

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

生醫用植體材料表面改質技術之研發

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2216-E-040-001-

執行期間：91年08月01日至92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：呂福興 潘思蓉 賴玉鈴

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 92 年 11 月 5 日

生醫用植體材料表面改質技術之研發

計畫編號：NSC 91-2216-E-040-001-

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：黃何雄 中山醫學大學牙科材料研究所

共同主持人：呂福興 中興大學材料工程學系

計畫參與人員：潘思蓉 中山醫學大學牙科材料研究所

賴玉鈴 靜宜大學應用化學系

摘要

本研究評估 U-2 OS 類造骨細胞在經表面改質的鈦植體金屬表面（含各種粗糙度處理及備製奈米級網狀鈦氧化物薄膜）之初期貼附行為，並建立即時監測細胞成長的電化學裝置。結果顯示，粗糙度 R_a 為 $0.064 \mu\text{m}$ 的鈦表面有最佳的初期（24 小時及 3 天）細胞貼附行為，較粗糙（ R_a ： $0.128 \sim 0.610 \mu\text{m}$ ）或較光滑（ R_a ： $0.041 \mu\text{m}$ ）的表面均顯示較差的細胞貼附性。經陽極處理（在 5M NaOH 溶液中外加電壓至 10、15 及 20 V）的鈦箔表面為奈米級網狀結構，並為 TiO_2 及 Ti_2O_3 的混合相，其表面有較多的初期（24 小時）細胞貼附數量及較佳的細胞貼附能力（相較於未經陽極處理試片）。此外，本研究也成功應用電化學技術即時監測細胞在鈦基植體金屬表面的成長過程。結論：經適當表面改質（例如適當粗糙度及奈米網狀鈦氧結構）的鈦金屬植體表面可獲得更佳的細胞貼附行為；電化學技術（如 EIS）可應用於研究細胞-植體金屬介面的反應機制。

關鍵字：表面改質、粗糙度、奈米網狀鈦氧薄膜、類造骨細胞、細胞貼附、EIS

Abstract

This study was to investigate the initial adhesion behavior of osteoblast-like U-2 OS cells on surface-modified Ti implant material, including Ti metal with various surface roughnesses and with nano-network Ti-O film. Furthermore, the in-situ monitoring of cells growth on Ti metal via electrochemical technique was also developed. Results showed that Ti metal with a surface roughness R_a of $0.064 \mu\text{m}$ revealed the optimal initial cell adhesion behavior with respect to either the rougher (R_a : $0.128 \sim 0.610 \mu\text{m}$) or smoother (R_a : $0.041 \mu\text{m}$) specimen. The nano-network film formed on the anodize Ti foils, via applying an anodic potential (10, 15 and 20V) to the Ti foil in 5M NaOH solution, contained TiO_2 and Ti_2O_3 . The anodized Ti foil had a higher number of the attached cells and a better cell adhesion

behavior than the as-received Ti foil without surface treatment. Furthermore, the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurement technique was successfully applied to monitor the in situ growing process of cells on Ti metal. Conclusions: The optimal cell adhesion behavior on Ti implant material could be obtained via suitable surface modifications (e.g. suitable surface roughness and nano-network Ti-O structure); electrochemical technique (e.g. EIS) could be applied to monitor the interfacial reaction between the cells and implant material.

Keywords: surface modification, roughness, nano-network Ti-O film, osteoblast-like cell, cell adhesion, EIS.

前言

鈦基植體材料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^[1-8]，如純鈦常應用於人工牙根（dental implant）及顱顏整形駐植體（cranio- and maxillofacial implants）等。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層（主要為TiO₂），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TiO₂氧化層接觸，所以鈦植體表面的TiO₂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。

生醫材料植入組織後，生物相容性的好壞除了與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）。就表面粗糙度而言，相關研究已指出表面粗糙度和骨整合（osseointegration）有密切的關係^[9,10]。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（如 Fibronectin、Vitronectin、osteopontin、thrombospondin、fibronogen）中均含有 arginine-glycine-aspartic acid (RGD)，會與細胞表面和貼附有關的受器（receptor）結合^[10-12]，進而促進細胞的貼附。Eisenbarth 等人^[13]研究纖維母細胞在不同粗糙度的 Ti、Ti6Al4V 和 Ti30Ta 合金表面附著情形，發現將細胞培養在有溝紋的試片表面 2 天後，細胞排列的形狀會隨著試片表面粗糙度（R_a）增加而更明顯。Anselme 等人^[14]評估骨細胞在不同粗糙面 Ti6Al4V 表面之初期貼附情形，發現較光滑（R_a：0.16μm、0.20μm）試片上的細胞貼附性比較粗糙（R_a：0.30μm、3.4μm）的試片好。然而，Deligianni 等人^[15]研究骨髓細胞（Bone marrow cell）初期 2 小時貼附的結果為粗糙度越大之試片表面貼附的細胞數目越多。縱然已經有許多有關表面粗糙度與細胞間反應的文獻，但其粗糙度範圍不盡相同，所得結果也多有違背，因此本研究利用碳化矽砂紙及氧化鋁粉研磨方式來備製各種表面粗糙度的植體材料表面，粗糙

