

纳米银羟基磷灰石复合涂层的生物安全性研究

张 敏¹ 施更生¹ 林海升¹ 陈再鸿¹ 史建陆² 林昌健³

[摘要] 目的 研究纳米银羟基磷灰石的细胞毒性。方法 采用能快速、准确、敏感地评价细胞增殖率和细胞毒性的 MTT 比色法,以纳米羟基磷灰石为对照组,纳米银羟基磷灰石为实验组,在材料浸提液中,分别检测人牙周膜成纤维样细胞的相对增殖率。另观察细胞在扫描电镜中的形态,从而分析比较涂层表面对细胞的毒性。结果 与纳米羟基磷灰石相比,纳米银羟基磷灰石涂层中的纳米银粒子直径在 200~400 nm 时体外细胞培养显示表现出较高的细胞增殖率,细胞毒性趋于 0 级,显示其具有良好的生物活性。结论 纳米银羟基磷灰石涂层无细胞毒性。

[关键词] 纳米银羟基磷灰石涂层; 细胞毒性; MTT 比色法

[中图分类号] R783.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-9872(2010)09-0541-03

Study on bio-safety for Nano-Ag /HAp as anti-bacterial materials

ZHANG Min, SHI Geng-sheng, LIN Hai-sheng, CHEN Zai-hong, SHI Jian-lu, LIN Chang-jian. (Department of Orthodontics, Hospital of Taizhou, Linhai 317000, China)

Abstract: **Objective** To study the cytotoxicity of a Nano-Ag/HAp composite coating on titanium surface. **Methods** A Nano-Ag/HAp composite coating was deposited on the surface of pure titanium by electrochemical deposition. In vitro cellular responses of the PDLF to the coating were also evaluated by MTT assay. Conventional HAp coatings and commercially pure titanium were taken as control. **Results** The Nano-Ag/HAp bioceramic coating has good crystallization and homogeneity on nano-scale surface morphology. The PDLF culture exhibits satisfactory bioactivity. **Conclusions** The Nano-Ag/HAp bioceramic coating on titanium surface has promising prospects in the future clinical application.

Key words: Nano-Ag /Hydroxyapatite coating; cytotoxicity; MTT assay

Stomatology 2010, 30(9): 541-543

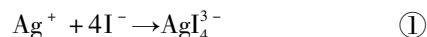
金属钛表面涂覆羟基磷灰石涂层是一种理想的人体硬组织替代材料。羟基磷灰石(HAp)是骨的主要成分,具有骨诱导性,能在手术初期促进伤骨生长愈合。然而,这种生物活性的环境也便于细菌的附着和繁殖,细菌感染仍是目前植入手术失败的最主要的原因。高温消毒后 90% 的生物材料仍然带有细菌。银、氧化银及银盐具有广谱和高效的抗菌效果。因此,在金属钛表面沉积纳米银/羟基磷灰石复合涂层,有可能获得既有生物活性又具有抗菌特性的生物材料。我们采用恒电位电化学法在钛种植体表面沉积纳米银/羟基磷灰石复合涂层,试图制备一种简单易得、涂层结合力强、生物活性高、抗菌特性好的硬组织生物材料。

1 材料与方法

1.1 实验分组及材料制备

将商业纯钛(厦门大学化学化工学院提供)切

割成 10 mm × 10 mm × 1 mm 的钛板,分为 3 组,每 6 个试件为 1 组,经 600、800、1 000、1 200、1 500#砂纸逐级打磨后,在丙酮、乙醇和 3 次蒸馏水依次超声清洗各 15 min。在 1:1 浓硫酸和浓盐酸混合液中浸泡 1 h,以除去钛板表面的氧化钛,并形成氢化膜保护其不被氧化。以沉积银颗粒的钛板为工作电极阴极,1 cm × 1 cm 铂片为对电极,饱和甘汞电极做参比电极。电解液组分为无水 CaCl₂、NaH₂PO₄、AgNO₃ 和 KI,控制电位为 -1.30 V,室温下沉积 10 min。复合电沉积后得到的材料是纳米银/二水合磷酸氢钙(DCPD)复合涂层。经 75 °C 2.5 mol/L NaOH 中水浴 3 h,使纳米银/二水合磷酸氢钙(DCPD)转化为 Nano-Ag/HAp 复合涂层。在整个制备过程中主要发生以下 5 种反应。在高浓度的碘化钾溶液中,银离子发生络合反应:



所以 AgNO₃ 能和 CaCl₂、NaH₂PO₄ 共存于溶液中。在负电位下,阴极钛表面发生反应:

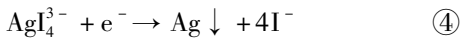


作者单位: 1 浙江省台州医院口腔科, 临海(317000); 2 厦门市口腔医院正颌科, 厦门(361003); 3 厦门大学化学学院固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门(361005)

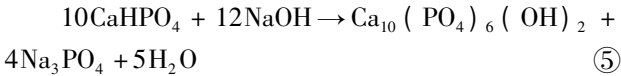
通信作者: 史建陆 Tel: (0576) 85199572

E-mail: zmfjmu@gmail.com

同时银离子发生还原反应:



随后将 DCPD 在 75 °C 的碱液中水浴加热 3 h 后转化为 HAp, 反应如下:



1.2 实验细胞株、试剂及设备

实验用人牙周膜成纤维样细胞(PDLF)培养:采集自我院正畸青少年拔除的健康前磨牙,冲洗 3 遍,刮取牙根中 1/3 处的牙周膜剪成 1 mm³ 大小的组织块,均匀地铺于培养瓶底培养。待组织块贴牢瓶底后轻轻翻转培养瓶,继续培养,每 4 天换液 1 次,直至细胞从组织块周围游出、传代后取第 4~6 代细胞进行实验。实验用 10% 的小牛血清的 DMEM 培养液(Gibco 美国) 0.25% 胰蛋白酶(Gibco 美国) 磷酸盐(PBS)缓冲液;噻唑蓝(Serva, 美国) 二甲基亚砷(上海金山化工厂);96 孔板(Costar 美国);酶联免疫检测仪(Bp800, Biohit, 美国);超净工作台(YJ-875DA 型, 苏净集团安泰公司制造);细胞培养箱(BB5060 型, 日本);倒置显微镜(TE300, Nikon, 日本)等。

1.3 材料浸提液的制备

用 3 蒸水反复清洗试件后,常规消毒、干燥。按照试件表面积与浸提液量之比为 2 cm²/ml 的比例,在小培养皿中分别放入 DMEM 培养液和试件,放入 37 °C 恒温培养箱中,静置浸提液 24 h 后备用。材料浸提液的制备,依据 GB/T 16886.12-2000(ISO 10993-12:1996)“医疗器械生物学评价第 12 部分:样品制备与参照样”进行。将密度为 5 × 10³ 个/孔的 PDLF 悬液以 100 μl/孔接种于 96 孔板中,每组 6 孔,置于恒温培养箱中培养 24 h,待贴壁后分别加入 100 μl 浸提液;阴性对照组加入 100 μl 新鲜培养液,然后放入上述环境中培养 48 h。每孔加入 5 g/L 噻唑蓝 20 μl,继续培养 4 h,然后吸弃原液,加入二甲基亚砷 200 μl,震荡 10 min,使用酶联免疫检测仪在波长 490 nm 处测定吸光度值。

1.4 细胞毒性评价

计算细胞的相对增殖度(relative growth rate, RGR)。RGR(%) = 试样组吸光度值/空白对照组吸光度值 × 100%。

1.5 电子扫描电镜观察细胞形态

以 5 × 10⁴ 个/ml 细胞悬液接种于材料表面,在恒温培养箱中培养,于第 3 天随机取出 1 份样本固定:用 PBS 清洗材料 1 次,0.1 mol/L 的磷酸缓冲液清洗 2 次,在 4 °C 下用 2.5% 的固定液固定 2 h,用 4

