科学通报 2008 年 第 53 卷 第 16 期: 1981 ~ 1986
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

生物镁锌合金体内对心肝肾脾的生物相容性

何耀华[①], 陶海荣[①], 张岩[①], 蒋垚[①*], 张绍翔[②], 赵常利[②], 李佳楠[②], 张蓓蕾[②], 宋阳[②], 张小农[②*]

① 上海交通大学附属第六人民医院骨科, 上海 200233;
② 上海交通大学材料科学与工程学院, 上海 200240
* 联系人, E-mail: heyaohua@vip.163.com; xnzhang@sjtu.edu.cn

2008-04-15 收稿, 2008-07-10 接受
国家自然科学基金(批准号: 30772182)和上海交通大学医工交叉课题(编号: YG2007MS26)资助项目

摘要 骨内固定的可降解材料尚未涉及金属基材料, 机械性能差, 难以在骨承载部位发挥作用. 研制出全营养素组成的镁锌合金, 将其制成棒状物植入新西兰兔股骨髓腔, 旨在探讨该金属合金在体内是否能降解, 降解产物对骨、心、肝、肾和脾的功能影响. 将镁锌合金植入新西兰兔股骨远端髓腔, 与对侧仅建立骨隧道的股骨侧比较. 通过X光片、扫描电子显微镜和元素能谱分析镁锌合金降解机制; 测定外周血镁、肝肾功能和心肌酶谱含量, 将心、肝、肾和脾制成病理切片, 在组织学上分析材料对动物重要脏器及功能的影响. 结果表明镁锌合金在股骨髓腔内能降解, 术后 14 周约降解 87%; 镁锌合金降解后血镁、肝肾功能和心肌酶谱与术前相比无统计学差异, 心、肝、肾和脾在组织学上的细胞结构无改变. 揭示镁锌合金在骨组织内能降解, 其降解产物对心、肝、肾和脾具有良好的生物相容性, 继续深入研究镁锌合金在体内体外的降解机制将给骨组织材料的选择提供新思路.

关键词
镁锌合金
骨
血镁
生物相容性

骨内固定金属材料主要有不锈钢、钛和钴铬合金等. 这些金属的弹性模量远大于人骨, 易产生应力遮挡效应, 导致骨骼强度下降、骨愈合延迟. 这些金属还有可能通过腐蚀或磨损释放毒性离子和颗粒, 诱发周围组织炎性反应, 降低材料生物相容性, 导致骨溶解. 骨折固定的金属材料是永久性的, 需二次手术取出, 给患者带来不必要的痛苦[1~4].

固定骨折的材料选用生物可降解材料则更为理想. 目前体内可降解材料主要有聚合物材料和某些陶瓷材料, 还未涉及金属基材料. 由于聚合物的力学性能较低、陶瓷韧性较差, 金属材料则具有优异的强度和塑韧性等综合力学性能, 因此, 研发骨组织可承载需要的可降解金属材料成为目前研究热点[5~9].

镁具有以下突出优点: (ⅰ) 良好的生物相容性和生物可降解性; (ⅱ) 高的比强度和比刚度, 弹性模量为 45 GPa, 更接近人骨, 能有效降低应力遮挡效应, 符合理想接骨板要求[1]. 另外, 镁是体内第四位、细胞内第二位最丰富的阳离子, 是人体不可缺少的重要营养元素, 对神经、肌肉、骨和心脏功能具有重要影响. 补充镁在临床中已引起足够重视, 营养学家建议镁的摄入量是 300~350 mg/d, 可见镁作为生物医用材料具有良好的安全性基础.

