

經電化學陽極處理後之鈦金屬表面所引發凝血性質變化之探討

陳靜宜¹、陳智華²、李天翎³、楊明鈴⁴、李慈心⁵、劉嘉民⁵、黃何雄*¹

Titanium Surface Blood Coagulation Changes Induced by Electrochemical Anodization Treatment

J. Y. Chen¹, Z. H. Chen², T. L. Lee³, M. L. Yang⁴, T. H. Lee⁵,
C. M. Liu⁵, H. H. Huang*¹

摘要

本研究是評估鈦金屬表面經電化學陽極處理後凝血性質的變化。牙科用純鈦表面利用電化學陽極處理備製孔洞狀的鈦-氧層，並以凝血測試及血小板貼附來評估其凝血性質。電化學處理結果顯示，經電化學陽極處理後的鈦表面有二氧化鈦的網狀結構生成。凝血測試結果顯示，經電化學陽極處理的鈦試片比未經處理的鈦試片有較短的凝血時間。血小板貼附觀察結果顯示，經電化學處理後的鈦試片有較多的血小板貼附、活化及聚集的現象。牙科用鈦植體材料表面經由電化學陽極處理可產生網狀的二氧化鈦結構，此結構可增進材料的凝血特性。

關鍵詞：鈦；電化學陽極處理；網狀結構；凝血。

ABSTRACT

This study was to evaluate the blood coagulation changes of commercially pure Ti surface after an electrochemical anodization treatment. Anodization treatment was used to produce a

1 國立陽明大學牙醫學系

1 Department of Dentistry, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

2 國立陽明大學口腔生物研究所

2 Institute of Oral Biology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

3 中山醫學大學口腔醫學研究所

3 Institute of Oral Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

4 中山醫學大學醫學系解剖科

4 Department of Anatomy, School of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

5 中山醫學大學牙醫學系

5 School of Dentistry, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

* 連絡作者：hhhuang@ym.edu.tw



porous Ti-O layer on ground Ti surface for dental implant application. The blood coagulation of surface modified Ti specimens was analyzed using kinetic clotting time method and platelet adhesion observation. Results showed that a network TiO_2 layer was developed on Ti surface after anodization treatment. The clotting time of surface modified Ti specimens was shorter than that of the untreated Ti specimen. Surface modified Ti specimens had better platelet adhesion, activation and aggregation. According to the present results, we may conclude that the blood coagulation of Ti surface can be improved using an electrochemical anodization treatment via the formation of a network-structured TiO_2 surface layer.

Keywords: Titanium; Electrochemical anodization; Network structure; Blood coagulation.

1. 前言

鈦具有良好的生物相容性質、抗腐蝕性質、機械性質以及低毒性，因此在牙科植體與矯正方面被廣大的應用^[1]。生醫材料在經過適當的表面處理後可有效提升其生物相容性、加速骨整合及縮短癒合的時間，以達到較高的手術成功率^[2]。有研究指出：電化學陽極處理可以在鈦金屬表面生成奈米級網狀結構，此結構對於骨頭生長扮演重要角色^[3]，植體材料表面本身奈米(nm) ~ 微米(μm)的表面形貌和結構會影響到人體體內對於材料所產生的生物反應^[4]，以及影響到骨頭的生長^[5]。

牙科用植體植入口腔後立即會接觸到人體的血液，血液是在心臟和血管腔內循環流動的一種組織，pH值約為7.3 ~ 7.4，而鈦所具備的良好骨整合特性，推測可能是因鈦本身具有良好的凝血性質導致^[6]，其凝血性質對於牙科植體中骨頭形成更是重要因素^[4]。血液中的血小板具有凝血的主要功能，在傷口的周圍，血小板和纖維蛋白(原)(fibrinogen)會比成骨細胞更早一步填滿傷口周圍並與植體材料接觸進行交互作用^[7]。由於血液中的血小板活化會促進凝血現象以及血小板釋放生長因子。其中，血小板包含許多生長因子，像是血小板衍生生長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、類胰島素成長因子(insulin-like growth factor, IGF)、轉化生長因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、血管內皮細胞生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor, FGF)，這些生長因子都會使植體材料在植入人體後促進其骨整合^[8]。而富血小

