

# 纯钛表面TiN/Ag多层复合结构制备及生物学性能的评价

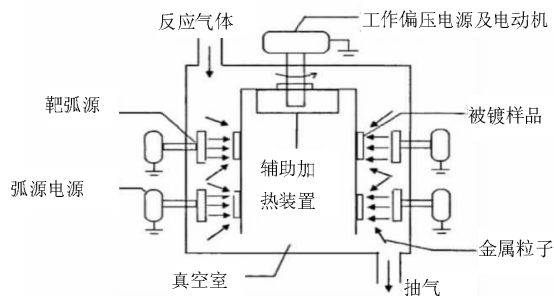
马明<sup>1</sup>, 万荣欣<sup>2</sup>, 吕晓飞<sup>1</sup>, 褚珊珊<sup>1</sup>, 李立军<sup>1</sup>, 顾汉卿<sup>2</sup>, 彭诚<sup>1</sup>(<sup>1</sup>天津医科大学第二医院, 天津市 300211; <sup>2</sup>天津市泌尿研究所, 天津医科大学, 天津市 300211)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0005

ORCID: 0000-0003-4096-8086(彭诚)

文章快速阅读:

采用多弧离子镀技术在纯钛表面制备硬质薄膜



马明, 男, 1991年生, 辽宁省锦州市人, 天津医科大学在读硕士, 主要从事口腔种植体表面改性及抑菌成骨方面的研究。

通讯作者: 彭诚, 主任医师, 硕士生导师, 天津医科大学第二医院口腔科, 天津市 300211

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2017-09-28



文题释义:

**多弧离子镀技术:** 是制备硬质薄膜的一项常用技术, 原理为在真空条件下利用弧光放电原理, 使阴极靶材料蒸发、离化, 飞向阳极的机体表面, 沉积成膜, 其优点有沉积速率较高、操作简单、镀膜速度快、效率高等。  
**银的细胞毒性机制:** 尚不完全清楚, 但其推测有以下两种说法: 一种是银颗粒在溶液中释放银离子, 银离子产生细胞毒性, 其机制与纳米银产生细胞毒性的原理相似; 另一种观点认为银离子可以胞吞的方式进入细胞, 并与细胞的细胞器产生效应, 干扰细胞的功能, 影响细胞的正常生理功能, 最终可能导致细胞死亡。

摘要

**背景:** 在钛种植体表面建立一种能促进细胞早期黏附增殖、分化且无细胞毒性抑菌效果明显的界面至关重要。  
**目的:** 在纯钛种植体材料表面制备 TiN/Ag 多层复合结构涂层, 分析其抗菌性能及对 MC3T3-E1 细胞生物学行为的影响。

**方法:** 采用酸蚀喷砂技术及多弧离子镀技术在光滑纯钛表面制备 TiN/Ag 多层复合结构。取生长状态良好的 MC3T3-E1 细胞, 分别接种于光滑钛片、酸蚀喷砂钛片及载 TiN/Ag 多层复合结构钛片表面, 接种后 24 h, 激光共聚焦显微镜观察细胞黏附及细胞活化情况, 扫描电镜观察细胞生长形态; 接种后 24, 48, 72 h, CCK-8 法检测细胞增殖及毒性分级。将金黄色葡萄球菌菌液分别滴加于光滑钛片、酸蚀喷砂钛片及载 TiN/Ag 多层复合结构钛片表面, 16 h 后, 激光共聚焦显微镜观察细菌生长情况。

**结果与结论:** ①激光共聚焦显微镜显示, 光滑组细胞呈两极或三极的纺锤状结构, F-肌动蛋白和丝状伪足表达量较少; 酸蚀喷砂组与载银涂层组细胞分散附着排布, 方向不同, 并形成大量丝状伪足, 相互交织融合在一起, 细胞铺展较充分, F-肌动蛋白明显高表达, 肌动蛋白纤维较粗; ②扫描电镜显示, 光滑组细胞黏附与铺展不够充分; 酸蚀喷砂组、载银涂层组细胞铺展黏附良好, 铺展大, 细胞状态较好; ③CCK-8 实验显示接种 72 h 后, 载银涂层组细胞生长良好, 增殖明显, 细胞毒性为 1 级; ④激光共聚焦显微镜显示, 光滑组和酸蚀喷砂组钛片表面金黄色葡萄球菌生长良好, 载银涂层组钛片表面细菌出现大面积死亡; ⑤结果表明, TiN/Ag 多层复合结构涂层具有良好的细胞相容性及抗菌性能。

关键词:

生物材料; 口腔材料; 载银钛; 抑菌; 细胞增殖; 细胞毒性; MC3T3-E1 细胞; 多弧离子镀; 涂层

主题词:

牙种植体; 钛; 银; 细胞生物学; 组织工程

基金资助:

国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2015AA034702); 国家重点研发计划课题(2016YFC1100302)表面改性对生物材料综合性能的影响; 天津市应用基础与前沿技术计划(重点项目)课题(15JCZDJC38200); 天津市卫计委科技基金课题(2015KZ094)

Ma Ming, Studying for master's degree, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Corresponding author: Peng Cheng, Chief physician, Master's supervisor, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

## Preparation and biological properties of TiN/Ag composite coating on pure titanium surface

Ma Ming<sup>1</sup>, Wan Rong-xin<sup>2</sup>, Lv Xiao-fei<sup>1</sup>, Chu Shan-shan<sup>1</sup>, Li Li-jun<sup>1</sup>, Gu Han-qing<sup>2</sup>, Peng Cheng<sup>1</sup> (<sup>1</sup>The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; <sup>2</sup>Tianjin Institute of Urological Surgery, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** It is of vital importance to fabricate an interface on the titanium implant surface which can promote early cell adhesion, proliferation, and differentiation, and exert better antibacterial effects with no cytotoxicity.

**OBJECTIVE:** To prepare a TiN/Ag composite coating on the surface of pure titanium implant, and to explore its antibacterial properties and effects on MC3T3-E1 biobehaviors.

