

http://pmse.scu.edu.cn

载银二氧化硅改性硅橡胶的抗菌性能和生物安全性

侯晓杰¹, 薛宝霞^{2,3,4}, 刘书浩^{2,3}, 朱彦霖^{2,3}, 牛梅^{4,3}, 杨永珍^{5,3}, 张利^{2,3}

(1. 山西医科大学 公共卫生学院, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第三医院(山西白求恩医院 山西医学科学院 同济山西医院), 太原 030032; 3. 山西浙大新材料与化工研究院, 太原 030032; 4. 太原理工大学 轻纺工程学院, 太原 030024; 5. 太原理工大学 新材料界面科学与工程教育部重点实验室, 太原 030024)

摘要: 通过硫化法制备了一种载银二氧化硅(SiO₂)改性抗菌硅橡胶, 并采用抑菌平板法、溶血试验及细胞毒性测试对其抗菌性能及生物安全性等进行表征和分析。结果表明, 在载银 SiO₂ 抗菌剂含量为 20 mg/mL 时, 硅橡胶对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的抑菌率分别达到 100% 和 66%; 溶血试验表明, 抗菌硅橡胶的溶血率小于 5%; 且细胞毒性测试结果显示其细胞毒性为 0 级, 表明载银 SiO₂ 改性抗菌硅橡胶具有良好的抗菌性能及生物安全性。在抗菌医用导管领域, 表现出广阔的临床应用前景。

关键词: 硅橡胶; 抑菌性能; 溶血性; 细胞毒性

中图分类号:

文献标识码: A

文章编号: 1000-7555(2023)02-000

医用导管是临床中广泛应用的体内植入器材, 在疾病诊疗中发挥着重要作用。硅橡胶因其良好的生物相容性、生理惰性及优良的柔韧性优势^[1], 目前已被广泛应用于生产各种医用导管。然而, 随着医用导管在体内留置时间的延长, 因导管引发的相关性感染日益严重, 因此, 抗菌硅橡胶的制备和开发具有重要的研究意义。

由于纳米抗菌材料的高比表面积和高反应活性的粒子优势, 整体抗菌效果较传统抗菌剂有显著提高。其中, 纳米银(AgNPs)对多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌具有抗菌作用^[2,3], 已成为纳米材料抗菌领域的研究重点。AgNPs的抗菌机制包括: (1) AgNPs附着在细菌表面, 破坏细菌的细胞壁和细胞膜, 引起细胞膜的通透性改变和细胞成分的泄漏^[4-6]; (2) 进入细胞内, 破坏细胞内结构; (3) AgNPs通过产生活性氧自由基, 引起细胞毒性和氧化应激^[7]。将 AgNPs 通过表面涂层或本体改性的方式应用于导尿管^[8], 可有效抑制导管表面的细菌聚集和

生物膜形成。但 AgNPs 本身存在着分散性差、易团聚、易氧化等问题, 影响了其在实际中的应用。SiO₂ 呈现介孔结构, 具备高表面活性与良好的生物相容性^[9], 是一种优良的抗菌剂载体; 现有报道显示, 以介孔 SiO₂ 负载 AgNPs 后对链球菌具有较强的抑制作用^[10,11], 主要应用在根管治疗消毒及感染性伤口消毒等方面。且纳米 SiO₂ 粒子表面的羟基与硅橡胶基体间存在强作用^[12], 因此, 以 SiO₂ 负载 AgNPs 制备的抗菌剂与硅橡胶复合, 预期具备更好的分散性。

基于此, 本文通过纳米 SiO₂ 负载 AgNPs 制备复合抗菌剂, 对硅橡胶进行本体改性, 得到新型抗菌硅橡胶, 对改性的硅橡胶进行抗感染性能测试、溶血试验及细胞毒性测试等, 评价其抑菌性能和生物安全性, 为抗菌硅橡胶的临床应用提供实验证据。

1 实验部分

1.1 原料与试剂

doi:10.16865/j.cnki.1000-7555.2023.0038

收稿日期: 2022-05-25

基金项目: 山西浙大新材料与化工研究院技术开发项目(2021SX-TD013); 山西省基础研究计划项目(20210302124200, 202103021224355, 202203021211065); 纳米药物可控缓释省技术创新中心(202104010911026)

通讯联系人: 张利, 主要从事医用抗菌导管研究, E-mail: pureli@126.com;

薛宝霞, 主要从事纳米抗菌材料研究, E-mail: xuebaoxia@tyut.edu.cn;

