

3D 打印钛合金牙种植体的细胞毒性的研究

王 骅 王 鹞

张 彪

【摘要】目的：利用 MTT 比色实验，检测以 3D 打印技术铸造出的钛合金牙种植体的细胞毒性，评测新型铸造工艺的可行性，为下一步的临床应用提供理论依据。**方法：**我们以专业软件设计建立计算机模型，选取 Ti-6Al-4V、Ti-6Al-7Nb 两种不同的钛合金作为铸造原材料，以 3D 打印技术铸造出同样规格的三种实验标准片。实验主要分为 3 组，即 Ti-6Al-4V 组、Ti-6Al-7Nb 组、空白对照组。通过 MTT 比色实验方法，我们分别检测了这三种标准件对于成骨细胞 MG63 增殖率的影响，来完成对于 3D 打印技术的评价。**结果：**在倒置相差显微镜下我们观察到：三组细胞的生长状态均良好，实验组与空白对照组相比，细胞形态无显著区别。MTT 比色结果显示，两组钛片的细胞毒性分级均为 0 级，同时，Ti-6Al-7Nb 钛合金片增殖率略高于 Ti-6Al-4V 钛合金片浸提液组。**结论：**通过 3D 打印技术铸造出的钛合金种植体，其细胞毒性水平满足口腔种植材料临床应用的要求，且 Ti-6Al-7Nb 的细胞毒性水平略低于 Ti-6Al-4V。

【关键词】 3D 打印；TC4；牙种植体；细胞毒性

中图分类号：R781

文献标识码：A

文章编号：1007-3957(2019)01-10-4

Study of the cytotoxicity for 3D printed titanium alloy dental implants

WANG Hua, WANG Yao, ZHANG Biao

Hospital of Stomatology Wuhu, Wuhu 241000, Anhui Province, China

Abstract

Objective: MTT colorimetric assay was used to detect the cytotoxicity of titanium alloy dental implant cast by 3D printing technology, and to evaluate the feasibility of the new casting process, so as to provide theoretical basis for further clinical application. **Methods:** We used professional software design to build the computer model, selected two different titanium alloys Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb as the casting raw materials, and cast three kinds of experimental standard plates of the same specification by 3D printing technology. The experiment was mainly divided into three groups, namely Ti-6Al-4V group, Ti-6Al-7Nb group and blank control group. By MTT colorimetric assay, we tested the effects of these three standard components on the proliferation rate of osteoblast MG63 to complete the evaluation of 3D printing technology. **Results:** Under the inverted phase contrast microscope, we observed that the growth status of cells in the three groups were all good, and there was no significant difference in cell morphology between the experimental group and the blank control group. MTT colorimetric results showed that the cytotoxicity level of the two groups of titanium sheets was 0. Meanwhile, the proliferation rate of Ti-6Al-7Nb titanium alloy sheets was slightly higher than that of Ti-6Al-4V titanium alloy sheet extraction solution group. **Conclusion:** The cytotoxicity level of titanium alloy implants cast by 3D printing technology meets the requirements of clinical application of oral implant materials, and the cytotoxicity level of Ti-6Al-7Nb is slightly lower than that of Ti-6Al-4V

Key words: 3D printing, TC4, implant, cytotoxicity

近年来, 由于经济、技术、医疗水平的提高, 人们对于个性化医疗的呼声越来越高。同时, 由于铸造技术的革新, 尤其是3D打印技术的出现, 个性化种植体的发展也已起步。运用3D打印工艺制作的牙种植体, 具有数字智能化、网络定制化、高度个性化等特点, 是口腔种植学科未来发展的方向。钛及钛合金, 由于其优良的机械力学性能和优良的生物相容性, 是现在临床上主流的种植体材料。3D打印领域中常用的钛合金有Ti-6Al-4V^[1], 其作为医疗领域传统的植体应用钛合金, 有许多针对其性能的研究, 不同的处理工艺对于其的生物性能会有不同的影响^[2]。同时, Ti-6Al-7Nb是另一种新兴的钛合金材料, 这种钛合金在口腔环境中不仅保留了钛良好的生物相容性, 其中的Nb元素赋予植体抵抗电偶腐蚀^[3]和机械疲劳的能力^[4], 使其近年来在临床上也逐步产生应用。本实验旨在探明以这两种钛合金为原材料通过3D打印制造的种植体, 其细胞毒性的差异, 以此为之后的医疗材料的发展及临床应用打下扎实的理论基础。

