



·论著·

Mg-Zn-Nd-Zr 镁合金浸提液对神经细胞活性和分化的影响

蒋欣宸¹, 吴沛¹, 何超鹏², 段答¹, 卓毅¹, 李文水¹, 卢明¹

1. 湖南师范大学第二附属医院(解放军联勤保障部队第921医院)

神经外科/神经修复学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410003

2. 湖南师范大学第二附属医院(解放军联勤保障部队第921医院)

骨科, 湖南长沙 410003

摘要:目的 研究 Mg-Zn-Nd-Zr 镁合金浸提液对神经细胞活性和分化的影响。方法 制备 Mg-Zn-Nd-Zr 镁合金浸提液, 实验分组: 对照组、稀释1倍组、稀释2倍组、稀释3倍组、稀释10倍组。通过 MTT 法、流式细胞术、WB、CCK-8 法、RT-PCR、免疫荧光法检测 Mg-Zn-Nd-Zr 镁合金对神经细胞活性和分化的影响。结果 与对照组相比, 各实验组的星形胶质细胞和神经干细胞细胞死亡率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。各组星形胶质细胞处于 G₀/G₁ 期及 G₂/M 期的细胞比例, 差异无统计学意义($P>0.05$)。稀释10倍组中星形胶质细胞处于 S 期的细胞比例减少($P<0.05$)。与对照组相比, 稀释10倍组和稀释3倍组中星形胶质细胞的 PCNA 蛋白表达量增加, 而稀释2倍组和稀释1倍组中星形胶质细胞的 PCNA 蛋白表达量减少($P<0.05$)。与对照组相比, 稀释10倍组和稀释3倍组中神经干细胞的 PCNA mRNA 表达增加以及 Bax、bcl-2 的 mRNA 表达减少, 而稀释2倍组中神经干细胞的 PCNA mRNA 表达减少, 稀释1倍组中神经干细胞 Bax、bcl-2 的 mRNA 表达增加($P<0.05$)。神经干细胞在稀释10倍组的浸提液中可分化为神经元及星形胶质细胞。结论 Mg-Zn-Nd-Zr 镁合金浸提液对神经细胞无明显细胞毒性。在稀释10和3倍时能促进星形胶质细胞和神经干细胞的增殖, 而且稀释10倍时能促进神经干细胞向神经元及星形胶质细胞分化。但稀释2倍组和稀释1倍组的星形胶质细胞和神经干细胞凋亡增加。[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(4): 343-348.]

关键词: 星形胶质细胞; Mg-Zn-Nd-Zr 镁合金; 神经干细胞

中图分类号: R741

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.04.005

Effect of Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy on the activity and differentiation of neural cells

JIANG Xin-Chen¹, WU Pei¹, HE Chao-Peng², DUAN Da¹, ZHUO Yi¹, LI Wen-Shui¹, LU Ming¹

1. Hunan Key Laboratory of Neurorestoratology/Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital (the 921st Hospital of PLA), Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410003, China

2. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital (the 921st Hospital of PLA), Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410003, China

Corresponding author: LU Ming, Email: lumings163@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy on the activity and differentiation of neural cells. **Methods** Preparation of different concentrations of the Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy extracts, experimental groups: control group, diluted 1 times, 2 times, 3 times, 10 times groups. The effects of Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy extracts on the activity of astrocytes were evaluated by MTT method. The cell cycle of astrocytes was detected by flow cytome-

基金项目: 国家自然科学基金项目(81371358); 湖南省教育厅研究生科研创新项目(CX2018B240); 湖南省教育厅科学研究基金(16B159)

