

氧化镁膜 AZ31B 镁合金材料的细胞毒性研究

郭 磊¹, 刘 魁¹, 张世亮¹, 黄晶晶², 谭丽丽², 杨 柯²

(1. 中国医科大学, 辽宁 沈阳 110001)

(2. 中国科学院金属研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要: 利用恒电流阳极氧化技术制备氧化镁(MgO)表面膜的 AZ31B 镁合金材料(MgO/AZ31B), 观测材料在体外生理环境中的微观形貌, 评价材料的细胞毒性作用以及对体外培养的成骨细胞功能的影响。结果表明, MgO 膜可有效地延缓 AZ31B 镁合金降解产物的释放速度, 显著降低合金的致突变反应和溶血反应, 对成骨细胞的增殖和成骨活性无毒性作用。在骨组织工程领域内 MgO/AZ31B 材料可望成为新型可降解生物医学材料。

关键词: 镁合金; 氧化镁; 成骨细胞; 细胞毒性

中图分类号: TG 146.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2008)06-1027-05

金属材料在骨组织的替代和修补方面具有非常重要的作用。作为生物医用植入材料, 金属镁具备理想的力学性能, 而且在含有 Cl⁻离子的体液环境中具有可控性降解的特性^[1]。但镁的化学性质不稳定, 并在腐蚀介质中产生的氧化膜疏松多孔 (PBR=0.8), 导致金属镁迅速降解, 而金属镁材料在组织中的快速腐蚀可能诱导局部组织的炎症反应^[2]。研发可控降解的镁合金生物材料, 将是一个崭新的创新性研究课题。利用恒电流阳极氧化技术提高 AZ31B 镁合金的表面腐蚀防护性能, 深入研究氧化镁(MgO)膜 AZ31B 镁合金材料的生物适应性和细胞毒性, 为新型可降解镁金属材料在医用生物材料领域中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

试验选用铸态 AZ31B 镁合金(中国科学院金属研究所提供), 化学成分见表 1。试验材料经抛光后, 采用 AZ31B 镁合金的恒电流阳极氧化法, 在 AZ31B 镁合金表面形成阳极氧化膜(MgO 膜层), 制成 MgO 膜 AZ31B 镁合金材料(MgO/AZ31B 材料)。材料经 ⁶⁰Co 辐射灭菌后备用。

表 1 AZ31B 镁合金的化学成分

Table 1 Chemical composition of AZ31B magnesium alloy (wt%)

Ni	Cu	Zn	Al	Mn	Mg
0.0003	0.0028	0.74	2.92	0.35	Bal.

将镁合金材料(AZ31B 材料和 MgO/AZ31B 材料)加工成 10 mm×10 mm×10 mm 的方形试件(中国科学院金属研究所提供), 经 ⁶⁰Co 辐射灭菌后置于 20 mL 生理盐水中 50 °C 浸提 72 h, 按照 ISO10993-1 标准(试样表面积/浸体介质=3 cm²/mL)制备材料生理盐水浸提液。在 COBAS 生化自动分析仪(瑞士产)上采用放免法检测浸提液的镁离子浓度 ([Mg])。

对于生理盐水浸泡后的材料, 采用 2201 型表面粗糙度检查记录仪(哈尔滨量具刃具厂)测定材料的表面粗糙度 Rz, 取样长度为 7 mm, 评定长度为 5 mm。在试样表面的 3 个不同点测试, 取平均值。

采用 JSM-840 型扫描电镜(SEM) (日本 JEOL 公司)观察浸泡后的镁合金表面及截面微观结构, 并且进行材料表面能谱分析。

取健康昆明小鼠 30 只(中国医科大学试验动物中心提供), 体重 20~24 g, 随机分成 3 组, 分组情况是: 正常对照组 (10 只)、AZ31B 合金组 (10 只) 和 MgO/AZ31B 合金组 (10 只)。试验组按 50 mL/kg 剂量经腹腔注射 AZ31B (或 MgO/AZ31B) 材料浸提液, 对照组注射等量生理盐水。连续观察 2 w, 记录动物一般情况及不良反应。

取健康昆明小鼠 30 只, 分组方法同急性毒性试验。试验组按 10 mL/kg 剂量经腹腔注射 AZ31B (或 MgO/AZ31B) 材料浸提液, 每周 5 次, 对照组注射等量生理盐水。2 个月后取肝脏标本进行组织病理学检查。

收到初稿日期: 2007-07-31; 收到修改稿日期: 2007-12-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30500414) 和辽宁省教育厅高等学校科学研究项目 (05L508) 资助

