

Cu 型医用抗菌不锈钢在大鼠体内抗细菌感染研究

赵华福¹ 李梅¹ 张余^{2△} 南黎³ 杨柯³ 尹庆水²

(1 广州军区广州总医院医学实验科 广东 广州 510010; 2 广州军区广州总医院骨科医院 广东 广州 510010;

3 中国科学院金属研究所 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的: 比较普通 304 医用不锈钢和 304-Cu 型医用抗菌不锈钢的体内抗细菌感染性能。方法: 将两种不锈钢片涂布浓度为 1×10^7 cfu/mL 的金黄色葡萄球菌培养 24 h, 植入 SD 大鼠胫腓骨肌袋内, 继续饲养并在术前及术后第 1、4、7、14 天进行大体观察、植入部位细菌培养、白细胞计数、组织学观察等检测。结果: 普通 304 不锈钢组术后中度化脓, 检测到较多细菌, 白细胞增多且有大量的炎症细胞出现, 而 304-Cu 型抗菌不锈钢术后只有轻微化脓, 检测到的细菌较少, 白细胞数稍有增多但无统计学差异, 炎症细胞少, 感染程度轻。结论: 与医用 304 不锈钢相比, 304-Cu 型抗菌不锈钢有较好的抗细菌性能, 有一定的抗感染作用。

关键词 铜 不锈钢 大鼠 金黄色葡萄球菌 抗菌

中图分类号 Q95-3, TG142.71 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)06-1048-06

Antibacterial Properties of Copper-Contained Stainless Steel in Rat

ZHAO Hua-fu¹, LI Mei¹, ZHANG Yu^{2△}, NAN Li³, YANG Ke³, YIN Qing-shui²

(1 Department of Medical Research, 2 Department of Orthopedic Surgery, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, 510010, China; 3 Inst. of Metal Res., Chinese Acad. of Sci., Shenyang, 110016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the antibacterial activity of 304 stainless steel and 304 copper-contained stainless steel. **Methods:** 1×10^7 cfu/mL *Staphylococcus aureus* was spread on 304 stainless steel and 304 copper-contained stainless steel for 24 hours. Then the two kinds of stainless steel were implanted into muscle of tibia fibula in Sprague Dawley rats. General observation, gemiculture, white blood cell count (WBC) and histopathological analysis were performed before operation and on postoperative 1d, 4d, 7d and 14d respectively. **Results:** In 304 stainless steel group, there were moderate suppuration, abundant *S.aureus* and inflammatory cells, high WBC, while there were slight suppuration, few *S.aureus* and inflammatory cells in 304 copper-contained stainless steel group. Moreover, WBC increased slightly in latter group but there was no significant difference between preoperation and postoperation. **Conclusion:** 304 copper-contained stainless steel has better but limited antibacterial effects than those of 304 stainless steel.

Key words: Copper; Stainless steel; Rat; *Staphylococcus aureus*; Antibacterial

Chinese Library Classification: Q95-3, TG142.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)06-1048-06

前言

随着医用金属材料的大量使用, 医疗器械导致微生物感染的情况频繁发生, 已成为临床亟待解决的重要问题之一。其中, 金黄色葡萄球菌是引起骨科植入器械感染的主要细菌之一^[1,2], 其引起的术中或术后感染会直接造成患者伤口经久不愈, 经常导致手术失败, 甚至引起一系列的并发症, 给患者带来巨大的身心痛苦和沉重的经济负担^[3]。因此寻找和开发各种有效的抗菌材料具有重要意义。

通过掺入抗菌金属离子而制成的抗菌不锈钢是一种新型多功能材料, 具有良好的市场发展前景。其中, Cu 型医用抗菌不锈钢以其优良的抗菌活性, 逐渐在越来越多的领域中得到应

