网络出版时间:2017-10-16 9:20 **网络出版地址**:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.013.html

选择性激光熔覆微孔钛试件制备及体外生物学评价

朱一铭[1],夏 荣[1],孙 磊[1],章 辉[1],闵 曦[2],刘 春[1]

摘要 **目的** 探究经碱酸热处理的选择性激光熔覆微孔钛在体外生物学活性方面是否具有优势。**方法** 制备光滑组(PT组)、喷砂酸蚀组(SLA组)、亲水组(ModSLA组)、选择性激光熔覆组(SLM组)、选择性激光熔覆-碱酸热处理组(SLM-T组)5种不同的钛表面,对各组试件表面人类血清白蛋白(HSA)吸附行为进行研究,在各组试件表面接种小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)进行培养,评价不同钛试件表面的体外生物学活性。**结果** 在5、10、20、40、60 min时,SLM-T组对HSA具有相对良好的吸附特性。第1、3、5天,与其他3组相比,SLM组和SLM-T组表现出最为显著的增殖活性,差异有统计学意义($P<0.01$),第7天,5组试件碱性磷酸酶(AKP)的表达水平差异无统计学意义;第14天,SLM-T组有着最为显著的AKP表达水平,差异有统计学意义($P<0.01$),SLM组与PT组的AKP表达水平差异无统计学意义。**结论** 体外实验表明,经碱酸热处理的选择性激光熔覆微孔钛具有良好的体外生物学活性,可望促进骨结合,潜在地提升种植体植入后的初期稳定性。

关键词 微孔钛;选择性激光熔覆;生物学活性;骨结合
中图分类号 R 783.1
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)12-1805-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.013

2017-06-20 **接收**
基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1508085MH156);安徽省学术和技术带头人科研活动经费资助项目(编号:2016H075)

作者单位:[1]安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601
[2]安徽医学高等专科学校口腔系,合肥 230601
作者简介:朱一铭,男,硕士研究生;
夏 荣,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xiarongqh@aliyun.com

选择性激光熔覆(selected laser melting,SLM)技术构建的微孔钛临床用于面部骨缺损重建已有报道[1]。具有多孔结构的种植体植入后,在宿主与骨之间提供了较大的摩擦阻力,并随着骨组织扩张到多孔结构中快速达到生物固定[2]。虽然微孔钛及其合金具有优秀的生物相容性,良好的机械稳定性,利于骨形成的微孔结构,但是一般不与骨直接接触[3]。表面处理技术的发展,促进了种植体和骨的结合,例如喷砂酸蚀[4]和亲水性表面[5]。细胞反应是通过蛋白质和蛋白质配体介导的,因此细胞反应

Study of porous titanium specimens manufactured by selective laser melting *in vivo*

Zhang Hui, Xia Rong, Zhu Yiming, et al
(*Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230601)

Abstract ***Objective*** To evaluate the effect of bioactivity of porous titanium specimens manufactured by selective laser melting(SLM). ***Methods*** Spherical titanium powder in 0~45 μm was used as the experimental materials and formed on a pure titanium substrate of 5 cm×5 cm×0.5 cm. Under suitable laser parameters, the pore size range was 150~200 μm and 200~250 μm of the two sets of specimens. Sandblasting with large-grit and acid-etching (SLA) was used as the control group, and the related properties were evaluated by the relatedanimal experiments. ***Results*** Field emission scanning electron microscopyobservation of different surface of pore structure. The EDS showed that the C element on the SLA group was higher than that of the SLM group($P=0.037$). The elastic modulus of the SLM group was significantly lower than that of the human bone cortex($P<0.05$). The macroporous implant could promote the growth of bone tissue($P=0.028$). ***Conclusion*** The microporous structure can effectively reduce the elastic modulus of the specimen surface, and the pore size range of 200~250 μm specimen in the middle of the ability to induce bone formation is more significant.

