

纯镁在动物体内骨诱导性能的研究

高家诚, 乔丽英, 王 勇, 辛仁龙

(重庆大学, 重庆 400045)

摘 要: 将改性前后的 4N-Mg 以及 TC4 合金对照样植入白兔股骨, 术后 2, 6, 12 w 时取 1 只处死, 进行 X 线片检查, 血镁浓度测试, 并对标本进行 SEM 观察、EDS 分析, 以及组织切片光镜观察。结果表明, 骨内植入试验中, 动物血镁浓度均在正常值范围之内; 镁基植入材料显示出较好的骨结合性和骨诱导性, 新生骨组织矿化明显, 新生骨层上有排列整齐的破骨细胞; 改性镁基材料的腐蚀降解速率明显减小。初步表明镁基材料有较好的骨诱导性能, 改性对镁基材料腐蚀降解有调控作用。

关键词: 镁; 表面改性; 生物相容性; 骨诱导性

中图分类号: TG172

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2010)02-0296-04

近年来, 随着科学技术的进步, 将镁作为骨组织植入材料的研究重新受到了国内外学者的关注, 成为新的研究热点^[1]。大多数研究集中在镁基材料的表面改性及其在仿生体液中的腐蚀行为^[2-6], 部分学者对镁合金的生物力学性能进行了评价^[7]和新型镁基材料的开发^[8,9]。但是, 镁基材料的腐蚀速率过快, 不可避免地会产生气体而导致皮下气泡, 使血清中的镁离子浓度超标。镁基植入物是否具有骨诱导活性等, 系统深入的研究鲜见报道^[10-13]。显然, 镁合金能否成为医用可降解材料, 其安全性和降解速率的控制是两个基本条件。一方面, 可降解生物材料要求材料降解速度与组织新生或者愈合速度之间匹配, 故镁基材料在生理环境下的腐蚀降解过程和机制、过程控制方法等问题还有待进一步研究。另一方面, 镁基生物材料的生物相容性的系统评价是镁基材料成为医用材料的基础; 镁对宿主生理各方面的影响需要深入探讨, 作为硬组织植入物, 对其成骨行为更需要进行多方面的研究。本实验按 GB/T16886.6-1997 idt ISO10993.11 研究纯镁和镁钙合金改性前后的生物相容性和生物活性, 以探明镁基生物材料与体内物质相互作用的过程机制及其对宿主的影响, 探讨镁基生物材料的骨响应机制, 为镁合金在生物医学领域的应用新思路提供理论和实践基础。

1 实 验

实验材料为铸态 4N-Mg(纯度为 99.99%的 Mg)

和经过热处理-硬脂酸改性的 4N-Mg(S-Mg)^[14]。试样尺寸为 $\Phi 2 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$, 试样分别在丙酮、乙醇与蒸馏水中超声清洗, 紫外照射灭菌消毒。对照组试样为 TC4 合金(西北有色金属研究院提供)。

健康新西兰大耳白兔 8 只(重庆医科大学动物实验中心提供), 体重 2.2-2.6 kg, 雌雄不限, 随机植入 4N-Mg, S-Mg 和 TC4 合金对照样。

植入时, 用 2.5%戊巴比妥钠静脉麻醉。无菌条件下, 于一侧股骨钻 $\Phi 2 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ 骨腔洞。将圆柱体材料植入骨腔洞内, 圆柱体低于骨质表面。生理盐水冲洗伤口后, 缝合骨膜、皮肤。两组动物分笼喂养。植入后各组 2, 6, 12 w 时取 2 只处死。其余 2 只作备用。试验过程中进行如下分析: (1) 在术后及 2, 6, 12 w 时牺牲动物前对植入材料部位进行 X 线片检查, 跟踪植入区的生长恢复过程; (2) 牺牲动物时取其血液进行血镁浓度测试; (3) 将植入材料及周围骨组织完整取出。一组用于组织切片观察; 一组用于扫描电镜(SEM)观察及能谱分析(EDS)。组织切片标本用 10%福尔马林固定。其中, 1 期和 3 期标本常规脱钙处理、脱水、切片, 石蜡包埋、HE 染色; 2 期标本进行不脱钙切片观察, 二甲苯染色。对于进行 SEM 和 EDS 分析的标本, 分别用无水乙醇和叔丁醇逐级脱水, 真空冷冻干燥, 在离子溅射仪中喷金后, 使用 KYKY21000BG 型扫描电镜进行表面观察及 TN25400 型 X 射线能谱仪进行能谱分析。

收稿日期: 2009-06-17

基金项目: 国家自然科学基金(30670562)

