

基台表面抗菌涂层 PDMS-CHXG 的构建及抗菌性能的研究

李趁趁,夏 荣,庞诗梦,余金兰

摘要 目的 探究抗菌涂层:聚二甲基硅氧烷-葡萄糖酸氯己定(PDMS-CHXG)在光滑钛片表面的构建及不同浓度CHXG对牙龈卟啉单胞菌的抗菌效果。**方法** 将钛片逐级抛光至7 000目达到基台的镜面状,清洗干燥后硅烷化处理,将试件随机分为5组:空白对照组(C),接枝CHXG溶液浓度分别为0(T_0)、0.4(T_1)、0.8(T_2)、1.6 mg/ml(T_3)的实验组。使用冷场发射扫描电子显微镜(CFESEM)观察样品表面形貌变化,并对涂层的组成元素进行半定量分析。通过抑菌环、活/死细菌染色及结晶紫实验,评价涂层的抗菌性能。**结果** CFESEM下,与C组相比,实验组形成致密的薄膜,表面元素半定量分析显示Cl元素含量随CHXG浓度增加而增加。抑菌环实验在C、 T_0 组样品周围未观察到抑菌环, T_1 、 T_2 、 T_3 组抑菌环形成。活/死细菌染色在 T_2 、 T_3 组未见活菌存在。结晶紫染色实验结果显示 T_1 、 T_2 、 T_3 组与C、 T_0 组间OD值差异有统计学意义, T_2 、 T_3 组之间差异无统计学意义。**结论** PDMS-CHXG抗菌涂层构建成功,当CHXG浓度达到0.8 mg/ml时具有良好的抗菌性能。

关键词 种植义齿;基台;聚二甲基硅氧烷;葡萄糖酸氯己定;牙龈卟啉单胞菌;抗菌性能

中图分类号 R 782.12;R 783.6;R 982;R 916.4;R 378.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1542-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.006

种植义齿因良好的远期稳定性成为牙缺失的常规修复方式,而预防种植体周围疾病的发生是其长期存留的关键。Lee et al^[1]研究表明种植体周围疾病的发病率约为47%,种植体周围黏膜炎和周围炎分别约为29.48%和9.25%。种植体周围炎的发生与牙周炎相似菌斑生物膜为始动因子,牙龈卟啉单胞菌是致病菌^[2]。两段式种植体中,种植体-基台连接处的微间隙会成为细菌储存库^[3-4],赋予基台一定的抗菌能力会有助于种植体周围炎的预防。葡

萄糖酸氯己定(chlorhexidine gluconate, CHXG)是临床常用的抗菌剂之一,聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)含有硅氧硅(Si-O-Si)结构,可与钛表面的羟基官能团结合,聚硅氧烷单元上的烷基链可通过范德华作用力捕获CHXG^[5-7]。该研究通过浸渍提拉法使PDMS与光滑的钛表面结合,然后浸泡在CHXG溶液中,实现钛表面抗菌涂层PDMS-CHXG的构建并探究不同浓度CHXG的抗菌性能。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 医用钛片(TA1)(宝鸡泰宇鑫金属材料有限公司);Sylgard 184(聚二甲基硅氧烷,美国Dow Corning公司);20%葡萄糖酸氯己定溶液(美国Sigma-Aldrich公司);牙龈卟啉单胞菌(北京百欧博伟生物技术有限公司);脑心浸液培养基(brain heart infusion, BHI)、琼脂粉、无菌脱纤维山羊血(上海索莱宝生物科技有限公司);结晶紫溶液、抗荧光淬灭剂、氯化血红素(上海碧云天生物技术有限公司);维生素K1注射液(安徽长江药业有限公司);DMAO/EthD-III活/死细菌染色试剂盒[翌圣生物科技(上海)有限公司];HITACHI SU8220冷场发射扫描电子显微镜、LSM880激光扫描共聚焦显微镜(德国卡尔·蔡司股份公司);麦氏比浊仪(上海梅里埃诊断产品有限公司);多功能微孔板酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 试件制备 将直径12 mm、厚1 mm的60枚钛片用砂纸逐级抛光至7 000目达到基台光滑度,分别用丙酮、无水乙醇及超纯水各超声荡洗30 min,以去除杂质获取更多-OH,碱化处理,烘干、备用。

