

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 工程學(二)科

第二名

052405

天然水膠組織工程支架之孔洞型態探討

學校名稱：國立鳳山高級中學

作者： 高二 鄭雅心 高二 陳昱希 高二 廖晨妤	指導老師： 吳家進 柯嘉冷
---	-----------------------------

關鍵詞：組織工程支架、孔洞型態、物化性質

摘要

長期以來，若人體發生軟骨缺損，僅能依賴藥物或手術來減緩軟骨損傷，但無法達到修復軟骨之目的。

本研究使用天然高分子進行交聯反應製備軟骨支架，透過溶劑鑄造鹽洗法，控制內層孔洞粒徑及數量，探討不同粒徑大小與添加量之造孔劑對支架物化性質與促進細胞分化能力之影響。透過觀察顯微結構，測試吸水量、降解性、抗壓強度與交聯度，並測試生物相容性與促進前驅骨母細胞增生及分化之能力。

結果發現，造孔劑粒徑大且添加量多的軟骨支架 (170-4)，雖抗壓強度僅 0.0177 MPa，每克支架吸水量達 14.72 mL，浸泡於試劑 30 天後，支架不會明顯降解，且不具細胞毒性，促進前驅骨母細胞增生與分化的能力最佳，因此可作為適用於軟骨缺損修復之組織工程支架，提高軟骨修復之成效。

壹、研究動機

一、契機

組隊參加本次科展的起因，源始於曾經到組織工程實驗室參觀，透過實驗室學長姊的介紹，我們看到了從材料製備、性質測試，到細胞分析等跨領域的實驗，這引起了我們想要更深入了解，為何平凡無奇的材料，經系統性測試後，可變身為能夠使用在人體的產品。與學校老師討論後決定進行本研究，除了解生醫材料開發的過程，也可強化我們實驗設計與邏輯架構的能力。

二、前言

台灣目前已步入老年化社會，隨著年齡增長，不可避免會遭遇組織或器官功能退化的問題，最常見的就是好發於老年人的退化性關節炎，主因是因為關節面持續受到應力作用，引起軟骨磨耗缺損，初期症狀可能為略感不適、疼痛，若是軟骨缺損面積大，甚至可能導致無法行走的問題，但目前對於關節軟骨會磨耗，甚至自行降解之成因及機轉仍不甚清楚，因此，軟骨修復仍是目前許多學者挑戰的研究目標。

三、緒論

過去人體組織器官若出現損傷，僅能選用移植或者人工合成材料取代原有的組織器官，

像是器官移植或是人工心臟等，但除了使用別人的器官外，能否有更好的選擇？如，加強自體組織修復能力或是培養自己的器官作為替換的選擇。然而，並非所有的組織器官都擁有自行修復的能力，關節軟骨屬於沒有血管、神經及淋巴組織的結締組織，所以關節軟骨受到損傷時，自行恢復的能力相當有限。截至目前為止，臨床上常見的治療退化性關節炎方式都較為被動，如使用葡萄糖胺類或注射玻尿酸以減緩關節退化的速度或是服用非類固醇抗發炎藥，來減輕疼痛；當關節炎惡化至重度時，需要倚靠手術治療，但是受制於患者年齡、軟骨損傷程度或是手術後生成之軟骨種類等因素，能修復受損軟骨的機會有限，因此，在自體修復能力有限的情況下，臨床治療開始發展所謂的『再生醫學 (regenerative medicine)』。

再生醫學，也稱為『組織工程 (tissue engineering)』。組織，是由細胞 (cell)、細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 及生長訊息系統 (signaling system) 三個部分所構成，這也成為組織工程的三要素，這三要素橫跨了三大領域的應用，分別是臨床醫學應用 (細胞)、工程材料知識 (支架) 與生命科學原理 (刺激訊號)。

組織工程的起點是製作一個具有生物相容性的組織替代物，用來修復、重建受損的組織器官功能或取代病變的組織器官。這個組織替代物，其實就是一個支架，除了用來支撐細胞外，還是組成完整組織所需的框架，所以一個好的生物支架是組織工程中不可或缺的元素。

組織工程的另外兩要素，其實就是細胞療法的概念，若能從自體取得足夠數量的軟骨細胞，將其種植於支架上，搭配體外誘導培養，在增加軟骨細胞數量的同時，促進軟骨細胞進行分化，再將此一富含軟骨細胞的支架植回患處，可增加修復軟骨缺損的機率，達到減輕病患不適，恢復生活機能的作用。

因此，我們希望製備一組織工程支架，透過調整製程參數，探討對支架物化性質之影響，並測試支架的生物相容性，最後與細胞共培養，確認不同參數的支架是否會影響細胞增生與分化的能力。

四、文獻探討

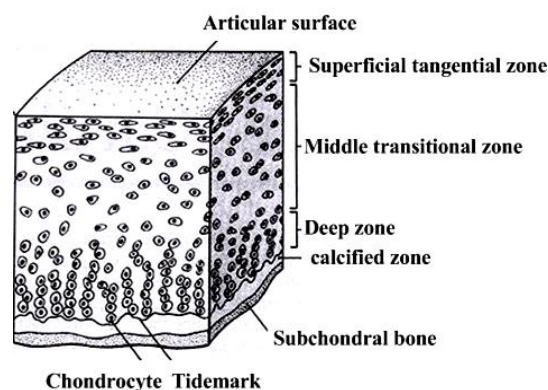
(一) 軟骨介紹

軟骨屬於結締組織，其中沒有血管及神經通過，僅有軟骨細胞 (chondrocytes) 及細胞外基質 (extracellular matrix, ECM)，其中超過 95% 的體積為細胞外基質。軟骨基質又屬於高度水合的組織，60% ~ 80% 由水構成，其他為膠原蛋白及肽聚糖-玻尿酸 (hyaluronan) 聚合體，有

助於代謝物質在軟骨與周遭組織間擴散，維持軟骨組織的活性。

隨著細胞外基質組成成份的不同，可分成三種軟骨，分別為透明軟骨 (hyaline cartilage)、彈性軟骨 (elastic cartilage) 和纖維軟骨 (fibrocartilage) (Hunter, W., 1995)。人體內的關節軟骨就是屬於透明軟骨，主要為75%的水份、5 % 的軟骨細胞以及 20 % 的細胞外基質；其中細胞外基質是由蛋白聚醣 (proteoglycans, PGs)、醣蛋白 (glycoproteins) 及纖維性膠原蛋白所組成；纖維性膠原蛋白中有 90 % ~ 95 % 為第二型膠原蛋白 (type II collagen) (Levangie, P.K., & Norkin, C.C., 2001)。

一般成人的關節軟骨厚度約為 2 ~ 5 mm，分為四區，最靠近關節面的為表層正切區 (superficial tangential zone)，第二型膠原蛋白纖維小束平行於關節表面，周圍包圍長而扁的軟骨細胞；第二區為中間斜切區 (intermediate transitional zone)，膠原纖維呈現不規則排列，軟骨細胞為圓形並隨意散布；第三區為深層放射區 (deep radial zone)，膠原蛋白纖維與硬骨長軸平行排列，軟骨細胞為小而圓的型態，但是細胞是成短柱型垂直於軟骨表面；最後為鈣化區 (calcified zone)，存在鈣化基質與小而圓的軟骨細胞，此區與深層區之間有一明顯界線區隔，此界線稱為波紋 (tidemark)。在此線上，軟骨細胞會在軟骨窩中分裂，提供間質性生長 (interstitial growth) 所需的新生軟骨細胞，新生的軟骨細胞會由此層向關節面遷移，關節軟骨組織不同分層間的關係，如圖一所示。由此可知，軟骨內四區的基質特性及軟骨細胞型態有所不同，因此在研發軟骨支架時，應該考慮這四區不同的排列方式。



圖一、軟骨分層示意圖(REF：Hunter, W., 1995；Nam, Y.S., Yoon, J.J., Park, T.G., 2000)

(二) 組織工程

組織工程 (tissue engineering)，所謂組織，包含了細胞 (cell)、細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 及生長訊息系統 (signaling system)，同時這也是構成組織工程的三要素。

組織工程是希望製作一個具有生物相容性的組織替代物，用來修復、重建受損的組織器官功能或取代病變的組織器官。這個組織替代物，其實就是一個支架，除了用來支撐細胞外，還是組成完整組織所需的框架，所以一個好的生物支架是組織工程中不可或缺的元素。

一個好的組織工程的支架須具有以下特性，包括支架本身有適當強度、擁有適當的孔隙度、孔洞為相互連通的結構；支架本身不具有生物毒性、細胞可貼附於支架表面；最終支架可在體內完全降解，但過程中支架要能支持細胞逐漸產生所需的細胞間質，並逐漸降解，又不至於降解太快，可全程保持一穩定結構等特性(Zuk et al., 2001)。

(三) 支架製備與材料選擇

目前有許多製備支架的方式，如相分離法、溶劑鑄造鹽洗法、融化鑄造法、冷凍乾燥法、顆粒燒結法等(Langer, R., 2000；Lo, H., Kadiyala, S., Guggino, S.E., Leong, K.W., 1996；Schugens, C.H., Maquet, V., Grandfils, C.H., Jerome, R., & Teyssie, P.H., 1996)。每種方式皆有其優缺點，最常用的是相分離法，利用互不相溶的液體（水溶液及高分子溶液）混合均勻後，以冷凍方式使其凝結，再進行冷凍與真空乾燥，可得到多孔性的材料。此方法可得到高孔隙率（90 %左右）及孔洞相互連通的多孔性材料。溶劑鑄造鹽洗法，則是將高分子膠化後，添加鹽類，藉此產生孔洞，待高分子溶液呈現膠體後再將鹽類溶出，即可產生大量的孔洞。此方式的優點為製備方法簡單，且可控制材料的孔徑及孔隙度，但是缺點是若是支架內層不是連續型孔洞時，可能無法完全溶出鹽類（孔洞製造劑），會造成支架生物相容性不佳的問題；也可使用有機物質作為發泡劑來製造孔洞，但會造成支架內部會殘留許多的有機溶劑，導致細胞毒性。

一旦有殘留的造孔劑，就可能影響後續的生物相容性，因此，為了去除造孔劑，只好將支架型態變成薄膜，減少厚度，避免造孔劑可能包覆於內層，無法完全清洗乾淨的問題，但薄膜支架又跟軟骨原先的結構有所不同，因此，還需努力將支架製作成立方體結構，才能更為貼近軟骨原先的結構。

可用來製造支架的材料大多為高分子，可分為天然及人工合成高分子。天然高分子，如明膠 (gelatin)(Chou, C.H., Cheng, W.T.K., Lin, C.C., Chang, C.H., Tsai, C.C., & Feng, H.L., 2006)、膠原蛋白 (collagen) (Pieper J.S., van der Kraan P.M., Hafmans T., Kamp J., Buma P., & van Susante J.L.C., 2002)，褐藻膠 (alginate)、瓊膠 (agarose) 等，還有透明質酸 (hyaluronan acid, HA) (Park, S.N., Park, J.C., Kim, H.O., Song, M.J., & Suh, H., 2002) 及微纖維 (fibrin) 與甲殼素 (chitosan)

(Lee, J.E., Kim, K.E., Kwon, I.C., Ahn, H.J., Lee, S.H., & Cho, H., 2004)等。人工合成高分子，如聚乙醇酸poly-glycolic acid、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物及以太酯類(polydioxanone)等(Ma, Z., Gao, C., Gong, Y., Shen, J., 2005)，其裂解產物為小分子鏈段，這些產物將隨著人體內的新陳代謝過程排出體外，因此，將不會殘留於體內。考量耐磨、彈性暨恢復性等性質之聚己內酯多元醇或聚原酸酯等都是可選擇的材料。

軟骨基質主要由第二型膠原蛋白、彈絲蛋白、醣蛋白、黏附性醣蛋白、葡萄糖胺聚醣所構成，其中醣蛋白聚合體為主成分，結構呈現羽毛狀，是由透明質酸，也就是俗稱玻尿酸，構成結構主體，旁邊有核心蛋白，以共價鍵鏈結兩旁的糖基蛋白(羽絨)，結合形成聚蛋白聚醣(aggregans)。玻尿酸在軟骨組織中可維持軟骨健康，使得關節液被保留在適當的位置，組織的新陳代謝正常，以及預防組織不正常分解。

由以上結果可知，玻尿酸為軟骨基質最基本的成分，然而玻尿酸含量越多，合成的支架強度越差，會影響支架本體結構穩定性，導致支架植入後降解速率過快等問題，因此，不適合單獨使用玻尿酸作為支架之成分。在本研究中，製作之組織工程支架，在成分中除加入玻尿酸外，還會加入其他天然高分子，如明膠與海藻酸鈉，透過交聯使不同高分子鏈結，模擬玻尿酸與其他蛋白質所形成的基質結構。

此外，製作之軟骨組織工程支架，應考量不同層軟骨孔洞型態差異，在相分離法及冷凍乾燥法的製程當中，要均勻的控制孔徑及孔洞數量並非容易的事，若以溶劑鑄造鹽洗法、融化鑄造法、顆粒燒結法則須透過控制造孔劑來控制孔徑，因此，在本研究中，欲透過溶劑鑄造鹽洗法，控制內層的孔洞粒徑及孔洞數量，探討不同粒徑大小及含量的造孔劑對支架之物化性質影響，但後續須測試支架的生物相容性，確保製程中使用的造孔劑沒有殘留於支架內，最後再測試支架是否具備促進細胞生長及分化的能力。

貳、研究目的

本研究欲使用兩種以上的天然高分子，如明膠與海藻酸鈉，再加入玻尿酸，進行交聯反應，製備一具有一定強度的軟骨支架，再透過溶劑鑄造鹽洗法，控制內層的孔洞粒徑及孔洞數量，探討不同粒徑大小與添加量之造孔劑對支架物化性質之影響，同時測試其生物相容性與促進細胞生長及分化的能力。

