

TiO₂ 纳米管负载米诺环素的释放动力学研究

程佳蕙¹, 吴雨峰¹, 王泽华², 高啟坤², 吴明月^{2,3}

摘要 目的 研究不同管径 TiO₂ 纳米管 (TNT) 形貌对米诺环素负载的影响, 探索其缓释效果。方法 采用阳极氧化法以 10、20、30 V 电压分别在钛表面制备不同管径的 TiO₂ 纳米管, 并在表面加载盐酸米诺环素 (MH), 构建抗菌涂层。通过场发射扫描电镜、接触角测量仪、X 射线光电子能谱仪、傅里叶红外光谱以及紫外分光光度计对样品进行表征, 比较其缓释效果。结果 10、20、30 V 电压可制备管径约 30、70、120 nm 的 TiO₂ 纳米管涂层, 70 nm TiO₂ 纳米管组载药量最高、缓释效果最佳, 其次为 120 nm TiO₂ 纳米管组、30 nm TiO₂ 纳米管组。结论 70 nm 管径的 TiO₂ 纳米管的载药量最高、缓释效果最好, 有望提高钛种植体表面的持续抗菌性能。

关键词 TiO₂ 纳米管; 盐酸米诺环素; 缓释; 种植体周围炎
中图分类号 R 318.08

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)02-0210-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.011

种植义齿已成为牙齿缺失的首选修复方法, 但其仍存在有 2%~3% 的失败率, 种植体周围炎被认为是口腔种植修复失败的主要原因之一^[1], 因此如何提高钛种植体的抗菌性能, 从而减少种植体周围炎的发生, 成为当前研究热点。随着种植体表面改性技术的发展, 在含纳米结构的钛种植体表面构建局部药物释放体系已引起广泛关注。TiO₂ 纳米管 (TiO₂ nanotubes, TNT) 具有比表面积大、多孔且结构均一、排列整齐、底端封闭等特点, 可作为吸附药物的良好载体^[2]。该实验在钛表面制备出不同管径的含有盐酸米诺环素 (minocycline hydrochloride, MH) 修饰的 TNT 涂层, 检测 MH 载入不同管径 TNT 后的载药能力及缓释特征。为种植体表面抗菌涂层研究提供新方法, 并为种植体周围炎的预防和治疗提供新的思路。

2019-12-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81170993)

作者单位: ¹安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

²安徽医科大学附属口腔医院, 合肥 230032

³安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

作者简介: 程佳蕙, 女, 硕士研究生;

吴明月, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: wumingyue321@126.com

1 材料与方法

1.1 原料及试剂 纯度 99.99% 钛箔片 (北京中金研新材料科技有限公司); 丙酮、丙三醇、氟化铵 (西陇化工股份有限公司), MH、壳聚糖 (上海科肽生物科技有限公司), 试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器 LP6003D 型直流稳压电源 (深圳市乐达精密工具有限公司); Sirion-200 场发射扫描电镜 (FESEM, 美国 FEI 公司); X 射线光电子能谱仪 (XPS, 美国 Thermo-VG Scientific 公司); 傅里叶红外光谱 (FTIR, 美国 Thermo-VG Scientific 公司); 接触角测量仪 (成德市成慧试验仪器有限公司); UV-1800 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司)。

1.3 实验过程

1.3.1 钛纳米管的制备 将钛箔片加工成直径 15mm、厚度 0.25mm 的圆形光滑钛片, 依次放入丙酮、75% 无水乙醇、去离子水中, 超声清洗各 20 min。再放入电解液为含 0.27 mol/L 氟化铵的丙三醇溶液 (丙三醇溶液与双蒸水的体积比为 1:1) 中, 采用阳极氧化法石墨接负极, 钛片接正极, 调节直流稳定电源电压为 10、20、30V 的条件下分别 3 h, 以制备管径 30、70、120 nm 的 TNT。反应结束后将钛片取出, 大量双蒸水清洗, 干燥。

