

# 國立交通大學

## 機械工程學系

### 碩士論文

大氣電漿表面改質於聚乳酸人工血管支架對細  
胞培養之影響

Study on atmospheric plasma surface modification and its  
effects on cells culture of synthetic PLA vascular scaffold

研究生：陳柏廷

指導教授：徐瑞坤 教授

中華民國一零一年八月

大氣電漿表面改質於聚乳酸人工血管支架對細胞培養之影

響

Study on atmospheric plasma surface modification and its effects on cells  
culture of synthetic PLA vascular scaffold

研究生：陳柏廷

Student : Po-Ting Chen

指導教授：徐瑞坤

Advisor : Ray-Quen Hsu



中華民國一零一年八月

# 大氣電漿表面改質於聚乳酸人工血管支架對細胞培養之影響

研究生：陳柏廷

指導教授：徐瑞坤 教授

國立交通大學機械工程學系碩士班

## 摘要

本研究利用兩個階段的大氣電漿處理，對電氣紡絲製備而成的聚乳酸人工血管支架進行改質。從第一個階段以氮氣/氧氣混合電漿對血管支架做親水性的提升並造成材料表面斷鍵；隨後以第二階段的氮氣/氨氣電漿進行胺基的導入。以不同處理次數的參數組合，探討兩個階段電漿對於細胞培養之影響。

經過電漿處理後的血管支架表面，親水性有確實的提升，並且從顯微觀察纖維結構，發現表面粗糙度增加，親水性與粗糙度都是對於細胞貼附皆有所幫助。另外從細胞活性分析探討親水性和胺基在細胞培養過程中的角色，發現在第三天時細胞貼附的效果是由親水性所決定，但是較佳的親水性卻不一定可以獲得較多的細胞貼附；而胺基的效果必須到第七天才會顯現出來，這是由於胺基並非直接與細胞作結合或反應，而是經由吸附培養液中的特定糖蛋白種類，幫助細胞在培

養過程中獲取養分，並且隨著胺基電漿處理次數的增加，細胞活性有愈提升的趨勢。

而較長時間的親水電漿處理造成較多的斷鍵空缺，提供足夠的糖蛋白附著，也因此儘管在一開始細胞貼附的效果不佳，但長時間的培養還是可以獲得較佳的成長與增殖現象。

關鍵字：電氣紡絲、組織工程、人工血管支架、電漿表面改質





Study on atmospheric plasma surface modification and its effects on  
cells culture of synthetic PLA vascular scaffold

Student : Po-Ting Chen

Advisor : Ray-Quen Hsu

Department of Mechanical Engineering  
National Chiao Tung University

## ABSTRACT

A 2-step atmospheric plasma was adopted for treating the vascular scaffold prepared by electrospinning. At first step, we mix nitrogen/oxygen to generate plasma to promote the vascular scaffold surface hydrophilic property bond. Subsequently, the second step which uses nitrogen/ammonia plasma to graft amine group. The effect of cell culture on the vascular scaffold through 2-step plasma treatment in different parameter were compared.

The roughness and hydrophilic property bond on the vascular scaffold surface increase through plasma treatment. Hydrophilic property bond and roughness affect cell culture. In addition, we found that cell attachment is decided on hydrophilic property bond on third day, but the better hydrophilic property bond doesn't mean that more cell attachment. The effect of amine group can only be observed on seventh day. The results indicated that amine group doesn't interact with the cell, but absorb particular glycoproteins that provide nutrition in cell culture. And increasing the treatment times of amine group plasma processing, cell activity is improved.

Keywords : electrospinning, tissue engineering, synthetic vascular scaffold, plasma surface modification.



## 誌謝

時間過得真的很快，沒想到今天真的要畢業了，有太多情緒話語想要表達了！講廢話之前，不免俗的還是要先表達對眾人的感謝，好符合誌謝的精神。

首先，感謝我的指導教授徐瑞坤老師這兩年的指導和照顧，感謝老師當初收我進了這麼棒的實驗室，老師的成就和人生智慧也讓我相當羨慕和佩服！再來是諸位博班學長，阿達梁達嵐、阿K江維堂、宣哥黃宣諭、璽哥李艾璽、PF葉人瑜、吳偉仁、強強哥張洪誌，碩班學長踢踢何昇融、皮皮啦陳瑋奇、謝晟謝其晟、老魯魯鎮宇，感謝各位學長不論在生活上或研究上對我的照顧和幫助；還有常常被我凹來幫忙做實驗的學弟們，蕭國賢、林治濤、曾炫凱、劉佳文；然後是親愛的同學們，阿姐黃怡菁、徐韶謙、陳侑群、曹植培、鍾權任，雖然沒有到相互扶持這麼誇張的形容詞，但大家同學一場，就是很令人開心的一件事。以上，再次感謝材料物性與成形實驗室的諸位！另外還有吳宗信老師實驗室電漿部門，以楊宜偉為首，包括劉志東、沈育安、廖國淳、蕭駿平，感謝諸位在關於電漿技術方面的各項指點和幫助；當然還有所有在我人生各個階段幫助過我的人，雖然無法一一列出，但由衷感謝大家對我的照顧；最後，感謝我的父母對我二十餘來

的養育和栽培，讓我總算完成了學業！

很慶幸自己可以待在這麼棒的老師門下，有著這麼棒的一群學長同學學弟，也認識了很多這麼棒的朋友。雖然幾年後交情可能也淡了，回想這些往事印象也變得模糊了，但至少在這研究所這兩年的時間裡有緣結識到這群人，真的是很讓人開心的一件事！

人生真的很妙！這是我從大學畢業到退伍，繞了一圈之後又回學校讀書得到的心得。人生就是這樣，在每個階段會面對不同的抉擇，不同的抉擇又會遭遇不同的際遇、遇見不一樣的人。這不像玩遊戲可以重複選擇劇情來體驗各種結局。一個人的個性和思維決定了生活的方式，主導了人生的方向，觸發這些不可逆的人生劇情。當然，有時候會想，如果當初我應屆就考上研究所？如果我選擇延畢而不是先當兵？如果上的是另一間學校？如果進了另一間實驗室？我的人生是如何？現在的心情又是如何？有太多未知的如果無法去求證了。但我是何其幸運，讓我選擇了這麼一條道路，可以在這裡遇見這麼棒的一群人，開心的度過最後的學生生涯，也滿懷感激地寫著這麼一篇誌謝！

這不禁讓我想起當初找指導教授的時候，曾經找過洪景華老師聊過，洪老師跟我說：「雖然現在覺得晚了應屆同學兩年，但到了老師這個年紀再來回顧，好像也無足輕重了，誰又知道因為晚了這兩年會不會有什麼意想不到的收穫呢？」洪老師的話言猶在耳，但我想不用等到

他這個年紀，我現在已經懂了也有所收穫！

奇妙！奧妙！人生就是這麼妙！妙不可言！就像我為了排一個實驗必須跟公司延後報到，一延就是三個多月，但等到實驗當天，卻因為發電廠跳電而無法順利進行，最後只能在某個數據留下缺陷。人生不也如此，豈能盡如人意，因此不用計較太多，但求活得開心！無論做什麼決定，只要確定是自己想追求的目標，就算結果不盡滿意，也無須感到後悔，或許生命會在某個意想不到的部分獲得驚喜！

研究所兩年就這麼結束了，學生生涯沒意外的話就到此為止了，總覺得記憶裡很多事情都好像昨天才發生一樣，對於時間的流逝，不禁讓人感到惆悵和無助，但這不就是人生嗎？一個階段結束就是另一個階段的開始。我想，最後就以獵人動畫的經典名言做結語吧：

「想想自己的希望，自己的喜怒，喜歡什麼，想追求什麼，到哪裡去旅行，遇見什麼樣的人，得到了什麼樣的經驗，就如同這一切的過程會形成你們的未來，也同樣會展現出最適合你們自身的能力，你們必須找到它，讓它變的如影隨形；只要想辦法做到這一點，就一定可以指引你們往更好的未來之路前進；最重要的，也要努力的享受自己的人生。」

柏廷 謹識

2012. 8  
peace

# 目錄

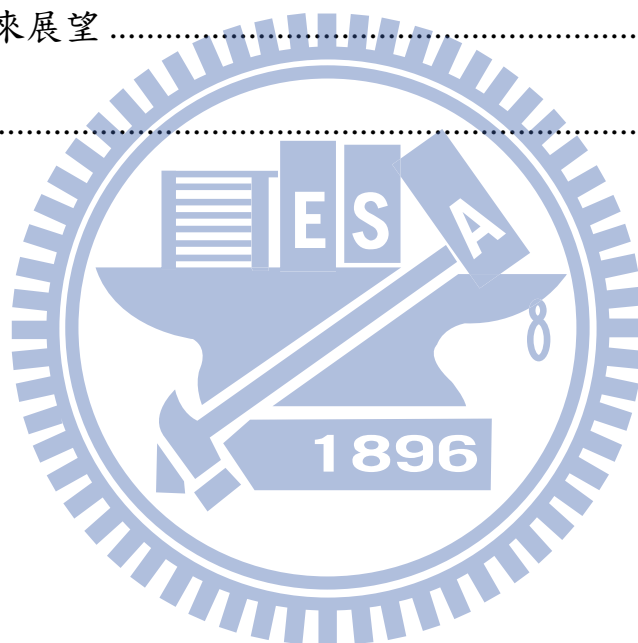
摘要.....	i
ABSTRACT.....	iii
誌謝.....	v
目錄.....	viii
表目錄.....	xii
圖目錄.....	xiii
第一章 緒論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究動機與目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	4
2.1 組織工程學.....	4
2.1.1 組織工程學的發展.....	4
2.1.2 組織工程的定義與基本概念.....	6
2.1.3 細胞生長支架 (scaffold).....	7
2.2 電氣紡絲 (Electrospinning).....	9
2.2.1 電氣紡絲的發展.....	9
2.3.1 電氣紡絲原理.....	10
2.3 電氣紡絲在組織工程之應用.....	12

2.3.1	心血管組織工程.....	12
2.3.2	方向性纖維結構.....	13
2.4	高分子材料－聚乳酸 Poly Lactic Acid.....	13
2.5	大氣電漿.....	15
2.6	血栓因子.....	16
2.7	傳統表面改質.....	17
2.8	電漿表面改質技術.....	18
第三章	研究材料與方法.....	25
3.1	研究流程概述.....	25
3.2	實驗設備.....	26
3.2.1	電氣紡絲實驗設備.....	26
3.2.2	PLA 溶液配製.....	27
3.2.3	平行板介電質 (DBD) 大氣電漿設備.....	28
3.2.4	接觸角探針量測儀.....	30
3.2.5	傅立葉轉換紅外線光譜儀 (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR).....	31
3.2.6	化學元素分析儀 (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS).....	32
3.2.7	細胞動態轉動培養裝置.....	32

3.2.7	盤式酵素免疫分析儀 (ELISA reader) .....	32
3.2.8	倒立式光學顯微鏡.....	33
3.2.9	場發射掃描式電子顯微鏡 (field scanning electron microscope, FE-SEM) .....	33
3.3	人工血管支架製備 .....	34
3.4	電漿表面改質 .....	35
3.5	表面能計算與親水性量測.....	36
3.6	內皮細胞培養 .....	38
3.6.1	靜態培養.....	38
3.6.2	動態轉動培養.....	38
3.7	MTT 細胞活性試驗.....	39
3.8	HE 細胞染色.....	39
第四章	實驗結果與討論 .....	59
4.1	接觸角量測 .....	59
4.1.1	親水性分析 .....	59
4.1.2	材料表面能.....	60
4.2	血管支架纖維表面顯微形態觀察 .....	62
4.3	表面官能基分析 .....	63
4.4	XPS 化學元素分析.....	64

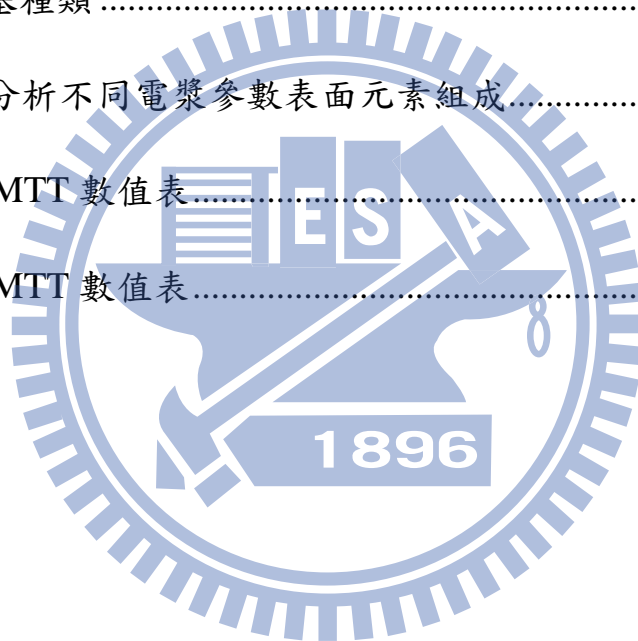


4.5	細胞貼附與成長分析 .....	65
4.5.1	MTT 細胞活性測試 .....	65
4.5.2	HE 細胞染色觀察.....	67
4.5.3	FE-SEM 高倍率細胞顯微觀察.....	67
第五章	結論與未來展望 .....	79
5.1	結論 .....	79
5.2	未來展望 .....	81
參考文獻	.....	83



## 表目錄

表 3-1 電漿實驗條件 .....	42
表 4-1 胺基電漿不同處理次數之表面能 (10 LOOPS 親水電漿前處理) .....	69
表 4-2 胺基電漿不同處理次數之表面能 (30 LOOPS 親水電漿前處理) .....	69
表 4-3 官能基種類 .....	70
表 4-4 XPS 分析不同電漿參數表面元素組成.....	70
表 5-1 三天 MTT 數值表.....	82
表 5-2 七天 MTT 數值表.....	82



## 圖目錄

圖 2-1 體外再生方式 (IN VITRO) .....	21
圖 2-2 體內再生方式 (IN VIVO) .....	21
圖 2-3 泰勒錐 .....	22
圖 2-4 電氣紡絲法示意圖 .....	22
圖 2-5 高分子薄膜製備之管狀結構 (A) 剖面視圖 (B) 等視圖[19] .....	23
圖 2-6 光學顯微鏡觀測下之具直線性纖維支架[22] .....	23
圖 2-7 大氣電漿源[25].....	24
圖 3-1 實驗流程 .....	43
圖 3-2 高壓電源供應器 .....	43
圖 3-3 注射式針筒幫浦 .....	44
圖 3-4 穩壓式直流電流供應器 .....	44
圖 3-5 壓克力絕緣箱 .....	45
圖 3-6 不鏽鋼針頭 (平頭, 規格為#21) .....	45
圖 3-7 不鏽鋼收集棒 .....	46
圖 3-8 電子天平 .....	46
圖 3-9 電磁加熱攪拌器 (HOT PLATE MAGNETIC STIRRER) .....	47
圖 3-10 聚乳酸顆粒 .....	47

圖 3-11	氣仿 .....	48
圖 3-12	DBD 大氣電漿電及構造圖[47].....	48
圖 3-13	脈衝電源供應器 .....	49
圖 3-14	水路冷卻系統 .....	49
圖 3-15	實驗腔體 .....	50
圖 3-16	單向移動平台／升降平台 .....	50
圖 3-17	接觸角探針量測儀.....	51
圖 3-18	液滴接觸角示意圖 .....	51
圖 3-19	液滴接觸角影像擷取角度示意圖 .....	52
圖 3-20	傅立葉轉換紅外線光譜儀.....	52
圖 3-21	化學元素分析儀 .....	53
圖 3-22	細胞動態轉動培養裝置 .....	53
圖 3-23	盤式酵素免疫分析儀 (ELISA READER) .....	54
圖 3-24	倒立式光學顯微鏡.....	54
圖 3-25	場發射掃描式電子顯微鏡.....	55
圖 3-26	葡萄糖.....	55
圖 3-27	PE 表面 XPS 分析結果[45]: (A) 對照組 (B) 氮氣電漿 (C) 氮 氣電漿前處理+氮氣電漿 (D) 氮氣電漿前處理+氮氣電漿 .....	56
圖 3-28	PLA 人工血管支架電漿處理設置圖 .....	56

圖 3-29	人工血管電漿處理示意圖 .....	57
圖 3-30	液滴接觸角量測圖 .....	57
圖 3-31	旋轉式振盪器 .....	58
圖 3-32	MTT 試驗產生之顏色 .....	58
圖 4-1	電漿處理距離之親水性量測 .....	71
圖 4-2	親水電漿親水性量測 .....	71
圖 4-3	PLA 人工血管支架電漿處理下表面形態：(A) 0-0 (B) 10-0 (C) 30-0 (D) 80-0 (E) 0-20 (F) 0-60 (G) 0-120 (H) 80-120 .....	72
圖 4-4	PLA 結構圖 [51] .....	73
圖 4-5	FTIR 600~2000 $\text{cm}^{-1}$ 圖譜 .....	73
圖 4-6	FTIR 2500~4000 $\text{cm}^{-1}$ 圖譜 .....	74
圖 4-7	FTIR 1500~1700 $\text{cm}^{-1}$ 圖譜 .....	74
圖 4-8	FTIR 3100~3400 $\text{cm}^{-1}$ 圖譜 .....	75
圖 4-9	XPS 全頻譜圖 .....	75
圖 4-10	三天細胞活性圖 .....	76
圖 4-11	七天細胞活性圖 .....	76
圖 4-12	三天與七天細胞 FE-SEM 圖：(A) 0-0 (B) 0-120 (C) 30-0 (D) 30-120 .....	77
圖 4-13	三天與七天細胞染色：(A) 0-0 (B) 0-120 (C) 30-0 (D) 30-120 .....	78

# 第一章 緒論

## 1.1 研究背景

自 1920 年 Staudinger 提出了高分子的概念，經過近 100 多年來的發展，高分子材料已經遍佈在我們的周遭環境。包含人類食衣住行等活動，各式各樣使用的工具、物品，隨處皆可見高分子材料製品的蹤影，一般而言高分子材料依其特性的不同，可區分為纖維、塑料、橡膠、塗料與接合劑等五類。除了使得生活上更加便利，許多研究嘗試進一步的將高分子材料引用到組織工程上，希望可以利用高分子各項優異的性質，改善人類各種先天或後天的疾病缺陷。也因此，當高分子科學持續的發展，已經不單純只是滿足人類對於生活的需求，更大的目標是，幫助人類對於生存及生命的延續。

理想生物醫學材料具備其特殊功能，經常用於器官組織修復、診斷治療、復健療養等用途，是集生命科學、現代醫學、材料、化學與工程學多方領域綜合發展的學問。

過去，當人體器官組織受到重大損害而必須修復或汰換，往往僅能考慮到自體移植或異體移植。分析兩種移植方式的優點：自體移植由於是利用自身組織因此無排斥現象；而異體移植則是器官功能適合於受移植者。然而，不論是自體或異體移植，卻都有著相同的缺點，

即是來源缺乏。為了克服這個困難，近年來研究的另一項重點，就是利用天然或合成材料，製造出人工器官與人工組織。所使用的材料，最常見的為金屬、陶瓷與高分子材料。高分子材料良好的物理性質以及易於製造、取得的優點，是其被廣泛應用在組織工程上最大的因素，也因此被認為是一種相當理想的生醫材料。舉凡人工皮膚、人工關節、人工瓣膜與人工血管等各種不同的人體器官、組織，均可見利用高分子材料的製備與相關研究。

## 1.2 研究動機與目的

高分子材料儘管有其優勢，但移植於人體上，卻不免會面臨一些棘手的難題，常見如致癌、發炎過敏以及血栓等。因此，如何克服這些問題，便是在追求適當材料後，更進一步亟需解決的目標。

血栓一直是造成高分子人工血管在臨床上使用限制的主要因素，是由於高分子材料與血液接觸時，凝血與血小板的堆積而形成。欲改善這個問題就必須從人工血管與血液相容性著手。近年來已有相關研究發現在人工血管支架內壁培養內皮細胞有明顯改善[1]。而透過材料表面改質，有效提升內皮細胞的貼附及成長兩方面，一直都是研究追求的重要目標。

近年來，大氣電漿（即常壓電漿）以其快速、低成本以及低污染的特性，被廣泛應用在民生、能源、生醫等各種用途上。改質過程中，

處理深度僅在表面淺層部分，運用在高分子生醫材料上，得以完整保留材料的基本性質，如可降解性、生物相容性、機械強度等，確實為一種的理想表面改質技術。

由於管狀結構的關係，相較於其他研究的薄膜試片，以  $90^\circ$  接觸電漿光束，效果與均勻性皆較佳。然而本研究希望能處理到血管支架內壁，血管支架須直立以  $0^\circ$  與電漿光束接觸，其均勻性與處理效率均需要考慮。而當材料表面以親水前處理導入親水性官能基如羥基 (hydroxyl group,  $-OH$ )[2] 與胺基 (amine group,  $-NH_2$ )[3]，藉以增加細胞貼附，同時造成表面斷鍵；進而到第二階段處理使胺基的導入，提升細胞成長與增殖效果。

本研究利用電氣紡絲法，以聚乳酸為材料製備多孔性與方向性之人工血管支架，隨後氮氣為主的大氣電漿進行兩階段混合氣體之聚乳酸人工血管支架內壁的表面改質，在電漿改質的過程中，我們希望找到一個最有效的參數組合，來改善細胞培養的效果，並且藉由兩個階段的不同電漿的處理方式對細胞培養所呈現之成果進行探討。



## 第二章 文獻回顧

### 2.1 組織工程學

近年來細胞生物學與細胞分化研究日益進步，使得組織工程學成為了一項新興科技學門。組織工程學涵蓋了生命科學、現代醫學、材料、化學與工程學等，帶動了跨領域學科的發展，並推動了生物材料、生物反應器等新型高技術產業和產業群的形成。目前國際間在組織工程學上，主要以研發製造人工皮膚、人工軟硬骨、人工血管、人工肝、人工眼角膜、神經再生、細胞治療與幹細胞等技術發展為重點項目，應用在人體各種組織與器官損害的替代、修復或改善。也因此，組織工程被視為一項具高度發展潛力與前瞻性的科技。

#### 2.1.1 組織工程學的發展

早期組織工程學的研究是伴隨著人工生醫材料而發展。1960年代為了治療燒傷病人，開始嘗試合成材料製作人工皮膚。1970年代末期，體外培養的皮膚、血管等組織，在麻省理工學院的 Eugene Bell 實驗室成功的被製備。1980年代麻省理工學院的 Robert Langer 教授、哈佛醫學院的 Joseph Vacanti、Charles Vacanti 兄弟等人，在經過一系列的實驗後發現，新生的軟骨組織，可經植入具降解性的高分子材料

