

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.08.002

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200318.1241.002.html\(2020-03-19\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200318.1241.002.html(2020-03-19))

缓释生长因子羧甲基壳聚糖支架抑菌功能的研究

李 蕾^{1,2}, 林 放², 施琳颖², 周 谋², 许育兵², 李荣娟³, 赵春林⁴, 单桂秋^{1,2△}

(1. 南方医科大学, 广州 510515; 2. 中国人民解放军南部战区总医院输血科, 广州 510010;

3. 广州中医药大学, 广州 510405; 4. 湖南省常德市澧县人民医院检验科 415500)

[摘要] **目的** 制备缓释生长因子的羧甲基壳聚糖支架(PRP/CMCS)并检测其抑菌功能。**方法** 利用冻干技术构建一种富含多种生长因子的 PRP/CMCS, 观察支架的结构, ELISA 法检测生长因子负载率和缓释效果, 并通过抑菌圈试验和糖尿病合并细菌小鼠创面模型验证其抑菌功能。**结果** PRP/CMCS 的孔径在 20~125 μm 的范围内, 孔隙率大于 80%。血管内皮生长因子(VEGF)及血小板衍生生长因子(PDGF)第 1 天的负载率分别为 35.7% 和 4.7%, 体外缓释 7 d 累计释放量分别占总负载率的 48.7% 和 14.6%。抑菌圈试验证明 PRP/CMCS 对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌具有明显抑制作用; 动物实验也证实了其抑菌效果及具有促进难愈创面愈合的功能。**结论** PRP/CMCS 具有稳定的抑菌功能, 可作为一种高效可靠的抗感染促愈合材料。

[关键词] 生长因子; 羧甲基壳聚糖; 支架; 缓释; 抑菌

[中图分类号] R453.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)08-1212-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on antibacterial function of carboxymethyl chitosan scaffold for slow release growth factor

LI Lei^{1,2}, LIN Fang², SHI Linying², ZHOU Mou², XU Yubing²,

LI Rongjuan³, ZHAO Chunlin⁴, SHAN Guiqiu^{1,2△}

(1. Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Department of Blood Transfusion, General Hospital of Southern Theater Command of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 4. Clinical Laboratory, Lixian People's Hospital, Changde, Hunan 415500, China)

[Abstract] **Objective** To get a carboxymethyl chitosan scaffold (PRP/CMCS) for slow-release growth factors and test its antibacterial function. **Methods** A carboxymethyl chitosan scaffold rich in various growth factors was constructed by freeze-drying technology. The structure of the scaffold was detected, the loading rate of growth factors and slow-release effect were detected by ELISA. Inflammation tests of diabetic rats combined with bacterial wound and antibacterial circle test were detected for antibacterial function. **Results** The pore diameter of the PRP/CMCS were in the range of 20—125 μm , and the porosity was more than 80%. The loading rates of VEGF and PDGF growth factors on the first day were 35.7% and 4.7%, respectively, and the cumulative release amount of 7 d sustained-release in vitro accounted for 48.7% and 14.6% of the total loading rate, respectively. The antibacterial circle test proved that the scaffold had obvious inhibitory effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Animal experiments also confirmed its antibacterial effect of promoting healing wounds. **Conclusion** The scaffold has stable bacteriostatic function and can be used as an efficient and reliable anti-infection and pro-healing material.

[Key words] Growth factor; carboxymethyl chitosan; scaffold; sustained release; antibacterial

难愈性创面是由各种因素引起的不能在生理愈合时间范围内按生物学规律完全愈合的创面。难愈性创面易合并微生物感染使创面愈合更加困难。市

面上有多种新型的可溶性材料,但其单一的治疗效果具有局限性^[1]。因此研制出一种具有抑菌及促进创面愈合的可溶性材料,能在医药领域发挥重要的应用价

值。为了解决上述问题,本实验采用真空冷冻干燥技术,制备出富含多种生长因子的羧甲基壳聚糖支架 (PRP/CMCS),现对该支架的抑菌功能进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

