

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

生醫合金成份表面性質對巨噬細胞生物功能影響之研究

The study of properties of slags in plasma and induction melting of low level radio active nuclear waste

計畫編號：NSC -89-2213-E-002-129

執行期限：89 年 08 月 01 日至 90 年 10 月 31 日

主持人：連雙喜 臺灣大學材料科學與工程學系

共同主持人：

計畫參與人員：陳裕鴻 臺灣大學材料科學與工程學系

一、摘要

生醫材料 CoCrMo 合金為常用之骨骼移植材料。但其磨耗所產生的碎屑極可能有引起骨質疏鬆的問題，必須設法改善。本實驗室自行嘗試利用高壓感應熔煉及精煉法加氮製成成份相當於 F-67 高氮的 CoCrMoN 合金，以提高其耐磨性[1]及強度，並以有別於傳統放電加工之電解加工方式來加工熔煉的合金鑄錠，但對其生物相容性未作探討。本研究將針對此新合金有關生物相容性作一初步探討。此實驗包含兩個不同層面：(1)生物相容性方面，探討巨噬細胞對商用 F-67 合金和熱處理 CoCrMo 的影響；(2)腐蝕方面，利用動態極化比較 F-67、F-75 及熱處理 CoCrMo 的腐蝕電流和腐蝕電位。實驗中將 J774 細胞與合金培養在一起，並且採用細胞培養盤材質作為控制組，再利用錐蟲藍排除法和 7-AAD 螢光染色方法來測試細胞存活率。結果發現，本實驗所熔煉出來的 CoCrMo 合金和 F-67 都有不錯的生物相容性。腐蝕方面，以所收集的細胞培養液當作腐蝕溶液，比較其腐蝕電流，結果發現：經過 24 小時培養後的細胞培養液會使 CoCrMo 的腐蝕電流些微增加。而經過鍛造熱處理的 CoCrMo 合金抗腐蝕性比雖然比 F-67 差卻比 F-75 佳，F-75 為 $7 \times 10^{-4} (A/cm^2)$ ，F-67 為 $9.2 \times 10^{-4} (A/cm^2)$ 。而經過氮化處理的 CoCrMo 其抗腐蝕性卻比沒有經過氮化處理的差，加氮 CoCrMo 為 $4.3 \times 10^{-4} (A/cm^2)$ ，未加氮 CoCrMo 為 $1.7 \times 10^{-4} (A/cm^2)$ 。實驗結果顯示，由本實驗室所熔煉之 CoCrMo 不論在生物相容性方面或材料性質方面，均和商用 F-67 相似。

關鍵詞：CoCrMo、發炎反應、鼠巨噬細胞

Abstract

Co-Cr-Mo alloy is one of most common used implant alloy, but the wear debris produced from the implants is considered as the main

cause of Osteolysis. It is therefore needed to improve this problem. A low carbon Co-Cr-Mo-N alloys with different compositions of nitrogen content were hence to developed and melted with a high-pressure induction furnace. The alloys melt were then cast into a water-cooled copper mould. Samples were taken from the solidified ingots and machined with electro chemical machining. Their mechanical properties were tested. The resulting alloy had shown good strength as well as wear resistance. However, even though the alloy possessed good wear resistance, it may have different roughness due to variety of machining & polishing. Both the wear resistance and roughness of high nitrogen Co-Cr-Mo-N as cast alloys were closely related to the tissue reaction and performance of eventual fabricated orthopedic implant parts. It is therefore necessary to have a study on the biological response of these new alloys with different roughness.

A sample of the resulting alloy was first put into a cell culture reactor filled with Raw 264.7 cultured cells and LPS activator to evaluate the release of NO oxide, IL-1 β TNF- α .

The effect of surface morphology of alloys with different nitrogen contents on the production of NO, TNF- α and IL-1 α by Raw264.7 Cells in Response to 1 μ g/ml LPS treatment was examined.

The results show that the nitrogen content of Co-Cr-Mo-N alloys has no obvious effects on the production of NO oxide, IL-1 (α) TNF-α. Although the smooth surface has less macrophages adhered on the surface but more toxic product will be released.

