

钛基表面纳米银复合涂层体外抗菌活性及生物安全性评价

鲜爱明¹, 张晓岗¹, 曹力¹, 徐恩洁², 彭理斌¹, 胡洋¹(新疆医科大学第一附属医院, ¹骨科中心, ²医学检验中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

文章亮点:

实验构思特点: ①材料的制备、加工、表征、银离子缓释。②就材料的组织相容性和生物安全性进行评价: 主要通过传统的评价方法, 按照国家及国际标准, 进行动物实验。③在兔膝关节假体柄上涂层羟基磷灰石纳米银, 建立动物膝关节置换后金黄色葡萄球菌感染模型, 检测材料动物体内抗菌活性。

关键词:

生物材料; 纳米生物材料; 纳米银; 医用钛; 组织相容性; 羟基磷灰石; 骨科植入物; 脉冲电泳涂层; 抗菌活性; 金黄色葡萄球菌; 生物安全性; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

主题词:

羟基磷灰石类; 银; 葡萄球菌; 金黄色; 钛

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金(2013211A075)

摘要

背景: 羟基磷灰石是骨的主要成分, 具有诱导成骨细胞的功能。纳米银具有广谱和高效的抗菌效果, 钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层材料既有生物活性又具有抗菌特性。

目的: 研究钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层体外抗菌作用及影响因素, 评价钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层的生物相容性和安全性。

方法: 选取浓度 0, 0.5, 1.0 mmol/L 银溶液制备钛基表面沉积的羟基磷灰石/纳米银复合涂层样品, 将其浸提液与金黄色葡萄球菌与材料共培养, 进行体外抗菌定性分析。按照国家和国际标准化组织对生物材料相容性检测标准, 对健康成年昆明小鼠、新西兰兔进行热原试验、溶血试验、急性毒性试验、皮肤刺激试验, 综合评价材料的生物相容性和安全性。

结果与结论: 钛基表面沉积制备的羟基磷灰石/纳米银复合涂层材料体外对金黄色葡萄球菌有明显抗菌作用, 复合材料中银含量越高抗菌作用越明显, 且动物实验中未出现明显的热原反应、溶血反应、急性毒性反应、皮肤刺激反应, 与不含银的纯羟基磷灰石材料相比, 生物相容性差异无显著性意义。说明钛基表面沉积制备的羟基磷灰石/纳米银复合材料, 体外对金黄色葡萄球菌具有良好的抗菌作用, 且具有良好的生物相容性。

鲜爱明, 张晓岗, 曹力, 徐恩洁, 彭理斌, 胡洋. 钛基表面纳米银复合涂层体外抗菌活性及生物安全性评价[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(52):8387-8392.

In vitro antibacterial activity and biological safety of nano-silver composite coating on the surface of titanium base

Xian Ai-ming¹, Zhang Xiao-gang¹, Cao Li¹, Xu En-jie², Peng Li-bin¹, Hu Yang¹ (¹Department of Orthopaedic Surgery, ²Medical Examination Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Hydroxyapatite is the main component of bone with the capacity of osteogenic induction. Nano-silver has broad-spectrum and efficient antibacterial activity, while hydroxyapatite/nano-silver composite coating on the surface of titanium base has either biological activity or antimicrobial properties.

OBJECTIVE: To study the antimicrobial properties of hydroxyapatite/nano-silver composite coating on the surface of titanium base and to evaluate the biocompatibility and security of hydroxyapatite/nano-silver composite coating on the surface of titanium base.

METHODS: Silver solution of 0, 0.5, 1.0 mmol/L was selected to prepare hydroxyapatite/nano-silver composite coating samples deposited on the surface of titanium base. Then, *Staphylococcus aureus* was cultured in the sample leaching solution for the *in vitro* antibacterial qualitative analysis. In accordance with national and international standardization for biocompatibility testing, healthy adult Kunming mice and New Zealand rabbits were subjected to pyrogen test, hemolysis test, acute toxicity test, skin irritation test for comprehensive evaluation of the material biocompatibility and safety.

