

新型外科植入用钛合金 TZNT 的生物相容性

李 军¹, 李佐臣², 陈杜娟²

(1. 上海工程技术大学 材料工程学院, 上海 201620;

2. 西北有色金属研究院, 西安 710016)

摘 要: 制备一种新型外科植入用钛合金 Ti12.5Zr2.5Nb2.5Ta(TZNT), 通过溶血试验、细胞毒性试验和皮下埋植试验系统评价该合金的生物相容性, 并与 3 种标准外科植入用钛合金 Ti6Al4V、Ti6Al7Nb 以及 TA2 进行对比。该合金经完全退火工艺处理后(700 ℃, 45 min, AC), 主要由大量位向不同的片层状 α 相簇和少量位于 α 片间的 β 相组成。溶血试验结果表明: TZNT 的溶血率为 0.683%(远低于 5%), 因此不会引起急性溶血。细胞毒性试验结果表明: TZNT、Ti6Al4V 和 Ti6Al7Nb 在 3 个时间组(2、4 和 6 d)的相对细胞增殖率均不低于 100%, 细胞毒性等级评定为 0 级, 即对细胞不产生毒性。皮下埋植试验结果表明: 与 Ti6Al4V 和 Ti6Al7Nb 相比, TZNT 和 TA2 植入白鼠体内 4 周和 8 周后, 无论是炎细胞密度还是植入物周围的纤维膜厚度均有所降低, TZNT 合金植入 4 周后, 组织良好, 包绕材料的纤维膜较疏松且与组织间的界限不清; 随着植入时间延长至 8 周, 炎细胞密度进一步减少, 纤维膜也变得更薄, 更致密。综合评价结果表明该新型合金具有良好的生物相容性。

关键词: 生物材料; 钛合金; 医用钛合金; 生物相容性; 溶血; 细胞毒性; 皮下埋植

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

Biocompatibility of new titanium alloy TZNT for surgical implant application

LI Jun¹, LI Zuo-chen², CHEN Du-juan²

(1. School of Materials Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China;

2. Northwest Institute for Nonferrous Metal Research, Xi'an 710016, China)

Abstract: The biocompatibility of a new titanium alloy Ti12.5Zr2.5Nb2.5Ta (TZNT) for surgical implant application was investigated by hemolysis test, cytotoxic test and subcutaneous implantation test. The three standard titanium alloys Ti6Al4V, Ti6Al7Nb and TA2 for surgical implant application were taken as contrast materials. TZNT subjected to the full annealing treatment (700 ℃, 45 min, AC) is composed of a large number of lamellar α -phase clusters with different orientations and a small amount of β -phase between lamellar α -phase. The hemolysis test result shows that the hemolysis rate of TZNT is 0.683% (less than 5%), which indicates that the acute hemolysis cannot be induced by TZNT. The cytotoxic test result shows that the relative cell proliferation rates of TZNT, Ti6Al4V and Ti6Al7Nb are more than or equal to 100% at different cultivation periods (2, 4 and 6 d), the cytotoxicity is ranked as 0 grade, which indicates that three titanium alloys cannot induce the cytotoxic effect. The subcutaneous implantation test result shows that the density of inflammation cells and the thickness of fibrous membrane decrease in the TZNT and TA2 groups at different implantation periods (4 weeks and 8 weeks) to white mice when compared with those in the Ti6Al4V and Ti6Al7Nb groups. For TZNT implanted for 4 weeks, the tissues surrounding TZNT are good, the fibrous membrane is very loose and the interface between the fibrous membrane and the tissues is very obscure. When the implantation period increases to 8 weeks, the density of inflammation cells further decreases. Other than that, the fibrous membrane also gets compacter and thinner. The comprehensive evaluation results show that the new titanium alloy TZNT possesses good

biocompatibility and is an ideal biomedical material.

Key words: biomaterial; titanium alloy; medical titanium alloy; biocompatibility; hemolysis test; cytotoxic test; subcutaneous implantation

当前在医学界广泛使用生物相容性良好和耐腐蚀性能优良的钛合金作为硬组织修复替代材料^[1]。Ti6Al4V 是第一代用作生物材料的钛合金^[2], 然而, 研究发现该合金中的元素 V 在人体使用过程中会少量释放, 而引起细胞毒性反应和生理紊乱^[3-4]。随后 Ti6Al7Nb 作为第二代医用钛合金在瑞士被开发, 该合金用无毒元素 Nb 取代 V, 因而具有更好的生物相容性。但这两种 $\alpha+\beta$ 型合金具有较高的弹性模量(大约 120 GPa)^[5], 以及人体骨骼的弹性模量严重不匹配(大约 28 GPa)。研究表明: 如果合金的弹性模量比骨骼的高, 承受应力的金属和骨骼将产生不同的应变, 在金属与骨的接触界面处会出现相对位移, 从而造成界面处松动。另外, 由于应力不能完全从人体关节传递到其临近的自然骨组织, 可能导致骨的吸收和功能的退化, 产生应力-屏蔽现象^[6]。 β 型合金由于具有低弹性模量的特点而成 为人们开发的第三代医用钛合金, 其弹性模量比 $\alpha+\beta$ 型钛合金的降低 30%~50%, 然而其容许应变(屈服强度和弹性模量的比值)达到 1.337%, 远高于皮质骨的 0.67%^[7]。STEINEMANN 等^[8]指出, 仅仅考虑骨骼和植入物弹性模量的差异是片面的, 自然骨和人工植入物之间另一个很重要的差异是容许应变, 该指标可以用来衡量植入物的生物力学相容性。由此可知, 开发一种新的医用材料, 不仅要考虑骨和植入物弹性模量的匹配, 还要考虑容许应变的匹配问题。

