

网络出版时间:2022-8-16 15:44 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0831.001.html

钛表面新型抗菌涂层的生物相容性研究

庞诗梦,夏 荣,李趁趁,余金兰

摘要 目的 探究钛表面聚二甲基硅氧烷/葡萄糖酸氯己定(PDMS/CHG)涂层的生物相容性。方法 将不同浓度CHG通过PDMS共价接枝到钛表面,分为5组。钛组:空白对照组;PDMS组:仅用PDMS处理组;C1组:用PDMS和0.2 mg/ml CHG处理组;C2组:用PDMS和0.4 mg/ml CHG处理组;C3组:用PDMS和0.8 mg/ml CHG处理组;使用扫描电子显微镜(SEM)观察各组钛片表面形貌,并将大鼠牙龈成纤维细胞(RGFs)接种至样品表面共培养,FITC标记的鬼笔环肽和AO/EB染色后,激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察各组钛片表面细胞形态和细胞状态,CCK-8实验检测细胞增殖。结果 SEM下可见各实验组钛片表面均已成膜,结合元素分析可得,C2、C3组表面的膜均匀且致密;CLSM显示各实验组细胞形态与钛组一致,伸展较好,且AO/EB染色结果表明,各组均有大量绿色荧光,且细胞形态良好;CCK-8结果显示各组OD值差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 钛表面结合浓度不超过0.8 mg/ml的PDMS/CHG涂层具有良好的生物相容性。

2021-12-30 接收

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFB0407204);安徽省学术和技术带头人科研活动经费资助项目(编号:2021H253)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

作者简介:庞诗梦,女,硕士研究生;

夏 荣,男,博士,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xiarongqh@aliyun.com

关键词 聚二甲基硅氧烷;氯己定;抗菌涂层;种植体周围炎
中图分类号 R 781.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)09-1355-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.003

种植义齿修复具有成功率高、不损伤邻牙等优点,是替代缺失牙的金标准^[1],被称为“人类的第三副牙齿”^[2]。而钛基材料本身不具备抗菌性能,若发生微生物感染,则可能导致种植体周围疾病,是导致种植失败的主要因素之一^[3]。近年来有学者通过在种植体表面上制备纳米粒子涂层以达到抗菌效果^[4-5];Faramarzi et al^[6]将米诺环素与种植体相结合,3个月内种植体周围牙龈卟啉单胞菌的数量明显减少;Carinci et al^[7]研究了涂覆聚二甲基硅氧烷/葡萄糖酸氯己定(polydimethylsiloxane/chlorhexidine gluconate,PDMS/CHG)内涂层的种植体的抗菌性,结果表明该涂层具有良好抗菌性能,但无法持续释放药物。该研究拟在钛片表面构筑PDMS/CHG复合涂层,模拟愈合基台高度光滑的表面,观察该复合涂层不同浓度下对成纤维细胞的影响,探究涂层的生物相容性,以期为今后在愈合基台表面构建抗菌涂层提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 医用钛片 TA1(宝鸡泰宇鑫金属

on HEK 293T cell cycle and apoptosis. **Methods** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-p100^{Rb}-FLAG and pcDNA3.1-p80^{Rb}-FLAG were constructed, plasmid was transfected into U2OS cells and immunofluorescence was performed to define the localization of p100^{Rb} and p80^{Rb} in cells. Plasmid was also transfected into HEK 293T cells, and the total protein was extracted for Western blotting to detect the protein expression level. After overexpression of Rb, p100^{Rb} and p80^{Rb} in HEK 293T cells, cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry. **Results** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-p100^{Rb}-FLAG and pcDNA3.1-p80^{Rb}-FLAG were constructed successfully. p100^{Rb} was mainly located in the nucleus while p80^{Rb} was mainly located in the cytoplasm, in U2OS cells. Rb, p100^{Rb} and p80^{Rb} could be overexpressed in HEK 293T cells. Following overexpression of Rb, p100^{Rb} in HEK 293T cells, the percentage of G₁ phase of cell cycle significantly increased compared with the control group, and p100^{Rb} and p80^{Rb} inhibited apoptosis compared with control group ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of p100^{Rb} can inhibit the apoptosis of HEK 293T cells and block the cell cycle. Overexpression of p80^{Rb} can inhibit the apoptosis of HEK 293T cells, but has no effect on cell cycle.