度範圍大致含括臨床所使用的粗糙度，評估粗糙度對類造骨細胞在 Ti 植體材料表面的初期貼附行為，以作為選用或發展適當表面粗糙度的植體材料之參考。

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。文獻指出^[16]，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；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^[17,18]。因此，利用適當的表面改質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。de Goot 等人^[19]以電漿噴鍍法 (plasma-spray) 披覆氫氧基磷灰石 (Hydroxyapatite, HA) 於金屬表面上，所生成的 HA 鍍膜具有優良的組織反應，可是在人工牙根、人工關節的臨床植入卻發現在鍍層與金屬間界面有剝離現象^[20]。Kokubo 等人則利用 NaOH 溶液的浸泡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 的析出^[21,22]，藉此所得到的氧化薄膜在機械性質與生物相容性質均有更好的表現，然而該方式所備製的 Na_2TiO_3 層附著性不佳，且化學製程不易精確控制。因此，在鈦金屬表面備製具良好生物活性的反應層或薄膜，一直是生醫材料表面改質的重要研究方向之一，其中利用電化學方式來達到植體材料表面改質的目的是近年來非常具有潛力的研究課題之一。電化學法具有製程設備簡易、製程溫度低、高沉積速率、附著力佳，以及容易形成結晶膜等諸多優點。因此，本研究利用電化學技術在鈦箔表面備製奈米級網狀鈦氧化物薄膜，再利用體外細胞培養技術分析類造骨細胞在鈦箔表面初期的貼附行為。

當細胞與材料接觸之際，許多複雜的過程 (包括貼附 (adhesion)、伸展 (spreading) 及增殖 (proliferation)) 便開始發生，上述過程通常可藉由電子顯微鏡來觀察，但此法並不能即時 (*in-situ*) 瞭解細胞與材料之間的交互作用。本研究亦自行設計一內部安裝電化學儀器之細胞培養箱，利用 EIS 量測技術即時 (*in-situ*) 監測及分析類造骨細胞 (osteoblast-like cell) 在鈦植體材料表面之成長過程，以做為臨床選用植體材料的參考，所建立的電化學系統可應用於評估新開發植體材料的生物相容性質。

實驗方法

一、表面處理及性質分析

(1) 表面粗糙度

本研究所使用的材料為片狀的商業級純 Ti。試片表面經不同號數 (#120、#320、#1500) 砂紙研磨或氧化鋁粉 (1.0 μm 、0.3 μm) 拋光處理，以備製各種表面粗糙度值的 Ti 試片。將經過研磨、拋光過後的 Ti 試片浸泡於酒精中，以超音波震盪 10 分鐘後，再用酒精沖洗 2 次，以冷風吹乾，所有試片經表面粗糙度值 (R_a) 的量測後，進行後續的細胞培養試驗。

(2) 陽極處理

本研究主要的材料為商用鈦箔，試片厚度 0.01 mm、陽極表面處理面積 1 cm²。試片先以丙酮去除表面油污，再以蒸餾水清洗，置於試驗槽之陽極（工作電極），陰極為白金試片（輔助電極），參考電極為 Ag/AgCl，電解液為 5M 的 NaOH 溶液。以電源供應器外加電壓至 10、15 及 20 V。製成的陽極氧化膜試片以 X 光繞射儀及 Raman 散射光譜儀分析其表面晶體結構，以場發射掃描式電子顯微鏡觀察表面形貌。表面未經陽極處理的原素材（as-received）試片則為對照組試片。

二、細胞繼代培養

本研究選用細胞為類造骨（osteoblast-like）U-2 OS 細胞來模擬骨細胞的行為，相關研究指出此細胞株具有造骨細胞的遺傳表型（phenotype）^[23]。將類造骨細胞以 Complete McCoy, s 5A 培養液培養於培養瓶中，培養瓶放置在含 5 % CO₂、37 °C 的培養箱。待細胞生長接近全滿時，將培養瓶中的培養液吸除，以 PBS（phosphate buffer saline）沖洗細胞表面兩次，加入 0.25 % 胰蛋白酶（trypsin-EDTA）並置於培養箱中 5 分鐘消化貼附於培養瓶的細胞，再加入兩倍體積的培養液中和胰蛋白酶的消化作用，將含培養液、胰蛋白酶和細胞的液體置入離心管並離心 5 分鐘，倒掉上層液體，最後新鮮的培養液製成細胞懸浮液，進行後續細胞貼附實驗。

三、細胞貼附數量計算

培養 U-2 OS 細胞於試片表面及 12 孔聚苯乙烯培養盤（視為控制組），接種密度為每平方公分 1.8×10^6 個細胞，接種後將試片及培養盤放置在含 5 % CO₂、37 °C 的培養箱中。待培養 24 小時後取出試片及培養盤，以 PBS 沖洗細胞表面兩次，加入 0.25% 胰蛋白酶（trypsin-EDTA）消化貼附於試片的細胞，再加入兩倍體積的培養液中和胰蛋白酶的消化作用，利用血球計數器計算每個試片和控制組的細胞數目，並計算平均細胞貼附數目百分比（ $\frac{\text{試片表面細胞數量}}{\text{控制組細胞數量}} \times 100\%$ ）（n = 3）。

四、細胞貼附形態觀察

本研究利用結晶紫染色技術觀察細胞貼附於試片表面之巨觀形態（包含外型及分佈），以及場發射掃描式電子顯微鏡觀察細胞貼附於材料表面後的微觀形態（包含試片與細胞膜、細胞絨毛之接觸行為）。

