

文章编号:1004-7220(2018)05-0417-06

# 高纯镁在体内定量载荷下的降解行为

高元明<sup>1,2</sup>, 张阔<sup>3\*</sup>, 王丽珍<sup>1,2</sup>, 李林昊<sup>1,2</sup>, 孙海明<sup>3</sup>, 樊瑜波<sup>1,2,4</sup>

(1. 北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 生物力学与力生物学教育部重点实验室, 北京 100083; 2. 北京航空航天大学 生物医学工程高精尖创新中心, 北京 102402; 3. 北京大学 医学部, 实验动物科学部, 北京 100191; 4. 国家康复辅具研究中心, 北京 100176)

**摘要:**目的 定量研究力学载荷对高纯镁在体内降解的影响。方法 将直径 2 mm、长 14 mm 的圆柱状高纯镁 (99.99 wt.%) 试件装配到聚醚醚酮 (PEEK) 制成的圆环上。PEEK 环可使镁试件分别处于 3 种应力状态: 无应力、压应力 [ $(6.2 \pm 0.6)$  MPa] 和拉应力 [ $(4.6 \pm 0.1)$  MPa]。将不同应力状态的试件植入 SD 大鼠背部皮下 4 周后取出。通过试件失重、剩余体积、表面形貌和周围软组织染色分析高纯镁的降解行为。结果 植入大鼠皮下的高纯镁试件均出现降解, 并且被胶原纤维囊包裹。受到压、拉应力的试件与无应力试件在失重和剩余体积上无显著差别。在各应力状态下的试件都趋于均匀腐蚀。结论 在体内皮下环境中, PEEK 环对高纯镁施加 4~6 MPa 压、拉应力对高纯镁降解行为无明显影响。研究结果为镁基可降解植入物的设计与临床应用提供理论依据。

**关键词:** 应力腐蚀开裂; 可降解材料; 高纯镁; 体内实验; 定量载荷

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2018.05.006

## *In Vivo* Degradation Performance of High-Purity Magnesium Subjected to Quantitative Mechanical Load

GAO Yuanming<sup>1,2</sup>, ZHANG Kuo<sup>3\*</sup>, WANG Lizhen<sup>1,2</sup>, LI Linhao<sup>1,2</sup>, SUN Haiming<sup>3</sup>, FAN Yubo<sup>1,2,4</sup>

(1. Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100083, China; 2. Beijing Advanced Innovation Centre for Biomedical Engineering, Beihang University, Beijing 102402, China; 3. Department of Laboratory Animal Science, Health Center, Peking University, Beijing 100191, China; 4. National Research Center for Rehabilitation Technical Aids, Beijing 100176, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of mechanical load on *in vivo* degradation performance of high-purity magnesium (HP Mg, 99.99 wt.%) quantitatively. **Methods** Cylindrical Mg specimens, with a 2 mm diameter and a 14 mm length, were mounted in polyetheretherketone (PEEK) rings to bear compressive stresses [ $(6.2 \pm 0.6)$  MPa], tensile stresses [ $(4.6 \pm 0.1)$  MPa] or no stress (as control). The specimens under different stress states were implanted subcutaneously in dorsal abdominal regions of SD rats for 4 weeks. The mass loss, residual volume and surface morphology of the specimens and staining of surrounding soft tissues were used to analyze the degradation rate of HP Mg. **Results** Specimens and rings were completely encapsulated by membranous tis-

收稿日期:2017-10-16; 修回日期:2017-11-11

基金项目:国家自然科学基金项目(11572029, 11421102)。

通信作者:樊瑜波,教授,博士研究生导师,E-mail: yubofan@buaa.edu.cn

\* 为共同第一作者

sues after implantation for 4 weeks. No significant differences in the degradation rates were noted between specimens bearing stress and the control. The corrosion layers of specimens under each stress state were uniform.

**Conclusions** The compressive and tensile stresses (4-6 MPa) could not affect significantly HP Mg degradation performance *in vivo*. The research findings provide theoretical references for the design and clinical application of Mg-based degradable implants.