作者简介: 郭 磊, 男, 1969 年生, 博士, 副教授, 中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁 沈阳 110001, 电话: 024-83283360, E-mail: g572@sina.com

选用昆明雄性小鼠 20 只, 体重 20~24 g, 随机分成 4 组, 每组 5 只, 分组情况是: AZ31B 材料浸提液组(经腹腔注射 AZ31B 浸提液 50 mL/kg), MgO/AZ31B 材料浸提液组(经腹腔注射 MgO/AZ31B 浸提液 50 mL/kg), 生理盐水阴性对照组(经腹腔注射生理盐水 50 mL/kg), 环磷酰胺阳性对照组(经腹腔注射环磷酰胺 80 mg/kg)。在处死动物前 30 min 和 6 h 经腹腔给药 1 次。小鼠处死后制备骨髓涂片, 瑞氏染色, 每只动物计数 1000 个多染红细胞, 计算微核细胞出现率。

取新鲜兔血用生理盐水释成 2% 兔血悬液, 将材料浸提液、生理盐水(阴性对照)和双蒸水(阳性对照)各 1 mL、分别加入 2% 兔血悬液 1 mL, 每组各 5 份。37 °C 水浴 1 h, 肉眼观察有无溶血, 随即 3000 g 离心 3 min; 取上清液 1 mL, 加入 0.2% Na₂CO₃ 溶液 3 mL, 在 722 型分光光度计于 540 nm 处测定各样本光密度, 计算溶血率。溶血率=(样品吸光度-阴性对照吸光度)/阳性对照吸光度-阴性对照吸光度)×100%。

取出生 24 h 内的 Wistar 大鼠(中国医科大学试验动物中心提供), 采用颅盖骨消化法体外培养大鼠成骨细胞。传代培养至第 2 代时采用差速贴壁法除去成纤维细胞。成骨细胞常规培养于 10%DMEM 培养液中(含有 10%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素)。试验分为 3 组: AZ31B 材料组、MgO/AZ31B 材料组和正常对照组。按照 ISO10993-1 标准(试样表面积/浸体介质=3 cm²/mL), 试验组成骨细胞在浸有无菌金属材料的 10%DMEM 培养液中培养 2~21 d; 正常对照组成骨细胞仅在 10%DMEM 培养液中培养 2~21 d。

成骨细胞培养 2、3 d 后, 0.25% 胰蛋白酶消化 2 min, 取出金属材料, 500 g 离心 10 min, 加入 DMEM 培养液 200 μL, 以 1×10⁵/mL 的密度接种至 96 孔培养板, 每组 6 孔, 每孔加入 5 mg/mL 的四甲基偶氮唑蓝(MTT) 20 μL(美国 Sigma 公司)。继续培养 4 h 后, 加入 DMSO 150 μL, 振荡 10 min, 在 722 型分光光度计于 490 nm 波长处测定各样本的 A 值。采用 *t* 检验进行统计学分析。

成骨细胞培养 7、14、21 d 后, 0.25% 胰蛋白酶消化 2 min, 取出金属材料, 500 g 离心 10 min, 加入细胞裂解液 1 mL, 37 °C 作用 20 min, 收集裂解液, 采用对硝基酚磷酸盐法测定碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)活性^[3]。采用 *t* 检验进行统计学分析。

2 实验结果

2.1 MgO/AZ31B 材料微观结构的变化

本试验中利用表面粗糙度仪可以部分量化描述材料表面的形貌特征, 表 2 为生理盐水浸泡后镁合金材料表面粗糙度的变化。表 2 表明, 生理盐水中 50 °C 浸提 72 h 后, AZ31B 材料和 MgO/AZ31B 材料的表面 Rz 值明显增大, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Rz 代表微观不平度, 是 10 点高度的平均值。

表 2 材料浸泡前后的表面粗糙度 Rz (μm) 变化
Table 2 Surface roughness of the implanted material in vitro, Rz (μm)

Material	AZ31B	MgO/AZ31B
Before soaking	0.13±0.05	0.09±0.03
After soaking	7.45±1.42	7.66±0.78

