

特约专栏

新型抗菌功能医用金属研究

杨柯¹, 任玲¹, 张余², 马政¹, 张丹³, 梅晰凡⁴

(1. 中国科学院金属研究所, 辽宁 沈阳 110016)

(2. 广州军区广州总医院, 广东 广州 510010)

(3. 中国医科大学口腔医学院, 辽宁 沈阳 110001)

(4. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 不锈钢、钛及钛合金等医用金属材料已广泛应用于骨科、齿科及心血管介入等医疗领域, 生物可降解镁合金是正在研究发展的新型医用金属材料, 具有诱人的临床应用前景。面对目前临床上亟待解决的植入物引发的细菌感染问题, 开展医用金属材料的抗菌功能研究意义重大, 也是实现金属材料结构/功能一体化发展的新探索。简要介绍了作者近年来在不锈钢、钛合金、可降解镁基金属等医用金属材料的抗菌功能研究方面的主要进展, 并展望了抗菌医用金属材料的临床应用前景。

关键词: 医用金属材料; 抗菌功能; 含铜不锈钢; 镁基金属; 含铜钛基金属

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2012)09-0020-07

Study on Novel Metallic Biomaterials with Antibacterial Functions

YANG Ke¹, REN Ling¹, ZHANG Yu², MA Zheng¹, ZHANG Dan³, MEI Xifan⁴

(1. Institute of Metal Research, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

(2. Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

(3. School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China)

(4. Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract: Metallic biomaterials such as stainless steels and titanium alloys are widely used in medical areas including orthopedics, dentistry and coronary stents. Biodegradable magnesium alloys are a new class of metallic biomaterials that are being studied and developed with attractive future of clinical applications. In order to solve the currently existed bacterial infections caused by implants, it is great significance to study and develop novel metallic biomaterials with antibacterial functions, which is also a new exploration to realize the structural/functional integrity for metallic materials. This paper briefly introduces the recent research progresses on antibacterial functions of stainless steels, titanium alloys and biodegradable magnesium-based materials, and proposes the future applications for antibacterial metallic biomaterials.

Key words: metallic biomaterial; antibacterial function; Cu-bearing stainless steel; magnesium alloy; Cu-bearing titanium alloy

1 前言

医用金属材料以其高强度、耐疲劳、易加工成形和应用可靠性高等一系列优良特性, 一直是医学临床上用量大而广泛的一类生物医用材料, 占到植入性医疗器械用材的40%以上, 是需要承受较高载荷的骨、齿等硬组织治疗以及制作介入治疗支架的首选植入材料, 大

量应用于骨科、齿科、心血管介入治疗等医疗领域中的各类植入医疗器械以及各种外科手术工具。因此, 提升现有医用金属材料的性能, 以及发展新型医用金属材料, 对于进一步提升金属植入器械的治疗水平, 扩大医疗功能和提高相关产品的市场竞争力, 造福广大患者, 都具有重要的现实意义。

作为常见的也是灾难性的术后并发症, 与医疗器械或植入材料相关的细菌感染, 正在成为21世纪医学领域内亟待解决的重要问题之一, 也成为以生物医用材料为中心而引发的感染问题(Biomaterial Centered Infection, BCI)^[1]。有统计表明, 美国骨科植入物相关感染的年发病率约为4.3%^[2]。根据世界卫生组织(WHO)颁布

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 科技部973计划项目(2012CB619101); 全军医学科研面上课题资助项目(CWS11C268)

第一作者及通信作者: 杨柯, 男, 1961年生, 研究员

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2012.09.03

的《院内感染防治实用手册》中的有关数据,每天全世界有超过1 400万人正在遭受院内感染的痛苦,其中60%的细菌感染与使用的医疗器械有关^[3]。David等^[4]在骨科植入器械相关感染问题的综述性文章中指出,金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌是引起骨科植入器械感染的主要细菌,分别占到34%和32%。王化芬等^[5]近年对国内708例采自骨科病房及骨科门诊病人的细菌感染患者的3年统计数据表明,金黄色葡萄球菌是骨科病人感染单菌株的首位感染菌,3年平均占到33.0%;但以大杆菌为代表的革兰阴性杆菌的总菌株数在3年平均已占到分离菌总数的52%,且有逐年增高的趋势。Leonhardt等^[6]研究表明,引起口腔正畸器械细菌感染的主要是变形链球菌、牙龈卟啉单胞菌等厌氧菌。

