

超声波光催化法制备亚微米银胶体及其抑菌特性研究

赵明星^{1,2}, 姚文栋³, 李范珠^{1*}, 张云凤², 张瑜², 董显文⁴(1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.湖州师范学院, 浙江 湖州 313000; 3.浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310018; 4.浙江欧美环境工程有限公司, 浙江 湖州 313000)

摘要: 目的 对亚微米级银材料的遗传毒性、抑菌性能及扩散能力进行研究。方法 在超声波清洗器 and 高压汞灯作用下, 以 AgNO₃ 为银源、PVP 为分散剂, 在水溶液中反应制备银胶体。以 TEM、UV-Vis、XRD 进行表征分析。将胶体银设高、中、低(500, 50, 5 mg·L⁻¹)剂量组、阴性对照组(生理盐水)和阳性对照组(环磷酰胺), 于同一部位(股骨)取材观察小鼠骨髓细胞微核率的变化。以土霉素、氟康唑等为阳性对照, 去离子水为阴性对照, 通过银胶体对痢疾杆菌、伤寒杆菌、大肠杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等 8 种细菌和真菌(白色念珠菌)进行抑菌圈试验, 以常量肉汤稀释法进行 MIC 试验。结果 与阴性对照组相比较, 高、中剂量组的小鼠骨髓细胞微核率明显升高, 而低剂量组微核率无显著性差异, 小鼠骨髓细胞微核率与银胶体浓度存在剂量关系, 结果呈阳性并具有统计学意义, 该银胶体呈现出剂量依赖性的遗传毒性。通过抑菌圈试验发现银胶体抑菌圈更清晰, 抑菌效果更彻底。通过 MIC 试验发现该银胶体对白色念珠菌的最小抑菌浓度为 0.6 mg·L⁻¹, 对白色念珠菌的最小抑菌浓度为 5 mg·L⁻¹。结论 本试验成功制备了粒径均匀的簇状亚微米级银胶体, 其作为抑菌剂, 性质稳定, 扩散性低, 抑菌效果良好, 但口服仍存在遗传毒性, 不宜直接用于体内。

关键词: 亚微米银胶体; 高效抑菌; 遗传毒性; 低扩散性

中图分类号: R944.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)15-1848-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.009

引用本文: 赵明星, 姚文栋, 李范珠, 等. 超声波光催化法制备亚微米银胶体及其抑菌特性研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1848-1855.

Preparation of Submicron Silver Colloid by Ultrasonic Photocatalysis and Its Bacteriostatic Properties

ZHAO Mingxing^{1,2}, YAO Wendong³, LI Fanzhu^{1*}, ZHANG Yunfeng², ZHANG Yu², DONG Xianwen⁴(1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Huzhou University, Huzhou 313000, China; 3.The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310018, China; 4.Zhejiang Omex Environmental Engineering Co., Ltd., Huzhou 313000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the genotoxicity, bacteriostasis and diffusion ability of submicron silver colloid. **METHODS** Under the action of ultrasonic cleaner and high pressure mercury lamp, AgNO₃ was used as silver source and PVP as dispersant to prepare silver colloid in aqueous solution. TEM, UV-Vis, XRD were used for characterization and analysis. Colloidal silver was divided into high, medium and low dose groups(500, 50, 5 mg·L⁻¹), negative control group(stroke-physiological saline solution) and positive control group(cyclophosphamide). The micronucleus rate of bone marrow cells in mice was observed at the same site(femur). With oxytetracycline and fluconazole used as positive control and deionized water as negative control, eight kinds of bacteria and fungi(*Candida albicans*) including *Shigella castellani*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albicans*, *Staphylococcus lemonis* and *Bacillus subtilis* were tested by silver colloid. MIC was performed by constant broth dilution method. **RESULTS** Compared with the negative control group, the micronucleus rate of bone marrow cells in the high and medium dose groups increased significantly, but there was no significant difference in the low dose groups. There was a dose-response relationship between the micronucleus rate of bone marrow cells and the concentration of silver colloid in mice. The results were positive and statistically significant. The silver colloid showed dose-dependent genetic toxicity. The silver colloid bacteriostatic circle was found to be clearer and the bacteriostatic effect was more thorough through the bacteriostatic circle test. MIC test showed that the minimum inhibitory concentration of the silver colloid to *Staphylococcus albicans* was 0.6 mg·L⁻¹, and to *Candida albicans* was 5 mg·L⁻¹. **CONCLUSION** The silver colloid with uniform particle size is successfully prepared. As a bacteriostatic agent, it has stable properties and good bacteriostasis effect. However, it is not suitable for direct use *in vivo* because of its genotoxicity in oral administration.

