

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

應用電漿沈浸式離子植入及電化學技術在多孔性純鈦及鈦
合金植體材料表面備製次微米級鍍膜

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2216-E-040-001-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學牙科材料研究所

計畫主持人：黃何雄

計畫參與人員：潘思蓉

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，2年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

摘要

本研究之目的在探討生醫用純鈦金屬表面的電化學改質方法與改質後之生物相容性。利用電化學陽極氧化處理於純鈦表面製備網狀結構的氧化膜，利用 X 光薄膜繞射儀、原子力顯微鏡、X 光光電子能譜儀及場發射掃描式電子顯微鏡分析氧化膜特性；利用細胞培養技術探討網狀結構之生物相容性質，所選用的細胞為 U-2 OS 類造骨細胞，並以場發射掃描式電子顯微鏡觀察細胞貼附形態。結果顯示，經電化學陽極氧化處理之純鈦表面為奈米至次微米級的網狀形貌，氧化膜結構主要為 anatase 相的 TiO_2 。生物相容性質之研究結果顯示，相較於未經陽極氧化處理的試片，經陽極氧化處理之純鈦表面有較多的蛋白質吸附，以及較高的細胞增殖指數。本研究利用電化學技術可於純鈦表面製備具較佳生物相容性之 Ti-O 網狀結構。

關鍵詞：電化學；表面改質；鈦；網狀結構；類造骨細胞；生物相容性。

Abstract

This study was to investigate the surface modification of biomedical pure titanium using electrochemical technique and the corresponding biocompatibility of the surface modified titanium. We prepared the network-structured oxide layer on pure titanium substrate using the electrochemical anodization treatment. Surface characterizations of the network-structured layer was analyzed using thin-film X-ray diffractometer (TF-XRD), atomic force microscope (AFM), X-ray photoelectron spectrometer (XPS), and field emission scanning electron microscope (FE-SEM). The *in vitro* cell culture technologies were used to investigate the biocompatibility of the surface modified titanium. Osteoblast-like U-2 OS cells were used in this study. The morphology of the attached cells on specimens was observed using FE-SEM. Results showed that a network-structured anatase TiO_2 layer could be produced on titanium substrate using an electrochemical anodization treatment. The network-structured Ti-based oxide layer on titanium was beneficial to protein adsorption compared to the untreated specimen, and had a higher index of cell proliferation. We conclude that a network-structured Ti-O layer with a better biocompatibility can be prepared on pure titanium substrate using an electrochemical technique.

Keywords: electrochemical; surface modification; titanium; network-structure; osteoblast-like cell; biocompatibility.

1. 前言

鈦及鈦合金由於具有優良的機械性質、耐蝕性質及生物相容性質，所以被廣泛應用於骨科與牙科的植體材料。鈦金屬在大氣環境中表面會自然生成一層緻密且具有保護作用的氧化膜（主要為 TiO_2 ），於室溫下具有良好的抵抗腐蝕能力。同時，當鈦植體材料植入人體後，周遭的組織（tissue）直接與植體材料表面的 TiO_2 氧化膜接觸，所以鈦植體表面的 TiO_2 層性質（包括結構、化學成份及厚度）亦決定了鈦植體材料的生物相容性質。然而，儘管鈦基金屬已廣泛應用於臨床上，但目前仍有許多問題亟待改善。鈦表面保護層可能受到植體材料與人體組織間相對移動而部分遭受損壞[1]；臨床案例中也發現鈦植體材料在骨質癒合階段有達 5 % 失敗率[2,3]。因此，利用適當的表面處理來增進鈦基金屬耐蝕性質及生物相容性質是不可忽視的程序之一。

