

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※

※ 表面粗糙度與塗覆層對純 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金在 ※

※ 口腔環境中耐蝕性質及生物相容性質之研究 (2/2) ※

※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2216-E-040-001-

執行期間：90年08月01日至91年07月31日

計畫主持人：黃何雄

共同主持人：李天翎、何主亮

計畫參與人員：何俊德、潘思蓉

執行單位：中山醫學大學牙科材料研究所

中華民國 91 年 10 月 31 日

# 表面粗糙度與塗覆層對純 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金在口腔環境中耐蝕性質及生物相容性質之研究 (2/2)

計畫編號：NSC 90-2216-E-040-001-

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃何雄 中山醫學大學牙科材料研究所

共同主持人：李天翎 中山醫學大學口腔醫學研究所

何主亮 逢甲大學材料科學與工程學系

計畫參與人員：何俊德、潘思蓉 中山醫學大學牙科材料研究所

## 一、中文摘要

本研究探討不同表面粗糙度的 Ti 及 Ti 合金對類造骨細胞 (U-2 OS) 貼附及增殖的影響。利用表面粗度儀測量表面粗糙度，利用原子力顯微鏡觀察材料表面立體形態。細胞成長方面，利用 MTT 分析法評估細胞貼附 (二小時) 數量，利用台盤藍排除法計算細胞增殖 (三天) 數目，利用結晶紫染色技術及掃描式電子顯微鏡觀察細胞的形態。本研究結果顯示，表面粗糙度會影響 U-2 OS 細胞在 Ti 及 Ti 合金表面初期的貼附數目及形態，材料種類會影響 U-2 OS 細胞在材料表面的增殖行為。

**關鍵詞：**粗糙度、細胞、鈦、鈦六鋁四鈮、貼附、增殖

## Abstract

The effect of surface roughness of Ti and Ti6Al4V alloy on the adhesion and proliferation behavior of osteoblast-like cell (U-2 OS) was investigated. The surface roughness ( $R_a$ ), measured by profilometry. 3-D surface topography was measured using atomic force microscope, respectively. MTT assay and trypan blue exclusion method were used to calculate the number of cells attached after 2 h and 3 d incubation, respectively. Crystal violet stain technique and scanning electron microscope were used to characterize the cell morphology after 2 h and 3 d incubation. The results of this study showed that surface roughness had a significant effect on the cell morphology and cell adhesion number after 2 h incubation, while the material had a significant influence on the cell proliferation number after 3 d incubation.

**Keywords:** roughness, cell, Ti, Ti6Al4V, adhesion, proliferation.

## 二、緣由與目的

植體材料表面特性是影響細胞/植體材料界面行為的重要關鍵。機械切削是目前臨床上被廣泛應用的植體材料表面處理方法之一。雖然已有相當多的文獻[1,2,3]探討機械切削所產生的粗糙度對植體材料與細胞反應的影響，但其粗糙度範圍大多未能涵蓋市售植體材料的表面粗糙度範圍[4]。另一方面，大部分文獻探討單一植體材料[1,5-7]或各種不同植體材料系統 (如不同表面鍍層、不同金屬或合金底材) 與細胞間的反應[8-12]，對於臨床上常用的同為 Ti 基植體材料 (Ti 及 Ti6Al4V 合金) 表面細胞成長的差異性仍有待更進一步研究。因此本研究目的在市售機械切削的植體表面粗糙度範圍內，評估粗糙度對類造骨細胞在 Ti 及 Ti6Al4V 合金表面的貼附及增殖行為的影響，以作為選用或發展適當表面粗糙度的 Ti 基植體之參考。

## 三、結果與討論

### 3-1 細胞貼附

本研究選用的 Ti 及 Ti6Al4V 試片經不同表面研磨及拋光處理後之粗糙度 ( $R_a$ ) 範圍為  $0.042\sim 0.928\ \mu\text{m}$  (表 1)，相較市售利用機械切削所生產的 Ti 植體表面之粗糙度範圍約在  $0.08\sim 1.3\ \mu\text{m}$ [4]，本研究所選用的試片表面粗糙度值大致涵蓋上述範圍。圖 1 及 2 顯示，細胞在 Ti 及 Ti6Al4V 試片表面貼附二小時後的吸光值大小分別為：(Ti 試片) 控制組  $\approx\#1500\approx\#600>\#120\approx\text{polish}$  ( $P<0.001$ )；(Ti6Al4V 試片) 控制組  $\approx\#120\approx\#600\approx\#1500>\text{polish}$  ( $P<0.05$ )。上述結果顯示，拋光組試片表面的粗糙度最不利於細胞的貼附。

