



Mg-Nd-Zn-Zr 镁合金体外降解行为及生物相容性

王勇平^①, 何耀华^①, 朱兆金^①, 蒋焱^{①*}, 张健^②, 牛佳林^②, 毛琳^②, 袁广银^{②*}

① 上海交通大学附属第六人民医院骨科, 上海 200233;

② 上海交通大学轻合金精密成型国家工程研究中心, 上海 200240

* 联系人, E-mail: jiangyao195106@163.com; gyyuan@sjtu.edu.cn

2011-08-11 收稿, 2011-10-09 接受

国家自然科学基金 (81071452, 30772182) 资助

摘要 探讨可降解医用生物材料 Mg-Nd-Zn-Zr 镁合金(NZK)体外降解行为及生物相容性. 通过静态浸泡实验、电化学腐蚀实验、扫描电子显微镜及能谱分析评价 NZK 合金体外降解性能; 通过溶血实验和细胞毒性实验评价其体外生物相容性. 纯镁为对照组. 在模拟体液中, 静态浸泡实验和电化学腐蚀实验结果表明, 添加钕、锌、锆合金元素可以提高镁合金耐腐蚀性. 溶血实验显示钙磷涂层 NZK 合金的溶血率为 4.8%, 低于 5%; 细胞毒性实验提示 NZK 合金浸提液对 MC₃T₃-E₁ 细胞无明显细胞毒性. 溶血和细胞毒性试验表明 NZK 合金具有优良的血液相容性和细胞相容性. 以上结果表明可降解医用生物材料 NZK 合金在模拟体液中可逐渐降解, 并且具有优良的生物相容性.

关键词

镁合金
降解
生物相容性
体外

金属材料是骨科广泛应用的植入材料, 具有较高的机械强度、断裂韧性和弹性, 适合承重部位应用. 然而, 金属材料, 包括钛合金、不锈钢和钴基合金在临床应用过程中存在一些不可避免的问题, 如应力遮挡效应及释放毒性离子或粒子, 应力遮挡可导致骨强度下降或发生骨折病, 毒性离子或粒子可导致慢性炎症和骨溶解^[1~4]. 此外, 金属植入材料是永久性的, 其中大部分需要通过第二次手术取出, 这不仅增加了医疗成本, 而且给患者带来不必要的痛苦. 可降解生物材料可以解决上述问题, 从而使其成为理想的骨科植入材料.

镁合金很容易在生理环境中降解, 有望成为可降解医用生物材料, 因此近年来备受关注^[5~8]. 镁合金由于其可降解性、良好的生物相容性、适当的机械性能如比强度高及弹性模量低接近人体骨骼, 成为具有潜在优势的可降解医用生物材料^[9~11]. 以往研究表明, 镁合金接骨板及螺钉在体内降解太快, 无法满足骨折治疗需要, 由于当时冶金水平限制, 无法克服镁合金降解速率过快的矛盾, 镁合金作为医用生物

材料的研究及应用便停止了^[12,13]. 近年来, 随着冶金技术的发展, 镁合金作为可降解医用生物材料的研究再次引起学者的广泛关注. 到目前为止, 多种镁合金材料, 如块状材料^[8~11]、支架^[14,15]和复合材料^[16~18]作为植入材料已进行了大量研究, 但是, 限制镁合金在临床应用的障碍是镁合金在人体环境中降解太快^[1,2]. 为了获得耐腐蚀性更好的镁合金, 本课题组通过合金热力学计算, 设计开发出了新型高强韧医用镁合金 Mg-Nd-Zn-Zr(NZK)^[19], 目前为止, 尚无系统进行 NZK 合金体内外降解和生物相容性研究的报道.

本研究旨在探讨 NZK 合金体外降解行为、生物相容性及医用安全性, 为 NZK 合金从基础研究到临床应用提供理论及实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

NZK 合金和纯镁由上海交通大学轻合金精密成型国家工程研究中心提供, 合金的成分见表 1^[19], 该

表 1 NZK 合金及纯镁的化学成分

材料	化学成分 (wt.%)								
	Mg	Nd	Zn	Zr	Si	Ni	Cu	Fe	Al
NZK 合金	balance	2.5	0.2	0.5	0.0016	0.0025	0.0195	0.1038	—
纯镁	≥99.99	—	—	—	≤0.0016	≤0.0001	≤0.0004	≤0.0014	≤0.0005

合金杂质含量低, 具有良好的纯度.

