

钛表面微-纳米结构改性对变形链球菌粘附的影响

刘雯君,邱 憬*,仇颖莹,杨 洁,王国平,汤春波

(南京医科大学口腔医学研究所,南京医科大学附属口腔医院种植修复科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究钛表面微-纳米结构改性对变形链球菌粘附的影响。方法:根据钛表面处理方法分为 4 组:机械抛光组、喷砂组、阳极氧化组、喷砂-阳极氧化组。采用扫描电镜观察各组试件的表面形貌,采用接触角测量仪测算双蒸水在试件表面的接触角,检测各组试件表面的润湿性。将试件与变形链球菌共同孵育,采用菌落形成单位计数法和扫描电镜观测试件表面粘附细菌的数量和形态。结果:扫描电镜观察显示,喷砂-阳极氧化组的钛表面形成微米孔内复合纳米管阵列的微-纳米结构。四组试件表面的接触角为:机械抛光组、喷砂组 > 阳极氧化组、喷砂-阳极氧化组。4 组试件表面的变形链球菌粘附数量为:阳极氧化组、喷砂-阳极氧化组 > 喷砂组 > 机械抛光组。结论:与钛表面纳米管阵列相比,钛表面微-纳米结构改性未增加变形链球菌的粘附数量。

[关键词] 钛;微-纳米结构;变形链球菌

[中图分类号] R783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-727-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150530

Effects of micro-nano patterned surface modification on *Streptococcus mutans* adhesion

Liu Wenjun, Qiu Jing*, Qiu Yinying, Yang Jie, Wang Guoping, Tang Chunbo

(Research Institute of Stomatology, Department of Oral Implantology, Stomatological Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effects of micro-nano patterned titanium surface modification on *Streptococcus mutans* adhesion. **Methods:** According to different titanium surface modifications, there were four groups: Mechanical polishing group, Sandblasting group, Anodic oxidation group, and Sandblasting-anodic oxidation group. The specimen of each group were characterized by scanning electron microscopy. The contact angles of double distilled water on specimen of each group were calculated to evaluate the wettabilities. The specimens were incubated in *Streptococcus mutans* cell suspension, and the bacteria on specimens were numbered by colony-forming units and observed by scanning electron microscopy. **Results:** Scanning electron microscope demonstrated that the micro-nano patterned structure of nano-tube arrays within micro-pores grew on the titanium surface of Sandblasting-anodic oxidation group. The sequence of surface contact angles among four groups was as follows: Mechanical polishing group, Sandblasting group > Anodic oxidation group, Sandblasting-anodic oxidation group. The sequence of the bacterial adhesion quantities among four groups was as follows: Anodic oxidation group, Sandblasting-anodic oxidation group > Sandblasting group > Mechanical polishing group. **Conclusion:** In comparison with the nano-tube arrays, the micro-nano patterned surface modification did not increase the adhesion of *Streptococcus mutans* on the titanium surface.

[Key words] titanium; micro-nano patterned structure; *Streptococcus mutans*

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 727-731]

[基金项目] 国家自然科学基金(81472928);江苏省自然科学基金(BK20130898);江苏省高校大学生创新计划项目(201310312020Z);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2014-37)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qiujing@njmu.edu.cn

利用阳极氧化法在钛种植体表面进行纳米改性的技术已得到广泛关注。该技术制备出的 TiO₂ 纳米管阵列具有比表面积大、湿润性强等特点。研究表明,钛表面的 TiO₂ 纳米管能增强成骨细胞的碱性磷酸酶活性和钙基质分泌,促进钛表面成骨细胞的增殖、分化和功能,有利于钛种植体的早期骨

