

新型镁合金支架材料的体外抑菌性能

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3151>王亮¹, 郭玉兴¹, 吴训¹, 黄华², 袁广银², 张雷¹

2095-4344.3151

投稿日期: 2020-03-06

送审日期: 2020-03-11

采用日期: 2020-05-16

在线日期: 2020-10-21

中图分类号:

R459.9; R318.08; R608

文章编号:

2095-4344(2021)16-02506-08

文献标识码: A

文章快速阅读:

材料:

新型生物医用
镁合金支架。

方法:

验证镁合金材料抑菌
性能,探索抑菌机制。

- (1) 抑菌活性测定实验;
- (2) 细菌形态观察实验;
- (3) 细菌外碱性磷酸酶含量测定实验;
- (4) 电导率测定实验;
- (5) 细菌外 K⁺ 含量测定实验;
- (6) 细菌外核酸、蛋白质含量测定实验;
- (7) 细菌内核酸、蛋白质含量测定实验。

文章特点一

探讨生物医用可降解多孔镁合金支架材
料的抑菌性能及可能机制。

结论:

- (1) 新型生物医用镁合金材料早期抑菌效果显著;
- (2) 其抑菌机制可能是影响了细胞膜的完整性及菌体内蛋白质与核酸的合成。

结果:

- (1) 新型生物医用镁合金材料对细菌增长数量及形态均有影响;
- (2) 材料浸提液对细菌外环境电导率、K⁺ 含量、细菌内核酸及蛋白质含量有显著影响。

文题释义:

新型生物医用镁合金支架材料: 针对颌骨缺损设计的可降解金属修复支架材料,以Mg元素为主体,加入了Nd、Zn、Zr等元素,既有金属的优良机械学性能又可缓慢均匀降解,避免二次手术取出问题。

摘要

背景: 研究已证实部分生物医用镁合金产品具备抑菌性能,但是具体抑菌机制尚不明确。

目的: 探讨新型生物医用镁合金支架材料的体外抑菌性能及可能抑菌机制。

方法: 制取新型镁合金支架材料浸提液,以大肠杆菌及金黄色葡萄球菌为实验菌,通过浸提液接触培养的方式定量评估材料的相对抑菌率,通过扫描电镜观察细菌形态定性评估材料的抑菌性能,通过接触培养方式检测碱性磷酸酶、电导率、钾离子、细菌内外核酸及蛋白质含量等指标,初步探索新型镁合金支架材料可能的抑菌机制。

结果与结论: ①新型镁合金支架材料浸提液在与细菌接触培养的12 h内,对大肠杆菌的抑菌率在56.23%~79.72%之间,对金黄色葡萄球菌的抑菌率在62.34%~76.07%之间;②扫描电镜显示,与材料浸提液接触培养的两种细菌形态皱缩,体积变小,分布稀少;③材料浸提液对两种细菌细胞外环境中的碱性磷酸酶含量无影响,提高了两种细菌细胞外环境中的电导率、钾离子含量;④材料浸提液对大肠杆菌细胞外环境中的核酸与蛋白质含量无影响,提升了金黄色葡萄球菌细胞外环境中的核酸与蛋白质含量;⑤材料浸提液可抑制两种细菌内的核酸含量,对大肠杆菌细胞内可溶性蛋白含量无影响,抑制金黄色葡萄球菌细胞内可溶性蛋白合成;⑥结果表明,新型镁合金支架材料在体外具有一定的抑菌性能,对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于大肠杆菌,其抑菌机制可能是破坏了细菌细胞膜的通透性,影响了细菌内核酸及蛋白质的合成。

关键词: 骨; 植入物; 支架材料; 镁合金; 抑菌性; 抑菌机制

Antibacterial properties of Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds *in vitro*Wang Liang¹, Guo Yuxing¹, Wu Xun¹, Huang Hua², Yuan Guangyin², Zhang Lei¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China; ²National Engineering Research Center of Light Alloys Net Forming, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Wang Liang, Master candidate, Physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China

Corresponding author: Zhang Lei, Chief physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China

Abstract

BACKGROUND: It has been confirmed that some biomedical magnesium alloy products have antibacterial properties, but the specific antibacterial mechanism

¹北京大学口腔医院口腔颌面外科,北京市 100081; ²上海交通大学轻合金精密加工成型国家工程中心,上海市 200240

第一作者: 王亮,男,1991年生,河北省保定市人,汉族,北京大学口腔医学院在读硕士,医师,主要从事新型颌骨缺损修复镁合金材料的生物学性能研究。

通讯作者: 张雷,主任医师,北京大学口腔医院口腔颌面外科,北京市 100081

<https://orcid.org/0000-0002-5333-945X> (王亮)

基金资助: 科技部重点研发计划子课题(2016YFC1102104),项目参与者: 张雷; 国家自然科学基金(51571143),项目负责人:

袁广银; 上海市卫生和计划生育委员会课题(201640281),项目参与者: 袁广银

引用本文: 王亮,郭玉兴,吴训,黄华,袁广银,张雷.新型镁合金支架材料的体外抑菌性能[J].中国组织工程研究,2021,25(16):2506-2513.



is still unclear.

OBJECTIVE: To investigate the antibacterial properties of biomedical Jiao Da Bio-Magnesium scaffold *in vitro* and explore possible mechanism.

METHODS: Jiao Da Bio-Magnesium porous scaffold material extract was prepared. As the most common bacteria causing orthopedic implants infection, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were selected for testing. The bacteriostasis rate was quantitatively evaluated by contact culture of the extraction solution. The bacteriostasis performance of the material was qualitatively evaluated by observing the bacterial morphology through scanning electron microscope. The alkaline phosphatase, conductivity, potassium ion, nucleic acid and protein content in bacterial extracellular liquid environment were detected. The possible antibacterial mechanism of Jiao Da Bio-Magnesium porous scaffold material extract was preliminarily explored.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The bacteriostasis rate of Jiao Da Bio-Magnesium porous scaffold extract cultured with *Escherichia coli* for 12 hours ranged from 56.23% to 79.72%, while the *Staphylococcus aureus* group ranged from 62.34% to 76.07%. (2) Under scanning electron microscope, wizened form, smaller volume and scarcer distribution were observed. (3) The material extract had no effect on the content of alkaline phosphatase in the extracellular environment of the two bacteria, but increased the electrical conductivity and potassium ion content in the extracellular environment of the two bacteria. (4) The material extract had no effect on the content of nucleic acid and protein in the extracellular environment of *Escherichia coli*, and increased the content of nucleic acid and protein in the extracellular environment of *Staphylococcus aureus*. (5) The material extract could inhibit the nucleic acid content of the two bacteria, but had no effect on the soluble protein content of *Escherichia coli* cells, and inhibited the synthesis of soluble protein in *Staphylococcus aureus* cells. (6) Results suggested that Jiao Da Bio-Magnesium porous scaffold material has certain antibacterial properties *in vitro*, and the inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* is stronger than that on *Escherichia coli*. The possible antibacterial mechanism is speculated that it can change the permeability of bacterial cell membrane and affect the synthesis of bacterial nucleic acids and proteins.

