

# 载银二氧化钛抗菌涂层气管导管的体外细胞毒性试验

王原<sup>1</sup> 许江燕<sup>1</sup> 曹俊敏<sup>1</sup> 蒋旭宏<sup>2</sup>

(浙江中医药大学附属第一医院 ①微生物实验室, ②急诊科, 浙江 杭州 310006)

**【摘要】** 目的 评价本课题组研制的载银二氧化钛(Ag-TiO<sub>2</sub>)抗菌涂层气管导管(试验导管)的体外细胞毒性。方法 选取 10% 小牛血清 MEM 培养基为浸提介质和培养基,取小鼠成纤维细胞 L929 为试验细胞株。分别制备成 100%、50%、25% 稀释度的 1%Ag-TiO<sub>2</sub> 试验导管供试液(100%、50%、25% 浸提液试验组)、苯酚溶液供试液(阳性对照组)、常规导管供试液(阴性对照组)和单纯培养基对照液(空白对照组)。吸取 100 μL 的 L929 细胞悬液分别接种在 96 孔培养板中,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37 ℃ 下培养 24 h 后,弃去原培养液,加入相应的浸提液 100 μL 继续培养 48 h;显微镜下观察细胞毒性情况并记分,然后采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定各孔吸光度(A)值并计算相对增值率(RGR)。结果 100%、50%、25% 浸提液试验组细胞形态均正常,无空泡形成、无脱落、无溶解现象,记 0 分,说明无细胞毒性,与空白对照组和阴性对照组结果一致;阳性对照组 80% 以上细胞畸形,部分细胞膜溶解,记 3 分,为重度细胞毒性。阳性对照组 RGR 为 7.33%,明显低于空白对照组的 100.00% 和阴性对照组的 103.16%(均  $P < 0.05$ );试验导管的细胞 RGR 均较高,100%、50%、25% 浸提液试验组 RGR 值分别为 98.99%、110.74%、104.42%,与阴性对照组比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。结论 Ag-TiO<sub>2</sub> 抗菌涂层气管导管体外细胞毒性试验为阴性,符合医疗器械生物学评价国家标准。

**【关键词】** 气管导管; 载银二氧化钛; 细胞毒性

**A experiment on cytotoxicity test in vitro of antibacterial coating endotracheal tube with silver loaded titanium dioxide** Wang Yuan\*, Xu Jiangyan, Cao Junmin, Jiang Xuhong. \*Microbiology Laboratory, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medical University, Hangzhou 310016, Zhejiang, China  
Corresponding author: Jiang Xuhong, Email: Anhong2225@163.com

**【Abstract】** Objective To evaluate cytotoxicity in vitro of antibacterial coating with silver loaded titanium dioxide (Ag-TiO<sub>2</sub>) on endotracheal intubation tube (the test tube made by our research group) by cytotoxicity test. Methods We selected 10% calf serum minimum essential medium (MEM) for the leaching liquor and cell medium, and took the mouse fibroblast L929 as the test cell strain. The test fluids were prepared respectively as follows: 100%, 50% and 25% dilution groups of 1% Ag-TiO<sub>2</sub> test tube (100%, 50%, 25% dilution groups), phenol test solution (positive control group), leaching liquor of conventional tube (negative control group) and simple MEM culture medium (blank control group). 100 μL cell suspension of L929 was sucked up and inoculated in a 96-well culture plate. After the plate was cultured in a 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> incubator for 24 hours, the original cultural liquid was discarded, then 100 μL corresponding leaching liquor was added in the holes, and the culture continued for 48 hours. Under microscope, the cytotoxicity of the cells was observed and scored, then methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to determine the absorbance (A) value of each hole and the relative growth rate (RGR) was calculated. Results The cell morphology in 100%, 50%, 25% dilution groups of the test tube was normal without vacuole formation, cell loss and dissolution, and the value was 0 point, showing no cytotoxicity and the results were consistent with those in blank control group and negative control group; 80% cells of the positive control group were abnormal, some cells membrane lysed, and the resulting score was 3 points, representing severe cytotoxicity. The RGR value of positive control group was 7.33%, obviously lower than that of blank control group (100%) and negative control group (103.16%), both  $P < 0.05$ ; the RGR values of 100%, 50%, 25% dilution groups were higher, 98.99%, 110.74%, 104.42% respectively, and there were no statistical significant differences, compared with the RGR value in the negative control group (all  $P > 0.05$ ). Conclusions The cytotoxicity test in vitro of the test endotracheal intubation tube with Ag-TiO<sub>2</sub> antibacterial coating was negative, and accorded with the national standard of biological evaluation of medical devices.

