

TiAl₆Vi₄表面超疏水修饰后的体外抑菌实验

张巍, 张里程, 张立海, 魏军强, 唐佩福(解放军总医院骨科, 北京市 100853)

文章亮点:

实验创新性采用电化学阳极氧化法在 TiAl₆Vi₄ 钛合金表面制备 TiO₂ 纳米管薄膜, 并通过氟硅烷自组装修饰成功制备超疏水表面, 使其接触角>150°。通过比较超疏水表面、普通疏水表面和亲水表面对金黄色葡萄球菌贴附的作用, 验证通过增加内植物表面疏水性可提高其抑菌效果。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 钛金属 TiAl₆Vi₄; 细菌贴附; 超疏水; 钛金属; 感染

主题词:

生物相容性材料; 钛; 葡萄球菌, 金黄色; 疏水及亲水作用

基金资助:

解放军总医院科技创新苗圃基金课题(13KMM11)

摘要

背景: 研究表明, 材料表面亲、疏水性(即表面浸润性)是影响细菌黏附的重要原因。

目的: 探讨钛金属 TiAl₆Vi₄ 表面超疏水改性后对金黄色葡萄球菌的抑菌作用。

方法: 将 TiAl₆Vi₄ 板经砂纸、酸溶液抛光和超声清洗后, 随机分组: 超疏水表面组采用电化学阳极氧化法在 TiAl₆Vi₄ 表面制备 TiO₂ 纳米管薄膜, 并通过氟硅烷自组装修饰; 亲水表面组采用电化学阳极氧化法在 TiAl₆Vi₄ 表面制备 TiO₂ 纳米管薄膜; 疏水表面组对 TiAl₆Vi₄ 表面行氟硅烷自组装修饰, 分别测量 3 组表面的接触角。将 3 组样品浸泡于金黄色葡萄球菌菌液中 2 h, 观察样品表面细菌黏附和分布状态, 以及浸泡过样品剩余菌液的 A 值。

结果与结论: 亲水表面组表面多数金黄色葡萄球菌彼此聚集、重叠, 呈葡萄串形态; 疏水表面组表面细菌有聚在一起的趋势, 但没有彼此重叠、覆盖, 只是单层排列, 没有形成葡萄串表面; 超疏水表面组表面细菌分散排布, 一般只有两三个细菌在一起, 不成串, 不重叠。3 组表面随着亲水性的降低细菌数量逐渐减少, 以超疏水表面组为最少, 而且细菌相互分离的也更加明显。超疏水表面组剩余菌液的 A 值明显高于亲水表面组和疏水表面组($P < 0.05$)。表明钛金属表面超疏水修饰能有效抑制金黄色葡萄球菌贴附。

张巍, 张里程, 张立海, 魏军强, 唐佩福. TiAl₆Vi₄ 表面超疏水修饰后的体外抑菌实验[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(21):3322-3328.

Modification of superhydrophobic surface of TiAl₆Vi₄ and its bacteriostatic action *in vitro*

Zhang Wei, Zhang Li-cheng, Zhang Li-hai, Wei Jun-qiang, Tang Pei-fu (Department of Orthopaedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that the surface hydrophilicity and hydrophobicity (*i.e.*, surface wettability) are important factors affecting bacterial adhesion.

OBJECTIVE: To observe the bacteriostatic action on *Staphylococcus aureus* after changing wettability on TiAl₆Vi₄ plates by surface modification.

METHODS: TiAl₆Vi₄ plates were buffered and polished, then divided into three groups, ten plates in each group. T₁ group was prepared for TiO₂ nanometer film on TiAl₆Vi₄ surface by electrochemically anodic oxidation method, and self-assembled PETS. T₂ group was only prepared for TiO₂ nanometer film. T₃ group was only self-assembled PETS. All the groups were observed by contact angle measurements and *Staphylococcus aureus* adhesion on different surfaces was evaluated immersion in *Staphylococcus aureus* solution for 2 hours *in vitro*.

RESULTS AND CONCLUSION: *Staphylococcus aureus* on the plates with hydrophilic surfaces (T₁ group) aggregated reciprocally and overlapped together in the shape of grape cluster while those on the hydrophobic surfaces (T₂ group) displayed a tendency of aggregation, however resulting in monolayer but not in grape-cluster like shape. On the contrary, bacteria on the plates with superhydrophobic surfaces (T₃ group) distributed dispersedly with no bacteria-clusters or strings. Furthermore, along with the decline of hydrophilia, bacteria counts decreased gradually, exhibiting an increasing trend of separation among bacteria as well. Absorbance value of T₃ group remained significantly higher than that of T₁ and T₂ groups ($P < 0.05$). It is indicated that titanium superhydrophobic surfaces are able to reduce *Staphylococcus aureus* adhesion and useful for prevention implant related infection of orthopedics.

张巍, 男, 1980 年生, 河北省承德市人, 解放军总医院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事骨科学研究。

通讯作者: 唐佩福, 主任医师, 教授, 博士生导师, 解放军总医院骨科, 北京市 100853

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.21.008
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)21-03322-07
稿件接受: 2014-02-21

Zhang Wei, M.D., Attending physician, Department of Orthopaedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Corresponding author: Tang Pei-fu, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Orthopaedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Accepted: 2014-02-21

Subject headings: biocompatible materials; titanium; *Staphylococcus aureus*; hydrophobic and hydrophilic interactions
Funding: the Nursery Foundation for Science and Technology Innovation in PLA General Hospital, No. 13KMM11

Zhang W, Zhang LC, Zhang LH, Wei JQ, Tang PF. Modification of superhydrophobic surface of $TiAl_6V_4$ and its bacteriostatic action in vitro. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(21):3322-3328.