1.3.2 实验分组 钛片组 (A 组); 30 nm TNT (B 组); 70 nm TNT 组 (C 组); 120 nm TNT (D 组)。

1.3.2.1 BCD 组 制备 1 g/L 的 MH 溶液, 然后将 25 μl MH 溶液移液到 TNT 表面并轻轻铺展以确保均匀覆盖, 后置入冷冻干燥系统, 在 -45 °C 真空下冷冻干燥 2 h, 重复上述加载步骤, 直至负载 MH 的量达到 200 μg, 在最后干燥步骤后, 移取 2 ml PBS 快速冲洗表面以除去积聚在表面的药物。

1.3.2.2 BCD-MH 组 配制 10 mg/ml 壳聚糖 (chitosan, CHI) 溶液: 1% (g/L) CHI + 0.8% Vol 乙酸置于去离子水中, 将 TNT 基底固定在旋转涂布机上, 将 20 μl 该聚合物溶液移液到钛纳米管表面, 使 CHI 以转速 500 r/min 涂层到底基上, 涂布 15 s, 重复 4 次, 然后在室温中干燥。

1.3.3 样品的表征 FESEM 观察样品表面形貌,

并通过观察其侧方断面测量 TNT 的高度; 接触角测量仪分析材料表面亲水性: 滴 3 μl 去离子水于钛片表面, 持续 10 s, 采集液滴影像并检测; XPS、FTIR 对样品成分进行分析; 紫外分光光度计检测样品表面 MH 的释放曲线(将含有 MH 的样品置于 12 孔板中, 并加入 1ml 磷酸盐缓冲液, 放入温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温摇床中, 再分别于 6、12、24 h、2、3、4 ~ 15 d 取出 200 μl 释放液以检测其中 MH 的浓度, 并重新加入 200 μl 新的 PBS 溶液)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 钛基材表面形貌表征 FESEM 显示: 光滑钛片为镜面状; 钛纳米管为蜂窝状, 管径分别约为 30、70、120 nm 左右。见图 1。断面显示不同管径钛纳米管的高度一致, 约为 700 nm。见图 2。

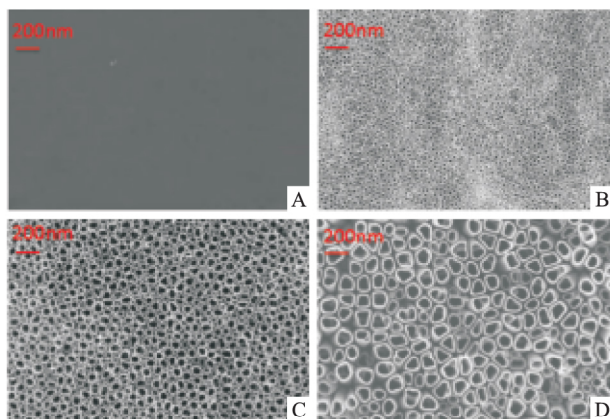


图 1 光滑钛片及 TNT 的表面微观结构 $\times 30\ 000$
A: 光滑钛片; B: 30 nm TNT; C: 70 nm TNT; D: 120 nm TNT

2.2 载药纳米管表面形貌分析 图 3A 为载药前 TNT 的表面形貌。当载入米诺环素后, 纳米管管腔

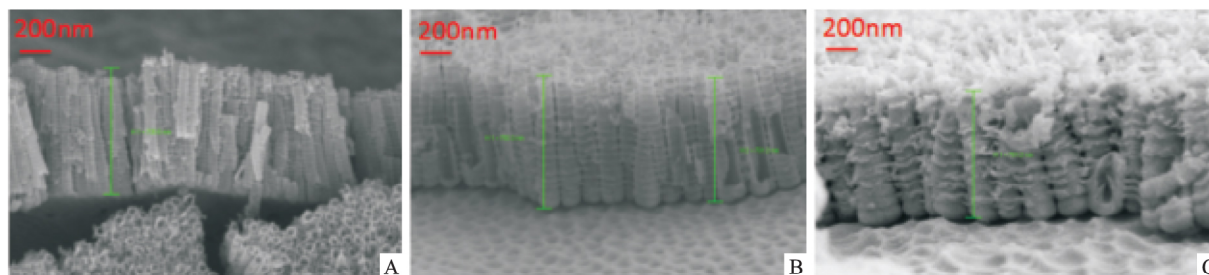


图 2 TNT 的断面结构 $\times 50\ 000$
A: 30 nm TNT; B: 70 nm TNT; C: 120 nm TNT

及之间的孔隙被药物充填, 但管状形貌依然存在。见图 3B。之后用 CHI 多层覆盖后, 纳米管形貌消失, 表面光滑平整。见图 3C。可见 CHI 多层的覆盖起到了封堵纳米管管口的作用, 从而避免药物的突释。