1 材料和设备

1.1 材料

Ti-6Al-4V、Ti-6Al-7Nb钛合金粉(3D systems公司)

1.2 设备

Prox100金属直接打印机; SW-CJ-IF超净工作台(苏净安泰公司); SC-3610低速离心机(ZONKIA公司); MCP-17AIC二氧化碳恒温培养箱(SANYO公司)。

1.3 3D打印牙种植体方法

运用UG计算机三维设计建模软件设计个性化牙种植体(4.5mm×10mm圆柱型)和实验性钛片(25mm×5mm圆形), 建立牙种植体和实验性钛片标准件数据模型, 三维模型导出为STL格式, 导入设备控制软件, 执行生成标准打印格式的文件, 数据虚拟切层, 设置层厚度为0.08mm。分别在Prox 100 3D打印机上经过逐层熔结叠加完成Ti-6Al-4V、Ti-6Al-7Nb牙种植体和实验钛片各3件。(图1, 2)

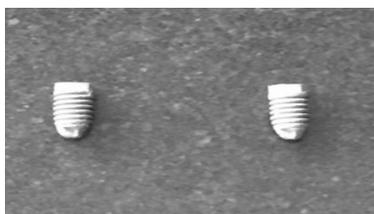


图2 3D打印钛片

1.4 细胞毒性实验方法

1.4.1 浸提液制备: 使用丙酮及无水乙醇超声震荡清洗钛片, 再用紫外线分别消毒各个面。按照样品表面积: 溶液体积3cm²/ml的比例, 用相应体积的含10%胎牛血清的无菌DMEM培养基浸泡钛片, 37°C、5%CO₂孵育96小时, 待金属离子充分析出后, 将浸提液用0.22μm微孔筛网过滤, 密封于EP管中, 4°C贮存。

1.4.2 试样分组: 共分3组, A组(加入Ti-6Al-7Nb钛片浸提液组); B组(加入Ti-6Al-4V钛片浸提液组); C组为空白对照组, 每组实验钛片各3件。

1.4.3 MTT比色实验: 用含10%胎牛血清及1%双抗的DMEM培养液培养MG63细胞至对数生长期, 0.25%胰蛋白酶将其消化, 移液枪吹打后, 重悬制成细胞密度约为8×10⁴/ml的单细胞悬液, 以8000个/孔的数量铺板于96孔板。在板中选取30个孔, 分成3组, 每组10孔, 37°C、5%CO₂条件下培养24小时, 显微镜下观察细胞生长情况, 确认贴壁后丢弃原培养液, 使用PBS溶液冲洗, 每孔3遍。将之前准备好的两种浸提液以及普通培养液加入对应组, 放入孵育箱48小时后观察细胞形态, 拍照记录。以每孔20μl的量加入MTT20后, 放入恒温培养箱培养, 4小时后弃净孔内的液体, 每孔再加入150μl DMSO, 使用微量振荡器振荡10分钟, 490nm波长下测定各孔OD值。

1.4.4 细胞相对增殖率及毒性评价: 通过OD值计算细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)计算公式: RGR(%)=(实验组OD值/培养基OD值)×100, 然后根据5级毒性标准分级(表1), 对检测结果分级。

表1 细胞毒性标准评价表

RGR(%)	Cytotoxicity level
80~100	0
60~80	1
40~60	2
20~40	3
0~20	4

1.4.5 统计学处理: 采用Excel 2007及SPSS 17.0软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 采用方差分析及LSD检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