0 引言 Introduction

钛合金 $TiAl_6V_4$ 是20世纪中期发展起来的一种重要合金材料^[1]。自20世纪60年代Branemark将钛合金用做口腔种植体后便开始在生物医用材料领域得到广泛发展,应用领域广泛涉及骨科、矫形外科、心脑血管等多学科。尤其作为主要的外科植入物材料,钛合金具较其他材料有着多方面的优势:①生物相容性和耐腐蚀性^[2]。正常人体内的物质,如体液等能够腐蚀植入物,不仅会缩短植入物寿命,还会使分解产物在体内蓄积,对机体产生不良反应^[3-4]。而Leventhal等^[5-7]的动物实验表明钛金属表面附着氧化层,该氧化层化学惰性高,生物毒性低,介电常数较大,水溶性好,生物分子反应小,吸附蛋白质分子的概率也较小,因而组织排异性低,具有良好的生物相容性。②韧性和综合的加工性能。钛合金较其他金属如不锈钢有更好的韧性,能依据人体各部位不同的解剖形态完成内植物的塑形,更好地发挥生理功能。③仿生特性。钛合金能够连续、持久的将各种负荷传递到需要治疗的骨与其他组织上,并使二者在界面处有较好的匹配。以 $TiAl_6V_4$ 等为代表的钛合金植入物,如髌、膝、肩等人工关节;髓内钉、接骨板等骨创伤产品;脊柱内固定系统;钛金属种植牙;人工心脏瓣膜,心血管支架等已广泛应用到临床,发挥了药物不能替代的诊断与治疗作用^[8]。

当然,钛合金植入材料也存在一定缺陷,即表面生物活性不高,耐磨性能较差。并且,由于医疗器械与人体接触、介入或植入体内后对宿主的影响是一个非常复杂的过程,能够引起包括组织反应、血液反应、免疫反应和全身反应在内的诸多生物学改变,因而出现如感染、钙化、血栓栓塞、肿瘤等并发症^[9-10]。而在众多并发症中,感染是外科植入器械在治疗上最常见的主要并发症之一,其发生率为1%~10%。尤其在骨科,内植物感染已然给骨科术后康复造成了灾难性的影响^[8,11]。

针对上述问题,在设计骨科内植物时,有研究者提出对钛合金表面进行修饰和改性,以提高或改进钛金属的性能,从而增加耐腐蚀性能,同时,利用内植物表面进行抗菌或抑菌修饰,降低感染发生的风险^[12-13]。目前,国际上表面修饰和改性的工艺报道很多,例如电化学氧化、金属有机化学气相沉积等,可以在钛金属表面制备出各种形貌,并在其表面沉积羟基磷灰石层、钙肽层或生物功能分子层等,借此改善内植物与聚甲基丙烯酸甲酯、聚乳酸等医用聚合物,以及聚乙二醇等生物聚合物的结合性,增加骨的把持力,提高骨结合、骨长入效果;同时,控制蛋白质的吸收及细胞、血小板和细菌的黏附,进而改善骨骼的

形成和软组织附着^[14-19]。

然而,对于内植物表面修饰的抑菌效果及作用机制,目前研究的主要热点在于探讨内植物表面修饰后对细菌黏附的影响^[20]。有研究表明,依据不同方法进行修饰的钛合金材料表面的亲、疏水性(即表面浸润性)是影响细菌黏附的重要原因。例如,亲水表面(接触角小于 90°)可以吸引金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等细菌贴附^[21],而疏水表面(接触角大于 90° ,小于 150°)可以降低金黄色葡萄球菌等细菌的黏附^[22-23]。然而目前关于超疏水涂层与细菌黏附的相关研究报道较少。实验拟在 TiO_2 纳米管薄膜载体的基础上^[24],通过自组装方法对钛金属表面进行超疏水(接触角大于 150°)处理,探讨超疏水表面、普通疏水表面和亲水表面对金黄色葡萄球菌贴附的作用,验证能否通过增加内植物表面疏水性提高其抑菌效果。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 样本观察性试验。

时间及地点: 于2013年4至11月在厦门大学、解放军军事医学科学院完成。

材料:

$TiAl_6V_4$ 表面超疏水修饰后体外抑菌实验的材料与仪器:

材料与仪器	来源
钛金属 $TiAl_6V_4$	天津正天医疗器械有限公司
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> 8325	解放军军事医学科学院
氟硅烷溶液	环新氟材料有限公司
LB 培养基	Sigma 公司
The BacLight™ RedoxSensor™ CTC 试剂盒	Sigma Invitrogen 公司
氢氟酸	江苏章旭高纯化学试剂公司
临界点干燥仪	HCP-2 型, 日立公司

实验方法:

$TiAl_6V_4$ 表面浸润性修饰实验: 将 $TiAl_6V_4$ 板材按照 $10\text{ mm}\times 20\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ 大小切割,经过砂纸、酸溶液抛光和超声清洗后,分成3组,每组中包含10个样品。每组按照不同步骤处理,详细如下:①超疏水表面组10枚样品悬浮于0.5%氢氟酸溶液中,采用恒定电流法,控制电压为20 V,在室温下电化学阳极氧化20 min。反应结束后,经过去离子水冲洗以及超声波振荡,干燥后放入马弗炉中恒定温度热处理2 h。冷却后将样品悬置在1%的氟硅烷甲醇溶液中浸泡1 h,再放入 140°C 烘箱中干燥1 h。②亲水表面组10枚样品反应条件同超疏水表面组,但仅进行电化学