KEYWORDS: submicron silver colloid; high-efficiency bacteriostasis; genotoxicity; low diffusivity

作者简介: 赵明星, 男, 硕士生, 实验师 Tel: (0572)2321166 E-mail: zhaomingxing@zjhu.edu.cn *通信作者: 李范珠, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)61768130 E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn

纳米银尺寸小、生物穿透性强,具有高效、广谱抗菌能力,对细菌、真菌、病毒都有效,应用广泛^[1-3],但纳米银的安全性存在争议^[4]。体外研究数据表明,银纳米颗粒能通过产生活性氧使DNA损伤、细胞周期阻滞,诱导细胞毒性和基因毒性,最终导致炎症、细胞凋亡和细胞死亡^[5-8]。当前的研究发现纳米银的毒性与其粒径大小有关,且粒径越小毒性越强。Recordati等^[9]对小鼠静脉注射10,40,100 nm纳米银后,发现10 nm纳米银粒子渗透性最强,对机体造成的损伤最大。同时,Park等^[10]对粒径20,80,113 nm的银纳米粒子的细胞毒性、炎症、发育毒性和遗传毒性的影响进行了探讨,发现20 nm的纳米银毒性最大。Silva等^[11]用20,60 nm纳米银对大鼠进行雾化染毒,发现20 nm纳米银引发的肺部炎症最显著。上述研究说明有必要对更大尺寸的纳米银的毒性和抑菌性能进行研究,找到更安全的抑菌剂。目前粒径<100 nm的纳米银的毒性已经有很多报道^[12-15],研究表明银纳米颗粒能够进入血液循环,穿过血脑屏障而造成脑损伤;纳米银能在大脑、肾脏、肺、脾脏、睾丸等部位积累而诱发一系列毒性,如肝肾毒性等;纳米银还有可能迁移到子宫、胎盘和胚胎,从而导致发育毒性。而对尺寸大、穿透力相对较弱的亚微米级银颗粒(1.0~100 μm)的报道还比较少,有望发展成毒性更低的抗菌剂。利用传统还原剂硼氢化钠、水合肼等还原硝酸银制备纳米银反应快,易得到小颗粒纳米银沉淀。本研究采用紫外光照法还原硝酸银制备亚微米银材料,加入聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)做分散剂和保护剂,超声波震荡防止团聚沉淀,通过慢反应得到银胶体大颗粒,最终在水溶液中得到红棕色亚微米级银胶体。用银胶体对小鼠灌胃,通过小鼠骨髓细胞微核率的变化来判断其遗传毒性;通过抑菌圈试验测试了银胶体的扩散性能和广谱抗菌能力;用液体培养基测试其抑菌持久性;由最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)试验测试其抗菌效能。

1 仪器与试剂

Hitachi S-4700 场发射扫描电子显微镜(日本日立);XD-6 型粉末衍射仪(北京谱析仪器有限责任公司);KQ-100B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);QVF135 高压汞灯(上海飞利浦灯具有限公司);Leica 2000 光学显微镜(德国莱卡);

Shimadzu UV-2600 紫外可见分光光度计(日本岛津);HZ-9310K 恒温摇床(常州中诚仪器制造有限公司);SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州净化仪器有限公司)。

硝酸银(批号:20141013)、PVP(批号:20170613)、甲醇(批号:20170816)、盐酸(批号:20170916)、冰乙酸(批号:20170816)、Giemsa(批号:20170511)、磷酸二氢钾(批号:20170509)、磷酸氢二钠(批号:20170403)、氯化钠(批号:20170608)、氯化钾(批号:20171013)、甘油(批号:20170813)、葡萄糖(批号:20170924)、氢氧化钠(批号:20170509)均为分析纯,来自国药集团化学试剂有限公司;环磷酰胺(江苏恒瑞制药股份有限公司,批号:17122021);营养琼脂培养基(生物试剂,杭州微生物试剂有限公司,批号:20180817);酸水解酪蛋白(批号:20180615)、牛肉粉(批号:20180416)、牛肉浸膏(批号:20180616)、蛋白胨(批号:20180413)均为生物试剂,来自北京双旋微生物培养基制品厂;小牛血清(生物试剂,杭州四季青生物有限公司,批号:161013);硫酸链霉素(华北制药股份有限公司,批号:161013);氟康唑(批号:C10406107;含量:98%)、二水合土霉素(批号:C10382214;含量:97%)均来自上海麦克林生化试剂科技有限公司。

