

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

團隊合作獎

052011

可注射性富含血小板水膠複合物之開發及其應用

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者： 高二 廖芳均 高一 廖珮宇 高二 陳于婷	指導老師： 張琬琳 簡崇真
---	-----------------------------

關鍵詞：可注射性富含血小板水膠、生醫材料、
神經損傷

摘要

富含血小板血漿(Platelet-rich plasma ; PRP)是透過血液離心及活化製備出含有高濃度血小板的產物，能幫助組織修復與再生。但傳統 PRP 在特定組織微環境的滯留時間低，治療效果不佳，因此需要研究適合的生醫材料作為傳統 PRP 的運載工具。本研究證實，PRP 中血小板被激活後，可以釋放出更多的生長因子與細胞激素，且 PRP 透過與玻尿酸(Hyaluronic acid ; HA)結合可形成穩定且生物體可以降解的水膠劑型(Hydrogel)。生醫材料殼聚醣(Chitosan)與 HA 形成之複合物，不僅可以增強 Hydrogel 結構的穩定，還能完整包覆血小板且不影響其完整結構與特性，具備生長因子緩釋效果。最後開發出可注射性富含血小板水膠複合物 (PRP-Chitosan-HA complex Hydrogel, PRH)，證實其能促進神經細胞增生，並改善膀胱神經損傷後的相關組織變化，相當具備未來臨床應用之潛力。

壹、 研究動機

富含血小板血漿(PRP)是 Platelet-rich plasma 的縮寫，PRP 是抽取人體或動物本身的血液，透過離心及活化等方法將血漿中的血小板濃度提高(約為正常血小板濃度的 3 至 5 倍)，再將這種濃縮後血漿(PRP)注射到需要治療的部位(Anitua et al., 2007)。為什麼 PRP 會有治療效果呢？這要從我們血液的功能說起，我們的血液裡主要的成分是血漿跟血球，血漿中含有纖維蛋白質，類似網狀型態，可以在傷口處捕捉血小板以形成凝塊。而血球的組成主要包括三種：白血球、紅血球和血小板。白血球負責打擊感染源及殺死病菌，紅血球可以協助氧氣的運送，而血小板最主要的功能是幫助傷口凝血避免血流不止。當身體發生出血或組織受傷時，血小板會彼此聚集堵住傷口，並召喚更多血小板與幫助凝血的蛋白質聚集成血凝塊幫助止血。除此之外，血小板對於受傷組織的修復也有幫助，血小板在作用的過程中，接觸到需要被"修復"的組織後，會進入"活化態"(被激活)，透過釋放「細胞生長因子」(growth factor) 以及其他數種「細胞激素」(cytokines) 等，能調節發炎反應並促進幹細胞與修復細胞的移動、增生、分化等，幫助組織修復及再生(Yu et al., 2011)。

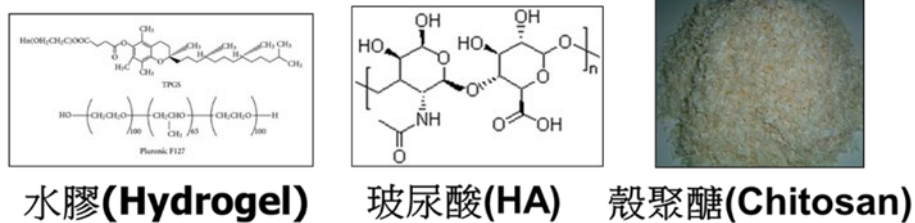
由於 PRP 是種自體衍生的產物並且含有高濃度的生長因子與細胞激素，我們可以利用物理或化學的方式，讓濃縮後血小板內含的細胞顆粒釋放出生長因子與細胞激素，來引發受傷組織一系列的生物訊息反應，可以調節發炎反應並在原地招募未分化的細胞到損傷

的部位，誘發這些細胞進行有絲分裂與血管新生作用。此外，PRP 也被發現有協助調節人體內的代謝、幫助組織修復與癒合的功能。目前醫學界在臨床上已經開始利用 PRP 來調節各種發炎表現並透過其增強組織修復的能力來協助治療多種病症，像是用來幫助慢性皮膚潰瘍(Anitua et al, 2008)及糖尿病足潰瘍的癒合(Babaei et al., 2017)、腰椎骨融合(Hee et al, 2003)、牙周組織的再生(Agarwal et al, 2014)以及骨關節炎的治療(Dai et al, 2017)等，在加速燒燙傷的癒合、骨科、整形外科和脊椎外科的領域 PRP 都有很大的應用空間。除此之外，PRP 同時也提供了損傷的神經一個富含血小板生長因子的培養基，進而增強其再生功能(Eccleston et al., 1993; Marx, 2004)，這些生長因子也被發現除了有神經保護的功能更有機會能促進神經再生(Apel et al., 2010; Koriyama et al., 2007; Lin et al., 2010)。更重要的是 PRP 還具有成本低、製備容易且兼具生物安全性等種種優點 (Anitua et al., 2007)，因此未來在臨床上的使用相當值得讓人期待。

然而目前 PRP 在臨床製備流程上並無一致標準，且其詳細作用機轉目前仍有許多值得探討之處，若能深入探討 PRP 在臨床應用的作用機轉，將可提供其臨床應用更堅實的基礎。此外，每個人的血液情況在不同的時間與條件下都不同，因此雖然目前認為三到五倍的 PRP 有最佳治療效果，不過在身體不同的部位，所需要的最佳濃度仍然未知。另外，在治療方式的部分，包括一次應該注射多少量的 PRP 以及多久要注射頻率一次等，也都還沒有定論。此外，PRP 雖然在動物實驗顯示出可能有神經與組織修復的效果(Wu et al., 2016)，但抗發炎作用需在特定的組織位置才能顯現出其抗發炎的作用。傳統 PRP 在特定組織微環境的滯留的時間低，若是在組織受傷後直接注射血小板在開放的組織空間，其作用效果可能會無法長久，所以開發生物材料作為 PRP 中生長因子及細胞激素的運載工具是一件重要的課題。

近年來，特殊水凝膠複合物在生醫材料與藥物釋放的應用上受到矚目。水凝膠(Hydrogel)可以運用在生物體的組織受損原位處，而達到緩慢且長時間的藥物釋放效果。同時其生物相容性及可降解性更是水凝膠的一大優點。其次，天然來源的生物材料如殼聚糖(Chitosan)先前研究指出該產品是安全的，它是一種幾丁質的衍生物，殼聚糖的神經移植物質已廣泛用於神經重建。而玻尿酸(hyaluronic acid; HA)也是相當具有潛力的生醫材料，已知可以作為藥物傳遞系統，有效延長藥物釋放時間，達到最好的治療效果(Jhang et al. 2014)。

因此我們希望利用這些材料結合 PRP，開發一個新的富含血小板水凝膠複合物製劑。PRP 的治療方式與潛在作用機轉還有非常多值得去探討的地方，也促使我們想要去瞭解它的製備特性，並嘗試優化及廣化其製備。透過前面的特性分析與優化製備的基礎來開發可注射性的富含血小板的水膠複合物，並進一步透過細胞與動物實驗驗證其對神經組織保護的效果。期待這些研究成果未來將可以提供做為新醫材開發的基礎以及提供臨床新的治療應用。



貳、 研究目的

綜觀文獻，雖然已知富含血小板的血漿(PRP)會影響組織的修復及再生，但傳統 PRP 目前在製備流程上並無一致標準，且其在特定組織微環境滯留的時間低，效果無法持久，因此需要研究適合的生物材料作為傳統 PRP 中生長因子及細胞激素的運載工具，再加上文獻上對於 PRP 在神經相關組織的應用證據較缺乏。

所以本次研究具體目標有以下三點：

- 一、富含血小板血漿的特性分析與製備改良，進一步作為開發可注射性富含血小板水膠的基材。
- 二、開發可注射性富含血小板水膠複合物 (PRP-Chitosan-HA complex Hydrogel)作為生長因子及細胞激素運送的載體，我們將之命名為 **Platelet Rich Hydrogel (PRH)**。
- 三、透過細胞與動物實驗證實此複合物 PRH 對神經組織保護的效果。

透過這些研究目標，我們希望開發新的可注射性富含血小板水凝膠複合物，並進一步利用細胞與動物研究讓我們更加了解 PRH 未來應用在醫學上的應用與潛力，期待這些研究成果未來將可以提供做為新醫材開發的基礎以及提供臨床新的治療應用

參、 研究設備及器材

一、 儀器

用途	儀器設備
PRP製備	離心機 (Hettich zentrifugen, MIKRO 200R)
	無菌操作台
	細胞培養箱
	數位顯示乾浴器
生長因子測量	酵素免疫吸附分析儀 (Thermo Scientific, Multiskan EX)
超細微構造組織分析	穿透式電子顯微鏡
細胞培養	無菌操作台
	細胞培養箱
組織染色	螢光顯微鏡(Nikon 50i)
	組織切片機 (Thermo HM325)
	恆溫水浴槽 (TSK shaking bath, SB301)

二、 器材

- (一) 0.22 μ m 針頭過濾器 (Sartorius)
- (二) ACD-A 採血管
- (三) 10 ml 塑膠注射針筒 (TERUMO)
- (四) 1.5ml 離心管 (Thermo)
- (五) 50ml test tube (Falcon)
- (六) PE50 管
- (七) ELISA 96 孔分析盤 (Costar)
- (八) 細胞培養 96 孔盤
- (九) Polypropylene conical tube 15 ml (Falcon)
- (十) Polypropylene conical tube 50 ml (Falcon)
- (十一) Silane-coated slide (DAKO)
- (十二) 微量吸管分注器
- (十三) 微量吸管

(十四) 封口石蠟膜

(十五) 血球計數盤 (Hausser scientific bright-line® hemacytometer)

(十六) 計數器

(十七) 黏度計

三、藥品

(一) 95% 酒精 - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(二) HistoChoice® Clearing Agent - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(三) Collagen solution type I from rat tail - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(四) Eosin - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(五) Hematoxylin Stain Solution - Merck Chemicals Co. (Darmstadt, Germany)

(六) Isoflurane - Halocarbon Products Corporation (Odaiba, Tokyo, Japan)

(七) Isopropanol - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(八) Paraformaldehyde - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(九) CaCl₂ -Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(十) VitroView™ Toluidine Blue Stain Kit-VitroVivo Biotech Co.(Rockville, Maryland,USA)

(十一) HCS Apoptosis-TUNEL Assay - Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

(十二) Sodium pentobarbital - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(十三) PBS buffer- Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(十四) ELISA kit- R&D Systems, Inc.(Minneapolis, MN, USA)

(十五) Tris - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(十六) Tween 20 - Fisher Scientific (New Jersey, USA)

(十七) Lipopolysaccharide(LPS) -Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

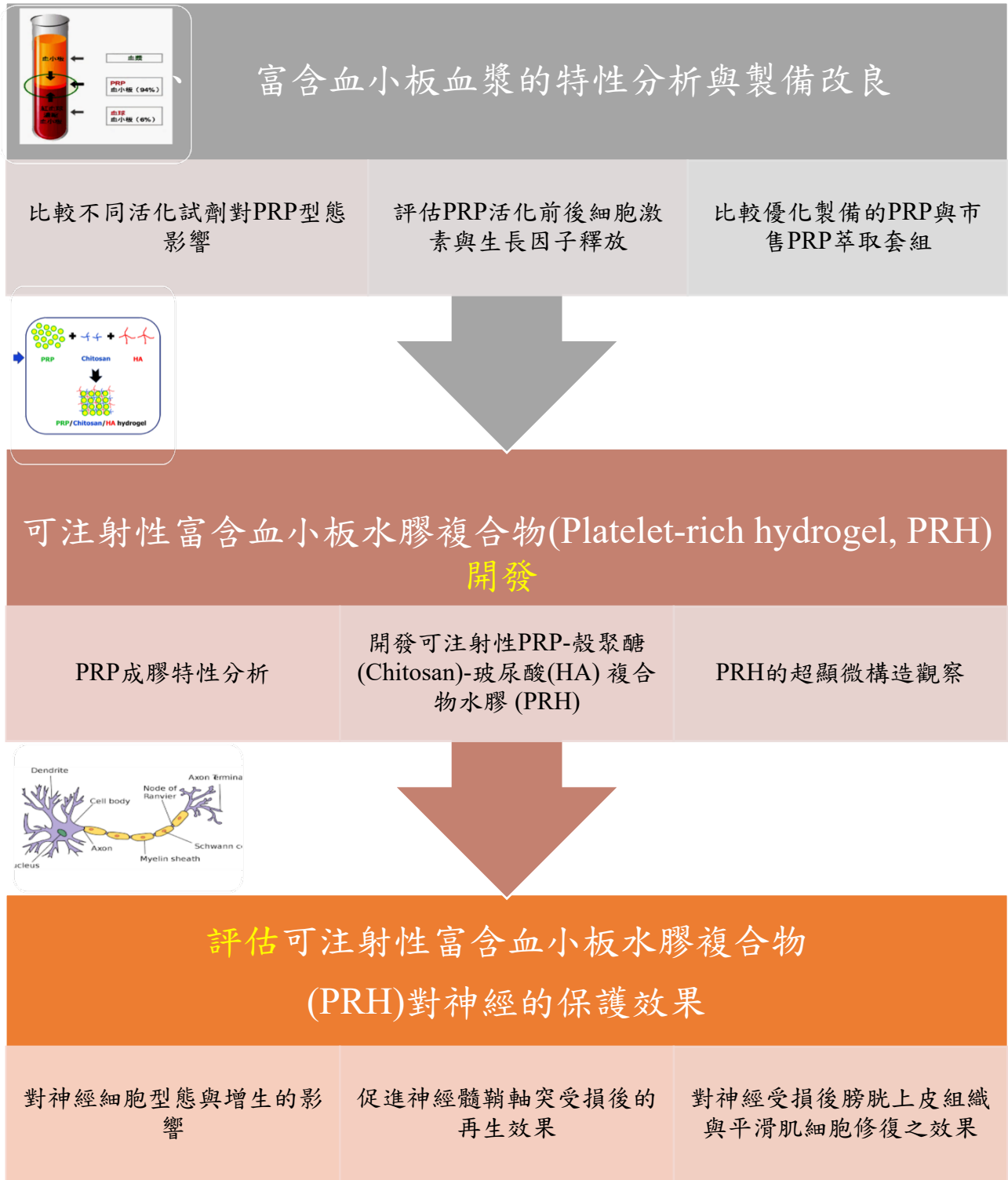
(十八) HA-Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(十九) Chitosan- Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

(二十) Pluronic F127 (PF127) - Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MP, USA)

肆、 研究過程或方法

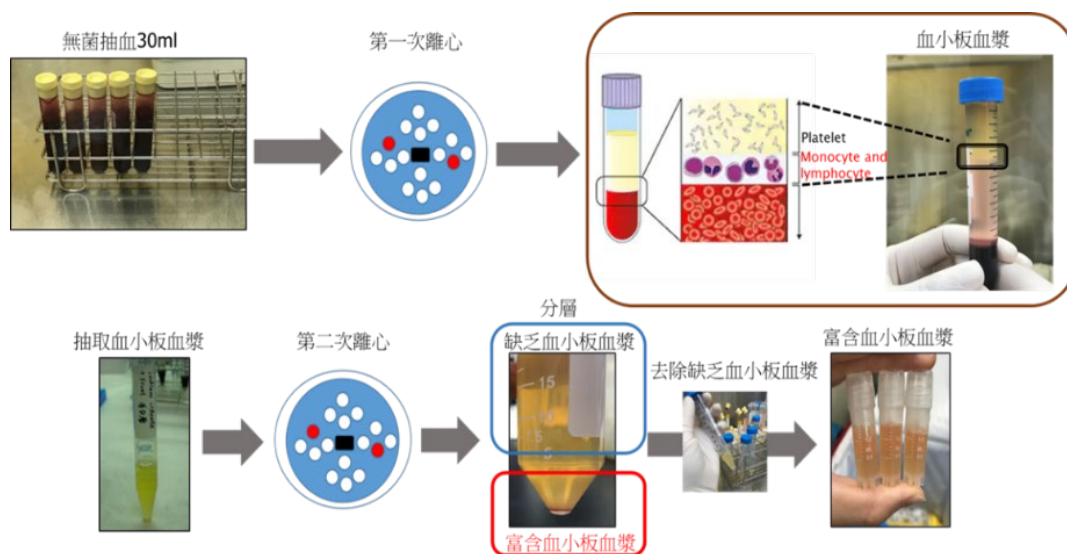
研究流程圖



一、富含血小板血漿(PRP)的製備與改良

(一) PRP 製備：

以 21 號針頭抽取 40 mL 的大鼠血液並立即加入含 ACD-A 抗凝血劑的採血管中充分混合。以 500 x g 離心 30 分鐘，分離完成後可以分為三層：上層血漿，中層 buffy coat 及下層紅血球。抽取中層 buffy coat 及上層血漿。以 2000 xg 的速度離心 15 分鐘。離心後分為二層：上層為血漿，下層即為「PRP」。小心抽掉 9/10 的上層缺乏血小板血漿 (Platelet poor plasma, PPP)，剩餘的 1/10 即為「PRP」。需計數後確定含有 $1\sim 2\times 10^6/\mu\text{L}$ 以上的血小板數量在血漿內。



圖一、PRP 製備過程說明與流程圖。

(二) 傳統 PRP 活化前後血小板的型態變化

利用穿透式電子顯微鏡來觀察 PRP 加入氯化鈣前後血小板的型態變化。我們將製備好的 PRP，加入 1:9 的 40mM 的氯化鈣之後，經由特殊的固定處理過程，由專門技術人員協助製備成標本並放置在銅網上後於電子顯微鏡上做觀察。

(三) 驗證不同活化試劑對 PRP 中血小板型態改變之影響

利用穿透式電子顯微鏡來觀察 PRP 加入不同活化試劑對 PRP 中血小板型態改變之影響。我們將製備好的 PRP，分別加入 5% Thrombin, 1.75% CS175, 1% TC196 and 1% SB052 之後，經由特殊的固定處理過程，由專門技術人員協助製備成標本並放置在銅網上後於電子顯微鏡上做觀察。

(四) 以酵素免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay) 測試活化前後生長因子與細胞激素濃度差異，並與市售套組做比較。

後續我們將 PRP 使用 CS175 活化後使用稀釋緩衝液將其稀釋 50 倍後備用。並將標準液依序 2 倍稀釋，濃度分別為 (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0 ng/ μ L、各 3 重複)。各取 100 μ L 加至 ELISA plate。室溫靜置 2 小時後，以 400 μ L 的 PBS / 0.05% Tween 20 各清洗 4 次，再加入稀釋 1000 倍的 100 μ L 的 Detection antibody (稀釋成 1/1000)，置於室溫 2 小時，接著以 400 μ L 的 PBS / 0.05% Tween 20 清洗 4 次，加入 100 μ L 的 HRP-linked antibody (稀釋成 1/200)，置於室溫 20 分鐘，接著以 400 μ L 的 D-PBS / 0.05% Tween 20 清洗 4 次，加入 100 μ L 的 Substrate solution，於室溫下靜置 20 分鐘，加入 50 μ L 的 2N 硫酸 使之停止反應，以 Elisa reader 於 450 nm 測定。實驗結束後標準溶液畫出標準曲線，再以內差法推測算出「富血小板血漿」中含 CXC 趨化因子 5 (C-X-C motif chemokine 5 ; CXCL5)、轉化生長因子- β 1 (Transforming growth factor beta 1 ; TGF- β 1) 與血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factors ; VEGF)濃度，作為「PRP」生長因子與細胞激素濃度的參考依據。而與市售 PRP 萃取套組比較下列細胞激素 CXCL5、Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)、Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP5)、Interferon gamma (IFN γ) 與生長因子 Platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA)、VEGF-C、VEGF、Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9)、Epidermal growth factor (EGF)、Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) 之濃度。

二、可注射性富含血小板水膠複合物(Platelet Rich Hydrogel, PRH)開發

(一) 不同促凝試劑對PRP成膠特性分析：

將製備好的PRP分別加入凝血酶、膠原蛋白與玻尿酸(hyaluronic acid; HA)後，這三個分別是可以促進血小板活化或凝集的物质，加入後分別觀察其成膠後的型態、成膠後放置37°C，1天、3天、7天後的膠體變化。

(二) 製備PRP / 玻尿酸水膠複合物(HA complex hydrogel)

1. 玻尿酸複合物(HA-complex)的製備：

分別使用不同濃度的玻尿酸(hyaluronic acid; HA)與Pluronic F127 (PF127)混合後，形成HA-complex。詳細流程為秤取1 g的HA後，加去離子水99g混合。為使HA能夠溶解，將配製樣品放在震盪器搖晃一晚，樣品置於冰箱備用。配製1M MgCl₂

溶液，稱取20.33 g的magnesium chloride hexahydrate後，加入100 mL去離子水，攪拌溶解。配製30% PF127 (w/w) 溶液，稱取30 g的PF127後，再加入 70g 的水混合。

