

网络出版时间: 2019-1-11 14:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.018.html>

钛纳米管表面固定 GL13K 抗菌肽的实验研究

王泽华 程佳蕙 高啟坤 宋婷婷 吴明月

摘要 目的 探讨在二氧化钛 (TiO_2) 纳米管表面固定 GL13K 抗菌肽 (AMP) 的方法并对其效果进行比较,为钛种植体表面的抗菌改性及种植体周围炎治疗研究提供新的思路。方法 采用物理吸附、共价结合及层层自组装将 GL13K 抗菌肽固定至 TiO_2 纳米管表面,构建生物活性抗菌涂层,并比较其固定效果。结果 通过场发射扫描电镜、正置荧光显微镜、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,证实 3 种方法均可将 GL13K 抗菌肽固定至 TiO_2 纳米管表面。结论 层层自组装法的缓释效应最佳,有望提高钛种植体表面的持续抗菌性能。

关键词 TiO_2 纳米管; GL13K 抗菌肽; 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(2019)02-0251-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.018

钛金属因其良好的生物相容性,成为牙种植体

的基本材料,然而其本身不具有抗菌性,因此如何提高钛种植体表面的抗菌性能一直是该领域研究的重要内容^[1]。近年来,在含纳米结构的钛种植体表面固定抗菌肽 (antibacterial peptide, AMP),构建生物活性抗菌涂层成为该领域研究的热点^[2]。二氧化钛 (titanium dioxide, TiO_2) 纳米管具备化学性质稳定、耐腐蚀、结构规整、高度有序,一端开口而另一端封闭的特性,其特有的蜂窝管状结构、较大的比表面积可作为特定生物大分子及抗菌药物的有效载体,且能够对目的成分具备缓释效应^[3]。该实验通过阳极氧化法在钛基材表面原位构建 TiO_2 纳米管结构,再通过物理吸附、共价结合及层层自组装将 GL13K 抗菌肽固定至纳米管材料表面,构建生物活性抗菌涂层,比较其固定效果,为种植体表面的抗菌改性及种植体周围炎的治疗研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 纯度 99.99% 钛箔片购自北京中金研新材料科技有限公司;异硫氰酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 荧光标记的 GL13K 抗菌肽购自上海科肽生物科技有限公司;多巴胺、海藻酸钠购自北京天根生化科技有限公司;丙酮、乙二醇、氟化铵、

2018-10-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81170993)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:王泽华 男 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

Serum T_3 , T_4 , TgAb and TPOAb levels were measured by electrochemical luminescence immunoassay, and serum TSH were measured by enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay. Vaginal exfoliative cells were stained to select the estrous mice. Immunohistochemical method was used to observe the expression level and distribution of ER α in both CON group and HT group. The ER α mRNA levels was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in estrus. Cytometric bead array (CBA) method was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in the two groups. mRNA expression levels of IL-6 and IL-10 in uterus were detected by RT-PCR. **Results** The differences of T_3 , T_4 and TSH between the two groups were not statistically significant, and TgAb and TPOAb in HT group were significantly higher than those in the CON group ($P < 0.05$). Vaginal exfoliation cell staining showed that the cell morphological characteristics of HT mice were similar to those of the CON group. Immunohistochemistry showed the ER α was expressed in the HT group and the CON group, and both immunohistochemistry and RT-PCR showed the ER α expression level in HT group was lower than that in the CON group ($P < 0.05$); RT-PCR and CBA showed that IL-6 and IL-10 mRNA and protein levels in the HT group were lower than those in the CON group ($P < 0.05$). **Conclusion** Mice with HT have estrous cycles and the expression level of ER α in the endometrium is low during the estrous period, suggesting that HT mice can get pregnant but have low fertility.

