

第一章 前言

商業級純鈦 (commercially pure titanium, Cp Ti) 和鈦六鋁四鈱合金 (Ti6Al4V) 因為具有良好的生物相容性，所以常被用來作為骨骼的移植材料 (Albrektsson et al.,1983; Abrahamsson et al., 2001; Howlett et al., 1999; Keller et al.,1994; Kieswetter et al.,1996) 生醫材料植入組織後，生物相容性的好壞除了與材料表面的物理及化學性質有關，也取決於細胞在材料表面的初期反應，如細胞貼附 (adhesion) 與細胞伸展 (spreading)。許多研究已指出，組織與生醫材料之界面反應會受到表面處理 (Anselme et al.,2000; Curtis et al., 2001; Gray et al., 1996; Keller, 1998; Ku et al., 2002; Orsini et al., 2000; Sykaras et al., 2000; Wong et al., 1995; Wennerberg et al., 2000) 表面能量 (Alaerts et al., 2001; Bess et al., 1999; Lim et al., 2001; Mekayarajjananonth et al., 1999) 細胞種類 (Bruinink et al., 2001; Eisenbarth et al. 1995; Wang et al.,2000; Walboomers et al.,2000) 材料種類 (Ahmad et al, 1999; Eisenbarth et al., 1995; Hanawa et al., 1999; Keller, 1999; Puleo et al., 1991; Schmidt et al., 2001; Sykaras et al., 2000) 和粗糙度 (Anselme et al., 2000; Boyan, 1999; Brunette and Chehroudi et al., 1999; den Braber et al., 1996; Keller, 1998; Link et al., 1998; Ong et al., 1996; Sykaras et al., 2000; Wieland et al., 2002) 等因素的影響。

表面處理會影響材料表面的化學性質和表面形態。材料表面的化學特性則直接影響血清與細胞外 (extracellular) 液體吸附於材料表面的能力 (Degasne et al., 1999; Bess et al., 1999; Ong et al., 1996)，進而影響細胞接觸、貼附與增殖等後續表現。

Deligianni 等人 (Deligianni et al., 2001) 利用 X 光光電子能譜儀 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 和放射線標定 (radiolabeling) 法來測量蛋白質在 Ti6Al4V 合金表面的吸附行為，發現人類血清白蛋白 (serum albumin) 吸附在較光滑試片上的量較多，而培養液中蛋白質和 fibronectin 在粗糙試片上的吸附量較多，推測細胞貼附數目的不同可能和蛋白質的吸附有關係。表面處理所產生不同的表面形態 (如溝紋 groove、凹陷 pits、孔洞 porosity) 也會影響細胞在材料表面的反應 (即使粗糙度值相同) (Curtis et al., 2001; Martin et al., 1995)。 Martin 等人 (Martin et al., 1995) 發現人類類造骨細胞 (human osteoblast-like cell, MG 63) 植入人體 24 小時後，有較小孔洞試片表面的細胞酵素活性明顯較大孔洞試片低，即表面形態會影響細胞反應。

就表面能量而言，不同的表面能量有不同的潤溼性 (wettability)，進而影響血清吸附在材料表面的速率及蛋白質的排列 (Anselme, 1999; Boyan et al., 1996)。因此，許多細胞生物學家藉由改變材料表面能量的方式來獲得最佳之生物親和性：例如，利用聚苯乙烯 (polystyrene) 表面培養細胞，並以灼熱法增加試片表面帶電離子密度，評估不同帶電荷表面對細胞貼附與伸展等性質之影響 (Baier et al., 1984)。另外，表面能量高的材料，會有較佳的細胞貼附行為，而材料表面的製備及滅菌過程中表面所吸附的污染物 (如 grease) 則會降低材料表面能量，而使細胞貼附能力受到影響 (Brunette, 1999)。

不同種類的細胞對材料表面粗糙度的反應也不同。 Clark 等人 (Clark et al, 1991, Eisenbarth et al., 1996) 曾比較上皮細胞 (epithelial cells) 和纖維母細胞 (fibroblasts)

在溝紋上的貼附行為，發現上皮細胞有較強的橫跨過溝紋 (groove) 傾向。臨床研究報告也指出，表面粗糙的植體易有成骨細胞貼附，而光滑表面的植體則易促成纖維細胞生長。一般而言，粗糙面可促進骨細胞的分化 (Kieswetter et al.,1996; Boyan et al.,1998)，纖維母細胞則易在光滑面上貼附及增殖 (Könöen et al., 1992)。

就金屬材料而言，Ti 已被公認為具有良好的生物相容性材料，但是對於 Ti6Al4V 合金中所含鋁 (Al) 和鈦 (V) 對細胞生物反應的影響則仍需更進一步研究。Keller 等人 (Keller et al., 1985) 探討幼鼠顱內類造骨細胞在 Ti 與 Ti6Al4V 試片之細胞生物反應，發現 Ti6Al4V 試片表面氧化膜除了 Ti 元素，也可分析到 16% 的 Al 含量，且氧化膜較純 Ti 金屬厚。在相同粗糙度、短時間條件下，造骨細胞在 Ti 與 Ti6Al4V 試片表面的貼附數目在統計上並沒有顯著差異。有報告指出，雖然 Ti 及 Ti6Al4V 合金表面都有二氧化鈦 (TiO₂) 的生成，但是氧化層的結晶形態會因為底材種類而不同 (Donley et al., 1991; Ducheyne et al., 1988; Sykaras, 2000) 另外，Keller 等人 (Keller et al., 1998) 用歐傑電子能譜儀 (Auger electron spectroscopy, AES) 分析出 Ti6Al4V 合金上的氧化層較 Ti 金屬厚。Anselme 等人 (Anselme et al., 2000) 利用 X 光光電子能譜儀 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 偵測出 Ti6Al4V 合金表面有 Al 和 V 的成份，而這兩種成份都會影響到細胞的反應。Eisenbarth 等人曾探討纖維母細胞在相同拋光處理的 Ti、Ti6Al4V 和 TiTa30 試片上貼附情形，發現經二天細胞培養後，不同材料表面細胞形狀並沒有差異，但經 14 天細胞培養後，Ti6Al4V 試片表面細胞形狀則明顯比在其他兩種試片上生長的細胞要圓，這種圓形的細胞外形即代表了細

胞和材料之間的貼附性不佳，此現象可能是 Ti6Al4V 經長時間培養後，材料表面釋放的 V 離子影響了細胞貼附的行為 (Eisenbarth et al., 1996)。

就表面粗糙度而言，表面粗糙度和骨整合 (osseointegration) 有著密切的關係 (Albrektsson et al.,1981; Sykaras et al., 2000)。一般而言，粗糙面可吸附特定的蛋白質於表面，與細胞貼附行為相關的蛋白質中(如 fibronectin、 vitronectin、 osteopontin、 thrombospondin、 fibrinogen) 均含有 arginine-glycine-aspartic acid (RGD)，此 RGD 會被細胞表面和貼附有關係的受器 (receptor) 所結合(Sykaras et al., 2000; Ruoslan et al., 1987; Kornu et al.,1996)，進而促進細胞的貼附 Eisenbarth 等人(Eisenbarth et al., 1996) 研究纖維母細胞在不同粗糙度的 Ti、 Ti6Al4V 和 Ti30Ta 合金表面貼附情形，發現將細胞培養在有溝紋的試片表面二天後，細胞排列的形狀會隨著試片表面粗糙度 (Ra) 增加而更明顯。 Anselme 等人 (Anselme et al., 2000) 評估骨細胞在在不同粗糙面 Ti6Al4V 表面之貼附(一天) 情形，發現 #4000 研磨(Ra : 0.16 μm) #1200 研磨(Ra : 0.20 μm) 及 500 μm 噴砂 (Ra : 2.19 μm) 試片上細胞的貼附性比#80 研磨 (Ra : 0.30 μm) 及 3 mm 噴砂(Ra : 3.4 μm) 試片強。然而， Deligianni 等人(Deligianni et al., 2001) 研究骨髓細胞 (bone marrow cells) 在#1200 (Ra : 0.320 μm) #600 (Ra : 0.490 μm) 和#180 (Ra : 0.874 μm) 砂紙研磨的 Ti6Al4V 試片表面貼附情形，發現細胞經過 1/2 和二小時貼附後，粗糙度越大之試片表面貼附的細胞數目越多。 Keller 等人(Keller et al., 1998) 研究不同的植體表面對造骨細胞 (primary osteoblast-like cell) 的影響，發現在 Ti 試片上，光滑面(Ra : 0.03 μm) 研磨表面(Ra : 0.1 μm) 和噴砂粗糙面(Ra :

0.7 μm) 經細胞貼附一小時之後，噴砂粗糙面的 Ti 試片表面細胞數目明顯大於光滑面及研磨面，光滑面和研磨面兩組的細胞數目沒有顯著差異。在細胞增殖 (proliferation) 方面，Anselme 等人 (Anselme et al., 2000) 曾探討類造骨細胞 (MC3T3-E1) 在不同粗糙度 (R_a : 0.16~2.19 μm) 的 Ti6Al4V 表面增殖數目的差異，發現細胞增殖數目(三天)隨著 R_a 升高而變少。Deligianni 等人 (Deligianni et al., 2001) 在 #1200 (R_a : 0.32 μm)、#600 (R_a : 0.49 μm) 及 #180 (R_a : 0.874 μm) 砂紙研磨的 Ti6Al4V 試片上培養骨髓細胞 (8、11、14 和 16 天) 發現只有在 14 和 16 天時，#180 試片表面的細胞數目明顯較其他組試片多，其餘天數試片上所量測的細胞數目並無明顯差異。

從材料的觀點而言，植體材料表面的特性是影響細胞/植體材料界面行為的重要關鍵。機械切削 (machining) 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 (Deligianni et al., 2001; Link et al., 1998; Ong et al., 1996) 探討過機械切削所產生的粗糙度 (通常利用砂紙研磨來模擬) 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 (Wennerberg et al., 2000)。另一方面，大部分的文獻是探討單一植體材料 (Anselme et al., 2000; Deligianni et al., 2001; Keller et al., 1998; Ku et al., 2002) 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 (Degasne et al., 1999; Howlett et al., 1999; Puleo et al., 1991, Schmidt et al., 2001; Wong et al., 1995)，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。因此本研究的目的是要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。

第二章 材料和方法

2-1 實驗材料

本研究所使用的材料為片狀的商業級純 Ti 及 Ti6Al4V 合金 (Goodfellow Cambridge Ltd., Cambridge, England)。試片表面經砂紙研磨和 1 μm 氧化鋁粉拋光處理, 以製備各種表面粗糙度值的各種試片。#120、#600、#1500 及拋光試片分別表示材料表面研磨至#120、#600、#1500 號砂紙及拋光處理。試片經乾熱滅菌 (150 / 2.5 小時) 後, 進行後續的表面性質分析及細胞培養。

2-2 材料表面性質分析

利用表面粗度儀 (Surfcoorder SE-40G, Kosaka, Laboratory Ltd., Japan)(圖 2-1) 量測 Ti 及 Ti6Al4V 各種粗糙度試片的表面粗度曲線中心線平均粗度值 (Ra), 用來表示試片橫斷面的垂直平均距離。利用原子力顯微鏡 (atomic force microscope, AFM) (Nanoscope III, Digital Instruments Inc., USA)(圖 2-2) 觀察試片表面三維空間外貌。利用 X 光光電子能譜儀 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)(圖 2-3)(ESCA 210, VG Scientific Ltd., England) 分析試片表面化學結構。利用歐傑電子能譜儀 (Auger electron spectroscopy, AES)(Microlab 310D, VG Scientific Ltd., England)(圖 2-4) 分析試片表面元素縱深分佈。

2-3 細胞培養 (cell culture)

本研究選用的細胞為類造骨細胞 (U-2 OS, osteosarcoma cell) , 相關研究指出此細胞株具有造骨細胞 (osteoblast) 的遺傳表型 (phenotype) (Nelissen et al., 2000) , 故本研究以此細胞株來模擬骨細胞的行為 (貼附和增殖) 。 將 U-2 OS 細胞培養於 McCoy ' s 5A 培養液 (含 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum) 100 μ g/mL streptomycin 和 100 mg/mL penicillin) 中 , 培養皿放置在含 5% CO₂ 的保溫箱中 , 保持 37 $^{\circ}$ C , 待細胞生長接近全滿時 , 以胰蛋白酶 (trypsin-EDTA) 消化培養皿上的細胞製成細胞懸浮液 , 再進行後續的細胞貼附及增殖相關試驗。

2-4 生長曲線 (growth curve) 量測

取含 2×10^5 個 U-2 OS 細胞的細胞懸浮液接種於培養盤上 , 在第 1、3、5、7、10、14 及 19 天等不同時間下計算細胞數目 , 求取細胞生長曲線 (n=3) 。

2-5 細胞貼附 (cell adhesion) 分析

2-5-1 MTT 分析法

MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) 分析法可定量評估細胞和材料之間的貼附情形。 將 U-2 OS 細胞均勻接種 (密度 : 10^5 細胞 / 3.8 cm^2) 於各種粗糙度的試片表面二小時後 , 表面利用磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 2 次 , 移除未貼附的細胞 , 再加入 MTT 試劑 (5 mg/mL) 繼續培養

3 小時，活細胞粒腺體脫氫酶還原 MTT 藥劑為不溶於水的藍色產物，吸除培養液，加入重氫二甲亞風(Dimethylsulfoxide, DMSO)溶解藍色產物，搖勻 5 分鐘充分溶出，置於酶聯檢測儀(ELISA reader)(Model-960, Labindia Instruments Ltd., India)(圖 2-5)，在 550 nm 波長的光源下測定其吸光值(optic density, OD)，紀錄不同表面研磨及拋光處理後細胞貼附二小時的吸光值百分比(實驗組吸光值 / 控制組吸光值 × 100%)。