2.3 材料表面亲水性分析 TNT 组的接触角明显低于钛片组(Ti), 表现出良好的亲水性, 且管径越大, 接触角越小, 亲水性越大。加载 MH 后的 TNT 亲水性降低, 而覆盖 CHI 后, 亲水性明显减小, 证明了 CHI 成功覆盖 TNT, 差异均有统计学意义($F = 433.014$, $P = 0.00$)。见表 1。

表 1 各样品表面接触角角度($n = 36$, $\bar{x} \pm s$)

组别	接触角角度($^{\circ}$)
Ti	46.94 \pm 4.30
30 nm TNT	8.42 \pm 0.43
70 nm TNT	4.38 \pm 0.89
120 nm TNT	1.81 \pm 0.51
TNT + MH	18.62 \pm 1.20
TNT + MH + CHI	33.12 \pm 2.33

2.4 XPS 分析 图 4A、B 分别为 TNT 载药前后的 XPS 谱图, 结果显示载药后 N、C、Cl 元素较载药前均明显上升, 这与 MH 的分子式相吻合, 见图 5。

2.5 FTIR 检测 图 6A、B 分别为 TNT 载药前后的红外光谱图, 载药后, 处于 3 000 cm^{-1} 的谱带为苯环的特征谱线, 1 498 cm^{-1} 为苯环骨架 C=C 的特征带, 这与 MH 的结构式相吻合, 见图 5。

2.6 MH 的加载量与释放曲线 由图 7 可见: 3 组样品在 24 h 内突释较为明显, 在前 9 d 药物释放量逐渐增加, 释放趋势基本一致, 而后释放速度有所减慢, 至 13 ~ 15 d 释放量不再增加。侧面反映药物的加载量, 随着管径的增加 30、70、120 nm 钛纳米管, 载药量分别为 48.33、71.29、60.01 μg 。其中 70 nm 钛纳米管组载药量最高, 整个释放过程较其它 2