由植入器件引发的细菌感染与细菌生物膜(Bacterial Biofilm, BF)的形成密切相关。细菌生物膜是单一或多种细菌为适应自然环境而形成的微菌落聚集物,其主要成分为多糖蛋白复合物,将细菌自身包裹其中,使细菌相互黏连产生特定结构的细菌复合体,形如膜状并不可逆地附着于病灶或器件表面^[7]。据美国国家卫生研究院(NIH)的初步统计,80%的细菌性疾病与细菌生物膜有关。人体内如呼吸道、牙面上的牙菌斑、体内短期或长时间留置的人工装置(如导尿管、人工瓣膜、支架等)上均有细菌生物膜的广泛存在,并且具有极强的耐药性及免疫逃避性^[8]。

细菌生物膜对抗菌药物具有很强的耐药性。首先,由包外多糖等物质构成的细菌生物膜的独特三维结构,起到保护生物膜细菌的作用,成为抗菌药物向生物膜和生物膜细菌体内渗透的天然屏障,降低了菌体内抗菌药物的浓度,表现出耐药性。其次,细菌生物膜中的营养成分自外向内,呈梯度下降,生物膜细菌处于饥饿状态,使得细菌生长缓慢,处于这种状态的细菌对抗菌药物多不敏感。最后,细胞生物膜主要是经过定植、释放和影响宿主免疫系统而致病^[9]。由此可见,如果能直接从植入材料的角度上解决植入器件造成的细菌感染问题,或能够有效降低细菌感染发生的风险性,将会具有重要的临床应用价值。

2 金属植入材料的抗菌功能研究

利用Cu离子来杀菌的历史十分悠久,自1761年Schulthees采用硫酸铜防治小麦腥黑病起,至今已有200多年的历史。1885年法国人Milharde研究开发成功著名的含Cu离子杀菌功能的波尔多液,化解了法国波尔多庄园葡萄连年遭受病虫害的危机,随后,相继出现了很多品种的含Cu离子杀菌剂,开创了Cu离子杀菌的辉煌

时代。Cu是钢中常见的一种合金化元素,其可提高钢的强度、耐蚀性,并改善钢的冷变形加工性能。因此,本课题组就是利用Cu离子具有的强烈广谱杀菌能力,在国际上率先开展了含Cu医用金属材料的抗菌功能研究,取得了令人振奋的研究进展,具有诱人的临床应用前景。

2.1 含Cu抗菌不锈钢

针对临床上亟待解决的与植入器件相关的细菌感染问题,在已有含Cu抗菌不锈钢研究方面的大量相关工作基础上^[10-14],通过在目前骨科等领域广泛临床应用的317L不锈钢(一种Fe-Cr-Ni-Mo型奥氏体不锈钢)中添加4%~5%的Cu元素,设计和制备出具有强烈抗菌能力的317L-Cu抗感染不锈钢^[15]。在此基础上,开展了多方面的体外及部分体内植入相关实验研究,证明317L-Cu抗菌不锈钢对骨科典型感染细菌具有强烈的抗菌感染能力,有望成为具有抗感染功能的新型医用不锈钢而得到临床应用。

研究结果表明:①经过固溶+时效热处理后,317L-Cu抗菌不锈钢基体中,会弥散析出一定量的富Cu相,其有助于不锈钢在人体环境中持续溶出微量Cu离子,从而起到强烈广谱杀菌作用^[10];②317L-Cu抗菌不锈钢对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)等常见感染细菌均具有强烈的杀灭作用^[16],如图1所示,与细菌接触24 h后的杀菌率接近100%;③317L-Cu抗菌不锈钢,可强烈抑制在其表面形成细菌生物膜^[16](见图2~图4),从而会具有抑制或降低细菌感染的医学功能;④将同时沾有菌液的317L不锈钢和317L-Cu抗菌不锈钢螺钉植入兔子骨内一定时间后,发现前者螺钉周围组织中含有较多的炎性细胞,具有较强的细菌感染倾向,而后的相应组织中很难发现有炎性细胞存在,初步说明317L-Cu抗菌不锈钢在体内具有明显的抗感染能力^[17]。