二、緣由與目的

由於台灣已經邁入高齡化社會，生醫材料所製造之人工臟器及植入物之需求日漸增加，而這些材料之製作技術，屬於高科技技術，目前國內市場幾乎全為國外廠商所壟斷。即使一些技術較低層次但較常用之材料尚須仰賴國外進口，例如：人工水晶體，骨釘骨板。其中最主要的原因為一種新的生醫材料，要植入人體時除了材料性質外，尚必須經過層層的生物測試甚至動物實驗後，才能使用於人體，以避免和人體組織產生嚴重的反應甚至造成組織的壞死。美國的國家衛生研究院(National Institute of Health, USA; 簡稱 NIH)指出生醫材料，應符合幾點要求：(1)生物相容性2生物力學相容性(3)生物黏合性。因此本實驗除了材料性質實驗外，也對生物相容性做一系列測試，以評估未來植入人體的可行性。

在材料的加工方面，鑑於傳統所使用之放電加工法不但耗時耗力，且在加工過程中因高溫而可能殘留熱應力，進而改變材料的表面性質，因此，本實驗採用了放電加工法，以二手銑床改裝為自製電解加工機來做材料加工之用。

巨噬細胞是人類單核吞噬細胞系統中的一種，具有吞噬病原菌、趨化作用、抗原呈現、分泌酵素及細胞激素等物質及抑制腫瘤細胞生長[3]。將生醫材料植入動物體內時，動物體內會引發一連串由化學和細胞變化的排斥作用造成發炎反應，發炎反應過程中，巨噬細胞會產生大量的化學物質和細胞激素等強烈氧化劑，例如： H_2O_2 、NO、 O_2^- 等，會加速材料的腐蝕速率。因此為了避免細胞接觸合金表面，加速其發炎反應，可利用 collagen 披覆在合金表面上，以期減少其反應。巨噬細胞在執行功能前，往往由細胞激素、生長因子等讓其處於“活化”狀態。其中被研究最清楚的當屬細菌內毒素。內毒素(endotoxin 或稱 lipopolysaccharide; 簡稱 LPS)是革蘭氏陰性細菌細胞膜之主要成分，屬於醣脂質(glycolipid)，其分子之 lipid A 部分是造成內毒素之生物毒性的主要成分。因此本實驗利用錐蟲藍排除法[4]和 7-ADD (7-amino actinomycin) 螢光染色法[5]來觀察細胞在有、無發炎狀況和有、無 collagen 保護和不同合金情況下其細胞的存活率，並利用 Giemsa 染色觀察細胞的外觀。存活的細胞均有排除蟲藍的能力，但是死細胞因缺乏此種能力而會被染成藍色，則可使用光學顯微鏡分辨：

細胞存活率=活細胞數目/總細胞數目 $\times 100\%$

7-ADD 可分析細胞膜完整性，當細胞膜被破壞時，7-ADD 就會嵌入細胞核，細胞核就會呈現紅色，而螢光染色法，則是利用流式細胞儀來分析，流式細胞儀則可以很精準及快速的分析一大群細胞：

細胞死亡率=死細胞數目/總細胞數目 $\times 100\%$

因此本實驗先粗略利用錐蟲藍排除法計算細胞存活率，再以精密的流式細胞儀來當作左證，以期實驗的正確性和完整性。當材料的實驗組的細胞存活率和控制組沒有顯著差異時，稱此材料具有不錯的生物相容性。

在腐蝕實驗方面，利用動態極化分析往兩個方面探討，第一，利用 LPS 模擬細胞發炎反應使其產生化學物質，看這些化學物質是否會加速合金的腐蝕反應。第二，探討經過熱處理和氮化的 CoCrMo 的抗腐蝕性是否會比 F-75 佳。

三、材料與方法

3.1 細胞株培養狀態

J774(鼠巨噬細胞)係得自 ATCC(American Type Culture Collection)。細胞株培養於 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)培養液(添加 10% FCS, 100 U/ml 青黴素, 100 g/ml)，置於充填含 5% 二氧化碳空氣潮濕培養箱中，在 37℃ 下培養。將滅菌過的合金放置於 24 孔的培養盤中，以 1.5×10^5 細胞/ml 的密度種於合金上，待細胞經 2 個小時後黏貼於合金表面後，加入 LPS 刺激。再將 24 孔的培養盤放入培養箱中培養。

3.2 Collagen 披覆

將滅菌過的試片放置入 24 孔培養盤內含有 45 g/ml collagen，放置 4℃ 冰箱中使其隔夜。待實驗前，置於 lamina flow 中 2-3 小時，吹乾合金表面的 collagen。

