

國立交通大學

機械工程學系

碩士論文

奈米材料添加對纖維母細胞成長之影響

The Effect of Nano-Material Additives on
NIH3T3 Fibroblast Viability

研究生：陳世璋

指導教授：傅武雄 教授

周長彬 教授

中華民國九十六年三月

奈米材料添加對纖維母細胞成長之影響

學生:陳世璋

指導教授:傅武雄 博士

周長彬 博士

國立交通大學機械工程學系 碩士班

摘 要

本研究主要是探討不同的材料來進行細胞培養對 NIH3T3 纖維母細胞貼附及增殖的影響，利用掃描式電子顯微鏡分析及觀察細胞的形態。研究結果顯示，纖維母細胞可在 1~2 天內附著在基材及所有鍍層表面，而表面粗糙度會影響細胞在基材上貼附情況。在光滑表面（培養皿及鈦基材），細胞從初期漸漸貼附於基材；在粗糙表面（奈米碳管/鈦片基材）鍍層上，細胞與細胞之間有細長的假足絲相連接至基材上。另外，纖維母細胞經培養觀察其貼附情形，奈米碳管/鈦片基材鍍層比鈦片基材、培養皿佳。從 SEM 觀察可發現，奈米碳管/鈦片基材鍍層之細胞貼附生長攤平的能力較培養皿及鈦片基材良好且快速，顯示奈米碳管鍍層於鈦合金上具有優良的生物相容性。

The Effect of Nano-Material Additives on NIH3T3 Fibroblast Viability

Student: Shi-Zhang Chen

Advisors: Dr. Wu-Shung Fu
Dr. Chang-Ping Chou

Department of Mechanical Engineering
National Chiao Tung University

ABSTRACT

This investigation is focused on cultures with NIH3T3 fibroblasts, in order to observe the effect of different materials on adherence, growth and proliferation. A scanning electron microscope was used to characterize cell morphology. The fibroblasts were able to attach on all substrates and coatings after 1 to 2 days. On smooth surface (flask and Ti substrates), cells became gradually attached on substrates at early phases; on rough-surface materials (CNTs/Ti), thin and long filopodia between the cells were connected to the substrate. Surface roughness has significant effect on the cell morphology and cell adhesion number. Additionally, the fibroblasts under SEM showed better and faster attachment and greater extension on CNTs/Ti coatings than flask and Ti alloy. This indicates that the carbon nanotube composite coating on Ti alloy has remarkable biocompatibility.

誌 謝

首先感謝指導教授，傅武雄教授與周長彬教授對於學生諄諄教導與耐心指導，使學生在碩士班求學的過程中能順利的畢業。感謝你們對於學生的實驗規劃以及方向給予正確的建議，並給學生實驗所需之幫助與聯繫，使得在實驗設備設備學習與幫助方面不虞匱乏。在做人處世上也對學生給予許多的引導，使學生得到正確的人生經驗，也因此體會到在追求知識下仍然有許多處世的智慧是學生所應該學習的。

感謝溫華強學長，常常都要麻煩學長幫我改東西還有解答我一些很奇怪的問題，從學長的幫忙學到了許多材料分析相關的知識，以及實驗時要注意的細節和小技巧。在求學時間中，感謝實驗室夥伴杜sir、衿良、哲瑋、冠廷、無敵、炳坤，感謝你們在生活以及實驗上給我的協助，使我覺得碩士的生活並不是那麼樣的無趣，也感謝在奈米實驗室一起作實驗的朋友謝謝你們。

最後要感謝我的家人，求學的過程你們總是很支持我，也很放任我自由的學習，適時的給我鼓勵為我打氣，僅將這份論文獻給你們，謝謝你們。

目 錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
誌 謝.....	III
目 錄.....	IV
表 目 錄.....	IX
圖 目 錄.....	X
第 一 章 緒 論.....	1
1-1 前 言.....	1
1-2 研究動機與目的.....	1
第 二 章 文 獻 回 顧.....	3
2.1 細胞培養.....	3
2.1.1 細胞培養的發展.....	3
2.1.2 細胞培養的分類.....	4
2.2 細胞組成.....	4
2.2.1 細胞壁.....	5
2.2.2 細胞膜.....	5
2.2.3 細胞質.....	5
2.2.4 細胞核.....	6



2.2.5 纖維母細胞簡介.....	6
2.3 奈米粒子簡介.....	9
2.3.1 金奈米粒子.....	11
2.3.2 銀金屬簡介.....	12
2.4 奈米粒子合成原理.....	13
2.5 奈米粒子之製備方法.....	14
2.5.1 物理方法製備奈米微粒.....	14
2.5.1-1 蒸發冷凝法.....	14
2.5.1-2 離子濺射法.....	15
2.5.1-3 冷凍乾燥法.....	15
2.5.1-4 機械力粉碎法.....	16
2.5.2 化學法製備奈米微粒.....	17
2.5.2-1 沈澱法.....	17
2.5.2-2 水熱法.....	17
2.5.2-3 細液滴熱解法.....	18
2.5.2-4 溶膠-凝膠法.....	18
2.5.2-5 氣相化學物質反應法.....	19
2.6 還原奈米銀粒子.....	20
2.7 生醫材料應用.....	20

2.7.1 鈦及鈦合金.....	21
2.7.2 奈米碳管於生醫方面之應用.....	22
2.7.3 高度生醫相容性.....	22
2.7.4 奈米粒子於生醫上之應用.....	23
第三章 實驗方法.....	28
3.1 細胞培養.....	28
3.2 解凍細胞.....	28
3.2.1 實驗材料.....	28
3.2.2 實驗步驟.....	28
3.3 細胞繼代培養.....	29
3.3.1 實驗材料.....	29
3.3.2 實驗步驟.....	29
3.4 細胞計數.....	30
3.4.1 實驗器材.....	30
3.4.2 實驗步驟.....	30
3.5 冷凍細胞.....	30
3.5.1 實驗材料.....	30
3.5.2 實驗步驟.....	30
3.6 奈米銀製備.....	31



3.7 實驗耗材與分析儀器.....	31
3.7.1 掃描式電子顯微鏡(SEM)	31
3.7.2 原子力探針顯鏡(AFM)	32
3.7.3 拉曼光譜儀(Raman Spectrum)	32
3.7.4 X射線光電子能譜儀(XPS).....	33
第四章 實驗結果與討論.....	44
4.1 奈米碳管的性質與形貌.....	44
4.1.1 影響前製程之主要參數.....	44
4.1.2 奈米碳管的前處理.....	45
4.1.3 奈米結構的品質.....	46
4.2 銀奈米顆粒之合成.....	46
4.2.1 銀奈米顆粒.....	47
4.2.2 粒徑分佈.....	47
4.2.3 銀奈米顆粒在不同的濃度的NIH3T3生存能力.....	47
4.3 細胞附著型態的觀察.....	48
4.3.1 以OM觀察細胞附著的型態.....	48
4.3.1-1 培養皿(flask)上細胞附著型態.....	48
4.3.1-2 鈦片基材上細胞附著型態.....	49

4.3.1-3 奈米碳管/鈦片基材上細胞附著型態.....	49
4.3.2 以SEM觀察細胞附著的型態.....	50
4.3.2-1 培養皿(flask)之SEM觀察細胞附著型態.....	50
4.3.2-2 鈦片基材之SEM觀察細胞附著型態.....	50
4.3.2-3 奈米碳管/鈦片基材之SEM觀察細胞附著型態.....	50
第五章 結論與未來展望.....	68
5.1 結論	68
5.2 未來展望.....	69
參考文獻.....	70



表目錄

表2-1 球形顆粒原子數隨顆粒直徑變化對照表.....	26
表 2-2 金屬奈米粒子之融點及燒結溫度.....	26
表2-3 銀的基本性質.....	26
表 2-4 純鈦的物理及化學性質.....	27
表 2-5 純鈦及其合金的機械性質.....	27
表 3-1 細胞株資料表.....	41
表3-2 掃描式電子顯微鏡系統規格表.....	42
表 3-3 原子力顯微鏡規格表.....	42
表3-4 拉曼光譜儀系統一般規格表.....	43
表 4-1 銀奈米顆粒不同濃度在 6~72 小時的纖維母細胞培養.....	67

圖目錄

圖 2-1 細胞膜結構.....	24
圖 2-2 金奈米粒子形成過程.....	24
圖 2-3 雙離子層圍繞金奈米粒子的保護形式.....	25
圖 3-1 恆溫水槽.....	34
圖 3-2 無菌培養皿.....	34
圖 3-3 無菌操作台.....	35
圖 3-4 液態氮鋼瓶.....	35
圖 3-5 高速冷凍離心機.....	36
圖 3-6 血球計數盤示意圖.....	37
圖 3-7 血球計數盤、蓋玻片、計數器.....	38
圖 3-8 光學顯微鏡.....	38
圖 3-9 利用血球計數盤示意圖.....	39
圖 3-10 掃瞄式電子顯微鏡.....	39
圖 3-11 原子力顯微鏡.....	40
圖 3-12 拉曼散射光譜儀.....	40
圖 4-1 前處理溫度 530 °C (SEM).....	52
圖 4-2 前處理溫度 530 °C (AFM).....	52
圖 4-3 奈米碳管成長影像.....	53

圖 4-4 經過超音波震盪後的奈米碳管.....	53
圖 4-5 奈米碳管觸媒顆粒.....	53
圖 4-6 奈米碳管觸媒蝕刻.....	54
圖 4-7 奈米碳管沉積之拉曼光譜儀分析.....	54
圖 4-8 玻璃基板上奈米碳管影像.....	55
圖 4-9 水平奈米碳管在玻璃基板影像.....	55
圖 4-10 掃描式電子顯微鏡影像.....	56
圖 4-11 矽基板上穿透式電子顯微鏡影像.....	56
圖 4-12 AFM 分析銀奈米顆粒之粒徑大小.....	57
圖 4-13 利用 AFM 分析 3D 銀奈米顆粒之表面型態.....	57
圖 4-14 光學顯微鏡(放大倍率 200)隨時間變化情形.....	59
圖 4-15 銀奈米顆粒混合 NIH3T3 在不同濃度、時間的分布情形.....	60
圖 4-16 經 12 小時培養皿上的細胞 OM 之觀察.....	61
圖 4-17 經 24 小時培養皿上的細胞 OM 之觀察.....	61
圖 4-18 經 12 小時鈦基材上細胞 OM 之觀察.....	62
圖 4-19 經 24 小時鈦基材上細胞 OM 之觀察.....	62
圖 4-20 經 12 小時 CNTs/Ti 基材上細胞 OM 之觀察.....	63
圖 4-21 經 24 小時 CNTs/Ti 基材上細胞 OM 之觀察.....	63
圖 4-22 經 12 小時培養皿上的細胞 SEM 之觀察.....	64

圖 4-23 經 24 小時培養皿上的細胞 SEM 之觀察.....	64
圖 4-24 經 12 小時鈦基材上細胞 SEM 之觀察.....	65
圖 4-25 經 24 小時鈦基材上細胞 SEM 之觀察.....	65
圖 4-26 經 12 小時 CNTs/Ti 基材上細胞 SEM 之觀察.....	66
圖 4-27 經 24 小時 CNTs/Ti 基材上細胞 SEM 之觀察.....	66



第一章 緒論

1.1 前言

由於高科技的發展對於微小化材料的需求，使得奈米材料的發展成為全球高科技研究材料科學的熱門主題，舉凡光、電、磁[1]、機械、催化[2]等領域都需要奈米材料的加入以獲得更大的提升。其中奈米粒子(nanoparticle)的製造與應用在生物科技及半導體科技中亦扮演著相當重要的角色。奈米材料的應用在一、二十年來，才被廣泛的研究和討論，其歷史可以回顧到二十世紀的60年代，在奈米粒子或超微粒子的合成與性質的研究[3]，有關奈米的論文也隨著研究領域的不同，奈米材料的研究儼然已經成為未來發展的重心之一，而目前被大量研究的材料中，主要以金、銀為主[4]。其中奈米粒子的製備便是相當重要的一門學問，奈米粒子的研究主要在於如何將奈米粒子控制到：大小一致性、分佈均勻性、製備過程便利性、製備不同大小粒徑的奈米粒子。

一般而言，奈米粒子定義是粒徑大小介於1-100nm。在此粒徑分佈的粒子，外圍缺乏適當的保護物質，其結構呈現不穩定性，自身會凝聚成較大的顆粒。隨著材料粒徑大小不同如熔點、沸點、水溶性、光學、電性、磁性、熱傳、擴散、機械、催化等性質，這使奈米材料的研究變成熱門的研究主題。未來奈米材料將整合物理、化學、生物等領域在機械、半導體等實務上做更有效的應用與發展。

1.2 研究動機與目的

銀具有良好的導電性與導熱性質，也是貴金屬中價格最低者，基於其優秀的應用性質，以及材料的微小化趨勢，銀奈米粒子的製備已經是

非常熱門的研究課題。在本實驗中以硝酸銀(AgNO_3)來還原銀奈米粒子，使用硼氫化鈉 (NaBH_4)當還原劑。藉由檸檬酸鹽使穩定並水溶解於奈米顆粒，來控制銀奈米粒子。

而銀奈米粒子具有不同傳統塊材的化學與物理性質，使得銀奈米顆粒比奈米顆粒良好運用於細胞上，為了解奈米材料與 NIH3T3 之間的互相影響有助於細胞在醫學上的應用，本研究重點在探討銀奈米粒子之製備。將銀奈米粒子有效分散於基材中，並以鼠科的 NIH3T3 細胞，以培養液補充不同的濃度的銀奈米顆粒，並分別以(0, 10, 30, 50%)混合 2-72 小時，以奈米材料來增加細胞附著與觀察細胞生長的型態，利用光學顯微鏡計數細胞總數，並藉由掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察細胞膜上銀奈米顆粒的變化結果。



第二章 文獻回顧

2.1 細胞培養

細胞培養(Cell Culture)就是選用各種細胞最佳的生存條件，對活細胞進行培養和研究的技術，是指將單一細胞或細胞群從生物體內取出，模擬體內生理環境，在無菌、適當溫度、氣體濃度與適合的營養環境下，使細胞生存與生長並維持其組織結構和功能特性的方法。細胞貼附的行為是決定生物適應性的重要因素，而細胞貼附的過程分為四種階段，包括：細胞貼附、偽足伸出、細胞質形成網狀，細胞攤平以及周邊細胞質皺折[5]。

2.1.1 細胞培養的發展[6]

動物細胞培養技術之興起，始自 1907 年 Harrison[7]將青蛙的胚胎組織，培養於顯微鏡的載玻片上，以觀察細胞成長。因為動物細胞生長的速度較微生物的生長慢，因此動物細胞培養發展初期，主要困難在於克服微生物的污染。至 1912 年 Carrel[8]將外科醫生的無菌技術應用在動物細胞的培養上，細胞才能長期培養，不受污染。1916 年 Rous 及 Jones 利用蛋白酶(Trypsin)由組織中分解出細胞，之後發展出附著性細胞的繼代培養法。1940 年代開始在細胞培養液中添加抗生素，進一步降低細胞污染的機率，也使得細胞培養的技術日漸普及，Mouse L 及 Hela 兩種可持續培養的細胞株，即在 1948 及 1952 年間建立。1955 年 Eagle 開發出化學配方培養液，不必完全依賴體液培養細胞，是培養基上的重大突破。1975 年 Kohler 和 Milstenin 研發出融合(Hybridoma)技術，之後廣用於單株抗體的製備，亦是動物細胞培養史上的一重要里程碑。

動物細胞的大量培養應用，最初是因病毒的生產而起。1949 年 Ender

發現小兒麻痺病毒可以在體外細胞中培養應用，奠下疫苗製造的基礎。1950 年代小兒麻痺疫苗開始大量接種，同時也是第一個上市的動物細胞製品。之後其他產品陸續地開發，大量培養與生產條件的探討，成為動物細胞培養技術的研究重點。1987 年第一個利用遺傳工程動物細胞得藥用蛋白質 tissue plasminogen activator 核准上市。

2.1.2 細胞培養的分類

目前動物細胞可依其性質、形態及培養特質來分類，以其性質來分有初代細胞 (primary cell)、正常細胞 (normal cell) 及持續性細胞株 (continuous cell line) 三種。初代細胞是直接以胰蛋白酶將動物組織或器官分解而得，正常細胞是指具成對染色體，培養時須附著面，單層長滿後即不再增生，可用胰蛋白酶讓他們脫離附著面來進行繼代培養，但無法永續的培養。相反地，如胞株則可持續的培養。細胞依其形態則可分類為纖維狀 (fibroblast-like) 及表皮狀 (epithelial-like) 兩種不同的細胞。細胞若以培養時是否需要附著面，又可分為懸浮性 (suspension) 及附著性 (adherent) 兩種細胞。

2.2 細胞組成[9]

細胞是構成各種生物的最小單位。雖然不同種類的細胞上結構形態或功能上有極大的差異，但是它們都擁有一些共同的物徵，例如：細胞外圍都是一層很薄的細胞膜 (cell membrane)，裡面還有一種類似凝膠的液體就是細胞質。細胞主要是由細胞壁 (cell walls)、細胞核、細胞質 (cell plasma) 和細胞核 (cell nuclear) 四個部份所組成，在光學顯微鏡下都可以觀察到。

2.2.1 細胞壁

位於植物細胞的最外層，是一層透明的薄壁。它主要是由纖維素組成的，孔隙較大，物質分子可以自由透過。細胞壁對細胞起著支持和保護的作用。

2.2.2 細胞膜

細胞壁的內側緊貼著一層極薄的膜，叫做細胞膜。這層由蛋白質分子和脂類分子組成的薄膜，水和氧氣等小分子物質能夠自由透過，而某些離子和大分子物質則不能自由透過。因此，它除了起著保護細胞內部的作用以外，還具有控制物質進出細胞的作用：既不讓有用物質任意地滲出細胞，也不讓有害物質輕易地進入細胞。細胞膜在光學顯微鏡下不易分辨。用電子顯微鏡觀察，可以知道細胞膜主要由蛋白質分子和脂類分子構成如圖 2-1。在細胞膜的中間，是磷脂雙分子層，這是細胞膜的基本骨架。在磷脂雙分子層的外側和內側，有許多球形的蛋白質分子，它們以不同深度鑲嵌在磷脂分子層中，或者覆蓋在磷脂分子層的表面。這些磷脂分子和蛋白質分子大都是可以流動的，可以說，細胞膜具有一定的流動性。細胞膜的這種架構特點，對於它完成各種生理功能是非常重要的。

