

細胞 / 植體金屬表面電化學性質研究

黃何雄^{1,*}、何俊德¹、潘思蓉¹、劉嘉民²

Electrochemical Behavior of Implant Metals Cultured with Cells

Her-Hsiung Huang^{1,*}, Chun-Te Ho¹, Szu-Jung Pan¹, and Chia-Min Liu²

摘要

金屬植體 (implant) 表面的電化學性質與其生物相容性質息息相關。本研究利用電化學技術評估類造骨細胞 (osteoblast-like cell) (U-2 OS) 在植體金屬 (拋光處理的 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金) 表面的成長過程 (72 小時)。利用電化學交流阻抗頻譜 (electrochemical impedance spectroscopy, EIS) 量測技術分析細胞成長過程中金屬表面極化電阻 (polarization resistance, R_p) 的變化, 利用掃描式電子顯微鏡觀察不同時期細胞在金屬表面的成長形態。實驗結果顯示, Ti 及 Ti-6Al-4V 合金表面經細胞附著後之 R_p 值均比未附著細胞的對照組試片高。Ti 及 Ti-6Al-4V 合金表面的 R_p 值隨著細胞的成長 (包括貼附、伸展及增殖階段) 而漸增。細胞成長過程中, Ti 及 Ti-6Al-4V 合金的 R_p 值均高於 $3.7 \text{ Mohm}\cdot\text{cm}^2$, 而 Ti 的 R_p 值較 Ti-6Al-4V 合金高。本研究顯示, EIS 量測技術可成功應用於監測細胞在金屬表面的成長過程。

關鍵詞: 植體; 細胞; 電化學交流阻抗頻譜; 極化電阻。

ABSTRACT

The biocompatibility of metal implant is related to its surface electrochemical behavior. In this study, the electrochemical technique was used to monitor the growing process of osteoblast-like cells (U-2 OS) on implant metals (polished Ti and Ti-6Al-4V alloy) during 72 h incubation. Polarization resistance (R_p) of metals cultured with U-2 OS cells was measured by using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurement technique. Surface morphology of cultured cells on metals was observed by using scanning electron microscope after different incubation periods. Results showed that the presence of cells on Ti and Ti-6Al-4V alloy led to an increase in R_p of metals. The R_p of Ti and Ti-6Al-4V alloy cultured with cells increased with the growth of cells, i.e. adhesion, spreading, and proliferation period. Regardless of the incubation period, the R_p values of Ti and Ti-6Al-4V alloy were higher than $3.7 \text{ Mohm}\cdot\text{cm}^2$, and Ti showed a higher R_p than Ti-6Al-4V alloy. In the present investigation, the EIS measurement technique was

1 中山醫學大學牙科材料研究所

Institute of Dental Materials, Chung Shan Medical University, Taichung 402, Taiwan.

2 中山醫學大學附設醫院牙科部

Department of Dentistry, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung 402, Taiwan

* 連絡作者 (TEL:04-24718668 Ext. 5509)

successfully applied to monitor the growing process of U-2 OS cells on Ti and Ti-6Al-4V alloy.

Key Words: implant; cell; electrochemical impedance spectroscopy; polarization resistance.

一、前言

當生醫用植體材料 (implant materials) 被植入人體 (含口腔) 環境中, 最先與活組織 (living tissue) 接觸的便是植體材料的表面, 因此, 材料表面的性質會直接影響活組織與植體材料間相互作用。在臨床應用上, 開發同時有優良基材 (bulk) 性質及表面特性的生醫材料無疑是一個值得重視的課題。雖然眾多的人工生醫材料已被使用於人體, 但是並非所有材料的表面均具有真正良好的生物相容性。另外, 植體材料與人體環境反應所生成的腐蝕產物對人體組織可能會有不良影響^[1], 而植體材料因摩擦所生成的磨耗粒子也可能導致組織嚴重的反應^[1-5]。所以植體材料表面若具有不良的生物相容性質, 不僅會對組織細胞有傷害, 同時也會引起植體材料本身的損壞^[6-8]。

在探討植體材料於人體環境中的生物相容性時, 可利用細胞與材料之間的反應加以了解。然而, 有關研究細胞與植體材料之間相互作用的定量化實驗方法卻相當有限。其中評估生物相容性質的方法之一為評估細胞在植體表面附著性的強弱, 也就是先將細胞接種到材料表面, 經過不同的時間間隔後, 再利用緩衝溶液將附著性不佳的細胞沖刷起來, 而剩下附著性佳的細胞, 再用血球計數器或 colorimetric assay 定量材料表面的細胞數目。

