

钛表面氧化锌与纤连蛋白复合修饰应用于 抗种植体周炎的研究

张大卫¹, 朱立远², 卢红亮², 王佐林¹

(1. 同济大学口腔医学院 同济大学附属口腔医院, 上海牙组织修复与再生工程技术研究中心, 上海 200072; 2. 复旦大学微电子学院, 上海智能电子与系统研究院, 专用集成电路和系统国家重点实验室, 上海 200433)

摘要: 种植体周炎会导致种植体周牙龈附着丧失、骨组织吸收, 甚至种植体松动、脱落。本研究采用原子层沉积技术联合硅烷化修饰在钛表面制备氧化锌纳米薄膜和纤连蛋白复合涂层。选取种植体周炎相关致病菌伴放线聚集杆菌和牙龈卟啉单胞菌用作该复合涂层抗菌效果的体外验证。同时, 检测牙龈成纤维细胞在钛、氧化锌修饰钛及纤连蛋白与氧化锌复合修饰钛表面黏附、增殖及其相关基因的表达。在大鼠上颌第一磨牙位点通过注射细菌法建立种植体周炎模型, 并比较不同材料的钛钉周围骨破坏范围和牙龈组织中的炎症程度。实验结果显示, 该复合涂层对伴放线聚集杆菌和牙龈卟啉单胞菌的 24 h 抗菌率分别为 80.9% 和 75.7%; 牙龈成纤维细胞在复合修饰钛片表面展现出良好的黏附、增殖状态; 在大鼠种植体周炎模型中, Micro-CT 结果显示, 纯钛钉周围骨组织吸收为(1.14±0.71) mm, 而经复合修饰的钛钉周围骨组织吸收仅为(0.37±0.28) mm。石蜡切片观察和 qPCR 定量检测结果显示, 纯钛钉周牙龈及牙槽骨组织的炎症反应较重, 而经复合修饰的钛钉周围组织炎症反应明显减轻。因此, 该复合修饰可能在牙种植体防御细菌入侵、增强牙龈附着和降低牙龈炎症反应方面发挥作用。

关键词: 钛; 氧化锌; 纤连蛋白; 种植体周炎

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

Titanium Modified with ZnO Nanofilm and Fibronectin: Preventing Peri-implantitis and Biocompatibility

ZHANG Dawei¹, ZHU Liyuan², LU Hongliang², WANG Zuolin¹

(1. Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Department of Implantology, School & Hospital of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. State Key Laboratory of ASIC and System, Shanghai Institute of Intelligent Electronics & Systems, School of Microelectronics, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Peri-implantitis can lead to peri-implant attachment loss, bone absorption, and even implant loose or lost. In this study, the atomic layer deposition technique and silanization were applied to prepare a composite zinc oxide (ZnO) /fibronectin (Fn) coating on the surface of titanium (Ti). Peri-implantitis related bacteria, including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a*) and *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*), were chosen to evaluate the antibacterial effect of the composite coating. Spreading, proliferation and associated gene expression of human

收稿日期: 2021-03-03; 收到修改稿日期: 2021-04-07; 网络出版日期: 2021-04-30

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFE0202200); 上海市自然科学基金(18ZR1405000)

National Key R&D Program of China (2018YFE0202200); Natural Science Foundation of Shanghai (18ZR1405000)

作者简介: 张大卫(1994-), 男, 硕士研究生. E-mail: david_zhang@tongji.edu.cn

ZHANG Dawei(1994-), male, Master candidate. E-mail: david_zhang@tongji.edu.cn

通信作者: 王佐林, 教授. E-mail: zuolin@tongji.edu.cn

WANG Zuolin, professor. E-mail: zuolin@tongji.edu.cn

gingival fibroblasts on Ti, Ti/ZnO, and Ti/ZnO/Fn were evaluated. *In vivo* peri-implantitis model was established on SD rat maxilla through the infusion of mixed bacterial suspension. The peri-implant bone resorption and inflammatory infiltration in gingiva were investigated. The results showed that antibacterial efficacies of the composite coating against *A. a* and *P. g* for 24 h were up to 80.9% and 75.7%, respectively. Fibroblasts on the surface of Ti/ZnO/Fn showed adhesion and proliferation *in vitro*. In the model of peri-implantitis, Micro-CT showed that the amount of peri-implant bone absorption of Ti was (1.14±0.71) mm, while the amount of Ti/ZnO/Fn was only (0.37±0.28) mm. Moreover, the observation of paraffin section and qPCR revealed that inflammation level of gingiva and alveolar bone around Ti was lower in Ti/ZnO/Fn than in other groups. In conclusion, the composite coating for dental implants might be effective on defending bacterial invasion, enhancing gingiva attachment and preventing inflammation response of gingiva.

Key words: titanium; zinc oxide; fibronectin; peri-implantitis

在过去的几十年里,越来越多的研究表明,种植体周炎已成为口腔种植修复中最常见的并发症之一,它同时影响着种植体周的软、硬组织,最终可导致种植体的牙修复失败^[1]。目前认为,种植体周炎受医源性、环境和微生物等多种因素影响^[2-3],其中伴放线聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetem-comitans*, *A.a*)和牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.g*)的龈下定植是种植体周炎的始动因素^[4]。

目前,牙种植体多为钛及其合金制成,现已有多种途径赋予钛表面抗菌活性^[5-7]。其中,载抗生素方法,贵金属和过渡金属氧化物涂层的抗菌效果已得到广泛验证^[8-9]。然而,负载药物的疗效不稳定、释放速率难以控制、细菌产生耐药性等问题在很大程度上限制了其应用^[10]。相比之下,贵金属或过渡金属氧化物涂层的抗菌效果更加稳定^[11]。氧化锌作为广谱抗菌剂,所产生的活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)及释放 Zn^{2+} 对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌均有较强的抗菌作用^[12]。作为一种化学气相沉积方法,原子层沉积(Atomic layer deposition, ALD)技术可将 ZnO 均匀沉积在平面或曲面上,其涂层的厚度可精确地控制在纳米尺度^[13]。通过 ALD 技术沉积的 ZnO 薄膜的硬度为 6.9 GPa,弹性模量为 143 GPa,而断裂韧性可达 $3.1 \text{ MPa/m}^{-1/2}$ ^[14-15],既能保证机械强度,又能赋予其抗菌能力。然而,ZnO 纳米材料虽有良好的抗菌性能,但生物相容性较差,阻碍了其临床应用^[16-17]。

纤连蛋白(Fibronectin, Fn)作为细胞外基质中含量较丰富的蛋白之一,可以通过精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列与细胞表面的多种整合素相结合,调控细胞的粘附、迁移和增殖^[18]。另一方面,有文献报道 Fn 能够通过调节巨噬细胞的形态来调控其分化状态,减少炎症因子的分泌^[19]。因此,将 ZnO 抗

