

利用原子力顯微鏡觀測 TiO₂ 奈米粒子在細胞中的新陳代謝

Metabolism of TiO₂ Nano-Particles in NIH-3T3 Cells Using Atomic Force Microscopy

黃雅琦、黃品琇、何孟書

Ya-Chi Huang, Pin-Siou Huang, Mon-Shu Ho

本篇研究藉由觀測兩種不同粒徑：3–5 nm 與 10–30 nm 的 TiO₂ 奈米粒子，探討 TiO₂ 奈米粒子在 NIH-3T3 細胞中的新陳代謝現象。由加入 3–5 nm 與 10–30 nm TiO₂ 奈米粒子之細胞 1 至 7 天的生長曲線結果顯示，兩種不同粒徑之奈米粒子皆會對細胞產生抑制生長，其中 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子的抑制效果較為顯著。利用原子力顯微鏡 (atomic force microscopy, AFM) 對加入 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子的細胞，比較其 1–7 天細胞膜機械應力的特徵，由細胞核高度變化可發現，細胞核會隨著奈米粒子的加入而膨脹，且細胞膜黏滯力也會隨著 TiO₂ 奈米粒子加入的天數而改變。其中細胞核及細胞突觸的黏滯力明顯上升，而細胞外圍則是下降的現象。研究結果顯示加入 TiO₂ 奈米粒子會對細胞骨架造成破壞，使細胞結構鬆散，TiO₂ 奈米粒子會對細胞造成永久性的傷害以及產生細胞病變的現象。

This study compared the effects of 3–5 nm and 10–30 nm TiO₂ nanoparticles after exposing to NIH-3T3 cells over a span of 7 days. we observed that TiO₂ nanoparticles, of both sizes, are toxic to cells. Both sizes of nanoparticles show cell growth inhibition in which the inhibitory effects of 3–5 nm TiO₂ nanoparticles were more significant. Comparative effects of mechanical properties on the cell, and around in which 3–5 nm TiO₂ nanoparticles were added, through AFM, showed height variation in the cell nucleus where the nucleus expanded and cell adhesion changed with increasing number of days. The nucleus and cell synapses adhesion were seen to have significantly increased as well, while adhesion force of the cell periphery showed a decline, this showed that cytoskeletal damage caused softening of the cell structure were cause after having being exposed to TiO₂ nanoparticles.

一、前言

隨著現代科技的快速進步，物理與生物醫學跨領域整合的發展為現今重要的研究技術之一。隨著奈米技術的日新月異，許多奈米尺度的材料具有

被應用在生物醫學上的潛力，其中二氧化鈦 (TiO₂) 為奈米技術中一項重要的材料。二氧化鈦具有高穩定、耐腐蝕與光催化等特性，現今常被應用於化妝品、護膚產品及防曬用品上。二氧化鈦材料依其晶格排列方式，可分為銳鈦礦 (anatase)、金紅石

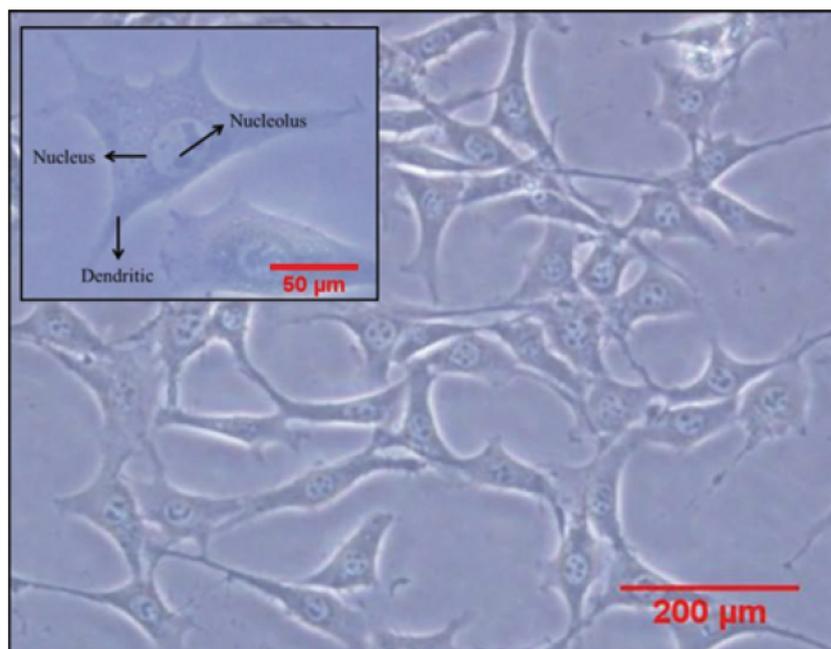


圖 1. NIH-3T3 在光學顯微鏡下形貌圖。

(rutile) 及板鈦礦 (brookite) 三種。在自然界中銳鈦礦與金紅石較為常見，其中又以銳鈦礦具有較佳的光觸媒特性。筆者實驗所使用的二氧化鈦主要以銳鈦礦為主，但不考慮其光觸媒特性，同時避免此效應可能對細胞所造成的傷害。由文獻得知二氧化鈦為相當穩定的成分，但當其粒徑趨近奈米尺度時，化學與物理性質皆呈現不穩定的狀態。而二氧化鈦的奈米粒子進入生物體後是否會產生影響，仍是現今尚待釐清的課題，奈米粒子對於生物與環境的毒性研究⁽¹⁾ 可做為新興科學研究指標之一。