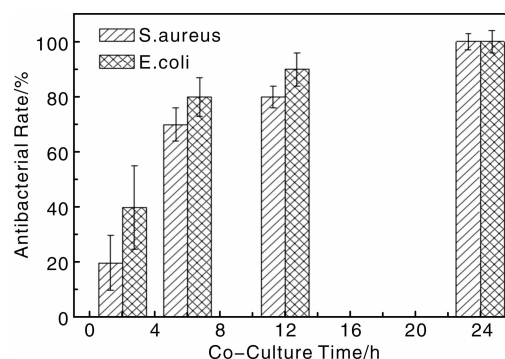


图1 317L-Cu 不锈钢分别与金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)在37 °C共培养2~24 h后的杀菌率

Fig. 1 Antibacterial rates of 317L-Cu SS against *S. aureus* and *E. coli* after co-cultured with bacteria at 37 °C for 2, 6, 12 and 24 h, respectively

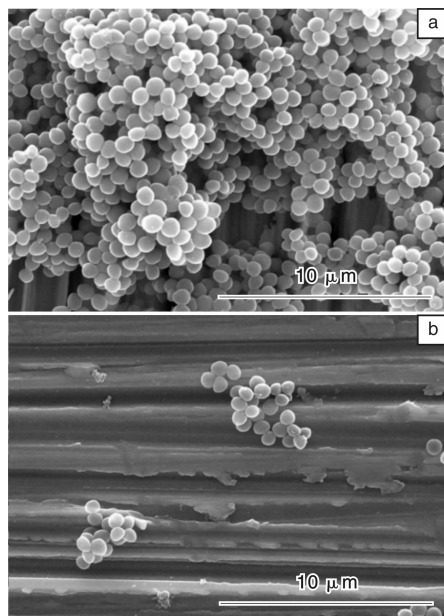


图2 317L(a)和317L-Cu(b)不锈钢与金黄色葡萄球菌共培养 24 h 后的表面 SEM 照片

Fig. 2 SEM images of *S. aureus* on surfaces of 317L SS (a) and 317L-Cu SS (b) after incubation at 37 °C for 24 h

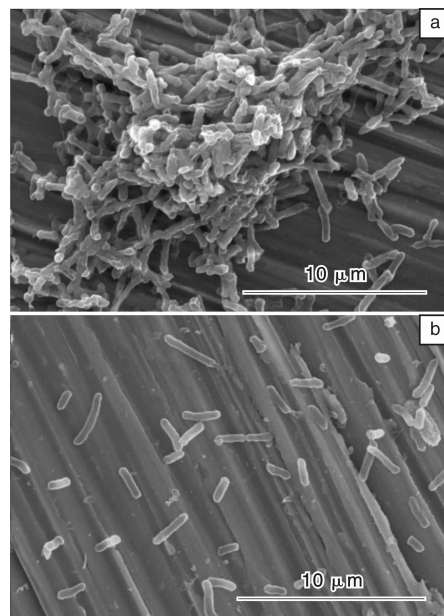


图3 317L(a)和317L-Cu(b)不锈钢与大肠杆菌共培养 24 h 后的表面 SEM 照片

Fig. 3 SEM images of *E. coli* on surfaces of 317L SS (a) and 317L-Cu SS (b) after incubation at 37 °C for 24 h

