

## AZ31B 镁合金降解后周围微环境对成骨细胞生物活性的影响

商晓盼<sup>1,2</sup>, 李涛<sup>2</sup>, 陆雨桐<sup>1,2</sup>, 柏青<sup>1,2</sup>, 杨永进<sup>2</sup>

1. 锦州医科大学北京解放军火箭军总医院研究生培养基地, 辽宁 锦州 121001; 2. 解放军火箭军总医院, 北京 100088

**【摘要】目的:**模拟AZ31B镁合金在体外降解过程中周围微环境的变化,进一步探讨其降解后对MC3T3成骨细胞增殖和粘附的影响。**方法:**首先,制备不同时间段的AZ31B镁合金浸提液,对其镁离子浓度及其pH值的变化进行检测。其次,利用制备好的浸提液分别培养MC3T3成骨细胞1、3、5和7 d,测定OD值来观察成骨细胞的增殖变化。然后,采用AZ31B镁合金浸提液分别培养成骨细胞30、60和120 min后,进行细胞核染色,观察成骨细胞粘附情况。**结果:**当AZ31B镁合金浸提液中镁离子浓度达到45.4~63.6  $\mu\text{g/mL}$ 时,MC3T3成骨细胞的增殖粘附明显,且在63.6  $\mu\text{g/mL}$ 左右时能够更好地促进成骨细胞的增殖粘附。**结论:**培养3 d的AZ31B浸提液最有助于成骨细胞的增殖和粘附。

**【关键词】**AZ31B镁合金;浸提液;成骨细胞;增殖;降解

**【中图分类号】**R318

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2017)09-0946-04

### Effect of microenvironment changes during AZ31B magnesium alloy degradation on osteoblast proliferation and adhesion *in vitro*

SHANG Xiaopan<sup>1,2</sup>, LI Tao<sup>2</sup>, LU Yutong<sup>1,2</sup>, BAI Qing<sup>1,2</sup>, YANG Yongjin<sup>2</sup>

1. Education Base for Postgraduate Students of PLA Rocket Force General Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. PLA Rocket Force General Hospital, Beijing 100088, China

**Abstract: Objective** To simulate the microenvironment changes during degradation of AZ31B magnesium alloy and explore the effect of such changes on proliferation and adhesion of MC3T3 osteoblasts *in vitro*. **Methods** Magnesium ion concentration and pH value were measured in AZ31B magnesium alloy extracts obtained with different extraction time. MC3T3 osteoblasts were cultured in these extracts for 1, 3, 5 and 7 d, after which the OD values were measured to assess the proliferation of the osteoblasts. The cells cultured in the extracts for 30, 60 and 120 min were observed for changes in cell adhesion using nucleus staining. **Results** The proliferation and adhesion of MC3T3 osteoblasts were significantly enhanced after exposure to AZ31B magnesium alloy extracts with magnesium ion concentrations ranging from 45.4  $\mu\text{g/mL}$  to 63.6  $\mu\text{g/mL}$ . A magnesium ion concentration of 63.6  $\mu\text{g/mL}$  was optimal to promote the proliferation and adhesion of the osteoblasts. **Conclusion** AZ31B extract at 3 d can be optimal for promoting the proliferation and adhesion of osteoblasts *in vitro*.

**Keywords:** AZ31B magnesium alloy; extract; osteoblast; proliferation; degradation

### 前言

近年来镁合金作为一种可降解的植入型生物材料,受到了越来越多研究者的关注。与其他植入材料相比较,镁合金具有良好的生物相容性和力学性

能,其弹性模量与天然骨相似<sup>[1-2]</sup>。更为重要的是镁合金生物材料在骨组织愈合过程中可以完全自行降解,避免二次手术给患者带来的痛苦和经济负担<sup>[3]</sup>。但由于镁的化学性能比较活泼,其合金的耐腐蚀性比较差。植入人体后,镁合金植入物可以快速降解,导致其周围镁离子浓度过高。研究表明镁离子浓度过高可能对成骨细胞具有毒副作用<sup>[4]</sup>。而镁合金降解后周围微环境的变化会对成骨细胞的生物活性造成影响,其中影响微环境变化的两个主要因素是镁离子浓度和pH值变化,这两个因素是影响镁合金材料能否在人体内得到广泛应用的重要因素<sup>[5]</sup>。镁合金植入物周围镁离子浓度的升高和pH值增大会造成骨代谢过程中骨形态发生蛋白(BMP-2)的分泌量增

