

# SLA 表面处理 TiCu 合金的抗菌性能研究

刘蕊<sup>1,2</sup>, 任玲<sup>2</sup>, 杨柯<sup>2</sup>

(1.东北大学, 沈阳 110819; 2.中国科学院金属研究所, 沈阳 110016)

**摘要:**目的 对 TiCu 合金进行 SLA 表面粗糙化处理, 探究具有粗糙表面的 TiCu 合金的抗菌性能。方法 用喷砂+酸蚀 (SLA) 的方法对 TiCu 合金表面进行粗糙化处理 (SLA-TiCu), 并与经过相同处理的 SLA-Ti 进行对比研究。采用金黄色葡萄球菌作为实验菌株, 通过平板菌落计数法计算杀菌率, 采用活/死细菌染色实验观察表面细菌的粘附分布及生物被膜的形成情况, 在透射电镜下观察细菌微观结构的变化, 探究 SLA-TiCu 的抗菌作用及对细菌微观结构的影响。结果 SLA 表面处理使 TiCu 合金具有微米-亚微米的复合双层孔洞结构表面, SLA-TiCu 具有优异的抗菌性能, 对表面粘附细菌的抗菌率为 100%。染色结果表明, SLA-TiCu 表面粘附的细菌中大量的死细菌, 没有形成生物被膜, 而 SLA-Ti 表面已经形成细菌生物被膜。透射电镜观察表明, SLA-TiCu 作用后的细菌出现了明显的细胞膜溶解现象, 破损的细菌体内部出现透明和半透明的区域, 细胞壁和细胞膜破损, 细胞内的细胞质流出, 在破损的细菌周围可以看到高电子密度的颗粒和沉淀。结论 SLA 处理的 TiCu 合金具有优异的抗菌性能, 更能有效发挥合金中 Cu 的杀菌作用, 能够高效杀死表面粘附的细菌, 从而抑制表面生物被膜的形成。因此, 具有优异抗菌性能的 SLA-TiCu 具有极大潜力应用于牙种植体制造。

**关键词:** SLA; TiCu 合金; 钛; 抗菌; 表面粗糙化; 牙种植体

**中图分类号:** TG13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2019)07-0278-07

**DOI:** 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2019.07.031

## Antibacterial Performance of SLA Treated TiCu Alloy

LIU Rui<sup>1,2</sup>, REN Ling<sup>2</sup>, YANG Ke<sup>2</sup>

(1.Northeastern University, Shenyang 110819, China;

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

**ABSTRACT:** The work aims to explore the antibacterial performance of TiCu alloy with rough surface after SAL. The TiCu alloy was treated by sandblasting and acid etching (SLA) in order to acquire a rough surface and then compared with SLA-Ti for study. *S. aureus* was used as the experimental strains to calculate the sterilizing rate through the plate colony-counting method. Dead/live bacteria staining test was carried out to observe the bacteria adhesion distribution and formation of biofilm on the surface and the change of bacteria microstructure under TEM, in order to explore the antibacterial properties of SLA-TiCu and the effects on bacterial microstructure. The surface of SLA-TiCu had the micro-submicron dual-hole scale structure and excellent antibacterial properties, with an antibacterial ratio of 100% for surface adhesion bacteria. The staining result reflected that a large

收稿日期: 2018-11-08; 修订日期: 2018-12-21

Received: 2018-11-08; Revised: 2018-12-21

基金项目: 国家自然科学基金 (51631009, 51811530320)

Fund: National Natural Science Foundation of China (51631009, 51811530320)

作者简介: 刘蕊 (1991—), 女, 博士研究生, 主要研究方向为抗菌医用金属。

Biography: LIU Rui (1991—), Female, Ph. D., Research focus: antibacterial biometal materials.

通讯作者: 任玲 (1983—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为生物材料。邮箱: lren@imr.ac.cn

Corresponding author: REN Ling (1983—), Female, Doctor, Professor, Research focus: biological materials. E-mail: lren@imr.ac.cn

number of bacteria on the surface of SLA-TiCu were dead, and no biofilm was formed, but biofilm was observed on the surface of SLA-Ti. Observed under TEM, the bacteria on SLA-TiCu were found to have obvious cell membrane dissolution phenomenon and transparent and semitransparent areas appeared inside the damaged bacteria body. Cell walls and cell membranes were damaged, cytoplasm in cells flew out, and particles and precipitates with high electron density could be seen around the damaged bacteria. The TiCu alloy treated by SLA has excellent antibacterial properties, which can effectively play the antibacterial role of Cu ions and then effectively kill the bacteria adhering to the surface, thus inhibiting the formation of biofilms on the surface. Therefore, SLA-TiCu with outstanding antibacterial performance has great potential for application in dental implants.