商業化的鈦植體材料表面常會鍍上一層具生物活性（bioactive）的氫氧基磷灰石（hydroxyapatite, HA），其鈣磷比約為 1.67（與人體骨骼相當）。雖然許多鍍 HA 的方法被提出，但是電漿噴塗仍是商業化最主要的方法，然而該製程所備製的 HA 鍍層之成份及結晶結構不易控制（由於高操作溫度）[4,5]，容易生成較厚的鍍層，且植入人體一段時間後 HA 易與植體材料之間發生剝離。因此，Kokubo 等人[6,7]曾利用 NaOH 溶液的浸泡（室溫下）及後續熱處理方式在鈦表面先備製一層 Na_2TiO_3 ，然後再浸泡於鈣磷溶液中，藉由 Na_2TiO_3 的水解反應，間接誘發 HA 析出。然而，利用上述浸泡加熱處理方式所備製的 Na_2TiO_3 層容易被破壞，且化學製程不易精確控制。另一方面，許多學者也曾利用各種不同的前處理（包括鹼處理[6,8,9]、酸處理[10]、熱處理[11]及高濃度的模擬體液[12]）使得金屬表面被官能基貼附，進而加速鈣磷鍍層的生成。綜合上述文獻所述，各種鍍層的備製過程仍有浸泡時間長、溶液配置繁複、製程不易精確控制等缺點。因此，在低溫下能快速且方便備製穩定且具良好生物相容性的鍍層是目前亟待發展的植體材料表面改質技術之一 [13-15]。

相較於直接浸泡的製程方式，電化學方法具有製程設備簡易、製程溫度低、高沉積速率、製備時間短等諸多優點。故本研究擬在鹼性溶液中以電化學陽極氧化法，於鈦金屬表面備製適當形貌及結構的氧化膜，再利用體外細胞培養技術探討此氧化膜生物相容性質，研究成果預期能提供牙科及骨科植體產業於生醫用植體材料表面改質的重要資訊，並有助於提升國內生醫材料表面處理技術的發展。

2. 材料與方法

2.1 實驗材料

實驗材料為符合 ASTM F67 Grade 2 等級之片狀商業級純鈦。試片大小為直徑 15.5 mm、厚度 0.89 mm。利用碳化矽砂紙將試片表面研磨至 # 1500 後，以 RO 水超音波震盪，再以 95 % 酒精震盪，冷風吹乾後進行後續的電化學陽極氧化處理。

2.2 電化學陽極氧化處理

電化學陽極氧化處理程序如下：將試片置於電化學試驗槽中的工作電極（陽極），輔助電極為白金試片（陰極），參考電極為飽和甘汞電極，電解液為鹼性溶液。將電化學試驗槽

置於低溫恆溫箱中，利用電化學工作儀（5000 Electrochemical Workstation，捷翰公司，台灣）外加陽極電流，截止電流預設為 A1、A2 及 A3 安培（ $A1 < A2 < A3$ ）。本文中以 A0 試片表示未經電化學陽極氧化處理試片，A1、A2 及 A3 試片則分別表示經陽極氧化至 A1、A2 及 A3 安培的試片。

2.3 表面性質分析

以原子力顯微鏡（atomic force microscope, AFM）觀察試片經電化學陽極氧化處理前後表面三維空間外貌，再以場發射掃描式電子顯微鏡（field emission scanning electron microscope, FE-SEM）來觀察試片表面氧化膜之微結構。利用 X 光光電子能譜儀（X-ray photoelectron spectroscopy, XPS）分析經陽極氧化處理後試片表面化學結構。利用 X 光薄膜繞射儀（thin-film X-ray diffractometer, TF-XRD）分析經陽極氧化處理後試片表面氧化膜的晶體結構。

2.4 細胞培養及貼附數量計算

本研究選用 U-2 OS 類造骨（osteoblast-like）細胞來模擬骨細胞的行為。均勻接種 5×10^4 個細胞於編號 A0、A1、A2 及 A3 的純鈦試片表面以及 24-well 聚苯乙烯培養盤（做為對照組），再將試片置於含 5 % CO_2 、37 °C 的培養箱中，以 complete McCoy's 5A 培養基培養一及三天後，利用台盤藍排除法（trypan blue extrusion method）輔以血球計數器，計算每個試片表面存活的細胞數目，將試片上的細胞數目除以對照組細胞數目 $\times 100\%$ ，即為試片表面細胞貼附數目百分比，再將培養三天及一天的細胞貼附數目百分比相減，即為細胞增殖指數（index of cell proliferation）。