Key words: bone; implant; scaffold material; magnesium alloy; bacteriostasis; antibacterial mechanism

Funding: the Key Research and Development Sub-Project of Ministry of Science and Technology, No. 2016YFC1102104 (to ZL); the National Natural Science Foundation of China, No. 51571143 (to YGY); the Project of Shanghai Health and Family Planning Commission, No. 201640281 (to YGY)

How to cite this article: WANG L, GUO YX, WU X, HUANG H, YUAN GY, ZHANG L. Antibacterial properties of Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds *in vitro*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(16):2506-2513.

0 引言 Introduction

目前用于骨折及骨缺损修复辅助固定的生物植入材料主要是钛合金材料,其优良的机械学性能可提供良好的固位及支撑作用^[1],但是在伴有感染或污染的术区应用受到严格限制^[2]。因此,开发具有抑菌性能且兼具优良机械学性能、安全性能的生物植入材料是当前较为迫切的需求。近年来随着对生物医用可降解镁合金材料研究的日渐深入,发现其除具备可降解性能^[3-4]、安全性能^[5-6]、成骨性能外^[7-9],还具有抑菌性能^[10-11]。实验旨在评价新型生物医用镁合金支架材料的体外抑菌性能及可能的抑菌机制,为用于伴感染骨缺损植入材料的研发改进提供参考依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年10月至2019年3月在北京大学口腔医院中心实验室完成。

1.3 材料 新型镁合金支架材料的特性见表1^[12]。

表1 | 新型生物医用镁合金多孔支架材料概况

Table 1 | Introduction of Jiao Da Bio-Magnesium scaffold material

项目	新型镁合金支架材料
来源	上海交通大学轻合金精密成型国家工程研究中心袁广银教授课题组
材料成分	Mg质量百分比≥96%,融入少量Nd、Zn、Zr合金化
制备工艺	利用热压烧结工艺将球形NaCl颗粒制备成开放多孔支架模板;将液态镁合金材料渗透至NaCl模板中,固化后水浴浸出NaCl模板;经超声清洗、硝酸酒精蚀刻、表面氟化处理等步骤处理后备用
医用范围	目前只适用于体外实验及动物体内实验

实验用细菌与试剂:金黄色葡萄球菌(*S.aureus*, ATCC 6538),大肠杆菌(*E.coli*, ATCC 15922),菌种均来自于北京大学口腔医院中心实验室;Tryptone胰蛋白胨(英国OXOID);Yeast Extract酵母提取物(英国OXOID);氯化钠(上海国药沪试);碱性磷酸酶检测试剂盒(碧云天生物);钾测试盒(南京建成生物);DAPI染液、2.5%Gluta固定液(北京索莱宝);预染蛋白Marker(美国Thermo Fisher

Scientific); Tris base、Glycine、SDS(美国Sigma); Tween 20(Amresco); 5×还原样品缓冲液、考马斯亮蓝R250(北京凯诺塞斯)。

实验用主要设备:酶标仪(BioTek,美国);酸度计(Mettler,瑞士);扫描电子显微镜(S-4800,日本);电感耦合等离子体发射光谱仪(Agilent,美国);5021笔式电导率仪(三信仪表,中国);台式冷冻离心机(Eppendorf,德国);Mini P-4电泳槽(Cavoy,中国);电泳仪(Bio-rad,美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 镁合金支架材料浸提液的制备 参照GB/T16886.12中不规则形状固体器械表面积与浸提液体积比例0.2 g/mL^[13],浸提介质选用LB液体培养基,置于37℃、80 r/min恒温摇床内24 h后获得浸提液。浸提液经电感耦合等离子体发射光谱仪所测Mg²⁺质量浓度为206.8 mg/L,经酸度计测得pH值为10.3。

1.4.2 细菌数量(抑菌活性)测定实验 分别取对数生长期大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,用生理盐水洗涤2次^[14],按照表2分组,用各实验样液混悬至细菌浓度约1×10⁶ CFU/mL,转移至5 mL离心管中培养于37℃恒温摇床(200 r/min)中。培养的第3, 6, 9, 12, 24小时各取样100 μL至96孔板,用酶标仪测定波长在600 nm处的吸光度值(A值),每组实验重复3次;计算各时间点各实验样液的相对抑菌率^[15]。相对抑菌率=(对照组A值-实验组A值)/对照组A值×100%。

表2 | 抑菌活性试验各组分依据

Table 2 | Grouping basis of antibacterial activity test

组别	实验样液
A组	新型镁合金支架材料浸提液
B组	稀释至75%浓度的新型镁合金支架材料浸提液
C组	稀释至50%浓度的新型镁合金支架材料浸提液
D组	稀释至25%浓度的新型镁合金支架材料浸提液
E组	对照组, LB液体培养基

1.4.3 细菌形态观察实验 分别取对数生长期两种细菌悬液,洗涤后按照1.4.2分组配制浓度1×10⁶ CFU/mL的菌液。培养

24 h 各取 2 mL 菌液, 6 000 r/min 离心 5 min 后收集沉淀菌体, PBS 洗涤 2 次; 加入 2.5% 戊二醛 400 μL 混匀, 4 °C 固定过夜。再次 6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 冲洗 2 次, 体积分数 70%, 80%, 90% 及无水乙醇 (2 次) 各 10 min 梯度脱水^[16]; 无水乙醇 500 μL 重悬菌液, 取 100 μL 滴于载玻片, 烘干, 菌体干燥后喷金, 扫描电镜观察细菌表面形态。

另设新型镁合金支架材料与两种细菌分别共培养, 共培养 24 h 后观察材料表面附着细菌形态。2.5% 戊二醛固定完成后取出金属材料, PBS 冲洗表面 2 次, 并参照以上方法完成逐级脱水干燥等电镜前准备步骤。

1.4.4 细胞外碱性磷酸酶含量检测 通过测定菌液碱性磷酸酶含量变化评估细菌细胞壁完整性的改变。分别取对数生长期的两种细菌悬液, 根据实验样液分为 2 组: 实验组 (浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液) 和对照组 (LB 液体培养基), 用各实验样液混悬细菌浓度至 1×10^6 CFU/mL, 转移至 5 mL 离心管中, 培养于 37 °C 恒温摇床 (200 r/min) 中。培养 2, 4, 6, 8, 10 h 取菌液, 6 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 用碱性磷酸酶试剂盒按操作步骤测上清液 $A_{405\text{ nm}}$ 。

1.4.5 电导率检测 通过测定菌液电导率变化评估细菌生物膜通透性的改变。取对数生长期的两种细菌悬液, 按照与 1.4.4 相同分组配制浓度 1×10^6 CFU/mL 的菌液。培养 2, 4, 6, 8, 10 h 取菌液, 离心后取上清液, 检测各组菌液电导率值^[17]。

