

评审编号: \_\_\_\_\_

# 华北理工大学

## 大学生创新训练计划项目 申报书

项目名称 高氮钢 3D 打印儿童间隙保持器的技术参数及细胞毒性研究

项目负责人 帅星月

所在学院 口腔医学院

专业年级 21 口腔医学

学 号 202014790222

联系电话 18871055785

电子信箱 2630490012@qq.com

项目起止年限 2023.05-2024.05

项目参与学生人数 4 人

## 填写说明

1. 凡申报大学生创新训练计划项目必须填写本申报书。
2. 向学校报送本申报书时，一式三份，并报送申报书电子文档。
3. 本书应该填写完整、内容详实、表达准确，数字一律填写阿拉伯数字。
4. 项目开展支撑平台指支撑本项目开展的校、院级教学实验中心、科研实验室等，表中填写有关实验室名称，可以多个。
5. 打印格式与装订
  - (1) 纸张为 A4 大小，双面打印；
  - (2) 文中小标题为四号、仿宋、加黑；
  - (3) 栏内正文为小四号、仿宋；

项目名称	高氮钢 3D 打印儿童间隙保持器的技术参数及细胞毒性研究			
申请经费	10000 元		起止时间	2023 年 5 月至 2024 年 5 月
项目所属一级学科	医学-口腔医学			
项目	<input type="checkbox"/> 硬件 <input type="checkbox"/> 软硬结合 <input type="checkbox"/> 软件 <input checked="" type="checkbox"/> 理论分析			
项目负责人基本信息				
姓名	学号	专业年级	所在学院	
帅星月	202014790222	21 口腔 1 班	口腔医学院	
性别	联系电话	电子邮件	身份证号	
女	18871055785	2630490012@qq. com	420624200209211326	
项目组成员基本信息（不含项目负责人）				
序号	1	2	3	4
姓名	韩鸽	高凤志	董树诚	
性别	女	男	男	
学号	202115390121	202115390316	202214680507	
专业年级	21 级口腔医学 1 班	21 级口腔医学 3 班	22 级新能源科学与工程 专业碳中和实验班	
所在学院	口腔医学院	口腔医学院	以升创新教育基地	
联系电话	15613572558	15097523915	15192860703	
电子邮件	2570650527@qq. com	1906271953@qq. com	3400639399@qq. com	
身份证号	131023200204200225	130203200205291514	371302200402241211	

研究内容概述(限 200 字以内)

本项目旨在通过 SLM 打印技术、数值模拟软件、万能实验机等研究新型医用高氮无镍奥氏体不锈钢（以下均简称“高氮钢”）的力学性能和 3D 打印技术参数；通过细胞荧光染色法、CCK-8 法、流式细胞术来检测对比小鼠肺成纤维细胞（L929）在 2 种合金浸提液（钴铬合金、高氮钢浸提液）下的粘附、增殖、周期情况，进而评价高氮钢的细胞毒性，为 3D 打印高氮钢儿童口腔间隙保持器的临床应用提供科学依据。

项目创新特色概述（50 字以内）

率先运用高氮钢材料结合 3D 打印技术，个性化制备儿童间隙保持器，并对其进行细胞毒性研究，为临床实时解决间隙保持问题，减少就诊次数节约医疗成本提供可能

项目组成员分工

姓名	主要研究工作
帅星月	实验方案设计、细胞培养、撰写论文
韩鸽	流式细胞仪检测、撰写研究报告
高凤志	收集统计数据、实验结果分析、撰写论文
董树诚	高氮钢的 3D 打印参数及其力学性能测试

## 一、项目简介（研究内容、目的意义、具体目标、国内外研究现状分析及评价等）

### 一、研究内容

#### （一）3D 打印高氮钢技术

1、通过 SLM 打印技术调控医用高氮钢打印过程中的激光功率、扫描速度、气氛压力等条件，分析不同能量密度、气氛压力对医用高氮钢打印过程中微熔池形成和凝固的影响，探究微熔池大小对打印质量的影响、快速冷却过程对氮偏析的抑制作用。

