

电泳沉积制备微弧氧化钛表面氧化镁 涂层及其生物学性能

杜佳恒^{1,2}, 范鑫丽^{3,4}, 肖东琴², 尹一然¹,
李忠¹, 贺葵¹, 段可¹

(1. 西南医科大学附属医院骨与关节外科, 四川省骨科植入器械研发及应用技术工程实验室, 泸州 646000; 2. 川北医学院第二临床学院, 南充市中心医院组织工程与干细胞研究所, 南充 637000; 3. 山东大学齐鲁医学院口腔医学院, 口腔医院口腔颌面外科, 济南 250012; 4. 山东省口腔组织再生重点实验室, 山东省口腔生物材料与组织再生工程实验室, 山东省口腔疾病临床医学研究中心, 济南 250012)

摘要: 骨科钛内置物存在感染的风险, 需要开发具有抗菌性、生物相容性且不易产生耐药性的表面涂层。通过电泳沉积 15、30、45、60 s 在微弧氧化(MAO)的钛表面制备了 4 组纳米氧化镁(MgO)涂层。MgO 颗粒在 MAO 表面形成均匀涂层, 覆盖率随电泳时间延长。与金黄色葡萄球菌共培养 6 h 后, 4 组样品抗菌率分别为 1%、69%、83%、84%; 共培养 24 h 后抗菌率分别为 81%、86%、89%、98%。显微观察发现 MgO 沉积样品表面黏附细菌密度、活细菌比例均随沉积时间延长而减少。与小鼠成骨细胞共培养 1 d 后, 4 组样品存活率(相对空白孔板中所接种细胞)分别为 108%、89%、53%、27%, 5 d 后分别为 139%、117%、112%、66%。荧光显微观察发现 MAO 样品表面未见死细胞, 而 MgO 沉积样品表面死细胞比例随沉积时间延长而增加, 但在实验周期(5 d)内均<5%。本研究表明电泳沉积 30 s 制备的 MgO 涂层具有良好的体外抗菌性和生物相容性。

关键词: 钛; 内置物; 抗菌; 微弧氧化; 氧化镁; 电泳沉积

中图分类号: R318 文献标志码: A

Electrophoretic Coating of Magnesium Oxide on Microarc-oxidized Titanium and Its Biological Properties

DU Jiaheng^{1,2}, FAN Xinli^{3,4}, XIAO Dongqin², YIN Yiran¹, LI Zhong¹, HE Kui¹, DUAN Ke¹

(1. Engineering Laboratory of Orthopaedic Implant Device R&D and Application Technology, Sichuan Province, Department of Bone and Joint Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Research Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, Nanchong Central Hospital, the Second Clinical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Qilu School of Stomatology, Stomatological Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China; 4. Shandong Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration, Shandong Engineering Laboratory of Oral Biomaterials and Tissue Regeneration, Shandong Clinical Medical Research Center for Oral Diseases, Jinan 250012, China)

收稿日期: 2023-04-18; 收到修改稿日期: 2023-06-03; 网络出版日期: 2023-10-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(52071277); 四川省科技计划(2020YFS0455, 2022YFS0628); 泸州市-西南医科大学合作项目(2020LZXNYDZ08, 2020LZXNYDF02); 西南医科大学产学研项目(2022CXY03); 泸县西南医科大学联合课题(2020LXXNYKD-01)

National Natural Science Foundation of China (52071277); Science & Technology Program of Sichuan Province (2022YFS0628, 2020YFS0455); Luzhou-SWMU Cooperation Program (2020LZXNYDZ08, 2020LZXNYDF02); Industry-University Research Project of SWMU (2022CXY03); Luxian-SWMU Joint Project (2020LXXNYKD-01)

作者简介: 杜佳恒(1997-), 男, 硕士研究生. E-mail: dujiaheng1011@163.com

DU Jiaheng (1997-), male, Master candidate. E-mail: dujiaheng1011@163.com

通信作者: 段可, 教授. E-mail: keduan@swmu.edu.cn

DUAN Ke, professor. E-mail: keduan@swmu.edu.cn

Abstract: Titanium orthopaedic implants present a risk of infection and require the development of antibacterial, but still biocompatible and non-resistant coatings. Magnesium oxide (MgO) coatings were prepared on micro-arc oxidized titanium by electrophoretic deposition for 15, 30, 45, or 60 s. Nano-sized MgO particles agglomerated to form homogeneous coatings with surface coverage increasing with the duration of deposition. The four groups produced antibacterial rates of 1%, 69%, 83%, and 84% after co-cultured with *S. aureus* for 6 h, and 81%, 86%, 89%, and 98% after co-cultured for 24 h. Electron and fluorescence microscopies showed decreasing density of bacterial cells and proportion of living cells with increasing time of deposition. Mouse osteoblasts seeded on the four groups had survival rates of 108%, 89%, 53%, and 27% on day 1, and 139%, 117%, 112%, and 66% on day 5. Proportion of dead cells on the coated samples increased with increasing time of deposition but less than 5% on day 5. These results indicate that MgO coatings prepared by electrophoretic deposition for 30 s is reasonable *in vitro* antibacterial activities and cytocompatibility.

Key words: titanium; implant; antibacterial; micro-arc oxidation; magnesium oxide; electrophoretic deposition

钛内置物广泛应用于骨科, 但存在 0.4%~5% 的感染风险, 其主要致病菌为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 等^[1]。内置物感染处置困难且费用高昂, 许多研究探索利用涂层或表面改性技术赋予内置物抗感染能力。Malizos 等^[2]在钛接骨板表面涂覆含抗生素凝胶后感染率为 0。银离子也被广泛用于制备抗菌涂层^[3]。但抗生素存在引起细菌耐药的隐患^[4], 银则有明显细胞毒性^[5-6]。因此, 有必要研发能有效抗菌且不具有上述副作用的涂层技术。

