



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104258468 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201410521036. 4

(22) 申请日 2014. 09. 30

(71) 申请人 广西中医药大学

地址 530213 广西壮族自治区南宁市青秀区五合大道 13 号

(72) 发明人 李培源 苏炜 霍丽妮 陈睿

(74) 专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理事务所 (普通合伙) 11369

代理人 靳浩

(51) Int. Cl.

A61L 27/54 (2006. 01)

A61L 27/38 (2006. 01)

A61L 27/06 (2006. 01)

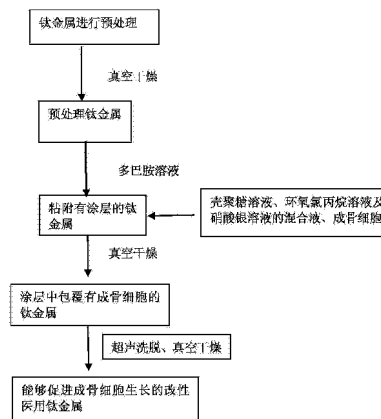
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法

(57) 摘要

本发明公开了一种具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,将钛金属预处理,配制可粘附在钛金属表面的含有一定交联空间结构的混合液,其中混合液中含具有抗菌作用的硝酸银,再加入成骨细胞和预处理钛金属,真空干燥,得到涂层中包覆有成骨细胞的钛金属,最后浸入胰酶溶液中 15-45 秒,超声洗脱,真空干燥,得到本发明所述能够促进成骨细胞生长的改性医用钛金属。本发明方法简单,制备条件温和,在制备过程中无有害物质产生,本发明所得产品能有效识别成骨细胞,促进成骨细胞在钛金属表面的快速生长,有效抑制细菌生长;将本发明所得产品作为植入体植入体内后,有利于成骨细胞在钛金属表面固定生长。



www.patviewer.com
CN 104258468 A

1. 一种具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一、钛金属预处理,将钛金属在 10-20ml 1-3mol/L 丙酮溶液中超声处理 2-3 次,每次 15-45 分钟,然后放入体积分数为 30-40%硝酸溶液中浸泡 5-30 分钟,真空干燥,得到预处理钛金属;

步骤二、涂层制备,取预处理钛金属浸泡于多巴胺水溶液中 20-30 小时,得到粘附有涂层的钛金属;

步骤三、成骨细胞的引入,分别配置一定浓度的壳聚糖溶液、环氧氯丙烷溶液及硝酸银溶液,混合所述三种溶液,得到可与涂层连接的具有一定交联空间结构的混合液,向所述混合液中加入成骨细胞和预处理钛金属,浸泡 5-10 分钟后,取出预处理钛金属,真空干燥得到涂层中包覆有成骨细胞的钛金属;

步骤四、成骨细胞的移除,将步骤三得到的涂层中包覆有成骨细胞的钛金属浸入胰酶溶液中 30-50 秒,再放入蒸馏水中超声 5-10 分钟,使所述成骨细胞从所述交联空间结构内移除,并使预处理钛金属表面形成具有与成骨细胞相匹配的空间结构的涂层,即得兼具抗菌性及促成骨细胞生长的改性钛金属。

2. 如权利要求 1 所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其特征在于,步骤二中多巴胺水溶液的用量为 10-20ml,浓度为 1-3mg/mL。

3. 如权利要求 1 所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其特征在于,步骤三中所述壳聚糖溶液是取 2-4g 壳聚糖溶于 30-80ml 含 0.3-0.5mmol 乙酸的蒸馏水得到;环氧氯丙烷溶液是取 0.2-0.5g 环氧氯丙烷溶于 5-15ml 乙醇得到;硝酸银溶液是取 0.01-0.05g 硝酸银溶于 1-5ml 蒸馏水制得。

4. 如权利要求 3 所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其特征在于,所述壳聚糖是端基为羧基,分子量为 10-100 万的壳聚糖。

5. 如权利要求 1 所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其特征在于,步骤三中所述成骨细胞的用量为 1-5ml,所述成骨细胞密度为 $2-10 \times 10^4/\text{ml}$ 。

6. 如权利要求 1 所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其特征在于,步骤四中所述胰酶溶液为用量为 2-10ml,所述胰酶溶液浓度为 0.25-1%;所述蒸馏水为 30-50ml。