2-6 細胞增殖 (cell proliferation) 分析

2-6-1 台盤藍排除法 (trypan blue exclusion method)

U-2 OS 細胞在 4 種不同粗糙度的 Ti 及 Ti6Al4V 試片上及 12 孔 (12-well) 的聚苯乙烯(polystyrene)培養盤(當作控制組)上，培養(密度： 10^5 細胞 / 3.8 cm^2)三天後，以 0.25%的胰蛋白酶(trypsin-EDTA)消化試片表面上的細胞製成細胞懸浮液，利用台盤藍排除法，以血球計數器計算(Neubauer improved, Marienfeld, Germany)(圖 2-6)每個試片上的細胞數目。紀錄不同粗糙度試片增殖數目，並除以控制組的細胞數目(試片細胞數目/控制組細胞數目 × 100%)，即為試片表面細胞增殖百分比。

2-7 細胞形態 (morphology) 觀察

2-7-1 結晶紫染色 (crystal violet stain, CV stain) 技術

均勻接種(密度： 10^5 細胞 / 3.8 cm^2)細胞於試片上二小時後，吸除未貼附的細

胞和培養液，以 PBS 清洗 2 次後，加入新的 PBS/甲醇 (methanol) 混合液，待靜置 2 分鐘然後吸掉，再加入新的甲醇 10 分鐘後吸除，靜置乾燥，加入 0.1% 的結晶紫 (crystal violet) 溶液染色，然後以去離子水反覆清洗，待乾燥後把試片放在反射式光學顯微鏡 (圖 2-7) (BH2-UMA, Olympus, Japan) 下觀察細胞形態。

2-7-2 掃描式電子顯微鏡觀察 (scanning electron microscope, SEM)

U-2 OS 細胞經二小時與三天培養於試片表面後，移除細胞培養液和未貼附的細胞，加入 PBS 清洗 2 次，然後先以 2.5 % 戊乙醛 (glutaraldehyde) 初步固定細胞，接著繼續以 1 % 四氧化鐵 (O_3O_4) 作用 1 小時，1 % 單寧酸 (tannic acid) 作用 1 小時固定細胞，經酒精一系列 (30%、50%、70%、90%、95%、100% 酒精) 脫水後，浸泡於六甲基二矽氯烷 (hexamethyldisilazane, HMDS) 10 分鐘，臨界點乾燥處理，最後將試片表面蒸鍍一層薄金，置於掃描式電子顯微鏡 (JSM-T300, JEOL Ltd., Japan) (圖 2-8) 下，進行細胞表面形態觀察。

2-8 統計分析

本研究利用 one-way 及 multiple linear regression 分析細胞貼附 (MTT 法之分析結果) 及細胞增殖 (台盤藍排除法之分析結果) 情形。其中 one-way ANOVA 是用來分析表面粗糙度對 Ti 或 Ti6Al4V 合金表面細胞貼附及增殖的影響，多重線性回歸 (multiple linear regression) 是用來分析粗糙度與材料種類對細胞貼附及增殖的影響。

第三章 結果

3-1 材料表面性質

表 3-1 為 Ti 及 Ti6Al4V 經研磨及拋光處理後表面粗糙度 (Ra) 值。圖 3-1 為其相對應之 AFM 表面 3-D 形態圖。結果顯示，就 Ti 而言，粗糙度 (Ra) 大小順序為 #120 試片 ($0.928\ \mu\text{m}$) > #600 試片 ($0.218\ \mu\text{m}$) > #1500 試片 ($0.146\ \mu\text{m}$) > 拋光試片 ($0.072\ \mu\text{m}$)；就 Ti6Al4V 而言，粗糙度 (Ra) 順序為 #120 試片 ($0.672\ \mu\text{m}$) > #600 試片 ($0.134\ \mu\text{m}$) > #1500 試片 ($0.070\ \mu\text{m}$) > 拋光試片 ($0.042\ \mu\text{m}$)。

圖 3-2 為 (a) Ti 及 (b) Ti6Al4V 合金拋光表面 XPS 分析圖譜。結果顯示，Ti 表面有 TiO_2 存在；Ti6Al4V 表面除 TiO_2 外，也可偵測到 Al_2O_3 的存在。圖 3-2 (c) 及 (d) 分別為圖 3-2 (b) 之局部放大圖，圖中顯示，Ti6Al4V 表面可偵測到 Al 及 V 的存在。圖 3-3 為 Ti 及 Ti6Al4V 合金拋光表面 AES 縱深元素分佈圖。圖中顯示，Ti 表層主要是含 Ti 及 O 元素；Ti6Al4V 表層除 Ti 及 O 元素外，尚可偵測到 Al 及少量 V 元素存在。

3-2 細胞生長曲線

圖 3-4 為 U-2 OS 類造骨細胞生長曲線圖。結果顯示，細胞數目隨著時間增加而增加，細胞的倍增時間 (doubling time) 則為 37.85 小時 (約一天半)。

3-3 細胞貼附

圖 3-5 為細胞在培養盤表面上貼附二小時後之數目和吸光值 (optic density, OD) 的標準曲線圖。結果顯示，吸光值與細胞數目呈良好的線性關係，($y=0.0849+0.1728x$, $R^2=0.9799$)，因此試片上貼附初期 (二小時) 的細胞數目適合用吸光值來計算。

圖 3-6 為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。結果顯示，吸光值大小順序為控制組試片 > #1500 試片 \approx #600 試片 > 拋光試片 \approx #120 試片 ($P < 0.001$)。

圖 3-7 為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 結果顯示，吸光值大小順序為控制組試片 \approx #120 試片 \approx #600 試片 \approx #1500 試片 > 拋光試片 ($P < 0.05$)。

圖 3-8 為 Ti 及 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後，表面細胞貼附二小時的吸光值百分比 (實驗組吸光值 / 控制組吸光值 $\times 100\%$)。結果顯示，對 #120 試片：Ti < Ti6Al4V；對 #600 試片：Ti > Ti6Al4V；對 #1500 試片：Ti > Ti6Al4V；對拋光試片：Ti < Ti6Al4V。

表 3-2 為 Ti 及 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後，表面細胞貼附二小時的吸光值百分比之統計分析 (multiple linear regression)。結果顯示，不論是粗糙度或材料種類對細胞貼附二小時的吸光值百分比都沒有顯著影響。

圖 3-9 為不同表面粗糙度 (Ra) 的 Ti 和 Ti6Al4V 試片細胞貼附二小時吸光值的百分比。結果顯示，粗糙度與吸光值百分比並沒有規律。

3-4 細胞增殖

圖 3-10 為細胞在不同表面處理的 Ti 試片表面培養三天後的數目。結果顯示，細胞數目多寡順序如下：控制組試片 \approx 拋光試片 $>$ #120 試片 \approx #600 試片 \approx #1500 試片 ($P < 0.001$)。

圖 3-11 為細胞在不同表面處理的 Ti6Al4V 試片表面培養三天後的數目。結果顯示，數目多寡順序如下：控制組試片 $>$ #1500 試片 $>$ #120 試片 \approx #600 試片 \approx 拋光試片 ($P < 0.001$)。

圖 3-12 為 Ti 及 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後，細胞增殖三天的數目百分比。結果顯示，對 #120 試片：Ti $>$ Ti6Al4V；對 #600 試片：Ti $>$ Ti6Al4V；對 #1500 試片：Ti $<$ Ti6Al4V；對拋光試片：Ti $>$ Ti6Al4V。

表 3-3 為 Ti 及 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後，表面細胞增殖三天數目百分比之統計分析 (multiple linear regression)。結果顯示，材料是有顯著影響的因子 ($P < 0.001$)，粗糙度則無 ($P > 0.05$)，而材料與粗糙度兩因子彼此沒有交互作用。

圖 3-13 為不同表面粗糙度 (Ra) 的 Ti 及 Ti6Al4V 試片表面細胞增殖數目 (三天) 的百分比 (實驗組細胞數目 / 控制組細胞數目 $\times 100\%$)。結果顯示，粗糙度與細胞數目的百分比並沒有規律。

3-5 細胞形態

圖 3-14 為 Ti 經不同表面研磨及拋光處理試片後，細胞貼附二小時的結晶紫染

色。結果顯示，可觀察到濃染細胞核和淡染的細胞質。#120 及#600 試片表面的細胞有較明顯的接觸引導 (contact guidance) 現象，部分細胞易順著表面的溝痕 (groove) 方向伸展；#1500 試片上細胞貼附的程度比其他組試片明顯；拋光組試片表面細胞多呈圓形，其貼附的程度較不明顯。

圖 3-15 為 Ti6Al4V 試片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。結果顯示，可觀察到濃染細胞核和淡染的細胞質。#120 及#600 試片表面的細胞有較明顯的接觸引導 (contact guidance) 現象，部分細胞易順著表面的溝痕 (groove) 方向伸展；#1500 試片上細胞貼附的程度比其他組試片明顯；拋光組試片表面細胞多呈圓形，其貼附的程度較不明顯。

圖 3-16 (a) 為細胞貼附 (二小時) 於 Ti 金屬 (#120 試片) 表面的 SEM 圖。圖中可以觀察到細胞在溝紋 (groove) 方向上伸展。圖 3-16 (b) 為細胞貼附 (二小時) 於 Ti 金屬 (#1500 試片) 表面的 SEM 圖，圖中可觀察到細胞表面伸出許多絲狀假足，代表細胞具有優良活性及貼附性。圖 3-16 (c) 為細胞貼附 (二小時) 於 Ti 金屬 (拋光試片) 表面的 SEM 圖，圖中可觀察到細胞表面還存有許多泡狀物 (Blebs)，顯示細胞在材料表面的貼附性不佳。圖 3-17 (a) (c) 所顯示細胞在 Ti6Al4V 表面初期 (二小時) 的貼附外貌與圖 3-16 (a) (c) 所敘述相同。

圖 3-18 (a) 為細胞貼附 (二小時) 於 Ti 金屬 (#1500 試片) 表面的 SEM 圖。圖中可觀察到細胞底部有溝紋存在，此為細胞與金屬表面貼附時所留下的痕跡。圖 3-18 (b) 為細胞貼附 (二小時) 於 Ti6Al4V 金屬 (#1500 試片) 表面的 SEM 圖，圖

中也可觀察到細胞底部有溝紋存在，此亦為細胞與金屬表面貼附時所留下的痕跡。

第四章 討論

4-1 細胞貼附

本研究所選用的 Ti 及 Ti6Al4V 試片經不同表面研磨及拋光處理後之粗糙度 (Ra) 範圍為 0.042 ~ 0.928 μm (表 3-1), 由於市售利用機械切削所生產的 Ti 植體材料表面之粗糙度 (Ra) 範圍約在 0.08 ~ 1.3 μm (Wennerberg et al., 2000), 故本研究所選用的 Ti 及 Ti6Al4V 試片表面粗糙度值 (Ra) 大致涵蓋上述範圍。

圖 3-5 及 3-6 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) 控制組試片 \approx #1500 試片 \approx #600 試片 $>$ #120 試片 \approx polish 試片 ($P < 0.001$); (Ti6Al4V 試片) 控制組試片 \approx #120 試片 \approx #600 試片 \approx #1500 試片 $>$ polish 試片 ($P < 0.05$)。上述結果顯示, 拋光組試片表面的粗糙度 (Ti : 0.072 μm , Ti6Al4V : 0.042 μm) 最不利於細胞的貼附。Anselme 等人 (Anselme et al., 2000) 曾探討 Ti6Al4V 表面粗糙度對骨細胞貼附一天行為的影響, 所選用的粗糙度分別是 #4000 (Ra : 0.16 μm)、#1200 (Ra : 0.20 μm)、#80 (Ra : 0.3 μm) 和 500 μm (Ra : 2.19 μm)。3 mm 氧化鋁粉噴砂 (Ra : 3.40 μm) 試片, 結果顯示, 經 #4000、#1200 砂紙研磨及 500 μm 氧化鋁粉噴砂等三組試片表面細胞貼附的情形比其他組試片良好。另一方面, Deligianni 等人 (Deligianni et al., 2001) 也以 #180、#600 及 #1200 等不同號數碳化矽砂紙研磨 Ti6Al4V 合金, 其相對應之粗糙度 (Ra) 分別為 0.874、0.490 及 0.320 μm , 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 (Keller et al., 1998) 發現噴砂處理的 Ti 試片 (Ra : 0.7 μm) 表面骨細胞明顯大於鑽石膏拋光

($R_a : 0.03 \mu\text{m}$) 和 #600 碳化矽砂紙研磨 ($R_a : 0.1 \mu\text{m}$) 的 Ti 試片，以 SEM 觀察細胞貼附情形也發現細胞緊密貼附在研磨和噴砂試片表面上，而較不易貼附在拋光試片的表面。

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，此與上述相關文獻的結果相符合。

4-2 細胞增殖

圖 3-9 及 3-10 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：對 Ti 試片而言，控制組試片 \approx 拋光試片 $>$ #120 試片 \approx #600 試片 \approx #1500 試片 ($P < 0.001$)；對 Ti6Al4V 試片而言，控制組試片 $>$ #1500 試片 $>$ 拋光試片 \approx #600 試片 \approx #120 試片 ($P < 0.001$)。Ong 等人 (Ong et al., 1996) 曾以 ^{45}Ca 放射線標定來量測培養老鼠骨髓細胞在 Ti 表面 12 天內生長速率，結果發現 #600 試片 ($R_a: 0.28 \mu\text{m}$) 和 $0.3 \mu\text{m}$ 氧化鋁粉拋光試片 ($R_a: 0.11 \mu\text{m}$) 並無顯著差異。Deligianni 等人 (Deligianni et al., 2001) 也發現經 #180、#600 和 #1200 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(第 8 及第 11 天)，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 (Degasne et al., 1999) 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 (Anselme et al., 2000) 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(Ra：0.042~0.928 μm)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($P>0.05$)。

