

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

電漿浸沒離子注入技術應用於人工植牙之性能提昇研究
**Improving the property of dental implant using plasma immersion
ion implantation technique**

計畫編號：992001INER029

受委託機關(構)：國立陽明大學

計畫主持人：黃何雄 教授

核研所聯絡人員：蔡文發

聯絡電話：02-28267068

E-mail address：hhhuang@ym.edu.tw

報告日期：2010/12/15

目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、計劃源起與目的.....	3
貳、研究方法與過程.....	6
一、材料製備.....	6
二、表面形貌分析.....	6
三、表面化學成分分析.....	6
四、表面機械性質分析.....	7
五、表面親疏水性分析.....	7
六、耐蝕性質分析.....	8
七、凝血性質分析.....	9
(一) 全血凝固分析.....	9
(二) 血小板貼附分析.....	9
八、細胞相容性質分析.....	10
(一) 細胞培養.....	10
(二) 細胞貼附分析.....	10
(三) 細胞增生分析.....	11
(四) 初期細胞分化分析.....	12

參、主要發現與結論.....	13
一、表面形貌分析.....	13
二、表面化學成分分析.....	13
三、表面機械性質分析.....	15
四、表面親疏水性分析.....	16
五、耐蝕性質分析.....	16
六、凝血性質分析.....	17
七、細胞相容性質分析.....	18
八、結論.....	19
肆、參考文獻.....	21
伍、表及圖.....	25

中文摘要

本研究是使用氧離子電漿浸沒離子注入處理技術，藉由不同的氧離子劑量(1×10^{16} 、 4×10^{16} 及 1×10^{17} ions/cm²)來提升純鈦金屬表面耐蝕性質、凝血性質及細胞相容性質。分別使用原子力顯微鏡、X 光光電子能譜儀、奈米壓痕試驗機及接觸角量測儀，來分析純鈦金屬表面形貌、化學成分、機械性質及親水性質。耐蝕性質分析是於模擬血漿環境下進行動電位極化曲線量測。凝血性質分析包括全血凝固速率及血小板貼附能力。細胞相容性質分析是使用人類骨髓間葉幹細胞來評估細胞貼附、增生及初期分化之能力。研究結果顯示，氧離子電漿浸沒離子注入技術並不會對純鈦金屬表面形貌造成明顯的改變，但能夠增加純鈦金屬表面氧化層厚度、提高表面硬度、楊氏係數及親水性質。耐蝕性質分析結果顯示，氧離子電漿浸沒離子注入處理能夠降低腐蝕速率及鈍化電流。凝血性質分析結果顯示，氧離子電漿浸沒離子注入處理能夠促進血小板的接觸活化。細胞相容性質分析結果顯示，氧離子電漿浸沒離子注入處理能夠促進人類骨髓間葉幹細胞的貼附、增生及初期分化能力。本研究結果證實，氧離子電漿浸沒離子注入處理技術可增加純鈦金屬表面氧化層的厚度(主要是二氧化鈦)，進而提高純鈦金屬表面耐蝕性質、凝血性質及細胞相容性質。

Abstract

In this study, oxygen plasma immersion ion implantation (O-PIII) treatment, with different oxygen doses (1×10^{16} , 4×10^{16} and 1×10^{17} ions/cm²), was utilized to improve the corrosion resistance, blood coagulation and cytocompatibility of Ti surface. Atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, nanoindenter and contact angle goniometer were used to analyze surface topography, chemical compositions, mechanical property and hydrophilic property of Ti specimens, respectively. Corrosion resistance of Ti specimens was evaluated by potentiodynamic polarization curve measurement in simulated blood plasma solution. Blood coagulation property of Ti surfaces was evaluated using whole blood clotting time and platelet adhesion observation. Adhesion, proliferation and initial differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) on Ti surfaces were studied. The results showed that the O-PIII treatment had no significant influence on the surface topography of Ti specimens. The thickness of oxide layer on the O-PIII treated Ti specimens increased with an increase in oxygen dose implanted. The O-PIII treated Ti specimens possessed higher surface hardness, Young's modulus and hydrophilic property than the untreated Ti specimen. Potentiodynamic polarization tests revealed that the O-PIII treated Ti surfaces had lower corrosion rate and passive current than the untreated Ti surface. The O-PIII treated Ti surfaces showed a better platelet activation than the untreated Ti surface. The adhesion, proliferation and initial differentiation of hMSCs on Ti surfaces were improved by O-PIII treatment. O-PIII treatment could enhance the corrosion resistance, blood coagulation and cytocompatibility of Ti surface due to the increase in surface thickness of Ti-oxides (mainly as TiO₂) on Ti.

壹、計畫緣起與目的

純鈦 (titanium, Ti) 金屬因為具有良好的機械性質及生物相容性質，所以是現今生醫材料最廣泛應用的金屬材料之一。由於純鈦金屬會在表面自然形成一層薄薄的二氧化鈦 (titanium dioxide, TiO_2)，所以具有極佳的生物相容性質 [1-5]。二氧化鈦本身與生物組織的相容性極佳，且不易與周圍的生理環境起反應 [6, 7]。然而，當純鈦金屬置於體內且具有荷重的情況下，此二氧化鈦層可能會因為純鈦金屬與骨組織產生細微的移動而產生崩解的情況，此現象會導致金屬顆粒或離子的釋出並進入生物組織內 [8, 9]。此外，由於人體的血漿中含有鹽類或離子的存在，所以亦可能會導致二氧化鈦層的崩解 [10]。因此，必須改善純鈦金屬的表面特性，以延長純鈦金屬在臨床上應用的壽命。

電漿浸沒離子注入 (plasma immersion ion implantation, PIII) 是一種新穎的表面改質技術，其可以改善材料的表面特性且不會對材料的原始形貌造成破壞 [11]。PIII 的植入層即使是在不規則的材料表面亦具有極佳的附著力 [12, 13]。金屬材料的耐蝕性質是決定其壽命長短的重要因素，因為腐蝕會導致金屬材料表面的崩解，並導致金屬材料內部元素的釋出 [14]。

在過去，已有研究學者將純鈦金屬經過氧離子電漿浸沒離子注入 (oxygen plasma immersion ion implantation, O-PIII) 處理後，

在不同的環境下例如 Hank's 溶液、Ringer's 溶液及模擬體液 (simulated body fluid, SBF) 等去進行耐蝕性質評估 [10, 15-17]。儘管如此，當金屬材料植入人體內部後，第一個接觸到的其實是血漿，因為血漿會立刻填滿材料與骨組織之間的空隙 [18]。而且血漿會與金屬材料產生較劇烈的反應，因為血漿中含有大量的氯離子 (chloride ion, Cl^-)，氯離子的存在會促進腐蝕反應的進行 [19]。再者，比較傳統模擬體液與人體血漿之離子濃度差異，結果發現傳統模擬體液含有較高的氯離子及較低的碳酸氫離子 (bicarbonate ion, HCO_3^-)，而模擬血漿 (simulated blood plasma, SBP) 則具有與人體血漿相同的離子濃度 [20]。然而，有關純鈦金屬經過 O-PIII 處理後，在血漿的環境中分析探討其腐蝕行為之文獻至今亦是相當缺乏。更進一步，有學者藉由動物實驗研究證實 O-PIII 處理能夠改善純鈦金屬的骨整合性 (osseointegration) [8, 9, 21]。儘管如此，有關純鈦金屬經過 O-PIII 處理後，影響細胞反應機制之文獻至今亦是相當缺乏。

