

牙龈卟啉单胞菌定植对钛表面氧化膜特性的影响

明盼盼,邵水易,邱 憬*

(南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室,南京医科大学附属口腔医院种植科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**研究牙龈卟啉单胞菌定植对钛表面氧化膜特性的影响。**方法:**将纯钛试件浸泡于牙龈卟啉单胞菌悬液中进行共培养,采用扫描电镜观察钛表面牙龈卟啉单胞菌生物膜的微结构。以牙龈卟啉单胞菌悬液为实验组,生理盐水为对照组,收集 7、14、21 d 的试件和浸泡液,采用 X 射线光电子能谱(XPS)分析浸泡后纯钛的表面特性,采用电感耦合-等离子体发射光谱仪(ICP-OES)检测不同时间点浸泡液中的钛离子释放量。**结果:**扫描电镜观察到牙龈卟啉单胞菌在钛表面定植形成致密的生物膜。XPS 广谱分析显示,钛表面的钛和氧元素含量随细菌作用时间延长逐步降低;XPS 高像素谱分析显示,钛表面的二氧化钛含量随细菌作用时间延长逐步降低。ICP-OES 检测发现随着细菌作用时间的延长,钛离子释放量增加,且第 1 周释放量最多。**结论:**牙龈卟啉单胞菌能在钛表面定植形成致密生物膜,引发钛表面氧化膜破坏和钛离子释放,该效应随细菌作用时间延长而加剧。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌;钛;氧化膜

[中图分类号] R783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)10-1249-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20161023

Effects of *Porphyromonas gingivalis* colonization on titanium surface oxide film properties

Ming Panpan, Shao Shuiyi, Qiu Jing*

(Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Oral Implantology, Affiliated Hospital of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of *Porphyromonas gingivalis* colonization on titanium surface oxide film properties. **Methods:** The samples of pure titanium were immersed in *Porphyromonas gingivalis* bacterial suspensions. Biofilm microstructure on the titanium surface was observed using scanning electron microscopy (SEM). The experimental groups were immersed in bacterial suspensions while the control group was immersed in physiological saline. After being co-cultured for 7, 14, and 21 days, both samples and solutions were collected to analysis titanium surface properties using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and to detect the quantity of titanium ion release using inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES), respectively. **Results:** SEM observed a dense biofilm after *Porphyromonas gingivalis* colonized on the titanium surface. With co-culture time increased, the XPS survey spectra showed reductions in the surface levels of titanium and oxygen, corresponding with an evident reduction of dominant titanium dioxide (TiO₂) on the titanium surface revealed by the XPS high resolution spectra. ICP-OES indicated a increase of titanium ion release after colonization of *Porphyromonas gingivalis* on the titanium surface with the time extension, and the fastest release rate happened in the first week. **Conclusion:** *Porphyromonas gingivalis* was able to colonize on the titanium surface and form a dense biofilm. *Porphyromonas gingivalis* colonization weakened the protective TiO₂ film on the titanium surface and induced the release of titanium ions, which enhanced with the bacterial action time prolonged.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; titanium; surface oxide film

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(10):1249-1253]

[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“六大人才高峰”资助(2014-WSW-035);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(2014-37)

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

种植义齿是口腔医学领域的一个突破性进展,随着该技术在临床上日益广泛应用,种植体周围炎也逐渐受到关注。种植体周围炎会影响种植义齿的远期成功率,是种植牙失败的主要原因之一^[1]。Van Velzen 等^[2]的10年临床随访研究显示,种植牙的成功率为91.6%,而种植体周围炎的发生率为7%。与牙周病类似,细菌定植在种植体周围炎的发生发展中起着至关重要的作用。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, P.g)是目前已公认的牙周病主要致病菌之一^[3],同时也被认为是种植体周围炎的可疑致病菌。已有动物模型实验和临床检测研究发现,在种植体周围炎导致失败的种植体周围,聚集着大量革兰氏阴性厌氧菌,其中牙龈卟啉单胞菌具有很高的检出率^[4-6]。