Key words Hashimoto thyroiditis; estrogen receptor alpha; interleukin-6

氯化钙购自广州西陇化工有限公司;试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器 LP6003D 型直流稳压电源购自深圳乐达精密工具有限公司;Sirion-200 场发射扫描电镜(FESEM)购自美国 FEI 公司;X 射线光电子能谱仪(XPS)、傅里叶红外光谱(FTIR)购自美国 Thermo-VG Scientific 公司;接触角测量仪购自成德成慧试验机器有限公司;正置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司;UV-4800 紫外-可见分光光度计购自日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 钛纳米管的制备 将钛箔片加工成直径为 15 mm 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 90 mmol/L 氟化铵电解液中,石墨接负极,钛片接正极,两步法阳极氧化:15 V、10 min;50 V、60 min。最后将样品置于去离子水中超声清洗 3~5 min,干燥备用。

1.3.2 实验分组 分为 4 组:钛纳米管组(A 组:空白对照组)、物理吸附组(B 组)、共价结合组(C 组)和层层自组装组(D 组)。

1.3.2.1 钛纳米管组 上述阳极氧化法制备的钛纳米管,未吸附 GL13K 抗菌肽。

1.3.2.2 物理吸附组 将钛纳米管浸入经 FITC 荧光标记的、0.2 mg/ml 的 GL13K 抗菌肽溶液中 12 h,避光,真空干燥备用。

1.3.2.3 共价结合组 将钛纳米管浸入 2 mg/ml 的多巴胺溶液中 12 h,避光,再置于去离子水中清洗,干燥备用;再将上述处理的纳米管完全浸入至经 FITC 标记的、0.2 mg/ml 的 GL13K 肽溶液中 12 h,避光,真空干燥备用。

1.3.2.4 层层自组装组 将钛纳米管浸入至 2 mg/ml 的海藻酸钠溶液中 10 min,再置于去离子水中清洗,真空干燥;而后在样品表面滴加 0.2 mg/ml 的 GL13K 肽溶液,使液滴覆盖整个基材表面,再次干燥,依次循环,直至抗菌肽溶液滴加完毕;最后将上述处理完成的纳米管浸入 2% CaCl_2 溶液中 10 min,真空干燥备用。

1.3.3 样品的表征 分别使用 FESEM、接触角测量仪、XPS、FTIR 及荧光显微镜对上述 4 组样品进行表征;紫外分光光度计检测样品表面抗菌肽的释放曲线(将含有抗菌肽的样品置于 12 孔板中,并加入 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS),放入温度为 37 °C 的恒温摇床中,再分别于 1、2、4、8、12、24 h;2、3、5 d 取出

200 μl 释放液以检测其中抗菌肽的浓度,并重新加入 200 μl 新的 PBS 溶液。

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

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;钛纳米管为特有的蜂窝状结构,管腔直径均匀一致,多为 80 nm 左右;断面显示钛纳米管的高度约 2.4 mm。见图 1。

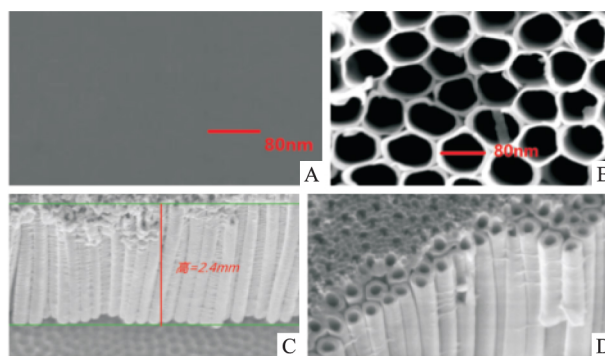


图 1 光滑钛片及 TiO_2 纳米管的表面微观结构

A:光滑钛片 $\times 100\ 000$;B: TiO_2 钛纳米管 $\times 100\ 000$;C、D:钛纳米管断面 $\times 30\ 000$

2.2 材料表面亲水性分析 实验组的接触角相对于空白对照组均有不同程度增加,亲水性减弱。这与材料表面接枝了弱亲水性的 GL13K 以及多巴胺、海藻酸钠封闭了纳米管管口相关。差异有统计学意义($F = 90.438$, $P < 0.05$),LSD- t 检验对组间两两比较,结果显示 4 组各组之间差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 1、图 2。

表 1 各样品表面接触角角度($n = 24$, $\bar{x} \pm s$)

组别	接触角角度($^\circ$)
钛纳米管	16.05 ± 1.05
物理吸附	18.69 ± 1.40
共价结合	29.50 ± 1.34
层层自组装	23.79 ± 1.76

2.3 XPS 分析 结果显示 400 eV 处,实验组氮元素的波峰较对照组均明显上升。表明 GL13K 成功固定在钛基材表面。见表 2、图 3(共价结合组的检测中增加了多巴胺修饰组,以排除多巴胺溶液中氮元素的干扰,即图 3 中的 D 组)。

