

多孔镁表面生物活性 β -TCP 涂层的制备及其细胞相容性研究

耿芳^{1,2}, 谭丽丽¹, 贺永莲³, 杨敬玉³, 张炳春¹, 杨柯¹

(1. 中国科学院金属研究所, 辽宁 沈阳 110016)

(2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

(3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 采用化学沉积法在镁支架表面制备生物活性的 β -TCP(磷酸三钙陶瓷)涂层, 利用X射线衍射, 扫描电子显微镜研究 β -TCP涂层的相结构和表面形貌。并对表面改性的镁支架与类成骨细胞UMR106的体外生物相容性进行了详细研究。结果表明, 表面改性后的镁支架浸提液细胞毒性为1级, 即无细胞毒性; 材料浸提液无细胞DNA毒性, 对细胞周期无改变, 也无异倍体细胞出现。实验结果证明, 表面改性后的多孔镁具有良好的细胞相容性, 是一种很有前景的新型骨组织工程支架材料。

关键词: 多孔镁; 骨组织工程; β -TCP; 细胞相容性

中图分类号: O614.22; R62; Q28

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2009)02-0318-05

随着对骨组织工程支架材料研究不断深入, 开发具有良好力学性能, 又可在体内安全降解的新型骨组织工程支架材料具有重要意义。多孔镁金属由于具有良好的生物学特性、力学相容性以及可降解性, 有望作为一种新型骨组织工程支架材料^[1]。然而由于镁在体内的降解作用, 会改变细胞周围的微环境, 可能会引起对细胞的毒性作用, 因此有必要对镁及其合金进行表面改性以提高其细胞相容性, 目前对镁作为生物材料进行表面改性的研究比较少, 有碱热处理^[2]、热-有机膜处理^[3]、以及在镁表面制备钛涂层^[4]等。 β -磷酸三钙陶瓷(β -TCP)主要由钙、磷组成, 具有良好的理化性能、生物相容性和可降解性, 可以引导新骨生成, 发挥骨传导作用, 修复骨缺损^[5-7], 有望作为骨组织工程支架的涂层材料。本研究采用化学沉积法首次多孔镁表面制备生物活性的 β -TCP涂层, 使镁支架既有镁良好的力学性能又有 β -TCP涂层优良的生物活性, 并对表面改性后的多孔镁与类成骨细胞UMR106的体外细胞生物相容性进行了详细研究, 通过采用多孔镁支架的浸提液考察降解产物对细胞形态和增殖的影响, 同时还考察对细胞周期、DNA损伤等影响以评价其潜在的致癌性及基因毒性, 为可降解镁基骨植入材料的设计和发展提供理论依据。

1 实验

采用激光加工技术制备孔径为 0.5 mm、孔隙率约为 50%的多孔镁支架^[1]。支架经电解抛光后, 置于双蒸水中超声清洗 10 min, 然后浸入 37 °C 的过饱和 Na_2HPO_4 溶液中 3 h, 随即在 400 °C 下恒温热处理 10 h, 清洗后室温干燥, 再置于 Ca/P 摩尔比为 1.67 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 的混合溶液中 70 °C 处理 24 h, 水洗后室温干燥保存。

在 JSM-630 1F 型扫描电镜下观察镁支架表面涂层后的形貌。用 X 射线衍射分析镁表面制备涂层后的相结构, 所用设备为 D/MAX-2500PC18kW 衍射仪, 采用 Cu 靶, 管电压 40 kV, 管电流 30 mA。

分别将未处理和表面涂层后的多孔镁支架紫外照射 2 h 后, 用 75%乙醇浸泡 30 min 消毒, 然后用 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲盐清洗 3 遍, 每遍 1 h, 以去除乙醇残留, 最后浸入 MEM 细胞培养液中 3 d 让其适应细胞生长的环境。参照 GB/T 16886.5, 将消毒处理好的试样按 1 mL/3cm² 加入浸提介质(含血清细胞培养液), 在 37 °C 细胞培养箱中放置 72 h, 收集浸提液, 无菌封存, 4 °C 保存备用^[8]。

MTT 实验^[9]分组为: 空白对照组(MEM 细胞培养

收到初稿日期: 2008-01-23; 收到修改稿日期: 2008-11-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-YW-207)

