

# 生物活性化表面改質鈦金屬人工牙根之體外骨細胞親和性評估

林怡<sup>1</sup> 郭子瑄<sup>1</sup> 郭獻南<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 金屬工業研究發展中心 醫療器材研發組

## 摘要

人工牙根表面與骨組織形成良好的骨整合是植牙成功的關鍵因素之一，而除了型態設計與手術技巧的影響外，人工牙根骨整合的速率及質量與表面性質息息相關。透過不同的表面處理方式改變人工牙根的表面性質，可能有助於加速骨整合。影響植體—組織界面表面性質的因子包括表面組成份、表面型貌、粗糙度、親水性及滅菌方法等，有許多學者針對以上不同表面性質對骨整合的影響做過體外研究。然而，大多數文獻皆以處理過的平板試片模擬人工牙根表面作為試驗模型，因此對於人工牙根本身型態設計對後續表面處理及細胞本身行為的影響，並無法完整地模擬之。本研究的目的就是使用一種常見的類骨母細胞—人類骨腫瘤細胞株MG63作為細胞模型，觀察MG63細胞在金屬中心自行研發的商用四級純鈦製人工牙根上之體外細胞親和性。以機械加工表面人工牙根作為控制組，針對鹼蝕熱生物活性化表面處理人工牙根進行類骨母細胞在人工牙根表面上貼附及增生表現之比較，以評估其體外細胞親和性良窳。實驗結果顯示：細胞初期貼附數量在人工牙根各個幾何部位有所不同，粗螺紋區>切削刃區>根端區>細螺紋區。生物活性化表面處理人工牙根比機械加工表面人工牙根具有更良好的細胞貼附型態與更加的細胞增生活性，尤其在細螺紋區的細胞貼附數量及形貌，兩個組別有很大的

**關鍵字：**人工牙根、生物活性化表面改質、細胞親和性

**通訊作者：**林怡

**通訊處：**高雄市路竹區路科五路82151路  
科五路88號3F

**電話：**07-6955298轉230

**電子信箱：**allison@mail.mirdc.org.tw

差異。故由類骨母細胞早期貼附與增生情形看來，生物活性化表面處理製程的確在人工牙根上達到良好的表面改質效果。

---

## 前言

人工植牙是將有良好生物相容性之人工牙根植入齒槽骨內，待數個月後，人工牙根與齒槽骨緊密結合後在其上方裝置假牙，而取代失去的牙齒，植入後不論從外觀、咀嚼的感覺都與自然牙相同。

人工牙根與周圍骨組織形成良好的骨整合(osseointegration)是植牙成功的關鍵，骨整合速率與人工牙根本身材質與表面性質息息相關<sup>1</sup>。鈦金屬與骨組織間具有良好的生物相容性，故目前市售人工牙根產品之材質仍是以純鈦為主流。然而為了獲得更佳的骨整合效率，鈦金屬人工牙根的型態設計及表面處理製程仍不斷地推陳出新。

骨細胞在植體表面之附著、貼附和伸展是細胞與材料作用的第一期，對於細胞後期的增生、分化及礦化進而形成良好的骨整合界面是非常重要的，因此，驗證人工牙根的細胞親和性良窳是生物性檢測的首要之務。人工牙根的表面性質會影響細胞在其表面的行為及後續的骨整合能力，而影響基材表面性質的因子包括材料本身的性質、表面粗糙度、表面型態結

構、滅菌方法、氫氧基磷灰石的結晶度與化學成分組成、表面能與表面濕潤度等，皆有許多學者做過體外研究<sup>2</sup>。然而，關於不同人工牙根表面特性對於細胞行為的影響，大多數的文獻皆以2D平板試片模擬人工牙根表面來進行體外試驗<sup>3</sup>。Alves及Wassall等學者<sup>4</sup>曾將機械加工表面(machined surface)的市售人工牙根產品(Titamax Liso®, Neodent, Curitiba, PR, Brazil)浸泡在類骨母細胞Osteo-1之細胞懸浮液內24、48、72小時，觀察細胞在機械加工表面人工牙根上之貼附、型態及增生的情形。Lumbikanonda及Sammons等學者<sup>5</sup>則是將多種不同表面處理的市售人工牙根產品，包含機械加工表面(Astra Tech)、二氧化鈦噴砂(Astra Tech)、鈦漿噴塗(ITI/Straumann、IMZ/Friatec AG)、氫氧基磷灰石塗覆(IMZ/Friatec AG)等，浸泡於初生大鼠之骨母細胞懸浮液中20分鐘，再以電子掃描式顯微鏡(scanning electron microscope, SEM)觀察貼附於各款人工牙根上之細胞數量，並依不同的貼附週期分