硝酸银(AgNO₃):分析纯,天津大茂化学试剂厂;氨水(NH₃·H₂O):分析纯,天津凯通化学试剂厂;试验用水:超纯水;纳米SiO₂:粒径30~50 nm,比表面积200 m²/g,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;硅橡胶(2889#):AB双组份(A组份由碳酸二甲酯、107基胶、白炭黑等组成,B组份为有机锡固化剂),惠州市永卓科技有限公司;大肠杆菌(*E. coli* ACTT25922)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ACTT25923)标准菌株:由山西白求恩医院检验科提供;营养琼脂:北京奥博星生物技术有限责任公司;HL-02细胞:武汉赛维尔生物科技有限公司;1640培养基:美国Hyclone公司。

1.2 样品制备

1.2.1 载银纳米SiO₂抗菌剂的制备:配制200 mL的0.07 mol/L AgNO₃溶液,在连续搅拌状态下,加入10 g纳米SiO₂,用氨水调节溶液的pH值保持在6~8,于50 °C、避光条件下反应10 h。反应结束后,对反应液进行离心,洗涤,反复数次,直到洗液中无Ag⁺,经避光干燥后,得到载银纳米SiO₂复合抗菌剂。

1.2.2 载银纳米SiO₂抗菌硅橡胶的制备:分别称取10 mg, 15 mg和20 mg抗菌剂与50 mL硅橡胶进行充分的物理混合,加入1 mL固化剂,搅拌后放入模具中,使用硫化机室温硫化20 min,压力11 MPa压片成型,制备得到约2 mm厚的抗菌硅橡胶片。

1.3 测试与表征

1.3.1 形貌结构表征:取样品微量涂上导电胶并喷金处理,使用日本电子株式会社的JSM-6700F型扫描电子显微镜及能谱分析表征抗菌剂的微观形貌,加速电压0.5~30 kV。

1.3.2 抑菌性能测试

(1)抑菌环实验:取*E. coli*和*S. aureus*标准菌株制备0.5麦氏浓度(约1.5×10⁸ CFU/mL)的*E. coli*和*S. aureus*菌悬液,无菌操作下用涂布棒将*E. coli*和*S. aureus*菌液分别均匀地涂布到培养基上,再把制备的直径为6 mm的抗菌剂样品置于培养皿中央。然后将培养皿置于37 °C生化培养箱中24 h后测量抑菌圈的直径。

(2)抑菌平板实验:将10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL的抗菌硅橡胶片在紫外线下照射30 min,按照GB/T 16886.12-2005的标准,样品厚度大于1.0 mm时样品量为1.25 cm²/mL,用0.9%氯化钠溶液浸泡抗菌硅橡胶样品并置于恒温振荡器震荡24 h,取500 μL浸出液分别与浓度为3.0×10⁵ CFU/mL, 500 μL的*E. coli*和*S. aureus*充分混合5h制备样品组。

同时,取500 μL的0.9%氯化钠溶液分别与浓度为3.0×10⁵ CFU/mL, 500 μL的*E. coli*和*S. aureus*充分混合5 h制备对照组,将样品组与对照组在摇床中震荡培养4 h,取其中液体10 μL涂于培养皿表面,置于37 °C生化培养箱中24 h后,计数菌落数,并得出抑菌率(*X*)

$$X = \frac{A - B}{B} \quad (1)$$

式中:*A*——样品组菌落数;*B*——对照组菌落数。

1.3.3 溶血性测试:按照YY/T1651.1-2019医疗器械溶血试验标准,将8 mL抗凝血与10 mL,0.9%氯化钠溶液混合后轻轻摇晃混匀,得到稀释血液。将12.5 cm²的试验样品分别加入10 mL,0.9%氯化钠溶液中,阴性对照组每管加入10 mL,0.9%氯化钠溶液,阳性对照组每管加入10 mL蒸馏水,平行制备三管。将全部试管放入恒温水浴(上海东星建材实验设备有限公司)中(37±1)°C孵育30 min,按照每0.2 mL稀释血液中加入10 mL,0.9%氯化钠溶液,在每个试管中加入稀释血液,轻轻混匀。将所有试管置于(37±1)°C水浴中继续孵育(60±5)min。孵育后轻轻混匀试管,将各试管溶液转移到相应离心管中,800 g离心5 min。吸取上清液移入比色皿中,使用空白管调零,在分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)545 nm波长处测定吸光度。根据式(2)计算溶血率(*HI*)。