參、研究設備及器材

一、原料

下表一列出本研究用來製作軟骨支架之原料以及用於檢驗分析、細胞培養及分析之化學藥品及原料。

表一、使用之原料及藥劑

	中文名稱	英文名稱	廠牌
高分子原料	1 明膠	Gelatine	PanReac
	2 藻酸鈉	Sodium Alginate	Spectrum
	3 玻尿酸	Hyaluronic acid	Foodchemifa
原料 造孔劑與交聯劑	4 蔗糖	Saccharose	KATAYAMA CHEMICAL
	5 氯化鈣	Calcium chloride	PanReac
	6 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺	3-(ethyliminomethyleneamino)-N,N-dimethyl-propan-1-amine	Sigma
細胞培養所需藥劑	16 DMEM 培養基	Dulbecco's Modified Eagle Medium	gibco
	17 Alpha-MEM 培養基	Minimum Essential Medium α	gibco
	18 磷酸緩衝溶液	Dulbecco's phosphate Buffered saline	gibco
	19 胰蛋白酶	Typsin EDTA Solution	Biological Industries
	20 抗生素溶液	Penicillin Steptomycin	gibco
	21 馬血清	Horse Serum	gibco
	22 胎牛血清	Fetal Bovine Serum	Hyclone
23 重碳酸氫鈉	Sodium Bicarbonate	Sigma	
細胞分析之藥劑	24 XTT細胞增生試劑	XTT Cell Proliferation Kit	Biological Industries
	25 細胞活性試劑	Alamar Blue	Bio-RAD
	26 二甲基亞硫	Dimethyl sulfoxide(DMSO)	Sigma
	27 阿爾辛藍	Alcian Blue	Sigma
	28 甘油	Glycerol	Ajax-Finechem
	29 二聚甲醛	Paraformaldehyde	Panreac
	30 鹽酸	Hydrochloric acid solution	Panreac AppliChem

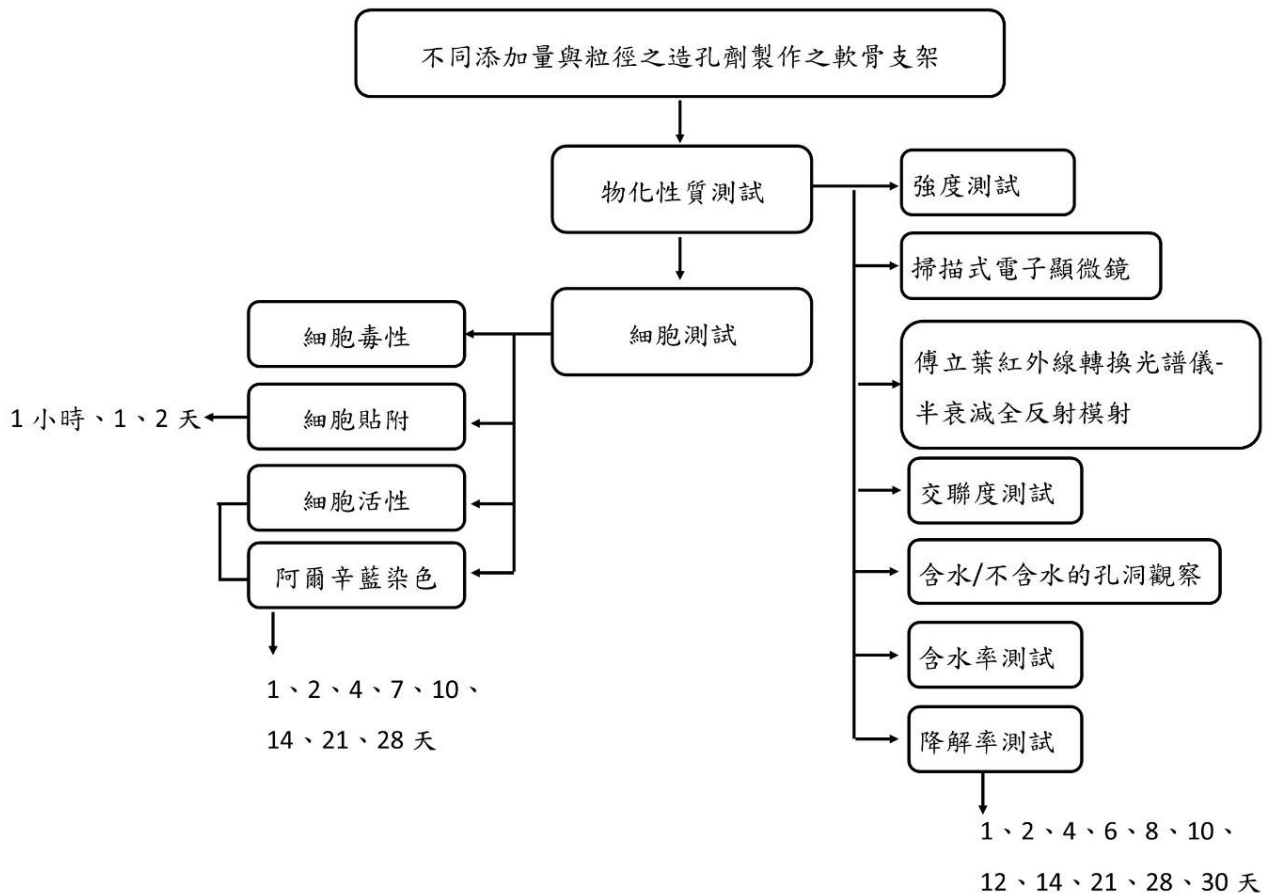
二、研究設備

下表二為本研究用來製作軟骨支架以及用於檢驗分析、細胞培養及分析之儀器設備。

表二、使用之儀器及設備

	名稱	廠牌	型號		名稱	廠牌	型號
製程設備I							
1	電子天平	SHMADZU	TW423L	2	電子天平	SHMADZU	UW2200H
3	超純水系統	ELGA	-	4	4度冰箱	KING COOL	KC-4579
5	-20度冰箱	FRIGIDAIRE	FFU21F5HW	6	冷凍乾燥機	EYELA	FDU-830
檢驗設備							
7	電子天平	SHMADZU	ATX224	8	傅里葉轉換 紅外線光譜儀	THERMO	NICOLET 6700
9	萬能試驗機	弘達	HT-2402	10	反射式顯微鏡	ZEISS	Primotech
11	掃描式 電子顯微鏡	HITACHI	S-3400N	12	恆溫水槽	DENG YNG	G-20
細胞培養及分析設備							
25	無菌操作台	三雄	-	26	細胞用顯微鏡	OLYMPUS	CK
27	細胞培養箱	Thermo	Forma 310	28	搖晃式培養箱	YIHDER	LM-400D
29	離心機	Hsiang Tail	CN 10001	30	酵素免疫分析 儀	BMG LAB	SPECTRO

肆、研究過程或方法



圖二、實驗流程圖

一、材料與方法

(一) 製備膠體溶液

混合 0.8 g 明膠 gelatin (from bovine skin , type B)、0.008 g 玻尿酸 (hyaluronic acid, 簡稱 HA, 分子量 range from 8 to 10000 kDa, 與 0.2 g 海藻酸鈉作為支架的主體。

粉末均勻混合, 後隨即加入至少 50 °C 的二次去離子水, 共 20 mL, 使三種高分子液化, 並與水形成膠體; 將此混合均勻之膠體溶液, 加入經過粒徑控制之造孔劑, 用以製造不同大小均質孔洞。造孔劑含量為每 mL 膠體分別加入不同粒徑 (70 mesh 以上, 未過 170 mesh, 粒徑範圍 88 μm ~ 177 μm 及過 170 mesh 未過 325 mesh, 粒徑範圍 44 μm ~ 74 μm) 與不同重量 (2 g、4 g) 的蔗糖做為造孔劑, 探討以不同粒徑與克數之造孔劑製備軟骨支架, 對其物化性質及生物相容性之影響。

(二) 交聯劑的配置

使用的交聯劑溶液為 1 vol % 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺(N-(3-Dimethylaminopropyl) - N' - ethylcarbodiimide hydro - chloride, 簡稱 EDAC) 及 0.5 % 氯化鈣 (CaCl₂)。

(三) 製備支架

將膠體均勻調拌後，第一天是利用將樣本泡入 100mL 的硬化劑溶液當中，使其交聯硬化為支架的半成品。將第一次交聯劑去除並秤樣品重量，以樣品重比交聯劑為 1 比 2 的比例加入第二次交聯劑，第二天使用的交聯劑 1 vol% EDAC，交聯 1 天。待樣本完成交聯後，即可將支架主體切成適當大小之樣本型態(長條型)，然後為了將支架內所含造孔劑完全溶蝕，半成品支架本體須浸泡去離子水中，以洗去殘留於 scaffold 表面及內部之造孔劑後，去除第二次交聯劑並水洗 3 小時，水洗後冰 -20°C 4 小時，再冷凍乾燥 3 天，即可取得軟骨支架。

表三、組別代號

組別代號	造孔劑粒徑	造孔劑含量
170-2	88 μ m ~ 177 μ m	2g
170-4	88 μ m ~ 177 μ m	4g
325-2	44 μ m ~ 74 μ m	2g
325-4	44 μ m ~ 74 μ m	4g

二、材料物化性質、顯微結構與官能基之分析

(一) 光學顯微鏡分析

在本研究中，使用光學顯微鏡進行乾燥支架與含水支架之觀察，觀察支架大量吸水後，結構與孔洞形態是否有改變。乾燥支架是取支架完成品，切除表面薄層後，置於玻片上進行光學顯微觀察。含水支架須先將支架之完成品置於微量離心管中，加入 1 mL 的二次去離子水，隨即將 1.5 mL 微量離心管以封口蠟膜封蓋，置於 37°C 恆溫水槽中 24 小時後，取出含水支架，置於玻片上進行光學顯微觀察。

(二) 吸水量分析

將切除表面薄層之支架完成品以四位數電子天平紀錄未含水之支架重量 (乾重)，再將支架放入微量離心管中，加入 1 mL 的二次去離子水，將微量離心管以封口蠟膜封蓋後置於 37 °C 恆溫水槽中，分別在浸泡 5、10、15、30 分及 1、2、24 小時取出測試，測試方法是將支

架從離心管中取出，以吸飽水的海棉吸掉表面多餘的水分後，再以四位數電子天平秤重，即可得到支架含水的重量(濕重)，經過計算後可得到不同條件下，每公克支架可以吸附之水量。

$$(\text{濕重}-\text{乾重}) / \text{乾重} = \text{每公克支架之含水量 (mL / g)}。$$

(三) 支架降解性測試

將切除表面薄層之支架完成品，以四位數電子天平秤重後，紀錄未含水之支架重量(乾重)，再將支架放入 10 mL 離心管中，加入 5 mL 的二次去離子水，封蓋後置於 37 °C 恆溫水槽中 1、2、4、6、8、10、12、14、21、28、30 天，時間到後測量，到達設定時間後將樣本從離心管中移出置於吸飽水的海綿上，吸除多餘的水分後，再以四位數電子天平秤重測得浸泡後剩餘支架重量(濕重)。

$$\text{重量殘留率 (\%)} = 1 - [(\text{濕重} - \text{乾重}) / \text{乾重}] \times 100\%$$

(四) 掃瞄式電子顯微鏡

將不同條件支架之完成品，切成薄片後，再將薄片置於金屬載台的碳膠上，並以離子覆膜機鍍白金，再使用掃描式電子顯微鏡觀察支架的表面及孔隙狀況；同時也可應用於試片直接觀察及細胞培養後之細胞固定試片形態觀察。

(五) 抗壓強度-乾壓

挑選大小一致之支架之完成品，切除表面薄層後，測量並記錄其長(L)、寬(W)，高(H)，再以桌上型萬能試驗機測試支架之抗壓強度，記錄抗壓後的曲線變化，經由面積的計算可得應力(stress)、高度或長度的變化可得應變(strain)，取其線性斜率後可得到支架承受之最大力及彈性模數(modulus)。

(六) 衰減式全反射傅立葉紅外線光譜儀(ATR-FTIR)分析

紅外線光譜儀可確認是否有新的官能基生成。穿透式試片製作方式為取適量粉末或樣本壓碎，並將背景粉末 KBr 以 1: 100 的比例充分混合，壓成半透明圓形薄片，將壓製好的半透明薄片置於儀器中進行測試。衰減式全反射模組 (Attenuated total reflectance, ATR)利用高反射率介質(鑽石)入射低反射率介質(樣本)達到光波打至樣本產生全反射，分析其樣本吸收及釋放之波長，達到檢測的效果。波數與打入深度成正比，所以波長越長，訊號也越強。由此可見光譜強度與 Sample 厚度無關，所以樣品不需經過前處理，在聚合物測試上可達到較為準確的效果。

(七) 交聯度測試

本研究為評估支架經交聯劑反應後，判斷其交聯能力之差異。交聯度原理是利用支架的自由胺基與交聯劑反應的百分率，此數據是利用茚三酮試劑來測量支架上未反應的自由胺基含量，再經由公式計算而得。茚三酮試劑 (Ninhydrin reagent)，又稱寧希德林，為一種有機物，主要用於檢測胺、一級和二級胺，茚三酮分子上的羰基會與胺基發生縮合反應，反應後產生藍紫色產物，再以比色法測定胺基的含量，隨著胺基含量越多所呈現的藍色越深，藉由酵素免疫分析測讀儀(ELISA Reader)分析比較，推算胺基的含量。茚三酮比色法測定胺基含量不僅操作簡單、成本較低而且較易取得較佳的測量結果，因此茚三酮比色法已被廣泛應用於檢測胺基含量。在本研究中，若支架表面殘留的胺基多，則反應溶液的顏色越深，也就是未反應的官能基多，代表交聯度差；反應溶液顏色淺，代表支架表面殘留的胺基少，代表交聯度好。

測試方法如下，取樣本 0.01 克加 2 mL 的去離子水，放 37 °C 恆溫水槽 1 小時，可取得樣本萃取液。再取樣本萃取液：茚三酮溶液 = 2 : 1，均勻混合後，在沸水中反應十分鐘，待放涼即可測試。

$$\frac{[(\text{NHN reactive amine})_{\text{fresh}} - (\text{NHN reactive amine})_{\text{fixed}}]}{[(\text{NHN reactive amine})]_{\text{fresh}}} \times 100\%$$