類。Lumbikanonda及Sammons等學者<sup>5</sup>還以圓柱狀尼龍網布（網目大小：100  $\mu$ m）包裹鈦漿噴塗(ITI/Straumann、IMZ/Friatec AG)及氫氧基磷灰石塗覆(IMZ/Friatec AG)之人工牙根產品，將其置於顱骨碎片中培養最多至四週，比較在不同人工牙根表面上細胞之遷移、增生及分化等行為<sup>5</sup>。然而上述文獻於人工牙根本身型態設計對後續表面處理及細胞本身行為的影響，並無法完整地模擬之。

針對此，本研究以金屬工業研究發展中心自行研發的人工牙根(IM07)作為類骨母細胞之載體，對鹼蝕熱處理生物活性化改質後的人工牙根(IM07-AAH)與未施加表面處理、單純機械加工表面的人工牙根(IM07-M)進行類骨母細胞親和性試驗比較，觀察類骨母細胞在人工牙根表面貼附及增生之行為，以證實表面處理製程是否的確在人工牙根上達到良好的生物活性化表面改質效果。

## 研究方法

### （一）人工牙根生物活性化表面改質

將金屬工業研究發展中心自行設計開發並加工製造的四級商業純鈦(CP4 Ti)製人工牙根(IM07,  $\phi$ :3.3mm, L:10mm)先以丙酮超音波振盪清洗30分鐘，之後再以異丙醇超音波振盪清洗30分鐘，然後再用超純水超音波振盪清洗30分鐘，最後置入

40°C烘箱中乾燥。待人工牙根表面及內孔完全無水分殘留後才取出進行接下來的處理製程。

將已進行清洗處理並乾燥的人工牙根浸泡於熱強鹼溶液中作用4小時，接著再以溫弱酸溶液作用3小時，最後將鹼蝕酸洗處理後之人工牙根放入高溫爐進行熱處理。將製備好的樣品放入防潮箱存放備用，待欲進行細胞親和性試驗時才取出。

### （二）細胞培養

本體外研究所使用的細胞模型是一種文獻常用的類骨母細胞—人類骨腫瘤細胞株MG63 (Human osteosarcoma cell line)。所使用的細胞培養液為DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)-high glucose 培養基(Invitrogen 12800)，加入10% 胎牛血清(FBS)及1%盤尼西林／鏈黴素(Penicillin-Streptomycin)，培養環境條件為5%CO<sub>2</sub>，37°C恆溫二氧化碳培養箱。

有別於一般體外細胞測試用的鈦平板實驗模型，此步驟直接以人工牙根做為細胞實驗模型，直接考量到人工牙根型態設計對後續表面處理及細胞行為本身的影響。

將欲進行細胞親和性試驗的人工牙根依不同表面處理分別裝入不同的滅菌包裝袋中並確實封口，進行高溫高壓滅菌（121°C, 1.2 kg/cm<sup>2</sup>, 30分鐘）並烘乾處理，再放置於無菌操作台進行紫外光滅菌。

取底面未作表面處理的96孔細胞培養盤(NUNC 260887)做為細胞種植容器，在無菌操作台裡，將滅完菌的人工牙根小心放入96孔細胞培養盤中。將已培養至直徑10cm培養皿達七~八分滿的MG63細胞以trypsin-EDTA作用2分鐘，使細胞與培養皿底部脫離，收集成高濃度的細胞懸浮液。將收集到的MG63細胞懸浮液稀釋成 $4 \times 10^5$  cells/mL的細胞濃度，取250  $\mu$  L/well的細胞液加入每一個裝入人工牙根的well中。

以封口蠟膜(parafilm)將96孔細胞培養盤的蓋緣封好，接著放在旋轉機上旋轉20分鐘，轉速低於100 rpm。此步驟的目的為利用旋轉產生的微量離心力抵抗微重力對細胞的影響，讓細胞可以盡量均勻地貼附在人工牙根的所有幾何結構上，而非大部分均沉降附著於根端上。將培養盤上的封口蠟膜移除，以70%酒精擦拭整個培養盤後，再把培養盤放入5%CO<sub>2</sub>，37°C恆溫二氧化碳培養箱內，待24小時後便完成細胞種植。

