网络出版时间:2022-04-19 14:02 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220415.1513.015.html

# 钛表面载银的硫酸乙酰肝素/壳聚糖抗菌涂层的构建

李娇娇,韦章澳,张维波,李向阳,陈佳龙

**摘要 目的** 研究多孔钛表面通过层层自组装技术(LBL) 制备硫酸乙酰肝素(HEP)/壳聚糖(CHI)聚电解质多层膜并 沉积纳米银后的抗菌性能。**方法** 应用 LBL 将带负电的 HEP 和带正电荷的 CHI 交替吸附在多孔钛表面形成聚电解 质多层膜,在碱性条件下装载银离子。使用扫描电子显微 镜、X 射线光电子能谱仪、接触角测量仪、电感耦合等离子体 发射光谱仪评价各制备表面性质,利用抑菌圈法、浊度法、 活/死细菌染色法和涂布平板法评估载银聚电解质多层膜的 抗菌性能。结果 材料表征手段证实聚电解质多层膜成功 沉积在钛表面,且纳米银颗粒沉积在膜表面。抗菌实验显示 载银修饰显著改善涂层抗菌能力。结论 通过层层自组装 技术在改性钛表面制备的载银 HEP-CHI 聚电解质多层膜具 有良好的抗菌性能。

关键词 钛;层层自组装;银;抗菌性

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022)05 - 0754 - 05 doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.05.015

钛及其合金广泛用于牙科种植体,但种植体感染相关并发症影响其长期疗效<sup>[1]</sup>。为解决该问题,抗生素被整合在材料表面赋予材料一定的抗菌能力;但抗生素的抗菌谱狭窄、易引发细菌耐药性等问题影响其应用效果<sup>[2]</sup>。由于广谱、高效的抗菌活性和不引发细菌耐药性,银成为抗生素的潜在替代物<sup>[3]</sup>,但载银表面制备成本高、费时、高耗能等缺点制约其应用<sup>[4]</sup>。故亟需寻找制备方法简单、抗菌效果优异的种植体表面载银技术。该研究旨在微纳米 多孔钛表面,采用层层自组装技术(layer by layer self-assemble technology, LBL)将带负电荷的硫酸乙

作者单位:安徽医科大学口腔医学院口腔材料教研室,安徽医科大学 附属口腔医院,口腔疾病研究安徽省重点实验室,合肥 230032 酰肝素(heparin sulfate, HEP)和带正电荷的壳聚糖 (chitosan, CHI)交替吸附在多孔钛表面,构建出具 有良好生物相容性的多层膜<sup>[5]</sup>,再吸附银离子,构 建出具有良好抗菌性能的涂层,为钛基植入材料抗 感染表面制备提供可行的思路。

## 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料与仪器

1.1.1 材料 纯钛(山西宝鸡有色金属有限公司);聚赖氨酸、硝酸银、HEP(美国 Sigma Aldrich 公司);丙酮(上海阿拉丁试剂有限公司);氢氧化钠、 CHI、冰醋酸(上海国药集团化学试剂有限公司);脑 心浸液肉汤(brain heaet infusion broth, BHI,青岛高 科园海博生物技术有限公司);活/死细菌染色试剂 盒(美国 Invitrogen 公司)。

1.1.2 仪器 扫描电子显微镜(日本日立有限公司);X射线光电子能谱仪(美国热电公司);接触角测试仪(德国克吕士公司);电感耦合等离子体发射光谱仪(美国热电公司)。

#### 1.2 材料制备及表征

1.2.1 载银的 HEP/CHI 聚电解质多层膜制备 将 直径 10 mm 的钛片用 80、120、240、320、500、600、 800、1000、1200、1500和2000目砂纸连续抛光,然 后依次置于丙酮、无水乙醇、去离子水中各超声清洗 3次,每次5 min,标记为Ti; 然后放入2.5 mol/L的 氢氧化钠溶液中60℃活化12h,取出后用煮沸去离 子水超声清洗5次,每次2min,之后将钛片放于煮 沸去离子水中浸泡 1.5 h,标记为 pTi;然后浸入 2 mg/ml 聚赖氨酸溶液(PLL)中12 h,取出钛片,去离 子水中漂洗,吹干,标记为 pTi-P。将 pTi-P 依次浸 于 10 mg/ml 的 HEP 溶液中(预先调节 pH = 7) 和 2 mg/ml CHI 中(预先用冰醋酸调节 pH = 4) 各 15 min。重复4次,最后一层是HEP,标记为pTi-P-LBL。将 pTi-P-LBL 浸泡在 pH 为 10、浓度为 1 mg/ ml的硝酸银溶液中,室温下浸泡0.5h,干燥后得到 表面载银的样品,标记为 pTi-P-LBL-Ag。制备过程 如图1所示。

