doi:10.11659/jjssx.12E023106

·基础研究·

钛等离子体浸没离子注入增强Bio-HPP材料的细胞相容性和抗菌性

许 朗[1],黄忠卫[2],石 锐[3] (1.首都医科大学附属北京积水潭医院口腔科,北京 100035;2.北京王府中西医结合医院口腔科,北京 102200;3.北京市创伤骨科研究所/首都医科大学附属北京积水潭医院研究所,北京 100035)

[摘 要] **目的** 使用等离子体浸没离子注入(PIII)技术将钛离子注入到Bio-HPP材料表面,并初步评价该材料对人牙龈成纤维细胞(HGFs)的生物相容性和对牙龈卟啉单胞菌(P.g)的抗菌性。**方法** 体外研究为细胞实验和抗菌实验,将试件随机分为改性组和对照组,改性组试件置于离子注入装置内,采用PIII技术注入钛离子。通过扫描电子显微镜观察材料表面纳米结构的形态。通过HGFs的增殖检测、免疫荧光染色和细胞周期分布检测进行Bio-HPP材料细胞相容性评估。进行P.g的抗菌率检测和致病基因表达分析来评价材料的抗菌活性,初步分析其抗菌机制。**结果** 对照组Bio-HPP表面相对平整,改性组形成了直径为100~300 nm的纳米孔,纳米结构中分布着更小的纳米颗粒。培养3、5、7 d后,改性组细胞增殖率均高于对照组(P<0.05)。孵育4 h后,细胞在2组材料表面均有较好的铺展,细胞骨架进一步向外延伸,但对照组样品表面的铺展面积略小于改性组。孵育24 h后,2组材料表面细胞均呈细长的纺锤形或梭形,生长良好。对照组和改性组G1和G2期细胞比例比较,差异无统计学意义(P>0.05);改性组S期细胞比例高于对照组(P<0.05)。培养24 h后,改性组菌落数相对于对照组显著减少;改性组的抗菌率明显高于对照组(P<0.05)。改性组表面致病基因fimA相对表达量明显低于对照组(P<0.05)。**结论** 钛等离子体注入改性的Bio-HPP材料促进了HGFs的黏附和增殖,有利于牙龈周围软组织黏附,且具有较好的抗菌活性。

[关键词]人牙龈成纤维细胞;Bio-HPP;黏附;增殖;牙龈卟啉单胞菌;抗菌性
[中图分类号]R783.1;R318.08 [文献标志码]A [收稿日期]2023-12-23

Titanium plasma immersion ion implantation enhanced cytocompatibility and antibacterial activity of Bio-HPP materials

XU Lang[1], HUANG Zhong-wei[2], SHI Rui[3] (1. Department of Stomatology, Beijing Jishuitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100035, China; 2. Department of Stomatology, Beijing Royal Integrative Traditional Medicine Hospital, Beijing 102200, China; 3. Beijing Research Institute of Traumatology and Orthopaedics/Research Institute of Beijing Jishuitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100035, China)

Abstract: Objective Titanium ions were implanted into Bio-HPP materials using plasma immersion ion implantation (PIII) technology, and the biocompatibility against human gingival fibroblasts (HGFs) and antimicrobial activity against porphyromonas gingivalis (P.g) to the materials were preliminarily evaluated. **Methods** The cell experiments and antibacterial experiments in vitro were conducted, and the specimens were randomly divided into the modified group and the control group, and the modified specimens were placed in an ion implantation device and implanted with titanium ions by PIII technology. The morphology of the nanostructures on the surface of the materials was observed by scanning electron microscopy. The cytocompatibility of Bio-HPP materials was evaluated by proliferation detection, immunofluorescence staining and cell cycle distribution detection of HGFs. The antibacterial activity of the materials was evaluated by the detection of antibacterial rate of P.g and the expression analysis of pathogenic gene, and the antibacterial mechanism was preliminarily analyzed. **Results** The surface of Bio-HPP in the control group was relatively flat, and the modified group formed nanopores with diameters of 100 to 300 nm, with smaller nanoparticles distributed in the nanostructures. The cell proliferation rates of HGFs after cultured for 3, 5 and 7 days in the modified group were higher than those in the control group (P<0.05). After 4 hours of incubation, the cells spread well on the surface of the both groups, and the cytoskeleton extended further outward, while the spreading area on the surface of the control group was slightly smaller than that of the modified group. After 24 hours of incubation, the cells on the surface of materials in the both groups showed elongated spindle or shuttle shape, with good growth. There was no significant difference in the proportions of cells at stages G1 and G2 between the control group and the modified group (P>0.05). The proportion of cells at stage S in the modified group was higher than that in the control group (P<0.05). After 24 hours of incubation, the number of colonies in the modified group was significantly reduced compared with the control group; the antibacterial rate of the modified group was significantly higher than that of the control group (P<0.05). The relative expression of pathogenic genes fimA on the surface in the modified group was significantly lower than that in the