2.2.3 細胞質

細胞膜包著的黏稠透明的物質，叫做細胞質。在細胞質中還可看到一些帶折光性的顆粒，這些顆粒多數具有一定的架構和功能，類似生物體的各種器官，因此叫做細胞器。例如，在綠色植物的葉肉細胞中，能看到許多綠色的顆粒，這就是一種細胞器，叫做葉綠體。綠色植物的光合作用就是在葉綠體中進行的。在細胞質中，往往還能看到一個或幾個

液泡，其中充滿著液體，叫做細胞液。在成熟的植物細胞中，液泡合併為一個中央液泡，其體積佔去整個細胞的大半。

細胞質不是凝固靜止的，而是緩緩地運動著的。在只具有一個中央液泡的細胞內，細胞質往往圍繞液泡循環流動，這樣便促進了細胞內物質的轉運，也加強了細胞器之間的相互聯繫。細胞質運動是一種消耗能量的生命現象。細胞的生命活動越旺盛，細胞質流動越快，反之，則越慢。細胞死亡後，其細胞質的流動也就停止了。除葉綠體外，植物細胞中還有一些細胞器，它們具有不同的架構，執行著不同的功能，共同完成細胞的生命活動。這些細胞器的架構需用電子顯微鏡觀察。

2.2.4 細胞核

細胞質裡含有一個近似球形的細胞核，是由更加黏稠的物質構成的。細胞核通常位於細胞的中央，成熟的植物細胞的細胞核，往往被中央液泡推擠到細胞的邊緣。細胞核中有一種物質，易被洋紅、蘇木精等鹼性染料染成深色，叫做染色質。生物體用於傳種接代的物質即遺傳物質，就在染色質上。當細胞進行有絲分裂時，染色質就變化成染色體。

2.2.5 纖維母細胞簡介[10]

纖維母細胞 (fibroblast) 是屬於初級培養細胞 (primary cells)，由生物體直接取出來培養的細胞。纖維母細胞不能懸浮培養，必需靠壁生長，它們會分泌基質蛋白質 (matrix protein)：層狀蛋白 (laminin)、纖維網蛋白 (fironectin)、膠原蛋白 (collagen) 等以便黏在壁上。因其較容易培養成功，故一般進行細胞培養時多會採用纖維母細胞為培養細胞。

纖維母細胞是一種尚未完全分化的結締組織細胞，是形成其他結締

組織細胞的先驅，所形成的細胞有：脂肪細胞、平滑肌細胞及製造軟骨和硬骨的細胞。某結締組織的纖維母細胞會特化成骨母細胞、成骨細胞、軟骨母細胞和軟骨細胞。這些細胞會製造、修飾和更新軟骨及硬骨。在生物體的整個生活史中，軟、硬骨的製造是一典型的動態過程，並終其一生持續地發生。另外，血液中的細胞，包括紅血球、單核白血球、嗜中性白血球、嗜鹼白血球、嗜伊紅白血球及血小板亦源於結締組織。這些細胞皆由硬骨內的骨髓組織所製造。且局部的 ECM 是由纖維母細胞所分泌。由纖維母細胞所分泌的有葡萄糖氨聚合醣 (glycosaminoglycans, GAGs)、膠原蛋白、彈性蛋白、纖維網蛋白、板素和其他蛋白質。GAGs 是多醣鏈，通常共價附著到蛋白質以形成蛋白多糖 (proteoglycans)，蛋白多糖再與水形成可塑的膠狀物質，以抵抗壓縮，如同橡膠或的填充基質。膠原蛋白纖維通過並嵌在這種膠狀基質中，提供抗張強度。纖維網蛋白可以促進細胞附著到 ECM，而板素則是促使細胞鍵結到基底層。

纖維母細胞是呈現紡錘狀或星形並有長細的細胞質突起，細胞類相對較少，且在光學顯微鏡下相並不清楚。細胞核呈橢圓形而微有凹口，其邊緣有明顯的核膜，核中有數個核仁。

過去許多研究顯示出，各種不同的細胞在不同條件下的表面微結構進行細胞培養，會造成對細胞不同的影響及改變，下列將概要說明各項研究的結果與討論：

Harrison[11]就從細胞培養的結果發現表面微結構及形態對細胞附行為有所影響的可能性，其觀察到藉由方向性的溝槽可造成細胞呈非等方向性移動貼附。

Harris[12]等人在 1980 年將纖維母細胞培養在矽膠薄膜(silicone

rubber film)基底上，提出纖維母細胞運動時與基底間互相的牽引力(traction force)。

Oliver[13]等人提出細胞移動時包含貼附(adhesion)、延伸(extension)與收縮(retraction)三種現象，與纖維母細胞移動方向之假設。

Ponsonnet[14]等人利用鎳鈦合金觀察人類纖維細胞在不同表面粗糙度，細胞的行為(behaviour)、附著(adhesion)、方向性(orientation)和增殖(proliferation)，研究發現平坦的表面增殖較好。

Miller[15]等人的研究指出，在具有良好生物相容性的高分子材料(PDLA)基底上，改變其表面型態會影響細胞生長的方向與速度。

Bruchez[16]等人利用螢光水溶性半導體粒子標定使用兩種包覆二氧化矽不同粒徑的core-shell奈米粒子來標記3T3老鼠的纖維母細胞，發現不同粒子之光波長的差異為550到630nm，奈米粒子的作用力影響產生的光位移現象。

Balaban[17]等人以高分子彈性材料(PDMS)，利用微機電製程來製作微陣列平面，量測纖維母細胞的力學特性。

Wirth[18]等人利用人類纖維細胞與鼠胚胎成骨細胞，培養於鎳鈦記憶合金上，使用兩種不同表面粗糙度合金，比較細胞形態貼附和增殖，發現纖維細胞在平坦的表面上有較佳的貼附和增殖現象。

Linez-Bataillon[19]等人利用Ti-6Al-4V合金在 80, 1200, and 4000不同等級的拋光，利用SEM研究細胞生長的型態與細胞貼附蛋白質的變化，發現鼠骨細胞 (MC3T3-E1 cell)在越平坦的表面，細胞的增殖和伸展現象也跟著提高。

Large[20]等人利用螢光染色法，在鈦合金的表面藉由機械拋光，以SEM在光滑與粗糙不同的表面，分析細胞貼附與量測物理-化學性質，

發現骨細胞(MG-63 cell)在平坦的表面細胞伸展較佳。

Webster[21]等人研究利用奈米結構基材 (Alumina、titania、HA)，其奈米材料表面特性(粗糙度、晶粒、孔徑大小)會增加蛋白質的吸附、型態、生物活性等，進而增加骨細胞、纖維母細胞與內皮細胞的黏附力。

2.3 奈米粒子簡介

奈米粒子(nanoparticle)是指粒徑在介於1-100nm 範圍之間的微小粒子，又因為其尺寸小於一般機械研磨可得之最小粒徑(1-100 μ m)，因此又稱為超微粒子，或於液體中稱為膠體粒子(colloid particle)。奈米材料其性質隨著粒徑大小不同而異，當材料的大小在奈米範圍時，物理及化學性質與巨觀時大不相同，且隨著材料的不同而有所差異。

當固體顆粒尺寸逐漸降低到某一個限度時，由於粒子之表面效應、體積效應與內外交互作用力使得其物理與化學性質與塊狀材料有著顯著之差異[22-25]。以下茲分別敘述之：

(1) 表面效應(surface effect)

由於球形顆粒的比表面積(specific surface area)與直徑成反比，因此隨著粒子之縮小，其比表面積將會顯著的增大。係指暴露在表面之原子數相對於總原子數的比例大為增加，所以奈米粒子具有表面原子比率極高、比表面積極大之基本特徵，如表2-1 所示。由於表面原子與內部原子相比具有更大之活化性和表面能，所以有些無機奈米粒子暴露在空氣中能直接與氣體進行反應，另外，奈米粒子的高表面能亦能降低其燒結溫度，使奈米粒子較易於低溫下燒結，表2-2為部分金屬奈米粒子之融點及燒結溫度。

(2) 體積效應(Size effect)

不同於塊狀金屬的連續電子能帶，奈米金屬粒子因所含原子數隨粒子直徑減小而降低時，其電子能階間隔增大，使其電子帶不再具有連續性，且當能階間隔大於熱能、磁能與光子能量時，就需考慮量子效應(quantum effect)。量子效應是一種明顯之體積效應，吾人可由粒徑大小來調整其能階(band gap)。

(3) 交互作用(Interaction effect)

所謂的交互作用，是指粒子與粒子間，原子與原子間之交互作用。由於奈米粒子其表面與內部原子距離極短，故粒子間的交互作用力不僅發生在表面，更擴及至粒子內部。所以當粒子表面吸附化合物或粒子與溶液發生交互作用時，其光學性質及介電性質等物性亦將隨之改變。

奈米金屬是指金屬基材中含有奈米粒子或奈米結構組成之金屬材料，若為含有兩種以上成分者稱為奈米合金。奈米粒子具有不同的幾何形狀，而奈米結構組成包含結晶、非結晶、組織、介面層等結構。因此，奈米金屬或合金基本上是必須具有下列兩大特性：

(1) 奈米級尺寸：材料尺寸、結構或介面具有可以辨識1奈米到100奈米尺寸之大小(介觀尺寸)。就空間而言可分為零維(粒子)、一維(棒、管、線)、二維(如鍍層或薄膜)與三維奈米結構，分別代表微粒狀、線狀、片層狀與三維方向之排列結構。

(2) 新穎的特性：必須具有異於塊材(bulk material)之特殊性質，微小尺寸僅是奈米材料必要之基本條件，但更重要的是在微觀奈米狀態下，能夠證實出特殊新穎的物理或化學性質，例如電性、磁性、光學等等。

2.3.1 金奈米粒子

金奈米粒子除具有高活性、大表面積、高表面活化能及特殊光電效應等特性外，其表面修飾技術的成熟使其更容易地與生特分子連結，進而從事醫療檢測、疾病治療、藥物釋放等應用，藉由奈米材料所具有特殊性質來克服過往傳統技術的限制，以其在雙方面均有相當的突破。

推溯金奈米粒子的起源，在 1857 年法拉第[26]將【AuCl₄】⁻水溶液（chloroaurate）以磷（phosphorus）來還原，而得到深紅色之金膠體粒子溶液，從而開始了金膠體粒子製備方法及性質的研究。而金奈米粒子溶液的合成機制在 1938 年 Borries 和 Kausche[27] 以較完善的機制合成出 150~500 埃（Å）的金奈米粒子溶液後，1949 年[28]及 1951 年 Turkevich、Stevenson 及 Hillier 以相同的方式利用三鈉檸檬酸鹽為還原劑，以水熱法將【AuCl₄】⁻水溶液還原成核，並在不同的反應條件控制下改善了 Borries 和 Kausch 的方法，合成出穩定且均相的金奈米粒子，金奈米粒子溶液的合成方法及其粒徑的控制於是就此建立，也因此開啓了金奈米粒子往後在各方面應用的大門。在 1975 年 Horisberger[29] 等人，首度發展出快速且有效的方法來觀測細胞表面的受體所在位置。以抗體抗原專一性結合的特性為基礎，在金奈米粒子表面上修飾抗甘露聚糖抗體，以此奈米粒子與生物分子結合所形成的標記物來標定假絲酵母細胞 (Candida Cells)，細胞表面的受體甘露聚糖在 SEM 的觀測下，得以得到金奈米粒子標定細胞表面受體的影響。

由於金奈米粒子之物理化學性質，過去十年在研究基礎上已有相當之成果，對於表面電漿共振性質的（SPR）理論計算，也是較過去了解更多，另外在金奈米粒子的形狀控制，從只有不同大小的球狀金奈米粒

子，到現在各種不同的形狀，大小的金奈米棒、奈米管以及奈米線，皆已有相當之研究成果，而以金為基礎之奈米合金球，也有一些報導。

金的導電性穩定性之高原子量，早已被使用於電子顯微鏡上標定及校正物質，而今奈米粒子本身具有表面電漿之共振性，及表面拉曼光譜之加強性在實際生物檢測上，預計未來應有相當多之生醫檢測儀器上使用。

2.3.2 銀金屬簡介

自古以來，銀就被用於加速傷口癒合、治療感染、淨化水和保存飲料；銀的科學新發現也證明人類從經驗得到的智慧與現代科學完全一致；人類發現銀可以和有毒物質或細菌反應，具有去除有毒物質和抗菌的性能。科學界發現銀的效能包含：超強的殺菌力、維持人體內分泌系統的平衡、抗細菌、抗黴菌等；現代醫學實驗也證明，在各種金屬元素中，銀的抗菌性能最好[30]。另外，高分子奈米複合材料還可以用於醫用材料，如醫用紗布中加奈米銀粒子可以消毒殺菌[31]。

在所有的金屬之中，銀的導電率、導熱率最大，柔軟具延展性、抗氧化作用，但在空氣中會與大氣中的硫作用而變色；比重-10.5、熔點-961°C、沸點-2259°C。可溶於硝酸、熱濃硫酸，及氰化鹼中，不溶於水及鹼，除粉末外不可燃。銀的基本性質如表2-3。

銀奈米粒子由於其低電阻($1.47 \times 10^{-8} \Omega \text{ m}$)之性質常調製成導電膠，應用於混成積體電路組件，多層陶瓷電容器之金屬批覆及其他厚膜用途上。在電子工業上，此導電膠需具備低電阻，強黏著性，與焊料具相容性，對焊料之溶解度低及低成本等特性。因此所需之奈米粒子最好為高純度、結晶性佳、均勻且低凝聚性。銀奈米粒子雖具備低電阻、低

成本之優點，但其對錫鉛焊料之溶解度高，且濕氣環境下及電場作用下易發生遷移(migration)之現象。

2.4 奈米粒子合成原理

金屬奈米粒子的製備方式，可以分成兩種不同的方式；物理方法：一種是利用塊材(bulk metal)再分解的方式生成；另一種方法化學方法：則是利用離子或分子作為前驅物而生成金屬原子，接著進行再聚集(aggregation)後而形成奈米粒子，其中以化學方法能提供較小且大小均勻性較高的奈米粒子，故一般在奈米粒子的製備上主要還是利用化學方法加以合成。化學還原法又可分成：檸檬酸還原法(citric acid reduction methods)、乙醇還原法(alcohol reduction methods)、 KBH_4 還原法等。檸檬酸還原法是利用檸檬酸鈉當作還原劑與保護劑，通常使用的還原劑有檸檬酸鈉(sodium citrate)、黃磷(yellow phosphorus)、硼氫化鈉(sodium borohydride)等等。

以金奈米粒子為例，一般製備的方法是在溶液中，使用還原劑提供電子給正電的金離子，成為金原子，如2.1式中所示， HAuCl_4 中的 Au^+ 的離子還原成 Au^0 的金原子，如圖2.2所示。



在還原劑加入之前，溶液中100%都是金離子，圖中縱座標指出當還原劑加入金離子之後成為金原子的過程，當加入還原劑後，陡峭上升的曲線一直持續到過飽和為止，產生聚集的過程，形成11個原子的金殼，這種現象稱為成核過程(nucleation)。為了減少金原子在溶液中過飽和，成核現象非常的迅速發生。當金膠體環繞著負電層，由剩餘溶液中的負電所造成如圖2.3所示，這帶電層稱為介面電位(zeta potential)，藉由介

面電位的庫倫排斥力使金微粒在溶液中，可以排斥其他懸浮粒，使離子吸附於奈米粒子上，而不易與其他離子產生聚集，而形成金奈米粒子。

2.5 奈米粒子之製備方法

傳統的機械研磨方式，算是最簡單的減小粒徑的方法，它通常僅能達到次微米級的尺寸，而且研磨所得到的粒徑不夠均勻，粒子形狀也都不規則，同時可能有殘留的應力或晶結構改變的現象發生，因而不易應用在奈米級粒子的製造上。

奈米粒子之研究[32]，主要包含製備、分離、性質鑑定與應用這四個基本面，而製備在其中扮演了最關鍵的角色。有關奈米粒子的製備，由於有愈來愈多的學者專家投入研究，因此如何製備奈米粒子的相關文獻不斷的被發表，而且製備方法也愈來愈多，但是主要可以分為物理方法跟化學方法兩種。1.物理方法:將塊狀金屬加以細分，又稱為Top-down 之技術。2.化學方法:利用化學還原反應製備而成，又稱為Bottom-up 之技術。物理方式多屬破壞性製備，如蒸氣冷凝法、離子濺射法、冷凍乾燥法、機械力粉碎法等等；化學方式如沉澱法、水熱法、細液滴熱解法、溶膠-凝膠法、氣相化學物質反應法等。

2.5.1 物理方法製備奈米微粒

應用物理方法製備奈米顆粒，除採用光電技術使材料在真空或惰性氣體氣氛中蒸發，然後使細化後之原子或分子冷凝形成奈米微粒外；尚有機械球磨、噴霧等以機械力學為主的奈米微粒製備技術。

2.5.1-1 蒸發冷凝法

蒸發冷凝法是將合適的材料加熱、蒸發，使成為原子或分子，再使這些原子或分子凝聚，生成細緻的奈米微粒，在蒸發、冷凝過程中沒有

化學反應，所得產品之粒徑一般在 5~100 奈米之範圍。常見的加熱蒸發技術有電阻加熱、電訊放電蒸發、電極蒸發、電漿蒸發、雷射光束蒸發、爆炸絲法等。在 1980 年代初期，H.Gleiter 等人首先以蒸發冷凝製得奈微粒，在超高真空條件下以粉末壓實可得奈米固體。在高真空容器內，導入固定壓力之氬氣，當金屬原料被蒸發後，金屬粒子被周圍氣體分子碰撞，而在冷凝管凝聚的顆粒大小約有 10nm，據報導，調整蒸發溫度、氣體壓力，可得到較小粒徑（約 2nm）之奈米微粒。蒸發冷凝法基本上適用於任何可被蒸發的元素以及化合物，透過蒸發冷凝法可製備具下列特徵之奈米微粒（1）純度高、（2）純徑分佈均勻、（3）良好結晶及表面清潔、（4）奈米微粒粒徑可調節控制。

2.5.1-2 離子濺射法

離子濺射一般用於物理製膜，濺射是將兩塊金屬極板置於氬氣中（壓力約 40~250Pa），一塊為陽極，另一塊為陰極靶材。在兩極間輸入數百伏的直流電壓，進而產生輝光放電（glow discharge），藉由兩極板間的輝光放電產生離子，撞擊於陰極靶材上，靶材中原子則由其表面蒸發。利用濺射法製備奈米微粒有許多優點，如靶材蒸發面積大、產率高，此外尚有反應氣體的反應性濺射，可製備粒子均勻、粒度均佳的奈米微粒。如使用銀靶時，可製備出粒徑 5 至 20nm 之奈米微粒，而放電流電壓及靶材面積與氣體壓力都是影響奈米微粒生成因素。