Key words selective laser melting; porous titanium; biocompatibility; bone-implant contact

与蛋白质密切相关，同时蛋白质的吸附在细胞的新陈代谢和促进细胞黏附上有重要作用，进而影响骨结合。对碱酸热处理的 SLM 微孔钛进行蛋白质吸附实验以及细胞实验，探究经碱酸热处理的 SLM 微孔钛的体外生物学活性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器 EOSINT M270 选择性激光熔覆机(北京恒尚科技有限公司)；商业纯钛板(北京中金研新材料科技有限公司)；异硫氰酸荧光素 - 人血清白蛋白(fluorescein isothiocyanate-human serum albumin，FITC-HSA)(南京肽业生物科技有限公司)；小鼠骨髓间充质干细胞(上海晶旷生物科技有限公司)；CCK-8 细胞增殖活性检测试剂盒(日本同仁化学研究所)；碱性磷酸酶(alkaline phosphatase，AKP)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 钛试件制备和分组 光滑组(pure titanium，PT 组)：利用激光将商业纯钛板切割成 10 mm × 10 mm × 2 mm 的钛试件($n = 150$)，碳化硅砂纸逐级打磨，超声清洗机清洗、干燥。喷砂酸蚀组(sand blasting etching，SLA 组)：钛试件表面喷砂处理(颗粒直径：120 μm，压力：0.45 MPa，距离：5 cm)，浸于 32% 盐酸与 95% 硫酸 1∶1 混合酸中，清洗，干燥。亲水组(modified sand blasting etching，ModSLA 组)：亲水组与喷砂酸蚀组处理过程相同，但是在氮气保护下进行，处理后置于等渗氯化钠溶液中密封保存，防止暴露于空气中。选择性激光熔覆组(selected laser melting，SLM 组)：样本大小为 10 mm × 10 mm × 2 mm，Solidworks 软件设计，Magics 软件将模型切成薄层的二维图像，EOSINT M270 SLM 机利用钛粉(纯度 > 99.5% + 颗粒直径小于 45 μm)，电脑提供分层扫描数据，将钛粉平铺于成型缸中，激光束按设定线路扫描，制备 SLM 微孔钛。超声清洗、干燥。选择性激光熔覆 - 碱酸热处理组(selected laser melting-galkali acid heat，SLM-T 组)：从 SLM 组随机选取 30 个钛试件，先置于 5 mol/L NaOH 溶液中，60 ℃、24 h，后置于 0.5 mmol/L 盐酸溶液中，40 ℃、24 h，蒸馏水清洗，干燥，再将试件加热到 600 ℃、1 h，冷却。SLM-T 组为实验组，空白对照为 PT 组，阴性对照分别为 SLA 组、ModSLA 组、SLM 组。

1.2.2 表面形态检测及微孔钛孔径的检测 电镜观察各组钛试件表面形貌及测量 SLM 微孔钛试件的孔径。两项检测均在中国科学技术大学理化科学实验中心进行。

1.2.3 微孔钛孔隙率检测 SLM 在钛基打出直径为 10 mm，高为 6 mm 的规则微孔钛试件，线切割将微孔钛试件从纯钛表面完整切除，微孔钛试件的孔隙率公式如下：

$$\rho_{abs} = \frac{m_{air}(\rho_{ethanol} - 0.001\ 2)}{m_{air} - m_{ethanol}} + 0.001\ 2$$

$$P = \left(1 - \frac{m_{air}}{m_o}\right) \times 100\%$$

其中 ρ_{abs}：钛样本的绝对密度；钛的理论密度为 4.507 g/cm^3；

m_{air}：空气中微孔钛样本重量；$\rho_{ethanol}$：乙醇密度 0.8 g/cm^3；

$m_{ethanol}$：乙醇中微孔样本重量；P：微孔钛试件的孔隙率；

m_o：微孔钛试件的理论重量。

1.3 HSA 吸附评价 本研究应用的蛋白是 FITC-HSA。酶标仪分别测定 2.5、5、10、20、40 μg/ml 的 HSA 溶液，得出 HSA 标准曲线方程。将浓度为 5 mg/ml FITC-HSA 配制成 10 μg/ml，2 ml。每组试件随机选取 3 个，置于 10 μg/ml FITC-HSA 溶液中，37 ℃恒温水浴，在实验设计的时间(0、5、10、20、40 min)，取出钛试件，1 000 r/min 离心 10 min。按照人血清白蛋白 ELISA 试剂盒说明书，测量上层清液的吸光度值，以此来反推吸附于材料表面的 HSA 的量。

1.4 细胞学评价

1.4.1 细胞培养 本研究的细胞是小鼠骨髓间充质干细胞，采用细胞培养技术的胰酶消化法培养。

1.4.2 细胞增殖 胰酶消化对数期细胞，重悬，细胞浓度调到 1×10^5/ml 时，接种到各组试件表面，37 ℃、5% CO_2 环境下常规培养。第 1、3、5 天取出，按 CCK-8 说明书操作，酶标仪测各孔在波长 490 nm 的吸光度值。