1.2.2 样品表征 各组选1个样品干燥后喷金30s,

<sup>2022-03-20</sup> 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31670967、32000932);安徽省重 点研究与开发计划(编号:202104j07020039);安徽高等学 校自然科学研究项目(编号:KJ2019A0251);安徽省高等 学校省级质量工程项目(编号:2019jyxm0138)

作者简介:李娇娇,女,硕士研究生; 陈佳龙,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: jialong\_ dt@126.com



图 1 钛片上载银的 HEP/CHI 聚电解质多层膜的制备工艺

利用扫描电子显微镜观察表面形貌的变化。各组选 1 个样品,利用 X 射线光电子能谱仪分析表面元素 组成和含量。各组选 5 个样品,利用接触角测试仪 室温下测量样品表面亲水性能的改变。各组选 1 个 样品利用硝酸/盐酸(1:3)混合液溶解表面的银, 通过感应耦合等离子体质谱仪测定钛片表面总载银 量。

1.3 抗菌性能评价 为评价制备材料的抗菌能力,
使用 BHI 培养基将金黄色葡萄球菌制成浓度为1×
10<sup>7</sup> CFU/ml 的细菌悬液,进行以下评价。

1.3.1 种菌圈法评价 取 100 μl 细菌悬液均匀涂 在琼脂固体培养基上,每组取 1 个样品正面朝下放 置在培养基上,37 ℃培养 24 h,拍摄记录各个样品 周围抑菌环的大小。

**1.3.2** 浊度法评价 每组取3个灭菌样品放入24 孔板,每孔加入2 ml 菌液,37 ℃培养,分别于4、6、 8、10、12、24 h 吸取150 μl 溶液用酶标仪测量波长 660 nm 下的吸光度,通过浊度法评价材料抗菌能 力。

1.3.3 活死细菌染色评价 每组取1个灭菌样品 放入24孔板并加入2 ml 菌液,37℃培养24 h,取出 样品,PBS 漂洗后,活/死细菌试剂盒染色10 min,荧 光显微镜观察各样品表面细菌黏附数量及活死细菌 比例。

1.3.4 涂板法评价 每组取1个灭菌样品放入24 孔板中并加入2 ml 菌液,37 ℃培养24 h,取出样品 PBS漂洗后,置于5 ml 离心管并加入3 ml PBS,超 声3 min,涡旋震荡3 min,将样品表面的细菌分散在 PBS 中,取 100 μl 涂板,37 ℃培养 24 h 后进行观察。

1.4 统计学处理 所有的实验至少进行了 3 次独 立的实验,使用 SPSS 16.0 软件进行分析。采用 K-S 检验和 Levene 检验证实数据符合正态分布且方差 齐,以 x ± s 表示,用单因素方差分析比较水接触角 和细菌增殖量的组间差异,Tukey 法进行两两比较, 检验水准双侧。以双侧 P < 0.05 为差异有统计学 意义。

#### 2 结果

#### 2.1 样品表征

2.1.1 表面形貌 各步反应后表面形貌的扫描电 子显微镜照片显示:碱热处理形成均匀的纳米孔,并 有大量的杆状物(图2A);PLL 沉积后,杆状物增粗 (图2B);静电层层自组装后,多孔结构的孔隙被填 充、孔径明显缩小,说明多层膜成功组装在表面(图 2C);载银后,表面孔隙进一步缩小,出现形状不规 则的颗粒,证明载银表面构建成功(图2D)。



图 2 各样品的表面形貌 ×100 000 A: pTi; B: pTi-P; C: pTi-P-LBL; D: pTi-P-LBL-Ag

2.1.2 元素分析 图 3 是各步反应后表面元素变化的 X 射线光电子能谱全谱图,如图所示,聚赖氨酸沉积后(pTi-P),Ti 2p 峰的减少和 N 1s 峰的出现,证明 PLL 已成功吸附到多孔钛表面上;HEP/CHI 组装后(pTi-P-LBL),Ti 2p 峰消失和 S 2p 峰出现,证明了层层组装成功;硝酸银浸泡后(pTi-P-LBL-Ag),Ag 3d 峰出现,证明了银已成功装载到材料表面。

