



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

### Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90 - 2314-B-038-033

執行期限：90年08月01日至91年07月31日

主持人：林哲堂教授 台北醫學大學口腔醫學院

共同主持人：李勝揚教授台北醫學大學口腔復健醫學研究所

#### 一、中文摘要

人工牙根植入後仍需三至六個月頗為漫長的癒合時間，且其骨整合程度經常不如預期，因此進行其鈦金屬之表面處理，以有效縮短骨癒合時間並強化骨整合，就變得格外重要。本研究利用低溫電漿來活化鈦金屬表面以連接第一型膠原蛋白。鈦金屬表面先以丙烯胺電漿處理，使附著上胺基(-NH<sub>2</sub>)，再分別以不同濃度的交鏈劑 BS<sup>3</sup> 及戊二醛連接固定第一型膠原蛋白。而後以電子顯微鏡(SEM)觀察樣本的表面，以電子能譜儀(XPS)作定性分析，並以元素分析儀(SEM-EDS)作定性分析與半定量分析，檢測蛋白質於不同種類和濃度的交鏈劑處理下在鈦金屬表面連接的情況。SEM結果可見，實驗組的鈦金屬上有球型或海綿狀類似膠原蛋白之披覆。而XPS分析圖中顯示有 S、C、N、O、-C=O、C-H、N-C、-N= 等膠原蛋白的結構存在；並由SEM-EDS數據顯示，第一型膠原蛋白的量會隨著戊二醛或 BS<sup>3</sup> 濃度的升高而增加。經電漿與交鏈劑 BS<sup>3</sup> 或戊二醛的處理並固定第一型膠原蛋白後之實驗組類成骨細胞(MG 63)培養4小時後觀察(和對照組相比較)，可見骨細胞伸出無數觸角延伸向有膠原蛋白纖維處，培養24小時後，可見骨細胞型態變為扁平並平鋪且深入具有膠原蛋白纖維處。顯示使用電漿處理技術可達成鈦金屬表面胺基化，加上交鏈劑 BS<sup>3</sup> 或戊二醛的處理後，可使鈦金屬表面接上第一型膠原蛋白，且會隨著交鏈劑的濃度升高而增加，並可促進骨細胞生長。

**關鍵詞：**鈦金屬，低溫電漿，交鏈劑，第一型膠原蛋白

#### Abstract

One of the disadvantages for the dental implants is the six-month healing time. To shorten the healing time of osseointegration is an important issue for the dental implant development. Glow Discharge is a surface treatment to activate surface characters using gas plasma. Collagen is a key factor during the healing procedure and bone structuring. In this study, collagen connected titanium plates were evaluated in vitro. The titanium plates were treated by glow discharge with allylamine. Glow discharged titanium plates were connected with Type I collagen by amine cross-linking agents BS<sup>3</sup> or glutaraldehyde. The collagen-coated titanium plates were evaluated by their surface condition with scanning electron microscope-energy dispersive spectrometer (SEM-EDS) and X-ray photoemission spectroscopy (XPS). There were collagen components S、C、N、O detected on the titanium surfaces. And collagen structural bonds -C=O、C-H、N-C、-N= bonding were detected on the titanium surfaces by XPS. The data proved that collagen was successful grafted on the titanium surfaces. The counts of collagen were increased with the increase of concentrations of BS<sup>3</sup> or glutaraldehyde detected on the titanium surfaces by SEM-EDS. Osteoblast-like cells (MG 63) were cultured on the treated titanium plates for 4 or 24 hours. The result showed the osteoblast-like cells spread radically after 4 hours, and they were almost flat after 24 hours. Therefore, collagens were successful grafted on the titanium plates by glow discharge technology. This method could improve the spread of human osteoblasts and their possible growth..

**Keywords:** : Titanium, glow discharge, cross-linking agent, Type I collagen

#### 二、緣由與目的

人工牙根植體應用在口腔復健上至今已具有突破性發展，因為材料的精進，骨整

合觀念的提出與植牙技術的改善等，植牙的成功率也大幅地增加。然而植入後仍需三到六個月頗為漫長的癒合期<sup>1</sup>，且骨整合面積所佔的比例有限(< 70%)<sup>2</sup>，其骨整合程度常不如預期，所以如何縮短骨癒合時間並增加骨整合程度，就變得格外重要。