2. 製備PRP / 玻尿酸水膠複合物(HA complex hydrogel)：

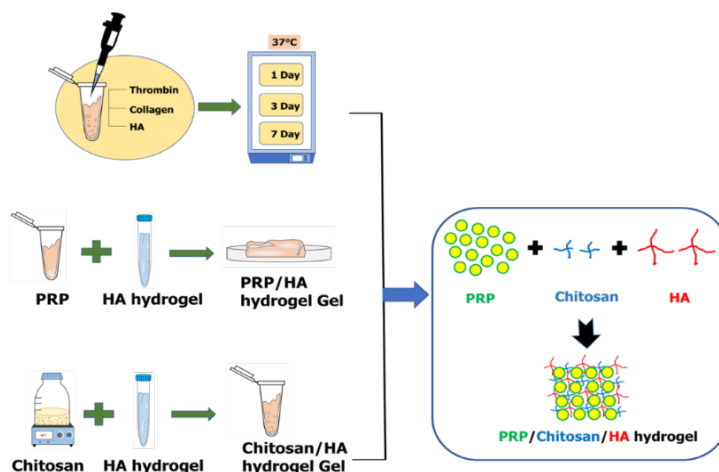
利用mechanically vortex震盪450 μ L PRP，一邊震盪一邊緩慢添加50 μ L的HA complex hydrogel，添加完後，均勻搖晃震盪使PRP能夠均勻於水凝膠中。

3. 觀察PRP / 玻尿酸水膠複合物(HA complex hydrogel)的備黏稠性與附著力：

使用黏度計確認各組黏性(Viscosity)、剪應力(shear stress)、剪切速率 (Shear rate) 與流速(Flow rate)等參數及其相關性，以確認可注射性之條件。

(三) 殼聚糖(Chitosan)對玻尿酸水膠複合物(HA complex hydrogel)結構的穩定性影響：

將3 mg的Chitosan與1 mL HA complex hydrogel混合形成膠體後，分別置於PH4-7的緩衝液中，並分別放置於25 $^{\circ}$ C，37 $^{\circ}$ C，45 $^{\circ}$ C等溫度下4小時，觀察其膠體的降解程度來確定交體結構的穩定性。統計方式為四小時後剩餘膠體的重量/原膠體重量x100%。



圖二、可注射性富含血小板水膠複合物(Platelet Rich Hydrogel, PRH)開發流程

(四) 可注射性富含血小板水膠複合物(Platelet Rich Hydrogel, PRH)製備及觀察：

先配置3mg/mL的Chitosan，取100 μ L與1 mL PRP混和後，配置0.25% HA complex hydrogel(根據實驗結果(二))，慢慢地將100 μ L的PRP/Chitosan與900 μ L HA complex hydrogel混合形成膠體後，放置於4 $^{\circ}$ C備用。後續進一步用穿透性電子顯微鏡驗證PRP/HA complex水膠與PRP/Chitosan/HA complex水膠的超顯微構造，發現PRP/Chitosan/HA complex水膠具可注射性且對血小板的包覆性佳。我們利用小鼠皮下注射證實PRH在體內的聚合性，生體降解性與膠體穩定度。最後我們將進一步驗證可

注射性富含血小板水膠複合物對神經的保護效果，並將開發之產物命名為Platelet Rich Hydrogel(PRH)。

三、 評估可注射性富含血小板水膠複合物(PRH)對神經的保護效果

(一) 對神經細胞型態的影響

1. 細胞培養：

大鼠許旺細胞系 RT4-D6P2T 購自 ATCC。使用 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培養基培養。後續使用 DMEM 培養液培養，並在補充有 10%胎牛血清(FBS, Gibco, Grand Island, NY) 和 1%青黴素-鏈黴素溶液中生長。每兩天更換一次培養基。

2. 細胞形態研究：

為了進一步研究細胞在膠體中的分佈和形狀，將 100 μ L 含細胞的 PRH 培養在 96 孔盤的孔中，並孵育 3 天。之後將細胞在顯微鏡下觀察其型態變化。

(二) 以 MTT 檢測不同濃度的 PRH 對大鼠神經細胞增生之效果

1. 細胞毒性與增生實驗：

將實驗分為對照組(無細胞)、有使用 PRH 與無使用 PRH。細胞毒性試驗濃度的 PRH 分別含有 20%, 10%, 5%, 3%, 1%的 PRP，而增生實驗的 PRH 分別含有 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01%的 PRP。兩組各在加有 10%胎牛血清和 1%青黴素鏈黴素的 DMEM 存在下，在 96 孔盤中培養上述細胞。沒有 PRH 的細胞與僅加 HA complex hydrogel 作為對照組。細胞貼附後分別培養 2 與 4 天，為了進行測定，小心吸出培養基，並用無菌生理食鹽水沖洗 PRH 一次。將培養液吸掉後加入 MTT 混合培養基(比例 1:9 要避光)，總體積 100 μ L，放在培養箱 4 小時後吸掉培養液加入 100 μ LDMSO，輕輕搖晃 5mins 後測吸光值 570nm。

2. 細胞毒性與增生實驗分析：

將有使用 PRH 測得的吸光值-沒有細胞的組別測得的吸光值/無使用 PRH 測得的吸光值)*100%。每個組別至少三次重複，各組數值代表至少三個獨立實驗測得的光密度值(optical density values)的平均值(mean) \pm 平均值標準誤差 (standard error of mean, SEM)。

(三) 動物實驗流程

對於 Lipopolysaccharide (LPS)灌注，17 隻雄性 8 周大的 Sprague-Dawley 大鼠分成

控制組(無經 LPS 灌注)、LPS 灌注後使用生理食鹽水治療與 LPS 灌注後使用活化後的 PRH 治療三組，使用 PE50 的導管插入膀胱並將其綁緊，45 分鐘後，將膀胱內尿液排空，並用 PBS 溶液洗滌，最後使用 PBS 或 LPS 膀胱內灌注處理 (750 μ g/大鼠, Sigma-Aldrich) 30 分鐘以誘發發炎現象。每週膀胱內灌注一次 LPS，共 5 週，誘導尿路上皮的慢性損傷。等待誘發膀胱炎之後，每周膀胱內灌注 200ul PRH 一次，連續灌注兩周，治療結束後再讓動物休息 7 天，進行膀胱內壓力測試。在進行膀胱內壓力測試前，會進行大鼠頸動脈插管，將頸動脈找到後，插入 PE50 的管子，同時將管子接到測壓力的機器上面，再將膀胱內的管子也同時接到機器上，同時進行血壓與膀胱壓的偵測。等待膀胱功能測試結束後，膀胱組織將收集進行組織學分析。動物在所有實驗過程中若有產生不適感或疼痛，將給予止痛藥處置。該實驗進行過程無觀察到動物有顯著不適的現象，且實驗過程中，藥物處理組別無造成動物死亡的案例。膀胱動物模式的操作與最後動物組織的採集由輔大醫學系吳宜娜老師指導輔大研究生協助進行相關動物實驗操作，兩位皆有實驗動物訓練證書並具備多年動物研究經驗。所有動物實驗均已得到輔仁大學動物照顧與倫理委員會核可 (IACUC-A10775)。

1. 對神經髓鞘軸突受損後的再生評估

(1) 化學組織染色：甲苯胺藍染色 (toluidine blue staining)：

評估骨盆神經髓鞘性軸突的數量與型態變化。將經脫水、浸蠟後的組織，以組織包埋機製作成的組織蠟塊，放入冰箱冰凍兩分鐘，即可利用切片機來切成厚度約為 2~5 μ m 的石蠟切片。以鑷子將組織薄片置於溫水中，使其充分舒張，再以經 silane-coated slide 處理過的玻片將之撈起，並將玻片置於烘片台上使其水分乾燥，使切片與玻片貼合，後續分別進行組織染色來評估組織損傷所產生的變化。

(2) 電子顯微鏡結果觀察：

將組織放置於含有 2.5% 戊二醛與 4% 聚甲醛的磷酸鹽緩衝溶液中，經三次磷酸鹽緩衝溶液置換 (每次 10 分鐘)，接著換上含有 1% 四氧化鐵的磷酸鹽緩衝溶液，靜置 1 小時。再經三次磷酸鹽緩衝溶液置換 (每次 10 分鐘)，最後酒精脫水 (Dehydration) 與丙酮滲透 (infiltration) 並將其包埋後送入 68°C 烘箱中，進行聚合 24 小時。最後厚切片為 500nm，超薄切片為 70nm。上機與拍照部分由輔仁大學電子顯微鏡實驗室專業技術人員依電子顯微鏡操作手冊操作。我們與技術人員共同討論實驗觀察內容與結果分析。

2. 對受損尿路上皮細胞、膀胱平滑肌細胞、膀胱組織之影響

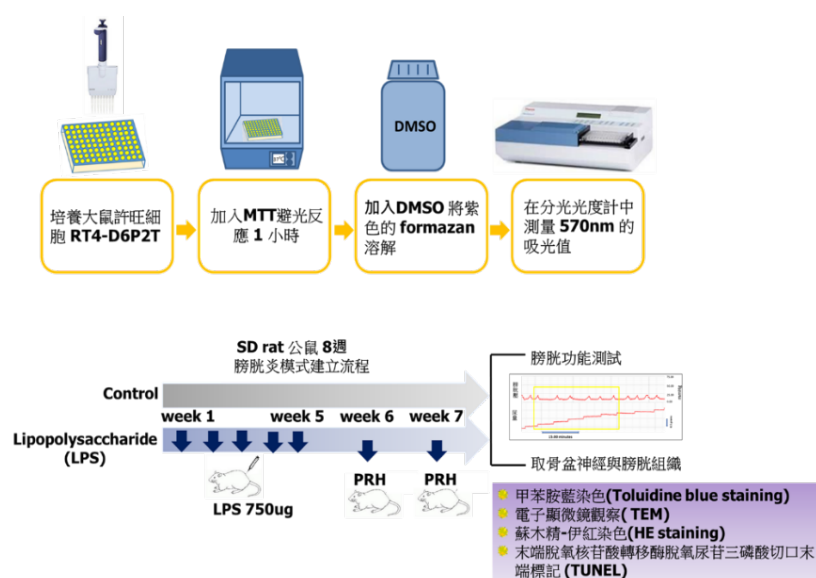
(1) 蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain (HE) stain) :

評估膀胱組織上皮與黏膜層的傷害。

(2) 末端脫氧核苷酸轉移酶脫氧尿苷三磷酸切口末端標記

(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling;TUNEL) :

將組織切片烘乾後脫蠟，回水後放置在 D-PBS 中清洗，接著將片子放置在 blocking buffer 中作用一小時，接著使用 PBS 清洗，接著使用蛋白酶 k 的孵育 30 min，使後面的酶和抗體進入胞內。加入 TUNEL 反應液，在室溫作用 1 小時，再次用 PBS 清洗三次後，再加入二級抗體(濃度 1:400)室溫作用一小時，用 PBS 清洗三次，最後上核染劑後在螢光顯微鏡下觀察。氧核糖核苷酸末端轉移酶介導的缺口末端標記分析用來評估平滑肌細胞凋亡的數量。



圖三、可注射性富含血小板水膠複合物(PRH)對神經的保護效果的實驗流程

(四) 統計分析

實驗數據表示為平均值±標準偏差。使用 Windows 的 SPSS 12.0 版 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), 透過單因子變異數分析 (ANOVA) 和 Scheffé 事後檢驗進行統計分析。P < 0.05 被認為具有統計學意義。

伍、 研究結果

一、 富含血小板濃縮液的製備與改良

(一) 富含血小板血漿(Platelet Rich Plasma; PRP)的製備與特性分析：

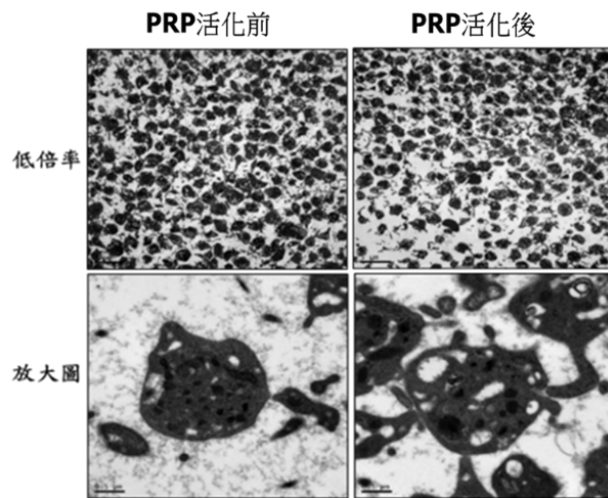
1. PRP 製備：

PRP 製備在一般醫院或診所標榜的是簡單與快速，但看似簡單的流程卻很難達到標準一致的結果，一開始我們將透過學習 PRP 製備流程，從中學習 PRP 製備中需要特別被注意的事項。首先，實驗室人員將大鼠全血抽取後加上抗凝血劑 ACD-A 後混勻，提供給我們去進行第一次離心後，我們可以顯著看到分層，中間會有一層較為雲霧狀的區域，透過文獻搜尋與討論，這區域為血小板與單核球與淋巴球混合物。最上層為血小板血漿。將血小板血漿全部吸取到新的試管後，經過第二次離心可以得到明顯的分層與沉澱物。紅色框線區域為 PRP，藍色框線區域為缺乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma; PPP)。再將缺乏血小板血漿去除後，可以得到濃縮的血小板血漿。最後加入活化劑活化後產生凝膠塊。但在這製備過程中，我們無法很清楚的將單核球與淋巴球混合物與血小板做分離，一定會取到部分的單核球與淋巴球混合物，而且每次取到的範圍也會不是那麼的確定，我想這是目前 PRP 製備上的限制。另外，最後 PRP 需要活化促使其凝集後才能有效釋放其顆粒內攜帶物質，但我們亦發現在活化後並不是每次都可以觀察到 PRP 凝集而成為膠體構造。這也可能是在第一次離心後，得到血小板數量差異所導致的。

2. PRP 活化前後的血小板型態變化-血小板內顆粒會透過活化而釋放：

血小板在體內的主要功能是凝血。在活體組織，受傷組織本身會釋放大量使血小板活化的訊號蛋白，促使血小板內的鈣離子濃度上升，讓顆粒可以被運送到膜上來釋放修復物質，增強組織修復。所以血小板活化是使其生長因子與細胞激素釋放的一個很重要的過程。但在活體外血小板的活化路徑是否跟在活體內是一樣的過程，並沒有那麼清楚。若體內跟體外的反應是一致的，我們提高血小板內鈣離子濃度就會發生活化現象使血小板內的顆粒釋放。為了驗證這個想法，我們利用穿透式電子顯微鏡，觀察 PRP 加入傳統血小板活化劑(氯化鈣)前後血小板的型態變化。結果顯示血小板膜上的受體被活化後觸手增加，可以吸引鄰近的血小板過來進行結合產生凝集反應，並進一步可能影響血小板中 α 顆粒釋放生長因子與分泌蛋白(圖四)。透過上面這些實驗過程，我們確認 PRP 是可以在體外被活化

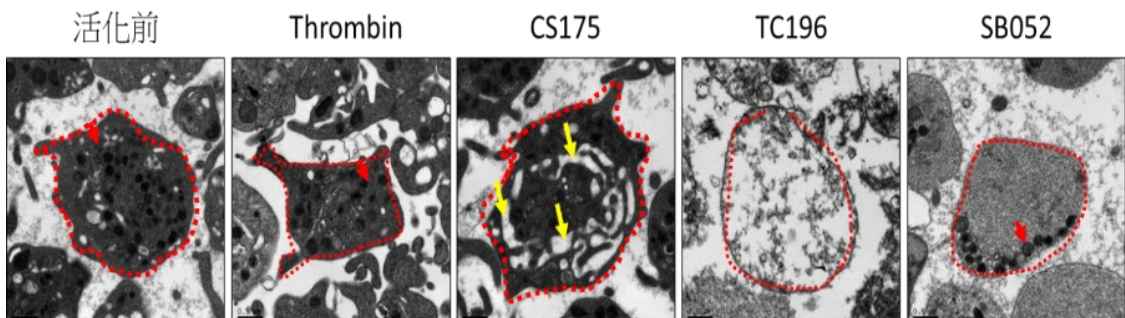
的。但同時透過這個實驗也讓我們發現更多製備上的疑慮，就是 PRP 會因為製備過程中的碰撞而使部分血小板先行活化將生長因子釋放，導致後續收集到的血小板是不含修復物質的空殼血小板。



圖四、電子顯微鏡觀察 PRP 經傳統活化劑氯化鈣處理後的血小板型態變化。

3. 不同活化試劑會改變 PRP 中血小板型態：

我們想知道不同的活化方式是否會改變 PRP 中血小板的型態，進而影響血小板中 α 顆粒細胞釋放生長因子與分泌蛋白的含量。所以我們在 PRP 中加入四種不同的活化試劑，分別為 Thrombin, CS175, TC196 and SB052，使用電子顯微鏡觀察各組 PRP 中血小板結構。結果發現 PRP 中加入 Thrombin，血小板型態不會有太多的改變，活化的效果較差。CS175 組別顯示可以釋放較多的 α 顆粒且形態完整。而加入 TC196 會破壞血小板外膜的結構，而使得血小板被溶解使其內含物釋出，且整個結構改變。此外 SB052 的組別則會導致血小板中顆粒會被吸引到血小板膜周邊，但不會被釋放到血小板外。這些結果不僅證實不同活化試劑確實會使血小板型態產生變化，更發現 CS175 對血小板活化較果最佳(圖五)。進一步我們將驗證 PRP 活化前後對生長因子釋放之效果。



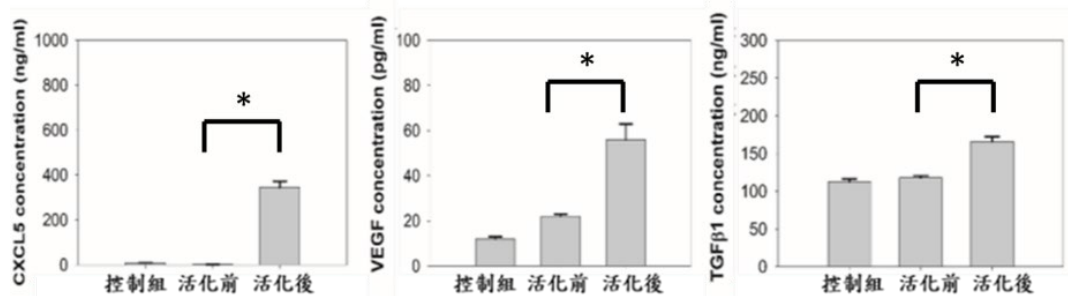
圖五、電子顯微鏡比較 PRP 經四種不同活化劑處理後的血小板型態變化。

紅色虛線顯示一個完整血小板大小，紅色箭頭為血小板中顆粒，黃色箭頭為顆粒釋出後，在血小板內產生之空泡。

4. PRP 透過活化可以提高生長因子釋放：

我們利用穿透式電子顯微鏡證實能透過外加活化劑的方式促進 PRP 內的顆粒釋放。但 PRP 內的顆粒被釋放出來後是否真的會增加細胞激素與生長因子的濃度？還是這些物質依舊被顆粒給包覆？

為了證實活化後 PRP 內的血小板顆粒有將其含有的修復物質釋放到血小板外，我們利用酵素免疫吸附分析方法來確認活化前後修復物質的釋放效果。我們將製備好的 PRP 分成 3 管，進一步使用 CS175 為活化劑，將其分為控制組(一般血漿)、未經活化的 PRP 及經活化後的 PRP 共三組，使用酵素免疫吸附分析去測定血漿細胞激素(CXCL5)與生長因子(VEGF 與 TGF- β 1)濃度。結果發現活化後的 PRP 組別中的細胞激素與生長因子濃度顯著增多，比未活化組增加 1.4 倍到 4 倍以上(圖六)，證明活化過程對血小板細胞激素與生長因子釋放的重要性。



圖六、PRP 活化後細胞激素與生長因子釋放。*為活化後與活化前比較 P 值 <0.05 。

5. 優化製備的 PRP 較市售 PRP 萃取套組釋放更多生長因子：

為了比較優化製備的 PRP 與市售 PRP 萃取套組的生長因子濃度，我們選用了一組市售 PRP 套組，利用酵素免疫吸附分析方法來確認兩組的生長因子釋放差異。我們將試驗分為 PRP, Plasma(一般血漿)與市售 PRP 套組(PRP kit)共三組，使用酵素免疫吸附分析去測定各組 PRP 中細胞激素 CXCL5、GCSF、IGFBP5、IFN γ 與生長因子 PDGF-AA、VEGF-C、VEGF、FGF9、EGF、與 BDNF 濃度。結果發現優化後的 PRP 組別中的細胞激素與生長因子濃度顯著比市售 PRP 萃取套組高 (圖七)，證明優化後的結果在細胞激素與生長因子釋放的效果優於市售產品。先前研

究也證實 PRP 細胞激素和生長因子濃度的增加有助於組織修復的過程(Wu et al., 2016)。所以進一步我們將優化製備完成的 PRP 應用在新型 PRP 水膠開發與後續細胞與動物研究上。