X 射线光电子能谱元素高分辨检测获得表面各 元素的原子百分比,结果显示:随着反应进行,表面 钛原子百分含量持续下降,表明钛基底逐渐被覆盖; 含有大量氮原子的 PLL 修饰后,表面 N 原子含量大



图 3 各组样品表面 X 射线能量色散谱全谱

幅上升; HEP 和 CHI 中氮原子含量较 PLL 低、且 HEP 含有硫元素,因此,层层组装表面(pTi-P-LBL) 氮含量降低和硫元素出现以证明 HEP 和 CHI 被组 装在钛表面;硝酸银浸泡后表面银原子含量显著提 高,证明银成功装载在涂层上。见表1。

表1 不同样品表面各元素原子百分含量(%)

组别	С	0	Ν	S	Ti	Ag
рТi	29.55	51.28	0.95	-	18.22	-
pTi-P	34.11	41.86	9.38	-	14.65	-
pTi-P-LBL	52.34	37.34	7.47	2.59	0.26	-
pTi-P-LBL-Ag	54.29	29.77	5.68	3.43	0.27	6.55

2.1.3 水接触角 通过接触角测量仪测量监控涂 层制备过程,见表2。Ti、pTi、pTi-P的水接触角分别 为(59.79 ± 2.50)°、(8.46 ± 1.57)°、(11.76 ± 0.95)°,组间差异有统计学意义(P<0.05),说明碱 热活化和聚赖氨酸沉积成功实现。层层组装过程 中,由于 CHI 比 HEP 更疏水,所以 HEP 组装表面的 水接触角显著低于 CHI 组装表面,且呈现锯齿形波 动,每次组装后表面水接触角与前一步有显著性差 别(P<0.05),证明多层膜组装成功。与 HEP/CHI 组装膜相比,载银表面水接触角显著增加到(35.45 ±2.74)°,亲水性变差,间接证明银装载成功。以上 结果表明多层膜和银已成功地结合在多孔钛表面。

2.1.4 银定量 电感耦合等离子体发射光谱仪检 测涂层表面载银量,结果显示表面载银总量 34.24 μg,表明银成功装载到自组装涂层上。

# 2.2 抗菌评价

2.2.1 抑菌环 抑菌圈试验测试样品对周围的金 黄色葡萄球菌的生长影响,见图4,只有载银样本周 围出现透亮的抑菌环,表明载银表面可以通过释放 银离子以抑制或杀死周围细菌。

表2 各组样品静态水接触角 $(\bar{x} \pm s, n = 5)$ 

组别	接触角(°)
Ti	$59.79 \pm 2.50$
pTi	8.46 ± 1.57
pTi-P	$11.76 \pm 0.95$
HEP1	$6.94 \pm 1.31$
CHI1	$11.57 \pm 1.28$
HEP2	$6.96 \pm 2.43$
CHI2	$11.11 \pm 0.51$
HEP3	$5.90 \pm 1.55$
CHI3	$11.45 \pm 2.87$
HEP4	$7.57 \pm 0.89$
CHI4	$16.59 \pm 1.68$
HEP5	$7.42 \pm 0.89$
pTi-P-LBL-Ag	$35.45 \pm 2.74$
F 值	369.00
<i>P</i> 值	< 0.05



图 4 各组样品抑菌环结果 A: pTi;B: pTi-P-LBL;C: pTi-P-LBL-Ag;黑色虚线:抑菌圈

2.2.2 浊度法 通过浊度法测量溶液体系中细菌 数量,见图5。吸光度值与溶液中细菌的数量呈正 相关,样品在与细菌共培养24h后,只有pTi-P-LBL-Ag组吸光度值无增长,证明载银表面可以完全 抑制或杀死周围细菌。



2.2.3 活/死细菌荧光染色 原位活/死细菌荧光 染色法直接检测材料表面抗菌能力,如图 6 所示,细 菌在 pTi、pTi-P-LBL 表面快速和广泛黏附,表面绿 色面积大于红色,表明细菌活力良好;pTi-P-LBL-Ag 表面细菌附着量较未装载银的表面少,且死细菌占 比高,表明载银表面具有较好的抗菌和杀菌性能。



**图6** 各样品表面原位活/死细菌荧光染色结果 ×100 A: pTi; B: pTi-P-LBL; C: pTi-P-LBL-Ag;绿色:活菌;红色:死菌

2.2.4 涂板法 样品表面黏附细菌重新分散于溶 液后,采用涂板法直观显示细菌数量,结果如图7所 示,pTi和pTi-P-LBL组的培养皿中几乎长满细菌, 而 pTi-P-LBL-Ag 组没有菌落。结果表明载银表面 具有良好的抑菌/杀菌性能。



