

# 含银羟基磷灰石种植体的细胞毒性研究\*

张 敏<sup>1</sup> 史建陆<sup>1\*\*</sup> 林昌建<sup>2</sup>

(1.福建医科大学教学医院·厦门市口腔医院 福建 厦门 361000;

2.厦门大学化学系固体表面物理化学国家重点实验室 福建 厦门 361000)

**[摘要]** 目的 在钛种植体表面构筑羟基磷灰石纳米银涂层并进行生物学评价。方法 采用恒电位电化学法在纯钛表面构建纳米级羟基磷灰石/纳米银(HAp/Nanosilver)涂层。采用扫描电镜(SEM)检测手段对涂层进行理化性能表征。考察了涂层的结构组分和表面的微观形貌,而后将人牙周膜成纤维样细胞培养于涂层表面,采用细胞毒性评价及其形态观察,分析比较不同表面涂层对牙周膜成纤维样细胞粘附率及增殖率的影响。结果 羟基磷灰石纳米银涂层体外细胞培养显示其具有良好的生物活性。结论 本实验构筑的涂层具有良好的生物相容性和细胞粘附性,应用前景广阔。

**[关键词]** 种植体 涂层 生物相容性

**[中图分类号]** R783.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1003-1634(2009)03-0139-03

**The preparation and biological evaluation of Hydroxyapatite / Nanosilver bioceramic coating on Titanium implant surface.** ZHANG Min<sup>1</sup> SHI Jian-lu<sup>1</sup> LIN Chang-jian<sup>2</sup>. 1. Department of Orthodontics Dental Hospital of Xiamen, Fujian Medical University Fujian Xiamen 361003, China; 2. State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces Department of Chemistry, Xiamen University Fujian Xiamen 361005, China.

**[Abstract]** **Objective** To prepare the composite of Hydroxyapatite / Nanosilver composite coating on titanium implant surface. **Method** A HAp / Nanosilver composite coating was deposited on the surface of pure titanium by electrochemical deposition. Scanning electromicroscope(SEM) was employed to characterize the obtained coating. The reactions of human periodontal ligament fibroblast-like cells (PDLF) to the coating were also evaluated by MTT assay and SEM observation. **Result** The HAp / Nanosilver bioceramic coating has good crystallization and homogeneousness on nano-scale surface morphology. The PDLF growth was tested by MTT assay and the cell relative growth rate (RGR) was calculated. **Conclusion** : The HAp / Nanosilver bioceramic coating on titanium surface possesses good biocompatibility and cellular adhesion and has promising prospects in the future clinical application.

**[Key words]** implant coating biocompatibility

由于纯钛和钛合金种植体表面缺乏生物活性,为获得种植成功,采用在钛种植体表面涂覆羟基磷灰石(HAp),是一种有效的改善其生物活性的方法。然而,具有良好生物活性的HAp涂层亦为细菌附着提供了有利场所。牙种植体颈部暴露在口腔这个复杂的微生物环境中,其周围炎症已经成为导致种植体保存率下降的重要原因<sup>[1,2]</sup>。与目前使用的所有抗生素不同,细菌对银离子不产生耐药性<sup>[3]</sup>。以牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和伴放线杆菌为代表的革兰氏阴性厌氧菌及螺旋体是导致种植体周围炎的主要微生物因素<sup>[4]</sup>。因此,

具有抗菌性HAp生物涂层的研究具有现实意义。传统的种植体表面涂层工艺主要为等离子喷涂,其缺点是设备昂贵、工艺复杂、处理温度高、有副产品、磷灰石结晶度低、涂层过厚且残余应力大等,导致涂层在体液中易崩解失效。运用电化学的方法旨在用简便、廉价的方法在医用金属钛表面构筑具有特殊结构的且具有一定强度的HAp/Nanosilver涂层并表征其主要性能,为钛种植体表面生物活性涂层的研究和应用提供新的思路。

## 材料和方法

\* 基金项目 厦门市科技局资助项目(3502Z20084034)

\*\* 通讯作者 史建陆 Tel:13606923777

E-mail:ldent777@sina.com

- [5] Yamane M, Yamaoka M, Hayashi M et al. Measuring tooth mobility with a no-contact vibration device [J]. J Periodont Res 2008, 43(1): 84-89.
- [6] K Komatsu, C Sanctuary, T Shibata et al. Stress-relaxation and microscopic dynamics of rabbit periodontal ligament [J]. Journal of

biomechanics 2007, 40(3): 634-644.

