

国产镍钛合金材料热氧化表面改性后组织相容性评价

丁仲如, 秦永文* (第二军医大学长海医院心内科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**比较常温空气自然氧化和经不同温度热氧化表面改性处理后国产镍钛合金材料的生物相容性差异。**方法:**国产镍钛合金样品分别在空气中常温自然氧化1周(A组)及在氩气气体保护炉(6个大气压氩)进行低氧环境下热氧化处理(B组:400℃/30 min,C组:500℃/30 min,D组:600℃/30 min)。以目前常用医用体内植入金属317L不锈钢(E组)和假手术组(F组)为对照组。将实验及对照材料植入豚鼠皮下,观察植入后1、2、4、8周植入物周围软组织炎细胞浸润及组织增生程度的定量差异。**结果:**材料植入后炎症细胞浸润和纤维增生最明显时间分别为植入后第1周和第4周。所植入材料炎症细胞浸润和增生反应程度均较轻,分级符合GB/T 16886.6-1997体内植入标准。炎症细胞浸润及囊壁增生程度由轻至重顺序依次为:F<C<B<A<D<E。**结论:**国产镍钛合金材料及其热处理产品组织相容性良好,符合GB/T 16886.6-1997体内植入标准;400℃和500℃热氧化表面处理组织相容性提高,500℃处理时组织相容性最佳。

[关键词] 镍钛合金;热氧化处理;组织相容性

[中图分类号] R 541.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0495-05

Biocompatibility evaluation of domestically-manufactured NiTi-alloys after thermal oxidation of surface

DING Zhong-ru, QIN Yong-wen* (Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To compare the tissue biocompatibility of domestically manufactured NiTi alloy before and after thermal surface oxidation under 3 different temperatures. **Methods:** Domestically manufactured NiTi alloy was oxidized in air (group A) and subjected to 30 min heat treatment at 400℃ (group B), 500℃ (group C), and 600℃ (group D) to form different protective oxide surface layers in presence of argon (607.95 kPa). Wire samples from A, B, C and D groups were subcutaneously implanted in guinea pigs. Guinea pigs received 317L stainless steel transplantation (group E) and sham-operation group (F) were taken as control. The order of inflammatory cell infiltration and tissue hyperplasia around implanted materials were observed 1, 2, 4, and 8 weeks after implantation. **Results:** The peak time of inflammatory cell infiltration and fibrous hyperplasia were at the first and fourth week after implantation. The inflammatory cell infiltration and fibrous hyperplasia were both slight and all met the GB/T 16886.6-1997 *in vivo* implantation standard. The order of inflammatory cell infiltration and thickness of capsule walls from low to high was F < C < B < A < D < E. **Conclusion:** The domestically-manufactured NiTi alloy and its thermal oxidation products all possess excellent tissue biocompatibility and meet the GB/T 16886.6-1997 *in vivo* implantation standard. The tissue biocompatibility of the 400℃ and 500℃ thermal oxidation products has been increased, the optimal tissue biocompatibility is obtained at 500℃.

[KEY WORDS] Nitinol; thermal oxidation treatment; histocompatibility

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 495-499]

镍钛合金封堵器的应用使先天性心脏病介入治疗发生革命性进展,但镍释放和镍离子潜在危害仍备受关注^[1-2]。在自然状态下,镍钛合金表面形成的钝化膜可阻滞深层离子态的镍释放,是镍钛合金具有良好的生物相容性基础。但自然形成的钛氧化膜较薄,仅数个纳米,很容易剥落。而一旦在磨损、电化学腐蚀等因素作用下钝化膜遭到破坏,镍离子大量溶出,造成其生物相容性迅速恶化。因此有必要对镍钛合金进行表面改性,以增加氧化膜厚度。热氧化法为最简单实用表面改性方法,但也是一个非常复杂的物理化学过程,影响因素多,其中受热处理

温度影响最大^[3-4]。

本实验采用制作国产先天性心脏病封堵器的镍钛合金丝为原材料,以热氧化法在不同热处理温度下,对其进行热氧化表面处理,采用皮下植入法比较其组织相容性差异,以探索国产镍钛合金丝最佳的热处理条件,为国产封堵器材料的进一步改良提供理论依据。