作者简介: 耿芳, 女, 1977 年生, 博士研究生, 中国科学院金属研究所, 辽宁 沈阳 110016, 电话: 024-23971676, E-mail: fgeng@imr.ac.cn; iamgengfang@163.com

液和血清),未处理镁支架 25%、50%、100%浸提液组,表面处理镁支架 25%、50%、100%浸提液组。每组设 6 个复孔,取对数生长期细胞,配成 $20 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液,种植于 96 孔板,每孔 $100 \mu\text{L}$,24 h 后换空白及各浸提液组作用于细胞,一定时间后每孔加 $10 \mu\text{L}$ MTT(终浓度为 0.25 mg/mL)继续孵育 4 h,之后弃去培养液加 $\text{DMSO} 100 \mu\text{L}$ 溶解结晶,10 min 后在酶标仪 492 nm 处检测吸光度值。材料浸提液对细胞存活率影响的评定方法参照美国药典中对细胞毒性的评价,以空白对照组为 100%,参照公式(1):

$$\text{细胞存活率 } X = \frac{\text{试样组 OD 值的平均值}}{\text{对照组 OD 值的平均值}} \times 100\% \quad (1)$$

计算出的细胞存活率 X 水平为: $X \geq 100\%$ (0 级); $X \geq 80\%$ (1 级); $X \geq 50\%$ (2 级); $X \geq 30\%$ (3 级); $X \geq 0$ (4 级),其中 0 级和 1 级表示无毒性。结果以 3 次独立实验的平均值表示,并在倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况。

进行了流式细胞仪检测。实验将空白对照组,表面处理镁支架的 25%、50%、100%浸提液组分别作用细胞 24 h 后,消化、离心收集 1×10^6 个细胞,并在 70%(体积比)的冰乙醇里 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定。将固定好的细胞用 PBS 洗 2 次,加入含 $50 \mu\text{g/mL}$ PI 的 PBS 溶液 $500 \mu\text{L}$,室温避光作用 30 min。用流式细胞仪检测细胞周期,在配有双合透镜鉴别元件的 FL2 通道检测 PI 标记的细胞,计数 3×10^4 细胞。数据分析采用 cellquest pro 3.0 软件系统,结果以至少 3 次独立实验的平均值表示。计算 DNA 指数^[10](DNA Index, $\text{DI} = \text{受试组细胞 } G0/G1 \text{ 百分含量} / \text{对照组细胞 } G0/G1 \text{ 百分含量}$ 之比),DI 在 1.0 ± 0.1 范围内,说明无异倍体细胞。

进行了单细胞凝胶电泳实验。将空白对照组,表面处理镁支架 25%、50%、100%浸提液组分别作用细胞 24 h 后,消化、离心收集制成约 $10^6/\text{mL}$ 密度的细胞悬液。用不含钙、镁的磷酸盐缓冲液(PBS)等量稀释,轻轻混匀后,备用,制片。然后将载玻片在电压 18 V、电流 300 mA 下,电泳 30 min。取出后用 400 mmol/L Tris-HCl pH7.5 缓冲液中和,每次 5 min,中和 3 次。再缓缓加入无水乙醇将载玻片浸埋 1 h,然后晾干或室温下过夜。EB 染色后在荧光显微镜下观察电泳图像。每个样本随机观察 40 个细胞,采用捷克 Laboratory Imaging 公司开发的 LUCIA 遗传工作站系统中 Comet assay 彗星试验分析软件对细胞 DNA 损伤的程度进行精确评价,并提供统计分析报告。

采用 SPSS(13.0)统计软件包进行检验分析。结果用平均值 \pm 标准误差表示,在判断数据是正态分布(在偏度和峰度上 t 分布的检验值 < 1.96)的前提下,采用

One-Way ANOVA 评价整体性差异,方差齐性用 LSD t -test 分析方法进行组间比较,方差不齐用 Dunnett T3 分析方法进行组间比较, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 β -TCP 涂层的制备与表征

