

· 基础研究 ·

钛合金表面聚合氨基阳离子纳米薄膜的制备及抗菌性能的初步研究

陈睿¹, 何海龙^{1*}, 袁文¹, 田野¹, 秦余磊², 赵鹏², 董敏杰¹

1. 第二军医大学附属长征医院脊柱外科, 上海 200003

2. 同济大学纳米研究所, 上海 200092

【摘要】目的 制备钛合金表面聚合氨基阳离子纳米薄膜并初步评价其抗菌性能。**方法** 通过低温等离子体聚合技术(Plasma)使烯丙胺单体于钛合金材料表面引发聚合, 制备带表面涂层的钛合金样品。采用扫描电子显微镜(SEM)观察样品表面形貌, 水接触角测量仪分析表面亲水性, X线光电子能谱仪(XPS)分析表面元素含量, 体外抗菌实验测试样品对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的抑菌率。在新西兰大白兔胫骨的骨髓腔内注入金黄色葡萄球菌, 然后置入带涂层的钛合金螺钉, 观察体内抗菌实验效果。**结果** 采用Plasma方法制备的带涂层的钛合金样品表面散在颗粒样聚合物, 水接触角由不带涂层的对照组的 $100.3^{\circ} \pm 3.4^{\circ}$ 下降至 $13.6^{\circ} \pm 3.0^{\circ}$, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); X线光电子能谱仪显示氮(N)元素含量由对照组的2.75%提高至11.80%。体外抗菌实验中, 与对照组相比, 涂层组对金黄色葡萄球菌的抑菌率为 $(86.1 \pm 3.8)\%$, 对大肠杆菌的抑菌率为 $(75.5 \pm 2.6)\%$, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。动物实验中, 与对照组相比, 涂层组螺钉周围中性粒细胞明显减少。**结论** 低温等离子体聚合技术可以在钛合金表面成功制备聚合氨基阳离子纳米薄膜, 制品具有良好的抗菌性, 为聚合阳离子进一步的抗菌研究提供基础。

【关键词】 钛; 假体和植入物; 细菌感染; 纳米医学

【中图分类号】 R 318.08 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-2957(2017)05-0299-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-2957.2017.05.009

Fabrication and antibacterial property of amino cationic nanofilm on surface of titanium alloy: a preliminary study

CHEN Rui¹, HE Hai-long^{1*}, YUAN Wen¹, TIAN Ye¹, QIN Yu-lei², ZHAO Peng², DONG Min-jie¹

1. Department of Spinal Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Institute of Nano, Tongji University, Shanghai 200092, China

【Abstract】Objective To fabricate amino cationic polymer on the surface of titanium alloys and evaluate its antibacterial property. **Methods** Amine cationic polymer was deposited on the surface of titanium rod with plasma polymerization technique by introducing allyl amine. The surface topography and wettability of the samples were observed with scanning electron microscope(SEM) and contact angle. Surface element contents were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy(XPS). The antibacterial activity was measured by bacteria counting of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli in vitro*. Antibacterial experiment *in vivo* in rabbit was conducted and histological analysis performed. **Results** Diffused distribution of spherical particles was observed under SEM on the surface. Water contact angle reduced from $100.3^{\circ} \pm 3.4^{\circ}$ to $13.6^{\circ} \pm 3.0^{\circ}$, which was of a statistical significance($P < 0.05$). XPS results showed the content of N element increased from 2.75% to 11.8%. Bacteriostasis rate of *Staphylococcus aureus* was $(86.1 \pm 3.8)\%$ and that of *Escherichia coli* was $(75.5 \pm 2.6)\%$ in plasma group, which has a statistical significance in difference compared with the control group($P < 0.05$). *In vivo*, histological analysis demonstrated that decrease of neutrophils was observed around the implant and bone in plasma group. **Conclusion** Plasma polymerization technique can acquire amino cationic polymer on titanium surface successfully, and the polymer shows good antibacterial activity, thus providing the basis for future experiments.

