

3D 打印含铜钴基合金与 PDLF 细胞生物相容性初探

朱伟尧¹, 刘蕊², 战德松¹, 任玲², 王强¹

(1.中国医科大学, 沈阳 110122; 2.中国科学院金属研究所, 沈阳 110015)

摘要: **目的** 在现有医用钴基合金材料中加入铜元素, 使用选择性激光熔化技术 (selected laser melting, SLM) 制得一种新型含铜钴基合金, 并检测其生物相容性。**方法** 以 SLM 技术制得的新型含铜钴基合金作为实验组, 以 SLM 技术制得的不含铜元素的传统医用钴基合金作为对照组, 将实验材料与人牙周膜成纤维细胞 (periodontalligament fibroblast, PDLF) 进行共培养后, 使用细胞增殖活力测定 (CCK-8 法) 及实时无标记细胞分析技术 (Real Time Cellular Analysis, RTCA) -细胞毒性测定、鬼笔环肽细胞染色、细胞流式实验, 来检测材料对细胞增殖、凋亡、粘附的影响, 从而评价新型含铜钴基合金的生物相容性。**结果** 与新型含铜钴基合金直接接触共培养后的 PDLF 细胞, 其细胞相对增长率大于 99%, 属于零级细胞毒性。与新型含铜钴基合金间接接触共培养后的 PDLF 细胞, 其整个生长增殖过程并未受到新型合金的影响。与新型含铜钴基合金共培养 1 天后, 所有分组 PDLF 细胞凋亡率均小于 1%, 共培养 3 天后, 所有分组细胞凋亡率均小于 5%, 实验组与对照组无显著性差异, 且整体略低于对照组。鬼笔环肽染色后观察到细胞粘附正常, 实验组与对照组之间无明显差异。**结论** 经 SLM 技术制作的含铜钴基合金在保证拥有良好抗菌性能的同时, 不会对细胞产生细胞毒性, 即具有良好的细胞相容性。

关键词: 钴基合金; 铜元素; SLM 技术; 3D 打印; 生物相容性; 细胞毒性

中图分类号: TG139 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2019)07-0324-08

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2019.07.037

Biocompatibility between Cu-bearing CoCrW Alloy by 3D Printing and PDLF

ZHU Wei-yao¹, LIU Rui², ZHAN De-song¹, REN Ling², WANG Qiang¹

(1.China Medical University, Shenyang 110122, China;

2.Institute of Metal Research, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015, China)

ABSTRACT: The work aims to add Cu in existing medical CoCrW alloy to prepare a new Cu-bearing CoCrW alloy by selected laser melting (SLM) and test the biocompatibility. The new Cu-bearing CoCrW alloy prepared by SLM was used as the experimental group and the Cu-free CoCrW alloy prepared by SLM was regarded as the control group. After the experimental materials and periodontalligament fibroblast were co-cultured, CCK-8 and Real Time Cellular Analysis (RTCA, cytotoxicity assay,

收稿日期: 2018-10-25; 修订日期: 2019-02-12

Received: 2018-10-25; Revised: 2019-02-12

基金项目: 沈阳市科技计划项目 (18-014-4-36)

Fund: Shenyang Science and Technology Plan Project (18-014-4-36)

作者简介: 朱伟尧 (1992—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为口腔材料学。

Biography: ZHU Wei-yao (1992—), Male, Master, Research focus: dental materials.

通讯作者: 战德松 (1964—), 男, 硕士, 教授, 主要研究方向为再制造工程。邮箱: zhandesong@163.com

Corresponding author: ZHAN De-song (1964—), Male, Master, Professor, Research focus: dental materials. E-mail: zhandesong@163.com

Phalloidin cell staining and flow cytometry) were adopted to test the effects of materials on proliferation, apoptosis and adhesion of cells so as to evaluate the biocompatibility of new Cu-bearing CoCrW alloy. The RGR of PDLF cells directly contacting the new Cu-bearing CoCrW alloys after co-cultured was more than 99% and the cells were classified as zero-grade cytotoxicity. The growth of PDLF cells indirectly contacting the new Cu-bearing CoCrW alloys after co-cultured was not affected by the new alloy. The apoptosis rate of PDLF was less than 1% after co-cultured with CoCrW-Cu alloy for 1 day and less than 5% after 3 days of co-culture. There was no significant difference between the experimental group and the control group and the apoptosis rate of experimental group was lower than that of control group. Through the Phalloidin cell staining, the cell adhesion was normal and there was no significant difference between the experimental group and the control group. The Cu-bearing CoCrW-Cu alloy fabricated by SLM technology has good antibacterial performance and no cytotoxicity to cells, that is, good cell compatibility.

