PIII 改性 ePTFE 膜对细菌生存状态的影响研究

吴 艳[1] 米方林[1] 张玉梅[2] 王勤涛[2△]

(1 川北医学院口腔科 四川 南充 637000;2 第四军医大学口腔医院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨等离子注入技术(Plasma immersion ion implantation,PII)对膨体聚四氟乙烯(ePTFE)膜改性后表面性能以及对细菌生存状态的影响。**方法:**采用氧等离子注入技术(PII)对 ePTFE 膜表面处理,获得改性 ePTFE 膜,利用扫描电镜(SEM)观察改性 ePTFE 膜和未处理膜的表面形貌,体外培养变形链球菌,观察改性前后各组膜作体外细菌生存状态变化。**结果:**与未处理 ePTFE 膜相比,改性 ePTFE 膜表面形貌、亲水性发生改变。荧光染色后观察长脉冲组表面的细菌最少;短脉冲组膜表面粘附的细菌密集,形成生物膜;空白组可见少量死菌和活菌粘附于 ePTFE 膜上。**结论:**长脉冲 PIII 改性 ePTFE 膜后有良好的抗细菌粘附能力。

关键词:等离子浸没离子注入(PII);膨体聚四氟乙烯;生物膜

中图分类号:Q73 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2012)24-4647-04

Surface Modification of Expanded Polytetrafluoroethylene Membrane by Oxygen Plasma Immersion Ion Implantation and its Survival Condition

WU Yan[1], MI Fang-lin[1], ZHANG Yu-mei[2], WANG Qin-tao[2△]

(1 Department of Stomatology, The North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;

2 School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China)

ABSTRACT Objective: The study aimed at the surface modification of oral biomaterials(expanded polytetrafluoro-ethylene, ePTFE) by means of oxygen plasma immersion ion implantation (PIII) and evaluating its survival condition. Methods: PIII had been used to modify the surface of ePTFE membrane, and the modified ePTFE samples were investigtaied by scanning electron microscopy(SEM). Its survival condition to the modified ePTFE was studied. Results: It revealed that PIII changed surface morphology and water contact angle of ePTFE. The bacteria survival condition indicated that after fluorescence-labeling, less bacteria in long pulse PIII ePTFE, and more bacteria in short pulse PIII ePTFE and virgin samples. Conclusion: It manifested that long pulse PIII treated ePTFE significantly reduced the bacterial adhesion *in vitro*.

Key words: Plasma Immersion Ion Implantation(PIII); Expanded polytetrafluoroethylene; Biofilm

Chinese Library Classification: Q73 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)24-4647-04

随着各种生物材料的临床大量应用,其相关感染的发病率明显增加。在牙周引导组织再生术(guided tissue regeneration,GTR)和引导骨再生术(guided bone regeneration, GBR)中,国内常用的膜材料多为可降解生物膜如胶原膜、冻干异体骨膜、聚乳酸膜等,但可吸收膜降解速率不稳定以及膜相关感染限制了再生修复的发展[1,2]。目前国际上 GTR 和 GBR 的金标准膜为膨体聚四氟乙烯膜(ePTFE),为许多微纤维起伏相连的多孔性裂沟,研究证明该膜理化性能稳定,组织相容性好、抗感染能力较强[3]。但在大量临床应用过程中,各种因素导致生物膜暴露于口腔环境从而引发生物材料相关感染[4]。细菌生物膜与生物材料相关感染是材料、细菌、宿主的相互影响,细菌对生物材料表面的粘附是感染的第一步[5-8],若能使引导膜表面性能改变从而影响细菌的粘附,对控制其相关感染、提高 GTR 术和 GBR 术的成功率有重要临床意义。

作者简介:吴艳(1983-),女,硕士,助教,主要研究牙周组织工程,电话:15196792290,E-mail: wuyanzi19822010@yahoo.com.cn

△通讯作者:王勤涛,教授,博士,E-mail:wqtzym@fmmu.edu.cn,电话:029-84776096

(收稿日期:2012-03-30 接受日期:2012-04-26)

等离子体改性技术是利用等离子体轰击材料表面,引起高分子材料表面性能变化的一种改性过程[9]。等离子注入技术(PII)处理后材料的表面相对均匀,且能低温操作,是材料表面改性技术中较环保、有效的技术[10]。本实验拟采用 PIII 技术,对 ePTFE 膜表面氧等离子处理,改变 ePTFE 膜表面性能,以期抑制细菌对 ePTFE 膜的粘附,控制膜相关感染。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