板血漿(platelet-rich plasma)含有大量的血小板，因而具有更多生長因子的釋放量，進而可有效的促進骨頭癒合^[9]。因此血液的凝血系統和血小板的活化皆會影響後續細胞及骨頭的生長^[4]。

本研究室先前研究顯示，鈦金屬經過電化學陽極處理後，鈦表面生成的網狀結構在蛋白質吸附與細胞貼附有良好的表現^[10]。由於鈦表面備製出的奈米結構與誘發凝血反應的纖維蛋白同屬於奈米級尺寸。此外，血小板偽足(pseudopodium)也相似於奈米級網狀結構，因此推測奈米級網狀結構將有利於血液的凝結。然而，鈦金屬表面會自然生成氧化層，而氧化層在體內會與骨頭、組織或許人體體液相接觸^[11]，所以植體材料與血液之間的相互關係更需要進一步的探討。因此本研究擬利用電化學陽極處理在鈦表面備製出奈米級網狀結構，探討其與血液接觸時所引起的凝血反應。

2. 實驗

2.1 試片準備

本實驗使用美國材料試驗協會(American Society for Testing and Materials, ASTM)第二級純鈦試片，鈦試片表面以不同號數砂紙研磨至#1500號，並將研磨完成的鈦試片以二次水進行超音波震盪，再將鈦試片以酒精進行超音波震盪，之後以冷風吹乾，接著進行不同溫度下電化學陽極表面處理。

2.2 電化學備製

本實驗是以電化學陽極處理進行表面處理，將鈦試片接上電化學儀器中的工作電極(陽極)，白金試



片為相對電極(陰極)，飽和甘汞電極則是參考電極，電解液為高濃度的氫氧化鈉溶液，以電化學儀器進行定電流陽極氧化處理至 I_1 及 I_2 安培($I_1 < I_2$)，其陽極處理時間可達數小時。試片編號說明如下：研磨至#1500 號砂紙的鈦試片編號為 I0，而研磨後的鈦試片在低溫(L)與高溫(H)環境中外加定電流 I_1 及 I_2 安培，編號分別為試片 LI1、LI2、HI1 和 HI2。備製完成的鈦試片以場發射掃描式電子顯微鏡(field-emission scanning electron microscope, FESEM)觀察各試片表面形貌，以原子力顯微鏡 atomic force microscopy, AFM)觀察表面(範圍： $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$)三維型態並計算其表面中心線平均粗糙度 R_a 。

2.3 血液凝固測試

凝血測試主要檢測內在路徑的凝血反應，因為當材料與血液接觸時所產生的凝血反應主要為凝血內在路徑，故利用檢測內在路徑凝血來評估材料的凝血性質。

將經表面處理的鈦試片放置於 12 孔的細胞培養盤內後加入全血，讓血液完全覆蓋在鈦試片表面

進行接觸，接觸後將孔盤內溶液加至呈色液內，進行呈色作用，再以 540 nm 波長進行吸光值測定。本實驗結果以溶血比形式呈現，溶血比為各試片溶液的吸光值/完全溶血的吸光值，溶血比之百分比值越高表示溶血反應越多，相對的有較少的凝血現象產生。

2.4 血小板貼附

將表面經電化學處理後的鈦試片置於 12 孔的細胞培養盤內，並於試片表面加入富血小板血漿進行血小板的貼附，貼附作用 10 分鐘後，將鈦試片進行固定、脫水和臨界點乾燥的步驟，再以場發射掃描式電子顯微鏡(FE-SEM)觀察血小板在鈦試片表面貼附的情形。利用血小板貼附時的形貌及數量來評估材料與血液接觸時的凝血性質。

