

医用可降解 Mg-3Zn-0.5Sr 合金 耐蚀性及细胞毒性

张雅静, 郭廷廷, 李帅平, 彭武贤

(东北大学 材料科学与工程学院, 辽宁 沈阳 110819)

摘 要: 采用仿生法在 Mg-3Zn-0.5Sr 合金表面制备涂层,通过 SEM,EDS 和 XRD 分析表征涂层形貌和结构;采用电化学实验和浸泡腐蚀实验来研究涂层对合金降解速率的影响;采用生物毒性实验验证有无涂层 Mg-3Zn-0.5Sr 合金的毒性等级.实验结果表明:在 Mg-3Zn-0.5Sr 合金表面可以沉积致密的羟基磷灰石(HA)涂层,厚度约为 30~40 μm,HA 涂层可以有效地降低 Mg 合金的降解速率;在体积分数为 25% 的有无涂层合金浸提液中培养细胞 4 d,细胞相对增值率均超过 100%,有无涂层合金的细胞毒性均为 0 级.

关 键 词: Mg-3Zn-0.5Sr 合金;HA;涂层;耐蚀性;细胞毒性

中图分类号: TG 146.2+2; R 318.08 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-3026(2018)07-0976-05

Corrosion Resistance and Cytotoxicity of Medical Degradable Mg-3Zn-0.5Sr Alloy

ZHANG Ya-jing, GUO Ting-ting, LI Shuai-ping, PENG Wu-xian

(School of Materials Science & Engineering, Northeastern University, Shenyang 110819, China. Corresponding author: ZHANG Ya-jing, E-mail: zhangyj@smm.neu.edu.cn)

Abstract: The hydroxyapatite (HA) coating was prepared on the surface of Mg-3Zn-0.5Sr alloy by bionic method. The morphology and structure of the coating were characterized by SEM, EDS and XRD. Electrochemical and immersion corrosion experiments were carried out to study the degradation of the alloy and cytotoxicity experiments were also subjected to the HA-coated and uncoated Mg alloy samples. The results show that a dense HA layer with the thickness of 30~40 μm can be deposited on the surface of the Mg-3Zn-0.5Sr alloy, which can effectively reduce the degradation rate of this alloy. Relative viability of cells is more than 100% and all samples have cytotoxicity scores of 0, after the cells are cultured in the extracts with the volume fraction of 25% for 4 days.

Key words: Mg-3Zn-0.5Sr alloy; hydro xyapatite; coating; corrosion resistance; cytotoxicity

近年来,研究者们对 Mg 及 Mg 合金作为医用可降解生物材料进行了广泛的研究,例如研究将其用作整形外科植入物的可行性,结果表明镁合金具有良好的机械性能和生物相容性^[1].作为一种人体所必须的微量元素,Mg 对人体骨骼的生长和钙的代谢都具有一定的促进作用^[2].此外,Mg 及 Mg 合金可以在生理条件下完全腐蚀,避免了在骨愈合后需要第二次外科手术来移除植入物.但是,Mg 及 Mg 合金化学性质活泼,作为生

物可降解材料所面临的巨大挑战是其降解速度不能很好地与骨组织愈合及再生速度相匹配.在含有氯离子的环境中降解速率过快,氢离子的大量释放以及 pH 变化都可能导致一些生物反应发生^[3-4].本文通过仿生法在 Mg-3Zn-0.5Sr 合金表面制备 HA 涂层,研究涂层对合金降解速率的影响,同时进行细胞毒性实验,得出有无涂层合金的细胞毒性等级,进一步验证其生物相容性.

1 实验材料与方法

1.1 仿生法在合金表面制备涂层

实验所用材料 Mg-3Zn-0.5Sr 合金通过铸造、热处理、热轧及线切割制备的试样规格为 14 mm×14 mm×5 mm. 参照 Qu 等^[5]的配制方法配制 3CaP SBF(simulated body fluid). 将预处理后的合金浸入 3CaP SBF 中,在 42℃ 恒温水槽中保温 24 h,涂层在合金表面自然沉积.

1.2 有无涂层试样检测

利用扫描电子显微镜(SEM)观察 Mg-Zn-Sr 合金表面和纵截面的涂层形貌,并测量涂层厚度,同时通过能谱图分析涂层成分;采用 PW3040/60 型 X 射线衍射仪对有无涂层 Mg-Zn-Sr 合金的物相进行分析.