RESULTS AND CONCLUSION: The hydroxyapatite/nano-silver composite coating on the surface of titanium base exhibited obvious antibacterial activity *in vitro* against *Staphylococcus aureus*, in a silver dose-dependent manner. There was no pyrogen response, hemolytic reaction, acute toxic reaction and skin stimulus response in

鲜爱明, 男, 1975年生, 四川省南充市人, 汉族, 骨科主治医师, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事骨与关节疾病方面的研究。

通讯作者: 曹力, 教授, 主任医师, 博士生导师, 新疆医科大学第一附属医院骨科中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.52.005
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)52-08387-06
稿件接受:2014-11-18

Xian Ai-ming, Studying for master's degree, Attending physician, Department of Orthopaedic Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Cao Li, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Orthopaedic Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-11-18

the animal experiments. There was also no difference in the biocompatibility of hydroxyapatite materials containing silver or not. These findings indicate that the hydroxyapatite/nano-silver composite coating on the surface of titanium base has good antibacterial activity for *Staphylococcus aureus in vitro* as well as excellent biocompatibility.

Subject headings: hydroxyapatites; silver; *Staphylococcus aureus*; titanium

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2013211A075

Xian AM, Zhang XG, Cao L, Xu EJ, Peng LB, Hu Y. In vitro antibacterial activity and biological safety of nano-silver composite coating on the surface of titanium base. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(52):8387-8392.

0 引言 Introduction

作者所在课题组前期应用脉冲电化学沉积的方法, 发现医用纯钛表面沉积羟基磷灰石/纳米银复合涂层是由纳米针状羟基磷灰石和点状的银颗粒相互堆积而成的网状结构, 银颗粒在钛基表面涂层中呈均匀分布, 无团聚现象; 在热处理后涂层变得致密, 羟基磷灰石的晶化度提高, 并通过在模拟体液中银离子的缓释研究发现, 第1天银离子释放量最多, 能够达到有效杀菌浓度; 第1-7天, 释放速度较快; 银离子释放速度随时间推移而逐渐变缓, 第7-30天, 银离子释放量基本稳定, 释放总量低于细胞毒性浓度, 证明材料能够在体内发挥持久的抗菌作用^[1]。本次实验作者拟进一步钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层体外抗菌作用及影响因素, 评价钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层的生物相容性和安全性, 为进一步临床研究和应用奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 生物材料体外抗菌及组织相容性实验。

时间及地点: 实验于2013年10月至2014年7月完成。体外抗菌试验在新疆医科大学第一附属医院医学检验中心微生物室完成; 组织相容性试验在新疆医科大学第一临床医学院医学科研中心完成。

材料:

动物: 成年SPF级新西兰兔28只, 雌雄不限, 体质量2.4-2.6 kg。成年SPF级昆明小鼠40只, 雌雄不限, 体质量19-23 g。所有动物均来自新疆医科大学第一附属医院实验动物科学部, 动物质量符合实验要求, 动物生产许可证号: SCXK(新)2013-0007, 并通过动物伦理审查(审批号: IACUC-20130926002)。

细菌: 金黄色葡萄球菌标准菌株ATCC 25923由新疆医科大学第一附属医院医学检验中心微生物室提供。

方法:

纳米复合涂层材料体外抗菌试验:

定性抑菌分析: 参考文献^[1], 按照电解液中银离子的浓度, 钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层样品共制备3种规格(1号为浓度0.5 mmol/L银溶液制备的材料, 以下简称0.5羟基磷灰石/银; 2号为浓度1.0 mmol/L银溶液制备的材料, 以下简称1.0羟基磷灰石/银; 3号为浓度0 mmol/L银溶液制备的材料, 为纯羟基磷灰石涂层), 材料大小统一为

钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层研究使用的主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
医用钛条	施乐辉公司
医用钛板	宝鸡英耐特公司
草酸钾	上海紫一试剂厂
生理盐水	新疆医科大学第一附属医院科研中心
磷酸盐缓冲液	上海酶联生物科技有限公司
哥伦比亚血琼脂平板	广州市迪景微生物科技有限公司
温度计	上海华辰医用仪表有限公司
高速多功能离心机	德国 Heraeus 公司
漩涡振荡仪	合肥艾本森科学仪器有限公司
比浊仪	北京中西远大科技有限公司
微量加样器	上海艾测电子科技有限公司
温控摇床	德国赛多利斯集团

