

· 实验研究 ·

纳米银涂层可吸收线吻合小鼠肠壁近期抗炎疗效的实验研究^{*}

刘雪来 宋岩彪^① 张 创 曹学会 靳晓次^② 费 川 张永婷 李索林^{**}

(河北医科大学第二医院小儿外科, 石家庄 050000)

【摘要】 目的 探讨纳米银涂层可吸收缝合线的近期抗炎疗效。**方法** 采用化学涂层法将纳米银颗粒涂层在普通可吸收缝合线(Vicryl suture, 4-0, Polyglactin 910)表面, 制备纳米银涂层线。12 只 Balb/C 小鼠随机分 3 组: 普通可吸收线、抗菌可吸收线和纳米银涂层可吸收线。在小鼠回肠制备肠切开模型后, 分别采用上述 3 组缝线行单层间断端端吻合。术后 7 天取材吻合口处肠管组织标本, 连续冰冻切片进行白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、增殖性细胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen, PCNA)免疫组化观察和半定量分析。**结果** 免疫组化和半定量分析显示纳米银涂层可吸收线组吻合口处 IL-6 和 TNF- α 表达最少, 普通可吸收线组 IL-6 和 TNF- α 表达最多(普通、抗菌和纳米银涂层可吸收线 IL-6 的光密度值分别为 0.25 ± 0.03 、 0.19 ± 0.02 、 0.10 ± 0.02 , $F = 41.378$, $P = 0.000$; TNF- α 光密度值分别为 0.39 ± 0.04 、 0.29 ± 0.03 、 0.13 ± 0.02 , $F = 77.885$, $P = 0.000$)。PCNA 标志物染色显示纳米银涂层线组吻合口内增殖细胞数量最多[(48.0 ± 7.6) 个, (83.5 ± 14.2) 个, (126.5 ± 13.2) 个, $F = 42.857$, $P = 0.000$]。**结论** 纳米银涂层可吸收线用于肠切除肠吻合之后, 吻合口处炎症反应轻微, 组织细胞增生和修复明显。

【关键词】 纳米银颗粒; 可吸收线; 炎症反应; 吻合; 肠管

文献标识:A **文章编号:**1009-6604(2018)09-0825-05

doi:10.3969/j.issn.1009-6604.2018.09.015

Inhibited Inflammatory Responses Induced by Silver Nanoparticles-coated Vicryl Suture in Mice Intestinal Wall Anastomotic Model Liu Xuelai^{*}, Song Yianbiao, Zhang Chuang^{*}, et al. ^{*}Department of Pediatric Surgery, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Li Suolin, E-mail: lisuolin@263.net

【Abstract】 Objective To explore the anti-inflammatory efficacy of Vicryl suture (Polyglactin 910) coated with silver nanoparticles. **Methods** The absorbable suture (4-0 in size) was coated with silver nanoparticles through layer-by-layer deposition. A total of 12 Balb/C mice were randomly divided into 3 groups: normal suture group, antibacterial suture group and silver nanoparticles coated suture group. After the mouse ileum was prepared for intestine incision model, the above three groups of sutures were then respectively utilized for single layer interrupted anastomosis of ileum. The tissue samples at post-anastomosis day 7 were harvested to investigate IL-6, TNF- α and proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression via IHC staining and semi-quantitative analysis. **Results** The immunohistochemistry and semi-quantitative analysis results showed that IL-6 and TNF- α production was at the least levels around anastomotic site in the silver nanoparticles coated suture group, while the most in the normal suture group [the optical density (OD) values of IL-6 in the normal suture, antibacterial suture and silver nanoparticles coated suture group were 0.25 ± 0.03 , 0.19 ± 0.02 , and 0.10 ± 0.02 , respectively, $F = 41.378$, $P = 0.000$; The OD values of TNF- α in the normal suture, antibacterial suture and silver nanoparticles coated suture group were 0.39 ± 0.04 , 0.29 ± 0.03 , and 0.13 ± 0.02 , respectively, $F = 77.885$, $P = 0.000$]. The highest PCNA expression was found in the silver nanoparticles coated suture group [the proliferating cells numbers under high magnification random field of vision around anastomotic tissue in the normal suture, antibacterial suture and silver nanoparticles coated suture group were (48.0 ± 7.6) cells, (83.5 ± 14.2) cells, and (126.5 ± 13.2) cells, respectively, $F = 42.857$, $P = 0.000$]. **Conclusion** Silver nanoparticles-coated sutures have potential to inhibit local inflammation and promote cell proliferation,

^{*} 基金项目:河北医科大学第二医院课题(2h2017002)

^{**} 通讯作者, E-mail: lisuolin@263.net

① 中心实验室

② 动物实验中心

as well as contribute to intestinal post-anastomotic healing.