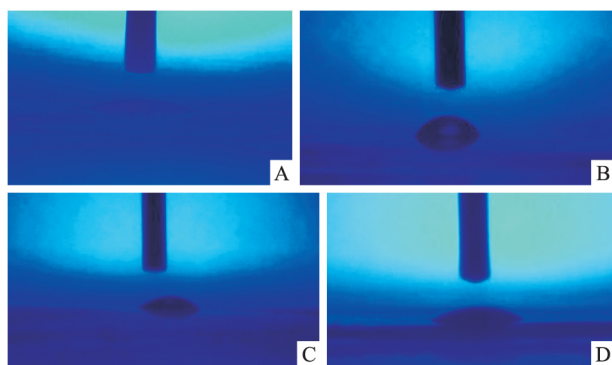


图2 接触角测量图片

A: 钛纳米管组; B: 物理吸附组; C: 共价结合组; D: 层层自组装组

表2 钛纳米管样品不同方法固定多肽后表面各元素含量(%)

组别	碳	钙	氮	钛	氧
钛纳米管	43.96	0.11	4.06	12.77	39.10
物理吸附	65.96	0.16	9.77	3.21	20.89
共价结合	64.49	0.22	13.59	0.37	21.33
多巴胺修饰	43.36	0.06	5.70	14.33	36.55
层层自组装	60.16	0.43	10.87	0.32	28.22

2.4 FTIR 检测 结果显示吸收波为 $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ 时实验组的波峰均与 GL13K 抗菌肽的波峰一致, 此为氨基化合物的波峰, 表明 GL13K 成功固定在钛基材表面。见图 4。

2.5 免疫荧光分析 空白对照组材料表面无荧光分布; 实验组材料表面均可见不等量的荧光, 其中共价结合组的荧光分布量较多且均匀, 证实 GL13K 已

成功固定在钛基材表面。见图 5。

2.6 GL13K 抗菌肽的释放曲线 由释放曲线可见: 物理吸附组样品表面的 GL13K 释放速度最快, 释放时间短, 24 h GL13K 基本完全释放; 共价结合组样品表面的 GL13K 24 h 内突释明显, 之后释放速度减缓; 层层自组装组样品表面的 GL13K 24 h 内突释较为明显, 而后释放速度有所减慢, 整个释放过程较其它两组更为稳定, 至第 5 天时 GL13K 仍持续释放。见图 6。

3 讨论

目前, 通过物理、化学方法在钛种植体表面构建各种抗菌涂层, 成为钛种植体表面抗菌改性研究的主流^[1]。根据是否向周围释放抗菌物质, 可将抗菌涂层分为直接抗菌涂层和抗菌物质释放的抗菌涂层, 前者如季铵盐类及抗菌肽类涂层, 后者是由抗菌剂与载体材料相结合的复合涂层^[1], 其中, AMP 广泛存在于生物体内, 是由生物细胞特定基因编码的一类带正电荷的两亲性小分子多肽, 表现出抗菌谱广、理化性质稳定、不易产生耐药等特点而备受关注^[4-5]。因此, 本实验选择来自于人类腮腺蛋白的 GL13K 抗菌肽为研究对象, 通过 3 种不同涂层构建方法的比较来考察其结合效果。作为一种新型肽, GL13K 肽不易被酶解且细胞毒性极低, 与成骨细胞有良好的生物相容性^[6], 实验^[7]证明其能够以 $5 \sim 10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的最小抑菌浓度抵抗种植体周围炎优势

