

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.12.005 [http://www.crter.org]
张涛, 武肖娜, 尹庆水, 夏虹, 张余, 李梅, 杨小明, 蓝国波. 镁合金 AZ31B 材料表性与成骨细胞的黏附[J].
中国组织工程研究, 2013, 17(12):2123-2130.

镁合金AZ31B材料表性与成骨细胞的黏附**☆◆

张涛^{1,2,3}, 武肖娜^{1,4}, 尹庆水^{2,3}, 夏虹^{2,3}, 张余^{2,3}, 李梅^{2,3}, 杨小明^{2,3}, 蓝国波^{2,3}

- 1 南方医科大学, 广东省广州市 510515
- 2 解放军广州军区广州总医院骨科, 广东省广州市 510010
- 3 解放军全军战区组织救治与组织修复重点实验室, 广东省广州市 510010
- 4 解放军广州军区广州总医院神经内科, 广东省广州市 510010

文章亮点:

- 1 实验以钛合金为对照, 研究镁合金材料 AZ31B 的表面性质、蛋白吸附及细胞黏附, 明确镁合金 AZ31B 对成骨细胞黏附的影响。
- 2 实验结果表明镁合金 AZ31B 对于蛋白有较好的吸附作用, 其研究结果与目前医用钛合金无明显差异; 成骨细胞可以顺利在镁合金 AZ31B 表面黏附, 且早期黏附效果较好。
- 3 实验虽然证实了镁合金 AZ31B 表面具有良好的蛋白吸附能力, 对于成骨细胞具有良好的表面黏附性能, 为其适合于骨科植入材料提供了部分理论依据, 但其对成骨细胞增殖及分化的影响还有待于进一步研究。

关键词:

生物材料; 组织工程骨材料; 镁合金; 钛合金; 成骨细胞; 黏附; 表性; 国家自然科学基金; 生物材料
图片文章

摘要

背景: 镁合金对成骨细胞的生物学行为及早期黏附是否有影响尚不明确。

目的: 分析镁合金 AZ31B 的表性, 并评价其对成骨细胞黏附的影响。

方法: 采用扫描电镜及能谱分析明确镁合金 AZ31B 的表面形态及元素组成。以蛋白吸附实验检测镁合金 AZ31B 与钛合金对蛋白的吸附能力。将镁合金 AZ31B 与钛合金分别与小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 共培养于 24 孔板内, 观察培养 2, 6, 24 h 的细胞黏附情况。

结果与结论: 扫描电镜可见镁合金 AZ31B 表面较为粗糙, 有利于细胞在其表面的黏附。能谱分析结果表明镁合金 AZ31B 的主要元素有镁、铝、锌, 其中镁约占 96%, 铝约占 3%, 锌约占 1%, 另有一些其他元素, 含量较少。镁合金 AZ31B 与钛合金的蛋白吸附率差异无显著性意义。培养 2 h 时, 镁合金 AZ31B 与钛合金上的细胞黏附率差异无显著性意义; 培养 6, 24 h, 镁合金 AZ31B 上的细胞黏附率显著低于钛合金上的细胞黏附率($P < 0.01$)。培养于镁合金表面的成骨细胞贴壁展开, 形态不规则, 大多呈梭形, 有较多突起, 部分细胞间突起相互连接。表明镁合金 AZ31B 具有良好的细胞黏附性, 适合于成骨细胞的早期黏附。

Surface properties of magnesium alloy AZ31B and its influence on osteoblast adhesion

Zhang Tao^{1,2,3}, Wu Xiao-na^{1,4}, Yin Qing-shui^{2,3}, Xia Hong^{2,3}, Zhang Yu^{2,3}, Li Mei^{2,3},
Yang Xiao-ming^{2,3}, Lan Guo-bo^{2,3}

- 1 Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
- 2 Department of Orthopedics, General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China
- 3 Key Laboratory of Trauma & Tissue Repair of Tropical Area, Guangzhou Military Region of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

张涛☆, 男, 1982 年生, 安徽省固镇市人, 汉族, 南方医科大学在读博士, 主治医师, 主要从事关节外科及金属植入材料研究。
lupuszt@yahoo.com.cn

通讯作者: 尹庆水, 教授, 主任医师, 解放军广州军区广州总医院骨科, 广东省广州市 510010
gz_yqs@126.com

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2013)12-02123-08

收稿日期: 2012-12-19
修回日期: 2013-01-30
(20121008001/GW·W)

Zhang Tao ☆, Studying for doctorate, Attending physician, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; Department of Orthopedics, General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China; Key Laboratory of Trauma & Tissue Repair of Tropical Area, Guangzhou Military Region of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China lupuszt@yahoo.com.cn

Corresponding author: Yin Qing-shui, Professor, Chief physician, Department of Orthopedics, General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China; Key Laboratory of Trauma & Tissue Repair of Tropical Area, Guangzhou Military Region of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China gz_yqs@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30872642*; the Key Program of Military "Twelfth Five-Year" Plan, No. BWS11C065*

Received: 2012-12-19
Accepted: 2013-01-30

4 Department of Neurology, General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Whether the biological behavior and early adhesion of osteoblasts can be affected by magnesium alloy is still unknown.

OBJECTIVE: To study surface properties of magnesium alloy AZ31B and to investigate the effects on the adhesion of osteoblasts *in vitro*.

