>; 尿道上皮细胞; 导尿管; 四甲基偶氮唑盐; 安全性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.29.013

翟军红, 郭云童, 刘春, 张利, 张雁钢, 张进. 纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管的细胞毒性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(29):5371-5374. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

## 0 引言

导尿管作为临床一种常见的诊治措施, 长期留置, 几乎100%的患者会发生泌尿系感染, 具有抗菌活性的纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管可以很好地改变这种现状, 降低长期留置导尿管所发生的导尿管相关性尿路感染(CAUTIs)。

纳米银的尺度很接近银离子, 可以引起相似的毒性, 因此纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管需要通过实验证明其使用的安全性。细胞毒性试验是一类在体外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, 它是医用生物学评价体系中重要检测指标之

一, 几乎是各种医疗器械和医用材料临床应用前的必选项目。由于噻唑蓝比色法较灵敏, 结果客观且重复性好, 所以本实验采用该方法进行体外细胞毒性检测<sup>[1]</sup>。研究纳米载银无机抗菌剂对人体的生物安全性, 是其作为纳米银导尿管应用的前提。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察。

**时间及地点:** 实验于2009-10/2010-04在山西医科大学完成。

**材料:**

**实验动物:** 3月龄的家兔3只用于提取尿道上

<sup>1</sup>First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; <sup>2</sup>Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Zhai Jun-hong★, Master, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Liu Chun, Chief physician, Master's supervisor, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
sxtlyluchun@126.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Shanxi Province, No. 2006011119\*

Received: 2010-12-06  
Accepted: 2011-02-20

<sup>1</sup>山西医科大学第一医院, 山西省太原市 030001; <sup>2</sup>山西医科大学, 山西省太原市 030001

翟军红★, 男, 1982年生, 山西省长治市人, 汉族, 2010年山西医科大学毕业, 硕士, 主要从事泌尿系感染的研究。

通讯作者: 刘春, 主任医师, 硕士生导师, 山西医科大学第一医院, 山西省太原市 030001  
sxtlyluchun@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2011)29-05371-04

收稿日期: 2010-12-06  
修回日期: 2011-02-20  
(20101206020/W·W)

皮细胞, 由山西医科大学动物实验中心提供。

试剂与仪器:

材料及试剂	来源
纳米 Ag-SiO <sub>2</sub> 导尿管	太原理工大学材料学院
普通医用导尿管:	美国 hyclone 公司
DMEM/F12 培养基	
胎牛血清	杭州四季青生物试剂公司
胰岛素 5 mg/L、EGF 20 μg/L	美国 Sigma 公司
混合消化酶(1.25 g/L 胰蛋白酶与 0.2 g/L 乙二胺四乙酸等体积混合)、	
Dispase II 酶	
氢化可的松 0.8 mg/L	上海化学试剂站分装厂
MTT 试剂盒	南京凯基生物科技发展有限公司
二甲基亚砜	上海化学试剂厂

实验方法:

分组: 实验组采用纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管浸提液培养; 对照组采用普通医用导尿管浸提液培养; 空白组采用混合培养液培养。

混合培养液的配制: 以DMEM/F12(1:1)为基础培养基, 添加体积分数10%的优质胎牛血清, 20 μg/L的EGF, 5 mg/L, 胰岛素, 0.8 mg/L氢化可的松, 100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素, 0.22 μm滤膜过滤除菌, pH调至7.2。

浸提液的制备: 根据《医疗器械生物学评价第12部分: 样品制备与参照样品》规定<sup>[2]</sup>, 将纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管和普通医用导尿管分别随机截取2 cm, 按照6 cm<sup>2</sup>/mL的比例加入混合培养液, 在(37±1) °C, 体积分数5%的CO<sub>2</sub>环境中浸提24 h, 所得浸提液用于细胞毒性实验。

免尿道上皮细胞的制备: 麻醉家兔, 剪取0.4 cm×0.3 cm尿道黏膜组织块, 迅速放入盛有青霉素和链霉素的D-Hank's液漂洗黏膜组织两三遍, 浸入2.4 U/mL Dispase II 工作液, 静置消化30 min。分离上皮层与真皮层, 并将上皮层充分剪碎。以混合消化酶振荡消化15~20 min, 加适量D-hank's液, 以1 000 r/min低速离心5 min, 弃去离心液, 加适量D-hank's液, 用吸管吹打成单细胞悬液后以200目尼龙纱中过滤, 接种于24孔培养板内, 加DMEM/F12培养液, 以差速贴壁法排除成纤维细胞等混杂细胞。在37 °C温度下培养于体积分数5%的CO<sub>2</sub>恒温孵育箱, 2 d换液1次, 细胞生长、增殖至70%~80%融合时予以1:3传代继续培养。在培养过程中, 以倒置显微镜观察细胞纯度、形态、生长状况等, 根据实际情况实时采取差速贴壁等方法纯化培养出的上皮细胞。

