

钛表面电化学沉积氢氧化镁与氧化镁涂层的抗菌性能与生物活性

杜佳恒^{1,2}, 范鑫丽³, 肖东琴², 刘刚利³, 尹一然¹, 贺 葵¹, 闫吉元¹, 李 忠¹, 谭言飞⁴, 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, 四川 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, 四川 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, 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; 4. 四川大学, 生物材料工程研究中心, 成都 610065)

摘 要: 骨科植入物相关感染已严重影响手术效果及术后康复, 因此需研究具备良好抗菌性能及生物活性的涂层。首先确定电化学沉积氢氧化镁[Mg(OH)₂]及氧化镁(MgO)涂层的制备条件, 在钛表面沉积不同时间的 Mg(OH)₂ 及 MgO 涂层, 评价并比较 2 种涂层的体外抗菌及生物相容性。各组样品表面均匀分布颗粒样物质[Mg(OH)₂ 及 MgO], 颗粒密度与覆盖率随沉积时间增加。Mg(OH)₂ 及 MgO 涂层对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌均具良好抗菌性且抗菌率随沉积时间增强。沉积 ≤ 3 h, MgO 抑菌率显著高于 Mg(OH)₂; 沉积 ≥ 6 h, 两者抑菌率均接近 100%。Mg(OH)₂ 及 MgO 涂层细胞毒性随沉积时间上升, 其中沉积 0.5、1.0 h 的 2 组样品毒性随培养时间下降, 其余 3 组随培养时间上升。沉积 0.5 h 的 Mg(OH)₂ 及 MgO 样品与细胞共培养 5 d 时的细胞存活率为 152%、90%; 沉积 12 h 的 2 组样品与细胞共培养 5 d 时细胞存活率为 2%、6%。研究表明电化学沉积法可成功制备 Mg(OH)₂ 涂层, 且煅烧后可获得 MgO 涂层。沉积 1 h 的 Mg(OH)₂ 及 MgO 涂层样品具备良好抗菌性能的同时细胞毒性较小。

关键词: 骨科植入物; 抗菌; 电化学沉积; 氢氧化镁; 氧化镁; 生物相容性

中图分类号: R318.08 文献标志码: A 文章编号: 0454-5648(2024)05-1570-08

网络出版时间: 2024-02-23



金属骨内植入物术后感染是临床严重并发症之一。Tande 等^[1]报道, 初次髋、膝关节置换术后 1~10 a 的累积感染率为 0.5%~1.4%。已有大量研究报道在金属植入物表面制备抗菌涂层以降低感染率, 如负载金属离子及抗生素涂层等。Sobolev 等^[2]用等离子体阳极氧化在钛合金表面制备含银的氧化钛涂层; 当银离子浓度为 0.1 g/L 时, 涂层与金黄色葡萄球菌及大肠杆菌共培养 20 h 后抗菌率接近 100%。Tsikopoulos 等^[3]在钛表面喷涂载万古霉素的聚合物涂层, 发现其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌体外抑菌率为 80%。但银等重金属会引起肝功能损伤和线粒体呼吸障碍的风险^[4]。抗生素不当使用则可能导致耐药等不良反应^[5]。因此, 需研发无上述毒副作用的抗菌涂层。

镁是人体常量元素之一, 成年人含镁 ~ 25 g, 人体细胞外液中镁含量约 0.75~1.25 mmol/L。研究报道, 部分镁化合物具备一定生物安全性和抗菌性。

Yu 等^[6]用溶胶-凝胶法在钛表面制备 MgO 薄膜, 发现其促进 MC3T3-E1 细胞增殖。Hickey 等^[7]用电泳沉积法在聚左旋乳酸表面制备纳米 MgO 涂层, 发现涂层促进体外培养的人成骨细胞增殖。Nygren 等^[8]在大鼠胫骨髓腔植入 MgO 块材, 3 周后发现胫骨皮质骨厚度增加 25%。Janning 等^[9]将 Mg(OH)₂ 棒材植入兔股骨 2~6 周, 发现 Mg(OH)₂ 未导致任何不良反应且促进骨皮质增厚。Peng 等^[10]用静电纺丝技术制备复合 MgO 的聚己内酯种植体, 发现与对照组比, 复合种植体具有更好的亲水性、生物相容性和人牙周韧带干细胞增殖率。

收稿日期: 2023-07-25。 修订日期: 2023-09-05。

基金项目: 四川省科技计划(2020YFS0455, 2022YFS0628); 泸州市-西南医科大学合作项目(2020LZXNYDZ08, 2020LZXNYD F02); 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)。

第一作者: 杜佳恒(1997—), 男, 硕士研究生。

通信作者: 肖东琴(1986—), 女, 博士, 副研究员;

段 可(1973—), 男, 博士, 教授。

Received date: 2023-07-25. Revised date: 2023-09-05.

First author: DU Jiaheng (1997—), male, Master candidate.

E-mail: dujiaheng1011@163.com

Correspondent author: XIAO Dongqin (1986—), female, Ph.D., Associate Professor.

DUAN Ke (1973—), male, Ph.D., Professor.