2.5 細胞貼附形態觀察

將貼附於試片表面的細胞進行一系列的固定、脫水、乾燥及鍍白金等步驟，再利用 FE-SEM 觀察 U-2 OS 類造骨細胞貼附於材料表面的微觀形態。

3. 結果與討論

3.1 表面性質

圖 1 為經不同電化學陽極氧化處理的純鈦試片表面之 AFM 觀察圖，經電化學陽極氧化處理的純鈦試片表面之粗糙度值及形態並無明顯的改變，仍可觀察到經砂紙研磨之溝痕（groove）。圖 2 為對應於圖 1 之 FE-SEM 觀察結果，經陽極氧化處理後的試片表面氧化膜均呈現縱橫交錯的立體網狀結構，該網狀結構隨著截止電流的增加更趨明顯及擴大，網目大小約在數十至數百個 nm。經陽極氧化處理後的試片表面經 TF-XRD 分析得知，試片表層的氧化物主要為 anatase 結構的 TiO_2 。Huang 等人[16]的研究指出 anatase 結構的 TiO_2 可有效提高蛋白質的吸附及減少纖維組織生成。因此，本研究所製備之網狀 anatase 相的 TiO_2 氧化膜預期具有良好之生物相容性。

3.2 細胞貼附數量

圖 3 為 U-2 OS 類造骨細胞在不同電化學陽極氧化處理條件的純鈦試片表面之細胞增殖指數。結果顯示，細胞於經陽極氧化處理的表面（奈米至次微米之 TiO_2 網狀結構）較易達到增殖。研究指出，蛋白質的吸附在細胞的貼附及增殖上扮演著相當重要的角色；奈米尺寸的表面形貌會影響蛋白質吸附[17]；造骨細胞較易貼附於接近奈米尺寸的陶瓷表面[18]。為瞭解本研究所製備之網狀結構對蛋白質之吸附情形，將 A0 及 A3 試片經或未經培養基（含 10 % 胎牛蛋白）浸泡 2 小時後，利用 XPS 分析試片表面之 N_{1s} 及 C_{1s} 強度。相較於未經浸泡之試片，經培養基浸泡之 A0 及 A3 試片表面可偵測到較明顯之 N_{1s} 訊號峰（如圖 4 (a) 中箭頭所示），並可於 C_{1s} 訊號峰中分解出碳氮（-C-N-）鍵結（如圖 4 (b) 中箭頭所示），顯示經培養基浸泡之試片表面有蛋白質的吸附；未經培養基浸泡的 A0 及 A3 試片表面則無明顯的 N_{1s} 及 C_{1s} 訊號。此外，比較經培養基浸泡之 A0 及 A3 試片，於 A3 試片表面之 N_{1s} 及 C_{1s} 訊號均較 A0 試片明顯，表示經陽極氧化處理的試片表面（網狀結構）較未經陽極氧化處理的試片表面吸附更多的蛋白質，該蛋白質較易促進細胞進一步的貼附，故經陽極氧化處理的試片有較高的細胞增殖指數（圖 3）。

3.3 細胞貼附形態

圖 5 為 U-2 OS 類造骨細胞在經或未經電化學陽極氧化處理的 A0 及 A1 純鈦試片表面培養一天後之 FE-SEM 觀察圖。圖 5 (a) 及 (b) 顯示，試片不論有無經陽極氧化處理，U-2 OS 類造骨細胞均能攤平於試片表面，但 A1 試片表面之細胞攤平程度更為明顯（圖 5 (b)），顯示經陽極氧化處理的試片跟細胞之間有較佳的貼附性。由圖 5 (c) 及 (d) 之局部放大圖可觀察到細胞絲狀偽足（filopodia）與試片表面更微觀的貼附形態，其中 A0 試片表面可觀察到細胞的絲狀偽足與基材間的連結點較小（如圖 5 (c) 中箭頭所示），而 A1 試片表面的連結點較明顯（圖 5 (d) 中箭頭所示），上述連結點的形成可能是因細胞絲狀偽足上的受器（receptor）連接到吸附於材料表面的蛋白質所致。

4. 結論

電化學表面改質對 U-2 OS 類造骨細胞在純鈦表面貼附與增殖行為的影響顯示，經電化學陽極氧化處理之純鈦表面為奈米至次微米級的網狀形貌，氧化膜結構主要為 anatase 相的 TiO_2 。相較於未經陽極氧化處理的試片，經陽極氧化處理的純鈦表面之網狀結構可吸附較多的蛋白質，使得細胞的貼附性較佳，故於細胞增殖階段有較高的細胞增殖指數（index of cell proliferation），本研究利用電化學技術可於純鈦表面製備具較佳生物相容性之 Ti-O 網狀結構，研究成果將有助於生醫用純鈦植體材料表面改質的發展。