【Key Words】 Titanium; Prostheses and implants; Bacterial infections; Nanotechnology

J Spinal Surg, 2017, 15(5): 299-303

基金项目: 上海市科委纳米专项课题(12nm0501202)

作者简介: 陈睿(1990—), 硕士, 医师; 934099140@qq.com

*通信作者: 何海龙 hailong0530@126.com

钛合金因具有良好的弹性模量、耐腐蚀性及生物相容性等优点而成为目前骨科使用最广泛的置入物材料,但是由置入物相关感染造成的内固定失败屡见不鲜。文献报道细菌可于钛合金置入物表面定植形成细菌生物膜^[1],而且抗菌药物难以起效,使得置入物相关感染迁延不愈,因此预防感染发生可更好地从源头上解决问题。预防置入物相关感染的重要策略是阻止细菌在初始位置的黏附及增殖,抑制细菌生物膜的形成。本实验通过低温等离子体聚合技术(Plasma),使烯丙胺单体于钛合金表面引发聚合,形成具有“接触性杀菌”性能的聚合氨基阳离子纳米薄膜涂层,再通过物理-化学表征检测、体外及体内抗菌实验对涂层进行验证,初步获得该薄膜的制备方法及抗菌性能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于制备带涂层样品的钛合金材料为枢法模医疗器械公司CD Horizon系统的钛合金棒,激光切割机切割成44段长度50.0 mm、直径5.5 mm的圆柱形棒(24段用于表征检测、20段用于体外抗菌实验);16枚Center-piece螺钉(大小为7.0 mm × 1.6 mm × 1.6 mm)用于动物体内抗菌实验。用超声清洗样品,去离子水漂洗后烘干待用。留取22段钛合金棒及8枚螺钉,作为对照组。

1.2 聚合氨基阳离子涂层的制备及表征检测

Plasma处理气体的选择及参数的控制参考Labay等^[2]的实验方法。将样品置入等离子体设备反应室,先通入50 mL/min(标准状态)氩气,调整放电功率为100 W,处理时间300 s;打开单体气体阀门,通入烯丙胺蒸汽、50 mL/min氩气及50 mL/min氧气组成的混合气体,保持真空室压强在80 Pa,峰值放电功率为100 W,聚合物薄膜沉积时间为1 200 s。破真空结束后,取出反应室内的样品,置于冰箱内冷藏2 h。用场发射扫描电子显微镜(SEM)观察样品的表面形貌、接触角测量仪测量水接触角、X线光电子能谱仪(XPS)分析表面成分含量。

1.3 体外抗菌实验

分别进行金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的培养及梯度稀释,使得最终制备的菌悬液活菌数为 $1 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$ cfu/mL。取出4组钛合金棒(每组分别为5个样品)置于平板内;用40.0 mm × 5.0 mm大小的无纺布20片分别覆盖于钛棒表面,用微量移液器吸取制备的两种菌液各100.0 μL,将其滴于无纺布上

使其完全湿润并紧贴于钛棒表面,置于室温反应24 h后,将4组样品的钛棒连同紧贴的无纺布样片共同加入到含10.0 mL无菌生理盐水的离心管中,剧烈摇晃1 min,洗涤振荡细菌(避免钛棒及无纺布样片细菌残留),取0.1 mL菌液涂于平板,每个样品各涂2个平板,将其置于培养箱中培养24 h后取出并计数。抑菌率(%)=(对照组的活菌数-涂层组的活菌数)/对照组的活菌数 × 100%。

1.4 动物体内抗菌实验及组织学评估

参照Jin等^[3]的动物体内抗菌实验方法,在新西兰大白兔(第二军医大学实验动物中心)胫骨的骨髓腔内注入金黄色葡萄球菌,然后置入带涂层的钛合金螺钉或对照钛合金螺钉,观察体内抗菌实验效果。将取出的标本置于4%多聚甲醛进行组织固定,过滤并包埋样品。在切片机(德国EXAKT公司,EXAKT310)上将样品固定牢固,且使刀片切割方向与骨缺损长轴方向垂直,切成厚度为50.0 μm的切片。用黏合剂将切片贴至硬组织专用的有机玻璃载玻片上。玻片用苏木精染色后,于显微镜下观察相应骨组织与置入物周围中性粒细胞浸润情况。

1.5 统计学处理

运用Graphpad Prism软件进行数据分析,组间均数的比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 涂层表征检测结果