2、通过数值模拟软件，采用 Fluent 软件模拟、神经网络等方法，建立高氮钢微熔池熔化、凝固模型，模拟不同因素对微熔池形成和凝固的影响。

3、通过 XRD、SEM、万能试验机等分析方法和实验技术，对高氮钢进行观察定性分析，测量其弹性模量和强度，分析高氮钢支架的含氮量、打印工艺对微观组织结构、力学性能、耐腐蚀性的影响，进而改进医用高氮钢 3D 打印工艺。

#### （二）细胞毒性实验

##### 1、实验材料和仪器

###### 1.1 实验仪器

荧光染色激光共聚焦荧光显微镜、酶标检测仪、离心管、流式管、流式细胞仪、离心机、漩涡器、超净台、水浴锅

###### 1.2 实验材料

L929 细胞、PI 染料、无水乙醇、PBS、胰酶、钴铬合金浸提液、3D 打印高氮钢浸提液、胎牛血清、CCK-8 试剂盒、多聚甲醛、0.1% Tritonx-100 溶液、鬼笔环肽工作液、DAPI 溶液、75%酒精、RPMI1640 培养液

##### 2、实验内容

###### 2.1 制备浸提液

将各金属制备成直径 5mm 厚 1mm 的小圆片，常规打磨并抛光金属片后用无水乙醇浸泡脱脂超声波清洗器清洗 15min 三蒸水冲洗 3 遍热风烘干 然后在 121℃下高压蒸汽灭菌 20min 备用。参照 GB/T16886.12-2017 和 ISO 10993-12 对牙科金属材料生物相容性评价的浸提标准（0.5~6.0ml/ml）将各金属片置于玻璃培养瓶中 加入含有胎牛血清的 RPMI1640 培养液在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下浸提 7d。用 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌制出材料浸提液，4℃ 保存用于后续实验。

实验分组分为 3 组，分组如下：

表 1：实验分组

组别	名称
A 组	高氮钢组
B 组	钴铬合金组
C 组（空白）	空白实验组（含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液）

2.2 材料的细胞粘附实验

通过比色法法计算细胞粘附率，荧光染色法观测细胞粘附情况。

2.2.1 比色法

使用细胞外基质的组分包被 96 孔板，接种细胞培养后，用 PBS 洗，粘附能力强的细胞就不容易洗掉，粘附能力弱的就容易被洗掉，然后用 CCK-8 孵育显色，酶标仪测定 450 nm 各孔的吸光值反应粘附的细胞数。计算细胞黏附率，公式如下：

$$\text{细胞黏附率 (\%)} = \frac{\text{待测细胞OD值} - \text{空白OD值}}{\text{对照细胞OD值} - \text{空白OD值}} \times 100\%$$

2.2.2 细胞荧光染色实验

将 L929 细胞接种在放置玻片的培养基中，进行培养，细胞培养至 80-90%满时，使用 4% 多聚甲醛溶液进行细胞固定，后用 PBS 清洗，用 0.5% Triton X-100 溶液透化处理，再用 PBS 清洗，取 200μL 配制好的罗丹明标记的鬼笔环肽工作液，室温避光孵育 30min，PBS 清洗，使用 200μL DAPI 溶液（浓度：100 nM）对细胞核进行复染，约 30s，最后进行激光共聚焦荧光显微镜观察拍照观察

2.3 材料的细胞增殖检测

通过 CCK-8 法检测细胞增值情况，使用酶标仪在 450 nm 处测定第 1、3、5、7 天时浸提液培养的小鼠肺成纤维细胞（L929 细胞）的光密度（OD）值，同时观察 L929 细胞形态，并且计算细胞相对增殖率(Relative Growth Rate, RGR)，评价钴铬合金和高氮钢对 L929 的细胞毒性。公式如下：

$$RGR = \frac{\text{实验组OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100\%$$

根据 RGR 值，按照表 2 评估 2 种材料的细胞毒性。

表 2 RGR 与细胞毒性分级关系

RGR(%)	细胞毒性级（级）	材料的生物相容性
≥100	0	合格
≥75 ~ <100	1	合格
≥50 ~ <75	2	结合细胞形态分析
≥25 ~ <50	3	不合格
>0 ~ <25	4	不合格
0	5	不合格

