

可降解 Fe@Fe-Zn 骨组织工程支架体外 生物相容性研究

罗彩云¹, 王伟强^{1*}, 史淑艳¹, 杨帅康¹, 许雅南¹, 朱明², 刘慧颖²

(1.大连理工大学, 辽宁 大连 116024; 2.大连医科大学, 辽宁 大连 116044)

摘要: **目的** 以多孔铁为基体, 利用脉冲电沉积制备可降解多孔 Fe@Fe-Zn 复合材料骨组织工程支架, 以期提高材料的降解速率和抗菌性能。**方法** 通过调节脉冲频率, 得到不同 Zn 含量的 Fe-Zn 合金层; 使用电子探针、X 射线衍射仪、扫描电镜来研究材料的元素含量、相组成和显微结构; 通过压缩测试考察支架的力学性能; 用体外浸泡来考察材料的降解性能; 用浸提液培养分析材料对小鼠胚胎成骨细胞的黏附铺展和细胞活性的影响; 用浸提液和直接培养来探究材料的抗大肠杆菌性能。**结果** 随脉冲频率增加, 合金中 Zn 含量减小; 不同合金均为单一的 $\alpha(\text{Fe})$ 相; 电沉积组织致密, 杂质含量低; Zn 含量为 7.5% (均以质量分数计) 时, 支架抗压屈服强度较多孔铁提升 6%; 复合材料的降解速率为 0.44~0.48 mm/a, 较多孔铁有显著改善; 复合材料浸提液在稀释到 25% (体积分数) 时, 表现出良好的细胞相容性, 且随 Zn 含量增加, 细胞活性增强; Zn 含量为 7.5% 时, 材料的抗菌性能最好。**结论** 通过电沉积制备的 Fe@Fe-Zn 支架的腐蚀速率相较于多孔铁有明显提高。随合金层中 Zn 含量的增加, 其细胞活性增强, 抗菌性能提高。Fe@Fe-Zn 有望发展为可广泛应用的可降解骨组织工程支架材料。

关键词: 骨组织工程支架; 多孔铁; Fe-Zn 合金; 降解性能; 生物相容性; 抗菌性能

中图分类号: TB34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-3660(2024)08-0163-10

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2024.08.015

In Vitro Biocompatibility of Biodegradable Fe@Fe-Zn Bone Tissue Engineering Scaffold

LUO Caiyun¹, WANG Weiqiang^{1*}, SHI Shuyan¹, YANG Shuaikang¹,
XU Yanan¹, ZHU Ming², LIU Huiying²

(1. Dalian University of Technology, Liaoning Dalian 116024, China;

2. Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT: Iron-based alloys are widely studied as biodegradable materials for bone grafts or bone tissue engineering scaffolds, but their slow degradation rate may affect the repair of bone defects, and the material itself may induce local inflammation. To increase the degradation rate of porous pure iron used for bone tissue engineering scaffolds and decrease its susceptibility to inflammation, the alloying method and the electrochemical deposition technique were used to modify the

收稿日期: 2023-04-02; 修订日期: 2023-07-14

Received: 2023-04-02; Revised: 2023-07-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金 (DUT22YG118, LD202219)

Fund: The Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (DUT22YG118, LD202219)

引文格式: 罗彩云, 王伟强, 史淑艳, 等. 可降解 Fe@Fe-Zn 骨组织工程支架体外生物相容性研究[J]. 表面技术, 2024, 53(8): 163-172.

LUO Caiyun, WANG Weiqiang, SHI Shuyan, et al. In Vitro Biocompatibility of Biodegradable Fe@Fe-Zn Bone Tissue Engineering Scaffold[J]. Surface Technology, 2024, 53(8): 163-172.

*通信作者 (Corresponding author)

porous pure iron. The zinc element with good biocompatibility and antibacterial property was adopted as an alloying element. A layer of Fe-Zn alloys was electrodeposited on the surface of the porous pure iron to prepare degradable porous Fe@Fe-Zn composite scaffolds. During electrodeposition, a porous pure iron scaffold with a pore density of 50 PPI and a working size of 60 mm × 25 mm × 3 mm was used as the cathode and a pure iron plate with a working area of 100 mm × 47 mm was used as the anode. The working mode of electrodeposition was bipolar pulse electrodeposition. The pulse peak current density was set as 10 A/dm² with a duty ratio of 10%, and the ratio of pulse changing direction was 20 : 5. The pulse frequency of the experimental group was set as 50, 100, and 1 000 Hz, respectively, to prepare different Fe@Fe-Zn composite scaffolds, of which the zinc contents were varied. The element content, phase composition and microstructure of the composite materials were analyzed by electron probe microanalyzer (EPMA), X-ray diffractometer (XRD) and scanning electron microscope (SEM). The mechanical properties of Fe@Fe-Zn were investigated by compression test. The degradation performance of the modified materials was investigated by in vitro immersion test. The effects of different materials on the adhesion, spread and cell activity of mouse embryonic osteoblasts (MC3T3-E1) were analyzed by means of extraction culture. Finally, the anti-*E.coli* properties of different materials were investigated by the extract method and the direct culture method, respectively. The results showed that the Zn content of the deposited alloy layer decreased with the increase of frequency. The Fe-Zn alloys with different Zn contents had a single α (Fe) phase. The prepared Fe-Zn alloy layer was dense and well combined with the porous iron matrix. When the content of Zn in the alloy layer was 7.5% (all in terms of mass fraction), the compressive yield strength of Fe@Fe-Zn was 6% higher than that of porous iron. The results of in vitro immersion test showed that the degradation rate of the Fe@Fe-Zn group was significantly improved than that of the controlled porous iron group (the corrosion rate of Fe@Fe-Zn composites was in the range of 0.44 ~ 0.48 mm/a, and that of porous Fe was 0.33 mm/a). The results of CCK-8 test showed that the cell number increased gradually with the extension of culture time, the cell viability of the Fe@Fe-Zn group was better than that of the porous iron group, and the cell viability of the Fe@Fe-Zn cell was the best when the zinc content of alloy layer was 7.5%. Fluorescence staining showed that the cell spreading ability of the Fe@Fe-Zn group was better than that of the controlled porous iron group. Regarding antibacterial activity, all the antibacterial rates of the Fe@Fe-Zn group were greater than 50%, and the best one obtained from the Fe@Fe-Zn sample with 7.5% Zn content was (67.0±1.1)%. In conclusion, compared with the porous pure iron, the comprehensive properties of the porous Fe@Fe-Zn composite prepared by electrodeposition are significantly improved. The corrosion rates of Fe@Fe-Zn composite material scaffolds prepared by electrodeposition are greater than pure iron scaffolds. With the increase of Zn content in the deposited alloy layer, the cell activity of the material is more obvious, and the antibacterial property is gradually improved. The Fe@Fe-Zn composite has great potential as a biodegradable material for bone tissue engineering scaffolds.

