论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411098

银离子表面注入改性硅橡胶抗菌性能及生物相容性的初步研究

周 鑫,陈 兴,石小花,王韶亮,雷泽源,樊东力,张一鸣 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院整形美容科)

[摘要] **目的** 采用银离子对普通硅橡胶进行表面注入改性,以期制备一种抗菌性能及生物相容性良好的整形填充材料。**方法** 用高能离子注入机向普通硅橡胶表面注入银离子,对改性后的硅橡胶采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope,SEM)、X射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy,XPS)、傅里叶红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer,FTIR)以及水接触角检测仪对表面形貌、元素组成、化学结构以及亲/疏水性进行检测。选用大肠杆菌进行抑菌圈、抗细菌黏附性实验,初步探究其抗菌性能。采用体外及体内实验对生物相容性进行评价。**结果** SEM观察各材料的表面形貌无明显差异;XPS结果显示银离子已注入材料表面;FTIR观察各材料图谱无明显变化;水接触角检测结果显示,银离子注入硅橡胶水接触角随注入剂量加大而逐渐变小,逐渐呈现出亲水性趋势。抑菌圈结果显示银离子注入硅橡胶可以使抑菌圈直径>7 mm,呈现出抑菌效果;抗细菌黏附性实验显示,改性硅橡胶具有明显的抗菌性。生物相容性评价显示,与普通硅橡胶比,银离子注入硅橡胶均有较好的特性。**结论** 采用银离子注入技术对硅橡胶进行表面改性可以明显提高硅橡胶的亲水性能和抗菌能力以及生物相容性。

[关键词] 硅橡胶;离子注入;银离子;表面注入改性;抗菌性;生物相容性
[中图法分类号] R312; R318.08; R62 [文献标志码] A

Antibacterial property and biocompatibility of silver ion implanted silicone rubber

Zhou Xin, Chen Xing, Shi Xiaohua, Wang Shaoliang, Lei Zeyuan, Fan Dongli, Zhang Yiming (Department of Plastic and Cosmetic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To change the surface of silicone rubber by silver ion implantation technology in order to obtain an implantable silicone rubber with antibacterial property and good biocompatibility. **Methods** High-energy ion implantation machine was used for the silver ion implantation on the surface of silicone rubber. After then, the surface properties of 3 doses of silver ion implanted silicone rubber (3×10^{15}, 1×10^{16} and 3×10^{16} ion/cm^2) were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) and water contact angle test for surface morphology, elemental composition, chemical structure and hydrophilic/hydrophobic properties. The antibacterial properties of these materials were conducted by bacterial inhibition ring test and antibacterial adhesion assay using *E. coli*. The biocompatibility was evaluated by *in vitro* and *in vivo* experiments. **Results** SEM indicated that there was no obvious difference in the surface morphology of silicone rubber with different doses or without silver ion implantation. XPS showed that the silver ions were injected in the surface of silicone rubber but the content of silver ions had no change with the different doses of silver implantation. FTIR indicated that there was no obvious change in organic functional groups on the surface of 4 kinds of silicone rubber. Ion implantation significant reduced water contact angle with the increase of silver doses,

[基金项目] 重庆市创新青年科技人才培养项目(cstc2013kjrc-qnrc0075)
[通信作者] 张一鸣,电话:(023)68774196, E-mail: zympla@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150722.0956.013.html(2015-07-22)

indicating a trend of hydrophobic property of silicone rubber. The bacterial inhibition ring test showed that the diameter of inhibition ring is over 7 mm in the silver ion implanted silicone rubber, showing antibacterial activity. The antibacterial adhesion assay indicated that the silver ion implanted silicone rubber have decreased bacterial adhesion. The *in vitro* and *in vivo* experiments suggested the silver ion implanted silicone rubber had good biocompatibility. **Conclusion** The silver ion implantation can achieve a new material with good surface properties and increased antibacterial property.

