

# CA-P/AZ31B 镁合金的生物相容性研究

郭 磊<sup>1</sup>, 刘 魁<sup>1</sup>, 张世亮<sup>1</sup>, 高晓宇<sup>1</sup>, 黄晶晶<sup>2</sup>, 杨 柯<sup>2</sup>

(1. 中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁 沈阳 110001)

(2. 中国科学院金属研究所, 辽宁 沈阳 110016)

**摘 要:** 将具有磷酸钙(CA-P)表面涂层的 AZ31B 镁合金植入家兔的骨骼和肌肉组织间, 观察了体内 CA-P/AZ31B 合金周围骨骼、肌肉组织的炎性反应, 以及 CA-P/AZ31B 合金的微观结构, 评价了 CA-P/AZ31B 合金的细胞毒性作用及溶血性。结果表明, CA-P 涂层可有效地延缓 AZ31B 镁合金降解产物的释放速度, 增加合金的表面粗糙度, 减轻合金在体内诱导的组织炎性反应, 显著降低合金的溶血率。CA-P/AZ31B 合金具有良好的生物相容性, 有望成为新一代可降解生物医学材料。

**关键词:** 镁合金; 磷酸钙; 生物相容性; 炎性反应

中图分类号: TG 146.2<sup>+</sup>2

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2009)01-0099-05

镁元素是一种人体所必需的微量元素, 人体内 50%~60% 的镁分布于骨组织中, 具有调节骨细胞的增殖与分化、参与体内多种组织的新陈代谢等重要生理作用。镁合金具有较高的比强度和比刚度, 能有效地缓解应力遮挡效应<sup>[1]</sup>。作为硬组织植入材料, 镁合金具有骨传导性、可降解性和无毒性等优势, 而且植入材料中的镁离子对人体的微量释放对组织愈合具有促进作用<sup>[2]</sup>。然而, 有关镁合金在生物医用材料方面的研究和应用, 目前在国内外还很少报道。这主要是因为镁的化学性质不稳定(-2.36VSCE), 且在腐蚀介质中产生的氧化膜疏松多孔(PBR=0.8), 会导致金属镁的快速腐蚀, 不能对基体产生很好的保护作用<sup>[3]</sup>。因此通过表面改性来提高金属镁在人体内的耐蚀性能并对其生物相容性进行评价是十分重要的。本研究采用表面磷酸钙(calcium phosphate, CA-P)涂层技术制备CA-P/AZ31B镁合金生物医学材料, 检测带有表面涂层的镁合金材料的体内和体外细胞毒性和生物相容性, 为可降解镁金属植入材料的研究与应用提供理论依据。

## 1 材料与实验方法

### 1.1 CA-P/AZ31B镁合金材料的制备

选用铸态AZ31B镁合金, 其化学成分见表1。试验材料经抛光后, 分别用乙醇和去离子水超声清洗, 然后采用恒电压阴极电沉积法及碱热处理在镁合金表面制备CA-P涂层, 获得CA-P/AZ31B镁合金材料。材

料经Co<sup>60</sup>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%)

Element	Ni	Cu	Zn	Al	Mn
Content	0.0003	0.0028	0.74	2.92	0.35

### 1.2 合金浸提液制备

将CA-P/AZ31B镁合金加工成45 mm×42 mm×2 mm的条形试件, 用环氧乙烷消毒后备用。另取合金置于20 mL、50 ℃的生理盐水中浸提72 h, 按照ISO10993-1标准(试样表面积/浸提介质=3 cm<sup>2</sup>/mL)制备材料浸提液, 24 h内进行试验。

### 1.3 合金的体内植入试验

取健康家兔27只(由中国医科大学实验动物中心提供), 体重2.0~2.5 kg。本研究中家兔的分组情况是: 正常对照组(9只)、AZ31B合金组(9只)和CA-P/AZ31B合金组(9只)。无菌条件下在距家兔股骨髁关节面18~20 mm处作股骨横形截骨, 制作骨折模型。复位后采用金属板和螺钉在股骨外侧固定骨折, 金属板表面以肌肉组织覆盖。AZ31B合金组采用AZ31B镁合金板和螺钉固定, CA-P/AZ31B合金组采用CA-P/AZ31B镁合金固定, 正常对照组不用金属板和螺钉固定。术后动物自由活动。于术后1、4、8周各处死3只动物, 观察皮肤切口和植入材料周围组织炎症反应, 取股骨远