二、可注射性富含血小板水膠複合物(Platelet Rich Hydrogel, PRH)開發

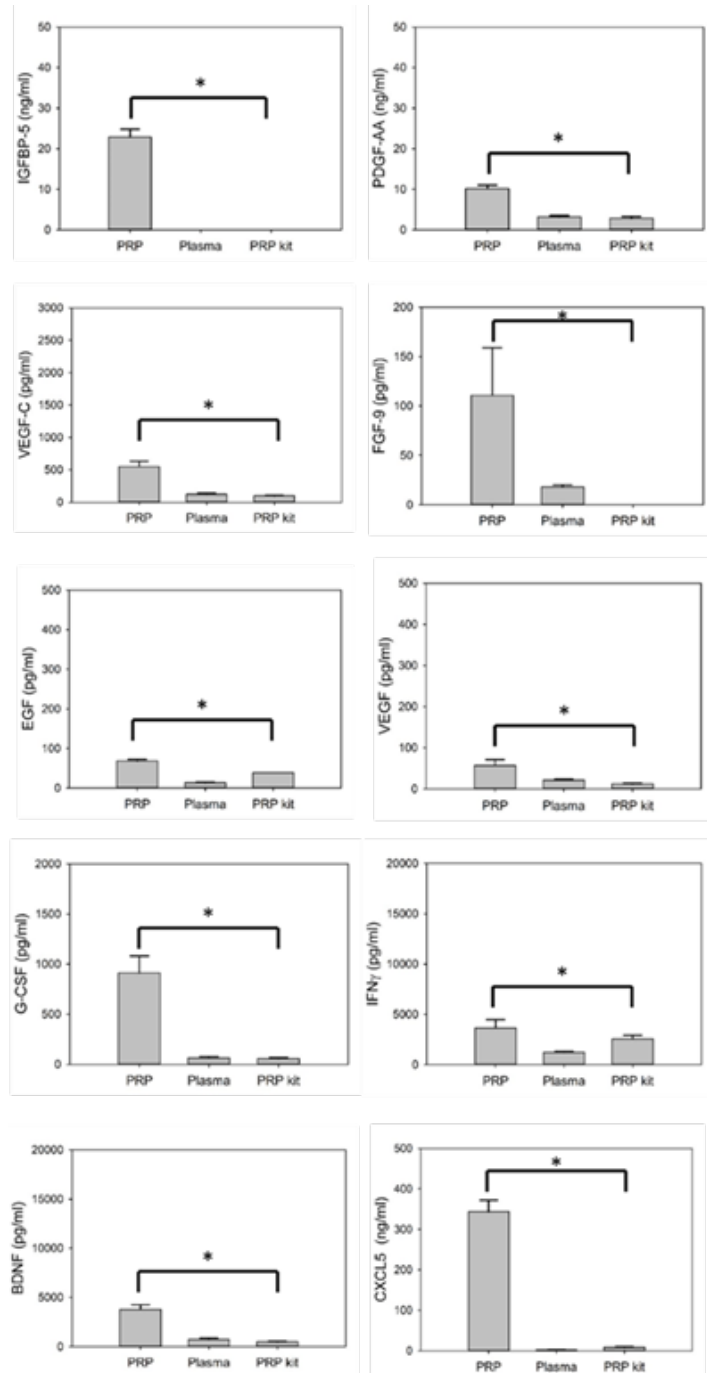
(一) PRP 成膠特性分析-不同促凝試劑使用於 PRP 會形成不同的膠體結構：

前述提到 PRP 因為有事前在抽血過程中加入抗凝血劑，所以較不易在抽血產生凝血，可以有充分的時間來製備 PRP，增加醫學上應用可能性。我們認為若可以瞭解不同促凝物質對 PRP 成膠的過程與影響，透過這樣的研究結果，未來可以將原先為流體的 PRP 產物改成凝膠的 PRP 製劑，可以提供醫學上更多的應用。所以我們將製備好的 PRP 分別加入凝血酶、膠原蛋白與玻尿酸後，這三個分別是可以促進血小板活化或凝集的物质，加入後分別觀察其成膠後的型態、成膠後放置 37°C 一天、成膠後放置 37°C 七天的穩定性。我們觀察到凝血酶與膠原蛋白皆會快速的產生纖維凝膠塊。凝血酶與膠原蛋白組別於成膠後放置 37°C 一天，可以觀察到部分纖維凝膠內的物質被釋放，放置 37°C 七天後，纖維凝膠構型仍然維持完整強韌，但內含物質已完全釋放。有趣的是加入玻尿酸的組別並不會形成強韌的纖維凝膠塊，而是形成血小板水膠結構，成膠後放置 37°C 一天，血小板水膠的總含量減少，放置 37°C 七天後，血小板水膠幾乎完全降解只剩下少許細微的血小板凝集聚合物(圖八)。自體產物、生體相容性與生體降解性是目前熱門的議題，PRP 因製備來自自體血液，本身就具備相當的生物安全性(Anitua et al., 2007)。若在製備改良後又可以使 PRP 具有生體可降解之特性，將會更具有醫療上的應用潛力。我們的結果加入凝血酶與膠原蛋白後都形成很強韌的纖維蛋白凝膠，但加入玻尿酸後卻可以形成 PRP 水膠，PRP 水膠可以達到黏稠現象，也似乎形成了更密集的交聯網絡。這個 PRP 水膠未來可以應用在該組織需要良好 PRP 貼附能力的治療上，像是膀胱或鼻腔，甚至可以塗抹在神經接合的導管中。

(二) 富含血小板水膠與 HA 複合物可以形成可注射性水膠 (PRP / HA complex hydrogel)：

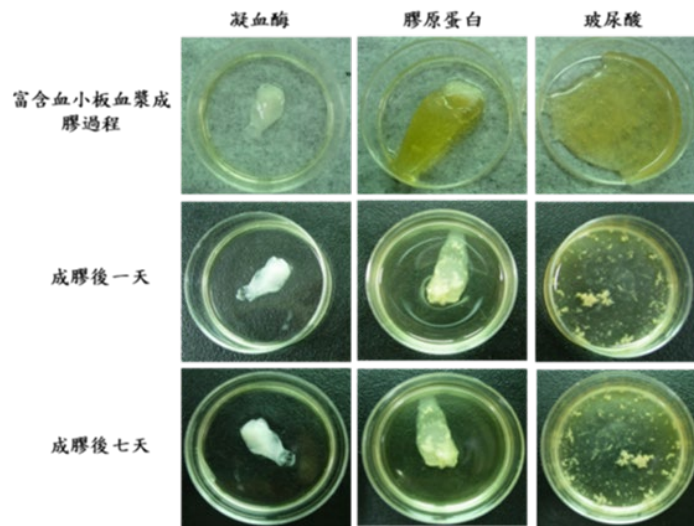
為了確認可注射性之富含血小板水膠之條件，我們將製備好的 PRP 分別加入不同濃度的 HA complex 後，分別觀察不同時間其成膠後的型態。我們觀察到 0.5% HA complex 與 PRP 放置 37°C，30 分鐘後就可以形成膠體，但因附著性與黏稠度很高，無法作為注射之劑型。使用低濃度的 0.05% HA complex 跟 PRP 混和後，放置達 1.5 小

時，依然無法形成凝膠。0.25% HA complex 與 PRP 混和後，可以具備黏稠性與附著力，而且具備可注射性之條件(圖九)。利用黏度計測量各組別的黏性後，發現不同濃度 HA complex 製備的 PRP / HA complex hydrogel，不僅其黏性差異很大之外，剪應力(shear stress)、剪切速率 (Shear rate) 與流速(Flow rate)都與 HA complex 呈現高度相關性(R 值 >0.9)(表一與圖十)。後續我們選擇 0.25% 的 HA 濃度作為後續 PRH 的製備條件。

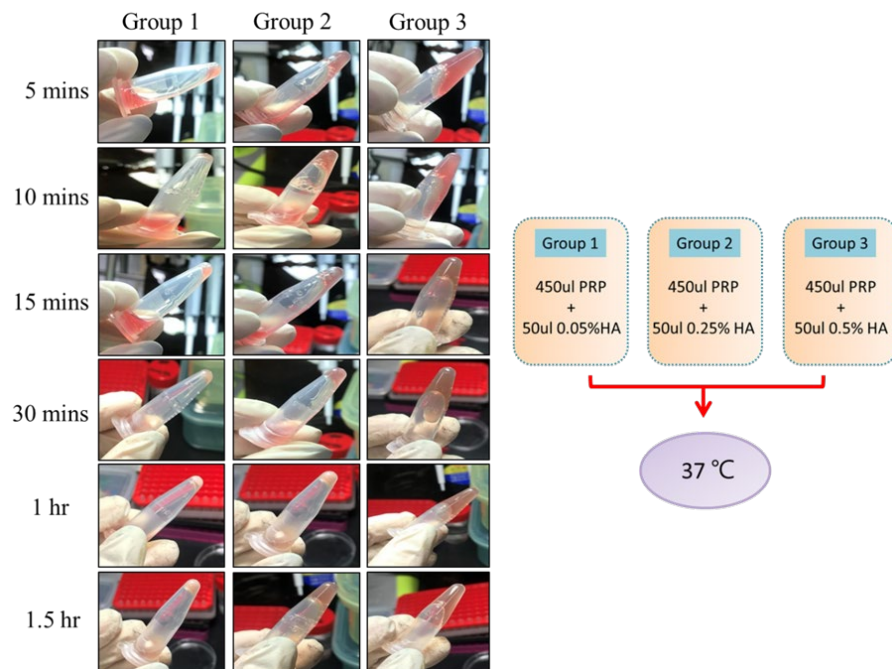


圖七、優化製備的 PRP 與市售 PRP 萃取套組中生長因子的濃度比較。

*為 PRP 組別與 PRP kit 組別比較 P 值 < 0.05。



圖八、不同活化試劑對 PRP 成膠的過程與影響。
分別呈現凝血酶、膠原蛋白與玻尿酸成膠過程與穩定性。

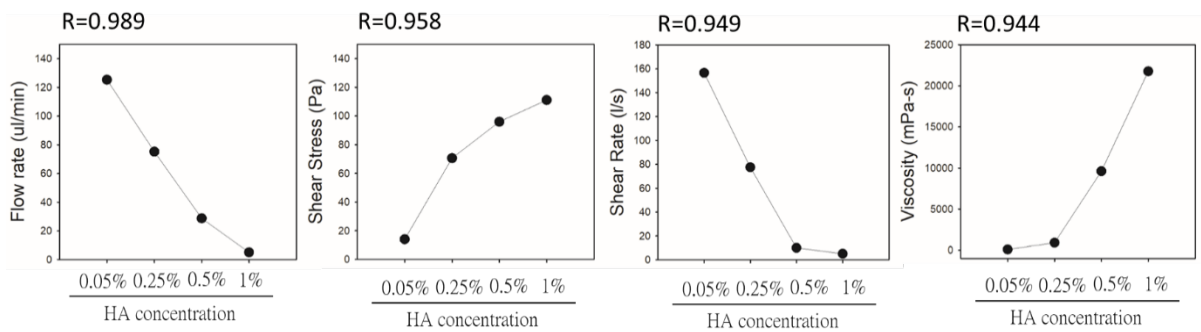


圖九、不同濃度 HA complex 與作用時間長短對形成可注射性富含血小板水膠之影響。

表一. HA concentration and viscosity change in PRH

Sample	Flow rate(ul/min)	Shear Stress(Pa)	Shear Rate(l/s)	Viscosity(mPa-s)
PRP+0.05% HA	125.3	14.0	156.6	89.5
PRP+0.25% HA	75.2	70.6	77.5	911.7
PRP+0.5% HA	28.7	96.0	10.0	9615.0
PRP+1% HA	5.0	111.1	5.1	21771.0

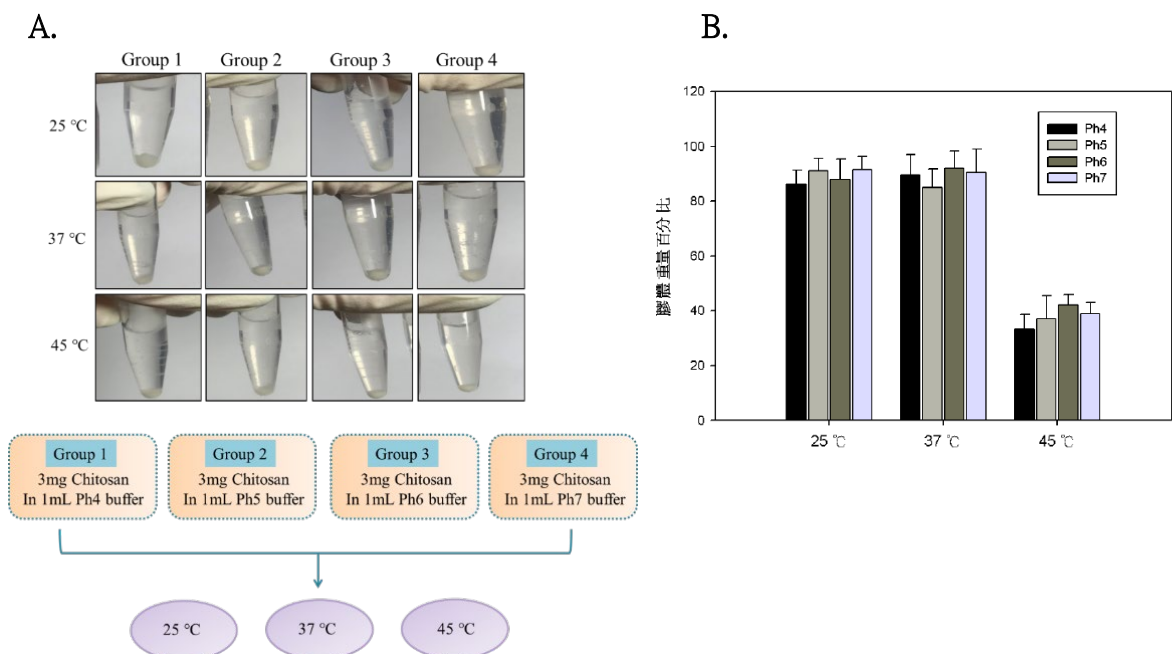
Final PRP concentration in PRP / HA complex hydrogel is 10%.



圖十、不同濃度 HA complex 製備的 PRP / HA complex hydrogel 與黏性(Viscosity)、剪應力(shear stress)、剪切速率 (Shear rate) 與流速(Flow rate)之相關性。

(三) 殼聚糖(Chitosan)生醫材料有助於 HA complex 膠體結構的穩定性：

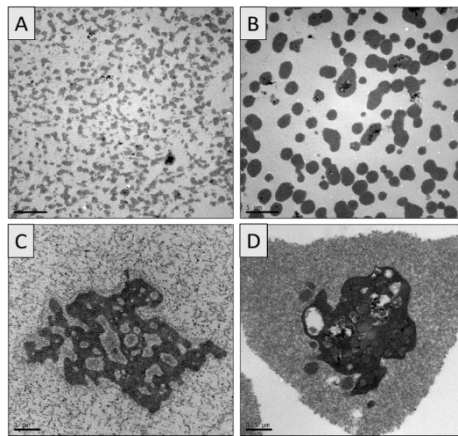
先前實驗室結果顯示 Chitosan/HA complex 形成膠體後的孔洞直徑較 HA complex 來得小。可以包覆更多的分子使其緩慢釋放。但進一步想驗證 Chitosan/HA complex 水膠在不同酸鹼與溫度下，是否會影響其穩定性與生長因子釋放能力。我們將 3mg 的 Chitosan 與 HA complex 混合形成膠體後，分別置於 PH4-7 的緩衝液中，並將其分別置於 25°C, 37°C, 45°C 等溫度下，放置 4 小時，觀察其膠體的穩定性。結果顯示 Chitosan/HA complex 水膠在不同酸鹼值下都可以維持很好的穩定結構，但在高溫 45°C 的環境下會有顯著的降解現象，膠體在 4 小時之後，僅剩餘原先製備膠體重量的 33% (圖十一)。這個結果顯示 Chitosan 生醫材料與水膠結合後，有助於膠體結構的穩定性。



圖十一、A. 觀察 Chitosan/HA complex 水膠在不同酸鹼與溫度下，對膠體穩定性之影響。 B. 定量 Chitosan/HA complex 水膠在不同酸鹼與溫度下，剩餘膠體的重量百分比。

(四) Chitosan/HA complex hydrogel 可以完整包覆 PRP

為了證實 PRP/Chitosan/HA complex，是否能完整包覆且形成穩定的膠體，我們利用穿透性電子顯微鏡分別觀察 HA complex hydrogel 與 Chitosan/HA complex hydrogel 的超顯微構造。結果顯示 HA complex hydrogel 的結構較為鬆散，聚合能力較差，容易降解(圖十二 A)。而 Chitosan/HA complex 膠體結構較 HA complex hydrogel 緻密，聚合能力較佳，容易形成球形膠體結構，有助於 PRP 的包覆與釋放(圖十二 B)。進一步再分別觀察 HA complex hydrogel 與 Chitosan/HA complex hydrogel 包覆 PRP 的能力，顯示在 PRP/HA complex hydrogel 組別中，血小板周邊的膠體鬆垮且排列不規則(圖十二 C)。而 Chitosan/HA complex 不僅能形成更穩定的膠體，還能將血小板完整包覆，而且包覆的凝膠緻密且規則排列。更重要的是並不影響血小板的完整結構與特性(圖十二 D)。



圖十二、利用穿透性電子顯微鏡觀察水膠的超顯微構造。

(A) HA complex hydrogel (B) Chitosan/HA complex hydrogel

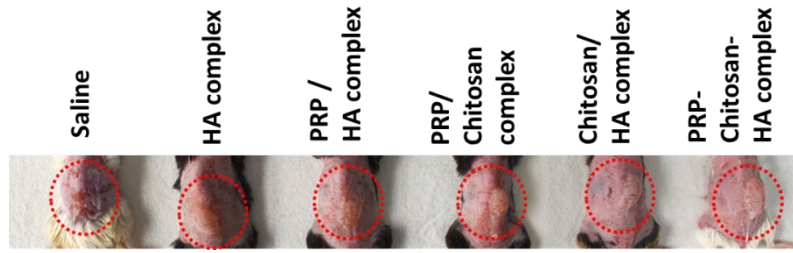
(C) PRP/ HA complex hydrogel (D) PRP/ Chitosan/HA complex hydrogel。

(五) PRP-Chitosan-HA complex Hydrogel (PRH)具備體內聚合性，生體可降解性並具備更佳的緩釋能力

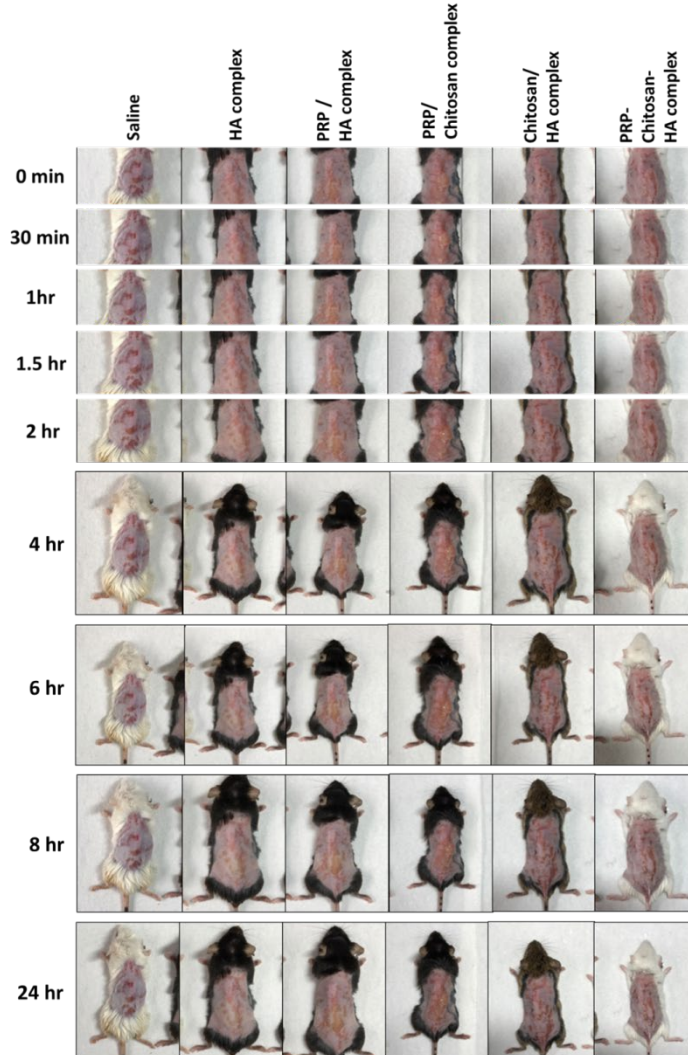
為了證實 PRH 在體內是否可以緩慢降解，讓 PRP 中的生長因子緩慢釋放，達到生長因子長時間緩釋的功效，我們利用動物中心淘汰小鼠，將其背部的毛剃除後，將其分成六組(生理食鹽水，HA complex，PRP / HA complex hydrogel，PRP/Chitosan complex，Chitosan/HA complex 與 PRP-Chitosan-HA complex Hydrogel)，各組分別施打 0.3ml 體積的複合物於小鼠背部皮下並觀察各組不同時間之降解情形。我們發現不同組別在皮下形成的面積不同，膠體結構越穩固的可以在皮下聚合成一個明顯的突起物。而生理食鹽水與膠體結構較鬆散的則無法在皮下聚合，會在背部擴散(圖十三 A)。我們也發現 HA complex hydrogel 降解時間較快，而 Chitosan/HA complex hydrogel 相較於 HA complex

hydrogel 在體內可以有更長時間的釋放。進一步再觀察比較 PRP-Chitosan-HA complex Hydrogel 與 Chitosan/HA complex hydrogel 在體內降解的情形，發現 PRP-Chitosan-HA complex Hydrogel 有更佳的緩釋效果(圖十三 B 與 C)。

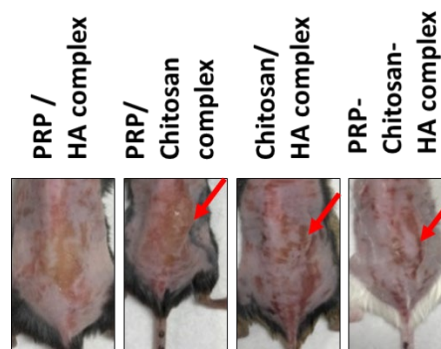
A.