收稿日期: 2020-11-13; 修回日期: 2021-07-18

作者简介: 蒋欣宸, 女, 医师, 硕士, 主要从事神经外科学及神经修复研究。

通信作者: 卢明, 男, 主任医师, 博士, 主要从事神经外科学及神经修复研究, Email: lumings163@163.com。

try, and the expression of related proliferative proteins was detected by Western blot. The neural stem cells were tested for the cytotoxicity of the Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy extracts after one day and three days by cck-8 method. The RT-PCR assay extracts of each group on the gene expression of PCNA, BAX, BCL-2 of neural stem cells, neural stem cells were finally induced to differentiate at the concentration of the Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy extracts that promoted neural stem cell differentiation, and differentiated cells were identified by immunofluorescence. **Results** There was no statistical difference in astrocyte and neural stem cell mortality compared to controls, with the proportion of astrocytes in the 10x group increased and the decrease in phase S. PCNA protein expression was significantly increased in the 10x and 3x groups and decreased in the 2x and 1x groups. Compared with control groups, PCNA mRNA expression in Bax, bcl-2 in the 10x and 3x groups, the 2x group, and a significant increase in mRNA expression of neural stem cell Bax, bcl-2 in the 1x group. Neural stem cells can differentiate into neurons and astrocytes in 10x group extracts. **Conclusions** Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy can promote the proliferation of astrocytes at the dilution of 10x and PCNA protein expression at the dilution of 3x group. At the same time, Bax and bcl-2 genes were down-regulated at the dilution of 10x group. However, at the dilution of 1x and 2x group, astrocyte cell cycle and neural stem proliferation were affected by high concentrations of the Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy extracts. The differentiation of neural stem cells into astrocytes and neurons could be promoted by the dilution of 10x group of Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy extract. However, apoptosis of astrocytes and neural stem cells occurred in 1x and 2x group. According to the experimental results, it can be seen that the Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy has good biocompatibility with nerve cells and can be used for the next animal experiment.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(4): 343-348.]

Keywords: astrocytes; Mg-Zn-Nd-Zr magnesium alloy; neural stem cells

由于力学性能与骨组织非常接近,同时拥有较好的生物相容性及生物安全性,镁合金被广泛应用于医用植入材料中。但镁合金也有着降解速率过快等问题^[1]。有研究发现稀土元素的加入可提高镁合金的支撑性和耐腐蚀性,并且稀土元素与细胞有特殊的亲和力,适量添加对细胞生长有着积极的作用^[2],但稀土镁合金材料对植入部位细胞是否存在不良的影响,还需要进一步的研究。本研究旨在研究 Mg-Zn-Nd-Zr 镁合金(JDBM)浸提液对星型胶质细胞(astrocytes, AS)和神经干细胞(neural stem cells, NSCs)活性和分化的影响,进一步探讨稀土镁合金运用于脑部骨组织替代材料的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 JDBM由复旦大学提供,SD大鼠及孕鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、DMEM/F12培养基购于美国 Invitrogen 公司,巢蛋白抗体、STRO-1 抗体购于美国 Abcam 公司, B27、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、多聚赖氨酸购于美国 Sigma 公司,荧光二抗购于美国 Santa Cruz 公司, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色剂购于瑞士 Roche 公司。

1.1.2 实验仪器 美国 Beeton Dickinson 流式细胞仪,美国 Corning 细胞培养瓶,美国 Thermo Forma 生物安全柜及恒温二氧化碳 CO₂ 培养箱,美国 PALL 纯水机,德国 Leica

荧光显微镜,日本 SANYO 超低温冰箱,日本 Olympus 倒置显微镜,中国天津市医用离心机厂低温高速离心机。

1.2 试验方法

1.2.1 培养 AS 及 NSCs 取 SD 大鼠大脑半球获取 AS,使用含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养细胞,置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中。取胎鼠额叶大脑皮质组织获取 NSCs,接种于培养瓶,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中。

1.2.2 制备 JDBM 浸提液及实验分组 将 JDBM 合金置于超净工作台紫外线照射灭菌 30 min 及高温蒸汽灭菌 30 min,放入 DMEM/F12、10%FBS 中,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中浸提 72 h,按比例稀释浸提液,分成稀释 1 倍组、稀释 2 倍组、稀释 3 倍组、稀释 10 倍组和对照组共 5 组,调整 pH 值为 7.3,4℃冰箱内保存。