30.0 mm×8.0 mm×0.18 mm^[1]。样品及器具高温高压蒸汽灭菌后备用。用比浊仪将金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923)浓度调节为 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$; 取4个已经灭菌的含有10 mL PBS的试管, 每个试管中加入100 μL 菌悬液。将1, 2, 3号样品分别放入1, 2, 3号试管中, 4号试管为空白对照组。在37 °C 200 r/min的温控摇床中需氧培养24 h。用移液枪分别从4只试管中吸取100 μL 液体, 涂布于4个血琼脂平板上, 37 °C温箱中需氧培养24 h后观察细菌生长情况, 拍照并进行分析。

定量抑菌分析: 钛基表面羟基磷灰石/纳米银涂层样品, 按照电解液中银离子的浓度, 制备4种规格样品, 0.5羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银作为实验组; 羟基磷灰石沉积样品和普通钛板在实验中作为对照组。材料大小统一为50.0 mm×50.0 mm×2.0 mm, 所有实验器具高温高压蒸汽灭菌后备用。调节金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923)浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$; 将被测样品置于灭菌干燥培养皿中, 培养皿底部放一载玻片, 加入无菌生理盐水, 以防止菌液蒸发, 取50 μL 菌悬液滴于样品表面, 再用40 mm×40 mm方形玻片轻轻覆盖在钛板表面以使菌液均匀散开, 但勿溢出, 37 °C温箱中需氧培养24 h^[2]。最后在各培养皿中加入20 mL磷酸盐缓冲液后在漩涡振荡仪中震荡10 min, 取洗脱液50 μL 涂布血琼脂平板, 需氧培养24 h, 即得菌落数, 样品的抗菌作用通过计算样品的抗菌率来表

示, 抗菌率的计算方法如下所示, 进行3次平行试验, 以得到平均抗菌率。抗菌率=(对样品菌落数-被测样品菌落数)/对样品菌落数×100%。

纳米复合涂层材料组织相容性实验: 浸提液按照0.1 g : 1 mL的比例配制, 用生理盐水37 °C浸提72 h后, 4 °C冰箱保存备用, 注射时加温至38 °C。

热原实验: 将新西兰兔随机分为3组, 各3只。将1, 2, 3号材料浸提液处理1, 2, 3组动物。实验前1周开始用相同饲料喂养, 保持体质量无减轻, 精神、食欲、排泄均正常。实验前预测体温, 每30 min测肛温1次, 取3次均值作为正常体温值, 动物体温保持在38.0-39.6 °C, 体温测定值波动不超过0.4 °C。实验室温度控制在20-25 °C。浸提液按兔体质量10 mL/kg计算, 自耳缘静脉缓慢注入, 注射后每隔30 min测量体温1次, 共6次, 6次体温中最高的1次减去正常体温即为试验兔体温升高值^[9]。如3只新西兰兔中有1只体温升高≥0.6 °C, 或3只兔体温升高均低于0.6 °C, 但体温升高的总和≥1.3 °C时, 判断有致热原存在。

溶血实验: 健康新西兰兔1只, 心脏采血8 mL, 加入2%草酸钾0.5 mL混匀, 再加生理盐水10 mL稀释备用^[4]; 取每组各取3份, 置于试管内, 每管加生理盐水10 mL; 空白对照组3管, 每管加同批号生理盐水10 mL; 阳性对照组3支试管每管加蒸馏水10 mL^[5-6]。所有试管均浸入37 °C水浴30 min, 加稀释兔血0.2 mL, 轻轻混匀, 37 °C水浴60 min后离心取上清液, 分光光度计在545 nm波长处测定吸光度。按溶血率(%)=(样品吸光度-阴性对照吸光度)/(阳性对照吸光度-阴性对照吸光度)×100%。根据ISO10993-2009和GB/T16886.1-2008标准^[3,7], 非直接接触血液的医用生物材料溶血率小于5%为合格。