因此，本研究將使用 O-PIII 處理並配合不同的離子劑量來改善純鈦金屬表面的耐蝕性質、凝血性質及生物相容性質。耐蝕性質分析是於模擬血漿環境下進行動電位極化曲線 (potentiodynamic polarization curve) 量測。凝血性質分析包括全血凝固速率及血小板貼附能力。細胞相容性質分析是使用人類骨

髓間葉幹細胞 (human mesenchymal stem cells, hMSCs) 來評估
細胞貼附、增生及初期分化之能力。

貳、研究方法與過程

一、材料製備

本研究選用商業用二級純鈦金屬試片（直徑 16 mm、厚度 1 mm）做為研究基材。純鈦金屬試片表面會先使用碳化矽（SiC）砂紙研磨至#1200 後，再分別使用去離子水及酒精清洗純鈦金屬試片表面。O-PIII 處理是在一個高真空度（ 8.5×10^{-6} torr）的腔體內進行，並使用無線射頻（radio frequency）做為電漿源。本研究選用 3 組不同的氧離子劑量（低劑量： 1×10^{16} ions/cm²；中劑量： 4×10^{16} ions/cm²；高劑量： 1×10^{17} ions/cm²）進行 O-PIII 處理，分別命名為 T_L、T_M 及 T_H。未經過 O-PIII 處理的純鈦金屬試片（對照組：control group）則命名為 T_C。

二、表面形貌分析

使用原子力顯微鏡（atomic force microscope, AFM）（Veeco Metrology Inc., Santa Barbara, CA, USA）分析 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面三維形貌及粗糙度之變化。每個純鈦金屬試片表面的掃描區域為 $50 \times 50 \mu\text{m}$ 。

三、表面化學成分分析

使用 X 光光電子能譜儀（X-ray photoelectron spectrometer，

XPS)(Thermo VG Scientific Inc., East Grinstead, West Sussex, UK)
分析 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面化學成分之變化。以單色的 Al K α 做為 X 光光源，每個純鈦金屬試片表面的分析區域為直徑 400 μm 。純鈦金屬試片表面深度分析之估算是參照儀器的操作手冊，蝕刻時間 (sputtering time) 1 秒約減少氧化層厚度 1 \AA 。

四、表面機械性質分析

使用奈米壓痕試驗機 (nanoindenter) (MTS Nano Instruments Inc., Oak Ridge, TN, USA) 分析 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面硬度及楊氏係數(彈性模數)之變化。使用三角錐狀的 Berkovich 鑽石做為試驗機的壓痕尖端，並以連續剛性量測 (continuous stiffness measurement) 的技術進行分析，最大的分析深度為 100 nm。

五、表面親疏水性分析

使用接觸角量測儀 (contact angle goniometer) (Model 100SB, Sindatek, Taiwan) 分析 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片親疏水性之變化。量測的過程是將試片置於平台上，並將水溶液滴在試片表面，然後擷取水溶液與試片表面接觸瞬間之影像，再藉由分析軟體進一步取得水溶液與試片表面之接觸角，接觸角的大

小可以用來評估純鈦金屬試片親疏水性之變化，接觸角越小代表材料表面的親水性越佳。

六、耐蝕性質分析

使用恆電位儀 (potentiostat) (Jiehan Technology Co., Beitun District, Taichung, Taiwan) 來進行動電位極化曲線 (potentiodynamic polarization curve) 量測，以評估 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面耐蝕性質之變化。測試的過程中，是以模擬血漿 (simulated blood plasma, SBP) 做為電解液，其成分包含 NaCl (5.403 g/L)、Na₂CO₃ (2.046 g/L)、Na₂SO₄ (0.072 g/L)、NaHCO₃ (0.740 g/L)、KCl (0.225 g/L)、CaCl₂ (0.293 g/L)、MgCl₂·6H₂O (0.311 g/L)、K₂HPO₄·3H₂O (0.230 g/L) 及 C₈H₁₈N₂O₄S (11.928 g/L)，並藉由 NaOH 調整 pH 值至 7.4。以純鈦金屬試片、白金片 (platinum sheet) 及飽和甘汞電極 (saturated calomel electrode) 分別做為工作電極 (working electrode)、相對電極 (counter electrode) 及參考電極 (reference electrode)。動電位極化曲線量測是從 -0.8 V (SCE) 往陽極方向進行掃描，而掃描速率為 1 mV/s。當電流密度超過 1 mA/cm² 或電壓達到 2 V 即停止量測。動電位極化曲線量測前，電解液會先使用氮氣進行除氧 1 個小時。藉由動電位極化曲線可得到各項腐蝕參數，包含腐蝕速率 (corrosion rate, I_{corr})

及鈍化電流 (passive current, I_{pass})，藉此可以用來評估純鈦金屬試片表面耐蝕性質之變化。

七、凝血性質分析

(一) 全血凝固分析

將試片置於 12 孔細胞培養盤中，於試片表面加入 100 μl 血液作用 3 及 6 分鐘。作用完後各加入 1 mL 的去離子水作用 10 分鐘後將試片取出，接著再由細胞培養盤中分別取出 0.5 mL 的溶液，並加入 Drabkin's 溶劑作用 5 分鐘進行呈色，最後使用酵素免疫分析儀 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA reader) (PowerWave X340, Bio-Tek, USA) 在 540 nm 的波長下測量其吸光值 (optical density, OD)，以測定溶液中血紅素之含量，吸光值越高代表溶血量越多，而溶血量與凝血量成反比。

(二) 血小板貼附分析

抽取成人之全血於 3.2 % 檸檬酸鈉 (sodium citrate, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) 抗凝血劑中混合均勻，以 1500 rpm 轉速離心 5 分鐘取得上清液為富含血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP)。接著，將富含血小板血漿置於試片表面，於 5.0 % CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 環境下培養 5 分鐘後，利用磷酸緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS)

清洗以移除試片表面未貼附的血小板。接著將試片表面的血小板進行固定、脫水處理，最後使用場發射掃描式電子顯微鏡（field emission scanning electron microscope, FE-SEM）（JEOL Ltd., Musashino, Tokyo, Japan）觀察血小板於試片表面之貼附形態。

八、細胞相容性質分析

（一）細胞培養

本研究選用人類骨髓間葉幹細胞（human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs）來評估 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面細胞貼附、增生及初期分化之能力。首先將細胞置於培養液（Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM）中，並加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 去活化胎牛血清（dialyzed fetal bovine serum, dFBS）、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青黴素（penicillin）、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鏈黴素（streptomycin）及 370 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碳酸氫鈉（sodium bicarbonate, NaHCO_3 ）。接著再將細胞培養於含有 5 % 二氧化碳（carbon dioxide, CO_2 ）且溫度控制於 37 $^\circ\text{C}$ 之培養箱中。

（二）細胞貼附分析

純鈦金屬試片在與細胞共培養之前，會先使用紫外光（ultraviolet, UV）滅菌 30 分鐘。接著，將 1×10^4 個細胞均勻種

上純鈦金屬試片表面，再放入培養箱分別培養 24 個小時。之後，將已貼附細胞的純鈦金屬試片進行固定、脫水 (dehydration) 及臨界點乾燥 (critical point drying, CPD)。最後，使用場發射掃描式電子顯微鏡觀察純鈦金屬試片表面細胞的貼附形態。

(三) 細胞增生分析

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 為水溶性的黃色染劑，若與活細胞粒線體中的酵素交互作用後，會轉變為深紫色且不溶於水的 MTT-formazan 結晶，而此水溶液的反應速率會與細胞增生的數目成正比，藉此來進行細胞初期增生能力之評估。