**Key words:** stress corrosion cracking; degradable material; high-purity magnesium; *in vivo* experiment; quantitative load

镁基材料作为可降解生物材料的研究虽然已有较长的历史,但受到当时的科学和技术条件制约,没有形成广泛的临床应用<sup>[1]</sup>。随着材料科学和医学的进步,近年来可降解植介入体得到迅猛发展。相较于聚合物材料,镁及其合金作为金属可降解材料具有更好的强度和韧性<sup>[2-3]</sup>,能够应用于承载的可降解植介入体<sup>[4-5]</sup>。其中,高纯镁因其良好的生物相容性和适宜的降解速率成为具有潜在临床应用前景的材料<sup>[6-8]</sup>。植介入体在体内都会处于一定的力学载荷环境,故将镁作为可降解生物材料进行研究时,要明确应力对其降解的影响。但在以往关于应力对镁腐蚀的研究中仍然有大量问题无法解释<sup>[9]</sup>。目前关于应力对镁降解影响的研究大多采用体外实验<sup>[10-13]</sup>。然而体内生理环境十分复杂,镁在体内的降解行为不能完全用体外实验来研究。由于体内的载荷条件很难定量测定和控制,在一定程度上制约了力学载荷对镁在体内降解影响的相关研究。本文设计了聚醚醚酮(polyetheretherketone, PEEK)环加载装置,通过动物在体实验研究高纯镁在体内定量载荷下的降解行为,以期对镁基可降解植介入体的研究和设计提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 高纯镁与 PEEK 环

直径 8 mm 的高纯镁棒材(99.99 wt.%, 东莞宜安科技股份有限公司)经机械加工制成直径 2 mm、长 14 mm 圆柱试件。距试件两端 2 mm 处有深 0.5 mm、宽 1 mm 的卡槽。直径 22 mm 的 PEEK 棒材(GEHR 公司,德国)经机械加工制成外径 18 mm、厚 1 mm、轴向长度 2 mm 的 PEEK 环。PEEK 环径向两端有卡槽与高纯镁试件配合。PEEK 环的两个卡槽底部间距离分为 14、13、15 mm 3 种规格,从而

使安装其上的高纯镁试件沿轴向分别处于无应力、压应力和拉应力 3 种载荷状态[见图 1(a)]。利用力学试验机(AG-IS, 岛津公司,日本)测试得到 PEEK 环对试件施加的压应力为(6.2 ± 0.6) MPa,拉应力为(4.6 ± 0.1) MPa。

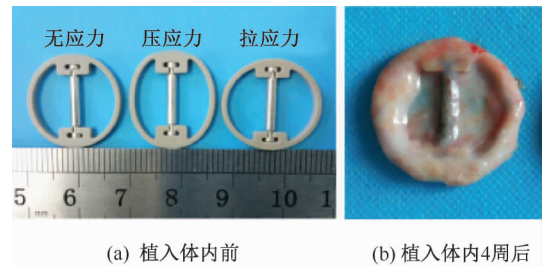


图1 高纯镁试件与 PEEK 环

Fig. 1 High-purity magnesium and PEEK ring

(a) Pre-implantation, (b) 4-week post-implantation

高纯镁试件与 PEEK 环依次经丙酮、无水乙醇和去离子水超声清洗 15 min。高纯镁试件经称重后安装在对应的 PEEK 环上,并进行辐照灭菌(25 kGy)。

### 1.2 实验动物与手术方法

雄性 SD 大鼠 10 只,体重 200 ~ 220 g,由北京大学医学部实验动物科学部提供并饲养[许可证号:SCXK(京)2016-0010;SYXK(京)2016-0041]。大鼠被随机分为压应力组(5 只)和拉应力组(5 只),以 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg, Sigma-Aldrich 公司,美国)腹腔注射麻醉。压应力组中的大鼠背部左侧皮下植入压应力试件,右侧皮下植入无应力试件作为对照。拉应力组中的大鼠背部左侧皮下植入拉应力试件,右侧皮下植入无应力试件作为对照。每只大鼠均被植入无应力试件以排除动物个体差异性。动物手术在无菌环境下进行。术后大鼠饲养 4 周,期间给予大鼠配合饲料,自由饮食。

### 1.3 取材与表征

试件植入 4 周后,通过腹腔注射过量麻醉药处

死大鼠。将高纯镁试件和 PEEK 环连同其周围组织一起取出,浸泡在 10% 福尔马林中固定。组织固定后,将高纯镁试件从其周围的组织中抽离,经去离子水冲洗,室温干燥。试件周围组织进行石蜡包埋及 HE 和 Masson 染色。高纯镁试件经充分干燥后对其降解表面进行扫描电镜(Quanta 250FEG, FEI 公司,美国)观察和 EDS 能谱分析。

