

高速离心机(Sigma,美国);微量加样器(Eppendorf,德国);紫外分光光度计(BECKMAN,美国);标准96孔微量板(Costar,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 从-70℃冰箱中将变链菌标准株及耐氟株取出,常规复苏,分别接种于TPY固体培养基,37℃厌氧(80%N₂,10%H₂,10%CO₂)培养48 h,经涂片和生化鉴定为纯菌后,分别挑取单个菌落转种于TPY液体培养基,过夜培养后4 000 r/min离心10 min,弃上清,用生理盐水将细菌沉淀物调节为0.5麦氏浊度(即1.5×10⁸ CFU/mL)的菌悬液备用。

1.2.2 纳米银的制备 a液:将0.51 g硝酸银溶解于10 mL蒸馏水中;b液:将1.08 g葡萄糖、0.75 g PVP、0.192 g NaOH、1.02 g CTAB放入烧瓶中,加入30 mL蒸馏水,搅拌使其完全溶解。室温下,将a液迅速加到b液中,溶液立即变为红棕色,即纳米银溶胶(简称溶胶)生成,继续搅拌30 min。将该溶胶12 000 r/min离心10 min,弃上清,并用蒸馏水进行震荡冲洗,如此重复3次。然后高温烘干得到纳米银粉末,经预实验证实该纳米银在较低浓度下抗菌性较好,用蒸馏水配制800 μg/mL的溶胶作为实验药品,置暗处4℃下存放。用紫外-可见分光光度法(ultraviolet-visible,UV-vis)、X线衍射(X-ray diffraction,XRD)、透射电子显微镜(transmission electron microscopy,TEM)对该纳米银进行表征。

1.2.3 抑菌环实验 将直径为10 mm的标准定性滤纸片高压灭菌后,保存备用。在超净台内,用无菌棉棒蘸取稀释为10⁶ CFU/mL的菌液,均匀涂抹在TPY平板上,分别制备两菌平板,置室温干燥5 min。分别将30 μL纳米银溶胶(800 μg/mL)、蒸馏水滴到两滤纸片(即1号、2号)上为实验、对照纸片,一式2份,并晾干、紫外照射30 min。在两菌平板上,分别放上两种纸片。将平板倒置、放于37℃恒温箱厌氧培养24 h。观察结果,并测量抑菌环直径,测3次取平均值,实验重复3次。

1.2.4 MIC、MBC的测定 将800 μg/mL的溶胶用TPY液体培养基二倍稀成400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56、0.78 μg/mL的系列浓度。取两块96孔板,在每一板内分别向第一行的1到10孔内依次加入100 μL上述银溶胶。然后吸取100 μL稀释为10⁶ CFU/mL的两菌液分别加到两板的以上各孔内并混匀。11号孔为阳性对照仅加入200 μL菌液,12号孔为阴性对照加入800 μg/mL的溶胶200 μL。一式3份,实验重复3次。密封孔板,置于

37℃温箱厌氧培养24 h,观察各孔的混浊度。在96孔板中,当阳性对照呈现混浊(有菌生长),阴性对照澄清(无菌生长)时,实验组中未见混浊孔的最低纳米银浓度即为该溶胶对实验菌的MIC。MBC值的测定:从未混浊的实验孔里分别取100 μL液体,滴到TPY固体培养基上,涂布均匀,37℃温箱厌氧生长24 h,板中未见菌生长或菌落数小于5个的药液最低浓度视为MBC值。实验重复3次,取平均值。

1.3 统计学处理 纳米银对标准株及耐氟株的抑菌圈直径、MIC、MBC值分别以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 20.0统计包软件进行方差分析。

2 结果

2.1 纳米银的表征 室温下,葡萄糖还原硝酸银制备出的纳米银为:均一、粒径小、分散性高、多结晶的类球形银粒子。如图1,纳米银的UV-vis图显示银粒子最大等离子吸收峰在411 nm处,单峰、左右对称、半峰宽较窄(在300~500 nm内)。将纳米银溶胶置于暗处4℃下,存放1个月,稳定性较好;如图2,纳米银的XRD图中出现表征银的4个明显峰值,对应的晶面指数由里到外依次为(111)、(200)、(220)、(311),即该纳米银为较高纯度的银纳米粒子,且为多晶结构;如图3,TEM图表明纳米银为分散性较好、均粒径约为13.04 nm的类球形粒子。

