

纯镁及两种不同涂层纯镁的溶血现象***

赵刚¹, 吴艳娟¹, 胡津², 刘广义², 李德超¹

Hemolysis phenomenon of pure magnesium and two different coating pure magnesium

Zhao Gang¹, Wu Yan-juan¹, Hu Jin², Liu Guang-yi², Li De-chao¹

Abstract

BACKGROUND: Although magnesium as implant material which has good biocompatibility and biodegradable absorption. However, excessive corrosion of magnesium will cause rapid decrease of the mechanical properties before rehabilitation of bone tissue.

OBJECTIVE: To detect the blood-compatibility of pure magnesium (MG), micro-arc oxidized magnesium (MAO) and dicalcium phosphate dihydrate coating formed on micro-arc oxidized magnesium (DCPD).

METHODS: MG, MAO and DCPD extracts were contacted with anticoagulation dilution rabbit blood. Sodium Chloride was used in negative control group; distilled water was used in positive control group. Centrifuged after mixing, the optical density value of supernatant was determined by spectrophotometer, and hemolytic rate was counted.

RESULTS AND CONCLUSION: Hemolytic rate of untreated pure magnesium extract group was 52.34%; the MAO and DCPDC extract group were 0.32% and 0.14%. Hemolytic rate of negative and positive group were 0% and 100%. The untreated pure magnesium showed a serious hemolysis. However, MAO and DCPD have excellent blood-compatibility, hemolytic rate is less than 5%, and they conform to the national standard requirement.

Zhao G, Wu YJ, Hu J, Liu GY, Li DC. Hemolysis phenomenon of pure magnesium and two different coating pure magnesium. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(34): 6339-6341. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 尽管作为植入材料镁具有良好的生物相容性及可降解吸收等优点, 但镁腐蚀过快, 它的快速腐蚀将引起其机械性能在骨组织康复之前就显著下降。

目的: 检测纯镁及微弧氧化、二水磷酸氢钙涂层后的纯镁的血液相容性。

方法: 将纯镁及微弧氧化、二水磷酸氢钙两种涂层后的纯镁浸提液与抗凝稀释兔血接触, 阴性对照组用为生理盐水, 阳性对照为蒸馏水。混匀后离心, 用分光光度计测定其上清液的A值, 计算溶血率。

结果与结论: 未经处理的纯镁浸提液组溶血率为52.34%, 微弧氧化涂层后的纯镁浸提液组溶血率为0.32%, 二水磷酸氢钙涂层后的纯镁浸提液组溶血率为0.14%, 阴性对照组溶血率为0, 阳性对照组溶血率为100%。提示未经处理的纯镁出现了较严重的溶血现象, 涂层后的纯镁血液相容性良好, 溶血率小于5%, 符合国家标准。

关键词: 纯镁; 微弧氧化; 二水磷酸氢钙; 溶血率; 口腔生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.34.017

赵刚, 吴艳娟, 胡津, 刘广义, 李德超. 纯镁及两种不同涂层纯镁的溶血现象[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(34):6339-6341. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前有很多种已应用于临床的骨断端固定材料, 均显示出一些弊端, 此外大多为不可降解材料, 须再次手术取出, 增加了患者痛苦及医疗费用负担。由于颌面部位置比较特殊, 二次手术创口可能直接影响患者美观, 因此, 寻找一种可以被人体吸收的骨断端固定材料是口腔医学领域倍受瞩目的研究课题之一。

作为机械性能近似于人骨的轻金属——镁, 由于具有生物相容性及可降解吸收性, 有望成为一类新型医用植入材料^[1-2]。镁密度与人密质骨密度极为接近; 镁是人体内仅次于钾的细胞内正离子, 主要分布于细胞内, 它参与体内一系列新陈代谢过程, 包括骨细胞的形成。

镁资源丰富、价格便宜^[3], 植入人体后可被降解吸收^[4]。用镁作硬组织植入材料, 不但不用考虑微量金属离子对细胞的毒性, 而且植入材料中镁离子对人体的微量释放还是有益的。作为植入材料, 尽管镁有诸多的优点, 但镁腐蚀过快, 它的快速腐蚀将引起其机械性能在骨组织康复之前就损失殆尽。