阳极氧化处理和热处理。③疏水表面组10枚样品悬置在1%的氟硅烷甲醇溶液中浸泡1 h, 再放入140 °C烘箱中干燥1 h。采用外形图像分析法, 使用接触角仪(FTA 200)测定3组样品的接触角。

细菌的培养和贴附: 取一定量无抗性LB液体培养基中加入适量金黄色葡萄球菌菌液, 将菌液浓度稀释到 1×10^6 cfu/mL。在无菌6孔板内放入3组样品, 取配置好的菌液, 分别在各板孔内加入10 mL菌液浸没样品, 放置于相对湿度大于90%, 温度37 °C的孵育箱内培养。2 h后取出进行扫描电镜和荧光显微镜观察。

扫描电镜观察3组细菌贴附后的样品: 将样品用0.01 mol/L PBS漂洗, 2.5%戊二醛固定并置于4 °C冰箱内过夜后, 再次0.01 mol/L PBS漂洗3×30 min、1%四氧化锇固定2 h、0.01 mol/L PBS漂洗3×30 min后、2%的单宁酸溶液60 min, 再次0.01 mol/L PBS漂洗3×30 min, 梯度乙醇脱水 and 醋酸异戊酯处理。临界点干燥仪干燥和E-102型真空离子溅射仪进行镀膜, 扫描电镜观察3组样品表面细菌贴附和分布状态。

利用荧光计算3组样品细菌贴附数量: 样品用0.01 mol/L PBS 冲洗, 以除去样品表面悬浮或者黏附不牢的细菌。样品表面滴加CTC染料, 在37 °C下进行避光荧光染色15 min, 然后在荧光显微镜下观察细菌分布情况进行计数: 在镜下200 mm×200 mm视野, 拍摄荧光照片, 使用Image Pro软件进行光点计数。每组样品各选取10个视野计数。

剩余菌液计数: 波长在600 nm时, 使用紫外分光光度计, 测定浸泡过样品菌液的A值, 即2, 4 h后菌液浓度, 并采用空白菌液为对照组。

主要观察指标: ①3组样品表面接触角。②3组样品浸泡于金黄色葡萄球菌菌液后的表面细菌黏附和分布状态, 以及浸泡过样品剩余菌液的A值。

统计学分析: SPSS 12.0软件进行统计学分析, 3组标

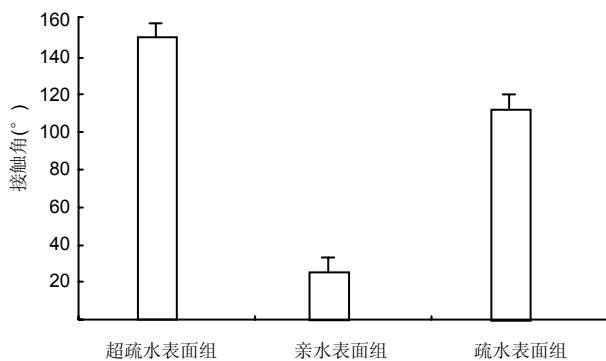


图3 钛合金 $TiAl_6V_4$ 表面超疏水修饰、亲水修饰、疏水修饰后的接触角测量

Figure 3 Contact angle measurement after different modifications on the surface of $TiAl_6V_4$

图注: 超疏水表面组接触角为 $(151.6 \pm 3.3)^\circ$, 亲水表面组接触角为 $(25.3 \pm 3.9)^\circ$, 疏水表面组接触角为 $(114.4 \pm 9.6)^\circ$ 。

本荧光计数和剩余菌液A值比较采用完全随机设计的方差分析(one-way ANOVA)和两两比较的Tukey检验法。检验的显著性水准均设定在 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 样品表面接触角 采用电化学阳极氧化法可以在钛合金 $TiAl_6V_4$ 表面制备出丛林状的 TiO_2 纳米管阵列薄膜(图1), 增加了钛合金表面的粗糙程度和表面积。如图2, 3所示, 通过氟硅烷修饰可形成超疏水表面, 此组接触角为 $(151.6 \pm 3.3)^\circ$, 亲水表面组接触角为 $(25.3 \pm 3.9)^\circ$, 疏水表面组接触角为 $(114.4 \pm 9.6)^\circ$ 。

2.2 扫描电镜观察细菌在3组样品表面的贴附情况 黏附2 h后, 亲水表面组表面多数金葡萄菌彼此聚集、重叠, 呈葡萄串形态; 疏水表面组表面细菌有聚在一起的趋势, 但是没有彼此重叠、覆盖, 只是单层排列, 没有形成葡萄串表面; 超疏水表面组表面细菌分散排布, 一般只有二三个细菌在一起, 不成串, 不重叠(图4)。

2.3 样品细菌贴附后的荧光染色观察 细菌贴附2 h后, 3种表面随着亲水性的降低细菌数量逐渐减少, 以超疏水表面组为最少, 而且细菌相互分离的也更加明显(图5)。黏附细菌荧光计数结果显示, 超疏水表面组为 83.7 ± 13.0 , 亲水表面组为 796.9 ± 71.2 , 疏水表面组为 175.6 ± 35.9 , 3组之间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 超疏水表面组金黄色葡萄球菌荧光计数最少(图6)。