急性毒性实验: 将昆明小鼠随机分为4组, 各10只。1, 2, 3号材料浸提液分别处理1, 2, 3组小鼠, 第4组用等量的体积分数6.4%苯酚腹腔注射作为阳性对照。按体质量50 mL/kg标准计算, 无菌条件下小鼠腹腔内注射材料浸提液^[8-9]。注射后于24, 48, 72 h三个时间点观测各组动物的一般状态(呼吸、进食、排泄、运动)、中毒表现、体质量变化以及动物有无死亡^[10-12]。毒性试验判断标准: 无毒: 注射后无任何异常症状; 轻度毒性: 注射后有呼吸困难或腹部刺激轻度症状, 无运动减少; 中度毒性: 注射后有腹部刺激症状、呼吸困难、运动减少、眼睑下垂、腹泻、体质量下降; 重度毒性: 呼吸衰竭、发绀、震颤、严重腹部刺激症状、眼睑下垂、呼吸困难、体质量严重下降; 死亡: 注射后动物死亡。皮肤刺激实验: 观察动物皮肤及周围组织有无局部红肿、渗出、溃烂等刺激反应。

皮肤刺激试验:

皮内注射刺激试验: 9只新西兰兔手术野脱毛备皮, 随机分为3组, 每组3只。1, 2, 3号材料浸提液处理3组动物。分别在每只兔左后大腿外侧皮内注射0.1 mL材料浸提液, 右后大腿外侧相应部位注射等量生理盐水, 作为对照组。

分别于注射后1, 24, 48, 72 h观察并记录注射部位皮肤及周围组织有无局部红肿、渗出、溃烂等刺激反应。

原发性皮肤刺激试验: 9只新西兰兔手术野脱毛备皮, 随机分为3组, 每组3只。1, 2, 3号材料浸提液分别处理3组新西兰兔。在每只兔双侧后腿及左前腿外侧各划“#”形损伤伤口(面积约2 cm×2 cm), 在所有兔左前腿外侧创面各自涂敷0.1 mL浸提液, 兔左后腿外侧伤口涂敷甲醛0.1 mL为阳性对照侧, 兔右后腿外侧伤口涂敷0.1 mL生理盐水为阴性对照侧^[13], 无菌纱布覆盖, 分别于1, 24, 48, 72 h观察并记录受试物对兔破损皮肤有无刺激作用。

主要观察指标: 钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层的生物相容性和安全性。

统计学分析: 所有数据使用SPSS 19.0软件包进行统计学处理, 溶血实验采用单因素方差分析, 全身急性毒性实验采用重复测量数据方差分析, 组间两两比较采用SNK法, 方差不齐采用Dunnett T3法。

2 结果 Results

2.1 纳米复合涂层材料体外抗菌试验结果

2.1.1 定性抑菌分析 空白对照组和纯羟基磷灰石组生长有大量的细菌, 大体观察二者之间菌落数量接近, 许多菌落堆积在一起形成菌苔, 菌体表面有一层白色的类似黏稠状物质, 表明细菌生长代谢旺盛, 说明纯钛和不含银的纯羟基磷灰石不具有抗菌活性。1.0羟基磷灰石/银材料样品细菌菌落数减少最明显, 只有零星的菌落分布在培养基上; 0.5羟基磷灰石/银材料菌落数比1.0羟基磷灰石/银材料菌落数多(图1)。

2.1.2 定量抑菌分析 在培养24 h以后, 0.5羟基磷灰石/银和1.0羟基磷灰石/银两种材料对金黄色葡萄球菌的抗菌率都在95%以上, 0.5羟基磷灰石/银和1.0羟基磷灰石/银两种材料抗菌率差异无显著性意义($P > 0.05$); 而2组抗菌率均高于纯钛和羟基磷灰石组($P < 0.05$), 说明羟基磷灰石/纳米银复合涂层有着很好的抗菌性能(表1)。

2.2 实验动物数量分析 所有新西兰兔及大鼠均进入结果分析。

2.3 纳米复合涂层材料组织相容性试验结果

2.3.1 热源实验 注射材料浸提液后, 3组新西兰兔3 h内体温升高数均低于0.6 °C。各组间差异无显著性意义($P > 0.05$; 表2)。

2.3.2 溶血实验 0.5羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银、纯羟基磷灰石涂层3种材料和空白对照组试管溶液离心后, 上清液均澄清, 无色透明, 红细胞沉积到管底, 无溶血现象。阳性对照组蒸馏水试管中呈现玫瑰红色, 红细胞完全破裂溶解。阳性对照组的吸光度与0.5羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银、纯羟基磷灰石涂层3种材料组相比差异有显著性意义($P < 0.01$), 而0.5羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银、纯羟基磷灰石涂层三种材料组吸光度接近($P > 0.05$)。

