

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

電化學形成不同粗糙度於鈦金屬表面對細胞之影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-038-015-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：臺北醫學大學口腔復健醫學研究所

計畫主持人：林哲堂

計畫參與人員：歐耿良、楊政峰

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 2 月 10 日

電化學形成不同粗糙度於鈦金屬表面對細胞之影響

計畫編號：NSC91-2314-B-038-015

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：林哲堂 台北醫學大學口腔醫學院口腔科學研究所
計畫參與人員：歐耿良 台北醫學大學口腔醫學院口腔科學研究所
楊政峰 台北醫學大學口腔醫學院口腔科學研究所

一、中文摘要

鈦金屬/合金所具有良好之生物相容性及骨整合程度和其表面獨特的氧化鈦膜性質有關，且其表面之孔徑大小/粗糙度和細胞初始的攀附行為、增殖、分化亦息息相關。本研究目的即在探討鈦金屬表面不同氧化膜層厚度及不同孔徑大小對類骨母細胞 MG-63 行為的影響。分成不同氧化膜厚度及不同孔徑大小兩大組，皆以電化學方式之陽極氧化處理，前者是在定電壓下分別形成 40 nm, 80 nm 及 120 nm 之氧化膜厚度，而後者則以交流電在特定時間內分別形成 10 μm , 50 μm 及 100 μm 的孔徑。試樣製備完成且在無塵室加以清洗、消毒、分析後進行細胞培養，經 4 小時，1, 2, 4, 6, 8, 12 天分別對細胞的攀附、增殖作 MTT 的測試及觀察。結果顯示，當鈦試片之氧化膜層厚度增加時，造成金相結晶結構中氧/鈦原子組成比例(先由 1.616 增加到 1.834，再降至 1.404)及表面接觸角的改變。細胞初步附連行為在校正表面積因素(即令表面粗糙度相近)後，顯示和表面接觸角有關連性，接觸角越小細胞吸附濃度越高。在細胞增殖行為上，40 及 80 nm 氧化膜厚度的細胞濃度吸光值在後期第 8 天及第 12 天分別增加約 21.2% 及 15.4% ($P < 0.05$)。在不同孔徑組，細胞初步附連(4 小時)以 100 μm 孔徑

之細胞濃度吸光值最高且和最低之 10 μm 孔徑有顯著差異，細胞增殖後期(8, 12 天)則顯示兩種 machined surfaces (rough, smooth)及 10 μm 孔徑之表面細胞濃度較高。以本研究製備的條件下顯示，氧化膜在適當厚度內對細胞的附連及增殖是有利的，過厚則由於金相、結晶性、氧鈦原子組成比結構及表面物理性質的改變，並不利於細胞行為。而細胞的附連，除了表面接觸角外，表面粗糙度及所增加的表面積可能亦扮演相當重要的角色。

關鍵詞：陽極氧化，氧化鈦膜厚度，孔徑，細胞附連，增殖

Abstract

Many studies have shown that the excellent biocompatibility of titanium is due to its passive oxide film. The surface characteristics (pore sizes/roughness) of titanium implants are related to initial cell behaviors or osseointegration; however, the optimal surface design of dental implants for enhancing the rate and result of osseointegration remains unknown. The purpose of this study was to investigate the effects of various thicknesses of titanium oxide and pore sizes/roughness (micrometer range) on the initial attachment and proliferation of osteoblast-like cells (MG-63) to the implant surfaces *in vitro*. The

experiment was designed to examine 2 categories: A) thicknesses of the titanium oxide and B) pore sizes/roughness. Grade II titanium discs (10 x 10 x 3 mm) were electrochemically formed with various textures and surface topographies. Different current densities, voltages, and times used to control the thickness of the titanium oxide and to create different pore sizes on the titanium discs were studied. A mechanical stylus (2D) combined with scanning electron microscopy to measure the surface topography, and SIMS (secondary ion mass spectrometer) to detect the thickness of titanium oxide was also employed. Cell cultures were performed on the titanium discs under different conditions after materials were prepared and cleaned. The MTT test was used to investigate cell attachment and proliferation at different time periods (4 hours, and 1, 2, 4, 6, 8, and 12 days). Machined surfaces (rough and smooth) were used for comparisons. The results showed that the anodizing oxide layer contained TiO_2 in different phases (anatase, rutile, or brookite) and with Ti_3O_5 on a 120-nm-thick oxide layer. The optical density from the MTT test showed that cells significantly proliferated on titanium samples except with 50- and 100- μm pore sizes after 48 hours. Titanium oxide with thicknesses of 40 and 80 nm showed higher levels of cell proliferation with statistical significant differences on the 8th and 12th days. Titanium discs with 100- μm pore size showed the greatest optical density of initial cell attachment with a statistically significant difference compared with that of 10- μm pore size. Smaller pore sizes and smooth

surfaces presented greater cell proliferation than larger ones but no statistical significant difference was shown on the 8th and 12th days. Surface roughness with increased surface areas was considered, when the relationship between contact angle and cell attachment level was investigated in this work.

Keywords: anodization, titanium oxide thickness, pore size, cell attachment, proliferation.

