

CBD-RGD 胜肽應用於組織修復材料： 二、於數種材料上對不同細胞貼附性之影響並與電漿改質 效果比較

褚文平¹ 徐善慧² 陳震漢³ 張素華¹ 林修正⁴

關鍵詞：含 RGD 胜肽(或蛋白質)、integrin 受體。

摘 要

本研究是利用一種由基因工程製造含 RGD (arginine-glycine-aspartate)之蛋白質(名 CBD-RGD)對生醫材料表面進行改質。之前，我們曾將此含 RGD 蛋白質使用於聚胺基甲酸酯(polyurethane, PU)上，測試其對胞貼附生長之影響，以及是否改變原材料之血液相容性，並且找出 CBD-RGD 在聚胺基甲酸酯上的最適使用狀況；至於本篇研究之重點在找出此含 RGD 之蛋白質於不同材料上對不同細胞株(cell line)或母體細胞(primary cell)貼附生長之影響，並與電漿表面改質法比較。本實驗利用體外細胞培養測試來評估 CBD-RGD 在材料表面是否發揮促進細胞貼附之功能，數據結果顯示，CBD-RGD 促進細胞貼附之效果，會隨不同生醫材料之表面性質而有差異，可能是因為 CBD-RGD 在每種材料上的吸附力不同造成，此外，此 RGD 蛋白質促進不同細胞於同一種材料上之貼附效果並不同，可能因為細胞表面之 integrin 受體多寡之差異所致而不同。最後，我們並發現 RGD 蛋白質對促進母體細胞在材料上的貼附效果更為顯著，且整體優於電漿改質，故在未來組織工程之研究上極具潛力。

APPLICATION OF THE CBD-RGD PEPTIDE IN BIOMATERIALS FOR TISSUE REPAIR II. CELL ADHESION ONTO DIFFERENT MATERIALS COATED WITH CBD-RGD AND THE COMPARISON WITH PLASMA TREATMENT

Wen-Ping Chu¹ Shan-hui Hsu² David Chanhen Chen³
Su-Hua Chang¹ Andrew Lin⁴

^{1,2}Department of Chemical Engineering

³Graduate Institute of Veterinary Microbiology

National Chung-Hsing University Taichung, Taiwan 402, R.O.C.

⁴Energy & Resources Laboratories,

Industrial Technology Research Institute,

Hsinchu, TAIWAN 300, R.O.C.

Key Words: RGD-containing peptides (proteins), integrin receptor.

National Chung Hsing University

¹ 國立中興大學化學工程學系專題生

² 國立中興大學化學工程學系教授

³ 國立中興大學獸醫微生物學研究所副教授

⁴ 工業技術研究院能源與資源研究所研究員

Abstract

In this study, a recombinant RGD-containing protein, CBD-RGD, was applied to modify the surface of biomaterials. Previously, this protein has been applied to polyurethanes and its effect on cellular adhesion and growth, as well as blood compatibility, was evaluated. The optimum conditions for application were established. The focus of the current study was to find out the effect of RGD containing protein on adhesion of different cell lines or primary cells onto different materials, and to compare it with that of plasma treatment. *In vitro* cell culture test was used. The results showed that the effect of CBD-RGD was different for each material, probably due to the unique adsorption characteristics. The effect was also distinct for each cell line or primary cell, due to the difference in numbers of integrin receptors. Finally, we found CBD-RGD was especially efficient in promoting the attachment of primary cells, and its overall effect was generally higher than that of plasma treatment. Therefore, CBD-RGD could be potential in tissue engineering related applications.

一、前言

在組織工程(tissue engineering)的研究中,對理想組織修復材料(tissue repair materials)的要求,除了具有優良的生物相容性之外,更希望能引導細胞貼附、生長和加速組織的癒合。一般生物合成的高分子材料雖具有良好的機械性質,但較不利細胞的貼附生長,因此常用表面改質法改善誘導細胞貼附之性質。

RGD 序列是細胞貼壁因子 fibronectin 中促進細胞貼壁的最小功能單位。在體內,它可以受到細胞表面 integrin receptor 的辨識結合後發動細胞內化學訊息的傳遞,令細胞發生細胞架構的重組,使細胞產生型態及生理上的改變,細胞因而吸附於胞外間質上[1-5]。已有廠商利用基因工程生產含 RGD 胜肽[6],其用途之一即是用在組織修復材料上,利用 RGD 胜肽的引入,促進細胞的貼附。

心臟血管材料常需具抗血栓特性,而許多人工合成的低分子量 RGD[7]也被證實具有這樣的作用[8],同理猜測,基因工程製造[9]的較高分子量 RGD 蛋白質可能也會有抑制血小板凝集的作用。而本實驗室所使用由基因工程製造含 RGD 之蛋白質對附著與抑制血小板的雙重影響,在心臟血管生醫材料上應頗具潛力。

本實驗所用之 CBD-RGD (cellulose binding domain-RGD)為一種由基因工程製造之含 RGD 序列之蛋白質,一開始乃是設計吸附於纖維素材料上,其目的在將懸浮培養所使用的纖維素做表面改質,以改進其細胞貼附性質[10,11]。本研究則主要是探討是否可利用 CBD-RGD 對聚胺基甲酸酯(polyurethane,

PU)、聚乳酸(poly-L-lactide, PLLA)或聚乳酸-聚甘醇酸的共聚物(poly-D,L-lactide-co-glycolide, PLGA)進行表面改質,這些材料之中有的本身都已具有不錯之性質[12],但是仍想更進一步利用 CBD-RGD 表面改質看是否可提高其細胞貼附或伸展之特性。同時,本篇的後半部將比較其與電漿改質[13,14]在提高細胞相容性上成效之差異。

二、實驗部分

2.1 材料的製備與改質

本實驗所用的 PU,為美國 Upjohn 公司生產的商品 Pellethane® 2363-80A, PLLA 是由日本 Shimadzu 所生產,分子量約 19 萬, PLGA 則為美國 Sigma 公司所生產,分子量約 8 萬, THF (tetrahydrofuran)為美國 Tedia 公司生產, chloroform 也是美國 Tedia 公司生產,兩者皆是 HPLC 級。