图 7 样品表面黏附细菌涂板照片 A: pTi; B: pTi-P-LBL; C: pTi-P-LBL-Ag

# 3 讨论

钛及其合金已经广泛用于牙科种植体并取得良 好的临床效果,但细菌所致种植体相关并发症是导 致愈合延迟、种植体失败和再次手术的主要因 素<sup>[2,6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>表明,口腔作为人体第四大菌库,细 菌种类约700多种,其中部分菌种会在植入手术后, 快速黏附于种植体表面且促进其它细菌定植和生物 膜成熟。黏附细菌形成生物膜可以保护细菌免受抗 生素和人体免疫系统的攻击<sup>[8]</sup>,是细菌所致种植体 并发症治疗困难的主要因素<sup>[9]</sup>,所以构建抗菌涂层 可以减少细菌的初始黏附和随后的生物膜形成,有 效地预防该类并发症的发生<sup>[5]</sup>。

LBL 是一种通过静电相互作用使多聚阴离子和 多聚阳离子连续吸附在材料表面的技术。该技术具 有工艺简单、制备条件温和、厚度可控的特点,适用

于构造复杂医疗装置的表面修饰<sup>[6]</sup>。HEP 是一种 硫酸化的糖胺聚糖,在聚合物链中有高含量的硫酸 基团,从而可形成高负电荷的聚合物<sup>[10]</sup>。CHI 是一 种天然甲壳素多糖生物高分子材料,具有成本低、无 毒、可降解性高、生物相容性好等优点[5];同时,由 于活性羟基和氨基官能团的存在,CHI 表现出独特 的成膜特性和高正电特征<sup>[11]</sup>。因此,可以将 CHI 与 HEP 通过静电组装修饰在材料表面形成平滑的涂 层。Zhou et al<sup>[5]</sup>将 HEP 和 CHI 进行交联形成聚电 解质多层膜并进行小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 细 胞实验,结果显示多层膜能有效促进成骨细胞在钛 表面的分化和增殖。然而,很多种植体并发症都与 细菌侵入有关,仅在表面上制备聚电解质多层膜无 法避免细菌所致并发症,故装载抗菌物质以赋予材 料抗菌性能,可以有效降低细菌所致并发症的发生 率<sup>[5]</sup>。

银具有广谱抗菌性,且不易产生细菌耐药<sup>[3]</sup>。 目前,银抗菌机制主要分为两种:释放杀菌和接触杀 灭<sup>[12]</sup>。释放杀菌是指银及其化合物在液体环境中 产生 Ag<sup>+</sup>以破坏细菌并抑制细菌繁殖。接触杀灭是 指当细菌直接接触载银表面而被杀死。口腔中大量 致病菌会导致种植体周围软硬组织炎症,进而引发 种植体周围软组织封闭能力下降和周围骨的吸收, 最终导致治疗失败;另外,细菌黏附在种植体表面并 形成生物膜是细菌所致并发症难以根治的主要原 因,故抑制或杀死种植体表面黏附的细菌和抑制种 植体周围细菌增殖是保障种植体长期疗效的有效手 段[13]。金黄色葡萄球菌对钛金属亲和力高,可以快 速黏附且介导其它细菌在种植体表面定植和促进生 物膜成熟<sup>[7]</sup>,是导致种植体周围炎症尤其是化脓性 感染的重要致病菌<sup>[14]</sup>,故本研究采用金黄色葡萄球 菌评价修饰表面的抗菌能力。通过抑菌圈法和浊度 法证明载银表面具有对周围细菌的杀灭能力,活死 细菌染色和细菌涂板证明载银表面可以防止细菌黏 附和生物膜形成。故载银表面可以显著降低由细菌 引起并发症的发生率,是钛基植入材料表面改性的 有效手段。

综上所述,该实验采用层层自组装技术在钛材 的多孔表面构建聚电解质多层膜并进一步装载纳米 银,实现了种植体周围抗菌和种植体表面抗菌,且对 种植体感染和相关并发症有很好的防治效果。该表 面技术在增加钛基种植体的抗菌性能方面有良好的 应用前景。 参考文献