[**Key words**] silicone rubber; ion implantation; silver ion; surface modification; antibacterial property; biocompatibility

Supported by the Culturing Project for Innovative Young Scientific Talents of Chongqing (CSTC2013kjrc-qnrc0075). Corresponding author: Zhang Yiming, Tel: 86-23-68774196, E-mail: zympla@sina.com

硅橡胶(silicone rubber, SR)因其良好的理化稳定性和生理惰性,能在体内较长期的植入,能耐受组织液腐蚀,不被机体代谢、吸收和降解以及低成本性而在生物医学上得到广泛应用[1],尤其作为填充材料应用于整形外科领域。但因其表面呈现出较强的疏水性,使其与组织和细胞黏附性较差,作为填充材料植入体内后,组织不能长入而在周围形成包膜,其后易随时间增厚、挛缩,导致植入材料移位、变形。此外,还容易引起细菌黏附,造成临床或亚临床感染的发生[2],给患者造成经济及身心的极大痛苦。

增强硅橡胶等软组织填充材料的生物相容性及抗菌性已经引起诸多研究者的关注。前期研究发现,离子表面注入技术可以改变材料表面亲/疏水性以此提高材料的细胞及组织相容性[3-6],同时也能降低细菌的黏附性进而起到抗菌的作用[7]。银离子是一种重金属离子,但因其广谱抗菌性、不易降解且较其他金属离子对身体的危害小等优点而作为抗菌剂受到广泛的应用[8]。当前已有将银离子注入生物材料并显著提高了材料抗菌性的相关报道[9-10]。基于上述研究背景,本研究采用银离子注入技术对硅橡胶进行表面改性,并采用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、X射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、傅里叶红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)以及水接触角对改性硅橡胶表面形貌、元素组成、化学结构以及亲/疏水性进行了分析,并对改性前后材料表面的抗菌性以及生物相容性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

硅橡胶由成都晨光化工研究院提供的双组分医用液体硅橡胶配置。所需要的仪器:高能离子注入机(核工业西南物理研究院,中国); AMRAY1000-B20KV扫描电镜(Amray公司,美国);470型傅里叶红外光谱仪(Thermo Nicolet公司,美国);Escalab250型X射线光电子能谱仪(Thermo Electron公司,美国);DSA100型接触角测定仪(汉堡市KRUSS公司,德国)以及SC7640型高精度喷金喷碳仪(上海易微信息科技有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 普通硅橡胶(SR)和银离子改性硅橡胶(Ag-SR)的制备 在室温条件下,将双组分医用液体硅橡胶等比例混合后注入预先制备好的金属模具(100 mm×100 mm×0.5 mm)中,其后将金属模具置于真空泵中抽真空30 min以去除液体硅橡胶中的气泡,待室温下硫化后选择表面光滑,完整无缺陷的SR片进行离子注入操作。

离子注入于高能离子注入机内进行,选择的离子注入条件为:束流密度0.6 mA/cm^2,离子能量10 keV,残余气压小于1×10^{-4} Pa,分别注入剂量为3×10^{15}、1×10^{16}、3×10^{16} ion/cm^{2}的银离子,其后标记为Ag1-SR、Ag2-SR以及Ag3-SR,普通硅橡胶无银离子注入标记为SR。

1.2.2 材料表征

1.2.2.1 表征样品准备 将4种材料(SR、Ag1-SR、Ag2-SR以及Ag3-SR)分别用打孔器剪成直径为8 mm的圆形小片,并将其加工为7 mm后置于无水乙醇中清洗干净,干燥备用。

1.2.2.2 SEM 将干净干燥的4种样品采用高精度喷金喷碳仪对其进行喷金镀膜操作,待冷却后置于扫描电镜中观察表面形貌。

1.2.2.3 XPS 将清洗干净的4种样品置于X射线光电子能谱仪中,采用Al Kα射线辐射样品,然后按动能收集从样品中发射的光电子,以此给出光电子能谱图。并以此对材料表面化学元素含量进行分析。

1.2.2.4 FTIR 将干净干燥的样品置于傅里叶红外光谱仪中,波数设定为4 cm^{-1},扫描范围为400 ~

4 000 cm^{-1},通过光谱采集对样品材料的表面成分进行测定。

1.2.2.4 接触角 采用DSA100型接触角测定仪对制备好的样品材料进行接触角检测,所选用的检测液体为蒸馏水。测量样品接触角时,均选取样品的6个不同部位进行测量,每点测量至少3次。

1.2.3 抗菌性能检测

1.2.3.1 细菌培养及样品准备 抗菌性实验选用的细菌为大肠杆菌ATCC 25922菌株。在实验前将细菌复苏,并在37 ℃下于琼脂平板上培养24 h,其后将平板置于4 ℃冰箱中备用。每次实验将挑选1个菌落于TSB培养基中培养24 h。其后将菌悬液参照Mc-Farland标准用0.9%的无菌生理盐水稀释至终浓度1.5×10^6 CFU/mL。所有材料在实验前浸于75%酒精中过夜后用无菌生理盐水清洗,干燥后备用。