将 NZK 合金及纯镁切割加工成直径 12 mm, 高度 3 mm 的圆柱体状试样, 表面抛光, 用无水乙醇超声清洗 10 min, 实验前用环氧乙烷消毒. 模拟体液为测试体外降解行为的介质: 氯化钠 6.800 g/L, 氯化钙 0.200 g/L, 氯化钾 0.400 g/L, 硫酸镁 0.100 g/L, 碳酸氢钠 2.200 g/L, 磷酸氢二钠 0.126 g/L 和磷酸二氢钠 0.026 g/L^[20]. 模拟体液的 pH 用 NaOH 和 HCl 调至 7.4±0.2. 新西兰兔(体重 2.5±0.3 Kg)由上海杰思捷实验动物有限公司提供[许可证号为 SCXK(沪)2010-0026]. MC₃T₃-E₁ 细胞由中国科学院典型培养物保藏委员会提供.

1.2 NZK 合金显微结构

扫描电子显微镜(日立 S-4800, 日本)观察 NZK 合金和纯镁的表面形貌.

1.3 静态浸泡实验

静态浸泡实验在水浴中进行, 温度 37±0.5℃, 静态浸泡第 3, 7 和 30 d 后从模拟体液中取出试样, 去离子水冲洗后用乙醇清洗, 室温下干燥. 扫描电子显微镜观察试样表面形貌, 用 200 g/L 铬酸清洗去除试样表面沉积的腐蚀产物, 根据下列方法计算降解率, 单位为 mm/a^[21]:

$$\text{腐蚀速率} = (K \times W) / (A \times T \times D), \quad (1)$$

其中, $K=8.76 \times 10^4$, W 为失重(g), A 为试样与溶液接触的表面积(cm^2), T 为浸泡时间(h), D 为密度(g/cm^3).

1.4 电化学实验

电化学实验采用电化学工作站 PARSTAT®2273 系统, 三电极体系, 参比电极为饱和干汞电极, 对电极为铂电极, 工作电极为试样(NZK 合金和纯镁), 扫描频率为 1 mV/s, 室温(25±1℃)测试. 每组测定 3 个试样, 结果取 3 次测量的平均值.

1.5 溶血试验

按照 ISO 标准制备浸提液^[22], 实验共分 3 组, 实

验组、阴性对照组和阳性对照组, 分别为 10 mL 浸提液、10 mL 生理盐水及 10 mL 蒸馏水. 所有试管置入 37℃ 恒温水浴箱 30 min, 将 10 mL 生理盐水加入 8 mL 新西兰兔抗凝血(含 0.5 mL 20 g/L 草酸钾)进行稀释, 分别取 0.2 mL 稀释抗凝兔血加入各个试管, 置入 37℃ 水浴中 60 min, 离心 5 min (1500 r/min), 取上层清液移入比色皿内, 在分光光度计(722S, 上海精密科学仪器公司)545 nm 波长处测定吸光度(OD 值), 每组 6 个平行样本, 计算平均值. 根据下列公式计算溶血率(HR):

$$\text{HR} = [(\text{OD}_T - \text{OD}_N) / (\text{OD}_P - \text{OD}_N)] \times 100\%, \quad (2)$$

其中, OD_T 代表实验组 OD 值, OD_N 和 OD_P 分别表示阴性对照组和阳性对照组 OD 值, 溶血率小于 5% 表示材料无明显溶血.

1.6 细胞毒性试验

MC₃T₃-E₁ 细胞用来评估 NZK 的细胞毒性.

(i) 浸提液的制备. 用 a-MEM(Gibco 公司, 美国)细胞培养液作浸提介质, 按试样表面积(cm^2)与浸提介质体积(mL)之比为 1.25 cm^2/mL 加入 a-MEM, 置于 37℃, 95% 相对湿度和 5% CO_2 培养箱内 24 h, 得到浸提液原液^[23,24]. 然后加入 a-MEM 培养基, 分别稀释成 10% 和 50% 浓度浸提液, 以单纯 a-MEM 作为阴性对照, 以含有 0.64% 苯酚的 a-MEM 培养基为阳性对照组.

(ii) 细胞培养. MC₃T₃-E₁ 细胞培养于含 10% 胎牛血清(Hyclone 公司, 美国), 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 a-MEM 培养基中, 在 37℃, 95% 相对湿度和 5% CO_2 培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次. 当细胞生长成单层汇合至 80% 时进行传代.

