

钛基表面纳米银复合涂层的缓释性能

鲜爱明, 张晓岗, 曹力, 王佳明, 彭理斌, 胡洋(新疆医科大学第一附属医院骨科中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

文章亮点:

1 钛基表面制备银/羟基磷灰石复合涂层的方法较多, 传统物理方法工艺复杂、需要高温处理; 化学方法沉积时间长、成本较高。脉冲电泳沉积法是在低温条件下进行的, 因此基体和涂层界面之间不存在残余热应力问题, 同时也避免了高温喷涂引起的相变和脆裂, 有利于增强基体与涂层之间的结合力。

2 实验利用脉冲电沉积法在钛表面制备银/羟基磷灰石复合涂层, 发挥银离子的抗菌作用, 发现含 0.5 mmol/L 银复合涂层钛材料在 30 d 时 Ag^+ 释放总量低于细胞毒性浓度, 含 1.0 mmol/L 银复合涂层钛材料在 30 d 时 Ag^+ 释放总量接近细胞毒性浓度的临界值, 因此含 0.5 mmol/L 银电解液制备的材料用于临床更安全可靠。

关键词:

生物材料; 缓释材料; 纳米银; 羟基磷灰石; 钛金属; 电泳沉积; 复合涂层; 银离子缓释性能; 抗菌活性; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

主题词:

羟基磷灰石类; 金属纳米粒子; 钛

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金(2013211A075), 项目名称: 纳米银/羟基磷灰石(Ag-HA)纳米复合涂层抗菌性能的体内体外试验研究

摘要

背景: 骨科植入材料表面改性可以减少或避免细菌黏附, 利用金属表面的特殊涂层释放抑菌及杀菌成分可以预防骨科术后感染。

目的: 选择不同的制备参数, 在医用纯钛表面沉积羟基磷灰石/纳米银复合涂层, 观测复合材料表面银离子在模拟体液中的缓释性能。

方法: 利用脉冲电沉积法, 在含银、钙、磷离子的溶液中共沉积纳米银和羟基磷灰石在钛表面的共沉积, 再高温烧结处理制得复合涂层钛材料, 用扫描电镜、X 射线衍射仪、能谱仪对其形貌、组成进行表征。将分别含有 0.5, 1 mmol/L 银的复合涂层钛材料浸泡在模拟体液中, 在不同的时间点用原子吸收光谱法检测 Ag^+ 浓度。

结果与结论: 复合涂层是由纳米针状羟基磷灰石和点状的银颗粒相互交织成的网状结构, 纳米银颗粒在涂层中均匀分布。高温处理后涂层变得致密, 羟基磷灰石的晶化度提高, 银颗粒在烧结后无团聚现象。在模拟体液中, 第 1-7 天 Ag^+ 释放量最大, 第 7-30 天 Ag^+ 释放量趋于稳定并维持有效抗菌浓度。含 0.5 mmol/L 银复合涂层钛材料在 30 d 时 Ag^+ 释放总量低于细胞毒性浓度, 含 1.0 mmol/L 银复合涂层钛材料在 30 d 时 Ag^+ 释放总量接近细胞毒性浓度的临界值, 因此含 0.5 mmol/L 银电解液制备的材料用于临床更安全可靠。

鲜爱明, 张晓岗, 曹力, 王佳明, 彭理斌, 胡洋. 钛基表面纳米银复合涂层的缓释性能[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(39):6335-6341.

Release properties of titanium-based nano-silver coating

Xian Ai-ming, Zhang Xiao-gang, Cao Li, Wang Jia-ming, Peng Li-bin, Hu Yang (Department of Orthopaedic Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Surface modification of orthopedic implants can reduce or prevent bacterial adhesion. Bacteriostatic and bactericidal ingredients released from special coating of metal surfaces prevent orthopedic surgery infection.

OBJECTIVE: To prepare hydroxyapatite/nano-silver composite coating on the surface of medical titanium based on different preparation parameters and to observe the release properties of silver ions on the composite material surface in the simulated body fluid.

METHODS: Using pulse electrochemical methods, hydroxyapatite and nano-silver were deposited in the solution containing silver, calcium and phosphate ions. Scanning electron microscopy, X-ray diffraction and energy dispersive spectroscopy were used to characterize its morphology and composition. The composite titanium materials containing 0.5, 1 mmol/L silver were immersed in the simulated body fluid, and Ag^+ concentration was detected by atomic absorption spectrometry at the different time points.

鲜爱明, 男, 1975 年生, 四川省南充市人, 汉族, 主治医师, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事骨与关节疾病方面的研究。

通讯作者: 曹力, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 新疆医科大学第一附属医院骨科中心主任, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.39.018
<http://www.crter.org>

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)39-06335-07

稿件接受: 2014-09-05

Xian Ai-ming, Studying for master's degree, Attending physician, Department of Orthopaedic Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Cao Li, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Orthopaedic Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-09-05

RESULTS AND CONCLUSION: Nanoparticles were uniformly distributed in the coating which was interwoven with the nano needle-like hydroxyapatite and dot-like silver particles. After high temperature processing, the coating became denser, and hydroxyapatite became more crystal and silver particles exhibited no agglomeration. In the simulated body fluid, Ag^+ release was maximal at 1–7 days and became stable at 7–30 days which maintained an effective antimicrobial concentration. The material containing 0.5 mmol/L Ag^+ showed a lower amount of Ag^+ released than cytotoxic concentration at 30 days, but the material containing 1 mmol/L Ag^+ could release the total of Ag^+ close to the critical value of cell toxicity at 30 days. Above all, the material containing 0.5 mmol/L Ag^+ is more secure in the clinical application.

