

臺灣二〇〇七年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：人類脂肪幹細胞培養於電漿處理幾丁聚醣薄膜之初步研究

學校 / 作者：國立臺南女子高級中學 洪瑋柔

作者簡介



我是洪瑋柔，目前就讀台南女中二年級數理資優班。家中共有 6 個人，爸爸、媽媽、姊姊、我和兩個弟弟。我的個性開朗活潑，喜歡嘗試新的事物，在學校同時是羽球隊、游泳隊隊員及西洋棋社社長。課餘時間，我喜歡打羽球、網球、游泳、下棋、閱讀和看卡通，最喜歡的卡通是海賊王。因為對醫學很感興趣，將來也期盼能從事相關的事業，所以希望藉由這次科展的機會，對這方面的領域有更深入的了解。研究過程中，學習到做實驗的程序與精神，並對題目相關的知識印象深刻，受益良多。最後，我要對家人和指導教師們的鼓勵和指導致上萬分的感謝，有了這些幫助和支持，這項研究才得以完成。

目次

i. 摘要/ Abstract

壹、前言	1
貳、材料與藥品	6
參、研究過程與方法	6
一、Chitosan 溶液的製備	
二、人類脂肪幹細胞體外培養	
三、計算細胞數目	
四、細胞毒性測試	
五、Chitosan 薄膜製備	
六、以氬氣電漿對 Chitosan 薄膜做表面處理	
七、電漿處理後 Chitosan 與水接觸角的測量	
八、細胞再經電漿處理的 Chitosan 薄膜上的型態觀察	
肆、研究結果與討論	9
一、獲得人類脂肪幹細胞以及培養	
二、Chitosan 的細胞毒性測試	
三、電漿處理對 Chitosan 與水接觸角的影響	
四、不同時間電漿處理的 Chitosan 對細胞型態的影響	
伍、結論與應用	12
陸、參考文獻	13
柒、致謝	13

摘要

人類的脂肪幹細胞，取得容易，且來源不涉及倫理問題，是一種理想的成體幹細胞來源。目前已發現其可分化成骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肌肉細胞等等，因此其深具未來發展的潛力，將可應用於組織工程、細胞治療上。而 Chitosan(幾丁聚醣)則是一種具生物相容性、生物分解性且無生物毒性的材料，在生醫材料的領域中亦具相當的發展性。在這個實驗中，我們將 chitosan 薄膜經過氬氣電漿處理，並測量其與水的接觸角，發現電漿處理時間愈長，接觸角愈小，表示電漿處理有助於增加 chitosan 薄膜表面的親水性。細胞在經過電漿處理的薄膜上，其黏附情形亦隨處理時間增長，黏著數目愈多，且型態愈扁平，表示電漿處理過的 chitosan 表面有助於細胞的依附。

關鍵字: 脂肪幹細胞、幾丁聚醣、氬氣電漿

Abstract

Human Processed Lipoaspirate cells (hPLA) can be subtracted easily from lipoaspirate and the source of the cells does not violate the moral and ethic standard. Therefore, it is an ideal source of somatic stem cells. Recently, researches show that the hPLA cells have the ability to differentiate into osteoblast cells, chondrocytes cells, adipose cells, and skeletal muscle cells. In the future, they have great potential in tissue engineering or cell therapy. Chitosan is a biocompatible, biodegradable, and non-toxic material. It is also an advanced material to be used in the biomaterial field. In this study, we treated chitosan film with argon plasma and measured its contact angle with water. The contact angles decreased as the duration of plasma treatment on chitosan increased, indicating that plasma treatment has a positive influence on increasing the hydrophilicity of chitosan film surface. Moreover, the numbers of hPLA cells adhering to chitosan films increased and their morphology became flatter when the durations of plasma treatment on chitosan films prolonged. Hence, the result showed that plasma treatment on chitosan films also promoted the adhesion of hPLA cells on chitosan film surfaces.

Key word: hPLA, chitosan, argon-plasma

壹、前言

幹細胞是一群保有在分裂過程中自我更新的能力並可以分化成各種類型細胞的原始細胞。這個領域的研究是由 1960 年加拿大科學家 Ernest A. McCulloch 和 James E. Till 的實驗發現骨髓中至少含有兩種幹細胞(造血幹細胞 hematopoietic stem cells 和骨髓間質細胞 bone marrow stromal cells)開始的。幹細胞依其來源大致可分為兩類: 胚胎幹細胞(embryo stem cell) 和成體幹細胞(adult stem cell), 另外還有一種則是來自臍帶血的臍帶血幹細胞。在囊胚發展成胚胎的過程中, 幹細胞會不停的分化成胚胎組織, 而在成體中, 前驅細胞(progenitor cells)和幹細胞則扮演修復系統的角色, 負責修補受傷的組織。