微弧氧化(Micro-Arc Oxidation, MAO)是通过高电压引起金属表面氧化、击穿, 制备牢固结合的氧化层的表面改性技术^[7]。MAO 处理的表面具有火山口样的粗糙形貌且可引入提高生物相容性的元素(如钙、磷), 被广泛应用于骨内置物^[8], 但 MAO 处理的钛表面不具备抗菌性。Al-Ahmad 等将牛牙釉质、MAO 钛种植体分别与细菌共培养后发现后者的细菌黏附显著高于前者^[9]; 他们将 MAO 和机械加工钛植入人体内 3~5 d 后, 发现前者表面形成的生物膜厚度高于后者, 显示 MAO 钛表面有利于微生物黏附增殖^[10]。因此, 赋予 MAO 表面抗菌能力具有重要临床价值。

镁是人体常量元素, 成人含约 20~38 g 镁, 其中 60%~65% 存在于硬组织。研究发现氧化镁(MgO)可诱导 MC3T3-E1 细胞成骨分化及上调成骨基因表达^[11-12]且具有抗菌能力^[13]。Nguyen 等^[14]将纳米 MgO 与 *S. aureus* 等 9 种致病菌共培养, 发现其最低杀菌浓度(MLC90)为 0.7 mg/mL。Coelho 等^[15]制备了纳米 MgO-羟基磷灰石复合材料, 并与 3 种细菌共培养 24 h, 发现细菌黏附、生长均被显著抑制。可见 MgO 具有优良的抗菌作用。

电泳沉积是一种简单快速的涂层制备方法^[16], 已用于制备多种骨科钛表面涂层^[17]。Hickey 等^[18]在聚乳酸表面电泳沉积了纳米 MgO 涂层, 并与革兰氏阳性菌(*S. aureus*、表皮葡萄球菌)和革兰氏阴性菌(铜绿假单胞菌)共培养 4 h 后, 发现 MgO 涂覆组表面活细菌数分别下降 64%~90%。MgO 的抗菌性可以通过多种材料学参量加以调节, 如形貌^[19]、掺杂^[20]、氧空位^[21]等。电泳沉积是室温物理过程, 可以用于沉积各种特性的 MgO 而不改变其关键材料学特性。此外, 电泳也可以实现不同功能材料的共沉积, 如增强成骨性能^[22]和可生物降解性^[23]。但至今尚无研究报道采用电泳沉积方法在钛表面制备抗菌 MgO 涂层。本研究在 MAO 处理钛表面电泳沉积 MgO 涂层, 并比较不同沉积时间对抗菌率和细胞相容性的影响, 用以探索降低 MAO 钛内置物感染的有效方法。

1 实验方法

1.1 微弧氧化

纯钛板(TA2, 厚度 1 mm, 宝鸡钛业)切割成 40 mm×10 mm 后用碳化硅砂纸打磨至 15 μm(800 目)。用质量分数 3%氢氟酸(川东化工)、5%硝酸(广东光华)的混合酸处理 1 min 后去离子水超声清洗 30 min, 吹干备用。将样品部分浸于电解液中(质量分数 0.8%的 β-甘油磷酸钠(Harveybio), 5.9%的乙酸钙(迈瑞尔生化)的去离子水溶液)作为正极; 以 316 不锈钢板(100 mm×10 mm)为负极, 施加 350 V 直流电压(顺德三阳 STP-400V/200)并保持 30 s。

1.2 电泳沉积

将 0.25 g 纳米 MgO 粉(30 nm, 鑫康新材料)悬浮

在 100 mL 丙酮(川东化工)中, 超声分散 30 min。将上述微弧氧化钛片浸于该悬液中作为正极, 以铂片(20 mm×20 mm, Ledonlab)为负极, 施加 40 V 直流电压(Keithley 2260B-80-13)并保持 15、30、45 或 60 s^[24]; 样品相应记为 MAO-MgO15、MAO-MgO30、MAO-MgO45 和 MAO-MgO60。

1.3 涂层表征

用 X 射线衍射仪(XRD, CuK α , 40 kV, 20 mA; 丹东通达 TD-3500)分析样品物相; 扫描电子显微镜(SEM; 中科科仪 KYKY-EM6900)及其所配能谱仪(EDS; Bruker 1048)观察样品表面形貌和元素分布; 场发射扫描电子显微镜(FE-SEM; JEOL JSM-7500F)及其所配能谱仪(Oxford X-Max 80)观察 MgO 粉体形貌、截面形貌和元素分布; 用浊度仪(SGZ-200AS, 上海悦丰)测量纳米 MgO/丙酮悬浮液的稳定性。将沉积 MgO 的样品浸入 3 mL 磷酸盐缓冲溶液(Phosphate Buffered Solution, PBS), 在指定时间点转入含 3 mL PBS 的新管中; 将原 PBS 离心, 分离液相与游离粉末, 加入 3 mL 0.1 mmol/L 盐酸溶解粉末。36 h 后, 将钛片取出, 用 3 mL 0.1 mmol/L 盐酸溶解表面残余 MgO。用原子吸收光谱仪(AA-7000, Shimadzu)分析所有样品中镁浓度并换算为累积释放量; 每组 3 个平行样。

1.4 体外抗菌率

按 ISO 22196-2011 评价体外抗菌率。将 *S. aureus* (菌株 CMCC(B)26003, 南京乐诊生物)制成单菌落, 挑取至 10 mL LB 肉汤培养液(索莱宝生物)中, 37 °C、180 r/min 培养 24 h。调整菌液浓度至 1×10^8 CFU/mL ($OD=0.139$)^[25], 梯度稀释至 1×10^5 CFU/mL。将样品切割成 10 mm×10 mm 片状, 干热灭菌(200 °C, 1 h)后放入 24 孔板, 表面滴加 300 μ L 菌液, 37 °C 下分别培养 6、12 或 24 h; 取出后用 10 mL PBS 冲洗。冲洗液梯度稀释 10^6 倍, 取 150 μ L 滴在 LB 固体培养基(索莱宝生物)表面, 37 °C 培养 24 h 后观察菌落数。抗菌率=[(对照组回收菌落数-实验组回收菌落数)/对照组回收菌落数]×100%; 每组 3 个平行样。

1.5 细菌黏附

上述(1.4 节中, 下同)共培养后的钛片经冲洗后, 以质量分数 2% 的戊二醛(源叶生物)固定过夜, 系列浓度的乙醇脱水后用 SEM 观察。本实验及后续实验的冲洗均用 PBS, 每次 2 mL, 每个样品冲洗 3 次。