口腔是一个存在众多细菌的复杂微生物环境,钛种植体的应用必然与口腔菌群发生千丝万缕的联系。Proff 等^[7]研究发现,牙龈卟啉单胞菌可穿过种植体颈部微间隙,并能在种植体表面存活。Zhang 等^[8]研究了内氏放线菌在钛表面定植后对钛表面氧化膜的破坏以及由此引发的钛腐蚀行为。Souza 等^[9]则研究了变形链球菌和白色念珠菌定植后对钛表面的生物腐蚀和破坏。然而,作为种植体周围炎的可疑致病菌,牙龈卟啉单胞菌在钛表面定植后对其表面特性的影响,目前尚未见研究报道。本研究拟在钛表面构建牙龈卟啉单胞菌微生物膜,观察细菌定植,并研究该菌对钛表面氧化膜特性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

纯钛片(99.5%, Alfa Aesar, 英国), SiC 砂纸(鹰牌, 湖北玉立公司), 牙龈卟啉单胞菌(ATCC 33277, 南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室), 牛脑心浸出液(BHI, Oxoid 公司, 英国), 琼脂(Aiosharp 公司, 日本), 氯化血红素(南京都莱生物), 维生素 K₁(上海阿拉丁公司), 脱纤维绵羊血(南京便诊), 厌氧工作站(Ruskinn Bugbox 公司, 英国), 细菌浊度仪(WGZ-2XJ, 上海昕瑞), 场发射扫描电镜(LEO 1530VP, Zeiss 公司, 德国), X 射线光电子能谱仪(XPS, PHI 5000 VersaProbe, Ulvac-Phi 公司, 日本), 电感耦合-等离子体发射光谱仪(ICP-OES, Vista AX, Varian 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 试件准备

制备纯钛试件(7 mm×7 mm×0.25 mm), SiC 砂

纸逐级打磨(400、600、800、1 000、1 200、1 500 目)。双蒸水、无水乙醇、双蒸水依次超声清洗 10 min, 消毒, 烘干备用。

1.2.2 牙龈卟啉单胞菌培养

将冻存的牙龈卟啉单胞菌菌株复苏于 BHI 血琼脂板(30%牛脑心浸出液, 10%琼脂, 10%氯化血红素+维生素 K₁溶液, 10%脱纤维羊血), 置于 37℃ 的厌氧工作站(80% N₂、10% CO₂、10% H₂)中培养, 培养 4~5 d 后形成直径约 2 mm、表面光滑的黑色球形菌落, 采用扫描电镜观察细菌形态。

1.2.3 钛表面细菌生物膜的观察

将血琼脂板上生长状态良好的牙龈卟啉单胞菌接种于 BHI 液体培养基(30%牛脑心浸出液, 10%氯化血红素+维生素 K₁溶液), 厌氧培养 36~48 h, 使用细菌浊度仪配制成浓度 1×10⁷ CFU/mL 菌悬液备用。将消毒保存的纯钛试件置于 48 孔板中, 每孔接种 1 mL 菌悬液, 共培养 3 d 后, 测量菌悬液 pH 值, 用 2.5%戊二醛溶液 4℃ 固定 30 min, 梯度酒精(30%、50%、70%、80%、90%、100%)脱水, 冷冻干燥, 采用扫描电镜观察细菌生物膜的形态结构。

1.2.4 细菌与钛片共培养

将血琼脂板上生长状态良好的牙龈卟啉单胞菌接种于 BHI 液体培养基, 厌氧培养 36~48 h, 使用细菌浊度仪配制成浓度 1×10⁷ CFU/mL 菌悬液备用。将制备并消毒保存的纯钛试件置于 48 孔板中, 每孔接种 1 mL 菌悬液作为试验组, 按照接种后培养时间分为: 7 d 组、14 d 组、21 d 组, 接种生理盐水培养 21 d 作为对照组。各组置于厌氧工作站培养, 每 3~4 d 更换菌悬液和生理盐水。

1.2.5 细菌作用后纯钛表面分析

收集各组试件, 双蒸水、无水乙醇、双蒸水依次各超声清洗 10 min, 采用 XPS 分析试件的表面元素组成及元素化学态。入射 X 线: Al 靶, 电压 15 kV, 功率 25 W, 入射角 45°。表面元素广谱分析: 160 eV, 表面元素高分辨率窄谱分析: 40 eV。解析元素结合能参考数据库: National Institute of Standards and Technology XPS Online Database。以外源性碳(C)作为 XPS 谱特征参照元素, 碳结合能: 284.8 eV。根据峰面积和原子灵敏度因子进行表面元素含量和化学状态分析。

