

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00952

## 纳米银生物腹壁修复材料的生物安全性评价

柴云笙,周海洋\*,胡志前\*,张奇,王强

第二军医大学长征医院普外一科,上海 200003

**[摘要]** **目的** 研究自制的纳米银猪小肠黏膜下层(nano-silver modified porcine small intestinal submucosa, NS-PSIS)生物腹壁修复材料的生物安全性。**方法** 取新鲜猪小肠,采用机械处理(去除浆膜层、黏膜层及肌层)、化学 SDS 法脱细胞制备猪小肠黏膜下层生物材料(porcine small intestinal submucosa, PSIS),配制 50 μg/mL 的单体纳米银(直径 15 nm)溶液,将制备好的 PSIS 置入单体纳米银溶液中,制备成 NS-PSIS,通过热原试验、皮肤刺激试验、皮内刺激试验、急性全身毒性试验及体内银吸收代谢试验对自制的纳米银生物腹壁修复材料进行生物安全性评价。**结果** 纳米银生物腹壁修复材料无热原、皮肤刺激、皮内刺激及急性全身毒性。火焰原子吸收分光光度法显示纳米银生物腹壁修复材料不造成血液及肝、脑、肾等重要器官的银沉积。**结论** 纳米银生物腹壁修复材料具有良好的生物安全性。

**[关键词]** 腹壁修复;纳米银;小肠黏膜下层;生物安全性

**[中图分类号]** R 318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)09-0952-05

### Biosafety study of a nano-silver modified small intestinal submucosa mesh

CHAI Yun-sheng, ZHOU Hai-yang\*, HU Zhi-qian\*, ZHANG Qi, WANG Qiang

Department of General Surgery I, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the biosafety of a nano-silver modified porcine small intestinal submucosa (NS-PSIS) mesh. **Methods** To prepare the porcine small intestinal submucosa (PSIS) biological materials, the mucosa and muscle layers were removed from fresh porcine small intestine by mechanical method and SDS method. 50 μg/mL monomer nano-silver (15 nm in diameter) solution was prepared and the PSIS was exposed to the solution to prepare NS-PSIS. The biological safety of our self-made nanometer silver biological material was examined by pyrogen test, skin irritation test, skin stimulus test, acute systemic toxicity test and the metabolism of silver absorption test. **Results** The prepared NS-PSIS mesh was not pyrogenic and had no skin, subcutaneous irritation or systemic acute toxicity. Flame atomic absorption spectrophotometry results showed that NS-PSIS mesh caused no silver deposit in major organs such as the brain, blood, liver or kidney of SD rats. **Conclusion** Our nano-silver modified small intestinal submucosa mesh has satisfactory biosafety.

**[Key words]** abdominal repair; nano-silver; small intestinal submucosa; biosafety

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(9):952-956]

疝修补术是普通外科最常规的手术,补片的应用实现了无张力修复,使疝复发率降至 10% 以下<sup>[1]</sup>。然而,对细菌定植的易感性及由此导致的植入物感染是疝修补材料的一个重要不足,将导致住院时间延长及医疗费用增加,甚至迫使外科医生不得不再次手术取出补片<sup>[2]</sup>。银是一种传统的抗菌剂,具有

高效、抗菌谱广等优点,此外还有促进伤口愈合的功能<sup>[3]</sup>。将银加工成纳米微粒后,原子排列表现为介于固体和分子之间的“介态”,其表面积极大,显现明显的表面效应、小尺寸效应和宏观隧道效应,表现为超强的抗菌能力及更持久的效力<sup>[4-5]</sup>。我们前期采用自组装技术制备了纳米银猪小肠黏膜下层(nano-

**[收稿日期]** 2014-02-10 **[接受日期]** 2014-04-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31100681),上海市科学与技术委员会纳米专项基金(11nm0504800),上海市晨光计划(11CG42)。Supported by National Natural Science Foundation of China(31100681), Special Fund for Nano-research of Science and Technology Commission of Shanghai(11nm0504800), and the Chenguang Plan of Shanghai Education Development Foundation(11CG42)。

**[作者简介]** 柴云笙,硕士生。E-mail: 1264135143@qq.com

\* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 021-81885597, E-mail: haiyang1985\_1@aliyun.com; Tel: 021-81885591, E-mail: czhuzyq@aliyun.com

silver modified porcine small intestinal submucosa, NS-PSIS)生物腹壁修复材料,经体外及体内实验证实其具有良好的抗菌作用<sup>[6]</sup>。然而,任何抗菌材料在杀灭微生物的同时也会对人体细胞产生一定的毒副作用。故研究纳米银生物腹壁修复材料的生物安全性,是其作为腹壁修复材料应用的前提。本研究采用热原试验、皮肤刺激试验、皮内刺激试验、急性全身毒性试验及体内银吸收代谢试验对纳米银生物腹壁修复材料进行生物安全性评价。