1.6 细菌活/死染色

上述共培养钛片冲洗后用细菌活力检测试剂盒(Live/Dead BacLight, Invitrogen)染色, 倒置荧光显

微镜(Zeiss 1940645S)观察活、死细菌, 并计数。

1.7 细胞相容性

钛片干热灭菌后放入 24 孔板, 表面滴加 1 mL 小鼠成骨细胞(细胞株 OB-6, 上海青旗生物技术)悬液(1×10^5 cells/mL; 质量分数 89% 的 DMEM 细胞培养液、10% 的胎牛血清(均为 Gibco)、1% 的青霉素-链霉素-庆大霉素(上海龙田生物)), 放入培养箱(Thermo Fisher 3111GP)中 1、3 或 5 d 后每孔加入 200 μ L CCK-8 试剂(重庆葆光生物)后再培养 2 h。每孔吸取 100 μ L 混悬液, 用酶标仪(Thermo Fisher 1410101)测量 450 nm 处吸光度。以加入培养基和 CCK-8 试剂但无细胞的孔板为空白样, 接种 1 mL 小鼠成骨细胞的孔板为对照样。将测得的吸光度换算为细胞相对(对照组)存活率, 每组做 5 个平行样。

1.8 细胞活/死染色

上述共培养钛片(1.7 节)同 1.6 节方法处理, 并活/死染色(Live/Dead Cell Imaging Kit, Thermo Fisher)后在倒置荧光显微镜下观察。

1.9 统计学分析

数据行单因素方差分析(ANOVA, SPSS 16.0)和 Tukey 多重比较; $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 电泳沉积与涂层表征

SEM 观察显示(图 1(a, b)), MgO 粉体由尺寸约 200 nm 的片状晶体构成的微米尺度的团聚体/多晶体组成。纳米 MgO 颗粒在丙酮溶液中超声分散 30 min 后在 1 h 内悬浮液浊度变化较小(图 1(c)); 1 h 后浊度加速下降。

采用 SEM 观察发现 MAO 钛片表面(图 2(a, b))具有大量火山口状微孔, 直径 2~5 μ m。MAO 钛在纳米 MgO-丙酮悬浮液中电泳 15~60 s 后, MgO 颗粒团聚并沉积在表面(图 2(c~f)), MAO 基体的火山口形貌逐步覆盖, 部分火山口内有 MgO 颗粒嵌入。MAO-MgO45 表面几乎完全被 MgO 颗粒覆盖(图 2(e))。EDS 分析(图 3(a))在所有样品表面均检测到 Ti、Mg、Ca、P、O 元素, 且 Mg 峰的相对强度随电泳时间延长。能谱面扫描发现, Mg 元素完全覆盖各组样品表面且强度分布较均匀(图 3(b))。

FE-SEM 观察样品截面发现(图 4(a~d)), 各组样品在钛-树脂界面处存在过渡区, 各组过渡区内物质均呈颗粒状形貌, 难以可靠区分 MgO 沉积层与 MAO 形成的氧化物。EDS 面扫描发现(图 4(e~h)), Mg 在

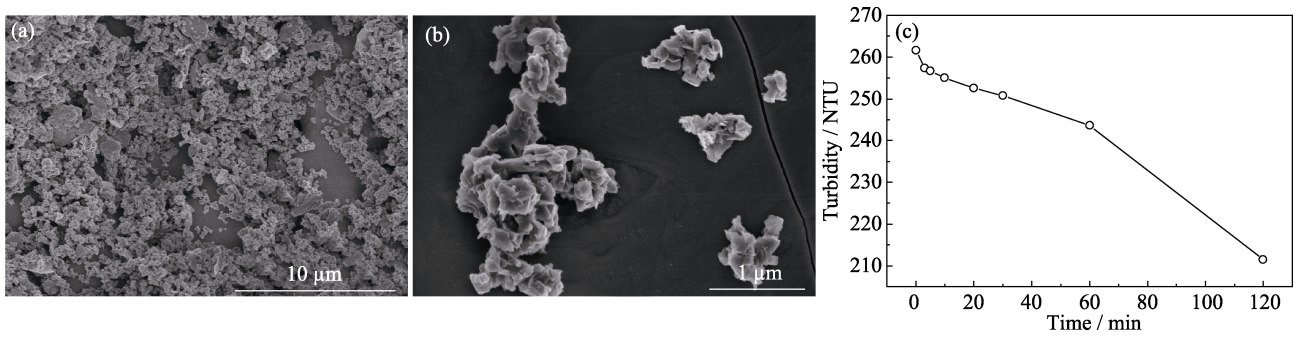


图 1 (a, b) 纳米 MgO 的低、高倍 SEM 形貌及(c)纳米 MgO/丙酮悬浊液浊度随时间的变化曲线
 Fig. 1 (a, b) Low and high-power SEM images of nano-MgO powder used and (c) variation of turbidity of nano-MgO/acetone suspension with time

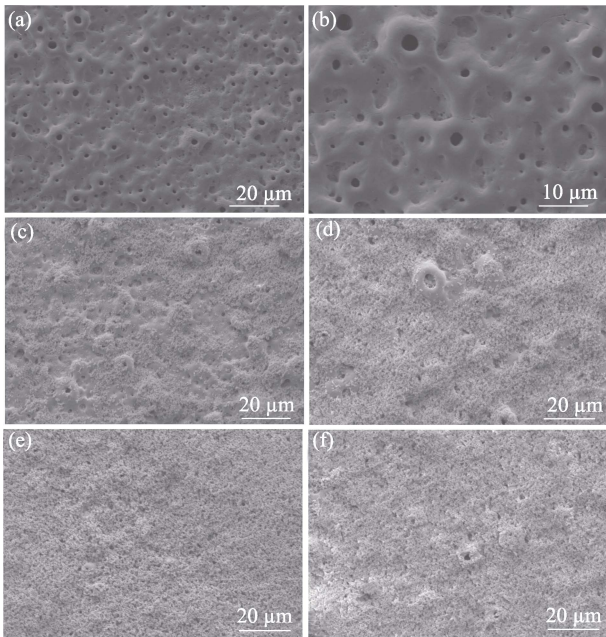


图 2 样品的 SEM 表面形貌
 Fig. 2 SEM images of samples MAO at low (a) and high (b) magnification ratios; (c) MAO-MgO15; (d) MAO-MgO30; (e) MAO-MgO45; (f) MAO-MgO60