目前对镁合金研究主要集中在镁铝合金和镁稀土合金上. 黄晶晶报道[5]将镁合金AZ31B植入大鼠脊柱两侧, 发现该镁合金对外周血具有良好的生物相容性. Witte等人[3]将镁铝合金 AZ31 和AZ91 制成棒状材料植入豚鼠股骨髓腔, 结果在镁合金周围有大量新骨形成. Witte等人[2]添加稀土元素制成镁稀土合金, 在体内做降解试验. 镁稀土合金 LAE442、WE43 与镁铝合金AZ31、AZ91 比较, 结果LAE442 降解率最低, 说明添加不同元素可影响镁合金的降解速率. 2007 年Witte等人[4]将镁合金AZ91D与羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)制成金属基复合物(MMC-HA), 分别与人成骨细胞、成骨细胞系MG-63 和巨噬细胞系RAW264.7 混合培养, 这三种细胞在镁合金降解层均能良好存活和增殖, 且对镁合金有良好的黏附能力,

说明MMC-HA具有良好的细胞相容性. Pietak等人[10]研制出镁钙合金和镁铝锌合金, 将镁合金与大鼠骨髓间充质细胞共培养, 发现镁合金能促进骨髓间充质细胞向成骨细胞转化, 对成骨样细胞具有良好的黏附、分化和增殖能力, 并在镁合金周围有骨样基质形成, 镁合金在体外对骨样细胞无毒性.

然而, 铝存在神经毒性, 稀土元素如钇等存在肝毒性, 镁铝合金和镁稀土合金本身对机体存在潜在毒性, 为避免这些元素的潜在危害, 我们拟以镁、锌等全营养素组成的镁合金作为替代[11]. 镁合金成分由机体需要的营养元素组成, 理论上应具有良好的生物相容性, 但其在体内降解变化后是否会引起机体异常还须进一步研究. 目前对镁合金的研究方法主要是通过材料在模拟体液中降解和将其植入动物体内后大体观察骨组织的改变上. 对外周血镁浓度的变化, 肝肾功能的改变, 以及对机体重要脏器功能的影响报道不多. 本研究拟将镁锌合金制成棒状物植入新西兰兔股骨远端髓腔, 分析其在骨组织中的降解, 研究其体内降解后对外周血生化、肝肾功能, 心肌酶谱以及动物重要脏器的组织学改变, 旨在为其在体内的应用提供试验依据.

1 材料与方法

(ⅰ) 材料制备. 材料由上海奥芮济医疗科技有限公司制造提供, 其成分见表 1. 将该镁锌合金制成 Φ4.5 mm×10 mm 的棒状植入物, 经环氧乙烷消毒后干燥封存待用.

(ⅱ) 动物试验. 试验动物为健康成年新西兰兔 12 只, 体重 2.0~2.5 kg, 雌雄各半. 一侧股骨为镁合金植入组, 对侧股骨作为对照组. 用戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉注射麻醉. 在无菌条件下于兔股骨远端切开皮肤、皮下, 显露股骨远端, 通过 3.5 mm 克斯针钻入股骨髓腔后建立股骨隧道, 之后将镁合金植入隧道, 用生理盐水冲洗伤口后逐层缝合, 术后肌注青霉素 40 万单位/d, 连续 3 d. 动物分笼饲养, 自由活动. 假手术组仅用 3.5 mm 克斯针在对侧股骨建立骨隧道, 但不植入任何材料. 植入手术后定期拍摄 X 光片, 了解植入术后骨组织的变化.

(ⅲ) 外周血检查. 术前 1 d 抽外周动脉血 5 mL. 将镁锌合金植入新西兰兔股骨髓腔后, 分别在术后第 1 和 3 d 以及术后第 1 周和第 3 周抽外周动脉血各 5 mL. 采用双缩尿比色法测定总蛋白(试剂: 上海科华东菱诊断用品有限公司 S717), 溴甲酚绿法测定白蛋白(试剂: 上海科华东菱诊断用品有限公司 S718), 紫外－乳酸脱氢酶法测定丙氨酸氨基转移酶(试剂: 上海科华东菱诊断用品有限公司 S701), 紫外－苹果酸脱氢酶法测定天门冬氨酸氨基转移酶(试剂: 上海科华东菱诊断用品有限公司 S502), AMP 缓冲液法测定碱性磷酸酶(试剂: 上海科华东菱诊断用品有限公司 S712), γ-谷氨酰酶转移酶测定γ-GT(试剂: 上海科华东菱诊断用品有限公司 S713), 肌氨酸氧化酶-PAP 法测定肌酐(试剂: 上海科华东菱诊断用品有限公司 S708), 化学测定法测定血清镁(日本和光纯药工业株式会社 WAKO EH357), 尿素氮法测定尿素氮(试剂: 第一化学药品株式会社 034RAB-039RCB), 尿酸酶法测定尿酸(试剂: 第一化学药品株式会社 051RJA-052RBB), 乳酸底物 UV 法测定乳酸脱氢酶(试剂: 罗氏 03002209), 磷酸肌酸底物 UV 法测定血清肌酸激酶(试剂: 罗氏 12132672). 试验均通过日立 7600-020 全自动生化分析仪进行检测.