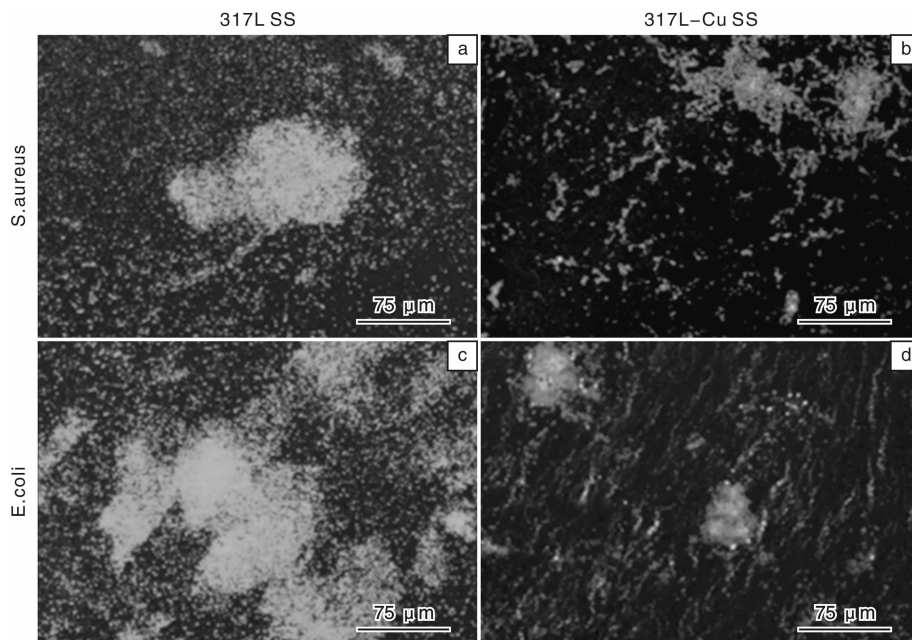


图4 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)分别在 317L 不锈钢(a, c)和 317L-Cu 不锈钢(b, d)表面上培养 24 h(37 °C)后的荧光染色照片, (a, c)中的浅灰色代表活细菌染色结果, (b, d)中的深灰色代表死亡细菌染色结果

Fig. 4 Fluorescent images of *S. aureus* on surfaces of 317L SS (a) and 317L-Cu SS (b), and *E. coli* on surfaces of 317L SS (c) and 317L-Cu SS (d), respectively, after incubation at 37 °C for 24 h with live bacteria stained light grey (a, c) and dead bacteria stained dark grey (b, d)

此外,在 304 不锈钢(一种 Fe-Cr-Ni 型奥氏体不锈钢)成分基础上,通过添加 3% ~4% 的 Cu 元素,设计并

制备出 304-Cu 抗菌不锈钢^[10-14],并针对口腔中引起牙周炎的主要致病菌之一,牙龈卟啉单胞菌(*P. g*,一种厌

氧菌), 开展了抗菌功能实验研究。研究结果表明, 304-Cu 抗菌不锈钢对牙龈卟啉单胞菌具有强烈的杀灭作用, 与细菌接触 10 h 以上时的杀菌率接近 100%, 见图 5。

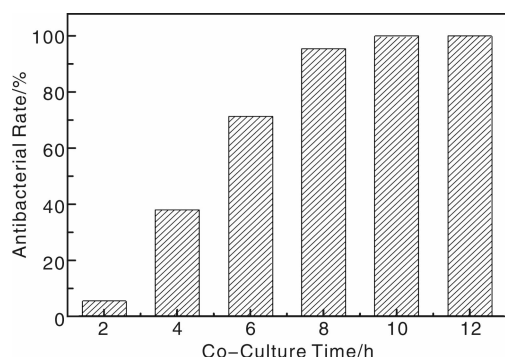


图5 304-Cu 抗菌不锈钢与牙龈卟啉单胞菌共培养不同时间时的杀菌率

Fig. 5 Antibacterial rate of 304-Cu stainless steel against P. g after co-cultured for different time

从生物安全性的角度考虑, 将 317L-Cu 抗菌不锈钢样品在生理盐水中浸泡不同时间后, 利用原子吸收光谱 (AAS) 测得每天的 Cu 溶出量约为 5×10^{-6} mg/cm²。对于一只尺寸为 40 mm × 10 mm × 2 mm 的 317L-Cu 抗菌不锈钢骨板, 则其每天的 Cu 溶出量约为 5×10^{-6} mg, 远低于世界卫生组织推荐的成人每日 2 ~ 3 mg 的 Cu 摄入量^[18]。即使考虑到人体肠胃对食物中金属的吸收率为 0.1%, 则每天由食物等摄入 Cu 的最高吸收量为 $(2 \sim 3) \times 10^{-3}$ mg, 也远大于上述 317L-Cu 抗菌不锈钢骨板中的每天 Cu 溶出量。所以, 可以初步判断, 含 Cu 不锈钢应该是生物安全的。此外, 适量 Cu 元素的加入, 对 317L 型不锈钢的力学性能和耐均匀腐蚀能力没有显著影响, 力学强度略有增加, 均匀腐蚀速率升高不足 10%。此外, 细胞毒性实验结果表明^[19-20], 304-Cu 抗菌不锈钢对 L929 细胞 (小鼠成纤维细胞)、MG63 细胞 (人骨肉瘤细胞)、KB 细胞 (人口腔上皮癌细胞) 的细胞毒性与纯 Ti 及 304 不锈钢相同, 均为 1 级, 满足对外科植入物材料的细胞毒性要求。此外, 还采用 CCK-8 法考察了 316L-Cu 不锈钢的生物安全性, 并对其进行毒性评级^[21], 实验结果见表 1。可见, 316L 和 316L-Cu 两种