Subject headings: hydroxyapatites; metal nanoparticles; titanium

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2013211A075

Xian AM, Zhang XG, Cao L, Wang JM, Peng LB, Hu Y. Release properties of titanium-based nano-silver coating. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(39):6335-6341.

0 引言 Introduction

尽管采取了多种预防措施, 骨科假体植入物术后感染率仍高达1%–4%^[1], 开放性骨折术后感染率甚至超过30%^[2]。抗生素的广泛应用导致了耐药细菌的不断增多, 因此, 骨科植入材料表面抗菌性能研究已成为当前的热点。近年来, 人们逐渐认识到假体植入后感染与细菌黏附于生物材料表面并进一步形成生物膜有关^[3]。植入材料表面结构、成分、形貌、能量状态、亲(疏)水性、电荷和导电特性等决定了细菌的黏附能力^[4], 传统的抗生素涂层存在作用时间短、易产生耐药性、存在药物不良反应等, 临床应用受到限制。纳米银具有高效、广谱抗菌作用, 不产生耐药性, 作用时间长, 安全无毒等优点。应用脉冲电泳方法在医用纯钛表面沉积银/羟基磷灰石, 发挥银离子的抗菌作用, 是骨科植入材料表面改性研究的一个新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 材料表面改性研究。

时间及地点: 实验于2013年3月至2014年3月在新疆大学应用化学研究所与新疆医科大学药学院完成。

实验方法:

材料的制备: 将医用钛条规格统一为30.0 mm×8.0 mm×0.8 mm, 先用丙酮、乙醇分别超声清洗3次, 10 min/次; 再用混合酸(H_2SO_4 : HCl : H_2O 三者体积比为1:1:1)溶液60 °C超声3 h, 去离子水冲洗后放入5 mol/L的NaOH溶液中60 °C浸泡1 h, 去离子水冲洗后烘干备用。

基本条件设定: 电解液中Ca浓度5.0 mmol/L, PO_4^{3-} 浓度3.0 mmol/L, 银0.5 mmol/L。溶液温度40 °C, pH值=4.0, 脉冲电位-2 V, 沉积时间2 h, 热处理温度700 °C。通过改变电解液浓度、温度及沉积时间来比较样品的涂层效果。制备2组材料, 银浓度为0.5 mmol/L电解液制备的0.5 mmol/L复合涂层材料(以下简称为0.5 mmol/L银/羟基磷灰石组), 银浓度为1.0 mmol/L电解液制备的1.0 mmol/L复合涂层材料(以下简称为1.0 mmol/L银/羟基磷灰石组)。

钛基表面纳米银复合涂层缓释性能实验的试剂、仪器与材料:

材料、试剂与仪器	来源
医用纯钛	施乐辉公司提供
数控超声波清洗机(KQ-500QE型)	昆山市超声仪器有限公司
电化学工作站(CHI660D)	上海辰华仪器有限公司
扫描电镜(HITACHI S-4800)、X射线衍射仪(XRD-6100)、微量加样器(Nichikyo)	日本
集热式恒温加热磁力搅拌器(DF-101S)	上海东玺制冷仪器有限公司
马弗炉(KSL-1100X)	中美合资合肥科晶材料技术有限公司
X射线能谱仪(Bruker EDS QUANTAX)、石墨炉原子吸收光谱法(Zeenit 700)	德国
铂片电极	上海越磁电子科技有限公司
饱和甘汞电极	南京互川电子有限公司
L-Cysteine	生兴生物技术(南京)有限公司
硝酸银	天津市河东区红岩试剂厂
丙酮	东莞市力冠化工有限公司
无水乙醇	深圳市东茂化学试剂有限公司
硫酸、盐酸	北京化工厂
硝酸、氨水	乌鲁木齐迪城化工有限公司
混合磷酸盐、邻苯二甲酸氢钾	天津傲然精细化工研究所
氢氧化钠	天津市科盟化工工贸有限公司
磷酸二氢氨	天津市登科化学试剂有限公司
硝酸钙	天津永晟精细化工有限公司

磷酸钙溶液(CaP)的配制: 分别称取1.18 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.345 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 溶于250 mL蒸馏水中。

AgNO_3 及半胱氨酸溶液(Ag-Cys)的配制: 确定n AgNO_3 :n Cys 为2:1。将上述配置的Ag-Cys溶液250 mL, 与CaP溶液充分混合, 在40 °C水浴锅中保温30 min。充分搅匀后定容至1 L, 再用氨水和硝酸将溶液pH值调定至4.0。

使用CHI660D电化学工作站, 以钛作为工作电极, 铂金板作为对电极, 饱和甘汞电极作为参比电极进行电化学沉积。取100 mL电解液于烧杯中, 将烧杯置于集热式恒温

