Modern Practical Medicine, August 2024, Vol.36, No.8

·临床研究·

钛植入物表面氮化铪涂层的制备及抗菌性能研究

薛军，王蔚，陈思慧，朱锦宇，蒋毅

【摘要】目的 构建钛植入物表面氮化铪涂层，并探索其抗菌性能。**方法** 采用磁控电流体动力学打印装置在钛植入物表面分别制备不同厚度及不同成分比的氮化铪涂层，利用扫描电子显微镜对涂层表面形貌进行观察。通过平板菌落计数、结晶紫染色法、扫描电镜、活/死细菌染色等方法来评价不同涂层材料的抗菌性能。**结果** 实验组氮化铪涂层、对照组钛基片与金黄色葡萄球菌共培养，平板计数、菌液浊度、生物膜检测及表面涂层黏附细菌量结果都表明样品 2（厚度为 50 nm，N_2 流量为 2.5 sccm）具有最优的抗菌性能；电子显微镜和激光共聚焦结果表明，涂层可能是通过抑制细菌生长而不是杀死细菌来发挥抑菌作用。**结论** 在钛植入物表面构建氮化铪涂层，能有效减少金黄色葡萄球菌在植入物表面的黏附，起到良好的抑菌效果。

【关键词】 钛植入物；氮化铪涂层；金黄色葡萄球菌；抗菌性能

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.08.007

【中图分类号】 R63 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)08-1010-04

骨科植入物在骨折创伤内固定、脊柱融合内固定及人工关节置换等领域已获得广泛应用，其在为患者解决病痛的同时，也存在感染的风险。骨科植入物感染的重要发生机制便是细菌生物膜（BBF）的形成。BBF 通过膜性结构的多重方式来对抗宿主的免疫防御和药物的抗菌作用[1]，严重影响患者的生活质量[2]。钛（Ti）及其合金因具有良好的力学性能和骨整合性，常用作骨植入材料[3]，但钛及钛合金本身没有抗菌能力，植入后易发生感染。研究表明，在没有植入物的情况下，每克组织污染 10 万个细菌才会造成感染，而在有植入物的情况下，每克组织污染约 100 个细菌就可以导致感染的发生[4-5]，因此赋予钛植入物抗菌能力具有重大临床意义。氮化铪是一种典型的含有自由电子的共价键材料，具有耐腐蚀和力学性能[6-10]，经受 10 000 次摩擦磨损实验后仍能保持良好表面特征[11]，但有关氮化铪材料作为抗菌涂层的研究鲜有报道[12]。本研究尝试通过带有辅助磁场的磁控电流体动力学（EHD）3D 打印技术取代离子刻蚀等传统的微纳加工技术，在骨科植入物表面构建新型的氮化铪纳米结构抗菌涂层，以探索其抗菌性能，现报道如下。

基金项目： 嘉兴市科技计划项目（2022AY30018）

作者单位： 314001 浙江省嘉兴，嘉兴市第一医院

通信作者： 蒋毅，Email：jiangyi0573@163.com

1 资料与方法

1.1 氮化铪涂层的制备 在 Ar 和 N_2 氛围中，利用铪靶材在 Ti 基片上溅射不同厚度和不同成分比的氮化铪薄膜。厚度约为 50 nm、200 nm。铪与氮的成分比通过控制 Ar 和 N_2 的流量比来实现，厚度由溅射时间来控制。射频功率为 150 W，Ar 流量为 80 sccm，N_2 流量分别为 2、2.5 和 3 sccm。本底真空度为 4×10^{-4} pa，工作压强为 1.1 pa，样品台转速为 5 r/min，偏压为−80 V。根据涂层厚度和成分比的不同将样品分为 7 组，分别为样品 1：厚度为 50 nm，N_2 流量为 3 sccm；样品 2：厚度为 50 nm，N_2 流量为 2.5 sccm；样品 3：厚度为 50 nm，N_2 流量为 2 sccm；样品 4：厚度为 200 nm，N_2 流量为 3 sccm；样品 5：厚度为 200 nm，N_2 流量为 2.5 sccm；样品 6：厚度为 200 nm，N_2 流量为 2 sccm；样品 7：Ti 基片。

1.2 植入物生物膜体外模型制备 本研究使用的金黄色葡萄球菌（ATCC25923）由嘉兴市第一医院临床检验科提供。将冻存菌株接种于 TSA 平板，放入恒温培养箱中，37 ℃培养过夜。挑取一个单克隆菌落，接种于含 TSB 培养液中，放入 37 ℃恒温摇床振荡培养 24 h。用 TSB 配制成密度 10^6 CFU/ml 的菌悬液备用。将样品经清洗、干燥、灭菌预处理后放入 24 孔板中，每孔加入 1 ml 浓度为 1×10^6 CFU/ml 菌悬液，置 37 ℃的恒温培养箱中培养 24 h。