[作者简介] 丁仲如, 博士生, 副主任医师, 硕士生导师, 现在南昌解放军第94医院心内科, 南昌 330002. E-mail: dzrsj@126.com

* Corresponding author. E-mail: ywqin@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 热氧化镍钛合金材料的制备 国产镍钛合金丝(原子比:镍 55.7%~55.89%,钛 43.5%)丝材由上海形状记忆合金有限公司提供。为先后采用热拉丝、冷拉丝制成的直径 0.5 mm 金属丝,丝材经 400、500、600 及 1 000 砂纸依次表面抛光,然后剪成 20 mm 长度丝材样品备用。A 组样品在空气中常温自然氧化 1 周;其他样品在氩气气体保护炉(6 个大气压氩)进行低氧环境下热氧化处理。分组如下: B 组:400℃/30 min; C 组:500℃/30 min; D 组:600℃/30 min。以目前常用医用体内植入金属 317L 不锈钢(E 组)和假手术组(F 组)为对照组, E 组制成的丝材规格同上。所有材料均经超声波先后在丙酮和去离子水中清洗 15 min,去离子水中清洗 3 次,去离子水浸泡 24 h 后自然晾干,密封包装经环氧乙烷消毒备用。

1.2 实验材料皮下植入及组织相容性观察 选择 200~250 g 豚鼠 54 只,雌雄不限。随机分为 6 组,每组 9 只。四肢固定于特制手术架上,剪刀及剃刀去除脊柱两侧皮毛。腹腔内注射 2% 戊巴比妥钠 0.3~0.4 ml 麻醉,碘酒、75% 乙醇消毒,铺无菌手术单。从脊柱两侧分别切开皮肤一长约 2 mm 小口、用自制的钝头不锈钢针皮下钝性分离形成一约 2.2 cm 植入床,两侧各植入一根长 2 cm 植入物,缝合切口。假手术组不置入任何植入物。手术后 6 h 清醒后进食饲料饮水,常规饲养。

术后 1、2、4、8 周每组分别断头处死 1、2、3、3 只豚鼠,肉眼观察植入物周围有无明显炎症及增生反应,取出其两侧植入物各一,切取紧贴移植物软组织,假手术组取植入床周围组织。立即 10% 甲醛溶液固定。48 h 后常规石蜡包埋,每一蜡块连续做 5 张切片,组织厚度 5 μm ,常规 H-E 染色。

1.3 植入物周围软组织炎细胞浸润定量 每种材料植入后 2、4、8 周各取 4 个样本,每样本观察 5 张切片,每一张切片于植入物周围随机选择 5 个不同视野(共 20 个视野)。在放大 400 倍视野下对炎性细胞进行计数,计数结果以 5 个视野计数平均值为准。

1.4 植入物周围软组织炎性浸润和纤维增生程度的分级评估 植入后第 1、2、4、8 周每种材料分别取 2、4、6、6 份样本,每份样本切片 5 张,对每一张切片进行光镜观察,依据 GB/T 16886.6-1997 标准对植

入物周围炎性细胞浸润及纤维组织囊壁增生程度进行评分。

GB/T 16886.6-1997^[5] 植入物软组织炎性细胞浸润和纤维囊壁形成分级评分标准如下:(1) I 级:未见或仅见极少量淋巴细胞,囊壁厚度稳定,无继续增生现象;(2) II 级:可见少量淋巴细胞,纤维化囊腔致密,壁的厚度比形成初期为薄;(3) III 级:少量嗜中性粒细胞、淋巴细胞浸润和巨细胞反应,可见成纤维细胞,纤维细胞与胶原纤维,并已形成纤维囊腔结构;(4) IV 级:以嗜中性粒细胞浸润为主的炎症反应,可见吞噬细胞。试样周围可见小血管与成纤维细胞增生,开始形成疏松的囊壁。国家规定的组织反应程度合格标准:(1)植入 1 周:炎性细胞浸润 \leq IV 级,无囊壁形成;(2)植入 4 周:炎性细胞浸润 \leq II 级,纤维囊壁形成 \leq IV 级;植入 12 周:炎性细胞浸润 \leq I 级,纤维囊壁形成 \leq II 级。