1.4.6 细胞外钾离子含量检测 通过测定释放至胞外的钾离子含量评估细菌细胞膜通透性改变。取对数生长期的两种细菌悬液, 按照与 1.4.4 相同分组配制浓度 1×10^6 CFU/mL 的菌液。培养 2, 4, 6, 8, 10 h 取菌液, 离心后取上清液, 采用钾离子测定试剂盒按照操作步骤测定上清液在波长 450 nm 处的吸光度值^[15]。

1.4.7 细胞外核酸、蛋白质等大分子含量检测 通过测定菌液中核酸、蛋白质含量变化评估细菌生物膜通透性的改变。取对数生长期额两种细菌悬液, 按照与 1.4.4 相同分组配制浓度 1×10^6 CFU/mL 的菌液。培养 2, 4, 6, 8, 10 h 取菌液, 离心后取上清液, 测量上清液样本在波长为 260 nm (核酸) 及 280 nm (蛋白质) 处的吸光度值^[17]。

1.4.8 细胞内核酸、蛋白质等含量检测 通过测定细菌细胞内核酸、蛋白质含量的变化评估新型生物医用镁合金多孔支架材料浸提液对细菌核酸及蛋白质的合成的抑制作用。取对数生长期的两种细菌悬液, 按照与 1.4.4 相同分组配制浓度 1×10^6 CFU/mL 的菌液, 转移至 15 mL 离心管中, 培养

于 37 °C 恒温摇床 (200 r/min) 中。培养 6, 12, 24 h 取菌液, 8 000 r/min 离心 5 min, 菌体经 PBS 洗涤离心后重新收集, 每样本取 100 mg 菌体, 用 0.5 mL 无菌水重悬, 取 50 μL 置于 96 孔板后加入 150 μL DAPI 染液, 立即用酶标仪检测波长在 364 nm (DNA) 和 400 nm (RNA) 处的吸光度值^[18], 每组实验重复 3 次; 每样本取 100 mg 菌体悬于 40 μL 无菌水, 按照 1 : 4 加入上样缓冲液, 煮沸 8 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 30 μL 上清液进行十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳实验^[15]。

1.5 主要观察指标 新型镁合金支架材料浸提液对两细菌细胞壁、细胞膜结构、细菌内外核酸及蛋白质含量的影响。

1.6 统计与分析 数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 抑菌活性检测结果 新型镁合金支架材料浸提液随稀释浓度的降低, 其相对抑菌率在各时间均降低, 详见表 3 及图 1。而且由结果可知新型生物医用镁合金多孔支架材料浸提液在与大肠杆菌及金黄色葡萄球菌接触的早期 (12 h) 内的抑菌作用强烈。

2.2 细菌形态观察结果 扫描电镜高倍视野下观察大肠杆菌为两端钝圆的短小杆菌, 一般大小为 0.5–3.0 μm, 常单个或成对存在; 金黄色葡萄球菌外形为球形, 一般直径 0.5–1.0 μm, 常多个成团分布, 排列呈葡萄球状。LB 液体培养基内生长的大肠杆菌及金黄色葡萄球菌形态饱满, 数量较多, 成堆存在; 随着新型生物医用镁合金多孔支架材料浸提液浓度的增加, 培养的细菌形态相较于对照组明显皱缩, 体积变小, 部分内容物泄露, 出现细胞碎片, 细胞分布数量相对稀少, 见图 2, 3。

对新型镁合金支架材料表面直接扫描电镜观察, 可见细菌形态体积相较于 LB 液体培养基中自然生长者明显缩小, 见图 4。而且相较于以往报道的在细菌混悬液环境培养 24 h 后钛合金材料表面细菌黏附分布情况^[19-20], 新型镁合金支架材料表面的细菌黏附数量明显稀少。该实验结果表明新型镁合金除有直接抑菌作用外, 还具有影响细菌在材料表面黏附、定植的作用。

2.3 细胞外碱性磷酸酶含量检测结果 当细胞壁完整性受损时, 位于细菌细胞壁和细胞膜之间的碱性磷酸酶可释放至胞外, 即细菌外液体环境中的碱性磷酸酶含量变化可反映细菌

表 3 | 新型镁合金支架材料浸提液对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, *n*=3, *A* 值)

Table 3 | Inhibitory effect of extracts from Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

组别	大肠杆菌					金黄色葡萄球菌				
	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
浓度 100% 浸提液组	0.053±0.003	0.059±0.006	0.075±0.006	0.095±0.027	0.270±0.002	0.056±0.002	0.077±0.002	0.108±0.002	0.168±0.003	0.321±0.002
浓度 75% 浸提液组	0.053±0.005	0.072±0.008	0.081±0.006	0.208±0.020	0.468±0.048	0.064±0.002	0.105±0.002	0.169±0.001	0.256±0.003	0.390±0.002
浓度 50% 浸提液组	0.064±0.003	0.160±0.017	0.230±0.013	0.368±0.011	0.560±0.005	0.089±0.002	0.183±0.002	0.282±0.003	0.386±0.003	0.552±0.003
浓度 25% 浸提液组	0.101±0.011	0.189±0.006	0.257±0.010	0.422±0.005	0.672±0.006	0.125±0.002	0.275±0.002	0.382±0.007	0.566±0.002	0.796±0.001
对照组	0.120±0.008	0.224±0.004	0.299±0.001	0.470±0.045	0.683±0.005	0.149±0.002	0.327±0.003	0.449±0.007	0.610±0.002	0.855±0.002

细胞壁结构的完整性。

无论是大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌, 实验组与对照组相同时间时细胞外液环境中的碱性磷酸酶含量比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 5。结果表明, 实验组大肠杆菌及金黄色葡萄球菌菌体外液体环境中碱性磷酸酶含量没有明显增高, 即新型生镁合金支架材料浸提液未对两种细菌细胞壁的完整性造成明显影响。

2.4 电导率检测结果 细菌在生长过程中与外界环境不断的进行物质交换, 包含 K^+ 、 Na^+ 等小分子物质及蛋白质、链状核苷酸等大分子物质, 这些带电物质的跨膜运动使细胞外液体环境的带电粒子数目发生变化, 带电粒子总数的变化可用电导率测得。而细胞膜的完整性是有序调控这些物质交换的前提, 即细胞外液体环境的电导率可在一定程度上反映细胞膜的完整性。

无论是大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌, 实验组与对照组细胞外液环境电导率均随时间延长而增大, 并且不同时间点对对照组电导率均低于实验组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 6。结果表明, 实验组细菌细胞内外环境的带电粒子分布出现变化, 即材料浸提液对两种细菌细胞膜的完整性有影响。

2.5 细胞外钾离子含量检测结果 钾离子是细胞内主要的带电小分子物质, 细胞膜的选择通透性维持其在细胞内外分布的较大浓度差, 因此细胞外环境的钾离子浓度变化可以间接反映细胞膜结构的完整性。