B.



C.



圖十三、觀察小鼠皮下各組不同複合物在體內。

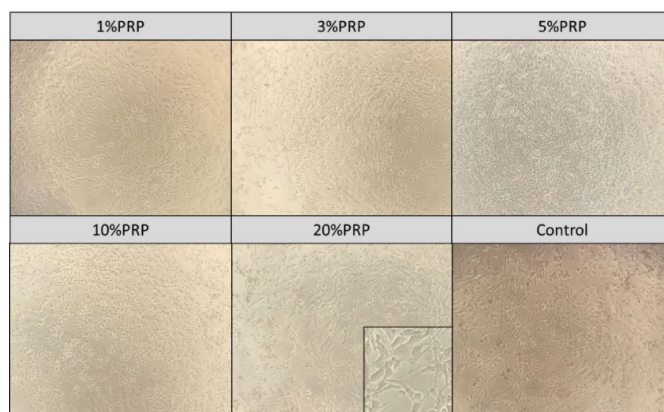
A. 聚合與 B. 皮下注射後 0-24 小時不同時點在體內降解情形。

C. 皮下注射後 36 小時觀察在體內的降解情形。

三、驗證可注射性富含血小板水膠複合物(PRH)對神經的保護效果

(一) 可注射性富含血小板水膠複合物 (PRH)對大鼠許旺細胞型態的影響：

在本篇研究中，我們使用大鼠許旺細胞 RT4-D6P2T 在含不同濃度 PRP 之 PRH 的處理下對其細胞型態的觀察。首先，先將含不同濃度 PRP 之 PRH (1%、3%、5%、10% 與 20%)在許旺細胞單獨做預處理，評估 PRP 在這樣的濃度下是否會影響 RT4-D6P2T 之細胞型態，對其產生細胞毒性。實驗結果顯示，經過不同濃度 PRH 處理之組別，在濃度範圍 1%-10%之間均不會影響 RT4-D6P2T 之型態 (圖十四)。但在高濃度 20%PRH 的處理下，有少許 RT4-D6P2T 細胞的核質比變大。



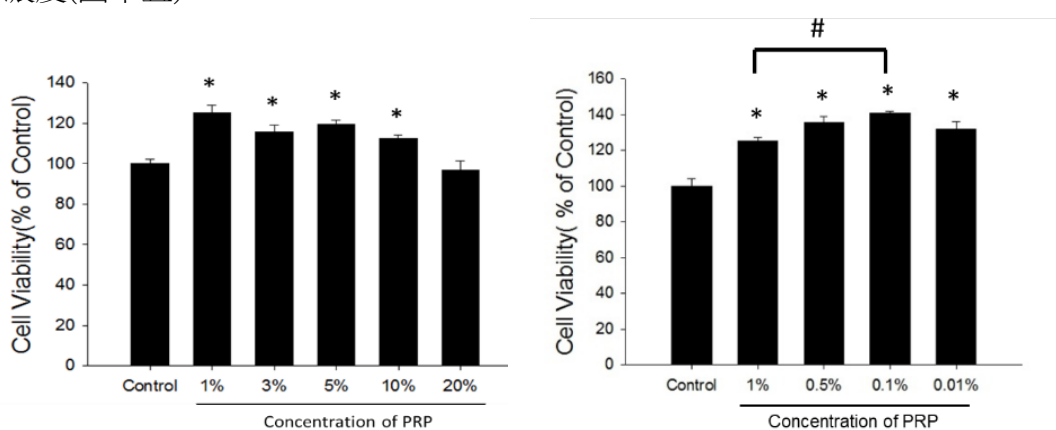
圖十四、觀察可注射性富含血小板水膠複合物對大鼠許旺細胞型態的影響。

大鼠許旺細胞在含不同濃度 PRP 之 PRH ((1%、3%、5%、10%與 20%)與控制組培養 72 小時之細胞型態變化。

(二) PRH 不僅不具細胞毒性還能促進大鼠許旺細胞的增生：

在本篇研究中，我們利用 MTT 還原分析法，檢測大鼠許旺細胞在含不同濃度 PRP 之 PRH 的處理下對其促進增生的效果，以篩選出最適合之作用濃度。首先，使用高濃度的 PRP 來測試 PRH 是否會產生細胞毒性。先將不同濃度 PRP(1%、3%、5%、10% 與 20%)的 PRH 在許旺細胞單獨做預處理，評估 PRH 在這樣的濃度下是否會導致 RT4-D6P2T 死亡。實驗結果顯示，我們發現透過 MTT 還原分析法，經過(1%-10%)不同濃度 PRP 水膠處理之組別，均有助於許旺細胞之存活率，顯示 PRH 不僅不具細胞毒性，還能促進神經細胞增生。為確認何種濃度對細胞增生之效果最佳，我們亦再分別使用含有 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01% PRP 的 PRH，結果顯示含 0.1% PRP 之 PRH 的增生效果最

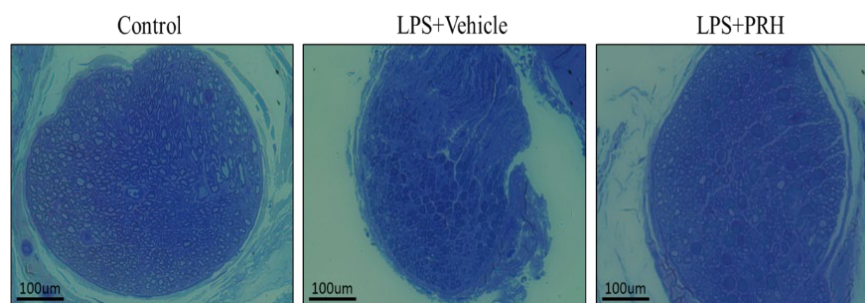
佳，因此在後續的動物實驗中，我們將換算細胞與組織的比例，作為 PRH 應用之作用濃度(圖十五)。



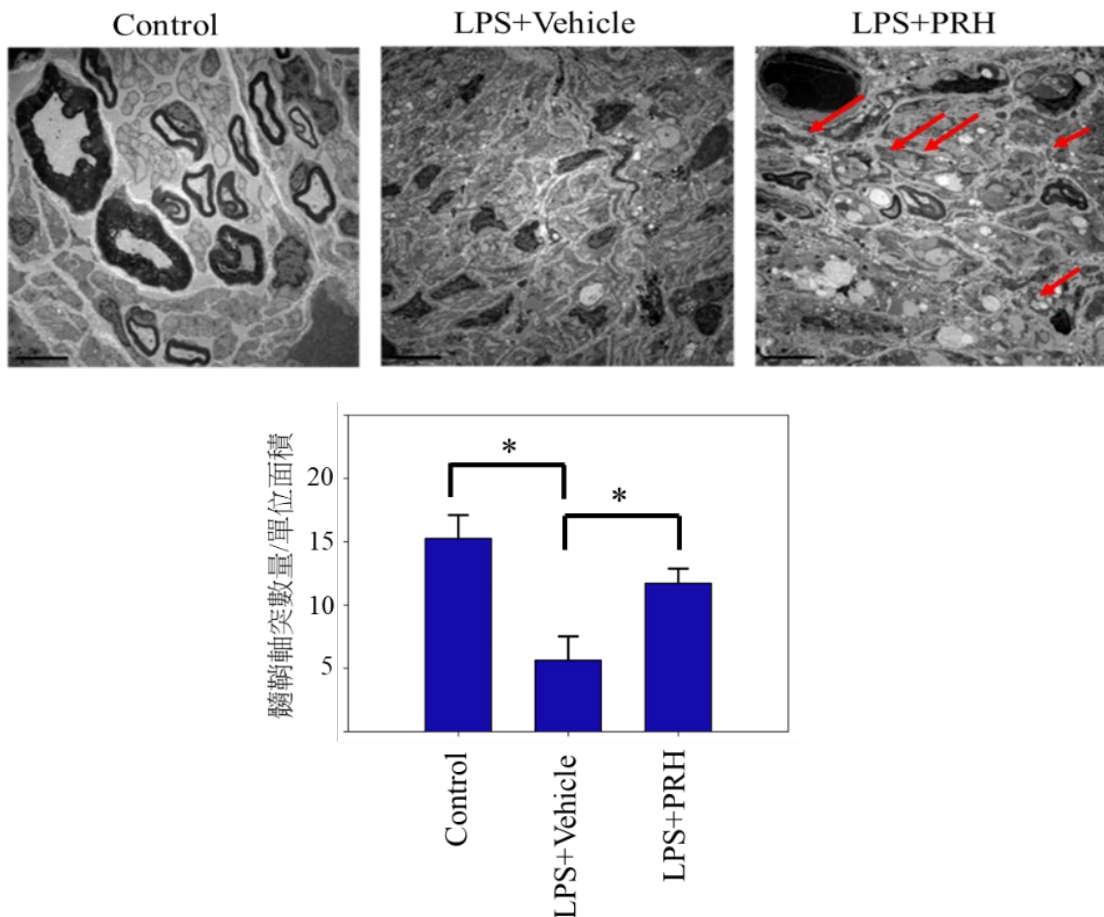
圖十五、以 MTT 檢測富含血小板水膠促進大鼠許旺細胞毒性與增生之效果。各組數值代表至少三個獨立實驗測得的光密度值(optical density values)的平均值(mean) ± 平均值標準誤差 (standard error of mean, SEM)。
*為各組別與 Control 組別比較 P 值 <0.05 。#為 0.1% PRP 與 1% PRP 比較 P 值 <0.05 。

(三) 可注射性富含血小板水膠複合物(PRH)治療可以增強富含髓鞘軸突受 LPS 傷害後的再生

膀胱內灌注 LPS 會導致骨盆腔神經退化，膀胱組織纖維化，白細胞浸潤與細胞凋亡。為了證實 PRH 對膀胱組織的保護，實驗室學姊在進行完排尿功能分析後，協助將骨盆腔神經分離取下來後，我們將其進行包埋成的蠟塊進行切片，分別進行甲苯胺藍染色(toluidine blue staining)與電子顯微鏡觀察與分析。結果顯示灌注 LPS 組的神經束中髓鞘軸突細胞顯著減少，有嚴重神經退化的現象。而以 PRH 治療後可以發現有許多新生的髓鞘軸突神經細胞再生，顯示 PRH 對於 LPS 造成之神經退化，有增強其修復之效果(圖十六與圖十七)。



圖十六、圖示為甲苯胺藍染色(toluidine blue staining)顯示各組別骨盆腔神經束中富含髓鞘軸突神經的退化與再生。

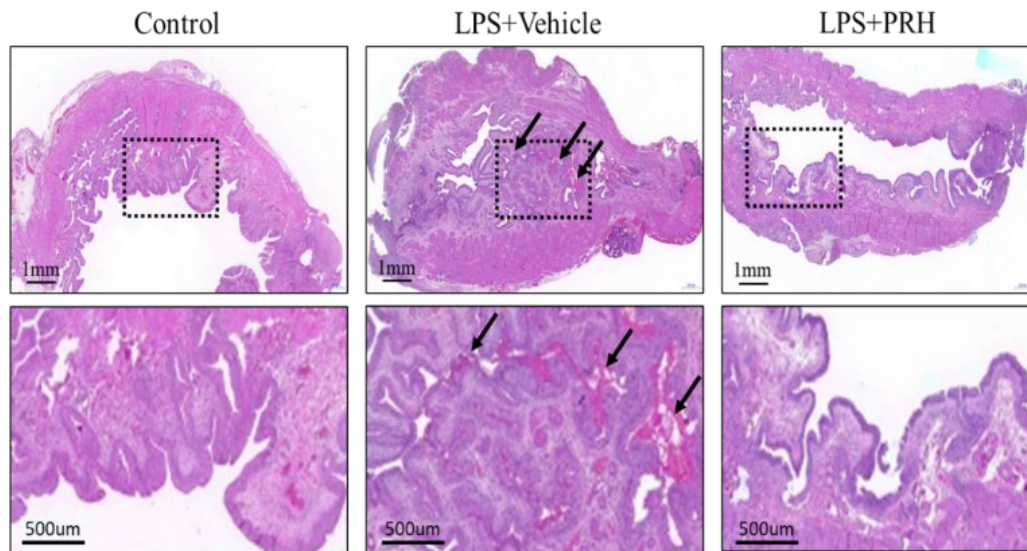


圖十七、電子顯微鏡顯示各組別骨盆腔神經束中富含髓鞘軸突神經的表現與統計結果。
*為各組別與 LPS+Vehicle 組別比較 P 值<0.05。

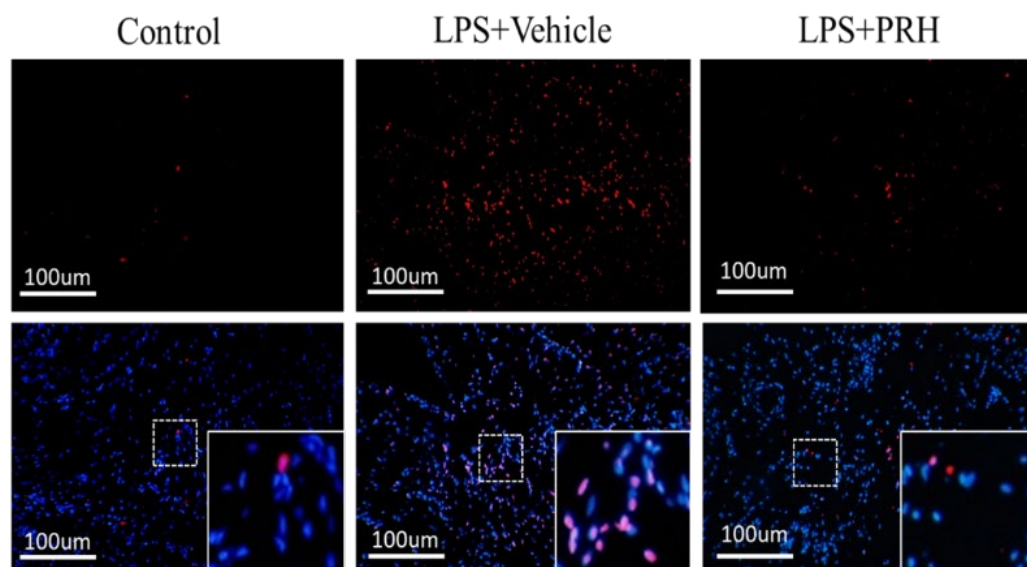
(四) PRH 治療可以防止尿路上皮細胞增厚、膀胱平滑肌細胞凋亡、膀胱組織纖維化：

膀胱內灌注 LPS 會導致膀胱組織纖維化，白細胞浸潤與細胞凋亡。為了證實 PRH 對膀胱上皮的保護與減緩細胞凋亡的能力，我們分別進行蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain (HE) stain)，與末端脫氧核苷酸轉移酶脫氧尿苷三磷酸切口末端標記分析 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay)。結果顯示膀胱內灌流 LPS 組的膀胱內壁增生嚴重，有出血現象，且膀胱容量減少。而以 PRH 治療後，不正常上皮增生情形減低，出血與發炎情形減緩，顯示 PRH 對於 LPS 造成之膀胱上皮傷害，有保護與增強其修復之效果(圖十八)。在細胞凋亡部分，結果顯示 LPS 組與控制組比較，膀胱內的平滑肌細胞凋亡顯著表現增加，而 PRH 處理的組別與 LPS 組比較，顯著減少平滑肌細胞凋亡的數量。顯示 PRH 對於 LPS 造成的膀胱平滑肌細胞損傷具有保護與促進增生之效果(圖十九)。經 LPS 處理過後的膀胱平滑肌細胞凋亡顯著增加，而經 PRH 治療後可以減少平滑肌細胞受 LPS 傷害後的細胞凋亡。過去的研究顯示 PRP 可以保存與促進陰莖海綿體的平滑肌細胞增生(Wu et

al., 2016), 所以與本次實驗結果一致。PRH 亦可以增強富含髓鞘軸突受 LPS 害後的再生與回復血管傷害。所以我們的研究顯示，凝膠形式的 PRH 不僅可以增加生長因子跟生長激素的釋放，對受傷的神經組織有很好的回復效果之外，對於神經受傷後所導致的其他組織病變，不論是平滑肌細胞還是上皮細胞都有保護的效果，間接證實了 PRH 未來在人類各種病症使用的潛力。



圖十八、蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain (HE) stain) 顯示各組別膀胱組織上皮增生、白血球浸潤、出血與發炎情形。上圖為各組虛線方框的放大圖。箭頭指出膀胱出血情形。



圖十九、利用末端脫氧核苷酸轉移酶脫氧尿苷三磷酸切口末端標記分析 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay) 觀察 PRH 對防止膀胱平滑肌細胞凋亡的情形。紅色代表細胞凋亡的細胞；藍色代表細胞核。上圖為各組細胞凋亡情形，上圖為凋亡細胞與細胞核合併圖。

陸、 討論

一、 PRP 活化劑的選擇

其實 PRP 活化劑有很多，像凝血酶，膠原蛋白，血清素或鈣離子等等，在本次實驗我們僅以氯化鈣作為活化劑無法與其他活化物質相比較，是本研究的一個限制。使用鈣離子活化後，發現血小板型態顯著改變，血小板中的顆粒小泡明顯減少，而從 PRP 活化後生長因子濃度增加證實 PRP 內的血小板透過活化使血小板顆粒釋放生長因子。另一個特別的發現是使用一種活化劑，不同的生長因子或細胞激素的釋放比例並不盡相同，尤其是 TGF- β 1 活化前就有大量的釋放，而活化後只增加了 1.4 倍；但 CXCL5 卻在活化前並無顯著被釋放，而是必須透過活化才能增加其含量。顯示不同的因子從血小板顆粒中釋放的方式不同，TGF- β 1 可能是製備過程的離心碰撞就足以使該因子釋放出來，所以許多的 TGF- β 1 在第一次離心後就已部分被釋放，導致在第二次濃縮後無法很有效率地提高濃度倍率。而 CXCL5 的釋放方式須經特殊活化的步驟，與 TGF- β 1 不同。或許未來同時使用多種活化試劑，嘗試不同的活化路徑，也許可以增進不同有效因子的釋放。對血小板量稀少的患者，可能可以透過這樣的方式來加強治療效果。血小板中含有的因子也非常的多，不只我們測的這三種，可能多達數百種，它們可以調控細胞的生長和分化，而且在血管新生上扮演重要角色。我們選擇了三種測量因子，第一種 TGF- β 1 在人體中應用非常廣泛，是一個相當重要的生長因子，參與了許多疾病的機轉，諸如傷口癒合、組織纖維化、癌症發生與轉移等，亦與免疫細胞的增生、活化有關。軟組織修復時，需要膠原蛋白產生才會有彈性。另外，VEGF 主要的功能是刺激血管生成，對於內皮細胞的活化與再生扮演重要角色。由於半月板及關節軟骨位於關節內血液的供應非常的不好，特別需要血管的新生才容易達到修復的功能。CXCL5 是一種很特別的細胞激素因子，先前研究指出 CXCL5 可以增強海綿體神經與神經節細胞的再生，亦可以招募許旺細胞到髓鞘受損的位置，促進周邊神經的髓鞘再生(Zhanget al., 2011)。所以在本次實驗我們針對上述這三種因子來做當作含量試驗指標，顯示活化後上述三中因子都有顯著增加。

二、 PRH 濃度對神經細胞增生的影響

我們利用 MTT 還原分析法，發現經過(1%-10%)不同濃度 PRP 水膠處理之組別，均有助於許旺細胞之存活率，顯示 PRH 不僅不具細胞毒性，還能促進神經細胞增生。但其促進神經細胞增生的效果並不會隨著 PRP 濃度增加而增加，這也跟臨床上觀察到得結果相仿，並非 PRP 濃霧越高效果就越好，且對不同的組織其最適當的作用濃度可能也不

同，由於我們的結果顯示含 1%PRP 之 PRH 的增生效果最佳，因此在後續的動物實驗中，我們將換算細胞與組織的比例，作為 PRH 應用之作用濃度。

三、血小板水膠複合物 (PRH)

先前實驗室的 PRP 研究雖然顯示出有神經與組織修復的效果，但事實上 PRP 其具有雙重作用，包括促炎作用與抗炎作用，而且在特定的組織位置才能顯現出其抗炎作用 (Andia et al., 2013)。我們先前提到目前 PRP 的限制是在特定組織的滯留的時間低，若是在組織受傷後直接注射血小板在開放的組織空間，其作用效果可能會無法長久 (Cheng et al., 2010)。所以需要開發生物材料作為 PRP 中生長因子的運載工具。生醫材料除了能當做生長因子的載體外，其本身更被認為有組織修復之效果，像本次使用的 Chitosan 的特性本身就有神經保護與神經再生作用；抗腫瘤活性；抗炎和止痛作用；止血活性與抗菌活性。也可以增加許旺細胞的存活率以及分化。本次研究的限制在於細胞與動物研究中，沒有將生醫材料 Chitosan 做個別組別的評估與比較，未來更多實驗的組別已經在設計與執行中，相信未來能有更多的研究證據證實 PRH 的治療功效。

柒、 結論

富含血小板濃縮液
的製備與改良

- PRP活化改良後能促進細胞激素與生長因子釋放
- 改良後PRP釋放的細胞激素與生長因子較市面上的PRP套組(kit)佳

可注射性富含血小板水膠複
合物(Platelet Rich Hydrogel,
PRH)開發

- PRP+玻尿酸(HA)可以形成身體可降解的水膠 (Hydrogel)
- PRP-Chitosan-HA complex形成的可注射型水膠 (PRH)能作為細胞激素與生長因子的載體