图 1 为 AZ31B 材料和 MgO/AZ31B 材料的 SEM 表面和断面形貌。生理盐水中 50 °C 浸提 72 h 后, AZ31B 镁合金表面有层状物堆积, 表面形成的大结节比 MgO/AZ31B 材料更加明显, 并且结构疏松, 孔隙结构增多, 表面有龟裂与孔洞(图 1b 箭头所示); 断面形貌发现, AZ31B 镁合金的金属基体被氧化, 该氧化层厚度为 5~8 μm(图 1c 箭头所示); MgO/AZ31B 材料浸泡后, 表面可见颗粒样物, 同时可见孔隙结构, 金属基体氧化层厚度约为 1~2 μm(图 1e~1f 箭头所示)。表面能谱分析发现, MgO/AZ31B 材料的表层 Mg 元素含量约为 AZ31B 材料含量的 2 倍(表 3)。本试验中采用放免法检测材料浸提液镁离子含量, 发现 MgO/AZ31B 材料浸提液镁离子浓度约为 AZ31B 材料的 1/7(表 4), 说明 MgO 膜延缓了 AZ31B 镁合金降解产物的释放速度。

2.2 MgO/AZ31B 材料的细胞毒性作用

在急性及亚急性毒性试验中, 对照组和试验组小鼠均未出现不良反应, 体重及体长无显著性差别。小鼠肝脏病理学检查可见: 肝细胞形态排列正常, 肝小叶清晰规则, 细胞质均匀, 未见明确组织水肿、纤维化及炎症细胞浸润等异常变化, 偶见小泡性脂肪滴空泡。为阐明 MgO/AZ31B 材料的细胞毒性作用, 本研究中采用了微核试验和溶血试验。微核试验中发现 AZ31B 材料浸提液组微核出现率为 8.5%, 与环磷酰胺阳性对照组(12.7%)无显著性差异($P > 0.05$); MgO/AZ31B 材料组的微核率为 4.4%, 与生理盐水阴性对照组无显著性差异($P > 0.05$), 且低于 5% 的国际药典阳性标准, 无致突变反应(表 5)。溶血试验中发现, AZ31B 材料出现了较为严重的溶血现象, 溶血率为 69%; MgO/AZ31B 材料溶血率为 4.3%, 符合生物材料溶血性的要求(溶血率小于 5%)(表 6)。以上试验结果表明,

AZ31B 经过表面 MgO 膜等处理后, 具有良好的生物相容性, 有可能应用在生物材料领域。

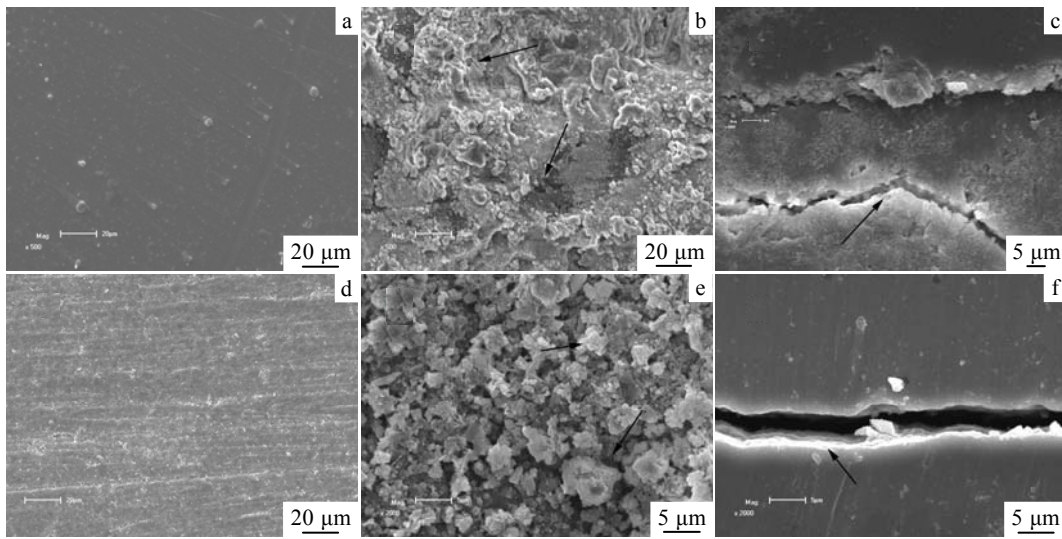


图 1 材料的表面及横截面 SEM 形貌

Fig.1 SEM photographs of surface and cross section of the materials: (a) the AZ31B surface before soaking, (b) the AZ31B surface after soaking, (c) the AZ31B cross section after soaking, (d) the MgO/AZ31B surface before soaking, (e) the MgO/AZ31B surface after soaking, and (f) the MgO/AZ31B cross section after soaking

表 3 材料表面能谱分析结果

Table 3 EDS analysis on the surface of materials (at%)