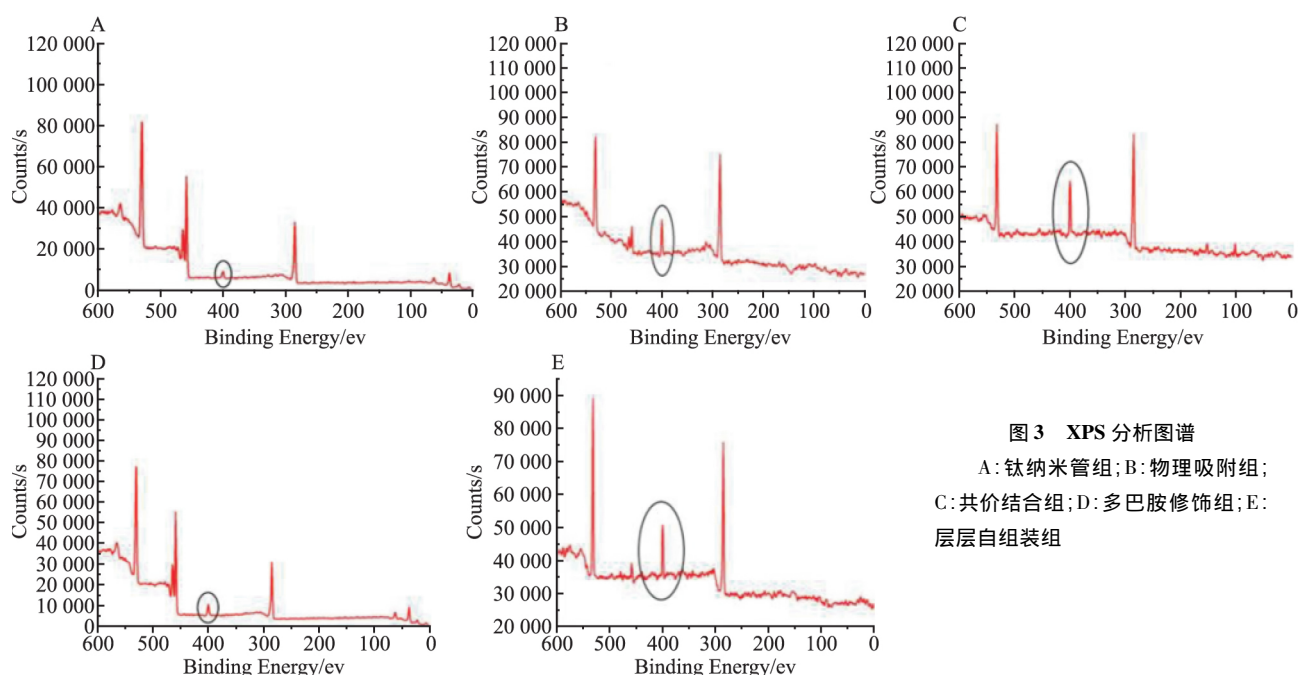


图3 XPS 分析图谱

A: 钛纳米管组; B: 物理吸附组;
C: 共价结合组; D: 多巴胺修饰组; E: 层层自组装组

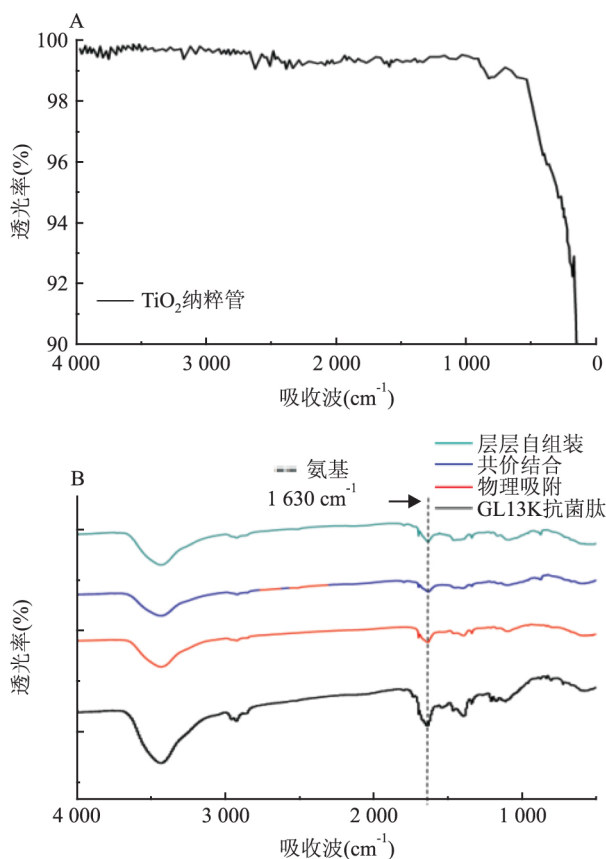


图4 FTIR检测结果
A: 钛纳米管组; B: 实验组

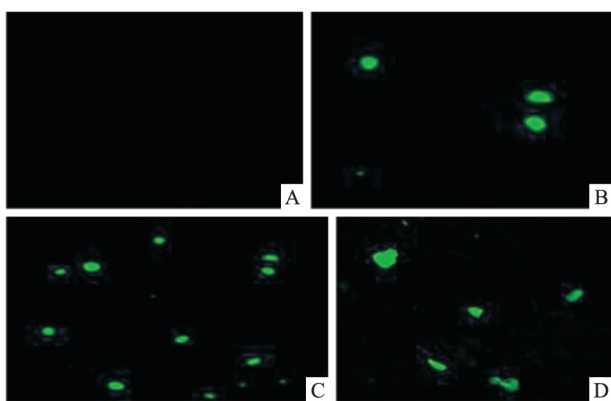


图5 荧光分析结果 ×200
A: 钛纳米管组; B: 物理吸附组; C: 共价结合组; D: 层层自组装组

菌即牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌。因此,本研究采用 TiO_2 纳米管为基材,将 GL13K 抗菌肽接枝至纳米管表面,以期提高钛种植体表面的抗菌性能。

近年来,纳米化修饰是钛种植体表面改性研究的重要内容。钛基材表面的纳米级形貌可抑制细菌的黏附和生物膜的形成^[8],且纳米结构的钛基材表面可实现对目的分子的缓释效应。缓释体系的构建可使 AMP 等生物活性成分在基材表面得到可控有

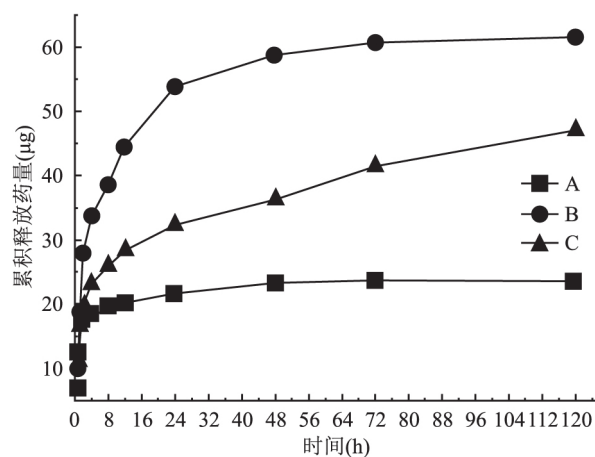


图6 抗菌肽释放曲线
A: 物理吸附组; B: 共价结合组; C: 层层自组装组