**【收稿日期】**2017-03-27

**【基金项目】**国家自然科学基金青年基金(81400564);北京市科技新星计划(Z161100004916164);军事口腔医学国家重点实验室开放课题(2014KA05);第二炮兵总医院青年科研创新基金

**【作者简介】**商晓盼,女,硕士研究生,研究方向:口腔医学,E-mail: 564944981@qq.com

**【通信作者】**杨永进,硕士,主任医师,研究方向:口腔医学,E-mail: 82176566@qq.com

加,刺激破骨细胞的增殖分化,进而影响骨组织的再生和改建<sup>[6]</sup>。以往研究为了探索镁离子浓度的变化对成骨细胞生物活性的影响,多采用在培养液中添加镁盐调节镁离子在培养液中的浓度,与镁合金的自然降解仍有较大的差异。在本研究中,我们采用不同时间的镁合金浸提液来模拟镁合金在体内降解过程和镁离子浓度的释放曲线和pH值变化,初步分析对成骨细胞生物活性的影响,寻找最适宜的镁离子浓度和范围,为镁合金更好在体内应用提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

$\alpha$ -MEM 培养基(HyClone,美国),胎牛血清(HyClone,美国),双抗(HyClone,美国),0.25%Trpsin 胰酶(含EDTA、含酚红,亚太恒信有限公司),CCK-8

(东仁化学科技有限公司,上海),细胞计数板(柯仕达电子材料有限公司,苏州),单孔培养皿(柯仕达电子材料有限公司,苏州),96孔培养皿(柯仕达电子材料有限公司,苏州),显微镜(东仁化学科技有限公司,上海),离心机(东仁化学科技有限公司,上海),超净台(北京冠鹏净化设备责任有限公司,北京),培育箱(SANYO,日本),酶标仪(Thermo Fisher,美国),50 mL 试管(柯仕达电子材料有限公司,苏州),15 mL 试管(柯仕达电子材料有限公司,苏州),AZ31B 型镁合金金属片(宝鸡钛业有限公司,宝鸡)。

### 1.2 AZ31B 镁合金的处理和浸提液的制备

本实验采用AZ31B型镁合金作为实验材料,其化学成分见表1,将AZ31B镁合金切割成直径为2 cm、厚度为2 mm的金属圆片,经过抛光打磨以后,再以丙酮、75%酒精和蒸馏水超声荡洗5 min,室温下干燥,采用Co60消毒备用。

表1 实验用AZ31B镁合金的化学成分(w%)

Tab.1 Chemical composition of AZ31B magnesium alloy used in the experiment (w%)

| Composition | Si   | Fe     | Cu    | Mn      | Mg     | Zn      | Al      | Ni     |
|-------------|------|--------|-------|---------|--------|---------|---------|--------|
| Percentage  | ≤0.1 | ≤0.005 | ≤0.05 | 0.2-0.5 | ≤96.64 | 0.5-1.5 | 2.5-3.5 | ≤0.005 |

将消毒好的AZ31B镁合金金属圆片按2 mL/cm<sup>2</sup>加入培养基,放在含5% CO<sub>2</sub>的37℃培育箱中进行浸泡,分别浸泡0.5、1.0、2.0、3.0、5.0和7.0 d的浸提液,取上清液体放入15 mL的试管中,以2 000 r/min离心5 min,取上清液体放入新的15 mL试管中,将制备好的AZ31B镁合金浸提液送检,采用离子色谱仪(DIONEX公司,美国)检测镁离子浓度的释放以及pH值的变化。

### 1.3 MC3T3 成骨细胞增殖能力检测

MC3T3成骨细胞以10<sup>4</sup>的密度接种在4个96孔板中,每个孔中分别加入0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0 d的AZ31B镁合金浸提液各100  $\mu$ L,每组设置6个重复组,在5% CO<sub>2</sub>的37℃培育箱中分别培育1、3、5和7 d。之后在每孔中分别加入10  $\mu$ L的CCK-8,放在5% CO<sub>2</sub>的37℃培育箱中培育30 min。采用酶标仪进行检测,用波长为450 nm进行检测,检测不同镁离子浓度以及pH值对成骨细胞增殖的影响。

### 1.4 MC3T3 成骨细胞粘附检测

MC3T3成骨细胞以10<sup>4</sup>的密度接种在24孔板中,每孔加入0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0 d的AZ31B镁合金浸提液200  $\mu$ L,每组设置6个复孔,分别在培育箱中培育30、60、120 min后,弃上层培养基,PBS冲洗去除表面未粘附细胞,75%酒精固定5 min,PBS冲洗3次,再采用DAPI对细胞核进行染色,激光共聚焦显微镜