用^[4], 本文在通过对其抗菌特性进行进一步的研究, 为抗菌不锈钢更为广泛的应用提供依据。

1 资料和方法

1.1 实验动物和试剂

实验动物选择 SPF 级 SD 大白鼠, 200g 左右, 雌雄不限, 实验动物质量合格证号 0057172。实验选择普通 304 医用不锈钢和 304-Cu 型医用抗菌不锈钢, 尺寸均为 10mm×3mm×1mm, 高温高压灭菌备用。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923 由广州军区总医院检验科提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细菌培养及大鼠胫腓骨肌袋不锈钢植入实验 金黄色葡萄球菌菌种接种于 LB 液体培养基中, 37℃ 培养 24 小时。调整菌液浓度至 1×10^7 cfu/mL, 分别滴加到 304 不锈钢和 304-Cu 型抗菌不锈钢上, 铺匀整个表面后将钢片置于无菌培养皿中, 湿盒中 37℃ 条件下培养 24 h 待用。

实验大鼠共 24 只, 分为 2 组, 12 只/组。将培养细菌的钢片 - 实验组 and 对照组分别植入到大鼠大腿胫腓骨附近的肌袋中, 继续饲养, 术后不用药。

作者简介 赵华福 (1982), 男, 硕士, 主要研究方向: 骨科植入材料与骨肿瘤, E-mail: zhf0416@yahoo.com.cn

李梅 (并列第一作者) (1986), 女, 硕士, 主要研究方向: 骨肿瘤, E-mail: maylee3223@126.com

△通讯作者 张余, 电话: 020-36654541,

E-mail: luck_2001@126.com

(收稿日期: 2011-08-23 接受日期: 2011-09-18)

1.2.2 大体观察实验 术后观察大鼠切口愈合、有无红肿,及其活动和饮食等基本情况。并在术后第 1、4、7、14 天实验组和对照组各处死 3 只动物,观察钢片周围软组织包裹情况。

1.2.3 细菌检测 术后第 1、4、7、14 天各处死 3 只动物,用无菌棉签拭拭钢板周围肌肉组织,通过血平板划线法进行细菌培养,判断细菌感染情况。

1.2.4 白细胞计数 术前以及术后第 1、4、7、14 天进行大鼠眼眶静脉采血。取 20 μL 血液,加入到 380 μL 2%乙酸中,吹打混匀至液体澄清,取 10 μL 用血细胞计数板计数白细胞。

1.2.5 组织学观察 术后第 1、4、7、14 天处死动物,取钢板周围肌肉组织,剪成小块,用体积分数为 4% 的甲醛溶液固定,经脱水、石蜡包埋、切片制作、HE 染色后在光镜下观察并拍片。

2 结果与讨论

2.1 大体观察

术后大体观察结果如图 1-4 所示,手术大鼠第 4 天开始出现伤口化脓现象,至第 14 天伤口愈合。两组大鼠在肌肉未感染时的区别不明显,而在感染出现后,304 不锈钢组大鼠伤口处肿胀程度及钢片周围化脓状况较为严重,白色脓液状分泌物较多,且钢片周围肌肉组织被纤维囊包裹的现象更为明显。而 304-Cu 型抗菌不锈钢组只见轻微化脓,白色脓液状分泌物较少,即实验组的感染程度比对照组的感染程度轻。

2.2 细菌培养

细菌培养的结果由图 5~8 可知,与 304 不锈钢组相比,术后 1d、7d 时 304-Cu 型抗菌不锈钢组钢片周围肌肉组织中培养出的细菌明显要少,手术 14d 后二者趋于相似,无明显差别。