結合細胞來培養形成。人工生醫材料持續的被研究與製備，直到 1987 年，美國國家科學基金會確立組織工程概念，並在 1990 年舉辦了第一屆組織工程學術研討會，1995 年亦正式發行了專業期刊《組織工程》(Tissue Engineering)。而在 1996 與 1998 年，美國與國際的組織工程學會也分別正式成立，這意味著自此組織工程在生物技術領域上具有其重大地位。

經過這幾十年來各國耗費大量心力研究的成果，組織工程已取得某些方面的成果，在人體整形或病損組織的修復移植，也有相當卓越的技術水準。除了腦部與大部分內分系器官外，從外表的皮膚、五官到內部的臟器、血液，皆可採取人工或異種、同種異體移植來移植組織或器官，達到病損組織的功能恢復或美容的目的。例如大面積燒燙傷病人當自身完好皮膚有限而無法採取自體移植的情況下，必須經由豬皮、人屍皮膚或含藥敷料來進行覆蓋移植。引發的問題，除了上述供體來源相當稀少之外，當移植組織不為受移植者身體所接受，引發免疫系統反應而攻擊移植組織，亦即所謂的移植排斥現象產生，往往造成了手術或治療的失敗。

因此，如何經由體外培養與人體無排斥、無免疫反應的正常組織來提供手術使用，是醫學界和生物醫學工程學界共同追求的目標。組織工程的出現，正是為了實現這個目標帶來希望。未來，或可預見特

定的組織、器官藉由組織工程生產，病變或受損組織即可透過外科手術進行替換，以達到治癒的效果。

### 2.1.2 組織工程的定義與基本概念

組織工程的定義是：應用生物與工程的原理發展活組織的取代物，藉以修復、維持或改善人體組織的功能，且此取代物將成為病患身體的一部分，達到對於特定疾病醫治的效果，亦即在損傷處移植具備正常或類似功能的人工組織或器官，以進行修復、治療的目的。

目前組織工程的基本作法與流程：

- (1) 自人體取出細胞
- (2) 於體外進行細胞培養至足夠數量
- (3) 在人工支架中植入這些細胞並持續培養
- (4) 必要時加入化學物質或生長因子促進細胞分化
- (5) 將此人工組織移植至病患身體

而由上述五項組織工程的基本作法，可歸納出組織工程具有三大要素：

- (1) 細胞 (cell)
- (2) 支撐細胞生長所需的支架 (scaffold)
- (3) 影響細胞行為的訊息因子 (signal)

本研究探討的主要對象，在於支撐細胞的支架結構，製備在組織

工程上適合細胞生長、培養的管狀支架結構。

組織工程可由體外 (in vitro) 或體內 (in vivo) 兩種模式來進行，如圖 2-1、圖 2-2 所示。所謂體外的方式，是結合上述組織工程三大要素，在實驗室無菌環境下，培養出完整的組織或器官，再經由外科手術移植進入患者身體。而體內的方式，則是僅提供人工細胞外間質與生長信息蛋白質，當植入患者病損部位，引發周遭組織與器官的細胞進行修復的動作。

### 2.1.3 細胞生長支架 (scaffold)

構成組織的成分，包括了細胞、細胞外液體與細胞外間質 (extracellular matrix)。細胞外間質是由基底層 (basement membrane) 與許多相互交聯的網狀結構蛋白質和多醣而組成，當中最主要的是膠原蛋白 (collagens) 纖維。膠原蛋白具有很多種類，各組織間或同組織的不同區域所含的膠原蛋白亦有所不同。這些細胞外間質與網狀纖維結構就是支撐著組織形狀的支架。受精卵分裂發育成胚胎，由初期的一團細胞，生長至桑葚期 (Blastula) 開始分泌細胞外間質，假設此時膠原蛋白合成受到抑制，胚胎的發育便會停頓。可見細胞外間質對於細胞分裂與組織形成有其重要性。

而組織工程與細胞生長過程相反，先是建構出支架，再讓細胞貼附、生長，最後才逐漸形成組織。因此可依照植入人體組織缺陷的需

求，來塑造其支架形狀。

支架材料大致上可區分為天然與人工兩類，目前普遍使用的天然材料多為如藻膠、洋菜膠等含水膠質與動物萃取膠原蛋白；而人工合成材料更是多樣，如聚乳酸 (polylactate)、聚甘醇酸 (polyglycolate)。膠原蛋白、聚乳酸、聚甘醇酸常被塑造成如海綿般具多孔性的高分子化合物結構，以利細胞貼附。而無論天然或人工合成材料，作為理想的細胞生長支架，必須具備下述幾項特點：

- (1) 材料與天然細胞外間質的結構和功能相似。
- (2) 具有良好的生物相容性 (biocompatibility)，對周遭組織環境無免疫或發炎反應，引發身體排斥現象；生物可降解性 (biodegradability)，植入人體後可隨時間分解進而由該處新生組織基質取代。
- (3) 製備簡便、快速且便於應用，並可就物理、化學、生物與力學等方面調整材料性能。
- (4) 結構穩定，具備一定的力學強度支援新生組織生長。

簡而言之，組織和器官的再生與形成，是組織工程不斷努力的目標，藉由材料科學與生物科技的進步，在模仿組織與器官形狀的材料中植入細胞，使細胞依模型長成可供移植的完整組織與器官，這對於許多器官病損而亟需修復的病患，無疑是一大福音。

## 2.2 電氣紡絲 (Electrospinning)

西元 1900 年，當時人們將熔融封蠟 (Sealing Wax) 放置於高壓電場，從高壓端射出固態纖維並在接地處形成薄膜狀沉積物，此即電氣紡絲之原理。

Anton Formhals 在 1934 年發明了電氣紡絲，將高分子聚合溶液經由高壓電場的帶電荷噴嘴，溶劑揮發乾燥後形成奈米纖維網材。雖然電氣紡絲技術早在 70 幾年前就被發明，但直到廿世紀末，奈米技術的興起才獲得重視，其應用範圍又以過濾、生醫、感測為大宗。

電氣紡絲纖維直徑約略微 1~100 nm 之間，具有孔洞性高、比表面積大的特性，使得其表面能和活性增加。應用於生醫領域方面，以藥物釋放控制、創傷敷材及組織工程為主。近年來電氣紡絲在細胞生長支架的研究應用有大幅增加的趨勢。

### 2.2.1 電氣紡絲的發展

在 1914 年後，Zeleny 等學者開始從事電氣紡絲的研究，卻依然侷限在熔融狀態的物質[4][5]。直到 1934 年，Anton Formhals 率先申請了第一個電氣紡絲專利，描述在靜電力場製造高分子纖維的設備，此後研究方向便以溶液狀態物質為主。1964 年後，Taylor 利用連續式光學攝影技術，發現了臨界電壓及液滴平衡外型，俗稱泰勒錐 (Taylor



Cone) [6][7][8][9]，平衡半角 (Semi-vertical Angle) 為  $49.3^\circ$ ，如圖 2-3 所示。1966 年，Simons 利用電氣紡絲製備出輕薄的不織布薄膜 [10]。1970 年，Baumgarten 發表了一系列高速攝影儀所拍下的電紡相片，使得電紡的運動方式與過程更為人們所熟悉。隔年 Baumgarten 更做出了直徑僅有  $0.05\sim 1.1\ \mu\text{m}$  的纖維 [11]，更加確立了電氣紡絲技術具有達到奈米尺寸的能力。

### 2.3.1 電氣紡絲原理

電氣紡絲是將含有高分子的離子溶液或熔融狀態高分子至於毛細管 (Capillary) 中，接上作為驅動力的高壓電 [12]，產生能量強大的高電壓差，使溶液在毛細管端形成泰勒錐。當電壓逐漸升高，電場電壓大於溶液的表面張力 (內聚力)，溶液隨即脫離泰勒錐形成飛行軌跡 (Jet) 射出 [13]；當飛行的高分子溶液接近收集板 (Collector) 時，拉扯電場面積變大，造成展開 (Splaying) 現象 [13]，使飛行高分子分散成更細緻的纖維平均散佈沉積於收集板上，形成無方向性的不織布薄膜，同時纖維與纖維之間也形成具有張力強度的網狀交錯結構 [14]。分散之後的高分子纖維，藉由改變電場強度、溶液黏度等參數其直徑可控制在  $1\ \mu\text{m} \sim 100\ \text{nm}$  之間。電氣紡絲法示意圖如圖 2-4。

為了達到不同薄膜使用的目的，電氣紡絲藉由改變電壓強度、溶

液濃度、收集距離等條件，準確控制纖維直徑[15]，進而調整薄膜孔洞率 (Porosity)、孔徑。奈米化的纖維直徑，造成了量子尺寸效應與表面效應，展現出許多優異的物理與化學性質，電氣紡絲技術具有以下優點：

- (1) 纖維尺寸可達奈米級[13]。
- (2) 經由控制溶液濃度 (Concentration)、工作電壓 (Voltage)、收集距離 (distance) 等參數，可精準調整纖維結構與直徑大小[14]。
- (3) 成形後的不織布薄膜適合當作藥物載體，加入抗生素 (Antibiotics) 或生長因子 (Growth Factor) 等功能載子，可加強薄膜功能性[15]。
- (4) 電氣紡絲屬於單一加工過程 (Single Process) [16][17]。

利用電氣紡絲纖維具比表面積大、孔洞率高等特性，配合可生物分解與生物相容性醫療材料，生醫領域方面在下列技術運用具有極大優勢：

- (1) 藥物釋放控制：均勻釋放藥物，解決突釋現象發生。
- (2) 創傷敷藥：質量輕薄，可增加傷口膨潤性，與藥物控制釋放結合可改善傳統創傷材料。
- (3) 組織工程：電氣紡絲的高比表面積與高孔洞率，適合生物



細胞的附著生長。

## 2.3 電氣紡絲在組織工程之應用

### 2.3.1 心血管組織工程

近年來，心血管疾病一直高居台灣十大死因第二名，其中冠狀動脈疾病（CAD）又名列心血管疾病第三名，動脈粥樣硬化

（Atherosclerosis）是造成死亡的主因。目前治療的方式並不多，包括血管支架置放術及血管成形術，或截取自體及其他生物體的血管做繞道手術（bypass），因此在治療動脈阻塞的外科手術時，必須尋找替代血管（Vessel Graft），然而這些方法發生再阻塞（restenosis）的機會極高。利用組織工程技術製備人工血管為冠狀動脈硬化的病患帶來另一種治療的可能，但是移植時所需克服的生物相容性和血管生物活性（active tone），都是所面臨的挑戰。

人工替代血管所需克服的問題包括了：適當的機械性質以承受血液流動時血管脈動所引起的高壓力和高血流速；設計最佳材料、結構與製作方式，又要讓細胞有良好的附著性以生長成完整單細胞層，以避免血栓發生。

目前製作人工管狀結構的方法如下：

- （1）微機電方式：以半導體黃光製程與微電鑄技術製作出不鏽

鋼及矽晶片基板母膜，再利用微熱壓技術製作出高分子材料微管道[18]。

(2) 高分子薄膜成形：先製作網狀結構之高分子薄膜，再將薄膜捲成管狀結構[19]，如圖 2-5。

(3) 電氣紡絲：利用一軸心旋轉收集棒材，將高分子溶液以高壓電進行噴灑，製作成管狀。

### 2.3.2 方向性纖維結構

近年研究發現，當纖維結構小於細胞尺寸，細胞會有較佳的附著性與組織性[20]。在天然動脈中間層，具有線性且方向性排列的次微米肌肉纖維結構，及細胞外間質。因此在 2004 年 Boland 等人採用了電氣紡絲法，以膠原蛋白及彈性蛋白為材料，嘗試做出模仿動脈結構的纖維支架[21]。之後 Xu 等人同樣嘗試了電氣紡絲法，以 p[LLA-CL] (75:25) 為材料，做出直線排列的可降解纖維結構[22]，如圖 2-6，並證實了在直線排列的奈米纖維結構，平滑肌細胞的附著性與繁殖速率都有明顯改善。

## 2.4 高分子材料—聚乳酸 Poly Lactic Acid

聚乳酸是一種人工合成、生物可吸收白色半結晶玻璃態高分子材料，具有塑性 (plastic) 性質[23]，屬於 poly-alpha-hydroxy acid，其玻

璃轉化溫度（Glass transition temperature）為 57°C，熔點為 174°C。

在活體中，PLA 經由水解（Hydrolytic Deesterfication）成為乳酸，乳酸就由乳酸脫氫酵素（Lactate Dehydrogenase）的催化成焦葡萄糖酸鹽（Pyruvate）。焦葡萄糖酸鹽可用於葡萄糖合成或經檸檬酸循環代謝成水和二氧化碳，經由肺或腎排出。

當添加低分子聚乳酸的含量愈多，生物分解速率愈高，當添加量達 30% 時，生物薄膜約在 60 天後完全被吸收。PLA 被吸收的時間範圍相當大，在動物體內，完全被吸收時間從 32 週到超過 4 年不等。在人體中，則是植入後的 12 至 18 個約才開始[24]。

聚乳酸的優點主要有下列幾項：

- (1) 良好的機械性質與物理性能
- (2) 良好的生物可分解性：聚乳酸能完全被自然界中微生物分解，最終形成二氧化碳和水，不會污染環境。
- (3) 良好的細胞相容性與可降解性：在醫藥領域，可製備一次性輸液用具、免拆型手術縫合線，低分子聚乳酸可作為藥物緩衝包裝劑。

PLA 以其優異的生物相容性、合適的機械強度、可為人體吸收代謝等特性，近年來受到廣泛注意，尤其是在生物醫學領域方面，更是被大量應用研究，成為一項熱門的生醫材料。

## 2.5 大氣電漿

電漿反應過程相當複雜，當中參與反應的物質包括了電子、離子、自由基與中性粒子，與傳統化學反應中僅與自由基或官能基有關不同。電漿產生的原理，在於電場中加速電子碰撞氣體分子使其離子化，游離後的電子又受到電場加速，再度碰撞氣體分子，形成連鎖反應。而電場中電子亦有可能與離子作結合（Recombination），當結合速率與游離速率相等時，電漿中電子與離子密度就會趨於平衡，達到電中性。電子具帶電性且質量輕，因此在電場中加速可產生較高能量，電子與其他粒子碰撞之後再將能量傳遞出去。因此，影響能量傳遞的均勻性在於碰撞頻率與電子大小，而粒子碰撞頻率則與所在環境息息相關。

大氣電漿近年來被廣泛地研究及應用，最主要分為四種類型：電漿火炬(plasma torch)、暈光放電(corona discharge)、介電質屏蔽放電(dielectric barrier discharge)與常壓電漿束(atmospheric pressure plasma jet)[25]，如圖 2-7。電漿火炬使用高電流低電壓進行放電，出口溫度可達數千度，大多應用在冶金或焊接上；暈光放電利用針狀或線狀電極對另一平板狀或管狀電極放電，溫度約介於 50~400°C 之間，暈光放電容易在電極間產生電弧(arc)，常常造成電極損壞，因此使用上多有限制；介電質屏蔽放電是在兩端電極間加入一層或數層介電質材料來防止電弧產生，常見的介電質材料有石英或陶瓷。常壓電漿束是利

用高流速氣體其它少量欲反應氣體流經圓管內產生穩定電漿，由於常壓電漿束溫度低且放電均勻，因此多被應用在不耐熱塑膠或聚合物表面處理上，例如：提升表面能、改質親水性等[26]。

## 2.6 血栓因子

在人體中，纖溶系統（fibrinolytic system）與凝血系統的生理平衡確保了血液在血管中正常的流動。其中的關鍵，在於內皮細胞所分泌的第一型胞漿素原活化抑制劑（plasminogen inhibitor-1, PAI-1）、組織型纖維蛋白溶酶原激活物（tissue plasminogen activator, t-PA）所維持[27]。當 PAI-1 濃度的升高，抑制了纖維蛋白的溶解，凝血系統運作大量活化，是造成心血管栓塞的主因。而 t-PA 的作用在於將纖溶酶原轉變成纖溶酶，進而達成降解纖維蛋白以防止血栓疾病以及血管移植後血栓情況的發生。PAI-1 與 t-PA 之間的適度調節，是維繫血管中血液通暢的重要因素。另外，內皮細胞所分泌的前列環素（prostacyclin, PGI<sub>2</sub>）在血栓形成初期，具有預防血小板吸附與堆積之作用[28]。

近年來除了了解到透過在人工血管支架內壁培養內皮細胞，對於血栓的預防有所成效[1]，更進一步的得知，經由人工血管支架的表面改質或細胞外間質蛋白質塗佈等等不同方式，改善內皮細胞的培養與成長，有效率地達到促進 t-PA 與 PGI<sub>2</sub> 的分泌和 PAI-1 的抑制之成

果[29]。

## 2.7 傳統表面改質

提高細胞貼附能力的方法，著重於高分子材料表面濕潤性的調整[30][31]，經由提升材料表面的親水性，改善細胞附著的效果。或是在材料表面塗佈纖維連接蛋白（fibronectin）[29][32][33][34]、膠原蛋白（collagen）[29][33][34]此類構成細胞外間質成分的結構蛋白[35][36]，藉以營造適合細胞生長的環境。

目前所見不管是增加親水性的改質，或是結構蛋白的塗佈，有兩大缺點是目前面臨到的問題：一是化學藥劑的殘留；另一就是改質時間手續繁雜耗時。在結構蛋白塗佈之前，必須先進行酒精的預濕潤（pre-wetted）[3][34]。首先將材料浸泡在 70% 酒精中 15 分鐘，隨後加入無菌的磷酸鹽緩衝液（phosphate buffered saline, PBS）兩次進行的水合反應（hydrated reaction）後將 PBS 移除。

在預濕潤的步驟，面臨到的問題就是，水分蒸發導致濕潤度無法控制，以及酒精的殘留則會造成細胞毒性並且疏水性的問題依然存在[37]。尤其若以電氣紡絲所製備的多孔性材料而言，為了讓水分子可以順利通過材料的每個微小孔隙，以酒精做預濕潤更是不可缺少的程序。

之後進行細胞外間質結構蛋白的塗佈[34]。而在塗佈膠原蛋白之



前，需先在 37°C 下將 0.1% 的膠原蛋白溶液混合 0.1M 的冰醋酸 24 小時，然後才將所用的材料浸泡在混合溶液內 24 小時進行塗佈。取出後，在以無菌 PBS 沖洗兩次以移除未吸附分子。

在後續塗佈的過程中，不僅處理過程冗長且繁雜，PBS 的殘留反而導致細胞的貼附困難[37]，其他化學藥物的殘留，同樣有造成細胞毒性的可能。

## 2.8 電漿表面改質技術

電漿處理僅對材料表面或較上層原子層進行改質，對材料整體塊材(bulk)並無影響，故可保留原有特性[38]。電漿表面改質基本上有四種類型：

- (1) 去除污染物 (Contamination Removal)
- (2) 表面活化 (Surface Activation)
- (3) 蝕刻 (Etch)
- (4) 鏈結 (Cross Linking)

電漿中離子受電場加速，以高速轟擊 (bombardment) 材料表面分子鏈，造成分子鏈斷裂後達到去除污染物與表面活化的效果。然而大氣電漿在某些表面改質應用上，處理試片被放置在幾乎沒有電場加速效應的後放電區域(post discharge)，且離子與充斥在空氣中的大氣粒子快速反應後還原成原子或分子態，因此材料表面並無斷鏈活化作

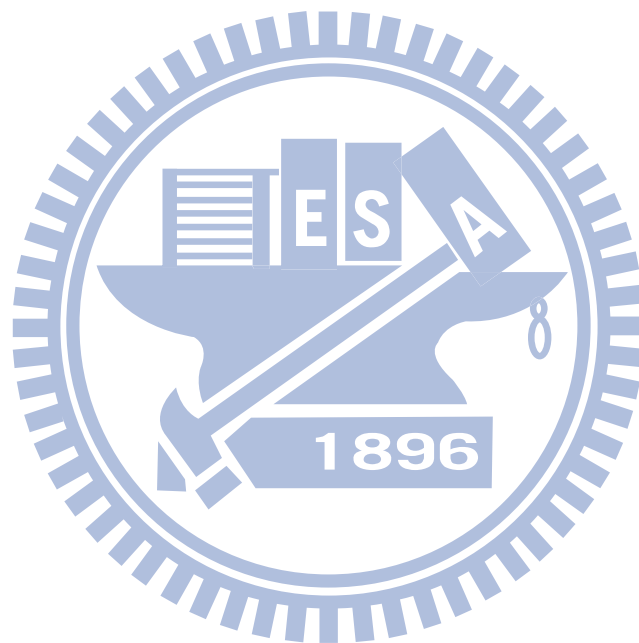
用。所幸電漿中同時存在著許多激發態粒子，激發態粒子由高能階軌域返回較低能階軌域時可能會放出 UV 或 EUV 等短波長光源，同時具有將表面斷鍵活化的效果[39]。活性粒子雖然不受電場加速，但其強烈的反應性可以與表面官能基作用，來改變特性，例如，當含氧官能基被導入聚合物表面，可以有效率的改善材料表面親水性；而含氮官能基則有助於提升材料生物相容性。另外，在電漿表面改質過程中，並不需要用到水或其他化學溶劑，造成環境污染的可能性較低，稱得上是一種相當環保的科技[40]。

目前利用電漿進行高分子材料表面改質尚以低壓電漿為主要應用 [29][37] [41][42][43]，其優點是將整個腔體環境控制高度真空下，阻絕外界空氣、水氣分子等雜質的污染，並能以較低的輸入功率和小流量氣體來產生電漿，另外高真空環境下電子有較大的平均自由徑，因此電漿的能量也較強。但也正因為如此，為了維持適當的低壓環境，真空設備除了必須花費高額成本架設與維護，更是需要耗費長時間來進行真空抽取，對於製程上的連續性十分不利。

也因此，大氣電漿以其高效率、低成本及製程高彈性的特性，近年來在民生、能源、生醫等各方面，獲得高度重視與研究，被認為具有取代舊有製程的潛力。本研究以大氣電漿諸多優勢，對聚乳酸人工血管支架做表面改質的可行性作探討，進而觀察細胞附著與生長之