二、計畫緣由與目的

目前牙科領域中，針對牙齒缺損病患的治療，除了傳統的固定贖復及活動假牙外，牙科植體已逐漸成為熱門選項之一。除了其各個元件及設計的最佳化是近年來方興未艾致力研究的主题外，如何造成快速有效骨整合(osseointegration)之最佳表面孔径(pore size)、粗糙度(roughness)及鈦氧化膜層厚度，以獲致較佳之初步(primary)與癒合後(secondary)穩固度(stability)，至今仍未有明確及多樣性的研究。

1969年Branemark提出骨整合(osseointegration)的概念¹，七年後Schroeder等人才首度在未脫鈣的組織切片觀察到骨頭和植體直接接觸的情形(direct bone-to-implant contact)²，一些科學家稱此種現象為 osseointegration³ 或 functional ankylosis^{4,5}。近年來更由於材料及手術不斷更新及成熟，自早期Branemark implant system 在下頷存活率(survival rate)的 86% 及上頷存活率的 78%⁶，已提升到目前五年成功率(success rate) 達 95%以上⁷⁻⁹。

有不少文獻研究人工植體表面的特質(texture)與型態(topography)對不同細胞行

為的影響¹⁰⁻¹⁷。很多人工牙科植體系統也進行不同的表面處理(Surface treatment)，其目的乃為增加植體和骨組織的接觸面積^{18,19}，增加骨細胞或骨組織機械性的嵌合(interlocking)作用¹⁸⁻²³，和基質成分交互作用後影響骨母細胞的附著及攀爬²⁴⁻²⁶，促進細胞吸附分子如 fibronectin、vitronectin 的附著²⁷⁻³⁰，促進成骨細胞活性增加^{12,16,17}，增加血小板及血塊固持在植體表面的能力²⁸⁻³⁰，或不同孔徑/粗糙度之表面會影響細胞附著及其構形，進而影響細胞行為的表現^{31,32}。

另一有趣的主題是有關於鈦金屬氧化膜層厚度對細胞行為的影響。研究顯示，增加鈦氧化膜層厚度的效應可避免膜層下方金屬離子的游離或釋出³³，可改變表面的物理性質³⁴，可增加本體(bulk)金屬原子對氧化膜層環境外分子(如水分子)的屏蔽效應³⁵，且由於膜層折反射可使表面形成不同色彩，同時在植體表面可較快形成骨組織，同時含有較高量的礦化成分³⁶。但對於特定細胞的攀附、增殖或分化等行為表現，文獻上卻著墨不多。

本研究目的即在探討鈦金屬表面不同氧化膜層厚度及孔徑大小/粗糙度對類骨母細胞 MG-63 附連(attachment) 及增殖(proliferation) 行為的影響，以提供植體不同表面處理後形態能否加速牙科植體骨癒合之重要參考。

三、實驗步驟

(1)鈦試片之製備及檢測

Grade II 純鈦金屬試片(BioTech One Inc.)切割成 12 mm 直徑, 3 mm 的厚度後, 將鈦試片進行拋光、超音波振盪、洗淨及乾燥之前處理。其後再使鈦試片置於電解槽陽極, 白金棒作為陰極, 以 NaCl 或 HCl 溶液作為電解液外加不同電流密度, 製得

試片表面不同的孔徑大小。試片氧化膜之控制, 為將鈦金屬連接於脈衝整流儀之陽極端, 並於 9N 之磷酸溶液中分別施予 30、60 或 90 伏特之電壓。此陽極處理(anodization) 後之試片表面即可得到不同厚度的氧化膜層。

清洗完鈦試片進行體外細胞培養前, 進行 γ -ray 的消毒步驟。使用電子顯微鏡(Scanning electroscopic microscopy, SEM, Hitachi- 4700 Tokyo, Japan)檢視鈦試片表面並量測孔徑大小。由於電化學表面處理所形成之孔洞並非圓形, 且長徑及寬徑並非等長(圖 1), 計算時利用電腦程式設計(Image pro 4.0)中面積相等之互補原理將其假設為圓形孔洞再求出平均徑長; 這些孔洞並非均質一致性大小, 而是呈現在平均孔徑值(mean pore size)附近之一常態型分布, 因此將所有抽樣測量所得之孔洞大小加以平均, 而得到此一平均孔徑。利用 X 射線光電子光譜儀(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS, Vacuum Generator Scientific, Sussex, England)用以偵測氧化層 1 nm 深度之元素分布, 而以二次離子質譜儀(secondary ion mass spectroscopy, SIMS, IMS- 4f, Cameca Co., France)量測氧化膜層厚度, 其自材料表面之最外層開始到氧原子濃度衰減為其 plateau 最高濃度的一半距離定義為氧化膜厚度。以能量散射光譜儀(Energy dispersive spectroscopy, EDS, Hitachi, Tokyo, Japan), 測量氧化膜中氧/鈦原子組成比, 以接觸角測量儀(contact angle meter, Kyowa interface science Co., Japan), 檢測試片表面接觸角, 以 X-ray 繞射(Thin film X-ray, MAX 2000 PC, Rigaku D Co., Japan), 分析氧化膜層之晶格結構, 以接觸式地形測量儀(contact profilometer, α -step, Talysurf Co.,

Germany), 檢測不同條件鈦金屬表面之粗糙度。同時以切割後鈦試片 (machined rough surface) 及研磨後鈦試片 (machined smooth surface) 作為控制組比較。

(2) 細胞培養

實驗所用 MG-63 細胞來自新竹食品工業發展研究所菌種中心，國家衛生研究院細胞庫。其組織來源為 osteogenic sarcoma, interferon producer: Human, 冷凍日期為 1999.6.01., 細胞繼代數為第八代。