2.4 材料的细胞周期检测

细胞内的 DNA 含量会随细胞周期进程而发生周期性变化，通过流式细胞仪对细胞内 DNA 的相对含量进行测定，可分析细胞周期各阶段的百分比。

通过流式细胞术，观察各实验组 48h 细胞周期 S 期、G2 期细胞数量的改变从而比较不同合金对于细胞周期的影响。若细胞在 G2 期比例降低，则说明细胞分裂减慢，进而说明此合金具有抑制 DNA 合成、细胞分裂和增值的作用，生物相容性较差，反之则生物相容性良好。

2.5 统计学分析

采用 SPSS、Origin 软件对数据进行处理分析，采用单因素方差分析进行多组数据分析，当  $P<0.05$  时，认为组间比较有差异，当  $P\geq0.05$  时，认为组间比较无差异。

二、目的意义

本项目旨在研究新型医用高氮无镍奥氏体不锈钢在 3D 打印儿童间隙保持器的应用。通过进行细胞毒性研究，为口腔间隙保持器的发展提供新的材料选择，为临床实时解决间隙保持问题。个性化定制的儿童间隙保持器，可有效提高稳定性及精确度，提升临床治疗效果，减小就诊次数及节约医疗成本，并最终推广于儿童口腔临床修复提供新的方向及思路。

三、具体目标

- 1、通过 XRD、SEM 等分析方法和实验技术，对高氮钢进行观察定性分析；万能试验机测量其弹性模量和强度；
- 2、通过 CCK-8、流式细胞术等方法得出高氮钢的细胞毒性，以及利用高氮钢材料 3D 打印间隙保持器可行性前景的结论。

四、国内外研究现状

3D 打印技术是在数字模型文件的基础上，利用计算机硬件资源及可黏合材料通过逐层打印的方式来构造物体，工艺流程一般分为三维建模、数据分割、打印、后处理四步，产品具有智能化程度高、精度高、制造快的特点。而口腔视野有限，解剖结构复杂，传统修复手段

所用间隙保持器与口腔匹配度有限，舒适度较低，技术水平和修复效果难以达到预期，选用 3D 打印模型，可制作精细度更高的间隙保持器。

与美国、德国等 3D 打印技术水平较高的国家相比，中国的 3D 打印儿童间隙保持器技术研究起步较晚，但近 5 年相关研究数量增长态势与国际同步，说明针对该技术的研究热度不减，且仍存在诸多需要解决的问题。受限于材料等因素，目前国内外缺乏儿童间隙保持器的应用规范，制备标准、带入步骤、术后维护等参照标准不一，医师在临床应用中难以把握其适应症。

目前用于口腔领域的金属 3D 打印材料主要是钴铬合金和钛合金，金属合金以粉末粉体形式生产应用。目前钴铬合金粉末主要依赖进口，国产钴铬合金粉末各项性能还不尽人意，且钴铬合金长期植入人体后，会释放铬离子等金属离子，具有潜在的细胞毒性、致癌性和致敏性。钛合金细胞毒性较好，但金属 3D 打印工艺对钛合金粉末粒度要求较高，加工不易，制作成本亦较高。

目前国内外对于高氮不锈钢在生物医学领域应用价值的研究较少。传统不锈钢含镍元素等致敏、致畸元素，有研究表明高氮不锈钢可用氮元素替代镍元素，且具有较好的细胞毒性、抗腐蚀性和机械性能。本项目将探究高氮不锈钢材料在更广范围的生物应用，将其作为口腔儿童间隙保持器的制作材料，前景较为光明。