早在 1920 年，Langmuir 等人即研究電漿中的現象<sup>3</sup>，且在 1929 年 Langmuir 首先使用了「plasma」來敘述此一離子化氣體狀態，因其不同於固、液、氣三態，故電漿又稱為物質的第四態<sup>4</sup>。對物質施加高溫或以電磁場加速電子、離子給予能量，藉由加速粒子的碰撞傳遞能量，使得物質粒子產生激發、解離、裂解、離子化...等效應所形成的物質狀態，稱之為電漿。由低溫電漿產生的自由基有四種主要作用：蝕刻(etching)、剝離(ablation)、交聯(cross-linking)和表面活化(activation)。這四種作用同時會發生，但何種作用較佔優勢，則取決於程序 (processing conditions) 及反應室的設計。然而，這些影響只會在表面極少數的分子層 (約 100 Å)，所以不會改變基材的外觀與整體的性質。

電漿處理方法有電漿蝕刻(plasma etching)<sup>4</sup>，是利用如氫、氬氣等惰性氣體以及如氮、氧、氬氣等非聚合反應性氣體 (non-polymerizable reactive gas) 所產生的電漿來改變基材表面的結構。氫、氬所形成的電漿，可在高分子基材表面產生化學自由基與交聯的活性表面<sup>5</sup>。

而電漿聚合則是利用可聚合之有機物質氣體所產生的電漿在基材表面沉積出一層薄薄的聚合膜，具有高度的交聯與側鏈結構。電漿聚合反應亦可稱為電漿沉積聚合反應(plasma deposition polymerization)<sup>5</sup>。

丙烯胺(allylamine)可做為電漿聚合的單體<sup>6</sup>，經由低溫電漿作用後，產生裂解(degradation)與再結合(recombination)反應，可使基材表面上含有官能基一級胺，此一級胺可與交鏈劑作用。不同電漿氣體在胺基化反應的比較上，丙烯胺電漿比氬(ammonia)電漿所形成的胺基在基材表面更加穩定，甚至做完高溫高壓消毒後，還能保有 75% 以上的一級胺<sup>7</sup>。

膠原蛋白(collagen)廣泛存在於脊椎動物的結締組織中，是體內含量最豐富的結

構性纖維蛋白質，約佔體內蛋白質總量的 25~30%。而其中的第一型膠原蛋白(Type I collagen)則佔骨頭成分中 32% 左右。第一型膠原蛋白也是骨癒合初期必要的元素，能加速骨癒合的時間。此外，第一型膠原蛋白有促進細胞附著之生長功能，也可增加傷口癒合速度<sup>8</sup>。其生物相容性極佳<sup>9</sup>，具有生物塑性<sup>10</sup>，可抵抗身體組織所受到的拉力與延伸力。另外，第一型膠原蛋白可促進血小板凝集，具有止血功能<sup>19</sup>。在抗原性上，膠原蛋白分子除去兩端會引起免疫反應的 telopeptide 後，即成低抗原性材料，不易引起免疫反應<sup>19</sup>。

Davies 等人也發現骨頭和鈦金屬的界面上有豐富的膠原纖維<sup>11</sup>，且在有膠原纖維處亦可以檢測出鈣和磷，而在組織間液內也發現有網狀交織的膠原蛋白質，顯示在鈦金屬植體上的骨癒合與界面上的骨整合均需要大量膠原蛋白，才能達成骨頭礦化，以形成堅硬的骨質。

本研究乃以丙烯胺低溫電漿(glow discharge)與交鏈劑 BS<sup>3</sup> 或戊二醛來處理純鈦金屬表面，進而接上第一型膠原蛋白，以期改變鈦金屬表面性質，並促進骨細胞吸附及生長，以期能加速植體手術傷口的癒合及骨整合之進行。

### 三、結果與討論

#### SEM 觀察。

經由電漿處理並固定第一型膠原蛋白後之鈦金屬表面型態觀察發現，相較於對照組，在以 BS<sup>3</sup> 為交鏈劑的樣本上可見排列整齊且獨立的圓形或橢圓形的第一型膠原蛋白披覆在鈦金屬表面上。在以戊二醛為交鏈劑的樣本上，可清楚看到大量成片的膠原蛋白披覆在鈦金屬表面上。

#### EDS 元素分析結果

實驗組可見經由電漿與交鏈劑 BS<sup>3</sup> 處理並固定第一型膠原蛋白後之元素分析圖，顯示有碳、氧、氮、鈦元素。以 N/Cl ratio 代表第一型膠原蛋白的含量，比較兩組樣本中第一型膠原蛋白的含量，發現其會隨著交鏈劑濃度的升高而增多。