Anselme 等人[5]曾探討 Ti6Al4V 表面粗糙

度對骨細胞貼附一天行為的影響，結果顯示，經#4000、#1200 砂紙研磨及 500  $\mu\text{m}$  氧化鋁粉噴砂等三組試片表面細胞貼附的情形較為良好。另一方面，Deligianni 等人[1]也以不同號數砂紙研磨 Ti6Al4V 合金，其中最光滑的#1200 試片之細胞貼附（二小時）數目明顯最少。Keller 等人[6]發現噴砂處理的 Ti 試片表面骨細胞明顯大於鑽石膏拋光和#600 砂紙研磨的 Ti 試片，以 SEM 觀察細胞貼附情形也發現細胞較拋光試片更緊密貼附在研磨和噴砂試片表面上。本研究中，不論 Ti 或 Ti6Al4V 試片，表面最光滑的拋光試片在細胞貼附初期（二小時）均顯示最少的細胞數目。

### 3-2 細胞增殖

圖 3 及 4 顯示細胞在 Ti 及 Ti6Al4V 試片表面經三天培養後細胞數目多寡順序分別為：(Ti 試片) 控制組  $\approx$  拋光  $>$  #120  $\approx$  #600  $\approx$  #1500 ( $P < 0.001$ )；(Ti6Al4V 試片) 控制組  $>$  #1500  $>$  拋光  $\approx$  #600  $\approx$  #120 ( $P < 0.001$ )。Ong 等人[3]曾以  $^{45}\text{Ca}$  放射線標定來量測老鼠骨髓細胞在 Ti 表面 12 天內生長速率，結果發現#600 試片和 0.3  $\mu\text{m}$  氧化鋁粉拋光試片並無顯著差異。Deligianni 等人[1]也發現經不同號數砂紙研磨的 Ti6Al4V 試片表面骨細胞的增殖數目並沒有顯著差異，直到第 14 天後，#180 試片的細胞數目才較#600 和#1200 的試片為多。Degasne 等人[8]發現 SAOS-2 類造骨細胞在粗糙的 Ti 試片表面有較多的細胞數目。然而，Anselme 等人[13]卻發現 MC3T3-E1 類造骨細胞在 Ti6Al4V 試片表面的增殖數目會隨著表面粗糙度的增加而減少。上述文獻中結果的差異，可能是因為所用細胞種類的不同及材料表面形態不盡相同所致。在本研究中，表面粗糙度的不同 ( $R_a: 0.042 \sim 0.928 \mu\text{m}$ ) 對 U-2 OS 細胞在 Ti 及 Ti6Al4V 合金表面的增殖數目似乎並無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。

另外，Eisenbarth 等人[14]指出，從 Ti6Al4V 釋放出來的 V 離子對細胞貼附有不良的影響。本研究所顯示 Ti6Al4V 試片表面細胞三天的增殖數目比 Ti 試片少的現象 ( $P < 0.001$ )，可能與 Ti6Al4V 試片表面 V 離子的釋放有關，然而此推測仍需進一步驗證。

### 3-3 細胞形態

在本研究中，MTT 分析法之結果顯示，拋光 Ti 及 Ti6Al4V 試片表面初期(二小時)貼附的細胞數量最少，由 CV stain 分析結果得知(圖

5 及 6)，#120 和#600 試片均可觀察到部分細胞呈現與研磨溝紋 (groove) 方向一致的排列。SEM 觀察結果也顯示(圖 7 及 8)，細胞在不同粗糙度的試片表面貼附外貌有所差異：#120 試片表面可觀察到細胞有接觸引導 (contact guidance) 的現象。AFM 圖(圖 9)中所顯示 Ti 及 Ti6Al4V 的#120 試片表面有明顯的溝脊 (groove ridge) 存在，此溝脊間的位置便可能是細胞容易發生接觸引導現象所在。另一方面，Ti 及 Ti6Al4V 拋光試片表面初期貼附的細胞呈近似圓形外貌，表面有泡狀物 (blebs)，沒有明顯延展 (spreading) 現象；#1500 試片上的細胞表面較平滑且伸出絲狀假足 (filopodia)，並無泡狀物。Orisini 等人[15]認為細胞的絲狀假足是細胞和材料間貼附的有利證據。因此，本研究中細胞貼附初期階段，拋光的 Ti 及 Ti6Al4V 試片表面細胞活性 (activity) 較其他組試片低，而#1500 試片表面的細胞貼附性最佳，且活性最高。

