



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849439 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510214825. 8

(22) 申请日 2015. 04. 30

(71) 申请人 四川农业大学

地址 625014 四川省雅安市雨城区新康路  
46 号 (四川农业大学)

(72) 发明人 刘耀文 叶劲松 吴贺君 陈淑娟  
何利 李美良 王淑瑶

(74) 专利代理机构 北京国林贸知识产权代理有  
限公司 11001

代理人 胡琳梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/48(2006. 01)

B82Y 35/00(2011. 01)

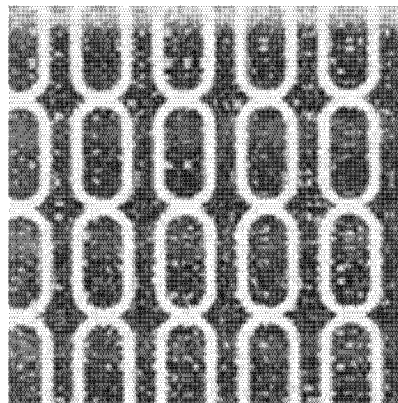
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种高效检测纳米颗粒肾毒性的方法

(57) 摘要

本发明公布了一种高效检测纳米颗粒肾毒性的方法,该方法包括如下步骤:1) 制备图案化纤维电纺接收板,利用光刻蚀技术和直流磁控溅射技术,制备具有图案化金属银层的接收板;2) 制备图案化电纺纤维,利用步骤1) 所得物进行静电纺丝;3) 制备 PDMS 腔体;4) 将步骤2) 和步骤3) 所得物用等离子处理进行连接;5) 将原代小鼠肾小管上皮细胞接种于步骤4) 所得物中的图案化电纺纤维上,利用注射泵将培养基泵入步骤4) 所得物的腔体,再将纳米颗粒泵入,于纳米颗粒泵入后 20 天内记录各种毒性指标。本发明可以实现高效、高精度的纳米颗粒肾毒性检测,检测效果与体内动物实验一致;相对于体内动物实验更加快捷。



1. 一种高效检测纳米颗粒肾毒性的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

1) 制备图案化纤维电纺接收板:先在绝缘玻璃片上涂覆正性感光胶,再覆盖一层光掩模,利用光刻机进行刻蚀;再通过直流磁控技术在刻蚀后的玻璃片上沉积一层金属银,所沉积的金属银的形状包括圆形阵列、椭圆形的一种,圆形半径为  $100\ \mu\text{m}$ – $500\ \mu\text{m}$ ,椭圆长轴为  $200\ \mu\text{m}$ – $600\ \mu\text{m}$ ,短轴为  $100\ \mu\text{m}$ – $300\ \mu\text{m}$ ;最后清洗掉剩余的正性感光胶;

2) 制备图案化电纺纤维:将医用高分子聚合物用有机溶剂溶解,利用步骤 1) 所得物作为电纺接收板,通过静电纺丝技术制备圆形或椭圆形的图案化电纺纤维;控制所得纤维的直径为  $300$ – $500\ \text{nm}$ ;

所述医用高分子聚合物包括聚乳酸、聚己内酯、聚氨酯、聚丙烯腈中的一种,所述有机溶剂包括丙酮、二甲基甲酰胺中的至少一种;

3) 将负性环氧树脂型近紫外线光刻胶 SU-8 放置在硅片上,利用光刻蚀技术,保留宽为  $40$ – $550\ \mu\text{m}$ 、高为  $30$ – $80\ \mu\text{m}$  的 SU-8 长方体作为模具,去掉其余的 SU-8;将熔融的 PDMS 置于所得模具上,待 PDMS 冷却后,去除模具,得到 PDMS 腔体;

4) 将步骤 2) 和步骤 3) 所得物在  $\text{O}_2$  或  $\text{N}_2$  的氛围下,用等离子体处理  $30$  秒,使得步骤 2) 和步骤 3) 所得物紧密连接;