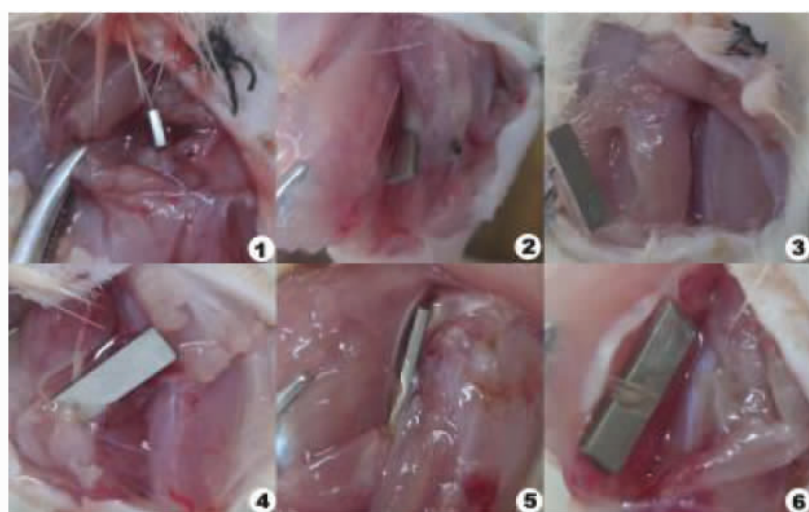


图 1 术后 1d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组大鼠肌肉组织感染情况 ①-③ 304 不锈钢组;④-⑥ 304-Cu 型抗菌不锈钢组

Fig. 1 Infection status of rats muscle tissues in 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 1d ①-③ 304 stainless steel group;④-⑥ 304 copper-contained stainless group

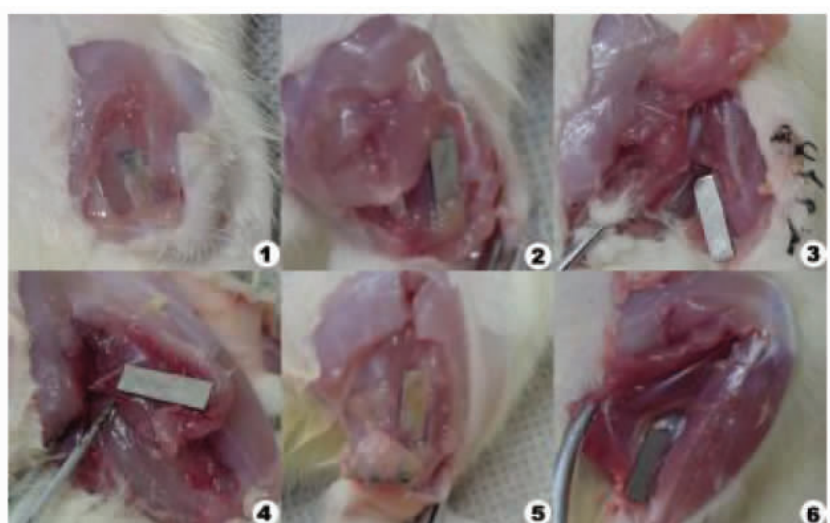


图 2 术后 4d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组大鼠肌肉组织感染情况 ①-③ 304 不锈钢组;④-⑥ 304-Cu 型抗菌不锈钢组

Fig. 2 Infection status of rats muscle tissues in 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 4d: ①-③ 304 stainless steel group;④-⑥ 304 copper-contained stainless group

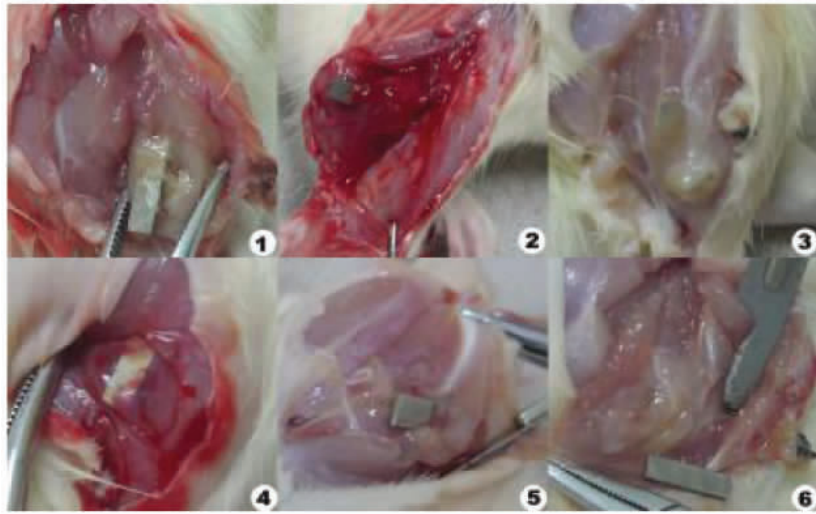


图 3 术后 7d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组大鼠肌肉组织感染情况 ①-③ 304 不锈钢组；④-⑥ 304-Cu 型抗菌不锈钢组
Fig. 3 Infection status of rats muscle tissues in 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 7d :①-③ 304 stainless steel group ;④-⑥ 304 copper-contained stainless group