试验选用♀♂各半的清洁级昆明小鼠50只,体质量25~30 g,由浙江大学试验动物中心提供,代购自上海杰思捷实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0004;合格证号:20180004005102。饲养环境参考GB14925-2010,室温20~26℃,自由饮水,每笼5只饲养。试验所用菌种分别为大肠杆菌(*Escherichia coli*)、变形杆菌(*Proteus*)、伤寒杆菌(*Salmonella enterica*)、痢疾杆菌(*Shigella castellani*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、柠檬色葡萄球菌(*Staphylococcus citreus*)、白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)、白色念珠菌(*Candida albicans*),由湖州师范学院医学院病原生物与免疫学实验室李小余老师提供。

2 方法

2.1 亚微米银胶体的制备

精密称取AgNO₃ 1.5748 g,加入适量去离子水搅拌溶解,稀释至1 L。取50 mL上述溶液于100 mL烧杯中,加入50 mg PVP作为保护剂及还原剂,超声处理,并用高压汞灯作为紫外光源照

射, 1.5 h 后以氯化钠溶液检验无氯化银沉淀, 反应完全, 得到红棕色银胶体。以福尔哈德法滴定检测胶体中的银浓度, 然后将其按比例稀释, 得到一系列不同浓度的银胶体。

2.2 亚微米银胶的电镜表征

取一滴制备液滴于导电胶带, 晾干, 喷 Pt 处理, 在 Hitachi S-4700 场发射扫描电子显微镜下观察其形态。

2.3 亚微米银胶的紫外表征(UV-Vis)

取含银单质浓度为 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的银胶体, 以去离子水稀释至四分之一, 去离子水为参比, 在紫外可见分光光度计下, 从 300 nm 至 700 nm 以 0.5 nm 为最小单位对其进行光谱扫描。

2.4 亚微米银胶的粉末 X 射线衍射(XRD)表征

将银胶体冷冻干燥, 用丙酮洗涤, 高速离心, 多次重复, 得到干燥粉末。用 XRD 测定样品晶体的分散状态和晶体结构。采用粉末衍射仪, CuK α 射线, 起始角=5, 终止角=80, 步宽=0.02, 波长=1.540 56, Co 靶, 36 kV, 20 mA。

2.5 小鼠微核试验

Giemsa 染液等的制备、磷酸盐缓冲液的配制及动物试验分组、灌胃、阅片等参照国家标准 GB15193.5-2014。给药: 按照国家标准将试验动物 50 只分成高、中、低剂量组和阴性对照组、阳性对照组, 每组 10 只, ♀♂各半。阴性对照组灌胃生理盐水 $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、阳性对照组腹腔注射环磷酰胺 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、高、中、低剂量组分别灌胃 $500, 50, 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 银胶体, 灌胃 $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 每 24 h 给药 1 次, 共给药 2 次。制片: 于末次给药后 6 h 脱颈椎处死小鼠, 于股骨取材, 制片。阅片: 在高倍镜下选取染色良好完整清晰的红细胞群, 在油镜下观察计数红细胞, 并记录嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE)比例, 观察小鼠骨髓细胞微核, 统计小鼠骨髓细胞微核发生率。每只小鼠计数 1 000 个骨髓 PCE, 记录其中微核的出现率(%)和每 200 个红细胞中 PCE/正染红细胞(normochromatic erythrocyte, NCE)比例, 各组微核数据用统计学软件 SPSS 19.0 分析。

2.6 抑菌圈试验(无菌操作)

2.6.1 制备菌悬液 纯化: 从 4 °C 冰箱取出菌种, 进行划线纯化, 细菌和真菌分别用 LB 固体培养基和沙氏培养基。置于 37 °C 恒温培养箱中培养。接种: 用接种环挑取纯化后的单菌落接入液体培养基中震荡培养。细菌、真菌分别采用营养肉汤液

体培养基和 PDA 液体培养基。分别置于 37 °C 恒温摇床中培养 24 h。

2.6.2 制备菌平板 涂布: 移取 100 μL 达到对数生长期的菌悬液, 接种到固体培养基中, 涂布, 晾干。打孔: 用打孔器在培养基上打直径 5 mm 孔, 注意防止培养基破裂, 影响药液扩散, 各孔中心之间相距>25 mm, 与培养皿的周缘相距>15 mm, 打好孔分别标记, 用无菌针头将琼脂孔内的培养基挑出。给药: 取一定量纳米银胶, 细菌试验以四环素类药物土霉素水溶液作为阳性对照, 真菌试验以氟康唑溶液作为阳性对照, 无菌水(经高压灭菌处理的去离子水)作为阴性对照。用移液枪移取 20 μL 抑菌剂注入到孔内, 干燥 5 min, 封口, 置于 37 °C 的恒温培养箱内。测量: 每 24 h 观察菌的生长情况, 并用游标卡尺测量抑菌圈直径, 判断药液对真菌和细菌的抑菌效果并记录^[16]。