製備 PU 薄膜[15],首先取含有 3wt.%PU 的 THF 溶液,利用玻璃滴管緩慢滴落溶液於 15mm 玻璃蓋玻片上並使其均勻分佈,然後將其放入 50°C 的烘箱中烘乾 8 小時,待溶劑揮發之後,於 50°C 的烘箱中再進行真空抽氣 8 小時,去除殘留之有機溶劑。以類似方法製備 PLLA 和 PLGA 薄膜[16]。

研究中所用之 CBD-RGD 是利用 PCR (polymerase chain reaction)的方式修改了 *Trichoderma koningii* 的 CBD 的基因,結果表現出一段含有對纖維素有親合力且同時具有促進細胞貼壁的融合蛋白質[10,11],此蛋白質中僅具一個 RGD 序列,其分子量約為 13KDa。在改質時材料首先進行滅菌,然後在表面上塗佈 CBD-RGD。塗佈前先將冷藏於-20°C 的 RGD 置於常

二、於數種材料上對不同細胞貼附性之影響並與電漿改質效果比較

溫下退冰，視實驗而定將 RGD 用 0.22 μ m 醋酸纖維素(cellulose acetate, CA)濾膜過濾，取此 RGD(濃度：0.1~0.2 mg/ml)20 μ l，將其均勻塗佈於材料上，然後靜置 30 分鐘即可使用[17-18]。

至於電漿改質的 PU 薄膜，則是利用電漿處理後之基材與空氣或氧氣接觸而使其表面產生過氧化基[19]；如此便能產生親水性的表面，進而促進細胞的貼附。本實驗所使用之電漿產生器頻率為 13.56MHz，型號 PE-1000，為德國 Advanced Energy 公司所生產；其餘部份為工研院能資所自行設計與組裝完成。以氬氣電漿(argon plasma)處理參數[20]：電漿功率 60W、氬氣壓力保持於 20mtorr，且處理四種不同時間 30、60、120、180 sec。

2.2 細胞之繼代培養

實驗所用培養基粉末 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)為以色列 Biological Industries 公司生產；Ham's F12 nutrient mixture 為美國 Gibco BRL 所生產；M199 (Medium 199)亦為美國 Gibco BRL 所生產。緩衝溶液 PBS (phosphate-buffered saline)，由 1000ml 的二次去離子水，加入 9 克 NaCl、0.795 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 0.144 克 KH_2PO_4 配製而成，其中所含三種藥品皆由美國 Sigma 公司生產。細胞培養基 DMEM 與 M199 的組成皆為以二次去離子水為溶劑的 DMEM 溶液和 M199 溶液，兩者皆含 10%胎牛血清 FBS (fetal bovine serum)與 1%抗生素 PSA (Penicillin-streptomycin-Amphotericin)；細胞培養基 F12 的組成也是以二次去離子水為溶劑的 F12 溶液，內含 10%胎牛血清和 1%抗生素，還有 200mg Gentamycin 及 100 μ g Fungizone[®]。實驗所用之細胞有 ATCC 之纖維母細胞 (NCTC clone 929；簡稱 FB)、牛腎上皮細胞(Madin-Darby bovine kidney；簡稱 MDBK)、內皮細胞(ECV304 endothelial cells；簡稱 EC)、軟骨細胞株(immortalized rat chondrocytes；簡稱 IRC)四種細胞株，及兔子軟骨細胞(rat chondrocytes；簡稱 RC)，老鼠頭蓋骨骨母細胞(osetoblast；簡稱 OB)兩種母體細胞。細胞培養於 T 型容器(T-flask)，並以 Nikon(日本)TE-300 倒立式光學顯微鏡觀察細胞的生長情況。

2.3 母體細胞之取得

RC 之取得，首先是取 3~4 個月的成兔以適量之麻醉劑使其死亡，將其四肢切取後用刀片將關節軟骨切碎取下，先以 HBSS 溶液清洗，接著依序加入 hyaluronidase、trypsin 與 collagenase 反應，最後將溶液離心即可取得 RC 之懸浮液；而 OB 之取得則是取

新生一、二天的 Wistar 老鼠，打入麻醉劑使其死亡，接著取得其頭蓋骨並以 PBS-EDTA 溶液清洗，將頭蓋骨剪碎之後加入 collagenase 反應兩小時，最後取得溶液離心即可得 OB 之懸浮液。

2.4 細胞貼附生長測試

將改質或未改質之材料分別置入含 24 個培養孔(24-well)的組織細胞培養盤(tissue culture plate)孔的底部，並以一個只有玻璃蓋玻片的作為對照組(control)。用 trypsin 將細胞由原先培養的 T 型容器(T-flask)上打下來，以高速離心機分離出細胞，再加入新的培養基，配製成起始細胞密度為 5×10^4 cells/ml 的細胞懸浮液(suspension)。接著，於每個培養孔中，各注入 1ml 細胞懸浮液，再將整個細胞培養盤置於 5%二氧化碳(CO_2)與 95%空氣的細胞培養箱(incubator)中，在 37 $^\circ\text{C}$ 下進行培養；經過 1、3、6、12、24 及 48 小時後，利用顯微鏡於不同位置觀察拍照，並計算約 70 個細胞中已伸展的百分比。然後將培養孔內溶液以吸量管吸乾，分別以 1ml PBS 溶液沖洗，之後加入 0.3ml trypsin 溶液作用 5 分鐘，使附著在材料表面的細胞完全脫落，再加入 0.3ml medium，以中和 trypsin 的作用。最後，用血球計數器(hemocytometer)配合倒立式顯微鏡，計算細胞個數。實驗數據以 Student's *t*-test 來進行統計學顯著性之分析。