(iii) 细胞形态. 将 MC₃T₃-E₁ 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔平底培养板, 每组 6 孔, 培养 24 h 后弃去培养液, 分别加入 100 μL 10%, 50% 和 100% 浓度浸提液、单纯 a-MEM 培养液和含 0.64% 苯酚的 a-MEM 培养液, 置于 37℃, 5% CO_2 培养箱内培养, 分别于 1, 4 和 7 d 在倒置相差显微镜下(Olympus

IX71, 日本)观察细胞形态。

(iv) MTT 试验. 根据 ISO 标准^[23]用 MTT 试验评估细胞毒性. 将 MTT(Sigma 公司, 美国)用 PBS 配成 5 mg/mL 浓度, 实验时每孔内加入 20 μ L MTT, 继续培养 4 h, 然后吸弃 MTT 溶液, 加入 150 μ L DMSO (Sigma 公司, 美国)震荡 15 min, 用酶标仪(Wellscan MK3, Labsystem, 芬兰)在 490 nm 波长测量吸光度(OD 值). 按下列公式计算细胞相对生长率(RGR):

$$RGR(\%)=(OD_T/OD_N)\times 100\%, \quad (3)$$

OD_T 表示试验组的 OD 值, OD_N 表示阴性组的 OD 值.

1.7 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计软件(SPSS 公司, 美国)进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 两组间均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 NZK 合金显微结构

图 1(a)显示了 NZK 合金的典型金相结构. 图 1(a)中, NZK 合金微观结构更加均匀, 晶界几乎无法辨别, 表明合金化显著改变了 NZK 合金的微观结构,

从而导致不同的降解行为. 图 1(b)为扫描电子显微镜下 NZK 合金的表面形貌, 显示组成 NZK 合金的所有微粒均匀分布, 表面无腐蚀.

2.2 静态浸泡实验

NZK 合金和纯镁静态浸泡于模拟体液中第 3, 7 和 30 d 后的降解速率如图 2 所示, 结果表明 NZK 合金在各时间点的降解速率均比纯镁慢. NZK 合金静态浸泡于模拟体液中第 30 d 后表面覆盖一层降解产物, 形成防腐层(图 1(c)).

能谱分析表明, 沉积于 NZK 合金表面的腐蚀产物成分主要由氧、碳、钠、镁、钙、磷和氯组成(图 3). 铬酸清洗去除腐蚀产物后, 可清楚地看到 NZK 合金表面的腐蚀坑(图 1(d)). 然而, NZK 合金表面腐蚀坑比纯镁表面腐蚀坑的体积更小、更均匀, 说明 NZK 合金和纯镁存在不同的腐蚀形式.

值得注意的是静态浸泡 30 d 后 NZK 合金的降解率低于静态浸泡 3 d 后 NZK 合金的降解率(表 2), 这可能是覆盖于 NZK 合金表面的降解产物形成防腐层阻止 NZK 合金降解的结果.