羧甲基壳聚糖(脱乙酰度 80%,大连美仑生物技术有限公司),京尼平(纯度大于 98%,上海阿拉丁公司),前列腺素 E1(美国 Sigma 公司),血管内皮生长因子(VEGF)酶联免疫试剂盒(广州 Raybio 公司),血小板衍生生长因子(PDGF)酶联免疫试剂盒(广州 Raybio 公司),大肠埃希菌(暨南大学生物医学工程学院实验室)、金黄色葡萄球菌(暨南大学生物医学工程学院实验室)、琼脂(Solarbio A8350,中国北京)、小鼠成纤维 3T3 细胞(贝奥基因生物有限公司),细胞增殖试剂盒(CCK-8,日本同仁公司),白细胞介素(IL)-6 抗体(ab9324,英国 Abcam 公司),转化生长因子(TGF)- β 3 抗体(ab15537,英国 Abcam 公司),中性树胶(中国上海模型厂)。

1.1.2 仪器

24 孔板(美国 ThermoFisher 公司),48 孔板(美国 ThermoFisher 公司),50 mL 离心管(美国 Corning 公司),Heraeus Cryofuge 600i S/N 大容量冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司),全自动血液细胞分析仪(BC-3000,深圳迈瑞),全自动血液成分分离机(T-ACE II+,日本 TERUMO),低速大容量离心机(TDL-5-A,上海安亭),血小板专用保存袋(山东威高),FREEZONE 6 冻干机(美国 Labconco 公司),电子扫描电镜(LEO1530 VP,荷兰 Philips 公司),SHZB 水浴两用振荡箱(上海悦丰公司),AIRTECH 生物安全柜(苏州安泰空调净化设备有限公司),纯水机(天创净水),W-J3 CO₂ 培养箱(上海跃进医疗器械有限公司),细胞培养瓶、板、皿(美国 BD 公司),牛鲍计数板(上海精进公司),移液枪(德国 Eppendorf 公司),空白平板(美国 ThermFish Scientific 公司),全波长酶标仪(Multiskan Sky,美国 ThermoFisher Scientific 公司),显微镜(BX51,日本 Olympus 公司),组织脱水、包埋、切片机(德国 Leica 公司),56 °C 病理样品烘箱(北京福意联),玻片(广州晶欣公司)。

1.1.3 血小板来源

来自中国人民解放军南部战区总医院血液中心的健康无偿献血者,献血前 3 d 未服用阿司匹林及其类似药物,血液样品均按我国血液检测标准检测合格。

1.1.4 实验动物

BKS.Cg-Dock7m +/+Leprdb/Nju 品系二型糖尿病小鼠 30 只,雌雄各半,6~7 周龄。实验动物许可证号 SYXK(粤)2014-0100,合格证号 3200210000 2159,设施合格证号 00174962。实验动物购自南京大学动物中心,在南部战区总医院实验动物中心进行饲养

及实验,实验符合动物伦理学要求。

1.2 方法

1.2.1 PRP/CMCS 的制备

富血小板血浆 3 000 r/min 离心 20 min 后分离出上清液和血小板层,将上清液保存备用。下层血小板根据离心前计数及体积与目的计数得到加入适当的上清液体积。根据课题组前期实验结果,将 1%~5%不同水平的羧甲基壳聚糖(CMCS)冻干后负载富血小板血浆(PRP)得出支架外观成形性最佳水平为 4%。将 4%羧甲基壳聚糖与 3%、5%、7%、10%不同浓度京尼平交联制备成不同浓度 PRP/CMCS 后测试其支架脆性(拉伸应力中的弹性模量表征),得出最佳支架配比。根据本课题组前期实验结果,PRP 在 $(1\ 000\sim1\ 200)\times10^9/L$ 范围内对细胞生长有促进作用,本实验将 PRP 计数调整为 $1\ 200\times10^9/L$ 后将 PRP 溶液与上述最佳直接配比得到的支架进行冻干得到 PRP/CMCS 支架。

1.2.2 宏观和微观结构观察

采用电子扫描电镜对支架进行扫描,得到其电镜图片。

1.2.3 体外生长因子释放量

将直径约 10 mm 的支架置于 20 mL 无菌生理盐水中,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液即得到浸提液。按照 Raybio 试剂公司的 VEGF 和 PDGF 试剂盒说明书进行操作,检测上述所得浸提液中的生长因子水平。