**【Key words】** Endotracheal intubation tube; Silver loaded titanium dioxide; Cytotoxicity

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.02.010

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY14H150004);浙江省医药卫生科技计划项目(2015KYB262);国家发明专利(ZL2011 1 0361576.7)

通讯作者:蒋旭宏, Email: Anhong2225@163.com

在临床急救工作中,气管插管术是常用的重要抢救技术,它能及时排出气管内分泌物和异物,保持呼吸畅通,避免患者出现缺氧和二氧化碳(CO<sub>2</sub>)潴留,气管插管技术广泛应用于急性呼吸窘迫患者,效果显著,插管及时与否是抢救能否成功的关键因素之一<sup>[1-2]</sup>。当前,未作抗菌处理的普通塑料导管和金属导管是临床应用的主流导管。该导管在使用时,因摩擦、压迫等情况容易造成患者呼吸道黏膜的损伤,引发医院获得性感染的发生,导致呼吸机相关性肺炎(VAP)<sup>[3-4]</sup>。气管插管术后容易引起较多的并发症,其中 VAP 是较常见的,发生 VAP 后不仅会导致呼吸机使用时间延长,增加患者负担,甚者可能会增加死亡风险<sup>[5-6]</sup>。为了尽可能减少气管插管的感染并发症,提高临床治愈率,本课题组经过大量实验研究,成功研发了载银二氧化钛(Ag-TiO<sub>2</sub>)抗菌涂层气管导管,并经抗菌实验明确抗菌剂质量浓度为 1% 时该导管即有明确的抗菌性能<sup>[7]</sup>,且口腔黏膜刺激试验为阴性<sup>[8]</sup>。但根据我国医疗器械生物学评价标准 GB/T16886.1-2001<sup>[9]</sup>的要求,气管导管的生物学评价还需要进行体外细胞毒性试验。故本研究对 Ag-TiO<sub>2</sub> 抗菌涂层导管的体外细胞毒性情况进行评价,为下一步研究工作奠定基础,现将研究结果报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 主要实验试剂:**抗菌剂质量浓度为 1% 的试验导管由本课题组研究人员制备<sup>[7]</sup>;普通气管导管(常规导管)由浙江省中医院麻醉科提供〔美国 Covidien 生产,批号:国食药监械(进)字 2011 第 2652256 号〕,苯酚、分析纯由杭州双林试剂厂生产;四甲基偶氮唑盐(MTT)由美国 SIGMA 公司提供;小鼠成纤维细胞 L929 由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所提供。

**1.2 实验方法:**按照我国医疗器械生物学评价中体外细胞毒性试验<sup>[10]</sup>进行,小鼠成纤维细胞 L929 采用含 10% 小牛血清的 MEM 培养基培养,细胞活性使用 MTT 法检测。常规导管作为阴性对照,苯酚溶液(5 g/L)作为阳性对照,含 10% 小牛血清的 MEM 培养基作为试验导管的浸提介质。实验设 4 组(各 6 孔),分别为:试验组、空白对照组、阴性对照组、阳性对照组。

**1.2.1 浸提液的制备:**将切为小段的 1% 药物的试验导管浸没于浸提介质中,导管与浸提介质的比例为 4 g : 20 mL,置于(37±2)℃中浸提 72 h,配制成 100%、50%、25% 3 个稀释度的供试液。以同样

的方法浸提常规导管,得阴性对照供试液。按比例混合苯酚和 MEM 培养基制备 5 g/L 的苯酚溶液,于(37±2)℃中孵育 72 h,得阳性对照供试液;将不含试验材料的 MEM 培养基置于(37±2)℃中浸提 72 h,制备空白对照液。