Key words retinoblastoma protein; overexpression; cell cycle; apoptosis

材料有限公司);聚二甲基硅氧烷 Sylgard 184(美国 Dow Corning 公司);葡萄糖酸氯己定溶液(美国 Sigma 公司);SU8220 冷场发射扫描电子显微镜(日本株式会社日立制作所);LSM880 激光扫描共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss 公司);多功能微孔板酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);大鼠牙龈成纤维细胞及专用培养基(中国普诺赛生命科技有限公司);CCK-8 试剂盒(中国赛国生物科技有限公司);AO/EB 双染试剂盒(中国贝博生物科技有限公司);FITC 标记鬼笔环肽(中国索莱宝生物科技有限公司);DAPI、抗荧光淬灭封片液(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 涂层的制备 将直径 12 mm,厚 1 mm 的钛片抛光至 7 000 目,放入丙酮、无水乙醇和超纯水中超声荡洗,各 30 min,烘干,采用系统抽样将其随机分为 5 组。钛组:空白对照组;PDMS 组:仅用 PDMS 处理组;C1 组:用 PDMS 和 0.2 mg/ml CHG 处理组;C2 组:用 PDMS 和 0.4 mg/ml CHG 处理组;C3 组:用 PDMS 和 0.8 mg/ml CHG 处理组。

PDMS 预聚体和交联剂按质量比 10:1 混合,将 PDMS 组、C1 组、C2 组、C3 组钛片放入浸泡,烘干。再将 C1 组、C2 组、C3 组钛片分别放入 0.2、0.4、0.8 mg/ml CHG 溶液中浸泡,冲洗,烘干,环氧乙烷灭菌。

各组随机抽取 3 枚钛片,利用扫描电子显微镜(scanning electron micrograph, SEM)观察表面微观形貌,检测涂层是否成功涂覆;随机抽取 2 枚钛片的各 3 个区域,用 X 射线能谱仪(energy dispersive spectroscopy, EDS)分析表面元素。

1.3 大鼠牙龈成纤维细胞的准备 大鼠牙龈成纤维细胞(rat gingival fibroblasts, RGFs)使用专用培养基培养,传代至 3~5 代时进行实验。将细胞置于 5% CO₂, 95% 空气, 37 °C 培养箱中培养,密度达到 80% 左右时进行细胞接种。

1.4 细胞骨架染色实验 每组随机取 5 枚钛片分别放入 24 孔板内,将第 3 代 RGFs 按每孔 1×10^4 个细胞接种至钛片表面,放入细胞培养箱培养 12 h 后,弃掉板内旧的培养液, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 用 0.5% TritonX-100 透化处理 5 min, 加入 100 nmol/L FITC 标记的鬼笔环肽工作液染色 30 min, 再加入 DAPI 复染细胞核, 倒置在载玻片上, 激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)下观察。

1.5 AO/EB 染色实验 每组随机取 5 枚钛片,将细胞按照每孔 1×10^4 个细胞接种至钛片表面,培养

24 h 后,每孔加入染色缓冲液 500 μ l,再各加入 5 μ l AO 和 5 μ l EB,室温放置 10~20 min, CLSM 下观察。

1.6 细胞增殖实验 每组随机取 5 枚钛片,将细胞按照每孔 1×10^4 个细胞接种至钛片表面,培养 1、4、7 d 后,从各组随机选取 3 枚钛片,每孔加入 1 ml 新鲜的培养基,并加入 100 μ l CCK-8 试剂,放入 37 °C 恒温箱中孵育 4 h,每孔吸取 200 μ l 加入 96 孔板中,设 3 个平行重复孔,最后用酶标仪测 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 21.0 版统计软件处理数据,各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电子显微镜观察 各涂层组钛片表面扫描电镜图见图 1,钛组表面可看到少量划痕;PDMS 组表面形成了一层有少量裂纹的膜;C1、C2 组表面虽形成了均匀的 PDMS/CHG 膜,但不够致密;C3 组钛片表面组形成了均匀且致密的 PDMS/CHG 膜。钛片表面元素分析见图 2, A~C、D~F 分别为 2 枚钛片不同区域,结果显示同 1 枚钛片各区域均含有 Cl 元素,且含量大致相等,证明 PDMS/CHG 涂层涂覆成功。