1.2.4 体外生长因子释放实验

采用 VEGF 及 PDGF 酶联免疫试剂盒,将 PRP/CMCS 放入冻干前等体积生理盐水中进行浸泡,浸泡 24 h 后 3 000 r/min 离心 15 min 留取浸提液按照试剂盒使用说明书进行实验。根据结果计算体外首日释放量及 7 d 累计释放量占总负载量的百分比。

1.2.5 体外抗菌实验

琼脂煮沸溶解后浇板,普通平板中加入约 5 mL 琼脂液先浇注成下层,置室温成型。将剩余液体琼脂与大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌菌液按照 5 mL:20 μ L 的比例分别进行混匀后形成两种带菌琼脂液,加入 5 mL 浇注于上述已成形的平板中制备上层带菌琼脂层。置于室温冷却成形后制成含菌平板。再将 PRP/CMCS 贴于带菌平板上,置于 37 °C 环境中进行培养。24 h 后取出观察,是否出现抑菌圈并测量抑菌圈直径的大小。

1.2.6 细胞毒性实验

将上述支架置于 Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco (DMEM) 培养基中,并按比例加入 0.02 g/mL 溶菌酶加速支架成分的分解以便更好地释放出负载物。浸泡 24 h 后,3 000 r/min 离心 10 min 取上清液得到支架浸提液。3T3 细胞复苏后传代培养,用 CCK-8 检测 PRP/CMCS 浸提液对 3T3 细胞增殖的影响。

1.2.7 糖尿病合并细菌小鼠创面模型的建立

1.2.7.1 糖尿病小鼠创面缺损模型制备

测定血糖当日对成模糖尿病鼠进行难愈性创面造模。所有手术器械均灭菌后使用。在 SPF 级动物实验室进行操作,操作台上铺消毒巾,实验人员佩戴手套、帽子、口罩,将糖尿病小鼠臀部表面皮肤剃毛后乙醇消毒备皮,用皮肤活检取材器为模具在备皮区域用力按下直径约 2 cm 的圆形区域。后用眼科剪按照皮肤活检器按下的圆形区域进行裁剪,去除表面皮肤全层。即在糖尿病鼠臀部形成一直径约 2 cm 的圆形全层皮肤缺损创面。

1.2.7.2 动物抗菌实验

根据实验需要分为两组:空白对照组及 PRP/CMCS 组。为了消除实验动物个体本身带来的差异,本实验每只大鼠皮肤背部造模形成 3 个大小相同的孔后分为空白对照组(不做任何处理)和 PRP/CMCS 组,分别对 3 个创面进行不同处理。期间不予换药,分别在治疗后第 7、14、21 天观察创面大小并观察创面有无细菌感染后脓液形成或其他由细菌感染导致的情况;并每组随机选取 3 个创面进行免疫组织化学染色进一步分析伤口愈合中感染情况。

1.3 免疫组织化学实验

(1)石蜡切片置于 67℃烘箱中,烘片 2 h,脱蜡至水,用 pH 7.4 的 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。(2)取一定量 pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液,加入微波盒中,微波加热至沸腾,将脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料切片架上,放入已沸腾的缓冲液中,中档微波处理 10 min,取出微波盒流水自然冷却,从缓冲液中取出玻片,先用蒸馏水冲洗 2 次,之后用 PBS 冲洗。(3)每张切片加 1 滴 3% H₂O₂,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。(4)除去 PBS 液,每张切片加 1 滴相应的第一抗体(相应稀释倍数),室温下孵育 2 h。(5)PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。除去 PBS 液,每张切片加 1 滴聚合物增强剂,室温下孵育 20 min。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。(6)除去 PBS 液,每张切片加 1 滴酶标抗鼠/兔聚合物,室温下孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。(7)除去 PBS 液,每张切片加 1 滴新鲜配制的二氨基联苯胺液(DAB),显微镜下观察 8 min。(8)苏木素复染,0.1% HCl 分化,自来水冲洗,蓝化,切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,晾干后观察。