KEY WORDS: CoCrW alloy; Cu; selected laser melting (SLM); biocompatibility; cytotoxicity

口腔技术和口腔医用材料的发展一直伴随着人类的进步而逐渐完善。口腔健康水平体现了一个社会的现代化程度。随着社会的发展和水平的提高,口腔修复类合金凭借着其良好的实用性快速占领了口腔材料的一席之地,并广泛应用于可摘局部义齿,铸造金属全冠,烤瓷熔附金属全冠、桩核冠种植体等口腔修复体的制作当中。其中,钴基合金为我国临床口腔治疗中最常用的制作口腔修复体的金属材料之一^[1]。

现阶段造成口腔修复远期效果不佳的最重要原因之一便是微生物的滋生问题。众所周知,口腔是一个复杂的电解质环境,酸性饮食、菌斑堆积、细菌新陈代谢作用都会产生酸性物质,不论是无机酸,还是有机酸,都会对金属的耐腐蚀性能产生不良影响,从而影响远期修复效果^[2]。同时,由于无论何种口腔修复体均属于口腔异物,构成修复体的各个部分均能影响口腔局部的生理性自洁作用,引起局部组织微生态改变,形成有利于微生物生长的局部环境,最终导致炎症和疾病的发生^[3-4]。此外,在复杂的口腔环境下,粘结剂的溶解导致的微渗漏也会促进口腔中微生物的滞留,从而导致口腔系统病变^[5-6]。Dylina^[7]报道桥体龈端与牙槽嵴顶黏膜之间存在微小间隙,易滞留食物,使该区的唾液流速减慢,流量减少,氧化还原电势和氧张力发生改变,口腔微生态平衡失调,微生物的种类和数量发生变化,从而导致口腔局部组织炎症。Drake 等^[8]报道凡与义齿接触的牙面,其菌斑指数均较未接触义齿的牙面高。其次就是传统口腔修复体制作工艺存在固有缺陷。传统口腔修复体制作方法由于工序繁多,存在铸造不完全、表面粘砂等缺陷,最终成品往往存在空隙,且精度变差^[9-10]。而这样的缺陷又会进一步导致口腔中细菌滞留的增加,从而诱发各类口腔疾病。同时,根据 J R. Strub 等学者研究报道,传统制作工艺也会造成大量的材料浪费^[11]。

面对以上问题,常见的解决方法包括:改良修复体的设计,精细制作过程,叮嘱患者加强自洁等^[12]。但不论哪一种方法,都无法从根本上解决口腔中修复

体周围细菌滞留和制作方法上的固有缺陷问题。为了应对以上问题,本课题组设计出全新的使用 SLM 技术并加入铜元素的 3D 打印含铜钴基合金材料的方法,来解决传统口腔医用材料所存在的固有缺陷。

在各类具有生物医学功能的金属元素中,具有良好抗菌作用的铜元素不仅存在于多种合金之中,同时也是维持人体正常机能的必要微量元素之一^[13-14]。早在 1885 年便有记录,波尔多庄园的庄园主正是使用硫酸铜溶液解决了困扰庄园已久的虫害问题。根据文献报道^[14-15],Cu 合金对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)等常见感染细菌,甚至超级病菌 MRSA,均具有强烈的杀灭作用。同时,铜元素还具有多种生物功能化作用,不仅可以抑制血栓的形成,还能抑制动脉平滑肌的过度增殖、变性等病变,促进血管内皮再生。近期有医学研究表明,铜元素能起到修复骨组织、促进骨再生、改善骨质疏松症状等有益作用^[16]。由于铜优异的生物功能作用,已经开始应用于医用金属材料中。杨柯研究员带领的研究团队^[17-25]已经开发出系列含铜抗菌不锈钢材料、抗菌钛铜材料等,其抗菌性能、生物功能性、生物相容性都已得到充分验证。在前期工作基础上,本课题组成功在现有医用钴基合金(钴铬钨 CoCrW)的成分基础上,通过添加适量的铜,获得一种含铜钴基合金(CoCrW-Cu),并且在体外抗菌实验中获得了优异的抗菌效果^[25]。

在现代口腔修复治疗中,3D 打印技术经过多年发展,其扫描精度以及制作精度已经达到了临床使用的标准^[26-27]。目前,应用较多的 3D 金属打印技术为选择性激光熔化技术(selected laser melting, SLM)^[28]。与传统的铸造工艺相比,SLM 技术能够准确地根据不同患者的需要,提供个性化义齿设计,而且其自动化生产过程效率高、耗材少、成本低。根据文献报道^[29-30],由 SLM 工艺制得的烤瓷熔附金属全冠相比于传统工艺制得的同类产品,具有更好的金-瓷结合强度。所以由 SLM 技术制得的义齿产品在口腔修复领域获得了越来越广泛的认可,已经成为常规印模制作口腔修复体之外的又一可靠选择。

3D 打印含铜钴基合金 (CoCrW-Cu) 材料作为一种新型生物医用材料, 在自身拥有良好性能的前提下, 为满足临床实用的标准, 还必须具有良好的细胞相容性, 所以本文将含铜钴基合金与人牙周膜细胞 (PDLF) 进行共培养, 观察含铜钴基合金对 PDLF 细胞增殖、凋亡、粘附的影响。通过细胞增殖活力测定 (CCK-8 法)、实时无标记细胞分析技术 (Real Time Cellular Analysis, RTCA)-细胞毒性测定、鬼笔环肽细胞染色、细胞流式等四个实验, 来评价含铜钴基合金的细胞相容性, 以求为后期进一步研究探索含铜钴基合金生物功能化作用以及最终完成医用含铜钴基合金的临床应用打下坚实的基础。

1 实验材料和方法

1.1 材料制备

现阶段存在两种制备含铜钴基合金的方法: 1) 在 CoCrW 合金成分基础上添加 3% 的 Cu 粉末, 通过 SLM 工艺制得 CoCrW-Cu 合金。2) 采用气体雾化技术获得 CoCrW-Cu 合金粉末, 过筛选择合适的粒度, 再进行 3D 打印, 获得 CoCrW-Cu 合金。