幹細胞有非常嚴謹的定義, 依定義幹細胞必須具備兩種能力, 即自我更新和終極分化能力。自我更新能力是可以歷經多次細胞週期、不斷分裂, 卻仍能保持在尚未分化狀態的能力; 終極分化則是細胞分化成任何類型之成熟細胞的能力。在生命週期中, 幹細胞共分有兩種分裂方式以確保其自我更新: 對稱分裂與不對稱分裂。首先, 進行對稱分裂, 幹細胞分裂成兩個同樣是幹細胞的子細胞。接著進行不對稱分裂, 分裂完成後的兩個子細胞, 其中之一仍為幹細胞, 另一個則分化成自我更新和分化能力皆有限的前驅細胞。這些前驅細胞會在歷經多次的細胞分裂才會完全分化成成熟的細胞。另外, 更進一步的區分, 可將幹細胞依分化能力分為: 全能幹細胞(totipotent stem cells), 由精卵結合產生, 受精卵在最初幾次分裂的細胞也都是全能幹細胞。這些幹細胞能分化成各種類型的胚胎組織細胞及胚胎外組織的細胞, 如胎盤等。一般而言, 其泛指所有有能力發育成完整個體的細胞, 分化能力強, 具有完全的分化潛能, 分化途徑多達兩百多種。事實上, 只有受精卵到桑葚胚的細胞仍是全能的幹細胞, 再往後發展就不再具如此強的分化能力。多能幹細胞(pluripotent stem cells), 是全能幹細胞的「後裔」, 指從囊胚內部取出的內細胞群, 具有分化成三個胚層細胞的能力, 但無法發育成個體, 因為他們無法分化成胚胎外組織的細胞。專能(多潛能)幹細胞(multipotent stem cells), 是多能幹細胞再繼續分化的結果, 其分化路徑比之全能及多能幹細胞已大幅減少, 只能分化出同一族的細胞。例如, 造血幹細胞(hematopoietic stem cells)就是一種專能幹細胞, 只能分化成紅血球(red blood cells)、白血球(white blood cells)、血小板(platelets)等血球細胞。單能幹細胞(unipotent stem cells), 即幹細胞中分化途徑最窄的, 只能分化成一種成熟細胞, 唯獨其仍具有自我更新能力, 故仍符合幹細胞兩項基本要件, 屬幹細胞的一種。

就應用性而言, 以全能性及多能性幹細胞能力最強, 科學家能夠操控其分化效果也最佳, 前景最被看好。這些細胞可從受精卵發育的過程中取得。最早在 1998 年美國科學家 James Thomson, 便在人類進行人工受精時, 使用多餘的受精卵來取得胚胎幹細胞。當受精卵發展成囊胚(blastula or blastocyst) (約 5~6 天), 囊胚含有約 150 個未分化的細胞, 外表是一層扁平的細胞, 稱為滋養層(trophoblast), 可發育成胚胎的支援組織如胎盤等。囊胚中心的腔, 稱囊胚腔(blastocoel), 腔內一側的細胞群, 稱內細胞群(inner cell mass), 就是我們所謂的胚胎幹細胞, 屬於多能幹細胞。這些細胞在體外培養的環境下, 若沒有給予刺激因子或加入白血球抑制因子(leukemia inhibitory factor), 則細胞能持續分裂並保持在尚未分化的時期。若加入刺激分化的因子或去除白血球抑制因子, 細胞便會開始分裂、分化形成內、中、外三個胚層, 每個胚層將分別分化形成人體的各種組織和器官。基於他們這些特徵和能力, 胚胎幹細胞成爲一種極具潛能的再生醫療資源和受傷組織的代替材料。未來當操控胚胎幹細胞分化的機制技

術發展成熟，可以將幹細胞誘導成指定的細胞，他們就可被應用於治療某些疾病。在將來可能以胚胎幹細胞治療的疾病包括帕金森氏症(Parkinson's disease)、糖尿病(diabetes)、脊椎創傷(traumatic spinal cord injury)、浦金氏細胞衰退(Purkinje cell degeneration)、裘馨氏肌肉萎縮症(Duchenne's muscular dystrophy, DMD)、心臟病及視覺和聽力喪失等。不過，胚胎幹細胞的研究牽涉到倫理和宗教的問題，目前沒有任何國家批准胚胎幹細胞在醫療上的應用，有些國家甚至已暫停在胚胎幹細胞上的研究或生產。在美國，布希總統決定有限度的開放幹細胞研究，聯邦經費只能補助利用現有的 64 株人類胚胎幹細胞株進行的研究。這使得科學家開始尋找另一種幹細胞來源—成體幹細胞。

成體幹細胞(adult stem cells)，或體幹細胞(somatic stem cells)，是存留在成人和小孩器官中仍保有生長並轉化成其他種細胞能力的細胞，其在成熟組織中明確的來源不明，可以確定的是每種組織中都有少量的成體幹細胞。在人體中，這些幹細胞會保持未分化的狀態，直到他們受到刺激，就會開始分裂並負責補充衰老、死去的細胞和修復受損的組織。因為他們細胞分化的能力有限，許多體幹細胞被更明確地歸於所謂前驅細胞。然而，目前一些研究顯示，部分成體幹細胞是專能(多潛能)幹細胞，他們具有可塑性(plasticity)，能分化成他們所在的組織之外的細胞，這種情形稱為轉分化(transdifferentiation)。雖然成體幹細胞的可塑性較胚胎幹細胞低，他們在再生醫療應用上的潛力是無可否認的，而且他們的取得和應用不牽涉倫理和宗教問題(未涉及人類胚胎的破壞)，未來用於自身體上也不會引發免疫排斥的困擾，因此漸漸成為幹細胞研究的主流。

近代分子生物學及細胞生物學基礎科學快速發展，特別是幹細胞技術之應用潛力日漸被看好，再加上生醫材料之既有基礎，組織工程技術之應用開發已成為各工業先進國家大力推動之科技重點。工研院生物醫學工程中心目前積極研發的生醫材料，以生物可分解(Biodegradable)或可吸收(Bioresorbable)之生物高分子為主，包括天然高分子如膠原蛋白(Collagen)、多醣類生物高分子，例如：透明質酸(Hyaluronic Acid, HA)、幾丁聚糖(Chitosan)，以及化學合成之聚乳酸-甘醇酸(Poly (glycolide co-lactide), PLGA)等。

