

SLM 含铜钴基合金的抗菌性能及细胞相容性的初步探索

徐晶¹, 刘蕊², 曲冠霖¹, 王强¹, 任玲², 张扬¹

(1.中国医科大学 附属口腔医院, 沈阳 110122; 2.中国科学院金属研究所, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 以 SLM-CoCrW 为对照, 评价 SLM-CoCrCu 的抗菌性及生物相容性, 为 SLM-CoCrCu 的潜在临床应用提供理论依据。**方法** 选择金黄色葡萄球菌为研究对象, 采用平板法验证合金的抗菌性能。选择 MC3T3-E1 细胞为研究对象, 采用 CCK-8 检测法评价合金对于细胞增殖的影响和细胞毒性等级。采用细胞骨架荧光染色标记法评价细胞在合金表面的粘附及生长, 结合增殖率, 反映合金的细胞毒性。采用流式细胞术评价材料对细胞早期凋亡的影响。**结果** SLM-CoCrCu 对金黄色葡萄球菌的生长有明显抑制作用, 对金黄色葡萄球菌抗菌率可达 98%, 与 SLM-CoCrW 比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。随培养时间的延长, SLM-CoCrCu 细胞数量逐步增长, 表现出对细胞增殖的促进作用。SLM-CoCrCu 和 SLM-CoCrW 在与细胞共培养 1、3、7 d 后, 细胞增殖率有显著差异性 ($P = 0.01$)。共培养 1 d 后, 不含铜组细胞增殖率优于含铜组; 共培养 3 d 及 7 d 后, 含铜组对细胞增殖影响明显优于不含铜组。两者对于细胞粘附及形态上的影响无明显差异。SLM-CoCrCu 和 SLM-CoCrW 对于细胞凋亡的影响无明显差异。**结论** SLM-CoCrCu 相较于 SLM-CoCrW 有良好的抗菌性能。同时, SLM-CoCrCu 具有良好的生物相容性, 对细胞增殖、粘附及形态都无明显影响。

关键词: 钴基合金; 铜; 选择性激光熔融; 生物相容性; 金黄色葡萄球菌; 抗菌性能

中图分类号: TG146.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2019)07-0296-06

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2019.07.033

Preliminary Exploration on Antibacterial Property and Biocompatibility of SLM Copper-Cobalt Alloys

XU Jing¹, LIU Rui², QU Guan-lin¹, WANG Qiang¹, REN ling², ZHANG Yang¹

(1.Affiliated Stomatological Hospital of China Medical University, Shenyang 110122, China;
2.Institute of Metal Research, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: The work aims to use SLM-CoCrW as a control to evaluate the antimicrobial and biocompatibility of SLM-CoCrCu, and then provide a theoretical basis for the potential clinical application of SLM-CoCrCu. *Staphylococcus aureus* was selected as the research object, and the antimicrobial properties of the alloy were tested by plate method. MC3T3-E1 cells

收稿日期: 2018-11-21; 修订日期: 2019-06-11

Received: 2018-11-21; Revised: 2019-06-11

基金项目: 国家自然科学基金资助 (51631009); 中国医科大学-中国科学院沈阳分院科学家合作伙伴项目 (HZHB2018017); 沈阳市科技计划项目 (18-014-4-36)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (51631009), China Medical University-Shenyang Branch of Chinese Academy of Sciences Scientist Partnership Project (HZHB2018017), Shenyang Science and Technology Funded Project (18-014-4-36)

作者简介: 徐晶 (1992—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为口腔正畸学, 抗菌医用金属新材料。

Biography: XU Jing (1992—), Female, Master, Research focus: orthodontics, new antimicrobial medical metal materials.

通讯作者: 张扬 (1984—), 女, 教授, 主要研究方向为口腔正畸学。邮箱: kq3666@126.com

Corresponding author: ZHANG Yang (1984—), Female, Professor, Research focus: orthodontics. E-mail: kq3666@126.com

were selected as the research object. CCK-8 assay was used to evaluate the effect of alloy on cell proliferation and cytotoxicity. The adhesion and growth of cells on the alloy surface were evaluated by cytoskeleton fluorescence staining, and the cytotoxicity of the alloy was reflected by the proliferation rate. Flow cytometry was used to evaluate the effect of materials on early cell apoptosis. SLM-CoCrCu obviously inhibited the growth of *staphylococcus aureus*, and the antimicrobial rate of SLM-CoCrCu was 98%. There was a significant difference between SLM-CoCrCu and SLM-CoCrW ($P < 0.01$). With the prolongation of culture time, the number of SLM-CoCrCu cells increased gradually, and promoted cell proliferation. SLM-CoCrCu and SLM-CoCrW co-cultured with cells for 1, 3 and 7 days showed significant difference in cell proliferation rate ($P = 0.01$). After co-culture for 1 day, the cell proliferation rate of copper-free group was better than that of copper-free group. After co-culture for 3 days and 7 days, the effect of copper-containing group on cell proliferation was significantly better than that of copper-free group. There was no significant difference in cell adhesion and morphology between the two groups. There was no significant difference between SLM-CoCrCu and SLM-CoCrW on apoptosis. Compared with SLM-CoCrW, SLM-CoCrCu has better antimicrobial properties. At the same time, SLM-CoCrCu has good biocompatibility and has no significant effect on cell proliferation, adhesion and morphology.