1.3 实验分组与涂层制备 将Sylgard 184以10:1混合于正庚烷溶液中,恒温磁力加热搅拌器室温下搅拌30 min,然后将上述试件放置于溶液中,在超声震荡条件下浸泡30 min后均匀提取得出,超纯水超声波清洗3 min,在60℃环境中烘干。随机分为5组,空白对照组为光滑钛片;实验组按CHXG浓度0、0.4、0.8、1.6 mg/ml分为4组,分别记为C、 T_0 、 T_1 、 T_2 、 T_3 。取20%CHXG溶液加入去离子水中,混匀后得到上述浓度的CHXG溶液,将试件浸泡于

2022-05-13 接收

基金项目:安徽省学术和技术带头人后备人选科研活动经费资助项目(编号:2021H253);国家重点研发计划项目(编号:2018YFB0407204)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

作者简介:李趁趁,女,硕士研究生;

夏 荣,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xiarongqh@aliyun.com

CHXG 溶液 24 h 后均匀提拉取出,超纯水超声波清洗 3 min,烘干,环氧乙烷灭菌后备用。

1.4 牙龈卟啉单胞菌悬液制备 将牙龈卟啉单胞菌菌株划线接种在 BHI 琼脂平板上,在 37 °C 厌氧环境(80% N₂、10% CO₂、10% H₂)培养 72 h,挑取单菌落接种于 BHI 血清培养基中,制备成 1.5×10^8 CFU/ml 的细菌悬液。

1.5 抗菌涂层表征 在各组中随机选取 3 枚样品使用 CFSEM 观察表面结构的变化,并用 X 射线能谱对样品表面的元素组成进行半定量分析。

1.6 抗菌性能检测

1.6.1 抑菌环实验 取 100 μ l 上述细菌悬液滴在 BHI 血琼脂平板上,用涂布棒均匀涂布至菌液被血琼脂平板完全吸收,每组随机选取 3 枚样品将正面轻轻放置于平板表面,使其与琼脂平板完全接触,37 °C 厌氧培养 72 h 后观察实验结果并记录。

1.6.2 活/死细菌染色实验 利用 DMAO/EthD-III 活/死细菌染色试剂盒鉴别样品表面活/死细菌。将 DMAO : EthD-III : 0.85% NaCl 溶液按 1.25 μ l : 2.5 μ l : 1 ml 的比例配制成荧光染液,避光备用。在超净工作台内放入 24 孔板,每组随机选取 3 枚样品将受试面朝上置于孔板内,取上述细菌悬液,每个样品表面接种 100 μ l,每孔加入 1.5 ml BHI 血清培养基,37 °C 厌氧培养 72 h,弃去旧培养基。用 0.85% NaCl 溶液清洗 5 min,去除未牢固黏附的细菌,重复 3 次。吸取 200 μ l 荧光染液滴于样品表面,室温避光孵育 15 min,然后用 0.85% NaCl 溶液清洗并滴加抗荧光淬灭剂,将样品倒置于载玻片上,激光共聚焦显微镜($\times 40$ oil)下观察。

1.6.3 结晶紫染色实验 每组随机选取 3 枚样品将受试面朝上置于孔板内,接种菌种,37 °C 厌氧培养 72 h。将样品置于另一 24 孔板内,PBS 清洗去除悬浮细菌,2.5% 戊二醛固定 30 min,弃去固定液,并用 PBS 清洗,加入 1 ml 1% 结晶紫溶液振摇 20 min,用 PBS 将游离染料彻底清洗干净,加入 1 ml 33% 醋酸溶液溶解样品表面结晶紫染液,充分震荡后吸取 200 μ l 液体于 96 孔板中,每个样品设 3 个复孔。用

酶标仪测定 590 nm 处的吸光度(optical density, OD)值,评估样品表面抑制细菌生物膜形成的能力。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析,实验所测数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 SNK 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CFSEM 下观察样品表征 C 组钛片表面相对光滑,除了方向一致的细小划痕外无其他特殊形貌;实验组随着 CHXG 浓度的增加,样品表面出现了致密均一的薄膜,表明抗菌涂层使用该方法可在钛片表面成功构建。见图 1。

X 线能谱进行半定量分析,结果见图 2, T_0 组样品表面的元素组成主要为 C、Si、O,从 PDMS 的化学结构式(C_2H_6OSi)_n 中可以看出 C、Si、O 为 PDMS 涂层的主要组成元素,表明 PDMS 与钛片表面的成功结合;与 T_0 组比较,其他实验组的结果出现了 Cl 元素,且随着 CHXG 浓度的增加所占比例也增加,该分析结果也表明抗菌涂层 PDMS-CHXG 在钛片表面的成功构建。

