

纳米 TiO₂:C 涂层对口腔常见细菌的抗菌效果观察

麦理想¹, 张 晟², 谢永建¹, 谢 彬¹, 王大为¹, 张志光^{3*}

(1.中山大学光华口腔医学院附属口腔医院正颌科 广东省口腔医学重点实验室 广东 广州 510055; 2.广东省口腔医院正颌科 广东 广州 510280; 3.中山大学光华口腔医学院//附属口腔医院颌面外科科 广东省口腔医学重点实验室 广东 广州 510055)

摘 要:【目的】考察纳米 TiO₂:C 薄膜涂层的抗菌性能,为其在种植体周围炎防治中的应用奠定实验基础。【方法】制备 TiO₂ 及 TiO₂:C 薄膜涂层,根据贴膜法,每个样品做 3 个平行样,每个样品重复 3 次实验,检测其对不同口腔常见细菌的抗菌效果;通过 X 射线能谱仪检测牙龈卟啉单胞菌胞膜的离子种类并计算离子含量,从而分析探讨纳米 TiO₂:C 薄膜涂层的抗菌机理。【结果】本研究合成的纳米 TiO₂:C 薄膜涂层厚度均匀,对口腔常见细菌 20 min 可见光催化抗菌率均达到 90%以上,具有良好的抗菌效果。X 射线能谱显示牙龈卟啉单胞菌 Na 离子、Ca 离子含量随着光催化时间的延长而降低,而 P 元素变化趋势无规律。【结论】纳米 TiO₂:C 薄膜涂层对口腔细菌有很强的抗菌效果,改善了基体材料的抗菌性能。纳米 TiO₂:C 薄膜涂层的可见光催化抗菌机理之一可能为改变细胞膜的结构,影响细胞膜的通透性。

关键词:微型支抗种植体;纳米二氧化钛;抗菌效果

中图分类号:R783.1

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)01-0122-05

Antibacterial Effect of TiO₂:C Composite Film Coating on Titanium

MAI Li-xiang¹, ZHANG Sheng², XIE Yong-jian¹, XIE Bin¹, WANG Da-wei¹, ZHANG Zhi-guang^{3*}

(1.Department of Orthodontics, Guanghua College of Stomatology//Hospital of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China; 2.Department of Orthodontics, Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China; 3.Department of Surgery, Guanghua College of Stomatology//Hospital of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

Abstract:【Objective】In this study, antibacterial effect of TiO₂:C composite thin film was investigated aiming to lay foundation for the use of this film in prevention and treatment of peri-implantitis.【Methods】Scanning electron microscope (SEM) was used to study the morphology of this coating film and the nick-fastness of the coating was analyzed by an automatic coat adhesion tester. The antibacterial efficacy of the TiO₂:C composite film was tested by film applicator coating method. Antibacterial mechanism of TiO₂:C composite film was discussed by X-ray energy dispersion spectrum (XED).【Results】More than 90% of bacterium were killed within 20 minutes which confirm fine antibacterial effect of the film. The results of XED showed that, under the visible light photochemical catalysis of TiO₂:C thin film, constitution and permeability of P.gingivalis cellular membrane could be changed which result in functional change.【Conclusion】With outstanding antibacterial property, the TiO₂:C composite thin film will be a potential coating material of micro-implant.

Key words: orthodontic micro-implant; titanium dioxide; antibacterial effect

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(1):122-126]

微型支抗种植体颈部暴露于口腔有菌环境中,与天然牙周相比,种植体与口腔黏膜直接接触,无牙周膜和结合上皮,种植体周围结构容易

受到口腔内致病菌及其毒性产物的袭击而发生上皮分离形成种植体周围袋,细菌定植于种植体周引起宿主反应进而破坏骨性结合导致种植体

收稿日期:2013-08-11

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(11ykpy54)

作者简介:麦理想,博士,讲师,主要从事口腔正畸学及口腔生物材料方面研究,E-mail: mailixiang@163.com; * 通信作者: 张志光, E-mail: drzhangzg@163.com