當細胞在材料表面的貼附穩定之後，便開始發生增殖、分化，此時金屬離子可能會從 Ti 及 Ti6Al4V 試片表面釋放出來。Eisenbarth 等人 (Eisenbarth et al., 1996) 指出，從 Ti6Al4V 釋放出來的 V 離子對細胞貼附有不良的影響。Thompson 和 Puleo (Thompson and Puleo, 1996) 的研究結果也顯示，Ti6Al4V 的離子溶液會抑制正常骨質的形成。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 ($P<0.001$)，可能是與 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。

4-3 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(圖 3-8)，為了瞭解其中可能的原因，遂利用結晶紫染色 (CV stain) 和掃描式電子顯微鏡 (SEM) 做進一步觀察及分析。由 CV stain 技術分析之結果得知(圖 3-14 及 3-15)，#120 和#600 試片均可觀察到部分 Ti 及 Ti6Al4V 表面濃染的細胞核和淡染的細胞膜呈現與研磨溝紋(groove)方向一致的排列。SEM 觀察結果也顯示(圖 3-16 及 3-17)，細胞在不同粗糙度的 Ti 及 Ti6Al4V 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，即細胞沿著材料表面溝紋 (groove) 方向成長；#1500 及拋光試片則無此現象。AFM 圖(圖

3-1(a))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 (二小時) 貼附的細胞均呈近似圓形外貌 , 而且沒有明顯伸展 (spreading) 現象 , 並可觀察到細胞表面有許多的泡狀物 (blebs); #1500 試片上的細胞表面則較平滑 , 無泡狀物 , 並伸出許多代表細胞貼附於物體表面的絲狀假足 (filopodia) Rajaraman 等人 (Rajaraman R. et al., 1997) 指出 , 細胞於材料表面的貼附生長可分成四個時期 : (1) 點狀接觸 (point of contact) , (2) 絲狀足生長 (growth of filopodia) , (3) 細胞膜延展 (cytoplasmic webbing) , (4) 攤平 (flattening of the central mass) 。當懸浮的細胞剛貼附於試片表面時 , 大多數的細胞表面都有泡狀物 (blebs) , 隨著細胞貼附時間的增長 , 這些泡狀物將漸漸的變少 , 而出現絲狀假足 (filopodia) 。文獻曾指出 (Orsini et al., 2000) 絲狀假足的出現和細胞的貼附性有關 , 細胞後續所發展的貼附便會在絲狀假足 (filopodia) 之間延展成細胞薄膜 (cytoplasmic webbing) , 使細胞整個伸展平貼於材料表面 , 這在評估植體材料生物相容性質方面可視為細胞生長情況良好的指標之一。因此 , 本研究中細胞貼附初期階段 (二小時) , 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。

有關材料表面粗糙度如何改變細胞的行為 , 從貼附和接觸引導 (contact guidance) 來看 , Bengham 和 Pethica 等人 (Bengham et al., 1961; Pethica et al., 1961) 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 (Rajaraman et al.,

1997) 也指出這些觸角末端直徑和絲狀假足的大小相近。Orisini (Orisini et al., 2000) 等人認為在 SEM 下觀察到細胞的絲狀假足 (filopodia) 是細胞和材料間貼附的有利證據。den Braber 等人 (den Braber et al., 1996) 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) (Wang et al., 2000) 或是因細胞在材料表面尋求達到生物機械力平衡 (biomechanical equilibrium) (Ward et al., 1993) 所造成的結果。Walboomers 等人 (Walboomers et al., 2000) 也認為隨著材料表面溝級深度的增加，細胞在材料表面的展延 (spreading) 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 (不論 Ti 或 Ti6Al4V 合金)，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。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的區域成骨或形成屏障，進而阻隔不必要的細胞，製造符合需求的植體。

第五章 結論

1. 表面經不同號數砂紙研磨（#120、#600 及#1500）及拋光處理（1 μm 氧化鋁粉）的 Ti 及 Ti6Al4V 試片，其粗糙度（Ra）值如下：對 Ti 而言，#120 試片為 0.928 μm ，#600 試片為 0.218 μm ，#1500 試片為 0.146 μm ，拋光試片為 0.072 μm ；對 Ti6Al4V 而言，#120 試片為 0.672 μm ，#600 試片為 0.134 μm ，#1500 試片為 0.070 μm ，拋光試片為 0.042 μm 。
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 表面細胞三天的增殖數目順序為：拋光試片 $>$ #120 試片 \approx #600 試片 \approx #1500 試片（ $P<0.001$ ）；Ti6Al4V 表面細胞三天的增殖數目順序為：#1500 試片 $>$ #120 試片 \approx #600 試片 \approx 拋光試片（ $P<0.001$ ）。
4. 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的接觸引導現象；#1500 試片表面的細胞可觀察到許多絲狀假足（表示細胞活性較佳）；拋光試片的細胞表面則可發現許多泡狀物（表示細胞活性較差）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貼附初期有接觸引導現象。

第六章 參考文獻

- Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:323-332.
- Albrektsson T, Branemark P-I, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop Scand* 1981;52:155-170.
- Albrektsson T, Brånemark P-I, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundstrom I. The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone. *Ann Biomed Eng* 1983;11:1-15
- Ahmad M, McCarthy M, Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 1999;20:211-220.
- Alaerts JA, De Cupere VM, Moser S, Van den Bosh de Aguilar P, Rouxhet PG. Surface characterization of poly(methyl methacrylate) microgrooved for contact guidance of mammalian cells. *Biomaterials* 2001;22:1635-1642.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-681.
- Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155-166.
- Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res* 2002;60:529-540.
- Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, Hildebrand HF, Iost A, Leroy JM. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials* 2000;21:1567-1577.
- Bengham AD, Pethica BA. *Proc Roy Soc, Edinburgh* 1961;B28,43.
- Bess E, Cavin R, Ma K, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast responses to heat-treated titanium surfaces. *Implant Dent* 1999;8:126-132.
- Boyan BD, Hummert T.W, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17:137-146.
- Boyan BD, Sylvia VL, Liu Y, Sagun R, Cochran DL, Lohmann CH, Dean DD, Schwartz Z. Surface roughness mediates its effects on osteoblast via protein kinase A and phospholipase A₂. *Biomaterials* 1999;20:2305-2310.

- Brunette DM, Chehroudi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *Journal of Biomechanical Engineering* 1999;121:49-57.
- Clark P, Connolly P, Curtis ASG, Dow JAT. Cell guidance by ultrafine topography in vitro. *J Biomed Mater Res* 1991;99:73-77.
- Curtis ASG. Cell reactions with biomaterials: The microscopies. *European Cells and Materials* 2001;1:59-65.
- Curtis ASG, Casey B, Gallagher JO, Pasqui D, Wood MA, Wilkinson CDW. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important? *Biophysical Chemistry* 2001;94:275-283.
- Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 1999;64:499-507.
- Deligianni DD, Katsala N, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 2001;22:1241-1251.
- den Braber ET, de Ruijter JE, Smots HTJ, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. Quantitative analysis of cell proliferation and orientation on substrata with uniform parallel surface micro-grooves. *Biomaterials*.1996;17:1093-1099.
- Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials* 1996;17:1399-1403.
- Gray C, Boyde A, Jones SJ. Topographically induced bone formation in vitro: implications for bone implants and bone grafts. *Bone* 1996;18:115-123.
- Hanawa T. In vivo metallic biomaterials and surface modification. *Materials Science and Engineering* 1999;A267:260-266.
- Howlett CR, Zreiqat H, Wu Y, McFall DW, McKenzie DR. Effect of ion modification of commonly used orthopedic materials on the attachment of human bone-derived cells. *J Biomed Mater Res* 1999;45:345-354.
- Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughn RA, Zaharias R. Characterization of titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res* 1994;28:939-946.

- Keller JC. Tissue compatibility to different surfaces of dental implants: in vitro studies. *Implant Dent* 1998;7:331-337.
- Keller JC. Physical and biological characteristics of implant materials. *Adv Dent Res* 1999;13:5-7.
- Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:329-345.
- Kornu R., Malomey WJ, Kelly MA, Smith RL. Osteoblast adhesion to orthopaedic implant alloys: Effects of cell adhesion molecules and diamond-like carbon coating. *J Orthop Res* 1996;14:871-877.
- Ku C-H, Pioletti D.P, Browne M, Gregson PJ. Effect of different Ti-6Al-4V surface treatments on osteoblasts behavior. *Biomaterials* 2002;23:1447-1454.
- Lim YJ, Oshida Y, Andres CJ, Barco MT. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:333-342.
- Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998;19:2219-2232.
- Malik MA, Puleo DA, Bizios R, Dpremus RH. Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro: morphology during the first 2 h of attachment. *Biomaterials* 1992;13:123-128.
- Martun JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford DJ, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells(MG 63). *J Biomed Mater Res* 1995; 29:389-401.
- Mekayarajjananonth T, Winkler S. Contact angle measurement in dental implant biomaterials. *J Oral Implantology* 1999;4:230-236.
- Nelissen JM, Torensma R, Pluyter M, Adema GJ, Raymakers RA, Van Kooky Y, Figdor CG. Molecular analysis of its hematopoiesis supporting osteoblastic cell line U2-OS. *Exp Hematol* 2000;28:422-432.
- Ong JL, Prince CW, Raikar GN, Lucas LC. Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. *Implant Dent* 1996;5:83-88.
- Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piatelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Impants* 2000;15:779-784.

- Pethica, BA. *Exptl cell res* 1961;suppl. 8:123.
- Puleo DA, Holleran LA, Doremus RH, Bizios R. Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro. *J Biomed Mater Res* 1991;25:711-723.
- Rajaraman R, Rounds DE, Yen SPS, Rembaum A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exptl Cell Res* 1974;88:327-339.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238:491-497.
- Schmidt C, Ignatius AA., Claes LE. Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;54:209-215.
- Sykaras N, Iacopino A.M., Marker VA. Implant materials, designs, and surface topographies: Their effect on osseointegration. A Literature Review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:675-690.
- Walboomers XF, Ginsel LA, Jansen JA. Early spreading events of fibroblasts on microgrooved substrates. *J Biomed Mater Res* 2000;51:529-534.
- Wang JH-C, Grood ES, Florer J, Wenstrup R. Alignment and proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching. *J Biomechanics* 2000;33:729-735.
- Ward MD, Hammer DA. A theoretical analysis for the effect of focal contact formation on cell-substrate attachment strength. *Biophys J* 1993;64:936-959.
- Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:331-344.
- Wieland M, Chehroudi B, Textor M, Brunette D.M. Use of Ti-coated replicas to investigate the effects on fibroblast shape of surfaces with varying roughness and constant chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002;60:434-444.
- Wong M., Eulenberger I., Schenk R., Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1567-1575.
- Zreiqat H, Howlett CR. Titanium substrata composition influences osteoblastic phenotype: In vitro study. *J Biomed Mater Res* 1999;47:360-366.

表 3-1 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

表 3-2 Ti 及 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後，表面細胞貼附

(二小時) 吸光值百分比之統計分析 (multiple linear regression)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob>F
material	1	5.78	5.78	0.07	0.78
roughness	1	215.42	215.42	2.69	0.10
material*roughness	1	100.19	100.19	1.25	0.26
Error	68	5442.85	80.04		
C. Total	71				0.13

表 3-3 Ti 及 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後，表面細胞增殖
 (三天) 數目百分比之統計分析 (multiple linear regression)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob>F
material	1	2231.36	2231.36	19.30	<.0001
roughness	1	408.16	408.16	3.53	0.06
material*roughness	1	172.86	172.86	1.49	0.22
Error	44	5084.74			
C. Total	47				0.0006



圖 2-1 表面粗度儀 (Surfcorder SE-40, Kosaka Laboratory Ltd., Japan)



圖 2-2 原子力顯微鏡 (Nanoscope III, Digital Instruments Inc., USA)



圖 2-3 X 光光電子能譜儀 (ESCA 210, VG Scientific Ltd., England)



圖 2-4 歐傑電子能譜儀 (Microlab 310D, VG Scientific Ltd., England)



圖 2-5 西每聯檢測儀 (Model-960, Labindia Instruments Ltd., India)