2.4 各组样品剩余菌液的细菌A值测定 金黄色葡萄球菌在紫外600 nm处的吸光度值, 即是A值与菌液浓度呈正比。也就是说A值越大细菌溶液浓度越高。超疏水表面组样品剩余菌液的细菌A值为 0.40 ± 0.06 , 亲水表面组样品剩余菌液的细菌A值为 0.27 ± 0.04 , 疏水表面组样品剩余菌液的细菌A值为 0.32 ± 0.03 。超疏水表面组A值明显高于亲水表面组和疏水表面组($P < 0.05$, 图7)。

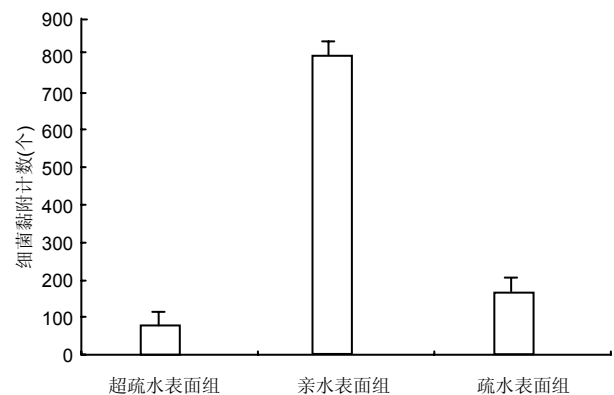


图6 金黄色葡萄球菌菌液浸泡表面不同修饰 $TiAl_6V_4$ 钛合金 2 h 后的金属表面细菌贴附数量

Figure 6 The number of attached bacteria on different surfaces of $TiAl_6V_4$ after immersion in *Staphylococcus aureus* solution for 2 hours

图注: 超疏水表面组为 83.7 ± 13.0 , 亲水表面组为 796.9 ± 71.2 , 疏水表面组为 175.6 ± 35.9 , 3组之间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

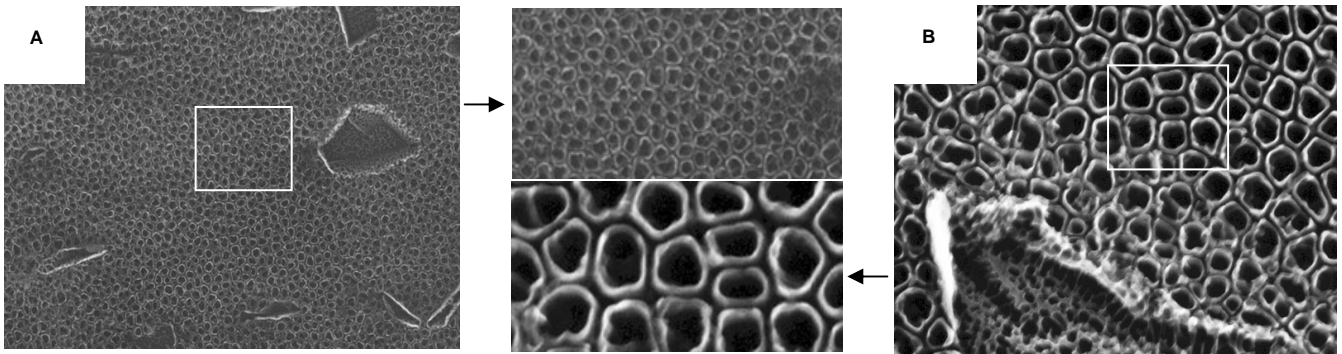


图 1 阳极氧化法制备的 $TiAl_6V_4$ 钛合金 TiO_2 纳米管薄膜电镜图

Figure 1 Electron microscope images of TiO_2 nanometer films of $TiAl_6V_4$ by electrochemically anodic oxidation method

图注: 图中 A 为放大 20 000 倍, B 为放大 50 000 倍。 TiO_2 纳米管阵列薄膜呈丛林状, 增加了钛合金表面的粗糙程度和表面积。

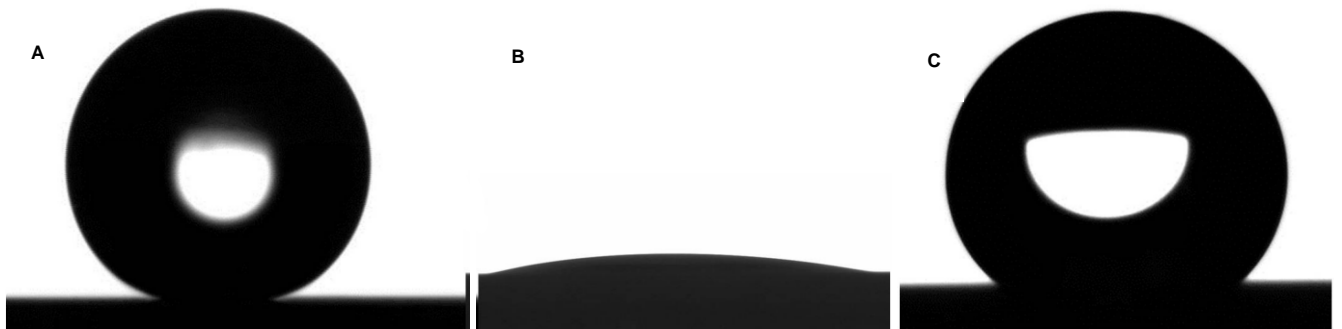


图 2 钛合金 $TiAl_6V_4$ 表面超疏水修饰、亲水修饰、疏水修饰后的接触角外形图

Figure 2 Contact angle drawing after different modifications on the surface of $TiAl_6V_4$

