DOI:10.16016/j.1000-5404.201411181

论著

硅橡胶的表面性能与细菌黏附的关系

石小花,张一鸣,周 鑫,陈 兴,樊东力 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院整形美容科)

[摘要] **目的** 研究硅橡胶的表面性能变化对细菌黏附的影响。**方法** 采用细菌培养和菌落技术对普通硅橡胶(silicon rubber,SR)、碳-硅橡胶(carbon ion implanted silicon rubber, C-SR)和羟基磷灰石涂层硅橡胶(hydroxyapatite coating silicone rubber, HA/SR)表面细菌黏附情况进行分析,通过扫描电镜(scanning electron microscope,SEM)对材料表面的形貌进行观察,采用X射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy,XPS)、X射线衍射光谱仪(XRD)、傅里叶红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer,FTIR)对材料表面的分子结构进行分析,同时对材料表面的粗糙度以及亲/疏水性(水接触角)进行检测。**结果** 普通硅橡胶(SR)表面细菌黏附最多[$(2.11\pm0.12)\times10^5$CFU],羟基磷灰石涂层硅橡胶(hydroxyapatite coating silicone rubber, HA/SR)次之[$(1.88\pm0.88)\times10^5$CFU],碳-硅橡胶(carbon ion implanted silicon rubber, C-SR)表面细菌黏附最少[$(0.98\pm0.35)\times10^5$CFU],C-SR组细菌黏附明显少于SR组($P<0.05$),HA/SR组细菌黏附较SR组有所减少,但是差异无统计学意义($P>0.05$);材料的表面亲/疏水性与细菌黏附呈相似趋势;而表面粗糙度的变化与细菌黏附趋势不一致。**结论** 硅橡胶表面的亲/疏水性可能是影响细菌黏附的主要因素。

[关键词] 生物材料;感染;细菌黏附;表面性能;亲/疏水性
[中图法分类号] R312; R318.08; R62 [文献标志码] A

Relationship of surface properties of silicone rubber with bacteria adhesion

Shi Xiaohua, Zhang Yiming, Zhou Xin, Chen Xing, Fan Dongli (Department of Plastic and Cosmetic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the relationship of the surface properties of silicone rubber with bacterial adhesion in order to provide theoretical basis to prevent infection of bio-implants. **Methods** Bacterial culture and colony formation counting were used to analyze the bacterial adhesion on the surface of ordinary silicon rubber (SR), carbon ion implanted silicon rubber (C-SR), and hydroxyapatite coating silicone rubber (HA/SR). Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the morphology of the substrate surface. The molecular structures of the surface were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray diffraction spectroscopy (XRD) and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). Meanwhile, the hydrophilic/hydrophobic properties of substrate surface were detected by water contact angle test. **Results** The number of bacteria adhered to the surface was largest in the SR [$(2.11\pm0.12)\times10^5$CFU], followed by HA/SR [$(1.88\pm0.88)\times10^5$CFU], and then C-SR [$(0.98\pm0.35)\times10^5$CFU]. Significant difference was seen in the bacterial count between C-SR and SR ($P<0.05$), but not between HA/SR and SR ($P>0.05$). Similar trend was also in the hydrophilic/hydrophobic properties, but not in the surface roughness. **Conclusion** Hydrophilic/hydrophobic properties may play an important role for bacterial adhesion on the biomaterial surface.