Bengham 和 Pethica 等人[16,17]認為細胞的貼附和伸展與細胞突出的觸角末端有直接的關係。Rajaraman 等人[18]也指出這些觸角末端直徑和絲狀假足的大小相近。den Braber 等人[19]則認為細胞初期純粹是以機械性的卡鎖 (interlocking) 方式貼附於材料表面，所以本研究推測適當的表面粗糙度值對細胞可以產生良好的機械性卡鎖效應而有利細胞的貼附。另一方面，接觸引導的現象可能是因材料表面形狀影響細胞的肌動蛋白骨架 (actin cytoskeleton)、貼附點 (focal adhesion) 及微管 (microtubule) [20]或是因細胞在材料表面尋求達到生物機械力平衡 (biomechanical equilibrium) [21]所造成的結果。Walboomers 等人[22]也認為隨著材料表面溝脊深度的增加，細胞在材料表面的延展將主要沿著溝壁表面進行。因此，本研究中表面粗糙度值最大的#120 試片，細胞最容易發生接觸引導現象，進而使細胞的成長方向受到引導作用。

## 四、結論

1. 表面經不同號數砂紙研磨及氧化鋁粉拋光處理的 Ti 及 Ti6Al4V 試片，其粗糙度 ( $R_a$ ) 值如下：對 Ti 試片而言，#120 為 0.928  $\mu\text{m}$ ，#600 為 0.218  $\mu\text{m}$ ，#1500 為 0.146  $\mu\text{m}$ ，拋光試片為 0.072  $\mu\text{m}$ ；對 Ti6Al4V 試片而言，#120 為 0.672  $\mu\text{m}$ ，#600 為 0.134  $\mu\text{m}$ ，#1500 為 0.070  $\mu\text{m}$ ，拋光試片為 0.042  $\mu\text{m}$ 。
2. MTT 法分析之結果顯示，對 Ti 而言，#600

及#1500 試片表面初期（二小時）貼附的細胞數目大於#120 及拋光試片（ $P<0.001$ ）；對 Ti6Al4V 而言，#120、#600 及#1500 試片表面初期（二小時）貼附的細胞數目大於拋光試片（ $P<0.05$ ）。

3. 台盤藍排除法分析之結果顯示，Ti 試片表面細胞的增殖數目（三天）順序為：拋光>#120 ≈#600 ≈#1500（ $P<0.001$ ）；Ti6Al4V 試片表面細胞的增殖數目（三天）順序為：#1500>#120 ≈#600 ≈拋光（ $P<0.001$ ）。
4. 結晶紫染色技術分析之結果顯示，Ti 及 Ti6Al4V 合金的#120 及#600 試片表面可觀察到細胞有沿溝紋生長現象。SEM 觀察顯示，不論 Ti 或 Ti6Al4V 合金，細胞貼附初期（二小時）在#120 試片表面的細胞均有明顯接觸引導現象；#1500 試片表面的細胞可觀察到絲狀假足（表示細胞活性較佳）；拋光試片的細胞表面則可發現泡狀物（表示細胞活性較差）。
5. 在臨床應用上，接觸引導現象可以應用於引導骨細胞在特定區域成骨或形成屏障，進而阻隔不必要的細胞生長，製造出符合需求的植體。

## 五、計畫成果自評

本研究已依計畫書內容如期完成，並得到重要結果可供臨床參考。目前正準備將研究成果發表於國內外相關期刊，未來亦將延續本計畫的研究成果，繼續探討材料表面改質對植體材料生物相榮幸之影響。