医用膨体聚四氟乙烯(ePTFE)膜(上海索康医用材料有限公司);变形链球菌(streptococcus mutans)ATCC25175 标准株(四川大学华西口腔医学院口腔生物工程重点实验室);OA/EB(吖啶橙 / 溴化乙锭)染色剂(北京拜尔迪生物技术有限公司);唾液(无龋病无牙周病健康人提供);BHI 培养基(OXOID,英国);等离子体注入装置(香港城市大学自制);扫描电镜(HETACH I,X- 650,日本);激光共聚焦显微镜(Bio-aelMRC-024,美国);酶标仪(TECAN,澳大利亚)。

1.2 方法

1.2.1 ePTFE 膜表面处理 采用多功能全方位等离子浸没离子

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

注入机对厚 1 mm 的 ePTFE 膜表面进行处理。步骤和方法：ePTFE 膜置于高压仪器的靶台上，真空室预抽真空后再充入氧气，使真空室压力在 3.2×10^{-4} Torr；用射频电源建立氧等离子体，施加 -5 KV 脉冲高压，采用脉冲频率为 500 Hz，时间 200 μs 和脉冲频率 50 Hz，时间 30 μs 的参数对膜进行氧等离子体处理，处理时间均为 30 min，获得长脉冲、短脉冲两种不同的引导膜。

1.2.2 表面形貌、表观接触角 取长脉冲、短脉冲改性膜和未处理膜干燥并喷金后，扫描电镜观察膜的表面结构形貌；接触角测定仪测量三组表面表观水分子接触角，取均值。

1.2.3 试剂准备 取捐献者晨起刷牙 2 h 后非刺激性全唾液，4℃条件下 14000 r/ min × 15 min 离心后过滤除菌。取吖啶橙(AO)、溴化乙锭（EB）各 1 mg，用 PBS 溶液配制成浓度为 100μg/mL 的储备液备用。BHI 培养液(含有 1%蔗糖)消毒备用。

1.2.4 细菌培养 将变形链球菌单个菌落接种于 BHI 液体培养基，37 ℃厌氧（80% N_2、10% H_2、10% CO）培养 24 h 后，采用酶标仪调整菌细胞密度为 1×10^6 CFU/ mL，制成菌悬液备用。将改性和未改性 ePTFE 膜置于含有 1 mL离心唾液的试管内孵育 2 h，置于含 1%蔗糖的 BHI 培养液和菌悬液各 1.5 mL 的试管内，37℃厌氧培养 24 h。

1.2.5 样本表面细菌的染色、激光共聚焦显微镜观察 表面附着变链生物膜样本加入 1 mL 的 AO/EB 染色剂，染色 15 min 后激光共聚焦显微镜观察。

2 结果

2.1 样本的表面形貌

未处理组膜表面扫描电镜观察似一条条相对连续的"岭嵴"状形貌，"岭嵴"间有细小纤维条索相连（图 1 A）；B 组"岭嵴"条索状结构似有而不连续，其间的纤维条索似断裂（图 1 B）；C 组"岭嵴"状结构不明显，表面呈蚀刻性粗糙（rough-ness），"岭嵴"间纤维似断裂（图 1 C）。