因此, 对镁表面改性技术完善成了解决镁在材料领域应用的关键^[5]。

本实验通过微弧氧化、二水磷酸氢钙涂层技术对镁表面进行处理, 以增加其耐腐蚀性能。为了验证纯镁材料的生物相容性, 课题从现行的国家标准中筛选出了细胞毒性实验、溶血实验、急性毒性实验、微核实验等实验。本文按照ISO和中国国家标准的相关规定, 主要对涂层后镁的血液相容性进行测试^[6]。

¹School of Stomatology, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China; ²School of Materials Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Zhao Gang ★, Master, Associate professor, School of Stomatology, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China zhaogangkq@126.com

Correspondence to: Li De-chao, Doctor, Professor, School of Stomatology, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China dechao12004@yahoo.com.cn

Supported by: Science and Technology Project of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2009-36*; Science and Technology Research Project of Jiamusi University, No. S22009-001*

Received: 2011-02-10 Accepted: 2011-03-10

¹佳木斯大学口腔医学院, 黑龙江省佳木斯市154007; ²哈尔滨工业大学材料科学与工程学院, 黑龙江省哈尔滨市150001

赵刚★, 男, 1975年生, 黑龙江省依兰县人, 硕士, 副教授, 主要从事牙缺损、缺失及牙颌畸形的修复与矫治研究。
zhaogangkq@126.com

通讯作者: 李德超, 博士, 教授, 佳木斯大学口腔医学院种植科, 黑龙江省佳木斯市154007
dechaoli2004@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)34-06339-03

收稿日期: 2011-02-10
修回日期: 2011-03-10
(20110106017/GW-L)

1 材料和方法

设计: 观察实验。

时间及地点: 于2009-12/2010-02在佳木斯大学基础学院生化实验室完成。

材料: 雄性健康新西兰大白兔, 体质量2.5 kg, 由佳木斯大学动物中心提供。2%草酸钾、水浴箱、分光光度计、离心机均有佳木斯大学生化实验室提供。纯镁(99.99%)、微弧氧化样品及二水磷酸氢钙涂层的样品均由哈尔滨工业大学提供。

实验方法:

涂层材料的制备: 按文献[7]中方法制作纯镁及纯镁微弧氧化、二水磷酸氢钙涂层。将纯镁(99.99%)用线切割的方法制成Φ10 mm×3 mm的圆片, 水砂纸打磨到2 000#。微弧氧化样品是纯镁在电解液成分15 g/L Na₂SiO₃·9H₂O, 8 g/L NaOH, 8g/L KF, 工作电压为450 V下放电10 min获得。将微弧的样品在Ca(NO₃)₂和K₂HPO₄中采用共滴定的方法室温下在其表面获得表面有二水磷酸氢钙涂层的样品。按GB/T16886.12-2005制备材料浸提液, 备用。

溶血实验: 由新西兰大白兔心脏采血20 mL, 将2%草酸钾1 mL加入20 mL新鲜兔血中制成抗凝兔血。取此兔血8 mL加入10 mL生理盐水, 制备成稀释兔血, 分别用试管取纯镁、涂层后的纯镁浸提液10 mL, 阴性对照组和阳性对照组分别为10 mL生理盐水和蒸馏水, 每组4只试管, 置于37 °C水浴30 min, 每只试管中均加入0.2 mL稀释兔血, 混匀后, 置于37 °C水浴箱中保温60 min, 1 000 r/min离心5 min, 吸取上清液移入比色皿中用分光光度计在波长为545 nm处测吸光度(A值), 根据结果按公式计算溶血度。

$$\text{溶血程度} = \frac{(\text{试验材料吸光度} - \text{阴性对照吸光度})}{(\text{阳性对照吸光度} - \text{阴性对照吸光度})} \times 100\%$$

主要观察指标: 纯美及微弧氧化、二水磷酸氢钙涂层后纯美的溶血率。

2 结果

纯美及微弧氧化、二水磷酸氢钙涂层后纯美的溶血率见表1。

表1 各组吸光度及溶血率
Table 1 Absorbance and hemolytic rate of in each group

Group	Absorbance	Hemolysis (%)
Magnesium extract		
Micro-arc oxidized magnesium extract	0.415 2	52.34
Dicalcium phosphate dihydrate coating formed on micro-arc oxidized magnesium extract	0.018 7	0.32
Negative	0.017 4	0.14
Positive	0.016 3	0.00
	0.762 0	100.00