加热磁力搅拌器中, 设定温度为40 °C, 缓慢搅拌。初始电位为3次开路电位测定的平均值, 高电位0.30 V, 低电位-2 V, 阶跃次数72, 脉冲宽度100 s, 采样间隔1 s, 静置时间0.5 s。完成电沉积后, 将制得样品放入马弗炉, 在空气中进行高温处理。升温速度为5 °C/min, 热处理温度为700 °C, 达到处理温度后保温2 h。

材料的表征: 用扫描电镜、X射线衍射仪、能谱仪等对制备材料形貌、组成进行观测。

复合涂层材料体外银离子缓释实验: 配制模拟体液^[5], 溶液pH调定为7.25。将0.5 mmol/L银/羟基磷灰石、1.0 mmol/L银/羟基磷灰石两组涂层材料经丙酮超声清洗、去离子水冲洗, 干燥灭菌后浸泡于100 mL 模拟体液中, 37 °C恒温避光浸提30 d。分别在第1, 7, 14, 21, 30天用微量加样器取浸提液20 μL, 行原子发射光谱法检测。仪器参数设定^[6]: 波长328.1 nm, 干燥温度120 °C, 灰化温度450 °C, 原子化温度1 100 °C, 吹扫温度2 700 °C。

主要观察指标: 复合涂层钛材料的形貌与表征结果, 以及体外银离子缓释结果。

2 结果 Results

2.1 样品表征结果 对不同沉积时间的X射线衍射仪图谱进行分析, 随沉积时间的变化, 羟基磷灰石、银及钛衍射峰的位置不变, 峰的强弱与时间呈正相关(图1A)。随着电解液浓度及温度的增加, 银的特征峰相对增强(图1B, C)。烧结前后比较, 材料在经700 °C热处理之后, 出现了典型的羟基磷灰石衍射峰, 表明热处理提高了复合涂层的结晶度(图1D)。

基本条件下制备的银/羟基磷灰石复合涂层钛材料元素分布图, 见图2。

基本条件下, 制备银/羟基磷灰石复合涂层钛材料的元素定量分析, 见图3。

X射线衍射仪对制备材料的元素分析发现, 图片中黄白色的亮点为银颗粒(图2A), 分布基本均匀, 与扫描电镜中结果完全吻合, 钙元素也呈均匀分布(图2B)。定量分析: 0.5 mmol/L银/羟基磷灰石组的银含量为2.75%; 1 mmol/L银溶液制备材料的银含量为8.83%。

扫描电子显微镜观察结果, 见图4。

扫描电镜可见, 基本条件下制备的材料, 复合涂层是由纳米针状羟基磷灰石和点状的银颗粒相互堆积而成的网状结构, 银颗粒较均匀的分布于银/羟基磷灰石复合涂层中, 羟基磷灰石晶体小于100 nm(图4A); 沉积时间缩短至1 h, 图像中可见涂层表面凹凸不平(图4B); 延长沉积时间至4 h, 涂层厚度明显增加(图4C, D); 增加电解液中银离子浓度, 涂层表面沉积的银颗粒增加(图4E, F); 材料经过高温处理后, 银颗粒分布均匀, 无明显的团聚现象, 羟基磷灰石的晶化度明显提高(图4H), 与X射线衍射检测结果一致。

在材料的制备过程中, 可以通过控制电流强度、电压大小、沉积温度以及溶液pH值等实验参数, 来控制涂层的厚度、表面结构和孔隙率等来获取理想的材料。电解液中nCa/nP=1.67, 等同于人体骨组织中的钙磷比, 更加符合人体生理状况。

随着电解液温度的增加, 银的特征峰相对增强, 可能是温度增加改变了离子的热运动, 更有利于银/羟基磷灰石的沉积, 所以选择沉积温度为40 °C。在材料的表征时发现, 从1 h的扫描电镜图像中发现涂层凹凸不平, 是钛片经过酸处理后表面不平, 1 h沉积时间较短, 涂层较薄, 随着时间的增加, 涂层的厚度增加, 表面变得平坦; 从4 h的扫描电镜图像中看到涂层表面有絮状物覆盖, 可能是由于沉积的时间增加, 涂层的厚度增加, 电阻逐渐增大而电流逐渐变小, 影响了涂层表面的晶粒生长, 故选择最佳沉积时间为2 h。

2.2 银/羟基磷灰石涂层材料在模拟体液中的银离子缓释结果 材料银离子释放具有一定规律性, 两组材料浸泡第1天银离子释放最多, 分别占30 d总量的45.55%和48.10%, 均能够达到杀菌浓度; 第1-7天, 释放速度较快, 银离子释放趋势图可见曲线陡直, 维持有效杀菌浓度, 银离子释放速度随时间推移而逐渐变缓; 第7-30天, 银离子释放量基本稳定, 曲线趋于平坦, 证明材料能够在体内发挥持久的抗菌作用(表1, 图5); 0.5 mmol/L银/羟基磷灰石组材料在第30天时释放总量低于细胞毒性浓度, 1 mmol/L银/羟基磷灰石组材料第30天时释放总量接近细胞毒性浓度的临界值, 前者用于临床更安全可靠。考虑到银离子释放量极少, 远低于银离子的溶解饱和度^[7], 所以实验过程中没有更换浸提液。