(ⅳ) 内脏组织学检查. 术后 6 周处死 6 只新西兰兔, 取出心、肝、肾和脾制成病理切片, HE 染色观察动物脏器的组织学改变.

(ⅴ) 镁锌合金的降解分析. 取材前两周和前 4 天肌注四环素(30 mg/kg). 术后 14 周取出材料做元素能谱分析(EDS), 扫描电子显微镜(JSM-6460)观察材料降解形态. 将材料周围组织脱钙后常规石蜡包埋、喷金, 扫描电子显微镜观察材料和骨组织相互作用后的形态改变.

(ⅵ) 体外检测材料降解后的 pH 值变化. 将材料制成Φ10 mm×2 mm Mg-Zn 圆片, 重复样品 3 片. 1000#砂纸打磨, 抛光, 备用. 用 3 个 80 mL 小烧杯, 各盛 20 mL DMEM 高糖细胞培养液(Gibco 公司, pH 为 7.44), 置于 37℃恒温水箱. 稳定后, 将样品分别放

表 1 镁锌合金的化学组成

材料	化学成分(%, 质量分数)							
	Mg	Zn	Ni	Cu	Al	Mn	Fe	Si
Mg-Zn	Balance	5.6210	0.0005	0.0005	0.0085	0.0004	0.0038	0.0016

置于3个烧杯底部. 每隔一定时间采用雷磁 PHS-3C 精密 pH 计测 pH 值.

(vii) 统计学分析. 将测定的外周血镁、肝肾功能和心肌酶谱含量数据输入电脑, 通过软件 SPSS11.5 (社会统计软件包)进行统计学分析, P<0.05 存在统计学差异.

2 结果

2.1 动物试验

镁锌合金植入新西兰兔股骨远端髓腔后, 无感染发生. X光片提示早期(3 周内)在植入物侧存在皮下积气现象, 未经任何处理 6 周自然消除; 12 周植入物开始变得模糊, 周围存在骨吸收; 24 周材料已不能显影, 提示材料可能完全吸收, 在股骨外皮质形成大量新骨. 对照组在术后 3 周隧道即已愈合(图 1). 术后 6 周和 14 周四环素标记后扫描电镜下发现植入物与股骨内皮质存在较大空隙(图 2).

2.2 外周血检查和重要脏器组织切片分析

外周血化验发现新西兰兔在术前血镁浓度为 1.17 mmol/L, 术后 3 周内血镁浓度均无统计学差异. 外周血尿酸有短暂升高(P<0.05), 术后一周即恢复正常. 外周血肌酸激酶在术后第 1 d 迅速上升, 且存在统计学差异(P < 0.05), 但术后第 3 d 即恢复正常. 术后 1 周白蛋白和白球比值存在下降, 虽然术前和术后 1 周存在统计学差异, 但术后白球比值未倒置, 且总蛋白、谷丙转氨酶和谷草转氨酶在术后 3 周内不存在统计学差异, 提示肝功能并未受到影响; 术后肌酐和尿素氮在 3 周内无统计学差异, 提示肾功能良好. 术后 6 周处死新西兰兔后取出心、肝、肾和脾等脏器做病理切片, HE 染色. 光学显微镜下发现心、肝、肾和脾的细胞结构在形态学上无改变, 无炎性细胞侵润(图 3). 结果表明镁锌合金在术后 3 周已存在降解, 术后 24 周可能已完全吸收, 但其降解成分被吸收后对外周血镁浓度、肝肾功能等无影响, 在组织形态学上对新西兰兔的心、肝、肾和脾等脏器细胞结构无显著性改变.