E-mail: xiaodongqin@nsmc.edu.cn; keduan@swmu.edu.cn

Zhu 等^[11]研究纳米 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 颗粒对大肠杆菌的抗菌性, 发现其最低抑菌浓度为 $4.4 \mu\text{g/mL}$ 。Wang 等向牙科树脂中加入 MgO 颗粒, 发现含 7.5% (质量分数) MgO 的样品对变形链球菌的抗菌性能最佳^[12]。Okamoto 等制备了 3 种不同粒径的纳米 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 颗粒, 通过体外抗菌实验发现其均能有效抑制细菌生物膜形成^[13]。Cho 等^[14]报道, 水镁石[三方晶型 $\text{Mg}(\text{OH})_2$]对金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌均具有强抗菌活性。

电化学沉积是一种通过电场作用从金属或合金化学物水溶液中在电极表面沉积生成涂层的技术。该技术具备: 1) 低成本, 2) 快速制备, 3) 可在复杂形状表面制备涂层, 4) 可制备从纳米至微米的结构特征等优点^[15]。

目前, 尚无研究通过电化学沉积法在钛表面制备 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层。本研究通过电化学沉积在钛表面制备 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 涂层, 并煅烧成为 MgO 涂层。通过评价并比较两者体外抗菌及生物相容性, 以期降低临床植入物相关感染提供一种新方法。

1 实验

1.1 仪器与试剂

丹东通达仪器公司 TD-3500 X 射线衍射仪(XRD, $\text{Cu K}\alpha$, 40 kV, 20 mA)、北京中科科仪 KYKY-EM6900 扫描电子显微镜(SEM)、Bruker 公司的 1048 能谱仪、pH 计(芯硅谷, W6267)。本研究中所用化学试剂均为商业购买且直接使用。

1.2 钛片制备

纯钛板切割成 $4 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的片状样品后用碳化硅砂纸打磨至 1200 目。置入含 3% HF 、5% HNO_3 混合酸中 1 min 后去离子水冲洗并超声清洗 15 min, 烘干备用。

1.3 电化学沉积参数确定

配制含 0.15 mol/L NaCl 和 0.1~0.5 mol/L MgCl_2 的系列混合溶液。取 50 mL 上述溶液, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定至沉淀产生并立即记录 pH 值。将含 0.15 mol/L NaCl 与 0.1 mol/L MgCl_2 的混合溶液在电极电势区间-0.4~-1.8 V 进行线性伏安扫描(Gamry Reference 3000 电化学工作站; 参比电极: 饱和甘汞), 获得电势-电流曲线。在曲线平台期区间选取多点电极电位值, 测量不同电势值对应的电压。

1.4 涂层制备

配置 500 mL 含 0.1 mol/L MgCl_2 与 0.15 mol/L

NaCl 的混合溶液, 用 0.5 mol/L NaOH 滴定 pH 值至 9.5。以钛片为阴极, 铂片为阳极。两端施加 3.0 V 直流电压, 沉积不同时间并标记, 去离子水冲洗并烘干。将样品切割成 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$, 置入马弗炉煅烧(2°C/min 升温至 650°C , 6 h)。

1.5 涂层表征

样品用 XRD 分析物相, SEM 分析表面形貌并用所配 EDS 分析表面元素组成。将各组样品浸泡于 3 mL PBS 中 1~5 d 后用 pH 计检测其 pH 值变化。将各组样品浸泡于 3 mL PBS 中 24 h 后用超氧阴离子自由基检测试剂盒检测溶液中超氧阴离子浓度。

1.6 体外抗菌

按 ISO 22196—2011 标准评价各组样品体外抗菌性能。将菌液复苏, 稀释至 $1 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$ (*S. aureus* $OD \approx 0.14$; *E. coli* $OD \approx 0.08$; cfu 为菌落形成单位)^[16], 并 1:10 逐级稀释至 $1 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$ 备用。将各组样品干热灭菌(200°C , 60 min)后置入 24 孔板。每孔加入 300 μL 菌液, 置入恒温培养箱(37°C)孵育 24 h。每孔加入 2.7 mL 磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L, pH 值为 7.2~7.4; PBS)冲洗并转移至离心管中, 将上述冲洗液 1:10 逐级稀释 10^6 倍后取 150 μL 滴至琼脂平板中, 孵育(37°C , 12 h)后拍照分析菌落数, 用下式换算为抗菌率。每组均为 3 个平行样。

$$\text{抗菌率} = (\text{对照组平均回收菌落数} - \text{样品组平均回收菌落数}) / \text{对照组平均回收菌落数} \quad (1)$$

1.7 细胞毒性

将样品干热灭菌后置入 24 孔板内(对照组为无样品细胞悬液, 空白组为完全培养基), 每孔加 1 mL 小鼠成骨细胞悬液(OB-6; 5000 cell/mL)后置入细胞培养箱中(5% CO_2 , 37°C)孵育 1、3 d 或 5 d。培养完成后每孔加 100 μL CCK-8 试剂并再次孵育 2 h 后取 200 μL 混悬液至 96 孔板, 用酶标仪测量 450 nm 处吸光度, 并用下式换算为相对细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (\text{样品组吸光度} - \text{空白组吸光度}) / (\text{对照组吸光度} - \text{空白组吸光度}) \quad (2)$$

1.8 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 结果与讨论

2.1 沉淀边界曲线及线性扫描伏安曲线

滴定发现, 沉淀产生时的 pH 值随 MgCl_2 浓度增加而略有降低(见图 1), 形成沉淀边界曲线。观察发现, 当溶液条件距边界曲线过近, 则趋于自发沉

淀; 如当溶液 pH 值距边界曲线差值 <0.2 时, 在 1 h 内发生自发沉淀。反之, 当溶液条件距边界曲线过远(如 pH 差值 >2.0), 溶液不自发沉淀, 但难以形成电化学沉积涂层。因此, 本研究选择溶液条件为 0.10 M MgCl_2 , pH 值距边界条件差值=1.00 (即 pH=9.50)。线性扫描伏安曲线在约 -1.20 V 出现电流上升, 对应氢离子的还原; 在 -1.33~ -1.62 V 区间, 达到一稳定平台(见图 2a), 对应氢离子还原达到扩散控制。该平台对应的电压为 2.70~3.00 V (见图 2b), 因此本研究选择 3.00 V 为两电极沉积模式的工作电压。实验发现, 上述条件能有效形成电化学涂层。