过渡区中出现层状连续的特征 X 射线信号, 显示其为 MgO 沉积层。MAO-MgO15、MAO-MgO30、MAO-MgO45 和 MAO-MgO60 的 MgO 厚度分别约为 3、6、

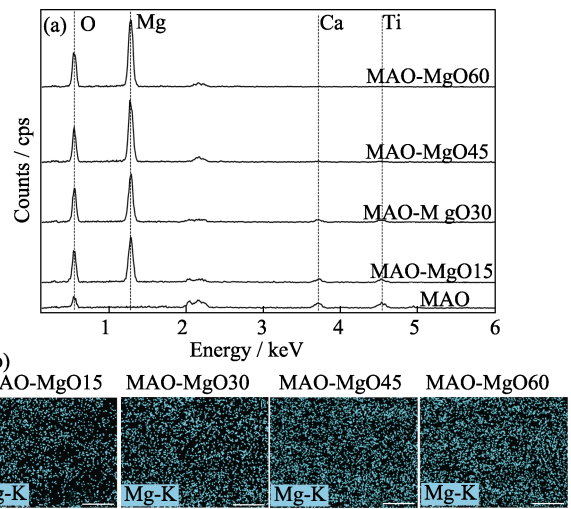


图 3 样品的(a) EDS 谱图和(b) Mg 元素面分布图
 Fig. 3 (a) EDS spectra and (b) Mg mappings of samples All scale bars: 40 μm

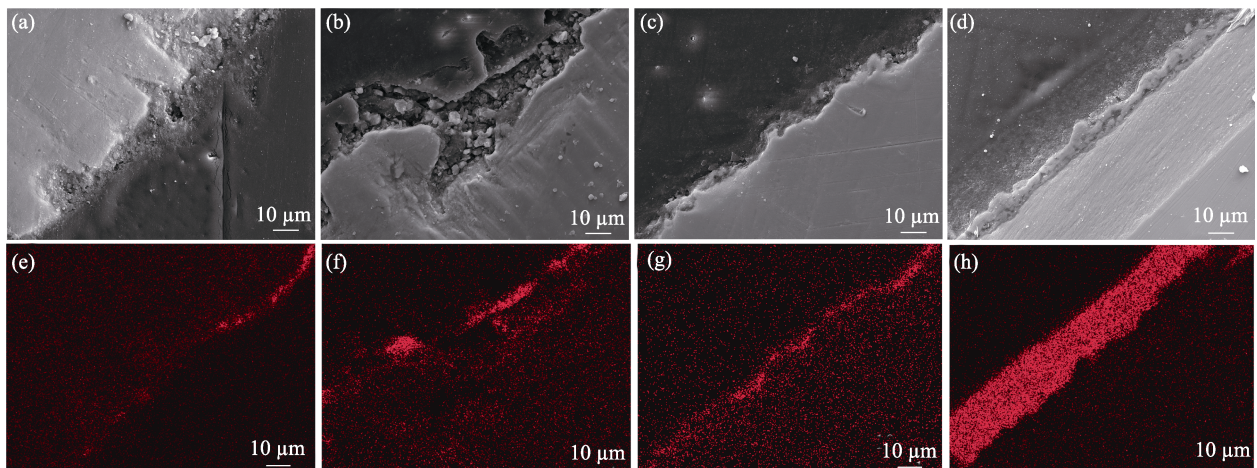


图 4 样品的 SEM 截面形貌和 Mg 元素面分布
 Fig. 4 Sectional SEM images and Mg mappings of samples (a, e) MAO-MgO15; (b, f) MAO-MgO30; (c, g) MAO-MgO45; (d, h) MAO-MgO60

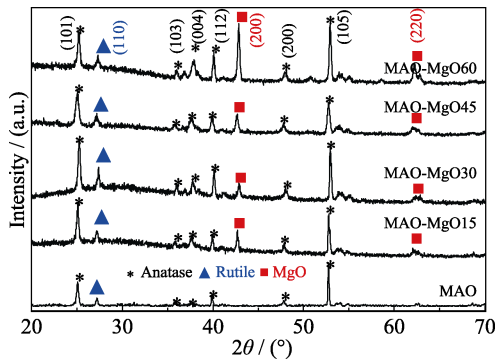


图 5 各组样品 XRD 谱图
Fig. 5 XRD patterns of samples

9、32 μm 。XRD 谱图显示(图 5), MgO 特征峰强度随电泳沉积时间延长而增强, 说明涂层厚度增加。

4 组样品表面 Mg²⁺ 总量分别为 284.9、323.5、698.7、823.3 μg (图 6)。在 PBS 浸泡过程中, Mg²⁺ 均

主要通过溶解的方式释放, MgO 粉末脱落所占比例可忽略。MAO-MgO15、MAO-MgO30 的 Mg²⁺ 在 6 h 内几乎完全释放, 而 MAO-MgO45、MAO-MgO60 则在 3 h 内快速释放, 随后释放速率逐渐降低, 至 36 h 分别释放 99%和 87%的总 Mg²⁺。

2.2 体外抗菌

图 7(a)为各组接种细菌并培养 24 h 后冲洗液稀释涂板形成菌落的典型照片。电泳沉积 MgO 的样品形成菌落数均少于 MAO 样品, 且随电泳时间延长而减少。与金黄色葡萄球菌共培养 6 h 后, 4 组样品抗菌率分别为 1%、69%、83%、84%, 共培养 24 h 后分别为 81%、86%、89%、98%(如图 7(b)所示)。各组抗菌率随培养时间延长而提高, 4 组样品在 24 h 的抗菌率比 6 h 分别提高了 80%、17%、6%、14%。活死