(1) 結晶紫染色

將試片以 PBS 沖洗細胞表面兩次，加入 PBS 與甲醇等比例混合之溶液 2 分鐘，移除混合液後再加入新鮮之甲醇固定 10 分鐘、移除甲醇並靜待乾燥，最後加入 1 % 結晶紫溶液染色 10 分鐘，以去離子水清洗靜置乾燥，用光學顯微鏡觀察細胞在材料表面培養 24 小時後之巨觀形態。

(2) 場發射掃描式電子顯微鏡觀察

將試片以 PBS 沖洗細胞表面兩次，加入非凝聚固定劑（0.1M cacodylate、0.1M sucrose 溶液含 2 % glutaraldehyde 4 % paraformaldehyde 及 1 % tannic acid, pH 7.4）在 37 °C 下初步固定細胞 30 分鐘二次，再以含 1 % osmium tetroxide (OsO_4) 之 0.1M cacodylate、0.1M sucrose 溶液固定細胞 1 小時，之後分別以 1 % thiocarbohydrazide 的溶液及 1 % OsO_4 的溶液作用 15 分鐘二次。以蒸餾水徹底清潔細胞標本，依序以不同濃度的乙醇將細胞標本脫水。並用 hexamethyldisilazane (HMDS) 以漸進式的比例浸潤細胞標本置換乙醇，小心取出試片置於濾紙上靜置乾燥。觀察前將試片置於真空蒸鍍儀內濺鍍上一層白金，再置入場發射掃描式電子顯微鏡腔體內進行觀察。

五、電化學即時監測

本研究將電化學測試設備安裝於自行設計的 CO_2 培養箱，在細胞成長過程中，量測試片在不同時間點的電化學交流阻抗頻譜 (electrochemical impedance spectroscopy, EIS)，再配合細胞數目計算及形態的觀察 (利用掃描式電子顯微鏡 (SEM))，分析電化學訊號 (即極化電阻, R_p) 與細胞成長過程中不同階段 (包含貼附、伸展及增殖) 的關係。進而建立即時監控細胞/材料界面反應的電化學測試系統。EIS 的量測頻寬為 100 kHz - 10 mHz，交流電壓為 10 mV，直流電壓為開路電位 (open circuit potential)，以飽和甘汞電極為參考電極，白金片為輔助電極，電解液則為細胞培養液。

結果與討論

一、表面粗糙度對細胞貼附的影響

表一為經研磨拋光後之鈦試片表面粗糙度值，本研究所備製之粗糙度 R_a 範圍約在 0.041 - 0.610 μm 之間。圖一為 U-2 OS 類造骨細胞在不同表面粗糙度值的鈦試片表面培養一天及三天後的細胞貼附數目百分比；結果顯示，不論培養週期為一天或三天，當粗糙度 R_a 值約在 0.064 μm 有最多的細胞貼附數量。圖二為 U-2 OS 類造骨細胞在不同表面粗糙度值的鈦試片表面細胞培養一天的結晶紫染色，圖二 (a) 結果顯示粗糙的試片表面，細胞形狀為紡垂形伴隨明顯的接觸引導 (contact guidance) 現象，並可觀察到細胞有沿著研磨方向排列的趨勢；圖二 (b) 顯示適當的粗糙度表面有最明顯的細胞貼附情形；圖二 (c) 較光滑的試片表面細胞形狀較圓，細胞貼附程度也較不明顯。

本研究結果顯示出鈦表面有一個最適當的粗糙度值，使得細胞貼附數目最多及貼附情形最為良好，由圖一及圖二研判，當粗糙度 R_a 值為 0.064 μm 時，細胞不但有最多的貼附數量，也有最好的貼附行為。在較粗糙 (R_a : 0.128 - 0.610 μm) 及較光滑 (R_a : 0.041 μm) 的鈦表面均顯示較差的細胞貼附數目及形態。Keller^[24] 的研究指出，粗糙面 (R_a : 0.1 μm) 比光滑面 (R_a : 0.03 μm) 有較高

的貼附數量。Deligianni 等人^[15]的研究結果也顯示越粗糙的表面反而有越多的細胞貼附。另一方面，Anselme 等人^[14]的研究則指出光滑的表面 (R_a : 0.16、0.20 μm) 比粗糙的表面 (R_a : 0.30 μm) 細胞貼附數目為多；Linez-Bataillon 等人^[25]在不同材料、相似的粗糙度表面也得到相似的結果。造成上述文獻結果不盡相同的原因之一，可能是與所選用的材料或細胞種類不相同有關。

Den Braber 等人^[26]認為細胞貼附初期純粹以機械式互鎖 (interlocking) 方式貼附於材料表面,所以本研究粗糙度值 R_a 為 0.064 μm 的鈦試片表面提供 U-2 OS 類造骨細胞在初期有良好的機械式互鎖效應,進而顯示出最多的細胞貼附數量。

二、陽極處理表面對細胞貼附的影響

圖三為鈦箔在 5M NaOH 電解液中經不同電壓 (15V 及 20V) 陽極處理後表面氧化層之 Raman 散射光譜圖。結果顯示, 154 cm^{-1} 、429 cm^{-1} 、517 cm^{-1} 、602 cm^{-1} 推測為銳鈦礦相 (anatase) TiO_2 的能峰, 267 cm^{-1} 、452 cm^{-1} 為 Ti_2O_3 (corundum) 之能峰, 即鈦在 NaOH 電解液中陽極氧化後, 表面氧化物包括銳鈦礦相 TiO_2 及 Ti_2O_3 結構。