3. 結果與討論

3.1 材料表面分析

圖 1 為未經電化學陽極處理試片(I0)與經電化學陽極處理試片(LI1、LI2、HI1 和 HI2)利用場發射

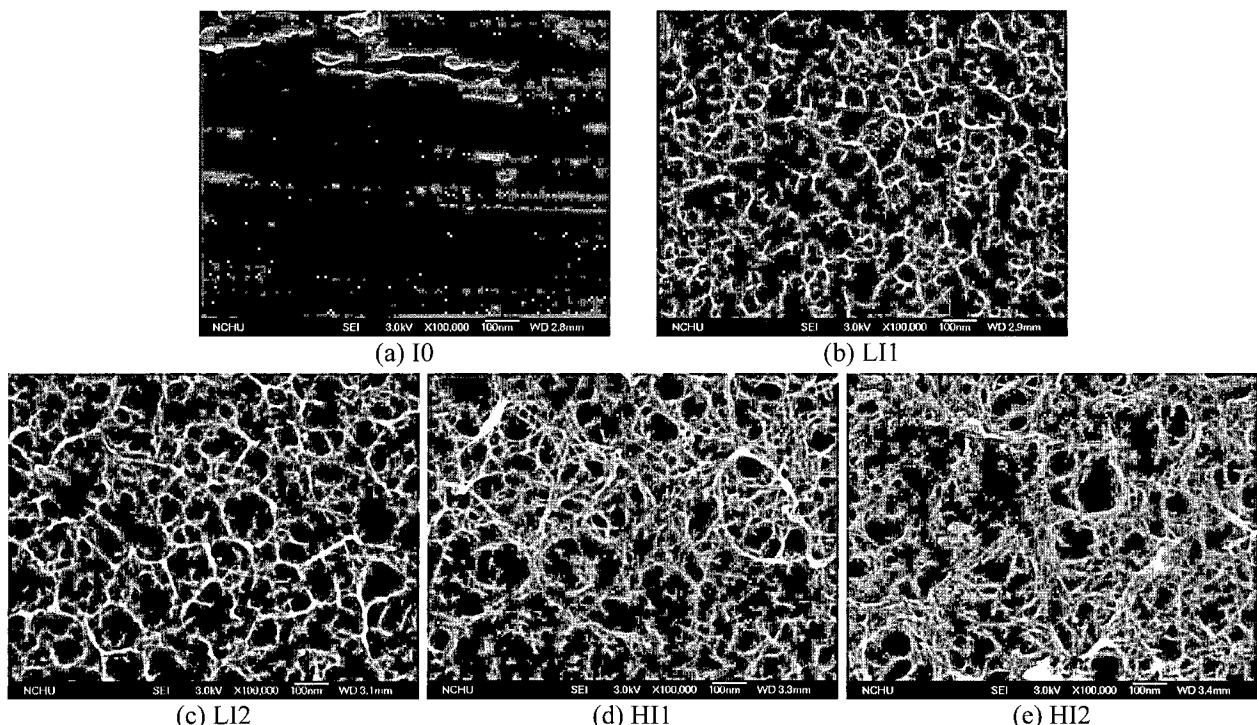


圖 1 未經電化學陽極處理試片(I0)與經電化學陽極處理試片(LI1、LI2、HI1 和 HI2)的表面形貌。

Figure 1 Surface morphology of untreated (I0) and electrochemically treated (LI1、LI2、HI1 and HI2) samples.



