

國立臺灣大學工學院材料科學與工程學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Material Science and Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

細胞於二元自組裝單層膜修飾之玻璃表面之貼附與生長行為

Cell Adhesion and Proliferation on Binary  
Self-Assembled Monolayers Modified Glass

郭育廷

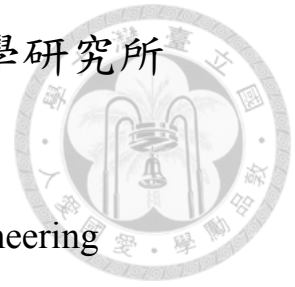
Yu-Ting Kuo

指導教授：薛景中博士

Advisor: Jing-Jong Shyue, Ph.D.

中華民國103年7月

July, 2014

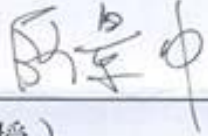


# 國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

論文中文題目：細胞於二元自組裝單層膜修飾之玻璃  
表面之貼附與生長行為

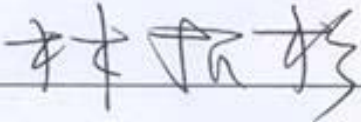
論文英文題目：Cell Adhesion and Proliferation on  
Binary Self-Assembled Monolayers  
Modified Glass

本論文係郭育廷(R01527011)在國立臺灣大學材料科學  
與工程學系、所完成之碩士學位論文，於民國 103 年 7 月 24  
日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：薛景中   
(指導教授)

虞邦英 

康佳正 

系主任、所長 林招松  (簽名)

## 致謝



這大概是整本最難寫的部分，要感謝的人實在太多了，不知從何開始。

謝謝老大，總是有問必答、知無不言言無不盡，從老大身上學到了很多課業相關的以及其他領域方面的知識，老大真的懂很多東西，只要吃頓午餐都能獲得新知。

謝謝口委們，在口試當天給我的建議與指教。

謝謝熊爺，認真細心地教我養細胞，以及替我解答在實驗過程中、poster 以及寫論文時遇到的種種難題。

謝謝芝潔，帶我進入 Shyue Lab 這個大家庭，以及實驗與論文中的經驗傳承，還有即使遠在美國，也不時聽我 murmur 與求救。

謝謝廖爸爸、麥哥、小岡和偉倫，在 SEM 方面給我的指導與建議，雖然到最後我還是個 SEM 菜鳥。

謝謝偉倫，在 ACS 發揮專業 HR 的能力與精神，認識了帥哥和正妹。

謝謝丁丁，在我苦悶的時候陪我喝酒，讓我傾倒垃圾，以及忍受任性幼稚的我，陪我一起打鬧。

謝謝鈞浩，不時分享 ptt 上好笑的文章和影片，以及在我口試的時候特地趕回來睡午覺(咦?)。

謝謝 AD，口試期間的幫忙，以及最重要的午餐。

謝謝香香，扮演實驗室的開心果，讓我在碩二苦悶時還能開懷大笑，雖然有時候會吵到我睡午覺。

謝謝好庭，妳是最好的酒友以及談心的對象。

謝謝阿寶，陪我看了好幾年的柯南。

謝謝學生們，一直被我嗆，當我的出氣筒，真是難為你們了，但我還是很愛你們的。

謝謝所有借我玩手機的人，有點多人就不一一列舉了。

謝謝老爸老媽，沒有你們就沒有我。

謝謝老哥，不時跟我分享遊戲。

謝謝麥德姆，在我口試前一天放颱風假。

謝謝所有曾幫助過我，但被我遺忘的人們。

謝謝老天，讓我順利的活著。



## 摘要



隨著醫學的發展與需求，細胞於人造表面的貼附生長行為研究也愈來愈受到重視，而細胞貼附行為更是許多細胞行為的基礎，如細胞的能動性、生長與分裂。而人造表面的表面性質則是影響細胞貼附行為的重要因素之一。相較於其他常用於細胞研究的人造表面，如聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、纖維，自組裝單層膜 (SAMs) 能更精準的調控表面組成，進而調控表面性質。

為了提高表面改質的彈性，本研究採用兩種官能基混合修飾的玻璃基材的自組裝單層膜系統。選用的自組裝單層膜分子為 3-氨基丙三甲羥矽烷和 3-巰基丙基-三甲羥矽烷。在 pH 7.4 的環境下，將兩種分子以不同比例混合修飾玻璃表面，能得到一系列表面電位介於 24 mV 和 -155 mV 之間的面，並以此探討表面電位對於細胞行為的影響。

研究中使用 X 光光電子光譜儀 (XPS) 量測自組裝單層膜表面的化學組成，並由文獻得知其表面電位。另外以光學顯微鏡、螢光顯微鏡以及掃描式電子顯微鏡觀察小鼠胚胎纖維細胞株 NIH3T3 在各個混合比例的自組裝單層膜上的貼附與生長行為，包含貼附量、生長量、生長速率以及細胞形貌。研究發現，由於細胞表面整體帶負電性，基材表面上  $\text{NH}_2$  官能基比例愈多，表面電位愈正，細胞的貼附量較多，細胞形狀較健康；反之，基材表面上  $\text{NH}_2$  官能基比例愈少，表面電位愈負，細胞的貼附量較少，細胞生長情況較差。而生長速率則主要受接觸抑制特性影響，表面電位對其影響不大。

關鍵字：細胞貼附、細胞生長、自組裝單層膜、混合官能基、表面電位

# Abstract



With the development of medicine, cell behaviors on artificial surface have gained attention among researchers. Cell adhesion is central to many cell behaviors including motility, survival and differentiation. Surface properties of artificial surface are known to be one of the key factors in cell adhesion. Compared with other artificial surface usually used in cell research such as polystyrene, PMMA, and fiber, self-assembled monolayers are known for its excellent ability to modify surface.

To acquire better control of surface properties, mixed functional groups of silanes are introduced to glass surface. In this study, different ratio of 3-aminopropyltrimethoxysilane and 3-mercaptopropyltrimethoxysilane are applied to glass substrate, surfaces with a series of zeta potentials from +24 to -155 mV at pH 7.4 are obtained.

The surface chemical composition of binary SAMs is quantified using x-ray photoelectron spectroscopy, while that of zeta potential can be found in reference. NIH3T3 cells are chosen to culture on these binary-SAM modified glass and incubated for several different time periods. The population density, proliferation rate and shape of cells adhered on surfaces of various potentials are examined using optical microscope, fluorescence microscope and scanning electron

microscope. The results showed that surface with higher positive potential promotes cell adhesion and proliferation. On the contrary, more negative the zeta potential is, worse the cells adhere and grow. And zeta potential have little effect on proliferation rate.

Keyword: Cell adhesion, cell proliferation, self-assembled monolayers, mixed functional groups, surface potential, zeta potential

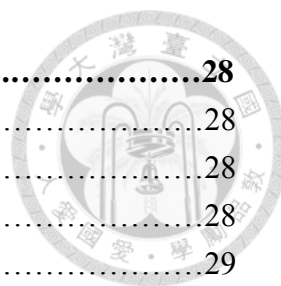
# 目錄



審定書.....	I
致謝.....	II
摘要.....	IV
Abstract.....	V
目錄.....	VII
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XI
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1. 細胞貼附生長與人工表面.....	3
2.1.1. 細胞外基質與細胞貼附生長.....	3
2.1.2. 常見人造表面.....	4
2.1.3. ECM 對細胞貼附生長的影響.....	5
2.2. 自組裝單層膜 (SAMs) 簡介.....	7
2.3. 自組裝單層膜 (SAMs) 應用.....	9
2.3.1. 靜電吸附.....	9
2.3.2. 選擇性沉積.....	9
2.3.3. 選擇性靜電吸附.....	10
2.4. 以 SAMs 研究細胞貼附行為.....	11
2.5. 二元自組裝單層膜.....	14
2.5.1. SAMs 之成長速度與機制.....	14
2.5.2. SAMs 的均勻度.....	16
2.5.3. 調控表面電位與偶極.....	17
2.6. 二元自組裝單層膜與生物系統之交互作用.....	20
第三章 實驗.....	23
3.1. 實驗藥品.....	23
3.1.1. 試片製備.....	23
3.1.2. 細胞培養.....	23
3.1.3. 細胞染色.....	23
3.1.4. 細胞固定.....	24
3.2. 儀器簡介及原理.....	25
3.2.1. X 光光電子光譜儀 (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) .....	25
3.2.2. 倒立螢光顯微鏡.....	25
3.2.3. 超臨界流體乾燥機.....	26
3.2.4. 掃描式電子顯微鏡.....	26



<b>3.3. 實驗步驟.....</b>	<b>28</b>
3.3.1. 二元自組裝單層膜製備.....	28
3.3.2. 表面官能基比例測定.....	28
3.3.3. 細胞培養.....	28
3.3.4. 細胞染色.....	29
3.3.4.1. 細胞膜螢光染劑純化.....	29
3.3.4.2. 細胞染色.....	29
3.3.5. 細胞固定術、超臨界流體乾燥與電子顯微鏡影像拍攝.....	29
<b>第四章 結果討論.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. 表面官能基比例.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2. 表面電位對細胞貼附、生長的影響.....</b>	<b>32</b>
4.2.1. 表面電位對細胞貼附量的影響.....	32
4.2.2. 表面電位對細胞生長的影響.....	33
4.2.3. 細胞密度對細胞貼附、生長的影響.....	35
<b>4.3. 表面電位對細胞形貌的影響.....</b>	<b>38</b>
4.3.1. 以光學顯微鏡觀察表面電位對細胞形貌造成的影響.....	38
4.3.2. 以螢光顯微鏡觀察表面電位對細胞形貌的影響.....	41
4.3.3. 以掃描式電子顯微鏡觀察表面電位對細胞形貌的影響.....	45
<b>第五章 結論.....</b>	<b>52</b>
<b>第六章 參考文獻.....</b>	<b>53</b>





## 圖目錄

圖 2.1-1. 細胞間連結以及細胞與 ECM 連結之示意圖[2]。.....	4
圖 2.1-2. 表面分子均勻度對細胞貼附行為的影響，為共焦螢光顯微鏡影像，紅色為 ECM 區域，綠色為貼附之細胞，右下角為 ECM 區域的間距，比例尺為 10 $\mu\text{m}$ [7]。.....	6
圖 2.2-1. 自組裝單層膜之結構示意圖。.....	8
圖 2.4-1. 接觸角與細胞貼附量、生長量之關係圖[27]。.....	11
圖 2.4-2. 培養 2 小時後之人類纖維細胞貼附比例關係圖[26]。.....	12
圖 2.4-3. 人類纖維細胞展開的面積，■為培養 45 分鐘，□為培養 2 小時[26]。.....	12
圖 2.4-4. 具有圖案的表面，細胞貼附生長的光學影像[30]。.....	13
圖 2.5-1. SAMs 在金基材上之成長機制[10]。.....	14
圖 2.5-2. ZnO 基材浸泡在混合 SAMs 溶液 2.5 小時後的表面組成以及矽的原子百分比[28]。.....	15
圖 2.5-3. $\text{NH}_2$ 尾基的自催化機制[28]。.....	16
圖 2.5-4. 混合官能基 SAMs 之 SEPM 圖，掃描範圍分別為(a) 2560 nm (b) 256 nm[10]。.....	17
圖 2.5-5. 官能基混合比例與表面電位關係圖[44]。.....	18
圖 2.5-6. 經不同比例 SAMs 修飾後矽基材之 zeta potential 對 pH 值關係圖[29]。.....	18
圖 2.5-7. 混合官能基修飾之矽基材之表面組成與功函數關係圖[43]。.....	19
圖 2.6-1. 接觸角對細胞貼附量的關係圖。○為 HUVECs，●為 HeLa cells [19]。.....	20
圖 2.6-2. 官能基混合比例與血小板貼附量關係圖[44]。.....	21
圖 2.6-3. 培養 4 小時與 24 小時後，試片表面的細胞密度，原始密度為 $5 \times 10^4$ (cells/cm <sup>2</sup> )[45]。.....	22
圖 3.1-1. DiO 激發與發射光譜[31]。.....	24
圖 3.1-2. Hoechst33342 激發與發射光譜[32]。.....	24
圖 3.2-1. 螢光顯微鏡基本原理[33]。.....	26
圖 4.2-1. 培養 4 小時後，細胞貼附密度與 Zeta potential 之關係圖，原始密度為 $4 \times 10^4$ (cells/cm <sup>2</sup> )。.....	32
圖 4.2-2. 培養不同時間後，細胞貼附密度與 Zeta potential 之關係圖，原始密度為 $4 \times 10^4$ (cells/cm <sup>2</sup> )。.....	34
圖 4.2-3. 培養 4 小時後，比較在不同基材上，細胞貼附密度與 Zeta potential 之關係圖，原始密度為 $5 \times 10^4$ (cells/cm <sup>2</sup> )[45]。.....	37
圖 4.3-1. 0% $\text{NH}_2$ 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 $\mu\text{m}$ 。.....	39
圖 4.3-2. 30% $\text{NH}_2$ 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 $\mu\text{m}$ 。.....	39
圖 4.3-3. 50% $\text{NH}_2$ 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 $\mu\text{m}$ 。.....	40
圖 4.3-4. 70% $\text{NH}_2$ 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 $\mu\text{m}$ 。.....	40
圖 4.3-5. 100% $\text{NH}_2$ 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 $\mu\text{m}$ 。.....	41

圖 4.3-6. 0% NH <sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。	42
圖 4.3-7. 30% NH <sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。	43
圖 4.3-8. 50% NH <sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。	43
圖 4.3-9. 70% NH <sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。	44
圖 4.3-10. 0% NH <sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。	44
圖 4.3-11. 0% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	45
圖 4.3-12. 30% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	46
圖 4.3-13. 50% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	46
圖 4.3-14. 70% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	47
圖 4.3-15. 100% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	47
圖 4.3-16. 0% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	48
圖 4.3-17. 30% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	49
圖 4.3-18. 50% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	49
圖 4.3-19. 70% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	50
圖 4.3-20. 100% NH <sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。	50



## 表目錄

表 2.2-1. 各種自組裝單層膜系統的基材(substrate)與配位體(ligand)[9]。.....	7
表 2.5-1. 兩種 SAMs 分子在溶液中與試片上的比例[29]。.....	15
表 4.1-1. SAMs 製備溶液與 SAMs 試片上實際胺基矽烷比例與對應表面電位 [29]。.....	31
表 4.2-1. 培養 4 小時後，各試片間細胞密度、相對密度、細胞貼附量與原始密度 比較表，原始密度為 $4 \times 10^4$ (cells/cm <sup>2</sup> )。.....	33
表 4.2-2. 培養不同時間後，各試片間細胞密度、細胞相對密度與生長速率比較表， 原始密度為 $4 \times 10^4$ (cells/cm <sup>2</sup> )。.....	34
表 4.2-3. 改變細胞原始密度為 $5 \times 10^4$ cells/cm <sup>2</sup> ，並培養不同時間後，各試片間細胞 密度、細胞相對密度與生長速率比較表。.....	36

# 第一章 緒論



細胞間傳遞訊息的管道有細胞間連結 (cell-cell junction) 或是經由細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM)。細胞的貼附行為會影響細胞間訊息的傳導，同時也是細胞存活、分裂、能動性 (motility) 的基礎。透過傳遞與接收訊息，除了影響細胞代謝與生長的速率，也影響了包含傷口癒合、組織修復等生理反應。而這些行為都建立在細胞貼附行為的基礎上[1—3]。

由於細胞貼附行為的重要性，關於細胞於人造表面的細胞貼附行為的研究也愈來愈受到重視。為了使細胞貼附得更順利，人造表面多會模仿 ECM 的性質，如以蛋白質覆蓋的聚苯乙烯 (polystyrene, PS)、聚氯乙烯 (polyvinylchloride, PVC)、尼龍 (nylon)、聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA)、金屬以及自組裝單層膜 (SAMs)。其中自組裝單層膜為這之中最容易調控表面性質的系統，故被廣泛應用於細胞貼附行為[1—6]。

自組裝單層膜 (self-assembled monolayers, SAMs)，泛指溶液中分子受到材料表面分子的吸引，以化學吸附在材料表面，形成具高規則性的單分子層。其製程簡單，不需昂貴的儀器，在室溫和一大氣壓的環境下即可反應，且生成的單層膜能與基材形成穩定鍵結。

透過 SAMs 調控材料的表面性質，能產生各種不同的應用，如在矽基材上沉積不同厚度的氧化鈮薄膜，或是在矽基材上選擇性沉積鈦酸鋇薄膜，或是在玻璃基材上選擇性沉積金[14, 20—23]。

既然能夠以 SAMs 調控表面性質達到選擇性吸附，於是許多研究團隊開始以 SAMs 做為研究細胞行為的平台。由於金與玻璃的生物相容性較高，因此採用的 SAMs 系統則以硫醇修飾金基材的系統以及矽烷修飾矽或玻璃基



材的系統為主[19, 24—27]。

為了提高 SAMs 對材料表面改質的彈性，許多研究團隊開始將兩種分子混合生長於基材表面。但當溶液中同時含有兩種不同的 SAMs，其成膜的情形會變得相當複雜。文獻中指出，雖然不會有相同分子聚集的現象產生，且能透過調整兩者的比例來微調各種表面性質，但兩種 SAMs 的生長速度會有所不同，使得表面生成的比例與溶液比例並不相同，而須做另外的定量測試 [10, 11, 28, 29]。

本研究中的 SAMs 系統採用不同比例混合的 3-氨基丙三甲羥矽烷與 3-巰基丙基-三甲羥矽烷來微調玻璃基材的表面電位。在 pH 7.4 的環境下，純-NH<sub>2</sub>和純-SH 表面的表面電位差異約為 180 mV，且以不同比例混合後，表面電位與-NH<sub>2</sub>的含量呈正相關。因此本研究將採此系統來探討表面電位對小鼠纖維母細胞 (NIH3T3) 貼附與生長的影響。

## 第二章 文獻回顧



### 2.1. 細胞貼附生長與人工表面

#### 2.1.1. 細胞外基質與細胞貼附生長

生物體內有相當多細胞同時在活動，為了順利運作，細胞間必須相互傳遞訊息。而傳遞訊息的管道有細胞間連結 (cell-cell junction) 或是經由細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM)。為了傳遞訊息，細胞必須先彼此貼附或是貼附在 ECM 上，因此細胞的貼附行為便顯得相當重要[1, 2]。

細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 是細胞與細胞之間物質的統稱，由許多不同蛋白質所組成，如膠原蛋白 (collagen)、纖維蛋白 (fibronectin)、纖維蛋白原 (fibrinogen) 等等，不同的細胞周圍的 ECM 成分會根據需求的不同而有相當大的差距。其主要功能有提供支撐、區隔不同組織、輔助細胞貼附、提供細胞訊息傳導等等[1—3]。

細胞的貼附行為會影響細胞間訊息的傳導，同時也是細胞存活、分裂、能動性 (motility) 的基礎。透過傳遞與接收訊息，除了影響細胞代謝與生長的速率，也影響了包含傷口癒合、組織修復等生理反應。而這些行為都建立在細胞貼附行為的基礎上[1, 2]。

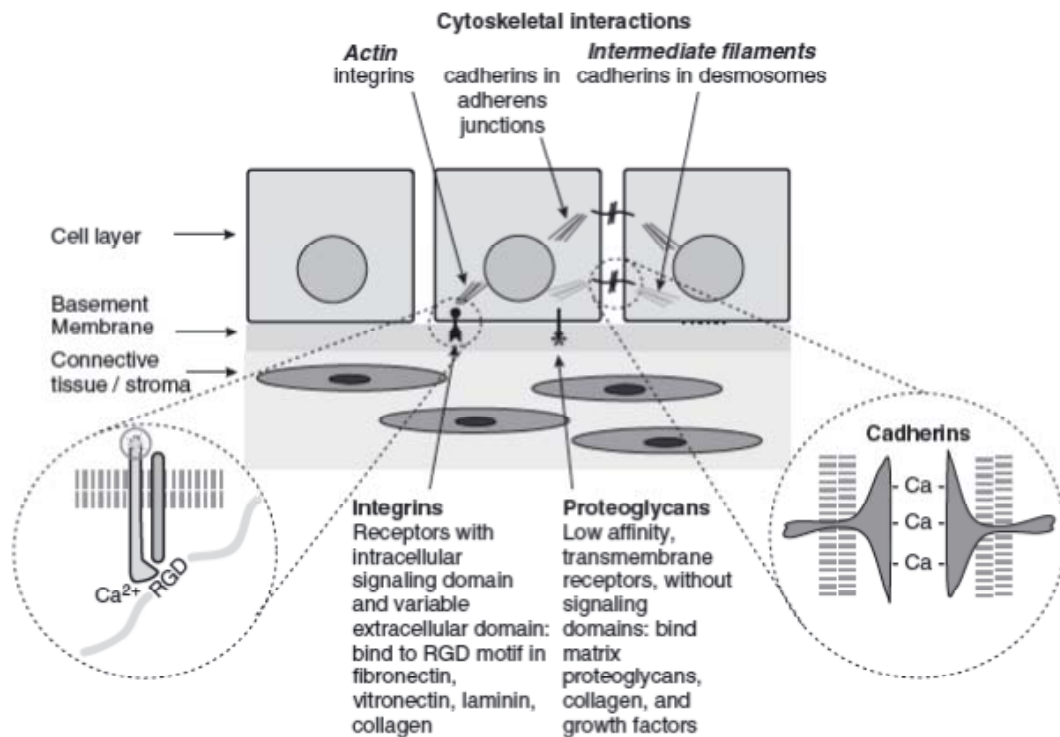


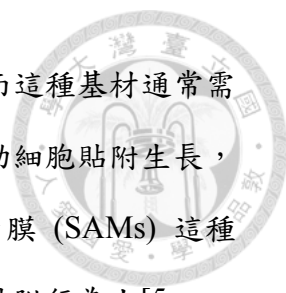
圖 2.1-1 細胞間連結以及細胞與 ECM 連結之示意圖[2]。

### 2.1.2. 常見人造表面

由於細胞貼附行為的重要性，關於細胞於人造表面的細胞貼附行為的研究也愈來愈受到重視。為了使細胞貼附得更順利，人造表面多會模仿 ECM 的性質，如在表面覆蓋纖維蛋白等輔助貼附的蛋白質。若細胞貼附於表面時，表面有輔助貼附的蛋白質，能加速細胞貼附的速率，然而即使沒有這些蛋白質，細胞仍然會貼附在表面，細胞必須先自行分泌輔助貼附的蛋白質，使得貼附的速率較慢[2]。