图注: A-C 分别为钛合金 $TiAl_6V_4$ 表面超疏水修饰、亲水修饰、疏水修饰后的接触角外形图。

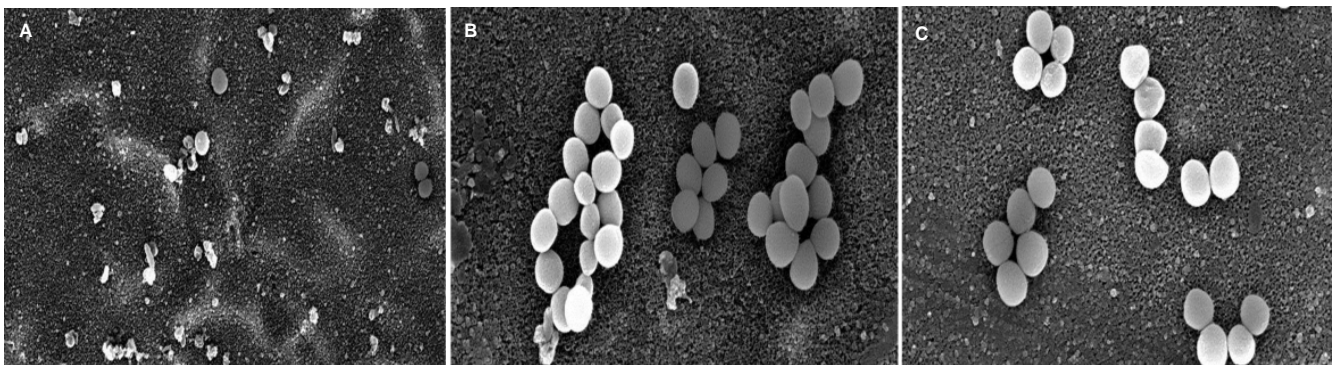


图 4 扫描电镜观察金黄色葡萄球菌菌液浸泡表面不同修饰 $TiAl_6V_4$ 钛合金 2 h 的金属表面细菌贴附($\times 40$)

Figure 4 Scanning electron microscope observation of different surfaces of $TiAl_6V_4$ after immersion in *Staphylococcus aureus* solution for 2 hours ($\times 40$)

图注: ①A-C 分别为超疏水修饰、亲水修饰、疏水修饰的 $TiAl_6V_4$ 钛合金。②亲水表面组表面多数金葡菌彼此聚集、重叠, 呈葡萄串形态; 疏水表面组表面细菌有聚在一起的趋势, 但是没有彼此重叠、覆盖, 只是单层排列, 没有形成葡萄串表面; 超疏水表面组表面细菌分散排布, 一般只有二三个细菌在一起, 不成串, 不重叠。

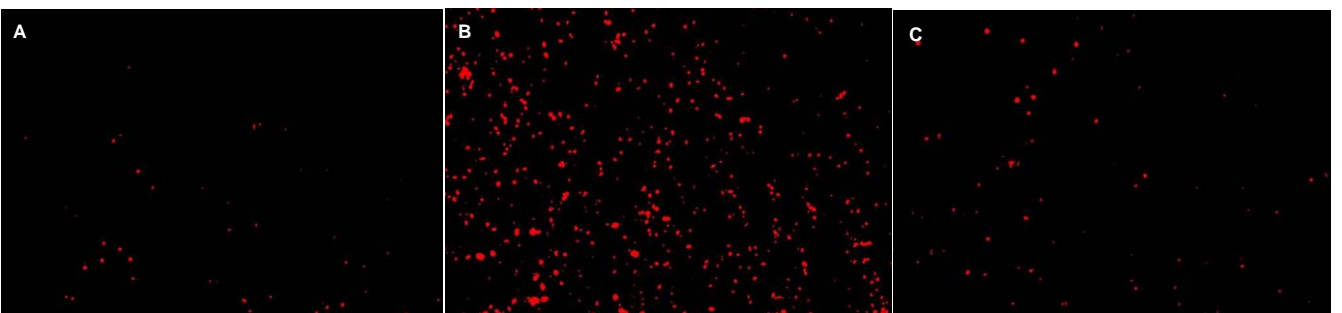


图 5 荧光染色观察金黄色葡萄球菌菌液浸泡表面不同修饰 $TiAl_6V_4$ 钛合金 2 h 后的金属表面细菌贴附($\times 40$)

Figure 5 Fluorescent staining pictures of different surfaces of $TiAl_6V_4$ after immersion in *Staphylococcus aureus* solution for 2 hours ($\times 40$)

图注: ①A-C 分别为超疏水修饰、亲水修饰、疏水修饰的 $TiAl_6V_4$ 钛合金。②3 种表面随着亲水性的降低细菌数量逐渐减少, 以超疏水表面组为最少, 而且细菌相互分离的也更加明显。

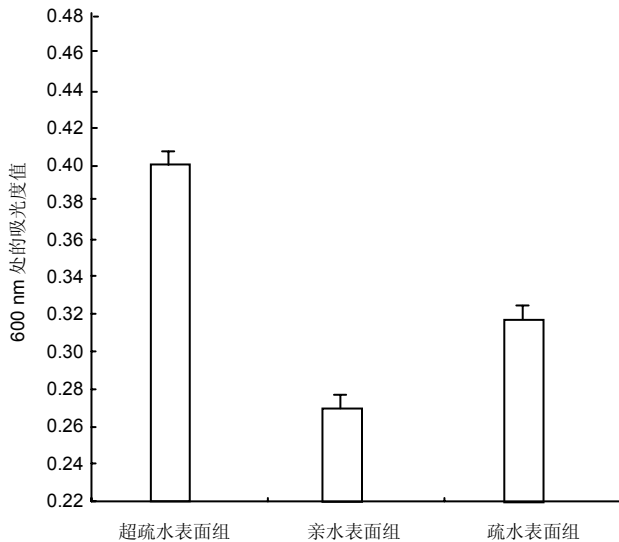


图7 金黄色葡萄球菌菌液浸泡表面不同修饰 $TiAl_6V_4$ 钛合金 2 h 后剩余菌液细菌的 A 值测定

Figure 7 Absorbance value of the remaining bacteria liquid on different surfaces of $TiAl_6V_4$ after immersion in *Staphylococcus aureus* solution for 2 hours