1.2.3.2 抑菌圈实验 实验方法及测定主要参照中华人民共和国卫生部发布的《医疗机构消毒技术规范》(2012版)中抗(抑)菌实验评价规定,抑菌作用的判断:抑菌环直径>7 mm者,判为有抑菌作用;抑菌环直径≤7 mm者,判为无抑菌作用。操作时无菌棉拭子将配置好的菌悬液均匀涂抹于琼脂平板上,再将待测材料置于涂有菌液的平板内。其后将平板置于37 ℃孵箱培养24~48 h,观察并计量抑菌环直径大小。实验进行6次。

1.2.3.3 黏附性实验 将4种材料分别置于配置好的菌悬液中培育24 h,取出材料用无菌生理盐水轻洗材料表面未黏附的细菌,其后将材料放置于1 mL EP管中加入0.8 mL无菌生理盐水于超声震荡仪上震荡5 min,再将生理盐水涂抹琼脂平板上于孵箱中培养24 h。实验进行6次,观察并记录菌落数。采用SR作为对照组,Ag1~3作为实验组,按公式计算抗细菌黏附率。

抗细菌黏附率=(对照组菌落数-实验组菌落数)/对照组菌落数×100%

1.2.4 生物相容性评价

1.2.4.1 细胞增殖检测 采用文件打孔器将4种材料裁剪成96孔板孔径大小的小圆片,消毒后置于孔板里,每组材料设置6组复孔,以SR作为对照,在材料上加入100 μL预先配置好的密度为4×10^4/mL的细胞悬液,并将其置于37 ℃,5% CO_2的培养箱培养48 h。加入CCK-8工作液,继续培养1 h后用酶标仪在450 nm波长处检测各孔光密度值[$D(450)$]。

1.2.4.2 体内植入实验 参照《医疗器械生物学评价》第6部分:植入后局部反应实验(GB/T 16886.10-2005/ISO 10993-10:2002)。16只SD大鼠分为4组,将材料剪切成10 mm×10 mm大小消毒后,植入大鼠背部,分别于术后7、30、90、180 d完整取出材料周围组织,冰冻切片,苏木精-伊红(HE)染色。光镜下观察炎症及相关细胞情况。

1.3 统计学分析

接触角、抑菌环直径以及抗细菌黏附率均以$\bar{x}\pm s$表示。使用SPSS 18.0统计软件进行单因素方差分析和Tukey显著性检验。

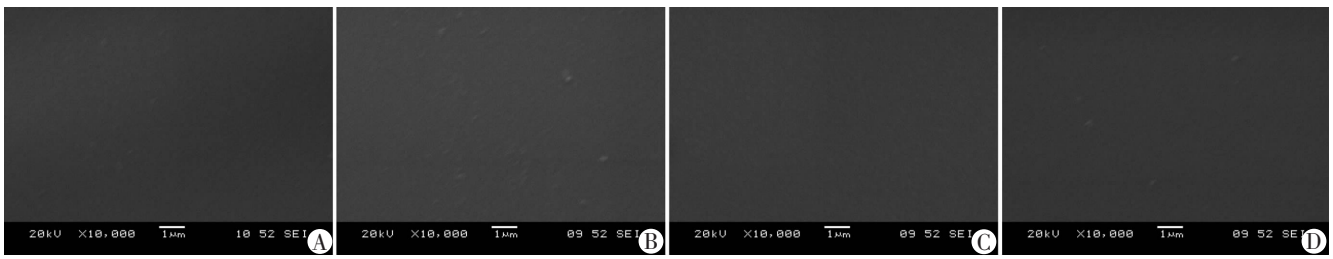
2 结果

2.1 表征结果

采用SEM,将材料表面放大10 000倍后观察发现4种材料表面均光滑整洁,结构上无明显差异(图1)。XPS结果显示波峰有明显变化(图2),银离子已注入表面,但表面银离子含量不随银离子注入剂量的增加而增大(表1)。傅里叶红外光谱分析发现4种材料表面有机官能团的结构无太大差异(图3)。水接触角数据显示,银离子注入硅橡胶水接触角逐渐变小,Ag2-SR和Ag3-SR与SR相比变化显著($P<0.05$,图4)。