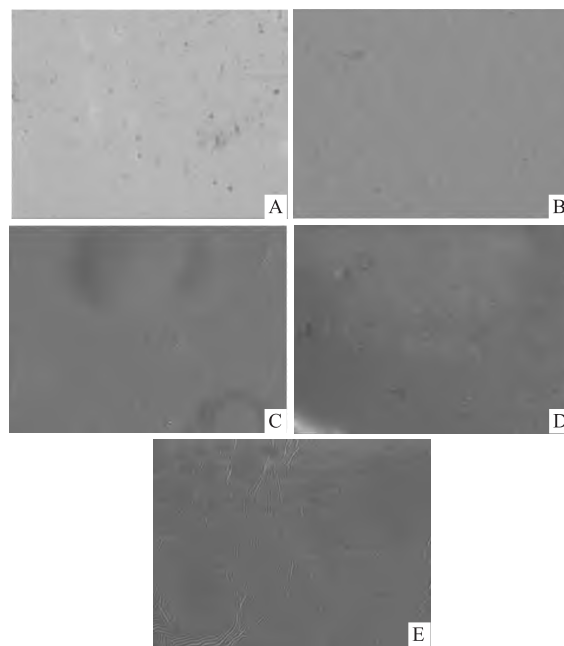


图 1 各组钛片在 SEM 下的表面形貌 $\times 500$
A: 钛组; B: PDMS 组; C: C1 组; D: C2 组; E: C3 组

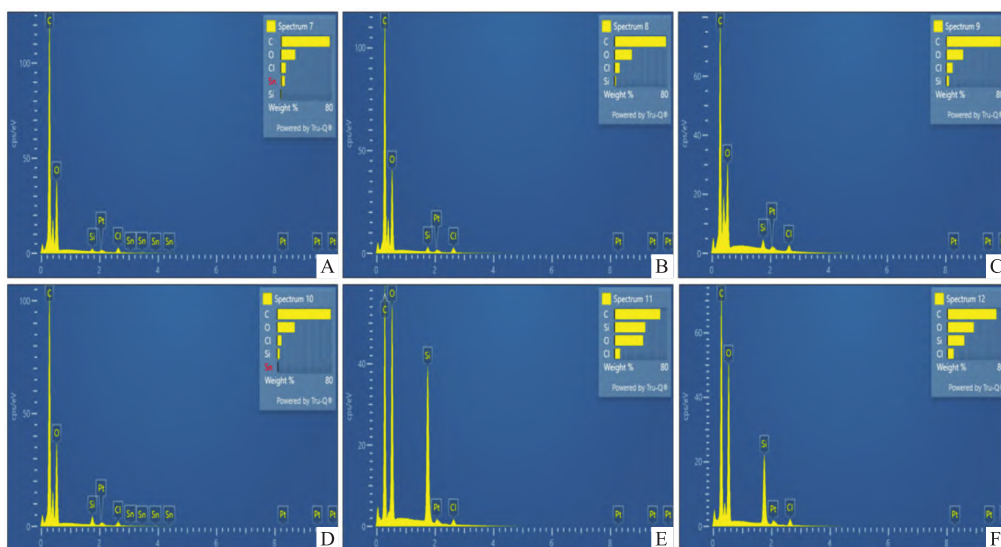


图2 钛片表面EDS分析图

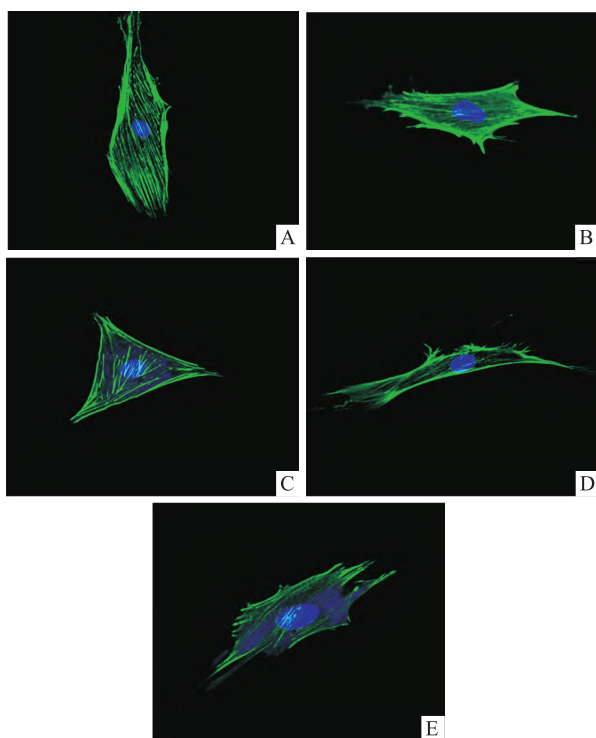
A~C、D~F:分别为2枚钛片不同区域的元素分析结果