(NHN reactive amine)fresh : 樣本交聯前自由胺基含量

(NHN reactive amine)fixed : 樣本在交聯後剩餘的自由胺基含量

三、體外細胞實驗分析 (in-vitro test)

(一) 生物相容性測試

1. 細胞毒性測試 (Cytotoxicity test)(Follo ISO 10993-5)

使用 L929 cell line，培養基為 alpha- modified Eagle's medium (α -MEM, Gibco®, Invitrogen Taiwan Ltd., MD)，內含馬血清 (house serum) (Biologend Co., US)，培養於 37 °C 含有 5% CO₂ 的培養箱中，2 天置換培養基一次，當細胞生長至八分滿時，可進行繼代培養。本實驗的陽性對照組 (positive control) 為 15% 的二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)，每 1 mL 的細胞培養液中含 150 μ L 的 DMSO，經由 0.22 μ m 的過濾膜過濾滅菌後備用。陰性對照組 (negative control) 使用高密度聚乙烯，重量對培養基體積比 (g/ml) 為 1:5，置於 37°C 恆溫槽中培養 24 小時，吸取上層澄清液，此即為陰性對照組的萃取液。Control 組使用正常的細胞培養基。實驗組使用薄膜狀支架，厚度約 0.5 mm，其萃取液的準備方式為計算好樣本上下

層的面積後，將試片置入細胞培養基中，以面積對培養基體積比 (g/ml) 為 6 cm²: 1 mL 的比例，加入培養基，完成後置於 37 °C 恆溫槽中培養 24 小時，到達培養時間後吸取上層澄清液，此即為測試材料的萃取液，每組做六重複 (n = 6)。

細胞培養方式為取 100 μ l 細胞濃度為 1×10^5 cells/mL 的細胞懸浮液植入 96 孔培養盤，於培養箱培養隔夜後，吸掉原有的培養基並加入樣本的萃取液 (100 μ l / well) 作為培養基來培養細胞。培養 24 小時後，吸掉實驗用的細胞培養基，加入一般的細胞培養基 (100 μ l / well)，與 XTT cell proliferation assay kit (50 μ l/well) 混合，放入 37 °C，5% CO₂ 的培養箱中 4 小時後，以 ELISA reader 測試 OD 值 (XTT assay OD 值與細胞活性成正比)。

2. 細胞毒性試驗之型態觀察

細胞毒性試驗中的型態觀察，試片萃取液的準備方式如上細胞毒性試驗步驟所述，細胞培養方式則是取 100 μ l 細胞濃度為 1×10^6 cells/mL 的細胞懸浮液植入 48 孔盤養盤中，於培養箱培養 24 小時後，吸掉原有的細胞培養基，加入樣本的萃取液 (1000 μ l / well) 作為培養基來培養細胞。培養 24 小時後，以倒立式顯微鏡觀察細胞之形態拍下不同倍率的照片。

(二) 細胞實驗

1. 細胞培養

細胞貼附、增生、分化能力分析是使用小鼠的前驅骨母細胞 (D1 cell)。使用的細胞培養為 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco®, Invitrogen Taiwan Ltd., MD)，內含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)(Biologend Co., US)，培養於 37 °C 含有 5% CO₂ 的培養箱中，2 天置換培養基一次，當細胞生長至八分滿時，可進行繼代培養。

此細胞雖然為前驅骨母細胞，但在適當的環境及刺激下，可分化為骨細胞、軟骨細胞或脂肪細胞。選用此細胞株的原因也是為了測試當前驅骨母細胞與製作之軟骨支架共培養時，軟骨支架是否可促使前驅骨母細胞分化為軟骨細胞，若某一參數的軟骨支架可使前驅骨母細胞分化為軟骨細胞，代表未來植入體內後，可能有較好的軟骨修復效果。

2. 細胞貼附型態觀察-cell attachment test and cell morphology observation

將支架切成長、寬、高各為 5 mm，大小一致的正方體試片後，取 100 μ l 細胞濃度為 1×10^5 cells/mL 前驅骨母細胞 (D1 cell) 的細胞懸浮液，與試片做接觸性培養，培養時間為 1 小時、1 天、2 天。到達培養時間後，依序以 2.5% glutaraldehyde 與 paraformaldehyde 固定、

不同濃度酒精序列脫水後，將試片鍍金並以掃描式電子顯微鏡觀察細胞與材料接觸之型態及體外培養長時間之變化。

3. 細胞增生測試- cell viability

將支架切成長、寬、高各為 5 mm，大小一致的立方體試片後，取 100 μ l 細胞濃度為 1×10^6 cells/mL 前驅骨母細胞 (D1 cell) 的細胞懸浮液離心後加入 20 μ l 培養基，做接觸性培養，培養時間為 1、4、7、10、14、21、28 天。到達培養時間後，清洗後再以新的細胞培養基與 alamar blue proliferation assay kit 混合，4 小時後用 ELISA reader 測試細胞的光密度(正比於細胞活性)，檢測其光密度 (optical density, 簡稱 OD 值)，測試波長為 570nm 與 595 nm。

4. 細胞分化能力分析-阿爾辛藍染色 (Alcian Blue stain)

此染色方法可染出軟骨基質中的蛋白聚醣，此成分含量越高，則染出的藍色越深。實驗方法如下，將支架切成長、寬、高各為 5 mm，大小一致的立方體試片後，取 100 μ l 細胞濃度為 1×10^6 cells/mL 前驅骨母細胞 (D1 cell) 的細胞懸浮液離心後加入 20 μ l 的培養基，做接觸性培養，培養時間為 1、4、7、10、14、21、28 天。至培養時間後的試片，利用磷酸緩衝溶液清洗 3 次後，利用 4 % paraformaldehyde 溶液於室溫固定 15 分鐘，再經磷酸緩衝溶液清洗後加入濃度為 1 % Alcian blue 溶液作用 30 分鐘，再利用 0.1 N HCl 溶液作用 5 分鐘，用以去除過多的染劑，最後加入甘油保存並拍照。

四、統計分析

本研究的抗壓強度、吸水性、交聯度、降解度與細胞增生能力，是使用變異數分析(ANOVA)來進行統計分析。變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 是比較多組平均數有沒有差異的統計方法，主要是利用兩個不同變異數估計值來達到比較多組平均數之差異，分別利用組內平方和除以其對應自由度，可了解各組內變異的情形；組間平方和除以其對應自由度，可了解各組平均與總平均之變異情形。可藉由組內平方和與組間平方合之比值，來檢定各組平均數相等之假說，若是比值接近於一，則各組平均數相等之假說成立。

無母數則採用 Kruskal-Wallis Test；有母數的事後檢定採用涂基 HSD 檢定法 (Tukey's honestly significant difference)，涂基 HSD 檢定法適用於各組樣本數相同且要同時比較各組之平均是否有差異，主要是利用 HSD 方法計算出一差異值，只要任兩組的差異值大於此 HSD 差異值，即有統計顯著差異。

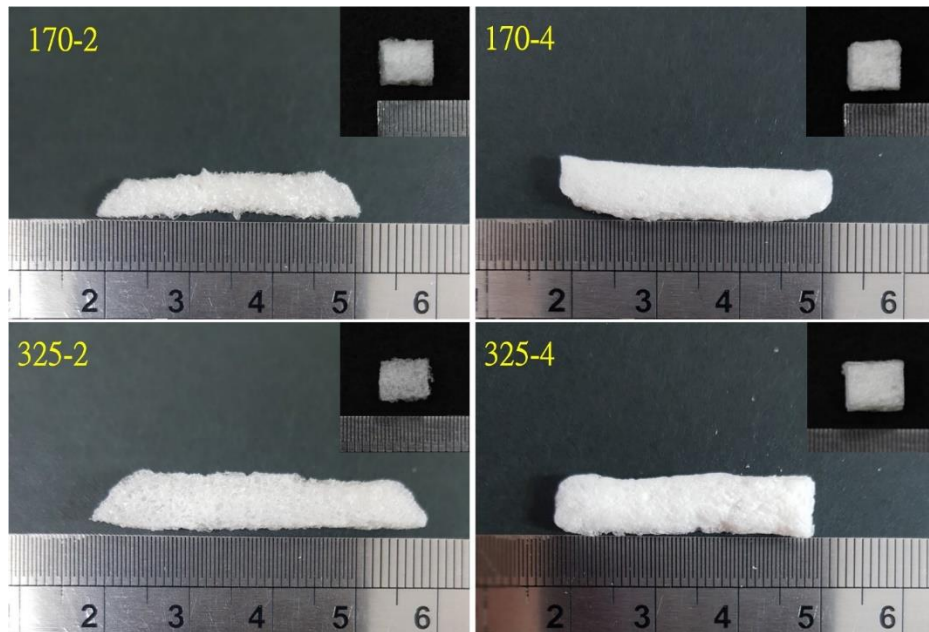
伍、研究結果

一、材料物化性質分析

(一) 光學顯微鏡分析

為了了解製作之軟骨支架內部孔洞的型態，因此利用光學顯微鏡分別觀察未含水與含水的支架，在進行觀察之前，先以相機拍攝支架外觀照與剖面照（圖三），一開始製作時，支架為長條形，170-2 與 325-2 的支架外觀質感較為疏鬆、不緻密，質感也較硬脆，而 170-4 與 325-4 的支架外觀，較偏向海綿，是較為軟略帶 Q 彈的質感。

剖面照，則是可初略觀察支架內部結構，170-2 與 325-2 這兩組有較明顯的孔洞，其餘兩組，孔洞較為緻密，肉眼無法直接看到孔洞。

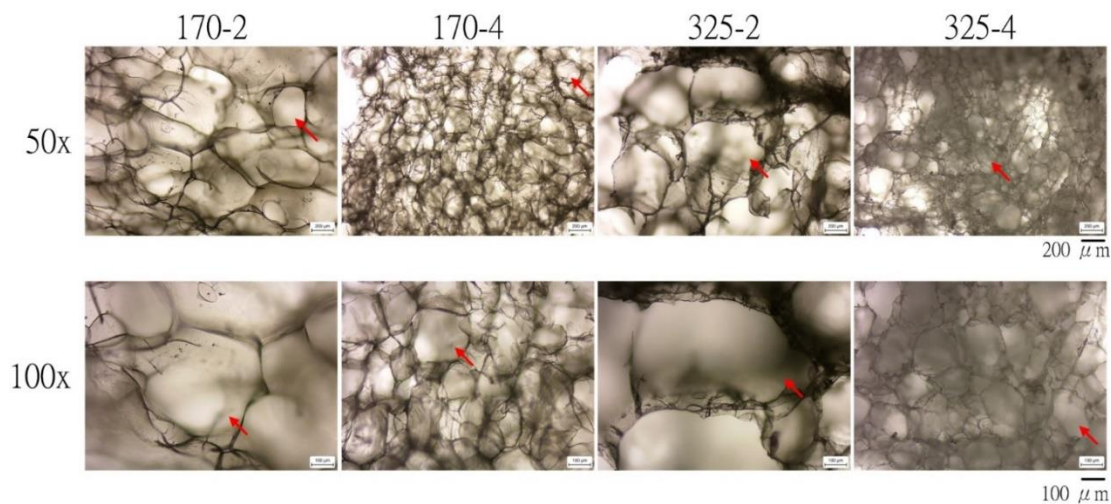


圖三、四組不同參數之軟骨支架外觀及剖面照

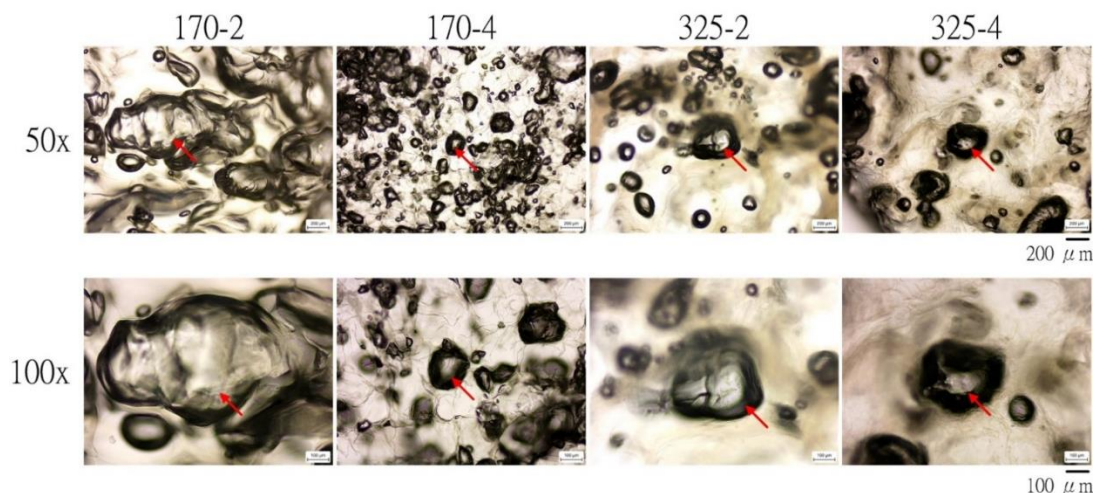
圖四則是以光學顯微鏡觀察支架內層剖面，發現，170-2 與 325-2 孔洞大，數量少，可透過上層孔洞看到下方孔洞的結構；至於170-4 與 325-4，孔洞明顯小於 170-2 與 325-2，但孔洞數量明顯較多，可以看到不同層的孔洞互相交錯的影像。

圖五是將支架浸泡於去離子水後再取出，觀察支架含水後的內層結構狀態，發現四組支架含水後，材料本身雖然有膨脹，支架本體並未崩壞，可維持原有的立方體，內部孔洞也依然為圓形，代表支架擁有一定的強度，可承受吸附液體之重量，但結構不會損壞。支架含水後，可透過最上層的孔洞中，看到下層的孔洞結構，這也證實，製作之軟骨支架內部為孔洞