1.4 统计学处理

数据处理用 SPSS20.0 软件分析整理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One Way-ANOVA 统计分析,方差齐时用 LSD 方法或方差不齐时用 Welch 校正及 Dunnett T3 方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 支架不同配比脆性比较

根据前期实验结果可知,用 4% CMCS 经不同浓

度(1%、3%、5%、7%、10%)京尼平交联。根据弹性模量结果(图 1)可知,4% CMCS 经 5% 京尼平交联后得到的支架具有最高弹性模量值,且与其他组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

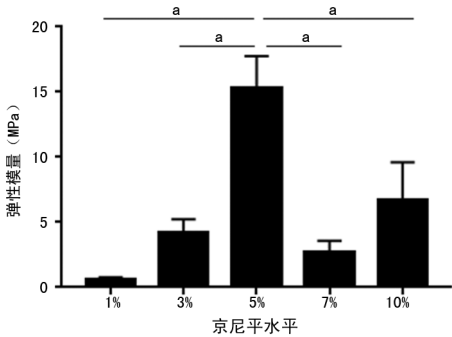


图 1 不同水平京尼平配比支架的弹性模量
^a: $P < 0.05$.

2.2 PRP/CMCS 的结构特征

用扫描电子显微镜扫描后的 PRP/CMCS 形态,支架的孔径在 20~125 μm 的范围内,孔隙率在 80% 以上(图 2)。

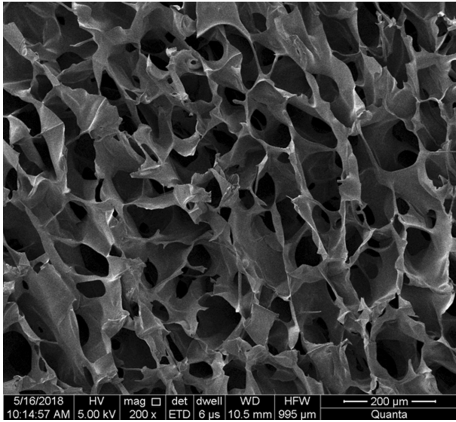


图 2 4% CMCS+5% 京尼平支架扫描电镜图(×200)

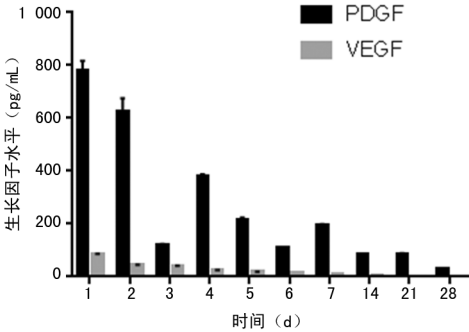


图 3 生长因子水平测定

2.3 VEGF 和 PDGF 的生长因子负载量及体外生长因子释放试验

检测支架浸提液中 VEGF 和 PDGF 水平。由图 3 可知,支架浸提液中生长因子水平明显可见,显示 PRP/CMCS 支架上已负载上生长因子。其中,PDGF 的水平较 VEGF 高。将支架浸提液离心后进行生长因子水平检测,根据结果可知,负载 PRP 后的即 PRP/CMCS 支架中有生长因子的存在,其中 VEGF

第 1 天释放水平为 $(83.20\pm7.75)\text{pg/mL}$,PDGF 第 1 天释放水平为 $(780.54\pm69.93)\text{pg/mL}$ 。VEGF 体外缓释 7 d 累计释放量占总负载率的 48.7%,PDGF 体外缓释 7 d 累计释放量占总负载率的 14.6%。