本研究藉由觀測 NIH-3T3 小鼠胚胎纖維母細胞 (mouse embryonic fibro blast) 對二氧化鈦的新陳代謝現象，其細胞線 (cell line) 由紐約大學醫學院病理系的 Geogre 和 Howard 於 1962 年所建立⁽²⁾。3T3 的意思是在直徑為 5 公分的培養皿培養 30 萬株細胞，每三天就需繼代培養一次。一般的動物細胞在分化多次後便不會再進行分裂，NIH-3T3 則與一般動物細胞不同，培養出一批細胞株後可以多代的增生，且對環境具有相當的敏感性，可作為正常細胞的代表，因此本研究使用此細胞作為生物相容性的測試研究。圖 1 為 NIH-3T3 光學顯微鏡下的形貌圖以及結構。

原子力顯微鏡是 G. Binning、C. Gerber 與史丹佛 (Stanford) 大學 C. F. Quate 等人為克服掃描穿隧顯微鏡 (scanning tunneling microscope, STM) 操作上的限制，在 1985 年以掃描穿隧顯微鏡的設計為基礎，發明了原子力顯微鏡 (atomic force microscopy, AFM)。相較於光學顯微鏡 (optical microscopy)、電子顯微鏡 (electron microscopy)，原子力顯微鏡屬於另外一種不同形式的探測模式。原理是利用探針與樣品間大小約為 pico newtons⁽³⁾ 的凡得瓦爾力 (van der Waals force) 來呈現樣品的表面特性。原子力顯微鏡不僅具有原子級的解析能力，更彌補了掃描穿隧顯微鏡在樣品材料上的選擇。其可應用於導體及非導體等多種材料的表面分析，並能在氣體、液體及真空的環境下進行操作，亦可做為奈米加工之工具，在樣品的處理上也無須經過繁雜的加工程序。

另外，原子力顯微鏡也可以利用探針的修飾 (例如圓球狀探針⁽⁴⁾)，對於生物性樣品的量測有較佳的輔助作用。與掃描穿隧顯微鏡相比，儘管原子力顯微鏡在空間解析度上略為遜色，但因具有原子及解析度、較少的環境與樣品限制，應用於原子操控、晶圓粗糙度量測及奈米雕刻等領域有較佳的

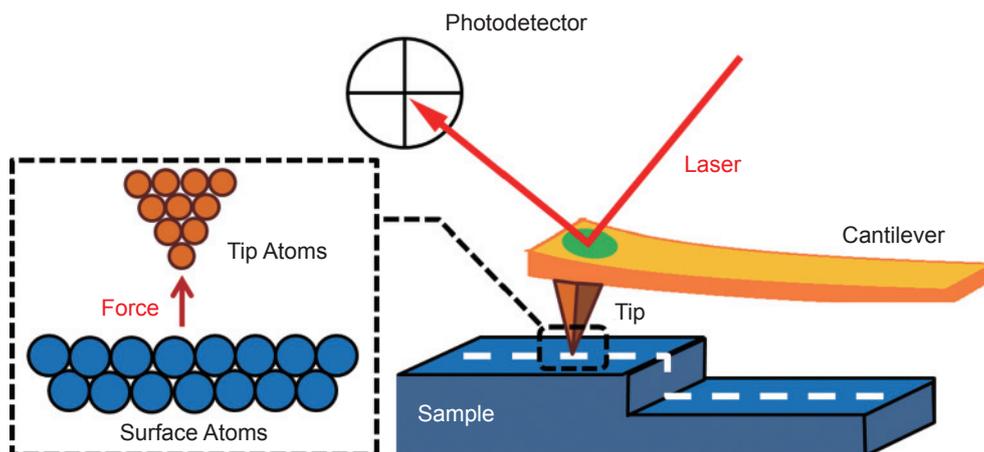


圖 2. 原子力顯微鏡系統架構。

實用性，近年諸多文獻中，原子力顯微鏡在生醫領域中也具有相當顯著的貢獻^(5, 6)，若搭配其他生醫研究儀器，如共軛焦雷射顯微鏡 (confocal laser scan microscopy)、穿透電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 與倒立式螢光顯微鏡等，可使研究得到更好的成果，因此原子力顯微鏡對於未來的發展仍扮演著不可或缺的角色。

原子力顯微鏡系統大致可分為三部分，分別是力感測 (force sensing part)、位置感測 (position sensing part) 與回饋系統 (feedback system)，其架構如圖 2 所示，利用懸臂偵測樣品與探針間的交互作用，使其產生形變，再藉由光槓桿原理，使用 PSPD 偵測打在懸臂上雷射反射光隨形變之偏移量，PSPD 再將此訊號做為回饋訊號傳至回饋系統，最後再將樣品之表面特性以影像的方式呈現。原子力顯微鏡根據原子間淨力的變化，區分

為三種不同的操作模式，分別為接觸模式 (contact mode)、非接觸模式 (non-contact mode) 以及輕敲模式 (tapping mode)。

本篇文章藉由輕敲模式呈現細胞外貌，並藉由接觸模式偵測細胞膜的表面應力，研究 TiO_2 奈米粒子對於細胞膜表面特性之影響。

本研究分別比較 3–5 nm 及 10–30 nm 粒徑之 TiO_2 奈米粒子對於 NIH-3T3 細胞之影響。利用戊二醛與 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 溶液配成 0.5% 的固定溶液固定 NIH-3T3，為避免掃描過程中對細胞的破壞，選用較軟的探針。如圖 3 所示，探針的 spring constant 為 0.12 N/m。

二、作用力-距離曲線

在 AFM 實驗中，我們使用接觸模式測量，以作用力-距離曲線 (force-distance curve) 為根據，來判斷樣品與探針間的相互作用力，分析材料的表面特性，探討生物樣品的表面黏滯力 (adhesion force)。圖 4 為 AFM 操作過程中的力圖曲線，其反應懸臂偏移量與樣品間的交互作用力。