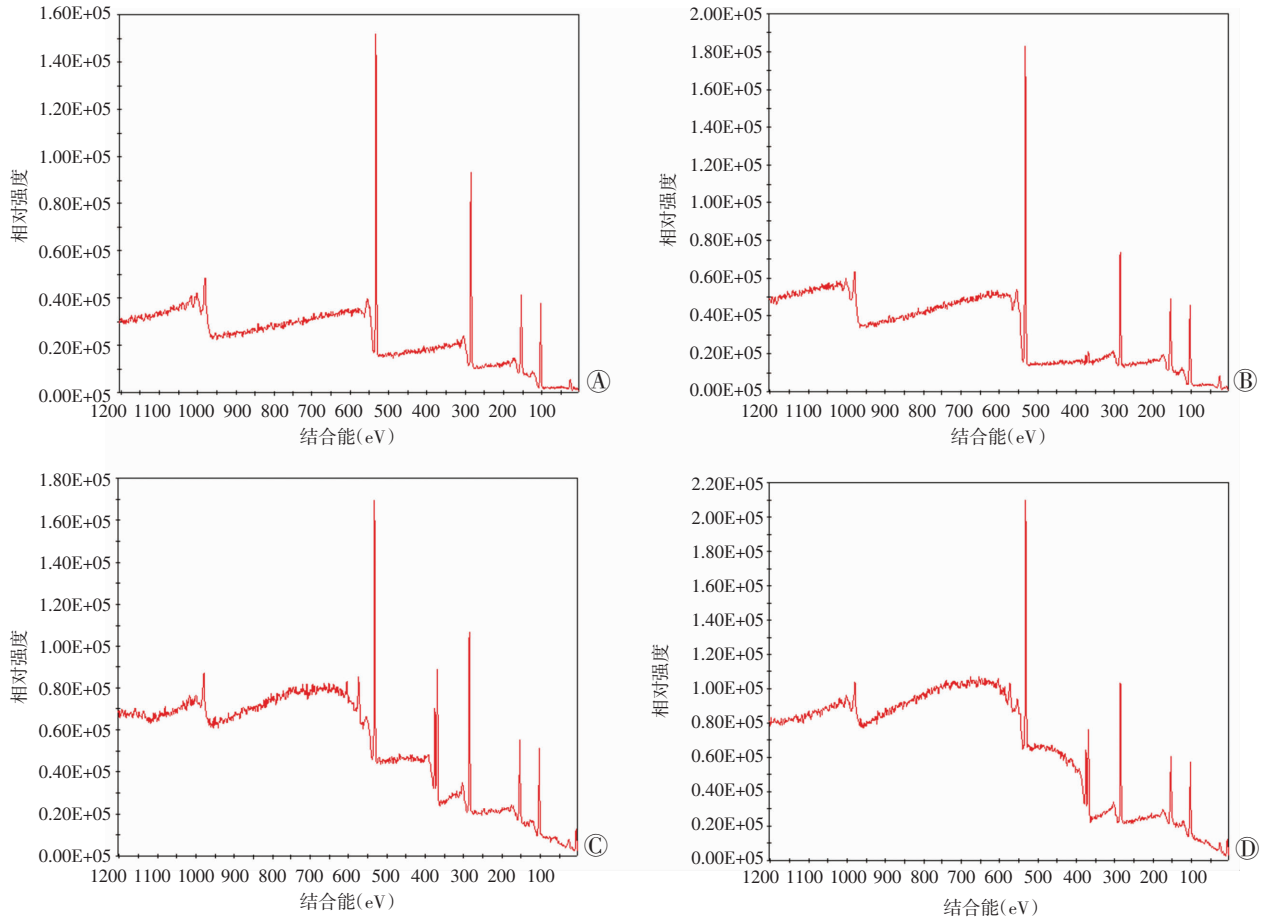
表1 普通硅橡胶与银离子硅橡胶表面元素含量(%)

材料	C1s	O1s	Si2p+Si2s	Ag3d
SR	28.70	43.06	28.24	0.00
Ag1-SR	32.16	36.21	31.33	0.30
Ag2-SR	45.07	23.68	28.22	3.03
Ag3-SR	40.79	27.75	28.86	2.60