【Key Words】 Silver nanoparticle; Absorbable suture; Inflammatory; Anastomosis; Intestine

纳米颗粒是一类小于 100 nm, 为生物细胞直径 1/100 ~ 1/1000 的新材料^[1,2], 与生物大分子(如多肽、蛋白质、核酸)和药物分子大小相仿。与传统微米级药物颗粒相比, 其具有良好的静电吸附效应, 可聚集在膜表面、改善膜电位、吸附和聚集外源性配体或糖蛋白、调控胞膜和胞浆内信号转导通路, 表现出药物分子或传统微米级大颗粒材料无法发挥的生物医学优势^[3,4]。其中, 纳米银颗粒作为一种新型纳米金属颗粒材料, 已被证实能有效阻断细菌呼吸链而具有抗菌作用^[5]。此外, 近来纳米银颗粒介导的抗炎作用也受到关注, 是目前创伤外科领域的研究热点内容之一。Tian 等^[6]将涂有纳米银颗粒的敷料覆盖于炎症性创口表面, 观察到可有效抑制炎症细胞浸润和降低创口炎症蛋白表达而促进伤口功能细胞的增殖和移行, 降低创伤后局部组织发生感染的机会, 加快创伤后伤口组织的修复; Wong 等^[7]观察到纳米银颗粒介导的抗炎作用能有效降低腹膜炎反应, 有效降低肠粘连和肠梗阻的发生。在此基础上, 我们的前期研究^[8]将纳米银颗粒与具有抗炎作用的纳米载体进行螯合, 将螯合物局部应用于烫伤伤口创面, 证实纳米银颗粒具有良好的抗炎特性, 以及纳米载体进行螯合之后在抗炎疗效方面表现出生物协同作用。

鉴于此, 本研究采用组织工程学技术在普通可吸收缝合线表面制作纳米银颗粒涂层, 制备具有抗炎特性的纳米银涂层可吸收缝线, 并将该缝线用于小鼠肠切除肠吻合模型, 旨在探索其抗炎特性和效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

带针薇乔可吸收线(4-0, Vicryl suture, Polyglactin 910, 全长 45 cm)和相同粗细的三氯生抗菌涂层薇乔可吸收线(4-0, Vicryl plus, 缝针 13 mm 1/2 弧度, 全长 45 cm)购自强生公司(美国)。磷酸盐缓冲液(PBS)和枸橼酸盐溶液(Solarbio, 中国), 白介素 6(IL-6)抗体(Abcam, 英国), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)抗体(Abcam, 英国), 增殖性细胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen, PCNA)抗体(Abcam, 英国), 山羊抗兔 IgG(Bioworld, 美国), DAB 检测试剂盒(中杉金桥, 中国)用于免疫组织化学形态研究。1%戊巴比妥钠、二烯丙基二甲基氯化铵(分子量 20.00 ~ 35.00)、聚甲基丙烯酸钠(分子量 9500)、硝酸银溶液、氯化钠溶液、乙酸钠溶液购

自 Sigma(美国)。采用 1 mmol/L 乙酸钠溶液调定上述溶液酸碱度至 pH = 7。无菌水稀释硝酸银至 1 mmol/L。

1.2 纳米银颗粒和纳米银涂层可吸收线的制备

纳米银颗粒的制备参照我课题组前期报道^[9,10]。固定液配备: 等量 1 mmol/L 聚甲基丙烯酸钠和硝酸银溶液混合后紫外线照射 4 h。黏附液的配备: 无菌水稀释二烯丙基二甲基氯化铵至浓度为 1 mmol/L。纳米银涂层可吸收线制备方法参照文献^[11], 经典化学逐层涂层法。采用无菌带针普通薇乔可吸收线缠绕于塑料磨具后依次放置于固定液和黏附液内, 各 1 min, 置于双蒸水内 1 min, 甩干后重新放置于 2 种溶液内和双蒸水内, 如此反复。制备的纳米银涂层可吸收线放置于室温下, 过夜, 干燥。