- (1) 下針前樣品尚未與探針接觸，懸臂未產生型變。
- (2) 當探針逐漸與樣品接近，此時探針會因吸引力而向下偏折，使探針接觸至樣品表面。
- (3) 當探針持續下壓樣品表面，使探針懸臂向上彎曲。

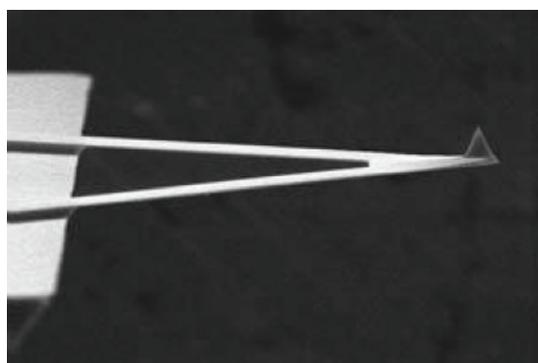


圖 3. 原子力顯微鏡探針：m-Masch CSC21。⁽⁷⁾

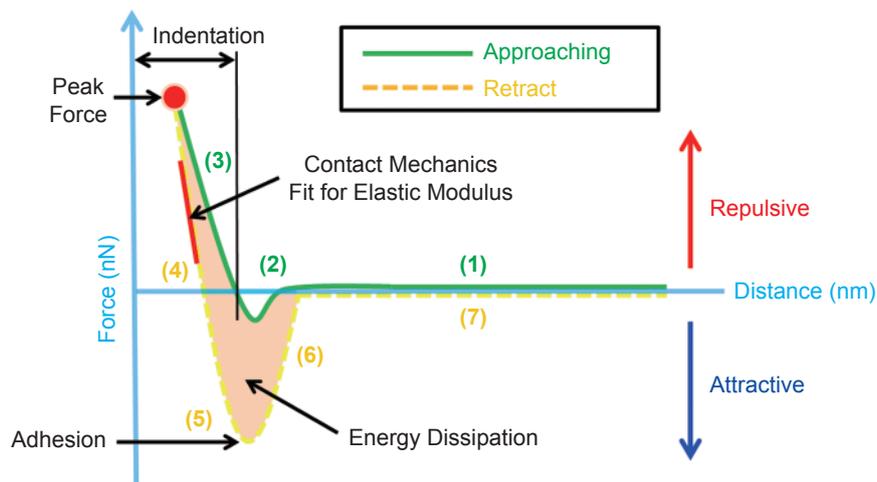


圖 4. 作用力－距離曲線圖。

- (4) 感測系統接收探針所受之阻力而往回收縮，使探針遠離樣品表面，上升力與表面作用力達到平衡，此時懸臂所受淨力為 0。
- (5) 探針遠離表面，此時探針受樣品表面吸引力，故探針仍與樣品表面接觸，懸臂下向偏折。
- (6) 探針持續遠離表面，此時懸臂回復力大於吸引力，向上彈回。
- (7) 探針遠離表面後，樣品與探針間淨力為 0，懸臂恢復為原始狀態。

圖 4 中的黏滯力為本研究量測的細胞膜應力改變的參考作用力，其結果顯示黏滯力越大的表面，應力代表較軟或結構鬆散的表面組織；黏滯力越小的表面，則呈現較為剛性堅硬的材料特性。

三、TiO₂ 奈米粒子對細胞生長之影響

為初步了解 TiO₂ 奈米粒子對於細胞之影響，待細胞貼附基板後，加入高濃度 TiO₂ 奈米粒子。圖 5(A) 為細胞貼附後不加入任何物質之形貌圖，圖 5(B) 為加入 TiO₂ 奈米粒子後第三天之形貌圖，其中加入後第三天後可以觀察到，細胞周圍的奈米粒子分布明顯較少，表示細胞吞噬了其周圍的 TiO₂ 奈米粒子，細胞形貌與數量也有明顯的差別。

圖 6 為加入不同濃度之 3–5 nm 及 10–30 nm

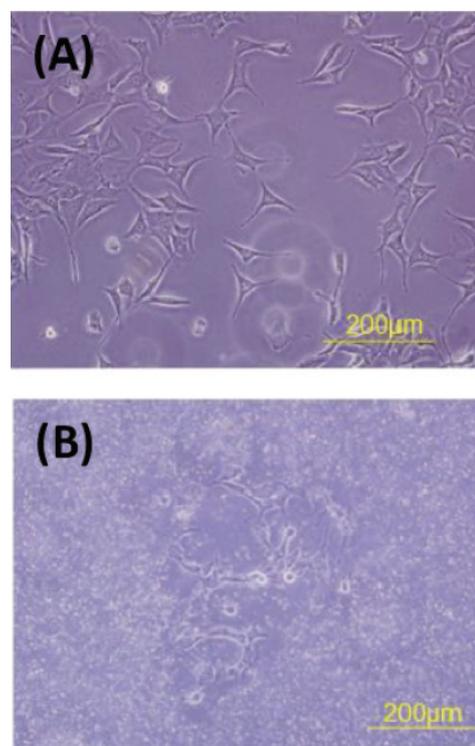


圖 5. 光學顯微鏡下：(A) control 細胞。(B) 加入 TiO₂ 奈米粒子之細胞形貌圖。

TiO₂ 奈米粒子後，第一天至第七天細胞生長密度之曲線圖，3–5 H 表示加入高濃度 TiO₂ 奈米粒子，其濃度約 10.934 µg/ml；3–5 M 表示為中等濃度之 TiO₂ 奈米粒子，濃度約為 1.09334 µg/ml；3–5 L