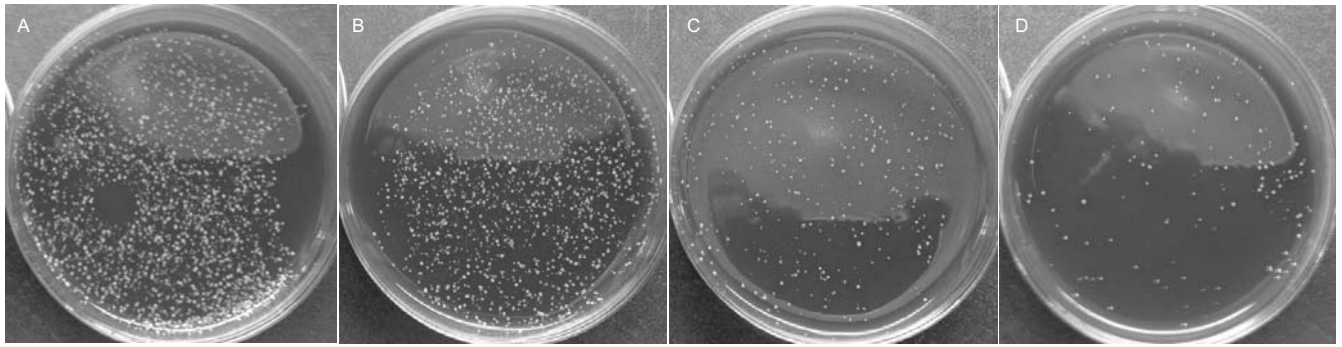


图 1 纳米复合涂层材料定性抑菌结果

Figure 1 Antibacterial qualitative analysis of hydroxyapatite/nano-silver composite coating

图注: 图中 A-D 分别为空白对照组、纯羟基磷灰石组、0.5 羟基磷灰石/银组和 1.0 羟基磷灰石/银组。随银含量的增加, 细菌菌落数量明显减少。

表 2 纳米复合涂层材料组织的热源实验

Table 2 Pyrogen test results of hydroxyapatite/nano-silver composite coating

(°C)

组别	注射前基础体温	注射后每 30 min 的体温						注射后平均体温	升高值
		第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次		
0.5 羟基磷灰石/银									
1	38.5	38.7	38.8	38.8	38.7	38.7	38.6	38.7	0.3
2	38.6	38.8	38.8	38.6	38.7	38.8	38.8	38.8	0.2
3	38.5	38.9	38.9	38.8	38.8	38.6	38.6	38.8	0.4
1.0 羟基磷灰石/银									
1	38.5	38.7	38.7	38.7	38.6	38.6	38.6	38.6	0.2
2	38.7	38.7	38.8	38.8	38.9	38.6	38.7	38.8	0.2
3	38.6	38.7	38.7	38.8	38.8	38.7	38.7	38.7	0.2
纯羟基磷灰石涂层									
1	38.4	38.6	38.5	38.6	38.4	38.3	38.5	38.5	0.2
2	38.5	38.7	38.7	38.6	38.6	38.6	38.7	38.6	0.2
3	38.7	38.8	38.8	38.7	38.7	38.8	38.7	38.8	0.1

表 1 纳米复合涂层材料对金黄色葡萄球菌的抑制

Table 1 Hydroxyapatite/nano-silver composite coating against *Staphylococcus aureus*

材料	菌落数($\bar{x}\pm s$)	抗菌率(%)
纯钛	373.5±17.5	0
羟基磷灰石	356.5±16.4	0
0.5 羟基磷灰石/银	17.6±2.0 ^a	95.3 ^a
1.0 羟基磷灰石/银	9.0±1.7 ^a	97.6 ^a

表注: 与纯钛和羟基磷灰石组相比, ^a $P < 0.05$ 。

表 3 纳米复合涂层材料组织的溶血实验结果

Table 3 Hemolysis test results of hydroxyapatite/nano-silver composite coating

组别	吸光值(545 nm)($\bar{x}\pm s$)	溶血率(%)
0.5 羟基磷灰石/银组	0.031±0.007	2.24
1.0 羟基磷灰石/银组	0.027±0.006	1.64
纯羟基磷灰石涂层组	0.022±0.004	0.89
空白对照组	0.016±0.002	0
阳性对照组	0.687±0.014	100