KEY WORDS: bone tissue engineering scaffold; porous iron; Fe-Zn alloy; degradation property; biocompatibility; antibacterial activity

目前,由创伤、感染或肿瘤引起的骨质缺损是骨科临床上常见的疾病之一^[1]。少量的骨质缺损可通过自身骨的再生能力修复,而当骨缺损长度达到骨干直径的 1.5 倍时,会超出机体的愈合能力^[2],则需要通过骨移植进行修复。骨移植材料主要分为 2 类,一种是自体骨移植材料,优势是免疫反应低,但是骨量有限;另一种是骨移植替代材料,其可以解决自体骨移植材料不足的问题,但是存在免疫排斥反应和生物活性较低等缺点^[3]。

骨组织工程支架特有的多孔结构及粗糙的内外表面均有利于成骨细胞的黏附、增殖和分化,能够促进植入体同骨之间形成生物固定^[4-6],是应用最广泛的骨移植替代材料。而降解骨组织工程支架不仅可以避免植入体二次手术取出对人体正常生活的影响,还可以消除永久植入材料所引发的物理刺激和慢性

局部炎症反应^[7],理想的可降解骨组织工程支架对材料的综合性能也提出了更高的要求。

铁基材料具有优异的力学性能、人体内含量较高以及具有一定的化学活性等优势,成为了可降解骨移植替代材料领域的研究热点^[8]。已有大量研究证明了可降解铁基材料具有良好的生物相容性,但是其腐蚀速率较慢以及抗菌性能较差等问题也是阻碍其发展的主要因素^[9-11]。对 Fe 基体进行合金化是提高其腐蚀速率的常用措施,用 Zn、Mn、Co、Al、W、Sn、B、C 和 S 等元素对 Fe 进行合金化均被证明可以提高材料的腐蚀速率^[12-16]。其中, Xu 等^[12-13]的研究表明,通过电沉积制备的 Fe-Zn 二元合金不仅有效提高了铁基体的降解速率,还呈现出良好的力学性能和体外生物相容性。另有研究表明, Zn 还具有一定的抗菌能力^[17],因此用 Zn 对 Fe 进行合金化还有望得到具

有良好抗菌活性的材料。

正如 Xu 等^[12]所述, 由于 Fe 和 Zn 熔沸点差别较大, 很难通过常规冶炼方式制备, 电沉积无疑是制备多孔 Fe-Zn 二元合金的最优方式。为了获得多孔的骨组织工程支架材料, 电沉积阴极基体的材料选择至关重要。选用有一定孔隙密度的聚氨酯泡沫作为阴极基体, 原则上可以直接获得多孔 Fe-Zn 合金, 但沉积后的高温烧结脱模过程会导致合金中 Zn 元素的大量损失, 难以获得预期的合金材料^[17-18]。因此, 本文拟以多孔纯铁作为阴极基体, 在其表面均匀沉积 Fe-Zn 合金, 制备多孔的 Fe@Fe-Zn 骨组织工程支架材料, 以期维持铁基材料良好的力学性能和生物相容性的同时, 进一步提高其降解速率和抗炎性能。在研究中通过改变电参数调控合金层中的 Zn 含量, 并分析不同材料的力学性能、降解性能、细胞相容性和抗菌性能, 以建立镀层中 Zn 含量与材料体外生物相容性之间的联系, 评估 Fe@Fe-Zn 复合材料作为可降解骨组织工程支架材料的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 可降解 Fe@Fe-Zn 复合材料的制备

使用脉冲电沉积制备多孔 Fe@Fe-Zn 复合材料, 分别以多孔纯铁 (购自昆山隆圣宝电子材料有限公司, 规格为 50 PPI, 工作尺寸为 60 mm×25 mm×3 mm) 和纯铁板 (纯度 99.9%, 工作面积为 100 mm×47 mm) 作为电沉积的阴极和阳极。依据霍晓敏^[18]所述方法计算泡沫铁阴极的实际工作面积为 0.625 dm²。电解液组成可参考已有文献结果^[12-13]。脉冲电沉积时固定峰值电流密度为 10 A/dm², 占空比为 10%, 正负向脉冲个数分别为 20 和 5 个。为优化镀层组织结构, 选用中高频脉冲^[19], 并在 Xu 等^[12]的研究基础上, 调节脉冲频率为 50、100、1 000 Hz, 以获得不同成分的 Fe-Zn 合金镀层。最后, 将所获得的复合材料在 450 °C 下热处理 30 min。本文选用同样电参数下沉积的多孔纯铁作为对照组。

1.2 材料成分及组织结构表征

用场发射电子探针 (EPMA, JXA-8530F PLUS, Jeol, Japan) 分析 Fe-Zn 合金沉积层元素组成。用 X 射线衍射仪 (XRD, Empyrean, PANalytical B.V., Netherlands) 探究合金层的相结构 (为方便测试, 采用同样工艺下制备的片状样品)。用高分辨场发射扫描电子显微镜 (SEM, IT800-SHL, Jeol, Japan) 及其附件能量色散 X 射线光谱仪 (EDS, Ultim Max, Oxford Instruments, UK) 考察材料形貌和元素分布。

1.3 材料力学性能测试

根据 GB/T 31930—2015^[20], 使用电火花线切割

将样品加工为直径 20 mm、高 3 mm 的柱体。采用 UTM4204X 型试验机对多孔材料进行压缩测试, 压缩速率为 0.5 mm/min。在应力-应变曲线上, 取应变量为 0.2% 平行于弹性区的截线与压缩曲线的交点定义为抗压屈服强度, 以弹性区的斜率计算材料弹性模量。

1.4 体外降解行为测试

本文选取 Hank's 溶液作为模拟体液进行体外降解实验。根据 ASTM G31-12a (2012)^[21], Hank's 溶液体积与样品质量之比固定在 100 mL/g。用 pH 计 (CH-9100, Vantone, Switzerland) 记录浸泡过程中溶液的 pH 值。根据 ASTM G1-03 (2017)^[22]标准, 使用 100 g/L NH₄Cl 溶液在 70 °C 下超声清洗样品表面的降解产物。根据 ASTM G31-12a^[21], 由式 (1) 计算多孔材料的体外降解速率 (CR)。

$$R_{CR} = 87.6 \frac{(W_0 - W_t)}{ATD} \quad (1)$$

式中: A 为样品的表面积, cm²; T 为浸泡时间, h; D 为样品密度, mg/cm³; W₀ 为浸泡前质量, mg; W_t 为浸泡后去除降解产物的质量, mg。

采用 X 射线光电子能谱仪 (XPS, ESCALAB XI+, Thermo, England) 分析多孔材料腐蚀产物的化学组成。在实验过程中, 除 pH 值测试组不更换 Hank's 溶液外, 其余实验组每 7 d 更换一次 Hank's 溶液。

1.5 体外生物相容性评价

1.5.1 细胞培养和浸提液的制备

细胞实验选用小鼠胚胎成骨细胞 (MC3T3-E1, 中国科学院细胞库), 培养基为 α-MEM 完全培养基 (含 10% (体积分数) 胎牛血清)。培养箱的环境设置为 37 °C、5% (体积分数) CO₂, 待细胞生长至孔板的 80% 时, 用 0.25% (质量分数) 胰蛋白酶消化细胞, 按 1:2 比例进行传代, 并在第 3~4 代时进行细胞接种。

制备合金浸提液时, 由于 Fe-Zn 合金沉积层化学活性较高, 本文选择 75% (均以体积分数计) 酒精和紫外灭菌结合的方式进行灭菌处理, 具体操作为: 将样品置于 75% 酒精中超声清洗 6 次, 每次 10~20 min; 随后放入无菌操作台中紫外照射 24 h (正反面各 12 h)。将灭菌处理后的样品置于 12 孔板中, 根据 ISO 10993-12 (2009)^[23]标准, 样品尺寸为 10 mm×10 mm×3 mm 时, 每孔加入 3 mL 培养基。在 37 °C 下浸泡 72 h 后, 将制备得到的浸提液转移至试管中, 并稀释至指定倍数 (25% 和 50% (均以体积分数计)) 的溶液, 在 4 °C 下密封保存。