2.4 体外抑菌实验结果

利用带菌平板进行支架的抑菌性能检测,图中蓝色支架为 PRP/CMCS,周围为抑菌圈大小,抑菌圈直径在 7 mm 左右。中间白色为滤纸空白对照(图 4)。

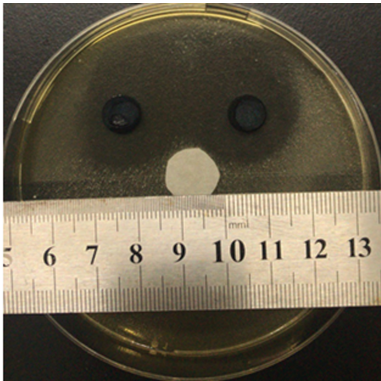


图 4 抑菌圈实验

2.5 细胞毒性实验结果

浸提液培养的细胞与正常培养基培养的细胞状态相似(图 5)。

2.6 动物实验结果

从创面愈合的效果可知,PRP/CMCS 组治疗的创面愈合速度较空白对照组快,与空白对照组相比差

异有统计学意义($P<0.05$)。相对于空白对照组,PRP/CMCS 组在愈合过程中出现的脓液较少,局部愈合创面的红肿情况较空白对照组轻。用 Image J 计算愈合率之后可知,PRP/CMCS 组的愈合趋势优于空白对照组,且差异有统计学意义(图 6、7)。

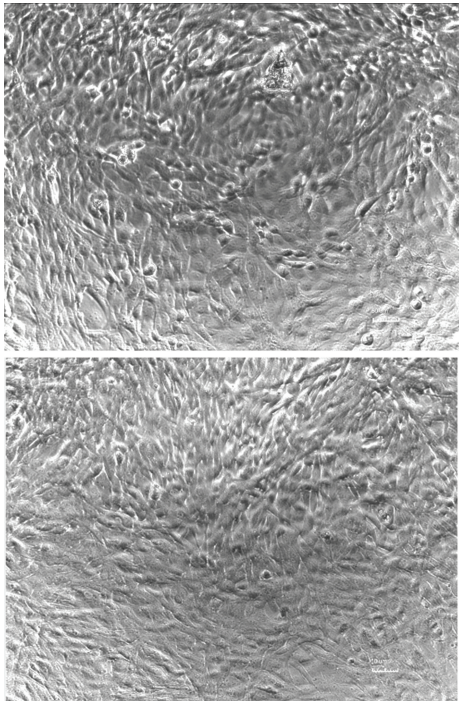


图 5 细胞培养图($\times 200$)

