

[文章编号] 1000-1182(2011)05-0526-03

渗氮类金刚石薄膜应用于纯钛后的细菌黏附变化

尹路 肖云

(厦门市口腔医院 修复科, 厦门 361003)

[摘要] 目的 观察纯钛试件应用等离子镀膜法镀制纳米渗氮类金刚石(N-DLC)薄膜后的细菌黏附变化,以期对临床应用有所指导。方法 采用等离子镀膜机,在纯钛试件表面沉积N-DLC薄膜、TiN薄膜、阳极氧化膜以及空白对照,然后将其黏附于树脂基托表面,实际使用6个月后,扫描电子显微镜观察白色假丝酵母菌黏附试件情况;粗糙度检测仪对比检测试件粗糙度变化。结果 白色假丝酵母菌在N-DLC膜表面附着数量比其他组试件明显少($P<0.05$),且菌体生长不良,处于抑制状态;阳极氧化膜和空白对照试件表面黏附菌量最多,且菌体生长旺盛。N-DLC膜表面粗糙度在戴用前后变化最小($P<0.05$)。结论 纯钛表面镀制N-DLC膜在口腔实际应用过程中可以明显降低白色假丝酵母菌的黏附量,从而降低罹患义齿性口炎的风险。

[关键词] 纯钛; 表面改性; 粗糙度

[中图分类号] R 783.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.05.020

The change of bacterial adhesion during deposition nitrogen-diamond like carbon coating on pure titanium

Yin Lu, Xiao Yun. (Dept. of Prosthodontics, Xiamen Stomatological Hospital, Xiamen 361003, China)

[Abstract] **Objective** The aim of this study was to observe the change of bacterial adhesion on pure titanium coated with nitrogen-diamond like carbon(N-DLC) films and to guide the clinical application. **Methods** N-DLC was deposited on titanium using ion plating machine, TiN film, anodic oxide film and non-deposition were used as control, then made specimens adhering on the surface of resin denture base for 6 months. The adhesion of *Saccharomyces albicans* on the titanium surface was observed using scanning electron microscope, and the roughness was tested by roughness detector. **Results** The number of *Saccharomyces albicans* adhering on diamond-like carbon film was significantly less than on the other groups($P<0.05$), and the growth of bacterial cell was inhibited and in a poor state. The largest number of adhesion and cell strains grew well on anodic oxide film group and non-deposition control group. The change of surface roughness of N-DLC film was less than other group($P<0.05$). **Conclusion** Pure titanium coated with N-DLC film reduced the adhesion of *Saccharomyces albicans* after clinical application, thereby reduced the risk of denture stomatitis.

[Key words] titanium; surface modification; roughness

纯钛可摘义齿是目前口腔修复领域常用的修复体之一。可摘义齿戴入口内后,口腔内的唾液、脱落的黏膜细胞和食物碎屑等易聚集于基托和口腔黏膜之间,这些介质促进了义齿表面菌斑生物膜形成,菌斑中微生物尤其是白色假丝酵母菌产生的毒性物质可渗透到变薄或损伤的黏膜组织中,从而容易引起义齿性口炎,导致义齿修复失败^[1]。因此,要较好预防义齿性口炎发生,需要修复材料对游离致病菌,尤其是白色假丝酵母菌有良好杀灭和抑制效果。本

实验以白色假丝酵母菌为黏附菌,对镀制有纳米渗氮类金刚石(nitrogen-diamond like carbon, N-DLC)薄膜的纯钛试件进行黏附效果观察,以期指导N-DLC在临床实际的应用。

1 材料和方法

1.1 材料与设备

白色假丝酵母菌(ATCC 90028,第四军医大学西京医院检验科提供),超声清洗机(上海齿科材料厂产品),隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械一厂),离心机(上海仪器设备厂),TR240便携式粗糙度仪(北京时代之峰科技有限公司),扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(Philips公司,荷兰),DF1700S稳压稳流直流电源系统(宁波东

[收稿日期] 2010-08-23; [修回日期] 2011-05-21

[基金项目] 福建省自然科学基金青年创新基金资助项目(2009D013); 厦门市杰出青年创新基金资助项目(3502Z20105010)

[作者简介] 尹路(1979—),男,福建人,主治医师,博士

[通讯作者] 尹路, Tel: 0592-2669535

风无线电厂)。

1.2 试件制备

参照本课题^[2]系列实验,制作铸造纯钛试件80片,按纯钛表面处理方式不同分4组:表面镀制N-DLC膜、TiN薄膜(90% N₂,厚度500 nm,时间为15 min)、应用稳压稳流直流电源系统镀制阳极氧化膜(含有0.5 mol·L⁻¹ H₂SO₄和0.2 mol·L⁻¹的H₃PO₄去离子水,电压40 V,30 min)和空白对照组(纯钛表面不作处理)。

