

鈦金屬表面之微奈米複合結構對細胞之影響

林清祺

慶達科技股份有限公司

高雄市岡山區本工六路 38 號

摘 要

基於鈦金屬的表面處理技術日漸提升，對於醫學上不僅是只能讓骨質達到癒合的結果，更是要追求如何能夠更快速的達到骨整合效果。在考量改變金屬表面結構的情況下，針對改變粗糙面之結構尺寸及型態，使預期能夠達到更快速的骨整合效果。本研究採用高潔淨度的雷射表面處理技術，透過高能量密度之雷射光對鈦金屬表面進行粗糙化，使表面產生微米與奈米之複合性結構，再經由金屬表面與細胞生成相對關係的觀察，探討表面結構之型態對細胞的生成趨勢，本研究透過細胞培養後，於雷射表面處理後之微米結構(約為1~15 μm)及其表面具有約100 nm之奈米尺寸結構中，發現此微奈米複合結構有助於細胞的增生，且相較於傳統的噴砂處理表面有更佳的細胞生長表現。

關鍵詞：雷射，表面處理，生物相容性，奈米

The Effect of the Cell Response on Micro-and-nano complex Structure of Titanium Surface

CHIN-CHI LIN

Biomate Medical Devices Technology Co., Ltd, Kaohsiung 82059, Taiwan

No. 38, Bengong 6th Rd., Gangshan Town, Kaohsiung County 820, Taiwan

ABSTRACT

The medical requirement for titanium nowadays is not only achieving healing effect of the bone, but also reaching osseointegration faster due to the improving technique of surface treatment day by day. Under the consideration of changing the surface structure of the metal, by changing the structure, size and form of the rough surface, it is expected to reach osseointegration faster. The study uses high cleanliness laser surface treatment technique, forming rough metal surface of micro and nano composition structure through high efficacy laser luminous energy; then conferring the pattern of cell generation trend on the surface structure through the observation of the relative relationship between the metal surface and the generation of cell. The study discovers that in the micro (1~15 μm) and nano (~100 nm) composition structure after laser surface treatment has better cell proliferation effect than that of the traditional sand-blast surface treatment.

Key Words: Laser, Titanium, Biocompatibility, nano

一、前言

現今的醫學領域中，鈦金屬被廣泛的運用在人體內的支架及其骨骼之替代物，再透過各種不同表面處理技術，針對鈦金屬表面進行表面結構的修飾，或是進行表面材料的改質行為，或是予以幫助生長的生醫活性材料的塗覆，使達到生物細胞的貼合與攀附，讓骨細胞可以順利的在鈦金屬表面成長發展，使達到促進骨癒合或骨整合的功效。

在針對表面結構的改變或是表面材質的變更，一直是學者不斷在探討的議題，先前的學者利用機械式的方法讓金屬表面達到粗糙化的表面結構，稍早期的表面結構其粗糙度逐漸遞減，至今較為成熟的粗糙度Ra值大約在1~4 μm 之間[1-2]，也經過臨床的證實具有較高的骨癒合效果，而表面改質的部分學者亦是透過化學方式使鈦表層之材質產生變化，不論是表層氧化或是氮化，亦或是表面鍵結官能基等功能鍵，在體外細胞試驗都呈現有不錯得效果[3-4]。

惟表面處理技術當中，現代醫學不僅是只能讓骨質達到癒合的結果，更是要追求如何能夠更快速的達到骨整合效果，且學者大多採用單一類型的表面處理技術，在考量改變金屬表面結構的情況下，針對粗糙化的表面再進一步予以表面改質，使預期能夠達到更快速的骨整合效果。本研究基於潔淨度的觀點，採用非接觸式的雷射處理技術對鈦金屬進行表面粗糙化，並觀察金屬表面與細胞生成的相對關係，探討表面結構之型態對幫助細胞的生成趨勢，使在未來可以進一步的釐清表面結構對生物細胞之影響。