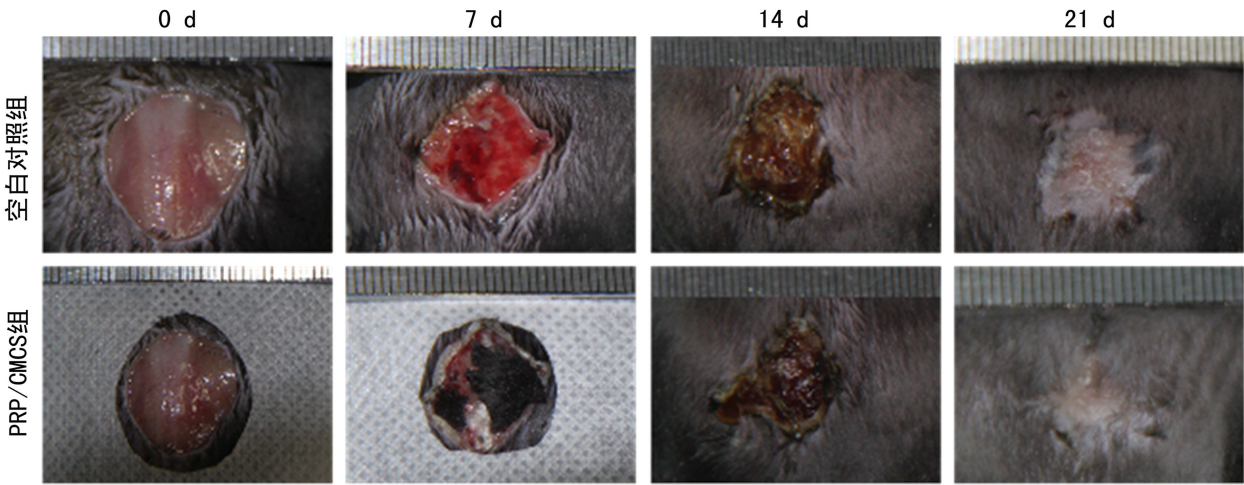


图 6 创面愈合图

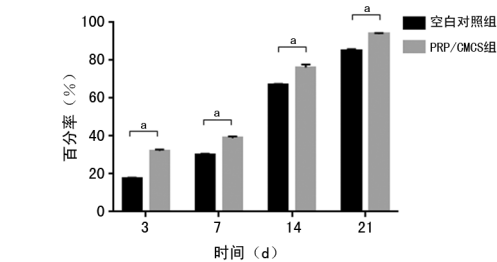


图 7 CCK-8 检测结果

从 IL-6 的免疫组织化学结果得知,IL-6 的阳性表达在创面愈合早期较少,在愈合后期表达较前期明显增加。其中,在愈合早期及晚期,空白对照组 IL-6 的阳性表达率相对于 PRP/CMCS 组较高。从总体趋势上看,PRP/CMCS 组的炎症反应趋势在创面愈合的过程较空白对照组处于较低水平(图 8)。

由 TGF- $\beta 3$ 的免疫组织化学结果得知,在创面愈合过程中,炎症反应中的促炎因子与抑炎因子相辅相成,相互作用于整个创面愈合中的炎症过程。TGF- $\beta 3$

^a: $P<0.05$ 。

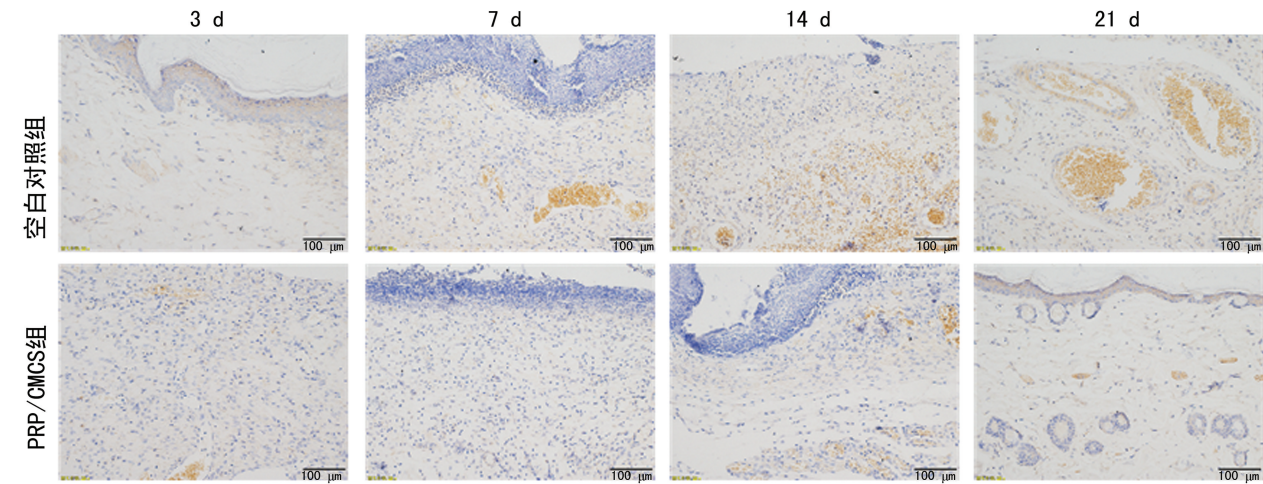


图 8 IL-6 免疫组织化学结果(×200)

