

dl-扁桃酸对人精子与阴道黏膜上皮 VK2/E6E7 细胞的毒性研究

夏敏杰, 王玉柱, 黄超, 丁训城, 李卫华*, 芦洁* (上海市计划生育科学研究所, 国家计划生育药具重点实验室, 上海 200032)

摘要: 目的 探讨 dl-扁桃酸对人阴道黏膜上皮细胞(VK2/E6E7)与精子的细胞毒性损伤。方法 不同浓度的 dl-扁桃酸处理高活力精子 20 s, 计算机辅助精子分析仪测定精子活率, 扫描电子显微镜检测精子受损情况。1.25, 2.5 g·L⁻¹ dl-扁桃酸和 4.0 g·L⁻¹ 壬苯醇醚(nonoxynol-9, N-9)处理 VK2/E6E7 细胞, MTT 法检测细胞活性, ELISA 试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)释放率, 并用流式细胞法检测细胞凋亡率。结果 dl-扁桃酸抑制精子活率的半数有效浓度约为 1.25 g·L⁻¹, 最低有效浓度约为 2.5 g·L⁻¹。扫描电镜结果显示, dl-扁桃酸处理组精子表面结构与对照组形态相似, 无明显受损特征, N-9 组精子严重受损。MTT 实验结果表明, 1.25 g·L⁻¹ dl-扁桃酸组细胞存活率>95%, 2.5 g·L⁻¹ dl-扁桃酸组细胞存活率约为 50%。1.25, 2.5 g·L⁻¹ dl-扁桃酸处理组 LDH 释放量只有微量检出, 远低于 N-9 组。流式细胞检测表明, 1.25, 2.5 g·L⁻¹ dl-扁桃酸处理组中活细胞和晚期凋亡比例与对照组相近, 早期凋亡细胞略少于对照组, 死亡细胞稍多于对照组, N-9 组大量细胞死亡。结论 dl-扁桃酸对 VK2/E6E7 细胞毒性远低于 N-9, 其对精子的抑制作用不是通过破坏精子质膜与鞭毛来实现。

关键词: dl-扁桃酸; 壬苯醇醚; VK2/E6E7 细胞; 细胞毒性

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)04-0391-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.001

Cytotoxicity of dl-Mandelic Acid on Human Sperm and VK2/E6E7 Cells

XIA Minjie, WANG Yuzhu, HUANG Chao, DING Xuncheng, LI Weihua*, LU Jie* (State Key Labs of Family Planning Devices, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the cytotoxicity of dl-mandelic acid to VK2/E6E7 cells and human sperm. **METHODS** The high vigor sperm was incubated with dl-mandelic acid for 20 s, the sperm survival rate was evaluated by computer assistant spermanalysis(CASA). The damage of sperm surface structure was detected by scanning electron microscope. The VK2/E6E7 cells were incubated with 4.0 g·L⁻¹ nonoxynol-9(N-9) or dl-mandelic acid of 1.25 and 2.5 g·L⁻¹, the cells survival rate was evaluated by MTT assay, the release rate of LDH was detected by ELISA, and the apoptosis rate were detected by flow cytometry. **RESULTS** The median effective concentration and the minimal effective concentration of dl-mandelic acid to sperm were 1.25 g·L⁻¹ and 2.5 g·L⁻¹. There were no obvious damage characteristics on sperm plasmalemma or flagellum of dl-mandelic acid groups detected by scanning electron microscope, but the sperm plasmalemma or flagellum of N-9 group were severely damaged. The VK2/E6E7 cells survival rate of 1.25 g·L⁻¹ dl-mandelic acid group was>95%, survival rate of 2.5 g·L⁻¹ dl-mandelic acid group was about 50%. The LDH release rates of dl-mandelic acid groups were infinitesimal, and far below N-9 group. The living cells and late apoptotic cells of dl-mandelic acid groups were close to control group, showed no significant difference; the early apoptotic cells were little less and dead cells were little more than control group, while most cells of N-9 group were dead. **CONCLUSION** The dl-mandelic acid has a lower cytotoxicity to VK2/E6E7 cells than N-9. The inhibitory effect of dl-mandelic acid on sperm is not by destroying sperm plasmalemma or flagellum.