2.3 镁锌合金降解分析

术后 14 周取出镁锌合金, 称重仅为原来质量的 13%, 提示材料吸收了 87%. 肉眼观察镁合金表面失

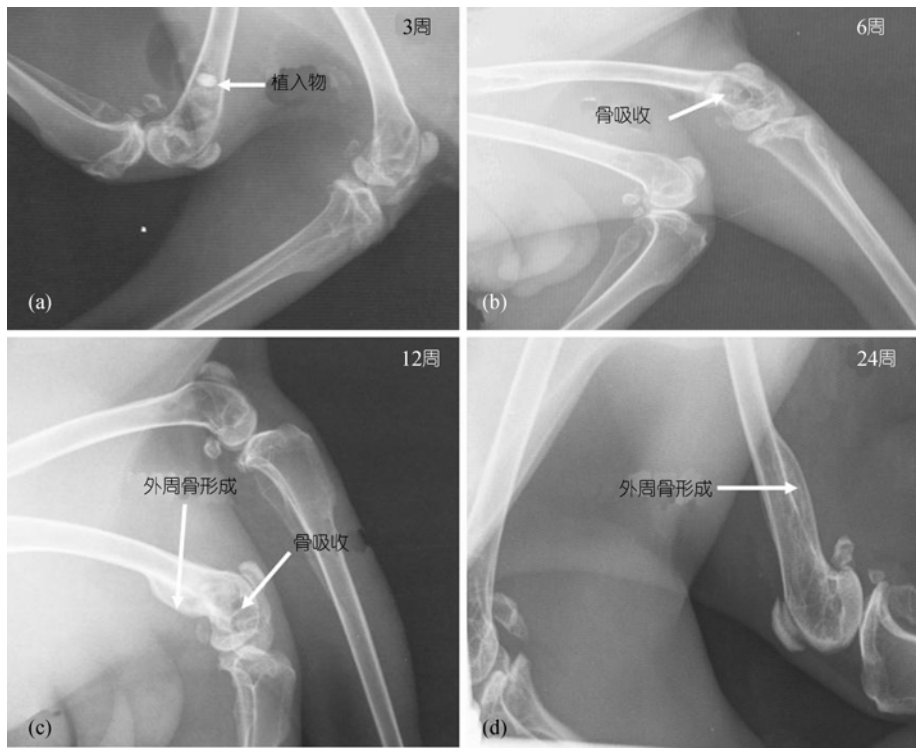


图 1

(a) 术后 3 周植入镁锌合金后在股骨周围存在积气, 对侧骨隧道已经愈合; (b) 术后 6 周在植入物周围存在骨吸收; (c) 术后 12 周材料显影模糊, 在植入物周围存在骨吸收, 在股骨皮质外有成骨现象; (d) 术后 24 周材料完全吸收, 在股骨皮质外形成大量新骨组织