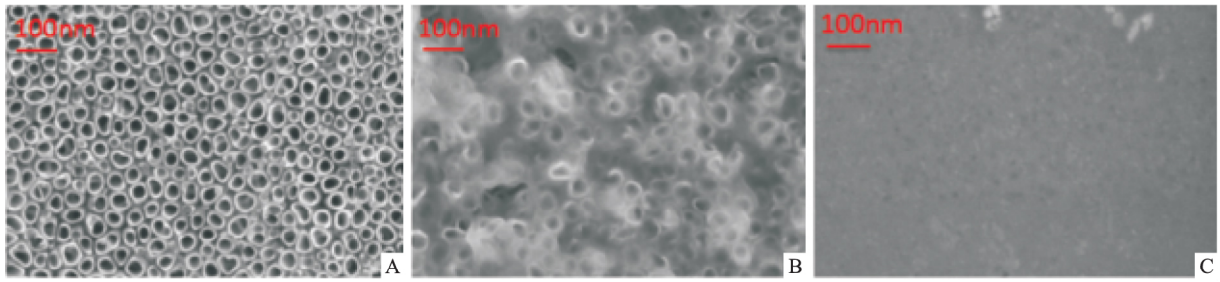


图3 TNT载药后的表面微观结构 × 100 000

A: 30 nm TNT; B: TNT内载入MH; C: 载药后TNT表面覆盖CHI多层

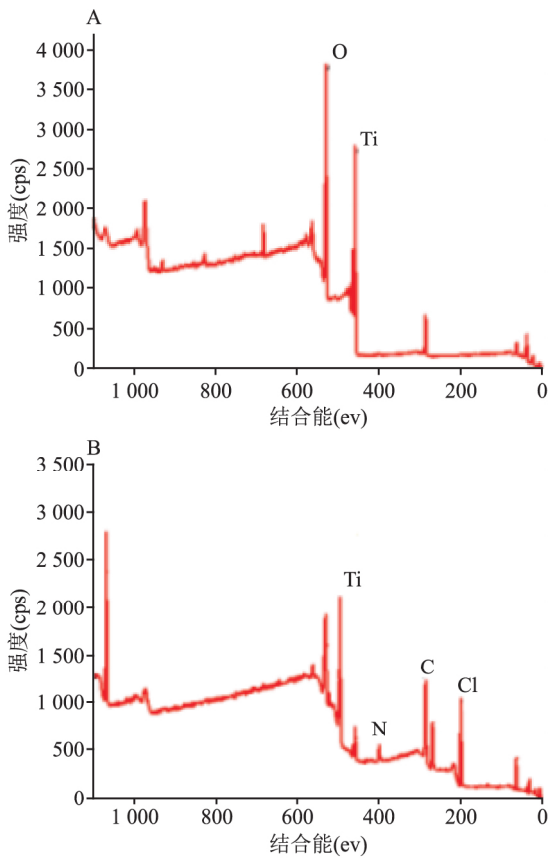


图4 XPS分析图谱

A: TNT组; B: 加载MH的TNT组

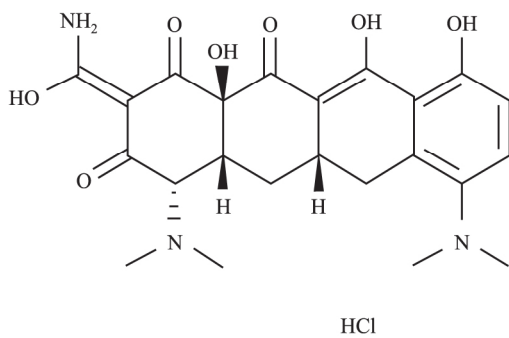


图5 MH化学结构式

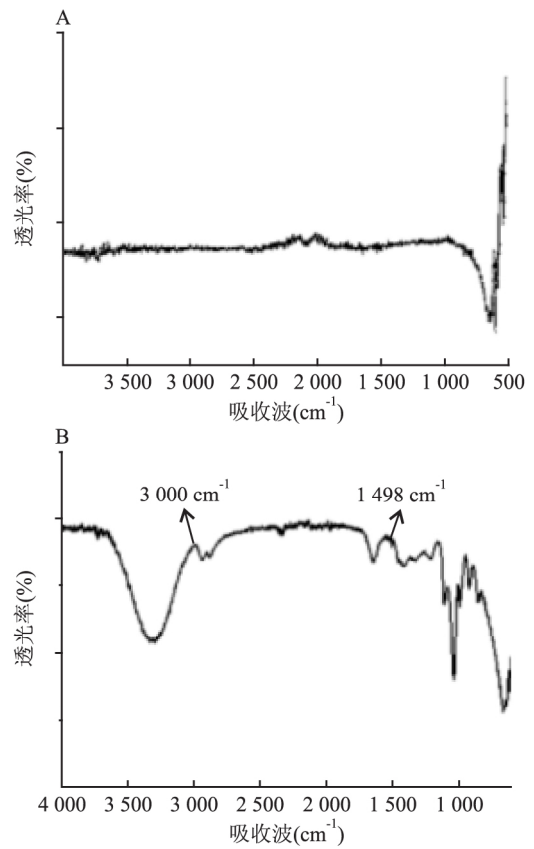


图6 FTIR检测结果

A: TNT组; B: 加载MH的TNT组

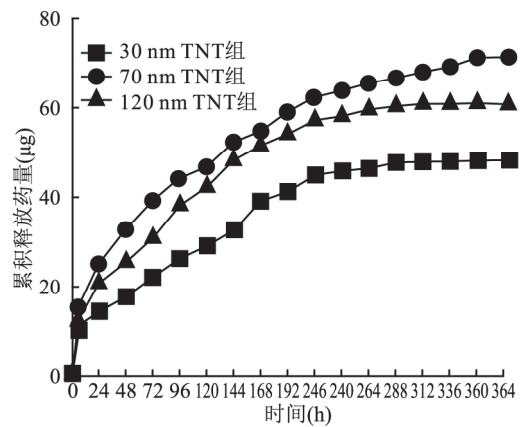


图7 MH释放曲线

组更为稳定,至第 15 天时仍有少量释放。

3 讨论

目前,提高钛种植体抗菌性能的方法主要有 2 类:①通过物理和化学方法,构建种植体预防感染表面以减少菌斑的附着。②构建种植体抗菌表面以杀灭细菌,研究^[3]证实,后者的抗菌效果更为持续有效。近年来,通过纳米化修饰来进行钛种植体表面改性成为研究的热点内容。TNT 具有优异的生物相容性,高比表面积,尺寸可控,是局部药物输送的良好载体。研究^[4-5]显示,药物的载药量及缓释特征,涂层的抗菌效果及对细胞的功能作用随着纳米管管径的不同而变化,适宜管径的 TNT 能够载负较大的药物量,具备更佳的释放效应,增加成骨相关细胞的活性,并且可抑制细菌的粘附。然而目前对于 TNT 最佳管径的选择尚存争议,据此,本实验采用阳极氧化法构建管径分别为 30、70、120 nm 的 TNT。SEM 观察呈特有的蜂窝管状结构,其断面高度一致,约 700 nm。