$$HI = \frac{A - B}{C - B} \quad (2)$$

式中:*A*——实验组吸光度;*B*——阴性对照组吸光度;*C*——阳性对照组吸光度。

1.3.4 细胞毒性测试:采用细胞增殖实验(CCK-8法)来评价样品的细胞毒性。将HL-02细胞置于含10%的胎牛血清(包括1%双抗)的1640培养基中,在体积分数5%CO₂、37 °C培养箱(上海博讯实验有限公司医疗设备厂)中培养。按照医疗器械生物学评价标准GB/T16886.12-2017制备样品浸提液,按照样品厚度大于1.0的标准1.25 cm²/mL,用1640培养基浸泡样品,置于培养箱,浸泡24 h,去掉样品即制得样品浸提液。将制备好的浓度5×10⁴ /L细胞悬液接种于96孔板的3,4,5,6,7列,每孔加入100 μL。放置于培养箱中。24 h后换液(1640培养基)并除去没有贴壁的细胞。第2列只加入100 μL的1640培养基作为空白对照,第3列加入不含样品的培养基作为阴性对照,第4,5,6,7列分别加入100 μL样品浸提液,分别于0 h和24 h记录细胞形态。继续培养,

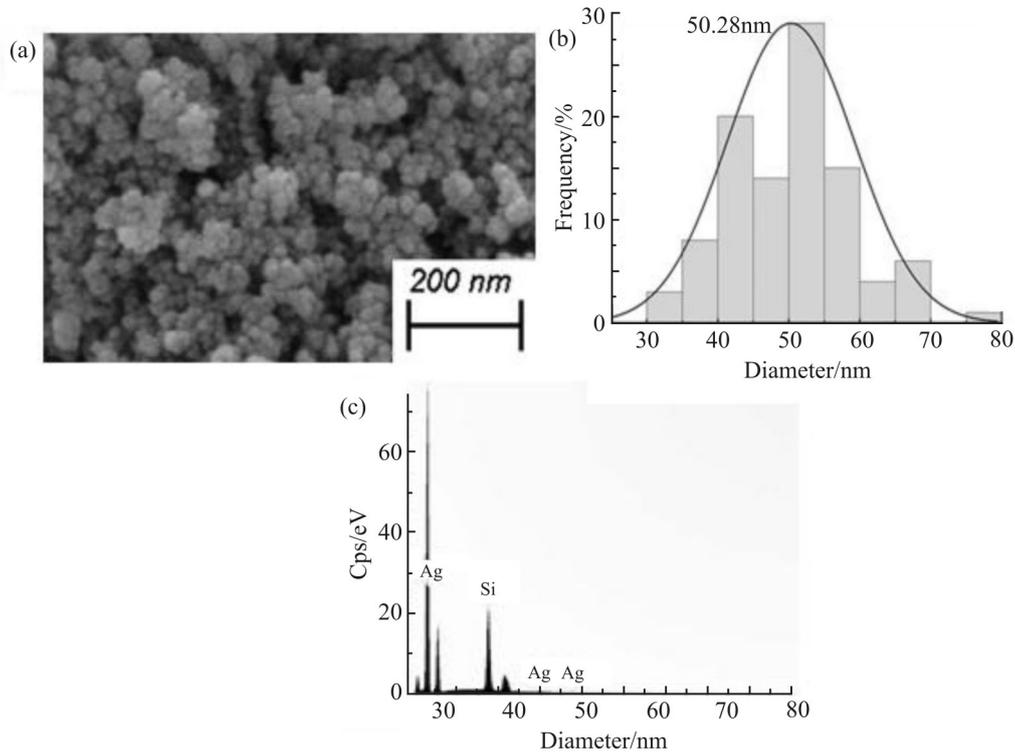


Fig.1 Representative SEM images of (a)silver-loaded nano-SiO₂, (b)particle size distribution of silver-loaded nano-SiO₂ and (c)EDS elemental mapping of silver and silicon

在 24 h 时加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 在培养箱孵育 1~4h 后, 用酶标仪 450 nm 波长测定 *OD* 值, 并按照式(3)计算各样品的细胞相对增殖率(*RGR*)

$$RGR = \frac{A}{B} \quad (3)$$

式中: *A*——实验组平均 *OD* 值; *B*——阴性对照组平均 *OD* 值。细胞毒性分级: $RGR \geq 100\%$, 细胞毒性 0 级; $75\% \leq RGR \leq 99\%$, 细胞毒性 1 级; $50\% \leq RGR \leq 74\%$, 细胞毒性 2 级; $25\% \leq RGR \leq 49\%$, 细胞毒性 3 级; $1\% \leq RGR \leq 24\%$, 细胞毒性 4 级; $RGR \leq 1\%$, 细胞毒性 5 级。