无论是大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌, 实验组与对照组细胞外环境中的钾离子浓度均呈上升趋势, 并且不同时间点对对照组细胞外环境的钾离子浓度均低于实验组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 7。结果表明, 实验组细菌细胞内外钾离子分布出现变化, 即材料浸提液对两种细菌细胞膜结构完整性有影响, 导致了细胞膜选择通透性改变。

2.6 细胞外核酸及蛋白质含量检测结果 核酸及蛋白质是细菌细胞内主要的带电大分子物质, 当细菌的细胞膜的结构完整性受到严重破坏时, 这些带电荷的大分子物质会游离至细胞外液体环境中。

无论是大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌, 实验组与对照组细胞外环境中的核酸及蛋白质浓度均呈上升趋势; 在金黄色葡萄球菌中, 实验组核酸及蛋白质浓度高于对照组 ($P < 0.01$), 见图 8, 9。结果表明, 材料浸提液对大肠杆菌细胞内外的核酸及蛋白质浓度分布未产生明显影响, 即大肠杆菌细胞膜的完整性未受到严重破坏; 材料浸提液对金黄色葡萄球菌细胞内外的核酸及蛋白质浓度分布产生影响, 即金黄色葡萄球菌细胞膜的完整性受到了严重破坏。

2.7 细胞内核酸含量检测结果 细菌细胞内核酸是其遗传信息的主要载体, 其中 DNA 携带遗传信息, RNA 参与遗传信息的表达, 细胞内核酸含量的变化直接反映其分裂增殖的活跃程度。

无论是大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌, 实验组与对照组菌体内的 DNA 及 RNA 含量均呈上升趋势, 并且不同时间点

对照组的 DNA 及 RNA 含量高于实验组 ($P < 0.01$), 见图 10, 11。该结果表明, 实验组细菌菌体内 DNA 及 RNA 含量减少, 即材料浸提液抑制了细菌内核酸的合成。

2.8 细胞内可溶性蛋白含量检测结果 蛋白质是细胞生命的物质基础, 细菌内蛋白质含量的变化可间接反映细菌生命活动的活跃程度。

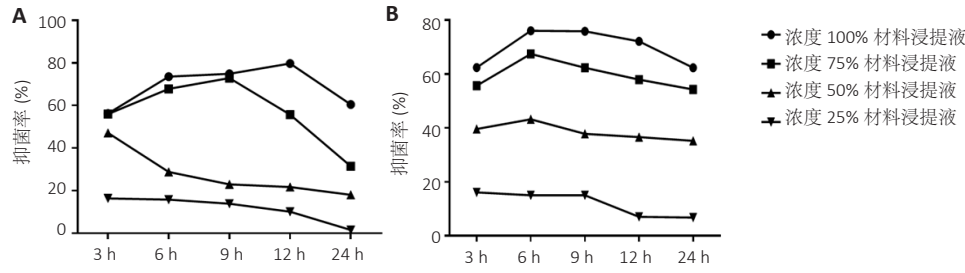
通过对比蛋白质 Marker 的染色条带分析可知大肠杆菌的可溶性蛋白质分子质量在 10–170 kD 之间; 而金黄色葡萄球菌的可溶性蛋白质分子质量在 10–300 kD 之间, 分布宽度大于大肠杆菌, 见图 12。大肠杆菌中实验组与对照组不同时间点各分子质量蛋白质分布无明显差异, 表明材料浸提液对大肠杆菌菌体内蛋白质的合成无明显抑制作用; 金黄色葡萄球菌中实验组相较于对照组最大分子质量的蛋白质条带变浅, 且随时间延长这种差异减弱, 表明材料浸提液对金黄色葡萄球菌菌体内蛋白质合成具有抑制作用, 进一步推测该结果可能是材料浸提液对金黄色葡萄球菌内维持高分子质量蛋白质结构的某些化学键有破坏作用, 或者直接抑制了高分子量蛋白质的合成, 而且这种抑制作用随接触时间的延长逐渐变弱。

3 讨论 Discussion

骨科术后感染是较难控制的并发症之一, 尤其是有金属植入物等材料的感染治疗, 一直是骨科领域面临的严峻挑战^[21-22]。一旦发生植入物感染, 往往需要取出植入物、扩大清创、延长抗生素使用及换药时间等。有统计数据显示, 肿瘤切除术后大量骨缺损的体内假肢置换后感染发生率为 5%–35%^[23], 美国每年 200 万例的院内感染病例中有大约一半都与植入物相关^[24]。因此研究金属植入物并发感染的防治措施具有十分重要的意义, 而开发新型具有抗菌作用的医用金属植入物是目前国内外研究的热点。

目前已经有多数报道认同金黄色葡萄球菌和大肠杆菌、表皮葡萄球菌是引起骨科金属植入物感染的主要细菌^[21]。植入初期的细菌黏附、细菌对抗生素的耐药性及植入物周围的特殊环境, 是导致感染发生的关键因素^[24]。有研究显示, 植入物的界面周围通常是宿主免疫受抑制及抵抗力较低的区域, 被称为免疫缺陷纤维性炎症区域, 致病菌较易在此定植并引发相应部位感染。而且, 植入物周围形成感染所需的临界污染微生物数量远小于正常部位形成感染所需数量^[25]。另外, 植入物本身的化学性质和表面结构形态均对致病菌早期的黏附和定植有重要影响, 当细菌早期黏附于材料表面形成生物膜后更能抵抗宿主防御和抗生素的作用^[26]。

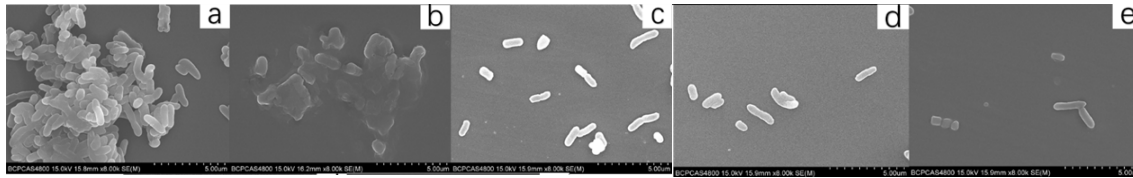
针对细菌生物膜的形成过程, 以干预早期细菌黏附定植及生长为切入点研发新型具备抗菌作用的金属植入物, 是有效减少植入物相关感染的重要途径之一。当前研究主要集中在通过对医用金属植入物的合金成分中添加抗菌元素或对其进行表面改性 (如添加抗菌涂层、负载抗菌药物^[27-28]), 以干扰材料植入早期表面细菌生物膜的形成, 从而减少或杜绝植入物相关感染的发生, 其中添加最多的抗菌元素为铜 (Cu)、