2.6.3 MIC 试验 稀释菌悬液: 量取菌悬液加入液体培养基, 校正至 0.5 麦氏比浊标准, 再稀释 100 倍, 此时含菌量约为 $1.5\times 10^6 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。给药: 取试管多只, 采用二倍稀释法依次稀释, 使银胶体浓度从 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 另取 2 支试管, 1 支为阳性对照(细菌采用 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸链霉素、土霉素, 真菌采用 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟康唑), 1 支试管不做任何处理, 作为生长对照。培养: 用硅胶塞子塞住试管口, 将试管置于 37 °C 恒温摇床中培养 24 h 后观察现象。判定: 按照文献方法^[17-18]判定 MIC。

2.6.4 72 h 抑菌试验 参照 MIC 试验方法, 使每只试管中细菌浓度达到约 $1.5\times 10^6 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 分别加入 2 倍梯度不同浓度亚微米银胶体或 2 倍梯度不同浓度阳性对照物, 每 24 h 取 100 μL 培养液, 10 倍梯度稀释, 取 100 μL 制备菌平板。共取样 3 次, 持续 72 h, 并于每次取样后 37 °C 恒温培养 24-48 h 并计数。

3 结果与讨论

3.1 亚微米银胶体表征

该反应中紫外光照射使水发生电离和激发, 生成还原粒子 $\cdot\text{H}$ 自由基和水合电子(e_{aq}^{-})以及氧化性粒子 $\cdot\text{OH}$ 自由基等活性粒子^[19], 还原性粒子将大部分 Ag^+ 离子还原成 Ag 原子, 在超声波作用下, 大分子的 PVP 作为分散剂和保护剂, 多个 Ag 原子团聚成簇, 被 PVP 包覆成核, 生成银胶体, 最终得到胶体呈红棕色, 清澈透亮, 长期放置不易沉淀。超声波主要用来防止生成的纳米银团聚沉淀, 反应完成前, 撤去超声波几分钟后, 溶液中

就出现了黑色沉淀，持续超声作用下沉淀不易出现，反应产物颜色由偏黄棕色向红棕色转变，可见胶体光谱发生了红移，粒径变大。另外，有文献^[20]报道，超声波产生的超声空化效应、声流效应和非线性交变振动效应也能水分子被激活，生成还原粒子·H 自由基和水合电子(e_{aq}⁻)以及氧化性粒子·OH 自由基等活性粒子，对金属 Ag 盐溶液的直接超声作用，也能把 Ag⁺还原为银原子，沉积在胶体颗粒表面。实验中发现单独超声处理反应进行很慢，需要几十小时才能接近完成，证明反应中紫外光辐照起主要作用。如图 1，在紫外可见分光光度计下扫描发现银胶体最大吸收峰在 419 nm，与纳米银的等离子震动吸收峰符合。胶体颗粒 XRD 粉末衍射谱图峰型与峰值与卡片 JCPDS (NO 14-0781)的 111, 200, 220, 311 晶面基本一致，证明反应生成了纳米 Ag 结晶，属多晶结构，见图 2。在 Hitachi S-4700 场发射扫描电子显微镜下观察，银颗粒呈簇状、分散良好，粒径约为 200~300 nm，反应成功制得了亚微米级银胶体，见图 3。

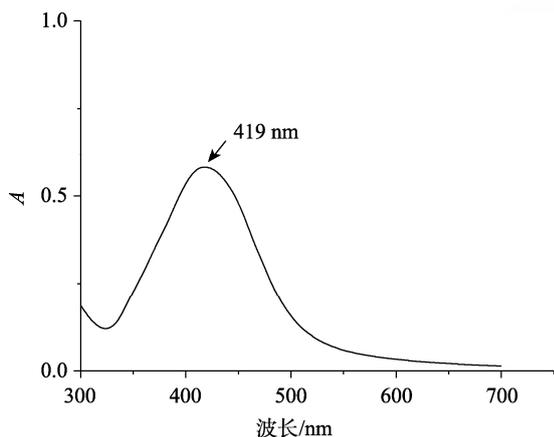


图 1 亚微米银胶体的紫外可见光谱图
Fig. 1 Ultraviolet-visible spectra of submicron silver colloids