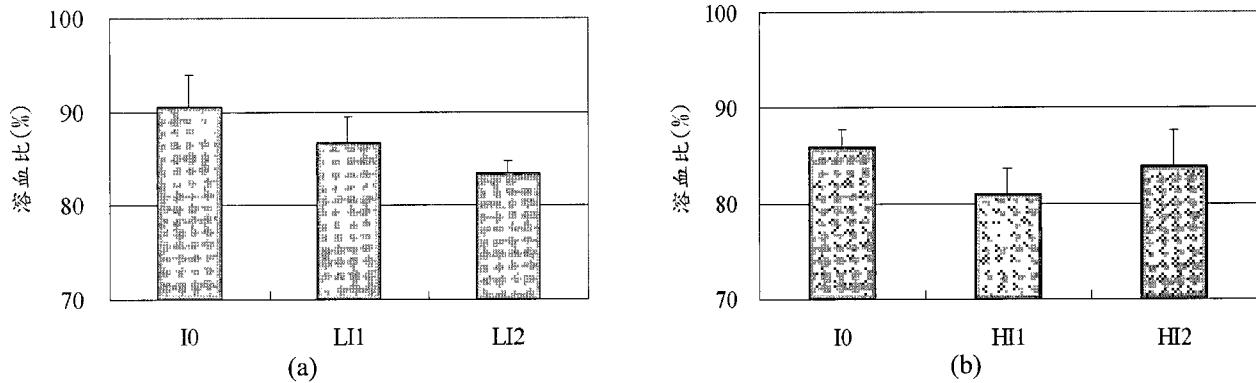


圖 2 (a) 低溫與(b) 高溫環境備製各鈦試片 3 分鐘凝血時間測試之溶血比結果(誤差線為標準誤差)。

Figure 2 Clotting time results (3 min) for different samples obtained at low and high temperatures (error bar = standard error).

掃描式電子顯微鏡觀察結果。鈦試片經過電化學處理後有網狀結構的生成，此結構經 X 光繞射儀分析為銳鈦礦(anatase)的二氧化鈦(實驗結果未呈現)。表 1 為經電化學陽極處理試片(LI1、LI2、HI1 和 HI2)的網目直徑大小，隨著備製時溫度與外加電流不同，網目直徑大小也隨之不同。由圖 1 與表 1 歸納可得知，電化學陽極處理後鈦試片表面呈現奈米尺度的網狀結構，而網目大小則會隨著溫度與外加電流增加而增加；網目排列也隨著溫度與外加電流增加而呈現混亂現象。有研究指出溫度可能會影響到在備製電化學陽極處理的鈦試片上，而出現混亂排列的二氧化鈦層^[12]。表 2 為未經電化學陽極處理試片(I0)與經電化學陽極處理試片(LI1、LI2、HI1 和 HI2)的粗糙度 R_a 值，結果顯示，經過電化學陽極處理的鈦試片並不會因此影響到微米級的粗糙度變化。

鈦金屬在大氣中自然生成緻密的氧化層，厚度約為數個到數十個 nm，而主要成份為二氧化鈦。然而，經電化學陽極處理的鈦試片可增加氧化層厚度

表 1 經電化學陽極處理試片(LI1、LI2、HI1 和 HI2)的網目直徑大小。

Table 1 The network diameter size of electrochemically treated samples (LI1、LI2、HI1 and HI2).

試片編號	LI1	LI2	HI1	HI2
網目(nm)	47	56	54	82
標準誤差(nm)	1	2	4	8

約至 50 ~ 200 nm^[13]。更有研究指出，銳鈦礦的二氧化鈦氧化層可有效提高蛋白質吸附^[14]。吸收蛋白質則有助於緻密骨的向內生長，而隨著氧化層厚度增加可提高蛋白質吸收，並進一步影響骨細胞貼附而提高生物相容性^[15]。

改善材料的生物相容性，可歸因於氧化層厚度和多孔性，用來提高人工骨和骨頭間的貼附^[16]。鈦表面網狀結構的生成主要原因之一為鈦試片於自然環境中容易被氫吸附，形成氫化鈦，再經過長時間浸泡於鹼性溶液中，氫化鈦會溶解於鹼性溶液而使材料表面呈現多孔性結構^[17]。而本研究利用電化學陽極處理後有網狀結構生成外，同時也增加鈦試片氧化層厚度。

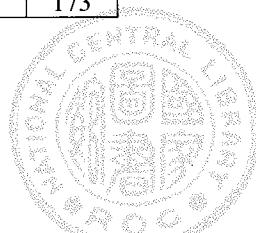
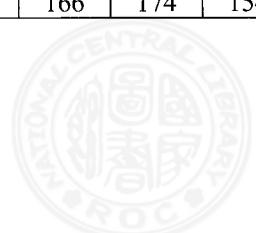
3.2 血液凝固測試

圖 2 為低溫與高溫環境備製各鈦試片 3 分鐘凝血測試結果。在圖 2(a)可觀察到凝血測試之溶血比

表 2 未經電化學陽極處理試片(I0)與經電化學陽極處理試片(LI1、LI2、HI1 和 HI2)的粗糙度 R_a 值。

Table 2 Surface roughness (R_a) of untreated (I0) and electrochemically treated samples (LI1、LI2、HI1 and HI2).