针对以上三代钛合金存在的问题, 本文作者采用 d-电子合金设计理论设计并制备一种近 α 型新型医用钛合金 Ti12.5Zr2.5Nb2.5Ta(TZNT)。研究表明: 该合金具有比 Ti6Al4V 和 Ti6Al7Nb 更低的弹性模量以及与骨骼更匹配的容许应变^[9], 因而具有更优异的生物力学相容性。作为一种新型医用钛合金, 评价其生物相容性是非常必要的。生物相容性是生物医学材料区别于其它功能材料所必须具备的特性。本研究根据国际标准化组织 7406 技术报告(ISO/TR7406)推荐的试验项目, 采用溶血试验、细胞毒性试验和皮下埋植试验, 对该合金生物安全性进行初步评价。

1 实验

1.1 材料制备

试验合金的名义化学成分为 Ti-12.5Zr-2.5Nb-

2.5Ta (简称 TZNT, 质量分数, %), 采用真空自耗电弧炉熔炼, 二次重熔而成。原材料选用 1 级海绵钛、海绵锆、高纯钽以及 Ti53.5Nb 中间合金。按名义成分投料 5 kg, 在 300 t 油压机上制备出 6 根 $d 30 \text{ mm} \times 270 \text{ mm}$ 电极, 3 根电极头尾相接焊成 $d 30 \text{ mm} \times 900 \text{ mm}$ 的电极棒, 作为熔炼一次锭的原材料。熔炼成 2 根 $d 60 \text{ mm}$ 的一次锭再焊接成电极棒, 然后熔炼出 $d 90 \text{ mm}$ 的二次锭。二次锭经过削去冒口、扒皮再取样分析, 其成分如表 1 所列。由表 1 可以看出, 合金的名义化学成分和实际检测结果非常接近。将该合金锭高温锻造造成 $d 18 \text{ mm}$ 的棒, 并采用完全退火工艺进行热处理, 具体工艺通过 $\alpha+\beta/\beta$ 相变点的测定来确定。对比材料 Ti6Al4V、Ti6Al7Nb 和 TA2 均为退火态, 由西北有色金属研究院提供。

表 1 TZNT 合金的化学成分

Table 1 Chemical composition of TZNT

Alloy	Mass fraction/%			
	Ti	Zr	Nb	Ta
Nominal	82.5	12.5	2.5	2.5
Testing	82.3	12.4	2.5	2.8

1.2 $\alpha+\beta/\beta$ 相变点的测定

钛合金的 $\alpha+\beta/\beta$ 相变点是确定热处理工艺的重要基本参数。本试验采用热膨胀法在 NETZSCH 型热膨胀仪上进行测试, 试样尺寸为 $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$ 。

1.3 组织表征

采用 Rigaku D/mas 2550V 型 X 射线衍射仪(XRD)对合金 TZNT 物相组成进行分析。采用 Cu 靶(波长 $\lambda=0.154 06 \text{ nm}$), 管电压 40 kV, 管电流 100 mA, 扫描速度 $2.5 (^{\circ})/\text{min}$ 。金相试样在 Buehler Phoenix 4000 型金相试样制备仪上制备, 然后将试样用酒精和丙酮浸洗, 经冷风吹干后用 10%HF+60%HNO₃+30%H₂O (体积分数)进行侵蚀, 最后采用 PMG3 型光学显微镜(OM)对合金组织进行观察。

1.4 溶血试验

取 1 mm 厚的 TZNT 棒材, 表面磨光后将其切割成 $5 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 的方片状, 共计 15 g。用丙酮洗净材料表面油污后, 以酒精超声洗涤 20 min, 用蒸馏水冲

洗3遍,于70℃烘干备用。抗凝剂采用质量分数为2%的草酸钾溶液。试验步骤如下。

1) 采用心脏穿刺法抽取兔血10 mL,立即注入有0.5 mL草酸钾抗凝剂的试管中,从中取4 mL加入含5 mL生理盐水的试管,制成新鲜抗凝稀释兔血。

2) 取已准备好的试验材料5 g,浸泡在10 mL生理盐水的试管中。阳性对照组:在每个试管中加10 mL蒸馏水;阴性对照组:在每个试管中加10 mL生理盐水。试验组以及阳性、阴性对照组均需3支试管。将此9支试管放在37℃恒温水浴箱30 min后取出,每个试管加0.2 mL稀释兔血,缓慢混合,再放入37℃恒温水浴箱中维持60 min。

3) 将所有试管置入离心机中离心5 min (2 500 r/min),分别吸取各试管上清液,用分光光度计测定光密度(OD)值,所选波长为545 nm,每组3支试管的均值为该组的吸光度。