目前最常使用的人造表面是以蛋白質覆蓋的聚苯乙烯 (polystyrene, PS) 表面，是多數細胞培養盤的材料。除了 PS 之外，聚氯乙烯 (polyvinylchloride, PVC)、尼龍 (nylon)、聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA) 等材料在覆蓋蛋白質之後，都可以當作人造表面。雖然細胞於這種表面的生長情況十分良好，但這種表面無法進一步調控表面性質，因此無法用於研究更細節的細胞行為[1, 2, 4]。





除了高分子之外，亦有人將細胞培養在金屬表面。然而這種基材通常需要在表面覆蓋一層蛋白質或是高分子進行表面改質，以幫助細胞貼附生長，同樣遇到無法進一步調控表面性質的問題。因此自組裝單層膜 (SAMs) 這種能調控表面性質的表面改質方式便逐漸被使用在研究細胞貼附行為上[5, 6]。

### 2.1.3. ECM 對細胞貼附生長的影響

前兩節提到，ECM 會影響貼附，而許多人造表面都會仿 ECM 的性質來幫助細胞貼附。而 Lehnert 等人利用微接觸印刷技術 (microcontact printing,  $\mu$ CP)，在鍍金玻璃片上，長上不同間隔的 ECM，控制 ECM 區域間隔大小來探討表面分子均勻度對細胞行為的影響，其結果如圖 2.1-2 所示。結果顯示，當 ECM 間隔小於  $2\ \mu\text{m}$  時，細胞仍能正常生長；當間隔大於  $10\ \mu\text{m}$  時，細胞的形狀會 ECM 影響而變形；當間隔增加至  $25\ \mu\text{m}$  時，細胞甚至無法順利攤開而成球狀。[7]

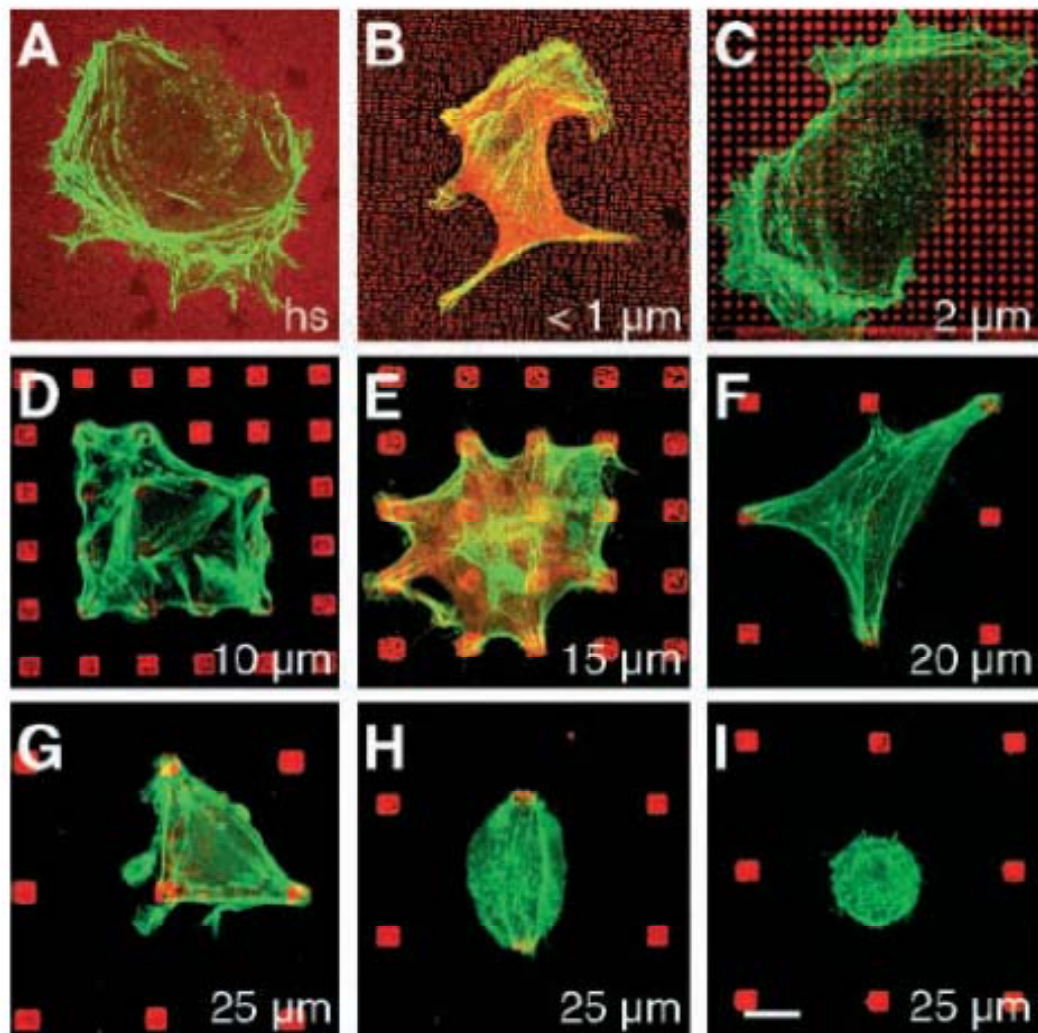


圖 2.1-2 表面分子均勻度對細胞貼附行為的影響，為共焦螢光顯微鏡影像，紅色為 ECM 區域，綠色為貼附之細胞，右下角為 ECM 區域的間距，比例尺為  $10 \mu\text{m}$  [7]。



## 2.2. 自組裝單層膜 (SAMs) 簡介

溶液中分子受到材料表面分子的吸引，以化學吸附在材料表面，形成具高規則性的單分子層即為自組裝單層膜 (SAMs) [36—38]。Zisman 在西元 1946 年發表有關 Eicosyl alcohol ( $C_{20}H_{41}OH$ ) 自動吸附在鉑 (Platinum, Pt) 表面的研究，這是 SAMs 這個名詞首次被提出，但這項技術在當時並沒有被深入的研究[8]。直到 1980 年代左右，才開始出現較多研究團隊加入研究 SAMs 的行列，因此許多不同的自組裝單層膜系統逐漸被發展出來，如表 2.2-1 所示[9]。其中最廣為使用與研究的是烷基硫醇 (alkanethiols) 與金基材之系統 [10, 11, 12]以及矽氧烷 (siloxane) 與矽或玻璃之系統[13, 14]。

表 2.2-1 各種自組裝單層膜系統的基材(substrate)與配位體(ligand)[9]。

Substrate	Ligand or Precursor	Binding
Au	RSH, ArSH (thiols)	RS-Au
Au	RSSR' (disulfides)	RS-Au
Au	RSR' (sulfides)	RS-Au
Au	RSO <sub>2</sub> H	RSO <sub>2</sub> -Au
Au	R <sub>3</sub> P	R <sub>3</sub> P-Au
Ag	RSH, ArSH	RS-Ag
Cu	RSH, ArSH	RS-Cu
Pd	RSH, ArSH	RS-Pd
Pt	RNC	RNC-Pt
GaAs	RSH	RS-GaAs
InP	RSH	RS-InP
SiO <sub>2</sub> , Glass	RSiCl <sub>3</sub> , RSi(OR') <sub>3</sub>	siloxane
Si/Si-H	(RCOO) <sub>2</sub> (neat)	R-Si
Si/Si-H	RCH=CH <sub>2</sub>	RCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -Si
Si/Si-Cl	RLi, RMgX	R-Si
Metal oxides	RCOOH	RCOO <sup>-</sup> ...MO <sub>n</sub>
Metal oxides	RCONHOH	RCONHOH...MO <sub>n</sub>
ZrO <sub>2</sub>	RPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	RPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ...Zr <sup>IV</sup>
In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /SnO <sub>2</sub> (ITO)	RPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	RPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ...M <sup>n+</sup>

SAMs 的結構主要分成三個部份，如圖 2.2-1 所示。第一部分為頭基 (head group)，負責與基材表面的分子產生化學吸附，是生成 SAMs 的關鍵，隨著基材的不同，頭基的選擇也會不同。頭基與基材之間，多為共價鍵結，如：矽烷與矽或玻璃之系統[15]；亦有少部分是離子鍵結，如：有機酸類與金屬氧化物之系統[16]。以上兩種鍵結的鍵結能 (150~400 kJ/mole) 皆足以維持 SAMs 的穩定性，使其不易脫落。

第二部分為飽和碳鏈 (alkane chain)，飽和碳鏈間有微弱的凡得瓦力 (< 5 kJ/mole) 存在，使得碳鏈間互相吸引、排列，形成緊密且整齊的結構，以降低整體的表面能[17, 18]。

第三部分為尾基 (terminal group)，由於位處材料最表層，尾基扮演了調控與修飾材料表面性質的角色。藉由適當選擇不同的尾基，能調整材料表面性質以因應不同的需求。近年來，亦有研究團隊藉由混合不同尾基的分子來調控材料的表面性質，使得 SAMs 系統更加豐富多變[10, 11, 14, 19]。

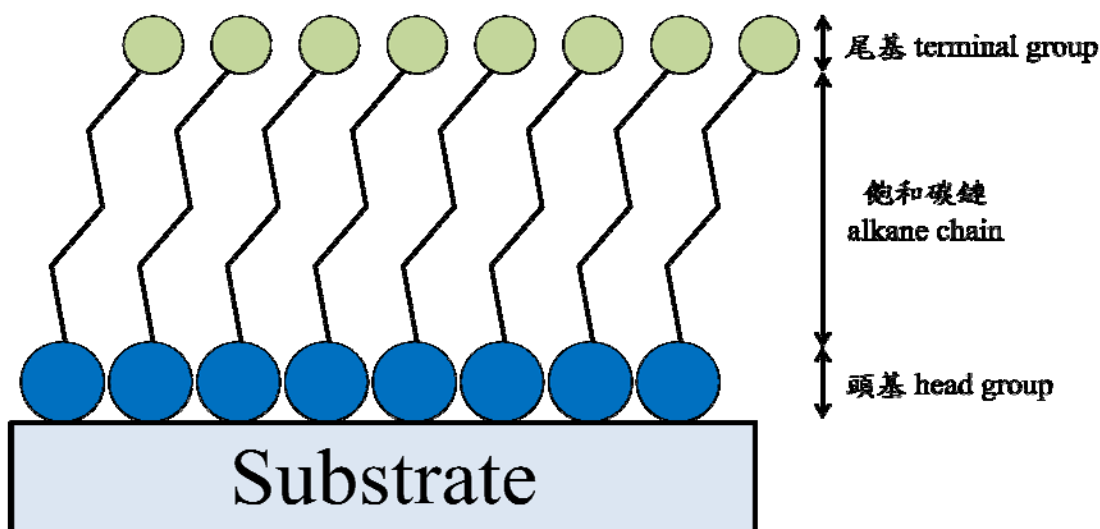


圖 2.2-1 自組裝單層膜之結構示意圖。



## 2.3. 自組裝單層膜 (SAMs) 應用

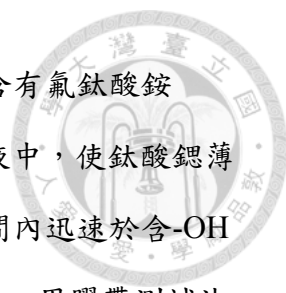
自組裝單層膜能改變材料的表面性質，如：疏水性、表面電性、反應性等等。而透過調控這些性質，就能產生各種不同的應用。

### 2.3.1. 靜電吸附

利用 SAMs 系統在離子溶液中帶電的特性，吸引溶液中帶有相反電性的離子吸附。利用此概念，Shyue 在西元 2004、2005 年間，發表數篇文章，討論以 SAMs 修飾過的矽基材來促使金屬氧化物在表面沉積以生成薄膜。在其中一篇文獻中，利用經過尾基為  $\text{-NH}_2$  與  $\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$  修飾過的矽基材，來生成五氧化二釩 ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ) 薄膜。將上述兩種官能基修飾過的矽基材放入 10 mM 的  $[\text{V}_{10}\text{O}_{26}(\text{OH})_2]^{4-}$  水溶液中，並控制溶液 pH 值介於 2.5 和 3 之間，此時溶液中生成的氧化釩粒子帶微弱負電，受到帶正電性的 SAMs 吸引 (環境 pH 值為 3 時，尾基為  $\text{-NH}_2$  與  $\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$  的 SAMs 之 Zeta Potential 分別為 75 mV 和 105 mV) 而沉積在矽基材上形成氧化釩薄膜。在相同實驗置備條件下，尾基為  $\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$  之 SAMs 上所形成的氧化釩薄膜厚度是尾基為  $\text{-NH}_2$  之 SAMs 的 3 倍。這是因為尾基為  $\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$  之 SAMs 表面所帶正電位較大，能對氧化釩粒子產生較大的靜電吸附力。此結果顯示 SAMs 可利用靜電庫侖力吸引陶瓷粒子，而選擇不同尾基則能控制吸附的數量[14, 20, 21]。

### 2.3.2. 選擇性沉積

Yanfeng Gao 等人在西元 2002 年利用液相沉積法搭配 SAMs 的修飾技術，將鈦酸鋁選擇性沉積並生成薄膜。首先用 HFDTs ( $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{SiCl}_3$ ) 在矽基材上形成 SAMs，再將此試片表面擺上光罩後，以真空紫外光臭氧 (UV-Ozone) 照射。經紫外光照射與臭氧反應的區域，其 HFDTs 上之疏水性官能基  $\text{-CF}_3$  會被氧化移除並轉變為親水性的  $\text{-OH}$ ，此時矽基材表面就產生了



兩種具有不同性質與反應性的區塊。再將此矽基材浸泡在含有氟鈦酸銨  $(\text{NH}_4)_2\text{TiF}_6$ 、硝酸鋇  $(\text{Sr}(\text{NO}_3)_2)$  與硼酸  $(\text{H}_3\text{BO}_3)$  的水溶液中，使鈦酸鋇薄膜在矽基材表面生成。其實驗結果發現，鈦酸鋇會在短時間內迅速於含-OH 的 SAMs 上沉積，而不會沉積在 HFDTs 的 SAMs 上。此外，用膠帶測試法與超音波震盪法測試矽基材後，在含-OH 的 SAMs 上之鈦酸鋇均未脫落，顯示其與-OH 間產生之穩固化學鍵結是造成此選擇性沉積現象的主因[22]。

### 2.3.3. 選擇性靜電吸附

結合以上兩小節的概念，若先將一種反應物以靜電吸附的方式吸附在特定區域，在與另一種反應物反應，就能使其沉積在特定區域。Shyue 等人在西元 2008 年發表相關研究，選用的基材為玻璃，而選用的 SAMs 分子為 OTS 與 APTES。首先在玻璃表面生成一層 OTS，接著將此試片表面擺上光罩，並以 UV-Ozone 照射燒去部分 OTS，再在沒有 OTS 的玻璃表面上生成 APTES。再將試片放入四氯化金以及抗壞血酸溶液中，讓金的還原反應產生並沉積。實驗結果發現，由 OTS 與 APTES 修飾過的玻璃表面，其等電位點 (Isoelectric Point, IEP) 分別為 pH 4.0 以及 pH 6.6。而當溶液 pH 值控制在 4.0 和 6.6 之間時，金主要都沉積在 APTES 的區域上。這是因為在這段 pH 值範圍中，APTES 修飾的表面帶正電，會吸引帶負電的四氯化金離子  $(\text{AuCl}_4^-)$ ，而使還原後的金主要沉積在此區域；而 OTS 修飾的表面帶負電，會排斥帶負電的四氯化金離子，使得較少金沉積在此區域。而選擇性沉積的現象在 pH 值 6.5 時最為明顯，因為此時 OTS 區域的負電性較大，對帶負電的四氯化金離子有較大的排斥力[23]。



## 2.4. 以 SAMs 研究細胞貼附行為

既然能夠以 SAMs 調控表面性質達到選擇性吸附，於是有許多研究團隊開始以 SAMs 做為研究細胞行為的平台。採用的 SAMs 系統則以硫醇修飾金基材的系統[19, 24]以及矽烷修飾矽或玻璃基材的系統為主[25, 26, 27]。

Margel 等人在 1993 年發表的文章中，將犬細胞 (Canine endothelial cell) 種在以四種不同尾基 (-CH<sub>2</sub>OH, -CO<sub>2</sub>Me, -CH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>) 的矽烷修飾過的矽以及玻璃上，以探討接觸角和細胞貼附與生長量之間的關係。四種尾基的接觸角大小關係為：-CH<sub>2</sub>OH < -CO<sub>2</sub>Me < -CH<sub>3</sub> < -CF<sub>3</sub>，而細胞的貼附量與生長量的趨勢則正好相反：-CH<sub>2</sub>OH > -CO<sub>2</sub>Me > -CH<sub>3</sub> > -CF<sub>3</sub>。因此當接觸角愈大時，此犬細胞的貼附量與生長量會較低，代表疏水性愈高，表面將愈不利細胞貼附與生長[27]。

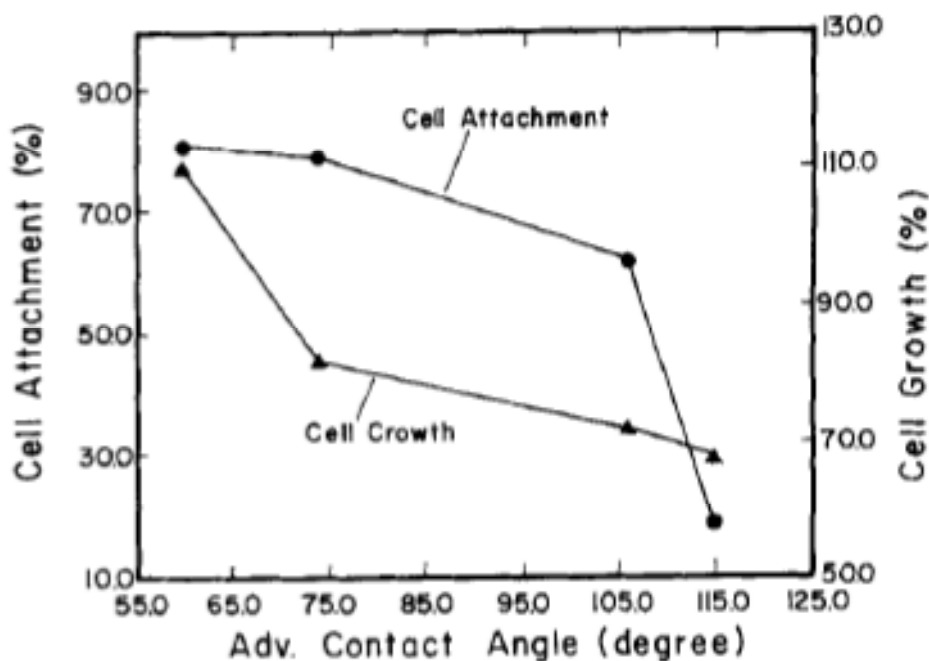


圖 2.4-1 接觸角與細胞貼附量、生長量之關係圖[27]。

但 Faucheux 於 2003 年發表的文章則有不同的看法。該研究同樣是使用矽烷修飾過的矽和玻璃表面，選用的尾基有高疏水性的甲基 (CH<sub>3</sub>)、中等潤

濕性的胺基 (-NH<sub>2</sub>)、酸基 (-COOH)，以及高親水性的乙二醇基 (-PEG)、羥基 (-OH)。觀察人類纖維細胞 (human fibroblast) 在這些表面的貼附情形，結果如圖 2.4-2 和 2.4-3 所示。其結果顯示，在高親水性和高疏水性的表面，細胞的貼附量較少而細胞的生長情況較差；而在中等濕潤性的表面，細胞的貼附量較多，生長的情況也較佳[26]。

