

载银二氧化钛对金黄色葡萄球菌生物被膜抑制作用的研究

丁阳阳¹ 陈益¹ 庄鸣阳¹ 许江燕² 蒋旭宏³

¹浙江中医药大学第一临床医学院,杭州 310053;²浙江中医药大学附属第一医院微生物实验室,杭州 310016;³浙江中医药大学附属第一医院急诊科,杭州 310006

通信作者:蒋旭宏,Email: anhong2225@163.com

【摘要】 目的 观察载银二氧化钛(Ag-TiO₂)和 Ag-TiO₂ 抗菌涂层气管导管(ETT)对金黄色葡萄球菌生物被膜(BF)的抑制作用。方法 采用二甲氧喹黄(XTT)比色法检测 Ag-TiO₂ 抗金黄色葡萄球菌 BF 的最低抑菌浓度(MIC);制备 Ag-TiO₂ 涂层 ETT,按浓度梯度分为 Ag-TiO₂ 11 mg/L 组、8 mg/L 组、5 mg/L 组、2 mg/L 组和空白组,分别浸渍于 1.0×10⁹ cfu/L 浓度的金黄色葡萄球菌菌悬液,通过检测 ETT 上细菌菌落数及 BF 的含量,确定抗菌涂层 ETT 对金黄色葡萄球菌 BF 形成的影响。结果 Ag-TiO₂ 对金黄色葡萄球菌 BF 具有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性,其 MIC 为 10 mg/L; Ag-TiO₂ 涂层 ETT 具有明显的抗金黄色葡萄球菌 BF 作用,且浓度越高作用越强,5 mg/L、8 mg/L、11 mg/L 组吸光度(A)值均明显低于空白组(0.176±0.004、0.147±0.002、0.094±0.002 比 0.267±0.045,均 P<0.05),Ag-TiO₂ 涂层浓度为 2、5、8、11 mg/L 的 Ag-TiO₂ 涂层 ETT 对金黄色葡萄球菌的抑制率逐渐升高,且 11 mg/L 的 ETT 抗 BF 效果最好,抑制率分别为 6.4%、34.1%、44.9%、64.8%。结论 Ag-TiO₂ 和 Ag-TiO₂ 涂层 ETT 对金黄色葡萄球菌 BF 均有显著的抑制作用。

【关键词】 载银二氧化钛; 金黄色葡萄球菌; 细菌生物被膜

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY551,2018KY552);浙江省自然科学基金(LY14H150004)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200518-00390

Study on inhibitory effect of Ag⁺-loaded TiO₂ on the biofilm of *Staphylococcus aureus*

Ding Yangyang¹, Chen Yi¹, Zhuang Mingyang¹, Xu Jiangyan², Jiang Xuhong³

¹The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China;

²Microbiology Laboratory, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310016,

Zhejiang, China; ³Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

Corresponding author: Jiang Xuhong, Email: anhong2225@163.com

【Abstract】 Objective To observe the antibacterial effect of Ag⁺-loaded TiO₂ (Ag-TiO₂) and Ag-TiO₂ coated endotracheal tube (ETT) on the bacterial biofilm (BF) of *Staphylococcus aureus*. **Methods** 2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) colorimetric method was used to detect minimal inhibitory concentration (MIC) of Ag-TiO₂ for inhibition of BF of *Staphylococcus aureus*. The Ag-TiO₂ coated ETT were prepared, and divided into 11 mg/L, 8 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L and 0 mg/L ETT group, according to the concentration gradient, then impregnated in the liquid with *Staphylococcus aureus* at a concentration of 1.0×10⁹ cfu/L. The influence of antibacterial coated ETT on the formation of *Staphylococcus aureus* BF was determined by detecting the colonies of bacteria and BF on the ETT. **Results** Ag-TiO₂ had a significant inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* BF in a concentration-dependent manner, and its MIC was 10 mg/L. Ag-TiO₂ coated ETT has significant anti-*Staphylococcus aureus* BF effect, and the higher the concentration, the stronger the effect. The absorbance (A) values of Ag-TiO₂ 5 mg/L, 8 mg/L, 11 mg/L ETT groups were significantly lower than that in control group (0.176±0.004, 0.147±0.002, 0.094±0.002 vs. 0.267±0.045, all P<0.05). The inhibitory rates of Ag-TiO₂ 2 mg/L, 5 mg/L, 8 mg/L ETT groups were increased gradually, and 11 mg/L Ag-TiO₂ coated ETT group had the highest inhibitory rate for BF, the inhibitory rates were 6.4%, 34.1%, 44.9% and 64.8%, respectively. **Conclusion** Both Ag-TiO₂ and Ag-TiO₂ coated ETT have significant inhibitory effects on *Staphylococcus aureus* BF.