METHODS: Scanning electron microscope and energy dispersive spectrometer were used to study surface morphology and elemental composition of the magnesium alloy AZ31B. Protein absorption assay was applied to study the ability of magnesium alloy AZ31B and titanium alloy for protein adsorption. Then, mouse osteoblasts MC3T3-E1 were cocultured with magnesium alloy AZ31B or titanium alloy in 24-well plates to observe the cell adhesion at 2, 6 and 24 hours.

RESULTS AND CONCLUSION: The surface of AZ31B was rough which is beneficial for cell adhesion. Energy dispersive spectrometer results proved that the main elements of AZ31B were magnesium, aluminum, and zinc, among which, magnesium accounted for about 96%, aluminum for about 3%, and zinc for about 1%. There were also some other elements, but the content was little. Protein adsorption experiment results showed that AZ31B had good protein adsorption capacity. When the cells were cultured 2 hours, there was no significant difference between magnesium alloy AZ31B and titanium alloy in the rate of cell adhesion, but at 6 and 24 hour, the adhesion rate of magnesium alloy AZ31B was significantly lower than that of the titanium alloy ($P < 0.01$). The cells cultured on the surface of AZ31B expanded, and appeared with irregular shape, mostly fusiform, and more processes. Interconnected processes were seen among some cells. These show that the magnesium alloy AZ31B has a good capacity of cell adhesion, which is suitable for early osteoblast adhesion.

Key Words: biomaterials; tissue-engineered bone materials; magnesium alloy; titanium alloy; osteoblasts; adhesion; surface properties; the National Natural Science Foundation of China; biomaterial photographs-containing paper

Zhang T, Wu XN, Yin QS, Xia H, Zhang Y, Li M, Yang XM, Lan GB. Surface properties of magnesium alloy AZ31B and its influence on osteoblast adhesion. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(12): 2123-2130.

0 引言

镁合金是近年来新兴的一种新型可降解金属材料,具有良好的降解性及生物相容性^[1],其作为植入材料具有其他金属难以比拟的优点:其密度 1.74 g/cm^3 左右,与人骨的密质骨密度 1.75 g/cm^3 基本相当;比强度和比刚度高;杨氏模量约为 45 GPa ,接近人骨的弹性模量 20 GPa ,可避免应力遮挡效应;镁是人体内仅次于钙、钠和钾的常量元素,成人每人每日需要量超过 350 mg ,镁还与神经、肌肉及心脏功能关系密切^[2]。

基于上述种种优点,研究者们认为镁合金有希望应用于临床,尤其是骨科植入材料及支架材料领域。他们对镁合金的生物相容性做了一系列探索研究,但是主要集中在成纤维细胞方面,并且结果不一。

有研究认为镁合金具有较好的生物相容性,黄晶晶等^[3]对镁及其合金材料AZ31B进行体外实验,以316L不锈钢为对照,结果表明其具有良好的抗凝血性能,且性能:镁合金AZ31B>纯镁>不锈钢材料。张宗扬等^[4]应用鼠伤寒沙门氏菌研究镁合金AZ31B可降解镁合金的致突变性,结果未见镁合金AZ31B存在潜在致突变性。杨柯等^[5]将镁合金AZ31植入动物肌肉、骨皮质及骨髓腔中,发现其具有优异的生物相容性,降解产物主要以尿液的形式排出体外,不会对血液产生影响。Huan等^[6]进行了镁锌铝合金ZK30的体外细胞毒性研究,结果表明其对骨髓基质干细胞无明显细胞毒性。Gu等^[7]研究了9种二元镁合金(Mg-Al、Mg-Ag、Mg-In、

Mg-Mn、Mg-Si、Mg-Sn、Mg-Y、Mg-Zn和Mg-Zr)的力学性能、腐蚀降解性能及生物相容性。研究表明, Mg-Al、Mg-Sn和Mg-Zn对成纤维细胞(L2929和NIH3T3)和成骨细胞(MC3T3E1)无细胞毒性; Mg-Al和Mg-Zn对人脐静脉血管内皮细胞(ECV304)和血管平滑肌细胞无细胞毒性。

血液相容性实验结果指出, Mg-In、Mg-Mn、Mg-Si和Mg-1Y溶血率小于5%, 合金样品表面黏附的血小板呈圆形, 有少量伪足。Witte等^[8]应用豚鼠研究了AZ31, AZ91, WE43, LAE442 4个不同镁合金植入材料的皮肤致敏性, 根据组织形态及病理活检结果表明4个不同镁合金植入材料无皮肤致敏性。陈旭琼等^[9]以小鼠为实验对象进行镁合金最大剂量致敏实验, 结果表明镁合金具有良好的生物相容性。张涛等^[10]以体外实验观察镁合金对骨骼肌细胞的黏附及增殖影响, 结果表明镁合金AZ31B对骨骼肌细胞具有良好的生物相容性。

另有研究结果提示镁合金具有部分毒性反应, Geng等^[11]研究发现镁合金体外细胞学实验提示镁合金组的细胞增殖率均为2级, 存在一定的细胞毒性。

而作为骨科植入材料, 镁合金对于成骨细胞的生物学行为有何影响, 对于成骨细胞的早期黏附有无影响尚不明确, 而能否成功黏附对于细胞的生物学行为至关重要, 因此镁合金对于成骨细胞黏附的影响成为其能否成为良好骨植入材料的关键点之一。实验以钛合金为对照, 通过对镁合金材料AZ31B表面性质研究、蛋白吸附、细胞黏附率及黏附形态扫描电镜观察等方法, 明确镁合金AZ31B对成骨细胞黏附的影响。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2011年8月至2012年3月在解放军广州军区广州总医院全军热区组织救治与组织修复重点实验室完成。