幾丁聚糖(Chitosan, poly[(1-4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glucosamine]) 是自然界中最常見的聚合物之一。結構上與纖維素相似，是由葡萄糖胺糖(glucosamine)所聚合而成的長鏈狀多醣類，結構如圖所示。商業上的製備是由幾丁質(Chitin)去乙醯化(deacetylation)所得到幾丁聚糖。幾丁聚糖是一種白色帶淡黃色的粉末狀。幾丁質經過去乙醯化反應(也就是將乙醯基去掉，形成胺基)後，即可得到幾丁聚糖，又稱甲殼素。幾丁聚糖是組成甲殼類外骨骼之結構元素，常見的螃蟹、蝦和昆蟲等的外殼皆由其構成。Chitosan 中，胺基的 pKa 值約為 6.5，因此，chitosan 帶正電並可溶於酸性或具極性的中性溶液，其溶解度視其 pH 值和去乙醯化程度而定。換言之，Chitosan 具有生物黏附性且易與帶負電的表面結合，例如黏膜(mucous membrane)。其有助於極性藥物在上皮表面的運輸，且可被生物體分解，具生物分解性(biodegradable)，生物相容性(biocompatibility)易良好，是以精煉的 chitosan 適合作為生物醫學方面的應用。

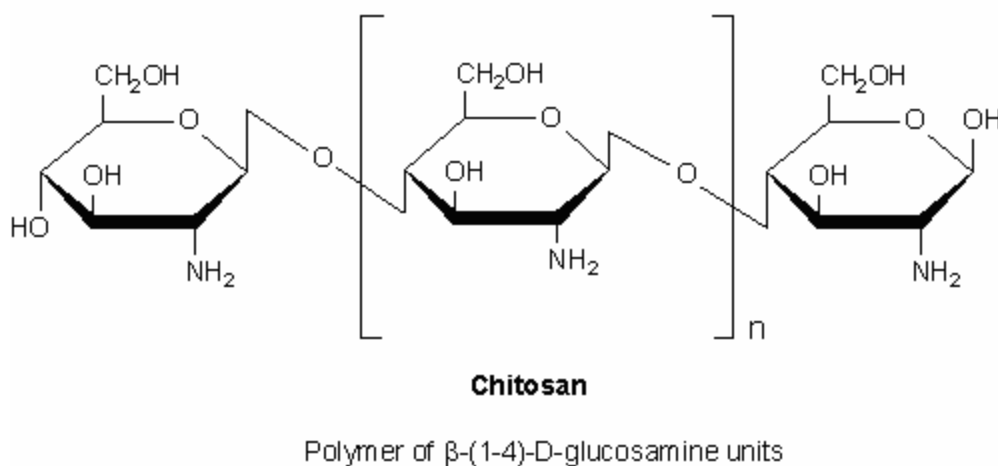


Figure 1. The chemical structure of chitosan. (ref. www.sigmaaldrich.com)

Chitosan 被廣泛應用於植物栽培上，用於增強植物對真菌感染的抵禦力，幫助植物生長，室內外皆適用。其毒性很低，若依照指示使用，對人體無害，唯可能因長期接觸皮膚產生刺激或過敏現象。因為在自然界含量豐富，且使用量並不大，對環境不會造成污染。Chitosan 亦可運用於水的淨化過程。它可以除去水中的含磷化合物、重金屬和油等物質，又因為 Chitosan 會使細微的雜質互相結合而沉澱，這些雜質便可在水通過「砂濾池」時一併被去除掉。生物醫學上，因具有可以快速凝血的作用加上其抗菌性和不易產生過敏的特性(有則輕度過敏)，現已在美國獲准使用於繃帶上，在繃帶加上一層經過小心處理的 chitosan，在傷口上便可有效止血。

另外，chitosan 也經常以藥片的形式販賣。廠商依其可吸附油脂的特性，聲稱可以同樣的吸附消化道中的油脂並將之排除，如此使用者便不須節食而達減肥之效。不過，科學研究顯示這並不正確。也有人說因為 chitosan 可以去除對身體有害的物質，故須服用 chitosan 以維持健康。其他功效例如降低膽固醇、控制血壓、減少血液中尿酸含量、預防便秘、制酸、防止蛀牙/牙菌斑、預防腫瘤等等，皆可耳聞。但是，上述這類的說法皆缺乏確鑿的科學根據。

由於幹細胞研究日漸發展，chitosan 的特性又符合組織工程生醫材料的需要，chitosan 也已成爲目前積極開發的材料之一。

目前很多人工合成材料已將當進步，物理性質上，已幾乎可與自然組織媲美。但是，礙於表面材質的特性與生物體的相容性有限，常導致實際使用上的困擾，例如：發炎、感染或血栓。若將材料表面經過些微處理，便可改變其表面特性，提升生物相容性與其他的附加機能。表面處理的方法很多已經被開發應用，利用電漿處理也是其中之一。電漿(plasma)態是物質的第四態，又稱爲離子體。氣態時，電子在電場的束縛下繞行原子核旋轉，如果氣體被加熱，這些電子的動能就會增加，一旦電子之動能超過原子核對其的吸引力，電子即脫離原子核束縛而成自由電子，此過程稱之「電離」(ionization)。被電離的原子數與總原子數的比稱爲電離度(ionicity)。電離度100%表示原子全數被電離，稱之爲完全電離(fully ionized)，否則稱爲部份電離(partially ionized)。最嚴格定義下，電漿是百分之百電離的氣體，但實際應用而言，只需滿足一定的條件及可稱爲電漿。自然界中，就地球表面而言，雖然有電漿的存在，如極光或閃電等，但其實並不多。日常生活中所接觸到的，都是日光燈、霓虹燈、電漿電視等，

