

细菌在生物活性钛表面的粘附行为

甘露, 杨帮成, 张兴栋

(四川大学, 四川 成都 610064)

摘要: 以经酸碱处理、碱热处理和阳极氧化处理后的生物活性钛材为研究对象, 对材料进行了表面形貌分析和表面能的测定, 并选用常见感染细菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为研究菌株, 采用体外共培养法培养, 通过 SEM 对细菌的形态、在材料表面的粘附情况和粘附量进行观察, 通过 MTT 法对细菌粘附量进行半定量测定, 综合评价生物活性钛的表面结构对细菌增殖和粘附的影响。结果表明, 在 3 种生物活性钛材料表面, 细菌的粘附和增殖受材料表面形貌影响显著, 其中碱热处理钛表面和阳极氧化钛表面不利于细菌的增殖和粘附, 显示出较好的抑菌性能。

关键词: 生物活性钛; 金黄色葡萄球菌; 大肠杆菌; 细菌粘附

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2009)07-1242-04

在常用的外科植入材料中, 钛具有优良的性能, 是当今广泛应用于人体的硬组织修复材料^[1]。钛的化学稳定性高, 在金属材料中其力学性能与骨最为匹配; 钛表面的钝化膜使其耐腐蚀, 在体液中不溶解、不产生有害物, 与人体组织有良好的亲和性; 植入骨组织后能与骨组织形成骨整合, 生物相容性好, 使用安全^[2]。钛表面经酸碱处理、碱热处理和阳极氧化处理后能够形成一层钛凝胶, 其中富含的 Ti-OH 基团能诱导磷酸钙晶核生成, 从而形成类骨磷灰石层, 表现出生物活性^[3~5]。

生物医用材料目前失效的最大问题之一在于后继感染^[6]。感染主要由金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)引起, 伴随有大肠杆菌(革兰氏阴性菌)、表皮葡萄球菌(革兰氏阳性菌)、铜绿假单胞菌(革兰氏阴性菌)等细菌存在^[7,8]。当植入材料引发感染时, 感染部位将有大量急性炎症细胞出现, 在材料周围形成纤维结缔组织包囊并形成脓肿, 最后将导致植入体失败^[9]。

为进一步提高生物活性钛植入体的成功率, 有必要研究生物活性钛材的抑菌性能, 降低其感染率。本实验以酸碱处理、碱热处理和阳极氧化处理 3 种表面改性方法得到的生物活性钛为研究对象, 采用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌与材料共培养的方法, 定性和定量地观察细菌的形态、增殖和粘附情况, 比较 3 种生物活性钛材对细菌增殖和粘附的抑制能力, 优化选择抑菌性生物活性钛植入材料。

1 实验

实验所用仪器和试剂有: 接触角和表面能测定仪(KRUSS-GmbH-DSA100); 扫描电镜(JSW-5900LV-JEOL); 紫外分光光度计(755B 型); 酶联免疫检测仪(BIO-RAD550); 蛋白胨(OXOID, UK); 酵母抽提物(OXOID, UK); NaCl(BBI, USA); 二苯基四氮唑溴盐(MTT, Sigma, USA, 进口分装, 250 mg/瓶)。

细菌株: 金黄色葡萄球菌(S.a——*Staphylococcus aureus* ATCC 25923); 大肠杆菌(E.c——Gram-negative strain of *Escherichia coli* ATCC 25922)。

用水磨砂纸将纯钛片(10 mm×10 mm×1 mm)表面打磨光滑, 再依次用石油醚、丙酮、乙醇和去离子水清洗后烘干。然后按照文献[3~5]的方法分别进行碱热处理、酸碱处理和阳极氧化处理, 获得具有生物活性的碱热处理钛(AH-Ti)、酸碱处理钛(AA-Ti)和阳极氧化处理钛(AO-Ti)。处理后的材料表面形貌用扫描电镜观测。接触角用 KRUSS-DSA100 测量仪以纯净水和二碘甲烷为介质测定, 并使用 Owens 法计算获得表面能。实验中以未处理的光滑钛材(P-Ti)为对照。