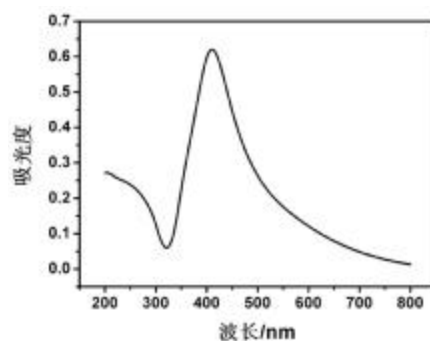


图1 纳米银的UV-vis图

Fig 1 UV-vis spectrum of silver nanoparticles

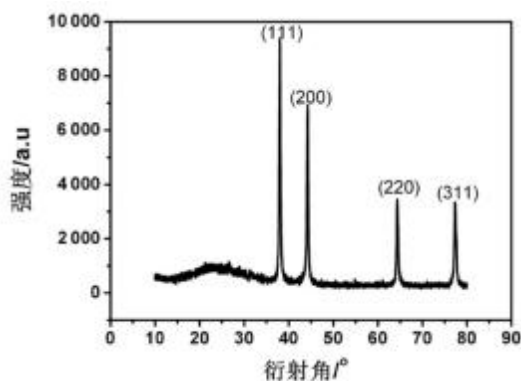


图2 纳米银的XRD图

Fig 2 XRD of silver nanoparticles

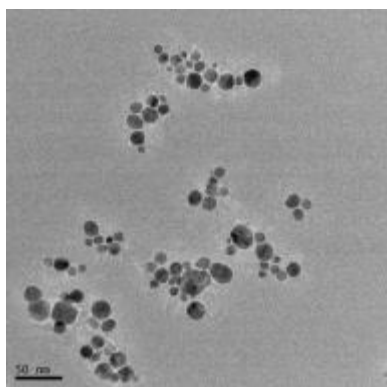
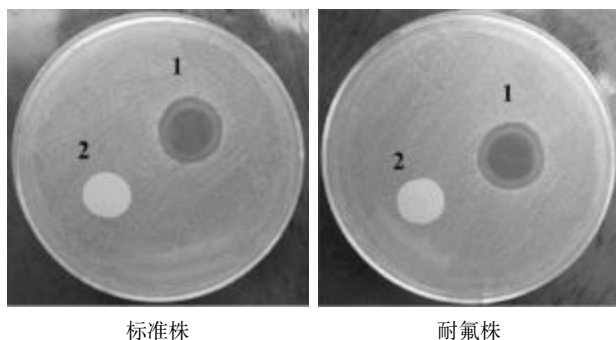


图3 纳米银的 TEM 图

Fig 3 TEM of silver nanoparticles

2.2 抑菌环结果 纳米银溶胶对标准株及耐氟株的抑菌环清晰效果较好(图4),抑菌环直径分别为 (10.87 ± 0.67) mm、 (9.68 ± 0.86) mm,对照组无显著抑菌性,抑菌环直径为 (0.25 ± 0.12) mm、 (0.26 ± 0.11) mm。经方差分析可知:与对照组相比,纳米银溶胶对标准株、耐氟株有较高的抑菌效果,差异有统计学意义($P < 0.05$);但溶胶对标准株、耐氟株的抑菌性无统计学差异($P > 0.05$)。



1:纳米银溶胶;2:蒸馏水

图4 纳米银溶胶对标准株及耐氟株的抑菌圈图

Fig 4 The zones of inhibition of silver colloids against two strains

2.3 MIC、MBC 值 纳米银溶胶对标准株及耐氟株的MIC分别为 (2.08 ± 0.90) $\mu\text{g/mL}$ 、 (2.60 ± 0.90) $\mu\text{g/mL}$,MBC分别为 (4.16 ± 1.81) $\mu\text{g/mL}$ 、 (5.21 ± 1.81) $\mu\text{g/mL}$ 。溶胶对标准株、耐氟株有较高的抑菌杀菌效果,差异有统计学意义($P < 0.05$);但溶胶对标准株、耐氟株的抗菌性无统计学差异($P > 0.05$)。