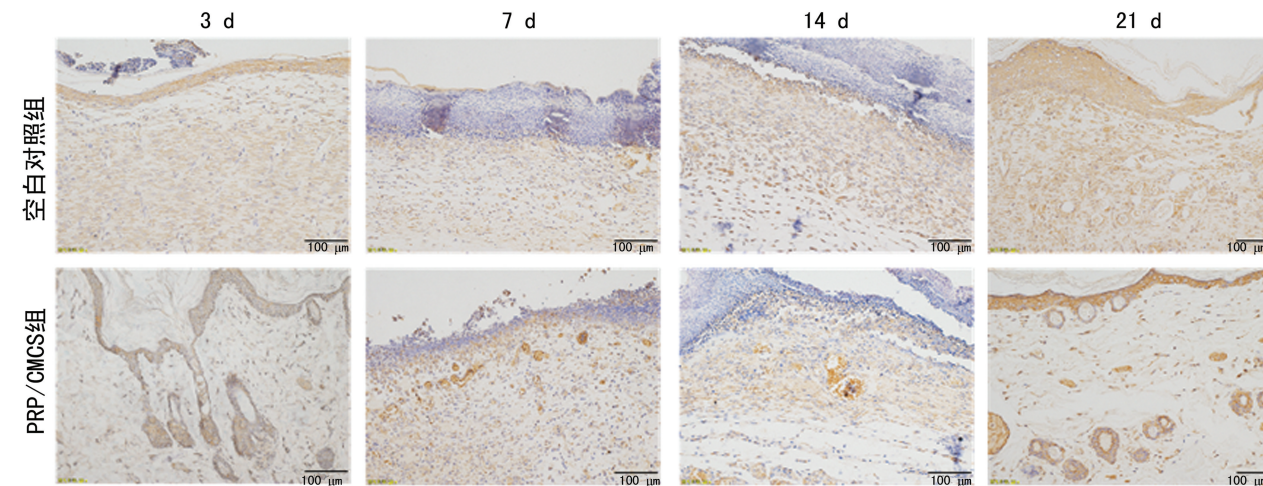


图 9 TGF-β3 免疫组织化学结果(×200)

在创面愈合过程炎症反应中阳性表达明显较 IL-6 多。在创面愈合全过程均有明显表达,空白对照组及 PRP/CMCS 组的 TGF-β3 阳性表达在愈合早中期并无明显差异;在愈合后期,PRP/CMCS 组的 TGF-β3 阳性表达即组织中棕黄色着色明显较空白对照组深。在创面愈合全过程,抑制炎症的细胞因子强烈表达,在早期及中期的表达量无明显区别,在愈合晚期,PRP/CMCS 组的表达较明显,这与上述促进炎症的细胞因子 IL-6 的表达呈现相反的趋势(图 9)。

3 讨 论

随着人们生活水平的提高,各种慢性疾病的患病率也逐年增加,导致与之相关的糖尿病足、下肢静脉性溃疡等慢性创面也呈现出了高发病率。糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,其导致的高血糖和代谢异常,会对眼、肾的血管和神经等组织造成慢性损害和功能障碍。除此之外,高糖环境还会引起皮肤微环境变化,导致下肢远端神经异常和不同程度的周围血管病变相关的足部感染、溃疡和(或)深层组织的破坏。进一步形成糖尿病足和下肢皮肤溃疡等慢性难愈性创面^[2]。难愈创面愈合过程中的诊疗要点除了彻底清创之外,及时闭合创面也可防止创面进一步发生坏死。因此,在完成清创工作后,用敷料覆盖

使创面闭合对伤口有重要作用^[3]。多数慢性难愈性创面易合并细菌感染,多种细菌在形成细菌生物膜后会增强抵抗人体免疫清除的能力,使创面长时间停留在慢性炎症阶段。创面处细菌的繁殖也会增加其毒性因子的分泌,阻滞整个愈合过程^[4-6]。

CMCS 是一种在壳聚糖分组链上引入羧甲基而成的衍生物,有良好的水溶性和生物相容性,与细胞间相互作用可促进细胞生长、组织再生及伤口愈合^[7]。其良好抗菌活性适用于创面愈合,且该物质能够根据预期孔径及生物降解速率进行相应的制备调整。CMCS 因能够结合生长因子和葡萄糖胺聚糖等阴离子分子、保水性能强、无毒,可降解等特性,可用于药物控释治疗、创伤愈合、组织工程等领域^[8]。本实验制备的 PRP/CMCS 的孔径均在 20~125 μm,适宜细胞的生长黏附^[9]。

研究表明,慢性创面中的生长因子水平低于急性创面,主要是因为慢性创面中局部生长因子的代谢加快,且慢性创面中的纤维蛋白渗出包裹血管壁阻止生长因子向创面的聚集^[10]。富血小板血浆是一种全血经离心后得到的血小板浓缩物,含丰富的凝血因子、纤维蛋白原、白细胞和生长因子,有较强的止血、抑菌和促进创面愈合功能^[11]。VEGF 是一种血管内皮细