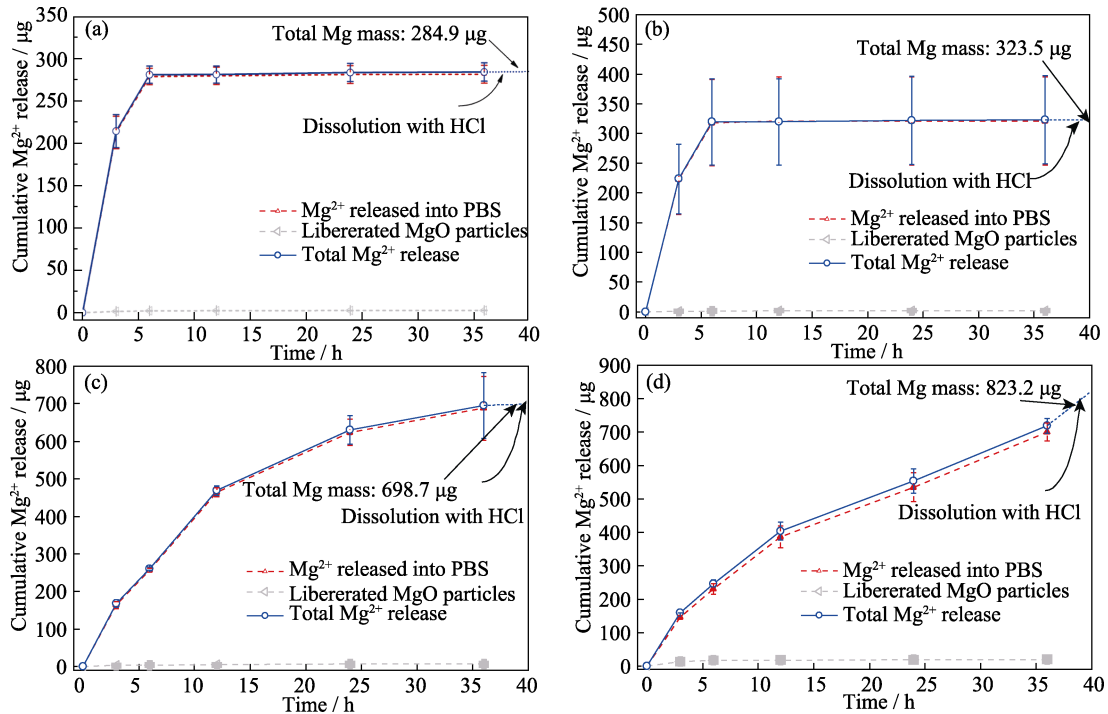


图 6 各组样品镁离子累计释放量

Fig. 6 Cumulative release of Mg²⁺ from samples

(a) MAO-MgO15; (b) MAO-MgO30; (c) MAO-MgO45; (d) MAO-MgO60

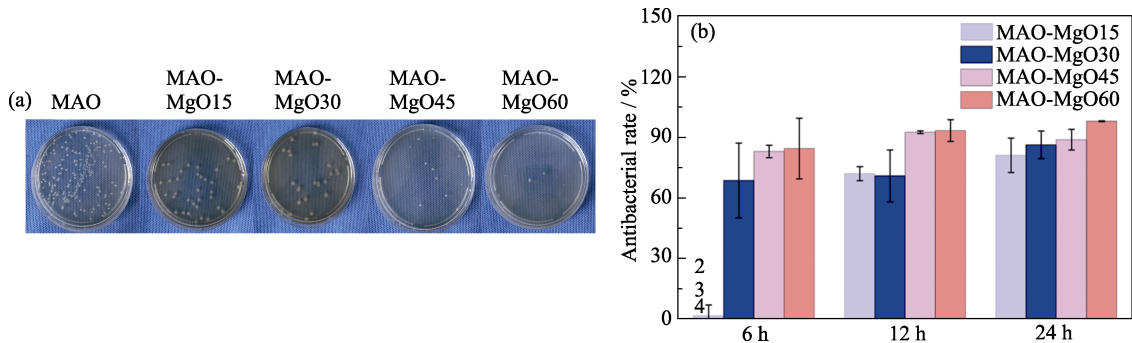


图 7 (a)各组样品与细菌共培养 24 h 后冲洗液涂板形成菌落的典型照片及(b)共培养后的抗菌率

Fig. 7 (a) Representative photographs of colonies formed on samples after co-cultured with *S. aureus* for 24 h, and (b) antibacterial rates Numbers 2, 3 and 4 indicating MAO vs. MAO-MgO30, MAO-MgO45, MAO-MgO60, respectively ($p < 0.05$)

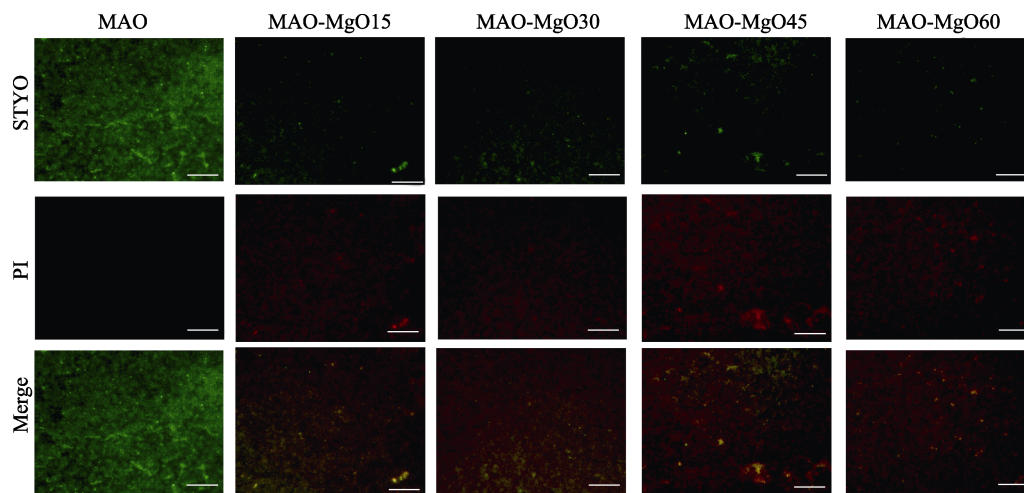


图 8 各组样品与细菌共培养 24 h 并活/死染色后的荧光显微照片

Fig. 8 Micrographs of samples after Live/Dead fluorescent staining on co-cultured *S. aureus* for 24 h
Red pixels: Dead *S. aureus* cells; Green pixels: Alive *S. aureus* cells; All scale bars: 100 μm

