

负载金属离子的 5A 沸石的体外抗菌实验

吕小星 陈绍宗[△] 李学拥 赵聪颖 赵雨千 雷战军

(第四军医大学唐都医院整形烧伤外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的 探讨负载金属离子的 5A 沸石的体外抗菌作用。方法 选用金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌 利用倍比稀释法对 5A 沸石组、磺胺嘧啶银组及载不同浓度 Ag^+ 、 Zn^{2+} 5A 沸石共 15 组进行了体外抗菌试验研究,确定最佳抗菌效果离子负载方案。结果 三种细菌的 MIC 双金属离子负载在抗菌上具有协同载 Ag^+ 5A 沸石分别达到了 125 $\mu\text{g/ml}$ ~500 $\mu\text{g/ml}$ 、31.25 $\mu\text{g/ml}$ ~500 $\mu\text{g/ml}$ 、250 $\mu\text{g/ml}$ ~500 $\mu\text{g/ml}$ 附载 Zn^{2+} 5A 沸石分别达到了 12.5mg/ml~25mg/ml、6.25mg/ml~50mg/ml、25mg/ml 负载双离子 5A 沸石分别为 250 $\mu\text{g/ml}$ ~500 $\mu\text{g/ml}$ 、62.5 $\mu\text{g/ml}$ ~500 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 。结论 5A 沸石负载金属离子后均具有抗菌作用,且抗菌作用与附载金属离子的量正相关,负载相同质量 Ag^+ 的 5A 沸石较附载 Zn^{2+} 者具有更强的抗菌作用,双金属离子负载在抗菌上具有协同作用,2% Ag^+ +8% Zn^{2+} 与 2% Ag^+ +10% Zn^{2+} 及 4%载银组与阳性对照组无显著性差异。

关键词 5A 沸石;止血剂;抗菌;MIC

中图分类号:R282.76 R285.5 R973.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)09-1688-03

Study on Antibacterial Ability of the New Type of Hemostat for Combat Injury in Vivo

LV Xiao-xing, CHEN Shao-zong[△], LI Xue-yong, ZHAO Cong-ying, ZHAO Yu-qian, LEI Zhan-jun

(Department of plastic and burns surgery, Tang Du Hospital, Fourth Military Medical University 710038, Shanxi, Xi'an China)

ABSTRACT Objective: To explore the 5A zeolite load metal ions in vitro antibacterial action. **Methods:** Select staphylococcus aureus, the pseudomonas aeruginosa, candida albicans, use times than dilution method to study the vitro antibacterial experiment on 5A zeolite group, sulfonamides silver group, and altogether 15 groups which bases loaded with different concentrations Ag^+ , Zn^{2+} , 5A zeolite. In the end we determine the optimal antibacterial effect ion load scheme. **Results:** These three kinds of bacteria in the MIC, loaded with Ag^+ , 5A zeolite respectively reached 125mg/ml ~ 500mg/ml, 31.25 mg/ml ~ 500mg/ml, 250mg/ml ~ 500mg/ml and loaded with Zn^{2+} 5A zeolite respectively reached 12.5 mg/ml ~ 25mg/ml, 6.25 mg/ml ~ 50mg/ml, 25mg/ml, loaded with double ion 5A zeolite respectively reached 250mg/ml ~ 500mg/ml, 62.5mg/ml~500mg/ml, 500mg/ml. **Conclusion:** 5A zeolite loaded with metal ions all have the antibacterial effect, and the amount that the antibacterial action is positive correlation with the metal ions'amount. Loaded with the same quality of 5A zeolite Ag^+ has a stronger antibacterial action than those loaded with Zn^{2+} . Dual metal ions loaded material has a collaborative effect in antibacterial property. Meanwhile, 2% Ag^+ + 8% Zn^{2+} , 2% Ag^+ + 10% Zn^{2+} with 4% silver group have no significant differences from the positive control group.