材料:

金属合金材料: 镁合金AZ31B和医用钛合金均由中科院金属所制造提供, 材料被加工成直径10 mm、厚3 mm的圆片状, 磨平并抛光后, 用丙酮和无水乙醇超声清洗, 设置医用钛合金为对照组, 消毒后待用。

细胞: 小鼠前成骨细胞MC3T3-E1由中国科学院典型

培养物保藏委员会细胞库提供。

镁合金AZ31B表性与成骨细胞黏附实验的主要试剂及仪器:

Main reagents and instruments used in the experiment of surface properties of magnesium alloy AZ31B and influence on osteoblast adhesion:

试剂及仪器	来源
a-MEM 培养基、优等胎牛血清、胰蛋白酶	Hyclone
BCA 蛋白试剂盒	Pierce
Triton-X100、PBS	广州威佳科技有限公司
AIR TECH 超净工作台	苏净集团安泰公司
CO ₂ 培养箱	Precision Scientific
96 孔板和 24 孔板	Corning
酶标仪	Multiskan Spectrum
倒置显微镜	Olympus
扫描电镜	Hitachi S-3700N
能谱仪	HORIBA EMAX

实验方法:

镁合金的表面形态与能谱分析: 将镁合金抛光后, 采用丙酮和无水乙醇超声清洗, 干燥后将其表面喷金, 采用扫描电镜观察材料的表面细形态。采用HORIBA EMAX能谱仪分析镁合金AZ31B的表面元素组成并研究其组成比例。

蛋白吸附实验: 取BCA蛋白试剂盒中标准样品, 按照说明说配置不同浓度的标准液, 分别取25 μ L各组标准液, 加入新的96孔板中, 加入200 μ L BCA蛋白试剂盒显色剂, 振动20 s, 将细胞培养板置于37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 去除培养板, 冷却至室温, 用酶标仪于562 nm处读数, 测定A值, 每组重复3次以上, 结合标准液的给定浓度, 拟合蛋白浓度与A值之间的函数曲线。

将镁合金AZ31B及钛合金分别放入24孔板, 加入含体积分数20%FBS的a-MEM培养基0.5 mL, 37 $^{\circ}$ C孵育24 h, 然后取出各组试件, 放置到新的24孔板中, PBS冲洗3遍, 加入0.2%Triton-X100 0.5 mL裂解材料表面蛋白, 置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜后, 分别吸取25 μ L各组裂解液, 加入新的96孔板中, 加入200 μ L BCA蛋白试剂盒显色剂, 振动20 s, 将细胞培养板置于37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 取出培养板, 冷却至室温, 用酶标仪于562 nm处读数, 测定A值。根据蛋白浓度与A值之间的函数关系计算各种样品的吸附蛋白量, 每组重复6次。

小鼠前成骨细胞MC3T3-E1的培养: 将小鼠前成骨细胞MC3T3-E1加入含体积分数10%胎牛血清的a-MEM培养基中, 在37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO₂及饱和湿度条件下培

养, 二三天换液, 细胞长至80%融合时进行传代。

细胞黏附率的测定: 取3个24孔培养板, 分别用于3个时间点, 将镁合金与钛合金分别取18枚试件平均置于3个培养板内, 将小鼠MC3T3-E1细胞以 1×10^5 /孔接种于24孔板内, 37℃、体积分数5%CO₂培养箱内分别培养2, 6, 24 h后, 各取出1个培养板, 每组取出6个试件用作细胞计数计算黏附率, PBS漂洗3次, 吸净液体, 0.25%胰蛋白酶1.0 mL消化1 min, 加含血清的培养基1.0 mL终止消化, 1 000 r/min离心5 min, 吹打制成细胞悬液。细胞计数板计数, 即已贴壁细胞数, 每个试件重复6次, 取平均值, 计算黏附率。

$$\text{黏附率} = \frac{\text{已贴壁细胞数}}{\text{植入细胞总数}} \times 100\%$$

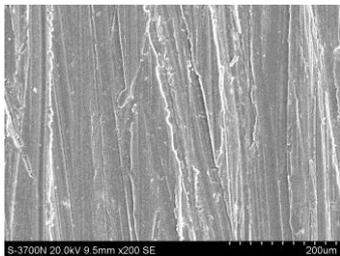
扫描电镜观察细胞黏附: 将镁合金消毒备用样品置入24孔培养板中, 将处于对数生长期的成骨细胞悬液接种到各样品表面, 接种浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 置于37℃, 体积分数5%CO₂的细胞培养箱内培养。培养24 h后, 取出试样, 用0.1 mol/L PBS清洗后放入戊二醛中固定24 h, 然后将试样再次用PBS清洗, 随后依次梯度乙醇脱水、真空干燥6 h, 表面喷金后扫描电镜下观察材料表面细胞的黏附形态。

主要观察指标: ①镁合金AZ31B的表面形态及元素组成。②镁合金AZ31B与钛合金对蛋白的吸附能力。③镁合金AZ31B与钛合金表面的细胞黏附情况。

统计学分析: 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用成组 t 检查进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 镁合金扫描电镜与能谱分析结果 扫描电镜可见镁合金表面较为粗糙, 见图1, 这样有利于细胞在其表面的黏附。