## 1 材料和方法

1.1 实验仪器与材料 超净工作台,火焰原子光谱吸收仪,直径15 nm的单体纳米银颗粒(购自上海沪正纳米科技有限公司)。实验动物:清洁级新西兰大白兔(2.5~3.5 kg),清洁级SD大鼠(250~300 g),清洁级成年豚鼠(700~1 200 g),清洁级BALB/c小鼠(18~20 g),实验动物均由上海市第九人民医院实验动物中心提供。

1.2 猪小肠黏膜下层(PSIS)、NS-PSIS生物材料及NS-PSIS浸提液的制备

1.2.1 PSIS及NS-PSIS生物材料的制备 采用机械-SDS法<sup>[7]</sup>制备PSIS,取新鲜猪空肠清洗后进行机械处理,刮除空肠浆膜层、黏膜层及肌层,用去离子水清洗后将其剪成长10~20 cm;将制得的PSIS基质浸泡于甲醇与氯仿溶液(1:1, V/V)12 h;去离子水冲洗干净,在37℃含0.05%胰蛋白酶与0.05% EDTA的溶液中浸泡12 h;生理盐水持续冲洗基质,去除胰蛋白酶,后浸于含0.5% SDS与0.9%盐水中持续振荡4 h;生理盐水冲洗,在含0.1%过氧乙酸与20%乙醇溶液中浸泡30 min,生理盐水冲洗干净。操作结束后留取样品( $n=10$ )用于SD大鼠体内银含量变化的对照试验。将制备好的PSIS置入配制好的50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单体纳米银溶液(直径15 nm)中,置于振荡器上振荡24 h,得到NS-PSIS生物腹壁修复材料,4℃保存备用。

1.2.2 NS-PSIS生理盐水浸提液的制备 将NS-PSIS切成30 mm×5 mm条状,置于去热原的25 mL锥形瓶中,按受试材料与生理盐水注射液3 cm<sup>2</sup>:1 mL的比例,取一定量的生理盐水注射液于锥形瓶中,置于37℃电热恒温培养箱中浸提72 h。后将浸提液转移至另一去热原的锥形瓶中,调节pH值为

7.0,4℃保存备用。

1.2.3 NS-PSIS植物油浸提液的制备 将NS-PSIS生物材料剪碎,大小约10 mm×5 mm条状,置于去热原的25 mL锥形瓶中,加入一定量的植物油与之混匀后,于电动搅拌机中搅拌,使纳米银粒子充分溶于植物精油中;3 000 r/min(离心半径为13.5 cm)离心15 min,取上层浸提液。

1.3 热原试验 在试验前7 d选3只家兔,雌雄不限,雌兔未孕,体质量1.7~3.0 kg,测温前7 d内3只家兔于同一环境下相同饲料饲养,且体质量无减轻,精神、食欲、排泄等无异常。预测体温时,不注射任何药液,仅测肛温并计数。每隔1 h测量1次,共测4次,体温38.0~39.6℃,符合热原试验要求。3 d后将家兔固定于固定器内,30 min后第1次测量,间隔30 min再测1次,两次体温之差不超过0.2℃,以两次体温的平均值为该兔的正常体温。且当日使用家兔的体温在38.0~39.6℃的范围内,各兔间的正常体温之差不超过1℃。试验用的注射器、针头及一切和供试品溶液接触的器皿均置入烘箱中250℃加热30 min除去热原。在家兔体温符合要求后15 min内,自家兔耳缘静脉缓慢注入预热38℃ NS-PSIS生理盐水浸提液10 mL/kg。注射后每隔1 h测量体温1次,连续测试6次,以6次中最高的1次减去正常体温为试验家兔体温升高值。

1.4 白细胞测定 在实验前7 d选5只清洁级SD大鼠,雌雄不限,雌鼠未孕,在同一环境下用相同饲料饲养,大鼠体质量无减轻,精神、食欲、排泄等无异常。经鼠尾静脉采血,检测其生理状态下血液中白细胞数值均在 $(2.08\sim 11.78)\times 10^9/\text{L}$ ,符合实验要求。经大鼠腹壁肌肉缓慢注射NS-PSIS生理盐水浸提液,剂量10 mL/kg。注射后第1、3、5、7天经鼠尾静脉采血,检测大鼠白细胞水平变化。