1.3 腐蚀实验

1.3.1 电化学实验

本文使用三电极体系的电化学工作站(CHI660E)进行电化学测量. 试样、饱和甘汞电极(SCE)和铂电极分别与工作电极、参比电极和辅助电极相连. 极化曲线的测试实验是在 $5\times 10^{-4}\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ 的扫描速率下进行的,并且施加的电位从 -2.1 V 到 -1.2 V. 阻抗谱^[6]的测试实验所选用的交流信号为 5 mV,从 10^5 Hz 开始,到 10^{-2} Hz 时结束. 浸泡试样的 SBF 溶液参照 Kokubo 等^[7]所描述的方法配制而成,溶液的温度和 pH 分别调节至 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 和 7.4. 在电化学测试之前用环氧树脂和固化剂进行封样.

1.3.2 析氢实验

通过测量镁合金腐蚀过程中产生的氢气的量,计算出镁合金腐蚀过程析出氢气的速率,反映出镁合金降解速度. 分别将无涂层和有涂层的试样

预处理后放入装有 1 000 mL SBF 溶液的大烧杯中,将一个倒扣的漏斗置于试样上,其上再放置一充满腐蚀液的倒置的量筒. 镁合金腐蚀产生氢气,氢气的产生导致量筒中的液面下降,观测量筒中液面下降的刻度,计算出收集的氢气的量. 浸泡 15 d (恒温 36.5°C),每隔 24 h 记录析氢量并测溶液的 pH,绘制两组试样的析氢量、析氢速率及 pH 随时间的变化曲线. 析氢速率的计算公式:

$$v=V/(St).$$

其中: v 是析氢速率, $\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; V 是析氢总体积, mL ; S 为试样的表面积, cm^2 ; t 为腐蚀时间, h .

1.4 细胞毒性实验

1.4.1 细胞培养

取生长状态良好的大鼠成骨细胞配制成细胞悬浮液(1×10^4 个细胞/ mL),注入 96 孔板中,培养板需要接种 3 块,置于环境为 37°C , CO_2 体积分数为 5% 的细胞培养箱中培养,培养 24 h 后弃去原培养基. 设置一组只含有单纯培养液的作为对照组. 浸提液的配制按有无涂层 Mg-3Zn-0.5Sr 合金试样表面积与浸提液介质的体积之比均为 $1.25\text{ cm}^2/\text{mL}$,浸提液稀释 25% 备用.

1.4.2 细胞活力的测定与毒性观察

在显微镜下观察培养了 2 d 和 4 d 的细胞形态并拍好照片. 然后将 5% MTT 注入 96 孔板中,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$,孵育 4 h 后将孔内的培养液和 MTT 吸出,再加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ DMSO,振荡. 用酶标检测仪测得吸光度值,测量位置是波长 490 nm 处. 并计算出细胞的相对增殖度(RGR). RGR 的计算公式如下:

$$\text{RGR}=\frac{\text{试样组平均吸光度值}}{\text{阴性对照组平均吸光度值}}\times 100\%.$$

根据 ISO 10993.5—1999 细胞毒性评价标准评估细胞毒性,见表 1.

表 1 细胞毒性评价标准
Table 1 Evaluation criteria for cytotoxicity

细胞相对增值率/%	>100	75~99	50~74	25~49	1~24	0
细胞毒性等级	0	1	2	3	4	5

2 实验结果与分析

2.1 涂层形貌及物相分析

通过观察图 1a 可看到细小的圆形颗粒密集地覆盖在合金基体表面,从图 1b 中可发现 Ca,P,O 的峰明显高于 Mg,因此可推断出合金表面被很好地覆盖且覆盖物中含有较高的 Ca,O 和 P 元

素. 图 1c 是涂层纵截面的 SEM 图,从图中也可发现涂层比较致密,并可得出涂层厚度约为 $30\sim 40\text{ }\mu\text{m}$. 图 2 是有无涂层的 Mg-3Zn-0.5Sr 合金试样 XRD 图谱. 从中可以看出,有涂层的 Mg-3Zn-0.5Sr 合金试样图谱特征峰位与 HA 标准图谱的特征峰位均是一致的,由此可见,在 Mg-Zn-Sr 合金试样表面成功制备了 HA 涂层,且与无涂层试样相比,有涂层试样的基体中镁峰变弱,

这是由涂层的形成导致的.