**KEY WORDS:** SLA; TiCu alloy; Ti; antibacterial; surface roughening; dental implant

纯钛 (Ti) 具有良好的力学性能、较高的耐腐蚀性和优异的生物相容性<sup>[1]</sup>, 因此在骨科和牙科领域应用广泛。近年来, 由商业纯钛制作的牙种植体逐渐用于口腔缺失牙的处理<sup>[2-3]</sup>, 商业纯钛在种植体材料中占有较大的市场份额。临床研究表明, 早期骨结合是临床上钛种植体植入成功的重要影响因素之一<sup>[4]</sup>。目前临床上使用的纯钛牙种植体大多都进行表面处理, 大多数口腔种植体的粗糙度  $Ra$  为  $1.0\sim 2.0\ \mu\text{m}$ <sup>[5-7]</sup>。有研究表明<sup>[8]</sup>, 粗糙表面可以促进纤维蛋白的形成、成骨细胞粘附和宿主体内种植体的机械稳定性。在过去的几十年里, 喷砂酸蚀处理 (SLA) 已经成为钛植入物表面最普遍采用的表面处理方式, 用来获得微米/亚微米的双层次结构。微米/亚微米的双层次复合结构可以扩大钛的比表面积, 进而增加表面与粘附细胞及体液环境的接触面积, 有利于成骨细胞的粘附、增殖和分化。另一方面, 粗糙表面还可以提高骨-植入物界面的机械嵌合, 从而提高植入物的初期固定性<sup>[9]</sup>。Gittens<sup>[10]</sup>的研究表明, 粗糙度在微米和亚微米级的粗糙表面能够通过促进成骨细胞分化和相关因子分泌来促进骨结合。Blatt<sup>[11]</sup>的研究结果也表明, 喷砂酸蚀处理的纯 Ti 和喷砂酸蚀+亲水性处理的纯 Ti 表面都能够触发成骨细胞应答, 包括细胞粘附和成骨分化。

植入物表面生物被膜的形成是导致植入失败的一个重要原因<sup>[12-14]</sup>。一旦形成生物被膜, 膜内的细菌表现出对抗生素和宿主防御的高度抵抗力, 也就是高耐药性。临床数据表明, 在感染发生之前, 植入物上的生物被膜必须用物理方式去除。植入物的表面形貌是影响细菌在表面定植的一个重要影响因素。有报道了在与多种细菌分别共培养 2 h 后, SLA 处理的钛表面粘附的细菌数量远高于酸浸表面 (pickled surface)。Han 等<sup>[15]</sup>对比了两种不同状态的钛植入物表面生物被膜的动力学形成过程, 结果表明, 粗糙度越高, 各种类型的细菌在材料表面的早期粘附能力越强。

生物被膜一旦形成, 其膜内的细菌很难再被移除和杀死, 这时采用抗生素治疗已无法起到有效作用<sup>[16]</sup>。目前较为理想的解决途径是采用特殊的材料制备方法, 使种植体表面具有抗菌功能, 从而抑制或减少生物被膜的形成。常用的方法是在种植体表面进行表面改性涂层<sup>[16-19]</sup>, 其中添加不同含量的抗菌成分是赋予

材料抗菌功能最常见的方式之一。具有抗菌作用的涂层能够有效地抑制细菌在种植体表面的粘附及形成生物被膜, 但是表面涂层一般很薄, 释放速度快, 因而很难保证长久持续的抗菌作用。种植体在植入的过程中, 不可避免地要承受骨组织及结缔组织的挤压和摩擦, 涂层因此可能会发生损伤, 进而可能会引起宿主的免疫排斥反应<sup>[20]</sup>。

铜 (Cu) 对细菌具有广谱的杀灭作用<sup>[21]</sup>。已有将铜添加到金属中制备含铜抗菌金属材料的研究报道, 机理是表面发生的缓慢腐蚀使微量的铜离子持续地释放出来, 从而发挥铜离子的杀菌作用<sup>[22-23]</sup>。在前期工作中, 已开发出 Ti-Cu 抗菌钛合金<sup>[24-26]</sup>, 其对需氧菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌, 或者厌氧菌牙龈卟啉单胞菌和变形链球菌, 都具有良好的抗菌作用。动物体内实验研究表明, TiCu 合金具有优异的生物相容性和抑制体内细菌感染的作用, 作为植入材料具有很大的应用潜力。因此, 文中通过对 TiCu 合金进行表面喷砂酸蚀处理 (SLA), 研究了 SLA-TiCu 的抗菌性能, 为 SLA-TiCu 作为口腔种植体的应用提供实验研究依据。

## 1 实验

### 1.1 样品准备及表面观察

采用真空自耗电弧炉熔炼实验组材料 Ti-Cu 合金, 铸锭经锻造后, 进行  $850\ ^\circ\text{C}/2\ \text{h}$  热处理, 随炉冷却, 然后加工成直径为  $10\ \text{mm}$ 、厚度为  $2\ \text{mm}$  的圆片。实验材料的化学成分 (质量分数) 分析结果为: Ti 94.98%、Cu 5.02%。对照组材料为商业级纯钛 (cp-Ti)。两组材料均经  $400\#$ — $2000\#$  的 SiC 砂纸逐级打磨表面。所有样品经由大颗粒的  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ( $\phi 250\sim 500\ \mu\text{m}$ ) 在  $0.3\ \text{MPa}$  压强下喷丸, 喷砂后的样品在  $60\ ^\circ\text{C}$  混合酸 ( $V(18\%\text{HCl}): V(48\%\text{H}_2\text{SO}_4)=1:1$ ) 中酸洗  $5\ \text{min}$ 。经过“喷砂+酸蚀”处理后的所有样品依次在丙酮、乙醇和双蒸水中充分超声清洗, 在 75% (体积分数) 酒精中浸泡 2 h, 高温高压灭菌后备用。