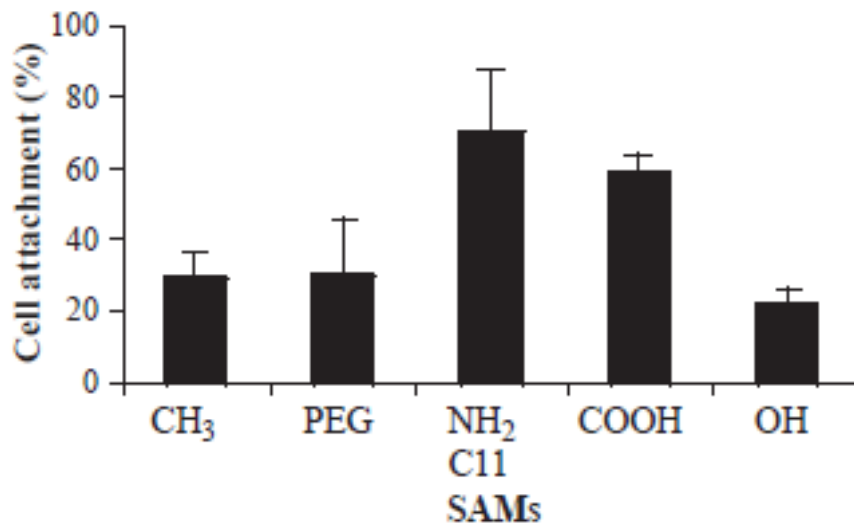


圖 2.4-2 培養 2 小時後之人類纖維細胞貼附比例關係圖[26]。

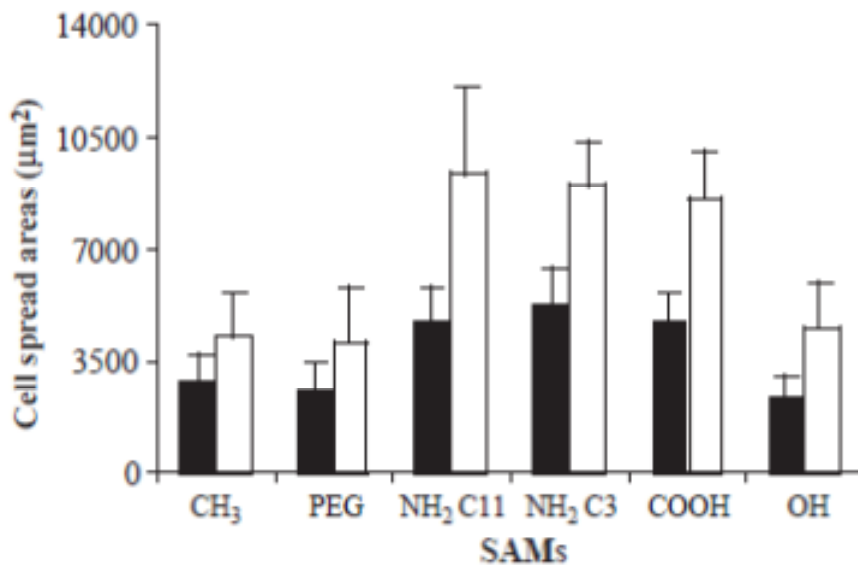


圖 2.4-3 人類纖維細胞展開的面積，■為培養 45 分鐘，□為培養 2 小時[26]。



而在 Mrksich 於 2000 年發表的文章中，以兩種不同尾基的矽烷分子，在矽和玻璃的表面生成兩種不同的區域，一區在表面長上 bioinert 的分子，如： $-OH$ 、 $-PEG$ ；另一區則覆蓋適合細胞貼附的分子，如： $-NH_2$ 、 $-COOH$ 。其結果顯示，細胞會傾向在適合細胞貼附的區域進行貼附並生長[30]。

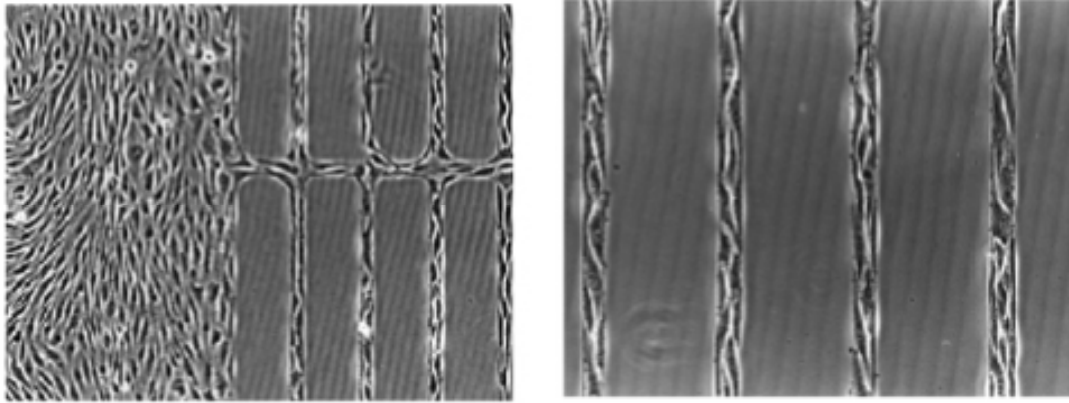


圖 2.4-4 具有圖案的表面，細胞貼附生長的光學影像[30]。

而 Lin 等人於 2014 年發表的文章中，則以 APTMS 與 MPTMS 分別修飾二氧化鈦奈米管，並在其上培養 NIH3T3 細胞。其結果顯示，以 APTMS 修飾的二氧化鈦奈米管由於表面帶正電，會吸引整體表面帶負電的細胞，而使得細胞的貼附生長量較多[46]。



## 2.5. 二元自組裝單層膜

為了提高 SAMs 對材料表面改質的彈性，許多研究團隊開始將兩種分子混合生長於基材表面。但當溶液中同時含有兩種不同的 SAMs，其成膜的情形會變得相當複雜，並不像一元 SAMs 那樣單純。

### 2.5.1. SAMs 之成長速度與機制

Shyue 等人在 2009 年發表的文章中，利用不同比例 8-胺基辛基硫醇 ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$ ) 與 15-基十五烷基硫醇 ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ ) 修飾金基材，結果溶液中的 SAMs 比例和實際在表面生成的 SAMs 比例並不相同，顯示兩者在基材上的成長速率並不相同。這是因為兩種 SAMs 的碳鏈長度不同，且尾基會互相吸引，導致當長碳鏈的 15-基十五烷基硫醇先與金基材產生鍵結時，會阻礙短碳鏈的 8-胺基辛基硫醇與金基材鍵結，如圖 2.5-1 所示[10, 11]。

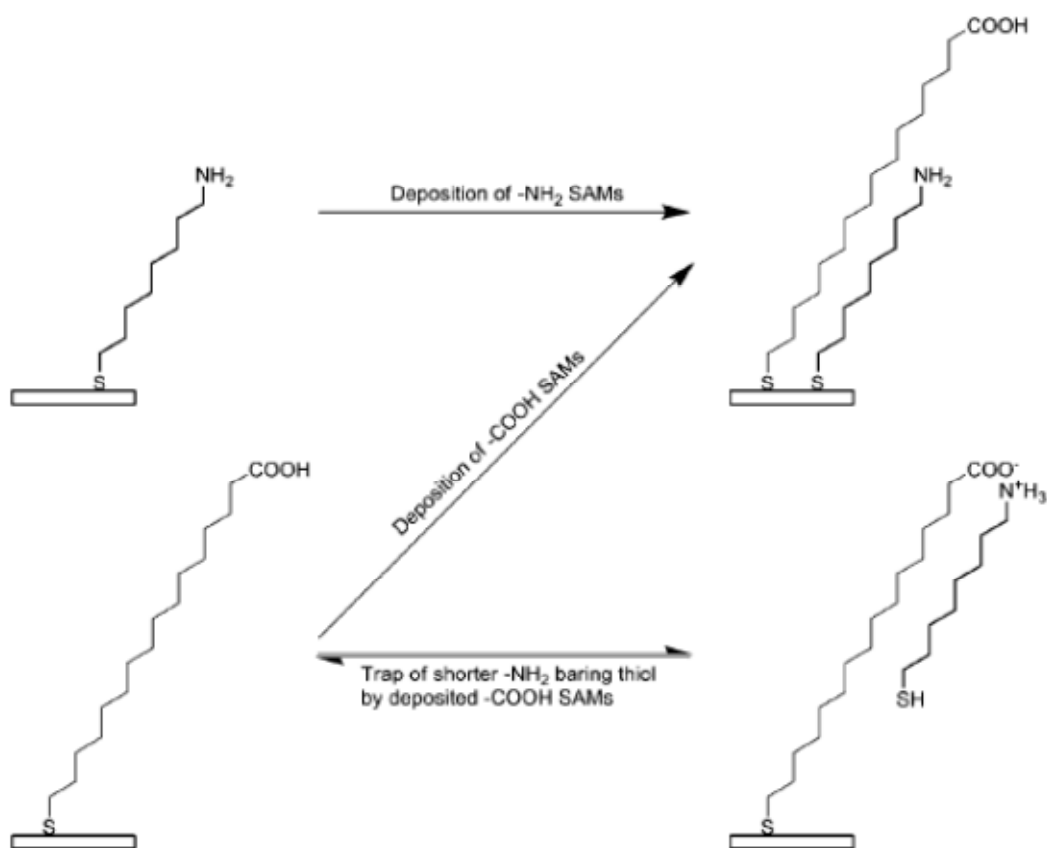


圖 2.5-1 SAMs 在金基材上之成長機制[10]。

而在 Guo 等人於 2011 年發表的文章中，使用了兩種相同碳鏈長度的矽烷分子 (APTMS、MPTMS) 修飾矽基材，以調控矽基材的等電位點 (Iso-electric point, IEP)。在量測表面官能基比例時，仍然發現其與溶液中比例不同，顯示有除了碳鏈長度以外的因素影響其成長速率。他們推測，這是因為 APTMS 具有  $\text{NH}_2$  官能基，在溶液中會有部分被質子化 (protonated) 形成帶正電的  $-\text{NH}_3^+$ ；而矽的表面則因受過 UV-ozone 處理，使得表面氧化成 OH 官能基，在溶液中有部分會水解成  $-\text{O}^-$ ，使得表面會吸引較多的 APTMS，而提高 APTMS 在表面的比例，使得表面官能基比例與溶液中分子比例不同。

表 2.5-1 兩種 SAMs 分子在溶液中與試片上的比例[29]。

Mixed ratio APTMS : MPTMS	1 : 0	3 : 1	2 : 1	1 : 1	1 : 19	1 : 49	1 : 98	1 : 196	0 : 1
S/N in solution	0	0.33	0.50	1	19	49	98	196	$\infty$
S/N in SAMs	0	0.31	0.50	0.75	0.85	1.04	1.08	1.29	$\infty$
Amine : thiol ratio in SAMs	1 : 0	3.2 : 1	2.0 : 1	1.3 : 1	1.2 : 1	1 : 1.04	1 : 1.08	1 : 1.29	0 : 1

而在 Xavier Bulliard 等人於 2013 年發表的文章中，則混合了尾基為  $\text{NH}_2$  以及另一低反應性 (non-reactive) 尾基的矽烷生長在 ZnO 上。結果發現最後生長在基材上的 SAMs 比例與溶液中的 SAMs 比例有差距。他們推測，尾基為  $\text{NH}_2$  的矽烷具有自催化的效果 (autocatalytic effect)，而使其沉積速率較快，進而導致最後生長在基材上的 SAMs 比例與溶液中的 SAMs 比例有相當大的差距[28]。

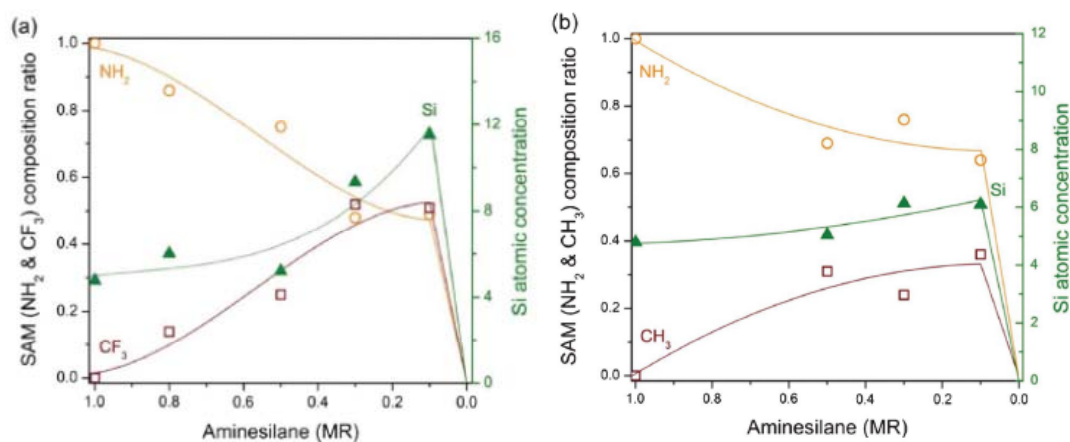


圖 2.5-2 ZnO 基材浸泡在混合 SAMs 溶液 2.5 小時後的表面組成以及矽的原子百分比[28]。

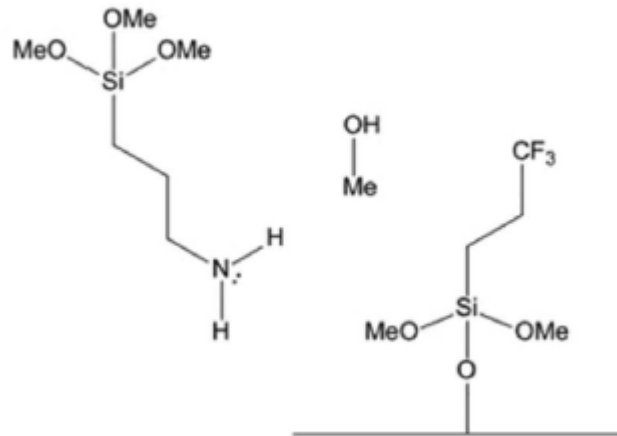
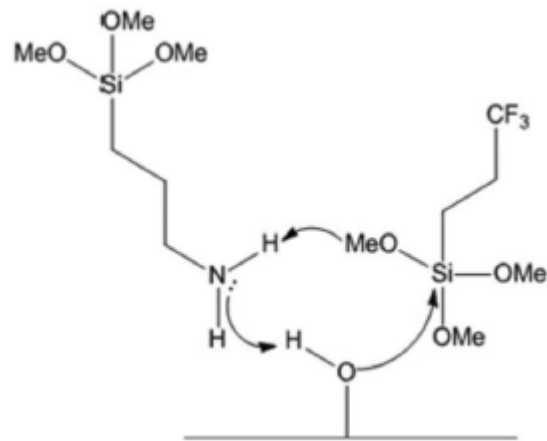


圖 2.5-3  $\text{NH}_2$  尾基的自催化機制[28]。

### 2.5.2. SAMs 的均勻度

為了確認混合兩種不同 SAMs 時，不會產生有相同官能基聚集的現象，文獻中以掃描式表面電位顯微鏡 (SEPM) 檢測 SAMs 試片。結果顯示，混合修飾過的金基材表面，並無明顯對比，表示當混合兩種不同 SAMs 時，並不會有相同官能基聚集的現象，因此證明二元自組裝單層膜能均勻修飾材料表面性質[10]。

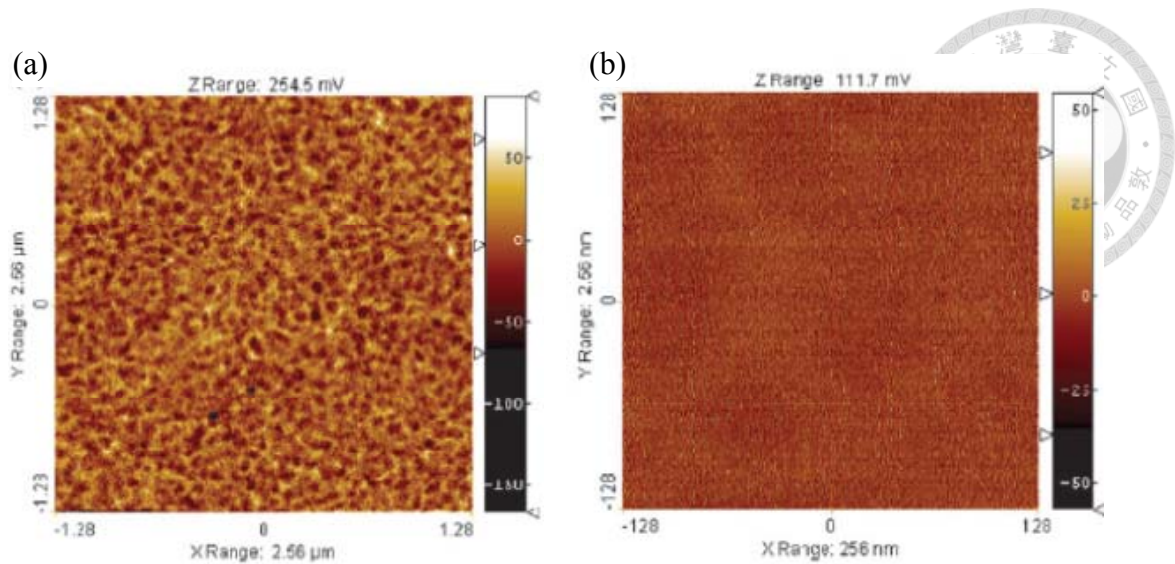


圖 2.5-4 混合官能基 SAMs 之 SEPM 圖，掃描範圍分別為(a) 2560 nm (b) 256 nm[10]。

### 2.5.3. 調控表面電位與偶極

使用單一 SAMs 修飾表面，只能得到單一的表面性質，而將兩種 SAMs 以不同比例混合，能否將表面性質在兩極端之間調控就顯得相當重要。

在 Shen 等人 2012 年發表的文章中，以金為基材，採用的混合官能基系統有兩種，分別是  $-\text{SO}_3\text{H}$  與  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  的混合系統以及  $-\text{PO}_3\text{H}_2$  與  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  的混合系統。並探討不同比例混合後，對接觸角以及表面電位的影響。而結果顯示，這兩個系統由於採用了離子性的表面分子 ( $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ )，使得陰陽離子彼此吸引力太強，而在溶液中先行結合，導致能實際調整的電位差異較小，且並不成比例關係，而無法達到以混合分子微調表面電位的目的[44]。

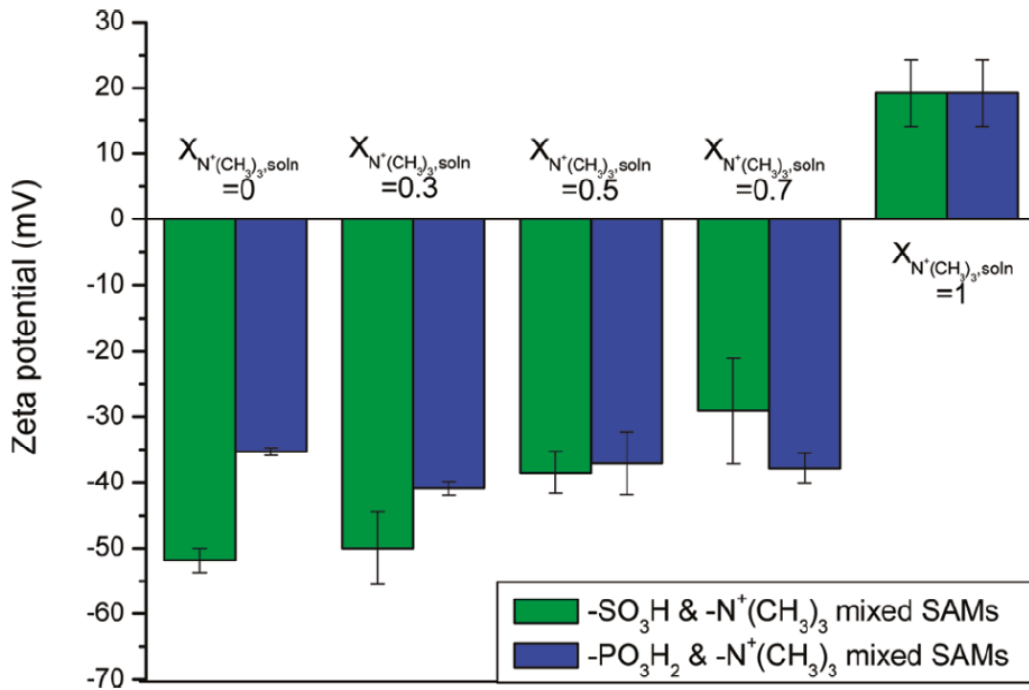
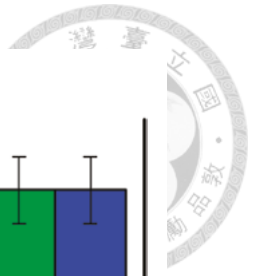


圖 2.5-5 官能基混合比例與表面電位關係圖[44]。

而 Guo 等人則以矽為基材，並以  $-NH_2$  與  $-SH$  兩種不同尾基的矽烷混合不同比例修飾，之後在不同 pH 值下測量其表面電位。結果顯示，混合不同比例的 SAMs 能有效調控材料的表面電位，藉此控制其與其他分子間的靜電吸附與排斥力[29]。

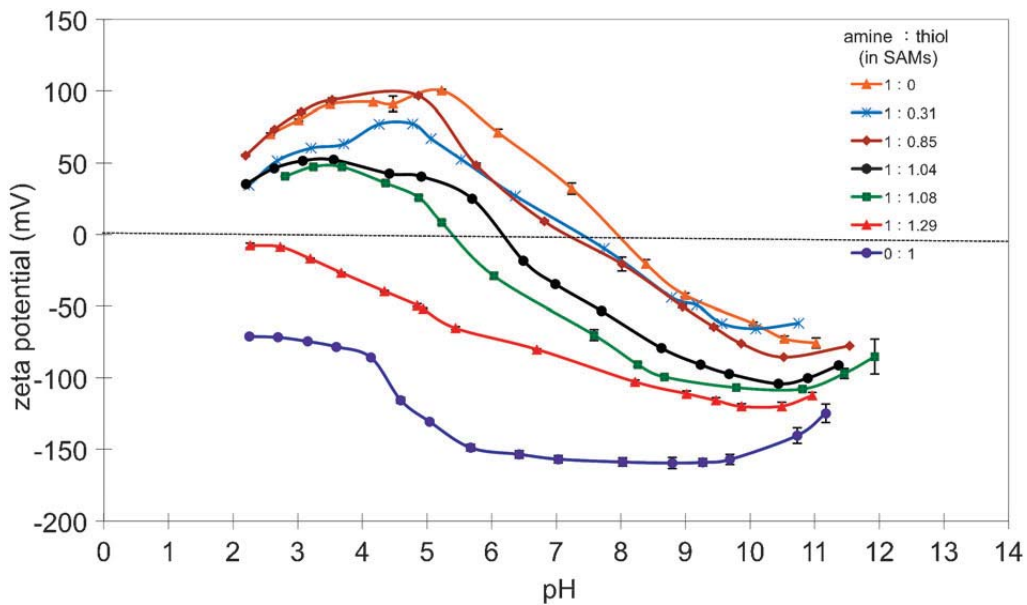


圖 2.5-6 經不同比例 SAMs 修飾後矽基材之 zeta potential 對 pH 值關係圖[29]。

除了調控表面電位之外，利用 SAMs 分子所產生的 dipole，也能調控基材的功函數[39—42]。而 Guo 等人在 2011 年發表的文章中，則混合了兩種不同官能基的矽烷修飾矽基材，以觀察功函數的變化。結果顯示，混合官能基的 SAMs 能有效調控其功函數，且約略與表面組成呈線性關係[43]。