5) 将  $0.5 \times 10^6$ – $1.5 \times 10^6$  个原代肾小管上皮细胞接种于步骤 4) 所得物中的图案化电纺纤维上,利用注射泵将培养基泵入步骤 4) 所得物的腔体,流速为  $0.2$ – $0.5\ \text{ml/h}$ ;再将纳米颗粒悬浮于 PBS 后泵入,于纳米颗粒泵入后,记录原代肾小管上皮细胞的存活率、细胞形态学、乳酸脱氢酶、谷胱甘肽、丙二醛、超氧化物歧化酶的测定结果、细胞凋亡和周期的变化、细胞内氧自由基、酶活力、特征基因表达水平,得出纳米颗粒的毒性;

所述纳米颗粒包括纳米四氧化三铁、纳米二氧化钛、纳米氧化锌、纳米二氧化硅、纳米银颗粒中的一种。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 1) 中沉积的金属银的形状为椭圆形,椭圆长轴为  $200\ \mu\text{m}$ – $600\ \mu\text{m}$ ,短轴为  $100\ \mu\text{m}$ – $300\ \mu\text{m}$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中,进行电纺时,电压为  $15$ – $25\ \text{KV}$ ,流速为  $0.5$ – $1.0\ \text{ml/h}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中,纤维的直径为  $300\ \text{nm}$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中的医用高分子聚合物为聚乳酸,所述有机溶剂为丙酮与二甲基甲酰胺的混合溶液,丙酮与二甲基甲酰胺的体积比为  $9:1$ 。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中的模具的宽为  $200\ \mu\text{m}$ ,高为  $50\ \mu\text{m}$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中的模具的宽为  $50\ \mu\text{m}$ ,高为  $80\ \mu\text{m}$ 。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 5) 中,用于接种的原代肾小管上皮细胞的数目为  $1 \times 10^6$  个。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 5) 中,培养基的流速为  $0.3\ \text{ml/h}$ 。

## 一种高效检测纳米颗粒肾毒性的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米颗粒毒性检测领域,具体涉及一种高效检测纳米颗粒肾毒性的方法。

### 技术背景

[0002] 随着纳米技术产业化进程,许多纳米材料已经大规模生产并应用于涂料、化妆品、催化剂、新型材料、医学等领域,人们在不知不觉中暴露在有纳米物质存在的环境中。特别是近年来,纳米材料在直接关系到人身安全和健康的医药领域的快速发展,使纳米材料的安全性引起了各方面的格外关注。

[0003] 纳米材料具有的独特理化性质决定了其独特的生物学效应,诸多研究已表明纳米物质可能具有与常规尺寸物质不同的毒性。

[0004] 尤其在生物医药领域,纳米颗粒常常用作药物输送的载体,全面快速的检测所用纳米颗粒的毒性,尤其是细胞毒性,显得十分重要。

[0005] 肾是人体的重要器官,能否精确高效的评价纳米颗粒的肾毒性是判断所用纳米颗粒是否适用于生物医用的重要内容。

[0006] 在现有技术中,评价纳米细胞的肾毒性的常用方法为进行纳米颗粒毒性的动物实验。然而进行动物实验,所需检测周期长,同时常会由于实验动物的个体差异造成检测误差。现有技术中用于替代动物实验的体外实验,步骤繁琐,容易由于操作失误造成误差,精确度难以保证。

[0007] 因此,如何实现高效、快捷、高精度的对纳米颗粒肾毒性的检测,成为本领域亟待解决的问题。

### 发明内容

[0008] 针对现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种高效检测纳米颗粒肾毒性的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