图注: A 为材料浸提液对大肠杆菌的抑菌率, B 为材料浸提液对金黄色葡萄球菌的抑菌率

图 1 | 新型镁合金支架材料浸提液对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的抑菌率

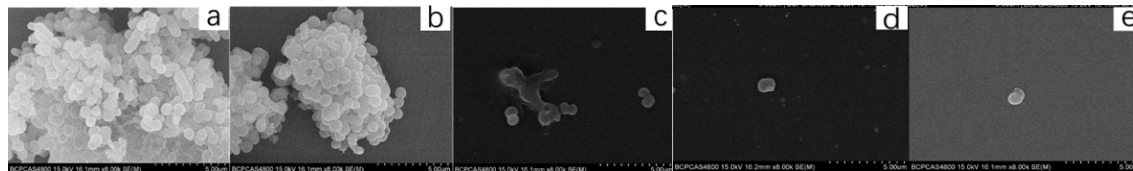
Figure 1 | Antimicrobial activity of extracts from Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*



图注: a-e 分别为对照组及浓度 25%, 50%, 75%, 100% 材料浸提液组; 随着材料浸提液浓度的增加, 培养的细菌形态相较于对照组明显皱缩, 体积变小, 部分内容物泄露, 出现细胞碎片, 细胞分布数量相对稀少

图 2 | 新型镁合金支架材料浸提液中的大肠杆菌形态 (扫描电镜, $\times 8\ 000$)

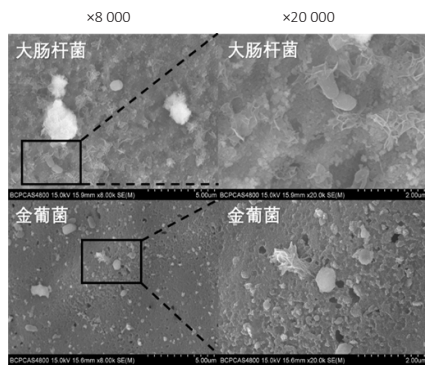
Figure 2 | Morphology of *Escherichia coli* in the extract of Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds (scanning electron microscope, $\times 8\ 000$)



图注: a-e 分别为对照组及浓度 25%, 50%, 75%, 100% 材料浸提液组; 随着材料浸提液浓度的增加, 培养的细菌形态相较于对照组明显皱缩, 体积变小, 部分内容物泄露, 出现细胞碎片, 细胞分布数量相对稀少

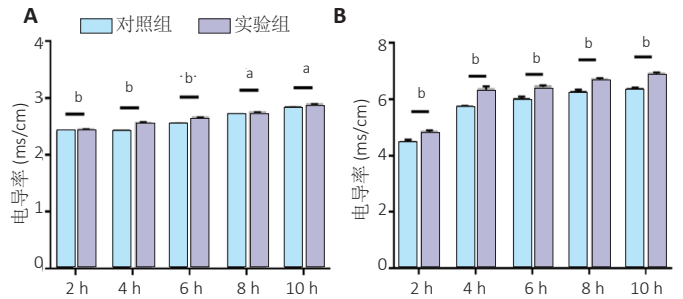
图 3 | 新型镁合金支架材料浸提液中的金黄色葡萄球菌形态 (扫描电镜, $\times 8\ 000$)

Figure 3 | Morphology of *Staphylococcus aureus* in extracts of Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds (scanning electron microscope, $\times 8\ 000$)



图注: 细菌形态体积相较于 LB 液体培养基中自然生长者明显缩小

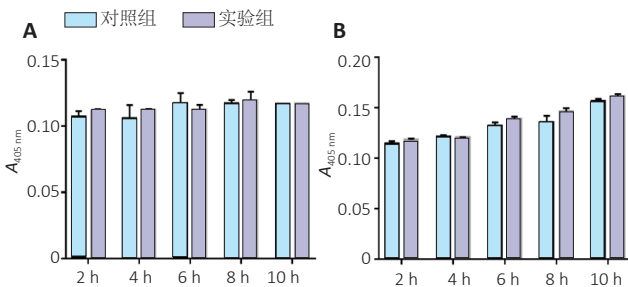
图 4 | 新型镁合金支架材料表面的细菌形态 (扫描电镜)
Figure 4 | Morphology of bacteria on the surface of Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds (scanning electron microscope)



图注: A 为大肠杆菌培养上清液电导率, B 为金黄色葡萄球菌培养上清液电导率; $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$

图 6 | 浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液对两种细菌培养上清液电导率的影响

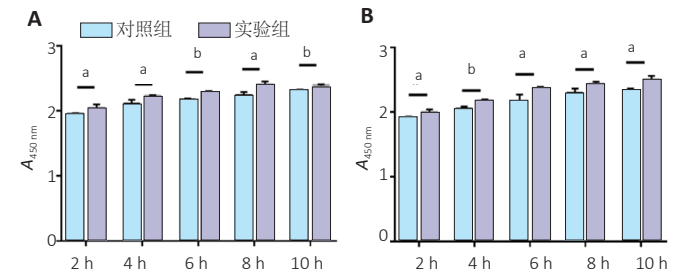
Figure 6 | Effect of extracts from 100% Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on electrical conductivity of two bacterial culture supernatants



图注: A 为大肠杆菌上清液碱性磷酸酶含量, 材料浸提液对大肠杆菌上清液碱性磷酸酶含量无影响; B 为金黄色葡萄球菌上清液碱性磷酸酶含量, 材料浸提液对金黄色葡萄球菌上清液碱性磷酸酶含量无影响

图 5 | 浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液对两种细菌培养上清液碱性磷酸酶含量的影响

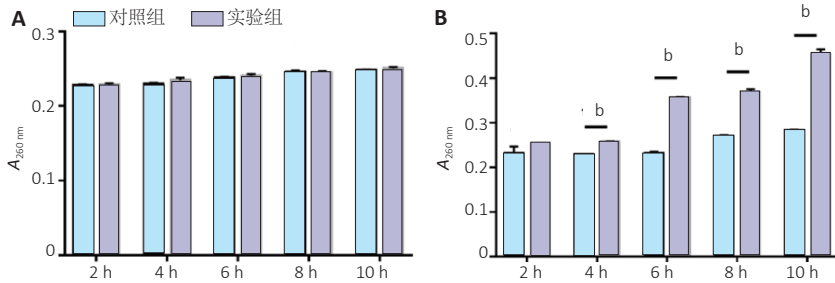
Figure 5 | Effect of extracts from 100% Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on alkaline phosphatase content of two bacterial culture supernatants



图注: A 为大肠杆菌培养上清液 K^+ 含量, B 为金黄色葡萄球菌培养上清液 K^+ 含量; $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$

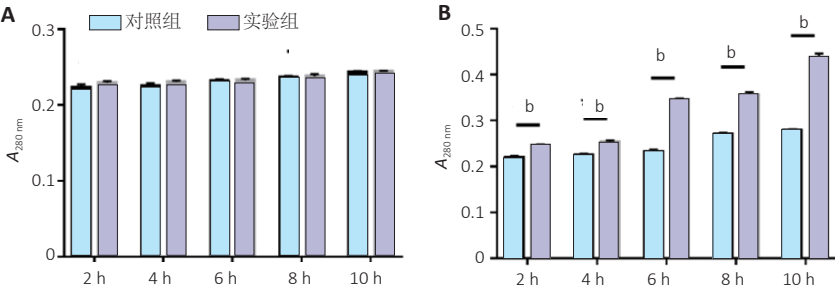
图 7 | 浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液对两种细菌培养上清液 K^+ 含量的影响

