

文章编号:1005-6947(2008)02-0159-03

· 基础研究 ·

# 载阿霉素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒对 L-02 细胞的毒性研究

桂凯, 张阳德

(卫生部纳米生物技术重点实验室, 湖南长沙 410008)

**摘要:**目的 检验载阿霉素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(ADM-PBCA-NP)对人肝细胞株 L-02 细胞的毒性。方法 体外培养人肝细胞株 L-02, 检测各组不同纳米粒浓度培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的活性;用噻唑蓝(MTT)法检测 L-02 在与 ADM-PBCA-NP, 阿霉素(ADM)和空白纳米粒(PBCA-NP)共同培养的条件下对肝细胞的毒性,通过对不同浓度 PBCA-NP 的溶血试验测定其生物相容性。结果 MTT 结果显示,ADM 组,ADM-NP 组,PBCA-NP 组在  $10^{-6}$  mol/L 的浓度范围内,细胞毒性均为 1 级,即对细胞无害。各组肝细胞 L-02 培养上清液中 LDH 活性的测定无统计学差异。结论 在  $10^{-6}$  mol/L 浓度范围内,ADM-NP 和 PBCA-NP 对肝细胞 L-02 无明显毒性作用;在一定的浓度范围内细胞相容性良好,不会引起溶血。 [中国普通外科杂志,2008,17(2):159-161]

**关键词:** 肝细胞/药物作用;阿霉素;纳米粒

**中图分类号:** R 333.4 **文献标识码:** A

## A study on cytotoxicity of ADM-PBCA-NP to L-02 cells

GUI Kai, ZHANG Yangde

(National Key Laboratory of Nano Biotechnology, Ministry of Health, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the cytotoxicity of ADM-PBCA-NP on L-02 cells. **Methods** L-02 cells were cultured in vitro and the LDH activity of supernatant liquid of culture cells was examined. The toxicity of ADM-PBCA-NP, ADM and PBCA-NP to L-02 cells by the MTT assay was also determined, and the haemolysis function of PBCA-NP with different concentrations was detected. **Results** The cytotoxicity of ADM-PBCA-NP, ADM and blank PBCA nanoparticles to L-02 cells under the  $10^{-6}$  mol/L concentration range was not cytotoxic (grade 1). LDH activity of supernatant liquid of culture cells showed no differences between the 3 groups. **Conclusions** Nanoparticles of ADM-NP and PBCA-NP in the  $10^{-6}$  mol/L concentration range have no significant toxic effect on L-02 hepatic cells; and in a certain concentration range, the cell compatibility is excellent and will not lead to hemolysis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(2): 159-161]

**Key words:** Hepatocellular/drug eff; Adriamycin; Nanoparticles

**CLC number:** R 333.4 **Document code:** A

细胞毒性实验是一类在离体状态下模拟生物体生长环境、检测材料和器械接触机体组织后生物学反应的体外试验,它是生物学评价体系中最

重要的检测指标之一。本实验室采用界面聚合的方法制备出粒径分布良好的阿霉素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(ADM-PBCA-NP)。并对其生物相容性进行系统性评价。采用 MTT 法检测细胞培养液中 LDH 的释放量,以评价聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(PBCA-NP)及 ADM-PBCA-NP 对 L-02 的毒性,为体内的进一步研究提供依据。

收稿日期:2007-07-26; 修订日期:2008-01-08。

作者简介:桂凯,男,卫生部纳米生物技术重点实验室硕士研究生,主要从事纳米药物方面的研究。

通讯作者:桂凯 E-mail:kevin.gui@163.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与试剂

人肝细胞株 L-02 (中南大学湘雅医学院细胞培养中心), 二甲基亚砷 (DMSO) (美国 Sigma 公司), RPMI-1640 (GIBCO 公司), 胎牛血清 (FBS) (GIBCO 公司), D-Hank's 液 (HyClone 公司), 胰蛋白酶 (GIBCO 公司), DMEM 培养液及 MTT (Sigma 公司)。5 mg/mL MTT 贮存液: 50 mg MTT 溶于 10 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 调整至 pH7.3, 过滤除菌, 置棕色瓶内, 4℃ 冰箱贮存。低温高速离心机 (美国 Beckman 公司)、超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)、恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Quene 公司)、IX70 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)、显微照相系统 (日本 Olympus 公司)、全自动紫外分光光度计 (美国 Beckman 公司)、E260 电子天平 (梅特勒公司)、细胞培养瓶及培养板等为 Costar, Orange, Millipore 等公司产品; 阿霉素 (珐玛希亚公司), ADM-PBCA-NP 及 PBCA-NP 为本实验室自制。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 L-02 细胞用含 10% 新生小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 完全培养液于 37℃, 5% 恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养约 3~4 h 后, 细胞已贴壁, 再培养 1~2 d 观察细胞生长状态, 至对数生长期时提取细胞进行实验。