KEY WORDS: cobalt-based alloy; Cu; selective laser melting; cytocompatibility; *staphylococcus aureus*; antibacterial property

选择性激光熔融 (Selective laser melting, SLM) 技术是增材制造的一种, 最早被广泛用于航空航天、汽车等工业行业。随着 SLM 技术日臻成熟及各种优点为人所熟知, 其逐步被医疗行业引进, 为临床治疗提供了无限可能。与传统成形工艺相比, SLM 技术有着工序简单, 加工环境要求较低、时间短, 材料利用率高, 成本低和成形产品质地均匀紧凑, 能保证成形件良好的机械及化学性能等诸多优点^[1-3]。目前, SLM 技术已被研究者试用于各类医疗器械的制造, 其中, SLM 技术与钴基合金相结合受到了口腔科医生的广泛关注。

现今, 由于先天及后天因素引起的口颌面畸形、不良生活习惯导致的口腔疾病以及交通事故、生活外伤造成的各类缺损越来越常见。钴基合金作为口腔科应用最广泛的金属之一, 因其有着良好的生物相容性、延展性及耐腐蚀性, 在临床上多用于口内冠修复、植入体及修复体支架^[4-5]。口腔作为一个复杂的人体环境, 目前检测到的细菌种类多达 500 种, 这些细菌极易附着在牙齿、假体及植入物表面, 形成细菌生物膜而引发感染, 从而导致各种炎症的发生, 例如种植体周围炎、牙龈炎、牙周炎、义齿性口炎等^[6]。细菌感染不仅会降低口内植入器件的成功率, 引发的牙周炎还会对口腔牙周组织的健康产生极大的影响, 严重者甚至可能导致牙龈萎缩和牙槽骨不可逆转的吸收, 对于患者面部美观及咀嚼功能产生不可估量的伤害^[7]。如何预防及控制植入体及修复体引发的细菌感染, 已经成为研究者炙手可热的话题之一。此外, 钴基合金作为一种惰性金属, 不具有抗菌的能力, 如何提高钴基合金抗菌性能也成为了研究的一大热点。

铜 (Cu) 作为人体必需元素之一, 在维持机体正常的分泌功能、免疫功能上不可或缺。Cu 离子另一受到研究者广泛关注的是它的抗炎性和抗菌性。早在 20 世纪 90 年代, 日本川崎制铁株式会社及日本日新

制钢公司先后公布开发出含银抗菌不锈钢及三种含铜抗菌不锈钢。这种向不锈钢中添加银和铜以达到抗菌目的的方法收获到了显著的成果^[8]。现在, 中国科学院金属研究所杨柯研究员团队已有相关研究将 Cu 添加到医疗级不锈钢 (316L、304 型不锈钢) 和钛合金 (Ti-6Al-4V) 中, 获得相应的含铜金属材料 (316L-Cu、304-Cu、Ti-6Al-4V-Cu 合金), 体液环境下, 合金发生腐蚀, 能够持续稳定地释放微量的 Cu 离子来发挥 Cu 的抗菌作用。研究表明, 含铜金属材料不仅对材料表面粘附的细菌有直接杀灭的作用, 并且能抑制细菌生物膜形成, 发挥 Cu 的抗菌效果^[9-15]。

本研究利用 SLM 技术, 将 CoCrW 粉和铜粉按照一定配比混合后, 通过增材制造获得一种新型抗菌含铜钴基合金 (SLM-CoCrCu)。旨在赋予钴基合金抗菌能力, 为临床钴基合金的应用提供更多空间。本实验首先对于 SLM-CoCrCu 抗菌性能进行初步验证, 着重于初步评价合金对细胞增殖、粘附、凋亡的影响, 为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

SLM 成形含铜钴基合金 (CoCrW-Cu, 以下记为 SLM-CoCrCu) 及 SLM 成形钴基合金 (SLM-CoCrW), 由中国科学院金属研究所提供; 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 (MC3T3-E1), 由中国医科大学提供; 金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*, ATCC 6538), 由广州微生物菌种保藏中心提供。

本实验所用仪器包含: SLM 成形仪 (Mlab-R, CONCEPTLAER, Germany), HERAcell 150 细胞培养箱 (Thermo Scientific, 美国), TDZ5-WS 高速离心机 (湘仪离心机仪器有限公司, 中国), Infi-nite200 酶标仪 (TECAN, 瑞士), TE2000-S 倒置相差显微镜

(Nikon, 日本)。

1.2 实验

1.2.1 样品制备

将纯度为 99.9%、粒度为 15~50 μm 的铜粉及 CoCrW 合金粉充分混合, 获得铜含量为 3% 的混合粉, 再过筛。将筛选合格的混合金属粉通过 SLM 成形仪制备出尺寸为 10 cm \times 5 cm \times 2 cm 的 SLM-CoCrCu 金属块, 使用 CoCrW 粉制备对照组 SLM-CoCrW 金属块, 由线切割设备切割为 $\phi 10\text{ mm}^2 \times 1\text{ mm}$ 的金属圆片。依次用 150—2000# 的 SiC 砂纸打磨样品, 然后分别采用无水乙醇、去离子水超声清洗, 最后用 75% 酒精浸泡 1 h, 再在无菌条件下烘干, 经紫外线杀菌备用。