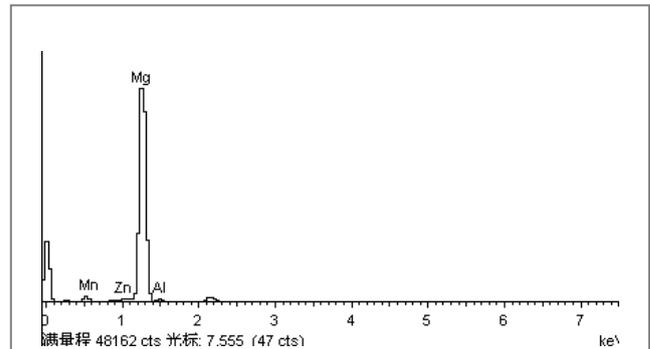


注: 镁合金表面较为粗糙, 这样有利于细胞在其表面的黏附。

图1 扫描电镜观察镁合金表面形貌($\times 200$)

Figure 1 Scanning electron microscope of AZ31B surface ($\times 200$)

能谱分析结果表明镁合金AZ31B的主要元素为镁、铝、锌, 其中镁大约为96%, 铝大约为3%, 锌大约为1%; 另有一些其他元素, 但是其含量较少, 见图2。

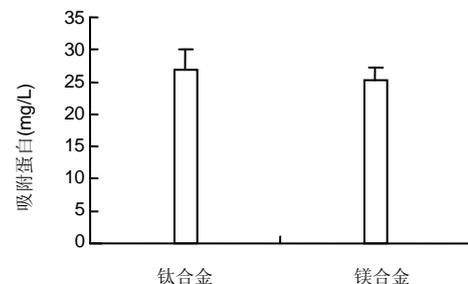


注: 镁合金 AZ31B 的主要元素为镁、铝、锌, 其中镁大约为 96%, 铝大约为 3%, 锌大约为 1%; 另有一些其他元素, 但是其含量较少。

图2 镁合金 AZ31B 的能谱分析

Figure 2 Energy dispersive spectrometer analysis of AZ31B

2.2 镁合金蛋白吸附实验结果 图3显示镁合金AZ31B和医用钛合金材料表面的24 h蛋白吸附率, 分别为 (25.27 ± 2.02) , $(26.95 \pm 3.17) \text{ mg/L}$ 。



注: 镁合金 AZ31B 和医用钛合金材料表面 24h 蛋白吸附率分别为 (25.27 ± 2.02) , $(26.95 \pm 3.17) \text{ mg/L}$; 两组间蛋白吸附率差异无显著性意义($P > 0.05$), 这提示镁合金 AZ31B 在蛋白吸附能力方面与目前医用钛合金相当。

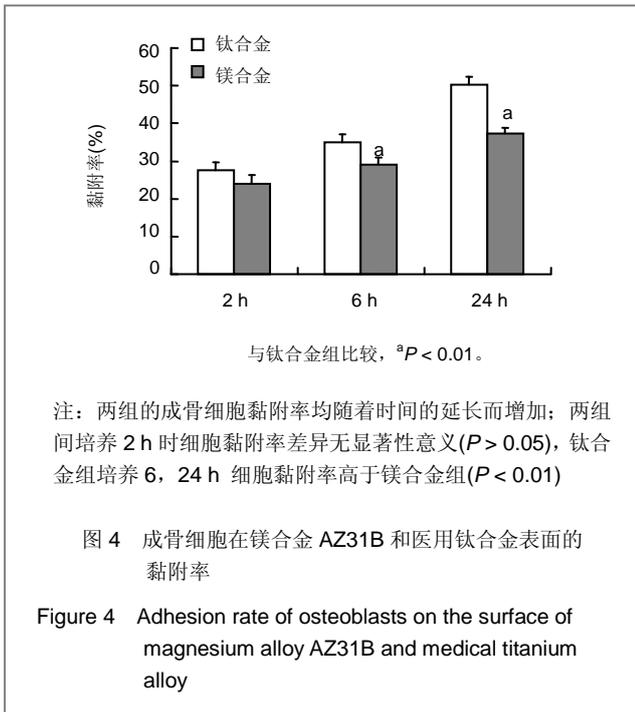
图3 镁合金 AZ31B 和医用钛合金表面 24 h 的蛋白吸附

Figure 3 24 h protein adsorption of magnesium alloy AZ31B and medical titanium alloy