情況，期望在生醫與組織工程上，能達到有效的應用與推廣。



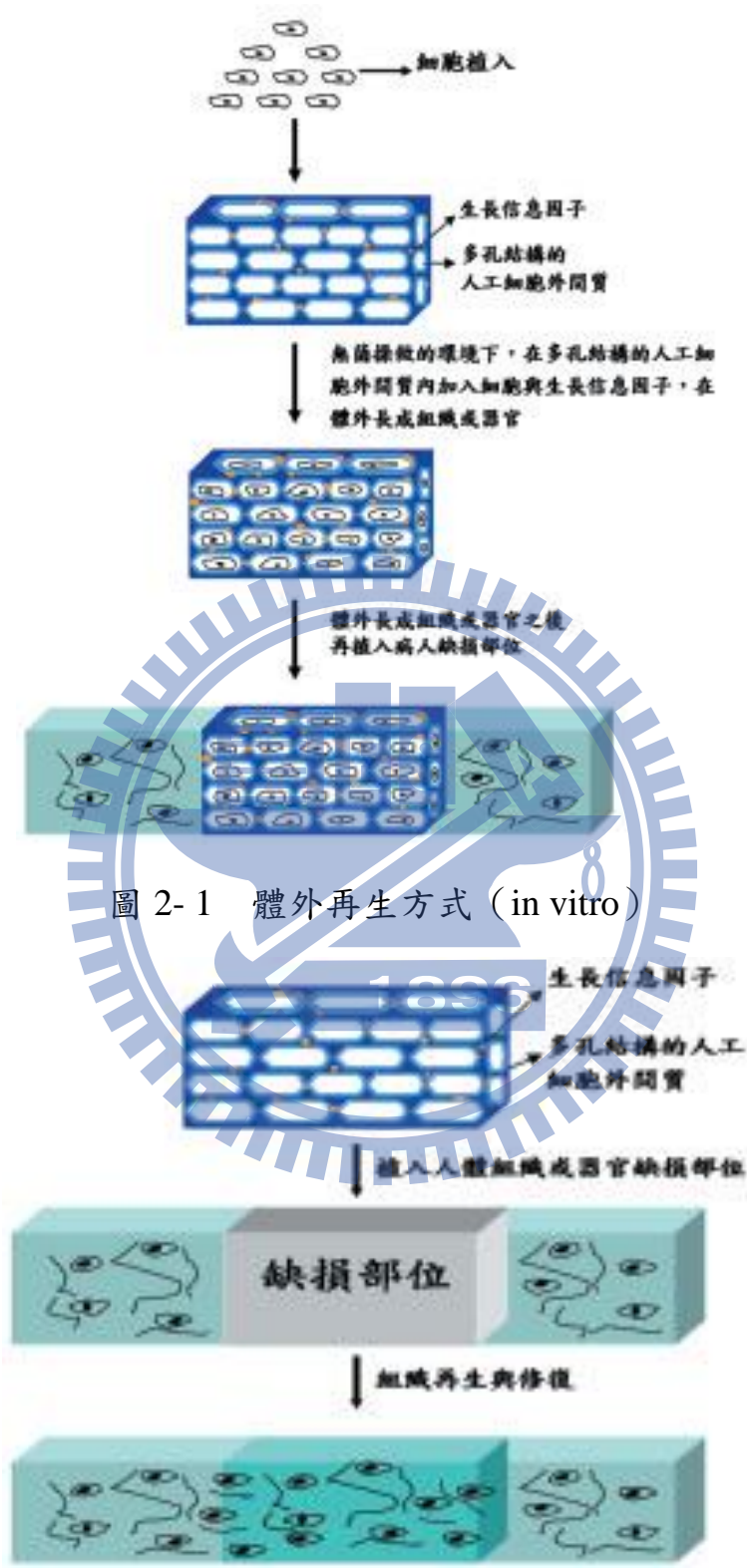


圖 2-1 體外再生方式 (in vitro)

圖 2-2 體內再生方式 (in vivo)



圖 2-3 泰勒錐

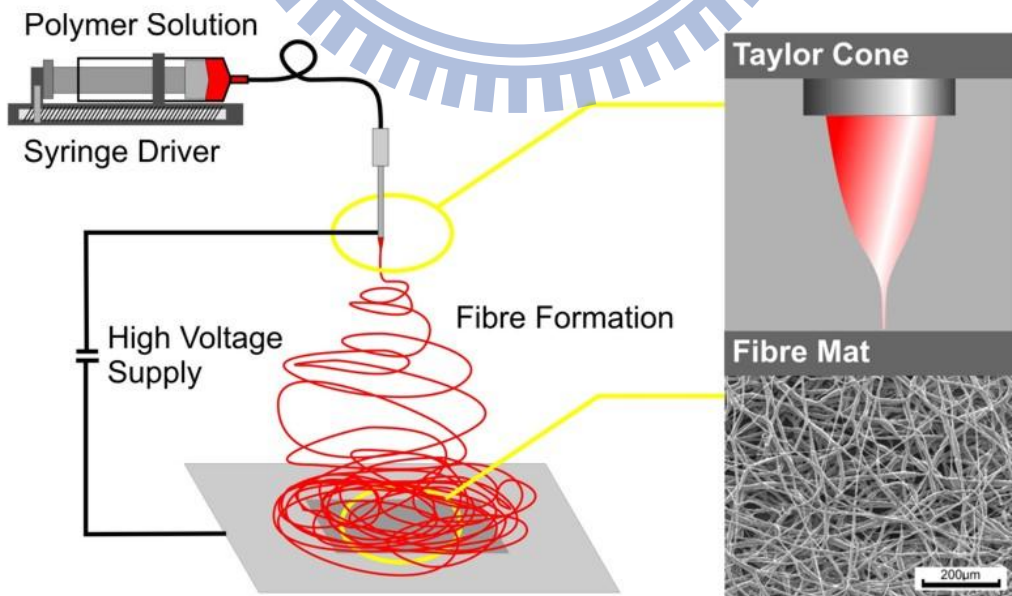


圖 2-4 電氣紡絲法示意圖

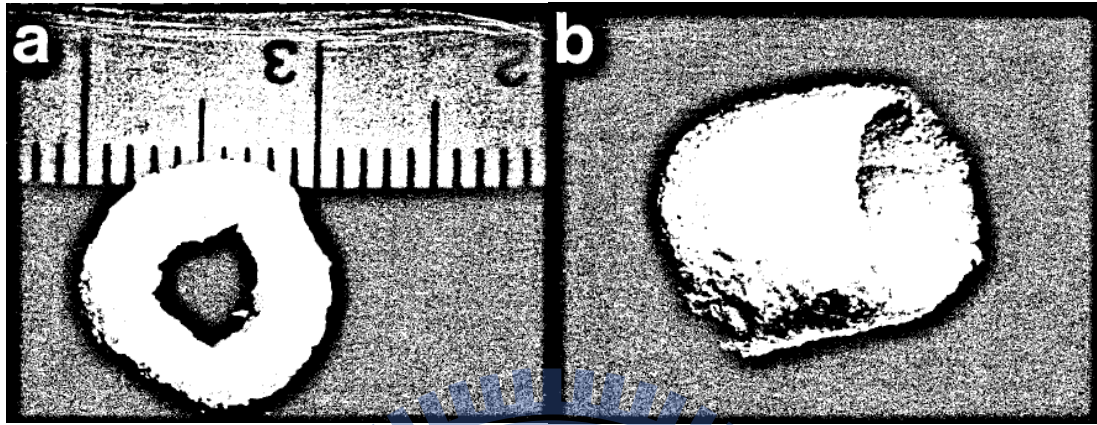


圖 2-5 高分子薄膜製備之管狀結構 (a) 剖面視圖 (b) 等視圖[19]



圖 2-6 光學顯微鏡觀測下之具直線性纖維支架[22]

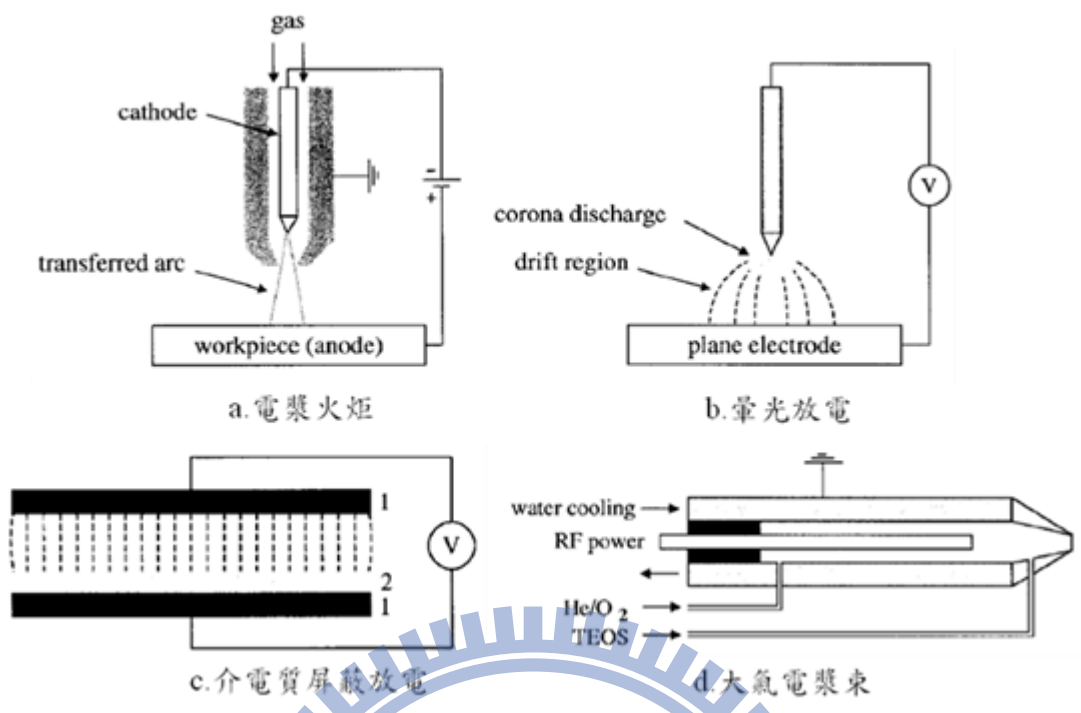


圖 2-7 大氣電漿源[25]





## 第三章 研究材料與方法

### 3.1 研究流程概述

本研究主要目的在於首先利用電氣紡絲法製備具方向性纖維結構之生物可分解管狀支架，再藉由大氣電漿通入以氮氣為主的混合氣體，對人工血管支架做二階段的表面改質，藉以達到親水性改善與胺基導入的可行性。之後以內皮細胞進行體外培養，探討親水性改善與胺基導入對於內皮細胞附著與成長的關係。期望能以此為開端，未來可以建立在體外的循環系統，甚至有機會在臨床上實際應用。研究的流程，如圖 3-1 所示。整個實驗基本上可分為四個主要部分：

- (1) 建立電氣紡絲實驗設備，調配適當 PLA 濃度與各項實驗參數，製備具方向性纖維結構人工血管支架。
- (2) 進行電漿表面處理，首先以氮氣/氧氣對 PLA 人工血管支架表面作親水性改質，再以氮氣/氨氣進行胺基導入。
- (3) 對改質後之材料表面進行分析。
- (4) 內皮細胞培養以及後續觀察。

以上研究流程及方式會在下面幾個小節中詳細介紹。

## 3.2 實驗設備

### 3.2.1 電氣紡絲實驗設備

- (1) 直流高壓供應器，友聲電子 (YSTC)，台灣：

如圖 3-2 所示，此儀器用於控制操作電壓，其範圍在 5 ~30KV 之間，隨著電壓大小不同電氣紡絲所噴灑的纖維粗細也會有所變化。此直流高壓電源供應器有兩端接頭，一端為正極接頭接於不鏽鋼針頭上，另一端負極接於不鏽鋼棒材上。

- (2) 注射視針筒幫浦，KDS-100，KDscientific，美國：

如圖 3-3 所示，用以控制幫浦流速，流速的不同與電氣紡絲噴灑的纖維形態也會不同。將 PLA 溶液裝入針筒中再放在夾具上固定，打開開關使溶液流出，等溶液流速穩定之後即可進行電紡。

- (3) 穩壓式直流電流供應器，Topward，台灣：

如圖 3-4 所示，提供穩定電壓給予馬達，使馬達以固定轉速穩定作動。

- (4) 壓克力箱：

如圖 3-5 所示，利用壓克力良好的絕緣性質，將實驗環



境與外界隔絕，降低外在環境對高壓電場的影響，降低實驗誤差。

(5) 不鏽鋼針頭（平頭），top corporation，日本：

如圖 3- 6 所示，規格#21，內徑 0.524mm。

(6) 不鏽鋼收集棒與馬達座：

如圖 3- 7 所示，不鏽鋼棒材直徑 4 mm，長度約為 20 cm，將收集棒接於轉動馬達上，收集時使之高速轉動以呈現纖維絲成方向性結構。

### 3.2.2

#### PLA 溶液配製

用以調配 PLA 溶液的材料與器材包括：

- (1) 電子天平，PB303，Mettler，瑞士（圖 3- 8）
- (2) 電磁加熱攪拌器（hot plate/magnetic stirrer）（圖 3- 9）
- (3) 聚乳酸（Poly Lactic Acid，PLA），（PLLA：PDLA/95：5），Mw：180K~200K，偉盟工業，台灣：如圖 3- 10 所示。

(4) 氯仿（Chloroform），試藥級，美國：如圖 3- 11 所示

聚乳酸作為溶質，以電子天平量測其重量，以氯仿作為溶質，一齊放入樣本品再加入攪拌子，置於電磁加熱攪拌器上攪拌均勻，調配出重量體積比（w/v）濃度為 15% 之 PLA 溶液，並確立在電場電壓在 7000KV、幫浦流速為 1.5ml/hr、馬達轉速約 6500~7000 rpm 等參數

下可製備出結構均勻的具方向性纖維管狀支架，以此作為電漿改質所用之樣本。

### 3.2.3 平行板介電質 (DBD) 大氣電漿設備

此設備由本系氣熱與電漿物理研究室自行架設，第一步驟使用氮氣/氧氣對血管支架作改變親水之前處理（本研究以「親水電漿」稱之），再以氮氣/氧氣進行胺官能基導入之第二階段處理（本研究以「胺基電漿」稱之）。

所謂介電質屏蔽放電(Dielectric Barrier Discharge)，屬於 Townsend discharge 中的不正常放電區(Abnormal discharge)。相較於其他型態之電漿，DBD 會在電極與電極間另外設置一層或數層介電質，常見的介電質有陶瓷、石英等等，目的是用來減少電極間的直接放電，避免電弧的產生。

#### (1) 電極設計與配備

構造示意如圖 3-12 所示，電極材料由兩塊平行銅（50\*50\*8 mm）組成，電極內設有水路通道，可維持銅電極之溫度。兩塊電極間各覆蓋一塊同樣為平板石英介電質（70\*70\*1 mm），石英介電質係數為 3.92。放電間隙(gap)厚度為 1 mm 的鐵氟龍控制。

#### (2) 電源供應器

如圖 3-13 所示，此套 DC quasi pulsed 電源供應器頻率操作範圍 20 到 60 kHz，最大輸出電壓為 15 kV (peak to peak)，最大輸出功率為 2 kW，電源密度分成大、中、小三種模式可供調變。

### (3) 氣體管路系統

氮氣與氬氣從各自氣體鋼瓶外接一調壓閥，氣體純度分別為 4N、5N，出口壓力皆為 2 至 5 公斤(相對大氣壓力)。經由鐵氟龍材質管線 (1/4 inch) 接至流量計控制進氣流量，以調整氣體混合比例。流量計採用浮子式流量計，實驗前必須確認浮球穩定，以確保氣體流量的精準度。經過三叉接頭後通入電漿電極放電間隙，間隙入口處設有一層多孔濾網，可確保混合氣體之均勻性。

### (4) 冷卻系統

如圖 3-14 所示，對電極輸入功率時，部分能量用於激發電漿並維持，但部分能量以各種型式消耗掉，其中有一部分以熱的形式產生於電極。為了避免電極過熱產生變形，電極內設有水路冷卻通道，電漿操作時水路流通並外接冰水機，水流溫度控制在 20°C 左右。

### (5) 實驗腔體

如圖 3-15 所示，大氣電漿腔體，目的不在於抽真空時保持氣密性，腔體將電極部分包覆於內部，提供高壓電運作時一層隔離，也將電漿產生之廢氣包覆在腔體內部，以便腔體外接一抽風櫃對廢氣作後處理。

#### (6) 單向移動平台

如圖 3-16 所示，為一維移動方向，設置於電漿電極後放電區域(post discharge)之出口下方，試片可放置於平台上讓電漿對其來回掃動處理。最大處理距離為 30 公分，可調控平台移動速度(最大速度每秒 9 公分，最低速度每秒 1 公分)、加速度、來回次數。平台下方有架設一機械式升降平台，用來調整距離電漿出口距離。

#### 3.2.4 接觸角探針量測儀

型號為 TAD FTA-98095，如圖 3-17 所示。

接觸角是一個決定材料表面濕潤程度的指標，也能判別物質的親疏水性。接觸角是液-氣界面接觸到固體表面時形成的角度，取決於三相界面（液-氣、固-氣和固-液）間的相互作用，如圖 3-18，達到平衡時的液滴的形狀由 Young's equation 所定義[44]：

$$\gamma_{gs} = \gamma_{gl} \cos \theta + \gamma_{ls} \quad (3.1)$$

其中， $\gamma_{gs}$ ：固體表面能

$\gamma_{gl}$ ：液體表面張力

$\gamma_{ls}$ ：固-液間界面張力

$\theta$ ：接觸角

另外，如圖 3-19 所示，本儀器影像擷取軟體所讀取之角度為水滴兩端與頂點連線之夾角 $\theta_0$ ，為接觸角 $\theta$ 之一半，故計算上需乘 2 方可得其實際角度。

### 3.2.5 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR)

型號為 BRUKER FT-IR TENSOR 27，如圖 3-20 所示。

傅立葉轉換紅外線光譜儀是一種對於材料表面官能基分析的重要工具，可用來對材料表面作定性或定量之量測。不同化學結構分子因吸收紅外線輻射所引起的原子間鍵結的振動、轉動產生的特定能量變化。由於所有有機化合物的吸收頻率都不同，透過了解紅外線光譜分析材料表面的化學鍵結與種類，了解特定官能基的存在。

不過，由於電漿處理深度遠小於材料本身厚度，因此在電漿處理效果較差時，可能導致官能基訊號強度不佳，造成在定量分析上的錯誤。

### 3.2.6 化學元素分析儀 (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS)

本儀器由清大貴儀中心提供，如圖 3-21 所示。

利用 X-ray 作為激發源，當材料表面原子內殼層受激發後游離出自由電子。受游離之後的自由電子稱為光電子，由於各種元素或化學結構受激發後的光電子不同，可藉此分析材料元素種類和化學型態。XPS 能譜訊號主要來自於光電子，並以光電子能譜圖能量值來分析元素種類及含量，可藉此對材料表面成分作定量之分析。

高分子聚合物的 XPS 表面分析上，文獻經常選擇碳(C1s)、氮(N1s)、氧(O1s) 為待測元素，當電漿中的電子、活性粒子透過物理或化學反應使聚合物之 C-C 產生斷鍵，進而產生 C-O 或 C-N 等成分。

### 3.2.7 細胞動態轉動培養裝置

本裝置由本實驗室自行裝設完成，如圖 3-22 所示。用以進行細胞動態實驗，將人工血管支架置於以 0.1 rpm 緩慢轉動的鐵氟龍管之間，使細胞能在三維結構的血管支架上均勻貼附而不脫落。

### 3.2.7 盤式酵素免疫分析儀 (ELISA reader)

型號為 Biochrom Anthos 2020，如圖 3-23 所示。

靜態培養後之細胞，經過 MTT (3-(4,5)-dimethylthiazolium (-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazoliumromide) 試劑處理後，透過盤式酵素免

疫分析儀量測顏色深淺後所得光密度 (optical density, O.D.) 的吸收值，可知其細胞成長活性。MTT 活性試驗原理於後續章節介紹。

### 3.2.8 倒立式光學顯微鏡

型號為 DM IL，Leica，如圖 3-24 所示。

經過細胞動態轉動培養後之人工血管支架，經過細胞染色之後，透過光學顯微鏡觀察，藉以了解電漿處理後細胞生長的分佈情況。染色步驟與原理於後續章節介紹。

### 3.2.9 場發射掃描式電子顯微鏡 (field scanning electron microscope, FE-SEM)

型號為 HITACHI S-4000 SEM，如圖 3-25 所示。放大倍率為 20 ~ 300000 倍。

透過電子束撞擊材料表面，偵測激發出的二次或背向散射電子訊號，便可觀察到試片在微小區域的表面形態與影像。

動態轉動培養之細胞。由於光學顯微鏡的倍率較低，僅能觀察人工血管支架下，細胞經過染色後的分佈情形。透過 FE-SEM，可以觀察到更細微的細胞生長狀況。



### 3.3 人工血管支架製備

詳細溶液濃度與各項參數已於 3.2.2 介紹，以下說明其製備流程：

- (1) 彎折注射筒前方連結之橡皮管與針頭，緩緩將溶液倒入並盡量使溶液直接滴至底部避免流觸筒壁。在溶液倒入注射筒後迅速倒置，擠壓推筒使空氣排出避免產生氣泡。
- (2) 將收集棒材裹上葡萄糖漿以便脫模。本實驗使用葡萄糖為培養細胞用之葡萄糖，如圖 3-26 所示。
- (3) 如圖 3-7 所示，不鏽鋼收集棒上方套上一段橡膠管，與接地端作為阻隔，避免電紡絲過度集中於上方。接上轉動馬達以便收集具方向性纖維絲。
- (4) 穩定收集電氣紡絲約一小時，將收集完成之棒材浸入水中脫膜 6 小時後換水，再浸泡至隔天取出放置乾燥。
- (5) 輕推取下製備之人工血管支架並剪裁(去掉前後端不均勻部分)。

製備之人工血管支架內徑約 4.3 mm，外徑約 4.5 mm，屬小管徑人工血管支架。

### 3.4 電漿表面改質

本步驟的目的在於希望藉由調整電漿參數來對 PLA 人工血管支架作表面改質，改質流程包括親水電漿前處理與胺基導入改質的第二階段的胺基電漿。

大氣電漿需要較高的電壓輸入，才能將氣體崩潰產生電漿，因此大氣電漿通常藉由混合少量比例的第二種氣體來增加電漿強度。同時因為的氣體流量通常較大，考量到成本的問題，選擇的氣體大多為氮氣、氬氣等，較少以純氧氣電漿和純氮氣電漿來作應用。

