

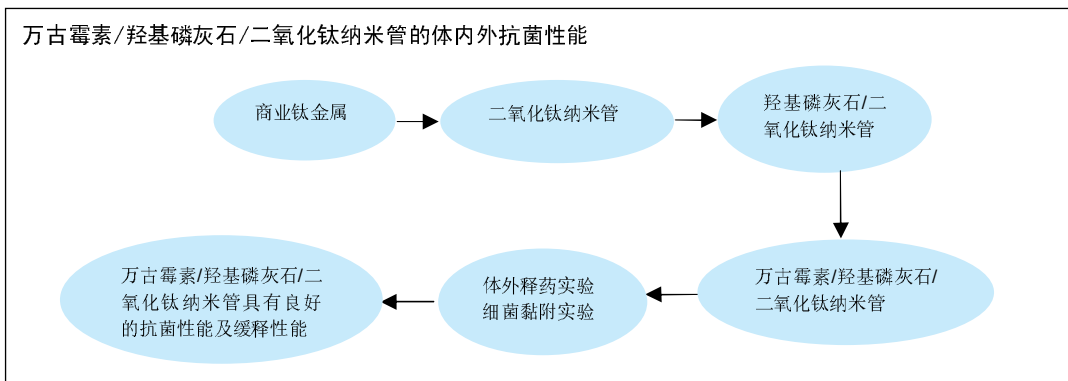
万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管的抗菌性能

张杭州¹, 田 昂², 梁庆威¹, 白希壮³, 薛向欣² (¹中国医科大学附属第一医院运动医学科/关节外科, 辽宁省沈阳市 110001; ²东北大学材料与冶金学院, 辽宁省沈阳市 110016; ³中国医科大学附属人民医院运动医学科/关节外科, 辽宁省沈阳市 110006)

引用本文: 张杭州, 田昂, 梁庆威, 白希壮, 薛向欣. 万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管的抗菌性能[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(25):3732-3737.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.25.013 ORCID: 0000-0001-8233-5362(张杭州)

文章快速阅读:



张杭州, 男, 1984年生, 山东省淄博市人, 汉族, 博士, 主治医师, 主要从事运动关节损伤及骨科新型抗菌内植物的研究。

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)25-03732-06

稿件接受: 2016-04-10

文题释义:

万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管: 前期实验将万古霉素单纯沉积于二氧化钛纳米管中, 万古霉素的药物释放时间小于 6 h, 释放特性为早期爆发性释放。实验中通过将羟基磷灰石及万古霉素共沉积于二氧化钛纳米管上, 通过纳米羟基磷灰石涂层显著延缓了万古霉素的药物释放时间。

载药人工骨: 是由药物与载体材料相结合而构成的具有特定作用的组织工程人工骨, 通常填充于各种原因所致的骨组织缺损, 能在患处发挥修复骨缺损和局部释放药物治疗作用。

摘要

背景: 研究表明, 钛金属纳米管涂层不仅能够促进材料本身的生物活性, 同时还可作为药物载体负载抗生素及生长因子等。

目的: 检测万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管的体内外抗菌性能。

方法: 检测万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管、万古霉素/二氧化钛纳米管的体外释药性能。将 10^{10}L^{-1} 的金黄色葡萄球菌稀释液分别铺于商业钛金属、二氧化钛纳米管及万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上, 24 h 后, 扫描电镜观察细菌生长情况, 聚焦扫描电镜观察细菌活性。

结果与结论: ①扫描电镜观察: 金黄色葡萄球菌在万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上的数量最少且细菌形态破坏; ②聚焦扫描电镜观察: 万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上的细菌数量及活菌数量最少, 商业钛金属上的活菌数量最多; ③体外释药性能: 万古霉素从羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上的释放时间长达 18 d, 从二氧化钛纳米管上的时间仅仅约为 4 h; ④结果表明: 万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管具有良好的抗菌性能及缓释性能。

关键词:

生物材料; 纳米材料; 羟基磷灰石; 二氧化钛纳米管; 万古霉素; 抗菌性能; 金黄色葡萄球菌; 国家自然科学基金

主题词:

羟基磷灰石类; 钛; 万古霉素; 组织工程

基金资助:

国家青年基金(81501857): Ti-Ag 纳米管/HA 复合涂层的抗菌性能及生物相容性的基础研究; 辽宁省省直医院改革重点临床科室诊疗能力建设项目(LNCCC-A03-2014)

Zhang Hang-zhou, M.D.,
Attending physician,
Department of Sports
Medicine & Joint Surgery,
First Affiliated Hospital of
China Medical University,
Shenyang 110001,
Liaoning Province, China

Antibacterial property of vancomycin/hydroxyapatite/titanium dioxide nanotubes

Zhang Hang-zhou¹, Tian Ang², Liang Qing-wei¹, Bai Xi-zhuang³, Xue Xiang-xin² (¹Department of Sports Medicine & Joint Surgery, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; ²School of Material and Metallurgy of Northeastern University, Shenyang 110016, Liaoning Province, China; ³Department of Sports Medicine & Joint Surgery, Affiliated People's Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Present studies have proved that titanium coating nanotubes cannot only promote the biological activity of the material itself, but also be used as a drug carrier loading antibiotics and growth factors.

OBJECTIVE: To investigate the antibacterial properties of vancomycin/hydroxyapatite/titanium dioxide nanotubes *in vitro* and *in vivo*.

METHODS: The releasing property *in vitro* of vancomycin/hydroxyapatite/titanium dioxide nanotubes and vancomycin/titanium dioxide nanotubes were detected. And 10^{10} /L *Staphylococcus aureus* dilution was put onto the commercial titanium, titanium dioxide nanotube and vancomycin/hydroxyapatite/titanium dioxide nanotube, respectively. Twenty-four hours later, the bacterial growth and activity was observed by scanning electron microscope and confocus scanning electron microscope, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Scanning electron microscope showed: the number of *Staphylococcus aureus* was the least on the vancomycin/hydroxyapatite/titanium dioxide nanotube, and the bacterial morphology was destroyed. Confocus scanning electron microscope observed: the number of bacteria and viable bacteria was the least on the vancomycin/hydroxyapatite/titanium dioxide nanotube, and the most on the commercial titanium. Besides, the releasing time of vancomycin from the hydroxyapatite/titaniumdioxide nanotube was up to 18 days, but the releasing time of vancomycin was only 4 hours from the titanium dioxide nanotube. In conclusion, the vancomycin/hydroxyapatite/titanium dioxide nanotube has good antibacterial property and slow-releasing performance.

Subject headings: Hydroxyapatites; Titanium; Vancomycin; Tissue Engineering

Funding: the National Youth Foundation of China, No. 81501857; the Reformed Key Clinical Diagnosis and Treatment Capacity Construction Project of Provincial Hospitals in Liaoning, No. LNCCC-A03-2014

Cite this article: Zhang HZ, Tian A, Liang QW, Bai XZ, Xue XX. Antibacterial property of vancomycin/hydroxyapatite/titanium dioxide nanotubes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(25):3732-3737.

0 引言 Introduction

据统计,全球每年在骨缺损和骨折上的治疗费用至少为170亿美元,治疗患者大约为3000万人次^[1-2]。这些骨科问题常需要骨折固定及骨缺损替代的金属材料。在这些病例中,5%-15%的病例因缺损较严重需要结构性植骨^[3-4]。

骨组织材料中钛金属及其合金因为优越的生物相容性、生物弹性模量及耐腐蚀性,在骨科领域被广泛使用^[5-9]。虽然钛金属及其合金有着优越的生物相容性,然而也有着其自身的生物惰性及无抗菌性的局限性。尽管经过严格的无菌处理,骨科内植物的感染率仍然在1%-4%之间^[10-15],外固定器械感染率更高,高达30%-50%^[16]。感染部位往往形成菌膜而难以处理;抗生素所需的剂量往往需要高达几十倍甚至上百倍,才能对菌膜下的细菌产生灭菌作用,然而高剂量抗生素的使用带来肝肾功能损害。在这些临床病例中,植入体的移除是目前彻底清除感染的唯一手段^[17],但这种二次干预治