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。另外, 金屬在水溶液中的腐蝕現象通常是電化學反應進行, 而電化學交流阻抗頻譜 (electrochemical impedance

spectroscopy, EIS) 量測技術是一種不干擾材料表面電化學行為, 卻能得到"真實"表面性質的量測技術^[9]。故有學者曾嘗試利用EIS量測技術分析細胞在表面鍍金的細胞培養盤上之成長狀況^[10]。然而, 有關實際的植體材料 (例如 Ti 或 Ti 合金) 在人體環境中與細胞間反應過程的研究, 至今仍有待進一步發展。

本研究擬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) 在植體材料 (Ti 及 Ti-6Al-4 V合金) 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。

二、材料和方法

(1) 材料

本研究所使用的材料為表面經 1 μm 氧化鋁粉拋光處理的片狀商業級純 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金試片。試片經乾熱滅菌後, 進行後續的細胞培養。

(2) 細胞培養

本研究選用的細胞為類造骨細胞 (U-2 OS, osteosarcoma cell)。以 McCoy, s 5A 培養液 (含 10 % fetal bovine serum、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin 和 100 mg/mL penicillin) 培養 U-2 OS 細胞於培養皿, 並置入含 5 % CO_2 、37°C 的培養箱中, 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, 再將 U-2 OS 細胞均勻接種 (密度: 10^5 細胞 / cm^2) 於試片表面, 分別於培養 2、24 及 72 小時後, 進行後續的電化學試

驗及細胞形態觀察。

(3) 電化學試驗

本研究將電化學測試設備安裝於自行設計的 CO₂ 培養箱 (如圖 1)，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, Rp) 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 k~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。

三、結果與討論

圖 2 為 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金在不同細胞培養時間 (2、24 及 72 小時) 之 (a) EIS 圖 (Nyquist-plot) 及 (b) 相對應之極化電阻 (Rp)。結果顯示，Ti 及 Ti-6Al-4V 合金在細胞貼附初期 (2 小時) 的 Rp 值分別為 3.9 及 3.7 Mohm-cm²。當細胞在材料表面進行伸展時 (24 小時)，Ti 及 Ti-6Al-4V 合金的 Rp 值分別達到 4.7 及 4.5 Mohm-cm²。當細胞在增殖階段，Ti 及 Ti-6Al-4V 合金的 Rp 值分別可達到 10.8 及 8.0 Mohm-cm²。換言之，Rp 值隨細胞培養時間的增加而上升，且 Ti 的 Rp 值高於 Ti-6Al-4V 合金，但兩種金屬之 Rp 值均高於無培養細胞的對照組試片 (對照組試片之 Rp 值並不隨時間而改變)。

圖 3 為 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金在不同細胞培養時間 (2、24 及 72 小時) 之表面 SEM 圖。圖 3 (a) 顯示，細胞在 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金表面成長的初期階段 (2 小時) 尚未發生伸展，表面貼附的細胞形

態主要是球形結構。圖 3 (b) 顯示，細胞在 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金表面成長 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 3 (c) 顯示，細胞在兩種金屬表面已完全貼滿，即已發生增殖現象，此時細胞數目是成倍數增加。由圖 3 (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 Rp 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^[11]，Ti 及 Ti-6Al-4V 合金表面的細胞經 72 小時培養後，細胞密度由原先的 10⁵ no./cm² 增為 2 × 10⁵ no./cm² 左右。其中 Ti 的細胞數目約為 Ti-6Al-4V 合金的 1.3 倍。此現象可能是因 Ti-6Al-4V 合金表面釋放的微量 V 元素不利於細胞的成長所致^[12]。

根據 EIS 量測及 SEM 觀察結果，表面培養細胞的 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金在培養液環境中可能的電化學行為以圖 4 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 5 為 (a) Ti 及 (b) Ti-6Al-4V 合金在培養液中，細胞培養二小時後之 EIS 實驗數據與利用等效電路 (圖 4) 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的一致性。