2.5.1-3 冷凍乾燥法

冷凍乾燥法是將調配妥當的溶液霧化噴灑成微小液滴並迅速於冷凍劑中冷凍，然後在低溫低壓下真空乾燥將溶劑昇華除去，以得到奈微粒。特別是各類新型無機奈米材料的製備相當適用。倘若以水為溶劑來製備奈米微粒，則是將溶質用溶劑細化後予以凍結，而後將冰昇華除

去，得到奈米微粒。又如果是熔融態的鹽，凍結後則需要進行熱分解，才能得到奈米微粒。事實上冷凍乾燥法有許多需要注意的參數，諸如溶劑的選用、溶液濃度、霧化液滴的大小及凍結速率等均需適當調節。故控制可溶性鹽的均勻度、凍結速率以及控制離子在溶液的均勻性，都將可有效的增加所製備奈米微粒之純度、組成成份及粒徑等之均勻性。此外，透過冷凍乾燥，往往可生成多孔性且連通性佳的乾燥體，在鍛階段有利於揮發物質排放，且粒子粉碎性佳。

2.5.1-4 機械力粉碎法

粉碎包涵了破碎與磨粉，是將大料塊變成小料塊，小料塊再成粉體的過程；傳統的機械力足夠大且迅猛，物質料塊或粒子之間來自機械的應力，大大超出物質料塊的機械強度，物質料塊進而破碎。物質料塊基本破碎的方式有壓碎、剪碎、沖擊粉碎的磨碎，如球磨與振動磨是磨碎與沖擊粉碎的組合，物質料塊受力粉碎時，可能在其結構與表面發生物理化學性質的變化，此種因為機械負致使粒子晶體結構微細化，因表面積增加導致表面能變化、溫度升高，相鄰兩原子之鍵結被活化。由於表面能的增大和機械能活化作用，導致下列幾種變化發生：(1) 粒子結構變化，表面結構自發重組，形成非晶態結構或再結晶。(2) 粒子表面之物理化學性質，如表面電性、物理與化學吸附性、溶解性、分散性與聚集性等發生變化。(3) 粒子受力部分，因反覆承受應力作用，有如一種物質轉變為另一種物質而釋放出氣體，外來離子進入晶體結構中而引起原物化學組成產生變化。機械力粉碎之極限往往是奈米微粒面臨的重要問題，一般而言，原物料粒子粒徑的減小，使粉碎物料的結晶性增加，粒子強度增大，斷裂提高，粉碎所需的機械力亦大增，因此粒子度愈細，粉碎難度亦大，但粉碎到一定粒徑後儘管繼續施加機械力，物料粉碎徑

不會再持續減小，或者減小的速率相當緩慢，此乃物料粉體的粉碎極限。理論上機械力粉碎可達之最小粒徑約為 $0.01\sim 0.05\mu\text{m}$ ，唯依現有機械粉碎設備與工藝尚達不到此一理想值。

2.5.2 化學法製備奈米微粒

利用化學法製備奈米微粒是指在氣相、液相或固相中透過特定的化學反應程序，諸如沈澱、微乳液、溶液凝膠、水熱等產生鬆散前或團聚的奈米微粒。其特點是產率高、成本較低；但相對的缺點則是適用材料種類有限、奈米顆粒表面易受雜質污染而影響純度、製程環境易造成污染且難以製備金屬粉體的先驅物。

2.5.2-1 沈澱法

將不同化學成份的物質或包含一種或多種離子之可溶性鹽先以溶液溶解、分散，再將這些不同的物質在溶液狀態充分混合，而後加入適當的沈澱劑（如氫氧根， OH^- ，草酸根 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ，及碳酸根 CO_3^{2-} 等）至混合溶液，使不同化學成份的物質沈澱析出為奈米微粒的先驅物，溶劑和溶液中之陽離子需先洗去；再將沈澱物進行乾燥（脫水）或鍛燒（熱分解），以製備奈米微粒。一般常使用金屬鹽或氫氧化物的溶解度，調整溶液酸鹼度、溫度、溶劑比例，使物質沈澱，然後將沈澱物洗滌、過濾、乾燥、施加熱處理使用成奈米微粒。產物顆粒粒徑常取決於沈澱物的溶解度，沈澱物的溶解度愈小，產物顆粒粒亦愈小。

2.5.2-2 水熱法

利用液相（尤其是水溶液）在高溫環境及 $100\sim 350^\circ\text{C}$ 的溫度下，使無機或有機化合物與水化合，通過加速滲析反應和再過濾、洗滌、乾燥等物理過程的控制得到高純度、細顆粒的微粒子。水熱法可將金屬鹽溶

液或其沈澱物置入高壓反應釜內，密閉後恆溫靜止（或加入磁性轉子密閉後將高壓反應釜置於電磁攪拌器上攪拌）狀態下，維持足夠長的時間後，再進行物理後續處理程序，一般而言，動態攪拌可加速合成速率即持溫時間可縮短。日本已有利用水熱法由銦鹽或其他金屬鹽在高溫壓的水中，成功得到粒徑、形狀、組成成份均勻之高品質氧化銦、氧化鋁和磁性氧化鐵奈米微粒。

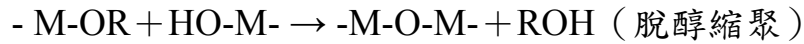
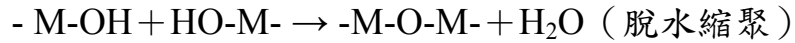
2.5.2-3 細液滴熱解法

細液滴熱解法是將金屬鹽溶劑依化學反應比例加入可燃性溶劑配製成溶液，溶液經噴霧或其他方法以細液滴之形式，送入已完成控制的加熱室內反應，通過化學反應蒐集生成的微細粉末。加熱反應室之處理則有乾燥、焙燒、燃燒、水解等四類不同方式，舉噴霧方式為例，乾燥的熱處理方式，為將配製好的溶液或微乳液，靠噴霧噴嘴形成霧狀之微細液滴來進行微粒化方法，鎳、鋅的鐵氧化合物，即是利用此法製備奈米微粒。燃燒則是將金屬鹽溶液以氧氣霧化，在高溫下燃燒分解而製備奈米微粒。水解法是醇鹽溶液經噴霧、水蒸氣水解、單分散性粒子、焙燒後得到奈米類粒。細液滴熱解法的優點在可製備多成份粉末顆粒、粒子呈球狀、粒徑分佈均勻、製程簡單等特性。

2.5.2-4 溶膠-凝膠法

金屬無機鹽或金屬醇鹽以化學試劑配製成液體的烷氧物等先驅物質，這些先驅物質依比偷例在溶劑中形成均勻的溶液，溶質與溶劑產生水或醇解反應，生成物經聚集後生成 1nm 左右的粒子，是為不沈澱且穩定的溶膠，經過長時間的放置或乾燥處理，溶膠才會轉化為凝膠。凝膠中通常仍含大量液相，需藉萃取或蒸發去除液相中之物質（大部份是溶劑或化學試劑），並在遠低於一般傳統的燒結溫度下進行熱處理，以製

備化合物的奈米微粒。在溶膠轉化為凝膠的過程中，將有水解反應和縮聚反應，其反應式簡述如下：



利用上述次微米方法膠體懸浮物確是製備奈米粉末或薄膜材料等方法之一。使用溶膠-凝膠法製備氧化物有下列優點：(1) 起始反應物是分子級，能製備顆粒均勻的氧化物材料。(2) 與傳統製程比較（金屬在高溫進行氧化），可以在較佳條件下製備。(3) 可控制所製備氧化物之孔隙度。(4) 容易製成不同形狀，如塊狀、纖維狀、單一大小的粉末。

2.5.2-5 氣相化學物質反應法

將金屬化合物、氮化物、硫化物、硼化物等氣化成蒸氣，再通過化學反應（分解、合成或氣體與預置固液體反應），生成期盼的化合物，在設定的保護氣環境下快速冷凝，進而製備，奈米微粒。此種方法因利用蒸氣態氣相物質進行反應，在產物粒徑上已占優勢，倘控制得當，尚有純度高、分散性好、化學反應性及活性高等特性，故適合於各類金屬、金屬化合物、非金屬化合物等奈米微粒之製備。關於化學反應的部份則有氣相分解與氣相合成之分類。針對反應前原料之三態又有氣-氣、氣-液、氣-固等反應型態。而將物質活化成氣相，才能使後續化學反應發生，一般活化方法有加熱及射線輻射等方式，常見的諸如電阻絲、電熱爐、火焰、電漿、雷射誘導、 γ 射線輻射等均為物質活化的技術。眾所皆知，為了製備有效益的奈米微粒，在反應體系、反應的活化、反應器的結構、反應物與氣相物導入方式及生成物之蒐集及後續處理均是需要靠精密技術與精良設計才能適當解決。

2.6 還原奈米銀粒子

製備奈米銀粒子，通常需要使用化學合成的方法，所以選擇該金屬的適當前驅物（precursor），然後選擇反應物（如還原劑），將兩者充分混合後，藉由控制反應的速率，以及反應進行的環境，經過成核與成長的程序，以得到奈米銀粒子。

在銀的原料方面[33]，多仍以銀的硝酸鹽、氯化鹽為主；至於在還原劑方面，則有許多選擇，聯胺（ N_2H_4 ）、硼氫化鈉（ $NaBH_4$ ）、次磷酸鈉（ NaH_2PO_2 ）、甲醛（ $HCHO$ ）、檸檬酸鹽等。在生成奈米銀粒子時，為了避免凝聚或燒結（因為反應溫度較高的緣故）的效果，所以需要加入保護劑之類的成分，以控制粒徑，可與金屬成分形成鍵結，吸附在粒子表面，所以他們多半也會抑制粒子的生長，而使粒子變小。在此本實驗使用硝酸銀（ $AgNO_3$ ）為奈米銀的前驅物，硼氫化鈉（ $NaBH_4$ ）為還原劑。[34]



根據上面的兩各反應式，還原奈米銀粒子。

2.7 生醫材料應用

生醫材料(Biomaterials)之功用為植入生物體內作為修護、替補生物體內損壞之組織或器官，重建其原有之功能。因此，利用生醫材料設計成代替人體之組織，長期有效地使用於人體，並有良好的生物相容性及親和性即為材料界與醫學界一致追求的目標。目前常見的骨科用生醫金屬材料是以不銹鋼、鈷鉻合金與鈦為最重要之三大類。生醫材料植入生物體取決於植入物本身表面性質和細胞間的互相影響（implant-cell

interaction) [35]。材料本身的物理性質，像是表面粗糙度、表面型態 [36-37]、材料表面親疏水性也會影響細胞行為。

當生醫材料移植到人體，人體就會對生醫材料產生反應，依據影響的區域可分成下列幾種[38]：

(1) 細胞反應 (cellular reaction)：是指生醫材料是否對細胞產生毒性，尤其是當生醫材料長期在人體中，可能會有一些添加物或交聯劑滲出，影響細胞進而導致細胞死亡，所以選擇的生醫材料要具有穩定性。

(2) 組織反應 (tissue reaction)：是指當生醫材料移植到人體中，人體會產生慢性發炎的組織反應，乃因生醫材料無法被白血球吞噬而移走，便會產生吞噬細胞的附著，隨後就會產生慢性發炎，最後由結締組織會再生醫材料外面形成一層夾膜將生醫材料包圍住，其目的是在使生醫材料與身體其他部分隔離。

(3) 系統反應 (systematic response)：是指生醫材料移入到人體中，人體各部分組織對它產生排斥的連鎖反應，進而影響人體重要機能。

基於上述這三點，當生醫材料移植到人體中一定要考慮到生物相容性 (biocompatibility)。包含組織的相容性 (tissue compatibility) 及血液相容性 (blood compatibility)。組織相容性是指材料與鄰近組織之反應，材料本身不可釋放出有毒物質，引起周圍組織病變，減少發炎及免疫反應的發生。血液相容性就是不會對紅血球、白血球、血小板造成破壞性；不會改變血漿中的蛋白質；不會破壞酵素。另一方面生物穩定性是相當重要，植入人體的生醫材料，不能有降解的情形，否則會有嚴重的情形。

2.7.1 鈦及鈦合金

鈦和鈦合金金屬為一種質量輕、比强度高且抗腐蝕性佳的金屬，也是應用在結構輕量化領域中極佳的材料。早期鈦金屬材料的應用以軍事及航太工業為主，隨著真空冶煉與加工技術漸趨成熟，鈦金屬已被廣泛的應用於一般工業如運輸工業、海運業、高科技產業、和生物醫學上的應用，甚至已超越航太與軍事用途的使用量[39-40]。鈦金屬的特色為融點高、質量輕、韌性強、低密度、比重介於鐵和鋁之間，熱膨脹係數、楊氏係數比鋼小，具良好耐蝕性，延展性佳，低熱傳導性及其優良生物相容性。是目前所使用的金屬植入材中具有較佳抗生物腐蝕性(biocorrosion)和生物相容性(biocompatibility)的材料，且和其他高強度的金屬材料相比，有較低的密度與骨骼較接近的彈性係數兼具良好的疲勞強度。

鈦有兩種同素異構的相，一種為低溫穩定的 α 相為六方最密堆積(hexagonal close packed; HCP; $c/a=1.587\text{\AA}$)結構，兩相的轉變溫度約為 883°C ，其融點高達 1660°C ，如表 2-4 純鈦的物理及化學性質所示，表 2-3 為純鈦及其合金的機械性質[43]。

2.7.2 奈米碳管於生醫方面之應用[44]

隨著生物科技與奈米科技的日新月異，奈米材料的生醫應用也越廣。相較於光電、材料等領域，奈米碳管材料的醫學應用尚屬起步階段。如何掌控奈米碳管及其衍生物的多變性，以及與生物體的互動反應，是當前重要的課題。若能確實掌握此要點，奈米碳管材料在奈米生醫領域應用上將會有極大的貢獻。

2.7.3 高度生醫相容性

奈米碳管具有與碳六十相似的籠狀碳結構；化學性質穩定，外層碳

殼經官能基化修飾後易分散溶於水溶劑，且外層碳殼可依照不同的生醫應用目的修飾，使的奈米碳管具生醫相容性或更多樣的表現，因而被看好適合生醫應用。

奈米碳管的石墨殼層，目前已知並無醣素可分解，其結構具高度生物穩定性；外殼碳層經化學修飾後，具有良好的水溶性，容易藉代謝作用移除，易被生物體接受；因此，奈米碳管為一穩定且特殊的材料，可具有一般奈米金屬材料更易於應用特性。

奈米碳管的特殊結構使其在生醫領域具有廣泛的應用，例如：在生醫藥物載體的應用上，奈米碳管表面可吸附承載生物性高分子物質。如蛋白質、磷脂、脂質體、膠原蛋白、醣蛋白等。利用它們的親和力與基因片段或藥物結合，可作為藥物載體，或應用生物材料的純化分離。應用在生物材料的檢測與純化分離方面，將磁性奈米碳管表面修飾具辨識功能官能基，再與目標物（例如：蛋白質）結合，藉外加磁性分離而達到純化的效果。

2.7.4 奈米粒子於生醫上之應用

奈米粒子異於大塊物質的理由是在其表面積相對增大，也就是超微粒子的表面佈滿了階梯狀結構，此結構代表具有高表面能的不安定原子。這類原子極易與外來原子吸附鍵結，同時因粒徑縮小而提供了大表面的活性原子。奈米粒子微細結構使其對環境中的化學或物指標的變化極為敏感，因此可對人體內的病原體作出早預測，如：當腫瘤只有幾個細胞大小時就可以將其檢測出來，加以根除。

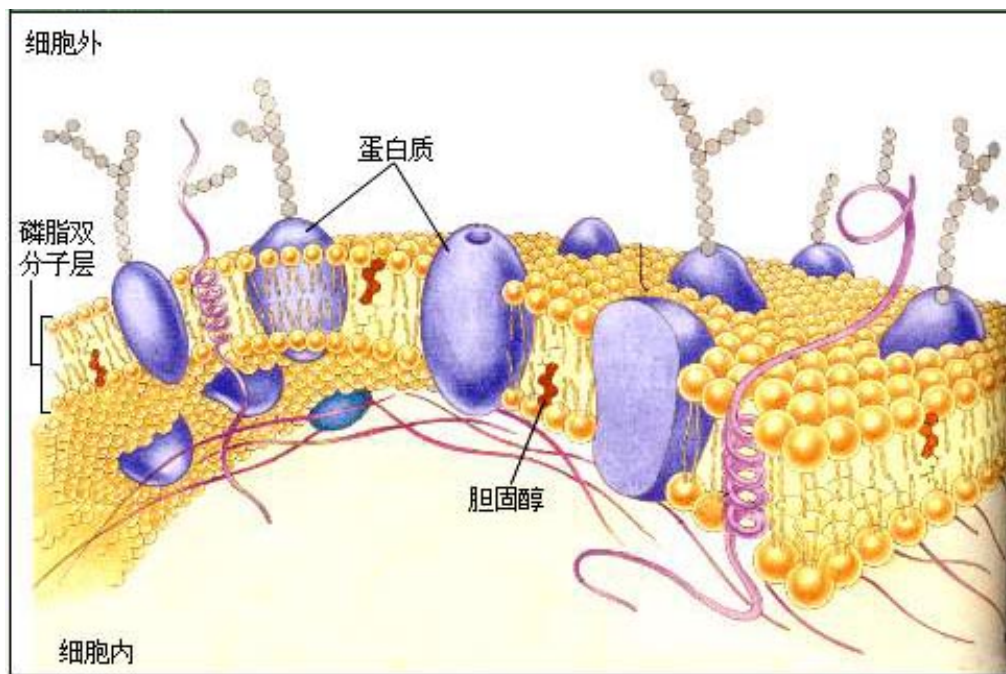


圖 2-1 細胞膜結構

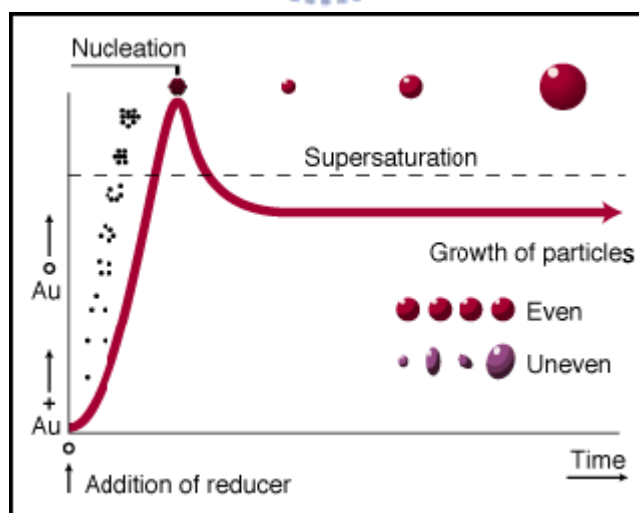


圖2-2 金奈米粒子形成過程

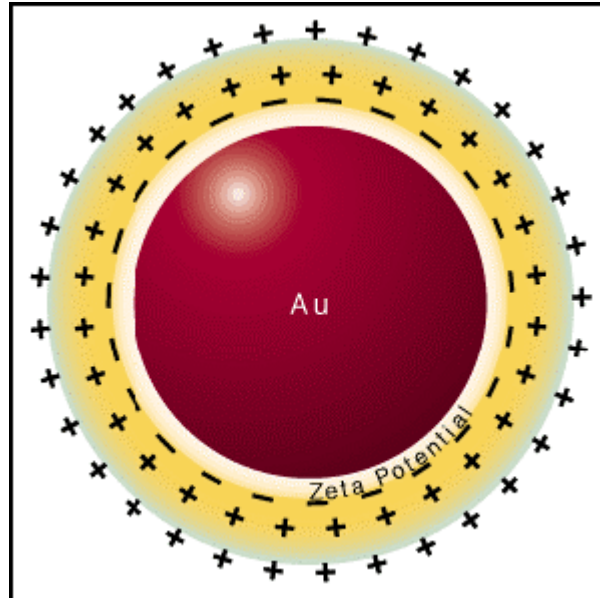


圖2-3 雙離子層圍繞金奈米粒子的保護形式



表2-1 顆粒直徑變化對照表[45]