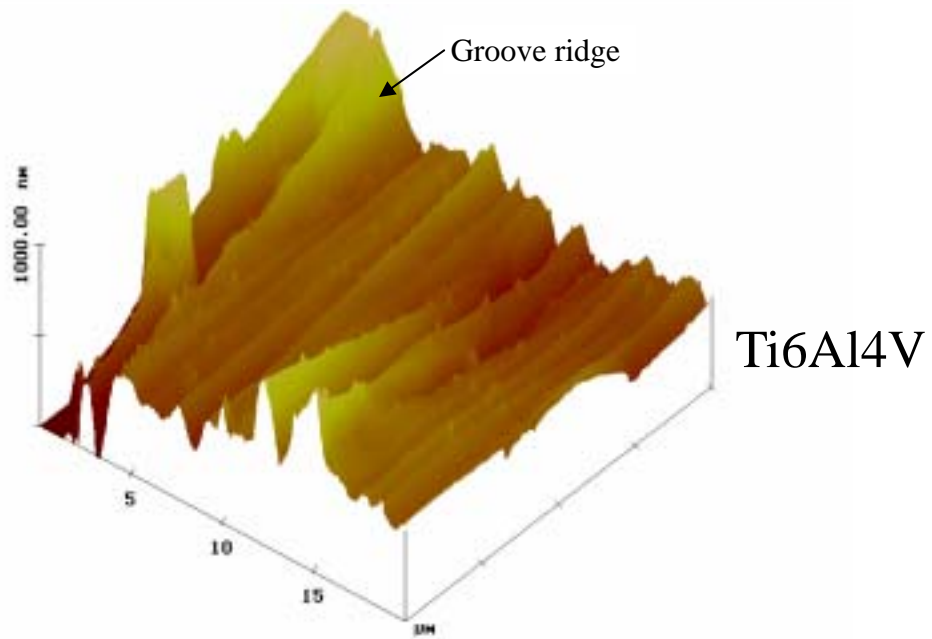
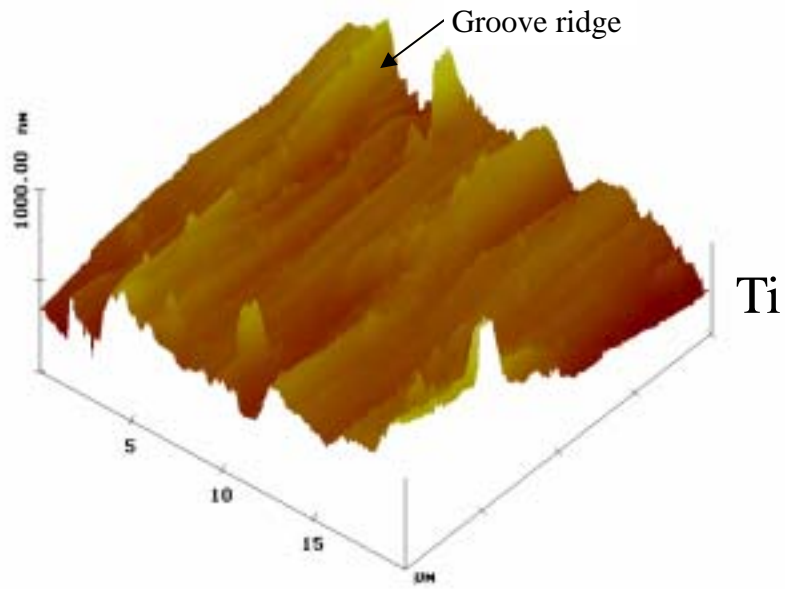
圖 2-6 血球計數器 (Neubauer improved, Marienfeld, Germany)



圖 2-7 反射式光學顯微鏡 (BH2-UMA, Olympus, Japan)

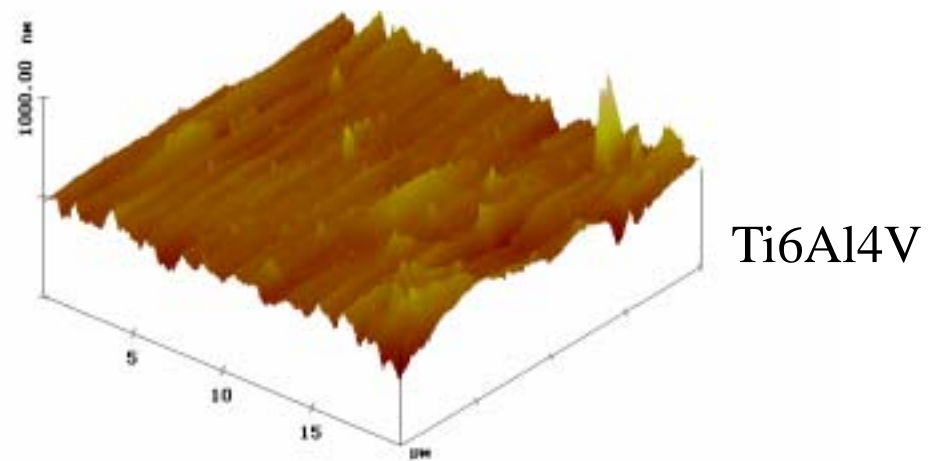
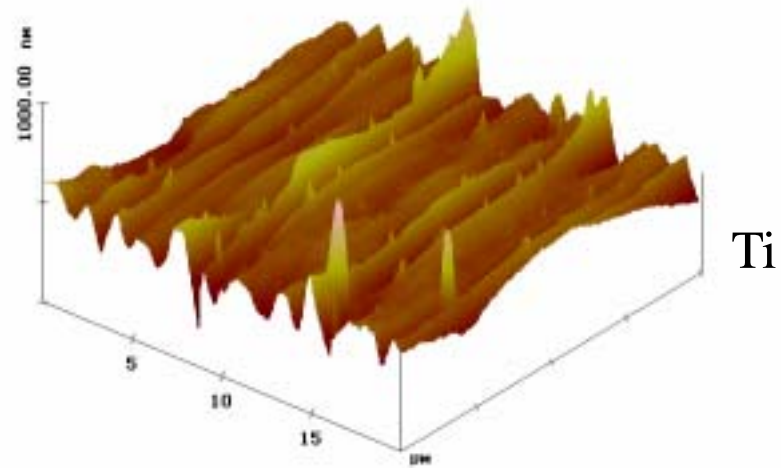


圖 2-8 掃描式電子顯微鏡 (JSM-T300, JEOL Ltd., Japan)



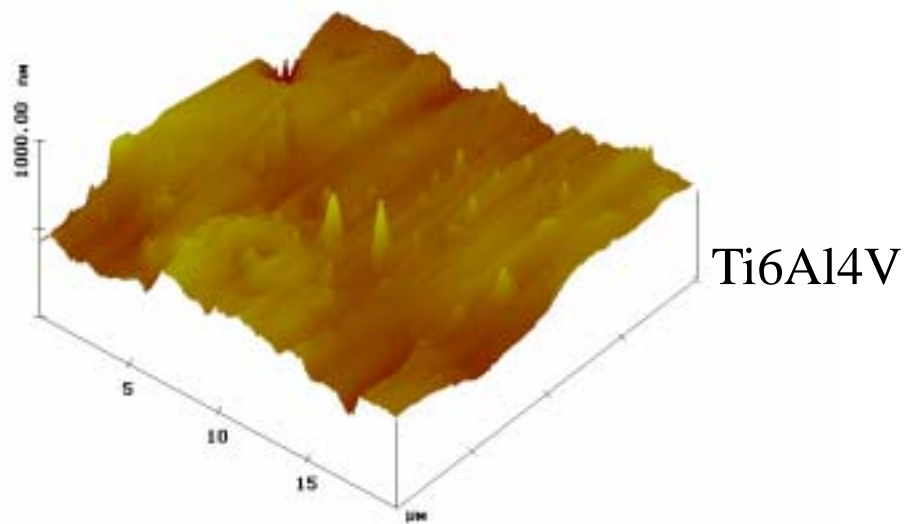
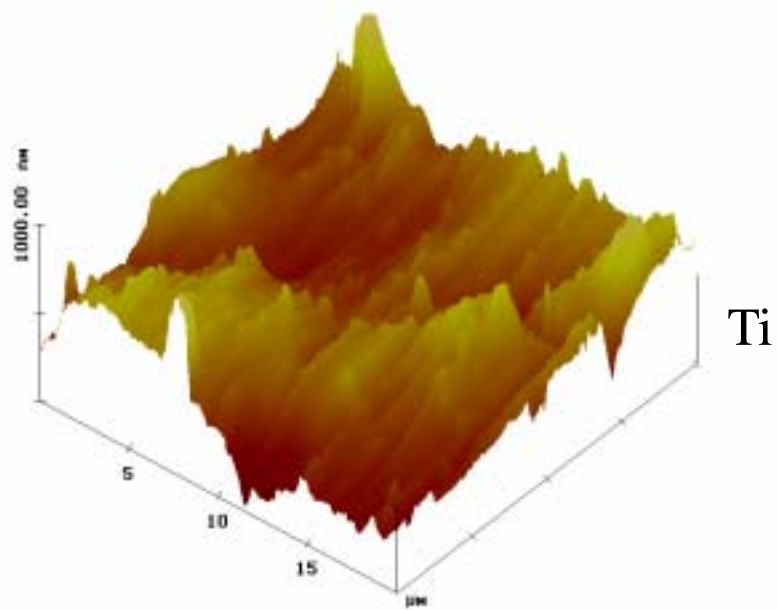
(a)#120

圖 3-1 Ti 和 Ti6Al4V 經研磨及拋光處理後表面 AFM 圖



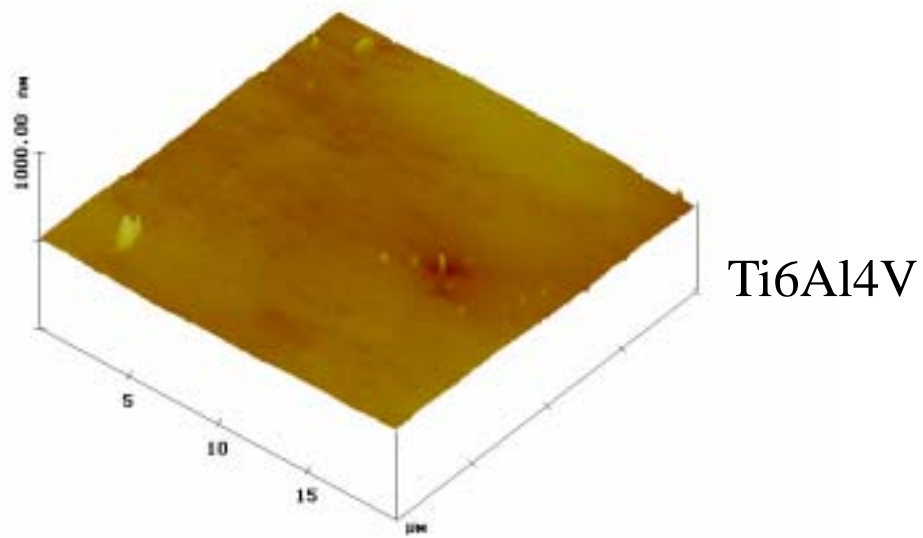
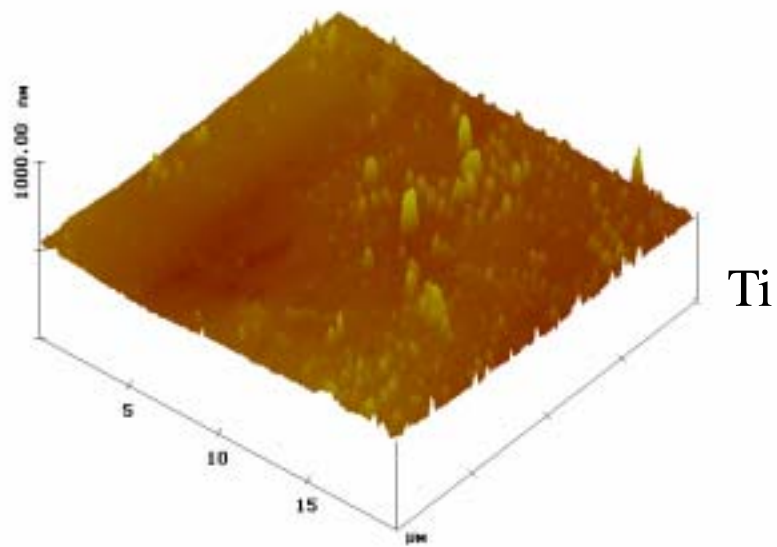
(b)#600