三、實驗結果

3.1 細胞株於玻片上的基礎測試

首先使用 CBD-RGD 於玻片做細胞貼附測試，比較 FB、MDBK、EC、IRC 對 RGD 改質玻片的貼附情形，由實驗結果(如圖一、圖二所示)可看出經過 RGD 處理的玻片表面細胞貼附數量不管在 3 或 48 小時都比未處理的玻片多，大約較未處理的玻片增加了 10-30%的細胞數量，且每種細胞之間此增加細胞貼附效果的差異並不大。

3.2 使用細胞株於 PU 材料上的貼附測試

在 PU 材料上使用 RGD 的效果(如圖三、圖四所示)，於 3 小時的實驗中 FB 與 EC 在經 RGD 改質的 PU 材料上皆有非常顯著促進細胞貼附的效果，細胞貼附量大約是未改質者的 4-5 倍，由圖五可看出 EC 在經過 RGD 改質表面上貼附量較多，且細胞在 RGD 改質表面上伸展比例也較高(見表一)，MDBK 與 IRC 細胞在 RGD 改質的 PU 材料表面的貼附量也較未處理前多，但效果沒有 FB 及 EC 兩種細胞顯著。在 24 小時後，各細胞之間 RGD 效果的差異縮小，不像在前述

3 小時差異如此大。我們猜測這是因為 RGD 的功能主要是在短時間內讓細胞貼附，而時間一久，未貼附的細胞藉重力作用最後仍會到達表面進行貼附，因此 RGD 在長時間的效果也會變得不明顯，故在 24 小時彼此之間的差異就會縮小。

如前述於 PU 材料上使用過各種細胞株做測試後，發現 RGD 均有促進細胞於材料上貼附的效果，由此可知 CBD-RGD 會吸附於 PU 材料上，因為 RGD 若未吸附於材料上，則會發生抑制的效果[21]。

3.3 母體細胞於 PU 材料上的貼附測試

為測試 RGD 對母體細胞的效果是否更為顯著，此處用兔子的軟骨細胞(RC)以及小老鼠頭蓋骨的骨母細胞(OB)來作測試，實驗發現 RGD 對此兩種細胞亦有效果(如圖六、圖七所示)，就兩種細胞而言，RGD 用於 OB 的效果顯著於 RC，因此大概可推論 OB 細胞表面與此種 RGD 作用的特定的 integrin receptor 多於 RC。由表二亦可看出，RGD 對母體細胞(即 RC 與 OB)的效果會好於對細胞株的效果。

3.4 細胞株於 PLLA 和 PLGA 材料上的貼附測試

做完 RGD 對各種細胞於 PU 材料上貼附之實驗後，接著對於不同類型的 PLLA 及 PLGA 材料上 RGD 的效果，由圖八、圖九發現 RGD 用於 PLLA 材料上對 FB 仍有促進貼附的效果；在圖十、圖十一中也可發現對 IRC 有促進貼附的效果但不若在 PU 材料上顯著，且若用在 PLGA 材料上則不但沒有促進，反而會有抑制的效果，由此推論，CBD-RGD 無法完全吸附於 PLGA 材料上，懸浮於溶液中的 RGD 會對細胞的 integrin receptor 造成競爭結合，而使細胞較不易貼附於材料，故造成了抑制的效果。由此可見材料之表面性質不同(見表三)，蛋白質的吸附及其在表面上的滯留時間也會因之改變，進而影響到 RGD 的效率。

3.5 母體細胞於 PLLA 和 PLGA 材料上的貼附測試

另外，在使用母體細胞時(圖十二、圖十三)發現 CBD-RGD 不管於 PLLA 或 PLGA 材料上其效果皆被抑制，因此可推論 CBD-RGD 確實無法吸附於 PLGA 材料上，而吸附於 PLLA 材料上的量也有限，對於較不易貼附的母體細胞，亦造成了抑制貼附的作用。由細胞株與母體細胞的實驗結果可斷定 CBD-RGD 於此兩種材料上的吸附情況皆比 PU 材料上為差。因此要在此二類生醫材料中使用 CBD-RGD，必須利用其它方法，改善含 RGD 蛋白質與材料上的吸附或鍵結情形。

3.6 CBD-RGD 與電漿改質法之比較

實驗發現在經電漿處理 30~120 秒的 PU 材料上生長的情形改善最佳，但不同處理時間對於細胞貼附增進的效果並無統計學上的差異，因此我們選擇以電漿處理 60 秒為標準。由表四可觀察到纖維母細胞於電漿改質過的 PU 材料上細胞貼附量增加約 30%，表皮細胞則增加約 90%，而內皮細胞也增加約 80%。

由表五可得知，PU 材料經電漿改質後，促進細胞貼附生長程度最佳是在一週內，當材料保存超過兩個月後改善程度便會下降。此乃因為非聚合電漿表面改質法改質後的性質常會隨時間而變[22-24]。

四、討論

實驗之初先選擇玻片做細胞貼附測試的材料，是因為蛋白質一般會吸附於玻片之表面[25]，於細胞貼附測試之結果確實加了 CBD-RGD 之材料細胞貼附量會增加，因此我們可以確定 CBD-RGD 會吸附於玻片上；同時，我們也發現 RGD 對於 FB、MDBK、EC 和 IRC 四種細胞株皆有效果，由此可以推論這些細胞株都有可以與 CBD-RGD 結合的 integrin receptor，而這些結果也可以拿來當作於在其它生醫高分子材料表面上測試 RGD 效果實驗的基礎。由於玻片本身的性質就很容易讓細胞貼附生長，故 RGD 用於玻片上的效果就不顯著。當測試之材料換成 PU 材料後，因為此種細胞在此種材料上的貼附性質沒有玻片佳，所以 RGD 對細胞貼附測試的促進效果就變得較顯著。而不同細胞間效果差異也會變得較明顯，由實驗結果發現在 3 小時實驗中 FB 與 EC 的效果遠好於其它細胞，其主要原因可能就在於不同細胞表面的 integrin receptor 數量上的差異。CBD-RGD 於 PU 材料上的吸附應該是屬於非特定性吸附，但是其真正吸附的機制可能需要再做一些其它的分析才可以判斷。但是由結果不難看出，CBD-RGD 確實有吸附於 PU 材料上，且能在注入細胞懸浮液後及細胞貼附前仍維持在表面上。