1.2.6 钛离子释放检测

收集 7、14、21 d 实验组和对照组的浸泡液, 每组 3 个样本, 采用 ICP-OES 检测各组浸泡液中的钛离子释放量。

1.3 统计学方法

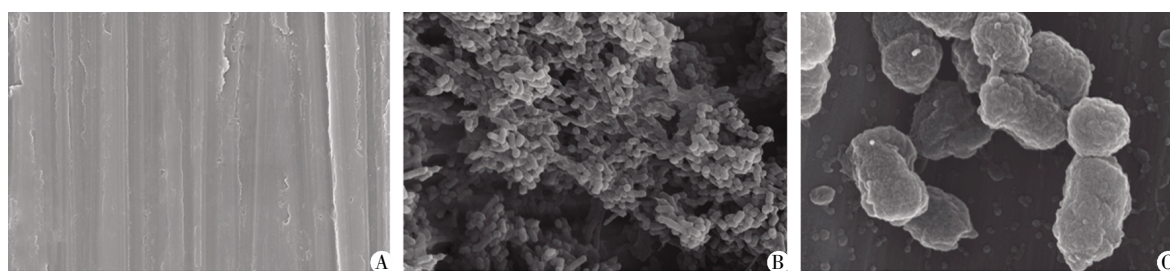
采用 SPSS11.5 统计软件,对 各 组 浸 泡 液 中 的 钛 离 子 释 放 量 进 行 方 差 齐 性 检 验 显 示 数 据 方 差 齐,采 用 单 因 素 方 差 分 析 和 SNK 多 重 比 较,检 验 水 准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 钛表面细菌生物膜构建

扫描电镜观察显示,龈卟啉单胞菌与纯钛共培

养 3 d 后,细菌能定植于纯钛表面,形成细菌生物膜。菌悬液 pH 值从 7.3 降至 6.9。图 1A 为无细菌定植的纯钛试件表面,表面基本平坦无缺损,见均一同方向的机械打磨痕迹;图 1B 为牙龈卟啉单胞菌与在钛表面形成的微生物膜,细菌交错接触、层层堆叠形成致密的微生物膜。图 1C 为高倍镜下观察的牙龈卟啉单胞菌形态,细菌呈短杆状或椭圆形,菌体表面粗糙。



A: 纯钛表面; B: 钛表面的细菌生物膜; C: 钛表面的牙龈卟啉单胞菌。

图 1 钛及钛表面细菌生物膜的扫描电镜观察($\times 50\ 000$)

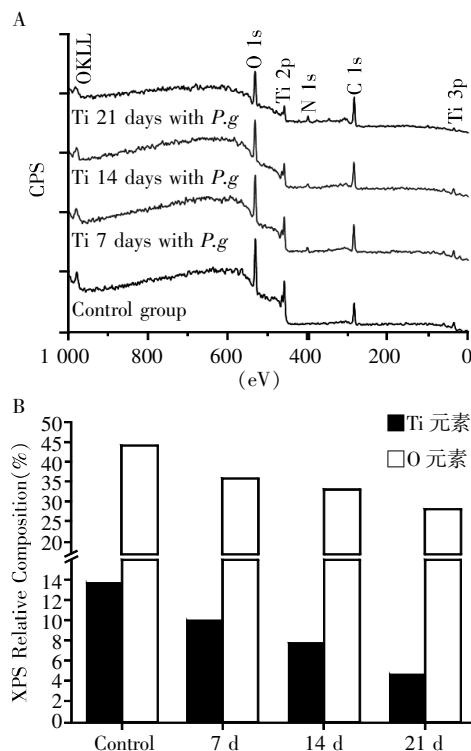
Figure 1 Scanning electron microscopy images of pure titanium surface and bacterial biofilm on the titanium surface($\times 50\ 000$)

