

溶胶浸渗结合电沉积制备氧化镁-磷酸钙复合抗菌涂层

谭俊杰, 杜佳恒, 文振宇, 闫吉元, 贺葵, 段可, 尹一然, 李忠

<https://doi.org/10.12307/2024.523>

投稿日期: 2023-07-18

采用日期: 2023-10-20

修回日期: 2023-11-06

在线日期: 2023-11-14

中图分类号:

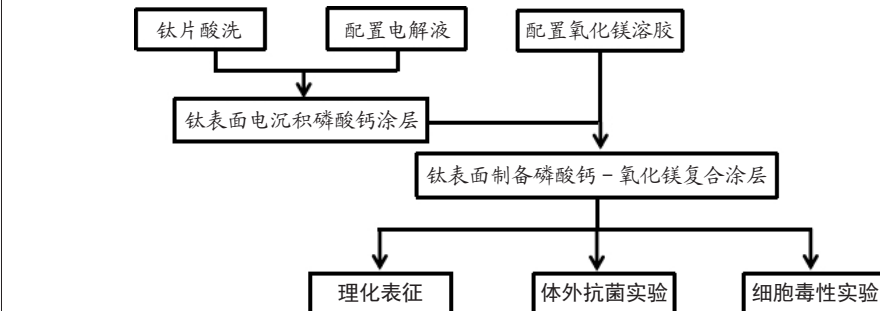
R459.9; R318.08; R683

文章编号:

2095-4344(2024)29-04663-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 氧化镁-磷酸钙复合涂层的理化性质和生物相容性



文题释义:

氧化镁-磷酸钙复合涂层: 利用表面改性技术将氧化镁复合到磷酸钙涂层中, 使磷酸钙涂层获得氧化镁的理化性质和生物学特性。**细菌生物膜:** 是指细菌黏附于植入物表面分泌细胞外基质, 将自身包绕其中而形成的大量细菌聚集膜样物。细菌生物膜有利于细菌生长, 抵抗各种细胞免疫及抗菌物质, 从而引起感染扩散、宿主对植入物反应及植入物周围骨溶解吸收等并发症。

摘要

背景: 磷酸钙(CaP)涂层被广泛用于改善钛植入物与骨的整合, 但存在感染风险, 因此有必要赋予CaP涂层抗菌能力。**目的:** 通过氧化镁(MgO)溶胶浸渗制备MgO-CaP复合涂层, 评价其体外抗菌能力和细胞相容性。**方法:** 通过滴定法确定CaP电沉积的电解液条件, 在钛表面制备CaP涂层(记为Ti-CaP); 采用不同质量分数(15%, 30%, 50%)的MgO溶胶浸渗处理CaP涂层并煅烧成为MgO-CaP复合涂层, 分别记为Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg和Ti-CaP-50Mg, 表征涂层的微观形貌、拉伸性能、临界载荷与体外Mg²⁺释放情况。将金黄色葡萄球菌菌液分别接种于纯钛片及Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg和Ti-CaP-50Mg表面, 24, 48 h后采用稀释涂布平板法检测抗菌率。将小鼠成骨细胞悬液分别接种于纯钛片及Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg和Ti-CaP-50Mg涂层钛片表面, 采用CCK-8法检测细胞增殖, 计算细胞存活率; 同时观察复合涂层浸泡于DMEM培养基中的微观形貌变化。**结果与结论:** ①电沉积在钛表面制备出由片状磷酸八钙晶体堆积组成的多孔CaP涂层, 经浸渗-煅烧处理后, MgO颗粒聚集填充磷酸八钙晶体的间隙, 并且填充程度随MgO含量增加而上升; 3组复合涂层第1天均出现Mg²⁺快速释放, 从第3天开始Mg²⁺释放速率明显下降, 至第7天仍可检测出少量Mg²⁺释放; Ti-CaP-30Mg涂层钛片的屈服强度、抗拉强度、断裂伸长率与纯钛片比较差异均无显著性意义($P > 0.05$); Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg和Ti-CaP-50Mg组临界载荷比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。②除纯钛片及Ti-CaP无抗菌性能外, 其余样品均具有良好的抗菌性能, 并且抗菌率随涂层中MgO含量的增加而增大。③共培养1, 3 d, Ti-CaP-15Mg组、Ti-CaP-30Mg组和Ti-CaP-50Mg组细胞存活率低于纯钛组、Ti-CaP组($P < 0.05$); 培养5, 7 d, 5组间细胞存活率比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 随着浸泡于培养基中时间的延长, 涂层中MgO的含量逐渐减少。④结果表明, 通过MgO浸渗处理赋予CaP涂层抗菌性的同时保持了其生物相容性。**关键词:** 骨科植入物; 钛; 抗菌; 氧化镁; 磷酸钙; 抗菌涂层; 细胞毒性

Antibacterial magnesium oxide-calcium phosphate composite coating prepared by combining electrodeposition and sol-gel impregnation

Tan Junjie, Du Jiaheng, Wen Zhenyu, Yan Jiyuan, He Kui, Duan Ke, Yin Yiran, Li Zhong

Sichuan Provincial Laboratory of Orthopedic Implant Device Research and Development and Application Technology Engineering, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Tan Junjie, Master candidate, Sichuan Provincial Laboratory of Orthopedic Implant Device Research and Development and Application Technology Engineering, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Duan Ke, MD, Professor, Sichuan Provincial Laboratory of Orthopedic Implant Device Research and Development and Application Technology Engineering, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China**Corresponding author:** Yin Yiran, Master, Associate professor, Sichuan Provincial Laboratory of Orthopedic Implant Device Research and Development and Application Technology Engineering, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

西南医科大学附属医院骨科, 四川省骨科植入器械研发及应用技术工程实验室, 四川省泸州市 646000

第一作者: 谭俊杰, 男, 1997年生, 四川省泸州市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事骨外科学、骨修复材料方面的研究。**通讯作者:** 段可, 博士, 教授, 西南医科大学附属医院骨科, 四川省骨科植入器械研发及应用技术工程实验室, 四川省泸州市 646000**通讯作者:** 尹一然, 医学硕士, 副教授, 西南医科大学附属医院骨科, 四川省骨科植入器械研发及应用技术工程实验室, 四川省泸州市 646000<https://orcid.org/0009-0002-4955-7769> (谭俊杰)**基金资助:** 四川省科技计划项目 (2020YFS0455), 项目负责人: 尹一然; 四川省科技计划项目 (2022YFS0628), 项目负责人: 闫吉元; 泸州市-西南医科大学科技战略合作项目 (2020LZXNYDZ08), 项目负责人: 段可; 西南医科大学产学研项目 (2022CX03), 项目参与人: 段可**引用本文:** 谭俊杰, 杜佳恒, 文振宇, 闫吉元, 贺葵, 段可, 尹一然, 李忠. 溶胶浸渗结合电沉积制备氧化镁-磷酸钙复合抗菌涂层 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(29):4663-4670.

Abstract

BACKGROUND: Calcium phosphate (CaP) coatings are widely used to improve the integration of titanium implants into bone but these coatings are associated with risks of infection. It is thus desirable to confer antibacterial properties to CaP coatings.

OBJECTIVE: To prepare CaP-MgO composite coatings by impregnating magnesium oxide (MgO) sol into CaP coatings and assess the *in vitro* antibacterial activities and cytocompatibility.

