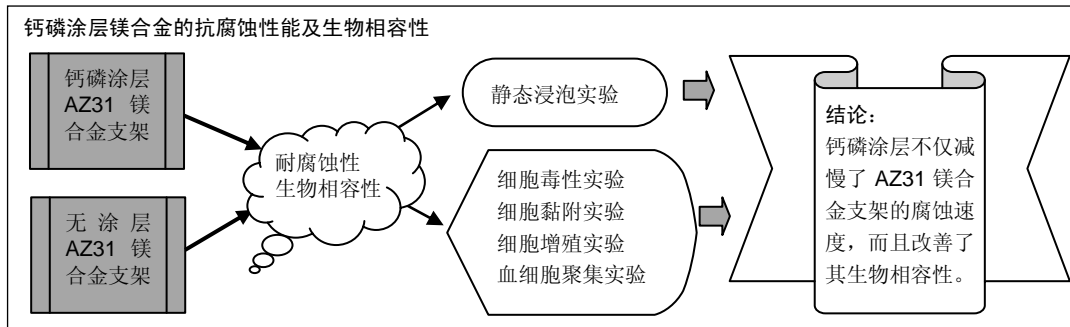


钙磷涂层镁合金支架的抗腐蚀性及其生物相容性

马飞¹, 李想¹, 谢瑞敏¹, 王勇平¹, 何耀华² (¹兰州大学第一医院骨科, 甘肃省兰州市 730000; ²上海交通大学第六人民医院骨科, 上海市 200233)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0914 ORCID: 0000-0001-9825-2801(王勇平)

文章快速阅读:



马飞, 男, 1986 年生, 甘肃省陇南市人, 汉族, 兰州大学第一临床医学院在读硕士, 主治医师, 主要从事骨科的创伤、脊柱及骨科生物材料研究。

通讯作者: 王勇平, 博士, 博士后, 研究生导师, 兰州大学第一医院骨科, 甘肃省兰州市 730000

中图分类号: R318

文献标识码: B

稿件接受: 2018-04-08



文题释义:

钙磷涂层: 钙磷涂层的化学成分主要由氧、碳、钙和磷构成, 具有良好的生物相容性; 钙磷涂层可提高镁合金的耐腐蚀性能; 钙磷涂层没有明显的细胞毒性, 可促进细胞黏附和增殖, 可提高细胞的生物活性。

镁合金: 是以镁为基础加入其他元素组成的合金, 具有可降解性, 良好的生物相容性, 良好的力学性能, 可促进骨细胞生长, 诱导成骨细胞和骨细胞的产生。

摘要

背景: 镁合金具有良好的生物相容性, 可促进成骨细胞生长, 然而镁合金在生理环境中的腐蚀速率较高, 不能满足临床需要。

目的: 探讨钙磷涂层对 AZ31 镁合金支架抗腐蚀性和生物相容性的影响。

方法: 采用化学沉积法在 AZ31 镁合金支架表面制备钙磷涂层。①静态浸泡实验: 将钙磷涂层和无涂层 AZ31 镁合金支架分别浸泡于 DMEM 细胞培养液中, 浸泡第 10, 20, 30 天后检测材料腐蚀速率; ②细胞毒性实验: 分别以 100%, 75%, 50%, 25% 浓度的钙磷涂层 AZ31 镁合金支架浸提液培养 MC3T3-E1 细胞, 培养 1, 3, 5 d, 检测细胞增殖率, 判定毒性分级; ③细胞黏附实验: 将 MC3T3-E1 细胞分别接种于钙磷涂层和无涂层 AZ31 镁合金支架表面, 接种 6, 12, 24 h 计数细胞数量; ④细胞增殖实验: 将 MC3T3-E1 细胞分别接种于钙磷涂层和无涂层 AZ31 镁合金支架表面, 培养 1, 3, 5 d 后检测细胞数; ⑤血细胞聚集实验: 将钙磷涂层和无涂层 AZ31 镁合金支架分别浸入抗凝兔血中, 8 min 后检测红细胞、白细胞及血小板数量。

结果与结论: ①钙磷涂层 AZ31 镁合金支架不同时间点的腐蚀速率均低于无涂层 AZ31 镁合金支架 ($P < 0.05$); ②不同浓度钙磷涂层 AZ31 镁合金支架浸提液的细胞毒性为 0 至 1 级; ③钙磷涂层 AZ31 镁合金支架组接种 12, 24 h 的细胞黏附数量多于无涂层 AZ31 镁合金支架组 ($P < 0.05$); ④钙磷涂层 AZ31 镁合金支架组培养 3, 5 d 的细胞数量显著多于无涂层 AZ31 镁合金支架组 ($P < 0.05$); ⑤钙磷涂层 AZ31 镁合金支架组的红细胞、白细胞及血小板数量与无涂层 AZ31 镁合金支架组比较无差异; ⑥结果表明, 钙磷涂层不仅减慢了 AZ31 镁合金支架的腐蚀速度, 而且改善了其生物相容性。

关键词:

钙磷涂层; 镁合金; 生物相容性; 抗腐蚀性; 生物材料

主题词:

材料试验; 腐蚀; 细胞粘附; 细胞增殖; 组织工程

基金资助:

甘肃省高等学校科研项目(2018B-013); 兰州大学第一医院科研项目(ldyyyn2017-21; ldyyyn2013-01); 国家自然科学基金资助项目(81271961, 81572106)

Ma Fei, Master candidate, Attending physician, Department of Orthopedics, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Corresponding author: Wang Yong-ping, M.D., Master's supervisor, Department of Orthopedics, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Effect of calcium phosphate coatings on corrosion resistance and biocompatibility of magnesium alloy scaffolds

Ma Fei¹, Li Xiang¹, Xie Rui-min¹, Wang Yong-ping¹, He Yao-hua² (¹Department of Orthopedics, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²Department of Orthopedics, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

Abstract

BACKGROUND: Magnesium alloy has better biocompatibility and can accelerate growth of osteoblasts, but its

clinical use is limited because of a high corrosion rate in the physiological environment.