## 六、參考文獻

- [1] Deligianni DD, Katsasla N, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. *Biomaterials* 2001;22:1241-1251.
- [2] Links J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. *Biomaterials* 1998;19:2219-2232.
- [3] Ong JL, Prince CW, Raikar GN, Lucas LC. *Implant Dent* 1996;5:83-88.
- [4] Wennerberg A, Albrektsson T. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:331-344.
- [5] Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155-166.
- [6] Keller JC. *Implant Dent* 1998;7:331-337.
- [7] Ku C-H, Pioletti D.P, Browne M, Gregson PJ. *Biomaterials* 2002;23:1447-1454.
- [8] Degasne I, Baslé MF, Demais V, Huré G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D. *Calcif Tissue Int* 1999;64:499-507.
- [9] Howlett CR, Zreiqat H, Wu Y, McFall DW, McKenzie DR. *J Biomed Mater Res* 1999;45:345-354.
- [10] Puleo DA, Holleran LA, Doremus RH, Bizios R. *J Biomed Mater Res* 1991;25:711-723.
- [11] Wong M., Eulenberger I., Schenk R., Hunziker E. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1567-1575.
- [12] Schmidt C, Ignatius AA., Claes LE. *J Biomed Mater Res* 2001;54:209-215.
- [13] Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, Hildebrand HF, Iost A, Leroy JM. *Biomaterials* 2000;21:1567-1577.
- [14] Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme. *Biomaterials* 1996;17:1399-1403.
- [15] Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piatelli M, Piattelli A. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:779-784.
- [16] Bingham AD, Pethica BA. *Proc Roy Soc, Edinburgh* 1961;B28,43.
- [17] Pethica, BA. *Exptl cell res* 1961;suppl. 8:123.
- [18] Rajaraman R, Rounds DE, Yen SPS, Rembaum A. *Exptl Cell Res* 1974;88:327-339.
- [19] den Braber ET, de Ruijter JE, Smots HTJ, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. *Biomaterials*. 1996;17:1093-1099.
- [20] Wang JH-C, Grood ES, Florer J, Wenstrup R. *J Biomechanics* 2000;33:729-735.
- [21] Ward MD, Hammer DA. *Biophys J* 1993;64:936-959.
- [22] Walboomers XF, Ginsel LA, Jansen JA. *J Biomed Mater Res* 2000;51:529-534.

表 1 Ti 及 Ti6Al4V 經研磨及拋光處理後表面粗糙度 (Ra) 值

	Ti	Ti6Al4V
#120	0.928 ± 0.117	0.672 ± 0.176
#600	0.218 ± 0.036	0.134 ± 0.026
#1500	0.146 ± 0.015	0.070 ± 0.012
Polish	0.072 ± 0.021	0.042 ± 0.004