1.5.2 细胞活性

将细胞以每毫升 2×10⁴ 个的密度接种于 96 孔板中, 待细胞完全贴壁后, 将培养基更换成体积分数为 25%、50%、100% 的浸提液继续培养 12、24 和 72 h。在相应的时间点下, 每孔加入 100 μL CCK-8 (CCK-8,

索莱宝科技有限公司, 北京) 后孵育 3.5 h, 用酶标仪 (Synergy H1, Thermo Scientific, USA) 检测波长在 450 nm 处的吸光度 (Optical Density, OD)。

1.5.3 细胞黏附

将细胞爬片置于 24 孔板内, 以每毫升 2×10^4 个的密度将细胞接种于细胞爬片上。待细胞完全贴壁后, 将培养液更换为 25% 浓度浸提液培养 12 和 24 h, 到指定时间后用 4% (均以质量分数计) 多聚甲醛对细胞进行固定。随后, 使用 DAPI (DAPI, 碧云天生物技术有限公司, 上海) 和 FITC-鬼笔环肽 (FITC, 碧云天生物技术有限公司, 上海) 分别对细胞质和细胞核进行染色, 用荧光显微镜观察染色后的细胞形态。

1.6 抗菌性能测试

选用细菌浓度为每毫升 1×10^5 CFU (CFU 为菌落形成单位) 的标准阴性大肠杆菌 (*E.coli*, ATCC 25922, China) 进行抗菌性能评价。在浸提液培养时, 取 10 μ L 菌液于 48 孔板中, 每孔加入 500 μ L LB 液体培养基 (Luna-Bertani, China) 和 500 μ L 25% 浓度浸提液, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h 后, 使用酶标仪检测波长在 600 nm 处的吸光度。在直接培养时, 将样品放置于 24 孔板中 (样品尺寸为 10 mm \times 10 mm \times 3 mm), 每孔接种 200 μ L 菌液和 1 800 μ L LB 液体培养基。在 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后, 使用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 在梯度浓度乙醇中脱水, 用 SEM 观察喷金后样品上细菌细胞的黏附形态。

1.7 统计分析

本研究中的所有数据均以至少 3 个独立实验的平均标准偏差 (SD) 表示。对所有定量实验结果采用单因素方差分析, 若 $P < 0.05$ 时, 表明差异具有统计学显著性 (标记为*), 若 $P < 0.01$, 则表示差异极显著 (标记为**)。

2 结果与讨论

2.1 Fe@Fe-Zn 的成分及物相分析

不同脉冲频率下 Fe-Zn 合金沉积层中的成分见表 1。合金层中 Zn 含量分别为 7.5% (50 Hz)、4.6% (100 Hz) 和 2.4% (1 000 Hz), 即随着脉冲频率的提高, 沉积层中 Zn 含量逐渐降低。在电沉积过程中, 溶液中的 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 在电场作用下共同吸附在阴极表面, 由于阳离子在阴极表面的还原速率远大于其在溶液中的扩散速率, 在阴极附近会产生浓差极化。由于 Fe^{2+} 的还原电位更高^[24], 阴极附近的 Fe^{2+} 优先被还原, 浓差极化对其影响也较大。研究表明, 通过提高脉冲频率可以有效抑制电沉积过程中阴极附近的浓差极化现象^[25-26], 同时由于溶液中 Fe^{2+} 浓度更高, 更有利于阴极附近 Fe^{2+} 的还原, 使得沉积层中 Zn 的相对含量降低。这与 Xu 等^[12]的研究结论一致。根据合

金层中 Zn 含量的不同, 将制备的合金层分别命名为 Fe-2.4Zn (1 000 Hz)、Fe-4.6Zn (100 Hz)、Fe-7.5Zn (50 Hz), 对照组多孔纯铁命名为 Fe。

表 1 脉冲频率对 Fe-Zn 合金层成分的影响
Tab.1 Effect of pulse frequency on composition of Fe-Zn alloy layers

| Samples | wt. % | | |
|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | Fe | Zn | O |
| $f=50$ Hz | 91.9 \pm 0.1 | 7.5 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.1 |
| $f=100$ Hz | 95.2 \pm 0.1 | 4.6 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 |
| $f=1\ 000$ Hz | 97.1 \pm 0.1 | 2.4 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 |

图 1 为不同频率下沉积 Fe-Zn 合金的 XRD 谱图。由 Fe-Zn 平衡相图^[27]可知, 室温下 Zn 在 Fe 中的溶解度小于 2%, 但不同 Zn 含量的 Fe-Zn 合金镀层的 XRD 结果均为单一的 $\alpha(\text{Fe})$ 相 (PDF#06-0696), 且具有明显的 (211) 晶面的择优取向。以上结果说明, 电沉积得到的 Fe-Zn 合金层形成了过饱和固溶体。由于 Zn 的原子半径大于 Fe 的原子半径, 随着合金层中 Zn 含量的增加, 晶格畸变程度增加, 衍射峰逐渐向左偏移。

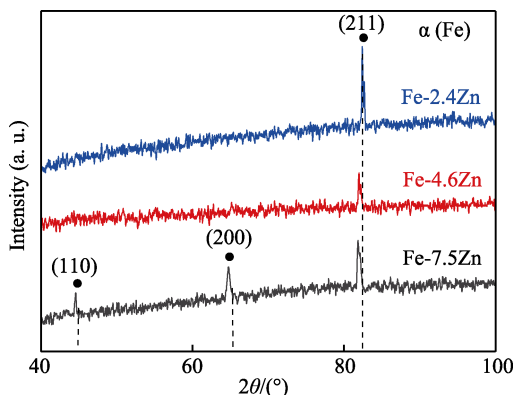


图 1 不同频率下沉积铁锌合金的 XRD 图谱
Fig.1 XRD patterns of Fe-Zn alloys deposited at different frequencies

2.2 Fe@Fe-Zn 的显微组织结构分析

图 2 为电沉积前后材料的结构形貌图。在不同的脉冲频率下, 电沉积改性后的材料结构变化不大, 均呈松质骨样的三维多孔结构, 且具有相互联通的微孔。使用 Nano Measurer 1.2 软件测量材料的孔径: 多孔 Fe 为 $(383.0 \pm 62.0) \mu\text{m}$, Fe-2.4Zn 为 $(344.0 \pm 53.0) \mu\text{m}$, Fe-4.6Zn 为 $(345.0 \pm 62.0) \mu\text{m}$, Fe-7.5Zn 为 $(347.0 \pm 57.0) \mu\text{m}$ 。Xu 等^[12]的研究表明, 改变脉冲频率不会影响沉积效率, 因此不同脉冲频率下所制备的材料结构参数相似。研究表明, 矿化骨长入的最佳孔径范围为 100~500 μm ^[28], 本研究所制备的 Fe@Fe-Zn 满足矿化骨长入孔径的范围。

不同脉冲频率下所制备的材料形貌图显示, 多孔

铁骨架表面覆盖了一层均匀且致密的 Fe-Zn 合金层, 且随着脉冲频率的降低, 合金层表面的晶粒细化。这是由于脉冲频率的降低, 使得合金层中的锌含量增加, 合金层的过饱和固溶程度增加, 加剧了基体的晶格畸变, 也提高了位错密度。较高的位错密度提供了电沉积的形核位点, 提高了形核率, 也阻碍了晶粒长大, 因此合金晶粒逐渐细化。