1.4.3 细胞分化 细胞培养及接种如前所述，在第 7、14 天终止培养，PBS 清洗 3 次，加入浓度为 0.2% 的 TritonX-100 溶液，37 ℃条件下裂解细胞 30 min，取混合液转移到 96 孔板，按 AKP 检测试剂盒说明书操作，波长 520 nm，酶标仪测定各孔吸光度值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，统计分析对同一时间点采用单因素方差分析(ANOVA)，随后进行 Turkey 多重比较检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同钛试件表面形貌分析 通过 FESEM 观察,PT 组表面可见细长的划痕;SLA 组和 ModSLA 组具有相似的表面结构:可见尖锐的峰嵴,呈相互交错状;SLM 组表面布满内部交错互通的微孔;SLM-T 组表面形貌与 SLM 组相似。见图 1。

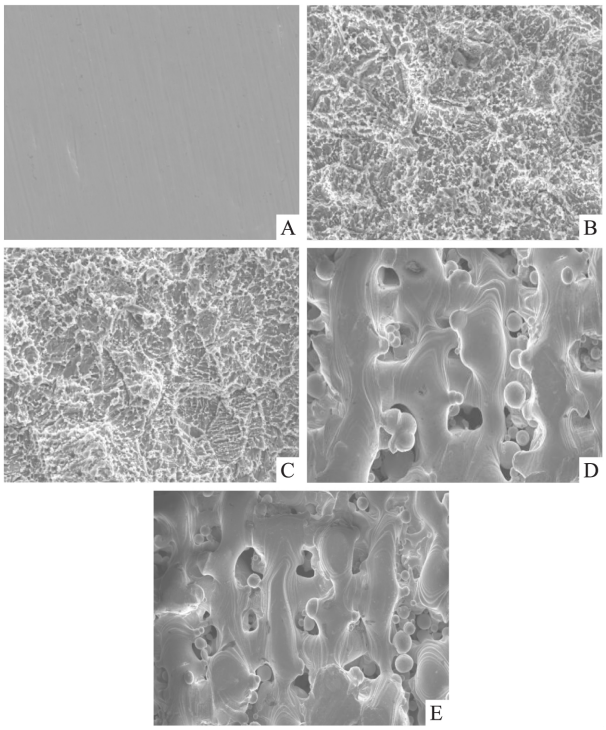

图 1 5 组试件在 SEM 下的表面形貌分析 ×500
A:PT 组;B:SLA 组;C:ModSLA 组;D:SLM 组;E:SLM-T 组

2.2 微孔钛的孔径、孔隙率 孔径分布范围 72 ~ 272 μm。孔隙率检测结果显示:SLM 微孔钛试件平均孔隙率为(21.1 ±0.9)% 。见表 1。

表 1 微孔钛试件孔隙率

试件	M(g)	ρ(g cm^3)	P(%)
1	1.557 0	4.290	2.0
2	1.481 6	4.320	21.9
3	1.615 8	4.400	20.2
4	1.789 6	4.370	22.0
Average	1.588 6	4.345	21.1 ±0.9

质量 M(g);平均密度 ρ(g/cm^3);孔隙率 P(%)

2.3 蛋白质吸附评价 HSA 吸附结果,在 0、5、10、20、40、60 min 时 5 组试件表面的蛋白质吸附量总体比较差异均有统计学意义(F = 63.953,P < 0.01;F = 13.424,P < 0.01;F = 5.063,P < 0.01;F = 12.609,P < 0.01;F = 10.324,P < 0.01)。在 0 min 时 5 组之间的吸光度值差异无统计学意义,至 5、10、20、40、60 min 时,5 组之间的吸光度值差异有统计学意义(P < 0.05)。见图 2。