實驗過程先在純鈦金屬試片表面均勻種上 0.5×10^4 個細胞，放入培養箱分別培養 1 及 3 天後，將種有細胞的純鈦金屬試片取出，先加入 MTT 染劑進行反應，等待反應完畢再加入異丙醇 (isopropanol)，以溶解 MTT 與細胞反應之結晶，最後使用酵素免疫分析儀 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA reader) (PowerWave X340, Bio-Tek, USA) 在 570 nm 的波長下測量其吸光值 (optical density, OD)。吸光值越高代表細胞增生的數量越多。

(四) 初期細胞分化分析

茜素紅 S (Alizarin red S, $C_{14}H_7NaO_7S$) 為橘紅色的染劑，細胞外基質於礦化初期會有鈣離子的沉積，而茜素紅 S 可與細胞中的鈣離子反應呈色，而鈣離子的沉積會與細胞分化的數目成正比，藉此來進行細胞初期分化能力之評估。

實驗過程先在純鈦金屬試片表面均勻種上 0.5×10^4 個細胞，放入培養箱分別培養 7 及 14 天後，將種有細胞的純鈦金屬試片取出，先加入酒精進行脫水，接著再加入茜素紅 S 染劑進行反應，等待反應完畢後再加入氯化十六烷基吡啶 (hexadecylpyridinium chloride monohydrate)，以溶解茜素紅 S 與細胞反應之呈色，最後使用酵素免疫分析儀在 550 nm 的波長下測量其吸光值。吸光值越高代表細胞分化的數量越多。

參、主要發現與結論

一、表面形貌分析

圖 1 為 AFM 分析 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面之三維形貌 (three-dimensional topography)。結果顯示，未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片，其表面形貌主要是由平行的溝槽紋路所組成，此表面形貌是純鈦金屬試片於材料製備的過程中，經由碳化矽砂紙研磨所產生的紋路。經過 O-PIII 處理後，可在 T_L 、 T_M 及 T_H 試片表面看到相似的表面形貌，且沒有任何明顯的缺陷產生。另外，藉由表面三維形貌所求得之中心線平均粗糙度 (average roughness, R_a)，4 組不同試片其 R_a 值皆約為 $0.18 \mu\text{m}$ 。AFM 分析結果證實，O-PIII 處理並不會改變純鈦金屬試片原始的表面形貌。

二、表面化學成分分析

圖 2 為 XPS 分析 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面化學成分之縱深分佈 (depth profiling) 曲線圖。分析 Ti 及 O 元素原子百分比與表層深度之變化，藉此來推算表面氧化層的厚度。結果顯示， T_C 、 T_L 、 T_M 及 T_H 試片其表面氧化層的厚度依序約為 30 nm、120 nm、170 nm 及 210 nm。圖 3 為 XPS 分析 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面之 Ti_{2p} 曲線擬合 (curve fitting) 光譜圖。 Ti_{2p} 光譜圖主要是由 4 個化學組態所組成，包含 Ti^0 (Ti)、 Ti^{+2} (TiO)、

$Ti^{+3}(Ti_2O_3)$ 及 $Ti^{+4}(TiO_2)$ 。Ti、TiO、 Ti_2O_3 及 TiO_2 之束縛能(binding energy) 是參考相關的文獻得知 [22]。結果顯示，未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片，其表面主要成分為 Ti (純 Ti)，並含有少量的 TiO_2 、 Ti_2O_3 及 TiO。經過 O-PIII 處理的 T_L 、 T_M 及 T_H 試片，其表面主要成分依次為 TiO_2 、 Ti_2O_3 及 TiO。另外，藉由 Ti_{2p} 曲線擬合光譜圖所求得各個氧化物之原子百分比，列於表 1。結果顯示，未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片，其表面 TiO_2 氧化物的含量約為 33 %。經過 O-PIII 處理的 T_L 、 T_M 及 T_H 試片，其表面 TiO_2 氧化物的含量依序約為 40 %、44 %及 49 %。

XPS 縱深分佈曲線圖中，O 元素分佈的深度會隨著 O 離子注入劑量的提高而有明顯增加的趨勢，這是因為在 PIII 處理的過程中會有溫度的產生，溫度上升會使 O 離子產生熱擴散 (thermal diffusion) 的效應，而往材料的內層移動 [23, 24]。而 O 離子注入的劑量愈高所需 O-PIII 處理的時間也愈長，所以 O 離子擴散的時間也愈久，深度也愈深。相對地，Ti 元素分佈的深度則會隨著 O 離子注入劑量的提高而有明顯減少的趨勢，這是因為 O 離子往材料內層進行擴散後，會導致原本位在材料內層的 Ti 原子，往材料更深層進行擴散 [25]。XPS 分析結果證實，純鈦金屬試片表面氧化層的厚度會隨著 O 離子注入劑量的提高而有明顯增厚的趨勢，此氧化層主要的成分為 TiO_2 。

三、表面機械性質分析

圖 4 及圖 5 為奈米壓痕試驗機量測 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面硬度及楊氏係數之曲線圖。首先，比較 3 組不同試片表面硬度之差異，結果顯示，未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片，其表面最大的硬度約為 5 GPa，深度約在 10 nm。經過 O-PIII 處理後， T_L 、 T_M 及 T_H 試片表面最大的硬度依序約為 8 GPa、12 GPa 及 10 GPa，深度依序約在 10 nm、10 nm 及 20 nm。接著，比較 3 組不同試片表面楊氏係數之差異，結果可看到與表面硬度相似的趨勢。經過 O-PIII 處理後， T_L 、 T_M 及 T_H 試片表面最大的楊氏係數依序約為 189 GPa、219 GPa 及 207 GPa，深度都約在 10 nm。未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片，其表面最大的楊氏係數約為 184 GPa，深度約在 10 nm。

奈米壓痕試驗曲線圖中，硬度及楊氏係數會隨著 O 離子注入劑量的提高而有明顯提升的趨勢，這是因為在 PIII 處理的過程中，會導致材料表面的晶格變形 (lattice deformation) 及固溶硬化 (solution hardening) [23]。另外，在 PIII 處理的過程中，高能量的離子撞擊到材料表面的原子，亦會使原子產生位移的現象 [26]。藉由上述這些理論可以說明為何 O-PIII 處理可提升純鈦金屬試片表面的硬度及楊氏係數。

四、表面親疏水性分析

圖 6 為接觸角量測儀量測 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面之水接觸角圖。結果顯示，經過 O-PIII 處理的 T_L 、 T_M 及 T_H 試片與未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片相比，其水滴附著情況較佳。另外，藉由水滴附著形態所求得之接觸角，列於表 2。結果顯示，未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片，其表面水接觸角約為 40° 。經過 O-PIII 處理的 T_L 、 T_M 及 T_H 試片，其表面水接觸角依序約為 33° 、 33° 及 13° 。

五、耐蝕性質分析

圖 7 為恆電位儀量測 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片於模擬血漿中之動電位極化曲線圖。藉由動電位極化曲線所求得之各項腐蝕參數，包含腐蝕速率 (I_{corr}) 及鈍化電流 (I_{pass})，列於表 3。首先，比較 4 組不同試片腐蝕速率之差異，結果顯示， T_C 、 T_L 、 T_M 及 T_H 試片其腐蝕速率依序約為 $0.064 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、 $0.016 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、 $0.035 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 及 $0.056 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 。接著，比較 4 組不同試片鈍化電流之差異，結果顯示， T_C 、 T_L 、 T_M 及 T_H 試片其鈍化電流依序約為 $4.696 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、 $0.083 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、 $0.080 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 及 $0.087 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 。