顆粒直徑	比表面積	表面原子佔總原子數之百分比%
10	90	20
5	180	40
2	450	80
1	900	99

表2-2 金屬奈米粒子之融點及燒結溫度[46]

性質	奈米粒子(粒徑)	塊狀金屬
熔點	Au(3nm):900	1300
燒結溫度	Ni(20nm):~200	700

表 2-3 銀的基本性質[47]

銀的基本性質			
原子序	47	沸點	2259°C
原子量	107.87	溶點	961.93°C
熱傳導	1cal.cm.s(20°C)	比熱	0.0559
溶解潛熱	21 仟卡	比重	10.5(20°C)
抗拉強度	14~16 kg/mm	電阻	1.59MΩ/cm(18°C)

表 2-4 純鈦的物理及化學性質[41-42]

Properties	α -Ti	β -Ti
Space group	HCP	BCC
Lattice constant	$a=2.9511\text{nm}; c=4.6843\text{nm}$	$a=3.3065\text{nm}$
Melting point	1660°C	1660°C
Specific gravity	4.512	
Phase transform temperature	$T(\alpha \rightarrow \beta) = 882^{\circ}\text{C}$	
Coefficient of thermal expansion	$8.35 \times 10^{-6} \text{C}^{-1}$	

表 2-5 純鈦及其合金的機械性質(ASTM F136) [43]

PROPERTY	UNALLOYED				ALLOYED	
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Ti16Al4V	
Tensile strength (Mpa)	240	345	450	550	860	895
Yield strength (0.2% offset) (Mpa)	170	275	380	485	795	830
Elongation(%)	24	20	18	15	10	10
Reduction of area(%)	30	30	30	25	25	— —

第三章 實驗方法

3.1 細胞培養

本實驗採用鼠科的NIH3T3 細胞(老鼠NIH/Swiss胚胎，也稱為人體纖維母細胞)，細胞株資料如表 3-1，每 1 毫升培養液濃度有 1.5×10^5 細胞。培養基使用 90% (Dulbeccos Modified Eagles Medium, DMEM)、4mM L-glutamine、1.5g/L sodium bicarbonate、4.5g/L glucose 與 10% (calf serum, CS)。細胞需培養在室溫 37°C 和 5% CO_2 環境下進行培養。

3.2 解凍細胞

3.2.1 實驗材料

- (1) 新鮮培養基: 90% DMEM(45cc)、FBS(5cc)、L-glutamine(1cc)、抗生素(1cc)。
- (2) 37°C 恆溫水槽。如圖 3-1
- (3) 纖維母細胞(NIH3T3)。
- (4) 無菌培養皿。如圖 3-2
- (5) 無菌吸管。

3.2.2 實驗步驟

- (1) 將新鮮培養基置於 37°C 水槽中回溫 10~20 分鐘，回溫之後以酒精擦拭後，移入無菌操作台內如圖 3-3。
- (2) 自液態氮鋼瓶如圖 3-4 取出冷凍的細胞株，將細胞株解凍後，以酒精棉擦拭後試管外部置入無菌操作台。
- (3) 拿 15 cc 試管將調配好的新鮮培養基，取 3cc 加入解凍好的細胞

株，使細胞株均勻混合於培養基中。

- (4) 將離心後的試管取出，抽去上清液，留下細胞並加入 1cc 的培養基置細胞中。

3.3 細胞繼代培養

當 NIH3T3 細胞生長至高密度時須分盤至新的培養皿中，先移除舊的培養基，再分殖至新的培養皿中。

3.3.1 實驗材料

- (1) 無菌磷酸生理緩衝液(Dulbeccos phosphate- buffered saline，D-PBS)。
- (2) trypsin-EDTA solution 保存於 4⁰C 的冰箱中，使用前在拿至 37⁰C 恆溫水槽回溫。
- (3) 新鮮培養基。
- (4) 裝廢液的燒杯。
- (5) 高速冷凍離心機。如圖 3-5



3.3.2 實驗步驟

- (1) 先移除舊的培養基。
- (2) 以 D-PBS 清洗細胞 1~2 次
- (3) 加入 trypsin-EDTA 溶液，置於 37⁰C 培養箱數分鐘，輕拍培養皿使細胞脫落，加入適當含血清之新鮮培養基，離心後再吸掉上清液。
- (4) 移除上清液後，加入適當含血清之新鮮培養基，以 pipet 上下吸放次數以打散細胞團塊，移置新的培養皿中，以正常條件培養。

3.4 細胞計數[48]

如圖 3-6 血球計數盤一般有兩個chamber，每個chamber中細刻 9 個 1mm^2 大正方形，其中 4 個角落之正方形再細刻 16 個小格，深度均為 0.1mm 。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形的體積為 $1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 1 \times 10^{-4}\text{ml}$ ，計數每個大正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每ml中之細胞數。

3.4.1 實驗器材

- (1) 血球計數盤(Hemocytometer)及蓋玻片(coverlip)。如圖 3-7
- (2) 計數器(counter)。如圖 3-7
- (3) 光學顯微鏡(optical microscopy OM)。如圖 3-8

3.4.2 實驗步驟

- (1) 取少數之細胞懸浮液，血球計數盤 chamber 從上方凹槽加入，並蓋上蓋玻片。如圖 3-9
- (2) 計數(四大方格之細胞總數/4) $\times 2 \times 10^4$ ，即為細胞懸浮液之細胞數。



3.5 冷凍細胞

3.5.1 實驗材料

- (1) 生長良好的細胞。
- (2) 新鮮培養液。
- (3) 冷凍培養基(dimethylsulfoxide, DMSO)
- (4) 血球計數盤及蓋玻片(計數細胞濃度)。
- (5) 高速冷凍離心機。

3.5.2 實驗步驟

- (1) 冷凍前先更換培養基，觀察細胞成長情形。
- (2) 配製冷凍培養基(93% culture medium+7% DMSO)加入血清，並使兩者均勻混合，置於室溫下。
- (3) 依細胞繼代培養之操作，收集培養的細胞，取少量細胞懸浮液，計數細胞濃度。
- (4) 離心後，去除上清液，先加入適當新鮮培養基，再加入之前混合好的冷凍培養基。

3.6 奈米銀製備

在銀奈米顆粒製作，以10毫升的 10^{-3} M硝酸銀(AgNO_3)加入於 2×10^{-3} M NaBH_4 (硼氫化鈉) 溶解增加沸騰溫度。銀奈米顆粒改變藉由檸檬酸鹽使穩定並水溶解於奈米顆粒，合成之奈米銀粒子粒徑約20~50nm，為近乎圓球狀之銀粒子。銀奈米顆粒的形態學藉由掃描式電子顯微鏡(SEM)與原子力顯微鏡(AFM)所分析。顆粒的尺寸則藉由穿透式電子顯微鏡來分析顆粒尺寸分布情形。

3.7 實驗耗材與分析儀器

3.7.1 掃描式電子顯微鏡

本實驗採用HITACHI S-4000機型。掃描式電子顯微鏡是以電子束對試片做掃描，其原理由電子槍 (Electron Gun) 發射電子束，經過一組磁透鏡聚焦 (Condenser Lens) 聚焦後，用遮蔽孔徑 (Condenser Aperture) 選擇電子束的尺寸(Beam Size)後，通過一組控制電子束的掃描線圈，再透過物鏡 (Objective Lens) 聚焦，打在試片上，在試片的上側裝有訊號接收器，用以擇取二次電子 (Secondary Electron) 或背向散射電子

(Backscattered Electron) 成像。儀器如圖3-10所示，主要的偵測信號為二次電子(Secondary Electrons)、背反電子(Backscattered Electrons)、穿透電子(Transmitted electron)、X-ray 等，將其放大同步顯示在CRT 上，目前SEM 之訊號處理，大多以數位取代類比方式，故對於影像之處理與儲存相當方便；其特性為表面或縱切面形貌(Topography)影像觀察及其他電性性質分析，本分析所採用之掃描式電子顯微鏡型號與規格參照表3.2。

3.7.2 原子力探針顯鏡

採用Digital Instruments DI 5000 機型。主要的原理是利用探針尖端數個原子與樣本間的凡得瓦力，當距離近時，凡得瓦力大，探針臂會受到較大程度的彎曲，此一彎曲可由雷射光反射到位移感測器而得出，因此，原子力顯微鏡是藉由分子間作用力直接量取表面。儀器如圖3-11所示，其操作方式是利用一支極細的探針，沿材料表面進行掃描，過程中穿隧電流(Tunneling current)因為表面高低起伏不同而變化成像，經電腦運算可得材料表面的三維圖形，本分析所採用之原子力顯微鏡型號與規格參照表3.3。

3.7.3 拉曼光譜儀

本分析採用之拉曼光譜儀使用氬(Ar)離子雷射，雷射光波長為 514.5 nm之綠光，其光學系統包括低能量雷射光源、單色儀(Monochromator)、CCD偵測器、光學顯微鏡和個人電腦，機型為Renishaw 2000，介面如圖3-12 所示。其光譜儀之分光原理如下：當入射光經狹縫進入光譜儀後，隨即由超環鏡面 (Toroidal mirror) 將導入之光校準為平行光，經由光柵依波長予以分光；分光後經過聚焦鏡投射在二維的 L-N₂ CCD 陣列上，

最後由類比-數位轉換卡將數據傳至電腦，由軟體擷取訊號解析之。若以簡單的一段話來敘述，所謂的拉曼效應即是光對分子的一種“非彈性散射”(Inelastic scattering)的行為；即光束(能量)照射到一個樣品，光子會與分子碰撞，除了動量有改變，能量也會交換，而拉曼散射只測量光子能量的改變，也就是分子的能階差。以波數差(Wave number)的改變來表示，即為拉曼位移(Raman Shift)。拉曼光譜儀在分析奈米碳管石墨化(或非晶質化)之程度，亦即此儀器常用於判斷奈米碳管的品質。選用綠光之原因是頻率較高，散射光強度也較強。分析所採用之拉曼光譜儀系統一般規格請參考表 3-4。

3.7.4 X射線光電子能譜儀

X 射線光電子能譜儀，是一種以單一能量的X 射線照射樣品，然後分析被激發電子能量，這些光子對固體的穿透能力為1~10 mm，跟表面上的原子產生光電效應，造成電子的激發，激發出來的電子具有動能(K.E.)光電子能譜儀是藉著量測X 光光電子能譜來分析材料表面各種元素的化學狀態，因此化學分析功能，也稱為電子能譜化學分析儀(electron spectroscopy for chemical analysis, ESCA);其特色是可鑑定材料表面上各種元素的化學鍵能，適合分析材料表面的化學性質。



圖 3-1 恆溫水槽

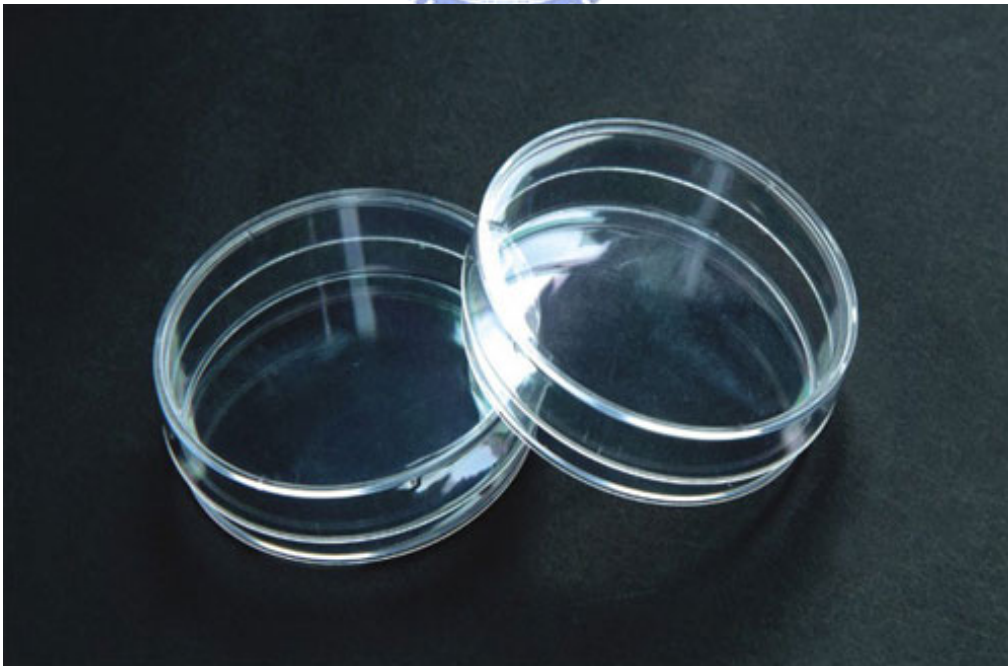


圖 3-2 無菌培養皿



圖 3-3 無菌操作台



圖 3-4 液態氮鋼瓶

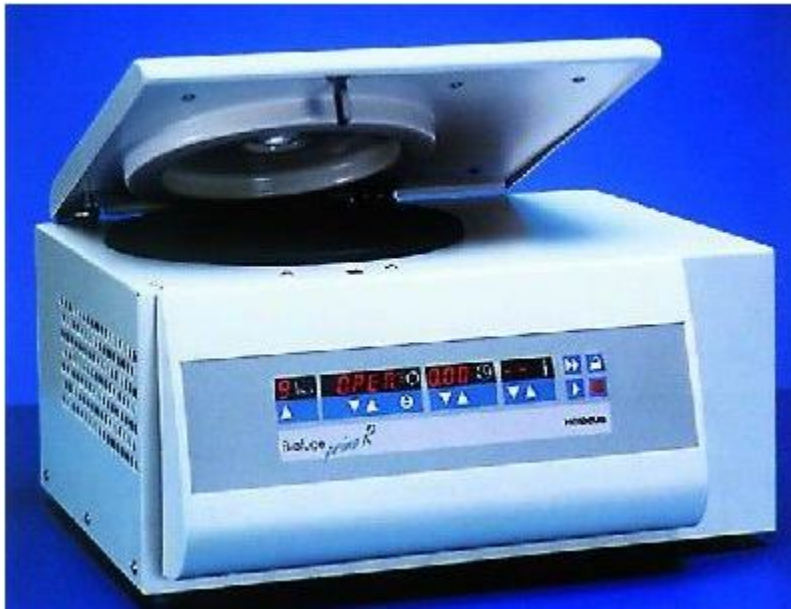


圖 3-5 高速冷凍離心機

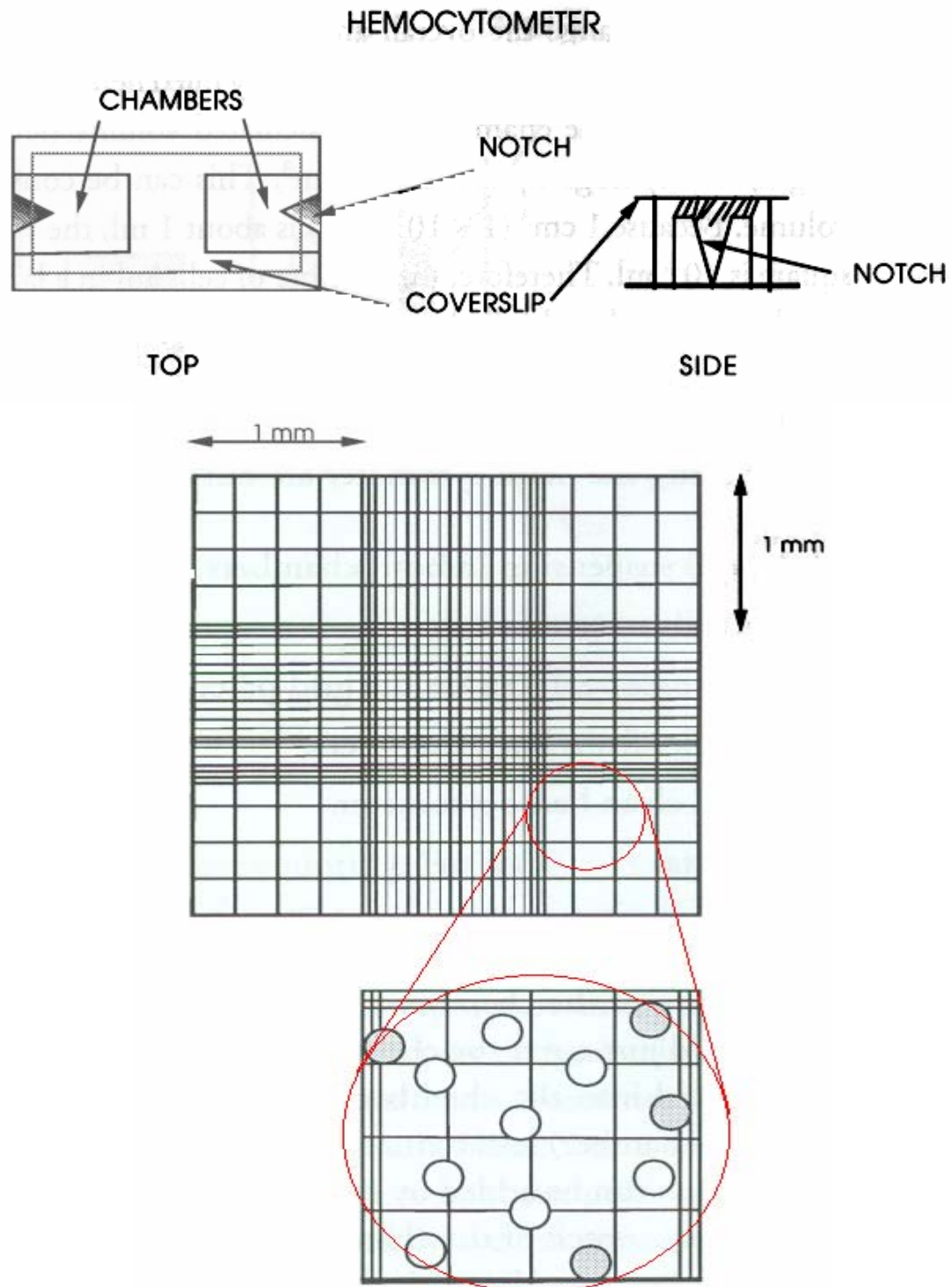


圖 3-6 血球計數盤示意圖[48]