菌活性与 Fn 的生物相容性结合值得深入探索。

本研究通过 ALD 技术将 ZnO 沉积于 Ti 表面形成 Ti/ZnO,再通过硅烷化的方法共价结合 Fn 形成 Ti/ZnO/Fn,以人牙龈成纤维细胞(Human gingival fibroblasts, hGFs)在其表面的黏附和对 *A.a* 和 *P.g* 的抑制分别检验复合表面的细胞相容性和抗菌性,从而探索促进种植体相容性和抗种植体周炎发生的新材料。

1 实验方法

1.1 材料制备与表征

将钛片(10 mm×10 mm×1 mm,上海宝钢)和钛钉(长 2.0 mm,外径 1.5 mm,山东威高)放入 ALD 系统中,以双氧水和二乙基锌分别作为氧化剂和锌的前驱体反应形成 Ti/ZnO。利用光谱椭偏仪系统测量表面 ZnO 的厚度。将 Ti/ZnO 置于 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)的甲苯溶液中完成材料表面硅烷化(Ti/ZnO/APTES)。将 Ti/ZnO/APTES 浸入含有交联剂的 Fn 水溶液中,制备成 Ti/ZnO/Fn(详见补充材料)。

采用扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy, SEM)、光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析检测材料表征。使用电感耦合等离子体质谱检测 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 的 Zn^{2+} 的释放速率。

1.2 体外抗菌性能的检测

A. a 和 *P. g* 培养至 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面 24 h,收集菌液稀释后涂板,菌落计数,计算抗菌率。使用活/死细菌染色试剂盒观察材料表面细菌

死亡比例(详见补充材料)。

1.3 材料表面的细胞相容性

hGFs 培养至 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面 6 和 12 h, 对黏着斑蛋白进行免疫荧光染色。取同样处理的样本, SEM 下观察细胞形态。hGFs 培养至 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面 1、3 和 7 d 后, 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测 hGFs 在材料表面的增殖率。hGFs 于 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面培养 3 d 后通过实时聚合酶链反应(qPCR)定量检测 I 型胶原蛋白(Col1)、III型胶原(Col3)、整合素 $\beta 1a$ (ITGB1a) 基因的表达(详见补充材料)。

1.4 体内抗菌实验

拔除 SD 大鼠上颌双侧第一磨牙, 随机植入颈部经不同处理方式处理后的钛钉, 在实验组位点周围注射 *A. a* 和 *P. g* 混合菌液, 而在对照位点周围注射等量的细菌培养基。随后每 2 d 在种植位点周围注射一次。4 w 后取材进行 Micro-CT 扫描、石蜡切片、H&E 染色, 取钛钉周牙龈通过 qPCR 定量检测白细胞介素 1β (IL1 β)、精氨酸酶 1 (Arg1)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白细胞介素 4 (IL4)、肿瘤生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)的表达情况(详见补充材料)。

2 结果与讨论

2.1 钛表面的复合修饰

Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 的制备过程如图 1(a)所示。采用 ALD 技术在 Ti 表面首先沉积 ZnO 纳米薄膜, 然后经硅烷化形成 Ti/ZnO/氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES), 再由 APTES 的氨基与 Fn 反应, 最终形成 Ti/ZnO/Fn。经光谱椭偏仪测得 ZnO 纳米薄膜的平均厚度为 20 nm。在扫描电子显微镜(SEM)下拍摄的 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 的表面形貌如图 1(b~g)所示。Ti 的表面较为光滑, 而 Ti/ZnO 的表面可见高度均一的细小颗粒, 粒径约为 20 nm, 在 Ti/ZnO/Fn 的表面则可见散在分布的凝胶状物质。

光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)检测结果(图 2(a))表明, Ti 中存在 Ti2ps、C1s、O1s 和 N1s 4 种元素, 相比之下 Ti/ZnO 中存在的 Zn2p3、Zn3s 和 Zn3p 峰则证明了 ZnO 纳米薄膜的存在^[20]。而在 Ti/ZnO/Fn 中仅出现 O、N、C 峰, 未出现任何 Zn 元素的峰, 表明 ZnO 表面被有机物覆盖。N1s 元素窄谱分析结果(图 2(b))显示, 相较于 Ti/ZnO, Ti/ZnO/Fn 表面 N1s 峰明显增强, 同时定量检测结果(补充表 3)也显示 N1s 元素含量增加, 这证

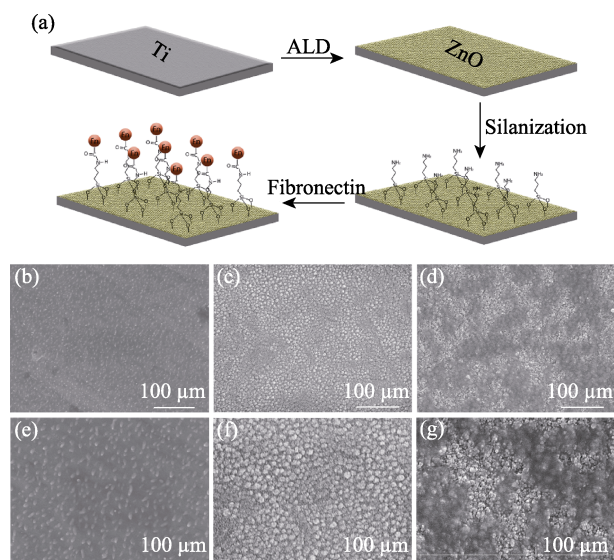


图 1 (a) Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 的制备过程示意图, (b, e) Ti、(c, f) Ti/ZnO 和 (d, g) Ti/ZnO/Fn 的 SEM(b~d)低倍照片及 (e~g) 相应的高倍照片

Fig. 1 (a) Schematic diagram of fabrication progress of Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn, and SEM images of (b, e) Ti, (c, f) Ti/ZnO and (d, g) Ti/ZnO/Fn at low (b-d) and high (e-g) magnification

ALD: Atomic layer deposition

明 Fn 成功连接于材料表面^[21]。

傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)检测结果(图 2(c))显示, 在 Ti/ZnO/APTES 中, 1000 cm^{-1} 处的波峰证明其含有 Si-O 键, 这证明了 APTES 与 ZnO 连接成功。Ti/ZnO/Fn 与 Ti/ZnO/APTES 不同的是, 在 3350 和 3180 cm^{-1} 处出现了较宽的波峰, 证明其含有酰胺键中的 N-H 键, 在 1409 cm^{-1} 处出现的波峰证明其含有酰胺键中的 C-N 键, 在 1657 和 1631 cm^{-1} 处出现的波峰证明其含有酰胺键中的 C=O 键。结合 SEM、XPS 和 FT-IR 的结果, 可以判定 Fn 通过图 1(a)所示的设计路线共价结合在 Ti/ZnO 表面。