图注: 超疏水表面组 A 值明显高于亲水表面组和疏水表面组 ($P < 0.05$), 说明超疏水表面组剩余菌液的细菌浓度高。

3 讨论 Discussion

目前, 钛合金已经在生物医用材料领域得到广泛发展, 应用领域涉及医疗分析检测设备、药物控释和载药微系统、骨科、矫形外科、人工器官、心脑血管介入系统、血液净化与分离、组织工程等多学科, 代表性产品包括人工关节、牙种植体和血管支架等。然而, 随着对仿生材料生物性能的进一步追求, 钛合金的缺点也随之凸显, 如表面生物活性不高, 耐磨性能较差等均受到研究者的关注。为此, 研究者利用化学或物理方法对钛金属表面进行修饰和改性, 以期增加其耐腐蚀性能, 延长材料的使用寿命, 减少对身体的不良反应。尽管如此, 作为生物内植物, 其对机体造成的影响依然存在。由内植物引起的局部或全身生物学反应使宿主局部脏器或全身出现相应病理生理变化。特别是在外科植入内植物后, 如骨科内固定物植入可能引起的感染并发症, 不但造成内植物失效, 甚至威胁宿主生命。

由于内植物感染发生在生物材料和周围组织的界面, 而且细菌贴附是感染的始动因素, 因此在内植物表面进行抗菌或抑菌修饰成为目前研究的热点。从理论上讲, 内植物表面修饰后局部形成抗菌或抑菌的微环境, 可以减少细菌的贴附, 提高自身免疫力和抗生素杀灭细菌的能力。目前用来进行表面修饰的抗菌物质种类有: ①抗生素类: 万古霉素^[25], 利福平等^[26]。②生物活性物质: 蛋白质(白蛋白^[27])、亲水性负电多糖(透明质酸、肝素^[28]、壳聚糖等^[29-30])。③抑菌剂: 长链季胺盐^[12]、三氯生等。④无机抗菌剂: 银离子^[10-11,31]、铜离子等。⑤抑菌肽类^[32]。制备方法雷同: 首先在金属基底进行酸蚀、喷砂、激光蚀刻等工艺, 形成基底微观的粗糙结构, 然后

将抗菌物质通过物理或者化学的方法与之结合, 形成抗菌涂层。以上因选择抗菌物质不耐高温或对机体有毒性, 或价格昂贵等原因, 很难在临床推广。同时由于涂层界面与金属物质之间弹性模量的不同, 各种抗菌涂层都很容易脱落, 而且制备工艺复杂, 很难达到骨科内植物的要求。因此能够找到一种工艺简单, 可大规模生产, 而且制备的载体耐磨, 与金属基底结合牢固, 甚至是金属本身, 将有望在临床应用。

现有研究表明内植物表面的亲疏水性可能与细菌的贴附有关, 亲水表面可以吸附金黄色葡萄球菌等细菌, 疏水表面可以抑制某些细菌^[22-23], 然而, 也有少数细菌如 *Psx. Taiwanensis*, 表皮葡萄球菌等可以吸附在疏水表面^[33]。作者认为其原因可能是疏水程度不够导致, 因此作者在钛合金 $TiAl_6V_4$ 制备的 TiO_2 纳米管阵列薄膜并修饰氟硅烷, 进一步降低钛金属表面的亲水性, 使之成为超疏水表面, 观察其抑菌效果。

浸润性是固体表面的重要性质之一, 它是由固体表面的化学组成和微观几何结构共同决定的。当接触角接触角 $> 150^\circ$ 时为超疏水表面, 在工农业生产和人们日常生活中都有着极其重要的应用前景。超疏水表面可以通过两个途径获得, 一是在粗糙表面修饰低表面能物质, 二是在疏水材料表面构建粗糙结构。实验将二者结合, 首先应用电化学阳极氧化的方法, 在钛合金 $TiAl_6V_4$ 表面制备出丛林状的 TiO_2 纳米管阵列薄膜, 增加了表面的粗糙程度和表面积, 使得氟硅烷分子更加容易通过自组装的方法与其结合。 TiO_2 纳米管阵列薄膜为亲水性, 而自组装氟硅烷后, 接触角为 $(151.6 \pm 3.3)^\circ$, 形成接触角大于 150° 的超疏水表面。而在打磨、抛光后的光滑钛表面修饰氟硅烷后, 其接触角仅为 $(114.4 \pm 9.6)^\circ$, 该结果与 Lafuma 等^[34] 的观点一致, 他认为在光滑表面修饰低表面能物质无法制备超疏水表面, 仅能制备出接触角在 $100^\circ - 120^\circ$ 之间的疏水表面。接触角是指在气、液、固三相交点处所作的气-液界面的切线穿过液体与固-液交界线之间的夹角 θ , 是润湿程度的量度。若 $\theta < 90^\circ$ 则固体表面是亲水性的, 即液体较易润湿固体, 其角越小, 表示润湿性越好; 若 $\theta > 90^\circ$ 则固体表面是疏水性的, 即液体不容易润湿固体, 容易在表面上移动。接触角现有测试方法通常有两种, 其一为外形图像分析方法, 其二为称重法。后者通常称为润湿天平或渗透法接触角仪, 但目前应用最广泛, 测值最直接与准确的还是外形图像分析方法。外形图像分析法的原理为: 将液滴滴于固体样品表面, 通过显微镜与相机获得液滴的外形图像, 再运用数字图像处理和一些算法将图像中的液滴的接触角计算出来, 计算接触角的方法通常基于一特定的数学模型如液滴可被视为球或圆锥的一部分, 然后通过测量特定的参数如宽/高或通过直接拟合来计算得出接触角值。Young-Laplace 方程描述了一封闭界面的内、外压力差与