3 讨论 Discussion

Shirkhanzadeh^[8]首次报道了电沉积制备钛合金基羟基磷灰石涂层工艺; 张建明等^[9-11]系统研究了电流密度、阴极电位及温度对磷酸钙盐沉积组成、结构和表面形貌等特征的影响, 认为低温条件下制备的涂层比高温条件下质量小, 但结构致密, 电流密度小或阴极电压小时, 沉积物孔径较小, 表面均匀, 反之, 表面粗糙, 结构疏松。传统的阴极沉积法主要以恒电流模式为主, 结果是涂层疏松。赵中伟等^[12]用脉冲电沉积法解决了浓差极化问题, 提高了涂层与基底的结合强度; 王英波等^[13]的研究也证明脉冲电化学更有利于复合涂层的沉积; 张柏林等^[14]在脉冲电化学沉积中加入半胱氨酸, 解决了银颗粒在涂层中团聚问题; 并提出700 °C高温烧结能够提高复合涂层的结合强度, 不影响抗菌活性, 还能提高细胞相容性。

在电沉积之前先用混合酸去除钛表面的氧化膜和油污, 增加表面粗糙度, 可以增加涂层与基底的结合强度; 再用碱处理可以提高钛基亲水性^[15], 让钛表面接上羟基(-OH), 有利于磷酸钙的沉积^[16]。在羟基磷灰石的电沉积过

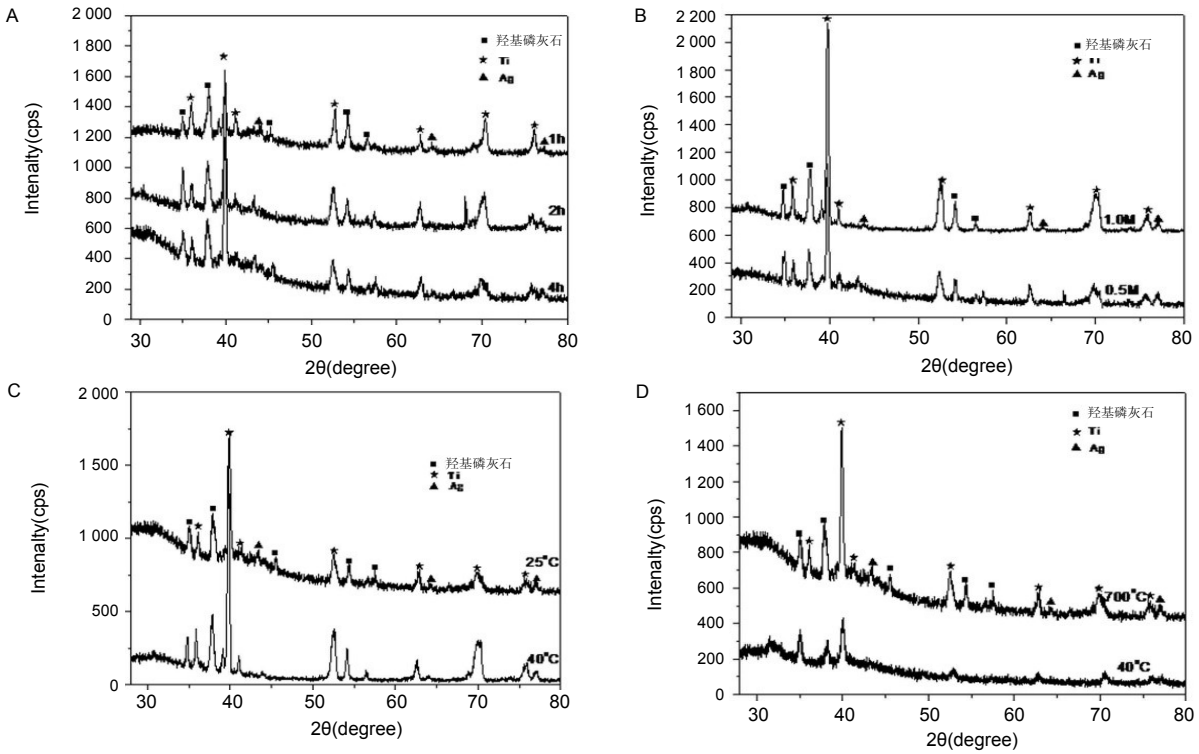


图 1 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料的 X 射线衍射图谱

Figure 1 X-ray diffraction patterns of hydroxyapatite/nano-silver composite coating

图注: 图中 A 为不同沉积时间的 X 射线衍射图谱, B 为不同电解液浓度的 X 射线衍射图谱, C 为不同沉积温度的 X 射线衍射图谱, D 为高温烧结前后的 X 射线衍射图谱。