METHODS: An electrolyte was determined by titration and used for CaP coating electrodeposition on titanium (referred to as Ti-CaP). MgO was impregnated into the coating by immersing in an MgO sol with different mass fractions (15%, 30%, 50%) and subsequently calcined to form MgO-CaP composite coatings, which were recorded as Ti-CaP-15Mg, Ti-CaP-30Mg and Ti-CaP-50Mg, respectively. Microstructure, tensile properties, critical load, and Mg^{2+} release of coatings *in vitro* were characterized. Antibacterial activity was assayed using spread plate method by culturing *S. aureus* on the pure titanium sheet surface and Ti-CaP, Ti-CaP-15Mg, Ti-CaP-30Mg and Ti-CaP-50Mg surfaces for 24 and 48 hours. Mouse osteoblast suspension was inoculated on pure titanium sheets and Ti-CaP, Ti-CaP-15Mg, Ti-CaP-30Mg and Ti-CaP-50Mg coated titanium sheets, respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay, and cell survival rate was calculated. The morphology of composite coating soaked in DMEM was also observed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Homogeneous, microporous CaP coatings consisting of octacalcium phosphate crystal flakes were prepared on titanium by electrodeposition. After sol impregnation-calcination, MgO aggregates were filled into the inter-flake voids. The extent of MgO filling and Mg concentration in the coating increased with the number of sol impregnation procedures. When immersed in phosphate buffered saline, all composite coatings actively released Mg^{2+} within 1 day; subsequently, the Mg^{2+} release slowed down on day 3. A small amount of Mg^{2+} release was still detected on day 7. The yield strength, tensile strength and fracture growth rate of Ti-CaP-30Mg coated titanium were not significantly different from those of pure titanium ($P > 0.05$). There was no significant difference in the critical load of Ti-CaP, Ti-CaP-15Mg, Ti-CaP-30Mg and Ti-CaP-50Mg groups ($P > 0.05$). (2) Except that pure titanium sheet and Ti-CaP had no antibacterial properties, the other samples had good antibacterial properties, and the antibacterial rate increased with the increase of MgO content in the coating. (3) After 1 and 3 days of co-culture, the cell survival rate of Ti-CaP-15Mg, Ti-CaP-30Mg and Ti-CaP-50Mg groups was lower than that of pure titanium group and Ti-CaP group ($P < 0.05$). After 5 and 7 days of culture, there was no significant difference in cell survival rate among five groups ($P > 0.05$). The content of MgO in the coating decreased gradually with the time of immersion in the medium. (4) The MgO sol impregnation added antibacterial properties to the CaP coatings while retained their biocompatibility.

Key words: orthopedic implant; titanium; antibacterial; magnesium oxide; calcium phosphate; antibacterial coating; cytotoxicity

Funding: Science and Technology Project of Sichuan Province, No. 2020YFS0455 (to YJR); Science and Technology Project of Sichuan Province, No. 2022YFS0628 (to YJR); Joint Project of Luzhou and Southwest Medical University, No. 2020LZXNYDZ08 (to DK); Production, Teaching and Research Project of Southwest Medical University, No. 2022CX03 (to DK)

How to cite this article: TAN JJ, DU JH, WEN ZY, YAN JY, HE K, DUAN K, YIN YR, LI Z. Antibacterial magnesium oxide-calcium phosphate composite coating prepared by combining electrodeposition and sol-gel impregnation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(29):4663-4670.

0 引言 Introduction

钛 (Ti) 及其合金因具有良好的力学性能和骨整合性常用作骨植入材料^[1], 但钛植入器械存在感染的风险, 如目前关节置换的感染率达 2.5%–10%^[2]。骨植入物感染多与细菌生物膜有关^[3], 而生物膜内的细菌对抗生素的敏感性远低于浮游细菌^[4], 导致骨植入器械感染难以治疗^[2], 因此赋予钛植入物抗菌能力具有临床意义。

磷酸钙 (CaP) 是人体硬组织的无机成分, 主要包括羟基磷灰石 $[Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6]$ 等。等离子喷涂 CaP 涂层现被广泛用于改善钛的骨整合^[5], 但该技术只适用于形状相对简单的器械, 较难应用于多孔金属等复杂形态^[6]。电沉积法可在各种形态导电基材表面制备均匀的 CaP 涂层^[7], 其原理为: 将基材作为阴极浸入含有 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 的电解液, 施加电压, 阴极反应 (如 H^+ 还原) 造成基材附近 pH 值上升, 引起 CaP 结晶形成涂层^[8]。一项 5 年随访研究发现在骨质减少患者中, 表面电沉积涂覆 CaP 人工髋关节股骨头柄的位移显著低于等离子喷涂 CaP 股骨头柄^[9]。但是, CaP 本身不具有抗菌能力。细菌培养、动物模型和临床随访研究报道, CaP 涂层的细菌黏附和体内感染高于钛^[10-12]。

许多研究将 CaP 涂层与抗生素或重金属复合赋予其抗菌能力。ALTOMARE 等^[13]用电沉积法在钛表面制备含庆大霉素的 CaP 涂层, 并证实其在金黄色葡萄球菌培养中形成抑菌圈。KOSE 等^[14]制备掺银的等离子喷涂 CaP 涂层, 发现其植入兔膝关节后能减少细菌定植和术后感染率。PIERRE 等^[15]采用电沉积法制备含铜 CaP 涂层, 发现其在体外抑制牙龈卟啉单胞菌增殖。但是抗生素易引起耐药, 所以在临床上使用日益受限。银和铜等重金属为人体非必需或微量元素, 具有一定毒副作用^[16]。

镁是人体常量元素 (成人约含镁 24 g^[17]), 参与能量代谢等多种生理过程^[18]。镁及其化合物具有良好的安全性, 目前推荐成人每日镁适宜摄入量为 330 mg^[19]。PATEL 等^[20]将氧化镁 (MgO) 纳米颗粒分别与人肠细胞、宫颈癌细胞共培养, 发现其在 $< 300 \mu g/mL$ 下无明显毒性。近期研究报道 MgO 颗粒具有抗菌能力。SAWAI 等^[21]报道 MgO 颗粒在体外琼脂培养中能抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长。BHATTACHARYA 等^[22]发现纳米 MgO 颗粒在细菌悬液中生成活性氧, 加入自由基清除剂 (抗坏血酸) 后抗菌率显著降低, 提示产生活性氧是 MgO 的抗菌机制之一。有研究证实 MgO 能抑制细菌生物膜形成, 如 COELHO 等^[23]制备了 MgO-羟基磷灰石复合颗粒, 并用稀释涂板实验发现其在体外能有效抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌形成生物膜。

目前尚无研究报道利用复合 MgO 赋予 CaP 涂层抗菌性, 因此, 此次实验结合电沉积和溶胶凝胶法制备出 MgO-CaP 复合涂层, 检验其抗菌性, 同时表征复合涂层的理化性质和生物安全性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料制备、理化性质表征、体外抗菌实验及体外细胞学实验, 多组间比较采用单因素方差分析和 SNK 检验, 两组间比较采用 *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 6 月至 2023 年 9 月在四川省骨科植入器械研发及应用技术工程实验室完成。

1.3 材料 Ti 片 (TA2, 厚度 0.1 mm、4 mm, 北京研诺信诚科技有限公司); 铂片 (10 mm×10 mm, 耀乐仪器); 小鼠成骨细胞 (BFN60805977, 生命科学); 金黄色葡萄球菌标准菌株 [CMCC(B)26003, 南京乐诊生物技术]; 无水氯化钙 ($CaCl_2$,

广东广试试剂科技有限公司); 磷酸二氢铵 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)、十六烷基三甲基氯化铵、乙酸镁 (麦克林试剂); NaCl (国药化学试剂); 氢氧化钠 (西陇科学); 草酸 (罗恩试剂); 无水乙醇、氢氟酸 (成都科隆化学); 平板计数琼脂、LB 肉汤、镁离子浓度试剂盒 (北京索莱宝科技); CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术); 可编程直流电源 (2260B-80-13, Tektronix 中国); 马弗炉 (SX2-4-13, 重庆观致科技); 扫描电子显微镜 (KYKY-EM6900, 北京中科科仪); X 射线能谱仪 (630M, Bruker); 紫外可见分光光度计 (721, 上海佑科仪器仪表); X 射线衍射仪 (TD-3500, 丹东通达科技); 万能力学试验机 (MIT-100, 常州三丰仪器); 纳米划痕仪 (UNHT, Anton Paar); 恒温培养箱、生物安全柜、酶标仪 (Thermo); DMEM 培养基、胎牛血清 (Gibco)。