為低濃度 TiO_2 奈米粒子，濃度約為 $0.10934 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。由圖中曲線的變化可以看出，不論粒徑大小，control 組細胞生長密度在第三天後有明顯的上升，而加入 TiO_2 奈米粒子之細胞則在第五天後曲線才有顯著變化，其中隨著濃度的升高，細胞生長密度及數量會減少，尤其是加入高濃度 TiO_2 奈米粒子之成長趨勢最為平緩，其細胞密度也是最少的。

綜合以上結果可得知，加入 TiO_2 奈米粒子後細胞成長之趨勢皆比 control 組曲線平緩，表示 TiO_2 奈米粒子對於細胞具有一定的毒性影響、或是抑制細胞生長因素的存在，且隨著 TiO_2 濃度增加對細胞的影響也隨之提高。3–5 nm TiO_2 奈米粒子和 10–30 nm TiO_2 奈米粒子在相同濃度的比較下，3–5 nm TiO_2 奈米粒的生長曲線皆比 10–30 nm TiO_2 奈米粒子之曲線平緩，10–30 nm TiO_2 奈米粒子之曲線趨勢在第三天就有上升的表現，但 3–5 nm TiO_2 奈米粒子在第四天至第五天曲線才有往上升的趨勢，由此可證，3–5 nm TiO_2 奈米粒子對細胞之影響是比較大的。

四、利用 AFM 量測細胞表面形貌及細胞膜機械力學特性

圖 7 為細胞之形貌圖，peak force error image 為形貌之微分圖，比對輕敲模式振幅以及接觸模式形變上的誤差，可觀測到細胞不同的結構。由 AFM 圖像顯示，細胞的核仁分布在細胞偏上方的位置，細胞大小約為 $91 \mu\text{m}$ ，細胞核高度大約是 $3.16 \mu\text{m}$ ，由量測細胞彈性係數的 modulus image 可看出，細胞核仁的楊氏係數最大，表示細胞核仁抗應變的能力較佳，而細胞核的楊氏係數最小，表示其為整個細胞較軟之區域，黏滯力部分則以細胞核仁為最小的部位。放大之細胞突觸 (dendritic) 來看，可以由圖 8 (A) 與 (B) 明顯地觀察到細胞骨架的分布。從力圖來看，細胞骨架在圖 8(C) 為最亮，在圖 8(D) 則為最暗，表示細胞骨架在細胞中為偏硬之結構，主要負責支撐細胞主體和細胞運動等功能。

圖 9 至圖 10 為加入 3–5 nm TiO_2 奈米粒子後

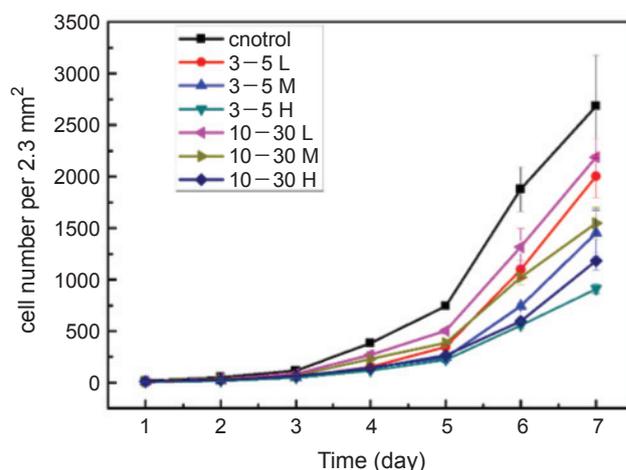


圖 6. 比較 3–5 nm 及 10–30 nm TiO_2 奈米粒子之細胞成長曲線圖。

1–7 天的 AFM 影像，分別以 high image 與 peak force error image 呈現，由 1–4 天的影像 (圖 9 與圖 10 (A)–(D)) 來分析，細胞表層有些許 TiO_2 顆粒在 AFM 掃描時被探針拖曳的痕跡，而 5–7 天 (圖 9 與圖 10 (E)–(G)) 後細胞的表層並未發現這些顆粒物質，表面也相對的乾淨許多，由第六天的細胞影像 (C) 圖可看出，這些 TiO_2 顆粒從細胞由內而外的凸出表面，表示 TiO_2 奈米粒子在第 5 天後可能被細胞所吞噬，因此 5 天後表面並無顆粒物質的存在，而是觀察到細胞由內而外的突起物。

圖 12 顯示以 AFM 量測加入奈米粒子後細胞核 (圖 11(1) 位置) 高度隨天數的變化。1–7 天為加入 3–5 nm TiO_2 奈米粒子之結果。如圖所示，未經包覆 TiO_2 奈米粒子的細胞核高度約為 $3–4 \mu\text{m}$ ，而加入 TiO_2 奈米粒子後 1–7 天的高度雖然沒有明顯的規律變化，但細胞核高度都落在 $6 \mu\text{m}$ 以上，甚至還有達到 $10 \mu\text{m}$ 的高度，與 control 組相比有明顯的差距，此結果證明 TiO_2 奈米粒子的加入會使細胞骨架與其核附近發生變異產生膨脹之現象。

本研究也針對加入 3–5 nm TiO_2 奈米粒子 1–7 天之細胞黏滯力變化，分別對於細胞核 (圖 11(1) 位置)、細胞核外圍 (圖 11(2) 位置) 及細胞突觸 (圖 11(3) 位置) 作 AFM-adhesion 量測。與前段細胞核高度的比較相同，比較細胞加入 3–5 nm TiO_2 奈米粒子後 1–7 天的黏滯力變化。如圖 13 所示，細