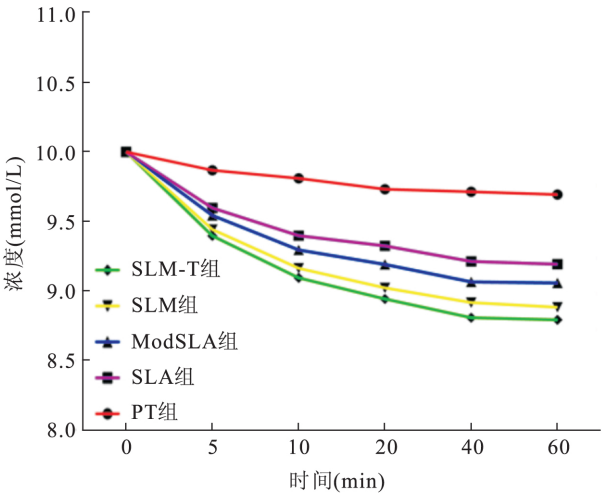

图 2 溶液中蛋白质溶度与时间的关系

2.4 细胞增殖特性 CCK-8 检测结果显示,PT 组、SLA 组、ModSLA 组、SLM 组、SLM-T 组在第 1、3、5 天差异有统计学意义(F = 157.179,P < 0.01;F = 144.188,P < 0.01;F = 295.092,P < 0.01;F = 279.179,P < 0.01;F = 299.586,P < 0.01)。在第 1、3、5 天,与 PT 组相比,SLA 组和 ModSLA 组有较高的增殖活性(P < 0.05),SLM 组和 SLM-T 组有显著高的增殖活性(P < 0.01);与 SLA 组相比,ModSLA 组呈现较高的增殖活性(P < 0.05),SLM 组和 SLM-T 组呈现显著高的增殖活性(P < 0.01);与 ModSLA 组相比,SLM 组和 SLM-T 组增殖活性显著增高(P < 0.01);SLM 组和 SLM-T 组之间增殖活性差异无统计学意义。见图 3。

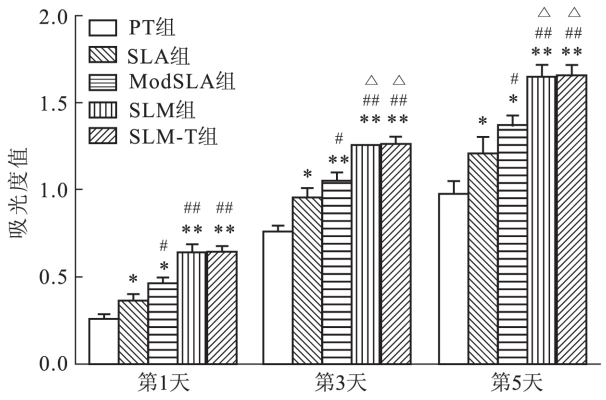

图 3 5 组试件细胞增殖特性

与 PT 组比较:* P < 0.05,** P < 0.01;与 SLA 组比较:$^{\#}P$ < 0.05,$^{\#\#}P$ < 0.01;与 ModSLA 组比较:$^{\triangle}P$ < 0.05

2.5 AKP 检测 AKP 的表达水平评估不同材料对成骨细胞分化的影响。PT 组、SLA 组、ModSLA 组、SLM 组、SLM-T 组在第 7 天和第 14 天差异有统计学意义($F = 89.125$, $P = 0.001$; $F = 353.845$, $P < 0.01$; $F = 2\,962.718$, $P < 0.01$; $F = 101.040$, $P < 0.01$; $F = 1\,730.827$, $P < 0.01$)。第 7 天,观察到 5 组试件 AKP 的表达水平差异无统计学意义。第 14 天,SLM-T 组与另外 4 组相比 AKP 表达水平显著增高($P < 0.01$);SLM 组与 PT 组的 AKP 表达水平差异无统计学意义;SLA 组、ModSLA 组与 PT 组、SLM 组相比 AKP 表达水平显著增高($P < 0.01$);ModSLA 组与 SLA 组相比 AKP 表达水平显著增高($P < 0.01$)。见图 4。

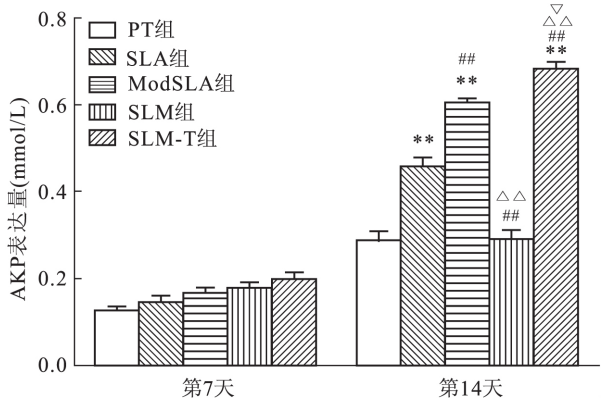

图 4 不同时间 5 组试件细胞 AKP 表达水平

与 PT 组比较:$^{**}P < 0.01$;与 SLA 组比较:$^{\#\#}P < 0.01$;与 ModSLA 组比较:$^{\triangle\triangle}P < 0.01$;与 SLM 组比较:$^{\triangledown}P < 0.05$

