

• 研究报告 •

载银二氧化钛抗菌涂层气管导管的口腔黏膜刺激试验

许江燕 曹俊敏 王原 蒋旭宏

【摘要】 目的 研究载银二氧化钛 (Ag-TiO₂) 抗菌涂层气管导管对口腔黏膜的刺激作用。**方法** 选取 20 只 SPF 级雄性金黄地鼠, Ag-TiO₂ 抗菌涂层气管导管和常规气管导管 (空白管)。以 0.9% 氯化钠注射液或棉籽油作为极性或非极性对照液。将浸有涂层管或空白管极性浸提液或非极性浸提液的棉球 (各 5 个) 放入金黄地鼠左侧颊囊内, 同时将浸有极性或非极性对照液的棉球 (各 10 个) 放入金黄地鼠右侧颊囊内作为对照, 接触 5 min 后取出棉球并用生理盐水冲洗颊囊, 每小时重复 1 次, 共 4 次。于末次接触 24 h 后麻醉金黄地鼠, 肉眼观察口腔黏膜损害程度, 光镜下观察黏膜组织反应情况并进行组织反应评分。**结果** 各组动物颊囊均未见糜烂、溃疡、充血、肿胀等病理学改变。镜下观察发现, 双侧口腔黏膜上皮完整, 上皮细胞未见增生、变平、变性或坏死, 黏膜下未见充血、水肿、炎性浸润和坏死等病理改变, 各组组织反应评分均值均为 0 分。**结论** Ag-TiO₂ 抗菌涂层气管导管口腔黏膜刺激试验为阴性, 符合医疗器械生物学评价国家标准。

【关键词】 载银二氧化钛; 抗菌涂层; 气管插管; 口腔黏膜刺激试验

气管插管是将一种特制的气管内导管经声门置入气管的技术, 是建立通畅气道的简捷有效方法。但气管插管机械通气 48 h 后容易引起呼吸机相关性肺炎 (VAP), VAP 是气管插管患者最常见的严重并发症, 其发病率、病死率高, 治疗效果差, 医疗资源消耗大^[1], 目前采取的预防措施主要是积极抗感染治疗^[2]、气道湿化^[3]、改变体位和有效护理^[4]等, 但并没能很好地减少 VAP 的发生^[5]。重症呼吸道感染及 VAP 常见的病原菌是铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌等, 且表现出多重耐药甚至泛耐药^[6-8], 这些病原菌特别是铜绿假单胞菌易黏附在气管插管表面, 并分泌多糖基质、纤维蛋白、脂蛋白等, 使细菌相互粘连聚集, 形成生物被膜, 定植在患者气道, 导致细菌多重耐药的发生, 成为院内感染最棘手的问题, 也成为机械通气患者脱机困难的重要因素^[9-11]。

为了尽可能减少气管插管的感染并发症, 经大量实验研究, 我们最后确定以正硅酸乙酯 (TEOS) 为硅源, 以硅烷偶联剂 (KH570) 和甲基三乙氧基硅烷 (MTES) 为有机相前驱体, 以载银二氧化钛 (Ag-TiO₂) 为抗菌剂, 经溶胶-凝胶法在常温条件下制备 TEOS / KH570 / MTES / Ag-TiO₂ 抗菌有机硅溶胶。将上述抗菌有机硅溶胶均匀涂布在常规导管表面, 经热固化干燥后, 获得 TEOS / KH570 / MTES / Ag-TiO₂ 抗菌涂层导管。经反复测试, 我们发现有机硅溶胶的最佳配比为 TEOS : KH570 : MTES = 15 : 6 : 1, 此时各项性能最佳, 符合国家关于医用生物学材料的相关标准。前期研究表明, 抗菌剂浓度为 1% 时 Ag-TiO₂ 抗菌涂层管即有明确的抗菌