界面的曲率和界面张力的关系, 可用来准确地描述一轴对称的液滴的外形轮廓, 从而计算出其接触角。

实验通过比较超疏水、亲水及疏水3种不同表面浸润性的钛合金表面在体外对金黄色葡萄球菌贴附的影响。选择在2 h后观察细菌的贴附情况原因有2个: 根据细菌的生长曲线, 知道在细菌培养前2 h, 细菌只有菌体变大而没有数量的增加; 2 h后是机体免疫力最低下且抗生素暂时没有有效发挥作用的时期。根据扫描电镜和荧光图片可以看到, 在亲水表面组大部分细菌处于聚集状态, 呈葡萄串状; 而超疏水表面组、疏水表面组细菌多孤立存在。电镜能详细显示个体菌的情况: 亲水表面组表面细菌生长状态良好, 菌体大, 触角明显; 超疏水表面组表面能较低, 对细菌吸引力小, 细菌贴附差, 不易彼此联系形成生物膜, 因此很容易被自身免疫力和外来抗生素杀灭^[35]。

实验通过荧光染色对3种表面贴附的细菌量进行计数。采用的染色剂为CTC^[36-40], 是一种活菌染料, 意味着只有活菌才能被染成红色, 因此荧光染色下红色的亮点就是金黄色葡萄球菌。荧光计数结果显示, 与亲水表面组相比, 超疏水表面组可以减少80%以上的细菌贴附。由于2 h前细菌只有菌体的增大, 没有数量的变化, 因此对剩余菌液进行紫外线分光光度计测定, 测定其A值, 该值与菌液浓度呈正比, 结果发现超疏水表面的A值最大, 亲水表面的A值最小, 说明细菌大部分都留在超疏水钛合金表面的剩余菌液中, 其表面贴附很少细菌, 而在亲水表面组中恰好相反。以上两组数据均说明超疏水表面有较强的抑制金黄色葡萄球菌贴附的能力。

结论: 采用电化学阳极氧化法在 $TiAl_6V_4$ 表面制备 TiO_2 纳米管薄膜并通过氟硅烷自组装修饰可以成功制备超疏水表面, 接触角 $>150^\circ$ 。而且超疏水表面能够明显抑制金黄色葡萄球菌黏附, 可能成为预防内植物感染的一种有效手段。

致谢: 感谢厦门大学化工学院林昌健教授课题组在钛合金表面修饰实验给予的指导与支持!感谢解放军军事医学科学院三所六室于继云教授课题组在细菌实验给予的指导与帮助!

作者贡献: 唐佩福进行实验设计, 实验实施为张巍、张里程、魏军强, 实验评估为张立海, 张巍负责资料收集、成文并对文章负责, 唐佩福审校。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 超疏水-是指水滴在材料表面呈球状, 接触角大于 150° 。真正具有本征超疏水的材料是不存在的, 对于平整材料而言, 最大的水接触角不过 119° 。但是可对金属材料进行表面修饰, 实现表面粗糙化或者修饰低表面能物质, 使其接触角大于 150° , 从而实现超疏水性能。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Williams D. The golden anniversary of titanium biomaterials. *Med Device Technol.* 2001;12(7):8-11.
- [2] Ferguson SJ, Langhaff JD, Voelter K, et al. Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23(6):1037-1046.
- [3] Vadillo-Rodriguez V, Bruque JM, Gallardo-Moreno AM, et al. Surface-dependent mechanical stability of adsorbed human plasma fibronectin on Ti6Al4V: domain unfolding and stepwise unraveling of single compact molecules. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids.* 2013;29(27):8554-8560.
- [4] Zhao Y, Wong SM, Wong HM, et al. Effects of carbon and nitrogen plasma immersion ion implantation on in vitro and in vivo biocompatibility of titanium alloy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(4):1510-1516.
- [5] Fischer U, Hempel U, Becker D, et al. Transforming growth factor beta1 immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity. *Biomaterials.* 2003;24(15):2631-2641.
- [6] Leventhal GS. Titanium, a metal for surgery. *J Bone Joint Surg Am.* 1951;33-a(2):473-474.
- [7] De Nardo L, Raffaini G, Ebrahimzadeh E, et al. Titanium oxide modeling and design for innovative biomedical surfaces: a concise review. *Int J Artif Organs.* 2012;35(9):629-641.
- [8] Murr LE, Quinones SA, Gaytan SM, et al. Microstructure and mechanical behavior of Ti-6Al-4V produced by rapid-layer manufacturing, for biomedical applications. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2009;2(1):20-32.
- [9] Minagar S, Wang J, Berndt CC, et al. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101(9):2726-2739.
- [10] Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013;20:407-415.
- [11] Vanderleyden E, Mullens S, Luyten J, et al. Implantable (bio)polymer coated titanium scaffolds: a review. *Curr Pharm Des.* 2012;18(18):2576-2590.
- [12] Saharudin KA, Sreekantan S, Abd Aziz SN, et al. Surface modification and bioactivity of anodic Ti6Al4V alloy. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013;13(3):1696-1705.
- [13] Niinomi M, Nakai M, Hieda J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomaterialia.* 2012;8(11):3888-3903.
- [14] Hanawa T. A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. *J Periodontal Implant Sci.* 2011;41(6):263-272.
- [15] Nakai M, Niinomi M, Akahori T, et al. Development of biomedical porous titanium filled with medical polymer by in-situ polymerization of monomer solution infiltrated into pores. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2010;3(1):41-50.
- [16] Yilmazer H, Niinomi M, Nakai M, et al. Heterogeneous structure and mechanical hardness of biomedical beta-type Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr subjected to high-pressure torsion. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;10:235-245.
- [17] Niinomi M, Nakai M, Akahori T. Frictional wear characteristics of biomedical Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy with various microstructures in air and simulated body fluid. *Biomed Mater.* 2007;2(3):S167-174.