另一方面，由 CBD-RGD 使用於 PLLA、PLGA 材料的結果，可以看出 CBD-RGD 並未完全吸附於材料上，結果造成經 RGD 處理過的材料不管是細胞株或母體細胞，其細胞貼附量都反而有減低的趨勢。由此可看出 CBD-RGD 並非可直接用塗佈的方法來使其吸附於任何材料上，因為材料表面性質的差異將會影響到蛋白質的物理吸附及其在表面上的滯留時間，進

二、於數種材料上對不同細胞貼附性之影響並與電漿改質效果比較

而影響此 RGD 蛋白質對細胞貼附的影響。

母體細胞在懸浮液中的存活時間較短，若無法迅速貼附，則會死亡，因此 RGD 效果在母體細胞貼附實驗中應會較顯著。而本實驗所用到的母體細胞有兔子的軟骨細胞(RC)以及小老鼠頭蓋骨的骨母細胞(OB)，經由實驗發現 CBD-RGD 對此兩種細胞亦有效果，就此兩種細胞而言，RGD 用於 OB 的效果顯著於 RC，因此大概可推論 OB 細胞表面的 integrin receptor 多於 RC。不過因為不同細胞表面的 integrin receptor 多寡會有差異，所以要運用於其它不同細胞時無法直接由單一種細胞去推測不同細胞貼附之結果。

利用電漿處理後之基材與空氣或氧氣接觸其表面會產生過氧化基；如此便能產生較親水的表面(見表三)，進而促進細胞的貼附。但電漿處理時間愈久，PU 材料表面之接觸角的下降幅度減少，此乃因為電漿會使 PU 表面溫度過高而造成蝕刻現象，此處為處理 30 秒時最為親水，而親水能力將影響細胞在 PU 表面的貼附生長狀況。由實驗結果發現在經電漿處理 30~120 秒的 PU 材料上生長的情形改善最佳，而經電漿處理 180 秒的 PU 材料促進細胞貼附效果會最差的。此外由電漿處理產生之過氧化基常會隨著時間的加長而漸漸降解，因而親水性下降，而其使細胞貼附之性質亦降低。基本上電漿改質促進細胞貼附效果在長時間，約 48 小時會較顯著；而由 CBD-RGD 改質則是在短時間，約 3 小時效果就會很顯著。整體上，CBD-RGD 改質優於電漿改質。

除了先前之研究和本研究提及的 CBD-RGD 濃度、CBD-RGD 用量、細胞濃度、細胞種類、材料種類及有無使用血清之外，其實影響 CBD-RGD 的因子尚有很多，例如溶液的離子強度、二價陽離子濃度[26]或是蛋白質構形中 RGD 序列是否裸露於其表面，皆會影響到此含 RGD 蛋白質的效果。之後我們除了會對吸附與促進貼附的機制做更進一步的探討，同時將 CBD-RGD 使用在組織工程產品上，來增進細胞植覆的成功率。

五、謝 誌

本研究承蒙國科會大專生參與專題研究計劃(NSC 89-2815-C-005-043-B)的支持，特此致上謝忱。

六、參考文獻

- Cheresh D. A., "Integrins: structure, function and biological properties", *Adv. Mol. Cell Biol.*, Vol. 6, pp. 225-237 (1993).
- Giancotti F. G. and Ruoslahti E., "Integrin Signaling", *Science*, Vol. 285, pp. 1028-1032 (1999).
- Ruoslahti E. and Pierschbacher M. D., "New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins", *Science*, Vol. 238, pp. 491-497 (1987).
- Yasuda T., Shimizu K., Nakagawa Y., Ishikawa H., Nishihara H. and Nakamura T., "Possible Involvement of RGD (Arg-Gly-Asp)-Containing Extracellular Matrix Proteins in Rat Growth Plate Chondrocyte Differentiation in Culture", *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 11, No. 10, pp. 1430-1437 (1996).
- Ohno S. et al., "RGD-CAP (β ig-h3) Enhances the Spreading of Chondrocytes and Fibroblast Via Integrin $\alpha_1\beta_1$ ", *Biochimica et Biophysica Acta* 1451, pp. 196-205 (1999).
- US Patent pending (No.5514581).
- Penke B., Hajnal R., Lonovics J., Holzinger G., Kadar T., Telegdy G. and River J., "Synthesis of potent heptapeptide analogues of cholecystokinin", *J. Med. Chem.*, 27, pp. 845-849 (1984).
- Torday L., Balogh G. E., Pataricza J., Zarandi J., Papp J. Gy. and Penke B., "Vasorelaxant properties and mechanism of action of some RGD (Arg-Gly-Asp-containing)-peptides", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Vol. 26, LXXXVI, No. 339 (1994).
- Varani J., Inman D. R., Fligel S. E. G. and Hillegas W. J., "Use of recombinant and synthetic peptides as attachment factors for cells on microcarriers. *Cytotechnology*", *Cytotechnology*, Vol. 13, pp. 89-98 (1993).
- 陳韻如，"開發 CBD-RGD 融合蛋白質應用於固定化細胞培養"，中興大學獸醫微生物學研究所碩士論文，台中(1997)。
- TW Patent pending (No.86114 750), US Patent pending (No.09/166,966).
- Lelah M. D. and Copper S.L., "Polyurethane in Medicine", *CRC Press*, Boca Raton, FL, Vol. 99, pp. 57-110 (1993).
- Hoffman A. S., "Biomedical applications of plasma gas discharge processes", *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium*, Vol. 42, pp.