2.2 抗菌性能评价

2.2.1 抑菌环实验结果 C、 T_0 组样品周围未观察到抑菌环; T_1 - T_3 组样品周围抑菌环明显,且抑菌环直径随着 CHXG 浓度的增大而增大,当 CHXG 的浓度达到 0.8 mg/ml 时表现出良好的抗菌性能。见图 3。

2.2.2 活/死细菌染色结果 C 组和 T_0 组样品表面含有大量绿色荧光(活菌),荧光信号较强表明细菌出现了成团的黏附生长; T_1 - T_3 组随着 CHXG 浓度增大可以观察到红色荧光(死菌)的出现且荧光信号明显变弱,在 T_2 、 T_3 组几乎观察不到绿色荧光,表明随着 CHXG 浓度的增大细菌黏附聚集生长现象减少且几乎无活菌出现。见图 4。

2.2.3 样品表面细菌数量 C、 T_0 组的 OD 值基本一致,随着 CHXG 浓度的增大, T_1 - T_3 组 OD 值逐渐

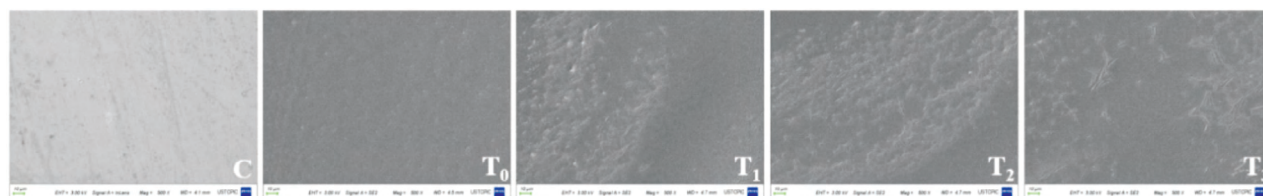


图1 CFSEM 下各组样品表面形貌变化 $\times 500$

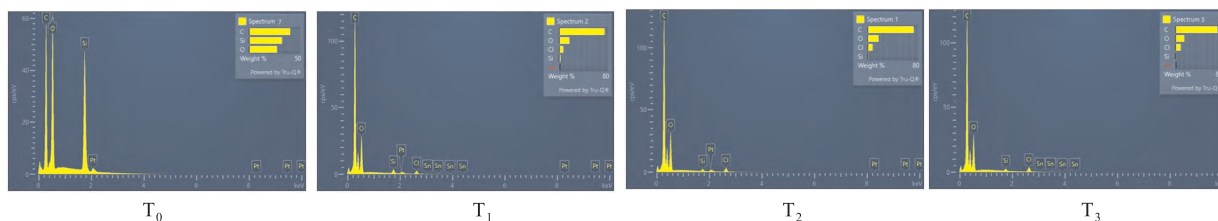


图2 X射线能谱表面元素半定量分析

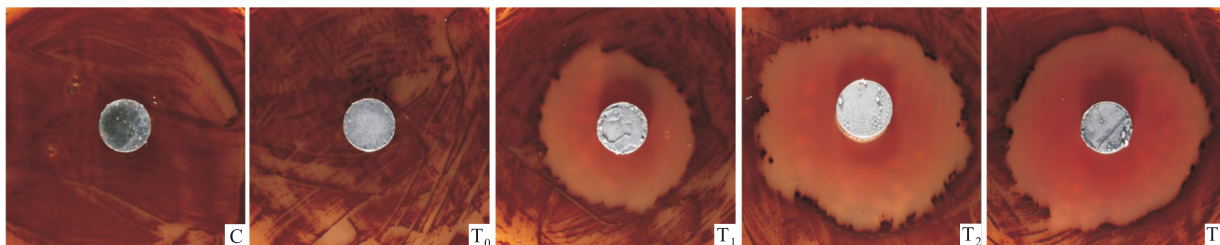


图3 各组样品抑菌环实验结果

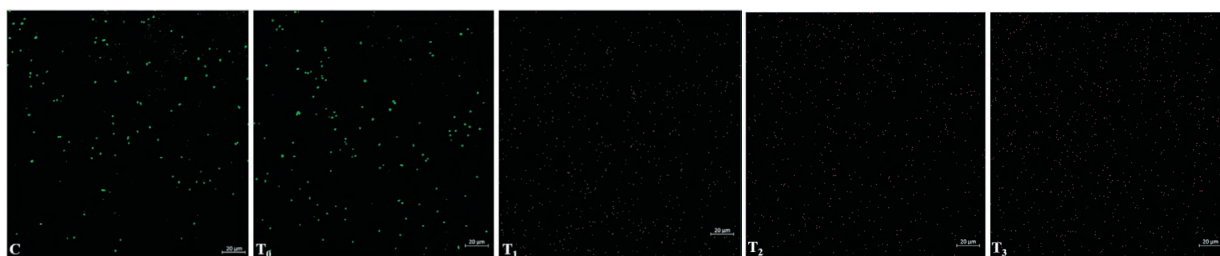


图4 各组样品表面活/死细菌染色免疫荧光结果 ×40oil

减小。ANOVA 结果表明各组间差异有统计学意义 ($F = 5\ 886.13, P < 0.01$)。SNK 检验结果显示 C 组与 T_0 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); T_2 组与 T_3 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); T_1 - T_3 组与 C 和 T_0 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

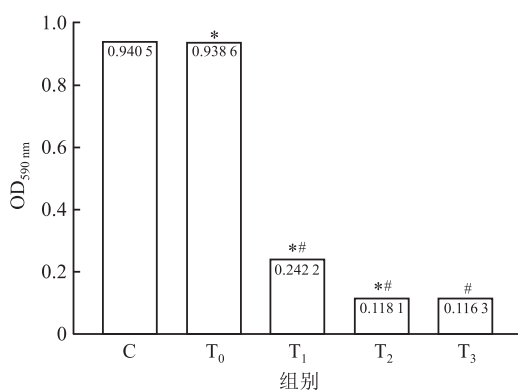


图5 结晶紫染色实验检测样品表面的细菌数量