本实验共使用三种钴基合金材料 (中国科学院金属研究所, 沈阳): 1) 合金粉制备的含铜钴基合金 (CoCrCu-alloy), 即由气体雾化获得的 CoCrCu 合金粉末经过选择性激光熔炼技术 (SLM) 制备。2) 混粉制备的含铜钴基合金 (CoCrCu-mix), 即由 CoCrW 合金粉末和 Cu 粉末混合后, 经过选择性激光熔炼技术 (SLM) 制备。3) 对照材料为相同 SLM 技术制备的常规医用钴基合金。获取样品后, 将样品切成圆形薄片 ($\phi 10 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$), 经 150~2000# SiC 砂纸打磨, 去离子水超声处理, 乙醇和无菌去离子水清洗干净, 最后经过高温高压蒸汽灭菌后, 备用。

1.2 材料浸提液制备

将三种实验用含铜钴基合金高温高压灭菌消毒, 按试样表面积/浸提液体积=1 cm²/1.25 mL 的标准, 浸泡在 D-MEM 培养液 (Hyclone 公司, 美国) 中, 并置于 CO₂ 恒温培养箱 (371, Thermo Scientific 公司, 美国) 中, 时间点为 3、7、10 d, 到达时间点后, 用涡流振荡器 (Cole-Parmer 公司, 美国) 涡流震荡, 吸出浸提液并过滤除菌后, 无菌保存备用。

1.3 细胞培养

本文使用人牙周膜成纤维细胞 (periodontalligament fibroblast, PDLFs, 中国医科大学中心实验室提供, 沈阳), 采用 D-MEM 培养基 (Hyclone 公司, 美国), 在 5% 的 CO₂ 恒温培养箱中培养。培养基中添加 10% 胎牛血清 (Gibco 公司, 美国) 和 1% 的青霉素-链霉素 (Hyclone 公司, 美国), 间隔 4 天传代和换液。

1.4 CCK-8 细胞增殖活力测定

样品在接种细胞之前经由高温高压蒸气灭菌, 完成灭菌后转移至超净台 (SW-CJ-IFD, 苏州安泰空气技术有限公司, 中国) 中, 先用无菌 PBS (Hyclone 公司, 美国) 漂洗两次, 漂洗后将 1 mL 人牙周膜细胞 (PDLF) 悬液以 1×10^4 细胞/孔的密度接种到放置有样品的 48 孔板内。接种完毕后, 在 CO₂ 恒温培养箱中分别培育 1、3、7 d, 到达每个时间点后取出培养板, 将样品用无菌 PBS 冲洗三次, 再使用 CCK-8 试剂盒 (Beyotime 公司, 中国) 评价其毒性。加入 250 μL 含有 10% (v/v) CCK-8 的 D-MEM, 然后将培养板放入 CO₂ 恒温培养箱中孵育 4 h。到达时间点后, 从每孔中吸取 100 μL 培养基, 并转移到新的 96 孔板中, 使用酶标仪 (Infinite 200 PRO, 中国) 测定其吸光度值 (OD 值)。相对增长率 (relative growth rate, RGR) 通过方程式 (1) 计算, 并按照表 1 中的要求, 将 RGR 值转化成五级水平, 评定材料的细胞毒性。
$$\text{RGR} = (\text{OD}_{\text{材料组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{阴性对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\% \quad (1)$$

表 1 细胞毒性反应分级标准
Tab.1 Grade standard of cytotoxic reaction

Level	Level of reaction	Reaction observation
0	No	Cell morphology is normal, adherent growth is good, there are discrete particles in the cytoplasm; no cell lysis
1	Extremely slight	Up to 20% of the cells are round, loose and adherent, without cytoplasmic granules; occasionally cell lysis
2	Mild	Up to 50% of the cells are round, no cytoplasmic granules; cytolysis is clearly visible
3	Moderate	Up to 70% of cells are round or dissolved
4	Severe	The cell layer is almost completely destroyed

表 2 细胞毒性分级标准和评定结果
Tab.2 Grade standard and evaluation result of cytotoxicity

Level	Relative appreciation rate/%	Evaluation results
0	≥ 100	Qualified
1	75~99	Qualified
2	50~74	Overview
3	25~49	Failed
4	0~24	Failed

1.5 RTCA-细胞毒性测定

相较于传统的 CCK-8、MTT 等通过测定固定时间点的细胞数量来评价细胞活力的实验方法, 新型的 RTCA 技术采用特殊工艺, 将微电子细胞传感器芯片

整合到细胞检测板的底部,从而做到实时、动态、定量跟踪细胞形态和增殖分化等改变,可帮助实验者更好地评价一种新材料对细胞是否产生毒性作用。

在超净台中将 0.1 mL 人牙周膜细胞 (PDLF) 悬液以 5×10^3 细胞/孔的密度接种到 96 孔电子板 (E-Plate View 96, ACEA Biosciences 公司, 美国) 中, 随后将其放入 CO_2 恒温培养箱中培育。使用 xCELLigence DP 系统 (ACEA Biosciences 公司, 美国) 每间隔 5 min 读取 96 孔电子板 (E-Plate) 中的细胞指数 (CI), 细胞指数的大小取决于细胞的数量、大小、形状以及细胞在孔板基底的附着质量。RTCA 监测 24 h 后暂停, 将平板从 xCELLigence 系统中取出。吸弃各个孔中的普通 D-MEM 培养液, 替换为材料浸提液。继续放回监测 72 h 后换液。到达时间点后, 使用 RTCA 软件 (ACEA Biosciences 公司, 美国) 收集结果。通过 RTCA 系统动力学变化反应曲线反映各孔 0~72 h 间 PDLF 细胞的生长状况。