作者简介: 高家诚, 男, 1947 年生, 教授, 重庆大学国家镁合金材料工程技术研究中心, 重庆 400045, 电话: 023-65102821, E-mail: gaojch@cqu.edu.cn

2 结果及分析

2.1 一般观察

术后兔生命体征平稳，术区无红肿，化脓，未见不适反应，无一因手术致死。术后第 2d 可进食，体重逐渐增加。实验组兔子术后腿功能恢复良好，行走自如，未见明显功能障碍。2 w 牺牲动物时，两组动物各方面均无异常，手术创口愈合较好，没有感染，但可见创口；6 w 时，两组动物手术创口愈合均非常好，看不见创口。肌肉与肌肉缝口消失，肌肉与骨间结合好，无明显皮下气泡。纯镁组骨表面较平整，愈合好；S-Mg 组，骨愈合好，骨增生明显；12 w 取材时，骨种植材料处愈合较好。

2.2 X 线片观察

分别于术后 2, 6 和 12 w 进行 X 射线检查，结果如图 1 所示。术后 2 w 镁基植入材料较清晰；6 w 后镁基植入材料边界较 2 w 阴影模糊，镁基材料植入部位边缘部分已逐步降解并与动物骨紧密相连；而对照组 TC4 合金骨缺损边缘及植入材料无明显变化；术后 12 w 实验组骨缺损边缘与植入材料界面更加模糊，而且植入部位阴影缩小，材料和骨结合进一步紧密，骨痂成熟，骨缺损区阴影密度大部分接近宿主骨。其中改性的镁基材料试样降解速度相对未处理试样慢。

2.3 血镁浓度测定

在术后 2, 6 和 12 w 牺牲动物前所进行的血镁浓度测试结果分别为：1.42, 1.18, 1.21 mol/L。可见，动物血镁浓度均在正常值范围之内。

2.4 扫描电镜观察

图 2 为扫描电镜下低放大倍数显示的植入 2 和 12 w 后，镁基材料和 TC4 合金对照植入体与原骨组织之间新骨的生长情况。从图 2 可以看出，植入 2w，材料和骨尚未完全愈合，在标本制作过程中造成材料和骨的部分分离，TC4 合金植入体与骨质之间有裂隙，镁基材料与骨之间界面处空隙不明显。植入 12w 后，在材料制作过程中未见材料和骨的分离，植入物与骨结合较紧密。TC4 合金与原骨之间已形成接触性生长，无明显新骨层生成；镁基植入物，伴随着材料的降解界面处有新类骨质形成，镁基材料与新骨之间的结合界面模糊不清，新骨的成熟度较高。

2.5 X 射线能谱分析

材料植入 2 w 后的 X 射线能谱分析显示，界面处由 Ca、P、Mg、Na、C、O 元素组成。镁基植入材料与骨的界面处，钙磷元素含量逐渐增加，而 TC4 合金对照样与骨的界面处未出现明显的钙磷富集现象。材料植入 12 w 后的 X 射线能谱分析表明，镁基

植入材料进一步降解，界面处形成了钙磷含量较高的新生骨层(NB)。图 3 为 S-Mg 植入材料区域的面扫描

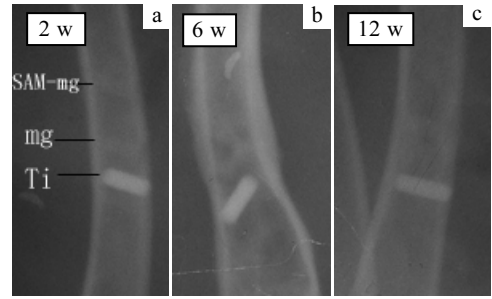


图 1 术后试样植入部位 X 光照片

Fig.1 X-ray photograph of implant parts after operation: (a) 2 w, (b) 6 w, and (c) 12 w

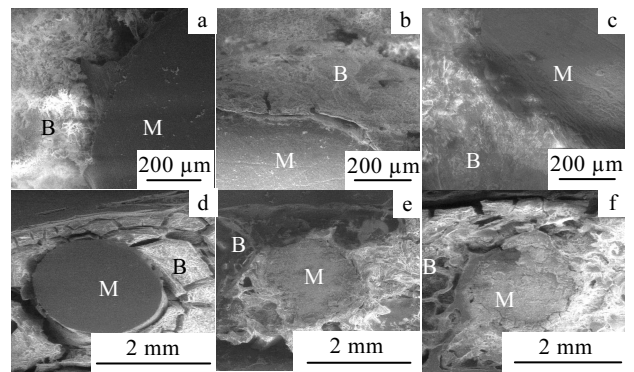


图 2 2 w 和 12w 后植入物与骨界面组织形貌

Fig.2 SEM images of histological interface of implants after 2 w(a, b, c) and 12 w(d, e, f) after implantation: (a, d) TC4, (b, e) Mg, (c, f) S-Mg