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(82072406)
[通信作者]石 锐,E-mail:shirui@jst-hosp.com.cn

control group (P<0.05). **Conclusion** Bio-HPP materials modified by titanium plasma implantation promotes the adhesion and proliferation of HGFs, which was conducive to the adhesion of soft tissues around the gingiva, with good antibacterial activity.

Keywords: human gingival fibroblasts; Bio-HPP; adhesion; proliferation; porphyromonas gingivalis; antibacterial activity

聚醚醚酮是骨组织工程中替代骨组织缺损的良好材料,具有接近皮质骨的可调节弹性模量(18 GPa),可以避免种植体与人体骨骼间弹性模量不匹配导致的应力屏蔽作用,降低骨硬化和骨吸收风险,具有无毒、无突变致畸性、无致癌性等特点,与磁共振成像兼容,成像时不会产生伪影[1-2]。改性聚醚醚酮Bio-HPP材料是一种以聚醚醚酮为基础的陶瓷增强型材料,通过添加20%的瓷颗粒,增加了硬度、弹性和抗弯强度,具有更高的表面抛光性和更好的材料机械性能。但Bio-HPP材料生物活性较低,其生物惰性表面不利于牙龈细胞黏附及生长,会增加种植体相关细菌感染率,阻碍了其临床应用。

Bio-HPP是金属钛及其合金的替代生物材料,可作为种植体基台。由于口腔中各种细菌在种植体基台表面黏附和堆积,种植体具有很高的感染风险[3]。种植体基台与周围黏膜组织的有效结合是种植体长期健康稳定的重要条件[4]。理想的软组织密封是通过胶原纤维在种植体基台和邻近软组织之间建立牢固的连接[5],从而形成口腔环境和牙槽骨之间的封闭,防止细菌入侵,避免牙周袋、骨吸收的发生[6-7]。

等离子体浸没离子注入(plasma immersion ion implantation, PIII)是一种高效且成熟的技术,可以引入几乎任何元素对生物材料表面进行修饰,而不会对其表面形态造成较大的损伤[3]。Lu等[8]将钛等离子浸没离子注入聚醚醚酮制备了TiO_2纳米结构,促进了大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal steml cells,bMSCs)的黏附、增殖和骨分化。

TiO_2具有良好的生物活性和细胞相容性,在牙科领域得到了广泛应用。现有关于Bio-HPP的研究局限在骨整合层面,然而种植体长期的使用不仅依赖于稳定的骨整合,还依赖于与种植体周围软组织的长期健康稳定。已有的研究主要是在Bio-HPP材料表面注入钽、锌等金属[5]观察其对种植体周围软组织封闭的影响。目前尚未见钛离子注入Bio-HPP后对人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts,HGFs)的软组织封闭影响的研究。本研究采用钛等离子体浸没离子注入Bio-HPP表面引入生物活性TiO_2,探究钛等离子体浸没离子注入对HGFs的生物学效应,通过体外培养HGFs来检测Bio-HPP材料的细胞相容性,使用常见的口腔病原体牙龈卟啉单胞菌(porphyromonas gingivalis, P. g)来测试Bio-HPP材料的抗菌性能。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

Bio-HPP(德国比丹公司),场发射扫描电子显微镜(S-4801,日本日立公司),自动细胞计数仪(Countess II,美国赛默飞公司),流式细胞仪(Accuri C6,美国碧迪医疗器械公司),荧光显微镜(BX51,日本奥林巴斯公司),多功能酶标仪(SpectraMax Paradigm,美国美谷分子仪器公司),细胞培养箱(CellInsight CX5,美国赛默飞公司),HGFs冻存株(2代,北京口腔医学研究所),CCK-8(CA1210,北京索莱宝生物科技有限公司),细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(C1052,上海碧云天生物技术有限公司),胰蛋白胨大豆琼脂培养基(CM0131,美国赛默飞公司),脑心浸液培养基(B8130-100,北京索莱宝科技有限公司),P. g(批号:ATCC33277,北京口腔医学研究所),实时荧光定量PCR仪(MA-6000,苏州雅睿生物技术股份有限公司),恒温培养箱(MJX-250L,北京万丰仪器公司)。