1.2.3 MTT 法评估细胞活性 将 AS 消化成细胞悬液,接种培养 1 d,贴壁后将培养基更换成浸提液,孵育 24 h。每孔加入 10 μL MTT 溶液,4 h 后测量各组在 490 nm 波长处的光密度即 OD₄₉₀,细胞存活率=(实验 OD₄₉₀/对照 OD₄₉₀)×100%。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期 将 AS 消化成细胞悬液,加入冷乙醇 1.2 mL,调节浓度为 75%,4℃放置 12 h 固定。去除乙醇后加入 150 μL 碘化乙啶(PI)液,在 4℃条件下避光染色 30 min。上机检测分析 PI 荧光直方图上各细胞周期的百分率。

1.2.5 Western blotting 检测相关增殖蛋白的表达 提取 AS 总蛋白,调配工作液,按 0、1、2、3、4、5 及 6 μL 分别加

到96孔板中,并稀释成每孔20 μL 。再加入200 μL BCA工作液,置于37℃下30 min。测定A562,540~595 nm之间的波长。根据标准曲线计算出蛋白浓度,保证样品浓度为2~4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。通过电泳、转膜、封闭,然后加入一抗,4℃下孵育12 h。加入二抗,以1:6 000的比例稀释兔抗(R),1:5 000的比例稀释鼠抗(M),4℃孵育1.5 h。用ECL化学发光液与膜孵育3 min,曝光,冲洗胶片。

1.2.6 CCK-8法检测NSCs的细胞增殖能力 将NSCs消化成细胞悬液接种于96孔板内,加入浸提液100 μL 。在第24和72小时加入10 μL CCK-8溶液,4 h后用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(A值)。细胞增殖率=(A实验-A空白)/(A对照-A空白) $\times 100\%$ 。

1.2.7 RT-PCR检测mRNA的表达 搜索目的基因的序列,并运用Primer 5软件对引物进行设计,由生工生物工程(上海)有限公司合成引物,检测各组细胞增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, BCL-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白(BCL2-associated X, BAX) mRNA的表达。

1.2.8 免疫荧光方法检测细胞分化能力 将NSCs消化成细胞悬液接种于6孔板上,实验分组为:对照组及稀释10倍浸提液组,诱导分化后行免疫染色鉴定。将细胞样本用5%牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)封闭1 h;滴加一抗[nestin、胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)+ β III-Tubulin],4℃孵育过夜。然后滴加二抗(抗小鼠IgG),37℃孵育1.5 h;加入DAPI工作液37℃孵育10 min,用90%甘油封片,在荧光显微镜下观察。

1.3 统计学方法

所有数据分析采用SPSS 17.00统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JDBM浸提液与神经细胞的生物相容性

在倒置显微镜下观察,AS细胞形态呈椭圆形、梭形及不规则形,随着培养时间增长,AS体积逐渐增加,伴随着细长分支增加(图1A)。以及细胞突起增加(图1B)。在荧光显微镜下观察可见,红色部分为GFAP标记阳性(图1C、1D)。原代NSCs在培养基中分裂形成2~4个细胞的细胞团,细胞悬浮,成球形,无突起(图2A)。免疫荧光染色显示NSCs Nestin抗原表达阳性(图2B)。

各组AS细胞的相对死亡率均在20%以下,与对照组相比,各实验组的AS死亡率无差异($P>0.05$)。见表1。

参照细胞相对增殖度分级表(表2),各组NSCs细胞毒性分级为0级或1级,安全性合格。与对照组相比,各实验组的NSCs细胞增殖率无差异($P>0.05$)。见表3。

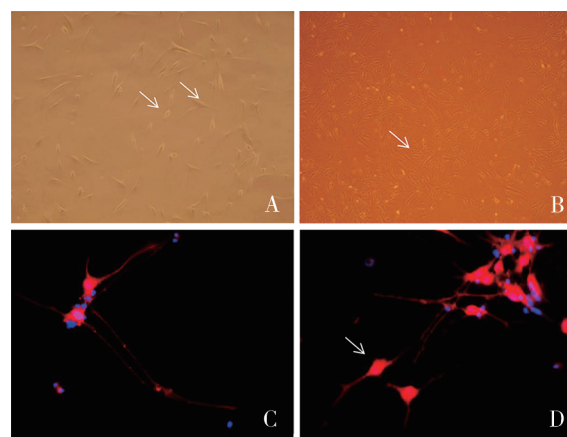


图1 AS的形态学特征
A:原代AS培养3 d后(箭头所指)($\times 100$); B:AS传代7 d后(箭头所指)($\times 100$); C:GFAP染色阳性(箭头所指)($\times 200$); D:增殖活跃期GFAP染色阳性(箭头所指)($\times 200$)。