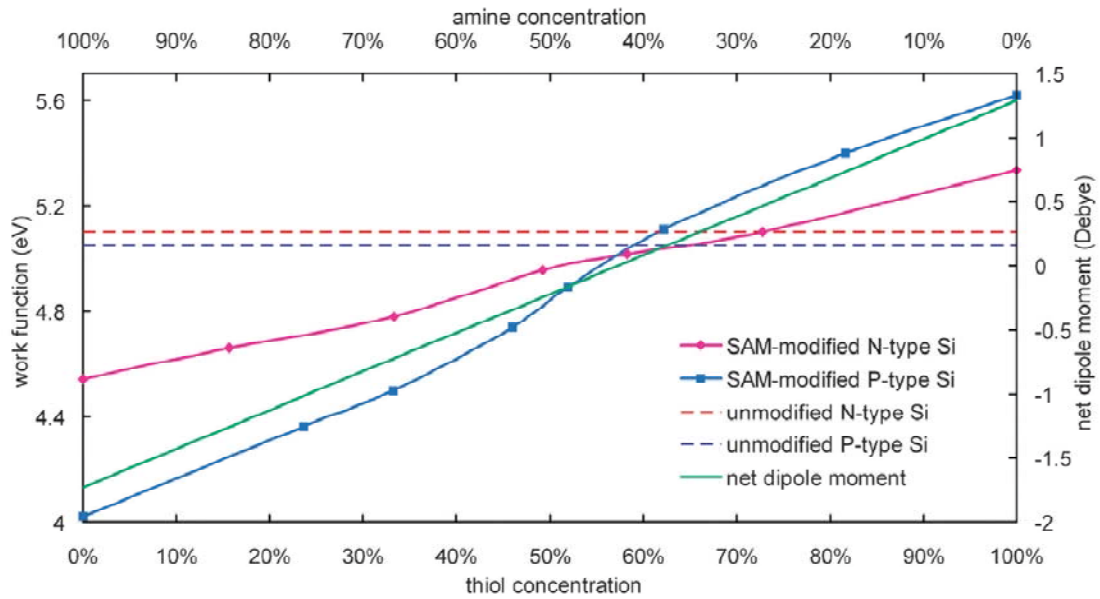


圖 2.5-7 混合官能基修飾之矽基材之表面組成與功函數關係圖[43]。





## 2.6. 二元自組裝單層膜與生物系統之交互作用

早期與 SAMs 相關的研究，採用的系統多為單一分子，因此表面的性質會受到該分子的限制而無法精準的調控。因此近年來，為了更精準的調控表面性質，愈來愈多研究團隊使用二元 SAMs 來進行研究。

Arima 等人在 2007 年發表了一篇文章，以不同比例混合不同尾基 ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ) 的 SAMs，以調控基材表面的接觸角，並探討其對於細胞貼附的影響。用於測試貼附行為的細胞為 HUVECs 與 HeLa。兩種細胞的貼附結果都顯示，當接觸角介於中間值 ( $40^\circ \sim 60^\circ$ ) 時，細胞貼附量最多。代表當表面潤濕性適中時，最適合細胞貼附[19]。

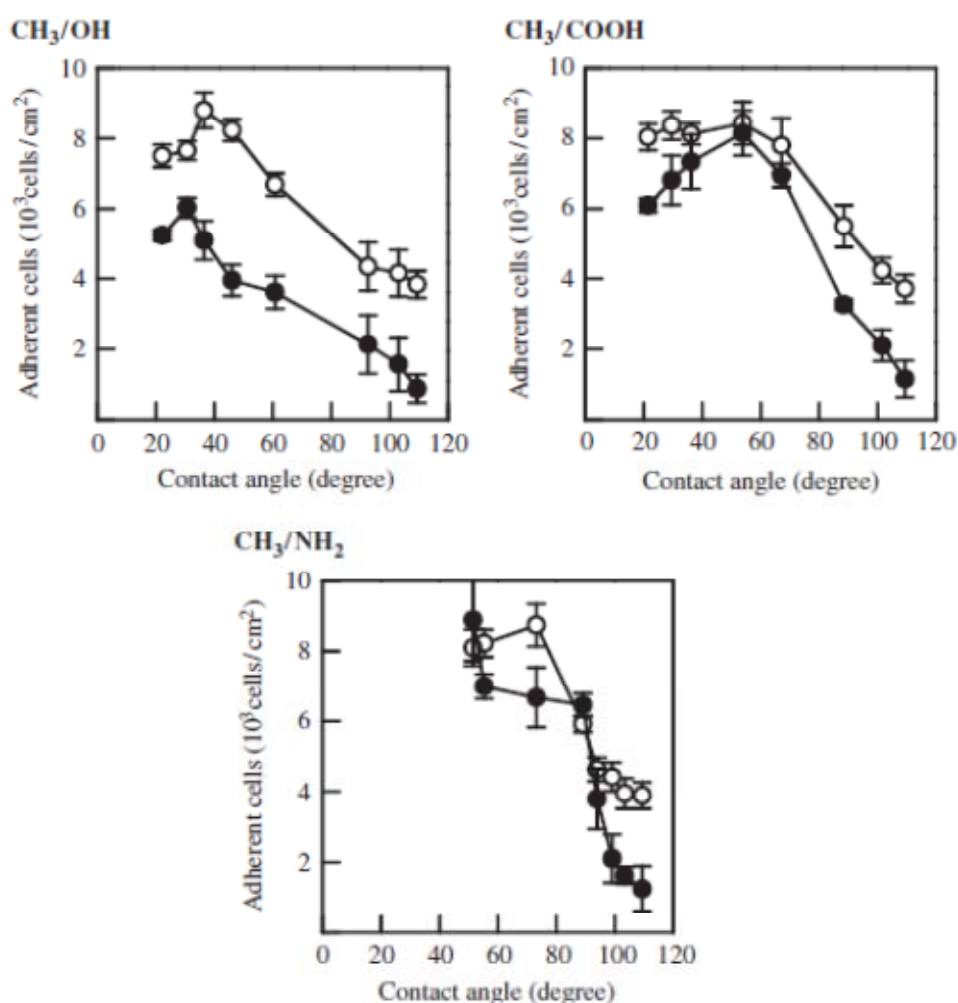


圖 2.6-1 接觸角對細胞貼附量的關係圖。○為 HUVECs，●為 HeLa cells [19]。





而在 2.5.3 節提到，Shen 等人 2012 年發表的文章中，亦以混合系統來觀測血小板的貼附情形。但由於其選用的混合系統無法明顯調控表面電位，而使得此混合系統對血小板的貼附量並無明顯影響[44]。

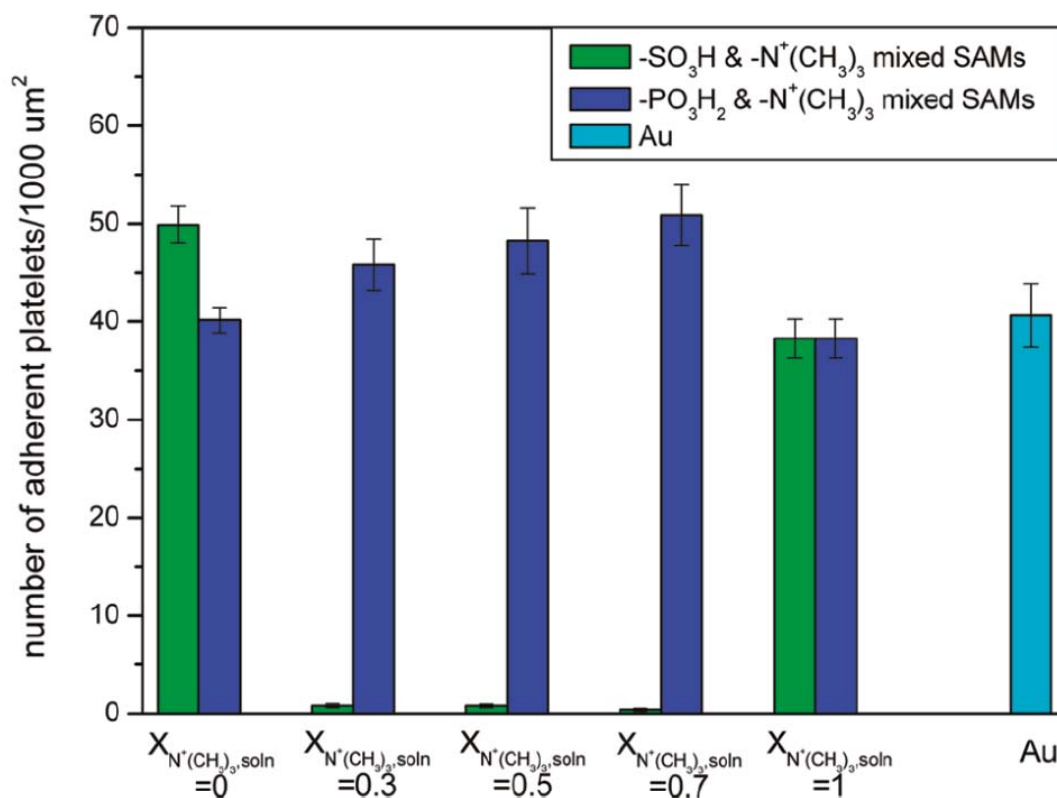


圖 2.6-2 官能基混合比例與血小板貼附量關係圖[44]。

而 Chang 等人在 2014 年發表的文章中，則以不同比例混合尾基為  $NH_2$  和  $COOH$  的硫醇修飾金基材，以調控表面電位，並觀察 NIH3T3 細胞的貼附與生長情形。結果發現，細胞貼附量隨著 zeta potential 增加而增加，但在培養一天後，不同試片表面的細胞密度差異降低，顯示在 zeta potential 較正的時候，細胞的生長速率反而較慢。他們推測，由於在 zeta potential 較正的試片上會吸附較多的細胞，而使得 NIH3T3 細胞的接觸抑制特性影響了生長速率，導致在 zeta potential 較正的試片上，細胞的生長速率較慢[45]。

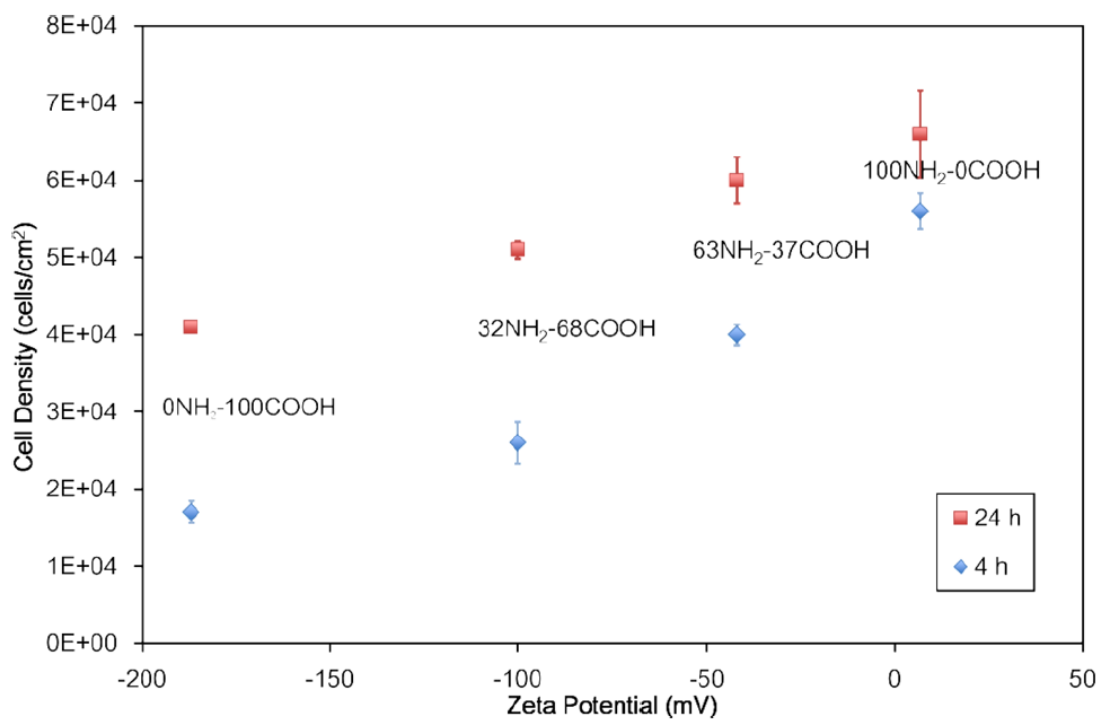


圖 2.6-3 培養 4 小時與 24 小時後，試片表面的細胞密度，原始密度為  $5 \times 10^4$  (cells/cm<sup>2</sup>)[45]。

由以上文獻討論可知，能微調表面電性的-NH<sub>2</sub>與-SH 混合官能基的 SAMs 搭配生物相容性高的玻璃基材，非常適合用來討論表面電位對細胞貼附生長的影響。因此本研究將採用此系統來探討表面電位對小鼠纖維母細胞 (NIH3T3) 貼附與生長的影響。

## 第三章 實驗



### 3.1. 實驗藥品

#### 3.1.1. 試片製備

1. 3-氨基丙三甲氧矽烷 (3-aminopropyltrimethoxysilane,  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ , 97%, APTMS), ALDRICH
2. 3-巰基丙基-三甲氧矽烷 (3-mercaptopropyltrimethoxysilane,  $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ , 95%, MPTMS), ALFA AESAR
3. 乙醇 (Ethanol absolute,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , >99%), Sigma-Aldrich, USA
4. 丙酮 (Acetone,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , >99%), ACROS
5. 玻璃

#### 3.1.2. 細胞培養

1. 小鼠胚胎纖維細胞株 NIH3T3 (財團法人食科所生物資源保存及研究中心)
2. 細胞培養液 (Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM)
3. 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS)
4. 胰島素 (Trypsin)
5. 左旋穀胺醯酸 (L-Glutamine)
6. 抗生素 (Pen-Strep Ampho Solution, PSA)
7. 小牛血清 (Calf Serum, CS)
8. 二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)

#### 3.1.3. 細胞染色

1. 細胞核螢光染劑 (Hoechst33342)



2. 細胞膜螢光染劑 (DiO', DiOC 18(3), D275, 100mg)
3. 二甲基甲醯胺 (N,N-Dimethylformamide,  $(\text{CH}_3)_2\text{NCOH}$ , DMF), ACROS
4. 氯仿 (Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ , >99%), ACROS
5. 甲醇 (Methanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , >99%), ACROS
6. 十八胺 (Octadecylamine,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$ , 97%), Merck

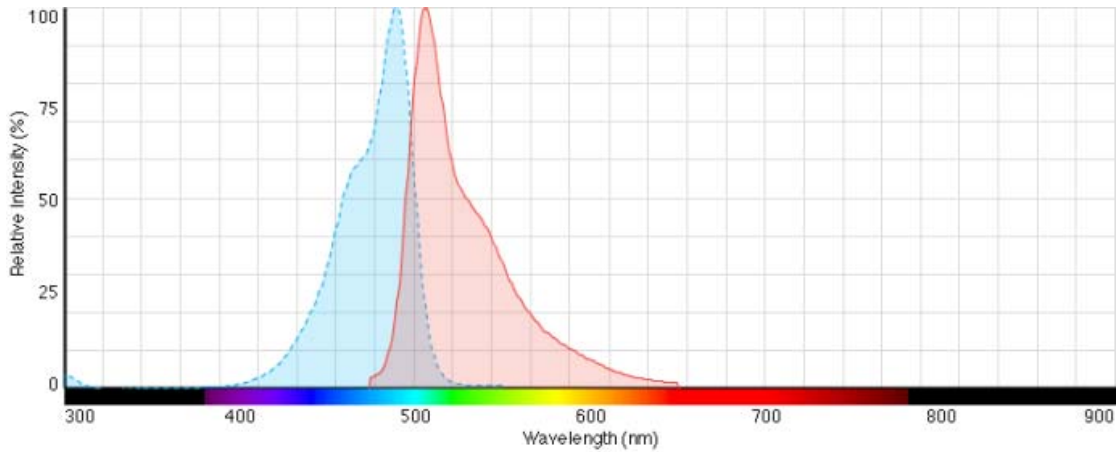


圖 3.1-1 DiO 激發與發射光譜[31]。

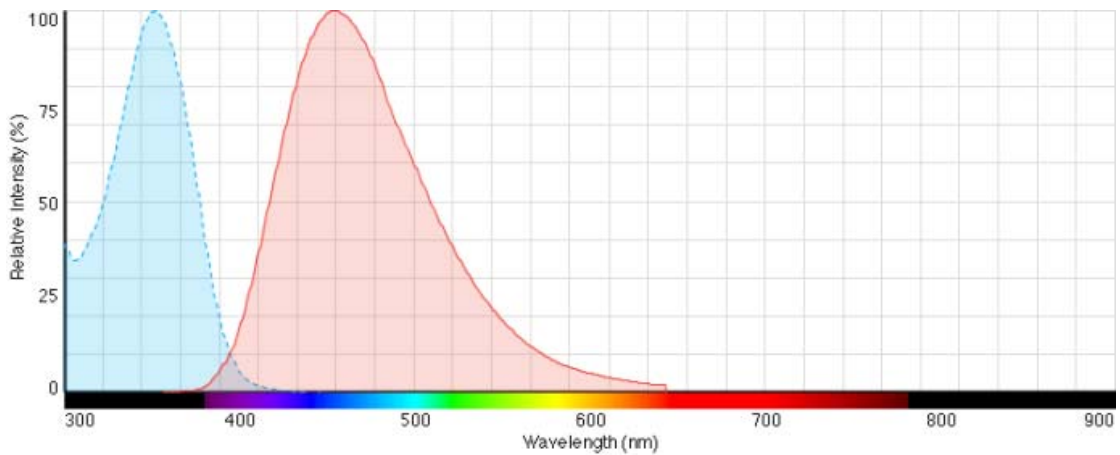


圖 3.1-2 Hoechst33342 激發與發射光譜[32]。

#### 3.1.4. 細胞固定

1. 戊二醛 (Glutaraldehyde,  $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ ), Sigma-Aldrich, USA
2. 乙醇 (Ethanol absolute,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , >99%), Sigma-Aldrich, USA



## 3.2. 儀器簡介及原理

### 3.2.1. X 光光電子光譜儀 (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS)

本研究使用 X 光光電子光譜儀 (FEI 5000 VersaProbe) 來量測表面實際 SAMs 比例。X 光光電子光譜儀又稱化學分析電子光譜 (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis, ESCA)，是被廣泛使用的表面分析技術。XPS 是以 X 光為光源，激發樣品表面原子的內層電子，使其游離成為光電子。藉由量測光電子的動能，可推得其束縛能，進而得到元素以及化學資訊。此外，藉由對特定元素光譜峰值的積分，可定量樣品表面的元素組成。

光電子動能與原子束縛能的關係式如下：

$$E_k = h\nu - E_b - \varphi_s$$

$E_k$ ：光電子動能

$h\nu$ ：入射 X 光能量

$E_b$ ：光電子束縛能

$\varphi_s$ ：光譜儀本身功函數

### 3.2.2. 倒立螢光顯微鏡

由於本研究所使用的基材為透光的玻璃，因此使用穿透式倒立螢光顯微鏡 (Olympus IX51) 拍攝明場以及螢光染色照片。拍攝明場影像時，使用白光光源；拍攝螢光染色影像時，則使用汞燈做為光源。

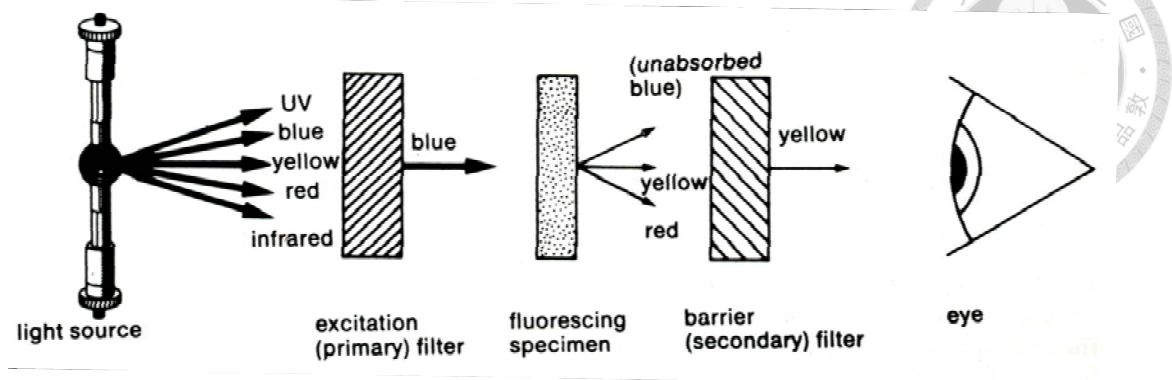


圖 3.2-1 螢光顯微鏡基本原理[33]。

螢光顯微鏡的原理如圖所示，以激發濾鏡 (excitation filter) 從光源中濾出具特定激發波長 (excitation wavelengths) 的光射向螢光樣品，螢光樣品被激發後，放出具特定發射波長 (emission wavelengths) 的光，接著以阻擋濾鏡 (barrier filter) 將未被吸收的激發光和螢光分開，只讓螢光通過[33]。