采用白光干涉仪 (Contour GT, Bruker, Germany) 和扫描电镜 (SIGMA500, ZEISS, Germany) 观察样

品的表面形貌,采用表面轮廓仪(ALpha-step IQ, KLA-Tencor, America)检测表面粗糙度  $Ra$ 。每种材料有3个平行样品,每个样品测试5个点,  $Ra$  值为平均值 $\pm$ 标准差( $n=15$ )。

## 1.2 细菌与细菌培养

本研究选用的细菌为革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC 6538),由中国广州菌种保藏中心提供。金黄色葡萄球菌采用LB液体培养基(5 g/L 牛肉膏、10 g/L 蛋白胨、5 g/L 氯化钠, pH 7.2~7.4)和固体培养基(5 g/L 牛肉膏、10 g/L 蛋白胨、5 g/L 氯化钠和20 g/L 琼脂粉, pH 7.2~7.4)进行复苏及传代培养,培养周期为18~24 h。实验前,用革兰氏染色法确定为纯培养物,然后采用比浊法配制菌浓度为 $(1.0\sim 10.0)\times 10^8$  CFU/mL的细菌悬液,用PBS缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2~7.4)梯度稀释至 $10^3$  CFU/mL备用。

## 1.3 平板计数法

根据SNT 2399—2010《抗菌金属材料评价方法》及ISO 10993-5:2009《医疗器械生物学评价方法》<sup>[27-28]</sup>,采用直接接触法来检测并评价SLA-TiCu对金黄色葡萄球菌的抗菌性能。SLA-Ti和SLA-TiCu各3个样品,经过高温高压灭菌处理后烘干,放入24孔板中,每个孔中的样品表面上用无菌枪头滴加50  $\mu$ L  $10^8$  CFU/mL的菌液,菌液刚好能够铺满样品的表面而不溢出。空白对照组为将50  $\mu$ L  $10^8$  CFU/mL的菌液滴加在孔内,然后将孔板放入37  $^{\circ}$ C的培养箱中培养24 h,保证环境湿度在90%以上。到达时间点后,分别将每一个样品和菌液一起移入离心管中,加入2 mL的PBS缓冲液稀释,vertex充分振荡(空白组直接加入2 mL PBS充分吹打混匀)。最后吸取50  $\mu$ L的稀释液均匀涂布在固体培养基平板上(每个样品涂布2个平板),37  $^{\circ}$ C条件下培养24 h后,取出平板进行菌落计数,最后取平均值作为菌落数 $C$ 。按照公式(1)、(2)计算杀菌率 $R$ ,评价材料的杀菌能力。 $R\geq 99\%$ 表示强抗菌能力, $99\%>R\geq 90\%$ 表示一般抗菌能力。

$$N=C\times d\times l_2/l_1 \quad (1)$$

$$R=(N_{\text{control}}-N_{\text{material}})/N_{\text{control}}\times 100\% \quad (2)$$

式中: $C$ 为固体培养平板上的菌落个数; $d$ 为稀释倍数,文中 $d=41$ ;  $l_1$ 为涂布在固体培养基平板上的菌液量,  $l_2$ 为每个样品表面接种的细菌悬液的体积,文中 $l_1=l_2=50$ ;  $N_{\text{control}}$ 和 $N_{\text{material}}$ 为培养24 h后对照组SLA-Ti和实验组SLA-Ti-Cu表面的活细菌数量。

## 1.4 活/死细菌染色

为了研究表面生物被膜的形成及粘附细菌的活性情况,对与 $10^8$  CFU/mL *S. aureus* 菌液接触培养24 h后的样品表面的细菌进行活/死染色。采用LIVE/DEAD<sup>®</sup>Bacterial<sup>™</sup> Viability Kits L7012试剂盒进行染色,该试剂盒包含SYTO-9和PI(propidium iodide)

两种荧光染色,SYTO-9能够将活细菌的核酸染色呈绿色荧光,而PI只能将死细菌染为红色。参照试剂盒的说明书,按照 $V_{\text{SYTO-9}}:V_{\text{PI}}:V_{\text{PBS}}=3:3:1000$ 的比例配制染色剂。将与菌液接触培养24 h后的样品表面用PBS清洗3次,然后将50  $\mu$ L染色剂滴加在样品表面,室温下避光染色15 min。用PBS再次清洗3次,然后在激光共聚焦荧光显微镜(Olympus FV10-ASW, Japan)下进行观察。用NIS Viewer软件进行三维图像重建,用Image J软件对图片进行量化分析。

## 1.5 透射电镜观察

两组样品分别与 $10^8$  CFU/mL菌液接触培养24 h后,取出置于离心管内,每管加入2 mL PBS溶液,vertex振荡30 s后分离出菌液。经3000 rad/min低温离心15 min后完全弃上清,然后加入1 mL 2.5%(体积分数)戊二醛与4%(体积分数)多聚甲醛的混合液( $V(2.5\%$ 戊二醛) $:V(4\%$ 多聚甲醛) $=1:1$ ),于4  $^{\circ}$ C过夜固定。用PBS清洗3次,每次30 min,之后用1%(体积分数)锇酸于4  $^{\circ}$ C固定2 h,用PBS再次漂洗3次。然后用丙酮(50%、70%、80%、90%、95%、100%)梯度脱水各15 min,浸透后用环氧树脂包埋,然后用钻石刀切片获得超薄切片。将切片附于铜网上,进行铀-铅双染色(2% uranyl acetate and Reynolds' lead citrate),染色后在透射电镜(TECNAI G2, Electron Optics)下直接观察,电压为100 kV。