7. 如权利要求 1 所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其特征在于,所述真空干燥条件为压强 0.1-0.3MPa,温度为 80-120°C,干燥时间为 10-30 分钟。

一种具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医用材料的表面改性领域,具体为一种兼具抗菌性及促进成骨细胞生长的钛金属改性方法。

背景技术

[0002] 随着医疗技术发展,医用钛金属被作为牙种植体和骨种植体等种植材料广泛应用在牙列缺损、骨头损失等疾病治疗,在挽救人的生命方面发挥了重要作用。然而该类手术的感染率很高,可能会导致大量抗生素治疗、去除种植体甚至死亡等严重后果。种植体相关感染高发的主要原因有两点:菌斑在种植体表面聚集和种植体骨结合界面抵抗能力低下。因此,需要提高钛金属的抗菌性能和促进成骨细胞生长功能。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,经过改性之后的钛金属提高涂层的稳定性,增强粘附效果,同时在加入抗菌物质,在提高钛金属的促成骨细胞生长能力的同时增强钛金属的抗菌能力。

[0004] 本发明提供的技术方案是:

[0005] 一种具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0006] 步骤一、钛金属预处理,将钛金属在 10-20ml 1-3mol/L 丙酮溶液中超声处理 2-3 次,每次 15-45 分钟,然后放入体积分数为 30-40%硝酸溶液中浸泡 5-30 分钟,真空干燥,得到预处理钛金属;

[0007] 步骤二、涂层制备,取预处理钛金属浸泡于多巴胺水溶液中 20-30 小时,得到粘有涂层的钛金属;

[0008] 步骤三、成骨细胞的引入,分别配置壳聚糖溶液、环氧氯丙烷溶液及硝酸银溶液,混合所述三种溶液,得到可与涂层连接的具有一定交联空间结构的混合液,向所述混合液中加入成骨细胞和预处理钛金属,浸泡 5-10 分钟后,取出预处理钛金属,真空干燥得到涂层中包覆有成骨细胞的钛金属;

[0009] 步骤四、成骨细胞的移除,将步骤三得到的涂层中包覆有成骨细胞的钛金属浸入胰酶溶液中 30-50 秒,再进入蒸馏水中超声 5-10 分钟,使所述成骨细胞从所述交联空间结构内移除,并使预处理钛金属表面形成具有与成骨细胞相匹配的空间结构的涂层,即得所述兼具抗菌性及促成骨细胞生长的改性钛金属。

[0010] 优选的是,所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法中,步骤二中多巴胺水溶液的用量为 10-20ml 密度为 1-3mg/mL。

[0011] 优选的是,所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法中,步骤三中所述壳聚糖溶液是取 2-4g 壳聚糖溶于 30-80ml 含 0.3-0.5mmol 乙酸的蒸馏水得到;环氧氯丙烷溶液是取 0.2-0.5g 环氧氯丙烷溶于 5-15ml 乙醇得到;硝酸银溶液是取 0.01-0.05g

硝酸银溶于 1-5ml 蒸馏水制得；

[0012] 优选的是,所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法中,所述壳聚糖是端基为羧基,分子量为 10-100 万的壳聚糖。

[0013] 优选的是,所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法中,步骤三中所述成骨细胞的用量为 1-5ml,所述成骨细胞密度为 $2-10 \times 10^4/\text{ml}$ 。

[0014] 优选的是,所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法中,步骤四中所述胰酶溶液为用量为 2-10ml,所述胰酶溶液浓度为 0.25-1% ;所述蒸馏水用量为 30-50ml。

[0015] 优选的是,所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法中,所述真空干燥条件为压强 0.1-0.3MPa,温度为 80-120°C,干燥时间为 10-30 分钟。

[0016] 本发明带来的有益效果是:本发明中采用分子印迹的方法,先使多巴胺紧密粘附在钛金属表面,再与涂层连接的具有一定交联空间结构形成一个交联的空间结构,引入成骨细胞,在加热条件下将成骨细胞包覆在交联空间结构中,同时壳聚糖的羧基可以跟多巴胺的胺基结合,稳定的与钛金属连接,粘附在钛金属表面,增加了涂层在钛金属表面的稳定性;在胰酶的作用下将成骨细胞移除,钛金属表面留下成骨细胞的“印迹”,即为与成骨细胞相匹配的空穴,具有对成骨细胞分子有效识别的功能,当钛金属表面的空穴与成骨细胞接触时,成骨细胞在钛金属表面固定生长。并且在钛金属进行改性前,先通过丙酮溶液进行除油处理,除去钛金属表面的氧化膜,有效防止涂层脱落,促进涂层的稳定性,通过在钛金属表面引入壳聚糖具有抗菌效果,提高了钛金属的抗菌性能。壳聚糖的生物相容性良好,在生物医学及制药等方面有较多应用,钛金属制成的植入体与人体具有很好的生物相容性,减少排斥反应造成的不良影响,本发明的制备方法简单,条件温和,无有害副产物生成。

