

网络出版时间: 2024-12-26 16:27:12 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1136.015>

多孔钛表面 EGCG/PLL 酚胺涂层整合氯己定的抗菌性能探究

洪慧蕾 徐建光 邱 华

(安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032)

摘要 目的 在多孔钛表面构建表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)与聚赖氨酸(PLL)酚胺交联涂层整合抗菌物质氯己定(CHX), 评价涂层的抗菌性能和生物安全性。方法 将纯钛进行碱热预处理制成多孔钛(pTi组), 然后在碱性有氧环境下浸没于EGCG与PLL混合溶液中24 h, 从而沉积酚胺交联涂层(EP组), 再将其进一步浸没于CHX溶液中24 h, 使之与CHX整合(EPC组)。用扫描电镜(SEM)、X射线光电子能谱仪(XPS)和水接触角测量仪进行材料表征; 通过体外抗菌实验(抑菌圈法、涂板法、浊度法、活/死细菌染色)评价样品体外抗菌性能; 体外细胞相容性实验(MTT法和细胞荧光染色)评价其生物安全性; 细菌细胞共培养实验评价在有菌环境中钛片表面的细胞黏附增殖能力。结果 SEM见碱热预处理后的多孔钛表面随着涂层沉积孔隙依次减小; 水接触角测量示pTi组随着酚胺交联涂层的沉积和与CHX的整合, 水接触角逐渐增加。XPS检测见EPC组Ti、O含量降低, C、N含量增加, 并出现Cl_{2p}特征峰; 体外抗菌实验表明EPC组对金黄色葡萄球菌和伴放线放线杆菌均有良好抗菌性能, 抗菌能力能维持7 d以上; MTT法和细胞荧光染色显示EPC组细胞数量随时间增长呈明显的递增趋势且形态良好; 细菌细胞共培养实验表明EPC组在有菌环境中细胞仍可有效增殖。结论 纯钛表面EGCG/PLL酚胺涂层整合CHX具有良好的抗菌性能和生物安全性, 且能在有菌环境中发挥抗菌作用的同时保障细胞的黏附、增殖。

关键词 多孔钛; 表面改性; 酚胺交联涂层; 抗菌; 氯己定

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)01-0109-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.015

种植体表面改性技术因其具有作用靶点明确、可携带药物、毒副作用小等优点成为了预防种植体周围炎领域的一项重要研究内容^[1]。目前种植体表面改性涂层中的常用抗菌物质主要包括抗生素涂层、离子涂层、抗菌肽涂层等, 但因其存在易引发耐药性、材料释放量不足、合成步骤繁杂等问题, 限制了涂层的研究和应用^[2-3]。氯己定(chlorhexidine, CHX)作为一种表面活性剂型杀菌剂, 因其具有耐药风险低、抗菌活性持久、抗菌谱广等诸多优点, 已在口腔领域广泛应用^[4]。然而研究^[5]表明, 单纯吸附在钛表面的CHX存在载药总量低、扩散系数高、药物早期突释、生物安全性差等问题。该实验受海洋贻贝启发, 在多孔钛表面构建类多巴胺酚胺交联涂层, 并以此作为二次反应平台整合CHX, 通过多种表征验证涂层的构建, 并探究涂层的体外抗

菌性能、生物安全性以及体外有菌环境下对成骨细胞增殖、黏附能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 纯钛购自山西宝鸡有色金属有限公司; 表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT)购自美国Sigma公司; 聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)、CHX购自上海Macklin公司; 活/死细菌染色试剂盒购自美国Invitrogen公司; 鬼笔环肽购自苏州宇恒生物科技有限公司; Tris购自广州赛国生物有限公司。Gemini SEM 300 扫描电镜(德国ZEISS公司); ESCALAB 250Xi X射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectrometer, XPS)(美国Thermo Scientific公司); OCA 15EC 接触角测量仪(德国Dataphysics公司); DMI 3000B 荧光显微镜(德国Leica公司); MQX 200 酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 样品制备及分组

1.2.1 碱热预处理 将钛片经由80~2 000目的砂纸打磨抛光, 依次经过丙酮、无水乙醇、去离子水超声清洗, 烘干后浸铺入NaOH溶液(2.5 mol/L)中60℃恒温浸泡24 h, 沸水超声冲洗1 h, 烘干, 标

2024-11-27 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 2208085QE136)

作者简介: 洪慧蕾, 女, 硕士研究生;

徐建光, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: xujianguang@ahmu.edu.cn;

邱 华, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: qiuhsua1990@foxmail.com

记为 pTi 组(对照组)。

1.2.2 涂层制备 将 pTi 浸入含 2 mg/ml EGCG、0.2 mg/ml PLL 的 Tris 溶液(1.5 mg/ml)中,37℃ 有氧环境下恒温静置反应 24 h,去离子水超声清洗 5 min × 3 次,烘干后标记样品组为 EP 组(酚胺组)。取部分酚胺组钛片浸没于 1 mg/ml 的 CHX 溶液中 24 h,去离子水超声清洗 5 min × 3 次,标记为 EPC 组(抗菌组)。