2.3 电化学实验

图 4 为典型的 NZK 合金和纯镁的电化学极化曲

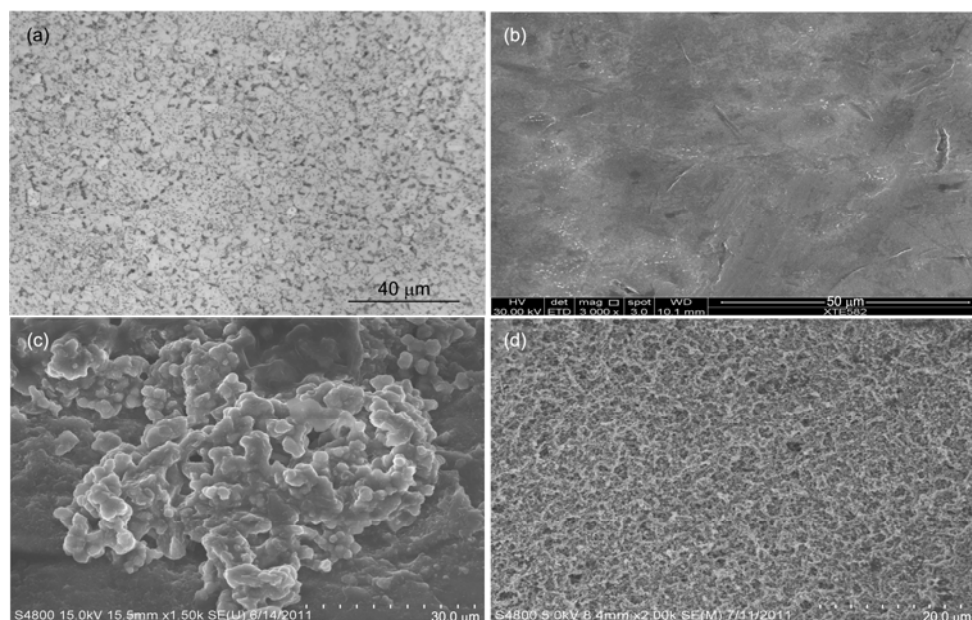


图 1 NZK 合金显微结构及降解行为

(a) NZK 合金的金相结构; (b) 扫描电子显微镜下 NZK 合金的表面形貌; (c) 模拟体液中静态浸泡 30 d 后, NZK 合金表面覆盖一层灰白色的降解产物; (d) 铬酸清洗去除降解产物后, NZK 合金表面的均匀腐蚀坑

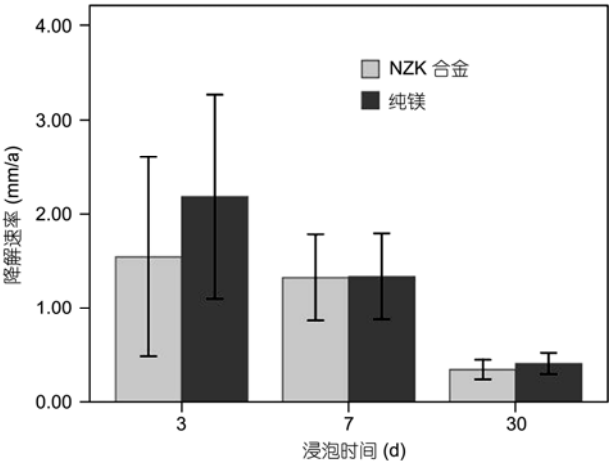


图2 NZK 合金和纯镁静态浸泡于模拟体液中第 3, 7 和 30 d 后的降解速率

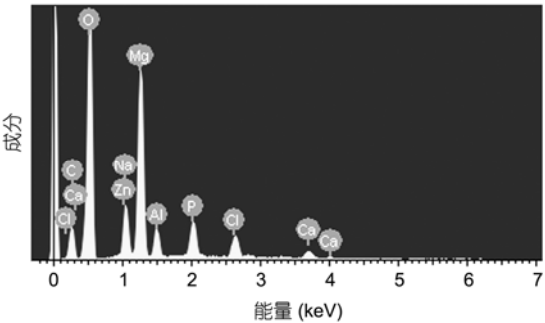


图3 能谱分析图 1(c)中沉积于 NZK 合金表面降解产物的成分

表 2 NZK 合金体外降解率(mm/a)

	3 d	7 d	30 d
NZK 合金	1.54±0.53	1.32±0.23	0.34±0.05
纯镁	2.50±0.54	1.33±0.23	0.40±0.06

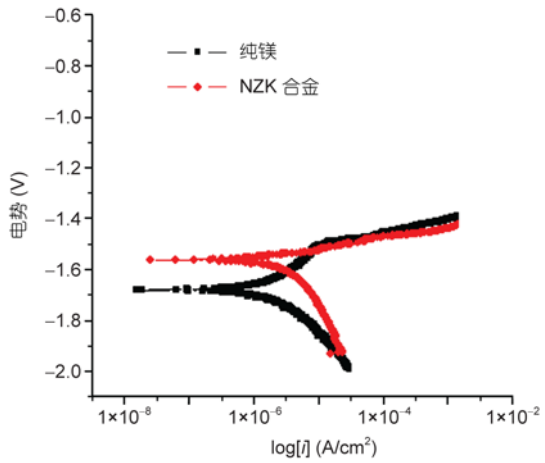


图4 NZK 合金和纯镁在模拟体液中的极化曲线

线. 由图可见, NZK 合金的腐蚀电位比纯镁高, 腐蚀电流比纯镁低, 说明 NZK 合金比纯镁更耐腐蚀. 电化学测试结果表明, NZK 合金相比纯镁具有更好的耐腐蚀性, 这与静态浸泡实验结果一致.

2.4 溶血实验

钙磷涂层 NZK 合金溶血率为 4.8%, 低于 5%, 表明钙磷涂层 NZK 合金不会导致严重溶血(表 3). 根据 ISO 标准^[22], 钙磷涂层 NZK 合金体外降解过程中对红细胞无明显的破坏作用, 具有优良的血液相容性.