### (三) 細胞貼附觀察

本研究以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察MG63細胞在人工牙根上培養一天及四天後的貼附情形。樣本製備的方式如下：將不同選定時間點的樣本以Karnovsky固定液及1%四氧化鈹(O<sub>5</sub>O<sub>4</sub>)溶液進行細胞固定處理，再以不同濃度梯度(30%~100%，由低濃度至高濃度)的酒精進行脫水處

理，最後將樣本保存於100%的絕對酒精中，待欲進行SEM觀察前再取出自然陰乾，接著鍍金乾燥處理，便可在SEM下觀察不同選定時間點的細胞貼附生長情形。

### (四) 細胞增生評估

本研究以活細胞代謝指示劑Alamar Blue(AbD Serotec)來測量細胞代謝活性，從而間接分析細胞增生的情況。由於Alamar Blue對細胞無毒，不影響細胞代謝、細胞因子分泌、抗體合成等，故可對同批細胞在同批基材上的增生狀態進行連續偵測和進一步的實驗觀察。

在每個選定的培養時間點(第1, 4, 7天)將含有10% Alamar Blue試劑的培養液加入裝有人工牙根樣本的96孔細胞培養盤中，每個樣本注入300  $\mu$  L的Alamar Blue培養液。將96孔細胞培養盤放入細胞培養箱培養4小時後，在無菌操作台裡將96孔細胞培養盤裡的溶液分兩次、每次100  $\mu$  L的量分注至新的96孔細胞培養盤裡。以盤式酵素免疫分析儀(ELISA reader)量測波長570nm及600nm的吸光值，再代入試劑說明中的公式求得細胞還原率。

將量測完畢的人工牙根樣本以磷酸鹽緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS)潤洗後，再置入新鮮培養液繼續放回細胞培養箱內培養，直至下一選定時間點再重複以上步驟量測細胞活性。

## 結果與討論

### (一) 細胞貼附觀察結果

將人類骨腫瘤細胞株MG63種植在生物活性化表面改質前後的人工牙根上，培養1天及4天後進行細胞固定處理，於電子掃描式顯微鏡下觀察人工牙根四個幾何結構區—細螺紋區(micro-screw region)、粗螺紋區(macro-screw region)、切削刃區(cutting-edge region)、根端區(apex region) (示意圖如圖1所示)，其細胞貼附觀察情形如圖2及圖3所示(第1天)：