24小时后两组细胞贴壁生长,折光性强,细胞形态主要呈梭形及多角形。两组细胞轮廓清晰,

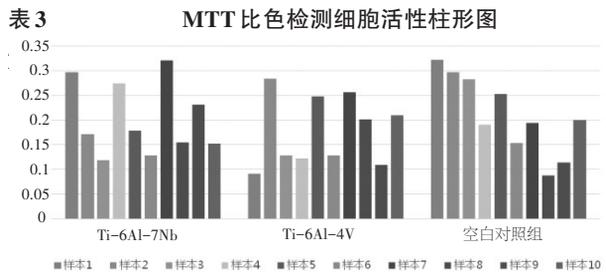
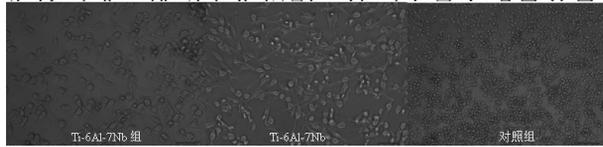


表4 各组OD值对比 (x±s)

Ti-6Al-7Nb 组	Ti-6Al-4V	对照组
0.203±0.073	0.1779±0.07	0.209±0.074

根据表2、表3数据,SPSS分析后实验组和对照组对比无统计学差异($P>0.05$)。Ti-6Al-7Nb组的RGR≈97%,细胞毒性为0级,Ti-6Al-4V组的RGR≈88%,细胞毒性为0级。

3 讨论

口腔种植是一种应用广泛的口腔缺牙修复手段,在这一技术中,对于用来铸造种植体的材料,医学界有着严格的要求。被学术界所公认的是,用于铸造口腔种植体的材料应具有良好的机械性能、稳定的物理化学性状,以及出色的生物相容性^[1]。目前,临床上常见的牙种植体,其铸造材料主要有金属及其合金、陶瓷、高分子材料和碳这

几类。其中,钛和钛合金是使用最为广泛的材料。钛不仅拥有良好的生物相容性,其骨结合和生物结合能力也是目前已知的材料中最好的。室温(25°C)下的钛,其内部为密排六方晶体结构(HCP),称做 α 相。当环境温度达到883°C时,钛便可变为体心立方晶体结构(BCC)称 β 相^[2]。目前被广泛应用于牙种植体的Ti-6Al-4V^[3-8]。钛合金Ti-6Al-4V在室温(25°C)下内部同时存在 α 相和 β 相两种晶体结构,同时合金中其他的元素,可影响 α 相和 β 相的相互转化,从而在一定程度上决定两者的比例^[9]。现阶段相关研究表明,钛种植体的5年、10年、16年的远期成功率分别可达到94.5%、89%、82%^[10]。大量的实验已经证明,钛合金无论是在生物安全性还是抗腐蚀性上,相比不锈钢或钴合金,占有很大的优势。然而,以Ti-6Al-4V为代表的第一代钛合金材料,仍有关于其在植入后引起人体过敏反应的报道^[11]。研究证明,从Ti-6Al-4V中长期释放的铝和钒,被证明与阿尔兹海默症等神经性疾病的发生有显著的相关性。所以,很多不含有钒的合金,如Ti-6Al-7Nb和Ti-5Al-2.5Fe被开发出来。由于第一代钛合金材料存在的这些缺点,第二代钛合金-- α 型钛合金,近年来受到学术界越来越多的关注。对于一种钛合金材料,其生物相容性及机械性质,除了与其本身成分有关,还与其加工工艺有着密切的关系。由于钛在大气中极易被氧化,易在表面形成一层以TiO₂为主要成分的氧化膜。在这层氧化膜中,随深度的变化,氧化物的成分也会略有不同,主流观点认为,氧化膜的存在与钛优异的抗腐蚀性有着密切关系。所以,大多数临床医生在口腔牙种植前会对钛进行表面的钝化膜增厚处理。常用的方法有化学氧化法、阳极氧化法以及大气加热法^[12],这些预处理可以增加氧化膜的厚度,提高钛的稳定性。

近年来,我们不难发现,定制型医疗服务正在逐渐成为医学领域一个重要的发展趋势。为患者量身定做的人工植入物,由于其定制化、个性

表2 MTT 比色检测细胞活性结果表

分组	吸光度						平均值		标准差			
Ti-6Al-7Nb	0.296	0.172	0.119	0.274	0.178	0.128	0.32	0.155	0.231	0.152	0.2025	0.072520112
Ti-6Al-4V	0.092	0.283	0.129	0.123	0.248	0.128	0.256	0.201	0.109	0.21	0.1779	0.069637873
空白对照组	0.321	0.297	0.282	0.191	0.252	0.153	0.194	0.088	0.114	0.2	0.2092	0.07810079