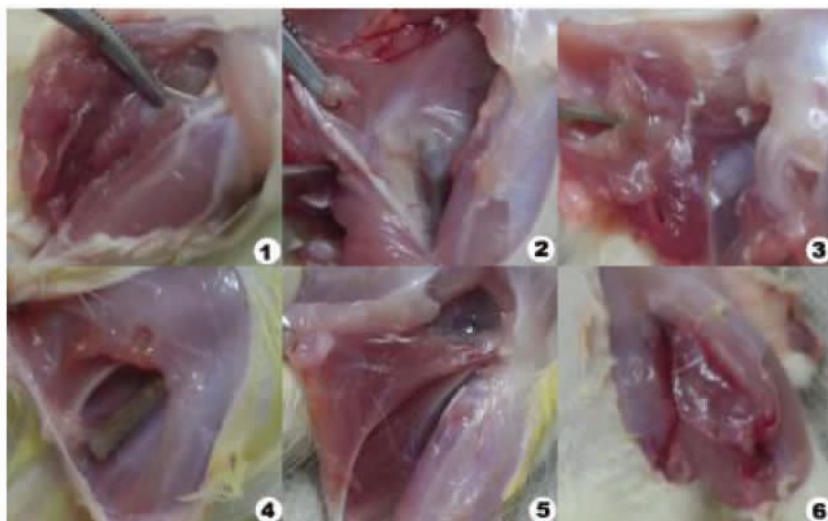


图 4 术后 14d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组大鼠肌肉组织感染情况 ①-③ 304 不锈钢组；④-⑥ 304-Cu 型抗菌不锈钢组
Fig. 4 Infection status of rats muscle tissues in 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 7d :①-③ 304 stainless steel group ;④-⑥ 304 copper-contained stainless group

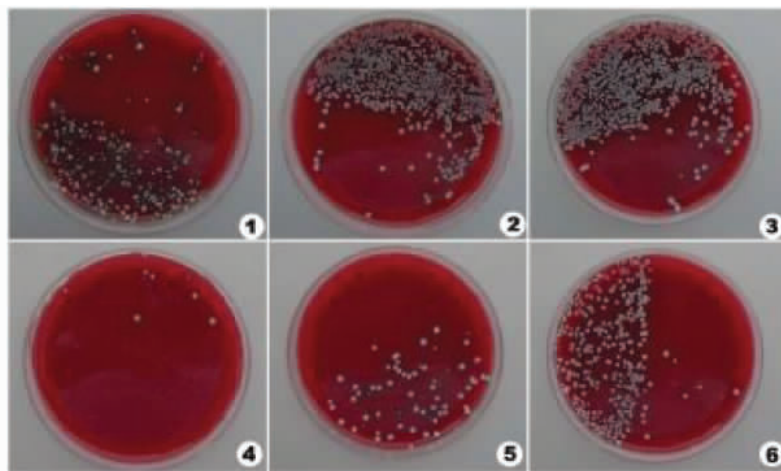


图 5 术后 7d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组细菌培养结果 ①-③ 304 不锈钢组；④-⑥ 304-Cu 型抗菌不锈钢组
Fig. 5 Gemiculture results of 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 7d :①-③ 304 stainless steel group ;④-⑥ 304 copper-contained stainless group