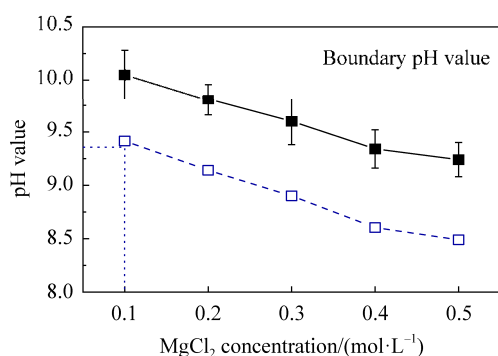
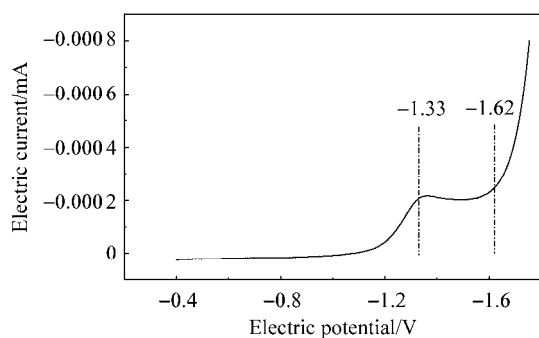
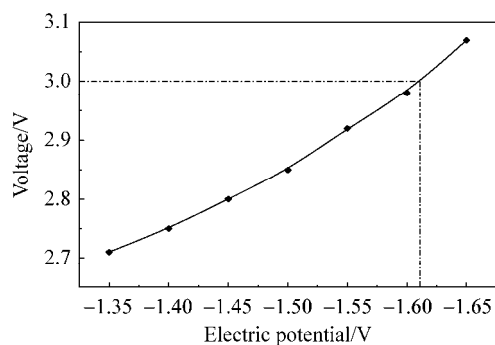


图 1 MgCl_2 溶液滴定-边界曲线

Fig. 1 MgCl_2 solution titration-boundary curves



(a) Solution potential-current curve



(b) Solution potential-voltage curve

图 2 0.1 mol/L MgCl_2 溶液线性伏安扫描曲线

Fig. 2 Linear voltammetric scanning curve of 0.1 mol/L MgCl_2 solution

2.2 样品物相、形貌和成分

XRD 显示, 沉积 12 h 的样品出现 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 的特征衍射峰; 该样品煅烧后, 出现 MgO 的特征衍射峰(见图 3), 提示成功制备 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层。SEM 观察发现, 电化学沉积的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及煅烧后的 MgO 涂层覆盖率随沉积时间增加(见图 4), 沉积 12 h 后颗粒完全覆盖钛表面。沉积 0.5 h 样品煅烧后由丝状转变为气泡状分布于表面; 沉积 1 h 和沉积 3 h 煅烧后形态无明显变化, 均为叶片状(沉积 3 h 样品表面存在未洗净 NaCl 颗粒); 沉积 12 h 后的样品 E 为细小颗粒状均匀分布于表面, 煅烧后的 MgO 转变为丝状排列。EDS 分析在各组样品均检出氧、镁、钛的特征峰, 氧和镁的相对峰强随沉积时间增加, 钛则随沉积时间降低(见图 5), 表明 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层厚度随时间增加。各组样品浸泡于 PBS 中 1、3 d 或 5 d 后 pH 变化未见明显差异(见图 6), 可能与 PBS 本身的缓冲能力有关。

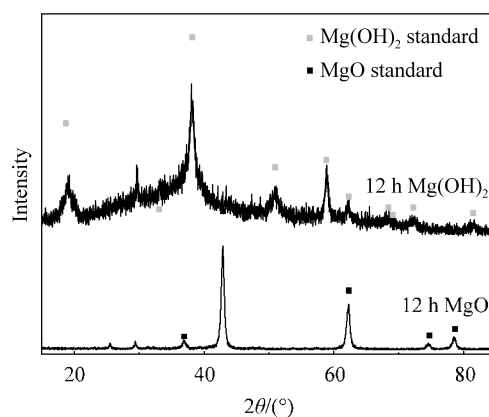


图 3 沉积 12 h $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 样品 XRD 谱

Fig. 3 XRD patterns of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ and MgO samples deposited at 12 h

超氧阴离子试剂盒与 MgO 涂层浸提液反应产生了微弱(肉眼恰可见)的黄色, 而试剂盒与 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 和空白 PBS 涂层的浸提液反应后均无可见变色(无色透明)。3 组的吸光度分别为 0.035、0.027、0.037(MgO), 0、0、0 [$\text{Mg}(\text{OH})_2$], 0、0、0 (PBS)。但是, 该吸光度值低于试剂盒的测定下限, 因此无法计算其超氧阴离子浓度。

2.3 体外抗菌

图 7 为各组样品表面接种细菌并培养 24 h 后冲洗液涂板形成菌落的典型照片, 可见菌落数随沉积时间延长而减少。金黄色葡萄球菌菌落计数发现, 和纯钛相比, 沉积 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 涂层 0.5、1.0、3.0、6.0、12.0 h 的样品的菌落数分别减少 33%、53%、74%、