動電位極化曲線圖中，腐蝕速率及鈍化電流值愈低表示測試的材料具有較佳的耐蝕性質。統計分析結果顯示，O-PIII 處理的

T_L 、 T_M 及 T_H 試片與未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片相比，其具有較低的腐蝕速率及鈍化電流。耐蝕性質分析結果證實，O-PIII 處理可提升純鈦金屬試片於模擬血漿中之耐蝕性質，這是因為純鈦金屬試片經過 O-PIII 處理後，會增加試片表面氧化層的厚度（如圖 2 所示）。另外，Tan 等人 [10] 指出在 PIII 處理的過程中，氧化物會擴散到鈦合金的表面，而產生很強的再鈍化能力（repassivation ability）。另一方面，Poon 等人 [15] 提出 PIII 處理可提升鈦合金的耐蝕性質，這是由於 PIII 處理的過程中，O 離子會與材料表面的 Ti 原子形成很強的鍵結。藉由上述這些理論可以說明為何 O-PIII 處理可提升純鈦金屬試片表面的耐蝕性質。

六、凝血性質分析

圖 8 為利用 FE-SEM 觀察 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面血小板之貼附形態。結果顯示，經過 O-PIII 處理後的試片表面其血小板有較佳的貼附型態，血小板的偽足會順著試片表面的結構伸展且血小板本身也會順著試片表面的結構攤平延展。

圖 9 為利用全血凝固分析評估 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面對於初期血液凝固之影響。結果顯示，經過 O-PIII 處理的 T_M 試片，其表面血液有最多的溶血量，即凝血性最差；而經過 O-PIII 處理的 T_H 試片，其表面血液的溶血量最低，即凝血性最好。

七、細胞相容性質分析

圖 10 為 FE-SEM 觀察 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面細胞之貼附形態。經過 24 個小時的培養後，細胞皆已完全貼附於 3 組不同試片的表面。首先，觀察圖 10 (a)-(d)，結果顯示，經過 O-PIII 處理的 T_L 、 T_M 及 T_H 試片，其表面的細胞密度高於未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片。接著，觀察圖 10 (e)-(h)，結果顯示，經過 O-PIII 處理的 T_L 、 T_M 及 T_H 試片與未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片相比，其表面的細胞具有較佳的貼附性及延展性。

圖 11 為 MTT 染劑分析 hMSCs 於 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面培養 1 及 3 天後之增生情形。首先，比較培養 1 天後之增生情形，結果顯示，經過 O-PIII 處理的 T_L 、 T_M 及 T_H 試片，其表面 hMSCs 的增生量多於未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片。接著，比較培養 3 天後之增生情形，結果顯示，經過 O-PIII 處理的 T_L 、 T_M 及 T_H 試片，其表面 hMSCs 的增生量亦多於未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片。

圖 12 為茜素紅 S 染劑分析 hMSCs 於 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面培養 7 及 14 天後之初期分化情形。首先，比較培養 7 天後之初期分化情形，結果顯示，經過 O-PIII 處理的 T_L 及 T_M 試片，其表面 hMSCs 的分化量多於未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片。接著，比較培養 14 天後之初期分化情形，結果顯示，經過 O-PIII

處理的 T_L 及 T_M 試片，其表面 hMSCs 的分化量亦多於未經過 O-PIII 處理的 T_C 試片。

在過去，McCafferty 等人 [27] 提出當金屬表面氧化物的等電點 (isoelectric point) 低於水溶液的 pH 值時，金屬氧化物會與吸附在表面的水分子 (H_2O) 產生反應，並帶走一個氫離子 (H)，此時吸附在金屬表面的離子大部份就僅剩下氫氧根 (OH^-)，因此會導致金屬表面的氧化物帶有負電 (negative charge)。另外，Kurrat 等人 [28] 證實 TiO_2 層的等電點約為 4.5，低於一般中性環境的 pH 值 (約為 7.0)，所以 TiO_2 層會帶有負電。更進一步，Ohgaki 等人 [29] 證實帶有負電的表面能夠促進鈣離子 (Ca^{2+}) 的吸附，而鈣離子吸附之後，能夠吸引到細胞貼附蛋白例如整合蛋白 (integrin)、纖維蛋白 (fibronectin) 及玻連蛋白 (vitronectin) 等，因此能夠促進細胞的附著及貼附。綜合上述這些理論，可以說明為何 O-PIII 處理可促進純鈦金屬試片表面細胞的貼附性及延展性。

八、結論

本研究使用 O-PIII 處理可在純鈦金屬表面形成混合的成分 (主要是 TiO_2)。與未經過 O-PIII 處理的純鈦金屬相比，O-PIII 處理的純鈦金屬具有較高的表面硬度及楊氏係數、較低的腐蝕速

率及鈍化電流、較佳的凝血性質、較佳的細胞貼附、增生及初期分化。本研究結果證實，O-PIII 處理可提升純鈦金屬表面耐蝕性質、凝血性質及細胞相容性質。

肆、參考文獻

1. Larsson C, Lardelli M, White I, Lendahl U. The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. *Genomics* 1994;24(2):253-258.
2. Pan J, Liao H, Leygraf C, Thierry D, Li J. Variation of oxide films on titanium induced by osteoblast-like cell culture and the influence of an H₂O₂ pretreatment. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998;40(2):244-256.
3. Chiang C-Y, Chiou S-H, Yang W-E, Hsu M-L, Yung M-C, Tsai M-L, et al. Formation of TiO₂ nano-network on titanium surface increases the human cell growth. *Dental Materials* 2009;25(8):1022-1029.
4. Yang W-E, Hsu M-L, Lin M-C, Chen Z-H, Chen L-K, Huang H-H. Nano/submicron-scale TiO₂ network on titanium surface for dental implant application. *Journal of Alloys and Compounds* 2009;479(1-2):642-647.
5. Yang W-E, Huang H-H. Improving the biocompatibility of titanium surface through formation of a TiO₂ nano-mesh layer. *Thin Solid Films* 2010;518(24):7545-7550.
6. Tan L, Crone WC. Surface characterization of NiTi modified by plasma source ion implantation. *Acta Materialia* 2002;50(18):4449-4460.
7. Lackner JM, Waldhauser W, Ebner R, Major B, Schöberl T. Pulsed laser deposition of titanium oxide coatings at room temperature-structural, mechanical and tribological properties. *Surface and Coatings Technology* 2004;180-181:585-590.
8. Mändl S, Krause D, Thorwarth G, Sader R, Zeilhofer F, Horch

- HH, et al. Plasma immersion ion implantation treatment of medical implants. *Surface and Coatings Technology* 2001;142-144:1046-1050.
9. Mändl S, Sader R, Thorwarth G, Krause D, Zeilhofer HF, Horch HH, et al. Investigation on plasma immersion ion implantation treated medical implants. *Biomolecular Engineering* 2002;19(2-6):129-132.
 10. Tan L, Dodd RA, Crone WC. Corrosion and wear-corrosion behavior of NiTi modified by plasma source ion implantation. *Biomaterials* 2003;24(22):3931-3939.
 11. Yeung KWK, Poon RWY, Liu XY, Ho JPY, Chung CY, Chu PK, et al. Corrosion resistance, surface mechanical properties, and cytocompatibility of plasma immersion ion implantation-treated nickel-titanium shape memory alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2005;75A(2):256-267.
 12. Mändl S, Rauschenbach B. Improving the biocompatibility of medical implants with plasma immersion ion implantation. *Surface and Coatings Technology* 2002;156(1-3):276-283.
 13. Tian XB, Chu PK, Fu R, Yang SQ. Hybrid processes based on plasma immersion ion implantation: a brief review. *Surface and Coatings Technology* 2004;186(1-2):190-195.
 14. Chaturvedi T. An overview of the corrosion aspect of dental implants. *Indian Journal of Dental Research* 2009;20(1):91-98.
 15. Poon RWY, Ho JPY, Liu X, Chung CY, Chu PK, Yeung KWK, et al. Improvements of anti-corrosion and mechanical properties of NiTi orthopedic materials by acetylene, nitrogen and oxygen plasma immersion ion implantation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2005;237(1-2):411-416.
 16. Yankov RA, Shevchenko N, Rogozin A, Maitz MF, Richter E,

