

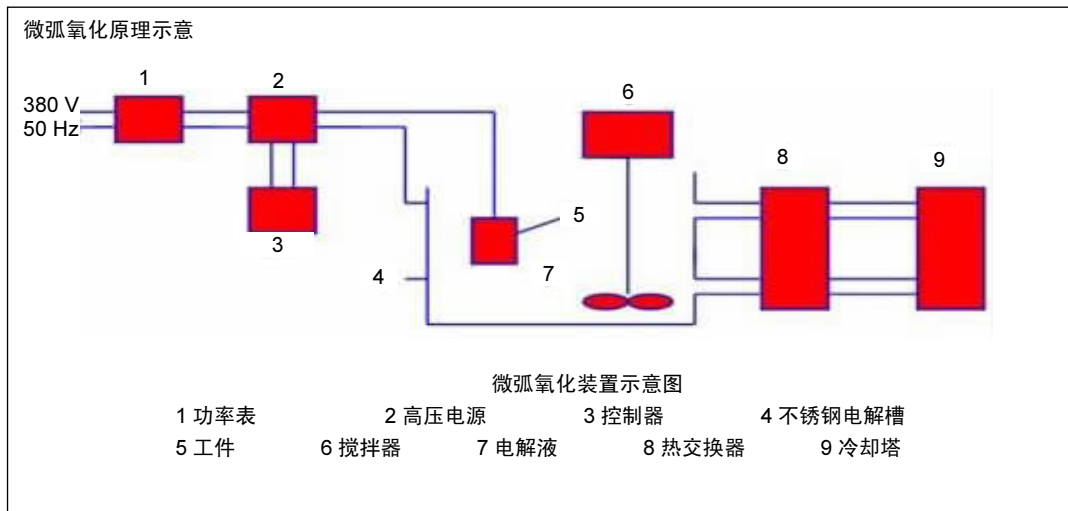
锌离子含量对微弧氧化涂层促成骨活性及抗菌性能的影响

张震祥(江苏省泰州市人民医院骨科, 江苏省泰州市 225300)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0705

ORCID: 0000-0001-9829-9861(张震祥)

文章快速阅读:



张震祥, 江苏省泰州市人民医院骨科, 江苏省泰州市 225300

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2017-11-21



文题释义:

微弧氧化: 又称等离子体电解氧化、微等离子体氧化等, 是通过电解液与相应电参数的组合, 在铝、镁、钛等金属及其合金表面依靠弧光放电产生的瞬时高温高压作用, 原位生长出以基体金属氧化物为主的陶瓷膜层。

锌离子的作用: 作为人体必需的微量元素, 在发挥抗菌性能中起重要作用。研究已证明, 用化学改性的方法在钛表面注入锌离子, 可显著降低金黄色葡萄球菌的生存及繁殖能力。此外, 锌离子还具备促成骨活性, 能加速骨形成。可见, 锌离子不但可促进骨骼形成, 而且还能抑制细菌黏附, 这可满足临床需要。

摘要

背景: 有研究发现锌离子具有促成骨活性, 也有文献表明高含量的锌离子无促成骨活性, 反而抑制成骨细胞的分化; 还有报道, 当锌离子被注入到钛表面后并没有有效的抑菌作用。由于存在许多争论, 对锌离子的影响尚需进一步研究。

目的: 观察锌离子含量对钛表面微弧氧化涂层促成骨活性及抗菌性能的影响。

方法: 采用微弧氧化法在钛片表面制作涂层, 使涂层中锌离子含量(原子百分数)分别为 0.199%、0.574% 及 1.995%, 分别设为低、中、高剂量组, 以未经处理的钛片为对照。将 MG63 细胞分别接种于 4 组材料表面, 检测细胞增殖、形态变化及碱性磷酸酶活性。将金黄色葡萄球菌分别接种于 4 组材料表面, 接种 48 h, 检测抑菌率; 接种 24 h 时, 观察细菌黏附情况。

