

· 论著 ·

不同制法纳米银的抗真菌活性研究

张璐璐¹, 苗琦¹, 叶招尧², 李洪娇³, 姜远英¹, 曹永兵¹ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福州 350108; 3. 第二军医大学附属长海医院口腔科, 上海 200433)

[摘要] 目的 探讨不同制备方法得到的纳米银的体外抗真菌活性。方法 采用微量液基稀释法测定纳米银对氟康唑不同敏感型白色念珠菌的最低抑菌浓度; 棋盘实验测定纳米银与氟康唑的协同抗真菌作用。结果 不同制备方法得到的纳米银对白色念珠菌的抑制作用不同, 对敏感菌与耐药菌的抑制作用无显著差异, 与氟康唑合用对白色念珠菌能产生协同作用。结论 不同制备方法得到的纳米银在体外的抗真菌作用有差异, 但与氟康唑合用可产生协同作用。

[关键词] 纳米银; 白色念珠菌; 抑菌作用

[中图分类号] R978.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)04-0328-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.04.010

Fungistasis of nanometer silvers synthesized by different methods on *Candida albicans*

ZHANG Lulu¹, MIAO Qi¹, YE Zhaojiao², LI Hongjiao³, JIANG Yuanying¹, CAO Yongbing¹ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 3. Department of Stomatology, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To explore the *in vitro* fungistasis of nanometer silvers made by different methods on *Candida albicans*. **Methods** The minimal inhibitory concentrations (MICs) of *Candida albicans* strains stimulated to silver nanoparticles were determined by microdilution method. The combination effects of silver nanoparticles with fluconazole were determined by chess board check assay. **Results** The inhabitation effect of two kinds of silver nanoparticles were different on the growth of *Candida albicans*. Silver nanoparticles had a synergistic effect with fluconazole on *Candida albicans*. **Conclusion** The two kinds of silver nanoparticles had various antifungal activities *in vitro* and had a synergistic effect with fluconazole on *Candida albicans*.

[Key words] silver nanoparticles; *Candida albicans*; fungistasis

现代研究发现, 银有杀菌作用。很早以前人们就利用银来加速伤口愈合、治愈感染、净化水和保存食物、饮料等^[1]。纳米级的银具有稳定的化学性质, 在电学、光学和催化等诸多方面具有十分优异的特性。在生物学方面, 很高的比表面积使得纳米银粒子与微生物表面接触的概率大大增加, 抗菌性能远大于传统的银系抗菌剂^[2,3]。目前, 已有纳米银应用于烧伤创面的敷料^[4]及软衬材料的报道^[5]。近年来, 真菌感染率不断上升, 在深部真菌感染中, 念珠菌是最常见的病原菌^[6]。本研究以白色念珠菌为研

究对象, 探讨不同制备方法得到的纳米银对白色念珠菌生长抑制作用的差异。

1 仪器与材料

1.1 仪器 THZ-82A 台式恒温振荡器(上海跃进医疗器械厂); SW-CT-IF 型单人双面超净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂); XW-80A 漩涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司); UV-2802 型紫外可见分光光度计(UNIC); 96 孔细胞培养板(丹麦 Nunclon 公司)。

1.2 材料 纳米银; 0.9% 生理盐水; AgNO₃; AgCl; 氟康唑(fluconazole)注射液(上海信谊金朱药业有限公司)。

RPMI1640 液体培养液; RPMI1640 (Gibco

[作者简介] 张璐璐, 硕士研究生. Tel: 15000621731; E-mail: 594361017@qq.com

[通讯作者] 曹永兵, 教授. 研究方向: 真菌耐药, 中药抗肿瘤. Tel: 13386270390

BRL)10 g、NaHCO₃ 2 g、吗啡啉丙磺酸(MOPS, Sigma公司) 34.5 g(0.165 mol/L),加三蒸水 900 ml溶解,用NaOH调pH值至7.0(25℃),三蒸水定容至1 000 ml,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,分装后于4℃保存备用。