【Key words】 Ag-TiO₂; *Staphylococcus aureus*; Bacterial biofilm

Fund program: Zhejiang Provincial Medical and Health Science and Technology Planning Project of China (2018KY551, 2018KY552); Natural Science Foundation of Zhejiang Province of China (LY14H150004)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200518-00390

危重患者机械通气 48 h 后发生的肺炎称呼吸机相关性肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP), VAP 是一类严重的医院感染性疾病^[1]。VAP 发生的主要原因是导管表面寄生并产生细菌生物被膜

(bacterial biofilm, BF),为细菌提供了很好的保护,从而表现出多重耐药甚至泛耐药,导致治疗失败^[2]。肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和金黄色葡萄球菌等是常见的与 VAP 发生有关的病原菌^[3]。

VAP可增加机械通气患者抗菌药物的使用和重症患者的病死率,给家庭和社会造成沉重的负担。

为了减少气管插管VAP等并发症的发生,有研究者使用载银二氧化钛(Ag^+ -loaded TiO_2 , Ag- TiO_2)作为抗菌剂,以临床常用聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)气管导管(endotracheal tube, ETT)作为基材,用溶胶凝胶法制备了Ag- TiO_2 抗菌涂层ETT^[4]。有研究显示,纳米银和 TiO_2 主要通过改变金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性抑制核酸的合成,减少蛋白生成来抑制细菌的生长^[5]。为进一步明确抗菌剂及涂层导管的抗BF作用,本研究以金黄色葡萄球菌为试验菌株,检测Ag- TiO_2 抗菌剂及Ag- TiO_2 涂层ETT的抗BF性能,以期为临床提供参考。

1 资料与方法

1.1 试验菌株、仪器与试剂:金黄色葡萄球菌(ATCC25923)购于美国模式培养物研究所(American Type Culture Collection, ATCC);TECAN Sunrise 酶标仪(瑞士帝肯公司);Thermo Scientific Nunc 聚苯乙烯96孔板(美国赛默飞世尔科技公司)、康宁1.8 cm 细胞刮刀(美国康宁公司)、艾本德(Eppendorf)移液枪(德国艾本德公司);Ag- TiO_2 抗菌涂层ETT(由本课题组研究人员制备);二甲氧喹黄[2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, XTT]比色法试剂(批号:MA0015904D,由浙江中医药大学附属第一医院微生物中心提供);Ag- TiO_2 原液(1 000 mg/L,批号:201803046,杭州博创纳米材料有限公司)。

1.2 伦理学:本试验为浙江省医药卫生科技计划项目的研究内容,实验过程中使用的金黄色葡萄球菌菌株来源于ATCC,试验经浙江中医药大学伦理委员会审核,其过程不涉及伦理问题。

1.3 研究方法

1.3.1 XTT比色法检测Ag- TiO_2 抗金黄色葡萄球菌BF的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC):将金黄色葡萄球菌单菌落接种至培养液中,于30℃、200 r/min振荡培养,活化16 h。用培养液调整细菌悬液浓度至 1.0×10^9 cfu/L。于96孔板接种100 μL 细菌悬液,在37℃恒温箱中静置培养2 h。取出BF板,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤3次,于1~10号孔分别加入100 μL Ag- TiO_2 溶液(浓度为20、16、14、12、10、8、6、4、2、1 mg/L),11号孔为阳性对照(纯培养液),12号孔为阴性对照(生理盐水)。于37℃培养24 h后取出