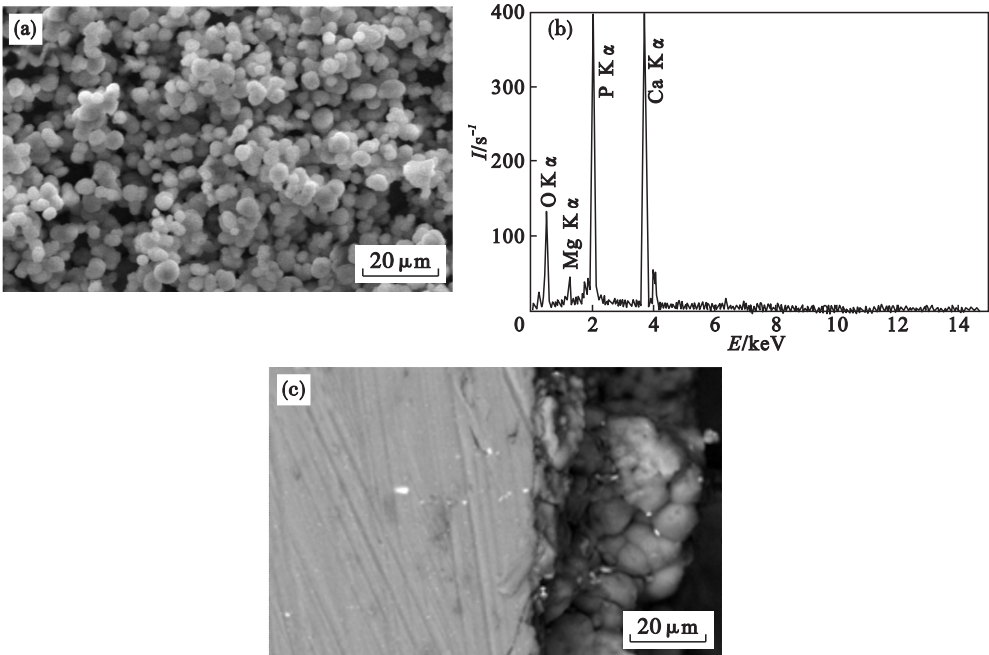


图 1 Mg-3Zn-0.5Sr 合金试样涂层形貌及能谱分析
Fig. 1 Surface morphology and EDS spectrum of the HA-coated Mg-3Zn-0.5Sr alloy
(a)—表面形貌; (b)—能谱图; (c)—纵截面形貌.

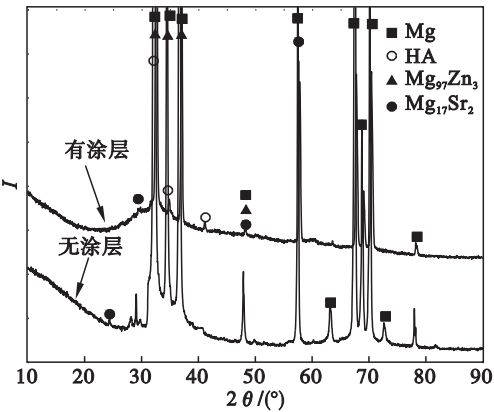


图 2 有无涂层 Mg-3Zn-0.5Sr 合金试样的 XRD 图谱
Fig. 2 XRD patterns of the Mg-3Zn-0.5Sr alloys with and without HA coating

2.2 合金的耐蚀性能

2.2.1 电化学腐蚀结果分析

图 3 为 Mg-3Zn-0.5Sr 合金有无涂层试样在 SBF 溶液中的极化曲线和阻抗谱. 从图 3a 可看出, 两条极化曲线具有基本相同的形状, 但和无涂层的 Mg-3Zn-0.5Sr 合金相比, 有涂层合金的腐蚀电位有明显的正移, 且有涂层合金电流密度为 $6.31 \times 10^{-5} \text{ A/cm}^2$, 无涂层合金电流密度为 $3.98 \times 10^{-4} \text{ A/cm}^2$. 这表明仿生法制备的涂层对合金基体起到了很好的保护作用, 使合金的耐蚀性能明显提高.

从图 3b 中可以看出, 有涂层合金试样的容抗

弧直径大约是无涂层合金试样的 4 倍. 已知容抗弧直径越大, 腐蚀电阻越大, 耐蚀性越好^[8]. 阻抗谱和极化曲线实验所得到的结果是一致的, 涂层有效地阻碍了腐蚀介质到达基体界面, 提高了合金的耐蚀性能.