**METHODS:** Acid etching blasting and multi-arc ion plating were adopted to prepare TiN/Ag composite coating on the smooth surface of pure titanium. Then, MC3T3-E1 cells that grew well were inoculated onto pure titanium plate, sandblasted and acid-etched titanium plate, and TiN/Ag-coated titanium plate. Twenty-four hours later, cell adhesion and viability were observed under confocal laser scanning microscope, and cell morphology was observed under scanning electron microscope. Cell counting kit-8 was used to detect cell proliferation and cytotoxicity at 24, 48, 72 hours after inoculation. In addition, *Staphylococcus aureus* solution was dropped onto the smooth titanium plated, acid-etched and sandblasted titanium and TiN/Ag-coated titanium plate, and the growth of bacteria was observed by the laser confocal scanning microscope at 16 hours.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Under the confocal laser scanning microscope, spindle cells with bipolar or three poles were observed on the smooth titanium surface, and there was less F-actin and filopodia expression; cells on the TiN/Ag-coated titanium surface and sandblasted and acid-etched titanium surface were scattered with a large amount of interconnected filopodia that were fully stretched and adhered to the titanium surface, highly expressed F-actin was detected, and actin fibers were thickened. Under the scanning electron microscope, the cells on the smooth titanium surface were not fully adhered and stretched, and those on the TiN/Ag-coated titanium surface or the sandblasted and acid-etched titanium surface exhibited better adhesion and extension. Findings from the cell counting kit-8 showed that after 72 hours of inoculation, the cells on the smooth titanium surface grew well, with cytotoxicity level 1. In addition, *Staphylococcus aureus* grew well on the smooth titanium surface under the confocal laser scanning microscope, while a large amount of *Staphylococcus aureus* died on the TiN/Ag-coated titanium surface or on the sandblasted and acid-etched titanium surface. These findings indicated that TiN/Ag coating has good biocompatibility and antibacterial properties.

**Subject headings:** Dental Implants; Titanium; Silver; Cell Biology; Tissue Engineering

**Funding:** the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program), No. 2015AA034702; the National Key Research and Development Program of China, No. 2016YFC1100302; the Applied Basic and Cutting-Edge Technology Research Program of Tianjin, No. 15JCZDJC38200; the Scientific Research Foundation of the Health and Family Planning Commission of Tianjin, No. 2015KZ094

## 0 引言 Introduction

钛及其合金作为牙科植入材料已有几十年的历史, 鉴于其良好的生物相容性、较高的化学稳定性、弹性模量低与人体骨组织更匹配等诸多优势<sup>[1]</sup>, 一直以来都是牙科及骨科植入的首选材料, 受到业界广泛关注。但纯钛材料不具备抗菌能力, 由于细菌的早期黏附、定殖及菌斑生物膜的形成, 常导致种植体周围炎的发生<sup>[2-3]</sup>, 因此有必要对钛表面进行特殊的处理, 使之具备抗菌能力。银(Ag)抗菌剂作为一种强效的无机抗菌剂, 已通过各种手段被加载到钛片表面赋予其抗菌性能<sup>[4]</sup>, 广泛用于伤口的抑菌。由于银抗菌剂在液体中可有银离子析出, 而银离子具有抗菌性持久、组织耐受性好等特点, 一时间成为了表面改良涂层的首选材料。银抗菌剂的抗菌性能已毋庸置疑, 但对细菌产生致死作用的载银抗菌剂一般对细胞也可能产生不良影响, 尤其是对生长在钛种植体表面的成骨细胞, 高浓度银离子可能会对其产生不良反应, 影响其生物学行为<sup>[5]</sup>。成骨细胞能否早期充分铺展黏附于种植体表面, 直接决定了后期成骨效果及骨结合的质量<sup>[6-7]</sup>, 而通过材料表面改性涂层技术可促进细胞早期黏附与繁殖, 多弧离子镀涂层技术就是涂层技术中的一种。

多弧离子镀技术是制备硬质薄膜的一项常用技术<sup>[8-9]</sup>, 原理为在真空条件下利用弧光放电原理, 使阴极靶材料蒸发、离子化, 飞向阳极的机体表面, 沉积成膜<sup>[10]</sup>, 其优点有沉积速率较高、操作简单、镀膜速度快、效率高等<sup>[11]</sup>。氮化钛(TiN)作为第一代硬质薄膜, 具有较低的摩擦系数, 高硬度, 作为纯钛表面涂层有不可替代的优势, 具有良好的生物相容性, 而且可增加纯钛的机械强度<sup>[12]</sup>。此次研究中运用多弧离子镀技术在纯钛表面进行TiN/Ag多层膜沉积, 目的是达到银的长期缓慢释放, 使材料具有长效抗菌性能。当各种不可避免的外界因素干扰导致TiN膜或者Ag膜损耗时, 由于多层结

构的产生, 材料表面会继续产生抗腐蚀或者抗菌性能<sup>[9]</sup>。此次实验通过体外细胞实验来初步评价TiN/Ag复合结构修饰纯钛表面的生物安全性, 以及其对MC3T3-E1细胞生物学行为的影响并检测其抑菌性能。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年2月15日至6月20日在天津医科大学第二医院中心实验室完成。

1.3 材料 光滑纯钛片、酸蚀喷砂粗糙钛片, 购自威海威高洁丽康生物材料有限公司, 规格为直径为10 mm、厚度为1 mm的圆形钛片。

**实验用主要试剂和仪器:**  $\alpha$ -MEM培养基、胎牛血清(BI, 以色列); 青链霉素混合液、LB细菌培养(天津索罗门生物科技有限公司); 0.25%胰蛋白酶、二甲基亚砜、曲拉通X-100、40 g/L多聚甲醛(Sigma, 美国); 罗丹明-鬼笔环肽(上海翊圣生物科技有限公司); Heochest33342染色液(碧云天); 抗荧光衰减封固剂(博士德生物工程有限公司); live/dead活死染料(abcam, 美国); CCK-8试剂盒(日本, 同仁); 国产SA-6T型复合离子镀膜机; 激光共聚焦显微镜、倒置相差显微镜(OLYMPUS, 日本); 扫描电镜(HITACHI SU8010); CO<sub>2</sub>细胞培养箱、叔丁醇冻干机、-80 °C冰箱(Thermo, 美国); 低速台式离心机(湘仪 L-530); 多功能酶标仪(天津志卓生物科技有限公司)。