Key word: 5A zeolite; hemostat; antibacterial; MIC

Chinese Library Classification(CLC): R282.76, R285.5, R973.1 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)09-1688-03

5A 沸石是我课题组研发的新型战伤急救止血剂中的主要成分,单纯 5A 沸石具有良好的止血作用^[1-2],但在止血同时放出的水合热足以造成局部组织热损伤。蒋立^[3]等通过 5A 沸石负载金属离子 Ag^+ 、 Zn^{2+} 后解决了这一问题。而 Ag^+ 、 Zn^{2+} 已证实具有明确的抗菌作用^[4-10],当其负载到 5A 沸石上时是否还具有抗菌作用?本实验将通过体外抗菌实验对负载 Ag^+ 、 Zn^{2+} 的 5A 沸石的抗菌作用进行研究,并最终确定金属离子的最佳负载比例。

1 材料与仪器

1.1 材料

作者简介:吕小星,男,医学博士,主治医师,电话:13991364742, E-mail:lvxiaoxing01@126.com

[△]通讯作者:陈绍宗,教授,博士生导师

(收稿日期:2011-02-12 接受日期:2011-03-10)

5A 沸石(国药集团化学试剂有限公司,球状,粒径 3~5mm,抗压强度 20~80N,水吸附量 $\geq 21\%$)、金黄色葡萄球菌(ATcc25925 本院检验科提供)、铜绿假单胞菌(ATCC27853 本院检验科提供)、白色念珠菌(ATCC10231 本院检验科提供);营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、沙氏琼脂培养基、细菌培养箱、培养皿、试管、接种环、SHY-100A 水浴恒温培养摇床、载不同量金属离子的 5A 沸石。

1.2 方法

实验分为 15 组。单纯 5A 沸石组(阴性对照)、磺胺嘧啶银组(阳性对照)、不同金属离子载量沸石组(实验组)即:附载 Ag^+ 质量百分比分别为 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0%的 5A 沸石;附载 Zn^{2+} 质量百分比分别为 1.0%、2.0%、4.0%、8.0%的 5A 沸石;附载 1% Ag^+ +8% Zn^{2+} 的 5A 沸石;附载 1% Ag^+ +10% Zn^{2+} 的 5A 沸石;附载 2% Ag^+ +5% Zn^{2+} 的 5A 沸石;附载 2% Ag^+ +10% Zn^{2+} 的 5A 沸石;

将 5A 沸石粉碎,过 4000 目筛后取粉末状沸石待用。取菌培养管 6 支,依次编为 0~5 号,予 0 号管加入 10 ml 肉汤培养基,1~5 号管加入 5 ml 肉汤培养基。取 10mg 之粉末状沸石混悬于 0 号管内,即得 1000μg/ml 之沸石培养基。按照倍比稀释法 1-5 号试管沸石培养基浓度分别为:500μg/ml、250μg/ml、125μg/ml、62.5μg/ml、31.25μg/ml。于 1~5 号管内均加入 5ml 含细菌 2×10^5 个细菌的培养基后,37 摄氏度下振荡培养 24 小时。振荡培养 24 小时后取出菌培养管,分别从 1~5 号管中吸取 0.1ml 培养液均匀涂布于 8cm 直径的培养皿(已布好固体培养基)中,入细菌培养箱培养 24 小时(白色念珠菌为 48 小时)后,

计数培养皿中的菌落数。几号管对应的培养皿中没有菌落,即没有长细菌,几号管中的沸石浓度就是沸石对这种细菌的 MIC。5A 沸石对绿脓杆菌及白色念珠菌的 MIC 重复以上步骤即可。各载金属离子组及阳性对照组重复 5A 沸石组步骤即可,每组重复测量 3 次。

1.3 统计学方法

数据结果以均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 软件行方差分析,取 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

表 1 负载金属离子的 5A 沸石对不同菌种的 MIC
Table 1 MIC of ion exchanged 5A zeolite

	Staphylo coccus au reus			Aerugi- nosas Bacillus			Blasto- muces allicons		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ag-Z (mg/ml) 1%	-	-	-	500	500	500	-	-	-
2%	500	500	500	250	250	250	-	-	-
4%	250	250	250	62.5	62.5	62.5	500	500	500
8%	125	125	125	31.25	31.25	31.25	250	250	250
1%	-	-	-	50	50	50	-	-	-
2%	-	-	-	25	25	25	-	-	-
Zn-Z (mg/ml) 4%	25	25	25	12.5	12.5	12.5	-	-	-
8%	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25	6.25	25	25	25
1%Ag+8%Zn(μg/ml)	-	-	-	500	500	500	-	-	-
1%Ag+8%Zn(μg/ml)	-	-	-	500	500	500	-	-	-
2%Ag+8%Zn(μg/ml)	250	250	250	62.5	62.5	62.5	500	500	500
2%Ag+10%Zn(μg/ml)	250	250	250	62.5	62.5	62.5	500	500	500
Zinc sucfadiazine(μg/ml)	250	250	250	62.5	62.5	62.5	500	500	500