圖 3-7 血球計數盤、蓋玻片、計數器



圖 3-8 光學顯微鏡



圖 3-9 利用血球計數盤示意圖



圖 3-10 掃瞄式電子顯微鏡



圖3-11 原子力顯微鏡



圖 3-12 拉曼散射光譜儀

表 3-1 細胞株資料表

細胞株名稱	NIH3T3		
細胞株來源	ATCC CRL-1658		
組織來源	老鼠 NIH/Swiss 胚胎		
冷凍管容量	1ml	濃度	0.9×10^6
生長特性	adherent	形態	Fibroblast-like
培養基	90%(Dulbeccos Modified Eagles Medium, DMEM) 、4mM L-glutamine 、1.5g/L sodium bicarbonate 、4.5g/L glucose=10% (calf serum ,CS)		
冷凍培養基	93% culture medium+7% DMSD		
培養條件	室溫 37°C 和 5% CO_2		
培養基更換	2~3 天		

表3-2 掃瞄式電子顯微鏡系統規格表

系統規格	規格說明
型號	電子顯微鏡(SEM)
機型	HITACHI S-4000
電子槍	冷陰極場發射電子源(CCFE)
加速電壓	0.5~30Kv
解析度	1.5nm
放大倍率	X20~X300000
最大試片尺寸	Airlock chamber : 75mm(直徑) x 25mm(高度) Sample chamber : 100mm(直徑)
可觀察範圍	25mm×25mm
傾斜	-5~+45°
旋轉	360°
可偵測訊號	二次電子影像, x-ray Mapping
真空度	2×10 ⁻⁷ (Pa)(電子源)

表 3-3 原子力顯微鏡規格表

系統規格	規格說明
型號	原子力顯微鏡
機型	Digital Instruments DI 5000
掃描面積	100X100 μm^2 (max)
試片尺寸	可接受小於 8inch 晶圓
解析度	XY 平面 2nm, Z 軸 0.01nm

表3-4 拉曼光譜儀系統一般規格表

系統規格	規格說明
型號	拉曼散射光譜儀(Raman Spectrum)
機型	Renishaw 2000
He-Ne	632.8 nm 17mW
雷射頻率響應	200~1100 nm(UV, VIS, NIR)
雷射點大小	1 μ m 直徑
共焦顯微鏡	50 cm 焦距
目鏡最高倍率	100X(per 3 pixels)
可量測範圍	30~6000 cm^{-1}
解析度	1 cm^{-1} (per 3 pixels)
光柵	2400/1200 gr/mm
液態氮冷卻之 CCD	1024 X 256 pixels



第四章 實驗結果與討論

4.1 奈米碳管的性質與形貌

4.1.1 影響前製程之主要參數

對於合成奈米碳管而言，控制前製程參數是重要；不同的製程參數會影響到後製程碳奈米結構的表面形貌、長度、直徑和方向性等。以下歸納出幾個影響較大的前製程參數做一簡單說明：

(1) 觸媒種類

要形成碳奈米結構，觸媒需具有溶碳的能力，故一般均使用過渡元素，例如：鐵(Fe)、鈷(Co)、鎳(Ni)、鉬(Mo) 作為觸媒，除可輔助碳管成長外，並可用來降低製程溫度。

(2) 氫氣濃度

氫氣在前製程的功用有二：

- 1.由電漿解離出氫離子可以清除觸媒表面氧化物，保持其活性。
- 2.低溫製程時，基材加熱溫度加上氫電漿離子轟擊 (ion bombardment) 的效應下，使觸媒薄膜層結構遭到破壞，將平整的薄膜表面蝕刻為島狀或顆粒狀以利碳管成長；氫氣濃度高可增加蝕刻效率。

(3) 溫度

前處理的溫度會影響觸媒的大小、形狀及密度。一般而言，當溫度達塊材物質熔點的 1/3 時，原子開始具明顯有擴散現象。

(4) 觸媒厚度

沈積在基板上的觸媒厚度會間接影響到合成的碳奈米結構，觸媒厚度愈薄，經過相同的前處理時間，所形成的觸媒奈米顆粒就愈小，合成的碳奈米結構直徑也會隨著變小，其單位面積上的密度也跟著變高，長



度也跟著下降。當觸媒厚度較厚時，薄膜會從表面開始熔解，而不是整片薄膜同時熔解，因此這種狀況會形成較大的顆粒。

(5) 微波電漿功率

電漿額外提供能量之，使觸媒層能順利的借由氫電漿的環境下，進行分裂、凝縮，形成奈米尺寸的觸媒顆粒，有效的降低製程溫度。當電漿功率愈大時，奈米微粒也跟著變大，合成的奈米碳管直徑也愈大。

(6) 前處理時間

前處理時間指的是在沒有通入碳源，觸媒以氫氣電漿蝕刻，由完整薄膜形成無數細小的觸媒金屬顆粒所需的時間。預處理時間若設定太短，觸媒並無法完全被催化分解成奈米顆粒，則奈米碳管合成的數量將有限，管徑也較大，此時增長前處理時間可有效縮減觸媒尺寸。預處理時間若設定過長，已顆粒化完成的顆粒則會開始因基板表面熱動能與表面擴散開始消長，小顆粒會被大顆粒所吸收造成密度又微量降低的情形。

4.1.2 奈米碳管的前處理

若要得到大量的奈米碳管，前處理的部份是非常重要的，若顆粒化均勻程度高的話，相對得到奈米碳管的數量與品質都會比較好，圖4-1即為氫氣流量100s.c.c.m、5分鐘後之氫電漿進行前處理所產生的現象。圖4-2為基材加熱與氫電漿離子轟擊下，鎳觸媒薄膜結構遭受破壞，將平整的薄膜表面蝕刻為島狀化，以利於奈米碳管合成，而SEM與AFM兩者有關聯性，當顆粒的均勻性與島狀化對碳管合成都有良好的品質，目前以530°C的前處理進行分析，之後會在做更多得參數分析。

圖4-3在前處理後通入氫氣流量(80 s.c.c.m)與甲烷流量(20 s.c.c.m)，

當前處理參數控制的好，奈米碳管的合成量大密集度高，長度介於2-4um，奈米碳管糾結在一起，則因凡得瓦爾力讓彼此糾結在一起造成分散性差。圖4-4為將合成好的奈米碳管放入裝有酒精(30 ml)的玻璃燒杯中，以超音波震盪30分鐘，如經超音波震盪後在基材上殘留少數的奈米碳管，顯示超音波能有效的將奈米碳管取下，如圖4-5所示。取下後的奈米碳管底部有觸媒金屬顆粒殘留。利用酸處理利將底部的觸媒蝕刻掉，蝕刻後奈米碳管底部為缺口狀，得到純化的奈米碳管，如圖4-6所示。

4.1.3 奈米結構的品質

拉曼光譜儀(Raman spectrum)主要由D-band與G-band，D-band通常在波數為 1328 cm^{-1} ；G-band則通常出現在波數為 1593 cm^{-1} ，D-band晶體的結構有缺陷、太散亂，或雜質過多所致，即石墨結構為短程有續或無續(disorder)結構，或是一些不純物顆粒的吸附都會造成D-band的強度變化；G-band代表具結晶性或有續長程結構(crystalline or order)之石墨結構。比較奈米碳管沉積與氮酸法，顯示奈米碳管的 I_D/I_G 比值增加0.8768~0.8948，如圖4-7所示。為了解奈米碳管的結構以原子力顯微鏡(AFM)與掃描式電子顯微鏡(SEM)做分析，如圖4-8所示。這可以推測水平奈米碳管的結構，如圖4-9所示。

4.2 銀奈米顆粒之合成

本節主要的目的是在探討合成奈米銀顆粒在基板表面之變化，並運用於纖維母細胞上，將NIH3T3用於不同濃度的銀奈米顆粒在不同週期時間，從24小時漸增到72小時，所以我們得針對以下幾個實驗結果加以討論：

4.2.1 銀奈米顆粒

在銀奈米顆粒製作，約10毫升的 10^{-3} M硝酸銀(AgNO_3)加入於 2×10^{-3} M NaBH_4 (硼氫化鈉) 溶解增加沸騰溫度。銀奈米顆粒改變藉由檸檬酸鹽使穩定並水溶解於奈米顆粒。

4.2.2 粒徑分佈

我們透過原子力顯微鏡(atomic force microscopy, AFM)，觀察奈米銀粒子之形狀與表面型態。首先將銀奈米粒子用去離子水稀釋後滴在矽晶片上，再經由低溫烘箱乾燥處理，將銀奈米粒子乾燥成固體，再透過掃描式電子顯微鏡分析，圖 4-10 顯示銀奈米顆粒在矽基板上 SEM 的結構，銀奈米顆粒由化學方法合成可溶解的奈米顆粒形成均勻的顆粒尺寸，由圖形中可以看到奈米銀粒子大多是球形狀，雖然有部分之顆粒彼此聚集，但推測其應該是樣品乾燥時所造成粒子聚集之現象；這也可以觀察奈米顆粒在合成過程得分佈情形。圖 4-11 係由穿透式電子顯微鏡觀察的橫斷面金相，由圖中得知顆粒尺寸在 60nm 以下，經由 SEM 與 AFM 比較發現，銀奈米顆粒表面量測到的長度約 87.891nm，如圖 4-12 所示。圖 4-13 為由原子力顯微鏡分析奈米顆粒表面，為銀奈米粒子 3-D 之幾何形狀。

4.2.3 銀奈米顆粒在不同的濃度的 NIH3T3 生存能力

圖 4-14 顯示，銀奈米顆粒(0 和 50%) 添加 NIH3T3 (15,000 cells/well) 藉由光學顯微鏡(放大倍率 200)。研究銀奈米顆粒(0、10、30、50%)生存能力在不同時間(2、4、6、8、12、24、48、72 小時)的組織細胞培養。在實驗 6 小時前，細胞無論添加銀奈米顆粒或者組織細胞附著酒精燒瓶或懸浮，發現細胞總數有點小變化。然而在 6 到 24 小時之間銀奈

米顆粒不但會減少纖維母細胞，而且在與低濃度(10%)相較下,奈米顆粒在高濃度(30, 50%)的狀態下會阻礙分裂。在另一方面正常的生存能力會增加從 24 到 72 小時，可以觀察出奈米顆粒在高濃度(30, 50%)可以保持 NIH3T3 的生存能力，緩慢分裂能力但不導致毀壞。表 4-1 銀奈米顆粒不同濃度在 6~72 小時的纖維母細胞培養。由於高度殺菌銀奈米顆粒在薄膜表面扮演重要的角色，由此可推測這對人體相當無害和絕對無毒性[49-50]。圖 4-15 中結果顯示不同百分比的銀奈米顆粒可以影響抑制 NIH3T3 在體內生存能力。

4.3 細胞附著型態的觀察

在 Z·Schwa 等人的研究顯示[51]，生醫材料有四種相互關聯的特性，化學組成(chemical composition)、表面能(surface energy)、表面粗糙度 (surface roughness)以及表面型態(surface topography)等對纖維母細胞的附著、生物功能的表現有顯著的影響。在探討材料特性對細胞之影響前，先簡單介紹細胞附著於基材的過程[52]，其過程如下:第一階段是血清蛋白 (serum proteins)先吸附在基材上;第二階段為圓形細胞(rounded cells)與基材相接觸;第三階段是細胞附著在基材上;第四階段為細胞在基材上攤開生長。

由於不同材質與鍍層表面會提供細胞不同的貼附與生長環境，所以藉由光學顯微鏡觀察培養皿、鈦基材、奈米碳管/鈦片基材上細胞的貼附之型態。

4.3.1 以OM觀察細胞附著的型態

4.3.1-1 培養皿(flask)上細胞附著型態

圖4-16中為培養皿上的細胞附著的型態。可明顯看出纖維母細胞經12小時培養後的貼附在培養皿上，且每個細胞相互連接，由於此flask表面是經特殊處理的塑膠材質，表面於生物材質上塗佈一層蛋白質，可提供細胞貼附的條件，所以細胞能很容易且順利的貼附在表面上，但提供細胞繼續生長除了良好的貼附環境外，Medium亦是提供細胞養份與營養的主要關鍵因素。圖4-17中為經24小時培養皿上的細胞，可觀察到細胞間已緊密靠在一起，顯示出貼附狀況相當良好，但還未攤平延展開且個別細胞看起來也較厚實，顯示出尚未完全貼附在培養皿上。

4.3.1-2 鈦片基材上細胞附著型態

為經處理鈦基材上細胞附著的型態，由圖中可觀察到纖維母細胞相互緊密連接貼附於在基材上，在此光滑表面，圖4-18中細胞從初期12小時即為整個貼附於基材上，圖4-19中經24小時培養後可發現整個細胞呈現出平整的型態，甚至已有向四方攤開的跡象，顯示出其延展攤開及生長狀況相當良好，此生長型態有別於培養皿上細胞附著生長的型態，此證明鈦合金是金屬植入材中具有較佳生物相容性材料的論點，鈦基材能提供細胞順利貼附及攤平延展的生長環境。

4.3.1-3 奈米碳管/鈦片基材上細胞附著型態

鈦金屬的特色為融點高、質量輕、韌性強、低密度、比重介於鐵和鋁之間，熱膨脹係數、楊氏係數比鋼小，具良好耐蝕性，延展性佳，低熱傳導性及其優良生物相容性。是目前所使用的金屬植入材中具有較佳抗生物腐蝕性和生物相容性的材料；而奈米碳管的石墨表面可提供特殊細胞生長環境與供應局部的磁場，可以用來攜帶養分或是培養細胞生

物。有鑑於此，本實驗便直接將奈米碳管散佈於血清中來觀察其對細胞培養的影響情形，來探討纖維母細胞與奈米碳管鍍層於鈦片上的關係。

圖 4-20 中經 12 小時培養後，細胞附著型態及生長狀況方面，參雜奈米碳管的細胞數會大幅增加其細胞生長速度；圖 4-21 中經 24 小時培養後，此時貼附的細胞呈現不規則形狀，細胞已攤成不規則的長片狀貼附在基材上，與對照組並進行比較，可發現 CNTs/Ti 混合鍍層最佳，而在 Ti 基材鍍層上雖然細胞亦有貼附，但其生長狀況較 CNTs/Ti 基材差。

4.3.2 以SEM觀察細胞附著的型態

4.3.2-1 培養皿(flask)之SEM觀察細胞附著型態

由於培養皿為特殊處理的塑膠材質，表面披覆有一層蛋白質，有利於細胞的貼附。圖4-22中經12小時培養後，培養皿上細胞附著型態SEM圖，可觀察到細胞間相互連結在一起；圖4-23中經24小時培養後，細胞數量多且緊密的相互連結在一起，圖中可發現中央稍有鼓起立體的情形，但還尚未攤平延展，顯示細胞尚未完全貼附在培養皿上。

4.3.2-2 鈦片基材之SEM觀察細胞附著型態

圖4-24中為鈦基材上經12小時細胞附著的型態，觀查SEM照片可以發現細胞已互相連接且貼附於鈦基材上，已有部分向四方攤平伸展開；圖4-25中為鈦基材上經24小時細胞附著的型態，並沒有像培養皿表面上的細胞中央稍有鼓起立體的情形，可發現整個細胞呈現出平整的型態，證明出鈦合金具有較佳的生物相容性，能提供細胞順利貼附的條件。

4.3.2-3 奈米碳管/鈦片基材之SEM觀察細胞附著型態

圖 4-26 中經 12 小時培養後，細胞附著型態及生長狀況方面，參雜

奈米碳管的細胞貼附時亦是呈現出多邊不規則狀，且細胞與細胞相互連接並整個貼附，其貼附生長情形比鈦基材的還厚實，且由圖中可觀察纖維母細胞，其周圍已長出假足絲；圖 4-27 中經 24 小時培養後，細胞的假足絲牢牢貼附於基材上，且細胞中心無突起現象，但其周圍延伸較粗且攤平與延伸，故由以上結果知，細胞在加入奈米碳管之後，會影響細胞的貼附與生長，能提供良好的貼附與攤平延展性。



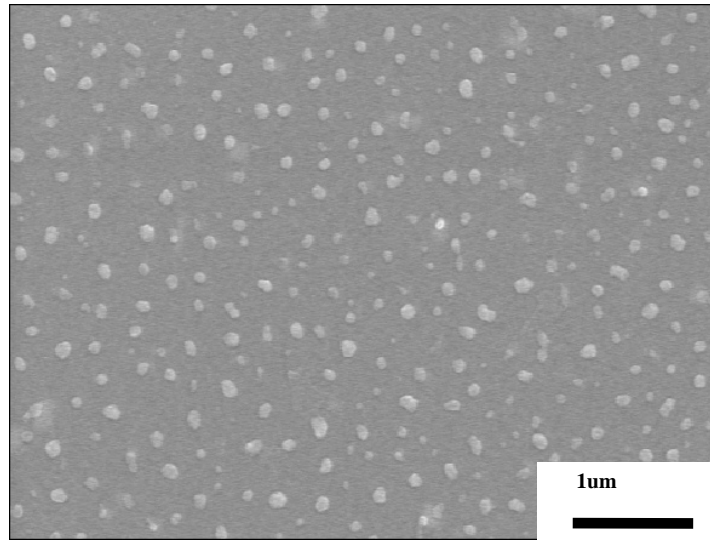


圖 4-1 前處理溫度 530 °C (SEM)