爲人造電漿。然而，就宇宙而言，98%以上物質卻都是由電漿組成的。

電漿有三個基本特性：集體行爲、屏蔽效應、具一定頻率。一般而言，電漿與固、液、氣三態最大的不同在於，固、液、氣態皆由原子或分子組成，故粒子本身不帶電，運動時不產生電場，也不受電場影響；而電漿的組成都是離子、電子等帶電的粒子。這些粒子本身帶電，運動時各自產生電場，且受電場影響。因此，一段距離以外的粒子與粒子之間不用產生碰撞就可以發生反應，同時，電場的運動和這些帶電粒子的運動產生交互作用而形成「集體行爲」(collective behaviour)，換言之，在電漿狀態中，主導反應產生的並非粒子與粒子間的碰撞，而是取決於集體行爲的作用。此爲電漿第一個基本特性。第二，電漿有屏障外家電場並保持電中性的能力，這種屏蔽效應(shielding effectiveness)稱爲「德拜屏蔽」(Debye Shielding)。不過，只有當氣體系統的尺度遠大於德拜長度(Debye length)，且德拜屏蔽層(Debye layer)中的帶電粒子達到一定的數量後，這個特性才會顯現出來。而當符合這個條件，此時系統中雙體碰撞的平均位能會遠小於電漿粒子的動能，集體行爲就會成爲主導反應的關鍵，又與第一項特性相符。最後，第三個基本特性是每一個電漿系統一定具有一個固有的頻率，稱爲「電漿頻率」(plasma frequency)。若一電磁波的頻率小於系統的電漿頻率，則此電磁波無法穿透此電漿系統。在電離度低的氣體系統中，粒子碰撞頻率大於電漿頻率，故碰撞主導反應，則此系統不是電漿；粒子碰撞頻率小於電漿頻率，三項特性皆符合，才可稱爲電漿。

相較其他三態物質，人們對電漿的發現較晚，認識也較少。但隨科技不斷進步，相關的研究愈來愈多；對電漿的了解愈多，使用的範圍也愈來愈廣。目前，電漿的應用之一，爲氣體放電(Gaseous discharge)。氣體放電的實驗最早於1830年，英國科學家法拉第(Faraday, Michael 1791~1867)關於氣體輝光放電效應的研究。隨後，人們對電漿的需求日益增加，至今，電漿已經廣泛應用於各種與氣體放電有關的工業製造。最常見的例如霓虹燈、日光燈和電漿顯示器等。此外，電漿也可用來修飾材質表面，稱爲表面處理(surface modification)。電漿系統中具有作用能量的粒子包括：離子(ion)、電子(electron)、自由基(free radical)、介穩態物種(metastables)、短波紫外光子(photon)。做表面處理時，乃利用這些高能粒子衝擊待處理物表面，在表面上產生物理或化學反應，以修飾其表面特性。電漿處理作用的深度大約僅至表面下數百Å ~ 10μm 的範圍，故既可改變表面性質又不損及材質主體特性。配合應用上的需要，也可加上不同的製程條件參數，如氣體種類、處理時間、操作壓力等，利用改變電漿氣氛中的化學組成，製造出多樣的化學表面特性。表面上產生的反應主要爲：交聯、蝕刻、沉積、表面機能化。交聯(cross linking)：一般選擇惰性氣體(如 He、Ar)，藉電漿氣氛中這些離子和介穩態物種撞擊待處理物表面，使表面上或淺層結構的部分原子脫落(大多爲氫原子)，形成可進行交聯的活性位置。不同分子鏈之間產生交聯作用後，便可達到增加基材表面硬度和強度的效果。蝕刻(etching)：依所需效果不同，選用惰性氣體(如Ar)或反應性氣體(如O₂)，甚至混合氣體系統。主要運用粒子對表面的衝擊破壞鍵結，使表面產生部份小分子物種；或者利用電漿氣氛種的自由基與表面反應產生揮發性物質而與材料脫離。蝕刻過程將使基材厚度衰減。沉積(deposition)：利用通入與電漿有聚合性的氣體(如C₂H₂、C₂F₄等)，使氣體與在電漿氣氛中產生的自由基聚合並沉積在基材表面，形成一層高分子薄膜。電漿沉積膜較一般情形下產生的薄膜緻密，且有助於提升模與基材間的附著性。表面機能化(Functionalization)：使用反應性氣體(如H₂、O₂、NH₃、N₂)，反應時這些電漿中的活性粒子會先破壞基材表面較弱的鍵結，進而以反應性氣體解離產生的高反應性官能基取代之。這些官能基一般較常見到的有-OH、-COOH、-C=O及-NH₂，如此，基材表面的活性改變，親水性、黏附性等機能也可