统计学分析表明两组间蛋白吸附率差异无显著性意义($P > 0.05$), 这提示镁合金AZ31B在蛋白吸附能力方面与目前医用钛合金相当。

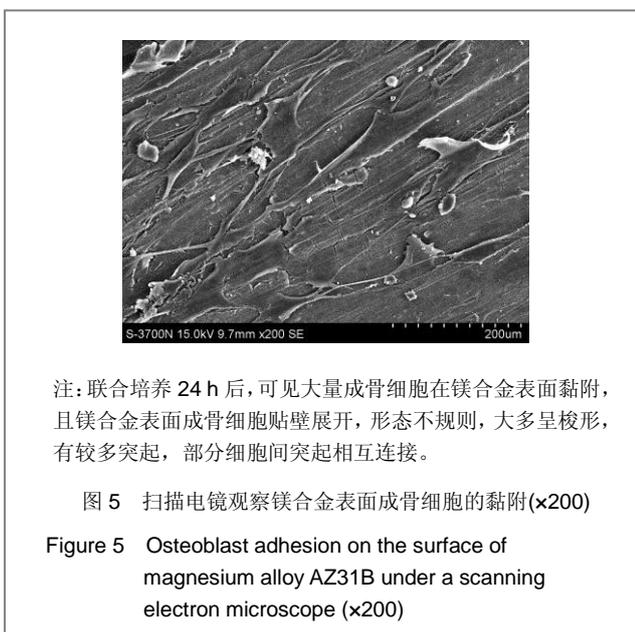
2.3 镁合金早期细胞黏附率的测定 图4显示镁合金AZ31B和医用钛合金两组材料表面各时间点上的

MC3T3-E1 细胞黏附率。



两组的成骨细胞黏附率均随着时间的延长而增加, 6, 12, 24 h 3 个时间点细胞黏附率: 钛合金组分别为 (27.58±2.11)%, (34.92±2.26)%, (50.21±2.11)%; 镁合金组分别为(24.04±2.33)%, (29.08±1.91)%, (37.33±1.49)%; 其中在2 h时间点上, 两组间细胞黏附率差异无显著性意义($P > 0.05$), 但是在6, 24 h 2 个时间点上, 镁合金和钛合金两组间细胞黏附率差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 且钛合金组>镁合金组。

2.4 镁合金表面细胞黏附扫描电镜观察结果 见图5。



联合培养24 h后, 可见大量成骨细胞在镁合金表面黏附, 且镁合金表面成骨细胞贴壁展开, 形态不规则, 大多呈梭形, 有较多突起, 部分细胞间突起相互连接, 见图5。

3 讨论

镁合金是近年来新兴的一种新型可降解金属材料, 具有良好的降解性及生物相容性, 其作为骨科植入材料的突出优点表现在^[1]: 镁是人体内仅次于钙、钠和钾的常量元素, 它参与体内一系列新陈代谢过程, 包括骨细胞的形成; 镁及其合金的密度在1.74 g/cm³左右, 镁及其合金与人骨密度最为接近; 镁及其合金具有高的比强度与比刚度, 且加工性能良好, 纯镁的比强度约133 GPa/(g·cm³), 而超高强度镁合金的比强度已达到480 GPa/(g·cm³), 比Ti-6Al-4V 260 GPa/(g·cm³)还高; 目前临床上常用医用金属材料的杨氏模量均在100 GPa以上, 而镁合金的杨氏模量约为45 GPa, 更接近人骨的弹性模量20 GPa左右, 可有效缓解应力遮挡效应; 镁的资源丰富, 价格相对低廉。

针对镁合金的种种优点, 研究者们开始进行镁合金的生物相容性能研究, 但结果报道不一。Li等^[12]研究发现鼠骨髓细胞与表面处理的纯镁共同培育72 h后没有出现细胞生长抑制。Witte等^[13]研究以羟基磷灰石颗粒为强固材料AZ91D镁合金的细胞相容性, 结果显示人类骨衍生细胞、成骨细胞谱系细胞和巨噬细胞谱系混合培养后可在其表面附着、增殖和生存。于国宁等^[14]研究发现在锰(质量分数1%)锌(质量分数1%) 镁合金中L929细胞生长良好, 无细胞毒性作用。将镁(质量分数98%)、锰(质量分数1%)、锌(质量分数1%)组成的镁合金与小鼠成骨细胞体外联合培养, 结果显示小鼠成骨细胞大量扩增, 细胞特性稳定, 保持良好的活性和分裂增殖能力^[15]。孟祥翔等^[16]对表面阶跃式阳极氧化技术改性后的镁合金材料(AZ-和AZ-3)进行体外生物相容性评价, 发现在镁合金材料上成骨细胞可良好黏附、增殖和生长; 细胞活性和碱性磷酸酶活性未受影响。郭磊等^[17]对氧化镁表面膜的AZ31B镁合金材料进行安全性评价, 结果显示其对成骨细胞增殖和分化无明显影响。然而, Serre等^[18]研究发现在添加镁的体外骨细胞培养基中, 较高的镁浓度对细胞具有毒性作用。

针对目前存在的问题, 作者不禁提出疑问, 尽管关

于镁合金生物性研究的结果不一,但是镁合金AZ31B作为骨科植入材料,对于成骨作用的关键细胞—成骨细胞的生物学行为有何影响目前研究尚不明确,而黏附是植入材料与成骨细胞接触的第一步,它将直接影响成骨细胞在其表面的增殖及分化^[19]。影响黏附的因素包括材料表面的形貌、粗糙度、表面元素成分及金相结构等^[20],这些影响参数不是孤立的,而是共同作用影响细胞在材料表面的黏附^[21]。此外,镁元素是骨组织中无机成分的主要元素,可以促进骨组织的再生和骨基质的分泌,在人体代谢中起着十分重要的作用^[22]。