另外，有時候單道電漿對於聚合物的表面改質效果並不明顯，因此有些研究嘗試先透過一道前處理的步驟，到達表面斷鍵，以提升第二階段的電漿處理的改質效果[45]。圖 3-27 為多種電漿組合對 Polyethylene 處理 30 秒之 XPS 分析結果，從 N1s 訊號強度判斷，在氮氣電漿前加入一道氬氣電漿作前處理對於胺基的導入有較好的效果。

並且由於氮氣為有毒物質，因此本研究選擇採用較小氮氣流量，以避免造成細胞毒性[46]，同時須降低氮氣流量確保氮氣濃度。而氮氣流量降低造成氣體在放電區停留時間變長，導致電漿溫度提高，因此在胺基電漿程序，調整輸出功率以降低電漿溫度，增快移動平台速度以縮短血管支架經過電漿光束的停留時間。也因此，經過調整的胺

基電漿與親水電漿相比，其表面改質效率較差，若未經過第一道親水電漿先行將材料表面做斷鍵，胺基導入之效果可能無法有效提升。

本研究嘗試先以一道親水電漿進行前處理，當含氧官能基被導入聚合物表面，可以有效率的改善材料表面親水性，並且在表面造成斷鍵；隨後通入胺基電漿進行第二階段處理，以利含氮官能基的導入。兩階段電漿的輸出功率、頻率、氣體流量、處理間距，移動平台速度等參數如表 3-1 所示[47]，本研究調整電漿參數僅以兩個階段之處理次數做討論。

處理過程先將每段人工血管支架剪裁成 10 mm 長度，直立於裁切過適當高度 200  $\mu$ l 的 pipette tip 上方，外圍包覆內徑 5 mm 外徑 7mm 之矽膠管確保在電漿處理時不致因氣流影響而導致血管支架彎曲。再將 tip 直立於 96 孔盤上，如圖 3-28 所示，為了處理到血管支架內壁，血管支架與電漿光束以  $0^\circ$  接觸，示意圖如圖 3-29。血管支架頂端距離電漿出口距離為 4 mm。移動平台來回經過電漿源一趟定義為處理一次，以 1 loop 表示之。

### 3.5 表面能計算與親水性量測

接觸角的量測對於推算材料表面的表面能 (surface energy) 與表面張力 (surface tension) 是一項重要指標。表面能係由兩種或兩種以上量測液體，透過表面能的計算公式即可推得。量測液體通常選用一

種 polar liquid，常用如蒸餾水（distilled water）或乙二醇（ethylene glycol）；與一種 dispersion（nonpolar） liquid，常用如二碘甲烷（diiodomethane, CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub>）。

根據 Young's equation，方程式(3.1)中可以由儀器量測可得與 $\gamma_{gl}$ ，為求得材料的表面能 $\gamma_{gs}$ 、 $\gamma_{gl}^p$ 、 $\gamma_{gl}^d$ 與 $\theta$ ，我們採用適用於高分子材料之 Wu（harmonic mean） method 計算表面能[48]：

$$\gamma_{ls} = \gamma_{gs} + \gamma_{gl} - 4 \left( \frac{\gamma_{gl}^d \gamma_{gs}^d}{\gamma_{gl}^d + \gamma_{gs}^d} + \frac{\gamma_{gl}^p \gamma_{gs}^p}{\gamma_{gl}^p + \gamma_{gs}^p} \right) \quad (3.2)$$

與 Young's equation 整理之後公式後可得方程式：

$$\gamma_{gl}(1 + \cos \theta) = 4 \left( \frac{\gamma_{gl}^d \gamma_{gs}^d}{\gamma_{gl}^d + \gamma_{gs}^d} + \frac{\gamma_{gl}^p \gamma_{gs}^p}{\gamma_{gl}^p + \gamma_{gs}^p} \right) \quad (3.3)$$

其中 $\gamma_{gl}^p$ 為量測液體之 polar force； $\gamma_{gl}^d$ 為量測液體之 dispersion force；液體表面張力 $\gamma_{gl} = \gamma_{gl}^p + \gamma_{gl}^d$ 。

透過兩種不同液體量測個別之接觸角，以及可查得參數 $\gamma_{gl}$ 、 $\gamma_{gl}^p$ 、 $\gamma_{gl}^d$ ，聯立解得方程式(3.3)後，可得材料表面 polar force  $\gamma_{gs}^p$ 、dispersion force  $\gamma_{gs}^d$ ，將 $\gamma_{gs}^p$ 與 $\gamma_{gs}^d$ 兩者相加就可獲得材料之表面能 $\gamma_{gs}$ 。

本研究採用之兩種量測液體，一種為 polar liquid 的蒸餾水，其 $\gamma_{gl} = 72 \text{ mJ/m}^2$ ， $\gamma_{gl}^p = 51 \text{ mJ/m}^2$ ， $\gamma_{gl}^d = 21.8 \text{ mJ/m}^2$ ；另一種為 dispersion liquid 的二碘甲烷，其 $\gamma_{gl} = 50.8 \text{ mJ/m}^2$ ， $\gamma_{gl}^p = 0 \text{ mJ/m}^2$ ， $\gamma_{gl}^d = 50.8 \text{ mJ/m}^2$ 。

量測接觸角前將長度為 1 cm 的人工血管支架中對半剪開，之後攤平黏貼於載玻片上，液滴固定 3  $\mu\text{l}$  並滴於試片正中央，影像擷取

圖如圖 3-30 所示。於親水性量測部分測量液體使用蒸餾水，表面能則使用蒸餾水與二碘甲烷。

### 3.6 內皮細胞培養

本研究是用 HMEC-1 內皮細胞於 PLA 人工血管支架上進行養殖實驗，培養液主要成分為 MCDB131、DMEM low glucose 與胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)。由於內皮細胞屬貼附型細胞，因此將原本培養於培養皿中的內皮細胞加入胰蛋白酶約八分鐘，使細胞得以漂浮，之後計算細胞數量，加入培養液，控制細胞量在  $3 \times 10^5$  株/ml。每段血管支架剪裁成 10 mm 進行電漿處理，之後進行靜態培養與動態轉動培養，放置在溫度  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恆溫箱 (incubator) 內，之後透過 MTT 試驗與顯微觀察了解第 3 天與第 7 天細胞貼附與成長之狀況。

#### 3.6.1 靜態培養

將經過電漿處理過的血管支架放置於 24 孔盤中，注入 1 ml 細胞後置於旋轉式振盪器 (圖 3-31)，以 40 rpm 振盪 5 小時，使細胞可以完整貼附於血管支架上。每兩天換取培養液，吸取舊的培養液 0.5 ml 後注入 0.5 ml 新培養液。此部分血管支架作為 MTT 試驗之用。

#### 3.6.2 動態轉動培養

由於人工血管支架屬於三維結構，因此在培養上不若平面薄膜支

架便利，在培養的過程中細胞有脫落的可能，因此本研究選擇以一種緩慢且持續的轉動培養，藉以幫助細胞貼附。

將內徑 6 mm 外徑 8 mm 之矽膠管剪裁成 25 mm 長度，將經過電漿處理後之血管支架放置於內，將細胞注滿後以鐵氟龍塞住兩端，放置於動態轉動培養裝置上，以 0.1 rpm 之速度培養兩天後，將血管支架取出放入 24 孔盤中，注入 1 ml 培養液繼續培養。每兩天換取培養液，吸取舊的培養液 0.5 ml 後注入 0.5 ml 新培養液。此部分血管支架以 HE 細胞染色後，作為顯微結構觀察之用。

### 3.7 MTT 細胞活性試驗

細胞活性採用 MTT 試驗分析進行，MTT 為一種淺黃色的試劑。利用活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶能使 MTT 溶液還原為紫色的不可溶性甲臍結晶 (formazan)，沉積於細胞中。再以二甲基亞砷 (DMSO ; Dimethyl sulfoxide) 或酸性異丙醇溶解甲臍結晶，圖 3-32 顯示了 MTT 活性試驗後的溶液顏色，藉由顏色深淺透過盤式酵素免疫分析儀測量吸光值，藉此了解活細胞的生長情況。

### 3.8 HE 細胞染色

蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain, HE stain)，係是利用細胞中各種構造不同酸鹼值，與染料溶液反應後產生之顏色差異，



作為細胞的觀察。細胞內之酸性物質如細胞核、核糖體等與鹼性染料染色後呈現藍色，稱為嗜鹼性 (basophilia)；而鹼性物質如細胞間的蛋白質、大部分細胞質等與酸性染料染色後呈現紅色，稱為嗜酸性 (acidophilia)。

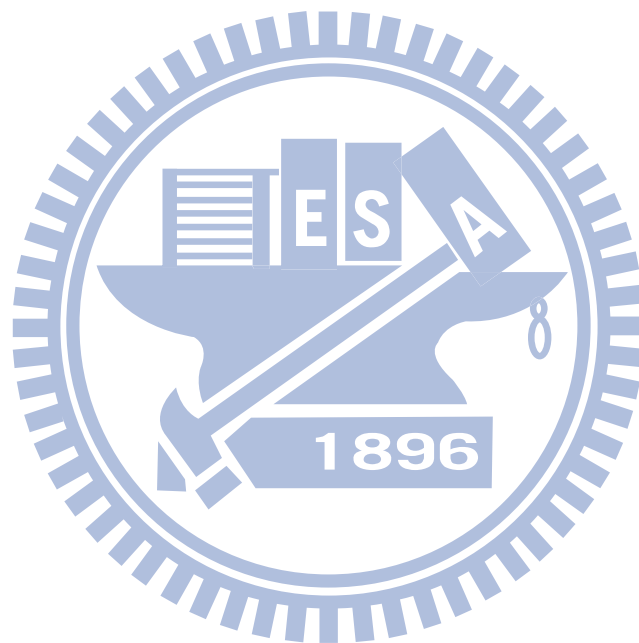
其染色步驟如下：

- (1) 將培養液吸取出，以磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 沖洗殘留之培養液與細胞代謝物，並減緩細胞在離開培養環境後 pH 值的變化。沖洗三次，每次一分鐘。
- (2) 加入福馬林將血管支架蓋滿用以細胞固定，靜置 30 分鐘後吸取出。
- (3) 加入蒸餾水沖洗。
- (4) 加入蘇木精將血管支架蓋滿染色，靜置 5 分鐘後吸取出。
- (5) 以自來水沖洗。
- (6) 加入伊紅將血管支架蓋滿染色，靜置 1 分鐘後吸取出。
- (7) 加入 95% 酒精將支架蓋滿進行脫水，靜置 2 分鐘後取出，  
放置自然風乾。

在光學顯微鏡下的染色細胞，由於倍率關係，僅可見在細胞部分呈現藍色，而 PLA 血管支架部分呈現紅色，雖無法清楚看出細胞各



個構造，但透過細胞與血管支架染色不同，已可觀察血管支架下細胞分佈情況。



	<b>N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Plasma Pretreatment</b> <b>(Hydrophilic Plasma)</b>	<b>N<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> Plasma 2nd-step treatment</b> <b>(Amine Group Plasma)</b>
<b>Gas</b>	N <sub>2</sub> + 0.1% O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> + 5% NH <sub>3</sub>
<b>Flow rate</b>	50 slm	10 slm
<b>Gap distance</b>	1 mm	
<b>Dielectric</b>	quartz (1 mm)	
<b>Input power</b>	500 W	400 W
<b>Frequency</b>	60 kHz	30 kHz
<b>Treatment distance</b>	4 mm	
<b>Velocity</b>	10 mm/s	20 mm/s
<b>Process time</b>	0.2 s/loop	0.1 s/loop

表 3-1 電漿實驗條件



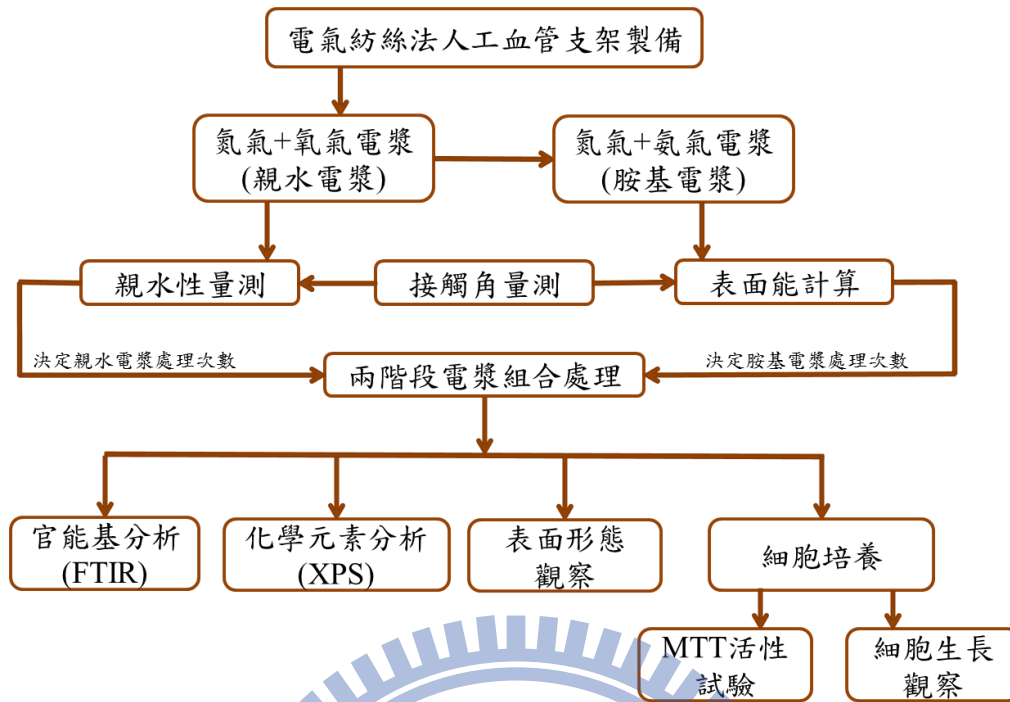


圖 3-1 實驗流程



圖 3-2 高壓電源供應器



圖 3-3 注射式針筒幫浦



圖 3-4 穩壓式直流電流供應器

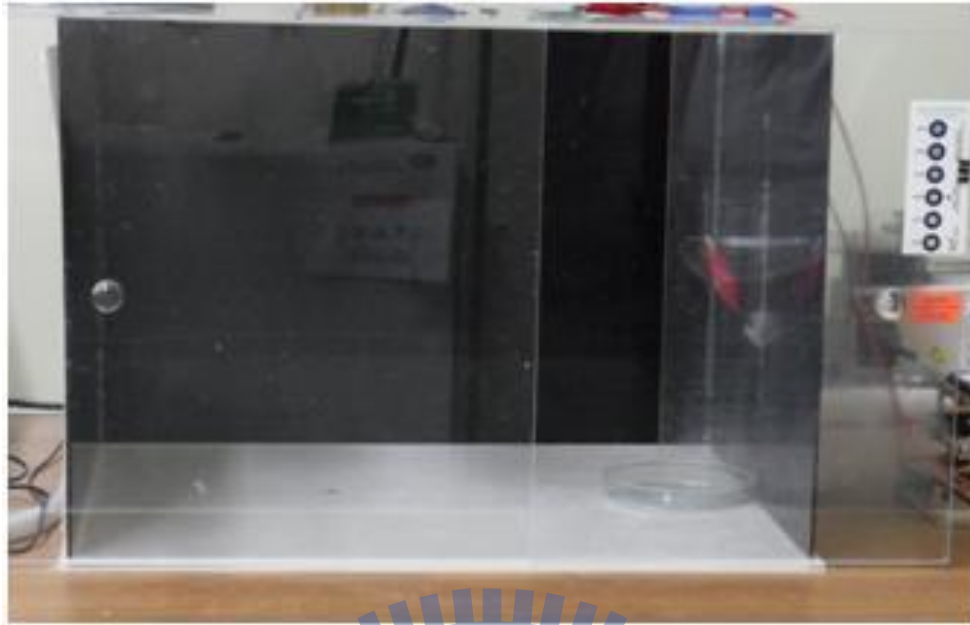


圖 3-5 壓克力絕緣箱

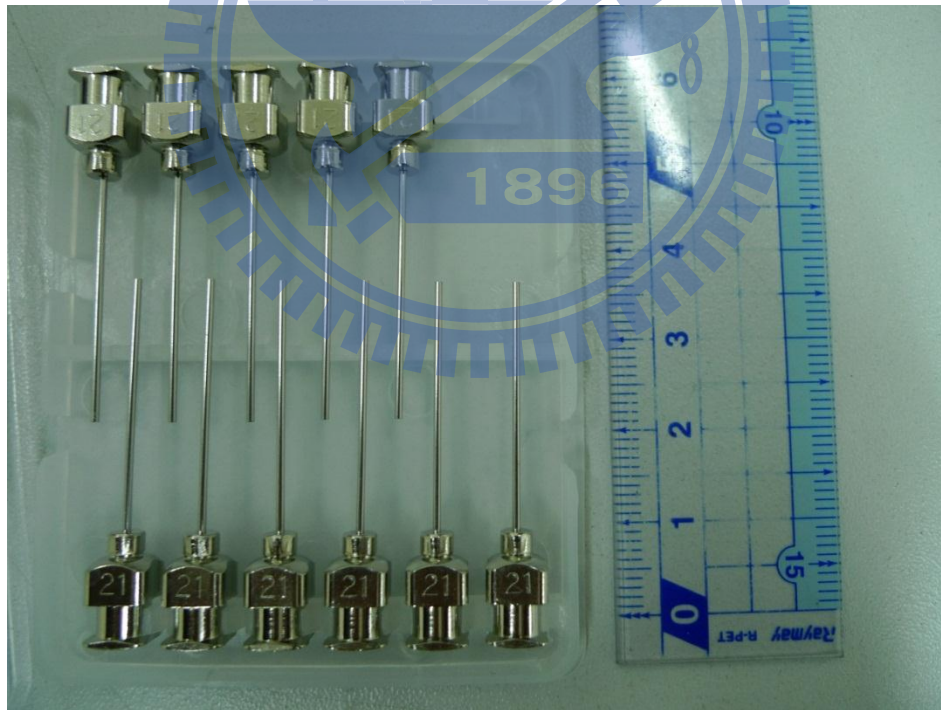


圖 3-6 不鏽鋼針頭（平頭，規格為#21）



圖 3-7 不鏽鋼收集棒



圖 3-8 電子天平



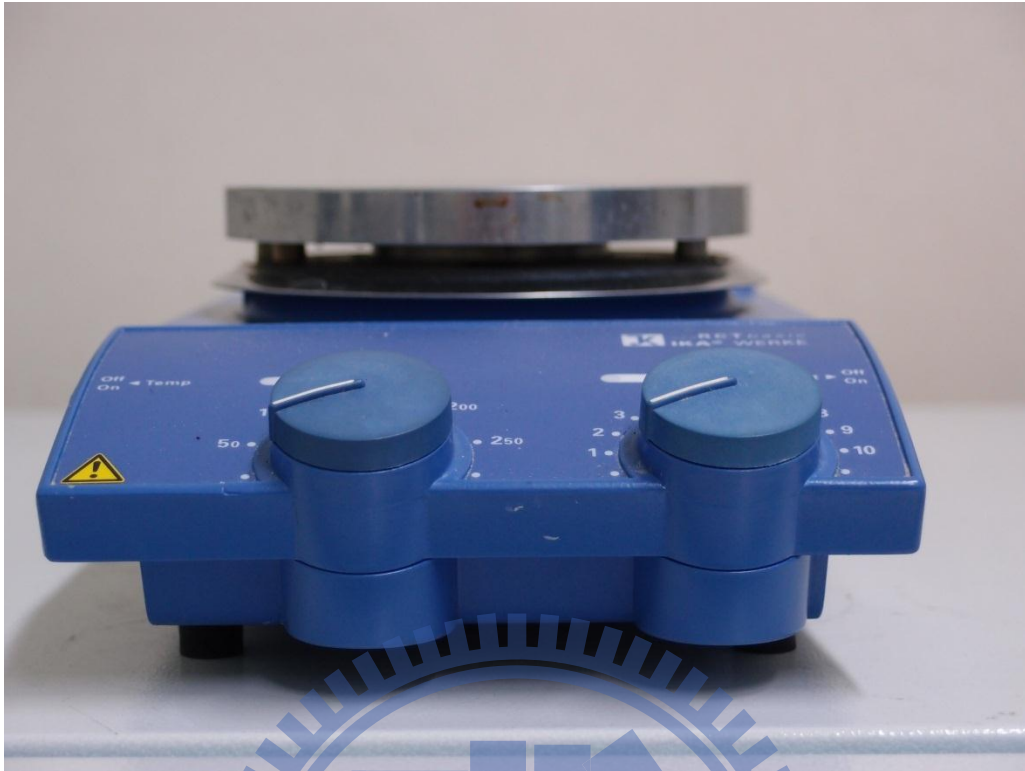


圖 3- 9 電磁加熱攪拌器 (hot plate magnetic stirrer)