3 讨论

SLM 技术是 20 世纪 70 年代兴起的一种材料表面改性技术,多用于金属材料的表面强化。本世纪初,国外该技术在医学领域多用于对加工各种合金金属冠及纯钛骨植入体方面的研究,2007 年该技术首次运用到口腔种植学领域[6]。我国研究始于上世纪 90 年代,目前,在口腔医学领域多用于对义齿金属全冠方面的研究[7],而在口腔种植方面报道较少。SLM 的原理利用电脑设计模型,再将模型水平切成分层的二维图像,SLM 机根据电脑提供分层扫描数据,将钛粉平铺于成型缸中,激光束按设定线路扫描,制备 SLM 微孔钛。

本研究中微孔钛试件孔径分布在 72 ~ 272 μm,孔隙率为 21.1%。当孔隙率为 15% ~ 75% 时,材料的弹性模量和屈服强度较为接近于人体骨组织,并且具有良好的力学性能,能够实现更多的新生骨长入,进而更易实现种植体植入后的初期稳定性[8]。

研究[9]显示,微孔钛表面通过碱热处理形成具有梯度结构的钛酸钠层,能促进生物活性钛酸钠层与纯钛基底或者钛合金基底的结合。钛表面的脱钠处理对植入后骨结合强度有着积极的促进作用,能够提升后期负载的成功率,促进钛表面的骨结合能力。微孔钛表面三维形貌较为复杂,以往的去离子水浸泡法无法有效地脱除钛表面钠元素。用稀盐酸处理微孔钛表面主要为了达到清除微孔钛表面钠元素以及孔洞内的钠元素的作用。碱热处理结合稀盐酸脱钠的方法在种植体的临床应用中很有前景,特别适用于微孔结构内。

在 5 种不同的钛试件表面蛋白吸附中,无论在任何时间段,SLM-T 材料表面吸附的白蛋白的量都大于 SLM 组,碱酸热处理加入改善了微孔钛的表面性质,提高了微孔钛的亲水性,更多的白蛋白被诱导吸附其上。以光滑组为参照,无论在任何时间点,光滑组吸附量最少,喷砂组和亲水组次之,SLM 组吸附较多,SLM-T 组吸附量最多。说明 SLM-T 组对于 HSA 有着最为优秀的吸附特性,SLM 组较为优秀,亲水组的表现略微次之,喷砂组表现较差。

细胞增殖结果显示:第 1、3、5 天,SLM-T 组与 SLM 组的吸光度明显高于其余 3 组。细胞分化结果显示:第 5、7 天,SLM-T 组 AKP 的表达水平明显高于 SLM 组,SLM 组与 PT 组的 AKP 表达差异无统计学意义。实验结果显示 SLM 组虽然促进成骨细胞增殖,但是对成骨细胞分化的影响不明显;SLM-T 组对成骨细胞增殖和分化均有促进作用。经过碱酸热处理后,可显著提高 SLM 微孔钛的亲水性。生物活性处理的正效应[10]主要归因于表面化学性质和电荷的变化。润湿性[11]也被确认为影响成骨细胞分化的一个重要因素。材料表面粗糙度和化学性质强烈影响材料的润湿性。亲水性表面对细胞附着影响机制[12]可能是亲水性材料表面影响蛋白吸附以及防止气泡的滞留在材料表面,这可能会干扰蛋白质的吸收和材料 - 细胞互动。SLM-T 组第 7 天观察到较低的吸光度值以及在第 14 天 AKP 表达增加表明成骨细胞从增殖到分化的早期转变。细胞分化实验结果与之前报道的研究[10]结果相一致。

本研究显示,SLM 微孔钛在促进血清白蛋白吸附以及成骨细胞的增殖方面具有明显优势,但是在成骨细胞分化方面与光滑组差异无统计学意义。SLM 微孔钛经碱酸热处理在促进血清白蛋白吸附、成骨细胞增殖、分化方面具有明显优势。经碱酸热

处理的 SLM 微孔钛具有良好的体外生物学活性，潜在的促进骨结合。

参考文献

[1] Tsukanaka M, Fujibayashi S, Takemoto M, et al. Bioactive treatment promotes osteoblast differentiation on titanium materials fabricated by selective laser melting technology [J]. Dent Mater J, 2016,35(1):118 - 25.