參考文獻

- [1] J. L. Katz, Orthopedic applications, in : *Biomaterials Science – An Introduction to materials in Medicine* , Ed. by D.R. Buddy (Academic Press, CA, USA, 1996)p.335.
- [2] P. Clark, P. Connolly, A. S. G. Curtis, and J. A. T Dow, *J. Biomed. Mater. Res.*, 99(1991) 73.
- [3] E. Eisenbarth, J. Meyle, W. Nachtigall, and J. Breme, *Biomaterials*, 17(1996)1399.
- [4] P. Ducheyne, R. W. van, J. C. Heughaert, and M. Heughaert, *Biomaterials*, 7(1986)97.
- [5] Z. S. Luo, F. Z. Cui, and W. Z. Li, *J. Cryst. Growth.*, 197(1999)939.
- [6] H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, and T. Nakamura, *J. Biomed. Mater. Res.*, 32(1996) 409.
- [7] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24(1990)721.
- [8] Q. L. Feng, H. Wang, F. Z. Cui, and T. N. Kim, *J. Cryst. Growth*, 200(1999)550.
- [9] H. B. Wen, J. de Wijn, F. Z. Cui, and K. de Groot, *Biomaterials*, 19(1998)215.
- [10] H. B. Wen, Q. Liu, J. De Wijn, K. de Groot, and F. Z. Cui, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 9(1998) 121.
- [11] H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, and T. Nakamura, *J Mater Sci: Mater Med*, 8(1997) 341.
- [12] Y. Liu, P. Layrolle, C. van Blitterwijk and K. de Groot, *Key. Eng. Mat.*, 192(2000)71.
- [13] N. Costa and P. M. Maquis, *Med. Eng. Phys.*, 20(1998)602.
- [14] C. B. Mao, H. D. Li, F. Z. Cui, Q. L. Feng, H. Wang, and C. L. Ma, *J. Mater. Sci. Lett.*, 17(1998)1479.
- [15] J. F. Shackelford, *Mater. Sci. Forum.*, 293(1999)99.
- [16] N. Huang, P. Yang, and X. Cheng, *Biomaterials*, 19(1998)771.
- [17] R. Thull, K. Trautner, and E. J. Karle, *Biomed. Tech.*, 37(1992)162.
- [18] J. W. Thomas, W. S. Richard, and B. Rena, *Biomaterials*, 20(1999)1221.