**细胞与细菌:** MC3T3-E1细胞系(中国科学院细胞库, 上海); 金黄色葡萄球菌(天津师范大学生命科学学院中心实验室)。

1.4 实验方法

1.4.1 钛表面TiN/Ag复合多层结构的制备 运用SA-6T型

复合粒子镀膜机, 伴随着离子的沉积, 各部分参数设置如下: 工作气压0.5-0.8 Pa, 固定直流偏压为50 V, 脉冲偏压为-150 V, 占空比为30%, 其中Ar<sub>2</sub>与N<sub>2</sub>的气压分压比为1:5, 沉积时间为35 min。

首先, 将酸蚀喷砂纯钛基底材料分别浸泡在乙醇和丙酮溶液中交替清洗, 每种溶液15 min, 吹风机吹干后置于空旷处, 放入镀膜机的腔室内, 其靶基距约为30 cm。处于工作状态后, 当真空室的本底真空度达到 $5 \times 10^{-3}$  Pa, 通入氩气至5 Pa, 调节直流偏压为200 V, 脉冲偏压为-600 V, 占空比为60%, 对样品进行辉光清洗15 min。之后调节气压至0.5 Pa, 镀银层时只通如氩气, 镀TiN时, 通入氩气与氮气的体积比为1:5, 根据设置的偏压进行镀膜。顺序为: TiN(5 min)-Ag(1 min)-TiN(5 min)-Ag(1 min)-TiN(5 min)-Ag(1 min)-TiN(5 min)-Ag(1 min)-TiN(5 min)-Ag(5 min), 共10层, 最外层为单质银。因为单质银较容易氧化, 故镀膜完成后立刻进行抽真空压膜分装保存, 环氧乙烷灭菌后, 使用时方可取出。

**1.4.2 MC3T3-E1细胞的培养** 将MC3T3-E1细胞培养于 $\alpha$ -MEM培养基中(含1%抗生素, 体积分数10%灭活胎牛血清), 放置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的恒温培养基中, 二三天进行1次换液, 当细胞达到90%以上融合后进行传代。

**1.4.3 载TiN/Ag多层复合结构钛表面对MC3T3-E1细胞骨架及黏附的影响**

**细胞接种:** 取光滑钛片、酸蚀喷砂钛片、载TiN/Ag多层复合结构钛片各5片, 分别记为光滑组、酸蚀喷砂组及载银涂层组, 分装在24孔板中。MC3T3-E1细胞培养3代后, 当细胞生长到对数期时进行细胞计数, 以每孔 $2 \times 10^4$ /well接种到各组钛片上, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱孵育24 h。

**罗丹明鬼笔环肽染色:** 细胞接种24 h后, 彻底吸掉培养基, 用37 °C预热的1×PBS(pH=7.4)清细胞2次, 每次5 min, 40 g/L多聚甲醛溶液固定细胞10 min; 用PBS清洗细胞二三次, 每次10 min; 用0.5% TritonX-100溶液通透化处理5 min; 取配置好的罗丹明鬼笔环肽工作液, 用移液枪滴加到各组钛片表面, 每孔200  $\mu$ L, 然后每孔滴加1 mL BSA封闭液封闭, 室温避光孵育1 h; PBS浸洗5 min, 室温下以配置好的Heochest33342细胞核染色, 每孔加入300  $\mu$ L, 室温下避光30 min, PBS浸洗5 min; 荧光封闭剂封固, 激光共聚焦显微镜下观察各组钛片表面的细胞黏附、铺展情况<sup>[13]</sup>。

**1.4.4 载银纯钛复合结构表面对MC3T3-E1细胞生长形态的影响**

**细胞的准备与固定:** 取光滑钛片、酸蚀喷砂钛片、载TiN/Ag多层复合结构钛片各3片, 分别记为光滑组、酸蚀喷砂组及载银涂层组, 分装在24孔板中。细胞培养同上, 将对数生长期的MC3T3-E1细胞进行细胞计数, 然后以 $2 \times 10^4$ /well接种到钛片表面, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱孵育24 h, 然后吸掉培养基, PBS浸洗三四次, 每次5 min。用2.5%戊二醛浸泡各组钛片, 然后用封口胶将材料

封闭, 置于4-8 °C的冰箱中存放, 进行细胞固定。

**细胞梯度脱水冻干与形态观察:** 将上述固定液吸净, 清洗2遍, 进行细胞梯度脱水, 方法如下: 体积分数30%乙醇浸泡2次, 每次8 min; 体积分数50%乙醇浸泡2次, 每次8 min; 体积分数70%乙醇浸泡3次, 每次10 min; 体积分数90%乙醇浸泡3次, 每次15 min; 体积分数100%乙醇浸泡3次, 每次17 min。然后进行梯度置换: 乙醇与叔丁醇(体积比3:1)浸泡钛片1次, 每次15 min; 乙醇与叔丁醇(体积比2:2)浸泡钛片1次, 每次15 min; 乙醇与叔丁醇(体积比1:3)浸泡钛片1次, 每次15 min; 乙醇与叔丁醇(体积比0:1)浸泡钛片1次, 每次15 min; 梯度置换完毕。在最后一步将叔丁醇吸净后, 将钛片放入叔丁醇冻干机的小钢管中加入叔丁醇, 没过样品即可, 放入冰箱冷冻层中, 冷冻30 min, 待叔丁醇凝固取出放入D109冷冻干燥机干燥, 12 h后取出<sup>[14]</sup>。

**扫描电镜观察细胞生长形态观察:** 载有的钛片冻干后细胞在扫描电镜下观察形貌, 首先进行样品制备, 将钛片用导电胶黏结于工作台上, 然后喷金60 s, 然后扫描电镜下进行观察。

**1.4.5 CCK-8检测细胞增殖**

**细胞接种:** 将处于对数生长期的MC3T3-E1细胞, 用0.25%胰蛋白酶消化下来, 用 $\alpha$ -MEM培养基(含体积分数10%血清, 1%双抗)配置成细胞悬液, 以每孔 $5 \times 10^3$ /well分别接种到光滑组、酸蚀喷砂组及载银涂层组钛片表面, 每组钛片设置5个平行样。然后将培养板放到孵育箱中孵育。空白对照组不加入钛片, 单独进行细胞培养。