圖 3-1 Ti 和 Ti6Al4V 經研磨及拋光處理後表面 AFM 圖



(c)#1500

圖 3-1 Ti 和 Ti6Al4V 經研磨及拋光處理後表面 AFM 圖



(d)拋光

圖 3-1 Ti 和 Ti6Al4V 經研磨及拋光處理後表面 AFM 圖

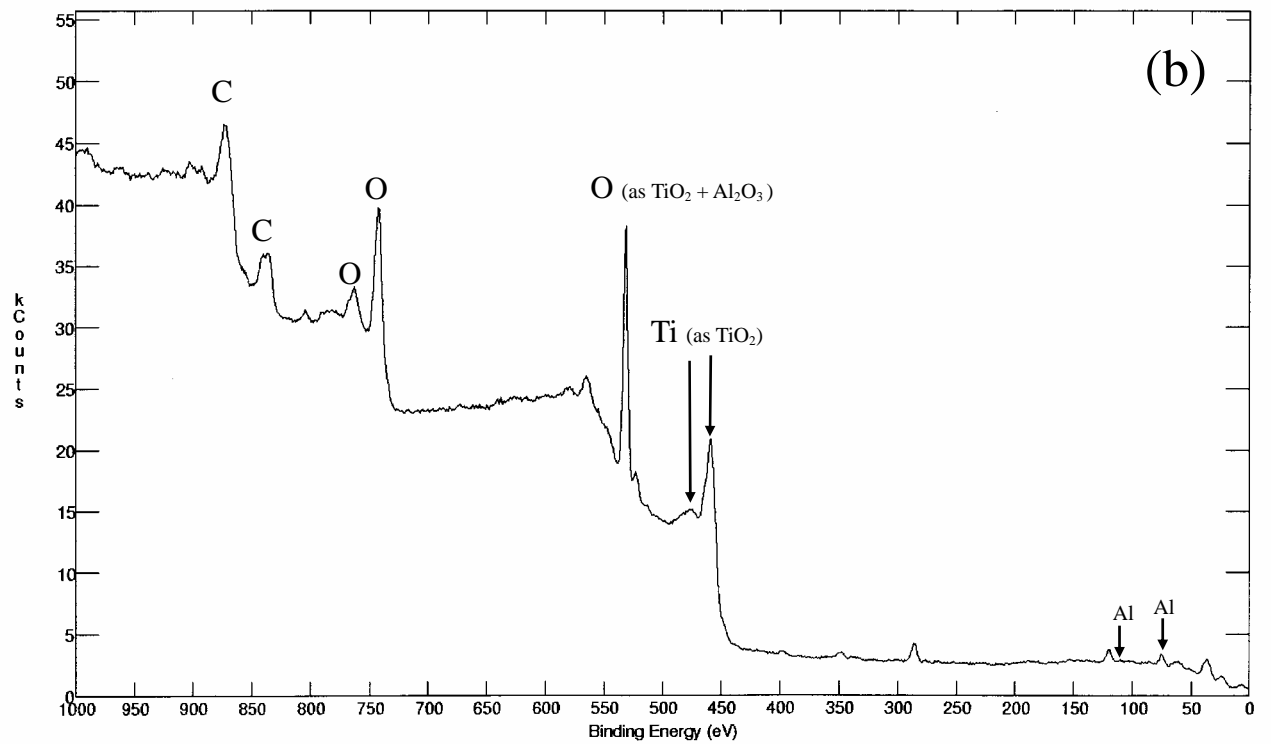
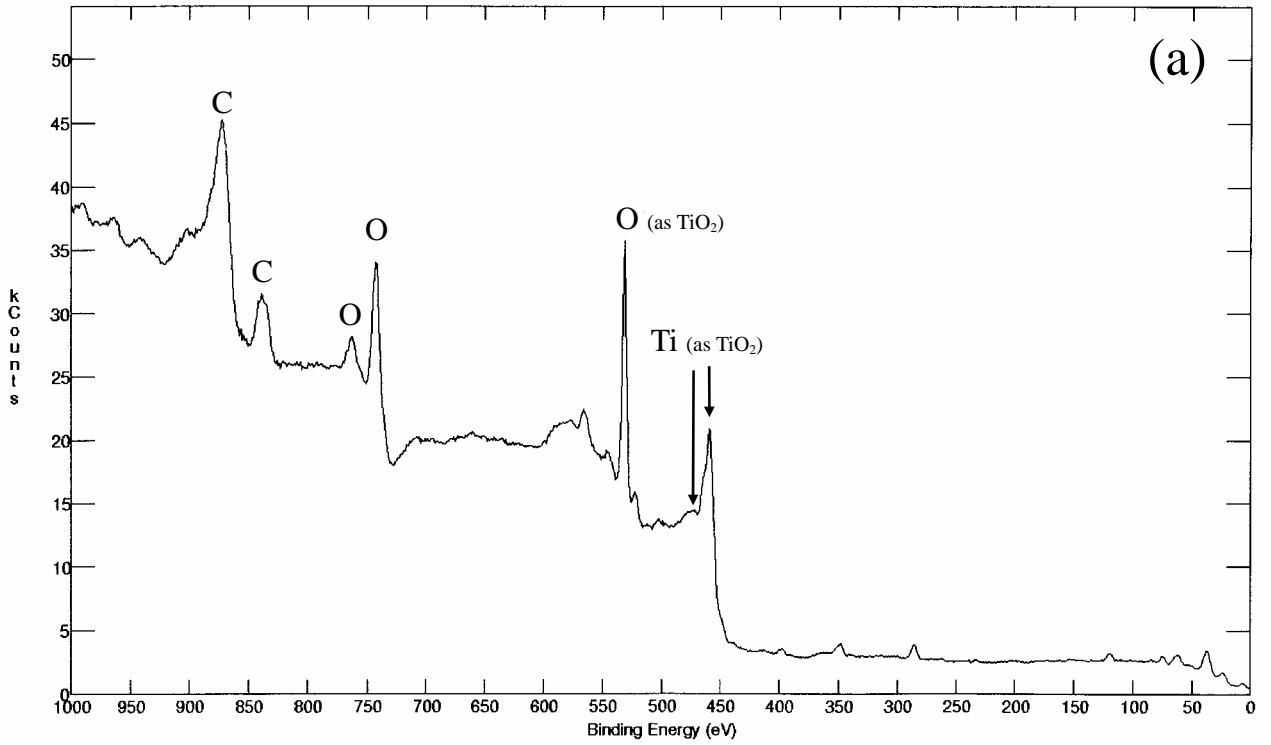


圖 3-2 (a) Ti 及(b) Ti6Al4V 合金拋光表面 XPS 分析圖譜

((c)及(d)為(b)之局部放大圖)

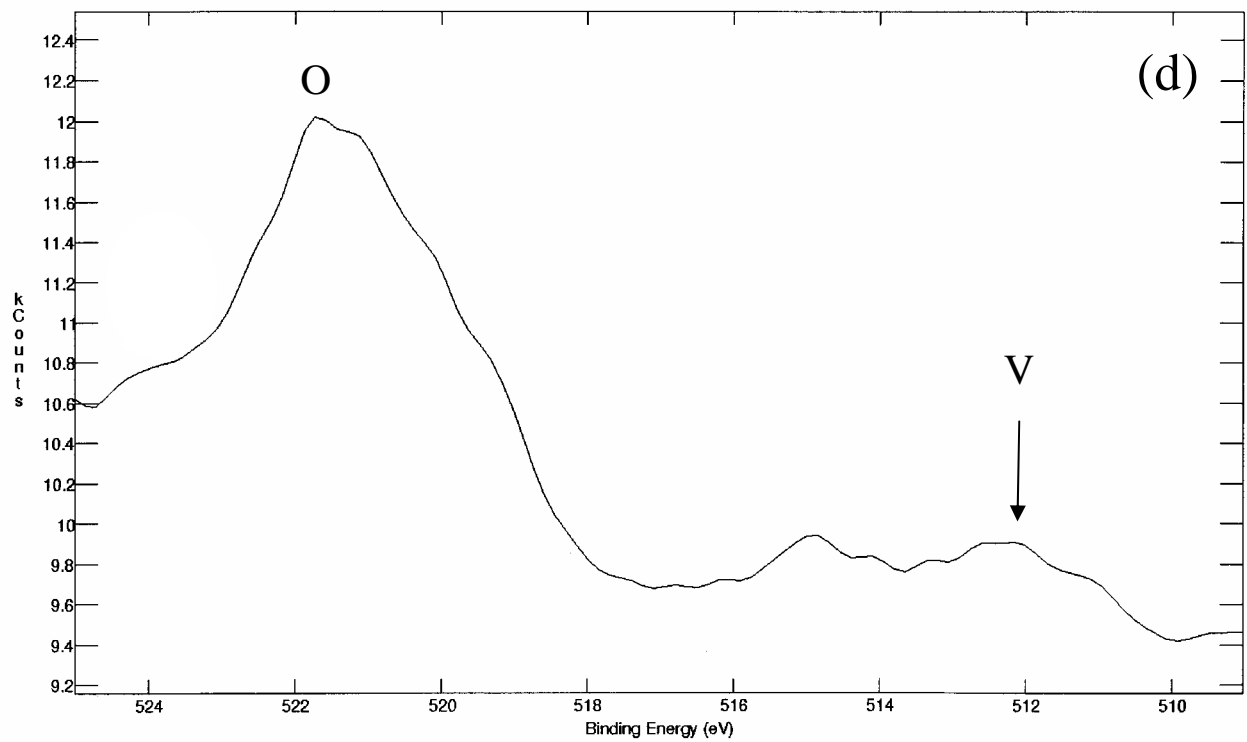
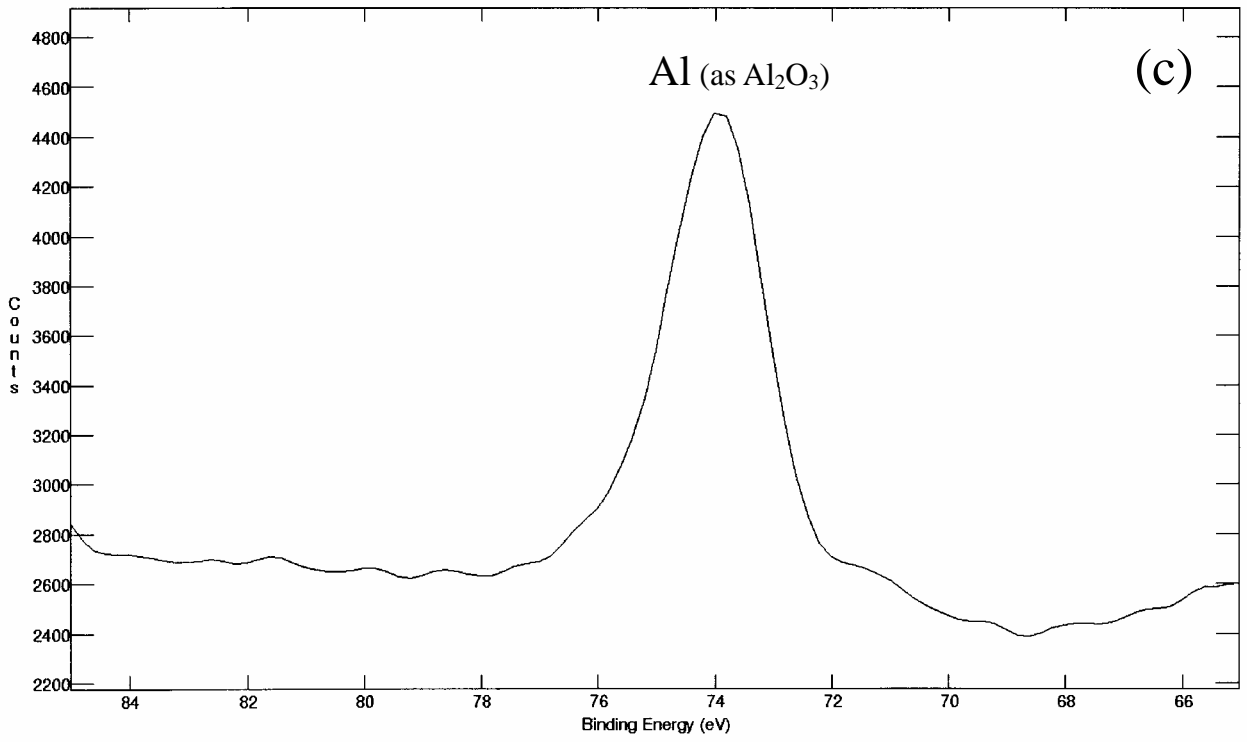


圖 3-2 (續)

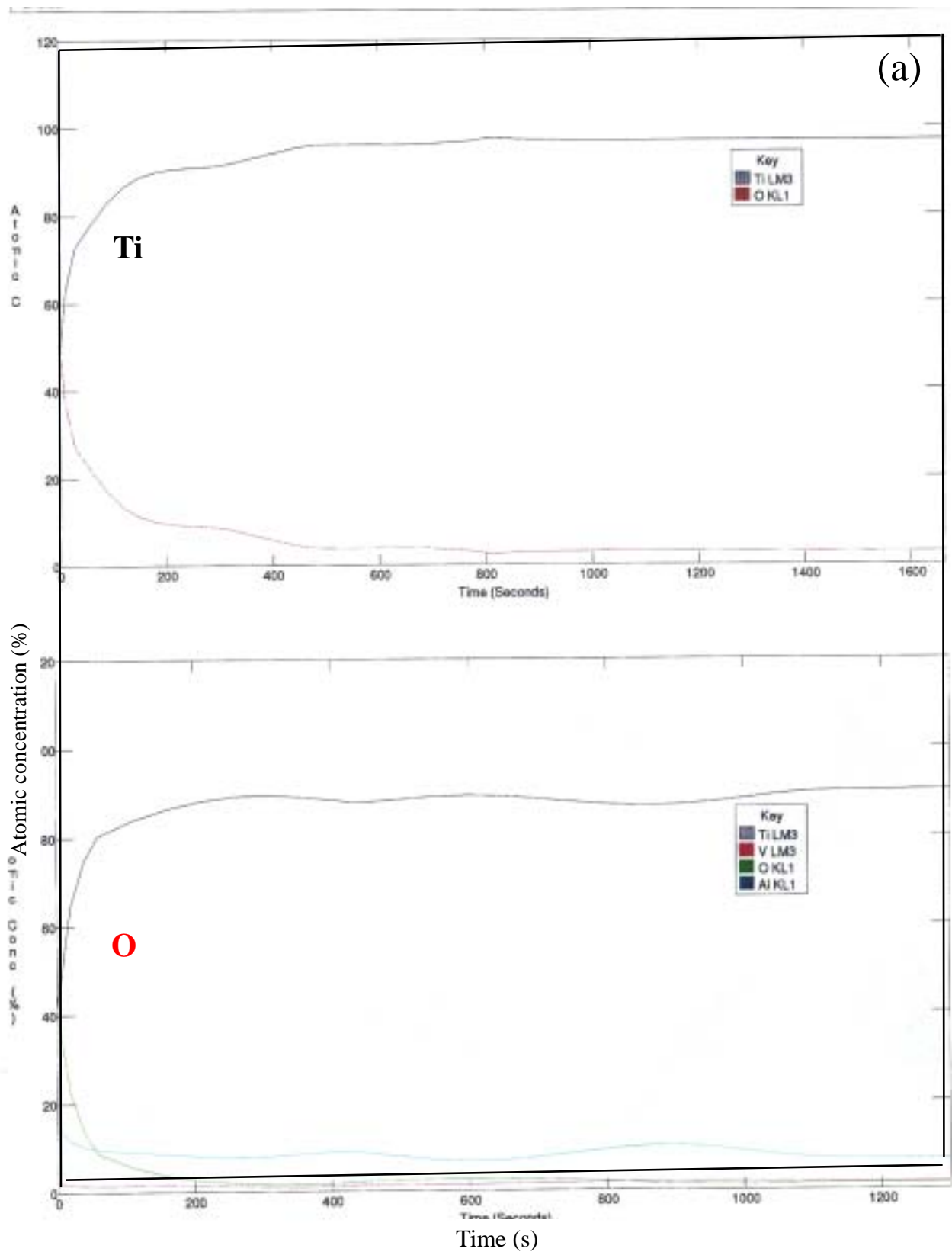
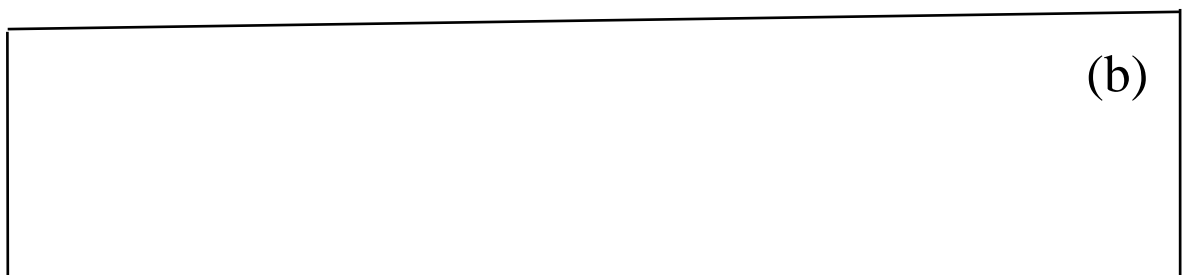