Figure 7 | Effect of extracts from 100% Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on K^+ content in two bacterial culture supernatants



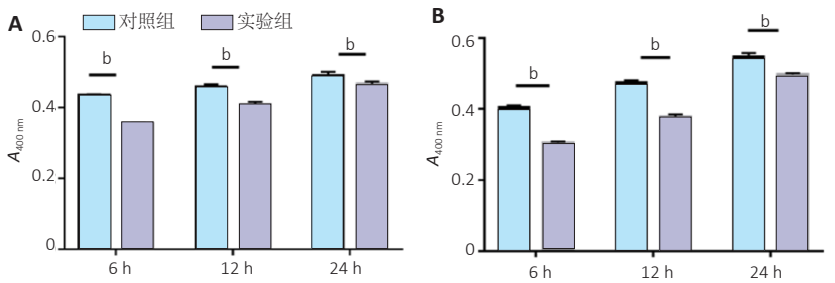
图注: A 为大肠杆菌培养上清液核酸含量, B 为金黄色葡萄球菌培养上清液核酸含量; ^b*P* < 0.01
图 8 | 浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液对两种细菌培养上清液核酸含量的影响

Figure 8 | Effect of extracts from 100% Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on nucleic acid content of two bacterial culture supernatants



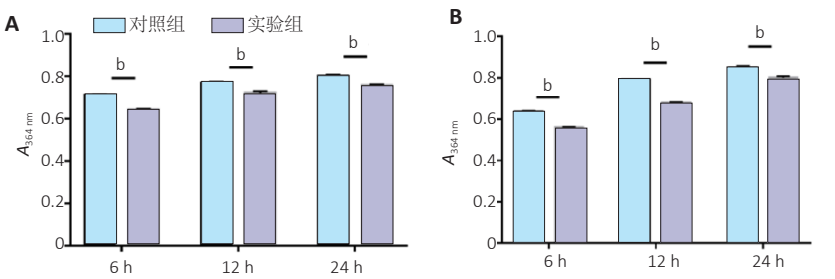
图注: A 为大肠杆菌培养上清液蛋白质含量, B 为金黄色葡萄球菌培养上清液蛋白质含量; ^b*P* < 0.01
图 9 | 浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液对两种细菌培养上清液蛋白质含量的影响

Figure 9 | Effect of extracts from 100% Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on protein content of two bacterial culture supernatants



图注: A 为大肠杆菌细胞内 RNA 含量, B 为金黄色葡萄球菌细胞内 RNA 含量; ^b*P* < 0.01
图 10 | 浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液对两种细菌细胞内 RNA 含量的影响

Figure 10 | Effect of extracts from 100% Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on RNA content of two bacterial culture supernatants



图注: A 为大肠杆菌细胞内 DNA 含量, B 为金黄色葡萄球菌细胞内 DNA 含量; ^b*P* < 0.01
图 11 | 浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液对两种细菌细胞内 DNA 含量的影响

Figure 11 | Effect of extracts from 100% Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on DNA content of two bacterial culture supernatants

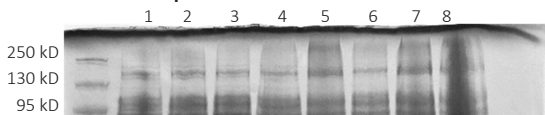


图 12 | 浓度 100% 新型镁合金支架材料浸提液对两种细菌体内不同分子量蛋白质分布的影响

Figure 12 | Effect of extracts from 100% Jiao Da Bio-Magnesium scaffolds on distribution of proteins with different molecular weights of two bacterial culture supernatants

图注: 1 为大肠杆菌对照组; 2-4 为大肠杆菌实验组培养 6, 12, 24 h; 5 为金黄色葡萄球菌对照组, 6-8 为金黄色葡萄球菌实验组培养 6, 12, 24 h

银 (Ag) 和氟 (F)^[29-30]。已有大量研究通过等离子喷涂、离子注入、磁控喷射等工艺将抗菌元素添加到植入物表面涂层或者与铜、银等元素制备新型合金材料, 经验证后均显示材料的抗菌性能提高^[31-32]。

近年来随着对生物可降解镁合金材料的研究不断深入, 其生物安全性、可降解性能、诱导成骨性能、机械学性能等逐渐被认可, 并且已经有相关骨科镁合金产品开始进入临床应用^[33-34]。而且有研究证实了镁基金属 (纯镁和镁合金) 在人体环境中的降解可抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等骨科常见感染细菌^[35], 甚至有动物实验显示 Mg 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌诱导的骨髓炎有很好的疗效, 并能改善植体周围骨形成^[36]。以往多数研究认为其抑菌作用主要来源于镁金属降解过程中造成的局部较强碱性环境, 而非因 Mg²⁺ 的直接作用^[35]。但陆续有研究证实 Mg²⁺ 可以通过影响细胞内物质代谢发挥抑菌作用^[37], 镁金属的抑菌作用来源于碱性环境与 Mg²⁺ 的协同作用^[38], 二者可产生类似喹诺酮类药物的作用^[20]。

上海交通大学轻合金精密成型国家工程中心研发的新型镁合金支架材料成分中包含少量 Zr、Cu 等元素, 而且在材料表面增加了氟化处理的涂层^[39], 理论上可干扰表面细菌生物膜的形成并抑制局部细菌生长。此次实验即从定性及定量角度设计实验对新型镁合金支架材料的体外抑菌性能进行评价, 并在此基础上初步探索其可能的抑菌机制。抑菌性验证实验结果表明, 新型镁合金支架材料浸提液对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌具有明显的抑菌作用, 12 h 内的抑菌率在 55% 以上, 这种良好的早期抑菌效果在减少植入物相关感染方面具有尤为重要的意义^[40]。实验结果还表明, 随新型镁合金支架材料浸提液浓度的增加其抑菌作用明显增强, 证明了其抑菌作用与 pH 值和 Mg²⁺ 浓度有关, 该结果与 MA 等^[41] 验证的 Mg²⁺ 浓度及 pH 值越高抑菌作用越明显结果一致。因为体内环境相对体外浸提环境更为复杂, 推测该材料在体内可能降解速率更快, 产生更

高的 pH 值及 Mg^{2+} 浓度环境,从而发挥更强的抑菌作用。但是, YAMAMOTO 等^[42] 研究证实, 体内环境中的蛋白质吸附于镁合金材料表面可明显延缓 Mg^{2+} 的析出, 材料析出的 Mg^{2+} 又能与周围环境的 OH^- 形成 $Mg(OH)_2$ 沉淀于金属材料表面, 延缓进一步的腐蚀降解速率^[43], 局部高 pH 值也会加速镁磷酸盐的沉淀, 起到稳定 $Mg(OH)_2$ 沉淀的作用^[44], 而 $Mg(OH)_2$ 沉淀并无任何抗菌作用^[45], 所以体内抑菌作用相较于体外的差异还需进一步实验研究。