圖四為經不同電壓陽極處理後鈦箔表面之場發射掃描式電子顯微鏡顯微金相圖, 不論外加陽極電壓為 10V、15V 或 20V, 所生成的氧化膜均呈現網狀結構, 網狀厚度約為數個 數十個 nm, 而網狀孔洞平均直徑大小約為數十 數百個 nm。此外, 掃描電壓越大時, 所生成的孔洞越大, 但孔洞周圍網狀結構的厚度越小。

圖五為 U-2 OS 類造骨細胞貼附於經不同電壓陽極處理的鈦箔表面 24 小時後之平均細胞貼附數目百分比。結果顯示外加陽極電壓為 20V 的試片表面有最多的細胞貼附數量(稍高於 10V 及 15V 的試片), 未經陽極處理之試片(鈦箔)表面細胞數目最少。圖六為 U-2 OS 類造骨細胞培養於經不同電壓陽極處理鈦箔表面 24 小時後, 以結晶紫染色之光學顯微鏡圖。圖六 (a) 顯示未經陽極處理之試片表面細胞貼附性最差, 圖六 (c) 顯示 20V 試片有最多細胞貼附, 且其貼附情形最為良好。圖七為 U-2 OS 類造骨細胞培養於經不同電壓陽極處理的鈦箔表面 24 小時後之掃描式電子顯微鏡圖。由圖可明顯觀察到試片表面均被蛋白質披覆。圖七 (a) 觀察到攤平的細胞膜, 細胞膜無特定方向地生長; 圖七 (b) 及 (d) 觀察到細胞膜前端與網狀結構緊密接合, 且細胞膜似乎有沿著溝脊生長成網狀的形貌; 圖七 (c) 可觀察到細胞的絲狀絨毛 (microvillus)。

比較圖四及圖七, 經細胞培養試驗的試片表面均披覆一層蛋白質, 此蛋白質來源主要為細胞培養液中的血清, 此蛋白質為細胞生長過程中所需要的重要養分。文獻指出, 材料表面微米級的形貌 (micron topography) 會影響細胞的貼附能力^[27], 而奈米級的形貌 (nano topography) 會影響蛋白質的吸附^[28]。本研究在鈦箔表面所備製的網狀鈦氧化物結構為奈米級尺寸, 有利於細胞培養液中蛋白質的吸附, 進而增進後續細胞的貼附, 因此經陽極處理的鈦箔試片比原

素材表面有較多的細胞貼附數目。

三、電化學即時監測

圖八為鈦金屬在不同細胞培養時間（2、24 及 72 小時）之 EIS 圖（Nyquist-plot）及相對應之極化電阻（ R_p ）。結果顯示，鈦金屬在細胞貼附（adhesion）初期（2 小時）的 R_p 值為 $3.9 \text{ Mohm}\cdot\text{cm}^2$ 。當細胞在材料表面進行伸展（spreading）時（24 小時），鈦金屬的 R_p 值達到 $4.7 \text{ Mohm}\cdot\text{cm}^2$ 。當細胞在增殖（proliferation）階段，鈦金屬的 R_p 值可達到 $10.8 \text{ Mohm}\cdot\text{cm}^2$ 。換言之， R_p 值隨細胞培養時間的增加而上升，且均高於無培養細胞的對照組試片（對照組試片之 R_p 值並不隨時間而改變）。

圖九為鈦金屬在不同細胞培養時間（2、24 及 72 小時）之表面 SEM 圖。圖九（a）顯示，細胞在鈦金屬表面成長的初期階段（2 小時）尚未發生伸展（spreading），表面貼附的細胞形態主要是球形結構。圖九（b）顯示，細胞在鈦金屬表面成長 24 小時後，表面形態已發生明顯伸展外貌，且活性（activity）良好（由細胞之觸角形狀得知）。圖九（c）顯示，細胞在鈦金屬表面已完全貼滿，即已發生增殖（proliferation）現象，此時細胞數目是成倍數增加。由圖九（a）~（c）得知，隨著細胞培養時間的增長，細胞覆蓋金屬表面的面積加大，造成離子在金屬/環境界面間的傳遞阻力增加，故 R_p 值上升（圖 2）。

利用台盤藍排除法（trypan blue exclusion method），以血球計數器計算試片表面的細胞數目得知^[29]，鈦金屬表面的細胞經 72 小時培養後，細胞密度由原先的 10^5 no./cm^2 增為 $2 \times 10^5 \text{ no./cm}^2$ 左右。根據 EIS 量測及 SEM 觀察結果，表面培養細胞的鈦金屬在培養液環境中可能的電化學行為以圖十的等效電路來表示。金屬表面的等效電路主要是包括對應於氧化層（通常為 Ti 基）及分子生物（biomolecule）吸附層的電阻-電容迴路，其中分子生物吸附層亦包含細胞的成長效應。圖十一為鈦金屬在培養液中，細胞培養二小時後之 EIS 實驗數據與利用等效電路（圖十）模擬結果之比較。結果顯示，等效電路模擬結果與實驗數據有良好的一致性。