- [7] A Ziegler, L Keilig, A Kavarizadeh et al. Numerical simulation of the biomechanical behaviour of multi-rooted teeth [J]. European Journal of Orthodontics 2005, 27(5): 333-339.

收稿日期 2008-08-10

1 实验材料的预备及制备

1.1 将纯钛切割成 10 mm × 10 mm × 1 mm 的钛板,分为 3 组,经 600#、800#、1000#、1200#、1500# 砂纸逐级打磨抛光后,在丙酮、乙醇和三蒸水依次超声清洗各 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,并形成氯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。电解液组分别为无水 CaCl<sub>2</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、AgNO<sub>3</sub> 和 KI,室温下沉积 10 min。复合电沉积后得到的材料是二水合磷酸氢钙(DCPD)/纳米银复合涂层。经 75 °C 2.5 mol/L NaOH 中水浴 3 h,使 DCPD/Nanosilver 转化为 HAp/Nanosilver 复合涂层。

1.2 实验细胞株、试剂及设备

牙周膜成纤维样细胞(PDLF)培养 取正畸拔除的前磨牙,冲洗 3 遍,刮取牙根中 1/3 处的牙周膜剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 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 d 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) 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(Coster, 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) 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

用三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为 2 m<sup>2</sup>/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。

2 实验方法

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:样品制备与参照样品"进行。将浓度为 5 × 10<sup>3</sup> 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。

3 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%。

4 SEM 观察细胞形态

以 6 × 10<sup>4</sup> 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 d 随机取出 1 份样本, PBS 冲洗,经 2.5%戊二醛固定、脱水、真空临界点干燥,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。

5 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件包对数据进行处理,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析(ANOVA)比较各实验材料 MTT 值之间的差异是否有统计学意义。

结 果

1 涂层的表面检测结果

1.1 扫描电镜(SEM)

HAp/Nanosilver 涂层整体形貌比较均匀致密,结构相对有序。HAp/Nanosilver 涂层的表面形貌,羟基磷灰石呈多孔状,孔径为纳米级。200 nm~400 nm 的银颗粒,均匀分散于多孔蜂窝状的羟基磷灰石中(见图 1)。这些纳米级晶体可以增加材料的生物活性。而表面的微孔则有利于营养物质的吸附和交换,促进细胞的早期粘附。

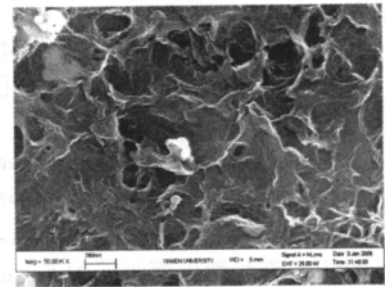


图 1 电沉积 HAp/Nanosilver 的 SEM 图(×50000)

1.2 SEM 观察细胞形态

L-929 细胞在复合涂层中的贴壁铺展状况良好,伸出较多的触须(见图 2),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,本文制备的 HAp/Nanosilver 复合涂层具有良好的生物活性。

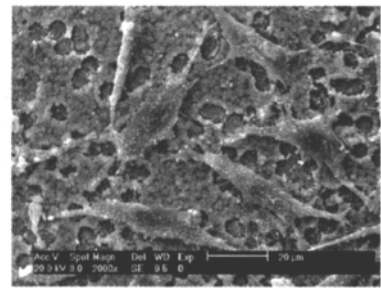


图 2 细胞贴附 HAp/Nanosilver 的 SEM 图(×2000)

1.3 细胞毒性评价

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见表 2。结果显示,HAp/Nanosilver 涂层对牙周膜成纤维样细胞无毒性。

表 2 HAp/Nanosilver 的体外细胞毒性测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

实验材料	吸光度值	RGR(%)	毒性分级
HAp 组( )	0.332±0.013	85.3±8.6	1
HApNanosilver 组( )	0.354±0.042	93.1±6.9	0
阴性对照组( )	0.388±0.026	100	0

实验组与阴性对照组比较  $p < 0.05$  ;