與孔洞間是聯通的，因為若是孔洞是封閉的不聯通孔，則無法透過孔洞看到下方的孔洞結構，因此，未來軟骨支架在進行細胞培養或是植入體內後，聯通的孔洞形態有助於液體流通，幫助細胞代謝廢物及帶來細胞所需養分。



圖四、以光學顯微鏡觀察未含水支架內部孔洞分佈狀況



圖五、以光學顯微鏡觀察含水支架內部孔洞分佈狀況

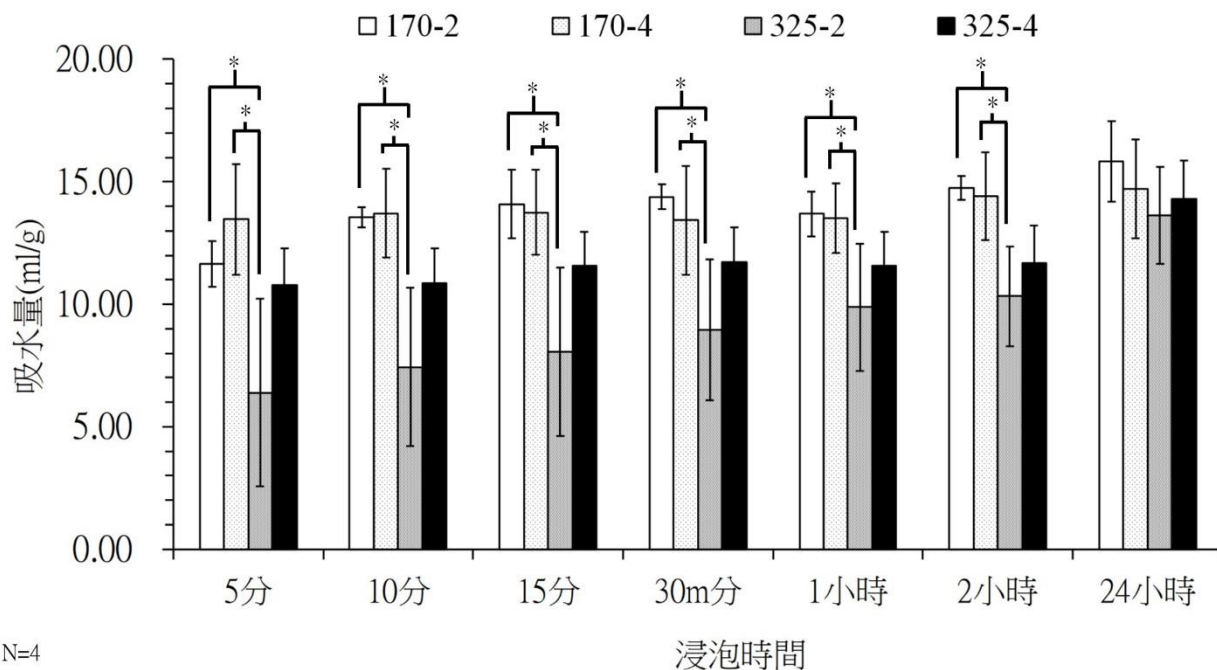
(二) 吸水量分析

吸水量，是為了了解每單位的軟骨支架能夠吸付多少溶液，吸附量高，代表未來可能有機會吸付較多的培養基或血液，可有較多的營養物質或生長因子，幫助細胞增生及分化。

測試四組軟骨支架不同浸泡時間的吸水量，結果如下圖六。170-2、170-4與325-4這三組有類似的趨勢，從支架浸泡5分鐘後開始，170-2與170-4有類似的吸水量，每克支架約可吸附13~15mL的溶液。325-4的初期吸水量較少，約在10~11mL左右，24小時後升為13~14mL。趨勢較為不同的則屬325-2這組，吸水量是隨著浸泡時間增加而增加，一開始

吸水量為 6 mL，後續會緩慢上升，至 24 小時吸水量已變成 13 mL。

比較各組在不同時間點的吸水量，可以發現，從浸泡後 5 分鐘開始，一直到 2 小時為止，170-2 與 170-4 的吸水量都明顯多於 325-2 這組的吸水量；只有 浸泡 24小時的各組間的吸水量沒有顯著差異 ($p\text{-value} = 0.4098$)。



N=4

symbol * means at the 0.05 level, the difference of the population was significantly different.

圖六、不同參數參數的軟骨支架測試每克材料吸水量之結果

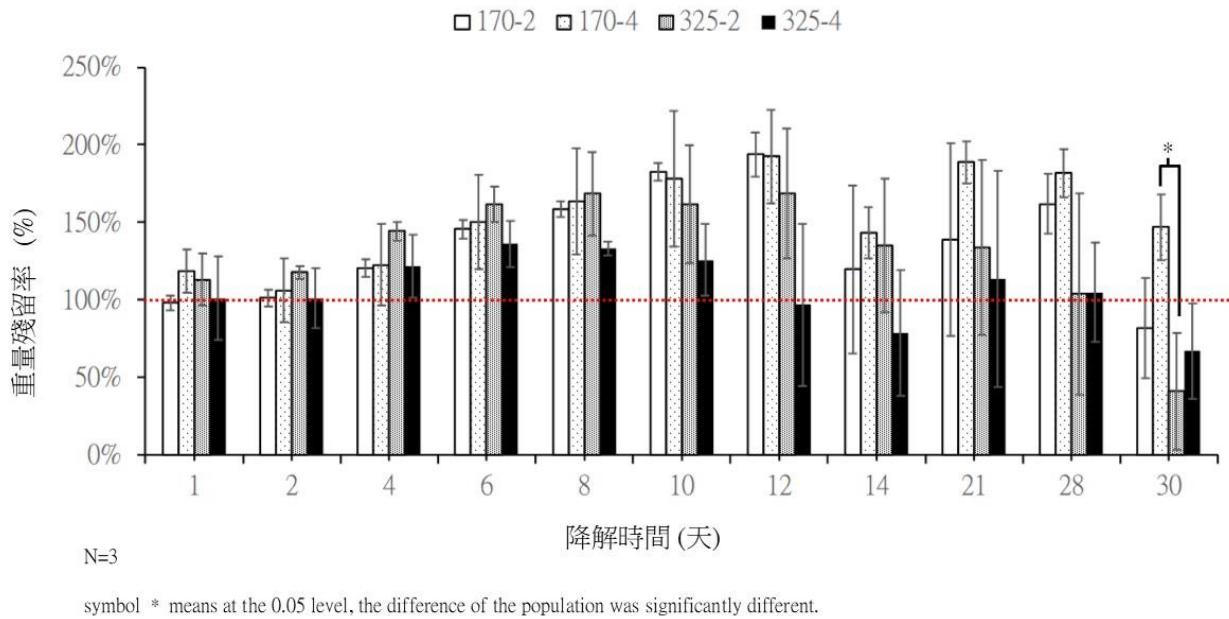
(三) 降解性分析

測試軟骨支架的降解性，是為了了解當支架接觸到溶液後，需要浸泡幾天支架才會完全消失，藉此模擬支架植入體內後，被人體完全降解的天數。

從測試結果發現，四組支架在浸泡一開始，其重量不減反增，代表一開始支架仍是持續吸水，產生膨潤，因此我們在呈現數據時，為了解釋得更為淺顯易懂，採用重量殘留率呈現支架，也就是分析剩下多少支架，而不是分析有多少支架已消失不見，因為若是分析降解率，則初期結果皆為負值，不易解釋。

各組別的支架都一直要到浸泡第 10 及 12 天後，才開始有支架降解的情形出現，下降趨勢最快的是 325-2 這組，到浸泡第 30 天時，重量殘留率僅剩下 41%，其餘組別重量殘留率都還超過 50% 以上。

因此，若用統計分析各時間點不同組別之軟骨支架的重量殘留率，除第 12 天 ($p\text{-value} = 0.0395$) 及第 30 天 ($p\text{-value} = 0.0173$) 之外，其餘時間點，各組的重量殘留率沒有顯著差異。

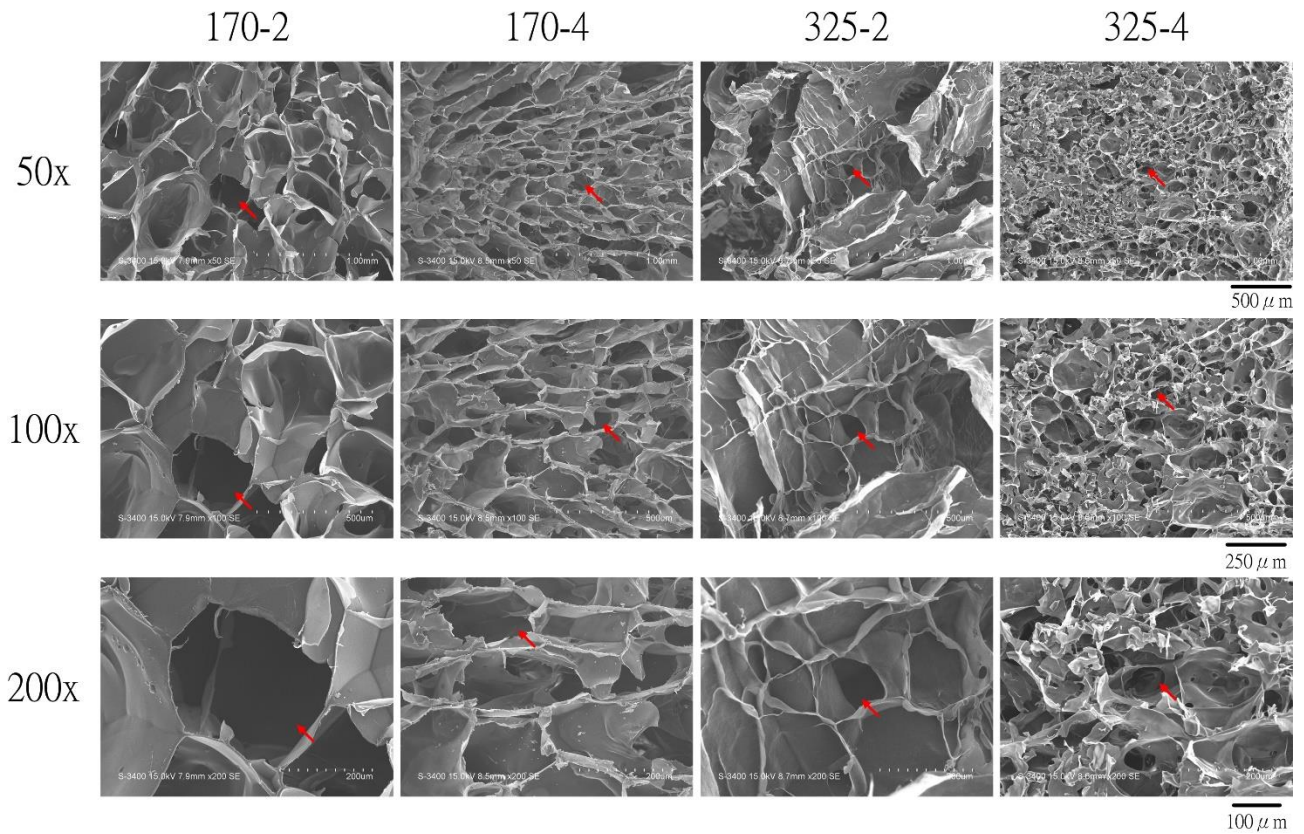


圖七、不同參數參數的軟骨支架測試不同浸泡時間之重量殘留率結果

(四) 掃瞄式電子顯微鏡分析

透過掃描式電子顯微鏡可以直接觀察到支架內部結構與孔洞大小等情況，支架內部具有相當緻密之孔洞，且孔洞間為相互連通的結構 (圖八)，放大倍率觀察孔洞表面材料呈現平滑狀，沒有觀察到造孔劑的殘留。170—2 及 170-4 這兩組，孔洞分布較為平均，畫面中沒有任一部分是沒有孔洞，或是孔洞大小落差甚大的情形。325-4 這組，因為添加的造孔劑重量雖然與 170-4 這組一樣，但因為造孔劑粒徑較小，因此，顆粒數量要較多才能達到一樣的重量，因此，這組也可明顯觀察的孔洞數量。最不一樣的是 325-2 這組，雖然仍有孔洞，但孔洞分布不均勻，有部分區塊是完全沒有孔洞的結構。

從這個觀察結果可以發現，隨著添加的造孔劑粒徑大小及添加量的不同，支架內部孔洞數量及大小有極大的差異，所以代表在此製程中可以放心的利用造孔劑的顆粒大小以及含量多寡，來調整支架所需之孔洞大小、分佈與緻密程度。