化的特点,受到越来越多医疗工作者们的重视^[13,14]。然而,传统的制造工艺无法满足个性化种植体其高特异性、低单件成本等要求,要想实现个性化修复的普及,我们急需一种新的铸造技术。3D打印是目前公认的,最适合个性化植入物的铸造技术^[15,16],该技术可在较短时间内制造出几何形态复杂、孔隙结构梯度变化的金属材料,非常适用于铸造精细的种植体。3D打印个性化牙种植体的主要优点有:(1)解剖形态结构与缺失牙更匹配,增加了种植体的手术初期稳定性,从而提高了种植成功率。(2)可以直接修复缺失牙的美容需求,尤其是前牙缺失牙。(3)与缺牙创更贴合有效地解决了手术微创,减轻了患者的痛苦,避免了创口愈合过程中的骨丧失。(4)省略了传统模具制作的耗时与成本,真正做到了节能环保。(5)3D打印工艺可制作表面形态多样,孔隙结构变化,材料成分合理,工艺技术先进,大大提高了种植体的生物相容性。

在这次实验中,我们尝试使用了Ti-6Al-4V、Ti-6Al-7N两种临床上常用的钛合金材料,使用3D打印技术制造出了两枚实验性钛片标准件。为了验证此项工艺的临床安全性,我们首先对标准件进行了体外的细胞毒性检测。通过MTT比色实验,我们证明了两组钛片标准件的细胞毒性均为0级,同时,两者相比之下,Ti-6Al-7N生物相容性更胜一筹。

参考文献

- 1 周仲炎,庄素国. Ti-6Al-4V合金激光原位合成自润滑复合涂层高温摩擦学性能[J]. 材料工程, 2019-03 vol(47): 101-108
- 2 丁子或,丁泽良. 医用植入材料Ti6Al4V的腐蚀与防腐研究进展[J]. 包装学报, 2018, vol10(3): 84-90
- 3 马凯,赵宝红,邓春富. 医用钛及钛合金牙种植体生物相容性及其相关抗菌性能研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2016, 7 vol9(7): 441-445
- 4 王聪. 刘永杰,模拟体液环境下植入用

Ti6Al7Nb合金的高周疲劳行为[J]. 实验力学, 2016, vol36(6): 723-729

- 5 Wang Y, Yu H, Chen C, et al. Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys[J]. Materials & Design, 2015, 85 : 640-652
- 6 Miura K, Yamada N, Hanada S, et al. The bone tissue compatibility of a new Ti-Nb-Sn alloy with a low Young's modulus[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(5): 2320-2326
- 7 Fukuda A, Takemoto M, Saito T, et al. Bone bonding bioactivity of Ti metal and Ti-Zr-Nb-Ta alloys with Ca ions incorporated on their surfaces by simple chemical and heat treatments[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(3): 1379-1386
- 8 Gottlow J, Dard M, Kjellson F, et al. Evaluation of a new titanium-zirconium dental implant: A biomechanical and histological comparative study in the mini pig[J]. Clinical implant dentistry and related research, 2012, 14(4): 538-545
- 9 张一迪. 应用于牙科种植体的新型钛合金生物安全性检测, 2016, 5, 吉林大学硕士学位论文
- 10 Wang X, Liu H, 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
- 11 Niinomi M. Biologically and mechanically biocompatible titanium alloys[J]. Materials transactions. 2008, 49(10) : 2170-8
- 12 王革. 钛及钛合金表面钝化膜的特点及其形成机理. 中国口腔种植学杂志, 2002, 3, 5(1): 37-39
- 13 QiuWeiliu(邱蔚六). China Reconstructive Surgery(中国修复重建外科杂志)[J], 2006, 20(4): 339
- 14 LiuFei. American Society of Biomechanics Newsletter [J], 2009, 22(1): 11
- 15 Giannatsis J, Dedoussis V. Int J AdvManufTechnol [J], 2009, 40 : 116
- 16 HoratiuRotaru, Horatiu Stan, Ioan Stefan Florian et al. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery[J], 2012, 70(2): 169