2.2 细胞骨架染色结果 细胞接种12 h后,在CLSM下观察各组钛片表面细胞骨架的形态。各组细胞沿着各个方向伸展,均匀铺开,周围见伪足伸出,见图3。

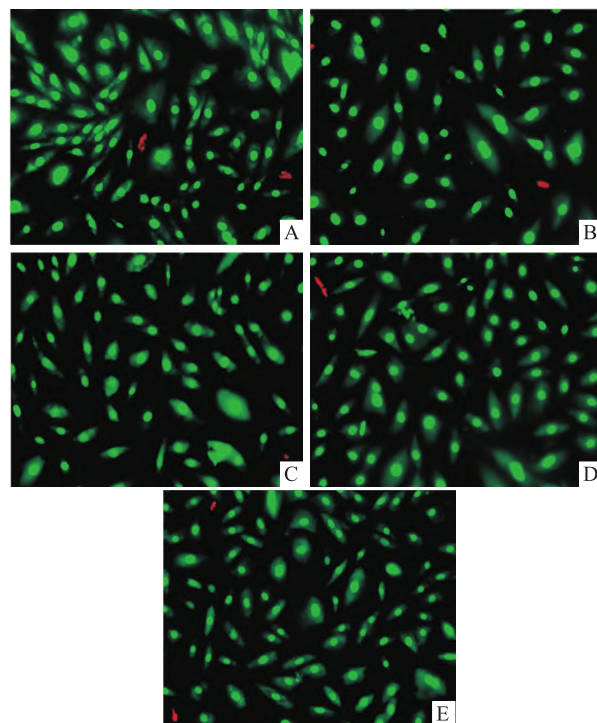
2.3 AO/EB实验结果 细胞接种24 h后,AO/EB染色,在CLSM下观察各组钛片表面细胞情况。各

组都有大量绿色荧光,仅可看到极少数红色荧光,见图4。

2.4 细胞增殖结果 各组钛片表面细胞培养1、4、7 d,随着时间推移,各组OD值都在逐渐增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见图5。