疗方式会给患者造成新的生理和心理创伤,并增加相关治疗花费。

通过阳极氧化技术在钛金属上制备纳米管涂层,已被证实能够促进其生物相容性,在钛金属表面制备二氧化钛纳米管的另外一个特点是其可作为一个很好的抗菌载药平台^[18-21]。前期实验已证实二氧化钛涂层负载一定剂量的万古霉素后,不仅不影响二氧化钛纳米管的生物相容性,而且促进了其抗菌性能;然而二氧化钛纳米管单纯负载抗生素的缺陷是难以调控其早期爆发性释放且释放时间短(<6h)^[22]。纳米羟基磷灰石作为涂层沉积在钛金属表面被认为是金属材料表面抗感染缓释系统中最具前景的一种复合材料^[23],通过控制纳米管长度、直径及纳米羟基磷灰石的厚度,理论上可控制药物释放时间。实验首先通过阳极氧化技术在钛金属上制备二氧化钛涂层,之后经过羟基磷灰石与万古霉素进行共沉积后形成羟基磷灰石/万古霉素/二氧化钛纳米管复合涂层,检测羟基磷灰石/万古霉素/二氧化钛纳米管复合

涂层的抗菌性能及药物释放特点。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 观察性实验。

1.2 时间及地点 于2013年6月至2014年6月在东北大学材料与冶金学院实验室和中国医科实验中心完成。

1.3 材料

钛金属纳米管复合涂层抗菌性实验的材料、试剂及仪器:

材料、试剂及仪器	来源
99.5%商业钛金属、二氧化钛纳米管	美国阿尔法公司
万古霉素	博士得公司; 中国
金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)	S.aureu, 美国模式培养物集存库
紫外分光光度计(U-2900)、扫描电镜(S-3400)、X射线能谱分析仪	Hitachi, 日本
共聚焦电镜(Fv10i)	Olympus, 日本

1.4 实验方法

商业钛金属的制备: 首先将99.5%的商业钛金属切割成直径2 cm、厚度1 mm的金属圆片及直径1 mm、长度为2 cm的金属棒。采用砂纸抛光金属表面后使用无水乙醇超声波清洗10 min, 蒸馏水清洗后干燥。

二氧化钛纳米管的制备: 经制备好的钛金属片采用阳极氧化技术制备二氧化钛纳米管。第1步是采用乙二醇加上0.5% NH_4F 作为第1步的电解液, 氧化2 h, 氧化电压为60 V。第2步的电解液是在第1步电解液的基础上加上0.75% HF 。所有实验都在室温条件下进行。随后二氧化钛纳米管在500 °C条件下烘干, 以使纳米管稳定。在二氧化钛纳米管表面逐步滴加万古霉素溶液, 将万古霉素溶液均匀附着在二氧化钛纳米管表面并干燥, 金属表面万古霉素药物浓度达到500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管的制备: 通过共沉积方法制备, 首先将钛金属纳米管放于 10^{-4} mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 与 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 中, 其中Ca/P为1.6。溶液pH值为6(通过 HNO_3 与 NH_4OH 调节pH值)。24 h后羟基磷灰石沉积在二氧化钛纳米管上。将制备的羟基磷灰石/二氧化钛纳米管干燥后, 表面逐步滴加万古霉素溶液, 将万古霉素溶液均匀附着在羟基磷灰石/二氧化钛纳米管表面并干燥, 金属表面万古霉素药物浓度达到500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

1.5 主要观察指标

样品微观形貌观察: 分别将钛金属纳米管及万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管复合物表面喷金后, 通过扫描电镜观察材料表面形貌, 同时通过射线能谱分析

仪分析材料表面成分。

体外药物释放模型: 将万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管样品及万古霉素/二氧化钛纳米管样品放于12孔板中, 分别加入500 μL PBS。经过1, 6, 12, 24 h及浸泡的每1 d取出200 μL PBS, 每次取完PBS后加入新鲜PBS, 以恢复液体总量。放于紫外分光光度计下检测药物释放量, 最后根据万古霉素曲线确定每个时间点的药物浓度。实验在室温下进行。

