

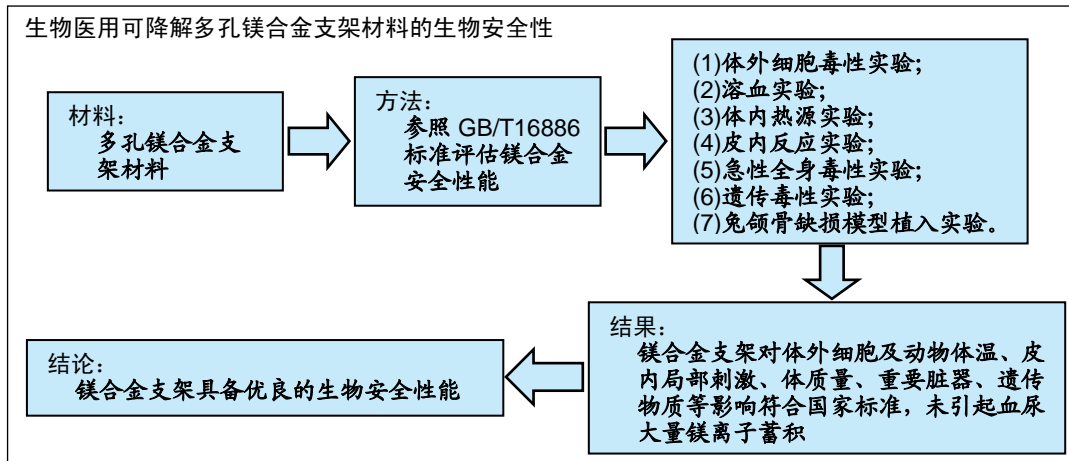
## 颌骨缺损修复用多孔镁合金支架材料的生物安全性评价研究

王亮<sup>1</sup>, 郭玉兴<sup>1</sup>, 黄华<sup>2</sup>, 袁广银<sup>2</sup>, 张雷<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北京大学口腔医院口腔颌面外科, 北京市 100081; <sup>2</sup>上海交通大学轻合金精密加工成型国家工程中心, 上海市 200240)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1736

ORCID: 0000-0002-5333-945X(王亮)

文章快速阅读:



王亮, 男, 1991年生, 河北省保定市人, 汉族, 北京大学口腔医学院在读硕士, 医师, 主要从事新型颌骨缺损修复镁合金材料的性能研究。

通讯作者: 张雷, 主任医师, 北京大学口腔医院口腔颌面外科, 北京市 100081

文献标识码:A

稿件接受: 2019-03-03



文题释义:

**多孔镁合金支架材料:** 针对颌骨缺损设计的可降解金属修复支架材料, 以 Mg 元素为主体, 加入了 Nd、Zn、Zr 等元素, 既有金属的优良机械学性能又可缓慢均匀降解, 避免了二次手术取出问题; 镁合金的诱导成骨性能及多孔支架形态设计有利于新骨形成。

**医疗器械生物安全性评价:** 医疗器械是指直接或者间接用于人体的仪器、设备、器具、材料及其他类似或者相关的物品, 其应用于临床必须保证安全性和有效性。医疗器械安全性评价一般需参照国标整理的方案, 通用的包括细胞毒性、全身急性毒性、血液相容性评价、皮肤致敏实验等。

摘要

**背景:** 研究已证实部分生物医用镁合金产品生物安全性及其他优势性能, 但在其合金成分基础上改变制作工艺及产品形态制得的多孔支架材料生物安全性尚不明确。

**目的:** 探讨生物医用多孔镁合金支架材料的生物安全性能。

**方法:** 制备多孔镁合金支架材料浸提液, 参照 GB/T16886 医疗器械生物学评价系列标准, 进行体外细胞毒性实验、体外溶血实验、皮内反应实验、热源实验、急性全身毒性实验及遗传毒性实验, 评估多孔镁合金支架材料浸提液对人骨髓间充质干细胞活性及血细胞膜结构完整性的影响, 对动物皮内组织、体温、体质量、嗜多染红细胞染色体结构的影响; 制备动物下颌骨缺损模型, 将多孔镁合金材料植入缺损区, 评估其对动物血清及尿液  $Mg^{2+}$  浓度、血细胞数目和重要脏器等的的影响。实验已通过北京大学医学部动物伦理委员会审核批准, 批号为 LA2017217。

**结果与结论:** ①多孔镁合金支架材料浸提液可促进骨髓间充质干细胞的增殖, 细胞毒性为 0 级; ②多孔镁合金支架材料浸提液的溶血率为 0.94%, 皮内刺激反应为 0 分, 符合医疗器械溶血实验 (<5%) 及皮内反应实验 (最终记分 ≤ 1.0) 相关要求; ③注射多孔镁合金浸提液后, 所有动物体温升高均 ≤ 0.4 °C, 升高总度数 ≤ 0.8 °C, 符合医疗器械热源实验相关要求; ④多孔镁合金浸提液未引起动物全身毒性反应, 未破坏嗜多染红细胞染色体结构; ⑤多孔镁合金支架材料植入动物骨缺损 1 个月内, 动物血清及尿液  $Mg^{2+}$  浓度无明显变化, 红细胞、白细胞、血小板处在正常范围, 未引起心、肝、肾、脾组织明显的病理性改变; ⑥结果表明, 多孔镁合金支架材料具备优良的生物安全性能。

关键词:

镁合金支架材料; 多孔镁合金; 生物安全性; 生物降解性; 颌骨缺损; 体外细胞毒性实验; 溶血实验; 皮内反应实验; 热源实验; 急性全身毒性实验; 遗传毒性实验

中图分类号: R459.9; R318.08

基金资助:

科技部重点研发计划子课题(2016YFC1102104), 项目参与者: 张雷; 国家自然科学基金(51571143), 项目负责人: 袁广银; 上海市卫生和计划生育委员会课题(201640281), 项目参与者: 袁广银

Wang Liang, Master candidate, Physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China

Corresponding author: Zhang Lei, Chief physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China

## Evaluation of biosafety of porous magnesium alloy scaffolds for jaw defects

Wang Liang<sup>1</sup>, Guo Yuxing<sup>1</sup>, Huang Hua<sup>2</sup>, Yuan Guangyin<sup>2</sup>, Zhang Lei<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>National Engineering Research Center of Light Alloys Net Forming and State Key Laboratory of Metal Matrix Composite, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Biosafety and other advantages of biomedical magnesium alloy products have been confirmed, but the biosafety of porous scaffold materials prepared by changing the manufacturing process and product morphology based on the alloy composition is unclear.