1.5 皮肤刺激试验 受试豚鼠3只,2只雄性,1只雌性,实验前24 h,在豚鼠脊柱两侧各选2个3 cm×3 cm面积的去毛区,用8%硫化钠溶液去毛,其中一侧皮肤保持完整,另一侧用20 mL注射器针头造成“井”字形皮肤破损,仅损伤豚鼠表皮,且避免出血。用75%乙醇消毒背部去毛区,2.5 cm×2.5 cm滤纸块浸泡于NS-PSIS的生理盐水浸提液中至饱和,贴敷于试验部位。材料贴敷于皮肤后,立即用3 cm×3 cm纱布覆盖,最外层用胶布固定。24 h后,移去贴

敷物,用温水清洁贴敷区并吸干,观察移去贴敷物后 24、48、72 h 豚鼠皮肤的红斑及水肿情况,并按试验部位的红斑和水肿程度进行评价记分。记分标准:皮肤无红斑、无水肿记为 0 分;皮肤轻微红斑(勉强可见)、极微弱水肿(勉强可见)记为 1 分;皮肤中等红斑(清晰可见)、清晰的水肿(高度 < 1 mm)记为 2 分;皮肤有较大红斑、较大的水肿(高度达 1 mm,轮廓清楚)记为 3 分;皮肤严重红斑(呈紫红色)乃至焦痂、严重水肿(高度 > 1 mm 并有扩大)记为 4 分。

1.6 皮内刺激试验 受试家兔 6 只,体质量 2.5~3.5 kg。实验前 24 h 于受试家兔脊柱两侧各剪裁 5 cm×2.5 cm 区域,应避免损伤皮肤,并用 75%乙醇消毒。在兔脊柱两侧各选择 10 个点,两点间隔 2 cm,每点皮内注射 0.2 mL 相应液体。一侧前 5 点注射 NS-PSIS 生理盐水浸提液,后 5 点注射对照生理盐水;另一侧前 5 点注射 NS-PSIS 植物油浸提液,后 5 点注射对照植物油。注射后 24、48、72 h 观察注射局部及周围皮肤组织反应,参照 1.5 项下记分标准进行评价计分。

1.7 急性全身毒性试验 将健康 BALB/C 小鼠随机分为试验组和对照组,每组 5 只。试验组由尾静脉注射 50 mL/kg NS-PSIS 生理盐水浸提液,对照组以相同方式同等剂量注射生理盐水。于注射后 24、48、72 h 观察并记录两组动物的一般状态、毒性表现和死亡动物数。中毒表现根据其症状程度记为:无中毒(动物反应良好,无任何中毒症状)、轻度中毒(轻度异常,但无运动减少、呼吸困难或刺激症状)、明显中毒(有腹部刺激症状、呼吸困难、运动减少、眼睑下垂、腹泻等,体质量降至 15~17 g)、重度中毒(严重腹部刺激症状、发绀、肌肉震颤、心力衰竭、眼睑下垂、呼吸困难,体质量减轻至 15 g 以下)或死亡。

1.8 体内银含量测定 体质量 300 g 左右的健康成

年 SD 大鼠(雌雄不限)20 只,随机分为 PSIS 治疗组( $n=10$ )和 NS-PSIS 治疗组( $n=10$ )。取腹部正中切口,切开皮肤,沿皮下向两侧锐性分离,暴露肌层,将 3 cm×3 cm 大小肌肉连同腹膜整块切除,造成腹壁全层缺损动物模型。两组分别采用相同面积的 PSIS 和 NS-PSIS 进行修补,6-0 丝线间断缝合。3-0 丝线间断缝合皮肤。两组分别于术后 1、3、5、7、15、30 d 眼眶采血,采用火焰原子吸收分光光度法测定大鼠血液中银的含量。于术后 30 d 处死大鼠,取其肝、脑、肾,测定各组织中的银含量。

## 2 结果

2.1 热原试验结果 由表 1 可见,3 只家兔体温升高均低于 0.6℃,且 3 只家兔体温升高总和低于 1.4℃,表明 NS-PSIS 对家兔无热原作用。

2.2 白细胞测定结果 由表 2 可见,注射后大鼠体内白细胞数值逐渐升高,第 5 天达到最高,但数值仍处于正常生理范围内,第 7 天时较之前有所下降。表明 NS-PSIS 具有良好的抗菌性,无明显毒副作用。

2.3 皮肤刺激试验结果 NS-PSIS 浸提液贴敷豚鼠皮肤 24、48 和 72 h,完整皮肤处与破损皮肤处均未见红斑,且无水肿形成,皮肤刺激试验积分均为 0,表明 NS-PSIS 对豚鼠皮肤无刺激。