与对照组相比,葡萄糖制备的纳米银对标准株及耐氟株均有抗菌性,差异有统计学意义($P < 0.05$);对标准株的抑菌环直径大于耐氟株,MIC、MBC值低于耐氟株,但对两菌的抗菌效果无统计学差异($P > 0.05$)。

3 讨论

变链菌是最重要的致龋菌,它在唾液中的正常量约为 1×10^5 CFU/mL^[5],实验中将菌液浓度调为 $10^5 \sim$

10^6 CFU/mL,接近人体口腔中正常的变链菌量,使实验结果有指导意义。氟化物有公认的防龋效果,但随着氟化物大量广泛的应用,耐氟株(可降低氟化物的抑菌性)不断出现。因此,临床上需要研发新型有效的防龋药物,同时还应避免耐药株的出现。纳米银是以纳米技术为基础研制出的一种新型非抗生素类抗菌剂,不易产生耐药性,且广谱高效、安全性高,有传统无机抗菌剂无法比拟的作用效果。液相化学还原法是制备纳米银最常用的方法,它是在液相有保护剂存在下,将银盐中的银离子还原成银原子,制备出纳米银粒子的方法。纳米银粒子的粒径与其抗菌性有关,粒径越小则抗菌性越高^[6],通过合成方法和反应条件可对其进行调控。最近,有纳米银抑制牙釉质表面变链菌粘附性的研究^[7],也表明小粒径纳米银有较高的抗菌性。

本研究中还原剂葡萄糖,绿色、价廉、易得;保护剂PVP,可阻止所形成的银粒子发生团聚,且在一定程度上可起到还原银离子的作用;反应在室温下进行。通过UV-vis分光光度、XRD及TEM3种最常用的表征手段^[8-9],对纳米银的结构和性能进行了表征:制备的纳米银为分散均匀、均粒径约为13.04 nm类球形的颗粒。UV-vis图可表征纳米银粒子的形貌,球形表现为单峰,半峰宽越窄则粒径分布越均匀。XRD是鉴定物质晶相的有效手段,XRD图中出现代表银粒子的4个明显峰值,说明纳米银晶体有4个晶面,对应的晶面指数从里向外依次为(111)、(200)、(220)、(311),即该纳米银为多晶结构。TEM可以研究纳米银的结晶情况,观察纳米粒子的形貌、分散情况,测量和评估粒子的粒径,能准确、直观地测出纳米银的形态(如球形等形状)等。

金属银和银离子有较好的抗菌性。银离子的抗菌性主要是借静电吸引力与带负电的细菌结合来实现的^[10]:它可干扰肽聚糖的合成、破坏细胞壁,损伤细胞的功能系统,与细菌蛋白质、DNA反应而抑制细胞的生长与繁殖,从而达到抑菌杀菌的效果。另外,细菌死亡后银离子可从细胞内游离出来,可重复杀菌。但是纳米银的抗菌机制目前尚未完全清楚,它是一种细菌细胞内、外同时作用的复杂机制。纳米银的抗菌性与表面接触相关,能抑制呼吸链的酶系统及改变DNA的合成等^[11]。它可抑制微生物的生长,穿过细菌细胞壁破坏细胞膜,进而与细胞内物质结合,且不同类型细菌的细胞壁差异较大,抑菌效果不同:纳米银对革兰阳性菌的抗菌性低于革兰阴性菌的^[12]。纳米银可在细胞壁上产生小孔,进入周质空间,破坏细胞膜结构使其渗透性发生变化;

进入细胞内部,使 DNA 浓缩,并与破损细菌的细胞质结合积聚,最终引起胞内物质流失使细菌死亡^[13]。此外,纳米银在液体环境中容易释放银离子,这将使其抗菌性进一步增强。