周围炎^[1-2]。学者们研究了许多方法治疗种植体周围炎,去除感染组织并重建种植体周围的健康组织,包括全身或者局部使用抗菌药物^[3]、翻瓣刮治、激光治疗等。在所有这些方法中去除种植体表面的感染物质是种植体周围炎治疗的关键,但对种植体周围炎未能起到预防作用且无长期防治效果^[4-6]。因此,抑制口腔细菌在种植体表面的粘附,杀灭种植体周围的细菌,预防支抗种植体在植入、组织愈合和行使功能各环节中有可能出现的细菌感染显得极其重要,有必要寻求一种在发挥抗菌作用的同时对种植体和周围组织不造成伤害的抗菌方法。为此,本实验采用溶胶-凝胶法在纯钛片表面制备了纳米 TiO₂:C 薄膜涂层,本课题前期研究认为该涂层具有可见光催化性能。C 掺杂后可使锐钛矿相开始转变为金红石相的退火温度提高,延缓 TiO₂ 锐钛矿相转变为金红石相;C 掺杂于锐钛矿型 TiO₂ 晶格内并取代 Ti 或 O 的位置从而形成 O-Ti-C 结构;随着 C 的掺杂,TiO₂:C 光禁带发生红移,禁带宽度的减小促使 C 掺杂的 TiO₂ 薄膜对可见光产生吸收,增强了 TiO₂ 在可见光激发条件下的光催化活性^[7-8]。基于上述工作基础,本研究提出全新的预防和治疗方略,从生物学角度解决问题,并对几种口腔常见细菌的抗菌效果作进一步深入研究,为种植体周围炎的预防和治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

变形链球菌(*S.mutans*, ATCC25175),由广东省微生物研究所提供;血链球菌(*S.sanguis*, ATCC10556);伴放线放线杆菌(*A.actinomycetemcomitans*, ATCC29523);具核梭杆菌(*F.nucleatum*, ATCC25586);牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*, ATCC33277);中间型普氏菌(*P.intermedia*, ATCC25611),由四川大学华西口腔生物医学重点实验室提供。

1.2 TiO₂ 及 TiO₂:C 薄膜涂层的制备

商业用纯钛片制备成 20 mm × 20 mm × 1 mm 的方形薄片,共 200 块,用 HF 与 HNO₃ 混合液去除表面氧化层,表面用 600# 至 1200# 金相砂纸逐级抛光,无水乙醇超声清洗 20 min,蒸馏水冲洗 3 遍后干燥、备用。使用旋转涂敷法在钛片上涂敷

TiO₂ 和 TiO₂:C 薄膜,旋转速度为 2000 rev/min,373 K 热处理 15 min,重复上述步骤,可得到不同厚度的薄膜。详细步骤见前期研究^[7-8]。本实验反复旋转涂敷 3 次,控制薄膜的厚度在 120 ~ 150 nm 间,然后在 673 K 下退火 2 h,使薄膜具备良好的结晶结构、亲水性、附着性及光催化性,最后随炉冷却,至室温时取出。

1.3 对口腔常见细菌的抗菌活性检测

将上述实验菌复苏菌冻干株接种于 BHI 血琼脂平板上,在 37 °C 厌氧条件下培养 48 h,经形态学及生化试验鉴定为纯培养物后,再接种于 BHI 液体培养基上厌氧培养 48 h,4 °C 下以 4 000 r/min (离心机半径 $r = 20$ cm) 速度离心 10 min,用 0.2 mol/L, pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)分 3 次小心将细菌洗出,并用 PBS 缓冲溶液将细菌浓度定容至 1×10^6 , 1×10^7 及 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液备用。

将 0.2 mL 已定容的菌液分别滴加于 TiO₂:C 薄膜和对照样品 TiO₂ 薄膜上,每个样品做 3 个平行样,用灭菌镊子夹起 10 mm × 10 mm 盖玻片覆盖,以使试验菌液散开但勿使菌液溢出,在室内日光灯光源下静置,光源为 350W 的氙弧光灯(上海光电设备公司),光线通过一个水滤器及紫外线滤波器(JB420, $\lambda > 420$ nm, 上海咖瓦光学器材有限公司),灯距盖玻片的距离为 60 cm。调节周围环境的湿度,以免膜片上菌液过度挥发 5、10、20、30、60、120、240 min 后,用洗脱液分 3 次小心洗出菌液并定容至 100 mL。

将抗菌实验所得菌液摇匀,稀释成 1/100 溶液,提取至 BHI 血琼脂培养皿,在细菌培养箱中 37 °C 下培养 36 h 后,观察。每个样品重复 3 次实验。