1.3 材料表征 样品经离子溅射仪真空喷金溅射,扫描电镜观察表面形貌变化;室温下用接触角测量仪测量其水接触角;XPS 分析样品表面元素组成。

1.4 体外抗菌性能评价

1.4.1 抑菌圈法 将金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Aa)菌液均稀释至 10^5 CFU/ml,各取 100 ml 均匀涂布于琼脂板培养基,将灭菌的钛片正面朝下放置于培养基上。在 37℃ 环境下,将 *S. aureus* 在有氧培养箱内培养 24 h, Aa 在无氧培养箱内培养 48 h,随后进行观察。

1.4.2 涂板法 取 50 μ l(10^5 CFU/ml) *S. aureus* 和 Aa 菌液分别滴定于钛片表面,4 h 后补充 1 ml 培养基,分别恒温培养 24 h 和 48 h 后取出钛片, PBS 溶液漂洗后置入含 5 ml 培养基的 EP 管中,小频率超声震荡 1 min,将菌液稀释 10^5 倍后取 100 μ l 涂板培养,分别继续恒温培养 24 h 和 48 h 后观察。

1.4.3 浊度法 将原始样品(标记为 O)浸泡在 1 ml/孔的 SBF 溶液中并每日更换,分别浸泡 3 d 和 7 d 后取出钛片(标记为 M3、M7),烘干、紫外灭菌备用。提升接种菌液浓度至 10^6 CFU/ml 滴定于钛片表面,37℃ 培养 4 h 后补充 1 ml 培养基,分别继续恒温培养 24 h 和 48 h 后,用酶标仪测定菌液在 660 nm 波长处吸光度值。

1.4.4 活/死细菌染色 实验初始操作方法同 1.4.3,然后取出钛片,活/死细菌荧光染色试剂盒避光染色 10 min,倒置荧光显微镜下观察。

1.5 体外细胞相容性实验

1.5.1 MTT 法 每孔样品接种 2×10^4 个/ml 的 MC3T3-E1 细胞悬浮液 1 ml,于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养,培养 1、3、5 d 后,每组随机取出 3 个钛片,MTT 法测定细胞增殖情况。

1.5.2 细胞荧光染色 培养 2、4、6 d 后分别取 1.5.1 中接种了 MC3T3-E1 的钛片每组 3 个, PBS 涮洗后 2.5% 戊二醛固定 4 h。荧光标记的鬼笔环肽、DAPI 染液分别避光染色,倒置荧光显微镜下观察细胞形态及数目。

1.6 细胞细菌共培养 在钛片表面滴定 50 μ l(10^6 CFU/ml) *S. aureus* 悬液,4 h 后每孔接种 2×10^4 个/ml 的 MC3T3-E1 细胞悬液 1 ml,培养 1、3 d 后取出钛片, PBS 漂洗后用活/死细菌荧光染色试剂盒避光染色 10 min,倒置荧光显微镜观察。

1.7 统计学处理 使用 SPSS Statistics 软件进行进行统计学分析。定量测量值均符合正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析方法比较多组间均数的差异,并采用 LSD-*t* 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表面理化性能表征

2.1.1 表面形貌 扫描电镜观察表面形貌如图 1 所示,光滑的 Ti 经碱热预处理制成多孔钛(pTi 组),表面可见微、纳米级尺寸支柱交织形成开放的孔状网络结构。沉积 EGCG/PLL 酚胺交联涂层后, EP 组孔隙被明显覆盖,支柱增粗,呈现较为疏松的短簇丛状结构。整合了 CHX 的 EPC 组,形成更为致密的丛状结构,表面孔隙被进一步填充,原孔隙结构不可见。

2.1.2 亲水性能 水接触角是衡量液体对材料表面润湿性能的重要参数,测量结果如图 2,经过碱热预处理后,水接触角由未处理的 Ti 组的(69.8 ± 2.7)°大幅降低至 pTi 组的(18.2 ± 1.3)°($P <$

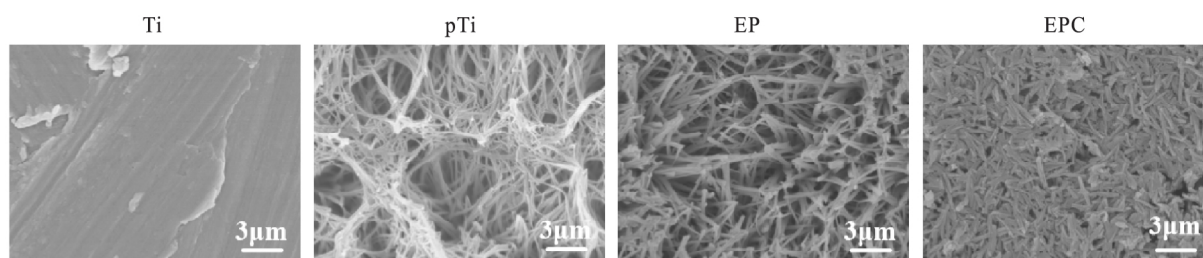


图1 各样品表面扫描电镜观察形貌 ×50 000

Fig.1 SEM images of different sample ×50 000

0.001)。pTi 组展现出优越的亲水性能,这是因为 pTi 表面富含亲水性的羟基。EP 组因酚胺涂层浓度较低,水接触角较 pTi 组差异无统计学意义。EPC 组水接触角则明显增高,较 pTi 组和 EP 组差异均有统计学意义($P < 0.001$),这是由 CHX 的疏水特点造成的。