#### XPS 檢測

經由電漿處理後再加上 BS<sup>3</sup> 或戊二醛的處理並連接第一型膠原蛋白後，可見有 S、C、N、Ti、O 元素存在圖和 -C=O, C-H, N-C, -N= 鍵結存在。不使用電漿處理亦不使用任何交鏈劑的對照組樣本上，則測得有 C、Ti、O、C=O 卻不見有 S、N 和其他鍵結存在。而在經由電漿處理卻不使用交鏈劑的對照組樣本上，測得有 -C-N, -C-N-H 鍵結存在和 C、N、Ti、O 卻不見 S、-N= 存在。

#### 類成骨細胞培養

經電漿與交鏈劑 BS<sup>3</sup> 或戊二醛的處理並固定第一型膠原蛋白後之實驗組的類成骨細胞培養 4 小時後觀察，可見類成骨細胞伸出無數觸角延伸向有膠原蛋白纖維處，在較大倍數(5.0 K)下觀察戊二醛這組的大部分細胞仍可見隆起凸出的細胞核外型，但細胞質部分則沒入在第一型膠原蛋白中。培養 24 小時後，更可見類成骨細胞型態變為扁平並平鋪且深入具有膠原蛋白纖維處，而且戊二醛比 BS<sup>3</sup> 處理後的細胞型態更扁平且平鋪深入第一型膠原蛋白內，

#### 討 論

SEM 下所見實驗組的鈦金屬上有球型物體披覆，只能推測為膠原蛋白，繼續經由 SEM-EDS 檢測的對照組資料來看，並沒有像實驗組有碳、氧、和氮等元素存在，可以確定實驗組中所測得的上述元素確為膠原蛋白所有，而進一步地確認 SEM 下所見的球狀物與片狀披覆物極可能為第一型膠原蛋白質。XPS 檢測實驗組結果，可見經電漿與 BS<sup>3</sup> 處理並固定第一型膠原蛋白後含有 S、C、N、Ti、O 元素和 -C=O、C-H、N-C、-N= 鍵結。另外，經電漿與戊二醛處理並固定第一型膠原蛋白後，XPS 亦檢測出相同的結果；上兩組中的 S、C、N、O 元素和 -C=O、C-H、N-C、-N= 鍵結可能來自於第一型膠原蛋白。再由對照組來看，不使用電漿處理也不使用交鏈劑的對照組樣本上，測得有 C、Ti、O、C=O 卻不見 N 和其他鍵結存在，其中所測得的 C、O、C=O 可能為空氣中的氧氣與二氧化碳成分，而 Ti 則為鈦金屬樣本本身就一定含

有的元素；而在經由電漿處理卻不使用交鏈劑的對照組樣本上，測得有 C、N、Ti、O 和 -C-N, -C-N-H 鍵結卻不見 -N= 存在，其中 N 元素和 -C-N, -C-N-H 鍵結可能來自於丙烯胺電漿處理後披覆在鈦金屬表面的胺基。由此反觀實驗組中 S 與 -N= 的測得，極可能為第一型膠原蛋白所有。

SEM-EDS 半定量分析結果可見第一型膠原蛋白的含量大致隨交鏈劑的濃度升高而增加。交鏈劑而能連接蛋白質含量的多寡，可由 SEM-EDS 半定量檢測結果顯示，使用戊二醛比使用 BS<sup>3</sup> 更能使鈦金屬表面接有更多的第一型膠原蛋白，而且會隨著交鏈劑濃度升高而增多。而且以戊二醛作為交鏈劑這組的元素分析圖上，鈦元素的峰值很低，幾乎檢測不出，並不像 BS<sup>3</sup> 作為交鏈劑的元素分析圖，鈦元素的峰值很高，清楚且明顯，但鈦金屬是確實存在於樣本上，那戊二醛作為交鏈劑這組的鈦元素的峰值幾乎檢測不出的原因，可能是披覆在鈦金屬上的物質厚度大於 SEM-EDS 檢測時所能穿透的厚度(1-2  $\mu\text{m}$ )，故檢測不出鈦元素，而披覆在鈦金屬上的物質就是第一型膠原蛋白，因此以戊二醛作為交鏈劑這組的第一型膠原蛋白的厚度可能大於 1-2  $\mu\text{m}$ ，而 BS<sup>3</sup> 這組的第一型膠原蛋白的厚度則是小於 1-2  $\mu\text{m}$ ，故以戊二醛作為交鏈劑之樣本上的第一型膠原蛋白的厚度大於以 BS<sup>3</sup> 作為交鏈劑其樣本上的第一型膠原蛋白的厚度，另外，以 SEM 觀察鈦金屬表面第一型膠原蛋白披覆的情況也可發現以戊二醛作為交鏈劑之樣本上的第一型膠原蛋白的厚度的確比較厚。