有研究通过体外和动物体内实验证实了纯镁金属材料可影响耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜的形成。HE 等^[46] 研究将 Zn 加入镁合金 (Mg-Ca-Sr-6Zn), 发现新合金不仅可增强抑制细菌生长的作用, 还可以影响细菌在合金表面的黏附。此次实验中的新型镁合金支架材料中包含 Mg、Zn 元素, 扫描电镜观察显示材料表面黏附的细菌形态体积相较于 LB 液体培养基中自然生长者明显缩小, 细菌黏附数量相较于以往报道的处于相似菌液环境 24 h 后钛合金表面黏附数量也明显稀少^[19-20], 故推测新型镁合金除有直接抑菌作用外, 还可影响细菌在材料表面的黏附、定植。

实验在验证新型镁合金支架材料具备优良的抑菌性能后, 通过检测碱性磷酸酶、导电率、钾离子浓度、核酸及蛋白质含量等指标初步探索新型镁合金材料浸提液对细菌细胞壁、细胞膜结构完整性及对菌体内核酸、蛋白质合成的影响, 结果显示材料浸提液可破坏金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的细胞膜完整性。这与 ZOU 等^[47] 研究证实的含 Zn 涂层镁合金材料对以上两种细菌的抑制主要是破坏了其细胞膜完整性, 使胞内物质释放, 从而影响其生命活动的结论一致。另外此次实验结果还显示, 新型镁合金材料对金黄色葡萄球菌细胞膜的破坏程度相较于大肠杆菌更为严重, 查阅文献未见相似报道。但是, 于潞等^[48] 在探索酸碱度对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌存活率的影响时证实, 在 pH 值为 10.0 时 LB 平板培养基上金黄色葡萄球菌的存活率 74.39%, 大肠杆菌的存活率为 8.39%, 即金黄色葡萄球菌更能耐受碱性环境。而此次实验中新型镁合金材料浸提液的 pH 值约为 10.3, 其对金黄色葡萄球菌的影响大于大肠杆菌, 这可能与溶液中 Mg^{2+} 对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于大肠杆菌有关。

在探索新型镁合金支架材料浸提液对细菌内核酸及蛋白质合成的影响实验中, 结果显示材料浸提液对两种细菌内的 RNA 及 DNA 合成有抑制作用, 对金黄色葡萄球菌内的大分子质量的蛋白质合成有抑制作用。该结果与两种细菌细胞膜结构完整性评价试验的结果差异相一致, 均表明材料浸提液对金黄色葡萄球菌抑制作用强于大肠杆菌。综合以上结果分析, 新型镁合金支架材料浸提液可能是抑制了金黄色葡萄球菌内与大分子质量可溶性蛋白表达有关的核酸合成, 而这些大分子质量蛋白质可能与维持其细胞膜结构完整性有重要关系。目前虽尚未见镁合金材料针对不同细菌细胞膜相关蛋白影响的研究, 尚不能肯定以上对镁合金可选择性的抑制某些细菌细胞膜相关蛋白合成的推测, 但如证实这种推测, 即可

对合金材料抑菌性能有针对性的改进^[49], 进一步提高其抑菌性能。

综合以上实验结果可以初步判定, 新型镁合金支架材料在体外具备一定的抑菌性能, 尤其是在植入早期对抑制细菌生长、影响细菌定植具有重要作用。新型镁合金支架材料对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于大肠杆菌, 其抑菌作用机制可能是破坏了细菌细胞膜的完整性, 使菌体内核酸及蛋白质的合成受到抑制, 从而影响了细菌正常代谢及增殖活性等。但该性能的验证目前只局限于体外实验结果, 体内抑菌实验验证、抑菌作用的具体机制及如何进一步加强材料的抑菌性能仍需进一步的研究。

致谢: 感谢李庆祥、袁临天等同学在试验实施过程中给予的帮助。

作者贡献: 第一作者及通讯作者负责实验设计、实施、实验数据分析、论文撰写; 第二、三作者负责实验设计、论文撰写; 第四、五作者负责材料研发与性能改进。

经费支持: 该文章接受了“科技部重点研发计划子课题 (2016YFC1102104)、国家自然科学基金 (51571143) 及上海市卫生和计划生育委员会课题 (201640281)”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中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守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: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经北京大学口腔医院生物统计学专家审核。

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 4.0”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] 成翔宇, 纪斌, 庞金辉. 骨折的生物学内固定及内固定材料性能分析 [J]. 中国组织工程研究, 2012,16(22):4121-4124.
- [2] 杨柯, 任玲, 张余, 等. 新型抗菌功能医用金属研究 [J]. 中国材料进展, 2012,31(9):20-26.
- [3] 曲立杰, 李慕勤, 刘苗, 等. 超声-微弧氧化医用镁合金体外降解性研究 [J]. 稀有金属材料与工程, 2014,43(S1):96-100.
- [4] NIU J, YUAN G, LIAO Y, et al. Enhanced biocorrosion resistance and biocompatibility of degradable Mg-Nd-Zn-Zr alloy by brushite coating. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2013;33(8):4833-4841.
- [5] 马剑雄, 高峰, 柏豪豪, 等. 可降解生物材料在骨科内固定中的研究及应用进展 [J]. 生物医学工程与临床, 2016,20(3):323-327.
- [6] 孔祥东, 郝永强, 王磊, 等. 新型医用可降解镁合金 (JDBM) 螺钉的生物安全性研究 [J]. 组织工程与重建外科杂志, 2015,11(3):124-127.
- [7] 袁广银, 牛佳林. 可降解医用镁合金在骨修复应用中的研究进展 [J]. 金属学报, 2017,53(10):1168-1180.
- [8] 郭宇, 姜译心, 周延民, 等. 镁合金成骨作用及机制的研究进展 [J]. 口腔医学研究, 2016,32(5):541-544.
- [9] YOSHIZAWA S, BROWN A, BARCHOWSKY A, et al. Role of magnesium ions on osteogenic response in bone marrow stromal cells. Connect Tissue Res. 2014;55 Suppl 1:155-159.