组间比较: * $P < 0.05$; 与 C 和 T_0 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

种植义齿具有与天然牙极其相似的良好生物特性,成为修复牙缺失的理想修复方式。种植体与基台的分离设计保证了种植体植入牙槽骨发生骨结合

的过程中被完全封闭在牙槽骨内,避免了其与口腔内微生物的接触,从而保证形成良好的骨结合^[8],种植体周围软组织封闭的形成也会阻止外界物理和生物刺激的侵入。种植体形成稳定的骨结合后会行二期手术而暴露在口腔环境中,研究^[2, 9]表明,早期炎症在种植体暴露于口腔内约 3 周的时间就可发生,软组织封闭形成的时间约为基台安装完成后 6~8 周。二期手术到终修复体完成之前,基台会被断开、重新连接多次使种植体穿龈部位的软组织封闭被破坏,新的结合在短期内不能形成,口腔内的微生物及其代谢产物、食物残渣等便会入侵,基台重新连接的过程中也易将细菌和其他污染物带入种植体-基台连接处,从而引起种植体周围炎症的发生,导致种植义齿修复失败。因此,增强种植体穿龈部位的抗菌性能及在软组织封闭形成之前降低感染风险是需要考虑的关键因素。

目前,主要研究的抗菌涂层包括银离子、铜离子等金属离子,抗菌肽及广谱抗生素等,金属离子可以通过阳极氧化法、微弧氧化法或离子注入法与种植体紧密结合^[10-11],但抗菌离子容易释放不足。抗菌肽抗菌谱广且具有特异性受体,但其合成费用较高,在临床难以推广应用^[12]。抗生素具有较强的抗菌性能,可抑制微生物的细胞壁和蛋白质的合成、干扰

DNA 转录和翻译,但会增加机体耐药的风险^[13]。Wu et al^[14]对 N-卤胺聚合物涂层持久性和抗菌性能研究结果表明涂层的抗菌功效可持续存在 12 ~ 16 周,且具有可重复构建性。Lauritano et al^[5]和 Carinci et al^[6]使用 1% CHXG 醇溶液作为种植体抗菌内涂层评价了其抗菌性能,结果表明涂层能够灭活通过种植体-基台连接处渗透到种植体内部的微生物,Carinci et al^[6]通过临床实验对 6 个月时连接处微间隙内的细菌数量进行了聚合酶链式反应分析,结果表明实验组微间隙内的微生物数量减少。CHXG 作为一种广谱抗菌剂,具有较强的杀菌和抑菌作用,且不易产生耐药性,临床应用前景较好,是目前研究的热点,但与钛片的结合涉及复杂的灌注程序,在临床难以推广^[15]。