A:SR;B:Ag1-SR;C:Ag2-SR;D:Ag3-SR

图1 普通硅橡胶与银离子硅橡胶SEM表面形貌比较



A:SR;B:Ag1-SR;C:Ag2-SR;D:Ag3-SR

图 2　普通硅橡胶与银离子硅橡胶 XPS 能谱图

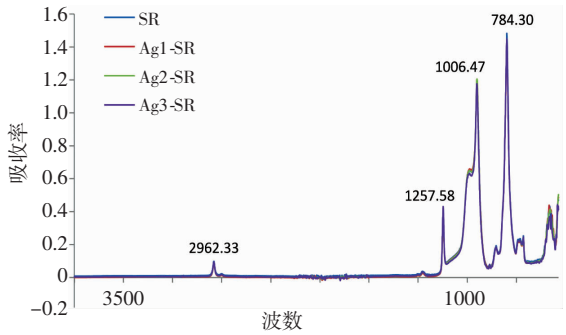
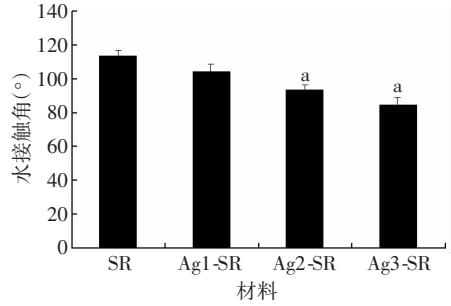


图 3　普通硅橡胶与银离子硅橡胶傅里叶红外光谱图



a:$P<0.05$,与 SR 比较

图 4　普通硅橡胶与银离子硅橡胶水接触角比较

2.2　抗菌性能

2.2.1　抑菌圈实验　　实验结果显示,普通硅橡胶 SR 和银离子注入改性硅橡胶 Ag1-SR 对大肠杆菌无抗菌活性,无抑菌环呈现。银离子注入改性硅橡胶 Ag2-SR 和 Ag3-SR 对大肠杆菌呈现出抗菌活性,有抑菌环出现,具有明显的抗菌作用(图 5)。Ag2、Ag3 抑菌环直径达到(12 ± 2)、(10 ± 1)mm,符合《医疗机构消毒技术规范》(2012 版)中抗(抑)菌实验抑菌标准。

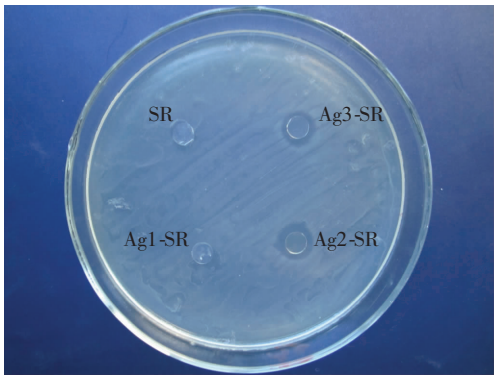
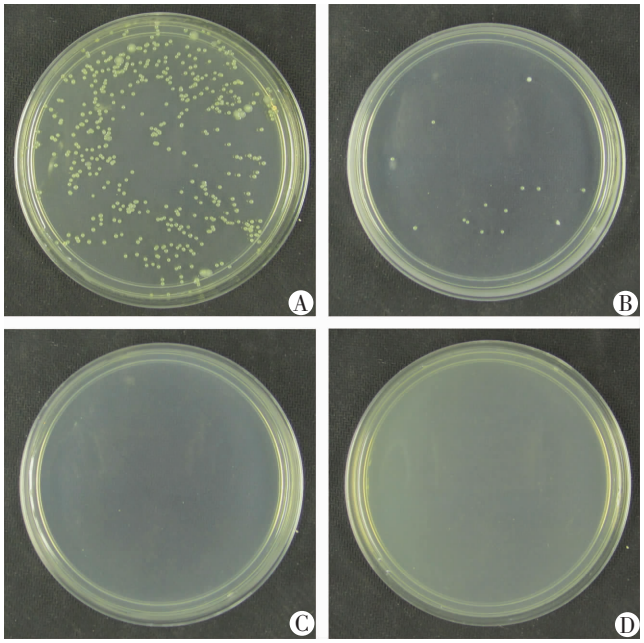


图 5　普通硅橡胶与银离子硅橡胶抑菌环

2.2.2 细菌黏附性实验 4种材料细菌培养情况见图6,从中可见,银离子注入改性硅橡胶表面几乎无细菌黏附,呈现出明显较强的抗细菌黏附性能。3种银离子硅橡胶Ag1-SR、Ag2-SR以及Ag3-SR抗细菌黏附率分别为(99.2±0.4)%、(100±0)%以及(100±0)%,银离子注入改性硅橡胶具有明显抗菌性,且Ag2-SR及Ag3-SR抗菌能力达到100%。