**1.2.2 试验步骤:**用 MEM 培养基将已传代培养至对数生长期的 L929 细胞配制成细胞悬液,浓度为 1×10<sup>4</sup> 个/mL,每组 6 孔,每孔接种 100 μL 细胞悬液,置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中孵育 24 h,此时细胞呈单层排列,生长至近汇合,将培养液吸去,向各孔分别加入 100 μL 相应的浸提液,再培养 48 h 后于显微镜下观察细胞毒性情况并计分,然后每孔加入 20 μL MTT(5 g/L)溶液,4 h 后弃去培养液,再加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO)振荡混匀,10 min 后用酶标仪在特定波长(570、630 nm)下测定各孔吸光度(A)值并计算相对增殖率(RGR)。

$$A = A_{570 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}}$$

$$\text{RGR} = (A_{\text{试验组}} / A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$$

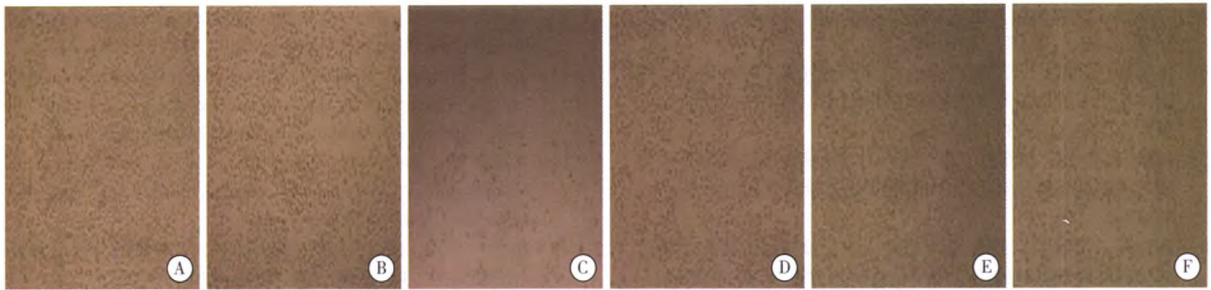
**1.2.3 细胞毒性制定标准<sup>[11]</sup>:**在阴性、阳性对照均有其相应预期反应时,试验组细胞毒性记分为 0 分(无细胞毒性)或 1 分(轻微细胞毒性)为合格;记分为 2 分(中度细胞毒性)的应结合细胞形态分析进行综合评价;计分为 3 分(重度细胞毒性)为不合格。

**1.3 统计学处理:**采用 SPSS 13.0 软件处理数据;计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞形态分析结果(图 1;表 1):**显微镜下观察发现,阴性对照组细胞形态正常、无空泡形成、无脱落,细胞膜完整、无溶解,毒性判定评分为 0 分,说明无细胞毒性;阳性对照组细胞生长状态不良,80% 以上细胞呈畸形,部分溶解,记 3 分,为重度细胞毒性;不同浸提液试验导管组和空白对照组细胞形态均正常,无空泡形成、无脱落、无溶解现象,记 0 分,说明无细胞毒性。

**2.2 各组细胞活性及 RGR 比较(表 1):**阳性对照组细胞活性明显低于空白对照组和阴性对照组(均 *P* < 0.05);3 个试验组 RGR 均明显高于阳性对照组(均 *P* < 0.05),且与阴性对照组比较差异无统计学意义(均 *P* > 0.05)。其中 50%、25% 浸提液试验组 RGR 略高于阴性对照组。



注：A、B、C、D、E、F 分别为空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和 100%、50%、25% 浸提液试验组

图 1 显微镜下观察各组与导管浸提液培养 48 h 小鼠 L929 成纤维细胞的细胞形态 (MTT 低倍放大)