試片編號	I0	LI1	LI2	HI1	HI2
R_a (nm)	166	174	154	169	173



結果： $LI2 < LI1 < I0$ ，由此可之，低溫環境下備製電化學陽極處理的鈦試片有較低的溶血比，也就是擁有較多的凝血效果。圖 2(b)的凝血測試之溶血比結果顯示： $HI1 < HI2 < I0$ ，在高溫環境下備製電化學陽極處理的鈦試片也呈現出較低的溶血比，即較多的凝血效果。在低溫與高溫環境下有相同的趨勢，皆呈現出經電化學陽極處理後的鈦試片有較佳的凝血性質。

鈦金屬的凝血性質在牙科植體方面的骨頭生成是相當的重要^[18]。鈦金屬表面凝血現象的增加可能會促進類造骨細胞增殖並抑制其死亡^[19, 20]。凝血主要可分為兩個路徑：內在路徑與外在路徑，血液與材料接觸為內在途徑，其主要凝固作用約 5 分鐘，且大部分的時間均發生在第一階段反應之凝血酶(thromboplastin)生成，約佔 3 ~ 5 分鐘^[21]。本研究圖 2 所顯示在低溫與高溫環境下，經電化學陽極處理的鈦試片有較低的溶血比，推測在內在途徑主要關鍵的 3 分鐘內，電化學陽極處理的鈦試片有較佳的凝血效果產生。

此外，因圖 2(a)及 2(b)分別為兩次獨立試驗之結果，故血液的來源可能會有些許的差異，進而造成圖 2(a)及 2(b)中 $I0$ 試片溶血比之不同，但此血液來源的差異性並不會影響圖 2(a)及 2(b)中 $I0$ 、 $I1$ 及 $I2$ 試片的相對溶血比大小。

3.3 血小板貼附

圖 3 為血小板在各條件試片表面貼附 10 分鐘的形貌觀察。結果顯示經電化學陽極處理後的鈦試片有較良好的血小板貼附情形、較大範圍的血小板貼附及較明顯的血小板活化聚集現象。

血小板活化對於與血液接觸的材料是一個重要的因子^[22]。血小板與材料接觸，血小板會進行形態轉變、活化和聚集的步驟。在血小板 10 分鐘的貼附實驗中，結果顯示在各條件試片表面皆有血小板貼附的現象，而經電化學陽極處理後的鈦試片可看見血小板已經有明顯大範圍的聚集現象，其中又以 $LI2$ 具有較完整貼附的型態。上述結果推測經電化學陽極處理後的鈦試片，血小板已經發生血小板凝血步