結論

- （1）表面粗糙度 R_a 為 $0.064 \mu\text{m}$ 的鈦植體材料有最佳的細胞初期貼附行為，較粗糙及較光滑的鈦表面均顯示較差的細胞貼附性。
- （2）以電化學方法備製的奈米級網狀 Ti-O 化合物，顯示有良好的蛋白質及細胞貼附行為，為一具有發展潛力的生醫用植體材料表面改質技術。
- （3）鈦金屬的極化電阻隨 U-2 OS 細胞的成長而增加。當細胞發生增殖時（72 小時），鈦金屬的極化電阻（ $>10 \text{ Mohm}\cdot\text{cm}^2$ ）為細胞貼附初期（2 小時）的二倍以上。本研究成功應用電化學技術即時監控細胞在金屬表面的成長過程。

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。目前正準備將最終研究成果發表於國外相關期刊，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關性之影響。

本研究已發表之論文如下：

- (1) H.-H. Huang, C.-T. Ho, T.-H. Lee, T.-L. Lee, and C.-C. Hsu, "Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion", submitted to *Biomolecular Engineering* (October 2003). (SCI)
- (2) 黃何雄、何俊德、游惠婷、潘思蓉、李天翎、廖保鑫、周明勇、徐啟智*，"表面粗糙度對類造骨 U-2 OS 細胞在 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金表面貼附初期及增殖之影響"，*中華牙醫學雜誌* (Chinese Dental Journal) revised, October 2003)。
- (3) 黃何雄、何俊德、潘思蓉、廖克剛及李天翎，"細胞/植體金屬表面電化學性質研究"，*防蝕工程* (*Journal of Chinese Corrosion Engineering*)。第十七卷，第二期，第 153-160 頁 (民國九十二年)

參考文獻

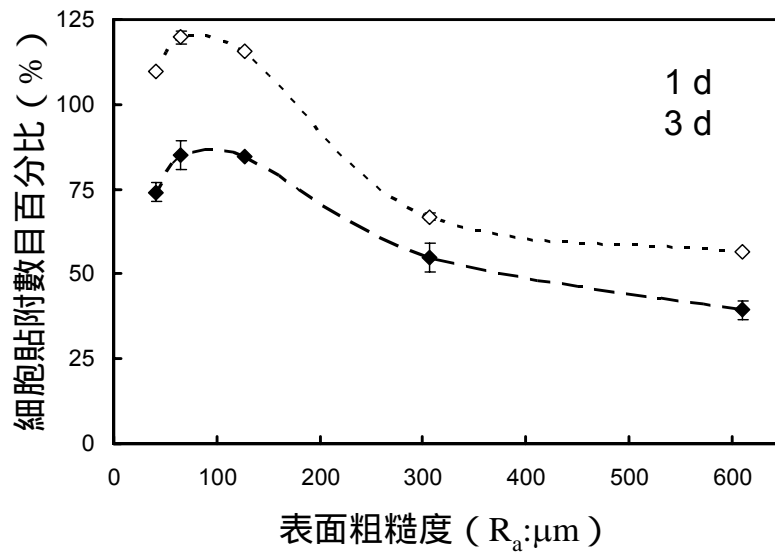
- [1] Helsen JA, Breme HJ. *Metals as Biomaterials*. Chichester: John Wiley & Sons;1998.
- [2] Long M, Rack HJ. *Biomaterials* 1998;19:1621-1639.
- [3] Worch H, Scharnweber D. Biologisierte Titanwerkstoffe. *Z Metallk* 1998;89:153-163.
- [4] Albrektosson T, Brånemark P-I, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundstrom I. *Ann Biomed Eng* 1983;11:1-15
- [5] Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:323-332.
- [6] Howlett CR, Zreiqat H, Wu Y, McFall DW, McKenzie DR. *J Biomed Mater Res* 1999;45:345-354.
- [7] Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughn RA, Zaharias R. *J Biomed Mater Res* 1994;28:939-946.
- [8] Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:329-345.
- [9] Albrektosson T, Brånemark P-I, Hansson HA, Lundstrom I. *Acta Orthop Scand* 1981;52:155-170.
- [10] Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:675-690.

- [11] Ruoslan E, Pierschbacher MD. Science 1987;238:491-497
- [12] Kornu R, Malomey WJ, Kelly MA, Smith RL. J Orthop Res 1996;14:L871-877.
- [13] Eisenbarth E, Meyle J, Nacftigall W, Breme. Biomaterials 1996;17:1399-1403.
- [14] 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.
- [15] Deligianni DD, Katasla N, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Biomaterials 2001;22:1241-1251
- [16] Thull R. In Jahrbuch der Gesellschaft für Orale Implantologie, 1993;49-60.
- [17] Fujii N, Kusakari H, Maeda TA. J Periodontol 1998;69:485-495.
- [18] Haas R, Mailath G, Do'rtbudak O, Watzek G. Clin Oral Impl Res 1998;9:117-122.
- [19] de Groot K, Geesink RTG, Klein CPAT, and Serekian P. J. Biomed. Mater. Res, 1987;21:1375-1381.
- [20] Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nishiguchi S, and Nakamura T. J. Biomed. Mater. Res, 1999;45:100-107.
- [21] Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. J Biomed Mater Res 1996;32:409-417.
- [22] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. J Biomed Mater Res 1990;24:721-734.
- [23] 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, 28:422-432, 2000.
- [24] Keller JC. Implant Dent 1998;7:331-337.
- [25] Linez-Bataillon P, Monchau F, Bigerelle M, Hildebrand HF. Biomol Eng 2002;19:133-141.
- [26] den Braber ET, de Ruijter JE, Smots HTJ, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. Biomaterials 1996;17:1093-1099.
- [27] Kawahara H. Int dent J. 1984;33:350 -357.
- [28] Thull R, Trautner K, Karle EJ. Biomed Tech 1992;37:162-169.
- [29] Ho CT. Master Thesis, Institute of Dental Materials, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, June 2002.