整合^[1-2]。近年来,一种以阳极氧化为基础的钛表面微-纳米改性新技术开始出现。Zhao等^[3]研究认为,微-纳米结构中的微米形貌和TiO₂纳米管之间形成协同效应,能进一步增强钛表面成骨细胞的铺展和基因表达;Li等^[4]在酸蚀的钛种植体表面制备TiO₂纳米管阵列,植入动物体内后发现,微-纳米表面较酸蚀表面获得了更大的骨结合面积和扭力,显著增强种植体的早期骨结合。Moon等^[5]对微-纳米表面改性的钛种植体进行植入后的扭力测试发现,微米结构可减少TiO₂纳米管的暴露,在种植体植入过程中能够有效保护较容易剥脱的TiO₂纳米管,从而在植入后保持钛表面的纳米管形貌。由此可见,基于TiO₂纳米管阵列的钛表面微-纳米结构改性不仅具有很好的促进成骨性能,而且在植入过程中能保持表面结构的完整性,是一种极具潜力的种植体表面改性技术。

口腔环境中存在着众多细菌,种植体在植入过程中难免将邻近的血液、唾液等组织中的细菌带入种植窝,接触种植体-骨界面,造成隐患。因此,在进行种植体表面改性提升成骨性能的同时,对细菌粘附的研究必不可少。目前,钛表面微-纳米结构的细菌粘附研究尚未见报道。本研究将喷砂法与阳极氧化法结合,制备出微-纳米结构,再在材料表面接种口腔常见细菌——变形链球菌,以研究钛表面微-纳米结构改性对变形链球菌粘附的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

纯钛片(10.0 mm×10.0 mm×0.3 mm),氧化铝砂砾,变形链球菌(ATCC 25175,南京医科大学口腔医学研究所保存),BHI培养基(OXOID公司,英国),琼脂(Biosharp公司,美国),笔式喷砂机(JNBP-Ⅲ型,天津市嘉年华公司),直流稳压电源(DYY-1C型,北京市六一仪器厂),场发射扫描电子显微镜(1530VP,LEO公司,德国),视频光学接触角测量仪(Optical Contact Angle Measuring Device)。

1.2 方法

1.2.1 试件制备

钛片抛光后随机分为4组:机械抛光组(M组)、喷砂组(S组)、阳极氧化组(A组)、喷砂-阳极氧化组(SA组)。用60目氧化铝颗粒在距S组和SA组试件表面1 cm处喷砂20 s,直至试件表面呈均匀灰黑色,超声清洗备用。将A组和喷砂后的SA组钛片依次采用酒精、丙酮、去离子水超声清洗

5 min,吹干后,采用钛箔作为阳极,石墨作为阴极,以含1 mol/L磷酸和0.5 w%氢氟酸的溶液为电解液,直流稳压电源20 V条件下作用1 h,制备钛表面TiO₂纳米管,超声清洗,吹干备用。

1.2.2 表面形貌观察

各组随机选择1个试件,喷金3 min后,采用扫描电镜观察试件的表面微形貌。

1.2.3 表面亲水性检测

各组随机选择3个试件,采用视频光学接触角测量仪,通过躺滴法在温度20℃、湿度45%的条件下测量双蒸水与试件表面之间的接触角。

1.2.4 细菌粘附与计数

将变形链球菌复苏增菌,使菌悬液浓度达到10⁸~10⁹ CFU/mL。将各组试件置于1 mL菌悬液中,37℃厌氧培养1 h后取出,PBS冲洗材料表面浮游细菌,将试件浸入10 mL PBS中超声震荡5 min,洗脱附着细菌。将洗脱液梯度倍比稀释,接种于BHI琼脂平板,37℃厌氧培养24 h后进行菌落计数。

1.2.5 细菌形态观察

各组随机选择1个试件,置于菌悬液中培养1 h后取出,用2.5%戊二醛溶液4℃固定24 h,再用乙醇溶液进行梯度脱水(30%、50%、70%、90%、95%、100%),每次10 min,最后进行临界点干燥。试件表面喷金后,采用扫描电镜观察试件表面的细菌形态和数量。

1.3 统计学方法

采用SPSS 11.5软件,对各组试件表面的细菌粘附计数值进行方差齐性检验和统计学分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 表面形貌