分别将带针普通薇乔可吸收线(普通可吸收线组)、三氯生涂层薇乔可吸收线(抗菌可吸收线组)和纳米银涂层可吸收线(纳米银涂层可吸收线组)各自剪断 1 cm 用于扫描电镜观察, 剩余缝合线各自用于动物实验。本研究采用涂层 10 次的纳米银可吸收线进行吻合。

1.3 动物分组和实验操作

所有实验程序均遵守动物福利道德原则。12 只 10 ~ 12 周 Balb/C 小鼠购自河北医科大学实验动物中心, 雌雄各半, 体重 20 ~ 24 g, 平均 22 g(合格证编号: 1708105)。随机分为 3 组, 每组 4 只。采用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 仰卧位平放操作板上, 采用组织切片刀剃除腹壁表面的毛发, 局部常规碘伏消毒。在每只小鼠右下腹壁纵向切口, 湿纱布保护术野, 无菌平镊提起全腹壁, 在距离小鼠回盲部 2 cm 处用组织剪横向剪断回肠, 以无菌水注射器冲洗肠壁断端, 3 组分别用 4-0 带针薇乔可吸收线、三氯生抗菌涂层薇乔可吸收线或纳米银涂层可吸收线单层间断行端端吻合, 皮肤切口采用粘皮胶封合。术后 1 周处死实验小鼠, 取材部位为以吻合口为中心的肠壁组织(纵向 10 mm, 横向 5 mm)。

1.4 观察指标

电镜下观察可吸收线表面是否有纳米银涂层。免疫组化法检测 3 种可吸收线(普通可吸收线、抗菌素可吸收线、纳米银涂层可吸收线)用于动物肠切除肠吻合之后, 吻合口局部炎症蛋白(即 IL-6 和 TNF- α)表达和修复过程中增殖细胞(即 PCNA)数量差异。

1.4.1 免疫组化方法观察吻合口局部 IL-6、TNF- α

和 PCNA 新鲜小鼠肠壁取材后 OCT 包埋,液氮异戊烷低温冷冻组织,连续切片(切片厚度 5 μm),95% 乙醇固定切片,-20 ℃ 低温保存待用。取出切片,室温放置 5 min 待切片回复室温并干燥。常规免疫组化染色操作。显微镜下观察。

1.4.2 半定量分析吻合口局部 IL-6、TNF-α 和 PCNA 的表达 采用双盲法进行免疫组化定量表达分析。普通光学显微镜下放大 400 倍,棕黄色颗粒为阳性蛋白表达,IL-6 和 TNF-α 各组分别随机取 5 个视野(吻合口区域),应用图像分析软件 Image pro plus 6.0 测量积分光密度(IOD)和面积(Area)并计算出平均光密度(OD),OD = IOD/Area。PCNA 各

组随机取吻合口区域 5 个 400 倍视野采用人工法数阳性细胞进行半定量检测。

1.5 统计学方法

采用 SPSS18.0 软件处理数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组比较采用 One-Way ANOVA,两两比较采用 LSD,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电镜下可见吸收线表面涂有纳米银颗粒 采用叠加涂层将纳米银涂层于缝线表面,扫描电镜下可见银颗粒涂于缝线表面(图 1)。

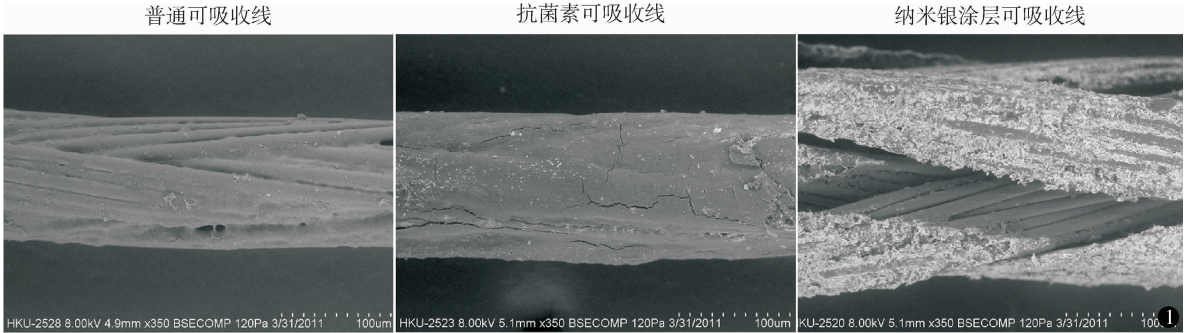


图 1 3 组可吸收线扫描电镜图(×350)。可见纳米银可吸收线表面银白色的纳米银颗粒涂层(连续涂层 5 次)。注:因溶液浸泡因素,纳米银涂层可吸收线直径有所增大