结果与结论: ①培养 7 d 内, 随着时间的推移, 各组材料表面的 MG63 细胞数目逐渐增加, 其中低剂量组细胞增殖活性最高, 其次为中剂量组及对照组, 高剂量组最低; ②培养 48 h 后, 对照组、低剂量组、中剂量组细胞展示正常形态及扩展的伪足, 有些伪足渗透到细胞表面; 高剂量组未发现正常或完整的细胞; ③培养 13 d 内, 低剂量细胞碱性磷酸酶活性最高, 其次为中剂量组及对照组, 高剂量组最低, 组间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ④低剂量组、中剂量组、高剂量组的抗菌率分别为 62.54%、69.84%、79.19%; ⑤结果表明, 随着锌离子含量的增加, 微弧氧化涂层的促成骨活性降低, 抗菌性能提高。

关键词:

钛片; 锌离子; 微弧氧化; 成骨活性; 抗菌性能; 生物材料

主题词:

钛; 锌; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(81401770): 关节假体微弧氧化掺锌微孔纳米涂层的抗菌性能及其机制研究

Zhang Zhen-xiang,
Department of Orthopedics,
Taizhou People's Hospital,
Taizhou 225300, Jiangsu
Province, China

Effects of zinc ion contents on pro-osteogenic and antibacterial activities of micro-arc oxidation coatings

Zhang Zhen-xiang (Department of Orthopedics, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Some studies have found that zinc ions have pro-osteogenic activity, while zinc ions at high levels are also reported to inhibit the differentiation of osteoblasts instead of the pro-osteogenic activity. In some studies, zinc ions that are injected into the surface of titanium have ineffective antibacterial effects. Therefore, further investigations on zinc ion's effects as a controversial topic are required.

OBJECTIVE: To observe the effects of zinc ion content on the pro-osteogenic and antibacterial activities of micro-arc oxidation coatings.

METHODS: The coating was made on the surface of titanium by micro-arc oxidation method. The zinc ion content (atomic percentage) in the coating was set to 0.199%, 0.574%, and 1.995%, respectively, as low, medium and high dose groups. Untreated titanium plates were used as controls. MG63 cells were seeded on the surface of four groups of materials and tested for cell proliferation, morphological changes, and alkaline phosphatase activity. *Staphylococcus aureus* was inoculated on the surface of four groups of materials and the antibacterial rate was detected at 48 hours after inoculation. Bacterial adhesion was observed at 24 hours after inoculation.

RESULTS AND CONCLUSION: Within 7 days of culture, the number of MG63 cells on the material surface gradually increased with time. The proliferative ability of cells was highest in the low-dose group, followed by the middle-dose and control group, and it was lowest in the high-dose group. After 48 hours of culture, the cells in the control, low-dose and middle-dose groups showed normal morphology and expanded pseudopodia, and some pseudopodia penetrated into the cell surface, while normal or intact cells were undetected in the high-dose group. Within 13 days of culture, the activity of alkaline phosphatase was the highest in the low-dose group, followed by the middle-dose and control groups, and the lowest in the high-dose group. There were significant differences in the activity of alkaline phosphatase between groups ($P < 0.05$). The antibacterial rate of the materials was 62.54% in the low-dose group, 69.84% in the middle-dose group, and 79.19% in the high-dose group, respectively. Findings from this study reveal that with the increase of zinc ion contents, the pro-osteogenic activity of micro-arc oxidation coatings decreased, while the antibacterial property improved.