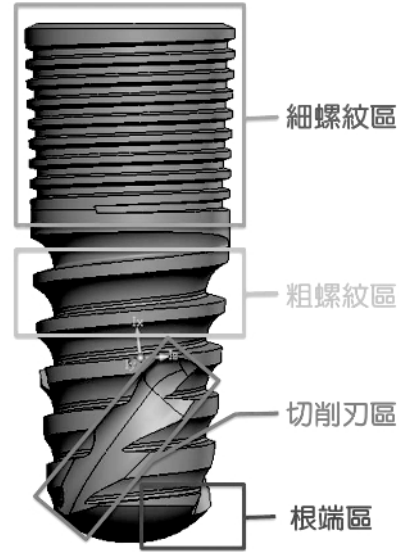


圖1：IM07人工牙根幾何結構示意圖

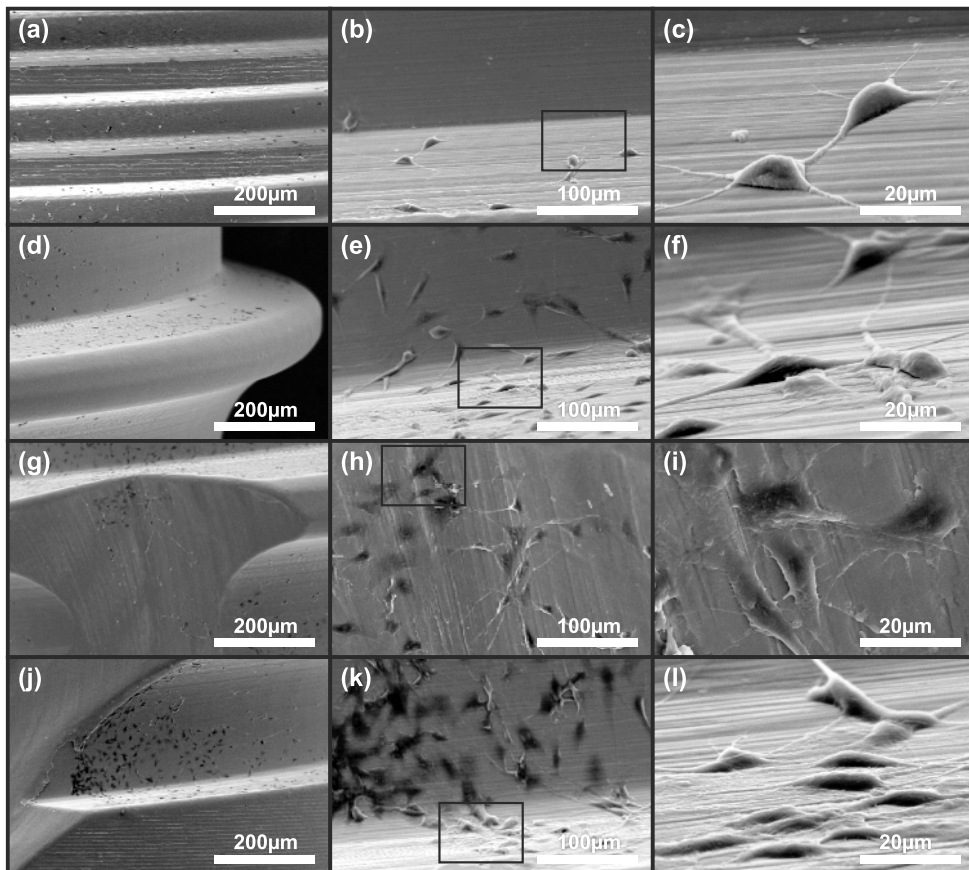


圖2：MG63細胞在單純機械加工表面人工牙根(IM07-M)上培養1天後的SEM觀察  
(a)~(c)：細螺紋區(40X、500X、2000X)；(d)~(f)：粗螺紋區(40X、500X、2000X)  
(g)~(i)：切削刃區(40X、500X、2000X)；(j)~(l)：根端區(40X、500X、2000X)