驗證可注射性富含血小板水
膠複合物(PRH)對神經的保
護效果

- PRH促進大鼠許旺細胞的增生
- PRH增強富含髓鞘軸突神經受傷害後的再生
- PRH可以改善LPS導致的神經、上皮、平滑肌與內皮細胞的組織損傷

捌、 參考資料

- 一、 Agarwal A, Gupta ND. Platelet-rich plasma combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of noncontained human intrabony periodontal defects: a randomized controlled split-mouth study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2014;34(5):705 – 711.
- 二、 Andia I, Abate M. Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates. *Regen Med.* 2013 Sep;8(5):645-658.
- 三、 Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007;28(31):4551 – 4560.
- 四、 Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;84(2):415 – 421.
- 五、 Apel PJ, Ma J, Callahan M, et al. Effect of locally delivered IGF-1 on nerve regeneration during

- aging: an experimental study in rats. *Muscle Nerve*. 2010;41(3):335 – 341.
- 六、 Babaei V, Afradi H, Gohardani HZ, Nasser F, Azarafza M, Teimourian S. Management of chronic diabetic foot ulcers using platelet-rich plasma. *J Wound Care*. 2017;26(12):784 – 787.
- 七、 Cheng M, Wang H, Yoshida R, Murray MM. Platelets and plasma proteins are both required to stimulate collagen gene expression by anterior cruciate ligament cells in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(5):1479 – 1489.
- 八、 Dai WL, Zhou AG, Zhang H, Zhang J. Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Arthroscopy*. 2017;33(3):659 – 670.
- 九、 Eccleston PA, Funa K, Heldin CH. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF alpha- and beta-receptors in the peripheral nervous system: an analysis of sciatic nerve and dorsal root ganglia. *Dev Biol*. 1993;155(2):459 – 470.
- 十、 Hee HT, Majd ME, Holt RT, Myers L. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion?. *Eur Spine J*. 2003;12(4):400 – 407.
- 十一、 Jhan HJ, Liu JJ, Chen YC, Liu DZ, Sheu MT, Ho HO. Novel injectable thermosensitive hydrogels for delivering hyaluronic acid-doxorubicin nanocomplexes to locally treat tumors. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(8):1263 – 1274.
- 十二、 Koriyama Y, Homma K, Sugitani K, et al. Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration. *Neurochem Int*. 2007;50(5):749 – 756.
- 十三、 Lin G, Shindel AW, Fandel TM, Bella AJ, Lin CS, Lue TF. Neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor in major pelvic ganglia of young and aged rats. *BJU Int*. 2010;105(1):114 – 120.
- 十四、 Marx RE. Platelet rich plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Quintessence*. 1999;12;71-82.
- 十五、 Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(4):489 – 496.
- 十六、 Wu YN, Wu CC, Sheu MT, Chen KC, Ho HO, Chiang HS. Optimization of platelet-rich plasma and its effects on the recovery of erectile function after bilateral cavernous nerve injury in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(10):E294-E304.
- 十七、 Yu W, Wang J, Yin J. Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *Int J Neurosci*. 2011;121(4):176 – 180.
- 十八、 Zhang H, Yang R, Wang Z, Lin G, Lue TF, Lin CS. Adipose tissue-derived stem cells secrete CXCL5 cytokine with neurotrophic effects on cavernous nerve regeneration. *J Sex Med*. 2011;8(2):437-446.

【評語】 052011

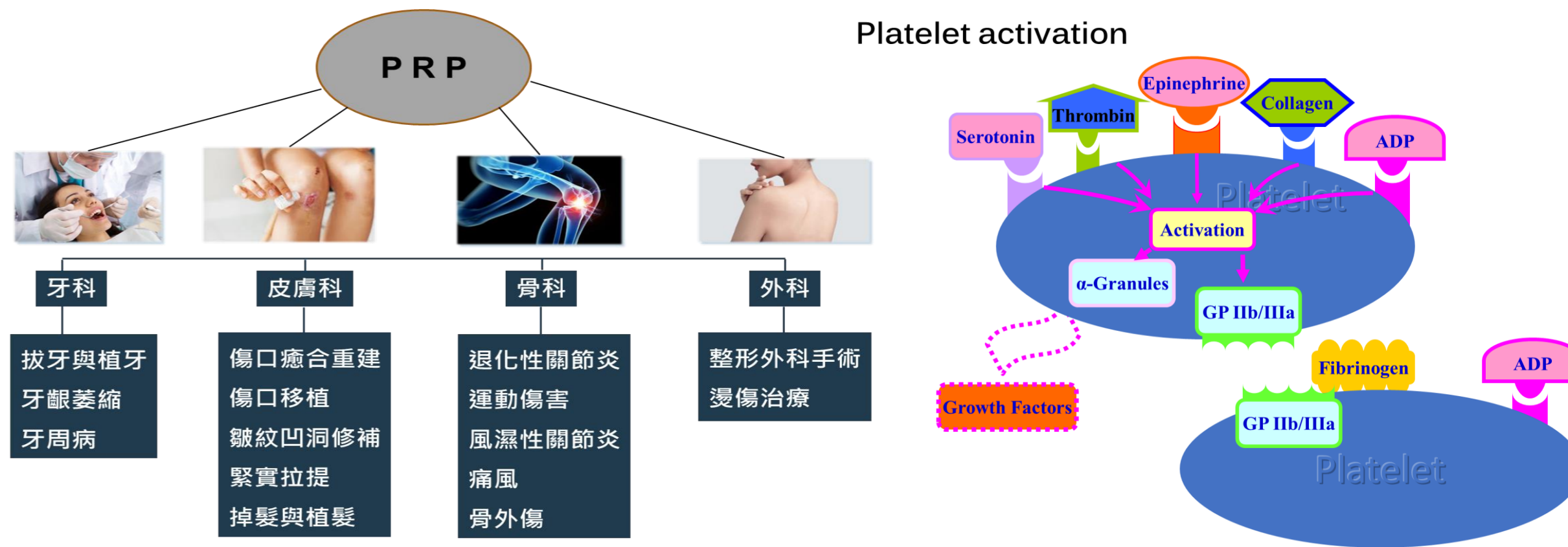
富含血小板血漿(Platelet-rich plasma, PRP)是透過血液離心及活化製備出含有高濃度血小板的產物，能幫助組織修復與再生。但傳統 PRP 在特定組織微環境的滯留時間低，治療效果不佳，因此需要研究適合的生醫材料作為傳統 PRP 的運載工具。本研究證實，PRP 中血小板被激活後，可以釋放出更多的生長因子與細胞激素，且 PRP 透過與玻尿酸(Hyaluronic acid, HA)結合可形成穩定且生物體可以降解的水膠劑型(Hydrogel)。生醫材料殼聚糖(Chitosan)與 HA 形成之複合物，不僅可以增強 Hydrogel 結構的穩定，還能完整包覆血小板且不影響其完整結構與特性，具備生長因子緩釋效果。但傳統 PRP 目前在製備流程上並無一致標準，且其在特定組織微環境滯留的時間低，效果無法持久，因此需要研究適合的生物材料作為傳統 PRP 中生長因子及細胞激素的運載工具，再加上文獻上對於 PRP 在神經相關組織的應用證據較缺乏。

1. 實驗目的和設計不具有創新性。
2. 類似的研究已經非常多了，應該找出與別人研究的方向不同才有意義。
3. 建議利用市售 PRP 測試 PRH 之效果是否比較好。

作品海報

研究動機與目的

- 富含血小板血漿 (Platelet rich plasma, PRP) 是利用物理或化學的方式，將血小板濃縮後使內含的顆粒釋出生長因子與細胞激素，來引發受傷部分組織一系列的生物訊息反應，或引導更多的細胞來修復組織。
- 目前臨床上PRP多應用在骨關節領域、慢性皮膚潰瘍、外科或口腔植牙手術等。因為PRP製備成本低、製備容易且兼具生物安全性，所以在醫學各領域的使用有愈來愈普遍的趨勢。
- 但傳統PRP在特定組織微環境的滯留時間低，作用效果無法持久。此外，PRP在神經修復的角色，仍然不清楚，這些都是PRP在臨床應用的一大挑戰。
- 近年來，許多生醫材料在製備水凝膠與藥物釋放的應用上受到矚目，因此我們希望利用這些材料結合富含血小板血漿，開發一個新的可注射性富含血小板水膠複合物製劑。

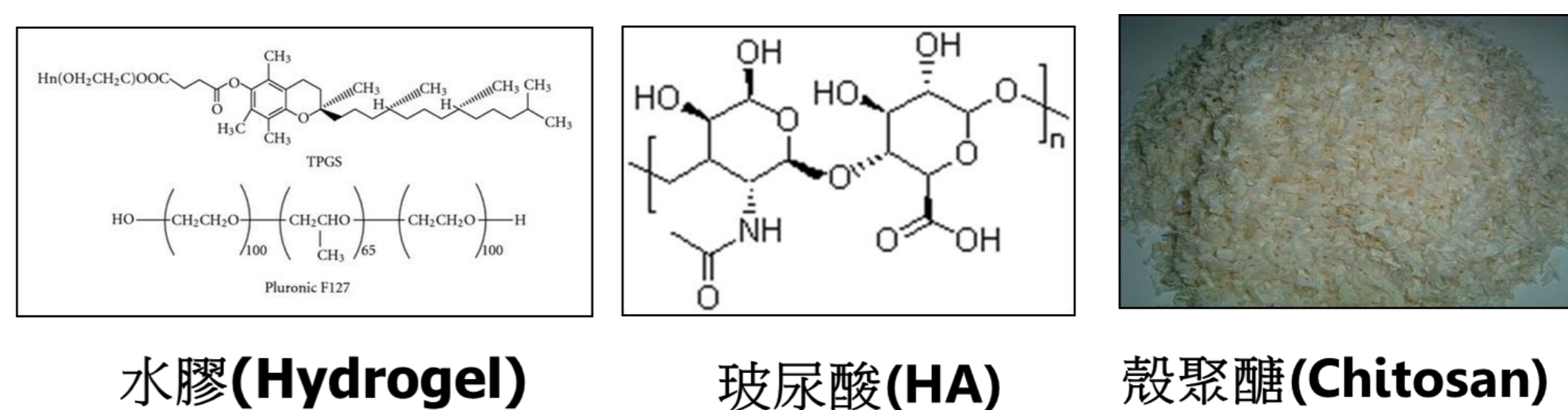


研究背景

- 一. 市售PRP製備產品，PRP濃縮倍率不一致，穩定性不佳，生長因子釋放含量差異大。
- 二. PRP產品目前皆為液狀劑型。

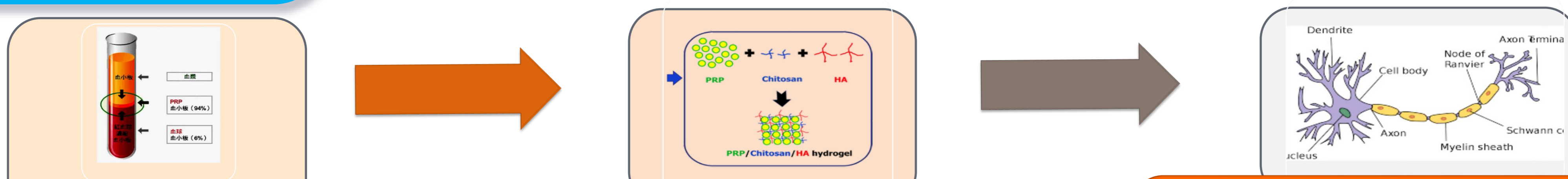
Brand	"Aeon"	"Tcmbio"	"Estar"	"YK"	"YCELLBIO"	"Tubex"
Product Name	Acti-PRP	PLTenus Plus Platelet Concentrate Separator	Tropocells PRP Device	Platelet-Rich Plasma Concentrate Kit	PRP Blood Separation Kit	Super PRP tube system
Capacity	9mL	7mL	22mL/11mL	30mL	15mL	15mL
Centrifugation times	1	1	1	2	2	2
Centrifugation condition	RPM 3200 /8 mins	RCF 500~1,200 /2~15 mins	RPM1500 /10 mins	1 : PM3000/10mins 2 : RPM3000/8mins	1: RPM3400~3600 2: RPM3200	1 : RCF1800/6min 2 : RCF 2000/4min

- 三. 水膠(Hydrogel)可以運用在生物體的組織受損原位處，而達到緩慢且長時間的藥物釋放效果。
- 四. 玻尿酸(Hyaluronic acid; HA)可以作為藥物傳遞系統，有效延長藥物釋放時間。
- 五. 殼聚糖(Chitosan)是幾丁質的衍生物，現已廣泛用於神經重建。



水膠(Hydrogel) 玻尿酸(HA) 殼聚糖(Chitosan)