表1 不同培养时间点各组 RGR 的细胞毒性

Table 1 RGR and cytotoxicity level of the extracts of experimental materials at different time

Samples	24 h		48 h		72 h	
	RGR/%	Level	RGR/%	Level	RGR/%	Level
Culture	100.00	0	100.00	0	100.00	0
316L	91.01	0	86.87	0	88.74	0
316L-Cu	80.72	0	86.27	0	85.25	0

不锈钢在观察期 (0 ~ 72 h) 内对 MG63 细胞的细胞毒性均为 0 级, 均符合外科植入材料的评级要求 (0 ~ 1 级), 是生物安全的。

2.2 含 Cu 抗菌 Ti 合金

纯 Ti 已经广泛应用于牙种植体等齿科材料, Ti-6Al-4V Ti 合金则以其高强度、低密度、高耐腐蚀性等优势而广泛应用于骨科领域。为此, 分别设计了 Ti-xCu ($x = 10, 20, 30$) 和 Ti-6Al-4V-yCu ($y = 1, 3, 5$) 系列含 Cu Ti 合金^[22-23], 以期对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等常见致病细菌同样起到强烈的杀灭作用。研究结果表明, Cu 元素的加入在 Ti 合金中形成了一定量的 Ti₂Cu 相, 从而具有了强烈抗菌功能。从表 2 中可以看出, 含 Cu 钛基金属对 E. coli, S. aureus 均具有强烈的杀菌作用, 说明 Ti₂Cu 析出相起到了杀菌作用, 即含 Cu 钛基金属表面溶出的 Cu²⁺ 起到了杀菌作用。

表2 含 Cu 钛基金属杀菌率 (%)

Table 2 Antibacterial rate of Cu-bearing Ti based metal (%)

Materials	Ti-10 Cu	Ti-20 Cu	Ti-30 Cu	Ti-6Al-4V-1Cu	Ti-6Al-4V-3Cu	Ti-6Al-4V-5Cu
E. coli	99.99	99.99	99.99	95	99.99	99.99
S. aureus	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99

从体外抗菌结果得知, 其具有优异的杀菌性能, 然而其是否在具有优良的抗菌性能同时, 还满足生物安全性能的要求, 为此, 选取 Ti-6Al-4V-3Cu 进行了 CCK-8 细胞毒性评级。不同培养时间点各实验样品分组的 L929 细胞相对增值率及细胞毒性等级见表 3^[22]。可见 Ti-6Al-4V-3Cu 在观察期 (2 ~ 7 d) 内, 对 L929 细胞的细胞毒性均为 0 级, 均符合外科植入材料的评级要求 (0 ~ 1 级), 是生物安全的。此外, Ti-6Al-4V-3Cu 浸提液培养 24 h 的 L929 细胞形貌见图 6^[22-23], 从图中可以看出, Ti-6Al-4V-3Cu 组的细胞与其它两对照组的细胞形态没有区别, 细胞形貌正常, 状态良好。表 4 给出的 Ti-6Al-4V 合金与 Ti-6Al-4V-3Cu 合金^[23] 的常规力学性能数值说明, Ti-6Al-4V-3Cu 的强度明显提高, 塑像下降, 在其发挥抗感染生物医学功能的同时, 还能保持较好的力学性能。

表3 Ti-6Al-4V-3Cu 浸提液培养 L929 细胞 2, 4, 7 d 的 RGR 及毒性级别

Table 3 RGR and cytotoxicity level of L929 after cultured in Ti-6Al-4V and Ti-6Al-4V-3Cu extracts for 2, 4, 7 days