表 1 各组细胞活性及 RGR 水平比较

组别	样本数 (孔)	细胞活性 (A 值, $\bar{x} \pm s$ )	RGR (%)
空白对照组	6	0.791 ± 0.046	100.00
阴性对照组	6	0.816 ± 0.041	103.16
阳性对照组	6	0.058 ± 0.006 <sup>a</sup>	7.33 <sup>a</sup>
100% 浸提液试验组	6	0.783 ± 0.043 <sup>b</sup>	98.99 <sup>b</sup>
50% 浸提液试验组	6	0.876 ± 0.035 <sup>b</sup>	110.74 <sup>b</sup>
25% 浸提液试验组	6	0.826 ± 0.031 <sup>b</sup>	104.42 <sup>b</sup>

注：与阴性对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与阳性对照组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

本课题组研发的抗菌涂层气管导管是一类常用的医疗用品,它不仅具备结实耐用、光滑平整、较强抗菌性能等特点,还必须具有良好的生物安全性。既往研究表明,二氧化钛(TiO<sub>2</sub>)和银离子(Ag<sup>+</sup>)均具有较强的抗菌性能,前者通过光催化方式杀菌,且化学性能稳定<sup>[12]</sup>;后者通过接触菌体而起到抗菌、杀病毒的作用<sup>[13]</sup>。但是当 Ag<sup>+</sup> 的浓度较高时会对真核细胞产生毒性,从而抑制细胞活性<sup>[14]</sup>。为减少 Ag<sup>+</sup> 浓度以提高安全性,我们将少量的 Ag<sup>+</sup> 均匀地结合到 TiO<sub>2</sub> 表面的介孔中,这样形成的 Ag-TiO<sub>2</sub> 既具有高效、持久、稳定的抗菌性能,又具有较好的生物安全性<sup>[15]</sup>。再以此 Ag-TiO<sub>2</sub> 为抗菌剂,经溶胶凝胶法研制出了抗菌涂层试验导管,并获得了国家发明专利。在前期的研究中,我们通过体外细胞毒性试验<sup>[7]</sup>和口腔刺激试验<sup>[8]</sup>证实了试验导管的生物安全性,符合我国医疗器械生物学评价要求。本试验以 GB/T 16886.5-2003 医疗器械生物学评价中体外细胞毒性试验<sup>[10]</sup>为依据,进行体外细胞毒性试验,以期完善试验导管的生物学安全性数据。

细胞形态分析结果表明,阴性对照组的细胞形态正常,未出现毒性反应,生长良好;阳性对照组 80% 以上的细胞呈重度毒性反应,生长迟缓。阴性、阳性对照组的试验结果符合预期,说明试验成功,结果是

有效的。试验导管组的细胞未见空泡、溶解现象、无细胞脱落、无毒性反应,形态、生长均正常,根据体外细胞毒性试验毒性的判断标准应定为 0 分,说明 1% 试验导管对 L929 细胞没有毒性。

MTT 法检测结果表明,阳性对照组、阴性对照组的 RGR 分别为 7.33%、103.16%,结果符合预期,说明实验结果是有效的。3 个不同稀释度试验组的 RGR 均较高,与阴性对照组无差异,再次说明 1% 试验导管对 L929 细胞无毒性。出现这种情况可能是由于有机硅溶胶与导管表面结合很牢固,几乎没有 Ag<sup>+</sup> 和 TiO<sub>2</sub> 在浸提液中析出<sup>[12, 16]</sup>;50% 和 25% 稀释度的试验组 RGR 略高于阴性对照组,这一现象与某些文献的观点相似。吕庆兵等<sup>[17]</sup>发现,含 Ag<sup>+</sup> 的敷料在杀菌的同时,不但没有造成组织细胞的损伤,还加快了重度烧伤患者创面的愈合进度,这些会在进一步的研究中予以探讨。

综上所述,我们研制的 1% Ag-TiO<sub>2</sub> 抗菌涂层气管导管体外细胞毒性试验结果为阴性,无细胞毒性,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 又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应用于其他医疗器械上,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] 田昕,方伟钧,吴建荣.心肺复苏机械通气时选择不同流速模式对气道峰压的影响[J].中华危重病急救医学,2014,26(10):722-725.
- [2] 苏华田,吴笛,刘长江,等.血清降钙素原水平对慢性阻塞性肺疾病急性加重期机械通气患者撤机结局的预测价值[J].中国中西医结合急救杂志,2014,22(6):446-448.
- [3] Bouadma L, Wolff M, Lucet JC. Ventilator-associated pneumonia and its prevention [J]. Curr Opin Infect Dis, 2012, 25(4):395-404.
- [4] 王秀岩,徐思成,刘光明,等.有创-无创序贯性机械通气治疗急性呼吸窘迫综合征的时机探讨[J].中华危重病急救医学,2014,26(5):330-334.