°C 的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 5 min (加入缓冲液,适当晃动使之均匀,弃缓冲液,换新缓冲液,洗 3 次也只需要 5 min)。梯度脱水:浸泡在不同的梯度乙醇溶液中 2 次,每次 10 min,梯度浓度和顺序分别为:30%、50%、70%、90%、100%。浸泡在乙酸异戊酯的乙醇溶液(1:1) 10 min,在乙酸异戊酯溶液中浸泡 10 min。进行零界点干燥,喷金镀膜后用扫描电镜观察材料表面细胞形貌,以此评价材料的生物相容性。

1.6 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件包对数据进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较各实验材料 MTT 值之间的差异是否有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞毒性评价

表 1 显示了对 Nano-Ag/HAp 涂层采用 MTT 比色法测定的吸光度值、细胞相对增殖率及毒性分析结果。表 2 结果显示,Nano-Ag/HAp 涂层对牙周膜成纤维样细胞无毒性。

表 1 两种材料及对照组的细胞相对增殖率

Tab 1 RGR of PDLF in extraction fluid of Nano-Ag/HAp coating

($\bar{x} \pm s, n=6$)	
实验材料	吸光度
HAp 组(I)	0.332 ± 0.013
Nano-Ag/HAp 组(II)	0.354 ± 0.042
阴性对照组(III)	0.388 ± 0.026

注:实验组与阴性对照组比较 $P < 0.05$

表 2 两种材料及对照组的细胞毒性分级

Tab 2 Cytotoxicity of PDLF in extraction fluid of Nano-Ag/HAp coating

($\bar{x} \pm s, n=6$)		
实验材料	RGR(%)	毒性分级
HAp 组(I)	85.3 ± 8.6	1
Nano-Ag/HAp 组(II)	93.1 ± 6.9	0
阴性对照组(III)	100.0	0

注:RGR 为细胞相对增殖度;实验组与阴性对照组比较 $P < 0.05$

2.2 低倍扫描电镜观察细胞形态

图 1 中绝大多数细胞黏附于纳米羟基磷灰石涂层,整体铺展状况良好。在图 2 中为单个人牙周膜成纤维样细胞在复合涂层中的贴壁铺展状况,其伸出较多的触须,表明镶嵌于涂层中的银颗粒有利于细胞贴附,刺激细胞生长的特殊位点。由此可见,本实验制备的 Nano-Ag/HAp 复合涂层具有良好的生物活性。

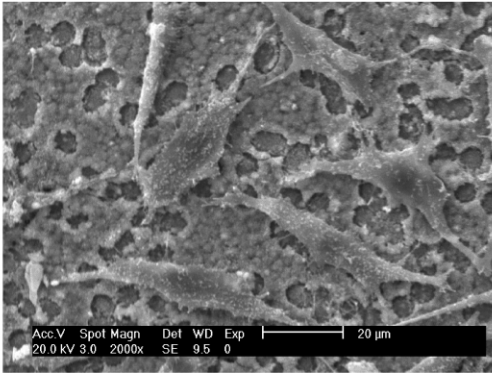


图 1 细胞贴附 Nano-Ag/HAp 的 SEM 图(×2 000)

Fig 1 SEM of PDLF attachment and proliferation on electrodeposited Nano-Ag/HAp (×2 000)

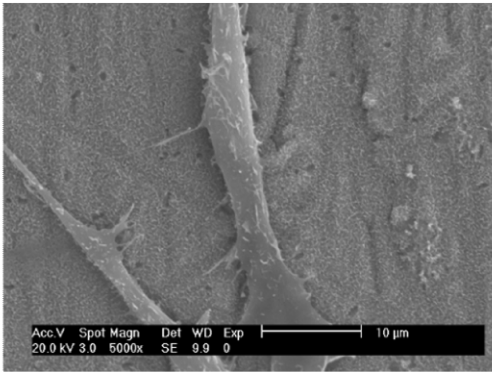


图 2 细胞贴附 Nano-Ag/HAp 的 SEM 图(×5 000)

Fig 2 SEM of PDLF attachment and proliferation on electrodeposited Nano-Ag/HAp (×5 000)