1.4 方法

1.4.1 CaP 沉淀边界测定 为选择合适电解液条件 (Ca^{2+} 浓度、pH 值), 采用滴定法确定不同 Ca^{2+} 浓度下的 CaP 沉淀 pH 值^[24]。配制含 100 mmol/L NaCl、0.2–50 mmol/L CaCl_2 、0.2–50 mmol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 的系列溶液作为电解液, 其中 Ca/P 摩尔比固定为 1.67。用 50 mmol/L NaOH 滴定上述溶液, 当出现沉淀后继续晃动电解液, 若沉淀 30 s 不消失迅速测量并记录 pH 值。根据所消耗 NaOH 滴定液的体积计算此时 Ca^{2+} 浓度, 并相应得到 Ca^{2+} 浓度–pH 关系 (即 CaP 沉淀边界)。

1.4.2 CaP 涂层电沉积及热力学分析 将钛片切割成 4 cm×5 cm 样品, 用 1% 氢氟酸腐蚀 1 min, 去离子水中超声清洗 5 min 后干燥备用。配制含 5 mmol/L CaCl_2 、3 mmol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、100 mmol/L NaCl 的电解液, 用 50 mmol/L NaOH 将其调整至 pH 值 = 6.00±0.02。将钛片和铂片部分浸没于电解液中, 分别连接直流电源负极和正极, 施加 2.80 V 电压并保持 60 min, 制备出涂覆 CaP 涂层的样品 (记为 Ti-CaP)。

为理解 CaP 的电沉积过程, 用下列公式计算上述电解液在不同 pH 值下相对 3 种液相中有可能出现的 CaP 相 [羟基磷灰石, 磷酸八钙, 透钙磷石] 的过饱和度 (S):

$$S_{HA} = \frac{[\text{Ca}^{2+}]^0 \times [\text{OH}^-]^2 \times [\text{PO}_4^{3-}]^6}{K_{sp,HA}} \quad S_{OCP} = \frac{[\text{Ca}^{2+}]^8 \times [\text{HPO}_4^{2-}]^2 \times [\text{PO}_4^{3-}]^4}{K_{sp,OCP}} \quad S_{DCPD} = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \times [\text{HPO}_4^{2-}]}{K_{sp,DCPD}}$$

其中, HA 为羟基磷灰石, OCP 为磷酸八钙, DCPD 为透钙磷石, $k_{sp,HA}$ 、 $k_{sp,OCP}$ 、 $k_{sp,DCPD}$ 分别为这 3 种液相的溶度积, 分别为 2.35×10^{-59} 、 3.31×10^{-37} 、 2.39×10^{-7} ; $[\text{PO}_4^{3-}]$ 、 $[\text{HPO}_4^{2-}]$ 用总磷酸盐浓度 (3 mmol/L)、各自在不同 pH 值下的分布系数和各自活度系数三者的乘积计算。其中, 分布系数进行如下计算:

$$\text{PO}_4^{3-} \text{ 分布系数} = \frac{K_{a1} \times K_{a2} \times K_{a3}}{K_{a1} \times K_{a2} \times K_{a3} + 10^{(-\text{pH})} \times K_{a1} \times K_{a2} + 10^{(-2\text{pH})} \times K_{a1} + 10^{(-3\text{pH})}}$$

$$\text{HPO}_4^{2-} \text{ 分布系数} = \frac{10^{(-\text{pH})} \times K_{a1} \times K_{a2}}{K_{a1} \times K_{a2} \times K_{a3} + 10^{(-\text{pH})} \times K_{a1} \times K_{a2} + 10^{(-2\text{pH})} \times K_{a1} + 10^{(-3\text{pH})}}$$

其中, K_{a1} 、 K_{a2} 、 K_{a3} 为磷酸的 3 级电离常数, 分别为 7.6×10^{-3} 、 6.3×10^{-8} 、 4.4×10^{-13} ; 活度系数用 Debye-Hückel 公式计算^[25]。

1.4.3 MgO-CaP 涂层的制备 根据文献 [26] 和前期预实验结

果, 以乙酸镁为原料制备 Mg 质量分数分别为 15%, 30%, 50% 的 MgO 溶胶。配制 3 瓶 50 mL 含 1 mmol/L 十六烷基三甲基氯化铵的乙醇溶液, 分别加入 2.19, 4.37, 7.12 g 乙酸镁, 40 r/min 搅拌 2 h 并用 50 mmol/L 草酸溶液调整 pH 值至 6.00±0.05, 配制成浸涂液。将 Ti-CaP 浸入浸涂液中 15 s, 垂直拉起 (1 cm/s), 室温干燥 4 h 后再重复上述操作 1 次; 烘箱干燥 (40 °C, 24 h) 后转入马弗炉, 5 °C/min 升温至 650 °C 后保持 4 h, 获得载 MgO-CaP 涂层钛片。按浸涂液的 Mg 含量, 将 3 组浸涂样品分别记为 Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg 和 Ti-CaP-50Mg。

1.4.4 涂层理化性质表征 扫描电镜观察 Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg 和 Ti-CaP-50Mg 的微观形貌, 利用 X 射线能谱分析涂层表面元素。使用 X 射线衍射仪 (CuKα, 40 kV, 25 mA) 检测 Ti-CaP、Ti-CaP-30Mg 的物相成分。

涂层中 Mg^{2+} 释放: 将 Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg 和 Ti-CaP-50Mg 均剪成 1 cm×1 cm, 分别浸泡在 10 mL PBS (37 °C, pH=7.40) 中 7 d, 定期收集 50 μL 溶液并补液, 使用镁试剂盒检测 Mg^{2+} 浓度, 如下计算累积释放量:

$$\text{累积释放量}(\text{mg}) = \sum_{\text{时间点}} (5 \times 10^{-5} \times [\text{Mg}^{2+}])$$

拉伸实验: 将 4 mm 厚钛板加工成哑铃状拉伸试样 (标距段长度 30 mm), 制备 Ti-CaP-30Mg, 按照 GB/T 228.1-2010 标准 (金属材料拉伸试验), 利用万能力学试验机以速度 1 mm/min 进行拉伸实验, 以纯钛板为对照组, 测试抗拉强度及延伸率。每组 3 个平行样。因各实验组热处理温度相同, 仅选择 Ti-CaP-30Mg 为代表进行测试。

纳米划痕实验: 将 5 mm 厚钛板切成 1 cm×1 cm 样品, 分别制备 Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg 和 Ti-CaP-50Mg, 用曲率半径为 100 μm 的半球形划痕头以 2 mm/min 速度划过样品表面, 同时以 30 N/min 速率逐渐增加法向载荷, 划痕全长为 2 mm^[27]。光学显微镜下拍摄划痕照片, 记录涂层明显剥落时载荷作为涂层临界载荷。每组 3 个平行样。

1.4.5 涂层体外抗菌性能评价 复苏金黄色葡萄球菌。吸取 0.5 mL 金黄色葡萄球菌原液与 LB 液体培养基混匀, 吸出 100 μL 溶液涂布于琼脂平板, 将平板倒置于培养箱中 24 h 后, 挑取单菌落于 4 mL 液体培养基中, 恒温摇床振荡 (37 °C, 150 r/min) 培养 24 h。调整菌液中细菌浓度为 10^8 CFU/mL (650 nm 吸光度值 = 0.14)^[28], 再逐级稀释至 10^5 CFU/mL 备用。

利用稀释涂布平板法评价样品的体外抗菌能力。将 Ti、Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg、Ti-CaP-50Mg 样品 (均 1 cm×1 cm) 干热灭菌 (200 °C, 30 min) 后分别放入 24 孔板, 每孔接种 300 μL 金黄色葡萄球菌菌液 (10^5 CFU/mL), 转入 37 °C 恒温培养箱中。培养 24, 48 h 后, 每孔加入 2.7 mL 生理盐水, 移液枪吹打 10 次后将菌液吸入 15 mL 离心管, 将菌液以 1 : 10 体积比逐次稀释 10^6 倍。吸取 100 μL 稀释后的菌液接种于琼脂平板, 涂布均匀, 37 °C 培养 24 h 后拍照并观察菌落数, 计算抗菌率。以无样品的空白孔板为对照组, 同上操作。每组 3 个平行样。

$$\text{抗菌率} = \frac{\text{对照组平均菌落数} - \text{实验组菌落数}}{\text{对照组平均菌落数}} \times 100\%$$