序的释放,从而达到持续抗菌效果^[9]。研究表明, TiO_2 纳米管化学性质稳定、结构规整,与钛基体结合牢固,可作为多肽、生长因子等生物活性分子的缓释载体^[3],且 80 nm 管径的纳米管能够实现最大的载药量^[10]。据此,本实验采用阳极氧化法在钛基材表面原位构建高度有序的 TiO_2 纳米管阵列,SEM 观察呈特有的蜂窝管状结构,其管腔直径多为 80 nm 左右,断面结果显示其高度约 2.4 mm。本实验的 AMP 释放曲线证实 TiO_2 纳米管本身具有“缓释”性能,但其缓释效果不佳,其表面吸附的 GL13K 24 h 内基本完全释放,因此,在纳米管表面构建各种“涂层”结构以封闭管口,增加其缓释效应成为目前的研究热点,常见的涂层成分有海藻酸盐、钙磷、壳聚糖、胶原凝胶等^[11]。

如何将 AMP 类的生物有机大分子接枝到具有生物惰性的钛基材表面,一直是该领域研究的难题。目前钛基材表面接枝生物活性多肽的方法主要有物理吸附、共价偶联、层层自组装等方法。本实验对上述 3 种固定方式进行比较分析,FTIR 的检测结果表明实验组样品表面均成功接枝 GL13K 抗菌肽;显微荧光及 XPS 检测结果亦进一步证实实验组样品表面均成功固定 AMP 成分,且共价组的载药量最多。本实验中,共价结合法所使用的交联剂为高度亲水性的多巴胺,其能够在固体材料表面形成附着牢固的聚多巴胺薄膜层,而后氧化成醌式结构,与有机分子的功能基团发生共轭加成反应,实现有机分子的固定,课题组前期研究^[12]已证实经多巴胺溶液处理的钛纳米管可实现与多肽的结合。由 AMP 的释放曲线可见自组装组的样品表面至第 5 天时仍有 GL13K 持续释放,表明该组的缓释效应优于其它两