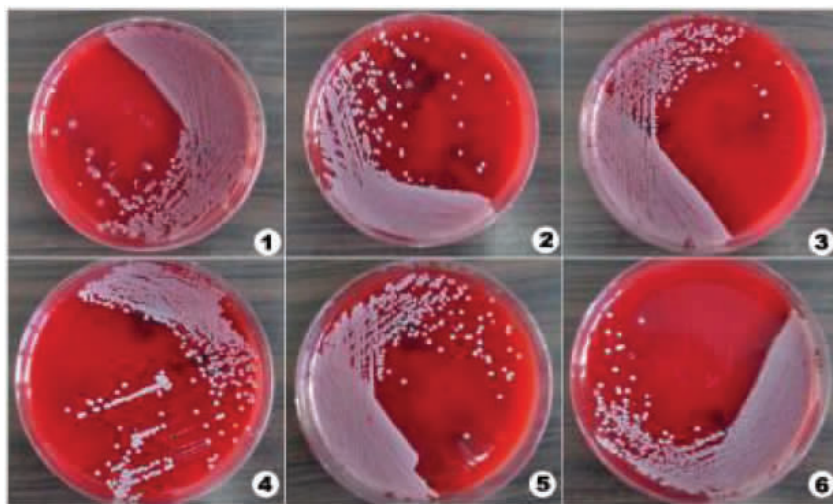


图 6 术后 4d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组细菌培养结果 ①-③ 304 不锈钢组；④-⑥ 304-Cu 型抗菌不锈钢组

Fig. 6 Germiculture results of 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 4d ①-③ 304 stainless steel group ;
④-⑥ 304 copper-contained stainless group

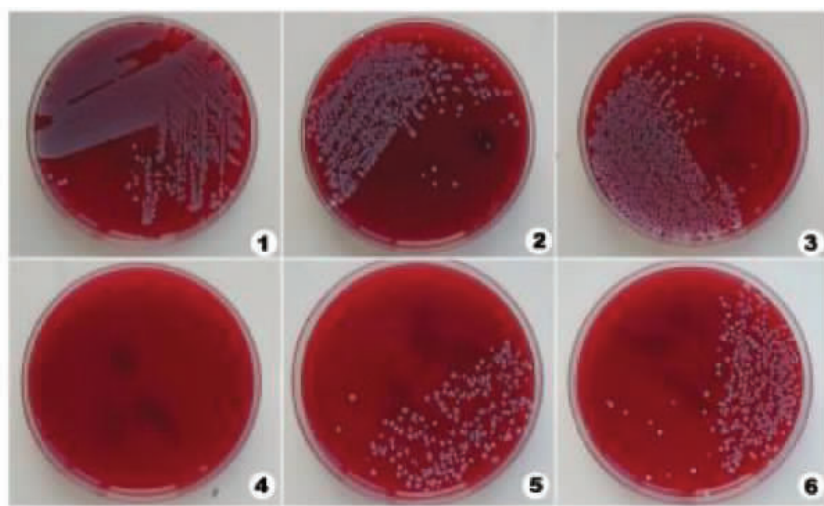


图 7 术后 7d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组细菌培养结果 ①-③ 304 不锈钢组；④-⑥ 304-Cu 型抗菌不锈钢组

Fig. 7 Germiculture results of 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 7d ①-③ 304 stainless steel group ;
④-⑥ 304 copper-contained stainless group

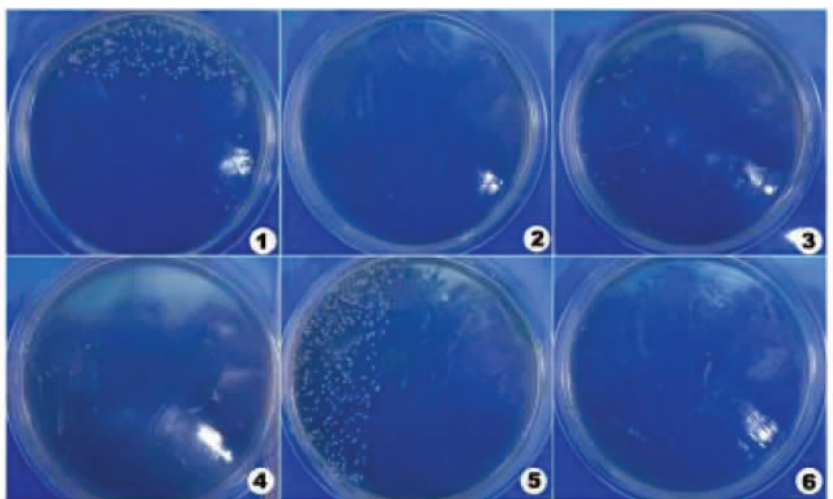


图 8 术后 14d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组细菌培养结果 ①-③ 304 不锈钢组；④-⑥ 304-Cu 型抗菌不锈钢组