- [1] 许克惠,王 爽,崔文迪,等.多巴胺修饰表面原位还原纳米银的关键影响因素[J].安徽医科大学学报,2020,55(5):86-92.
- [2] Zhang W, Wang S, Ge S, et al. The relationship between substrate morphology and biological performances of nano-silver-loaded dopamine coatings on titanium surfaces [J]. R Soc Open Sci, 2018, 5(4):172310.
- [3] Stein S, Kruck L, Warnecke D, et al. Osseointegration of titanium implants with a novel silver coating under dynamic loading
  [J]. Eur Cell Mater, 2020, 39:249 – 59.
- [4] Alharbi N S, Govindarajan M, Kadaikunnan S, et al. Nanosilver crystals capped with Bauhinia acuminata phytochemicals as new antimicrobials and mosquito larvicides[J]. J Trace Elem Med Biol, 2018, 50:146-53.
- [5] Zhou W, Jia Z, Xiong P, et al. Novel pH-responsive tobramycinembedded micelles in nanostructured multilayer-coatings of chitosan/heparin with efficient and sustained antibacterial properties [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 90:693-705.
- [6] Li W, Yang Y, Zhang H, et al. Improvements on biological and antimicrobial properties of titanium modified by AgNPs-loaded chitosan-heparin polyelectrolyte multilayers [J]. J Mater Sci Mater Med, 2019, 30(5):52.
- [7] Fürst M, Salvi G, Lang N, et al, Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants[J]. Clin Oral Im-

plants Res, 2007,18(4):501-8.

- [8] Orapiriyakul W, Young P S, Damiati L, et al. Antibacterial surface modification of titanium implants in orthopaedics [J]. J Tissue Eng, 2018, 9:2041731418789838.
- [9] Nakamura K, Shirato M, Tenkumo T, et al. Hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide photolysis recondition biofilm-contaminated titanium surfaces for subsequent osteoblastic cell proliferation[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):4688.
- [10] 吴 睿,肖 蓉,王继红. 硫酸乙酰肝素与癌症的相关性及其 在癌症治疗中的应用策略[J]. 中国细胞生物学学报,2019,41
  (8):1665-70.
- [11] Gao F, Hu Y, Gong Z, et al. Fabrication of chitosan/heparinized graphene oxide multilayer coating to improve corrosion resistance and biocompatibility of magnesium alloys [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 104:109947.
- [12] Ma M, Wan R, Gong H, et al. Study on the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity and biocompatibility of novel TiN/Ag multilayers immobilized onto biomedical titanium[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2019, 19(7);3777-91.
- [13] Thukkaram M, Coryn R, Asadian M, et al. Fabrication of microporous coatings on titanium implants with improved mechanical, antibacterial, and cell-interactive properties[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(27):30155-69.
- [14] Aguayo S, Donos N, Spratt D, et al. Nanoadhesion of Staphylococcus aureus onto titanium implant surfaces [J]. J Dent Res, 2015, 94(8):1078-84.

# Construction of heparin sulfate/chitosan antibacterial polyelectrolyte membrane loaded with silver on titanium surface

Li Jiaojiao, Wei Zhang'ao, Zhang Weibo, Li Xiangyang, Chen Jialong (Teaching and Research Section of Dental Materials, Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Anhui Province Key Laboratory of Oral Diseases Research, Hefei 230032)

**Abstract** *Objective* To study the antibacterial properties of nano-silver-containing polyelectrolyte multilayer films assembled with heparan sulfate (HEP) and chitosan (CHI) by layer-by-layer self-assembly technology (LBL) on porous titanium surface. *Methods* Negatively charged HEP and positively charged CHI were alternately adsorbed by LBL to form polyelectrolyte multilayer films, which were deposited on the surface of porous titanium, and then silver ions were loaded on the multilayer films under alkaline conditions. The surface was evaluated by scanning electron microscopy, X-ray photoelectron spectrometer, a measuring instrument for contact angle and inductively coupled plasma emission spectrometer. The antibacterial effect was evaluated by inhibition zone, turbidity method, live/dead bacterial staining and coated plate method. *Results* Material characterization methods showed polyelectrolyte multilayer films were successfully deposited on the surface of titanium, and nano-silver particles were loaded. Antibacterial experiments showed that the silver-loaded modification significantly improved the antibacterial ability of the coating. *Conclusion* Silver-loaded HEP-CHI polyelectrolyte multilayer films are deposited on the surface of modified titanium by LBL, which can inhibit the adhesion of bacteria.

Key words titanium; layer-by-layer self-assembly; silver; antibacterial