Materials	2 d		4 d		7 d	
	RGR/%	Cytotoxicity level	RGR/%	Level	RGR/%	Level
Ti-6Al-4V-3Cu	111.61	0	101.78	0	120.35	0
Ti-6Al-4V	117.49	0	98.78	1	142.99	0

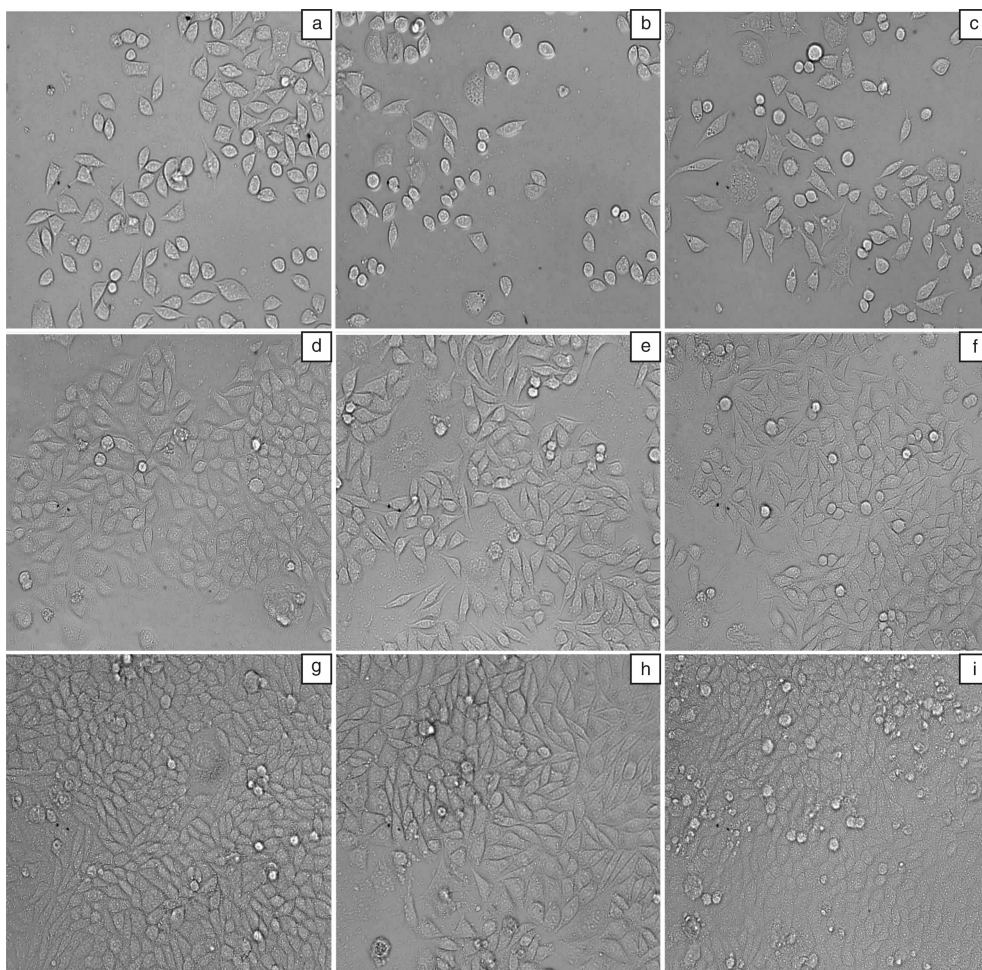


图 6 Ti-6Al-4V 和 Ti-6Al-4V-3Cu 浸提液培养 L929 细胞 2, 4, 7 d 的细胞形态: Ti-6Al-4V-3Cu (a, d, g), Ti-6Al-4V (b, e, h), 正常细胞对照(c, f, i)

Fig. 6 Morphology of L929 after cultured in Ti-6Al-4V (b, e, h) and Ti-6Al-4V-3Cu (a, d, g) extraction liquid for 2, 4, 7 days, and normal bacteriums contrasted (c, f, i)