## 2 结果及分析

### 2.1 表面观察

喷砂酸蚀处理后的纯Ti和TiCu合金表面呈现出微米-亚微米的复合双层孔洞结构,如图1所示。图1a、b为白光干涉图,可以看到,在SLA-Ti和SLA-TiCu的表面均分布有大小不一的孔洞,而且分布均匀。图1c—f为扫描电镜(SEM)观察图像。在SLA-Ti表面上可观察到直径在5~20  $\mu$ m的一级孔洞,是由喷砂引起的表面凹陷,再经酸蚀后得以保留下来。在SLA-TiCu表面上也可以观察到5~20  $\mu$ m的坑,同时还可以看到一定的片层状的形态分布,这一结构与TiCu合金基体的原始组织有关。在高倍镜下如图1e、f所示,SLA-Ti和SLA-TiCu表面都可以观察到在一级孔洞中遍布有小于1  $\mu$ m的亚微米级的二级孔洞,是由酸蚀作用产生的。SLA-Ti和SLA-TiCu表面的粗糙度分别为 $(1.78\pm 0.82)$   $\mu$ m和 $(2.04\pm 0.57)$   $\mu$ m。

### 2.2 抗菌性能

图2是与样品共培养24 h后的细菌菌落图像及菌落数目统计。梯度稀释法计数得到SLA-Ti组的菌落数为 $2000\pm 120$ 个。由式(1)计算可得,共培养

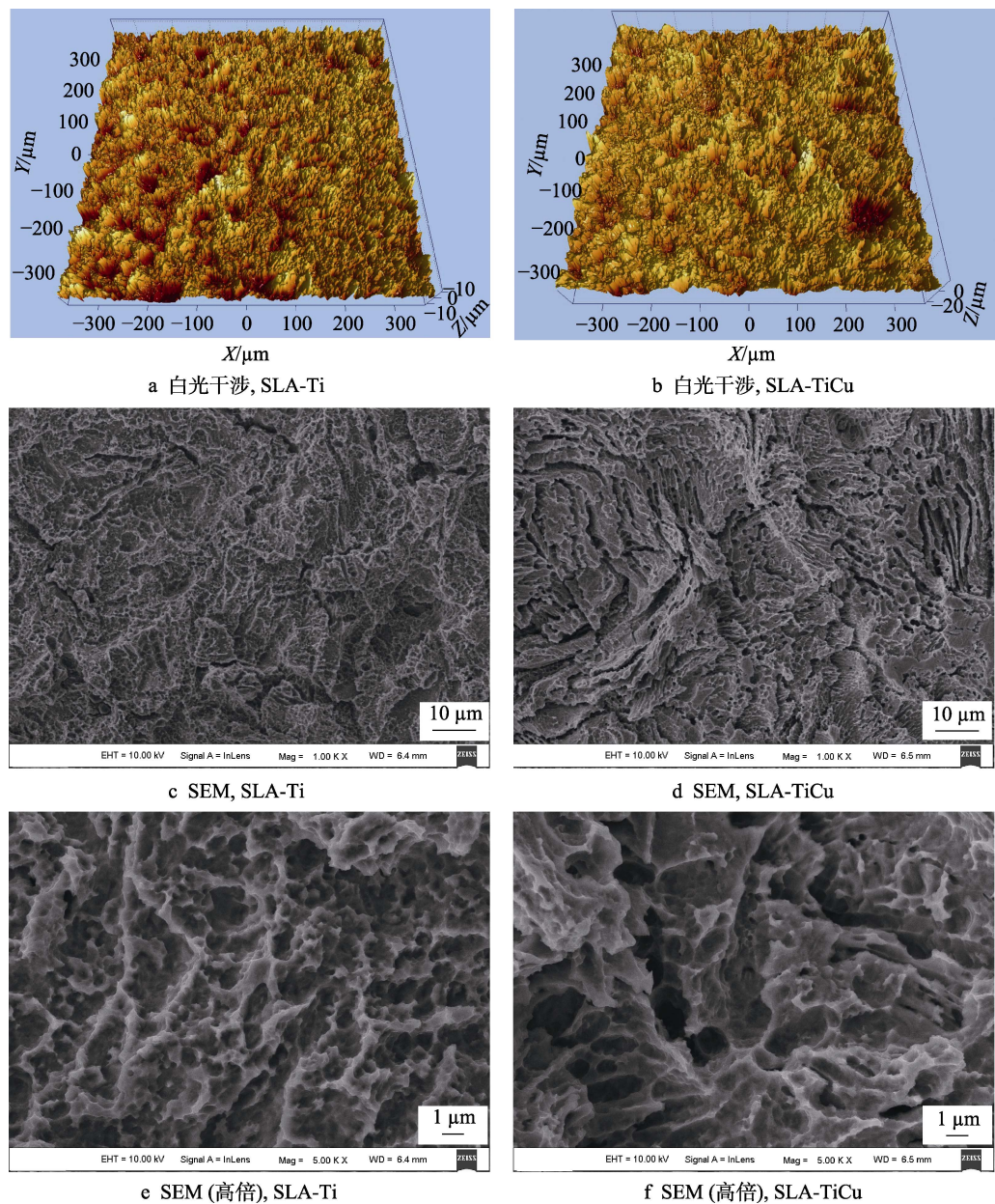


图 1 SLA-Ti 和 SLA-TiCu 表面形貌观察  
Fig.1 SEM images of SLA-Ti and SLA-TiCu surfaces: a, b) WLI images; c, d) SEM morphologies; e, f) SEM images under higher magnification

