

镁合金微弧氧化掺杂 Zn-HA 复合涂层细胞相容性与抗菌性

张鹏¹ 周立波¹ 张慧明² 张美玲¹ 姜枫¹ 黄宇博¹ 李慕勤^{3*} 李德超^{1*}

(1. 佳木斯大学附属口腔医院 黑龙江 佳木斯 154007;

2. 佳木斯大学生命科学中心 黑龙江 佳木斯 154007;

3. 黑龙江省高校生物医学材料重点实验室 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] 目的:通过掺杂 Zn-HA 复合涂层处理调节镁合金的生物活性和增加抗菌性。方法:以镁合金微弧氧化硅烷-植酸复合膜为对照组,添加 2 g/L、4 g/L、6 g/L Zn-HA 为实验组,通过扫描电镜、CCK-8 试剂盒、激光共聚焦显微镜等方式检测各组膜层生物相容性,采用吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双重荧光染色法检测抗菌性。结果:CCK-8 粘附与增殖实验测定的吸光率结果均为 C 组>D 组>B 组>A 组;激光共聚焦显微镜显示载 4 g/L Zn-HA 组试件表面细胞伸展最好,载 6 g/L Zn-HA 后涂层的抗菌性优于其他各组。结论:镁合金微弧氧化掺杂 4 g/L Zn-HA 硅烷-植酸处理后膜层的生物相容性最好,镁合金微弧氧化掺杂 6 g/L Zn-HA 硅烷-植酸处理后膜层具有较强抗菌能力。

[关键词] 镁合金 超声微弧氧化 Zn-HA 硅烷 植酸 细胞相容性 抗菌性

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)10—1001—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.10.021

Cellular Compatibility and Antibacterial Properties of Magnesium Alloy after Ultrasonic Microarc Oxidation-doped Zn-HA Silane-phytic Acid Treatment. ZHANG Peng¹, ZHOU Libo¹, ZHANG Huiming², ZHANG Meiling¹, JIANG Feng¹, HUANG Yubo¹, LI Muqin^{3*}, LI Dechao^{1*}. 1. Stomatological Hospital, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2. Life Science Center, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 3. Key Laboratory of College of Biomedical Materials of Heilongjiang Province, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China.

[Abstract] **Objective:** To test the cellular biocompatibility and antibacterial property of magnesium alloy after ultrasonic microarc oxidation-doped Zn-HA silane-phytic acid treatment. **Methods:** The magnesium alloy UMAO-silane-phytic was designed as the control group. Zn-HA at concentration of 2 g/L, 4 g/L, and 6 g/L were added respectively as the experimental group. The compatibility of different treatment membrane cells was detected by CCK-8 kit, scanning electron microscope, and laser confocal microscope. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double fluorescent staining was used to detect the antibacterial. **Results:** The optical density (OD) value of cell adhesion and proliferation measured by CCK-8. The OD values were in the order at: group C>group D>group B>group A. The number and shape of cells in the group C had the best extension. The antibacterial of 6 g/L Zn-HA group was obviously superior to other groups. **Conclusion:** The UMAO-doped 4 g/L Zn-HA silane-phytic acid treatment of magnesium alloy had the best biocompatibility. The UMAO-doped 6g/L Zn-HA silane-phytic acid treatment of magnesium alloy had the strongest antibacterial ability.

[Key words] magnesium alloy ultrasonic microarc oxidation Zn-HA silane phytic acid cellular compatibility antibacterial properties

基金项目 国家自然科学基金(编号:31370979)
黑龙江省卫生计生委科研课题(编号:2018037)
佳木斯大学口腔病防治协同创新中心(编号:
2011xtcx2016-02)

作者简介 张鹏(1987~),男,黑龙江鹤岗人,硕士,研究方向:口腔种植医学。

* **通信作者** 李慕勤, E-mail: jmsdxlimuqin@163.com
李德超, E-mail: dechaoli2004@163.com

目前口腔颌面部骨科金属内置物周围如果发生了感染化脓或者周围皮肤麻木不适等不良症状,这些不可降解的内置物均需要再次手术取出,这会给患者造成二次痛苦与过重负担^[1]。因此,可降解的并且具有抗菌性的口腔颌面部可吸收板成为近些年学者们的研究热点。