图 1 是采用低温化学沉积法在多孔镁支架上制备 β -TCP 涂层后的表面及侧面形貌。涂层呈现均匀、致密的颗粒状晶体结构,颗粒之间互相搭接,涂层结合紧密;对孔隙内部的观察可以看到,涂层在孔隙内不同深处能达到与表面同样的均匀致密性。从涂层的侧面形貌可以看出,涂层厚度大约在 $50 \mu\text{m}$ 左右,涂层与镁基体结合紧密,涂层表面无缝隙及脱落现象。XRD 分析结果(图 2)证实,本实验所制备的涂层由均一的 β -TCP 相组成。

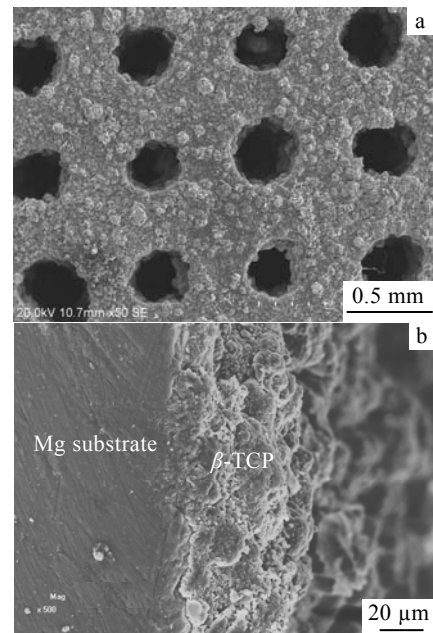
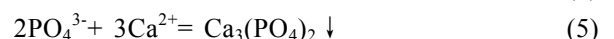
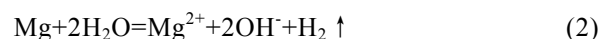


图 1 β -TCP 涂覆的多孔镁支架表面和涂层侧面形貌
Fig.1 Surface (a) and side wall (b) morphologies of β -TCP coated porous Mg scaffold

将磷化处理后的镁置于 $\text{Ca/P}=1.67$ 的硝酸钙和磷酸一氢钠混合溶液中,会发生如下化学反应:



由于镁是十分活泼的金属,尽管预处理后的磷化膜覆盖在镁的表面,由于膜层很薄,所以仍然会有部

分的镁与水溶液发生反应，产生碱性环境促使 HPO_4^{2-} 不断电离出 PO_4^{3-} 。其中 CaHPO_4 $K_{\text{sp}1}=2.7\times 10^{-7}$ ； $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $K_{\text{sp}2}=2.0\times 10^{-29}$ ，可见 $K_{\text{sp}2}\ll K_{\text{sp}1}$ ，所以在镁表面更容易生成 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 沉淀。又由于 $\text{Ca/P}=1.67$ ，大于 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 中 $\text{Ca/P}=1.5$ ，促进(5)式反应的不断进行，使(4)式反应加快，从而使 CaHPO_4 不易生成，所以表面由纯的 β -TCP 组成。另外预磷化处理后的纯镁表面带有很强负电的磷酸根离子，当将预磷化处理后的纯镁置于硝酸钙和磷酸一氢钠混合溶液中时，将很快聚集溶液中的钙离子。带正电的钙离子又不断聚集溶液中的磷酸根，形成磷酸钙沉淀，从而在镁的表面生成均匀致密的 β -TCP 涂层。