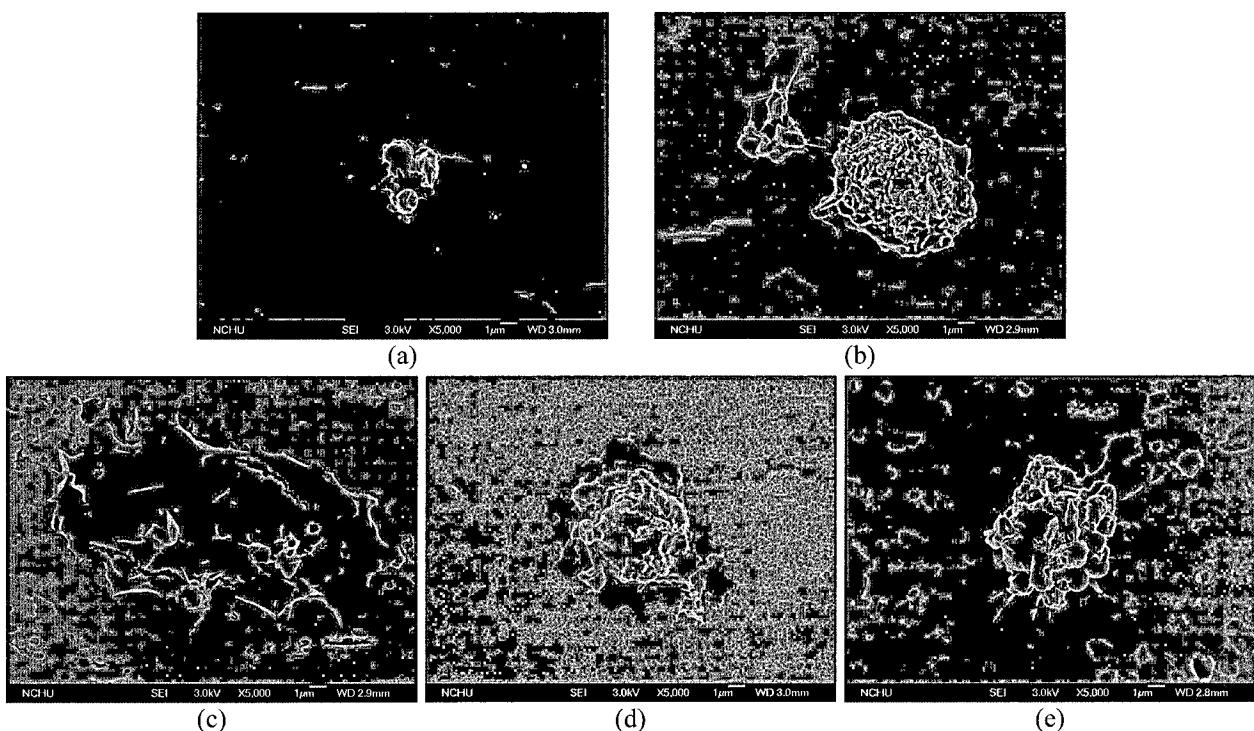
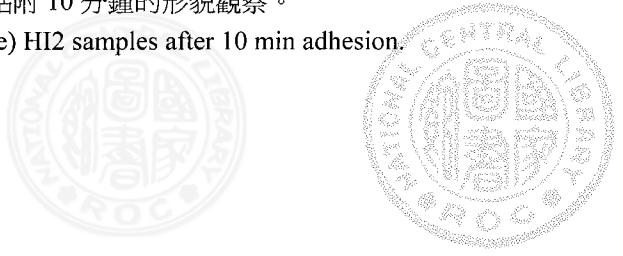


圖 3 血小板在(a) $I0$ 、(b) $LI1$ 、(c) $LI2$ 、(d) $HI1$ 及(e) $HI2$ 試片表面貼附 10 分鐘的形貌觀察。

Figure 3 Platelets morphologies on (a) $I0$ 、(b) $LI1$ 、(c) $LI2$ 、(d) $HI1$ and (e) $HI2$ samples after 10 min adhesion.



驟中的聚集活化反應，而 I0 試片血小板仍呈現在凝血步驟中聚集前的貼附狀態。

4. 結論

經電化學陽極處理後的鈦試片表面有奈米尺度的網狀結構生成，此網狀結構主要為鈍鈦礦(anatase)，網狀結構之大小隨著備製溫度的提高而加大，此網狀結構在凝血初期有助於凝血反應及血小板的活化聚集。

誌謝

感謝國科會(NSC 95-2314-B-010-018)、中山醫學大學(CSMU 92-OM-B-048、CSMU 92-OM-B-049、CSMC 82-B026、CSMU 91-OM-B-002)對本研究經費之支持。