所使用培養基是根據 1995 年 Martin 在 Journal of Biomedical Materials Research 所使用的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)¹², 其含 10% 的 fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml 的 penicillin 及 100 µg/ml 之 streptomycin, 並培養在 5% CO₂, 37 °C 的環境中。本實驗所使用的是 Gibco 公司低糖的 DMEM。

(3) 細胞附連及增殖觀察

如上所述分成不同氧化膜厚度及不同孔徑兩大組，每組皆有切割後及研磨後鈦試片作為控制組，並以 24 格細胞培養盤 (polystyrene) 作為對照組。將不同條件鈦試片放入 24 格的培養盤，將 MG-63 細胞的懸浮液以 10⁴/cm² 的密度置於試片上，並以 plastic culture disc 為 positive control。經 4 小時、1、2、4、6、8、12 天培養後，以 PBS (0.1M, pH 7.2) 沖洗掉未附著細胞，再加入 500 µl 的培養液及 50 µl 的 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 標記溶液，放置於 37 °C, 5% CO₂ 之培養箱，經 4 小時充分作用，活性細胞會產生紫色 formazan salt 結晶，此時再加入溶解緩衝液 (10% SDS/0.01M HCl, 500 µl/well)。隔夜，使用波長 595 nm 之光線讀取細胞活性吸光值 (optical density, OD)。如此五重覆，取平

均所得結果與控制組作比較並以 SEM 檢視。SEM 的標本處理是在特定時間培養後，先將試片以 phosphate-buffered saline (PBS) 清洗，再用 2% paraformaldehyde 及 2.5% glutaraldehyde 在 0.2 mole 的 Cacodelate 固定液固定，以 0.1 mole 的 Cacodelate 加上 7% 的 sucrose 的緩衝液 wash 三次，並使用 0.2 mole 的 Cacodelate buffer 製成 2% 的 OsO₄ 固定半小時，再以 0.1 mole 的 Cacodelate 的 buffer wash 三次，接下來分別以不同濃度之 ethanol 作一系列脫水，乾燥後將試片再以一薄層的 gold-palladium 濺鍍 (sputter-coated) 到試片上，以掃描式電子顯微鏡 (S-2400, Hitachi) 觀察細胞的形態。

(4) 統計分析

各實驗組及對照組的數據以平均值 (mean) + 標準差 (SD) 表示。其相互間差異以單因子變異數分析 (One-way ANOVA), 再以 Scheffe 方法作事後檢定，比較各組間是否有顯著差異，分析軟體採用 SPSS 11.0 版 (General Survey.sav, U.S.A.)。

四、結果與討論

在不同厚度氧化鈦膜層的電子顯微鏡觀察下，在外觀上顯示，鈦金屬陽極氧化表面處理後，會隨氧化膜厚度不同而在表面呈現明亮的紫灰色或金黃色，乃因不同氧化層內光線繞射所致。切割後鈦試片表面顯示有寬度約 1-5 µm，深度在 2 µm 以下的細溝紋，更高倍下可見細溝紋間有小凹陷出現。研磨至 R_a = 0.28 µm 後之鈦試片仍可見細溝紋，寬度不變但深度較淺。相較於上述兩種，陽極氧化處理過的鈦試片則顯得更為平滑，細溝紋幾乎不見。圖 1(a) 為以金相顯微鏡觀察 Machined surface 金相顯微結構。圖 1(b) 為 Machined surface

經掃描式電子顯微鏡觀察後的表面形貌

不同孔徑鈦金屬片的觀察，在施予不同電流密度及不同時間(time interval)所造成之不同大小孔徑，有如下特點：

- ①孔洞的大小、形狀、分布會隨著電化學條件設定、多晶型鈦試片本身的晶粒大小(grain size)、晶界(grain boundary)及加工條件而有所不同。
- ②所形成孔洞大小並非均質一致，而是呈現鐘形分佈型式。
- ③形成之孔洞並非正圓形狀，其長徑及寬徑非等長。
- ④較大孔徑處顯示孔洞間是相互連通的(圖 1(c))，亦即形成孔中有孔洞中有洞表面。

X-ray 繞射分析方面，控制組及氧化鈦膜厚度在 80 nm (含)以下者顯示皆以 anatase 及 rutile 兩種晶形之混合形態結構為主，而 120 nm 厚度的鈦試片則出現有 brookite TiO_2 及 Ti_3O_5 晶形結構。

在 EDS 分析中顯示，不同厚度氧化膜層的氧鈦原子組成比(O/ Ti)各不相同。40 nm 及 80 nm 厚之 O/Ti 比(分別為 1.681 + 0.0363 及 1.834 + 0.0215)皆較控制組(machined surface, 1.616 + 0.0367)為高，而當厚度增為 120 nm 時，其 O/Ti 比值最低(1.404±0.0377)，此結果顯示除 5nm 及 40nm 厚度之氧化膜層 O/Ti 比因標準差較大而無統計上意義，其餘各組之間有統計上差異。顯示隨著氧化膜層厚度增加，其結構內之各原子組成也會隨之改變。

XPS 分析顯示，氧化層內測出主要成分為 Ti, O, C, 同時存在少量的 N, P, Si, Na(圖 3) 而 SIMS 分析中結果顯示，在一定作用時間內電壓(Voltage)-氧化膜厚度之關係成一線性正相關(1.33nm/voltage) 測得以 30V、60V、90V 電壓所造成之氧化膜厚度分別為 40nm、