二十世纪初镁就作为生物医用材料应用于临

床,但具有一定生物相容性的镁合金在降解过程中存在降解速度比人骨生长速度快,且强度也随之下降等问题,使其在生物医学领域的发展受到抑制。针对此问题,使用合金化和表面处理来提高镁合金耐腐蚀性能已成为研究热点。锌(Zn)易附于材料表面,能够有效地杀灭多种细菌,其作为无机抗菌剂已经得到广泛研究和应用^[2]。并且在骨代谢的过程中,破骨细胞的活性可以得到抑制。锌抗菌性比抗生素更有优势,其抗菌性具有不易出现耐药性、持久、稳定等特点^[3]。有学者研究表明锌掺杂羟基磷灰石(HA)在修复骨组织领域拥有优异的骨诱导性、生物活性以及生物相容性^[4]。经超声微弧氧化的镁合金可以制备出内致密、外粗糙多孔的薄氧化层^[5]。并且该微弧氧化层可以进一步减少降解^[6]的程度,但仍然存在穿透表面的孔隙。为了减少穿透孔隙率,本实验首次将微弧氧化膜层技术同硅烷植酸密封共同处理镁合金,可以相互作用在镁合金与Zn-HA之间,形成既有屏蔽能力又兼有无机缓蚀性能连续膜层。以期望控制镁合金降解速度的同时,又具有抗菌性和生物活性。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器 MC3T3-E1 细胞株,胎牛血清, PBS, CCK-8 试剂盒, 胰蛋白酶, 双抗(美国 HyClone 公司), 罗丹明标记鬼笔环肽, Hoechst 荧光染料, 硅烷, 植酸, AO/EB 双染试剂盒, 激光共聚焦显微镜, 超声微弧氧化实验仪器(哈尔滨工业大学), 扫描电子显微镜, Air Tech 净化工作台, Hepa Class 100 型 CO₂ 培养箱, 能谱分析仪。

1.2 试件制备及分组

1.2.1 试件制备 将厚度 1 mm, 10 mm×10 mm 的 AZ31 镁合金, 使用 2000# 砂纸打磨去除氧化皮。镁合金置入无水乙醇中超声震荡 2 min。使用草酸、醋酸、硝酸、蒸馏水 = 1 g : 1 mL : 1 mL : 150 mL 表层粗糙活化。微弧氧化参数设为 500 Hz, 脉冲宽度 50 μs, 镁合金为正电极, 电解槽为负电极, 硅酸盐电解液 (EDTA · 2Na : Na₂SiO₃ : KOH : KF = 2 g : 30 g : 20 g : 16 g) 2L 放入超声波仪器中, 300 V 下 10 min 制备涂层。碱处理 NaOH 120 g/L 60 °C 加热 1 h。然后硅烷(硅烷 KH-550 : H₂O : 乙醇 = 1 : 9 : 1) 封孔处理, 将不同浓度的 Zn-HA 溶液(2 g/L Zn-HA、4 g/L Zn-HA、6 g/L Zn-HA) 加入到配制好的硅烷水解溶液(沉化 24 h)中, 然后逐渐缓慢地加入氨水调节 pH=8, 提拉 15 s, 2 次。植酸 7.5 g/L 加 NaOH 调节 pH=8,

再加入不同浓度的 Zn-HA(2 g/L Zn-HA、4 g/L Zn-HA、6 g/L Zn-HA)。水浴到 40 °C, 提拉 2 min。重复 3 次后, 再将镁合金试件拿出, 快速甩干, 制备出镁合金微弧氧化掺杂不同浓度的 Zn-HA(2、4、6 g/L) 硅烷植酸复合膜层。

1.2.2 实验分组 共分 4 组, 镁合金微弧氧化硅烷-植酸为对照组(A 组), 镁合金微弧氧化掺杂 2 g/L Zn-HA 硅烷-植酸(B 组), 镁合金微弧氧化掺杂 4 g/L Zn-HA 硅烷-植酸(C 组), 镁合金微弧氧化掺杂 6 g/L Zn-HA 硅烷-植酸(D 组)为实验组。

1.3 实验方法

1.3.1 扫描电镜下观察镁合金表面 镁合金试件制造完成后, 得到本实验分组, A 组、B 组、C 组、D 组, 试件表面进行喷金处理后, 在扫描电镜下观察镁合金试件表面的微形态。