4) 根据下式计算溶血率 η :

$$\eta = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: D_t 为试验样品的吸光度; D_{nc} 为阴性对照的吸光度; D_{pc} 为阳性对照的吸光度。

若材料的溶血率小于5%,说明材料符合医用材料的溶血要求;若溶血率大于5%,则预示材料有溶血作用。

1.5 细胞毒性试验

将试验材料TZNT、Ti6Al4V和Ti6Al7Nb制备成9 mm×9 mm×1 mm的薄片,并抛光成镜面,用丙酮洗净材料表面油污后,用蒸馏水冲洗3遍。以三氯乙烯超声洗涤10 min,然后用酒精超声洗涤10 min,再用蒸馏水冲洗3次,于60℃烘干备用。试验前经121℃高压灭菌20 min。试验步骤如下。

1) 浸提液的制备。浸提液采用含体积分数为10%的小牛血清的DMEM培养液,浸提时试件表面积(cm^2)与浸提介质体积(mL)之比为 $R_1=1.5$, $R_2=3$, $R_3=6$ 。浸提时使用无菌操作技术,浸提后将浸提液置于37℃培养箱内24 h,使金属离子尽可能多地析出,然后采用0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,制备出材料浸提液。阳性对照组浸提液是铝浓度为300 mg/mL的培养液;阴性对照组浸提液是未放试样的空白培养液。

2) 细胞接种和培养。将传代一次的原代培养家兔的成骨细胞用细胞培养液配制 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,分注于96孔塑料培养皿内,每孔300 μL ,共种3板,每观察期每种材料接种8孔。然后置于细胞培养箱中((37±2)℃、 CO_2 的体积分数为5%)培养24 h后,

弃去原培养液,用磷酸盐缓冲液洗涤两次,试验组分别加入100 μL 的浸提液,对照组分别加入100 μL 相应的对照液,放入上述培养环境中继续培养2、4和6 d。

3) 活细胞观察和吸光度值测定。取一块 $R_1=1.5$ 且培养4 d的培养板,在倒置相差显微镜下观察活细胞形态并摄影。在2、4和6 d各取一块培养板,每孔加入20 μL MTT液(Sigma, USA,使用浓度为5 mg/mL,溶解于磷酸盐缓冲液),继续培养6 h。然后吸取原液,每孔加150 μL 二甲基亚砜(Amresco, USA),置振荡器上振荡10 min,使结晶物充分溶解,用酶联免疫检测仪测定各孔吸收值,所选波长为500 nm。

4) 用下式计算细胞的相对增殖率(R):

$$R = D_s / D_{nc} \times 100\% \quad (2)$$

式中: R 为相对增殖率; D_s 为试验组(包括试验样品、阳性对照组及阴性对照组)平均吸光度; D_{nc} 为阴性对照组吸光度。

5) 根据表2所示,将相对增殖率转换成6级材料毒性评级。试验结果为0级或1级,反应为合格;试验结果为2级,应结合细胞形态来综合评价;试验结果为3~5级,反应为不合格。

表2 细胞毒性等级的评级标准

Table 2 Grade evaluation of standard cell cytotoxic

Grade	Relative cell proliferation rate/%
0	≥100
1	75~99
2	50~74
3	25~49
4	1~24
5	0

1.6 皮下埋植试验

选用健康、卫生情况良好的雄性SD大白鼠,共20只,按4周和8周两个时间组,每组10只。试验用材料为TZNT、Ti6Al4V、Ti6Al7Nb和TA2,将材料加工成长2 mm,直径为1 mm的圆柱体,圆柱两端用400#金相砂纸磨光,手术前对试验材料进行严格消毒处理。用丙酮洗净材料表面油污后,用蒸馏水冲洗3遍,用酒精超声洗涤20 min,再用蒸馏水冲洗3次,于37℃烘干备用。试验前于121℃高压灭菌20 min。按试验步骤如下。

1) 固定动物,暴露背部,手术区用脱毛剂脱鼠毛,常规消毒皮肤,铺无菌小洞巾。然后按每千克大白鼠40~50 mg的剂量,将质量分数为1%的戊巴比妥钠采用腹腔注射麻醉大白鼠。

2) 皮下埋植在无菌条件下沿脊柱长轴作左右各2点的长切口,深至皮下,钝性分离皮下组织,按A(TZNT)、B(Ti6Al4V)、C(Ti6Al7Nb)和D(TA2)顺序(见图1)分别将试样平行于脊柱植入,缝合皮肤。

3) 手术24和48 h后,观察动物活动状况,创口有无渗血、红肿、化脓和材料有无排出等迹象。

4) 术后4周和8周分别麻醉动物,首先观察种植体有无移位,然后切开皮肤,肉眼观察种植体周围组织情况。

5) 切取种植材料及周围组织,用中性福尔马林液固定,从试样中心垂直试样将组织切成二等份,去除试样,常规石蜡包埋,沿试样长轴进行切片,伊红-苏木精染色。光学显微镜下检查试样与结缔组织界面区域,观察是否存在炎症、炎症的密度和范围、组织坏死形成与否。

