

超声辅助微弧氧化钛合金表面制备含镧涂层的生物相容性评价[☆]

刘继光¹, 包殿瑞¹, 毕庆伟², 邬志锋¹, 李慕勤³

Ultrasound-assisted micro-arc oxidation to prepare biocoatings containing lanthanum on the surface of titanium alloy: Biocompatibility evaluation

Liu Ji-guang¹, Bao Dian-rui¹, Bi Qing-wei², Wu Zhi-feng¹, Li Mu-qin³

Abstract

BACKGROUND: Rare earth elements have some biological effects, and broad-spectrum anti-bacterial, anti-inflammatory and anti-virus capabilities, they can increase the bonding strength.

OBJECTIVE: To introduce rare earth lanthanum into the implant coating, and to evaluate the biocompatibility of ultrasound-assisted micro-arc oxidation preparing the lanthanum biocoating.

METHODS: Using ultrasound-assisted micro-arc oxidation, the biocoating containing lanthanum was prepared on the surface of the near β -type titanium alloy, and implanted in rabbit femur. The titanium alloy matrix and the micro-arc oxidation biocoating without lanthanum served as the control group. Optical microscope was used to observe the formation of new bone; Scanning electron microscopy was applied to observe the combination interface of implant and bone, and the bone residue after pulling the implant; and the bone contact rate was statistically analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: In the experimental group, the new bone formed surrounding the implant without any fibers and osteoclasts; Scanning electron microscopy and bone contact rate are the best in the experimental group and the worst in the titanium alloy group. This shows that ultrasound-assisted micro-arc oxidation preparing the lanthanum biocoating can achieve high osseointegration and good biocompatibility.

Liu JG, Bao DR, Bi QW, Wu ZF, Li MQ. Ultrasound-assisted micro-arc oxidation to prepare biocoatings containing lanthanum on the surface of titanium alloy: Biocompatibility evaluation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(29): 5351-5354. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 稀土元素具有一定的生物效应, 也有广谱抗菌、抗炎和抗病毒的能力, 能提高涂层结合强度作用。

目的: 在种植体涂层中引入稀土镧, 对引入稀土元素镧的钛基超声辅助微弧氧化涂层的生物相容性进行评价。

方法: 利用超声辅助微弧氧化在 β 型钛合金表面制备含镧生物涂层, 并植入家兔股骨内。以钛合金基体和未加镧生物涂层作对照。采用光学观察新骨形成, 通过扫描电镜观察种植体与骨的结合情况和拔出种植体后其表面骨残留, 并对骨接触率进行数据统计。

结果与结论: 实验组种植体周围新骨形成良好, 未见纤维形成和破骨细胞; 扫描电镜观察及骨接触率以实验组最好, 钛合金组最差。结果说明超声辅助微弧氧化制备的含镧生物涂层具有与新骨良好结合的能力, 显示出较好的生物相容性。

关键词: 种植体; 镧离子; 钛合金; 超声波; 微弧氧化

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.29.008

刘继光, 包殿瑞, 毕庆伟, 邬志锋, 李慕勤. 超声辅助微弧氧化钛合金表面制备含镧涂层的生物相容性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(29):5351-5354. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

采用微弧氧化技术在国内外医用生物材料的制备中得到较高关注, 研究表明微弧氧化膜能改善种植体的表面理化性能, 促进新骨形成和矿化, 提高种植体与骨的结合强度^[1-3]。但微弧氧化制备生物涂层仍有许多不足, 使其应用受到限制。

研究表明稀土元素具有一定的生物效应, 具有广谱抗菌、抗炎和抗病毒的能力, 能提高涂层结合强度作用^[4-5]。超声波在微弧氧化液中加快离子传输, 利于涂层成分均匀化^[6]。因

此, 实验利用超声辅助微弧氧化技术, 在Ca-P生物涂层基础上, 添加硝酸镧, 获得Ca-P-La种植体涂层, 改善涂层质量。通过植入新西兰白兔体内观察其与骨之间的结合情况和生物反应, 为涂层的临床应用提供理论依据。所做实验完全按照中国《医疗器械生物学评价》GB/T16886标准^[7], 对其涂层进行组织学观察和生物相容性评定。