扫描电镜观察4组试件的表面形貌见图1。机械抛光组试件表面在低倍视野下基本平坦,在中、高倍视野可见方向一致的机械划痕;喷砂组试件在低倍视野可见高低不平的粗糙结构,在中、高倍视野下可见大量不规则的深坑与沟壑,边缘高耸锐利;阳极氧化组试件在低倍视野下可见类似机械抛光组的平坦表面,在中、高倍视野中可见规则、密集排列的中空状纳米管阵列,纳米管开口向上,管径约100 nm;喷砂-阳极氧化组试件在低倍视野中可见类似喷砂组的高低不平粗糙结构,中倍视野可见高低起伏的微米级浅凹结构,浅凹呈开放状,边缘圆润,无高耸锐利边缘,在高倍视野中可见微米级浅凹中规则、密集排列的纳米管阵列,形成微-纳米复合结构(图1)。

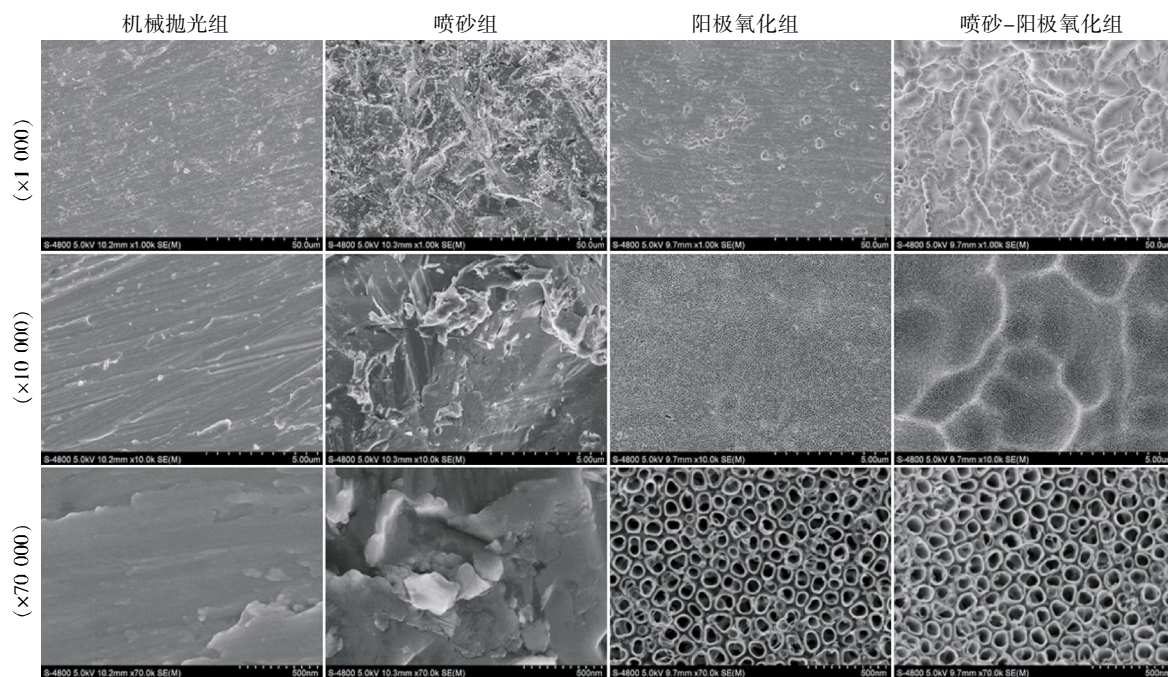


图 1 扫描电镜观察试件表面

Figure 1 Scanning electron microscopy images of surfaces

2.2 表面接触角

双蒸水液滴在喷砂组试件表面的接触角(59.25°)略大于机械抛光组(58.17°), 两者均接近 60° , 而阳极氧化组、喷砂-阳极氧化组的表面接触角均近似

0° 。接触角大小和润湿性成反比, 因而各组试件表面的润湿性大小为: 阳极氧化组、喷砂-阳极氧化组 > 机械抛光组、喷砂组(图 2)。

2.3 细菌黏附计数



图 2 试件表面接触角

Figure 2 Contact angles of surfaces

变形链球菌黏附计数结果见表 1。数据具有方差齐性, 采用单因素方差分析 SNK 多重比较显示, 4 组试件表面的变形链球菌黏附数量依次为: 阳极氧化组、喷砂-阳极氧化组 > 喷砂组 > 机械抛光组, 差异具有显著性。阳极氧化组的细菌黏附计数均值略大于喷砂-阳极氧化组, 但无显著性差异。