能增加。以電將做表面處理不僅可以改變材料表面的特性，同時也具有潔淨、消毒的效果。理想的生醫材料不僅需要具備主體特性(物理)還要能與生物相容，意即所謂生物相容性(biocompatibility)。主體特性是材料本身的組成、結構、設計等，以達到功能上的需求；生物相容性則是在生物環境(如組織、體液等)中，表面與之的作用，主要來自生物體對外來物質所起的生理反應。因此便與材料表面的化學性質、侵蝕性、潔淨度、構造、甚至於是否使鄰近蛋白質變質的傾向等，皆息息相關，故表面修飾的技巧成爲材料是否適合臨床使用的要素。電漿處理已被廣泛研究與應用。材料經過電漿處理不但可增加其表面的生物相容性，也可配合臨床需求，利用不同的處理條件達到不同的效果，例如：降低表面的黏滯性、阻隔膜沉積、增加親水程度、提升接著性等。但是，電漿處理因爲需要真空的環境，設備昂貴，且大多無法詳細的掌握電漿的物理、化學反應結果，例如，實驗常無法控制官能基形成的數量等都是使用電漿時仍存在的疑慮。再者，以目前的技術，要將電漿的應用，從實驗室的尺度擴大到工業大量生產的規模，仍無法達到。這些，都是未來改善的方向。

成體幹細胞是目前幹細胞研究領域中最熱門的一種，而脂肪幹細胞來源取得相當容易且不具爭議，所以本實驗中主要選用人類的脂肪幹細胞(hPLA)進行培養與觀察。Chitosan是一種新興的生醫材料，故在實驗中，我們以 chitosan 做細胞培養，觀察 hPLA 細胞在 chitosan 薄膜上的生長情形。由於使用氬氣電漿修飾材質表面已是實驗中經常使用的方法，因此我們便利用氬氣電漿對 chitosan 薄膜進行表面修飾，觀察經修飾過後的 chitosan 薄膜表面特性之變化。本實驗的目的主要是：首先，以 chitosan 爲基材培養細胞，確定 chitosan 沒有生物毒性而適合做細胞培養。接著，探討氬氣電漿處理對 chitosan 薄膜表面與水接觸角的影響。最後，將 hPLA 細胞種植在處理過後的 chitosan 薄膜上，觀察 hPLA 細胞生長在經過不同時間長度電漿處理的 chitosan 薄膜上細胞型態差異。

貳、器材與藥品

Chitosan(95% 去乙醯度) 購自凱得生生物科技公司

冰醋酸

FBS 血清 (Fetal Bovine Serum)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

細胞培養耗材

Collagenase type I

MTT kit (Tetrazolium salt)

fluorescein diacetate

參、研究過程與方法

一、Chitosan 溶液的製備

將 2 克的chitosan粉末溶於 100ml的(1%)冰醋酸(g/cc)，在室溫下以電磁攪拌器攪拌一整夜至均勻，得 2%chitosan醋酸溶液 100 ml。再以針頭濾器過濾chitosan醋酸溶液以去除未溶解的殘餘雜質。最後，將chitosan溶液置於一瓶內，以 121°C、1.2kg/cm²高溫高壓滅菌(約 15~20min)後，封好並妥善保存，以供實驗需要時用。

二、人體脂肪幹細胞體外培養 *processed lipoaspirate*

人類脂肪幹細胞(hPLA)是由人類抽脂所得之脂肪中分離出來的。將人體取出的脂肪先用三倍體積量的 4°C PBS清洗，以去除多餘的紅血球及殘渣。清洗過的脂肪加入等量的 0.075% collagenase type I。在 37°C 水浴下進行digestion 30~60min，過程中輕微搖晃。之後，再加入 DMEM/10%FBS (Fetal Bovine Serum胎牛血清)去中和collagenase活性，並進行 200g的離心，除去上清液。離心後的細胞pellet再加入 DMEM/10%FBS並經過 100µm mesh來去除殘渣。所得到的過濾液再經過離心，然後將pellet再control medium中進行細胞培養。使用的培養液成分為 DMEM，10%FBS，2 mM L-glutamine，100 U/ml penicillin。培養皿放置在 37°C，5%CO₂ 的培養箱中，2~3 天更換一次培養液。

三、計算細胞數目

將懸浮度細胞液，取些許體積，與 trypan blue 混合並以血球計數器計算細胞濃度。計算方式如下：

$$N = C \times V$$

N:細胞數目 C:細胞濃度 V:稀釋體積

$$\text{Cell density(細胞密度)} = N/S$$

N:細胞數目 S:總培養面積

四、細胞毒性測試(Cytotoxicity)

取一 96 Well。首先，將編號 1~8 列的每個well中加入 2 μ l的poly-hema，一種防止細胞黏附的高分子材質。再將其編號 1A~H和 5A~H的wells中加入 2% chitosan 醋酸溶液 100 μ l，2A~H和 6A~H wells加入 1% chitosan醋酸溶液 100 μ l，3A~H wells和 7A~H加入 0.5% chitosan醋酸溶液 100 μ l，4A~H wells和 8A~H加入 0.1% chitosan醋酸溶液 100 μ l。種植時，先將chitosan film 濕潤，取約 2 $\times 10^4$ 個細胞平均分散在chitosan film上，置於培養箱中 3 小時，使細胞貼附在上，使用前述之培養液培養。培養一天後，將之取出用MTT染色，測其吸光值。

MTT 原理如下：

Tetrazolium dye 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)，一種黃色溶液，可藉由細胞內的粒線體氧化還原反應，將其轉變成藍色結晶。此藍色結晶形成的量隨活細胞的數目呈正相關曲線。接著，將藍色結晶溶解在有機溶劑 DMSO 並搖晃至結晶完全溶解。將最後溶液送進 96 微孔盤分光光度計以吸光波長 570nm 測量其吸光值。