1.3　菌落平板计数　制备好的 7 组样品与菌悬液共培养 24 h 后，拍照比较菌液浊度。将样品逐个从 24 孔板中取出，放置在 1 ml 的 0.85%氯化钠注射液中，漩涡振荡器振荡 3 min 后逐级稀释，吸取 100 μl 细菌悬液于 LB 固体培养基，细菌涂布器划板，将培养基放入培养箱中 37 ℃培养 24 h 后，比较每组样品的活菌数目。

1.4　结晶紫法检测生物膜　使用结晶紫染色法定量金黄色葡萄球菌在材料表面所形成的生物膜。每孔加入细菌悬液 1 ml 及样品材料，放入培养箱中 37 ℃下静态培养 24 h；吸掉菌液，PBS 冲洗 2 次，晾干；1 ml 甲醛固定 15 min，晾干；将 0.1%结晶紫溶液（碧云天，中国上海）1 ml 加入放有样品的孔中染色。室温染色 15 min 后停止染色；PBS 缓冲液冲洗 2 次，加入 1.5 m1 95%乙醇，脱色 15 min。吸取脱色后的液体，加入到 96 孔板中，放入酶标仪（ELX 800，Bio-Tek，美国）检测 570 nm 处检测吸光度（OD），为获得稳定准确数据，每组数据设置 6 个重复，取其平均值，每组共进行了 3 次检测。

1.5　激光共聚焦观察金黄色葡萄球菌的黏附　材料与菌悬液共培养 24 h 后，吸去菌液，无菌 PBS 清洗 2 次。使用 SYTO-9/PI 活/死细菌荧光染色剂（上海复申生物科技有限公司，中国上海）对上述合金样品进行荧光染色，荧光染液 SYTO9 能使活细菌发出绿色荧光，PI 染液可使使死细菌发出红色荧光。按照染色试剂盒说明，在室温环境中，染色 15 min，注意避光。吸去染液后用无菌 PBS 缓冲液漂洗，使用激光共聚焦显微镜（CLSM，LSM800，德国蔡司）观察材料表面的活/死细菌黏附情况。

1.6　扫描电子显微镜检测样品表面金黄色葡萄球菌的黏附　将培养 24 h 后的样品用 PBS 清洗 3 次，加 2.5%的戊二醛溶液 1 ml 固定过夜，PBS 洗 3 遍；30%、50%、70%、80%、90%、100%乙醇溶液梯度脱水 15 min。样品置于乙醇和叔丁醇 1∶1 溶液中 15 min，叔丁醇中 15 min，放冷冻干燥机中冷冻干燥。使用扫描电子显微镜（SEM，Nova NanoSEM450，美国 FEI）对样品表面金黄色葡萄球菌的黏附进行检测。

1.7　统计方法　采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析，符合正态分布的计量资料采用 t 检验和单因素方差分析，非正态分布的计量资料采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

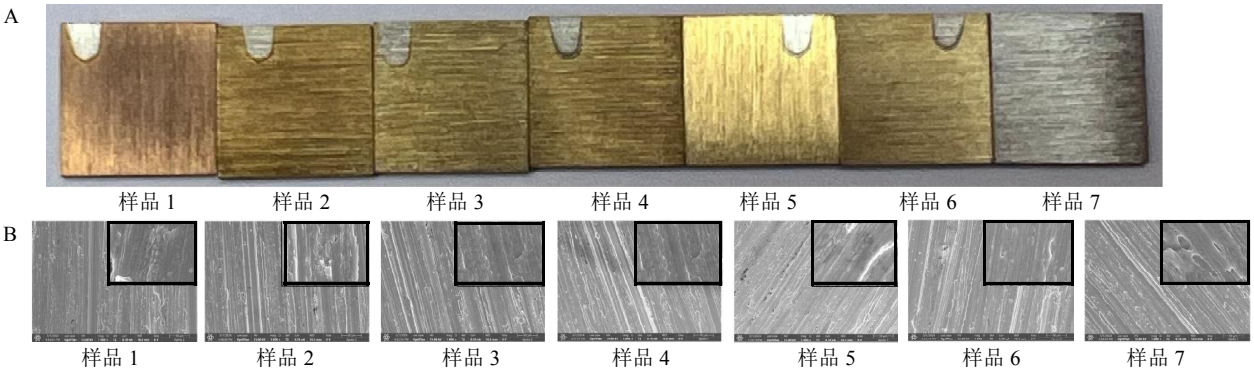
2　结果

2.1　涂层的形貌分析　经 Ar 和 N_2 处理过的样品呈金色，Ti 基片呈银色。扫描电子显微镜显示，氮化铬涂层与 Ti 基片为较均匀、表面连续的纳米级细丝，其间有些裂纹和气孔，其中 Ti 基片与氮化铬涂层相比气孔较大，见图 1。