2.2 钛表面分析

以生理盐水浸泡试件为对照,对牙龈卟啉单胞菌定植 7、14、21 d 后试件进行 XPS 广谱和高像素谱分析。图 2A 的 XPS 广谱分析显示,实验组和对照组试件表面均检测到钛和氧元素,相比对照组,Ti 2p、O 1s 峰强度在牙龈卟啉单胞菌定植 7、14、21 d 后的钛表面降低,随定植时间延长降低更为明显。图 2B 为 XPS 广谱的钛表面元素定量,结果显示,钛表面的钛和氧元素含量在牙龈卟啉单胞菌定植后降低,随定植时间延长降低更为显著。图 3 为 O 1s 和 Ti 2p 的 XPS 高像素谱分析,结果表明,钛表面 O 1s 包含 529.7eV 和 530.8 eV 2 个氧化物峰,Ti 2p 则包含 458.6 eV 和 464.4 eV 2 个 TiO_2 峰。在牙龈卟啉单胞菌定植后,O 1s 的氧化物峰和 Ti 2p 的 TiO_2 峰均呈逐步下降趋势,细菌定植时间越长降低越明显。

2.3 钛离子释放

ICP-OES 检测 7、14、21 d 实验组浸泡液中的钛离子释放量数据见表 1。对照组生理盐水浸泡液中的钛离子释放量低于检测水平下限 (<0.002 ppm),无检测数据。结果显示,牙龈卟啉单胞菌定植于钛表面 7、14、21 d 后,钛离子释放总量随时间延长而增加。第 1 周的钛离子释放速率最快,第 2 周和第 3 周的钛离子释放速率均显著低于第 1 周 ($P < 0.05$),而第 2 周和第 3 周的钛离子释放速率无显著性差异 ($P > 0.05$)。



A: 牙龈卟啉单胞菌定植前后纯钛表面元素的 XPS 广谱分析; B: 牙龈卟啉单胞菌定植前后纯钛表面钛元素和氧元素含量。

图 2 牙龈卟啉单胞菌定植前后纯钛表面元素的 XPS 广谱分析

Figure 2 XPS survey spectra of pure titanium surface elements before and after immersion in medium containing *Porphyromonas gingivalis*

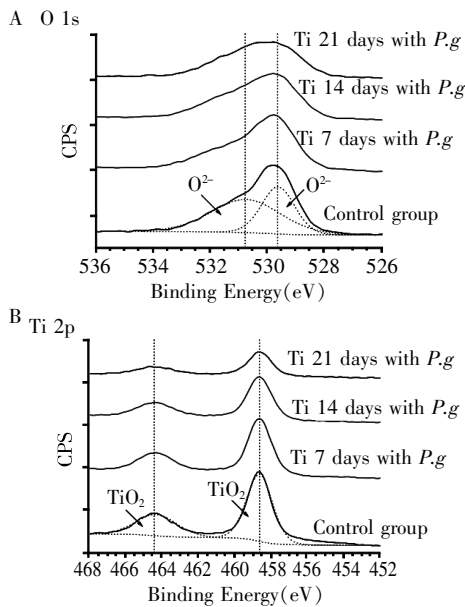


图3 牙龈卟啉单胞菌定植前后纯钛表面 O 1s(A)和 Ti 2p (B)的 XPS 高像素谱分析

Figure 3 XPS high-resolution spectra of O 1s (A) and Ti 2p (B) on the pure titanium surface before and after immersion in medium containing *Porphyromonas gingivalis*

表1 牙龈卟啉单胞菌定植钛表面后的钛离子释放量

Table 1 Quantity of titanium ion release after colonization of *Porphyromonas gingivalis* on the titanium surface ($\mu\text{g}/\text{cm}^2, n=3$)

定植周数	钛离子每周释放量	钛离子释放总量
第1周	0.319 ± 0.001	0.319 ± 0.001
第2周	0.232 ± 0.003*	0.551 ± 0.002
第3周	0.234 ± 0.004*	0.784 ± 0.003

与第1周比较, *P < 0.05。

3 讨论

伴随着种植义齿越来越广泛的临床运用,种植体周围炎也开始倍受关注,大量动物实验和临床研究证实菌斑生物膜的积聚是种植体周围炎发生和发展的主要病因。口腔环境是一个复杂的微生态环境,当细菌定植于种植体表面形成微生物膜后,代谢产物可改变局部的氧浓度、盐浓度和 pH 值,易在种植体表面构成散在的原电池,形成电化学腐蚀^[10]。本研究发现,作为种植体周围炎可疑致病菌的牙龈卟啉单胞菌,能在纯钛表面定植形成稳定的微生物膜,继而破坏钛表面氧化膜,并导致钛离子的释放。