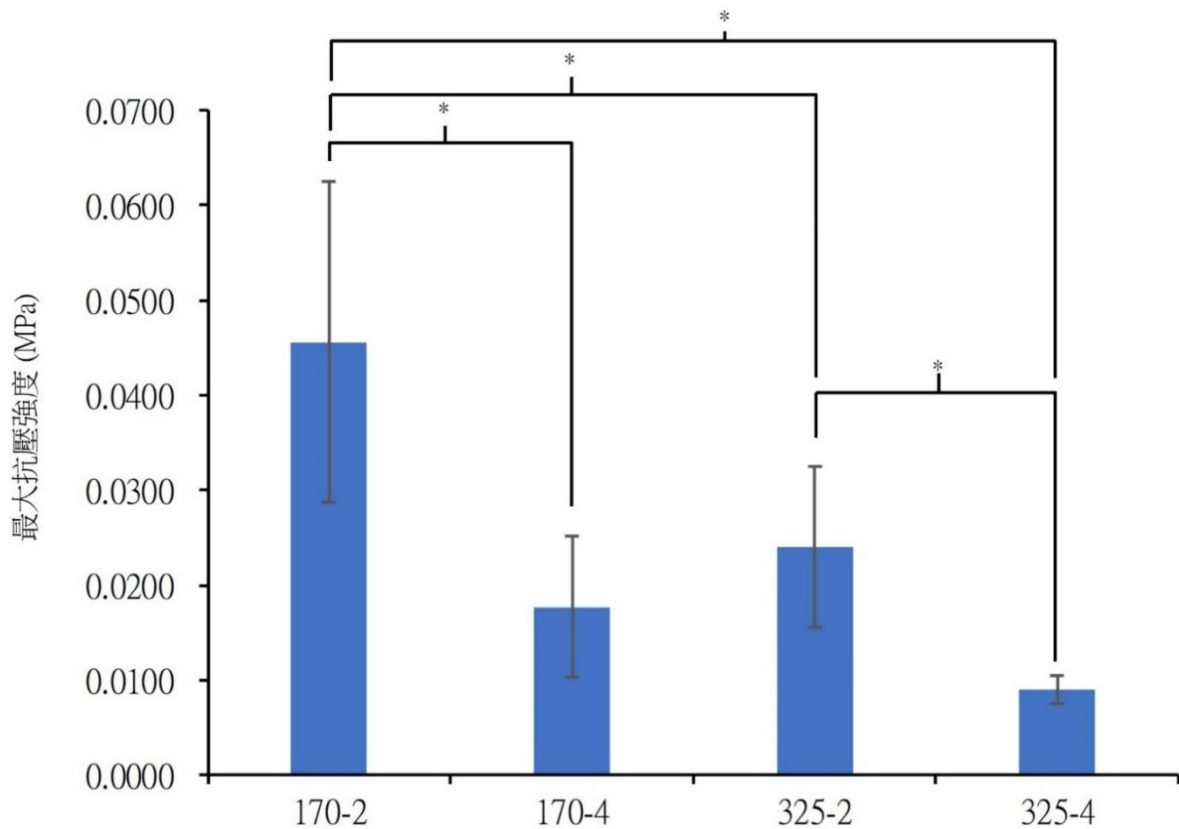


圖八、以掃描式電子顯微鏡觀察不同參數軟骨支架之結果

(五) 抗壓強度

我們利用抗壓強度來探討不同造孔劑粒徑與添加比例，對於支架本題強度造成之影響。理論上，當形成支架時所添加的造孔劑含量愈多時，會造成支架內部孔洞愈多，所以整體結構上的抗壓強度會較少。

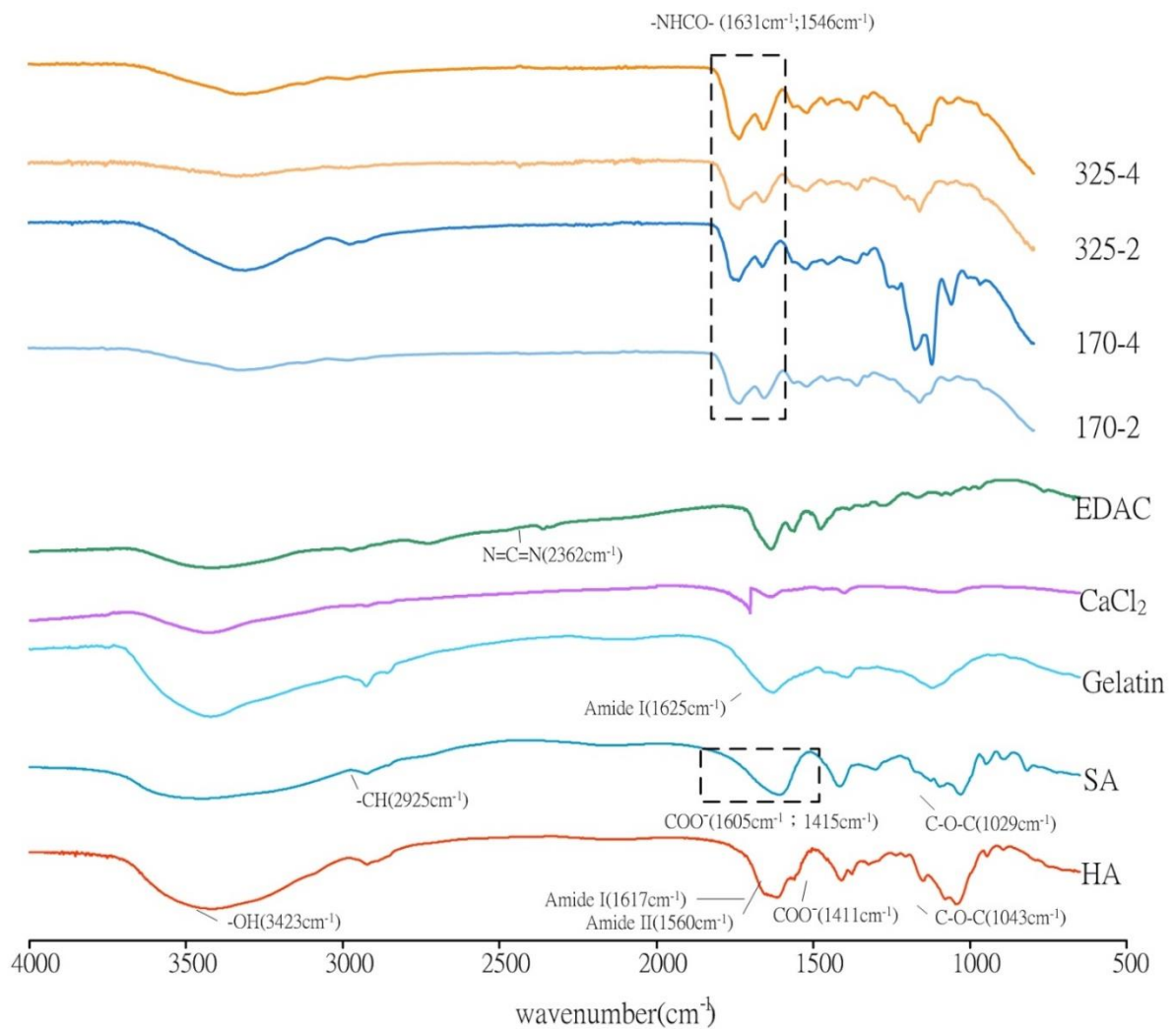
從結果來看 (圖九)，造孔劑粒徑最大、含量最少的 170-2，有最好的抗壓強度，強度在 0.0456 MPa，標準差為 0.0169 MPa；強度次之的是 325-2，強度數值在 0.0240 MPa，標準差為 0.0084 MPa；排行第三的則為 170-4 這組，其強度在 0.0177 MPa，標準差為 0.074 MPa；最後則是造孔劑粒徑最小、含量最多的 325-4 這組，強度僅有 0.0090 MPa，標準差為 0.0014 MPa。當四組一起比較，經由統計計算後發現，170-2 這組的強度顯著大於其他三組，另外 325-2 的強度顯著高於 325-4 ($p\text{-value} < 0.0001$)，但 170-2 與 170-4 這兩組強度沒有顯著差異。



圖九、不同參數的軟骨支架測試抗壓強度之結果

(六) 衰減式全反射傅立葉紅外線光譜儀(ATR-FTIR)分析

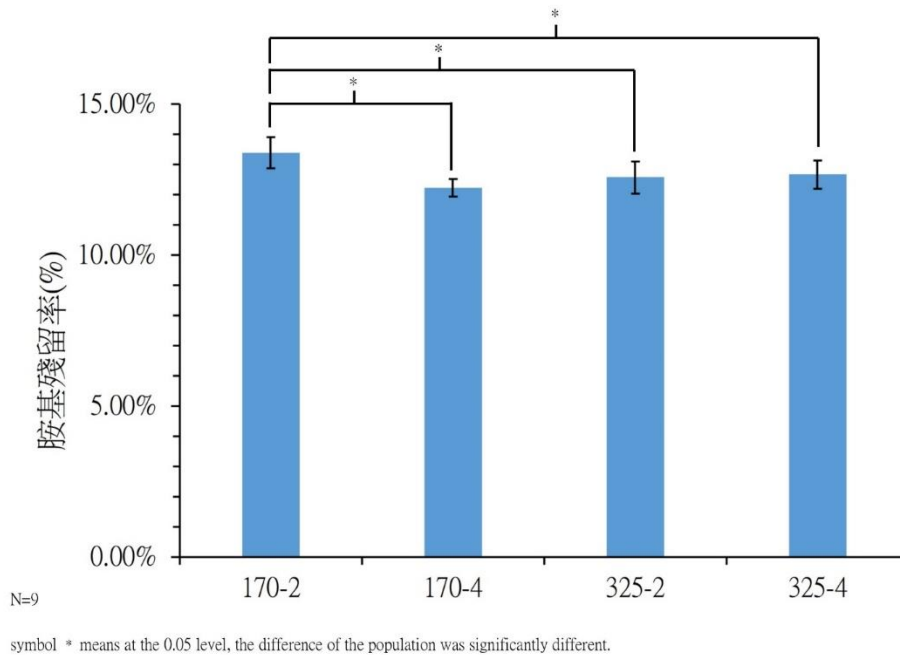
從圖十可以發現，軟骨支架的原料成分，包含明膠 (gelatine) 及玻尿酸 (HA) 都帶有醯胺類 (amides)，至於在海藻酸鈉 (SA) 中，帶有酯鍵(COO)，經交聯反應後，可在軟骨支架上生成醯胺鍵 ($1631 \text{ \& } 1546 \text{ cm}^{-1}$)。形成之醯胺鍵又與原料中的醯胺鍵位置有所不同，因此可以確定軟骨支架在交聯時確實有生成新的官能基，來幫助鍵結。



圖十、不同參數的軟骨支架之ATR-FTIR分析圖

(七) 交聯度分析

交聯度與支架結構穩定度與強度有一定的關係，若交聯度不佳，則支架遇溶液體液時，會很快產生結構不穩的情況，因此，須了解不同造孔劑參數及含量是否會影響支架。由於交聯度是測試支架表面上未反應的自由胺基含量，從結果（圖十一）來看，發現 170-2 這組的胺基殘留率最高，平均有 13.59 % 的胺基（標準差為 0.51%）未被反應。其餘三組的數據則都坐落在12.2~12.7% 之間。經由統計後發現，170-2 這組的胺基殘留率顯遇的高於其他三組 ($p\text{-value} < 0.0001$)。



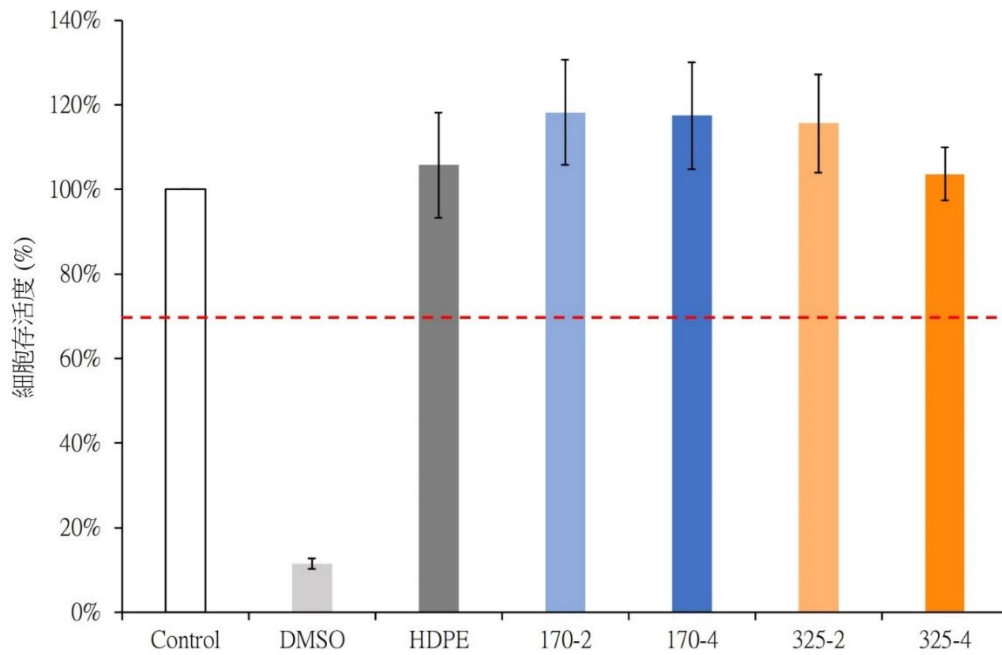
圖十一、不同參數軟骨支架測試交聯度之結果

二、體外細胞實驗分析 (in-vitro test)

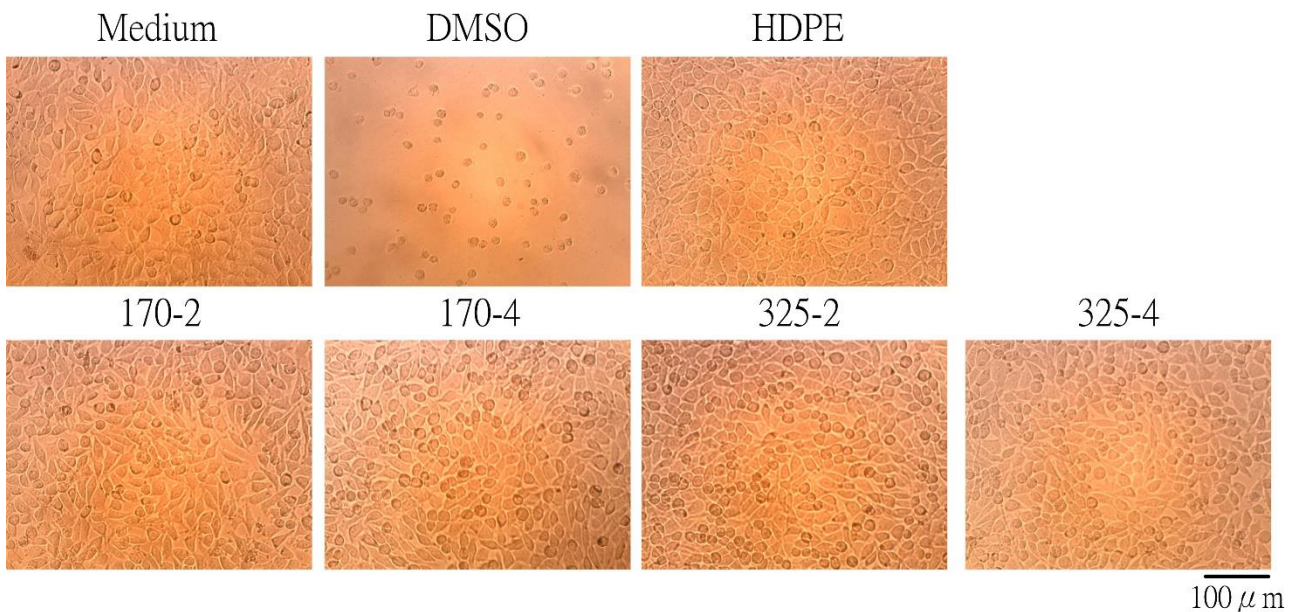
(一)生物相容性測試

1. 細胞毒性測試 (Cytotoxicity test)(Follow ISO 10993-5)