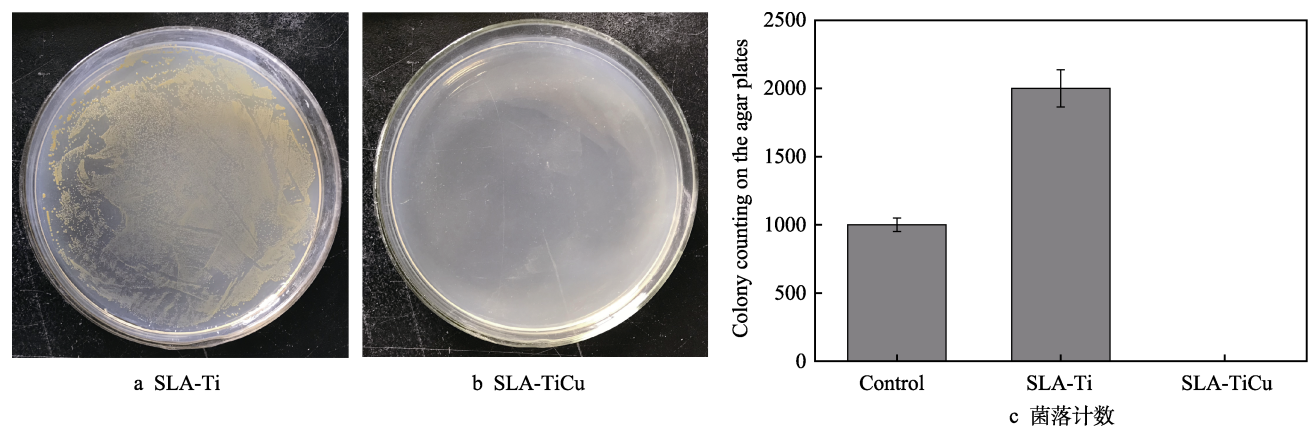


图 2 与 SLA-Ti 和 SLA-TiCu 样品接触培养 24 h 后的细菌菌落图像及菌落计数结果  
Fig.2 Photos (a, b) and counts(c) of bacterial colonies on agar plates after cultured with SLA-Ti and SLA-TiCu for 24 h



24 h 后, SLA-Ti 样品表面的活细菌数量至少为  $8.2 \times 10^4$  CFU。同理可得出, 空白对照组的活细菌数量至少为  $4.1 \times 10^4$  CFU, 而 SLA-Ti-Cu 组的菌落数为 0。这说明共培养 24 h 后, SLA-TiCu 表面不存在能够分裂增殖形成菌落的活性细菌。根据式 (2) 可计算出 SLA-TiCu 的杀菌率为 100%。

图 3 是 SLA-Ti、SLA-TiCu 表面的细菌经 SYTO-9 和 PI 这两种荧光染色剂作用后的染色效果图像, 其中活细菌能够被标记为绿色荧光, 而死细菌被标记为红色荧光。在图 3a 中, SLA-Ti 没有杀菌作用, 其表面的红色荧光点很少, 与绿色荧光点的数量相比, 基本上可以忽略不计, 视野内为大片的生物被膜, 生物

被膜内堆积的细菌均被染成绿色。与 SLA-Ti 相比, SLA-TiCu 表面上绿色荧光点的数量和面积大大减少, 而红色荧光点的数量明显增多, 活/死细菌的分布比例如图 3b、c 所示。细菌粘附和生物被膜的立体形态分布图像能够更加直观地表明, SLA-Ti 表面形成了具有一定厚度和空间结构的细菌生物被膜形态, 其内存在有大量的活细菌, 生物被膜厚度约为  $38 \mu\text{m}$ 。SLA-TiCu 表面未形成生物被膜, 表面的细菌零散地分布, 细菌覆盖面积均远低于 SLA-Ti, 表面存在的细菌团簇的厚度约为  $20 \mu\text{m}$  左右。也就是说, SLA-TiCu 表面上粘附的活细菌数远低于 SLA-Ti, 而死细菌数明显高于 SLA-Ti。