2 结果与讨论

2.1 载银纳米 SiO₂ 抗菌剂的微观结构

Fig.1 所示为载银纳米 SiO₂ 抗菌剂的 SEM、粒径分布及 EDS 能谱分析。由 Fig.1 (a, b) 可知, 载银纳米 SiO₂ 抗菌剂呈圆球颗粒状, 粒径分布均一, 平均粒径为 (50.28 ± 8.96) nm。结合 Fig.1 (c) 的 EDS 能谱图发现, 载银纳米 SiO₂ 中银的质量分数为 0.58%, 说明银已负载于 SiO₂ 中。

2.2 载银纳米 SiO₂ 抗菌剂的抑菌环试验

Fig.2 为载银 SiO₂ 抗菌剂对 2 种菌的抑菌测试效果, 结果表明抗菌剂在 Fig.2 (a) *E. coli* 中的抑菌环直

径为 9.50 mm, 在 Fig.2 (b) *S. aureus* 中的抑菌环直径为 11.00 mm, 二者均大于 7 mm。从体外抑菌环试验可见, 载银纳米 SiO₂ 抗菌剂对 *E. coli* 和 *S. aureus* 具有明显的抑制作用。

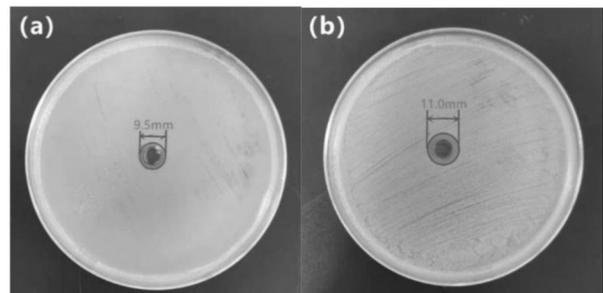


Fig.2 Antibacterial activity of silver-loaded nano-SiO₂ antibacterial agent on two kinds of bacteria

(a): *E. coli*; (b): *S. aureus*

2.3 抗菌硅橡胶的抑菌平板试验

抑菌平板实验结果见 Fig.3, 各组菌落计数及抑菌率数据列于 Tab.1。由 Fig.3 (b)~ Fig.3 (d) 可见, 随着载银 SiO₂ 抗菌剂含量的增加, 平板上菌落数逐渐减少, 表明抗菌硅橡胶对 *S. aureus* 的抑菌率, 随着抗菌剂含量的增高而增加; 由 Fig.3 (f)~ Fig.3 (h) 可见, 各组几乎无菌落生长, 抑菌率达到 100%, 表明抗菌剂对 *E. coli* 的抑菌效果较强, 明显优于 *S.*

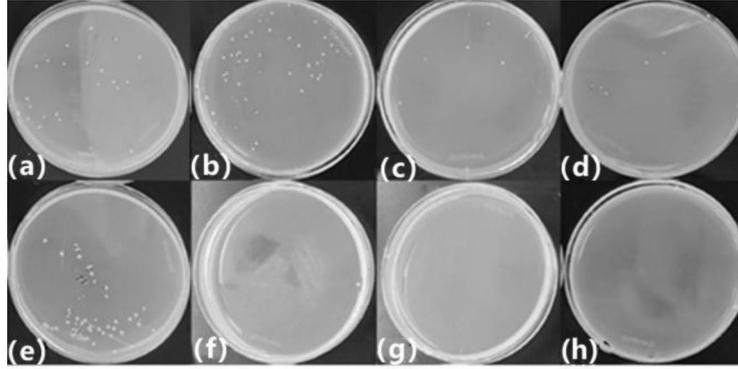


Fig.3 Antibacterial activity of antibacterial silicone rubber

(a):*S. aureus* control group;(b)~(d): antibacterial silicone rubber of 10 mg/mL, 15 mg/mL and 20 mg/mL on *S. aureus*; (e):*E. coli* control group;(f)~(h): antibacterial silicone rubber of 10 mg/mL, 15 mg/mL and 20 mg/mL on *E. coli*