表 4 纳米复合涂层材料组织的急性毒性实验动物体质量变化

Table 4 Body weight changes of animals before and after acute toxicity test of hydroxyapatite/nano-silver composite coating

($\bar{x}\pm s$, $n=10$, g)

组别	注射前	注射后(h)		
		24	48	72
0.5 羟基磷灰石/银组	21.20±1.35	22.03±1.15	23.41±1.07	24.20±0.97
1.0 羟基磷灰石/银组	20.54±1.57	21.45±1.24	22.36±1.33	23.27±1.15
纯羟基磷灰石涂层组	22.03±1.49	23.01±0.98	23.93±1.05	24.81±1.23
对照组	21.75±1.58	21.34±1.32	21.25±1.27	21.83±1.03

0.5羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银、纯羟基磷灰石涂层三种材料组与空白对照组的吸光度接近($P > 0.05$), 且3组材料溶血率均小于非直接接触血液的医用生物材料溶血国际标准(5%)(表3)。

2.3.3 急性毒性实验 注射材料浸提液后, 0.5羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银、纯羟基磷灰石涂层三种材料组和对照组均没有小鼠出现异常症状, 活动、进食、排泄正常, 未见步态不稳、惊厥、瘫痪以及呼吸抑制等毒性反应, 体质量有增加趋势, 观察期间无小鼠死亡, 0.5羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银、纯羟基磷灰石涂层三种材料组和对照组小鼠体质量变化无显著性意义($P > 0.05$; 表4)。

2.3.4 皮肤刺激试验 皮内注射刺激试验观察1-72 h, 0.5 羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银、纯羟基磷灰石涂层3种材料组注射点与对照侧注射点均无明显刺激反应。原发性皮肤刺激试验观察1-72 h, 0.5羟基磷灰石/银、1.0羟基磷灰石/银、纯羟基磷灰石涂层3种材料组与阴性对照侧注射点均无局部红肿、渗出、溃烂等刺激反应。阳性对照侧皮肤1-24 h逐渐出现轻微红斑、水肿, 48 h出现明显红斑及水肿, 72 h出现焦痂。

3 讨论 Discussion

基础研究表明, 细菌在关节假体等界面黏附形成生物膜是假体周围感染反复发作和难以控制的重要原因^[14-15], 生物膜内的细菌对抗生素的抵抗力可以增强1 000倍^[16]。目前对于细菌生物膜引起的感染仍然是临床骨科医生面临的难题。尽管采取了多种预防措施, 关节置换术后感染率约为1.2%, 翻修感染率高达3%-5%^[17-21], 70%由葡萄球菌引起^[22-24]。感染一旦发生, 如果不取出假体, 生物膜内的小菌落会持续存在^[25], 即使高度敏感的抗生素也难以清除细菌。

纳米技术具有广阔的应用前景^[26], 特别是纳米银, 它具有抑制细胞呼吸链、改变细胞膜渗透性、使核酸变性等多重杀菌机制。植入材料表面改性, 可以有效减少细菌黏附, 防止细菌生物膜的形成。利用金属表面的特殊涂层释放抑菌或杀菌成分, 可以有效预防骨关节置换术后假体周围感染。纳米银的小尺寸效应和表面效应, 可以轻易地进入病原体体内, 迅速与细菌中的巯基结合, 降低细菌合成酶的活性, 从而达到杀灭细菌的目的。银离子还具有抑制细胞呼吸链、改变细胞膜渗透性、使核酸变性等多重杀菌机制。其抗菌作用强大, 抗菌谱较广, 对革兰阳性菌与革兰阴性菌均具有杀灭作用^[27-29]; 对真菌也有抑制作用^[30], 还可杀灭对传统抗结核药物已经产生耐药的结核分枝杆菌^[31-32]; 对人类免疫缺陷病毒、乙肝病毒、禽流感病毒等也有一定的抑制作用^[33-36]。

纳米银在一定的计量范围内安全无毒副作用, 不产生耐药性。贴膜法主要用于表面光滑材料的抗菌性能测试, 测试结果重复性好, 数据可靠, 最能反映真实情况。本实验中通过贴膜法检测钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合涂层材料对金黄色葡萄球菌抗菌率达到90%以上, 实验中使用菌液浓度远远超过了临床骨科手术中生物材料所沾染到的细菌浓度, 证明钛基表面羟基磷灰石/纳米银复合材料抗菌作用能够满足骨科手术的需要。