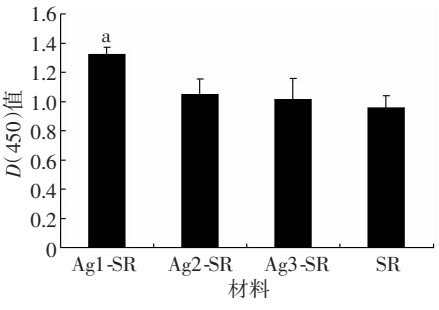


A:SR;B:Ag1-SR;C:Ag2-SR;D:Ag3-SR

图6 普通硅橡胶与银离子硅橡胶细菌黏附性比较

2.3 生物相容性评价

2.3.1 细胞增殖能力比较 从细胞增殖能力来看,Ag1-SR上的细胞增殖能力明显较SR好($P<0.05$,图7),Ag2-SR及Ag3-SR与SR上细胞增殖能力相当,但银离子硅橡胶上细胞增殖能力随着注入银离子剂量加大而呈现出逐渐降低的趋势。



a:$P<0.05$,与SR比较

图7 4种材料表面细胞增殖能力比较

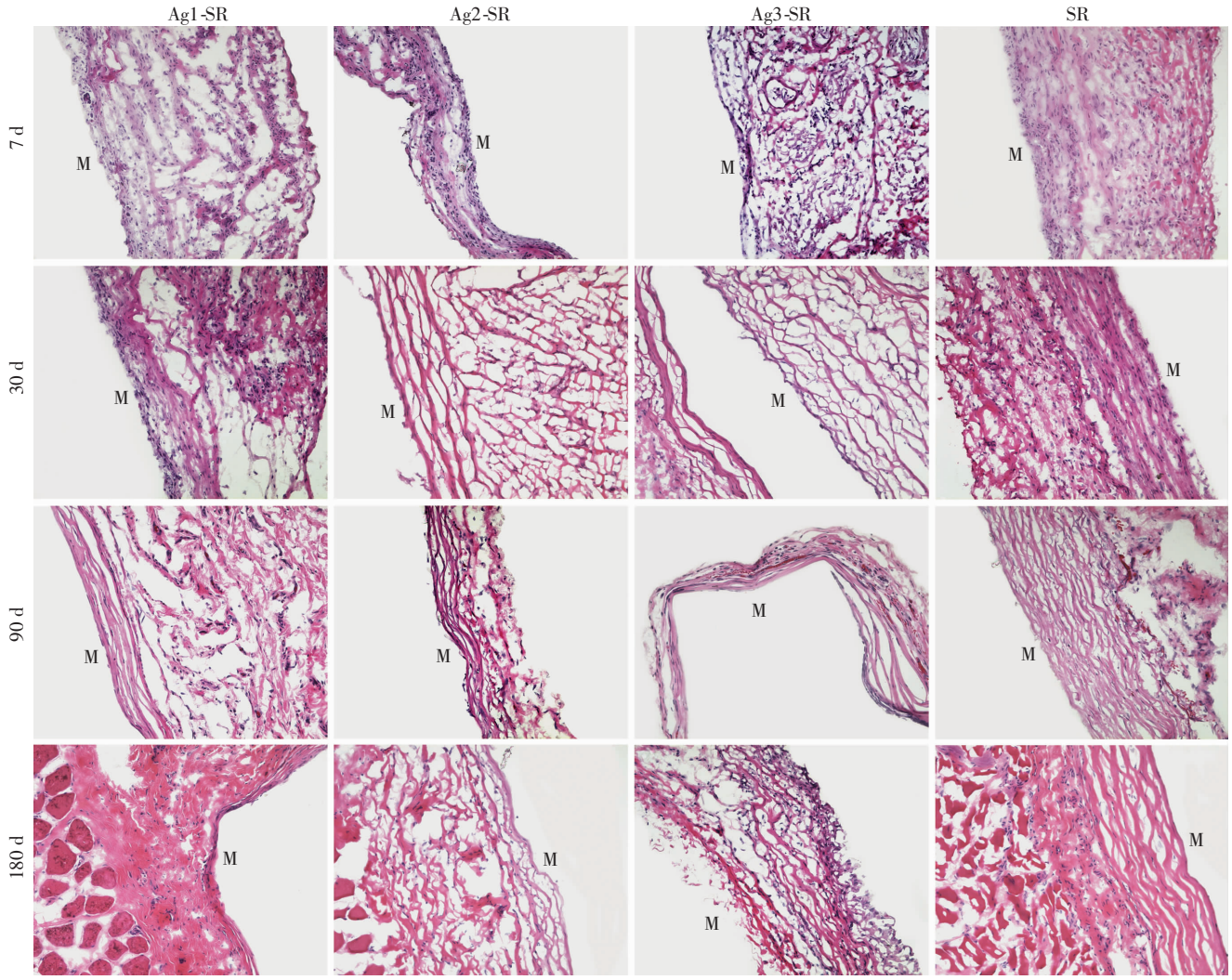
2.3.2 体内植入实验 将4种材料植入大鼠体内后,大鼠生命体征平稳,未出现死亡,术后伤口恢复良好。HE染色结果(图8)显示,7 d各组材料均呈现较重的炎症反应,其后均趋于平缓。Ag1-SR于90 d时炎症细胞明显减少,且和SR相比具有相对较薄的包膜组织,Ag2-SR及Ag3-SR也呈现出较薄的包膜组织,但具有相对较重的炎症细胞。