1.5 统计学处理 数据输入计算机,应用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析;计数资料组间比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 术后不同时间植入物周围软组织炎性反应及增生反应肉眼及光镜观察 所有实验动物均存活,进食,活动良好。植入后 1、2、4、8 周材料取出时均光洁如新,表面未见变色,周围组织肉眼未见明显炎症和增生。光镜组织学见所有材料植入后在术后不同时间均有不同程度炎性反应和纤维增生。不同材料之间炎性反应和纤维增生程度稍有差别,但时间规律类似,以材料 B 为代表说明如下。

图 1 为材料 B 植入后不同时间光镜组织学检查所见。图 1A 见植入后 1 周时炎症反应较为明显,有较多的中性及淋巴细胞浸润,纤维增生不明显;周边皮下组织见轻中度炎性反应;植入后 2 周炎症反应明显减轻,可见少量中性细胞、淋巴细胞和多核巨噬细胞浸润,纤维细胞及纤维已形成包膜(图 1B);植入后 4 周见慢性炎症浸润,未见中性粒细胞,可见少量淋巴细胞和大量成纤维细胞,纤维膜较厚(图 1C);植入 8 周无明显增生反应,偶见淋巴细胞,未见异物巨细胞及肉芽组织,纤维包膜变薄,完整光滑(图 1D)。

2.2 不同材料埋植物周围软组织炎性反应及周围组织增生定量分析 图 2 为植入 8 周时不同植入材料

和假手术组光镜组织学检查所见。见 E 组囊壁最厚, 炎症反应最重; F 组囊壁最薄, 炎症反应最轻。镍钛合金材料中 C 组囊壁最薄, 炎症反应最轻。各组第 2、4、8 周炎性细胞浸润计数见表 1, 见 F 组炎性细胞浸

润最少, C 组和 B 组次之, E 组和 D 组较明显。与 A 组和 F 组比较, D、E 组植入后第 2 周炎性细胞浸润计数差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 4、8 周各组之间炎性细胞浸润计数差异无统计学意义。

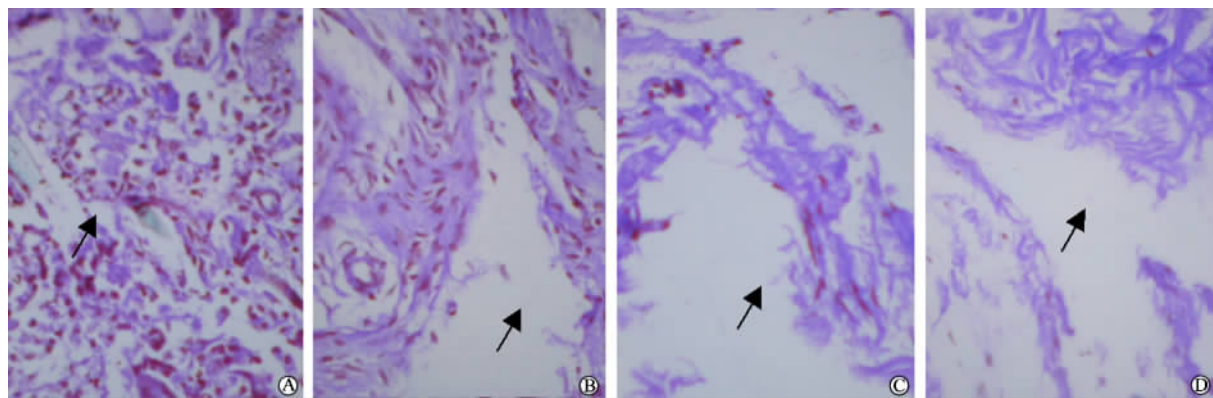


图 1 材料 B 植入后不同时间组织学检查所见

Fig 1 Histological findings of material B at different time points after implantation (H-E, ×250)