Elements	AZ31B	MgO/AZ31B
O K α	87.362	63.501
Mg K α	12.638	24.999

表 4 金属材料致小鼠骨髓细胞突变反应检测结果

Table 4 Micronuclear test results of the materials

Leaching fluid	AZ31B	MgO/AZ31B
Haemolysis/%	69.0 \pm 5.4	2.5 \pm 1.2
C _[Mg] /mmol·L ⁻¹	84.4 \pm 3.5	12.7 \pm 0.5

表 5 金属材料溶血性检测结果

Table 5 Hemolysis test results of the materials

Leaching fluid	Micronuclear rates/%
AZ31B	8.5 \pm 1.5
MgO/AZ31B	4.3 \pm 0.4
Physiological saline	3.2 \pm 0.4
Cyclophosphamide	11.5 \pm 1.5

2.3 MgO/AZ31B 材料对成骨细胞增殖和分化的作用

采用体外直接接触细胞毒性试验和 MTT 比色法试验, 判定 MgO/AZ31B 材料是否影响成骨细胞的增

殖功能。表 6 表明, 培养 48、72 h 后, MgO/AZ31B 材料组的吸光度 A 值略高于 AZ31B 材料组, 但与正常对照组比较, A 值变化不显著, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 说明 AZ31B 材料和 MgO/AZ31B 材料对体外成骨细胞的增殖无明显影响。

表 6 材料组的吸光度 (A)

Table 6 Absorbency (A) of the materials for different time

Materials	48 h	72 h
Controll	0.23 \pm 0.06	0.26 \pm 0.05
AZ31B	0.21 \pm 0.04	0.22 \pm 0.04
MgO/AZ31B	0.21 \pm 0.05	0.27 \pm 0.03

测定成骨细胞合成 ALP 活性的变化可以了解成骨细胞的分化成熟程度以及细胞成骨矿化的能力。本研究中体外成骨细胞培养至 7~21 d, 发现 AZ31B 材料和 MgO/AZ31B 材料试验组的 ALP 活性与正常对照组无显著性差异 ($P>0.05$) (表 7), 因而证实 MgO 膜和 AZ31B 材料对体外培养的成骨细胞的分化和成骨活性无毒性作用。

3 结果讨论

在骨组织工程中, 植入材料的强度与生物稳定性是金属材料顺利发挥作用的关键因素。镁合金具有理

表 7 材料对体外成骨细胞合成 ALP (U/mg) 的影响
Table 7 Effect of materials on the ALP (U/mg) synthesized by osteoblast in vitro

Materials	7 d	14 d	21 d
Controll	0.65±0.14	0.82±0.16	0.92±0.18
AZ31B	0.61±0.08	0.75±0.09	0.88±0.06
MgO/AZ31B	0.62±0.28	0.86±0.22	1.01±0.14

想的比强度和比刚度, 杨氏弹性模量为 45 GPa, 能有效地缓解应力遮挡效应, 而且镁在机体内的降解产物具有生物活性且无毒副作用等优势^[4]。但镁的化学性质活泼, 耐腐蚀性能差, 而镁的快速降解所释放的高浓度镁离子对骨细胞可能具有毒性作用^[5]。因此研究镁金属的细胞毒性和生物相容性, 提高镁在人体内的耐腐蚀性具有十分重要的意义。目前研究已证实, 金属基体上的表面涂层可以增加生物材料表面的生物相容性, 并且改善金属基体在机体内的生物化学作用^[6]。本研究中, 发现镁的快速降解所生成的氧化膜为多孔状, 不具有对基体的保护作用。利用阳极氧化技术制备 MgO/AZ31B 镁合金材料, AZ31B 镁合金的表面 MgO 膜层明显地减慢了镁合金降解产物的释放速度, 进而避免了金属基体周围的镁离子高浓度状态, 同时改善了 AZ31B 镁合金的耐腐蚀性。

镁是骨骼中重要的阳离子, 镁离子通过游离镁的浓度变化调节细胞内 ATP 储量和各种酶的活性, 参与细胞内蛋白质和核酸的合成及三磷酸腺苷代谢等重要生理代谢过程^[7]。镁缺乏可明显干扰骨代谢的平衡, 使血钙浓度降低^[8], 而高镁血症可能引起神经肌肉阻滞、骨量减少、骨质疏松等病理表现^[9]。本研究中的溶血试验和微核试验表明, AZ31B 材料在体外生理环境下可以迅速释放大量的镁离子, 且碱化材料浸提液, 出现了严重的溶血现象; AZ31B 材料经过表面 MgO 膜处理后, 明显降低了 AZ31B 材料的溶血反应, 同时有效地抑制 AZ31B 材料的致突变反应, 使镁合金材料具有良好的生物相容性。