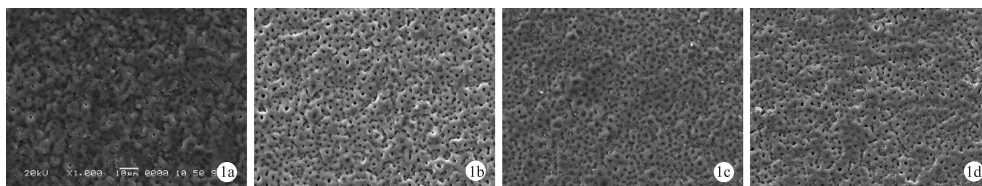
1.3.2 CCK-8 细胞黏附实验 消毒处理过的 4 组试件平铺进新的 24 孔板内, 接种细胞的密度为 5 × 10⁴/孔于 4 组试样表面后, 分别培养 4、6、8、10 h, 弃上清液, PBS 冲洗, 无血清的培养基和 CCK-8 按 10 : 1 加入各孔, 培育 1 h, 避光转移至 96 孔板, 酶标仪 450 nm 时检测 A 值。

1.3.3 CCK-8 细胞增殖实验 试件平铺进 24 孔板, 接种细胞的密度为 5 × 10⁴/孔。分别于 1、3、5 d 终止培养, 弃培养液, PBS 冲洗, 无血清的培养基和 CCK-8 按 10 : 1 加入各孔, 孵育 1 h, 吸取上清液加入 96 孔板, 酶标仪观察 450 nm 波长 A 值。

1.3.4 激光共聚焦显微镜观察细胞形态实验 4 组样本放入 24 孔板, 细胞浓度 5 × 10⁴/孔接种到材料表层, 培育 24 h 后, 0.5 mL 4% 多聚甲醛 37 °C 固定 10 min, PBS 冲洗, 0.5% Triton-X100 1 mL 加入各组试件上。37 °C 下 10 min 透膜, 弃透膜液, PBS 清洗 2 次, 弃上清液, 加 Hoechst 0.5 mL 放置 5 min, 吸出 Hoechst 加入 PBS 后, 于避光的环境下每孔加 200 μL 鬼笔环肽 50 min, PBS 冲洗。在试件表面加入抗荧光淬灭试剂, 显微镜观察细胞状态。

1.3.5 抗菌实验 采用金黄色葡萄球菌作为实验菌株, 每组 4 个试件, 每孔细菌密度 1.5 × 10⁵ CFU/mL 2.5 mL 滴于涂层表面, 培养 24 h, 终止培养, PBS 冲洗 3 次, 使用吡啶橙-溴化乙锭(AO/EB) 双重荧光染料避光染色 15 min 后吸出染色液, PBS 冲洗, 激光共聚焦显微镜下扫描观察。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 20.0 对整体数据加以研究, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水平 $\alpha = 0.05$ 。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。



1a:UMAO 硅烷-植酸;1b:2 g/L Zn-HA;1c:4 g/L Zn-HA;1d:6 g/L Zn-HA

图 1 不同膜层表面 SEM 形貌(×1000)

Fig. 1 The surface morphology of each specimen observed with scanning electron microscope.

2 结果

2.1 SEM 观测试件表层形貌 镁合金表层各种处理膜层 SEM 外形状态见图 1。镁合金 UMAO 膜层利用硅烷植酸处理之后,大多数孔隙均被均匀覆盖且试件表面比较平整。B、C、D 组经不同浓度的 Zn-HA 处理之后并没有影响封孔的效果,可以观测到粒状 Zn-HA 在表面。表明不同处理达到对膜层表面的封孔。

2.2 CCK-8 细胞黏附实验 将测得吸光度值在 SPSS 20.0 进行分析,采用单因素方差分析, $P = 0.000$, 差异具有统计学意义,见表 1。不同时间点,4 组 A 值随时间增长而现增长趋势,相同时间 4 组 A 值大小为: C 组 > D 组 > B 组 > A 组,说明 C 组细胞黏附性较其他 3 组强,A 组细胞黏附性最差。

表 1 成骨细胞黏附率

Tab. 1 The cell adhesion rate of osteoblasts $\bar{x} \pm s$

组别	4 h	6 h	8 h	10 h
A 组	0.215±0.008	0.264±0.009	0.312±0.010	0.334±0.009
B 组	0.255±0.011	0.283±0.011	0.336±0.005	0.363±0.007
C 组	0.332±0.009	0.352±0.010	0.365±0.006	0.384±0.009
D 组	0.294±0.007	0.346±0.012	0.355±0.008	0.365±0.005

注: $P = 0.000$

2.3 MC3T3-E1 细胞增殖实验 细胞增殖实验数值见表 2,将测得 A 值在 SPSS 20.0 进行分析,采用单因素方差分析, $P = 0.000$,4 组对比差异具有统计学意义,不同小组在各时间节点的差异有统计学意义($P < 0.05$)。3 个不同时间节点,在 C 组试件表面细胞培养增殖 1、3、5 d A 值大于 A、B、D 组,证