- Moller W, et al. Reactive plasma immersion ion implantation for surface passivation. *Surface and Coatings Technology* 2007;201(15):6752-6758.
17. Muñoz-Castro AE, López-Callejas R, Granda-Gutiérrez EE, Valencia-Alvarado R, Barocio SR, Peña-Eguiluz R, et al. Ion implantation of oxygen and nitrogen in CpTi. *Progress in Organic Coatings* 2009;64(2-3):259-263.
 18. Yang Y, Oh N, Liu Y, Chen W, Oh S, Appleford M, et al. Enhancing osseointegration using surface-modified titanium implants. *JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society* 2006;58(7):71-76.
 19. Virtanen S, Milosev I, Gomez-Barrena E, Trebse R, Salo J, Kontinen YT. Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions. *Acta Biomaterialia* 2008;4(3):468-476.
 20. Oyane A, Kim HM, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003;65A(2):188-195.
 21. Mändl S, Sader R, Thorwarth G, Krause D, Zeilhofer HF, Horch HH, et al. Biocompatibility of titanium based implants treated with plasma immersion ion implantation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2003;206:517-521.
 22. Moulder JF, Stickle WF, Sobol PE, Bomben KD. *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy*. Eden Prairie, Minnesota: Physical Electronics, Inc., 1995.
 23. Li J, Sun M, Ma X, Tang G. Structure and tribological performance of modified layer on Ti6Al4V alloy by plasma-based ion implantation with oxygen. *Wear*

2006;261(11-12):1247-1252.

24. Valencia-Alvarado R, de la Piedad-Beneitez A, López-Callejas R, Barocio SR, Mercado-Cabrera A, Peña-Eguiluz R, et al. Oxygen implantation and diffusion in pure titanium by an rf inductively coupled plasma. *Vacuum* 2009;83(Supplement 1):264-267.
25. Tan L, Shaw G, Sridharan K, Crone WC. Effects of oxygen ion implantation on wear behavior of NiTi shape memory alloy. *Mechanics of Materials* 2005;37(10):1059-1068.
26. Shi W, Li XY, Dong H. Improved wear resistance of ultra-high molecular weight polyethylene by plasma immersion ion implantation. *Wear* 2001;250(1-12):544-552.
27. McCafferty E, Wightman JP. Determination of the concentration of surface hydroxyl groups on metal oxide films by a quantitative XPS method. *Surface and Interface Analysis* 1998;26(8):549-564.
28. Kurrat R, Wälivaara B, Marti A, Textor M, Tengvall P, Ramsden JJ, et al. Plasma protein adsorption on titanium: comparative in situ studies using optical waveguide lightmode spectroscopy and ellipsometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1998;11(4):187-201.
29. Ohgaki M, Kizuki T, Katsura M, Yamashita K. Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001;57(3):366-373.

伍、表及圖

表 1、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面各個氧化物之原子百分比。

Component Group	Ti ⁰			Ti ⁺²			Ti ⁺³			Ti ⁺⁴			[Ti ⁺⁴]/[Ti ⁺² + Ti ⁺³ + Ti ⁺⁴]
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD	
T _C	51.69	54.19	4.56	15.19	15.77	1.02	17.17	16.21	4.59	15.95	16.90	2.08	33
T _L	11.85	12.37	2.02	22.86	24.37	4.75	30.08	32.63	6.50	35.21	37.07	3.58	40
T _M	12.14	11.43	2.48	19.90	19.36	3.80	29.08	30.05	3.88	38.90	38.68	0.86	44
T _H	12.66	12.49	2.39	18.73	19.05	1.26	25.69	28.24	5.00	42.91	41.60	2.57	49

表 2、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面之水接觸角。

Group	Contact angle ddH ₂ O (degree)	
	Mean	SD
T _C	40.36	1.45
T _L	33.28	1.45
T _M	33.64	1.06
T _H	13.34	1.39

表 3、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片於模擬血漿中之各項腐蝕參數。

Group	Parameter	I_{corr} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)		I_{pass} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	
		Mean	SD	Mean	SD
T _C		0.064	0.012	4.696	0.063
T _L		0.016	0.006	0.083	0.007
T _M		0.035	0.005	0.080	0.004
T _H		0.056	0.010	0.087	0.014

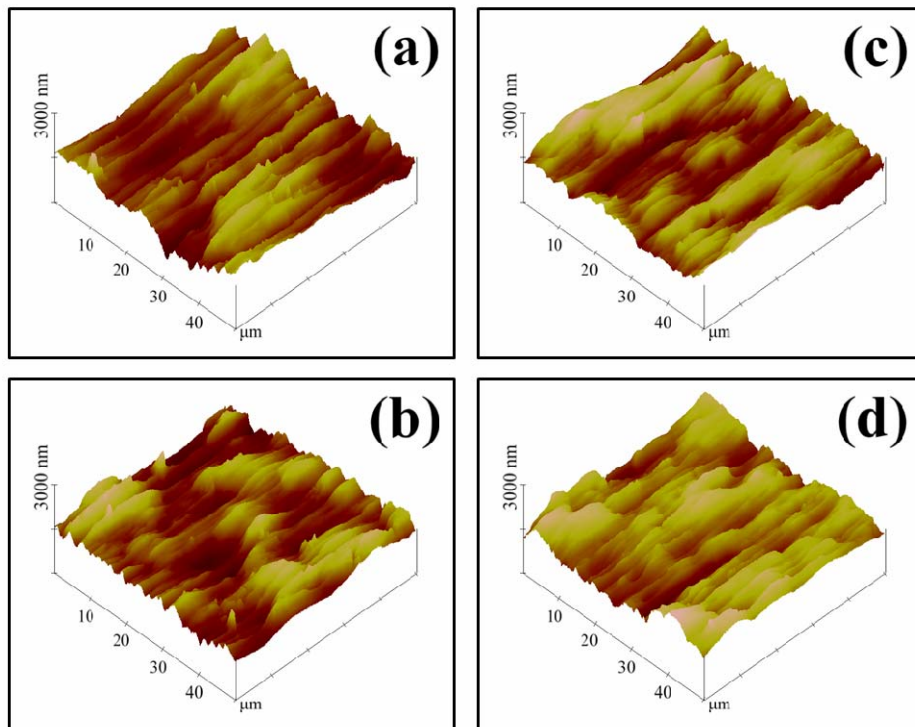


圖 1、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片之原子力顯微鏡表面三維形貌：(a) untreated T_C；(b) treated T_L；(c) treated T_M；(d) treated T_H。