**OBJECTIVE:** To investigate the biosafety properties of a biomedical porous magnesium alloy scaffold.

**METHODS:** Extracts of porous magnesium alloy scaffold materials were prepared, and *in vitro* cytotoxicity experiment, *in vitro* hemolysis experiment, intrathelial reaction experiment, pyrogen experiment, acute systemic toxicity experiment and genetic toxicity experiment were conducted according to GB/T16886 biological evaluation series of medical devices. The effects of extracts of porous magnesium alloy scaffold materials on the activity of human bone marrow mesenchymal stem cells and the structural integrity of blood cell membrane, and the effects on the animal endothelial tissue, body temperature, body mass and chromosomal structure of polychromatic red blood cells were evaluated. Animal mandibular defect model was prepared, and porous magnesium alloy was implanted into the defect area to evaluate its influence on serum and urine Mg<sup>2+</sup> concentration, blood cell number and important organs. The study was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Peking University Health Science Center (approval number: LA2017217).

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The extracts of porous magnesium alloy scaffolds could promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells, and the cytotoxicity was 0. (2) The hemolysis rate of the extracts of porous magnesium alloy scaffold material was 0.94%, and the response to intradermal stimulation was 0, which met the requirements of medical device hemolysis experiment (< 5%) and intradermal reaction experiment (final score ≤ 1.0). (3) After the injection of porous magnesium alloy extract, the increased degree of body temperature was ≤ 0.4 °C and elevated total degree ≤ 0.8 °C in all animals, which conformed to the requirements of the medical equipment of heat experiment. (4) The porous magnesium alloy extract caused no systemic toxicity or damaged chromosomal structure of polychromatic erythrocytes. (5) Within 1 month after implantation of porous magnesium alloy scaffold material into the bone defect, there was no significant change in serum and urine Mg<sup>2+</sup> concentration, the red blood cells, white blood cells and platelets were in the normal range, and no obvious pathological changes were found in the heart, liver, kidney and spleen tissues. (6) These results imply that porous magnesium alloy scaffold has excellent biosafety property.

**Key words:** magnesium alloy scaffold materials; porous magnesium alloy; biosafety; biodegradable; jaw defect; *in vitro* cytotoxicity experiment; hemolysis experiment; intrathelial reaction experiment; pyrogen experiment; acute systemic toxicity experiment; genetic toxicity experiment

**Funding:** the Key Research and Development Program of Ministry of Science and Technology, No. 2016YFC1102104 (to ZL); the National Natural Science Foundation of China, No. 51571143 (to YGY); the Project of Shanghai Municipal Health Commission, No. 201640281 (to YGY)

## 0 引言 Introduction

目前临床上用于骨折固定及骨缺损修复的材料主要是钛合金材料, 该类材料机械性能优良, 能保证骨折及骨缺损区愈合期间的稳定性, 但其弹性模量远大于人类骨骼, 会在钛合金固定区域产生应力遮挡, 引起遮挡部分骨质疏松<sup>[1]</sup>. 钛合金材料为生物惰性材料, 在体内几乎不被吸收, 在临床使用中存在炎症反应及异物反应的可能, 多数患者需要二次手术取出<sup>[2]</sup>. 因为镁合金的弹性模量与人体骨更为相近<sup>[3]</sup>, 且具备优良的机械学性能、生物相容性、可降解性能、价格低廉等<sup>[4]</sup>, 被视为潜力巨大的生物植入材料, 甚至被称为“革命性的金属生物材料”<sup>[5]</sup>. 近年来, 有越来越多的研究报道镁合金材料具有诱导成骨性<sup>[6-9]</sup>, 于是针对颌骨缺损后修复困难的临床问题, 作者研发了具备较高强度及塑性的多孔镁合金可降解支架材料, 旨在通过植入骨缺损区发挥缺损修复作用的同时引导骨组织生长, 缩短骨愈合时间, 提高骨缺损治疗效果。

但新型颌骨缺损修复材料的研发, 首先应满足临床应用的生物安全性问题, 目前有关镁合金材料安全性隐患的报道主要集中在其降解过程产气及离子蓄积问题, 而解决这些问题的主要方法就是控制降解速度及保证合金化添加元素的安全性及安全剂量<sup>[5]</sup>. 对于上海交通大学开发的生物医用镁合金材料, 既往已有相关研究验证了其部分产品生物安全性

及其他优势性能<sup>[10]</sup>, 但在其合金成分基础上改变制作工艺及产品形态制得的多孔支架材料生物安全性是不明确的. 为了验证多孔镁合金支架材料是否存在生物安全问题, 参照 GB/T16886 医疗器械生物学评价系列标准开展相关体内、外实验评价其生物安全性能, 为临床应用提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体内、外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年7月至11月在北京大学口腔医院中心实验室完成。

1.3 材料 多孔镁合金支架材料, 见图1, 表1。

表1 多孔镁合金支架材料理化性能

Table 1 Physical and chemical properties of porous magnesium alloy scaffold material

项目	多孔镁合金支架材料
来源	上海交通大学轻合金精密成型国家工程研究中心提供
材料规格	长 1.5 cm, 宽 0.7 cm, 高 0.6 cm, 矩形块状材料
材料成分	以镁元素为主, 质量百分比 ≥ 96%, 还融入少量 Nd、Zn、Zr 元素合金化
制备工艺	首先利用热压烧结工艺将球形 NaCl 颗粒制备成开放多孔支架模板, 然后在一定压力下将液态镁合金金属材料渗透至 NaCl 模板中, 固化后流动水浴浸出 NaCl 模板, 再经超声清洗、硝酸酒精蚀刻、表面氟化处理、高温高压蒸汽灭菌等步骤处理后备用 <sup>[11]</sup>
医用范围	目前只适用于体外实验及动物体内实验

