

文章编号:1004-7220(2010)01-0032-04

## 载药敷料体外细胞毒性及释药性评价

黄姝杰, 关静, 李志宏, 张西正, 武继民

(军事医学科学院卫生装备研究所, 天津 300161)

**摘要:** 目的 评价载药敷料体外细胞毒性和释药性。方法 按国标 GB/T14233.2-2005, 规定的 MTT 法操作, 通过光学倒置显微镜观察 L929 细胞形态和增殖状况定性分析载药敷料体外细胞毒性, 通过吸光度(OD)值计算细胞相对增殖率定量分析载药敷料体外细胞毒性等级; 以磷酸盐缓冲液(PBS7.4)为溶出介质, (32 ± 5) °C 模拟人体表皮温度, 于 1/6、1/2、1、3、16、24、36 和 48 h 不同时间点取样, 采用紫外分光光度法测定载药敷料体外累积释放性能。结果 该载药敷料浸提原液中的细胞形态正常, 贴壁生长良好, 细胞平均相对增殖率(RGR)为 91.25%, 毒性为 1 级。载药敷料的释药动力学符合 Higuchi 方程: 拟合方程为  $M_t/M_\infty = 0.3271t^{0.239}$ 。结论 该载药敷料细胞相容性良好, 并具有一定的缓释性能。

**关键词:** 增值; 左氧氟沙星; 释放率; 细胞毒性; 缓释

**中图分类号:** R318.01 **文献标志码:** A

## Evaluation of in vitro cytotoxicity and drug release property on pharmaceutical dressing

HUANG Shu-jie, GUAN Jing, LI Zhi-hong, ZHANG Xi-zheng, WU Ji-min (*Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Science, Tianjin 300161, China*)

**Abstract: Objective** To evaluate the cellular toxic and release of pharmaceutical dressing. **Method** Following the State standard GB/T14233.2-2005, the L929 cellular morphology was observed by inverted microscopy after 72h and proliferation of the cells was examined using mitochondrial function (MTT) assay. Relative growth rate (RGR) was calculated and cytotoxicity grade was evaluated by absorbency(OD) data. With PBS7.4 as dissolution media, and (32 ± 0.5) °C as dissolution temperature, the release rate was determined with UV method with the determination wavelength of 288 nm and the dissolved liquid in 1/6, 1/2, 1, 3, 16, 24, 36 and 48 h. **Results** The average cell RGR of the pharmaceutical dressing is 91.25% and reaches 1 cytotoxicity grade. L929 cellular morphology is normal. Pharmaceutical dressing release accord to Higuchi equation, and the simulated equation is  $M_t/M_\infty = 0.3271t^{0.239}$ . **Conclusions** Biologic compatibility of the pharmaceutical dressing is good, and the release of levofloxacin from the pharmaceutical dressing is sustained in vitro.

**Key words :** Proliferation; Levofloxacin; Release rate; Cytotoxicity; Drug release

抗生素的滥用现象, 如: 无明显用药指征; 预防性用药; 剂量过大、疗程过长、多种抗生素联用; 频繁更换抗生素种类; 大剂量使用广谱抗生素; 局部用药过多等<sup>[1]</sup>, 导致耐药菌株在全球范围内日益增多, 已

严重威胁到公众健康。通过简单的加大剂量或在原有化合物基础上增加、改变官能团来实现其抗菌效果, 很容易致使原有细菌耐药性持续增强或出现新的致病性细菌, 形成恶性循环, 导致大部分现有抗菌药

收稿日期: 2009-01-13

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(09JCZDJC18800), 军事医学科学院创新基金重点项目(2008ZD009)。

作者简介: 黄姝杰(1982-), 女, 研究方向: 药物分析。

通讯作者: 关静, E-mail: janeamms@yahoo.com.cn。

物疗效欠佳甚至失去疗效。为此,抗菌制剂的合理研发以及抗菌药物剂量合理使用已成为现实需要。

左氧氟沙星属于氟喹诺酮类抗菌药物,是氧氟沙星的左旋光学异构体,可通过作用于细菌的脱氧核糖核酸旋转酶,抑制细菌 DNA 的复制和转换,发挥广谱抗菌作用<sup>[2]</sup>包括对厌氧菌在内的很多种细菌感染有较好的防治作用。本次研究的载药敷料采用壳聚糖作为药物载体,因具有良好的缓释作用<sup>[3]</sup>,同时其具有良好的生物粘附性和多种生物活性,可被体内多种酶类降解,降解产物安全无毒,能被生物体完全吸收,具有抗菌、消炎、促进伤口愈合、抗溃疡等多种功效<sup>[4]</sup>。将壳聚糖与左氧氟沙星通过一定的方法复合,研制出一种新型载药复合敷料。通过体外细胞毒性实验及累积释放度实验,为该新型载药敷料临床应用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