1 材料和方法

设计: 超声辅助、细胞生物学体内观察实验。

时间及地点: 实验于2009-05/09在黑龙江

¹The Affiliated Second Hospital and Dental Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China; ²Heilongjiang Provincial Oral Disease Prevention Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China; ³Biomedical Materials Key Laboratory of Universities of Heilongjiang Province, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

Liu Ji-guang[☆], Doctor, Professor, The Affiliated Second Hospital and Dental Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China liujg5550@163.com

Correspondence to: Li Mu-qin, Doctor Professor, Biomedical Materials Key Laboratory of Universities of Heilongjiang Province, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China jmsdxlimuqin@163.com

Received: 2010-04-07
Accepted: 2010-05-14

¹佳木斯大学附属第二医院口腔医
院, 黑龙江佳木斯
市 154002; 黑
龙江省口腔病防
治院, 黑龙江哈尔
滨市 150001;
黑龙江省高校生
物医学材料重点
实验室, 黑龙江省
佳木斯市
154007

刘继光^{*}, 男,
1961年生, 黑龙
江省绥化市人, 汉
族, 2000年毕业
于日本大阪大学
博士学位, 教授,
主要从事口腔颌
面外科学研究。
liujg5550@
163.com

通讯作者: 李慕
勤, 博士, 教授,
黑龙江省高校生
物医学材料重点
实验室, 黑龙江省
佳木斯市
154007
jmsdxlimuqin@
163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)29-05351-04

收稿日期: 2010-04-07
修回日期: 2010-05-14
(20100407008/D·Y)

省高校生物医学材料重点实验室和佳木斯大学口腔医学研究所完成。

对象: 选用新西兰白兔27只, 雌雄均可, 体质量均约2.5 kg, 普通级, 由佳木斯大学动物实验中心提供, 实验动物编号(黑动字: DP01105002); 使用许可证号(SYXK(黑): 2006-004), 实验过程符合动物伦理学要求^[8]。

主要试剂及仪器:

主要仪器、试剂	来源
β型钛合金成分为 Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb	由西北有色金属研究院提供
双极性脉冲微弧氧化电源	哈尔滨工业大学 先进涂层技术实验室
JSM-6360LV 扫描电子显微镜	日本电子株式会社 JEOL
X-射线能谱仪(EDS/EDX)	美国伊达克斯有限公司
BIOQUANT OSTEO 高级 骨质形态学图像分析系统	美国 BIOQUANT 公司

方法:

种植体涂层的制备: 钛合金试样尺寸φ 3.3 mm×6 mm, 实验组和微弧氧化组清洗后进行超声辅助微弧氧化处理, 微弧氧化工作电压400 V, 电解液钙磷比0.9。其中实验组硝酸铜含量0.07 g/L; 钛合金组表面碱热处理。实验组试件扫描电镜形貌, 见图1; 能谱分析, 见图2。

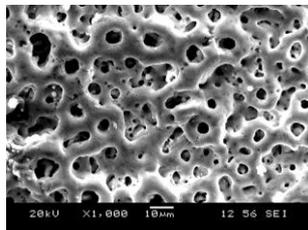


Figure 1 Coating surface morphology of the experimental group (Scanning electron microscope, ×1 000)

图1 实验组涂层表面形貌(扫描电镜, ×1 000)

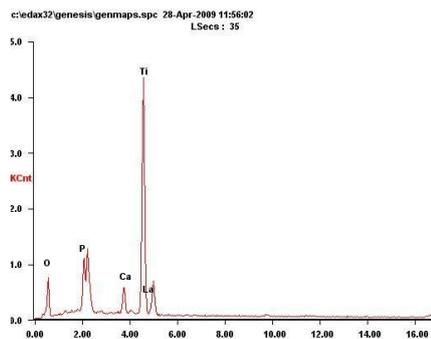


Figure 2 Coating spectrum analysis of the experimental group

图2 实验组涂层能谱分析

种植体的植入: 27只白兔随机分3组(1, 2, 3个月组), 每组9只。25%乌拉糖兔耳缘静脉全身麻醉, 每只每侧股骨远心端植入2枚种植体, 间距10 mm, 共植入108枚(见表1)。术后自然苏醒不限制活动, 每日肌注庆大霉素4万单位, 连注3 d。常规饲料喂养, 分别于术后1, 2, 3个月时处死各组动物。切取包含种植体在内的1 cm³组织块, 体积分数10%中性甲醛溶液固定3 d, 流水冲洗24 h。