OBJECTIVE: To explore the effect of calcium phosphate coating (Ca-P coating) on corrosion resistance and biocompatibility of AZ31 magnesium alloy scaffolds.

METHODS: Using chemical vapor deposition, Ca-P coating was prepared on the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds. (1) Immersion test in static state: AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without Ca-P coating were independently immersed in the DMEM medium and the material corrosion rate of each scaffold was tested at 10, 20 and 30 days after immersion. (2) Cytotoxicity test: MC3T3-E1 cells were cultured in the extracts of AZ31 magnesium alloy scaffolds with 100%, 75%, 50% and 25% Ca-P coatings, and cell proliferation and toxicity grade were determined at 1, 3, 5 days after culture. (3) Cell adhesion assay: MC3T3-E1 cells were separately seeded onto the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without Ca-P coating, and cell number was counted at 6, 12 and 24 hours after culture. (4) Cell proliferation test: MC3T3-E1 cells were separately seeded onto the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without Ca-P coating, and cell number was counted at 1, 3, 5 days after culture. (5) Aggregation test of blood cells: AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without Ca-P coating were immersed in anticoagulant rabbit blood samples, and amounts of red blood cells, white blood cells and platelets were determined at 8 minutes after immersion.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The corrosion and toxicity rate of AZ31 magnesium alloy scaffold with Ca-P coating was lower than that without Ca-P coating ($P < 0.05$) without coatings. (2) Cell toxicity of AZ31 magnesium alloy scaffolds with Ca-P coatings of different concentrations was grade 0 to 1. (3) The number of cells adherent to the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds with Ca-P coating was significantly higher than that without Ca-P coating at 12 and 24 hours after inoculation ($P < 0.05$). (4) The number of cells cultured in the extract of AZ31 magnesium alloy scaffolds with Ca-P coating was significantly higher than that cultured in the extract of the scaffold without Ca-P coating at 3 and 5 days after culture ($P < 0.05$). (5) The number of red blood cells, white blood cells and platelets in the scaffolds with or without Ca-P coating has no difference ($P < 0.05$). To conclude, Ca-P coating not only slows the corrosion rate of AZ31 magnesium alloy scaffolds, but also improves the scaffold biocompatibility.

Subject headings: Materials Testing; Corrosion; Cell Adhesion; Cell Proliferation; Tissue Engineering

Funding: the Scientific Research Program of Gansu Provincial Universities, No. 2018B-013; the Scientific Research Project of the First Hospital of Lanzhou University, No. ldyyn2017-21, ldyyn2013-01; the National Natural Science Foundation of China, No. 81271961, 81572106

0 引言 Introduction

镁合金在骨替代和骨移植生物医用材料领域具有非常大的潜力,多年来一直被认为是未来骨科可应用的可降解金属材料^[1-10]。截止到现在,存在着各种各样的镁合金,比如Mg-Zn^[4]、Mg-Zn-Ca^[7]、AZ31^[11]、AZ91^[11]、WE43^[11]、WE54^[12]、Mg-Y-Zn^[13],以及Mg-Ca和Mg-Nd-Zn-Zr^[14-18],都是比较有前途的骨科植入材料。研究证实,镁合金具有可降解性、良好的生物相容性及力学性能,可促进骨细胞生长,诱导成骨细胞和骨细胞的产生^[19-21]。然而,在生理环境下,由于镁合金的腐蚀速率很快,会产生很多的气体,引起机械强度的快速下降,使得镁合金在临床应用过程中有很大障碍^[3, 5, 19-20, 22-23]。因此,如果要使镁合金在骨科临床应用,它的腐蚀速度必须得到有效控制,使其保持机械完整性,直到损伤组织痊愈。此次研究选用综合性能较好的AZ31镁合金,因AZ31镁合金具有良好的强度和韧性,相比其他镁合金有较强的耐腐蚀性。为了进一步提高AZ31镁合金支架的耐腐蚀性能及生物相容性,采用化学沉积法在AZ31镁合金支架表面制备钙磷涂层,主要研究钙磷涂层的特征及钙磷涂层对AZ31镁合金支架腐蚀行为和生物相容性的影响,确定钙磷涂层控制AZ31镁合金支架腐蚀速率及改善其表面生物相容性的可行性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年7月至2017年8月在兰州大学第一临床医学院完成。

1.3 材料 AZ31镁合金是由中国科学院金属研究所提供,其中Al、Zn、Mn、Si、Ni、Cu、Fe的质量分数分别为1.92%、0.74%、0.35%、0.026%、0.003%、0.0028%、

<0.003%; MC3T3-E1细胞由中国科学院提供; DMSO(上海金山化工厂); 吡啶橙(西格玛,美国); 荧光显微镜(Olympus, IX71; 日本); 自动血液分析仪(Sysmex, xt-1800i); 扫描电子显微镜(日立, S-4800, 日本)。

实验动物: 健康新西兰大白兔, 体质量(2.5±0.3) kg, 由上海Jiesijie动物股份有限公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2010-0026。

1.4 实验方法

1.4.1 样品制备 将AZ31镁合金加工成5 mm×5 mm×5 mm直径的多孔支架结构, 表面经过抛光处理, 用无水乙醇进行10 min的超声清洗, 然后在室温下进行干燥处理。进行实验前使用环氧乙烷消毒处理。

1.4.2 钙磷涂层制备 采用化学沉积法进行AZ31表面钙磷涂层制备。试样首先在室温下浸于40%氢氟酸, 然后在去离子水中清洗, 样本在20 °C混合溶液(含55.5 g/L NaNO₃、99.7 g/L Ca(H₂PO₄)₂·H₂O、体积分数18.51%的30% H₂O₂)中浸泡24 h, 获得样品表面钙磷涂层。