1) 制备图案化纤维电纺接收板:先在绝缘玻璃片上涂覆正性感光胶,再覆盖一层光掩模,利用光刻机进行刻蚀;再通过直流磁控技术在刻蚀后的玻璃片上沉积一层金属银,所沉积的金属银的形状包括圆形阵列、椭圆形的一种,圆形半径为  $100\ \mu\text{m}$ – $500\ \mu\text{m}$ ,椭圆长轴为  $200\ \mu\text{m}$ – $600\ \mu\text{m}$ ,短轴为  $100\ \mu\text{m}$ – $300\ \mu\text{m}$ ;最后清洗掉剩余的正性感光胶;

2) 制备图案化电纺纤维:将医用高分子聚合物用有机溶剂溶解,利用步骤 1) 所得物作为电纺接收板,通过静电纺丝技术制备圆形或椭圆形的图案化电纺纤维;控制所得纤维的直径为  $300$ – $500\ \text{nm}$ ;

所述医用高分子聚合物包括聚乳酸、聚己内酯、聚氨酯、聚丙烯腈中的一种,所述有机溶剂包括丙酮、二甲基甲酰胺中的至少一种;

3) 将负性环氧树脂型近紫外线光刻胶 SU-8 放置在硅片上,利用光刻蚀技术,保留宽为  $40$ – $550\ \mu\text{m}$ 、高为  $30$ – $80\ \mu\text{m}$  的 SU-8 长方体作为模具,去掉其余的 SU-8,;将熔融的 PDMS 置

于所得模具上,待 PDMS 冷却后,去除模具,得到 PDMS 腔体;

4) 将步骤 2) 和步骤 3) 所得物在  $O_2$  或  $N_2$  的氛围下,用等离子体处理 30 秒,使得步骤 2) 和步骤 3) 所得物紧密连接;

5) 将  $0.5 \times 10^6$ – $1.5 \times 10^6$  个原代肾小管上皮细胞接种于步骤 4) 所得物中的图案化电纺纤维上,利用注射泵将培养基泵入步骤 4) 所得物的腔体,流速为 0.2–0.5 ml/h;再将纳米颗粒悬浮于 PBS 后泵入,于纳米颗粒泵入后,记录原代肾小管上皮细胞的存活率、细胞形态学、乳酸脱氢酶、谷胱甘肽、丙二醛、超氧化物歧化酶的测定结果、细胞凋亡和周期的变化、细胞内氧自由基、酶活力、特征基因表达水平,得出纳米颗粒的毒性;

所述纳米颗粒包括纳米四氧化三铁、纳米二氧化钛、纳米氧化锌、纳米二氧化硅、纳米银颗粒中的一种。

[0009] 本发明通过大量的实验摸索发现,当选用直径为 300 nm 的电纺纤维,并将纤维膜的图案设置为圆形或椭圆形,以及设置 PDMS 腔体的尺寸为宽为 40–550  $\mu$ m、高为 30–80  $\mu$ m 时,可使得小鼠原代肾小管上皮细胞在腔体内很好的生长,并对纳米颗粒产生几乎与动物实验相同的毒性反应。

[0010] 本发明可以使得图案化纤维和 PDMS 腔体和玻璃基底无缝紧密贴合,保证了纳米颗粒完全的与细胞接触,确保了检测的精确度。同时,由于图案化纤维膜紧密的与基底和腔体贴合,使得本发明可以具有很好的重复操作性,节省了检测的成本。

[0011] 重要的是,任何根据本发明作出的可预计的改变,如微调图案形状和 PDMS 大小,均属于本发明的保护范围。

[0012] 特别需要指出的是,本发明适用于检测纳米颗粒的肾毒性。根据本领域的常识,应理解本发明适用于任何纳米颗粒的肾毒性检测。应理解本发明所列举的几种纳米颗粒仅仅用于证明本发明适用于纳米颗粒的肾毒性检测,不应理解为对本发明的限定。

[0013] 本发明中,步骤 1) 沉积的金属银可以制备成任何形式的阵列,只需阵列中的图形为本发明所述的圆形或椭圆形即可。

[0014] 优选的,所述步骤 1) 中沉积的金属银的形状为椭圆形,椭圆长轴为 200  $\mu$ m–600  $\mu$ m,短轴为 100  $\mu$ m–300  $\mu$ m。当所沉积的金属银的形状为椭圆形阵列时,原代肾小管上皮细胞具有更好的生长状态,更有利于纳米颗粒的肾毒性的检测。