- [10] 王湛, 杨军, 李建军. 新型骨科植入物镁合金材料抗菌性能的体外实验研究 [J]. 中国医科大学学报, 2014,43(12):1142-1144.
- [11] ZHAO C, HOU P, NI J, et al. Ag-Incorporated FHA Coating on Pure Mg: Degradation and in Vitro Antibacterial Properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(8):5093-5103.
- [12] JIA G, HOU Y, CHEN C, et al. Precise fabrication of open porous Mg scaffolds using NaCl templates: Relationship between space holder particles, pore characteristics and mechanical behavior. *Mater Design*. 2018;140:106-113.
- [13] 奚廷斐. 医疗器械生物学评价标准 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [14] 张新虎, 何静, 沈慧敏. 苍耳提取物对番茄灰霉病菌的抑制作用及抑菌机理初探 [J]. 草业学报, 2008(3):99-104.
- [15] 云宝仪, 周磊, 谢鲲鹏, 等. 黄芩素抑菌活性及其机制的初步研究 [J]. 药学学报, 2012,47(12):1587-1592.
- [16] 李昌勤, 赵琳, 薛志平, 等. 隐丹参酮抑菌作用机制研究 [J]. 中国药学杂志, 2012,47(21):1706-1710.
- [17] 王倩, 谢明杰. 木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及其机制 [J]. 微生物学报, 2010,50(9):1180-1184.
- [18] 王海涛, 王倩, 谢明杰. 大豆异黄酮对金黄色葡萄球菌的抑菌机制研究 [J]. 中国农业科学, 2009,42(7):2586-2591.
- [19] 马骏, 李国庆, 曹力. 结核杆菌黏附不同人工关节假体材料的能力研究 [J]. 中国组织工程研究, 2012,16(47):8807-8812.
- [20] ROBINSON DA, GRIFFITH RW, SHECHTMAN D, et al. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomater*. 2010;6(5):1869-1877.
- [21] 蓝国波, 张余. 抗菌金属植入材料的研究进展 [J]. 中华关节外科杂志 (电子版), 2012,6(6):961-966.
- [22] 杨小卫, 李小康, 郭征, 等. 骨科金属植入物并发感染的动物模型构建方法及效果评价 [J]. 中国矫形外科杂志, 2012,20(16):1505-1509.
- [23] SHIRAI T, SHIMIZU T, OHTANI K, et al. Antibacterial iodine-supported titanium implants. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1928-1933.
- [24] DONLAN RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):277-281.
- [25] 任玲, 杨春光, 杨柯. 抗菌医用金属材料的研究与发展 [J]. 中国医疗设备, 2017,32(1):1-6.
- [26] ARCIOLA CR, CAMPOCCIA D, GAMBERINI S, et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped with *ica* locus. *Biomaterials*. 2002;23(PII S0142-9612(02)00171-021):4233-4239.
- [27] DAYAGHI E, BAKHSHESHI-RAD HR, HAMZAH E, et al. Magnesium-zinc scaffold loaded with tetracycline for tissue engineering application: In vitro cell biology and antibacterial activity assessment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;102:53-65.
- [28] JI XJ, GAO L, LIU JC, et al. Corrosion resistance and antibacterial properties of hydroxyapatite coating induced by gentamicin-loaded polymeric multilayers on magnesium alloys. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;179:429-436.
- [29] MAO L, SHEN L, CHEN J, et al. Enhanced bioactivity of Mg-Nd-Zn-Zr alloy achieved with nanoscale MgF₂ surface for vascular stent application. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(9):5320-5330.
- [30] SONG J, JIN P, LI M, et al. Antibacterial properties and biocompatibility in vivo and vitro of composite coating of pure magnesium ultrasonic micro-arc oxidation phytic acid copper loaded. *J Mater Sci Mater Med*. 2019;30(5):49.
- [31] LIU C, FU X, PAN H, et al. Biodegradable Mg-Cu alloys with enhanced osteogenesis, angiogenesis, and long-lasting antibacterial effects. *Sci Rep*. 2016;6:27374.
- [32] SIKDER P, BHADURI SB, ONG JL, et al. Silver (Ag) doped magnesium phosphate microplatelets as next-generation antibacterial orthopedic biomaterials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(3):976-989.
- [33] WINDHAGEN H, RADTKE K, WEIZBAUER A, et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed Eng Online*. 2013;12:62.
- [34] LEE JW, HAN HS, HAN KJ, et al. Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(3):716-721.
- [35] ZENG J, REN L, YUAN Y, et al. Short-term effect of magnesium implantation on the osteomyelitis modeled animals induced by *Staphylococcus aureus*. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(10):2405-2416.
- [36] LI Y, LIU G, ZHAI Z, et al. Antibacterial properties of magnesium in vitro and in an in vivo model of implant-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7586-7591.
- [37] REN L, LIN X, TAN L, et al. Effect of surface coating on antibacterial behavior of magnesium based metals. *Mater Lett*. 2011;65(23-24):3509-3511.
- [38] WU H, WU G, WANG G, et al. Systematic Study of Inherent Antibacterial Properties of Magnesium-based Biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(15):9662-9673.
- [39] 袁广银, 章晓波, 牛佳林, 等. 新型可降解生物医用镁合金 JDBM 的研究进展 [J]. 中国有色金属学报, 2011,21(10):2476-2488.
- [40] BJARNSHOLT T, KIRKETERP-MOLLER K, KRISTIANSEN S, et al. Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS*. 2007;115(8):921-928.
- [41] MA R, WANG W, YANG P, et al. In vitro antibacterial activity and cytocompatibility of magnesium-incorporated poly(lactide-co-glycolic acid) scaffolds. *Biomed Eng Online*. 2020;19(1):12.
- [42] YAMAMOTO A, HIROMOTO S. Effect of inorganic salts, amino acids and proteins on the degradation of pure magnesium in vitro. *Mater Sci Eng C-Biomimetic Supramol Syst*. 2009;29(5):1559-1568.
- [43] 甄珍, 奚廷斐, 郑玉峰. 生物可降解金属材料体外腐蚀测试体系综述 (英文) [J]. 中国有色金属学报 (英文版), 2013,23(8):2283-2293.
- [44] HIROMOTO S, YAMAMOTO A, MARUYAMA N, et al. Influence of pH and flow on the polarisation behaviour of pure magnesium in borate buffer solutions. *Corros Sci*. 2008;50(12):3561-3568.
- [45] FENG H, WANG G, JIN W, et al. Systematic Study of Inherent Antibacterial Properties of Magnesium-based Biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(15):9662-9673.
- [46] HE G, WU Y, ZHANG Y, et al. Addition of Zn to the ternary Mg-Ca-Sr alloys significantly improves their antibacterial properties. *J Mater Chem B*. 2015;3(32):6676-6689.
- [47] ZOU YH, WANG J, CUI LY, et al. Corrosion resistance and antibacterial activity of zinc-loaded montmorillonite coatings on biodegradable magnesium alloy AZ31. *Acta Biomater*. 2019;98:196-214.
- [48] 于璐, 杨敏, 李默, 等. 金黄色葡萄球菌与大肠埃希菌在不同环境下存活率的比较 [J]. 中国病原生物学杂志, 2016,11(2):110-115.
- [49] 薛东芳, 邹宗尧, 陈彪, 等. 黄连总生物碱与小檗碱对嗜水气单胞菌细胞膜损伤机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2015,40(9):1787-1792.

(责任编辑: GW, ZN, TXY)