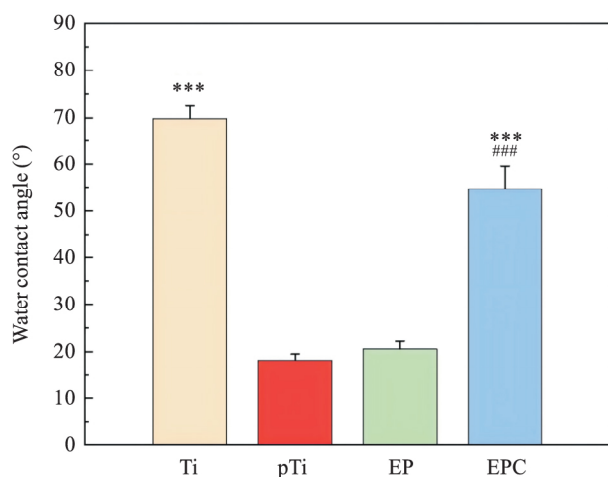


图2 不同样品组水接触角

Fig.2 Water contact angle on different sample surface

*** $P < 0.001$ vs pTi group; ### $P < 0.001$ vs EP group.

2.1.3 表面元素组成及含量分析 XPS 分析样品表面检测结果如图3所示,随着酚胺涂层的沉积和 CHX 的整合,Ti2p 和 O1s 峰均随之减弱,Ti 元素含量从 20.16% 分别降至 14.70% 和 9.02%,O 含量从 53.41% 分别降至 41.61% 和 15.28%。由于沉积物 PLL、CHX 均富含 C、N 元素,因此图3中可见两种元素呈现与 Ti、O 相反的递增趋势,C 元素含量从

21.93% 分别升至 37.02% 和 45.86%,N 元素含量从 3.89% 升至 6.21% 和 23.99%。此外 EPC 组出现 Cl2p 特征峰,这说明 CHX 整合成功。

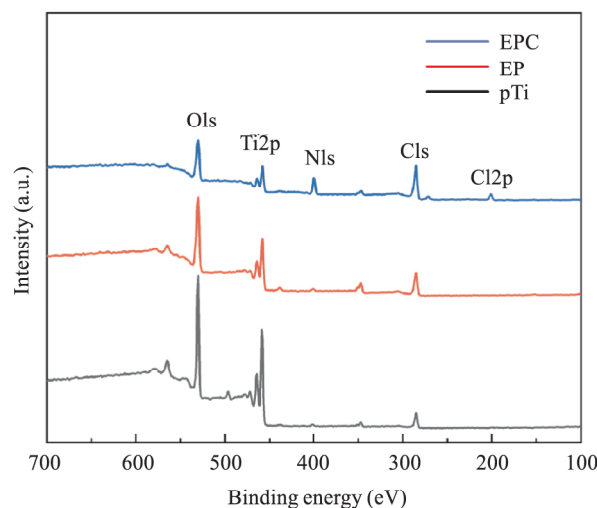


图3 样品表面 XPS 全谱图

Fig.3 XPS wide scans of different sample surfaces

2.2 体外抗菌性能评价 本实验采用 *S. aureus* 和 *Aa* 两种细菌分别作为革兰阳性需氧菌和革兰阴性兼性厌氧菌代表菌种,对改性涂层的抗菌性能进行评价。

2.2.1 抑菌圈法 抑菌圈法结果如图4A所示。pTi 组和 EP 组样品周围细菌正常生长,EPC 组由于 CHX 的扩散在样品周围形成透明的环状无菌抑菌圈区域。

2.2.2 涂板法 表面黏附细菌超声涂板结果如图4B,当 *S. aureus* 和 *Aa* 接枝浓度为 10^5 CFU/ml 时,

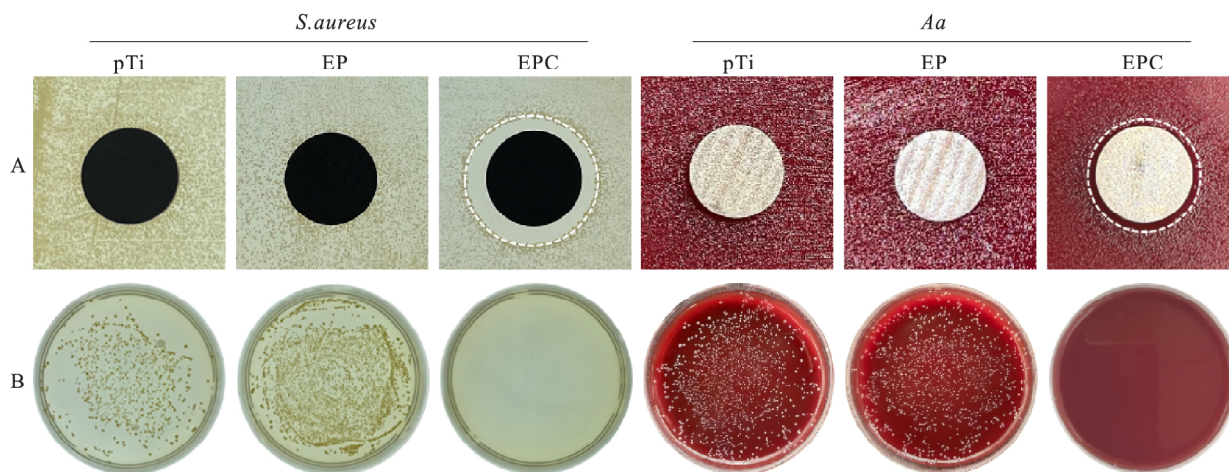


图4 抑菌圈法与涂板法

Fig.4 Bacteriostatic zone experiment and coating method

A: The ZOI results of different samples; B: The sample surface was incubated with different bacterial sonicated plates.