95%、98%，其中除沉积 6 h 和 12 h 的样品间的差异均具统计学意义。沉积 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 涂层 0.5、1.0、3.0、6.0、12.0 h 并煅烧处理的样品的菌落数分别减少 53%、79%、92%、98%、99%(见图 8)，其中除沉积 3、6 h 和 12 h 样品间的差异均具统计学意义。大肠杆菌菌落计数发现，和纯钛相比，沉积 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 涂层 0.5、1.0、3.0、6.0、12.0 h 的样品的菌落数分别减少 23%、50%、75%、86%、99%，各组间差异均具统计学意义。沉积 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 涂层 0.5、1.0、3.0、6.0、12.0 h 并煅烧处理的样品的菌落数分别减少 28%、71%、89%、98%、99%，其中除沉积 6 h 和 12 h 样品间差异均具统计学意义。

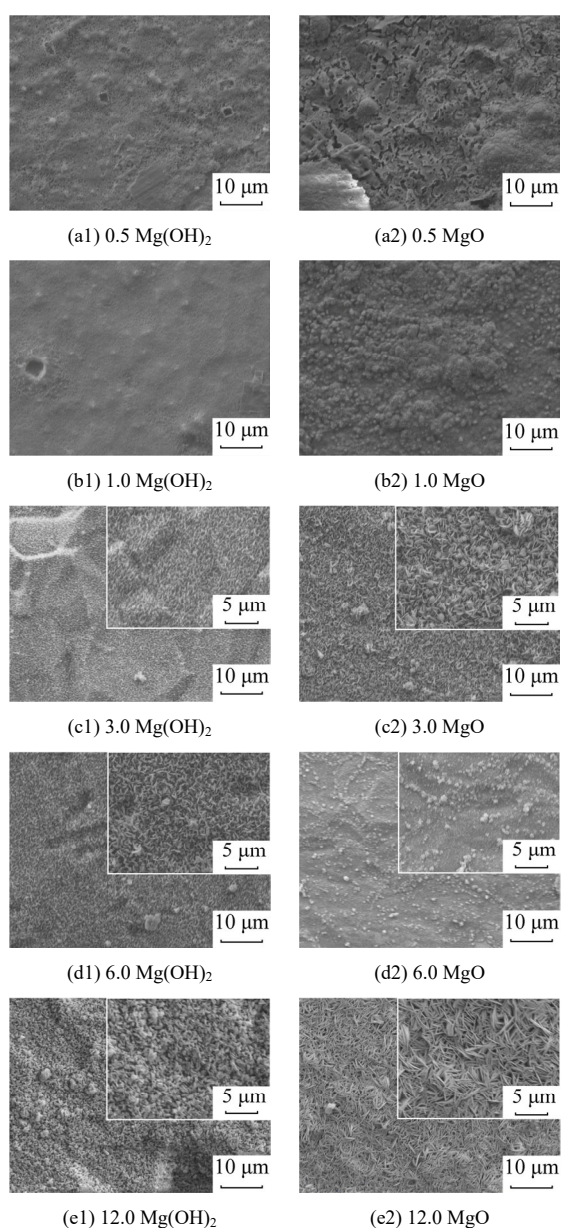
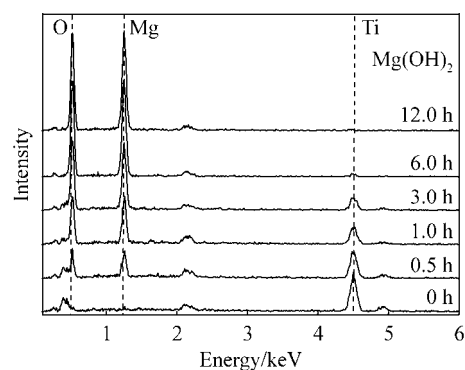
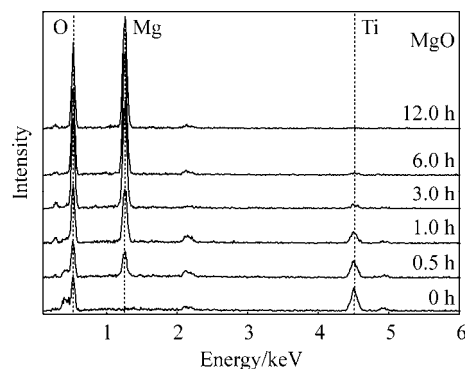


图 4 各组样品 SEM 表面形貌
Fig. 4 Surface topographies of samples in each group



(a) EDS spectrum of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ samples



(b) EDS spectrum of MgO samples

图 5 各组样品 EDS 谱

Fig. 5 EDS profiles of samples in each group

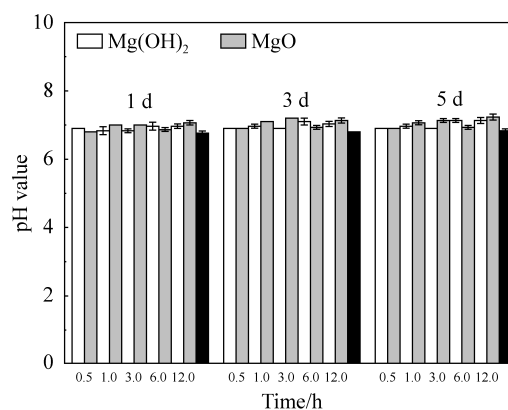


图 6 各组样品浸泡于 PBS 中 1~5 d 后的 pH 值变化

Fig. 6 pH values of each group after soaking in PBS for 1~5 d

$\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层对 2 种细菌的抑菌率均随沉积时间增加(见图 9)。对金黄色葡萄球菌，当沉积 ≤ 3 h， MgO 涂层抑菌率显著高于 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ；当沉积 > 6 h，2 组对金黄色葡萄球菌的抑菌率均接近 100%，2 组间差异无统计学意义。对大肠杆菌，当沉积 ≤ 6 h， MgO 抑菌率显著高于 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ；沉积 12 h 时，两者对大肠杆菌的抑菌率均接近 100%。