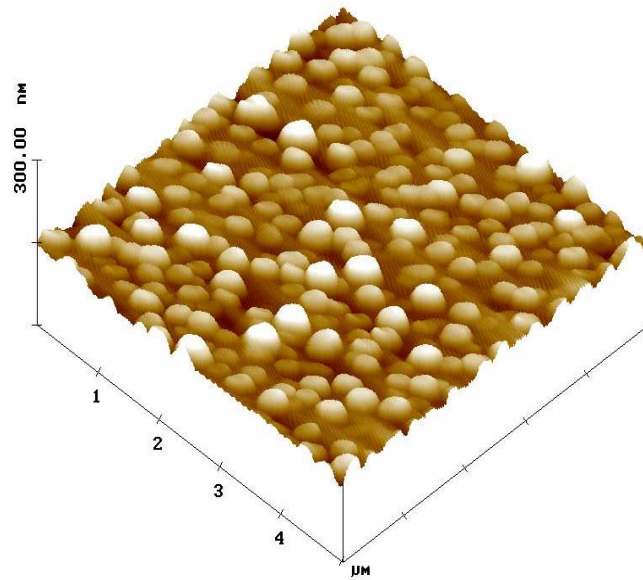


圖 4-2 前處理溫度 530 °C (AFM)

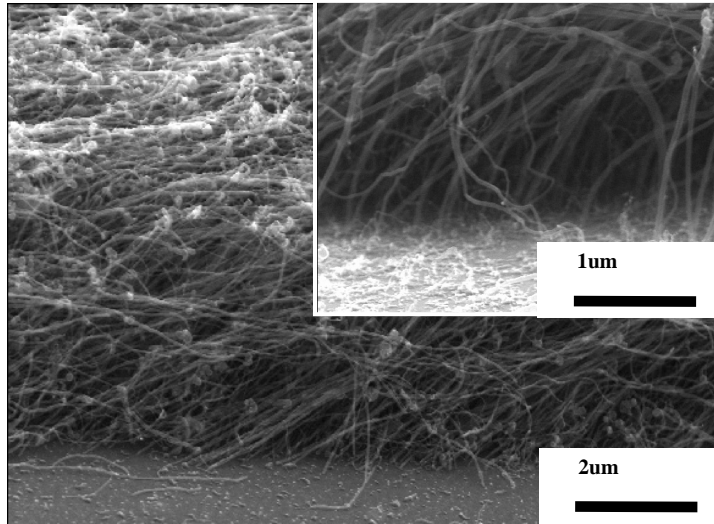


圖 4-3 奈米碳管成長影像

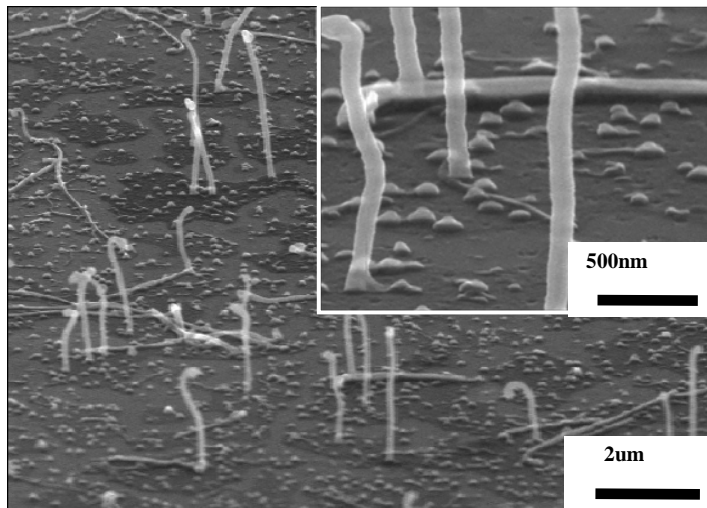


圖 4-4 經過超音波震盪後的奈米碳管

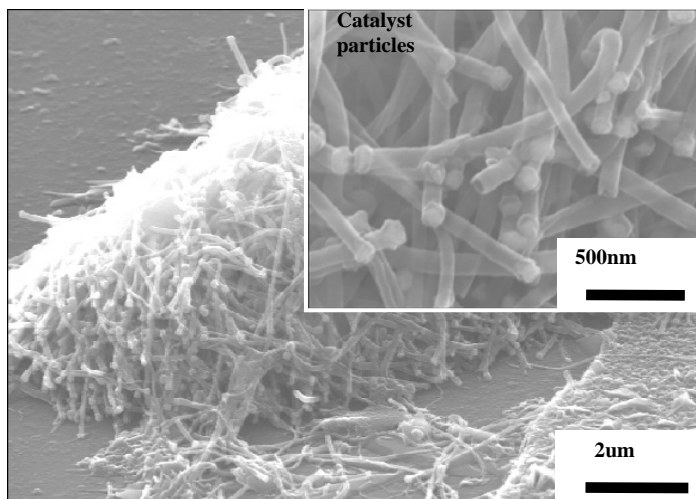


圖 4-5 奈米碳管觸媒顆粒

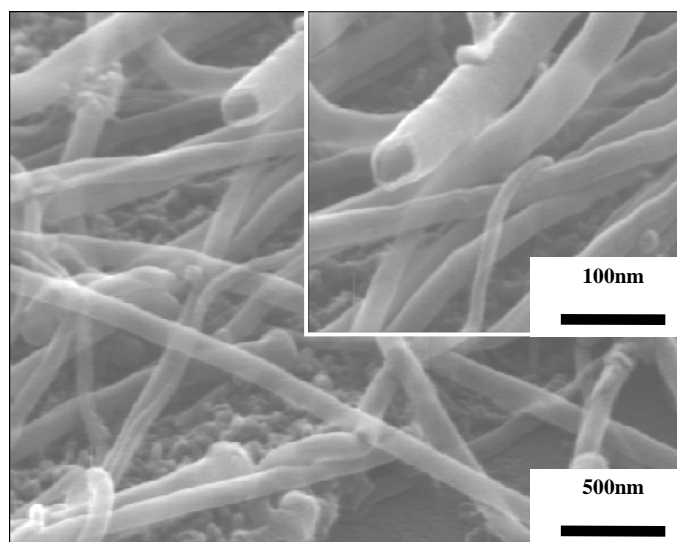


圖 4-6 奈米碳管觸媒蝕刻

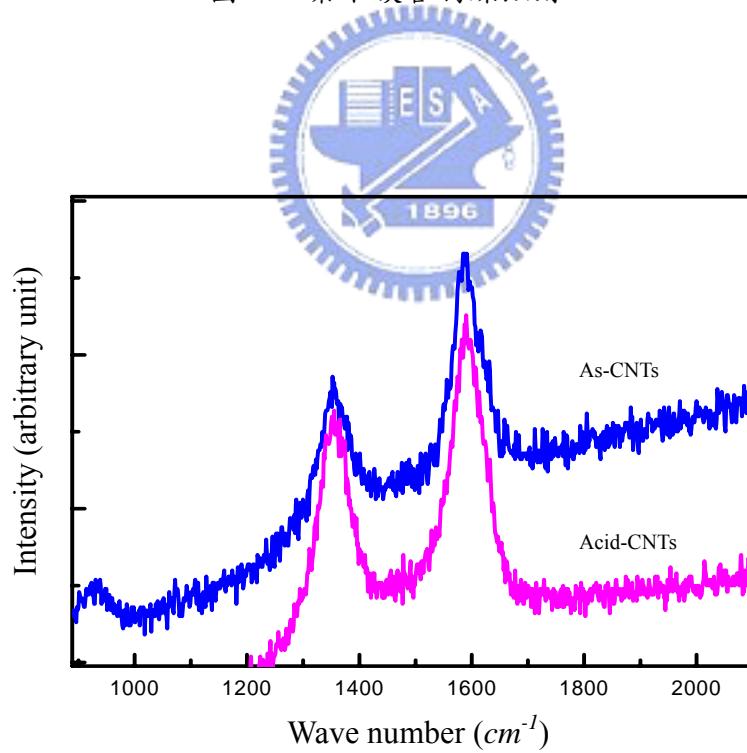


圖 4-7 奈米碳管沉積之拉曼光譜儀分析

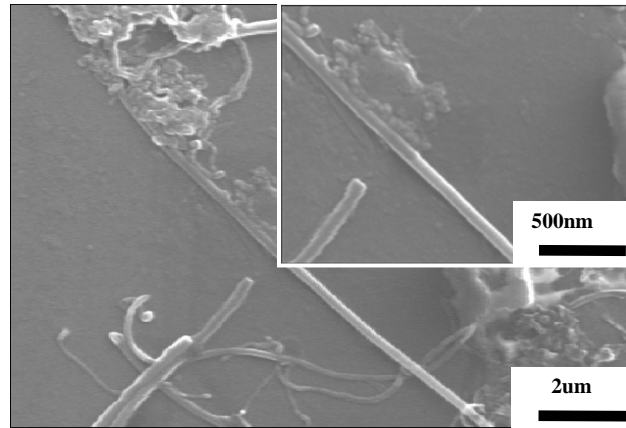


圖 4-8 玻璃基板上奈米碳管影像

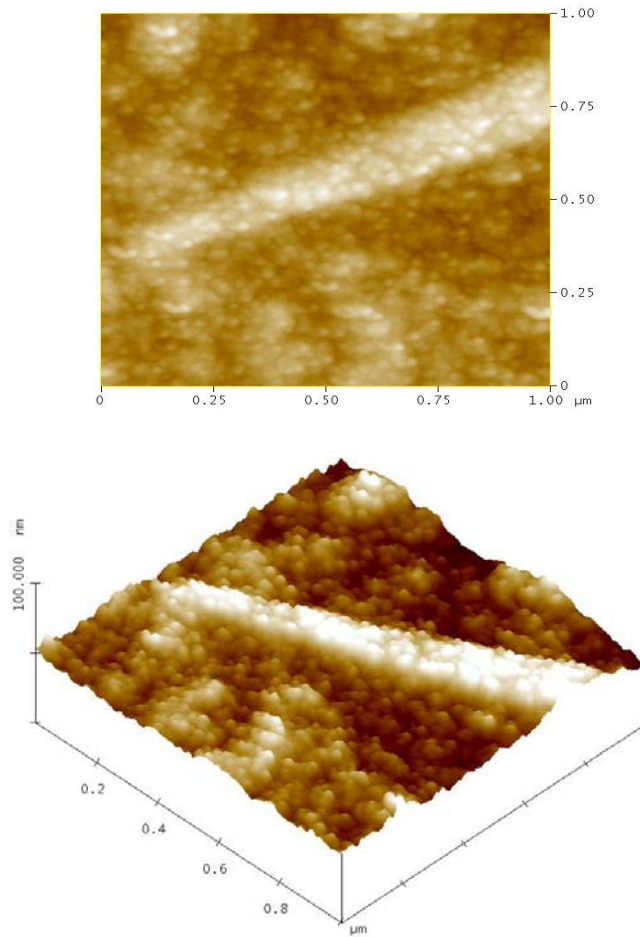


圖 4-9 水平奈米碳管在玻璃基板影像

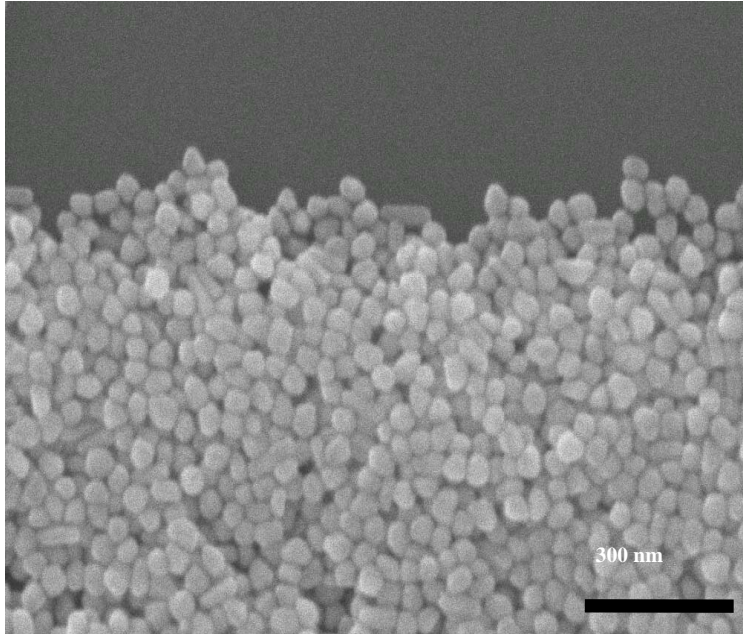


圖 4-10 掃描式電子顯微鏡影像

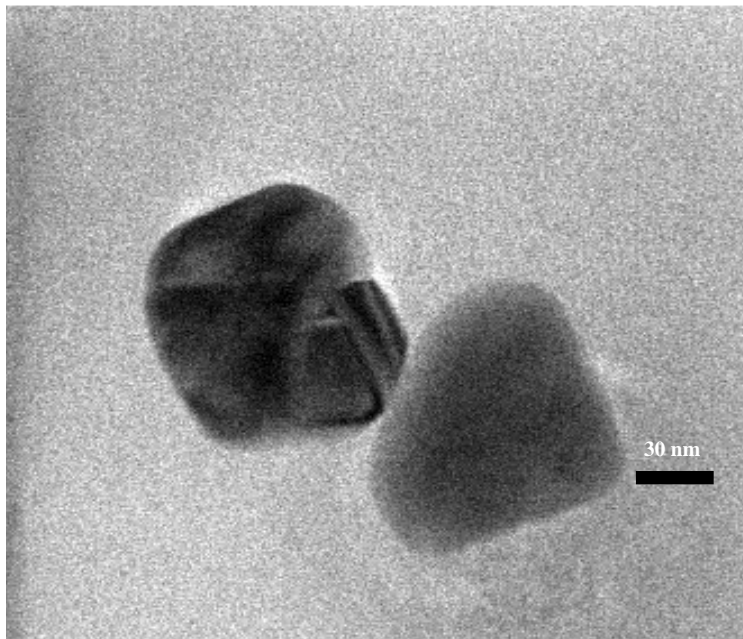


圖 4-11 矽基板上穿透式電子顯微鏡影像

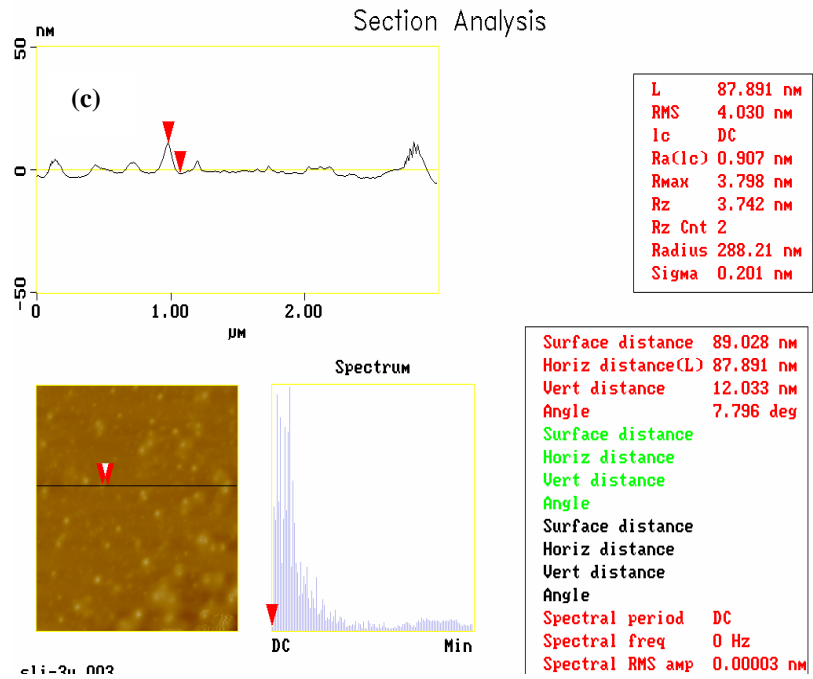


圖 4-12 AFM 分析銀奈米顆粒之粒徑大小

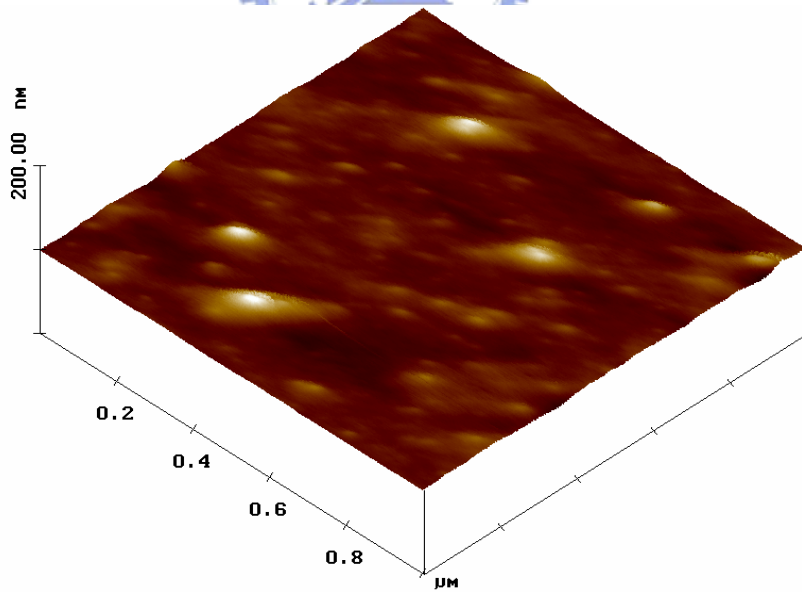
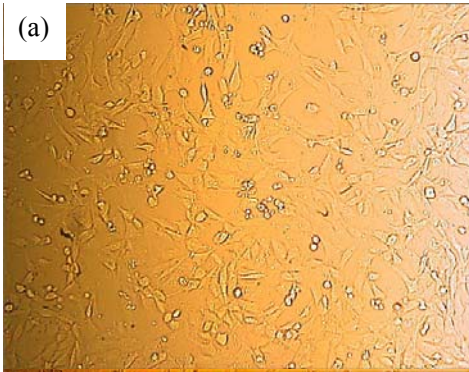
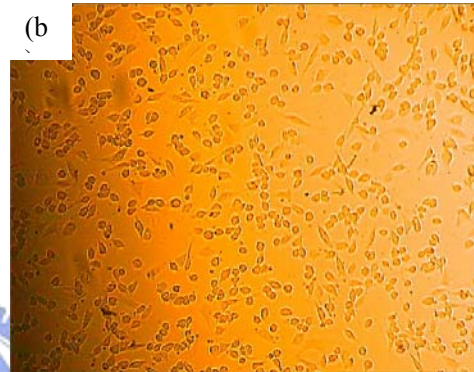