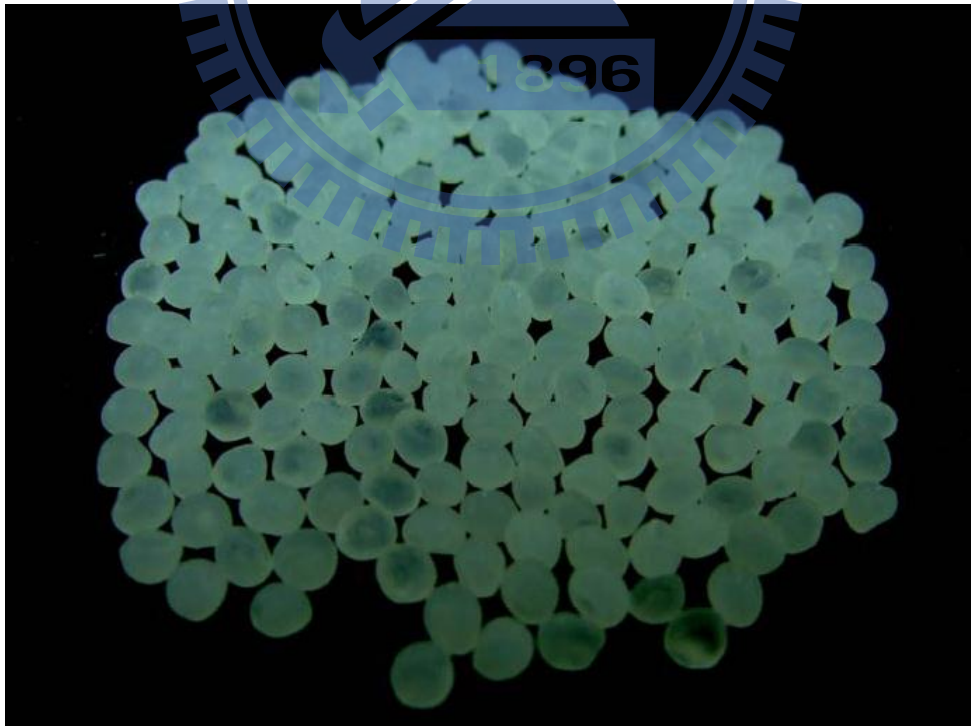


圖 3- 10 聚乳酸顆粒





圖 3-11 氯仿

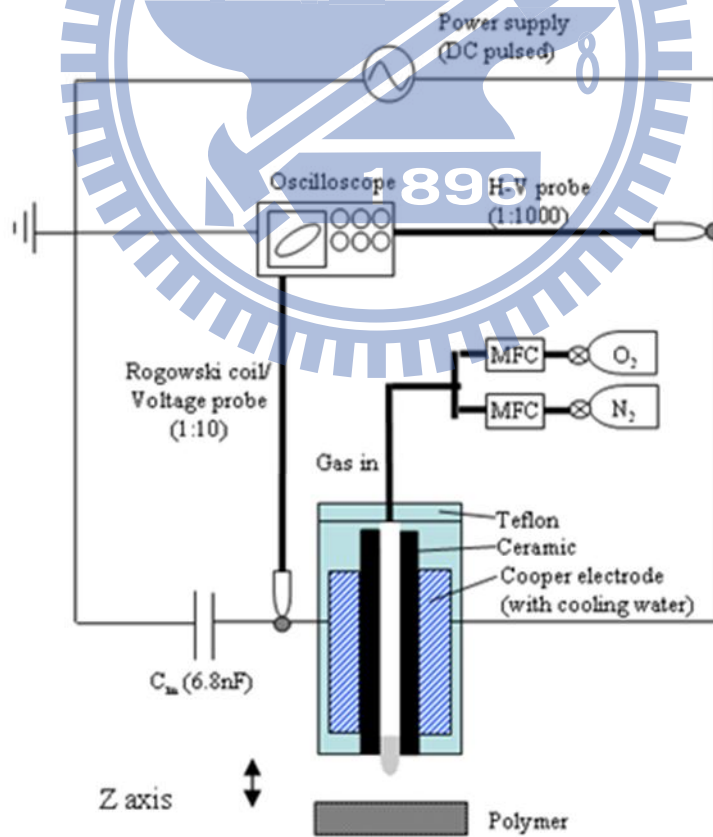


圖 3-12 DBD 大氣電漿電及構造圖[47]



圖 3-13 脈衝電源供應器



圖 3-14 水路冷卻系統



圖 3-15 實驗腔體

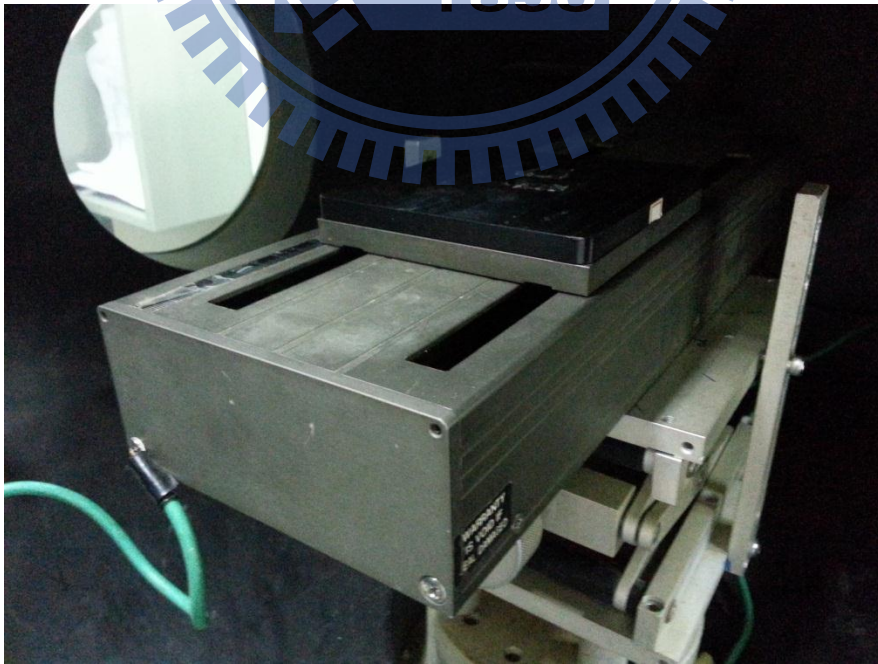


圖 3-16 單向移動平台／升降平台



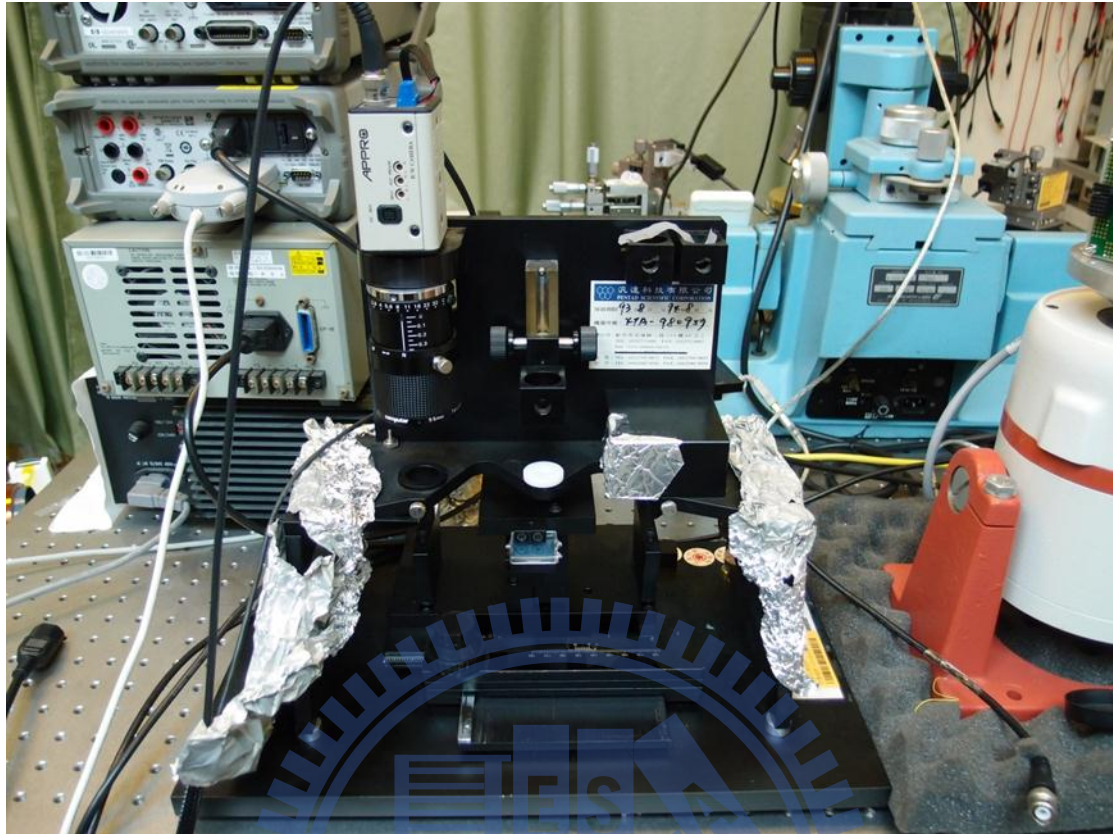


圖 3-17 接觸角探針量測儀

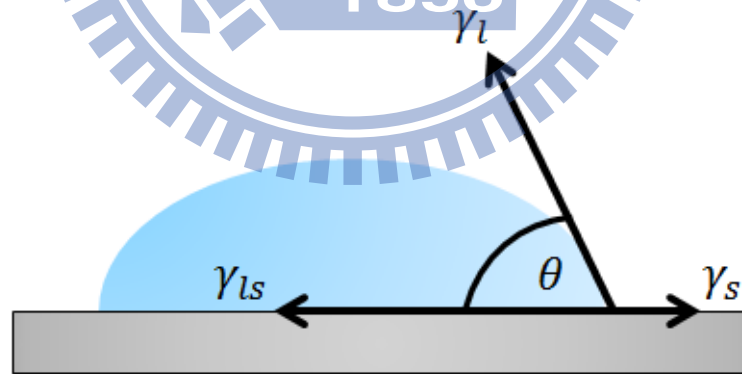


圖 3-18 液滴接觸角示意圖

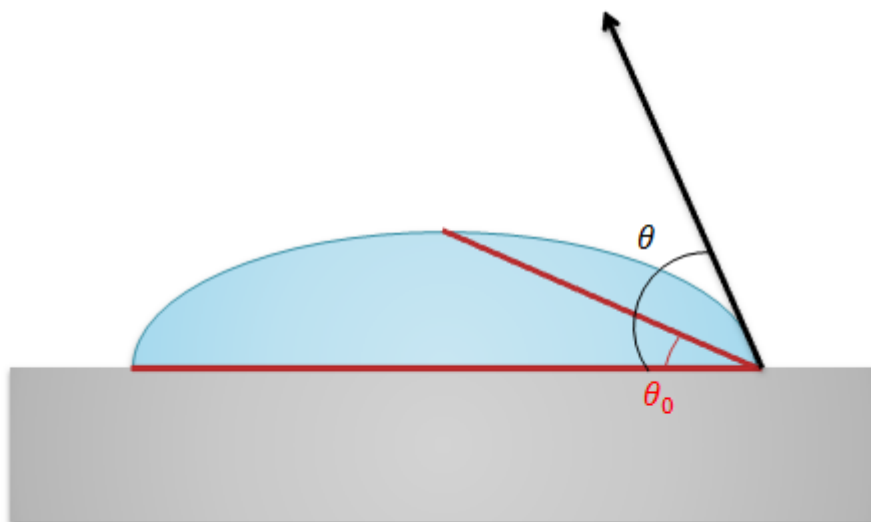


圖 3-19 液滴接觸角影像擷取角度示意圖



圖 3-20 傅立葉轉換紅外線光譜儀



圖 3- 21 化學元素分析儀

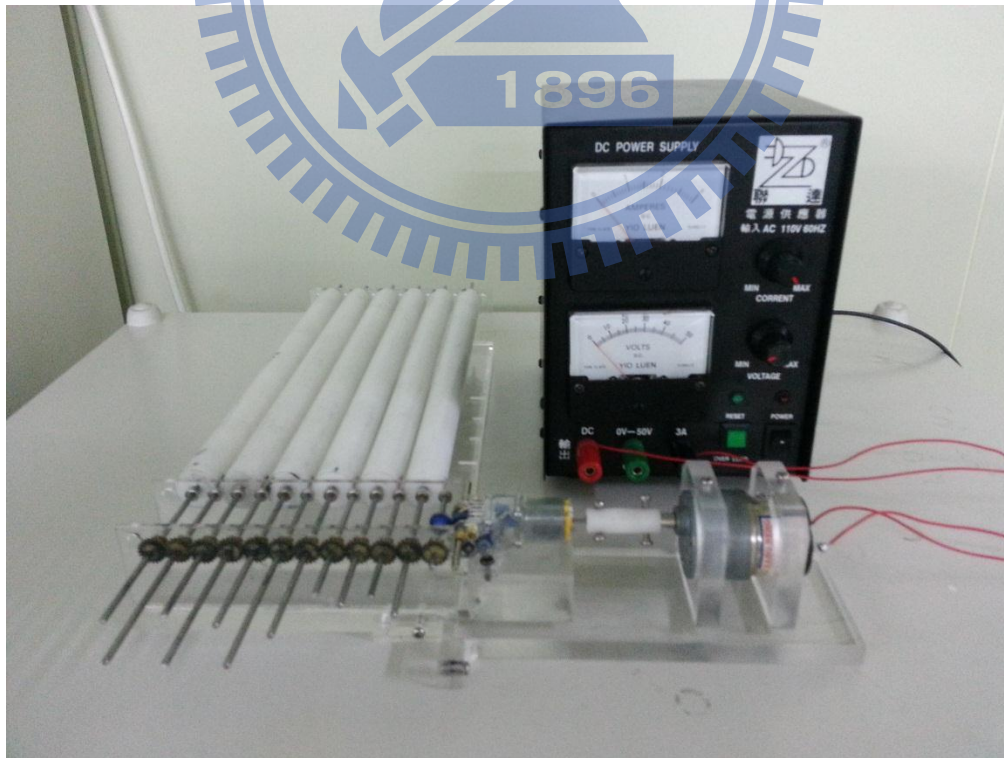


圖 3- 22 細胞動態轉動培養裝置





圖 3-23 盤式酵素免疫分析儀 (Elisa reader)



圖 3-24 倒立式光學顯微鏡





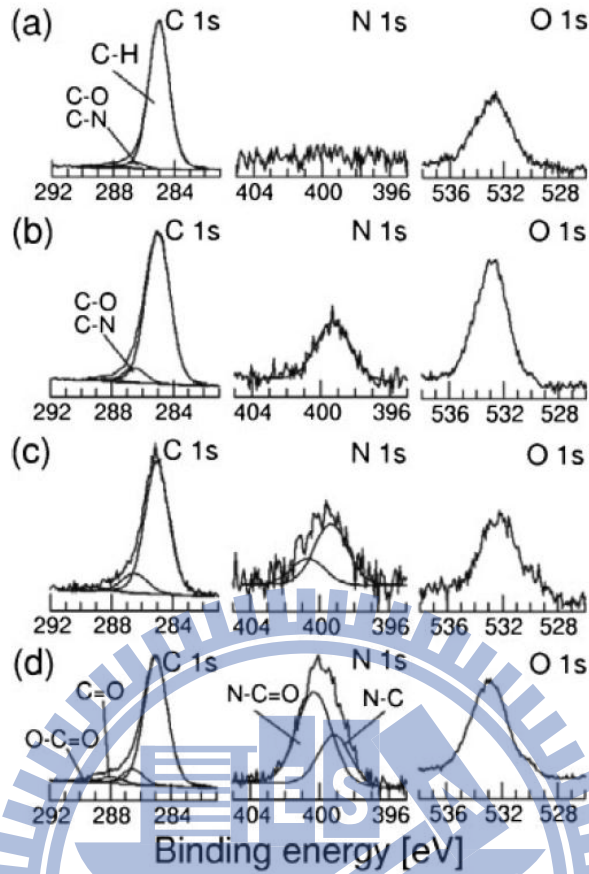


圖 3-27 PE 表面 XPS 分析結果[45]: (a) 對照組 (b) 氨氣電漿 (c) 氨氣電漿前處理+氨氣電漿 (d) 氨氣電漿前處理+氨氣電漿

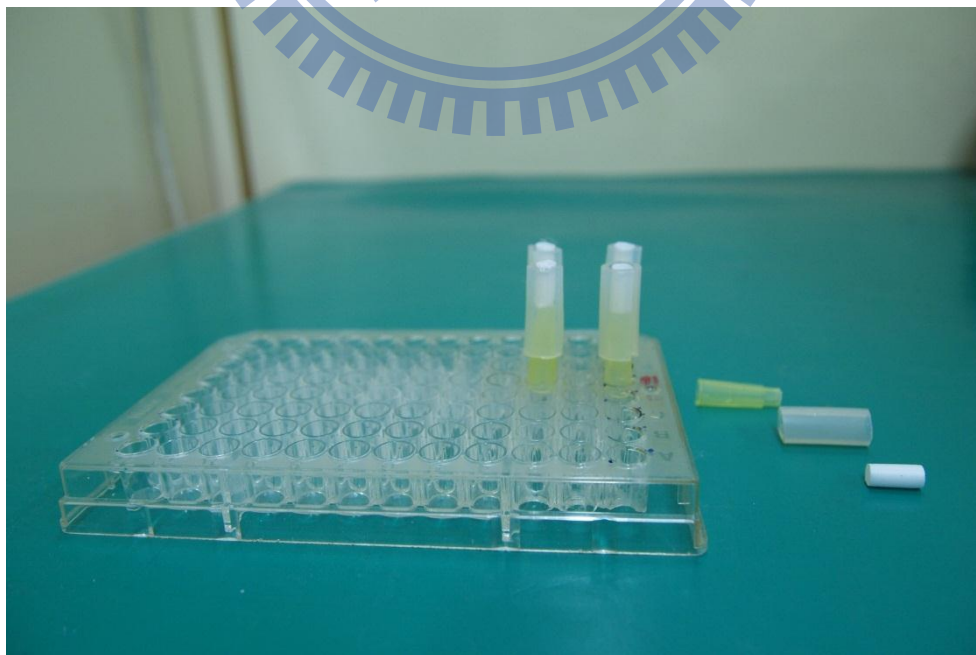


圖 3-28 PLA 人工血管支架電漿處理設置圖

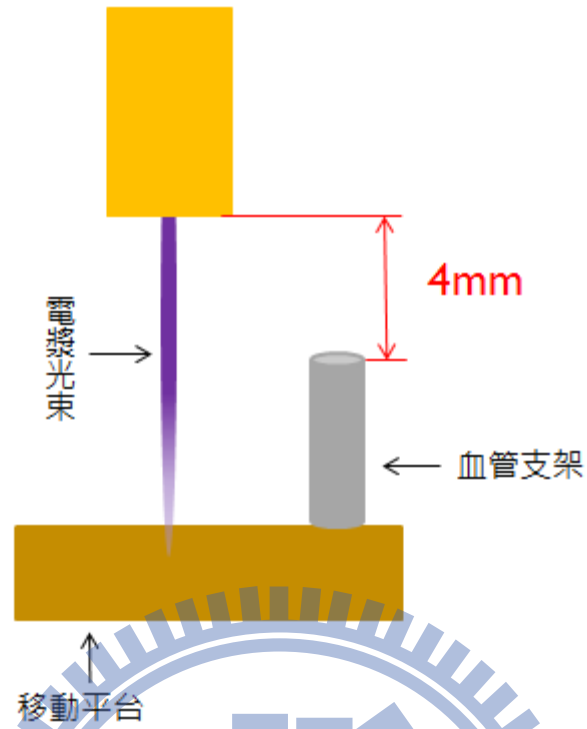


圖 3-29 人工血管電漿處理示意圖



圖 3-30 液滴接觸角量測圖



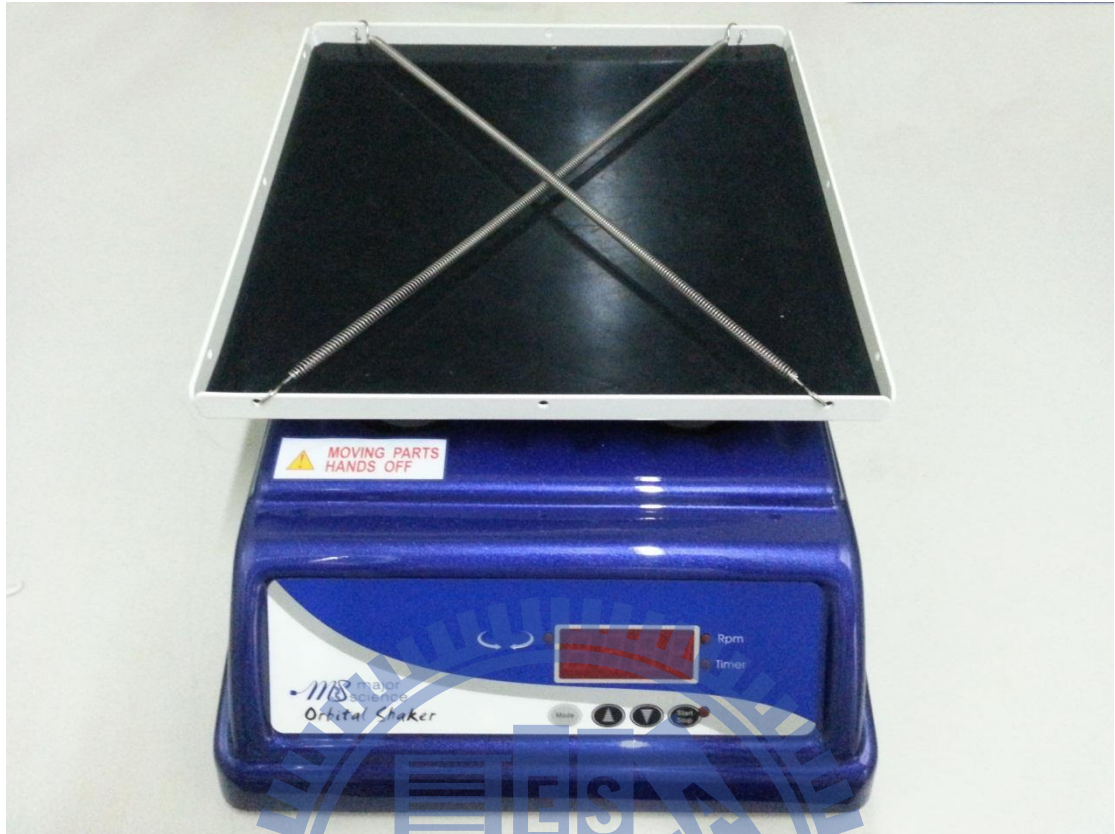


圖 3-31 旋轉式振盪器

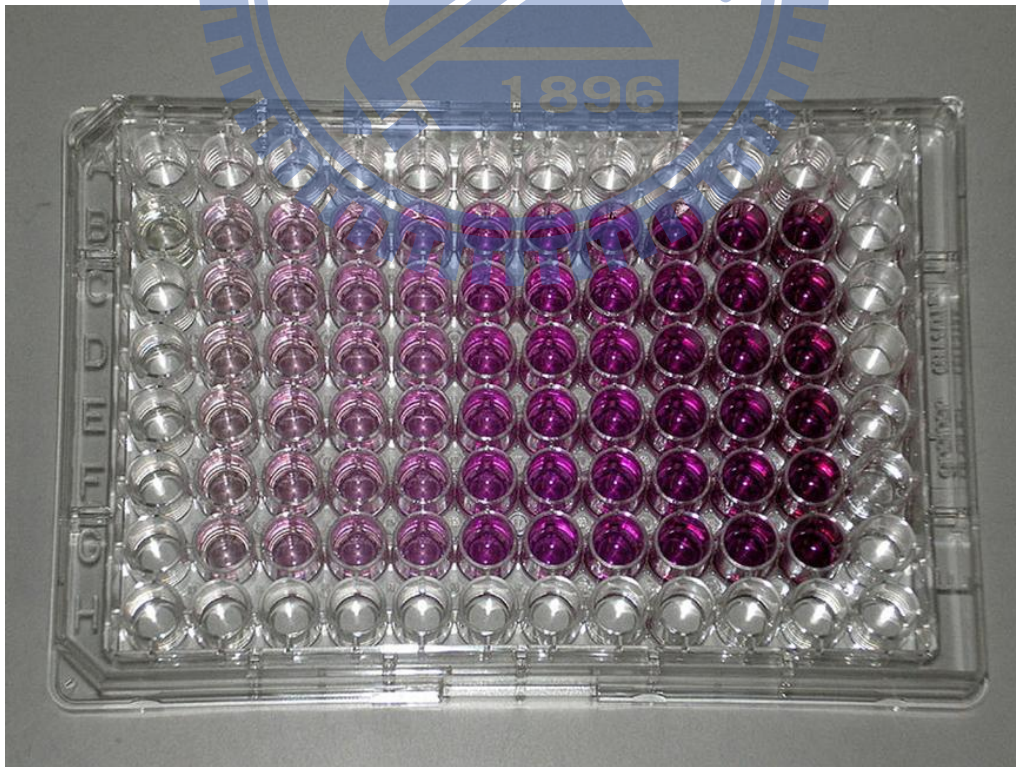


圖 3-32 MTT 試驗產生之顏色

## 第四章 實驗結果與討論

本研究將實驗結果分為三個主要部分做討論：首先先以接觸角量測，求得在 PLA 人工血管支架上，親水性與表面能的飽和值，進而確立親水電漿的前處理以及胺基電漿的第二階段處理採用的處理次數；其次利用表面官能基與表面化學元素的分析，探討在經過兩個階段的電漿處理後，PLA 人工血管支架生成了何種新官能基以及生成量多寡；最後在經過細胞培養之後，透過 MTT 試驗與細胞的顯微觀察，了解在二個階段電漿處理下的不同處理次數，細胞貼附與成長情況。