四、結論

Ti 及 Ti-6Al-4V 合金的極化電阻隨 U-2 OS 細胞的成長而增加。當細胞發生增殖時 (72 小時)，Ti 及 Ti-6Al-4V 合金的極化電阻 (>8 Mohm-cm²) 為細胞貼附初期 (2 小時) 的二倍以上。細胞成長的過程中 (包括貼附、伸展及增殖階段)，Ti 表面的極化電阻均大於 Ti-6Al-4V 合金。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。

五、誌謝

感謝國科會 (NSC 89-2216-E-040-002) 及中山醫學大學口腔醫學院 (CSOM 91-04) 對本研究經費之補助。

六、參考文獻

1. L. A. Thomson, F. C. Law, N. Rushton, and J. Franks: *Biomaterials*, 12 (1991) 37.
2. J. Charnley and D. K. Halley *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 112 (1975) 170.
3. H. G. Willert *Journal of Biomedical Materials Research*, 11 (1977) 157.
4. S. B. Goodman, R. C. Chin, S. S. Chiou, D. J. Schurman, ST Woolson, and MP Masada *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 244 (1989) 182.
5. D. W. Murray and N. Rushton *Journal of Bone & Joint Surgery*, 72 (1990) 988.
6. Y. Ikada *Biomaterials*, 15(1994)725.
7. J. R. Wolter *Biomaterials in Ophthalmology*, Bologna, 1990.
8. J. M. Courtney, S. Sundaram, and C. D. Forbers *Management of Bleeding Disorders in Surgical Practice*. (Blackwell Scientific, Oxford. 1993) p.236.
9. G. W. Walter, *Corrosion Science*, 26 (1986) 681.
10. I. Giaever and C. R. Keese *Nature* 366 (1993) 591.
11. C. T. Ho. Master Thesis (advisor: H. H. Huang), Institute of Dental Materials, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan (June 2002).
12. E. Eisenbarth, J. Meyle, W. Nachtigall, and J. Brems: *Biomaterials*, 17 (1996) 1399.

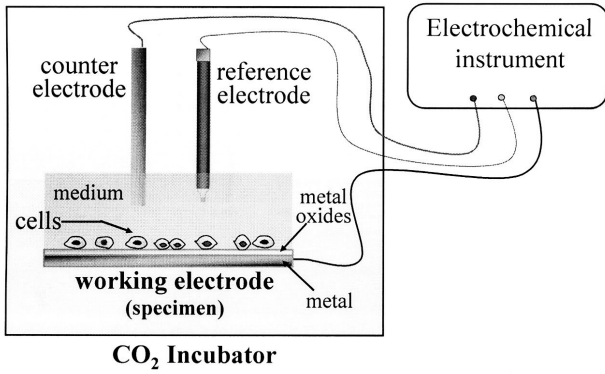
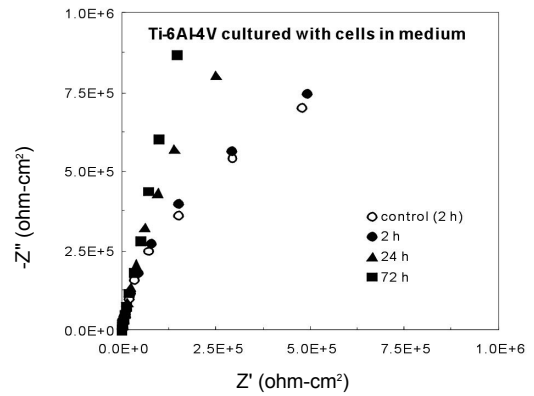
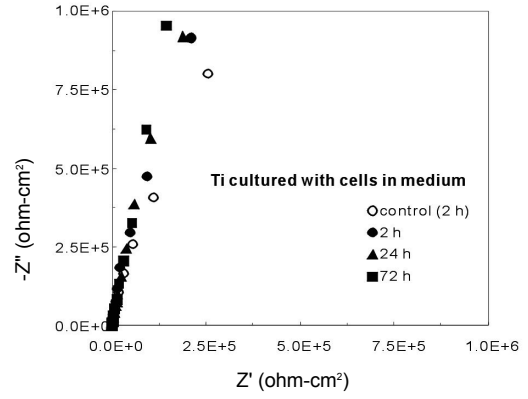
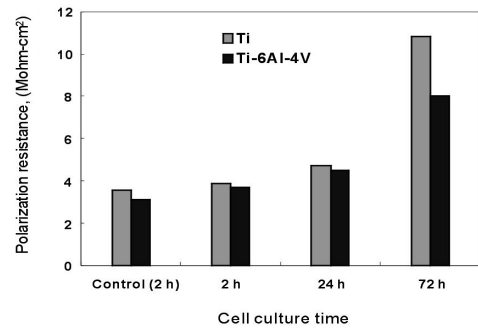


圖1. 電化學測試設備示意圖
Fig. 1 Schematic diagram of electrochemical testing equipment.