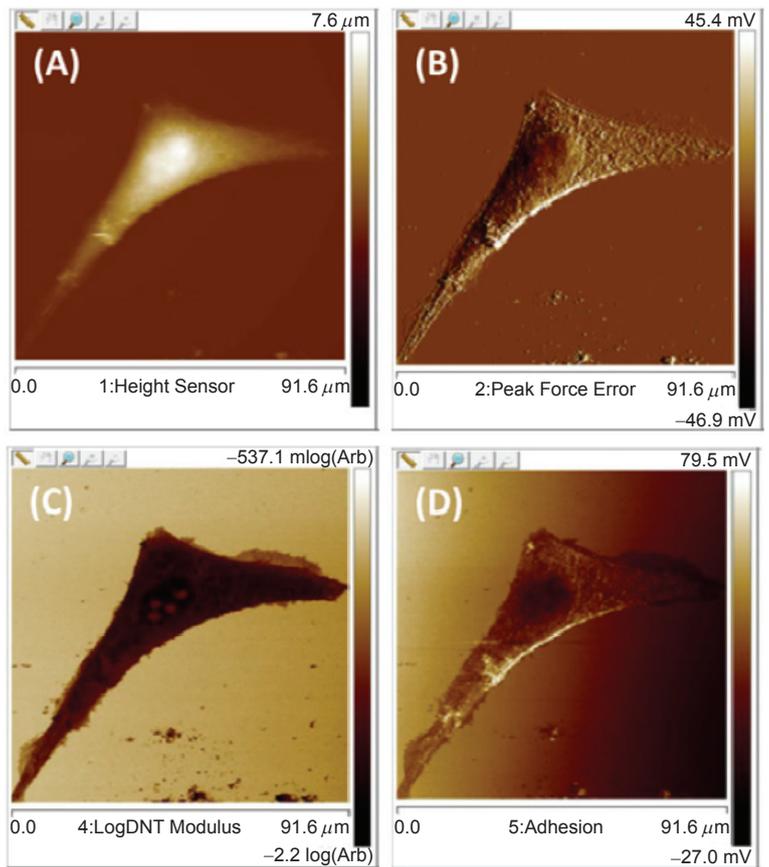


圖 7.
未加入 TiO_2 之細胞 AFM 形貌圖：(A) control high image，(B) control peak force error image，(C) control modulus image，(D) control adhesion image。

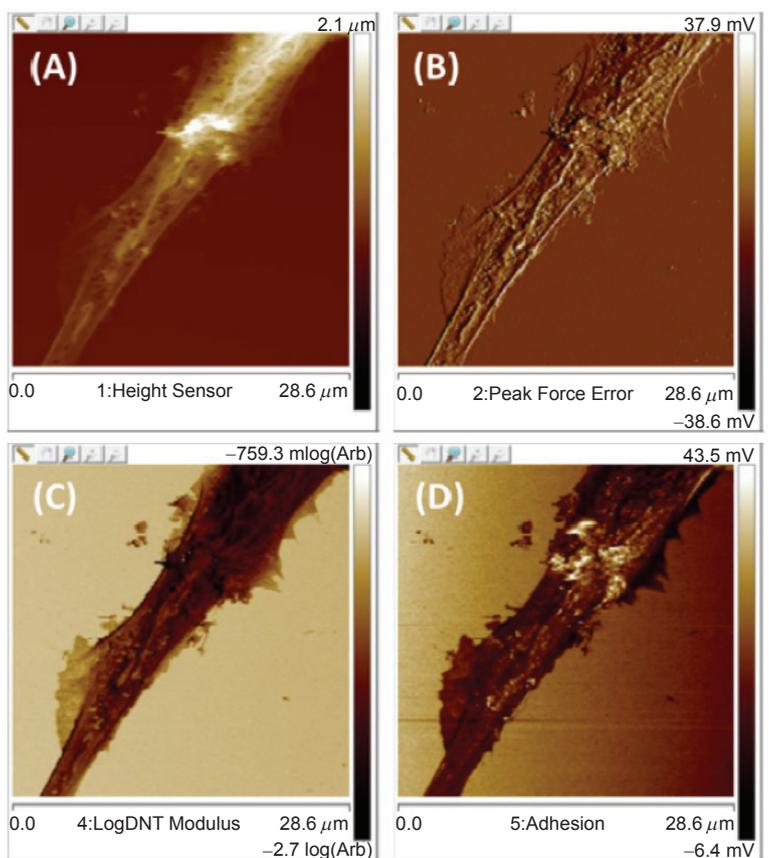


圖 8.
未加入 TiO_2 之細胞－細胞核放大 AFM 形貌圖：(A) control, zoom in dendritic high image。 (B) control, zoom in dendritic peak force error image。 (C) control, zoom in dendritic modulus image。 (D) control, zoom in dendritic adhesion image。