**实验动物:** 日本大耳白兔和昆明小鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

**实验用细胞与试剂:** 人骨髓间充质干细胞(HMSC-bm, ATCC); DMEM培养基(8118286)、青霉素-链霉素(1999373)、0.25% EDTA胰酶(1933273)(美国Gibco); 特级胎牛血清(FBS, AB20171102S, 乌拉圭ABW); 草酸钾(天津永大试剂); 乌拉坦(上海士锋); 注射用环磷酰胺(17090525, 江苏盛迪医药); FAB固定液、瑞氏-姬姆萨复合染液(北京索莱宝)。

**实验用主要设备:** 低速离心机(湘仪, 中国); 外科动力系统(Nouvag, 瑞士), 酸度计(Mettler, 瑞士); 体式荧光显微镜(Olympus, 日本); 酶标仪(BioTek, 美国); 扫描电子显微镜(S-4800, 日本); 电感耦合等离子体发射光谱仪(Agilent, 美国)。

**1.4 实验方法** 实验方案经北京大学医学部动物伦理委员会审核批准, 批号为LA2017217。

#### 1.4.1 多孔镁合金支架材料浸提液及对比液的制备

**浸提液制备:** 不规则形状固体器械表面积和浸提液体积比例0.2 g/mL, 浸提介质选用无菌生理盐水及DMEM培养基, 置于37 °C、80 r/min恒温摇床内24 h后获得浸提液<sup>[12]</sup>, 经电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP)及pH计分别测Mg<sup>2+</sup>浓度及pH值。DMEM浸提液制得后, 加入体积分数为10%胎牛血清及1%的青霉素-链霉素。

**对比液:** 以所选用介质(无菌生理盐水或DMEM培养基)为对比液。

**1.4.2 体外细胞毒性实验** 采用CCK-8法评估实验样液对人骨髓间充质干细胞的毒性。选用复苏后第3代人骨髓间充质干细胞单细胞悬液, 按照每孔5 000个细胞铺于96孔培养板, 置入37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中24 h; 显微镜下细胞贴壁后, 弃原培养液, 按100 μL/孔、18孔/组加入多孔镁合金材料DMEM浸提液(实验组)与DMEM培养基(阴性对照组)。继续培养第2, 4, 6天, 分别于各组内随机选取5孔加入10 μL CCK-8试剂, 在培养箱继续孵育4 h, 取孔内上清液用酶标仪测定波长450 nm的吸光度值, 计算细胞相对增殖率<sup>[12]</sup>, 并参照《美国药典》进行评级: 细胞相对增殖率≥100%时被评为0级; 细胞相对增殖率≥75%时评为1级; 50%≤细胞相对增殖率<75%时评为2级; 0或1级为合格。细胞相对增殖率(%)=实验组平均吸光度值/阴性对照组吸光度值×100%。

**1.4.3 体外溶血实验** 选健康志愿者1名, 静脉采血10 mL, 取0.5 mL, 2%草酸钾生理盐水抗凝处理, 稀释后37 °C保温备用。取5 mL离心管, 按照3管/组分3组, 实验组每管内加入5 mL镁合金材料生理盐水浸提液, 阴性对照组加等量生理盐水, 阳性对照组加等量蒸馏水。待离心管于37 °C水浴锅内保温30 min后, 每管内加入0.2 mL稀释抗凝血, 继续水浴保温60 min。各组离心管以1 200 r/min离心5 min, 吸取上清液移入96孔板, 每管设3个复孔, 用酶标

仪测定上清液在波长545 nm处的吸光度值<sup>[12]</sup>。溶血率(%)=[(试验组吸光度值-阴性对照组吸光度值)/(阳性对照组吸光度值-阴性对照组吸光度值)]×100%

**1.4.4 皮内反应实验** 取日本大耳白兔3只, 体质量2.5-3.0 kg, 雌雄不拘, 背部备皮24 h后, 于脊柱两侧各选择5个点, 每点间隔2.5 cm, 右侧(实验侧)各选取点处皮下分别注射0.2 mL多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 左侧(对照侧)各选取点处皮下注射0.2 mL生理盐水, 见图2。注射后24, 48, 72 h, 观察注射点局部及周围皮肤有无红斑和水肿等炎症反应。根据皮内反应评分系统, 见表2, 分别记录每只受试兔两侧3个时间点注射试验样液后出现红斑和水肿的分数, 总和除以3, 得出实验侧和对照侧的总平均分, 并通过比较两者差值得出实验样液最终记分<sup>[12]</sup>。

表2 皮内反应评分系统

Table 2 Intradermal response scoring system

分值	红斑和焦痂形成	水肿形成
0	无红斑	无水肿
1	极轻微红斑(勉强可见)	极轻微水肿(勉强可见)
2	清晰红斑	清晰水肿(肿起边缘清晰)
3	中度红斑	中度水肿(肿起约1 mm)
4	重度红斑(紫红色)至焦痂形成	重度水肿(肿起超过1 mm)

**1.4.5 热源实验** 取6只体温相对稳定的日本大耳白兔<sup>[13]</sup>, 体质量2.5-3.0 kg, 雌雄不拘, 实验前再分别间隔30 min测3次肛温, 取其平均值为正常体温值。将兔分2组, 3只/组, 实验组按10 mL/kg剂量经左侧耳缘静脉缓慢注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 对照组按同等剂量注射生理盐水。注射后1, 2, 3 h分别测量兔肛温<sup>[13]</sup>, 计算体温变化值及升高总度数<sup>[12]</sup>。

**1.4.6 急性全身毒性实验** 取8周龄健康昆明小鼠20只, 体质量19-21 g, 记录每只小鼠初始体质量。将小鼠分2组, 10只/组, 每组内雌雄各5只: 实验组按照50 mL/kg剂量腹腔注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 对照组注射等量生理盐水。注射后连续7 d观察并记录小鼠的进食、活动等一般情况、毒性表现和死亡动物数量, 记录注射后1, 2, 3, 7 d与初始体质量测量时同一时间段小鼠的体质量变化。注射7 d后, 采用过量CO<sub>2</sub>与颈椎脱臼处死小鼠, 切开腹腔后观察腹腔内有无腹水、各脏器有无水肿、脏器粘连或坏死等表现。每组内随机选雌雄各2只, 取心脏、肝、肾、脾组织标本, 制作切片后苏木精-伊红染色, 观察有无病理性改变<sup>[12]</sup>。