性能^[12]。但该涂层管能否成为临床试验前的候选导管, 还需要进一步明确其生物相容性。本研究以金黄地鼠口腔颊囊作为实验组织, 以 0.9% 氯化钠注射液或棉籽油作为极性或非极性对照液, 将浸有涂层管或普通管的极性或非极性浸提液的棉球分别与金黄地鼠左侧颊囊口腔黏膜接触, 同时将浸有极性和非极性对照液的棉球分别与金黄地鼠的右侧颊囊口腔黏膜接触; 观察口腔局部黏膜损害程度、组织切片镜下观察黏膜组织反应, 以明确涂层导管对金黄地鼠口腔黏膜是否有刺激作用, 为下一步研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: SPF 级雄性金黄地鼠 (口腔双侧颊囊无病变) 25 只, 体质量 100 ~ 120 g, 由北京维通利华实验动物有限责任公司提供, 生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.1.2 实验器材: 1% Ag-TiO₂ 抗菌涂层气管导管由浙江中医药大学附属第一医院课题研究组提供; 常规气管导管 (空白管) 由美国 Covidien 公司生产, 批号: 国食药监械 (进) 字 2011 第 2662686 号, 由浙江中医药大学附属第一医院麻醉科提供。极性对照液为 0.9% 氯化钠注射液, 由扬州中宝制药有限公司生产, 批号: 131101; 非极性对照液为棉籽油, 由浙江中医药大学动物实验研究中心提供。

1.1.3 浸提液制备: 将一套涂层管称重后剪成小段, 每 0.2 g 加入适量 0.9% 氯化钠注射液或棉籽油 1 mL, 用白色磨口广口瓶密封后置于 70 ℃ 培养箱 24 h, 得到涂层管极性或非极性浸提液。空白管操作方法同上, 得到空白管极性或非极性浸提液。另外单纯以 0.9% 氯化钠注射液或棉籽油密封后置于 70 ℃ 培养箱 24 h, 得到极性或非极性对照液。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物的准备: 将 25 只金黄地鼠编号, 常规饲养, 适应环境。给每只动物套上一个 3 ~ 4 mm 宽的适用项圈, 使之能维持正常进食和呼吸, 且又能防止口腔内棉球移出。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.016

基金项目: 国家发明专利 (ZL2011 1 0361576.7); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2012KYB142)

作者单位: 310006 杭州, 浙江中医药大学附属第一医院微生物实验室 (许江燕、曹俊敏、王原), 急诊科 (蒋旭宏)

通信作者: 蒋旭宏, Email: Anhong2225@163.com

每日称量体质量,连续 7 d,观察体质量下降情况及健康状况,必要时可调整项圈。如动物体质量持续下降或健康状况不佳则予以淘汰,最后选取 20 只状况较好的金黄地鼠进行实验。

1.2.2 操作过程:动物麻醉后,分别将涂层管极性、非极性浸提液浸透的棉球以及空白管极性、非极性浸提液浸透的棉球(各 5 个)放入金黄地鼠左侧颊囊内;再分别将极性、非极性对照液浸透的棉球(各 10 个)放入金黄地鼠右侧颊囊作为对照。给动物带上项圈,接触 5 min 后取下项圈和棉球,用生理盐水冲洗双侧颊囊;上述步骤每小时重复 1 次,共 4 次。

1.2.3 观察指标:末次接触 24 h 后麻醉金黄地鼠,肉眼观察动物颊囊后处死,无损伤取与棉球接触的颊部组织,进行组织切片、染色并镜下观察。

1.2.4 口腔黏膜组织反应评分标准见表 1。

1.3 统计学处理:应用 SPSS 13.0 软件处理数据,组间计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肉眼观察:每次接触后或末次接触 24 h 后取出棉球,肉眼观察金黄地鼠右侧颊囊(对照液组)和左侧颊囊(涂层管组、空白管组)均未见糜烂、溃疡、充血、肿胀等病理学改变。

2.2 镜下观察:右侧颊囊(对照液组)和左侧颊囊(涂层管组、空白管组)的组织切片分别在 100 倍和 400 倍镜下观察,发现双侧口腔黏膜上皮完整,上皮细胞未见增生、变平、变性或坏死,黏膜下未见充血、水肿、炎性浸润和坏死等病理学改变(图 1)。口腔黏膜急性接触组织反应评分显示,涂层管组、空白管组和对照液组颊囊上皮变化、白细胞浸润、血管充血、水肿评分均值均为 0 分;涂层管极性、非极性浸提液组和极性、非极性对照液组总积分均为 0 分,且组间比较无显著差异(均 $P > 0.05$;表 2)。