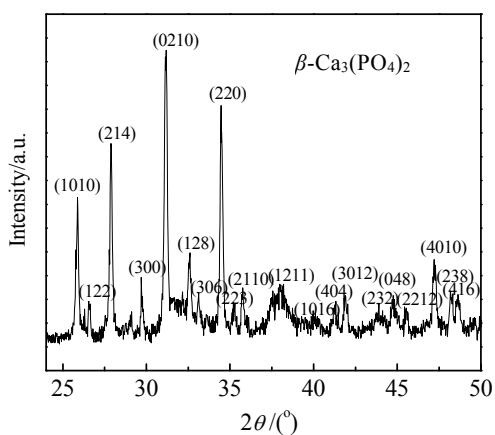


图 2 多孔镁支架上 β -TCP 涂层的 XRD 图谱
Fig.2 XRD pattern of β -TCP coating on porous Mg

植入体表面的陶瓷涂层，需要有一定厚度以保证涂层在体液作用下存在足够的时间，促进植入物与骨组织的键合；但是随着涂层厚度的增加，涂层的残余应力增大，涂层材料本身的性质也更容易表现出来，植入生物体后，将影响材料与骨的结合。文献[11~13]报道，10~15 μm 的HA涂层在假体植入体内几个月后便会溶解掉，100~150 μm 的HA涂层在应力作用下易发生疲劳碎裂。认为，理想的陶瓷涂层厚度为50~60 μm [14,15]。因此，本实验制备的涂层厚度可满足理想涂层厚度的要求。采用化学沉积的方法在镁支架表面制备生物活性的 β -TCP涂层，其突出优点表现在：在低温下进行，避免高温过程引起的相变和脆裂；可在形状复杂和多孔的基体上形成均匀的涂层，所需设备简单、操作方便、沉积工艺易控制、费用较低。

2.2 细胞相容性

2.2.1 表面改性前后镁支架浸提液作用后的细胞形态和细胞成活率

图 3a 是在光学显微镜下观察的空白组细胞形态。图 3b 是表面处理后的镁支架 100%浸提液作用细胞 24 h 后的细胞形态。与空白组相比几乎无形态差异，细胞生长良好，细胞呈棱形、梭形、三角形、不规则形等，细胞透光性好，密度正常，死亡细胞很少。而表面未处理的镁支架 100%浸提液组，如图 3c 所示。有较多细胞形态发生变化，呈圆形，细胞皱缩，无伪足伸出，细胞数量明显减少，说明未处理组所提供的环境对细胞正常生长不利，使细胞数量减少或形态改变。

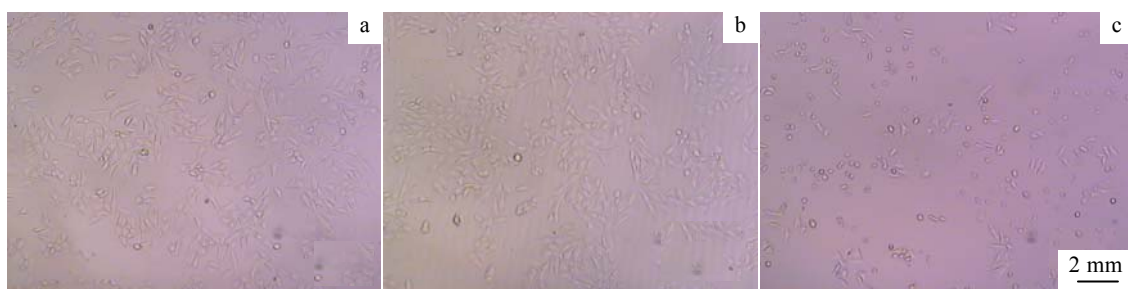


图 3 UMR106 细胞在 MEM 培养液中的形态(a)，在 β -TCP 涂层镁支架浸提液中的形态(b)和未表面处理镁支架浸提液中的形态(c)
Fig.3 UMR106 cells cultured with MEM (a) and the extracted liquid of β -TCP coated Mg (b) and the extracted liquid of untreated Mg(c)

未处理镁支架浸提液作用细胞 24 h 后，细胞培养液颜色与空白组相比有很大差异，呈明显紫色，即显碱性环境，测其 pH 值均大于 8。作用细胞 24 h 考察对细胞存活率的作用，结果如图 4 所示。未处理镁支架 50%浸提液组和 100%浸提液组与空白组相比有显著性差异，并具有浓度依赖性，且其对存活率的影响按浓度从低到高依次为 1 级、2 级和 3

级。分析认为主要由于未处理镁支架在细胞培养液中降解较快，产生碱性环境，不利于细胞生长。从图 4 也可以看到，表面改性后镁支架各浓度浸提液组细胞的存活率均在 90%以上，细胞毒性为 1 级，显示无毒性，与空白组相比均无显著性差异，说明表面改性后的镁支架初步满足作为骨组织工程支架材料的要求。