1.4.6 涂层细胞毒性评价 复苏小鼠成骨细胞，移入 10 mL 离心管内 1 000 r/min 离心 5 min，弃上清液；加入 2 mL DMEM 完全培养基（含体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗）后吹打，再加入 3 mL 该培养基，吹打混匀；将细胞转至细胞培养瓶中培养（37 ℃，95% 湿度，体积分数 5% CO₂），每 2 d 换液一次。将细胞传代，取第 2 代用于后续实验。

将 Ti（对照组）、Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg、Ti-CaP-50Mg 样品（1 cm×1 cm）干热灭菌（200 ℃，30 min）后放入 24 孔板，每孔接种 1 mL 小鼠成骨细胞悬液（2×10⁴ / 孔），每 2 d 换液一次。培养 1，3，5，7 d，取出孔板，每孔加入 100 μL CCK-8 溶液，孵育 2 h 后每孔吸取 100 μL，测量 450 nm 吸光度值，计算细胞存活率。空白组为仅加入 2 mL DMEM 但无细胞的孔板。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验中吸光度} - \text{空白组吸光度}}{\text{对照组吸光度} - \text{空白组吸光度}} \times 100\%$$

根据 GB/T 16886.5-2017 标准（医疗器械生物学评价），细胞存活率 ≥ 0.7 视为无细胞毒性。

为了解细胞毒性结果与涂层降解的关系，将 Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg、Ti-CaP-50Mg 分别浸泡在 2 mL DMEM 培养基中，转入细胞培养箱中保持（37 ℃，95% 湿度，体积分数 5% CO₂）1，3，5，7 d，扫描电镜下观察样品表面形貌。

1.5 主要观察指标 钛片的理化性能、抗菌性能与细胞毒性。

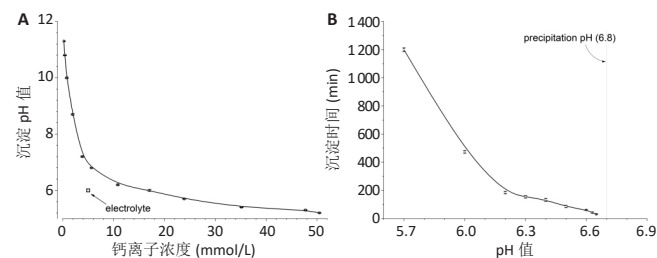
1.6 统计学分析 利用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，采用 t 检验分析两组间数据差异，采用单因素方差分析和 SNK 检验分析多组间数据差异。P < 0.05 认为差异有显著性意义。该文统计学方法已经西南医科大学附属医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 CaP 沉积边界曲线 CaP 沉淀边界曲线（图 1A）代表在不同 Ca²⁺ 浓度下发生沉淀时的 pH 值，该边界 pH 值随 Ca²⁺ 浓度上升而下降；当 Ca²⁺ < 2 mmol/L 时曲线陡峭，但斜率随 Ca²⁺ 浓度上升而逐渐下降；当 Ca²⁺ > 30 mmol/L，曲线平缓。该边界曲线代表电解液的临界过饱和度，它将溶液条件（pH 值、Ca²⁺ 浓度）分为 2 个区域：当电解液条件位于曲线上方，电解液立刻发生沉淀；当电解液条件位于曲线以下，但充分接近该曲线（即离子积高于溶度积但低于临界过饱和度），电解液在较短时间内发生沉淀；当电解液 pH 值远低于沉淀边界时（如离子积低于溶度积），电解液在较长时间不发生沉淀。

根据该曲线，合理的电沉积电解液条件应位于沉淀边界以下，但距离边界适当距离使电解液不自发沉淀，但允许阴极反应产生的局部 pH 值上升使溶液条件跨越该边界。此外，当 Ca²⁺ 浓度 < 2 mmol/L，沉淀边界斜率大，表明微小 Ca²⁺ 浓度变化会引起溶液中 CaP 沉淀 pH 值的较大变化，对电沉积的稳定性有不利影响。因此，实验选择电解液浓度为 5 mmol/L CaCl₂、3 mmol/L NH₄H₂PO₄。实验结果发现当该电

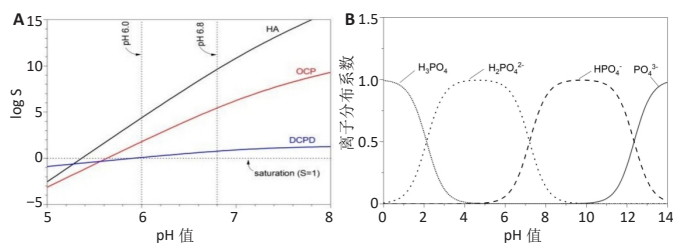
解液 pH 值距沉淀边界 < 0.20 时，电解液会在 100 min 内出现沉淀（图 1B）；当电解液 pH 远低于沉淀边界时（如 pH 值距边界 > 1.00），电解液在较长时间（> 20 h）不发生沉淀。因此，电解液 pH 值选择为 6.00（图 1A 箭头示）。



图注：A 为 Ca/P 沉淀边界曲线（Ca/P 摩尔比 = 1.67）；B 为电解液（5 mmol/L CaCl₂，3 mmol/L NH₄H₂PO₄，100 mmol/L NaCl）在不同 pH 值下发生沉淀的时间。

图 1 | CaP 沉淀边界曲线与电解液在不同 pH 值下发生沉淀的时间
Figure 1 | Calcium phosphate precipitation boundary curve and time to precipitate formation in the electrolyte selected when it was initially adjusted to different pH values

2.2 CaP 涂层电沉积过程中过饱和度和磷酸根分布变化 图 2A 为计算所得的实验所选该电解液在 pH 值变化（电沉积）过程中的过饱和度变化，可见在 pH 值 6.00–6.70 区间电解液对透钙磷石、磷酸八钙、羟基磷灰石均为过饱和，且过饱和度和（log S）依次增加。图 2B 显示计算所得不同 pH 值下磷酸根离子的分布系数，可见在电解液窗口内，磷酸根离子主要以 H₂PO₄⁻、HPO₄²⁻ 形式存在，而 PO₄³⁻ 的存在比例 < 0.5%。这些结果提示电沉积过程中 CaP 相的形成可能受热力学和结晶速率共同影响。

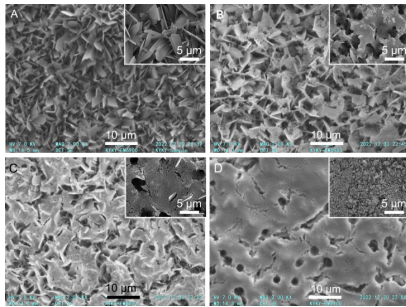


图注：A 为实验所选电解液在不同 pH 值下对 3 种磷酸钙相的过饱和度；B 为磷酸根离子的分布系数曲线。HA：羟基磷灰石；OCP：磷酸八钙；DCPD：透钙磷石。

图 2 | CaP 涂层电沉积过程中过饱和度和磷酸根分布变化
Figure 2 | Supersaturation of the electrolyte used for calcium phosphate phases and distribution changes of phosphate species

2.3 涂层理化性质表征结果

2.3.1 涂层形貌、成分与相组成 扫描电镜下可见 Ti-CaP 涂层由长、宽 2–4 μm，厚 0.1–0.5 μm 的片状晶体堆积组成，均匀覆盖，晶体间可见 2–5 μm 孔隙（图 3A）。经浸涂后，Ti-CaP-15Mg 可见 MgO 颗粒聚集成团（2–5 μm）分布于晶体间孔隙中，占据约 40% 晶体间孔隙（图 3B）。Ti-CaP-30Mg 中 MgO 结成团块，团块间相互连接，占据孔隙比例 > 70%（图 3C）。Ti-CaP-50Mg 中 MgO 大片聚集覆盖在 CaP 表面，MgO 层可见裂纹和直径 3–5 μm 的圆形孔洞，透过裂纹可见 MgO 层下的 CaP 晶体（图 3D）。