### 3.2.3. 超臨界流體乾燥機

生物樣品由於含有水分，在送入掃描式電子顯微鏡觀察前須要先乾燥，而直接乾燥時，液體的表面張力會對細胞表面造成破壞，因此本研究使用超臨界流體乾燥機 (Leica EM CPD 030) 來處理試片以避免在乾燥的過程中，對樣品表面造成不必要的破壞。

使用超臨界流體乾燥機乾燥生物樣品前，須先對生物樣品進行多階段脫水，將生物樣品中的水分替換成高純度乙醇 (> 99%)，再將其放入超臨界流體乾燥機中乾燥。超臨界流體乾燥 (Supercritical drying) 的原理是在一個低溫 (10 °C) 腔體內注入液態二氧化碳緩慢的將腔體中的高純度乙醇置換掉，接著將溫度、壓力提高到二氧化碳的臨界點之上 (31.1 °C, 7.39 MPa)，形成二氧化碳的超臨界流體。最後緩慢的將壓力釋放，即完成生物樣品的乾燥。

### 3.2.4. 掃描式電子顯微鏡

根據波粒二象性，高速電子將形成可被探測的物質波，其波長約為 pm 等級。因此以高能電子束為入射光源的電子顯微鏡，能有效提高原本光學顯

微鏡受可見光波長 (約 400 nm ~ 700 nm) 所限的解析度以及放大倍率，而能更進一步觀察到樣品的細微結構。

一般掃描式電子顯微鏡在處理非導體樣品時，需額外鍍一層導電層 (例：金) 以避免電荷累積。但在鍍金之後，樣品表面的細節會被金所覆蓋，且在鍍金的過程中，容易對生物樣品表面造成破壞。因此本研究採用的方法是加裝低真空偵測器 (Low vacuum detector, LVD)，它透過加裝一系列的壓力限制光圈 (Pressure-limiting Apertures, PLAs)，來維持電子槍和主腔體的壓力差，使得電子槍側能維持在高真空，而主腔體則利用水氣控制在低真空，水氣分子則同時扮演訊號放大以及電荷補償的角色。

本研究使用掃描式電子顯微鏡 (FEI NOVA 200 nanoSEM) 來拍攝明場影像，以觀察細胞的形貌結構。



### 3.3. 實驗步驟

#### 3.3.1. 二元自組裝單層膜製備

本研究採用蓋玻片做為試片基材。先分別以去離子水、高純度酒精浸泡並放入超音波震盪機中清洗三次，再以氮氣槍吹乾試片，最後將其放入紫外光臭氧清潔機 (UV-ozone cleaner, UV 波長為 193 nm) 中照射約 10 分鐘。依照特定比例調配適當體積之 3-氨基丙三甲羥矽烷和 3-巰基丙基-三甲羥矽烷丙酮溶液，再將清洗完畢的試片浸入溶液中，放置隔夜。浸泡隔夜之後，先以高純度酒精清洗試片表面，去除表面未經化學吸附的分子，再將試片置於 70%酒精溶液中殺菌備用。

#### 3.3.2. 表面官能基比例測定

將試片自 70%酒精溶液中取出，並以氮氣槍吹乾。將乾燥的試片黏於 ULVAC PHI 5000 專用載台上，放入預抽腔體中預抽真空約 10 分鐘，再送入主腔體中進行分析。所使用的光源為微米等級聚焦的  $Al K_{\alpha}$  X 光 (25W, 100  $\mu$ m)，起飛角為  $45^{\circ}$ ，能量分析器的通行能量 (pass energy) 設為 117.4 eV。主要偵測元素為硫與氮，硫為 3-巰基丙基-三甲羥矽烷的尾基特徵元素，氮為 3-氨基丙三甲羥矽烷的尾基特徵元素。將測得之硫光譜與氮光譜以 MultiPak 軟體內建之積分模型算出硫氮比，即為試片表面兩種不同矽烷分子所佔之真實比例。

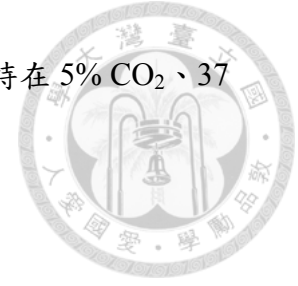
#### 3.3.3. 細胞培養

將 NIH3T3 細胞自液態氮中取出，回溫至  $37^{\circ}C$ ，並加入細胞培養液，置於細胞培養盤中，培養兩代後，以適當濃度種在放有試片的 3 公分細胞培養盤 (3 cm culture dish) 中，再將細胞培養盤放置於細胞培養箱中培養不同時間後，取出使用。

本研究所採用的細胞培養液是以 2X DMEM 加入去離子水、左旋穀胺醯



酸、抗生素和小牛血清調配而成。細胞培養箱內的環境維持在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C。



### 3.3.4. 細胞染色

#### 3.3.4.1. 細胞膜螢光染劑純化


先將 100 mg 細胞膜螢光染劑 (粉狀) 與 20 mg 十八胺 (粉狀)混合後，加入 2 mL 氯仿，並加熱到 50°C，使其溶解。接著加入 4 mL 甲醇，並將溶液置於冰中冷卻，使之析出。接著以 12000 rpm 的轉速，在微離心試管中離心 5 分鐘。移除上清液後，將微離心試管放入乾燥箱中放置隔夜，乾燥沉澱物。將 DMF 加入已乾燥的染劑中，配成 5% (w/v) 溶液，接著以超音波震盪機震盪，並加熱到 50°C，使沉澱溶解。最後以 12000 rpm 的轉速，在微離心試管中離心 10 分鐘，取澄清液儲存備用[31, 35]。

#### 3.3.4.2. 細胞染色

將純化過的細胞膜螢光染劑與細胞核螢光染劑以細胞培養液為溶劑做適當的稀釋後，滴 1 mL 在已有 NIH3T3 細胞貼附生長的試片上，放置於細胞培養箱 40 分鐘後，將含有染劑的細胞培養液吸出，並以 PBS 和新鮮不含染劑的細胞培養液沖洗三次，再以倒立螢光顯微鏡拍攝螢光照片。

### 3.3.5. 細胞固定術、超臨界流體乾燥與電子顯微鏡影像拍攝

自細胞培養箱取出已培養 4 小時、24 小時的 NIH3T3 細胞，將試片自原本的細胞培養盤中取出，放入新的細胞培養盤中，再以 PBS 沖洗兩次，以去除試片表面殘餘的細胞培養液。接著加入適量 2.5% 戊二醛 (Glutaraldehyde) 水溶液以進行固定[34]。浸泡兩分鐘之後，將戊二醛吸出，接著以 50%、70%、90%、99% 四種不同體積百分濃度的酒精水溶液進行多階段脫水，每次更換溶液時，均先沖洗一次，再浸泡兩分鐘。多階段脫水能避免細胞一次大量脫水，減少對細胞表面形貌的破壞。



先將 99%酒精溶液倒入超臨界流體乾燥機的腔體，再將完成多階段脫水並浸泡在 99%酒精溶液中的試片置於其中。將腔體冷卻至 10°C，接著以液態二氧化碳注入腔體，再將部分液體排出腔體，反覆操作，直到腔體中的酒精溶液全部被置換成液態二氧化碳。接著開始加熱，直到腔體內達到二氧化碳之臨界點之後，開啟氣閥，緩慢洩壓。洩壓完成後，即可將試片取出，送入電子顯微鏡中拍攝，或將試片置於乾燥櫃中保存。

將乾燥完成的試片，黏貼於掃描式電子顯微鏡載台上，並將低真空偵測器安裝至掃描式電子顯微鏡機台中，即可進行電子顯微鏡影像的拍攝。

## 第四章 結果討論



### 4.1. 表面官能基比例

本研究將具有  $\text{NH}_2$  與  $\text{SH}$  官能基的矽烷分子，以不同比例混合溶液修飾玻璃表面，希望能藉此調控表面官能基比例，進而調控其表面電位。但由於  $\text{NH}_2$  官能基是屬於反應性比較強的官能基(reactive functional group)，且具有自催化的特性[28]，因此在不同比例下，兩種矽烷分子的沉積速率都會有所不同，導致兩種矽烷分子在溶液中的比例與實際沉積在玻璃表面的比例並不會相同，而須使用 XPS 量測表面官能基實際比例，來對應其實際表面電位。

進行兩種矽烷分子的定量時，以氮 (N) 代表胺基 ( $\text{NH}_2$ )，以硫 (S) 代表硫醇 ( $\text{SH}$ )，量測與計算氮硫之比例，代表玻璃表面實際沉積的兩種矽烷分子比例，進而推算出胺基矽烷在玻璃表面所佔的實際百分比。為使胺基矽烷在試片上所佔比例較為分散，必須不斷利用定量結果來調整製備溶液的比例，反覆測試之後，最後挑選胺基矽烷實際比例為 0%、30%、50%、70%、100% 這五種比例進行後續實驗，後文中分別以其實際比例 0%、30%、50%、70%、100% 表示這五種試片。而各比例對應的表面電位 (zeta potential) 則從文獻中得知[29]。溶液比例和實際比例與其對應的表面電位見表 4.1-1。

表 4.1-1 SAMs 製備溶液與 SAMs 試片上實際胺基矽烷比例與對應表面電位[29]。

製備溶液 $\text{NH}_2$ 比例	0%	2%	5%	50%	100%
試片實際 $\text{NH}_2$ 比例	0%	30%	50%	70%	100%
表面電位 zeta potential	-155 mV	-108 mV	-46 mV	-5 mV	24 mV



## 4.2. 表面電位對細胞貼附、生長的影響

為了探討表面電位是否對細胞貼附量、生長速率造成影響，以倒立光學顯微鏡明場拍攝細胞於 SAMs 表面的情形，拍攝時間分別為細胞種在 SAMs 試片表面後 4 小時、24 小時和 48 小時，並以軟體 ImageJ 進行細胞計數。

### 4.2.1. 表面電位對細胞貼附量的影響

將細胞以  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 的密度種在長有 SAMs 的玻璃試片上，培養 4 小時之後，取出觀察其貼附情形。以光學顯微鏡拍攝各試片的明場影像並以軟體 ImageJ 進行細胞計數，並配合 4.1 節中各試片的 zeta potential，可得圖 4.2-1。各試片間細胞貼附量之相對值由表 4.2-1 可知。試片的 Zeta potential 隨著表面 NH<sub>2</sub> 比例增加而從 -155 mV 上升至 24 mV，而細胞密度則從  $1.42 \times 10^4$  增為  $4.44 \times 10^4$ ，100% NH<sub>2</sub> 和 0% NH<sub>2</sub> 的比例約為 3.12 倍，顯示當 Zeta potential 增加時，細胞貼附量也會隨之增加。

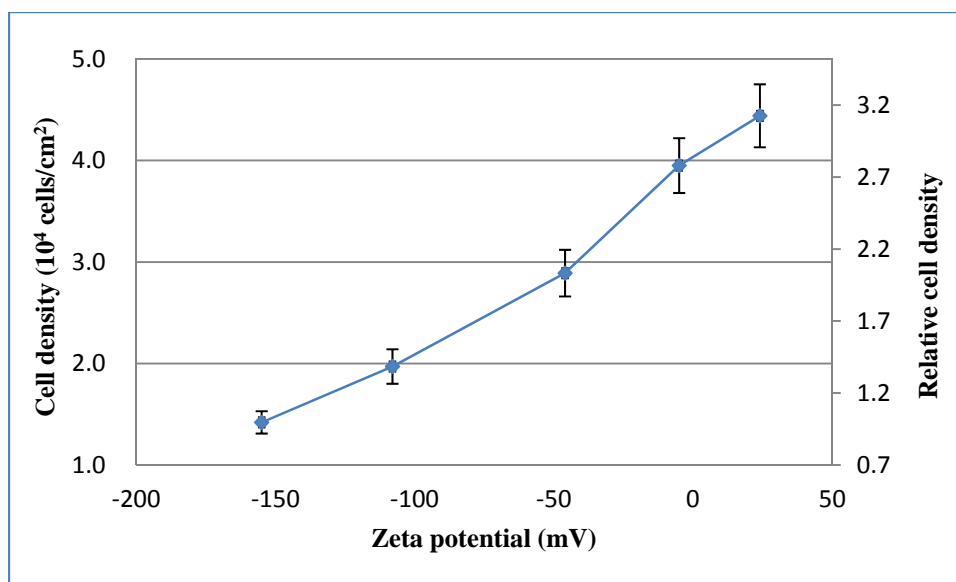


圖 4.2-1 培養 4 小時後，細胞貼附密度與 Zeta potential 之關係圖，原始密度為  $4 \times 10^4$  (cells/cm<sup>2</sup>)。

表 4.2-1 培養 4 小時後，各試片間細胞密度、相對密度、細胞貼附量與原始密度比較表，原始密度為  $4 \times 10^4$  (cells/cm<sup>2</sup>)。

胺基矽烷比例 (%)	100	70	50	30	0
Zeta potential (mV)	24	-5	-46	-108	-155
細胞密度 ( $10^4$ cells/cm <sup>2</sup> )	4.44±0.31	3.95±0.27	2.89±0.23	1.97±0.17	1.42±0.11
4 小時試片間相對密度	3.12	2.78	2.03	1.38	1
貼附密度與原始密度比	111%	98.7%	72.2%	49.2%	35.5%

將貼附密度與原始密度  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 做比較，結果如表 4.2-1。由表可知：100% NH<sub>2</sub> 的表面上貼附了比原始密度更多的細胞，隨著試片表面胺基比例下降，貼附的細胞量也隨之減少，70% NH<sub>2</sub> 的表面由於表面帶電性極弱，細胞貼附量約略與原始密度相同。而在純疏醇矽烷的表面則僅僅貼附了原始密度 35% 的細胞量。推測可能原因是由於細胞外層整體帶負電性，因此當材料表面帶正電性時，細胞會受到額外的吸引力，而使貼附量較大，反之當材料表面帶負電性時，細胞會受到額外的排斥力，使得貼附量下降。此結果亦與文獻相符合。

#### 4.2.2. 表面電位對細胞生長的影響

細胞後期之生長數量與生長速率的實驗，則是觀察細胞種在 SAMs 試片上 24 小時以及 48 小時後的情形。觀察方法同樣為使用光學顯微鏡拍攝各試片的明場影像並以軟體 ImageJ 進行細胞計數，並配合 4.1 節中各試片的 zeta potential，以及 4.2 節中培養 4 小時後的細胞密度，可得圖 4.2-2。各試片間細胞貼附量之相對值由表 4.2-3 可知。

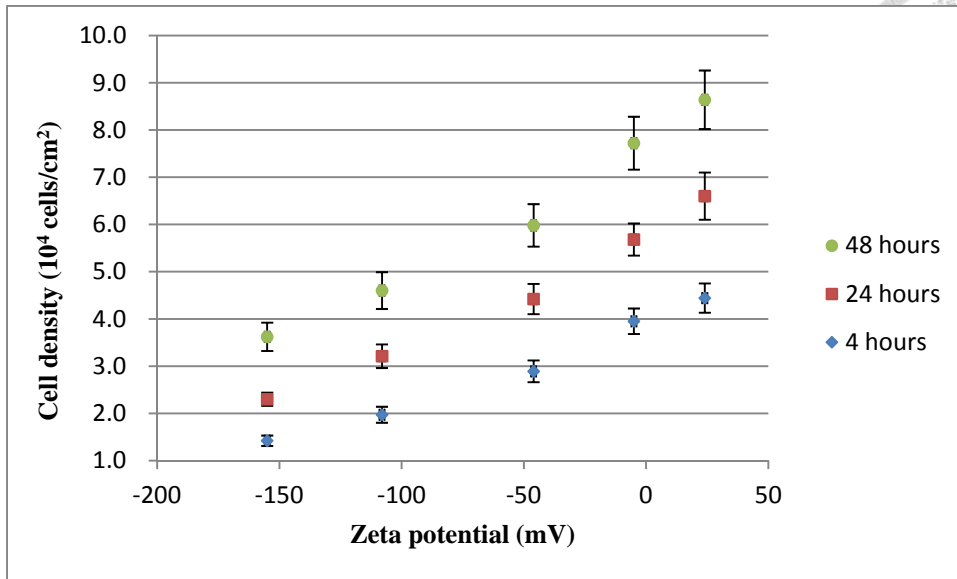



圖 4.2-2 培養不同時間後，細胞貼附密度與 Zeta potential 之關係圖，原始密度為  $4 \times 10^4$  (cells/cm<sup>2</sup>)。

表 4.2-2 培養不同時間後，各試片間細胞密度、細胞相對密度與生長速率比較表，原始密度為  $4 \times 10^4$  (cells/cm<sup>2</sup>)。

胺基矽烷比例 (%)	100	70	50	30	0
Zeta potential (mV)	24	-5	-46	-108	-155
24 小時細胞密度 (10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> )	6.60±0.5	5.68±0.34	4.42±0.32	3.21±0.25	2.30±0.14
24 小時試片間相對密度	2.86	2.46	1.92	1.39	1
生長速率 (24 小時/4 小時)	1.48	1.43	1.52	1.62	1.62
48 小時細胞密度 (10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> )	8.64±0.62	7.72±0.56	5.98±0.45	4.60±0.39	3.62±0.3
48 小時試片間相對密度	2.38	2.13	1.65	1.27	1
生長速率 (48 小時/4 小時)	1.94	1.95	2.07	2.32	2.44

由圖 4.2-2 可知，細胞生長量隨著 zeta potential 增加而增加。推測是因為貼附量同時會對後期的生長量產生影響，一開始貼附較多的細胞，進行分裂的細胞也會較多，使得細胞的生長量較多。但從表 4.2-1 和表 4.2-2 中可知，隨著培養時間的增長，100% NH<sub>2</sub> 和 0% NH<sub>2</sub> 試片細胞相對密度的比例從 4 小



時的 3.12 倍縮小至 48 小時的 2.38 倍。而將各比例試片培養 48 小時後的細胞密度除以培養 4 小時後的細胞密度，可得生長速率。顯示出當 zeta potential 較正時，雖然貼附量和生長量都較多，但其生長速率卻較低。這是由於 NIH3T3 具有接觸抑制 (contact inhibition) 的特性，因此當 zeta potential 較正時，細胞貼附量較多，使得細胞較容易與其他細胞產生接觸，而使得生長速率下降。

#### 4.2.3. 細胞密度對細胞貼附、生長的影響

由 4.2.2 節可知，當 zeta potential 較正時，由於細胞貼附量較多，細胞間產生接觸抑制，使得生長速率較低，為了驗證此推測，本研究將細胞的原始密度從  $4 \times 10^4$  提高到  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>，並重複 4.2.2 節之實驗，利用光學顯微鏡觀察培養 4、24、48 小時後，細胞的貼附與生長情形，並以軟體 ImageJ 進行細胞計數，結果如表 4.2-3。

由表 4.2-3 可知，培養 4 小時後，細胞的貼附比例，並不會因為細胞原始密度提高至  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 而有所下降，也就是接觸抑制的特性對於細胞的貼附行為並不會有太大的影響。同樣地，細胞的貼附量和生長量仍然會隨著 zeta potential 的增加而增加，若與文獻中 NIH3T3 於不同 zeta potential 金表面上之貼附密度做比較 (圖 4.2-3)，發現細胞的貼附密度與 zeta potential 呈現高度的相關性，當 zeta potential 愈正，細胞的貼附密度也愈大[45]，且與所使用的基材無顯著關係。觀察不同培養時間各試片間的細胞相對密度，仍然可發現，當培養時間越長，各試片間的差異有逐漸縮小的趨勢。

若比較表 4.2-2 與表 4.2-3，可發現當細胞原始密度較高時，100% NH<sub>2</sub>、70% NH<sub>2</sub>、50% NH<sub>2</sub> 上的細胞生長速率較細胞原始密度較低時慢，而對於 30% NH<sub>2</sub>、0% NH<sub>2</sub> 的表面則影響不大。推測原因可能是 NH<sub>2</sub> 比例較高的表面，貼附了較多的細胞，因此接觸抑制的情形較為明顯，使得生長速率有較明顯

的下降；而 NH<sub>2</sub> 比例較低的表面，貼附的細胞量較少，比較沒有產生接觸抑制的現象，因此不同細胞原始密度對於生長速率並沒有太大的影響。



表 4.2-3 改變細胞原始密度為  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>，並培養不同時間後，各試片間細胞密度、細胞相對密度與生長速率比較表。

胺基矽烷比例 (%)	100	70	50	30	0
Zeta potential (mV)	24	-5	-46	-108	-155
4 小時細胞密度 ( $10^4$ cells/cm <sup>2</sup> )	5.35±0.35	4.84±0.34	3.69±0.26	2.51±0.19	1.92±0.11
4 小時試片間相對密度	2.78	2.52	1.92	1.30	1
貼附密度與原始密度比	107%	96.8%	73.8%	50.2%	38.4%
24 小時細胞密度 ( $10^4$ cells/cm <sup>2</sup> )	7.55±0.49	6.95±0.53	5.53±0.35	4.04±0.31	3.18±0.24
24 小時試片間相對密度	2.37	2.18	1.73	1.27	1
生長速率 (24 小時/4 小時)	1.41	1.43	1.49	1.60	1.65
48 小時細胞密度 ( $10^4$ cells/cm <sup>2</sup> )	9.11±0.71	8.55±0.54	7.36±0.46	5.92±0.53	4.86±0.28
48 小時試片間相對密度	1.87	1.75	1.51	1.21	1
生長速率 (48 小時/4 小時)	1.70	1.76	1.99	2.35	2.53