将冻存细菌株用新鲜培养基复苏后进行平板涂布, 挑选生长良好的菌落用培养基增菌 24 h, 再用紫外分光光度计调整菌液浓度至 1×10^6 CFU。接种菌液于材料表面后, 在恒温培养箱中 37 °C 培养 6, 12 和 24 h 后测定 MTT 值(490 nm 处测得菌液的 OD 值)。

培养 12 h 后的材料用戊二醛水溶液(体积分数

收稿日期: 2008-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助(50672062)

作者简介: 甘露, 女, 1983 年生, 硕士研究生, 四川大学生物材料工程研究中心, 四川 成都 610064, 电话: 028-85416391; 通讯作者: 杨帮成, 电话: 028-85416391, E-mail: yangbcheng@126.com

2.5%) 在 4 °C 固定 24 h, 然后用乙醇水溶液依次进行梯度脱水(体积分数分别为 50%, 70%, 90%, 100% 和 100%), 每次 10 min; 再用醋酸异戊酯溶液进行梯度脱水(体积分数分别为 50%, 70%, 90%, 100% 和 100%), 每次 10 min; 最后进行临界点干燥。对材料表面喷金后在扫描电镜下观察细菌形态和细菌粘附量。

2 结果与讨论

2.1 材料表面形貌的 SEM 观察

由扫描电镜照片可以看出(图 1), 未处理纯钛为光滑表面, 3 种活化处理后的材料表面都得到了多孔结构。AA-Ti 的表面网孔最大, 其次为 AO-Ti 表面, AH-Ti 表面的网孔相对最小。

2.2 材料表面的接触角和表面能

表 1 给出了几种钛材的接触角和表面能。P-Ti 和 AO-Ti 的水接触角相似, 分别为 61.2° 和 66.4°, 相较其他材料而言具有更疏水的表面。AA-Ti 表面水接触角为零, 表现出强亲水性。AH-Ti 表面接触角介

于 AA-Ti 表面和 P-Ti 表面, 其水接触角为 20.1°。由于测得 AA-Ti 水接触角为零, 其表面能无法给出确定值, 但显然大于其他材料表面。AH-Ti 表面能次之, AO-Ti 和 P-Ti 的表面能相似, 都较低。

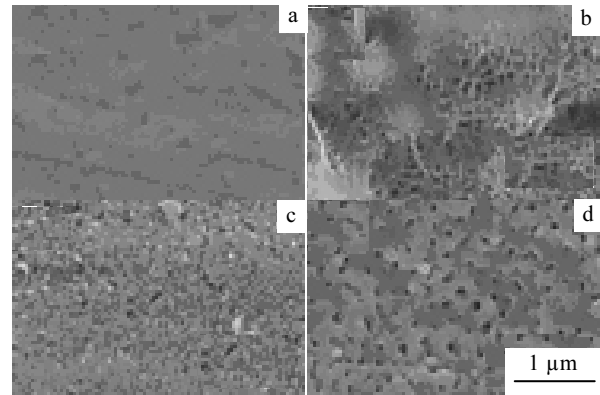


图 1 材料表面的扫描电镜照片

Fig.1 SEM photographs of materials: (a) P-Ti; (b) AA-Ti; (c) AH-Ti; and (d) AO-Ti

表 1 材料的接触角及表面能

Table 1 Material contact angles and surface energies

Materials	H ₂ O contact angle/(°)	CH 312 contact angle/(°)	Surface energy/mN·m ⁻¹	Disperse-Pt	Polar-Pt
P-Ti	61.2	36.4	52.45	41.18	11.27
AO-Ti	66.4	35.2	50.36	41.92	8.44
AH-Ti	20.1	27.3	75.37	45.31	30.06
AA-Ti	0	15.1	-	-	-