2.2　涂层的抗菌性能评价　各组材料与金黄色葡萄球菌共培养 24 h 后，可见样品 2、样品 5 上的细菌菌落数明显减少。观察细菌悬浮液底部的絮状物质沉积程度，样品 2、样品 5 底部明亮和清晰。结晶紫染色生物膜结果也显示样品 2、样品 5 与样品 7 相比，表面的生物膜形成被明显抑制，见图 2。

2.3　涂层表面细菌的存活情况　SYTO-9/PI 活/死细菌荧光染色显示，与样品 7 比较，样品 1、样品 3、样品 4 培养 24 h 后活细菌数量无明显变化，样品 2、样品 5、样品 6 培养活细菌数量减少；所有样品死细菌数量均无明显变化，见图 3。

2.4　涂层表面的细菌黏附情况　样品 7 的表面黏附了最多的金黄色葡萄球菌，而且细菌致密，菌体完



注：A 为制备好的 6 组氮化铬涂层及 Ti 基片材料；B 为 SEM 测量下的材料涂层的表面形貌（×1 000），黑色框内放大 40 000 倍

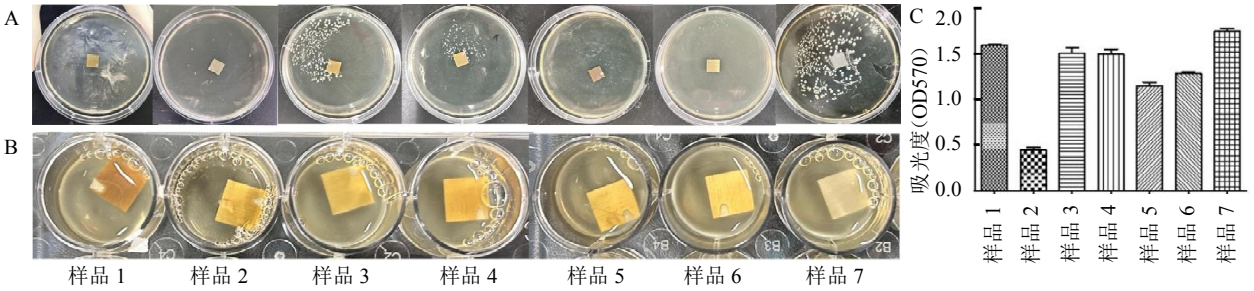
图 1　氮化铬涂层的形貌分析

整，菌膜厚实，黏附程度牢固，不易脱落，其次是样品1、3、4；黏附细菌最少的是样品2，其表面菌落稀疏，菌体之间松散，菌膜稀薄，其次是样品5、6。局部放大后可以看到样品5表面的细菌有堆叠并积聚成团，而样品2表面的细菌黏附比较分散未堆叠，且金黄色葡萄球菌的形态基本没有发生改变，见图4。

3 讨论

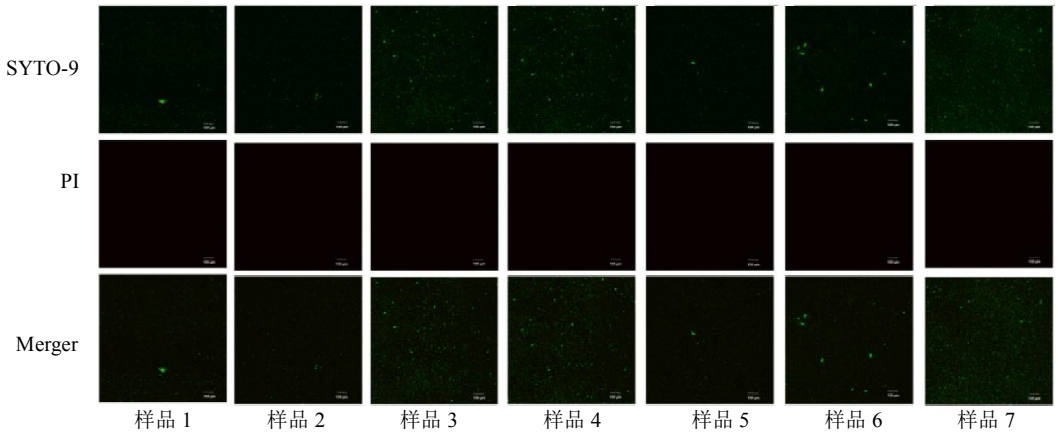
细菌与植入物材料黏附以及形成生物被膜是植入物发生感染的主要病理基础，也是骨科感染控制中首先取出内固定材料的理论基础[13]。其中生物膜形成贯穿于感染发生的各个环节，研究显示，细菌生物膜在形成的最初72 h内对抗菌药物比较敏感，而一旦成熟其所能耐受的抗菌药物浓度将大大高于浮游菌，甚至达到浮游菌最低抑菌浓度（MIC）的1 000倍以上[14]。