良好的生物相容性是生物材料应用于临床的生物学基础。按国际标准化组织会议的解释, 生物相容性是指生命体组织对植入材料产生反应的一种能力, 一般是指材料与宿主之间的相容性。生物相容性包括两大原则, 即生物安全性原则和生物功能性原则。生物安全性评价目的在于研究生物材料在人体的潜在危险性, 以保证生物材料临床应

用的安全。任何一种生物材料应用于临床, 首先必须具备使用安全性和良好的生物相容性, 这是生物材料获准临床使用的前提。兔热原实验是评价样品所含致热原是否符合标准的经典实验^[37], 兔对各种细菌内毒素、化学药品、异种蛋白等热原物资反应灵敏, 最易产生发热反应, 发热反应典型、稳定, 因此被广泛应用于制药和药检部门对各种制剂的热原质检定^[38]。溶血实验能敏感地反映出材料对红细胞的影响, 有溶血反应时, 可提示材料有毒性^[39], 材料可溶性残余分子化学作用和材料表面机械损伤是引起溶血的主要原因^[40]。急性毒性实验是指24 h内, 一次或多次大剂量使用某种物质进入动物体内, 观察其全身代谢的毒性反应, 从而评价材料对生物体的急性毒性作用^[41], 由于小鼠对多种毒性刺激敏感, 因此在药物的急性、亚急性和慢性毒性实验以及半数致死量测定中常用小鼠作为实验对象。皮肤刺激试验是指经皮肤给药后, 在皮肤上产生的可逆性炎性病变。可以选择多种哺乳类动物, 首选白色家兔, 观察动物皮肤接触受试物后, 是否有红肿、充血、渗出等局部反应, 根据红斑及水肿程度进行综合评价。

本实验严格按照国家和国际标准化组织对生物材料相容性的检测标准, 综合评价钛基表面羟基磷灰石/银复合涂层的生物相容性, 其结果证明制备的材料无全身急性毒性作用和溶血作用, 无致热原和致敏原。与不含银的纯羟基磷灰石材料相比, 生物相容性无明显差异。该结果为将来应用于人工关节的生物材料研究提供了实验依据。

致谢: 感谢新疆医科大学第一附属医院医学检验中心微生物实验室、新疆医科大学第一附属医院实验动物科学研究所。

作者贡献: 通讯作者、第一作者进行实验的设计, 实验实施为第一、四作者。实验评估为第二作者。资料收集为第五、六作者。第一作者成文, 通讯作者审核。通讯作者、第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验中对动物的处置按照《关于善待实验动物的指导性意见》标准执行。

学术术语: 生物相容性-是指生命体组织对植入材料产生反应的一种能力, 一般是指材料与宿主之间的相容性。生物相容性包括两大原则, 即生物安全性原则和生物功能性原则。生物安全性评价目的在于研究生物材料在人体的潜在危险性, 以保证生物材料临床应用的安全。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 鲜爱明, 张晓岗, 曹力, 等. 钛基表面纳米银复合涂层的缓释性能[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(39):6335-6341.
- [2] 廖娟, 费伟, 郭俊, 等. 载银抗菌纯钛表面的制备及其抗菌性能的检测[J]. 华西口腔医学杂志, 2014(3):303-305.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T16886. 10-2005刺激与迟发型超敏反应试验/中华人民共和国国家标准 医疗器械生物学评价[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.