Group	Experiment group	Micro-arc oxidation group	Titanium alloy group	Total
1 month	12	12	12	36
2 months	12	12	12	36
3 months	12	12	12	36

主要观察指标:

组织学观察: 每组每实验期取4块组织采用5%硝酸溶液脱钙3 d, 每8 h换液1次。完全脱钙后拔出种植体。进行组织学制片, 苏木精-伊红染色, 光镜观察。

扫描电镜观察: 每组每实验期另取4块组织, 每块组织取3等份横行截断。乙醇脱水, 临界点干燥, 喷金后采用SEM进行观察种植体与骨结合情况; 再取4块组织, 万能力学试验机上匀速加力拔出种植体, 干燥后SEM观察其表面骨残留状况。

骨接触率计量: 取扫描电镜观察过横截面的组织块进行重新打磨抛光。采用Bioquant软件对种植体与骨接触长度测量。每截面测量3遍取平均数。计算骨接触率, 公式如下:

$$\text{骨接触率} = \frac{\text{骨与种植体接触的长度}}{\text{种植体截面长度}} \times 100\%$$

统计学分析: 由第二作者采用SPSS 12.0软件包进行骨接触率的统计分析, *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有显著性意义。

2 结果

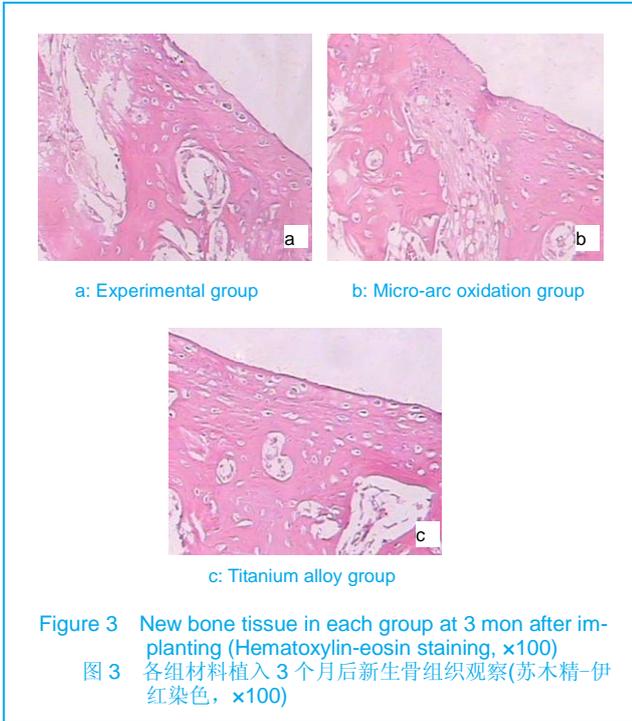
2.1 实验动物数量分析 纳入白兔共27只, 在实验过程中均健康无感染及死亡现象, 均未影响实验取材。

2.2 组织学观察

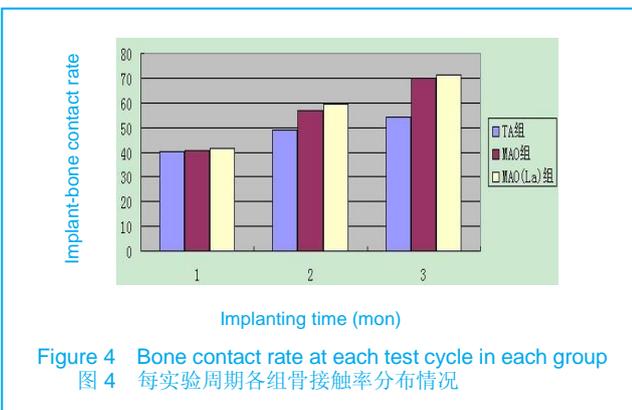
植入1个月时: 各组种植体周围均有新骨形

成, 但骨小梁较疏松成骨细胞分布其表面。

植入2个月和3个月: 可见新骨逐渐矿化, 骨小梁逐渐变粗致密有规则, 新骨由编织骨向板层骨转变, 能见成熟骨细胞。所有切片中种植体与骨接触处未发现纤维形成和破骨细胞, 细胞核与胞质内的核糖体着紫蓝色, 细胞外基质, 骨小梁等成分着红色; 空白处为种植体所在区域, 见图3。