Tab.1 Antibacterial rate of antibacterial silicone rubber in each group

Group	<i>E. coli</i> colonies /($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Bacteriostatic rate /%	<i>S. aureus</i> colonies /($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Bacteriostatic rate /%
10 mg/mL	1.5	97.5	16.0	39.6
15 mg/mL	0	100	11.5	56.6
20 mg/mL	0	100	9.0	66.0
Control	59.5		26.5	

aures。载银 SiO_2 抗菌剂含量为 20 mg/mL 的抗菌硅橡胶的抑菌效果在 3 组抗菌硅橡胶中的抑菌效果最优,对 *E. coli* 和 *S. aureus* 抑菌率分别达到 100% 和 66%。

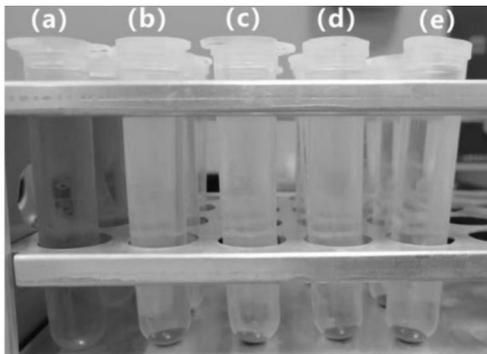


Fig. 4 Physical drawing after centrifugation

(a): positive control group;(b): negative control group;(c):10 mg/mL antibacterial silicone rubber sample;(d):15 mg/mL antibacterial silicone rubber sample;(e):20 mg/mL antibacterial silicone rubber sample

2.4 抗菌硅橡胶的溶血试验

由于医用导管与人体血液及细胞组织、黏膜直接接触,因此作为导管基材的抗菌硅橡胶,溶血率是影响其临床应用的重要指标之一。Fig. 4 为离心

后观察试管实物图,具体测试数据列于 Tab.2。由 Fig. 4 可见,阴性对照组 (b) 和抗菌硅橡胶组 (c~e) 红细胞沉积在管底,溶液整体呈现出澄清透明,阳性对照组 (a) 因红细胞破裂,溶液整体呈现鲜红色,无沉淀。由 Tab.2 可知,3 组抗菌硅橡胶的溶血率分别为 0.170%,0.087% 和 0.170%,均小于 5%,按照 YY/T1651.1-2019 医疗器械溶血试验标准结果判定标准,3 组抗菌硅橡胶无溶血作用,均符合安全标准。

Tab.2 Hemolysis of antibacterial silicone rubber

Antibacterial silicone rubber	Hemolysis rate/%	Hemolysis
10 mg/mL	0.17	No
15 mg/mL	0.087	No
20 mg/mL	0.17	No

2.5 CCK-8 试验检测结果

采用 CCK-8 法对抗菌硅橡胶的细胞毒性进行评价,分光光度计检测各组的 OD 值见 Fig.5,由 Fig.5 可知,各组 OD 值均大于 1.0,按照细胞相对增殖率 (RGR) 公式计算出各组抗菌硅橡胶的 RGR 见表 Tab.3。10 mg/mL, 15 mg/mL 和 20 mg/mL 抗菌硅橡胶

胶组的 *RGR* 分别为 111.9% , 110.1% 和 107.6% , 各组抗菌硅橡胶的 *RGR* 均大于 75% , 按照 *RGR* 细胞毒性分级评价标准 : *RGR* 值 $\geq 75\%$, 细胞毒性等级为 0 或 1 级 , 合格。各组细胞随着时间变化数量均增加 , 可见各组抗菌硅橡胶均具有良好的生物安全性。

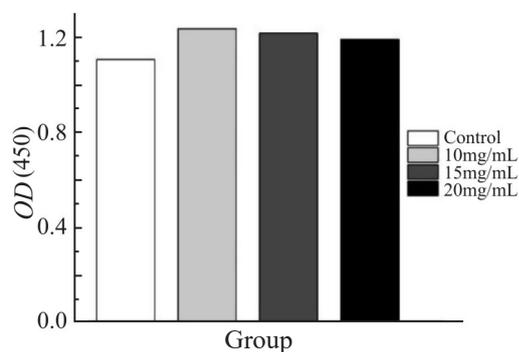


Fig.5 OD value of each group

Tab.3 Relative cell proliferation rate (*RGR*) and cytotoxicity grade

Antibacterial silicone rubber grouping	<i>RGR</i> (100%)	Cytotoxicity grading
10 mg/mL	111.9	0
15 mg/mL	110.1	0
20 mg/mL	107.6	0