- [4] 阮洪江,刘俊建,范存义,等.载银羟基磷灰石抗菌涂层体外抗菌性能及生物相容性研究[J].中国修复重建外科杂志,2009,23(2):226-230.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T16175-2008 医用有机硅材料生物学评价试验方法[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [6] 张岩,陶海荣,何耀华,等.可降解镁锌合金的细胞毒性和溶血实验[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(41):8162-8166.
- [7] 国际标准化组织. ISO10993-2009医疗器械生物学评价[S].2009.
- [8] 赵华福,张余,李剑,等.载银珊瑚羟基磷灰石的生物相容性评价[J].广东医学,2011,32(5):552-554.
- [9] 励永明,孙皎,顾国珍,等.评价生物材料不同给予方法致急性、全身毒性作用的实验初探[J].口腔材料器械杂志,2009,9(2):83-85.
- [10] 李广州,蒋电明,谭祖键,等.载银二氧化钛纳米羟基磷灰石/聚酰胺66复合材料的生物相容性及其安全性[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(47):9231-9235.
- [11] 朱辉,尹庆水,张余,等.数字化载银羟基磷灰石人工骨抗菌性及生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(47):8745-8748.
- [12] 邹兆伟.纳米载银磷酸锆抗菌聚氨酯抗菌性能及生物相容性研究[D].广州:南方医科大学,2012.
- [13] 唐良华,赵长虹,王爱民.载万古霉素-PDLLA钛合金钢板的毒性试验评估[J].创伤外科杂志,2009,11(3):256-259.
- [14] Shuman EK, Urquhart A, Malani PN. Management and prevention of prosthetic joint infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26(1):29-39.
- [15] Peel TN, Buising KL, Choong PF. Diagnosis and management of prosthetic joint infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25(6):670-676.
- [16] Parnham MJ. Immunomodulatory effects of antimicrobials in the therapy of respiratory tract infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18(2):125-131.
- [17] Bozic KJ, Ries MD. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(8):1746-1751.
- [18] Kurtz SM, Lau E, Schmier J, et al. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty.* 2008;23(7):984-991.
- [19] Urquhart DM, Hanna FS, Brennan SL, et al. Incidence and risk factors for deep surgical site infection after primary total hip arthroplasty: a systematic review. *J Arthroplasty.* 2010;25(8):1216-1222.e1-3.
- [20] Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, et al. The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(1):45-51.
- [21] Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, et al. The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(1):128-133.
- [22] Fulkerson E, Valle CJ, Wise B, et al. Antibiotic susceptibility of bacteria infecting total joint arthroplasty sites. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(6):1231-1237.
- [23] Salgado CD, Dash S, Cantey JR, et al. Higher risk of failure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;461:48-53
- [24] Walls RJ, Roche SJ, O'Rourke A, et al. Surgical site infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after primary total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 2008;90(3):292-298.
- [25] Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, et al. Biofilms in chronic infections-a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;59(3):324-336.
- [26] Singh R, Nalwa HS. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. *J Biomed Nanotechnol.* 2011;7(4):489-503.
- [27] Cho KH, Park JE, Osaka T, et al. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim Acta.* 2005;51(5):956-960.
- [28] da Silva Paula MM, Franco CV, Baldin MC, et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C.* 2009;29(2):647-650.
- [29] Lee BU, Yun SH, Ji JH, et al. Inactivation of *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilizing airborne silver nanoparticles. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(1):176-182.
- [30] Panáček A, Kolár M, Vecerová R, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials.* 2009;30(31):6333-6340.
- [31] Matsui Y, Otomo K, Ishida S, et al. Effect of silver-carrying photocatalyst "Hikari-Gintech" on mycobacterial growth in vitro. *Microbiol Immunol.* 2004;48(7):489-495.
- [32] Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, et al. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3373-3381.
- [33] Sun RW, Chen R, Chung NP, et al. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *Chem Commun (Camb).* 2005;(40):5059-5061.
- [34] Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology.* 2005;3:6.
- [35] Lu L, Sun RW, Chen R, et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther.* 2008;13(2):253-262.
- [36] 张若愚,夏雪山,胡亮,等.Ag/Diatomite复合材料及其对禽流感病毒的杀灭研究[J].贵金属,2004,25(2):28-32.
- [37] 何开勇,周素文,高华.体外人全血热原实验方法研究[J].医药导报,2011,30(7):936-939.
- [38] 秦川.实验动物学[M].北京:人民卫生出版社,2010:38-51.
- [39] 韩雪松,刘莹,战德松.溶血试验评价奥氏体无镍不锈钢生物相容性[J].沈阳医学院学报,2010,12(2):87-89.
- [40] 王翔,闫蕾,贾光,等.纳米材料潜在健康影响的研究进展[J].毒理学杂志,2005,19(1):15-17.
- [41] 陈康,李瑛,谢良宪.壳聚糖聚乳酸膜的制备和毒性试验研究[J].西南国防医药,2011,21(6):585-587.