6) 用显微镜的C5型0.5网形目镜尺和C7型0.1坐标目镜尺,在放大倍数为400倍条件下,分别对4周和8周组进行炎细胞记数和膜厚度测量。在材料两端区域内,任意记3次整个网尺的炎细胞数,取每个试样2端共6次记数的均值为该试样的炎细胞密度,测每个试样的两端中心点及附近2点的膜厚,取6次测量值的均数作为该试样的膜厚度。

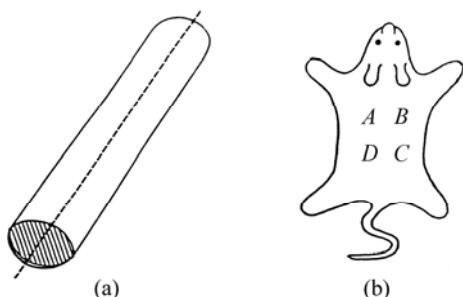


图1 皮下埋植试验示意图

Fig.1 Schematic diagram of subcutaneous implanting test:

(a) Shape of sample; (b) Implanting position

2 结果与讨论

2.1 $\alpha+\beta/\beta$ 相变点的测定

图2所示为合金TZNT的线膨胀率和热膨胀系数随温度的变化。由图2可见,在室温到753 °C的温度范围内,该合金基本呈线形膨胀,热膨胀系数随温度变化维持在一个相对稳定的数值,大约为 $1.1 \times 10^{-5} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ 。这说明合金的热膨胀特性在这个温度区间保持不变,即物相组成没有发生改变。当温度大于753 °C时,热膨胀系数随着温度的升高急剧增加,这是开始发生相变 $\alpha \rightarrow \beta$ 的缘故,晶体结构的变化,导致热膨胀

特性的改变。由图2可看出,在整个温度区间热膨胀系数会出现一个峰值,对应的温度816 °C就是 $\alpha+\beta/\beta$ 的相变点,该温度低于纯钛的同素异晶转变温度882.5 °C,

这是因为所添加的元素中Nb和Ta为 β 相稳定化元素,降低Ti的同素异晶转变温度所致。Zr为中性元素,对纯Ti的同素异晶转变温度影响较小。根据相变发生的温度范围,采用完全退火工艺进行处理,以获得稳定的、塑性好的或对应一定综合性能的显微组织。近 α 型钛合金在退火中除发生再结晶外,还有 α 相和 β 相在组成、数量及形态上的变化,确定退火工艺比较复杂,一般选择在 $\alpha+\beta/\beta$ 相变点以下120~200 °C进行,冷却方式也采用空冷。该合金的 $\alpha+\beta/\beta$ 相变点为816 °C,故采用的完全退火工艺为(700 °C, 45 min, AC)。

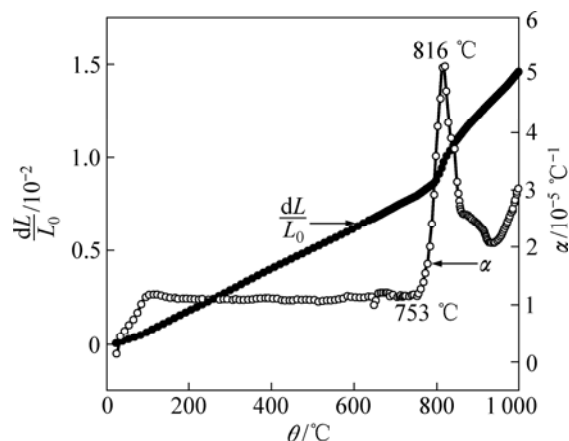


图2 钛合金TZNT线膨胀率和热膨胀系数随温度的变化

Fig.2 Change of linear expansion rate and thermal expansion coefficient of alloy TZNT with temperature

2.2 组织观察

图3所示为经完全退火处理后合金TZNT的XRD谱。根据所有衍射峰的标定结果,可知合金主要由大量密排六方结构的 α 相和少量体心立方结构的 β 相组成。物相组成和各相含量的差异主要与合金的化学成分有关。Nb和Ta是两种 β 相稳定化元素,可以使 β 相区向较低温度移动,有利于 β 相的稳定存在,但这两种元素含量较低,因此合金中 β 相的含量也较低。根据式(3)和(4)可以计算该合金的 β 稳定化元素质量分数 $w_{eq}(\text{Mo})$ 和 α 稳定化元素质量分数 $w_{eq}(\text{Al})$ ^[10],计算结果表明 $w_{eq}(\text{Mo})$ 和 $w_{eq}(\text{Al})$ 分别为1.25%和2.08%。根据文献[11]对钛合金的分类标准,可知TZNT为低铝含量近 α 型合金。

$$w_{eq}(\text{Mo}) = w(\text{Mo}) + 0.67w(\text{V}) + 0.44w(\text{W}) + 0.28w(\text{Nb}) + 0.22w(\text{Ta}) + 2.9w(\text{Fe}) + 1.6w(\text{Cr}) \quad (3)$$

$w_{eq}(Al)=w(Al)+1/3w(Sn)+1/6w(Zr)+w(Si)$ (4)