Fig. 8 Germiculture results of 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 14d ①-③ 304 stainless steel group ;
④-⑥ 304 copper-contained stainless group

2.3 白细胞计数

白细胞计数结果由表 1 和图 9 所示,304 不锈钢组大鼠体内白细胞数均大幅升高,且与术前相比存在显著性差异 ($P < 0.05$)。而 304-Cu 型抗菌不锈钢组白细胞数升高不明显,只有

第14 天与术前存在显著性差异。

另外,术后 1、4、7d 304 不锈钢组白细胞数比 Cu 型抗菌不锈钢组高,且存在显著性差异,14d 两组间无显著性差异。

表 1 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组白细胞计数结果($10^9/L$)
Table 1 WBC results of 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group ($10^9/L$)

Group	Day 0	Day 1	Day 4	Day 7	Day 14
Stainless steel group	6.35± 2.38	12.02± 3.00 ^{△*}	14.42± 0.83 ^{△*}	13.32± 1.80 ^{△*}	11.05± 2.31 [△]
Copper-contained stainless group	7.25± 3.12	6.38± 0.58	9.90± 1.98	8.33± 2.87	12.25± 0.85 [△]

Note: $\Delta P < 0.05$ Preoperation group compared with postoperation group; * $P < 0.05$ 304 stainless steel group compared with 304 copper-contained stainless group in the same day

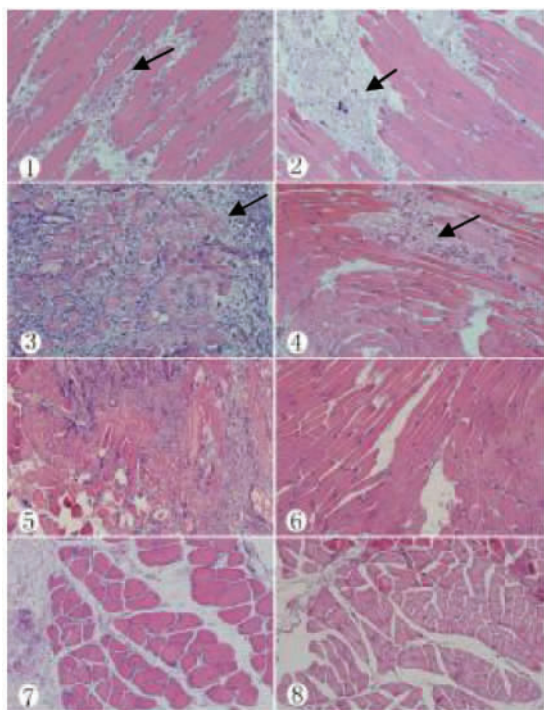


图 9 手术 1~14 d 304 不锈钢组和 304-Cu 型抗菌不锈钢组肌肉组织 HE 染色结果 ①:1 d;③:4d;⑤:7d;⑦:14d;304-Cu 型抗菌不锈钢组 ②:1 d;④:4d;⑥:7d;⑧:14d

Fig.9 HE stain results of muscle tissues in 304 stainless steel group and 304 copper-contained stainless group at postoperative 1~14d ①:1 d;③:4d;⑤:7d;⑦:14d;304 copper-contained stainless group ②:1 d;④:4d;⑥:7d;⑧:14d

3 结论

不锈钢是一类常作为外科植入金属材料或用于制作医疗工具及特殊手术器械的特殊金属材料,为了满足其长期使用的安全性及可靠性,目前已相继开发出含 Ag 或含 Cu 等抗菌不锈钢^[4]。抗菌不锈钢兼具结构材料和抗菌功能材料的双重特点,具有无毒、广谱抗菌、抗菌时效长、不产生耐药性以及其制品耐磨、美观等其它抗菌材料所无法比拟的特性,其研究与开发具有重要的社会意义与经济价值^[6]。