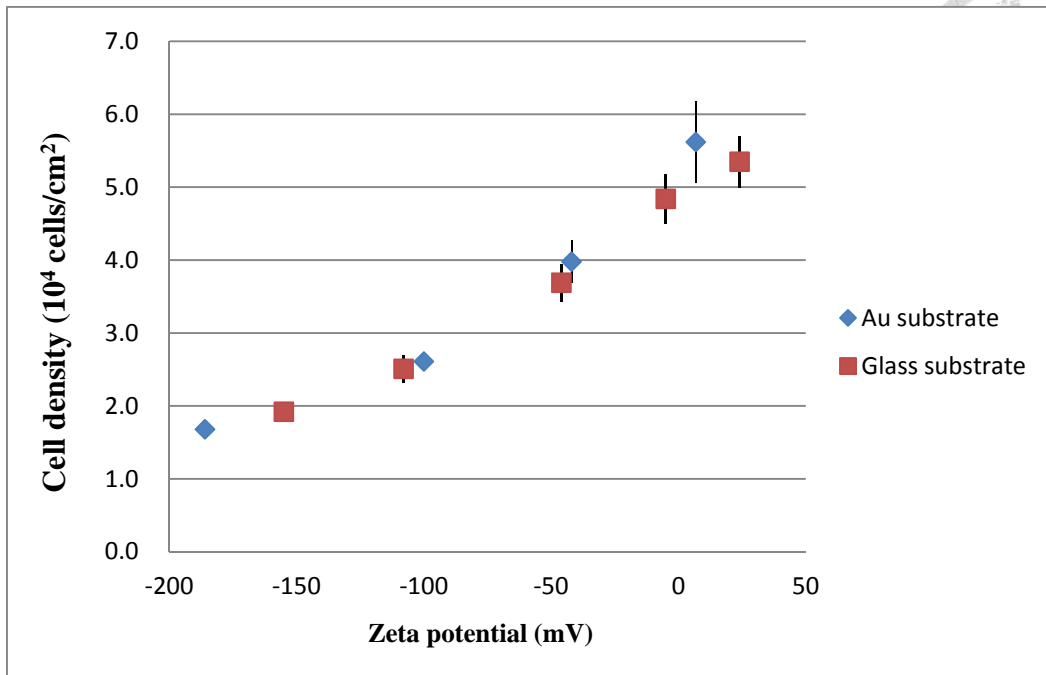


圖 4.2-3 培養 4 小時後，比較在不同基材上，細胞貼附密度與 Zeta potential 之關係圖，原始密度為  $5 \times 10^4$  (cells/cm<sup>2</sup>)[45]。



#### 4.3. 表面電位對細胞形貌的影響

為了探討表面電位是否對細胞形貌造成影響，本研究採用倒立光學顯微鏡、倒立螢光顯微鏡與掃描式電子顯微鏡進行影像的拍攝。採用的細胞原始密度為  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>。

##### 4.3.1. 以光學顯微鏡觀察表面電位對細胞形貌造成的影響

光學顯微鏡是觀察細胞形貌為基本的方法之一，因為其操作方法較為簡單，也因此先以光學顯微鏡觀察細胞形貌。圖 4.3-1 至圖 4.3-5 是細胞在各比例試片上培養 24 小時後的光學顯微鏡影像。

在 0% NH<sub>2</sub> 的表面上 (圖 4.3-1)，細胞多為球型與長條型，而隨著表面 NH<sub>2</sub> 官能基比例上升，細胞呈現球型與長條型的比例逐漸下降，而多稜角型的比例也逐漸上升，而在 100% NH<sub>2</sub> 的表面上，幾乎沒有球形的細胞出現。

球型與長條型的細胞，代表其在表面攤開情形較差，即貼附狀況較差，且與周遭細胞和環境連結較少，是屬於較不健康的細胞。多稜角型的細胞，則表示其攤的比較平，且與周遭細胞和環境有較多的連結，屬於比較健康的細胞。從光學影像可發現：表面 NH<sub>2</sub> 官能基比例愈高，細胞的形貌以多稜角狀為主；表面 NH<sub>2</sub> 官能基比例愈低，細胞的形貌則以球型與長條型為主。顯示當表面呈現弱電性時，細胞多呈健康的多稜角型，而隨著表面負電性的增加，細胞則多呈較不健康的球型與長條型。

光學顯微鏡的影像雖然提供了部分的形貌資訊，但對於攤的較平的細胞反而對比不佳，無法清楚判斷細胞的形狀，且光學顯微鏡無法呈現出更細微的細胞形貌，和提供更大的放大倍率，因此需要螢光顯微鏡和電子顯微鏡的輔助。



圖 4.3-1 0% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 μm。

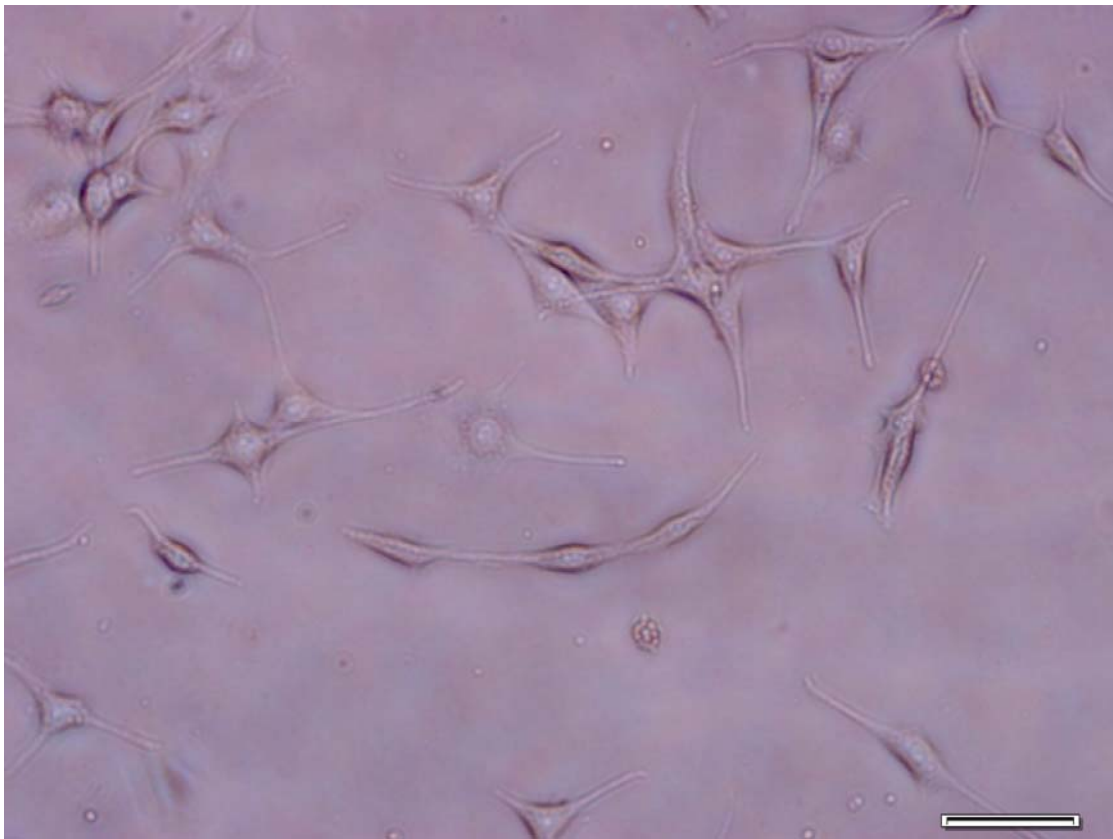


圖 4.3-2 30% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 μm。

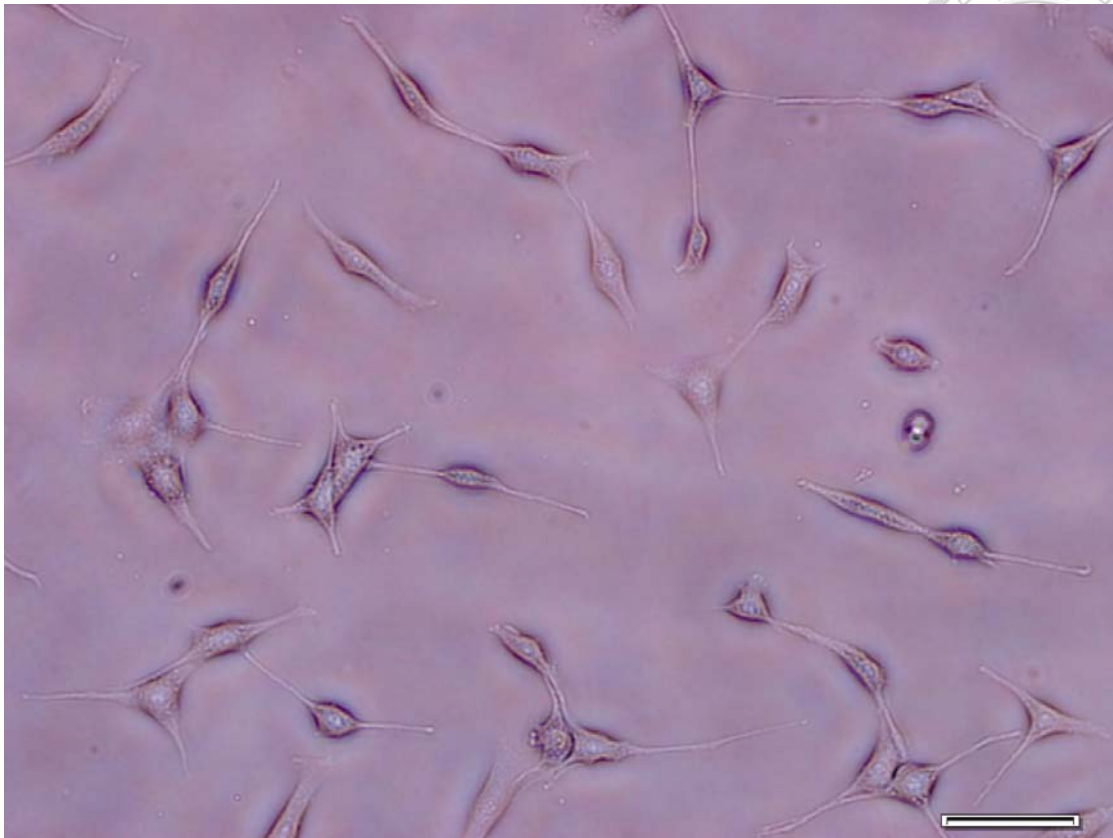


圖 4.3-3 50% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 μm。

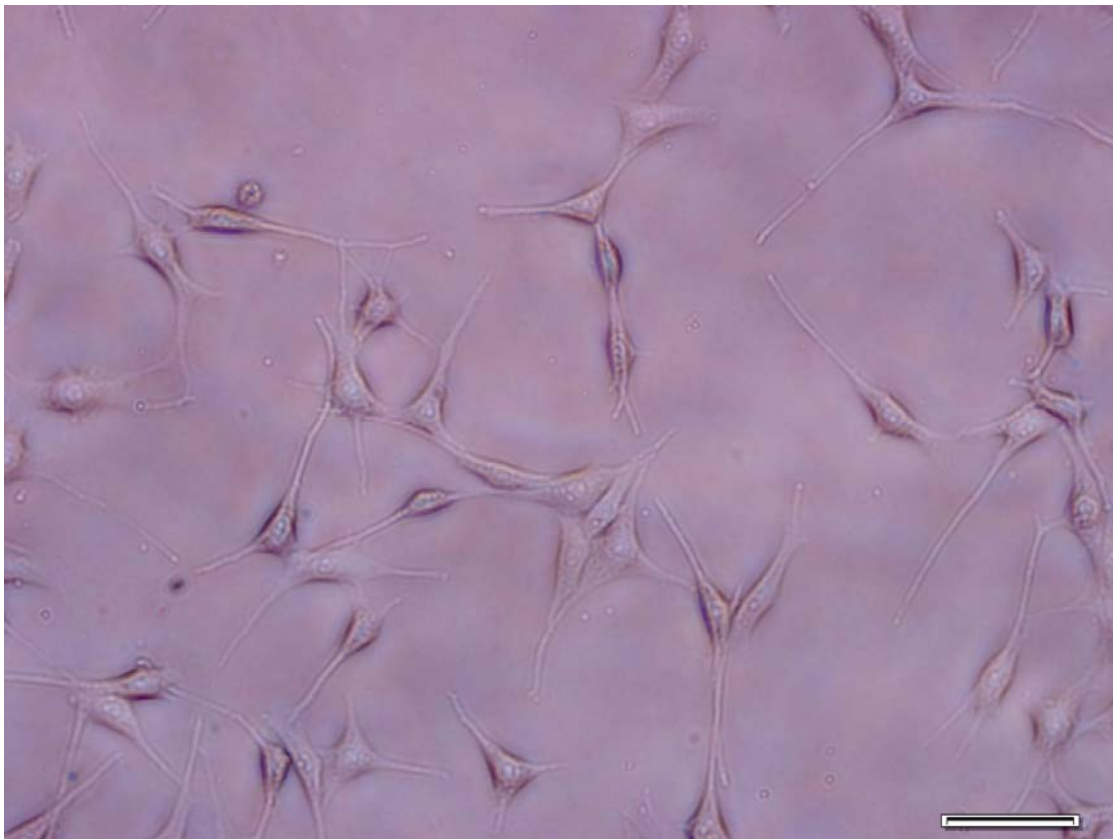


圖 4.3-4 70% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 μm。

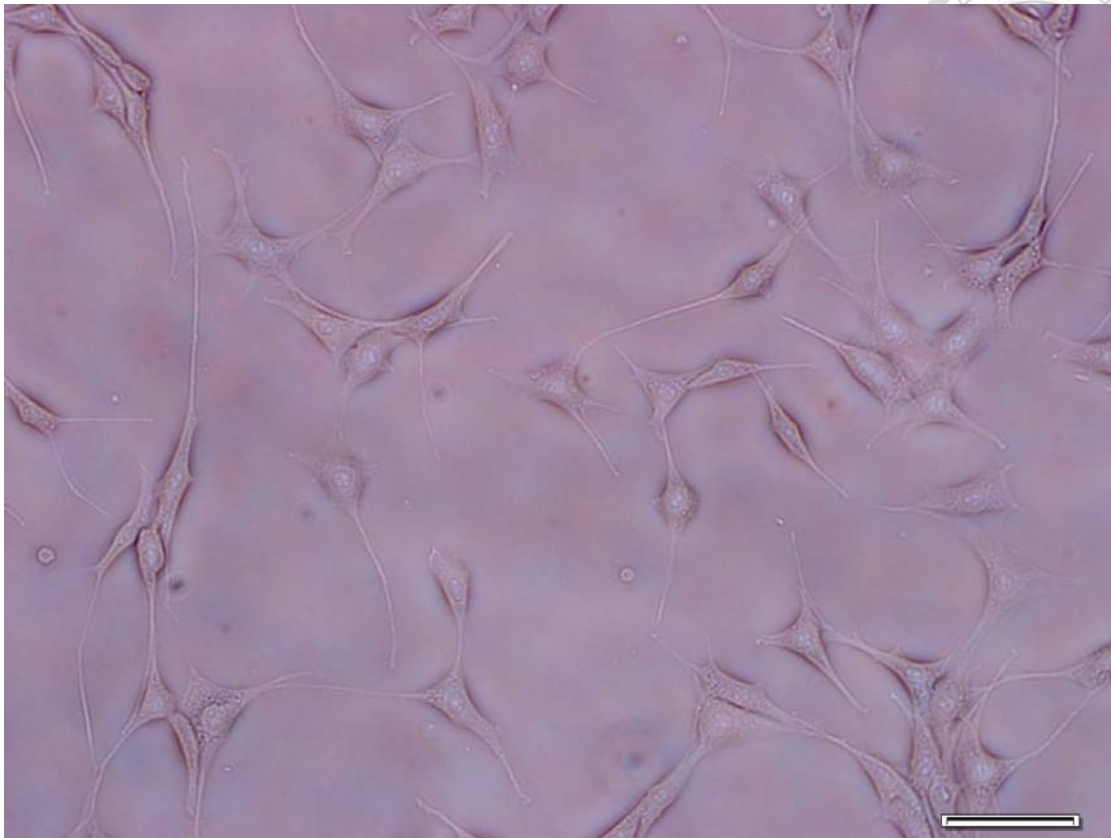


圖 4.3-5 100% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之光學影像，比例尺為 20 μm。

#### 4.3.2. 以螢光顯微鏡觀察表面電位對細胞形貌的影響

為了改善光學顯微鏡對比不佳的問題，改採螢光顯微鏡觀察細胞形貌。當使用螢光顯微鏡拍攝影像時，只有接收激發光後產生的發射波長能夠順利通過濾鏡，因此未與螢光染劑結合的玻璃基材便不會產生發射波長，而在影像中呈現黑色。如此便能克服光學顯微鏡對比不佳的問題。

圖 4.3-6 至圖 4.3-10 是細胞在各比例試片上培養 24 小時後的螢光照片。和光學影像比較，細胞的邊緣較為清楚，克服了原本對比較差的問題。各比例間相互比較可以發現，在 100% NH<sub>2</sub> 表面上的細胞，有較多比例呈現多稜角型，表示細胞較為健康；相較之下 0% NH<sub>2</sub> 表面上則多為球型與長條型的細胞，表示細胞生長情況較差。從這一系列的圖中，可以得到，當表面 NH<sub>2</sub> 比例愈高，zeta potential 愈正，細胞的生長情況較佳；反之，當表面 NH<sub>2</sub> 比