附图说明

[0017] 图 1 为本发明所述具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法流程图；

[0018] 图 2 为本发明所得产品进行抗菌能力试验的结果示意图；

[0019] 图 3 为本发明所得产品与普通钛片进行细胞活性检测的结果示意图；

[0020] 图 4 为本发明所得产品与普通钛片进行细胞毒性分析的结果示意图。

具体实施方式

[0021] 下面结合说明书附图对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0022] 如图 1 所示,一种具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法,其中,包括以下步骤:

[0023] 步骤一、钛金属预处理,将钛金属在 10-20ml 1-3mol/L 的丙酮溶液中超声处理 2-3 次,每次 15-45 分钟,然后放入 20-30ml 体积分数为 40-50% 的硝酸溶液中浸泡 5-30 分钟,在压强 0.1-0.3MPa,温度为 80-120°C,干燥 10-30 分钟,得到预处理钛金属;

[0024] 步骤二、涂层制备,取预处理钛金属浸泡于 30-50ml 1-3mg/mL 多巴胺水溶液中 20-30 小时,得到粘附有涂层的钛金属;

[0025] 步骤三、成骨细胞的引入,取 2-4g 壳聚糖溶于 30-80ml 含 0.3-0.5mmol 乙酸的蒸馏水得到壳聚糖溶液;取 0.2-0.5g 环氧氯丙烷溶于 5-15ml 乙醇得到环氧氯丙烷溶液;取 0.01-0.05g 硝酸银溶于 1-5ml 蒸馏水得到硝酸银溶液,混合所述三种溶液,得到可与涂层连接的具有一定交联空间结构的混合液,向所述混合液中加入 1-5ml 密度为 $2-10 \times 10^4$ /ml 成骨细胞,搅拌均匀后,再加入面积为 $1 \times 1 \text{cm}^2$ 的预处理钛金属,浸泡 5-10 分钟后,取出预处理钛金属,在压强 0.1-0.3MPa,温度为 80-120°C,干燥 10-30 分钟,得到涂层中包覆有成骨细胞的钛金属;

[0026] 步骤四、成骨细胞的移除,将步骤三得到的涂层中包覆有成骨细胞的钛金属浸入 2-10ml 浓度为 0.25-1% 胰酶溶液中 30-50 秒,再浸入 30-50ml 蒸馏水超声 5-10 分钟,在压强 0.1-0.3MPa,温度为 80-120°C,干燥 10-30 分钟,使所述成骨细胞从所述交联空间结构内移除,并使预处理钛金属表面形成具有与成骨细胞相匹配的空间结构的涂层,即得所述能够具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属

[0027] 所述的具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属改性方法中,所述壳聚糖是端基为羧基分子量为 10-100 万的壳聚糖。

[0028] 实施例 1

[0029] 步骤一、钛金属预处理,将钛金属在 20ml 1mol/L 的丙酮溶液中超声处理 3 次,每次 45 分钟,然后放入 30ml 体积分数为 40% 的硝酸溶液中浸泡 25 分钟,在压强 0.3MPa,温度为 80°C,干燥 10 分钟,得到预处理钛金属;

[0030] 步骤二、涂层制备,取预处理钛金属浸泡于 50ml 1mg/mL 多巴胺水溶液中 24 小时,得到粘附有涂层的钛金属;

[0031] 步骤三、成骨细胞的引入,取 2.5g 端基为羧基分子量为 10-100 万的壳聚糖溶于 50ml 含 0.5mmol 乙酸的蒸馏水得到壳聚糖溶液;取 0.2g 环氧氯丙烷溶于 10ml 乙醇得到环氧氯丙烷溶液;取 0.01g 硝酸银溶于 1ml 蒸馏水得到硝酸银溶液,混合所述三种溶液,得到可与涂层连接的具有一定交联空间结构的混合液,向所述混合液中加入 3ml 密度为 2×10^4 /ml 成骨细胞,搅拌均匀后,再加入面积为 $1 \times 1 \text{cm}^2$ 的预处理钛金属,浸泡 10 分钟后,取出预处理钛金属,在压强 0.1MPa,温度为 100°C,干燥 30 分钟,得到涂层中包覆有成骨细胞的钛金属;