1.2 细胞复苏与培养

将2代HGFs冻存株水浴融化。使用含10%胎牛血清、1%双抗溶液和1% L-谷氨酰胺的MEMα培养基传代培养。使用细胞计数板和自动细胞计数仪进行细胞计数,得到1×10^5/mL的细胞悬液,使用4~6代细胞进行后续实验。

1.3 细菌培养

将P. g冻存株溶解于生理盐水后接种至含有5%无菌脱纤维羊血、1%氯化血红素和0.1%维生素K的胰蛋白胨大豆琼脂固体培养基上,放入装有厌氧产气袋的厌氧培养盒中,置于37 ℃恒温培养箱内培养7 d后,取单菌落接种于新的胰蛋白胨大豆琼脂固体培养基上进行纯化,相同条件下继续培养7 d,用无菌接种环轻柔挑取适量菌落分散于新鲜灭菌的脑心浸液肉汤液体培养基中,培养24 h后,稀释至10^7 CFU/mL备用。

1.4 试件制备

将Bio-HPP制成方形试件(10 mm×10 mm×1 mm),砂纸打磨光滑后置于超声清洗装置中,以丙酮、无水乙醇以及去离子水作为震荡液,超声清洗去除表面杂质。将试件随机分为改性组和对照组,改性组试件置

于离子注入装置内,采用PIII技术注入钛离子。离子注入参数:阴极触发脉宽500 μs,离子注入脉宽500 μs,离子注入电压-15 kV,真空度5×10^{-3} Pa,频率10 Hz,注入时间2 h。通过施加脉冲负高压,均匀植入离子。

1.5 试件表征观察

采用扫描电子显微镜对离子注入前后试件表面微观形貌进行观察,并拍照记录。

1.6 细胞增殖检测

通过CCK-8细胞计数试剂盒测定细胞增殖抑制情况。HGFs置于含有10% CO_2的培养箱中,37 ℃下在含有10%胎牛血清、1% L-谷氨酰胺、1%青霉素-链霉素和88% MEM的MEMα培养基中培养。在细胞实验前,将试件通过紫外线照射灭菌2 h,然后置于24孔板中,在其表面接种100 μL HGFs单细胞悬液(密度为1×10^5个/孔),在培养1 d、3 d、5 d和7 d时取样,用PBS冲洗2次并转移到新板上。然后向每孔中加入500 μL培养基和50 μL CCK-8溶液,并在黑暗中孵育2 h。使用酶标仪测定450 nm波长处吸光度值。

1.7 免疫荧光染色

HGFs在试件上培养1 h、4 h和24 h后用PBS冲洗。将附着在样品表面的细胞用300 μL 4%多聚甲醛溶液固定15 min,然后用300 μL 0.1% Triton X-100透化10 min。将附着有HGFs的试件与300 μL鬼笔环肽在黑暗条件下孵育30 min进行细胞骨架染色。后用DAPI对细胞核染色5 min。24 h后通过荧光显微镜观察1 h、4 h、24 h HGFs的扩散和形态,分别采集两种荧光信号下的图像,Image J(1.52a版本)软件合并图像。

1.8 细胞周期分析

细胞在试件表面培养48 h后,用0.25%胰蛋白酶消化,得到细胞悬液,加入冰浴中预冷的70%乙醇溶液1 mL固定12 h,然后在4 ℃下离心(1 100 r/min)5 min后沉淀细胞;再加入1 mL预冷的PBS以重悬细胞,再次离心沉淀细胞,吸出上清液。留约50 μL的PBS以避免吸出细胞,轻弹离心管底部适当分散细胞。每管细胞中加入0.5 mL碘化丙啶染色液,并于37 ℃避光温浴重悬细胞沉淀30 min。染色完成后,依次使用70 μm和40 μm孔径细胞滤筛过滤细胞,去除细胞团块,然后立即采用流式细胞术检测488 nm波长处红色荧光。使用ModFit LT(V 3.1)软件分析细胞DNA含量,从而确定各个细胞周期的细胞数量。