5A 沸石附载 Ag^+ 后对金黄色葡萄球菌、铜绿假单孢菌、白色念珠菌的 MIC 分别达到了 125μg/ml~ 500 μg/ml、31.25μg/ml~ 500μg/ml、250μg/ml~ 500μg/ml;附载 Zn^{2+} 后对金黄色葡萄球菌、铜绿假单孢菌、白色念珠菌的 MIC 分别达到了 12.5mg/ml~25mg/ml、6.25mg/ml~ 50mg/ml、25mg/ml;双离子附载后对金黄色葡萄球菌、铜绿假单孢菌、白色念珠菌的 MIC 分别达到了 250 μg/ml~500 μg/ml、62.5 μg/ml~ 500 μg/ml、500μg/ml。说明 5A 沸石附载金属离子后均具有抗菌作用,且抗菌作用与附载金属离子的量正相关;附载相同质量 Ag^+ 的 5A 沸石较附载 Zn^{2+} 者具有更强的抗菌作用;双金属离子附载在抗菌上具有协同作用;三种细(真)菌对 Ag^+ 、 Zn^{2+} 的敏感性为:铜绿假单孢菌>金黄色葡萄球菌>白色念珠菌。其中仅 2% Ag^+ +8% Zn^{2+} 与 2% Ag^+ +10% Zn^{2+} 及 4%载银组与阳性对照组无显著性差异。

3 讨论

战时火器伤具有以下特点^[1]:①通常是入口小,出口大;②由于弹头或弹片具有较大的冲击力,使伤口及周围组织产生严重损伤;③通常会有异物存留;④致伤物尤其是在地面爆炸的弹片,可以将细菌带入伤口。火器伤的这些特点决定了其必然易于发生感染。所以,急救止血剂如果兼有抗感染性能,将会减少或减轻伤后感染,降低火器伤后期治疗的难度,提高治疗质量从而提高部队的战斗力。

早在数千年前,人们就发现金属器皿所贮存的水、牛奶等不易变质,尤其是银质器皿,但明确将银离子作为一个抗菌剂始于 1884 年^[12-13],德国产科医生 Crede 将 0.2%硝酸银溶液做为一种药物来治疗新生儿结膜炎,使其发生率从 10%降至 0.2%,显示了银离子强大的杀菌作用。银离子的抗菌机理可能和以下

几个方面有关^[14-15]：① Ag^+ 与细菌胞壁内蛋白的N或O结合，破坏了细菌的胞壁的结构，从而使细菌死亡；② Ag^+ 与细菌呼吸链的酶类相结合，抑制了细菌呼吸功能，从而杀死细菌。据报道， Ag^+ 可以作用于细菌呼吸链的细胞色素d和细胞色素b这两个位点之间的区域，阻断细菌的能量产生，引起细菌死亡。③银可以和细菌或细菌芽孢中的DNA结合，置换了嘌呤和嘧啶中相邻氮之间的氢键，导致细菌DNA结构的变性，抑制了DNA复制，使细菌失活。

银(锌)离子不仅杀菌力强，杀菌性持久，无毒副作用，对皮肤、粘膜无刺激性，而且用量很少。上世纪80年代以来，一些学者相继开展复合银、锌、铜及多离子沸石，用作吸附剂、离子交换剂、干燥剂、催化剂和土壤改良剂等。蒋立^[3]等发现，附载银和锌的沸石不仅能减少银的用量，而且会扩大抗菌范围，止血效果也优于单纯复合银者。本研究在以往研究基础上，对银锌双载5A沸石的抗菌功能做了进一步研究。