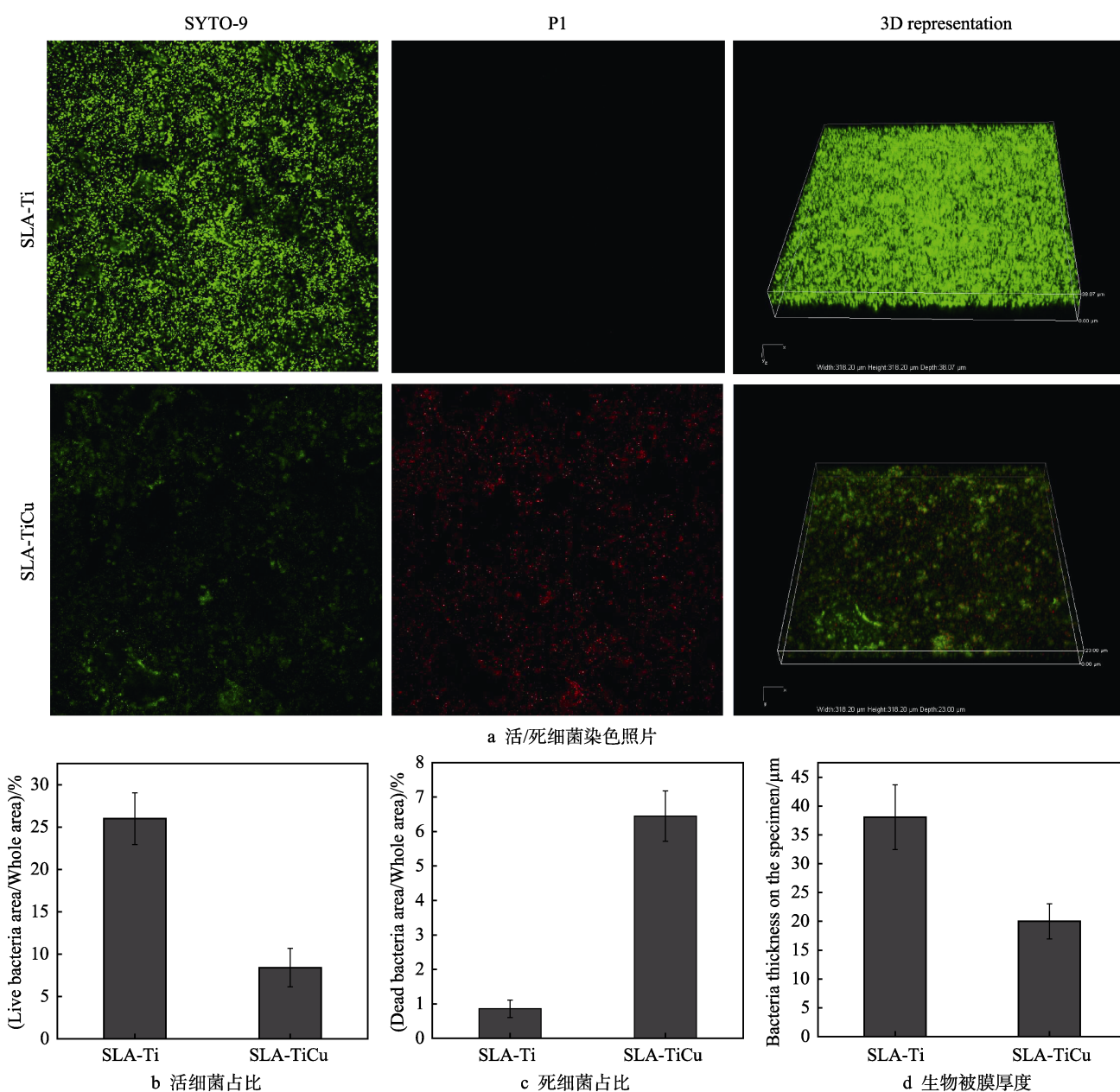


图 3 接触培养 24 h 后 SLA-Ti 和 SLA-TiCu 表面粘附细菌的荧光染色照片及量化分析  
Fig.3 Fluorescent images and quantitative results of bacteria on surfaces of SLA-Ti and SLA-TiCu after incubation for 24 h: a) Images of live bacteria (green) and dead bacteria (red); b) Area of live bacteria; c) Area of dead bacteria; d) Thickness of biofilm

已有很多研究表明<sup>[15,29]</sup>,喷砂酸蚀工艺使 SLA-Ti 具有的微米-亚微米复合粗糙表面结构有利于细菌粘附,这种表面孔洞结构对于细菌来说就像生存的港湾,利于粘附形成生物被膜。虽然 SLA-TiCu 表面具有相同的微米-亚微米结构,理应也有利于细菌粘附,但是这种表面粗糙结构增大了材料的比表面积,也有利于表面 Cu 离子的释放。由于 Cu 离子具有强烈的杀菌作用,所以 SLA-TiCu 表面的复合孔洞结构对粘附的细菌来说就是死亡的“陷阱”了,如图 4 所示。