五、Chitosan 薄膜製備

Chitosan 薄膜是爲了觀察經過氬氣電漿(argon-plasma)處理不同時間(duration)後，薄膜與水接觸角(contact angle)的變化和細胞型態(morphology)的不同而設計的。使用乾淨的平板玻片，將其浸泡於 2%chitosan 溶液中 10 秒。再將其移出，置於 50 $^{\circ}$ C 烘箱內烘乾，此步驟重複進行三次，以得到均勻的 chitosan 薄膜。將 chitosan 薄膜移出烘箱，改置於磷酸緩衝溶液(PBS)中 30 分鐘，重複置換 PBS 三次，使薄膜從酸性變爲 pH7.0。最後，以 D.D. water (去離子水) 浸泡，移出後置於 50 $^{\circ}$ C 烘箱內烘乾。

六、以氬氣電漿對 chitosan 薄膜做表面處理

將上述製備好之 chitosan 薄膜進行氬氣電漿處理。處理條件如下：

將薄膜移入 chamber 後蓋緊，進行抽真空處理，直到真空度達 50mtorr，通入氬氣，使真空度提高至 400mtorr。打開高壓按鍵，調整功率制 10W，此時可看見紅色可見光，代表正進行電漿處理。處理時間分別爲：0 秒、10 秒、60 秒、600 秒。

七、電漿處理後 chitosan 與水接觸角的測量

使用純水來進行 contact angle 的測量。首先，將針筒內裝滿 D.D. water，裝上 22 號針頭。在每一個試片上滴上 5 滴小水滴，再分別以儀器量測接觸角大小並將其數值進行平均。所有實驗在室溫下進行。

八、細胞在經電漿處理的 chitosan 薄膜上的型態觀察

將 hPLA 種植於不同 plasma 處理過後的 chitosan 薄膜上，經過兩小時後，配置 5mg/ml fluorescein diacetate，取 10 μ l 加入細胞液中，過 5 分鐘後以 PBS 進行清洗，以去除掉未黏著的細胞，再以 4% 福馬林進行細胞固定 10s，之後再以二次水進行清洗。最後，將試片放置於螢光顯微鏡下進行觀察，激發光為 450nm，散射光為 520nm。

肆、研究結果與討論

一、獲得人類脂肪幹細胞以及培養

實驗中細胞的取得，是由人類抽脂的檢體中，經過一些酵素處理過程再離心所分離出來的。細胞在培養基中培養 1、2 代，待其穩定生長，如圖二所示。細胞形狀呈纖維狀，與先前其他實驗中取得的細胞形狀類似，且由他人實驗得知此類細胞具有分化潛能，為脂肪幹細胞。本實驗的脂肪幹細胞是由成大醫院林聖哲醫師提供。

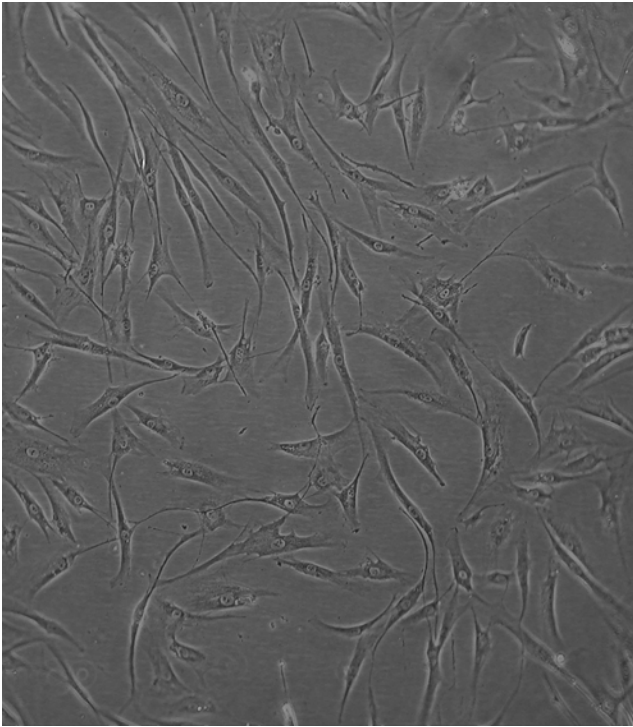


Figure 2. hPLA 細胞照片

二、Chitosan 的細胞毒性測試

這個部分的實驗，是爲了測試 chitosan 是否對生物具有細胞毒性。因此，我們將細胞種植在不同 chitosan 濃度的環境下，藉由 MTT 染色測其吸光值以判斷細胞是否生長正常。在這個實驗中，除了 hPLA 外，也同時以老鼠的頭蓋骨細胞(rOST)進行測試以確保 chitosan 沒有生物毒性。在圖三中，TCP(tissue culture plate)是實驗的控制組，由圖可知，細胞在這些濃度的 chitosan 基材中，生長情況正常，與先前他人實驗所得的結果類似。