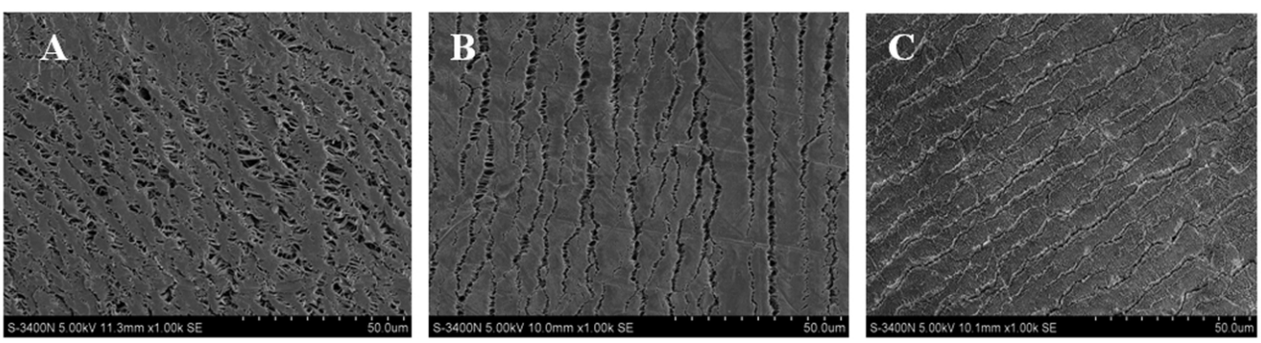

图 1 不同改性处理组膜表面形貌比较（A 对照组，B 短脉冲组，C 长脉冲组）

Fig.1 Surface topography of different ePTFE（A-Untreat, B-Short, C-Long）

2.2 样本表面水分子接触角

氧 PIII 改性后引导膜表面水分子接触角改变，长脉冲组表面水分子接触角达 143.20± 5.58°，与其它两组相比有统计学意义（$P<0.05$）；短脉冲组的接触角稍增加，与未处理组比较无统计学差异（$P>0.05$）（表 1）。

表 1 不同改性处理组膜表面水分子的接触角比较（度，$\bar{X}\pm S$）

Table 1 Static Contact Angle of Kinds of ePTFE

Group	n	Angle
Untreat group	10	116.63 ± 2.16^{A}
Short group	10	123.73 ± 3.22^{A}
Long group	10	143.20 ± 5.58^{B}

Note: different letter represent $P<0.05$.

2.3 激光共聚焦显微镜观察

AO/EB 染色标记后，绿色标记引导膜上的活菌，为细胞膜完整的细菌；红色标记引导膜上的死菌，为胞膜受损的细菌；黄色为两种生存状态细菌总荧光的叠加（图 2）。A 组可见少量死菌和活菌粘附于 ePTFE 膜上（图 2A1- A3），C 组表面仅见个别死菌（图 2C1- C3）；B 组表面可见两种生存状态的细菌形成一定厚度的生物膜(图 2B1- B3)。

3 讨论

生物材料的大量使用提高了人类的生存质量，但其相关感染限制了生物材料临床使用。引导再生术中引导膜的相关感染影响了临床疗效，如何提高引导膜的抗感染能力成为一大难题。目前国内外多采用引导膜表面涂布抗生素、表面注入抗菌剂等来提高抗感染能力，但抗生素和抗菌剂易产生耐药性。大

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

量研究表明 PIII 技术是简单、稳定、具有可观的前景的材料表面改性技术，已广泛应用于工业界[11]。为了寻找一种简单、安全且不影响引导疗效方法，我们选用环保的氧 PIII 技术在不改变引导膜的本身性质和结构前提下，通过改变 PIII 的处理参数来改变膜的表面结构和形貌，以期改变细菌对膜的粘附性能，从而控制膜相关感染。前期试验已观察到引导再生膜经 PIII 改性后仅改变膜的表面结构、形貌和疏水性，膜内部结构和理化性能均未改变。学者们对生物材料的表面性能与细菌粘附性能相关性研究，结果证明其表面形貌结构、表面亲疏水性等对细菌的粘附性均有较大影响[12,13]。一个固体表面与水的接触角超过 90°我们则称该固体表面为疏水表面。Huaiyu Wang[14]等采用氧 PIII 处理聚四氟乙烯（PTFE），当采用长脉冲高频率处理 PTFE 时，和其它对照组相比，PTFE 表面有许多约几百纳米大小的小突状结构，水分子接触角检测改变为 153.9°，呈疏水结构形貌。本实验采用氧等离子改性后，样本表面形貌改变，长脉冲组表面呈蚀刻性粗糙的疏水表面，水分子接触角增大 26.57°。