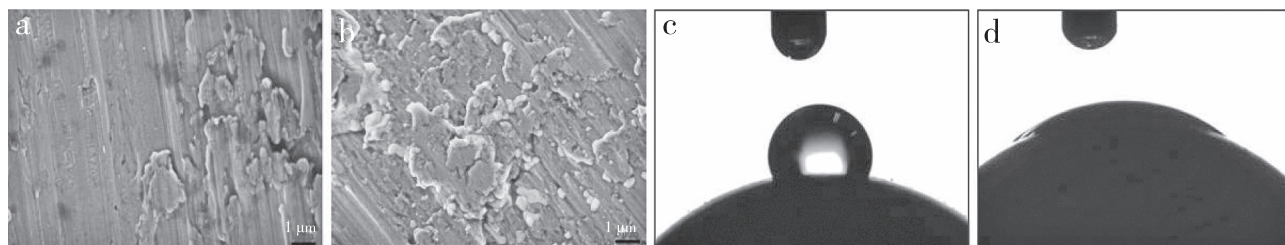
SEM下可见对照组钛棒表面粗糙,凹凸不平,纹理清晰可辨(图1a);经Plasma法处理后,原先纹理难以辨认,为一层薄膜所覆盖,可见较多散在分布的颗粒样聚合物(图1b)。亲水性测试中,对照组钛合金棒表面接触角为 $100.3^\circ \pm 3.4^\circ$ (图1c),为疏水性材料;经由Plasma处理后,接触角下降为 $13.6^\circ \pm 3.0^\circ$ (图1d),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。XPS测量结果可见对照组氮(N)元素含量为2.75%;经Plasma处理后,表面N元素含量提高至11.8%,N元素含量较对照组明显增加(图2)。

2.2 体外抗菌实验

2组样品对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的平板计数图(图3)示Plasma涂层组菌落数均明显少于对照组。在金黄色葡萄球菌抑菌实验中,对照组菌落数为 (178.7 ± 10.3) 个,Plasma涂层组菌落数为 (24.8 ± 8.0) 个,计算得出Plasma涂层组对金黄色葡

萄球菌的抑菌率为 $(86.1 \pm 3.8)\%$; 在大肠杆菌抑菌实验中, 对照组菌落数为 (220.2 ± 19.2) 个, Plasma涂层组菌落数为 (53.9 ± 5.6) 个, 计算得出Plasma涂

层组对大肠杆菌的抑菌率为 $(75.5 \pm 2.6)\%$ 。经过方差分析发现涂层组对2种细菌均具有明显的抑制作用, 与对照组相比差异具有统计学意义 $(P < 0.05)$ 。

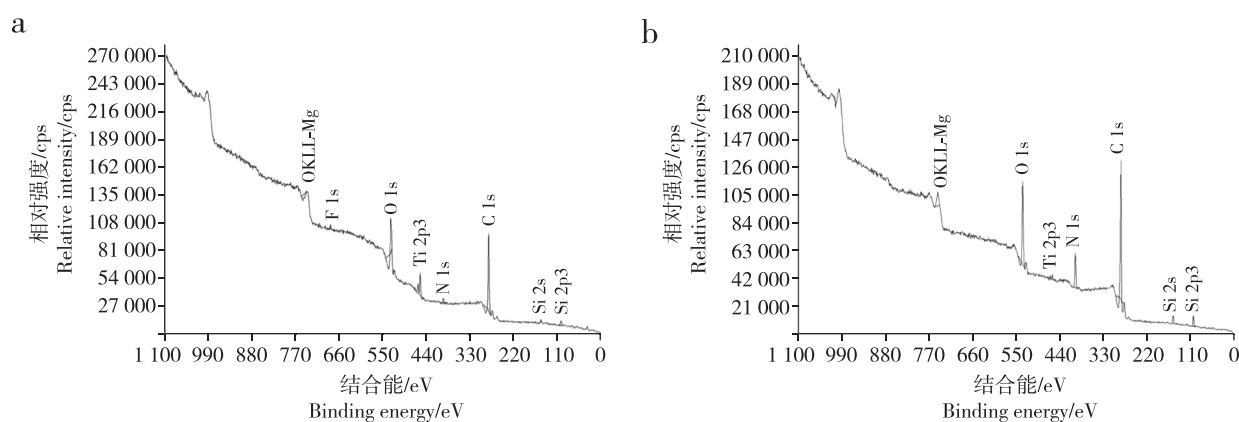


a: 对照组SEM观察结果 b: 涂层组SEM观察结果 c: 对照组水接触角 d: 涂层组水接触角

a: SEM results in control group b: SEM results in plasma group c: Water contact angle in control group d: Water contact angle in plasma group