收稿日期: 2008-01-27

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

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

端和周围肌肉组织作HE染色, 进行常规组织病理学观察。

### 1.4 合金的表面粗糙度测定

对于体内植入材料, 采用2201型表面粗糙度检查记录仪(哈尔滨量具刃具厂产)测定AZ31B镁合金的表面粗糙度 $R_z$ , 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, 取其平均值。

### 1.5 合金的微观分析

采用日本JEOL公司出产的JSM-840型扫描电镜(SEM)观察体内植入镁合金的表面微观结构, 并且进行材料表面的能谱分析。

### 1.6 合金的溶血试验

合金浸提液中的镁离子浓度([Mg])在COBAS生化自动分析仪(瑞士产)上采用血清放免法进行检测。取新鲜兔血, 用生理盐水稀释成2%兔血悬液。将合金浸提液、生理盐水(阴性对照)和双蒸水(阳性对照)各取1 mL, 分别加入2%兔血悬液1 mL, 每组各5份。在37℃水浴1h, 通过肉眼观察有无溶血, 随即在3000 g条件下离心3 min。取上清液1 mL, 加入0.2%  $Na_2CO_3$ 溶液3 mL, 在722型分光光度计于540 nm处测定各样本的光密度, 计算出溶血率为: 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) $\times 100\%$

## 2 实验结果

### 2.1 Ca-P/AZ31B合金对体内周围组织的影响

合金样品植入家兔1、4、8周后, 观察材料周围的肌肉和骨痂组织, 表明AZ31B合金组中有2只家兔的植入材料周围肌肉组织有明显水肿, 炎性反应为IV级。而Ca-P/AZ31B合金组和对照组的炎性反应均未超过III级, 符合国家标准GB/T16886.17-2005(III级以内)。光学显微镜下的组织观察表明, 术后1周时, AZ31B合金组可见材料周围有增生的肉芽和纤维组织, 周边有明显的炎性反应(图1c); 而在CA-P/AZ31B合金组中可见新生骨小梁, 纤维组织周边炎性细胞较多(图1e); 对照组中骨折端周围有较多新生骨小梁结构, 可见增生的骨母细胞, 周边很少见到炎性细胞和巨噬细胞(图1a)。术后4周时, AZ31B合金组中可见的新生骨小梁仍较少, 间质炎性反应减轻(图1d); CA-P/AZ31B合金组的肌肉和骨痂组织内间质炎性细胞较少, 可见较成熟的骨小梁结构(图1f); 在对照组的肌肉组织内未见有炎性细胞, 骨痂组织内有成熟的骨小梁结构(图1b)。术后8周时, 3组骨折端周围均有成熟的骨小梁结构, 间质炎性反应消失。