1.4.3 涂层特征检测 利用扫描电子显微镜观察钙磷涂层AZ31镁合金支架的表面形貌。利用能谱分析测定钙磷涂层的化学成分。

1.4.4 静态浸泡实验 采用静态浸泡试验评价钙磷涂层AZ31镁合金的体外腐蚀性能^[24]。将钙磷涂层与无涂层AZ31镁合金支架分别浸泡于DMEM细胞培养液中, 温度设置为(37.0±0.5) °C, 静态浸泡第10, 20, 30天后从模拟体液中取出试样, 先用去离子水冲洗, 再使用乙醇清洗, 然后放在室温下干燥。借助于扫描电镜观察试样表面形貌, 用200 g/L铬酸清洗去除试样表面沉积的腐蚀产物, 按照下面公式计算出腐蚀速率, 腐蚀速率=K×W/(A×T×D)。其中, 系数K=8.76×10⁴, W指的是失重(g), A指的是试样与溶液

表 2 不同浓度钙磷涂层 AZ31 镁合金支架浸提液中 MC3T3-E1 细胞的吸光度和细胞相对生长率 (n=6)
Table 2 Absorbance values and relative cell growth rates of MC3T3-E1 cells cultured in the extracts of AZ31 magnesium alloy scaffolds with 100%, 75%, 50% and 25% calcium phosphate coatings

组别	1 d		3 d		5 d	
	吸光度($\bar{x}\pm s$)	细胞相对生长率(%)	吸光度($\bar{x}\pm s$)	细胞相对生长率(%)	吸光度($\bar{x}\pm s$)	细胞相对生长率(%)
阴性对照组	0.170±0.027	100.0	0.312±0.072	100.0	0.347±0.032	100.0
25%浓度浸提液组	0.147±0.042	86.5	0.344±0.059 ^a	110.3	0.406±0.082 ^a	117.0
50%浓度浸提液组	0.147±0.016	86.5	0.341±0.029 ^a	109.3	0.369±0.057 ^a	106.3
75%浓度浸提液组	0.146±0.032	85.9	0.324±0.035 ^a	103.8	0.358±0.037 ^a	103.2
100%浓度浸提液组	0.148±0.026	87.1	0.321±0.037 ^a	102.9	0.376±0.024 ^a	109.2

表注: 与同组 1 d 比较, ^aP < 0.05.

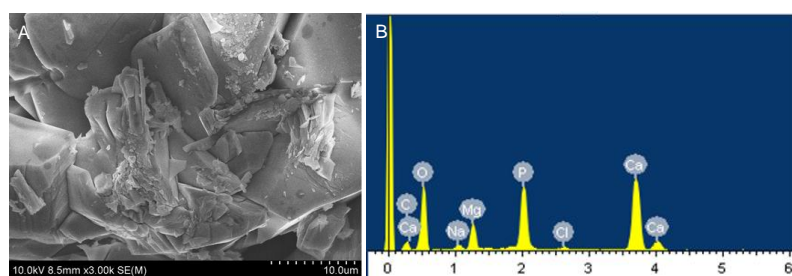


图 1 钙磷涂层 AZ31 镁合金支架的扫描电镜和能谱分析结果

Figure 1 Scanning electron microscope and energy spectrum analysis results of AZ31 magnesium alloy scaffolds with calcium phosphate coatings

图注: 图中 A 为钙磷涂层 AZ31 镁合金支架的扫描电镜表面形貌, 支架表面为一层灰白色的颗粒状物; B 为钙磷涂层 AZ31 镁合金支架的能谱分析结果, 钙磷涂层主要由钙、磷、氧和碳组成。

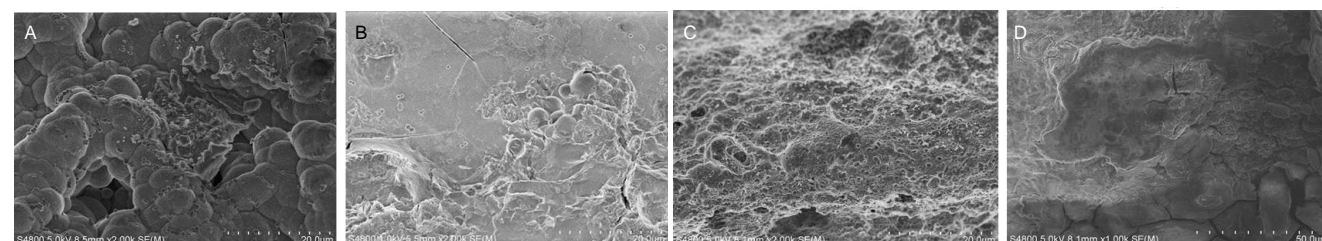


图 2 在 DMEM 细胞培养液中浸泡 30 d 后钙磷涂层和无涂层 AZ31 镁合金支架的体外腐蚀形貌(扫描电镜)

Figure 2 The *in vitro* corrosion morphology of AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without calcium phosphate coatings at 30 days after immersion in DMEM medium under scanning electron microscope

图注: 图中 A 为钙磷涂层 AZ31 镁合金支架, B 为无涂层 AZ31 镁合金支架, 两种支架表面粗糙, 有一层灰白色的腐蚀产物; C 为去除腐蚀产物后的钙磷涂层 AZ31 镁合金支架, D 为去除腐蚀产物后的无涂层 AZ31 镁合金支架, 与无涂层 AZ31 镁合金支架对比, 钙磷涂层 AZ31 镁合金支架表面的腐蚀孔小, 表面分布更加均匀。

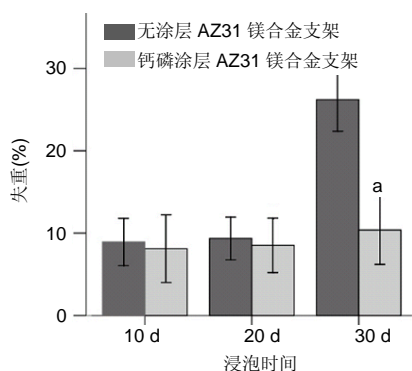


图 3 在 DMEM 细胞培养基中浸泡不同时间点后钙磷涂层和无涂层 AZ31 镁合金支架的体外腐蚀速率

Figure 3 *In vitro* corrosion rates of the AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without calcium phosphate coatings at different time after immersion in the DMEM medium

图注: 与无涂层 AZ31 镁合金支架比较, ^aP < 0.05.