二、實驗方法

本研究使用醫療專用之植入性第四級純鈦(ASTM F67 Grade 4)作為實驗基材，並以雷射二極體激發固態雷射(Diode Pump Solid State Laser, DPSS laser)對材料表面進行雷射表面處理，再經由配置之電腦軟體設定欲加工在材料表面上之圖騰與路徑，最後完成試片表面結構之處理作業。雷射參數設定為10 mm/sec、50 mm/sec、100 mm/sec、300 mm/sec 四種。另外亦準備噴砂與酸蝕(Sand-blasted, Large grit, Acid - etched; SLA)之試片，於細胞試驗中進行比較。

完成表面處理後之純鈦試片，先以光學顯微鏡進行表面孔洞之間距量測，觀察不同參數對表面之結構週期；後續再以場發射掃描式電子顯微鏡(FE-SEM, Hitachi-4700)進行表面結構之觀察。

細胞試驗則是以 MTT 測試骨母細胞之增殖功能分析。取出生 2~3 天的幼鼠之初代骨母細胞，進行MTT細胞活性試驗，將測試樣本各自放入 48 孔盤中，植入 10^4 well/cells，於 0、1、3、5、7 培養天數收點，將待測之細胞樣本中的培養液吸除後，使用磷酸緩衝溶液沖洗數次，加 MTT(3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.)黃色試劑進行測試，在 37 °C 培養箱培養三小時後移除培養液，添加 DMSO 使其紫色沉澱物溶解，利用 ELISA 分析檢測 OD 值(OD 值波長設定為 570 nm)即可得知細胞之增殖情形。

三、結果與討論

純鈦試片經由高能量密度之雷射束，透過脈衝光束對表面進行燒蝕過後，可發現不同的能量重疊次數能獲得不同的表面形貌結構，從SEM影像觀察到有明顯的不同(圖 1-4)，重疊次數越高者孔洞深度越深，且孔洞直徑也相對越小。隨著雷射重疊次數的增加，可發現重融的堆積面積越大且越明顯。透過雷射光對表面的熱循環效應，融熔液體向兩側堆積之凸狀再鑄表面範圍越廣，由SEM影像可被觀察到雷射速度 10mm/sec的堆積熔融表面的寬度是所有參數中最寬者，堆積熔融寬度約達15 μm 。其次之隨著雷射速度提升至 50mm/sec、100mm/sec、300mm/sec時，可獲得堆積熔融表面寬度約為10 μm 、5 μm 、3 μm 。

孔洞的深度隨雷射速度的增加而遞減，雷射速度 10mm/sec而言，雷射之重疊率約為98%，故可從SEM的影像中發現被熔蝕的孔洞深度最深。雷射掃描速度50 mm/sec、100 mm/sec、300 mm/sec之雷射重疊率各為90%、80%、70%，孔洞，故熔蝕的孔洞深度也會隨雷射速度的增加而逐漸遞減。因雷射重融過程中之融熔金屬液體在加熱過程中，是以熱傳導模式(conduction mold)以及鑰孔(Key hole mold)兩種模式，如圖5[5]，因此金屬表面之形貌有所差異，本研究中之雷射速度10 mm/sec與50 mm/sec兩種較偏向於鑰孔模式發生，而雷射速度100 mm/sec與300 mm/sec兩種則是較偏向於熱傳導模式，因此在表面形貌上則有呈現兩款明顯不同的結構型態。

許多學者指出，增加鈦金屬表面之粗糙度，可有效的提升或幫助細胞的貼附、增生、分化[5]，本研究透過高功率密度之雷射束對鈦金屬表面進行熔蝕處理，可有效的獲得各種不同程度的粗糙表面，使預期可獲得較佳的細胞增生效果。