组。层层自组装法使用了亲水性强的海藻酸钠,其化学性能稳定、生物相容性良好,中性条件时,羧基解离带负电荷,与带正电荷的 GL13K 肽通过静电作用吸附在钛纳米管表面;在 Ca^{2+} 水溶液中,海藻酸钠可迅速与 Ca^{2+} 发生交联反应,交联后形成溶解性低的藻酸钙凝胶,可增加其缓释效应^[13]。

本实验通过阳极氧化的方法将纯钛片制备成 TiO_2 纳米管结构,并使用 3 种方法将 GL13K 抗菌肽接枝至钛纳米管表面,成功构建生物活性抗菌涂层,其中,层层自组装法的缓释效应最佳,有望能够提高钛种植体表面的持续抗菌性能,为种植体表面的抗菌改性及种植体周围炎的治疗研究提供了新的思路和方法。该研究构建的抗菌涂层的生物学效应尚有待体外细胞学及体内动物实验的进一步验证。本研究 GL13K 抗菌肽是经 FITC 荧光标记的成品,免疫荧光分析时荧光衰减较快,导致荧光检测显示偏弱。

参考文献

- [1] Gallo J, Holinka M, Moucha C S. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants[J]. *Int J Mol Sci* 2014, 15 (8):13849–80.
- [2] Li T, Wang N, Chen S, et al. Antibacterial activity and cytocompatibility of an implant coating consisting of TiO_2 nanotubes combined with a GL13K antimicrobial peptide[J]. *Int J Nanomedicine* 2017, 12:2995–3007.
- [3] 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.
- [4] 柳江枫, 胡天驹. 抗菌肽的作用机制、生物活性及应用研究进展[J]. *微生物学免疫学进展* 2012, 40(5):84–8.
- [5] Ohlsen K, Dandekar G, Schwarz R, et al. New trends in pharmacogenomic strategies against resistance development in microbial infections[J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(11):1711–23.
- [6] Gorr S U, Abdolhosseini M, Shelar A. Dual host-defence functions of SPLUNC2/PSP and synthetic peptides derived from the protein[J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(4):1028–32.
- [7] Hirt H, Gorr S U. Antimicrobial peptide GL13K is effective in reducing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57(10):4903–10.
- [8] Bhardwaj G, Webster T J. Reduced bacterial growth and increased osteoblast proliferation on titanium with a nanophase TiO_2 surface treatment[J]. *International J Nanomedicine* 2017, 12:363–9.
- [9] Guo Y P, Yao Y B, Guo Y J, et al. Hydrothermal fabrication of mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres for a drug delivery system[J]. *Micropor Mesopor Mat*, 2012, 155:245–51.
- [10] Wang T, Weng Z, Liu X, et al. Controlled release and biocompatibility of polymer/titania nanotube array system on titanium implants[J]. *Bioact Mater* 2017, 2(1):44–50.
- [11] Kazemzadeh-Narbat M, Lai B F, Ding C, et al. Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(24):5969–77.
- [12] 高啟坤, 宋婷婷, 吴齐越, 等. 钛纳米管表面固定成骨细胞特异性多肽的实验研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(12):1790–94.
- [13] Pawar S N, Edgar K J. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications[J]. *Biomaterials* 2012, 33(11):3279–305.

The experimental study of immobilization of the GL13K antimicrobial peptide on the TiO_2 nanotubes *in vitro*

Wang Zehua, Cheng Jiahui, Gao Qikun, et al

(Stomatologic Hospital of Anhui Medical University Key Lab.

of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the method of immobilizing GL13K antibacterial peptide (AMP) on the surface of titanium dioxide (TiO_2) nanotubes and compare the effects thereof. Finally, offering new ideas for antimicrobial modification of titanium implant surface and the treatment of peri-implantitis. **Methods** The GL13K AMP was immobilized on the TiO_2 nanotubes by physical adsorption, covalently bonding and layer-by-layer self-assembly to construct a bioactive antibacterial coating, and the fixation effect was compared. **Results** We characterized the sGL13Ks by field emission scanning electron microscopy, fluorescence microscopy, contact angle measuring instrument, X-ray photoelectron spectroscopy, Fourier infrared spectroscopy and ultraviolet spectrophotometer. It was confirmed that all three methods can fix GL13K AMP on the TiO_2 nanotubes. **Conclusion** Layer-by-layer self-assembly method has the best sustained release effect and it is expected to improve the sustained antibacterial properties of the titanium implant surface.

Key words TiO_2 nanotubes; GL13K antimicrobial peptide; controlled-release; peri-implantitis