3 讨论

气管插管是急危重病患者抢救时机械通气的简捷有效的方法,是患者身上最重要的一条“生命线”,因呼吸衰竭入院的危重病患者中需呼吸支持者占 30%~50%^[13]。气管插管是一种有创性侵入性治疗,导管置入气道后与气道紧密黏连,破坏气道的自然屏障和气道内环境,细菌容易感染并生长定植,引发 VAP。因此,我们在开发涂层气管导管时,不仅需要考虑其抗菌

性能,还要确认其对患者气道黏膜是否有刺激或损害作用。

研究表明,银离子(Ag^+)具有一定的抗菌性能,通过接触菌体而起到抗菌、杀病毒的作用^[14]。近些年,银抗菌涂

表 1 口腔黏膜组织反应评分标准

反应程度	评分(分)	反应程度	评分(分)
上皮变化		血管充血	
正常	0	无	0
细胞变性或变平	1	极少	1
组织变形	2	轻度	2
局部糜烂	3	中度	3
广泛糜烂	4	重度伴血管破裂	4
白细胞浸润		水肿	
无	0	无	0
极少, <25 个/HP	1	极少	1
轻度, 26 ~ 50 个/HP	2	轻度	2
中度, 51 ~ 100 个/HP	3	中度	3
重度, >100 个/HP	4	重度	4