例愈低，zeta potential 愈負，細胞的生長情況會愈差。這個結果與 4.3.1 節相符合。

採用螢光顯微鏡有效改善了對比問題，但細胞間的連結，由於不易染色，較難在螢光顯微鏡下觀察。此外，為了達到更大的放大倍率，仍必須使用電子顯微鏡來拍攝影像。

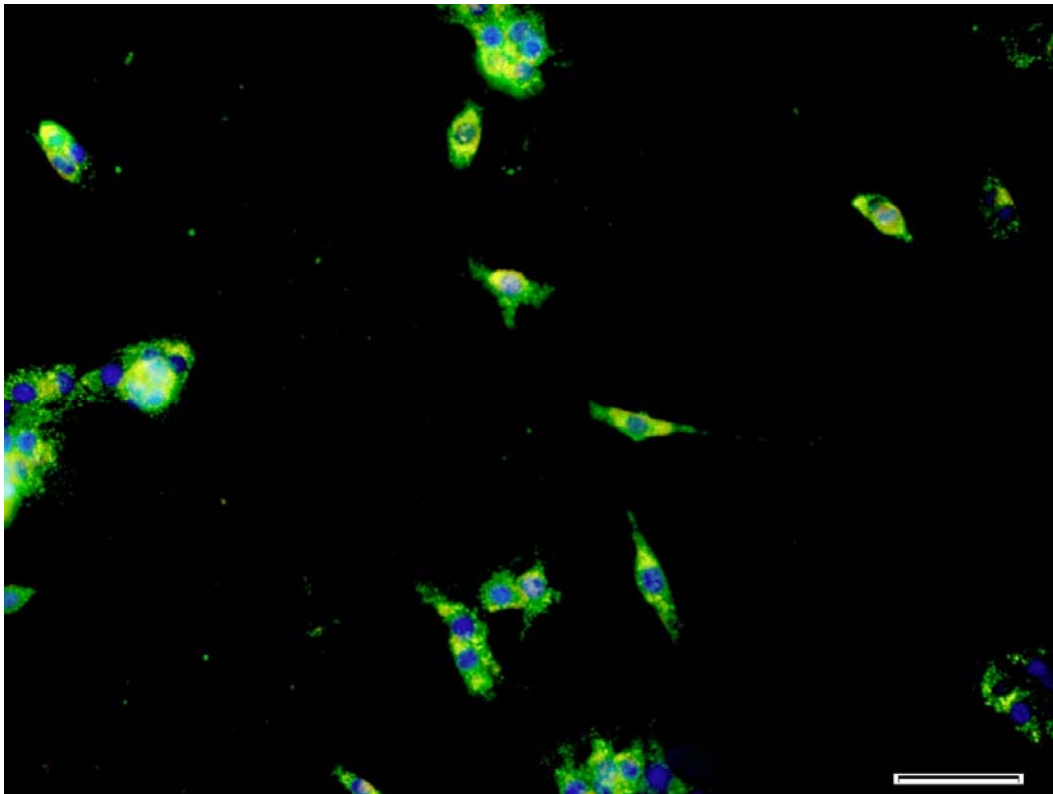


圖 4.3-6 0% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。



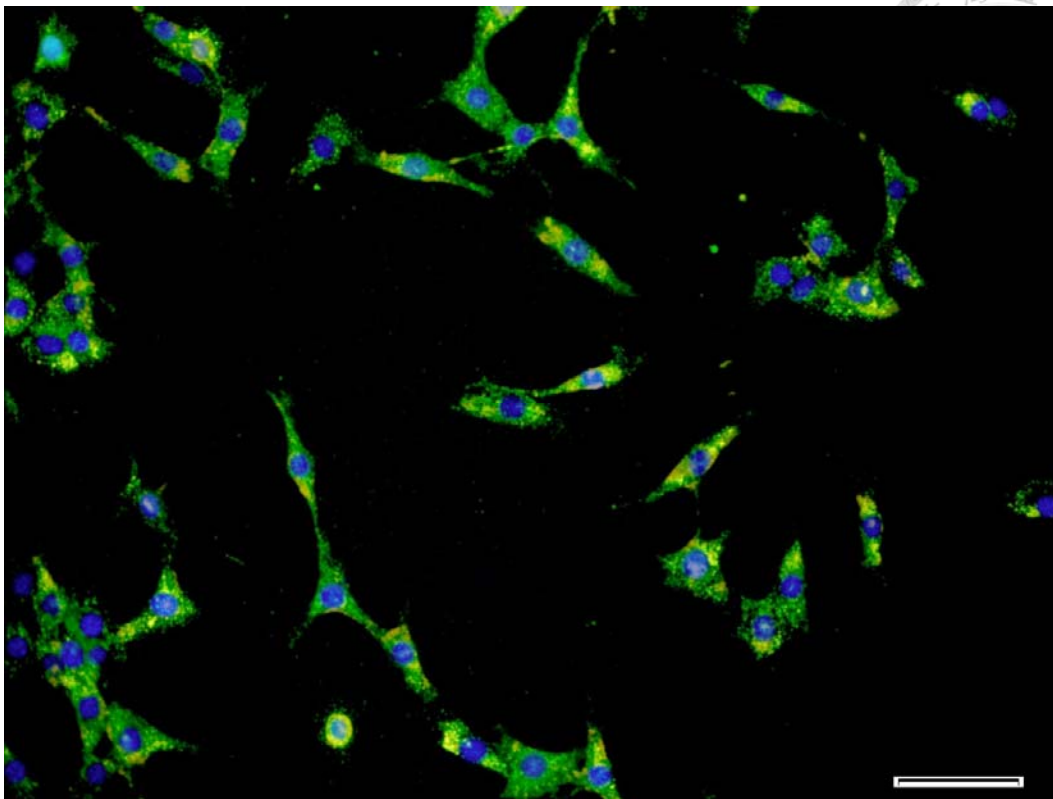


圖 4.3-7 30% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。

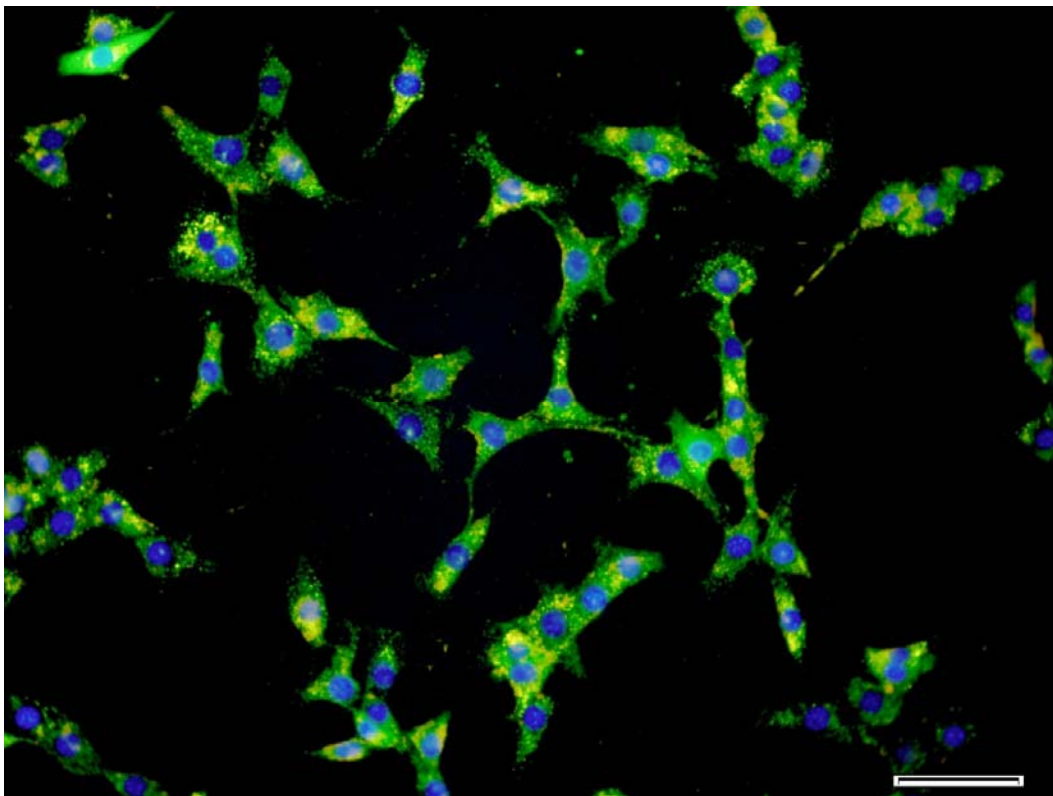


圖 4.3-8 50% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。

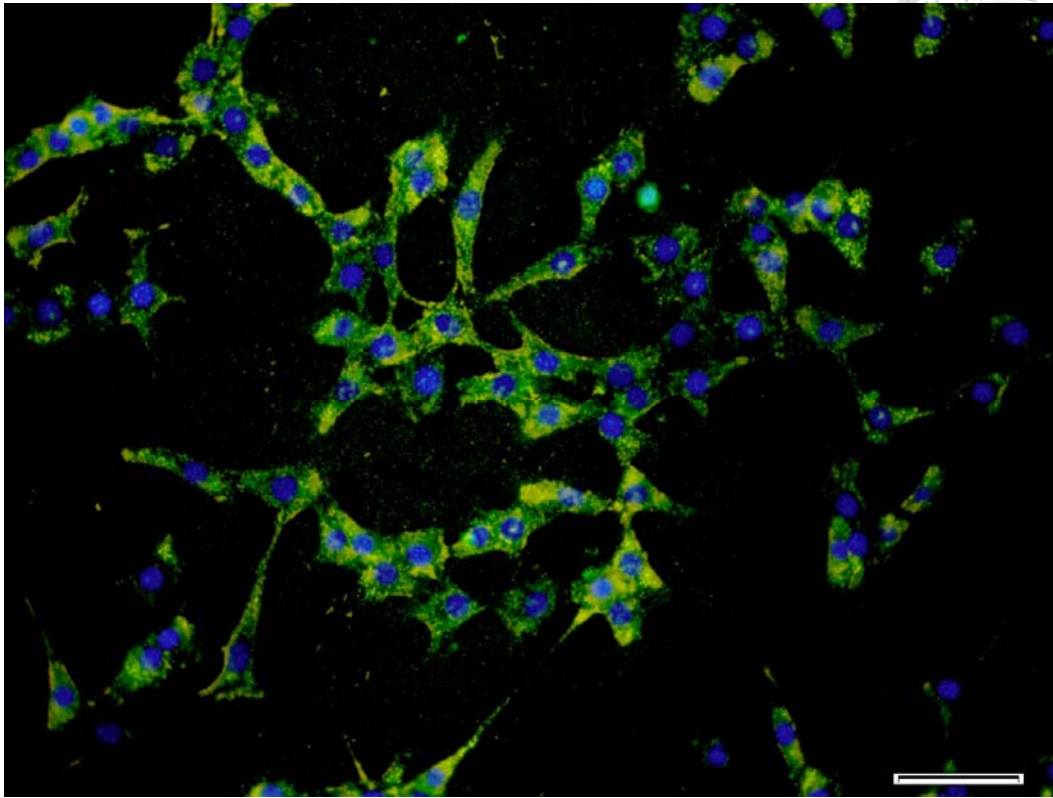


圖 4.3-9 70% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。

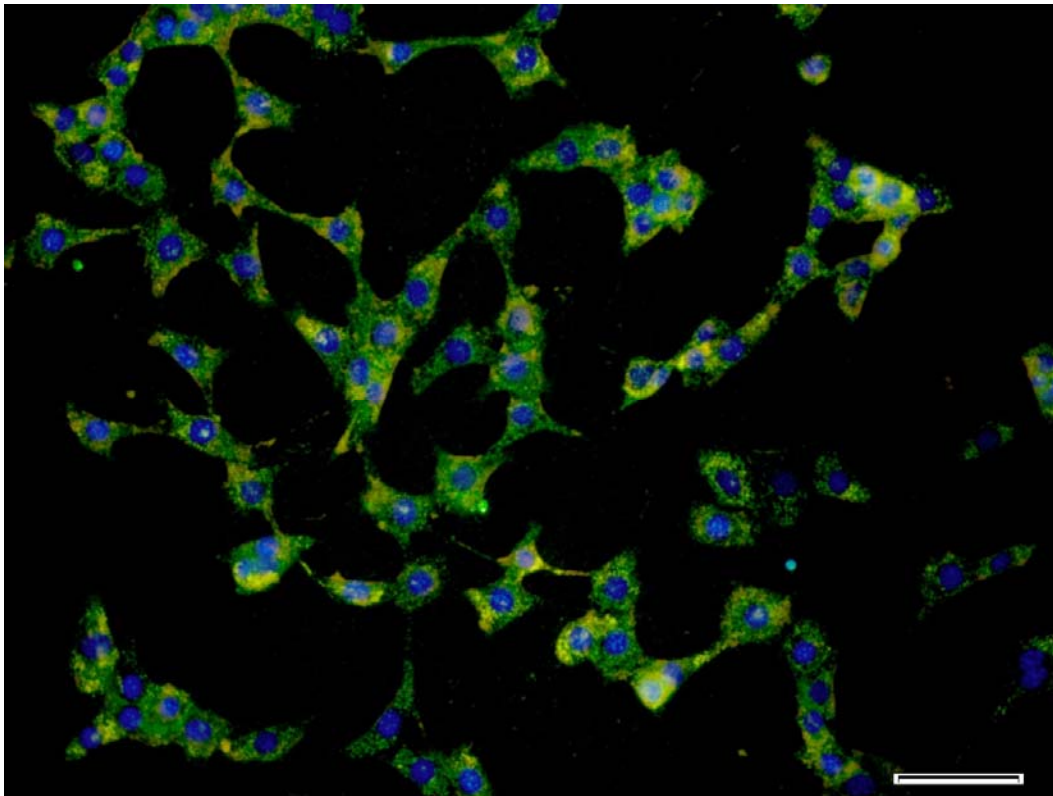


圖 4.3-10 100% NH<sub>2</sub> 表面上，細胞之螢光影像，藍色為細胞核，綠色為細胞膜，比例尺為 20 μm。



### 4.3.3. 以掃描式電子顯微鏡觀察表面電位對細胞形貌的影響

圖 4.3-11 至圖 4.3-15 為細胞在各比例試片上培養 4 小時後的電子顯微鏡影像。從影像中可知，100%  $\text{NH}_2$  表面上的細胞伸出了相當多且密集的突觸 (protrusion)，甚至已經與上方相鄰的細胞產生了連結。而隨著表面  $\text{NH}_2$  官能基比例的下降，細胞伸出的突觸量也隨之下降。推測可能原因有二，一種可能是 zeta potential 較正的表面會使細胞貼附速率較快，而較早開始向外伸出突觸，另一種可能是 zeta potential 較正的表面會使細胞生長較佳，而伸出較多的突觸。

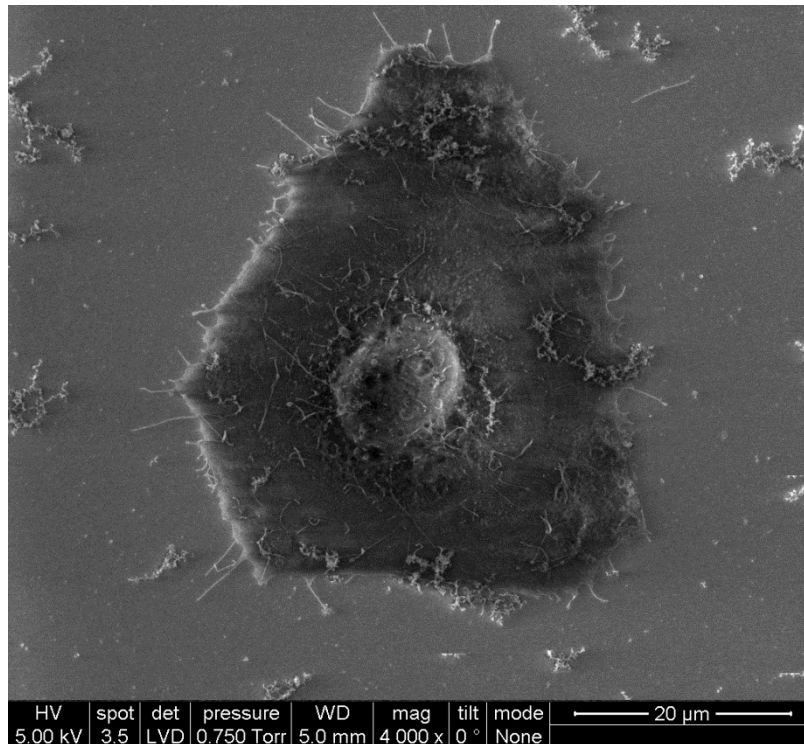


圖 4.3-11 0%  $\text{NH}_2$  表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

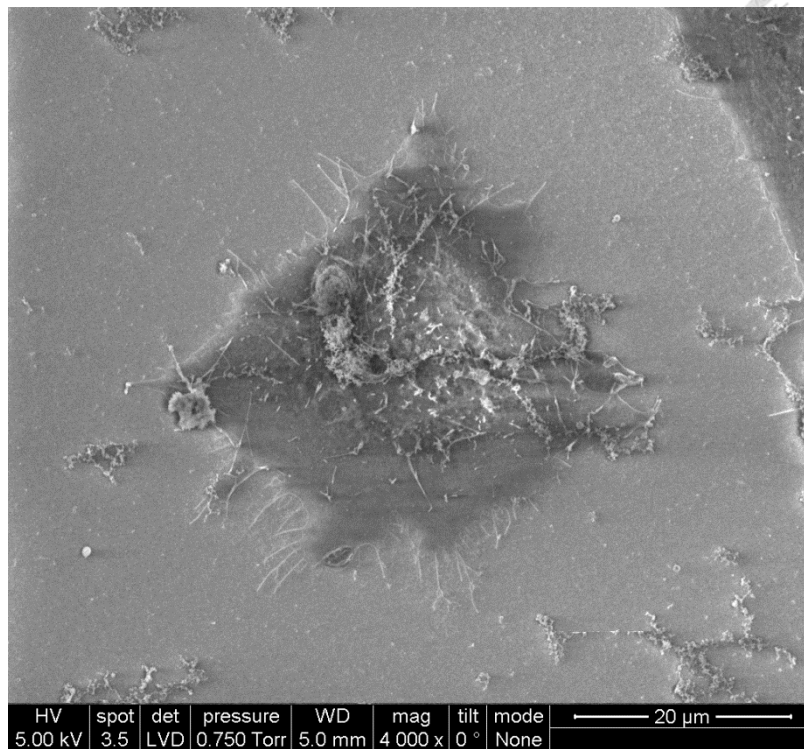


圖 4.3-12 30% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

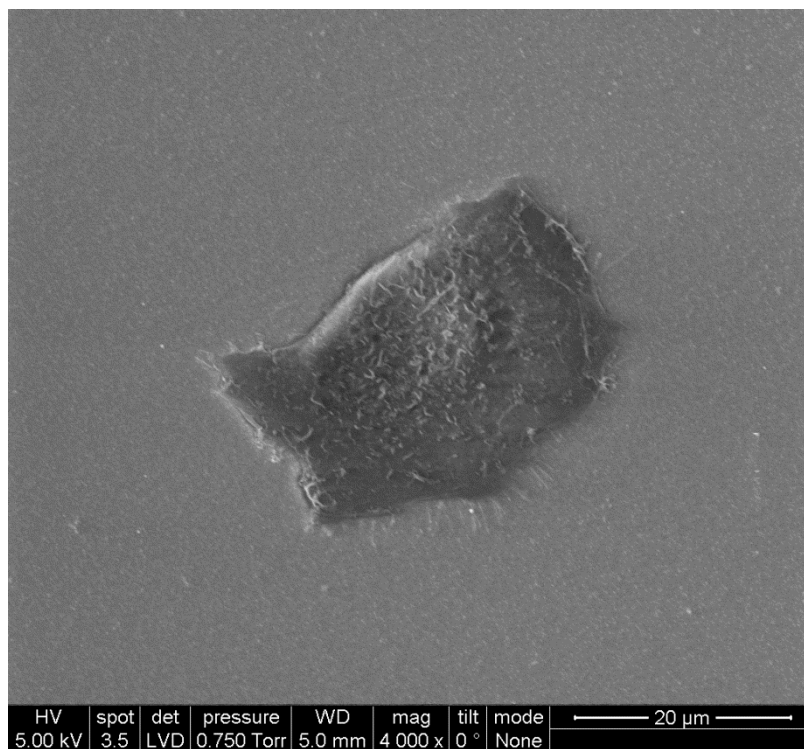


圖 4.3-13 50% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

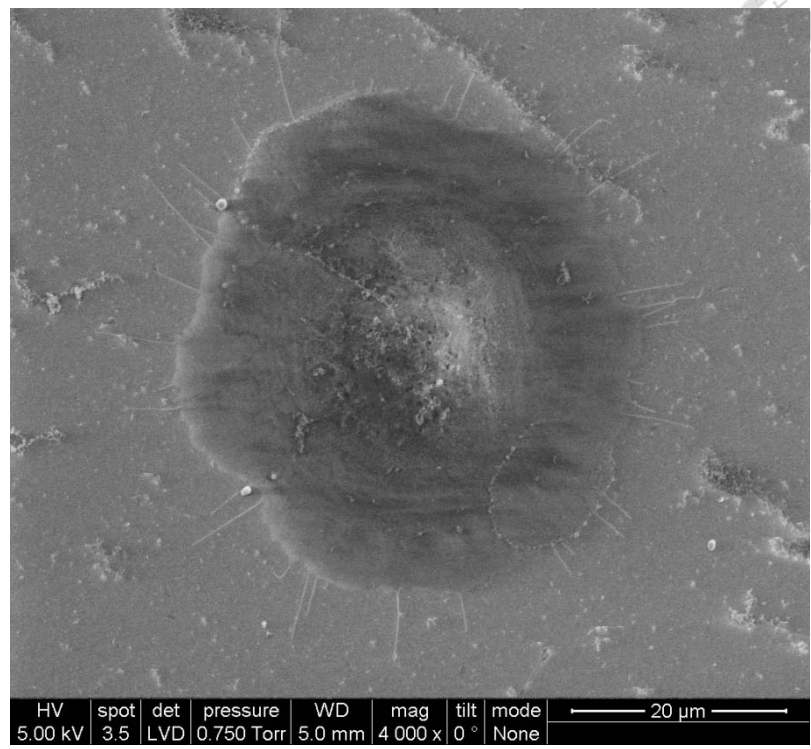


圖 4.3-14 70% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

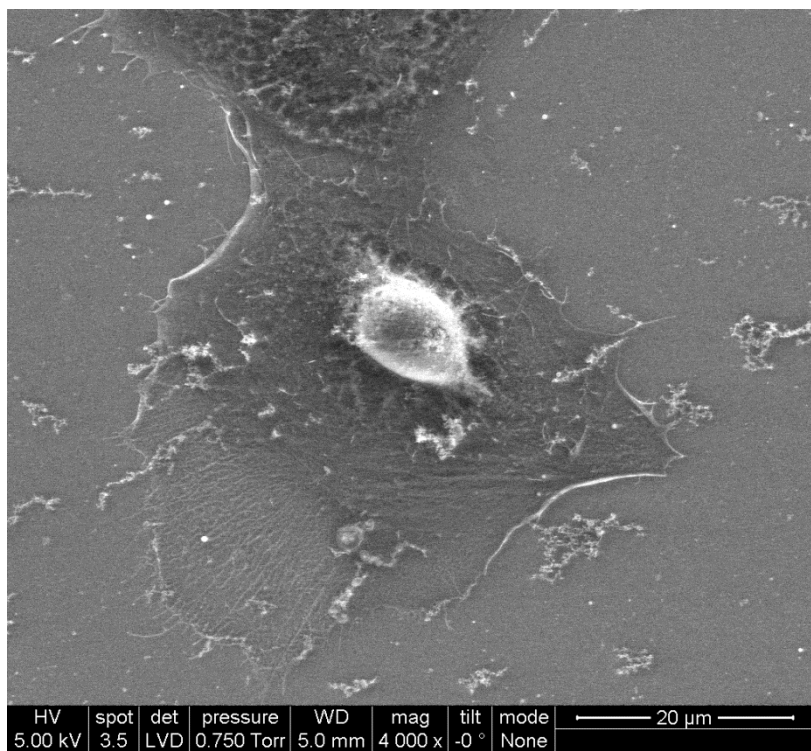


圖 4.3-15 100% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 4 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

圖 4.3-16 至圖 4.3-20 為細胞在各比例試片上培養 24 小時後的電子顯微鏡影像。從圖中可看出，100% NH<sub>2</sub> 表面上的細胞攤的較平，外型也呈現多稜角狀，與周圍的連結也較多，屬於比較健康的細胞。而在 0% NH<sub>2</sub> 表面上的細胞則呈現長條型，也沒有正常的攤平在表面，與周圍的連結也較少，此為較不健康的細胞。推測是因為在 100% NH<sub>2</sub> 表面上的細胞密度較高，較易與周遭的細胞產生連結，使得細胞的生長狀況較佳，而在 0% NH<sub>2</sub> 的表面則因細胞密度低，使得細胞與周遭連結較少，連結也較為細長。此結果與光學顯微鏡、螢光顯微鏡的結果相同。當 zeta potential 愈正，細胞的貼附生長情況較佳；zeta potential 愈負，細胞的生長情況則較差。