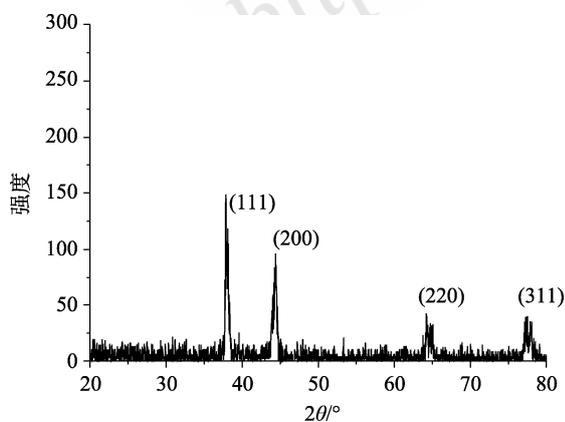


图 2 亚微米银胶体的 X 射线衍射谱图
Fig. 2 X-ray diffraction spectra of submicron silver colloids

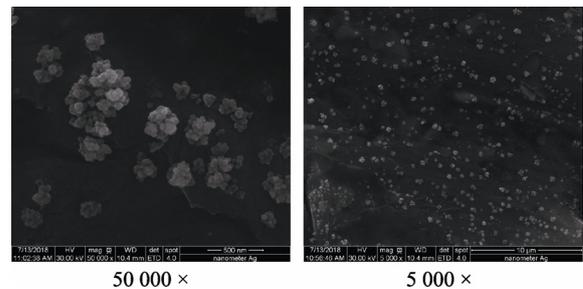


图 3 银颗粒电镜图
Fig. 3 Electron microscopy of silver particles magnified

3.2 小鼠骨髓细胞微核试验

微核(也叫卫星核)是真核类生物细胞中的一种异常结构，是染色体畸变在间期细胞中的一种表现形式。染色体^[21-22]是遗传物质的载体，其超微结构显示染色体是由 DNA 组蛋白高度螺旋化的纤维所组成。每一条染色单体可看作一条双螺旋的 DNA 分子，染色体的损伤就意味着遗传物质的损伤^[23]。由于微核的产生与染色体和 DNA 损伤有较大关系，故常将微核的检出率作为 DNA 损伤的一种指标^[24]。而小鼠微核试验是目前检测化学物质导致染色体损伤方便、快速的方法，是遗传毒理试验常用的细胞遗传学方法之一^[25-26]。目前许多国家(地区)和国际组织都将其视为评价新药、食品添加剂、农药、化妆品等化合物毒理安全性的评价试验之一^[27-28]。

图 4A 是油镜下拍摄的含有 4 个微核的 PCE 细胞，微核颜色较深，边缘光滑，细胞呈灰蓝色。微核指细胞核主核之外的颗粒，由染色体断裂的碎片形成或纺锤丝有丝分裂受影响而形成。图 4B 是油镜下拍摄的 PCE，染色后呈灰蓝色。PCE 的细胞主核已排出，但仍有核糖体，Giemsa 染色后细胞呈灰蓝色。小鼠骨髓细胞 PCE 细胞微核易于辨认且自发率低，适合用来判断染色体损伤诱变剂。NCE 是成熟的红细胞，无细胞核细胞器，Giemsa 染色后细胞呈淡橘红色。图 4C 是油镜下拍摄的 PCE 与 NCE，左上为 PCE，细胞核已排出，残留多个微核，染色后呈灰蓝色，右下为 NCE，呈淡橘红色。

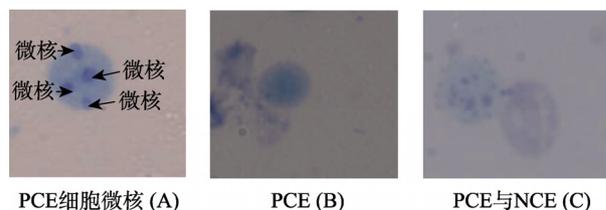


图 4 小鼠骨髓 PCE 细胞微核、PCE 与 NCE
Fig. 4 Micronuclei of PCE, PCE and NCE in bone marrow of mice

小鼠骨髓细胞微核率与灌胃的银胶体中银颗粒的浓度存在正相关性,随着银颗粒质量浓度的增加,小鼠骨髓细胞的微核率变大。低剂量组与阴性对照组比较无显著差异,中、高剂量组小鼠骨髓细胞微核率明显大于阴性对照组,试验结果见表1。各受试剂量组和阳性对照组200个红细胞中见到的PCE与阴性对照组比较,均无统计学意义。可以得出结论,该银胶体呈现出剂量依赖性的遗传毒性,因此,在应用时需注意浓度导致的遗传毒性,慎重选择使用浓度。