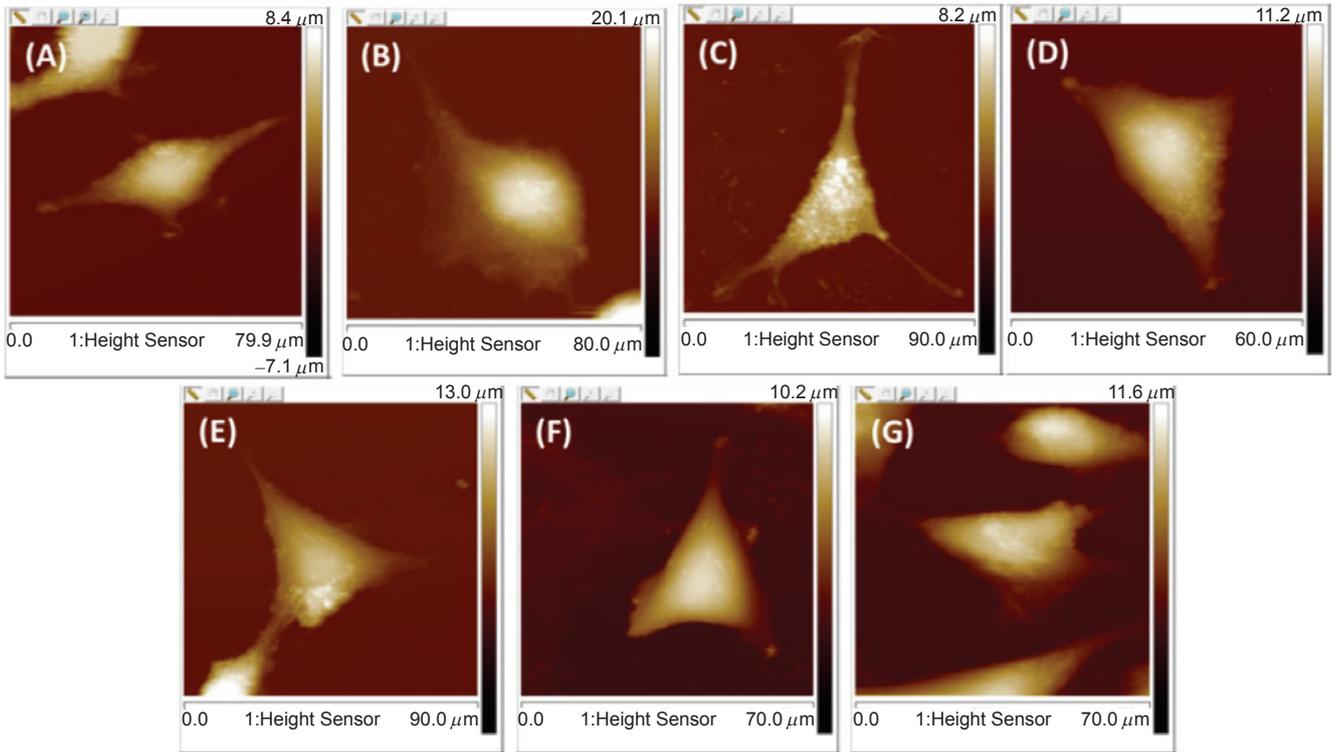


圖 9. 加入 3–5 nm TiO_2 奈米粒子 AFM-High image : (A) 1st day , (B) 2nd day , (C) 3rd day , (D) 4th day , (E) 5th day , (F) 6th day , (G) 7th day 。

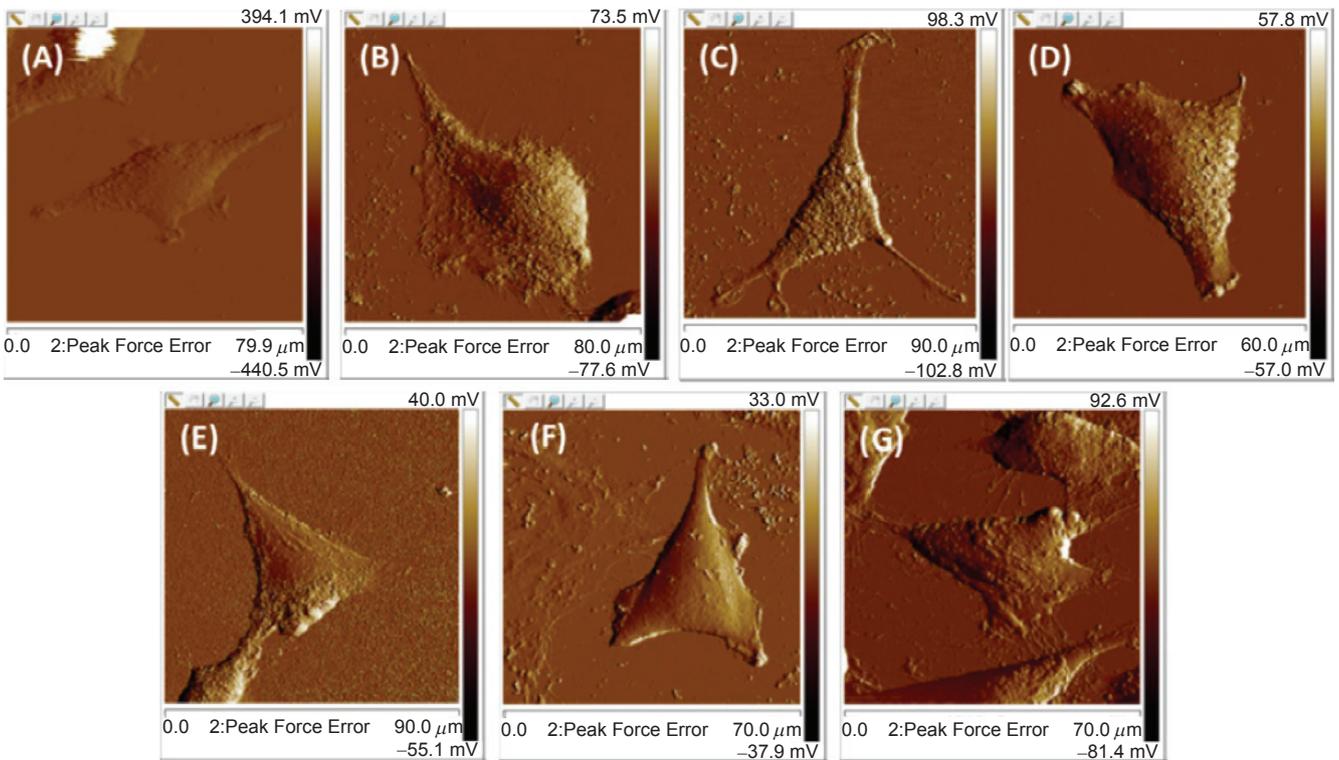


圖 10. 加入 3–5 nm TiO_2 奈米粒子 AFM-Peak force error image : (A) 1st day , (B) 2nd day , (C) 3rd day , (D) 4th day , (E) 5th day , (F) 6th day , (G) 7th day 。