**1.4.7 遗传毒性实验** 采用骨髓微核实验法计数嗜多染红细胞中异常染色体微核细胞数。取30只健康昆明小鼠, 体质量25 g左右, 分3组, 10只/组, 每组内雌雄各5只: 实验组按照50 mL/kg剂量腹腔注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 阴性对照组注射等量生理盐水, 阳性对照组注射等量环磷酰胺(60 mg/kg, 1.2 g/L), 采用2次给药法, 用药

间隔24 h, 于第2次给药6 h后, 采用高浓度CO<sub>2</sub>窒息与颈椎脱臼处死小鼠, 取小鼠左侧后肢股骨制作骨髓涂片。高倍显微镜下计数每只小鼠1 000个嗜多染红细胞中含有微核的细胞数, 微核率以千分率表示<sup>[12]</sup>。

**1.4.8 体内材料直接接触实验——兔下颌骨缺损模型植入实验** 选3只日本大耳白兔, 体质量2.5~3.0 kg, 雌雄不拘, 术前采静脉血及尿液, 行全血细胞分析及血清、尿液Mg<sup>2+</sup>浓度测定。经耳缘静脉按照4 mL/kg剂量注射25%乌拉坦麻醉后, 左侧颌下区备皮、消毒, 于下颌角前方沿下颌骨下缘设计长约2 cm切口, 切开、显露术区, 用外科动力系统在无茵生理盐水冲洗降温下沿下颌骨下缘做1.5 cm×0.7 cm方块截骨, 植入1.5 cm×0.7 cm×0.6 cm的矩形块状多孔镁合金支架材料, 分层对位缝合伤口。术后缺损区锥形束CT扫描验证, 见图3, 术后3 d连续肌肉注射青霉素4×10<sup>4</sup> U/(kg·d)。术后1周, 每天定时观察术区局部及动物一般情况, 术后1, 2, 4周监测静脉血细胞变化及血清、尿液Mg<sup>2+</sup>浓度。术后4周, 采用过量麻醉法处死动物, 解剖截骨区, 大体观察截骨区组织生长情况; 取出植入的多孔镁合金支架材料行电镜扫描, 观察材料表面降解情况; 采集心脏、肝、肾、脾组织标本, 经常规制作切片后行苏木精-伊红染色, 观察有无病理性改变。

**1.5 主要观察指标** 多孔镁合金支架材料的生物安全性。

**1.6 统计学分析** 数据分析采用SPSS 22.0统计软件, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组比较用 $t$ 检验, 多组比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 体外细胞毒性实验结果** 各组培养2, 4, 6 d后测得的吸光度值及细胞相对增殖率情况, 见图4, 实验组细胞相对增殖率分别为108.37%, 112.86%, 120.43%, 均大于100%, 而且该组吸光度值增长速度高于对照组, 提示多孔镁合金支架浸提液组细胞增殖活性优于对照组, 可能多孔镁合金浸提液对人骨髓间充质干细胞细胞增殖具有促进作用。

**2.2 溶血实验结果** 各组离心管内加入稀释抗凝血后, 均为均匀清亮的淡红色液体, 未见沉淀及明显颗粒物。离心完成后, 实验组及阴性对照组均为上层无色透明液体, 下层有薄层红细胞沉淀; 阳性对照组上层为淡红色清亮液体, 下层可见较少红细胞沉淀, 见图5。实验组、阴性对照组与阳性对照组吸光度值分别为0.048±0.005, 0.045±0.002, 0.397±0.007, 经计算得出多孔镁合金浸提液溶血率为0.94%, 符合医疗器械溶血试验相关要求(<5%)。

**2.3 皮内刺激实验结果** 3只日本大耳白兔背部皮下注射实验样液后24, 48, 72 h, 对比观察左右侧背部注射点及周围皮肤局部反应, 均未见明显红斑、局部水肿增厚或坏死等炎症反应。24, 48, 72 h各实验样液记分、空白对照记分及最终实验样液记分均为0。实验中多孔镁合金浸提液

符合医疗器械皮内反应实验相关要求(最终记分≤1.0)。

**2.4 热源实验结果** 6只兔正常体温及注射实验样液后体温值变化情况, 见表3及图6。注多孔镁合金浸提液后, 实验组所有兔体温升高均≤0.4 °C, 各组升高的总度数≤0.8 °C, 符合医疗器械热源实验相关要求(所有兔体温升高均<0.6 °C, 升高总度数<1.4 °C)。

表3 热源实验中各组兔体温变化情况 (°C)  
Table 3 Changes of body temperature of rabbits in each pyrogen experiment group

组别	兔序号	正常体温 ( $\bar{x}\pm s$ )	注射后最 高体温	升高 度数	平均升 高度数	升高总 度数
实验组	1	39.2±0.20	39.5	0.3	0.3	0.8
	2	39.1±0.15	39.5	0.4		
	3	39.1±0.06	39.2	0.1		
对照组	1	39.2±0.06	39.4	0.2	0.2	0.5
	2	39.1±0.10	39.2	0.1		
	3	39.3±0.06	39.5	0.2		

表注: 实验组注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 对照组注射生理盐水。

**2.5 急性全身毒性实验结果** 腹腔注射实验样品后, 两组小鼠进食、水未见明显异常, 无呼吸困难、抽搐、瘫痪等异常表现, 观察至干预后7 d无小鼠死亡。7 d内两组小鼠体质量均呈上升趋势, 详见表4, 体质量增长情况见图7, 各观测时间段内两组小鼠体质量增长无明显差异。7 d后处死小鼠, 剖开腹腔, 无腹水及大体可见的脏器粘连、水肿、坏死等异常表现。各组随机选取的小鼠心、肝、肾、脾组织切片苏木精-伊红染色结果见图8, 均未见明显病理性改变。实验提示多孔镁合金浸提液未产生明显全身毒性, 符合医疗器械急性全身毒性相关要求。

表4 急性全身毒性实验各组小鼠体质量变化情况 ( $\bar{x}\pm s$ , g)  
Table 4 Changes of body mass of mice in acute systemic toxicity experiment