1.2.2 细胞毒性实验分组<sup>[1]</sup> 细胞分为 (1) 空白对照组, 加入完全培养基; (2) ADM 组, 加入阿霉素; (3) ADM-PBCA-NP 组, 加入阿霉素纳米粒; (4) PBCA-NP 组, 加入空白纳米粒。(1)(2)(3) 组加入的药物终浓度分别为 10<sup>-6</sup> mol/L, 10<sup>-7</sup> mol/L 及 10<sup>-8</sup> mol/L 3 个剂量。加药培养 24 h 后, 行 MTT 测定。

1.2.3 MTT 法测定细胞相对增值率 取生长状态良好的处于对数生长的 L-02 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 直接用吸管吹打后, 用含 10% 小牛血清的培养基配成细胞悬液 (5 × 10<sup>4</sup>/mL), 接种于 96 孔培养板中, 每孔细胞悬液 200 μL; 4 h 后待细胞贴壁生长良好时加入待测药物, 与细胞共孵育 24 h 后洗 2 次; 加入 20 μL MTT 液 (5 mg/mL), 置培养箱反应 4 h; 小心吸弃孔内培养上清液后, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 于 570 nm 处在酶联免疫检测仪上测各孔光密度 (OD) 值, 细胞相对增值率 % = 实验组 OD 均值/阴性对照组 OD 值 × 100%。参照

美国药典的毒性分级法<sup>[4]</sup> 评价细胞毒性 (表 1)。实验结果为 0 或 1 级反应为合格, 实验结果为 2 级反应的结合细胞形态综合评价, 实验结果为 3 到 5 级反应为不合格。

表 1 美国药典中细胞相对增殖率与细胞毒性分级的关系

细胞相对增殖率 (%)	细胞毒性分级
100	0
≥80	1
≥50	2
≥30	3
≥0	4

1.2.4 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性的测定 将制备好的细胞悬液接种于 6 孔培养板上, 按上述方法培养、分组, 分别加入相应浓度的药物, 继续培养至 24 h; 取培养液 1 mL 离心, 用比色法测定上清液中漏出细胞外的 LDH。

1.2.5 血液反应 抽取新西兰兔新鲜血液 2 mL, 加入 2% 草酸钾抗凝, 玻璃棒搅动, 除去纤维蛋白原; 加 10 倍量的生理盐水, 摇匀, 离心, 弃去上清液; 沉淀的红细胞再用生理盐水如法洗涤 2~3 次, 至上清液不显红色为止。将所得红细胞用生理盐水配成 2% 的悬液。取试管 6 只, 按表 2 比例依次加入 2% 红细胞悬液和生理盐水 (第 5 管和第 6 管分别作为阴性对照组和阳性对照组); 混匀后, 于 37℃ 恒温箱放置 30 min; 分别加入不同量的空白纳米粒, 摇匀, 置 37℃ 水浴箱中。每隔 15 min 观察 1 次, 观察 1 h 后, 再每隔 1 h 观察 1 次, 观察 4 h (如溶液中有棕红色絮状沉淀, 表示有红细胞凝聚), 再将各管溶液置于干燥的离心管中离心 (2 000 r/min, 5 min), 取上清液, 移入比色皿内, 用分光光度计测 D(λ) 值, 紫外光波长为 545 nm。

阳性对照组 D(λ) 值应为 (0.8 ± 0.3), 阴性对照组 D(λ) 值应不大于 0.03。溶血率 (%) = [待测样品 D(λ) 值 - 阴性对照管 D(λ) 值] / [阳性对照管 D(λ) 值 - 阴性对照 D(λ) 值] × 100%。若溶血率 < 5%, 说明材料无溶血作用, 符合医用材料的溶血试验要求。

表 2 溶血试验

	试管号码					
	1	2	3	4	5	6
2% 红细胞悬液 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理盐水	2.0	2.1	2.2	2.3	2.5	0
蒸馏水 (mL)	0	0	0	0	0	2.5
空白纳米粒 (mL)	0.5	0.4	0.3	0.2	0	0

### 1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差表示 ( $\bar{x} \pm s$ ), 对照组与实验组之间比较采用 *t* 检验, 实验组组间显著性差异采用 One-way ANOVA 分析。各实验组与对照组的比较采用最小显著差值法 (LSD)。  $P < 0.05$  为差异有显著意义。