1.6 细胞流式实验

在接种细胞之前, 样品经高温高压蒸气灭菌, 再转移至超净台中, 先用无菌 PBS 漂洗两次, 漂洗后将 1 mL 人牙周膜细胞 (PDLF) 悬液以 1×10^4 细胞/孔的密度接种到放置有样品的 48 孔组织培养板内, 每五孔为一组。接种完毕后, 在 CO_2 恒温培养箱中培育 1 天和 3 天, 到达时间点后, 分别使用胰蛋白酶 (Gibco 公司, 美国) 消化收集细胞, 再用预冷 PBS 清洗细胞两次, 然后使用 FITC 膜联蛋白 V 凋亡检测试剂盒 I (51-66121E, BD 公司, 美国) 进行检测。将细胞重悬于 1X Binding Buffer 中, 调节浓度为 1×10^6 个细胞/mL。将 100 μL 溶液 (1×10^5 个细胞) 转移到 5 mL 培养管中。实验组加入 5 μL FITC V 染料 (51-65874X, BD 公司, 美国) 和 5 μL PI 染料 (51-66211E, BD 公司, 美国), 轻轻吹打混匀细胞, 并在室温下 (25°C) 避光孵育 15 min。孵育完成后, 1 h 内使用流式细胞仪 (FACSCanto II, BD 公司, 美国) 检测分析。

1.7 细胞骨架染色法观察细胞粘附

在接种细胞之前, 样品经高温高压蒸汽灭菌, 再转移至超净台中, 先用无菌 PBS 漂洗两次, 漂洗后将 1 mL 人牙周膜细胞 (PDLF) 悬液以 1×10^4 细胞/孔的密度接种到放置有样品的 48 孔组织培养板内, 接种完毕后在 CO_2 恒温培养箱中培育 4 h 和 24 h。到达时间点后, 先将样品用无菌 PBS 漂洗三次, 再用 4% 多聚甲醛 (PFA) 溶液 (Sigma, 美国) 在室温下固定细胞 5 min, 然后使用 0.1% Triton X-100 (Amresco, 美国) 透膜处理 7~8 min。之后用无菌 PBS 轻轻冲洗样品两次, 并用罗丹明-鬼笔环肽 (Sigma, 美国) 在室温下避光染色 40 min, 然后使用 DAPI (美国) 染色 5 min, PBS 清洗 2 次。染色结束后, 在荧光显微

镜 (FM-600, 中国) 下避光观察 F-肌动蛋白和细胞核。

1.8 数据处理

每组实验设三组平行实验, 组内设 4 个平行样本 ($n=4$), 数据采用 SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., 芝加哥) 软件进行分析, 组间比较以单因素方差分析进行显著性检验 ($P < 0.05$ 差异有显著性意义)。

2 结果与讨论

2.1 CCK-8 细胞毒性检测结果

图 1 为 PDLF 细胞与不同材料共培养 1、3 和 7 天后的结果。由图可知, 相同材料随着培养天数的增加, OD 值逐渐增大, 说明细胞增殖良好。两种含铜钴基合金材料的 OD 值和阴性对照组相比, 几乎无差别, 不存在显著性差异。两种含铜钴基合金材料之间也不存在显著性差异。如表 3 所示, 两种含铜钴基合金材料的细胞增殖率 (RGR 值) 均 $> 99\%$, 远大于 75% 的 1 级细胞毒性, 达到 0 级细胞毒性, 说明相对于传统医用钴基合金材料, 新型医用含铜钴基合金材料不具有细胞毒性, 满足植入材料对细胞毒性的要求。

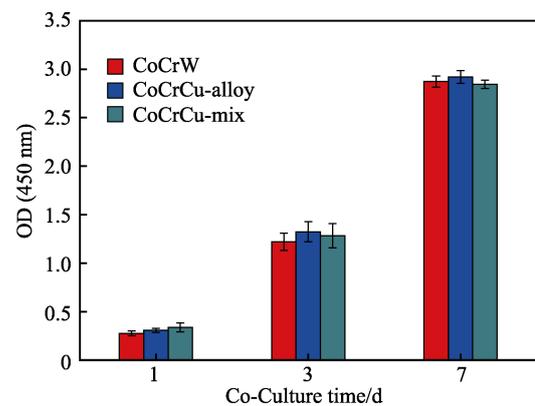


图 1 使用 CCK-8 法在酶标仪 (波长 450 nm) 中测得的 PDLF 细胞 OD 值

Fig.1 OD value of PDLF cells determined in microplate reader (wavelength of 450 nm) by CCK-8

表 3 PDLF 细胞在不同材料上的增殖率
Tab.3 RGR of PDLF cells on different materials

Co-Culture time/d	RGR/%		
	CoCrW	CoCrCu-alloy	CoCrCu-mix
1	100	111.3	122.6
3	100	108.5	105.1
7	100	101.6	99.1

2.2 RTCA 实时监测曲线的比较

图 2 为 PDLF 细胞使用不同材料浸提液培养 140 h 后的 Cell Index (CI) 值曲线。从接种时段 (最

初将 PDLF 接种到 E-Plate 的 24 h) 的各个细胞曲线来看细胞曲线随着培养时间的延长不断上升, 说明各孔的细胞生长良好, 无明显停滞和下降的情况发生, 各组间无明显差异。生长增殖时段(浸提液培养阶