下随机选取4个视野进行计数。

### 1.5 统计学方法

实验数据使用SPSS 23.0统计软件进行分析,数据采用单因素方差分析比较多组间统计学差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AZ31B 镁合金浸提液镁离子释放浓度和pH值分析

结果显示,Blank为培养基本身镁离子的浓度,作为实验的对照组。实验组随着时间的推移,镁合金降解释放镁离子的浓度呈上升趋势(图1)。 $\alpha$ -MEN培养液pH值为8.0,AZ31B镁合金浸提液pH值检测结果均为8.5。

### 2.2 AZ31B 镁合金浸提液对成骨细胞增殖的影响

实验结果显示(图2),同一浸提液中MC3T3成骨细胞,随着培养时间的延长,增殖呈上升趋势。而同一培养时间,不同浸提液中MC3T3成骨细胞的增殖存在一定的差异,在2、3、5和7 d浸提液中MC3T3成骨细胞的增殖与空白对照组相比较差异较明显,且具有统计学意义( $P < 0.05$ )。3 d时增殖最为明显,2、5、7 d浸提液中的MC3T3成骨细胞的增殖与3 d相比较,2、3 d浸提液中MC3T3成骨细胞增殖差异较明显,且具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

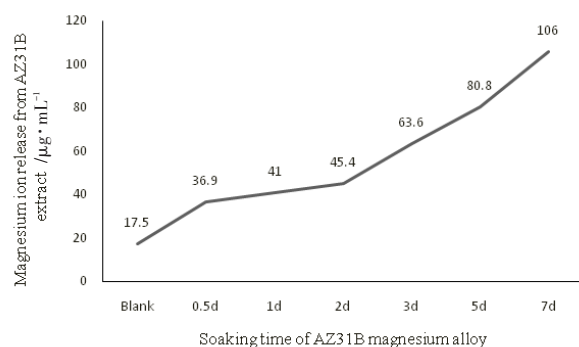
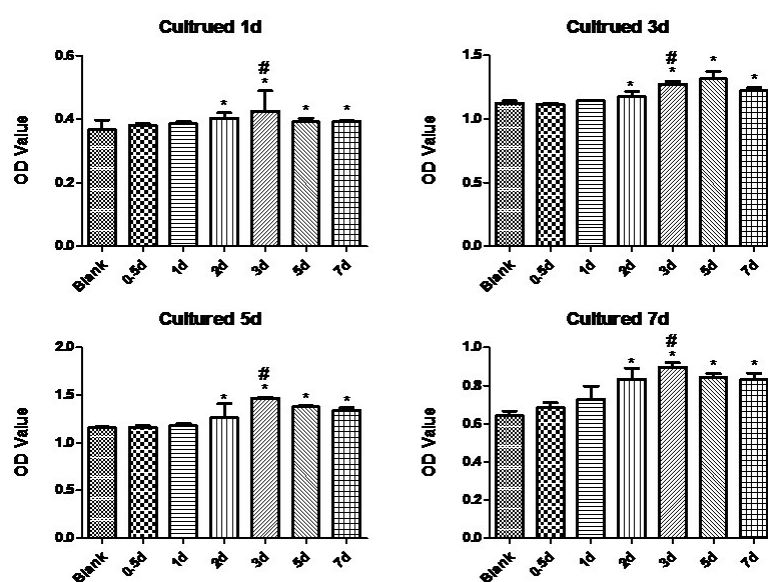


图1 AZ31B 镁合金不同时间段浸提液中镁离子的浓度( $\mu\text{g/mL}$ )

Fig.1 Magnesium ion concentration in AZ31B magnesium alloy extracts obtained after different time periods of extraction ( $\mu\text{g/mL}$ )