左氧氟沙星(levofloxacin, LVFX),批号:200801012,药用级,购于浙江东亚药业有限公司;L929 细胞株(小鼠成纤维细胞),由中国药品生物制品检定所提供;PRMI1640 细胞培养液(不含 L-谷氨酰胺,不含 NaHCO<sub>3</sub>)、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶,购于美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购于美国 Amresco 公司;磷酸盐缓冲液(PBS7.4, A. R 级)二甲基亚砷(DMSO)购于天津市化学试剂三厂。

### 1.2 仪器

高温高压灭菌锅 YX0602(山东新华医疗器械有限公司);10 万级超级洁净工作台 CZ-650(天津市尘埃净化设备厂);CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 3111(美国 Thermo 公司);倒置光学显微镜 IX70(日本 Olympus 公司);台式恒温振荡器 THZ-22(江苏太仓实验设备厂);酶标仪 CENiso(美国 TECAN 公司);紫外分光光度计 UV160A(日本岛津公司)。

### 1.3 MTT 法测定复合敷料体外细胞毒性

浸提介质:含 15% (V/V) FBS 的 PRMI1640 细胞培养液。

试验样品组:20 mL 浸提介质中放入表面积为 60 cm<sup>2</sup> 的载药敷料,于培养箱内 24 h,制备浸提液。平行对照为 3 组。

实验过程:传代 48 ~ 72 h 生长旺盛的 L929 细

胞系稀释成浓度为 1 × 10<sup>4</sup> mL<sup>-1</sup> 细胞悬浮液,按照 100 μL/孔的量接种于 96 孔板内,试验设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和试验样品组,每组各接种 6 孔,置于细胞培养箱内 24 h 后,弃去培养液,空白对照组用细胞培养液交换,阴性对照组用置于培养箱内 24 h 的细胞培养液交换,阳性对照组用含 5% (V/V) DMSO 的细胞培养液交换,试验样品组用浸体液原液交换,再次置于细胞培养箱内 37 °C 培养 72 h,倒置光学显微镜下观察细胞形态及贴壁生长状况,20 μL(5 g · L<sup>-1</sup>) MTT 溶液染色 4 h,弃去孔内所有液体后每孔加 150 μLDMSO,室温下置于震荡器以(30 ± 5) r · min<sup>-1</sup> 转速脱色 10 min,立即在酶标仪 570 nm 和 630 nm 处测量吸光度(OD)值。

判断方法:

(1)定性判断:MTT 染色前通过倒置光学显微镜观察各组细胞形态、增殖状况,根据表 1 评价试验样品组对体外细胞的毒性作用级别。

表 1 细胞毒性定性分级

Tab.1 cytotoxicity qualitative grade

级别	反应程度	反应观察
0	无	细胞形态正常,贴壁生长良好,胞浆内有离散颗粒;无细胞溶解
1	极轻	至多 20% 的细胞呈圆形,疏松贴壁,无胞浆内颗粒;偶见细胞溶解
2	轻微	至多 50% 的细胞呈圆形,无胞浆内颗粒;明显可见细胞溶解和细胞间空区
3	中度	至多 70% 的细胞呈圆形或溶解
4	重度	细胞几乎完全破坏

(2)定量判断:相对增殖率(RGR)% = A/A<sub>0</sub> × 100%, A:供试品组(浸提原液组、阴性对照组和阳性对照组)在 570 nm 和 630 nm 处吸光度的差值; A<sub>0</sub>:空白对照组在 570 nm 和 630 nm 处吸光度的差值。依据下表对应出细胞毒性级别。

### 1.4 动态扩散法测定复合敷料体外累积释放度

供试品取样:随机剪取载药敷料 2 cm × 2 cm; 释放介质:磷酸盐缓冲液(PBS pH7.4) 20 mL;取样量:10 mL;补液量:10 mL;介质温度:(32 ± 0.5) °C; 转速:(30 ± 2) r · min<sup>-1</sup>;取样时间:1/6, 1/2, 1, 5, 16, 24, 36, 48 h。