2.2 纳米银可吸收线组吻合口 IL-6 和 TNF-α 表达最低

各组动物手术操作顺利,无吻合口漏和腹腔感染,小鼠术中无死亡。各组标本肉眼下无明显异物反应和线结导致的组织学硬块。采用免疫组化方法观察各组肠壁吻合口组织炎症细胞因子 IL-6 和 TNF-α 的生成和表达情况,结果显示:普通可吸收线组 IL-6 和 TNF-α 表达最高,纳米银可吸收线组吻合口 IL-6 和 TNF-α 表达最低(图 2、图 3)。半定量检测结果进一步支持上述结果(表 1)。

2.3 纳米银可吸收线组吻合口组织内细胞增殖最活跃

PCNA 免疫组化染色结果显示:普通可吸收线组吻合口组织内增殖细胞数量最少,纳米银可吸收线组吻合口组织内增殖细胞数量最多(图 4)。半定量检测结果进一步支持上述观察结果(表 1)。

3 讨论

纳米银颗粒能有效破坏菌体蛋白和阻断细菌呼吸链,从而具有显著抑菌效果。此外,纳米银颗粒能有效抑制中性粒细胞和巨噬细胞浸润,因此具有良好抗炎特性,并成为近年来纳米金属颗粒领域研究热点^[5,12]。在前期研究中,我们将纳米银颗粒与具

表 1 3 组 IL-6、TNF-α 光密度(OD 值)和 PCNA 阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	IL-6	TNF-α	PCNA(个)
普通可吸收线①	0.25 ± 0.03	0.39 ± 0.04	48.0 ± 7.6
抗菌素可吸收线②	0.19 ± 0.02	0.29 ± 0.03	83.5 ± 14.2
纳米银可吸收线③	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.02	126.5 ± 13.2
F, P 值	41.378, 0.000	77.885, 0.000	42.857, 0.000
P ₁₋₂ 值	0.005	0.001	0.002
P ₁₋₃ 值	0.000	0.000	0.000
P ₂₋₃ 值	0.000	0.000	0.001

有抗炎作用的纳米载体进行螯合,将螯合物局部应用于烫伤介导的小鼠皮肤伤口创面,观察到纳米银颗粒具有良好抗炎特性,并能有效促进炎症性伤口组织修复和伤口愈合;与具有抗炎特性的纳米载体进行螯合后,抗炎效果表现生物协同作用。我们进一步采用脂多糖刺激巨噬细胞来模拟体外炎症环境,将巨噬细胞暴露于不同浓度纳米银溶液,细胞活力检测证实纳米银颗粒对炎症反应的抑制并非由细胞毒性作用所介导^[8],这提示纳米银颗粒不是通过对炎症细胞的毒性作用而实施抗炎作用。