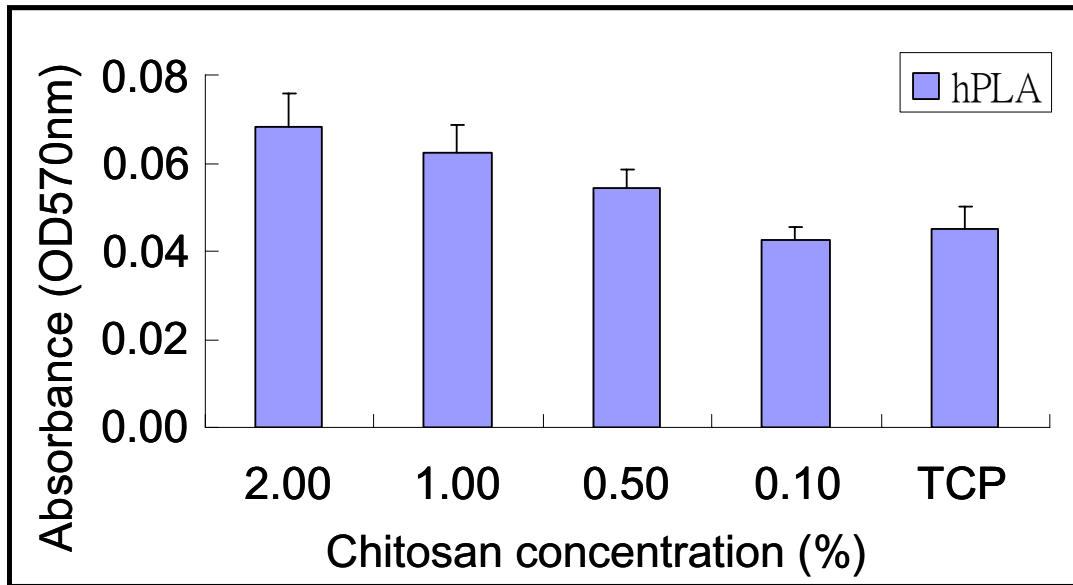


Figure 3. hPLA 與 rOST 培養於不同濃度 chitosan 基材的細胞毒性測試

三、電漿處理對 Chitosan 與水接觸角的影響

由上述實驗得知 chitosan 確實是具有生物相容性的材料。電漿是修飾高分子材料表面特性一中經常使用的方法，因此，這個部份的實驗中，我們將探討 chitosan 經電漿處理後，其表面化學性質的改變。本實驗中，我們將 chitosan 薄膜進行不同時間長度的電漿處理(如圖 4 所示)，再測量基材與水的接觸角。接觸角是液滴接觸基材表面，因為表面張力而與接觸面所形成的夾角。夾角愈大，表示材質表面愈不親水，夾角愈小則反之，如圖五所示。一般而言，接觸角介於 10~30°為親水表面，角度達 70~90°則為厭水表面。由下表可知，未經電漿處理的 chitosan 表面，接觸角為 78.5°，經電漿處理 10 秒，角度為 69.4°，60 秒為 40°，600 秒為 25°；隨電漿處理時間愈長，接觸角愈小，表示材質表面從厭水變為親水性。



Figure 4. Chitosan 試片進行電漿處理

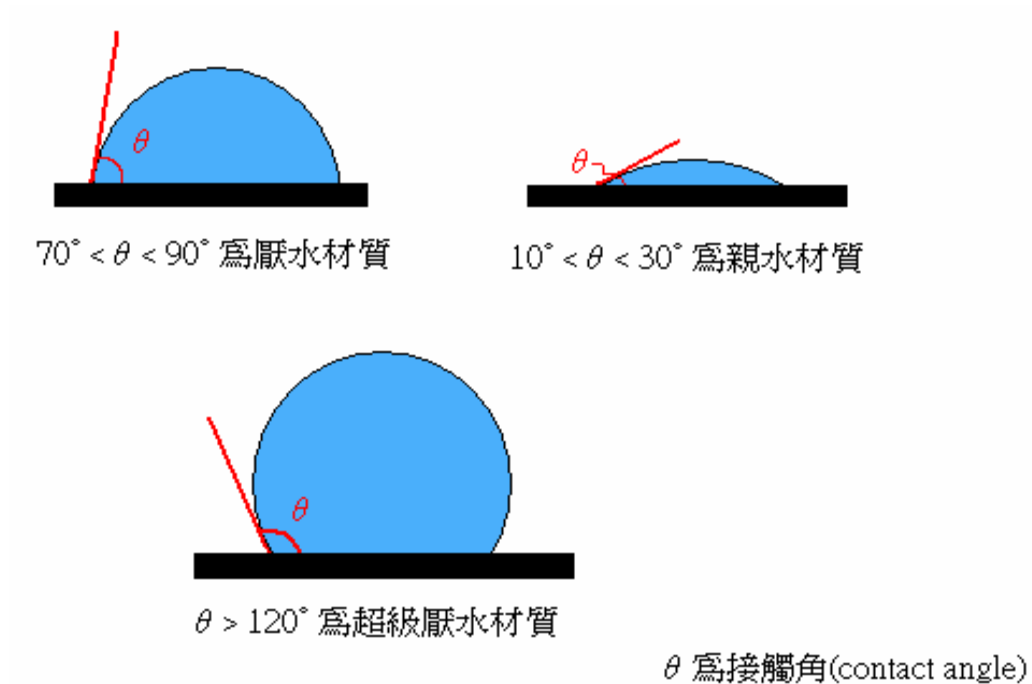


Figure 5. 接觸角示意圖

Dependence of Contact Angle on Plasma Duration

Sample	Time (s)	Contact angles (deg)
Control	0	78.5
1	10	69.4
2	60	40.0
3	600	25.0