KEY WORDS: dl-mandelic acid; nonoxynol-9; VK2/E6E7 cells; cytotoxicity

外用避孕药是指放入阴道内杀灭精子而达到避孕目的的药物, 通常是将外用杀精剂与药物载体制成特定的剂型, 使用时直接放入阴道内, 通过化学杀精和物理屏障作用达到避孕效果^[1]。目前, 国内供应的外用避孕药普遍以壬苯醇醚

(nonoxynol-9, N-9)为活性化合物, 品种单一, 不能涵盖各类人群的需求, 而且其对阴道黏膜刺激性较大, 有加大性传播疾病(sexual transmitted diseases, STDs)感染的风险, 其安全性问题也令人担忧^[2-4]。为此, 研发安全有效、对阴道黏膜刺激

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10001007-009-003, 2013ZX10001006); 十二五国家科技支撑计划项目(2012BAI31B04); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81100459); 上海市科委科技计划项目(13431900800); 上海市卫生和计划生育委员会科研项目(2012JG03)

作者简介: 夏敏杰, 男, 硕士, 研究实习员 Tel: (021)64436624 E-mail: mito1983@163.com *通信作者: 李卫华, 女, 博士, 研究员 Tel: (021)64437475 E-mail: iamliwehua@yahoo.com 芦洁, 女, 硕士, 副研究员 Tel: (021)64771789 E-mail: jielu126@126.com

性小的外用避孕新药具有重要意义。

本课题组对 *dl*-扁桃酸的前期研究结果表明, *dl*-扁桃酸具有显著的体外抑制精子的活性, 它通过影响精子顶体和降低线粒体膜电位, 引发精子运动障碍失去进行性直线运动的能力, 从而对精子起到制动作用。因此, *dl*-扁桃酸可以作为一种深具潜力的外用避孕新药。本实验就 *dl*-扁桃酸对 VK2/E6E7 细胞存活率影响、乳酸脱氢酶(LDH)释放量、细胞凋亡等的毒性效应进行研究, 为进一步探讨其临床前药效学与安全性评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 人精液样品

2013年10月就诊于上海市计划生育科学研究所医院门诊部的男性, 年龄 25~35 岁, 禁欲 3~8 d, 自渎法收集精液, 取符合 WHO 标准的正常精液(在 0.5 h 内液化, 精液量 >2 mL, pH 值 7.0~7.7, 精子活率 >70%)用于研究。通过上游法进一步获得高活力精子, 并将精子样本调节至密度为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。本研究经本研究所伦理委员会批准, 精液标本捐献者知情同意, 标本在完成实验研究后, 全部高温杀灭。精子采用精子培养基 EBSS(美国 Invitrogen 公司)培养。

1.2 细胞株及细胞培养基^[5]

永生化人阴道上皮细胞株(VK2/E6E7, 购自 ATCC)采用 VK2/E6E7 角质细胞培养基(美国 Gibco 公司)培养, 37 °C, 5% CO₂ 条件下细胞呈单层贴壁生长, 取对数期细胞用于实验。

1.3 试剂与仪器

dl-扁桃酸(上海贝合化工有限公司, 分析纯), 分别用精子培养基 EBSS 和细胞培养基配置成不同浓度溶液备用; N-9(西安瑞林生物科技有限公司)临床使用浓度为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别用细胞培养液和 EBSS 将其稀释 10 倍配置成浓度为 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液作为阳性对照备用。3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, 美国 Sigma 公司); 二甲亚砜(DMSO, 美国 Sigma 公司); 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH, 碧云天生物技术有限公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司); 其他常规试剂均为国产分析纯。Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD 公司); Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo); CKX-31 相差显微镜(日本 Olympus); XL-30 扫描电子显微镜(荷