组别	注射前	注射后 1 d	注射后 2 d	注射后 3 d	注射后 7 d
实验组	19.43±0.31	21.16±0.49	23.37±0.66	24.7±1.14	31.68±2.35
对照组	19.76±0.54	21.49±0.93	23.55±1.16	25.44±1.35	31.17±2.94
$P$ 值	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

表注: 实验组注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 对照组注射生理盐水。

**2.6 体内遗传毒性实验结果** 微核实验是检测细胞染色体或有丝分裂器损伤的常用遗传毒性实验方法。有丝分裂过程中丢失的染色体片段或全部染色体, 可在分裂后期以微核的形式存在于细胞质内。实验多选用啮齿类动物的骨髓嗜多染红细胞。实验中各组小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率, 见图9。实验组微核率为1.2‰, 符合医疗器械遗传毒性相关要求(<5‰)。

**2.7 兔下颌骨缺损模型植入实验结果** 植入手术后当天, 兔即开始正常咀嚼食物, 进食量基本同术前, 活动无明显

异常;术区当天少许血性渗出,至第2天基本无渗出;观察至术后第7天,手术切口无明显感染征象,切口基本愈合。注射前及注射后血清及尿液 $Mg^{2+}$ ,结果提示材料植入后1个月内血清及尿液 $Mg^{2+}$ 浓度无明显波动,见图10;白细胞、红细胞、血小板变化情况,结果显示3种血细胞在正常范围内波动,见图10;注射1个月后动物心脏、肝、肾组织切片苏木精-伊红染色情况,见图11,均未见明显病理性改变;取出多孔镁合金支架材料后行扫描电镜观察,见图12,显示材料表面少部分支架结构开始出现崩塌,但无明显降解缺损,提示多孔镁合金支架材料在体内降解相对缓慢,在1个月观察期内未导致局部及全身 $Mg^{2+}$ 蓄积问题。

### 3 讨论 Discussion

与传统钛合金材料比较,镁合金拥有生物可降解性及金属优良机械学性能等优势,但其降解的不可控性及降解产物在人体内的潜在危害,是限制其临床应用的主要障碍<sup>[14]</sup>。有研究曾应用纯镁材料固定下肢骨折,但8 d后手术失败,主要原因是纯镁材料降解过快,降解过程中产生大量气体<sup>[10]</sup>。近年来,以镁合金为代表的具有生物可降解性能的新一代医用金属材料得到迅速发展。德国 Syntellix 公司开发的 Mg-Y-RE-Zr 空心加压螺钉<sup>[15]</sup>、韩国 U&I 公司开发的 K-MET 螺钉<sup>[16]</sup>(Mg-Ca 合金)等已相继取得认证并开始应用于临床。

通过加入锌、铅、锶等元素形成新型耐腐蚀合金<sup>[17-18]</sup>,以及经阳极氧化、微弧氧化<sup>[19]</sup>、表面涂层等技术使材料表面改性<sup>[20]</sup>,成为了当前研究控制镁合金降解速度的主流。但是新元素的引入及加工工艺的改变,是否会引发人体生物安全问题,这是医疗器械材料应用于临床前必须明确的问题。尤其对于可降解材料,其生物危害不仅与构成元素有关,还与其降解速度有很大关系<sup>[5]</sup>,如果材料在短时间内快速降解,可能导致某些元素在局部急速大量蓄积,从而引发生物危害。

上海交通大学轻合金精密成型国家工程研究中心研发的多孔镁合金材料,镁元素质量百分比超过96%<sup>[11]</sup>,还融入少量Nd、Zn、Zr元素合金化,其中Nd的融入提高了镁合金材料的强度及耐均匀腐蚀性能,Zn提高了合金的塑性,Zr则增强了合金的强韧性及耐腐蚀性能<sup>[5]</sup>。在降解性能方面,有研究经动物体内实验验证多孔镁合金作为骨科植入固定材料植入3个月时基本完好,6个月时降解量不足40%,可满足骨折临床愈合的固定时间要求<sup>[5]</sup>。在安全性能方面,理论上Mg、Zn属于人体必需的微量元素,无生物毒性,Zr、Nd在合金中含量很少,有研究显示Zr有良好的生物相容性<sup>[21]</sup>,也有研究证实了轻稀土元素Nd产生的轻微体外细胞毒性,是临床可接受的<sup>[22]</sup>。而且孔祥东等<sup>[10]</sup>、刘天甲等<sup>[23]</sup>、Qin等<sup>[24]</sup>动物体内研究均显示该材料具备良好的生物安全性。

课题针对颌骨缺损研发的多孔镁合金材料,主要目的是利用其机械学性能及诱导成骨性能临时性修复骨缺损区

并提高缺损区成骨速度,为了减轻植入材料的质量及更快的引导细胞向缺损区生长,课题研究将该材料设计为多孔支架材料。参照以往研究结论:具有合适的孔径(约500  $\mu m$ )和高孔隙率(>60%)且内部设有三维方向相互通连的孔道结构,能有利于营养物质的输送、代谢产物的排放及新骨的长入等<sup>[25]</sup>。但是课题材料600  $\mu m$ 左右的主孔径及75%的高孔隙率,会使其在体液环境中发生腐蚀降解反应的有效面积显著增加<sup>[11]</sup>,这是否会明显加快其降解速率,造成体内局部或全身大量镁离子蓄积,进而导致局部或全身性病变?这一系列问题仍需实验进一步验证。

为了便于开展实验,在此次研究中除下颌骨缺损模型植入实验采用材料直接接触的方式外,其余实验均采用浸提液接触方式<sup>[25]</sup>。在体外细胞浸提液接触实验中,选择人骨髓间充质干细胞及人体静脉血细胞进行实验,以提高对进一步临床试验的参考价值,该组实验结果证明了多孔镁合金支架材料对体外细胞活性及细胞膜结构完整性的影响在医疗器械应用允许范围内。而且,在体外细胞毒性实验中,实验组细胞相对增殖率均大于100%,除了说明多孔镁合金材料除具有优良细胞安全性外,还可促进骨髓间充质干细胞的增殖,该结果与倪昕晔等<sup>[26]</sup>、Zhao等<sup>[27]</sup>研究镁离子对骨髓间充质干细胞增殖的促进作用结果一致。另外,也有研究证实药物对于骨髓间充质干细胞增殖的促进作用,可能是其向成骨细胞分化过程的初期阶段特点<sup>[28]</sup>。以上结果对于本课题进一步研究JDBM多孔镁合金支架材料的诱导成骨性能提供了初步的实验依据。