段——24 h 开始直到结束)内细胞的培养液换成相应材料的浸提液, 换液后可以看到各孔的细胞仍然生长良好, 细胞曲线仍然随着培养时间的延长而不断上升, 各组间无明显停滞和下降的情况发生, 各组间也无明显差异。这表明整个培养过程中, 各组 PDLF 细胞均生长状况良好。三组材料间无显著差异, 说明本材料浸提液中的成分在整个细胞生长繁殖过程中不会抑制细胞增殖, 未对细胞产生细胞毒性。

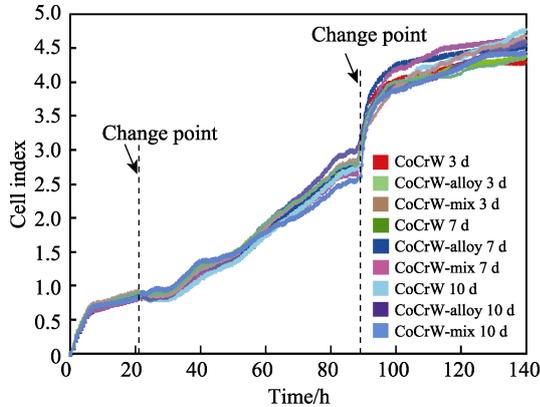
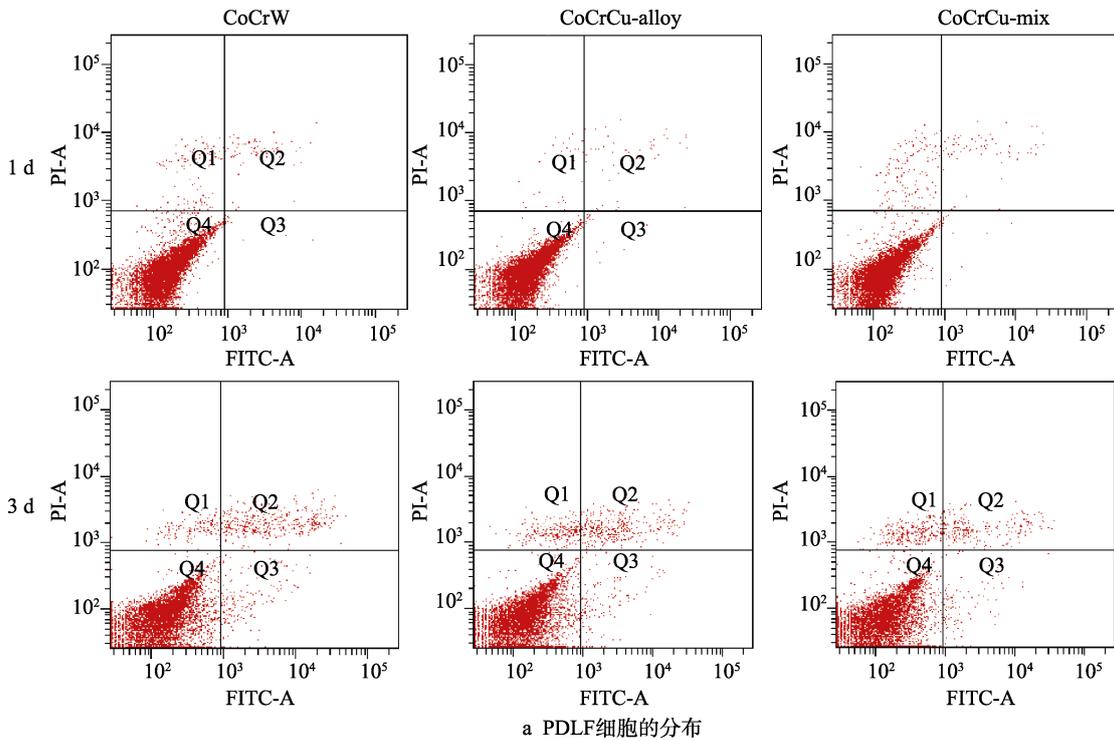


图2 RTCA 实时监测所得的各组 CI 值

Fig.2 CI value of each group measured by RTCA in real time

2.3 细胞凋亡率比较

流式细胞仪检测 PDLF 细胞 1 天、3 天的凋亡情况如图 3a 所示。培养第 1 天(图 3b), 对照组 CoCrW 组 PDLF 细胞平均凋亡率为 0.8%, 实验组 CoCrCu-alloy 组 PDLF 细胞平均凋亡率为 0.5%, 实验组 CoCrCu-mix 组 PDLF 细胞平均凋亡率为 0.7%, 对照组与各实验组间、实验组与实验组间的流式细胞仪检测结果比较表明, 其细胞平均凋亡率没有显著差异



a PDLF细胞的分布

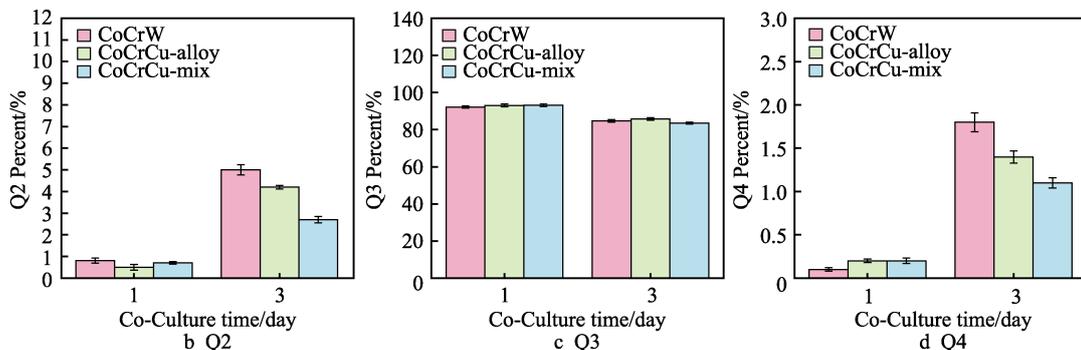


图3 PDLF 细胞的分布(1天、3天)及 Q2、Q3、Q4 各期细胞的分布对比

Fig.3 Flow cytometry was used to detect the distribution of cells in PDLF cells at 1 and 3 days and distribution of cells in Q2, Q3, Q4