实验中扫描电镜可见镁合金的表面较为粗糙,提示镁合金AZ31B有利于细胞的黏附,能谱分析表明其主要元素为镁等生物活性,从而明确了实验材料的性质及组成,即镁合金AZ31B。蛋白吸附实验结果表明镁合金AZ31B对于蛋白有较好的吸附作用,其研究结果与目前医用钛合金无明显差异,而吸附的蛋白也可能暴露更多的位点与细胞膜整合素结合,进一步促进细胞的黏附和增殖。这些研究结果均提示镁合金具有良好的生物学特性。但有学者采用镁合金(含2%Zn、0.8%Mn、1.0%Ca)进行大鼠成骨细胞黏附实验,认为镁合金不利于大鼠成骨细胞黏附^[23]。实验采用镁合金AZ31B进行小鼠成骨细胞黏附实验,结果表明成骨细胞可以顺利在材料表面黏附,这与部分学者的报道结果不尽相同,研究结果的差异可能是因为镁合金的成分不同引起的。黄晶晶等^[3]将纯镁植入大鼠背部肌肉处,3周后扫描电镜观察发现样品周围生成一种富含Ca、P元素的新物质,结果表明镁具有良好的骨诱导能力。杨柯等^[5, 24]将AZ31镁合金植入动物体内,发现材料降解后表面有Ca-P物质沉积,增强了表面生物活性。这些研究结果提示纯镁和镁铝锌AZ31合金具有良好的黏附性,这也从另一个方面支持实验镁合金AZ31B具有良好的细胞黏附性能。

虽然镁合金表面成骨细胞黏附率较钛合金低,且在6 h和24 h两个时间点存在统计学差异,但随着黏附时间的延长,成骨细胞在镁合金表面黏附逐渐增加,扫描电镜也客观证实了成骨细胞在镁合金表面的黏附,且成骨细胞形态良好,部分可见细胞相互连接,表明细胞的生物活性较好,这些结果也表明了镁合金具有良好的细胞黏附性,这为其具有良好的生物相容性奠定了基础。分析其细胞黏附率在6 h和24 h较低的原因可能是因为随着时间的延长,镁合金逐渐开始出现降解,表面的镁合

金降解后给周围环境带来的影响是pH值的变化,pH值升高,也就是说镁合金AZ31B组细胞培养液的酸碱性能开始发生改变,逐渐改变为碱性环境,从而影响后期的细胞黏附。体外的研究结果对于体内研究提供参考意义,结合体内强大的缓冲系统,镁合金降解带来的周围环境酸碱性能变化的影响将变得微乎其微,张涛等^[25]对镁合金的生物学性能文献进行回顾,发现镁合金对于成骨细胞及骨髓间充质细胞具有较好的生物相容性。

此外,郭磊等^[26]采用体外直接接触细胞毒性实验和MTT比色法实验,评价CA-P/AZ31B和CA-P/Ti-6Al-4V合金对成骨细胞增殖和成骨活性的影响,结果表明CA-P涂层使AZ31B镁合金材料具有良好的生物相容性,其成骨细胞合成碱性磷酸酶的活性明显高于CA-P/Ti-6Al-4V材料组和AZ31B材料组,对成骨细胞的细胞增殖和分化功能具有正性调节作用。Xu等^[27]进行了磷酸钙涂层镁合金材料的体内植入实验,通过组织切片及免疫组织化学检测证实合金材料具有良好的生物活性,可以促进镁合金及骨界面的生长。高家诚等^[28]将Mg和TC4合金植入兔股骨,植入2周后的X射线能谱分析显示,镁与骨的界面处有明显的钙磷富集,12周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。组织学切片染色发现术后6周,镁植入样与宿主骨的界面处有蓝紫色骨样物质;12周可见镁植入物与宿主界面的新生骨组织矿化,材料和骨缺损之间的骨质进一步成熟、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。在这些结果显示镁合金的活性有着诱人的应用前景。

上海交通大学针对体外人间充质干细胞成骨分化过程进行研究,应用Mg、AZ91D、NZ30K三种材料浸泡,提取浸提液培养人间充质干细胞,加入诱导剂诱导分化为成骨细胞,检测成骨细胞活性及成骨相关标志物的表达,结果表明在成骨分化过程中镁合金组骨桥蛋白的表达增高^[29]。张岩等^[30-32]观察新型可降解镁锌合金(Mg-6% Zn)对前成骨细胞MC3T3-E1细胞整合素表达的影响,利用实时荧光定量PCR方法检测成骨细胞整合素亚基的表达水平,结果表明镁锌合金能够提高成骨细胞Itga2 mRNA、Itga5 mRNA的表达水平,有利于促进成骨细胞在材料表面的黏附。这些结果都为镁合金具有良好活性提供了理论依据,也从另一个方面验证了实验结果。

综上所述,作者认为镁合金AZ31B表面具有良好的蛋白吸附能力,对于成骨细胞具有良好的表面黏附性能,这为其适合于骨科植入材料提供了部分理论依据,至于其对成骨细胞增殖及分化的影响,还有待于进一步研究。