图3 CLSM下各组钛片表面细胞骨架染色图像 $\times 40$ oil

A:钛组;B:PDMS组;C:C1组;D:C2组;E:C3组

图4 各组钛片表面活死细胞情况 $\times 200$

A:钛组;B:PDMS组;C:C1组;D:C2组;E:C3组;绿色:活细胞;红色:死细胞

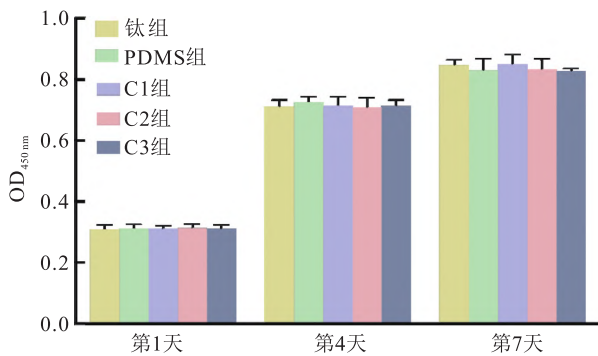


图5 各组钛片表面细胞增殖情况

3 讨论

当种植修复日渐成为人们心中的最佳修复方式,种植体周围疾病也得到了学者们的极大关注,它包括种植体周围黏膜炎和种植体周围炎。由于在种植修复过程中细菌的繁殖是不可避免的,而细菌负荷又是导致种植体周围炎的重要因素,最终甚至会出现种植体松动、移位、脱落等。基台和种植体之间的间隙较易滋生病原菌^[7],因此预防种植体和基台连接处微生物感染是维持种植体长期稳定的关键^[8-11]。

近年来,学者致力于种植体表面抗菌涂层的研究,但部分抗菌涂层生物相容性通常较差,甚至可能存在细胞毒性并导致内脏器官损伤^[12]。由于CHG具有类似于抗生素的特性,且不易导致细菌耐药,在口腔诊疗中广泛应用。除此之外,CHG能杀灭真菌和细菌,但不能破坏孢子或分歧杆菌,在较低浓度下,CHG可以引起革兰阳性菌和革兰阴性菌细胞内钾离子和戊糖的释放,达到杀菌的目的,而浓度较高的CHG会导致细菌细胞壁形成不可逆的损伤,因此本研究选用CHG作为抗菌成分,探究其不同浓度的生物相容性。PDMS涂层是一种新型的涂层,是一种疏水类有机硅物料,在药品、日化用品、食品、建筑等领域均有应用。PDMS通过聚硅氧烷链和钛表面的-OH官能团的相互作用与钛表面结合,硅氧烷则可通过范德华力捕获CHG分子,使它们在与水介质接触后缓慢释放^[13]。Lauritano et al^[13]报道内腔涂覆PDMS/CHG涂层的种植体能有效抑菌,结果显示,48 h内仅有0.3%的细菌污染种植体-基台连接处的外表面。

本研究采用PDMS与CHG结合的方式制备PDMS/CHG复合涂层,利用AO/EB活死细胞染色

试剂盒和CCK-8试剂盒检测活死和增殖情况,结果表明实验所选各浓度的CHG均呈现良好的增殖效果和活死比例,说明CHG浓度不超过0.8 mg/ml的PDMS/CHG不会抑制细胞的生长。随后利用FITC标记的鬼笔环肽对细胞骨架进行染色,结果显示,各组钛片表面细胞在共聚焦显微镜下伸展形态良好,细胞骨架清晰,呈梭形,且有伪足伸出。提示PDMS/CHG在CHG浓度不超过0.8 mg/ml时,具有良好的生物相容性。

本研究使用高度抛光的钛片模拟了愈合基台表面光滑的形态。在临床应用过程中,可将该涂层制备在愈合基台上,在不破坏种植体表面结构的前提下,达到抗菌的目的,且在复诊过程中可随时更换,降低了成本,节省了时间,并且方便后续灭菌和使用。相较于之前研究中将复合涂层涂覆于植体内腔的方案,减少了试剂对种植体本身的损害,不仅解决了内腔涂层无法使药物释放达到最佳浓度的问题,同时由于本涂层在愈合基台外表面,种植体-基台连接处间隙也不会因此增大而使细菌更容易定植。

本研究有一定的局限性,仅选用成纤维细胞进行实验,而牙周组织是由多种不同的细胞、纤维共同形成的,因此,后续会进一步对其他细胞的相容性进行研究,并模拟口腔内状态,以得到更加全面的理论支持;拟进行动物实验,探究该涂层的抗菌性及生物相容性,为体内实验提供依据;同时也需将涂层的制备工序进一步优化,使得涂层更加稳定和有效。

种植体抗菌涂层的研究进展迅速,在预防种植体周围疾病方面有重要意义,前景广阔,但由于大部分研究都停留在体外实验和动物实验阶段,因此,尚需要更多的基础及临床研究来推动这一技术的发展。