2.2 材料表面的体外抗菌性能

A. a 和 *P. g* 在 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面培养 24 h 的结果如图 3(a)所示: *A. a* 在 Ti 表面的细菌浓度为 2.57×10^7 CFU/mL, 而在 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面分别下降到 1.5×10^6 CFU/mL 和 4.9×10^6 CFU/mL, 即 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 对 *A. a* 的 24 h 抗菌率分别为 94.2%和 80.9%; *P. g* 在 Ti 表面浓度为 1.4×10^7 CFU/mL, 而在 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面浓度分别为 1.0×10^6 CFU/mL 和 3.4×10^6 CFU/mL, 即 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 对 *P. g* 的 24 h 抗菌率分别为 92.9%和 75.7%, 且 Ti/ZnO 显著高于 Ti/ZnO/Fn ($P < 0.05$)。图 3(b)为活/死细菌染色的结果, 其中红色代表细胞膜遭到破坏的死细菌, 而活细菌和死细菌均可被染为

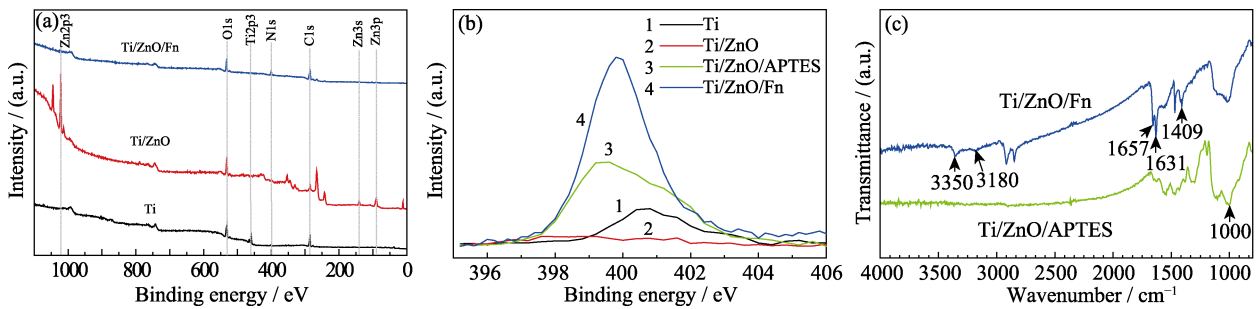


图 2 (a)Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 的 XPS 全谱, (b)Ti、Ti/ZnO、Ti/ZnO/APTES 和 Ti/ZnO/Fn 的 N1s 窄谱, 以及(c)Ti/ZnO/APTES 和 Ti/ZnO/Fn 的 FT-IR 光谱图

Fig. 2 (a) XPS spectra of Ti, Ti/ZnO, and Ti/ZnO/Fn, (b) high-resolution spectra of N1s peak of Ti, Ti/ZnO, Ti/ZnO/APTES, and Ti/ZnO/Fn, and (c) FT-IR spectra of Ti/ZnO/APTES and Ti/ZnO/Fn
Ti/ZnO/APTES: Ti disc with ZnO nanofilm modified with APTES

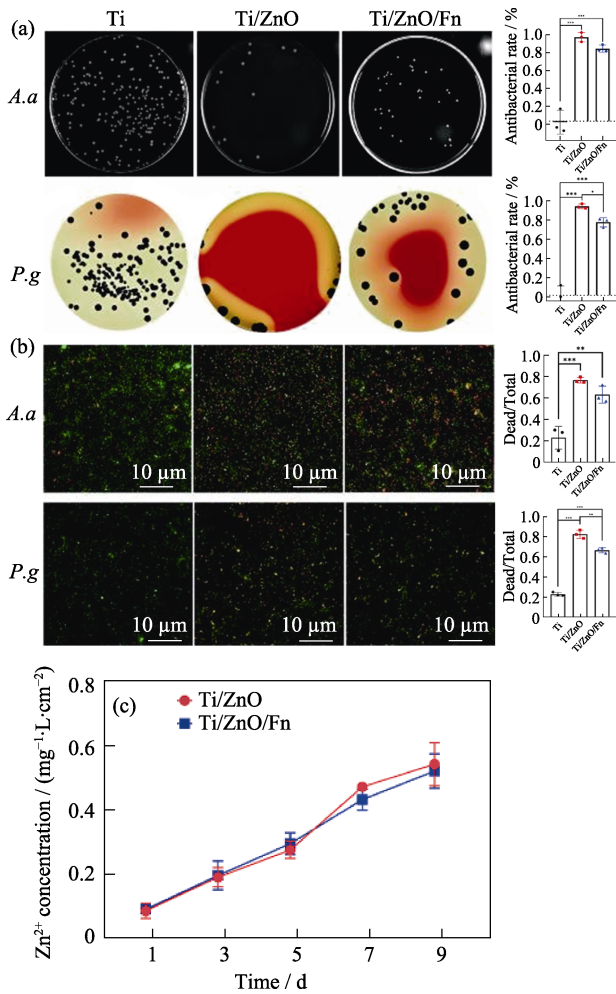


图 3 复合材料的 24 h 抗 *A. a* 和 *P. g* 效果及其机理

Fig. 3 Antibacterial effects and mechanisms of Ti, Ti/ZnO, and Ti/ZnO/Fn against *A. a* and *P. g* for 24 h

(a) Typical bacteria colonies of *A. a* and *P. g* on Ti, Ti/ZnO, and Ti/ZnO/Fn (left) with average corresponding antibacterial rates (right); (b) Fluorescent images of dead bacteria (red) and total bacteria (green) on surfaces of Ti, Ti/ZnO, and Ti/ZnO/Fn after incubation (left) and their dead/total ratio (right); (c) Cumulative zinc ion release curves of Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn

A. a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *P. g*: *Porphyromonas gingivalis*. The error bars indicate standard deviations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ ($n=3$, One-way ANOVA)

绿色。可以看出每组样本中细菌的总量相近, 而 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面的死细菌所占比例显著高于 Ti ($P < 0.005$)。此外, *P.g* 在 Ti/ZnO/Fn 表面培养后的死细菌比例显著低于 Ti/ZnO ($P < 0.005$), *A.a* 在 Ti/ZnO/Fn 表面培养后的死细菌比例虽然低于 Ti/ZnO, 但差异无统计学意义。从这些抗菌实验结果可以得出, Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 对 *A.a* 和 *P.g* 具有良好的抗菌作用, 而 Ti/ZnO/Fn 的 24 h 抗菌率稍低于 Ti/ZnO。

如前所述, ZnO 纳米薄膜的抗菌作用可能依赖于 Zn^{2+} 的释放以及 ROS 的产生^[22]。图 3(c)所示, 有效面积为 1 cm^2 的 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 在 PBS 溶液中可连续 9 d 持续释放 Zn^{2+} , 且释放趋势一致, 释放量无显著差异。对 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面 *A.a* 和 *P.g* 的细菌胞内 ROS 含量检测发现, 培养在 Ti/ZnO/Fn 上的 *P.g* 内 ROS 含量显著低于 Ti/ZnO 上的 *P.g* 内 ROS 含量(补充材料图 1)。这表明两种材料对 *P.g* 的抗菌活性差异可能是由于 Ti/ZnO/Fn 表面产生的 ROS 减少所致。