Subject headings: Titanium; Zinc; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81401770

0 引言 Introduction

钛及其合金因优良的机械性能和生物相容性已被用作骨科植入物。为了改善钛植入物的骨结合能力,微弧氧化(micro-arc oxidation, MAO)已被广泛研究,其可在钛表面产生多孔的、粗糙涂层,该多孔结构可增强骨与植入物之间的骨结合强度^[1-3];此外,通过在微弧氧化电解质溶液中引入Ca和P离子,可方便地将其注入到涂层表面,而Ca和P离子从涂层中释放,可显著地提高涂层的促成骨活性^[1, 3]。

植入物周围感染是潜在的破坏性并发症并可最终导致植入物失败^[4]。为了防止植入物相关的感染,许多学者已尝试赋予植入物抗菌性能,包括引入锌离子到植入物表面^[5-6]。锌,作为人体必需的微量元素,在发挥抗菌性能中起重要作用。研究已证明,用化学改性的方法在钛表面注入锌离子,可显著降低金黄色葡萄球菌的生存及繁殖能力^[7]。此外,已报道锌离子具备促成骨活性并能加速骨形成^[8-9]。可见,锌离子不但可促进骨骼形成,而且还能抑制细菌的黏附,这将满足临床需要。

尽管许多学者报道锌离子的促成骨活性^[10-11],但也有文献表明高含量的锌离子无促成骨活性,反而抑制成骨细胞的分化。同时有学者报道,当锌离子被注入到钛表面后并没有观察到有效的抑菌作用。由于存在许多争论,对锌离子的影响尚需进一步研究。

获得抗菌性能与促成骨活性之间的平衡,对生物材料是非常重要的。此次研究中,在微弧氧化涂层中引入不同含量的锌离子,并且评估这些涂层的成骨活性和抗菌性能,目的是探讨锌离子含量对微弧氧化涂层促成骨活性和抗菌性能的影响,并且寻求能够平衡涂层促成骨活性和抗菌性能的锌离子含量范围。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察性实验。

1.2 材料 采用微弧氧化法在钛片表面制作涂层,使涂层中锌离子含量(原子百分数)分别为0.199%、0.574%及1.995%,分别设为低、中、高剂量组,以未经处理的钛片为对照。

1.3 实验方法

1.3.1 涂层的制备及其特性 将钛片线切割为10 mm×10 mm×1 mm大小,微弧氧化处理前经砂纸打磨。电解质溶液的组成见表1。以钛片为阳极,不锈钢螺旋管为阴极,不锈钢螺旋管同时用作循环水冷却管以保持实验过程中电解液温度不超过30℃。磁力搅拌器用来保持实验过程中电解液成份和温度的均匀。采用成都普斯特电气公司生产的MAO30型直流脉冲等离子体电解氧化电源,选用恒流模式,固定频率为800 Hz,占空比10%,处理时间4 min,在电流密度为16.5 A/dm²的条件下制备涂层。以扫描电镜、X射线光电子能谱分别检测各涂层的表面形貌和化学组成。

表1 电解质溶液的组成 (mol/L)
Table 1 Composition of electrolyte solution

组别	Ca(Ac) ₂	Na ₅ P ₃ O ₁₀	Zn(Ac) ₂
低剂量组	0.10	0.025	0.01
中剂量组	0.10	0.025	0.03
高剂量组	0.10	0.025	0.04
对照组	0.10	0.025	0

1.3.2 MG63细胞成骨活性检测 将MG63细胞分别与各组材料在含有体积分数10%胎牛血清的Eagle培养基中共培养,湿度为95%,CO₂体积分数为5%。共培养1, 3, 5,

7 d后, 增殖细胞的数目通过结晶紫测定。培养48 h后, 以扫描电镜观察涂层表面成骨细胞的形态。培养4, 7, 10, 13 d后, 采用磷酸对硝基苯酯测定碱性磷酸酶活性。

1.3.3 涂层抗菌性能检测 将金黄色葡萄球菌分别接种于各组材料表面, 48 h后, 计算CFU数量。抑菌率用 $(C_0-C)/C_0 \times 100\%$ 计算。 C_0 是对照组的CFU数量, C 是实验组CFU数量。金黄色葡萄球菌接种24 h后, 以扫描电镜观测其形貌。

1.4 主要观察指标 各组材料表面的MG63细胞增殖、形态及碱性磷酸酶活性; 各组材料的抗菌性能。

1.5 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以SPSS 10.0统计软件包进行统计分析, 组间比较采用 t 检验。