参考文献

- [1] Al Otaibi N M, Dunne M, Ayoub A F, et al. A novel surgical model for the preclinical assessment of the osseointegration of dental implants: a surgical protocol and pilot study results [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 276.
- [2] 王培欢, 刘洪臣. 人工种植牙载药方式及材料的研究进展[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2017, 18(6): 354-8.
- [3] 余金兰, 夏荣, 刘春, 等. Er, Cr: YSGG激光清除SLA钛表面牙龈卟啉单胞菌生物膜[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(10): 1531-4.
- [4] Petrini M, Giuliani A, Di Campli E, et al. The bacterial anti-adhesive activity of double-etched titanium (DAE) as a dental implant surface[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8315.
- [5] Jin J, Fei D, Zhang Y, et al. Functionalized titanium implant in reg-

- ulating bacteria and cell response[J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14:1433–50.
- [6] Faramarzi M, Goharfar Z, Pourabbas R, et al. Microbiological and clinical effects of enamel matrix derivative and sustained-release micro-spherical minocycline application as an adjunct to non-surgical therapy in peri-implant mucosal inflammation[J]. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 2015, 41(4):181–9.
- [7] Carinci F, Lauritano D, Bignozzi CA, et al. A New Strategy against peri-implantitis: antibacterial internal coating[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16):3897.
- [8] Tallarico M, Canullo L, Caneva M, et al. Microbial colonization at the implant-abutment interface and its possible influence on peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Prosthodont Res*, 2017, 61(3):233–41.
- [9] Göthberg C, Gröndahl K, Omar O, et al. Bone and soft tissue outcomes, risk factors, and complications of implant-supported prostheses: 5-years RCT with different abutment types and loading protocols[J]. *C Clin Implant Dent Relat Res*, 2018, 20(3):313–21.
- [10] Sasada Y, Cochran D L. Implant-abutment connections: a review of biologic consequences and peri-implantitis implications[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2017, 32(6):1296–307.
- [11] Mencio F, De Angelis F, Papi P, et al. A randomized clinical trial about presence of pathogenic microflora and risk of peri-implantitis: comparison of two different types of implant-abutment connections[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(7):1443–51.
- [12] Crawford G A, Chawla N, Das K, et al. Microstructure and deformation behavior of biocompatible TiO₂ nanotubes on titanium substrate[J]. *Acta Biomater*, 2007, 3(3):359–67.
- [13] Lauritano D, Bignozzi C A, Pazzi D, et al. Efficacy of a new coating of implant-abutment connections in reducing bacterial loading: an in vitro study[J]. *Oral Implantol (Rome)*, 2017, 10(1):1–10.

Study on the biocompatibility of novel antibacterial coating on titanium

Pang Shimeng, Xia Rong, Li Chenchen, Yu Jinlan

(Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the biocompatibility of Polydimethylsiloxane/Chlorhexidine gluconate (PDMS/CHG) composite coating on titanium surface. **Methods** CHG with different concentrations were covalently grafted to the surface of titanium through PDMS and divided into 5 groups: Group Ti: blank control group; Group P: PDMS coating group; Group C1: treated with PDMS and 0.2 mg/ml CHG; Group C2: treated with PDMS and 0.4 mg/ml CHG; Group C3: treated with PDMS and 0.8 mg/ml CHG; the surface morphology of titanium was observed with scanning electron microscope (SEM), and rat gingival fibroblasts (RGFs) were inoculated to the sample surface co-cultivation. Confocal laser scanning microscope (CLSM) was used to observe the cells, on the surface of titanium, morphology and the state of the cell after FITC-labeled phalloidin and AO/EB staining, besides, CCK-8 was used to detect cells proliferation. **Results** It could be seen by SEM that films had been formed on the surface of titanium sheets in each experimental group. Combined with elemental analysis, the films on the surfaces of C2 and C3 groups were uniform and dense; CLSM showed that the cell morphology of each experimental group was consistent with that of the titanium group, with better extension, and the results of AO/EB staining showed that there was a lot of green fluorescence in each group, and the cells were in good shape. CCK-8 results showed that there was no difference between each group ($P > 0.05$). **Conclusion** Titanium surface combined with concentration of no more than 0.8 mg/ml PDMS/CHG coating has good biocompatibility.

Key words polydimethylsiloxane; chlorhexidine; antibacterial coating; peri-implantitis