图1 AS的形态学特征

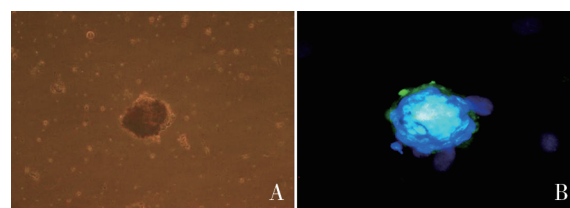


图2 NSCs的形态学特征
A:培养7 d后 NSCs 形态($\times 100$); B:NSCs 表达其标志物 nestin ($\times 200$)。

图2 NSCs的形态学特征

表1 浸提液浓度对AS细胞死亡率的影响以及PCNA蛋白表达情况 ($n=3$)

组别	细胞死亡率/%	PCNA蛋白表达量
对照组	17.071 \pm 1.014	0.412 \pm 0.005
稀释10倍组	15.572 \pm 4.496	0.426 \pm 0.004 ^①
稀释3倍组	17.004 \pm 5.938	0.528 \pm 0.002 ^①
稀释2倍组	18.622 \pm 2.269	0.369 \pm 0.007 ^①
稀释1倍组	19.303 \pm 3.595	0.305 \pm 0.003 ^①
F值	0.437	978.300
P值	0.780	0.000

注:①与对照组比较, $P<0.05$ 。

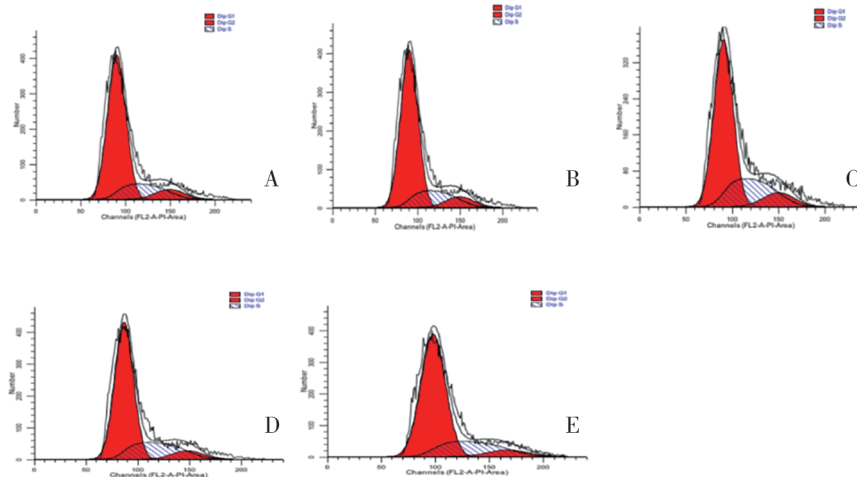
表2 细胞毒性反应分级

RGR(%)	毒性分级
≥ 100	0
75~<100	1
50~<75	2
25~<50	3
1~<25	4
0~<1	5

注:参照《中华药典》细胞毒性检查法,根据相对增殖率(RGR)=(实验组平均OD值/对照组平均OD值) $\times 100\%$,毒性分级为0和1级时,判定为安全性合格;毒性2级时,需结合细胞形态判定安全性;毒性3~5级时,判定为安全性不合格^[3]。

表3 NSCs OD值、RGR和HASC细胞分级 (n=3)

组别	培养第1天 OD值	培养第1天RGR%	毒性分级	培养第3天 OD值	培养第3天RGR%	毒性分级
对照组	0.233±0.018	100	0	0.241±0.017	100	0
稀释10倍组	0.249±0.013	107	0	0.251±0.006	104	0
稀释3倍组	0.242±0.015	103	0	0.252±0.014	101	0
稀释2倍组	0.223±0.030	95	1	0.230±0.006	95	1
稀释1倍组	0.223±0.033	95	1	0.227±0.016	94	1
F值	0.737	—	—	2.467	—	—
P值	0.588	—	—	0.113	—	—