96孔板,再用PBS洗涤3次,加入100 μL 培养液,随后避光条件下加入25 μL XTT复合物溶液,37℃孵育3 h,用酶标仪于490 nm处检测各孔吸光度(absorbance, A)值,计算不同浓度Ag- TiO_2 各孔的抑制率(抑制率= $|A_n - A_{11}|/A_{11} \times 100\%$)。与阳性对照孔比较,以A值下降80%以上最低浓度孔中的抗菌剂浓度为MIC。试验重复2次,取平均值。

1.3.2 Ag- TiO_2 抗菌涂层ETT对金黄色葡萄球菌BF的影响

1.3.2.1 导管BF的制备:将研究分为空白组及2、5、8、11 mg/L Ag- TiO_2 涂层ETT组5组。各组导管截取长度均为1 cm,每组截取3段ETT进行试验,将金黄色葡萄球菌菌悬液用培养液稀释至浓度为 1.0×10^9 cfu/L,加入无菌杯中,完全浸没导管,于36℃培养,第3天更换液体,培养3 d得到早期BF,培养7 d得到成熟的BF。培养7 d后将导管外壁和内壁用生理盐水反复冲洗去除未黏附细菌后备用。

1.3.2.2 导管BF内细菌菌落数测定:将各组试验导管剪成小块,放入盛有1 mL胰酶的无菌试管中,置于36℃温箱2 h,用涡旋振荡器振荡10 min,作为原液,倍比稀释5次。取原液和每份稀释溶液各10 μL ,分别接种于血培养皿中,36℃培养24 h,计数细菌菌落总数。以上操作在生物安全柜中进行,每管计数2次,取平均值。

1.3.2.3 导管对金黄色葡萄球菌抑制率的测定:金黄色葡萄球菌在接触物表面黏附后繁殖生长可形成BF, BF由多层细菌及其分泌的胞外多聚物构成,染色时结晶紫附着后不易被乙醇脱色而呈现紫色,以此为原理可测定BF的含量。本研究将已生成BF的各组导管分别置于1%结晶紫溶液中染色30 min,用生理盐水缓慢冲洗导管去除未结合的染料,再放入2 mL含33%乙酸溶液中解附BF上的染料,于涡旋振荡器上振荡2 min,所得有色溶液用可见光分光光度计测定620 nm处A值(A_{620}),每管计数6次,取平均值。与空白组的A值(A_0)比较,计算各组抑制率(抑制率= $|A_n - A_0|/A_0 \times 100\%$)。

1.4 统计学方法:用SPSS 25.0统计软件分析数据。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 用XTT比色法检测Ag- TiO_2 抗金黄色葡萄球菌BF的MIC(图1~2):Ag- TiO_2 对金黄色葡萄球菌

BF有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性。当Ag-TiO₂浓度达到10 mg/L时,对BF的抑制率>80%,即Ag-TiO₂对金黄色葡萄球菌BF的MIC为10 mg/L。