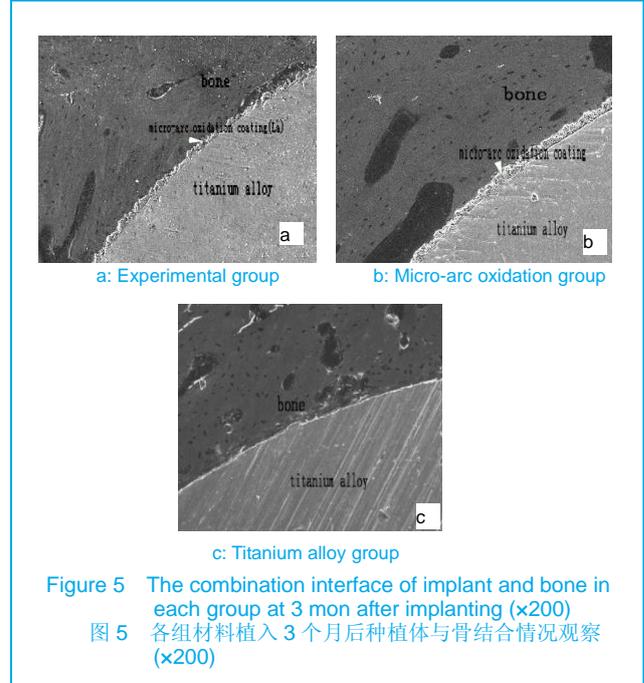
2.3 骨接触率及统计学分析 在植入1个月时接触率基本一致, 在40%~41%。2个月时实验组和微弧氧化组大致相同, 分别为57%和59%, 但钛合金组仅为49%骨接触率上升较慢。3个月时实验组和微弧氧化组都在69%~71%, 钛合金组只有54%。实验组骨接触率最高, 钛合金组最小。各种种植体与骨的接触率随着时间的延长不断的增加, 见图4。



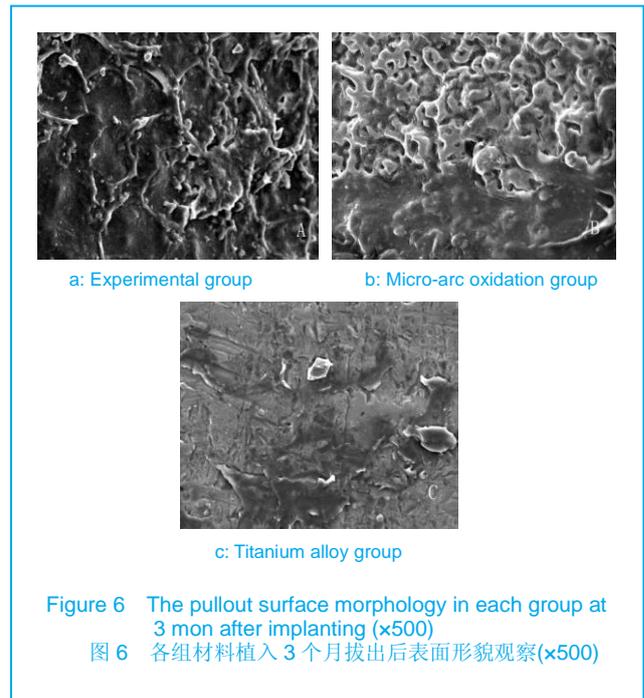
2.4 扫描电镜观察

骨与种植体界面的观察: 通过扫描电镜能够直接的观察到种植体与骨界面结合的细节。植入1个月各均见有

骨与种植体的结合, 但结合面积小。植入2个月种植体与骨结合逐渐增多, 结合较紧密, 能见到骨细胞留下的空隙, 实验组和微弧氧化组优于钛合金组, 并能见到骨组织沿种植体表面爬行的现象。植入3个月后各组骨组织与种植体结合良好, 结合长度增加, 结合更加紧密, 实验组表现更为突出, 见图5。图中见微弧氧化组涂层与种植体之间裂缝为电镜试件制作过程中机械外力所致。