## 2.3 AZ31B 镁合金浸提液对成骨细胞粘附的影响

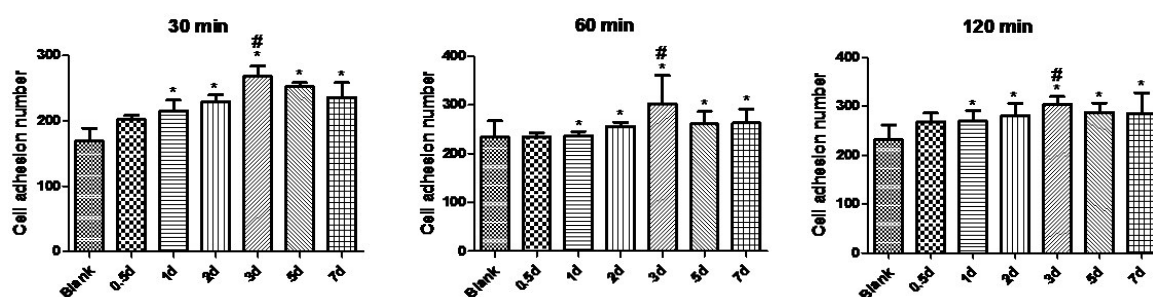
实验结果(图3)显示,同一 pH 值下,同一浓度下浸提液,成骨细胞粘附的个数随着接触时间的延长而呈上升趋势。同一接触时间下,AZ31B 镁合金不同时间的浸提液对成骨细胞粘附的影响不同,1、2、3、5、7 d 浸提液中 MC3T3 成骨细胞粘附个数与空白对照组相比较差异较明显,且具有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中 3 d 粘附差异最为明显,而 1、2、5、7 d 浸提液中 MC3T3 成骨细胞粘附数与 3 d 组相比较,1、2、5、7 d 与 3 d 浸提液中 MC3T3 成骨细胞粘附个数差异较明显,且有统计学意义( $P < 0.05$ )。



\*  $P < 0.05$ , compared with the blank control group; #  $P < 0.05$ , compared with the 3 d group.

图2 AZ31B 镁合金不同时间浸提液中镁离子对成骨细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of magnesium ion concentration in AZ31B magnesium alloy extracts on proliferation of osteoblasts



\*  $P < 0.05$ , compared with the blank control group; #  $P < 0.05$ , compared with the 3 d group.

图3 AZ31B 镁合金不同时间段浸提液中镁离子对成骨细胞粘附的影响

Fig.3 Effect of magnesium ion concentration in AZ31B magnesium alloy extracts on adhesion of osteoblasts

## 3 讨论

近年来镁合金生物材料被广泛应用到医学领域,其具有良好的生物相容性,低弹性模量和骨诱导

性、植入人体后可完全降解,避免二次手术取出的问题,同时可以避免骨愈合过程中的应力遮挡。更为重要的是,镁合金在人体内降解后,可以诱导骨组织的再生和改建,是目前应用较为广泛的生物金属材料



料。但由于其组成成分的不同,对成骨细胞增殖粘附的影响也不尽相同。目前应用较为广泛的是AZ31B镁合金,其具有超塑性成形性好、高比强度等优点<sup>[7]</sup>,更为重要的是其在人体内降解后,其降解产物具有生物活性且无毒性作用<sup>[8]</sup>。

镁合金生物材料植入人体后,在机体内环境下降解后,其周围微环境发生变化,影响成骨细胞的增殖分化,而微环境的变化主要包括其周围pH值和镁离子浓度。而pH值在骨组织重建过程中起着至关重要的作用,已有研究明确表示pH值影响成骨活性<sup>[9]</sup>。而pH值维持在8.0~8.5时有助于成骨细胞的增殖分化<sup>[10]</sup>。本实验AZ31B镁合金降解后其周围的pH值维持在8.5左右不变,波动范围小,与以往研究的能够促进成骨细胞增殖分化pH值范围相符合,说明AZ31B镁合金降解后其周围pH值维持在一个相对稳定的范围内,有助于成骨细胞增殖分化。

AZ31B镁合金降解后其周围pH值维持在一个相对恒定的范围内,因此其降解后周围微环境对MC3T3成骨细胞增殖变化的影响主要受镁离子浓度变化的影响。AZ31B镁合金降解后其周围微环境中呈碱性环境,且镁离子浓度上升,能够促进其周围BMP-2的增加,进而引导新骨的形成。然而,过量的镁离子将会导致BMP-2的分泌过量,进而促进了破骨细胞的增殖分化,影响骨组织的吸收<sup>[6]</sup>。对此,有学者研究发现,成骨细胞的生物活性具有镁离子浓度依赖性,当镁离子浓度在48~96  $\mu\text{g/mL}$ 时,能够促进骨的再生<sup>[11]</sup>。而本实验发现AZ31B降解后其降解液中镁离子浓度在45.4~63.6  $\mu\text{g/mL}$ 左右时,MC3T3成骨细胞的增殖粘附明显,且在63.6  $\mu\text{g/mL}$ 时能够更好地促进成骨细胞的增殖粘附。该结果与以往研究结果存在一定差异,我们猜测可能是由于AZ31B镁合金浸提液中除了镁离子的析出外,还有其组成的微量元素的析出,如Zn、Al、Mn等微量元素。Zn能够促进成骨细胞的增殖、骨胶原蛋白的合成以及钙盐的沉积<sup>[12]</sup>。低浓度Al能够促进成骨细胞的增殖和粘附<sup>[13]</sup>。Mn能够促进成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶的活性<sup>[14]</sup>。而AZ31B镁合金浸提液检测中含有以上3种微量元素。