2.3 SEM 观察结果

图 2 和图 3 分别是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在材料表面培养 12 h 后的扫描电镜照片。可以观察到 4 种材料表面都有细菌生长。材料表面的金黄色葡萄球菌呈圆形或椭圆形且边缘清晰。金黄色葡萄球菌的尺寸一般在 0.4~1.2 μm 之间, 本实验中的细菌大小为 0.6~1.0 μm。该葡萄球菌在材料表面呈少数散乱分布, 大部分团聚呈葡萄串状粘附。在 AA-Ti 的网状表面上, 由于 AA-Ti 表面孔径尺寸基本在 1 μm 以上, 所以可看到大量细菌粘附在孔内生长, 而 AH-Ti 和 AO-Ti 由于表面的微孔较小, 不超过 0.5 μm, 所以细菌依然停留在孔外生长。

在材料表面的大肠杆菌呈短杆状或长杆状, 边缘清晰, 散乱分布在材料表面。大肠杆菌的尺寸一般为 0.5~3.0 μm, 本实验所用细菌大小在 0.8~2.6 μm 间。两种细菌在材料表面粘附的量以 P-Ti 表面最少, AH-Ti 表面和 AO-Ti 表面次之, 以 AA-Ti 表面的细菌量最多。

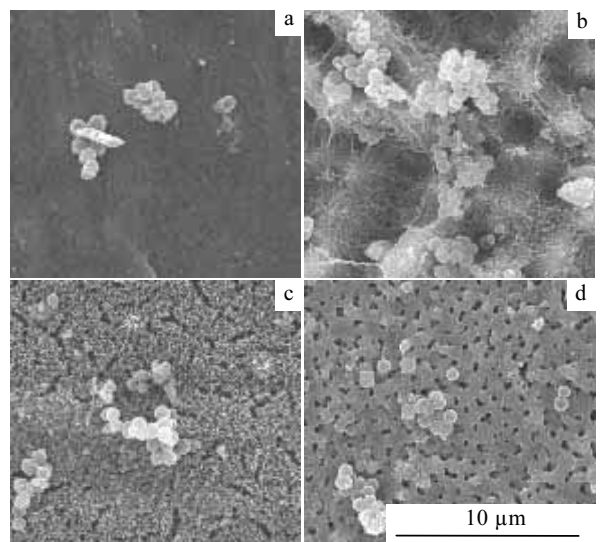


图 2 金黄色葡萄球菌在材料表面培养 12 h 后的扫描电镜照片

Fig.2 SEM images of S.a cultured for 12 h on materials:(a) P-Ti; (b) AA-Ti; (c) AH-Ti; and (d) AO-Ti

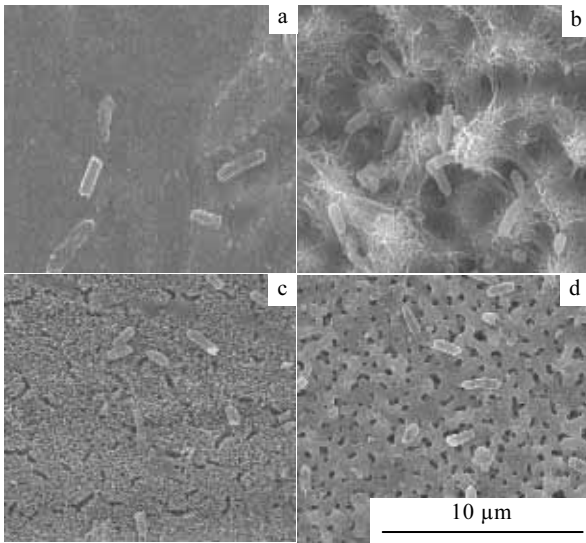


图 3 大肠杆菌在材料表面培养 12 h 后的扫描电镜照片
Fig.3 SEM images of E.c cultured for 12 h on materials: (a) P-Ti; (b) AA-Ti; (c) AH-Ti; and (d) AO-Ti

2.4 MTT 实验结果

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性二苯基四氮唑溴盐(MTT)还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲臞(Formazan)并沉积在细胞中。死细胞线粒体不发生反应。二甲基亚砷(DMSO)能溶解细胞中的甲臞,在 490 nm 波长处使用酶联免疫检测仪测定其光吸收值可以间接反映活菌数量。

在一定的细菌数量范围内,MTT 的结晶量与细菌数成正比,即测得的 OD 值与菌液中活细胞的数量成正比关系。实验结果表明(图 4 和图 5),AA-Ti 表面细菌粘附量最高,AH-Ti 和 AO-Ti 表面细菌粘附量居中,