Branemark 教授在研究骨微循环实验中意外发现钛与骨组织的牢固结合,之后进行系统的实验和临床研究,提出了骨结合理论。该理论的基础是纯

钛具有良好的骨组织生物相容性。金属材料的生物相容性取决于金属本身以及表面氧化膜的稳定性,在医用金属材料的应用性研究领域,深入了解金属材料的表面氧化膜特性十分重要。钛在空气中表面会很快形成一层纳米级厚度的天然氧化膜,阻止空气中的氧向钛基体内部进一步扩散。该氧化膜既具有保护作用,也决定了钛良好的生物学特性。目前的表面元素分析技术主要为 XPS 和 EDS。XPS 是分析 X 射线激发产生的光电子能量,用来测定材料表面 10 nm 范围内元素的化学态和相对含量,属于高灵敏度的表面分析技术。EDS 是分析特征 X 射线的能量,探测深度在材料表面 5 μm 以内,属于体相分析技术,用于分析材料内部的元素组成。因此,XPS 是更为敏锐的表面分析技术。本研究通过 XPS 分析发现,钛表面氧化膜的主要成分为二氧化钛(TiO_2),这与 Lewandowska 等^[11]的研究结果一致。已有研究证实,二氧化钛具有优异的生物相容性和骨结合能力^[12]。

在潮湿环境中,金属表面会吸附一层水膜。如水膜呈酸性,发生电化学腐蚀时,氢离子获得电子析出氢气,称为析氢腐蚀;如水膜呈弱酸性或中性,能溶解较多氧气,发生电化学腐蚀时,氧气得电子而析出 OH^- ,称为吸氧腐蚀。Zhang 等^[8]研究了内氏放线菌对钛表面的腐蚀行为,结果表明,内氏放线菌具有较强的代谢产酸能力,细菌作用 7 d 后,培养基 pH 值由 7.3 降至 5.0,钛表面出现点蚀孔,表面氧化膜被显著破坏。该现象主要源于钛表面酸性水膜导致的析氢腐蚀。本研究中,牙龈卟啉单胞菌与纯钛试件共培养 3 d 后,菌悬液 pH 值由 7.3 降至 6.9,培养液为偏酸性的中性状态。考虑到细菌黏附于钛表面,其代谢的酸性产物直接释放于钛表面,而致密的细菌生物膜可在一定程度阻断外周培养液对酸性产物的中和作用,由此可推断,钛表面局部的实际 pH 值应低于培养液,呈弱酸状态。因此,细菌与纯钛表面接触的这层水膜呈弱酸性或中性,发生电化学腐蚀的机制为吸氧腐蚀。

钛表面的天然氧化膜具有生物惰性^[13],能阻止钛基体金属向体液环境释放钛离子,减少生物腐蚀现象的发生。本研究中的 XPS 表面分析发现,钛表面的钛和氧元素含量以及二氧化钛含量均随细菌作用时间延长而逐步降低(图 2、3),这说明牙龈卟啉单胞菌定植破坏了钛表面氧化膜。Zhang 等^[8]在内氏放线菌影响钛腐蚀行为的研究中也通过 XPS 检测到细菌对钛氧化膜的显著破坏,与本研究结果类

似。细菌定植破坏保护性的钛表面氧化膜,将启动钛的生物腐蚀,进而导致钛基体金属释放钛离子。本研究通过 ICP-OES 检测证实了这一现象(表1)。对照组生理盐水浸泡 21 d 后,钛离子释放量仍低于检测水平下限(< 0.002 ppm),显示了钛氧化膜优良的化学稳定性,能有效阻止钛基体向体液环境释放钛离子。但在牙龈卟啉单胞菌定植于钛表面后,可检测到明显的钛离子释放,其总量随时间延长增加,第 1 周钛离子释放速率最快,达 $0.319 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,第 2 周和第 3 周的钛离子释放速率有所降低,稳定在 $0.232\sim 0.234 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。Wachi 等^[14]的动物实验发现,在大鼠上腭植入的钛种植体周围组织中可检测到钛离子释放。已有研究证实,一定量的钛离子能诱发机体组织的免疫炎症反应,促进破骨细胞增殖分化,并抑制成骨细胞功能^[15-16]。由此可见,牙龈卟啉单胞菌定植会破坏钛表面氧化膜,降低钛的耐腐蚀性,引发钛离子释放,这可能对钛的骨结合性能造成不利影响。在今后研究中,有必要对此进行更深入的探索。