图1 表面形貌观察及亲水性测试

Fig. 1 Surface topographic image and hydrophilic test

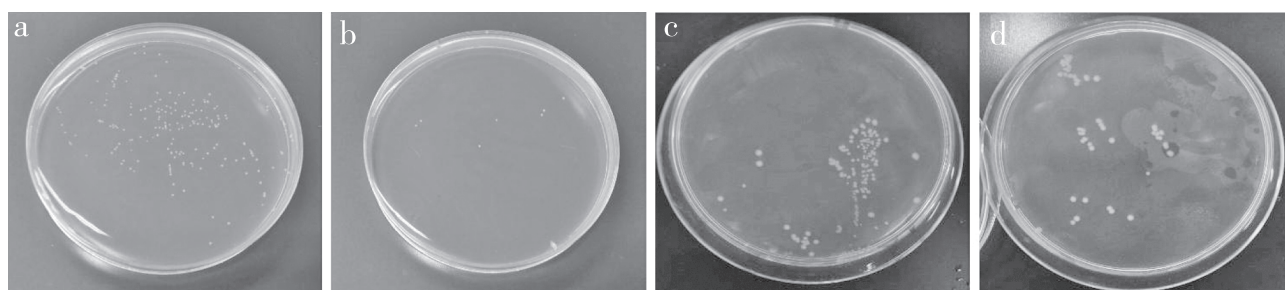


a: 对照组 b: 涂层组

a: Control group b: Plasma group

图2 2组样品XPS

Fig. 2 XPS in 2 groups



a: 对照组金黄色葡萄球菌 b: 涂层组金黄色葡萄球菌 c: 对照组大肠杆菌 d: 涂层组大肠杆菌

a: *Staphylococcus aureus* in control group b: *Staphylococcus aureus* in plasma group c: *Escherichia coli* in control group d: *Escherichia coli* in plasma group

图3 金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的平板计数图

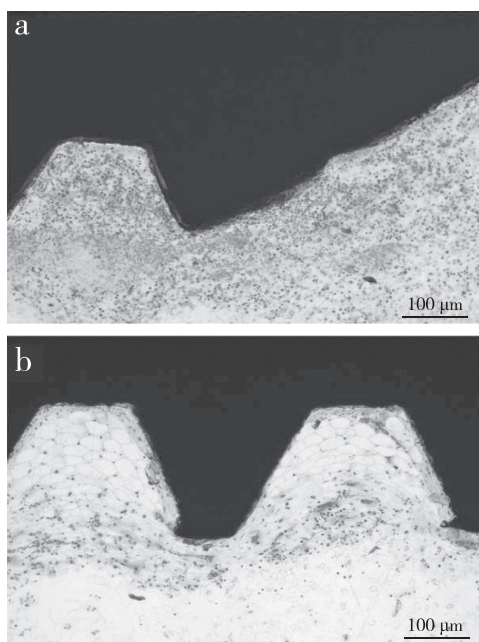
Fig. 3 Plate counting images of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