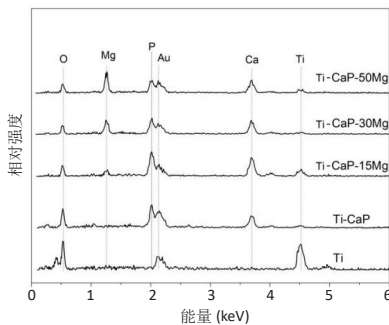


图注：A-D 分别为 Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg、Ti-CaP-50Mg。电沉积在钛表面制备出由片状磷酸八钙晶体堆积组成的多孔 CaP 涂层，经浸渗-煅烧处理后，MgO 颗粒聚集填充磷酸八钙晶体的间隙，并且填充程度随 MgO 含量增加而上升。

图 3 | 各组钛 (Ti) 片表面微观形貌 (扫描电镜)

Figure 3 | Surface micromorphology of titanium (Ti) sheets in each group (scanning electron microscope)

X 射线能谱分析发现，Ti-CaP 中出现 Ca、P 和 O 元素特征峰；相较于 Ti-CaP，Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg 和 Ti-CaP-50 Mg 中除上述元素外还出现 Mg 的特征峰，且其相对峰高随浸涂液中 Mg 质量分数的增加而增高 (图 4)。

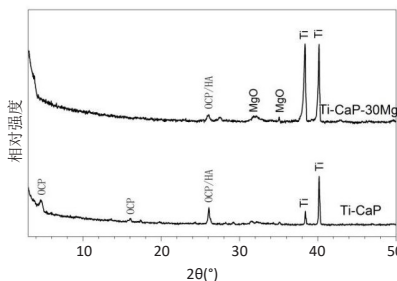


图注：Ti-CaP 中出现 Ca、P 和 O 元素特征峰；相较于 Ti-CaP，Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg 和 Ti-CaP-50Mg 中除上述元素外还出现 Mg 的特征峰，且其相对峰高随浸涂液中 Mg 质量分数的增加而增高。

图 4 | 各组钛 (Ti) 片 X 射线能谱图

Figure 4 | Energy dispersive X-ray spectra of titanium (Ti) sheets in each group

X 射线衍射图谱 (图 5) 显示，Ti-CaP 在 4.58° 、 15.98° 、 26.08° 出现衍射峰，其中前两者为磷酸八钙的特征峰。由于磷酸八钙和羟基磷灰石分别在 25.95° 、 25.87° 存在衍射峰，因此 26.08° 处衍射峰难以判定为磷酸八钙或羟基磷灰石。Ti-CaP-30Mg 在 31.82° 、 35.08° 出现 MgO 的衍射峰，在 26.06° 出现磷酸八钙或羟基磷灰石的衍射峰。但与 Ti-CaP 对比，Ti-CaP-30Mg 在 4.58° 的衍射峰接近消失。

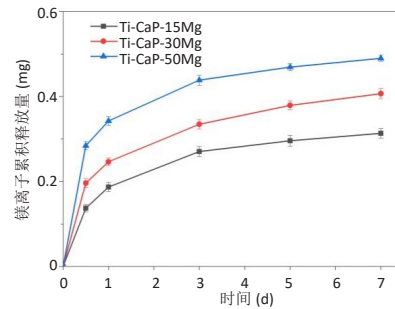


图注：Ti-CaP 在 4.58° 、 15.98° 、 26.08° 出现衍射峰，其中前两者为磷酸八钙 (OCP) 的特征峰；Ti-CaP-30Mg 在 31.82° 、 35.08° 出现 MgO 的衍射峰，在 26.06° 出现磷酸八钙或羟基磷灰石 (HA) 的衍射峰，但在 4.58° 的衍射峰接近消失。

图 5 | 各组钛片 (Ti) 的 X 射线衍射图谱

Figure 5 | X-ray diffraction pattern of titanium (Ti) sheets in each group

2.3.2 复合涂层体外镁离子释放 Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg 和 Ti-CaP-50Mg 在第 1 天均出现 Mg^{2+} 快速释放，随时间推移释放速度逐渐减慢，从第 3 天开始 Mg^{2+} 释放速率明显下降，趋向平缓，至第 7 天仍可检测出少量 Mg^{2+} 释放 (图 6)。



图注：Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg 和 Ti-CaP-50Mg 在第 1 天均出现 Mg^{2+} 快速释放，随时间推移释放速度逐渐减慢，从第 3 天开始 Mg^{2+} 释放速率明显下降，趋向平缓，至第 7 天仍可检测出少量 Mg^{2+} 释放。

图 6 | 各组钛 (Ti) 片涂层 Mg^{2+} 释放

Figure 6 | Mg^{2+} release from coating of titanium (Ti) sheets in each group

2.3.3 纯钛片与 Ti-CaP-30Mg 的拉伸性能 纯钛片和 Ti-CaP-30Mg 拉伸实验载荷-位移曲线见图 7。纯钛片和 Ti-CaP-30Mg 的屈服强度分别为 (394.5 ± 1.0) MPa 和 (377.6 ± 6.5) MPa，抗拉强度分别为 (475.3 ± 15.1) MPa 和 (468.3 ± 7.6) MPa，断裂伸长率分别为 0.27 ± 0.02 和 0.28 ± 0.03 ，组间比较差异均无显著性意义 ($P=0.43$ ， $P=0.11$ ， $P=0.41$)。两组所有指标均符合 GB/T 3631-2022 标准 (钛及钛合金板材) 要求，强度下降和伸长率上升符合热处理对晶粒尺寸和力学性能影响的规律^[29]。

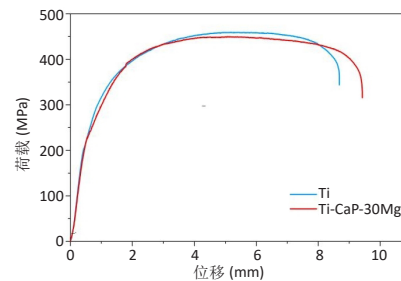


图 7 | 纯钛 (Ti) 片和 Ti-CaP-30Mg 拉伸实验载荷-位移曲线
Figure 7 | Load displacement curves of pure titanium (Ti) sheet and Ti-CaP-30Mg in tensile test

2.3.4 涂层临界载荷 图 8 显示 Ti-CaP-30Mg 划痕实验的代表性结果。Ti-CaP、Ti-CaP-15Mg、Ti-CaP-30Mg、Ti-CaP-50Mg 的临界载荷分别为 (4.32 ± 0.39) 、 (4.08 ± 0.19) 、 (3.99 ± 0.56) 、 (4.19 ± 0.32) N，4 组间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

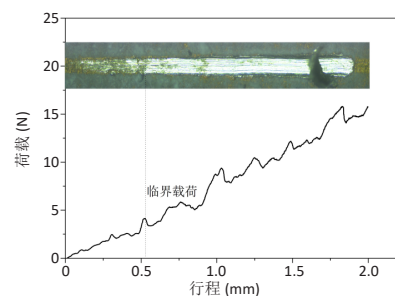
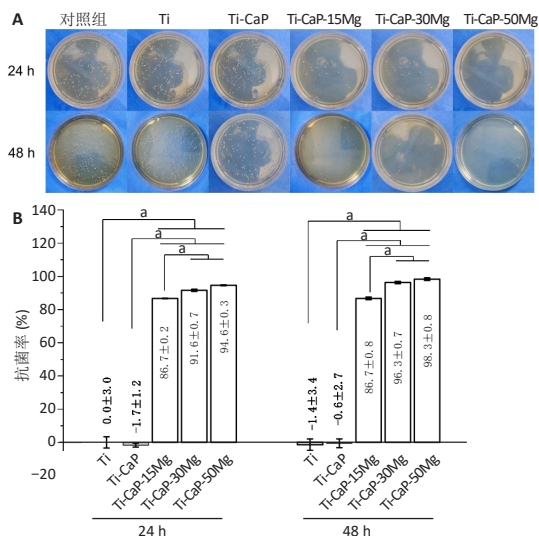