EPC 组均表现出 100% 的抑菌率, 琼脂板上未见菌落生长, 而 pTi 组、EP 组则出现大量菌落。

2.2.3 浊度法 为了进一步验证 EPC 组抗菌性能的持久性和稳定性, 将钛片分别浸泡释放 3 d 和 7 d 进行后续实验, 标记为 M3 和 M7, 未浸泡释放的钛片标记为 O。提升 *S. aureus* 和 *Aa* 接种浓度至 10^6 CFU/ml。样品与 *S. aureus* 和 *Aa* 分别孵育 24 h、48 h 后, 通过酶标仪测量培养基体系在 660 nm 处的吸光度值进行比较, 用以定性微生物的增殖情况。实验结果如图 5, pTi 组和 EP 组各组与 *S. aureus* 和 *Aa*

共培后, 体系吸光度值明显升高, 提示细菌大量增殖, 样品无抗菌能力。O-EPC 组、M3-EPC 组和 M7-EPC 组对 2 种细菌均始终维持较低的吸光度值, 6 组方差分析显示, 差异有统计学意义 (*S. aureus*: $F = 100.243, 278.742, 31.217, P < 0.001$; *Aa*: $F = 110.219, 90.357, 96.626, P < 0.001$)。EPC 组表现出显著的抗菌能力, 即使经过 7 d 的连续释放, 仍能有效发挥抗菌作用。

2.2.4 活/死细菌染色 采用活/死细菌染色对钛片表面黏附细菌进行更直观的观察, 如图 6 所示, 可

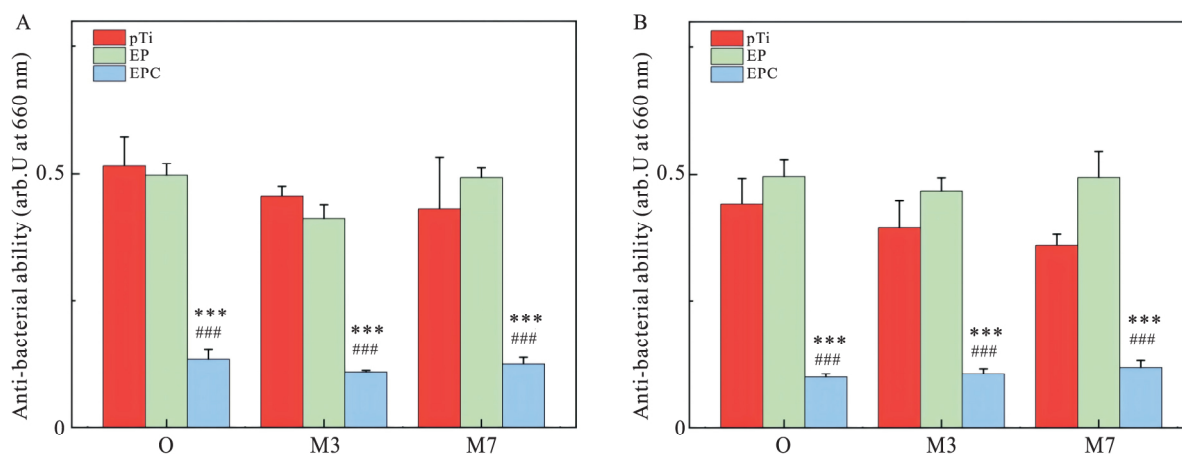


图 5 浊度法评价各组样品与 *S. aureus* (A) 与 *Aa* (B) 共培后的增殖情况

Fig. 5 The absorbance value of different groups of samples after incubation with *S. aureus* (A) and *Aa* (B)