兰 Philips); CPD030 临界点干燥仪(德国 Leica); LDM150D 离子溅射仪(上海电子光学技术研究所)。

1.4 *dl*-扁桃酸对精子活率的影响

采用改进的 Sander-Cramer 方法进行精子活率测定试验^[6-7]。50 μL 精液分别置入含 50 μL 37 °C 预温的 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸或 0.023, 0.045, 0.09, 0.18, 0.36 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ N-9 的 96 孔板中, 混匀, 20 s 后吸取混合后的精子悬液约 10 μL , 用计算机辅助精子分析仪(computer assistant spermanalysis, CASA)进行分析, 每份样品分析 200 个精子轨迹, 记录 10~15 个视野, 测定精子活率, 并用 SPSS 软件计算 *dl*-扁桃酸和 N-9 抑制精子活率的半数有效浓度(EC₅₀)与最低有效浓度(MEC)。

1.5 扫描电子显微镜检测精子受损

将精子样本分为 3 组, 分别用预先配置好的 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸、 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ N-9 和 EBSS 培养基处理 20 s。离心收集精子, 2.5%的戊二醛固定 2 h, 二甲砷酸钠洗涤 2 次, 再用 1%的钨酸固定 2 h, 进行酒精梯度脱水。用中间液置换酒精后, 将精子置于临界点干燥仪干燥, 离子溅射仪表面镀金, 扫描电镜里进行观察。

1.6 *dl*-扁桃酸对细胞活性的影响

收集对数生长期的 VK2/E6E7 细胞接种到 96 孔细胞培养板中, 每孔接种约 5 000 个细胞。待细胞贴壁后吸去培养基, PBS 洗涤 1 次, 将各培养孔分为对照组细胞孔以及药物处理细胞孔。在药物处理细胞孔中加入 200 μL 预先配置好的 1.25, 2.5, 5.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸或 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ N-9 溶液, 对照孔加入 200 μL 培养基, 培养 24 h, 加入 20 μL MTT 工作液, 培养 4 h, 离心, 弃上清, 加入 150 μL DMSO 溶解紫色结晶, 酶标仪检测, 490 nm 处测定吸光度。

1.7 *dl*-扁桃酸对细胞 LDH 释放的影响

细胞处理同“1.6”项下方法, 药物处理 4 h 后, 离心, 分别取各孔的上清液 120 μL , 加入到一新的 96 孔板对应孔中, 加入 60 μL LDH 工作液, 避光, 室温孵育 0.5 h, 酶标仪检测, 490 nm 处测定吸光度。

1.8 *dl*-扁桃酸对细胞凋亡的影响

将处于对数生长期的 VK2/E6E7 细胞接种到 6 孔细胞培养板中, 每孔接种约 1×10^6 个细胞。培养 24 h, 待细胞贴壁后吸去培养基, PBS 洗涤 1

次, 将各培养孔分成对照组细胞孔以及药物处理细胞孔。在对照组细胞孔中加入 5 mL 培养基, 药物处理细胞孔中加入 5 mL 预先配置好的 1.25, 2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸或 4.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ N-9 溶液, 培养 4 h, 离心, 弃上清。胰酶消化细胞, PBS 洗涤 2 次, 每孔收集 $3\sim5\times10^5$ 细胞; 加入 500 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞; 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide, 混匀; 室温、避光、反应 5~15 min; 流式细胞仪检测, 激发波长为 488 nm。