图 8 | Ti-CaP-30Mg 样品划痕实验结果
Figure 8 | Scratch test results of Ti-CaP-30Mg sample

2.4 涂层体外抗菌性能评价结果 培养不同时间后各组平板上形成的菌落数，见图 9A。培养 24 h 后平板上形成的菌落数由多到少为：Ti≈Ti-CaP > Ti-CaP-15Mg > Ti-CaP-30Mg > Ti-CaP-50Mg。纯钛组的抗菌率接近 0，Ti-CaP 组的抗菌率为 $(1.7 \pm 1.2)\%$ ，说明无抗菌性能；而 3 个复合涂层组的抗菌率均 > 0.85，且随浸涂液 Mg 质量分数的增加而上升，见图 9B。Ti-CaP-15Mg 组、Ti-CaP-30Mg 组、Ti-CaP-50Mg 组抗菌率大于纯钛组、Ti-CaP (均 < 0.05)；相比 Ti-CaP-15Mg 组，Ti-CaP-30Mg 组抗菌率上升 5.7% ($P=0.01$)；相比 Ti-CaP-30Mg 组，Ti-CaP-50Mg 组抗菌率上升 3.3% ，但差异无显著性意义 ($P=0.10$)。

培养 48 h 后, 纯钛、Ti-CaP 仍然无抗菌性能, 而 3 个复合涂层组的抗菌率仍均 > 0.85, 且随浸涂液 Mg 质量分数的增加而上升, 见图 9B。Ti-CaP-15Mg 组、Ti-CaP-30Mg 组、Ti-CaP-50Mg 组抗菌率大于纯钛组、Ti-CaP (均 < 0.05); 相比 Ti-CaP-15Mg 组, Ti-CaP-30Mg 组抗菌率上升 11.1% ($P < 0.01$); 相比 Ti-CaP-30Mg 组, Ti-CaP-50Mg 组抗菌率上升 2.1%, 但差异无显著性意义 ($P=0.63$)。

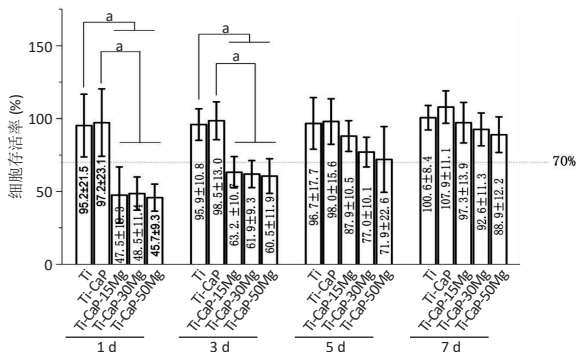


图注: A 为各组样品与金黄色葡萄球菌共培养 24, 48 h 后菌液稀释涂板菌落形成情况; B 为各组样品抗菌率, $^aP < 0.05$ 。

图 9 | 各组钛 (Ti) 片的抗菌性能

Figure 9 | Antibacterial properties of titanium (Ti) sheets in each group

2.5 涂层细胞毒性实验结果 各组样品与小鼠成骨细胞培养后的 CCK-8 检测结果, 见图 10。共培养 1 d, 纯钛组和 Ti-CaP 组细胞存活率 > 0.95, 3 个复合涂层组细胞存活率为 0.46–0.49, 且随浸涂液 Mg 质量分数的增加而下降, Ti-CaP-15Mg 组、Ti-CaP-30Mg 组和 Ti-CaP-50Mg 组细胞存活率低于纯钛组、Ti-CaP 涂层钛片组 (均 < 0.05)。共培养 3 d, 总体趋势与共培养 1 d 一致, 但 3 个复合涂层组相比共培养 1 d 的细胞存活率略有上升。共培养 5 d, 3 个复合涂层组细胞存活率明显上升, 其中 Ti-CaP-15Mg 组达 0.88, Ti-CaP-50Mg 组达 0.72, 5 组间细胞存活率比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。共培养 7 d, 3 个复合涂层组细胞存活率均升至 0.89–0.97, 5 组间细胞存活率比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

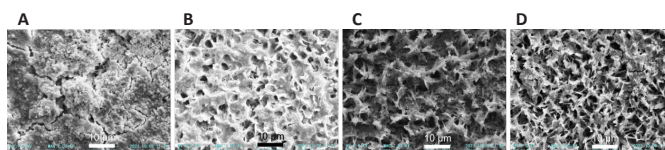


图注: 虚线代表标准 GB/T 16886.5-2017 规定的无细胞毒性阈值。 $^aP < 0.05$ 。

图 10 | 各组钛片表面小鼠成骨细胞存活率

Figure 10 | Survival rate of mouse osteoblasts on titanium surface of each group

图 11 为 3 组复合涂层样品在 DMEM 培养基中浸泡 1–7 d 后的代表性扫描电镜照片。浸泡第 1 天, 涂层中 MgO 将磷酸钙完全覆盖; 浸泡第 3 天, MgO 含量减少, 其下层磷酸钙晶体开始显露; 浸泡第 5 天, MgO 仅出现在磷酸钙晶体间隙中, 证实涂层中 MgO 含量随浸泡时间延长而减少。



图注: A–D 分别为为浸泡第 1, 3, 5, 7 天, 随着浸泡时间的延长, 涂层中 Mg 的含量逐渐减少。

图 11 | Ti-CaP-50Mg 在 DMEM 培养基中浸泡后的微观形貌 (扫描电镜)

Figure 11 | Microscopic morphology of Ti-CaP-50Mg after soaking in DMEM (scanning electron microscopy)

3 讨论 Discussion

当钛作为阴极时其表面发生析氢反应, 包括 H^+ 或水分子还原, 这些反应导致钛表面附近 H^+ 浓度降低, OH^- 浓度上升。pH 值升高引起溶液中 $H_2PO_4^-$ 、 HPO_4^{2-} 脱去 H^+ 向 PO_4^{3-} 转化, 造成钛附近 CaP 过饱和形成晶体, 并沉积在钛片表面。在沉积过程中, 随着涂层生长覆盖钛基体使其局部导电性减弱, 涂层生长减缓; 而未形成涂层或涂层较薄处, 局部导电性与阴极反应都相对较强, 涂层形成相对较快, 这种负反馈作用使得电沉积 CaP 涂层高度均匀。

根据滴定曲线, 此次实验所用电解液 pH 值达到约 6.70 会形成 CaP 相。但涂层中检测到磷酸八钙, 羟基磷灰石是否存在无法确定, 未发现透钙磷石, 这表明该电解液中晶体形成同时受动力学 (结晶速率) 和热力学 (过饱和度) 因素影响。按照磷酸根离子的分布系数曲线, 在 pH=7.0 附近 HPO_4^{2-} 约占总磷酸根离子的 40%, 而 PO_4^{3-} 的比例 < 0.5%, 在此 pH 值区间, 羟基磷灰石的两种组成阴离子 PO_4^{3-} 、 OH^- 浓度均很低, 其成核–生长速率受限; 反之, 由于磷酸八钙的组成阴离子为 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} , 其中 HPO_4^{2-} 的分布系数较大, 因此对磷酸八钙形成速率的限制相对较小。此外, 由于 HPO_4^{2-} 的分布系数大, 透钙磷石的形成速率所受限制较小, 但其过饱和度 (热力学驱动力) 最小, 因此可能不利于克服成核所需的能垒。DE ROOIJ 等^[30]用恒定组分技术研究各种 CaP 相的形成 pH 值范围, 发现磷酸八钙形成的 pH 范围为 6.0–7.0, 羟基磷灰石在 pH > 7.4 时形成, 透钙磷石在 pH < 5.5 时形成。BROWN^[31]发现磷酸八钙作为骨成分之一能指导胶原纤维矿化。JEONG 等^[32]研究发现, 磷酸八钙骨移植替代材料能促进鼠临界骨缺损愈合, 表明磷酸八钙具有良好的骨传导性。