细菌黏附于材料表面是植入物感染的始动环节，尽管采用术前严格消毒、术中无菌操作及应用抗菌素等有力措施，仍不能避免感染的发生。同时，引



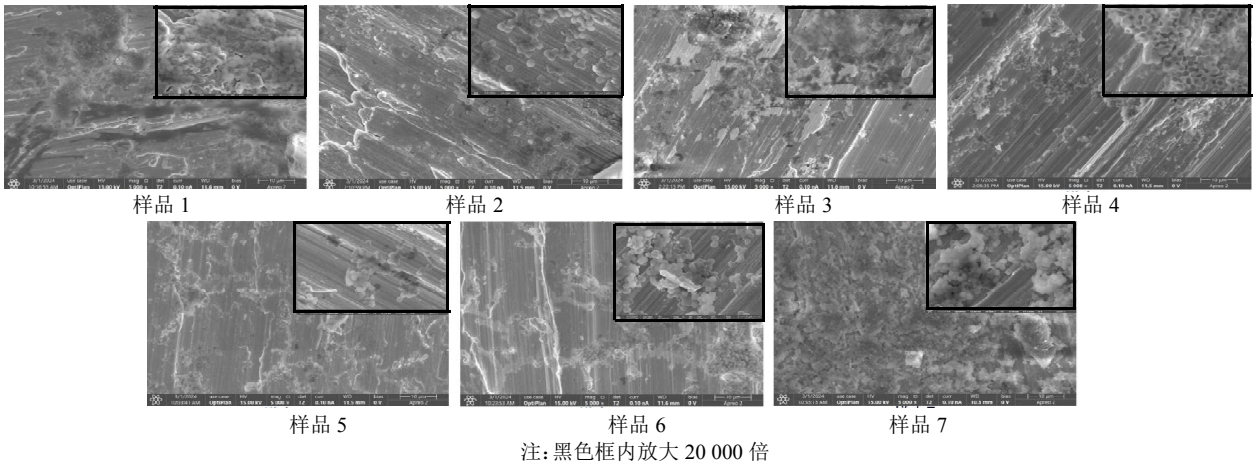
注：A为材料表面冲洗下的细菌稀释10^4后平板涂片的生长情况；B为材料与菌悬液共培养后的菌液浊度情况；C为结晶紫对材料表面生物膜染色后的定量结果

图2 涂层的抗菌性能评价



注：荧光染液SYTO9能使活细菌发出绿色荧光，荧光染液PI可使使死细菌发出红色荧光（×100）

图3 涂层表面细菌的存活情况



注：黑色框内放大20 000倍

图4 涂层表面的细菌黏附情况（×5 000）

起感染的常见细菌如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等又对各种骨科植入物材料具有较强亲和力，容易黏附于材料表面并发感染及形成生物膜[15-18]。因此，通过在植入物表面进行抗菌或抑菌修饰以减少细菌在植入物表面的黏附、增殖，从而阻断生物膜的形成，将有效预防植入物相关感染。

Grossman 等[19]通过结晶紫和共聚焦显微镜观察定量金黄色葡萄球菌生物膜形成，这是一种经典和标准化的方法。本研究用同样的方法进行研究，涂层样品 2 中的生物膜数量最低，其次是涂层样品 5。本研究结果显示，对照组（样品 7）上细菌致密，菌体完整，菌膜厚实，黏附程度牢固，不易脱落；样品 2 菌落稀疏，菌体之间松散，菌膜稀薄；其次是样品 5，可能的解释是铪与氮的成分比在抑菌作用中占主导地位，其次随着涂层厚度纳米尺寸的减小，与生物接触面增加，抑菌活性增加。结合电镜及荧光染色结果，金黄色葡萄球菌的形态基本没有发生改变，且各组间死细菌数量无明显差异。氮化铪涂层在骨科植入物表面的构建为抑制细菌黏附提供了新的方向，后期可以继续探索涂层复合其他抗菌因素，进一步加强其抗菌性能。