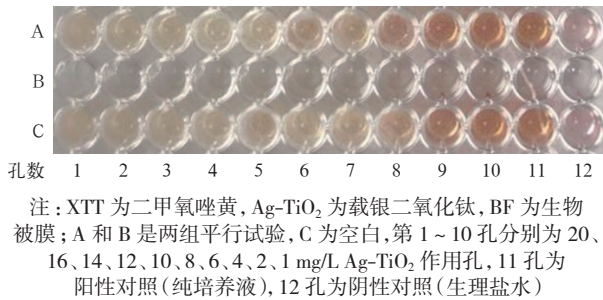


图1 XTT法检测Ag-TiO₂对金黄色葡萄球菌BF的抑制作用

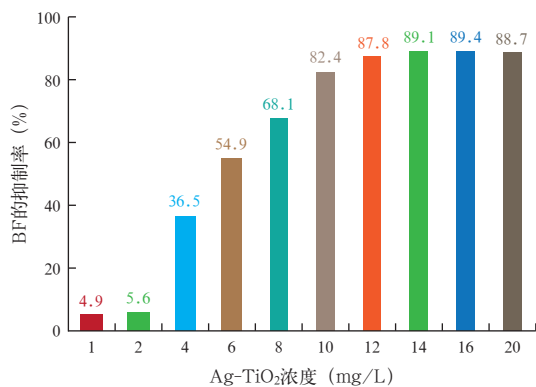


图2 不同浓度Ag-TiO₂涂层ETT对金黄色葡萄球菌BF的抑制率

2.2 Ag-TiO₂ 抗菌涂层ETT的抗BF性能检测

2.2.1 导管BF内的细菌菌落数比较(表1):Ag-TiO₂涂层ETT具有明显的抗金黄色葡萄球菌BF作用,且浓度越高,作用越强。Ag-TiO₂涂层浓度为11 mg/L的ETT抗BF效果最好,附着于导管上的细菌最少。

表1 不同浓度Ag-TiO₂涂层ETT细菌菌落计数及吸光度(A)值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	菌落数(个)	A ₆₂₀ 值
空白组	123.0 ± 15.6 (2)	0.267 ± 0.045 (6)
Ag-TiO ₂ 2 mg/L 组	64.5 ± 30.4 (2) ^a	0.250 ± 0.003 (6)
Ag-TiO ₂ 5 mg/L 组	78.5 ± 2.1 (2) ^a	0.176 ± 0.004 (6) ^a
Ag-TiO ₂ 8 mg/L 组	35.0 ± 12.7 (2) ^{ac}	0.147 ± 0.002 (6) ^{abc}
Ag-TiO ₂ 11 mg/L 组	11.5 ± 7.8 (2) ^{abc}	0.094 ± 0.002 (6) ^{abcd}
F 值	13.056	75.314
P 值	0.007	0.001

注:Ag-TiO₂为载银二氧化钛,ETT为气管导管;括号内为样本量;与空白组比较,^aP<0.05;与Ag-TiO₂ 2 mg/L比较,^bP<0.05;与Ag-TiO₂ 5 mg/L组比较,^cP<0.05;与Ag-TiO₂ 8 mg/L组比较,^dP<0.05

2.2.2 导管对金黄色葡萄球菌的抑制率(表1;图3):随着涂层表面Ag-TiO₂抗菌剂浓度的升高,A值呈逐渐降低的趋势,表明导管抗菌剂涂层浓度越高,细

菌越不容易在上面形成BF。随着Ag-TiO₂涂层浓度的增高,抑制率呈上升趋势,当浓度为11 mg/L时抑制率最高,表明导管抗菌剂涂层浓度越高,细菌在导管表面越难形成BF。

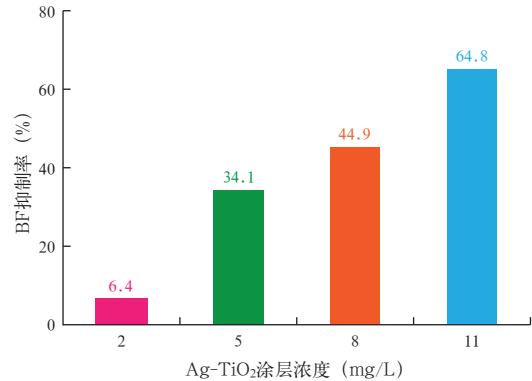


图3 不同浓度Ag-TiO₂涂层ETT对金黄色葡萄球菌BF的抑制率

3 讨论

VAP是重症监护病房(intensive care unit, ICU)获得性感染中最常见的一种疾病,其发生率为5%~40%,病死率约为10%^[6]。气管内插管可能是导致VAP最重要的因素^[7]。因为ETT通常由PVC制成,插管后不久其内表面易被一层由糖萼基质和不同微生物组成的BF覆盖^[8],BF一旦形成,细菌不仅可逃避宿主免疫作用,而且可阻止抗菌药物进入BF内部,使BF内细菌比浮游细菌的耐药性增加100~1000倍以上^[9]。集束化预防措施有助于降低VAP的发生率^[10]。此外,也有研究通过调整导管来预防和减少VAP的发生,如设计声门下分泌物引流系统、改进导管表面、改变袖口形状或材料等。