表 1 细胞相对增殖率与细胞毒性分级的关系

Table 1 Correlation between relative growth rate of cells and cytotoxicity grading

评分	毒性	相对增殖率
0级	无毒性	$\geq 100\%$
1级	无毒性	75%-99%
2级	轻度毒性	50%-74%
3级	中毒毒性	25%-49%
4级	重度毒性	1%-24%
5级	重度毒性	0

**细胞增殖检测:** 培养24, 48, 72 h后, 吸净培养基, 将预先配置好的CCK-8工作液加入各孔中, 每孔500  $\mu$ L。CO<sub>2</sub>孵育箱中孵育4 h, 达到孵育时间后, 每孔抽取100  $\mu$ L, 用移液枪将液体从24孔板移入96孔板中, 用多功能酶标仪检测每孔在450 nm波长处的A值<sup>[15]</sup>。通过下列公式计算相对相对增殖率, 相对增殖率=实验组A值/空白对照组A值 $\times 100\%$ , 最后根据相对增殖率均值按以下评分标准对材料评定毒性程度<sup>[16]</sup>, 见表1。

**1.4.6 细胞live/dead染色** 首先, 将处于对数生长期的MC3T3-E1细胞用0.25%胰蛋白酶消化下来, 用 $\alpha$ -MEM培养基(含体积分数10%血清, 1%双抗)配置成细胞悬液, 然后将细胞悬液进行细胞计数, 以 $2 \times 10^4$ /well接种到装有光滑组、酸蚀喷砂组及载银涂层组钛片的24孔板中, 每组设3

个平行样,放入孵箱中孵育24 h,孵育结束后取出,吸净培养基,用PBS浸洗3次,每次5 min,每孔滴加300  $\mu$ L活死染色液(每2  $\mu$ L染液加入1 mL PBS稀释),室温下培养15 min,吸净染色液,PBS清洗3次,每次5 min,清洗后的钛片每片滴加20  $\mu$ L荧光淬灭剂,盖玻片封固,在激光共聚焦显微镜下观察细胞活死<sup>[17-18]</sup>。

#### 1.4.7 抑菌实验

**实验菌株的培养:**将复苏冻干的金黄色葡萄菌株接种于LB琼脂平板上,在37  $^{\circ}$ C需氧状态下培养24 h,涂片染色后形态学观察为纯培养物后,将菌株均匀接种于LB琼脂平板上,需氧(体积分数为20%O<sub>2</sub>)条件下培养24 h,经鉴定为纯培养物,无其他杂质后备用。

**培养基和菌液的准备:**用接种环将培养皿上的金葡萄接种到10 mL LB液体培养基中,用加样枪充分吹打混匀后,取2细菌悬液进行比浊,根据比浊后结果将剩余金黄色葡萄浓度调整至 $5 \times 10^7$  CFU/mL,液体LB培养基加入适量琼脂,放入灭菌蒸锅中加热,取出后倒入培养皿中冷却,备用。

**接触法检测抗菌性能:**分别取光滑组、酸蚀喷砂组、载银涂层组钛片,每组各6片,分别置于灭菌干燥平皿中,各取30  $\mu$ L菌悬液滴加于钛片表面,再用圆形盖玻片轻轻覆盖钛片表面,以使菌液均匀散开,但勿溢出,然后将其放入细菌培养箱中培养16 h,取出后进行细菌活死染料染色,激光共聚焦显微镜下观察。

**1.5 主要观察指标** ①接种后24 h,3组钛片表面MC3T3-E1细胞的黏附、活化情况及生长形态;②接种后24,48,72 h,3组钛片表面MC3T3-E1细胞增殖及毒性分级;③抑菌实验中,与细菌接触16 h后,3组钛片表面的细菌生长情况。

**1.6 统计学分析** 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,采用SPSS 20.0 软件处理,多组间比较采用单因素方差分析,两独立样本的资料采用Student's双尾t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 不同材料表面的形貌观察** 扫描电镜下观察获得3组材料的表面微观结构,光滑组钛片表面粗糙度只有0.3  $\mu$ m;酸蚀喷砂组表面可见相对均匀的空隙,直径为4-6  $\mu$ m,凹坑状的空隙上有小的突起,平均粗糙度为(4.2 $\pm$ 0.10)  $\mu$ m;载银涂层组表面可见均匀分布的单质银覆盖在钛片表面(图1)。

**2.2 激光共聚焦下观察钛片表面细胞骨架形态、黏附及铺展情况** 第4代MC3T3-E1细胞生长良好,形态均一,可用于后续实验研究,见图2。

荧光显微镜观察显示,光滑组钛片表面的MC3T3-E1细胞呈现两极或三极的纺锤状结构,F-肌动蛋白和丝状伪足表达量较少,类似于正常生长的成纤维细胞;与光滑组不同,酸蚀喷砂组与载银涂层组钛片表面的MC3T3-E1细胞分散附着排布,方向不同,形成大量丝状伪足,相互交织融合在一起,形成细胞角状突起,两组钛片上的细胞铺展都比较充分,且载银涂层组优于酸蚀喷砂组,酸蚀喷砂

组与载银涂层组的F-肌动蛋白明显高表达,肌动蛋白纤维较粗,聚合度高,说明酸蚀喷砂组与载银涂层组钛片上的细胞黏附优于光滑组(图3)。

**2.3 扫描电镜下观察细胞形态与结构** 为了检测MC3T3-E1细胞在三组钛片表面的形态,细胞在钛片生长24 h后扫描电镜下观察,可见光滑组钛片表面细胞呈纤细的形态,细胞黏附与铺展不够充分;酸蚀喷砂组和载银涂层组钛片上的细胞铺展黏附良好,单位面积铺展大,细胞状态较好(图4)。这与激光共聚焦显微镜下观察到的结果一致。