沙堡葡萄糖琼脂培养基(SDA):蛋白胨10 g、葡萄糖40 g、琼脂18 g,加三蒸水900 ml溶解,加入2 mg/ml氯霉素水溶液50 ml,调整pH值至7.0,定容至1 000 ml,高压灭菌,4℃保存。

YEPD培养液:酵母浸膏10 g、蛋白胨20 g、葡萄糖20 g,加三蒸水900 ml溶解,加入2 mg/ml氯霉素水溶液50 ml,三蒸水定容至1 000 ml,高压灭菌(121℃,15 min),于4℃保存备用。

YEPD固体培养基:酵母浸膏10 g、蛋白胨20 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g,加三蒸水900 ml溶解,加入2 mg/ml氯霉素水溶液50 ml,三蒸水定容至1 000 ml,高压灭菌(121℃,15 min),趁热将液体铺于无菌的平皿(直径9 cm)中,于4℃保存备用。

1.3 菌株 白色念珠菌(*Candida albicans*) SC5314由William A Fonzi教授惠赠;白色念珠菌(*Candida albicans*)Y0109由第二军医大学附属长征医院真菌室提供;白色念珠菌(*Candida albicans*)100、103由第二军医大学附属长海医院真菌室提供,所有菌株均经形态学和生化学鉴定。

2 实验方法

2.1 纳米银的制备 两种方法分别命名为W法和D法,得到的纳米银溶胶分别命名为Ag_w和Ag_d。

W法^[7]:称取硝酸银0.037 g加去离子水100 ml溶解,称取柠檬酸三钠0.26 g加去离子水26 ml溶解。取100 ml硝酸银溶液与2.6 ml柠檬酸三钠溶液混合,置于微波炉中以中高火加热6 min,得到灰绿色溶胶,冷却至室温,避光保存。

D法^[8]:称取90 mg硝酸银溶于500 ml去离子水中加热至沸腾,逐滴加入1%的柠檬酸钠10 ml,保持沸腾,同时剧烈搅拌1 h,继续搅拌至溶液冷却,得到黄绿色的银溶胶,冷却后避光保存。

2.2 微量液基稀释实验

2.2.1 药敏板的制备 将白色念珠菌SC5314、Y0109、103、100以1:100接种至1 ml YEPD培养液,于30℃、200 r/min培养箱中振荡培养16 h,活化2次,使真菌处于指数生长期后期。用血细胞计数板计数,用RPMI1640培养液将菌液浓度调整至(1~5)×10³ cfu/ml。取无菌96孔板,于每排1号孔加RPMI1640液体培养基100 μl作空白对照;

3~12号孔各加新鲜配制的菌液100 μl;2号孔分别加菌液和药物溶液共200 μl;12号孔不含药物,只加菌液100 μl作为阳性生长对照。2~11号孔进行倍比稀释。

2.2.2 最低抑菌浓度(MIC)的判定 在30℃恒温培养箱中培养,用酶标分析仪分别测定24 h和48 h各孔在630 nm波长处的消光度(OD值)。阳性对照孔的OD值控制在0.2左右,与阳性对照孔对比,以OD值下降80%以上的最低浓度孔中的药物浓度为MIC₈₀(真菌生长80%被抑制时的药物浓度)。当药物的MIC₈₀值超过测定浓度范围时,按以下方法进行统计:MIC₈₀值高于最高浓度64 μg/ml时,计为“>64 μg/ml”;MIC₈₀值为最低浓度或在最低浓度以下时,均计为“≤0.125 μg/ml”。上述实验均平行操作3次。

2.3 棋盘式微量稀释实验

2.3.1 药敏板的制备 合用的2种药物于96孔板上以二维棋盘的纵(A~H)、横(2~11)两方向分别进行2倍的倍比稀释。使得氟康唑的终浓度为16、8、4、2、1、0.5 μg/ml(敏感菌);0.125、0.062 5、0.031 25、0.015 6、0.007 8、0.003 9 μg/ml(耐药菌),纳米银的终浓度为16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg/ml。实验所用试剂、药物、实验操作步骤同上述体外药敏实验。