80nm 及 120nm。

接觸角的測試方面，各種不同氧化膜厚度鈦試片在清洗前後之接觸角分別是：原切割後鈦試片(45+3.6, 43+4.1)度，40 nm 厚(28+3.2, 29+3.5)度，80 nm 厚(37+3.2, 30+10.6)度及 120 nm 厚(38+3.5, 41+8.3)度。經分析顯示，各組不同氧化膜厚度之鈦試片其清洗前後之接觸角並無統計上顯著差異，而其中以 40 nm 厚氧化膜之值最小，而以原切割後之鈦試片值最大。此外，原切割後之鈦試片粗糙度 Ra 為 1.9 μm ，研磨後之 Ra 為 0.28 μm ，氧化膜 40 nm、80 nm、120 nm 厚試片之 Ra 分別為 0.26 μm 、0.25 μm 、0.27 μm 。而平均孔徑大小與粗糙度之相對值則分別為：10.4 $\mu\text{m}/2.5 \mu\text{m}$ ，51.1 $\mu\text{m}/4.8 \mu\text{m}$ ，103.5 $\mu\text{m}/8.3 \mu\text{m}$ ，顯示孔徑愈大，粗糙度也隨之增加。

在細胞形態的觀察方面，分為兩方面：不同氧化膜厚度的觀察及不同孔徑的觀察。

在不同氧化膜厚度 4 小時的觀察中(圖 4)，切割後鈦試片由於有較明顯的細溝紋(寬度小於 3 μm)，可見拉長的細胞形態，且有沿著細溝紋方向排列之傾向。而陽極氧化所造成不同氧化膜厚度的試片上，雖然細溝紋深度較淺，仍可見細胞沿著此痕跡排列之傾向(圖 5)。三種不同氧化膜厚度試片中，以 40 nm 厚之細胞數目較多，而 120 nm 厚之細胞數目則較少。

兩天的細胞觀察數目則顯示增加。切割後鈦試片表面上，細胞仍維持拉長形態，而研磨鈦試片及三種不同氧化層增厚試片的細胞形態則呈現較不規則或多角形。八天的細胞觀察中，原切割後試片組、研磨組及三種不同厚度試片都呈現覆蓋滿細胞，且是被連續細胞層所覆蓋。

不同孔徑細胞形態的觀察，4 小時的

觀察,可見附著到具孔性(porous)表面之細胞形態迥然不同於切割後試片組、研磨組及氧化層增厚組。孔性表面上的細胞數目可能由於本身地形的影響或由於細胞隱匿於孔洞之中,使得細胞在 SEM 下並非十分明顯。三種不同孔徑中,以 10 μm 的細胞數顯得最為稀少。兩天的觀察,孔性表面上的細胞均呈現三度立體形態。10 μm 孔徑表面清楚地呈現長條形,且可橫跨孔徑大小。50 μm 孔徑上的細胞形態則顯得細長且成多角形(圖 6),可見攀附或陷入整個孔洞內,最顯著的特徵是:可見有延伸程度最長的偽足(filopodia)。100 μm 的孔徑,則顯示細胞無法完全貼附在整個孔洞中(圖 7),且所延展的偽足也不如 50 μm 孔洞中明顯。第八天的細胞形態基本上和第二天的形態相去不遠,只是細胞數目增加許多,尤其是 10 μm 孔徑組甚至表面的小裂隙也被細胞或其分泌的基質所覆蓋。

細胞附著及增殖測試,實驗中以 24 格細胞培養盤(polystyrene)細胞培養作為鈦試片實驗組之對照,結果顯示細胞在 24 格細胞培養盤呈現正常的生長型態,並以此比較各鈦試片實驗組間細胞生長的情形。

比較不同氧化膜層試片細胞濃度吸光值(圖 8)顯示:同一試片條件在不同時間下,切割後之鈦試片、研磨組及不同厚度氧化膜層均顯示,細胞在第二天即有顯著增生現象($p < 0.05$)。在 4 小時,1 天,2 天,4 天細胞濃度之吸光值各鈦試片實驗組彼此間無統計上顯著差異。第六天時,細胞濃度吸光值以 80 nm 最高,40 nm 及研磨組次之,並和其他鈦試片實驗組有統計差異($p < 0.05$)。在第 8 及 12 天時,以 80 nm,40 nm 厚度試片細胞濃度吸光值最高,且較平均最低的吸光值(切割後鈦試片組及 120 nm 厚度)分別增加達 21.2 % 及

15.4 %,並有統計上差異($p < 0.05$)。

比較不同孔徑試片之細胞濃度吸光值(圖 9),結果顯示:同一試片條件在不同時間下,切割後之鈦試片、研磨組及 10 μm 孔徑表面的細胞,在第二天即顯示有明顯增生現象;而 50 μm 及 100 μm 孔性表面的細胞則在第四天才有明顯增生。4 小時細胞濃度吸光值以 100 μm 孔徑最高,且和最低值的 10 μm 孔徑有統計差異 ($p < 0.05$)。1 天,2 天,4 天,6 天,8 天,12 天各鈦試片實驗組間之細胞濃度吸光值雖無統計差異,但增殖後期(8,12 天)之切割後試片組、研磨組及 10 μm 孔徑則顯示稍高於 50 μm 及 100 μm 孔徑組的吸光值。

文獻上指出,在粗糙的鈦金屬表面 MG-63 細胞形態呈現近立方形,並有像樹枝狀的延伸,此一形態被認為是形成一更分化的骨母細胞^{37,38},而在平滑的鈦金屬表面,MG-63 細胞則顯得更為扁平,且更像纖維母細胞的形態,此結果與本實驗中所觀察到的情況類似。然而孔性表面上的細胞則呈現三度多角形的立體形態,且攀附於孔洞壁上,伸出許多細長的偽足,尤其在 50 μm 孔徑最明顯,可見得材料表面構造地形的變異對細胞形態及行為有相當大影響。