完全退火处理后的合金组织如图 4 所示。由图 4 可看出,组织呈片层状,主要由大量不同位向的片层状 α 相簇和分布于片层状 α 相间的少量 β 相组成。原始的 β 相晶界已经被破坏,且被多个 α 相簇分割,在每一簇中,各 α 相片是平行的,有相同的结晶学取向。各 α 片由 β 相中间层分开。 α 相和 β 相点阵有以下取向关系: $\{110\}_{\beta-Ti}$ $\{011\}_{\alpha-Ti}$ 、 $\langle 111 \rangle_{\beta-Ti}$ $\langle 100 \rangle_{\alpha-Ti}$, 这个关系决定在同一 β 晶粒中, α 相可能存在 12 个独立取向。

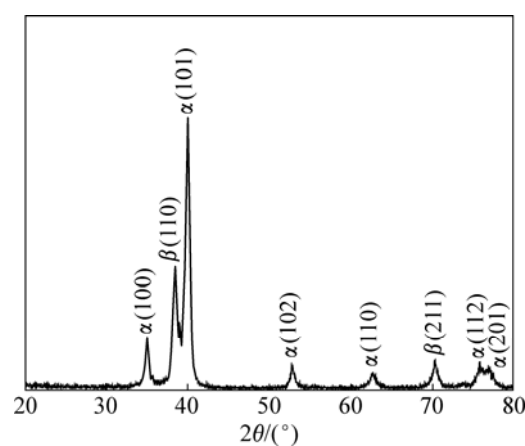


图 3 完全退火(700 , 45 min , AC)后 TZNT 合金的 XRD 谱

Fig.3 XRD pattern of TZNT alloy after full annealing (700 , 45 min, AC)



图 4 完全退火(700 , 45 min , AC)后 TZNT 合金的 OM 像

Fig.4 OM image of TZNT alloy after full annealing (700 , 45 min, AC)

2.3 溶血试验

溶血是红细胞溶解导致血红蛋白释放入血浆的现象。造成溶血的因素除红细胞本身疾病如红细胞膜异常,血红蛋白异常以及机体存在异常抗体,单核吞噬

细胞系统破坏红细胞过多等外,还一些外源性因素,如进入生物体内的某些药物,与生物组织接触的材料以及一些物理因素等。它们可引起红细胞的细胞毒性或对红细胞的机械损伤以及使血浆渗透压改变等。FDI 和 ISO 文件指出,种植体、修复用合金和义齿基托材料等应用于机体与生物组织接触的生物医用材料需要进行此项测试。表 3 所列各组吸光度值和 TZNT 合金的溶血率。FDI 标准要求试验中阳性对照组吸光度值应在 0.8 ± 0.05 范围内,阴性对照组吸光度值应小于 0.03,否则试验不可进行。本试验阳性和阴性对照组的测试值均符合要求,因此试验结果有效。表 3 所列 TZNT 的溶血率为 0.683%,一般认为超过 5%才会发生溶血,所以该合金不会引起急性溶血。

表 3 各组别材料吸光度和 TZNT 合金溶血率
Table 3 Absorbance values of different groups and hemolysis rate of TZNT group

Group	Absorbance value ¹⁾	Hematolysis rate/%
TZNT	0.014 3	
Negative group	0.009 3	0.638
Positive group	0.796 3	

1) Average value.

2.4 细胞毒性试验

细胞毒性是生物医用材料对特定细胞造成毒性作用的能力或趋势,可对细胞造成损伤或使细胞死亡。通过体外细胞毒性试验可检测材料的细胞毒性作用。

细胞毒性试验结果如表 4、5 和 6 所列。由表 4 可见,阳性对照组(纯铅组)的吸光度值明显低于其他组别的。培养 2 d 时,吸光度值为 0.187 75;随着时间延长到 4 d,该值增加到 0.285 75;但当时间进一步延长至 6 d 时,该值减少至 0.235 13,表明随时间的进一步延长,细胞生长受到抑制。由表 5 和 6 可见,该组在不同培养时间的相对增殖率明显低于 100%,培养 2 和 4 d 的毒性等级为 2 级,培养 6 d 后毒性等级进一步增加到 3 级,毒性等级较高,表明阳性对照组具有潜在的毒性,在人体中的长期毒性作用较大。相对而言,阴性对照组和 TZNT、Ti6Al4V 和 Ti6Al7Nb 组在相同培养时间的吸光度值相差不大,并且随时间延长呈增加趋势,提示细胞在这 4 个组别生长良好(见表 5 和 6),以上 3 个钛合金组的细胞相对增殖率均大于或等于 100%,毒性等为 0 级,表明这 3 种合金不具有细胞毒性,符合国家标准中的要求。

图 5 所示为阴性对照组、阳性对照组和 TZNT 合金组 3 个组别细胞培养 4 d 的 OM 像。由图 5 可见,

表 4 各组材料的吸光度值

Table 4 Absorbance values of different groups

Time/d	Negative group	Positive group	TZNT			Ti6Al7Nb			Ti6Al4V		
			R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃
2	0.359 25	0.187 75	0.360 12	0.359 55	0.359 31	0.360 08	0.360 15	0.359 72	0.359 87	0.359 41	0.359 30
4	0.408 88	0.285 75	0.412 63	0.411 35	0.410 78	0.412 21	0.410 28	0.410 21	0.410 09	0.409 86	0.409 21
6	0.478 63	0.235 13	0.480 23	0.480 02	0.478 85	0.480 49	0.480 15	0.479 83	0.480 02	0.478 72	0.478 65