表 2 细胞增殖实验的 A 值

Tab. 2 The cell proliferation rate of osteoblasts

组别	1 d	3 d	5 d
A 组	0.359±0.006	0.383±0.011	0.445±0.008
B 组	0.395±0.008	0.443±0.008	0.484±0.007
C 组	0.424±0.011	0.463±0.009	0.545±0.009
D 组	0.414±0.010	0.454±0.011	0.534±0.010

注: $P = 0.000$

明 C 组细胞增殖情况最佳。

2.4 细胞形态观察 激光共聚焦显微镜下观察结果见图 2。A 组细胞数量少,一些细胞呈圆形或卵圆形,没有明显伸展,细胞间没有密切联系。B 组细胞伸展情况略优于 A 组。C 组细胞数目较 B、D 组多,且形态较好,细胞间联系密切,多有伪足伸展。

2.5 不同锌浓度涂层对金黄色葡萄球菌的抗菌性 AO/EB 染色,绿色荧光表示活菌,红色荧光表示死菌,绿红荧光比例表示活死菌比例,激光共聚焦获取图像见图 3,A 组表面大量绿色活性菌,随载 Zn 量增加,绿色活菌逐渐减少,红色凋亡细菌逐渐增多,细菌存活率、死亡率见表 3。使用 SPSS 20.0 进行分析,采用单因素方差分析, $P = 0.000$,4 组对比差异具有统计学意义。其杀菌能力顺序为 6 g/L Zn-HA 组 > 4 g/L Zn-HA 组 > 2 g/L Zn-HA 组 > 硅烷植酸组。

表 3 不同浓度 Zn-HA 对金黄色葡萄球菌活死率的影响

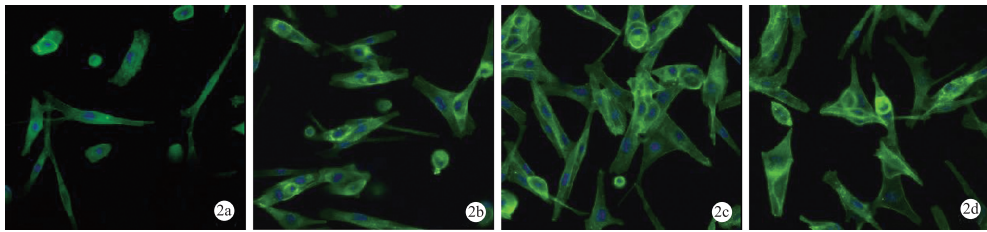
Tab. 3 Effect of different concentrations of Zn-HA on the survival rate of Staphylococcus aureus $\bar{x} \pm s$

组别	存活率	死亡率
A 组	0.867±0.009	0.133±0.009
B 组	0.610±0.008	0.390±0.008
C 组	0.462±0.011	0.538±0.011
D 组	0.232±0.013	0.768±0.013

注: $P = 0.000$

3 讨论

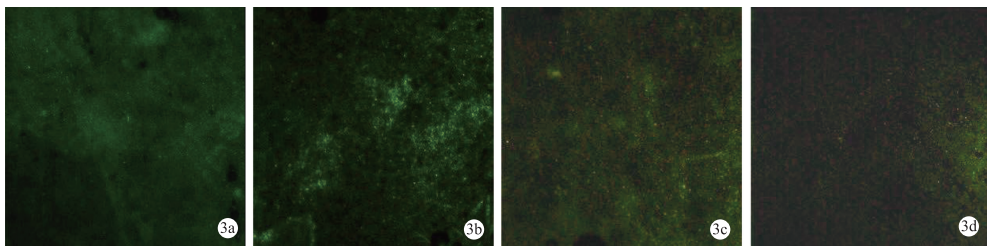
镁合金经过微弧氧化形成多孔结构,表面活性得到增强,这对其耐腐蚀性产生影响^[7]。但镁合金表面仍然留有微孔隙。这时将硅烷-植酸作为一种“粘结剂”,不仅可以提高合金材料的耐腐蚀性能,还可作为过渡层,将有机与无机性质材料连接起来,改善了涂层在金属材料表面的附着力。研究表明锌离子抗菌性可能与其所带的正电荷,吸附细胞膜为带负电荷的细菌有关,锌离子和细菌中的有机物发生反应,使细菌的膜蛋白结构得以破坏失去活性,从而实现杀菌目的,细菌被杀灭后,锌离子继续从菌体中脱离,可以再次与剩余细菌接触,继续重复杀菌过



2a: UMAO 硅烷-植酸; 2b: 2 g/L Zn-HA; 2c: 4 g/L Zn-HA; 2d: 6 g/L Zn-HA

图 2 激光共聚焦显微镜观察细胞骨架形态($\times 400$)

Fig. 2 The morphology of osteoblasts observed with laser confocal microscopy.