1.9 统计学分析

实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。组间均数比较用方差分析(one-way ANOVA)和 *t* 检验, 检验水准 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 *dl*-扁桃酸对精子活率的影响

dl-扁桃酸作用精子 20 s 后, 精子活率随着 *dl*-扁桃酸浓度的升高而逐渐降低, 在显微镜下表现为运动速率逐渐减缓, 尾部摆动幅度逐渐降低, 且表现出明显的剂量关系($P<0.05$), 结果见图 1。经计算 *dl*-扁桃酸抑制精子活率的 EC_{50} 约为 1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MEC 约为 2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。N-9 抑制精子活率的 EC_{50} 约为 0.09 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MEC 约为 0.18 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 *dl*-扁桃酸对精子表面结构的影响

dl-扁桃酸和 N-9 分别处理精子 20 s 后, 扫描电镜观察精子受损情况, *dl*-扁桃酸组精子与对照组精子形态相似, 无明显受损特征, 头部呈椭圆形, 光滑, 可见顶体后端增厚形成赤道沟, 精子主段到末段平滑逐渐变细; N-9 组精子顶体、环状沟消失, 头颈分离, 精子头部穿孔, 尾部断裂, 质膜破坏严重。结果见图 2。

2.3 *dl*-扁桃酸对细胞活性的影响

dl-扁桃酸和 N-9 分别处理 VK2/E6E7 细胞 24 h 后, 对照组中细胞形态完整, 细胞生长良好, 1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组中细胞形态与生长状况与

对照组无明显差异; 2.5 和 5.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组中, 部分细胞已经开始出现空泡, 少部分细胞已经破碎; N-9 组中, 绝大部分细胞破裂死亡, 视野下已经很难发现形态完整的细胞, 结果见图 3。MTT 测定细胞活性, 设对照组细胞平均存活率为 100%, 经对比, 1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组中细胞存活率 $>95\%$, 2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组的存活率约为 50%, 5.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组的存活率约为 40%, 而 N-9 组中的细胞存活率 $<20\%$, 显著低于 3 个浓度 *dl*-扁桃酸组($P<0.05$), 结果见图 4。

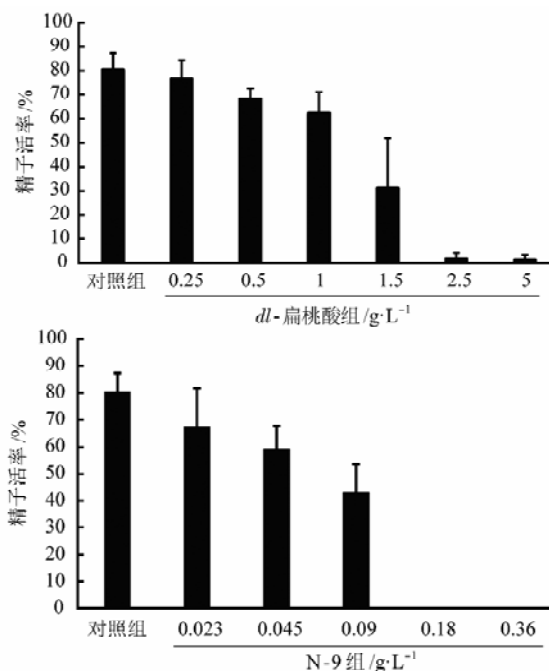


图 1 *dl*-扁桃酸和 N-9 对精子活率的影响

Fig. 1 The effect of *dl*-mandelic acid and N-9 on sperm viability

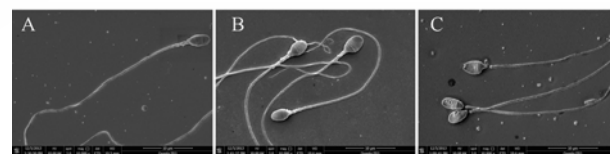


图 2 *dl*-扁桃酸对精子表面结构的影响

A-对照组; B-2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组; C-N-9 组。

Fig. 2 The effect of *dl*-mandelic acid on sperm morphology

A-control group; B-2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-mandelic acid group; C-N-9 group.