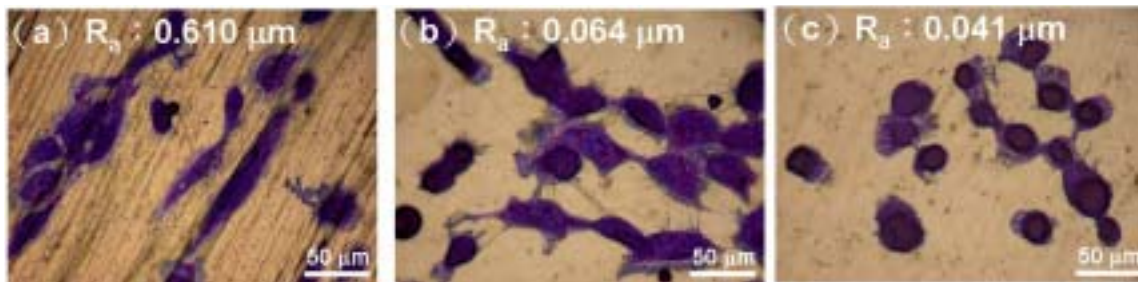
表一 經研磨拋光後之鈦試片表面粗糙度值 (R_a) (mean \pm SD)

	#120	#320	#1500	1 μ m	0.3 μ m
R_a	0.610	0.307	0.128	0.064	0.041
	± 0.022	± 0.017	± 0.007	± 0.012	± 0.003

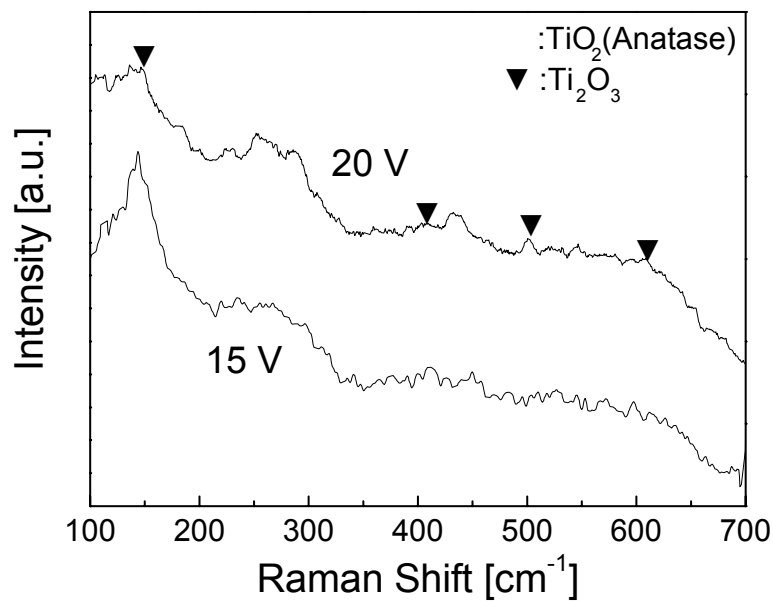
(unit : μ m)



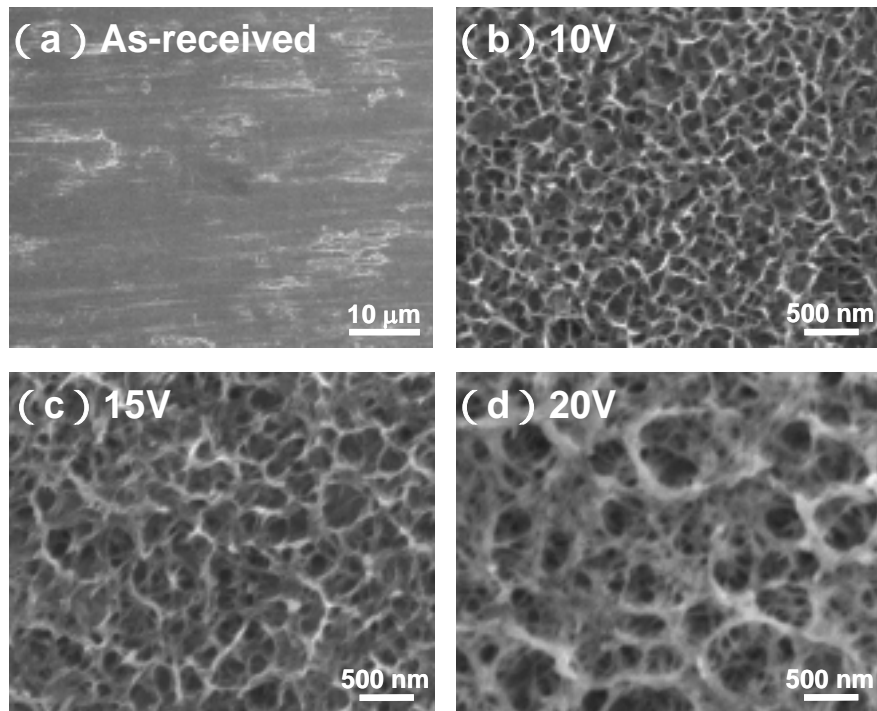
圖一 U-2 OS 類造骨細胞在不同表面粗糙度值鈦試片表面培養一天及三天後的細胞貼附數目百分比