大量研究^[6]表明,防止细菌在种植体表面黏附是预防感染的关键。抗生素全身应用存在生物利用度差,选择性不足,细胞毒性等缺点,为解决上述问题,将抗生素载入纳米管腔,以降低细菌浓度、阻止细菌粘附到种植体表面来防止相关感染^[7]。本实验使用的抗生素为 MH,显著作用于兼性厌氧菌和厌氧菌,抗菌谱广、耐药菌株少,能杀死种植体周围的致病菌并抑制细菌粘附到种植体表面^[8]。其作用机制是防止细菌蛋白质合成而发挥抗菌作用,抑制牙周组织胶原酶活性,减少牙槽骨吸收^[9]。研究^[10]显示,MH 对牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌等种植体周围炎优势菌的最小抑菌浓度为 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。因此,本研究采用 TNT 为基材将 MH 加载至纳米管表面,通过 XPS 及 FTIR 检测,证实实验组样品表面成功加载 MH。

尽管 TNT 是吸附药物的良好载体,但载入管腔中的抗生素会产生早期突释现象,造成局部药物浓度降低至最低杀菌浓度而引发感染,而过高抗生素浓度也会导致细胞毒性反应^[11-12]。据此,本实验将 CHI 多层覆盖到负载 MH 的 TNT 表面,封堵 TNT 管口,以达到 MH 的控制释放。SEM 显示纳米管形貌消失,表面光滑平整。CHI 为 N-乙酰葡萄糖胺单体构成的聚合物,是一种天然阳离子多糖。可与各种生物活性材料结合使用,具备无毒性,生物降解性,抗菌活性及良好的成膜性能等,广泛应用于生物工

程和再生医学等领域^[13]。

为比较不同管径的缓释效果,本实验进行了 MH 的释放动力学测定,由释放曲线可见:70 nm TNT 组的载药量最高,至 15 d 仍有少量释放,其次为 120 nm TNT 组、30 nm TNT 组。由以上规律可知,当 TNT 管径较小时,会阻止药物分子进入管腔内部而使载药量降低,而管径过大,钛纳米管的比表面积降低,载药量反而下降。

因此,本研究在钛表面制备出不同管径的含有 MH 修饰的 TNT 涂层,实现米诺环素的有效荷载,并涂覆 CHI 多层膜构建缓释系统,检测米诺环素载入不同管径 TNT 后的载药能力及缓释特征,其中,70nm 管径的 TNT 的载药量最大,缓释效果最好,为种植体表面抑菌改性及种植体周围炎的防治提供新的方法与思路。