为进一步验证 Fe@Fe-Zn 的核壳复合材料结构, 对多孔材料截面进行 SEM 和 EDS 分析。由合金截面形貌可知 (图 3a~c), 不同脉冲频率下所制备的 Fe@Fe-Zn 复合材料骨架均为中空结构, 多孔铁壁厚为 $(30.0\pm2.0)\mu\text{m}$, 合金层厚度均为 $(30.0\pm5.0)\mu\text{m}$ 。

Fe-Zn 合金层中无明显的孔洞裂纹, 说明电沉积所制备的合金层质量较好。图 3d~f 为合金层中 Zn 含量为 7.5% 的 Fe@Fe-Zn 截面的元素分布图, 合金层中 Fe 和 Zn 元素分布均匀, O 元素含量较少, 与上述成分测试结果相符, 均验证了镀层中杂质含量较低。

2.3 Fe@Fe-Zn 的力学性能分析

多孔材料压缩的应力-应变曲线如图 4a 所示。多孔铁和 Fe@Fe-Zn 均表现出典型的多孔材料压缩特征, 即弹性阶段、应力平台阶段和应力快速上升阶段^[29]。图 4b 中的屈服强度结果表明 (灰色阴影表示人体松质骨屈服强度值范围 0.9~8.8 MPa), 在相同的骨架直

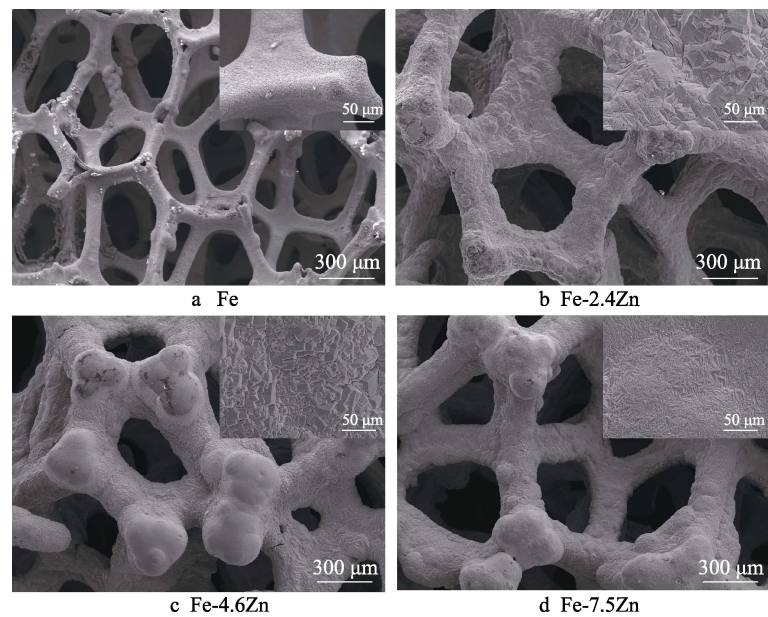


图 2 多孔材料的 SEM 图
Fig.2 SEM images of porous materials

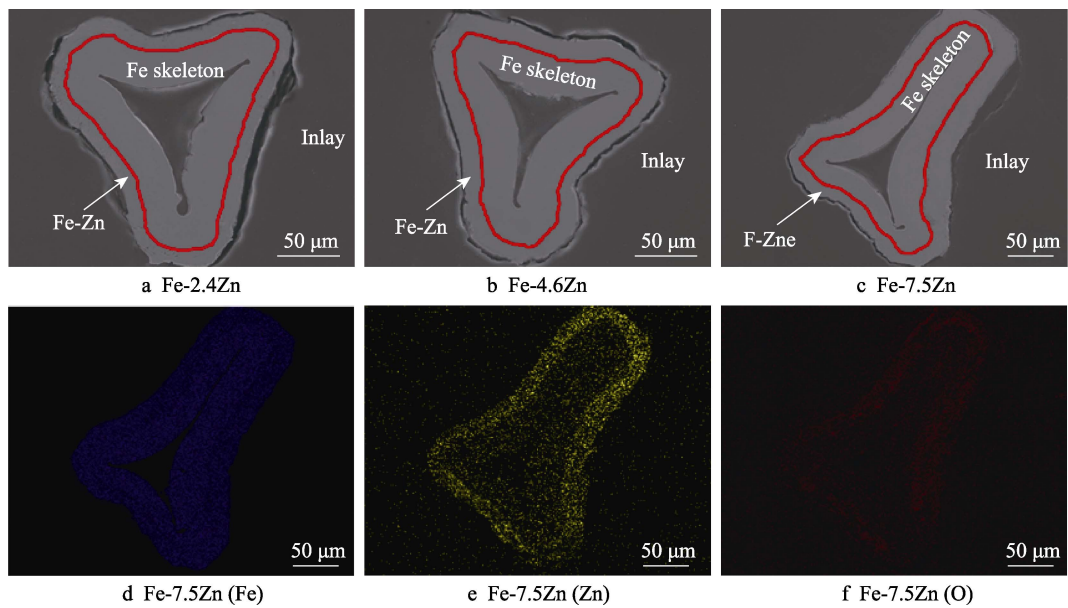


图 3 多孔材料截面 SEM 图和 EDS 图
Fig.3 Cross-sectional SEM and EDS images of porous materials

径和中空骨架总壁厚的前提下, Fe@Fe-Zn 的屈服强度随镀层中 Zn 含量的增加而增加, 且 Zn 含量为 7.5% 的 Fe@Fe-Zn 力学性能优于多孔铁, 其抗压屈服强度为 (9.9 ± 0.4) MPa, 较多孔铁提升 6%。这是由于 Fe@Fe-Zn 中的 Zn 是以固溶体的形式存在于 Fe 基体中, 随着合金层中 Zn 含量的增加, 晶格畸变严重, 极大地增加了位错运动阻力, 使合金层中的固溶强化效果增加, 材料整体的屈服强度也逐渐增加。图 4c 为在铁骨架上以相同电参数下沉积的对照组多孔纯铁截面图, 电沉积纯铁壁厚为 (34.0 ± 2.0) μm , 较 Fe-Zn 合金层提升了 13.3%。这表明纯 Fe 的沉积效率优于

Fe-Zn 共沉积, 使得电沉积纯铁层较厚, 故低 Zn 含量 (2.4% 和 4.6%) 的多孔材料测得的压缩性能较对照组纯铁偏低。作为骨移植替代材料, Fe@Fe-Zn 的压缩模量 (34.8~45.6 MPa) 能够满足人体松质骨压缩模量 (20~640 MPa) 的要求^[30-31], 在植入过程中可避免“应力屏蔽”效应的产生。

2.4 Fe@Fe-Zn 的体外腐蚀行为分析

腐蚀速率较慢一直是铁基材料需解决的关键问题^[32]。如图 5a 所示, Fe@Fe-Zn 的体外降解速率明显高于多孔铁。在浸泡 7 d 内, 随着合金层中锌含量的