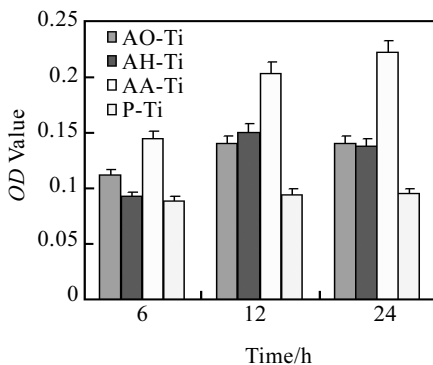


图 4 金黄色葡萄球菌在各种材料表面培养不同时间后的 OD 值
Fig.4 OD values of S.a cultured for different time on different materials

P-Ti 表面细菌粘附量最低;金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在 4 种材料表面的粘附有相似的规律。

2.5 讨论

材料表面的形貌、粗糙度、结构和性质(接触角和表面能)等都是影响材料与细菌相互作用的因素。粗糙的表面利于细胞在材料表面的定植和生长。在本实验中,证明了粗糙的表面同样利于细菌的粘附和繁殖。而未处理的纯钛是光滑表面,不利于细菌的粘附。

酸碱处理、碱热处理和阳极氧化处理后的表面形成了网孔状的表面结构,大大增加了材料的表面积。酸碱处理得到的是疏松的网孔结构,网孔之间彼此连通。阳极氧化得到的表面属于微孔结构,孔较小,有一定的连通性。由于微孔较小,细菌只能在网孔表面粘附,不能在微孔内生长。碱热处理表面也属于微孔结构,同时在表面有多个较深裂隙。碱热处理表面的微孔和裂隙属于微纳米级,因此细菌也不能在其内生长。4 种表面结构中,酸碱处理得到的表面形貌非常利于细菌的粘附和生长;碱热处理和阳极氧化处理的表面也有网孔结构,但都属于微纳米尺寸,不利于细菌的粘附,细菌无法在其内定植。

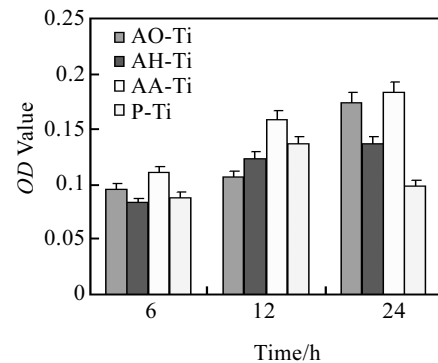


图 5 大肠杆菌在各种材料表面培养不同时间后的 OD 值
Fig.5 OD value of E.c cultured for different time on different materials

使用 SPSS10.0 软件对材料表面的 S.a 和 E.c 粘附量进行统计学分析表明:AA-Ti 与 AO-Ti、AH-Ti 和 P-Ti 都有显著性差异($P < 0.05$),其表面细菌粘附量显著地高于其他材料,其抑菌性能最差。AH-Ti 与 AO-Ti 无显著性差异($P > 0.05$),但它们和 P-Ti 都有显著性差异($P < 0.05$)。因此在 P-Ti 表面细菌粘附量显著低于其他材料,具有良好的抑菌性能;而 AH-Ti 和 AO-Ti 表面细菌粘附量没有显著差别,其粘附量高于 P-Ti 表面,但显著低于 AA-Ti 表面,表现出一定的抑菌性能。

由表 1 可见:AA-Ti 表面水接触角为零,表现出强亲水性,其表面能显著高于其他材料;AH-Ti 表面能

次之,具有一定的亲水性;AO-Ti表面和P-Ti表面能较低,其亲水性较低。SPSS10.0软件统计学分析表明:P-Ti与AO-Ti的表面能无显著性差异($P>0.05$),但它们和AH-Ti的表面能都有显著性差异($P<0.05$)。从本实验可以看出,材料的表面能是影响细菌粘附的重要因素,但是在50到80 mN/m范围内的表面能对细菌粘附具有相似的作用。