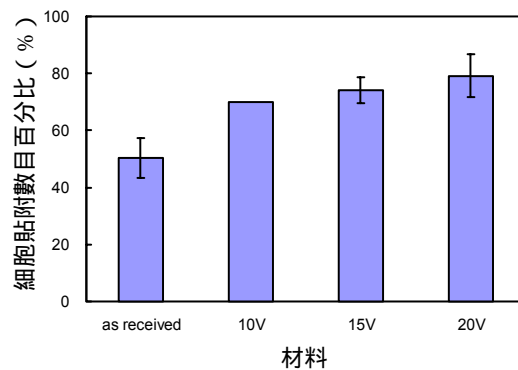
圖二 U-2 OS 類造骨細胞在不同表面粗糙度值鈦試片表面培養一天後的結晶紫染色觀察圖



圖三 鈦箔在 5M NaOH 電解液中經不同電壓陽極處理後表面之 Raman 光譜圖



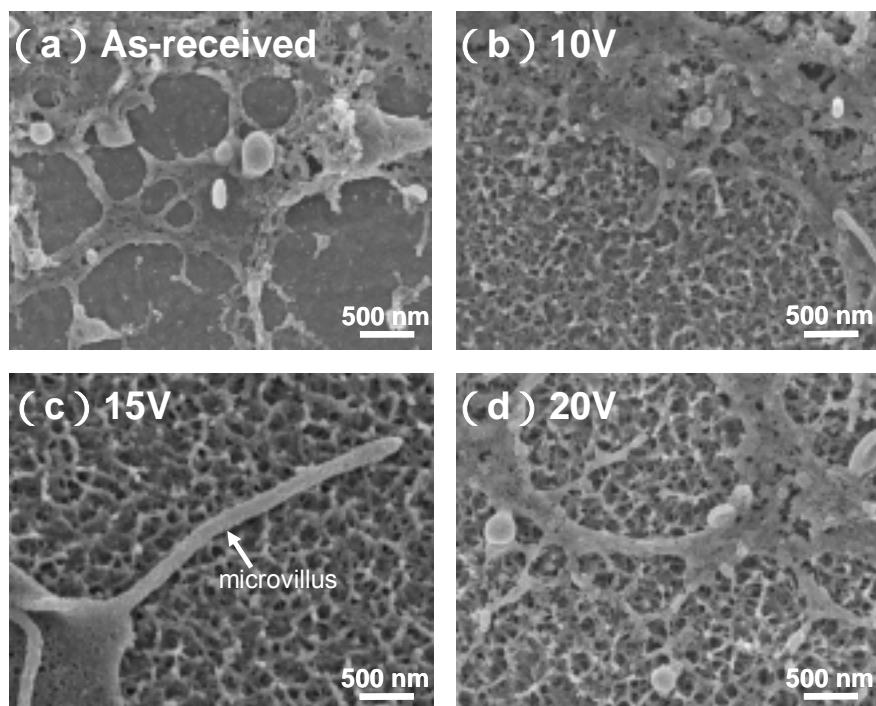
圖四 鈦箔在 5M NaOH 電解液中經不同電壓陽極處理後之表面 SEM 形貌((a) 原素材 (as-received), (b) 掃描電壓至 10V, (c) 掃描電壓至 15V, (d) 掃描電壓至 20V)



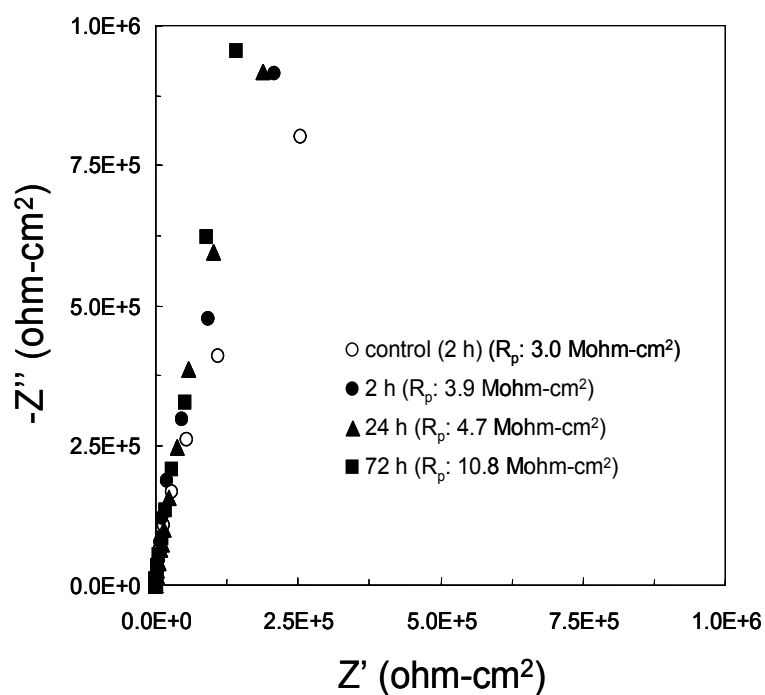
圖五 U-2 OS 類造骨細胞培養於不同電壓陽極處理的鈦箔表面 24 小時之平均細胞貼附數目百分比