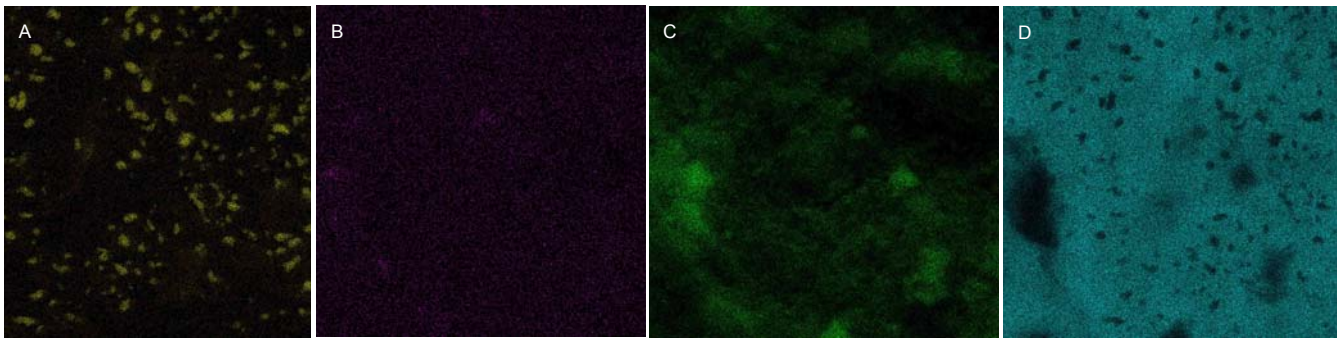


图 2 含银 0.5 mmol/L 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料的元素分布图

Figure 2 Element distribution of composite coating containing 0.5 mmol/L Ag⁺

图注: 图中 A-D 分别为银元素、钙元素、氧元素及钛元素。

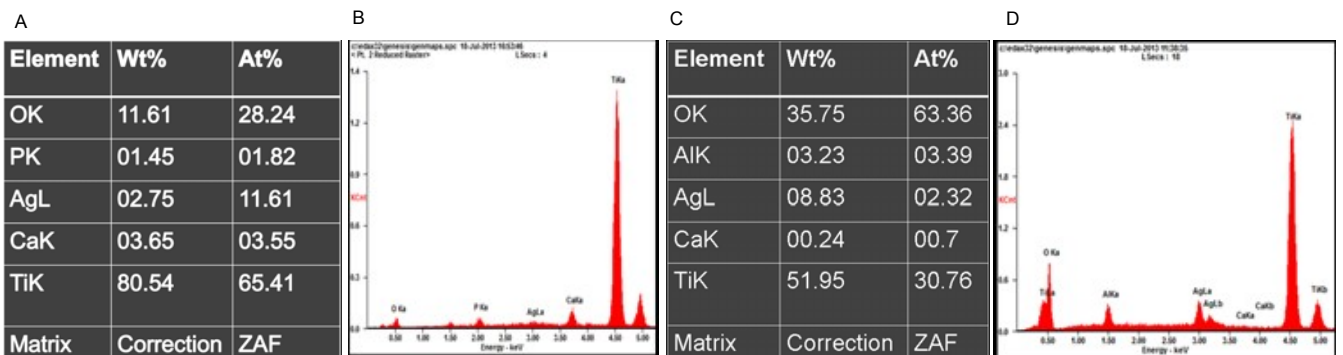


图 3 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料的银元素 X 射线能谱定量分析

Figure 3 Energy dispersive spectroscopy analysis of silver content in hydroxyapatite/nano-silver composite coating

图注: 图中 A、B 为 0.5 mmol/L 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料的银含量, C、D 为 1 mmol/L 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料的银含量。

表 1 两组样品各时间点银离子释放量

Table 1 Silver ions released from different samples at different time

($\bar{x} \pm s, \times 10^{-9}$)

组别	1 d	7 d	14 d	21 d	30 d
0.5 mmol/L 银/羟基磷灰石组	417.3±16.28	741.39±38.64	825.44±47.71	895.53±56.59	916.23±59.94
1.0 mmol/L 银/羟基磷灰石组	764.3±46.54	1 157.20±96.36	1 375.50±127.38	1 513.9±156.66	1 589.03±171.4

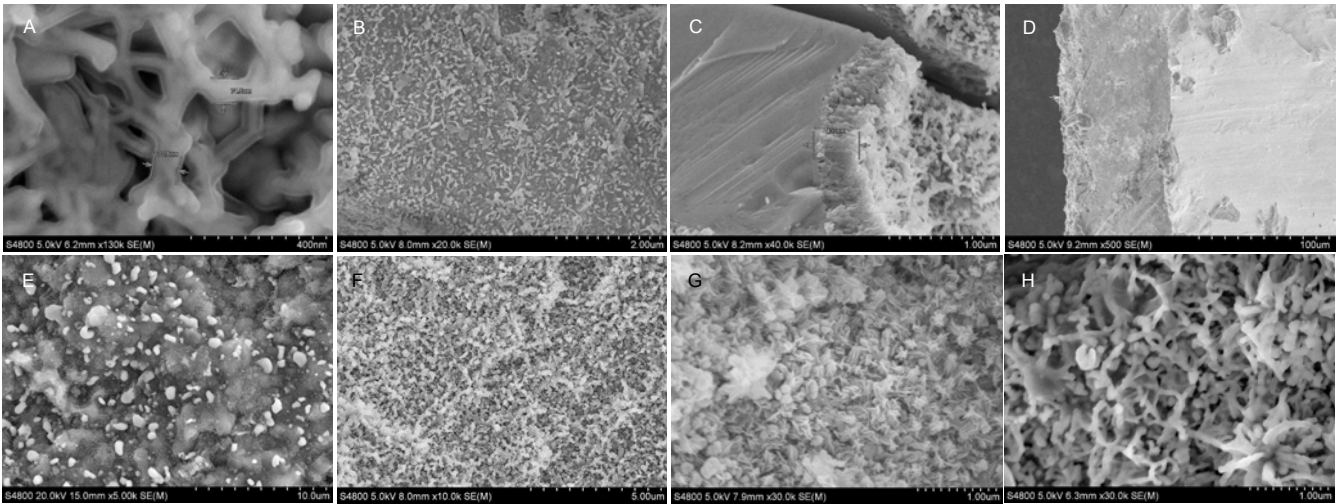


图 4 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料的扫描电子显微镜观察结果

Figure 4 Scanning electron microscope observation of hydroxyapatite/nano-silver composite coating