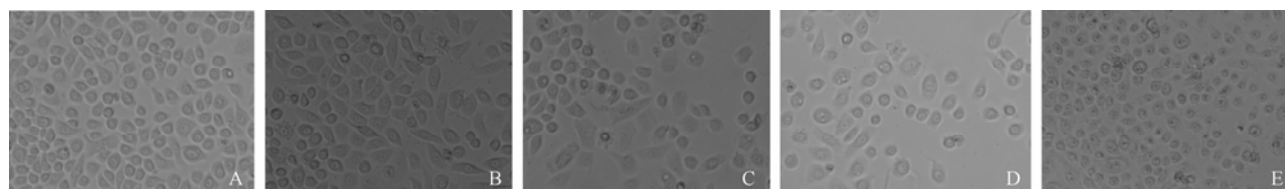


图 3 *dl*-扁桃酸对 VK2/E6E7 细胞形态的影响

A-对照组; B-1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组; C-2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组; D-5.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸组; E-N-9 组。

Fig. 3 The effect of *dl*-mandelic acid on cellular morphology of VK2/E6E7

A-control group; B-1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-mandelic acid group; C-2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-mandelic acid group; D-5.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-mandelic acid group; E-N-9 group.

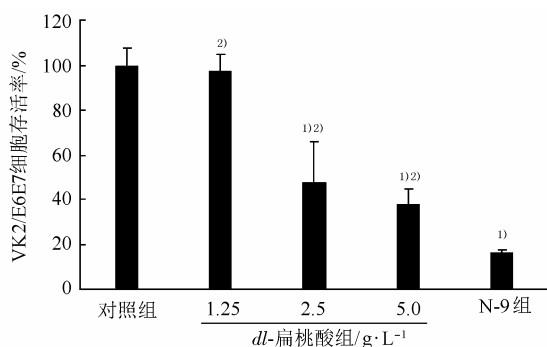


图4 *dl*-扁桃酸对 VK2/E6E7 细胞活率的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 N-9 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 The effect of *dl*-mandelic acid on survival rate of VK2/E6E7

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with N-9 group, ²⁾ $P<0.05$.

2.4 *dl*-扁桃酸对细胞 LDH 释放的影响

dl-扁桃酸和 N-9 分别处理 VK2/E6E7 细胞 4 h 后, 测定各组细胞 LDH 释放量。设 N-9 组平均 LDH 释放量为 100%, 经对比, 对照组和 *dl*-扁桃酸组 LDH 释放量只有微量检出, 远远低于 N-9 组。而且对照组与 1.25 g·L⁻¹ 和 2.5 g·L⁻¹ *dl*-扁桃酸组之间差异无统计学意义。结果见图 5。

2.5 *dl*-扁桃酸对细胞凋亡的影响

dl-扁桃酸和 N-9 分别处理 VK2/E6E7 细胞 4 h

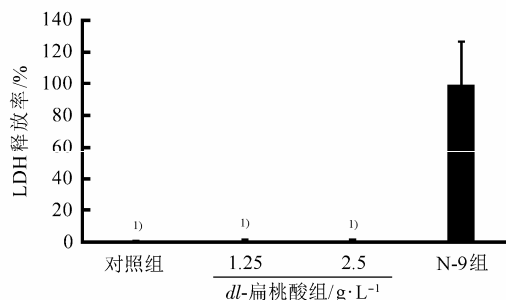


图5 *dl*-扁桃酸对细胞 LDH 释放的影响

与 N-9 组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 The effect of *dl*-mandelic acid on LDH release rate of VK2/E6E7

compared with N-9 group, ¹⁾ $P<0.05$.