2.5 NZK 合金的细胞毒性

(i) 细胞培养和细胞形态. 将 MC₃T₃-E₁ 细胞培养在不同浓度的浸提液中, 分别培养 1, 4 和 7 d 后, 在进行 MTT 实验之前在倒置相差显微镜下观察细胞形态. 不同浓度浸提液中 MC₃T₃-E₁ 细胞的形态如图 5 所示. 第 1 d, 细胞密度低, 几乎全部贴附于培养板的底部, 细胞呈扁平梭形, 轮廓清晰, 核质比例正常; 第 4 d, 细胞增殖迅速, 形态正常; 第 7 d, 细胞数量显著增加, 成团增长, 可见老化细胞, 胞质呈空泡或含颗粒. 然而, 在同一时间点不同组的细胞形态与阴性对照组无明显差异.

(ii) 细胞毒性. MTT 实验用来测定吸光度(OD 值)、相对增殖率(RGR)和细胞毒性, 结果见表 4.

细胞在不同浓度浸提液中培养 1, 4 和 7 d 后, 在同一时间点, 细胞活性(OD 值)与阴性对照组相比无显著性差异($P>0.05$). 细胞在不同浓度浸提液中的相对增殖率均大于 75%, 说明细胞毒性为 0~1 级(图 6). 细胞在同一浓度浸提液中培养, 第 4 天细胞活性(OD 值)与第 1 d 细胞活性(OD 值)相比较有显著差异($P<0.05$); 第 7 d 细胞活性(OD 值)与第 4 d 细胞活性(OD 值)相比较有显著差异($P<0.05$). MTT 实验结果表明 NZK 合金对 MC₃T₃-E₁ 细胞没有明显毒性作用, 具有良好的细胞相容性.

表 3 钙磷涂层 NZK 合金溶血实验结果($n=6$)

组别	OD 值(mean±SD)	溶血率(%)
实验组	0.054±0.0020	4.8
阴性对照组	0.018±0.0024	0
阳性对照组	0.767±0.0317	100

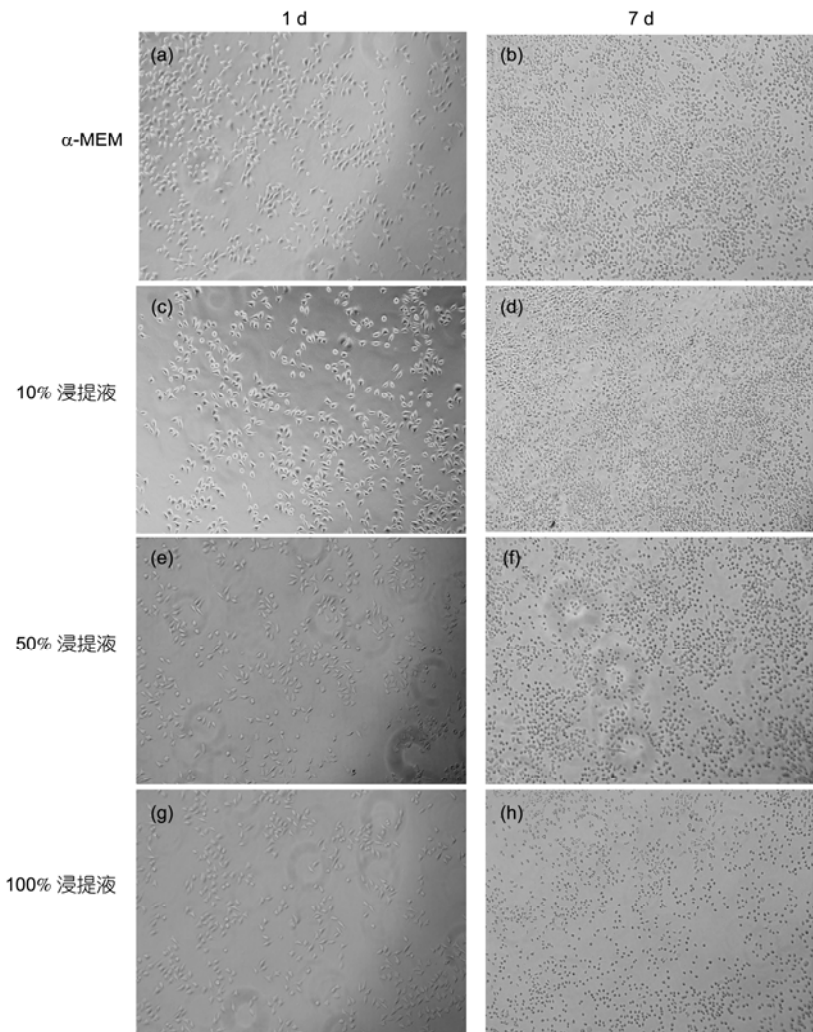


图 5 倒置相差显微镜下培养于不同浓度 NZK 合金浸提液中的细胞形态(×100)