A:对照组; B:稀释10倍组; C:稀释3倍组; D:稀释2倍组; E:稀释1倍组

图3 浸提液对AS细胞周期的影响

表4 各组AS细胞周期统计情况 (n=3)

组别	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
对照组	67.87±2.430	8.84±1.670	23.28±1.490
稀释10倍组	74.98±1.314	6.83±0.960	18.11±1.53 ^①
稀释3倍组	71.13±1.266	7.47±1.543	21.41±0.066 ^②
稀释2倍组	68.77±2.564	8.16±1.966	23.17±1.753 ^②
稀释1倍组	66.72±0.818	8.48±1.037	24.8±0.070 ^{②③}
F值	0.917	0.884	12.860
P值	0.491	0.507	0.001

注:①与对照组比较, $P<0.05$; ②与稀释10倍组比较, $P<0.05$; ③与稀释3倍组比较, $P<0.05$ 。

2.2 JDBM浸提液对AS和NSCs细胞增殖的影响

各组AS中处于G₀/G₁期及G₂/M期的细胞比例无差异($P>0.05$)。而各组AS中处于S期的细胞比例比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),与对照组相比,处于S期的细胞比例减少,具有统计学意义($P<0.05$)。见表4,图3。

各组PCNA蛋白表达量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,稀释10倍组和稀释3倍组的PCNA蛋白表达量增加,而稀释2倍组和稀释1倍组的PCNA蛋白表达量减少,具有统计学意义($P<0.05$)。见表2,图4。

各组NSCs的PCNA、BAX、BCL-2的mRNA相对表达

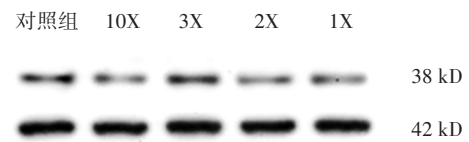


图4 AS的PCNA蛋白表达琼脂糖凝胶电泳

量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,稀释10倍组和稀释3倍组PCNA mRNA表达增加,稀释1倍组Bax、bcl-2的mRNA表达增加,而且稀释10倍组的PCNA mRNA表达量高于其他三组实验组,具有统计学意义($P<0.05$)。见表5。

表5 NSCs的PCNA、BAX、BCL-2的mRNA相对表达情况 (n=3)

实验分组	PCNA相对表达量	BAX相对表达量	BCL-2相对表达量
对照组	1.000±0.047	1.000±0.0115	1.000±0.153
稀释10倍组	1.621±0.026 ^①	0.923±0.093	0.928±0.208
稀释3倍组	1.311±0.05 ^{①②}	0.806±0.056	1.018±0.143
稀释2倍组	0.831±0.116 ^{②③}	1.055±0.181	1.368±0.145
稀释1倍组	0.845±0.122 ^{②③}	1.371±0.082 ^{①②③④}	1.627±0.170 ^{①②③}
F值	51.260	13.090	9.768
P值	0.000	0.001	0.002

注:①与对照组比较, $P<0.05$; ②与稀释10倍组比较, $P<0.05$; ③与稀释3倍组比较, $P<0.05$; ④与稀释2倍组比较, $P<0.05$ 。

2.3 JDBM浸提液对NSCs分化的影响

由稀释10倍浸提液诱导后的NSCs可以表达神经元标志物 β III-tubulin(图5A)及AS标志物GFAP(图5B)。与对照组相比,表达标志物阳性的细胞数量增多,细胞体积增大而且突起增多。