1. Cheresh D. A., "Integrins: structure, function and

- 251-265 (1998).
14. Piskin E., "Plasma processing of biomaterials", *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, Vol. 4, No. 1, pp. 45-60 (1992).
15. Lee P. C. et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 32, No. 1 (1996).
16. 湯正明, "可降解軟骨細胞支架之製備與評估", 中興大學化學工程學研究所碩士論文, 台中 (1999)。
17. 張素華等, "以 CBD-RGD 蛋白質改質與電漿改質對 PU 材料細胞附著與血小板活化影響之比較", 醫學工程科技研討會論文集, 第 447-448 頁(1998)。
18. 褚文平等, "CBD-RGD 胜肽應用於組織修復材料: 一、於聚胺基甲酸酯材料上之使用條件", 興大工程學刊投稿中。
19. Wang C. C. and Hsiue G. H., "*Journal of Polymer Science: Part A*", Vol. 31, pp. 1307-1314 (1993).
20. Eduard A. K., Maria I. I., Kato K., Sano S. and Ikada Y., "*Journal of Polymer Science: Part A*", Vol. 33, pp. 323-330 (1995).
21. Holland J. et al., "Culture of Human Vascular Endothelial Cells on an RGD-Containing Synthetic Peptide Attached to a Starch-Coated Polystyrene Surface: Comparison with Fibronectin-Coated Tissue Grade Polystyrene", *Biomaterials*, Vol. 17, pp. 2147-2156 (1996).
22. Plawky U., Londschiem M. and Michaeli W., "Surface modification of an aramid fibre treated in a low-temperature microwave plasma", *Journal of Materials Science*, Vol. 31, pp. 6043-6053 (1996).
23. Groning P., Collaud M., Dietler G. and Schlaapbach L., "Plasma modification of polymethylmethacrylate and polyethyleneterephthalate surfaces", *Journal of Applied Physics*, Vol. 76, No. 2, pp. 887-892 (1994).
24. Hayat U., n n e M. T., Michael R. C. and David J. C., "ESCA investigation of low-temperature ammonia plasma-treated polyethylene substrate for immobilization of protein", *Biomaterials*, Vol. 13, No. 11, pp. 801-807 (1992).
25. Horbett T. A. and Schway M. B., "Correlations Between Mouse 3T3 Cell Spreading and Serum Fibronectin Adsorption on Glass and HEMA-EMA Copolymers", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 22, pp. 763-793 (1988).
26. Dejun L. and Zhao J., "The structure and biomedical behaviour of ion bombarded and plasma polymerized segmented polyurethane", *Appl. Surf. Sci.*, Vol. 78, pp. 195-200 (1994).

論文收稿日期: 89年7月17日
論文修訂日期: 89年8月18日
論文接受日期: 89年8月25日

二、於數種材料上對不同細胞貼附性之影響並與電漿改質效果比較

表一、RGD 用於 PU 材料上對 EC 於短時間細胞伸展比率之影響

Table 1. The effect of RGD on spreading ratio of endothelial cells adhered to PU.

時間 (hours)	6 小時後 EC 細胞 伸展比率
PU2363	16.7±2.2%
PU2363+RGD	88.1±3.0%

表二、RGD 於 PU 材料上，在三小時的貼附量上，對母體細胞的效果與對細胞株效果比較

Table 2. The effect of RGD on numbers of primary versus cell-line type endothelial cells adhered to PU at 3h.

處理 方式	未經處理的 PU 其上細胞之貼附量 (A) (× 10 ⁴ cells)	經 RGD 處理 PU 其上細胞之貼附量 (B) (× 10 ⁴ cells)	B/A
FB	2.9±0.15	4.1±0.09	1.41
MDBK	4.7±0.63	5.3±0.27	1.13
IRC	2.1±0.23	2.3±0.06	1.09
RC	1.8±0.39	2.1±0.07	1.17
OB	1.5±0.03	3.9±0.03	2.60

表三、不同材料之表面接觸角測試

Table 3. The water contact angle of different materials.

	接觸角
PU 材料	79.0±1.54
PU+Plasma(30sec)	45.5±1.50
PU+Plasma(60sec)	53.3±5.97
PU+Plasma(90sec)	58.2±4.52
PU+Plasma(120sec)	63.8±8.17
PLLA	75.3±1.22
PLGA	70.6±1.56

表四、電漿處理 PU 材料對纖維母細胞、牛腎上皮細胞及內皮細胞三種細胞株於 48 小時之細胞貼附測試

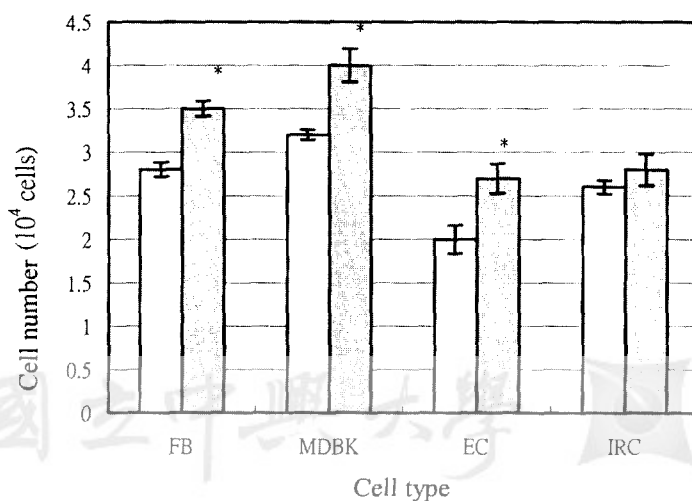
Table 4. The attachment of FB, MDBK, and EC, respectively, onto plasma-treated PU at 48h.