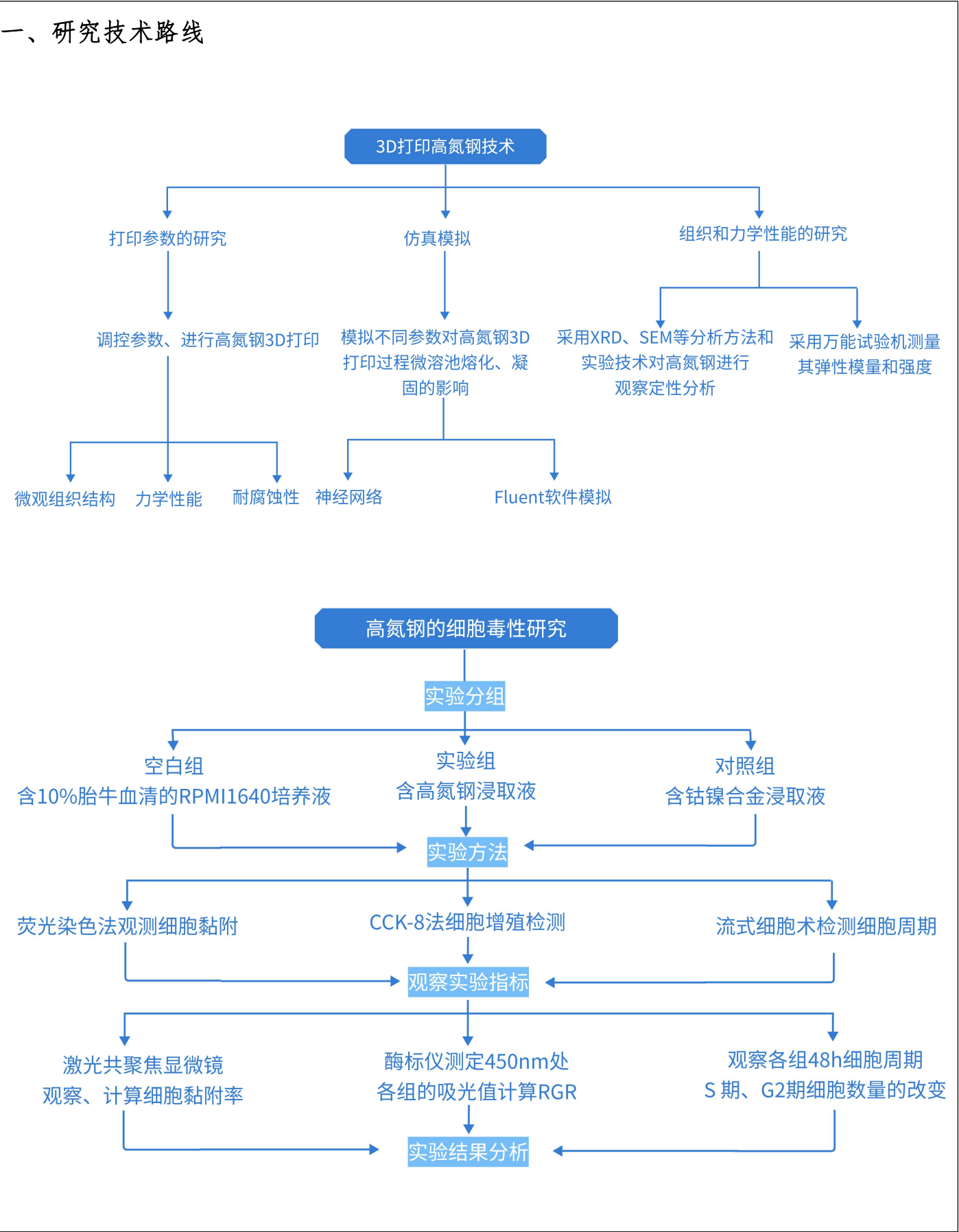
## 五、未来展望及新的研究方向

基于医用高氮无镍奥氏体不锈钢材料 3D 打印技术的儿童间隙保持器能够很好地满足患者的需求，精细程度高且能与组织面较好地贴合，细胞毒性良好。本项目组计划未来进行细胞氧化应激水平检测、细胞活力和凋亡能力评估、细胞成血管能力检测等实验，进一步研究医用高氮钢的生物相容性，深入研究高氮不锈钢材料的氮含量、致密度、拉伸性能、物相组成等因素，测试并优化个性化定制的儿童间隙保持器在临床上的应用效果。未来可将该技术推广到义齿支架、牙冠等领域，完善个性化定制技术，进一步实时解决临床问题，提高临床成功率，促进 3D 打印技术在国内口腔领域更广泛的规范化使用。



二、研究技术路线及可行性

一、研究技术路线



## 二、可行性分析

### 1. 人员及实验设施的可行性

本研究所涉及的细胞材料、3D 打印技术、实验试剂 CCK8 细胞毒性检测等实验条件，学校动物实验中心、基础医学院实验室、口腔医学院科研实验室均能够提供。

本课题组人员前期参加了本专业师哥师姐相关实验研究，对细胞实验操作相关细胞毒性检测方法等技术已有很好地掌握：且本组人员学习了相关课程，包括病理，免疫，卫生统计学，组胚等课程，为实验的理论研究打下良好基础，能够承担本课题及完成所涉及的实验内容。