高纯镁试件在温热  $\text{CrO}_3$  溶液(180 g/L, 约  $60^\circ\text{C}$ )中浸泡 5 min,再分别经去离子水和无水乙醇超声清洗 1 min 以去除腐蚀产物。试件充分干燥后进行称重,计算失重。

将去除腐蚀产物后的高纯镁试件进行 Micro-CT 扫描(SkyScan 1076, Bruker 公司,美国)。工作参数为:扫描电压 48 kV,扫描电流 200  $\mu\text{A}$ ,曝光时间 1.950 s,精度 9  $\mu\text{m}$ 。根据 Micro-CT 扫描数据进行

三维重建,通过 CTA<sub>n</sub> 软件在相同参数下计算高纯镁试件中部轴向长度 8 mm 区域的体积。

#### 1.4 统计学处理

各组实验数据以均数  $\pm$  标准差表示。通过 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计学分析。组间的差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

高纯镁试件在植入大鼠皮下 4 周后被组织包裹并出现降解[见图 1(b)]。压、拉应力组中的有应力试件与其各自对照(无应力试件)在失重上无明显差别[见图 2(a)、(b)]。各组中有应力试件与其各自对照的中部区域(轴向长度 8 mm)剩余体积无明显差别[见图 2(c)、(d)]。

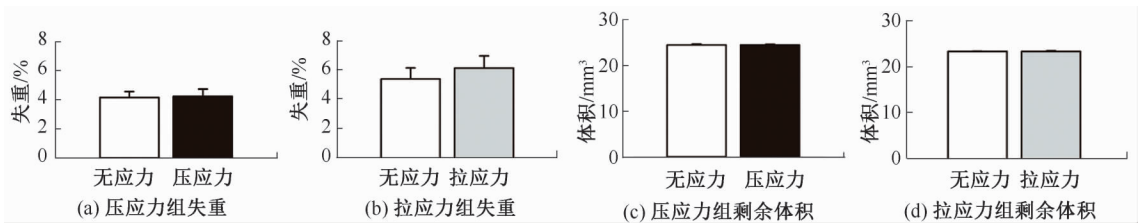


图 2 高纯镁试件失重和剩余体积( $n=5$ )

Fig. 2 Mass loss and residual volume of high-purity magnesium (a) Mass loss of compressive stress group, (b) Mass loss of tensile stress group, (c) Residual volume of compressive stress group, (d) Residual volume of tensile stress group

通过 SEM 对植入大鼠皮下 4 周后的高纯镁试件表面进行观察。各应力状态下的试件都形成了较均匀的腐蚀层,且各应力状态下的试件表面形貌无明显

差别(见图 3)。经  $\text{CrO}_3$  溶液清洗后,各试件表面形貌无明显差别。试件腐蚀层的 EDS 分析结果表明, O、Mg、P 和 Ca 是腐蚀层的主要元素(见图 4)。

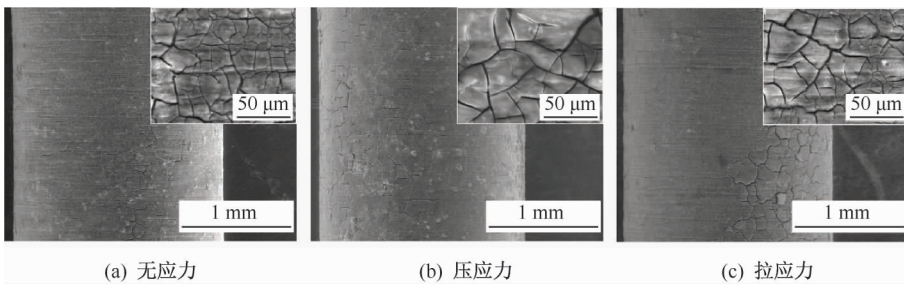


图 3 高纯镁试件在不同应力状态下体内降解 4 周后表面形貌

Fig. 3 SEM photograph of the high-purity magnesium under different stress states after implantation for 4 weeks (a) Non-stress, (b) Compressive stress, (c) Tensile stress