細胞種類 材料處理方式	纖維母細胞 ($\times 10^4$ cells)	牛腎表皮細胞 ($\times 10^4$ cells)	內皮細胞 ($\times 10^4$ cells)
PU 材料	15.0 \pm 2.41	7.4 \pm 0.80	6.1 \pm 0.61
PU+Plasma(60sec)	19.5 \pm 2.38	14.2 \pm 0.10	10.9 \pm 1.00

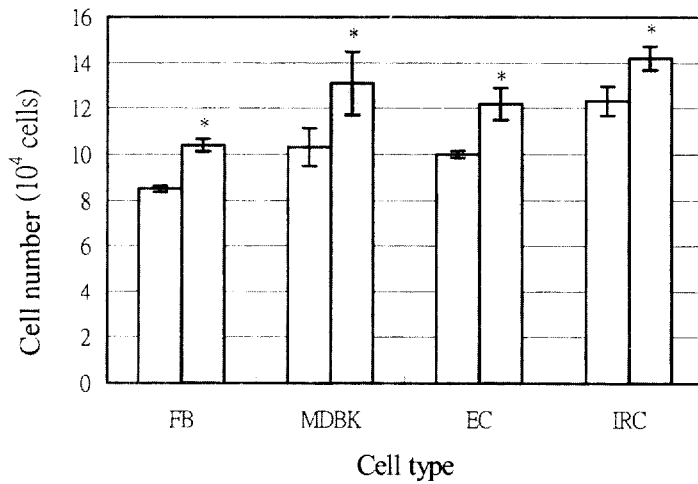
表五、電漿改質程度與放置時間之關係，以下為表皮細胞培養 48 小時後之細胞個數

Table 5. The effect of storage time on cellular affinity of plasma-treated PU, using MDBK adhesion at 48h as an example.

材料放置時間 材料處理方式	一星期後於材料上之細胞貼附量 ($\times 10^4$ cells)	兩個月後於材料上之細胞貼附量 ($\times 10^4$ cells)	三個半月後於材料上之細胞貼附量 ($\times 10^4$ cells)
PU 材料	5.9 \pm 0.21	5.8 \pm 0.43	6.5 \pm 0.77
PU+Plasma(30sec)	11.4 \pm 0.57	10.6 \pm 0.35	9.0 \pm 0.25

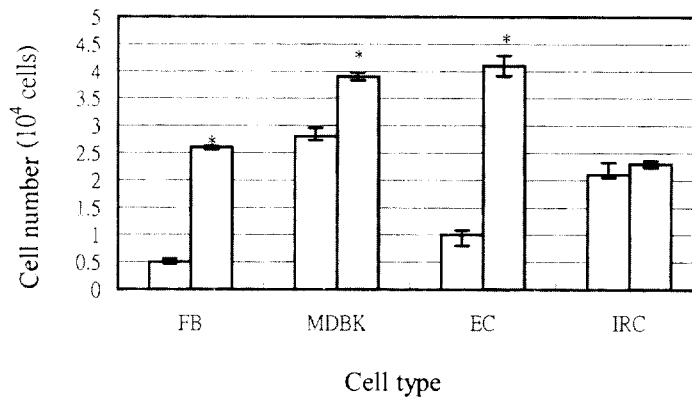
圖一、不同細胞株在 3 小時於玻片上的基礎測試(FB: 纖維母細胞; MDBK: 牛腎上皮細胞; EC: 內皮細胞; IRC: 軟骨細胞株, *表示較未經 RGD 處理高且有 $p < 0.05$ 的顯著性)Fig. 1. The effect of RGD on attachment of FB, MDBK, EC and IRC to coverslip glass at 3h. (* $p < 0.05$)

二、於數種材料上對不同細胞貼附性之影響並與電漿改質效果比較



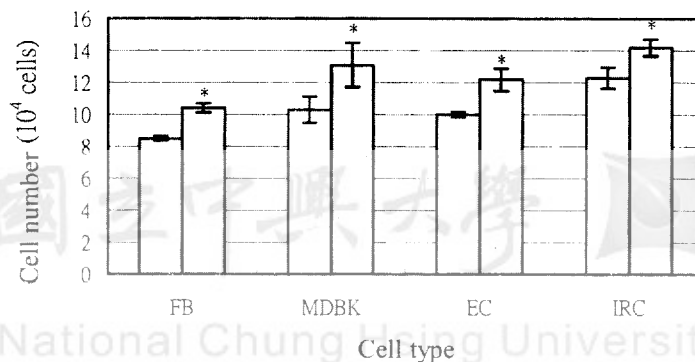
圖二、不同細胞株在 48 小時於玻片上的基礎測試(*表示較未經 RGD 處理高且有 $p<0.05$ 的顯著性)

Fig. 2. The effect of RGD on attachment of different cells to coverslip glass at 48h. (* $p<0.05$)



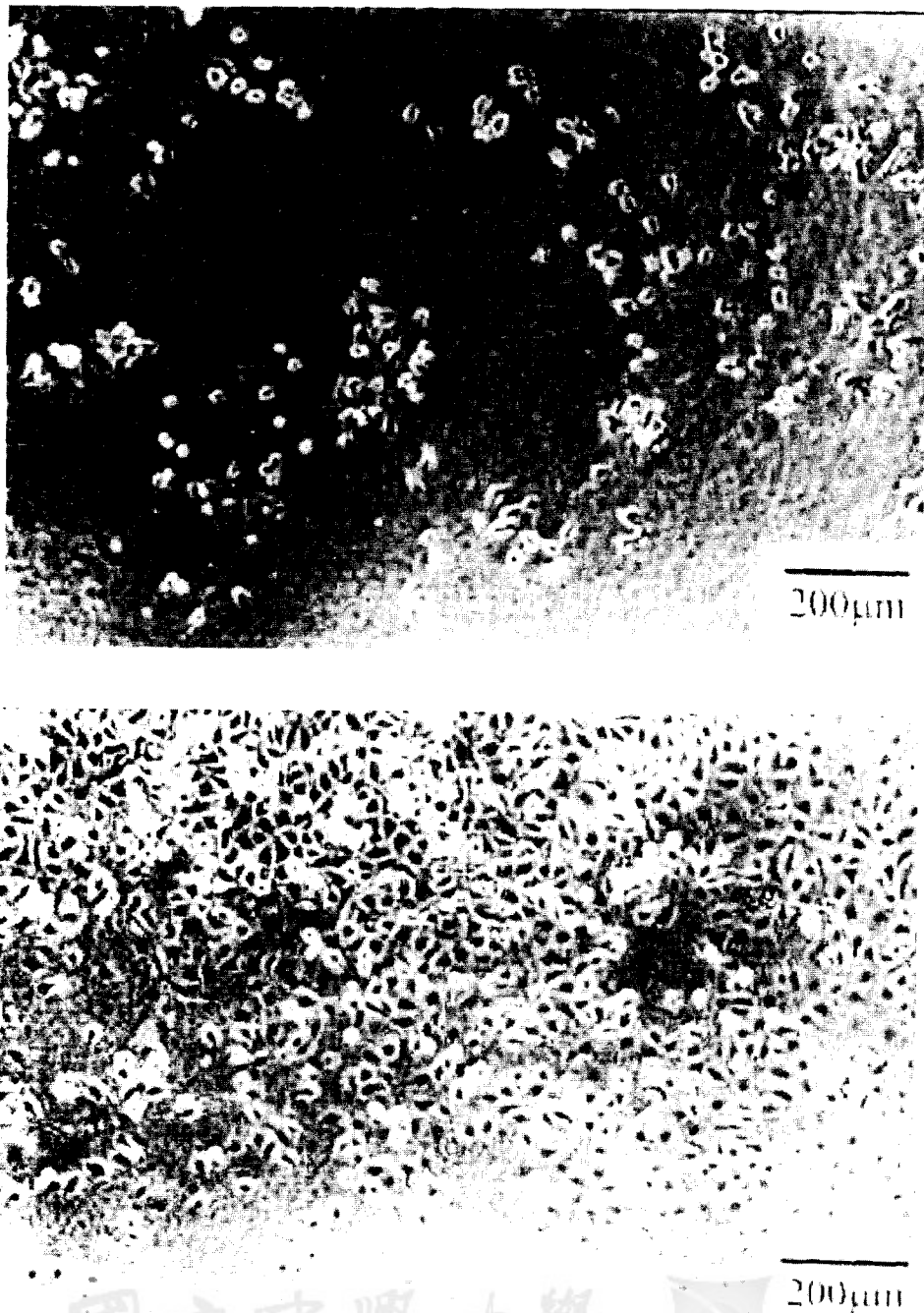
圖三、不同細胞株在 3 小時於 PU 材料上的貼附測試(*表示較未改質 PU 材料高且有 $p<0.05$ 的顯著性)