3.3 錐蟲藍排除法

經過 24 小時後，利用培養液輕輕的把細胞從合金表面上沖下來，取 50 μ l 的細胞懸浮液混合等量之 0.4% 錐蟲藍染色溶劑(溶於 PBS)，並擴散至 Neubaur 式血球計數器中於倒立顯微鏡下觀察計算。

3.4 7-AAD 螢光染色法

經過 24 小時後，先將上清液輕輕抽取掉，在以 PBS 沖洗兩次，再把細胞從合金表面上沖下來，離心 1200 rpm、3 分鐘，再將樣本至於冰上並加入 500 μ l PBS 最後加入 1mg/ml 5 μ l 7-AAD，讓其反應 10 分鐘。將全部液體(內含細胞)通過 Spectra/Mesh Nylon Filters (Spectrum, USA)以防止細胞聚集，以流式細胞儀(flow cytometry)測定細胞之螢光強度。

3.5 Cytospin 及 Giemsa 染色法

把經過 24 小時培養後的細胞輕沖下來，將細

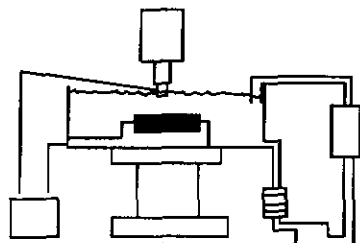
胞調整至 1×10^5 cells/ml 的濃度後，將細胞懸浮液 100 μ l 經細胞離心打片機(Cytospin 3; Shandon Scientific Limited, Pittsburgh, PA)打再玻片上，在顯微鏡下確認其密度為適中後，將玻片上細胞以甲醇固定 5 至 7 分鐘，風乾 10 至 15 分鐘，再以 Giemsa 染劑(Sigma)稀釋水溶液(1:20)浸染 60 分鐘後，以三次水清洗 10 次，風乾並以數位影像處理系統擷取影像。

3.6 動態電位極化掃描分析

所用的儀器為 EG&G 的 263A，並利用 GPIB 介面連接個人電腦，並由 M352 軟體控制各項掃描參數，263A 的另一端則是連接待測的 Cell 裝置。實驗條件為掃描速率 1 mV/s，掃描範圍從開路電位(Open Circuit Potential)以下 350mV (水解反應的產生)掃至 1600mV。其待測溶液為細胞經過 24 小時後的培養液。無 LPS 刺激作為控制組，有 LPS 刺激作為實驗組。待測試片有 F-67、F-75、鍛造熱處理 CoCrMo 其樣品分退火 4、6、8 小時，氮化樣品有 0 ppm、2880 ppm。

3.7 電解加工法

以二手之直立式銑床加上電解槽及電極改裝為電解加工系統，其示意圖如下：



電解加工係利用金屬在電解液中的電化學溶解(陽極溶解)將工件加工成形，在圖中，黑色部分為工件(陽極)，在其正上方者為電極(陰極)，其中，陽極的電化學反應為 $M + OH = MOH$ ，而陰極之化學反應為 $2H^+ = H_2$ 。此方法可加工任何金屬材料，尤其對於硬度及耐磨耗性都很高的 CoCrMo 合金而言，相當合適。

3.8 統計分析

結果以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ (standard error of the mean) 表示。數據以 ANOVA 分析後，以 Fisher's least significant difference (LSD) test 進行多重比較，並以取 P 值小於 0.05。

四、結果

生醫材料在植入人體之後，與血液及體液及組織直接接觸的地方正是材料表面，因此，本實驗將 J774 細胞種於材料表面上，經過 24 小時後利用錐蟲藍排除法和 7-AAD 螢光染色法分別計算細胞存活率和細胞死亡率。實驗結果(圖一)顯示：在錐蟲藍排除法方法下商用 F-67 或者鍛造熱處理 CoCrMo 之