*** $P < 0.001$ vs pTi group; ### $P < 0.001$ vs EP group.

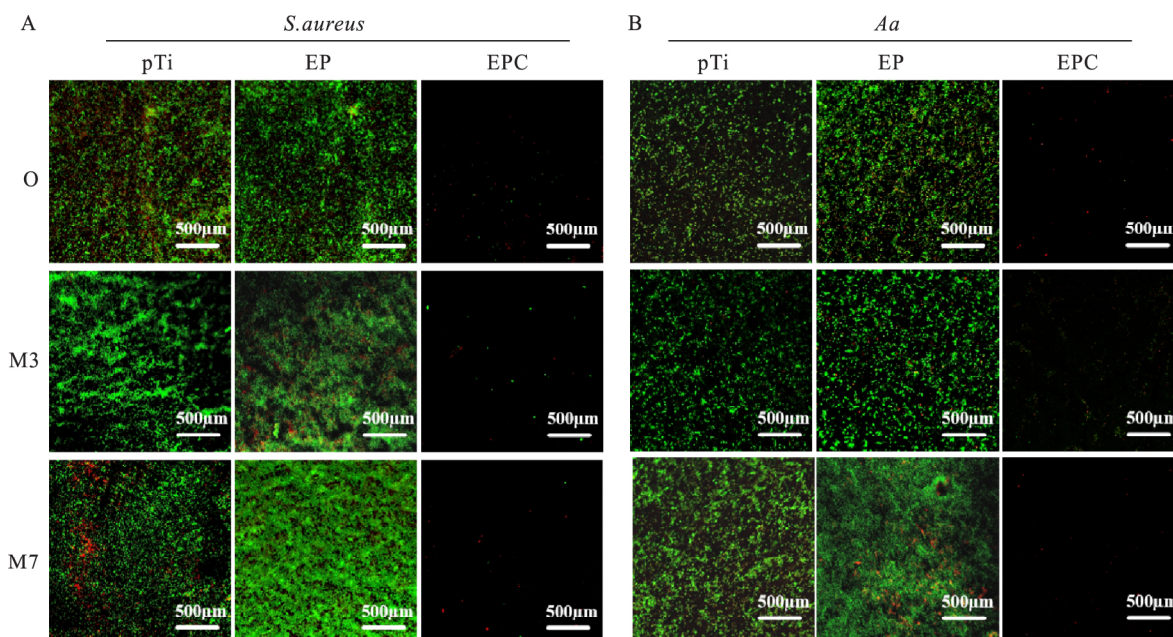


图 6 未浸泡 (O)、浸泡释放 3 d (M3)、7 d (M7) 后接种 *S. aureus* (A) 和 *Aa* (B) 活/死细菌染色 $\times 100$

Fig. 6 Live-dead bacterial staining of the surface of samples inoculated with *S. aureus* (A) and *Aa* (B) after immersion in SBF solution for 0 day (O), 3 days (M3) and 7 days (M7) $\times 100$

见各 pTi 组、EP 组表面密集的细菌几乎铺满钛片，且主要为标记为绿色荧光的活菌。各 EPC 组无论浸泡释放与否，钛片表面均少见甚至未见细菌存在。

2.3 体外细胞相容性实验

2.3.1 MTT 法 MTT 法是细胞增殖测定、细胞毒性测定的常用方法。实验结果如图 7，EPC 组培养 1、3、5 d 后吸光度值均始终稍低于 pTi 组和 EP 组，但 EPC 组培养 1、3、5 d 后的 MTT 测量值总体呈明显的递增趋势 ($F = 185.623$, $P < 0.001$)，培养 5 d 后 EPC 组的细胞增殖率可达 85% 以上。

2.3.2 细胞荧光染色 细胞荧光染色观察细胞在钛片表面的黏附和铺展情况，结果如图 8 所示，pTi 组、EP 组呈现相似的细胞密度和细胞铺展形态，细胞增殖趋势明显，铺满观察视野，细胞始终呈健康的纺锤状。EPC 钛片在培养 2、4 d 后的细胞数量均低于同期的 pTi 组和 EP 组，但 6 d 后同样几乎覆盖整个钛片并呈融合状态，且细胞始终形态良好，铺展充分相互接触。

2.3.3 细菌细胞共培养 细菌细胞共培养实验一定程度上模拟了临床上在有菌环境中植入种植体的情况，可用于观察有菌环境下成骨细胞的黏附、增殖行为。细胞细菌共培养 1、3 d 后的荧光实验结果如图 9，pTi 组和 EP 组由于不具备抗菌能力，细菌在竞

争性黏附中呈现明显优势，大量增殖占据钛片表面形成生物膜，接种细胞由于细菌分泌产物的毒力作用凋亡，只见少数红色凋亡细胞。而 EPC 组早期即可充分发挥优异的抗菌作用，细菌几不可见，绿色的活细胞形态良好呈纺锤状，铺展良好相互接触，且细胞增殖趋势明显。

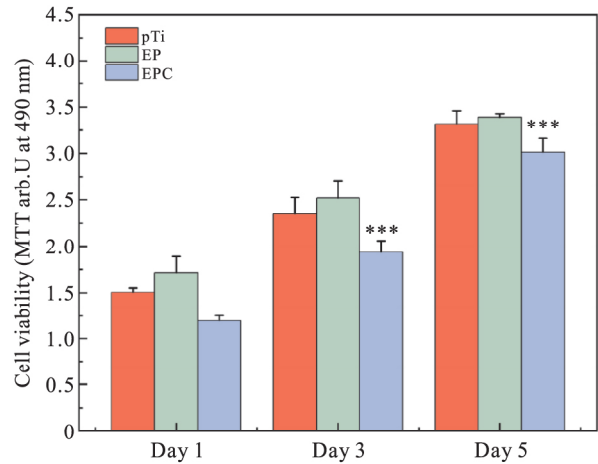


图 7 MC3T3-E1 细胞在各组样品表面培养 1、3、5 d 后的 MTT 测量值

Fig. 7 MTT measurements of MC3T3-E1 cells after 1, 3, and 5 days of incubation on the surface of each group of samples