表 4 不同组别吸光度(OD)及细胞相对增殖率(RGR)结果(n=6)

组别	1 d		4 d		7 d	
	OD (mean±SD)	RGR(%)	OD (mean±SD)	RGR(%)	OD (mean±SD)	RGR(%)
阴性对照组	0.180±0.027	100	0.323±0.072	100	0.374±0.062	100
10% NZK 合金	0.156±0.035	86.7	0.355±0.072 ^{a)}	109.9	0.388±0.072 ^{b)}	103.7
50% NZK 合金	0.154±0.014	85.6	0.333±0.011 ^{a)}	103.1	0.347±0.048 ^{b)}	92.8
100% NZK 合金	0.128±0.036	76.1	0.319±0.013 ^{a)}	98.8	0.327±0.029 ^{b)}	87.4

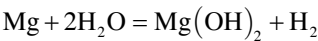
a) $P < 0.05$ vs. 1 d; b) $P < 0.05$ vs. 4 d

3 讨论

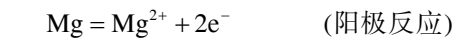
3.1 NZK 合金的降解行为

镁合金在溶液环境中很容易降解，尤其在富含氯离子的环境中，镁合金暴露于模拟体液中将发

生下列反应^[25]：



精确的反应过程如下：



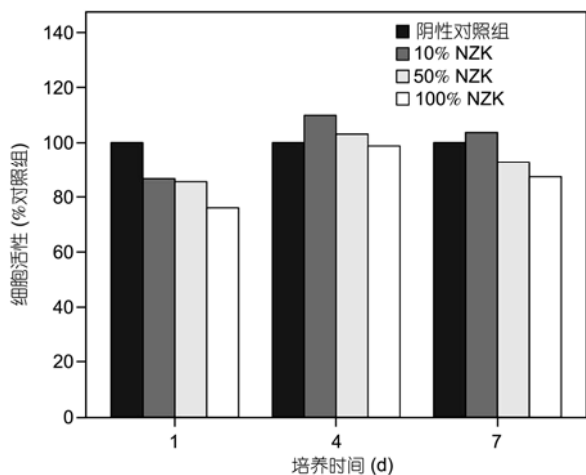
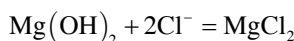


图 6 不同浓度浸提液中培养 1, 4 和 7 d 后细胞活性比较

通常镁合金在腐蚀介质中产生氧化膜, 其成分主要为 MgO 和/或 $\text{Mg}(\text{OH})_2$, 然而多孔或疏松的 MgO 和/或 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 并不能有效地保护镁合金, 其中, Cl^- 可将 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 转化成 MgCl_2 , 然后 MgCl_2 溶解形成 Mg^{2+} 和 2 个 Cl^- [17].



合金化是改变合金微观结构和提高镁合金腐蚀行为有效方法, 因此, 课题组经过合金热力学计算, 通过添加钕、锌、锆合金元素, 设计开发出了新型镁合金 NZK. 实验结果表明, NZK 合金比纯镁具有更高的耐腐蚀性(图 2). Witte 等人 [26] 添加稀土元素, 并进行体内降解实验, 结果表明添加稀土元素可降低镁合金的腐蚀速率. 锌是一种常见的合金元素, 它可克服杂质如铁和镍的腐蚀作用, 从而提高镁合金的耐腐蚀性能 [27]. Xu 等人 [28] 研究也表明锌的加入可提高镁合金的耐腐蚀性. 锆通常用来细化镁合金的晶粒, 从而提高合金的强度, 减少杂质对镁合金的腐蚀作用 [29,30]. 本课题组设计开发的 NZK 合金具有优越的耐腐蚀性能, 可能是由于钕、锌和锆合金元素不仅可使晶粒细化, 改变合金微观结构, 而且可减少杂质对镁合金的腐蚀作用; 同时, NZK 合金降解过程中的腐蚀产物沉积于表面形成的保护层(图 1(c)), 也是降低镁合金腐蚀速率的一个重要因素.