1.4 X 射线能谱检测牙龈卟啉单胞菌胞膜离子种类并计算含量

实验菌株为牙龈卟啉单胞菌,将 0.2 mL 已定容的牙龈卟啉单胞菌菌液滴加于 TiO₂:C 薄膜涂层上,抗菌条件同前述,5、10、20、30、60、120、240 min 后,取出各样品用 PBS 缓冲液轻轻地冲洗掉未粘附或粘附不紧的细菌,洗毕后放入 2.5 mL/L 戊二醛溶液中固定 5 h (过夜);将玻片再次用 PBS 缓冲液清洗,接着依次放入 40%、50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 的乙醇溶液中进行梯度脱水,每个梯度 15 min;再将各片放入 100% 乙醇异戊酞溶

0.20 wt% TiO₂:C 涂层样品经过各时间光照后牙龈卟啉单胞菌细胞膜离子 Na、Ca、P 含量(atom %) 如表 3 所示, 与阳性对照组相比, 实验组细胞膜离子含量有所改变, Na 离子、Ca 离子含量随着光催化时间的增加都呈降低趋势, 而 P 元素变化趋势无规律。

表 3 TiO₂:C 表面牙龈卟啉单胞菌经各时间光照后胞膜 Na、Ca、P 含量

Table 3 Content of Na⁺ Ca²⁺ and P in cell membrane of *P. gingivalis* on nanometer TiO₂:C coatings in different times

(atom %)			
Minutes	Na ⁺	Ca ²⁺	P
Positive control (0)	6.61	1.61	0.27
5	5.22	1.21	0.21
10	3.68	1.22	0.06
20	0.32	0.28	0.08
30	0.16	0.07	0.15
60	0.07	0.08	0.21
120	0.06	0.03	0.03
240	0	0	0.23

3 讨 论

3.1 纳米 TiO₂:C 薄膜涂层对口腔常见菌的抗菌性能

实验结果表明纳米 TiO₂:C 薄膜涂层样品对所有实验口腔常见菌均有抗菌活性,30 ~ 60 min 即可完全杀死浓度为 1 × 10⁶ CFU/mL 菌液中的细菌,而在可见光催化下 TiO₂ 薄膜作用 240 min 后也未见抗菌活性。由此说明,本研究的纳米 TiO₂:C 薄膜涂层,由于 C60 的掺杂赋予了 TiO₂ 薄膜涂层的可见光催化性能。一般情况下厌氧菌的生长在 6 h 之前为迟缓期,细菌生长很慢;6~24 h 进入对数生长期,细菌生长迅速,对外界环境因素的作用敏感;24 ~ 40 h 进入稳定期,细菌繁殖速度逐渐减慢,死亡菌数逐渐增加,活菌数保持恒定;48 h 后为衰退期,细菌的生理代谢趋于停滞^[10-11]。本研究根据厌氧菌的生长规律,选择的时间点少于 2 个小时,尽量减少实验条件对结果的负面影响。

实验结果证明 TiO₂:C 薄膜对不同菌种的抗菌活性存在差异。纳米 TiO₂:C 薄膜涂层对大肠杆菌的抗菌率优于口腔常见菌^[4],可能是由于在厌氧培养的条件下氧的缺乏削弱了 TiO₂ 的光催化杀菌作用。纳米 TiO₂:C 薄膜涂层对不同口腔菌种的抗菌活性也存在差异,对变形链球菌、血链球菌及牙龈卟啉单胞菌的抗菌活性最强,杀灭时间为 20~30 min;对粘性放线菌、具核梭杆菌及中间型普氏菌的抗菌活性次之,杀灭时间为 30 ~ 60 min。

3.2 从牙龈卟啉单胞菌胞膜离子种类及含量探讨 TiO₂:C 薄膜抗菌机理

细胞膜是由脂质、蛋白质和糖类构成的半渗透膜,结构复杂,质膜上分布有离子通道、离子泵、受体等结构,对各种离子有不同的通透性。外界因素的改变可造成细胞膜上离子泵失活,细胞质膜通透性变化,细胞膜内外离子转运异常,膜受体遭到损坏,严重时可导致细胞死亡。

Quanta 400 FEG 场发射扫描电子显微镜是集多领域手段于一体的显微形貌、显微成分、显微结构和显微织构的现代化显微分析系统。它可以对处理过的样品和未处理的原始样品提供微米、纳米级表面特征的图像和微观分析数据。其主要特点包括,三种成像真空模式——高真空模式、低真空模式 ESEMTM 模式。在生物学、地质、医学、金属材料、高分子材料、化工原料、考古以及其他领域中得到日益广泛的应用。本仪器还配有 INCA X-射线能谱仪和 EBSD 背散射电子衍射系统,元素分析范围为 4Be ~ 92U,同时可进行晶体结构和取向上的分析研究。