溶胶浸渗是提高多孔材料致密度、力学性能和赋予其新功能的重要方法^[33–34]。SPIRANDELI 等^[34]利用生物玻璃溶胶渗透多孔 β -磷酸三钙支架, 提高支架的体外生物相容性和抗菌活性。此次实验通过扫描电镜、X 射线能谱分析证实, 浸涂处理后溶胶渗入磷酸钙涂层并通过烧结转化成 MgO, 并且可通过改变溶胶浓度和浸涂次数来控制 MgO 负载量。当负载 MgO 过多时, 复合涂层烧结后会出现裂纹, 因此只能在一定

限度内装载 MgO。划痕实验结果显示引入 MgO 对临界载荷无显著影响,并且数值与 SUIUKI 等^[35]报道的电沉积磷酸钙涂层接近。此次实验中 MgO 浸渗未能提高涂层临界载荷的原因尚不清楚,但可能与 MgO 和 CaP 之间的结合能力有关,需进一步研究。目前用溶胶渗透 CaP 涂层增进其功能的研究较少。除 MgO 外,其他材料也可通过溶胶浸渗改变 CaP 涂层的物理、化学特征,赋予其新生物学功能。近期研究发现纳米颗粒对细菌生存有重要影响,如 DONG 等^[36]和 LIU 等^[37]报道纳米 Mg(OH)₂ 颗粒通过被细菌内吞等机制杀死细菌。此次实验制备的复合涂层中, MgO 能否直接或通过水解成纳米 Mg(OH)₂ 颗粒被细菌摄入后杀死细菌需要进一步研究。此外,实验中 MgO 颗粒 < 500 nm,而大量报道植入材料微纳米尺度形貌特征可以上调细胞的黏附、增殖和分化^[38]。HICKEY 等^[39]报道向羟基磷灰石/聚乳酸复合材料中添加纳米 MgO 颗粒显著提高了表面接种的成骨细胞的黏附、增殖,但 MgO 与磷酸钙陶瓷或涂层复合对其生物学性能的影响目前尚无报道,仍需系统研究。

X 射线衍射结果显示,涂层经过 650 °C 处理后磷酸八钙的衍射峰消失,这是因为磷酸八钙的热力学不稳定,在高温下脱去结晶水转化成羟基磷灰石。BARNES 等^[40]也报道磷酸八钙在 300 °C 以上转化成羟基磷灰石。

体外 24, 48 h 抗菌实验结果显示, CaP-MgO 复合涂层具有良好的抗菌性能,这有利于在植入手术后初始阶段(24 h 内)杀死黏附于涂层表面的细菌,避免其形成生物膜。CAI 等^[41]认为 MgO 的主要抗菌机制包括产生活性氧及 MgO 与细菌之间直接接触。此次实验中 MgO-CaP 复合涂层的抗菌机制尚不清楚,需进一步系统研究。

体外抗菌实验结果显示, MgO-CaP 复合涂层的抗菌率为 87%–98%。HE 等^[42]研究发现 8 mg/mL 纳米 MgO 颗粒在 4 h 内完全灭活 10⁸–10⁹ CFU/mL 大肠杆菌和沙门氏菌,其材料抗菌性能优于此次实验中的复合涂层材料,这提示 MgO-CaP 复合涂层的抗菌性能可能仍有提升余地。但是,机体内多种酶等物质对活性氧具有清除作用,因此复合涂层在体内的抗菌能力仍需进一步研究。

按 G/T 16886.5-2017 标准,细胞存活率 ≥ 0.70 视为无细胞毒性。此次实验中复合涂层在前 3 d 具有细胞毒性(存活率 0.46–0.63),但其毒性随时间明显下降,从第 5 天开始复合涂层无细胞毒性。复合涂层的初期细胞毒性可能与 MgO 产生的活性氧有关;此外, MgO 降解造成 pH 值升高,也可能影响细胞生长^[43];而 5 d 后细胞毒性下降可能与 MgO 随着换液在培养基中的含量减少有关。骨折后软骨骨痂形成时间通常在两到三周^[44],因此前 3 d 细胞毒性对新骨形成预期无负面影响。LIANG 等^[45]的研究发现,当镁-钛合金中镁含量较高时(≥ 2.5%)在体外会有细胞毒性。而 WANG 等^[46]在兔胫骨骨折模型中植入镁含量为 97% 的镁合金钢板和螺钉,发现镁合金组骨折愈合优于纯钛组。这两项研究提示镁的体外细胞毒性不影响体内成骨。

目前对 MgO 生物相容性的研究相对较少。POURDANESH 等^[47]制备了聚乙烯/磷酸三钙/羟基磷灰石/MgO 复合材料,将其植入兔颅骨 2 个月后发现炎症细胞明显减少,骨-材料界面有可观察到的成骨细胞和新骨。JANNING 等^[48]将 Mg(OH)₂ 植入兔股骨髁,4 周后观察到其附近骨体积高于对照组(未填充的手术缺损),6 周后与对照组接近。当前大量研究表明,镁合金在骨组织内具有生物相容性,而镁合金的腐蚀产物为 Mg(OH)₂,提示 Mg(OH)₂ 具有安全性。WITTE 等^[49]将 4 种不同镁合金植入豚鼠股骨,6–18 周后发现镁棒周围的矿物质附着率提高,骨量增加。这些研究均提示 MgO-CaP 复合涂层具有良好的生物相容性。

此次实验利用溶胶凝胶法将 MgO 与电沉积 CaP 涂层复合,体外实验表明该涂层具有良好的抗菌性和生物相容性。实验所述涂层制备方法简单易行,有较好的临床应用前景,但复合涂层在体外存在初期细胞毒性,并且其抗菌机制及体内抗菌性能尚不明确,需进一步研究。

作者贡献: 段可、尹一然进行实验设计,实验实施为谭俊杰、文振宇、杜佳恒,实验评估为李忠、闫吉元,资料收集为贺葵、谭俊杰,谭俊杰成文,段可、尹一然审核。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。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。

4 参考文献 References

- [1] KUMAR ST, DEVI SP, KRITHIKA C, et al. Review of metallic biomaterials in dental applications. *J Pharm Bioallied Sci.* 2020;12(Suppl 1):S14.
- [2] ALVAND A, REZAPOOR M, PARVIZI J. The role of biomarkers for the diagnosis of implant-related infections in orthopaedics and trauma. *Adv Exp Med Biol.* 2017;971:69-79.
- [3] NANA A, NELSON SB, MCLAREN A, et al. What's new in musculoskeletal infection: update on biofilms. *J Bone Joint Surg Am.* 2016;98(14):1226-1234.
- [4] DONLAN RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881.
- [5] NARAYANAN R, SESHADRI SK, KWON TY, et al. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;85(1):279-299.
- [6] SUN L, BERNDT CC, GROSS KA, et al. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J Biomed Mater Res.* 2001;58(5):570-592.
- [7] HAMAGAMI J, ATO Y, KANAMURA K. Fabrication of highly ordered macroporous apatite coating onto titanium by electrophoretic deposition method. *Solid State Ion.* 2004;172(1-4):331-334.
- [8] LOPEZ-HEREDIA MA, WEISS P, LAYROLLE P. An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18:381-390.