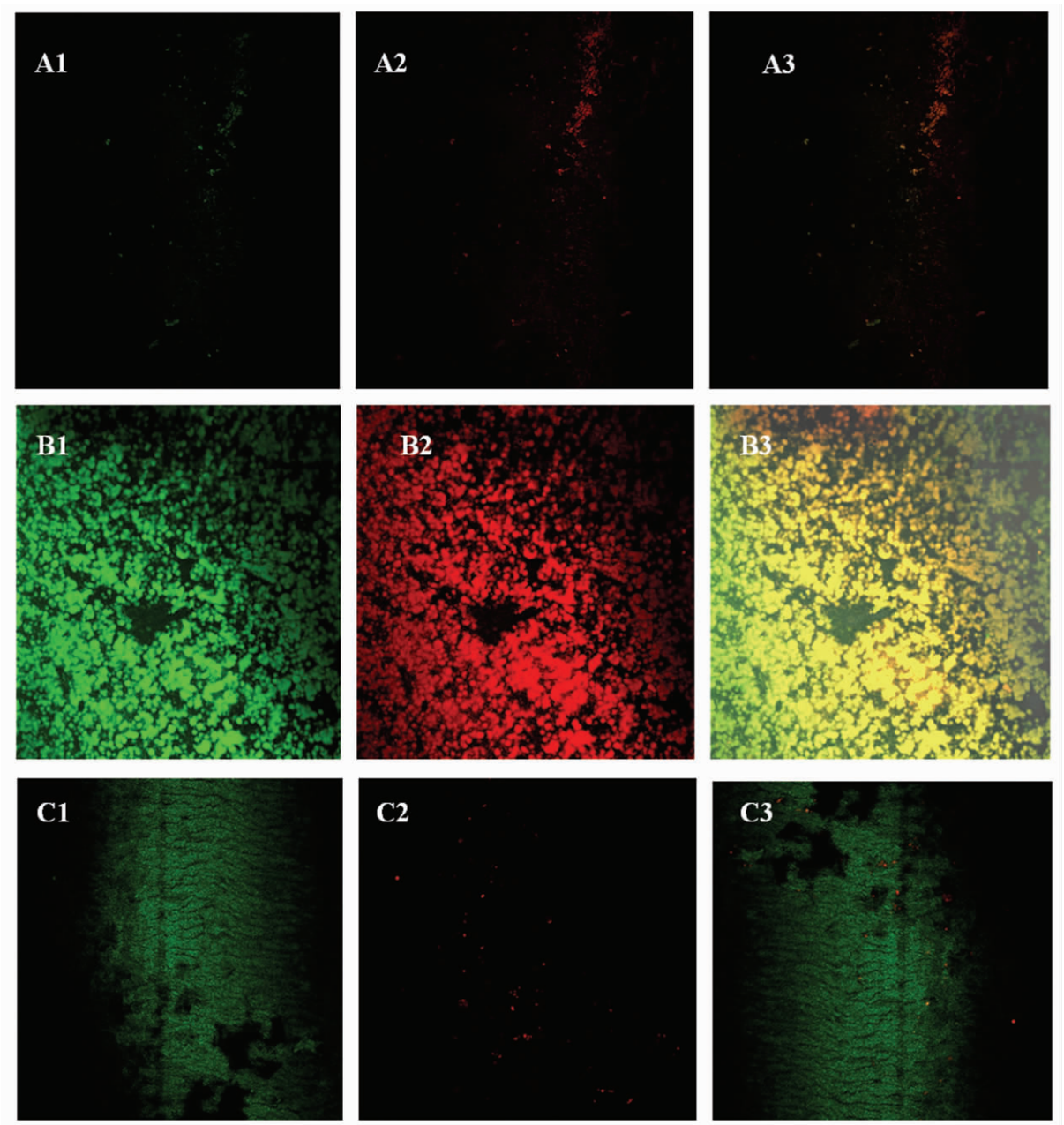

图 2 ePTFE 膜表面细菌生存状态的激光共聚焦观察结果

（A1、A2、A3 对照组，B1、B2、B3 短脉冲组，C1、C2、C3 长脉冲组）

Fig .2 Biofilm accumulation of different ePTFE

（A1, A2、A3-Untreat, B1, B2、B3-Short, C1, C2、C3-Long）

批培养法是模拟口腔内环境体外培养生物膜的方法，F,Li 等采用此方法模拟口腔内环境培养变形链球菌生物膜，实验证明获得了生长良好的变形链球菌生物膜，为后续的实验研究奠定了基础[15-17]。本实验模拟口内环境的细菌生存状态，选择变形

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

链球菌为研究对象，采用批培养法培养生物膜，更直观的观察改性 ePTFE 膜上细菌的生存状态。早期生物膜主要由粘附在生物材料上的死菌和活菌组成，有学者认为死菌具有促进生物膜进一步形成的作用[18]。为了探讨细菌对改性前后 ePTFE 膜的粘附是否有变化，实验采用 AO/EB 双荧光指示剂染色粘附于 ePTFE 上的生物膜，结果显示长脉冲组表面仅散在几个死菌；而短脉冲组有大量细菌；空白组有少量死菌和活菌粘附于 ePTFE 膜上。结果证明采用氧等离子改性技术改性 ePTFE 膜，当处理参数为脉冲频率为 500 HZ，脉冲宽度 200 μs 时，变形链球菌对 ePTFE 膜的粘附性降低。因此 PIII 技术可改变 ePTFE 膜的表面性能，处理后对口腔中常见细菌具有良好的抗粘附作用，为减少引导膜周围组织的感染、提高再生术的成功率提供了一种简便、有效的方法[19]。