2.3 体内抗菌实验

2组样品对金黄色葡萄球菌的体内抗菌实验结

果见图4。在对照组家兔骨髓腔内, 螺钉与骨组织周围可见大量中性粒细胞, 存在明显的炎症反应。

而在 Plasma 涂层组家兔骨髓腔内, 螺钉与骨组织周围仅见极少量中性粒细胞, 说明炎症反应不明显。



a: 对照组硬组织切片 b: 涂层组硬组织切片

a: Hard tissue section in control animals b: Hard tissue section in plasma group

图4 体内抗菌实验结果

Fig. 4 *In vivo* antibacterial result

3 讨论

文献报道脊柱术后感染发生率为0.7%~8.5%^[4]。2009年美国疾病预防控制中心则报道椎板切除或脊柱融合手术后的内固定相关感染发生率为3.2%~4.1%^[5]。如何有效降低脊柱置入物相关感染引发的内固定及融合失败的风险一直是困扰脊柱外科医师的难题。文献报道椎弓根螺钉在置入人体时, 术野的细菌或血液来源中的细菌均可能定植于螺钉表面, 继而黏附增殖并形成细菌生物膜^[1]。对置入物表面进行改性或负载某些抗菌性能的物质是预防感染发生的可行策略。以银、铜、锌等为代表的无机金属离子抗菌剂可以通过干扰细菌细胞膜的通透性和新陈代谢而发挥广谱抗菌作用, 但是其对成骨细胞的毒性作用限制了其在临床中的广泛使用^[6-8]。于生物可降解聚合物和无机材料表面负载抗生素是另一种解决途径, 例如在钛纳米管中载入庆大霉素^[9]、聚乙醇酸-乳酸中载入万古霉素^[10]、钙磷酸盐/羟基磷灰石骨支架上载入庆大霉素^[11]等, 但是, 传统抗生素的过度使用会导致细菌耐药性的产生。另外, 一些聚合物也被开发用来减少细菌的黏附, 如丝胶蛋白固定聚甲基丙烯酸酯的

亲水性聚合物薄膜可以显著减少金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌的黏附^[12]; 但是该抗菌黏附涂层会干扰置入物骨整合过程, 从而导致早期内固定失败^[13]。本研究利用聚合阳离子破坏细菌细胞膜的“接触性杀菌”抗菌特性, 采取 Plasma 技术, 使烯丙胺单体于钛合金表面聚合, 引入聚合氨基阳离子, 在细菌定植到置入物表面时即刻将其杀死。

Plasma 技术是近年来出现的一种对材料表面进行改性的方法, 具有成本低、清洁、高效等优点。选择合适的等离子体源能够确保在目标表面引入各种功能团, 包括目标基团的共价固定以及各种目标分子的物理吸附, 从而改善材料的亲水性、黏附性、生物相容性^[14]。Labay 等^[2]通过 Plasma 法, 成功在聚丙烯高分子材料上获得了氨苄青霉素载药涂层。本实验中选取烯丙胺单体作为等离子体源, 使聚合物薄膜在目标材料上沉积。SEM 结果发现, 对照组表面粗糙, 与文献报道一致^[15], 而经 Plasma 处理后, 可在样品表面观察到散在的球形颗粒, 推断为聚合氨基阳离子薄膜。文献报道置入材料表面的亲水性会影响细菌的定植, 而水接触角可以直观反映这一特点^[16]。本研究中对照组钛合金棒接触角为 $100.3^\circ \pm 3.4^\circ$, 疏水性明显, 可能与表面的氧化膜及粗糙度比较大有关。涂层组水接触角大大降低, 为 $13.6^\circ \pm 3.0^\circ$, 表面的亲水性得到了极大的提高, 因为 Plasma 处理大大降低了材料表面的粗糙度^[17]。XPS 分析结果显示, 经 Plasma 处理后, 材料表面的 N 元素含量增加明显, 这与烯丙胺单体在底物表面发生聚合引入了大量的 N 元素有关, 从而证明聚合氨基阳离子纳米薄膜的成功制备。

关于骨科置入物感染的细菌来源, Campoccia 等^[18]发现金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌所致的感染分别占有骨科置入物感染的 34% 及 32%; 而王化芬等^[19]发现金黄色葡萄球菌仍是首位感染菌, 占统计数据的 33%, 而大肠杆菌作为革兰阴性菌的代表菌, 占有阴性菌感染的 52%, 且呈逐年上涨趋势。因此本研究选择金黄色葡萄球菌及大肠杆菌来验证聚合氨基阳离子纳米薄膜的抗菌性。抗菌实验结果显示, 钛合金表面聚合阳离子薄膜具有抗金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的作用。而随后的动物实验也验证了该薄膜对金黄色葡萄球菌的杀菌能力。此外, 聚合阳离子的厚度与其杀菌效果直接相关, 金黄色葡萄球菌的细胞膜厚度为 45~55 nm, 大肠杆菌细胞膜厚度为 46 nm, 聚合阳离子至少需要 75 nm 的厚度才能透过细菌细胞膜杀灭细菌^[20-21]。