在体内浸提液接触实验中,通过皮内局部及全身给药途径分别评估注射多孔镁合金浸提液后对动物皮内局部刺激反应、体温变化、体质量变化、重要脏器组织损害、遗传物质(染色体)损害的影响,以期通过不同的观测指标更为全面地评估其安全性能,该组实验结果证明了多孔镁合金支架材料体外模拟降解过程的产物,在短期内没有引发明显皮内刺激反应及体温、体质量明显变化,对重要脏器组织及染色体结构短期内也不造成明显损害,这说明多孔镁合金支架材料在体外模拟降解速度下的产物,在短期内不会对机体造成明显全身毒性危害。

在体内材料直接接触实验中,以往研究中大多为将材料设计为螺钉的形式植入动物体内,该方式便于实验的进行,动物所受创伤小,而且降解效果便于影像学评估<sup>[29-30]</sup>,但这与课题的材料研发设计目的不同,所以即使同样是镁合金系列产品,具备同样的合金成分及比例,也无法模拟替代块状多孔支架材料的降解过程,所以作者通过制作兔下颌骨方块缺损模型并植入多孔支架材料,最大限度模拟了其临床应用设计环境,其结果是进一步的临床试验最有价值的参考依据。在此次研究1个月的观察期内,该材料未见明显降解,与文献[29-30]报道的降解时间基本一致;观察期内血清及尿液 $Mg^{2+}$ 浓度无明显波动,而且1个月后采集的心脏、肝、肾等重要脏器组织未见明显病理改变,实



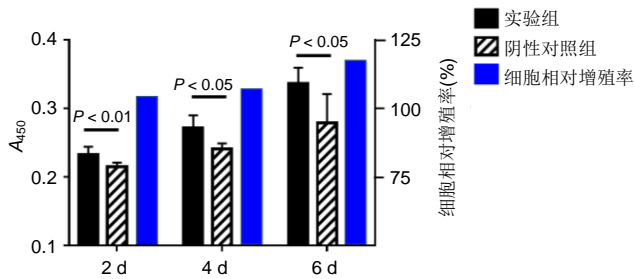
图1 多孔镁合金支架材料  
Figure 1 Porous magnesium alloy scaffold materials



图注: 左侧5点注射生理盐水, 右侧5点注射多孔镁合金浸提液。  
图2 皮内反应实验注射点示意图  
Figure 2 Schematic diagram of injection points in intradermal reaction test



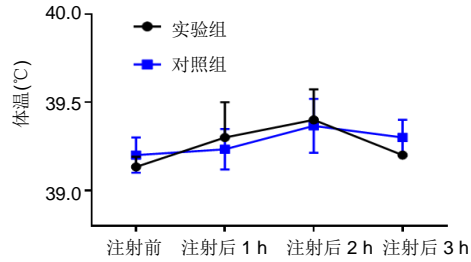
图3 颌骨缺损模型多孔镁合金植入后锥形束CT重建影像  
Figure 3 Cone-beam CT reconstruction of the jaw defect model after implantation of porous magnesium alloy



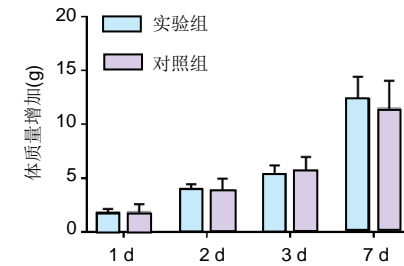
图注: 实验组加入多孔镁合金材料 DMEM 浸提液, 阴性对照组加入 DMEM 培养基。  
图4 多孔镁合金浸提液对体外骨髓间充质干细胞增殖的影响  
Figure 4 Effect of porous magnesium alloy extracts on human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*



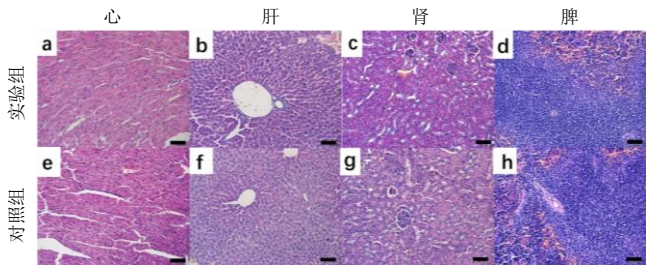
图注: 从左向右分别为含镁合金材料生理盐水浸提液的实验组、含生理盐水的阴性对照组及含蒸馏水的阳性对照组。  
图5 溶血实验中各组加入稀释抗凝血温育离心后表现  
Figure 5 Performance of each group in hemolysis test after adding diluted anticoagulant blood for incubation and centrifugation



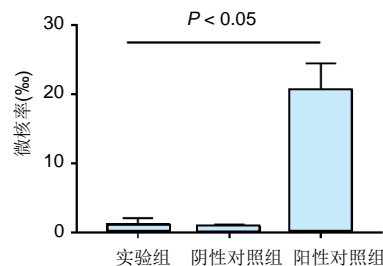
图注: 实验组注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 对照组注射生理盐水。注射后2组兔体温均无明显波动, 进一步分析显示, 各组兔体温升高均 $<0.6^{\circ}\text{C}$ , 升高总度数均 $<1.4^{\circ}\text{C}$ 。  
图6 热源实验中实验组与对照组兔的体温变化  
Figure 6 Changes of temperature of rabbits in the experimental and control groups in the pyrogen experiment