2.2.2 浸泡腐蚀结果分析

镁合金的腐蚀是 α 基体相被腐蚀, 而其他相被保护, 在腐蚀过程中每溶解一个镁原子就会产生一个氢分子, 所以通过测量氢气析出的速率就可以表征镁腐蚀的速率^[9]. 图 4 是通过析氢实验得到的有无涂层合金试样的析氢量、析氢速率、pH 随时间变化的曲线. 由图 4a 可看出在 15 d 内, 随着腐蚀时间的增加两组溶液的 pH 均明显升高, 浸有涂层合金试样的腐蚀溶液 pH 变化比浸无涂层试样的缓慢. 表明涂层在很大程度上减缓了合金的腐蚀. 由图 4b 可看出: 两试样析氢量均随时间增加而增加; 有涂层试样与无涂层试样相比析氢量增加得缓慢; 到 15 d, 无涂层试样的氢气量约是有涂层的 3 倍. 如图 4c 所示: 有无涂层合金试样在 SBF 中析氢速率均随时间的增加而降低, 无涂层合金试样的析氢速率下降得比较明显, 在反应的第 1 d, 有涂层试样的析氢速率就比无涂层的低 61%, 且很快趋于稳定, 这可以直接地说明涂层使合金试样的腐蚀速率降低.

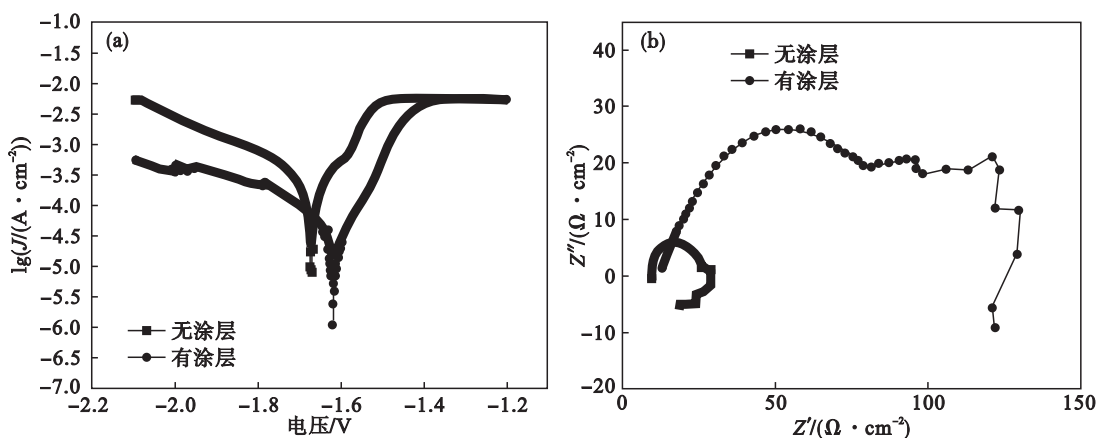


图 3 Mg-3Zn-0.5Sr 合金试样在 SBF 中的极化曲线与阻抗谱
Fig. 3 Polarization curves and electrochemical impedance spectroscopes for the Mg-3Zn-0.5Sr alloys in SBF
(a)—极化曲线；(b)—阻抗谱.

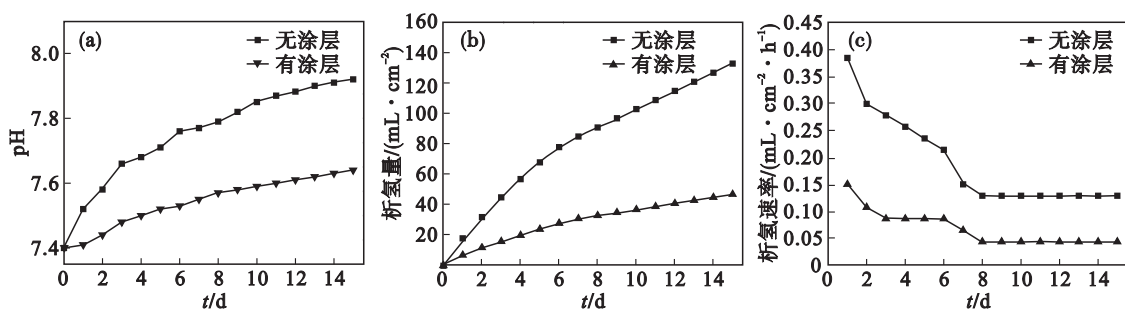


图 4 Mg-3Zn-0.5Sr 合金试样的 pH、析氢量、析氢速率随时间变化曲线
Fig. 4 The pH, hydrogen volume and hydrogen rate for the Mg-3Zn-0.5Sr alloys change with immersion time, respectively
(a)—pH 随时间变化曲线；(b)—析氢量随时间变化曲线；(c)—析氢速率随时间变化曲线.