參考文獻

1. T. Albrektsson, P. I. Branemark, H. A. Hansson, and J. Lindstrom, "Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man", *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 52 (1981) 155 ~ 170.
2. G. Zhao, Z. Schwart, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran, and B. D. Boyan, "High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure", *Journal of Biomedical Materials Research : Part A*, 74 (2005) 49 ~ 58.
3. S. Oh and S. Jin, "Titanium oxide nanotubes with controlled morphology for enhanced bone growth", *Materials Science and Engineering*, 26 (2006) 1301 ~ 1306.
4. B. Fiberg, K. Grondahl, U. Lekholm, and P. I. Bränemark, "Long-term Follow-up of Severely Atrophic Edentulous Mandibles Reconstructed with Short Branemark Implants", *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2 (2000) 184 ~ 189.
5. S. V. Paulo, M. S. Marcia, N. B. Ivan, and de A.S. Gloria, "Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments", *Dental Materials*, 22 (2006) 275 ~ 282.
6. J. Hong, J. Andersson, K. N. Ekdahl, G. Elgue, N. Axen, and R. Larsson, "Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis", *Thrombosis & Haemostasis*, 82 (1992) 58 ~ 64.
7. J. Y. Park, C. H. Gemmell, and J. E. Davies, "Platelet interaction with titanium: modulation of platelet activity by surface topography", *Biomaterials*, 22 (2001) 2671 ~ 2682.
8. H. Schliephake, "Bone growth factors in maxillofacial reconstruction", *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 31 (2002) 469 ~ 484.
9. W. Zechner, S. Tangl, G. Tepper, G. Furst, T. Bernhart, R. Hass, G. Mailath, and G. Watzek, "Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs", *International Journal of Oral & Maxillofacial implant*, 18 (2003) 15 ~ 22.
10. 莊羽喬，鈦表面經電化學處理後對不同組織特性的類造骨細胞貼附、增殖及分化之影響，中山醫學大學口腔材料科學研究所碩士論文，2006 年 6 月。
11. S. Takemoto, T. Yamamoto, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, and S. Takashim, "Platelet adhesion on titanium oxide gels: effect of surface oxidation", *Biomaterials*, 25 (2004) 3485 ~ 3492.
12. D. Gong, C. A. Grimes, O. K. Varghese, W. Hu, and R. S. Singh, "Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation", *Journal of Materials Research*, 16 (2001) 3331 ~ 3334.
13. 潘思蓉，應用電化學技術於生醫用純鈦金屬表面改質之研究，中山醫學大學牙科材料研究所碩士論文，2004 年 6 月。
14. N. Huang, P. Yang, and X. Cheng, "Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthesized by ion beam enhanced deposition", *Biomaterials*, 19 (1998) 771 ~ 776.
15. M. C. Sunny and C. P. Sharma, "Titanium-protein interaction: changes with oxide layer thickness",



- Journal of Biomaterials Application, 6 (1991) 89 ~ 98.
16. Y. T. Sul, C. B. Johansson, Y. Jeong, and T. Albrektsson, "The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes", Medical Engineering and Physics, 23 (2001) 329 ~ 346.
17. S. I. Tanaka, M. Aonuma, N. Hirose, and T. Tanaki, "The preparation of porous TiO₂ by immersin Ti in NaOH solution", Journal of the Electrochemical Society, 149 (2002) 167 ~ 171.
18. A. Thor, L. Rasumusson, A. Wennerberg, P. Thomsen, J. M Hirsch, B. Nilsson, and J. Hong, "The role of whole blood in thrombin generation in contact with various titanium surfaces", Biomaterials, 28 (2007) 966 ~ 974.
19. A. Forst, K. B. Jonsson, P. Ridefelt, O. Nilsson, S. Ljunghall, and Ö. Ljunggren, "Thrombin, but not bradykinin, stimulates proliferation in isolated human osteoblasts, via a mechanism not dependent on endogenous prostaglandin formation", Acta Orthopaedica Scandinavica, 70 (1999) 497 ~ 503.
20. C. N. Pagel, M. R. de Niese, L. A. Abraham, C. Chinni, S. J. Song, and R. N. Pike, "Inhibition of osteoblast apoptosis by thrombin", Bone, 33 (2003) 733 ~ 743.
21. 何敏夫, in: "血液學", 合記出版社, 臺灣, 台北, 2002 年, 第 857 頁。
22. P. Yang, N. Huang, J. Y. Leng, J. Y. Chen, H. Sun, G. J. Wang, and G. J. Wan, "Inhibition of adherent platelet activation produced by Ti-O thin film fabricated by PIII", Surface & Coatings Technology, 186 (2004) 265 ~ 269.

收到日期：2007 年 8 月 20 日

修訂日期：2007 年 11 月 27 日

接受日期：2008 年 3 月 4 日