3 讨论

硅橡胶因其优良的理化性能、生理惰性,能在体内较长期的植入,能耐受组织液腐蚀,不被机体代谢、吸收和降解,非磁性、易于加工、消毒以及低成本性而在生物医学上尤其是在整形领域得到广泛应用[11-12]。作为整形领域的植入材料,硅橡胶通常都需要和人体内部组织相接触,但因硅橡胶自身较强的疏水性等因素,使其与组织和细胞的相容性较差,容易在材料与组织之间形成缝隙,这使得细菌可通过各种途径入侵,引发感染。此外,硅橡胶表面的疏水性等特征使得细菌也易于黏附,更容易引发感染[13]。因此,提高硅橡胶的生物相容性以及抗细菌黏附性能,降低感染的发生率,为患者减轻痛苦显得尤为重要。

在当前有机材料改性技术中,较多采用等离子体处理、接枝共聚以及仿生涂层等方法与技术[14-17],但均存在一定的缺陷。如等离子体处理后,材料表面形成的极性基团容易翻转进入体相,改性效果会随时间渐渐衰退[15];接枝共聚法通过化学反应,使聚合物表面活化,再引入特定基团,形成的表面基团不稳定且步骤繁琐;仿生涂层在不改变材料表面性质的基础上,通过喷涂、溅射等方法在其上覆盖一层具有生物活性的物质,也存在条件不易控制和步骤繁琐等问题且制作成本还相对高昂[17]。据此,寻求一种简单、高效、实用、可行的改性方法就显得尤为重要。离子注入技术主要用于金属以及半导体等材料改性,该方法能控制基材温度,可选择多种离子源,同时表面的改性不影响材料本体的性质[18]。结合硅橡胶优良的本体性质,采用离子注入技术对其表面亲/疏水性等改性以此提高硅橡胶生物相容性以及抗细菌黏附性能呈现出极大的研究价值。由于银离子具有广谱抗菌性、不易降解、较其他金属离子对身体的危害小等优点[8],选择其作为离子源对硅橡胶进行改性具有更大的应用前景。

本研究采用SEM、XPS、FTIR以及接触角检测等方法对银离子注入改性硅橡胶进行表征,并采用抑菌环实验、抗黏附性实验对其抗菌性能以及体内及体外实验对生物相容性进行了初步研究。从SEM结果来看,银离子注入硅橡胶和普通硅橡胶相比其表面形貌并无太大变化(图1),表面可能仅仅是更加微观程度



M:材料植入点

图 8　4 种材料植入大鼠背部皮下不同时间后材料周围组织学变化　(HE ×200)

上的改变。这和碳离子注入结果具有极大的相似性[6],也需要进一步的原子力显微镜来进行检测。XPS 结果显示银离子均已注入材料表面(表 1)但表面含量不随注入剂量的增加而加大。FTIR 结果也均无太大差异,也说明银离子注入技术不改变硅橡胶有机官能团的结构。此外,水接触角结果显示,银离子注入技术已明显改变硅橡胶表面亲疏水性,随着银离子注入剂量的提高而呈现出接触角降低、并向着亲水性改变的趋势。文献[19]表明,离子注入技术可改变材料表面的粗糙度以此对材料表面微特征产生影响。据此,硅橡胶亲疏水性的改变可能和银离子硅橡胶原子层面的粗糙程度变化有关,粗糙度的提升使得银离子硅橡胶向着亲水性方向变化。从抑菌环结果来看,Ag2-SR 与 Ag3-SR 具有明显的抑菌效果,抑菌环的直径均 >7 mm,符合国家标准中关于抑菌性的要求,也表明银离子起到了明显的杀菌作用(图 5)。抗细菌黏附性实验结果显示,银离子注入改性硅橡胶抗细菌黏附性几乎近 100%,结合抑菌环实验结果,也可能是银离子的杀菌作用和材料表面亲疏水性改变的共同结果。此外,生物相容性评价结果显示,Ag1-SR 具有较好的生物相容性,但 Ag2-SR 及 Ag3-SR 是否因银离子注入剂量过大而呈现出细胞增殖能力减弱以及体内炎症及组织异样还有待进一步观察研究。