2 结果 Results

2.1 微弧氧化涂层的特性 如图1所示, 所有涂层显示出多孔结构, 这些结构很好地分散在涂层表面, 微孔的直径随着锌含量的增加而增加。涂层表面的粗糙度(Ra值), 高剂量组为 $(1.65 \pm 0.02) \mu\text{m}$, 显著高于其他剂量组($P < 0.05$); 中剂量组表面粗糙度 $(1.33 \pm 0.02) \mu\text{m}$, 显著高于低剂量组的 $(1.17 \pm 0.04) \mu\text{m}$ 和对照组的 $(1.13 \pm 0.03) \mu\text{m}$ ($P < 0.05$), 但低剂量组和对照组之间无明显差异($P > 0.05$)。涂层的化学组成如表2所示, 射线光电子能谱结果可见各涂层均含有O、Ca和P元素, 除对照组外, 各涂层组均检测到锌离子存在, 随着锌离子含量增加, 锌信号逐渐增强。

表2 各组材料表面的化学组成 (原子百分数, %)
Table 2 Chemical composition of the material surface in each group

组别	Ca	P	Zn
低剂量组	4.387	16.156	0.199
中剂量组	4.465	17.350	0.574
高剂量组	3.249	15.957	1.995
对照组	5.343	16.848	0

2.2 MG63细胞的成骨活性 如图2所示, 随着时间的推移, 所有材料表面的MG63细胞数目逐渐增加。低剂量组细胞增殖活性最高, 其次为中剂量组及对照组, 高剂量组细胞增殖活性最低, 4组间存在显著差异($P < 0.05$)。

扫描电镜结果显示, 培养48 h后, 对照组、低剂量组和中剂量组中细胞展示正常的形态及扩展的伪足, 有些伪足渗透到细胞表面(如箭头所示), 高剂量组表面未发现正常或完整的细胞(图3)。各材料表面细胞碱性磷酸酶活性从培养第4天逐渐增加到培养后第10天, 于第13天开始下降, 低剂量组细胞碱性磷酸酶活性最高, 其次分别为中剂量组及对照组, 高剂量组碱性磷酸酶活性受到抑制(图4)。统计分析表明, 各组之间碱性磷酸酶活性差异存在显著性意义($P < 0.05$)。随着锌离子含量下降, 细胞增殖和碱性磷酸酶

活性增加。

2.3 各组材料的抗菌性能 高剂量组、中剂量组、低剂量组及对照组细菌CFU分别为 15.25 ± 2.13 、 22.10 ± 2.21 、 27.45 ± 3.23 及 73.28 ± 3.67 , 组间存在显著差异($P < 0.05$)。高剂量组显示最强的抗菌性能。高剂量组、中剂量组、低剂量组的抑菌率分别为79.19%、69.84%、62.54%。细菌在各涂层表面的黏附结果见图5所示。大量细菌黏附于对照组表面, 而黏附于其他涂层表面的细菌数较少, 细菌数量随着锌离子含量的增加而减少。