随着纳米技术的不断发展,纳米状态下银的杀菌能力得到提高,少量的纳米银即可产生较强的杀菌效果。Juan 等^[11]研究表明纳米银对变链菌的抗菌性(MIC 为 $4.86 \mu\text{g/mL} \pm 2.71 \mu\text{g/mL}$, MBC 为 $6.25 \mu\text{g/mL}$)高于纳米金、氧化锌。本研究中,纳米银对两实验菌均有较高的抗菌性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。抑菌环直径、MIC、MBC 是表征药物抗菌性最常用的指标:同等条件下,抑菌环直径越大, MIC、MBC 值越小,药物的抗菌性越高。标准株和耐氟株均为革兰阳性菌对溶胶的敏感性相似,溶胶对两菌株的抗菌性无统计学差异($P > 0.05$)。该纳米银表现出较高抗实验菌的性能,少量、低浓度的纳米银溶胶可产生较好的抗菌效果。在临床应用中可以避免牙齿着色,符合低毒美观的要求,是用于抑制变链菌较理想的防龋药物。同时,含纳米银与季铵盐的抗菌剂对牙本质上的变链菌也有较好的抗菌效果,将来可以溶于牙科粘结剂、密封剂及复合材料等达到抗菌作用^[14]。此外,纳米银与多种抗生素可产生协同杀菌作用^[15],能增强原药物的杀菌效果,可用于耐药菌的防治。

本实验中,室温下葡萄糖还原硝酸银可制备出均一、分散性好、均粒径约为 13.04 nm 的类球形纳米银粒子,抗菌性能测试表明该纳米银对变链菌标准株及耐氟株均有较高的抗菌效果,在防龋、口腔抗菌材料领域有广阔的应用前景。今后尚需对纳米银的制备方法、抗菌机制及在口腔环境和临床转化实验等方面做进一步研究,为龋病的防治提供一定的实验依据。

参考文献:

- [1] Chansley P E, Kral T A. Transformation of fluoride resistance genes in *Streptococcus mutans*[J]. Infect Immun, 1989,57(7):1968
- [2] Bo L, Yang W, Chen M, et al. A simple and 'green' synthesis of polymer-based silver colloids and their antibacterial properties[J]. Chem Biodivers, 2009,6(1):111
- [3] Rastogi S K, Rutledge V J, Gibson C, et al. Ag colloids and Ag clusters over EDAPTMS-coated silica nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity against *Escherichia coli* [J]. Nanomedicine, 2011,7(3):305
- [4] 殷晓萍,于丹妮,陈锦英.变形链球菌耐氟株体外诱导分离方法的研究[J].天津医药,2004,32(6):321
- [5] Dasanayake A P, Caufield P W, Cutter G R, et al. Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods[J]. Arch Oral Biol, 1995,40(4):345
- [6] Martínez-Castañón G A, Niño-Martínez N, Martínez-Gutiérrez F, et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes[J]. J Nanopart Res, 2008,10(8):1343
- [7] Espinosa-Cristóbal L F, Martínez-Castañón G A, Téllez-Déctor E J, et al. Adherence inhibition of *Streptococcus mutans* on dental enamel surface using silver nanoparticles[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013,33(4):2197
- [8] 熊金钰,徐国财. 纳米银的制备及表征[J]. 金属功能材料,2004,11(2):38
- [9] Shamel K, Ahmad M B, Jazayeri S D, et al. Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method[J]. Int J Mol Sci, 2012,13(6):6639
- [10] Jung W K, Koo H C, Kim K W, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. Appl Env Microbiol, 2008,74(7):2171
- [11] Hernández-Sierra J F, Ruiz F, Pena D C, et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold[J]. Nanomedicine, 2008,4(3):237
- [12] Kim J S, Kuk E, Yu K N, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles[J]. Nanomedicine, 2007,3(1):95
- [13] Chen M, Yang Z, Wu H, et al. Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel[J]. Int J Nanomedicine, 2011,6:2873
- [14] Cheng L, Zhang K, Weir M D, et al. Effects of antibacterial primers with quaternary ammonium and nano-silver on *Streptococcus mutans* impregnated in human dentin blocks[J]. Dent Mater, 2013,29(4):462
- [15] Fayaz A M, Balaji K, Girilal M, et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria[J]. Nanomedicine, 2010,6(1):103

(2013-12-18 收稿)

文章编号 1006-8147(2014)03-0220-04

论 著

纳米银的制备及其对变异链球菌抗菌性的研究

李长娥, 于丹妮, 韩育植, 李 娜

(天津医科大学第二医院口腔科, 天津 300211)