2.4 皮内刺激试验结果 家兔皮内注射 NS-PSIS 生理盐水浸提液、NS-PSIS 植物油浸提液后 24、48 和 72 h,受试皮肤均无红斑及水肿形成,皮内刺激试验积分为 0,表明 NS-PSIS 对家兔无皮内刺激。

2.5 急性全身毒性试验 健康小鼠尾静脉注射 NS-PSIS 生理盐水浸提液 24、48 和 72 h,活动及进食良好,呼吸正常,无瘫痪、惊厥及死亡发生,且体质量稳定,无任何毒性反应;对照组动物亦无不良反应出现。表明健康小鼠 NS-PSIS 注射后无急性全身毒性反应。

表 1 热原试验结果 (试验动物:家兔)

Tab 1 Results of pyrogen experiment with rabbits

N=3

| Number | Mass <i>m</i> /kg | Temperature before injection $\theta$ /℃ | Temperature after injection $\theta$ /℃ |      |      |      |      |      | Increased temperature $\theta$ /℃ |
|--------|-------------------|--|---|------|------|------|------|------|-----------------------------------|
|        |                   |  | 1 h                                     | 2 h  | 3 h  | 4 h  | 5 h  | 6 h  |                                   |
| 1      | 1.7               | 39.3                                     | 39.5                                    | 39.3 | 39.2 | 39.4 | 39.5 | 39.3 | 0.2                               |
| 2      | 1.6               | 39.2                                     | 39.1                                    | 39.5 | 39.1 | 39.5 | 39.5 | 39.2 | 0.3                               |
| 3      | 1.5               | 38.9                                     | 39.0                                    | 39.1 | 39.1 | 39.3 | 39.3 | 39.2 | 0.4                               |

表2 白细胞测定结果(试验动物:SD大鼠)

Tab 2 Determination of white blood cells (WBC) in SD rats

N=5

| Number | Mass <i>m</i> /g | Sex    | WBC before experiment ( $\times 10^9, L^{-1}$ ) | WBC after experiment ( $\times 10^9, L^{-1}$ ) |       |       |       |
|--------|------------------|--------|---|--|-------|-------|-------|
|        |                  |        |   | Day 1  | Day 3 | Day 5 | Day 7 |
| 1      | 280              | Female | 4.56  | 5.57   | 7.29  | 8.94  | 7.52  |
| 3      | 275              | Female | 5.76  | 6.02   | 7.17  | 8.86  | 7.38  |
| 3      | 270              | Female | 3.23  | 4.96   | 6.21  | 7.14  | 6.32  |
| 4      | 260              | Female | 6.21  | 7.67   | 8.45  | 9.37  | 8.23  |
| 5      | 268              | Male   | 5.78  | 7.05   | 7.78  | 8.29  | 7.64  |

2.6 体内银含量的变化 由表3可见,NS-PSIS组术后各个时间点大鼠血中的银含量变化不明显,且于术后30 d恢复正常水平。术后30 d处死大鼠,检

测其肝、肾、脑等重要脏器的银含量,结果各脏器中均未发现银沉积。

表3 术后不同时间各组SD大鼠血中银含量

Tab 3 Blood silver contents in SD rats at different time points after operation in each group

 $n=10, \bar{x} \pm s, \omega_B / (\mu g \cdot g^{-1})$ 

| Group   | Day 1           | Day 3           | Day 5           | Day 7           | Day 15          | Day 30          |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| NS-PSIS | 0.30 $\pm$ 0.07 | 0.41 $\pm$ 0.07 | 0.19 $\pm$ 0.05 | 0.13 $\pm$ 0.03 | 0.08 $\pm$ 0.02 | 0.05 $\pm$ 0.02 |
| PSIS    | 0.05 $\pm$ 0.02 | 0.04 $\pm$ 0.02 | 0.05 $\pm$ 0.03 | 0.04 $\pm$ 0.03 | 0.05 $\pm$ 0.01 | 0.03 $\pm$ 0.02 |

NS-PSIS: Nano-silver modified porcine small intestinal submucosa; PSIS: Porcine small intestinal submucosa

### 3 讨论

银是一种传统抗菌剂,具有高效、抗菌谱广等优点。除此之外,银离子的使用不会导致耐药的发生,使之成为一种理想的抗菌剂<sup>[3]</sup>。目前银已被广泛应用于医用导管、手术器械、牙科抗菌材料、生殖健康、计划生育用具以及创伤敷料等方面<sup>[8]</sup>。纳米银颗粒直径(10~100 nm)极微,它具有独特的小尺寸效应和表面效应,可以轻易进入病原体,与菌体中酶蛋白的巯基迅速结合,使一些以此为必要基团的酶失去活性,从而达到杀灭细菌、修复组织、促进伤口愈合的作用<sup>[9]</sup>。纳米银颗粒通常在低浓度下可显示出抗菌效能,而且其抗菌性与纳米粒子的总表面积有关,其抗菌效能远高于传统银颗粒。