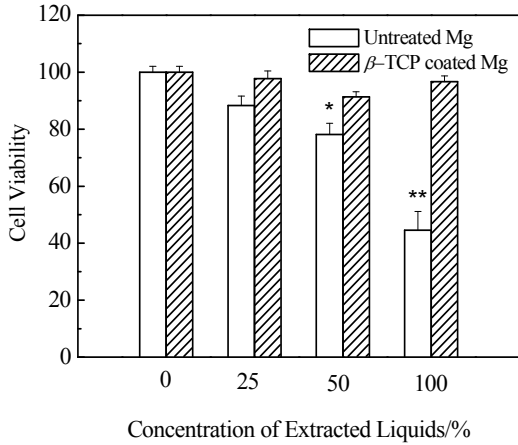


图 4 镁支架各浓度浸提液组作用 UMR106 细胞 24 h 后的细胞成活率

Fig.4 Effects of extracted liquids of untreated Mg and β -TCP coated Mg on the viability of UMR106 cells for 24 h, assessed by MTT assay

2.2.2 表面改性后的镁支架浸提液对细胞 DNA 的影响

由以上的 MTT 实验证实，未表面处理的镁支架具有一定的毒性，而表面处理后的镁支架无细胞毒性，但还需进一步考察其对细胞周期及 DNA 损伤等是否致癌及基因毒性方面的影响。

许多外来的因素会引起机体细胞 DNA 单链断裂 (single strand break, SSB)。偶尔的 SSB 不会影响 DNA 双链的连续性，细胞本身具有一定的自我修复能力。随着断裂修复的次数增多，产生修复差错的概率会随之增加，从而会影响 DNA 的遗传行为，进一步成为许多疾病尤其是肿瘤发生的原因。单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis assay, SCGE)，是一种在单细胞水平上检测真核细胞 DNA 损伤与修复的方法，能灵敏地检测 DNA 的断裂。本研究采用 SCGE 对表面处理后镁支架各浓度浸提液作用后的成骨细胞 DNA 进行检测，考察镁支架对细胞 DNA 的影响，结果(图 5)表明：各浓度浸提液组作用细胞 24 h 后，阳性药 H₂O₂ 与空白组相比有显著性差异，说明模型成功，各浓度浸提液组与空白组相比均无统计学意义，说明浸提液对细胞 DNA 无损伤作用，材料无遗传毒性，应用较安全。

2.2.3 表面改性后的镁支架浸提液对细胞周期的影响

人类正常体细胞均有较恒定的 DNA 二倍体，当人体发生癌变或具有恶性潜能的癌前病变时，细胞 DNA 含量会出现异常改变。导致 DNA 异倍体出现。流式细胞仪(FCM)通过测定细胞 DNA 含量能发现异

倍体细胞，从而成为肿瘤细胞学诊断的有效工具。本研究采用 FCM 对表面改性后镁支架各浓度浸提液作用于成骨细胞 24 h 后细胞 DNA 含量、倍体水平进行分析，结果(表 1)表明：各浓度浸提液组与空白组相比细胞周期均无显著性差异，说明浸提液不能造成细胞周期改变，DNA 指数(DNA Index, DI)在 1.0±0.1 范围内，呈正常二倍体峰，细胞与材料复合时可能保留细胞的正常生长状态。

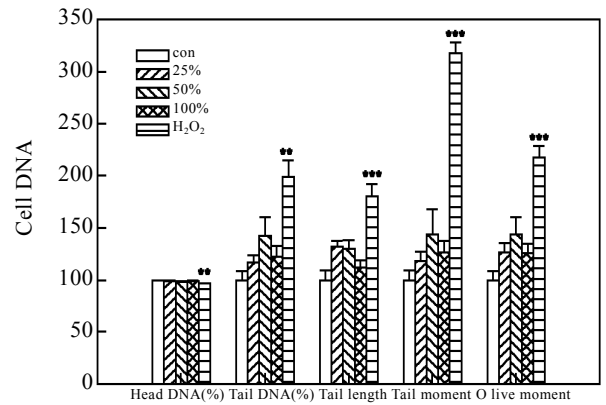


图 5 表面处理后镁支架不同浓度浸提液组对细胞 DNA 的影响

Fig.5 Effect of extracted liquids of treated magnesium (25%, 50% and 100%) on UMR106 cell DNA damage

表 1 表面处理的镁支架各浓度浸提液组对细胞周期的影响
Table 1 Effect of extracted liquid of treated magnesium on UMR106 cell cycles for 24 h

Groups	n	G0/G1±S.E	S±S.E	DI
Control	6	(50.82±2.76)%	(29.12±2.20)%	
25%	6	(51.56±2.50)%	(27.99±1.69)%	1.01
50%	6	(53.99±1.42)%	(27.80±1.74)%	1.06
100%	6	(51.74±2.88)%	(28.29±0.85)%	1.02