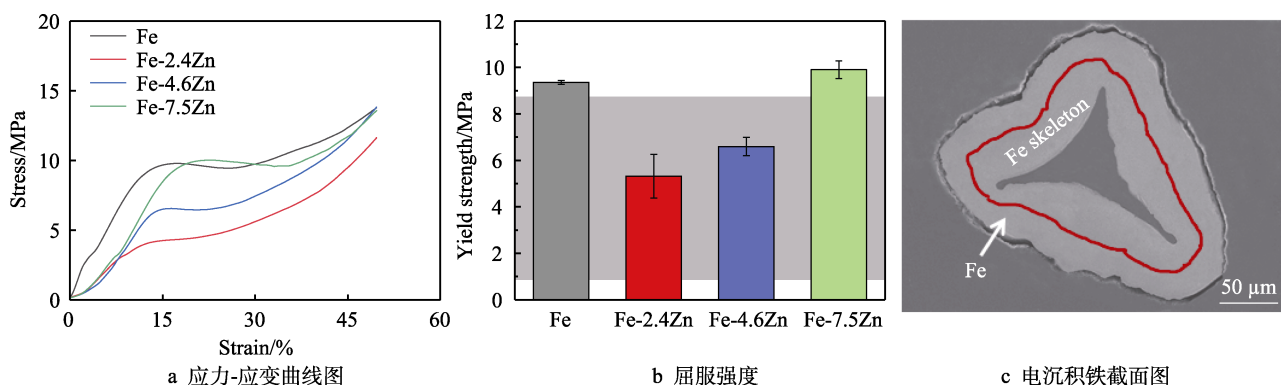


图 4 多孔材料的力学性能

Fig.4 Mechanical properties of porous materials: a) stress-strain curves; b) yield strength; c) cross section of electrodeposited iron

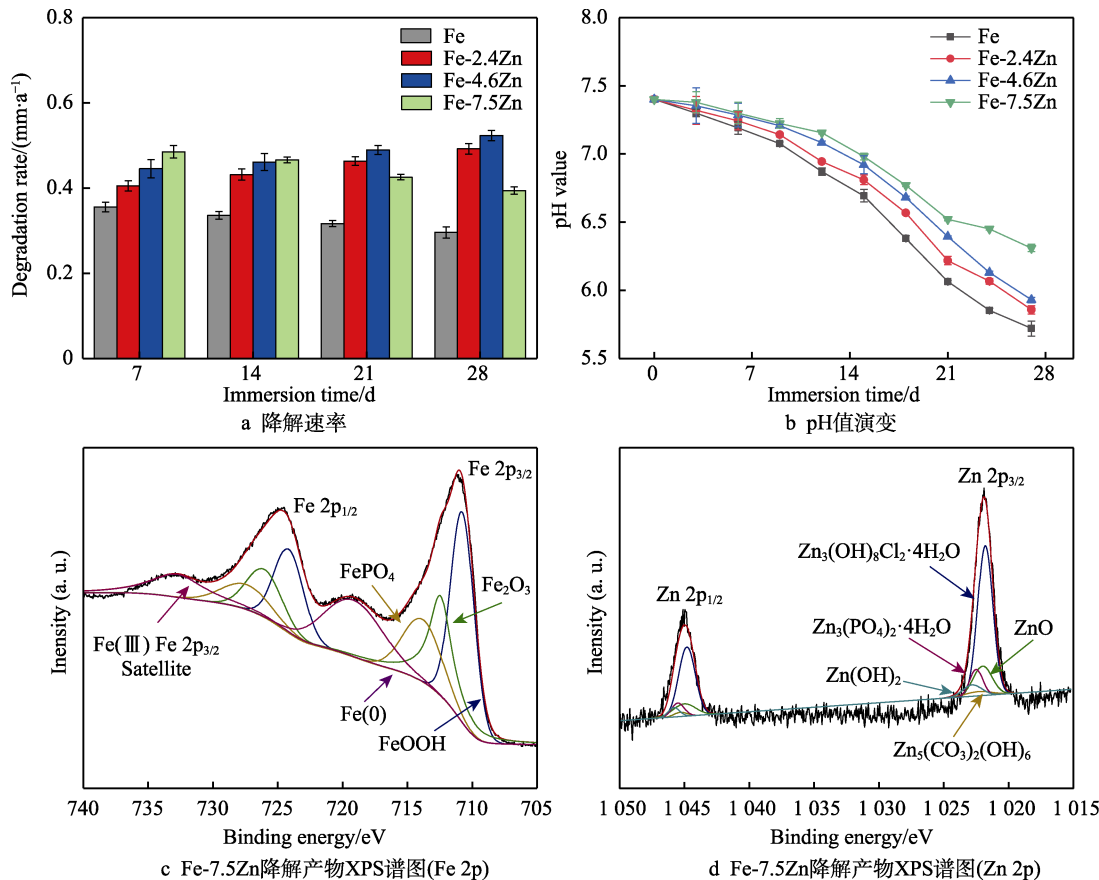


图 5 多孔材料在 Hank's 溶液中浸泡测试分析结果

Fig.5 Immersion results of porous materials in Hank's solution: a) degradation rate; b) pH evolution; c) XPS spectra of degradation products of Fe-7.5Zn (Fe 2p); d) XPS spectra of degradation products of Fe-7.5Zn (Zn 2p)

增加,降解速率逐渐增大;随着浸泡时间的延长(14~28 d),多孔铁和 Fe-7.5Zn 的降解速率逐渐下降,而 Fe-2.4Zn 和 Fe-4.6Zn 的降解速率逐渐升高。在浸泡 28 d 后,Fe@Fe-Zn 复合材料的平均腐蚀速率均高于多孔 Fe(多孔 Fe 为 (0.33 ± 0.03) mm/a, Fe-2.4Zn 为 (0.45 ± 0.04) mm/a, Fe-4.6Zn 为 (0.48 ± 0.03) mm/a, Fe-7.5Zn 为 (0.44 ± 0.04) mm/a),Fe@Fe-Zn 复合材料支架可以提高材料整体的腐蚀速率。此处需要注意的是,若作为阴极基体的纯铁骨架在复合材料占比上(即纯铁支架壁厚)进一步减少,复合支架完全降解的时间将逐渐趋于 Fe-Zn 合金层的降解时间。

图 5b 是多孔材料在 Hank's 溶液中浸泡 28 d 期间的 pH 值演变曲线。在浸泡的第 2 周内,所有合金的浸泡液 pH 值变化不大,随着浸泡时间的延长(3~4 周),pH 值持续下降,最终稳定在 5.5~6.5。正如实验部分所述,在测试 pH 值时,整个浸泡过程中没有更换新鲜溶液,因此在腐蚀后期,当溶液中 Fe 离子浓度超过溶液的溶解度后,Fe²⁺和 Fe³⁺均会发生水解反应^[33],使得溶液的 pH 值显著降低。Fe@Fe-Zn 的 pH 值始终高于多孔铁,这是因为有研究验证了锌元素的腐蚀会使溶液的 pH 值不断升高^[17],Fe 和 Zn 的综合作用,使得溶液的 pH 降低程度变缓,且随着合金层中 Zn 含量的升高,溶液 pH 的变化逐渐减小。以上研究验证了 Fe 基合金层中含有少量 Zn 元素会对环境的 pH 变化起到一定的缓冲作用,可以维持植入物周围的中性环境,有利于骨组织的健康和生长^[32]。

图 5c~d 分别为 Fe-7.5Zn 合金层腐蚀产物中 Fe 和 Zn 元素的 XPS 分析光谱图。Fe 2p 和 Zn 2p 均分裂成 2 个自旋轨道分量。Fe 2p 峰的分峰拟合结果表明,腐蚀产物由 Fe、FeOOH、Fe₂O₃ 和 FePO₄ 组成^[17,34-35]。同样地,Zn 2p 峰的分峰拟合结果表明腐蚀产物由 ZnO、Zn(OH)₂、Zn₃(OH)₈Cl₂·4H₂O、Zn₅(CO₃)₂(OH)₆