3.2 NZK 合金的生物相容性

植入材料必须具有良好的生物相容性, 因为材料植入人体后直接与人体组织和细胞接触, NZK 合

金作为一种新型可降解医用生物材料必须对其生物相容性和生物安全性进行评估.

通过溶血实验和细胞毒性实验测试了 NZK 合金的体外生物相容性. 溶血是血红蛋白从溶解的红细胞释放的现象. 溶血除了红细胞膜和血红蛋白异常等内源性因素外, 也有一些外在因素, 如红细胞与材料表面接触后导致细胞毒性或机械性损坏. 溶血实验显示钙磷涂层 NZK 合金溶血率为 4.8%(低于 5%), 表明钙磷涂层 NZK 合金不会造成严重的红细胞损害而导致溶血. 以往研究 [16] 表明, 未经处理的纯镁及其他镁合金(如镁锌锰合金)有明显的溶血现象, 可能是由于镁及其合金的降解速度过快, 溶液中高浓度的镁离子导致红细胞溶解. 而钙磷涂层 NZK 合金无明显溶血, 可能是因为添加钕、锌、锆合金元素可以提高镁合金的耐腐蚀性, 从而减缓镁离子的释放.

MTT 实验结果显示细胞在不同浓度浸提液中培养 1, 4 和 7 d 后, 在同一时间点, 细胞活性(OD 值)与阴性对照组相比无显著性差异($P>0.05$). 细胞在不同浓度浸提液中的相对增殖率均大于 75%, 细胞毒性为 0~1 级. 细胞在同一浓度浸提液中培养, 第 4 d 的细胞活性(OD 值)与第 1 d 的细胞活性(OD 值)相比较有显著差异($P<0.05$); 第 7 d 的细胞活性(OD 值)与第 4 d 的细胞活性(OD 值)相比较有显著差异($P<0.05$). MTT 实验结果表明, NZK 合金对 $\text{MC}_3\text{T}_3\text{-E}_1$ 细胞没有明显毒性作用, 具有优良的细胞相容性. 培养于浸提液中的 $\text{MC}_3\text{T}_3\text{-E}_1$ 细胞能很好地贴附于培养板底部, 随着培养时间增加, 细胞数量增加, 与对照组相比, 培养于浸提液中的 $\text{MC}_3\text{T}_3\text{-E}_1$ 细胞数量和形态在培养 1, 4 和 7 d 后没有显著差异, 表明 NZK 合金无明显的细胞毒作用, 不影响其正常功能.

综上所述, NZK 合金在模拟体液中可以逐渐降解, 具有优良的体外生物相容性, 有望成为新的骨科植入材料. 然而, 本研究也存在一定的局限性, 首先, 静态浸泡实验不可能完全模拟实际人体的生理条件, 因为人体体液循环是动态的; 其次, 离子浓度在人体不同部位的分布不同 [31]. 尽管 NZK 合金在体外具有优良的生物相容性, 但仍需进行体内研究以验证和补充体外实验结果.

4 结论

本实验对 NZK 合金体外降解行为、血液相容性和细胞相容性进行了研究, 从实验结果可以得出以

下结论: (1) 添加合金元素钕、锌、锆可以提高镁合金的耐腐蚀性; (2) 在模拟体液中静态浸泡后, 沉积于NZK合金表面的腐蚀产物可形成保护层; (3) 钙磷涂层NZK合金的溶血率为4.8%, 表明钙磷涂层NZK合金不会导致红细胞明显溶血, 具有优良的血液相容性; (4) 细胞毒性试验表明 NZK合金浸提液对