利用组织学染色进一步分析高纯镁试件与组织的生物界面情况。通过 HE 染色法可以观察到在试件与组织界面处聚集了大量的呈圆形细胞核的炎症

细胞,并且分泌了大量的细胞外基质[见图 5(a)]。通过 Masson 染色法发现细胞外基质为致密的胶原纤维(蓝色纤维状)[见图 5(b)]。组织学观察表

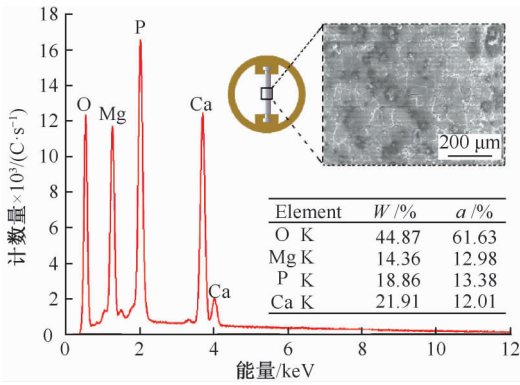


图4 高纯镁试件植入体内4周后的表面EDS分析结果

Fig. 4 EDS analysis on surface of high-purity magnesium after implantation for 4 weeks

明,大鼠皮下植入高纯镁可以引起炎症细胞黏附与胶原纤维囊的形成,表现出植入物所引发的异物反应的一般情况。

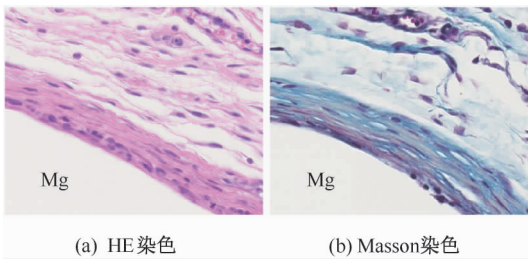


图5 高纯镁试件周围组织的HE和Masson染色(40×)

Fig. 5 HE and Masson staining of soft tissue around high-purity magnesium (a) HE staining, (b) Masson staining

### 3 讨论

关于应力对镁及其合金腐蚀的影响,相关研究普遍认为载荷可以造成应力腐蚀开裂(stress corrosion cracking, SCC),加速镁的腐蚀和失效<sup>[9]</sup>。针对载荷对镁在生理环境下降解的影响,目前的研究基本限于体外实验。镁的降解环境多为生理盐水、模拟体液(SBF)、Hank's溶液和细胞培养基等。Chin等<sup>[10]</sup>将纯镁(99.8 wt.%)试件置于8 g/L NaCl溶液中。试件在溶液中上端固定,下端连接质量块从而受到约6 MPa拉应力载荷;通过电化学和计算失重的评价方法,发现拉应力可加大纯镁的降解速率,并认为拉应力导致试件表面产生更多的微裂纹是造成降解加速的原因。本文体内实验中的高纯镁试件所受应力与Chin等<sup>[10]</sup>研究中涉及的应力大小相近。

但本文实验中并未观察到应力会导致试件表面产生更多的微裂纹,且应力没有明显的影响高纯镁在体内皮下环境中的降解速率。相较于本文涉及的体内生理环境,NaCl溶液的成分过于简单。其中单一的氯离子很容易加速镁的降解,使镁发生点蚀,产生微裂纹。另外,已有研究表明,生理环境中含有可促使镁趋于均匀降解的物质,如蛋白质的吸附<sup>[14]</sup>。

为了研究镁及其合金在承受载荷条件下的降解情况,本文设计了PEEK环加载装置,理由如下:  
① PEEK材料具有良好的生物相容性,且便于机械加工,已成为可以替代金属的植介入体材料<sup>[15]</sup>。本文中的PEEK环尺寸小,便于完成对实验动物的植入。  
② PEEK具有高刚度和优越的尺寸稳定特性,PEEK环能为镁试件提供较强且恒定的载荷。  
③ PEEK作为非金属材料,不会与镁形成局部电偶电池而影响镁的降解。Choudhary等<sup>[11]</sup>将镁合金置于SBF的水浴环境中,通过力学试验机对镁合金施加动载荷和静载荷研究了镁合金的断裂。Torre等<sup>[12]</sup>采用力学试验机在SBF的水浴环境下对镁合金进行慢应变拉伸实验(slow strain rate testing, SSRT),并结合电化学阻抗谱(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)技术来研究应变对镁合金腐蚀的影响。Wang等<sup>[13]</sup>利用力学试验机对具有微弧氧化(microarc oxidation, MAO)和羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)复合涂层的镁合金在SBF水浴环境中施加压力载荷,研究降解过程中压应力对镁合金涂层的影响。以上研究中所选用的加载设备主要为大型的力学试验机。该设备虽然能对试件提供高精度和多模式的载荷,但设备体积庞大,不适合研究镁在复杂环境条件下,特别是体内环境下的降解。Grogan等<sup>[16]</sup>和Tuchscheerer等<sup>[17]</sup>分别用金属弹簧和金属架为镁试件提供恒定的单向拉伸和3点弯曲载荷,并研究镁在承载条件下的体外降解情况。该两种装置在体积和结构上得到了简化,但还不满足可植入动物体内的条件,且装置中的金属部件会影响镁的降解。