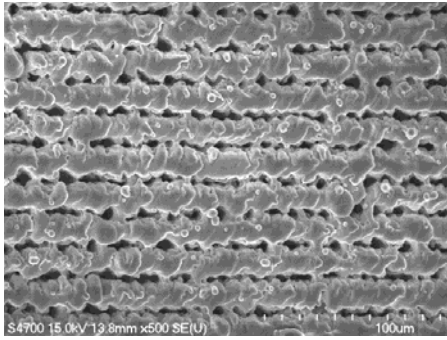


圖1. 掃描速度10 mm/s之SEM影像

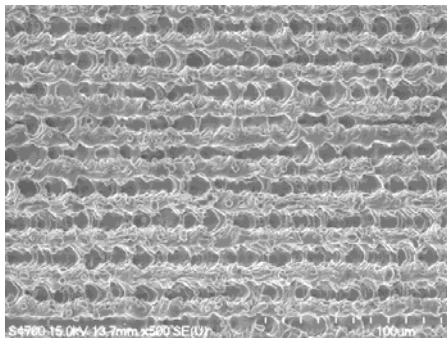


圖2. 50 mm/s之SEM影像

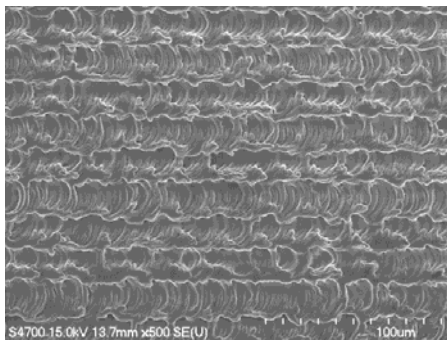


圖3. 100 mm/s之SEM影像

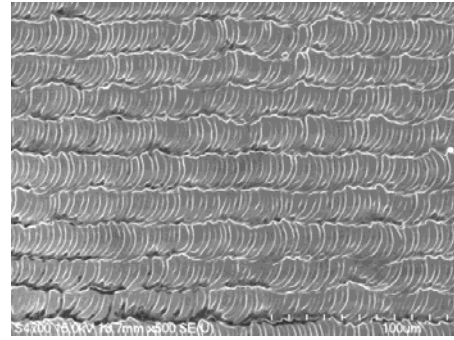


圖4. 300 mm/s之SEM影像

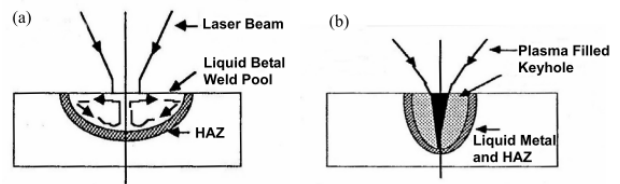


圖5 熱傳導模式與鑰孔模式示意圖

級之凝固結構，從圖5中可發現雷射速率10 mm/sec之顯微結構間距約為100 nm，而雷射速度300 mm/sec之顯微結構間距約為50 nm。隨著雷射速度的增加，除了巨觀表面的孔洞深度會隨著減少外，在顯微影像上亦可發現奈米結構之高度亦是受到雷射速度的影響，雷射速度越高則奈米結構之高度越低。

針對雷射熔蝕處理之表面，經由骨細胞的培養後，可透過MTT測試觀察其表面處理後之細胞增殖現象，由圖8所示，在機械加工表面、雷射處理及噴砂酸蝕處理之試片中測得細胞隨著培養的時間增加而遞增，各組試片於前期並無顯著的差異，僅呈現常態性的成長趨勢。但於細胞培養的第7天可發現雷射表面處理與噴砂酸蝕處理的試片，其細胞的數量明顯增加，特別是雷射處理的試片，細胞的增殖現象特別明顯，其中又以雷射速度10 mm/sec者為最高，具有相當顯著的增殖結果。Fuhrich等學者表示，粗糙化的表面有助於細胞的增生[9-10]，微米尺寸的表面結構可有效提升細胞的增生、分化與貼附效果。而更有學者提出奈米尺寸的表面結構有利於細胞的分化及貼附效果，且會影響細胞蛋白質的貼附行為[11]。

本研究經由脈衝式高重複率的雷射，可同時將鈦金屬表面同一時間產生微米尺寸與奈米尺寸的微奈米複合結構，透過細胞增殖的試驗結果，可得知此微奈米複合結構相當適合細胞的增殖生長，且相對於噴砂酸蝕處理的鈦金屬表面雷射處理的表面有較佳的細胞增殖反應。