目前已有体外研究设计了不同类型的抗菌涂层,使用最多的是银抗菌剂^[11]。Raad等^[12]使用银化合物研制涂层ETT,并观察其抗菌效果,结果表明,银化合物涂层ETT可以减少VAP发生的风险,但导管表面成膜性不稳定,容易脱落。Kollef等^[13]通过一项大型随机、单盲、前瞻性对照研究发现,银离子(Ag⁺)涂层ETT能减少并延迟VAP的发生,相比于无涂层的导管,使用Ag⁺涂层导管可使VAP的发生风险降低35.9%。Berra等^[14]针对磺胺嘧啶银(silver sulfadiazine, SSD)涂层ETT的临床试验表明,SSD涂层可防止ETT被细菌定植和管道变窄。虽然银抗菌剂有良好的抗菌效果,但由银制成的材料可能会因为Ag⁺浓度过高而导致部分Ag⁺析出,从

而出现不良反应。而且 Ag^+ 在紫外线的照射下生成黑色银单质和氧化银,会影响制品的色泽及抗菌性能。

为了降低 Ag^+ 浓度,提高导管的生物安全性及成膜稳定性,本研究采用 Ag-TiO_2 作为抗菌剂,以临床常用 PVC ETT 作为基材,采用溶胶凝胶法制备了 Ag-TiO_2 抗菌涂层 ETT。 TiO_2 比表面积大、表面介孔多,能将纳米银均匀地结合到 TiO_2 表面的介孔中,形成高效、持久、耐高温的广谱抗菌剂 Ag-TiO_2 ,它能有效去除金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌等病原菌,抑制肠病毒、流行性感病毒等病原体^[15]。经检测 Ag-TiO_2 抗菌涂层 ETT 具有良好的涂层结合力、成膜稳定性、平整性、增透性和极低的银析出率;经口腔黏膜试验、热源试验、溶血试验、细胞毒性试验等,证明具有良好的生物相容性和安全性^[16-17]。

本研究以 XTT 法检测 Ag-TiO_2 对金黄色葡萄球菌 BF 活性的影响,结果显示 Ag-TiO_2 对金黄色葡萄球菌 BF 具有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性, MIC 为 10 mg/L,高于抑制其菌体生长所需要的浓度,可能是因为菌体初步形成 BF 后疏水性增加,抗菌剂较难进入发挥抑制作用。本研究制备了浓度分别为 11、8、5 和 2 mg/L 的 Ag-TiO_2 涂层 ETT,以未涂层的导管为空白组,通过培养导管表面 BF,检测导管上金黄色葡萄球菌及 BF 的含量,确定抗菌涂层导管的抗菌性能。结果显示,随着涂层表面抗菌剂浓度的降低,导管表面细菌菌落及 BF 含量均呈增加的趋势,说明 Ag-TiO_2 涂层 ETT 有良好的抗 BF 效能,可以抑制金黄色葡萄球菌 BF 的形成,且 Ag-TiO_2 浓度越高,抗菌性能越好。但本研究中最高浓度 ETT 为 Ag-TiO_2 11 mg/L,其抑菌率为 64.8%,尚未达到 80%,在后续研究中可进一步增加抗菌剂的浓度,以期获得更好的抗 BF 效果。

综上所述, Ag-TiO_2 和 Ag-TiO_2 涂层 ETT 对金黄色葡萄球菌 BF 均有显著的抑制作用,其作用机制尚不清楚,需要通过进一步的研究为临床开发应用提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张晓慧, 宁波, 张洁, 等. 呼吸机相关性肺炎的原因分析及综合护理对策 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (11): 841-842. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.016.
Zhang XH, Ning B, Zhang J, et al. Analysis of causes of ventilator-associated pneumonia and comprehensive nursing countermeasures [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (11): 841-842. DOI: 10.3760/cma.