*** $P < 0.001$ vs Day 1.

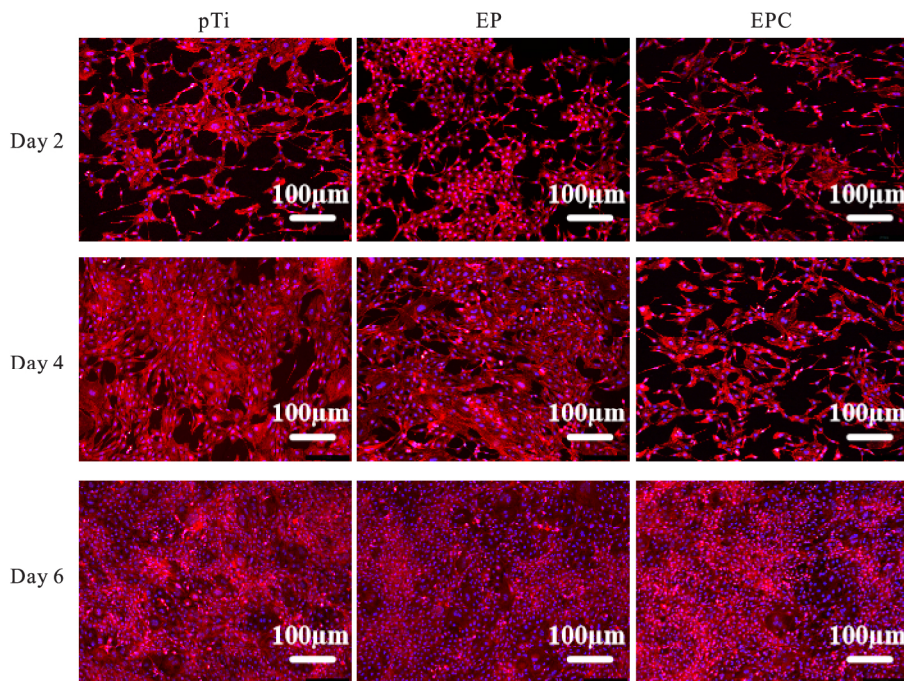


图 8 MC3T3-E1 在各样品表面培养 2、4、6 d 的 tritc-鬼笔环肽和 Dapi 染色 $\times 100$

Fig. 8 Tritc-phalloidin and Dapi staining plots of MC3T3-E1 cell cultured on the surface of each group of samples for 2, 4 and 6 days $\times 100$

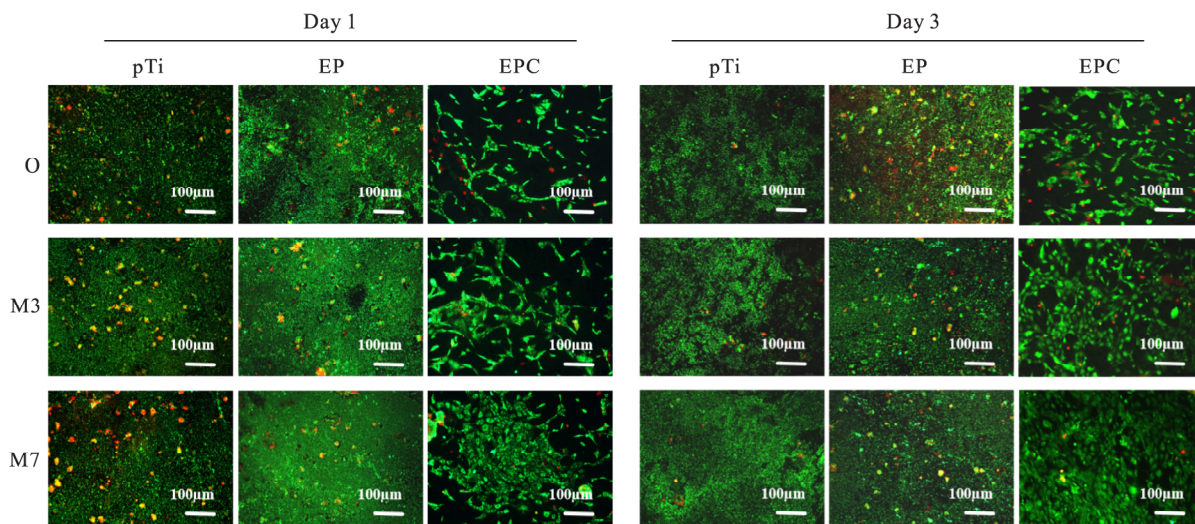


图9 未浸泡(O)、浸泡释放3 d(M3)、7 d(M7)后样品进行细菌细胞共培养的活/死细菌染色 $\times 100$

Fig. 9 Live-dead fluorescent staining of bacteria-cell co-culture on samples after immersion in SBF solution for 0 day (O), 3 days (M3) and 7 days (M7) $\times 100$

3 讨论

钛植体修复已成为牙列缺损患者的首选修复方式,而细菌感染导致的种植失败问题亟待解决^[6]。Fürst et al^[7]研究发现,种植体植入 30 min 后周围就可出现牙周致病菌定植,严重影响后续种植体周围炎的发生、发展。受限于种植体本身的螺纹结构和细菌生物膜的屏障作用,细菌一旦黏附增殖形成生物膜,临床上尚无有效的彻底清除手段。因此,防止首批细菌的黏附感染成为了构建种植体表面抗菌涂层的重要构想。

受贻贝启发的类多巴胺涂层作为二次反应平台,整合抗菌物质、赋予种植体抗菌性能的研究被广泛应用于涂层制备中。研究^[8-9]发现,碱性有氧环境下邻苯二酚基团和胺发生的迈克尔加成、席夫碱反应等一系列反应能够赋予涂层强大的多基底黏附力。同时,酚胺交联涂层表面富含醌基、胺基、酚羟基等功能基团,是有效的二次反应平台^[10],可以用于抗菌成分、促成骨成分、促成血管成分等多种生物活性分子的整合,进一步构建更多功能的种植体改性表面^[11]。