1.9 抗菌率检测

将紫外线照射消毒后的2组试件置于24孔板中,改性组改性层朝上,向各孔分别加入500 μL P. g悬液,在37 ℃完全厌氧环境下培养24 h后取出,置于装有1 mL PBS的离心管中超声振荡1 min,使黏附于试件上的细菌分散于PBS中,分别取100 μL该溶液,均匀涂于胰蛋白胨大豆琼脂固体培养基上,在37 ℃完全厌氧环境下培养7 d后,取出培养基,拍照并进行菌落计数。抗菌率=(对照组菌落数-改性组菌落数)/对照组菌落数×100%。

1.10 细菌致病基因相对表达检测

试件和P. g共培养24 h后取出,用PBS轻柔漂洗,置于装有1 mL PBS的离心管中超声振荡1 min,将黏附于试件上的细菌收集于PBS中,使用细菌总RNA提取试剂盒提取收集到的细菌总RNA。然后使用反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser合成cDNA。最后使用qPCR对目的基因的表达进行相对定量,以16S rRNA作为内参基因,引物序列见表1。PCR反应体系:2×UltraSYBR Mixture 10 μL,正向引物(10 μmol/L)0.8 μL,反向引物(10 μmol/L)0.8 μL,cDNA 1 μL,RNase Free ddH_2O 7.4 μL。

表1 引物序列

基因	引物序列
16S rRNA	正向引物:TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
	反向引物:TGCGGGACTTAACCCAACA
fimA	正向引物:CAGCAGGAAGCCATCAAATC
	反向引物:CAGTCAGTTCAGTTGTCAAT

1.11 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。正态分布且方差齐的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用两独立样本t检验;正态分布但方差不齐的数据采用校正t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

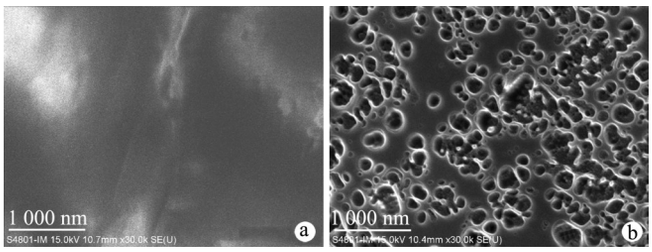
2 结果

2.1 Bio-HPP材料表征

除了抛光造成的一些划痕,抛光后的Bio-HPP表面相对平整(图1a)。离子注入后形成了直径为100~300 nm的纳米孔,纳米结构中分布着由高能离子轰击造成的更小的纳米颗粒(图1b)。

2.2 细胞增殖

CCK-8结果显示,从1~7 d随着时间的延长,对照组和改性组的吸光度值均逐渐增大。培养1 d后,2组细胞吸光度值比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示2组细胞增殖率无显著变化;在培养3 d、5 d、7 d后,改性组细胞吸光度值较对照组显著增高($P<0.05$),提示其细胞增殖率较高,见图2。