细胞接种: 将配制好的1×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>细胞悬液接种于96孔培养板的第2~4列, 每列8孔, 每孔200 μL。将200 μL培养液加至第1~5列的8个孔中。置体积分数为5%CO<sub>2</sub>

培养箱37 °C培养24 h, 使细胞贴壁。去除第1~5列各孔中的培养液, 第2列加入200 μL新鲜配制的培养液, 第3列和第4列分别加入200 μL纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管及普通医用导尿管浸提液, 继续培养5 d。

尿道上皮细胞的分离培养及鉴定: 细胞贴壁前为体积较小的圆形或类圆形, 胞质均匀、透亮, 轮廓光滑、清晰。接种6~8 h, 部分细胞贴壁; 12~24 h, 大部分细胞贴壁, 细胞突起逐渐伸展, 胞核清晰, 体积扁平变大, 为伸展前的两三倍, 部分原始细胞形态似“煎鸡蛋”样形态; 3~5 d, 细胞增殖, 数量增多, 核分裂相多见, 逐渐生长融合成片, 如铺路石状, 大小均一。细胞生长、增殖至80%融合时传代, 所传第2~4代细胞形态良好, 与原代培养无明显区别。

尿道上皮细胞活性的检测: 去除含有细胞的孔中的培养液, 加200 μL新鲜培养液, 在第2~4列各孔中各加入50 μL MTT。于37 °C环境中温育4 h。弃去孔中的培养液和MTT, 在第2~4列的所有孔中各加入200 μL二甲基亚砜, 轻轻震荡10~15 min。然后318MC型全自动酶标仪在490 nm测定各组吸光度值(A), 并记录。计算各试样的细胞相对增殖率(relative growth rate RGR)并评价各浸提液的细胞毒性分级。

$$RGR = \frac{\text{实验组}A}{\text{阴性对照组}A} \times 100\%$$

根据 RGR值按以下评分标准对材料评定毒性程度: 1级 RGR>100%; 2级 RGR75%~99%; 3级 RGR50%~74%; 4级 RGR25%~49%; 5级 RGR 1%~24%。

结果评价: 实验结果为0或1级, 为合格; 实验结果为2级, 应结合细胞形态分析综合评价; 实验结果为3~5级, 为不合格。

主要观察指标: 细胞形态、吸光度值、细胞相对增殖率及毒性。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验组与对照组细胞相对增殖率均数间比较采用t 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 添加纳米Ag-SiO<sub>2</sub>抗感染导尿管浸提液后, 细胞增殖良好, 数量增多, 核分裂相多见, 逐渐生长融合成片, 如铺路石状, 大小均一。见图1。

2.2 细胞毒性结果评价 纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管组浸提液细胞毒性为1级, 其细胞相对增殖率为93.6%~104.6%, 普通医用导尿管组浸提液细胞毒性均为0级, 其细胞相对增殖率为97.4%~106%; 纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿

管和普通医用导尿管毒性均轻微。纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管与普通医用导尿管相对增殖率均数间的差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。各组体外细胞吸光度值见表1。各组尿道上皮细胞相对增殖率及毒性分级见表2。

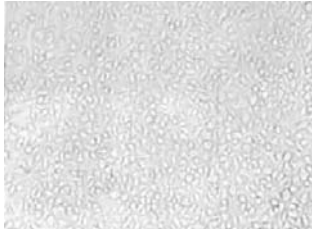


Figure 1 Primary epithelial cells of rabbit urethra was typically showed cobblestone-like (Inverted microscope,  $\times 100$ )

图1 原代兔尿道上皮细胞, 呈典型铺路石状外观(倒置显微镜,  $\times 100$ )

表1 各组体外细胞吸光度值  
Table 1 The absorbance value of the cells *in vitro* in different group ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Group	Absorbance value(A)
Blank	0.115 $\pm$ 0.008
Experimental	0.114 $\pm$ 0.006
Control	0.117 $\pm$ 0.005

表2 各组尿道上皮细胞相对增殖率及毒性分级  
Table 2 The relative growth ratio (RGR) and toxicity grading of urinary tract epithelial cells in different groups ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Group	RGR (100%)	Toxicity grading
Blank	100	0
Experimental	99.1 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	1
Control	101.7 $\pm$ 4.3	0