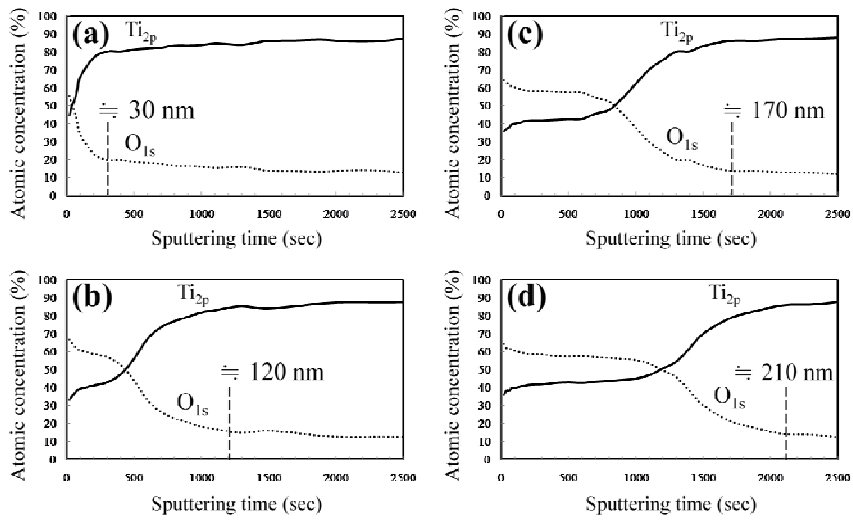


圖 2、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面化學成分之 X 光光電子能譜儀縱深分佈曲線圖：(a) untreated T_C ；(b) treated T_L ；(c) treated T_M ；(c) treated T_H 。

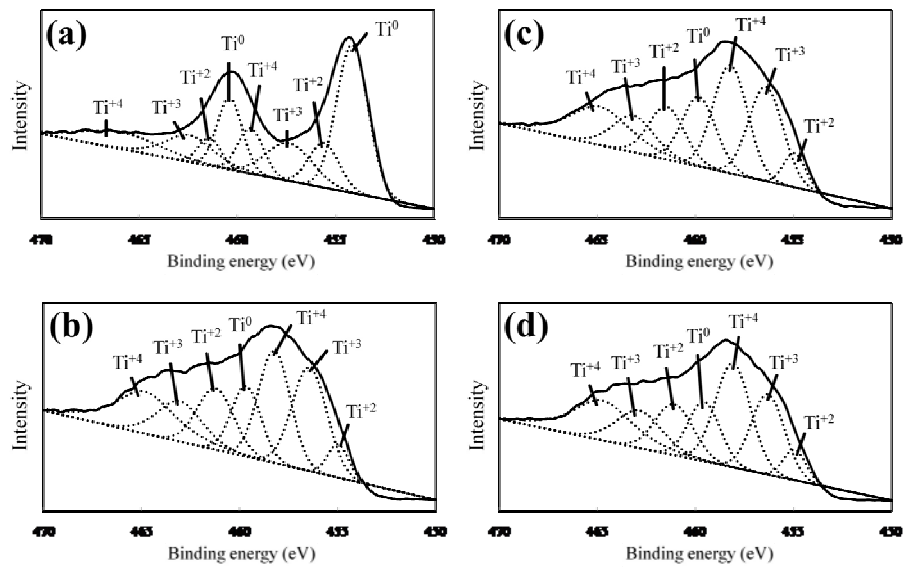


圖 3、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面之 X 光光電子能譜儀 Ti_{2p} 曲線擬合光譜圖：(a) untreated T_C ；(b) treated T_L ；(c) treated T_M ；(c) treated T_H 。

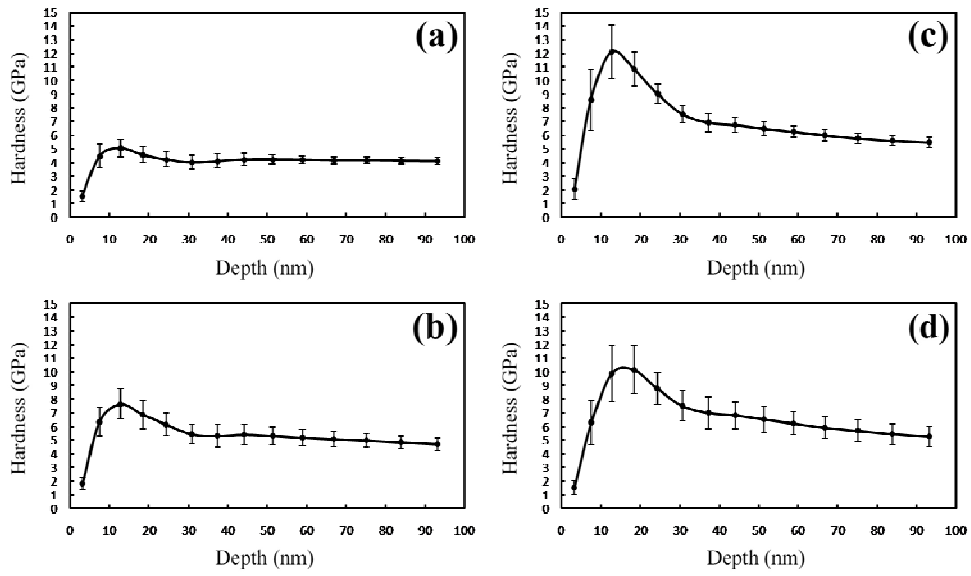


圖 4、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面硬度之曲線圖：(a) untreated T_C ；(b) treated T_L ；(c) treated T_M ；(d) treated T_H 。

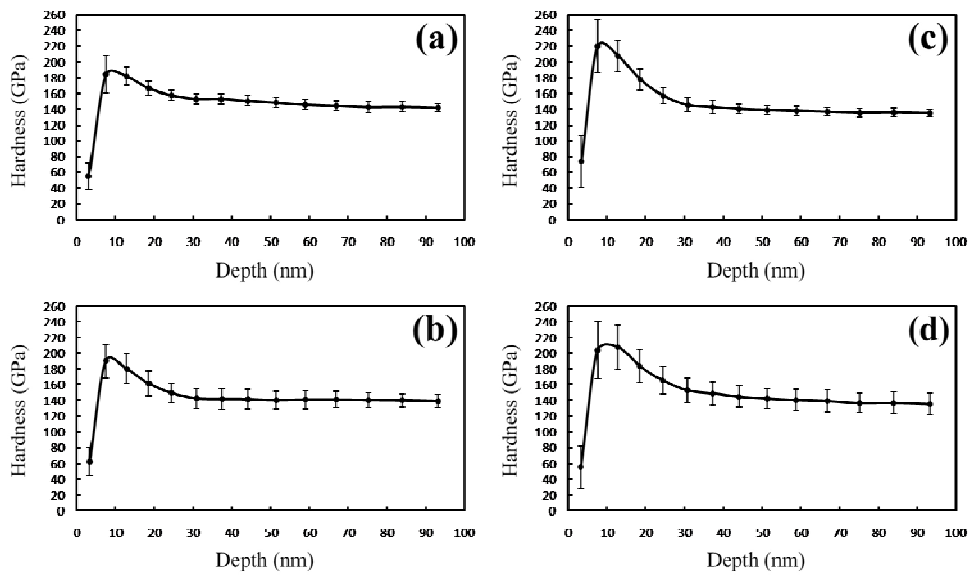


圖 5、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面楊氏係數之曲線圖：(a) untreated T_C ；(b) treated T_L ；(c) treated T_M ；(d) treated T_H 。

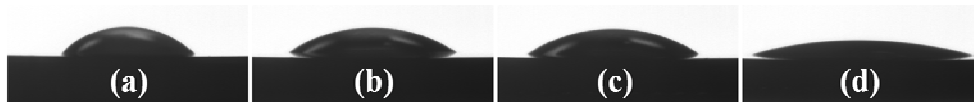


圖 6、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面之水接觸角圖：(a) untreated T_C ；(b) treated T_L ；(c) treated T_M ；(d) treated T_H 。