2.4 细菌黏附形态和分布

细菌黏附形态和分布的扫描电镜观察见图 3。各组试件表面的变形链球菌均由散在分布向链状分布过渡。其中, 阳极氧化组试件表面黏附细菌数量最多, 且细菌分布均匀(图 3C); 喷砂-阳极氧化组试件表面黏附细菌数略少于阳极氧化组, 且细菌分布较为均匀(图 3D); 喷砂组试件表面黏附有一

定数量的细菌, 主要集中于不规则深坑与沟壑中(图 3B); 机械抛光组试件表面的黏附细菌最少(图 3A)。

表 1 变形链球菌黏附计数

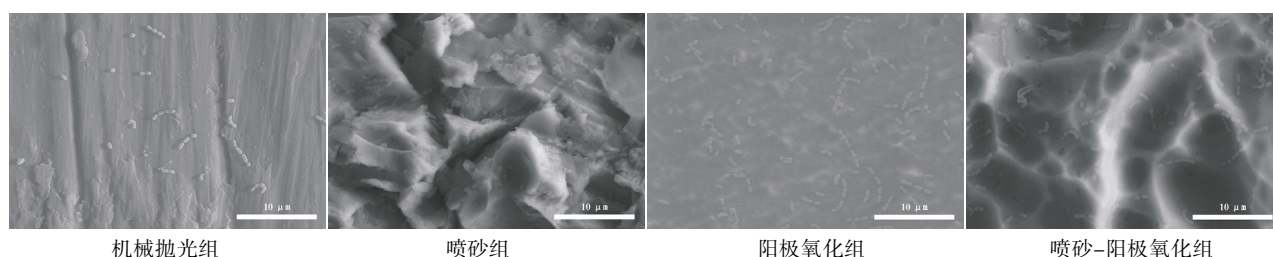
Table 1 Adhesion quantities of *Streptococcus mutans* ($\bar{x} \pm s$)

分组	细菌黏附计数
机械抛光组	$5.67 \pm 1.53^*$
喷砂组	$16.00 \pm 3.61^*$
阳极氧化组	30.33 ± 7.23
喷砂-阳极氧化组	26.33 ± 6.11

与阳极氧化组和喷砂-阳极氧化组比较, $*P < 0.05$ 。

3 讨论

现阶段的钛种植体表面改性主要分 3 种类型:

图3 细菌黏附扫描电镜观察($\times 3\ 000$)Figure 3 Scanning electron microscopy images of the bacterial adhesion($\times 3\ 000$)

微米级粗糙度、纳米级粗糙度、微-纳米级粗糙度。微米级粗糙度主要由喷砂、酸蚀、喷砂-酸蚀等方法制备,可增大种植体与种植窝的接触面积,增加种植体的初期稳定性,也可在一定程度上刺激成骨细胞的粘附增殖^[6]。纳米级粗糙度,如阳极氧化制备的氧化钛纳米管等,具有比微米级粗糙度更强的润湿性,能在早期吸附更多的成骨相关蛋白以及钙、磷等矿物质,更加有利于成骨细胞的黏附和铺展,促进成骨细胞的增殖和分化^[7]。微-纳米级粗糙度是先通过喷砂或酸蚀生成微米级粗糙度,再通过物理、化学等方法,在微米孔内制备更加细微的纳米级结构,形成微-纳米级粗糙度。由于兼具微米级和纳米级结构,微-纳米级表面改性已被证实具有很强的成骨活性^[3-5,8]。