A: 1 week; B: 2 weeks; C: 4 weeks; D: 8 weeks. Arrows showing the sites of implanted materials

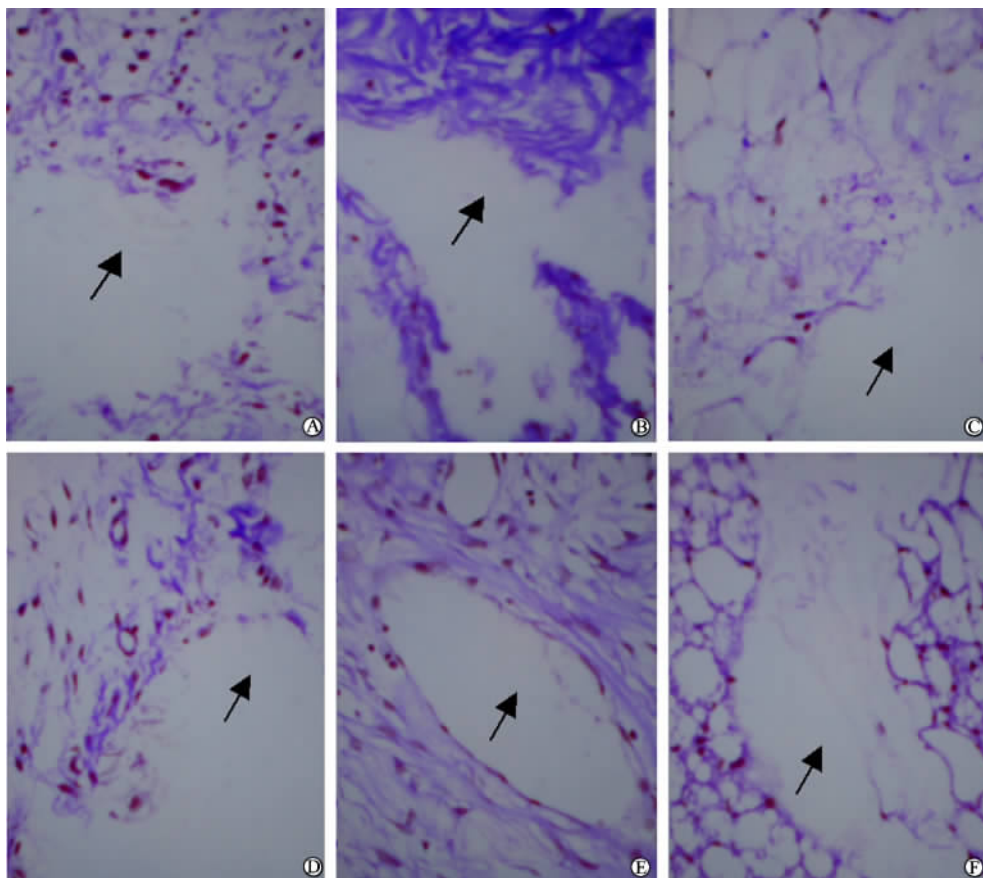


图 2 植入 8 周时不同材料和假手术组光镜组织学检查

Fig 2 Histological findings of different materials 8 weeks after implantation (H-E, ×250)

A: Oxidation in air; B: 400°C/30 min; C: 500°C/30 min; D: 600°C/30 min; E: 317L stainless steel; F: Sham operation. Arrows showing the sites of implanted materials

表 1 实验材料埋植术后不同时间周围软组织炎性细胞浸润定量

Tab 1 Quantitation of inflammatory cells around the test materials at different time points after implantation

(n=20, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after implantation(t/week)		
	2	4	8
A	5.7±1.5	4.1±1.5	1.6±1.2
B	5.8±1.3	4.3±1.3	1.6±1.1
C	5.5±1.0	3.8±1.4	1.7±1.2
D	6.3±1.2*△	4.1±1.5	1.9±1.3
E	6.2±1.2*△	4.2±1.4	1.7±1.1
F	5.4±1.0	3.9±1.4	1.6±1.0