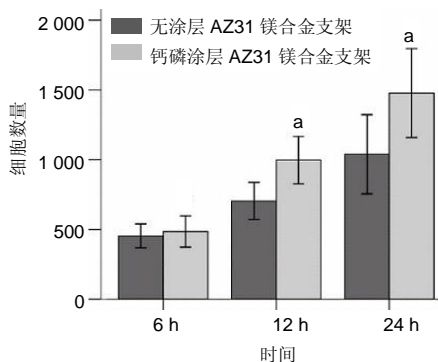


图 5 钙磷涂层和无涂层 AZ31 镁合金支架表面的 MC3T3-E1 细胞黏附数量

Figure 5 The number of adherent MC3T3-E1 cells on the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without calcium phosphate coatings

图注: 与无涂层 AZ31 镁合金支架比较, ^aP < 0.05.

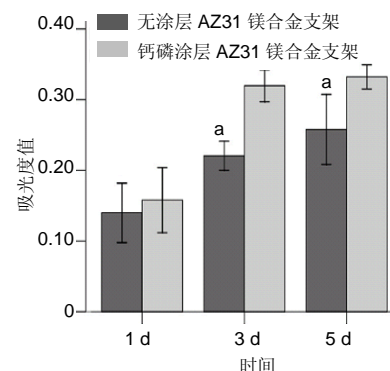


图 6 钙磷涂层和无涂层 AZ31 镁合金支架表面的细胞增殖

Figure 6 Cell proliferation on the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without calcium phosphate coatings

图注: 与钙磷涂层 AZ31 镁合金支架比较, ^aP < 0.05.

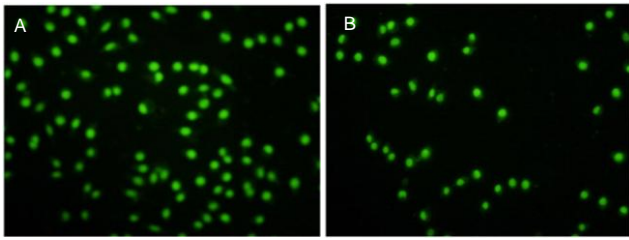


图4 在钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面24h的MC3T3-E1细胞黏附情况(吖啶橙染色, ×400)

Figure 4 The number of adherent cells on the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without calcium phosphate coatings at 24 hours after inoculation (acridine orange staining, ×400)

图注: 图中A为钙磷涂层AZ31镁合金支架表面的细胞, B为无涂层AZ31镁合金支架表面的细胞, 钙磷涂层AZ31镁合金支架表面黏附的细胞数量多于无涂层AZ31镁合金支架。

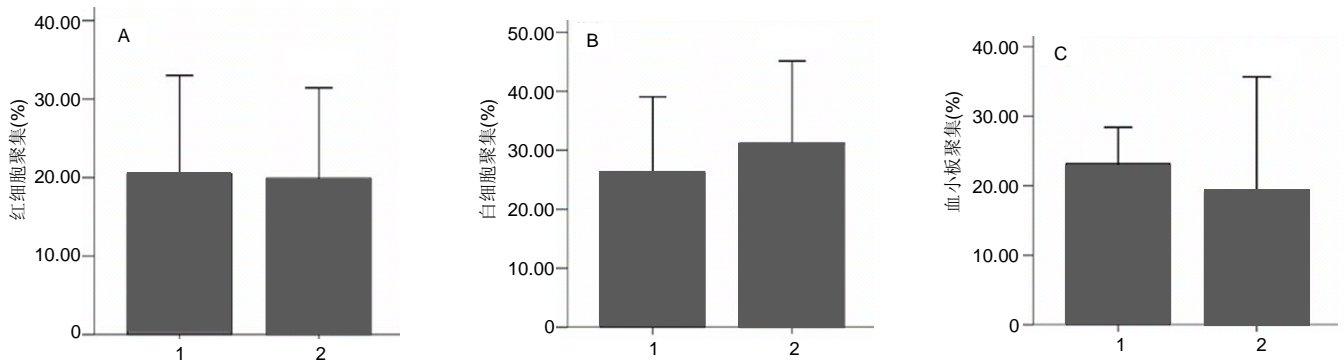


图7 钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面上的血细胞聚集

Figure 7 Blood cell aggregation on the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without calcium phosphate coatings

图注: 图中A为红细胞聚集, B为白细胞聚集, C为血小板聚集; 1代表无涂层AZ31镁合金支架, 2代表钙磷涂层AZ31镁合金支架。两种支架表面的红细胞聚集、白细胞聚集、血小板聚集比较差异均无显著性意义。