因此, 聚合阳离子纳米薄膜的厚度及抗菌谱范围需进一步的研究。

本研究目前只是初步的实验探索, 该聚合阳离子纳米薄膜的稳定性、成骨细胞毒性等均需进一步的研究, 而且本实验只验证了其对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的抗感染能力, 对其他细菌如厌氧菌、铜绿假单胞菌甚至结核杆菌等的抗菌性能也是下一步实验的重点。

参考文献

- [1] Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(4): 847-867.
- [2] Labay C, Canal JM, Modic M, et al. Antibiotic-loaded polypropylene surgical meshes with suitable biological behaviour by plasma functionalization and polymerization[J]. Biomaterials, 2015, 71: 132-144.
- [3] Jin G, Qin H, Cao H, et al. Synergistic effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium[J]. Biomaterials, 2014, 35(27): 7699-7713.
- [4] Hollenbeck BL, McGuire KJ, White AP, et al. Invasiveness index as a predictor of surgical site infection after spinal fusion, revision fusion, or laminectomy[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2017, 38(1): 11-17.
- [5] Edwards JR, Peterson KD, Mu Y, et al. National Healthcare Safety Network(NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009[J]. Am J Infect Control, 2009, 37(10): 783-805.
- [6] Qin H, Cao H, Zhao Y, et al. Antimicrobial and osteogenic properties of silver-ion-implanted stainless steel[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(20): 10785-10794.
- [7] Yu W, Chen D, Ding Z, et al. Synergistic effect of a biodegradable Mg-Zn alloy on osteogenic activity and anti-biofilm ability: an *in vitro* and *in vivo* study[J]. RSC Adv, 2016, 6(51): 45219-45230.
- [8] Đolić MB, Rajaković-Ognjanović VN, Štrbac SB, et al. Natural sorbents modified by divalent Cu²⁺- and Zn²⁺-ions and their corresponding antimicrobial activity[J]. N Biotechnol, 2017.[Epub ahead of print]
- [9] Nemati SH, Hadjizadeh A. Gentamicin-eluting titanium dioxide nanotubes grown on the ultrafine-grained titanium[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2017.[Epub ahead of print]
- [10] Tseng YY, Kao YC, Liao JY, et al. Biodegradable drug-eluting poly[lactic-co-glycol acid] nanofibers for the sustainable delivery of vancomycin to brain tissue: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. ACS Chem Neurosci, 2013, 4(9): 1314-1321.
- [11] Lilja M, Sörensen JH, Brohede U, et al. Drug loading and release of tobramycin from hydroxyapatite coated fixation pins[J]. J Mater Sci Mater Med, 2013, 24(9): 2265-2274.
- [12] Zhang F, Zhang Z, Zhu X, et al. Silk-functionalized titanium surfaces for enhancing osteoblast functions and reducing bacterial adhesion[J]. Biomaterials, 2008, 29(36): 4751-4759.
- [13] Busscher HJ, van der Mei HC, Subbiahdoss G, et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(153): 153rv10.
- [14] Yaman N, Özdoğan E, Seventekin N, et al. Plasma treatment of polypropylene fabric for improved dyeability with soluble textile dyestuff[J]. Appl Surf Sci, 2009, 255(15): 6764-6770.
- [15] Choe H, Kim J, Jeong Y. Nanotube growth analysis in the interface between oxide film and titanium alloy substrate using STEM and FE-SEM[J]. Surf Interface Anal, 2012, 44(11/12): 1473-1478.
- [16] Grace JM, Gerenser LJ. Plasma treatment of polymers[J]. J Dispers Sci Technol, 2003, 24(3/4): 305-341.
- [17] Hegemann D, Brunner H, Oehr C. Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement[J]. Nucl Inst Methods Phys Res B, 2003, 208(1/2/3/4): 281-286.
- [18] Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance[J]. Biomaterials, 2006, 27(11): 2331-2339.
- [19] 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]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(4): 313-315.
- [20] Matias VR, Al-Amoudi A, Dubochet J, et al. Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Bacteriol, 2003, 185(20): 6112-6118.
- [21] Meroueh SO, Bencze KZ, Heseck D, et al. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(12): 4404-4409.

(收稿日期: 2017-02-25)

(本文编辑: 于 倩)