[**Key words**] biomaterials; infection; bacterial adhesion; surface properties; hydrophilicity/hydrophobicity

Supported by the National Nature Science Foundation for Young Scholars of China (81401610) and the Foundation for Achievement Transformation of Third Military Medical University (2012XZH05). Corresponding author: Fan Dongli, E-mail: fdltmmu@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81401610);第三军医大学成果转化基金(2012XZH05)
[通信作者] 樊东力,E-mail:fdltmmu@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150722.0956.014.html(2015-07-22)

生物材料的组织相容性、材料相关的感染、癌变、钙化等问题,是生物材料及其相关产品使用过程中经常会发生的问题。其中,与材料相关的感染可能导致上述其他问题的出现[1]。研究表明,生物材料相关感染的起始动因是细菌黏附[2]。因此,研究生物材料表面的细菌黏附对防治生物材料植入后引起的感染具有重要的意义。几乎所有细菌可对机体及材料发生黏附,值得注意的是,在生物材料存在时,较少的细菌就能导致机体感染。体外实验表明,即使很少的细菌(甚至少于10个)也可能会导致细菌在生物植入材料表面黏附,引起后期感染,造成严重后果[3]。研究表明,细菌对材料的黏附与细菌菌种和生物材料种类相关[4-6]。生物材料的表面化学组成、亲疏水性、表面电荷分布等都对细菌黏附具有重要影响[4-6]。目前尚没有确切的研究证明何种表面性能是影响生物材料表面细菌黏附的主要因素。

在整形外科临床治疗领域,硅橡胶(silicon rubber,SR)是最为常用的软组织填充修复材料,其具有化学性质稳定,经济性价比高,易塑形、消毒等优点。但也存在明显的缺点,即表面呈疏水性,组织细胞的相容性较差。本课题组在前期研究中,采用不同的方法制作了以SR为基础的表面改性材料碳-硅橡胶(carbon ion implanted silicon rubber, C-SR)[7]和羟基磷灰石涂层硅橡胶(hydroxyapatite coating silicone rubber, HA/SR)[8],对3种硅橡胶表面细菌黏附情况进行观察,发现不同的材料表面细菌黏附存在一定差异。本研究进一步采用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、X射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectroscopy,XPS)、X射线衍射光谱仪(XRD)、傅里叶红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer,FTIR)对3种硅橡胶材料表面形貌及物理化学性能进行分析,同时对材料表面的粗糙度以及水接触角进行检测,旨在探讨材料的表面性能与细菌黏附的关系。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

硅橡胶制作原料(双组分医用液体硅橡胶)购买自成都晨光化工研究院。所需要的仪器:高能离子注入机(核工业西南物理研究院,中国);AMRAY1000-B20KV扫描电镜(Amray公司,美国);470型傅里叶红外光谱仪(Thermo Nicolet公司,美国);Escalab250型X射线光电子仪能谱(Thermo Electron公司,美国);SC7640型高精度喷金喷碳仪(上海易微信息科技有限公司,中国)、DSA 100型接触角测定仪(汉堡KRUSS公司,德国)、LEXT OLS4100激光共聚焦显微镜(Olympus公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 3种材料的细菌黏附检测 SR、C-SR和HA/SR的制作方法参见文献[7-8]。碳(C)离子注入剂量选用注入能量10 eV,离子剂量1×10^{16}离子/cm^2。羟基磷灰石颗粒粒径100 μm。在37 ℃环境下,人表皮葡萄球菌37 ℃过夜活化后,1∶100比例接种到LB液体培养基,37℃恒温振荡培养2.5~3 h,紫外线分光计测量菌液光密度值,调整光密度值于0.08~0.1之间(SE细菌数1×10^5~1×10^6个/mL)备用。将3种材料组分别置于无菌的6孔板中,每孔中再加入上述备用的菌液2 mL,在37 ℃培养箱,分别培养12 h取出,用无菌水清洗10次,去除材料表面未黏附上的细菌,然后放入2 mL的灭菌水,混合振荡器振荡15 min,彻底将已在材料表面黏附的细菌洗脱。最后,洗脱液10倍梯度稀释,各稀释菌液10 μL分别涂布于血琼脂平板,温度37 ℃,放入细菌孵育箱过夜培养,选择每平板30~300个菌落计数,计算平板生长细菌菌落个数。