综上所述,可以看出银离子改性硅橡胶符合整形材料中表面性能以及抗菌性能上的要求,具有极大的研究价值和临床应用前景。此外,本研究仅初步探讨了银离子注入硅橡胶的制备及其抗菌性能及生物相容性,但关于该材料的抗菌性及生物相容性提高的机制

等还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Liu P, Chen Q, Yuan B, *et al*. Facile surface modification of silicone rubber with zwitterionic polymers for improving blood compatibility[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013, 33(7): 3865－3874.

[2] Kaali P, Stromberg E, Aune R E, *et al*. Antimicrobial properties of Ag + loaded zeolite polyester polyurethane and silicone rubber and long-term properties after exposure to in-vitro ageing[J]. Polym Degrad Stab, 2010, 95(9): 1456－1465.

[3] Wang S L, Shi X H, Yang Z, *et al*. Osteopontin (OPN) is an important protein to mediate improvements in the biocompatibility of C ion-implanted silicone rubber[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98320.

[4] Ishikawa J, Tsuji H, Sato H, *et al*. Ion implantation of negative ions for cell growth manipulation and nervous system repair[J]. Surf Coat Technol, 2007, 201(19/20): 8083－8090.

[5] Tsuji H, Sommani P, Kitamura T, *et al*. Nerve-cell attachment properties of polystyrene and silicone rubber modified by carbon negative-ion implantation[J]. Surf Coat Technol, 2007, 201(19/20): 8123－8126.

[6] 杨芷，沈丽如，石小花，等. 碳离子硅橡胶改性材料的表面性能检测及其细胞相容性评价[J]. 第三军医大学学报，2013，35(2)：123－126.

[7] Price C, Waters M G, Williams D W, *et al*. Surface modification of an experimental silicone rubber aimed at reducing initial candidal adhesion[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 63(2): 122－128.

[8] 刘志军，肖勇，马骐，等. 抗菌材料的应用及发展展望[J]. 江西化工，2002(4)：35－37.

[9] 李建新，王进，沈丽如，等. 银离子注入表面改性涤纶材料的抗菌性能研究[J]. 真空科学与技术学报，2006，26(5)：408－411.

[10] 唐慧琴，郑津辉，刘桐，等. 银离子注入热解碳的抗菌性研究[J]. 真空科学与技术学报. 2006，26(2)：93－97.

[11] Aziz T, Waters M, Jagger R. Analysis of the properties of silicone rubber maxillofacial prosthetic materials[J]. J Dent, 2003, 31(1): 67－74.

[12] Keyf F. Change in a maxillo-facial prosthesis material effecting from environmental factors: a clinical report[J]. J Biomater Appl, 2002, 16(4): 259－266.

[13] 孙复钱，曾国屏，邓朝阳. 生物医用抗菌性硅橡胶材料的研究进展[J]. 高分子通报，2012(5)：61－69.

[14] 倪克钒. 抗菌型有机硅橡胶在医疗领域中的应用[J]. 中国医疗器械信息，2009，15(11)：20－22.

[15] Ren T B, Weigel T, Groth T, *et al*. Microwave plasma surface modification of silicone elastomer with Allylamine for improvement of biocompatibility[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 86(1): 209－219.

[16] Doro F G, Rodrigues-Filho U P, Tfouni E. A regenerable ruthenium tetraammine nitrosyl complex immobilized on a modified silica gel surface: preparation and studies of nitric oxide release and nitrite-to-NO conversion[J]. J Colloid Interface Sci, 2007, 307(2): 405－417.

[17] Zhang Y M, Wang S L, Lei Z Y, *et al*. Mechanical and biological evaluations of beta-tricalcium phosphate/silicone rubber composite as a novel soft-tissue implant[J]. Aesthetic Plast Surg, 2009, 33(5): 760－769.

[18] Nosworthy N J, McKenzie D R, Bilek M M. A new surface for immobilizing and maintaining the function of enzymes in a freeze-dried state[J]. Biomacromolecules, 2009, 10(9): 2577－2583.

[19] Suzuki Y, Kusakabe M, Iwaki M, *et al*. Surface modification of silicone rubber by ion implantation[J]. Nucl Instrum Methods Phys Res B, 1988, 32(1/4): 120－124.

（**收稿**：2014-11-10；**修回**：2015-01-27）

（编辑　王小寒）