本研究是在前期研究的基础上,进一步探讨纳米银颗粒抗炎特性在转化医学研究中的应用。薇乔缝合线是临床常用可吸收缝合线,我们通过组织工

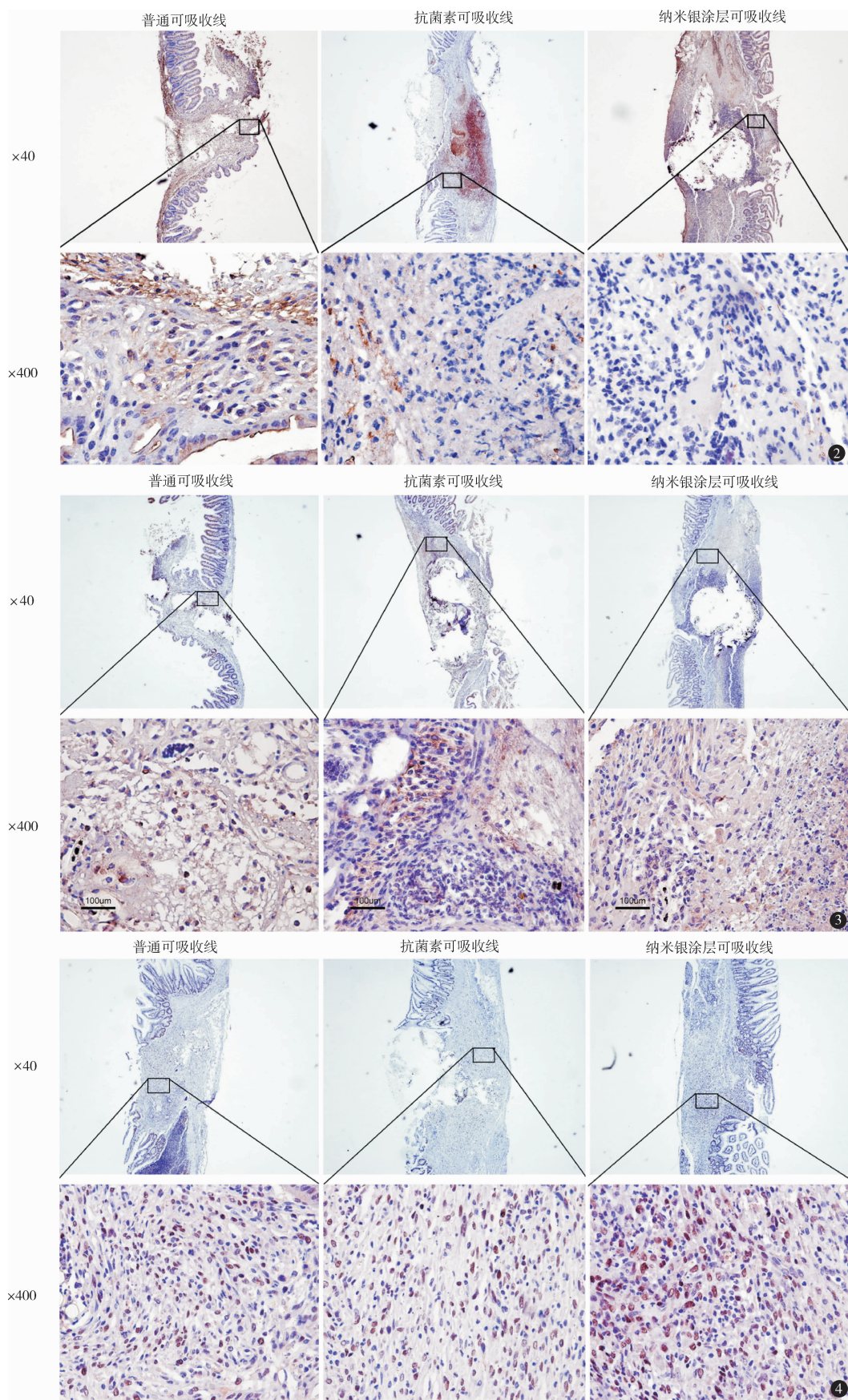


图 2 3 组肠壁吻合口冰冻组织免疫组化 IL-6 表达 图 3 3 组肠壁吻合口冰冻组织免疫组化 TNF-α 表达 图 4 3 组肠壁吻合口冰冻组织免疫组化 PCNA 表达

程学技术将纳米银颗粒涂层到薇乔缝合线表面,制备出纳米银可吸收缝合线,并在小鼠回肠切除模型上进行肠管端端吻合,观察和比较该缝合线在吻合口组织内介导的短期抗炎效果。研究证实纳米银可吸收缝合线吻合后的肠壁吻合口组织炎症反应轻微,其抗炎效果优于传统抗生素可吸收缝合线和普通可吸收缝合线;其抗炎效果也介导了吻合口组织内细胞的增殖和组织修复。在这方面,Tian 等^[6]分别将纳米银溶液、相同质量抗生素(阿莫西林+甲硝唑)混合液滴加到无菌纱布表面,将二者均分别覆盖于小鼠背部深Ⅱ度皮肤烫伤创面(3 cm×2 cm),结果显示纳米银溶液组伤口愈合平均时间为25.2天,而抗菌缝线组为28.6天,组织学研究结果证实纳米银抗炎特性优于抗菌缝线组。本研究结果与该结论一致,提示纳米银涂层可吸收缝合线的可行性,以及在肠壁吻合模型中具有良好短期抗炎效果。