最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration MIC)是临床常用的一种代表某抗菌药物对细菌敏感程度的指标，测试方法简单，结果可靠。磺胺嘧啶锌是一种创面常用药物，通常制成5%霜剂或乳膏剂用于创面，以达到抑菌，预防创面感染等作用。本实验中将其作为阳性对照药物，与复合金属离子的5A沸石作对比，发现载银离子4%或载银离子2%+锌离子8%的5A沸石的抗菌功能与其相仿，为新型急救止血剂中沸石载金属离子的质和量提供了一定的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Alam HB, Uy GB, Miller D, et al. Comparative analysis of hemostatic agents in a swine model of lethal groin injury [J]. J Trauma, 2003, 54: 1077-1082
- [2] Pusateri AE, Delgado AV, Dick EJ Jr, et al. Application of a granular mineral-based hemostatic agent (QuikClot) to reduce blood loss after grade V liver injury in swine[J]. Trauma, 2004, 57: 555-562
- [3] Li J, Yan W, Jing L, et al. Addition of an alginate to a modified zeolite improves hemostatic performance in a swine model of lethal groin injury[J]. Trauma, 2009, 66(3): 612-620
- [4] Jones V, Grey JE, Harding KG. Wound dressings [J]. BMJ, 2006, 33(44): 777-780
- [5] Karlsmark T, Agerslev R H, Bendz S H. Clinical performance of a new silver dressing, Contreet Foam, for chronic exuding leg ulcers [J]. Wound Care, 2003, (12): 351-354
- [6] Wright J B, Hansen D L, Burrell R E. The comparative efficacy of two antimicrobial barrier dressings: in vitro examination of two controlled release silver dressings [J]. Wounds, 1998, 10 (6): 179-188
- [7] Lansdown A B G, Jensen K, Jensen M Q. Contreet hydrocolloid and

contreet foam: an insight into new silver containing dressings [J]. Wound Care, 2003, 12 (6): 205-210

- [8] Tredgett E E, Shankowski H A, Groeneveld A, et al. A matched 2pair, randomised study evaluating the efficacy and safety of acticoat silver2coated dressing for the treatment of burn wounds[J]. J Burn Care Rehabil, 1998, 19 (6): 531-537
- [9] Thomas S, McCubbin P. An in vitro analysis of the antimicrobial properties of 10 silver2containing dressings [J]. J Wound Care, 2003, 12 (8): 305-308
- [10] Lansdown A B G, Williams A, Chandler S, et al. Silverabsorption and antibacterial efficacy of silver dressings [J]. J Wound Care, 2005, 14 (4): 205-210
- [11] 殷作明, 胡德耀, 李素芝, 等. 高原高寒战时环境猪肢体枪弹伤伤口组织中炎症介质变化的特点. [J] 中华创伤杂志, 2006, 22 (06), 463-465
Yin Zuoming, Li Suzhi, Hu Deyao, et al. Features of tract infections after gunshot wounds of swine's hind limbs in a wartime environment at high altitude [J]. The trauma magazine, 2006, 22 (06): 463-465(In Chinese)
- [12] 马楠, 李君晖, 崔德健, 等. 纳米抗菌塑料的抗菌性能测定[J]. 中国消毒学杂志. 2006, 23(4): 319-321
Ma nan, Li jun-hui, Cui dei-jian, et al. Determination of antimicrobial properties of nanometer antimicrobial plastics[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2006, 23(4): 319-321(In Chinese)
- [13] 侯文生, 张颖, 魏丽乔, 等. 热处理对载银4A沸石抗菌剂结构与性能的影响[J]. 电子显微学报, 2005, 4 (4): 363-363
Hou Wen-sheng, Zhang Ying, et al. Effect of Heat Treatment on Antibacterial Properties of Silver Loaded Zeolite 4A Antibacterial Agent [J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2005, 4 (4): 363-363(In Chinese)
- [14] 何丽新, 赵临远, 崔天顺. 双金属抗菌沸石研究[J]. 非金属矿, 2003, 26 (1): 13-15
He li-xin, Zhao lin-yuan, Cui tian-shun. Development of Antibiotic Zeolite Containing Two Kinds of Metallic Cations [J]. Nonmetallic mine, 2003, 26(1): 13-15(In Chinese)
- [15] Lee JH, Chae JD, Kim DG, Hong SH, Lee WM, Ki M. Comparison of the Efficacies of Silver-Containing Dressing Materials for Treating a Full-Thickness Rodent Wound Infected by Methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Korean J Lab Med, 2010, 30(1): 20-7
- [16] Kasyutich O, Ilari A, Fiorillo A, Tatchev D, Hoell A, Ceci P. Silver ion incorporation and nanoparticle formation inside the cavity of Pyrococcus furiosus ferritin: structural and size-distribution analyses[J]. Am Chem Soc, 2010, 17; 132(10): 3621-7