照片，从中可以看出，在植入材料与骨的界面处形成了钙磷含量较高的较成熟的新生骨层。此层 Ca 含量达 24%，P 达到 13%，Mg 含量达 2.1%，Ca/P 比约为 1.85；新生骨层的钙磷峰明显高出原骨组织，此新生骨层外有 C 元素的富集。此层平均厚度约为 0.19 mm，最厚处达 0.31 mm。

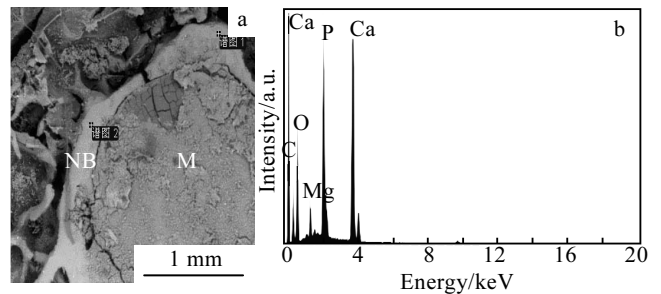


图 3 S-Mg 界面处形貌和能谱分析(mass fraction %) (12 w)

Fig.3 Elements analysis of interface of S-Mg after implantation for 12 w: (a) morphology, and (b) EDS

未改性的纯镁植入材料区域 12 w 的面分析及线扫描结果与改性的纯镁植入材料相类似。新生骨层约为 0.25 mm，此层 Ca 含量达 22%，P 达到 13%，Mg 含量达 2.2%，Ca/P 比约为 1.84，C 含量为 17%。而 TC4 合金对照样植入区域的元素分析结果，没有出现像镁基植入材料与骨界面处的新生骨层。

硬脂酸自组装改性的镁基植入物的降解速度明显比未改性的纯镁植入物要慢，12 w 时未改性纯镁的植入体降解较快的部分，直径最小处已从 2 mm 变为 1.07 mm，而 S-Mg 试样的直径仅减少了约 0.2 mm(图 4)。EDS 分析显示，12 w 时镁基植入材料的界面处形成的新生骨层的 Ca、P、C 含量与皮质骨相当，并且新生骨层外伴有 C 元素的富集。

2.6 组织切片光镜观察

组织切片的光镜观察结果如图 5 所示。术后 2 w，植入材料和宿主骨界面之间可见炎性细胞浸润，有纤维结缔组织，未见明显类骨质。术后 6 w，TC4 合金对照植入样与宿主骨的界面处仍没有出现新骨，而镁基植入样与宿主骨的界面处有蓝紫色骨样物质。术后 12 w，高倍镜下可见镁基植入物与宿主界面的新生骨

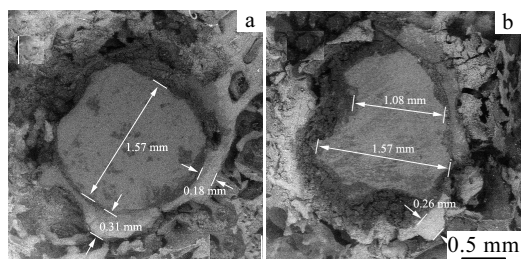


图 4 12 w 4N-Mg 组植入物和新生骨层尺寸

Fig.4 Dimension of residual of implantation and new bone in 4N-Mg group for 12 w: (a) S-Mg, and (b) 4N-Mg

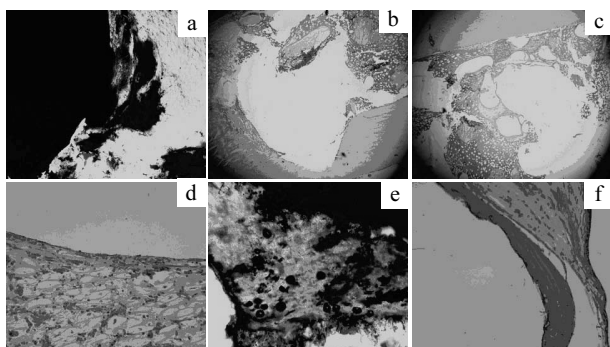


图 5 术后 2, 6, 12 w 组织学观察

Fig.5 Histological examination of the tissues for 2 (a, d), 6 (b, e) and 12 (c, f), respectively after the operation: (a, b, c)Ti; (d, e, f) Mg