有研究表明 Cu 型抗菌不锈钢对枯草杆菌、白色念珠菌、金

黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抗菌率分别在 80%、99.1%、99.2%、99.9%以上,显示了很好的抗菌性能。同时通过急性毒性实验、皮肤过敏实验、溶血实验及细胞毒性实验综合证明了抗菌不锈钢对人体的安全性^[7]。陈四红等通过在铁素体和奥氏体不锈钢中添加适量 Cu,探索含 Cu 不锈钢的抗菌特性,结果显示其对部分球菌、杆菌等均有强烈的杀灭作用,在生物电镜下可观察到细菌形态的改变与组织液溢出现象,而普通不锈钢组没有抗菌作用^[8-10]。南黎等研究含铜抗菌不锈钢的杀菌率是随作用时间而变化的,在作用时间为 150 min 时,达到了 99.9%以上的最大杀菌能力^[11,12],细菌呈现了重度扭曲变形,内容物大量漏出的状况等^[13,14]。因此, Cu 型抗菌不锈钢具有广谱的抗菌性能。本研究的大鼠体内不锈钢植入实验,不仅通过检测细菌培养而探索其抗菌性能,更直观观察动物的抗菌表现,因而更具有临床指导意义。

研究显示细菌感染可使外周血白细胞增多,因此白细胞数量可作为了解细菌感染程度的辅助指标之一^[15]。同时,炎症是机体抗病和修复的反应,也与细菌感染密切相关,因此炎症细胞的数量在一定程度上也可以反映机体细菌感染的水平。其中,304-Cu 抗菌不锈钢组的白细胞数在 14d 时突然增多可能是在第 7 天采血过程中大鼠的采血部位受到感染或遭创伤所致。除动物的个体差异造成的实验误差外,本研究的一系列抗菌实验说明 304-Cu 型抗菌不锈钢较普通 304 医用不锈钢有较好的抗菌作用。

抗菌不锈钢的杀菌或抑菌过程并未彻底了解,根据已有的实验结果,T. Yokota, M 等提出了若干种假设^[16],下一步还需对其抗菌机制进行深入研究,从而更好的指导其应用及开发。同时,虽然金属离子都具有或强或弱的杀菌能力即抗菌功能,但从其对人体的安全性考虑,并非所有金属离子均适合作为抗菌元素使用,下一步还需要该类材料是否具有细胞毒性做出客观的评价,使其更安全的应用于临床并发挥更大的社会与经济价值。

参考文献(Reference)

- [1] Davide C, Lucio M, Carla RA. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance[J]. Biomaterials, 2006, 27(11): 2331-2339
- [2] 王化芬, 王晓军, 于茜, 等. 骨科感染病原菌谱与抗菌谱 3 年报告