表1 *dl*-扁桃酸对细胞凋亡的影响

Tab. 1 The effect of *dl*-mandelic acid on apoptosis of VK2/E6E7

组 别	细胞状态/%			
	活细胞	早凋细胞	晚凋细胞	死亡细胞
对照组	81.81±4.16	3.44±1.39	10.33±6.85	2.42±1.3
1.25 g·L ⁻¹ <i>dl</i> -扁桃酸组	82.87±6.20	0.63±0.46	10.85±6.31	5.62±4.61
2.5 g·L ⁻¹ <i>dl</i> -扁桃酸组	82.42±3.47	1.01±0.81	11.72±6.49	4.65±3.02
N-9 组	1.60±0.87	0.32±0.17	16.97±8.79	80.85±19.64

3 讨论

目前 N-9 作为我国唯一获得 SFDA 批准的阴道外用避孕药已经过了数十年的临床验证, 其杀精避孕的药效已获得公认。然而, 国内外用避孕药长期以来仅限于 N-9 产品的局面过于单一, 且 N-9 自身存在较强的局部刺激性和过敏反应等不良反应, 可造成生殖道黏膜损伤, 从而增加性病/艾滋病(HIV/STDs)病原体经性传播的风险。为此, WHO 和 CONARD 在 2001 年发布联合公告, 禁止 N-9 在性病高危人群中使用^[6]。

为了研究外用避孕杀精剂对阴道黏膜的细胞毒性, 国外研究者已开始研究多种细胞模型、组织培养模型及动物模型, 以期从不同层次上对生

殖道外用药物的候选药物进行安全性和有效性的评价^[7-9]。VK2/E6E7 细胞株是一种永生化的阴道黏膜上皮细胞, 具有无限增殖能力和高存活率等特点。此外, VK2/E6E7 细胞还具有多层鳞状无角质上皮的物理屏障功能^[10], 因此, 能将其作为一种理想的研究外用杀精剂安全性的细胞模型。Doncel 等曾用 VK2/E6E7 细胞作为细胞模型, 通过 MTT 法测定细胞活性, ELISA 测定多种炎症因子释放, 研究了包括 N-9 在内多种药物的细胞毒性^[11]。本实验以 VK2/E6E7 细胞作为细胞毒性模型, 以 N-9 作为阳性对照, 研究 *dl*-扁桃酸对阴道黏膜细胞的细胞毒性。

本研究首先用 CASA 测得 *dl*-扁桃酸抑制精子

活率的 EC_{50} 约为 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 最低有效浓度 $2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后观察阳性对照 N-9 和 3 个不同浓度 ($1.25, 2.5, 5.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) *dl*-扁桃酸对 VK2/E6E7 细胞的毒性作用。N-9 和 *dl*-扁桃酸处理 VK2/E6E7 细胞 24 h 后, MTT 结果显示 N-9 组细胞存活率 $<20\%$, 而 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸细胞存活率 $>95\%$, 2.5 和 $5.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ *dl*-扁桃酸细胞存活率均 $>40\%$, 显著高于 N-9 处理组 ($P<0.05$)。N-9 和 *dl*-扁桃酸处理 VK2/E6E7 细胞 4 h 后, 流式细胞结果显示 2 个 *dl*-扁桃酸组活细胞比例 $>80\%$, 与阴性对照无显著差异, 而 N-9 处理组中绝大多数细胞已经死亡, 部分细胞处于凋亡阶段, 凋亡细胞比例与其他 3 组无显著差异。综合 MTT 和流式结果, 提示短小时内 (4 h) *dl*-扁桃酸对 VK2/E6E7 细胞无明显细胞毒性, 且不会诱导细胞凋亡, 而随着时间增加 (24 h), 较高浓度 ($\geq 2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) *dl*-扁桃酸对 VK2/E6E7 细胞仍具有一定的细胞毒性。