MC₃T₃-E₁细胞无明显细胞毒性, 具有优良的细胞相容性。

总之, 添加钕、锌、锆合金元素可以改善镁合金的耐腐蚀性, 体外溶血实验和细胞毒性实验均表明NZK合金具有良好的生物相容性, 有望成为新的骨科植入材料。

参考文献

- 1 Staiger M P, Pietak A M, Huadmai J, et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials*, 2006, 27: 1728–1734
- 2 Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomater*, 2010, 6: 1680–1692
- 3 He Y H, Tao H R, Zhang Y, et al. Biocompatibility of bio-Mg-Zn alloy within bone with heart, liver, kidney and spleen. *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 484–491
- 4 Zhang S, Zhang X, Zhao C, et al. Research on an Mg-Zn alloy as a degradable biomaterial. *Acta Biomater*, 2010, 6: 626–640
- 5 Xin Y, Hu T, Chu P K. *In vitro* studies of biomedical magnesium alloys in a simulated physiological environment: A review. *Acta Biomater*, 2011, 7: 1452–1459
- 6 Zberg B, Uggowitzer P J, Löffler J F. MgZnCa glasses without clinically observable hydrogen evolution for biodegradable implants. *Nat Mater*, 2009, 8: 887–891
- 7 Li Z, Gu X, Lou S, et al. The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials*, 2008, 29: 1329–1344
- 8 Williams D. New interests in magnesium. *Med Device Technol*, 2006, 17: 9–10
- 9 Gu X, Zheng Y, Cheng Y, et al. *In vitro* corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys. *Biomaterials*, 2009, 30: 484–498
- 10 Xu L P, Yu G N, Zhang E L, et al. *In vivo* corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 83: 703–711
- 11 Witte F, Kaese V, Haferkamp H, et al. *In vivo* corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials*, 2005, 26: 3357–3363
- 12 Lambotte A. L'utilisation du magnésium comme matériel perdu dans l'ostéosynthèse. *Bull Mem Soc Nat Chir*, 1932, 28: 1325–1334
- 13 McBride E D. Absorbable metal in bone surgery. *J Am Med Assoc*, 1938, 111: 2464–2467
- 14 Witte F, Ulrich H, Rudert M, et al. Biodegradable magnesium scaffolds: Part I. Appropriate inflammatory response. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 81: 748–756
- 15 Witte F, Ulrich H, Palm C, et al. Biodegradable magnesium scaffolds: Part II. Peri-implant bone remodeling. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 81: 757–765
- 16 Witte F, Feyereabend F, Maier P, et al. Biodegradable magnesium-hydroxyapatite metal matrix composites. *Biomaterials*, 2007, 28: 2163–2174
- 17 Gu X, Zheng Y, Zhong S, et al. Corrosion of, and cellular responses to Mg-Zn-Ca bulk metallic glasses. *Biomaterials*, 2010, 31: 1093–1103
- 18 Xu L, Pan F, Yu G, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy. *Biomaterials*, 2009, 30: 1512–1523
- 19 Yuan G Y, Zhang X B, Ding W J. Magnesium alloys and its fabrication methods for use in orthopaedic applications. PRC Patent, ZL 201010252357.0
- 20 Rondelli G, Torricelli P, Fini M, et al. *In vitro* corrosion study by EIS of a nickel-free stainless steel for orthopaedic applications. *Biomaterials*, 2005, 26: 739–744
- 21 American Society for Testing and Materials. Standard practice for laboratory immersion corrosion testing of metals. Annual book of ASTM standards, Philadelphia, PA, USA, 2004
- 22 ISO 10993. Biological evaluation of medical devices—Part 4: Selection of tests for interactions with blood, 2002
- 23 ISO 10993. Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for cytotoxicity: *In vitro* methods, 1999
- 24 ISO 10993. Biological evaluation of medical devices—Part 12: Sample preparation and reference materials, 2002

- 25 Witte F, Hort N, Vogt C, et al. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 2008, 12: 63–72
- 26 Witte F, Fischer J, Nellesen J, et al. *In vitro* and *in vivo* corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials*, 2006, 27: 1013–1018
- 27 Huan Z G, Leeftang M A, Zhou J, et al. *In vitro* degradation behavior and cytocompatibility of Mg-Zn-Zr alloys. *J Mater Sci Mater Med*, 2010, 21: 2623–2635
- 28 Xu L, Zhang E, Yin D, et al. *In vitro* corrosion behaviour of Mg alloys in a phosphate buffered solution for bone implant application. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19: 1017–1025
- 29 Babkin V M. Effect of zirconium on the grain size of magnesium containing 4.5% Zn. *Met Sci Heat Treat*, 2004, 5: 543–544
- 30 Song G, John D. The effect of zirconium grain refinement on the corrosion behavior of magnesium-rare earth alloy MEZ. *J Light Met*, 2002, 1: 1–16
- 31 Lévesque J, Hermawan H, Dubé D, et al. Design of a pseudo-physiological test bench specific to the development of biodegradable metallic biomaterials. *Acta Biomater*, 2008, 4: 284–295