表5 各组别材料的细胞相对增殖率

Table 5 Relative cell proliferation rates of different groups

Time/d	Negative group	Positive group	TZNT			Ti6Al7Nb			Ti6Al4V		
			R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃
2	100	52	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	70	101	101	100	100	101	100	100	100	100
6	100	49	100	100	100	100	100	100	100	100	100

表6 各组别材料的细胞毒性等级

Table 6 Toxicity grades of different groups

Time/d	Negative group	Positive group	TZNT			Ti6Al7Nb			Ti6Al4V		
			R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃
2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

阳性对照组中细胞的数量比 TZNT 合金组、阴性对照组的细胞数量明显减少，大量细胞变圆缩小、核固缩并聚集成团，在胞浆内可见大量中毒颗粒，处于中毒状态，少量细胞已死亡，其余细胞形态正常。另外两组的细胞形态正常，呈密集规则排列，细胞多为长梭形，可见少量的分裂状态细胞，未见含有中毒颗粒的细胞浆。相比而言，合金 TZNT 组的细胞数量要多于阴性对照组。细胞形态的分析结果和毒性等级测量结果相吻合。

2.5 皮下埋植试验

动物体内的植入试验是研究生物材料与机体反应的主要手段，其中最常用的方法是将样品埋植在皮下、肌肉、骨骼系统内一段时间后，取周围组织做成切片进行组织学观察。本试验经 24 和 48 h 后，各组动物饮食和活动良好，创口轻度充血、无肿胀、渗血、化脓和无材料被排出现象。试验过程中无动物死亡。取样时肉眼观察发现，各组种植体无移位，周围有纤维包膜包绕，贴近材料的组织未见腐蚀产物沉积和结节等恶变现象。

表 7 所列为不同材料植入 4 周和 8 周后的炎细胞密度和纤维膜厚度。由表 7 可知，TZNT 和 TA2 组在 4 周和 8 周的炎细胞密度和纤维膜厚度相近，8 周的炎

表 7 不同材料植入 4 周和 8 周后的炎细胞密度和纤维膜厚度

Table 7 Densities of inflammation cells and thickness of fibrous membranes of different groups implanted different materials for 4 and 8 weeks

Group	Density		Thickness of fibrous	
	4 week	8 week	4 week	8 week
TZNT	9	7	11.89	5.32
Ti6Al7Nb	10	9	12.31	5.66
Ti6Al4V	10	9	12.53	5.71
TA2	9	6	11.71	5.02

1) Inflammation cells number every network.

细胞密度较 4 周组的炎细胞密度有所减少，纤维膜的厚度也显著减低，且均低于相同时间的 Ti6Al4V 和 Ti6Al7Nb 组的炎细胞密度和纤维膜厚度，这表明 TZNT 和 TA2 比 Ti6Al4V 和 Ti6Al7Nb 引起的组织反应要轻，具有更优异的组织相容性。

TZNT 合金植入 4 周和 8 周后的组织形貌如图 6 所示。由图 6(a)和(b)可看出，组织结构良好，未见坏死区，包绕材料的纤维包膜较疏松且与组织间的界限不清，包膜组织主要由大量的成纤维细胞组成，可见少量炎细胞，主要为中性粒细胞、淋巴细胞、单核细

胞和浆细胞,炎症反应轻。由图 6(c)和(d)可看出,包膜较 8 周组变得更薄且更致密,膜内细胞成分进一步单一化,形成以排列有序的成纤维细胞为主体的结缔组织,包膜与构件不易分离,呈现材料与膜组织的粘结现象。炎细胞较 4 周组更少见,主要为单核细胞和淋巴细胞。综合评价该材料植入 4 周和 8 周引起组织反应程度均为轻度。

影响组织与材料反应的因素尚不清楚,但可能包括材料的物理和化学性质、材料的表面结构、手术创伤和材料被污染等。本试验过程中已注意减少组织创伤,也未发现术后伤口感染,所以不同的组织反应主要与材料本身的性质有关。材料性质不同,材料在使用环境中的耐蚀性能就存在差异,进而影响到其生物相容性。因此,材料的生物相容性和其耐蚀性有着密切的关系,这是因为材料的使用环境为人体体液,约含 1%氯化钠(质量分数)及少量其他盐类和有机物,温

度保持在 37 左右。这种环境极易对金属材料产生腐蚀,析出的金属离子和腐蚀产物与临近的组织接触,甚至渗入正常的组织或整个生物系统,对正常组织产生影响和刺激,引起包括组织非正常生长、畸变或炎症、感染等不良生物反应,甚至诱发癌变。STERNEMANN 和 PERREN^[12]提出金属和组织相互反应的判据:对于一种金属,如果生成腐蚀产物的 $pK(-\lg k)$ (k 为腐蚀产物的溶解度)值大于 14,那么该产物可以稳定存在,且避免金属络合物的生成,进而阻止金属和组织相互反应;反之,腐蚀产物就发生溶解,以离子形式进入人体,由于植入材料和组织或体液的充分接触,使得离子可以通过体液被传送到不同器官,这些离子在某一器官就有可能发生反应形成毒性的络合物,当离子的积蓄量超过器官的忍受极限时,一些不希望的细胞毒性反应就可能出现。表 8 所列钛合金组成元素基本腐蚀产物的化学数据^[13-15]。由表 8 可