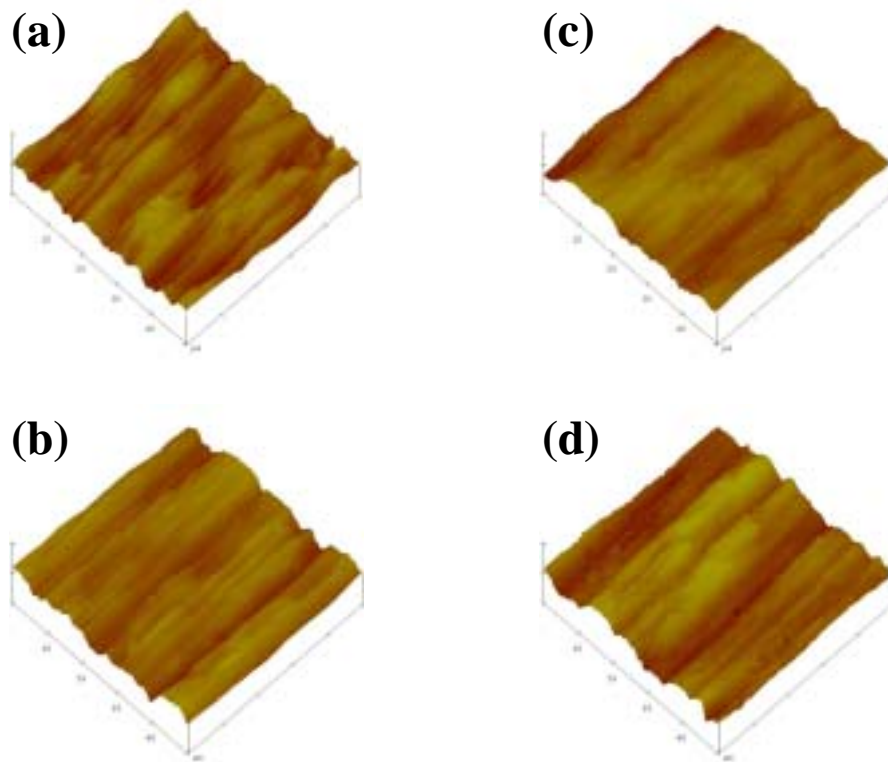


圖1. 純鈦試片表面之AFM觀察圖 ((a) 未經陽極氧化處理之A0試片 ; (b) (c) 及 (d) 分別對應於經陽極氧化處理之A1、 A2及A3試片)

Fig. 1 AFM observations of Ti specimens: (a) untreated A0 specimen; (b), (c), and (d) correspond to the anodized A1, A2, and A3 specimens.

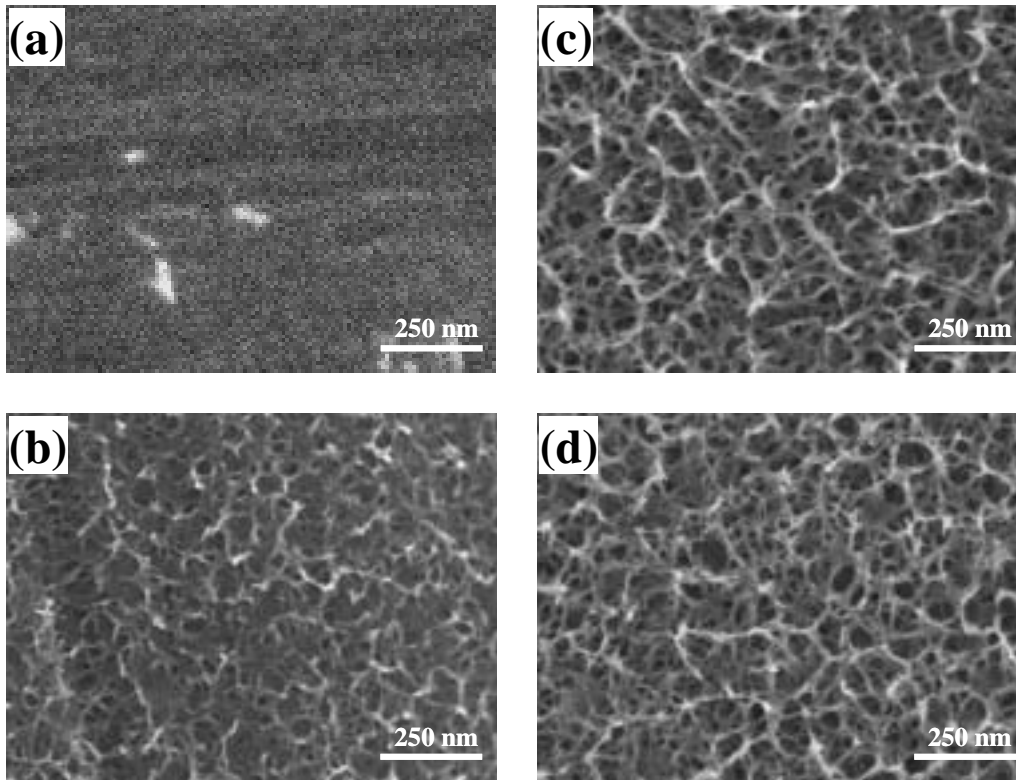


圖2. 純鈦試片表面之FE-SEM觀察圖((a)未經陽極氧化處理之A0試片;(b)(c)及(d)分別對應於經陽極氧化處理之A1、A2及A3試片)。

Fig. 2 FE-SEM observations of Ti specimens: (a) untreated A0 specimen; (b), (c), and (d) correspond to the anodized A1, A2, and A3 specimens.