3 讨论 Discussion

锌离子能够提高蛋白质的合成, 并促进骨细胞增殖和分化, 锌离子缺失可导致动物骨骼生长迟缓。Miao等^[10]报道在磷酸三钙和羟基磷灰石复合陶瓷中掺杂锌离子, 能够刺激成骨细胞分化并增加的基质细胞的碱性磷酸酶活性。掺杂锌离子后, 能够调节羟基磷灰石骨形成的活性^[8, 10]。以上报道和此次研究表明, 适当含量的锌离子能够促进成骨细胞增殖并提高碱性磷酸酶活性, 也就是说, 锌离子在调节成骨细胞活性中发挥了重要作用。然而, 高剂量组中细胞活性受到抑制, 表明高含量的锌离子对成骨细胞有毒性。根据Hu等^[5]报道, 质量分数0.32%、0.63%、0.88%及1.26%的锌离子均对成骨细胞活性具有促进作用, 且锌离子含量越高促进作用越强。相反地, Wu等^[12]报道, 在培养基中加入0.20, 0.65及2.62 g/L的锌离子, 对成骨细胞的增殖及分化均无影响, 而更高的锌离子含量对成骨细胞的增殖及分化有抑制作用。这些不同的结论可能由两种因素引起: 锌离子引入的方式及锌离子含量的不同。然而, 锌离子含量与其促成骨活性的关系尚不明朗。一种可能的机制为: 当锌离子引入到涂层中后, 可能与涂层中的Ca离子发生作用。锌离子能够抑制磷灰石的晶体生长^[9-10]。在电解质溶液中添加少量锌离子后, 锌离子能被注入到涂层或羟基磷灰石晶体中。当涂层中的锌与钙整合在一起后, 可共同沉积在成骨细胞表面, 一起促进成骨细胞增殖。然而, 当锌含量增加, 钙的结合位点可能被锌占据, 钙沉淀受到抑制, 这可能会影响羟基磷灰石的形成^[5, 13-14]。此次实验结果也证实了这一假设。羟基磷灰石能够有效促进骨形成, 然而, 高剂量组中钙离子含量降低可能减弱羟基磷灰石的成骨活性。这一假设有待进一步研究。

锌离子具备抗菌性能。以前的报道表明, 钛表面通过氧化锌改性后具备较强的抗菌活性^[5-7, 15-16]。Xu等^[15]报道随着锌离子含量增高, 涂层的抗菌性能增强, 且高含量的锌离子能够有效抑制细菌克隆, 这一结论与此次实验结果相一致。一些研究已提出, 锌离子抗菌性能的首要原因可能是细胞膜活性的破坏^[5, 7], 另一个可能性是由于细胞内活性氧的感应对细菌膜有损伤, 包括作为强氧化剂的过氧化氢^[6, 15-16]。虽然锌离子的抗菌机制仍然是未知的, 但此次实验结果显示: 在高剂量组涂层表面的细菌表现了较多损

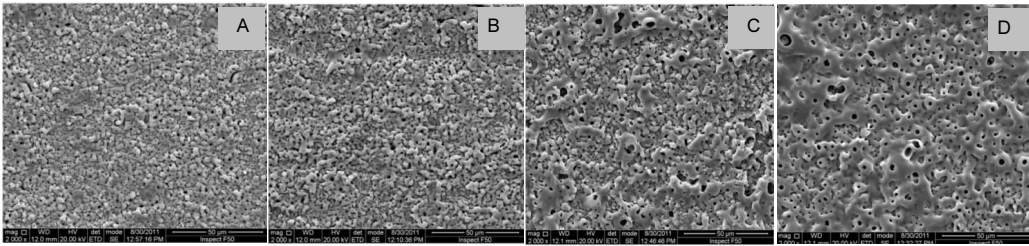


图1 各组钛材料的表面形貌
Figure 1 Surface topography of different titanium materials

图注: 图中 A-D 分别为对照组、低剂量组、中剂量组及高剂量组。

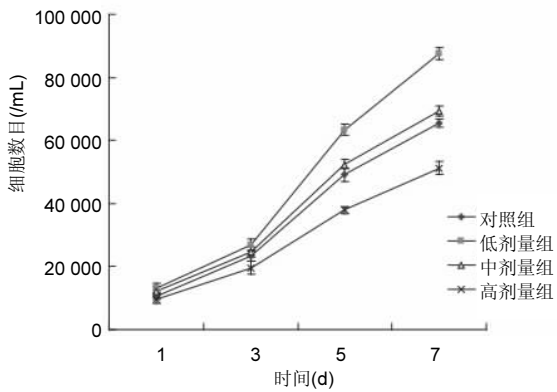


图2 各组材料表面的 MG63 细胞增殖活性
Figure 2 Proliferative ability of MG63 cells on different material surfaces