(a)



(b)

圖2 Ti 及 Ti-6Al-4V 合金在不同細胞培養時間 (2、24 及 72 小時) 之 (a) EIS 圖 (Nyquist-plot) 及 (b) 相對應之極化電阻 (Rp)

Fig. 2 (a) EIS data (Nyquist-plot) and (b) the corresponding polarization resistance (Rp) for Ti and Ti-6Al-4v alloy cultured with cells after different incubation periods (2, 24, and 72h)

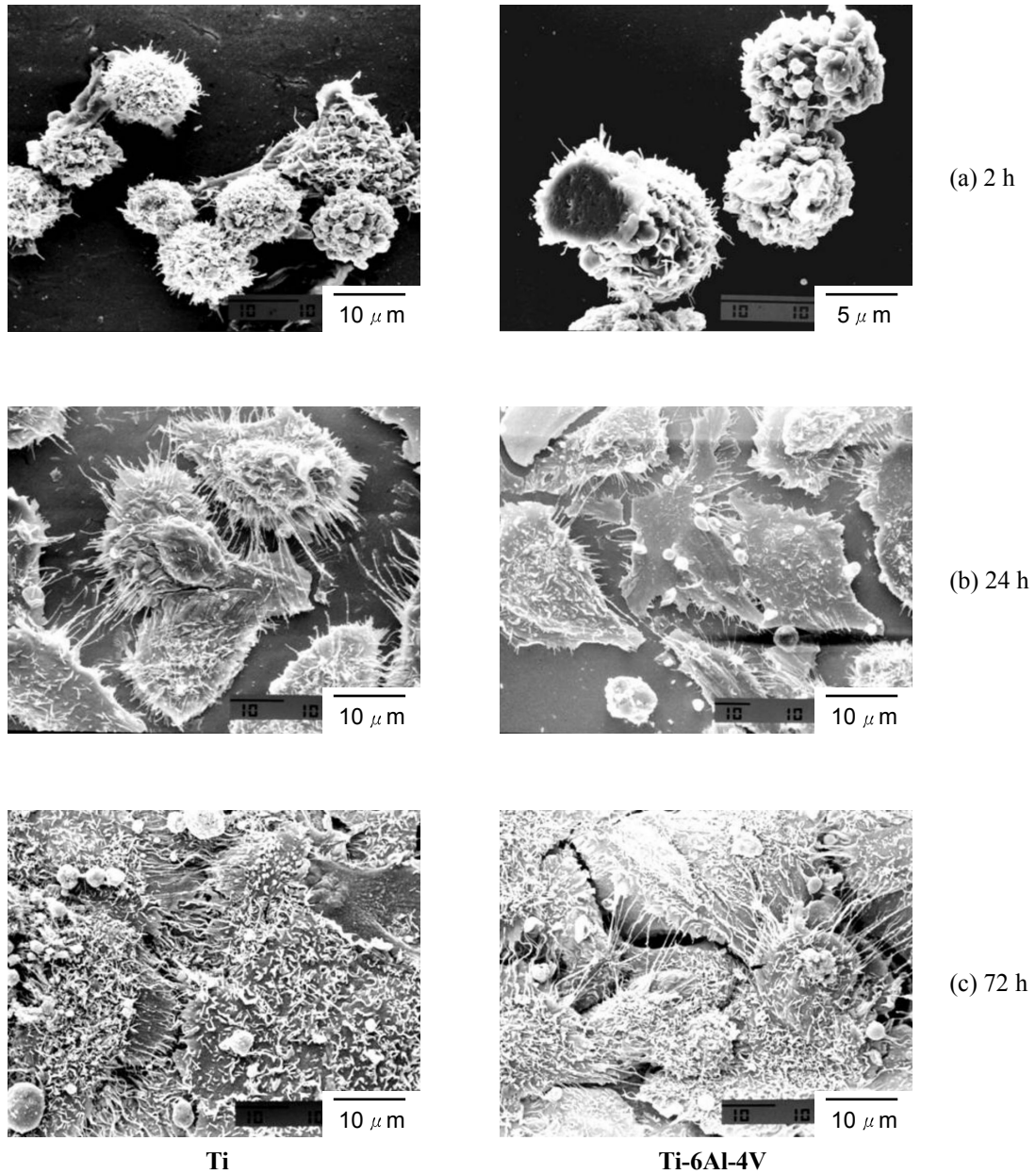


圖3 Ti (左側) 及 Ti-6Al-4V 合金 (右側) 在不同細胞培養時間 ((a) 2 小時、(b) 24 小時及 (c) 72 小時) 之表面 SEM 圖

Fig. 3 SEM observations of Ti (left side) and Ti-6Al-4V alloy (right side) cultured with cells after different incubation periods ((a)2h; (b)24h; (c)72h).