- [J]. 中华矫形外科杂志, 2007, 25(3): 313-315
Wang Hua-fen, Wang Xiao-jun, Yu Qian, et al. Pathogenic bacteria and drug resistance in orthopedics patients: a review of the past three years[J]. Orthop J Chin, 2007, 25(3): 313-315
- [3] 何国龙, 吴素兰, 赵体玉. 骨科手术植入物感染手术室相关危险因素分析及对策[J]. 护理学杂志, 2009, 24(24): 61-62
He Guo-long, Wu Su-lan, Zhao Ti-yu. Causal Analysis of Infections of Orthopedics Implants and Control Strategies[J]. Journal of Nursing Science, 2009, 24(24): 61-62
- [4] 王华, 梁成浩. 抗菌金属材料的研究进展[J]. 腐蚀科学与防护技术. 2004, 16(2): 96-100
Wang Hua, Liang Cheng-hao. Research development of antibacterial metallic materials[J]. Corrosion Science And Protection Technology, 2004, 16(2): 96-100
- [5] 任伊宾, 杨柯, 张炳春, 等. 新型医用不锈钢研究 [J]. 生物医学工程学杂志, 2006, 25(5): 1101-1103
Ren Yi-bin, Yang Ke, Zhang Bing-chun, et al. Study of a new medical Stainless Steel[J]. J Biomed Eng, 2006, 25(5): 1101-1103
- [6] Hong IT, Koo CH. Antibacterial properties, corrosion resistance and mechanical properties of Cu-modified SUS 304 stainless steel[J]. Materials Science and Engineering A, 2005, 393(1): 213-222
- [7] Yang K, Lu MQ. Antibacterial Properties of an Austenitic Antibacterial Stainless Steel and Its Security for Human Body[J]. J. Mater. Sci. Technol, 2007, 23(3): 333-336
- [8] 吕曼祺, 陈四红, 董加胜, 等. 铁素体抗菌不锈钢抗菌过程与机理初探[J]. 金属功能材料, 2005, 12(6): 10-13
Lv Man-qi, Chen Si-hong, Dong Jia-sheng, et al. Pilot study about the killing bacteria process and mechanism of ferrite antibacterial stainless steel[J]. Metallic Functional Material, 2005, 12(6): 10-13
- [9] 陈四红, 吕曼祺, 张敬党, 等. 含 Cu 抗菌不锈钢的微观组织及其抗菌性能[J]. 金属学报, 2004, 40(3): 314-318
Chen Si-hong, Lv Man-qi, ZHANG Jing-dang. Microstructure and antibacterial properties of Cu-contained antibacterial stainless steel [J]. Acta Metallurgica Sinica, 2004, 40(3): 314-318
- [10] 吕曼祺, 陈四红, 董加胜, 等. 含 Cu 铁素体抗菌不锈钢的抗菌特性[J]. 材料研究学报, 2005, 19(6): 581-588
Lv Man-qi, Chen Si-hong, Dong Jia-sheng, et al. Antibacterial properties of Cu-containing ferrite stainless steel[J]. Chinese Journal of Materials Research, 2005, 19(6): 581-588
- [11] Nan L, Yang WC, LIU YQ, et al. Preliminary Study on Antibacterial Mechanism of Copper-bearing Antibacterial Stainless Steel against E. coli[J]. Mater. Sci. Tech, 2008, 24(2): 197-201
- [12] 南黎, 刘永前, 杨伟超, 等. 含铜抗菌不锈钢的抗菌特性研究[J]. 金属学报, 2007, 43(10): 1065-1070.
Nan Li, Liu Yong-qian, Yang Wei-chao, et al. Study on antibacterial properties of copper-containing antibacterial stainless steels [J]. Acta Metallurgica Sinica, 2007, 43(10): 1065-1070
- [13] 南黎, 刘永前, 杨伟超, 等. 含铜铁素体抗菌不锈钢杀菌机理的初步研究[J]. 功能材料, 2007, (38): 3422-3425
Li Nan, Liu Yong-qian, Yang Wei-chao, et al. Pilot study about the killing bacteria process and mechanism of ferrite antibacterial stainless steel[J]. Function materials, 2007, (38): 3422-3425
- [14] Nan L, Liu YQ, Lü MQ, et al. Study on antibacterial mechanism of copper-bearing antibacterial stainless steel by atomic force microscopy [J]. J. Materials Science: Materials in Medicine, 2008, (19): 3057-3062
- [15] 吕美艳, 王明书, 杨丽红, 等. 细菌感染性疾病患者白细胞 VCS 参数的变化及临床意义[J]. 检验医学, 2007, 22(5): 578-580
Lv Meiyan, Wang Ming-shan, Yang Li-hong, et al. The change and clinical significance of the white blood cell volume and plasm-nucleus complexity in patients with bacteria infection [J]. Laboratory Medicine, 2007, 22(5): 578-580
- [16] Dan ZG, Ni HW, Xu BF, et al. Microstructure and antibacterial properties of AISI 420 stainless steel implanted by copper ions [J]. Thin Solid Films, 2005, 492(1-2): 93-100