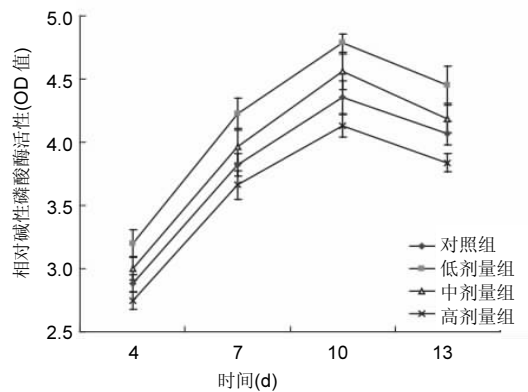


图4 各组材料表面 MG63 细胞碱性磷酸酶活性
Figure 4 Activity of alkaline phosphatase in MG63 cells on different material surfaces

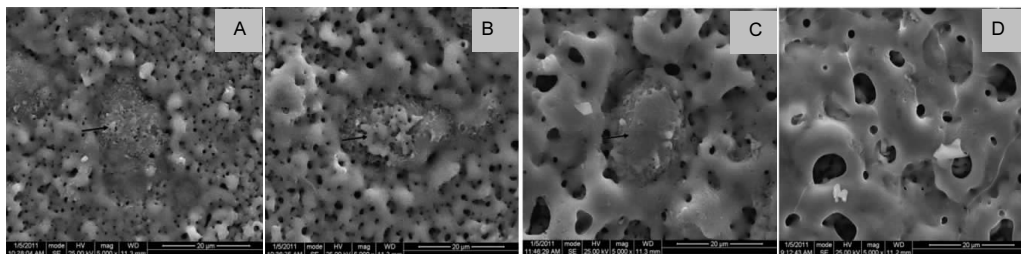


图3 各组材料表面 MG63 细胞的形态
Figure 3 Morphology of MG63 cells on different material surfaces

图注: 图中 A-D 分别为对照组、低剂量组、中剂量组及高剂量组。对照组、低剂量组和中剂量组中细胞展示正常的形态及扩展的伪足, 有些伪足渗透到细胞表面(如箭头所示), 高剂量组表面未发现正常或完整的细胞。

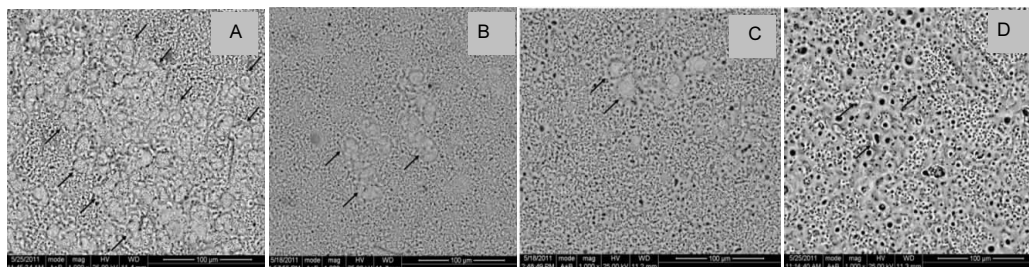


图5 各组材料表面的金黄色葡萄球菌黏附情况
Figure 5 Adhesion of *Staphylococcus aureus* onto the material surface in each group

图注: 图中 A-D 分别为对照组、低剂量组、中剂量组及高剂量组。大量细菌黏附于对照组表面, 而黏附于其他涂层表面的细菌数较少, 细菌数量随着锌离子含量的增加而减少。

坏细菌和碎片。据报道, 纳米ZnO颗粒可导致细胞膜渗透性增加^[17]。由锌离子引起的细胞膜通透性增加, 同样通过透射电子显微镜和拉曼光谱观察大肠杆菌实验中得到证实。然而, Atmaca等^[18]报道通过离子束混合方法在钛表面注入锌离子后, 并不能抑制细菌的繁殖。不同的表面改性