### 4.1 接觸角量測

#### 4.1.1 親水性分析

在確定處理次數前，必須先了解到電漿有效的處理距離，方能決定 PLA 人工血管支架得以獲得改質的適當長度。由於電漿最佳處理範圍約在距離電漿口 4 mm 到 6 mm 處，而非愈接近電漿出口愈佳 [49]。因此，先將血管支架剪裁成 40 mm 的長度，血管支架頂端距離電漿出口 4 mm，以親水電漿做 20 loops 的處理，之後對 5 mm、15 mm、25 mm、35 mm（距離電漿出口分別為 9 mm、19 mm、29 mm、39 mm）處做接觸角量測，得到結果如圖 4-1 所示：可以看出在血管

支架長度 5 mm 處可以得到最低的接觸角  $54^{\circ}$ ，之後隨著處理距離愈遠而效果愈差，到 25 mm 幾乎已與未處理過的血管支架無異。而對血管支架做 20 loops 胺基電漿處理所得之效果，在 5 mm 處之接觸角為  $74.14^{\circ}$ ，15 mm 則為  $81.75^{\circ}$ 。由此結果可知，就本研究所用之 PLA 人工血管支架的材料與結構上，以 10 mm 之長度可得較為穩定的電漿處理效果。

為改善 PLA 血管支架表面親水性，本研究嘗試以不同處理次數作探討。由圖 4-2 可知，未經過親水電漿處理（即 0 loops）的血管支架接觸角為  $82.83^{\circ}$ ，然後隨著處理次數的增加，到 80 loops 時接觸角為  $15.85^{\circ}$ ，親水電漿對支架表面的親水性差不多已達到飽和，更多的處理次數無法再提升其親水性。

由親水電漿接觸角的結果，本研究以 0、10、30、80 loops 作為親水電漿之使用參數，以探討不同親水性對於細胞貼附與生長之效果。

#### 4.1.2 材料表面能

表面能的改變，代表極性官能基被導入材料表面，藉此可判斷胺基導入血管支架表面的情況，根據表面能的改變，以決定胺基電漿的處理次數。

如節 3.4 所言，由於單道胺基電漿效果不如親水電漿來的優異，



因此若單純以胺基電漿做接觸角的量測，難以看出其效果變化。因此，在胺基電漿之前，先固定親水前處理次數，之後調整胺基電漿處理次數，以得到表面能的變化趨勢。表面能 $\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$ 。

首先以固定親水電漿處理次數為 10 loops，然而從表 4-1 發現，儘管隨著胺基電漿處理次數增加，其表面能卻並未呈現任何趨勢，數值均介於  $46.73 \text{ mJ/m}^2 \sim 59.16 \text{ mJ/m}^2$  之間。藉此研判，可能原因在於就本研究血管支架與電漿光束接觸之角度，若前處理次數過少，第二階段的胺基處理亦無顯著效果。同時，也由於經過電漿處理之緣故，造成材料表面粗糙度增加，除了胺基電漿在 40 loops 以前蒸餾水的接觸角呈現趨勢下降外，粗糙度尚不足以對親水性構成影響，其他接觸角數值皆未有任何趨勢可循。

也因此，若以 10 loops 的前處理，來決定胺基電漿的處理次數，並無法得到客觀之數據，因此，本研究隨後再調整前處理次數至 30 loops，嘗試以更長時間的前處理，加強胺基的導入效果。

從表 4-2 可以發現，當增加前處理之次數，確實其表面能隨著胺基電漿的次數增加而提高，從  $63.22 \text{ mJ/m}^2$  上升至  $76.88 \text{ mJ/m}^2$ 。然而，從蒸餾水的接觸角發現，當胺基電漿處理至 40 loops 之後，其水滴已完全被材料表面吸附，蒸餾水之接觸角以  $0^\circ$  表示。若胺基電漿處理次數再提高，僅能參考二碘甲烷之接觸角數值，如此便無法以本研究



所採用的 Wu (harmonic mean) method 做計算。

有鑑於透過材料表面能的計算，並無法有效決定胺基電漿的處理次數。因此，考慮本研究電漿光束之寬度 1 mm、親水電漿移動平台速度 10 mm/s，換算材料單位面積停留於電漿光束的時間，一次往返的 1 loop 是 0.2 秒，換算親水電漿的處理次數 0、10、30、80 loops 分別是 0、2、6、16 秒。對照胺基電漿的移動平台速度 20 mm/s，材料單位面積停留於電漿光束的時間 1 loop 是 0.1 秒，為使胺基電漿與親水電漿獲得相同的電漿處理時間，決定胺基電漿的處理次數為 0、20、60 loops，而由於若要與親水電漿 80 loops 獲得相同處理時間，可能會導致暴露在氨氣環境下過久造成細胞毒性，因此本研究調整為 120 loops。

因此，決定出兩個階段電漿的處理次數，分別為親水電漿的 0、10、30、80 loops 與胺基電漿的 0、20、60、120 loops。本研究對於此兩階段電漿處理次數，以 16 組處理參數組合，來進行親水電漿與胺基電漿對於細胞培養所呈現的貼附、生長效果作探討。在後續的討論中，本研究以「親水電漿-胺基電漿」的處理次數組合作表示（如 10-60 即親水電漿前處理 10 loops，第二階段胺基電漿 60 loops）。

## 4.2 血管支架纖維表面顯微形態觀察

經過電漿處理的過程中，PLA 人工血管支架受到離子轟擊，除了

造成材料表面的斷鍵活化，透過高倍率的電子顯微鏡，可以觀察到經過電漿處理後，孔隙度增加而使材料表面變得粗糙。粗糙的材料表面，雖然可能造成親水性變差，然而卻提供更多可供蛋白質吸附的空間，有利於細胞的附著與成長[50]。

圖 4-3 呈現出各種電漿組合的材料表面粗糙度，可以看出，與相同處理時間的胺基電漿相比，效果較佳的親水電漿確實對於表面形態的改變較為明顯。參數 0-0（即未經過任何電漿處理的原始試片）所呈現的則為電氣紡絲製程下所形成的孔隙。

### 4.3 表面官能基分析

PLA 的化學式為  $(C_6H_8O_4)_n$ ，結構式可參照圖 4-4[51]，大多為 C-O、C-C 以及 C=O 之鍵結，在經由電漿處理後，觀察其表面鍵結的變化可了解改質後表面成分的變化或官能基的導入，確定電漿處理的有效性。

圖 4-5 與圖 4-6 為 PLA 人工血管支架經過不同電漿參數處理下，所呈現之 FTIR 圖譜，其官能基種類與其吸收峰值可由表 4-3 進行對照。可以看出在  $1753\text{ cm}^{-1}$  的 C=O 與範圍從  $1045$  到  $1267\text{ cm}^{-1}$  的=C-O 都是 PLA 特有且主要的吸收峰值。而值得觀察的是，放大圖譜特定範圍，從圖 4-7 與圖 4-8 發現，在電漿參數為 0-0 所分析到之結果，並未存在  $1618\text{ cm}^{-1}$  的  $NH_2$  (primary amine group) 與  $3214\text{ cm}^{-1}$  的 NH

(Secondary amine group) 兩種胺基，而經過親水電漿或胺基電漿的處理後，上述兩類胺基確實被導入材料表面。

#### 4.4 XPS 化學元素分析

由圖 4-4 可知，PLA 是由 C、H、O 三種元素組合而成，未經過電漿處理之純 PLA，是無法在其表面測得任何 N 元素。因此，本研究透過分析 C1s、O1s、N1s 三種訊號，在經過電漿處理後之比例變化，即知胺基與親水基之導入效果。圖 4-9 為不同電漿參數下，對 PLA 作 XPS 分析之全頻譜圖。

分析表 4-4，首先排除 30-120 這組參數，由於該組數據不合乎趨勢比例，研判應為實驗錯誤。

是親水電漿或是胺基電漿處理材料表面時，應是先將 PLA 支鏈上的 C-C 與 C-H 斷鍵，方可提供官能基導入之空缺，而 C-C 斷鍵的現象可從經過電漿處理後 C1s 訊號下降得到證實；而 N1s 與 O1s 訊號的上升，則表示在經過電漿處理後，含氮官能基與含氧的親水官能基被導入材料表面。也因此，可以從 N/C 判斷在 C-C 斷鍵後導入多少比例之含氮官能基，並由 FTIR 圖譜相互驗證該官能基應為胺基；而 O/C 變化則可知親水性官能基如羥基 (hydroxyl group, -OH) 可能被導入材料表面。

而 0-120 之數據更可明確得知，若未經過親水電漿前處理先行將

支鏈上的 C-C 與 C-H 斷鍵，僅以單道胺基電漿作表面改質，與 30-0 相比，儘管 0-120 的處理時間比 30-0 多上一倍 (0-120 與 30-0 處理時間分別為 12 秒與 6 秒)，然而其效率卻差上許多。

## 4.5 細胞貼附與成長分析

### 4.5.1 MTT 細胞活性測試

在不同參數處理下的 PLA 人工血管支架，經過細胞培養後，觀察第三天與第七天之細胞活性，藉以分析電漿對於血管支架改質後，細胞的生長情況。

從圖 4-10 分析，細胞培養至第三天，在同樣的親水電漿前處理下觀察，第二階段不同的胺基電漿次數並未使細胞活性產生任何趨勢。但若在相同的胺基電漿下，改變親水電漿前處理次數則普遍可以在 30 loops 獲得最高的光密度 (O.D.)，而 0 loops 則為最低。表示在較短時間的細胞活性，主要取決於親水性改變造成的細胞貼附所影響。值得一提的是，對照圖 4-2 可知，並非親水性愈高而細胞貼附效果愈佳，這是由於影響細胞附著涉及到材料表面的其他諸多性質，包括電性、化學成分組成、孔洞率與粗糙度等等各種因素[52][53]，不過可以肯定的是，透過表面親水性的改善，確實對於細胞附著有所助益。

而當細胞培養至第七天，如圖 4-11 所示，在同樣電漿參數下可

以明顯看出比起三天 O.D.值，七天的 O.D.值有提升的趨勢，表示在這段時間內細胞有增殖的情況發生。並且到七天時，在同樣親水電漿前處理狀況下，隨著胺基電漿次數的增加，才會對細胞活性造成提升效果。

另外就親水前處理為 10 loops 的參數，無論第三天或第七天的所呈現的 O.D.值並未有特別趨勢，對照節 4.3 所量測到的表面能數據亦有相同情況發生，研判由於在較少次數的前處理下，表面的粗糙度、親水性與斷鍵效果較不均勻，導致細胞培養的情況較無規律。

比較三天與七天細胞活性的現象，分析兩個階段電漿處理導致的效果，探討胺基在細胞培養所扮演的角色，可以得到以下結論：在細胞培養過程中，有助於細胞貼附的關鍵在於親水性的改善，胺基在初期對於細胞貼附效果並不明顯。然而到了第七天，胺基的效果才逐漸顯現出來，胺基的功能並非直接與細胞結合而造成附著，並且因為經過電漿處理的材料表面活性極高，當培養液加入後胺基會馬上與培養液反應，因此也不是直接提供養分給細胞生長。胺基主要作用是當加入培養液時與當中的纖維連接蛋白（fibronectin）與玻璃連接蛋白（vitronectin）等此類特定糖蛋白（glycoproteins）種類結合[36][40]，提供細胞生長所需之養分。這種表面改質的機制與傳統上在支架表面直接塗佈糖蛋白很類似，其目的都是為了營造適合細胞生長與熟悉的



細胞外間質環境。

#### 4.5.2 HE 細胞染色觀察

透過細胞與 PLA 人工血管支架經過染色後顏色的差異，可以看出細胞在支架表面的形態，藉以探討電漿處理對於細胞的附著性與分佈情形。

圖 4-12 是三天與七天，不同參數電漿處理下細胞分佈所呈現之狀況，可以看出參數 0-0 與 0-120 的 PLA 人工血管支架表面，在第三天的細胞附著量相當稀少，表示在未經電漿處理或僅經過單到胺基電漿處理，細胞的附著性極差，且因為親水性較差，在轉動培養的過程中大部分的細胞可能脫落；而到第七天細胞已漸漸有成長的情況，有經過電漿處理過的又尤其明顯，重要的一點，可以觀察到細胞是沿著纖維方向增殖，而具有方向性的纖維結構是有助於細胞的成長[22]。

#### 4.5.3 FE-SEM 高倍率細胞顯微觀察

為了瞭解細胞生長的狀態，本研究透過 FE-SEM 進行觀察，可以比較在不同電漿處理參數下，不同天數細胞分別的生長形態。

圖 4-13 是三天與七天，不同參數電漿處理下細胞生長所呈現之狀況，在 0-0 的處理次數下，可以看出不論是三天還是七天，細胞僅僅是貼附在 PLA 血管支架上，其成長效果並不明顯；而經過電漿處

理，不論是僅有親水電漿或僅有胺基電漿，當細胞從環境中獲得養分，便開始有成長的趨勢，細胞也因為遷徙行為（migration）而發展出的絲狀偽足（Pseudopodium）。以效果最明顯的 30-120，在第三天細胞已經逐漸跨越纖維的間隙，當細胞持續的成長增殖，到第七天已修補部分纖維間的孔洞，判斷這即是細胞遷徙行為時呈現出的細胞再生，藉以修補傷口的現象[54]，這個結果表明了，經過電漿處理的人工血管支架確實對細胞的生長與增殖有著正面的影響。





**10 loops hydrophilic plasma pretreatment**

amine group plasma Times (loops)	Contact angle ( $\theta$ ) to distilled water	Contact angle ( $\theta$ ) to CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	$\gamma_s$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )
0	67.60	50.8	50.20	15.18	35.02
20	58.52	79.08	46.73	25.23	21.50
40	50.99	49.72	59.16	23.62	35.54
60	60.67	66	48.69	21.14	27.55
80	51.4	59.75	55.71	25.11	30.60
100	56.44	54.51	54.65	21.46	33.19
120	53.96	61.24	53.84	23.97	29.87

表 4-1 胺基電漿不同處理次數之表面能(10 loops 親水電漿前處理)

**30 loops hydrophilic plasma pretreatment**

amine group plasma Times (loops)	Contact angle ( $\theta$ ) to distilled water	Contact angle ( $\theta$ ) to CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	$\gamma_s$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )
0	39.84	55.49	63.22	30.52	32.70
20	16.86	63.45	71.39	42.60	28.79
40	0	50.43	76.88	41.69	35.19

表 4-2 胺基電漿不同處理次數之表面能(30 loops 親水電漿前處理)

Characteristic Absorptions (cm <sup>-1</sup> )	Functional Group	Type of Vibration
704、756、869	CH	bending
1045、1088、1129、1184、1267	=C-O	stretching
1363、1382	CH <sub>2</sub>	wagging
1453	CH <sub>3</sub>	bending
1618	NH <sub>2</sub>	deformation
1753	C=O	stretching
2945	CH	stretching
2995	CH <sub>3</sub>	stretching
3214	NH	stretching

表 4-3 官能基種類

	C1s (%)	N1s (%)	O1s (%)	N/C	O/C
<b>0-0</b>	63.92	0	36.08	0	0.564
<b>0-120</b>	64.95	0.31	34.74	0.005	0.535
<b>10-0</b>	59.63	0.64	39.73	0.011	0.666
<b>10-120</b>	59.96	1.04	38.99	0.017	0.650
<b>30-0</b>	59.84	1.18	38.98	0.020	0.651
<b>30-120</b>	<b>59.46</b>	<b>0.73</b>	<b>39.81</b>	<b>0.012</b>	<b>0.670</b>
<b>80-0</b>	58.51	1.85	39.64	0.032	0.677
<b>80-120</b>	58.34	2.55	39.10	0.044	0.670