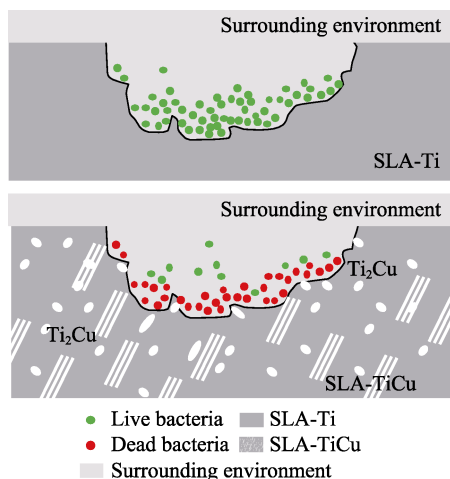
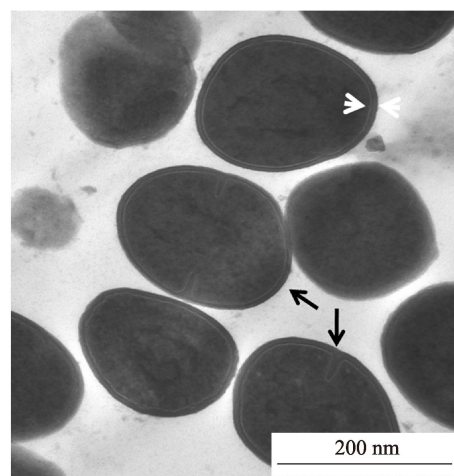


图 4 SLA-Ti 和 SLA-TiCu 表面细菌粘附  
Fig.4 Schematic diagram for bacterial adhesion on surfaces of SLA-Ti and SLA-TiCu

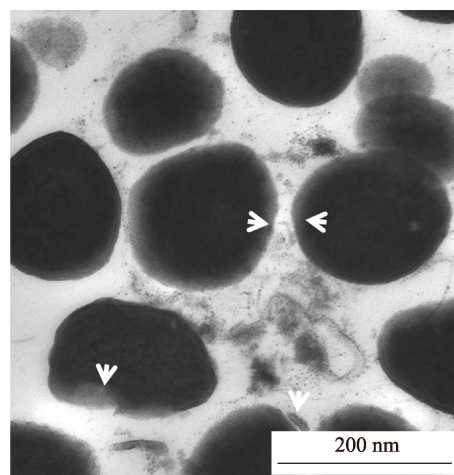
菌落计数表明, SLA-TiCu 表面的活细菌数目为 0, 杀菌率为 100%, 而 SYPO-9 染色结果表明, SLA-TiCu 表面仍存在显示为绿色荧光的活细菌。细菌在环境中会接受各种条件导致的生存压力。为了应对各种生存压力,一些细菌能够仅维持代谢活动,从而提高对外界的抗力。这样一种状态的细菌通常定义为“active but nonculturable (ABNC)”状态。ABNC 状态的细菌表现出明显的生理活动特征,但不能生长成可检测水平的菌落<sup>[30]</sup>。SLA-TiCu 表面释放的 Cu 离子与细菌接触作用 24 h 后,有可能会部分细菌处于 ABNC 或者濒死状态,该状态下的细菌在染色条件下显示是活细菌,但是不具备分裂增殖长成肉眼可分辨的菌落的能力。这应该就是菌落计数法和染色结果存在差别的原因所在。迫于外部环境中 Cu 离子的压力,细菌可能只能够分裂有限的次数,但仍是结构完好的细菌,所以可以被 SYTO-9 所标记。由于只能够分裂有限的次数,不足以长成菌落,所以在固体培养基上观察不到任何的菌落生成。

透射电镜 (TEM) 可用来观察和分析 SLA-TiCu 对粘附细菌细胞壁的破坏以及细胞内基质的变化,进而进一步探索 SLA-TiCu 与细菌作用的可能机理。图 5 是与实验材料共培养后 *S. aureus* 内部结构的 TEM 照片。图 5a 表明,与 SLA-Ti 共培养 24 h 后,绝大部分细菌细胞质的电子密度分布均匀而稠密,细胞结

构完整,细菌形态正常。白色短箭头所指为细胞膜和细胞壁(肽聚糖层),可以清晰地看到完整的细胞壁结构,而且还可以看到细菌处于分裂时期(黑色箭头所指)。图 5b 表明,与 SLA-TiCu 共培养 24 h 后,视野中大部分的细菌形态不完整,细菌内部的电子密度分布不均匀,出现了透明和半透明的区域,这说明细菌表现为明显的破损和溶解。白色短箭头所指细胞壁和细胞膜破损,并已经消失,细胞内基质流出到外部环境中。在破损的细菌周围可以观察到高电子密度的颗粒和沉淀。同时,视野中也存在有个别结构完整的细胞,与正常细胞相比并没有明显区别,其有可能是处于 ABNC 状态的细菌。



a SLA-Ti



b SLA-TiCu

图 5 *S. aureus* 内部结构的 TEM 照片  
Fig.5 TEM micrographs of inner structures of *S. aureus*

### 3 结论

通过对 TiCu 合金进行表面喷砂酸蚀 (SLA) 处理,获得了具有微米-亚微米复合粗糙表面结构的 SLA-TiCu 合金,其对金黄色葡萄球菌表现出优异的杀菌作用。与 SLA 处理的纯 Ti 相比,SLA-TiCu 能够高效杀死表面粘附的细菌,从而抑制细菌在表面形

成生物被膜。喷砂酸蚀表面的 Ti 种植体在口腔临床应用广泛,但其不具备抗菌性能,因而无法抑制细菌感染的发生。具有优秀抗菌性能的 SLA-TiCu 具有作为新型口腔种植体等的潜力,将得到广泛应用。