由以上实验结果分析可知，表面改性后的镁支架浸提液对细胞的存活率、细胞形态均无大影响，对细胞周期无影响，对细胞 DNA 无损伤，可满足体内医用植入材料的要求，具有良好的生物安全性。另外，由于体外细胞培养条件较体内植入条件对材料的要求更为苛刻，例如与体内植入条件相比，镁处于细胞培养液中，使其自身更充分地暴露于水分环境下，降解速度更为严重。而细胞培养液不具备体内的自我调节机制，因而这时的 pH 值变化对细胞的生长影响更大。因此体外联合培养会将作用信号扩大化，有利于实验过程中发现问题及分析问题，同时对材料的要求更高，有利于为进一步改进材料提供依据。

3 结 论

1) 低温化学沉积法在多孔镁支架表面制备的生物活性的 β -TCP 涂层厚度在 50 μm 左右, 可满足理想骨植入陶瓷涂层的要求。

2) 表面改性后的镁支架浸提液对细胞形态无影响, 显示无毒性, 作用细胞 24 h 后不能改变细胞周期, 无异倍体出现, 对细胞 DNA 也无损伤作用。

参考文献 References

- [1] Geng Fang(耿 芳) *et al. Materials Review(材料导报)*[J], 2007, 21(5): 76
- [2] Gao Jiacheng(高家诚) *et al. The Chinese Journal of Nonferrous Metals(中国有色金属学报)*[J], 2004, 14(9): 1508
- [3] Gao Jiacheng(高家诚) *et al. Rare Metal Materials and Engineering(稀有金属材料与工程)*[J], 2005, 34(6): 903
- [4] Zhang E L *et al. Scripta Materialia*[J], 2005, 53(5): 523
- [5] Ohura K *et al. J Biomed Mater Res*[J], 1996, 30: 193
- [6] Ohsava K *et al. J Biomed Mater Res*[J], 2000, 52: 460
- [7] Saito M *et al. J Orthop Sci*[J], 2000, 5: 275
- [8] Hu Jianzhong(胡建中) *et al. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation(中国临床康复)*[J], 2003, 7(6): 916
- [9] Chang J Y *et al. Biochem Biophys Res Comm*[J], 1998, 249(3): 817
- [10] David Hardisson *et al. Oral Oncology*[J], 2004, 40: 409
- [11] Yan Shangcheng(严尚诚) *et al. Chinese Journal of Orthopaedics(中华骨科杂志)*[J], 1997, 17(3): 167
- [12] Jarcho J *et al. Mater Sci*[J], 1976, 1(1): 2027
- [13] Levitt S R. *Biomed Mater Res*[J], 1969, 3: 683
- [14] Luo Xianzheng(罗先正) *et al. Surgery of Artificial Hip Replacement(人工髋关节学)*[M]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College Press, 2003: 76, 220
- [15] Groot K D *et al. J Biomed Mater Res*[J], 1987, 21: 1375

Preparation and Cytocompatibility of Bioactive β -TCP Coatings on Porous Magnesium Scaffold Surface

Geng Fang^{1,2}, Tan Lili¹, He Yonglian³, Yang Jingyu³, Zhang Bingchun¹, Yang Ke¹

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

(2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: A chemical deposition route was employed to prepare bioactive β -TCP coatings on porous magnesium scaffold surfaces. The phase identification and surface morphology of the specimens were studied by X-ray diffraction and scanning electron microscope, respectively. The cytocompatibility of treated porous magnesium scaffolds was studied in the present paper by using human osteoblast-like UMR106 cells. It was found that the cytotoxicity was in grade 1, indicating cytotoxicity free and without damage to DNA and no change to the cell cycle for the extracted liquid of treated magnesium. All the experimental results indicate that the treated porous magnesium has a good cytocompatibility and potential to be a new type of bone tissue engineering scaffolds.

Key words: porous magnesium; bone tissue engineering; β -TCP; cytocompatibility

Biography: Geng Fang, Candidate for Ph.D., Institute of Metal Research, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, P. R. China, Tel: 0086-24-23971676, E-mail: fgeng@imr.ac.cn; iamgengfang@163.com