[2] Rana M, Gellrich M M, Gellrich N C. Customised reconstruction of the orbital wall and engineering of selective laser melting (SLM) core implants [J]. Br J Oral Maxill ofac Surg, 2015, 53(2):208 - 9.

[3] Rotaru H, Schumacher R, Kim S G, et al. Selectivelaser melted titanium implants: a new technique for the reconstruction of extensive zygomatic complex defects [J]. Maxillofac Plast Reconstr Surg,2015,37(1):1.

[4] Kim H J, Kim Y K, Joo J Y, et al. A resonance frequency analysis of sandblasted and acid-etched implants with different diameters: a prospective clinical study during the initial healing period [J]. J Periodontal Implant Sci, 2017, 47(2):106 - 15.

[5] Li L J, Kim S N, Cho S A. Comparison of alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells cultured on different Ti surfaces: modified sandblasted with large grit and acid-etched (MSLA), laser-treated, and laser and acid-treated Ti surfaces [J]. J Adv Prosthodont, 2016, 8(3):235 - 40.

[6] Takemoro M, Fujibayashi S, Neo M, et al. Osteoinductive porous titanium implants: effect of sodium removal by dilute HCl treatment [J]. Biomaterials, 2006, 27(13): 2682 - 91.

[7] 陈克南，毛菁红，党玉琪，等. 选择性激光熔覆(SLM)纯钛全冠适合性的临床研究 [J]. 实用口腔医学杂志，2016，32(3)：317 - 20.

[8] Wauthle R, Ahmadi S M, Amin Yavari S, et al. Revival of pure titanium for dynamically loaded porous implants using additive manufacturing [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015, 54: 94 - 100.

[9] Pattanayak D K, Kawai T, Matsushita T, et al. Effect of HCl concentrations on apatite-forming ability of NaOH - HCl- and heat-treated titanium metal [J]. J Mater Sci Mater Med, 2009, 20(12): 2401 - 11.

[10] Kalantari S M, Arabi H, Mirdamadi S, et al. Biocompatibility andcompressive properties of Ti-6Al-4V scaffolds having mg element [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2015, 48(3):183 - 91.

[11] Lotz E M, Olivares-Navarrete R, Hyzy S L, et al. Comparable responses of osteoblast lineage cells to microstructured hydrophilic titanium-zirconium and microstructured hydrophilic titanium [J]. Clin Oral Implants Res, 2017,28(7):e51 - e59.

[12] Gittens R A, Scheideler L, Rupp F, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces II: biological and clinical aspects [J]. Acta Biomater, 2014, 10(7):2907 - 18.

Preparation of micropores titanium fabricated by SLM and the valuation of its bioactivity *in vitro*

Zhu Yiming, Xia Rong, Sun Lei, et al

(*Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230601)

Abstract ***Objective*** To investigate whether the micropores titanium produced by the selective laser melting technology has an advantage biological activity *in vitro*. ***Methods*** First, five different titanium specimens of PT, SLA, ModSLA, SLM and SLM-T were prepared, to investigate the adsorption behavior of human serum albumin on the surface of specimen, BMSCs were cultured on the surface of the specimens to evaluate the biological activity of the different titanium specimens *in vitro*. ***Results*** At 5, 10, 20, 40 and 60 min, the protein adsorption on the surface of the five specimens was statistically significant ($P<0.05$). The SLM-T had the most excellent adsorption properties to human serum albumin. At 1, 3 and 5 days, the proliferation of SLM-T and SLM was significantly higher than that of the other three groups. At 7 days, there was no significant difference in the expression level of AKP between the five groups. At 14 days, the SLM-T had the most significant AKP expression level ($P<0.01$). There was no significant difference in AKP expression between SLM and PT. ***Conclusion*** The results of protein adsorption experiments show that the selective laser melting micropores titanium has the best adsorption properties after alkali heat treatment and show excellent biocompatibility *in vitro*. It is expected to promote osseointegration and potentially enhance the initial stability of implants.

Key words micropores ti; selective laser melting; biological activity; osseointegration