细菌黏附和繁殖测定: 实验采用金黄色葡萄球菌分析商业钛金属、二氧化钛纳米管及万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管的材料抗菌性能。细菌于琼脂板上培养3 d后, 转至Luria broth用于接种, 制备浓度 10^{11} L^{-1} 的细菌原液(光密度法测定浓度)用于抗菌实验。将 10^{11} L^{-1} 的细菌原液稀释至 10^{10} L^{-1} , 铺于各金属板上, LB培养基培养24 h后, 经2.5%戊二醛固定, 乙醇梯度脱水(体积分分数70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%)各5 min, 一部分干燥, 喷金, 扫描电镜观察细菌生长情况; 另一部分用Syto9及PI染色, 共聚焦电镜下观察细菌菌落形成。激发波长设定为470 nm左右, 测定510 nm附近(绿色吸收波长)和630 nm附近(红光吸收波长)。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件进行分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 组内比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 被认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 不同材料的表面形貌 商业钛金属表面粗糙; 二氧化钛纳米管表面存在着排列规则(图1A), 垂直于钛金属基底的纳米管, 管径约为80 nm, 纳米管长度约为1 μm (图1B)。扫面电镜观察万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管的管上沉积了纳米棒状的羟基磷灰石(图1C)。通过X射线能谱分析仪证实万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管的主要成分为Ca及P(图1D)。

2.2 金黄色葡萄球菌在不同材料上的黏附与增殖情况 通过扫描电镜观察可见, 金黄色葡萄球菌在万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上的数量最少且细菌形态破坏, 见图2; 通过倒置共聚焦观察可见, 万古霉素/羟基磷灰石/纳米管上的细菌数量及活菌数量最少, 商业钛金属上的活菌数量最多, 见图3。

2.3 药物体外释放实验 通过体外药物释放实验观察可见, 万古霉素从羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上的释放时间长达18 d(第7天约为50%), 然而药物从二氧化钛纳米管上释放的时间仅仅约为4 h, 见图4。

3 讨论 Discussion

骨修复材料置入人体后, 病菌可通过形成生物膜或者变异, 黏附在植入物表面并持续存在。对于生物材料周围感染, 全身抗生素治疗较难满足治疗的需要, 致使患处局部组织达不到有效药物浓度, 导致感染迁延不愈, 骨折延迟愈合或不愈合^[24-26]; 同时长期全身应用抗生素容易引起一系列不良反应。此外, 一旦病原体附着于修复材料表面形成生物菌膜, 造成病原体对抗生素产生抵抗和逃脱免疫监督, 从而增强细菌的自我保护^[27]。

骨修复材料置入过程中所发生的相关感染是临床上较为严重的并发症^[28]。骨植入物感染的发生率与手术部位和手术程序相关。经皮骨折固定针有 2%-30% 的感染发生率^[28], 骨移植感染率高达 13%^[29], 脊柱感染在 2%-5% 范围内^[30]。相关的统计表明, 金黄色葡萄球菌是骨修复材料置入过程中发生相关感染常见的致病菌^[31], 为了改善骨感染治疗效果, 局部药物释放系统研究的不断深入彻底改变了常规连续间断性的给药方式, 只要在患处组织内放置可缓释药物的载体, 就可实现局部持续有效的给药, 极大提高了治疗依从性。局部药物释放系统的优点包括: 在患处部位释放药物; 在局部迅速达到有效药物浓度; 可实现长期维持局部有效药物浓度的同时, 避免了全身应用抗生素所引发的不良反应; 屏蔽了骨缺损后局部丧失血液供应的缺点。载药人工骨是由药物与载体材料相结合而构成的具有特定作用的组织工程人工骨^[32], 通常填充于各种原因所致的骨组织缺损, 能在患处发挥修复骨缺损和局部释放药物治疗作用。传统的载体材料主要分为非生物降解型和生物降解型两类, 其中非生物降解型的常用载体为聚甲基丙烯酸甲酯, 其负载的庆大霉素珠链是目前临床上用于局部治疗骨感染的载药系统。然而, 根据一些临床治疗的反馈可知, 这类抗生素释放系统存在着影响金属植入物生物稳定性效果的缺陷。可生物降解抗生素载体一般为无机盐类(羟基磷灰石)和可降解聚合物材料(聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物), 相比于无机盐类材料, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物和聚乳酸在宿主体内降解后, 其降解产物容易导致局部给药处 pH 值升高^[33], 易诱发炎症反应, 因此无机盐类载体材料更受到研究者的青睐。