染色(图 8)发现 MAO 表面存在大量活细菌(绿色像素), 而未发现死细菌(红色像素)。其余 4 组样品表面死细菌所占面积均远超活细菌, 且活细菌面积随样品中沉积 MgO 颗粒的时间呈减少趋势。SEM 观察发现接种并培养 24 h 后, MAO 组表面覆盖分散大量球状细菌菌落(图 9(a)); 其余 4 组表面细菌数量明显少于 MAO 组, 且随电泳沉积时间延长而减少(图 9(b~e))。各实验组样品表面已无明显可见的纳米 MgO 颗粒, 均露出 MAO 的火山口状微孔形貌。

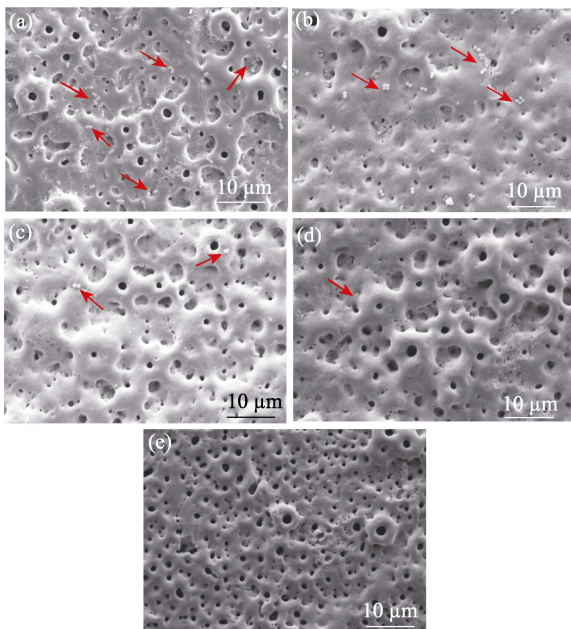


图 9 样品接种细菌培养 24 h 后表面 SEM 形貌

Fig. 9 SEM micrographs of samples

(a) MAO and (b-e) MAO-MgO15 to MAO-MgO60 after co-culture with *S. aureus* for 24 h; Red arrows pointing to *S. aureus* cells

2.3 细胞相容性

各组样品接种小鼠成骨细胞培养 1、3 和 7 d 后,

表面细胞相对存活率随培养时间延长而上升(图 10); 在同一时间点, 存活率随样品沉积 MgO 的时间延长而下降。培养 1 d 后, 4 组样品存活率(相对空白孔板中所接种细胞)分别为 108%、89%、53%、27%, 与 MAO 组比较, MAO-MgO15 的存活率上升 2%, 而 MAO-MgO30、MAO-MgO45、MAO-MgO60 分别下降 17%、53%和 79%, 其中后两组的降低量具有统计学意义。培养 5 d 后, 4 组样品存活率分别为 139%、117%、112%、66%, 与 MAO 组比较, MAO-MgO15、MAO-MgO30、MAO-MgO45、MAO-MgO60 分别下降 25%、47%、52%和 98%, 其中后 3 组的降低具有统计学意义。按照国际标准(ISO 10993.3)的规定, 细胞相对(对对照)存活率 $\geq 70\%$ 视为无细胞毒性。因此, 培养 1 d 时, MAO-MgO15、MAO-MgO30 无细胞毒性; 培养 5 d 时, 仅 MAO-MgO60 尚存细胞毒性(存活率 66%)。活死染色(图 11)结果显示, 培养 5 d 后, 各组样品表面均黏附大量活细胞。其中, MAO、MAO-MgO15 表面仅有极少量死细胞, 而其余 3 组表面死细胞占比均 $<5\%$ 。

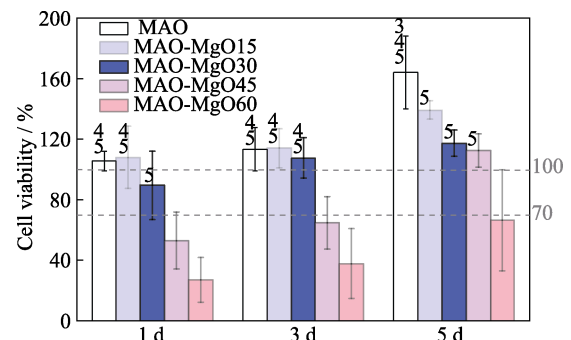


图 10 细胞接种在样品表面培养 1~5 d 后的相对存活率

Fig. 10 Viability of rat osteoblasts after co-culture on samples for 1, 3 and 5 d

Numbers 3, 4 and 5 indicating MAO vs. MAO-MgO30, MAO-MgO45, MAO-MgO60, respectively ($p < 0.05$)

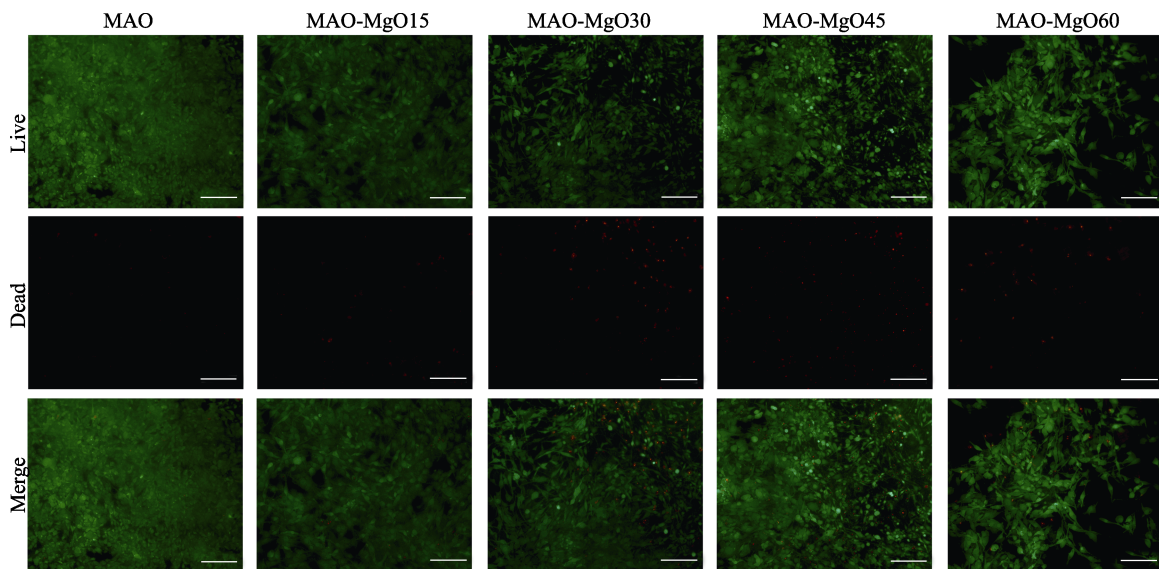


图 11 各组样品与细胞共培养 5 d 并活/死染色后的荧光显微照片

Fig. 11 Images of samples after Live/Dead fluorescent staining on co-cultured rat osteoblasts for 5 d
Red pixels: Dead cells; Green pixels: Alive cells; All scale bars: 100 μm