($P < 0.05$)。培养第 3 天 (图 3b), 对照组 CoCrW 组 PDLF 细胞平均凋亡率为 5%, 实验组 CoCrCu-alloy 组 PDLF 细胞平均凋亡率为 4.2%, 实验组 CoCrCu-mix 组 PDLF 细胞平均凋亡率为 2.7%, 对照组与各实验组间、实验组与实验组间流式细胞仪检测结果比较显示, 细胞平均凋亡率没有显著差异 ($P < 0.05$)。结果表明, 实验用新型钴基合金对细胞没有毒性, 结果与前两个实验相符, 且两种 3D 打印含铜钴基合金整体凋亡率甚至略低于传统医用钴基合金。

2.4 细胞粘附

用鬼笔环肽和 DAPI 染色 F-肌动蛋白 (红色) 和细胞核 (蓝色), 观察 PDLF 细胞的粘附, 如图 4 所示。培养 4 h 后, 发现传统医用和实验组新型含铜钴基合金表面上细胞铺展的形态彼此相似, 三组间未见显著差异。且培养 24 h 后, 三组材料上细胞数量均有所增加, 细胞形态也更加伸展。表明细胞在材料表面粘附良好。

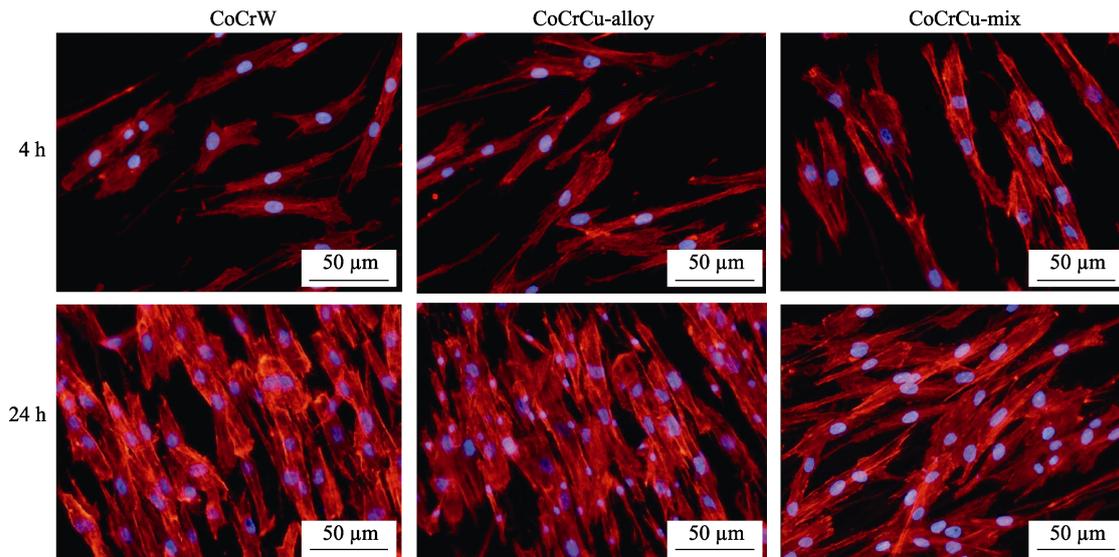


图 4 鬼笔环肽染色 4、24 h 细胞粘附
Fig.4 Cell adhesion after for phalloidine staining for 4 h and 24 h

2.5 讨论

铜元素因为具有优异的广谱抗菌能力, 因此选择将其加入到现有医用材料中。前期工作已经将适量铜元素加入到现有的传统医用材料中, 包括 317L 不锈钢、纯钛、Ti-6Al-4V 以及钴基合金材料, 并证明此举会赋予传统医用金属材料优异的抗菌性能, 从而起到防止细菌等微生物增殖的作用^[17-25]。然而, 某种元素在合金中存在与否, 以及该元素在合金中含量的多少与细胞毒性和机体组织反应强度有内在联系^[31-33]。加入过量的铜会导致材料生物相容性的恶化, 同时还可能导致材料机械性能的下降^[23,24]。根据 Bagheri B 等人的报道^[34-38], 人体中铜含量超标会引起多种疾病, 包括心血管疾病、帕金森综合征以及蛋白尿等。反之, 为了保证生物安全性, 在现有材料中加入不足量的铜, 则无法保证铜元素发挥其优异的抗菌性能^[39]。所以在前期已经充分验证含铜钴基合金的抗菌性能的基础上, 验证其添加铜元素后的生物相容性便显得十分重要。以口腔医用金属材料为例, 金属材料在口腔环境中往往不可避免地会释放一些可溶性金属离子 (例如 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 和氟化物等)^[1,2,16], 并且由于修复体邻近牙组织、牙周膜细胞、上皮细胞及各种免疫细胞, 所以受到可溶性物质的影响, 细胞的生