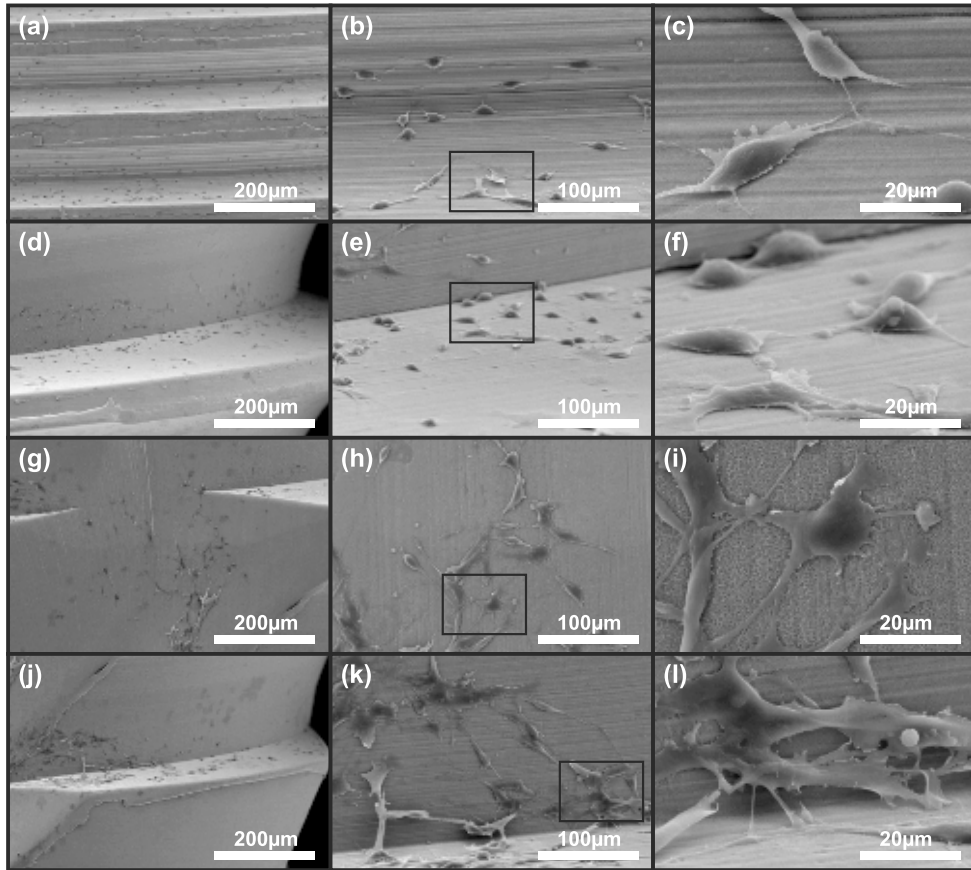


圖3：MG63細胞在生物活性化表面改質人工牙根(IM07-AAH)上培養1天後的SEM觀察  
 (a)~(c)：細螺紋區(40X、500X、2000X)；(d)~(f)：粗螺紋區(40X、500X、2000X)  
 (g)~(i)：切削刃區(40X、500X、2000X)；(j)~(l)：根端區(40X、500X、2000X)

由細胞在兩組人工牙根（IM07-M及IM07-AAH）上培養一天後的SEM圖（圖2及圖3）可看出，細胞貼附數量在人工牙根各個幾何結構位置有所不同，粗螺紋區>植體根端區>切削刃區>細螺紋區。對於這樣的結果，我們可以有以下合理的推斷：由於本研究的體外細胞培養方式是將人工牙根以仿植入人體下顎骨的相對位置直立式培養，受到重力的影響，細胞貼附數量會隨著愈靠近培養盤根端而愈多。針對此問題，我們在細胞種植的初期

以旋轉機施予少許離心力於細胞，以防止細胞受到重力的影響立即沉積在植體根端，雖然無法完全改善至讓細胞均勻地貼附在植體的每個幾何結構位置，但跟以往未施加離心力的先期試驗相比（先期試驗結果並未於本報告呈現），已獲得顯著改善的效果，在人工牙根最頂端的幾何結構位置－細螺紋區也有為數不少的細胞貼附，尤其是經過生物活性化表面改質後的人工牙根(IM07-AAH)上。比較圖2及圖3可發現：細胞培養一天後，在細螺紋區的細胞

貼附數量及貼附型態，兩個組別有很大的差異。在未施加表面處理、單純機械加工表面的人工牙根(IM07-M)上，雖然細胞於培養一天後便可觀察到貼附現象，此結果與Alves及Wassall等學者之研究吻合<sup>4</sup>。然而細胞在細螺紋區的貼附數量明顯較少，而且貼附的細胞也多呈現圓球狀，而在生物活性化表面改質的人工牙根(IM07-AAH)上，細螺紋區的細胞貼附數量不僅較多，而且細胞多為攤平狀，同時邊緣具有板足(lamellopodia)延伸的現象，顯示細胞貼附

狀態較好。在人工牙根其他幾何結構區上，機械加工表面人工牙根(IM07-M)上，除了少數呈現圓球狀外，多數(a)(b)皆為完全攤平狀，然而僅有少許的纖足(filopodia)長出，並沒有板足延伸的現象，細胞與基材之間呈現完全貼合，如圖2的(l)所示，此現象與Lumbikanonda及Sammons等學者之研究吻合<sup>5</sup>。而生物活性化表面改質的人工牙根(IM07-AAH)上，其他幾何結構區的細胞與細螺紋區一樣，不但多為攤平狀，且具有良好的板足延伸現象，值得注意