[5] 严蕊娜. 呼吸机相关性肺炎预防策略[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(2): 105-107.

[6] 张贇华, 王益斐, 李国法, 等. 中药制剂气囊上冲洗对重型颅脑外伤患者呼吸机相关性肺炎的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(3): 162-164.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 国家药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心. GB/T 16886.1-2001 医疗器械生物学评价——第 1 部分: 评价与试验[M]. 北京: 中国标准出版社, 2001.

[10] 国家药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心. GB/T 16886.5-2003 医疗器械生物学评价——第 5 部分: 体外细胞毒性试验[M]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[11] 金崇哲. 无机抗菌材料及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 130.

[12] 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): 241-246.

[13] Alt V, Bechert T, Steinrücke 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 吕庆兵, 于治, 肖贵喜, 等. 浸浴结合银离子敷料治疗大面积烧伤患者残余创面的疗效[J]. 中华烧伤杂志, 2013, 29(2): 203-204.

(收稿日期: 2015-05-14)  
(本文编辑: 邸美仙 李银平)

### · 书讯 ·



#### 《热射病防治技术手册》由人民军医出版社出版发行

中国人民解放军第四〇一医院重症医学科李海玲教授组织主编的《热射病防治技术手册》由人民军医出版社出版发行, 全国各地新华书店均有售, 定价: 25.0 元/本。

《热射病防治技术手册》是一部热射病防治方面的工具书, 共 11 章约 17 万字。详细阐述了热射病的流行病学特点、发病原因、病理生理机制、临床表现、辅助检查、诊断、监测技术、现场急救与后送、治疗方案、预防与健康宣教、护理、预后及管理策略等。

本书内容简明实用, 指导性强, 可以作为基层部队卫生预防宣教、急救后送指导教材, 以及供二、三线医院救治热射病参考。



#### 《急诊内科手册》第 2 版由人民卫生出版社出版发行

南方医科大学附属深圳宝安医院急诊医学科张文武教授组织主编的《急诊内科手册》第 2 版由人民卫生出版社出版发行, 全国各地新华书店均有售, 定价: 53.0 元/本。

本书是一部急诊内科学方面的工具书, 共 16 章约 83 万字。分别叙述了常见内科急症症状的诊断思路与处理原则, 休克、多器官功能障碍综合征、急性中毒、水电解质与酸碱平衡失调, 内科各系统疾病急诊的诊断与治疗措施等, 并较详细地介绍了内科常用急救诊疗技术。内容丰富, 资料新颖, 实用性强, 是急诊医师、内科医师和社区医师必备的工具书, 并可作为急诊医学教学和进修的参考读物。



#### 《腹部心肺复苏学》由人民军医出版社出版发行

武警总医院急救医学中心主任王立祥教授主编的《腹部心肺复苏学》由人民军医出版社出版发行, 全国各地新华书店均有售, 定价: 198.0 元/本, 购书服务电话: 4006-120-160。

《腹部心肺复苏学》是国内外第一部系统阐述腹部心肺复苏(CPR)的大型专著。第一篇全面论述了腹部 CPR 的概念、范畴、特征与途径, 深度解析了腹部 CPR 的解剖生理基础以及“腹泵”等参与复苏的“多泵机制”原理, 着重诠释了腹部提压 CPR 的研究与转化。第二篇系统归纳总结了腹部 CPR 的实验研究结果与临床实践案例。第三篇深刻揭示了 CPR 研究的现状、技术及趋势, 从整合医学的全新理念出发, 揭示腹部 CPR 的内在规律。本书内容翔实, 科学性强, 对于从事临床医学与基础医学的医界同仁具有重要的阅读价值。