#### 参考文献:

- [1] MEI S, WANG H, WANG W, et al. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(14): 4255-4265.
- [2] HOLMBERG KV, ABDOLHOSSEINI M, LI Y, et al. Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications[J]. *Acta biomaterialia*, 2013, 9(9): 8224-8231.
- [3] WANG X J, LIU H Y, REN X, et al. Effects of fluoride-ion-implanted titanium surface on the cytocompatibility in vitro and osseointegration in vivo for dental implant applications[J]. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 136: 752-760.
- [4] CHENG M, QIAO Y, WANG Q, et al. Calcium plasma implanted titanium surface with hierarchical microstructure for improving the bone formation[J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2015, 7(23): 13053-13061.
- [5] APARICIO C, PADROS A, GIL F J. In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests[J]. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2011, 4(8): 1672-1682.
- [6] DAVIES J E, AJAMI E, MOINEDDIN R, et al. The roles of different scale ranges of surface implant topography on the stability of the bone/implant interface[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(14): 3535-3546.
- [7] ALBREKTSSON T, WENNERBERG A. Oral implant surfaces. Part 2. Review focusing on clinical knowledge of different surfaces[J]. *International journal of prosthodontics*, 2004, 17(5): 544-564.
- [8] LAUER G, WIEDMANN-AL-AHMAD M, OTTEN J E, et al. The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillary osteoblast-like cells in vitro[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(20): 2799-2809.
- [9] XIE Y, LI J, YU Z M, et al. Nano modified SLA process for titanium implants[J]. *Materials letters*, 2017, 186: 38-41.
- [10] GITTENS RA, MCLACHLAN T, OLIVARES-NAVARRETE R, et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(13): 3395-3403.
- [11] BLATT S, PABST A M, SCHIEGNITZ E, et al. Early cell response of osteogenic cells on differently modified implant surfaces: Sequences of cell proliferation, adherence and differentiation[J]. *Journal of craniomaxillofacial surgery*, 2017, 46(3): 453-460.
- [12] BURGHARDT I, LUTHEN F, PRINZ C, et al. A dual function of copper in designing regenerative implants[J]. *Biomaterials*, 2015, 44(44): 36-44.
- [13] REN L, MEMARZADEH K, ZHANG S, et al. A novel coping metal material CoCrCu alloy fabricated by selective laser melting with antimicrobial and antibiofilm properties[J]. *Materials science & engineering C: Materials for biological applications*, 2016, 67: 461-467.
- [14] ZHAO L, CHU P K, ZHANG Y, et al. Antibacterial coatings on titanium implants[J]. *Journal of biomedical materials research part B: Applied biomaterials*, 2009, 91B(1): 470-480.
- [15] HAN A, LI X, HUANG B, et al. The effect of titanium implant surface modification on the dynamic process of initial microbial adhesion and biofilm formation[J]. *International journal of adhesion and adhesives*, 2016, 69: 125-132.
- [16] HARDES J, AHRENS H, GEBERT C, et al. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(18): 2869-2875.
- [17] GOODMAN S B, YAO Z, KEENEY M, et al. The future of biologic coatings for orthopaedic implants[J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 3174-3183.
- [18] HARRIS L G, TOSATTI S, WIELAND M, et al. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly (L-lysine)-grafted-poly (ethylene glycol) copolymers[J]. *Biomaterials*, 2004, 25: 4135-4148.
- [19] ZHENG Y, LI J, LIU X, et al. Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface[J]. *International journal of nanomedicine*, 2012, 7: 875-884.
- [20] ADIL M, SINGH K, VERMA P K, et al. Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms[J]. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2014, 2(4): 286-292.
- [21] ZHANG E, LI F, WANG H, et al. A new antibacterial titanium-copper sintered alloy: preparation and antibacterial property[J]. *Materials science & engineering C: Materials for biological applications*, 2013, 33(7): 4280-4287.
- [22] ZHANG S, YANG C, REN G, et al. Study on behavior and mechanism of Cu<sup>2+</sup> ion release from Cu bearing antibacterial stainless steel[J]. *Materials technology*, 2015, 30(B2): 126-132.
- [23] REN L, NAN L, YANG K. Study of copper precipitation behavior in a Cu-bearing austenitic antibacterial stainless steel[J]. *Materials & design*, 2011, 32(4): 2374-2379.
- [24] LIU R, TANG Y, ZENG L, et al. In vitro and in vivo studies of anti-bacterial copper-bearing titanium alloy for dental application[J]. *Dental materials*, 2018, 34(8): 1112-1126.
- [25] LIU R, MEMARZADEH K, CHANG B, et al. Antibacterial effect of copper-bearing titanium alloy (Ti-Cu) against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 29985.
- [26] MA Z, LI M, LIU R, et al. In vitro study on an antibacterial Ti-5Cu alloy for medical application[J]. *Journal of materials science materials in medicine*, 2016, 27(5): 91.
- [27] SNT 2399—2010, 抗菌金属材料评价方法[S]. SNT 2399—2010, Evaluation method for antimicrobial metallic materials[S].
- [28] ISO-10993-5, Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests in vitro for cytotoxicity: in vitro methods[S].
- [29] HAN A, TSOI J K H, RODRIGUES F P, et al. Bacterial adhesion mechanisms on dental implant surfaces and the influencing factors[J]. *International journal of adhesion and adhesives*, 2016, 69: 58-71.
- [30] JUNG W K, KOO H C, KIM K W, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2008, 74: 2171-2178.