測試細胞毒性是為了確保材料植入人體後，不會對細胞造成毒性。本實驗根據 ISO 10993-5 規範進行，若是 L-929 細胞存活度低於 70%，則代表其培養液對細胞有毒性 (陽性)；細胞存活度高於 70% 者，代表其萃取液對細胞沒有毒性 (陰性)。實驗結果顯示 (圖十二)，僅有陽性對照組 (含有 15% 的 DMSO) 之組別，其細胞存活率低於 70%，其餘組別包含控制組與陰性對照組 (純培養基及 HDPE) 與實驗組四組之軟骨支架樣本，萃取一天後的萃取液經過一天的培養後，L-929 細胞存活度可大於 70%，代表這四種軟骨支架樣本萃取液經一天的培養後，對 L-929 這株細胞來說沒有不良影響，不具有細胞毒性。



圖十二、不同參數軟骨支架測試細胞毒性的半定量結果



圖十三、不同參數軟骨支架測試細胞毒性的定性結果

顯微鏡 100 倍的觀察之下發現 (圖十三), 經過純培養基 (Medium) 培養的 L 929 細胞, 一端為紡錘狀, 另一端帶有球形之型態。陽性對照組 15% DMSO 這組, 細胞型態為圓球形 (圖十三上排中), 代表細胞已死亡, 細胞存活度遠低於 70 % , 代表 15% DMSO 的萃取液對細胞是有毒性的。

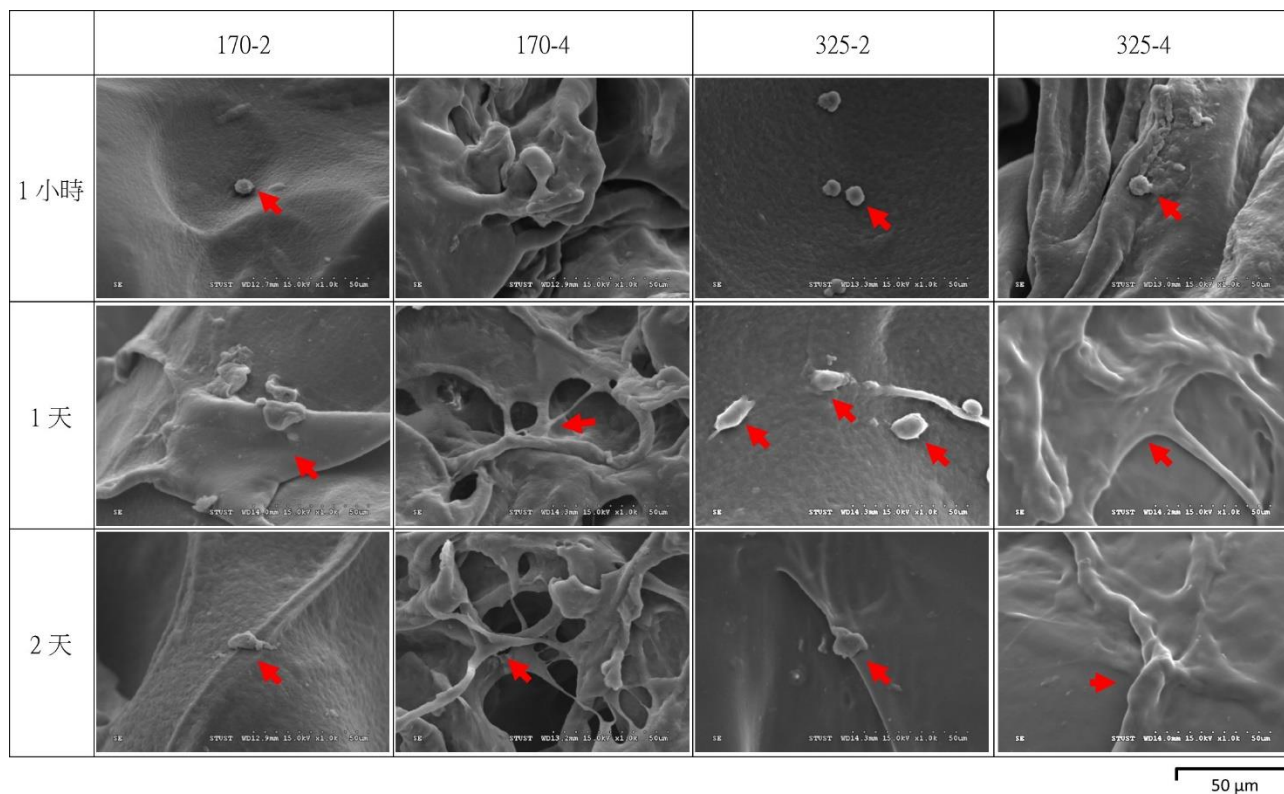
陰性對照組- HDPE 與四種軟骨支架樣本萃取液, 細胞型態皆與純培養基組相似, 在顯微鏡下觀察到細胞型態為一端為紡錘狀一端帶有球形之型態, 萃取液也保持清澈透明, 代表對細胞來說, 陰性對照組- HDPE 與實驗組的萃取液不具有細胞毒性, 此定性觀察結果與細胞毒

性半定量測試結果互相佐證可得到，本次實驗的實驗組四種軟骨支架樣本其萃取液經一天的培養後，對 L-929 這株細胞來說沒有不良的影響，不具有細胞毒性。

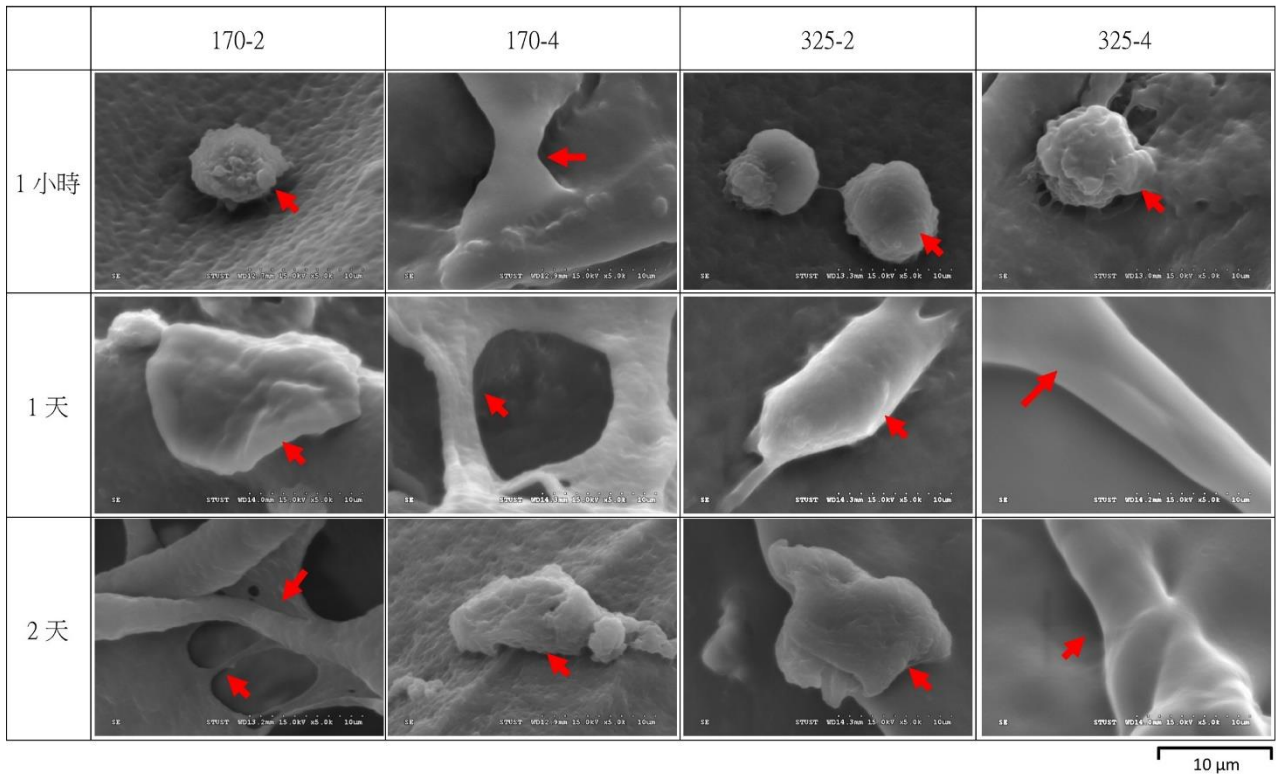
(二)細胞測試

1. 細胞貼附測試

細胞貼附測試觀察材料是否具有細胞親和性，因骨細胞屬於貼附型細胞，若貼附狀況不佳，則未來植入人體內，骨修復效果不佳。從細胞短期貼附可以發現 (圖十四)，經 1 小時培養後，四種軟骨支架表面皆有細胞貼附，細胞呈現未完全貼付的圓球形，有部分細胞開始分裂 (325-2)，也有細胞以伸出偽足 (325-4)；至於經 1 天及 2 天培養之後，細胞已完整貼附，呈現紡錘狀，表面有重新沉澱析出的晶體，因此細胞變得較不明顯。但四種軟骨支架皆可使細胞很快地貼附在表面，可以證明，四種軟骨支架皆具備有良好的細胞親和性。



圖十四、四種軟骨支架與前驅骨母細胞短期接觸培養之細胞貼附結果(紅色箭頭代表細胞)



圖十五、四種軟骨支架與前驅骨母細胞短期接觸培養之細胞貼附結果(紅色箭頭代表細胞)

2. 細胞存活度與分化能力測試

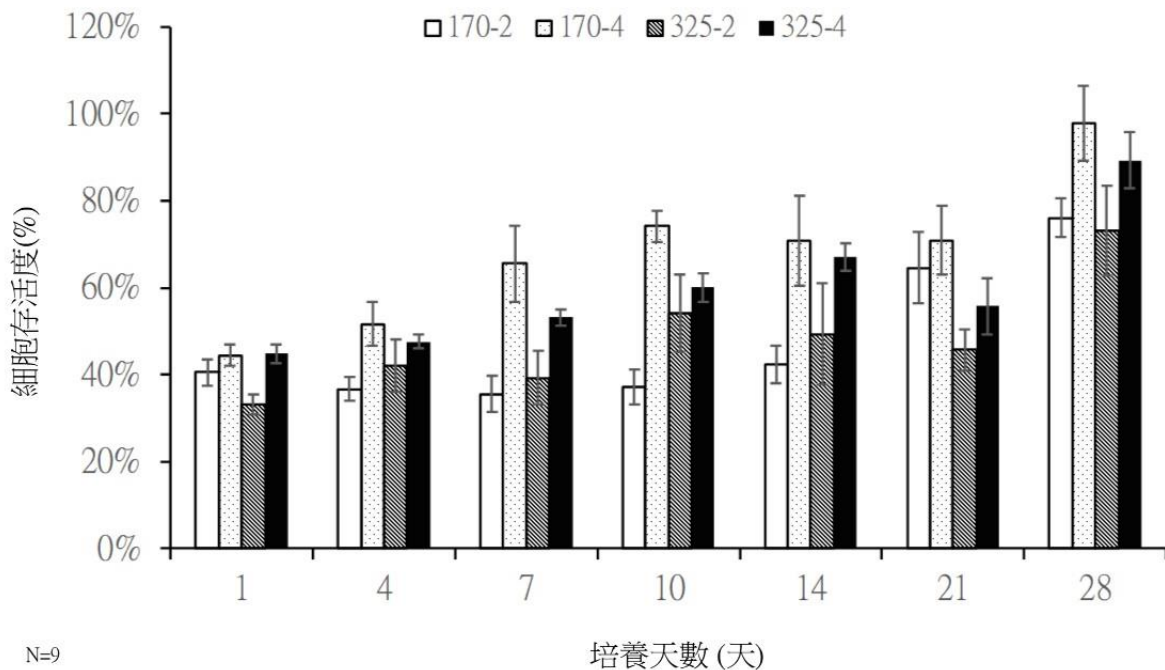
我們透過體外的細胞測試，確認四種軟骨支架是否具有促進前驅骨母細胞增生及分化的能力。另外，因軟骨細胞會分泌蛋白聚醣，因此利用阿爾辛藍染色 (Alican Blue Stain) 確定前驅骨母細胞是否有朝向軟骨細胞的方向分化，染色越深，代表蛋白聚醣越多，越接近軟骨細胞。

從結果圖十六顯示，170-4 這組的細胞存活度隨著培養時間增加而有緩慢增加的趨勢；170-2 這組，從培養第 1 天到第 10 天，細胞量都沒有明顯增加，要一直到第 21 天為止，細胞存活度才有明顯增加的趨勢。

至於在 325-2 這組，也與 170-2 有類似的狀況，一直要到第 28 天，細胞存活度才會明顯增加。325-4 的組別，其細胞存活度是隨著培養天數增加而有上升的趨勢，但在第 21 天，則略為下降，到第 28 天才又上升。

後續我們又統計分析同一時間點，各組之間的細胞存活度是否有差異，從結果發現 (表三)，不論是哪個培養時間點，各組間的細胞存活度皆有明顯差異 ($p\text{-value} < 0.0001$)，但各時間點的趨勢有所不同，表現最好的是 170-4 這組，最差的是 170-2。

