方法和细菌菌株的种类最可能是以上研究差距的两个因素。

尽管锌离子具有广泛的抗菌作用, 但锌浓度过高具备细胞毒性。锌离子毒性影响哺乳动物细胞的基础代谢及细胞功能。因此为谨慎起见, 掺入最小量锌到涂层表面, 以

达到充分减少细菌黏附及最小组织细胞毒性的目的。根据这项研究, 0.199%到0.574%范围的锌离子能够有效促进成骨细胞的活性, 同时具备优良的抗菌性能, 而较高的锌含量可能会伤害到成骨细胞的活性。

通过微弧氧化方法可在钛表面制备含锌离子涂层, 涂层中的锌离子含量可通过加入电解质中加入的锌离子量来调节。随着锌离子含量的增加, 成骨细胞的细胞活性降低, 而涂层的抗菌性能提高。0.199%到0.574%范围的锌离子能够有效促进涂层表面成骨细胞的活性, 同时具备优良的抗菌性能。

作者贡献: 实验的设计、实施及评估由全体作者共同完成。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81401770)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

伦理问题: 未涉及伦理问题。

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: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Zhang Z, Sun J, Hu H, et al. Osteoblast-like cell adhesion on porous silicon-incorporated TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011;97(2):224-234.
- [2] Wang W, Wan P, Liu C, et al. Degradation and biological properties of Ca-P contained micro-arc oxidation self-sealing coating on pure magnesium for bone fixation. Regen Biomater. 2015;2(2):107-118.
- [3] Duarte LT, Bolfarini C, Biaggio SR. Growth of aluminum-free porous oxide layers on titanium and its alloys Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb by micro-arc oxidation. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014; 41:343-348.
- [4] Yoshinari M, Oda Y, Kato T. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. Biomaterials. 2001; 22(14):2043-2048.
- [5] Hu H, Zhang W, Qiao Y, et al. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium. Acta Biomater. 2012;8(2):904-915.
- [6] Applerot G, Lipovsky A, Dror R, et al. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury. Adv Funct Mater. 2009;19:842-852.
- [7] Storrie H, Stupp SI. Cellular response to zinc-containing organoapatite: an in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. Biomaterials. 2005;26:5492-5499.
- [8] Tang A, Chappell HF, Dove MT. Zinc incorporation into hydroxylapatite. Biomaterials. 2009;30: 2864-2872.
- [9] Lusvardi G, Zaffe D, Menabue L, et al. In vitro and in vivo behaviour of zinc-doped phosphosilicate glasses. Acta Biomater. 2009;5:419-428.
- [10] Miao S, Cheng K, Weng W, et al. Fabrication and evaluation of Zn containing fluoridated hydroxyapatite layer with Zn release ability. Acta Biomater. 2008;4:441-446.
- [11] Zreiqat H, Ramaswamy Y, Wu C. The incorporation of strontium and zinc into a calcium-silicon ceramic for bone tissue engineering. Biomaterials. 2010;31:3175-3184.
- [12] Wu C, Ramaswamy Y, Chang J, et al. The Effect of Zn contents on phase composition, chemical stability and cellular bioactivity in Zn-Ca-Si system ceramics. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008;87:346-353.
- [13] Ramaswamy Y, Wu C, Zhou H, et al. Biological response of human bone cells to zinc-modified Ca-Si-based ceramics. Acta Biomater. 2008;4:1487-1497.
- [14] Tas AC, Bhaduri S, Jalota S. Preparation of Zn-doped b-tricalcium phosphate (β -Ca₃(PO₄)₂) bioceramics. Mater Sci Eng C. 2007;27:394-401.
- [15] Xu J, Ding G, Li J, et al. Zinc-ion implanted and deposited titanium surfaces reduce adhesion of Streptococcus mutans. Appl Surf Sci. 2010;256(24):7540-7544.
- [16] Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. Langmuir. 2011;27: 4020-4028.
- [17] Reddy KM, Feris K, Bell J, et al. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. Appl Phys Lett. 2007;90:2139021-2139023.
- [18] Atmaca S, Gul K, Clcek R. The effect of zinc on microbial growth. Tr J Med Sci. 1998;28:595-597.