目前镁合金生物材料被广泛应用到骨组织中,然而其自身降解速度过快,在植入人体之前需要在AZ31B镁合金表面制备一些相关的化学转化涂层,如稀土转化涂层<sup>[15]</sup>、氟转化涂层<sup>[16]</sup>等,以降解其在人体内降解的速度,同时控制镁离子的释放速度。在本研究中,我们利用AZ31B镁合金在降解过程中释放的不同浓度镁离子进行成骨细胞增殖粘附的实验,其结果能够为镁合金表面化学涂层处理时,控制镁合金降解速度提供一定的数据指导,有助于

推动镁合金生物材料在医学领域的应用。

除此之外,本实验也存在一定的局限性,本实验采用的是模拟人体体液浸泡AZ31B镁合金,因此降解液中除了含镁离子以外,还含有其他AZ31B镁合金组成微量元素的析出,而析出的其他微量元素的量对成骨细胞生物活性会产生怎样的影响也是我们今后研究的方向。

## 【参考文献】

- [1] WITTE F. The history of biodegradable magnesium implants: a review [J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(5): 1680-1692.
- [2] WITTE F, HORT N, VOGT C, et al. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion [J]. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 2008, 12(5-6): 63-72.
- [3] WITTE F, FEYERABEND F, MAIER P, et al. Biodegradable magnesium-hydroxyapatite metal matrix composites [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(13): 2163-2174.
- [4] YAMASAKI Y, YOSIHIDA Y, OKAZAKI M, et al. Action of FGMg CO<sub>3</sub> Ap-collagen composite in promoting bone formation [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(27): 4913-4920.
- [5] YANG C X, YUAN G Y, ZHANG J, et al. Effects of magnesium alloys extracts on adult human bone marrow-derived stromal cell viability and osteogenic differentiation [J]. *Biomed Mater*, 2010, 5(4): 045005.
- [6] HONG Y S, YANG K, ZHANG G D, et al. The role of bone induction of a biodegradable magnesium alloy [J]. *Acta Metallurgica Sinica*, 2008, 9(44): 1035-1041.
- [7] 宋美娟, 李宝顺, 王秋, 等. AZ31B镁合金板料超塑性成形极限数值模拟 [J]. *徐州工程学院学报*, 2015, 4(30): 33-39.
- [8] SONG M J, LI B S, WANG Q, et al. Numerical simulation of superplastic forming limit of AZ31B magnesium alloy sheet [J]. *Journal of Xuzhou Institute of Technology*, 2015, 4(30): 33-39.
- [9] TAIGER M P, PIETAK A M, HUADMAI J, et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 1728-1734.
- [10] SHEN Y, LIU W, WEN C, et al. Bone regeneration: importance of local pH—strontium-doped borosilicate scaffold [J]. *J Mater Chem*, 2012, 22(17): 8662-8670.
- [11] SHEN Y, LIU W, KAI L, et al. Interfacial pH: a critical factor for osteoporotic bone regeneration [J]. *Langmuir*, 2011, 27(6): 2701-2708.
- [12] LI H L, PAN H B, NING C Y, et al. Magnesium with micro-arc oxidation coating and polymeric membrane: an *in vitro* study on microenvironment [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26(3): 147.
- [13] SEO H J, CHO Y E, KIM T, et al. Zn may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3 -E1 cells [J]. *Nutr Res Pract*, 2010, 4(5): 356-361.
- [14] LIANG L. The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2003, 14(2): 100-114.
- [15] 张大威, 程岩, 张金超, 等. 微量元素与朝鲜淫羊藿中黄酮对原代成骨细胞增殖和分化的拮抗与协同效应 [J]. *科学通报*, 2007, 16(52): 1883-1890.
- [16] ZHANG D W, CHENG Y, ZHANG J C, et al. Antagonistic effects and synergistic effects of trace elements and flavonoids in epimedium on proliferation and differentiation of primary osteoblasts [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 16(52): 1883-1890.
- [17] CHIU K Y, WONG M H, CHENG F T, et al. Characterization and corrosion studies of fluoride conversion coating on degradable Mg implants [J]. *Surf Coat Technol*, 2007, 202(3): 590-598.
- [18] XU L P, ZHANG E L, YANG K. Phosphating treatment and corrosion properties on Mg-Mn-Zn alloy for biomedical application [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2009, 20(4): 859-867.

(编辑:陈丽霞)