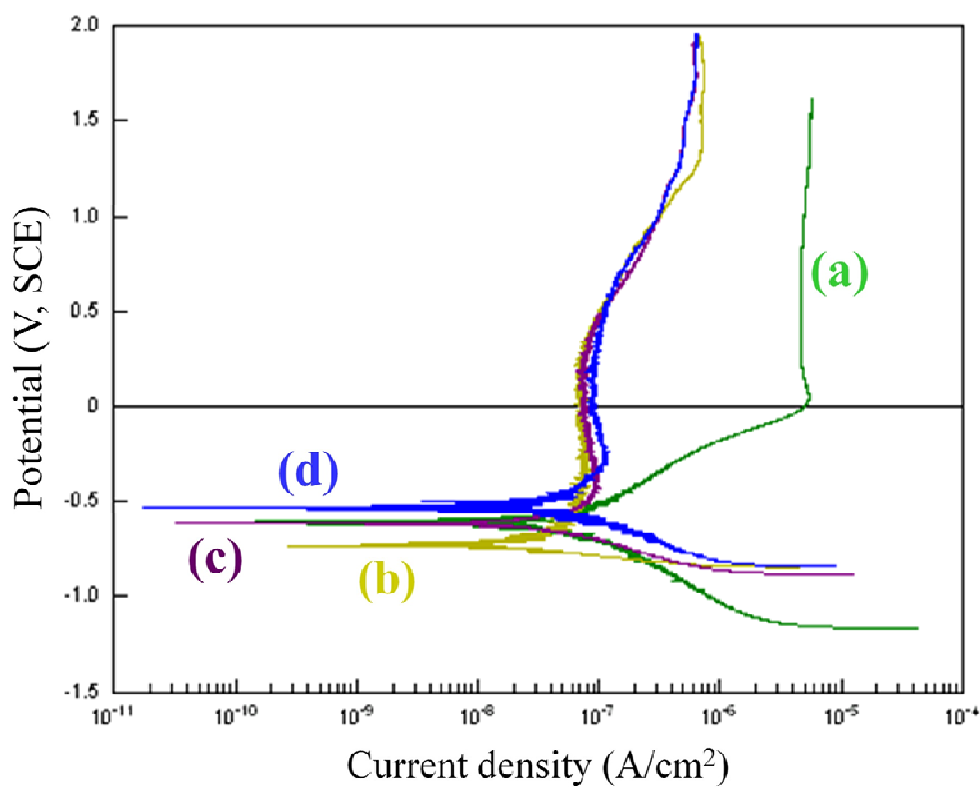


圖 7、O-PIII 處理前後純鈦金屬試片於模擬血漿中之動電位極化曲線圖：(a) untreated T_C ；(b) treated T_L ；(c) treated T_M ；(d) treated T_H 。

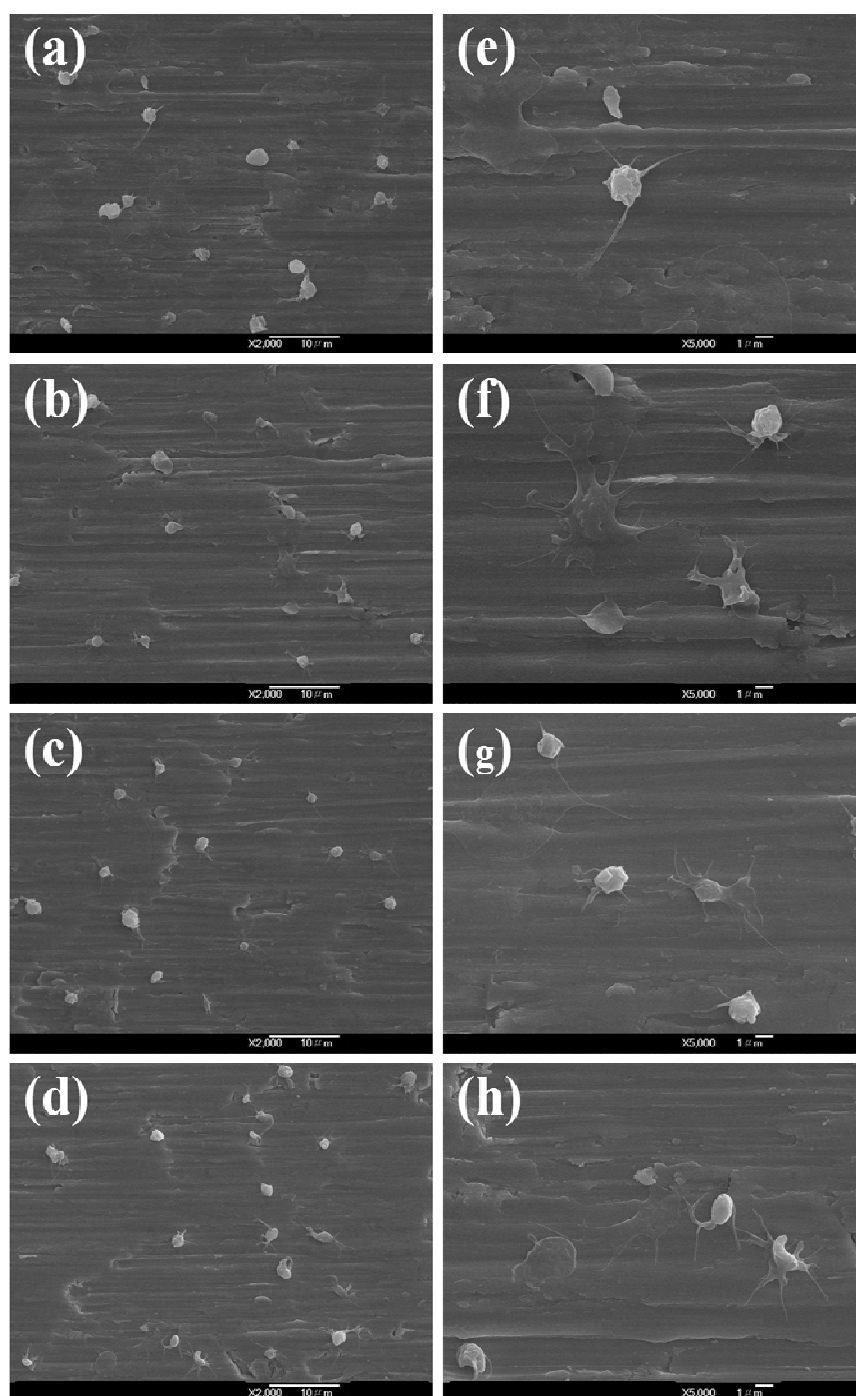


圖 8、FE-SEM 觀察 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面血小板經過五分鐘反應後之貼附形態：(a)、(b)、(c)及(d)分別為 T_C 、 T_L 、 T_M 及 T_H ，放大倍率為 X2000；(e)、(f)、(g)及(h)分別為 T_C 、 T_L 、 T_M 及 T_H ，放大倍率為 X5000。