表 4-4 XPS 分析不同電漿參數表面元素組成

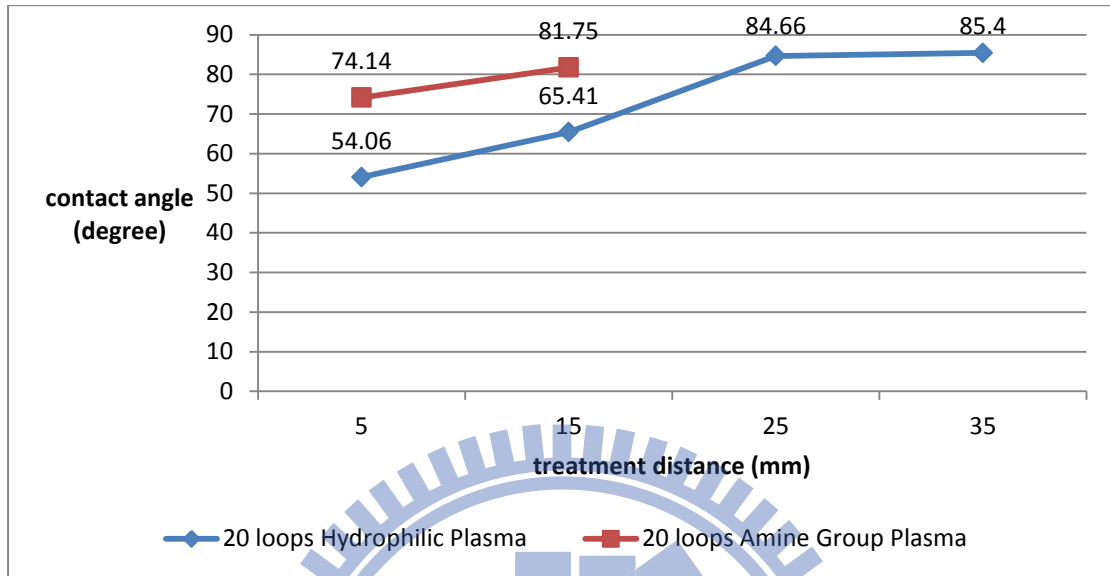


圖 4-1 電漿處理距離之親水性量測

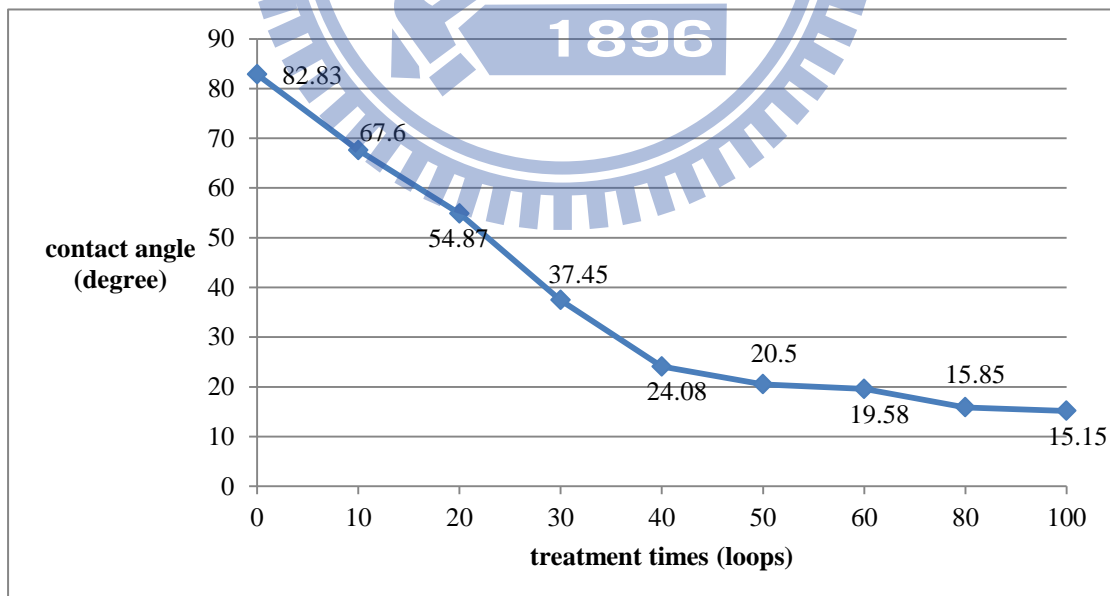


圖 4-2 親水電漿親水性量測

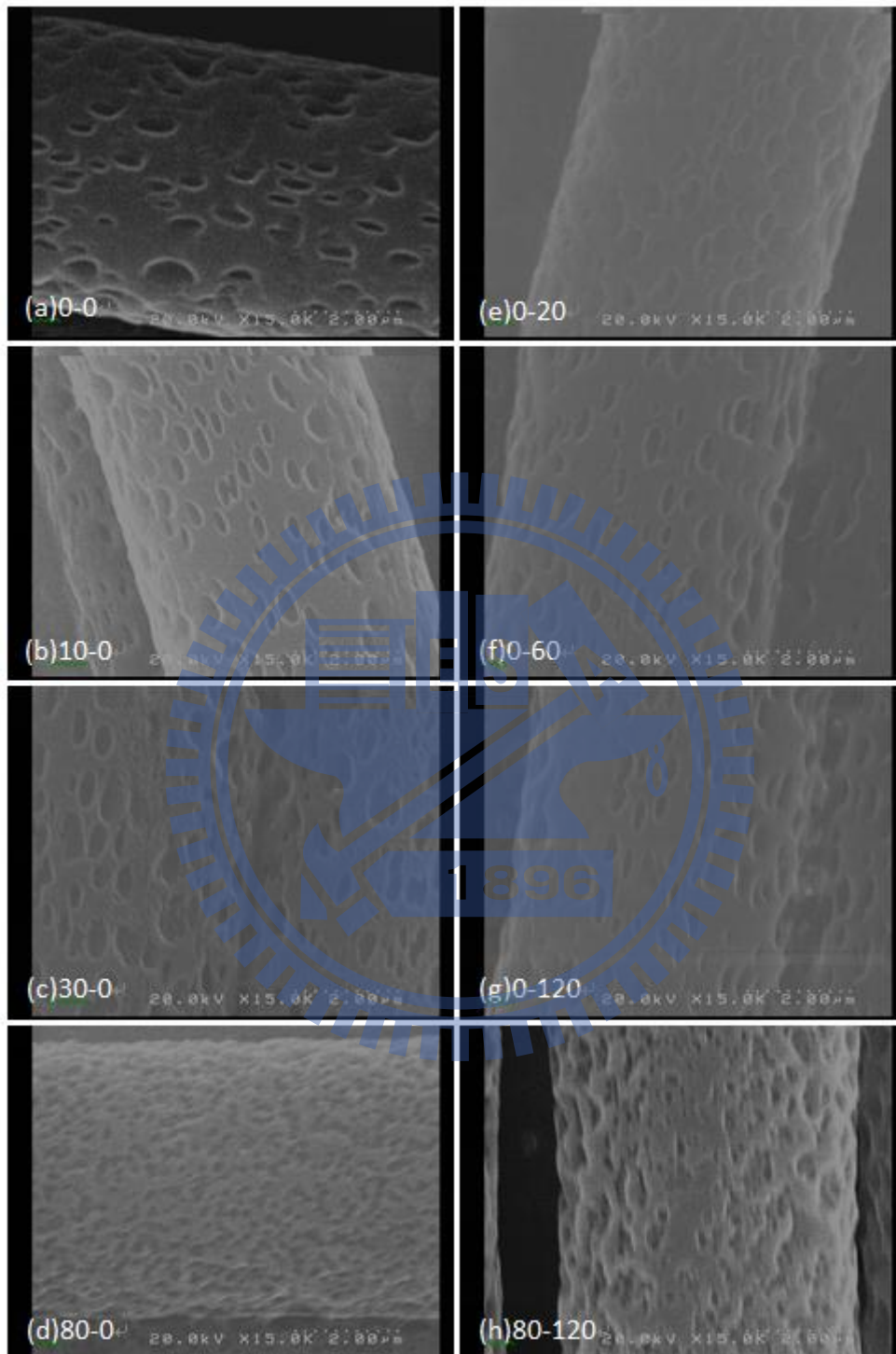


圖 4-3 PLA 人工血管支架電漿處理下表面形態：(a) 0-0 (b) 10-0 (c) 30-0 (d) 80-0 (e) 0-20 (f) 0-60 (g) 0-120 (h) 80-120

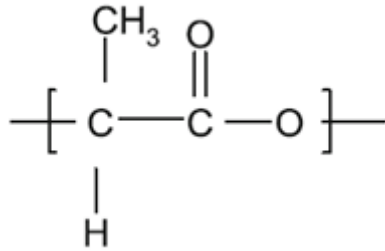


圖 4-4 PLA 結構圖[51]