综上所述,牙龈卟啉单胞菌作为种植体周围炎的可疑致病菌之一,能够定植于钛表面形成致密的微生物膜,破坏具有保护作用的钛表面氧化膜,引发钛离子释放,且效应随细菌作用时间延长而加剧。该现象可为种植体周围炎发病机理的探索提供新思路。

[参考文献]

[1] De Waal YC, Van Winkelhoff AJ, Meijer HJ, et al. Differences in peri-implant conditions between fully and partially edentulous subjects: a systematic review [J]. *J Clin Periodontol*, 2013, 40(3): 266-286

[2] Van Velzen FJ, Ofec R, Schulten EA, et al. 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 Titanium dental implants with a SLA surface: a prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2015, 26(10): 1121-1128

[3] Kaman WE, Galassi F, De Soet JJ, et al. Highly specific Protease-Based approach for detection of porphyromonas gingivalis in diagnosis of periodontitis [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(1): 104-112

[4] De Leitão JA, De Lorenzo JL, Avila-Campos MJ, et al. Analysis of the presence of pathogens which predict the risk of disease at peri-implant sites through polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Braz Oral Res*, 2005, 19(1):

52-57

[5] Rismanchian M, Shahabouei MH, Yaghinei J, et al. Comparative microflora assessment of natural sulci vs. deep and shallow implant sulci in partial edentulousness [J/OL]. *J Oral Implantol*, (2013-02-11) [2016-04-29]. <http://www.joionline.org/doi/pdf/10.1563/AAID-JOI-D-12-00150>

[6] 王宏远,李 婧,曹庆堂.种植体周围袋中牙龈卟啉单胞菌的 PCR 检测及临床意义[J].*口腔颌面修复学杂志*, 2010, 11(5): 293-296

[7] Proff P, Steinmetz I, Bayerlein T, et al. Bacterial colonisation of interior implant threads with and without sealing [J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2006, 65(1): 75-77

[8] Zhang SM, Qiu J, Tian F, et al. Corrosion behavior of pure Titanium in the presence of *Actinomyces naeslundii* [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24(5): 1229-1237

[9] Souza JC, Henriques M, Oliveira R, et al. Do oral biofilms influence the wear and corrosion behavior of titanium? [J]. *Biofouling*, 2010, 26(4): 471-478

[10] Koh I, Oshida Y, Andres CJ, et al. Effect of surface area ratios and bacteria on electrochemical behavior of galvanically coupled titanium [J]. *Int J Prosthodont*, 2008, 21(5): 433-436

[11] Lewandowska M, Roguska A, Pisarek M, et al. Morphology and chemical characterization of Ti surfaces modified for biomedical applications [J]. *Biomol Eng*, 2007, 24(5): 438-442

[12] Sul YT, Johansson C, Byon E, et al. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive Titanium implants [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(33): 6720-6730

[13] Pan J, Thierry D, Leygraf C. Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on Titanium for implant application [J]. *Electrochim Acta*, 1996, 41(7): 1143-1153

[14] Wachi T, Shuto T, Shinohara Y, et al. Release of Titanium ions from an implant surface and their effect on cytokine production related to alveolar bone resorption [J]. *Toxicology*, 2015, 327(2): 1-9

[15] Nishimura K, Kato T, Ito T, et al. Influence of Titanium ions on cytokine levels of murine splenocytes stimulated with periodontopathic bacterial lipopolysaccharide [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2014, 29(2): 472-477

[16] Mine Y, Makihira S, Nikawa H, et al. Impact of Titanium ions on osteoblast-, osteoclast- and gingival epithelial-like cells [J]. *J Prosthodont Res*, 2010, 54(1): 1-6

[收稿日期] 2016-04-29