3 讨论

细胞相对增殖度是医用生物学评价体系中的重要检测指标之一。贾元宏等^[1]对一种以纳米载银抗菌粉为主要成分的复方抗菌剂进行抑菌效果和毒性试验,结果显示该抑菌剂属无毒、无急性刺激性、弱蓄积性物质。余文珺等^[2]通过载银基托树脂的抗菌性及长效性研究中发现添加载银无机抗菌剂后,基托树脂具有抑制细菌的显著作用。张富强等^[3]通过分析 6 种纳米载银无机抗菌剂不同浓度银离子稀释液对体外细胞的毒性,初步评价它们的生物安全性,结果显示 6 种纳米载银无机抗菌剂高浓度稀释液对 L-929 均有毒性,当浓度 ≤ 25 g/L 时已无毒性。本项实验结果显示,当涂层中纳米银颗粒含量为 1.04% 时,人的牙周膜成纤维样细胞的 RGR 为 $(93.1 \pm 6.9)\%$,毒性分级为 0 级。通过细胞实验验证了这种材料的细胞毒性符合生物材料的要求。

将金属银加工成纳米银后,原子排列为介于固体和分子之间的“介态”,其比表面积大,显

示明显的表面效应、小尺寸效应和宏观隧道效应,这种活性极强的纳米银微粒具备超强的抗菌能力。利用纳米银所具有的抗菌作用,治疗或预防临床上经常遇到的感染问题,显示出它的正面生物效应。然而,对于处于纳米级的含银材料,它与生物体接触后是否也具有杀伤作用,涉及到纳米银作为抗菌材料本身的生物安全性问题。Gustafson 等^[4]在 1961 年首次报道了活细胞的伪足结构,推测此结构的出现是细胞用来探测外界空间信息接收装置^[5]。本研究中涂层材料表面为人牙周膜成纤维样细胞的细小伪足提供了附着位点,表现出良好的接触引导作用。研究表明细胞的伪足结构一旦选择了合适的表面位点,就会形成扁形伪足使细胞向更适宜的位置迁移^[6]。细胞的附着是细胞进一步繁殖行使功能的基础。最近有报告指出:暴露在 10~50 nm 银颗粒中的细胞的乳酸脱氢酶(LDH)外漏增加,在与其他纳米粒子的比较中发现纳米银具有很强的毒性^[7]。在本实验中纳米银羟基磷灰石复合涂层中纳米银颗粒为 200~400 nm,从图 1~3 中可见细胞比较均匀的铺在纳米银羟基磷灰石涂层表面,呈梭形和多角形生长,贴壁状态良好,胞膜完整,具有正常的细胞形态。细胞数量多,成群聚集多见,表面细胞皱褶较多,除较大的细胞突起外,尚有大量的细小细胞伪足,呈散射状分布于细胞四周,这些微小的突起直径在 50~80 nm,与纳米晶体之间呈广泛紧密接触,且有明显的沿纳米晶之间沟隙延伸的趋势。说明纳米银羟基磷灰石复合涂层细胞毒性很小。

【参 考 文 献】

- [1] 贾元宏,张淑青,张学庆,等.一种纳米材料抑菌效果及毒性实验观察[J].预防医学文献信息,2002,8(6):737.
- [2] 余文珺,张富强,李鸣宇,等.载银基托树脂的抗菌性及长效性研究[J].口腔医学,2006,26(5):345-347.
- [3] 张富强,余文珺,傅远飞.6种纳米载银无机抗菌剂的体外细胞毒性比较[J].中华口腔医学杂志,2005,40(6):504-507.
- [4] Gustafson T, Wolpert L. Studies on the cellular basis of morphogenesis in the Sea Urchin embryo: directed movements of primary mesenchyme cells in normal and vegetated larvae[J]. Exp Cell Res, 1961, 24(2): 64-79.
- [5] Wood W, Martin P. Structures in focus-filopodia[J]. Int Biochem Cell Biol, 2002, 34(7): 726-730.
- [6] Andersson AS, Brink J, Lidberg U, et al. Influence of Systematically Varied nanoscale Topography on the Morphology of Epithelial Cells[J]. IEEE Trans Nanobiosci, 2003, 2(2): 49-57.
- [7] Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells[J]. Toxicology in vitro, 2005, 19(5): 975-983.