細胞存活率和控制組之間沒有顯著的差異。然而再有 LPS 加入下，細胞存活率會明顯的降低，如果有 collagen 保護則會提高細胞存活率。為了更精確證實錐蟲藍排除法實驗，利用 7-ADD 對細胞進行螢光染色，在使用流式細胞儀來進行分析螢光亮度。實驗結果(圖二)，較高波峰區域螢光強度微弱，定義為正常的細胞即是活的細胞，M1 區域由於細胞膜遭破壞造成 7-ADD 嵌入細胞核，使得其螢光強度遠大於正常細胞，因此定義為死亡的細胞。圖三為圖二經過計算和統計分析所得到的圖表。由此圖可得知，細胞培養在合金在沒有加入 LPS 情況，不論是 F-67 或 CoCrMo 其細胞死亡率和控制組相比有顯著差異，但是彼此間沒有差異；而在有 LPS 的情況下，其細胞死亡率又有更顯著的增加。這個結果顯示，不論細胞培養在如商用 F-67 這麼好的生物相容性合金上，多多少少都會造成細胞的毒殺作用對細胞的死亡有加成的作用。而由(圖四)再次證實 collagen 的披覆能夠保護細胞。在定性上，利用 giemsa 染色法觀察細胞培養在鍛造熱處理 CoCrMo 上經過 24 小時外觀上的變化(圖五)。實驗結果顯示培養在合金上的細胞和控制組其外觀沒有差別。但是在有 LPS 刺激下細胞內部有許多液泡的產生，如果以 collagen 披覆在合金上則可明顯的減少液泡的產生。根據實驗結果，可得知由實驗室所熔煉之 CoCrMo 生醫材料合金之生物相容性均可和 F-67 比擬。腐蝕實驗方面，經由動態電位極化掃描的結果顯示(圖六)可以得知細胞培養在合金上經由 LPS 刺激的培養液些微的影響到 CoCrMo 的腐蝕電流。經過計算得到腐蝕電流(表一)。(圖七)顯示：經過鍛造熱處理的 CoCrMo 其腐蝕電流比 F-67 差但是卻比鑄造 F-75 來的好經過計算得到腐蝕電流(表二)。(圖八)顯示：鍛造 CoCrMo 經過加氮處理其腐蝕電流比未加氮處理來的差。經過計算得到腐蝕電流(表三)。

五、討論

當植入體植入人體時，會與人體內細胞及體液接觸，而細胞就會黏附在植入體表面，而植入體的表面這時就具有相當的影響力。文獻指出，當生醫材料植入人體時，骨母細胞及纖維細胞會再生醫材料表面上行成一層纖維細胞膜，經過長時間使用，會使得生醫材料的性質及表面發生變化及毀壞的現象，最後導致植入的生醫材料失效[6]。由本實驗室所自行熔煉加工 CoCrMo，利用錐蟲藍染色法、7-AAD 及 giemsa 染色進行細胞培養相關實驗，結果可以得知，細胞培養在其表面上經過 24 小時後其存活率和商用 F-67 相比，沒有顯著的差異。因此可以得證鍛造熱處理 CoCrMo 和 F-67 具有同等的生物相容性。

當細胞培養在合金表面上經 LPS 刺激後，發現細胞存活率明顯的下降，細胞培養在材料表面上或在 LPS 刺激下，其存活率都相當的高，但是培養在

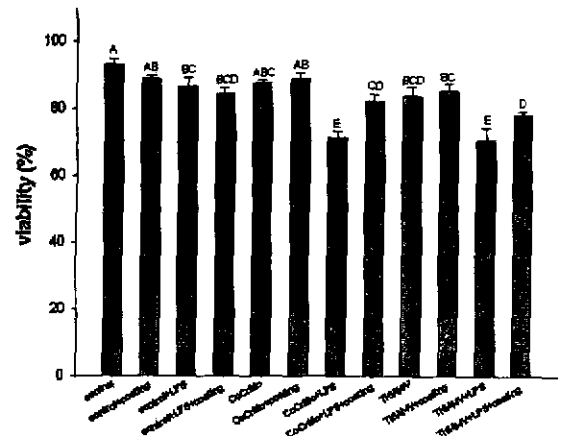
一起時就會對細胞毒殺造成加成的作用。為了探討是哪一方所造成的影響較大，因此，在材料表面上披覆 collagen，重複實驗。結果顯示出，細胞培養在經過披覆 collagen 的材料表面上，再加上 LPS 的刺激，其細胞存活率也是相當地高。因此，我們可以得到會對細胞造成毒殺作用的主因是因為材料表面。至於材料表面會有這種影響，其原因就不得而知了。當材料再臨床應用時，其表面會披覆一層 HA(hydroxyapatite)，HA 是一種含鈣物質可與骨骼產生化學鍵，使材料和組織緊密的結合，因此能穩定材料在人體內的穩定性。會利用 HA 披覆在材料上，其考慮點是在於就是可以使骨頭順利在材料表面上生長。而從本實驗的結果，可以得到另一個不同方向的思考，即是當人體內有發炎反應產生時，披覆一層物質可以保護細胞不因為材料表面而對其造成死亡。