近来的研究结果表明, 二氧化钛纳米管涂层不仅能够促进材料本身的生物活性, 同时还可作为药物载体, 负载抗生素及生长因子等^[34-37]。Peng 等^[37]将二氧化钛纳米管负载蛋白质、雷帕霉素和紫杉醇等。在这项研究中, 影响负载药物释放因素的最深刻影响因素是纳米管

高度及管径。较长的纳米管长度及较小的纳米管直径能延长负载药物的释放时间。前期实验将万古霉素单纯沉积于二氧化钛纳米管中, 万古霉素的药物释放时间小于 6 h, 释放特性为早期爆发性释放^[22]。实验中通过将羟基磷灰石及万古霉素共沉积于二氧化钛纳米管上, 通过纳米羟基磷灰石涂层显著延缓了万古霉素的药物释放时间。在体外药物释放实验上, 万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管复合涂层上的万古霉素释放时间长达 28 d, 而二氧化钛纳米管单纯负载万古霉素的药物释放时间仅为 6 h。万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管复合涂层上的万古霉素释放时间远远大于二氧化钛纳米管单纯负载万古霉素的药物释放时间。

结果证实, 将二氧化钛纳米管装载万古霉素及羟基磷灰石有着良好的生物抗菌性能及药物缓释功能。

作者贡献: 张杭州进行实验设计, 实验实施为张杭州、田昂, 实验评估为白希壮、薛向欣, 资料收集为张杭州, 张杭州成文, 田昂、梁庆威、白希壮、薛向欣审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经中国医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 AF-SOP-07-01。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Cheung C. The future of bone healing. Clin Podiatr Med Surg North Am. 2005;22(4): 631-641.
- [2] Ogden JA, Alvarez RG, Levitt R, et al. Shock wave therapy (orthotripsy) in musculoskeletal disorders. Clin Orthop. 2001;387:22-40.
- [3] Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. Drug Discovery Today. 2003;8(21):980-989.
- [4] Karladani AH, Granhed H, Edshage B, et al. Displaced tibial shaft fractures. A prospective randomized study of closed intramedullary nailing versus cast treatment in 53 patients. Acta Orthop Scand. 2000;71:160-167.

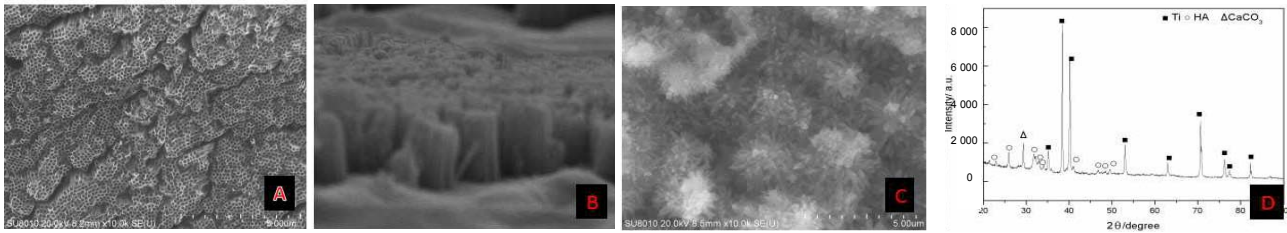


图 1 不同材料的表面形貌及化学成分

Figure 1 Morphology of the surface of different materials and their chemical compositions

图注: 图中 A 为二氧化钛纳米管管径(扫描电镜, $\times 10\ 000$); B 为二氧化钛纳米管管长(扫描电镜, $\times 10\ 000$); C 为万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管(扫描电镜, $\times 10\ 000$); D 为万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管 X 射线能谱分析。