四、不同時間電漿處理的 chitosan 對細胞型態的影響

由前一個實驗知道電漿處理可以增加 chitosan 表面的親水性。因此，我們想了解不同親水性的 chitosan 薄膜對細胞型態的影響。我們使用 hPLA 細胞種植於不同親水性的 chitosan 薄膜上，經 2 小時後，利用螢光染色觀察細胞的黏著型態。由圖七可知，未經電漿處理的薄膜上，黏著細胞數量極少，在拍照視野下僅有一顆。經電漿處理 10 秒的薄膜上，黏著細胞數如同未經處理的表面一樣，僅有少數細胞黏著。當處理 60 秒，黏著細胞數目明顯增加。經處理 600 秒的薄膜上，細胞黏著數目遠比未經處理的薄膜多，且細胞形狀亦較為扁平，顯示細胞的貼附情況較好。TCP 是以一般的細胞培養皿作為細胞黏附的控制組，可看出細胞黏附數目極多，貼附型態亦是扁平狀的。從此結果可知，電漿處理可幫助細胞黏附。

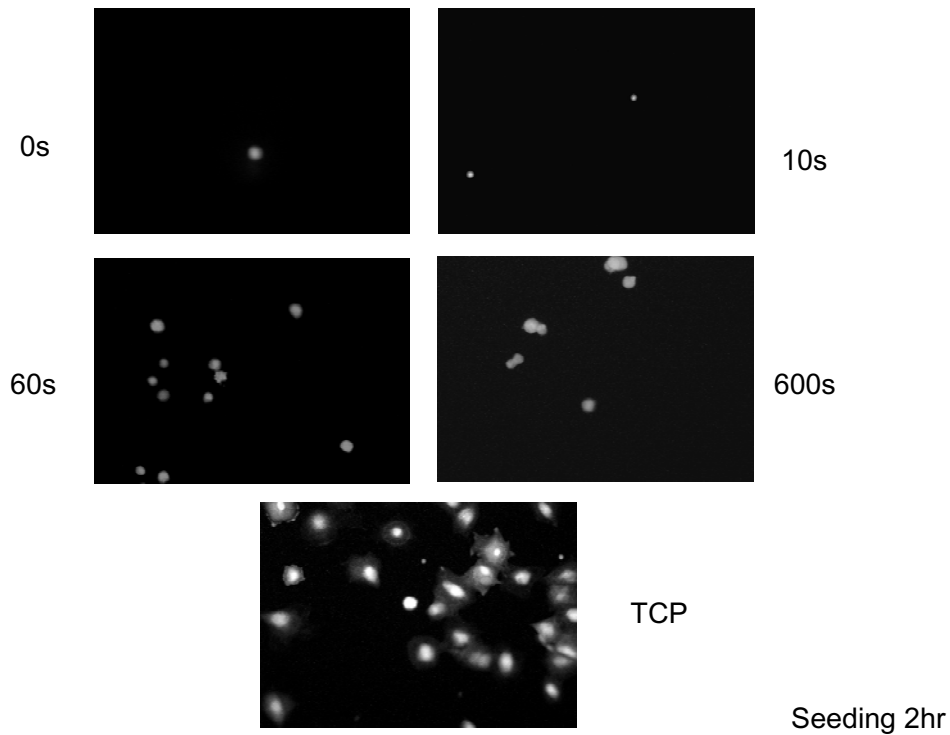


Figure 7. 細胞形態照片，細胞在經 0、10、60、600 秒電漿處理的 chitosan 及 tissue culture plate 上種植 2 小時後所得的照片

伍、結論與應用

經由本研究，我們得知 chitosan 確實對生物體沒有毒性，且使用電漿修飾 chitosan 薄膜表面亦是可行的，而經修飾後的 chitosan 薄膜則更有利人類的脂肪幹細胞(hPLA cells)在其上的貼附。實驗中，Chitosan 表面性質的變化，是經由測量和觀察其表面與水的接觸角而得。將來在生醫材料的應用上，chitosan 以其無毒、可與生物體相容和可被生物體分解的特性，可望成爲一種理想的鷹架材料或組織替代材料。本研究是對 chitosan 的性質做初步的了解與探討，將來更進一步的研究，則有賴他人繼續努力。

陸、參考文獻

- M. Nitschke, G. Schmack, A. Janke, F. Simon, D. Pleul, C. Werner
Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate) - toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds
J. Biomed. Mater. Res. (2002)
- Xiao Zhu, Kerm Sin Chian, Mary Bee Eng Chan-Park, Seng Teik Lee.
Effect of argon-plasma on proliferation of human-skin-derived fibroblast on Chitosan membrane
J. Biomed. Mater. Res. (2005)
- B. Mannheim
Cell Proliferation Kit1 (MTT). Roche Company.
- K. Grundke, M. Nitschke, S. Minko, M. Stamm, C. Froeck, F. Simon, S. Uhlmann, K. Pöschel, M. Motornov
Merging two concepts: Ultrahydrophobic polymer surfaces and switchable wettability
in: K. L. Mittal (Ed.) Contact Angle, Wettability and Adhesion, Vol. 3, VSP (2003) p. 267-291
- G. S. Oehrlein, M. F. Doemling, B. E. E. Kastenmeier, P. J. Matsuo, N. R. Rueger, M. Schaepkens, and T. E. F. M. Standaert
Surface science issues in plasma etching
IBM Journal of Research and Development Volume 43, Numbers 1/2, (1999)
Plasma processing
- Peter Rawlinson
Vacuum Plasma Processing
Materials World, Vol. 7 no. 5, pp. 276-77 May (1999)
- D.C. Schram
Plasma Processing and Chemistry
Pure. Appl. Chem., Vol. 74, No. 3, pp.369-380, (2002)

柒、致謝

感謝李澤民 老師提供電漿處理儀器以進行實驗。

評語

這個研究主題具實用科學價值，然，實驗內容仍需加強：

- (1) Stem cells 的分子 characterization。
- (2) 電漿處理幾丁聚醣薄膜對細胞生長的影響。