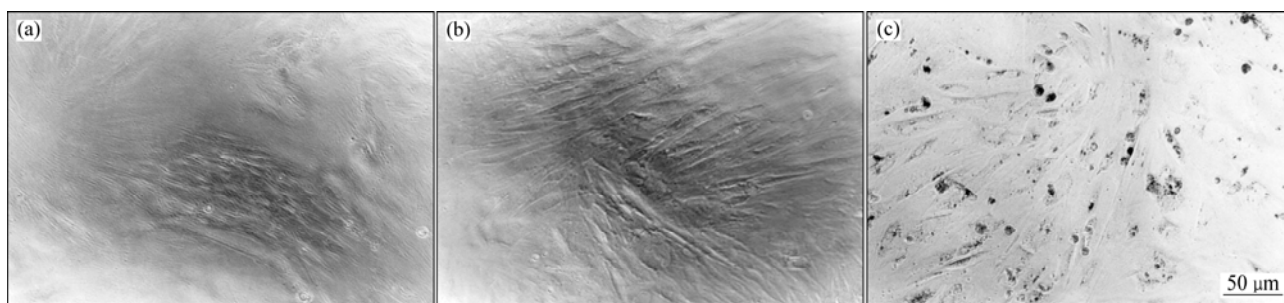


图 5 培养 4 d 时不同组别细胞的 OM 像

Fig.5 OM images of cells in different groups cultivated for 4 d at $R_1=1.5$: (a) Negative group; (b) TZNT alloy group; (c) Positive group

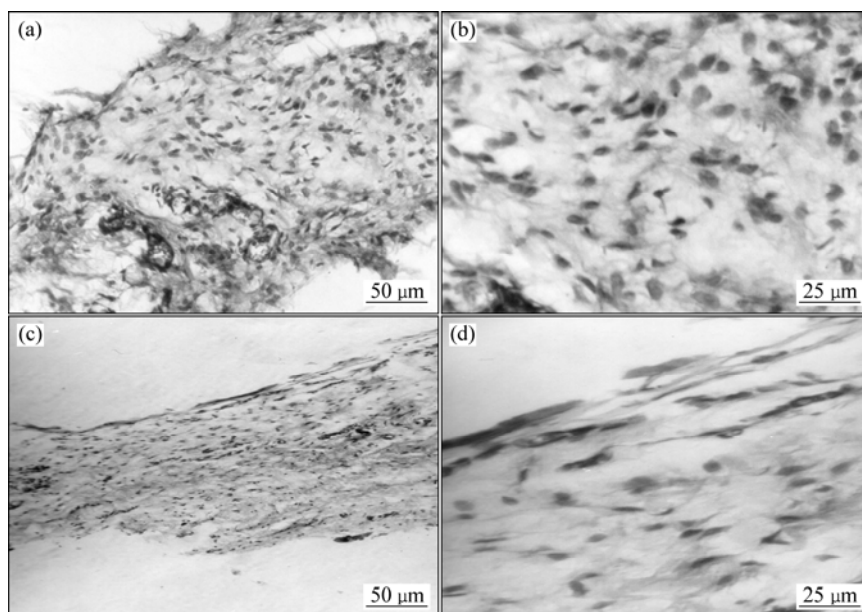


图 6 TZNT 合金植入 4 周和 8 周的组织形貌

Fig.6 Morphologies of tissues of group implanted TZNT for 4 and 8 weeks: (a), (b) 4 weeks; (c), (d) 8 weeks

表 8 合金化元素基本腐蚀产物的化学性质^[13-15]

Table 8 Chemical properties of some principle corrosion products associated with corresponding alloying elements^[13-15]

Element	Principle corrosion product	Relative dielectric constant	Formation enthalpy, $\Delta H_{298}/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	p_k	Biocompatibility
V	V_2O_5	-	-2 818	10	Toxic
Al	Al_2O_3	5-10	-1 680	15	Potentially necrotic
Ti	TiO_2	110	-945	18	Inert
Zr	ZrO_2	10-18	-1 088	17	Inert
Nb	Nb_2O_5	280	-794	20	Inert
Ta	Ta_2O_5	12	-2054	20	Inert