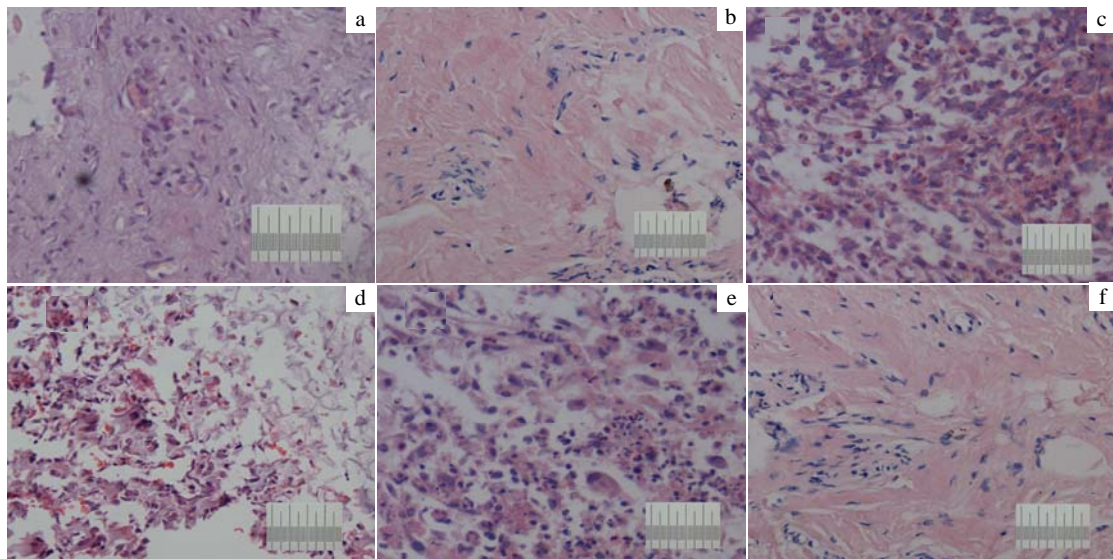


图1 体内植入CA-P/AZ31B后对周围组织的影响(HE染色)

Fig.1 Effect of CA-P/AZ31B magnesium alloy on the histopathology in vivo after implantation for different time: (a) the contrast group, for 1 week, (b) the contrast group, for 4 weeks, (c) AZ31B, for 1 week, (d) AZ31B, for 4 weeks, (e) CA-P/AZ31B for 1 week, and (f) CA-P/AZ31B for 4 weeks

### 2.2 CA-P涂层对AZ31B合金表面粗糙度的影响

本研究中利用表面粗糙度仪可以部分地量化描述

材料表面的形貌特征, 表2为AZ31B和CA-P/AZ31B合金板植入前(in vitro)和植入4周后(in vivo)的表面粗糙

度 $R_z$ 变化。从表2可以看出,植入4周后AZ31B合金的 $R_z$ 值明显增大,植入前后有明显差异。CA-P涂层明显增加了AZ31B合金的表面粗糙度,但CA-P/AZ31B合金植入前后的表面粗糙度变化不大。 $R_z$ 代表了微观不平整度,是10点高度的平均值。

表2 材料植入前后的表面粗糙度 $R_z$ 变化

Table 2 Surface roughness of implanted material in vivo and in vitro ( $\mu\text{m}$ )

Material	AZ31B	CA-P/AZ31B
In vitro	0.13±0.05	3.66±0.85
In vivo	5.25±1.28*	2.58±0.25

### 2.3 微观结构观察

图2为AZ31B合金和CA-P/AZ31B合金植入前后的SEM形貌照片及对应的能谱分析结果。图2a(植入前)和图2b(植入后)的对照表明,体内植入4周后,AZ31B合金表面形成凹陷和裂隙,并且结构疏松,孔隙结构

增多,表面粗糙度明显增加。而图2a(植入前)和图2e(植入后)的对照表明,CA-P/AZ31B合金经过 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 处理后,表面形成较为均匀的涂层;体内植入4周后CA-P/AZ31B合金表面的CA-P部分降解,形成均匀的结晶状颗粒堆积,孔隙结构和裂隙较单纯AZ31B合金明显减少。合金表面的能谱分析结果表明(图2c、2f),体内植入4周后CA-P/AZ31B合金表面的磷元素含量约为单纯AZ31B合金的3倍,镁、氧和钙元素含量也较单纯AZ31B合金明显增多(见表3)。

表3 材料的表面能谱分析结果

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

Element	AZ31B	CA-P/AZ31B
C	55.60	7.31
O	33.93	71.08
Mg	0.18	2.27
P	3.77	10.33
Ca	6.16	8.07
Na	0.36	1.54