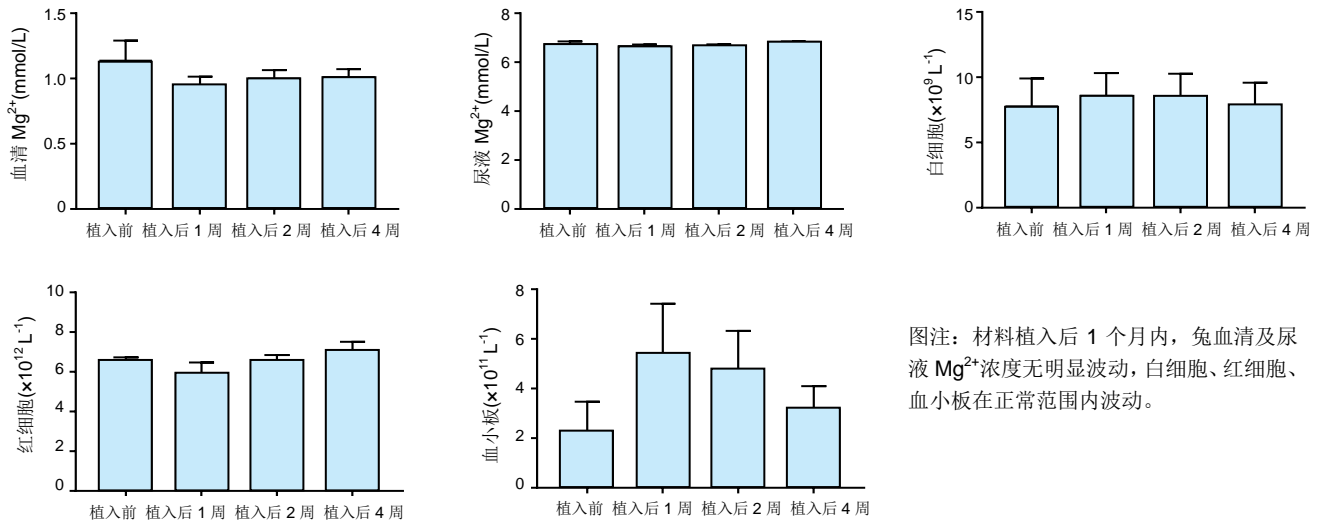
图注: 实验组注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 对照组注射生理盐水。两组小鼠体重逐渐增长, 且各时间段内体重增长无明显差异。  
图7 急性全身毒性实验中实验组与对照组动物体质量变化  
Figure 7 Changes of body mass in experimental and control groups in acute systemic toxicity experiment



图注: 实验组(a-d)注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 对照组(e-h)注射生理盐水。实验组小鼠重要脏器均无明显病理性改变。  
图8 注射多孔镁合金浸提液后小鼠体内重要脏器组织学改变(苏木精-伊红染色,  $\times 200$ , 标尺为  $50\mu\text{m}$ )  
Figure 8 Histological changes of mouse vital organs after porous magnesium alloy extract injection (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ , scale bar:  $50\mu\text{m}$ )



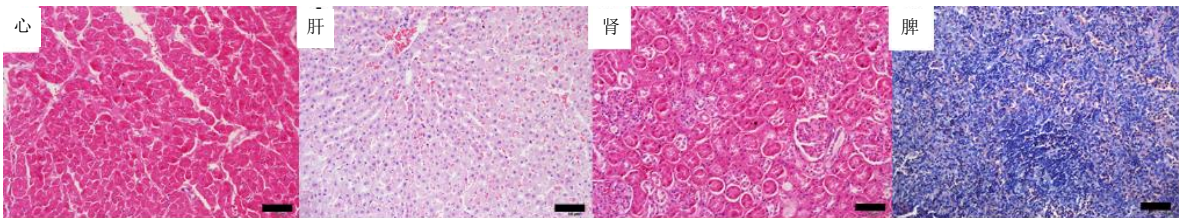
图注: 实验组腹腔注射多孔镁合金材料生理盐水浸提液, 阴性对照组注射生理盐水, 阳性对照组注射环磷酰胺。  
图9 体内遗传毒性实验中各组小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率  
Figure 9 Bone marrow polychromatic red blood micronucleus rate of mice in *in vivo* genotoxicity experiment



图注：材料植入后 1 个月内，兔血清及尿液  $Mg^{2+}$  浓度无明显波动，白细胞、红细胞、血小板在正常范围内波动。

图 10 多孔镁合金植入兔颌骨缺损模型后的血液及尿液相关指标变化

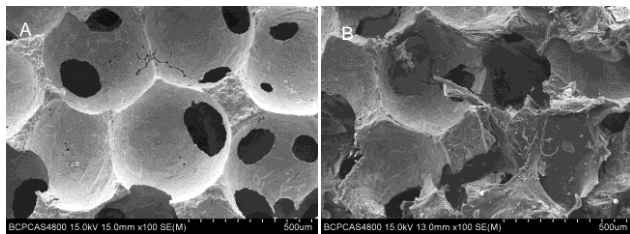
Figure 10 Changes of serum and urine indexes in the rabbit mandibular defect after porous magnesium alloy implantation



图注：各脏器均未见明显病理性改变。

图 11 多孔镁合金植入兔颌骨缺损模型 1 个月后的脏器病理改变(苏木精-伊红染色,  $\times 200$ , 标尺为  $50 \mu m$ )

Figure 11 Pathological changes of vital organs in rabbit jaw defects at 1 month after porous magnesium alloy extract implantation (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ , scale bar:  $50 \mu m$ )



图注：图中 A 为植入前的多孔镁合金表面形态，B 为植入 1 个月后的多孔镁合金表面形态，部分区域开始塌陷，但基本保持其原多孔状结构，提示降解缓慢。

图 12 多孔镁合金植入兔下颌骨缺损模型后的降解形貌改变(扫描电镜,  $\times 100$ )

Figure 12 Changes of degradation morphology of porous magnesium alloy implanted into the rabbit mandibular defect model (scanning electron microscope,  $\times 100$ )

验结果证明了多孔镁合金支架材料作为颌骨缺损修复体，植入生物体内发生持续降解反应过程中的短期生物安全性，而且在该部分实验取材时还发现，在多孔镁合金材料周围可见明显的新骨形成，这与Guan等<sup>[8]</sup>研究结果吻合，推测其可能与多孔镁合金降解释放的镁离子有关；也有研究表明，镁合金降解释放的镁离子及形成的局部碱性环境，可促进局部新骨形成，但高浓度的镁离子及高pH环境会导致溶骨现象<sup>[31]</sup>，由该结论也可推断此次实验多孔镁合金支

架材料降解释放的镁离子浓度可能处于相对较低的水平，未引起明显的生物安全危害。但具体的促进成骨作用强弱及在体内长期持续降解反应的安全性问题，还有待于进一步试验研究。