A:Oxidation in air;B:400℃/30 min;C:500℃/30 min;D:600℃/30 min;E:317L stainless steel;F:Sham operation;* P<0.05 vs group A;△P<0.05 vs group F

2.3 植入物周围组织切片炎性反应和纤维囊壁增生程度的分级 结果分别见表 2 和表 3。表 2 示与 A 组比较,植入第 1、2、4、8 周 B、C 组炎性反应分级较高的切片数有逐步减少趋势。炎症细胞浸润程度分级由轻至重顺序依次为: F < C < B < A < D < E。与 A 组及 E 组比较,第 2 周时 C 组和 F 组的不同等级切片计数的差异具统计学意义(P<0.05),即 C 组和 F 组炎性细胞浸润分级较 A 组和 E 组轻。表 3 示 1、2、4、8 周材料周围纤维增生分级与表 2 有相同的变化趋势,与 A 组比较,第 4 周时 C 组和 F 组不同等级切片的计数差异具有统计学意义(P<0.05)。将表 2 和表 3 分级结果与上文 GB/T 16886.6 - 1997 的标准对照,示所有实验材料的炎性反应和纤维囊壁增生程度均未超过有关标准,符合体内植入材料要求。

表 2 实验材料埋植术后不同时间周围软组织炎性反应程度分级

Tab 2 Grading of inflammatory reaction around the test materials at different time points after implantation

Group	Time after implantation(t/week)							
	1(10 slices)		2(20 slices)		4(30 slices)		8(30 slices)	
	Ⅲ	Ⅳ	I	Ⅱ	I	Ⅱ	I	Ⅱ
A	6	4	8	12	16	14	26	4
B	7	3	13	7	21	9	27	3
C	7	3	15*△	5	22	8	26	4
D	5	5	8	12	17	13	27	3
E	5	5	8	12	18	12	26	4
F	8	2	16*△	4	23	7	28	2

A:Oxidation in air;B:400℃/30 min;C:500℃/30 min;D:600℃/30 min;E:317L stainless steel;F:Sham operation;* P<0.05 vs group A;△P<0.05 vs group E

表 3 实验材料埋植术后不同时间周围软组织纤维增生程度评估

Tab 3 Grading of fibrous hyperplasia around the test materials at different time points after implantation

Group	Time after implantation(t/week)							
	1(10 slices)		2(20 slices)		4(30 slices)		8(30 slices)	
	Ⅲ	Ⅳ	I	Ⅱ	I	Ⅱ	I	Ⅱ
A	9	1	14	6	13	17	24	6
B	10	0	16	4	20	10	25	5
C	10	0	17	7	21*	9	24	6
D	10	0	13	7	13	17	22	8
E	9	1	14	6	16	14	21	9
F	10	0	15	5	22*	8	25	5

A:Oxidation in air;B:400℃/30 min;C:500℃/30 min;D:600℃/30 min;E:317L stainless steel;F:Sham operation;* P<0.05 vs group A

3 讨论

3.1 植入材料生物相容性的判断 植入的生物材料被机体组织包绕是生物体对异物材料较温和反应的主要形式。包括早期的炎症反应和随后的纤维增生反应,炎症反应和纤维增生的程度反映了机体对种植体的反应和容忍度,常用来作为生物材料相容

性的评价指标^[1,5-7]。近年采用组织定量分析技术对炎症反应和纤维增生进行定量或半定量分析,使其评价手段更加客观和准确^[6-7]。

植入材料最常见的病理表现是炎症及其继发的增生反应,植入后早期(2周内)表现为急性炎症反应,常于1周左右达高峰期,2周后逐渐消退并继发增生反应^[6-8]。早期炎症反应多为非特异性,常见原