本课题组前期采用自组装技术成功制备了NS-PSIS,经体外及体内实验证实具有良好的抗菌效能<sup>[6]</sup>。但纳米银与普通银相比,其物理、化学性质均发生了很大变化。有研究表明,没有毒性作用的微米物质当被加工成纳米级的超细颗粒时,会表现出

一定的毒性,而且颗粒尺寸越小,单位表面的活性也越大,产生的生物效应也越大<sup>[10]</sup>。还有研究表明,纳米颗粒较同种常规物质更容易在肝、肾、脑等重要脏器沉积<sup>[11]</sup>。故本研究采用热原试验、皮肤刺激试验、皮内刺激试验、急性全身毒性试验及体内银吸收代谢试验对NS-PSIS进行生物安全性评价。结果显示NS-PSIS具有抗感染、无热原、无皮肤刺激、无皮内刺激、无急性全身毒性。通过测量动物体温及白细胞含量,发现纳米银粒子注入机体后,不会引起机体热原性,白细胞数值虽有升高,但仍处于正常范围内<sup>[12]</sup>;且通过皮肤及皮下刺激试验可以看出,皮肤及皮下破损处均未有化脓、感染灶的形成。采用火焰原子吸收分光光度法对SD大鼠术后血液及肝、脑、肾等重要器官的银含量进行测定,结果发现NS-PSIS治疗后SD大鼠血中银含量变化不明显,并于术后30 d恢复正常水平,且30 d时肝、肾、脑等重要脏器等内均无银沉积。考虑其原因可能是纳米银是Ag<sup>0</sup>形式的银,与Ag<sup>+</sup>形式的银相比较,Ag<sup>0</sup>形式的银大部分不与卤化物结合,在有机物质中灭活

的速度大大降低,有效银相对增加。因此,在达到同样的治疗效果时,机体对纳米银的吸收更少,减小了银中毒的可能性,提高了生物安全性<sup>[13]</sup>。

本研究对 NS-PSIS 的生物安全性进行了初步评价,结果表明 NS-PSIS 的生物安全性良好,然而要将 NS-PSIS 应用于临床,尚有待进一步对其长期的生物安全性进行验证。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Penttinen R, Grönroos J M. Mesh repair of common abdominal hernias: a review on experimental and clinical studies[J]. *Hernia*, 2008, 12: 337-344.

[2] Bellows C F, Alder A, Helton W S. Abdominal wall reconstruction using biological tissue grafts: present status and future opportunities[J]. *Expert Rev Med Devices*, 2006, 3: 657-675.

[3] Leaper D J. Silver dressings: their role in wound management[J]. *Int Wound J*, 2006, 3: 282-294.

[4] Lu S, Gao W, Gu H Y. Construction, application and biosafety of silver nanocrystalline chitosan wound dressing[J]. *Burns*, 2008, 34: 623-628.

[5] Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan D J, Shah S I. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2005, 5: 244-249.

[6] Zhou H Y, Zhang J, Yan R L, Wang Q, Fan L Y, Zhang Q, et al. Improving the antibacterial property of porcine

small intestinal submucosa by nano-silver supplementation: a promising biological material to address the need for contaminated defect repair[J]. *Ann Surg*, 2011, 253: 1033-1041.

[7] Luo J C, Chen W, Chen X H, Qin T W, Huang Y C, Xie H Q, et al. A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS)[J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 706-713.

[8] Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27: 76-83.

[9] Feng Q L, Wu J, Chen G Q, Cui F Z, Kim T N, Kim J O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 52: 662-668.

[10] Service R F. American Chemical Society meeting. Nanomaterials show signs of toxicity[J]. *Science*, 2003, 300: 243.

[11] Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohleben W, van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats[J]. *Arch Toxicol*, 2008, 82: 151-157.

[12] 刘科亮, 王林, 王睿, 敬明武, 葛宇杰, 刘以农, 等. SD大鼠血常规指标正常参考值范围探讨[J]. *预防医学情报杂志*, 2009, 25: 715-716.

[13] Dunn K, Edwards-Jones V. The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns[J]. *Burns*, 2004, 30 (Suppl 1): S1-S9.

[本文编辑] 周燕娟