以上实验结果表明，多孔镁合金支架材料具备较好的生物安全性，后期将进一步开展动物体内长期下颌骨缺损模型修复实验，以更精确、具体的评估该材料的长期生物安全性及降解性能、诱导成骨性能等。

**致谢：**感谢感谢吴训、李庆祥同学在实验实施过程中给予的帮助。

**作者贡献：**第一作者及通讯作者负责实验设计、实施、实验数据分析、论文撰写；第二作者负责试验设计、实验数据分析、论文撰写；第三、四作者负责材料研发与性能改进。

**经费支持：**该文章接受了“科技部重点研发计划子课题(2016YFC1102104)、国家自然科学基金(51571143)、上海市卫生和计划生育委员会课题(201640281)”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中不存在利益冲突。

**机构伦理问题：**实验已通过北京大学医学部动物伦理委员会审核批准，批号为 LA2017217。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。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经北京大学口腔医院生物统计学专家审核。

**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4.0”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] 成翔宇, 纪斌, 庞金辉. 骨折的生物学内固定及内固定材料性能分析[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(22):4121-4124.

[2] 厉国定, 胡晓亮, 倪明, 等. 生物可吸收材料在骨折内固定治疗的临床研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2011, 8(1):34-35, 38.

[3] Niu J, Yuan G, Liao Y, et al. Enhanced biocorrosion resistance and biocompatibility of degradable Mg-Nd-Zn-Zr alloy by brushite coating. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(8):4833-4841.

[4] Mao L, Shen L, Chen J, et al. Enhanced bioactivity of Mg-Nd-Zn-Zr alloy achieved with nanoscale MgF<sub>2</sub> surface for vascular stent application. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015; 7(9):5320-5330.

[5] 袁广银, 章晓波, 牛佳林, 等. 新型可降解生物医用镁合金JDBM的研究进展[J]. 中国有色金属学报, 2011, 21(10):2476-2488.

[6] Chen Y, Zhao S, Liu B, et al. Corrosion-controlling and osteo-compatible Mg ion-integrated phytic acid (Mg-PA) coating on magnesium substrate for biodegradable implants application. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(22):19531-19543.

[7] Wang Y, Ouyang Y, Pang X, et al. Effects of degradable MG-ND-ZN-ZR alloy on osteoblastic cell function. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;25(3):597-606.

[8] Guan X, Xiong M, Zeng F, et al. Enhancement of osteogenesis and biodegradation control by brushite coating on Mg-Nd-Zn-Zr alloy for mandibular bone repair. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(23):21525-21533.

[9] Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A, et al. Role of magnesium ions on osteogenic response in bone marrow stromal cells. *Connect Tissue Res.* 2014;55 Suppl 1:155-159.

[10] 孔祥东, 郝永强, 王磊, 等. 新型医用可降解镁合金(JDBM)螺钉的生物安全性研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2015, 11(3):124-127.

[11] Jia G, Hou Y, Chen C, et al. Precise fabrication of open porous Mg scaffolds using NaCl templates: Relationship between space holder particles, pore characteristics and mechanical behavior. *Mater Design.* 2018;140:106-113.

[12] 奚廷斐. 医疗器械生物学评价标准[M]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[13] 陈硕, 蒋电明, 何彬, 等. 新型自组装肽纳米纤维支架材料的生物安全性评价[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(1):16-23.

[14] Yu Y, Lu H, Sun J. Long-term in vivo evolution of high-purity Mg screw degradation - Local and systemic effects of Mg degradation products. *Acta Biomater.* 2018;71:215-224.

[15] Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed Eng Online.* 2013;12:62.

[16] Lee JW, Han HS, Han KJ, et al. Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(3):716-721.

[17] 曹耿华, 毕衍泽, 陈民芳, 等. 骨折内固定用新型Mg-Zn-Ca/HA复合材料的成分、组织结构与性能[J]. 稀有金属材料与工程, 2013, 42(8):1632-1637.

[18] Jiang H, Wang J, Chen M, et al. Biological activity evaluation of magnesium fluoride coated Mg-Zn-Zr alloy in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;75:1068-1074.

[19] 曲立杰, 李慕勤, 刘苗, 等. 超声-微弧氧化医用镁合金体外降解性研究[Z]. 西安: 96-100.

[20] Zhao C, Hou P, Ni J, et al. Ag-Incorporated FHA Coating on Pure Mg: Degradation and in Vitro Antibacterial Properties. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(8):5093-5103.

[21] 马越, 程翔, 曹允雅, 等. 牙科用微弧氧化Zr-Cu-Al-Ag合金的血液相容性评价[J]. 现代口腔医学杂志, 2016, 30(6):352-355.

[22] 朱兆金. 骨科新型医用可降解植入材料JDBM镁合金的生物毒性、髓内针及植入物感染细菌生物膜的基础研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.

[23] 刘天甲, 顾硕, 周璐, 等. 可降解镁合金颅骨固定系统在动物实验中的安全性及有效性[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(30):4876-4881.

[24] Qin H, Zhao Y, An Z, et al. Enhanced antibacterial properties, biocompatibility, and corrosion resistance of degradable Mg-Nd-Zn-Zr alloy. *Biomaterials.* 2015;53:211-220.

[25] 邵惠锋, 贺永, 傅建中. 增材制造可降解人工骨的研究进展——从外形定制到性能定制[J]. 浙江大学学报(工学版), 2018, 52(6):1035-1057.

[26] 倪昕晔, 熊信柏, 尤瑞金, 等. 碳/碳复合材料表面掺镁羟基磷灰石生物涂层的体外性能[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(34):5443-5448.

[27] Zhao SF, Jiang QH, Peel S, et al. Effects of magnesium-substituted nanohydroxyapatite coating on implant osseointegration. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24 Suppl A100:34-41.

[28] 王平, 张会敏, 李刚. 鹿角多肽对骨髓间充质干细胞的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12):5644-5647.

[29] 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.

[30] 章晓波, 毛琳, 袁广银, 等. 心血管支架用Mg-Nd-Zn-Zr生物可降解镁合金的性能研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2013, 42(6):1300-1305.

[31] 洪岩松, 杨柯, 张广道, 等. 可降解镁合金的动物体内骨诱导作用[J]. 金属学报, 2008, 44(9):1035-1041.