参考文献

- [1] Huo K, Zhang X, Wang H, et al. Osteogenic activity and antibacterial effects on titanium surfaces modified with Zn-incorporated nanotube arrays [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(13): 3467-78.
- [2] Bae I H, Yun K D, Kim H S, et al. Anodic oxidized nanotubular titanium implants enhance bone morphogenetic protein-2 delivery [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 93(2): 484-91.
- [3] Feng W, Geng Z, Li Z, et al. Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 62: 105-12.
- [4] Zhao L, Mei S, Wang W, et al. Suppressed primary osteoblast functions on nanoporous titania surface [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96(1): 100-7.
- [5] Gulati K, Ramakrishnan S, Aw M S, et al. Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(1): 449-56.
- [6] 李志杰, 王少果, 李跃烘, 等. 高通量测序研究种植体周围龈下微生物多样性 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2015, 46(4): 568-72.
- [7] 李晖, 聂彬恩, 岳冰. 基于构建抗感染骨科植入物的钛表面纳米化修饰和载药的不同方式 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(6): 848-52, 884.
- [8] 周志迎, 李婷薇, 张晔, 等. TiO_2 纳米管阵列负载盐酸米诺环素前后抗牙周致病菌性能的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(5): 909-12.
- [9] Ma S, Adayi A, Liu Z, et al. Asymmetric collagen/chitosan membrane containing minocycline-loaded chitosan nanoparticles for guided bone regeneration [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31822.
- [10] 任蕾, 杨圣辉, 刘颖. 牙周炎常见菌对抗菌药物的筛选及活性测定 [J]. *现代口腔医学杂志*, 2000, 14(4): 256-7.
- [11] Qin H, Cao H, Zhao Y, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-biofilm

- effects of silver nanoparticles immobilized on titanium[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(33): 9114–25.
- [12] Rathbone C R, Cross J D, Brown K V, et al. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(7): 1070–4.
- [13] Husain S, Al-Samadani K H, Najeeb S, et al. Chitosan biomaterials for current and potential dental applications [J]. *Materials (Basel)*, 2017, 10(6): E602.

The study on release kinetics of minocycline loaded on the TiO₂ nanotubes *in vitro*

Cheng Jiahui¹, Wu Yufeng¹, Wang Zehua², et al

(¹*Stomatologic Hospital of Anhui Medical University;*

²*Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To study the effect of TiO₂ nanotubes(TNT) with different diameters on the loading of minocycline and explore its sustained release effect. **Methods** TNT with different diameters were fabricated on the surface of titanium by anodizing at 10, 20 and 30V, and minocycline hydrochloride(MH) was loaded on the surface to construct an antibacterial coating. The samples were characterized by electron microscopy, contact angle measurement, X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy and UV-Visible spectrophotometer, to compare the sustained release effects. **Results** Anodization at 10, 20 and 30V voltage produced 30, 70 and 120 nm nanotube coating. The 70 nm TNT had the highest drug loading and the best sustained release effect, followed by 120nm TNT and 30 nm TNT. **Conclusion** The 70 nm TNT has the highest drug loading and the best sustained release effect, which is expected to improve sustained antibacterial properties of the titanium implant surface.

Key words TiO₂ nanotubes; minocycline hydrochloride; controlled-release; peri-implantitis

(上接第 209 页)

Effects of focal cerebral ischemia reperfusion injury on SUV39H1, H3K9 and GFAP expression in mouse brain tissue

Hua Xiangyang, Bian Erbao, Zhang Zhengwei, et al

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

Abstract Objective To investigate the changes of histone 3 lysine 9 (H3K9), methylated transferase (SUV39H1) and glial fibrin acidic protein (GFAP), an active marker of astrocytes, in focal cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** The left middle cerebral artery occlusion model (MCAO model) was established by Koizumi method in the C57BL/6 mouse model. The expressions of SUV39H1, H3K9 and GFAP in the cerebral ischemia reperfusion mice cerebral ischemia 2 h reperfusion 24 h group (the experimental group), the sham operation group and the blank control group were observed by behavioral analysis, slice staining, qRT-PCR, correlation analysis and Western blot. **Results** 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining showed that the cerebral infarct size of the experimental group was significantly higher than those of the sham operation group and the blank control group. The experimental group had obvious cerebral edema. qRT-PCR and Western blot showed that the expressions of SUV39H1, H3K9 and GFAP in focal cerebral ischemia-reperfusion group were significantly higher than those in the sham operation group and blank control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Focal cerebral ischemia reperfusion injury can stimulate the expression of SUV39H1 and H3K9. Meanwhile, the expression of GFAP also increases significantly. These results suggest that astrocyte activation may play an important role in increasing SUV39H1 and H3K9 expression in brain tissue of mice with focal ischemia reperfusion injury.

Key words MCAO model; ischemia reperfusion injury; SUV39H1; histone 3 lysine 9; GFAP; astrocyte