實驗結果亦顯示,接觸角最大的是表面不處理的粗糙面及 120 nm 厚度的鈦試片,最小的則是 40 nm 厚度試片。相較於最初 4 小時細胞濃度的吸光值,以原切割試片組、研磨組及 40 nm 厚度的吸光值最高,其次為 80 nm 厚度,最低為 120 nm 厚試片,顯示接觸角對於本實驗細胞之初步附連並無太大關連。然而若將表面結構較為不相似的原切割試片和研磨試片兩控制組排除,只比較經陽極氧化處理的三種膜厚度之實驗組,則顯示隨著接觸角度的減少,細胞濃度吸附值也隨之增加,顯然

細胞的附連和氧化膜之表面接觸角有相當程度關連。

針對此一現象，Walivaara 在其研究中指出，欲探討材料表面的接觸角或表面親潤性(surface wettability)對蛋白質及細胞吸附行為的影響，必須同時考慮兩種因素：粗糙度及擴大的表面積(enlargement surface area)³⁹。當表面積增加時，表面親潤性及蛋白質吸附之關係並不顯著。對照本實驗，原切割組、研磨組及陽極氧化試片之表面結構有差異，且表面不處理試片 R_a 值為 $1.9 \mu\text{m}$ ，而三種不同膜厚度試片之 R_a 為 $0.26 \mu\text{m}$ 左右，其表面積因素即可造成重大差異。當只比較三種不同膜厚度試片時，由於三者粗糙度值相近 ($< 0.02 \mu\text{m}$)，可標準化或校正表面積增加此一因素，使得表面的接觸角/氧化膜厚度和細胞的初步附連存在著關連性。

不少研究指出，一旦鈦金屬表面氧化層有所改變會牽動表面許多因子的改變⁴⁰⁻⁴³，如氧化膜的組成、固定的原子組成比(stoichiometry)、結晶構造、表面地形及氧化膜厚度的改變，因此在探討氧化膜厚度對細胞行為影響時並無法明確指出是單純由氧化膜層厚度所造成或是由其所牽動的其他因子所致。而本實驗中對不同氧化膜厚度的鈦金屬所作的檢測也顯示，一旦氧化膜厚度增加，其 O/Ti 比值也隨之改變，顯示在一定厚度範圍內，其 O/Ti 比值會隨著厚度的增加而增加，然而超過一定厚度(如本實驗之 120 nm)後，O/Ti 比值反而減小。顯然鈦氧化膜厚度在超過一定範圍後，其 TiO_2 結構可能變得比較鬆散甚至被破壞。另外由 X-ray 繞射也得知，隨著氧化膜厚度的增加，其結晶結構也有所差異，尤其是較厚(120 nm)的氧化膜，其結構差異性更大。

關於細胞增殖的影響，Martin¹² 及

Boyan³⁷ 的研究都顯示，增加表面孔徑/粗糙度，類骨母細胞越會表現出分化的形態，這些行為表現包括：減少細胞的增生數目。Boyan 指出，相較於細胞在培養盤中，粗糙鈦金屬表面的 MG-63 細胞減少 36%，而平滑的鈦表面細胞數目則僅減少 20%³⁷。本實驗中，在細胞增殖的後期(8, 12 天)，則顯示原切割組、研磨組及 $10 \mu\text{m}$ 孔徑 ($R_a = 2.5 \mu\text{m}$)表現較 $50 \mu\text{m}$ ($R_a = 4.8 \mu\text{m}$) 及 $100 \mu\text{m}$ 孔徑 ($R_a = 8.3 \mu\text{m}$)更佳，雖然第 8 及 12 天細胞濃度吸光值無統計上差異。這樣的結果似乎符合粗糙度增加，細胞增殖或細胞數目反而減少的相同結果^{12,37}。另一方面，不同孔徑/粗糙度對細胞初步附連的實驗，4 小時時以 $100 \mu\text{m}$ 孔徑 ($R_a = 8.3 \mu\text{m}$)之細胞濃度吸光值最高，並和細胞濃度最低的 $10 \mu\text{m}$ 孔徑 ($R_a = 2.5 \mu\text{m}$)有統計上差異。因此細胞初步附連似乎和細胞增殖對孔徑/粗糙度的反應不同，此顯示在細胞初步附連階段，表面積增加的因素可能扮演相當重要的角色。進一步分析顯示，雖然細胞初步附連之濃度吸光值以 $100 \mu\text{m}$ 孔徑 ($R_a = 8.3 \mu\text{m}$)最高，並和最低的 $10 \mu\text{m}$ 孔徑 ($R_a = 2.5 \mu\text{m}$)有統計上差異，然而在增殖後期已無差異。此現象另一層意義顯示，孔徑較小/較平滑之表面其細胞增殖速率較大孔徑/粗糙表面更加快速。

五、計畫成果自評

本計畫按原計畫規定方向，完成結果如下：

- ①陽極氧化所造成之氧化膜厚度增加，氧化膜結晶結構、氧鈦原子組成比及表面接觸角也隨之改變。
- ②在比較細胞初步連附對於鈦金屬表面接觸角之影響時，表面積及粗糙度之因素是必須同時加以考慮的。