接触的表面积(cm^2), T指的是浸泡时间(h), D指的是密度(g/cm^3)。

1.4.5 细胞毒性实验 根据ISO标准用MTT法测定钙磷涂层AZ31镁合金支架浸提液对MC3T3-E1细胞的细胞毒性^[25]。

采用DMEM细胞培养液作浸提介质, 按钙磷涂层AZ31镁合金支架表面积(cm^2)与浸提介质体积(mL)之比为 $1.25 \text{ cm}^2/\text{mL}$ 加入DMEM培养基中, 置于 37°C 、95%相对湿度、体积分数5% CO_2 培养箱内24 h, 得到支架浸提液原始溶液。然后加入DMEM培养基, 分别稀释成25%, 50%, 75%及100%浓度的支架浸提液。取MC3T3-E1细胞, 分别加入25%, 50%, 75%及100%浓度的支架浸提液, DMEM培养基(阴性对照组), 含有0.64%苯酚的DMEM培养基(阳性对照组)^[25-26], 于培养不同时间点进行MTT检测, 每个孔滴入 $20 \mu\text{L}$ 的MTT溶液, 继续培养4 h, 然后吸弃MTT溶液, 加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO震荡15 min, 用酶标仪在490 nm波长测量吸光度(A值)。按下列公式计算细胞相对生长率, 细胞相对生长率(%)=实验组的A值/阴性对照组的A值 $\times 100\%$ 。

根据细胞相对生长率值, 参照毒性分级法评价细胞毒性程度, 评价标准为: ①细胞相对生长率值 $\geq 75\%$, 细胞毒性等级为0或1级(0级为 $\geq 100\%$, 1级为75%–99%), 没有细胞毒性, 属于合格; ②细胞相对生长率值为50%–74%, 细胞毒性等级为2级, 轻度细胞毒性, 应结合细胞形态综合评价; ③细胞相对生长率值 $\leq 49\%$, 细胞毒性3–5级(3级为25%–49%, 4级为1%–24%, 5级为0), 3级和4级为中度细胞毒性, 5级为明显细胞毒性, 属于不合格。

1.4.6 细胞黏附实验 用吖啶橙染色评估黏附于钙磷涂

层AZ31镁合金支架表面的细胞数。将6个钙磷涂层与无涂层样本AZ31镁合金支架分别置于24孔细胞培养板的底部, 将 1 mL MC3T3-E1细胞悬液($5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$)接种到每一个样本。在培养6, 12, 24 h后, 用磷酸盐缓冲液冲洗样品, 去除未黏附的细胞, 然后用0.01%吖啶橙染色10 min, 在荧光显微镜下观察。

1.4.7 细胞增殖实验 将 1 mL MC3T3-E1细胞悬液($5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$)分别接种到钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架上, 每3 d更换一次培养基。培养1, 3, 5 d后, 将细胞以0.25%的trypsin-edta分离出来。经过离心分离后, 用 1 mL 新鲜的DMEM细胞培养液重新悬浮细胞; 再将MTT使用PBS配制成 5 g/L 的MTT液体(即0.5%MTT), 每个孔滴入 $20 \mu\text{L}$ 的0.5% MTT溶液继续培养4 h, 然后吸弃MTT溶液, 加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 震荡15 min, 用酶标仪在490 nm波长测量吸光度。

1.4.8 血细胞聚集实验 血细胞的聚集包括红细胞、白细胞和血小板, 用血细胞计数法进行评估。将新鲜的健康新西兰大白兔动脉血液(3 mL)收集到含草酸钾 0.5 mL (20 g/L)抗凝剂的试管中, 然后, 将钙磷涂层和无涂层的AZ31镁合金支架立即浸入血液中, 8 min后采用自动血液分析仪测量红细胞、白细胞和血小板数量^[27]。

1.5 主要观察指标 钙磷涂层与无涂层AZ31镁合金支架的腐蚀速率及生物相容性。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0软件包对数据进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用%表示, 均数比较采用t检验, 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 钙磷涂层的特征 图1显示了钙磷涂层AZ31镁合金支架的扫描电镜和能谱分析结果, 在扫描电镜下观察, 钙磷涂层AZ31镁合金支架表面为一层灰白色的颗粒状物(图1A); 能谱分析结果表明钙磷涂层主要由钙、磷、氧和碳组成(图1B)。

2.2 静态浸泡实验结果 图2显示了在DMEM细胞培养基中浸泡30 d后, 钙磷涂层AZ31镁合金支架和无涂层AZ31镁合金支架的表面形貌。在钙磷涂层AZ31镁合金支架和无涂层AZ31镁合金支架表面有一层腐蚀产物(图2A, B), 能谱分析分析表明腐蚀产物的化学组成主要是氧、碳、钙、磷、镁、钠和氯(表1)。清除腐蚀产物后, 钙磷涂层与无涂层AZ31镁合金支架表面都能够清晰地看到腐蚀坑, 然而, 与无涂层AZ31镁合金支架对比, 钙磷涂层AZ31镁合金支架表面的腐蚀孔小, 表面分布更加均匀, 而无涂层AZ31镁合金支架存在严重的凹陷和普遍腐蚀(图2C, D), 说明了拥有钙磷涂层的AZ31镁合金支架抗腐蚀性能更好。

表1 钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面腐蚀产物的化学组成
Table 1 Elemental composition of the corrosion products on the surface of AZ31 magnesium alloy scaffolds with or without calcium phosphate coatings

元素	钙磷涂层 AZ31 镁合金		无涂层 AZ31 镁合金	
	质量分数(%)	原子数分数(%)	质量分数(%)	原子数分数(%)
O	51.77	58.98	58.13	63.97
C	15.24	23.13	10.01	56.20
Ca	16.59	7.54	4.41	1.94
P	10.12	5.95	2.50	1.42
Mg	2.68	2.01	23.87	17.21
Na	1.89	0.75	1.08	0.70
Cl	1.70	0.88	2.10	1.02

在DMEM细胞培养基中浸泡10, 20, 30 d后, 钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架的腐蚀速率如图3所示。浸泡30 d后, 无涂层AZ31镁合金支架的腐蚀速率约26.21%, 钙磷涂层AZ31镁合金支架的腐蚀速率为10.38%。与无涂层AZ31镁合金支架的腐蚀速率相比, 钙磷涂层AZ31镁合金支架的腐蚀速率明显减慢($P < 0.05$)。