1.2.2 体外定量抗菌实验

采用平板菌落计数法检测 SLM-CoCrCu 合金的抗菌性能。将灭菌处理后的样品 SLM-CoCrCu 及 SLM-CoCrW (各 3 枚) 置于 24 孔板内备用。使用比浊法配制细菌悬液, 初始浓度为 $0.275 \times 10^8\text{ cfu/mL}$, 采用无菌 PBS 缓冲液梯度稀释至 10^3 cfu/mL 备用, 取 10^6 cfu/mL 为工作浓度, 在每个样品表面滴加 50 μL 10^6 cfu/mL 的菌液, 保证能够充分浸润样品表面。将孔板放入温度为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中, 保证环境湿度为 95% 以上, 培养 24 h。另取 10^6 cfu/mL 菌液作为空白对照, 与实验组以相同条件培养。到达时间点后, 将样品连同菌液一起取出, 移入无菌的离心管中, 每个样品加入 2 mL 的无菌 PBS 溶液, 涡流振荡 1 min, 充分洗脱粘附细菌。每个样本平行接种两个固体培养皿, 置于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中, 24 h 后取出, 进行菌落计数。

1.2.3 细胞毒性评价

为了检测 CoCrCu 合金对细胞增殖的影响及毒性作用, 本实验采用 Cell Counting Kit-8 试剂盒评价细胞增殖。将灭菌样品 SLM-CoCrCu 组及 SLM-CoCrW 组各 15 枚分 3 组分别置于 48 孔板内, 消化对数生长期的细胞, 细胞计数后, 每孔接种 10 000 cells, 在 37°C 、5% CO_2 条件下培养 1、3、7 d。到达时间点后, 将粘附有细胞的样品转移至新的 48 孔板内, PBS 清洗样品 2 次, 每孔分别加入 250 μL 含有 CCK-8 的无血清培养基, CCK8 与培养基配制比为 10% (v/v)。然后将孔板置入培养箱孵育 4 h 后取出, 每孔取 200 μL 移至 96 孔板中, 于酶联免疫检测仪 450 nm 波长处测定各孔光密度值 (optical density, OD)。实验重复三次, 每种样品 5 组平行, 取均值, 计算细胞相对增殖率 (relative growth rate, RGR), $\text{RGR} = \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{对照组}} \times 100\%$, 评价细胞毒性等级。

1.2.4 细胞形态学观察

细胞接种方法同 1.2.3 小节, 培养 4、24 h, 后将

样品连同其上细胞一起取出, PBS 清洗样品 2 次后, 用 4% 的多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗细胞 2 次; 然后加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 的鬼笔环肽, 避光染色 40 min, 到达时间后, 用 PBS 清洗细胞 2 次; 随后用 DAPI 染色剂避光染色 5 min, PBS 清洗 2 次, 在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.5 细胞凋亡率检测

细胞接种方法同 1.2.3 小节, 将样品与细胞分别培养 1、3 d, 到达时间点后, 按照 Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒说明书进行细胞的消化收集及清洗, 随后用 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 进行重悬, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法进行染色。室温避光染色 15 min 后, 每管加入 400 μL $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬, 冰上放置, 30 min 内上机检测。

2 结果及分析

2.1 体外定量抗菌实验

图 1a 是金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 与 SLM-CoCrCu 和 SLM-CoCrW 合金分别作用 24 h 后的存活细菌菌落图, 图 1b 为共培养 24 h 后各组细菌的存活率。如图 1b 所示, 以空白对照组 (untreated group) 的细菌存活率为 100% 为标准, SLM-CoCrCu 组细菌存活率显著降低, 只有 0.14%, 表明 SLM-CoCrCu 合金对金黄色葡萄球菌具有良好的抗菌作用。与对照 SLM-CoCrW 组的细菌存活率相比, SLM-CoCrCu 的细菌存活率有显著性差异 ($P < 0.01$)。此实验结果表明, 在共培养 24 h 后, SLM-CoCrCu 对金黄色葡萄球菌的杀菌率可达到 98% 以上, 具有良好的抗菌作用。

2.2 细胞毒性

采用 CCK-8 法评价合金对细胞的毒性作用。CCK-8 试剂盒是一种广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的高灵敏度试剂盒, 主要原理是 WST-8 可以被线粒体内的脱氢酶还原形成橙黄色 formazan, 其 OD 值与活细胞数线性相关。吸光度值和 RGR 值评级如图 2 及表 1 所示。SLM-CoCrCu 组细胞相对增殖率均在 80% 以上, 符合国家对植入物细胞毒性要求。随着共培养时间的延长, SLM-CoCrCu 组细胞相对增殖率 (RGR) 呈逐步上升趋势, 在共培养后期明显优于 SLM-CoCrW 组。