- [9] KNUDSEN MB, THILLEMANN JK, JØRGENSEN PB, et al. Electrochemically applied hydroxyapatite on the cementless porous surface of Bi-Metric stems reduces early migration and has a lasting effect: an efficacy trial of a randomized five-year follow-up radiostereometric study. *Bone Joint J.* 2022;104(6):647-656.
- [10] KARLOV AV, KHLUSOV IA, PONTAK VA, et al. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to implants with different physicochemical characteristics. *Bull Exp Biol Med.* 2002;134:277-280.
- [11] VOGELY HC, OOSTERBOS CJM, PUTS EWA, et al. Effects of hydroxyapatite coating on Ti-6 Al-4V implant-site infection in a rabbit tibial model. *J Orthop Res.* 2000;18(3):485-493.
- [12] LAZARINIS S, MÄKELÄ KT, ESKELINEN A, et al. Does hydroxyapatite coating of uncemented cups improve long-term survival? An analysis of 28,605 primary total hip arthroplasty procedures from the Nordic Arthroplasty Register Association (NARA). *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25(12):1980-1987.
- [13] ALTOMARE L, VISAI L, BLOISE N, et al. Electrochemically deposited gentamicin-loaded calcium phosphate coatings for bone tissue integration. *Int J Artif Organs.* 2012;35(10):876-883.
- [14] KOSE N, OTUZBIR A, PEKŞEN C, et al. A silver ion-doped calcium phosphate-based ceramic nanopowder-coated prosthesis increased infection resistance. *Clin Orthop Relat Res.* 2013;471:2532-2539.
- [15] PIERRE C, BERTRAND G, PAVY I, et al. Antibacterial Electrodeposited Copper-Doped Calcium Phosphate Coatings for Dental Implants. *J Funct Biomater.* 2022;14(1):20.
- [16] CHEN Z, MENG H, XING G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett.* 2006;163(2):109-120.
- [17] VORMANN J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med.* 2003;24(1-3):27-37.
- [18] ARANCIBIA-HERNÁNDEZ YL, HERNÁNDEZ-CRUZA EY, PEDRAZA-CHAVERRIA J. Magnesium (Mg²⁺) Deficiency, Not Well-Recognized Non-Infectious Pandemic: Origin and Consequence of Chronic Inflammatory and Oxidative Stress-Associated Diseases. *Cell Physiol Biochem.* 2023;57(S1):1-23.
- [19] 中国居民膳食常量元素参考摄入量 [C]// 中国营养学会微量元素营养分会 . 中国营养学会微量元素营养第十二学术会议暨第六届微量元素营养分会会员大会论文集 . 四川西昌 ,2014:164.
- [20] PATEL MK, ZAFARYAB M, RIZVI M, et al. Antibacterial and cytotoxic effect of magnesium oxide nanoparticles on bacterial and human cells. *J Nanoeng Nanomfg.* 2013;3(2):162-166.
- [21] SAWAI J, KOJIMA H, IGARASHI H, et al. Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. *World J Microbiol Biotechnol.* 2000;16:187-194.
- [22] BHATTACHARYA P, DEY A, NEOGI S. An insight into the mechanism of antibacterial activity by magnesium oxide nanoparticles. *J Mater Chem B.* 2021;9(26):5329-5339.
- [23] COELHO CC, ARAÚJO R, QUADROS PA, et al. Antibacterial bone substitute of hydroxyapatite and magnesium oxide to prevent dental and orthopaedic infections. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;97: 529-538.
- [24] 肖东琴, 李文, 段可, 等 . 骨科植入金属材料表面电化学制备磷酸钙涂层方法及机理研究 [J]. 西部医学 ,2023,35(8):1110-1116,1121.
- [25] 武汉大学 . 分析化学 [M].6 版 . 北京 : 高等教育出版社 ,2016.
- [26] RAMANUJAM K, SUNDARAJAN M. Antibacterial effects of biosynthesized MgO nanoparticles using ethanolic fruit extract of *Embllica officinalis*. *J Photochem Photobiol B.* 2014;141:296-300.
- [27] 黄珂, 杨伏良, 陈力学, 等 . 划痕法测定 TiAlN 涂层结合强度的研究 [J]. 表面技术 ,2013,42(5):107-111.
- [28] 董自艳, 戴翠, 马仕洪, 等 . 紫外 - 可见分光光度法快速确定细菌菌液的浓度 [J]. 中国药品标准 ,2014(2):120-121.
- [29] YADAV P, SAXENA KK. Effect of heat-treatment on microstructure and mechanical properties of Ti alloys: An overview. *Mater Today Proc.* 2020;26:2546-2557.
- [30] DE ROOIJ JF, HEUGHEBAERT JC, NANCOLLAS GH. A pH study of calcium phosphate seeded precipitation. *J Colloid Interface Sci.* 1984;100(2): 350-358.
- [31] BROWN WE. Crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature.* 1962;196: 1050-1055.
- [32] JEONG CH, KIM J, KIM HS, et al. Acceleration of bone formation by octacalcium phosphate composite in a rat tibia critical-sized defect. *J Orthop Translat.* 2022;37:100-112.
- [33] JIN H, JIA D, YANG Z, et al. Fabrication and properties of embedded dense coating on direct ink writing Si₂N₂O porous ceramics. *Surf Coat Technol.* 2020;394:125801.
- [34] SPIRANDELI BR, RIBAS RG, AMARAL SS, et al. Incorporation of 45S5 bioglass via sol-gel in β -TCP scaffolds: Bioactivity and antimicrobial activity evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;131:112453.
- [35] SUZUKI O, SHIWAKU Y, HAMAI R. Octacalcium phosphate bone substitute materials: Comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials. *Dent Mater J.* 2020;39(2): 187-199.
- [36] DONG C, HE G, ZHENG W, et al. Study on antibacterial mechanism of Mg (OH) 2 nanoparticles. *Mater Lett.* 2014;134:286-289.
- [37] LIU Y, LIU Y, LI X, et al. Fabrication and research of Mg (OH) 2/PCL/PVP nanofiber membranes loaded by antibacterial and biosafe Mg (OH) 2 nanoparticles. *Polym Test.* 2022;112:107635.
- [38] LORD MS, FOSS M, BESENBACHER F. Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. *Nano Today.* 2010;5(1):66-78.
- [39] HICKEY DJ, ERCAN B, SUN L, et al. Adding MgO nanoparticles to hydroxyapatite-PLLA nanocomposites for improved bone tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2015;14:175-184.
- [40] BARNES D, JOHNSON S, SNELL R, et al. Using scratch testing to measure the adhesion strength of calcium phosphate coatings applied to poly (carbonate urethane) substrates. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;6: 128-138.
- [41] CAI Y, LI C, WU D, et al. Highly active MgO nanoparticles for simultaneous bacterial inactivation and heavy metal removal from aqueous solution. *Chem Eng J.* 2017;312:158-166.
- [42] HE Y, INGUDAM S, REED S, et al. Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *J Nanobiotechnol.* 2016;14:1-9.
- [43] NAKAMURA T, NAGURO I, ICHIJO H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2019;1863(9):1398-1409.
- [44] BUCKLEY RRE, MORAN CG, APIVATTHAKAKUL T. 骨折治疗的 AO 原则 [M]. 危杰, 刘璿, 吴新宝, 等译 .3 版 . 上海 : 上海科学技术出版社 ,2019:14-15.
- [45] LIANG L, HUANG Q, WU H, et al. Stimulation of in vitro and in vivo osteogenesis by Ti-Mg alloys with the sustained-release function of magnesium ions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021;197:111360.
- [46] WANG Y, LIANG W, LIU X, et al. Osteogenesis and degradation behavior of magnesium alloy plate in vivo. *Eur J Inflamm.* 2021;19: 20587392211034078.
- [47] POURDANESH F, JEBALI A, HEKMATIMOGHADDAM S, et al. In vitro and in vivo evaluation of a new nanocomposite, containing high density polyethylene, tricalcium phosphate, hydroxyapatite, and magnesium oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;40: 382-388.
- [48] JANNING C, WILLBOLD E, VOGT C, et al. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. *Acta Biomater.* 2010;6(5): 1861-1868.
- [49] WITTE F, KAESE V, HAFERKAMP H, et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials.* 2005;26(17):3557-3563.

(责任编辑: GW, ZN, QY, YJ)