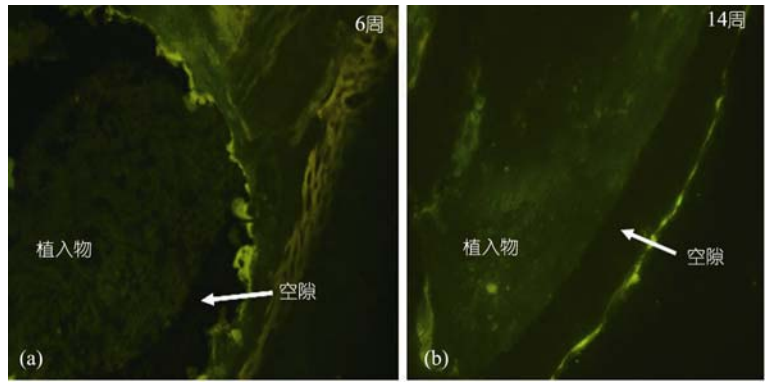


图 2

(a) 术后 6 周在植入物周围存在少量成骨，材料与骨皮质间存在空腔; (b) 术后 14 周在植入物周围存在少量成骨，植入物与股骨皮质间仍存在空腔

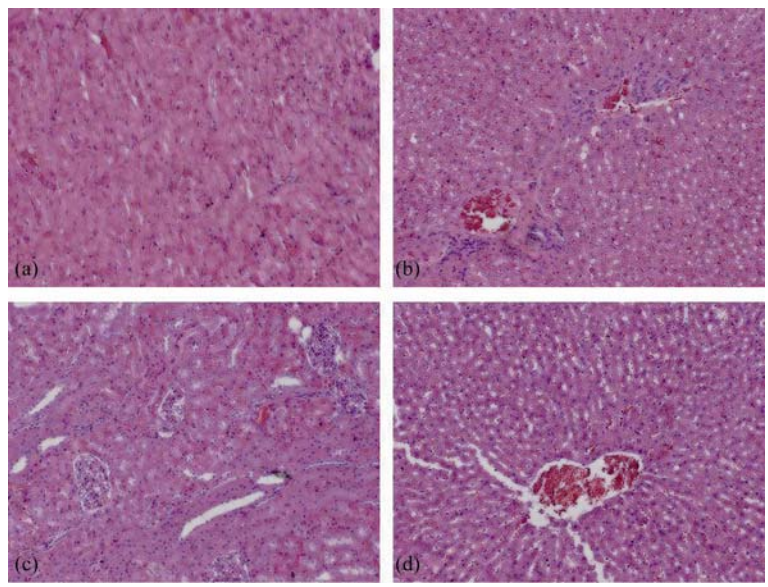


图 3

(a) 心脏病理切片提示心脏细胞结构正常(×100); (b) 肝脏组织正常(×100); (c) 肾脏病理切片提示肾小管等组织结构正常; (d) 脾脏组织正常(×100)

去原有金属光泽且边缘不清晰，干燥后表面出现白色疏松物质，股骨髓腔存在空腔，并有黑色样物存在股骨髓腔周围，结果说明镁锌合金对股骨髓腔内骨组织生物相容性欠佳(图 4). 扫描电镜下在镁锌合金表面覆盖一层降解产物，降解产物表面粗糙、强度低，并呈不规则的龟裂状(图 5). EDS 分析表明其主要降解成分为氧、镁、锌、磷和钙等元素(表 2). 将镁锌合金投入 DEME 细胞培养液， pH 值变化结果如图 6 所示.

图 6 说明 pH 值在前 2 h 左右急剧上升，之后逐渐趋于平缓. pH 值从 7.62 上升到 8.84 耗时 200 min，而从 8.84 上升到 8.90 耗时 1000 min.

3 讨论

本研究研制的镁锌合金由机体全营养素组成，植入新西兰兔股骨远端髓腔内能降解. X 光片显示 12 周材料已显影模糊，24 周材料已完全不能显影，材料可能已完全降解吸收. 术后 3 周材料侧股骨局部存在积气，6 周已无积气，说明材料降解产生的气体可自行吸收，但在材料周围存在骨吸收，对侧股骨骨隧道已愈合. 术后 12 周材料周围仍存在骨吸收，但在植入材料的股骨外皮质有新骨组织形成. 术后 24 周材