研究目標及架構



富含血小板血漿(PRP)特性分析與製備改良

- 比較不同活化試劑對PRP型態影響
- 評估PRP活化前後細胞激素與生長因子釋放
- 比較優化製備的PRP與市售PRP萃取套組

可注射性富含血小板水膠組合物(Platelet-rich hydrogel, PRH)開發

- PRP成膠特性分析
- 開發可注射性PRP-殼聚糖(Chitosan)-玻尿酸(HA)複合物水膠 (PRH)
- PRH的超顯微構造觀察

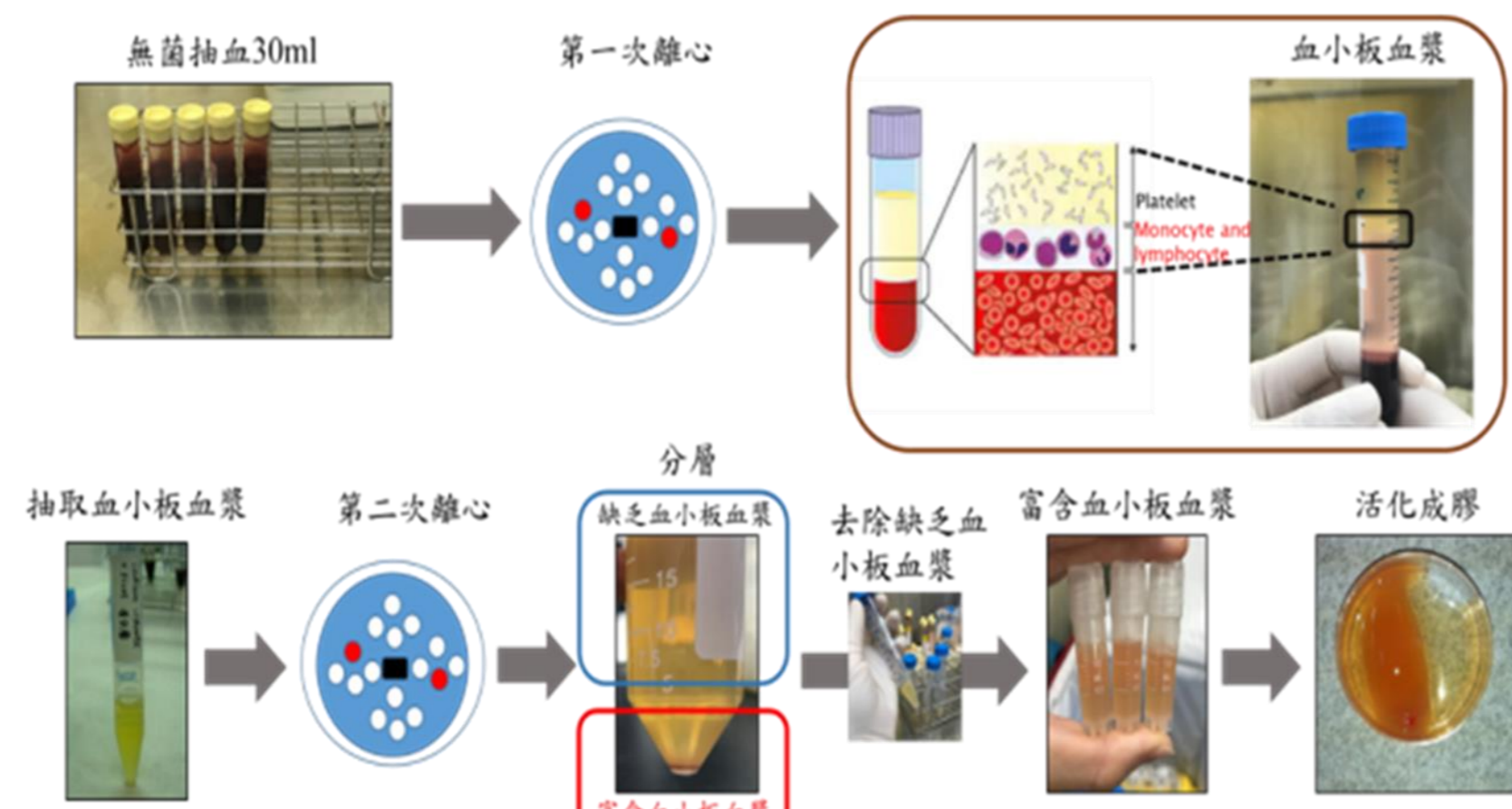
評估可注射性富含血小板水膠組合物(PRH)對神經的保護效果

- 對神經細胞型態與增生的影響
- 促進神經髓鞘軸突受損後的再生效果
- 對神經受損後膀胱上皮組織與平滑肌細胞修復之效果

研究結果

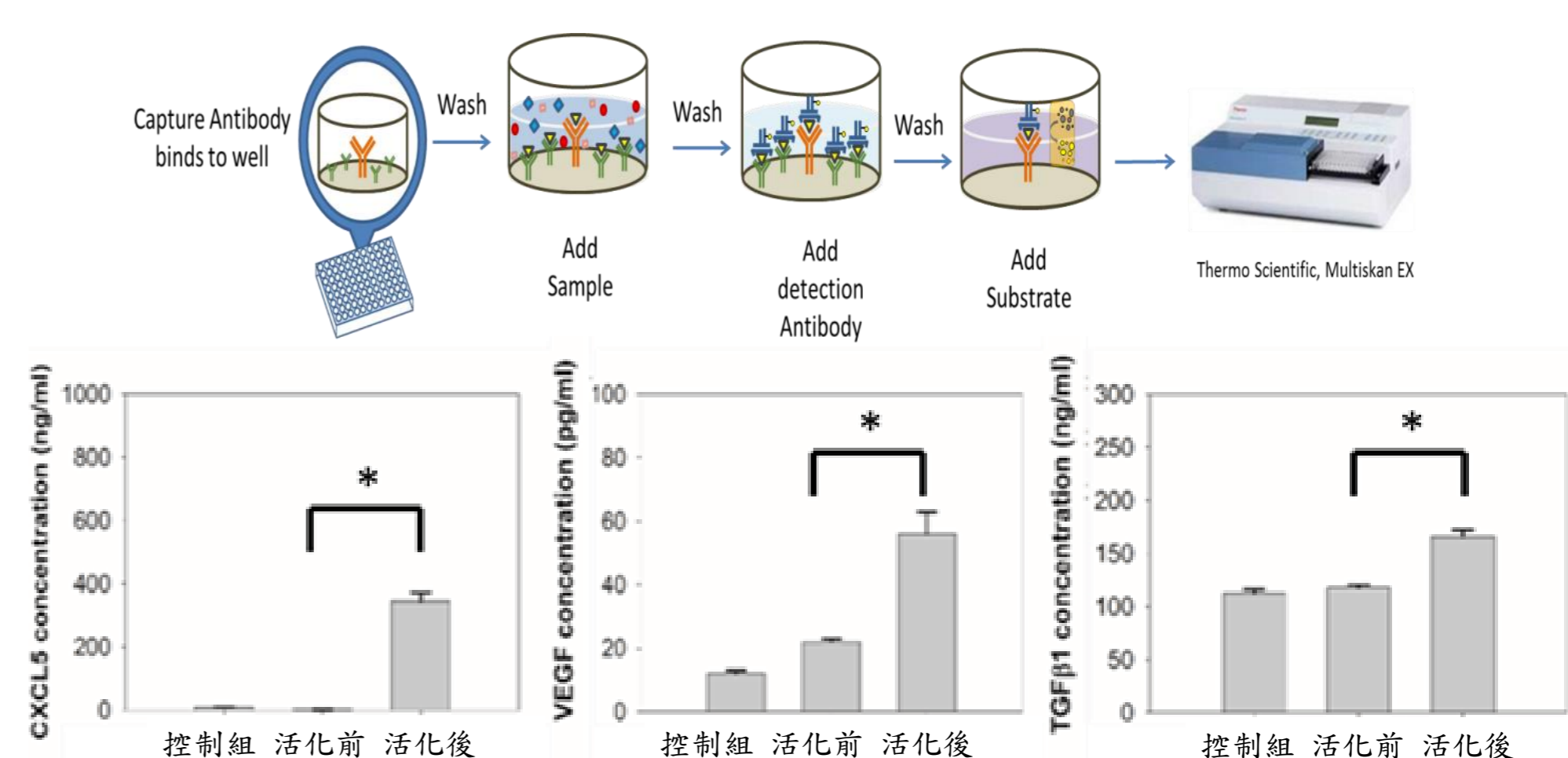
研究目標一 富含血小板血漿的特性分析

PRP 製備



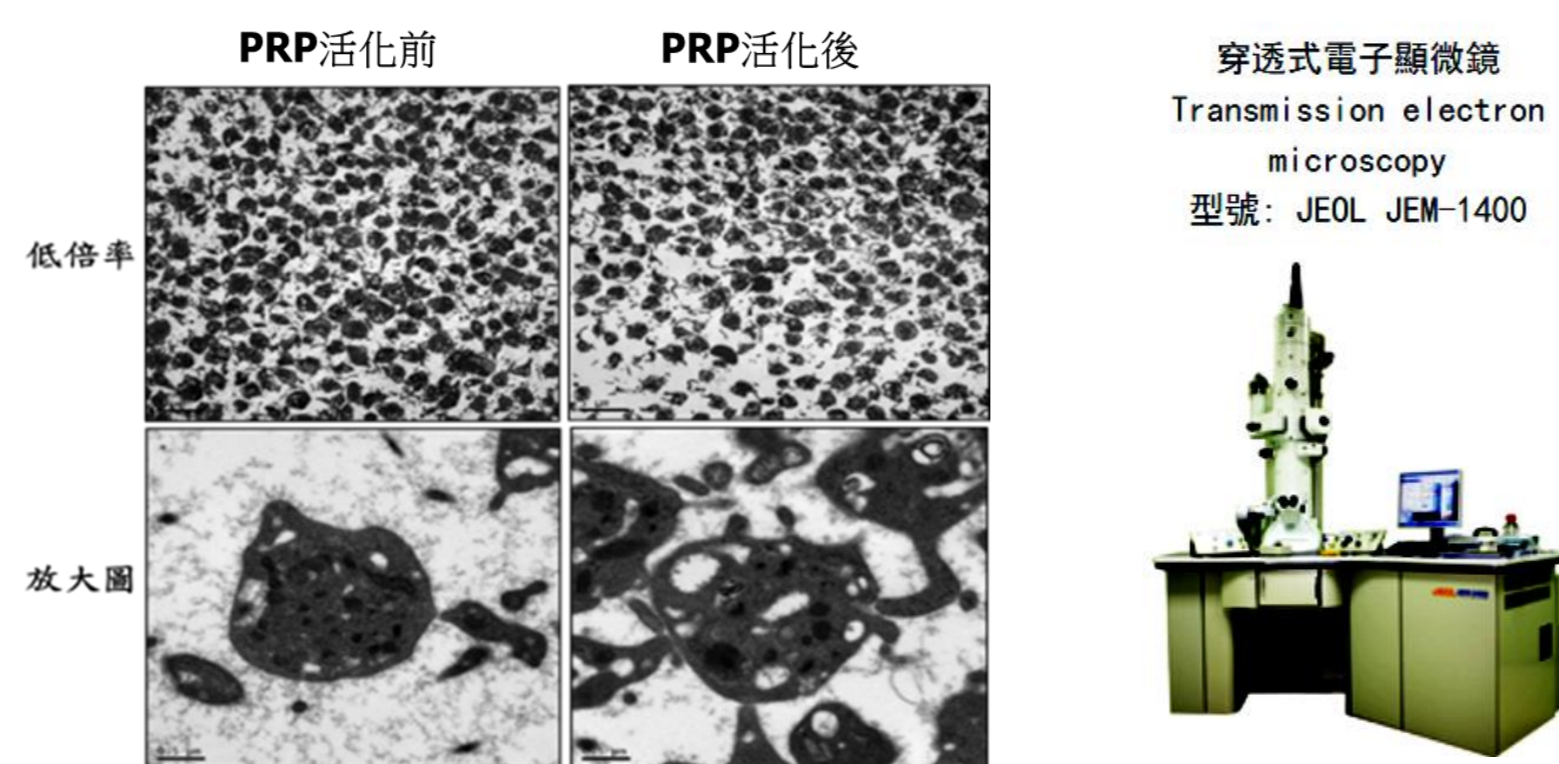
圖一、PRP製備與離心過程。

PRP 透過活化可以提高生長因子釋放



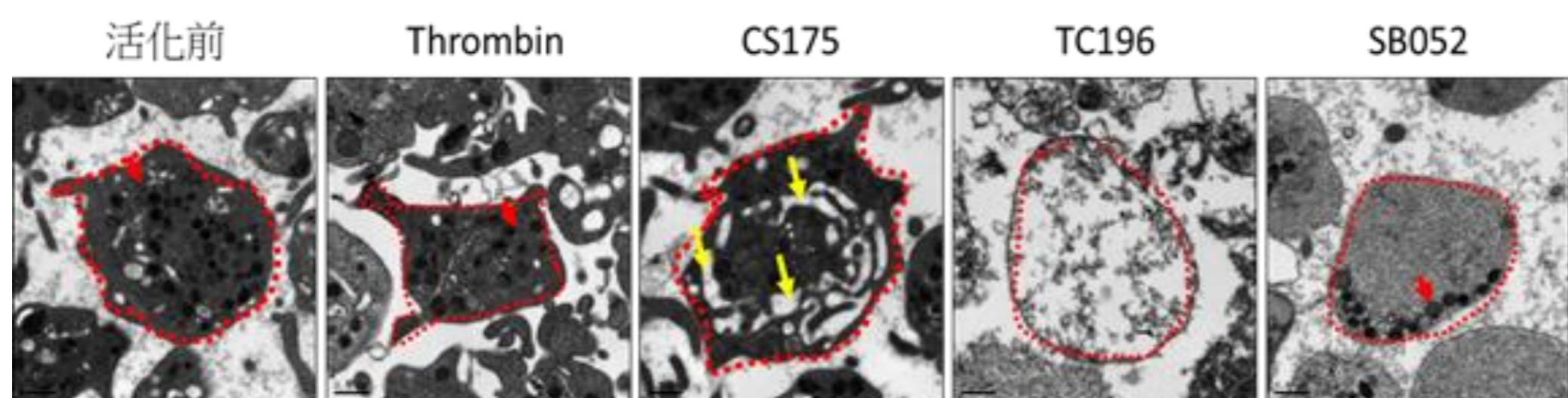
圖四、PRP活化後細胞激素與生長因子釋放。
*為活化後與活化前比較P值<0.05。

血小板內顆粒會透過活化而釋放



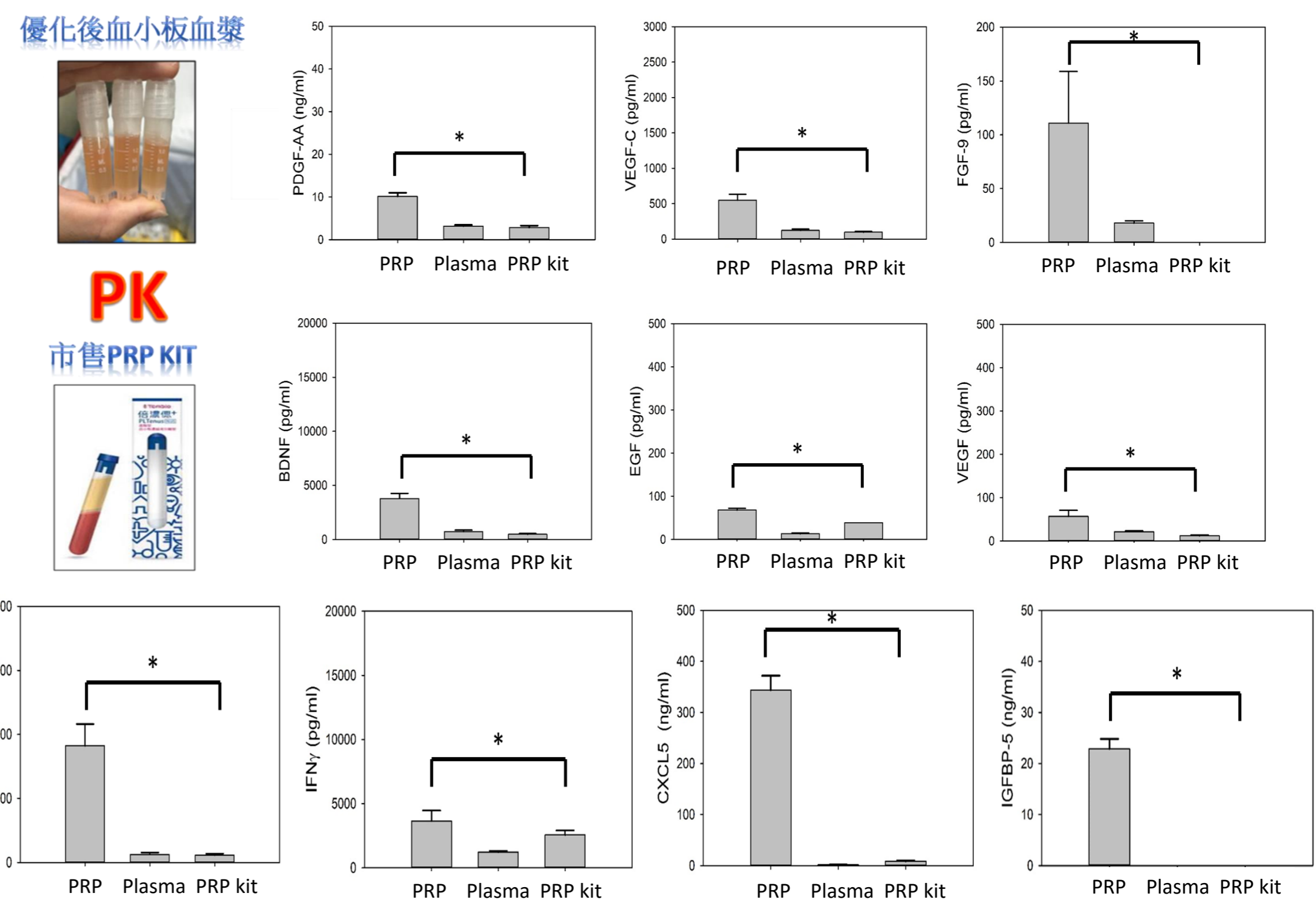
圖二、電子顯微鏡觀察PRP經傳統活化劑氯化鈣處理後的血小板型態變化。

不同活化試劑會改變PRP中血小板型態



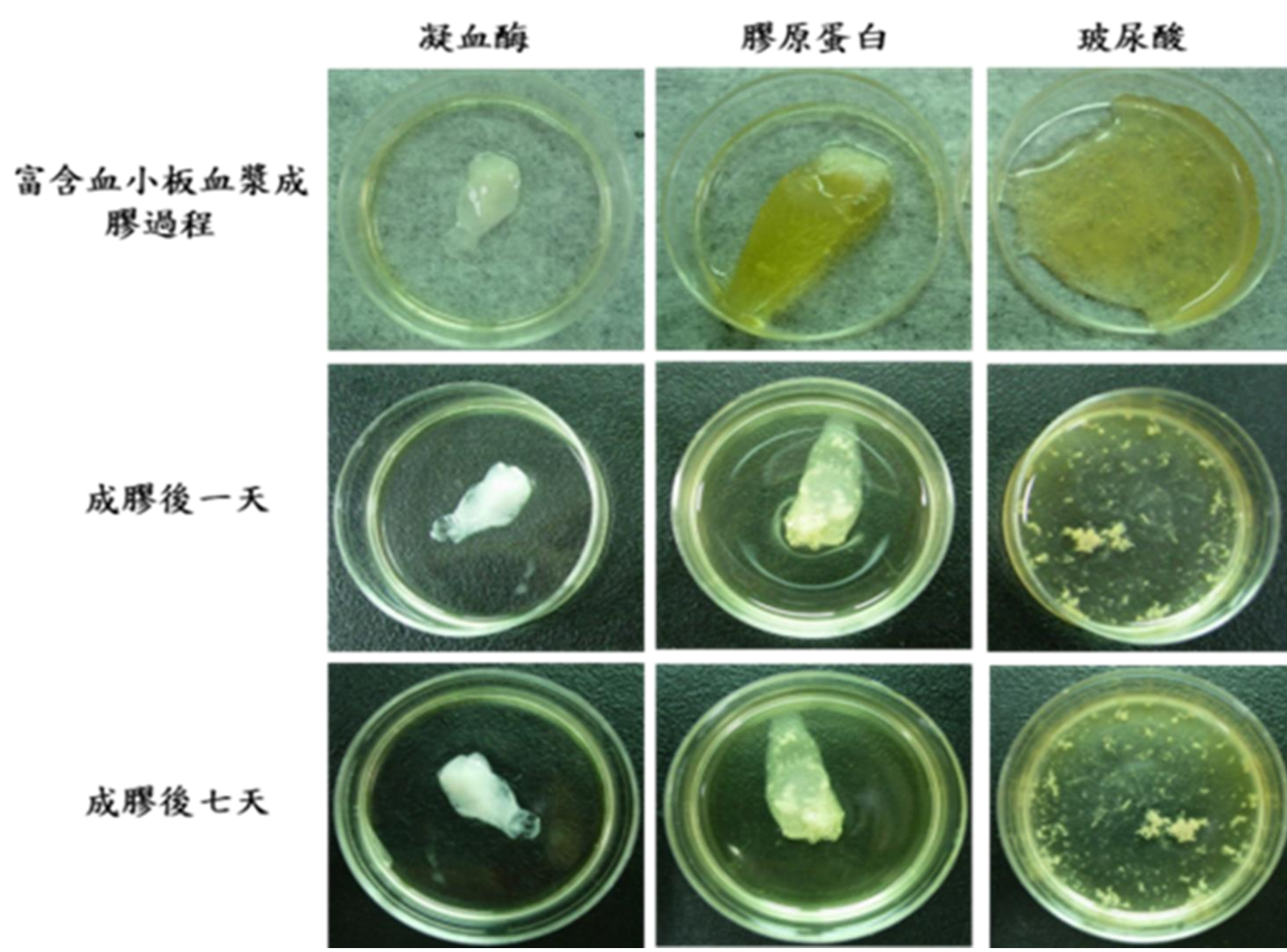
圖三、電子顯微鏡比較PRP經四種不同活化劑處理後的血小板型態變化。紅色虛線顯示一個完整血小板大小，紅色箭頭為血小板中顆粒。黃色箭頭為顆粒釋出後，在血小板內產生之空泡。

優化製備的PRP較市售PRP萃取套組釋放更多生長因子



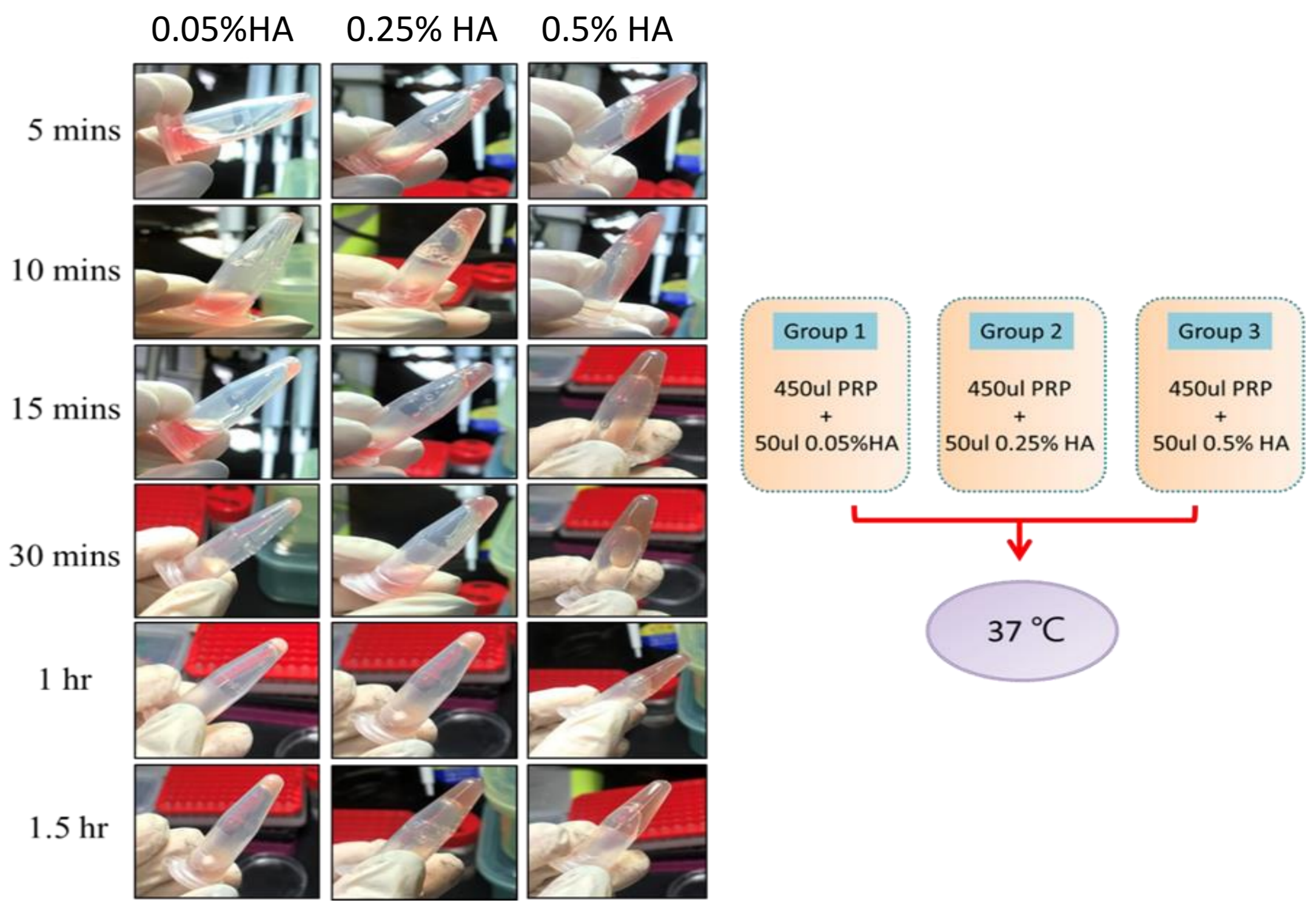
圖五、優化製備的PRP與市售PRP萃取套組中生長因子的濃度比較。
*為優化PRP組別與PRP kit組別比較P值<0.05。

PRP 膠體特性分析-不同促凝試劑會形成不同的PRP 膠體結構



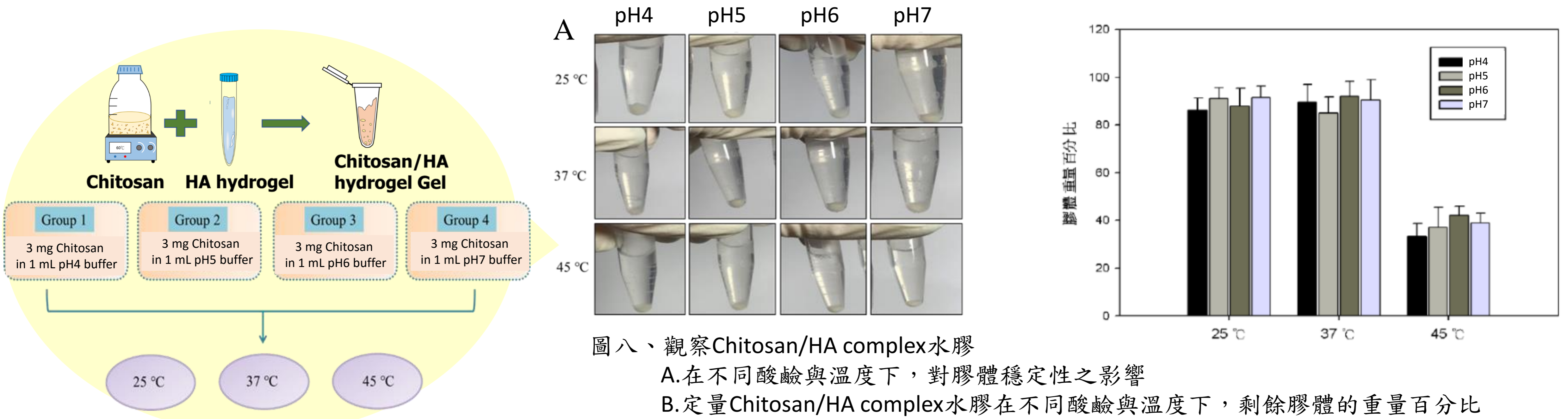
圖六、不同活化試劑對PRP成膠的過程與影響。分別呈現凝血酶、膠原蛋白與玻尿酸成膠過程與穩定性。

PRP 與 HA 複合物可以形成可注射性水膠 (PRP / HA complex hydrogel)