注:评分 0 分提示无刺激,1~4 分为极轻微刺激,5~8 分为轻度刺激,9~11 分为中度刺激,12~16 分为强度刺激;HP 为高倍视野

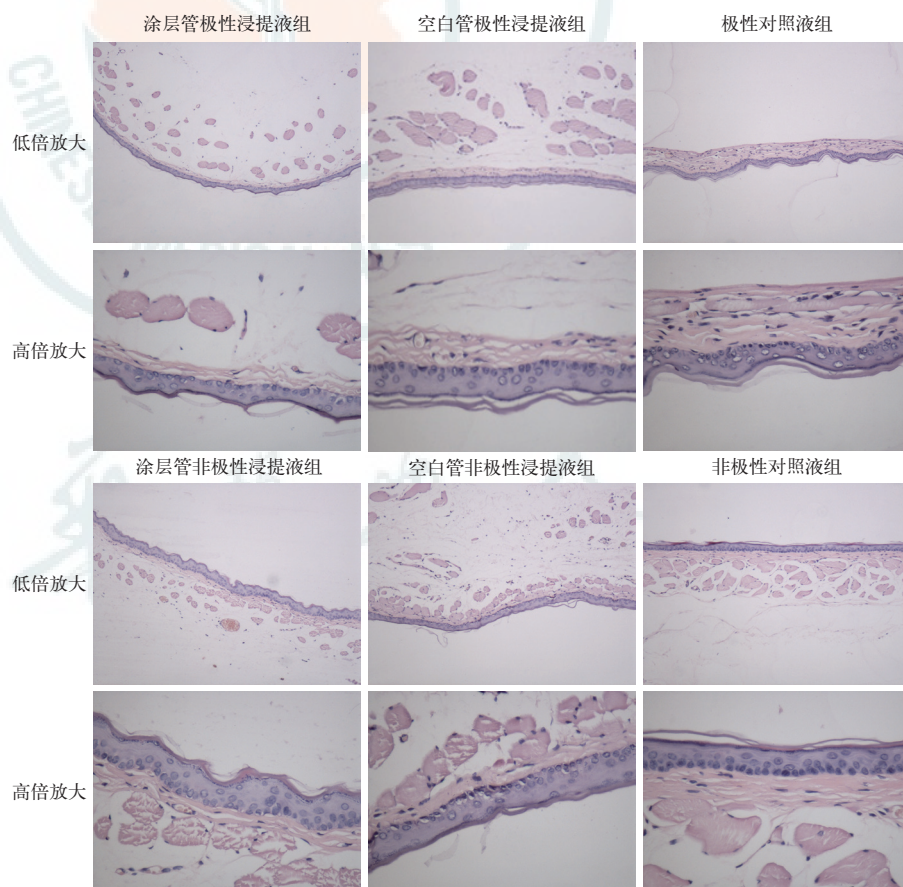


图 1 以 0.9%氯化钠注射液或棉籽油作为极性或非极性对照液,将浸有载银二氧化钛(Ag-TiO_2)涂层管或普通管的极性或非极性浸提液的棉球分别与金黄地鼠左侧颊囊口腔黏膜接触,同时将浸有极性或非极性对照液的棉球分别与金黄地鼠的右侧颊囊口腔黏膜接触,分别在低倍镜和高倍镜下观察发现,双侧口腔黏膜上皮完整,上皮细胞未见增生、变平、变性或坏死,黏膜下未见充血、水肿、炎性浸润和坏死等病理学改变 HE

层气管导管的研发成为国内外的研究热点。Pacheco-Fowler 等^[15]研制了一种抗菌药物涂层气管导管,采用 Ag⁺ 和双氯苯双胍已烷复合物制备而成,在体外模型对 VAP 的常见细菌具有明显的抗菌作用; Raad 等^[16]使用银化合物研制涂层气管导管并观察其抗菌疗效,结果发现,银化合物涂层气管导管可以减少 VAP 的发生风险。Kollef 等^[17]在北美 54 个研究中心进行了前瞻性随机对照单盲研究,结果发现银涂层气管导管能明显减少并延迟 VAP 的发生。二氧化钛 (TiO₂) 具有光催化式杀菌作用,能有效抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色假丝酵母菌等病原菌,且化学性能稳定^[18]。当 Ag⁺ 均匀地结合到 TiO₂ 表面的介孔中,就形成高效、持久、耐高温、稳定、广谱抗菌的 Ag-TiO₂^[19]。但是既往研究也表明:当 Ag⁺ 浓度较高时对真核细胞会产生毒性,从而抑制细胞活性^[20]。上述研究也因 Ag⁺ 浓度析出过高而未在临床应用。

为减少 Ag⁺ 浓度以提高安全性,我们以 Ag-TiO₂ 为抗菌剂,经溶胶凝胶方法研制了新型的抗菌涂层气管导管,并获得了国家发明专利。本研究中,我们对涂层导管进行了口腔黏膜刺激试验,这是国际标准化组织作为评价口腔接触材料生物安全性的必需试验。金黄地鼠口腔两侧的颊囊黏膜对刺激物反应灵敏,尤其对致癌物质特别敏感^[21],故选取其作为实验动物。与 Ag-TiO₂ 抗菌涂层导管接触后,金黄地鼠口腔两侧颊囊经肉眼观察未见糜烂、溃疡、充血、肿胀等病理改变;组织切片经镜下观察亦未发现上皮细胞增生、变平、变性或坏死,黏膜下未见充血、水肿、炎性浸润和坏死等病理改变;口腔黏膜急性接触组织反应评分结果显示,涂层管极性浸提液组评分与极性对照液组无显著差异;涂层管非极性浸提液组的总积分与非极性对照液组相比也无显著差异。表明涂层导管对口腔黏膜无刺激、无损伤。这与 Ag-TiO₂ 无毒无味、对皮肤无刺激有关,而且载银处理后使银释出减少,抗菌性能持久稳定,既发挥了较大的抗菌性能,又充分保证了涂层材料的安全性、稳定性和生物适应性^[22]。

综上所述,我们研制的 Ag-TiO₂ 抗菌涂层气管导管口腔黏膜刺激试验为阴性,符合我国医疗器械生物学评价要求,具有良好的生物安全性,可作为临床前研究的候选导管,为防治因气管插管引发的 VAP 开辟了一条新的途径。当然,在进入临床使用阶段之前,我们还有很多工作要做。另外,如果能将此研究成果用于其他医疗器械上,比如导尿管、静脉留置管等,其应用前景一定十分广阔。

参考文献

- [1] 王少利,安卫红,李宏亮,等.北京市某三级甲等医院综合重症监护病房患者器械相关感染的监测分析[J].中国危重病急救医学,2011,23(11):681-684.
- [2] 徐静.氯己定减少呼吸机相关性肺炎的国内外研究进展[J].上海护理,2012,12(5):75-78.