### 2. 细胞毒性检测的可行性

实验所用到的 CCK8 在口腔医学院科研实验室及基础医学院实验室均可以进行，且该方法应用泛，灵敏度高，可重复性强。

### 3. 3D 打印高氮钢的可行性

学校能够提供 3D 打印的实验环境，并且组内人员也系统学习过相关技术要求，可以熟练使用此项技能，试验系统和技术也较为成熟，保证本项目能顺利完成。

### 三、已有的知识积累或实践基础

(请勿填写指导教师姓名或明显指向指导教师的信息)

#### 一、知识积累:

- 1、本项目组成员已学习掌握 SPSS 软件,能对实验结果进行科学的统计和分析。
- 2、已系统学习并掌握了《细胞生物学》、《组织胚胎学》、《医学免疫学》、《病理生理学》、《卫生统计学》等基础医学课程,具备一定专业知识储备。

#### 二、实践基础:

- 1、项目成员为唐山市特种冶金及材料制备实验室成员,已掌握 3D 打印高氮钢技术
- 2、项目组成员修读并通过了《高级实验室技术》课程,且前期参加了本专业师哥师姐相关实验研究,对实验中的各种器材和实验技术的应用,细胞毒性检测方法等技术已有很好的了解和掌握,能够承担和完成实验过程中的具体操作。

### 四、研究计划和进度(可就文献查询、社会调查、方案设计、实验研究、数据处理、研制开发、撰写论文或研究报告、结题和答辩、成果推广、论文发表、专利申请等工作逐项进行安排)

#### 一、项目准备阶段:2023 年 5 月-2023 年 6 月

- 1、查阅相关文献,了解国内外关于 3D 打印高氮钢的现状
- 2、采用问卷调查、医院走访等方式,充分了解患者对间隙保持器的治疗需求
- 3、设计实验方案,准备实验所需器材、试剂,设备

#### 二、项目研究阶段:2023 年 7 月-2023 年 10 月

- 1、根据实验方案合理分工,完成实验操作

#### 三、项目完善阶段:2023 年 11 月-2024 年 1 月

- 1、总结整理数据,对数据进行分析
- 2、开始撰写论文,准备投稿
- 3、撰写中期报告,准备中期答辩

#### 四、项目总结阶段:2024 年 2 月-2024 年 5 月

- 1、修改论文,进行投稿
- 2、完成项目结题报告,准备答辩

## 五、项目研究支撑条件

(请勿填写指导教师姓名或明显指向指导教师的信息)

1、本项目依托于华北理工大学医学实验中心、口腔医学院科研实验室、基础医学院实验室，可对实验场所，实验设备予以支持。

2、小组成员来自 ME 医学智造协会，节能减排创新协会，都具有一定的竞赛经验及奖项，具有科研精神和较强的实验能力，敢于迎接挑战，不惧困难。

3、项目成员所在唐山市特种冶金及材料制备实验室，该实验室具有高氮无镍奥氏体不锈钢 3D 打印机，具备高氮钢 3D 打印实验条件。

4、项目成员所在的冶金与能源学院实验中心为教育部重点实验室，该中心目前有 XRD、扫描电镜、热重分析仪、金相显微镜等分析测量设备，可为本项目 3D 打印医用高氮不锈钢力学性能测量提供测试平台。

5、项目有来自口腔医学院，材料学院专业的指导老师，具有丰富的理论知识与实践经验，能够给予我们一定的帮助。

## 六、预期提供的成果及形式

预期通过整合统计实验数据，将高氮钢与钴铬合金对比分析，给出高氮钢细胞毒性评价。

预期成果形式：

- 1、论文 1-2 篇
- 2、项目研究报告

## 七、项目经费概算(包括调研、耗材、资料、发表论文、印刷等费用)

预计经费概算：

- 1、文献查阅与调研：500 元
  - 2、材料费用：5500 元
  - 3、发表论文：3000 元
  - 4、其他：1000 元
- 总计：10000 元

八、评审情况

学院专家组评审意见：

组长签字：年 月 日

学院推荐意见：

主管教学院长签字：（公章）年 月 日

学校专家组评审意见：

组长签名：年 月 日

学校意见：

负责人签名：年 月 日