1.2.2 SR和C-SR的表面性能检测

SEM:将3种材料分别切至10 mm×10 mm的方形,37 ℃干燥,真空负压条件下喷金镀膜,冷却后使用扫描电镜观察表面形貌。

XPS:3种材料分别切成10 mm×10 mm,75%乙醇浸泡、清洗、真空加热,去除样品表面污物,冷却后黏附在样品托上进行XPS检测材料表面的化学组成。射线源为1 000~1 500 eV,能谱扫描范围为0~1 200 eV,扫描间距1 eV。

XRD:3种材料剪裁成10 mm×10 mm,无水乙醇浸泡、干燥、真空加热去除表面污物,冷却后进行XRD测定分析材料表面的晶体结构。

FTIR:将3种材料分别切至10 mm×10 mm的方形,无水乙醇清洁表面,待乙醇挥发,样品干燥后进行测定(波数4 cm^{-1},扫描范围为400~4 000 cm^{-1})。

亲/疏水性(水接触角):去离子水滴于材料表面1 min后进行测试,每个样品取间距5 mm的3个点进行测量,共6次读数,取平均值。

表面粗糙度:采用LEXT OLS4100激光共聚焦显微镜(Olympus,日本)20倍物镜对材料表面进行扫描,扫描范围13 352 μm,每个样本重复6次。

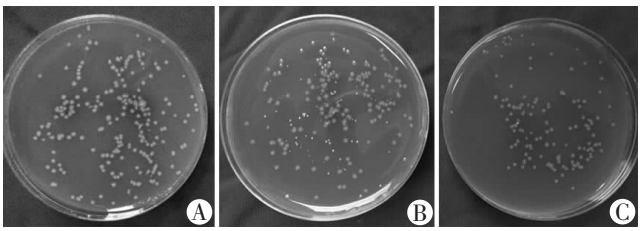
1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件,数据间的比较采用单因素方差分析和Turkey显著性检验。

2 结果

2.1 细菌黏附实验结果

结果见图1,SR表面细菌黏附最多[菌落计数(2.11±0.12)×10^5 CFU],HA/SR次之[菌落计数(1.88±0.88)×10^5 CFU],C-SR表面细菌黏附最少[菌落计数(0.98±0.35)×10^5 CFU]。C-SR组细菌黏附明显少于SR组($P<0.05$),HA/SR组细菌黏附较SR组有所减少,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。



A: SR; B: HA/SR; C: C-CR

图1 材料表面细菌黏附情况

2.2 3种硅橡胶的表面性能

采用扫描电镜对3种硅橡胶材料的表面形貌进行检测,发现C-SR和普通SR相比,没有显著差异,说明材料表面没有发生大尺度的形貌改变;而HA/SR表面可见羟基磷灰石颗粒(图2)。XPS分析发现,C-SR表面C元素的比例有所提高,提示C离子注入可以使SR表面C元素的比例提高,Si元素比例下降,可能C元素取代了Si元素发生了离子键合。HA/SR表面增加了Ca、P的信号,但是含量不高(图2、表1)。XRD检测材料表面的晶体结构结构,发现3种材料的XRD图谱无明显差异,说明C离子注入和进行表面晶体结构没有太大的差别。FTIR检测结果显示:3种材料中-CH_3成分的反对称伸缩振动吸收峰范围为(2 962±1)cm^{-1};(1 081±2)cm^{-1}为Si-O(-C)的衍射峰;CO_3^{2-}的衍射峰为(1 410±2)cm^{-1}。这一结果表明,C离子对SR表面进行注入以及HA进行表面涂层后,FTIR图谱与普通SR材料无明显变化,提示C离子注入后以及HA涂层材料表面有机官能团的构成并未发生明显改变。

表1 XPS检测材料表面元素组成(%)

组别	C元素	Si元素	O元素	Ca元素	P元素
SR	47.52	28.82	23.65		
HA/SR	42.65	27.46	24.54	2.69	2.61
C-SR	58.40	18.94	22.67		