[0015] 所述步骤 2) 中,进行电纺时,电压为 15–25 KV,流速为 0.5–1.0 ml/h。

[0016] 优选的,所述步骤 2) 中,纤维的直径为 300 nm。当所用纤维的直径为 300 nm 时,原代肾小管上皮细胞具有更好的生长状态,更有利于纳米颗粒的肾毒性的检测。

[0017] 所述步骤 2) 中的医用高分子聚合物为聚乳酸,所述有机溶剂为丙酮与二甲基甲酰胺的混合溶液,丙酮与二甲基甲酰胺的体积比为 9:1。当纤维为聚乳酸纤维时,原代肾小管上皮细胞具有更好的生长状态,更有利于纳米颗粒的肾毒性的检测。

[0018] 优选的,所述步骤 3) 中的模具的宽为 200  $\mu$ m,高为 50  $\mu$ m。

[0019] 更优选的,所述步骤 3) 中的模具的宽为 50  $\mu$ m,高为 80  $\mu$ m。检测腔道越小,越集成化,可以实现一个检测装置具有多个腔道,实现更多组平行实验的进行,更加确保检测的精确度。在现有技术中,尚未发现可以制备如此小的、基于电纺纤维膜进行肾毒性检测的腔体。

[0020] 所述步骤 5) 中,用于接种的原代肾小管上皮细胞的数目为  $1 \times 10^6$  个。

[0021] 所述步骤 5) 中, 培养基的流速为 0.3 ml/h。

[0022] 本发明的有益效果:

1、本发明可以实现高效、高精度的纳米颗粒肾毒性检测, 检测效果与体内动物实验一致; 相对于体内动物实验更加快捷;

2、本发明所用原料易得, 成本低, 所用的技术成熟易实施, 具有巨大的市场应用前景。

## 附图说明

[0023] 图 1 为本发明所得图案化纤维。

## 具体实施方式

[0024] 以下通过实施例的具体实施方式对本发明的上述内容作进一步的详细说明, 但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。

[0025] 实施例 1

1) 制备图案化纤维电纺接收板: 先在绝缘玻璃片上涂覆正性感光胶, 再覆盖一层光掩模, 利用光刻机进行刻蚀; 再通过直流磁控技术在刻蚀后的玻璃片上沉积一层金属银, 所沉积的金属银的形状为圆形阵列, 圆形的半径为 100  $\mu\text{m}$ ; 最后清洗掉剩余的正性感光胶;

2) 制备图案化电纺纤维: 将医用高分子聚合物用有机溶剂溶解, 利用步骤 1) 所得物作为电纺接收板, 通过静电纺丝技术制备图案化电纺纤维; 控制所得纤维的直径为 500 nm;

所述医用高分子聚合物为聚乳酸, 所述有机溶剂为丙酮;

3) 将 SU-8 放置在硅片上, 利用光刻蚀技术, 去掉其余的 SU-8, 保留宽为 200  $\mu\text{m}$ 、高为 50  $\mu\text{m}$  的 SU-8 长方体作为模具; 将熔融的 PDMS 置于所得模具上, 待 PDMS 冷却后, 去除模具, 得到 PDMS 腔体;

4) 将步骤 2) 和步骤 3) 所得物在  $\text{O}_2$  的氛围下, 用等离子体处理 30 秒, 使得步骤 2) 和步骤 3) 所得物紧密连接;