2.3 细胞形态观察

细胞在 SLM-CoCrCu 和 SLM-CoCrW 合金上的形态如图 3 所示。DAPI 能够通过细胞膜与双链 DNA 结合, 形成稳定的荧光复合物。DAPI-DNA 复合物在紫外光的激发下呈浅蓝色荧光。罗丹明-鬼笔环肽试剂与细胞中的肌动蛋白结合后显红色荧光。图 3 所示, 共培养 4 h 时, 细胞在合金表面粘附并开始铺展,

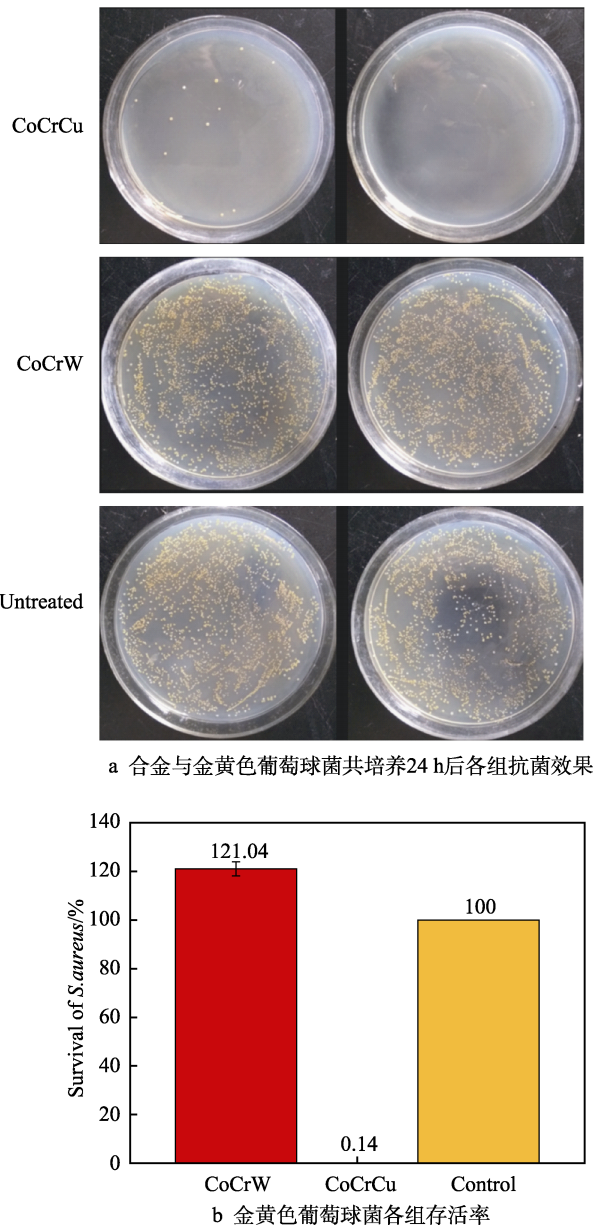


图 1 体外定量抗菌实验分析
Fig.1 Quantitative analysis of antibacterial activity in vitro
(a) antibacterial effects of alloy co-cultured with *S. aureus* for 24 h and (b) bacteria survival rates of and *S. aureus*

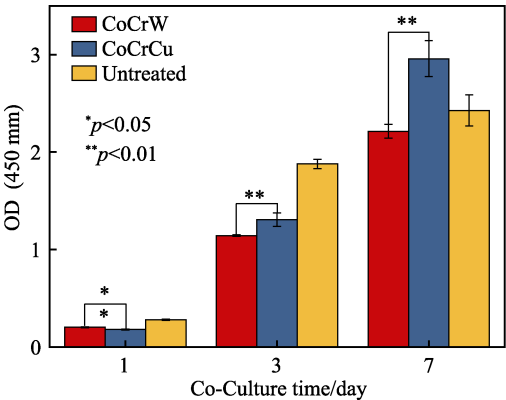


图 2 CCK-8 法测得的 MC3T3-E1 细胞的 OD 值
Fig.2 Viabilities of MC3T3-E1 cells determined by CCK-8 assay

表 1 CoCrCu 合金对细胞的相对增殖率和细胞毒性等级
Tab.1 Cell RGR and cytotoxicity grades of CoCrCu alloy to cells