种植体拔出后表面观察: 12周时实验组可见绝大部分表面已被薄层新骨覆盖, 弧氧化组也表现较大部分被覆盖, 但钛合金组仍然只有少量骨组织存在, 见图6。



1个月时除钛合金组基本没有骨组织残余外其余各

组均可见有新骨的残余附着在种植体表面, 微弧氧化小孔内有新骨基质但很少连成片。2个月时能见到小孔内有大量骨质, 并能小孔上骨质相连成片。实验组表现骨量较微弧氧化组更多, 钛合金组出现少量薄片骨质附着在表面。

3 讨论

钛和钛合金的本身生物惰性限制了它与骨组织不能直接结合, 种植体与骨组织的固定是一种紧密贴合的形态上的固定, 依赖于他们之间的机械咬合作用^[9-10]。本实验钛合金组的拔出种植体表面SEM观察中很少有骨组织附着证实其生物惰性没有较好的改善。

微弧氧化技术已成为成熟的医用生物材料表面改性的技术^[11-13]。超声波利用机械效应、空化效应和热效应, 在微弧氧化液中促进电解液中离子分布和传输, 利于涂层成分均匀化, 有效提高涂层分布均匀性及涂层的结合强度^[14-16], 故本实验通过超声辅助微弧氧化引入镧离子, 现将种植体植入动物体内进行观察, 致力于新型涂层材料的开发和完善。

实验分为实验组、微弧氧化组、钛合金组, 在大体观察中未见到毒性反应和感染现象。组织学观察中各组都有新骨形成, 并且3个月时实验组新骨表现成熟, 在实验全过程中实验组种植体周围未见到纤维形成和破骨细胞。说明实验组中组织没有对新涂层产生排异反应, 且新涂层具有良好的生物相容性, 可以在体内与新骨较好的结合。

实验在SEM观察中实验组和对照组的骨结合面积都随时间的延长而增加, 并结合良好, 骨接触率数据也证实这点^[17-18]。植入3个月时统计学分析实验组与钛合金组的骨接触率的差异有统计学意义($P < 0.05$), 实验组的数据比微弧氧化组高, 但差别无显著性意义($P > 0.05$), 说明超声辅助微弧氧化制备含镧离子涂层能够达到与常规微弧氧化涂层同样或更高的骨接触率。而利用超声辅助微弧氧化技术, 并在涂层中引入镧离子, 动物实验表明涂层仍具有良好的生物相容性和骨结合能力。

4 参考文献

[1] Liu YH, Li S. Cailiao Baihu. 2005;38(6):36-40. 刘耀辉,李颂.微弧氧化技术国内外研究进展[J].材料保护,2005,38(6):36-40.

[2] Ma CF, Li DM, Li HJ, et al. Diyi Junyi Daxue Xuebao, 2005, 25(1):62-65. 马楚凡, 李冬梅, 李贺军, 等. 微弧氧化方法在钛表面注入钙磷离子及对成骨细胞早期附着的影响[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(1):62-65.

[3] Wei Daqing, Zhou Yu, Dechang Jia, et al. Effect of applied voltage on the structure of microarc oxidized TiO₂-based bioceramic films. Materials Chemistry and Physics. 2007;104(1):177-182.

[4] Chen AM, Shi QS, OuYang YS, et al. Weishengwuxue Tongbao. 2009; 36(1):90-96. 陈爱美, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 稀土抗菌效应及应用的研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1):90-96.

[5] Cheng XY, Shi L. Yunhua yu Mifeng. 2006, 30(1):154-158. 程西云, 石磊. 稀土对陶瓷涂层的改性作用研究现状及发展趋势[J]. 润

滑与密封, 2006, 30(1):154-158.

[6] Aiqin Zhang, Muqin Li, Chen Ma. Study the Corrosion and Wear Resistance of Ultrasonic and Micro arc Oxidation Biocoating with Different Additives on Titanium. Collected Papers of Academic Conference of International Symposium on Chemical Engineering of New Materials 2009 (ISCENM). 2009, Harbin, China. 2009:324-331.

[7] 国家医药管理局医用高分子产品质量检测中心. GB/T 16886.6-1997. 医疗器械生物学评价-第6部分: 植入后局部反应实验[S]. 北京: 中国标准出版社出版, 1997:92-98.

[8] 国家药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心. GB/T16886. 2-2000, 医疗器械生物学评价第2部分: 动物保护要求[S]. 北京: 中国标准出版社出版, 2000:1-3.