⑤ 鈦金屬表面之氧化膜層在一定厚度的範圍內對細胞的附連及增殖是有利的，太厚的氧化膜層（如 120 nm）在本實驗中並不有利於細胞的附連及增殖行為。

④ 細胞增殖後期，在控制組及不同孔徑組別間的細胞濃度吸光值無統計上差異。但相較於較粗糙/孔徑較大之表面，較平滑/孔徑較小的鈦金屬表面之細胞濃度吸光值之增殖速率較快。

參考文獻

1. Branemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 3:81-89,1969.
2. Schroeder A, Pohler O, Sutter F. Gewebsreaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplantat mit Titan-Spritz schichtoberfläche. *Schweiz Monatschr Zahnheilk*, 86:713-722, 1976.
3. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, Omann A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 11(suppl),102-117,1977.
4. Schroeder A, Stich H, Straumann F, Sutter F. Uber die Anlagerung von Osteozement an einen belasteten Implantatkorper. *Schweiz Monatschr Zahnheilk*, 88:1051-1062, 1978.
5. Schroeder A, Van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reaction of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with sprayed titanium surface. *J Maxillofac Surg*, 9:15-24, 1981.
6. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 6:387-394, 1981.
7. Buser D, Weber HP, Lang NP. Tissue integration of non-submerged implants 1-year results of a progressive study with 100 ITI hollow-screw and hollow-cylinder implants. *Clin Oral Impl Res*, 1:33-39, 1990.
8. Buser D, Sutter F, Weber HP, Belser U, Schroeder A. The ITI dental implant system. Basics, clinical indications and procedures, results. In "Hardin J Clark's Clinical Dentistry", Philadelphia, Lippincott, 5:1-23, 1992.
9. Zarb GA, Schnitt A. The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants in anterior partially edentulous patients. *Int J prosthodont*, 6:180-186, 1993.
10. Brunette DM, Kenner GS, Gould TRL. Grooved titanium surfaces orient growth and migration of cells from human gingival explants. *J Dent Res*, 62:1045-1048, 1983.
11. Chehroudi B, Gould TRL, Brunette DM. Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently in vivo. *J of Biomedical Materials Research*, 24:1203-1219, 1990.
12. Martin JY, Schwartz Z. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG-63). *J of Biomedical Materials Research*, 29:389-401,1995.
13. Wong M, Eulenberger J, Schenk R. Effect of surface topography on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res*, 29:1567-1576, 1995.
14. Schwartz Z, Martin JY. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J of Biomedical Materials Research*, 30:145-155, 1996.
15. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic

- micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*, 20:573-588, 1999.
16. Deligianni DD, Katsala N. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation, and detachment strength. *Biomaterials*, 22:87-96, 2001.
 17. Deligianni DD, Katsala N. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*, 22:1241-1251, 2001.
 18. Steinemann SG, Eulenberger J, Maeusli P, Schroeder A. Adhesion of bone to titanium. In "Biomechanical Performance of Biomaterials", Elsevier, Amsterdam, pp: 409-414, 1986.
 19. Branemark R. A Biomechanical Study of Osseointegration. Thesis. Goteborg University, Goteborg, Sweden, 1996.
 20. Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT. Anchorage of TiO₂- blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. *J of Biomed Mater Res*, 29:1223-1231, 1995.
 21. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res*, 6:24-30, 1995.
 22. Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw shaped implants with special emphasis on effects of blasting materials and surface topography. *Biomaterials*, 17:15-22, 1996.
 23. Wennerberg A, Albrektsson T, Lausmaa J. Torque and histomorphometric evaluation of C.P. titanium screw blasted with 25- and 75- μ m particles of Al₂O₃. *J of Biomed Mater Res*, 30:251-260, 1996.
 24. Pillar RM. Implant stabilization by tissue ingrowth. Proceedings of an International Congress, Brussels. May 1985, Excerpta Medica, Amsterdam. pp.60-76, 1986.
 25. Pillar RM, Deporter DA, Watson PA, Valiquettl N. Dental implant design – Effect on bone remodeling. *J of Biomed Mater Res*, 25:467-483, 1991.
 26. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11: 38-45, 1996.
 27. Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 3:231-246, 1988.
 28. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J of Prosthodontics*, 11(5):391-401, 1998.
 29. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surface. *Clin Oral Impl Res*, 11:530-539, 2000.
 30. Gemmell CH, Park JY. Initial blood interaction with endosteal implant Materials. In :“Bone Engineering”, Davies JE, Em Squared Inc, Toronto, Canada, pp. 108-117, 2000.
 31. Pawley JB. Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York, pp.39, 1995.
 32. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18: 1573-1583, 1997.
 33. Kasemo B, Lausmaa J. Material-tissue interfaces: The role of surface properties and processes. *Environ Health Perspect* 102 (Suppl 5), 41-45, 1994.
 34. McAlarney ME, Oshiro MA. Effects of titanium dioxide passive film crystal structure, thickness, and crystallinity on C3 adsorption. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11: 73-80, 1996.