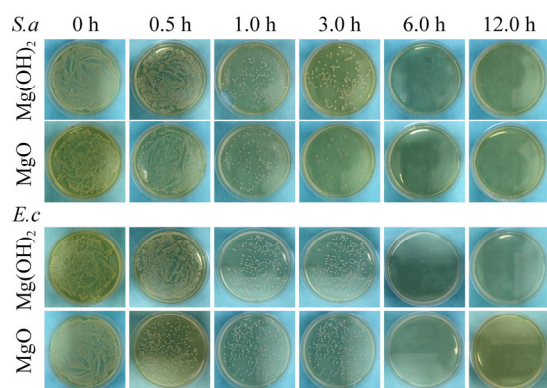
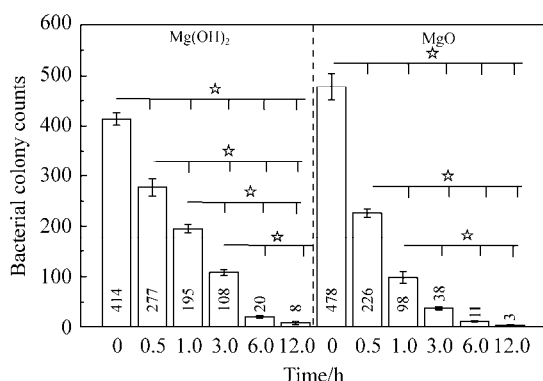
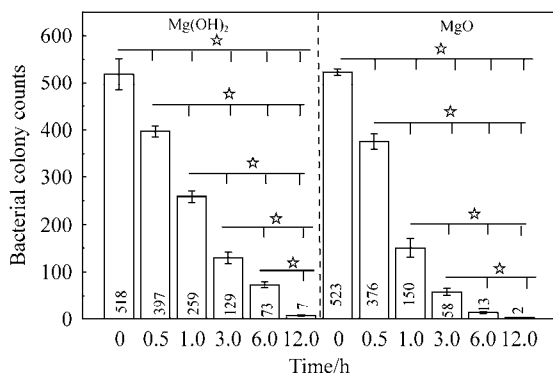


图7 各组样品与金黄色葡萄球菌及大肠杆菌稀释涂板后琼脂照片

Fig. 7 Agar photos of each group of samples diluted with *S. aureus* and *E. coli*



(a) Colony count statistics of diluted washing liquid coated plate after co-culture samples of each group with *S. aureus*



(b) Colony count statistics of diluted washing liquid coated plate after co-culture samples of each group with *E. coli*

☆: $p < 0.05$.

图8 各组样品与金黄色葡萄球菌及大肠杆菌共培养 24 h 后冲洗液稀释涂板菌落数统计

Fig. 8 Colony count statistics of diluted washing liquid coated plate after co-culture samples of each group with *S. aureus* and *E. coli* for 24 h

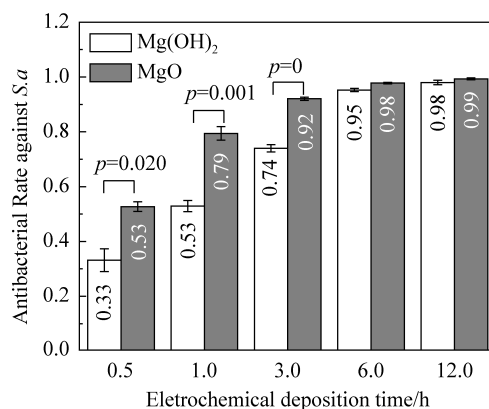
2.4 细胞毒性

按 ISO 10993.5 标准, 细胞相对存活率 $\geq 70\%$ 则无细胞毒性。各组样品与细胞共培养 1~5 d, 细胞

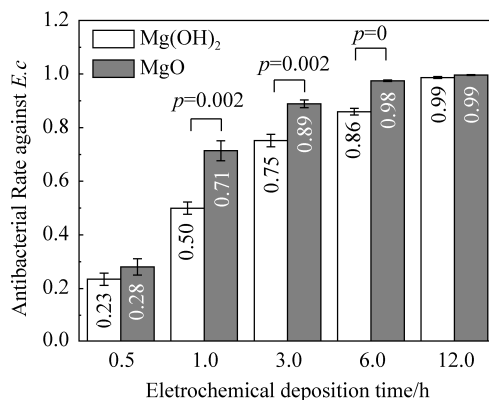
相对存活率随沉积时间下降(见图 10)。沉积 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 0.5 h 的样品在整个实验周期无毒性, 且细胞存活率随培养时间增加, 而沉积 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 1 h 的样品在 1 d 具微量毒性(相对存活率 38%), 但随培养时间降低, 至 5 d 细胞相对存活率超过 90%。

沉积 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 0.5 h 并煅烧处理的样品 1 d 具微量毒性(相对存活率 56%), 但随培养时间延长细胞存活率上升(5 d 细胞相对存活率达 90%)。而沉积 $\text{Mg}(\text{OH})_2 \geq 3$ h 并煅烧处理的样品在整个实验周期均具细胞毒性。