**2.4 CCK-8检测3组材料的细胞增殖与毒性** 培养24 h后,除酸蚀喷砂组细胞生长略高外,各组细胞生长活力相似;培养48,72 h后的细胞生长情况见图5。培养72 h后,各组材料表面细胞活力呈现如下趋势,空白对照组>光滑组 $\geq$ 酸蚀喷砂组>载银涂层组。各实验组相同时间点细胞活力无统计学差异,空白对照组培养48,72 h的细胞活力高于3实验组( $P < 0.05$ );载银涂层组钛片表面3个时间点的细胞活力存在显著差异( $P < 0.01$ ),细胞长势良好,增殖明显。各组根据表1的分级,3实验组细胞培养72h的细胞毒性均为1级,无细胞毒性(表2),载银复合结构表面未产生细胞毒性,未影响细胞生物学行为。

表2 各组培养不同时间点的细胞毒性分级比较

Table 2 Cytotoxicity grading of samples at different culture time

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0 级	0 级	0 级
光滑组	1 级	1 级	1 级
酸蚀喷砂组	1 级	1 级	1 级
载银涂层组	1 级	1 级	1 级

**2.5 活死染色观察细胞存活结果** 细胞活死染色结果显示,各组细胞几乎未出现红色区域,表明细胞活力良好,未出现死亡现象,从细胞形态可看出,载银涂层组细胞形态良好,充分铺展在钛片表面,具有良好的细胞活性(图6)。

**2.6 活死染色观察细菌存活结果** 细菌活死染色结果显示,光滑组和酸蚀喷砂组钛片表面几乎全被绿色区域覆盖,表明金黄色葡萄球菌在其表面长势良好;载银涂层组表面细菌出现大面积死亡,红色区域面积高于90%(图7),结果表明载银组钛片对金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用。

## 3 讨论 Discussion

自从20世纪70年代Branemark教授和Schroeder教授提出“骨整合”概念以来<sup>[19-20]</sup>,纯钛材料在齿科作为种植植入材料越来越受到口腔科医生的关注,纯钛因其良好的生物相容性及抗腐蚀性能已被作为齿科植入材料在临床上应用了几十年之久<sup>[21-22]</sup>。无论是体内还是体外,材料表面毋庸置疑成为最先与组织活细胞最早接触的区域,但钛材料也有其相应的缺陷,如无抗菌性、生物活性低、成骨周期长等<sup>[23]</sup>。因此钛表面改性成为促进骨整合的重要手段。在钛表面建立一种能促进细胞早期黏附、增殖、分化且无细胞毒性抑菌效果明显的界面至关重要,因此种植体表面改性涂层技术成为研究热点。



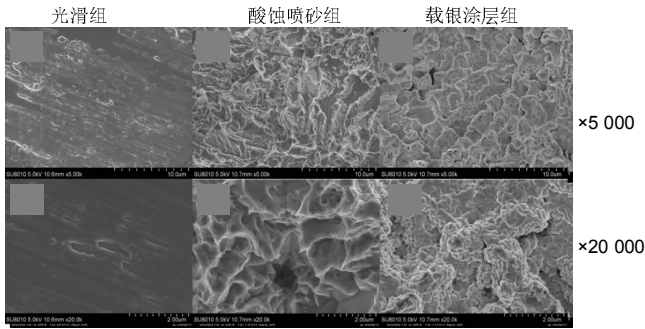


图1 扫描电镜观察各组材料基底部形貌图片  
Figure 1 Scanning electron microscope images of the material base in each group

图注：光滑组钛片表面粗糙度只有 0.3 μm；酸蚀喷砂组表面可见相对均匀的空隙，直径为 4-6 μm，凹坑状的空隙上有小的突起，平均粗糙度为(4.2±0.10) μm；载银涂层组表面可见均匀分布的单质银覆盖在钛片表面。

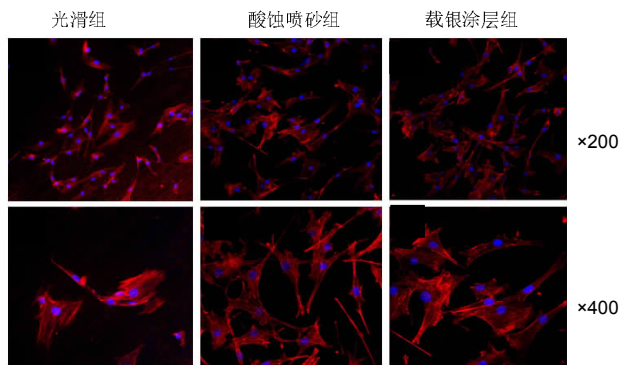


图3 激光扫描共聚焦显微镜观察各组钛片表面的 MC3T3-E1 细胞骨架(罗丹明-鬼笔环肽染色)

Figure 3 Confocal laser scanning microscope images of MC3T3-E1 cytoskeleton on different titanium surfaces (rhodamine-phalloidine staining)

图注：光滑组钛片表面的细胞呈现两极或三极的纺锤状结构，F-肌动蛋白和丝状伪足表达量较少；酸蚀喷砂组与载银涂层组钛片表面的细胞分散附着排布，方向不同，形成大量丝状伪足，融合成细胞角状突起，细胞铺展较充分，且载银涂层组优于酸蚀喷砂组，两组 F-肌动蛋白明显高表达，肌动蛋白纤维较粗，聚合度高。

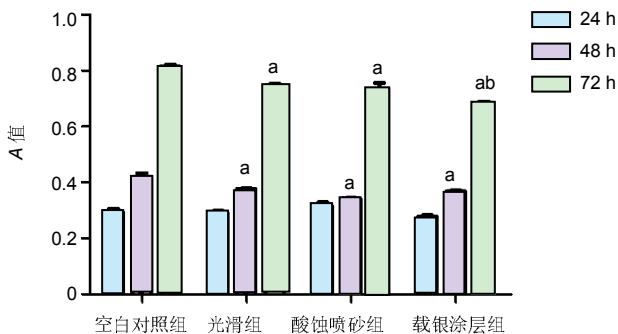


图5 各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞增殖  
Figure 5 The proliferation of MC3T3-E1 cells on different titanium surfaces