35. Kasemo B, Golg J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res*, 13:8-20, 1999.
36. Larsson C Thomsen P, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Kasemo B, Ericson LE. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thickness. *Biomaterials*, 17: 605-616, 1996.
37. Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG-63 osteoblast-like cells to $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. *J Biomed Mater Res*, 39: 77-85, 1998.
38. Groessner-Schreiber B, Tuan RS. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. *J of Cell Science*, 101: 209-217, 1992.
39. Walivaara B, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Tengvall P. Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials*, 15(10):827-834, 1994.
40. Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent*, 49: 823-837, 1983.
41. Lausmaa J, Mattsson L, Rolander U, Kasemo B. Chemical composition and morphology of titanium surface oxides. *Mat Res Soc Symp Proc*, 55: 351-359, 1986.
42. Leitner K, Schultze JW, Stimming U. Photoelectrochemical investigation of passive films on titanium electrodes. *J Electrochem Soc*, 133: 1561-1568, 1986.
43. McAlarney ME, Skalak R, Kim S, Neugroschl D, Machlin ES. TEM immunogold staining of C3 from plasma onto titanium oxides. *J Biomed Mater Res*, 25: 845-864, 1991.



圖 1(a) . Machined surface 100X 金相顯微鏡

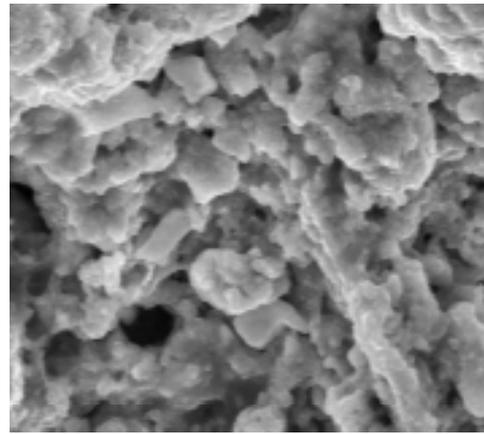


圖 1(b) . Machined surface 經掃描式電子顯微鏡觀察後的表面形貌

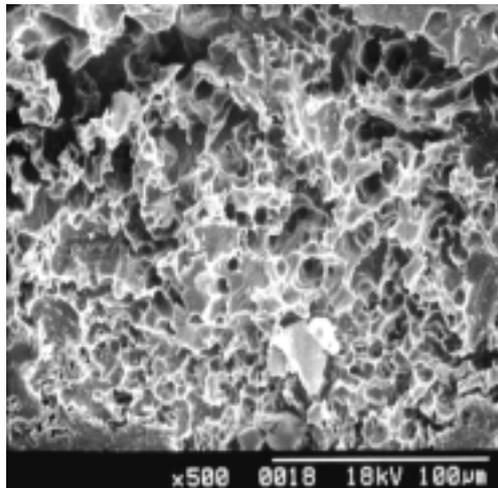


圖 1(c)電子顯微鏡下孔徑平均為 10 μm 之表面。

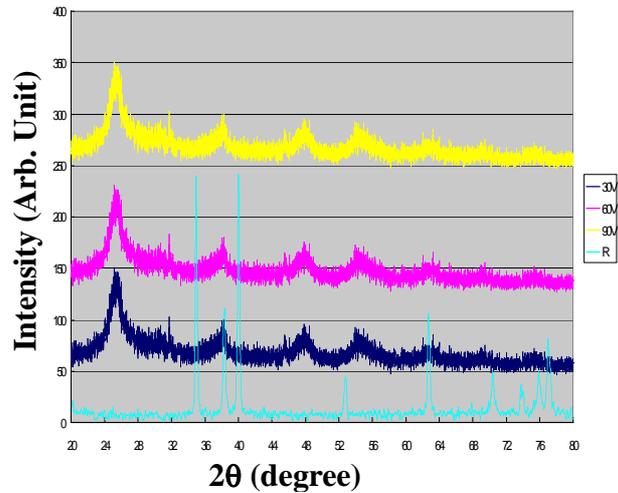


圖 2 X-ray 繞射圖譜，最上方為 40nm 氧化膜厚度，第二條線譜為 80nm 氧化膜厚度，第三條線譜為 120nm 氧化膜厚度，最下方則為自然氧化膜層厚度。