镁的降解过程发生在表层,其内部区域不受降解的影响,这使得镁与外界环境的接触面对于降解至关重要<sup>[18]</sup>。本文中植入皮下的高纯镁试件与胶原纤维囊之间形成接触面。研究结果表明,高纯镁的腐蚀层无明显点蚀现象,从而避免了应力和应变

的集中,进而未表现出应力对镁降解速率的影响。以往的体外实验研究发现,镁及其合金在应力作用下会产生应力腐蚀现象,进而可能导致材料断裂,发生应力腐蚀开裂。应力腐蚀中的裂纹扩展过程可分为裂尖的阳极溶解和机械开裂<sup>[9]</sup>。Logan 等<sup>[19]</sup>提出一种膜破裂处电偶驱动的阳极溶解理论,认为力学载荷使腐蚀中的镁的表面膜发生破裂,在表面膜破裂处和膜覆盖处形成电偶效应加速了镁的溶解,导致裂纹在此处萌生。同时,由于此处应力和应变集中,很难再钝化成膜,于是裂纹在该处不断扩展,形成应力腐蚀开裂。Pickering 等<sup>[20]</sup>提出阳极溶解管道理论,认为镁表面膜的破裂会产生管道状点蚀。在受到应力的情况下,管道状点蚀的持续发展最终会导致应力腐蚀开裂。从以上假说可知,镁腐蚀的不均匀性是导致发生应力腐蚀的关键因素。因此,本研究认为,胶原纤维囊会影响镁降解过程中的物质交换,并对镁表面膜起到一定的保护作用,抑制了表面膜的破裂,从而阻碍了裂尖的阳极溶解过程,使得应力腐蚀现象没有明显发生。Abidin 等<sup>[21]</sup>通过体外和体内的实验对比也认为,组织的包裹会影响镁的降解,导致体内降解速率低于体外降解速率。

本研究探讨了高纯镁试件在体内静态载荷下的降解行为。植介入体在体内同样会受到动态载荷。例如:血管支架因心脏跳动的影响而受到循环动态载荷。骨科植入物也会由于人的走、跑和其他活动而承受动态载荷。已有体外实验表明,动态载荷会使镁基材料发生应力腐蚀开裂和腐蚀疲劳(corrosion fatigue, CF)<sup>[22-23]</sup>。由于体内力学环境难以测量和控制,目前关于静态和动态载荷影响的定量研究都局限于体外实验。基于本文对高纯镁在体内定量静态载荷下降解行为的探讨,体内环境下动态载荷对镁基材料的影响可能与已有体外实验结果存在差异。后续工作将尝试研究定量动态载荷对镁基材料在体内降解的影响。

## 4 结语

本文通过将受到定量载荷的高纯镁植入 SD 大鼠皮下的体内实验,探讨高纯镁在不同应力状态下的降解行为。结果发现,体内环境中,拉、压应力(4~6 MPa)对高纯镁的降解无明显影响,复杂的生理环境和组织对试件的包裹是导致该结果的主要原