沉积并煅烧处理 3 h 的 MgO 涂层样品毒性显著低于 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 涂层, 沉积 0.5 h 的样品与细胞共培养 1~5 d 后细胞相对存活率为 72%~152%; 而沉积 0.5 h 并煅烧的样品与细胞共培养 1~5 d 后细胞相对存活率为 56%~90%。1 d 时, 沉积 3 h 及以上的 2 种样品间差异具统计学意义。3 d 时, 沉积 6 h 及以上的两种样品间差异具统计学意义。5 d 时, 沉积 3、12 h 的 2 种样品间差异具统计学意义。

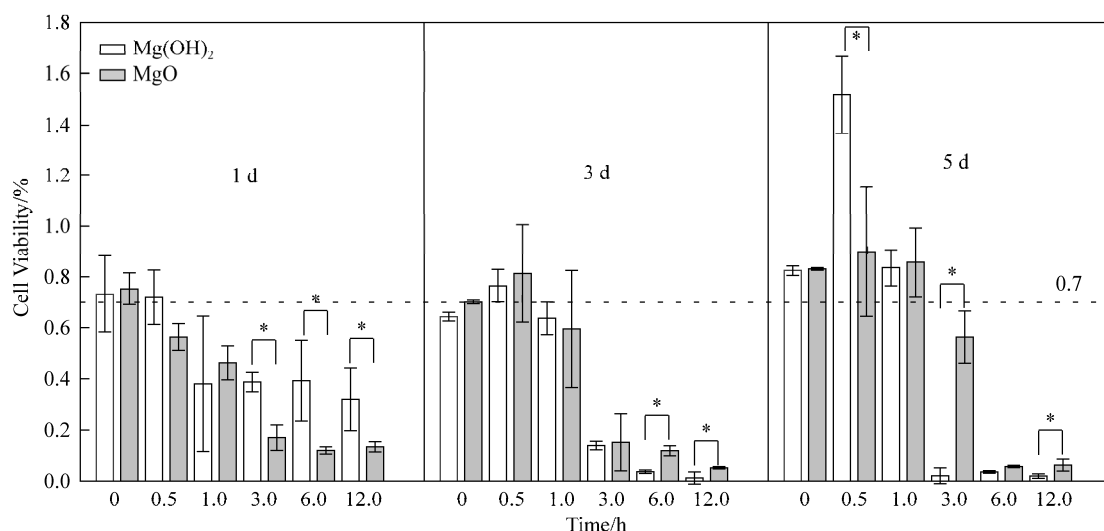


(a) Antibacterial rate of each group of samples against *S. aureus*



(b) Antibacterial rate of each group of samples against *E. coli*

图9 各组样品对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的抗菌率
Fig. 9 Antibacterial rate of each group of samples against *S. aureus* and *E. coli*



*: $p < 0.05$.

图 10 各组样品与小鼠成骨细胞共培养 1、3、或 5 d 后细胞存活率

Fig. 10 Cell survival after 1, 3, or 5 d of co-culture of samples from each group with mouse osteoblasts

2.5 讨论

在钛表面通过电化学沉积法制备 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 涂层, 煅烧后成功获得 MgO 涂层。比较了电化学沉积法制备的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 和 MgO 涂层的抗菌性与细胞毒性, 发现沉积相同时间的 MgO 涂层抗菌性能及细胞毒性均较 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 涂层强。

沉积一定时间制备的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层具良好抗菌性能($\text{MgO} \geq 1 \text{ h}$; $\text{Mg}(\text{OH})_2 \geq 3 \text{ h}$) (见图 9)。沉积 $\leq 6 \text{ h}$ 时, MgO 对 2 种细菌抗菌性显著优于 $\text{Mg}(\text{OH})_2$; $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -12h 及 MgO -12h 对两种细菌抗菌率均接近 100%。 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -0.5h 在整个实验周期均无细胞毒性 (见图 10), 而 MgO -0.5h 在 1 d 时具微量毒性, 但随培养时间延长毒性下降。在整个实验周期中, 沉积 $\geq 3 \text{ h}$ 的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层均具细胞毒性 (细胞存活率 $\leq 70\%$) 且随培养时间上升。

已有一些文献报道 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 的抗菌机制可能与 pH 值升高、ROS、粒子吸附等有关。Pan 等^[17]通过 3 种不同前体合成纳米 $\text{Mg}(\text{OH})_2$, 体外抗菌实验发现纳米 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 对大肠杆菌的抗菌率随浓度而增加, 并认为其抗菌机制可能与直接接触和表面电荷有关。Nakamura 等^[18]研究了 3 种不同粒径的纳米 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 颗粒, 发现其对 *E.c* 的杀菌机制可能为物理接触导致细胞损伤。Diaz 等^[19]研究发现纳米 MgO 对革兰氏阴、阳性菌均具有良好抗菌性能, 推测其机制可能为纳米 MgO 可产生 ROS 并破坏细菌膜脂质, 从而杀死细菌。Tan 等^[20]在钛表面磁控溅射制备 MgO 涂层, 抗菌率随沉积厚度提升, 猜测其抗菌机制跨膜质子泵干扰导致细菌死亡。本研究

中抗菌结果与上述研究基本一致, 抗菌性能与 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 可能存在一定量效关系。研究报道 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 通过改变 pH 值杀菌^[17], 而 MgO 的杀菌机制除改变 pH 值外还可形成氧自由基破坏细菌膜结构等行为^[18]。但是, Yu 等^[21]制备了 3 种不同的 MgO 纳米颗粒样品, 并发现在无 ROS 产生的情况下两种样品对大肠杆菌具有良好抗菌性。蛋白质组学数据表明无氧化应激, 并表明细胞死亡的主要机制与细胞膜损伤有关, 似乎不是由于脂质过氧化引起的。本研究将涂层样品浸泡于 PBS 中 24 h 后用超氧阴离子自由基试剂盒检测, 但未能检出超氧阴离子。 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层的抗菌机制仍在研究中, 结果将后续报道。