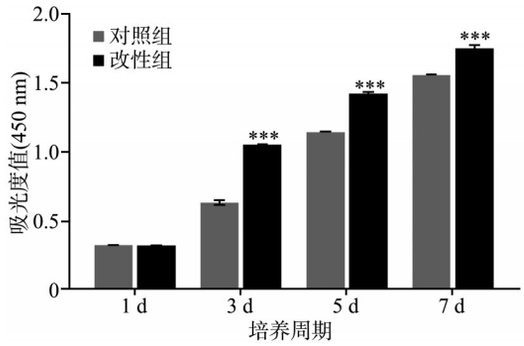


a:抛光后Bio-HPP表面;b:钛离子注入后Bio-HPP表面

图1　扫描电子显微镜下Bio-HPP表面形貌

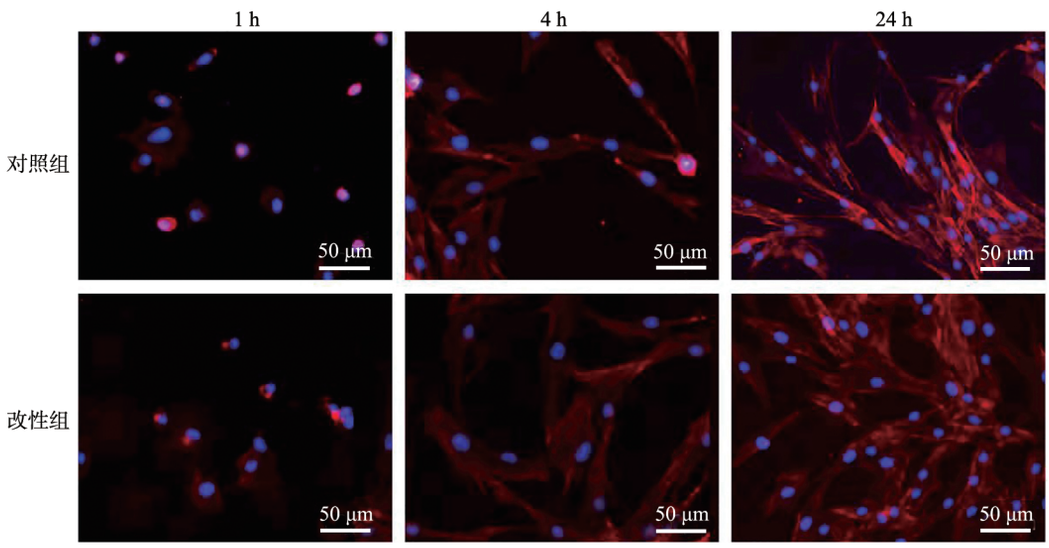
2.3　免疫荧光染色观察细胞形态

孵育1 h后,HGFs在所有试件表面上呈圆形或多边形;孵育4 h后,细胞在所有试件表面均有较好的铺展,细胞骨架进一步向外延伸,但对照组试件表面的铺展面积略小于改性组;孵育24 h后,细胞呈细长的纺锤形或梭形,并且在所有试件表面上生长良好,无明显差异(图3)。



***:与对照组比较,$P<0.001$

图2　CCK-8检测结果

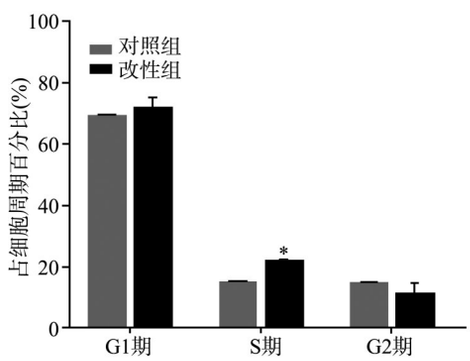


红色:细胞骨架染色;蓝色:细胞核染色

图3　2组试件表面HGFs的荧光染色

2.4　细胞周期分析

流式细胞术结果显示,对照组和改性组G1和G2期细胞比例比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。改性组S期细胞比例高于对照组($P<0.05$),见图4。



*:与对照组比较,$P<0.05$

图4　2组试件细胞培养48 h后的细胞周期分布

2.5　抗菌率检测

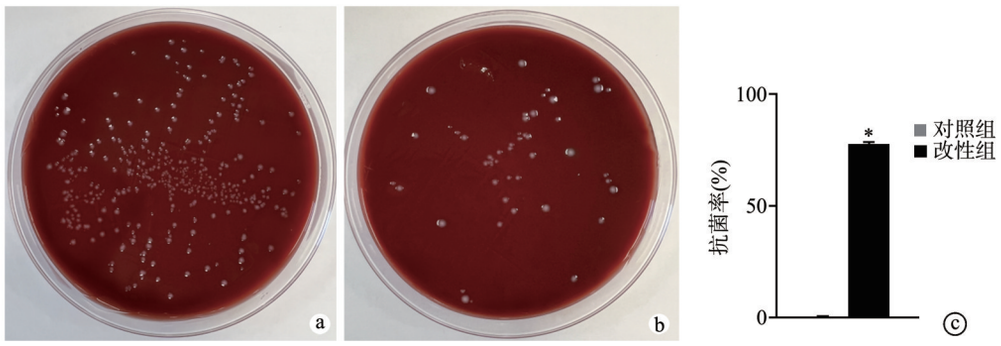
2组试件与细菌共培养24 h后,改性组菌落数较对照组显著减少,见图5a、b。与对照组比较,改性组的抗菌率明显高于对照组($P<0.05$),具有明显的抗菌活性,见图5c。

2.6　细菌致病基因相对表达

致病基因fimA在对照组的相对表达量为(0.803±0.031),高于改性组的(0.012±0.002),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3　讨论