2.3 复合材料的细胞相容性

2.3.1 材料表面对细胞形态及增殖速率的影响

人牙龈成纤维细胞(Human gingival fibroblasts, hGFs)在 Ti/ZnO/Fn 表面培养 6 h 后铺展较好, 呈多边形(图 4(a, b))。Ti/ZnO 表面的细胞呈圆形, 丝状伪足少。培养 12 h 后, Ti/ZnO/Fn 表面的 hGFs 铺展面积更大, 细胞之间相互重叠, 几乎覆盖整个材料表面。而 Ti 表面的 hGFs 呈长梭形, Ti/ZnO 表面的细胞仅出现较短的丝状伪足。经过统计分析显示(图 4(c)), Ti/ZnO/Fn 表面的黏着斑面积最大, 而在 Ti 和 Ti/ZnO 上的黏着斑面积无显著差异。

图 4(d)显示了 hGFs 在 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面 1、3 和 7 d 的增殖状况。其中, 培养 1 d 后, Ti 与 Ti/ZnO/Fn 差异不显著, 而 Ti/ZnO 对细胞增殖有

显著抑制作用($P < 0.005$)。培养 3 d 后, Ti/ZnO/Fn 上的细胞增殖率显著高于 Ti 与 Ti/ZnO($P < 0.005$)。

2.3.2 材料表面对细胞增殖、黏附相关基因表达的影响

图 5(a~c)分别表示与细胞黏附相关的 I 型胶原蛋白(Col1)、III型胶原蛋白(Col3)以及整合素 $\beta 1a$ (ITGB1a)基因的相对表达量。以 Ti 为对照组, Ti/ZnO 表面 hGFs 的 Col1、Col3 和 ITGB1a 的相对表达量不同程度降低。在 Ti/ZnO/Fn 组, 由于 Fn 可以与 hGFs 表面的整合素受体结合, 使其黏附能力增强, 其 Col1、Col3 及 ITGB1a 相对表达量分别达 Ti 的 1.08、1.48 和 1.06 倍, 这与细胞黏附实验结果一致。

2.4 材料表面对大鼠种植体周炎的影响

将 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 制成钛钉后植入大鼠牙槽骨, 并在后龈沟内注射 *A. a* 和 *P. g* 混合菌液, 以模拟大鼠体内的种植体修复及种植体周炎。根据 Micro-CT 结果, 如图 6(a)所示, 对照组骨组织仅维持在第 1 个螺纹处, 骨吸收长度为(0.31±0.20) mm, Ti 组骨组织吸收至第 4 个螺纹处, 吸收长度为(1.14±0.71) mm, Ti/ZnO 组骨组织吸收至第 2 个螺纹处, 吸收长度为(0.74±0.39) mm, 而 Ti/ZnO/Fn 维持在第 1 个螺纹左右处, 吸收长度为(0.37±0.28) mm。组织切片显示, 如图 6(b)所示, 对照组牙周牙龈组织内散在分布少量炎性细胞, 牙槽骨表面未见破骨细胞。Ti 周牙槽骨破坏严重, 被结缔组织代替, 结缔组织内见明显的炎性细胞; Ti/ZnO 周牙槽骨破坏程度略有减轻, 结缔组织炎症浸润范围稍小; 而 Ti/ZnO/Fn 周牙槽骨几乎无破坏, 结缔组织内存在少量炎性细胞。

qPCR 检测组织中炎症相关基因的表达状况显示(图 6(c)), 与对照组相比, Ti 牙周牙龈组织中白细胞介素 1β (IL1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF α)的表达量分别上调至 19.57 和 4.73 倍, 精氨酸酶 1 (Arg1)的表达量下调至 17.94%, 而 Ti/ZnO/Fn 牙周牙龈组织中 IL1 β 和 TNF α 基因的表达量无明显上调, 且肿瘤生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)和白细胞介素 4 (IL4)的表达量分别上调至 4.04 和 2.69 倍。上述结果证明, 通过钛钉植入后龈沟内注射 *A. a* 和 *P. g* 混合菌液模拟大鼠体内的种植体周炎是成功的^[23-24]。前文中体外实验结果已经证实, ZnO 纳米薄膜对 *A. a* 和 *P. g* 具有抗菌作用, 而 Fn 可以促进 hGFs 的黏附和增殖, 提高牙龈对材料表面的黏附, 形成良好的软组织封闭。在大鼠钛钉植入模型中, 经过 ZnO 和 Fn 联合修饰的 Ti/ZnO/Fn 组种植体牙龈组织中, 炎症因子(IL1 β 和 TNF α)基因表达量与 Control 组无明显差异, 未出现明显骨吸收现象, 且组织炎症细胞浸润程度较轻, 证明

该修饰方法可能有利于防止种植体周炎的发生。

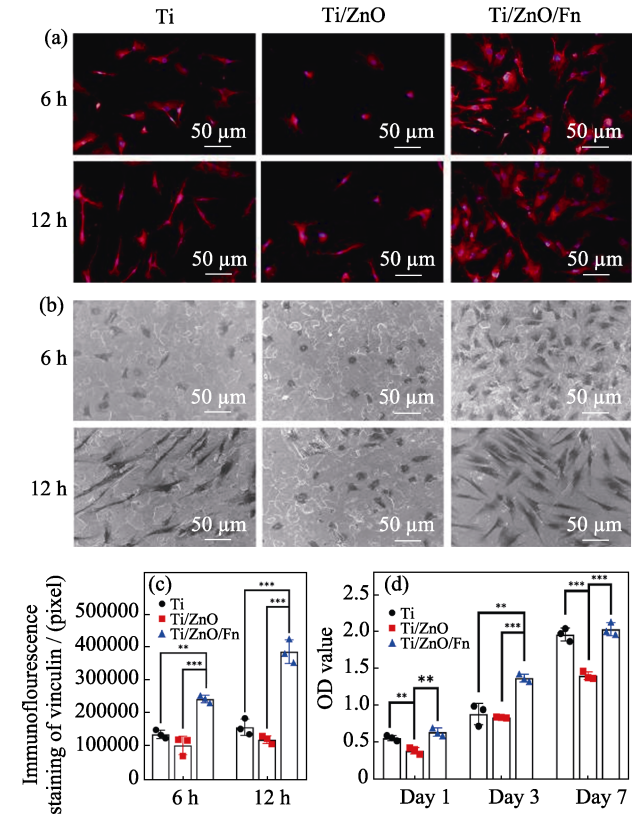


图 4 复合材料的细胞相容性

Fig. 4 Cytocompatibility of Ti/ZnO/Fn on human gingival fibroblasts

(a) Fluorescent images of hGFs cultured on Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn for 6 and 12 h with vinculin staining (red) and nuclei staining (blue); (b) SEM images of hGFs attachment on Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn for 6 and 12 h; (c) Quantitative measurement of spreading area of hGFs on Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn after 6 and 12 h culture; (d) Cell viabilities cultured on Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn after 1, 3 and 7 d

hGFs: human gingival fibroblasts. Error bars indicate standard deviations. ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ ($n=3$, One-way ANOVA)