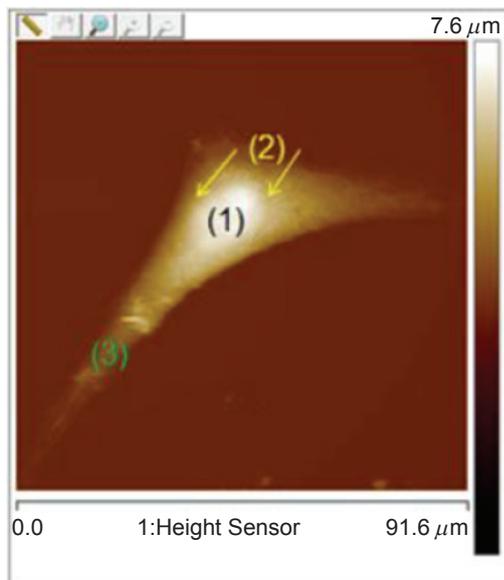


圖 11. NIH-3T3 細胞 AFM 形貌圖：(1) 細胞核，(2) 細胞外圍，(3) 細胞突觸。

胞核及細胞突觸的黏滯力加入 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子後皆有隨著天數增加而變大的趨勢，而細胞外圍則是略微下降。結果顯示，除了細胞外圍隨天數增加而略加變硬外，細胞核與細胞突觸皆變得柔軟(黏滯力變大)，推測是由於 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子的加入破壞了細胞骨架蛋白，使其結構鬆散而不稠密。

五、結果與未來展望

觀測 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子加入細胞後隨天數的代謝情形，由細胞生長曲線結果來看，TiO₂ 奈米粒子對於細胞具有一定的毒性影響，且在高濃度的環境下對於細胞影響最深，其中 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子對於細胞的生長有較大的抑制作用。而從 AFM 量測結果來看，加入 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子之細胞，其細胞核及細胞突觸黏滯力會隨著天數的增加而增大，而細胞外圍黏滯力則是隨著天數增加減少，原因是由於 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子會聚集於細胞核周圍，使細胞突觸及細胞核黏滯力上升，其中奈米粒子會破壞細胞骨架，導致細胞突觸的黏滯力上升得最為劇烈。

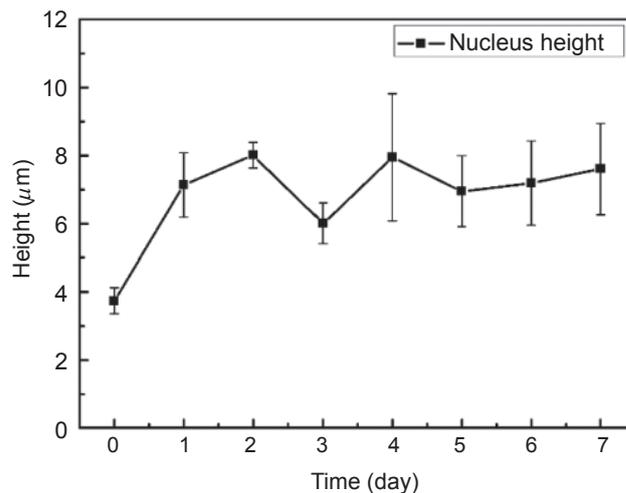


圖 12. 細胞核高度變化曲線圖。

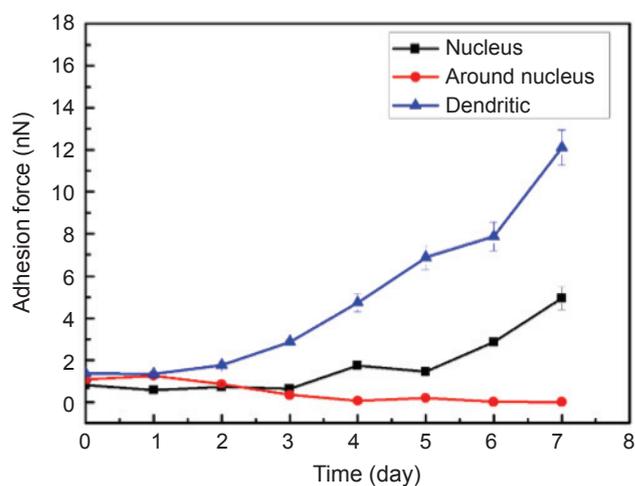


圖 13. 細胞黏滯力變化曲線圖。

NIH-3T3 是對環境相當敏感之細胞，本研究利用原子力顯微鏡作為表面機械應力量測，證實加入 TiO₂ 奈米粒子後會對細胞膜表面造成某種傷害，導致其結構鬆散現象產生，往後可搭配更多測量儀器更深入探討 TiO₂ 對於細胞的確切傷害，使得 TiO₂ 奈米粒子對於生物體的研究將會有更進一步的幫助，有利於奈米科技與生物物理領域之發展。

參考文獻

1. C.-Y. Jin et al., *Chem. Res. Toxicol* (2008).
2. G. J. Todaro et al., *The Journal of Cell Biology* (1963).
3. S. K. Lower, *Atomic Force Microscopy*, 18.
4. D. Dean, et al., *Materials*, (2010).