图注：与空白对照组比较，<sup>a</sup>P < 0.05；与同组 24, 48 h 比较，<sup>b</sup>P < 0.01。

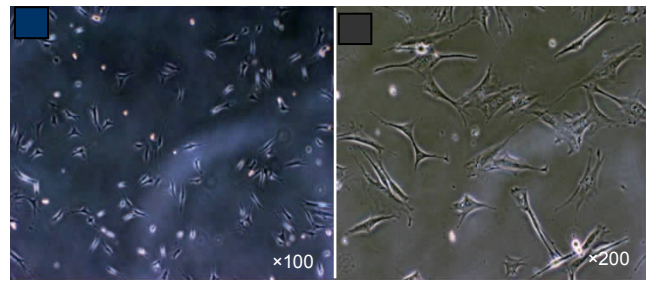


图2 第4代 MC3T3-E1 细胞  
Figure 2 Fourth generation of MC3T3-E1 cells  
图注：细胞生长良好，形态均一。

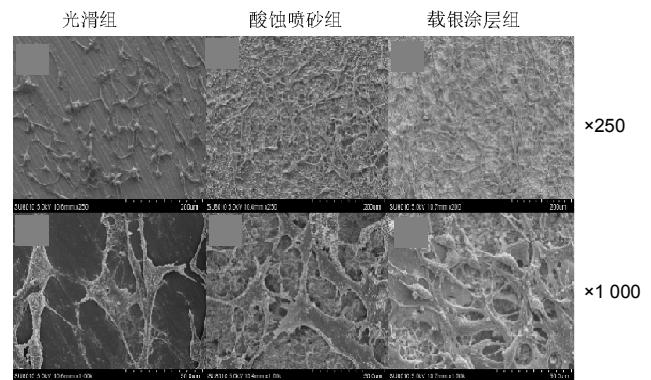


图4 扫描电镜观察各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞形态  
Figure 4 Scanning electron microscope images of cellular morphology of MC3T3-E1 cells on different titanium surfaces  
图注：光滑纯组钛片表面细胞呈纤细的形态，细胞黏附与铺展不够充分；酸蚀喷砂组和载银涂层组钛片上的细胞铺展黏附良好，单位面积铺展大，细胞状态较好。

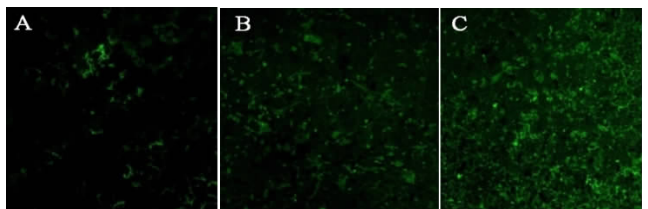


图6 细胞活死染色观察各组钛片表面 MC3T3-E1 细胞行为(×100)  
Figure 6 Behavior of MC3T3-E1 cells on different titanium surfaces (live/dead staining, ×100)

图注：图中 A-C 分别为光滑组、酸蚀喷砂组、载银涂层组钛片，各组细胞生长状态良好，均无死细胞，载银涂层组细胞形态良好，充分铺展在钛片表面。

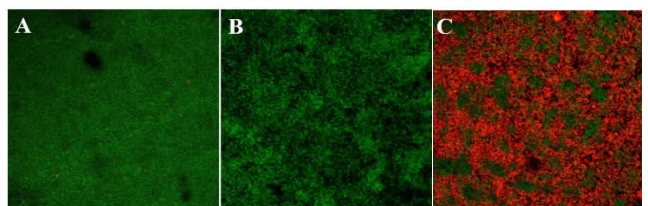


图7 活死染色观察金黄色葡萄球菌在各组钛片表面的行为(×100)  
Figure 7 Live/dead staining of *Staphylococcus aureus* on different titanium surfaces (×100)

图注：图中 A-C 分别为光滑组、酸蚀喷砂组、载银涂层组钛片，光滑组和酸蚀喷砂组钛片表面几乎全被绿色区域覆盖，表明金黄色葡萄球菌长势良好；载银涂层组表面细菌出现大面积死亡，红色区域面积高于 90%。

作为抑菌材料, 纯钛表面各种形式的银涂层被广泛应用<sup>[24]</sup>。最常用的两种方式为银离子注入技术和离子镀技术, 而表面改性常用的方式为酸蚀喷砂和微弧氧化等<sup>[25-27]</sup>。此次实验采用酸蚀喷砂技术在纯钛表面进行表面改性, 形成均匀的4-6 μm的孔隙, 在此基础上采用多弧离子镀技术进行TiN/Ag交替镀膜, 共10层, 最外层为5 min的银涂层。

运用薄膜技术(包括离子镀技术)得到的微纳米多层膜, 由于多层膜的界面更能够阻止柱状晶粒的长大及各种缺陷的滑移生长, 释放了聚集的应力, 并在小纳米周期范围内发生了性能异常升高的现象, 因此纳米多层膜比单层膜晶粒更小、质地更均匀、致密, 因此其抗腐蚀性、耐磨性及与基底材料的附着能力与单层膜相比得到明显提高。此次研究利用多弧离子镀技术在纯钛表面进行TiN/Ag多层膜表面改性, 这一涂层的设计保证了多层膜复合结构的机械性能<sup>[28-30]</sup>, 多层膜的银结构保证了材料的即时和长效抗菌性。此次实验主要探讨银改性涂层的生物性能。由于多弧离子镀技术不能很好的控制银的量, 所以根据以往经验, 用设定时间的方法来控制银的量<sup>[18, 31]</sup>。