3 分析讨论

本研究将纳米 MgO 悬浮于丙酮, 通过外加电场成功驱使 MgO 向负极移动、团聚-沉积于 MAO 钛表面。丙酮具有低黏度和高介电常数, 因此纳米 MgO 在丙酮中易发生电泳沉积, 且有利于提高涂层的均匀度^[24]。相较于其他 MgO 涂层制备方法(如溶胶-凝胶、磁控溅射), 电泳沉积技术简单快速, 且适用于复杂形状的基体^[16]。但是, 电泳沉积涂层的内聚力以及与基体的结合力主要为颗粒间的范德瓦尔斯力, 缺乏化学键合^[16]。本研究中利用 MAO 钛表面粗糙多孔结构相对有利于涂层形成机械结合。对于接骨板、多孔钛等内置物^[26-27], 其植入过程中不与周边骨发生强摩擦, 因此对涂层-基体结合性能要求不高。此外, Daghighi 等^[28]提出, 细菌在表面可快速溶蚀的生物材料上难以稳定附着, 且可随表面脱落。本研究中, MgO 涂层发生持续溶解, 其中 MAO-MgO15、MAO-MgO30 在约 6 h 内完全溶解。该溶解能否使部分细菌脱落而减少其附着于钛表面, 尚需进一步研究。

电泳沉积 15~60 s 的样品对金黄色葡萄球菌均具一定抗菌能力, 其中 MAO-MgO60 在 24 h 内抗菌率达 98%。金黄色葡萄球菌为内置物感染首位致病菌^[1], 因此本实验结果具有临床指导意义。MgO 的抗菌机制目前尚未完全确定, 其它研究认为可能包括氧自由基(ROS)产生、pH 升高、直接接触等。Diaz 等^[29]发现 MgO 对革兰氏阴性和阳性菌均有抗菌能力, 并认为其机制可以归于米 MgO 产生 ROS(如超氧阴离子自由基和过氧化氢)并破坏细菌膜脂质。

Tan 等^[30]用磁控溅射在钛表面沉积了 MgO 涂层, 发现其抗菌性随沉积厚度而升高, 提出其抗菌机理可能源于涂层碱性干扰跨膜质子泵从而影响细菌呼吸作用。Leung 等^[31]研究了 3 种纳米 MgO 对大肠杆菌的抗菌机制, 发现其中 2 种样品不产生 ROS 但仍有强抗菌性, 提示抑菌作用可能是由材料导致的细菌膜损伤。本研究中涂层的抗菌机理尚在研究中, 结果将作后续报道。

MgO 涂层的细胞毒性随沉积时间延长而上升, 但随培养时间延长而下降(图 10), 显示细胞毒性与 MgO 的剂量相关。培养后期细胞毒性下降可能与 ROS 释放-湮灭、MgO 溶解等因素有关。已有研究报道 MgO 颗粒对成骨谱系细胞的增殖具有正面或中性作用^[30,32-33]。目前对 MgO 陶瓷块材生物相容性研究相对较少; Janning 等^[34]将 Mg(OH)₂ 植入兔股骨 2~6 w 后发现骨皮质增厚, 未见其它不良反应。亦有大量动物和临床研究探讨了可吸收镁合金的体内外生物相容性^[35-37], 发现镁合金的降解产物仅有氢气和 Mg(OH)₂, 这间接支持了 MgO 涂层的生物相容性。本研究未评价涂层的体内抗菌性能和对成骨性能的影响, 需进一步研究以深入认识其性能。

4 结论

本研究采用电泳沉积法将纳米 MgO 颗粒沉积在微弧氧化钛的表面, 成功制备了均匀的 MgO 涂层。沉积 15~60 s 制备的钛表面 MgO 涂层具有良好的抗菌性和生物相容性。抗菌性和细胞毒性均随沉积时间而提高, 其中沉积 30 s 的样品具有较好的综

合性能。后续工作将研究涂层在动物模型中的抗菌及成骨性能。

参考文献:

- [1] POTAPOVA I. Functional imaging in diagnostic of orthopedic implant-associated infections. *Diagnostics*, 2013, **3(4)**: 356.
- [2] MALIZOS K, BLAUTH M, DANITA A, *et al.* Fast-resorbable antibiotic-loaded hydrogel coating to reduce post-surgical infection after internal osteosynthesis: a multicenter randomized controlled trial. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2017, **18(2)**: 159.
- [3] CAO H, MENG F, LIU X, *et al.* Antimicrobial activity of tantalum oxide coatings decorated with Ag nanoparticles. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 2016, **34(4)**: 04C102.
- [4] OLSEN I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2015, **34(5)**: 877.
- [5] SCHINS R P F, KNAAPEN A M. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhalation Toxicology*, 2007, **19(sup1)**: 189.
- [6] PALACIOS-HERNANDEZ T, DIAZ-DIESTRA DM, NGUYEN A K, *et al.* Cytotoxicity, cellular uptake and apoptotic responses in human coronary artery endothelial cells exposed to ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 2020, **40(7)**: 918.
- [7] WANG Y, YU H, CHEN C, *et al.* Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys. *Materials & Design*, 2015, **8(5)**: 640.
- [8] XUE T, ATTARILAR S, LIU S, *et al.* Surface modification techniques of titanium and its alloys to functionally optimize their biomedical properties: thematic review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, **8**: 603072.
- [9] AL-AHMAD A, WIEDMANN-AL-AHMAD M, FACKLER A, *et al.* *In vivo* study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Archives of Oral Biology*, 2013, **58(9)**: 1139.
- [10] AL-AHMAD A, WIEDMANN-AL-AHMAD M, FAUST J, *et al.* Biofilm formation and composition on different implant materials *in vivo*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2010, **95(1)**: 101.
- [11] CHEN Y, SHENG W, LIN J, *et al.* Magnesium oxide nanoparticle coordinated phosphate-functionalized chitosan injectable hydrogel for osteogenesis and angiogenesis in bone regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, **14(6)**: 7592.
- [12] CHEN R, CHEN H B, XUE P P, *et al.* HA/MgO nanocrystal-based hybrid hydrogel with high mechanical strength and osteoinductive potential for bone reconstruction in diabetic rats. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, **9(4)**: 1107.
- [13] LUQUE-AGUDO V, FERNÁNDEZ-CALDERÓN M C, PACHAOLIVENZA M A, *et al.* The role of magnesium in biomaterials related infections. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, **191**: 110996.
- [14] NGUYEN N Y T, GRELLING N, WETTELAND C L, *et al.* Antimicrobial activities and mechanisms of magnesium oxide nanoparticles (nMgO) against pathogenic bacteria, yeasts, and biofilms. *Scientific Reports*, 2018, **8**: 16260.
- [15] COELHO C C, PADRÃO T, COSTA L, *et al.* The antibacterial and angiogenic effect of magnesium oxide in a hydroxyapatite bone substitute. *Scientific Reports*, 2020, **10**: 19098.
- [16] BOCCACCINI A R, KEIM S, MA R, *et al.* Electrophoretic deposition of biomaterials. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, **7(suppl_5)**: S581.
- [17] BRUCHIEL-SPANIER N, BETSIS S, NAIM G, *et al.* Electrochemical and electrophoretic coatings of medical implants by nanomaterials. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2022, **26(9)**: 1871.
- [18] HICKEY D J, MUTHUSAMY D, WEBSTER T J. Electrophoretic deposition of MgO nanoparticles imparts antibacterial properties to poly-L-lactic acid for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2017, **105(11)**: 3136.
- [19] LIN Y J, LI D Q, WANG G, *et al.* Preparation and bactericidal property of MgO nanoparticles on gamma-Al₂O₃. *Journal Materials Science: Materials in Medicine*, 2005, **16(1)**: 53.
- [20] AL-SHARABI A, SADA'A KSS, AL-OSTA A, *et al.* Structure, optical properties and antimicrobial activities of MgO-BiCrO nanocomposites prepared *via* solvent-deficient method. *Scientific Reports*, 2022, **12**: 10647.
- [21] LI X, HONG X, YANG Y, *et al.* Enhanced antibacterial activity of acid treated MgO nanoparticles on *Escherichia coli*. *RSC Advances*, 2021, **11(60)**: 38202.
- [22] CHEN Q, GARCIA RP, MUNOZ J, *et al.* Cellulose nanocrystals--bioactive glass hybrid coating as bone substitutes by electrophoretic co-deposition: *in situ* control of mineralization of bioactive glass and enhancement of osteoblastic performance. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, **7(44)**: 24715.
- [23] LIU X, XIE Z, ZHANG C, *et al.* Bioactive borate glass scaffolds: *in vitro* and *in vivo* evaluation for use as a drug delivery system in the treatment of bone infection. *Journal Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, **21(2)**: 575.
- [24] HOSSEINBABAEI F, RAISSIDEHKORDI B. Electrophoretic deposition of MgO thick films from an acetone suspension. *Journal of the European Ceramic Society*, 2000, **20(12)**: 2165.
- [25] 董自艳, 戴翠, 马仕洪, 等. 紫外-可见分光光度法快速确定细菌菌液的浓度. 中国药品标准, 2014, **15(2)**: 120.
- [26] KIM D Y, KIM M, KIM H E, *et al.* Formation of hydroxyapatite within porous TiO₂ layer by micro-arc oxidation coupled with electrophoretic deposition. *Acta Biomaterialia*, 2009, **5(6)**: 2196.
- [27] FAN X, FENG B, DI Y, *et al.* Preparation of bioactive TiO film on porous titanium by micro-arc oxidation. *Applied Surface Science*, 2012, **258(19)**: 7584.
- [28] DAGHIGHI S, SJOLLEMA J, VAN DER MEI H C, *et al.* Infection resistance of degradable versus non-degradable biomaterials: an assessment of the potential mechanisms. *Biomaterials*, 2013, **34(33)**: 8013.
- [29] MUÑIZ DIAZ R, CARDOSO-AVILA P E, PÉREZ TAVARES J A, *et al.* Two-step triethylamine-based synthesis of MgO nanoparticles and their antibacterial effect against pathogenic bacteria. *Nanomaterials*, 2021, **11(2)**: 410.
- [30] TAN J, LIU Z, WANG D, *et al.* A facile and universal strategy to endow implant materials with antibacterial ability *via* alkalinity disturbing bacterial respiration. *Biomaterials Science*, 2020, **8(7)**: 1815.
- [31] LEUNG Y H, NG A M C, XU X, *et al.* Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small*, 2014, **10(6)**: 1171.
- [32] RICKER A, LIU-SNYDER P, WEBSTER T J. The influence of nano MgO and BaSO₄ particle size additives on properties of PMMA bone cement. *International Journal of Nanomedicine*, 2008, **3(1)**: 125.
- [33] DEMIREL M. Mechanical properties and cell viability of MgO-reinforced biografts fabricated for biomedical applications. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 2018, **20(4)**: 83.
- [34] JANNING C, WILLBOLD E, VOGT C, *et al.* Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6(5)**: 1861.
- [35] AGARWAL S, CURTIN J, DUFFY B, *et al.* Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: a review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, **68**: 948.
- [36] ZHU B, WANG L, WU Y, *et al.* Improving corrosion resistance and biocompatibility of AZ31 magnesium alloy by ultrasonic cold forging and micro-arc oxidation. *Journal of Biomaterials Applications*, 2022, **36(9)**: 1664.
- [37] ZHUANG J, JING Y, WANG Y, *et al.* Degraded and osteogenic properties of coated magnesium alloy AZ31: an experimental study. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2016, **11(1)**: 1.