## 2 结果

### 2.1 各组肝细胞 L-02 的毒性观察

ADM 组, ADM-PBCA-NP 组和 PBCA-NP 组在  $10^{-6}$  浓度内的细胞毒性分级均为 I 级, 即无细胞毒性(表 1)。

表 3 各组 L-02 细胞毒性 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 (mol/L)	OD 值	相对增殖率 (%)	毒性分级 (0-4)
对照组		0.887 ± 0.046		
ADM	$10^{-6}$	0.847 ± 0.087	80.23	1
	$10^{-7}$	0.783 ± 0.049	82.24	1
	$10^{-8}$	0.861 ± 0.030	85.27	1
ADM-PBCA-NP	$10^{-6}$	0.782 ± 0.024	80.22	1
	$10^{-7}$	0.754 ± 0.075	83.23	1
	$10^{-8}$	0.742 ± 0.058	81.01	1
PBCA-NP	$10^{-6}$	0.768 ± 0.024	87.25	1
	$10^{-7}$	0.790 ± 0.012	84.32	1
	$10^{-8}$	0.837 ± 0.029	89.78	1

注:  $P < 0.05$

### 2.2 各组肝细胞 L-02 细胞上清液 LDH 的活性

ADM-PBCA-NP 组, PBCA-NP 组的 LDH 释放值与 ADM 组和空白对照组相比, 差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 亦说明在  $10^{-6}$  mol/L 的浓度范围内, ADM-PBCA-NP 和 PBCA-NP 对肝细胞 L-02 无明显毒性作用(表 4)。

表 4 各组 L-02 细胞 LDH 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度		
	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
空白对照		43.4 ± 5.06	
ADM	45.3 ± 6.34	42.5 ± 5.14	40.9 ± 5.08
ADM-PBCA-NP	46.3 ± 5.06	43.8 ± 5.08	42.6 ± 4.15
PBCA-NP	45.1 ± 6.32	43.1 ± 4.33	42.7 ± 5.26

注:  $P > 0.05$

### 2.3 溶血试验

不同浓度 PBCA-NP 的溶血率均  $< 3.5\%$  (表 5)。

表 5 不同浓度 PBCA-NP 的溶血率

	试管号码					
	1	2	3	4	5	6
D(λ)	0.050	0.055	0.059	0.057	0.023	1.08
溶血率%	2.55	3.03	3.41	3.22	2.0	100

## 3 讨论

PBCA 在体内的降解途径主要为酯键的水解; 其降解产物为水溶性的, 被机体从肾脏排泄<sup>[2]</sup>, 此过程可被血清酯酶、细胞溶酶体、胰液等催化<sup>[3]</sup>; 此外在体外还观察到 PBCA 可以降解为甲醛及异丁醇, 并认为是此类材料具有细胞、组织毒性的主要原因<sup>[4]</sup>, 但相对于体内酯酶的催化降解过程而言, 这一过程是很缓慢的。本实验结果显示, ADM 组、ADM-NP 组、PBCA-NP 组在  $10^{-6}$  mol/L 的浓度范围内, 细胞毒性均为 1 级, 即对细胞无毒。同时其溶血率均小于 3.5%, 说明其生物相容性好, 在一定的浓度范围内不会引起溶血。尽管 PBCA 对机体的毒性很小, 但是在 Tseng 等<sup>[5]</sup>的研究中发现, 向培养的肝细胞中加入 PBCA-NP, 浓度达到 150 ug/mL 后可以出现细胞膜的损伤。ADM 的细胞培养浓度常在  $10^{-6} \sim 10^{-8}$  mol/L。

体外细胞毒性试验并不能完全反映药物在机体内的情况。实际上, 在体外细胞培养的过程中, 纳米药物与细胞的比例远远高于体内给药的浓度, 而且体外培养时纳米药物的代谢产物聚集在培养液中, 对细胞可产生持续的刺激作用; 而在体内, 代谢产物会及时被机体排泄到体外。但由于机体内药物的作用和代谢过程较体外更复杂, 故上述试验结果尚待动物实验进一步验证。

### 参考文献:

- [1] 申良方, 王欣, 王骋等. 阿霉素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒粒径对肝靶向性的影响[J]. 中南大学学报(医学版) 2006, 32(05): 47-50.
- [2] Lenaerts V, Couvreur P, Christiaens-Leyh D, et al. Degradation of poly ( isobutyl cyanoacrylate ) nanoparticles [ J ]. Biomaterials, 1984, 5(2): 65-68.
- [3] Muller RH, Lherm C, Herbolt J, et al. In vitro model for the degradation of alkylcyanoacrylate nanoparticles [ J ]. Biomaterials, 1990, 11(8): 590-595.
- [4] Kreuter J, Wilson CG, Fry JR, et al. Toxicity and association of polycyanoacrylate nanoparticles with hepatocytes [ J ]. J Microencapsul, 1984, 1(3): 253-257.
- [5] Tseng YC, Hyon SH, Ikada Y. Modification of synthesis and investigation of properties for 2-cyanoacrylates [ J ]. Biomaterials, 1990, 11(1): 73-79.