ALP 是成骨细胞分化和功能成熟的早期标志, 它可以促进细胞外基质矿化和钙磷沉积, 为骨组织的成核、结晶和增殖提供条件, 在成骨细胞趋向成熟的转化中起着重要作用^[10]。镁离子和钙离子可提高材料的生物相容性, 激活碳酸酐酶并促进破骨细胞分泌酸类物质, 增加局部骨细胞的生物活性^[11]。John 等人在体外试验中发现, 磷酸三钙涂层材料可降低体外培养的成骨细胞的活性, ALP 分泌量明显减少, 这可能与

培养液中的低镁和高磷环境有关^[12]。本研究中材料表面能谱分析证实, 在体外生理环境中 MgO/AZ31B 材料表面的 Mg 元素含量高, 而磷元素的含量低。体外直接接触试验证实, MgO/AZ31B 材料没有影响体外培养的成骨细胞的增殖功能, MgO 膜对体外培养的成骨细胞的分化和成骨活性无毒性作用。此种作用机制有待于进一步研究。

4 结 论

MgO 膜可有效地延缓 AZ31B 镁合金降解产物的释放速度, 显著降低合金的致突变反应和溶血反应, 对成骨细胞的增殖和成骨活性无毒性作用。MgO/AZ31B 材料可望成为新型可降解生物医用材料。

致 谢: 本文的工作得到了中国科学院知识创新工程重要方向项目“生物活性骨植入材料的应用研究”的部分资助。

参考文献 References

- [1] Gao Jiacheng(高家诚), Li Longchuan(李龙川), Wang Yong(王勇) *et al. Rare Metal Materials and Engineering(稀有金属材料与工程)*[J], 2005, 34(6): 903
- [2] Witte F, Ulrich H, Rudert M *et al. J Biomed Mater Res A*[J], 2007, 81(3): 748
- [3] Jia Jun(贾 骏), Duan Yuanyuan(段嫒嫒), Zhang Shaofeng(张少锋) *et al. Rare Metal Materials and Engineering(稀有金属材料与工程)*[J], 2006, 35(12): 1879
- [4] Mark P S, Alexis M P, Jerawala H *et al. Biomaterials*[J], 2006, 27(9): 1013
- [5] Serre C M, Papillard M, Chavassieux P *et al. J Biomed Mater Res* [J], 1998, 42(4): 626
- [6] Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M *et al. Biomaterials*[J], 2003, 24(19): 4913
- [7] Feillet-Coudray C, Coudray C, Wolf F I *et al. Metabolism*[J], 2004, 53(5): 660
- [8] Ghio A J, Cohen M D. *Inhal Toxic*[J], 2005, 17(13): 709
- [9] Kaplan W, Haymond M W, McKay S *et al. J Pediatr Endocrinol Metab*[J], 2006, 19(10): 1225
- [10] Xue W, Moore J L, Hosick H L *et al. Journal Biomed Mater Res A*[J], 2006, 79(4): 804
- [11] Leeuwenburgh S, Layrolle P, Barrere F *et al. Journal Biomed Mater Res*[J], 2001, 56(2): 208
- [12] John A, Varma H K, Kumari T V *et al. Journal Biomater Appl* [J], 2003, 18(1): 63

Cytotoxicity of AZ31B Magnesium Alloy Covering with Magnesium Oxide

Guo Lei¹, Liu Kui¹, Zhang Shiliang¹, Huang Jingjing², Tan Lili², Yang Ke²

(1. China Medical University, Shenyang 110001, China)

(2. Institute of Metal Research, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

Abstract: The magnesium alloy AZ31B with magnesium oxide (MgO/AZ31B) film has been electrosynthesized by anodic oxidation technique at a constant current. The microstructure and cytotoxic effect of the magnesium alloy were detected. The effects of MgO/AZ31B magnesium alloy on the function of osteoblast were evaluated in vitro. The results show that the release and degradation processes of AZ31B magnesium alloy are efficiently delayed by coating with MgO, whereas the mutagenesis and hemolytic reactions of AZ31B magnesium alloy are degraded. It is shown that the MgO/AZ31B magnesium alloy does not affect the proliferation and the bone formation of osteoblast by the direct contact test in vitro. Therefore, the MgO/AZ31B magnesium alloy would be a new degradable and biomedical material.

Key words: magnesium alloy; magnesium oxide; osteoblast; cytotoxicity

Biography: Guo Lei, Ph. D., Associate Professor, Department of Orthopedic Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, P. R. China, Tel: 0086-24-83283360, E-mail: g572@sina.com