2.3 细胞毒性实验结果 如表2所示, 在细胞培养1, 3, 5 d后, 不同浓度钙磷涂层AZ31镁合金支架浸提液中MC3T3-E1细胞的相对生长率在每个时间点均 $> 75%$, 根据ISO标准提示钙磷涂层AZ31镁合金支架细胞毒性等级为0至1级, 表明钙磷涂层AZ31镁合金支架对MC3T3-E1细胞没有明显毒性作用。

2.4 细胞黏附实验结果 图4显示吖啶橙染色结果, 与无涂层AZ31镁合金支架相比, 钙磷涂层AZ31镁合金支架表面黏附的细胞数量显著增加。培养6, 12, 24 h, 钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架的细胞数见图5所示, 钙磷涂层AZ31镁合金支架12, 24 h表面黏附的细胞明显多于无涂层AZ31镁合金支架表面($P < 0.05$)。

2.5 细胞增殖实验结果 图6显示了钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面的细胞增殖, 每组细胞增殖随着培养时间的增加而增加, 表明细胞可在钙磷涂层及无涂层AZ31镁合金支架表面黏附并增殖; 与无涂层AZ31镁合金支架相比, 钙磷涂层AZ31镁合金支架表面第3, 5天的细胞增殖显著增加($P < 0.05$), 表明钙磷涂层AZ31镁合金支架的表面生物活性明显优于无涂层AZ31镁合金支架。

2.6 血细胞聚集实验结果 血细胞聚集实验可用于研究生物材料与血细胞之间的相互作用, 血液中的主要成分有血细胞, 包括红细胞、白细胞和血小板, 分别在维持营养和氧气供给、炎症和凝血过程中发挥重要作用。生物材料引起的溶血、白细胞活化及血小板黏附和活化情况是血液相容性的主要研究内容。根据ISO标准规定对应用于人体的医用材料, 必须进行体外血液相容性的评价^[28]。实验主要研究了钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面血细胞的聚集情况, 钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面的血细胞聚集结果如图7所示。如图7A所示, 聚集于钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面的红细胞分别为19.90%和20.46%, 两组红细胞聚集无明显差异($P > 0.05$)。如图7B所示, 聚集于钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面的白细胞分别为31.21%和26.24%, 两组白细胞聚集无明显差异($P > 0.05$)。如图7C所示, 聚集于钙磷涂层和无涂层AZ31镁合金支架表面的血小板分别为19.03%和23.22%, 两组血小板聚集无差异($P > 0.05$)。这些结果表明, 由于优良的血液相容行为, 钙磷涂层AZ31镁合金表面没有明显的血细胞聚集。

3 讨论 Discussion

近年来, 镁合金被认为是一种较为理想的应用于骨科的可降解金属材料, 然而, 镁合金在体液中的高腐蚀率是限制其临床应用的关键因素^[3, 5, 28]。合金化是提高镁及合金耐腐蚀性的一种简便而有效的方法^[29-31]。研究结果证明, 经过合金化进一步提升了镁及镁合金的抗腐蚀能力; 但由于镁的高负电性特点, 单纯依靠合金化来提高镁及其合金的耐腐蚀性还远远不够。合金表面涂层是提高镁及其合金耐腐蚀性的另一种方法^[32-38], 然而, 由于镁的高反应性和较低的熔点^[39], 以及临床应用所不能接受的毒性, 因此并不是所有的涂层都适用于镁及其合金。在此次研究中, 采用化学沉积法在AZ31镁合金支架表面制备钙磷涂层, 并对其表面结构和化学组成进行检测, 重点探讨钙磷涂层对AZ31镁合金支架耐腐蚀性和其表面生物相容性的影响。

3.1 钙磷涂层对镁合金支架耐腐蚀性的影响 研究AZ31镁合金支架表面钙磷涂层, 首要关注的问题是钙磷涂层能否增强镁合金支架降解过程中的耐腐蚀性。静态浸泡试验前, 利用扫描电镜观察钙磷涂层AZ31镁合金支架表面形貌, 结果显示为一层灰白色的颗粒状物, 能谱分析结果显示钙磷涂层主要由钙、磷、氧和碳组成, 表明钙磷涂层具有良好生物相容性基础。再将AZ31镁合金支架浸泡在

DMEM细胞培养基中,浸泡30 d后,扫描电镜显示AZ31镁合金支架表面的钙磷涂层形状呈叶片状,能谱分析结果表明腐蚀产物的化学组成主要是氧、碳、钙、磷、镁、钠和氯构成,再次证明钙磷涂层具有良好的生物相容性的优势。在DMEM细胞培养基中静态浸泡10, 20, 30 d之后,钙磷涂层AZ31镁合金支架的腐蚀速率较无涂层AZ31镁合金支架显著降低($P < 0.05$),表明钙磷涂层可以提高AZ31镁合金支架的耐腐蚀性能。清除镁合金表面腐蚀产物后,扫描电镜下进一步观察钙磷涂层AZ31镁合金支架的腐蚀形貌,发现钙磷涂层AZ31镁合金支架表面的腐蚀坑比无涂层AZ31镁合金支架表面的腐蚀坑体积更小,而且分布更加均匀,表明无涂层AZ31镁合金支架存在严重的凹陷和普遍腐蚀,而钙磷涂层可以提高AZ31镁合金支架的耐腐蚀性能。通过上述试验证明了钙磷涂层具有良好的生物相容性,并且钙磷涂层支架表面可见大量的颗粒状或片状结构,这可能是增加了支架的表面积,提高了镁合金的抗腐蚀性能。表面改性后,对钙磷涂层AZ31镁合金支架耐腐蚀性造成影响的关键原因是,表面涂层的化学性能及物理性能。首先,钙磷涂层表面涂层的厚度对于AZ31镁合金支架的耐腐蚀性影响很大;其次,是腐蚀速度的快慢,主要受到钙磷涂层完整性的制约。所以,下一步将对表面涂层的物理性能和化学性质重点进行研究。