本实验以 EGCG 和 PLL 作为原料合成酚胺交联涂层。EGCG 是一种天然茶多酚类物质^[12],与多巴胺具有结构相似性。通过对天然贻贝黏附机理的研究,已明确赖氨酸有助于与多巴胺分子产生内交联^[13],是实现材料独立黏附的关键因素之一。实验

通过碱性有氧环境下 EGCG 邻苯二酚基团和赖氨酸残基发生多次自聚合-组装,通过动态共价键和氢键二重网络在材料表面形成紧密附着的酚胺交联涂层,并通过浸润法整合抗菌物质 CHX。CHX 在生理 pH 上携带两个正电荷,基于对胞膜渗透性的影响,可在低浓度(0.02% ~ 0.06%)产生抑菌作用,高浓度(> 0.1%)发挥杀菌作用^[14]。本实验所选用 CHX 浓度为 1 mg/ml,经本组前期实验结果已验证^[15],该浓度 CHX 发挥抗菌作用的同时兼具良好的生物安全性。

通过扫描电镜观察、水接触角测量和 XPS 检测,明确在多孔亲水 pTi 表面成功构建了 EP 酚胺交联涂层和整合了 CHX 的 EPC 抗菌涂层。碱热处理后钛片表面的微纳级多孔形态增大了种植体的比表面积和粗糙度,可为酚胺涂层沉积提供位点,加强 CHX 扩散行为的空间屏障,利于成骨细胞的早期黏附。

本实验采用 *S. aureus*、*Aa* 对改性涂层的抗菌性能进行评估。*S. aureus* 对钛具有极高的亲和力,其早期感染定植对于后续植体周炎的发展起重要作用^[16]。*Aa* 可导致牙槽骨吸收,结缔组织破坏。通过抑菌圈法和涂板法验证了 EPC 组存在抗菌性能。在浊度法和活/死细菌染色两项实验中,EPC 组即使在释放 3、7 d 以后,均始终对两种细菌发挥出色的抗菌作用,这说明 EPC 组的抗菌性能至少可以稳定维持 7 d 以上。

本实验用 MTT 法和细胞荧光染色法对细胞增殖及形态进行观察, CHX 的加入早期对细胞黏附产生了一定负面影响, 细胞数目较对照组和酚胺组略少, 但细胞形态始终正常。浸泡后 CHX 逐渐释放, 细胞得以正常增殖, 使得差异性进一步缩小。培养 6 d 后, EPC 组细胞数目和形态均与 pTi、EP 组无显著差别, 表明 EPC 组具有良好的生物安全性。

在体内实际感染过程中, 细菌与细胞存在竞争性黏附关系, 实验设计了细菌细胞共培养体系, 证明了 EPC 涂层可以有效发挥抗菌作用, 抑制细菌早期黏附, 避免生物膜形成, 从而保障成骨细胞黏附增殖。

综上所述, 本实验采用液相沉积法在碱热处理后的多孔亲水 pTi 表面构建了 EGCG/PLL 酚胺交联涂层, 并作为二次反应平台整合了 CHX。该复合涂层对 *S. aureus* 和 *Aa* 均呈现出良好的抗菌性能, 抗菌效果能维持 7 d 以上。涂层对 MC3T3-E1 细胞生物相容性良好, 有菌环境下早期即可充分发挥抗菌作用, 同时保障细胞的黏附、铺展和增殖, 为骨结合的发生创造了有利环境。