2.3.2 联合用药的效果评价 部分抑菌浓度指数(FICI)是评价联合用药的两药相互作用方式的主要参数。抑菌浓度分数(FIC),分别为每一种药物联合抑菌时所需MIC与单用时MIC的比值。而FICI则等于两种药物FIC之和,即 $FICI = \sum FIC = FICA + FICB = CA_{\text{联用}}/MIC_{A\text{单用}} + CB_{\text{联用}}/MIC_{B\text{单用}}$,MIC_A和MIC_B分别是药物A和B单用时的MIC值,CA和CB为两药联用时达到相同药效时各自的浓度。当MIC值高于检测最高限时,以最高限浓度的2倍值用以计算FICI。很多文献报道,当FICI≤0.5时,两药的相互作用确定为协同作用,且FIC指数越小,协同作用越强;0.5<FICI≤1时,两药的相互作用为相加;1<FICI≤4时,为无关作用;当FICI>4时,两药产生拮抗作用。

3 结果

3.1 纳米银颗粒的形态观察

3.1.1 粒径 两种方法制备的纳米银溶胶经上海材料研究所检测中心检测。Ag_w中纳米银颗粒的平均粒径为105.8 nm,Ag_d中纳米银颗粒的平均粒径为64.2 nm。

3.2 微量液基稀释实验 Ag_w对氟康唑敏感菌株白色念珠菌 SC5314、Y0109 于24、48 h 的 MIC₈₀为 0.25、4 μg/ml,对氟康唑耐药菌株白色念珠菌 100、103 于24、48 h 的 MIC₈₀为 1、4 μg/ml;Ag_D对不同

敏感性的菌株没有抑制作用(表1)。纳米银对敏感型白色念珠菌的抑制作用弱于氟康唑,对耐药菌则表现出较氟康唑更低的 MIC₈₀值。

3.3 棋盘式微量液基稀释实验 对氟康唑不同敏

表1 两种纳米银溶胶对白色念珠菌不同菌株药敏试验的 MIC₈₀值(ρ_B/μg·ml⁻¹)

药物	Y0109		SC5314		100		103	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Ag _w	0.25	4	0.25	2	1	4	0.5	4
Ag _D	0.25	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
氟康唑	<0.125	0.25	0.25	0.5	0.5	>1 024	1	>1 024

感性的菌株,Ag_w、Ag_D与氟康唑联合使用均可产生协同作用。Ag_w与氟康唑联用,两者的 MIC₈₀值均有不同程度的下降,并且氟康唑的用量显著下降。单用无抑菌作用的 Ag_D在与氟康唑合用后,FIC<0.5,表现出协同作用,且两药的用量均明显减少(表2)。从单用的结果看,W法制备的纳米银其抑菌效果要远优于D法。与氟康唑合用后,D法制备的纳米银的用量明显降低,可与氟康唑产生协同抗真菌的作用,但协同的用量仍高于W法制备的纳米银。综上所述,W法制备的纳米银有更好的抗真菌作用。

使真菌的 DNA 结构发生改变,丧失复制能力,导致致病菌失去增殖能力,从而达到杀灭真菌的作用。而 Kim 等^[10]的观点则认为纳米银与真菌表面的蛋白质分子发生结合,使蛋白质变性,质子泵裂解,膜蛋白或磷脂双分子层的通透性增强,H⁺容易外漏,导致真菌的细胞膜裂解而发挥杀菌作用。

本实验结果表明,不同制备方法得到的纳米银对白色念珠菌的抑制作用不同,这种抑制作用在不同敏感性的白色念珠菌中没有明显差异。此外,纳米银的粒径不同,抗菌效果也存在差异,根据本实验结果,纳米银的粒径越大,抗菌效果越好。目前,纳米银粒径与抗菌效果的关系仍未见文献报道,可作为今后研究的方向。

目前,抗真菌药物种类有限,耐药真菌的出现给临床治疗带来更大的挑战^[11]。因此,低耐药性、高安全性的纳米材料在抗真菌药领域值得进一步研究。

表2 两种纳米银溶胶与氟康唑合用对白色念珠菌的作用(ρ_B/μg·ml⁻¹)