表 2 载银二氧化钛抗菌涂层气管导管对金黄地鼠口腔黏膜的刺激

组别	动物数 (只)	颊囊	急性接触组织反应评分(分)				
			上皮变化	白细胞浸润	血管充血	水肿	总积分
涂层管极性浸提液组	5	左侧	0	0	0	0	0
空白管极性浸提液组	5	左侧	0	0	0	0	0
极性对照液组	10	右侧	0	0	0	0	0
涂层管非极性浸提液组	5	左侧	0	0	0	0	0
空白管非极性浸提液组	5	左侧	0	0	0	0	0
非极性对照液组	10	右侧	0	0	0	0	0

- [3] 莫敏,刘松桥,杨毅.热湿交换器和加温湿化器对呼吸机相关性肺炎发生率影响的荟萃分析[J].中国危重病急救医学,2011,23(9):513-517.
- [4] 冷玉鑫,宋崖含,姚智渊,等.45°半卧位对机械通气患者呼吸机相关性肺炎影响的 Meta 分析[J].中国危重病急救医学,2012,24(10):587-591.
- [5] Bailey JL, Yeung SY. Probiotics for disease prevention: a focus on ventilator-associated pneumonia [J]. Ann Pharmacother, 2011, 45(11):1425-1432.
- [6] Bouadma L, Wolff M, Lucet JC. Ventilator-associated pneumonia and its prevention [J]. Curr Opin Infect Dis, 2012, 25(4):395-404.
- [7] 晏斌林,赵年贵,冯清洲,等.呼吸机相关性肺炎病原菌及耐药性分析[J].南昌大学学报(医学版),2011,51(6):40-42.
- [8] 孙成栋,李真,刘斯,等.泛耐药鲍曼不动杆菌医院感染的耐药性分析[J].中华危重病急救医学,2013,25(6):369-372.
- [9] 伍育旗,单红卫,赵贤瑜,等.重症监护病房铜绿假单胞菌医院感染病例对照研究[J].中国危重病急救医学,2011,23(2):88-90.
- [10] Hong H, Landauer MR, Foriska MA, et al. Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein [J]. J Basic Microbiol, 2006, 46(4):329-335.
- [11] 秦英智.关注困难脱机的研究现状[J].中国危重病急救医学,2012,24(2):65-67.
- [12] 蒋旭宏,王原,华军益,等.载银二氧化钛抗菌涂层气管插管导管的抗菌性能研究[J].中华危重病急救医学,2014,26(5):343-346.
- [13] 单君,顾艳茹,吴娟,等.有效吸痰预防呼吸机相关性肺炎的研究进展[J].中华护理杂志,2011,46(1):98-100.
- [14] Alt V, Bechert T, Steinrück P, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement [J]. Biomaterials, 2004, 25(18):4383-4391.
- [15] Pacheco-Fowler V, Gaonkar T, Wyer PC, et al. Antiseptic impregnated endotracheal tubes for the prevention of bacterial colonization [J]. J Hosp Infect, 2004, 57(2):170-174.
- [16] Raad II, Mohamed JA, Reitzel RA, et al. The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes [J]. Biomaterials, 2011, 32(11):2689-2694.
- [17] Kollef MH, Afessa B, Anzueto A, et al. Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial [J]. JAMA, 2008, 300(7):805-813.
- [18] Wista J, Sanabria J, Dierolf C, et al. Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production [J]. J Photochem Photobiol A Chem, 2002, 147(3):241-250.
- [19] 张莹,彭兵,柴立元,等.载银纳米二氧化钛的分散及对 PVC 清漆的改性[J].涂料工业,2011,41(1):24-28.
- [20] Cohen MS, Stern JM, Vanni AJ, et al. In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh [J]. Surg Infect (Larchmt), 2007, 8(3):397-403.
- [21] 魏泓.医学实验动物学[M].成都:四川科学技术出版社,1999:149-163,170-179.
- [22] Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use [J]. Curr Probl Dermatol, 2006, 33:17-34.

(收稿日期:2014-08-11)

(本文编辑:李银平)