Culture time/d	RGR/%	Grade
1	88.35±4.36	1
3	105.75±17.59	1
7	114.94±16.26	1

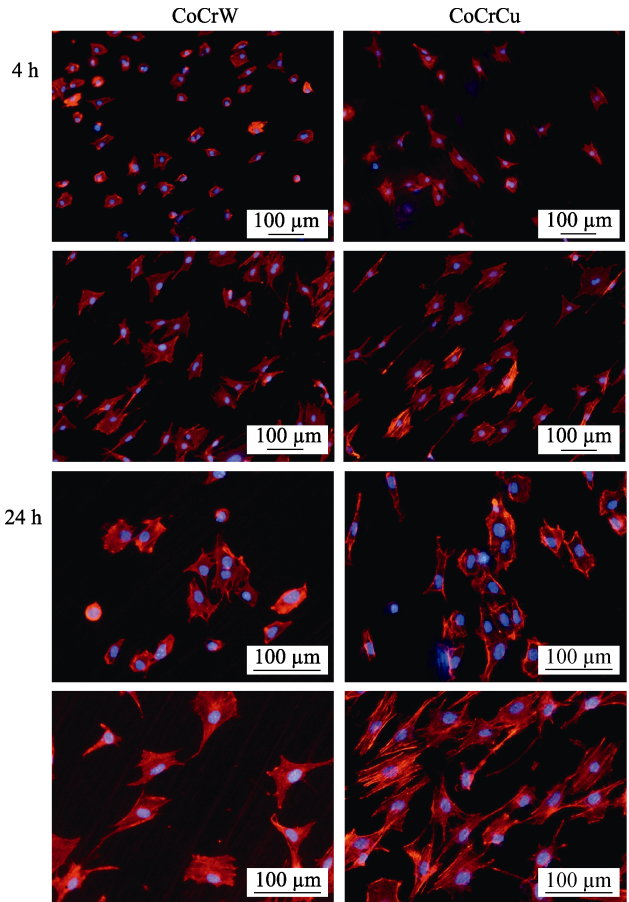
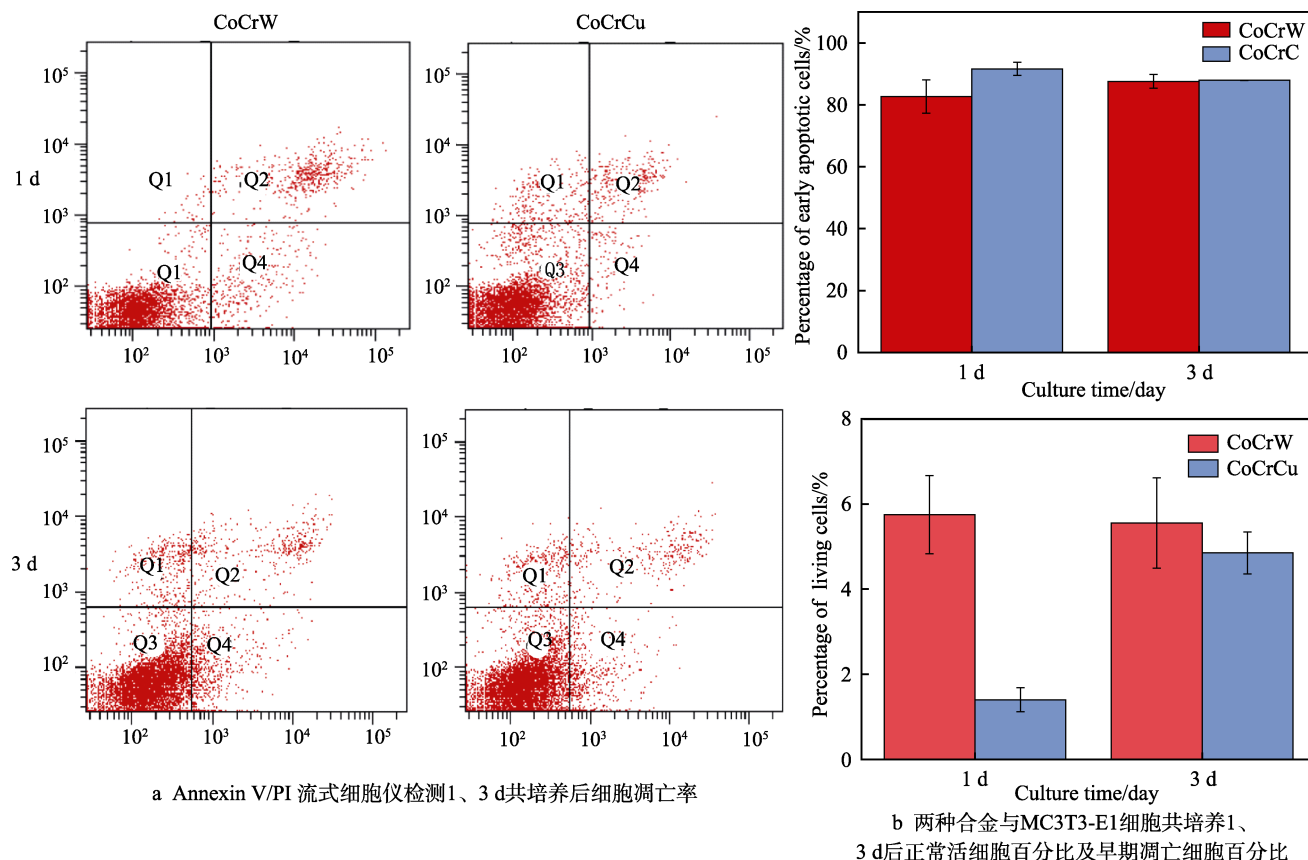