然而,在增强成骨活性的同时,这些钛表面的微米和纳米结构也成为微生物生长的优势表面。细菌大小由球菌的 $0.3\sim 1.2\ \mu\text{m}$ 至螺杆菌的 $3\sim 50\ \mu\text{m}$ 不等,微米级表面较深的缝隙及凹坑往往有利于细菌的定植,不仅帮助细菌躲避材料表面的剪切力与脱位力,还为细菌的聚集生长提供厌氧条件,促进菌斑成熟^[9]。纳米级表面由于比表面积大、润湿性强,更有利于细菌的黏附。本实验制备的纳米和微-纳米试件的表面接触角均接近 0° (图2),体现出很强的润湿性。有研究表明,阳极氧化制备的氧化钛纳米管直径越大,表面金黄色葡萄球菌黏附越多,直径 $120\ \text{nm}$ 纳米管的细菌黏附数较光滑钛增加 $3\sim 4$ 倍^[10]。而对于钛表面微-纳米级结构,其细菌黏附方面的研究在国内外尚未见报道。

Mombelli等^[11]发现,种植体植入后不久即可在种植体表面发现细菌菌落,且50%以上为革兰阳性球菌。种植体植入后早期,革兰阳性菌在种植体周围的定植可营造厌氧环境,有利于厌氧菌的黏附和定植。变形链球菌是一种口腔内常见的革兰阳性兼性厌氧菌,其菌株不仅存在于龈上菌斑,在邻面接触区下方的龈乳头及龈沟内等厌氧环境也大量

存在^[12]。种植体在植入过程中难免将邻近组织中的变形链球菌等细菌带入种植窝,接触种植体表面。钛种植材料表面细菌粘附的相关研究也常使用变形链球菌^[13-14]。因而,本研究采用变形链球菌作为钛表面细菌黏附的实验菌株。

种植体脱落失败往往发生于植入后的早期,推测该现象的原因,可以引用Gristina等^[15]的“表面竞争”理论:生物材料植入后,组织细胞和细菌在材料表面竞争性附着。如果组织细胞率先在材料表面附着成活,则宿主的功能性防御机制可以减小之后细菌定植的风险;如果细菌首先在材料表面定植,则组织细胞将很难取代细菌的位置与材料表面形成生物性附着。故种植体植入后的数小时内,其表面细菌附着对种植体的成活至关重要。因此,本实验选择在细菌粘附后1 h对钛表面的细菌数量和形态进行检测。

本实验中,共制备了4种钛表面结构:M组为经机械抛光后的光滑表面,S组为喷砂后的微米级表面,A组为阳极氧化后的纳米级表面,SA组为经喷砂和阳极氧化形成的微-纳米级表面。实验结果显示,A组与SA组的细菌黏附量较S组显著增加,究其原因,一方面,细菌的黏附主要与表面粗糙度、表面电荷、表面自由能以及润湿性等有关^[16],其中,润湿性与细菌的早期黏附密切相关。而A组与SA组的纳米管结构大大增加了比表面积,具有极强的润湿性,为超亲水表面,容易吸附细菌。A组与SA组的表面接触角均接近 0° ,远低于S组,也证实了这一点;另一方面,由于 $\text{HF}/\text{H}_3\text{PO}_4$ 电解液在钛表面制备纳米管残留的氟离子不易去除,导致短时间内与钛表面接触的细菌大量死亡^[17],而死菌分解产物可促进活菌的进一步黏附^[18],因而在早期造成纳米级和微-纳米级表面有较多细菌聚集。