目前已有一些研究报道 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层具有良好生物相容性。He 等^[22]通过水热法在钛表面制备纳米片状 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 薄膜, 与骨髓来源巨噬细胞体外培养, 发现该涂层有利于巨噬细胞极化、诱发温和的早期炎症, 促进骨愈合。Go 等^[23]用大鼠胫骨缺损模型, 评估了 PLGA/ β -TCP/ $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米复合材料, 发现该材料成功提高骨再生速率, 促进骨缺损愈合。同时, 本研究中涂层产生细胞毒性可能与 pH 值升高及 ROS 释放有关, 沉积时间较长组 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 含量较多, 两者协同作用于细胞导致其存活率降低。因此, 细胞毒性可能与 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 存在一定量效关系。

本工作中制备的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 及 MgO 涂层未涉及体内抗菌、抗菌机制及成骨性能的研究, 需进一步探究以深入了解 2 种涂层的性能。

3 结论

Mg(OH)₂ 及 MgO 涂层的表面形貌及厚度均随沉积时间延长而变化, 同时涂层的细胞毒性和抗菌率均随沉积时间延长而增强, 推测两者均与涂层存在量效关系。本工作中 Mg(OH)₂ 及 MgO 涂层具备强抗菌性能同时细胞毒性也较强的缺点。因此后续工作将研究如何保持该涂层的强抗菌性的同时降低其细胞毒性, 及其研究涂层在动物模型内的体内抗菌性能、机制及成骨性能。

参考文献:

- [1] TANDE A J, PATEL R. Prosthetic joint infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(2): 302–345.
- [2] SOBOLEV A, VALKOV A, KOSSENKO A, et al. Bioactive coating on Ti alloy with high osseointegration and antibacterial Ag nanoparticles[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(43): 39534–39544.
- [3] TSIKOPOULOS K, MERONI G, KALOUDIS P, et al. Is nanomaterial- and vancomycin-loaded polymer coating effective at preventing methicillin-resistant Staphylococcus aureus growth on titanium disks? An *in vitro* study[J]. Int Orthop, 2023, 47(6): 1415–1422.
- [4] AMEH T, SAYES C M. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2019, 71: 103220.
- [5] OLSEN I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(5): 877–886.
- [6] YU S Z, LI Z H, HAN L W, et al. Biocompatible MgO film on titanium substrate prepared by sol–gel method[J]. Rare Met Mater Eng, 2018, 47(9): 2663–2667.
- [7] HICKEY D J, MUTHUSAMY D, WEBSTER T J. Electrophoretic deposition of MgO nanoparticles imparts antibacterial properties to poly-L-lactic acid for orthopedic applications[J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105(11): 3136–3147.
- [8] NYGREN H, CHAUDHRY M, GUSTAFSSON S, et al. Increase of compact bone thickness in rat tibia after implanting MgO into the bone marrow cavity[J]. J Funct Biomater, 2014, 5(3): 158–166.
- [9] JANNING C, WILLBOLD E, VOGT C, et al. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling[J]. Acta Biomater, 2010, 6(5): 1861–1868.
- [10] PENG W Z, REN S S, ZHANG Y B, et al. MgO nanoparticles-incorporated PCL/gelatin-derived coaxial electrospinning nanocellulose membranes for periodontal tissue regeneration[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 668428.
- [11] ZHU Y, TANG Y F, RUAN Z, et al. Mg(OH)₂ nanoparticles enhance the antibacterial activities of macrophages by activating the reactive oxygen species[J]. J Biomed Mater Res, 2021, 109(11): 2369–2380.
- [12] WANG Y, WU Z Y, WANG T, et al. Antibacterial and physical properties of resin cements containing MgO nanoparticles[J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2023, 142: 105815.
- [13] OKAMOTO K, KUDO D, PHUONG D N D, et al. Magnesium hydroxide nanoparticles inhibit the biofilm formation of cariogenic microorganisms[J]. Nanomaterials, 2023, 13(5): 864.
- [14] CHO N, LEE B, CHOI S, et al. Brucite shows antibacterial activity via establishment of alkaline conditions[J]. RSC Adv, 2021, 11(29): 18003–18008.
- [15] GURRAPP A I, BINDER L. Electrodeposition of nanostructured coatings and their characterization—A review[J]. Sci Technol Adv Mater, 2008, 9(4): 043001.
- [16] 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[J]. 中国药品标准, 2014, 15(2): 120–121.
- [17] PAN X H, WANG Y H, CHEN Z, et al. Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano-Mg(OH)₂[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5(3): 1137–1142.
- [18] NAKAMURA Y, OKITA K, KUDO D, et al. Magnesium hydroxide nanoparticles kill exponentially growing and persister *Escherichia coli* cells by causing physical damage[J]. Nanomaterials, 2021, 11(6): 1584.
- [19] MUÑOZ 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[J]. Nanomaterials, 2021, 11(2): 410.
- [20] TAN J, LIU Z X, WANG D H, et al. A facile and universal strategy to endow implant materials with antibacterial ability via alkalinity disturbing bacterial respiration[J]. Biomater Sci, 2020, 8(7): 1815–1829.
- [21] LEUNG Y H, NG A M C, XU X Y, et al. Mechanisms of antibacterial activity of MgO: Non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*[J]. Small, 2014, 10(6): 1171–1183.
- [22] HE Y, YAO M Y, ZHOU J L, et al. Mg(OH)₂ nanosheets on Ti with immunomodulatory function for orthopedic applications[J]. Regen Biomater, 2022, 9: rbac027.
- [23] GO E J, KANG E Y, LEE S K, et al. An osteoconductive PLGA scaffold with bioactive β -TCP and anti-inflammatory Mg(OH)₂ to improve *in vivo* bone regeneration[J]. Biomater Sci, 2020, 8(3): 937–948.