3.3 抑菌性能试验

抗生素类药物的广泛使用导致致病菌的耐药株越来越多,耐药谱越来越广,使药物的选择余地也越来越少^[29-30]。纳米银能够破坏细菌细胞膜的磷脂分子,改变细胞膜的通透性,使细菌体内大量的糖和蛋白质流失^[31],具有强杀菌作用。有研究表明^[32],通过进行诱导细胞凋亡试验,发现纳米银粒子能够进入细胞内部,激活细菌的半胱天冬酶蛋白,通过降解DNA来达到抑菌效果。由于纳米银具有广谱高效的杀菌性能,能够使菌丧失繁殖能力,不易产生耐药性^[33],因此被广泛应用于医疗卫生、抑菌消毒等方面。亚微米级银具有类似能力,但报道较少。本试验合成了一种红棕色亚微米银胶体,并对其进行了抑菌圈试验、MIC试验和72h抑菌试验,验证了亚微米银胶体广谱抑菌能力、高效抑菌能力和持久抑菌能力。

3.3.1 亚微米银胶体抑菌圈试验 胶体对痢疾杆菌、柠檬色葡萄球菌、白色念珠菌的抑菌效果见图5,培养基打直径5mm孔,a、b、c、d孔注入亚微米银胶体,浓度由高至低(360, 180, 90,

45 mg·L⁻¹)与表2~3浓度对应,由结果可见亚微米银胶体抑菌效果良好。阳性对照物和阴性对照物对菌落抑菌效果见图6,其中右孔加入无菌水为阴性对照物,左孔分别加入阳性对照物。由图7可得出,胶体对细菌的抑菌性能强弱顺序为柠檬色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>痢疾杆菌>金黄色葡萄球菌>白色葡萄球菌>大肠杆菌>伤寒杆菌>变形杆菌。柠檬色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌为革兰氏阳性菌,痢疾杆菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、变形杆菌为革兰氏阴性菌,白色念珠菌为真菌,实验表明亚微米银胶体具有广谱抗菌能力。

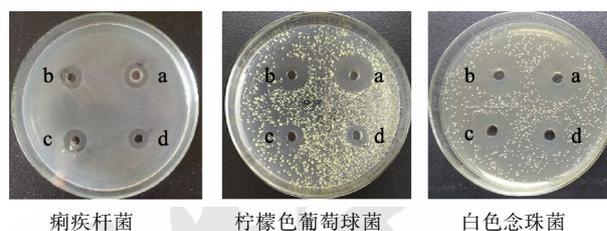


图5 不同浓度亚微米银胶体对菌落的抑菌效果 a-360 mg·L⁻¹; b-180 mg·L⁻¹; c-90 mg·L⁻¹; d-45 mg·L⁻¹。

Fig. 5 Bacteriostatic effect of submicron silver colloids with different concentrations on bacterial colonies a-360 mg·L⁻¹; b-180 mg·L⁻¹; c-90 mg·L⁻¹; d-45 mg·L⁻¹。

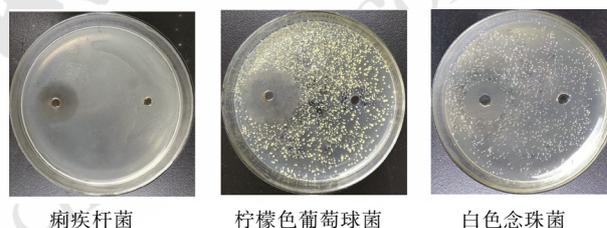


图6 阳性对照物(左)和阴性对照物(右)对菌落的抑菌效果

Fig. 6 Bacteriostatic effect of positive control(left) and negative control(right) on bacterial colonies

表1 不同浓度的亚微米银胶体对小鼠骨髓微核率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 1 Effect of different concentration of submicron silver colloid on micronucleus rate of bone ($\bar{x} \pm s, n=5$)