Fig. 3. The effect of RGD on attachment of different cells to PU at 3h. (* $p<0.05$)



圖四、不同細胞株在 24 小時於 PU 材料上的貼附測試(*表示較未改質 PU 材料高且有 $p<0.05$ 的顯著性)

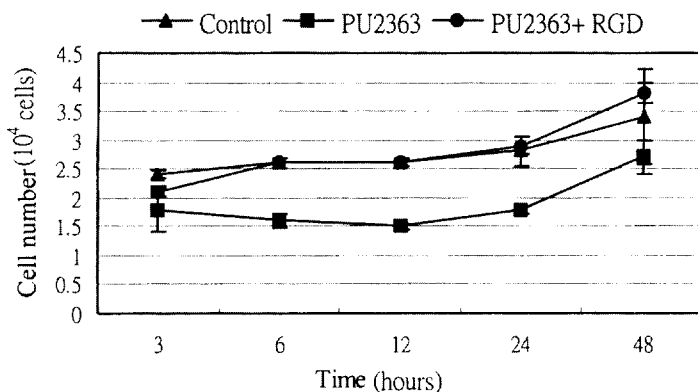
Fig. 4. The effect of RGD on attachment of different cells to PU at 48h. (* $p<0.05$)



圖五、內皮細胞株用於PU材料上在6小時之拍照 (a) PU材料(b)PU材料+RGD

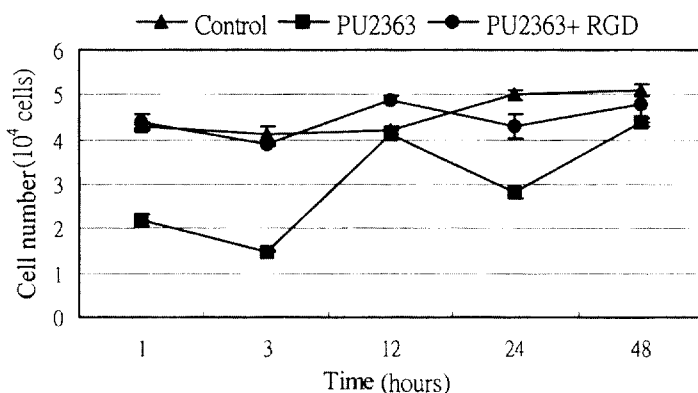
Fig. 5. Photographs showing the effect of RGD on EC attachment to PU at 6h: (a) control (b) with RGD.

一、於動種材料上對不同細胞貼附性之影響並與電漿改質效果比較



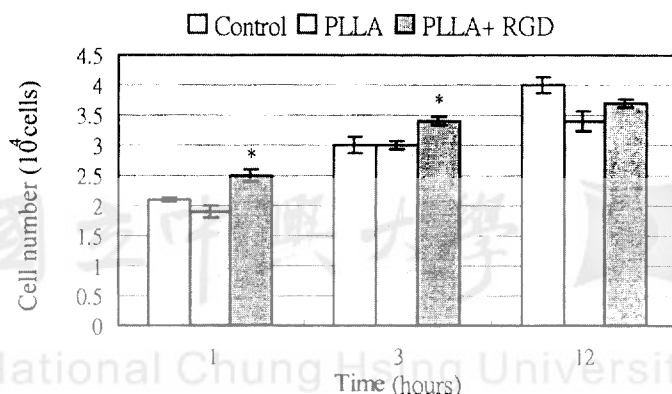
圖六、兔子軟骨細胞(RC)於 PU 材料上在不同時間的貼附測試

Fig. 6. Adhesion of primary rabbit chondrocytes onto PU at various time.