引导膜相关感染是制约再生术重要因素，尽管我们已证明 PIII 技术可以减少细菌粘附，但研究对象仅为变形链球菌，而生物膜的形成是一个动态、复杂的过程[20]，且口腔生物膜是多种细菌构成。口腔多菌生物膜对 ePTFE 的动态粘附、不同浓度细菌对不同引导膜的粘附力的差异等均有待后续实验研究。

致谢：上海索康医用材料有限公司无偿提供 ePTFE 膜，特表感谢！

参 考 文 献 (References)

[1] A. Piattelli, A.S., P. Russ. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes [J]. Biomaterials, 1996, 17(8): 791-796

[2] Bunyaratavej, P. and H.L. Wang. Collagen membranes: a review [J]. J Periodontol, 2001, 72(2): 215-229

[3] Saman Nikeghbalian, S.A., Kourosh Kazemi. Repairing Large Duodenal Injuries in Dogs by Expanded Polytetrafluoroethylene Patch [J]. Journal of Surgical Research, 2008, 144(1):17-21

[4] Kyoung Hwa Kim, L.J., Ho-Nam Park. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration journal of biotechnology[J]. Journal of Biotechnolog, 2005, 120(3): 327-339

[5] MacKintosh, E.E. Effects of biomaterial surface chemistry on the adhesion and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis in vitro [J]. J Biomed Mater Res A, 2006, 78(4): 836-842

[6] Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, (427): 4-12

[7] Amoroso, P.F. Titanium surface modification and its effect on the adherence of Porphyromonas gingivalis: an in vitro study [J]. Clin Oral Implants Res, 2006, 17(6):633-637

[8] Asadinezhad, A. An in vitro bacterial adhesion assessment of surface-modified medical-grade PVC [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010, 77(2):246-256

[9] Chu, C.L. Surface structure and properties of biomedical NiTi shape memory alloy after Fenton's oxidation [J]. Acta Biomater, 2007, 3(5): 795-806

[10] P. K. Chu, S.O., Chung Chan. Plasma immersion ion implantation-a fledgling technique for semiconductor processing [J]. Materials Science and Engineering: R: Reports, 1996, 17(6-7): 207-280

[11] Loh, J.H. Plasma surface modification in biomedical applications[J]. Med Device Technol, 1999, 10(1): 24-30

[12] 张维. 等离子体制备抗感染医用高分子材料的研究[D]. 全国博士论文, 2006
Zhang Wei. The sthudy of anti-infection medical polymers by plasma immersion ion implantation[D]. dissertation, 2006

[13] Kienast, A. Influence of a new surface modification of intraocular lenses with fluoroalkylsilan on the adherence of endophthalmitis-causing bacteria in vitro[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2006, 244(9): 1171-1177

[14] Huaiyu Wang, Dixon T.K. Kwok, Wei Wang, et al. Osteoblast behavior on polytetrafluoroethylene modified by long pulse, high frequency oxygen plasma immersion ion implantation [J]. Journal of biomaterials, 2010, 31: 413-419

[15] Filoche, S.K., K.J. Soma, and C.H. Sissons. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates [J]. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22(2): 73-79

[16] Guggenheim B. Application of the Zurich biofilm model to problems of cariology[J]. Caries Res, 2004, 38(3): 212-222

[17] Li, F. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer [J]. J Dent Res, 2009, 88(4): 372-376

[18] Netuschil, L., E. Reich, M. Brecx. Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on human dental plaque [J]. J Clin Periodontol, 1989, 16(8):484-488

[19] 吴艳, 李翠侠. 氧等离子注入对膨体聚四氟乙烯膜表面性能和细菌粘附影响的实验研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(12): 688-692
Wu Yan, Li Cui-xia. Surface modification of expanded polytetrafluoroethylene membrane by oxygen plasma immersion ion implantation and its antibacterial adhesion efficiency [J]. Chinese Journal of Conservative Dentistr, 2009, 19(12): 688-692

[20] Otto, K. Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion[J]. Research in Microbiology, 2008, 159(6): 415-422

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net