PDMS 是应用最广泛的有机聚合物,具有惰性、无毒、良好的生物相容性等特点。本实验选择 PDMS 作为中间层与含有 Cl 这一卤族元素的 CHXG 结合,通过简单的浸渍提拉法在光滑钛片表面形成抗菌涂层,制备方法简便高效,以期用于临床基台抗菌性能的研究。然而本研究存在一定的局限性,选择单一菌种进行研究不能代表口腔内复杂的微生态环境;种植体周围软组织封闭的形成在种植体周围炎的预防中也至关重要,涂层对生物学宽度内半桥粒的影响将在后续的动物实验中加以完善;基台是临床上重复使用的重要配件,因此,涂层构建成功后的无损清除也值得研究。

CFESEM 结果表明抗菌涂层构建成功,为了评价抗菌能力,进行了抑菌环、活/死细菌染色及结晶紫染色实验,表明涂层具有良好的抗菌性能,本课题组细胞相容性实验用牙龈成纤维细胞验证了其生物相容性良好。种植义齿修复过程二期手术、印模制取、临时冠试戴、预定个性化基台、终修复完成等涉及基台的断开、连接的操作均可在连接之前涂覆该抗菌涂层,增强其抗菌性能。

参考文献

- [1] Lee C, Huang Y, Zhu L, et al. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis [J]. J Dent, 2017,62:1-12.
- [2] 余金兰,夏荣,刘春,等. Er, Cr: YSGG 激光清除 SLA 钛表面牙菌斑单胞菌生物膜[J]. 安徽医科大学学报, 2021,56(10):1531-4.
- [3] Heitz-Mayfield L J A, Salvi G E. Peri-implant mucositis [J]. J Clin Periodontol, 2018,45(Suppl 20):S237-45.
- [4] Scarano A, Valbonetti L, Degidi M, et al. Implant-abutment contact surfaces and microgap measurements of different implant connections under 3-dimensional X-ray microtomography [J]. Implant Dent, 2016,25(5):656-62.
- [5] Lauritano D, Bignozzi C A, Pazzi D, et al. Efficacy of a new coating of implant-abutment connections in reducing bacterial loading: an *in vitro* study [J]. Oral Implantol (Rome), 2017,10(1):1-10.
- [6] Carinci F, Lauritano D, Bignozzi C A, et al. A new strategy against peri-implantitis: Antibacterial internal coating [J]. Int J Mol Sci, 2019,20(16):3897.
- [7] Liu J, Ye L, Wooh S, et al. Optimizing hydrophobicity and photocatalytic activity of PDMS-coated titanium dioxide [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019,11(30):27422-5.
- [8] Koutouzis T. Implant-abutment connection as contributing factor to peri-implant diseases [J]. Periodontol 2000, 2019,81(1):152-66.
- [9] Wang Q Q, Dai R, Cao C Y, et al. One-time versus repeated abutment connection for platform-switched implant: A systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2017, 12(10):e0186385.
- [10] Liu R, Memarzadeh K, Chang B, et al. Antibacterial effect of copper-bearing titanium alloy (Ti-Cu) against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* [J]. Sci Rep, 2016,6:29985.
- [11] Inoue D, Kabata T, Kajino Y, et al. Iodine-supported titanium implants have good antimicrobial attachment effects [J]. J Orthop Sci, 2019,24(3):548-51.
- [12] He Y, Zhang Y, Shen X, et al. The fabrication and *in vitro* properties of antibacterial polydopamine-LL-37-POPC coatings on micro-arc oxidized titanium [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018,170:54-63.
- [13] Nie B, Long T, Ao H, et al. Covalent immobilization of enoxacin onto titanium implant surfaces for inhibiting multiple bacterial species infection and *in vivo* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection prophylaxis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016,61(1):e01766-16.
- [14] Wu S, Xu J, Zou L, et al. Long-lasting renewable antibacterial porous polymeric coatings enable titanium biomaterials to prevent and treat peri-implant infection [J]. Nat Commun, 2021,12(1):3303.
- [15] 杨帮成,周学东,于海洋,等. 钛种植体表面改性方法 [J]. 华西口腔医学杂志, 2019,37(2):124-9.