越活化的骨細胞型態越是扁平且觸角越多<sup>12</sup>。而在經電漿與戊二醛處理並固定第一型膠原蛋白後所培養的類成骨細胞達到最扁平型態，並且平鋪並伸入在膠原蛋白質內，其觸角也最多，可見其類成骨細胞最為活化，顯示這組的處理方式是最能吸引類成骨細胞生長，而且這組的膠原蛋白質最厚，甚至可讓類成骨細胞完全沒入第一型膠原蛋白之中，這讓類成骨細胞不僅是生長在一個平面上，而且是生長在一個立體的空間上，可以預見若作為植體能吸引更多的成骨細胞生長並使成骨細胞和骨

質都能深入膠原蛋白質之間，與骨頭形成立體穩定的接合，而不是一個平面上的接合。

實驗結果顯示，含有第一型膠原蛋白的鈦金屬比未經任何處理的鈦金屬表面更能吸附骨細胞生長，因此人工牙根植體的鈦金屬表面若能披覆第一型膠原蛋白，可以合理推測其骨頭生長與骨整合完成時間將比未經任何處理的鈦金屬植體更快更好，以此披覆有第一型膠原蛋白的鈦金屬作為人工牙根植體材料，未來或可應用在骨質較差的病人，而一般病人也可多一項更好的選擇。若再加上第一型膠原蛋白具有攜帶藥物或骨質生長因子的特性<sup>13</sup>，未來的研究上，可依照不同的骨質情況，在鈦金屬表面上的第一型膠原蛋白內添加程度不等的藥物或骨質生長因子<sup>14</sup>以促進傷口癒合，增加骨生長，並加速骨整合，以有效縮短骨癒合時間。

#### 四、計畫成果自評

使用電漿處理技術達成鈦金屬表面胺基化加上交鍵劑 BS<sup>3</sup> 或戊二醛的處理後，可使鈦金屬表面接上第一型膠原蛋白質，並能吸附及促進類成骨細胞生長。而且此一研究為一跨領域之研究，具有相當高之發展潛力。

#### 五、參考文獻

- <sup>1</sup> Roberts WE. Bone tissue interface. *J Dent Educ*, 52: 804-890, 1988.
- <sup>2</sup> Brånemark P-I, Rydevik Björn L, Skalak Richard. Osseointegration in skeletal reconstructure and joint replacement, second international workshop on osseointegration in skeletal reconstruction and joint replacement. Rancho Santa FE, California, October 27-29, 1994. Quintessence publishing Co, Inc Press, USA, pp. 6, 1997.
- <sup>3</sup> Boenig, H.V. Plasma science and technology. Cornell University Press, USA, pp. 16-35, 1982.

- <sup>4</sup> B. Chapman. *Glow Discharge Processes – Sputtering and Plasma Etching*, Wiley University Press, New York, pp. 106-109, 1980.
- <sup>5</sup> Ih-Houng Loh, ScD, “Plasma surface modification in biomedical applications” Advanced Surface Technology Inc., Billerica, Massachusetts. *Medical Device technology*. Jan/Feb issues 1999.
- <sup>6</sup> Hoffman, A. S. Adsorption and immobilization of proteins on gas discharge-treated surfaces. *J. Appl. Polym. Sci. Symp*, 46: 341-359, 1990.
- <sup>7</sup> Jose G, Calderon. *J Biomed Mater Res*, 42: 597-603, 1998.
- <sup>8</sup> Takatsuka, M. Collagen. *Jpn J Artif Organs*, 7 (1): 12, 1982.
- <sup>9</sup> Fujisawa R, Kuboki Y. Bone matrix protein. *Japanese J. of clinical medicine*, 122(1-2): 119-22, 1998.
- <sup>10</sup> Fratzl P, Misof K, Zizak I, Rapp G, Amenitsch H, Bernstorff S. Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J. of Structure Biology*, 122(1-2): 119-22, 1998.
- <sup>11</sup> J. E. Davies, B. Lowenberg, and A. Shiga. The bone-titanium interface in vitro. *J Biomed Mater Res*, 24: 1289-1306, 1990.
- <sup>12</sup> M.A. Malik. Osteoblasts on hydroxylapatite, alumina and bone. *Biomaterials*, 13: 123-128, 1992.
- <sup>13</sup> Nishimura k. Effect of extracellular matrix and serum components on cellular adhesion an growth in vitro and in vivo. *Nichidai Koko Kagaku*. 16(2): 237-60, 1990.
- <sup>14</sup> J. M. Wozney. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci*, suppl 13: 149-156, 1990.