圖 3-3 (a) Ti 及(b)Ti6Al4V 合金拋光表面 AES 縱深元素分析圖



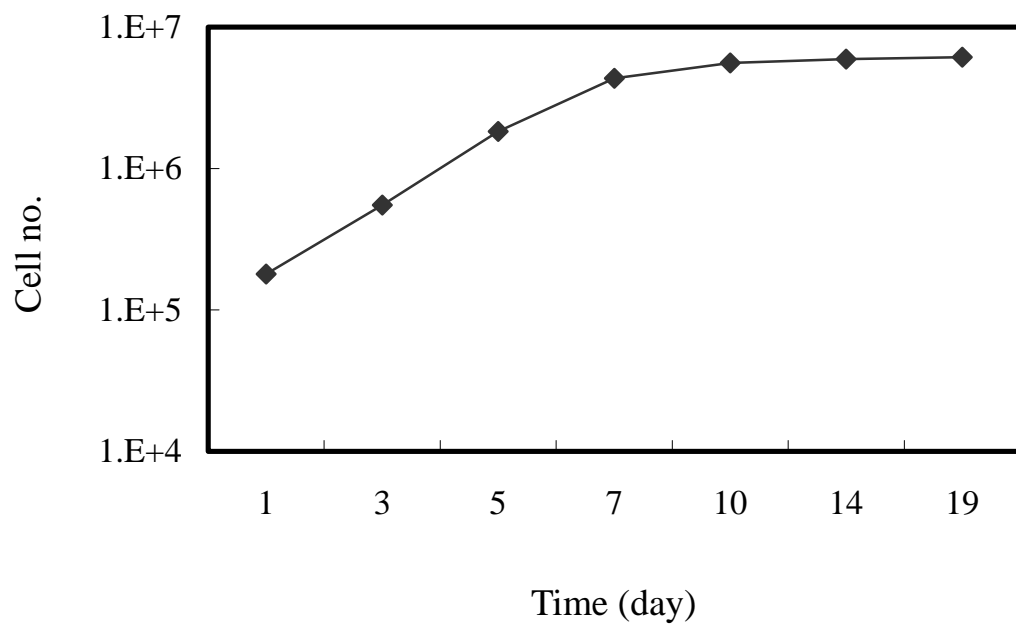


圖 3-4 U-2 OS 類造骨細胞生長曲線圖

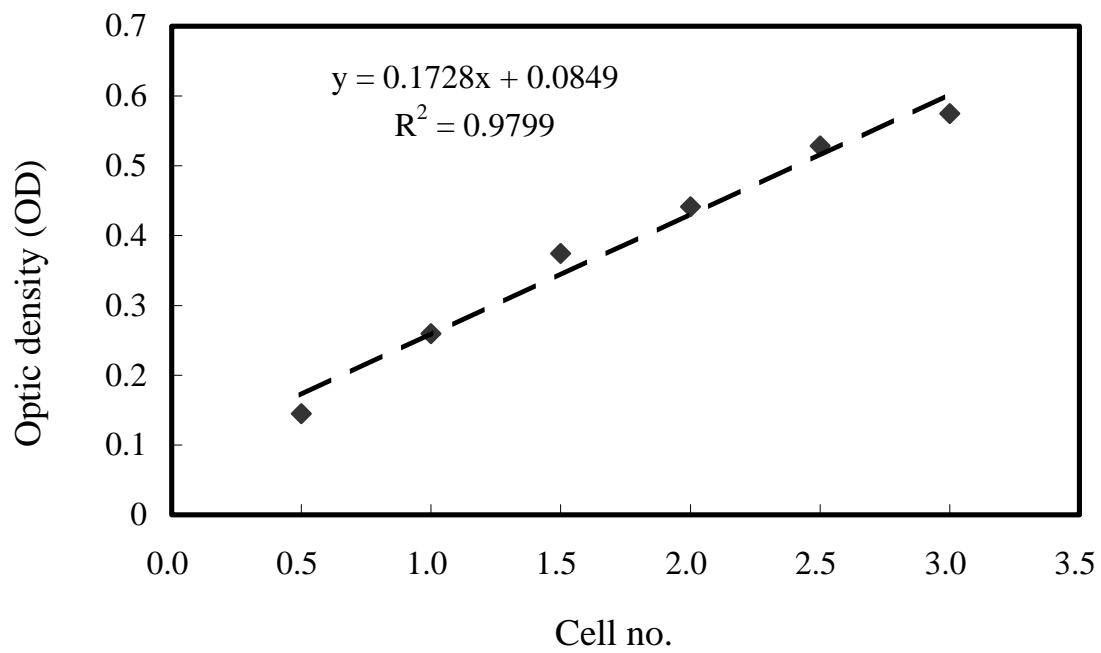


圖 3-5 細胞在培養盤表面貼附二小時之數目和
吸光值的標準曲線圖

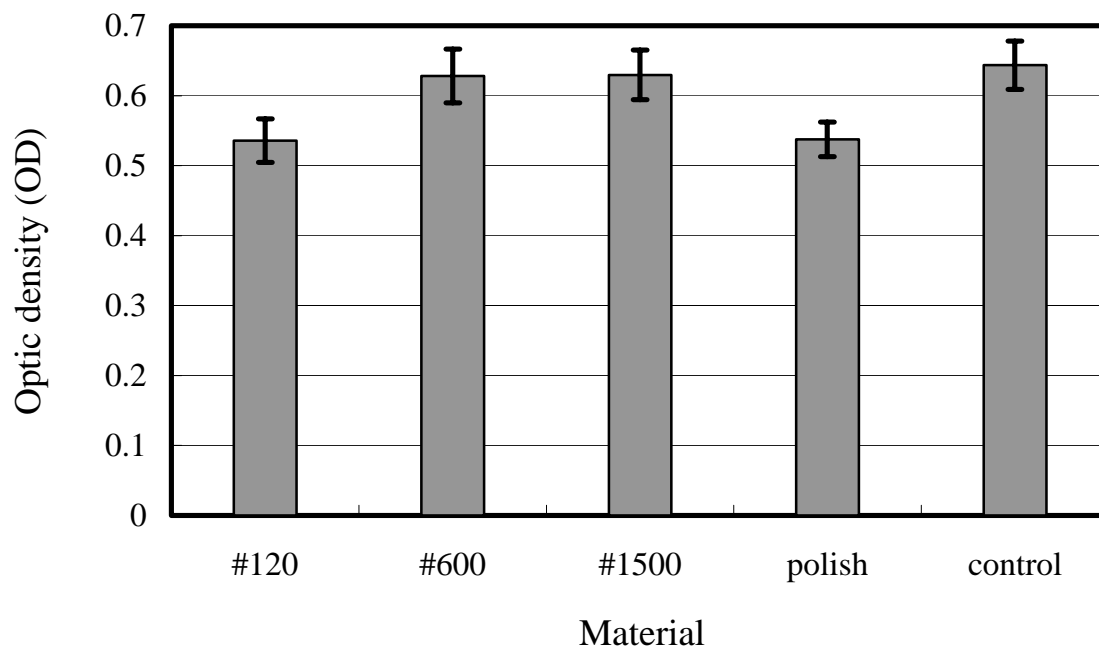


圖 3-6 細胞在不同表面處理的 Ti 試片貼附二小時後所測得的吸光值

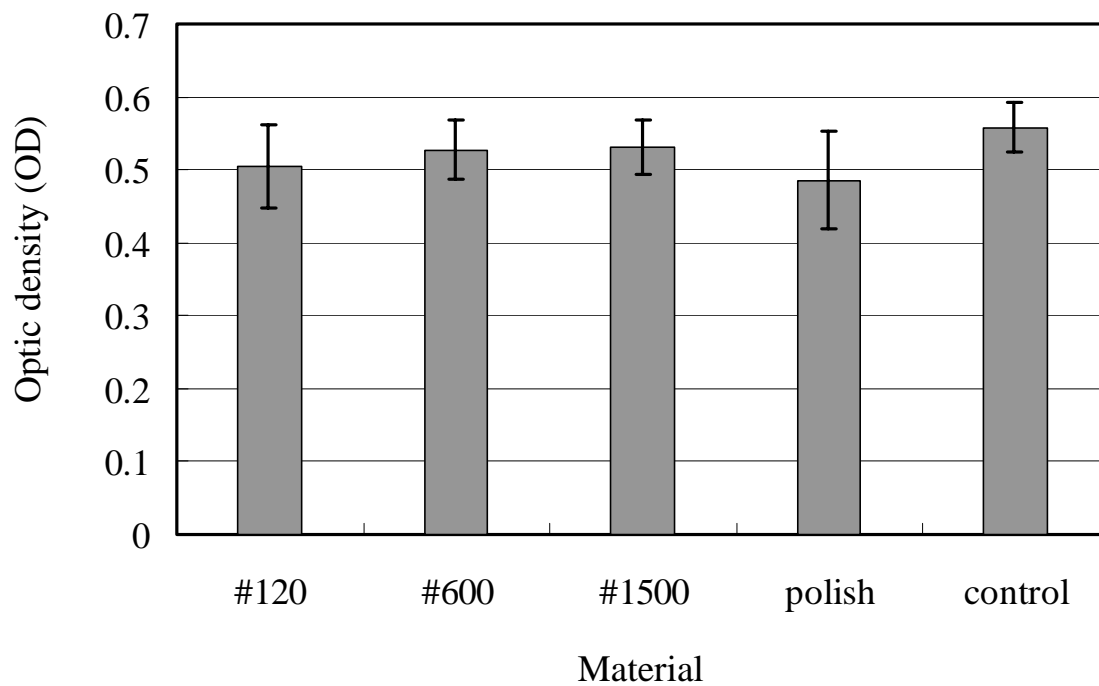


圖 3-7 細胞在不同表面處理的 Ti6Al4V 試片
貼附二小時後所測得的吸光值

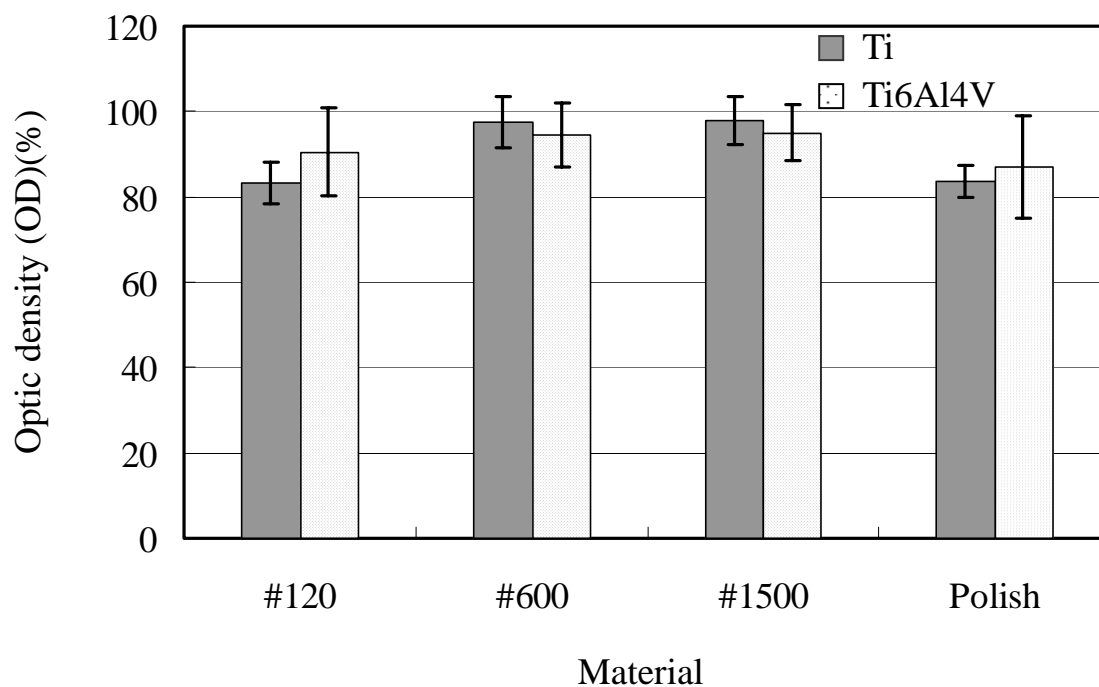


圖 3-8 Ti 及 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後細胞貼附二小時的吸光值百分比 (實驗組吸光值 / 控制組吸光值 ×100%)