[9] Lu X, Leng Y, Zhang XD, et al. Comparative study of osteoconduction on micromachined and alkali-treated titanium alloy surfaces in vitro and in vivo. Biomaterials. 2005;26(14):1793-1801.

[10] Yu ZT, Zhou L, Luo LJ, et al. Xiyou Jinsu. 2006, 30(2):226-230. 于振涛, 周廉, 罗丽娟, 等. 新型近β型医用钛合金TLM的加工、组织与性能[J]. 稀有金属, 2006, 30(2):226-230.

[11] Ma W, Liu BL, Wei JH, et al. Zhongguo Xinyiyao. 2003;2(12):12-14. 马威, 刘宝林, 魏建华, 等. 纯钛表面微弧氧化处理后的细胞毒性研究[J]. 中国新医药, 2003, 2(12):12-14.

[12] S Yu, ZT Yu. Preparation and activation of micro-arc oxidation films on a TLM titanium alloy. Biomedical Materials. 2008;3(4):889-892.

[13] Wang X, Zhou F, Pan JY, et al. Jixie Zhizao Yu Zhidonghua. 2009;38(4):6-10, 14. 王霄, 周飞, 潘建跃, 等. 钛合金表面微弧氧化技术的研究进展[J]. 机械制造与自动化, 2009, 38(4):6-10, 14.

[14] Xue JQ, WU CM. Jinshu Shijie. 2008, 22(1):25. 薛娟琴, 吴川眉. 超声波对溶液性质的影响[J]. 金属世界, 2008, 22(1):25.

[15] Sukti M, P. Senthil K, A.B. Pandit, Effect of liquid-phase properties on ultrasound intensity and cavitation activity. Ultrasonic Sonochemistry. 1998;5(3):113-118.

[16] Li JX, Zhang YM, Han Y. Shiyong Kouqiang Yixue Zazhi, 2007, 23(1):19-22. 李健学, 张玉梅, 憨勇. 占空比和脉冲频率对钛微弧氧化表面处理后与瓷结合强度的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2007, 23(1):19-22.

[17] Guo BS. Xitu. 1999;20(1):64-68. 郭伯生. 稀土在生物领域中的应用研究进展[J]. 稀土. 1999, 20(1):64-68.

[18] Liu DL, Wang XP, Yuan SF. Kouqiang Yixue Zhongheng Zaizhi. 2001;17(2):109-110. 刘大力, 王小平, 袁诗芬. 镧、钙、氟对釉质脱矿的影响---显微硬度测定[J]. 口腔医学纵横杂志, 2001, 17(2):109-110.

来自本文课题的更多信息一

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题意义: 实验利用超声辅助微弧氧化技术, 在Ca-P生物涂层基础上, 添加硝酸镧, 获得Ca-P-La种植体涂层, 改善涂层质量。通过植入新西兰白兔体内观察其与骨之间的结合情况和生物反应, 为涂层的临床应用提供理论依据。

课题评估的“金标准”: 所做实验完全按照中国《医疗器械生物学评价》GB/T16886标准, 对其涂层进行组织学观察和生物相容性评定。组织学观察利用脱钙石蜡切片苏木精-伊红染色光镜观察新骨形成, 利用扫描电镜观察种植体与骨组织结合情况, 均为直接观察, 均隶属于组织学范畴, 被认为是判断骨移植材料-骨界面愈合的“金指标”。

设计或课题的偏倚与不足: 兔股骨组织较硬, 脱钙处理时间仅为3d, 时间有一定局限性, 所以实验使用的是5%的硝酸和20%尿素的脱钙液, 硝酸属于强酸脱钙液, 脱钙较快, 并且骨组织不能长时间停留在硝酸中。在脱钙第3天时针刺微有阻力但可以穿过, 种植体拔出容易。另外, 从骨组织中拔出种植体的力量需要更好的控制, 因为力量偏差可能会导致植体表面骨残留量不同。

提供临床借鉴的价值: 作者曾设计进行不脱钙硬组织切片方法, 但是硬组织切片价格昂贵, 实验中需要切片, 磨片, 脱塑, 染色等步骤, 制片失败率较高, 磨片过程中种植体易脱离并使骨组织区域留有金属碎屑, 染色不均匀, 效果不理想, 本实验未采纳。而利用组织学切片进行观察, 制作方法成熟, 难度不高, 扫描电镜图像景深大成像更为清晰等优点。