由表1可见未经处理的纯镁出现较严重的溶血现象; 涂层后的纯镁血液相容性良好, 符合国家标准(溶血率<5%), 可认为涂层后的纯镁无溶血作用。

3 讨论

由于镁是化学活泼性高的金属, 表面氧化膜较疏松, 难以阻挡进一步腐蚀。因此, 要使镁替代其他金属生物材料成为可能, 必须对其进行表面改性, 以满足临床应用对生物材料耐腐蚀性能的要求。近年来通过涂层技术发展了一系列减缓镁腐蚀速率的方法, 镁表面处理不仅可以避免基体与腐蚀环境的直接接触, 而且可以引入一些具有生物相容性、生物活性的涂层来促进组织的愈合。包括电化学沉积、微弧氧化、以及在模拟体液中仿生生长。特别是仿生沉积涂层由于他们极好的生物相容性和促进骨生长的能力以及在较低温度下即可形成的特点在近期受到越来越多的关注。本实验利用化学方法在纯镁表面制备二水磷酸氢钙涂层, 以期减缓纯镁降解速率同时促进磷灰石的形成, 从而提高镁的生物活性。

血液相容性是衡量生物材料生物相容性好坏的一个重要评价指标。本实验采用了体外非直接接触法来考察纯美及微弧氧化、二水磷酸氢钙涂层后纯美的血液相容性。非直接接触法是利用和材料充分接触的浸提液来与新鲜血液接触, 从而考察血液的溶血情况。溶血试验是用于评价长期与人体接触材料的体外急性溶血活性^[8]。通过对材料与血细胞在体外接触过程中所致红细胞溶解和血红蛋白游离程度的测定, 对材料的体外溶血性进行评价。因该试验能敏感地反映试样对红细胞的影响, 故是一种特别有意义的材料筛选试验。通过对不同兔血的反应测定, 其平均溶血率为5%。一般来讲, 具有毒性物质的材料所造成的溶血反应程度较其在细胞培养实验按照标

准建议的方中所产生的毒性反应程度为大, 当在溶血试验中测得有溶血活动时可提示材料有毒性。本法对纯镁及涂层后的纯镁的溶血活性进行测试。

本实验结果显示, 未经处理的纯镁发生了较为严重的溶血现象, 经过微弧氧化、二水磷酸氢钙涂层后纯镁的血液相容性良好。出现此类实验结果可能是由于纯镁的耐腐蚀性能差, 在浸提过程释放到浸提介质中的镁离子较多, 因此浸提液中的镁离子浓度含量较高, 当新鲜稀释兔血与浸提液接触后, 红细胞细胞壁两边渗透压不同而产生溶血现象。经分析可以得出, 通过表面改性降低纯镁的腐蚀速度, 提高其耐腐蚀性能, 是可以避免纯镁出现溶血现象的。

综上所述, 尽管未经处理的纯镁出现的较严重的溶血现象, 但经涂层后的纯镁血液相容性良好, 说明通过合适的表面改性提高镁的耐腐蚀性能, 可以避免纯镁对人体产生有害的溶血现象。因此, 通过合适的表面改性后的纯镁是有可能作为生物材料应用于医学领域的。

4 参考文献

[1] Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials*. 2006; 27(9):1728.

[2] Zhang J, Zong Y, Yuan YY, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009; 13(29):5747-5750.
张佳, 宗阳, 袁广银, 等. 镁合金在生物医用材料领域的应用及发展前景[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(29):5747-5750.

[3] Li LC, Gao JC, Wang Y, Cailiao Daobao. 2003; 17(10):29-32.
李龙川, 高家诚, 王勇. 医用镁合金的腐蚀行为及表面改性[J]. *材料导报*, 2003, 17(10):29-32.

[4] Wu J, Wu FM. *Kouqiang Yixue*. 2007; 27(3): 159-161.
吴婕, 吴凤鸣. 新型口腔生物医用材料-镁及其合金[J]. *口腔医学*, 2007, 27(3): 159-161.

[5] Hu J, Wang C, Ren WC, et al. Microstructure evolution and corrosion mechanism of dicalcium phosphate dihydrate coating on magnesium alloy in simulated body fluid. *Mat Chem Physics*. 2010; 119: 294-298.

[6] Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, et al. Evaluation of the effect of acrylic bone cements on erythrocytes and plasmatic phase of coagulation. *Biomaterials*. 2001; 22: 1321-1326.