胞特异性的肝素结合生长因子,具有促进血管新生和增强血管通透性的作用;而 PDGF 是一种重要的促有丝分裂因子,具有增加创面成纤维细胞和炎症细胞的浸润,增加伤口组织胶原合成和促进肉芽组织生长的作用^[12]。因为 VEGF、PDGF 对促进创面愈合起着重要的作用,因此本实验在制备 PRP/CMCS 支架后,选择对支架浸提液中的 VEGF 和 PDGF 水平进行检测。ELISA 实验结果表明支架中的 VEGF、PDGF 释放水平分别为 $(83.20 \pm 7.75) \text{ pg/mL}$ 和 $(780.54 \pm 69.93) \text{ pg/mL}$ 。考虑支架用于慢性难愈性创面时可通过释放生长因子促进创面愈合。

有研究中提及 CMCS 对大肠埃希菌的抑菌作用明显,且壳聚糖寡聚体的抗菌活性似乎主要是由 DNA 转录的抑制引起的^[13]。慢性难愈性创面的感染中最常见的菌种是革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌,其中,革兰阴性杆菌以大肠埃希菌为代表,而革兰阳性球菌以金黄色葡萄球菌为代表^[14-15]。本实验利用上述两种菌制成了混合菌平板用于支架的体外抑菌实验,由实验结果中出现的抑菌圈可知相对于空白对照滤纸,PRP/CMCS 对于大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌制成的混合菌平板中细菌的生长具有明显抑制作用。后续动物实验结果表明,PRP/CMCS 组的愈合明显较空白对照组糖尿病小鼠快,且经病理组织切片免疫组织化学结果可知,PRP/CMCS 组的糖尿病鼠炎症反应明显低于空白对照组,表明该支架在治疗慢性难愈性创面的过程中具有负向调节炎症反应的作用。

本实验结果证明,PRP/CMCS 有良好的抑菌效果,对于糖尿病合并细菌的创面愈合具有明显的促进作用。较单纯 PRP 应用具有方便携带、活性蛋白在伤口释放均匀且释放时间延长、抑菌性增强等优点。PRP/CMCS 可广泛地应用于外科、内分泌科等科室的临床治疗工作中,具有较高的临床应用价值,拥有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 李晶,薛斌. 新型医用敷料的分类及特点[J]. 中国组织工程研究,2013,17(12):2225-2232.
- [2] 中华医学会创伤学分会. 中国创面诊疗指南(2015 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2016.
- [3] 付小兵,王德文. 现代修复创伤学[M]. 北京:人民军医出版社,1999.
- [4] 王宽,谢英,汪虹,等. 细菌生物膜与慢性创面愈合[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(19):4554-4556.
- [5] BISWAS S, ROY S, BANERJEE J, et al. Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(15): 6976-6981.
- [6] FISHER T K, WOLCOTT R, WOLK D M, et al. Diabetic foot infections: A need for innovative assessments[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2010, 9(1): 31-36.
- [7] ANITHA A, MAYA S, DEEPA N, et al. Curcumin-loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for cancer drug delivery[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2012, 23(11): 1381-1400.
- [8] SHARIATINIA Z. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120(Pt B): 1406-1419.
- [9] LOH Q L, CHOONG C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2013, 19(6): 485-502.
- [10] OKONKWO U A, DIPIETRO L A. Diabetes and Wound Angiogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): E1419.
- [11] 叶露露,单桂秋,马静,等. 富血小板血浆对痤疮动物模型治疗作用的实验研究[J]. 中国输血杂志,2016,29(6):561-564.
- [12] 李烛,李静,王更银,等. 血小板与创面愈合关系的研究进展[J]. 华北国防医药,2010,22(2): 178-181.
- [13] VENKATRAJAH B, MALATHY V, ELAYA RAJAH B, et al. Synthesis of carboxymethyl chitosan and coating on wound dressing gauze for wound healing[J]. Pak J Biol Sci, 2013, 16(22): 1438-1448.
- [14] 窦孝康,程代薇,王毅. 感染性创面细菌学调查与药物敏感性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(21): 4858-4860.
- [15] 梁尊鸿,潘云川,蒋佩如,等. 慢性难愈合创面病原菌分布及体外耐药性分析[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版),2012,7(4):351-354.

(收稿日期:2019-09-25 修回日期:2019-12-26)