合金试样在 SBF 中发生腐蚀反应,对于有涂层试样来说,涂层的存在会使基体与溶液隔离,但覆盖在基体表面的 HA 涂层有孔隙,基体依然会和溶液接触,发生腐蚀反应,涂层只是在一定程度上减少了基体与溶液的接触面积,使腐蚀速率明显降低.与此同时,HA 在 SBF 溶液中的反应是动态的,不断地溶解和沉积,不过沉积的 HA 量多于溶解的,所以随着反应的进行,基体表面的涂层变得更加致密^[10]. 因此有涂层试样的腐蚀速率降低.

2.3 细胞毒性分析

2.3.1 细胞形态的观察

如图 5 所示,在显微镜下,贴壁生长的大鼠成骨细胞呈梭形.在上述两种按 1.25 cm²/mL 比例浸取的无涂层 Mg-3Zn-0.5Sr 合金及有涂层 Mg-3Zn-0.5Sr 合金浸提液里培养的细胞生长状态良好,培养 4 d 后的细胞形态几乎没有变化,依然呈现梭形.且有涂层 Mg-3Zn-0.5Sr 合金浸提液里培养的细胞较无涂层 Mg-3Zn-0.5Sr

合金浸提液里培养的细胞生长得更加密集,这表明带有涂层的合金浸提液可以更好地促进细胞生长.

2.3.2 MTT 测试结果

实验材料与阴性对照组不同时间下 RGR 对比结果见表 2. 从中可见,阴性组在 4 d 内的 RGR 值均为 100,即无死亡细胞出现.有无涂层合金在 2 d 和 4 d 的细胞相对增值度均大于 100%,细胞毒性等级为 0 级,均满足医用材料细胞毒性要求.

2.3.3 细胞毒性结果讨论

Mg 是人体不可缺少的矿物质元素之一,几乎参与人体所有的新陈代谢过程^[11-12],它可以促进骨细胞的增殖并加快骨组织的愈合^[13-14]. Mg 在体内可形成可溶性、无毒性且随尿液排出的氧化物^[15]. 本实验在设计镁合金材料时,选取了人体必须且有益的金属元素 Zn 和 Sr 作为合金添加元素,控制了添加量.涂层的制备采用的是仿生法在基体表面自然沉积 HA 涂层. HA 是人体骨骼、牙齿等硬组织的主要成分.实验所选取的大鼠成

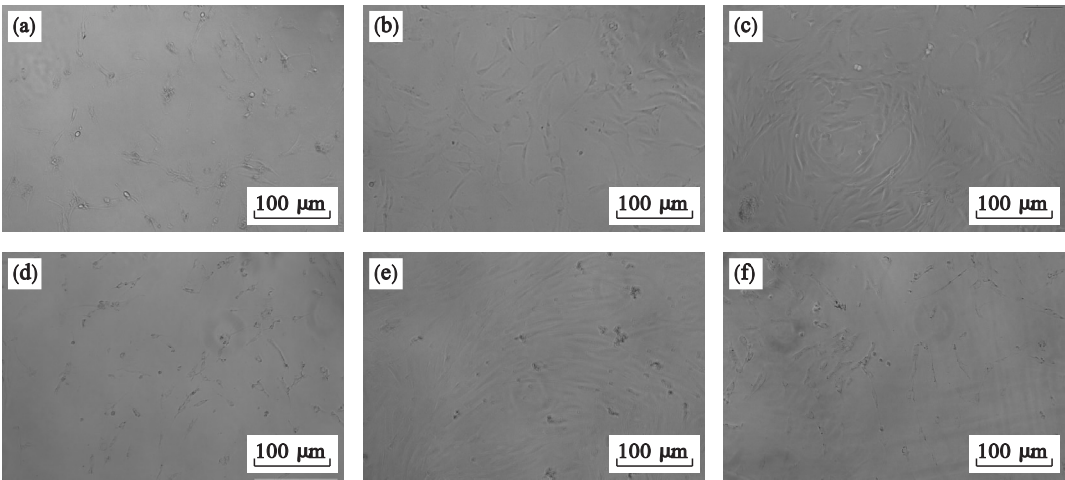


图 5 大鼠成骨细胞在 Mg-3Zn-0.5Sr 合金试样浸提液中培养 2 d,4 d 时的细胞形貌

Fig. 5 Morphology of rat osteoblasts cultured in the extracts of Mg-3Zn-0.5Sr alloys for 2 d and 4 d