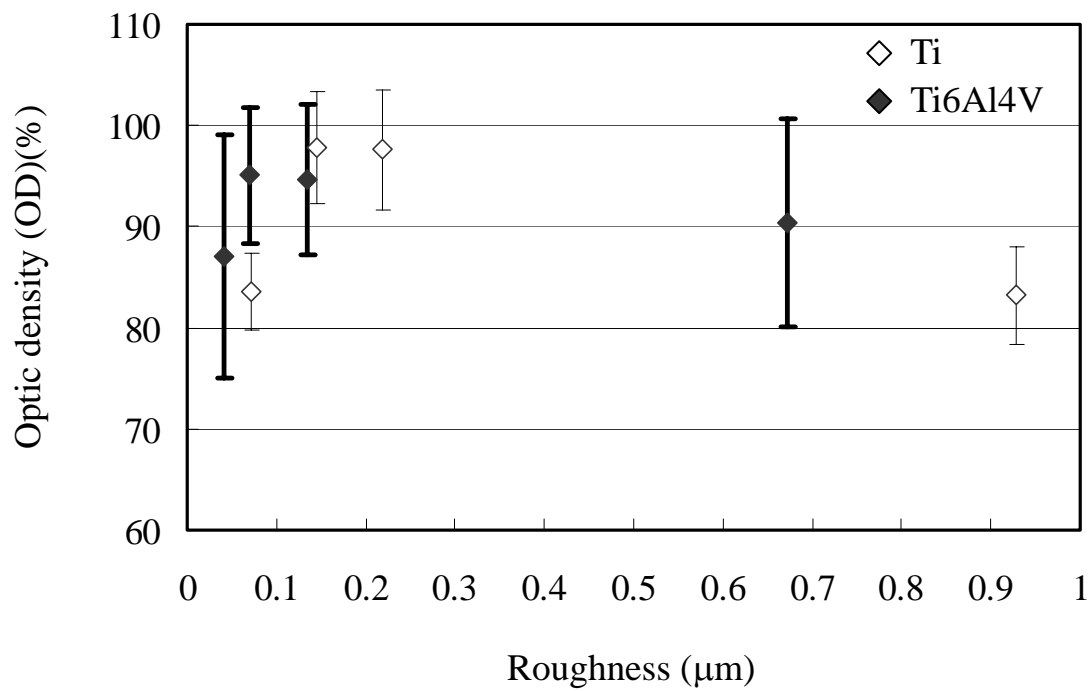


圖 3-9 不同表面粗糙度 (Ra) 的 Ti 和 Ti6Al4V 試片細胞貼附二小時吸光值的百分比 (實驗組吸光值 / 控制組吸光值 $\times 100\%$)

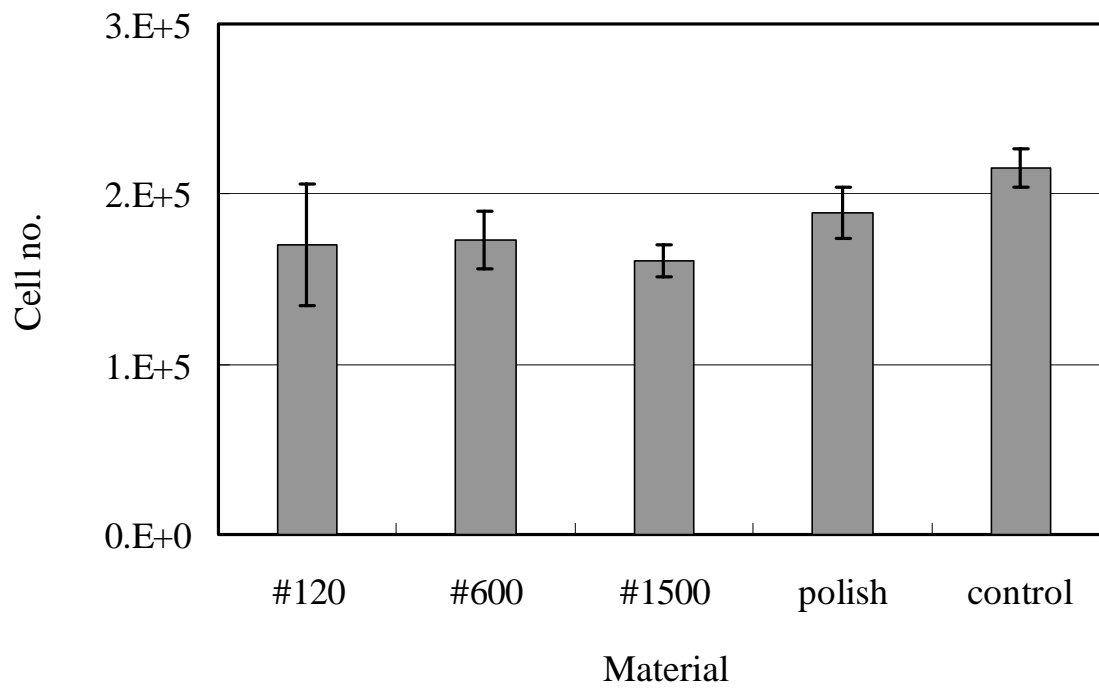


圖 3-10 細胞在不同表面處理的 Ti 試片表面培養三天後的數目

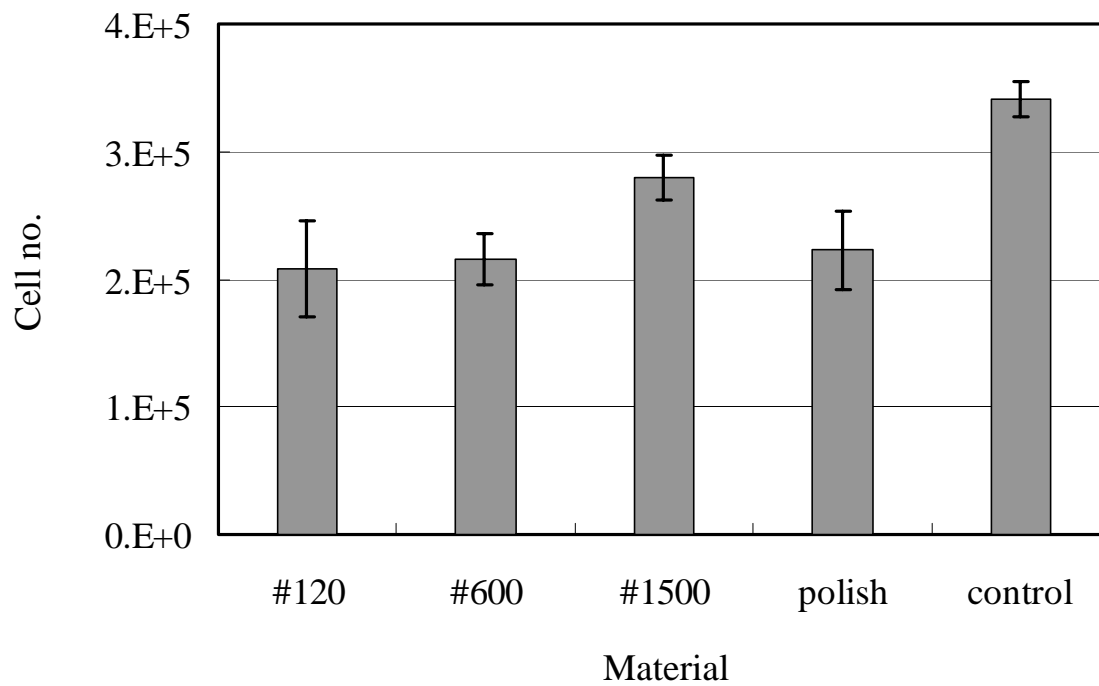


圖 3-11 細胞在不同表面處理的 Ti6Al4V 試片表面培養三天後的數目

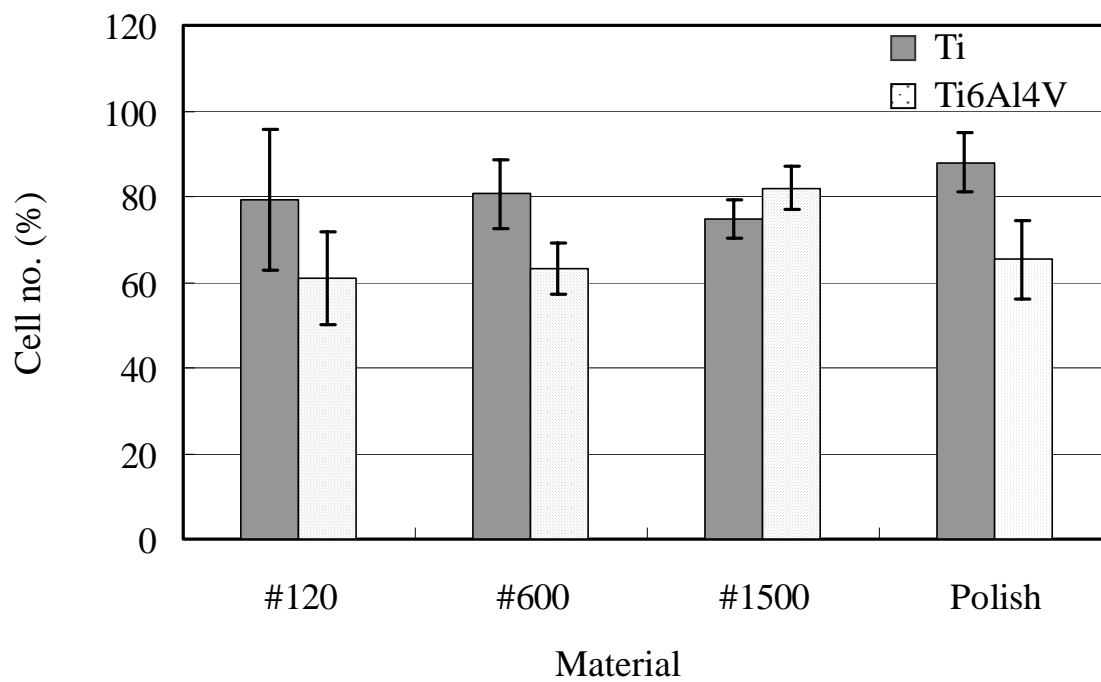


圖 3-12 Ti 及 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後細胞增殖三天數目百分比 (實驗組吸光值 / 控制組吸光值 ×100%)

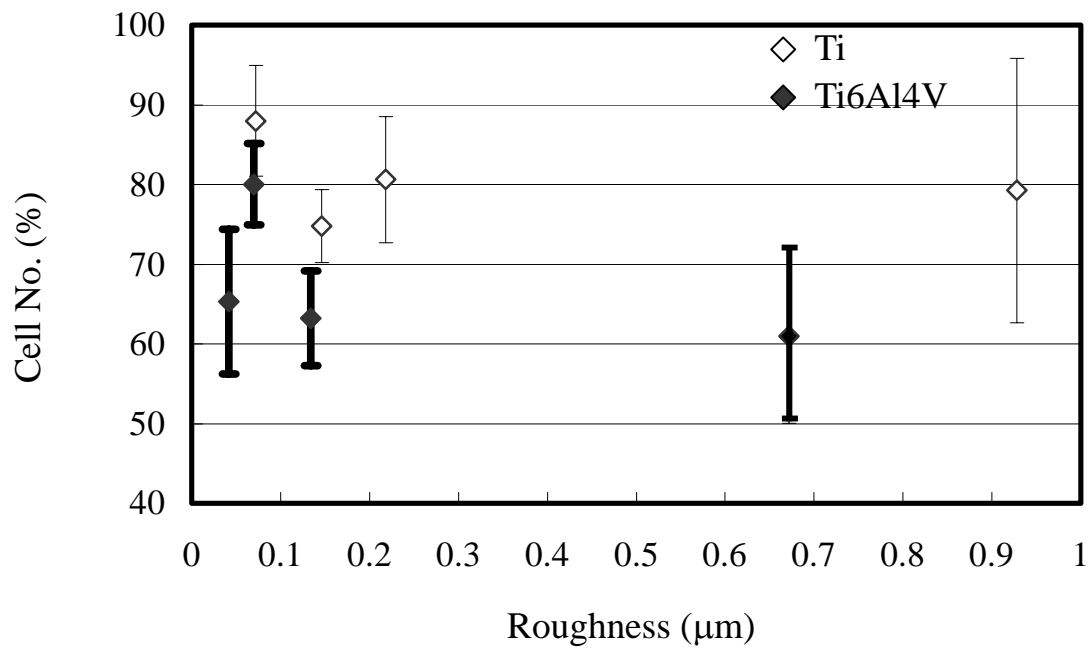


圖 3-13 不同表面粗糙度 (Ra) 的 Ti 及 Ti6Al4V 試片細胞增殖三天數目百分比 (實驗組細胞數目 / 控制組細胞數目 $\times 100\%$)