RGR 指细胞相对增殖度

## 讨 论

## 1 钛表面电化学沉积 HAp / Nanosilver 涂层

目前医用制备各种复合材料的方法主要有等离子喷涂、溶胶凝胶法、电泳法等。但由于金属和陶瓷在力学及热膨胀性能上的巨大差异,特别是在界面上会产生很高的残余热应力,因而对复合材料有许多不利的影响。另外这些方法存在设备复杂、不能大量生产、成本高等缺点,电化学方法制备陶瓷技术在一定程度上克服了以上方法的不足,是一种条件温和、方便易行的方法。电化学合成羟基磷灰石涂层已有广泛而深入的研究。纳米银是以纳米技术为基础研制而成的新型抗菌材料,关于纳米银杀菌作用的原理,多数学者认为超细状态银由于其比表面积大,遇水或在水溶液中释放出银离子:  $\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}^+ + \text{e}^-$ , 所以纳米银的杀菌作用主要与银离子有关<sup>[5]</sup>。Pavel<sup>[6]</sup>等人认为,纳米银的作用方式与  $\text{Ag}^+$  相似,只不过他们的有效浓度不同,纳米银是在纳摩尔水平,而  $\text{Ag}^+$  是在微摩尔水平,纳米银通过缓释作用释放  $\text{Ag}^+$  因而具有传统无机抗菌剂所无法比拟的优良抗菌效果和安全性,是一种具有长效性和耐热性的抗菌剂。将纳米银与生物陶瓷羟基磷灰石联合起来制备复合涂层,具有良好的应用前景。本文中采用的电解液含 4 种组分:无水  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{AgNO}_3$  和  $\text{KI}$ 。已有研究表明,纳米银比金属银、银盐具有更高的抗菌性,更低的生物毒性。因此,通过实验用恒电位电化学法可得到生物活性高、抗菌性强、无细胞毒性的生物材料。

## 2 HAp / Nanosilver 涂层的细胞毒性研究

通过细胞在涂层表面的形态学研究,有助于对细胞在种植体表面的功能活动进行探讨。将金属银加工成纳米银后,原子排列表现为介于固体和分子之间的“介态”,其比表积极大,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,这显然涉及到纳米银作为抗菌材料本身的生物安全性问题。最近有报道指出:暴露在 10 nm~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。显微镜下细胞大小异常,细胞皱缩,形态不规则<sup>[7]</sup>。在本实验 HAp / Nanosilver 涂层中可见细胞均匀地铺在 HAp / Nanosilver 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大约 50 nm~80 nm,与纳米晶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。

细胞相对增殖率同样也是医用生物学评价体系中的重要检测指标之一。张富强<sup>[8]</sup>等人通过分析 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  $\leq 25 \text{ g/L}$  时已无毒性。本实验结果显示,羟基磷灰石纳米银涂层与细胞的直接接触并未见细胞毒性作用,原代培养的牙周膜成纤维样细胞的 RGR 为  $(93.1 \pm 6.9)\%$  时,毒性分级趋于 0 级。说明原代培养的牙周膜成纤维样细胞具有较高的敏感性,验证了该种新型材料无细胞毒性,符合生物材料的要求。从实验结果分析可知,与普通的 HAp 对比,该新型材料具有更高的细胞增殖率,与活细胞直接接触时,并未见细胞毒性作用。

## [参 考 文 献]

- [1] Yu HJ, Xu XY, Chen XS et al. Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP Hydrogels containing silver nanoparticles [J]. J Appl Polym Sci, 2007, 103: 125-133.
- [2] Muraglia A, Martin I, Cancedda R et al. A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions [J]. Bone, 1998, 22: 131-134.
- [3] Demling RH, De Santi L. Effects of silver on wound management [J]. Wounds, 2000, 13: 1-15.
- [4] Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow [J]. Bone, 1992, 13: 81-88.
- [5] Liau SY, Read DC, Pugh WJ et al. Interaction of silver nitrate with readily identifiable group relationship to the antibacterial action of silver ions [J]. Lett Appl Microbiol, 1997, 25: 279-283.
- [6] Pavel D, Judith D, Khoosheh KG et al. Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of  $\text{Ag}^+$  in *Vibrio cholerae* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46: 2668-2670.
- [7] Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells [J]. Toxicology in vitro, 2005, 19: 975-983.
- [8] 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: 737.
- [9] 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: 504-507.

收稿日期 2008-11-26