银作为抗菌剂使用已有将近1个世纪的历史, 自古以来人们用银质的器具饮食及银汞合金作为齿科充填材料均未有出现不良反应的报道。单质银无细胞毒性, 但其在溶液中释放出的银离子既能杀灭细菌, 也可能对细胞产生毒性。银产生细胞毒性的机制尚不完全清楚, 但其推测有以下两种说法<sup>[32-33]</sup>: 一种是银颗粒在溶液中释放银离子, 银离子产生细胞毒性, 其机制与纳米银产生细胞毒性的原理相似; 另一种观点认为银离子可以胞吞的方式进入细胞, 并与细胞的细胞器产生效应, 干扰细胞的功能, 影响细胞的正常生理功能, 最终可能导致细胞死亡。研究表明, 银制剂的细胞毒性及免疫毒性与银颗粒的大小、暴露长度有直接关系。较常见的例子为不同粒径的纳米银对细胞产生的毒性也不尽行同<sup>[34-35]</sup>。刘玉等<sup>[36]</sup>通过研究20-40 nm银体外生物安全性能评价指出, 20-40 nm银对人牙龈成纤维细胞具有良好的体外生物安全性。Bouallegui等<sup>[37]</sup>通过实验比较小于50 nm与小于100 nm粒径纳米银的细胞毒性, 结果发现更小粒径的银具有更大的细胞毒性。而此次实验采用多弧离子镀技术制备TiN/Ag涂层, 由于微纳米多层膜的晶格结构与界面效应使膜具有良好的理化性能, 尽管银的量较大但多以单质形式存在, 且银单质颗粒的粒径较大, 不易脱落, 不会对细胞产生不良影响。

正常细胞遇到毒性物质时形态会发生相应改变, 相应的生物学行为也会发生改变<sup>[34, 38]</sup>, 因此可通过检测细胞的生物学行为变化及细胞毒性来验证载银涂层钛片的生物学性能。此次实验将MC3T3-E1细胞接种于3组钛片表面, 发现3组材料皆无细胞毒性。单质银涂层表面并未对细胞生物学行为造成影响。尽管72 h观察载银涂层组钛片的细胞增殖量略低于其他3组, 但载银涂层组3个时间点的细胞增殖组间存在统计学差异, 且无细胞毒性。说明载银涂层组钛片具备初步的生物安全性。设想在今后的实验中逐渐减小银的含量, 诸如最外层进行3 min离子镀膜, 再观察其细胞毒性及生物安全性, 可能对细胞的生长增殖朝向更有利的

趋势发展。

成骨细胞早期黏附增殖是细胞成骨的关键步骤, 也是骨结合成功的关键<sup>[39-40]</sup>。此次研究显示, 酸蚀喷砂纯钛表面加入银这一元素后, 细胞形态功能、早期黏附等一系列指标均未受到影响, 激光共聚焦显微镜下观察载银涂层钛片表面细胞铺展充分, 黏附良好, 细胞伪足明显, F-肌动蛋白高表达, 扫描电镜下观察载银涂层组细胞形态良好铺展充分, 伪足交织在一起, 与激光共聚焦显微镜下观察具有一致性, 且无细胞毒性。

人们在关注纳米银独特抗菌活性的同时, 也会担心含银涂层植入体内引起的生物毒性问题。从长期使用结果来看, 一般认为在控制剂量及确定有效性条件下使用银是安全的。也就是说此次研究中TiN/Ag多层膜的牙种植体只要控制银的释放在安全剂量以下并能起到良好的抑菌效果即可。此次研究制备TiN/Ag多层膜改性的纯钛表面虽然具有银镀层, 但由于银离子的析出量较低, 因此没有表现出明显的细胞毒性。

此次实验虽然验证自主设计的载银复合多层结构有较好的生物学性能, 但仍有几个问题需要进一步探讨: ①多弧离子镀技术常用工业器具的镀膜, 首次用此技术模拟种植体表面涂层远期效果还要通过体内动物实验进一步加以验证; ②实验中载银涂层组细胞增殖略低于其他各组但无细胞毒性, 光滑组钛片表面细胞增殖高于酸蚀喷砂组。目前已有较多研究表明与光滑钛表面相比, 粗糙钛表面上的细胞增殖速度明显下降, 这与本实验结果一致。认为这可能是由于与粗糙表面接触的骨含量相对少引起的。由于载银复合结构的制备是基于酸蚀喷砂表面产生的, 因此作者大胆推测载银涂层组细胞增殖略低于其他3组与改性后的酸蚀喷砂表面有密切关系, 但还需进一步印证; ③复合结构最外层全部为单质银覆盖, 由于银的机械强度较低, 出于涂层机械强度考虑, 今后的研究方向会逐步向TiN/Ag交互掺杂的方式倾斜, 早日将此项涂层技术应用到种植体表面, 继而为新型齿科种植体材料的研发提供新的思路。