單位：μm; n=5

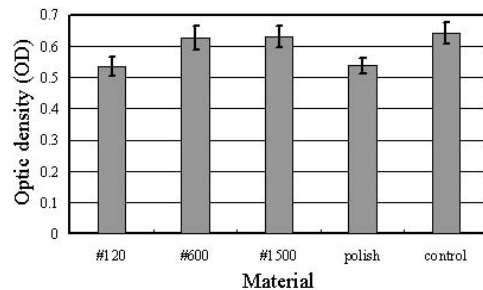


圖 1 細胞在不同表面處理的 Ti 試片貼附二小時後所測得的吸光值

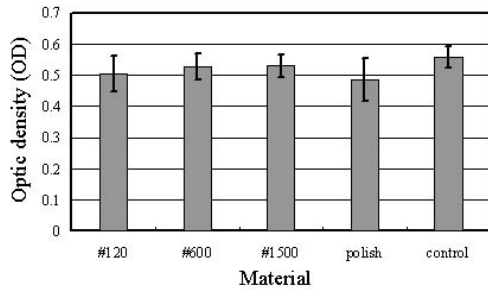


圖 2 細胞在不同表面處理的 Ti6Al4V 試片貼附二小時後所測得的吸光值

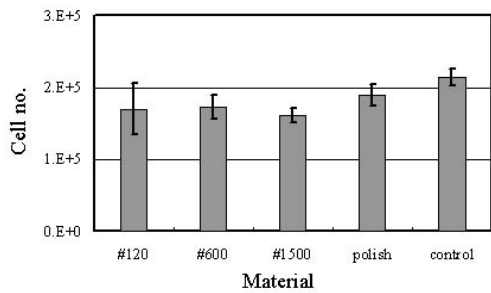


圖 3 細胞在不同表面處理的 Ti 試片表面培養三天後的數目

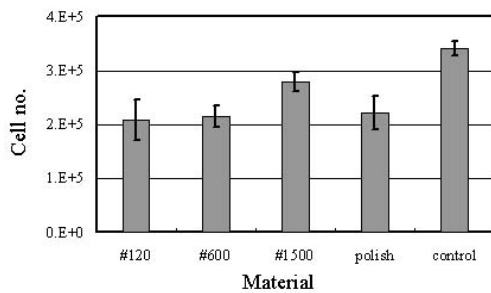


圖 4 細胞在不同表面處理的 Ti6Al4V 試片表面培養三天後的數目

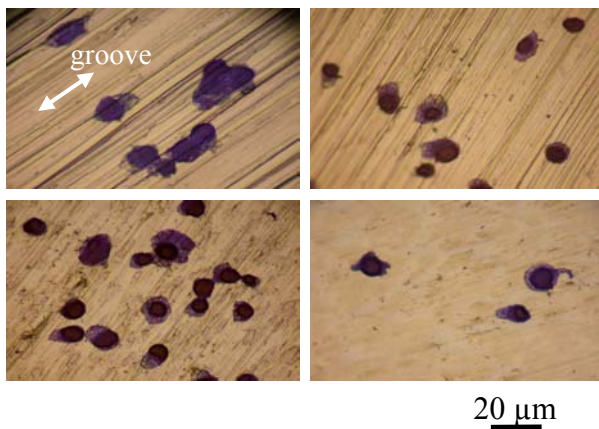


圖 5 Ti 經不同表面研磨及拋光處理後細胞貼附二小時的結晶紫染色結果

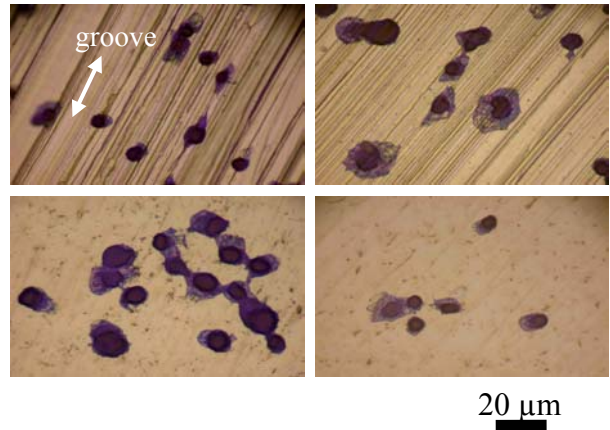


圖 6 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後細胞貼附二小時的結晶紫染色結果

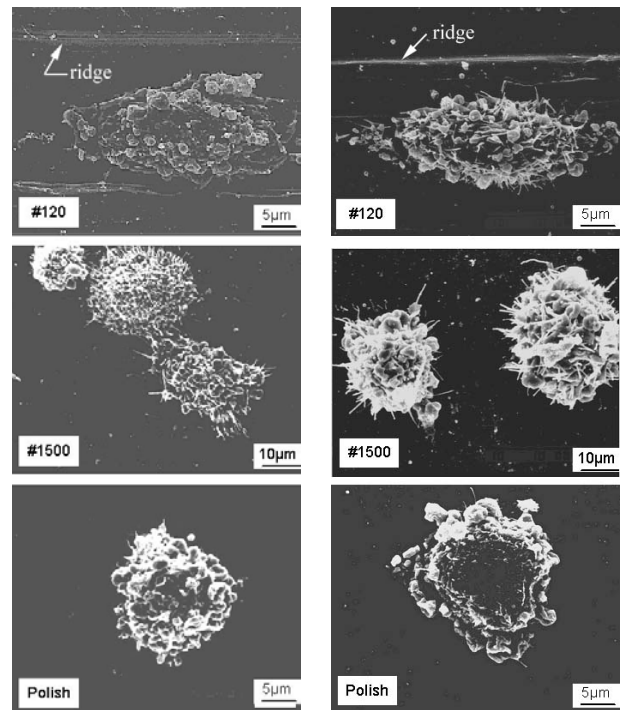


圖 7 Ti 金屬表面的細胞貼附 SEM 圖

圖 8 Ti6Al4V 金屬表面細胞貼附 SEM 圖

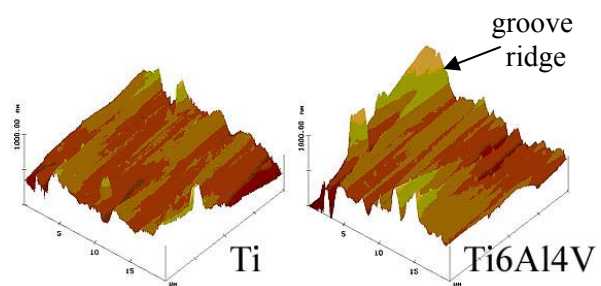


圖 9 Ti 和 Ti6Al4V 經#120 砂紙研磨後表面 AFM 圖