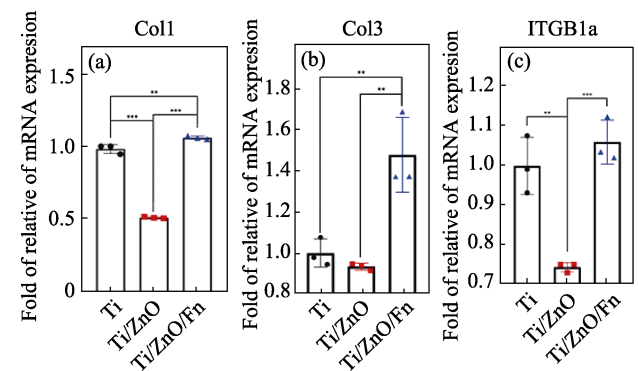


图 5 hGFs 在 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面培养 3 d 后(a) Col1、(b)Col3 和(c)ITGB1a 基因的相对表达量

Fig. 5 Quantification of the gene expression of (a) Col1, (b) Col3 and (c) ITGB1a in hGFs on Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn for 3 d by qPCR

Data are normalized against reference gene expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and standardized with Ct (cycle threshold) of Ti. Error bars indicate standard deviations. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$ ($n=3$, One-way ANOVA)

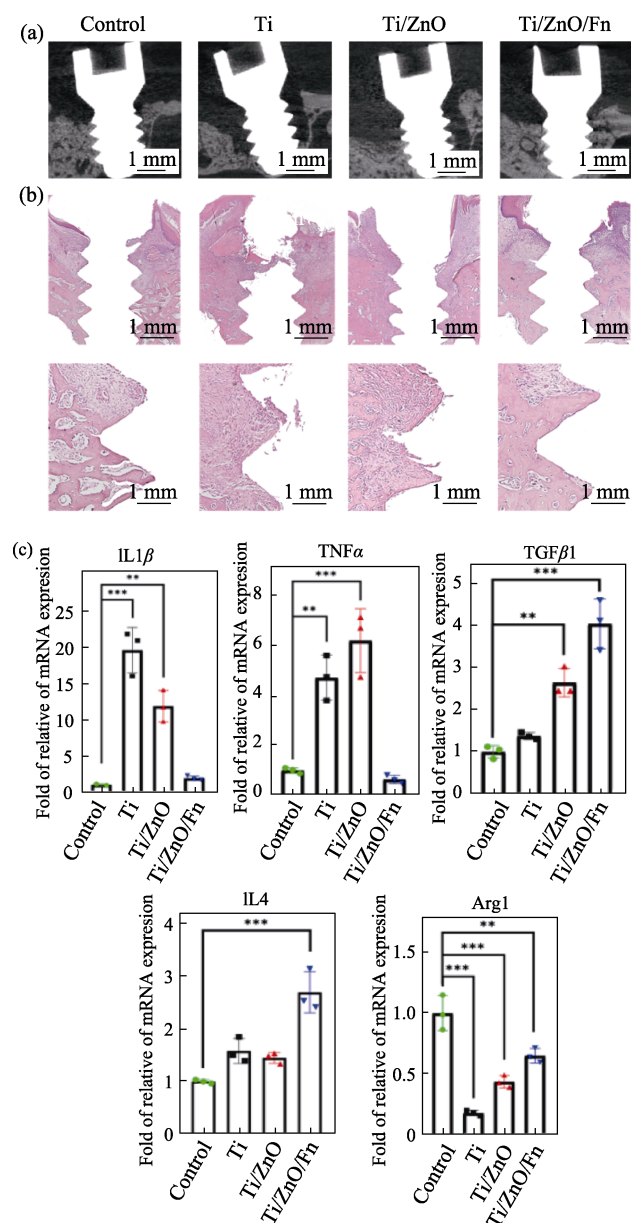


图 6 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 制成的钛钉植入大鼠牙槽骨 4 w 后 (a)Micro-CT 矢状面截图, (b)钛钉周组织石蜡切片 H&E 染色照片, 和 (c)钛钉周牙龈组织中 IL1 β 、Arg1、TNF α 、IL4、TGF β 1 基因的相对表达量

Fig. 6 (a) Sagittal pictures of Micro-CT, (b) H&E-stained tissues around screws, and (c) quantification of the gene expression of IL1 β , Arg1, TNF α , IL4, and TGF β 1 by qPCR in gingiva tissues around Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn screws after being inserted into maxillae of rats for 4 w

Data are normalized against reference gene expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and standardized with Ct of control. Control: Ti screws infused with bacteria culture medium; Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn: Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn screws infused with mixed bacterial suspension. Error bars indicate standard deviations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ ($n=3$, One-way ANOVA)

3 结论

本研究采用原子层沉积技术将 ZnO 纳米薄膜沉

积于 Ti 表面, 并通过硅烷化共价连接了纤粘蛋白, 并证明了该修饰方法能显著提高 Ti 表面对种植体周炎致病菌伴放线聚集杆菌和牙龈卟啉单胞菌的抗菌效果, 增强人牙龈成纤维细胞对材料表面的黏附和增殖活性。大鼠种植体周炎模型体内实验证明了该修饰方法可以降低由细菌引起的种植体周炎症反应和骨吸收。因此, 该修饰方法有望赋予牙种植体钛钉抵抗细菌侵袭的能力, 增强牙龈对其表面的附着, 降低种植体周炎发病的风险。

补充材料

与本文相关的补充材料请登陆 <https://doi.org/10.15541/jim20210125> 查阅。

参考文献:

- [1] SIMONIS PIERRE, DUFOUR THOMAS, TENENBAUM HENRI. Long-term implant survival and success: a 10–16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clin. Oral Implants Res.*, 2010, **21**(7): 772–777.
- [2] DIXON DOUGLAS R, LONDON ROBERT M. Restorative design and associated risks for peri-implant diseases. *Periodontol 2000*, 2019, **81**(1): 167–178.
- [3] DAUBERT DIANE M, WEINSTEIN BRADLEY F. Biofilm as a risk factor in implant treatment. *Periodontol 2000*, 2019, **81**(1): 29–40.
- [4] DE WAAL Y C, EIJSBOUTS H V, WINKEL E G, *et al.* Microbial characteristics of peri-implantitis: a case-control study. *J. Periodontol*, 2017, **88**(2): 209–217.
- [5] DE AVILA ERICA DORIGATTI, LIMA BRUNO P, SEKIYA TAKEO, *et al.* Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material. *Biomaterials*, 2015, **67**: 84–92.
- [6] SOBOLEV ALEXANDER, VALKOV ANTON, KOSENKO ALEXEY, *et al.* Bioactive coating on Ti alloy with high osseointegration and antibacterial nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, **11**(43): 39534–39544.
- [7] YUAN ZHANG, TAO BAILONG, HE YE, *et al.* Remote eradication of biofilm on titanium implant via near-infrared light triggered photothermal/photodynamic therapy strategy. *Biomaterials*, 2019, **223**: 119479.
- [8] ALQATTAN M, PETERS L, YANG F, *et al.* Microstructure, mechanical behaviour and antibacterial activity of biomedical Ti-xMn-yCu alloys. *J. Alloys Compd.*, 2021, **856**: 158165.
- [9] DIEFENBECK M, SCHRADER C, GRAS F, *et al.* Gentamicin coating of plasma chemical oxidized titanium alloy prevents implant-related osteomyelitis in rats. *Biomaterials*, 2016, **101**: 156–164.
- [10] LI BAOE, ZHANG LEI, WANG DONGHUI, *et al.* Thermosensitive-hydrogel-coated titania nanotubes with controlled drug release and immunoregulatory characteristics for orthopedic applications. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, 2021, **122**: 111878.
- [11] KUMAR RAJESH, UMAR AHMAD, KUMAR GIRISHE, *et al.* Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: a review. *Ceram. Int.*, 2017, **43**(5): 3940–3961.
- [12] YU FEN, FANG XUAN, JIA HUIJIN, *et al.* Zn or O? An atomic