图 3 细胞与两种合金共培养后荧光染色结果
(细胞质中肌动蛋白染红色，细胞核染蓝色)
Fig.3 Fluorescent images of cells cultured on the surface of CoCrW and CoCrCu alloy (actin stained with Rhodamine Phalloidin (red) and nuclei stained with DAPI (blue))

SLM-CoCrCu 组及 SLM-CoCrW 组细胞形态正常，贴壁生长良好，细胞核核形完整，染色质均匀，细胞开始伸出伪足，细胞形态舒展，视野内未见溶解细胞；共培养 24 h 时，细胞胞核无明显改变，细胞已呈完全伸展状态，伪足多且清晰，表明细胞状态活跃，SLM-CoCrCu 组及 SLM-CoCrW 组在细胞形态上无明显差异。

2.4 细胞凋亡

如图 4 二维点阵图所示，Q3 区代表正常活细胞，两种染色剂均呈低染；右下象限 Q4 区代表早期凋亡细胞，Annexin V-FITC 呈高染，PI 呈低染；右上象限 Q2 区代表细胞碎片，两种染色剂都显示为高染。



a Annexin V/PI 流式细胞仪检测1、3 d共培养后细胞凋亡率

b 两种合金与MC3T3-E1细胞共培养1、3 d后正常活细胞百分比及早期凋亡细胞百分比

图4 细胞早期凋亡结果分析

Fig.4 Analysis of early apoptosis results (a) cell apoptosis rate detected by Annexin V/PI with flow cytometry after 1 d and 3 d and (b) percentage of living cells and apoptotic cells of MC3T3-E1 cells detected by flow cytometry after co-culture with alloys for 1 d and 3 d

由图4可见,细胞分布以正常活细胞及凋亡细胞为主,在合金与细胞共培养1 d及3 d后,细胞总凋亡百分数无明显变化。SLM-CoCrCu合金组及SLM-CoCrW合金组在活细胞数目及凋亡细胞数目上无明显差异。

3 讨论

各类材料作为修复体及医疗辅助器械用于人体时,均会受到人体体液的影响。不论是植入体内的修复体,还是仅用于口内的修复体,都时刻浸没在体液中,或多或少会发生不同程度的腐蚀^[16]。合金在体液中发生腐蚀会导致合金中金属元素的溶出,这种腐蚀有利有弊。含铜合金材料的抗菌性能,主要依赖于合金在体液环境中发生微弱稳定的腐蚀进而释放出微量的铜离子,从而发挥铜离子的抗菌作用。L. Ren等研究表明^[17-18],一方面,含铜金属释放的Cu离子能够破坏细菌细胞壁结构、改变细菌细胞膜的通透性,导致细菌细胞质外流;同时能够破坏细菌正常的氧化呼吸作用,从而杀死细菌。另一方面,Cu离子能够破坏细菌DNA某些重要蛋白相关基因的复制及表达,从而抑制细菌的增殖。有研究表明,含铜钴基合

金具有很好的抗菌性能。S. wang等人^[19]将不同含量的Cu元素添加到铸态钴基合金中获得铸态含铜钴基合金,探究铸态含铜钴基合金的抗菌作用。结果表明,铸造含铜钴基合金对于金黄色葡萄球菌及大肠杆菌均有良好杀灭作用,并且对于细菌生物膜形成具有抑制作用。

生物金属材料在投入临床使用之前,不仅要对其机械、化学性能进行相应的研究和探索,材料生物安全性的验证也至关重要。在对SLM成形钴基合金的研究中发现,SLM制作的钴铬合金较铸造法制造的钴铬合金耐腐蚀性能更加优越^[20]。SLM技术在含铜钴基合金领域的应用不仅解决了传统工艺成形存在非均匀的微观组织和凝固缺陷,会导致材料机械性能不足和材料质量不均的问题,同时,一定程度上降低了有害离子溶出,提高了合金的临床适应性。现在临床应用的SLM成形钴基合金在合成件硬度、耐腐蚀性、精度上相较于传统钴基合金已有一定的提高^[20-21]。如今,关于SLM成形的钴基合金的理化性能研究已经有了一定的深入,并取得了实用性的结果。A. Takaichi等人^[3]对SLM制造CoCrMo合金的机械性能和微观组织进行了相关的探索,证实了SLM成形件较铸造的CoCrMo合金具有优越性,在医学制造领域

具有广阔的应用前景。B. Vandenbroucke 等人^[22]优化了 SLM 制作 CoCrMo 合金及钛合金的相关工艺参数,研发出了性能优越、结构复杂的支架和牙科植入体。D. Jevremovic 等使用 F75 标准的 CoCrMo 合金材料,对 SLM 直接制造可摘除义齿的性能进行了测试,并验证了其临床适用性^[23]。