图注: 图中 A、E 为 0.5 mmol/L 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料; B-D 分别为银/羟基磷灰石复合涂层钛材料电沉积 1, 2, 4 h; F 为 1 mmol/L 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料; G、H 分别为 0.5 mmol/L 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料烧结前与烧结后图片。

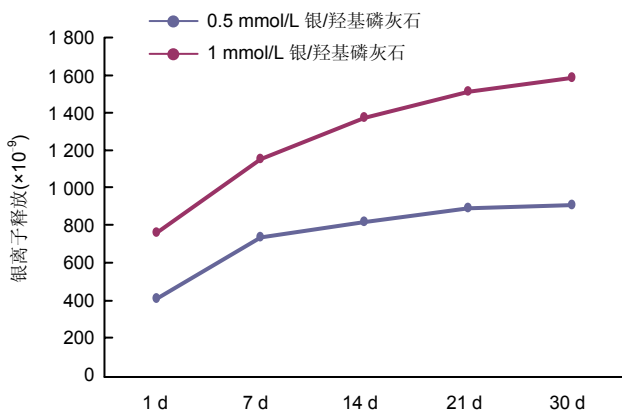


图 5 银/羟基磷灰石复合涂层钛材料的银离子释放量

Figure 5 Amount of silver ions released from hydroxyapatite/nano-silver composite coating

注: 两组材料浸泡第 1 天银离子释放最多, 第 1-7 天, 释放速度较快, 银离子释放曲线陡直, 银离子释放速度随时间推移而逐渐变缓; 第 7-30 天, 银离子释放量基本稳定, 曲线趋于平坦, 证明材料能够在体内发挥持久的抗菌作用。

程中, 阴极的钛片电解水产生 OH^- , 提高了阴极钛片周围的 pH 值。 Ca^{2+} 和 H_2PO_4^- 从电解液中向钛表面扩散, 在羟基磷灰石形成的同时, 溶液中银离子在阴极的电子被还原成银单质, 羟基磷灰石和银共同沉积在阴极钛的表面, 最终形成银/羟基磷灰石复合涂层。随着电解液温度的增加, 银的特征峰相对增强, 可能是温度增加改变了离子的热运动, 更有利于银/羟基磷灰石的沉积。从 1 h 的扫描电镜图像中发现涂层凹凸不平, 可能是钛片经过酸处理

后表面不平, 1 h 沉积时间较短, 涂层较薄; 随着时间的增加, 涂层的厚度增加, 表面变得平坦。从 4 h 的扫描电镜图像中看到涂层表面有有絮状物覆盖, 可能是由于沉积的时间延长, 涂层的厚度增加, 电阻逐渐增大而电流逐渐变小, 影响了涂层表面的晶粒生长。故选择最佳沉积时间为 2 h。银颗粒在涂层中能否均匀分布, 取决于羟基磷灰石和银两相的沉积速度必须相匹配。当电解液 pH < 3.5 时, 电解产生的 OH^- 被电解液中的 H^+ 中和, 磷酸钙很难在阴极达到过饱和而析出; 当 pH > 4.5 时, 电解液中出现白色絮状沉淀^[14]。为了得到均一稳定的 $\text{Ca-PO}_4^{3-}\text{-Ag}$ 混合电解液, 所以将 pH 调定为 4.0。热处理能提高银/羟基磷灰石复合涂层与钛基底的结合强度, 同时提高组织相容性, 更适合细胞的增殖和分化^[17], 原因可能是高温使银颗粒熔化, 渗透进复合涂层的内部, 细胞有更多的机会接触羟基磷灰石。

感染与细菌对生物材料表面的黏附力有密切关系^[18]。在钛基表面沉积羟基磷灰石纳米银涂层, 是通过材料表面改性减少细菌的黏附, 控制银离子在体内的长期、缓慢释放, 维持安全有效的抗菌浓度, 预防骨科术后感染。银离子抗菌机制较复杂, 目前还存在很大争议。比较一致的认为是通过干扰细菌 DNA 解链, 使 DNA 分子不能有效复制, 最终导致细菌死亡^[19]。细菌细胞膜和细胞内存在着含有巯基的功能蛋白质和含有氮、氧、硫的电子供体结构, 银离子与这些电子供体结合使蛋白质变性, 同时影响电子的释放。银离子可长期持续杀菌, 其可能的机制是从失活的菌