**致谢:** 感谢天津师范大学赵梦鲤老师、张川同学、龚焱焱同学给予的大力帮助和技术支持。

**作者贡献:** 实验设计、实施为第一、二作者, 资料收集为第三、四、五作者, 审核为第六、七作者。

**经费支持:** 该文章接受了“国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2015AA034702)”、“国家重点研发计划课题(2016YFC1100302)表面改性对生物材料综合性能的影响; 天津市应用基础与前沿技术研究计划(重点项目)课题(15JCZDJC38200)”、“天津市卫计委科技基金课题(2015KZ094)”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:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 研究用材料科学的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**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进行编辑、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] 杨晓丰,刘帆,刘奕,等.医用钛材料表面改性研究进展[J].临床口腔医学杂志,2016,32(9):569-571.
- [2] 焦艳军,王珏,潘福勤,等.纯钛种植体的2种表面处理对细菌黏附能力的影响[J].实用口腔医学杂志,2009,25(2):166-169.
- [3] Besinis A,Hadi SD,Le H.R,et al.Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings.Nanotoxicology. 2017;11(3):327-338.
- [4] Zhao L,Chu PK,Zhang Y,et al.Antibacterial coatings on titanium implants.J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;91(1):470-480.
- [5] Vimbela GV,Ngo SM,Fraze C,et al.Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. Int J Nanomedicine.2017;12:3941-3965.
- [6] Rossi MC,Bezerra FJB,Silva RA,et al.Titanium-released from dental implant enhances pre-osteoblast adhesion by ROS modulating crucial intracellular pathways.J Biomed Mater Res A.2017;105(11):2968-2976.
- [7] Fernandes GV,Cavagis AD,Ferreira CV,et al.Osteoblast adhesion dynamics: a possible role for ROS and LMW-PTP.J Cell Biochem. 2014;115(6):1063-1069.
- [8] Arita S,Suzuki, M,Kazama-Koide M,et al.Shear bond strengths of tooth coating materials including the experimental materials contained various amounts of multi-ion releasing fillers and their effects for preventing dentin demineralization.Odontology.2017.doi: 10.1007/s10266-016-0290-1.[Epub ahead of print]
- [9] 才学敏,刘桐,唐慧琴,等.离子束辅助沉积TiN\_Ag多层膜的抗菌性和抗腐蚀性[J].核技术,2007,30(12):1028-1032.
- [10] 党超群,白雪冰,李金龙,等.TiSIN/Ag纳米多层涂层的抗菌及摩擦学性能研究[J].摩擦学学报,2017,37(1):1-10.
- [11] 黄美东,李云珂,王萌萌,等.多弧离子镀沉积TiAIN\_TiN多层膜的结构与性能[J].天津师范大学学报(自然科学版),2015,35(1):26-29.
- [12] 姜雪峰,刘清才,王海波.多弧离子镀技术及其应用[J].重庆大学学报(自然科学版),2006,29(10):55-57,68.
- [13] 杜娟,姜焕焕,莫嘉骥,等.钛表面形貌和亲水性表面对成骨细胞增殖分化的影响[J].中国口腔颌面外科杂志,2012,10(3):182-187.
- [14] Wu P,Gao H,Sun J,et al.Biosorptive dehydration of tert-butyl alcohol using a starch-based adsorbent: characterization and thermodynamics.Bioresour Technol.2012;107:437-443.
- [15] Tomankova K,Horakova J,Harvanova M,et al.Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro.Food Chem Toxicol.2015;82:106-115.
- [16] Abbas HK,Yoshizawa T,Shier WT.Cytotoxicity and phytotoxicity of trichothecene mycotoxins produced by Fusarium spp.Toxicon. 2013;74:68-75.
- [17] Miao X,Wang D,Xu L,et al.The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: a systematic study.Int J Nanomedicine.2017;12:1415-1430.
- [18] Qin H,Cao H,Zhao Y,et al.In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium.Biomaterials.2014; 35(33):9114-9125.
- [19] Ye L.Current dental implant design and its clinical importance. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.2017;35 (1):18-28.
- [20] 邵磊,赵宝红.钛种植体骨结合界面组织学研究进展[J].中国实用口腔科杂志,2014,7(7):440-445.
- [21] Ma Z,Li M,Liu R,et al.In vitro study on an antibacterial Ti-5Cu alloy for medical application.J Mater Sci Mater Med.2016;27(5):91.
- [22] Vahabzadeh S,Roy M,Bandyopadhyay A,et al.Phase stability and biological property evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings for orthopedic and dental applications.Acta Biomater. 2015;17: 47-55.
- [23] 莫尊理,胡葱葱,王雅雯,等.抗菌材料及其抗菌机理[J].材料导报,2014,28(1):50-52,90.
- [24] Qin H,Zhu C,An Z,et al.Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human urine-derived stem cells at noncytotoxic concentrations.Int J Nanomedicine.2014;9:2469-2478.
- [25] Roy M,Pompella A,Kubacki J,et al.Photofunctionalization of dental zirconia oxide: Surface modification to improve bio-integration preserving crystal stability.Colloids Surf B Biointerfaces. 2017;156: 194-202.
- [26] Okazaki Y,Doi K,Oki Y,et al.Enhanced Osseointegration of a Modified Titanium Implant with Bound Phospho-Threonine: A Preliminary In Vivo Study.J Funct Biomater.2017;8(2).pii: E16. doi: 10.3390/jfb8020016.
- [27] Meng HW,Chien EY,Chien HH.Dental implant bioactive surface modifications and their effects on osseointegration: a review. Biomark Res.2016;4:24.
- [28] 胡敏,刘莹,赖珍莹,等.磁控溅射TiN薄膜的工艺及电学性能研究[J].功能材料,2009,40(2):222-225.
- [29] 袁建鹏.钛合金表面多弧离子镀TiAIN薄膜微观组织结构及性能研究[J].热喷涂技术,2012,4(3):84-88.
- [30] 赵时璐,张钧,刘常升.多弧离子镀(Ti,Al,Zr,Cr)N多组元氮化物膜的研究[J].真空科学与技术学报,2009,29(6):707-711.
- [31] Qiao S,Cao H,Zhao X,et al.Ag-plasma modification enhances bone apposition around titanium dental implants: an animal study in Labrador dogs.Int J Nanomedicine.2015;10:653-664.
- [32] 汤京龙,王硕,刘丽,等.纳米银颗粒的细胞毒性作用及机制初探[J].北京生物医学工程,2013,32(5):485-489.
- [33] 刘泉,黄文,熊颖铭,等.纳米银改性钛片细胞生物毒性实验研究[J].现代口腔医学杂志,2014,28(4):214-217.
- [34] Dong F,Mohd Zaidi NF,Valsami-Jones E,et al.Time-resolved toxicity study reveals the dynamic interactions between uncoated silver nanoparticles and bacteria.Nanotoxicology.2017;11(5):637-646.
- [35] Dong F,Valsami-Jones E,Krefl JU.New,rapid method to measure dissolved silver concentration in silver nanoparticle suspensions by aggregation combined with centrifugation.J Nanopart Res. 2016;18(9):259.
- [36] 刘玉,尹伟,史春.20-40nm银的体外生物安全性研究[J].口腔医学研究,2015,31(2):120-122.
- [37] Bouallegui Y,Ben Younes R,Turki F,et al.Effect of exposure time, particle size and uptake pathways in immune cell lysosomal cytotoxicity of mussels exposed to silver nanoparticles.Drug Chem Toxicol. 2017:1-6.
- [38] Foldbjerg R,Dang DA,Astrup H.Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line,A549.Arch Toxicol.2011;85(7):743-750.
- [39] Umeda H,Mano T,Harada K,et al.Appearance of cell-adhesion factor in osteoblast proliferation and differentiation of apatite coating titanium by blast coating method.J Mater Sci Mater Med.2017;28(8): 112.
- [40] 于卫强,徐玲,张富强.TiO<sub>2</sub>纳米管对MC3T3-E1前成骨细胞骨功能基因表达变化的影响[J].口腔医学研究,2011,27(2):101-104.