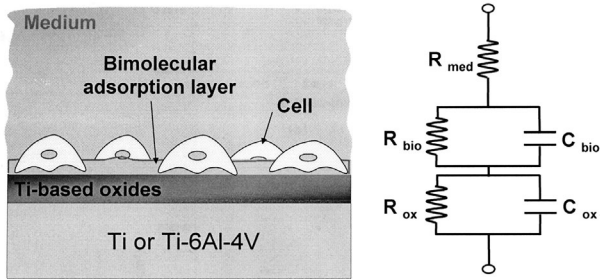
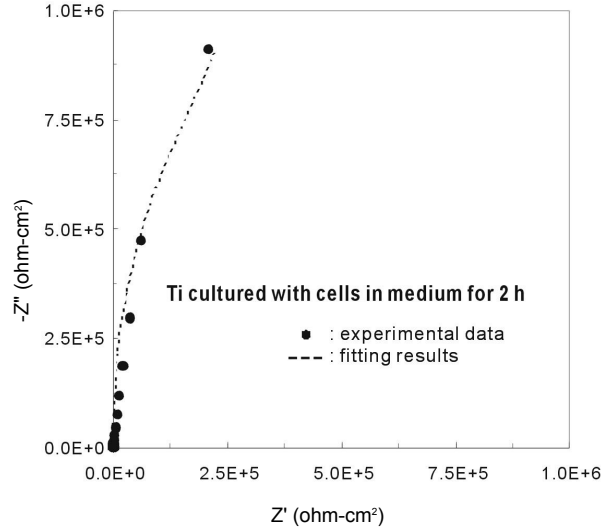
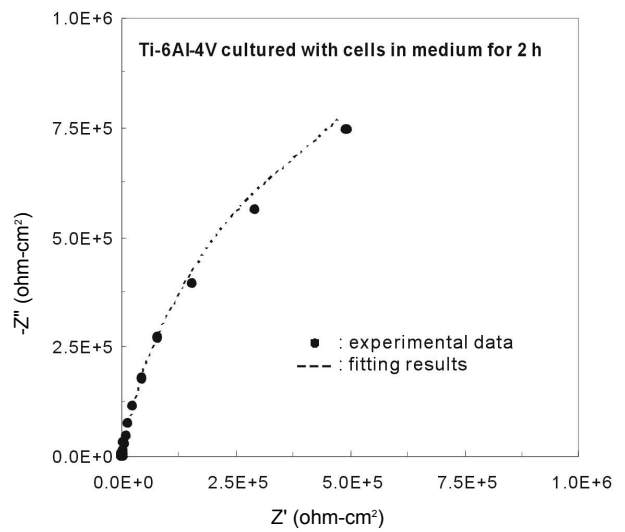


圖4. Ti 及 Ti-6Al-4V 合金在細胞培養過程中，材料表面可能的電化學行為（以等效電路描述）

Fig. 4 Possible electrochemical behavior, in terms of equivalent circuit, of Ti and Ti-6Al-4V alloy cultured with cells.



(a)



(b)

圖5. (a) Ti 及 (b) Ti-6Al-4V 合金在培養液中培養細胞二小時後之EIS實驗數據與利用等效電路（圖4）模擬結果之比較。

Fig. 5 Experimental EIS data and corresponding simulation results (based on the equivalent circuits shown in Fig. 4) of (a) Ti and (b)Ti-6Al-4V alloy cultured with cells in medium for 2h.