5) 将  $0.5 \times 10^6$  个原代肾小管上皮细胞接种于步骤 4) 所得物中的图案化电纺纤维上, 利用注射泵将培养基泵入步骤 4) 所得物的腔体, 流速为 0.2 ml/h; 再将纳米颗粒悬浮于 PBS 后泵入, 于纳米颗粒泵入记录原代肾小管上皮细胞的超氧化物歧化酶的酶活、谷胱甘肽过氧化物酶的活性、丙二醛含量、细胞 DNA 的损伤、细胞凋亡率的变化, 得出纳米颗粒的毒性;

所述纳米颗粒为纳米三氧化二铁。

[0026] 实施例 2

1) 制备图案化纤维电纺接收板: 先在绝缘玻璃片上涂覆正性感光胶, 再覆盖一层光掩模, 利用光刻机进行刻蚀; 再通过直流磁控技术在刻蚀后的玻璃片上沉积一层金属银, 所沉积的金属银的形状为椭圆形阵列, 椭圆长轴为 200  $\mu\text{m}$ , 短轴为 100  $\mu\text{m}$ ; 最后清洗掉剩余的正性感光胶;

2) 制备图案化电纺纤维: 将医用高分子聚合物用有机溶剂溶解, 利用步骤 1) 所得物作为电纺接收板, 通过静电纺丝技术制备图案化电纺纤维; 控制所得纤维的直径为 200 nm;

所述医用高分子聚合物为聚己内酯, 所述有机溶剂为丙酮;

3) 将 SU-8 放置在硅片上, 利用光刻蚀技术, 去掉其余的 SU-8, 保留宽为 40  $\mu\text{m}$ 、高为 30  $\mu\text{m}$  的 SU-8 长方体作为模具; 将熔融的 PDMS 置于所得模具上, 待 PDMS 冷却后, 去除模

具,得到 PDMS 腔体;

4) 将步骤 2) 和步骤 3) 所得物在  $N_2$  的氛围下,用等离子体处理 30 秒,使得步骤 2) 和步骤 3) 所得物紧密连接;

5) 将  $1.5 \times 10^6$  个原代肾小管上皮细胞接种于步骤 4) 所得物中的图案化电纺纤维上,利用注射泵将培养基泵入步骤 4) 所得物的腔体,流速为 0.5 ml/h;再将纳米颗粒悬浮于 PBS 后泵入,于纳米颗粒泵入记录原代肾小管上皮细胞的超氧化物歧化酶的酶活、谷胱甘肽过氧化物酶的活性、丙二醛含量、细胞 DNA 的损伤、细胞凋亡率的变化,得出纳米颗粒的毒性;所述纳米颗粒为纳米二氧化钛。

#### [0027] 实施例 3

1) 制备图案化纤维电纺接收板:先在绝缘玻璃片上涂覆正性感光胶,再覆盖一层光掩模,利用光刻机进行刻蚀;再通过直流磁控技术在刻蚀后的玻璃片上沉积一层金属银,所沉积的金属银的形状为圆形阵列,圆形半径为 200  $\mu\text{m}$ ;最后清洗掉剩余的正性感光胶;

2) 制备图案化电纺纤维:将医用高分子聚合物用有机溶剂溶解,利用步骤 1) 所得物作为电纺接收板,通过静电纺丝技术制备图案化电纺纤维;控制所得纤维的直径为 300 nm;

所述医用高分子聚合物包括聚乳酸,所述有机溶剂为丙酮和二甲基甲酰胺的混合溶液,丙酮与二甲基甲酰胺的体积比为 9:1;

3) 将 SU-8 放置在硅片上,利用光刻蚀技术,去掉其余的 SU-8,保留宽为 500  $\mu\text{m}$ 、高为 50  $\mu\text{m}$  的 SU-8 长方体作为模具;将熔融的 PDMS 置于所得模具上,待 PDMS 冷却后,去除模具,得到 PDMS 腔体;

4) 将步骤 2) 和步骤 3) 所得物在  $N_2$  的氛围下,用等离子体处理 30 秒,使得步骤 2) 和步骤 3) 所得物紧密连接;