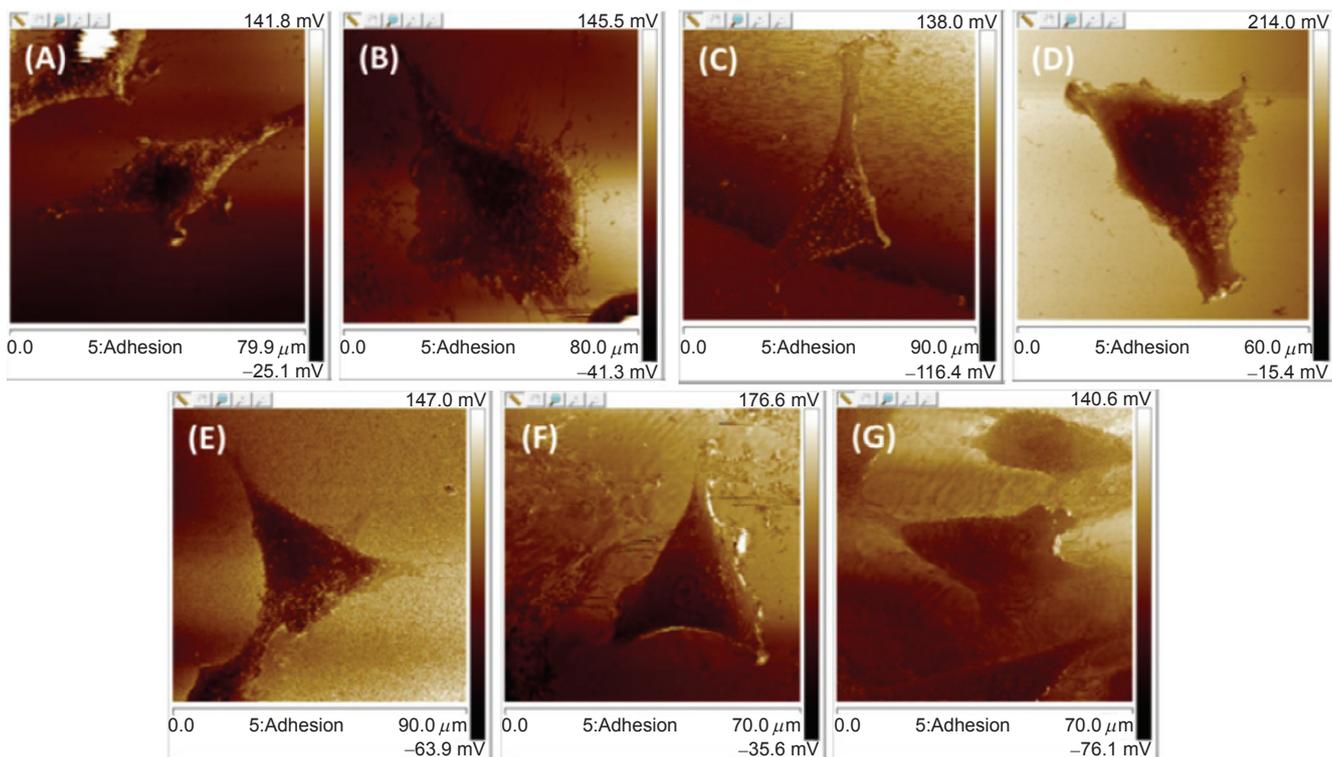


圖 14. 加入 3–5 nm TiO₂ 奈米粒子 AFM-Adhesion image : (A) 1st day , (B) 2nd day , (C) 3rd day , (D) 4th day , (E) 5th day , (F) 6th day , (G) 7th day 。

5. Y. Wu, et al, *Scanning*, **30**, 426 (2008).
6. B. N. Zaitsev, et al, *SPM*, (2002).
7. JPK-Mikromasch Cantilever, Force constant:1.0-17.5 (N/m).
http://cantilevers.jpk.com/csc_article_details.php?nPos=90&saArticle%5BBID%5D=206&VID=
8. N. Jalili and K. Laxminarayana, et al, *Mechatronics*, 14 (2004).
9. F. J. Rubio-Sierra, W. M. Heckl, and R. W. Stark, *Nanomanipulation by Atomic Force Microscopy* (2005).
10. A. Vilalta-Clemente, K. Gloystein, and N. Frangis, *Principles of Atomic Force Microscopy (AFM)*, Physics of Advanced Materials Winter School (2008).
11. 賀語喬, 二氧化鈦、銀與金奈米粒子在小鼠纖維母細胞中的研究, 國立中興大學奈米科學研究所碩士學位論文 (2015).
12. 竇培庭, 金奈米粒子對於小鼠纖維母細胞的代謝影響, 國立中興大學奈米科學研究所 碩士學位論文 (2014).



黃雅琦小姐現為國立中興大學物理研究所碩士班學生。

Ya-Chi Huang is currently a M.S. Student in physics at National Chung-Hsing University.



黃品琇小姐為國立中興大學物理碩士，現任台灣茂矽電子股份有限公司製程整合工程師。

Pin-Siou Huang received her M.S. in physics from National Chung-Hsing University. She is currently a process integration engineer at Mosel Vitelic Inc.



何孟書小姐為美國賓夕法尼亞州立大學物理博士，現任國立中興大學物理系及奈米科學研究所教授。

Mon-Shu Ho received her Ph.D. in physics from Pennsylvania State University, USA. She is currently a professor in the Department of Physics and Institute of Nanoscience at National Chung-Hsing University.