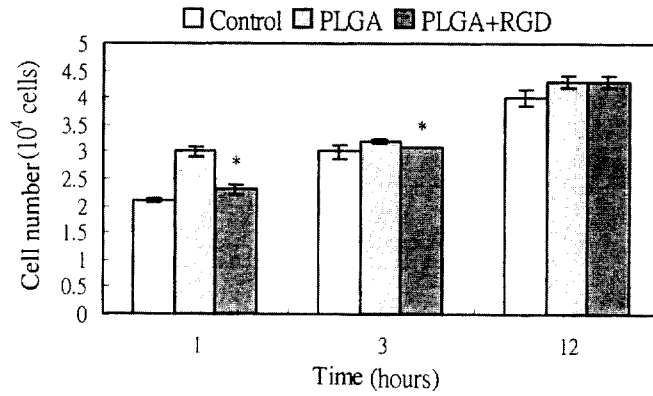
圖七、老鼠頭蓋骨骨母細胞(OB)於 PU 材料上在不同時間的貼附測試

Fig. 7. Adhesion of primary rat osteoblasts onto PU at various time.



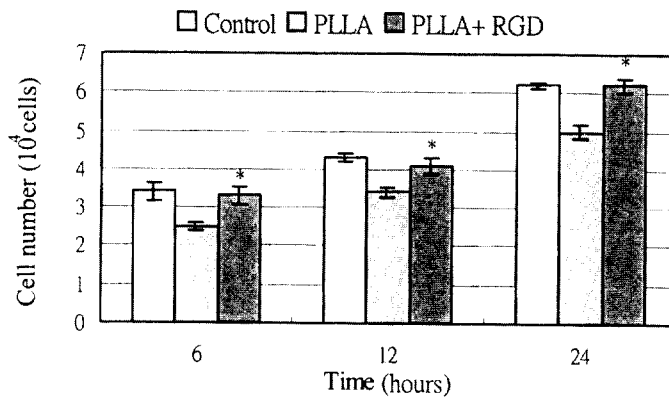
圖八、纖維母細胞株於 PLLA 材料上在不同時間的貼附測試(*表示較未改質 PLLA 材料高且有 $p < 0.05$ 的顯著性)

Fig. 8. Adhesion of FB on PLLA at various time. (* $p < 0.05$)



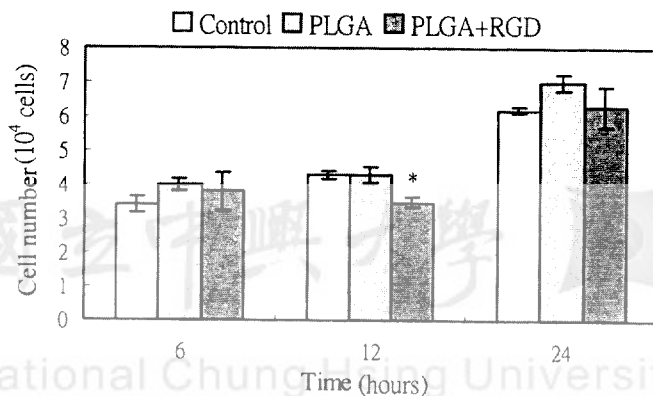
圖九、纖維母細胞株於 PLGA 材料上在不同時間的貼附測試(*表示較未改質 PLGA 材料低且有 $p < 0.05$ 的顯著性)

Fig. 9. Adhesion of FB onto PLGA at various time. (* $p < 0.05$)



圖十、軟骨細胞株於 PLLA 材料上在不同時間的貼附測試(*表示較未改質 PLLA 材料高且有 $p < 0.05$ 的顯著性)

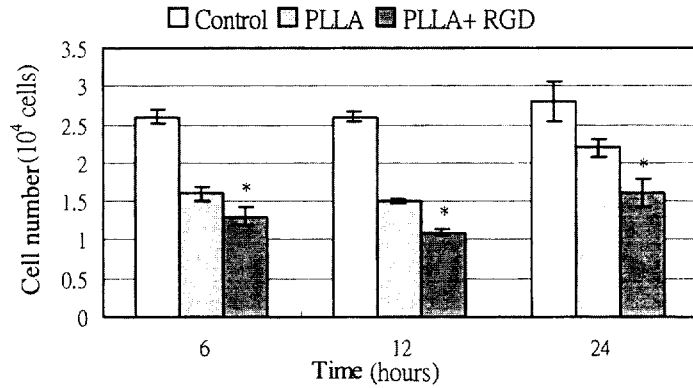
Fig. 10. Adhesion of IRC onto PLLA at various time. (* $p < 0.05$)



圖十一、軟骨細胞株於 PLGA 材料上在不同時間的貼附測試(*表示較未改質 PLGA 材料低且有 $p < 0.05$ 的顯著性)

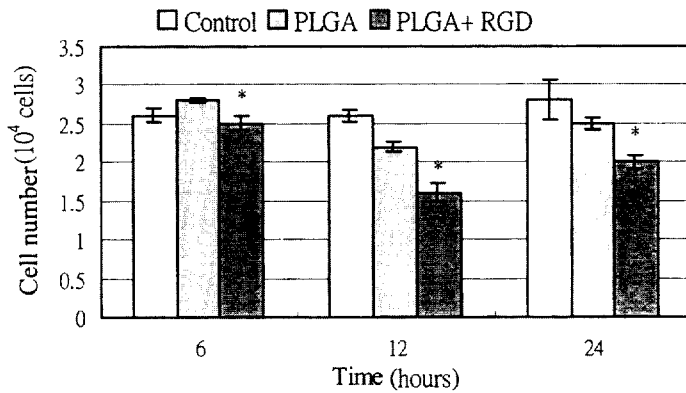
Fig. 11. Adhesion of IRC onto PLGA at various time. (* $p < 0.05$)

二、於數種材料上對不同細胞貼附性之影響並與電漿改質效果比較



圖十二、兔子軟骨細胞於 PLLA 材料上在不同時間的貼附測試(*表示較未改質 PLLA 材料低且有 $p<0.05$ 的顯著性)

Fig. 12. Adhesion of primary rabbit chondrocytes onto PLLA at various time. ($*p<0.05$)



圖十三、兔子軟骨細胞於 PLGA 材料上在不同時間的貼附測試(*表示較未改質 PLGA 材料低且有 $p<0.05$ 的顯著性)

Fig. 13. Adhesion of primary rabbit chondrocytes onto PLGA at various time. ($*p<0.05$)