2.3 亲/疏水性

经过水接触角检测发现,SR的水接触角最大(111.44°±2.66°),HA/SR次之(106.88°±0.78°),C-SR最低(97.75°±0.58°)。说明对SR进行HA涂层或C离子注入后,其亲水性增加(水接触角越低,亲水性越强)。其中,C-SR组较SR组差异明显($P<0.05$),HA/SR组水接触角较SR虽有所降低,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。这一变化趋势和细菌黏附的变化趋势一致。

2.4 材料表面粗糙度检测

经过材料表面粗糙度检测发现,SR的表面粗糙度[(3.81±0.16)μm]和C-SR表面粗糙度[(3.89±0.12)μm]差异无统计学意义($P>0.05$),HA/SR表面粗糙度[(8.20±0.13)μm]显著高于另外两种材料($P<0.05$)。这一变化趋势和细菌黏附情况变化趋势不同。

3 讨论

生物材料在使用过程中,与材料相关的感染可能导致材料的组织相容性差、感染、癌变等问题出现,防治与材料相关的感染是临床急需解决的重要问题[1]。目前研究表明,细菌黏附在生物材料表面及邻近组织可导致感染的发生[2]。本研究在前期研究基础上,以整形外科临床常用的SR材料为基础,采用不同的方法对其进行表面改性,制作出C-SR和HA/SR,观测材料的表面性能和细菌黏附情况,并探讨其关系。

细菌与生物材料的黏附可引起进一步的感染[9]。该过程受细菌、宿主、生物材料和局部环境等多种因素影响[3-6,10]。目前研究认为,材料表面性能是其中的重要因素[10]。本研究结果也证实,硅橡胶表面性质的不同,影响细菌在其表面的黏附。那么,硅橡胶表面何种性质的变化,影响了细菌黏附呢?

本研究结果显示,3种材料的表面形貌、化学组成、水接触角和表面粗糙度均发生了变化,这种变化与C离子和HA的引入有关。由于HA为直径100 μm的颗粒,涂层到SR表面后,会改变SR的表面形貌,大大增加其表面粗糙度;而C离子注入则属于原子层面的改变,因此,材料表面形貌和粗糙度无明显变化。在粗糙的表面,由于其表面积增加,可能利于细菌黏附[11],但也有研究指出,表面粗糙度的变化对细菌黏附无明显效果[12]。本研究发现,人表皮葡萄球菌在3种材料上的黏附与材料表面粗糙度的变化趋势不一致,提示材料SR的表面粗糙度对人表皮葡萄球菌黏附的影响有限。