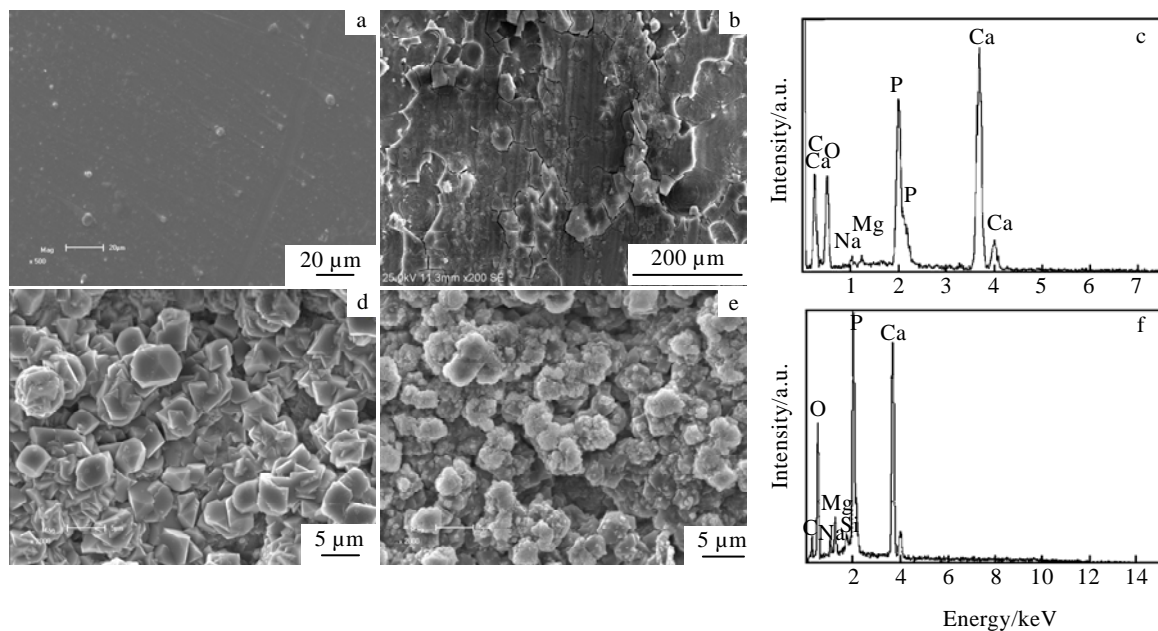


图2 材料的SEM表面形貌及对应的能谱分析结果

Fig.2 SEM images and EDS analysis on surface of the materials: (a) AZ31B before implantation, (b) AZ31B after 4 weeks implantation, (c) EDS of AZ31B after 4 weeks implantation, (d) CA-P/AZ31B before implantation, (e) CA-P/AZ31B after 4 weeks implantation, and (f) EDS of CA-P/AZ31B after 4 weeks implantation

### 2.4 CA-P 涂层对 AZ31B 合金溶血性的影响

试验表明,单纯AZ31B合金的浸提液中Mg浓度高于正常兔血清含量的30倍,而CA-P/AZ31B合金的浸提液中Mg含量在机体正常范围之内,表明CA-P涂层能有效地减慢镁金属降解产物的释放速度。溶血试验

结果表明(表4),AZ31B合金出现了溶血现象,溶血率为69%;而CA-P/AZ31B合金溶血率仅为2.5%,符合国家标准GB/T16886.17-2005(溶血率小于5%)。由此可见,AZ31B镁合金经过表面CA-P涂层处理后,具有良好的生物相容性,有望成为一类新型生物医学材料。



表4 材料溶血性检测结果

Table 4 Hemolysis test result of the materials

Leaching fluid	AZ31B	CA-P/AZ31B
[Mg](mmol/L)	84.4±3.5	2.7±0.5
Hemolysis/%	69.0±4.8	2.5±0.8

### 3 实验讨论

作为金属材料的镁及镁合金具有良好的力学强度，在机体内的降解产物具有生物活性且无毒副作用等优势。但金属镁作为生物医学材料的研究和应用在国内外还少有报道。这主要因为镁的化学性质活泼，耐腐蚀性能差，而且镁表面生成的氧化膜为多孔状，不具有对基体的保护作用。一些传统的表面改性方法，如化学转化膜处理和阳极氧化处理，能有效地提高镁及镁合金的耐腐蚀性能。然而，作为生物医学材料，表面改性后的镁及其合金不但要具有优异的耐腐蚀性能，而且表面涂层还要具有优良的生物相容性。Ca-P涂层的化学成分与生物骨组织中的磷酸钙相似，具有良好的生物相容性和生物活性。金属基体上的Ca-P涂层是将具有生物活性的Ca-P化合物与金属基体复合，使材料既具有金属的强度和韧性，又具有Ca-P表面生物活性。由于Ca-P在酸性介质中溶解度增加，形成微碱性环境<sup>[4]</sup>，可与酸性降解产物发生反应，降低了材料内部酸性降解产物的自催化效应及其产生速度，因而会对材料周围的pH值下降有一定缓冲作用。本研究中的SEM观察表明，单纯AZ31B合金在体内植入4周后表面形成了片状疏松氧化层和裂隙，证实AZ31B合金在体内的耐腐蚀性能差，而Ca-P/AZ31B合金的表面上分布有许多均匀的Ca-P颗粒，类似一种物理屏障，可减慢水分子等降解介质的进入和降解产物的释放速度。在植入试验中，Ca-P/AZ31B合金植入肌肉和骨组织后，动物伤口I期愈合，无感染和窦道形成，组织学观察表明组织炎症反应轻，未见大量的炎症细胞和巨噬细胞的集聚。