表 4 Ti-6Al-4V 与 Ti-6Al-4V-3Cu 的力学性能比较

Table 4 Comparison of mechanical properties between Ti-6Al-4V and Ti-6Al-4V-3Cu

Materials	$R_{p0.2}/\text{MPa}$	R_m/MPa	$A/\%$	$Z/\%$
Ti-6Al-4V	877	959	13.2	47.9
Ti-6Al-4V-3Cu	1145	1224	7.6	17.3

2.3 镁基金属的抗菌作用

近年来,随着具有生物可降解特性的镁基金属材料研究的不断深入和拓展,可降解镁合金骨内植入器件和心血管支架产品的研究开发已经逐步展开,并有望尽快进入临床应用。由于镁基金属在人体环境中的降解会引起其周围环境的碱性大幅升高,即 pH 值的显著增大,这也会明显破坏细菌的生存条件,从而起到杀灭细菌的作用。研究结果^[24]证实了镁基金属的这一生物功能,即镁基金属在体液环境中的降解可以强烈杀死大肠杆

菌、金黄色葡萄球菌等常见感染细菌。如图 7 所示,纯镁和 AZ31 镁合金(Mg-3% Al-1% Zn)分别浸泡在这 2 种细菌液中 48 h 后,对这 2 种细菌都产生了强烈杀灭作用,对浸泡镁基金属的菌液在培养皿中培养后,已看不到活细菌的存活。

进一步的研究表明,镁基金属的这一杀菌作用,可以通过适当的表面改性来调控。当镁基金属表面改性效果较好时(如采用氟化学处理),由于显著降低了镁基金属的降解速度,会使其抗菌作用下降或消失;如果表面改性效果较弱时(如采用阳极氧化处理),则其仍保持较强的杀灭细菌功能。深入研究表明^[24],镁基金属降解能够强烈杀死细菌的主要原因,是由镁基金属在降解过程中造成的周围环境中 pH 值的大幅升高(即碱性增大)而导致,而并非 Mg^{2+} 浓度增大的原因。镁基金属的杀菌作用在初步的动物实验中得到证实。如图 8 所示^[24],将金黄色葡萄球菌液注入兔子胫骨骨髓中 4 周

后, 将骨髓抽出培养, 可见有大量细菌存活; 之后再在原位适量填入纯 Mg 颗粒 1 周后, 将骨髓抽出培养, 已无明显细菌存活, 说明纯 Mg 在骨髓中起到了明显的杀菌作用。

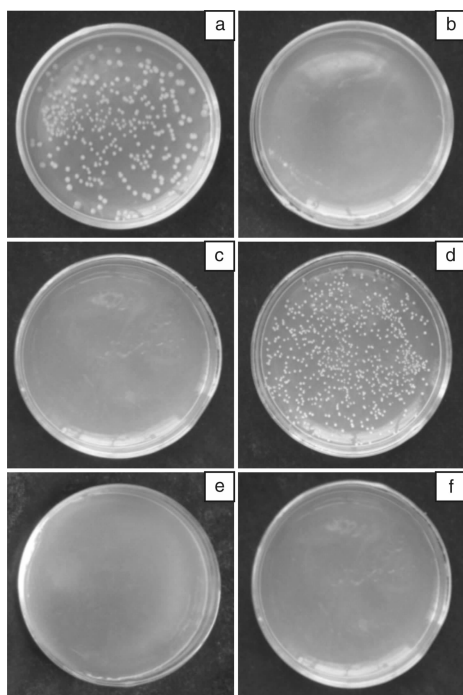


图7 镁基金属在不同菌液中降解对大肠杆菌(a, b, c)和金黄色葡萄球菌(d, e, f)的杀灭效果照片: (a, d)317L 不锈钢, (b, e)纯镁, (c, f)AZ31 镁合金

Fig.7 Antibacterial property of Mg based metal against *E. coli* (a, b, c) and *S. aureus* (d, e, f): (a, d) for 317L, (b, e) for Mg, and (c, f) for AZ31