菌株	纳米银 (Ag)	MIC ₈₀ (Ag)	MIC ₈₀ (氟康唑)	MIC ₈₀ (Ag+氟康唑)	FIC	相互作用	
SC5314	Ag _w	2	0.5	<0.125	0.125	0.281	协同
	Ag _D	>64	0.5	0.5	0.125	0.254	协同
Y0109	Ag _w	4	0.25	0.031 3	0.062 5	0.258	协同
	Ag _D	>64	0.5	0.125	0.125	0.251	协同
100	Ag _w	4	>1 024	0.031 3	0.5	0.008	协同
	Ag _D	>64	>1 024	0.25	0.25	0.002	协同
103	Ag _w	4	>1 024	<0.125	1	0.016	协同
	Ag _D	>64	>1 024	0.015 6	0.25	0.000 2	协同

4 讨论

纳米银的抗真菌机制复杂,主要包括银的金属离子作用和光催化作用。多数学者认为银离子在纳米银的杀菌过程中发挥了不可忽视的作用。目前,已报道的机制主要包括银离子与菌体中的酶蛋白巯基(-SH)结合,使一些以此为必要基团的酶失去活性,致使细胞丧失分裂增殖能力而死亡。Feng 等^[9]发现银离子可与致病菌中的 DNA 碱基相结合形成交叉链接,进而置换嘌呤和嘧啶中与氮相邻的氢键,

【参考文献】

[1] Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns II .Renewed interest for silver[J]. Burns , 2000,26(2):131-138 .

[2] Panacek A ,Kvitek L ,Prucek R ,et al .Silver colloid nanoparticles :synthesis ,characterization ,and their antibacterial activity[J].J Phys Chem B,2006,110(33):16248-16253 .

[3] Margaret Ip ,Sau LL ,Vincent KMP ,et al .Antimicrobial activities of silver dressings :an *in vitro* comparison[J].J Med Microbiol,2006 ,55(1):59-63 .

[4] 陈 炯,韩春茂,余朝恒.纳米银用于烧伤患者创面后银代谢的变化[J].中国烧伤杂志,2004,20(3):161-163 .

[5] 董 滢,尹 路.纳米银应用于软衬材料的抗菌性实验研究[J].山西医科大学学报,2006,37(8):860-862 .

[6] 廖万清,顾菊林.深部真菌感染治疗的现状与对策[J].中国感染与化疗杂志,2007,7(2):101-103 .

表1 猫人參中积雪草酸的含量测定结果

产地	批号	称重 (m/g)	含量 (mg/g)	平均值	RSD (%)
安徽	120503	1.009 6	0.739 3	0.750 8	1.4
		1.002 4	0.753 9		
		1.001 3	0.759 2		
安徽	100901	1.001 4	0.797 5	0.779 6	2.0
		1.012 1	0.767 1		
		1.013 4	0.774 2		
湖南	130601	1.011 3	1.081 5	1.085 1	1.1
		1.014 4	1.098 5		
		1.024 3	1.075 3		

3.2 流动相的考察 由于甲醇在 210 nm 处有紫外吸收,采用含甲醇系统的流动相时,积雪草酸的吸收峰被流动相背景吸收掩盖,故采用乙腈-水系统考察,发现积雪草酸的峰形前延严重、对称性较差。在水相中加入醋酸铵能够改善峰形,考察了浓度为 10、20 及 30 mmol/L 醋酸铵时的色谱峰对称性,发现醋酸铵浓度为 30 mmol/L 时积雪草酸色谱峰形对称,达到定量分析的要求,同时对流动相比例进行了优化,使之与干扰峰达到基线分离。