在腐蝕實驗方面，以細胞培養在合金表面經 LPS 刺激 24 小時後的培養液當作腐蝕液，可得知細胞所分泌的化學物質會使材料的腐蝕電流上升，此結果表示當材料植入人體時，當發炎作用產生時會使得材料加速腐蝕。由一些文獻可得知，細胞在發炎反應時，會分泌強的氧化劑，例如：超氧化物、過氧化氫、一氧化氮等。因此，當材料植入人體時，避免這種情形發生，實是一個重要的話題。

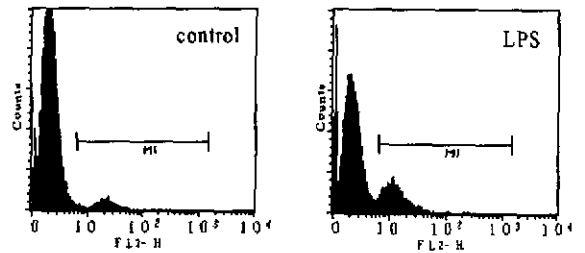
在鍛造熱處理 CoCrMo 腐蝕結果顯示，經過熱處理 CoCrMo 其腐蝕電流密度小於鑄造 F-75，而結果顯示出熱處理時間越長，其腐蝕電流也越低。而在加氮方面，含氮量越高，腐蝕電流密度越高。會造成此種原因，最主要是熱處理和氮化對晶粒影響所造成的；晶界多的化，大部分析出物都會在其析出，而材料晶界本身也是屬於一種缺陷，而這些都會影響到材料的腐蝕。其他文獻也指出：含碳量或含氮量高的合金，會減低其抗腐蝕效應[7]。

六、結論

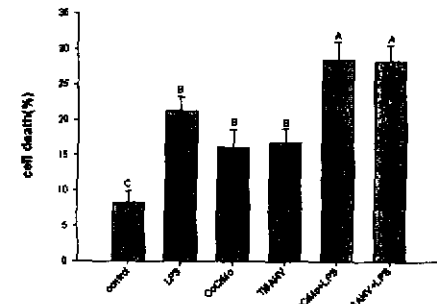
經由實驗室所熔煉之鍛造熱處理 CoCrMo 合金，經過生物相容性和腐蝕實驗後，發現，鍛造熱處理 CoCrMo 和商用生醫材料具有同等的生物相容性。而其更加增加 F-75 的抗腐蝕作用。雖然含帶量增加會減少其耐腐蝕，因此再耐磨和腐蝕之間必須作一定的取捨，以求達到理想的設計。