对于纳米银可吸收缝合线抗炎疗效优于三氯生可吸收缝合线,我们分析可能与以下因素有关:①纳米银颗粒本身介导的抗炎机制与抗生素抗炎机制存在差异;②纳米银颗粒本身能够吸附和聚集外源性配体或糖蛋白,调控胞膜和胞浆内信号转导通路,因此,其可能通过调控炎症细胞多个信号通路来抑制炎症细胞因子或介质释放,从而表现出更满意的抗炎特性;③缝合线质地本身决定其表面抗生素在释放的同时,也在不断降解和被体液稀释,以及被机体组织吸收,而缝合线表面释放的纳米银颗粒在局部组织区域内浓度能保持得相对持久,因此在短期内表现出更满意的抗炎效果;④本研究所使用的回肠肠切除肠吻合模型为感染性伤口,吻合口组织内及周围细菌耐药质粒对抗生素和纳米银颗粒敏感性存在差异。

后续研究我们将进一步对纳米银可吸收缝合线的远期抗炎疗效进行探讨。由于正常肠壁组织吻合口完全修复的时间需2~3周,因此将在本研究基础上,将收集标本的时间延长(本研究标本组织取材时间为术后第7天,后续研究将延长至术后14天和28天),继续观察吻合口愈合晚期吻合口内炎症反应程度、组织修复情况、肠壁修复过程中胶原蛋白沉淀、分布和排列情况、Ⅰ型和Ⅲ型胶原的密度和比例,以及吻合口所能承载的最大爆破压力等,以全面了解和评估纳米银涂层可吸收缝合线的转化应用潜能。此外,我们将本研究中肠切除肠吻合动物模型更换为单纯皮内或器官壁内缝合线线道模型,以进一步探讨纳米银颗粒对缝合线穿行组织过程中所造

成线道炎症反应的影响,以及组织内打结之后,线结周围异物反应情况。

综上,本研究成功将纳米银颗粒涂层于临床常用的可吸收缝合线表面,并在此基础上应用于动物小肠肠切除肠吻合模型上,观察到纳米银颗粒在吻合口处表现出明显抗炎疗效,并为吻合口带来良好的细胞再生和组织修复效果。本研究也为后续转化医学的开展提供了较好的借鉴和理论依据。

参考文献

- 1 Svensson CR, Ameer SS, Ludvigsson L, et al. Validation of an air-liquid interface toxicological set-up using Cu, Pd, and Ag well-characterized nanostructured aggregates and spheres. *J Nanopart Res*, 2016, 18:86.
- 2 Mashock MJ, Kappell AD, Hallaj N, et al. Copper oxide nanoparticles inhibit the metabolic activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Toxicol Chem*, 2016, 35(1):134-143.
- 3 Harshiny M, Matheswaran M, Arthanareeswaran G, et al. Enhancement of antibacterial properties of silver nanoparticles-ceftriaxone conjugate through *Mukia maderaspatana* leaf extract mediated synthesis. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2015, 121:135-141.
- 4 Tian B, Chen W, Yu D, et al. Fabrication of silver nanoparticle-doped hydroxyapatite coatings with oriented block arrays for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2016, 61:345-359.
- 5 刘雪来, 黄格元. 纳米生物材料在创伤修复中的研究与应用. *中华外科杂志*, 2013, 51(8):748-752.
- 6 Tian J, Wong KK, Ho CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *Chem Med Chem*, 2007, 2(1):129-136.
- 7 Wong KK, Cheung SO, Huang L, et al. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *Chem Med Chem*, 2009, 4(7):1129-1135.
- 8 Liu X, Hao W, Lok CN, et al. Dendrimer encapsulation enhances anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *J Pediatr Surg*, 2014, 49(12):1846-1851.
- 9 Liu X, Lee PY, Ho CM, et al. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *Chem Med Chem*, 2010, 5(3):468-475.
- 10 Kwan KH, Liu X, To MK, et al. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine*, 2011, 7(4):497-504.
- 11 Perelshtein I, Applerot G, Perkas N, et al. Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. *Nanotechnology*, 2008, 19(24):245705.
- 12 Du Juan, Liu Xuelai. The application of nano biomaterials in diabetic wounds. *中华内分泌外科杂志*, 2014, 8(6):463-466.

(收稿日期:2018-04-10)

(修回日期:2018-06-21)

(责任编辑:王惠群)