表2 细胞毒性定量分级

Tab.2 cytotoxicity quantitative grade

级别	相对增殖率/%
0	≥100
1	80~99
2	50~79
3	30~49
4	0~29

注:须同时满足阴性对照组不大于1级且阳性对照组至少为3级的预期,可依据表1或表2判断毒性级别。

采用动态扩散法进行体外累积释放度实验,将供试品置于双碟中,与伤口接触的一面朝下,保证与溶出介质充分接触,按照设计的取样时间定量取释放液体并即刻补充等量同温度的释放介质;释放液体经过0.45 μm水系滤膜过滤后,用紫外分光光度计测量释放液 λ<sub>288 nm</sub> 处的 OD 值,由 LVFX 在 PBS 7.4 中的标准曲线计算 LVFX 的质量,通过公式  $ADP = M_t/M_{\infty} \times 100\%$  ( $M_t$ : t 时溶出液中 LVFX 质量,  $M_{\infty}$ : 供试品中含有的 LVFX 质量) 计算不同时间点累积释放度 (Accumulation Dissolving out Percentage, ADP)。

### 1.5 统计学处理

本实验中所有结果均用平均值 ± 标准差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞毒性分析评价

#### 2.1.1 细胞形态观察 72 h 在光学倒置显微镜下

100 倍放大观察,载药复合敷料组有少许纤维分布在 96 孔板培养液中,复合敷料组和阴性对照组相比细胞形态均呈正常梭状,贴壁生长良好;阳性对照组细胞几乎完全破坏,细胞萎缩呈圆形,处于悬浮状态,可以初步判定复合敷料毒性极轻,为 1 级(见图 1)。

**2.1.2 细胞毒 OD 值和毒性评价** 载药敷料浸提原液组细胞相对增殖率 (RGR) 和毒性评级结果(见表 3),RGR 平均可达 91.25%,满足国标规定的 1 级。

### 2.2 复合敷料累积释放度评价结果

根据不同时间点的累积释放度(见表 4),绘制 ADP-T 时间关系曲线图(见图 2),由图表可以得出:该载药敷料的突释现象并不明显,10 min 时 ADP 平均达到  $(16.41 \pm 0.01)\%$ ,有效累积释放时间可以达到 48 h,48 h 时的 ADP 为  $(80.42 \pm 0.71)\%$ ,具有一定的缓释效果。载药敷料释放行为与 Higuchi 模型相吻合,遵循扩散控制机制,拟合方程为:  $M_t/M_{\infty} = 0.3271t^{0.239}$ 。

## 3 讨论

体外细胞毒性试验是利用体外细胞培养方法来评价材料或其浸体液成分中潜在的细胞毒性,根据 ISO 和我国质检总局等相关部门发布的标准中有关细胞毒性试验的要求,推荐的方法有:浸提液试验、直接接触试验、琼脂法试验和间接接触试验<sup>[5]</sup>等,根据载药敷料的主要用途,操作方法的可行性,试验

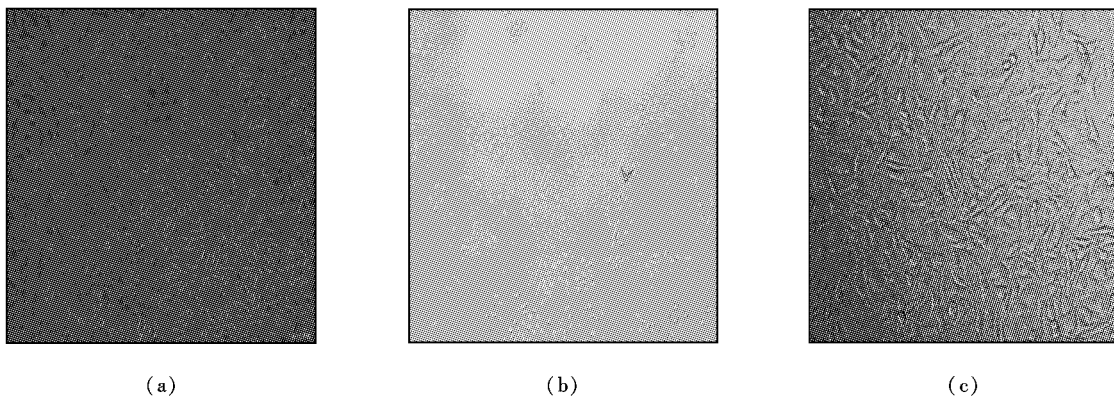


图1 L929 细胞与各组浸提液接触 72h 后细胞生长状态 (A) 阴性对照(100×); (B) 阳性对照(100×); (C) 试验样品(100×)