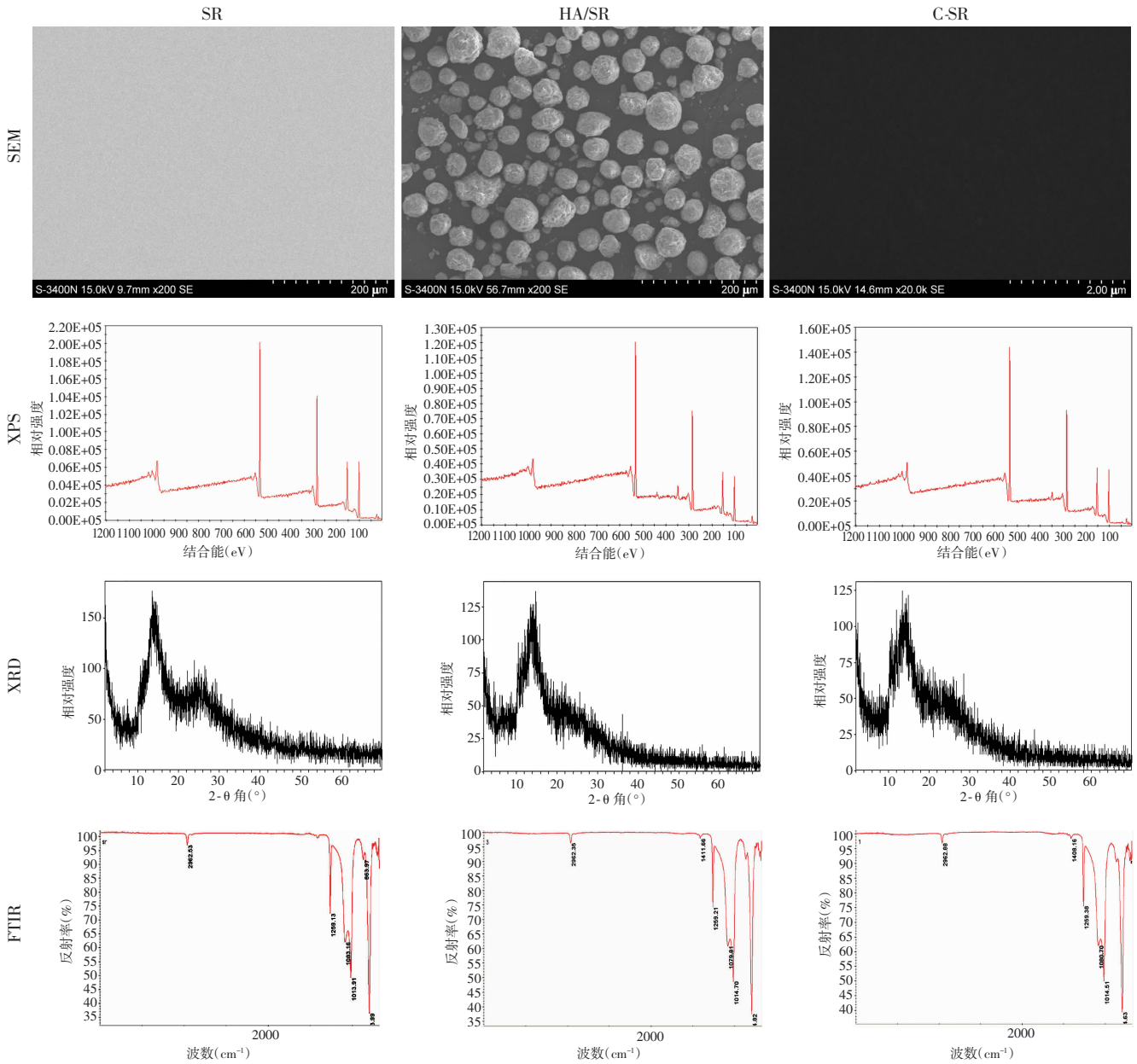


图 2　3 种材料的表面性能检测

此外,有研究指出,表面化学状态可影响细菌的黏附和增殖[13]。具有不同功能基团的材料可影响材料表面亲/疏水性和表面电荷,进而影响细菌黏附。例如,金黄色葡萄球菌在具有不同侧链基团的自组装单层材料上,黏附率最低的是三环氧乙烷处理后的材料,其可能的原因是三环氧乙烷促进水核的形成,在材料表面形成水化层,阻止了细菌和材料直接接触[14]。采用黏附素修饰不同的聚合材料,发现修饰后的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚苯乙烯(PS)和 SR,由于亲水性增加(即水接触角的降低),细菌黏附均得到了抑制[15]。结合本研究,C 离子注入和 HA 涂层后,材料表面的化学组成发生了变化(图 2、表 1),这种化学组成的变化,影响了材料的亲水性(即材料的水接触角),进而影响了细菌的黏附。本研究发现,人表皮葡萄球菌在材料表面的黏附情况与材料的水接触角变化趋势具有一致性。这提示 SR 材料表面的亲/疏水性是影响表皮葡萄球菌在其表面黏附的主要因素。这可能是由于材料表面亲/疏水性的变化,影响了蛋白在材料表面的吸附,进而影响细菌与蛋白之间的结合[7,16]。例如:Vadillo-Rodríguez 等[16]研究发现材料表面的疏水性越高,材料表面黏附的纤维蛋白越多,越有利于细菌的黏附。