性别	剂量组	剂量/浓度	红细胞数 (PCE+NCE)	PCE/NCE	观察的PCE 细胞数	有微核的PCE 细胞个数	微核率/%
♂	阴性对照组	-	5×200	1.16±0.10	5×1 000	12	2.40±0.49
	阳性对照组	40 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	5×200	1.02±0.06	5×1 000	106	21.20±1.17 ¹⁾
	高剂量组	20 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ /500 mg·L ⁻¹	5×200	1.03±0.07	5×1 000	100	20.20±1.02 ¹⁾
	中剂量组	20 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ /50 mg·L ⁻¹	5×200	1.01±0.04	5×1 000	54	10.80±0.75 ¹⁾
	低剂量组	20 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ /5 mg·L ⁻¹	5×200	1.03±0.05	5×1 000	13	2.60±0.80
♀	阴性对照组	-	5×200	1.10±0.08	5×1 000	11	2.20±0.75
	阳性对照组	40 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	5×200	0.98±0.05	5×1 000	106	21.20±1.17 ¹⁾
	高剂量组	20 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ /500 mg·L ⁻¹	5×200	1.05±0.06	5×1 000	97	19.40±1.02 ¹⁾
	中剂量组	20 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ /50 mg·L ⁻¹	5×200	0.99±0.08	5×1 000	56	11.20±0.75 ¹⁾
	低剂量组	20 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ /5 mg·L ⁻¹	5×200	1.03±0.05	5×1 000	11	2.20±0.75

注:与阴性对照组相比,¹⁾P<0.01。

Note: Compared with the negative control group, ¹⁾P<0.01.

作用。因此, 在应用时需注意浓度导致的遗传毒性, 慎重选择使用浓度。由于亚微米银颗粒较大, 根据 Recordati 等^[9-11]的研究结果推测, 其细胞穿透性和遗传毒性应小于粒径几纳米或几十纳米的纳米银, 或许未来可在一定范围替代小粒径纳米银的作用, 但其应用仍需谨慎, 需进一步研究。

试验发现亚微米银胶体对细菌和真菌均有明显的抑菌能力, 证明它可作为一种广谱的抑菌剂。琼脂扩散法抑菌圈试验发现亚微米银胶体在琼脂中扩散性较小, 但杀菌彻底; 它对细菌的抑菌性能强弱顺序为柠檬色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>痢疾杆菌>金黄色葡萄球菌>白色葡萄球菌>大肠杆菌>伤寒杆菌>变形杆菌; 对真菌的抑菌性能实验发现, 亚微米银胶体对白色念珠菌的抑菌能力大于抗真菌药物氟康唑; 通过常量肉汤稀释法 MIC 试验发现该亚微米银胶体的 MIC 为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明它具有高效的抑菌能力; 通过对白色念珠菌采用液体培养基培养, 计算存活挑战菌的数量, 发现亚微米银胶体抑菌效果更持久。

与传统抗菌剂抗生素相比, 亚微米胶体作为抑菌剂, 性质稳定, 广谱高效, 不易扩散, 不易被消耗, 抑菌持久性更强, 抑菌彻底, 可避免细菌产生耐药性。但直接用于体内或存在较高风险, 可能导致未知风险, 它可能在体内累积造成内脏损伤^[34], 例如肝损伤、肾损伤、脑损伤等, 还可能造成遗传物质损伤, 例如精子染色体和卵子染色体的损伤等。因此, 亚微米银胶体的使用范围应该限制在体外抗菌领域, 不建议用于体内抗菌用途。

REFERENCES

- [1] 韩丽萍, 陈瑞, 常平安, 等. 纳米银生物学效应及其作用机制研究进展[J]. 毒理学杂志, 2017, 31(3): 222-228.
- [2] QIN D X, SHAO Y Z, WANG Y, et al. Inhibition effect of new-type silver nanoparticles on ESBL-producing pneumonia klebsiella [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(22): 2737-2741.
- [3] LARA H H, ELSA N G, IXTEPANTURRENT L, et al. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds [J/OL]. J Nanobiotechnol, 2011, 9(1): 30. <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com>.
- [4] NI F F, WANG B L, SONG T J, et al. Toxic effect and mechanism of silver nanoparticles [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2016, 32(5): 593-597, 598.
- [5] YOU C G, HAN C M, WANG X G, et al. The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(9):

9193-9201.