圖七、不同HA complex濃度與作用時間對形成可注射性之富含血小板水膠的影響。

殼聚糖(Chitosan)增強 HA complex 膠體結構的穩定性並包覆 PRP



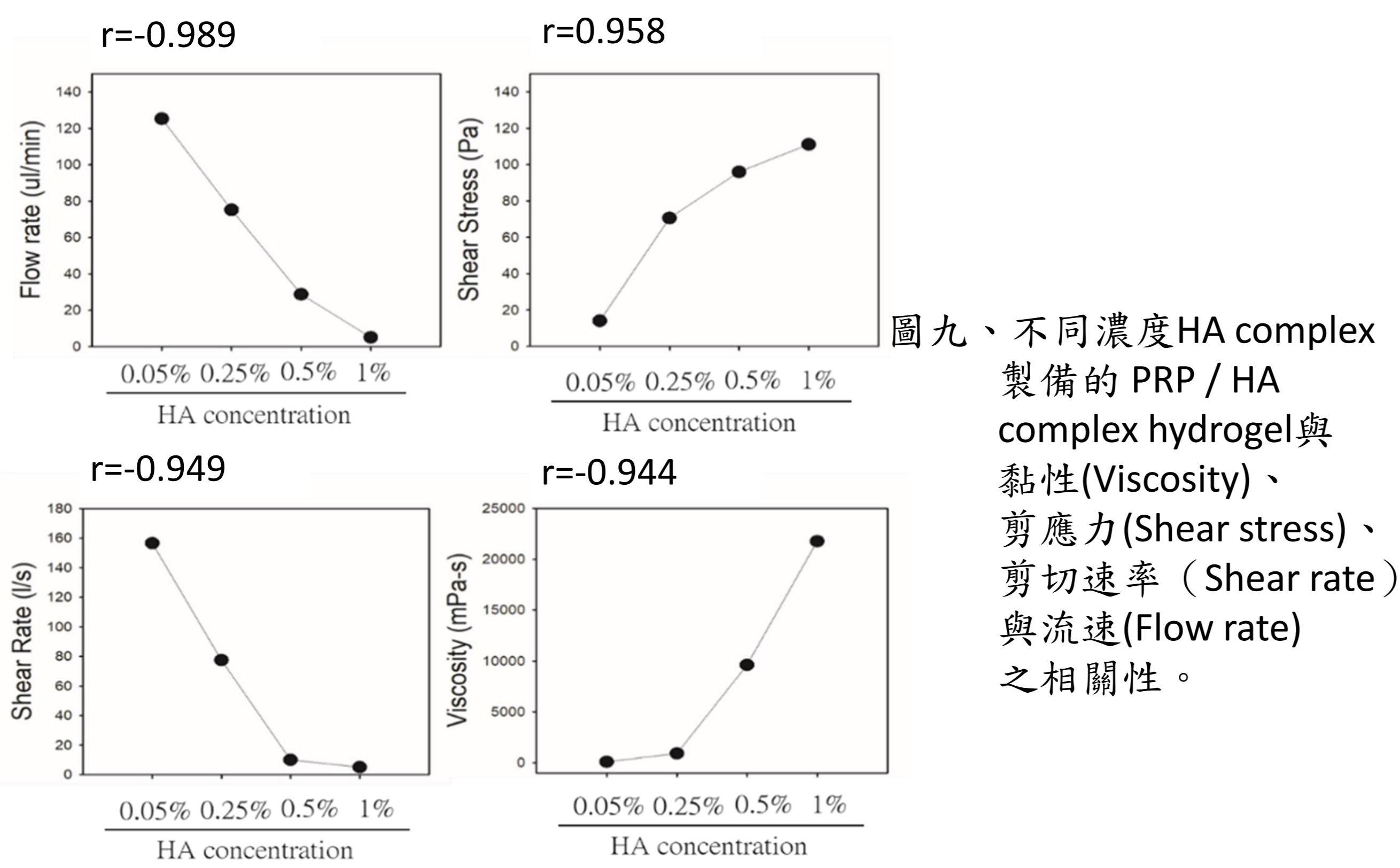
圖八、觀察Chitosan/HA complex水膠
A. 在不同酸鹼與溫度下，對膠體穩定性之影響
B. 定量Chitosan/HA complex水膠在不同酸鹼與溫度下，剩餘膠體的重量百分比

HA 的濃度與 PRP / HA complex hydrogel的黏性參數呈現高度相關性

表一. HA concentration and viscosity change in PRH

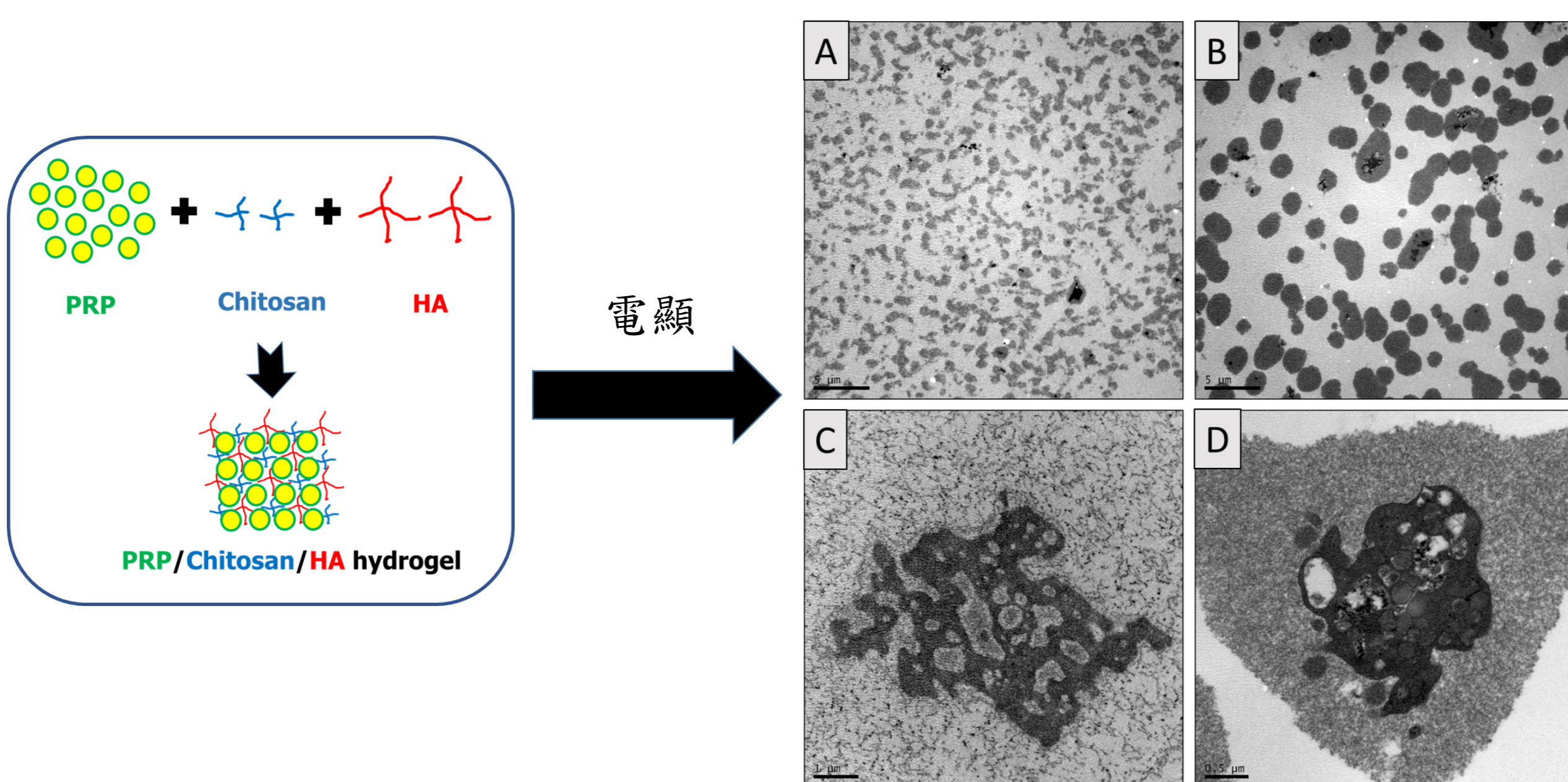
Sample	Flow rate(ul/min)	Shear Stress(Pa)	Shear Rate(l/s)	Viscosity(m Pa-s)
PRP+0.05% HA	125.3	14.0	156.6	89.5
PRP+0.25% HA	75.2	70.6	77.5	911.7
PRP+0.5% HA	28.7	96.0	10.0	9615.0
PRP+1% HA	5.0	111.1	5.1	21771.0

Final PRP concentration in PRP / HA complex hydrogel is 10%.



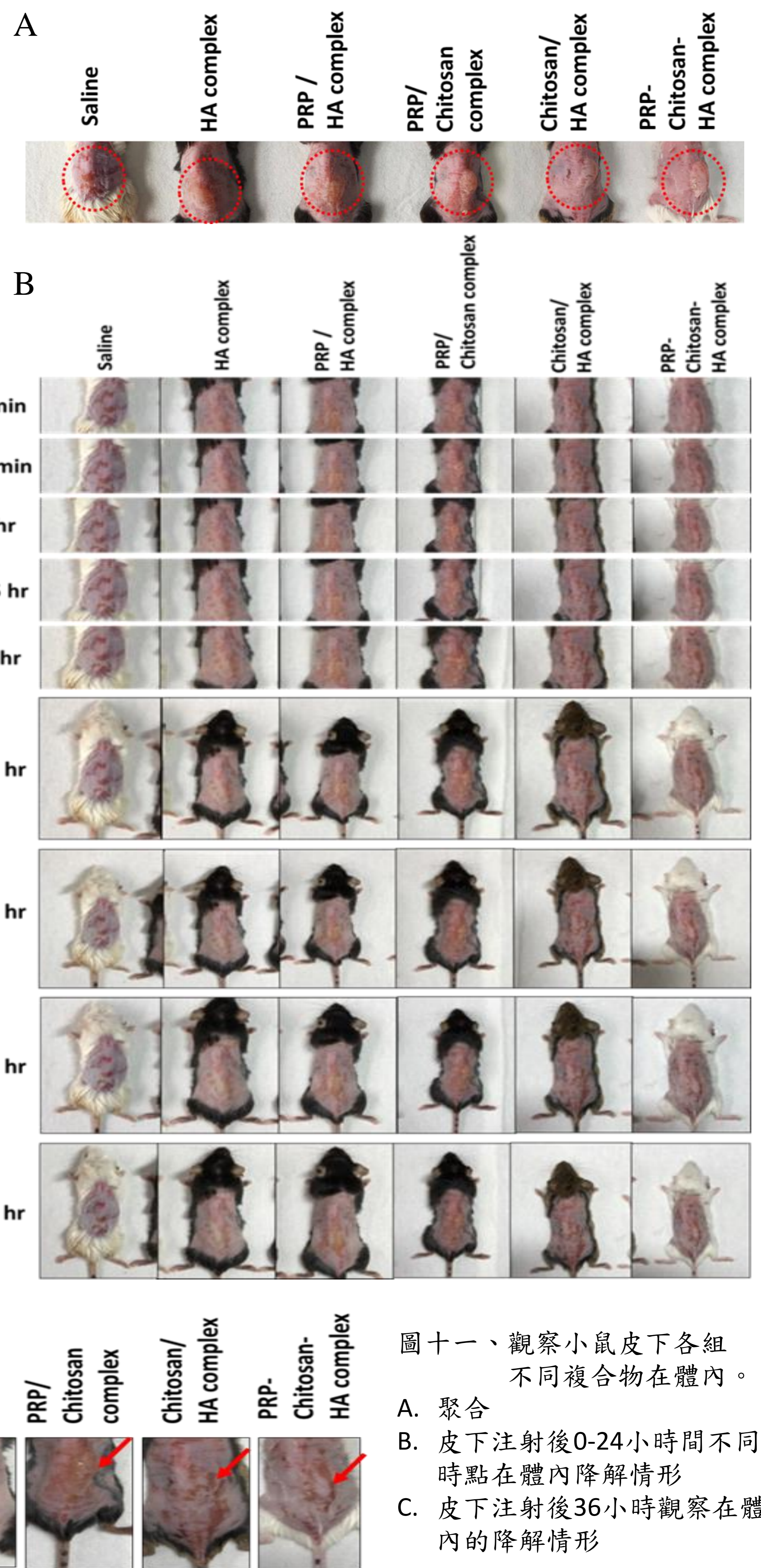
圖九、不同濃度HA complex 製備的 PRP / HA complex hydrogel 與黏性(Viscosity)、剪應力(Shear stress)、剪切速率 (Shear rate) 與流速(Flow rate) 之相關性。

Chitosan/HA complex hydrogel可以完整包覆 PRP



圖十、利用穿透性電子顯微鏡觀察水膠的超顯微構造。
A. HA complex hydrogel
B. Chitosan/HA complex hydrogel
C. PRP/ HA complex hydrogel
D. PRP/ Chitosan/HA complex hydrogel

PRP-Chitosan-HA complex Hydrogel (PRH) 具備體內聚合性、生物體可降解性並具備更佳的緩釋能力

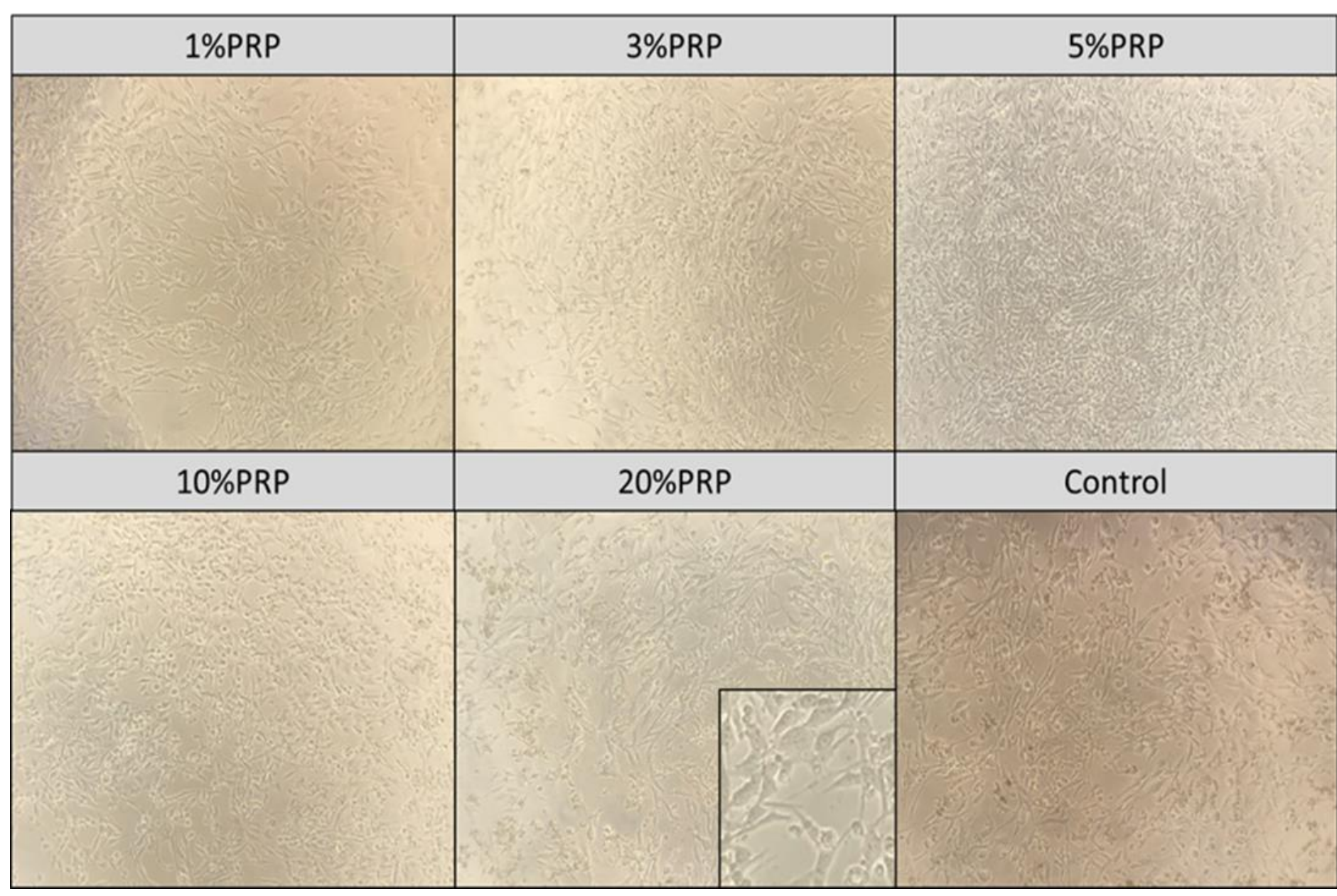


圖十一、觀察小鼠皮下各組不同複合物在體內。
A. 聚合
B. 皮下注射後0-24小時不同時點在體內降解情形
C. 皮下注射後36小時觀察在體內的降解情形

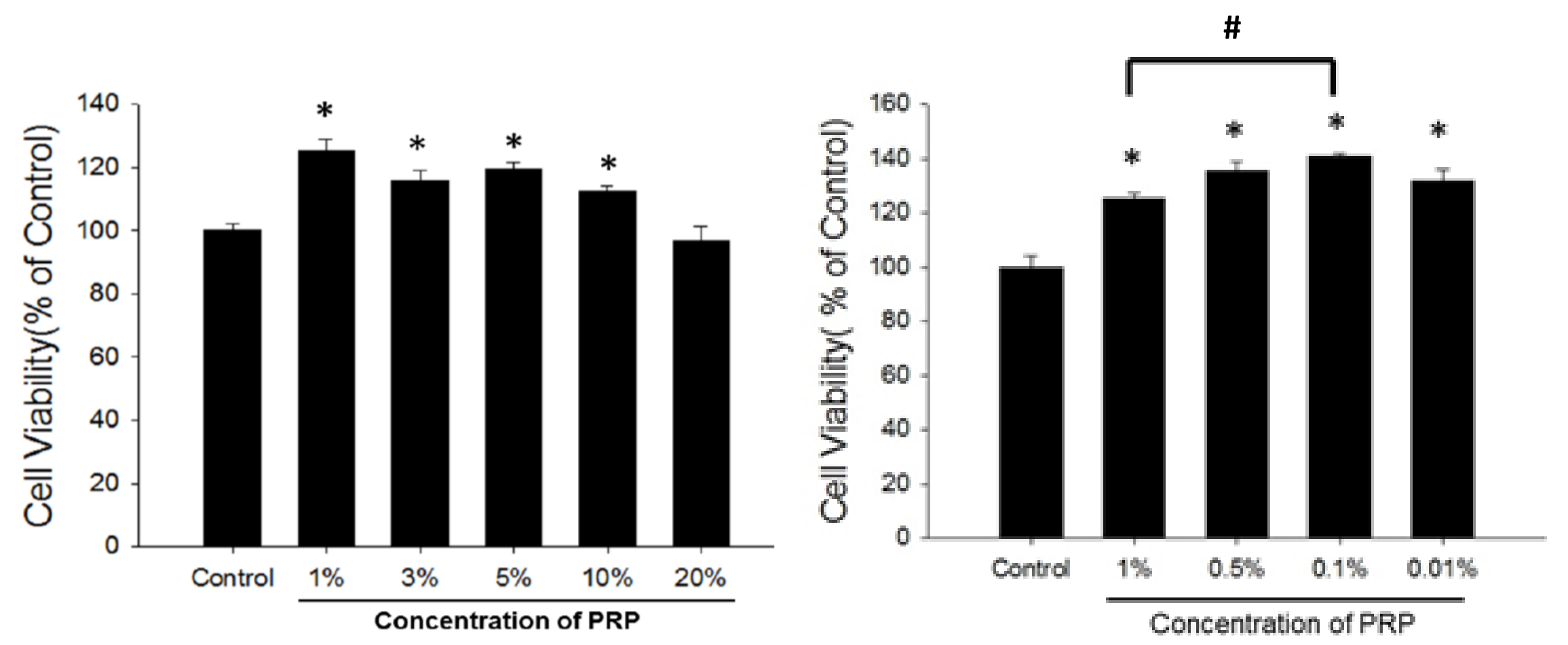
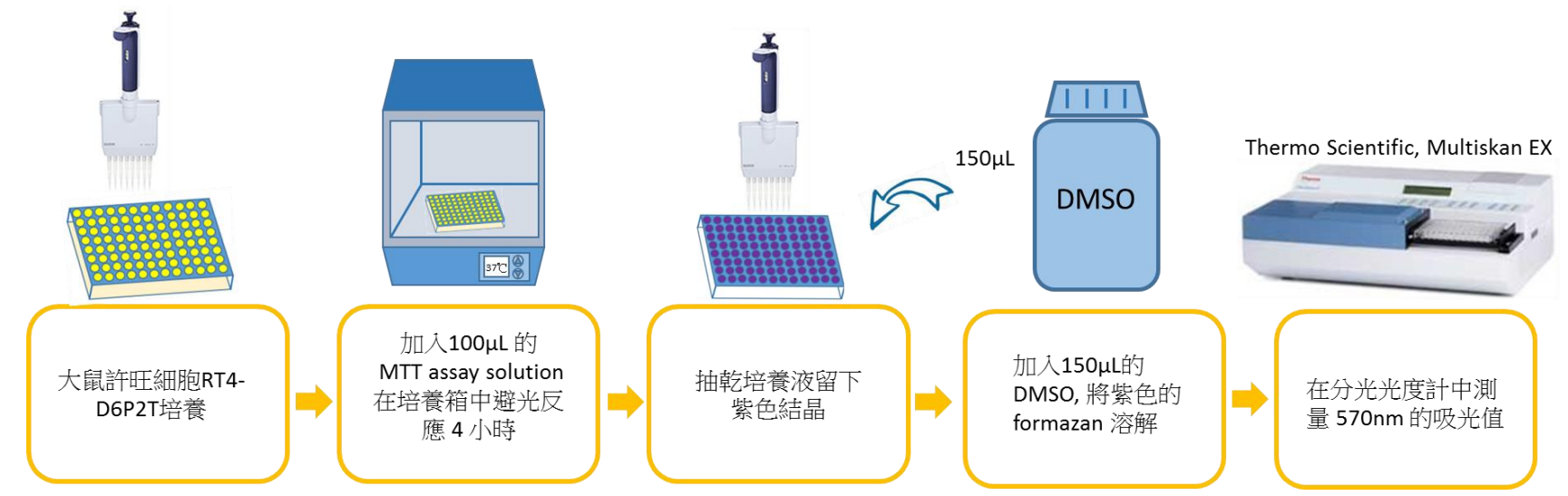
研究結果