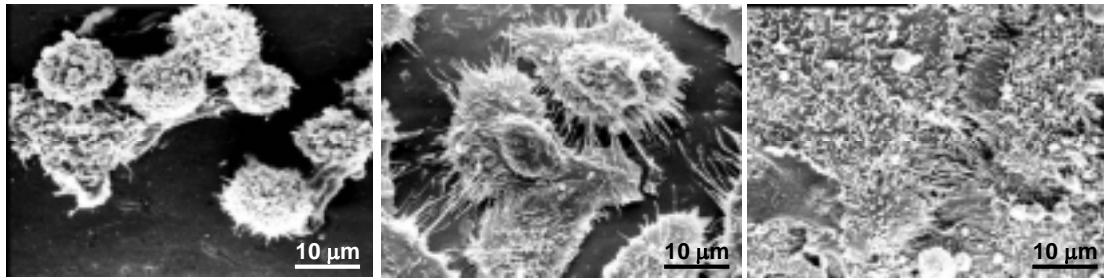
圖六 鈦箔在 5M NaOH 電解液中經不同電壓陽極處理後再經 24 小時細胞培養之結晶紫染色圖 ((a) 原素材 (as-received), (b) 掃描電壓至 15V, (c) 掃描電壓至 20V)



圖七 鈦箔在 5M NaOH 電解液中經不同電壓陽極處理後再經 24 小時細胞培養之表面 SEM 形貌 ((a) 原素材 (as-received), (b) 掃描電壓至 10V, (c) 掃描電壓至 15V, (d) 掃描電壓至 20V)



圖八 鈦金屬在不同細胞培養時間 (2、24 及 72 小時) 之 EIS 圖 (Nyquist-plot) 及相對應之極化電阻 (R_p)

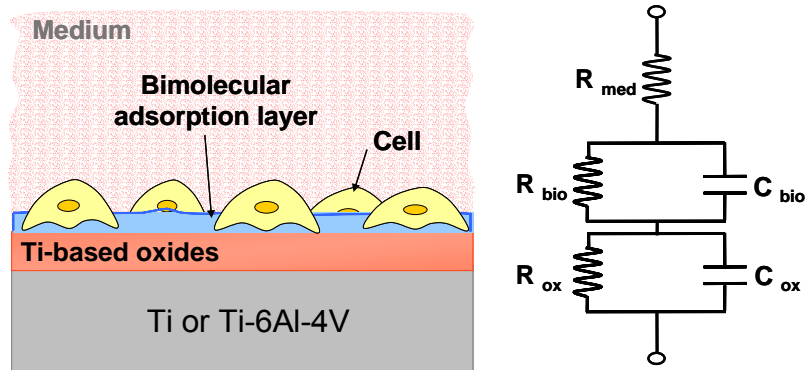


(a) 2 h

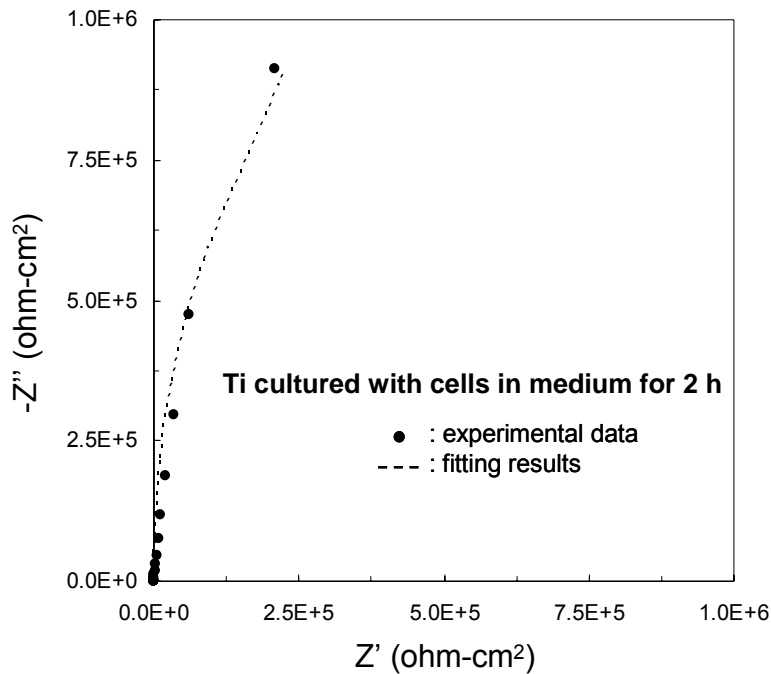
(b) 24 h

(c) 72 h

圖九 鈦金屬在不同細胞培養時間之表面 SEM 圖 ((a) 2 小時, (b) 24 小時, (c) 72 小時)



圖十 表面培養細胞的鈦金屬在培養液環境中可能的電化學行為及相對應之等效電路圖



圖十一 鈦金屬在培養液環境中細胞培養 2 小時後之 EIS 實驗數據及利用等效電路 (圖十) 模擬之結果