- level comparison on antibacterial activities of zinc oxides. *Chemistry*, 2016, **22(24)**: 8053–8058.
- [13] ZHU LIYUAN, YUAN KAIPING, YANG JIAHE, *et al.* Hierarchical highly ordered SnO₂ nanobowl branched ZnO nanowires for ultrasensitive and selective hydrogen sulfide gas sensing. *Microsystems & Nanoengineering*, 2020, **6(1)**: 30–43.
- [14] JIAN SHENGRUI, LEE YAHUI. Nanoindentation-induced interfacial fracture of ZnO thin films deposited on Si(111) substrates by atomic layer deposition. *J. Alloys Compd.*, 2014, **587**: 313–317.
- [15] TAPILY K, GU D, BAUMGART H, *et al.* Mechanical and structural characterization of atomic layer deposition-based ZnO films. *Semicond. Sci. Tech.*, 2011, **26(11)**: 115005.
- [16] LUO QIMING, CAO HUILIANG, WANG LANYU, *et al.* ZnO@ZnS nanorod-array coated titanium: good to fibroblasts but bad to bacteria. *J. Colloid. Interface Sci.*, 2020, **579**: 50–60.
- [17] BAKHORI SITI KHADIJAH MOHD, MAHMUD SHAHROM, MASUDI SAM'AN MALIK, *et al.* Cytotoxicity evaluation of ZnO-eugenol (ZOE) using different ZnO structure on human gingival fibroblast. *AIP Conference Proceedings*, 2017, **1865(1)**: 020008.
- [18] JORDAHL STACY, SOLORIO LUIS, NEALE DYLAN B, *et al.* Engineered fibrillar fibronectin networks as three-dimensional tissue scaffolds. *Adv. Mater.*, 2019, **31(46)**: 1904580.
- [19] MCWHORTER FRANCES Y, WANG TINGTING, NGUYEN PHOEBE, *et al.* Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2013, **110(43)**: 17253–17258.
- [20] LI JUN, TAN LEI, LIU XIANGMEI, *et al.* Balancing bacteria–osteoblast competition through selective physical puncture and biofunctionalization of ZnO/polydopamine/arginine-glycine-aspartic acid-cysteine nanorods. *ACS Nano*, 2017, **11(11)**: 11250–11263.
- [21] JIAN XIAOCHONG, HUANG WENXIU, WU DONG, *et al.* Effect of fibronectin-coated micro-grooved titanium surface on alignment, adhesion, and proliferation of human gingival fibroblasts. *Med. Sci. Monitor.*, 2017, **23**: 4749–4759.
- [22] KRÓL A, POMASTOWSKI P, RAFIŃSKA K, *et al.* Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 2017, **249**: 37–52.
- [23] KOUTOUZIS THEOFILOS, EASTMAN CHRISTIE, CHUKKAPALLI SASANKA, *et al.* A novel rat model of polymicrobial peri-implantitis: a preliminary study. *J. Periodontol.*, 2017, **88(2)**: e32–e41.
- [24] YAMAZAKI SEIYA, MASAKI CHIHIRO, NODAI TOMOTAKA, *et al.* The effects of hyperglycaemia on peri-implant tissues after osseointegration. *J. Prosthodont Res.*, 2020, **64(2)**: 217–223.

补充材料:

钛表面氧化锌与纤连蛋白复合修饰应用于
抗种植体周炎的研究张大卫¹, 朱立远², 卢红亮², 王佐林¹

(1. 同济大学口腔医学院 同济大学附属口腔医院 上海牙组织修复与再生工程技术研究中心, 上海 200072; 2. 专用集成电路和系统国家重点实验室, 复旦大学微电子学院, 上海智能电子与系统研究院, 上海 200433)

1 实验方法

1.1 材料制备与表征

1.1.1 材料

钛片(10 mm×10 mm×1 mm)购自上海宝钢集团公司, 人血浆纤连蛋白(Fibronectin human plasma, Fn)和二乙基锌[(C₂H₅)₂Zn, DEZ, 99.999%]购自Sigma-Aldrich公司, 其他化学试剂均购自国药集团化学试剂公司, 均为分析纯, 所用气体纯度为99.999%。设计纯钛柱状螺纹钛钉骨内段长2.0 mm, 外径1.5 mm, 内径1.2 mm, 螺纹直径0.15 mm, 颈部直径2.0 mm, 高1.5 mm, 并交由山东威高洁丽康生物材料有限公司加工。

1.1.2 制备氧化锌纳米薄膜

将钛片及钛钉在丙酮、乙醇和去离子水(deionized water, diH₂O)中分别连续超声洗涤15 min, 去除杂质。利用原子层沉积(Atomic layer deposition, ALD)技术系统(BENEQ), 在钛片表面及钛钉颈部沉积ZnO薄膜, 并循环沉积100次, 沉积在200 °C的条件下进行。分别以H₂O₂和DEZ作为氧化剂和锌的前驱体, 以高纯氩气(Ar)作为载气, 将试样经Ar气交替脉冲后进入反应仓。每个前驱体脉冲持续0.2 s, 间隔2.0 s使用Ar吹扫, 以清除残留物和副产物, 形成Ti/ZnO。反应结束后, 利用光谱椭偏仪系统(SOPRA GES-5E)测量表面ZnO纳米薄膜的厚度。

1.1.3 通过硅烷化共价连接纤连蛋白

在室温下将Ti/ZnO置于3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)的甲苯溶液(质量比0.2%)中浸泡10 min, 反应后使用甲苯洗涤3次, 然后在110 °C烘箱中加热2 h完成材料表面硅烷化, 形成Ti/ZnO/APTES。随后将Ti/ZnO/

APTES浸入含有1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC, 40 μg/mL)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 40 μg/mL)的Fn水溶液(50 μg/mL)中2 h, H₂O₂清洗3遍, N₂干燥, 制备成Ti/ZnO/Fn。