5) 将  $1.0 \times 10^6$  个原代肾小管上皮细胞接种于步骤 4) 所得物中的图案化电纺纤维上,利用注射泵将培养基泵入步骤 4) 所得物的腔体,流速为 0.3 ml/h;再将纳米颗粒悬浮于 PBS 后泵入,于纳米颗粒泵入记录原代肾小管上皮细胞的谷胱甘肽、丙二醛的含量、超氧化物歧化酶的测定、细胞 DNA 的损伤、细胞凋亡率的变化,得出纳米颗粒的毒性;

所述纳米颗粒为纳米氧化锌。

#### [0028] 实施例 4

1) 制备图案化纤维电纺接收板:先在绝缘玻璃片上涂覆正性感光胶,再覆盖一层光掩模,利用光刻机进行刻蚀;再通过直流磁控技术在刻蚀后的玻璃片上沉积一层金属银,所沉积的金属银的形状为椭圆形阵列,椭圆长轴为 400  $\mu\text{m}$ ,短轴为 200  $\mu\text{m}$ ;最后清洗掉剩余的正性感光胶;

2) 制备图案化电纺纤维:将医用高分子聚合物用有机溶剂溶解,利用步骤 1) 所得物作为电纺接收板,通过静电纺丝技术制备图案化电纺纤维;控制所得纤维的直径为 400 nm;

所述医用高分子聚合物为聚氨酯,所述有机溶剂为丙酮;

3) 将 SU-8 放置在硅片上,利用光刻蚀技术,去掉其余的 SU-8,保留宽为 550  $\mu\text{m}$ 、高为 80  $\mu\text{m}$  的 SU-8 长方体作为模具;将熔融的 PDMS 置于所得模具上,待 PDMS 冷却后,去除模具,得到 PDMS 腔体;

4) 将步骤 2) 和步骤 3) 所得物在  $O_2$  的氛围下,用等离子体处理 30 秒,使得步骤 2) 和步骤 3) 所得物紧密连接;

5)将  $1.5 \times 10^6$  个原代肾小管上皮细胞接种于步骤 4) 所得物中的图案化电纺纤维上, 利用注射泵将培养基泵入步骤 4) 所得物的腔体, 流速为 0.5 ml/h; 再将纳米颗粒悬浮于 PBS 后泵入, 于纳米颗粒泵入记录原代肾小管上皮细胞的超氧化物歧化酶的酶活、谷胱甘肽过氧化物酶的活性、丙二醛含量、细胞 DNA 的损伤、细胞凋亡率的变化, 得出纳米颗粒的毒性; 所述纳米颗粒为纳米二氧化硅。

#### [0029] 实施例 5

1) 制备图案化纤维电纺接收板: 先在绝缘玻璃片上涂覆正性感光胶, 再覆盖一层光掩模, 利用光刻机进行刻蚀; 再通过直流磁控技术在刻蚀后的玻璃片上沉积一层金属银, 所沉积的金属银的形状为圆形阵列, 圆形半径为 150  $\mu\text{m}$ ; 最后清洗掉剩余的正性感光胶;

2) 制备图案化电纺纤维: 将医用高分子聚合物用有机溶剂溶解, 利用步骤 1) 所得物作为电纺接收板, 通过静电纺丝技术制备图案化电纺纤维; 控制所得纤维的直径为 500 nm; 所述医用高分子聚合物为聚丙烯腈, 所述有机溶剂为丙酮;

3) 将 SU-8 放置在硅片上, 利用光刻蚀技术, 去掉其余的 SU-8, 保留宽为 200  $\mu\text{m}$ 、高为 50  $\mu\text{m}$  的 SU-8 长方体作为模具; 将熔融的 PDMS 置于所得模具上, 待 PDMS 冷却后, 去除模具, 得到 PDMS 腔体;

4) 将步骤 2) 和步骤 3) 所得物在  $\text{N}_2$  的氛围下, 用等离子体处理 30 秒, 使得步骤 2) 和步骤 3) 所得物紧密连接;