综上所述,本研究观察了人表皮葡萄球菌在SR、C-SR和HA/SR 3种材料表面的黏附情况,并分析了材料表面性能的变化,发现SR表面亲/疏水性是影响人表皮葡萄球菌黏附的主要因素。这为防治植入材料感染,进一步研制出符合临床应用的植入材料提供了依据。

参考文献:

[1] Subbiahdoss G, Aleyt T, Kuijer R, *et al*. Influence of prophylactic antibiotics on tissue integration versus bacterial colonization on poly(methyl methacrylate)[J]. Int J Artif Organs, 2012, 35(10): 840-846.

[2] Ludecke C, Jandt K D, Siegismund D, *et al*. Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown Escherichia coli and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84837.

[3] Sanders D L, Kingsnorth A N, Lambie J, *et al*. An experimental study exploring the relationship between the size of bacterial inoculum and bacterial adherence to prosthetic mesh [J]. Surg Endosc, 2013, 27(3): 978-985.

[4] Xu L C, Siedlecki C A. Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation[J]. Acta Biomater, 2012, 8(1): 72-81.

[5] Levon J, Myllymaa K, Kouri V P, *et al*. Patterned macroarray plates in comparison of bacterial adhesion inhibition of tantalum, titanium, and chromium compared with diamond-like carbon[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 92(4): 1606-1613.

[6] Rochford E T, Poulsson A H, Salavarrieta-Varela J, *et al*. Bacterial adhesion to orthopaedic implant materials and a novel oxygen plasma modified PEEK surface[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014, 113: 213-222.

[7] Wang S L, Shi X H, Yang Z, *et al*. Osteopontin (OPN) is an important protein to mediate improvements in the biocompatibility of C ion-implanted silicone rubber[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98320.

[8] Shi X H, Wang S L, Zhang Y M, *et al*. Hydroxyapatite-coated sillicone rubber enhanced cell adhesion and it maybe through the interaction of EF1β and γ-actin[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111503.

[9] Siegismund D, Schroeter A, Ludecke C, *et al*. Discrimination between random and non-random processes in early bacterial colonization on biomaterial surfaces: application of point pattern analysis[J]. Biofouling, 2014, 30(9): 1023-1033.

[10] Kodjikian L, Roques C, Pellon G, *et al*. Bacterial adhesion to intraocular lenses and endophthalmitis prevention: review of the literature[J]. J Fr Ophtalmol, 2006, 29(1): 74-81.

[11] Ji Y W, Cho Y J, Lee C H, *et al*. Comparison of surface roughness and bacterial adhesion between cosmetic contact lenses and conventional contact lenses[J]. Eye Contact Lens, 2015, 41(1): 25-33.

[12] Truong V K, Lapovok R, Estrin Y S, *et al*. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium[J]. Biomaterials, 2010, 31(13): 3674-3683.

[13] Parreira P, Magalhaes A, Goncalves I C, *et al*. Effect of surface chemistry on bacterial adhesion, viability, and morphology[J]. J Biomed Mater Res A, 2011, 99(3): 344-353.

[14] Tegoulia V A, Cooper S L. Staphylococcusaureus adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2002, 24(3/4): 217-228.

[15] Shi L, Ardehali R, Caldwell K D, *et al*. Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000, 17(4): 229-239.

[16] Vadillo-Rodríguez V, Pacha-Olivenza M A, Gonzalez-Martin M L, *et al*. Adsorption behavior of human plasma fibronectin on hydrophobic and hydrophilic Ti6Al4V substrata and its influence on bacterial adhesion and detachment[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(5): 1397-1404.

(收稿:2014-11-19;修回:2015-01-26)

(编辑 王小宾)