Fig.1 Morphology of L929 cells after 72 h contacting with the extract (A) negative control(100×); (B) positive control(100×); (C) tested sample(100×)

表3 载药敷料 MTT 试验结果及毒性评级

Tab.3 MTT assay results and cytotoxicity grade of pharmaceutical dressing

	1#原液		2#原液		3#原液		阳性对照		阴性对照		空白对照	
	570 nm	630 nm	570 nm	630 nm	570 nm	570 nm	630 nm	630 nm	570 nm	630 nm	570 nm	630 nm
OD 值	1.673	0.119	1.697	0.152	1.633	0.115	0.241	0.095	1.719	0.188	1.852	0.173
$\bar{X} \pm SD$	1.684	0.150	1.621	0.133	1.661	0.145	0.699	0.180	1.905	0.183	1.911	0.191
RGR/%	1.633	0.104	1.630	0.157	1.684	0.159	0.252	0.101	1.887	0.173	1.953	0.221
毒性评级	1.659	0.156	1.716	0.152	1.682	0.124	0.241	0.097	1.902	0.205	1.917	0.156
	1.667	0.141	1.592	0.155	1.662	0.150	0.172	0.081	1.774	0.197	1.907	0.185
	1.685	0.153	1.704	0.149	1.637	0.133	0.481	0.153	1.863	0.212	1.882	0.497
	1.667 ± 0.018	0.137 ± 0.019	1.660 ± 0.047	0.150 ± 0.008	1.660 ± 0.020	1.667 ± 0.018	0.348 ± 0.184	0.118 ± 0.036	1.842 ± 0.070	0.193 ± 0.013	1.904 ± 0.031	0.237 ± 0.118
	91.79		90.63		91.34		13.79		98.93			
	1		1		1		4		1			

表4 不同时间点累积释药度

Tab.4 ADP in different time

	t/h							
	1/6	0.5	1	5	16	24	36	48
1#	16.42	34.78	47.68	59.00	68.51	74.97	79.06	80.01
2#	16.40	35.06	47.50	58.92	68.55	74.66	78.54	81.24
3#	16.42	34.78	47.68	59.00	68.51	74.97	79.06	80.01
$\bar{X} \pm SD$	16.41 ± 0.01	34.87 ± 0.16	47.62 ± 0.10	58.97 ± 0.05	68.52 ± 0.02	74.87 ± 0.18	78.89 ± 0.30	80.42 ± 0.71

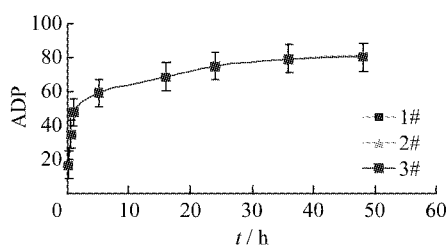


图2 载药敷料体外药物累积释放曲线

Fig.2 Accumulation release curve of pharmaceutical dressing

条件设备的局限性和实验结果的重现性,选择了浸提液试验法。随机选取三组不同部位的敷料,每组平行6小孔,根据细胞毒性的评定标准判定,毒性均为1级,说明该载药敷料中不含有对细胞生长有抑制作用的物质溶出。

载药复合敷料主要用于患者的伤口,其中主要

是溶出的左氧氟沙星发挥抗菌作用,采用浸提液试验法模拟人体创面,浸提液中含有的左氧氟沙星,壳聚糖和少量的纤维可以有效地接触细胞,所以其细胞毒性的评价结果可以有效地反映出载药敷料与人体细胞直接接触可能出现的状况,若材料有毒性物质溶出,细胞形态和增殖状况就会发生明显的改变,可以直接通过显微镜观察到材料毒性的强弱。

本试验采取的 MTT(四唑盐)比色法量化细胞毒性,该方法由 Mosmann 在 1983 年首先提出,目前已经被国内外公认并广泛应用,其原理是线粒体琥珀酸脱氢酶能催化 MTT 形成蓝色结晶,结晶形成的数目多寡与活细胞的数目和功能状态呈正相关,能灵敏的反映出细胞被损坏的程度。

在设计载药敷料中药物的体外释放试验时,考虑到一般创面的积液量体积,故释放介质选取20

(下转第 39 页)