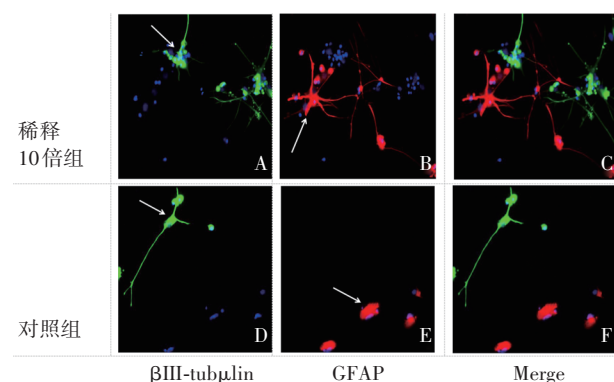


图5 NSCs诱导分化后 β III-tubulin染色阳性(箭头所指)、GFAP染色阳性(箭头所指)($\times 400$)

3 讨论

镁合金普遍应用于组织替代材料^[4]。其主要优点有:①镁合金的力学性能与骨组织非常接近。镁合金的密度约为 $1.7\sim 2.0\text{ g/cm}^3$,十分接近人体骨组织的密度($1.8\sim 2.1\text{ g/cm}^3$);镁合金的弹性模量与人骨相近,相近的弹性模量可减轻由于明显的载荷不匹配而导致的应力屏蔽作用^[5];②镁合金拥有较好的生物相容性和生物安全性, Mg^{2+} 在细胞内含量丰富,参与300种已知的酶反应^[6]。研究已经证实 Mg^{2+} 可以促进受损骨组织的愈合,维持成骨细胞的增殖^[7]。③体内可降解。镁在水溶液中降解所释放的适量的镁离子是安全的,一个健康的成年人体内需要每日需要摄入 $250\sim 350\text{ mg}$ 的镁^[8],多余的镁离子能够被组织吸收及随着尿液代谢。然而,目前镁合金作为医用替代材料也有其局限性。研究表明,镁合金在体内会与其他离子反应,产生 H_2 ,可能延缓组织的愈合,导致组织坏死^[9]。而且,镁合金在体内降解后产生的OH⁻可能导致植入部位pH值的升高^[10]。因此研究如何提高镁合金的耐蚀性是一个十分关键的问题。有研究发现在不会降低细胞活性的前提下,添加稀土元素后可提高镁合金的支撑性和耐腐蚀性^[2]。WILLBOLD等^[11]探究了添加稀土元素(镧、钆、铈)对镁的生物降解性和生物相容性的影响,结果显示,稀土镁合金不会引起全身或者局部的细胞毒理反应。张佳等^[12]分析了Mg-Nd-Zn-Zr(JDBM)与高纯镁的腐蚀过程,实验表明:在模拟体液的环境中,JDBM合金与高纯镁的抗腐蚀性能十分相近。朱兆金等^[13]通过提取JDBM浸提液与细胞培养,结果发现JDBM浸提液无明显细胞毒性和细胞凋亡现象。由此可见稀土元素能够提高镁合金的性能^[14]。

AS是数量最多的神经胶质细胞^[15],本研究细胞毒性结果显示:各组AS细胞的相对死亡率均在20%以下,毒性评级为1级,与对照组相比,各实验组的AS细胞死亡率无统计学差异。细胞周期检测结果显示:与对照组相比,稀释10倍组中处于S期的细胞比例减少。各组AS细胞进行PCNA蛋白表达结果显示,与对照组相比,稀释10倍组和稀释3倍组的PCNA蛋白表达量增加,而稀释2倍组和稀释1倍组的PCNA蛋白表达量减少。综合结果可知,稀土镁合金浸提液对AS无明显细胞毒性,而低浓度浸提液能促进AS增殖。

中枢神经系统(CNS)神经元损伤后很难再生,导致神经功能丧失^[16]。NSCs可以分化为神经元、少突胶质细胞和AS^[17],在修复各种病理引起的神经细胞缺失病变中发挥重要作用。本实验结果显示:在培养第1和3天,各组NSCs细胞毒性分级为0级或者1级,与对照组相比,各实验组的NSCs细胞增殖率差异无统计学意义,说明JDBM对NSCs无细胞毒性。RT-PCR结果提示:与对照组相比,稀释10倍组和稀释3倍组PCNA mRNA表达增加,稀释1倍组Bax、bcl-2的mRNA表达增加,而且稀释10倍组的PCNA mRNA表达量高于其他三组实验组,具有统计学意义,说明低浓度的浸提液能促进NSCs的增殖。然后用对促进细胞增殖影响最大的浓度(稀释10倍)对NSCs进行诱导分化,显示神经元标志物 β III-tubulin及AS标志物GFAP表达阳性,而且与对照组相比,表达标志物阳性的细胞数量增加,细胞体积增大而且突起增多。这说明适当浓度的JDBM浸提液能促进NSCs的增殖和分化。