然而，本研究在某些方面存在局限性。首先，本研究仅使用了一种菌株实验模型，可能不适用于其他类型的细菌，如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）；其次本实验未行细胞毒性、生物相容性等方面的研究，这些都有待进一步研究验证。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　薛军、王蔚、陈思慧：实验操作、论文撰写；薛军、陈思慧：数据整理、统计学分析；薛军、朱锦宇、蒋毅：研究指导、论文修改、经费支持

参　考　文　献

[1] MANASHEROB R, MOONEY J A, LOWENBERG D W, et al. Tolerant small-colony variants form prior to resistance within a Staphylococcus aureus biofilm based on antibiotic selective pressure[J]. Clin Orthop Relat Res, 2021, 479(7): 1471-1481.

[2] LAMRET F, COLIN M, MONGARET C, et al. Antibiotic tolerance of Staphylococcus aureus biofilm in periprosthetic joint infections and antibiofilm strategies[J]. Antibiotics, 2020, 9(9): 547.

[3] TAN L, LI J, LIU X M, et al. Rapid biofilm eradication on bone implants using red phosphorus and near-infrared light[J]. Adv Mater, 2018, 30(31): e1801808.

[4] CAMPOCCIA D, MONTANARO L, ARCIOLA C R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance[J]. Biomaterials, 2006, 27(11): 2331-2339.

[5] ZIMMERLI W, WALDVOGEL F A, VAUDAUX P, et al. Pathogenesis of foreign body infection: Description and characteristics of an animal model[J]. J Infect Dis, 1982, 146(4): 487-497.

[6] GU Z Q, HU C Q, HUANG H H, et al. Identification and thermodynamic mechanism of the phase transition in hafnium nitride films[J]. Acta Mater, 2015, 90: 59-68.

[7] GU Z Q, HUANG H H, ZHANG S, et al. Optical reflectivity and hardness improvement of hafnium nitride films via tantalum alloying[J]. Appl Phys Lett, 2016, 109(23): 232102.

[8] GU Z Q, HU C Q, FAN X F, et al. On the nature of point defect and its effect on electronic structure of rocksalt hafnium nitride films[J]. Acta Mater, 2014, 81: 315-325.

[9] HU C, LIU J, WANG J, et al. New design for highly durable infrared-reflective coatings[J]. Light Sci Appl, 2018, 7: 17175.

[10] HU C Q, GU Z Q, WANG J B, et al. Nature of tunable optical reflectivity of rocksalt hafnium nitride films[J]. J Phys Chem C, 2014, 118(35): 20511-20520.

[11] GAO J, ZHAO Y, GU Z Q, et al. Improving electrical conductivity and wear resistance of hafnium nitride films via tantalum incorporation[J]. Ceram Int, 2017, 43(11): 8517-8524.

[12] ROMANOV D, SOSNIN K, PRONIN S, et al. Electroexplosive hafnium coating on titanium implant modified by nitrogen ions and electron beam processing[J]. Surf Coat Technol, 2021, 409: 126895.

[13] ILYINA T S, ROMANOVA Y M, GINTSBURG A L. Biofilms as a mode of existence of bacteria in external environment and host body: The phenomenon, genetic control, and regulation systems of development[J]. Russ J Genet, 2004, 40(11): 1189-1198.

[14] MA C, ZHANG Y, LEI J E, et al. Programmed cell death protein 1/programmed cell death ligand 1 signaling pathway mediated interleukin-10 and bacterial biofilm formation to drug resistance mechanism of pneumoniae meningitis[J]. Cell Mol Biol, 2023, 69(4): 105-111.

[15] GBEJUADE H O, LOVERING A M, WEBB J C. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections[J]. Acta Orthop, 2015, 86(2): 147-158.

[16] PARVIZI J, ALIJANIPOUR P, BARBERI E F, et al. Novel developments in the prevention, diagnosis, and treatment of periprosthetic joint infections[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2015, 23(Suppl): S32-S43.

[17] 曹力,纪保超.髋膝关节置换术后假体周围感染焦点问题[J].中华关节外科杂志(电子版),2016,10(4):360-363.

[18] NANA A, NELSON S B, MCLAREN A, et al. What's new in musculoskeletal infection: Update on biofilms[J]. J Bone Joint Surg Am, 2016, 98(14): 1226-1234.

[19] GROSSMAN A B, BURGIN D J, RICE K C. Quantification of Staphylococcus aureus biofilm formation by crystal violet and confocal microscopy[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2341: 69-78.

收稿日期：2024-04-30

（本文编辑：吴迪汉）