研究目標三 驗證可注射性富含血小板水膠複合物對神經的保護效果

PRH無細胞毒性且促進大鼠許旺細胞的增生

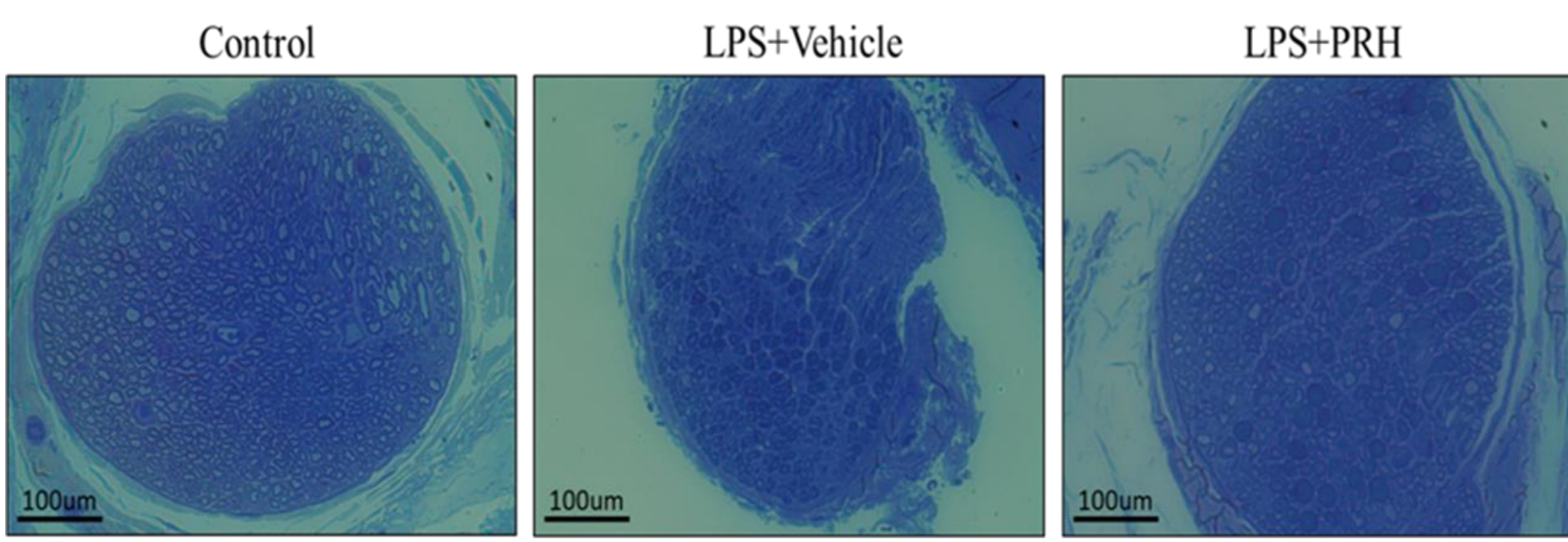
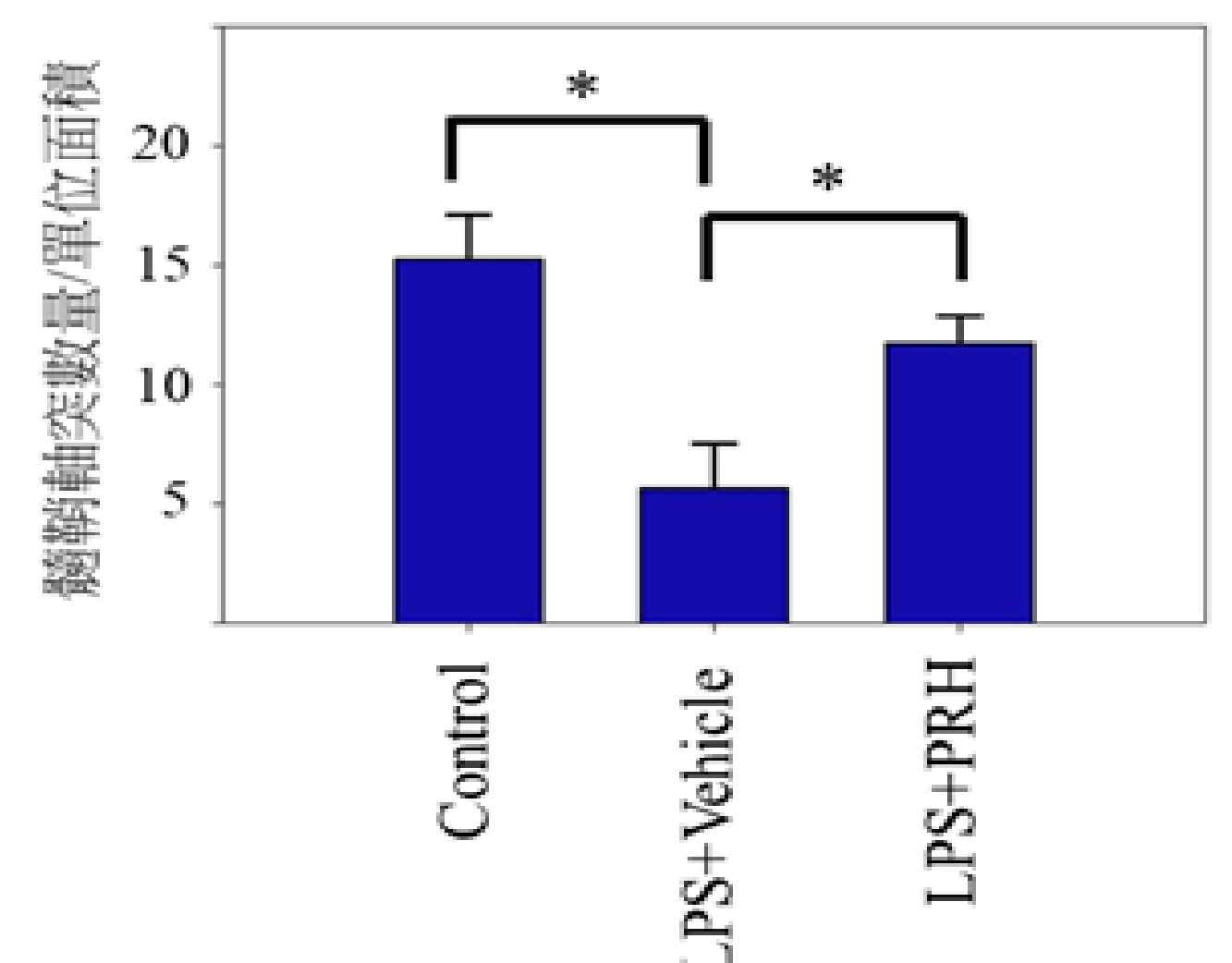
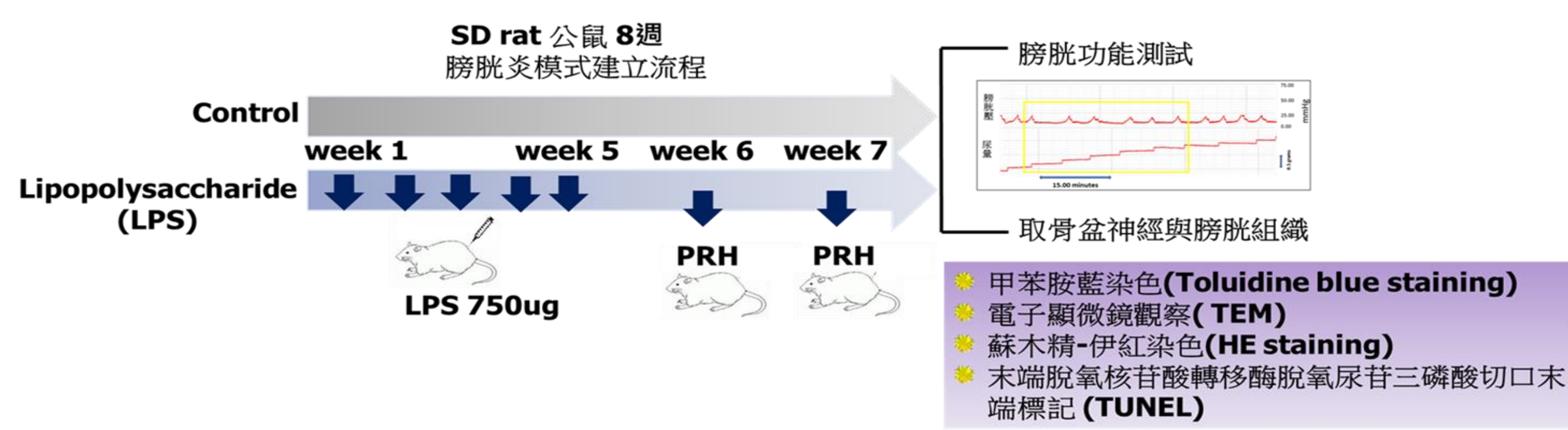


圖十二、觀察富含血小板水膠複合物對大鼠許旺細胞型態的影響。大鼠許旺細胞在含不同濃度PRH之PRH(1%、3%、5%、10%與20%)與控制組培養72小時之細胞形態變化。

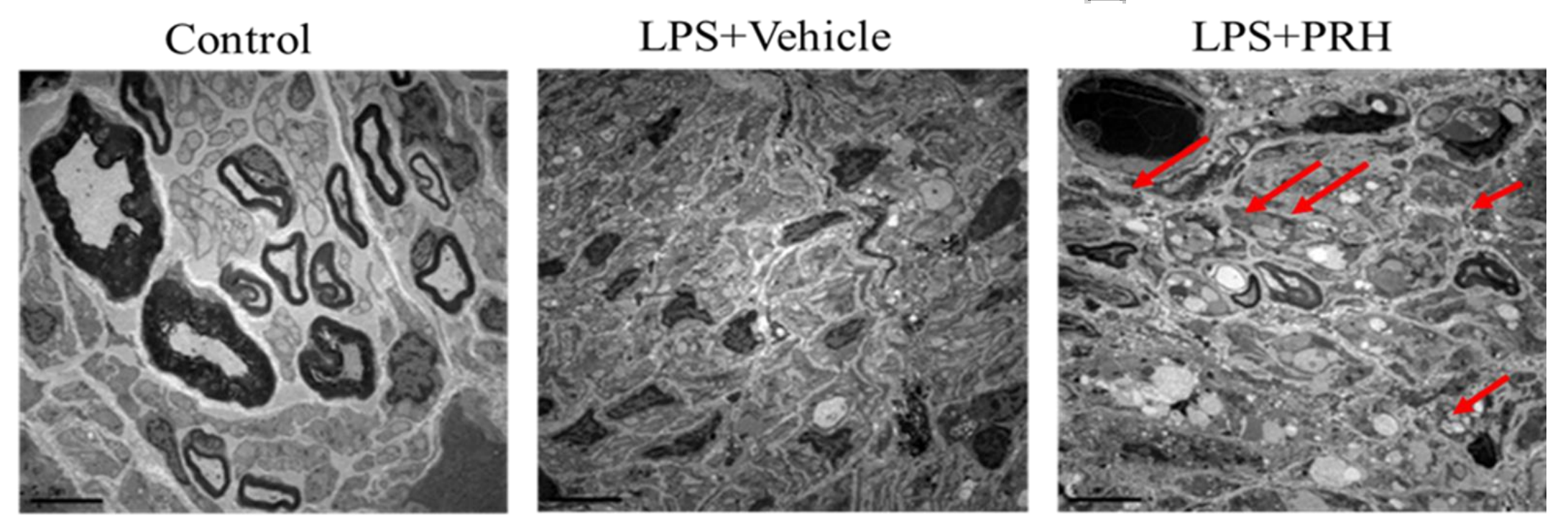


圖十三、以MTT檢測富含血小板水膠促進大鼠許旺細胞毒性與增生之效果。各組數值代表至少三個獨立實驗測得的光密度值(optical density values)的平均值(mean)±平均標準差(standard error of mean, SEM) *為各組別與Control組別比較P值<0.05。#為0.1% PRH與1% PRH比較, P值<0.05。

PRH治療可以增強富含髓鞘神經軸突受LPS傷害後的再生

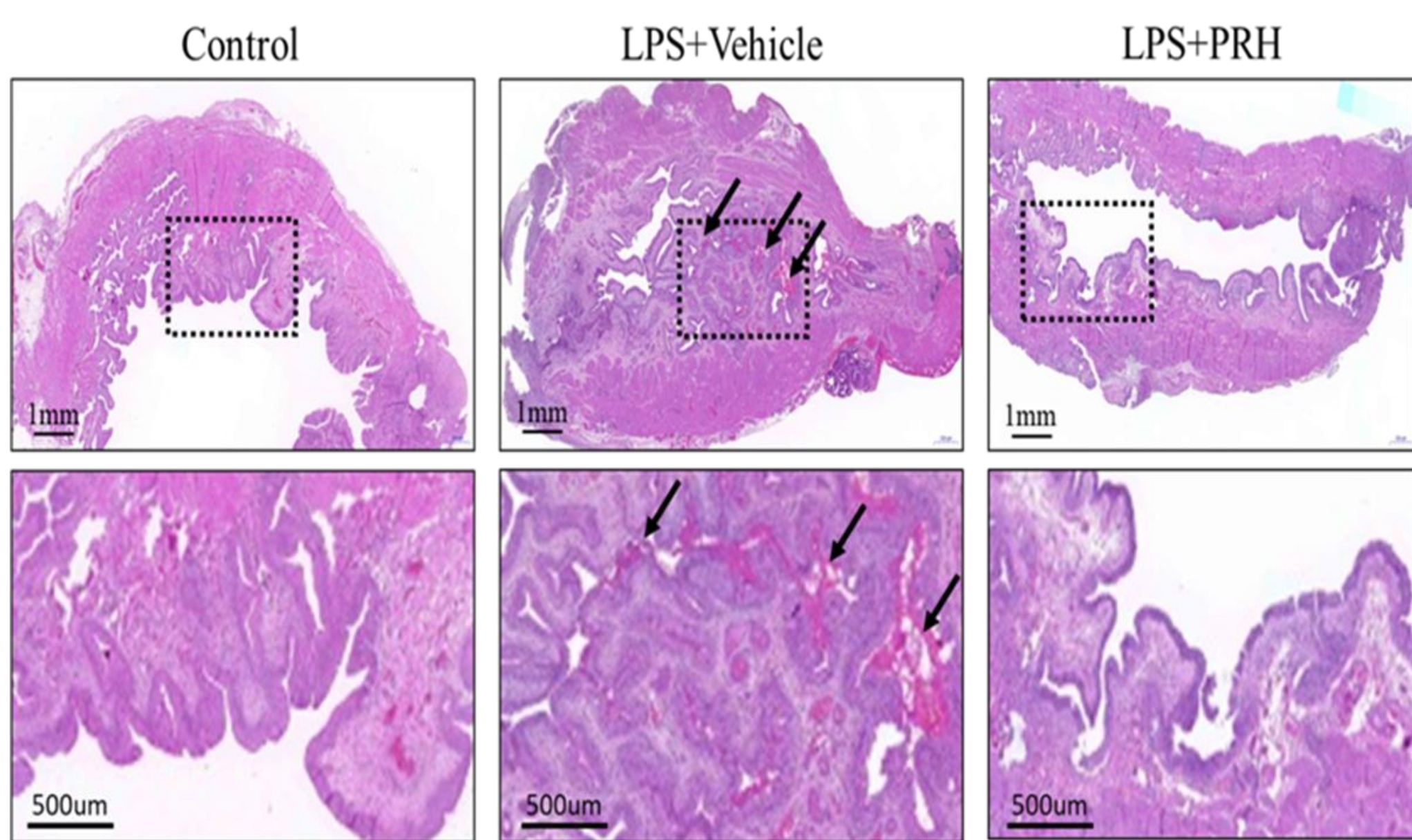


圖十四、圖示為甲苯胺藍染色(Toluidine blue staining)顯示各組別骨盆腔神經束中富含髓鞘軸突神經的退化與再生。

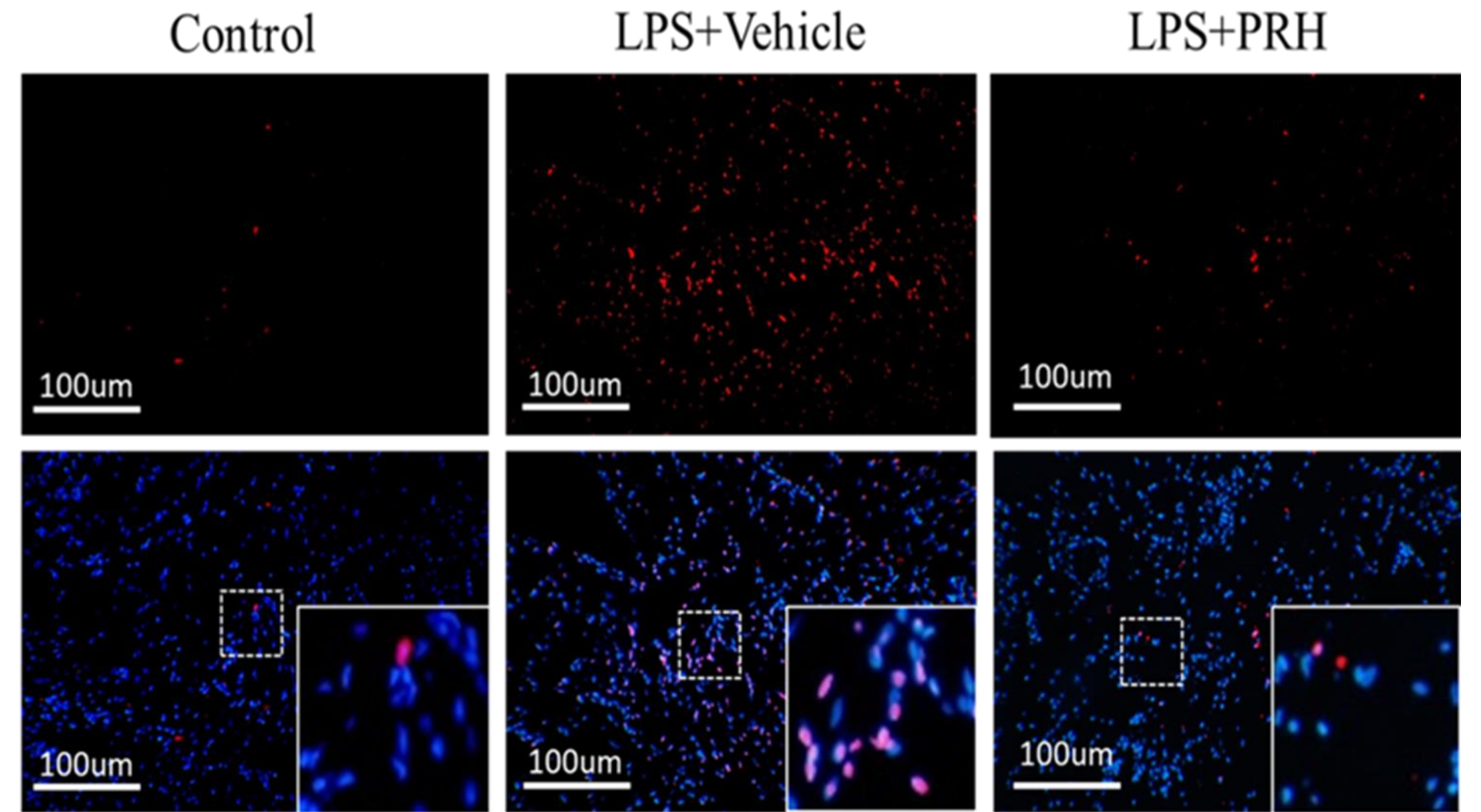


圖十五、電子顯微鏡顯示各組別骨盆腔神經束中富含髓鞘軸突神經的表現與統計結果。*為各組別與LPS+Vehicle組別比較P值<0.05。

PRH治療可防止尿路上皮細胞增厚、膀胱平滑肌細胞凋亡及膀胱組織纖維化



圖十六、蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin and eosin stain (HE) stain)顯示各組別膀胱組織上皮增生、白血球浸潤、出血與發炎情況。下圖為各組虛線方框的放大圖。箭頭指出為膀胱出血情形。



圖十七、利用末端脫氧核糖核苷酸轉移酶脫氧尿苷三磷酸切口末端標記分析(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay)觀察PRH對防止膀胱平滑肌細胞凋亡的情形。紅色表示凋亡的細胞；藍色表示細胞核。▲上圖為各組細胞凋亡的情形。下圖為凋亡的細胞與細胞核合併圖。

討論

- PRH活化劑的選擇：**本次研究我們發現不同活化劑會影響生長因子或細胞激素的釋放比例，也尋找到更有潛力的活化試劑，未來可以嘗試合併使用兩種以上不同性質的活化方式，確認其對PRH中生長因子釋放的效果。
- PRH的特性：**PRH具備相當的生物安全性，加入玻尿酸後形成PRH水膠可以應用在該組織需要PRH包覆的治療上。此外，PRH中使用Chitosan作為生醫複合和材料，不僅可以使PRH的結構更穩定，同時更能加強PRH在神經保護的效果。
- PRH的優勢：**PRH具備凝膠與控制生長因子釋放的優點，不僅可以更廣泛應用在各種不同領域，並且能減少未來患者臨床治療的次數。
- PRH的組織保護效果：**PRH不僅能促進富含髓鞘神經軸突的再生，更在本研究中發現其對上皮與平滑肌組織亦有良好的保護效果，顯示PRH未來在醫學上各領域的應用潛力。

結論

優化富含血小板濃縮液的製備方法

開發可注射性富含血小板水膠複合物(PRH)

確認可注射性富含血小板水膠複合物(PRH)在神經的保護效果