图 4　术后 14 周在植入物周围形成的空腔

料可能已完全吸收，在股骨外侧皮质形成大量新骨组织．术后14周镁锌合金已呈粉末状，在质量上吸收达 87%，股骨髓腔植入物处存在空腔．四环素标记后扫描电镜下发现植入物与股骨内皮质存在较大空隙，说明镁锌合金对股骨髓腔内的骨组织生物相容性欠佳．取残余材料进行元素能谱分析，氧、镁、锌、磷和钙元素是其主要降解产物．镁、锌、钙和磷等元素均能促进骨形成[1]，在我们的植入物周围却为什么存在骨吸收？我们分析可能是镁锌合金材料降解太快，在其周围形成大量氢氧化镁，局部环境pH值升高，造成材料周围细胞生存环境不佳．Song和Simaranov等人[12,13]报道纯镁在NaCl水溶液中腐蚀将导致试样附近溶液局部碱化，即使在pH=4 的酸性溶液中，试样附近的pH值也高达 10 以上．这种快速上升的pH值对体外细胞生长不利．我们将试验用镁锌合金投入DMEM细胞培养液后发现pH值在前 2 h(120 min)急剧上升，之后逐渐趋于平缓．pH 值从 7.62 上升到 8.84 耗时 200 min(3 h 多)，而从 8.84 上升到 8.90 用了 1000 min(约 17 h)．我们体外试验进一步证实材料降解后其周围环境 pH 值将迅速升高．由于骨组织内血流速度缓慢，不能及时代偿升高的 pH 值，致植入物局部 pH 值较长时间维持在高水平，导致骨细胞无法顺利贴附，影响材料周围细胞生长．本研究还发现术后 12 周和 24 周在植入材料的股骨外侧皮质存在大量新骨组织．我们分析骨组织本身具有很强改建(塑形)能力，材料植入股骨髓腔后在其周围存在骨吸收，骨组织为维持局部骨质强度，在股骨外周形成大量骨组织，这可能是机体应对外界干扰力图恢复“内稳态”的宿主反应，但其具体机制需进一步研究．

材料植入前 1 天和术后第 1 天，第 3 天，第 1 周和第 3 周通过外周血生化检查，发现材料降解后对外周血镁浓度、肝肾功能等指标无统计学差别；术后第 1 天和第 3 天血尿酸迅速升高，与术前相比存在统计学差异($P < 0.05$)，提示机体存在一过性代谢失调，术后 1 周即恢复到术前水平；术后第 1 天血肌酸激酶迅速上升($P<0.05$)，术后第 3 天恢复术前水平，说明植入材料后对心脏可能存在一过性影响．这可能是手术的创伤反应，因为在术后第 3 天该指标即回落到术前水平．术后 1 周白蛋白和白球比值下降，虽然术前术后存在统计学差异($P<0.05$)，但术后白球比值未倒置，且术后第 3 周的白蛋白水平与术前相比无统计学差异；另外，血总蛋白、谷丙转氨酶和谷草转氨酶一直处在术前水平，提示肝功能并未受影响；材料 24 周在影像学上完全吸收，术后 6 周在组织形态学上心、肝、肾和脾的细胞结构完好，组织切片无炎性细胞侵润．

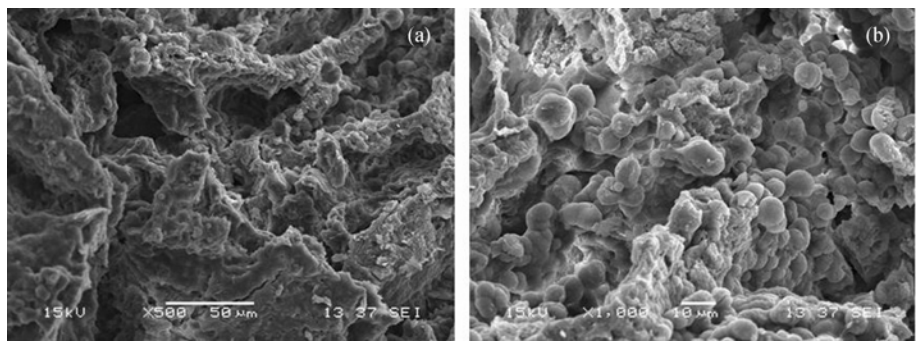


图 5

(a) 扫描电子显微镜观察镁合金降解形态(×500)．镁合金表面不平，存在大量沟壑状形态; (b) 镁合金表面存在大量灰白色降解物，材料表面粗糙(×1000)

表 2 镁锌合金表面降解成分元素能谱分析

成分	质量分数(%)	原子分数(%)
O	20.64	35.33
Mg	23.22	26.15
Zn	26.96	11.29
P	9.4	8.31
Na	6.19	7.37
Ca	7.52	5.13
N	1.57	3.06
Cl	2.71	2.09
K	1.8	1.26