3.3 色谱柱的考察 猫人參中成分复杂,为达到定量分析的要求,需要对积雪草酸及干扰峰进行完全分离。考察了不同类型填料色谱柱对积雪草酸与杂质分离的影响,如 Chromasil-C₁₈、Waters RP-C₁₈、Agilent XDB-C₁₈、SB-C₁₈、Plus C₁₈ 及 HC-C₁₈ 柱,发现在 Agilent HC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm) 色谱柱上,积雪草酸色谱峰与周围峰的分度良好、保留时间合适,且峰形对称,符合本研究要求。

3.4 前处理方法的考察 为能简便、快速地从猫人參药材中提取积雪草酸,将药材饮片粉碎后采用甲醇超声提取,设计三因素、三水平正交试验,考察提取溶剂体积(10、20、30 倍量)、超声时间(20、40、60 min)及超声次数(1、2、3 次)对积雪草酸提取结果的影响,结果表明,影响积雪草酸提取效率的因素

顺序为溶剂倍数>提取时间>提取次数,最终确定样品前处理方法为 20 倍量甲醇超声 60 min 提取 1 次。

本研究建立了 HPLC 法测定猫人參中积雪草酸含量的方法,通过对检测波长、色谱柱及流动相组成等条件的摸索,确定最优色谱条件;同时采用正交试验优化得到猫人參中积雪草酸的提取方法。此法前处理条件简便快速,测定结果准确可靠,重复性好,实用性强,可用于对猫人參药材中积雪草酸的含量测定及质量控制。

【参考文献】

- [1] 叶春. 猫人參的研究概述与利用[J]. 中国药业, 2011, 2(6): 68.
- [2] 万旭英, 张亚妮, 张晨. 猫人參注射液体外抗肝癌实验研究[J]. 浙江中医学报, 2004, 28(2): 45-47.
- [3] 万旭英, 张晨, 凌昌全, 等. 猫人參注射液抗肝癌作用和对免疫功能的影响[J]. 浙江中医学报, 2004, 28(4): 56-59.
- [4] 徐一新, 项昭保, 陈晓晶, 等. 中药猫人參中的抗肿瘤活性成分[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(7): 749-753.
- [5] 吕昉, 赵亮, 郑磊, 等. HPLC-TOF/MS 对中药猫人參化学成分的快速鉴别[J]. 中南药学, 2014, (2): 165-168.
- [6] 李海艳, 徐燕丰, 辛海量, 等. 科罗索酸对 SMMC-7721 细胞生长抑制作用的初步研究[J]. 山东医药, 2011, 51(52): 44-46, 135.
- [7] 杨光, 谭家驹, 何瑞华, 等. 积雪草酸阻断大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(7): 540-542.
- [8] 周军, 高静, 方春钱, 等. 积雪草酸对肝癌细胞增殖作用的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2009, 19(6): 475-479.
- [9] 汤丽霞, 杨光, 谭家驹. 积雪草酸诱导大鼠肝星状细胞凋亡[J]. 中草药, 2009, (S1): 230-232.
- [10] 夏彬彬, 李伊莎, 徐唯哲, 等. 积雪草中积雪草酸的分离、纯化及其含量测定[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(04): 538-540.

[收稿日期] 2014-03-06 [修回日期] 2014-09-09

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 330 页)

- [7] 尹利辉, 张雁. 正电性纳米银胶的表征及加入不同凝聚剂后的表面增强拉曼散射光谱[J]. 药物分析学杂志, 2010, 30(12): 2352-2355.
- [8] Lee PC, Meisel D. Adsorption and SERS of dyes on silver and gold sols[J]. J Phys Chem, 1982, 86(17): 3391-3995.
- [9] Feng QL, Wu J, Chen CQ, et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Biomed Mater Res, 2000, 52(4): 662-668.

- [10] Kim J, Lee J, Kwon S, et al. Preparation of biodegradable polymer/silver nanoparticles composite and its antibacterial efficacy[J]. Nanosci Nanotechnol, 2009, 9(2): 1098-1102.
- [11] Boschman CR, Bodnar UR, Tornatore MA, et al. Thirteen-year evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistant strains carried by cancer patients at a large medical center[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 42(4): 734-738.

[收稿日期] 2014-03-11 [修回日期] 2015-01-14

[本文编辑] 李睿旻