1.1.4 材料表征检测

采用扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy, SEM, Zeiss SIGAMA HD field-emission SEM)以观察不同材料表面形貌。为了测定材料表面的元素组成及其相对含量, 采用φ5000C ESCA系统对不同材料进行光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)分析。最后, 为了检测材料表面的共价键, 用红外光谱仪(Bruker Vertex 70)在1.5~20 μm范围内作傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析。

1.1.5 检测锌离子体外释放量

采用电感耦合等离子体质谱(ICP, Agilent 7900, 美国)分析Zn²⁺的释放速率。将有效面积为1 cm²的Ti/ZnO和Ti/ZnO/Fn在37 °C下浸泡于5 mL磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS)溶液中9 d, 从第1 d开始, 每隔2 d收集1次液体, 重复3次。

1.2 体外抗菌性能

1.2.1 细菌培养

伴放线聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. a*, ATCC[®] 29524TM)在37 °C、5% CO₂的条件下, 使用心脑浸液和哥伦比亚血琼脂板培养, 牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. g*, ATCC[®] 33277TM)在37 °C、无氧条件下, 使用胰蛋白酶大豆肉汤和哥伦比亚血琼脂板培养。

1.2.2 材料表面抗菌率

接种细菌前, 离心收集指数生长期的*A. a*和*P. g*, 使用PBS重悬, 调整细菌浓度至1×10⁶ CFU/mL。将Ti、Ti/ZnO和Ti/ZnO/Fn放入24孔板中, 加入50 μL的细菌悬液至材料表面。在上述培养条件下

培养 24 h 后, 每孔加入 1 mL PBS 后超声处理 30 s, 取其中 50 μ L 的菌液以 1:10、1:100、1:1000 的比例稀释后涂在 CBA 平板上, *A. a* 培养 24 h, *P. g* 培养 96 h 后拍照计数菌落, 按式(1)计算细菌浓度(C), 按式(2)计算抗菌率(R),

$$C=N \times D \times 1000/V \quad (1)$$

$$R=(C_{\text{Control}}-C_{\text{Material}})/C_{\text{Control}} \times 100\% \quad (2)$$

式(1)中, N 表示每组 3 个样本的平均菌落数, D 表示稀释倍数, V 表示菌液体积。式(2)中 C_{Control} 为 Ti 的细菌浓度, C_{Material} 包括 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 的细菌浓度。

1.2.3 材料表面的活/死细菌染色

使用活/死细菌染色试剂盒(Invitrogen, 美国)观察材料表面细菌死亡比例, 其中 SYTO[®] 9 将所有细菌标记为绿色, 碘化丙啶(PI) 将死亡细菌标记为红色。在 *A. a* 和 *P. g* 的指数生长期用 800 μ L 菌悬液(1×10^6 CFU/mL)接种至材料表面 24 h, 弃去培养基, 在材料表面滴加 50 μ L 预混合染色液(SYTO[®] 9:PI:PBS=3:3:1000)在黑暗中孵育 15 min。在荧光显微镜(Nikon, LV100DA-U)下观察样品, 并在 ImageJ 软件(下载自 <http://rsb.info.nih.gov/ij>)上随机选取 3 张 200 倍放大的图像对荧光面积进行定量分析。

1.2.4 材料表面细菌的活性氧自由基含量测定

在 *A. a* 和 *P. g* 的指数生长期用 800 μ L 菌悬液(1×10^6 CFU/mL)接种至 Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面 24 h, 然后利用活性氧(Reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(贝博, 中国)检测细菌内 ROS 含量。利用荧光显微镜观察, 并在 ImageJ 软件上随机选取 3 张 200 倍放大的照片对荧光面积进行定量分析。

1.3 材料表面的细胞相容性

1.3.1 人牙龈成纤维细胞的分离和培养

经同济大学附属口腔医院伦理委员会批准(2018 伦审字 001 号), 并获得患者知情同意, 从前来就诊拔除第三磨牙患者的健康牙龈组织中提取人牙龈成纤维细胞(Human gingival fibroblasts, hGFs)。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下, hGFs 在含 10%胎牛血清(Gibco, 美国)和 1%青霉素/链霉素(HyClone, 美国)的 α -MEM(HyClone, 美国)中培养。

1.3.2 材料表面 hGFs 的黏附状态

在 24 孔板中将 hGFs 以 1×10^4 cells/well 的密度接种于有效面积为 1 cm² 的 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面, 培养 6 和 12 h 后使用 PBS 冲洗, 加入 4%多聚甲醛固定 30 min, 随后用 PBS 冲洗, 加入 0.1% Triton x-100 (碧云天, 中国)打孔 5 min 后用 PBS 冲洗,

加入 1%牛血清白蛋白(碧云天, 中国)封闭 30 min, 再用 PBS 冲洗。每孔加入 200 μ L 鼠来源的黏着斑蛋白单克隆抗体(1:200, Sigma, 美国), 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。然后使用 PBS 洗 3 遍, 加入山羊抗小鼠 Alexa Fluor[®] 594 IgG 抗体(1:100, Invitrogen, 美国)在室温下避光孵育 30 min, 最后使用 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000, Sigma-Aldrich, 美国)染色 5 min。在激光共聚焦扫描显微镜(CLSM, TI2-E+A1 R, Nikon, 日本)下观察样品, 并在 ImageJ 软件上随机选取 3 张 200 倍放大的照片对荧光面积进行定量分析

为了进一步观察细胞形态在不同材料表面的变化, 在 24 孔板中将 hGFs 以 1×10^4 /孔的密度接种于 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面, 培养 6 和 12 h 后使用 PBS 冲洗, 再依次用体积比 30%、50%、75%、90%、95%和 100%的乙醇浓度梯度脱水, 每个梯度 15 min, 冷冻干燥过夜, 喷金, 最后在扫描电镜下观察细胞形态。

1.3.3 材料表面 hGFs 的增殖率

细胞计数试剂盒-8(CCK-8, 卡蒙, 中国)检测 hGFs 在材料表面的增殖率。在 24 孔板中将 hGFs 以 1×10^4 cells/well 的密度接种于 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面, 在培养 1、3 和 7 d 后将样品转移到新的 24 孔板上, 用 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 300 μ L 含有 10% CCK-8 的 α -MEM。孵育 2 h 后, 从每孔中取 200 μ L 加入 96 孔板, 用酶标仪(Synergy H1, BioTek, 美国)在 450 nm 处测定吸光度(OD)。每组测量 3 个样本, 计算平均 OD 值。

1.3.4 材料表面 hGFs 黏附、增殖相关基因的表达水平

在 24 孔板中将 hGFs 以 1×10^5 cells/well 的密度接种于 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 表面, 培养 3 d 后使用 RNAiso Plus(Takara, 日本)裂解细胞, 提取 mRNA, 使用 PrimeScript[™] RT Master Mix(Takara, 日本)反转录成 cDNA, 使用 Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix (Yeasen, 中国)在 Lightcycler 96[®](Roche Applied Science, 英国)上通过定量实时聚合酶链反应(qPCR)定量检测 I 型胶原蛋白(Col1)、III型胶原(Col3)、整合素 $\beta 1$ (ITGB1 α)基因的表达情况。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因, 计算相对表达量。上述基因正向引物和反向引物的具体序列见表 1。