從圖十六可以發現，以沒有種植任何前驅骨母細胞的軟骨試片，經 Alcian Blue 染色後，試片會呈現很淡的藍色，這是因為我們使用的原料中有玻尿酸所致，因為玻尿酸中含有蛋白聚醣，因此以 Alcian Blue 去染色時，也會染出很淡的藍色。實驗結果如圖十七，特別是 170-2 與 325-4 試片體積明顯縮小，從培養的過程中我們也發現，試片強度不佳，容易降解，因此，殘留下的體積，因細胞聚集於體積極小的支架上，因此，染出的顏色也會較深。至於 325-2，體積沒有明顯縮小，但顏色要到第 28 天才會最深。170-4 這組，隨著培養時間增加，試片體積沒有明顯縮小，但染出的藍色越來越深，代表細胞分泌了更多的蛋白聚醣，代表前驅骨母細胞種到支架上，經與支架共培養後，確實可使細胞開始朝向軟骨細胞來進行分化。



圖十六、四種軟骨支架與前驅骨母細胞長時間培養之細胞增生結果

表三、四種軟骨支架與前驅骨母細胞長時間培養之細胞存活度統計結果

培養天數	p-value	統計事後檢定
1	<.0001	170-4 = 325-4 > 170-2 > 325-2
4	<.0001	170-4 = 325-4 > 170-2 > 325-2
7	<.0001	170-4 > 325-4 > 325-2 = 170-2
10	<.0001	170-4 > 325-4 > 325-2 > 170-2
14	<.0001	170-4 = 325-4 > 325-2 = 170-2
21	<.0001	170-4 = 170-2 > 325-2 > 170-2
28	<.0001	170-4 = 325-4 > 325-2 = 170-2

	乾支架	D1 Cell 7D	D1 Cell 10D	D1 Cell 14D	D1 Cell 21D	D1 Cell 28D
170-2						
170-4						
325-2						
325-4						

圖十七、四種支架與前驅骨母細胞共培養之 Aican Blue 染色結果

陸、討論

在本研究中，主要是要探討改變造孔劑的粒徑及添加量，對於軟骨支架的物化性質、生物相容性以及促進細胞增生與分化能力之影響。一個理想的軟骨支架，應該要有高孔隙度與聯通孔(Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., and Chiellini, E., 2010)。我們利用溶劑鑄造鹽洗法，在膠體中加入造孔劑來製孔，最後再溶出造孔劑所製作之四種參數的軟骨支架，製造出的都是具有多孔性、孔洞為連通孔、可吸附溶液，且有一定強度的支架。

透過進一步分析發現，隨著造孔劑的添加量增加，強度會明顯下降。但在吸水量部分，造孔劑增加，並不會增加吸水量。降解率的部分，在 170 這區，造孔劑的含量多寡，對重量殘留率的影響要到長時間的浸泡後才會出現，但是在 325 這邊，造孔劑添加量越大的組別 (325-4)，其重量殘留率越少，也代表經長期浸泡後，其降解率越快。在交聯度部分，不會隨著造孔劑添加量多，而影響交聯度。

若是分析造孔劑粒徑的影響，會發現在吸水量的部分，大顆粒的造孔劑組別 (170)，吸水性優於小顆粒組 (325)，但其中小顆粒的添加量多的組別 (325-4)，又能較添加量少的組別 (325-2)，有更好的吸水量。在抗壓強度部分，同樣的添加量，粒徑大，其抗壓強度會優於粒徑小的組別，如：170-2 > 325-2；170-4 > 325-4。交聯度部分，則不受造孔劑粒徑大小之影響。

最後討論顯微結構，從掃描式電子顯微鏡的照片上，可以觀察到造孔劑添加量少的組別 (170-2、325-2)，可看到較多的形成孔洞結構的結構壁。但若是添加量多的組別，則剖面圖皆是非常均勻的孔洞。其實這也與支架的強度有關，孔洞越多，則強度越差，反之，結構壁越多，支架強度當然就越好。

另外，從掃描式電子顯微鏡的觀察中，也可發現，造孔劑添加量少的組別，雖然添加量都是 2 克，但 170 與 325 兩組剖面的孔洞相差非常多，在製作的過程中，其實我們也有發現，相較於 325 的造孔劑，其實 170 的造孔劑在與膠體混合攪拌時，非常容易就可以將造孔劑均勻分散，因為其粒徑大，顆粒數相對少，但 325-2 這組卻因為粒徑小，顆粒數多，所以需要更花時間去分散膠體溶液中的造孔劑，粒徑小又容易聚集，因此，造成造孔劑分散不均的問題，導致內部孔洞分布就不如其他組的軟骨支架來的均勻。

這樣分布不均勻的孔洞，其實就會造成，軟骨支架的吸水量及降解性受影響(Al-Munajjed, A.A., and O' Brien, F.J., 2009)，因為有均勻孔洞的支架，可以將水平均分散於孔洞內，但如果大部分都是結構壁，少數孔洞，自然吸水量就少，吸了水之後，又有機會因為支架內部負擔的重力不均，導致有部分結構一直在受力，當然受力結構崩壞的機會就好，一旦有一個角崩壞，支架原先既有的強度並沒有辦法支撐整體結構 (Oster, G.F., Murray, J.D., Maini, P.K., 1985)，因此支架會垮掉，自然就沒有辦法達到作為軟骨支架的功能了。

另外，其他學者已經證實，控制支架孔徑大小，有利於細胞分化與組織再生，100 ~ 300 μm 的孔徑有助於細胞貼附與增生，軟骨支架的孔徑則建議在 100 ~ 150 μm 之間，從本研究的結果可以發現，支架孔徑在 100 ~ 500 μm ，孔與孔之間為互相連通的孔洞，有利於細胞增生、營養物質擴散與去除代謝物質，而且又能提供誘導細胞分化的三維結構，因此，非常適合用來作為軟骨組織工程支架。

柒、結論

根據以上結果，可以確認，造孔劑粒徑大且添加量多的軟骨支架 (170-4)，雖抗壓強度僅 0.0177 MPa，每克材料吸水量仍達 14.72 mL，且浸泡於試劑 30 天後，支架不會明顯降解，且不具細胞毒性，促進前驅骨母細胞增生與分化的能力最佳，因此可作為適用於軟骨缺損修復之組織工程支架，提高軟骨修復之成效。

捌、參考資料及其他

一、參考文獻

- Al-Munajjed, A.A., O'Brien, F.J. (2009). Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2, 138 - 146.
- Chou, C.H., Cheng, W.T.K., Lin, C.C., Chang, C.H., Tsai, C.C., & Feng, H.L. (2006). TGF-beta1 immobilized tri-co-polymer for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 77(2), 338-348.
- Hunter, W. (1995). Of the structure and diseases of articulating cartilages. 1743. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 470, 514-521.
- Langer, R. (2000). Tissue engineering. *Molecular Therapy*, 1(1), 12-15.
- Lee, J.E., Kim, K.E., Kwon, I.C., Ahn, H.J., Lee, S.H., & Cho, H. (2004). Effects of the controlled-release of TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials*, 25(18), 4163-4173.
- Levangie, P.K., Norkin, C.C. (2001). Joint structure and function: a comprehensive analysis, 3rd Edition. *American Journal of Occupational Therapy*, 55, 49-83.
- Lo, H., Kadiyala, S., Guggino, S.E., Leong, K.W. (1996). Poly(L-lactic acid) foams with cell seeding and controlled-release capacity. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30(4), 475-484.
- Ma, Z., Gao, C., Gong, Y., Shen, J. (2005). Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 26(11), 1253-1259.
- Nam, Y.S., Yoon, J.J., Park, T.G. (2000). A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53(1), 1-7.
- Oster, G.F., Murray, J.D., Maini, P.K. (1985). A model for chondrogenic condensations in the developing limb: the role of extracellular matrix and cell contractions. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 89, 93 - 112.

- Park, S.N., Park, J.C., Kim, H.O., Song, M.J., & Suh, H. (2002). Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 23(4), 1205-1212.
- Pieper J.S., van der Kraan P.M., Hafmans T., Kamp J., Buma P., & van Susante J.L.C. (2002). Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering. *Biomaterials*, 23(15), 3183-3192.
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M., and Chiellini, E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, 35(4), 403 – 440.
- Schugens, C.H., Maquet, V., Grandfils, C.H., Jerome, R., & Teyssie, P.H. (1996). Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30(4), 449-461.
- Sherwood, J. K., Riley, S. L., Palazzolo, R., Brown, S. C., Monkhouse, D. C., Coates, M., Griffith, L. G., Landeen, L. K., & Ratcliffe, A. (2002). A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials*, 23(24), 4739 – 4751.
- Song, X., Zhu, C., Fan, D., Mi, Y., Li, X., Fu, R. Z., Duan, Z., Wang, Y., & Feng, R. R. (2017). A Novel Human-Like Collagen Hydrogel Scaffold with Porous Structure and Sponge-Like Properties. *Polymers*, 9(12), 638.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenx, H.P., & Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211-228.

【評語】 052405

軟骨修復仍是目前許多學者挑戰的研究目標。本研究希望製造一個組織工程的支架，透過調整製程參數來探討其對支架物化性質的影響，並測試支架的生物相容性，最後與細胞共培養，確認不同參數的支架是否會影響細胞增生與分化的能力。

本作品使用天然高分子進行交聯反應製備軟骨支架，透過溶劑鑄造鹽洗法，控制內層孔洞口徑及數量，主要的實驗變因為造孔劑(蔗糖)的添加量與粒徑大小。所製備的軟骨支架進行各種性質分析，探討造孔劑添加量與粒徑大小對抗壓強度、吸水量、降解率及交聯度的影響。研究目標明確，實驗規劃與分析亦相當完整，研究成果優異，未來有發表價值及應用潛力。

作品名稱宜聚焦以符合研究重點。目前實驗各變因僅有二個變量，建議增加變量，以尋找最佳條件。軟骨的抗壓強度和孔隙率及孔洞口徑與幾何形狀及尺寸有關，可由力學角度進行分析探討。

摘要

當人體發生軟骨缺損，現僅能依賴藥物或手術來減緩軟骨損傷，但無法達到修復軟骨之目的。本研究使用天然高分子進行交聯反應製備軟骨支架，透過溶劑鑄造鹽洗法，控制內層孔洞粒徑及數量，探討不同粒徑大小與添加量之造孔劑對支架物化性質與促進細胞分化能力之影響。透過觀察顯微結構，測試吸水量、降解性、抗壓強度與交聯度，並測試生物相容性與促進前驅骨母細胞增生及分化之能力。

結果發現，造孔劑粒徑大且量多的支架 (170-4)，雖抗壓強度僅 0.0177 MPa，但每克支架吸水量達 14.72 mL，浸泡 30 天後支架不會明顯降解，且不具細胞毒性，促進前驅骨母細胞增生與分化能力最佳，未來可作為組織工程支架，用於軟骨缺損，提高軟骨修復之成效。

研究動機

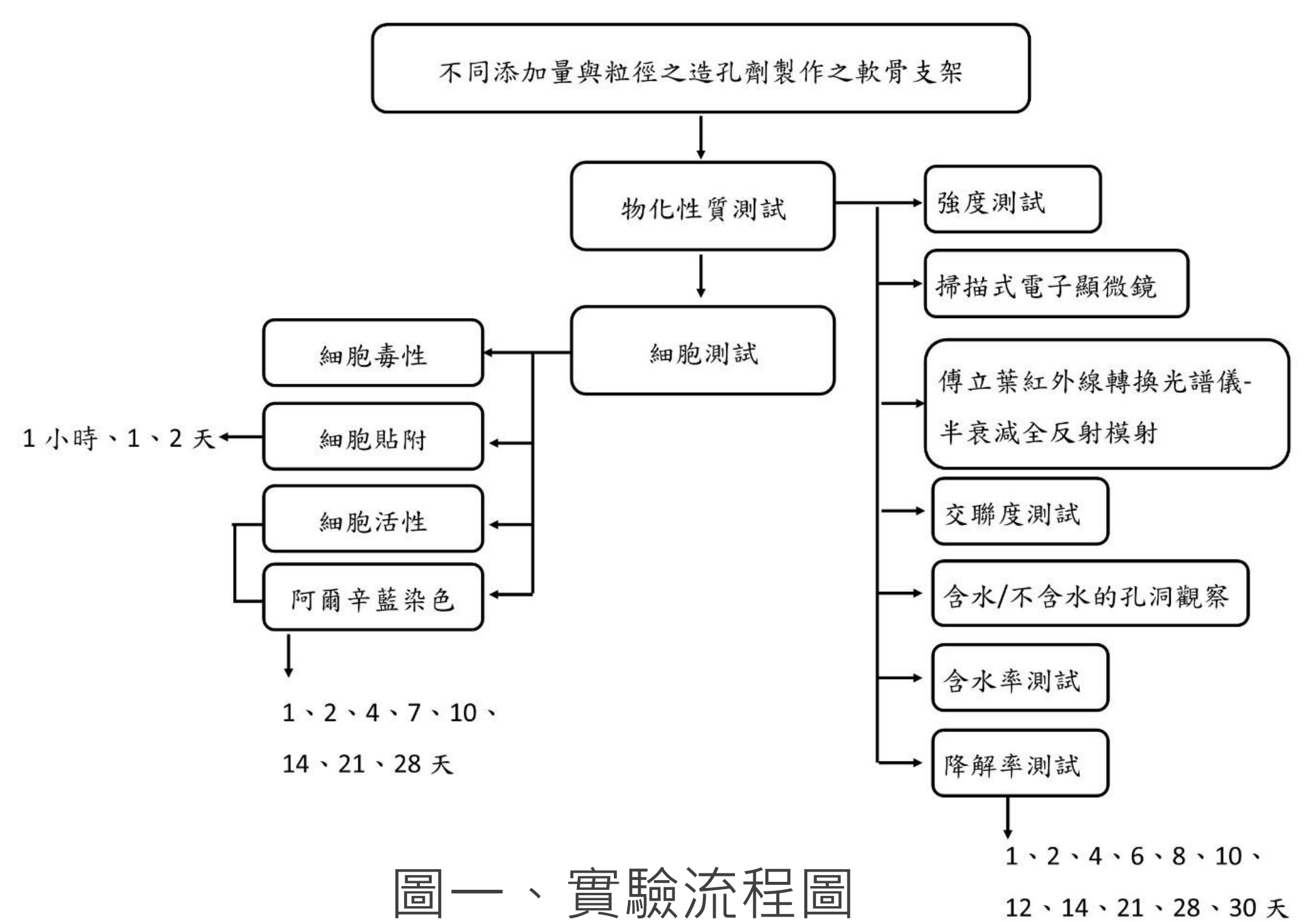
關節軟骨是沒有血管、神經及淋巴組織的結締組織，故軟骨受損時，其自行修復能力相當有限。臨床上現有的治療方式都較為被動，如用葡萄糖胺類或注射玻尿酸減緩關節退化的速度或是服用非類固醇抗發炎藥。當病況惡化至重度時，就以手術治療，但手術成功與否，和患者年齡、軟骨損傷程度或是手術後生成之軟骨種類...等有很大的相關性。後來，臨床開始發展『再生醫學』，在體外製作一個具有生物相容性的組織替代物，結合細胞與生長因子，促進修復或重建受損的組織器官與功能。因此，我們希望製備一組織工程支架，透過調整製程參數，探討對支架物化性質之影響，並測試支架的生物相容性，最後與細胞共培養，確認不同參數的支架是否會影響細胞增生與分化的能力。