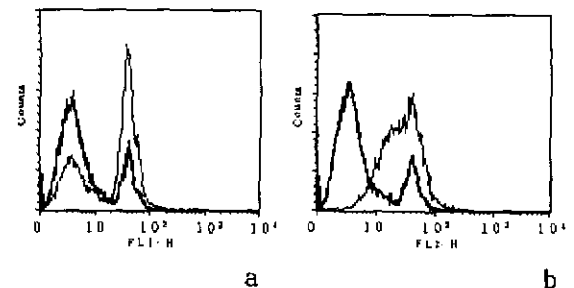
(圖一) 不同條件下細胞存活率之比較



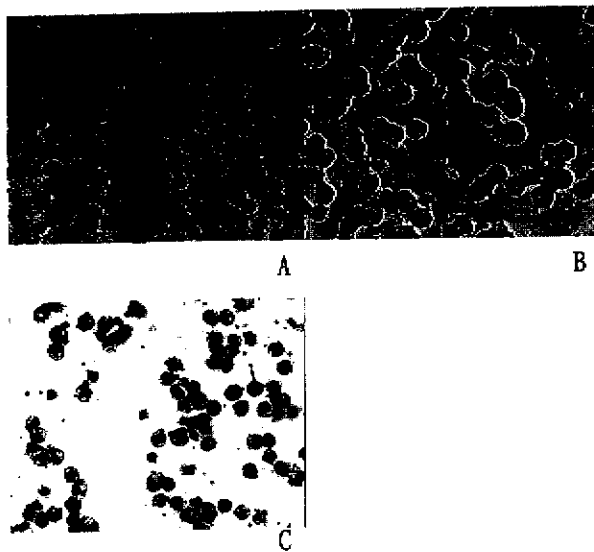
(圖二) 流式細胞儀所得到不同條件下之螢光強度



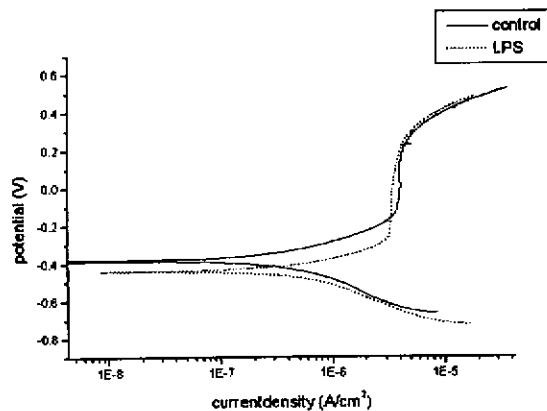
(圖三) 經由流式細胞儀所分析之資料以統計軟體分析作圖之結果



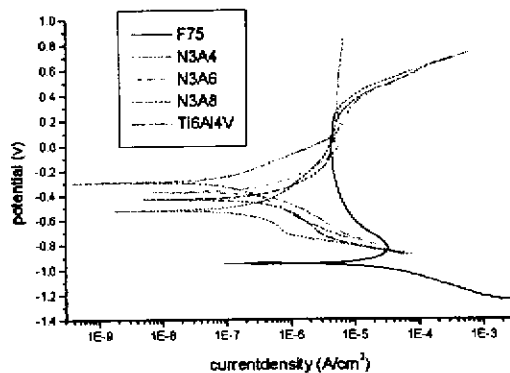
(圖四) 圖 a 表示 Ti6Al4V 有無披覆對細胞的螢光影響，細線表示無 collagen 披覆，粗線則有。圖 b 則為 CoCrMo



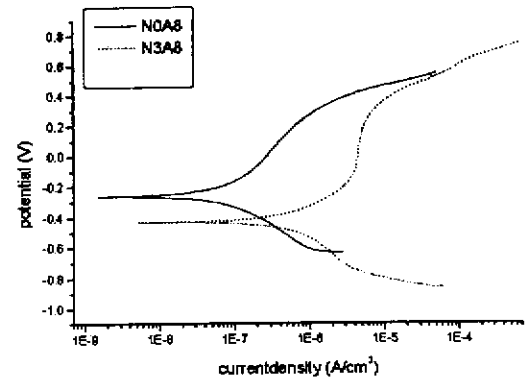
(圖五)Giemsa 染色。圖 A 為控制組。圖 B 為細胞培養於 CoCrMo 合金上並以 LPS 刺激。圖 C 為細胞培養於經過披覆處理的 CoCrMo 合金上並以 LPS 刺激



(圖六)動態極化掃描分析圖，實線代表沒有 LPS 處理；虛線代表有 LPS 處理



(圖七) 動態極化掃描分析圖，不同時間熱處理 CoCrMo 對 F-67 和 F-75 的比較



(圖八) 動態極化掃描分析圖，虛線代表含氮量 2880 ppm，實線代表含氮量 0 ppm。

	腐蝕電流(A/cm²)
Control	6.5×10^{-6}
LPS	6×10^{-6}

表一

	腐蝕電流(A/cm²)
N0A8	1.7×10^{-7}
N3A8	4.3×10^{-8}

表二

	腐蝕電流(A/cm²)
F-75	7×10^{-4}
N3A4	7.3×10^{-6}
N3A6	3.6×10^{-6}
N3A8	4×10^{-6}
Ti6Al4V	9.2×10^{-8}

表三

七、參考文獻

- [1] 許獻中：鍛造高氮鈷鉻鉍生醫合金磨耗性質研究，台灣大學，碩士論文，2000。
- [2] Tang, L. and Eaton, J.W. (1995). Inflammatory responses to biomaterials. American Journal of Clinical Pathology 103, 466-471.
- [3] Territo, M.C. and Cline, M.J. (1997). Monocyte function in man. Journal of Immunology 118, 187-192.
- [4] Sylvie I. Ertel, Buddy D. (1994). Journal of Biomedical Materials Research 28, 667-675.
- [5] 楊撫華，醫學細胞生物學概論，成都：四川科學技術出版社，1991：22
- [6] An, Y.H. and Friedman, R.J. (1998). Animal models of orthopedic implant infection. Journal of Investigative Surgery 11, 139-146.
- [7] Z. Paszenda and J. Marciniak (1998). The influence of base structure resistance of

Co-Cr-Mo alloy. Journal of Materials
Processing Technology 78,143-149.