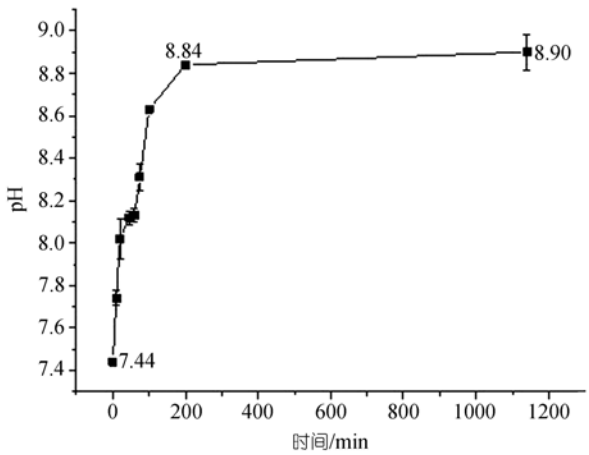


图 6 pH 值随时间变化曲线图

可见，镁锌合金降解物对心、肝、肾和脾具有良好的生物相容性. 总之，将金属镁锌合金植入新西兰兔股骨髓腔，金属基材料能完全降解. 材料降解后对血镁、肝肾功能无显著性影响，肌酸激酶有一过性升高，术后第 3 天即恢复术前水平；术后 6 周对心、肾、肝和脾等重要脏器在组织学上无显著性影响，提示材料及其降解物对新西兰兔的心、肝、肾和脾均具有良好的生物相容性.

4 结论

(ⅰ) 将镁锌棒状物(Φ4.5 mm×10 mm)植入新西兰兔股骨远端髓腔后14周，材料在质量上约降解87%，提示镁锌合金在股骨髓腔内能降解.

(ⅱ) 镁锌合金植入动物股骨髓腔后对外周血镁、肝肾功能等无影响；术后对血尿酸和肌酸激酶存在一过性升高、但术后 1 周即恢复到术前水平；术后新西兰兔心、肝、肾和脾在组织形态学上细胞结构无改变，这些均说明镁锌合金对机体重要脏器具有良好的生物相容性.

总之，镁锌合金在机体内是可以降解的金属材料，对心、肝、肾和脾的结构、功能无影响，继续深入研究该镁合金将给骨组织材料的选择提供新思路.

参考文献

1 Staiger M P, Pietak A M, Huadmai J, et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. Biomaterials, 2006, 27: 1728—1734 [DOI]
2 Witte F, Fischer J, Nellesen J, et al. *In vitro* and *in vivo* corrosion measurements of magnesium alloys. Biomaterials, 2006, 27(7): 1013—1018[DOI]
3 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[DOI]
4 Witte F, Feyerabend F, Maier P, et al. Biodegradable magnesium-hydroxyapatite metal matrix composites. Biomaterials, 2007, 28(13): 2163—2174[DOI]
5 黄晶晶, 任伊宾, 张炳春, 等. 镁及镁合金的生物相容性研究. 稀有金属材料与工程, 2007, 36(6): 1102—1105
6 Toolan B C. Current concepts review: Orthobiologics. Foot Ankle Int, 2006, 27(7): 561—566
7 Ryan G, Pandit A, Apatsidis D P. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. Biomaterials, 2006, 27(13): 2651—2670 [DOI]
8 Rodeo S A, Maher S A, Hidaka C. What's new in orthopaedic research. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86(9): 2085—2095
9 Grey J E, Luan B. Protective coatings on magnesium and its alloys-a critical review. J Alloy Comp, 2002, 336: 88—113[DOI]
10 Pietak A, Mahoney P, Dias G J, et al. Bone-like matrix formation on magnesium and magnesium alloys. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(1): 407—415[DOI]
11 张小农. 生物体内可吸收的 Mg-Zn 两元镁合金材料. 中国发明专利, ZL 200510111795.4
12 Song G, Atrens A, Stjohn D, et al. The electrochemical corrosion of pure magnesium in 1N NaCl. Corros Sci, 1997, 39(5): 855—875[DOI]
13 Simaranov A Y, Sokolova I, Marshakov A I, et al. Corrosion-electrochemical behavior of magnesium in acidic media, containing oxidants. Prot Met, 1991, 27(3): 329—334