同 SLM 成形的 CoCrMo 合金材料一样,SLM-CoCrCu 合金材料具有在制造工艺、力学性能及机械性能上的优势,Cu 的添加对钴基合金材料学性能及机械加工性能均没有太大影响,并赋予了其良好的抗菌性能^[16]。本文旨在对 SLM 成形含铜钴基合金的细胞相容性进行研究分析,通过比对两种合金的增殖率、凋亡率以及粘附能力,对 SLM 成形含铜钴基合金溶出 Cu 离子的潜在毒性有了初步探索。通过实验结果发现,铜的添加对于细胞增殖没有负向影响,甚至有利于细胞的增殖。有研究表明,当铜离子浓度处于合适的范围时,会开始对细胞表现出促增殖作用;当体内铜离子浓度变化时,细胞内活性氧(ROS)的值随铜离子浓度增加而增加。表明在细胞中,ROS 变化与细胞毒性息息相关^[24],这与本研究实验结果相印证。

4 结论

本文将钴基合金粉末和铜粉混合,通过 SLM 技术增材制造出新型含铜钴基合金(SLM-CoCrCu),通过铜离子的添加,将钴基合金生物惰性材料生物功能化。通过与 SLM-CoCrW 合金的研究对比可知,铜元素的添加,在提高合金抗菌能力上有了显著的效果,SLM-CoCrCu 抗菌性能优异。同时,通过细胞毒性检测,细胞形态、粘附观察以及对细胞早期凋亡率检测结果分析可知,细胞在两种合金上粘附的形态无明显差异,培养初期细胞数目相当,随共培养时间的延长,含铜组在细胞数目上略有优势。细胞凋亡实验则无明显差异性,材料具有良好的相容性,SLM-CoCrCu 合金兼具良好的生物相容性及抗菌性能。随着研究的深入,其具体抗菌机理及生物功能化方面的应用也将在未来逐步浮出水面,可以预见其巨大的市场潜力及应用价值。

参考文献:

- [1] XIN X Z, XIANG N, CHEN J, et al. Corrosion characteristics of a selective laser melted Co-Cr dental alloy under physiological conditions[J]. Journal of materials science, 2012, 47(12): 4813-4820.
- [2] XIANG N, XIN X Z, CHEN J, et al. Metal-ceramic bond strength of Co-Cr alloy fabricated by selective laser melting[J]. Journal of dentistry, 2012, 40(6): 453-457.
- [3] TAKAICHI A, SUYALATU, NAKAMOTO T, et al. Microstructures and mechanical properties of Co-29Cr-6Mo alloy fabricated by selective laser melting process for dental applications[J]. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2013, 21(3): 67-76.
- [4] 白晓峰. 口腔颌面外科学(9)口腔颌面部畸形和缺损[J]. 中国实用口腔科杂志, 2010, 3(8): 511-512.
- [5] BAI Xiao-feng. Oral and maxillofacial surgery(9) deformity and defect in oral and maxillofacial region[J]. Chinese journal of practical dentistry, 2010, 3(8): 511-512.
- [6] JABBARI Y S A. Physico-mechanical properties and prosthodontic applications of Co-Cr dental alloys: A review of the literature[J]. Journal of advanced prosthodontics, 2014, 6(2): 138-145.
- [7] TAKEDA O, TOYAMA T, WATANABE K, et al. Ameliorating effects of juzentaihoto on restraint stress and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss[J]. Archives of oral biology, 2014, 59(11): 1130-1138.
- [8] GODOY GALLARDO M, MANZANARESCÉ SPEDES M C, SEVILLA P, et al. Evaluation of bone loss in antibacterial coated dental implants: An experimental study in dogs[J]. Materials science & engineering C, 2016, 69: 538-545.
- [9] SUZUKI S, NAKAMURA S, MIYAKUSU K. Antimicrobial activity of Cu contained austenitic stainless steels[J]. Current advances in materials and processes, 1999(12): 518-518.
- [10] REN L, YANG K. Bio-functional design for metal implants, a new concept for development of metallic biomaterials[J]. Journal of materials science & technology, 2013, 20: 1005-1110.
- [11] REN L, MA Z, LI M, et al. Antibacterial properties of Ti-6Al-4V-xCu alloys[J]. Journal of materials science & technology, 2014, 30(7): 699-705.
- [12] ZHANG D, REN L, ZHANG Y, et al. Antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* and biological characteristics of antibacterial stainless steel[J]. Colloids surfaces B: Biointerfaces, 2013, 105(4): 51-57.
- [13] REN L, NAN L, YANG K. Study of copper precipitation behavior in a Cu-bearing austenitic antibacterial stainless steel[J]. Materials & design, 2011, 32: 2374-2379.
- [14] REN L, ZHU J, NAN L, et al. Differential scanning calorimetry analysis on Cu precipitation in a high Cu austenitic stainless steel[J]. Materials & design, 2011, 32(7): 3980-3985.
- [15] REN L, YANG K, GUO L, et al. Preliminary study of anti-infective function of a copper-bearing stainless steel [J]. Materials science & engineering C, 2012, 32(5): 1204-1209.
- [16] 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.