本实验采用能谱仪对细菌进行离子成份分析可以精确检测到细胞膜表面离子状态,观察其细胞膜离子变化,尝试从微观的角度探讨变化的分子生物学机理,从而了解纳米 TiO₂:C 薄膜涂层的可见光催化对细菌膜结构和功能的影响,有助于理解其抗菌机理。

X 射线能谱结果显示,0.20 wt%TiO₂:C 涂层样品经过各时间光照后牙龈卟啉单胞菌细胞膜离子 Na、Ca、P 含量(atom %),与阳性对照组相比,实验组细胞膜离子含量有所改变,Na 离子、Ca 离子含量随着光催化时间的增加都呈降低趋势,而 P 元素变化趋势无规律。P 为细胞膜成份,X 射线能谱结果显示 P 元素变化趋势无规律,升高或减少甚至消失,表明细胞膜成分或结构发生变化。膜通透性与 Ca 离子有关,Na 离子与细胞膜内外信号传递相关,Na 离子、Ca 离子含量降低提示细胞膜通透性改变,细胞膜离子部分流失,同时也意味着细胞膜两侧信号传递功能的改变。这些结果提示纳米 TiO₂:C 薄膜涂层的可见光催化抗菌机理之一可能为改变细胞膜的结构,影响细胞膜的通透性。

本研究显示纳米 TiO₂:C 薄膜能有效地杀灭各种口腔常见细菌,为种植体周围炎的预防和治

疗提供参考,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Abt E. Growing body of evidence on survival rates of implant-supported fixed prostheses [J]. Evid Based Dent, 2008, 9(2): 51-52.
- [2] 麦理想, 张晟, 谢永建, 等. 微型支抗种植体的临床效果观察 [J]. 中华口腔医学研究杂志: 电子版, 2011, 5(1): 49-52.
- Mai LX, Zhang S, Xie YJ, et al. A clinical research of peri-implantitis around micro-implant [J]. Chin J Stomatol Res (Electronic Edition), 2011, 5(1): 49-52.
- [3] Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, et al. Re- osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surface. An experimental study in the dog [J]. Clin Oral Implants Res, 2001, 12(6): 595-603.
- [4] Kreisler M, Kohnen W, Marinello C, et al. Antimicrobial efficacy of semiconductor laser irradiation on implant surfaces [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2003, 18(5): 706-711.
- [5] Schwarz F, Bieling K, Sculean A, et al. Treatment of periimplantitis with laser or ultrasound, A review of the literature [J]. Schweiz Monatsschr Zahnmed, 2004, 114(12): 1228-1235.
- [6] Dortbudak O, Haas R, Bernhart T, et al. Lethal photosensitization for decontami- nation of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis [J]. Clin Oral Implants Res, 2001, 12(2): 104-108.
- [7] Lixiang M, Chunming H, Dawei W, et al. Effect of C doping on the structural and optical properties of sol-gel TiO₂ thin films[J]. Appl Surf Sci, 2009, 255: 9285-9289.
- [8] 麦理想, 张晟, 王春阳, 等. 纳米 TiO₂:C 薄膜涂层的构建及对大肠杆菌的抗菌性能研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2011, 50(6): 82-87.
- Mai LX, Zhang S, Wang CY, et al. Synthesis and antibacterial effect against Escherichia coli of TiO₂:C composite film deposited on titanium [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sun Yat-sen, 2011, 50(6): 82-87.
- [9] 高宁. 口腔修复材料—镍铬铍合金中铍对龈下微生物影响的研究[D]. 四川大学, 2005.
- Gao N. The research of influence produced by beryllium ions from dental restoration material—Nickel-Chromium alloys on subgingival microbes[D]. Si Chuan University, 2005.
- [10] 李森, 肖丽英, 李继遥, 等. 常见致龋菌代谢组学鉴定的初步研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(4): 342-344.
- Li M, Xiao LL, Li JY, et al. Initial study on discrimination of oral microorganisms with the metabonomics technique[J]. West China J Stomatology, 2007, 25(4): 342-344.
- [11] Toh EC, Dashper SG, Huq NL, et al. Porphyromonas gingivalis cysteine proteinase inhibition by kappa - easein peptides [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(3): 1155-1161.

(编辑 王晓鹰)