<sup>a</sup> $P > 0.05$ , vs. control group

### 3 讨论

关于尿道上皮细胞培养技术, 文献报道较少。本实验根据既往研究报道尝试采用酶消化法成功分离培养兔原代尿道上皮细胞, 得到的活细胞数量较多。倒置显微镜下观察所培养的细胞生长状态良好、增殖较快、为类圆形、大小均一、如铺路石状密集排列、胞核大、符合尿道移行上皮细胞形态特点。

细胞毒性试验的重要性在于能在短期内检出供试品对细胞新陈代谢功能的影响, 对毒性物质具有较大敏感性, 为动物实验的进行与否提供了先决条件<sup>[3-4]</sup>。所以本实验选用细胞毒性实验来初步评价纳米载银抗菌导尿管对生物安全性的影响。为了保证结果的准确性, 实验采

用了尽可能接近材料实际应用条件的浸提方法, 以细胞培养液作为浸提介质, 在接近体温的温度条件下浸提24 h, 浸提比例符合国家标准。采用MTT比色法量化细胞毒性评价是基于MTT所检测的线粒体酶活性是反映细胞活性最灵敏的指标之一, 结果客观且重复性好。

MTT法是目前用于评价材料细胞毒性的常用实验方法, 是一种可以检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲基亚砷能溶解细胞中的甲瓚, 用酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞数量。MTT甲瓚的形成和由其构成的染色浓度取决于活细胞的数量和其新陈代谢强度, 因为MTT只有在活细胞作用下才能转化为使细胞染色的甲瓚, 而死亡细胞对MTT则不起作用, 即无细胞染色发生。因此在一定细胞数范围内, MTT结晶形成的量与细胞数成正比<sup>[5]</sup>。

线粒体在细胞的生命活动中是一个能量供应站, 其数目在细胞生命活动旺盛时增多, 衰退时则减少。线粒体病变被认为是表示细胞受损伤最灵敏的指征。MTT试验法选用线粒体作为其生物学终点, 无疑可以十分灵敏地反映出被测试材料对细胞造成的毒性损害程度。

纳米载银无机抗菌剂是一种新型抗菌剂, 由具有抑菌活性的银离子结合在纳米级载体上构成。使用过程中载体缓释出银离子破坏微生物膜屏障结构、原生质酶活性及DNA分子, 从而起到杀灭微生物的作用<sup>[6-7]</sup>。

纳米级SiO<sub>2</sub>粒径小、比表面积大、表面有大量的悬键和不饱和键, 具有很高的表面活性, 因此被广泛地用作抗菌剂载体。实验用纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管就是把具有抗菌作用的银离子通过特殊技术手段依附在纳米级的SiO<sub>2</sub>载体上制成抗菌剂并把这种抗菌剂被覆于导尿管表面制成的。由于超细纳米级粉体颗粒的特殊的量子效应、小尺寸效应和极大的比表面积特性, 显著提高了整体的抗菌效果, 使抗菌剂耐高温性、粉体细度、分散性和功能效应都得到了充分发挥<sup>[8]</sup>。但是此种抗菌剂的抗菌效果直接与其在材料中的分散性相联系。纳米Ag-SiO<sub>2</sub>是种新型抗菌材料, 临床上尚未见到将这种材料应用于导尿管的相关报道。课题组前期实验表明纳米Ag-SiO<sub>2</sub>抗菌剂体外抑菌作用显著, 制备成纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管后, 体外条件下, 同普通医用导尿管相比较, 抑菌作用显著, 其对金黄色葡萄球菌的抑菌作用要强于大肠杆菌<sup>[9]</sup>。动物实验也表明, 纳米Ag-SiO<sub>2</sub>导尿管具有抗菌性, 可显著减少导尿管相关性尿路感染的发生率<sup>[10]</sup>。

多数学者认为在颗粒尺寸减小到一定程度时, 原本无毒或毒性不强的物质或材料开始出现毒性或毒性明显加强, 而且纳米材料在生物体内可能会出现特殊的代谢产生特殊毒性。因此, 根据常规物质研究所得到的毒理学数据库与安全性评价结果可能并不适用于纳米物质。导

尿管作为与人体紧密接触的材料, 在充分利用纳米 Ag-SiO<sub>2</sub> 抗菌作用的同时也应该警惕其对人体潜在的危害。

本实验结果表明纳米 Ag-SiO<sub>2</sub> 导尿管浸提液对细胞的生长繁殖影响微小, 与普通医用导尿管一样, 细胞毒性均为 0 级或 1 级, 且与普通医用导尿管相对增殖率均数间的差别无显著性意义。