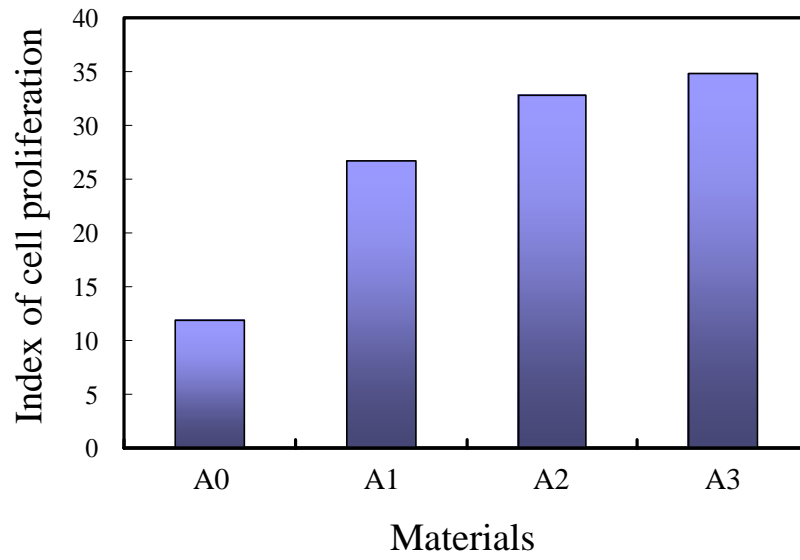


圖3. U-2 OS類造骨細胞在經或未經陽極氧化處理的純鈦試片表面之細胞增殖指數。

Fig. 3 Index of cell proliferation for osteoblast-like U-2 OS cells on the untreated and anodized Ti specimens.

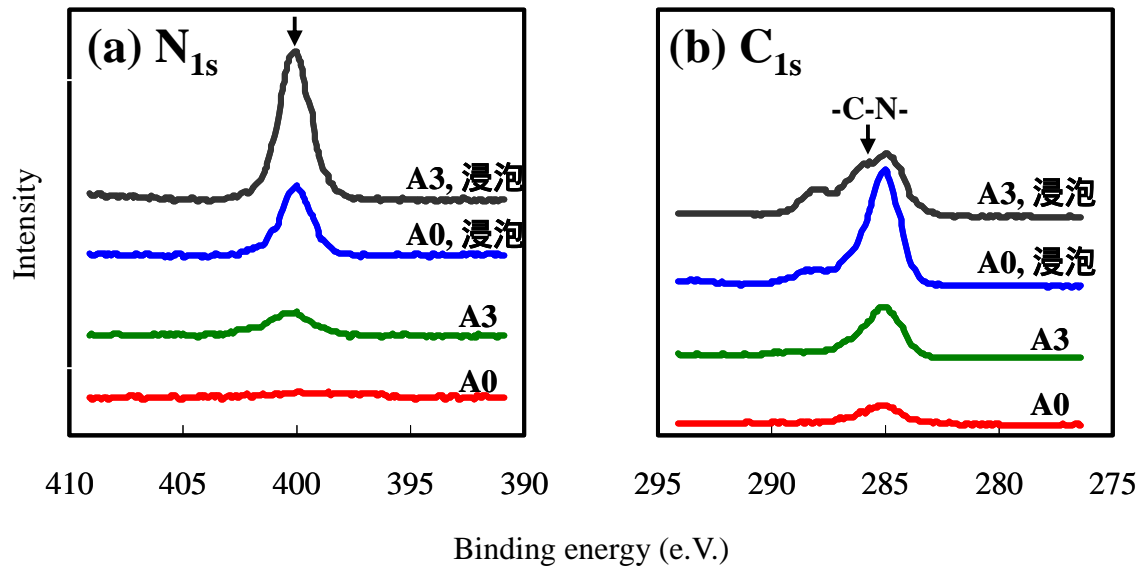


圖4. A0及A3試片且經或未經培養基浸泡2小時後表面XPS分析圖譜((a) N_{1s} ; (b) C_{1s})

Fig. 4 XPS surface analysis results of the untreated A0 and anodized A3 specimens with and without 2h immersion in culture medium: (a) N_{1s} ; (b) C_{1s} .