致谢:感谢中科院金属所为实验提供的研究材料及在实验过程中提供的帮助。

基金资助:国家自然科学基金(30872642);军队“十二五”计划课题重点项目(BWS11C065)。

作者贡献:尹庆水、夏虹进行实验设计,实验实施为张涛、武肖娜,实验评估为张余,资料收集为杨小明、蓝国波,张涛成文,尹庆水审核,张涛对文章负责。

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。

伦理要求:实验未涉及与伦理相冲突的内容。

作者声明:文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

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):1728-1734.
- [2] Shao MZ. Chengdu: Sichuan Keji Chubanshe. 1996: 3. 邵美珍. 镁的基础与临床[M]. 成都: 四川科技出版社, 1996: 3.
- [3] Huang JJ, Ren YB, Zhang BC, et al. *Xiyou Jinshu Cailiao yu Gongcheng*. 2007;36(6):112-1105. 黄晶晶,任伊宾,张炳春,等. 镁及镁合金的生物相容性研究[J]. 稀有金属材料与工程,2007,36(6):112-1105.
- [4] Zhang ZY, Ai HJ. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(32):6315-6318. 张宗扬,艾红军. AZ31B可降解镁合金的遗传毒性评价:鼠伤寒沙门氏菌营养缺陷型回复突变试验[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(32):6315-6318.
- [5] Yang K, Tan LL, Ren YB, et al. *Zhongguo Cailiao Jinzhan*. 2009;28(2):26-30. 杨柯,谭丽丽,任伊宾,等. AZ31镁合金的生物降解行为研究[J]. 中国材料进展,2009,28(2):26-30.
- [6] Huan ZG, Leeflang MA, Zhou J, et al. In vitro degradation behavior and cytocompatibility of Mg-Zn-Zr alloys. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(9):2623-2635.
- [7] Gu X, Zheng Y, Cheng Y, et al. In Vitro Corrosion and Biocompatibility of Binary Magnesium Alloys. *Biomaterials*. 2009;30:484-498.
- [8] Witte F, Abeln I, Switzer E, et al. Evaluation of the skin sensitizing potential of biodegradable magnesium alloys. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86(4):1041-1047.
- [9] Chen XQ, Yin QS, Zhang Y, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(16): 2899-2902. 陈旭琼,尹庆水,张余,等. 镁铝合金最大剂量的致敏试验研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(16): 2899-2902.
- [10] Zhang T, Yin QS, Xia H, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi*. 2012;20(22): 2074-2077. 张涛,尹庆水,夏虹,等. 镁合金AZ31B对骨骼肌细胞黏附及增殖的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2012,20(22): 2074-2077.
- [11] Geng F, Tan LL, Jin XX, et al. The preparation, cytocompatibility, and in vitro biodegradation study of pure b-TCP on magnesium. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20:1149-1157.
- [12] Li L, Gao J, Wang Y. Evaluation of cytotoxicity and corrosion behavior of alkali-heat-treated magnesium in simulated body fluid. *Surf Coat Technol*. 2004;185:92-98.
- [13] Witte F, Feyerabend F, Maier P, et al. Biodegradable magnesium-hydroxyapatite metal matrix composites. *Biomaterials*. 2007;28 (13): 2163-2174.
- [14] Yu GN, Pan F, Wen JQ, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi*. 2008;16(13): 1015-1018. 于国宁,潘锋,闻久全,等. 镁合金体内植入生物安全性的初步研究[J]. 中国矫形外科杂志,2008,16(13): 1015-1018.
- [15] Yu GN, Pan F, Wen JQ, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi*. 2008;16 (14): 1091-1093. 于国宁,潘锋,闻久全,等. 体外镁合金与小鼠成骨细胞联合培养观察[J]. 中国矫形外科杂志,2008,16 (14): 1091-1093.
- [16] Meng XX, Wang G, Wang F, et al. *Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi*. 2009;11(3): 243-246. 孟祥翔,王钢,王飞,等. 新型医用镁合金材料的体外生物相容性研究[J]. 中华创伤骨科杂志,2009,11 (3): 243-246.
- [17] Guo L, Liu K, Z SL, et al. *Xiyou Jinshu Cailiao yu Gongcheng*. 2008;37(6): 1027-1031. 郭磊,刘魁,张世亮,等. 氧化镁膜AZ31B镁合金材料的细胞毒性研究[J]. 稀有金属材料与工程,2008,37(6): 1027-1031.
- [18] Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, et al. Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 1998;42: 626-633.
- [19] Gharizadeh N, Moradi K, Haghizadeh MH. A study of microleakage in class II composite restorations using four different curing techniques. *Oper Dent*. 2007;32(4):336-340.
- [20] Prasanna N, Pallavi Reddy Y, Kavitha S, et al. Degree of conversion and residual stress of preheated and room-temperature composites. *Indian J Dent Res*. 2007;18(4):173-176.
- [21] Ghavamnasiri M, Moosavi H, Tahvildamejad N. Effect of centripetal and incremental methods in Class II composite resin restorations on gingival microleakage. *J Contemp Dent Pract*. 2007;8(2):113-120.
- [22] Daronch M, Rueggeberg FA, Moss L, et al. Clinically relevant issues related to preheating composites. *J Esthet Restor Dent*. 2006;18(6):340-350.
- [23] Zuo L, Bai SL, Pan F, et al. *Jiepo Xue Zazhi*. 2011;34(2): 152-155. 左林,柏树令,潘锋,等. 镁合金表面含硅涂层对成骨细胞的黏附、形态和细胞周期的影响[J]. 解剖学杂志,2011,34(2):152-155.
- [24] Yang JX, Cui FZ, Lee IS, et al. In vivo biocompatibility and degradation behavior of Mg alloy coated by calcium phosphate in a rabbit model. *J Biomater Appl*. 2012;27(2): 153-164.