摘要 目的: 对纳米银的制备及其对变异链球菌标准株和耐氟株的抗菌性进行研究。方法: 采用葡萄糖还原硝酸银制备纳米银; 采用纸片扩散法和微稀释法测定该纳米银对标准株及耐氟株的抗菌效果。结果: 制备的纳米银为分散性好、均粒径约为 13.04 nm 的类球形粒子, 它对标准株及耐氟株的抑菌环直径分别为 (10.87 ± 0.67) mm、 (9.68 ± 0.86) mm, MIC 为 (2.08 ± 0.90) $\mu\text{g/mL}$ 、 (2.60 ± 0.90) $\mu\text{g/mL}$, MBC 为 (4.16 ± 1.81) $\mu\text{g/mL}$ 、 (5.21 ± 1.81) $\mu\text{g/mL}$ 。该纳米银对标准株和耐氟株均有抗菌性 ($P < 0.05$), 且对两菌株抗菌性的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 葡萄糖还原硝酸银可制备出对变异链球菌标准株及耐氟株有较好抗菌性的纳米银。

关键词 葡萄糖; 纳米银; 变异链球菌; 抗菌性

中图分类号 R781

文献标志码 A

Research on the preparation of silver nanoparticles and its antibacterial property on *Streptococcus mutans*

LI Chang-e, YU Dan-ni, HAN Yu-zhi, LI Na

(Department of Stomatology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To explore the preparation of silver nanoparticles and its antibacterial property on *Streptococcus mutans*. **Methods:** Silver nanoparticles were prepared by reducing silver nitrate with glucose. Disk diffusion method and microdilution method were used to explore the antimicrobial properties of the silver nanoparticles on standard strain and fluoride-resistant strain of *Streptococcus mutans*. **Results:** The silver nanoparticles were spherical with 13.04 nm mean size and very well dispersed. The mean diameters of inhibition zone of the nanoparticles on test bacteria were (10.87 ± 0.67) mm, (9.68 ± 0.86) mm respectively while minimum inhibitory concentration were (2.08 ± 0.90) $\mu\text{g/mL}$, (2.60 ± 0.90) $\mu\text{g/mL}$ and minimum bactericidal concentration were (4.16 ± 1.81) $\mu\text{g/mL}$, (5.21 ± 1.81) $\mu\text{g/mL}$. Silver nanoparticles had excellent antibacterial effect on the test bacteria, showing significant statistical differences ($P < 0.05$). While the antibacterial property of silver nanoparticles on standard strain and fluoride-resistant strain revealed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** Glucose-reduced silver nitrate can be used prepare silver nanoparticles which has marked antibacterial property on standard strain and fluoride-resistant strain of *Streptococcus mutans*.

Key words glucose; silver nanoparticles; *Streptococcus mutans*; antibacterial property

变异链球菌 (*Streptococcus mutans*, 简称变链菌) 是公认的致龋菌, 氟化物是有效的防龋剂, 近几年随着其广泛高浓度的应用, 变链菌耐氟株不断出现^[1], 这使氟化物防龋效果降低。但龋病的患病率仍然较高, 故临床上需要开发新型有效的防龋药物。纳米银是一种新型非抗生素类抗菌剂, 目前尚无细菌对其耐药, 具有量子效应、小尺寸效应和较大的比表面积等特性, 呈现出独特的、优于普通材料的生物相容性及抗菌性等性能。纳米银的制备方法有多种, 主要分为物理法、化学法和生物还原法, 其中液相化学还原法因操作方便、设备简单等特点而成为最常用的方法。国内外有对纳米银的制备及其抗菌性等方面的报道^[2-3], 但在葡萄糖制备的纳米银对口腔细菌抗菌性的研究还相对较少。本研究采用室温下葡萄糖还原硝酸银的液相化学还原法制备纳

米银, 并测定了该纳米银对变链菌标准株及耐氟株的抑菌圈直径、最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)、最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 的大小, 初步探讨了其对实验菌的抗菌性, 为新型防龋药物的研制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 变异链球菌 Ingbritt C (血清 C 型) 国际标准株 (以下称标准株) 购自四川大学口腔医学研究所; 变异链球菌耐氟株 (以下称耐氟株) 本课题组成功构建并保存^[4]。

1.1.2 主要试剂 TPY 培养基 (OXOID, 英国); 硝酸银、葡萄糖、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、氢氧化钠 (NaOH)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 等均为分析纯 (天津化学试剂有限公司)。

1.1.3 主要仪器设备 磁力搅拌器 (DF-II, 上海);

作者简介 李长娥 (1987-), 女, 硕士在读, 研究方向: 口腔内科学; 通信作者: 于丹妮, E-mail: dann2468@eyou.com。