5) 将  $1.0 \times 10^6$  个原代肾小管上皮细胞接种于步骤 4) 所得物中的图案化电纺纤维上, 利用注射泵将培养基泵入步骤 4) 所得物的腔体, 流速为 0.3 ml/h; 再将纳米颗粒悬浮于 PBS 后泵入, 于纳米颗粒泵入记录原代肾小管上皮细胞的超氧化物歧化酶的酶活、谷胱甘肽过氧化物酶的活性、丙二醛含量、细胞 DNA 的损伤、细胞凋亡率的变化, 得出纳米颗粒的毒性; 所述纳米颗粒为纳米银颗粒。

#### [0030] 实施例 6

除所沉积的金属银的形状为椭圆形阵列, 椭圆长轴为 600  $\mu\text{m}$ , 短轴为 300  $\mu\text{m}$  以外, 其余与实施例 4 一致。

#### [0031] 实验例 1:

用实施例 1 的方法进行肾毒性检测, 检测结果为当原代肾小管上皮细胞在本发明体系中体外培养 10 天后, 加入浓度为 500  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 30 nm 的纳米四氧化三铁时, 作用 24 小时后, 测得原代肾小管上皮细胞的超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性为 90.14 U/mgprot, 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性为 87.14 U/mgprot, 丙二醛 (MDA) 的含量为 11.87 nmol/mgprot, DNA 的损伤率为 48.13%, 细胞凋亡率为 15.11%。

#### [0032] 实验例 2:

用实施例 2 的方法进行肾毒性检测, 检测结果为当原代肾小管上皮细胞在本发明体系中体外培养 20 天后, 加入浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 10 nm 的纳米二氧化钛时, 作用 24 小时后, 测得原代肾小管上皮细胞的超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性为 52.14 U/mgprot, 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性为 13.27 U/mgprot, 丙二醛 (MDA) 的含量为 4.63 nmol/mgprot, DNA 的损伤率为 25.64%, 细胞凋亡率为 7.81%。

#### [0033] 实验例 3:

用实施例 3 的方法进行肾毒性检测, 检测结果为当原代肾小管上皮细胞在本发明体系

中体外培养 15 天后,加入浓度为 80  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 50 nm 的纳米氧化锌时,作用 24 小时后,测得原代肾小管上皮细胞的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性为 40.46  $\mu\text{mol/gprot}$ ,丙二醛(MDA)的含量为 0.86  $\text{nmol/mgprot}$ ,超氧化物歧化酶(SOD)的活性为 9.37  $\text{U/mgprot}$ ,DNA 的损伤率为 37.71%,细胞凋亡率为 10.23%。

[0034] 实验例 4:

用实施例 4 的方法进行肾毒性检测,检测结果为当原代肾小管上皮细胞在本发明体系中体外培养 9 天后,加入浓度为 90  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 70 nm 的纳米二氧化硅时,作用 24 小时后,测得原代肾小管上皮细胞的超氧化物歧化酶(SOD)的活性为 17.09  $\text{U/mgprot}$ ,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性为 25.32  $\text{mg/gprot}$ ,丙二醛(MDA)的含量为 5.27  $\text{nmol/mgprot}$ ,DNA 的损伤率为 45.14%,细胞凋亡率为 23.74%。

[0035] 实验例 5:

用实施例 5 的方法进行肾毒性检测,检测结果为当原代肾小管上皮细胞在本发明体系中体外培养 5 天后,加入浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 80 nm 的纳米银颗粒时,作用 24 小时后,测得原代肾小管上皮细胞的超氧化物歧化酶(SOD)的活性为 17.09  $\text{U/mgprot}$ ,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性为 35.32  $\text{mg/gprot}$ ,丙二醛(MDA)的含量为 1.09  $\text{nmol/mgprot}$ ,DNA 的损伤率为 6.31%,细胞凋亡率为 3.48%。

[0036] 对比实验例 1:

对小鼠的进行灌胃实验,灌入浓度为 500  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 30 nm 的纳米四氧化三铁约 10 ml,作用机体 24 小时后,取出小鼠肾脏,进行匀浆检测,测得肾脏中的超氧化物歧化酶(SOD)的活性为 92.47  $\text{U/mgprot}$ ,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性为 89.38  $\text{U/mgprot}$ ,丙二醛(MDA)的含量为 13.41  $\text{nmol/mgprot}$ ,DNA 的损伤率为 53.41%,凋亡率为 17.56%。

[0037] 对比实验例 2:

对小鼠的进行灌胃实验,灌入浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 10 nm 的纳米二氧化钛约 10 ml,作用机体 24 小时后,取出小鼠肾脏,进行匀浆检测,测得肾脏中的超氧化物歧化酶(SOD)的活性为 58.15  $\text{U/mgprot}$ ,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性为 15.44  $\text{U/mgprot}$ ,丙二醛(MDA)的含量为 6.12  $\text{nmol/mgprot}$ ,DNA 的损伤率为 27.44%,凋亡率为 9.12%。

[0038] 对比实验例 3:

对小鼠的进行灌胃实验,灌入浓度为 80  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径为 50 nm 的纳米氧化锌约 10 ml,作用机体 24 小时后,取出小鼠肾脏,进行匀浆检测,测得肾脏中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性为 44.13  $\mu\text{mol/gprot}$ ,丙二醛(MDA)的含量为 1.24  $\text{nmol/mgprot}$ ,超氧化物歧化酶(SOD)的活性为 12.33  $\text{U/mgprot}$ ,DNA 的损伤率为 39.21%,凋亡率为 12.93%。

[0039] 对比实验例 4:

对小鼠的进行灌胃实验,灌入浓度为 90  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 70 nm 的纳米二氧化硅约 10 ml,作用机体 24 小时后,取出小鼠肾脏,进行匀浆检测,测得肾脏中超氧化物歧化酶(SOD)的活性为 20.03  $\text{U/mgprot}$ ,丙二醛(MDA)的含量为 6.84  $\text{nmol/mgprot}$ ,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性为 26.47  $\mu\text{mol/gprot}$ ,DNA 的损伤率为 45.71%,凋亡率为 24.19%。

[0040] 对比实验例 5:



对小鼠的进行灌胃实验,灌入浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$ , 粒径约为 80 nm 的纳米银颗粒约 10 ml,作用机体 24 小时后,取出小鼠肾脏,进行匀浆检测,测得肾脏中超氧化物歧化酶(SOD)的活性为 15.51 U/mgprot, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性为 36.58  $\mu\text{mol/gprot}$ , 丙二醛(MDA)的含量为 0.75 nmol/mgprot, DNA 的损伤率为 4.83%,凋亡率为 2.77%。

[0041] 由实验例 1-5 和对比实验例 1-5 可以看出,在纳米颗粒的肾毒性的检测上,本发明的检测结果与体内动物实验结果近似,可作为体内动物实验检测的替代方案。重要的是,本发明比体内实验更易控制,且经济成本和时间成本更低,具有十分良好的市场应用前景。

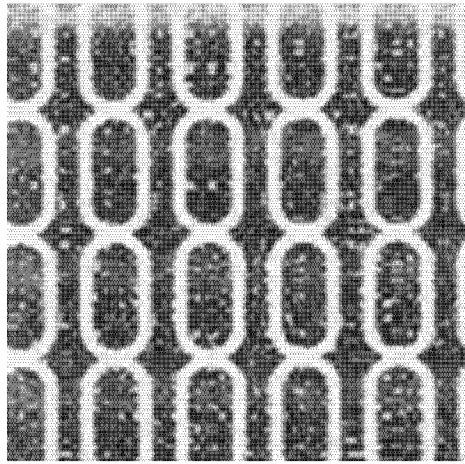


图 1