体中游离出来, 再次进入其他细菌, 反复发挥杀菌作用。大量研究证明, 银的抗菌谱较广, 对革兰阳性菌与阴性菌均具有杀灭作用^[20]; 对真菌也有很好的抑制作用^[21]; 还可杀灭对传统抗结核药物已产生耐药性的结核分枝杆菌^[22-23]; 对HIV病毒^[24]、乙肝病毒^[25]、禽流感病毒也有一定的抑制作用^[26]。纳米银的抗菌作用具有形状依赖性和尺寸依赖性^[27]。

原子吸收光谱法检测银离子的释放浓度具有灵敏度高、准确性好、抗干扰能力强的优势, 其工作原理是对元素基态原子蒸汽同种元素的原子特征谱线、共振吸收来进行定量分析, 其检测极限可达 10^{-10} – 10^{-14} g^[28-29]。钛基表面银/羟基磷灰石复合涂层载银材料的抗菌性能与Ag⁺的释放有关。影响银离子释放的因素较多, 如加工材料的银含量, 不同的处理工艺, 不同载体, 复合涂层与载体的结合强度, 材料与体液接触的单位面积, 不同的溶剂, pH值环境, 溶液的温度等都会影响到银离子的释放。在实验过程中发现, 热处理后的材料抗菌效果会受到一定程度的影响, 可能是因为热处理使得涂层表面的银颗粒熔化, 渗透进银/羟基磷灰石复合涂层内部, 会减少银离子的释放。体液因素也可能影响银离子的释放, 相同材料在血清中的释放量大于在人工唾液中的银释放量, 可能是血清中含有一些带巯基的蛋白质分子, 使银离子的释放量增加^[30]。以沸石为载体的复合银材料在蒸馏水中没有银离子释放, 而在含蛋白质的培养液中大量释放^[31], 也支持这一观点。环境pH值在弱碱性条件下, 银的释放增加, 杀菌能力加强^[32]。随着温度的升高, 银离子的活性增大, 释放量增加, 银在37 °C下的杀菌率是4 °C时的3倍^[33]。无论是银离子从材料表面的游离释放, 还是抗菌作用的发挥, 都需要一定的时间, 骨科不锈钢抗菌植入物需要近6 h才能发挥抗菌作用^[34]。银的毒性与其化学态密切相关, Ag⁺接触细胞后, 使细胞产生活性氧自由基而受损^[35], 单质银对真核细胞不产生毒性, 说明银的主要毒性是离子态。银离子的最低杀菌浓度为 0.1×10^{-9} , 对细胞毒性浓度为 1.6×10^{-9} ^[36]。

钛基表面银/羟基磷灰石复合涂层的制备方法较多, 物理方法有真空等离子喷涂和磁控溅射法。真空等离子喷涂的缺点是设备昂贵、处理温度高、工艺复杂; 磁控溅射法的优点是成膜速率高, 基片温度低, 膜的黏附性好。化学制备的方法较多, 各有优缺点。溶胶-凝胶法目前虽然广泛应用在玻璃、陶瓷、涂层等领域, 但因为生产过程中工艺时间长、成本较高, 逐渐被其他方法取代。脉冲电沉积法在钛合金表面制备羟基磷灰石涂层, 是在低温条件下进行的, 因此基体和涂层界面之间不存在残余热应力问题, 同时也避免了高温喷涂引起的相变和脆裂, 有利于增强基体与涂层之间的结合力; 该过程是一种非线性工艺, 可以在形状复杂和表面多孔的基体上制备出均匀的涂层。该方法设备投资少、原材料利用率

高、生产费用低、工艺简单、易于操作, 是一种比较方便而且经济的方法。复合材料无细胞毒性, 与不含银的纯羟基磷灰石材料相比, 生物相容性无明显差异, 该结果为将来应用于人工关节的生物材料研究提供了实验依据。

本实验存在以下的局限性, 影响银离子的因素较多, 实验因素只考虑了材料的银含量, 溶液的pH值、温度, 缺乏多因素的对比分析, 并且观察时间较短, 关节假体在体内与人体共处15–20年, 银离子长期作用于人体, 其生物相容性和安全性还需要建立动物模型进行长期观察研究。人工关节假体柄沉积羟基磷灰石纳米银抗菌涂层, 在研究银离子的释放时, 除了考虑假体柄的单位面积外, 还应该模拟髓腔内环境。动物关节造模长期观察将是骨关节假体表面载银抗菌材料以后的研究重点。

致谢: 感谢新疆大学应用化学研究所的各位老师, 感谢新疆医科大学药学院的各位老师。

作者贡献: 通讯作者、第一作者进行实验的设计, 实验实施为第一、四作者。实验评估为第二作者。资料收集为第五、六作者。第一作者成文, 通讯作者审校。通讯作者、第一作者对文章负责。

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: 电沉积-是指金属或合金从其化合物水溶液、非水溶液或熔盐中电化学沉积的过程。是金属电解冶炼、电解精炼、电镀、电铸过程的基础。这些过程在一定的电解质和操作条件下进行, 金属电沉积的难易程度及沉积物的形态与沉积金属的性质有关, 也依赖于电解质的组成、pH值、温度、电流密度等因素。