圖 4-13 利用 AFM 分析 3D 銀奈米顆粒之表面型態

(a) 0 % 12 h



(b) 0 % 24 h



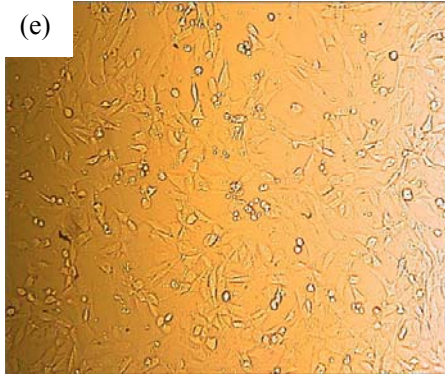
(c) 0 % 48 h



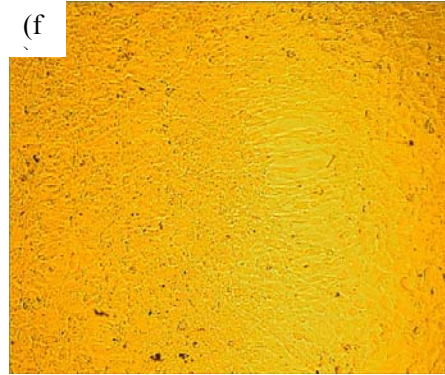
(d) 0 % 72 h



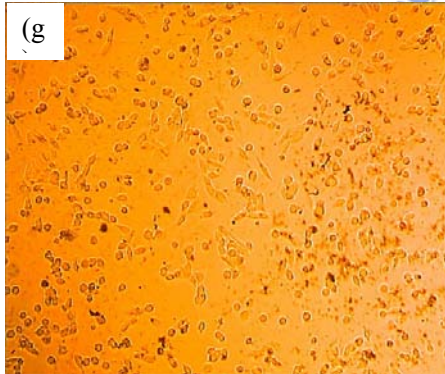
(e) 50 % 12 h



(f) 50 % 24 h



(g) 50 % 48 h



(h) 50 % 72 h

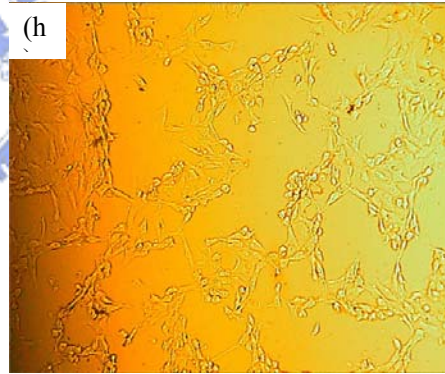


圖 4-14 光學顯微鏡(放大倍率 200)隨時間變化情形(a) 0 % 12h、(b) 0 % 24 h、(c) 0 % 48 h、(d) 0 % 72 h、(e) 50 % 12 h、(f) 50 % 24 h、(g) 50 % 48 h、(h) 50 % 72 h。