- [18] Nakai M, Niinomi M, Ishii D. Mechanical and biodegradable properties of porous titanium filled with poly-L-lactic acid by modified in situ polymerization technique. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011;4(7):1206-1218.
- [19] Tanaka Y, Matsuo Y, Komiya T, et al. Characterization of the spatial immobilization manner of poly(ethylene glycol) to a titanium surface with immersion and electrodeposition and its effects on platelet adhesion. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(1):350-358.
- [20] Nowicka J, Bartoszewicz M, Gosciniak G. [Effect of selected properties of *Staphylococcus epidermidis* to biofilm formation on orthopedic implants]. *Med Dosw Mikrobiol.* 2012;64(3):189-196.
- [21] Ji J, Zhang W. Bacterial behaviors on polymer surfaces with organic and inorganic antimicrobial compounds. *J Biomed Mater Res A.* 2009;88(2):448-453.
- [22] Raulio M, Jarn M, Ahola J, et al. Microbe repelling coated stainless steel analysed by field emission scanning electron microscopy and physicochemical methods. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35(7):751-760.
- [23] Okada A, Nikaido T, Ikeda M, et al. Inhibition of biofilm formation using newly developed coating materials with self-cleaning properties. *Dent Mater J.* 2008;27(4):565-572.
- [24] Huan Z, Fratila-Apachitei LE, Apachitei I, et al. Porous TiO_2 surface formed on nickel-titanium alloy by plasma electrolytic oxidation: a prospective polymer-free reservoir for drug eluting stent applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(5):700-708.
- [25] Antoci V Jr, Adams CS, Hickok NJ, et al. Vancomycin bound to Ti rods reduces periprosthetic infection: preliminary study. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;461:88-95.
- [26] Neogi DS, Yadav CS, Khan SA, et al. In vivo efficacy of antimicrobial-coated devices. *J Bone Joint Surg.* 2008; 90(8):1785; author reply 1785-1786.
- [27] An YH, Stuart GW, McDowell SJ, et al. Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating in vitro. *J Orthop Res.* 1996;14(5):846-849.
- [28] Arciola CR, Radin L, Alvergnà P, et al. Heparin surface treatment of poly(methylmethacrylate) alters adhesion of a *Staphylococcus aureus* strain: utility of bacterial fatty acid analysis. *Biomaterials.* 1993;14(15):1161-1164.
- [29] Chandy T, Sharma CP. Chitosan--as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs.* 1990;18(1):1-24.
- [30] Chandy T, Sharma CP. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials.* 1993;14(12):939-944.
- [31] Wassall MA, Santin M, Isalberti C, et al. Adhesion of bacteria to stainless steel and silver-coated orthopedic external fixation pins. *J Biomed Mater Res.* 1997;36(3):325-330.
- [32] Dell'Acqua G, Giacometti A, Cirioni O, et al. Suppression of drug-resistant *Staphylococcal* Infections by the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide. *J Infect Dis.* 2004;190(2):318-320.
- [33] Lerebour G, Cupferman S, Bellon-Fontaine MN. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *J Appl Microbiol.* 2004;97(1):7-16.
- [34] Lafuma A, Quéré D. Superhydrophobic states. *Nat Mater.* 2003;2(7):457-460.
- [35] Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature reviews. Microbiology.* Jan 2007;5(1):48-56.
- [36] Bernhardt R, Scharnweber D, Müller B, et al. Comparison of microfocus- and synchrotron X-ray tomography for the analysis of osteointegration around $Ti6Al4V$ implants. *Eur Cell Mater.* 2004;7:42-51; discussion 51.
- [37] Bernhardt R, Kuhlisch E, Schulz MC, et al. Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SR μ CT slices. *Eur Cell Mater.* 2012;23:237-247; discussion 247-248.
- [38] Shalabi MM, Wolke JG, Cuijpers VM, et al. Evaluation of bone response to titanium-coated polymethyl methacrylate resin (PMMA) implants by X-ray tomography. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18(10):2033-2039.
- [39] Kiba H, Hayakawa T, Oba S, et al. Potential application of high-resolution microfocus X-ray techniques for observation of bone structure and bone-implant interface. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(2):279-285.
- [40] Cancedda R, Cedola A, Giuliani A, et al. Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction. *Biomaterials.* 2007;28(15):2505-2524.