3a: UMAO 硅烷-植酸; 3b: 2 g/L Zn-HA; 3c: 4 g/L Zn-HA; 3d: 6 g/L Zn-HA

图 3 激光共聚焦下观察涂层表面抗菌性图像($\times 100$)

Fig. 3 The antibacterial properties of surface layer observed with laser confocal microscopy.

程,阻碍细菌生物膜形成,破坏细菌生存所依赖的微环境,降低分裂增殖力,从而起到杀菌抑菌作用^[8-10]。镁合金载锌不但能增加抑菌性,还能提高其表面的生物活性^[11]。并且把具有生物活性材料的 HA 引入锌,更能提高骨科金属植入物表面耐腐蚀性能和骨诱导性^[12]。研究人员指出,HA 含量越高,材料促进细胞的增殖能力就越强^[13]。本实验通过激光共聚焦检测抑菌实验效果发现 D 组抗菌力达到 76.8%,表明掺杂 6 g/L Zn-HA 的镁合金具有较强的抑菌功能。这与刘继光课题组^[14]研究锌具有强抗菌性的结果一致。Zn-HA 改善镁合金的不足,使其生物活性和抗菌性得以增强,这为镁合金载 Zn-HA 在今后的临床应用提供了较可靠的可行性。

镁合金微弧氧化掺杂 4 g/L Zn-HA 硅烷-植酸处理后膜层的生物相容性最好,镁合金微弧氧化掺杂 6 g/L Zn-HA 硅烷-植酸处理后膜层具有较强抗菌能力。但本实验处于细胞阶段,还需进行体外实验,以期望对今后镁合金的临床应用具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 宋琳琳. Mg-Zn-Sr 骨植入材料的制备及其降解性能与生物相容性研究[D]. 东北大学, 2014.
- [2] 薄丽丽. 银系纳米抗菌材料的制备与抗菌性能的研究[D]. 西北师范大学, 2008.
- [3] Zackular JP, Moore JL, Jordan AT, et al. Dietary zinc alters the microbiota and decreases resistance to *Clostridium difficile* infection [J]. *Nat Med*, 2016, 22(11): 1330-1334.

- [4] 袁秋华, 石鑫, 万磊, 等. HA-PLA 和 Zn 掺杂 HA-PLA 的界面结构及性能模拟[J]. *深圳大学学报(理工版)*, 2018, 35(6): 603-610.
- [5] Barranco V, Carmona N, Galván JC, et al. Electrochemical study of tailored sol-gel thin films as pretreatment prior to organic coating for AZ91 magnesium alloy [J]. *Progress in Organic Coatings*, 2010, 68(4): 347.
- [6] 曲立杰, 李慕勤, 张二林, 等. 超声微弧氧化处理镁合金模拟体液中的耐腐蚀性[J]. *材料热处理学报*, 2013, 34(3): 130-135.
- [7] 苗波, 吕岩, 刘苗, 等. 纯镁超声微弧氧化生物涂层植入体内 4 周的降解行为[J]. *中国表面工程*, 2013, 26(3): 45-50.
- [8] 孙千月, 罗雯静, 梁丹, 等. 纳米锌抗菌机理的研究进展[J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(2): 195-197.
- [9] 孟华. 纳米氧化锌的抗菌性及其抗菌机理讨论[J]. *科技资讯*, 2014, 12(22): 87.
- [10] 张宇承. 抗菌骨修复材料 HAPw/n-ZnO 的抗生物膜作用及抗菌机理研究[D]. 昆明医科大学, 2016.
- [11] Yamaguchi M. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 338(1-2): 242-254.
- [12] Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—a review [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(2): 557-579.
- [13] 邓纯博, 李洪秋, 刘吉泉, 等. 聚醚醚酮-羟基磷灰石-碳纤维复合材料的生物相容性研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2018, 22(6): 617-622.
- [14] 刘继光, 宋稼岐, 李慕勤, 等. 纯镁超声微弧氧化-植酸-镀锌生物膜层的制备与抗菌性[J]. *中国表面工程*, 2016, 29(6): 83-89.

[收稿日期: 2019-03-04]

(本文编辑 李四群)