长、附着、增殖及代谢等功能往往会产生变化, 临床常表现为修复体周围组织的红肿、疼痛、发黑等症状。

从 CCK-8 的实验结果可以看到, 在细胞与含铜钴基合金直接接触的情况下, PDLF 细胞的 RGR 值均大于 99%。同时在 RTCA 技术的实时监控下看到, 在材料浸提液环境中生长的细胞, 其整个生长增殖过程并未受到负面影响。说明无论是与细胞直接接触还是间接接触, 材料均不具有细胞毒性, 细胞相容性表现良好。此外, 在细胞凋亡实验中, 实验组与对照组之间的 PDLF 细胞凋亡率也不存在显著性差距, 说明新型含铜钴基合金材料并不会促进细胞的凋亡。而在细胞粘附实验中, 细胞在含铜钴基合金上正常的粘附则进一步说明了含铜钴基合金具有良好的生物相容性。根据世界卫生组织 (World Health Organization: WHO) 建议, 成年人每日对铜的建议摄入量 (Recommended Daily Allowance, RDA) 为 0.03 mg/kg, 一个健康的人体内含有 80~120 mg 的铜。同时根据孙皎等的报道^[40], 在铜基合金溶出液中, 铜元素质量分数达到 0.0141% 时, 会表现出较为明显的细胞毒性。而前期的试验结果表明, 含铜医用材料中 Cu 元素的释放量远远小于上述标准。同时, 由于含铜钴基合金相比于传统钴基合金具有更好的耐蚀性能, 而且使用的口腔

修复体体积往往都非常小巧,且金属材料只占修复体总体积中较少的一部分,铜离子在口腔中的释放量更少^[25,41-42]。此外,作为口腔修复材料,其溶出的铜离子基本全部伴随唾液进入消化道,而消化道作为铜排泄的主要途径,人体所摄入的不必要铜元素会通过其代谢作用随粪便一起排出体外^[43]。这也就说明开发的新型含铜钴基合金铜元素含量保证达到理想抗菌效果的同时,并不会展现出任何细胞毒性,并且难以在体内积聚对身体造成危害,即具有良好的生物相容性。

3 结论

本实验通过生物相容性试验证明,新型3D打印含铜钴基合金材料相较于传统医用钴基合金材料,对PDLF细胞无任何明显细胞毒性,所有检测指标均满足生物医用材料使用标准,而且在很多实验结果上相较于传统钴基合金材料具有一定优势。同时也说明,使用混粉钴基合金与合金粉钴基合金两种不同制作方法得到的材料在生物相容性方面无显著性差异。

参考文献:

- [1] SIMEL A S, SOYLU E H, İDE S, et al. Annealing of Co-Cr dental alloy: Effects on nanostructure and rockwell hardness[J]. The journal of advanced prosthodontics, 2013, 5(4): 471.
- [2] 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.
- [3] KONG L, QI X, HUANG S, et al. Theaflavins inhibit pathogenic properties of *P. gingivalis* and MMPs production in *P. gingivalis*-stimulated human gingival fibroblasts[J]. Archives of oral biology, 2015, 60(1): 12-22.
- [4] 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.
- [5] REITEMEIER B, HANSEL K, WALTER M H. Effect of posterior crown margin placement on gingival health[J]. Journal of prosthetic dentistry, 2002, 87(2): 167-172.
- [6] TAYLOR R, MARYAN C, VERRAN J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes[J]. Journal of prosthetic dentistry, 1998, 80(5): 592-597.
- [7] DYLINE T J. Contour determination for ovate pontics[J]. Prosthet dent, 1999, 82(2): 136-142.
- [8] DRAKE C W, BECK J D. The oral status of elderly removable partial denture wearers[J]. Oral rehabil, 1993, 20(1): 53-60.
- [9] YADROITSEV I, BERTRAND P, SMUROV I. Parametric analysis of the selective laser melting process[J]. Applied surface science, 2007, 253(19): 8064-8069.
- [10] ANTANASOVA M, KOCJAN A, KOVAČ J, et al. Influence of thermo-mechanical cycling on porcelain bonding to cobalt-chromium and titanium dental alloys fabricated by casting, milling, and selective laser melting[J]. Journal of prosthodontic research, 2018, 62(2): 184-194.
- [11] STRUB J R, REKOW E D, WITKOWSKI S. Computer-aided design and fabrication of dental restorations: Current systems and future possibilities[J]. Journal of the American dental association, 2006, 137(9): 1289-1296.
- [12] GALHANO G, PELLIZZER E, MAZARO J. Optical impression systems for CAD-CAM restorations[J]. Journal of craniofacial surgery, 2012, 23(6): 575-579.
- [13] SCHEIBER I F, MERCER J F B, DRINGEN R. Metabolism and functions of copper in brain[J]. Progress in neurobiology, 2014, 116(2): 33-57.
- [14] IBRAHIM M, WANG F, LOU M M, et al. Copper as an antibacterial agent for human pathogenic multidrug resistant *burkholderiacepacia* complex bacteria[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2011, 112(6): 570-576.
- [15] RENSING C, GRASS G. Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment[J]. FEMS microbiology reviews, 2003, 27(2-3): 197-213.
- [16] GUO S, LU Y, WU S. Preliminary study on the corrosion resistance, antibacterial activity and cytotoxicity of selective-laser-melted Ti6Al4V-xCu alloys[J]. Materials science and engineering: C, 2017, 72(3): 631-640.
- [17] REN L, NAN L, YANG K. Study of copper precipitation behavior in a Cu-bearing austenitic antibacterial stainless steel[J]. Mater design, 2011, 32(4): 2374-2379.
- [18] 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, 29(11): 1005-1110.
- [19] REN L, YANG K, GUO L, et al. Preliminary study of anti-infective function of a copper-bearing stainless steel[J]. Materials science and engineering: C, 2012, 32(5): 1204-1209.
- [20] CHAI H W, GUO L, WANG X T, et al. Antibacterial effect of 317L stainless steel contained copper in prevention of implant-related infection in vitro and in vivo[J]. Journal of materials science materials in medicine, 2011, 22(11): 2525-2535.
- [21] ZHANG D, REN L, ZHANG Y, et al. Antibacterial activity against *porphyromonas gingivalis* and biological characteristics of antibacterial stainless steel[J]. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 105(3): 51-57.
- [22] REN L, XU L, FENG J W, et al. In vitro study of role of trace amount of Cu release from Cu-bearing stainless steel