Bio-HPP材料表面生物活性低,限制了其在口腔种植领域的应用。本研究寻求一种新的提高表面生物活性的改性方法,以扩大Bio-HPP在口腔种植领域的应用范围。本研究显示,PIII改性后,Bio-HPP材料



a:对照组菌落图;b:改性组菌落图;c:2组试件的抗菌率 *:与对照组比较,$P<0.05$

图5 2组试件与细菌共培养24 h后的菌落生长情况以及抗菌率

表面呈现出不同大小的纳米微孔结构,形成凹凸不平的形貌,增加了材料表面粗糙度。这是由于激发的钛等离子体在电压的加速作用下猛烈撞击Bio-HPP,使其表面同时发生等离子体蚀刻和溅射,形成纳米形貌。

种植体周围的软组织封闭包括上皮附着和纤维结缔组织附着。上皮附着是抵御细菌入侵的第一道屏障。天然牙和种植体之间的主要区别:种植体周围的牙骨质、牙槽骨和牙龈软组织中缺少有序的胶原纤维插入;种植体的结合上皮也通过基底板和半桥粒与种植体相结合,但结合上皮宽度有限,上皮下纤维大多与种植体表面平行排列;此外,种植体周围的黏膜与种植体表面的结合不如天然牙紧密,屏障保护较薄弱,因此更易受到菌斑生物膜的影响,细菌更容易深入种植体根部[9]。

种植体周围软组织中结缔组织层主要由HGFs及其产生的胶原纤维组成[10]。HGFs负责种植体基台周围的软组织更新和黏附[11]。HGFs在种植体颈部的有效黏附和增殖确保了牙龈软组织封闭的形成和骨整合的稳定,其在种植体表面的良好生长和功能分化直接决定了软组织封闭效果。本研究HGFs的荧光染色结果显示,与对照组相比,HGFs在改性组表面的分布更多,细胞形态更长,伪足更明显,表明改性组HGFs表面的黏附性更好;CCK-8结果显示,在接种3 d、5 d和7 d后,改性组细胞表面具有更强的增殖能力,且其增殖能力强于对照组。

细胞周期分析可以探究材料对细胞增殖的影响。细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的整个过程,分为分裂间期和分裂期两个阶段。分裂间期又分为DNA合成前期(G1期)、DNA合成期(S期)和DNA合成后期(G2期)。S期主要进行DNA复制和染色体合成,是整个细胞周期的关键时期。DNA复制是有丝分裂的前提条件,因此S期的细胞越多则细胞增殖分裂越活跃。S期的差异反映了不同材料对细胞增殖的影响[12]。本研究结果显示,改性组S期细胞比例高于对照组,这是由于Bio-HPP表面的纳米结构促进了细胞周期的推进,刺激了细胞核DNA的合成,因而S期细胞的比例增加。

牙龈P. g是种植体周围炎患者龈下菌斑中的主要优势菌之一,具有很强的毒力,即使在低丰度的情况下,也能够通过改变共生菌群菌落结构,引起生态失调从而促进种植体周围炎的发生发展[13-14]。本研究结果显示,改性组菌落数明显少于对照组,具有良好的抗菌性能;PCR结果显示,改性组材料抑制了致病基因fimA的表达,从分子水平层面说明了离子注入材料对于细菌的毒力因子的抑制作用,与抗菌实验的结果相吻合。

综上所述,采用PIII技术可成功制备Bio-HPP材料表面的TiO_2纳米结构。钛离子注入的Bio-HPP材料具有更好的生物相容性,能够在体外促进HGFs的黏附增殖,有利于软组织黏附,抑制种植体周围炎致病菌P. g的生长,降低致病基因的表达,具有更好的抗菌活性。本实验可为下一步钛离子注入的Bio-HPP材料作为新型种植材料的临床应用提供依据和参考。

[参考文献]

[1] Brockett CL, John G, Williams S, et al. Wear of ceramic-oncarbon fiber-reinforced poly-ether ether ketone hip replacements[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012, 100(6): 1459-1465. doi: 10.1002/jbm.b.32664.

[2] Pei X, Friedrich K. Erosive wear properties of unidirectional carbon fiber reinforced PEEK composites[J]. Tribol Int, 2012, 55: 135-140. doi: 10.1016/j.triboint.2012.05.020.

[3] Guo C, Lu R, Wang X, et al. Graphene oxide-modified polyetheretherketone with excellent antibacterial properties and biocompatibility for implant abutment[J]. Macromol Res, 2021, 29(5): 351-359. doi: 10.1007/s13233-021-9042-3.