- [6] NISHANTH R P, JYOTSNA R G, SCHLAGER J J, et al. Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NFκB signaling pathway [J]. Nanotoxicology, 2011, 5(4): 502-516.
- [7] PARK E J, YI J, KIM Y, et al. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism [J]. Toxicol Vitro, 2010, 24(3): 872-878.
- [8] SHAVANDI Z, GHAZANFARI T, MOGHADDAM K N. In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2011, 33(1): 135-140.
- [9] RECORDATI C, MAGLIE M D, BIANCHETTI S, et al. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects [J/OL]. Particle & Fibre Toxicology, 2015, 13(1): 12. Doi: 10.1186/s12989-016-0124-x.
- [10] PARK M V D Z, NEIGH A M, VERMEULEN J P, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles [J]. Biomaterials, 2011, 32(36): 9810-9817.
- [11] SILVA R M, ANDERSON D S, PEAKE J, et al. Aerosolized silver nanoparticles in the rat lung and pulmonary responses over time [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(5): 673-686.
- [12] SHANA C, FARAH H, WILLIAM W. A current overview of the biological and cellular effects of nanosilver [J/OL]. Int J Molecular Sci, 2018, 19(7): 2030. Doi: 10.3390/ijms19072030.
- [13] PIAO M J, KANG K A, LEE I K, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis [J]. Toxicol Lett, 2011, 201(1): 92-100.
- [14] CARLSON C, HUSSAIN S M, SCHRAND A M, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species [J]. J Phys Chem B, 2008, 112(43): 13608-13619.
- [15] BRAYDICH-STOLLE L, HUSSAIN S, SCHLAGER J J, et al. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells [J]. Toxicol Sci, 2005, 88(2): 412-419.
- [16] WANG Y N, GENG H M, LI C G. Combined antibacteria test on *B. subtilis* of four antibiotics *in vitro* [J]. J Henan Agric Sci(河南农业科学), 2012, 41(8): 177-179.
- [17] 钟希文, 梅全喜, 高玉桥, 等. 蛇鳞草提取液体外抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2238-2239.
- [18] 李汉浠, 任赛赛, 李勇, 等. 枫杨鞣酐对常见菌的抗菌谱、最低抑菌浓度和最低杀菌浓度研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6): 1422-1424.
- [19] HOU L, XU G C, WANG H, et al. Constructure characterization of nano-silver/PVP composites synthesized bi-in situ UV irradiation [J]. Polymer Mater Sci Eng(高分子材料科学与工程), 2009, 25(12): 66-68.
- [20] FAN R G, XU G C, XIONG J Y. Silver nano-particles preparation using direct ultrasonic irradiation and the fractal analysis of its growth [J]. J Liaoning Tech Univ(辽宁工程技术大学学报), 2005, 24(2): 261-264.
- [21] HUANG W W, LI S J, GAO M, et al. Comparison of mouse bone marrow cells and testicular cells in the cell biology

- experiment of chromosomes preparation [J]. Biol Chem Eng (生物化工), 2018, 4(3): 85-87.
- [22] LI N, WANG J. Molecular diagnosis of genetic disease in the era of precision medicine [J]. J Diagn Concepts Pract(诊断学理论与实践), 2018, 17(2): 136-140.
- [23] WEN H R, WANG Y N, SONG J, et al. Standardization and historical data collection of mammalian cell chromosome aberration test [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2018, 41(5): 727-733.
- [24] SCHMID W. The micronucleus test [J]. Mutat Res(Environ Mutagenesis And Related Subjects), 1975, 31(1): 9-15.
- [25] CHEN S, LU K Q, MA X M. Research progress of the methods and applications of micronucleus assay [J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2016, 26(2): 83-86.
- [26] QU J S, YUAN J Q, ZHAO Y X, et al. Research progress of the methods of micronucleus assay [J]. J Pharm Res(药学研究), 2017, 36(10): 602-604.
- [27] 曹佳. 微核试验: 原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000: 46.
- [28] XU H D, GUANG J. Progress of the micronucleus test in the field of molecular cancer epidemiology [J]. Chin J Prevent Med(中华预防医学杂志), 2015, 49(1): 93-97.
- [29] 王晓琴. 研究微生物临床检验和细菌耐药性的监测要点[J]. 吉林医学, 2019, 40(1): 119-120.
- [30] NICKALLS K. On the front-line of antibiotic resistance [J]. Pract Nurs, 2018, 29(5): 201. Doi: 10.12968/pnur.2018.29.5.201.
- [31] LEE W, KIM K J, LEE D G. A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli* [J]. Bio Metals, 2014, 27(6): 1191-1201.
- [32] DUAN X J, DU X D, ZHANG B B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* and the underlying mechanism [J]. Biomed Eng Clin Med(生物医学工程与临床), 2015, 19(3): 237-240.
- [33] YANG D H. Preparation and study for antibacterial of nano-silver sol [J]. J Liaoning Univ: Nat Sci Ed(辽宁大学学报: 自然科学版), 2010, 37(4): 314-317.
- [34] WANG X J, XUE Y Y, TANG M. Research progress on internal toxicity and the toxic mechanism of silver nanoparticles [J]. Asian J Ecotoxicol(生态毒理学报), 2018 (1): 50-60.

收稿日期: 2019-05-14

(本文责编: 蔡珊珊)