有文献报道, 外用阴道杀精剂可因自身的表面活性直接或间接与主要存在于细胞膜上的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 从而破坏细胞膜结构, 引起质膜通透性改变^[12]。因此, 外用避孕杀精剂对细胞膜通透性的影响能更灵敏地反映其对细胞的毒性, 正常情况下 LDH 存在于细胞浆内, 不能透过细胞膜, 而当细胞受到损伤时, 细胞膜通透性改变, LDH 便可以从胞内释放至胞外^[13-14], 通过 ELISA 等方法可以精确检出 LDH 释放率, 以此评估细胞受损情况。在本研究中, 发现 2 个不同浓度 ($1.25, 2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) *dl*-扁桃酸 LDH 释放检出量微乎其微, 与阴性对照无明显差异, 推测 *dl*-扁桃酸并不是破坏细胞膜, 改变细胞通透性从而使细胞失活。此外, 本研究中采用扫描电子显微镜观察经 N-9 和 *dl*-扁桃酸处理后精子的受损情况, 发现 *dl*-扁桃酸处理组精子与正常对照组精子形态相似, 无明显受损特征; N-9 处理组精子头部穿孔, 尾部断裂, 质膜破坏严重。

综上所述, *dl*-扁桃酸对 VK2/E6E7 细胞无明显细胞毒性, 且不具有凋亡效应, 但当浓度达到 $2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, *dl*-扁桃酸随着作用时间的增加仍具有一定的细胞毒性。因此, 本研究认为, 相对于

N-9, *dl*-扁桃酸具有良好的细胞安全性, 在控制用药量、用药时间的前提下, *dl*-扁桃酸能成为一种既能有效失活精子, 又不损伤阴道黏膜的理想外用避孕新药。

REFERENCES

- [1] 避孕药具未来发展趋势药具课题组. 避孕药具报告: 外用杀精剂[J]. 生殖与避孕, 2006, 26(增刊 1): 129-140.
- [2] QUINN T C, OVERBAUGH J. HIV/AIDS in women: an expanding epidemic [J]. Science, 2005, 308(5728): 1582-1583.
- [3] CUTLER B, JUSTMAN J. Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission [J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8(11): 685-697.
- [4] 李卫华. 双功能外用避孕药物的研发进展[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(11): 761-764.
- [5] ANUKAM K C, REID G. *In vitro* evaluation of the viability of vaginal cells (VK2/E6E7) and probiotic *Lactobacillus species* in lemon juice [J]. Sex Health, 2009, 6(1): 67-74.
- [6] World Health Organization. WHO/CONRAD technical consultation on nonoxynol-9. WHO, Geneva, 9-10 October 2001. Summary Report [J]. Reprod Health Matters, 2002, 10(20): 175-181.
- [7] PATTON D L, COSGROVE S Y, PAUL K J. A summary of preclinical topical microbicide vaginal safety and chlamydial efficacy evaluations in a pigtailed macaque model [J]. Sex Transm Dis, 2008, 35(10): 889-897.
- [8] PEUSTER M, FINK C, RECKERS J, et al. Assessment of subacute inflammatory and proliferative response to coronary stenting in a porcine model by local gene expression studies and histomorphometry [J]. Biomaterials, 2004, 25(6): 957-963.
- [9] FICHOROVA R N, BAJPAI M, CHANDRA N, et al. Interleukin (IL)-1, IL-6, and IL-8 predict mucosal toxicity of vaginal microbicide contraceptives [J]. Biol Reprod, 2004, 71(3): 761-769.
- [10] KREBS F C, MILLER S R, CATALONE B J, et al. Sodium dodecyl sulfate and C31G as microbicidal alternatives to nonoxynol 9: comparative sensitivity of primary human vaginal keratinocytes [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(7): 1954-1960.
- [11] DONCEL G F, CHANDRA N, FICHOROVA R N. Preclinical assessment of the proinflammatory potential of microbicide candidates [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2004, 37(suppl 3): S174-S180.
- [12] ZHU D M, EVANS R K. Molecular mechanism and thermodynamics study of plasmid DNA and cationic surfactants interactions [J]. Langmuir, 2006, 22(8): 3735-3743.
- [13] LOBNER D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis [J]. J Neurosci Methods, 2000, 96(2): 147-152.
- [14] MICHAOWICZ J. Pentachlorophenol and its derivatives induce oxidative damage and morphological changes in human lymphocytes (*in vitro*) [J]. Arch Toxicol, 2010, 84(5): 379-387.

收稿日期: 2014-09-17