和 Zn₃(PO₄)₂·4H₂O 组成^[13,36-37]。Kasai 等^[38]的研究表明,在锌基材料的降解过程中,Zn(OH)₂ 的积累会在材料表面形成致密的保护层,阻碍腐蚀的进行。在浸泡第 1 周内,随着合金层中锌含量的增加,合金层化学活性提高,Fe@Fe-Zn 的降解速率增加(图 5a)。随着浸泡时间的增加,高锌合金中 Zn(OH)₂ 腐蚀产物逐渐积累会阻止合金的进一步腐蚀。因此,Fe-7.5Zn 的平均降解速率((0.44 ± 0.04) mm/a)小于 Fe-4.6Zn ((0.48 ± 0.03) mm/a),这也是该材料在腐蚀后期 pH 值变化较小的原因之一。

2.5 Fe@Fe-Zn 的体外生物相容性分析

图 6 为 MC3T3-E1 细胞在 25% 浓度浸提液中培养 12、18 和 24 h 后的细胞黏附状态。在所有材料的浸提液中均能够看到细胞正常黏附,细胞质和细胞核清晰可见。在培养 12~18 h 后,与空白对照组相比,在多孔 Fe 和 Fe@Fe-Zn 复合材料的浸提液中细胞铺展形态较好,有明显的触角延伸,细胞质面积较大。在培养 24 h 后,与多孔 Fe 对照组相比,在 Fe@Fe-Zn 复合材料的浸提液中能看到更好的细胞形态、纺锤体附着和一些明显的细胞间连接,说明 Fe 基材料中含有少量的 Zn 离子有利于细胞的黏附和铺展^[39]。

用 CCK-8 法评估了不同稀释倍数浸提液中的细胞活性,结果如图 7 所示。在 100% 和 50% 浓度浸提液中,细胞活性在 72 h 内持续下降。当浸提液浓度稀释至 25% 时,在培养 72 h 后,Fe@Fe-Zn 合金浸提液中细胞活性均高于多孔纯 Fe,且随着合金层中 Zn 含量逐渐增加,对细胞活性的促进作用更明显,说明 Fe 基材料中含有少量的 Zn 离子对细胞活性有一定的促进作用。此处需要注意的是,铁基材料在体内的降解速率远低于体外,故关于材料表面的细胞相容性以及体内的细胞相容性还有待进一步实验验证^[32]。

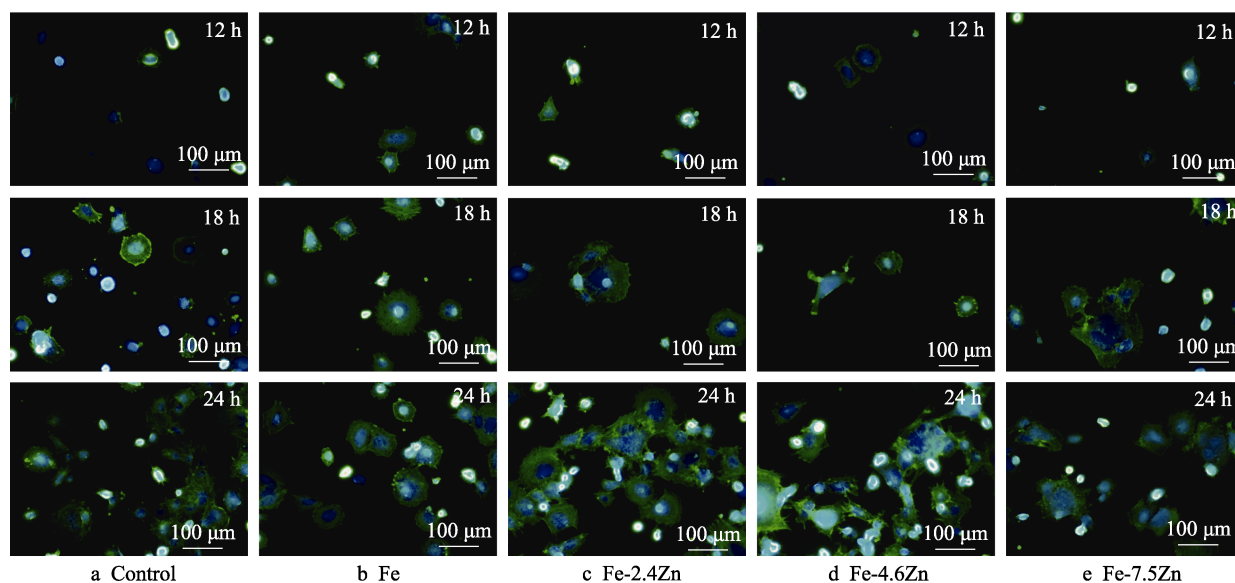
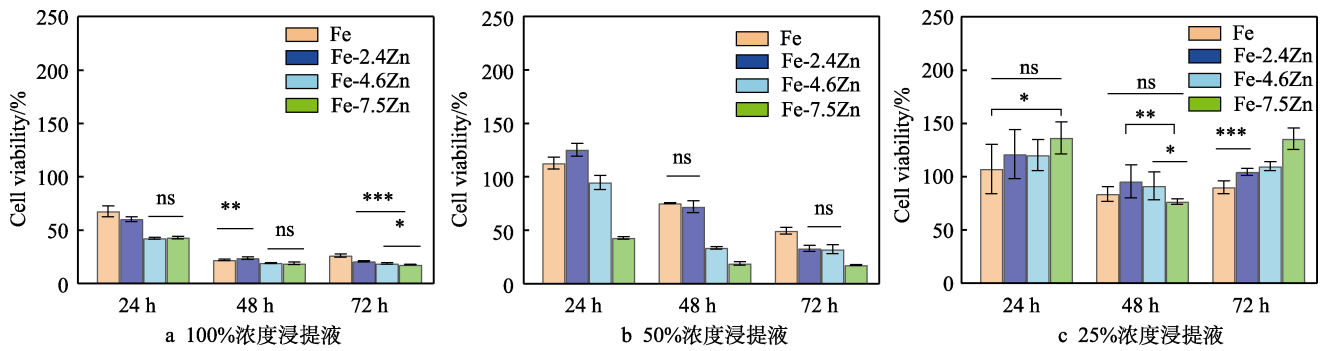


图 6 多孔材料对 MC3T3-E1 细胞黏附的影响
Fig.6 Effect of porous materials on adhesion of MC3T3-E1 cells



Note: ns $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n=3$.

图 7 CCK-8 法细胞活性评价

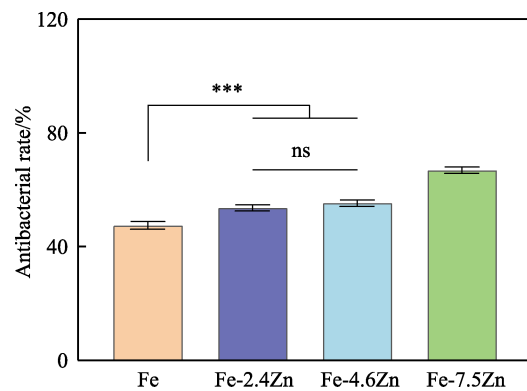
Fig.7 Evaluation of cell viability by CCK-8 method: a) 100% concentration extract; b) 50% concentration extract; c) 25% concentration extract

Fe@Fe-Zn 的体外细胞相容性结果显示, Fe 材料中含有少量的 Zn 离子有利于促进细胞的黏附和铺展, 也提高了细胞活性, 这可以促进植入物材料表面快速内皮化, 减少炎症反应的发生^[32]。

2.6 Fe@Fe-Zn 的抗菌性能分析

图 8 为 25% 浓度浸提液中的抗菌率(大肠杆菌)。相较于多孔铁, 由于 Zn 元素本身具有抗菌作用^[17], Fe@Fe-Zn 表现出更好的抗菌性能, 抗菌率均在 50% 以上, 且随着锌含量的升高, 材料的抗菌率升高, 当合金层中 Zn 含量为 7.5% 时, 抑菌率为 $(67.0 \pm 1.1) \%$ 。这与 He 等^[17]的研究结论相似。

为深入探究含 Zn 合金层的抑菌机制, 用扫描电镜观察多孔材料骨架上大肠杆菌的黏附形态, 结果如图 9a~d 所示。在相同的培养基下, 多孔铁的骨架上



Note: ns $P \geq 0.05$, *** $P < 0.001$, $n=3$.