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] Laure B, Besnier JM, Bergemer-Fouquet AM, et al. Effect of hydroxyapatite coating and polymethylmethacrylate on stainless steel implant-site infection with Staphylococcus epidermidis in a sheep model. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 84(1):92-98.
- [2] Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis*. 2006; 19(4):349-356.
- [3] Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury*. 2006; 37 Suppl 2:S3-S14.
- [4] Gristina AG, Naylor PT, Myrvik QN. Mechanisms of musculoskeletal sepsis. *Orthop Clin North Am*. 1991; 22(3): 363-371.
- [5] 王晓静, 王国伟, 赵钦民. 金黄色葡萄球菌在不同种植体表面涂层粘附情况的体外实验研究[J]. *中国口腔种植学杂志*, 2009, 14(2):16.
- [6] 朱梓园, 张富强, 郑学斌. 含银抗菌羟基磷灰石涂层银离子的缓释性能[J]. *上海口腔医学*, 2009, 18(1):66-68.
- [7] 余文珺, 张富强, 胡滨, 等. 载银抗菌基托树脂银离子的缓释性研究[J]. *口腔医学*, 2007, 27(7):340-342.

- [8] Shirkhazadeh M. Bioactive calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition. *Journal of materials science letters*, 1991;10(23):1415-1417.
- [9] Zhang J, Lin C, Feng Z, et al. Electrochemical preparation for bioactive ceramics coating on Ti-6Al-4V substrate. *Chem J Chinese U*. 1997; 18:961-962.
- [10] 张建民, 林昌健. 电沉积磷酸钙生物活性陶瓷[J]. *物理化学学报*, 1998, 14(8):698-703.
- [11] 张建民, 石秋芝, 杨长春, 等. 电流密度对钙磷沉积层组成和结构的影响[J]. *化学研究*, 2002, 13(2):5-7.
- [12] 赵中伟, 陈爱良, 陈星宇, 等. 脉冲阴极电沉积羟基磷灰石涂层[J]. *中国有色金属学报*, 2005, 15(12):2023-2027.
- [13] 王英波, 鲁雄, 赵婧, 等. 脉冲电化学沉积制备 n-HA/ZrO₂ 复合涂层[J]. *稀有金属材料与工程*, 2009, 38(6):1071-1075.
- [14] 张柏林. 电化学方法制备钛基纳米银/羟基磷灰石复合涂层及其相关性质研究[D]. 西南交通大学, 2010.
- [15] Kim H, Kokubo T, Fujibayashi S, et al. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(3):553-557.
- [16] Lu X, Wang Y, Yang X, et al. Spectroscopic analysis of titanium surface functional groups under various surface modification and their behaviors in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(2):523-534.
- [17] Legeros RZ, Legeros JP. Calcium phosphate bioceramics: past, present and future. *Key Eng Mater*. 2002;240:3-10.
- [18] 卢昱鹏, 蒋电明, 权正学, 等. 载银纳米抗菌复合骨填充材料体外抗菌及缓释性能研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(6):691-695.
- [19] Casemiro LA, Martins CHG, Pires-de-Souza FDC, et al. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite--part I. *Gerodontology*. 2008;25(3):187-194.
- [20] Lee BU, Yun SH, Ji JH, et al. Inactivation of *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilizing airborne silver nanoparticles. *J Microbiol Biotechnol*. 2008;18(1):176-182.
- [21] Panáček A, Kolár M, Vecerová R, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 2009;30(31):6333-6340.
- [22] Matsui Y, Otomo K, Ishida S, et al. Effect of silver-carrying photocatalyst "Hikari-Gintech" on mycobacterial growth in vitro. *Microbiol Immunol*. 2004;48(7):489-495.
- [23] Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, et al. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3373-3381.
- [24] Sun RW, Chen R, Chung NP, et al. Silver nanoparticles fabricated in hepes buffer exhibit, cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *Chem Commun*. 2005;(40):5059-5061.
- [25] Lu L, Sun RW, Chen R, et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther*. 2008;13(2):253-262.
- [26] 张若愚, 夏雪山, 胡亮, 等. Ag/Diatomite 复合材料及其对禽流感病毒的杀灭研究[J]. *贵金属*, 2004, 25(2):28-32.
- [27] Lok CN, Ho CM, Chen R, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*. 2006;5(4):916-924.
- [28] Welz B. 原子吸收光谱法:第二次全修订版[M]. 李家熙等译. 北京:地质出版社, 1989.
- [29] 马怡载. 石墨炉原子吸收分光光度法[M]. 北京市:原子能出版社, 1989.
- [30] Liao SY, Read DC, Pugh WJ, et al. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol*. 1997;25(4):279-283.
- [31] Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, et al. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater*. 2000;16(6):452-455.
- [32] 常涛. 银离子消毒剂研究概述[J]. *解放军预防医学杂志*, 2005, 23(1):75-77.
- [33] Qu F, Xu H, Wei H, et al. Effects of pH and Temperature on Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles[R]. Yantai: Computer Science of Yantai University, 2010:2033-2037.
- [34] Dong Y, Li X, Tian L, et al. Towards long-lasting antibacterial stainless steel surfaces by combining double glow plasma silvering with active screen plasma nitriding. *Acta Biomaterialia*. 2011;7(1):447-457.
- [35] Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, et al. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:4278-4281.
- [36] 阮洪江, 范存义, 郑学斌, 等. 载银羟基磷灰石抗菌涂层抗菌性能及对成骨细胞影响的体外实验[J]. *科学通报*, 2009, 54(1):60-66.