3.2 钙磷涂层对镁合金支架生物相容性的影响 研究AZ31镁合金支架表面钙磷涂层的另一个主要问题是钙磷涂层能否改善AZ31镁合金支架的表面生物相容性。首先,采用细胞实验研究钙磷涂层AZ31镁合金支架的细胞相容性,包括细胞毒性实验、细胞黏附及细胞增殖实验。细胞毒性实验结果显示,钙磷涂层AZ31镁合金支架浸提液中培养的MC3T3-E1细胞每个时间点的细胞相对生长率均大于75%,细胞毒性在0-1级,说明钙磷涂层AZ31镁合金支架对MC3T3-E1细胞没有明显的毒性。细胞黏附结果显示与无涂层AZ31镁合金支架比较,钙磷涂层AZ31镁合金支架对于细胞的黏附能力有显著作用($P < 0.05$);细胞增殖实验结果显示与无涂层AZ31镁合金支架相比,钙磷涂层AZ31镁合金支架表面的细胞增殖显著提高($P < 0.05$);综合细胞黏附和细胞增殖实验结果,表明钙磷涂层显著改善了AZ31镁合金支架表面生物活性。钙磷涂层可明显增加AZ31镁合金表面的细胞黏附和增殖,可能是钙磷涂层AZ31镁合金支架为MC3T3-E1细胞提供了良好的生物环境。一方面,AZ31镁合金支架表面的钙磷涂层当中没有任何的有毒成分,并且全部具有生物相容性;另一方面,钙磷涂层AZ31镁合金支架对MC3T3-E1细胞黏附和增殖的改善与降低了镁合金的腐蚀速率密切相关。通常,镁合金的细胞毒性是由于高腐蚀速率导致的,从而导致高的细胞渗透性^[40-41]。然而,最近的研究表明,适当的镁离子浓度可通过调控蛋白质合成和辅助过程来激活细胞^[42-43];同时,沉积在钙磷涂层AZ31镁合金支架表面的钙离子可促进细胞增殖^[44-46]。综上所述,钙磷涂层AZ31镁合金支架没有明显的细胞毒

性,可促进细胞的黏附和增殖,提高细胞生物活性。但该项研究也有很大的缺点。第一,静态的浸泡实验不能完全按照人体的生理实际状况进行模拟,主要是由于人体体液在不断循环,时时刻刻都在流动,在身体内不同的部位离子浓度会发生不同的变化^[47];其次,课题组只进行了体外实验,尚未进行体内实验,还需要进一步通过体内实验来验证体外实验的结果。

总之,在此次研究中课题组采用化学沉积法在AZ31镁合金支架表面成功制备钙磷涂层,其成分主要由氧、碳、钙和磷组成,研究发现钙磷涂层可显著提高AZ31镁合金支架的耐腐蚀性;体外研究结果表明,钙磷涂层改善了AZ31镁合金支架的细胞相容性和血液相容性。总体来说,此次研究结果表明,钙磷涂层AZ31镁合金支架逐渐被吸收,耐腐蚀性有提高,生物相容性有改善,表明钙磷涂层AZ31镁合金支架是一种很有前途的骨科生物材料。

作者贡献: 王勇平、马飞进行实验设计,实验实施为王勇平、马飞,实验评估为马飞、李想、谢瑞敏,资料收集为马飞、李想、谢瑞敏,马飞成文,王勇平、何耀华审核。

经费支持: 该文章接受了“甘肃省高等学校科研项目(2018B-013)”、“兰州大学第一医院科研项目(Idyyyn2017-21; Idyyyn2013-01)”、“国家自然科学基金资助项目(81271961, 81572106)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

伦理问题: 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 王勇平,蒋垚.基于SCI数据库收录文献分析镁合金植入物在骨科的应用[J].中国组织工程研究,2012,16(16):2971-2980.
- [2] 王勇平,尹自飞,蒋垚,等.镁合金材料在医学临床领域的应用[J].中华临床医师杂志,2011,5(24):7323-7326.
- [3] Witte F.The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomaterialia*.2010;6:1680-1692.
- [4] Zhang S,Zhang X,Zhao C,et al.Research on an Mg-Zn alloy as a degradable biomaterial.*Acta Biomaterialia*. 2010;6(2):626-640.
- [5] Staiger MP,Pietak AM,Huadmai J,et al.Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials*. 2006;27:1728-1734.
- [6] Li Z,Gu X,Lou S,et al.The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials*. 2008;29:1329-1344.