因有:(1)材料表面物质作为异物释放刺激组织所引起的非感染性炎症,一般而言不易分解或有惰性保护层的生物惰性材料炎性反应较轻,反之炎症反应重;(2)手术损伤、继发性微生物侵入引起细菌性炎症,以中性粒细胞为主;(3)植入物能抑制和吸附补体 C3a、C5a,增加多核白细胞在植入物局部组织中的数量,使抑制局部炎症反应的能力减弱。2周后植入物周围多转化为慢性无菌性炎症,1个月左右达到高峰并形成纤维囊壁。纤维囊壁为机体对异物包裹的一个病理生理过程,其持续的长短和反应程度常与材料自身的性质有关,能够较好反应材料生物相容性。生物相容性好的材料于1~2个月后增生性炎症反应逐渐停止,囊壁变薄。故植入后2个月左右急性和亚急性炎症反应均基本消退,此时组织病理变化能够较好反应材料和组织之间生物相容性。本实验所有材料植入后均符合上述病理变化特点,即早期发生急性炎症反应,1周时最明显,2周后减轻,4周时炎症反应明显减轻伴纤维增生反应,2个月后慢性炎症反应基本消失。本实验所有的植入材料炎性反应和增生反应均轻微,其分级均符合 GB/T 16886.6-1997 的体内植入标准。

3.2 不同温度热处理制备的镍钛合金材料植入后组织相容性差异 本实验中所有使用材料炎性反应和纤维增生均较轻微,仅在植入1周时炎症反应相对较强的 600℃/30 min 组(D组)和 317L 不锈钢对照组(E组)和炎症反应相对较弱的自然氧化组(A组)及假手术对照组(F组)炎性细胞计数比较存在统计学差异($P < 0.05$)。从形态学看,术后8周光镜检查囊壁 317L 不锈钢最厚,600℃/30 min 组(D组)次之,假手术组(F组)最薄。以上结果表明,不同热处理温度下制备的镍钛合金材料植入后组织相容性顺序为:C>B>A>D>E。即 500℃/30 min 处理组镍钛合金组织相容性最好,400℃/30 min 处理组次之,600℃/30 min 处理组最差,其炎性反应程度和 317L 不锈钢组类似。这一结果与 Firstov 等^[3]报道的结果相似,可能的原因为:在较低温度(400~500℃)时,随着热处理温度升高,材料表面氧

化膜厚度增加,材料耐腐蚀性增强。400℃/30 min 处理时氧化膜有一定程度增厚,500℃/30 min 处理时氧化膜厚度进一步增加,且表面氧化膜结构致密、分布均匀、成分相对单一,故耐腐蚀性达到最佳;而较高温度如 600℃/30 min 热处理时虽然氧化膜厚度显著增加,但因其表面成分复杂,镍离子浓度高,且表面多孔易开裂,耐腐蚀性反而降低。

本实验表明热氧化和自然氧化镍钛合金均具有良好组织学相容性,均符合 GB/T 16886.6-1997 标准的体内植入标准,可以在体植入应用。500℃/30 min 热处理镍钛合金组织相容性最好,400℃/30 min 热处理次之,600℃/30 min 热处理材料组织相容性较自然氧化者下降,其组织相容性和 317L 不锈钢组类似。

[参考文献]

- [1] Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, et al. *In vivo* study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2003,124: 687-693.
- [2] Michiardi A, Aparicio C, Planell J A, et al. New oxidation treatment of NiTi shape memory alloys to obtain Ni-free surfaces and to improve biocompatibility[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*,2006,77:249-256.
- [3] Firstov G S, Vitchev R G, Kumar H, et al. Surface oxidation of NiTi shape memory alloy[J]. *Biomaterials*,2002,23:4863-4871.
- [4] Es-Souni M, Es-Souni M, Fischer-Brandies H. Assessing the biocompatibility of NiTi shape memory alloys used for medical applications[J]. *Anal Bioanal Chem*,2005,381:557-567.
- [5] ISO10993-6:1994(GB/T 16886.6-1997)植入后局部反应实验[S].
- [6] Ryhanen J, Kallioinen M, Tuukkanen J, et al. *In vivo* biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy: muscle and perineural tissue responses and capsule membrane thickness[J]. *J Biomed Mater Res*,1998,41:481-488.
- [7] 王俊艳,梁玉,崔红梅,等. 镍钛形态记忆合金与骨组织相容性的形态学[J]. *解剖学杂志*,2004,27:660-663.

[收稿日期] 2006-11-06

[修回日期] 2007-03-31

[本文编辑] 曹静