参考文献

- [1] Xu J, Zhang J, Shi Y, et al. Surface modification of biomedical Ti and Ti alloys: a review on current advances [J]. *Materials (Basel)*, 2022, 15 (5): 1749. doi: 10.3390/ma15051749.
- [2] Yuan Z, He Y, Lin C, et al. Antibacterial surface design of biomedical titanium materials for orthopedic applications [J]. *J Mater Sci Technol*, 2021, 78: 51–67. doi: 10.1016/j.jmst.2020.10.066.
- [3] Janson O, Gururaj S, Palmer S, et al. Titanium surface modification to enhance antibacterial and bioactive properties while retaining biocompatibility [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 96: 272–9. doi: 10.1016/j.msec.2018.11.021.
- [4] Solderer A, Kaufmann M, Hofer D, et al. Efficacy of chlorhexidine rinses after periodontal or implant surgery: a systematic review [J]. *Clin Oral Investig*, 2019, 23 (1): 21–32. doi: 10.1007/s00784-018-2761-y.
- [5] Machtei E, Frankenthal S, Levi G, et al. Treatment of peri-implantitis using multiple applications of chlorhexidine chips: a double-blind, randomized multi-centre clinical trial [J]. *J Clin Periodontol*, 2012, 39 (12): 1198–205. doi: 10.1111/jcpe.12006.
- [6] 庞诗梦, 夏荣, 李趁趁, 等. 钛表面新型抗菌涂层的生物相容性研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57 (9): 1355–99. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.003.
- [6] Pang S, Xia R, Li C, et al. Study on the biocompatibility of novel antibacterial coating on titanium [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57 (9): 1355–99. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.003.
- [7] Fürst M, Salvi G, Lang N, et al. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2007, 18 (4): 501–8. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01381.x.
- [8] Hofman A, Hees I, Yang J, et al. Bioinspired underwater adhesives by using the supramolecular toolbox [J]. *Adv Mater*, 2018, 30 (19): e1704640. doi: 10.1002/adma.201704640.
- [9] Burzio L A, Waite J H. Cross-linking in adhesive quinoproteins: studies with model decapeptides [J]. *Biochemistry*, 2000, 39 (36): 11147–53. doi: 10.1021/bi0002434.
- [10] Waite J H. Mussel adhesion—essential footwork [J]. *J Exp Biol*, 2017, 220 (Pt 4): 517–30. doi: 10.1242/jeb.134056.
- [11] Yang Z, He H, Gao Z, et al. A dopamine-like deposition coatings on the polyethylene terephthalate fibers and its interface adhesion with rubber [J]. *Surf Interfaces*, 2024: 104485. doi: 10.1016/j.surf.2024.104485.
- [12] Almatroodi S A, Almatroodi A, Khan A, et al. Potential therapeutic targets of Epigallocatechin Gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, and its role in the therapy of various types of cancer [J]. *Molecules*, 2020, 25 (14): 3146. doi: 10.3390/molecules25143146.
- [13] Rapp M V, Maier G P, Dobbs H A, et al. Defining the catechol-cation synergy for enhanced wet adhesion to mineral surfaces [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138 (29): 9013–6. doi: 10.1021/jacs.6b03453.
- [14] Fiorillo L, D'Amico C, Mehta V, et al. Chlorhexidine cytotoxicity on oral behaviors: last 20 years systematic review [J]. *Oral Oncol Rep*, 2024, 9: 100245. doi: 10.1016/j.oor.2024.100245.
- [15] 丁思颢, 洪慧蕾, 徐凌寒, 等. 酚胺交联涂层接枝氯己定改善钛表面抗菌性能研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2022, 36 (3): 335–42. doi: 10.7507/1002-1892.202108095.
- [15] Ding S, Hong H, Xu L, et al. Chlorhexidine-grafted phenolamine coating to improve antibacterial property of the titanium surface [J]. *Chin J Reparative Reconstr Surg*, 2022, 36 (3): 335–42. doi: 10.7507/1002-1892.202108095.
- [16] Silva D, Guerra C, Muñoz H, et al. The effect of *Staphylococcus aureus* on the electrochemical behavior of porous Ti-6Al-4V alloy [J]. *Bioelectrochemistry*, 2020, 136: 107622. doi: 10.1016/j.bioelect.2020.107622.

Study on the antibacterial property of EGCG/PLL phenolamine coating integrated chlorhexidine on porous titanium surface

Hong Huilei , Xu Jianguang , Qiu Hua

(College & Hospital of Stomatology , Anhui Medical University , Key Lab. of
Oral Diseases Research of Anhui Province , Hefei 230032)

Abstract *Objective* To construct a phenolamine cross-linked coating composed of epigallocatechin gallate (EGCG) and poly-L-lysine (PLL) on the surface of the porous pure Ti integrated with the antibacterial substance chlorhexidine (CHX) , and to study the antibacterial property and biosafety. *Methods* A porous structure (pTi group) was formed on the surface of titanium samples by alkaline heat treatment. Then the pTi group was immersed in the mixed solution of EGCG and PLL in an alkaline aerobic environment for 24 h to obtain the phenolamine group samples (EP group) . Finally , the titanium tablets were further immersed in the aqueous solution of chlorhexidine (CHX) for 24 h to obtain the antibacterial groups (EPC group) . Microstructure and properties of the surface were characterized by scanning electron microscopy (SEM) , X-ray photoelectron spectrometer (XPS) and water contact angle measuring instrument. The antibacterial properties of coating were observed and evaluated by nephelometry , inhibition zone method and live/dead bacterial staining. The cytocompatibility of the coating was evaluated by MTT method and cell fluorescence staining , and the cell adhesion and proliferation ability in bacterial environment were evaluated by the co-culture of bacteria and cells. *Results* SEM results showed that the pore size of samples after alkali heat treatment decreased with the deposition of the phenolamine coating. The measurement of water contact angle showed that the contact angle increased significantly with the grafting of coating. The intensity of N1s and C1s peaks increased and Ti2p and O1s peaks decreased detected by XPS tests. The Cl2p peak appeared in EPC group referred to the control group. The antibacterial experiments *in vitro* showed that the antibacterial samples could perform effective antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* and *Aggregatibacter actinomycetem-comitans* for at least 7 days. In the biocompatibility experiments , MTT and cell fluorescence staining results showed that the adherent cells had good morphology and proliferative activity. The bacteria-cell co-culture results showed that the EPC groups could provide a good environment for cell proliferation and growth with excellent antibacterial properties. *Conclusion* Chlorhexidine-grafted phenolamine deposited on porous titanium surface displays an effective antibacterial effect with good biosafety performance , which can play an antibacterial role in the bacterial environment while ensuring cell adhesion and proliferation.

Key words porous titanium; surface modification; phenolamine cross-linked coating; antibacterial; chlorhexidine

Fund program Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2208085QE136)

Corresponding authors Xu Jianguang , E-mail: xujianguang@ahmu.edu.cn; Qiu Hua , E-mail: qiuhua1990@foxmail.com