The research of PDMS-CHXG coating construction and antibacterial properties on abutment surface

Li Chenchun, Xia Rong, Pang Shimeng, Yu Jinlan

(Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the antibacterial coating of polydimethylsiloxane-chlorhexidine gluconate (PDMS-

经尿道联合灌注 SCL 和 Cx43 基因慢病毒 对糖尿病膀胱功能的影响

轩留明, 马路平, 欧阳松, 孙 鹏, 谭明辉, 张永强, 王勤章

摘要 **目的** 探究干细胞白血病基因(SCL)重组慢病毒和缝隙连接蛋白基因(Cx43)重组慢病毒联合作用对豚鼠糖尿病膀胱(DCP)功能的影响。**方法** 90只健康豚鼠适应性喂养1周后,按照200 mg/kg一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ),定期每周监测随机血糖,正常饲养12周后,通过尿流动力学检查筛选出40只符合标准的豚鼠,将其随机分成4组:糖尿病组、SCL组、Cx43组、SCL+Cx43组。糖尿病组经尿道向膀胱内灌注0.2 ml不含基因的空慢病毒,SCL组、Cx43组使用同样方法分别灌注SCL慢病毒和Cx43慢病毒0.2 ml,SCL+Cx43慢病毒组经尿道灌注SCL、Cx43慢病毒各0.2 ml。转染14 d后进行尿流动力学检查,检查后处死豚鼠,并迅速摘取膀胱,进行冰冻膀胱切片及荧光双染。**结果** 与糖尿病组相比,SCL组、Cx43组在尿流动力学检查中差异无统计学意义($P>0.05$),SCL+Cx43组尿流动力学检

查可见逼尿肌压力、腹压、膀胱压均有改善($P<0.05$)。糖尿病组激光共聚焦可见Cajal间质细胞(ICC)的数量减少,梭形结构及细胞突起明显被破坏,出现细胞裂解状态。SCL组、Cx43组可见ICC样细胞的梭形结构和细胞突起有所改善,细胞数量无明显变化。SCL+Cx43组可见ICC样细胞的数量增多,梭形结构及细胞突起有改善,并可形成ICC-二聚体。**结论** 经尿道联合灌注SCL和Cx43基因重组慢病毒可以成功在豚鼠DCP膀胱中转染,可恢复损伤的ICC细胞的数量及结构,并形成ICC二聚体结构,提高糖尿病膀胱逼尿肌压力,改善排尿无力、腹压排尿等特点,为治疗DCP提供了新的方向。

关键词 糖尿病膀胱病变;Cajal样间质细胞;干细胞白血病基因;Cx43基因

中图分类号 R 694.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1546-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.007

2022-05-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960147)

作者单位:石河子大学医学院第一附属医院泌尿外科,石河子 832000

作者简介:轩留明,男,硕士研究生;

王勤章,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:wqz1969@sina.com

糖尿病发展过程中,可导致多系统并发症,其中泌尿系统常见的是糖尿病膀胱病变(diabetic cystopathy, DCP),发生率为25%~87%^[1]。目前DCP的发病机制仍存在争议,研究^[2]显示哺乳动物膀胱内

CHXG) constructed on the smooth titanium surface and antibacterial properties for *Porphyromonas gingivalis* of CHXG solution with different concentrations. **Methods** The titanium was polished to 7 000 mesh to mirror shape of abutment, cleaned and dried, then treated with alkalization. The samples were randomly divided into 5 groups: blank control group (C), test groups: grafted CHXG concentration of 0 (T_0), 0.4 (T_1), 0.8 (T_2), 1.6 mg/ml (T_3). The surface structural changes were observed by cold field emission scanning electron microscope (CFESEM), and the component elements of coating were analyzed semi-quantitatively. The antibacterial properties of the coating were evaluated by antibacterial zone, live/dead bacteria staining and crystal violet experiments. **Results** A dense film was formed on the surface of titanium under the CFESEM compared with C group. The content of Cl element increased with the increase of CHXG concentration. There was no inhibition zone around the samples in C and T_0 groups, but it was found in T_1 , T_2 and T_3 groups. Live/dead bacteria staining showed no viable bacteria in the T_2 and T_3 groups. The results of crystal violet staining showed that T_1 , T_2 and T_3 groups were statistically different from C and T_0 groups, but the difference between the groups T_2 and T_3 was not statistically significant. **Conclusion** The antibacterial coating of PDMS-CHXG is constructed successfully. The PDMS-CHXG coating displays an exceptional antibacterial property when the concentration of CHXG reaches 0.8 mg/ml.

Key words implant denture; abutment; polydimethylsiloxane; chlorhexidine gluconate; *Porphyromonas gingivalis*; antibacterial properties