S.a和E.c在4种材料表面的粘附有相似的规律,且S.a和E.c分别是革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的代表菌种。其中,未处理纯钛表面最不利于细菌的粘附,而酸碱处理表面非常利于细菌的粘附,阳极氧化和碱热处理表面的细菌粘附性能相同,介于酸碱处理和未处理纯钛之间。结合材料表面形貌观测结果,可以看出,材料的粗糙表面、表面网状结构和表面能是影响细菌在材料表面定植的主要因素。

对比4种材料,未处理纯钛表面最不利于细菌的粘附,即该表面相较其它3种表面有更好的抑菌效果,但是该表面不具有生物活性^[10],不是植入材料的首选。在3种生物活性钛表面中,碱热处理表面和阳极氧化钛表面细菌粘附和增殖较少,表现出较好的抑菌能力,结合其优良的生物活性^[4],将是良好的植入材料。

3 结 论

1) 钛材经不同方法进行表面改性后,由于其表面粗糙度、表面能等微纳米结构因素不同,表现出不同的抗菌抑菌性能。

2) 钛材经碱热处理或阳极氧化表面处理后,由于

其表面微纳米空隙的孔径小于细菌尺寸,不利于细菌在其表面定植,具有良好的抗菌抑菌性。

3) 钛材经表面改性后,其表面能对细菌粘附具有决定性作用,但在50到80 mN/m范围内的表面能对细菌粘附具有相似的作用。

4) 通过优化钛材表面改性方法,在赋予其生物活性的同时,还可以赋予其一定的抗菌抑菌性能。

参考文献 References

- [1] Van Noort R. *J Mater Sci*[J], 1987, 22: 3801
- [2] Niinomi M. *Adv Mater* [J], 2003, 4: 445
- [3] Wen H B, De Wijn J R *et al. J Biomed Mater Res*[J], 1998, 41: 227
- [4] Kim H M, Miyaji F, Kokubo T *et al. J Biomed Mater Res*[J], 1999, 45: 100
- [5] Yang B C, Uchida M, Kim H M *et al. Biomaterials*[J], 2004, 25: 1003
- [6] Feldman D S, Von Recum A F. *Biomaterials*[J], 1985, 6: 352
- [7] Gristina A G, Hobgood C D, Webb L X *et al. Biomaterials*[J], 1987, 84: 23
- [8] Yea L O, Anneta R, George G *et al. Langmuir*[J], 1999, 15: 2719
- [9] Gristina A G. *Science*[J], 1987, 237: 1588
- [10] Dee K C, Puleo D A, Bizios R. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*[M]. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2002

Adhesion Behavior of Bacteria on Bioactive Titanium Metals

Gan Lu, Yang Bangcheng, Zhang Xingdong

(Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The titanium metals subjected to surface modification have good biocompatibility, bioactivity and low cell toxicity. It could induce apatite formation in vitro and bone bonding in vivo. However, the infection of implant is a serious problem for the clinic, so it is important to study the interaction of titanium metal with germs involving in the infection. The titanium metals subjected to anodic oxidation treatment (AO-Ti), acid-alkali treatment (AA-Ti) and alkali-heat treatment (AH-Ti) were used in this study. The germs of Gram-positive strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and Gram-negative strain of *Escherichia coli* (ATCC 25922) were cultured on these bioactive metals. The material surfaces were characterized by SEM and DSA. The effects of surface properties on the germs were evaluated by the investigation of the cell extrinsic shape, the proliferation of bacteria according to SEM and MTT observations. The results show that the Ti metals subjected to alkali-heat treatment (AH-Ti) and anodic oxidation treatment (AO-Ti) have good bacterial restrain properties. The titanium surface topography has great effect on the bacterial adhesion and proliferation on its surface.

Key words: bioactive titanium; staphylococcus aureus; escherichia coli; bacterial adhesion

Biography: Gan Lu, Candidate for Master. Engineering Research Center in Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, P. R. China, Tel: 0086-28-85416391; Corresponding Author: Yang Bangcheng, Tel: 0086-28-85416391, E-mail: yangbchengc@126.com