[0032] 步骤四、成骨细胞的移除,将步骤三得到的涂层中包覆有成骨细胞的钛金属浸入 5ml 浓度为 0.25% 胰酶溶液中 50 秒,再浸入蒸馏水中超声 5-10 分钟,在压强 0.3MPa,温度为 100°C,干燥 30 分钟,使所述成骨细胞从所述交联空间结构内移除,并使预处理钛金属表面形成具有与成骨细胞相匹配的空间结构的涂层,即得所述能够具备抗菌性和促进成骨细胞生长的钛金属。

[0033] 1、抗菌能力实验

[0034] 将本发明所得产物依据 GB15979-2002 进行对金黄色葡萄菌、大肠埃希氏菌、白假丝酵母、枯草芽孢杆菌黑色变种进行抑菌试验。分别在本发明所得产物表面接种 1ml 浓度为 10^5 的菌液在 37°C 培养 1d 后,培养液用来检测试样表面粘附细菌中的活菌数。用倍比稀释和涂布培养法检测活菌数,实验结果列于如图 2 所示。结果表明,由本发明制得的产品对金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、大肠埃希氏菌 (ATCC 25922)、白假丝酵母 (ATCC 10231)、枯草芽孢杆菌黑色变种 (ATCC 9372) 都具有很强的抗粘附性能,其抗细菌粘附率达 99% 以

上。

[0035] 2、细胞活性检测

[0036] 将普通钛片和本发明产物分别置于 24 孔板中（每组设三个平行孔）。1ml 密度为 2×10^4 /ml 的细胞悬液接种于试样表面，然后培养 1、4 和 7d。到预定时间点后，试样用 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液轻柔漂洗三次后转移到新的 24 孔板内。每孔加入 200 μ l 浓度为 5mg/ml 的 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐和 800 μ l 无血清无酚红 DMEM 培养基。37°C 孵育 4h 后吸弃上清，加入 1ml 二甲基亚砷溶解生成的结晶物，每孔取 200 μ l 溶解液转到 96 孔培养板，用分光光度计于 490nm 处测其 OD 值。试验结果如图 3 所示。

[0037] 3、细胞毒性分析

[0038] (1) 试验原理：以乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性作为细胞毒性指标来评估本发明产物的细胞毒性大小，其原理为乳酸脱氢酶 (LDH) 是一种稳定的蛋白质，存在于正常细胞的胞质中，一旦细胞膜受损，LDH 即被释放到细胞外；LDH 催化乳酸形成丙酮酸盐，和四唑盐类 (INT) 反应形成紫色的结晶物质，可通过 500nm 酶标仪进行检测。

[0039] (2) 试验步骤：分别普通钛片和本发明产物分别放入 24 孔板中，然后将 1×10^4 个细胞的成骨细胞接种到 24 孔板中，并培育 1 天。分别收集培养液，离心后取上清用于 LDH 活性检测。试验结果如图 4 所示。

[0040] 4、试验结果

[0041] 从图 2 中可以看出，由本发明所得产品对金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)、大肠埃希氏菌 (ATCC 25922)、白假丝酵母 (ATCC 10231)、枯草芽孢杆菌黑色变种 (ATCC 9372) 都具有很强的杀菌性，其杀菌率达 99% 以上。

[0042] 从图 3 中可以看出普通钛片和本发明产物的 OD 值随着培养时间的增加而增大，但是可以看出，普通钛片随着培养时间的增加 OD 值的生长缓慢，相比之下，本发明产物的 OD 值在随着培养时间的增加快速增长，在培养 7 天时，本发明产品相较于普通钛片的 OD 值成倍增长。由此可以得出，本发明产品具有明显的细胞增殖活性效果。

[0043] 从图 4 中可以知道本发明产品与普通钛片相比，普通钛片的 LDH 活性 (U/L) 值为 236，而本发明产品的 LDH 活性 (U/L) 值为 225，低于普通钛片的 LDH 值，表明本发明产物无细胞毒性。