(a)—培养 2 d 的阴性对照组; (b)—在无涂层试样浸提液培养 2 d; (c)—在有涂层试样浸提液培养 2 d; (d)—培养 4 d 的阴性对照组; (e)—在无涂层试样浸提液培养 4 d; (f)—在有涂层试样浸提液培养 4 d.

表 2 大鼠成骨细胞的 MTT 测试结果
Table 2 Results of the MTT tests for rat osteoblasts

试样	2 d		4 d	
	RGR/%	级别	RGR/%	级别
阴性对照组	100	0	100	0
无涂层 Mg-3Zn-0.5Sr	127	0	101	0
有涂层 Mg-3Zn-0.5Sr	101	0	107	0

骨细胞繁殖能力强,可以很好地反映出材料中是否存在有毒物质,所用的 MTT 法的测试过程简单、自动化程度高,保证了实验结果的准确性.

3 结 论

- 1) 利用仿生法在 Mg-3Zn-0.5Sr 合金表面自然沉积的涂层均匀致密,厚度约为 30 ~ 40 μm,可以有效地提高合金的耐蚀性能,降低其降解速率.
- 2) 在体积分数 25% 有无涂层 Mg-3Zn-0.5Sr 合金浸提液里培养 4 d 的细胞毒性等级为 0 级,满足医用材料细胞毒性要求,生物相容性良好.

参考文献:

[1] Zheng Y F,Gu X N,Witte F. Biodegradable metals [J]. *Materials Science & Engineering: R*,2014,77 (2) :1 - 34.

[2] Zreiqat H,Howlett C R,Zannettino A,et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*,2002,62 (2) :175 - 184.

[3] Virtanen S. Biodegradable Mg and Mg alloys: corrosion and

biocompatibility [J]. *Materials Science & Engineering: B*, 2011,176 (20) :1600 - 1608.

[4] Rahim M I,Rohde M,Rais B,et al. Susceptibility of metallic magnesium implants to bacterial biofilm infections [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*,2016,104 (6) :1489 - 1499.

[5] Qu H,Wei M. Improvement of bonding strength between biomimetic apatite coating and substrate [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*,2008,84 (2) :436 - 443.

[6] 曹楚南. 电化学阻抗谱导论 [M]. 北京:科学出版社,2002: 87 - 113.

(Cao Chu-nan. Introduction to electrochemical impedance spectroscopy [M]. Beijing: Science Press,2002: 87 - 113.)

[7] Kokubo T,Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity [J]. *Biomaterials*,2006,27 (15) :2907 - 2915.

[8] 宋光铃. 镁合金腐蚀与防护 [M]. 北京:化学工业出版社,2006:94 - 208.

(Song Guang-ling. Corrosion and protection of magnesium alloys [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 94 - 208.)

[9] Legeros R Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics [J]. *Clinical Materials*,1993,14 (1) : 65 - 88.

[10] Zhang Y,Zhang G,Wei M. Controlling the biodegradation rate of magnesium using biomimetic apatite coating [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*,2009,89 (2) :408 - 414.

[11] Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability [J]. *Mutation Research*,2001,475 (1/2) :113.

[12] Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism [J]. *Molecular Aspects of Medicine*,2003,24 (1/2/3) :27 - 37.

[13] Witte F,Kaese V,Haferkamp H,et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response [J]. *Biomaterials*,2005,26 (17) :3557 - 3563.

[14] Yun Y H,Dong Z, Yang D, et al. Biodegradable Mg corrosion and osteoblast cell culture studies [J]. *Materials Science and Engineering: C*,2009,29 (6) :1814 - 1821.

[15] Saris N E L,Mervaala E,Karppanen H,et al. Magnesium: an update on physiological, clinical and analytical aspects [J]. *Clinica Chimica Acta*,2000,294 (1) :1 - 26.