1.3 临床试验

以自愿为原则,为4组牙列缺损和缺失患者(每组5人,共20人)制作甲基丙烯酸树脂义齿,当患者开始戴用基托义齿并能正常使用2周后,在基托的磨光面对称4个部位分别磨去适量树脂,按图1示顺序将4组试件放在基托树脂4个特定部位:阳极氧化膜组放在A处,空白对照组放在B处,TiN薄膜组放在C处,N-DLC膜组放在D处;用自凝树脂将试片黏固,但试片不应突出于基托表面,避免其与树脂发生缓慢移动,以免患者不适。嘱患者正常使用,饭后及睡前漱口,并用牙刷刷牙膏清洗义齿,6个月后取出试件消毒。



A: 阳极氧化膜组; B: 空白对照组; C: TiN薄膜组; D: N-DLC膜组。

图1 4组试件在义齿表面的位置

Fig 1 Four specimens location on denture surface

1.4 试件白色假丝酵母菌的黏附观察

将白色假丝酵母菌菌株经复苏、纯化处理后制成菌悬液,将0.2 mL加入经灭菌处理后的BHI营养液中,37℃振荡条件下培养14 h,将消毒后的试件悬

挂在BHI营养液中培养,培养在37℃、转速40 r·min⁻¹的水浴振荡器中进行。72 h后样品先经过20 mL无菌水的淋洗后,放于80 mL无菌水中,超声清洗10 min后取样,利用平板计数法测定活菌数目。SEM观察菌膜的形成:取出与白色假丝酵母菌培养过72 h的各组分试件各1片,用无菌水20 mL淋洗后,浸在无菌的生理盐水中2 h;取出用戊二醛定型、锇酸染色,分别经过50%、70%、90%的乙醇和无水乙醇脱水;然后用醋酸异戊酯浸泡15 min 2次;最后用CO₂临界点干燥24 h;取出后,喷金,SEM观察、拍照。

1.5 试件粗糙度的测量

使用TR240表面粗糙度仪,测量每组试件戴用前后的粗糙度,取样长度为0.8 mm,评定长度为4.0 mm,分辨率为0.022 μm。每个试件测量2次,取其平均值作为最终测量结果。

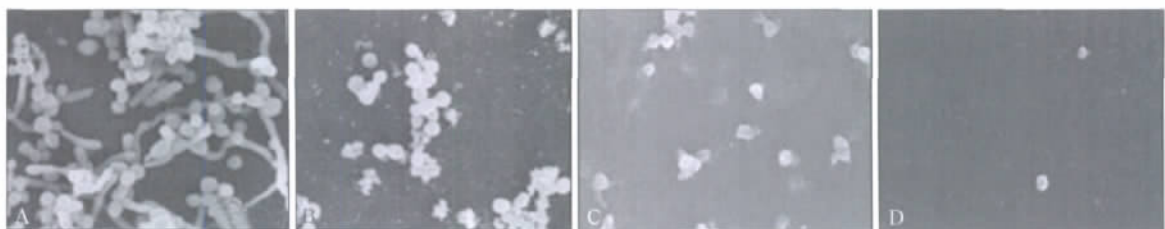
1.6 统计学分析

数据通过SPSS 10.0统计软件进行t检验,α=0.05。

2 结果

经过72 h培养后,白色假丝酵母菌菌膜在4组试件表面生长情况:N-DLC膜组表面黏附量为(1 019±223) CFU·mL⁻¹,TiN薄膜组为(1 430±335) CFU·mL⁻¹,阳极氧化膜组为(8 147±577) CFU·mL⁻¹,空白对照组为(6 012±464) CFU·mL⁻¹。可见白色假丝酵母菌在N-DLC膜表面附着数量比其他组试件明显少(P<0.05),表明白色假丝酵母菌不易黏附在N-DLC膜表面。

4组试件戴用后白色假丝酵母菌生长的情况见图2,图2D表明:N-DLC膜表面菌量最少,且形态不规则,说明菌体生长不良,处于抑制状态。图2A及2B表明:阳极氧化膜组和空白对照组表面黏附菌量最多,菌体形态椭圆形,大多带有尾体,表明细菌生长旺盛。图2C表明:TiN薄膜表面有一定数量的菌膜形成,菌体形态多为圆形,表明菌体生长处于半抑制状态。4组试件戴用前后表面粗糙度差值见表1,N-DLC膜组的表面粗糙度在戴用前后变化最小(P<0.05)。



A: 阳极氧化膜组; B: 空白对照组; C: TiN薄膜组; D: N-DLC膜组。

图2 4组试件戴用后白色假丝酵母菌的生长 SEM ×5 000

Fig 2 *Saccharomyces albicans* growth on 4 samples after trying-in SEM ×5 000

表 1 4组试件戴用前后表面粗糙度差值

Tab 1 The equation value of roughness of 4 samples before and after application $\mu\text{m}, \bar{x} \pm s$

项目	N-DLC膜组*	TiN薄膜组	阳极氧化膜组	空白对照组
戴用前	0.071±0.007	0.085±0.006	0.121±0.010	0.072±0.003
戴用后	0.073±0.009	0.096±0.004	0.187±0.006	0.288±0.012
增加值	0.002±0.001	0.011±0.003	0.066±0.012	0.216±0.010