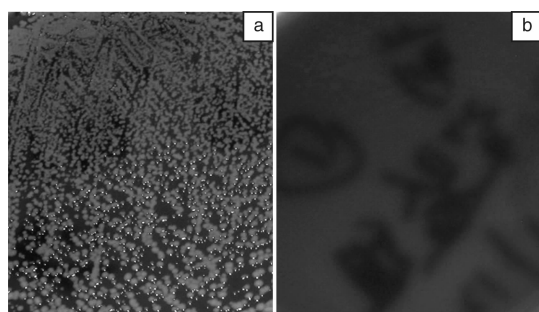


图8 将金黄色葡萄球菌液注入兔子胫骨骨髓中4周后, 将骨髓抽出培养, 可见有大量细菌存活(a), 再在原位填入纯镁颗粒1周后, 将骨髓抽出培养, 已无明显细菌存活(b)

Fig.8 *S. aureus* suspension injected in tibia of rabbit for 4 weeks, then the bone marrow was extracted and cultured which shown great number of live bacteria (a); implanted Mg particle in the tibia which infected by *S. aureus* for 1 week, then the bone marrow was extracted and cultured which have non live bacteria (b)

3 结 语

本文简要介绍的大量研究工作已经表明, 将具有杀菌功能的铜(Cu)元素适量加入到现已广泛临床应用的317L 不锈钢、纯钛、Ti-6Al-4V 合金中, 会赋予这些结构性医用金属材料强烈的抗菌功能, 从而在骨科、齿科和心血管介入治疗等临床应用中同时起到防止细菌感染的重要作用, 对于提高植入器件的治疗效果, 减轻患者负担, 从而提高相关医疗产品的市场竞争力等均具有重要的现实意义。

镁基金属材料的生物可降解特性使其有望很快在临床中得到应用, 其具有的强烈抗菌功能会进一步拓宽其应用范围。除了人们目前在骨内固定、骨内填充、心血管支架等方面的临床应用开发外, 镁基金属还可能在治疗由细菌感染造成的骨髓炎等方面发挥其特有功能, 起到意想不到的治疗作用。

参考文献 References

- [1] Stamm W E. Infections Related to Medical Devices[J]. *Ann Inter Med*, 1978 (89): 764 - 769.
- [2] Zimmerli W, Tram Puz A, Ochsner P E. Prosthetic-Join Infections [J]. *N Engl JM*, 2004 (16): 1 645 - 1 654.
- [3] Ye Gang(叶 刚), Zhang Weimin(张伟民), Yan Qing(严庆), *et al.* 抗感染 PVC 材料的研制及应用[J]. *World Plastic* (国外塑料), 2007, 25(3): 34 - 38.
- [4] Davide C, Lucio M, Carla R A. The Significance of Infection Related to Orthopedic Devices and Issues of Antibiotic Resistance [J]. *Biomaterials*, 2006 (27): 2 331 - 2 339.
- [5] Wang Huafen(王化芬), Wang Xiaojun(王晓军), Yu Qian(于茜). 骨科感染病原菌谱与抗菌谱 3 年报告[J]. *Orthopedic Journal of China*(中华矫形外科杂志), 2007(4): 313 - 315.
- [6] Leonhardt A, Adolfsson B, Lekholm U, *et al.* Putative Periodontal Pathogens on Titanium Implants and Teeth in Experimental Gingivitis and Periodontitis in Beagle Dogs[J]. *Clinical Oral Implants Research*, 1992(3): 112 - 116.
- [7] Donlann R M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces[J]. *Emerging Infectious Disease*, 2002 (9): 881.
- [8] Stewart P S, Costerton J W. Antibiotic Resistance of Bacteria Inbiofilms[J]. *Lancet*, 2001 (9 276): 135 - 138.
- [9] Ge Jianping(葛剑平), Yue Songling(岳松龄), Hu Tao(胡涛). 生物膜细菌耐药性机制的研究概况[J]. *Foreign Medical Sciences*(国外医学), 2004(5): 351 - 352.
- [10] Chen Sihong(陈四红), Lv Manqi(吕曼祺), Zhang Jingdang(张敬党), *et al.* 含 Cu 抗菌不锈钢的微观组织及其抗菌性能[J]. *Acta Metallurgica Sinica* (金属学报), 2004 (40): 314.
- [11] Nan Li(南 黎), Liu Yongqian(刘永前), Yang Weichao(杨伟超), *et al.* 含铜抗菌不锈钢的抗菌特性研究[J]. *Acta*