[7] Liu GY, Hu J, Ding ZK, et al. Bioactive calcium phosphate coating formed on micro-arc oxidized magnesium by chemical deposition. *Appl Surf Sci*. 2010; 257(6):2051-2057.

[8] Cai F, Chao YL, Liang X, et al. *Shiyong Kouqiang Yixue Zazhi*. 2001; 17(1):37-41.
柴枫, 巢永烈, 梁星, 等. G I - II 型医用玻璃渗透氧化铝陶瓷的生物安全性评价[J]. *实用口腔医学杂志*, 2001, 17(1):37-41.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 黑龙江省卫生厅科技项目(2009-36); 佳木斯大学科学技术研究项目(S₂2009-001)。

作者贡献: 第五作者进行实验设计, 实验实施为第一、二作者, 实验评估为第三、四作者, 资料收集为第二作者, 第一作者成文, 第五作者审核, 第一作者对文章负责。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

如何向 SCI 收录的优秀期刊投稿 Nature 审稿人是如何进行文献检索和阅读? ①(本刊发展部)

1. 如何进行文献检索

我是学自然科学的, 平时确实需要不少外文文献, 对于自然科学来讲英文文献检索首推 Elsevier, Springer 等。虽然这些数据库里面文献已经不算少了。但是有时还会碰到查不到的文献, 而这些文献的数据库我们所在研究所或大学又没有买, 怎么办? 我基本通过以下向个途径来得到文献。

1. 首先在 Google 学术搜索里进行搜索, 里面一般会搜出来你要找的文献, 在 Google 学术搜索里通常情况会出现“每组几个”等字样, 然后进入后, 分别点击, 里面的其中一个就有可能下全文, 当然这只是碰运气, 不是万能的, 因为我常常碰到这种情况, 所以也算是得到全文文献的一条途径吧。可以试一下。同时, 大家有没有发现, 从 Google 学术搜索中, 还可以得到一些信息, Google 学术搜索中会显示出你搜索文章的引用次数, 不过这个引用次数不准确, 但是从侧面反应了这篇文章的质量, 经典文章的引用次数绝对很高的。同时如果你用作者进行搜索时, 会按引用次数出现他写的全部的文章, 就可以知道作者的哪些文章比较经典, 在没有太多时间的情况下, 就可以只看经典的。

2. 如果上面的方法找不到全文, 就把文章作者的名字或者文章的 title 在 Google 里搜索 (不是 Google 学术搜索), 用作者的名字来搜索, 是因为我发现很多国外作者都喜欢把文章的全文 (PDF) 直接挂在网上, 一般情况下他们会把自己的文章挂在自己的个人主页 (home page) 上, 这样可能也是为了让别的研究者更加了解自己的学术领域, 顺便推销自己吧。这样你就有可能下到你想要的文献的全文了。甚至可以下到那个作者相近的内容的其它文章。如果文献是由多个作者写的, 第一作者查不到个人主页, 就接上面的方法查第二作者, 以此类推。用文章的 title 来搜索, 是因为在国外的网站上, 例如有的国外大学的图书馆可能会把本校一年或近几年的学术成果的 Publication 的 PDF 全文挂在网上, 或者在这个大学的 ftp 上也有可能会有这样类似的全文, 这样就很可能会免费下到你想要的全文了。

3. 如果上面两个方法都没有查到你要的文献, 那你就直接写邮件向作者要。一般情况下作者都喜欢把自己的文献给别人, 因为他把这些文献给别人, 也相当于在传播他自己的学术思想。下面是本人向老外作者要文献的一个常

用的模板:

Dear Professor xxx

I am in xxx Institute of xxx, Chinese Academy of Sciences. I am writing to request your assistance. I search one of your papers:..... (你的文献题目) but I can not read full-text content, would you mind sending your papers by E-mail?

Thank you for your assistance.

Best wishes!(or best regards)

xxx

本人的经验是讲英语的国家的作者给文章的机率会大, 一般你要就会给, 其它不讲英语的国家, 如德国, 法国, 日本等国家的作者可能不会给。出于礼貌, 如果你要的文 献作者 E-mail 给你了, 千万别忘记回信致谢。

4. 最后一种方法其实大家都熟悉, 就是发贴在小木虫上求助。我还用另一种方法, 就是直接让我所在的研究图书馆的管理员帮我从外面的图书馆文献传递。不过有的文献可能是要钱的。一页 0.3 元, 由于我们看文献的钱都是由课题出, 所以也就不太考虑钱的问题了。