骨基质的微观研究证实，Ca-P溶解释放的Ca<sup>2+</sup>离子和PO<sub>3</sub><sup>-4</sup>离子可能沉积在局部，与钙化骨基质形成骨性结合<sup>[5]</sup>。在本研究中，发现植入体内的Ca-P/AZ31B合金表面上的镁、磷和钙元素含量均较AZ31B合金明显增多。而Mg离子、Ca<sup>2+</sup>离子和PO<sub>3</sub><sup>-4</sup>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<sup>[6,7]</sup>。Zreiqat等人报道镁增加骨细胞的附着，可能与骨细胞高表达浓缩 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白受体有关<sup>[8]</sup>。另外，镁能加快磷酸钙化合物在体内的沉淀作用，能够利用它的特性诱发或增加骨传导性，同时也能改善耐腐蚀性<sup>[9]</sup>。在AZ31B合金表面上设计和制备具有理想厚度、致密度和结晶度的Ca-P涂层，阐述镁离子在细胞内外诱导的生物学效应及其作用机制，将是进一步的研究方向。

### 4 结论

CA-P涂层可有效地延缓AZ31B镁合金降解产物的释放速度，增加合金的表面粗糙度，减轻合金在体内诱导的组织炎症反应，显著降低合金的溶血率，使合金符合生物医学材料的溶血性要求。CA-P/AZ31B镁合金具有良好的生物相容性，有望成为新一代可降解生物医学材料。

致谢：本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] Wang Qintao(王勤涛), Zhang Yumei(张玉梅), Hu Naisai(胡奈赛) *et al. Rare Metal Materials and Engineering* (稀有金属材料与工程) [J], 2004, 33(4): 442
- [2] Witte F, Fischera J, Nellesenb J *et al. Biomaterials* [J], 2006, 27(9): 1013
- [3] 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
- [4] Bakos D, Soldan M, Hernandez-Fuentes I. *Biomaterials*[J], 1999, 20(2): 191
- [5] Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M *et al. Biomaterials* [J], 2003, 24 (19): 4913
- [6] Leeuwenburgh S, Layrolle P, Barrere F *et al. Journal Biomed Mater Res*[J], 2001, 56(2):208
- [7] Yamada S, Heymann D, Bouler J M *et al. Biomaterials* [J], 1997, 18 (9):1037
- [8] Zreiqat H, Howlett C R, Zannettino A *et al. J Biomed Mater Res* [J], 2002, 62(2): 175
- [9] Wine F, Kaese V, Haferkamp H *et al. Biomaterials*[J], 2005, 26 (17): 3557

## Biocompatibility of CA-P/AZ31B Magnesium Alloy

Guo Lei<sup>1</sup>, Liu Kui<sup>1</sup>, Zhang Shiliang<sup>1</sup>, Gao Xiaoyu<sup>1</sup>, Huang Jingjing<sup>2</sup>, Yang Ke<sup>2</sup>

(1. Department of Orthopedic Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

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

**Abstract:** The AZ31B magnesium alloy coated with calcium phosphate (CA-P/AZ31B) was implanted in rabbit skeletal and muscular tissue in this study. The inflammatory reaction in skeletal and muscular tissue was observed around the magnesium alloy in vivo. The microstructure and cytotoxic effect of the magnesium alloy were detected. The results show that the release and degradation process of AZ31B magnesium alloy was efficiently delayed by coated with CA-P. The surface roughness of AZ31B magnesium alloy was raised by coated with CA-P, whereas the inflammation induced by AZ31B magnesium alloy was inhibited in vivo. By hemolysis tests, the hemolytic effect was significantly decreased for the CA-P/AZ31B magnesium alloy coated with CA-P. Therefore, the alloy would be a new generation of degradable and biocompatible materials for medical applications.

**Key words:** magnesium alloy; calcium phosphate; biocompatibility; inflammation

---

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