1.4 体内抗菌实验

1.4.1 大鼠种植体周炎模型的建立

选取 12 只 SPF 级 SD 大鼠, 重 200~300 g, 饲养于同济大学附属口腔医院动物实验中心, 术前适应性饲养 1 周。根据上述培养条件制备 *A. a* 和 *P. g* 菌

液(密度 1×10^6 CFU/mL)备用。注射 3%戊巴比妥钠溶液(30~40 mg/kg, Merk, 德国)将大鼠全身麻醉后固定, 拔除上颌双侧第一磨牙, 于近中根拔牙窝处备洞, 随机植入颈部经上述不同处理方式处理后的钛钉共 24 枚, 其中包括 Ti 钉 12 枚, 颈部沉积 ZnO 的 Ti/ZnO 钉 6 枚, 以及颈部经过复合修饰的 Ti/ZnO/Fn 钉 6 枚。植入后随机选择 6 个 Ti 位点、6 个 Ti/ZnO 位点以及 6 个 Ti/ZnO/Fn 位点作为实验组, 剩余 6 个 Ti 位点作为对照组(Control)。使用注射器在实验组位点周围注射 *A. a* 和 *P. g* 混合菌液 200 μ L, 而在 Control 位点周围注射等量的细菌培养基。随后每 2 d 在种植位点周围注射一次, 持续 4 w。

1.4.2 影像学及组织学分析

术后 4 w, 采用过量麻醉的方式处死大鼠, 随机选取 Control、Ti、Ti/ZnO 及 Ti/ZnO/Fn 每组各 3 个位点取材, 4%多聚甲醛固定后进行 Micro-CT 扫描, 使用 SCANCO Medical AG 系统分析钛钉周骨组织吸收情况。扫描后的样本使用 10%乙二胺四乙酸脱钙 4 w, 脱水, 石蜡包埋, 切片, H&E 染色, 光学显微镜观察。

1.4.3 牙龈组织中炎症相关基因表达水平的检测

术后 4 w, 采用上述麻醉方法将大鼠全身麻醉后固定, 随机选取 Control、Ti、Ti/ZnO 及 Ti/ZnO/Fn 每组各 3 个位点, 取钛钉周围牙龈组织, 置于 PBS 溶液中清洗。将不同位点的牙龈组织分别置于 EP 管中, 加入 1 mL trizol 试剂及锆珠后使用组织研磨仪粉碎, 随后提取 mRNA, 采用上述方法进行 qPCR 分析牙龈组织中炎症相关基因包括白细胞介素 1β (IL 1β)、精氨酸酶 1 (Arg1)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白细胞介素 4 (IL4)、肿瘤生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)的表达。选择 GAPDH 作为内参基因, 计算相对表达量。上述基因正向引物和反向引物的具体序列见表 2。

1.5 统计分析

所有定量数据均采用 Student's t 检验和单因素方差分析(One-way ANOVA), 以均数 \pm 标准差表示, 实验均重复 3 次。所有统计分析均采用 SPSS 18.0 软件程序进行。

2. 实验结果

表 S1 人牙龈成纤维细胞相关基因正反引物序列

Table S1 Specific forward and reverse primer sequences of detected genes of HGFs

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (3'-5')
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
Col1	TCTAGACATGTTTCAGCTTTGTGGAC	TCTGTACGCAGGTGATTGGTG
Col3	GCAAATTCACCTACACAGTTCTGGA	CTTGATCAGACCACCAATGTCATA
ITGB1 α	TGTGTCAGACCTGCCTTGGTG	AGGAACATTCCTGTGTGCATGTG

表 S2 大鼠炎症相关基因正反引物序列

Table S2 Specific forward and reverse primer sequences of detected genes of rat

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (3'-5')
GAPDH	CCCCAATGTATCCGTTGTG	CTCAGTGTAGCCCAGGATGC
IL 1β	GACCTGTTCTTTGAGGCTGACA	CTCATCTGGACAGCCCAAGTC
Arg1	AGCAGAGACCCAGAAGAATG	TTTCCTTTCAGTTCCTTCAG
TNF α	GACAAGGCTGCCCCGACTAT	GGGAGACTCCTCCCAGGTACA
IL4	TCGCTTGCCTTGGTGGTC	TGTGATGTTGCTCAGCTCCTC
TGF $\beta 1$	AGGACCTGGGTTGGAAGTGG	AGTTGGCATGGTAGCCCTTG

表 S3 Ti、Ti/ZnO 和 Ti/ZnO/Fn 的表面元素含量

Table S3 Elemental chemical composition of Ti, Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn

Sample	C1s/%	O1s/%	N1s/%	Si2p3/%	Ti2p3/%	Zn2p3/%
Ti	57.69	31.07	1.92	0.02	9.26	0.05
Ti/ZnO	38.94	37.22	2.26	0.08	1.07	20.44
Ti/ZnO/Fn	63.91	21.2	11.88	2.27	0.13	0.6

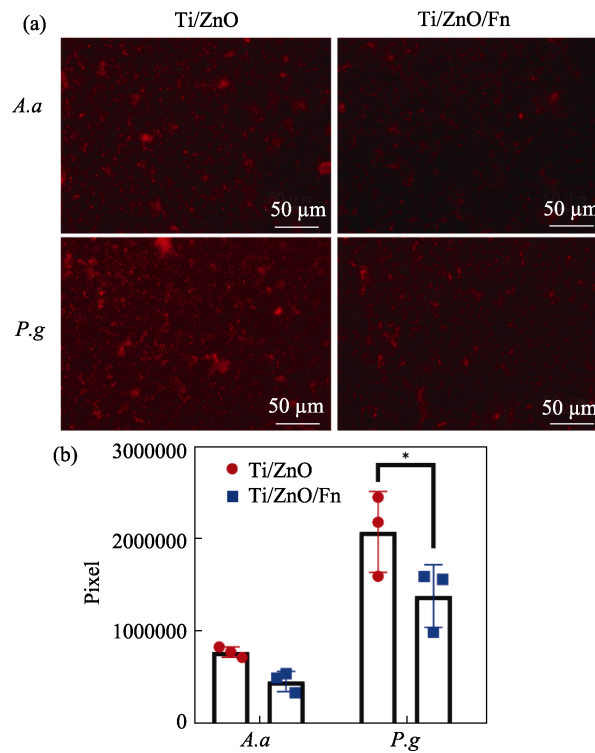


图 S1 使用荧光探针标记的在材料表面培养 24 h 细菌胞内 ROS 及其含量

Fig. S1 Reactive oxygen species (ROS) detected by fluorescence probes in bacteria cultured on materials for 24 h

(a) Fluorescent images of ROS in *A. a* and *P. g* cultured on Ti/ZnO and Ti/ZnO/Fn; (b) Quantitative measurement of area of ROS in *A. a* and *P. g*
 Error bars indicate standard deviations: * $P < 0.05$ ($n=3$, Student's *t* test)