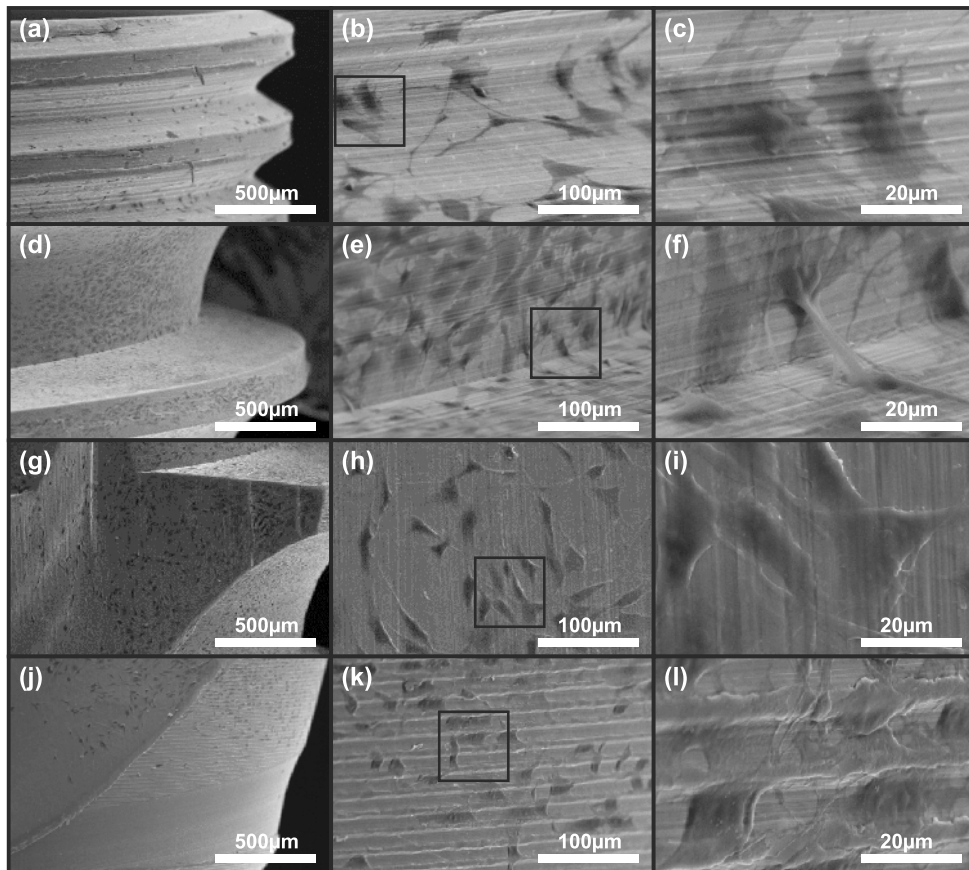


圖4：MG63細胞在單純機械加工表面人工牙根(IM07-M)上培養4天後的SEM觀察  
(a)~(c)：細螺紋區(40X、500X、2000X)；(d)~(f)：粗螺紋區(40X、500X、2000X)  
(g)~(i)：切削刃區(40X、500X、2000X)；(j)~(l)：根端區(40X、500X、2000X)

的是：在幾何不連續面處，細胞會以多方向延伸的觸角橫跨在兩個不連續的幾何面上，如圖3的(l)所示。根據Ravanetti等學者指出，此種細胞表型顯示具有較好的分化能力及骨基質合成，對於骨整合是較完全攤平狀的細胞更有利的<sup>3</sup>。

由圖4可觀察出，MG63細胞於單純機械加工表面的人工牙根(IM07-M)培養四天後，不管在哪個幾何結構區，細胞均呈現完全攤平狀，而且細胞數量明顯均較培養一天時的多，其中以粗螺紋區的細胞數量最多，已完全均勻分布在螺紋的波峰及波

谷處，此結果亦與Alves及Wassall等學者之研究吻合<sup>4</sup>。而由圖5亦可觀察出，細胞於生物活性化表面改質的人工牙根(IM07-AAH)上培養四天後，不管在哪個幾何結構區，細胞數量明顯比單純機械加工表面人工牙根(IM07-M)培養四天後的細胞數量多，尤其是切削刃區和根端區。除了細螺紋區外，生物活性化表面改質人工牙根(IM07-AAH)的其他幾何結構區皆均勻佈滿細胞，而且細胞本體攤平，同時邊緣均有良好的板足延伸現象，顯示細胞於其上之貼附生長情形非常良好。