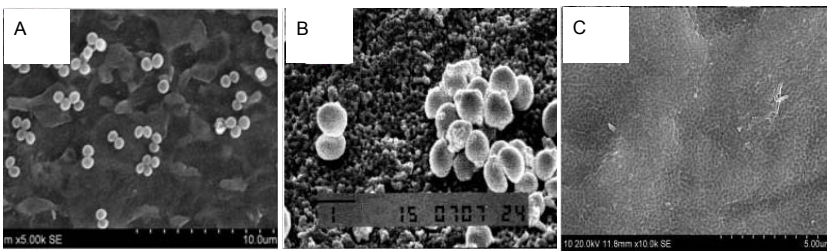


图 2 金黄色葡萄球菌在不同材料上的黏附(扫描电镜)

Figure 2 Adhesion of *Staphylococcus aureus* on different materials (scanning electron microscope)

图注: 图中 A 为商业钛金属($\times 5\ 000$), B 为二氧化钛纳米管($\times 10\ 000$), C 为万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管($\times 10\ 000$)。金黄色葡萄球菌在万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上的数量最少且细菌形态破坏。

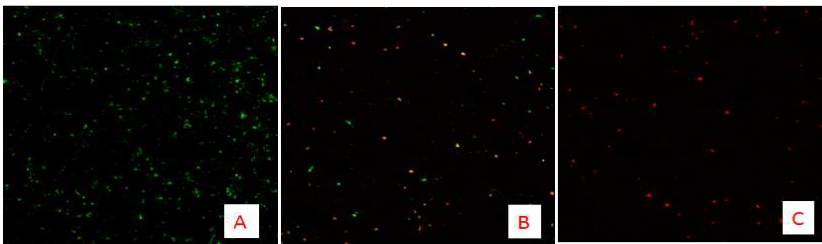


图 3 金黄色葡萄球菌在不同材料上的黏附(激光共聚焦显微镜, $\times 500$)

Figure 3 Adhesion of *Staphylococcus aureus* on different materials (laser scanning confocal microscope, $\times 500$)

图注: 图中 A 为商业钛金属, B 为二氧化钛纳米管, C 为万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管。万古霉素/羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上的细菌数量及活菌数量最少, 商业钛金属上的活菌数量最多。

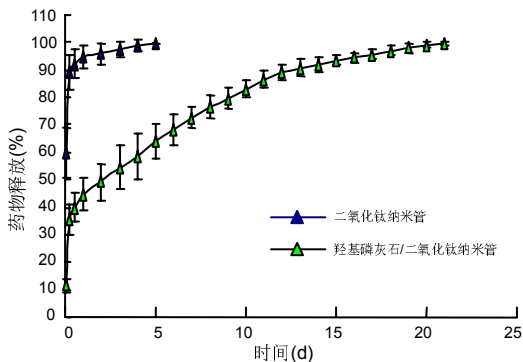


图 4 万古霉素从二氧化钛纳米管及羟基磷灰石/二氧化钛纳米管上的释放特点

Figure 4 The releasing characteristics of vancomycin from the titanium dioxide nanotube and the hydroxyapatite/titanium dioxide nanotube

- [5] Albrektsson T, Sennerby L. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Int J Prosthodont.* 1990;3(1):30-41.
- [6] Grotberg J, Hamlekhan A, Butt A, et al. Thermally oxidized titania nanotubes enhance the corrosion resistance of Ti6Al4V. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;1(59):677-689.

- [7] Butt A, Hamlekhan A, Patel S, et al. A Novel Investigation of the Formation of Titanium Oxide Nanotubes on Thermally Formed Oxide of Ti-6Al-4V. *J Oral Implantol.* 2015;41(5):523-531.
- [8] Li G, Liu S, Chen G, et al. Comparison of Clinical Outcomes of Phalangeal Fracture Treated with Dorsolateral Approach or Post-middle Approach Using AO Mini Titanium Plate. *Indian J Surg.* 2015;77(Suppl 2):657-661.
- [9] Sakamoto M, Watanabe H, Higashi H, et al. Pseudotumor Caused by Titanium Particles From a Total Hip Prosthesis. *Orthopedics.* 2015;28:1-4.
- [10] Balioglu MB, Albayrak A, Akman YE, et al. The effect of vertical expandable prosthetic titanium rib on growth in congenital scoliosis. *J Craniovertebr Junction Spine.* 2015; 6(4):200-205.
- [11] Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *New Engl J Med.* 2004;350:1422-1429.
- [12] Green SA, Ripley MS. Chronic osteomyelitis in pin tracks. *J Bone Jt Surg* 1984;66A:1092-1098.