与M组相比,S组形成的微米级凹坑具有更有利的细菌附着位点。扫描电镜观察发现,大量细菌集中于S组表面由砂砾撞击形成的凹坑沟壑内,而

M 组表面的细菌则明显稀少,这种由非微米级粗糙度转变为微米级后细菌黏附增加的现象与其他学者的研究一致^[19]。本实验中,当纳米级的 A 组转变为微-纳米级的 SA 组后,钛表面的细菌黏附数量并无显著性差异,甚至略有减少(表 1),该现象的原因分析如下:SA 组试件喷砂后获得的微米级表面,经过阳极氧化电化学处理后发生改变,原本锐利的棱角与深沟在 HF/H₃PO₄ 电解液中溶解,虽然保留了凹凸不平的微米级表面,但其表面粗糙度明显减小。扫描电镜显示 SA 组表面形成边缘圆润、无锐边的浅凹状结构证实了这一点(图 1,3)。有研究表明,当微米级粗糙度降低至临界值时,其对细菌黏附的影响可以忽略不计^[20]。本实验中的扫描电镜未观察到细菌在 SA 组表面凹坑内大量聚集的现象,表明 SA 组表面开放且光滑的浅凹形结构没有为细菌的附着提供有利支持。这使得该组 TiO₂ 纳米管阵列形成的超亲水表面成为细菌黏附的主导因素,故 SA 组与 A 组的细菌早期黏附数量无显著性差异。

[参考文献]

- [1] Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. TiO₂ nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction[J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 90(1): 225-237
- [2] Wang N, Li H, Lü W, et al. Effects of TiO₂ nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs[J]. Biomaterials, 2011, 32(29): 6900-6911
- [3] Zhao L, Mei S, Chu PK, et al. The influence of hierarchical hybrid micro/nano-textured titanium surface with titania nanotubes on osteoblast functions[J]. Biomaterials, 2010, 31(19): 5072-5082
- [4] Li Y, Gao Y, Shao B, et al. Effects of hydrofluoric acid and anodised micro and micro/nano surface implants on early osseointegration in rats[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2012, 50(8): 779-783
- [5] Moon SK, Kwon JS, Um SH, et al. Biological evaluation of micro-nano patterned implant formed by anodic oxidation[J]. Current Applied Physics, 2014[Epub of print]
- [6] Wall I, Donos N, Carlqvist K, et al. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells *in vitro* [J]. Bone, 2009, 45(1): 17-26
- [7] Oh S, Daraio C, Chen LH, et al. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes[J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 78(1): 97-103
- [8] Yun KD, Yang Y, Lim HP, et al. Effect of nanotubular-micro-roughened titanium surface on cell response in vitro and osseointegration in vivo[J]. Mater Sci Engin C, 2010, 30(1): 27-33
- [9] 高宁, 刘国秋. 口腔修复材料表面粗糙度与血链球菌早期粘附的关系[J]. 华西医科大学学报, 1998, 29(2): 147-150
- [10] Yu WQ, Jiang XQ, Xu L, et al. Osteogenic gene expression of canine bone marrow stromal cell and bacterial adhesion on titanium with different nanotubes[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2011, 99(2): 207-216
- [11] Mombelli A, Schmid B, Rutar A, et al. Local antibiotic therapy guided by microbiological diagnosis [J]. J Clin Periodontol, 2002, 29(8): 743-749
- [12] Ahmady K, Marsh PD, Newman HN, et al. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* at sub-sites in human approximal dental plaque[J]. Caries Res, 1993, 27(2): 135-139
- [13] Fujioka-Hirai Y, Akagawa Y, Minagi S, et al. Adherence of *Streptococcus mutans* to implant materials[J]. J Biomed Mater Res, 1987, 21(7): 913-920
- [14] Baffone W, Sorgente G, Campana R, et al. Comparative effect of chlorhexidine and some mouthrinses on bacterial biofilm formation on titanium surface[J]. Curr Microbiol, 2011, 62(2): 445-451
- [15] Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration[J]. Science, 1987, 237(4822): 1588-1595
- [16] Zhao L, Chu PK, Zhang Y, et al. Antibacterial coatings on titanium implants[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009, 91(1): 470-480
- [17] Ercan B, Taylor E, Alpaslan E, et al. Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy[J]. Nanotechnology, 2011, 22(29): 295102
- [18] 马瑞, 朱敏, 刘正. 血链菌死菌在生物膜再形成中的作用观察[J]. 上海口腔医学, 2002, 11(1): 37-39
- [19] 甘露, 杨帮成, 张兴栋. 细菌在生物活性钛表面的粘附行为[J]. 稀有金属材料与工程, 2009, 38(7): 1242-1245
- [20] Quirynen M, Bollen C ML, Papaioannou W, et al. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: Short-term observations [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 1996, 11(2): 169-178

[收稿日期] 2014-09-29