[0044] 尽管本发明的实施方案已公开如上，但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用，它完全可以被适用于各种适合本发明的领域，对于熟悉本领域的人员而言，可容易地实现另外的修改，因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下，本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的图例。

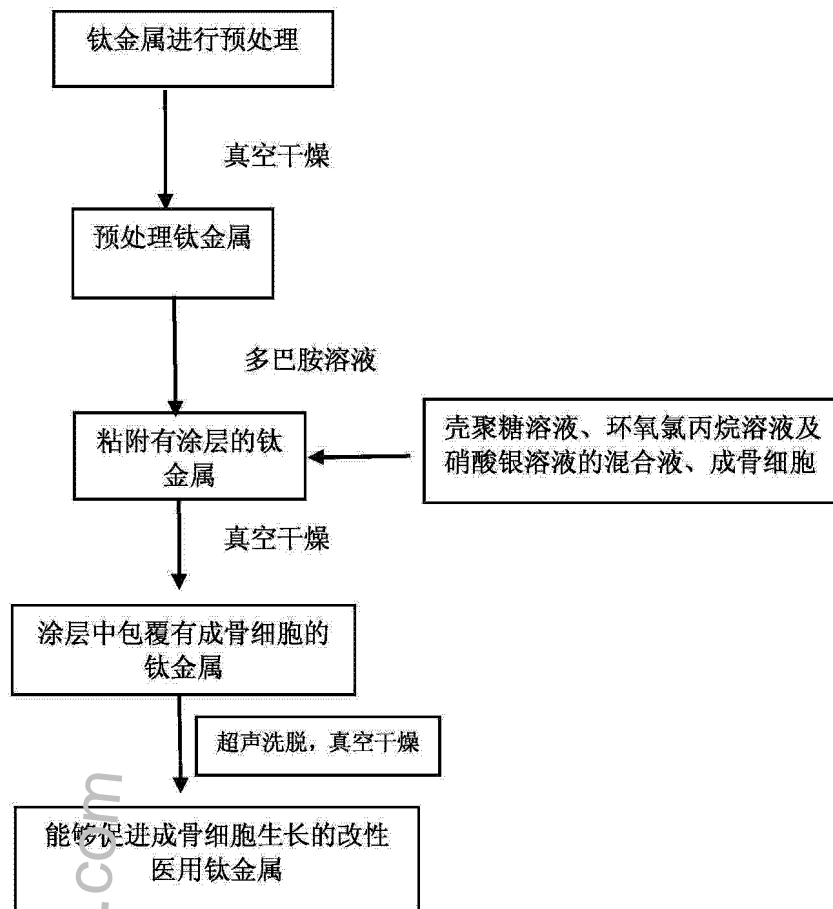


图 1

细菌	ATCC 6538	ATCC 25922	ATCC 10231	ATCC 9372
杀菌率	99.92 %	99.98 %	99.96 %	99.95 %

图 2

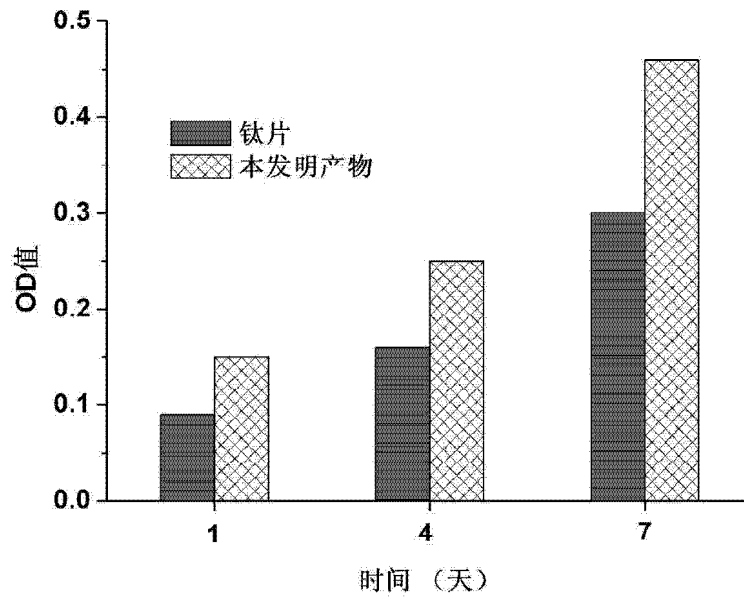


图 3

	钛片	本发明产物
LDH 活性	236	225

图 4