图 8 25% 浓度浸提液对大肠杆菌的抗菌率
Fig.8 Antibacterial rate of 25% concentration extract on *E.coli*

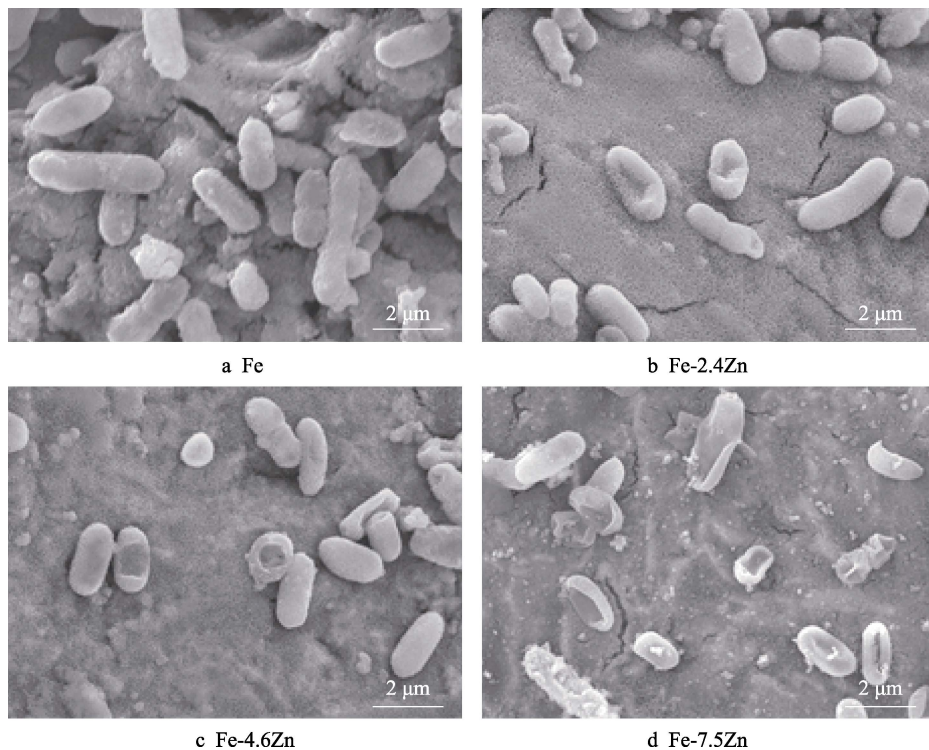


图 9 大肠杆菌在不同材料表面的黏附形态

Fig.9 Adhesion morphologies of *E.coli* on different material surfaces

黏附着大量的大肠杆菌, 细菌呈现出典型的棒状形态, 在高倍镜下可以观察到发育良好的细菌细胞结构。而 Fe@Fe-Zn 复合材料骨架表面的大肠杆菌数量要少得多, 细菌发生枯萎甚至裂解。这是由于 Zn 元素的存在, 抑制并破坏了细菌细胞壁的成长和繁殖, 促进胞内蛋白质的变性和内容物的流出^[40], 使得材料具有一定的抗菌效果。

3 结论

1) 通过电沉积在多孔铁表面制备出均匀且致密的 Fe-Zn 合金层, 合金层中杂质含量较少 (<1%)。其中, Zn 含量随脉冲频率的增加 (50 Hz→1 000 Hz) 而降低 (7.5%→2.4%)。通过 XRD 衍射结果发现, 合金层中的 Zn 以固溶体的形式存在于 α 铁基体中, 且固溶体基体具有 (211) 晶面生长的择优取向。

2) 在力学性能测试中, 与多孔铁相比, Zn 元素的加入没有损害铁基材料原本的力学性能, 且当合金层中 Zn 含量为 7.5% 时, Fe@Fe-Zn 的抗压屈服强度较多孔铁提升 6%。

3) 在体外浸泡测试中, Fe@Fe-Zn 的降解速率相较于多孔铁更快, 合金层中 Zn 元素的存在还抑制了 Fe 基材料水解导致的周围环境 pH 的降低, 且 Fe@Fe-Zn 的降解速率随合金层中 Zn 含量的增加呈现出先升高后降低的趋势。

4) 细胞相容性和抗菌性能评价结果显示, Fe 基材料中含有少量 Zn 元素有助于细胞的黏附和铺展, 对细胞活性有促进作用, 同时还显著提高了材料的抗菌性能。

综上, 以多孔 Fe 为基体, 电沉积制备的 Fe@Fe-Zn 复合材料支架, 具有与人体松质骨相似的结构特征 (孔径大小为 344.0~347.0 μm) 和力学性能 (压缩模量为 34.8~45.6 MPa), 以及合适的降解性能 (28 d 内平均降解速度为 0.45~0.48 mm/a), 同时具有良好的生物相容性以及抗菌性能 (合金层中 Zn 含量为 7.5% 时, 抑菌率为 67.0%), 有望成为潜在的可降解骨组织工程支架用材料。

参考文献:

- [1] GIANNOUDIS P V, DINOPOULOS H, TSIRIDIS E. Bone Substitutes: An Update[J]. *Injury*, 2005, 36(Suppl 3): S20-S27.
- [2] 赵鹏, 黄东, 熊雅茹, 等. 修复骨缺损的脂肪干细胞组织工程材料的研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2021, 49(1): 117-120.
ZHAO P, HUANG D, XIONG Y R, et al. Research Progress of Adipose Stem Cell Tissue Engineering Materials for Repairing Bone Defects[J]. *Medical Science Journal of Central South China*, 2021, 49(1): 117-120.
- [3] NOORI A, ASHRAFI S J, VAEZ-GHAEMI R, et al. A Review of Fibrin and Fibrin Composites for Bone Tissue Engineering[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 4937-4961.
- [4] PILLIAR R M. Powder Metal-Made Orthopedic Implants with Porous Surface for Fixation by Tissue Ingrowth[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1983(176): 42-51.
- [5] KLAUITTER J J, HULBERT S F. Application of Porous Ceramics for the Attachment of Load Bearing Internal Orthopedic Applications[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1971, 5(6): 161-229.
- [6] KARAGEORGIOU V, KAPLAN D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(27): 5474-5491.
- [7] LOBB D C, DEGEORGE B R Jr, CHHABRA A B. Bone Graft Substitutes: Current Concepts and Future Expectations[J]. *The Journal of Hand Surgery*, 2019, 44(6): 497-505.e2.
- [8] 魏晨旭, 何怡文, 王聃, 等. 组织工程学中骨修复材料的研究热点与进展[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(10): 1615-1621.
WEI C X, HE Y W, WANG D, et al. Research Hotspots and Progress of Bone Repair Materials in Tissue Engineering[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2020, 24(10): 1615-1621.
- [9] WEGENER B, BEHNKE M, MILZ S, et al. Local and Systemic Inflammation after Implantation of a Novel Iron Based Porous Degradable Bone Replacement Material in Sheep Model[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 12035.
- [10] WEGENER B, SICHLER A, MILZ S, et al. Development of a Novel Biodegradable Porous Iron-Based Implant for Bone Replacement[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 9141.
- [11] HUANG T, ZHENG Y F, HAN Y. Accelerating Degradation Rate of Pure Iron by Zinc Ion Implantation[J]. *Regenerative Biomaterials*, 2016, 3(4): 205-215.
- [12] XU Y N, WANG W Q, YU F Y, et al. Effects of Pulse Frequency and Current Density on Microstructure and Properties of Biodegradable Fe-Zn Alloy[J]. *Journal of Materials Research and Technology*, 2022, 18: 44-58.
- [13] XU Y N, WANG W Q, YU F Y, et al. The Enhancement of Mechanical Properties and Uniform Degradation of Electrodeposited Fe-Zn Alloys by Multilayered Design for Biodegradable Stent Applications[J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 161: 309-323.
- [14] HERMAWAN H, DUBÉ D, MANTOVANI D. Developments in Metallic Biodegradable Stents[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(5): 1693-1697.
- [15] LIU B, ZHENG Y F. Effects of Alloying Elements (Mn, Co, Al, W, Sn, B, C and S) on Biodegradability and in Vitro Biocompatibility of Pure Iron[J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(3): 1407-1420.
- [16] SCHINHAMMER M, HÄNZI A C, LÖFFLER J F, et al.

- Design Strategy for Biodegradable Fe-Based Alloys for Medical Applications[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(5): 1705-1713.
- [17] HE J, FANG J, WEI P B, et al. Cancellous Bone-Like Porous Fe@Zn Scaffolds with Core-Shell-Structured Skeletons for Biodegradable Bone Implants[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 121: 665-681.
- [18] 霍晓敏. Ni-Fe-Cr 合金在聚氨酯泡沫表面共沉积过程及性能研究[D]. 大连: 大连交通大学, 2018.
- HUO X M. Study on the Codeposition Process and Properties of Electrodeposited Ni-Fe-Cr Alloy Coating on Polyurethane Foam[D]. Dalian: Dalian Jiaotong University, 2018.
- [19] IBL N, PUIPPE J C, ANGERER H. Electrocrystallization in Pulse Electrolysis[J]. *Surface Technology*, 1978, 6(4): 287-300.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 31930—2015, 金属材料 延性试验 多孔状和蜂窝状金属压缩试验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 31930-2015, Metallic Materials Ductility Testing Compression Test for Porous and Cellular Metals[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [21] American Society for Testing and Materials. ASTM G31-2012a, Standard Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [22] American Society for Testing and Materials. ASTM G1-03(2017)e1, Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [23] International Standardization Organization. ISO 10993-12(2009), Biological evaluation of medical devices-Part 12: Sample preparation and reference materials[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009..
- [24] 王伟强, 梁婧, 许雅南, 等. 镀液组成对电沉积 Fe-Zn 合金镀层组织与性能的影响[J]. *电镀与环保*, 2020, 40(4): 29-33.
- WANG W Q, LIANG J, XU Y N, et al. Influence of Bath Composition on Microstructure and Properties of Electrodeposited Fe-Zn Alloy Coating[J]. *Electroplating & Pollution Control*, 2020, 40(4): 29-33.
- [25] LAJEVARDI S A, SHAHRABI T. Effects of Pulse Electrodeposition Parameters on the Properties of Ni-TiO₂ Nanocomposite Coatings[J]. *Applied Surface Science*, 2010, 256(22): 6775-6781.
- [26] BAHROLOLOOM M E, SANI R. The Influence of Pulse Plating Parameters on the Hardness and Wear Resistance of Nickel-Alumina Composite Coatings[J]. *Surface and Coatings Technology*, 2005, 192(2/3): 154-163.
- [27] OKAMOTO H. Fe-Zn (Iron-Zinc)[J]. *Journal of Phase Equilibria and Diffusion*, 2007, 28(3): 317-318.
- [28] ITÄLÄ A I, YLÄNEN H O, EKHOLM C, et al. Pore Diameter of more than 100 Mm is not Requisite for Bone Ingrowth in Rabbits[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, 58(6): 679-683.
- [29] LEFEBVRE L P, BANHART J, DUNAND D . Porous Metals and Metallic Foams: Current Status and Recent Developments[J]. *Advanced Engineering Materials*, 2008, 10(9): 775-787.
- [30] LI Y H, YANG C, ZHAO H D, et al. New Developments of Ti-Based Alloys for Biomedical Applications[J]. *Materials*, 2014, 7(3): 1709-1800.
- [31] KEAVENY T M, MORGAN E F, NIEBUR G L, et al. Biomechanics of Trabecular Bone[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2001, 3: 307-333.
- [32] SHUAI C J, LI S, PENG S P, et al. Biodegradable Metallic Bone Implants[J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2019, 3(4): 544-562.
- [33] HAVEROVÁ L, ORIŇÁKOVÁ R, ORIŇÁK A, et al. An in Vitro Corrosion Study of Open Cell Iron Structures with PEG Coating for Bone Replacement Applications[J]. *Metals*, 2018, 8(7): 499.
- [34] ZHOU J C, FINK M, BRUNS M, et al. Modification of in Vitro Degradation Behavior of Pure Iron with Ultrasonication Treatment: Comparison of Two Different Pseudo-Physiological Solutions[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 95: 275-285.
- [35] ZHOU J C, YANG Y Y, ALONSO FRANK M, et al. Accelerated Degradation Behavior and Cytocompatibility of Pure Iron Treated with Sandblasting[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(40): 26482-26492.
- [36] LIU X, YANG H T, LIU Y, et al. Comparative Studies on Degradation Behavior of Pure Zinc in Various Simulated Body Fluids[J]. *JOM*, 2019, 71(4): 1414-1425.
- [37] LIU X, YANG H T, XIONG P, et al. Comparative Studies of Tris-HCL, HEPES and NaHCO₃/CO₂ Buffer Systems on the Biodegradation Behaviour of Pure Zn in NaCl and SBF Solutions[J]. *Corrosion Science*, 2019, 157: 205-219.
- [38] KASAI N, KAKU Y, OKAZAKI S, et al. Mechanism for Corrosion Prevention by a Mechanical Plating of Uniform Zinc-Iron Alloy[J]. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 2016, 25(11): 4680-4685.
- [39] SHAFAGHI R, RODRIGUEZ O, WREN A W, et al. In Vitro Evaluation of Novel Titania-Containing Borate Bioactive Glass Scaffolds[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2021, 109(2): 146-158.
- [40] 张波, 周潘宇, 邱超, 等. 医用可降解锌合金材料抗菌性能及细胞相容性的体外实验研究[J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2016, 11(3): 191-197.
- ZHANG B, ZHOU P Y, QIU C, et al. Experimental Study on the Antibacterial Property and Cytocompatibility of Medical Biodegradable Zinc Alloy Materials in Vitro[J]. *Chinese Journal of Injury Repair and Wound Healing (Electronic Edition)*, 2016, 11(3): 191-197.