Antibacterial Properties and Biological Activities of Magnesium Hydroxide and Magnesium Oxide Coatings by Electrochemical Deposition on Titanium Surface

DU Jiaheng^{1,2}, FAN Xinli³, XIAO Dongqin², LIU Gangli³, Yin Yiran¹, He Kui¹, Yan Jiyuan¹, LI Zhong¹, TANYanfer⁴, DUAN Ke¹

(1. Department of Bone and Joint Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Engineering Laboratory of Orthopaedic Implant R&D and Application Technology, Luzhou 646000, Sichuan, China; 2. Institute of Tissue Engineering and Stem Cell Research, The Second Clinical College of North Sichuan Medical College, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology and Hospital of Stomatology, Qilu Medical College, Shandong University, Shandong Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration, Shandong Engineering Laboratory of Oral Biomaterials and Tissue Regeneration, Shandong Clinical Medical Research Center of Oral Diseases, Jinan 250012, China; 4. Sichuan University, Biomaterials Engineering Research Center, Chengdu 610065, China)

Extended Abstract

Introduction Titanium (Ti)-based implants are one of the most commonly used materials in orthopedic surgery. Although Ti-based implants have good biomechanical properties and biocompatibility, their non-antibacterial shortcomings lead to orthopedic implant-related infections that seriously affect the effect of surgery and postoperative recovery. and serious cases need a second operation and increase the pain and cost of patients. Some studies reported metal or antibiotic antibacterial coatings on Ti-based implants, but they have some disadvantages (i.e., heavy metal coatings can cause damage to the human body, and excessive use of antibiotic coatings can lead to drug resistance). It is thus necessary to investigate the preparation of coatings with good antibacterial properties and biological activities on the surface of Ti-based implants, so as to provide an effective solution to the problem of bone implant-related infection in clinic. Magnesium (Mg) is a major element in human body. Some studies reported that Mg and its compounds have good antibacterial and biocompatibility.

Methods Ti sheets were cleaned and immersed in an electrolyte containing sodium chloride and magnesium chloride (pH=9.5) and applied a DC voltage of 3.0 V for 0–12 h to obtain magnesium hydroxide [Mg(OH)₂] coatings. After deposition, Mg(OH)₂ coatings were calcined in a muffle furnace at a heating rate of 2 °C/min at 650 °C for 6 h to obtain magnesium oxide (MgO) coatings. The phases of each group of samples were analyzed by X-ray diffraction (XRD), the surface morphology was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and the composition of surface elements was analyzed by energy dispersive spectroscopy (EDS). The *in-vitro* antibacterial properties of the samples were evaluated according to the standard ISO22196—2011. The bacterial liquid was resuscitated, diluting it to 1×10^5 cfu/mL (cfu is colony-forming units). The samples were firstly sterilized by drying, then 300 μ L bacterial solution (i.e., *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) was then dropped onto each sample and incubated in a constant temperature incubator (at 37 °C) for 24 h. After diluting the coating plate, the colony number was analyzed and converted to antibacterial rate. The *in-vitro* cytotoxicity of each sample was evaluated according to the standard ISO10993.5. After dry heat sterilization, the samples were placed in a 24-well plate (no sample cell suspension in the control group and complete culture medium in the blank group). 1 mL mouse osteoblast suspensions (OB-6; 5 000 cell/mL) were dropped onto each sample and then incubated in a cell culture box (5% CO₂ at 37 °C) for 1 d, 3 d or 5 d. After the completion of culture, the absorbance value was detected by a method named CCK-8 and converted to a cell survival rate.

Results and discussion Mg(OH)₂ coating was prepared on titanium surface by an electrochemical deposition method, and MgO coating was obtained after calcination. Granular matter [Mg(OH)₂ and MgO] are uniformly distributed on the surface of each group, and the particle density and coverage rate increase with deposition time. Mg(OH)₂ and MgO coatings all have a good antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The antibacterial rates increase with deposition time. When deposited for ≤ 3 h, the antibacterial rate of MgO is higher than that of Mg(OH)₂. After deposited for ≥ 6 h, the bacteriostatic rate of both is close to 100%. The cytotoxicity of Mg(OH)₂ and MgO coatings increases with the deposition time, and the toxicity of the two groups (i.e., deposited for 0.5 h and 1.0 h) decreases with the culture time, and the toxicity of the other three groups (i.e., deposited for 3 h, 6 h and 12 h) increases with the culture time. At 5 d, the survival rates of Mg(OH)₂ and MgO samples deposited for 0.5 h are 152% and 90%, and the survival rates of the two groups of samples deposited for 12 h are 2% and 6%, respectively.

Conclusions The surface morphology and thickness of Mg(OH)₂ and MgO coatings changed with the deposition time. The cytotoxicity and antibacterial rate of the coatings were enhanced with the deposition time. It was speculated that there was a dose-effect relationship between them and the coating. The results showed that Mg(OH)₂ coating could be prepared by electrochemical deposition, and the MgO coating could be obtained after calcination. Mg(OH)₂ and MgO coatings deposited for 1 h had good comprehensive properties.

Keywords orthopedic implants; antibacterial; electrochemical deposition; magnesium hydroxide; magnesium oxide; biocompatibility