注：*示与各组有统计学差异， $P<0.05$ 。

3 讨论

修复体表面自由能和表面粗糙度的存在是菌斑黏附的始动因素，粗糙的表面可为细菌提供附着场所，并产生屏蔽效应使细菌繁殖，免受唾液流动、咀嚼、吞咽及口腔清洁措施的影响。表面粗糙度与细菌黏附，特别是早期附着有很大关系，本实验结果表明：白色假丝酵母菌在N-DLC膜表面附着数量比其他组试件明显少，试件戴用前后的表面粗糙度变化值也是N-DLC膜组最小，证明暴露于口腔中的铸件应高度光滑，以阻止及减少菌斑附着于其表面。

获得性膜可促进细菌黏附，实验^[3-4]证明：修复材料表面也可以形成获得性膜，唾液中的细菌会向修复体表面移动，通过非特异的静电作用与修复体结合，启动菌斑形成。而粗糙表面更有利于获得性膜的形成，本实验结果显示：N-DLC膜表面菌量最少，且形态不规则，说明菌体生长不良，处于抑制状态；阳极氧化膜组和空白对照组表面黏附菌量最多，且菌体形态椭圆形，大多带有尾体，表明细菌生长旺盛，同时两者粗糙度改变也最大，证明了粗糙的表面更易黏附细菌的结论；TiN薄膜表面有一定数量的菌膜形成，菌体形态多为圆形，表明菌体生长处于半抑制状态，这与其粗糙度改变小于N-DLC膜组，但大于阳极氧化膜和空白对照组的实验结果吻合。

Catalan等^[5]研究义齿性口炎患者的义齿菌斑发现：白色假丝酵母菌是口腔炎症主要致病菌，引起感染的初始动因首先是细菌对材料表面的黏附，一般认为细菌在材料表面经历一个动态的可逆吸附和不可逆吸附过程后，在材料表面附着并分泌形成一层生物膜，该膜既能保护膜内细胞免受宿主体内免疫机制及抗菌素的作用，又能促进细菌的进一步黏附，造成义齿性口炎发生。因此，材料的表面性质对材料的抗菌性能有重要影响。细菌与材料的最初接触受材料表面理化性质的影响，目前认为取决于以下4个因素^[6]：1)表面自由能，包括修复材料的表面自由能、细菌的表面自由能及悬浮介质的表面张力。2)修复材料的表面粗糙度。3)与机体免疫系统的关系。4)材料表面吸附的来自唾液的一些特殊分

子的存在。在上述4个因素中有3个是与材料表面性能有关的，所以，材料表面的改性成了近年来许多专家学者研究的重点。Keiji^[7]用表面上釉的方法来减少微生物的附着，但这种光洁度只能在口内维持很短的时间，一些口腔卫生措施如刷牙等会加大材料的粗糙度。而抗生素使用过多又会造成材料性能改变。N-DLC膜是口腔修复材料表面处理技术的新热点之一，它具有硬度大、抗蚀性好、与金属结合紧密等优点，笔者^[8]通过磁控等离子镀膜法将N-DLC镀制在纯钛表面，从而使钛义齿的耐磨性和耐腐蚀性提高。本实验首次将其引入口腔修复体抗菌领域，虽然N-DLC膜无杀菌作用，但因其光滑的表面可以明显降低白色假丝酵母菌的黏附量^[9]，同时具有高硬度、耐磨、耐腐蚀性，从而保证了抑菌作用的长期性。

[参考文献]

- [1] Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, et al. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development [J]. Clin Oral Implants Res, 2006, 17(Suppl 2) 68-81.
- [2] 尹路, 姚江武, 许德文. 沉积时间对渗氮类金刚石碳膜表面颜色的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(5) 543-547.
Yin Lu, Yao Jiangwu, Xu Dewen. Influence of deposition time on chromatics during nitrogen-doped diamond like carbon coating on pure titanium[J]. West China J Stomatol, 2010, 28(5) 543-547.
- [3] Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces[J]. Arch Oral Biol, 2008, 53(8) 755-764.
- [4] Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials *in vivo* and *in vitro*[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1999, 10(1) 99-116.
- [5] Catalan A, Herrera R, Martinez A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: Scanning electron microscopic and microbiologic study[J]. J Prosthet Dent, 1987, 57(5) 581-586.
- [6] 周学东, 肖晓蓉. 口腔微生物学[M]. 成都: 四川大学出版社, 2002: 214-268.
Zhou Xuedong, Xiao Xiaorong. Oral microbiology[M]. Chengdu: Publishing House of Sichuan University, 2002 214-268.
- [7] Keiji K. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion bacteria and their synthesizing glucans[J]. J Prosthet Dent, 2000, 83(6) 664-667.
- [8] 尹路, 郭天文, 越野, 等. 表面镀膜纯钛牙膏磨刷后表面粗糙度研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2008, 24(1) 65-68.
Yin Lu, Guo Tianwen, Yue Ye, et al. A study of roughness on pure titanium coating with diamond like carbon[J]. J Pract Stomatol, 2008, 24(1) 65-68.
- [9] Ishihara M, Kosaka T, Nakamura T, et al. Antibacterial activity of fluorine incorporated DLC films[J]. Diamond Related Materials, 2006, 15(8) 1011-1014.

(本文编辑 汤亚玲)