**结论:** 纳米 Ag-SiO<sub>2</sub> 导尿管对细胞的生长繁殖影响轻微, 无或低细胞毒性, 符合医疗器械生物学评价标准要求。

#### 4 参考文献

- [1] Hao HP. Beijing: Zhongguo Biaozhun Chubanshe. 2002. 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, 2002.
- [2] 医疗器械生物学评价, 第 5 部分, 体外细胞毒性实验[S]. GB/T 16886.5-2003.
- [3] Mulligan AM, Wilson M, Knowles JC. Effect of increasing silver content in phosphate-based glasses on biofilms of streptococcus sanguis. J Biomed Mater Res. 2003;67:401-412.
- [4] Alt V, Bechert T, Stein rucke P, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of the nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials. 2004;25(18):4383-4391.
- [5] Su RG, Ai HJ, Zhan DS. Kouqiang Yixue. 2003;23(5):272-275. 苏润刚, 艾红军, 战德松. 义齿磁性固位体中两种不锈钢的细胞毒性研究[J]. 口腔医学, 2003, 23(5):272-275.
- [6] Kawashita M, Toda S, Kim HM, et al. preparation of antibacterial silver-doped silica glass microspheres. J Biomed Mater Res. 2003;66:266-274.
- [7] Mulligan AM, Wilson M, Knowles JC. Effect of increasing silver content in phosphate-based glasses on biofilms of streptococcus sanguis. J Biomed Mater Res. 2003;67:401-412.
- [8] Nel A, Xia T, Moller L, Li Ning. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science. 2006;311:622-627.
- [9] Liu C, Ban HL, Niu M, et al. Zhongguo Yaowu yu Linchuang. 2009; 9(8):777-778. 刘春, 边海龙, 牛梅, 等. 纳米 Ag-SiO<sub>2</sub> 抗感染导尿管体外抑菌性能检测分析[J]. 中国药物与临床, 2009, 9(8):777-778.
- [10] Guo YT, Liu C, Zhang L, Shanxi Yike Daxue Xuebao. 2010;41(7): 609-612. 郭云童, 刘春, 张利. 纳米 Ag-SiO<sub>2</sub> 导尿管在家兔导尿管相关性尿路感染中抗菌性的研究[J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(7):609-612.
- [11] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

#### 来自本文课题的更多信息—

**基金资助:** 山西省自然科学基金资助项目 (2006011119)

**作者贡献:** 通讯作者刘春教授是本项目的主持人, 负责基金项目的设计、实施和指导, 第一、二作者负责实验实施, 其余作者参与实验的协作、数据的收集和分析等工作。项目经山西省科学技术厅基金委员会盲法评估。

**利益冲突:** 本项目已申报国家专利, 未发生任何技术转让和合作研发, 未发生任何经济和社会利益冲突。

**伦理批准:** 本项目所研究的内容尚未进入临床研究阶段, 没有与相关伦理道德冲突的内容。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[11]</sup>。

#### 本文创新性:

**提供证据:** 检索中国重大科技成果数据库、中国科技成果数据库、中国学术会议论文数据库、中国学位论文数据库、纳米材料产品数据库、中文科技期刊数据库、中国期刊全文数据库、中国科技经济新闻数据库、中国生物医学文献数据库、中国专利数据库、国家食品药品监督管理局网、国家科技成果网。检索词: 纳米 Ag-SiO<sub>2</sub>; 抗感染+抗菌; 导尿管。本项目由山西省科学技术情报研究所最终检索, 认定除本项目组成员发表的论文外, 尚未见采用本项目方法制备纳米 Ag-SiO<sub>2</sub> 导尿管的公开文献报道。因而具创新性和先进性。

**创新性说明:** 国内外相似研究应用导尿管表面涂银或覆银方法, 本实验所用纳米 SiO<sub>2</sub> 作为载体, 并充分利用纳米 SiO<sub>2</sub> 的立体晶格结构属性和缓释银离子的作用, 将纳米 Ag-SiO<sub>2</sub> 按照一定的浓度应用于导尿管, 已达到有效、长期、安全的抗菌效果, 为临床减少导尿管相关性尿路感染提供理论依据, 并为新型抗感染导尿管的研发与应用提供实验支持。该技术的理论性、技术性、方法性和应用性在国内外尚属创新, 具有先进性、创新性; 同时, 本项目先期查阅国外文献后, 经山西省科学技术厅鉴定处于国内领先。