因。后续将针对更长降解周期、更多时间点、更大强度载荷下和不同体内环境中应力对镁的降解影响及其机制进行研究,为可降解植入物的设计提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] WITTE F. The history of biodegradable magnesium implants: A review [J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(5): 1680-1692.
- [2] GU XN, LI SS, LI XM, et al. Magnesium based degradable biomaterials: A review [J]. *Front Mater Sci*, 2014, 8(3): 200-218.
- [3] 滕继平, 杨志胤, 程佑爽, 等. 三种肋骨骨折内固定材料的生物力学性能比较 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(3): 266-270.  
TENG JP, YANG ZY, CHENG YS, et al. Comparative study on biomechanical properties of 3 kinds of rib internal fixators [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(3): 266-270.
- [4] CHEN YJ, XU ZG, SMITH C, et al. Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(11): 4561-4573.
- [5] 张宏辉, 冯海全, 刘佳, 等. 血管支架柔顺性能的仿真模拟及灰色相关性分析 [J]. *医用生物力学*, 2016, 31(3): 206-212.  
ZHANG HH, FENG HQ, LIU J, et al. Simulation on flexibility of vascular stent and grey correlation analysis [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(3): 206-212.
- [6] CHENG PF, HAN P, ZHAO CL, et al. High-purity magnesium interference screws promote fibrocartilaginous entheses regeneration in the anterior cruciate ligament reconstruction rabbit model via accumulation of BMP-2 and VEGF [J]. *Biomaterials*, 2016, 81: 14-26.
- [7] HAN P, CHENG PF, ZHANG SX, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on the degradation of high-purity Mg (99.99wt.%) screw with femoral intracondylar fractured rabbit model [J]. *Biomaterials*, 2015, 64: 57-69.
- [8] ZHAO DW, HUANG SB, LU FQ, et al. Vascularized bone grafting fixed by biodegradable magnesium screw for treating osteonecrosis of the femoral head [J]. *Biomaterials*, 2016, 81(1): 84-92.
- [9] WINZER N, ATRENS A, SONG GL, et al. A critical review of the stress corrosion cracking (SCC) of magnesium alloys [J]. *Adv Eng Mater*, 2005, 7(8): 659-693.
- [10] CHIN DA, HEILLER A, CUI B, et al. Effects of tensile stress on the corrosion rate of magnesium [J]. *J Med Devices*, 2016, 10(2): 020926.
- [11] CHOUDHARY L, RAMAN RKS. Magnesium alloys as

- body implants: Fracture mechanism under dynamic and static loadings in a physiological environment [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(2): 916-923.
- [12] TORNE K, ORNBERG A, WEISSENRIEDER J. Influence of strain on the corrosion of magnesium alloys and zinc in physiological environments [J]. *Acta Biomater*, 2017, 48: 541-550.
- [13] WANG B, GAO JH, WANG LG, *et al.* Biocorrosion of coated Mg-Zn-Ca alloy under constant compressive stress close to that of human tibia [J]. *Mater Lett*, 2012, 70(3): 174-176.
- [14] GU XN, ZHENG YF, CHEN LJ. Influence of artificial biological fluid composition on the biocorrosion of potential orthopedic Mg-Ca, AZ31, AZ91 alloys [J]. *Biomed Mater*, 2009, 4(6): 065011.
- [15] ABDULLAH MR, GOHARIAN A, ABDUL KADIR MR, *et al.* Biomechanical and bioactivity concepts of polyetheretherketone composites for use in orthopedic implants—a review [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(11): 3689-3702.
- [16] GROGAN JA, OBRIEN BJ, LEEN SB, *et al.* A corrosion model for bioabsorbable metallic stents [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(9): 3523-3533.
- [17] TUCHSCHEERER F, KRUGER L. Hydrogen-induced embrittlement of fine-grained twin-roll cast AZ31 in distilled water and NaCl solutions [J]. *J Mater Sci*, 2015, 50(14): 5104-5113.
- [18] CHO SY, CHAE SW, CHOI KW, *et al.* Load-bearing capacity and biological allowable limit of biodegradable metal based on degradation rate *in vivo* [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100(6): 1535-1544.
- [19] LOGAN HL. Film-rupture mechanism of stress corrosion [J]. *J Res Natl Bur Stand*, 1952, 48(2): 99-105.
- [20] PICKERING HW, SWANN PR. Electron metallography of chemical attack upon some alloys susceptible to stress corrosion cracking [J]. *Corrosion*, 1963, 19(11): 373t-389t.
- [21] ABIDIN NIZ, ROLFE B, OWEN H, *et al.* The *in vivo* and *in vitro* corrosion of high-purity magnesium and magnesium alloys WZ21 and AZ91 [J]. *Corros Sci*, 2013, 75(7): 354-366.
- [22] RAMAN RKS, JAFARI S, HARANDI SE. Corrosion fatigue fracture of magnesium alloys in bioimplant applications: A review [J]. *Eng Fract Mech*, 2015, 137: 97-108.
- [23] JAFARI S, HARANDI SE, RAMAN RKS. A review of stress-corrosion cracking and corrosion fatigue of magnesium alloys for biodegradable implant applications [J]. *JOM*, 2015, 67(5): 1143-1153.