组织矿化明显，材料和骨缺损之间骨质进一步成熟，新生骨层上有排列整齐的骨细胞，材料周围仍有胶原纤维组织存在，材料和骨之间仍可见到薄层纤维膜；但是 TC4 合金对照样周围无此明显类骨层生成。

3 结 论

1) 术后镁植入材料边界逐渐模糊，植入试样边缘部分逐步降解并与动物骨紧密相连。术后 12 w 实验组植入部位阴影缩小，材料和骨结合紧密，其中改性镁的降解速度相对未处理样更慢。

2) 纯镁和改性镁两组的动物血镁浓度在实验条件下均在正常值范围之内。

3) 植入 12 w 后，镁与新骨之间的结合界面模糊不清，材料与骨结合较紧密；伴随着镁植入物的降解，界面处出现新类骨质，TC4 合金对照样与骨之间未发现类骨层。

4) 镁具有良好的骨诱导性，植入 2 w 后的 X 线能谱分析显示，镁与骨的界面处有明显的钙磷富集，12 w 后镁植入材料进一步降解，界面处形成了钙磷含量较高的新生骨层。而对照样 TC4 合金无此现象。

5) 术后 6 w，镁植入样与宿主骨的界面处有蓝紫色骨样物质。12 w，可见镁植入物与宿主界面的新生骨组织矿化，材料和骨缺损之间骨质进一步成熟、形成骨质，新生骨层上有排列整齐的骨细胞。TC4 合金对照样周围无此明显类骨层。

参考文献 References

[1] Gao Jiachen(高家诚), Qiao Liying(乔丽英), *Journal of Functional Materials*(功能材料)[J], 2008, 39(5): 705

[2] Gao Jiacheng, Wu Sha, Qiao Liying. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*[J], 2008, 18(3): 588

[3] Muller, Wolf Dieter. *Materials Research*[J], 2007, 10(1): 5

[4] Ren Yibin. *Key Engineering Materials*[J], 2007, 342-343: 601

[5] Song Guangling. *Corrosion Science*[J], 2007, 49: 1696

[6] Liu Chenglong. *Journal of Vacuum Science and Technology A: Vacuum Surfaces and Films*[J], 2007, 25(2): 334

[7] Qiao Liying, Gao Jiacheng, Wang Yong. *Materials Science Forum*[J], 2007, 546-549: 459

[8] Witte Frank. *Biomaterials*[J], 2007, 28: 2163

[9] Liang H. *Applied Surface Science*[J], 2007, 253: 3326

[10] Witte F. *Biomaterials*[J], 2005, 26(17): 3557

[11] Masayuki Okazaki. *J Oral Tissue Engin*[J], 2004, 1(1): 31

[12] Witte F. *Journal of Biomedical Materials Research-Part A*[J], 2007, 81(3):748

[13] Duygulu O *et al. Materials Science Forum*[J], 2007,

546-549(1): 421

Yong(王勇) *et al.* *Rare Metal Materials and Engineering* (稀

[14] Gao Jiacheng(高家诚), Li Longchuan(李龙川), Wang

有金属材料与工程)[J], 2005, 34(6): 903

Research on Bone Inducement of Magnesium in Vivo

Gao Jiacheng, Qiao Liying, Wang Yong, Xin Renlong

(Chongqing University, Chongqing 400045, China)

Abstract: The 4N-Mg alloys with and without modification and the TC4 alloy were embedded in the thigh bones of rabbits. The slices were tested by X-ray method and the concentrations of Mg^{2+} ion in blood were measured for the died rabbits after operation for 2, 6, and 12 w, respectively. The specimens were analyzed by SEM and EDS, and tissue slices were observed by optical microscope. The vivo results show that the magnesium concentrations in the blood of two groups of animal subjects were in the normal scale. The Mg-based materials have good bone inducement and show the better capability of bonding with bone. The new bone mineralizes obviously on the interface. And on the new bone, the osteoclast cells array orderly. The untreated magnesium-based materials are corroded faster than the treated magnesium-based materials. All results indicate that the Mg-based materials show better biocompatibility and capacity to induce new bone, and the surface modification has an effect to control the corrosion rate of Mg-based biomaterials.

Key words: magnesium; surface modification; biocompatibility; bone inducement

Corresponding author: Gao Jiacheng, Professor, National Engineering Research Center for Magnesium Alloys, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China, Tel: 0086-23-65102821, E-mail: gaojch@cqu.edu.cn