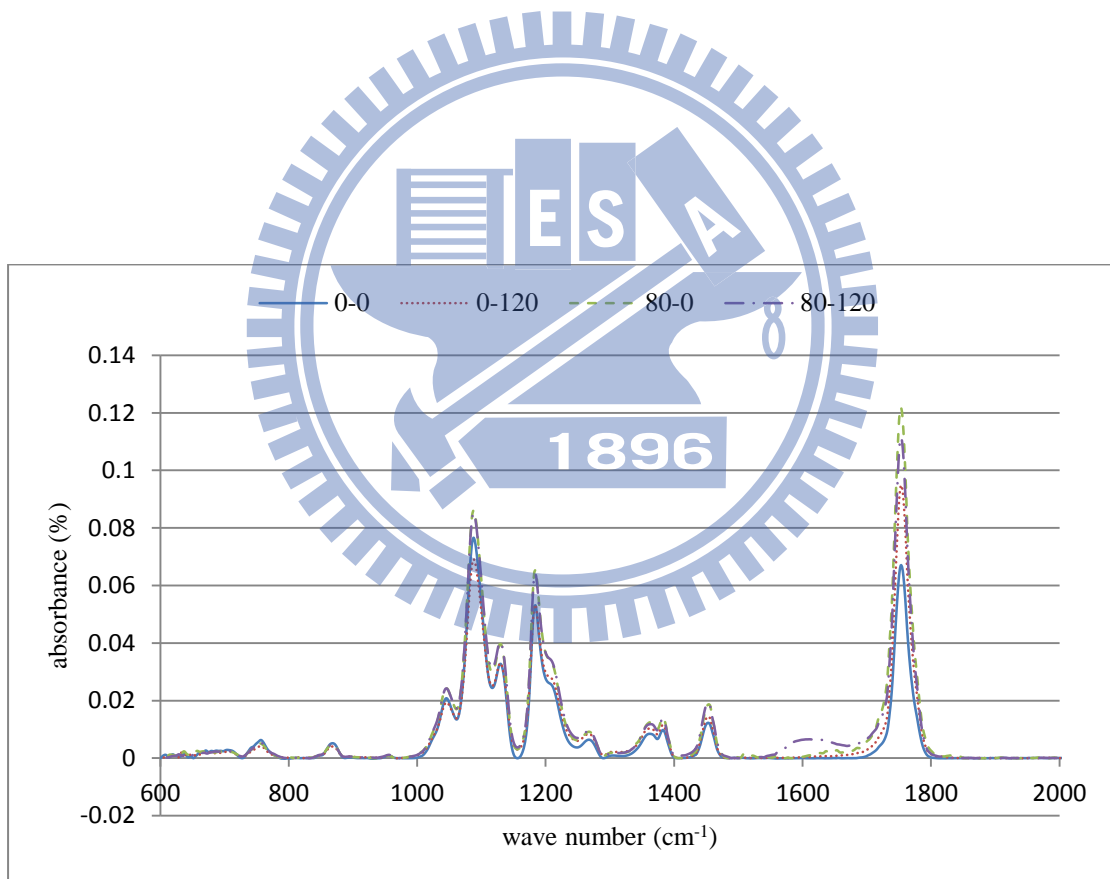


圖 4-5 FTIR 600~2000 cm<sup>-1</sup> 圖譜

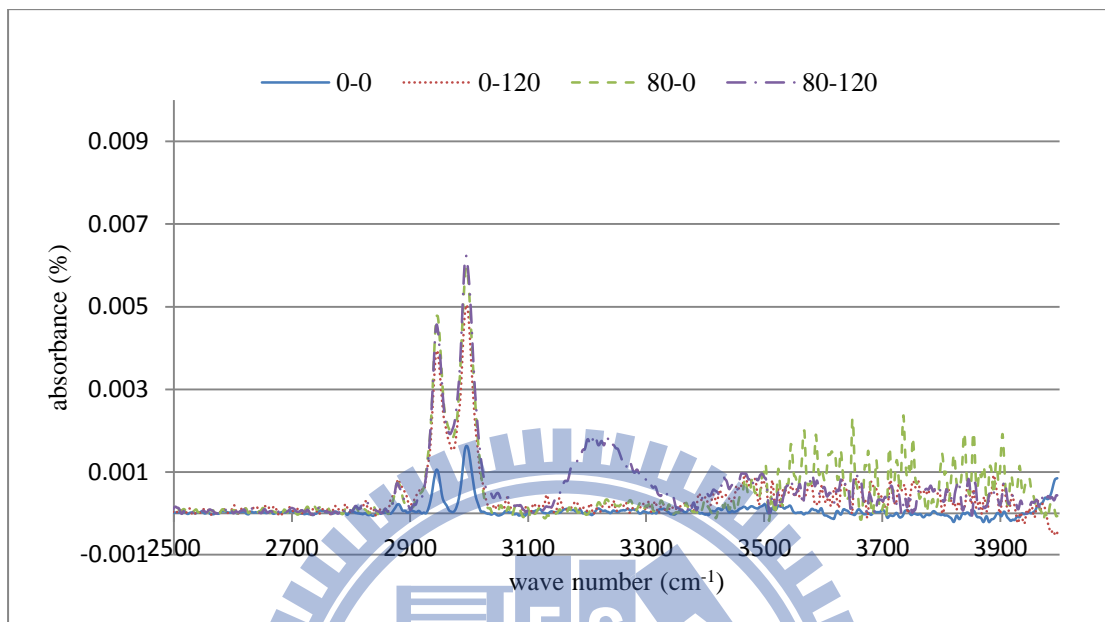


圖 4-6 FTIR 2500~4000  $\text{cm}^{-1}$  圖譜

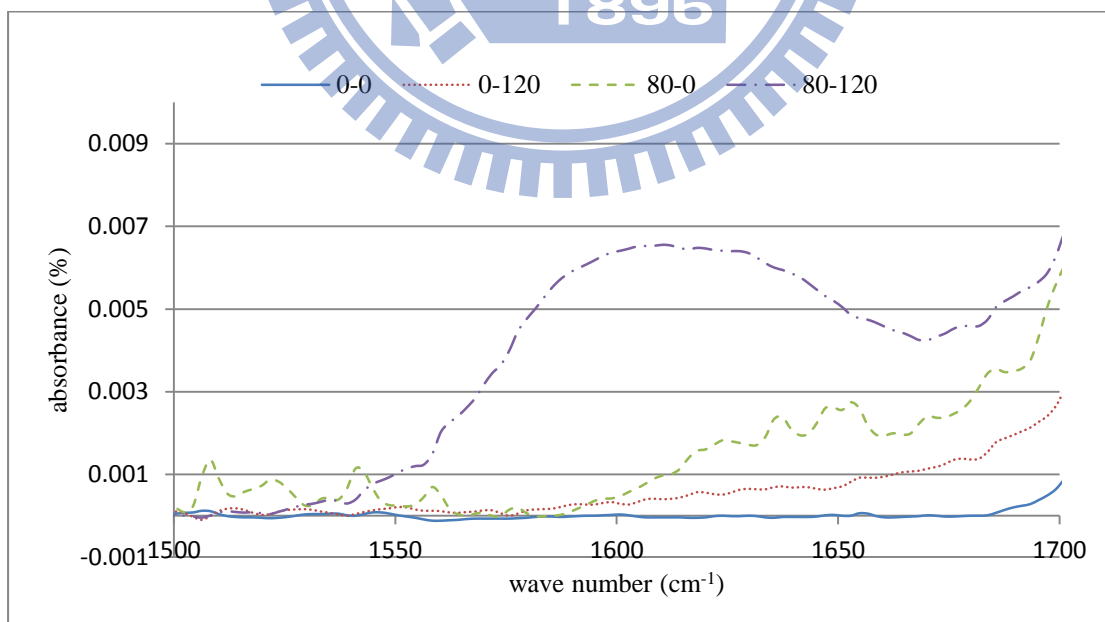


圖 4-7 FTIR 1500~1700  $\text{cm}^{-1}$  圖譜



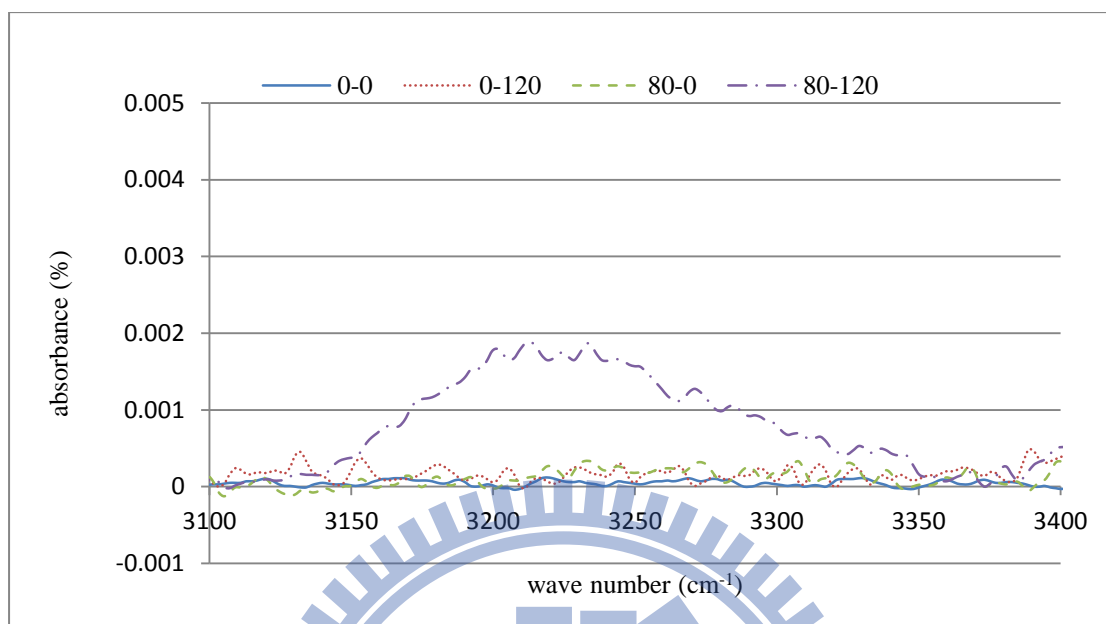


圖 4-8 FTIR 3100~3400 cm<sup>-1</sup> 圖譜

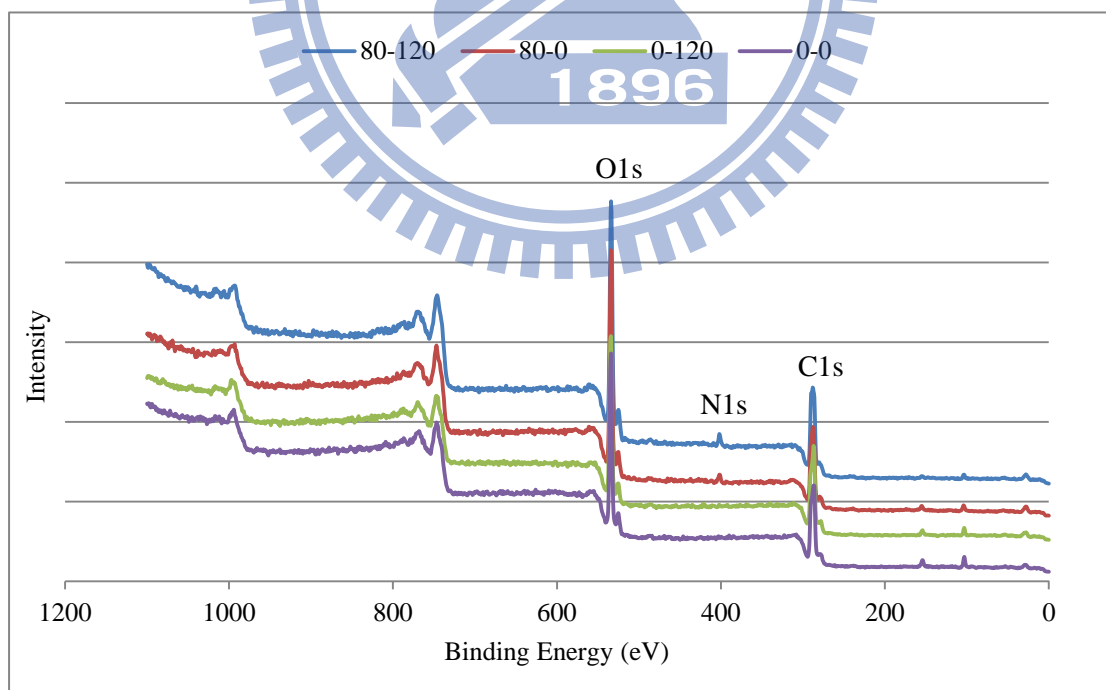


圖 4-9 XPS 全頻譜圖

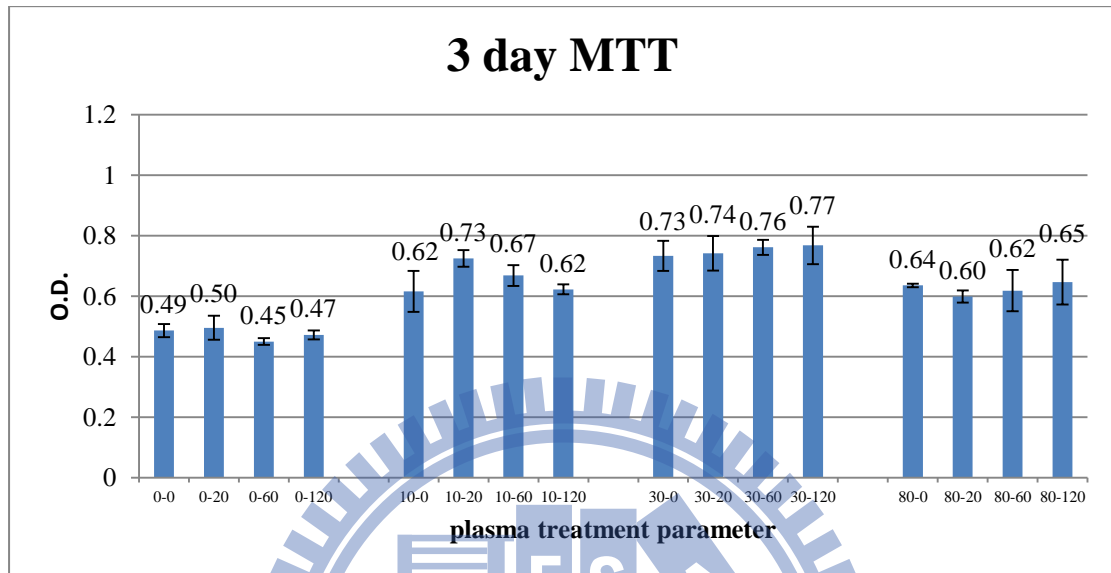


圖 4-10 三天細胞活性圖

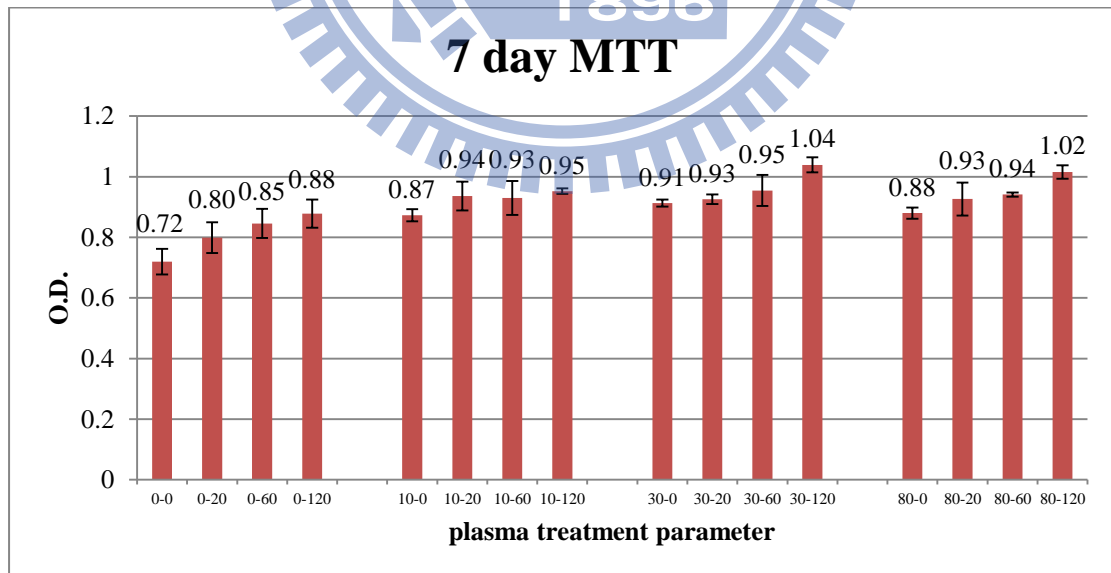


圖 4-11 七天細胞活性圖

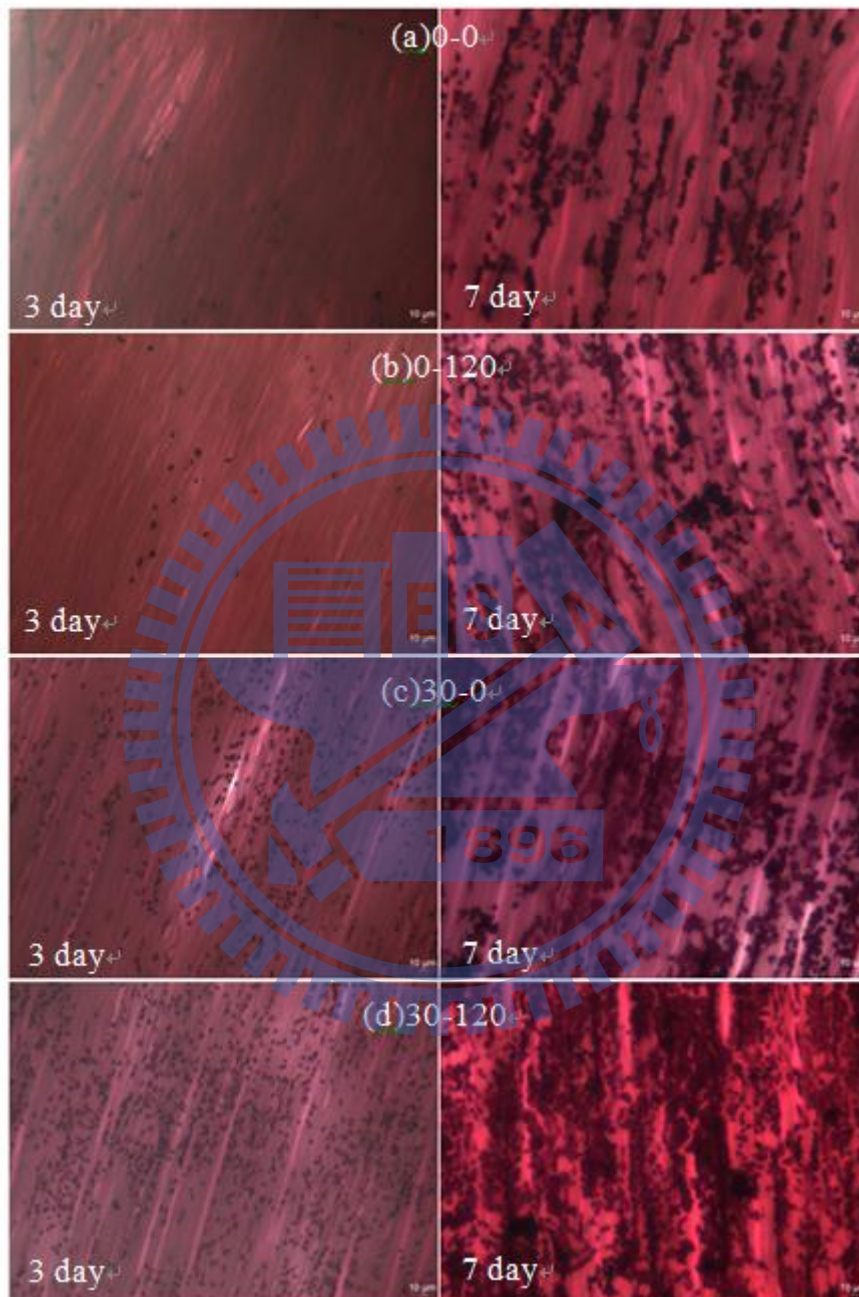


圖 4-12 三天與七天細胞 FE-SEM 圖：(a) 0-0 (b) 0-120 (c) 30-0 (d) 30-120

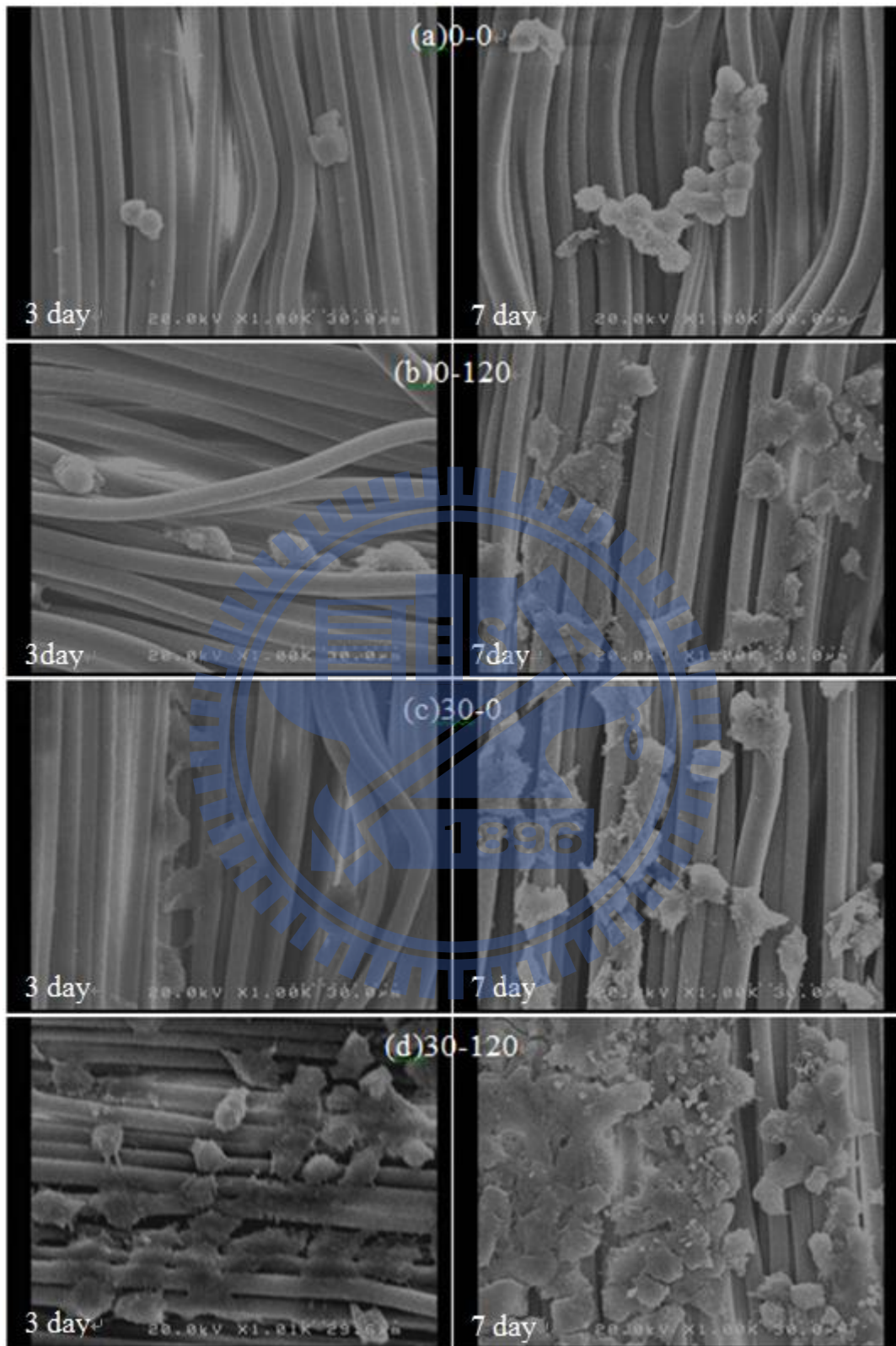


圖 4-13 三天與七天細胞染色：(a) 0-0 (b) 0-120 (c) 30-0 (d) 30-120

## 第五章 結論與未來展望

### 5.1 結論

本研究利用一種製程快速且不破壞材料本身性質的兩階段大氣電漿技術，對 PLA 人工血管支架內壁做表面改質，從親水性的改變、胺基的導入、材料表面粗糙度的變化，逐步探討細胞在改質過後的材料表面貼附與生長情況。

單道胺基電漿對於材料表面胺基的導入效果並不明顯，因此透過一道親水電漿的前處理，一方面可以增加材料表面的親水性，另一方面先將表面形成斷鍵，藉以提升胺基導入的效果。經過改質的材料表面，可以觀察出其表面形態變得更為粗糙，粗糙度的改變，雖然對於親水性會造成負面影響，卻提供細胞更多附著的空間，並且表面粗糙度與親水性提升同時對於細胞在三維結構下的貼附皆有所助益。

從第三天與第七天細胞活性值，可以了解在細胞培養初期，活性的高低取決於細胞貼附的效果，這與材料表面經過電漿改質後，其親水性與粗糙度的改變有關，胺基雖然對增加親水性有助益，但主要效果卻仍未顯現；胺基在細胞培養過程中所扮演的角色，並非養分的提供者，而是養分的吸附者。並且，胺基所吸附的糖蛋白雖然持續提供細胞營養，但在細胞培養初期效果尚不明顯，必須等到第七天後，細



胞因為吸收養分多寡而造成的增殖差異，才能凸顯出胺基電漿不同處理次數的趨勢。從細胞顯微形態更可以看出，經過較多次數兩階段電漿處理，細胞更有效的成長與增殖，顯示出親水性與胺基在細胞培養過程中確實扮演了相當重要的角色。

將量測第三天與第七天細胞的活性值，所得之數據每 0.1 為一個區間，以不同顏色代表其值高低，如表 5-1 與表 5-2 所示，發現當 10 loops 親水電漿時，或許是因為前處理次數較少，導致不論胺基電漿處理次數的多寡，胺基導入的量在一定的量就已達到飽和，因此在第三天與第七天呈現的數據大多差異不大。在 30 loops 前處理時，可以獲得最佳的細胞貼附效果，並且隨著胺基電漿處理次數的增加，細胞成長與增殖的情況會愈明顯。而雖然 80 loops 前處理的細胞貼附效果較 30 loops 差，但因為處理時間較長表面產生較大量的斷鍵，導入的胺基相對的也較多，也因此吸附了較充足的糖蛋白，提供給細胞較佳的生長養分，因此在第七天時所測得的細胞活性與 30 loops 相差不多。以第七天在 30 與 80 loops 前處理的數據相比較，或許可以得到一個結論：雖然一開始細胞貼附的效果較差，但只要提供充足的胺基來吸附糖蛋白提供養分，就長時間細胞培養而言，對於細胞成長和增殖還是有所幫助。

## 5.2 未來展望

大氣電漿在以製程快速且低成本的優勢，在生醫材料表面改質上確實有其價值，然而畢竟其改質效果尚不如低壓電將來的優異。並且由於改質區域是血管支架內壁，處理時直立的血管支架與電漿光束是以 $0^\circ$ 接觸，電漿的效果會隨著處理距離而遞減，如何以更有效的處理角度並保持電漿均勻性，或是增加處理深度，尚且存在有改善的空間。

而若能有效的分析在胺基電漿處理過程中，殘留在材料表面的有毒胺成分以及對細胞毒性所造成的影響，有助於未來調整氮氣比例與其他電漿參數，進而提高胺基電漿的強度，達到更佳的处理效果與縮短處理時間。

最後，從結果上看來，親水電漿與胺基電漿分別決定了細胞培養過程中，初期貼附與長期生長增殖的關鍵。在調整電漿強度之後，未來若能找出一個最佳兩階段處理次數的組合，相信在培養時間與耗費成本上，是可以獲得更有效率的幫助。



3 day MTT		Amine group plasma treatment times (loops)			
		0	20	60	120
Hydrophilic plasma treatment times (loops)	0	0.49	0.5	0.45	0.47
	10	0.62	0.73	0.67	0.62
	30	0.73	0.74	0.76	0.77
	80	0.64	0.60	0.62	0.65



表 5-1 三天 MTT 數值表

7 day MTT		Amine group plasma treatment times (loops)			
		0	20	60	120
Hydrophilic plasma treatment times (loops)	0	0.72	0.80	0.85	0.88
	10	0.87	0.94	0.93	0.95
	30	0.91	0.93	0.95	1.04
	80	0.88	0.93	0.94	1.02



表 5-2 七天 MTT 數值表

## 參考文獻

- [1] Kai von Appen, Peter Ivanovich, Salim Mujais, Horst Klinkmann, “Endothelium: The Next Frontier in Biocompatibility. ”, *Artificial organs*, vol. 17, pp. 985-995, December 1993.
- [2] A. S. G. Curtis, J. V. Forrester, C. McInnes, F. Lawrie, “Adhesion of Cells to Polystyrene Surfaces. ”, *The Journal of Cell Biology*, vol. 97, pp. 1500-1506, November 1983.
- [3] Jun Jin Yoon, Soon Ho Song, Doo Sung Lee, Tae Gwan Park, “Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method. ”, *Biomaterials*, vol 25, pp. 5613-5620, November 2004.
- [4] John Zeleny, “The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. ”, *Physical Review*, vol.3, pp. 69-91, February 1914.
- [5] John Zeleny, “Instability of Electrified Liquid Surfaces. ”, *Physical Review*, vol. 10, pp. 1-6, July 1917.
- [6] Geoffrey Taylor, “Disintegration of Water Drops in an Electric Field. ”, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, vol. 280, pp. 383-397, July 1964.
- [7] G. I. Taylor, A. D. McEwan, “The stability of a horizontal fluid interface in a vertical electric field. ”, *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 22, pp. 1-15, 1965.
- [8] Geoffrey Taylor, “Studies in Electrohydrodynamics. I. The Circulation Produced in a Drop by Electrical Field. ”, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, vol. 290, pp. 159-166, The Royal Society, April 1966.
- [9] Geoffrey Taylor, “Electrically Driven Jets. ”, *Proceedings of the*

Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, vol. 313, pp. 453-475, The Royal Society, December 1969.

[10] Simons HL. United States patent 3280229, 1966.

[11] P. K. Baumgarten, "Electrostatic spinning of acrylic microfibers. ", Journal of Colloid and Interface Science, vol. 36, pp. 71-79, 1971.

[12] L. Larrondo, R. St. John Manley, "Electrostatic fiber spinning from polymer melts. II. Examination of the flow field in an electrically driven jet. ", Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, vol. 19, pp. 921-932, June 1981.

[13] Darrell H Reneker, Iksoo Chun, "Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. ", Nanotechnology, vol. 7, pp. 216-223, September 1996.

[14] H. Fong, I. Chun, D. H. Reneker, "Beaded nanofibers formed during electrospinning. ", Polymer, vol. 40, pp. 4585-4592, July 1999.

[15] Simon C. Baker, Neil Atkin, Paul A. Gunning, Nick Granville, Karen Wilson, Darren Wilson, Jennifer Southgate, "Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. ", Biomaterials, vol. 27, pp. 3136-3146, January 2006.

[16] S. A. Angadjivand, M. G. Schwartz, P. D. Eitzman, M. E. Jones. United States Patent, 6375886. 2002.

[17] P. P. Tsaia, H. Schreuder-Gibson, P. Gibson, "Different electrostatic methods for making electret filters. ", Journal of Electrostatics, vol. 54, pp. 333-341, 2002.

[18] 陳季良，「以生醫微機電技術製作組織工程之人工微血管」，國立中興大學，碩士論文，民國 91 年。

[19] M. C. Wake, P. K. Gupta, A. G. Mikos, "Fabrication of pliable

biodegradable polymer foams to engineer soft tissues. ”, Cell Transplantation, vol. 5, pp. 465-473, 1996.

[20] C. T. Laurencin, A. M. A. Ambrosio, M. D. Borden, J. A. Cooper, Jr., “Tissue engineering: orthopedic applications. ”, Annual Review of Biomedical Engineering, vol. 1, pp. 19-46 , 1999.

[21] E. D. Boland , J.A. Matthews , K. J. Pawlowski, D. G. Simpson , G. E. Wnek, G. L. Bowlin, “Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering. ”, Frontier in Bioscience, vol. 9, pp. 1422-1432, 2004.

[22] C. Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, “Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. ”, Biomaterials, vol. 25, pp. 877-886, 2004.

[23] A. K. Schneider, “Polymers of high melting lactide. ”, United States Patent 2703316, 1955.

[24] J. M. Brady, D. E. Cutright, R. A. Miller, G. C. Battistone, “Resorption rate , route of elimination and ultrastructure of the implant site of PLA in the abdominal wall of the rat. ”, Journal of Biomedical Materials Research, vol. 7, pp. 155-166, 1972.

[25] Schutze A., Jeong J. Y., Babayan S. E., Park J., Selwyn G. S., Hicks R. F., “The Atmospheric-Pressure Plasma Jet : A Review and Comparison to Other Plasma Sources. ”, IEEE Transactions on Plasma Science, Vol. 26, pp. 1685-1694, December 1998.

[26] Yu A., Grushin M., Dyatko N., Kochetov I., Napartovich A., Trushkin N., Tran Minh Duc, S Descours, “Studies on cold plasma-polymer surface interaction by example of PP- and PET-films. ” Journal of Physics D: Applied Physics, vol. 41, pp. 1-13, 2008.

[27] Marcel Schouten, Willem Joost Wiersinga, Marcel Levi, Tom van der Poll, “Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. ” Journal of Leukocyte Biology, vol. 83, pp. 536-545, March 2008.

- [28] S Moncada, "Prostacyclin and arterial wall biology." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, doi:10.1161/01.ATV.2.3.193, pp. 193-207, 1982.
- [29] A. Lu, R. Sipehia, "Antithrombotic and fibrinolytic system of human endothelial cells seeded on PTFE: the effects of surface modification of PTFE by ammonia plasma treatment and ECM protein coatings." Biomaterials, vol. 22, pp.1439-1446, June 2001.
- [30] John L. Tan, Wendy Liu, Celeste M. Nelson, Srivatsan Raghavan, Christopher S. Chen, "Simple Approach to Micropattern Cells on Common Culture Substrates by Tuning Substrate Wettability." Tissue Engineering, vol. 10, pp. 865-872, 2004.
- [31] Yusuke Arima, Hiroo Iwata, "Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers." Biomaterials, vol. 28, pp. 3074-3082, July 2007.
- [32] Bengt Lindblad, Seth W. Wright, Ruth L. Sell, William E. Burkel, Linda M. Graham, James C. Stanley, "Alternative techniques of seeding cultured endothelial cells to ePTFE grafts of different diameters, porosities, and surfaces." Journal of Biomedical Materials Research, vol. 21, pp. 1013-1022, August 1987.
- [33] H. Hilbig, M. Kirsten, R. Rupietta, H. L. Graf, S. Thalhammer, S. Strasser, F. P. Armbruster, "Implant surface coatings with bone sialoprotein, collagen, and fibronectin and their effects on cells derived from human maxillar bone." European Journal of Medical Research, vol. 12, pp. 6-12, January 2007.
- [34] M. J. Cooke, S. R. Phillips, D. S. H. Shah, D. Athey, J. H. Lakey, S. A. Przyborski, "Enhanced cell attachment using a novel cell culture surface presenting functional domains from extracellular matrix proteins." Cytotechnology, vol. 56, pp. 71-79, February 2008.

[35] Stephen J. Yarwood, James R. Woodgett, “Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. ” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, pp. 4472-4477, April 2001.

[36] Zuwei Ma, Masaya Kotaki, Thomas Yong, Wei He, Seeram Ramakrishna, “Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. ” Biomaterials, vol. 26, pp. 2527-2536, May 2005.

[37] Jian Yang, Guixin Shi, Jianzhong Bei, Shenguo Wang, Yilin Cao, Qingxin Shang, Guanghui Yang, Wenjing Wang, “Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. ” Journal of Biomedical Materials Research, vol. 62, pp. 438-446, December 2002.

[38] H. U. Poll, U. Schladitz, S. Schreiter, “Penetration of plasma effects into textile structures. ” Surface and Coatings Technology, vol. 142-144, pp. 489-493, July 2001.

[39] M. Iwasaki, Y. Matsudaira, K. Takeda, M. Ito, E. Miyamoto, T. Yara, T. Uehara, M. Hori, “Roles of oxidizing species in a nonequilibrium atmospheric-pressure pulsed remote O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> plasma glass cleaning process.” Journal of Applied Physics, vol. 103, pp. 023303-1 - 023303-7, 2008.

[40] S M Mukhopadhyay, P Joshi, S Datta, J G Zhao, P France, “Plasma assisted hydrophobic coatings on porous materials: influence of plasma parameters. ” Journal of Physics D: Applied Physics, vol. 35, pp. 1927-1933, August 2002.

[41] Jian Yang, Jianzhong Bei, Shenguo Wang, “Improving Cell Affinity of Poly(D,L-lactide) Film Modified by Anhydrous Ammonia Plasma Treatment. ” Polymers for Advanced Technologies, vol. 13, pp. 220-226, 2002.

[42] Cecilia F. L. Chu, Albert Lu, Mark Liszkowski, Rajender Sipehia, “Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1472, pp. 479-485, November 1999.

[43] Sipehia R., “The enhanced attachment and growth of endothelial cells on anhydrous ammonia gaseous plasma modified surfaces of polystyrene and poly(tetrafluoroethylene).” *Biomater Artif Cells Artif Organs*, vol. 18, pp.437-446, 1990.

[44] N. K. Adam, “Use of the Term ‘Young's Equation’ for Contact Angles.” *Nature*, vol. 180, pp. 809-810, October 1957.

[45] Martin Král', Akihisa Ogino, Masaaki Nagatsu, “Effect of Ar and N<sub>2</sub> Plasma Pretreatment with Biased Sample Holder on Amino Group Introduction Onto Polyethylene Sheet Treated by Ammonia Plasma.” *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 47, pp. 7346-7348, 2008.

[46] Markus Schneider, Ian W. Marison, Urs von Stockar, “The importance of ammonia in mammalian cell culture.” *Journal of Biotechnology*, vol. 46, pp. 161-185, May 1996.

[47] 黃皓遠，「利用氮氣為主的常壓電漿束於聚乳酸材料表面快速植入胺基官能基之研究」，國立交通大學，碩士論文，民國 99 年。

[48] Souheng Wu, “Surface and interfacial tensions of polymer melts: I. Polyethylene, polyisobutylene, and polyvinyl acetate.”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 31, pp. 153-161, October 1969.

[49] Chiang M. H., Liao K. C., Lin I.M., Lu C. C., Huang H. Y., Kuo C. L., Wu J. S., “Modification of Hydrophilic Property of Polypropylene Films by a Parallel-Plate Nitrogen-Based Dielectric Barrier Discharge Jet.” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 38, pp. 1489-1498, June 2010.



[50] M. Lampin, R. Warocquier-Clérout, C. Legris, M. Degrange, M. F. Sigot-Luizard, “Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. ” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 36, pp. 99-108, July 1997.

[51] Ozan Avinc, Akbar Khoddami, “Overview of Poly (lactic acid) (PLA) Fibre. Part I: Production, Properties, Performance, Environmental Impact, and End-use Applications of Poly (lactic acid) Fibres. ” *Fibre Chemistry*, vol. 41, pp. 391-401, 2009.

[52] T. A. Horbett, J. J. Waldburger, B. D. Ratner, A. S. Hoffman, “Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus. ”, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 22, pp. 383-404, May 1988.

[53] P. B. van Wachem, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J. P. Detmers, W. G. van Aken, “Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. ” *Biomaterials*, vol. 6, pp. 403-408, November 1985.

[54] Richard A. F. Clark, Joan M. Lanigan, Patricia DellaPelle, Eleanor Manseau, Harold F. Dvorak, Robert B. Colvin, “Fibronectin and Fibrin Provide a Provisional Matrix for Epidermal Cell Migration During Wound Reepithelialization. ” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 79, pp. 264-269, 1982.