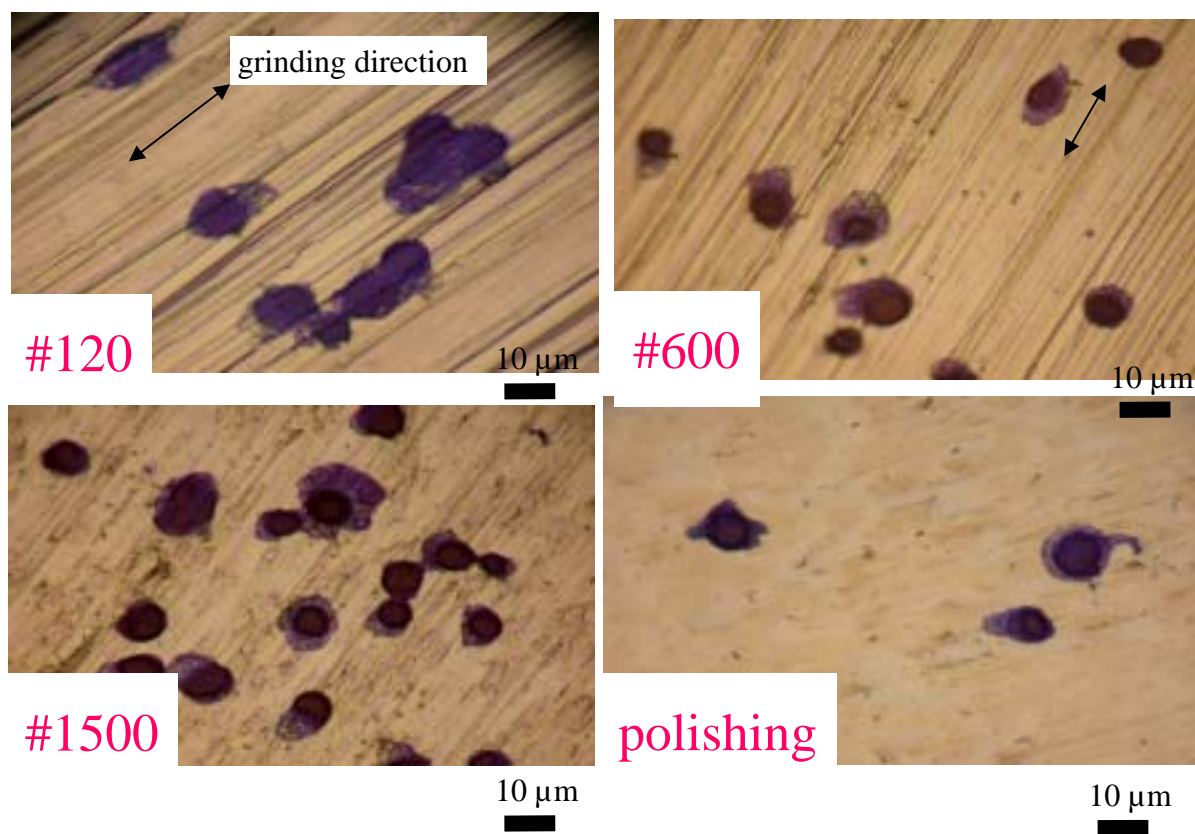


圖 3-14 Ti 經不同表面研磨及拋光處理後細胞貼附二小時的結晶紫染色結果

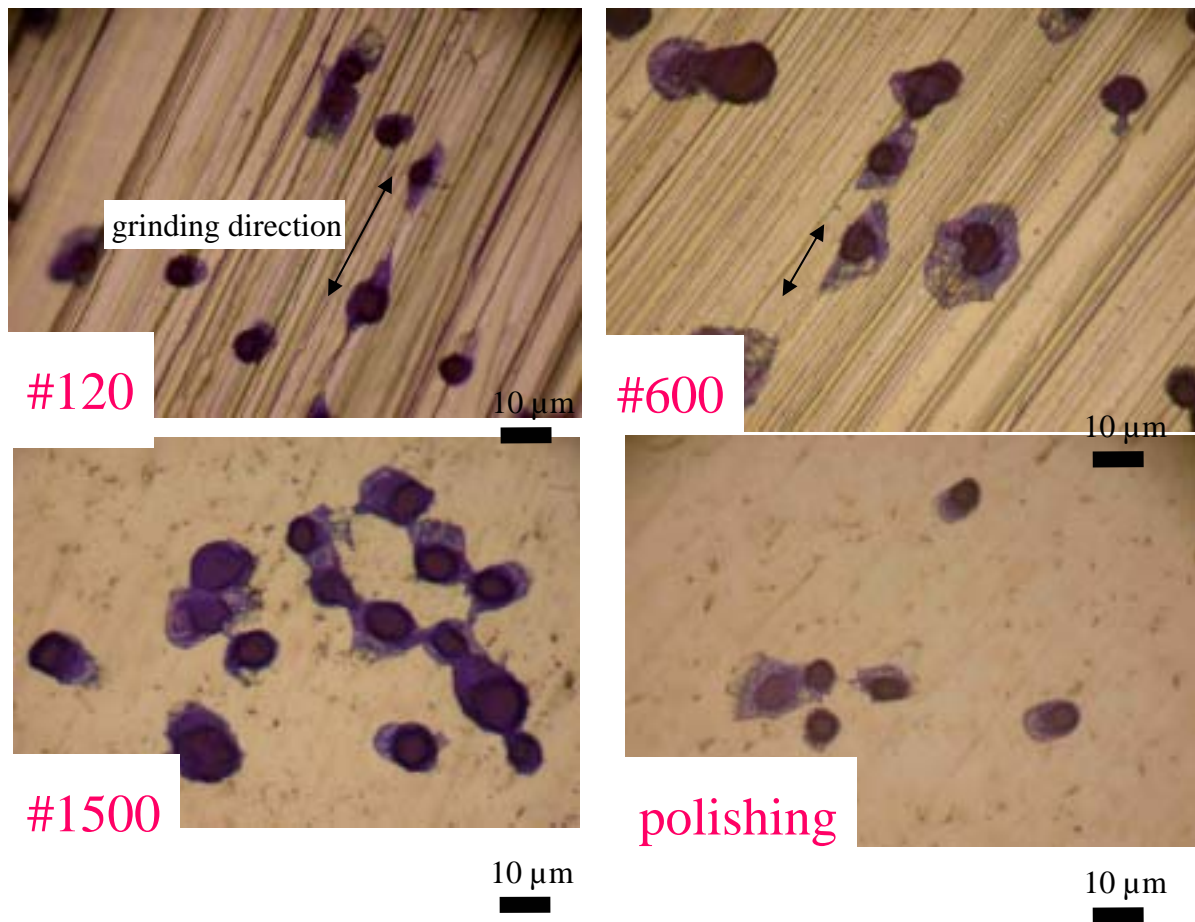


圖 3-15 Ti6Al4V 經不同表面研磨及拋光處理後細胞貼附二小時的
結晶紫染色結果

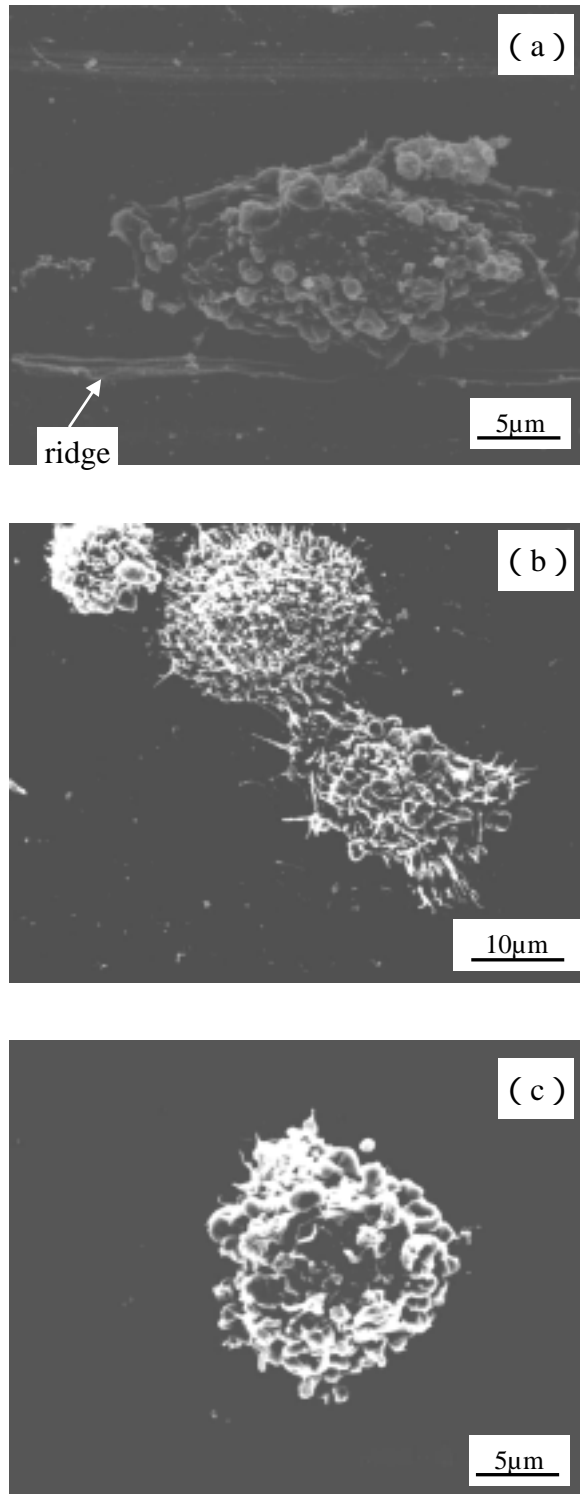


圖 3-16 細胞貼附 (二小時) 於 Ti 金屬表面的 SEM 圖：

(a) #120 試片 , (b) #1500 試片 , (c) 拋光試片

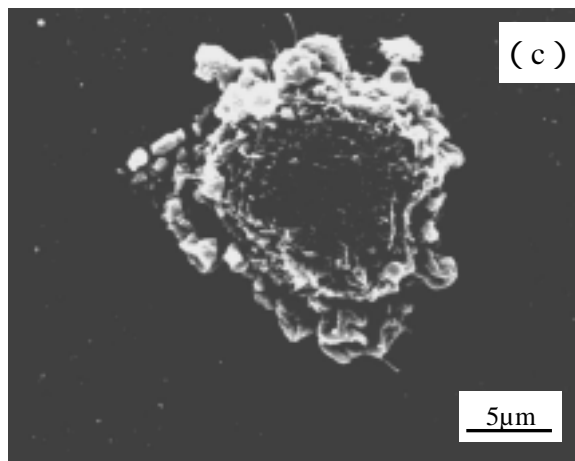
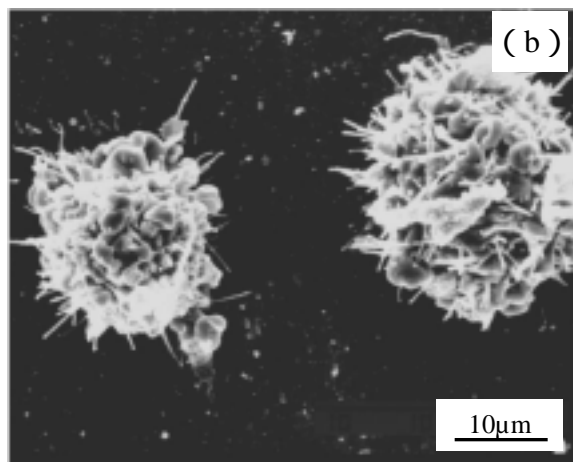
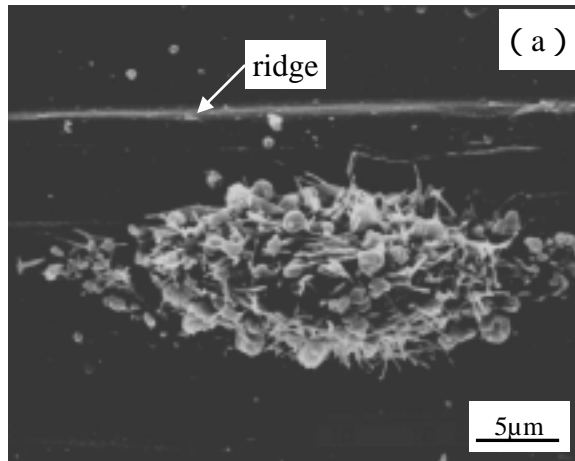


圖 3-17 細胞貼附 (二小時) 於 Ti6Al4V 金屬表面的 SEM 圖：

(a) #120 試片 ,(b) #1500 試片 ,(c) 拋光試片

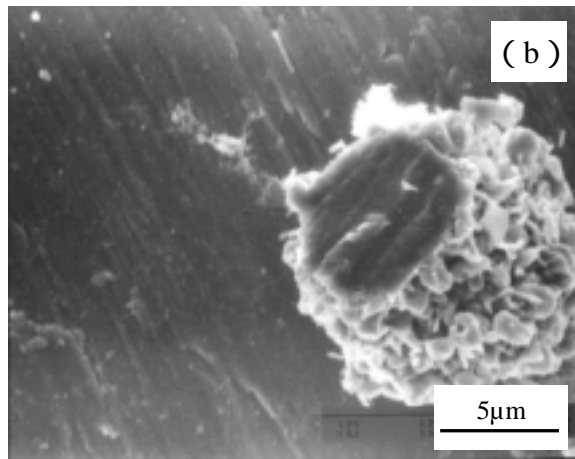
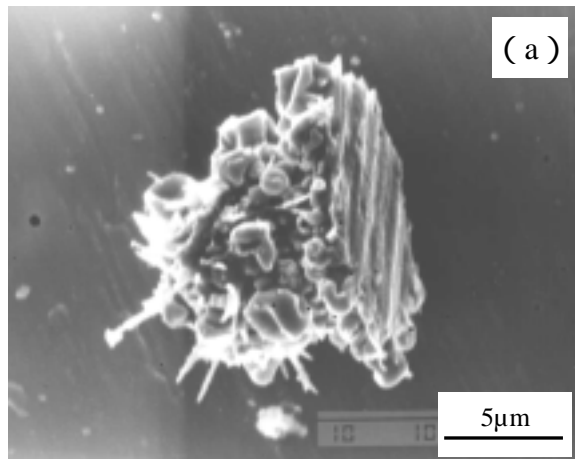


圖 3-18 (a) 細胞貼附 (二小時) 於 Ti 金屬 (#1500 試片) 表面的 SEM 圖 ;

(b) 細胞貼附 (二小時) 於 Ti6Al4V 金屬 (#1500 試片) 表面的 SEM 圖