3 结论

通过抑菌试验、溶血试验和 CCK-8 试验对制备的抗菌硅橡胶进行评价, 不同含量的载银 SiO₂ 的抗菌硅橡胶均具备抗菌性能, 且溶血性符合安全标准, 细胞毒性为 0 级或 1 级, 属于无或低细胞毒性, 符合医疗器械生物学评价标准。其中, 在载银 SiO₂ 含量为 20 mg/mL 时, 具备优异的抑菌性能和良好的生物安全性, 在抗菌医用导管领域表现出广阔的临床应用前景。

参考文献:

- [1] 刘芳, 胡琛. 生物医用抗菌性硅橡胶的研究进展[J]. 中国材料进展, 2016, 35(4): 308-312.
Liu F, Hu C. Research progress of biomedical antibacterial silicone rubber [J]. China Materials Progress, 2016, 35(4): 308-312.
- [2] Bruna T, MaldonadoBravo F, Jara P, *et al.* Silver nanoparticles and their antibacterial applications[J]. International Journal of

Molecular Sciences, 2021, 22: 7202.

- [3] Lara H H, Ixtapan-Turrent L, Jose Yacaman M J, *et al.* Inhibition of *Candida auris* biofilm formation on medical and environmental surfaces by silver nanoparticles[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12: 21183-21191.
- [4] Liao S J, Zhang Y P, Pan X H, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. International Journal of Nanomedicine, 2019, 14: 1469-1487.
- [5] Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2004, 275: 177-182.
- [6] Shrivastava S, Bera T, Roy A, *et al.* Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles[J]. Nanotechnology, 2007, 18: 225103.
- [7] Dakal T C, Kumar A, Majumdar R S, *et al.* Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1831.
- [8] Divya M, Kiran G S, Hassan S, *et al.* Biogenic synthesis and effect of silver nanoparticles (AgNPs) to combat catheter-related urinary tract infections[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 18: 101037.
- [9] 卞耀辉, 冯利邦, 于正洋, 等. 纳米 SiO₂ 改性热可逆自修复聚氨酯的修复行为[J]. 高分子材料科学与工程, 2019, 35(5): 44-50.
Bian Y H, Feng L B, Yu Z Y, *et al.* Repairing behavior of thermo-reversible self-healing polyurethanes modified with SiO₂ nanoparticles[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2019, 35(5): 44-50.
- [10] Ertem E, Gutt B, Zuber F, *et al.* Core-shell silver nanoparticles in endodontic disinfection solutions enable long-term antimicrobial effect on oral biofilms[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9: 34762-34772.
- [11] Rodrigues M C, Rolim W R, Viana M M, *et al.* Biogenic synthesis and antimicrobial activity of silica-coated silver nanoparticles for esthetic dental applications[J]. Journal of Dentistry, 2020, 96: 103327.
- [12] 王兵兵. 白炭黑表面接枝改性及其在橡胶中的应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
Wang B B. Surface grafting modification of silica and its application in rubber [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.

Antibacterial Property and Biosafety of Silicone Rubber Modified with Silver-Loaded Silica

Xiaojie Hou¹, Baoxia Xue^{2,3,4}, Shuhao Liu^{2,3}, Yanlin Zhu^{2,3}, Mei Niu^{4,3}, Yongzhen Yang^{5,3}, Li Zhang^{2,3},

(1. School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Third Hospital of Shanxi Medical University (Shanxi Bethune Hospital), Shanxi Academy of Medical Sciences, Tongji Shanxi Hospital), Taiyuan 030032; 3. Shanxi-Zheda Institute of Advanced Materials and Chemical Engineering, Taiyuan 030032; 4. College of Textile Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, 5. Key Laboratory of Interface Science and Engineering in Advanced Materials Ministry of Education, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024)

ABSTRACT: A kind of antibacterial silicone rubber modified with silver-loaded silica (SiO_2) was prepared by vulcanization, and its antibacterial properties and biological safety were characterized and analyzed by antibacterial plate method, hemolysis and cytotoxicity test. The results show that, when the content of silver-loaded SiO_2 antibacterial agent is 20 mg/mL, the antibacterial rate of silicone rubber against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* reaches 100% and 66%, respectively. Hemolysis test show that, the hemolysis rate of antibacterial silicone rubber is less than 5%. And the cytotoxicity of modified silicone rubber is grade 0. These show that silver-loaded SiO_2 modified antibacterial silicone rubber has good antibacterial performance and biological safety. In the field of antibacterial medical catheter, this kind of silicone rubber shows broad clinical application prospect.

Keywords: silicone rubber; antibacterial proper; hemolytic; cytotoxicity