此外，學者也表示雷射處理之鈦金屬表面能夠有效的達到表面粗糙化的結構，同時也可以提升骨整合的能力[6-7]，故此雷射表面處理是一種潔淨度高的表面處理方式，相當適合用來使用在植體表面粗糙化的方式。

Fancsaly 等學者也提到，透過不同能量的脈衝雷射可同時的在材料表面上導入微米與少許的奈米結構[8]，但因雷射源的不同，故所產出的微奈米結構也有明顯的差異。本研究之雷射為短波長之雷射光源，故可從SEM影像中得到具有明顯的奈米結構。

而在進一步放大倍率來觀察表面顯微結構，可發現經過本研究之雷射處理後之重融表面，雷射速度10 mm/sec、50 mm/sec、100 mm/sec、300 mm/sec等四種參數，皆有產生奈米等

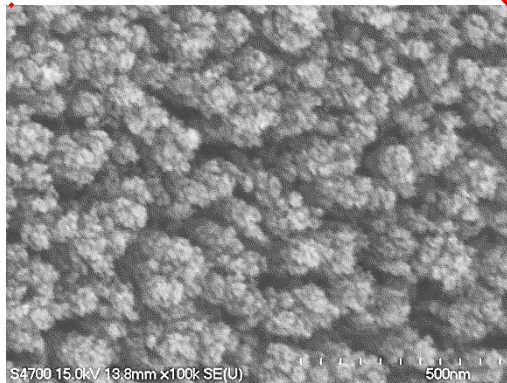
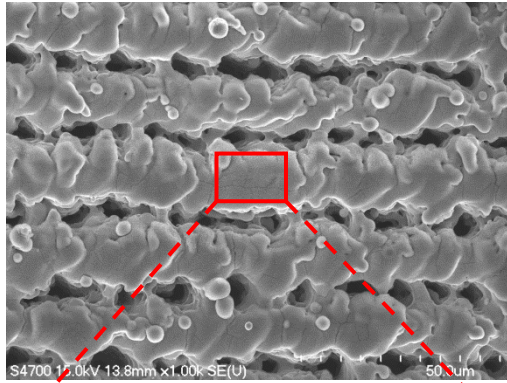


圖6. 雷射速度10mm/sec之微奈米複合結構

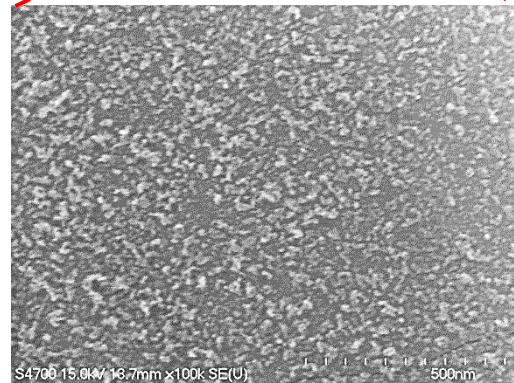
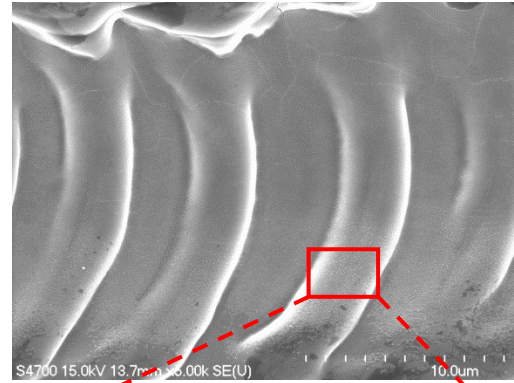


圖7. 雷射速度300mm/sec之微奈米複合結構

四、結論

本研究透過雷射處理設計不同的參數後，可獲得不同孔徑及孔深的結構，雷射速度越低，表面所被熔蝕的深度越深，且因熔融過程中之熱循環現象使重融金屬向兩側堆積，因而呈現孔徑有較小的尺寸。而隨著雷射速度的增加，金屬熔融現象由原有的鑰孔模式轉變為熱傳導模式，因此表面結構之深度也相對較低。