- [13] Hargreaves DG, Drew SJ, Eckersley R, Kirschner wire pin tract infection rates: a randomized controlled trial between percutaneous and buried wires. *J Hand Surg Brit Eur*. 2004;29(4):374-376.
- [14] Torres-Claramunt R, Gil-González S, Leal J, et al. A new score assessing the surgical wound of a TKA and its relation with pain, infection and functional outcome. *Acta Orthop Belg*. 2015;81(4):713-719.
- [15] Kim YH, Kulkarni SS, Park JW, et al. Comparison of infection control rates and clinical outcomes in culture-positive and culture-negative infected total-knee arthroplasty. *J Orthop*. 2015;12(Suppl 1): S37-43.
- [16] Green SA. Complications of external skeletal fixation. *Clin Orthop Rel Res*. 1983;180:109-116.
- [17] Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A. Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(404):116-124.
- [18] Aw MS, Simovic S, Addai-Mensah J, et al. Polymeric micelles in porous and nanotubular implants as a new system for extended delivery of poorly soluble drugs. *J Mater Chem*. 2011;21(20):7082-7089.
- [19] Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, et al. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomater*. 2009;5(8): 3215-3123.
- [20] Gulati K, Aw MS, Losic D. Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection. *Nanoscale Res Lett*. 2011;31(6):571.
- [21] Gulati K, Ramakrishnan S, Aw MS, et al. Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion. *Acta Biomater*. 2012;8(1):449-456.
- [22] Zhang H, Sun Y, Tian A, et al. Improved antibacterial activity and biocompatibility on vancomycin-loaded TiO₂ nanotubes: in vivo and in vitro studies. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4379-4789.
- [23] 张杭州, 孙羽, 王琳, 等. 羟基磷灰石/TiO₂纳米管复合物的生物相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 18(3):335-340.
- [24] Turner IG, Pilliar RM, Srichana T, et al. Sterility and Infection. In: Narayan R, ed. *Biomedical Materials*. New York, NY: Springer Science, 2009:239-258.
- [25] Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomater*. 2012;2(4): 176-194.
- [26] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318-1322.
- [27] Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J Control Release*. 2006;113(2):102-110.
- [28] Masse A, Bruno A, Bosetti M, et al. Prevention of pintrack infection in external fixation with silver coated pins: clinical and microbiological results. *J Biomed Mater Res*. 2000;53:600-604.
- [29] Mankin HJ, Hornicek FJ, Raskin KA. Infection in massive bone allografts. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; (432):210-216.
- [30] Collins I, Wilson-MacDonald J, Chami G, et al. The diagnosis and management of infection following instrumented spinal fusion. *Eur Spine J*. 2008;17(3): 445-450.
- [31] Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(4):295-305.
- [32] Neut D, Kluin OS, Crielaard BJ, et al. A biodegradable antibiotic delivery system based on poly-(trimethylene carbonate) for the treatment of osteomyelitis. *Acta Orthop*. 2009; 80(5):514-519.
- [33] Zhang DY, Tian A, Xue X, et al. The Effect of Temozolomide/PLGA/ nano-hydroxyapatite Microspheres on Glioma U87 Cells Behavior. *Int J Mol Sci*. 2012;13:1109-1125.
- [34] Moseke C, Hage F, Vorndran E, et al. TiO₂ nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents. *Appl Surf Sci*. 2012;258: 5399-5404.
- [35] Song YY, Schmidt-Stein F, Bauer S, et al. Amphiphilic TiO₂ nanotube arrays: an actively controllable drug delivery system. *J Am Chem Soc*. 2009;131(12): 4230-4232.
- [36] Gulati K, Aw MS, Findlay D, et al. Local drug delivery to the bone by drug-releasing implants: perspectives of nano-engineered titania nanotube arrays. *Ther Deliv*. 2012;3(7):857-873.
- [37] Peng L, Mendelsohn AD, Latempa TJ, et al. Long-term small molecule and protein elution from TiO₂ nanotubes. *Nano Lett*. 2009;9(5):1932-1936.