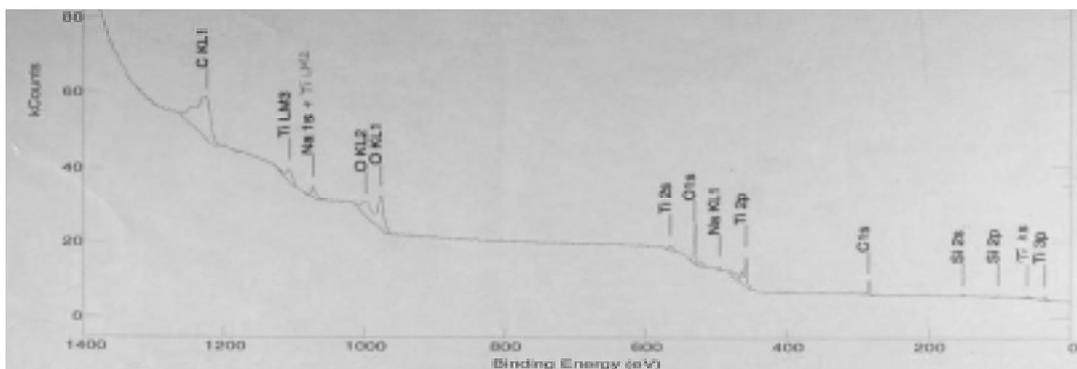


圖 3 清洗之原切割鈦試片之 X 射線光電子光譜儀。

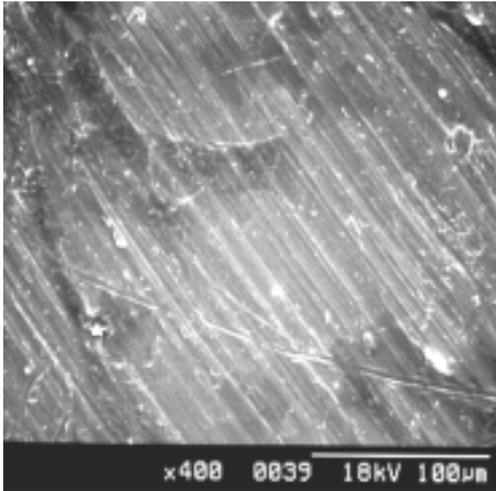


圖 4 電子顯微鏡下 MG-63 細胞培養於切割鈦試片表面 4 小時之情形 (400 倍)。

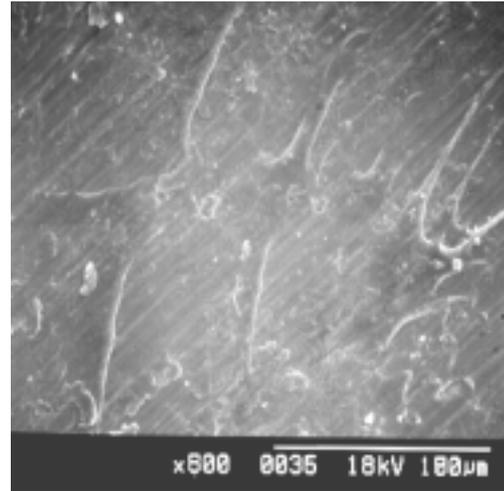


圖 5 電子顯微鏡下 MG-63 細胞培養於氧化鈦膜厚度為 40 nm 鈦試片 4 小時之情形(400 倍)。

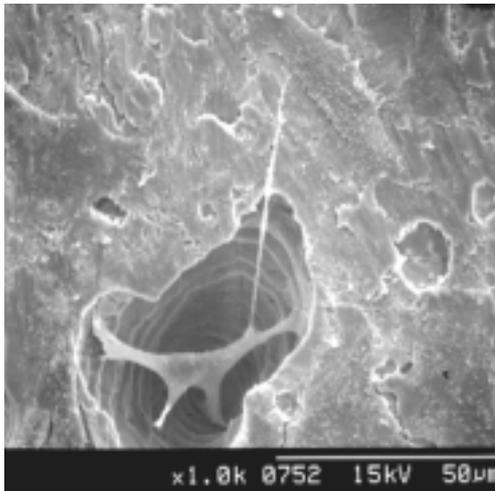


圖 6 電子顯微鏡下 MG-63 細胞在孔洞為 50µm 的情形 (800 倍)

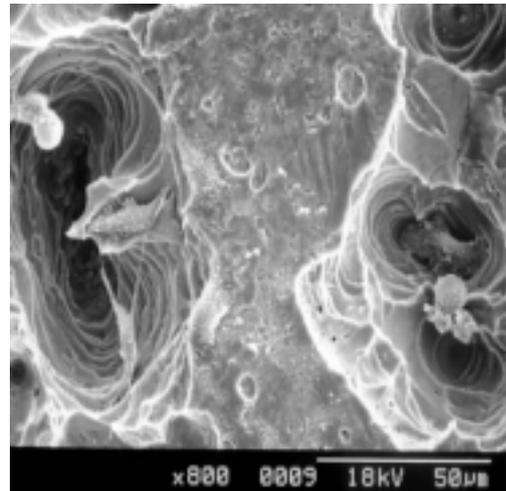


圖 7 電子顯微鏡下 MG-63 細胞在孔洞為 100µm 的情形 (600 倍)

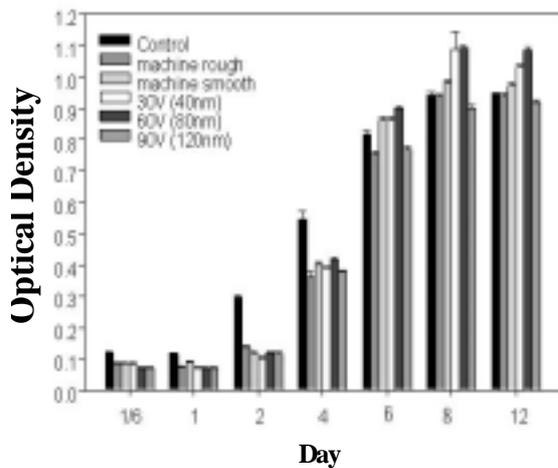


圖 8 同一時間內，比較不同氧化鈦膜厚度對細胞濃度之吸光值。

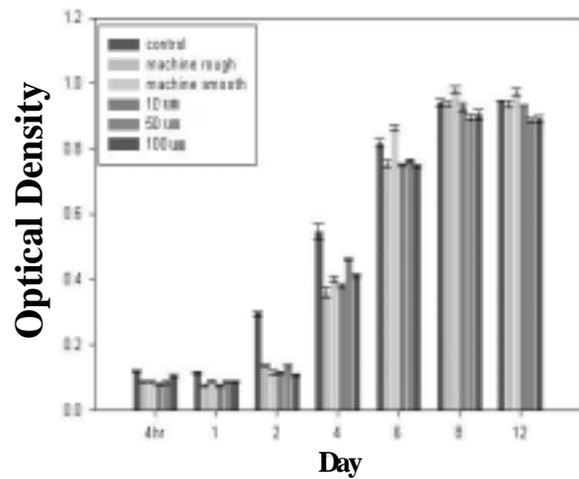


圖 9 同一時間內，比較不同孔徑大小對細胞濃度之吸光值。