經由雷射處理後之金屬表面，可同時產生微米與奈米尺的複合結構，於低雷射速度與高雷射速度之處理表面皆可獲得此微奈米複合結構。

對於的細胞的增殖試驗中，雷射表面處理與噴砂酸蝕處理皆適合細胞的生長。其中以雷射速度10mm/sec的表面處理裡有較佳的細胞增生表現，且雷射處理之表面與噴砂與酸蝕處理之表面，雷射速度10mm/sec的表面有較佳的細胞增殖生長的趨勢。

參考文獻

1. Isabel, M. O. B., R. Ito., H. Katagi, K. I. Tsuboi ,N. Yamada, T. I. Tanabe, K. Nagahara, and M. Mori (2009) Dental Implant Surface Roughness and Topography: A

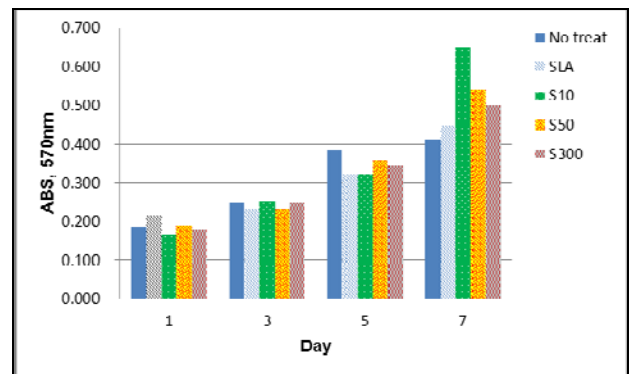


圖8. 雷射與噴砂酸蝕處理之細胞增殖趨勢

Review of the Literature, Dental Implant Surface Roughness and Topography, *J. Gifu Dent. Soc.*, **35**, 89-95.

2. Guéhenec, L. Le, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq (2007) Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dental Materials*, **23**, 844-854.
3. Huang, C. F., H.C. Cheng, C. M. Liu, C. C. Chen, and K. L. Ou (2009) Microstructure and phase transition of

biocompatible titanium oxide film on titanium by plasma discharging, *Journal of Alloys and Compounds*, **476**, 683 – 688.

4. Ou, K. L., H. H. Chou, C. M. Liu, and P. W. Peng (2011) Surface modification of austenitic stainless steel with plasma nitriding for biomedical applications, *Surface & Coatings Technology*, **206**, 1142–1145.
5. Fuhrich, T., P. Berger, and H. Hugel (2001) Marangoni Effect in Laser Deep Penetration Welding of Steel, *Journal of Laser Applications*, **13**, 178-186.
6. Gittens, R. A., T. McLachlan, R. Olivares-Navarrete, Y. Cai, S. Berner, R. Tannenbaum, Z. Schwartz, K. H. Sandhage, and B.D. Boyan (2011) The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation, *Biomaterials*, **32**, 3395-3403.
7. Cho, S. A. and S. K. Jung (2003) A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia, *Biomaterial*, **24**, 4859–4863.
8. Berardi, D., S. D. Benedittis, A. Scoccia, G. Perfetti, and P. Conti (2011) New laser-treated implant surfaces: a histologic and histomorphometric pilot study in rabbits, *Clin. Invest. Med.*, **34**, 202-210.
9. Fancsaly, A. J., T. Divinyi, A. Fazekas, C. Daroczi, A. Karacs, and G. Peto (2002) Pulsed laser-induced micro- and nanosized morphology and composition of titanium dental implants, *Smart Mater. Struct.*, **11**, 819–824.
10. Sammons, R. L., N. Lumbikanonda, M. Gross, and P. Cantzler (2005) Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration, *Clin Oral Implants Res.*, **16**, 57-66.
11. Mendonça, G., D. B. Mendonça, J. L. Francisco, F. J. Aragao, and L. F. Cooper (2008) Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography, *Biomaterials*, **29**, 3822–3835.