看出，根据金属和组织反应的判据可知，元素 V 的基本腐蚀产物 V_2O_5 的 p_k 值小于 14，不稳定。这说明该元素的氧化物较不稳定，易发生水解作用，离子容易进入体液，且该元素本身还具有毒性，那么很容易对组织造成伤害。即使对于本身不具有毒性的元素，如果在人体中的含量超过人体所能承受的极限，也能引起正常生理过程的紊乱。元素 Al 的基本腐蚀产物 Al_2O_3 的 p_k 值大于 14，表明该产物可以稳定存在，但该元素的存在引起骨疽的潜在危险。而 Ti、Zr、Nb 和 Ta 这 4 种元素基本腐蚀产物的 p_k 值都大于 14，这说明这些腐蚀产物比较稳定，不易发生水解，在人体中具有很好的耐蚀性，且这 4 种元素本身呈惰性，对组织不产生毒性。基于以上分析，不难得出如下结论，即以 Zr、Nb 和 Ta 作为强化元素的新型医用钛合金 TZNT 应比 Ti6Al7Nb 和 Ti6Al4V 具有更好的生物相容性，这和前面的试验结果是相吻合的。

3 结论

- 1) TZNT 的溶血率为 0.683%，远小于 5%，不会引起急性溶血。
- 2) TZNT、Ti6Al7Nb 和 Ti6Al4V 3 个时间组(2、4 和 6 d)的相对增殖率不小于 100，毒性等级为 0 级，对细胞没有毒性；TZNT 合金 4 d 组的细胞多为长梭形，可见少量分裂状态的圆形细胞，未见含有大量中毒颗粒的细胞浆。
- 3) TZNT 植入 4 周和 8 周引起的组织反应均为轻度。4 周组的中性粒细胞很少，只有少量的淋巴细胞和单核细胞，未见多核巨细胞和异物巨细胞，包绕植入体的纤维膜厚度为 11.89 μm ，纤维膜较疏松与组织间的界限不清楚；植入体内 8 周组的炎细胞密度进一

步减少，纤维膜较致密，且变薄。TZNT 和 TA2 植入后的纤维膜厚度和炎细胞密度均小于 Ti6Al7Nb 和 Ti6Al4V 的。

4) TZNT 比 Ti6Al7Nb 和 Ti6Al4V 具有更好的生物相容性，有望成为一种理想的硬组织修复替代材料。

REFERENCES

[1] GORDINA D M, GLORianta T, NEMTOIB G H, CHELARIUC R, AELANEID N, GUILLOUA A, ARSELA D. Synthesis, structure and electrochemical behavior of a beta Ti-12Mo-5Ta alloy as new biomaterial[J]. Materials Letters, 2005, 59(23): 2959-2964.

[2] GEETHA M, SINGH A K, MURALEEDHARAN K, GOGIA A K, ASOKAMANI R. Effect of thermomechanical processing on microstructure of a Ti-13Nb-13Zr alloy[J]. Journal of Alloys and Compounds, 2001, 329(1/2): 264-271.

[3] GEETHA M, KAMACHI MUDALI U, GOGIA A K, ASOKAMANI R, RAJ B. Influence of microstructure and alloying elements on corrosion behavior of Ti-13Nb-13Zr alloy[J]. Corrosion Science, 2004, 46(4): 877-892.

[4] NILSON T C, OLIVEIRA G A, CARAMB R, ANTONIO C G. Development of Ti-Mo alloys for biomedical applications: Microstructure and electrochemical characterization[J]. Mater Sci Eng A, 2007, 452/453(15): 727-731.

[5] STEINEMANN S G, MAUSLI P A, SZMUKLERMONCLER S, SEMLITSCH M, POHLER O, HINTERMANN H E, PERREN S M. Beta-titanium alloy for surgical implants[C]//FROEA F H, CAPLAN I. Proceedings of Titanium'92 Science and Technology. Warrendale: TMS. 1993: 2689-2694.

[6] 李 军，周 廉，李佐臣，陈杜娟. 新型医用钛合金 Ti-12.5Zr-2.5Nb-2.5Ta 的研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2003, 32(5): 398-400.

- LI Jun, ZHOU Lian, LI Zuo-chen, CHEN Du-juan. Study of a new titanium alloy for surgical implant application[J]. Rare Metal Materials and Engineering, 2003, 32(5): 398–400.
- [7] 王金友, 葛志明, 周彦邦. 航空 α 用钛合金[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 60.
- WANG Jin-you, GE Zhi-ming, ZHOU Yan-bang. α titanium alloys for aviation applications[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1985: 60.
- [8] БОРИСОВА Е А. 钛合金金相学[M]. 陈石卿, 译. 北京: 国防工业出版社, 1986: 4–7.
- БОРИСОВА Е А. Titanium alloy metallography[M]. CHEN Shi-qing, transl. Beijing: National Defence and Industry Press, 1986: 4–7.
- [9] STEINEMANN S G, PERREN S M. Titanium alloys as metallic biomaterials[C]//LÜTJERING G, ZWICKER V, BUNK W. Proceeding of the 5th International Conference on Titanium. Munich: FRG, 1985: 1327–1334.
- [10] 梁英教. 物理化学[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1995: 369–373.
- LIANG Ying-jiao. Physical chemistry[M]. Beijing: Metallurgical Industry Press, 1995: 369–373.
- [11] HELSEN J A, BREME J. Metals as biomaterials[M]. New York: Wiley, 1998: 30–40.
- [12] JONSSON A K, NIKLASSON G A, VESZELEI M. Electrical properties of ZrO_2 thin films[J]. Thin Solid Films, 2002, 402(11): 242–247.

(编辑 李艳红)