- [7] Zberg B, Uggowitzer PJ, Löffler JF. MgZnCa glasses without clinically observable hydrogen evolution for biodegradable implants. *Nat Mater*. 2009;8(11):887-891.
- [8] 王勇平, 何耀华, 朱兆金, 等. Mg-Nd-Zn-Zr 镁合金体外降解行为及生物相容性[J]. *科学通报*, 2012, 57(32):3109-3116.
- [9] Gu X, Zheng Y, Cheng Y, et al. In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys. *Biomaterials*. 2009;30(4):484-498.
- [10] 王勇平, 蒋垚, 毛琳, 等. 可降解金属 Mg-Nd-Zn-Zr 镁合金的降解行为[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(47):8189-8195.
- [11] Witte F, Kaese V, Haferkamp H, et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials*. 2005;26(17):3557-3563.
- [12] Walter R, Kannan MB. In vitro degradation behaviour of WE54 magnesium alloy in simulated body fluid. *Mater Lett*. 2011;65:748-750.
- [13] Hänzli AC, Gerber I, Schinhammer M, et al. On the in vitro and in vivo degradation performance and biological response of new biodegradable Mg-Y-Zn alloys. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(5):1824-1833.
- [14] Salahshoor M, Guo YB. Surface integrity of biodegradable magnesium-calcium orthopedic implant by burnishing. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(8):1888-1904.
- [15] Wang Y, Ouyang Y, He Y, et al. Biocompatibility of Mg-Nd-Zn-Zr alloy with rabbit blood. *Chin Sci Bull*. 2013;58:2903-2908.
- [16] Wang Y, He Y, Zhu Z, et al. In vitro degradation and biocompatibility of Mg-Nd-Zn-Zr alloy. *Chin Sci Bull*. 2012;57(17):2163-2170.
- [17] Wang Y, Zhu Z, He Y, et al. In vivo degradation behavior and biocompatibility of Mg-Nd-Zn-Zr alloy at early stage. *Int J Mol Med*. 2012;29(2):178-184.
- [18] Wang Y, Ouyang Y, Peng X, et al. Effects of degradable Mg-Nd-Zn-Zr alloy on osteoblastic cell function. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25(3):597-606.
- [19] Zhang S, Li J, Song Y, et al. In vitro degradation, hemolysis and MC3T3-E1 cell adhesion of biodegradable Mg-Zn alloy. *Mater Sci Eng C*. 2009;29:1907-1912.
- [20] Xu L, Zhang E, Yin D, et al. In vitro corrosion behaviour of Mg alloys in a phosphate buffered solution for bone implant application. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(3):1017-1025.
- [21] Wei J, Jia J, Wu F, et al. Hierarchically microporous / macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials*. 2010;31:1260-1269.
- [22] Yamamoto A, Watanabe A, Sugahara K, et al. Improvement of corrosion resistance of magnesium alloys by vapor deposition. *Scr Mater*. 2001;44:1039-1042.
- [23] Gray JE, Luan B. Protective coatings on magnesium and its alloys—a critical review. *J Alloys Compd*. 2002;336:88-113.
- [24] ASTM-G31-72: Standard practice for laboratory immersion corrosion testing of metals. In: *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia, PA: ASTM, 2004.
- [25] ISO 10993. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods. 1999.
- [26] ISO 10993. Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials. 2002.
- [27] Ito Y, Sisido M, Imanishi Y. Adsorption of plasma proteins and adhesion of platelets onto novel polyetherurethaneureas—relationship between denaturation of adsorbed proteins and platelet adhesion. *J Biomed Mater Res*. 1990;24(2):227-242.
- [28] Persaud-Sharma D, McGoron A. Biodegradable magnesium alloys: A review of material development and applications. *J Biomim Biomater Tissue Eng*. 2012;12:25-39.
- [29] Kirkland NT, Birbilis N, Walker J, et al. In vitro dissolution of magnesium-calcium binary alloys: Clarifying the unique role of calcium additions in bioresorbable magnesium implant alloys. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;95(1):91-100.
- [30] Kirkland NT, Lespagnol J, Birbilis N, et al. A survey of bio-corrosion rates of magnesium alloys. *Corros Sci*. 2010;52:287-291.
- [31] Witte F, Fischer J, Nellesen J, et al. In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials*. 2006;27:1013-1018.
- [32] Yang J, Cui F, Lee IS. Surface modifications of magnesium alloys for biomedical applications. *Ann Biomed Eng*. 2011;39:1857-1871.
- [33] Li GY, Lian JS, Niu LY, et al. Growth of zinc phosphate coatings on AZ91D magnesium alloy. *Surf Coat Technol*. 2006;201:1814-1820.
- [34] Zhao M, Wu S, An P, et al. Microstructure and corrosion resistance of a chromium-free multi-elements complex coating on AZ91D magnesium alloy. *Mater Chem Phys*. 2006;99:54-60.
- [35] Wang YQ, Wu K, Zheng MY. Effects of reinforcement phases in magnesium matrix composites on microarc discharge behavior and characteristics of microarc oxidation coatings. *Surf Coat Technol*. 2006;201:353-360.
- [36] Thorey F, Menzel H, Lorenz C, et al. Osseointegration by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta 2 coated titanium implants in femora of New Zealand white rabbits. *Indian J Orthop*. 2011;45(1):57-62.
- [37] Aykut S, Ozturk A, Ozkan Y, et al. Evaluation and comparison of the antimicrobial efficacy of teicoplanin- and clindamycin-coated titanium implants: an experimental study. *J Bone Joint Surg Br*. 2010;92(1):159-163.
- [38] Kazemzadeh-Narbat M, Kindrachuk J, Duan K, et al. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials*. 2010;31:9519-9526.
- [39] Wen C, Guan S, Peng L, et al. Characterization and degradation behavior of AZ31 alloy surface modified by bone-like hydroxyapatite for implant applications. *Appl Surf Sci*. 2009;255:6433-6438.
- [40] Witte F, Hort N, Vogt C, et al. Degradable bio-materials based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2008;12:63-72.
- [41] Song GL. Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys. *Corros Sci*. 2007;49:1696-1701.
- [42] Rude RK, Gruber HE, Wei LY, et al. Magnesium deficiency: Effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(1):32-41.
- [43] Harry R. Magnesium: The missing element in molecular views of cell proliferation control. *Bioassays*. 2005;27:311-320.
- [44] Yamaguchi M, Oishi H, Suketa Y. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(22):4007-4012.
- [45] Villa I, Dal Fiume C, Maestroni A, et al. Human osteoblast-like cell proliferation induced by calcitonin-related peptides involves PKC activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(3):E627-633.
- [46] Cheng K, Weng W, Wang H, et al. In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings. *Biomaterials*. 2005;26(32):6288-6295.
- [47] Lévesque J, Hermawan H, Dubé D, et al. Design of a pseudo-physiological test bench specific to the development of biodegradable metallic biomaterials. *Acta Biomater*. 2008;4(2):284-295.