综上所述,Mg-Zn-Nd-Zr镁合金与神经细胞有着良好的生物相容性,无细胞毒性。适当浓度的JDBM浸提液可以促进AS和NSCs的增殖,还能促进NSCs向AS和神经元分化。该研究为JDBM运用于脑部骨组织替代材料奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 张庆鑫. Ce/La混合稀土对Mg-Zn-Ca合金组织转变、力学性能及耐蚀性的影响机制[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [2] FEYERABEND F, FISCHER J, HOLTZ J, et al. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines[J]. Acta Biomater, 2010, 6(5): 1834-1842.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典—一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [4] ZHAO DW, WITTE F, LU FQ, et al. Current status on clinical applications of magnesium-based orthopaedic implants: a review from clinical translational perspective[J]. Biomaterials, 2017, 112: 287-302.
- [5] KAMRANI S, FLECK C. Biodegradable magnesium alloys as temporary orthopaedic implants: a review[J]. Biometals, 2019, 32(2): 185-193.

- [6] HE S, PENG WB, ZHOU HL. Combination treatment of deep sea water and fucoidan attenuates high glucose-induced insulin-resistance in HepG2 hepatocytes[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(2): 48.
- [7] DOU YA, LI N, ZHENG YF, et al. Effects of fluctuant magnesium concentration on phenotype of the primary chondrocytes[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(12): 4455-4463.
- [8] KHAYAT S, FANAEI H, GHANBARZEHI A. Minerals in pregnancy and lactation: a review article[J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(9): QE01-QE05.
- [9] REZK AI, RAMACHANDRA KURUP SASIKALA A, NEJAD AG, et al. Strategic design of a mussel-inspired in situ reduced Ag/Au-nanoparticle coated magnesium alloy for enhanced viability, antibacterial property and decelerated corrosion rates for degradable implant applications[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 117.
- [10] WONG CC, WONG PC, TSAI PH, et al. Biocompatibility and osteogenic capacity of Mg-Zn-Ca bulk metallic glass for rabbit tendon-bone interference fixation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2191.
- [11] WILLBOLD E, GU XN, ALBERT D, et al. Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium[J]. *Acta Biomater*, 2015, 11: 554-562.
- [12] 张佳, 宗阳, 袁广银, 等. 新型医用 Mg-Nd-Zn-Zr 镁合金在模拟体液中的降解行为[J]. *中国有色金属学报*, 2010, 20(10): 1989-1997.
- [13] 朱兆金. 骨科新型医用可降解植入材料 JDBM 镁合金的生物毒性、髓内针及植入物感染细菌生物膜的基础研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [14] DING J, LIU X, WANG YJ, et al. Effect of Sn addition on microstructure and corrosion behavior of as-extruded Mg-5Zn-4Al alloy[J]. *Materials (Basel)*, 2019, 12(13): 2069.
- [15] PAYÁN-GÓMEZ C, RODRÍGUEZ D, AMADOR-MUÑOZ D, et al. Integrative analysis of global gene expression identifies opposite patterns of reactive astrogliosis in aged human prefrontal cortex[J]. *Brain Sci*, 2018, 8(12): 227.
- [16] VAN DER MERWE Y, FAUST AE, SAKALLI ET, et al. Author correction: matrix-bound nanovesicles prevent ischemia-induced retinal ganglion cell axon degeneration and death and preserve visual function[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15799.
- [17] NATU R, MARTINEZ-DUARTE R. Numerical model of streaming DEP for stem cell sorting[J]. *Micromachines (Basel)*, 2016, 7(12): 217.

责任编辑:王荣兵