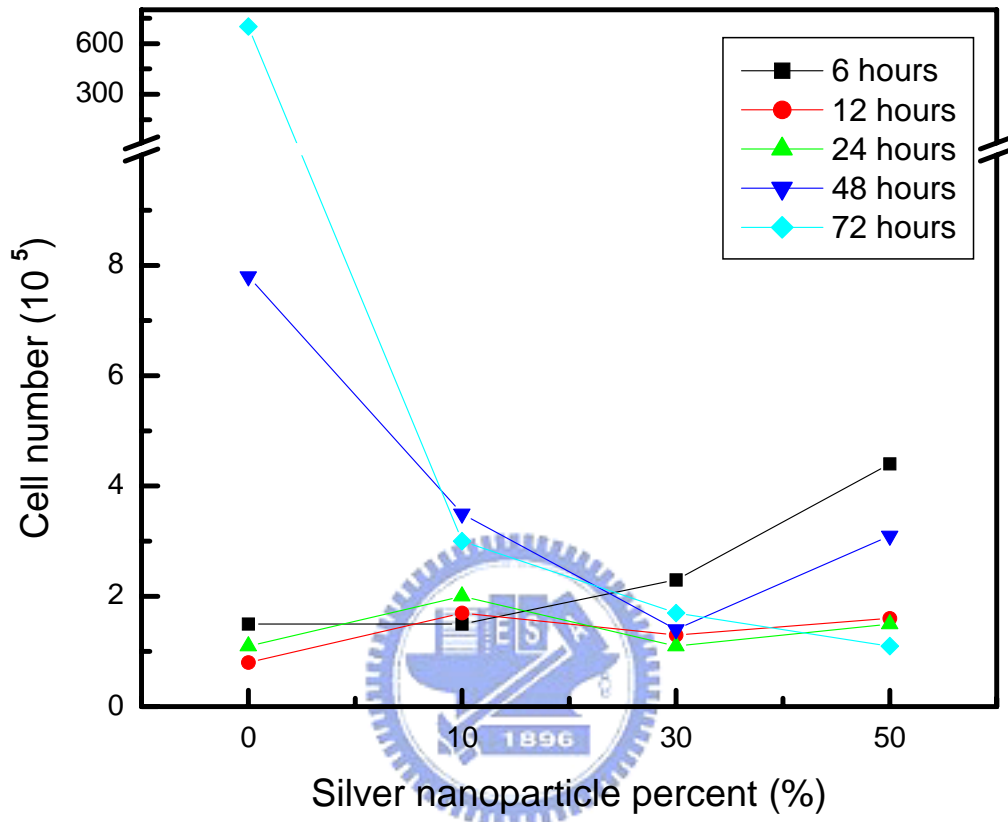


圖 4-15 銀奈米顆粒混合 NIH3T3 在不同濃度、時間的分布情形

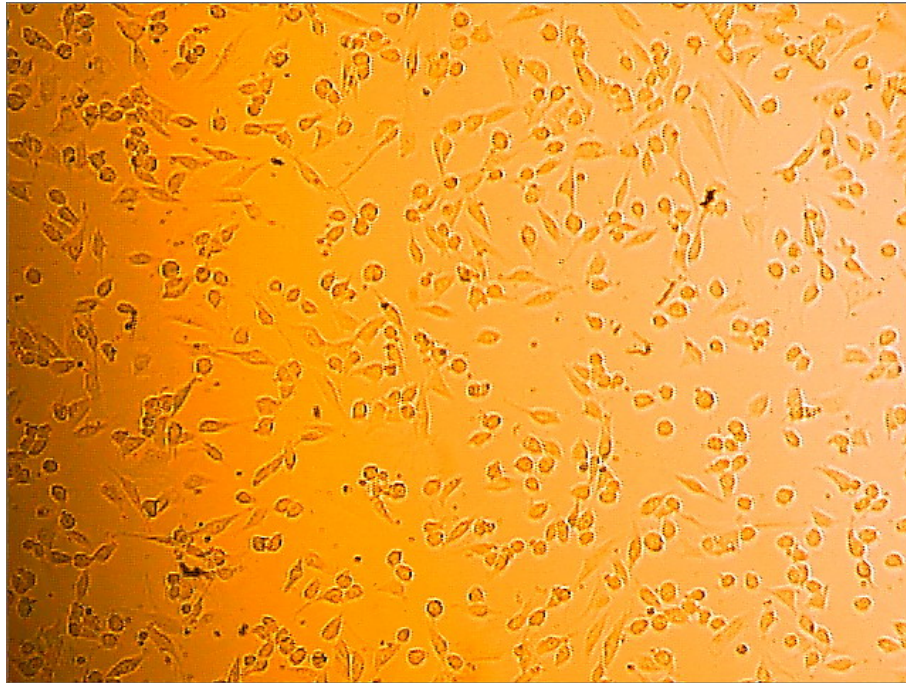


圖 4-16 經 12 小時培養皿上的細胞 OM 之觀察



圖 4-17 經 24 小時培養皿上的細胞 OM 之觀察



圖 4-18 經 12 小時鈦基材上細胞 OM 之觀察

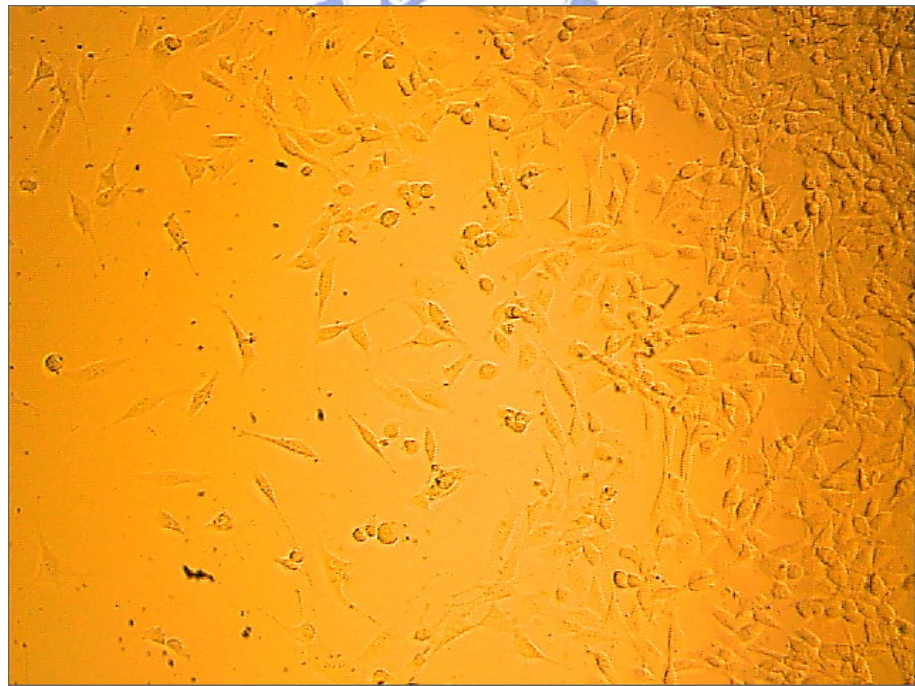


圖 4-19 經 24 小時鈦基材上細胞 OM 之觀察

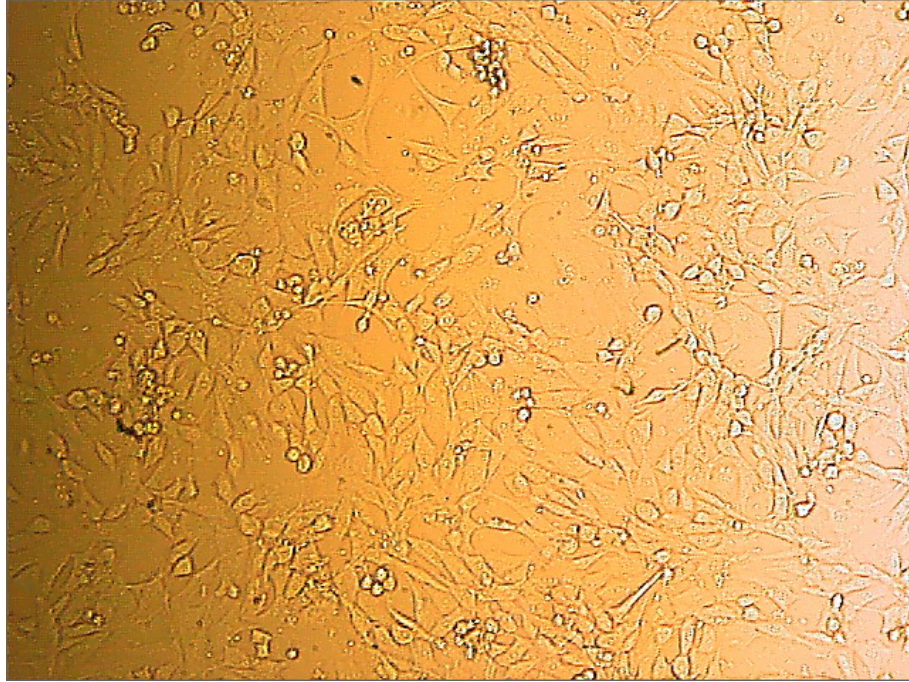


圖 4-20 經 12 小時 CNTs/Ti 基材上細胞 OM 之觀察

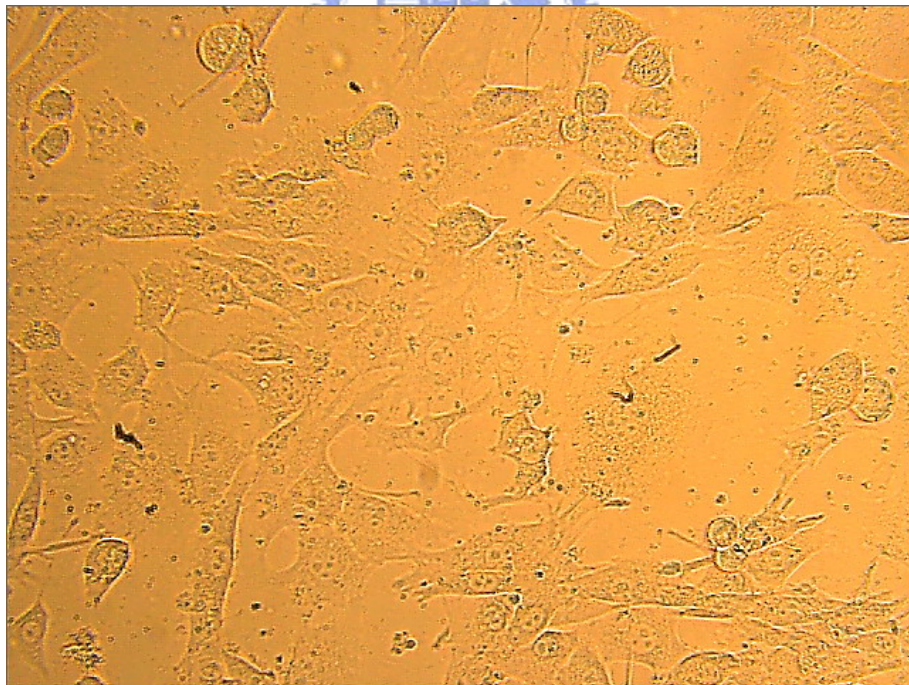


圖 4-21 經 24 小時 CNTs/Ti 基材上細胞 OM 之觀察

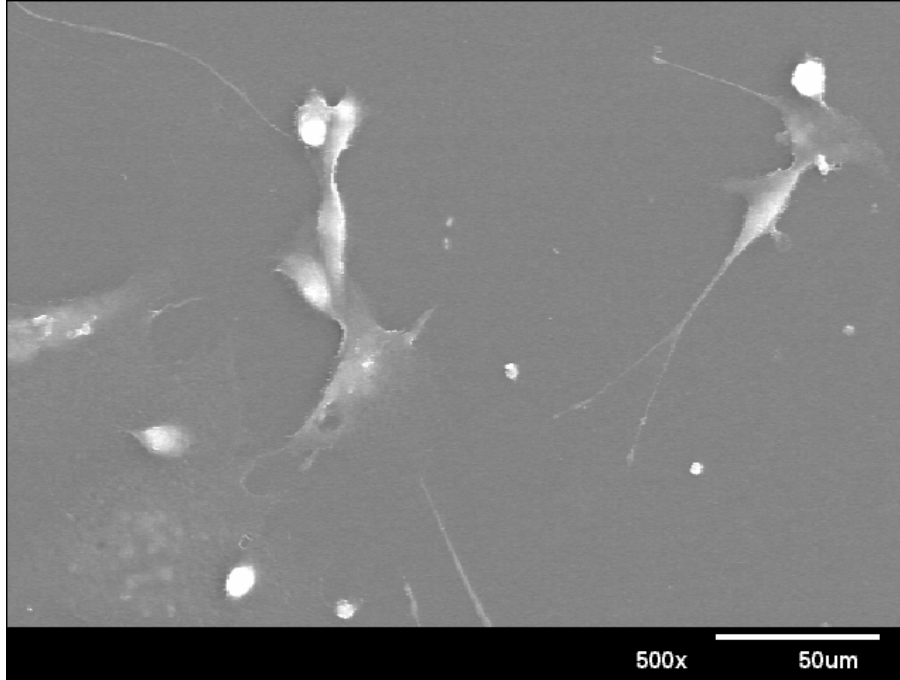


圖 4-22 經 12 小時培養皿上的細胞 SEM 之觀察

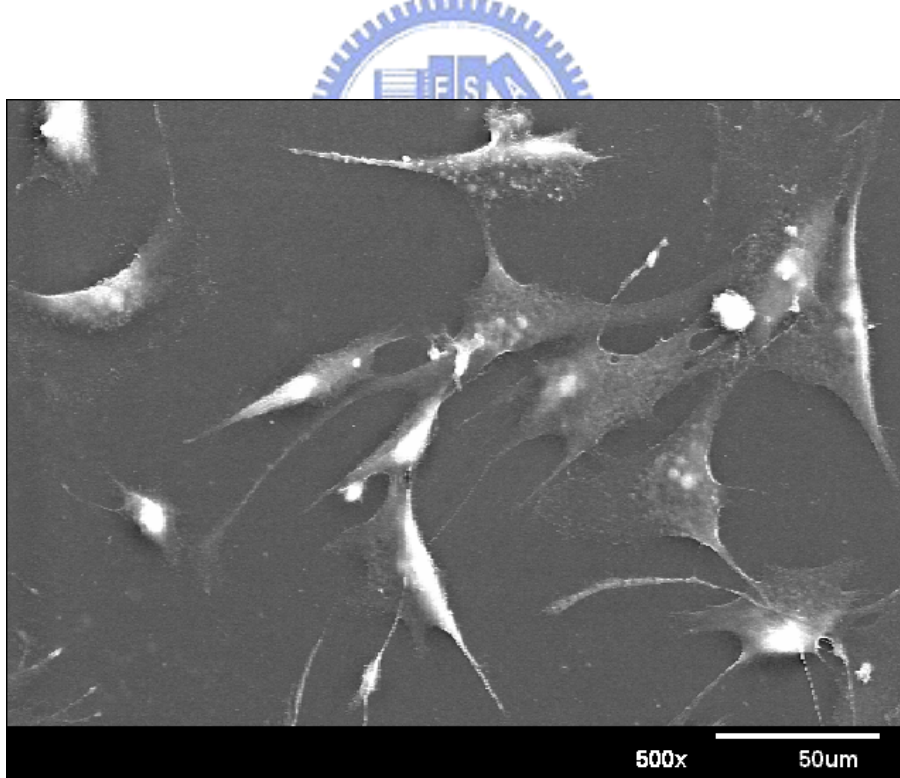


圖 4-23 經 24 小時培養皿上的細胞 SEM 之觀察

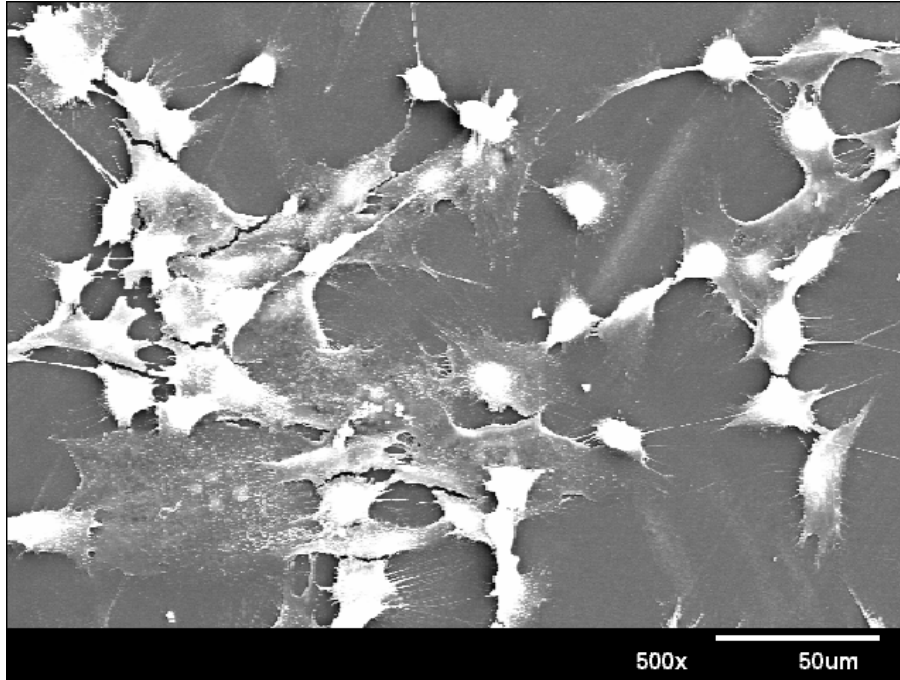


圖 4-24 經 12 小時鈦基材上細胞 SEM 之觀察

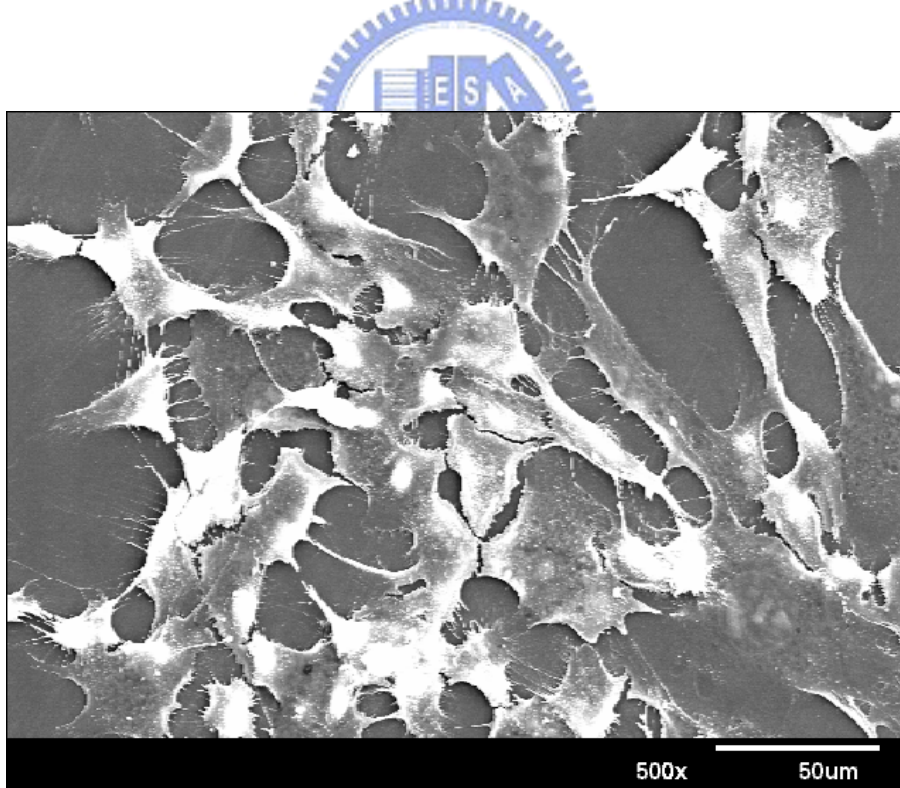


圖 4-25 經 24 小時鈦基材上細胞 SEM 之觀察

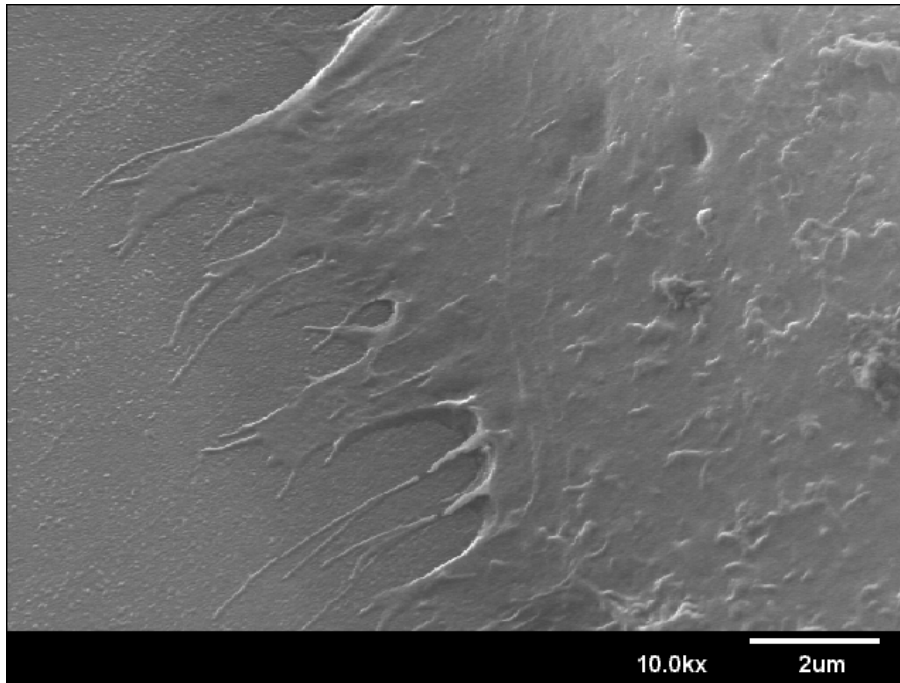


圖 4-26 經 12 小時 CNTs/Ti 基材上細胞 SEM 之觀察

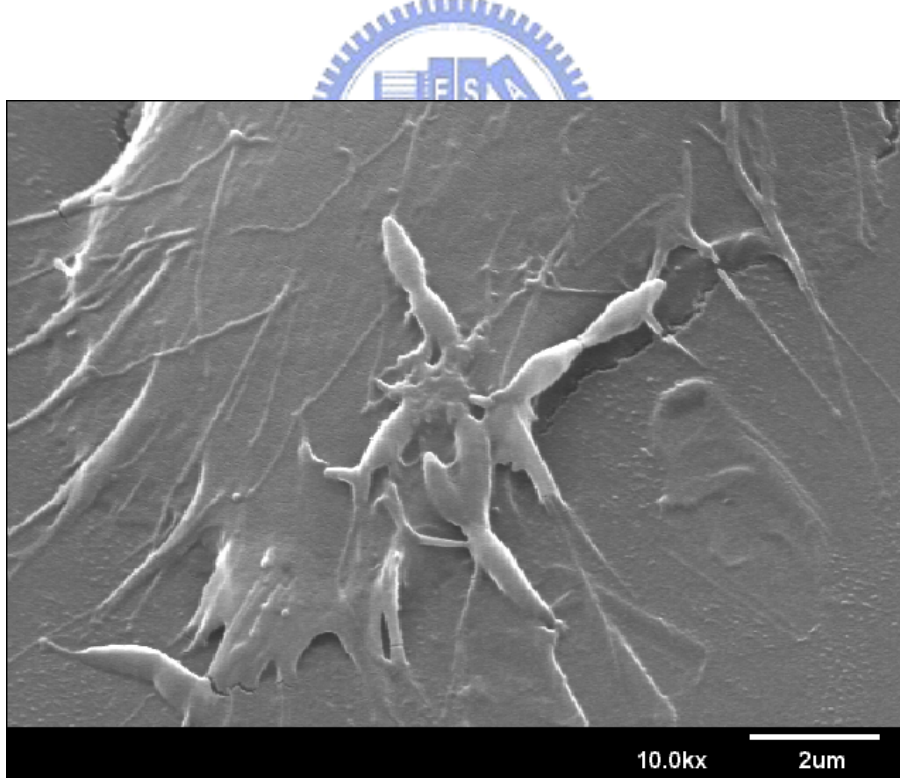


圖4-27 經24小時CNTs/Ti基材上細胞SEM之觀察

表 4-1 銀奈米顆粒不同濃度在 6~72 小時的纖維母細胞培養

Samples		研究銀奈米顆粒不同濃度的生存能力在不同時間的 NIH3T3 (15,000 Cells/well) 培養				
銀奈米顆粒 (%)	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr	
0	1.5±0.075	0.8±0.04	1.1±0.055	7.8±0.39	700±35	
10	1.5±0.075	1.7±0.085	2±0.01	3.6±0.18	3±0.015	
30	2.3±0.115	1.3±0.065	1.1±0.055	1.4±0.07	1.7±0.085	
50	4.4±0.22	1.6±0.08	1.5±0.075	3.1±0.155	1.1±0.055	



第五章 結論與未來展望

5.1 結論

1. 奈米碳管的添加下，部分阻礙細胞增量，顯示其具有影響力，但仍需日後研究佐證。
2. 在實驗中銀奈米顆粒添加溶液接觸纖維母細胞的表面，當奈米顆粒濃度介於10%至30%之間，微量的毒物對於循環細胞的影響也會導致NIH3T3總數減少。
3. 表面粗糙度會影響細胞在基材上貼附情況，在光滑表面上(培養皿及鈦基材)上，細胞從初期漸漸貼附於基材上；而在粗糙表面(奈米碳管/鈦片基材)上，細胞則從假足絲至整個貼附於基材上。由此可知，表面的粗糙度會影響細胞的附著、延展情況。
4. 鈦片基材具備不錯的生物相容性，能提供細胞貼附與攤平延展的環境，但經過奈米碳管/鈦片基材更能提升細胞貼附與攤平延展的能力。由細胞培養之結果顯示，纖維母細胞加入CNTs之生物適應性較鈦金屬佳，生長速度較快，故可知CNTs不具生物毒性，可以應用於生物醫學材料。
5. 由SEM結果發現，纖維母細胞經培養觀察，可以24小時貼附在所有基材表面，攤平延展以奈米碳管/鈦片基材最佳，其細胞呈現放射狀攤開成長，鈦片基材、培養皿表面次之。

5.2 未來展望

1. 未來在奈米碳管的特性方面，利用空間結構設計，讓細胞呈現攤開成長，以觀察成長奈米碳管的助益。
2. 合成不同粒徑銀奈米粒子，未來可以運用不同溶劑，或添加介面活性劑來合成銀奈米粒子，甚至是其他金屬奈米粒子，並將其運用於整合物理、化學、生物、機械、半導體以做更有效的應用與發展。
3. 針對試片（表面粗糙度、濕潤性等）與纖維細胞黏附間關係進行討論，試著找出影響細胞黏附的主要因素。
4. 探討骨母細胞在不同基材上黏附力的表現情況，以利於將奈米材料導入生物力學之領域。
5. 以旋轉式生物反應器與超音波刺激系統進行培養，利用生化分析方法測試細胞生長個數與基質含量。



參考文獻

1. T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. B. Na, "Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process", *J. Am. Chem. Soc.* 123, pp.12798-12801(2001).
2. Y. Zhang, Nathan W. Franklin, Robert J. Chen, Hongjie Dai, "Metal coating on suspended carbon nanotubes and its implication to metal-tube interaction", *Chem. Phys. Lett.* 331, pp.35-41(2000).
3. Gleiter, H., "Nanocrystalline materials", *Progress in Materials Science*, vol. 33, pp 223-315, (1989)
4. J. Rockenberger, E.C. Scher, A. P. Alivisatos, "A New Nonhydrolytic Single-Precursor Approach to Surfactant-Capped Nanocrystals of Transition Metal Oxides" *J. Am. Chem. Soc.* 121, pp 11595-11596(1999).
5. Iio, K., Minoura, N., Aiba, S., Nagura M., and Kodama, M., "Cell Growth on Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel Membranes Containing Biguanidogroups," *J. Biomed.Mater. Res*, Vol. 28, No. 459, 1994.
6. 陳麗婷、華傑著，"動物細胞產業應用前景評估"，民國 92 年
7. Harrison, R. G., "Observations on the Living Developing Nerver Fiber," *Proc. Soc. Biol., Med.* 4, pp.140-143, 1907.
8. Carrel, A., "On the Permanent Life of Tissues Outside the Organism," *J. Exp., Med.* 15, pp.516-528, 1912.
9. 翟中和, "細胞分子生物學", 九州圖書文物有限公司 2001。
10. 王斐譯, "醫學細胞分子生物學", 合記圖書出版社 2001.
11. Harrison, R., "The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphogenetic study," *Anat Rec*, Vol. 6, pp.181—193, 1912.

12. A.K. Harris, P. Wild, D. Stopak “Silicone rubber substrata: A New Wrinkle in the Study of Cell Locomotion”, *Science*, Vol.208, pp177-179,1980
13. T. Oliver, J. Lee, K. Jacobson “Forces exerted by locomoting cells”, *Seminars in Cell Biology*, Vol.5, pp139-147, 1994
14. L. Ponsoonnet, V. Comte, A. Othmane, C. Lagneau, M. Charbonnier, M. Lissac, and N. Jaffrezic, “Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel-titanium substrates,” *Materials Science and Engineering*, Vol. 21, pp. 157-165, 2002.
15. C. Miller, H. Shanks, Witt, Rutkowski, “Oriented Schwann cell growth on micro patterned biodegradable polymer substrates” *Biomaterials*, Issue11, pp1263-1269, 2001
16. Bruchez, M. Jr., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A. P. *Science* 1998
17. N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S.A. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, B. Geiger “Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates” *Nature Cell Biology*, Vol.3, pp466-472,2001
18. C. Wirth, V. Comte, C. Lagneau, P. Exbrayat, M. Lissac, N. J. Renault, and L. Ponsoonnet, “Nitinol surface roughness modulates in vitro cell response: a Comparison between fibroblasts and osteoblasts,” *Materials Science and Engineering*, Vol. 25, pp.51-60, 2005.
19. P. L. Bataillon, F. Monchau, M. Bigerelle, and H. F. Hildebrand, “In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates,” *Biomolecular Engineering*, Vol. 19, pp.133-141, 2002.
20. R. Lange, F. Luthen, U. Beck, J. Rychly, A. Baumann, B. Nebe, “Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material,” *Biomolecular Engineering*, Vol. 19, pp.255-261, 2002.

21. T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios, "Specific proteins mediate enhanced osteoblasts adhesion on nanophase ceramics," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 51, pp. 475-483, 2000.
22. 莊萬發, "超微粒子理論應用", 復漢出版社, 民國84年
23. 蘇品書, "超微粒子材料技術", 復漢出版社, 民國78年
24. G. A. Ozin, *Adv. Mater.*, 4, 612(1992).
25. C. Hayashi, *Phys. Today*, 40, 44(1987).
26. M.P.Faraday, *Trnsa. R. Soc. London*, 1857, pp 147,145
27. Beischer, D., and Krause, F., *Z. angew. Chem.*, 1938 51,331
28. John Tukicevich, Jame Hiller, Princeton, *V. J. Anal. Chem.* 1949, pp 21, 475
29. Horisberger M, Rosset J, Bauer H. *Experientia*. 1975, 31, pp 1147-1149.
30. 鄭育玲, "合成奈米銀粒子及其在多孔二氧化鈦上特性之研究", 中原大學化學研究所, 民國 93 年
31. 劉陵崗, "實用奈米技術", 新文京, 民國 94 年
32. 劉陵崗等著, "實用奈米技術/Practical Nanotechnology", 台北市/新文京/2005
33. 任鏘瑜, "奈米金屬微粒之製備及其性質研究", 清華大學化工所碩士論文民國 88 年
34. 劉仲明, "奈米科技的發展與挑戰", 2001 材料奈米技術專刊, 1 (2001) .
35. L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezia, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, and C. Martelet, "Relationship between surface properties(roughness, wettability) of Titanium and titanium alloys and cell behaviour," *Materials Science and Engineering*, Vol. 23, pp. 551-560, 2003.
36. O. Zinger, K. Anselme, A. Denzer, P. Habersetzer, M. Wieland, J. Jeanfils, P. Hardouin, and D. Landolt, "Time-independent morphology and adhesion of osteoblastic cells titanium model surfaces featuring scale-resolved topography," *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 2695-2711, 2004.

37. F. Luthen, R. Lange, P. Becker, J. Rychly, U. Beck, and J. G. B. Nebe, "The influence of surface roughness of titanium on β 1- and β 3-integrin adhesion and the organization fibronectin in human osteoblastic cells," *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 2423-2440, 2005.
38. Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigal W, Breme J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblast. *Biomaterials* 1996 ; 17 : pp1399-1403.
39. E. Merian, "Metalle in der Umwelt: Verteilung, Analytik und biologische Relevanz," Verlag Chemie, Weinheim.
40. I. G. Macara, "Vanadium, an element in search of a role," *Trends Biochem. Sci.*, 5, pp 92-95 (1980).
41. J. B. Park, "Biomaterials Science and Engineering", Plenum Press, New York and London, (1985).
42. "Properties of Titanium and Titanium Alloys", 3 P.372-406, in ASM Committee on Titanium and Titanium Alloys, *Metal Hand Book*, 9 th eds., (1973).
43. E. P. Lautenschlager and P. Monaghan, "Titanium and Titanium Alloys as Dental Materials", *Internat. Dent.*, 43 pp 245-253 (1993).
44. 蔡信行,孫光中著,“奈米科技導論基本原理及應用” 台北市/新文京/2004
45. 莊萬發,“超微粒子理論應用”,復漢出版社,民國84年
46. C. Hayashi, *Phys. Today*, 40, 44(1987).
47. 柯清水,“化工化學大辭典”,正文書局有限公司(2000)
48. Bernic M.Martin, "Tissue Culture Techniques An Introduction", (1994)
49. Searle, A B 1913 *The British Medical Journal*. 83
50. Becker, Robert O, M D, Spardaro, Joseph A. 1978 *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **60(A)** pp 871-881
51. Z .Schwartz and B. D. Boyan, "Underlying Mechanisms at the Bone-Biomaterial

Interface” , Journal of Cellular Biochemistry, 56, pp.340-347 (1994)

52. M. A. Malik, D. A. Puleo, R. Bizios and R. H. Doremus, “Osteoblasts on hydroxyapatite alumina and bone surfaces in vitro : morphology during the first 2h of attachment”., Biomaterials,13, pp 123-128 (1992)