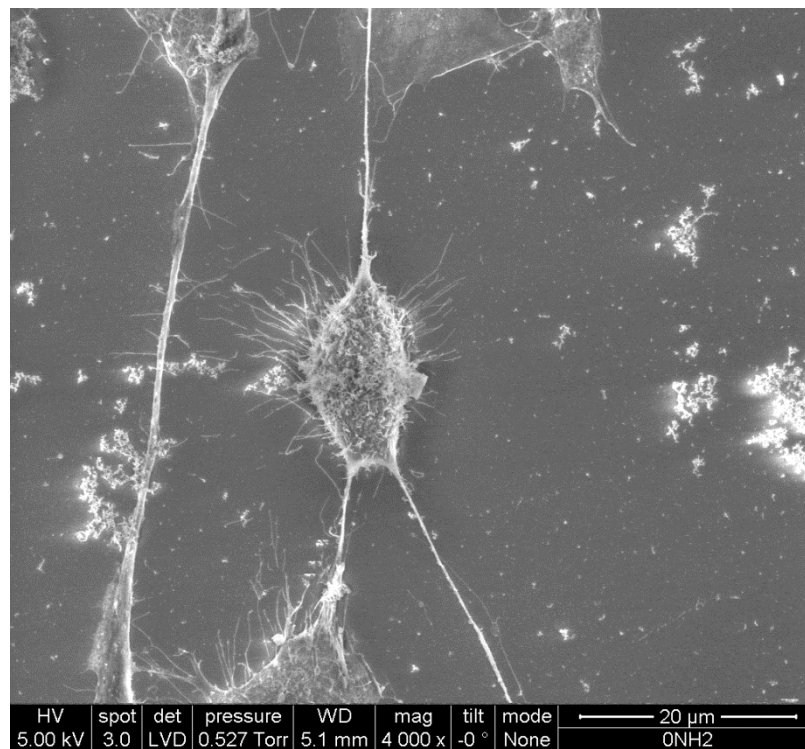


圖 4.3-16 0% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

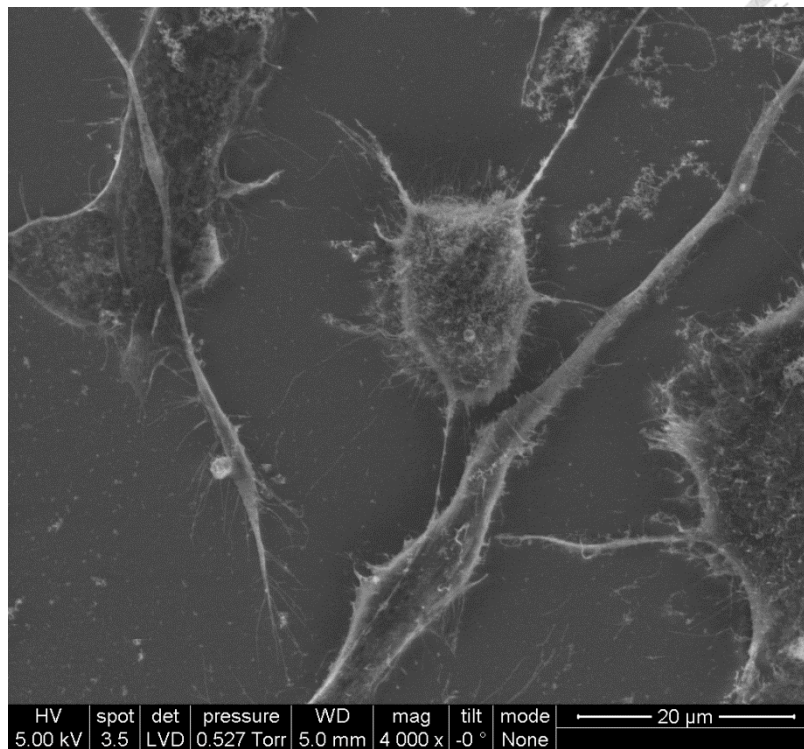
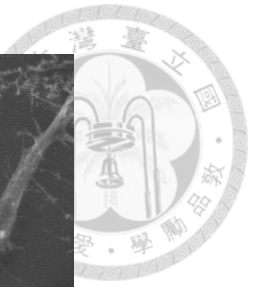


圖 4.3-17 30% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

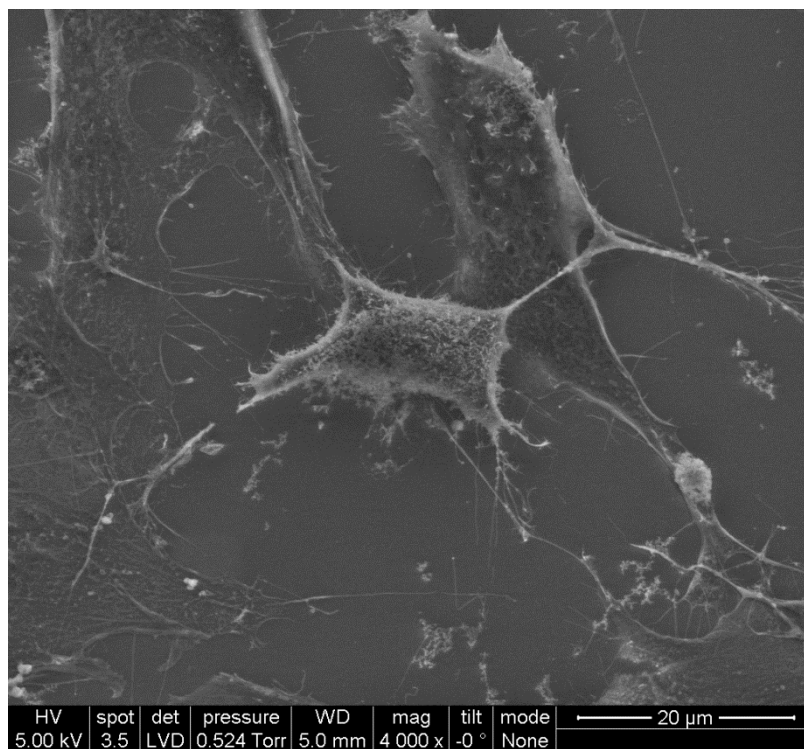


圖 4.3-18 50% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

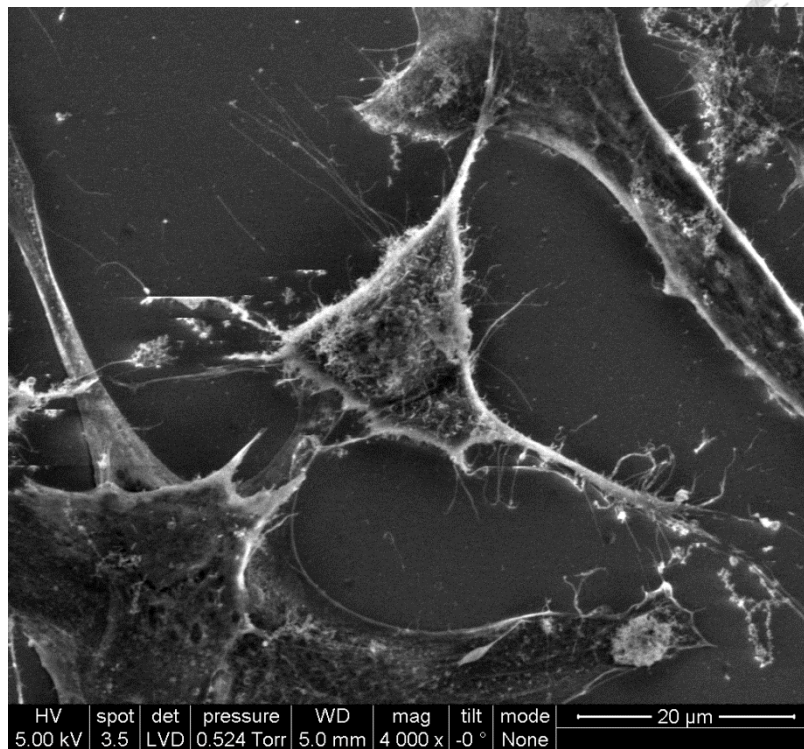
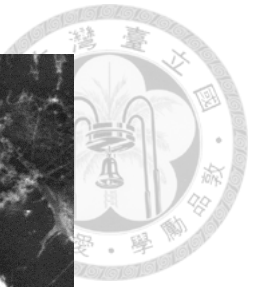


圖 4.3-19 70% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。

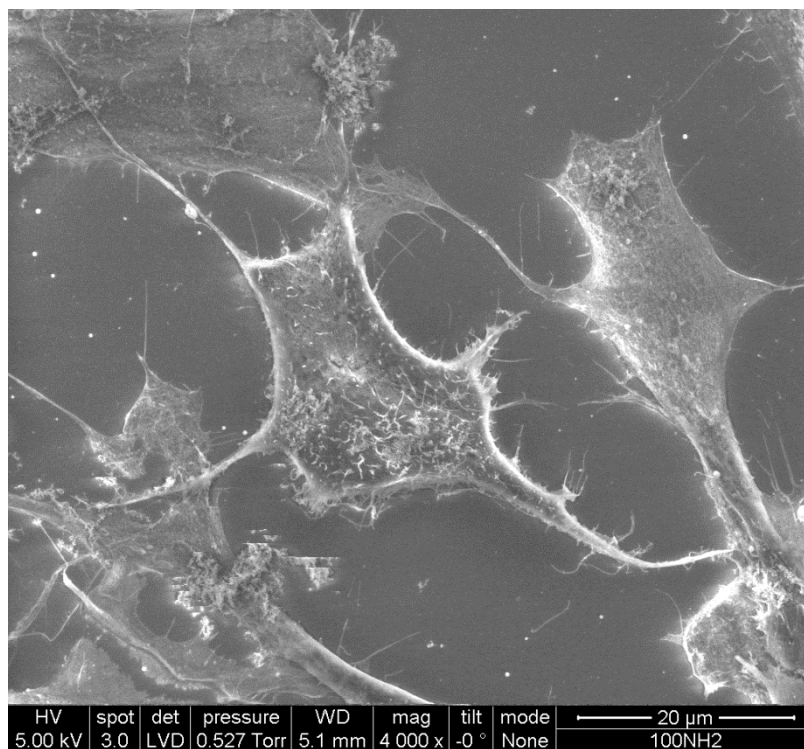



圖 4.3-20 100% NH<sub>2</sub> 表面上，培養 24 小時後細胞的電子顯微鏡明場影像。



透過拍攝光學顯微鏡、螢光顯微鏡以及電子顯微鏡三種不同的影像，都得出相同的結果：當表面  $\text{NH}_2$  官能基比例愈高，zeta potential 愈正，細胞的貼附與生長情形都較佳，反之，當表面  $\text{NH}_2$  官能基比例愈低，zeta potential 愈負，細胞的貼附與生長情形都較差。由此可知，zeta potential 對於細胞的貼附生長行為有相當大的影響。



## 第五章 結論




1. 本研究將具有  $\text{NH}_2$  和  $\text{SH}$  官能基之矽烷分子，以不同比例混合修飾玻璃基材，希望藉由調整玻璃表面的二元官能基比例來調控其表面電位。藉由 XPS 量測表面官能基實際比例，由實驗結果可知，表面  $\text{NH}_2$  官能基的實際比例較製備溶液中大，顯示胺基矽烷在玻璃表面的生長速度較快。
2. NIH3T3 細胞於 SAMs 試片上的貼附量隨著 zeta potential 增加而增加。這是由於細胞外層整體帶負電性，因此當材料表面電性為正時，將吸引細胞貼附；反之當材料表面電性為負，將與細胞表面產生排斥，而使細胞較不易貼附於表面。
3. 比較在 SAMs 試片上培養不同時間的 NIH3T3 細胞，其生長量隨著 zeta potential 增加而增加，但生長速率卻隨著 zeta potential 增加而下降。這是由於當 zeta potential 較正時，會貼附較多的細胞，因此生長量較大，但因為貼附於表面的細胞較多，較易產生接觸抑制而使生長速率下降。
4. 提高 NIH3T3 細胞種下去的初始密度，會增加各試片的貼附量，但對於各試片貼附的比例並沒有太大的影響。這是因為細胞貼附時，主要是受細胞整體的負電性以及材料表面的電性影響，相較之下受細胞密度的影響則較小。
5. 提高 NIH3T3 細胞種下去的初始密度，會降低  $\text{NH}_2$  官能基比例較高的試片上的細胞生長速率，對於  $\text{NH}_2$  官能基比例較低的試片上的細胞生長速率則影響較小。這是由於當提高細胞初始密度時，在  $\text{NH}_2$  官能基比例較高的試片上，會貼附較多的細胞，使得接觸抑制的情形更加嚴重，使得生長速率下降；而在  $\text{NH}_2$  官能基比例較低的試片上，由於細胞的貼附量較少，比較沒有接觸抑制的情形發生，因此其生長速率受影響較小。
6. 觀察 NIH3T3 細胞在 SAMs 試片上生長的形貌，當 zeta potential 愈正時，細胞的形貌愈正常健康。這是由於當 zeta potential 愈正時，細胞的貼附量較多，較易和其他細胞產生連結，使細胞生長情形較佳。



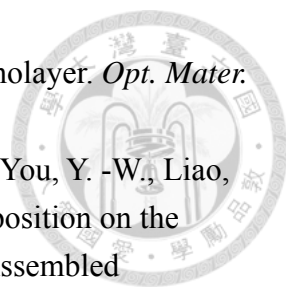
## 第六章 參考文獻



1. Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell*: Garland Science.
2. Ian Freshney, R. (2010). *Culture of animal cells*.
3. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., Fausto, N. (2010). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*.
4. Gottwald, E., Lahni, B., Thiele, D., Giselbrecht, S., Welle, A., & Weibezahn, K. F. (2008). Chip-based three-dimensional cell culture in perfused micro-bioreactors. *J. Vis. Exp.* 15:564.
5. Birnie, G. D., & Simons, P. J. (1967). The incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -uridine into chick and mouse embryo cells cultured on stainless steel. *Exp. Cell Res.* 46:355–366.
6. Westermark, B. (1978). Growth control in miniclones of human glial cells. *Exp. Cell Res.* 111:295–299.
7. Lehnert, D., Wehrle-Haller, B., David, C., Weiland, U., Ballestrem, C., Imhof, B.A., & Bastmeyer, M. (2004). Cell behaviour on micropatterned substrata: Limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J. Cell Sci.*, 117(1), 41-52.
8. Bigelow, W. C., Pickett, D. L., & Zisman, W. A. (1946). Oleophobic Monolayers. 1. Films Adsorbed from Solution in Non-Polar Liquids. *J. Colloid Interface Sci.* 1(6), 513-538.
9. Xia, Y., & Whitesides, G. M. (1998). Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 550-575.
10. Lin, W. -C., Lee, S. -H., Karakachian, M., Yu, B. -Y., Chen, Y. -Y., Lin, Y. -C., & Shyue, J. -J. (2009). Tuning the surface potential of gold substrates arbitrarily with self-assembled monolayers with mixed functional groups. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11(29), 6199-6204.
11. Lin, Y. -C., Yu, B. -Y., Lin, W. -C., Lee, S. -H., Kuo, C. -H., & Shyue, J. -J. (2009). Tailoring the surface potential of gold nanoparticles with self-assembled monolayers with mixed functional groups. *J. Colloid Interface Sci.* 340(1), 126-130.
12. Bain, C. D., & Whitesides, G. M. (1988). Formation of 2-Component Surfaces by the Spontaneous Assembly of Monolayers on Gold from Solutions Containing Mixtures of Organic Thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 110(19), 6560-6561.
13. Sagiv, J. (1980). Organized Monolayers by Adsorption. 1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid-Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 102(1), 92-98.

- 
14. Shyue, J. -J., & De Guire, M. R. (2004). Acid-base properties and zeta potentials of self-assembled monolayers obtained via in situ transformations. *Langmuir*, 20(20), 8693-8698.
  15. Ulman, A. (1996). Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* 96(4), 1533-1554.
  16. Bierbaum, K., Kinzler, M., Woll, Ch., Grunze, M., Hahner, G., Heid, S., & Effenberger, F. (1994). A near edge X-ray absorption fine structure spectroscopy and XPS study of the film properties of SAMs of organosilanes on oxidized Si(100). *Langmuir*, 11(2), 512-518.
  17. Gao, Y. F., & Koumoto, K. (2005). Bioinspired ceramic thin film processing: Present status and future perspectives. *Cryst. Growth Des.* 5(5), 1983-2017.
  18. Whitesides, G. M., & Laibinis, P. E. (1990). Wet Chemical Approaches to the Characterization of Organic-Surfaces - Self-Assembled Monolayers, Wetting, and the Physical Organic-Chemistry of the Solid Liquid Interface. *Langmuir*, 6(1), 87-96.
  19. Arima, Y., & Iwata, H. (2007). Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 28(20), 3074-3082.
  20. Shyue, J. -J., & De Guire, M. R. (2005). Deposition of vanadium(V) oxide thin films on nitrogen-containing self-assembled monolayers. *Chem. Mater.* 17(4), 787-794.
  21. Shyue, J. -J., & De Guire, M. R. (2005). Deposition of titanium-vanadium oxide thin films on organic self-assembled monolayers: Role of complexing agents. *Chem. Mater.* 17(22), 5550-5557.
  22. Gao, Y. F., Masude, Y., Yonezawa, T., & Koumoto, K. (2002). Site-Selective Deposition and Micropatterning of SrTiO<sub>3</sub> Thin Film on Self-Assembled Monolayers by the Liquid Phase Deposition Method. *Chem. Mater.* 14(12), 5006-5014.
  23. Lin, Y. -C., Yu, B. -Y., Lin, W. -C., Chen, Y. -Y., & Shyue, J. -J. (2008). Site-selective deposition of gold on photo-patterned self-assembled monolayers. *Chem. Mater.* 20(21), 6606-6610.
  24. Palyvode, O., Bordenyuk, A. N., Yatawara, A. K., McCullen, E., Chen, C. -C., Benderskii, A. V., & Auner, G. W. (2008). Molecular organization in SAMs used for neuronal cell growth. *Langmuir*, 24(8), 4097-4106.
  25. Altankov, G., Richau, K., & Groth, T. (2003). The role of surface zeta potential and substratum chemistry for regulation of dermal fibroblasts interaction. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 34(12), 1120-1128.
  26. Faucheux, N., Schweiss, R., Lützwow, K., Werner, C., & Groth, T. (2004).

- Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*, 25(14), 2721-2730.
27. Margel, S., Vogler, E.A., Firment, L., Watt, T., Haynie, S., & Sogah, D. Y. (1993). Peptide, protein, and cellular interactions with self-assembled monolayer model surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 27(12), 1463-1476.
  28. Bulliard, X., Benayad, A., Ihn, S. -G., Yun, S., Park, J. -H., Choi, W., Choi, Y. S., & Kim, Y. (2013). Autocatalytic effect of amine-terminated precursors in mixed self-assembled monolayers. *RSC Adv.* 3, 1112-1118.
  29. Kuo, C. -H., Chang, H. -Y., Liu, C. -P., Lee, S. -H., You, Y. -W., Shyue, J. -J. (2011). Effect of surface chemical composition on the surface potential and iso-electric point of silicon substrates modified with self-assembled monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13(9), 3649-3653.
  30. Mrksich, M. (2000). A surface chemistry approach to studying cell adhesion. *Chem. Soc. Rev.* 29(4), 267-273.
  31. Invitrogen. (2008). Lipophilic tracers—DiI, DiO, DiD, DiA, and DiR (mp 00282). 1-6.
  32. Invitrogen. (2005). Hoechst stains (mp 21486). 1-4.
  33. Ploem, J. S., & Tanke, H. J. (1987). *Introduction to Fluorescence Microscopy*.
  34. Kiernan, J. A. (2000). Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today.* 2000(1), 8–12.
  35. Basu, P., & Johnson, M. (2009). *The Integrated Approach to Chemistry Laboratory: Selected Experiments*.
  36. Christopher Love, J., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., & Whitesides, G. M. (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* 105, 1103-1169
  37. Madou, M. J. (2002). *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*.
  38. Saliterman, S. S. (2005). *Fundamentals of BioMEMS and Medical Microdevices*.
  39. Hiremath, R. K., Rabinal, M. K., Mulimani, B. G., & Khazi, I. M. (2008). Molecularly controlled metal-semiconductor junctions on silicon surface: A dipole effect. *Langmuir*, 24(19), 11300-11306.
  40. He, T., Ding, H., Peor, N., Lu, M., Corley, D. A., Chen, B., Ofir, Y., Gao, Y., Yitzchaik, S., & Tour, J. M. (2008). Silicon/molecule interfacial electronic modifications. *J. Am. Chem. Soc.* 130(5), 1699-1710.
  41. Appleyard, S. F. J., Day, S. R., Pickford, R. D., & Willis, M. R. (2000). Organic electroluminescent devices: enhanced carrier injection using SAM derivatized ITO electrodes. *J. Mater. Chem.* 10(1), 169-173.
  42. Appleyard, S. F. J., & Willis, M. R. (1998). Electroluminescence: enhanced

- 
- injection using ITO electrodes coated with a self assembled monolayer. *Opt. Mater.* 9(1-4), 120-124.
43. Kuo, C. -H., Liu, C. -P., Lee, S. -H., Chang, H. -Y., Lin, W. -C., You, Y. -W., Liao, H. -Y., & Shyue, J. -J. (2011). Effect of Surface Chemical Composition on the Work Function of Silicon Substrates Modified by Binary Self-Assembled Monolayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13(33), 15122-15126.
44. Shen, C. -H., & Lin, J. -C. (2012). Platelet compatibility improvement by proper choice of acidic terminal functionality for mixed-charge self-assembled monolayers. *Langmuir*, 28(1), 640-647
45. Chang, H. -Y., Huang, C. -C., Lin, K. -Y., Kao, W. -L., Liao, H. -Y., You, T. -W., Lin, J. -H., Kuo, Y. -T., Kuo, D. -Y., & Shyue, J. -J. (2014). Effect of surface potential on NIH3T3 cell adhesion and proliferation. *J. Phys. Chem. C*, 118(26), 14464-14470.
46. Lin, S. -P., Huang, S. -Y., Chen, S. -F., Vinzons, L. U., Ciou, J. -Y., & Wong, P. -J. (2014). Investigation of the interfacial effects of small chemical-modified TiO<sub>2</sub> nanotubes on 3T3 fibroblast responses. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. doi: 10.1021/am503323y.