(下转第 315 页)

- steels in Dagang simulated soil solution[J]. Surface technology, 2018, 47(6): 218-223.
- [6] SERGIO L, TOMMASO P, TIZIANO B. Cathodic protection modelling of a propeller shaft[J]. Corrosion Science, 2016(100): 36-46.
- [7] KEAR G, BARKER B D, STOKES K R. Corrosion and impressed current cathodic protection of copper-based materials using a bimetallic rotating cylinder electrode (BRCE)[J]. Corrosion science, 2005, 47(7): 1694-1705.
- [8] 潘峻, 熊建波, 丁建军. 淡水海水环境下钢结构阴极保护的设计与实现[J]. 施工技术, 2013, 42(5): 261-263.
PAN Jun, XIONG Jian-bo, DING Jian-jun. Cathodic protection design for steel structure in brackish water[J]. Construction technology, 2013, 42(5): 261-263.
- [9] 余晓毅, 赵赫, 常炜. 基于数值模拟的海上平台阴极保护系统的技术研究[J]. 装备环境工程, 2017, 14(2): 81-84.
YU Xiao-yi, ZHAO He, CHANG Wei. Technical research on cathode protection system of offshore platform based on numerical simulations[J]. Equipment environmental engineering, 2017, 14(2): 81-84.
- [10] 王弯弯, 张胜寒, 张秀丽. 沿海及盐渍地区输电杆塔混凝土钢筋阴极保护技术研究[J]. 华北电力技术, 2016(8): 13-17.
WANG Wan-wan, ZHANG Sheng-han, ZHANG Xiu-li. research on cathodic protection of reinforced concrete transmission tower in salinization and coastal areas[J]. North China electric power, 2016(8): 13-17.
- [11] 谢飞, 王月, 王兴发. 辽河油田土壤中溶解氧对X70管线钢腐蚀的影响[J]. 表面技术, 2018, 47(10): 186-191.
XIE Fei, WANG Yue, WANG Xing-fa. Effect of dissolved oxygen on corrosion of X70 pipeline steel in Liaohe oil-field[J]. Surface technology, 2018, 47(10): 186-191.
- [12] 朱万武, 许杨溢. 船体外加电流阴极保护的应用[J]. 广东造船, 2011(1): 55-58.
ZHU Wan-wu, XU Yang-yi. Application of impressed current cathode protection system for hull[J]. Guangdong shipbuilding, 2011(1): 55-58.
- [13] 尚兴彬, 胡乃科, 张守峰. 外加电流阴极保护电流屏蔽与阴极干扰研究[J]. 石油化工腐蚀与防护, 2015, 32(6): 14-18.
SHANG Xing-bin, HU Nai-ke, ZHANG Shou-feng. Study on current shielding and interference of impressed current cathodic protection[J]. Corrosion & protection in petrochemical industry, 2015, 32(6): 14-18.
- [14] 孙斌, 王广, 赵文革. 沙钢取水船阴极保护技术的应用[J]. 城市建筑, 2013(22): 332-334.
SUN Bin, WANG Guang, ZHAO Wen-ge. Application of the Shagang water boat cathodic protection technology[J]. Urbanism and architecture, 2013(22): 332-334.
- [15] 刘极莉. 船体内舱阴极保护设计技术研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2005.
LIU Ji-li. Study on cathodic protection design technology of ship internal tank[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2005.
- [16] RP-B401—2010, Cathodic Protection Design[S].

(上接第301页)

- [16] 浦素云. 金属植入材料及其腐蚀[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 1990.
PU Su-yun. Metal implant materials and their corrosion[M]. Beijing: Beijing University of Aeronautics and Astronautics Press, 1990.
- [17] 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, 2016, 67: 461-467.
- [18] 马政. 新型含铜抗菌钛合金的制备与性能研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2015.
MA Zheng. Study on preparation and properties of new-type copper-containing antibacterial titanium alloy[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2015.
- [19] WANG S, YANG C, REN L, et al. Study on antibacterial performance of Cu-bearing cobalt-based alloy[J]. Materials letters, 2014, 129(32): 88-90.
- [20] 李小宇, 郑美华, 王洁琪, 等. 3D打印和铸造钴铬合金耐蚀性及力学稳定性比较[J]. 中华口腔医学研究杂志, 2016, 10(5): 327-332.
LI Xiao-yu, ZHENG Mei-hua, WANG Jie-qi, et al. 3D Printing and casting the corrosion resistance and mechanical stability of cobalt-chromium alloy[J]. Chinese journal of stomatology research, 2016, 10(5): 327-332.
- [21] 邹洁, 胡滨. 选择性激光熔融技术所制牙科合金的研究进展[J]. 北京口腔医学, 2014(5): 292-294.
ZOU Jie, HU Bin. Research progress of dental alloys made by selective laser melting technology[J]. Beijing oral medicine, 2014(5): 292-294.
- [22] VANDENBROUCKE B, KRUTH J P. Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts[J]. Rapid prototyping journal, 2007, 13(4): 196-203.
- [23] JEVREMOVIC D, PUSKAR T, KOSEC B, et al. The analysis of the mechanical properties of F75 Co-Cr alloy for use in selective laser melting (SLM) manufacturing of removable partial dentures(RPD)[J]. Metalurgija, 2012, 51(2): 171-174.
- [24] 段小冬. 银、铜离子对人角质形成细胞增殖的影响及机制探索[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
DUAN Xiao-dong. Effects of silver and copper ions on the proliferation of human keratinocyte cells and its mechanism[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2015.