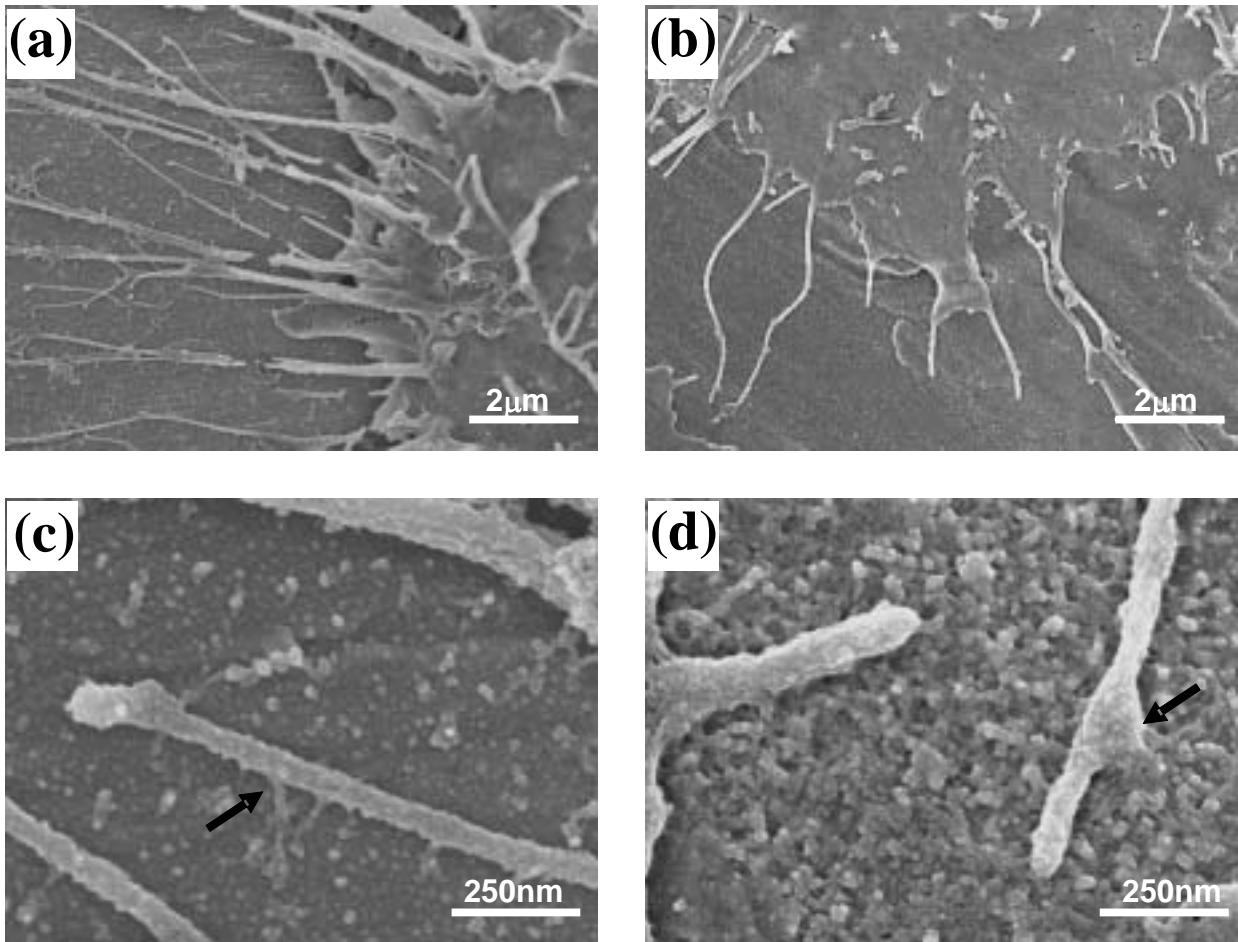


圖5. U-2 OS類造骨細胞在純鈦試片表面培養一天後的FE-SEM觀察圖((a)未經電化學陽極氧化處理之A0試片;(b)經電化學陽極氧化處理之A1試片;(c)(d)為(a)(b)之局部放大)。

Fig. 5 FE-SEM observations of Ti specimens after 1 day cell culture of osteoblast-like U-2 OS cells: (a) untreated A0 specimen; (b) anodized A1 specimen; (c), (d) higher magnification of (a) and (b), respectively.