j.issn.2095-4352.2014.11.016.
[2] 江梅, 刘冬冬, 黎毅敏. 呼吸机相关性肺炎诊疗指南循证解读 [J]. 中国循证医学杂志, 2016, 16 (1): 33-35. DOI: 10.7507/1672-2531.20160008.
Jiang M, Liu DD, Li YM. The interpretation of diagnosis and treatment guidelines of ventilator associated pneumonia [J]. Chin J Evidence-Based Med, 2016, 16 (1): 33-35. DOI: 10.7507/1672-2531.20160008.
[3] 董琰伟, 徐旭华. 呼吸机相关性肺炎病原菌分布及耐药性分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12 (36): 154-156. DOI: 10.15887/j.cnki.13-1389/r.2019.36.075.
Tong YW, Xu XH. Analysis of the distribution and drug resistance of pathogens associated with ventilator-associated pneumonia [J]. Chin J Clinical Rational Drug Use, 2019, 12 (36): 154-156. DOI: 10.15887/j.cnki.13-1389/r.2019.36.075.
[4] Jiang XH, Lyu B, Shen QH, et al. Preparation of silicon-modified antimicrobial polyethylene endotracheal tubes [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017, 105 (1): 91-98. DOI: 10.1002/jbm.b.33530.
[5] Jiang XH, Lyu B, Wang Y, et al. Bactericidal mechanisms and effector targets of TiO_2 and Ag-TiO_2 against *Staphylococcus aureus* [J]. J Med Microbiol, 2017, 66 (4): 440-446. DOI: 10.1099/jmm.0.000457.
[6] Papazian L, Klompas M, Luyt CE. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review [J]. Intensive Care Med, 2020, 46 (5): 888-906. DOI: 10.1007/s00134-020-05980-0.
[7] Coppadoro A, Bellani G, Foti G. Non-pharmacological interventions to prevent ventilator-associated pneumonia: a literature review [J]. Respir Care, 2019, 64 (12): 1586-1595. DOI: 10.4187/respcare.07127.
[8] Sottile FD, Marrie TJ, Prough DS, et al. Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes [J]. Crit Care Med, 1986, 14 (4): 265-270.
[9] Rosenberger LH, Hranjec T, McLeod MD, et al. Improvements in pulmonary and general critical care reduces mortality following ventilator-associated pneumonia [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2013, 74 (2): 568-574. DOI: 10.1097/TA.0b013e3182789312.
[10] 赵莉莉, 刘立丽, 陈菁, 等. JCI 理念指导下实践集束化预防措施可有效降低 VAP 发生率 [J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (7): 624-628. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.07.010.
Zhao LL, Liu LL, Chen J, et al. Ventilator bundle guided by context of JCI settings can effectively reduce the morbidity of ventilator-associated pneumonia [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (7): 624-628. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.07.010.
[11] Berra L, Curto F, Li Bassi G, et al. Antimicrobial-coated endotracheal tubes: an experimental study [J]. Intensive Care Med, 2008, 34 (6): 1020-1029. DOI: 10.1007/s00134-008-1099-3.
[12] 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. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.015.
[13] 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. DOI: 10.1001/jama.300.7.805.
[14] Berra L, Kolobow T, Laquerriere P, et al. Internally coated endotracheal tubes with silver sulfadiazine in polyurethane to prevent bacterial colonization: a clinical trial [J]. Intensive Care Med, 2008, 34 (6): 1030-1037. DOI: 10.1007/s00134-008-1100-1.
[15] Pablos C, van Grieken R, Marugán J, et al. Simultaneous photocatalytic oxidation of pharmaceuticals and inactivation of *Escherichia coli* in wastewater treatment plant effluents with suspended and immobilised TiO_2 [J]. Water Sci Technol, 2012, 65 (11): 2016-2023. DOI: 10.2166/wst.2012.868.
[16] 王原, 许江燕, 曹俊敏, 等. 载银二氧化钛抗菌涂层气管导管的体外细胞毒性试验 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (2): 147-150. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.02.010.
Wang Y, Xu JY, Cao JM, et al. A experiment on cytotoxicity test in vitro of antibacterial coating endotracheal tube with silver loaded titanium dioxide [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (2): 147-150. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.02.010.
[17] 许江燕, 曹俊敏, 王原, 等. 载银二氧化钛抗菌涂层气管导管的口腔黏膜刺激试验 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (12): 920-922. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.016.
Xu JY, Cao JM, Wang Y, et al. Oral mucosal irritation test of silver-loaded titanium dioxide antibacterial coating endotracheal tube [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (12): 920-922. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.016.