- [25] Zhang T, Yin QS. Zhongguo Guke Linchuang yu Jichu Yanjiu Zazhi. 2011;3(3):216-219.
张涛, 尹庆水. 镁合金及其涂层的生物学性能研究进展[J]. 中国骨科临床与基础研究杂志, 2011, 3(3):216-219.
- [26] Guo L, Liu K, Gao XY, et al. Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi. 2009;19(2):161-163.
郭磊, 刘魁, 高晓宇, 等. 磷酸钙涂层的AZ31B 镁合金材料对成骨细胞功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(2):161-163.
- [27] Xu L, Pan F, Yu G, et al. In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy. Biomaterials. 2009;30(8):1512-1523.
- [28] Gao JC, Qiao LY, Wang Y, et al. Xiyao Jinshu Cailiao yu Gongcheng. 2010;39(2):296-299.
高家诚, 乔丽英, 王 勇, 等. 纯镁在动物体内骨诱导性能的研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2010, 39(2):296-299.
- [29] Yang C, Yuan G, Zhang J, et al. Effects of magnesium alloys extracts on adult human bone marrow-derived stromal cell viability and osteogenic differentiation. Biomed Mater. 2010; 5(4):1-9.
- [30] Zhang Y, Tao HT, He YH, et al. Zhonghua Shiyao Waike Zazhi. 2010;27(5):640-642.
张岩, 陶海荣, 何耀华, 等. 镁锌合金对成骨细胞整合素表达的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(5):640-642.
- [31] Zhang Y, Tao HT, He YH, et al. Yiyao Luntan Zazhi. 2010; 31(10): 1-6.
张岩, 陶海荣, 何耀华, 等. 镁锌合金对成骨细胞整合素 $\alpha 5$ 表达的影响[J]. 医药论坛杂志, 2010, 31(10):1-6.
- [32] Zhang Y, Tao HT, He YH, et al. Yiyao Luntan Zazhi. 2010;31(15): 1-7.
张岩, 陶海荣, 何耀华, 等. 镁锌合金对成骨细胞整合素 $\alpha 2$ 表达的影响[J]. 医药论坛杂志, 2010, 31(15):1-7.

● 社长的话: 三月杏花开

(上接目次页)

如杜牧《清明》中的“借问酒家何处有, 牧童遥指杏花村。”如王维《春中田园作》中的“屋上春鸠鸣, 村边杏花白。”如李贺《恼公》中的“歌声春草露, 门掩杏花丛。”还有“日日春光斗日光, 山城斜路杏花香。”“燕子不归春事晚, 一汀烟雨杏花寒。”“杏花未肯无情思, 何事行人最断肠。”“小楼一夜听春雨, 深巷明朝卖杏花。”“风吹梅蕊闹, 雨细杏花香。杏花零落燕泥香, 睡损红妆。”等等, 让人陶醉其中, 百读不厌。

至于大俗, 让百姓们记忆最深刻的莫过于“杏花天”和“杏花村”的传说了。

杏花天虽只是位于北京地安门外大街东侧一条东西走向的小胡同, 却是京城最富有意境和诗意的名字之一, 今人考证得其名有两说。传早年地安门外曾有一私家花园种有 10 余棵杏树, 每至阳春满园杏花盛开, 香飘大街小巷, 于是就有了将临近这家花园的胡同叫“杏花天”后又称为“杏花天胡同”之说。又传明朝时胡

同西口儿有一“杏花天酒家”, 所售的酒均为自酿, 醇香宜人, 许多人慕名而来, 日子一长, 人们就将这附近的胡同叫成了“杏花天胡同”。

至于杏花村, 正如杜牧《清明》中所记, “借问酒家何处有, 牧童遥指杏花村。”一首千古绝唱, 一位牧童指向, 就使杏花村名满天下。据悉全国有十多处杏花村, 遍及江苏、安徽、湖北、山西等八个省份, 人们熟知的就有山西汾阳县的杏花村和安徽贵池的杏花村也。

关于杏花, 在我记忆中最久远的是当小姑娘的时候, 院子里总会有三五成群的小伙伴手拉手围着地上划出的圆边转边唱着歌谣的游戏。“杏花杏花几月开? 三月不开四月开。杏花杏花几月开? 四月不开五月开。杏花杏花几月开? 五月不开六月开……”这期间, 场外的另一群小朋友可以在任何时候高喊一声, 杏花开了! 于是, 转圈的全体小朋友就都松开手并立即跑向四方, 没有跑出圆圈就被另一群小朋友抓住者为输, 输者就不能再参加游戏, 只能站在圈

中央为继续游戏的小伙伴们伴唱歌谣了。

这也是社会给我上的最早的关于竞争机制的教育课。输者就要被罚出局外, 只要竞争原则是公平的, 参加游戏者就应该有愿赌服输的心理准备。而输者的尴尬和困境自不必言说。后来, 我将其为作人的一面镜子, 怎样才能做得好, 不被罚出或者边缘到圈外? 能更早一点的懂得这样的道理对一个人来说真是有好处的。

从一点一滴一言一行开始, 到三年五年乃至更多, 只要坚定信念, 坚韧行动, 坚强固守, 坚韧进取, 在每年杏花开放的时候, 你都会享受进入圈内的新感觉, 都会有闯出圈外的新收获!

杏花杏花几时开? 三月不开四月开。赏春人在等待, 处露红妆燕归来……一个天天在室内码字的编辑人, 多希望看到室外那棵杏树花开似锦哟!

(王莉莎)