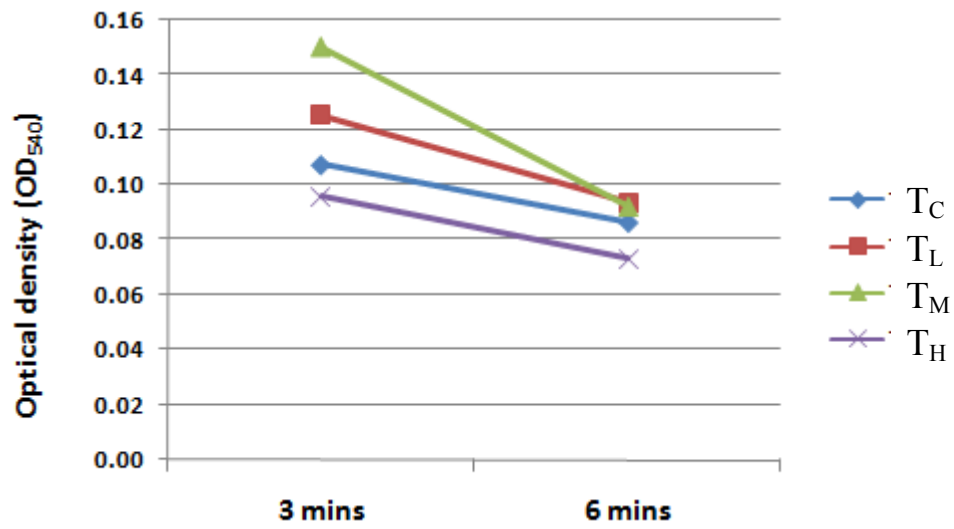


圖 9、全血分別於各試片表面凝血三分鐘及六分鐘後加入一次水觀察其溶血程度。

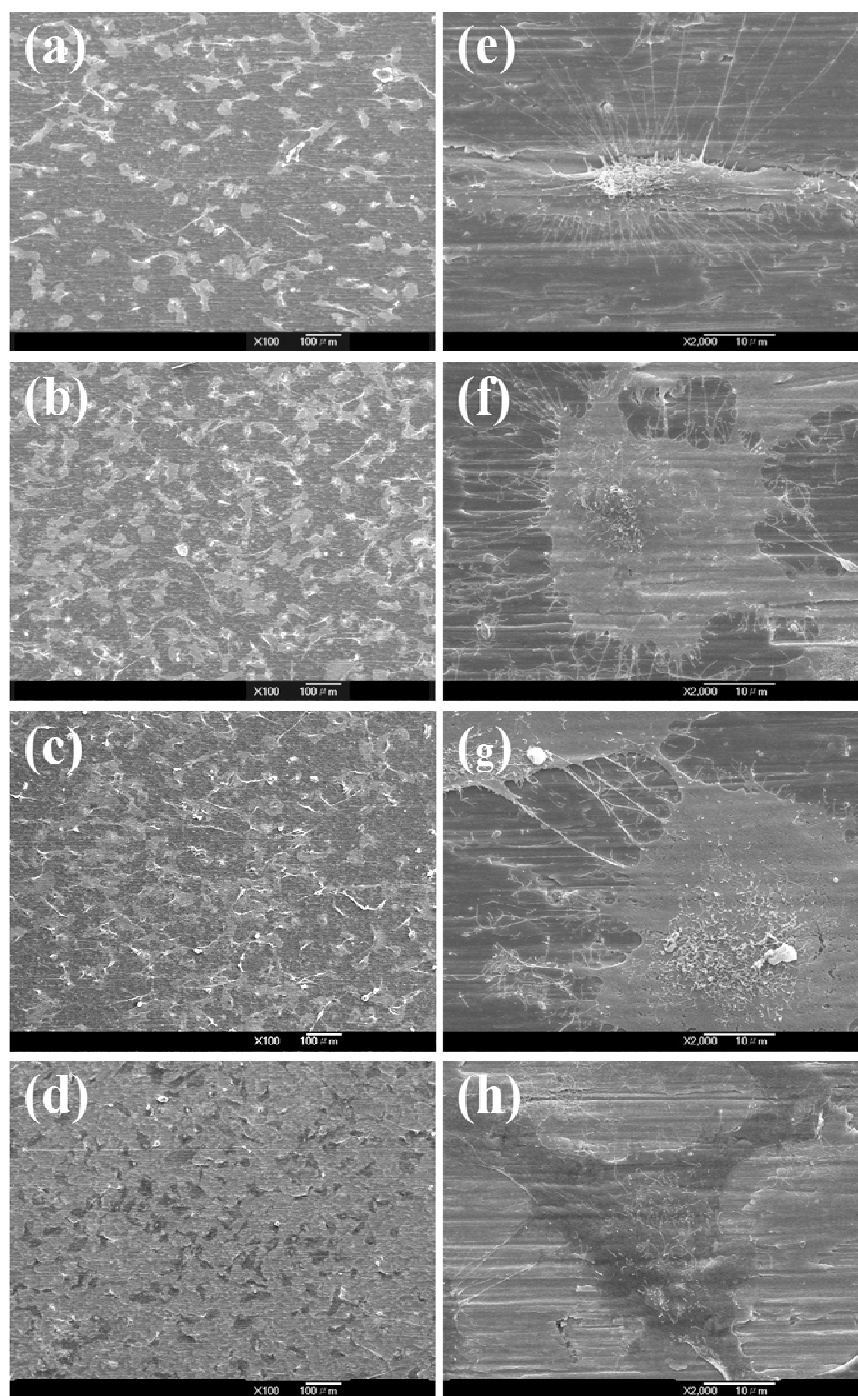


圖 10、FE-SEM 觀察 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面細胞經過 24 個小時培養後之貼附形態：(a)、(b)、(c)及(d)分別為 T_C 、 T_L 、 T_M 及 T_H ，放大倍率為 X100；(e)、(f)、(g)及(h)分別為 T_C 、 T_L 、 T_M 及 T_H ，放大倍率為 X2000。

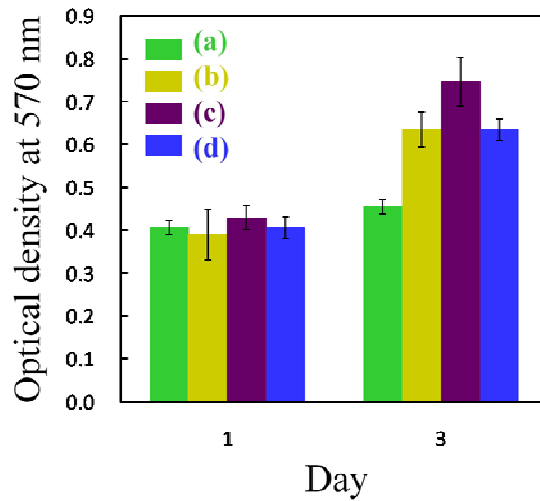


圖 11、MTT 染劑分析 hMSCs 於 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面培養 1 及 3 天後之增生情形：(a) untreated T_C ；(b) treated T_L ；(c) treated T_M ；(d) treated T_H 。

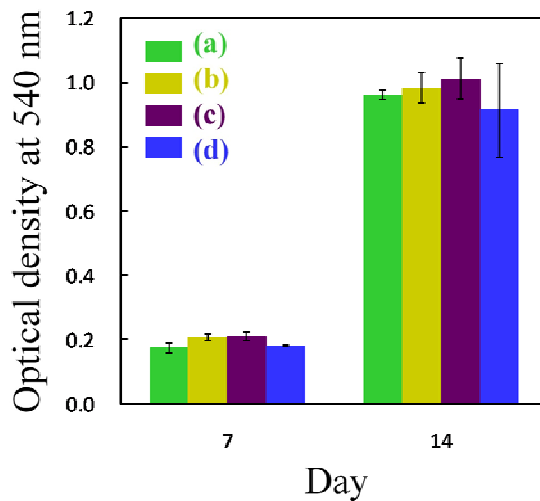


圖 12、茜素紅 S 染劑分析 hMSCs 於 O-PIII 處理前後純鈦金屬試片表面培養 7 及 14 天後之初期分化情形：(a) untreated T_C ；(b) treated T_L ；(c) treated T_M ；(d) treated T_H 。