- targeting for reduction of in-stent restenosis[J]. Journal of materials science materials in medicine, 2012, 23(5): 1235-1245.
- [23] 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(1): 29985.
- [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] 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 and engineering: C, 2016, 67(10): 461-467.
- [26] FLÜGGE T V, SCHLAGER S, NELSON K, et al. Precision of intraoral digital dental impressions with iTero and extraoral digitization with the iTero and a model scanner[J]. American journal of orthodontics & dentofacial, 2013, 144(3): 471-478.
- [27] DA C J, PELOGIA F, HAGEDORN B, et al. Evaluation of different methods of optical impression making on the marginal gap of onlays created with CEREC 3D[J]. Operative dentistry, 2010, 35(3): 324-329.
- [28] WILLIAMS R J, BIBB R, EGGBEER D, et al. Use of CAD /CAM technology to fabricate a removable partial denture framework[J]. Journal of prosthetic dentistry, 2006, 96(2): 96-99.
- [29] BAE E J, KIM J H, KIM W C, et al. Bond and fracture strength of metal-ceramic restorations formed by selective laser sintering[J]. The journal of advanced prosthodontics, 2014, 6(4): 266-271.
- [30] LIU Y, WANG Z, GAO B, et al. Evaluation of mechanical properties and porcelain bonded strength of nickel-chromium dental alloy fabricated by laser rapid forming[J]. Lasers in medical science, 2010, 25(6): 799-804.
- [31] CRAIG R, HANKS C. Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys[J]. Journal of oral pathology and medicine, 1988, 17(7): 341-347.
- [32] BERARDEN L J, COOKE F W. Growth inhibition of cultured fibroblasts by cobalt and nickel[J]. Journal of biomedical materials research, 1980, 14(3): 289-309.
- [33] KAWAHARA H, YAMAGAMI A, NAKAMURA M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture[J]. Int Dent J, 1968, 18: 443-467.
- [34] BAGHERI B, AKBARI N, TABIBAN S, et al. Serum level of copper in patients with coronary artery disease[J]. American journal of the medical sciences, 2015, 56(1): 39-42.
- [35] SHEKARKHAR S, FOROUGH M, MOATAMEDI M, et al. The association of serum parathyroid hormone and severity of coronary artery diseases[J]. Coronary artery disease. 2014, 25(4): 339-342.
- [36] HASHEMIPOUR M, KELISHADI R, SHAPOURI J, et al. Effect of zinc supplementation on insulin resistance and components of the metabolic syndrome in prepubertal obese children[J]. Hormones, 2009, 8(4): 279-285.
- [37] KARPENKO M, ILYICHEVA E, MURUZHEVA Z, et al. Role of copper dyshomeostasis in the pathogenesis of parkinson's disease[J]. Bulletin of experimental biology and medicine, 2018, 164(5): 596-600.
- [38] ESKICI G, AXELSEN P H. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Biochemistry, 2012, 51(32): 6289-6311.
- [39] SHIRAI T, TSUCHIYA H, SHIMIZU T, et al. Prevention of pin tract infection with titanium-copper alloys[J]. Journal of biomedical materials research part B: Applied biomaterials, 2009, 91(1): 373-380.
- [40] 孙皎, 薛森, 今井弘一, 等. 牙科金属材料的组成对细胞毒性影响的研究[J]. 中国生物医学工程学报, 1997(2): 59-64, 99.
- SUN Jao, XUE Miao, JINJING Hong-yi, et al. Cytotoxicity of dental metal material composition[J]. Chinese journal of biomedical engineering, 1997(2): 59-64, 99.
- [41] LU Y, REN L, XU X, et al. Effect of Cu on microstructure, mechanical properties, corrosion resistance and cytotoxicity of CoCrW alloy fabricated by selective laser melting[J]. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2018, 81(3): 130-141.
- [42] LUO J, WU S, LU Y, et al. The effect of 3% Cu addition on the microstructure, tribological property and corrosion resistance of CoCrW alloys fabricated by selective laser melting[J]. Journal of materials science: Materials in medicine, 2018, 29(4): 37.
- [43] DOGUER C, HA J H, COLLINS J F. Intersection of iron and copper metabolism in the mammalian intestine and liver[J]. Comprehensive physiology, 2018, 8(4): 1433-1461.