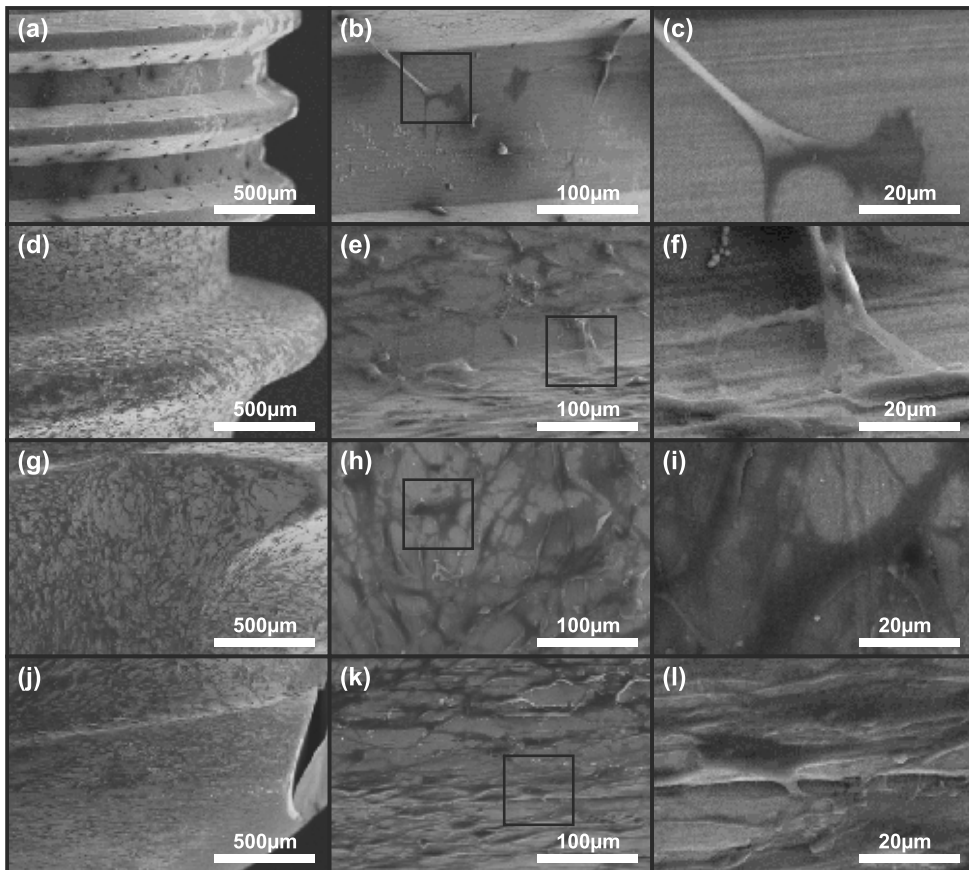


圖5：MG63細胞在生物活性化表面改質人工牙根(IM07-AAH)上培養4天後的SEM觀察  
 (a)~(c)：細螺紋區(40X、500X、2000X)；(d)~(f)：粗螺紋區(40X、500X、2000X)  
 (g)~(i)：切削刃區(40X、500X、2000X)；(j)~(l)：根端區(40X、500X、2000X)

## (二)細胞增生評估結果

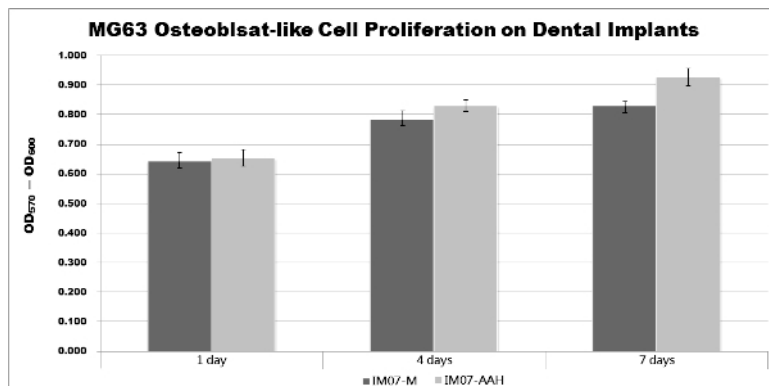


圖6：Alamar Blue Assay

由圖6可以看出，MG63細胞在生物活性化表面改質的人工牙根(IM07-AAH)上增生情況良好，在培養至第1, 4, 7天的細胞還原率均略高於未施加表面處理、單純機械加工表面的人工牙根(IM07-M)，尤其是培養至第7天時。而且兩者皆有一個趨勢：隨著培養天數增加，細胞還原率皆是呈現正成長，顯示兩組樣品對於細胞均無毒性或其他不良的影響。

### 結語與建議

本研究有兩個重點：一是證明在骨科領域行之有年且商品化的生物活性化表面改質技術，應用在人工牙根領域是否也同樣具有優異的細胞親和性表現；二是證明此種直接以醫材產品做為細胞貼附基材的體外細胞測試方法，是否也能跟以平板材料做為細胞貼附基材的測試結果相符，達到驗證醫材產品的表面處理是否具有良好細胞親和性或抗細胞沾黏性效果。根據實驗結果分析，不管是在細胞貼附生長形

態或細胞增生表現，生物活性化表面改質人工牙根組皆比單純機械加工表面人工牙根組來得優秀，證實此種生物活性化表面改質應用在人工牙根領域，的確也能提升產品的細胞親和性。此結果與pre-study的平板細胞測試結果相吻合（此報告未呈現平板細胞測試結果），證實此種直接以醫材產品做為細胞貼附基材的體外細胞測試方法，的確具有驗證產品表面處理細胞親和性良窳的能力。

對於醫療器材產品的開發及生物功能性確效來說，建立一種簡易、有效且可信度高的體外細胞測試方法，以降低動物實驗及臨床前測試的人力資源與成本，是產業界迫切需要解決的課題。本研究目前是針對人工牙根產品進行測試實驗，得到令人滿意的效果，若能進一步地以此測試方法進行其他醫療產品的研究，例如驗證骨釘的表面處理是否具良好的抗細胞沾黏性效果等，相信對產業界在產品的測試開發上，會是極具助益的。

## 參考資料

1. Le Guehennec, L., et al., *Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*. Dental materials : official publication of the academy of dental materials, 2007. 23(7): p. 844-54.
2. Chiesa, R., et al., *In vitro and in vivo performance of a novel surface treatment to enhance osseointegration of endosseous implants*. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics, 2007. 103(6): p. 745-56.
3. Ravanetti, F., et al., *In vitro cellular response and in vivo primary osteointegration of electrochemically modified titanium*. Acta biomaterialia, 2010. 6(3): p. 1014-24.
4. Alves, S.F. and T. Wassall, *In vitro evaluation of osteoblastic cell adhesion on machined osseointegrated implants*. Brazilian oral research, 2009. 23(2): p. 131-6.
5. Lumbikanonda, N. and R. Sammons, *Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics*. The International journal of oral & maxillofacial implants, 2001. 16(5): p. 627-36.

# In Vitro Cytocompatibility Evaluation of Osteoblast-like Cells on Bioactive-treated Titanium Dental Implants

Yi Lin, Tzu Huang Kuo, Hsien-Nan Kuo

Metal Industries Research & Development Centre, Medical Device Development Division

## Abstract

One of the key factors for the success of dental implants is the achievement of close contact between the bone and the implant surface. This is what is known as osseointegration. Besides implant design and surgical technique, the rate and quality of osseointegration in dental implants are related to their surface properties. Osseointegration may be accelerated by modifying the surface properties with different surface treatments. Surface composition, roughness, hydrophilicity and sterilization methods are parameters that influence surface properties of implant-tissue interaction. There were many in-vitro studies reviewed about the influence of different implant surface properties on osseointegration. However, most of them used treated-plate models to simulate implant surfaces. Treated-plate models cannot simulate the influence of implant design upon followed surface treatment and cellular behavior. The aim of the present study was to investigate the cytocompatibility in vitro directly upon CP4 Titanium dental implants made by MIRDC using MG63 human osteosarcoma cells as a cellular model. The in vitro cytocompatibility characterized by cell morphology, adhesion, and proliferation activity were assessed by comparing the bioactive alkali-acid and heat (AAH) treatment to machined surface as control. The in vitro study showed the numbers of early attached cells on different geometric regions of implants were different: macro-screw region > cutting edge region > apex region > micro-screw region. Enhanced osteoblast adhesion and higher proliferation activity for the bioactively modified implants compared to the machined-surface implants, especially on the micro-screw region. In conclusion, the AAH surface treatment on dental implants indeed enhanced the biological response in vitro, promoting an early osteoblast-like cell adhesion and proliferation.

Keywords: Dental implants, Bioactive surface treatment, Cytocompatibility

Correspondence: Yi Lin

Address: 3F, No.88, Luke 5th Rd., Luzhu Dist., Kaohsiung City, Taiwan 82151, R.O.C.  
(Kaohsiung Science Park)

Tel: +886-7-6955298#230

Email: allison@mail.mirdc.org.tw