研究目的

本研究使用天然高分子，以明膠與海藻酸鈉，結合玻尿酸，進行交聯反應，製備一軟骨支架。

透過溶劑鑄造鹽洗法，控制支架內層孔洞粒徑及數量，探討不同粒徑大小與添加量之造孔劑對支架物化性質影響，同時測試其生物相容性與促進細胞生長分化的能力。

研究架構



圖一、實驗流程圖

研究結果

一、材料物化性質分析

光學顯微鏡分析

觀察軟骨支架內部孔洞的型態(圖二)。支架皆為長條形。

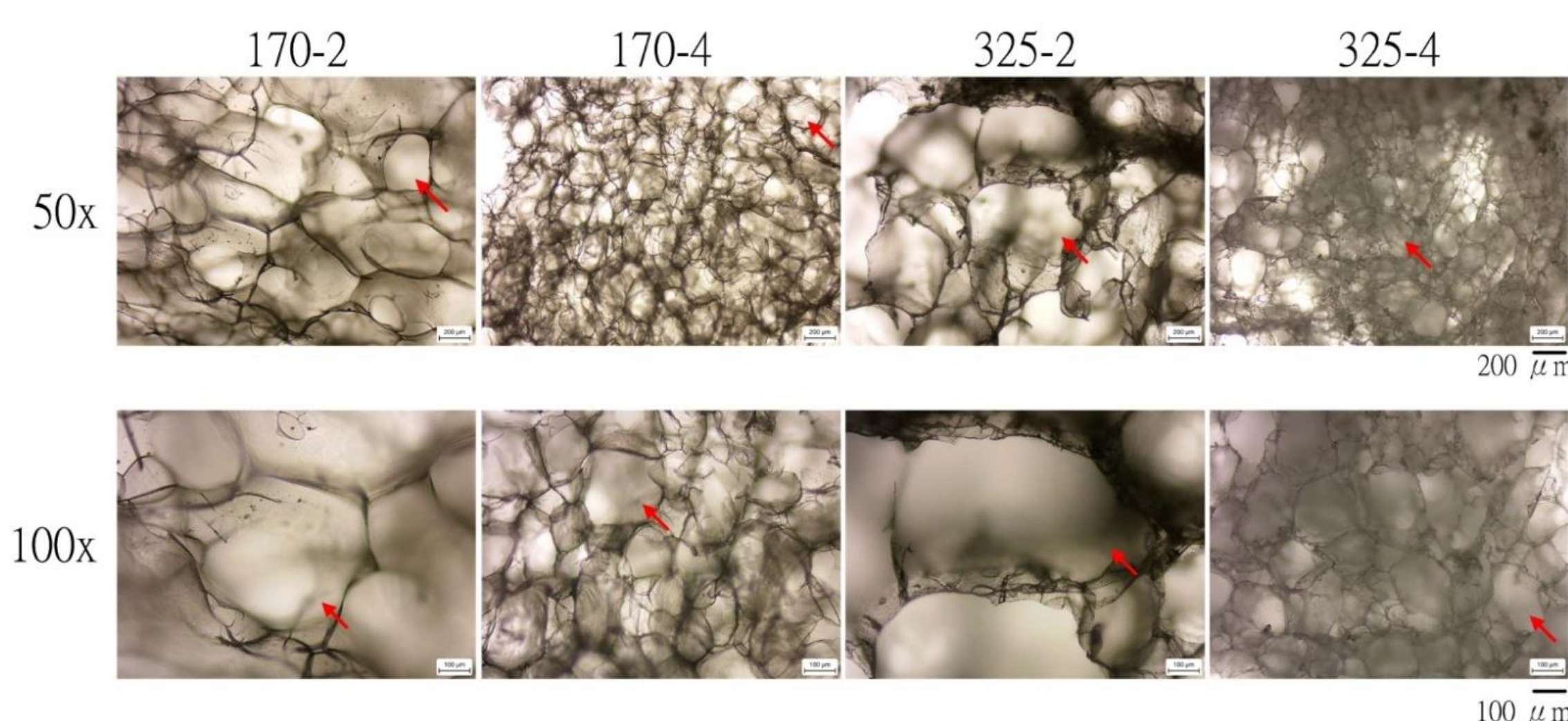
170-2 與 **325-2**：外觀較疏鬆、不緻密，質感硬脆。

170-4 與 **325-4**：外觀為海綿狀，屬於較軟且略帶 Q 彈的質感。

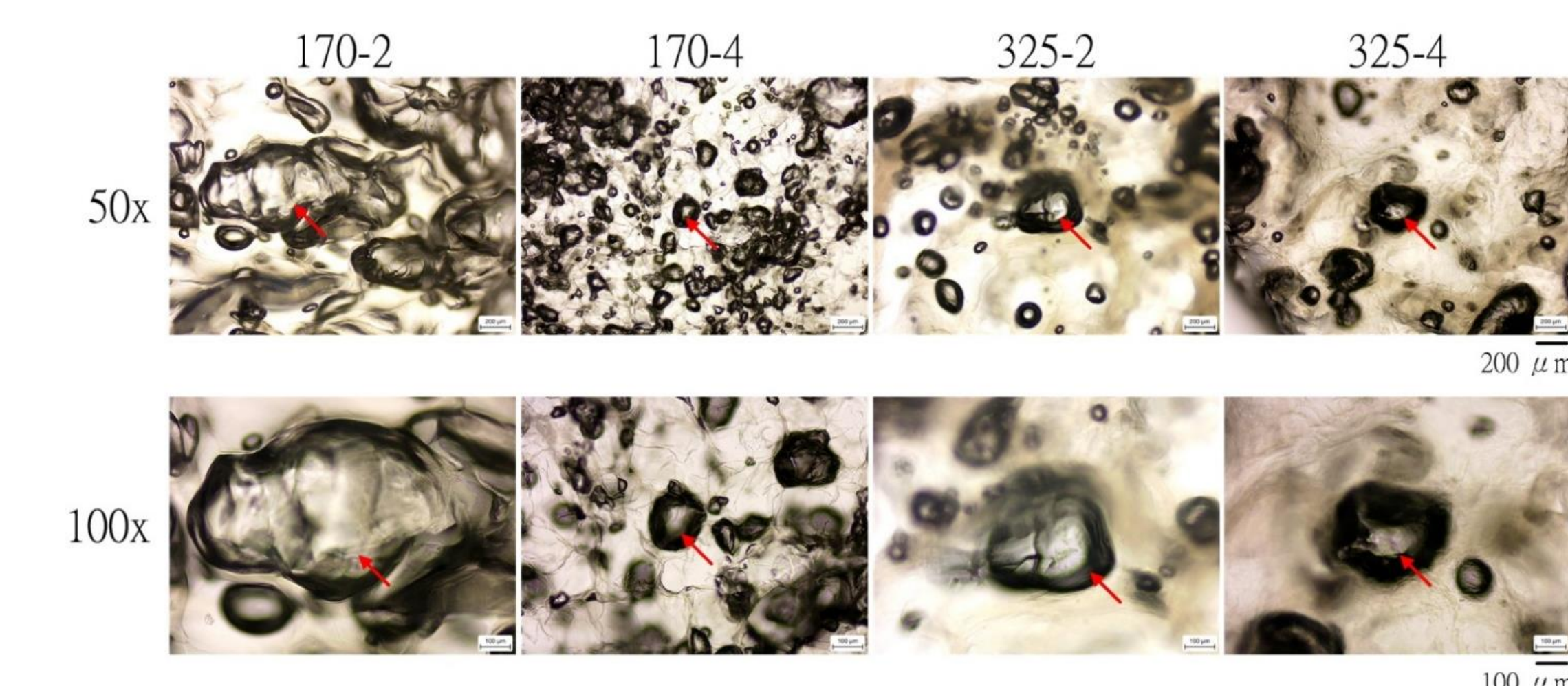
從剖面照，可以觀察支架內部結構。

170-2 與 **325-2**：肉眼可見明顯孔洞。

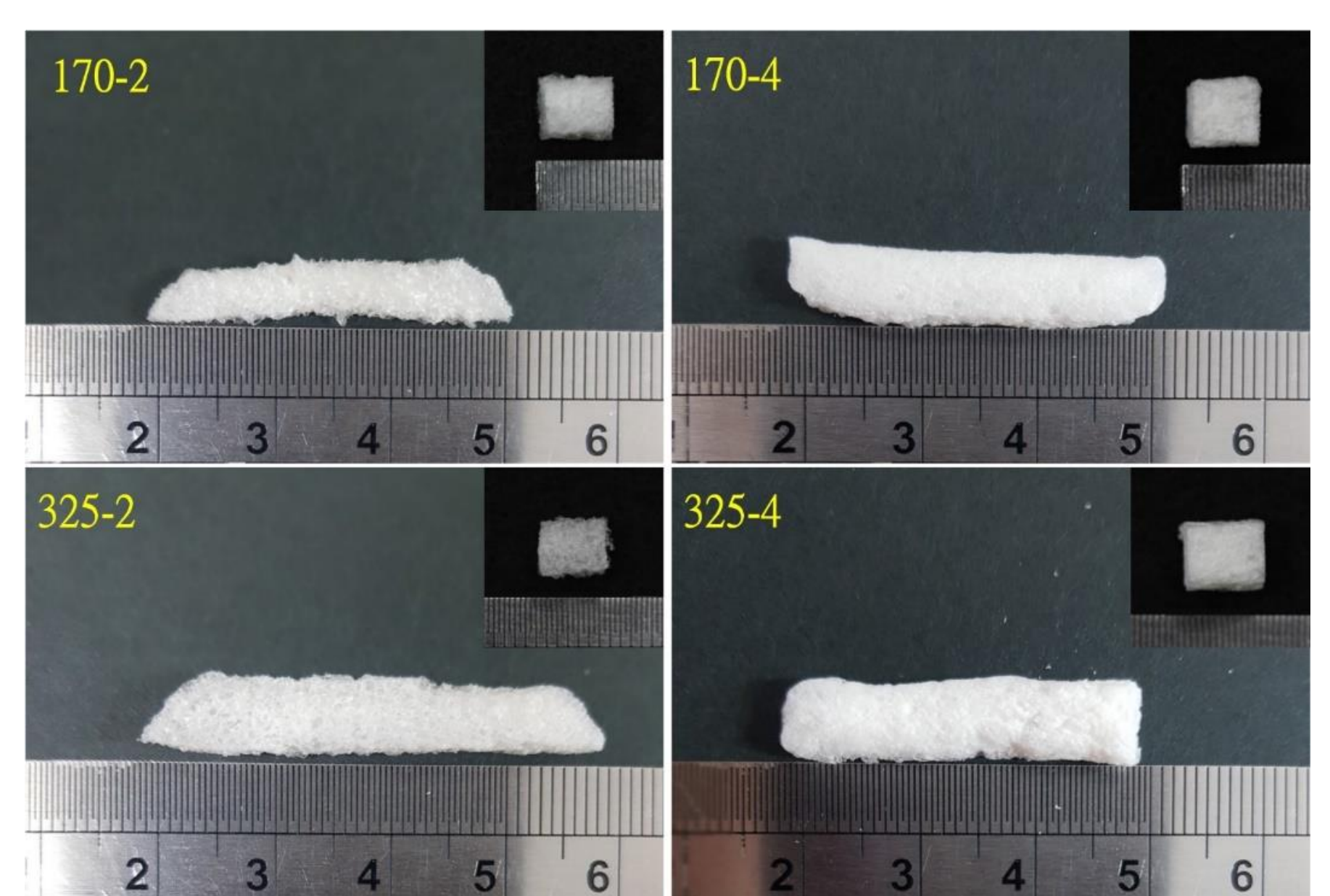
170-4 與 **325-4**：孔洞較緻密，肉眼無法觀察到孔洞。



圖三、以光學顯微鏡觀察未含水支架內部孔洞分佈狀況



圖四、以光學顯微鏡觀察含水支架內部孔洞分佈狀況



圖二、4組不同參數之軟骨支架外觀及剖面照

觀察支架內層剖面(圖三)。

170-2 與 **325-2**：孔洞較大，數量少，可從上層看到下方孔洞的結構。

170-4 與 **325-4**：孔洞小，數量多，可以看到不同層的孔洞互相交錯的影像。

圖四是觀察支架含水的內層結構狀態。

- 4組支架含水後，支架雖膨脹，但本體並未崩壞，仍維持原有的形狀。
- 孔洞依然為圓形，代表支架擁有一定的強度。
- 可透過最上層的孔洞看到下層的孔洞結構，證實，內部孔洞間為聯通孔。未來在進行細胞培養或是植入體內後，聯通孔有助於幫助細胞傳輸養分及代謝廢物。

研究結果

一、材料物化性質分析

掃描式電子顯微鏡分析(SEM)

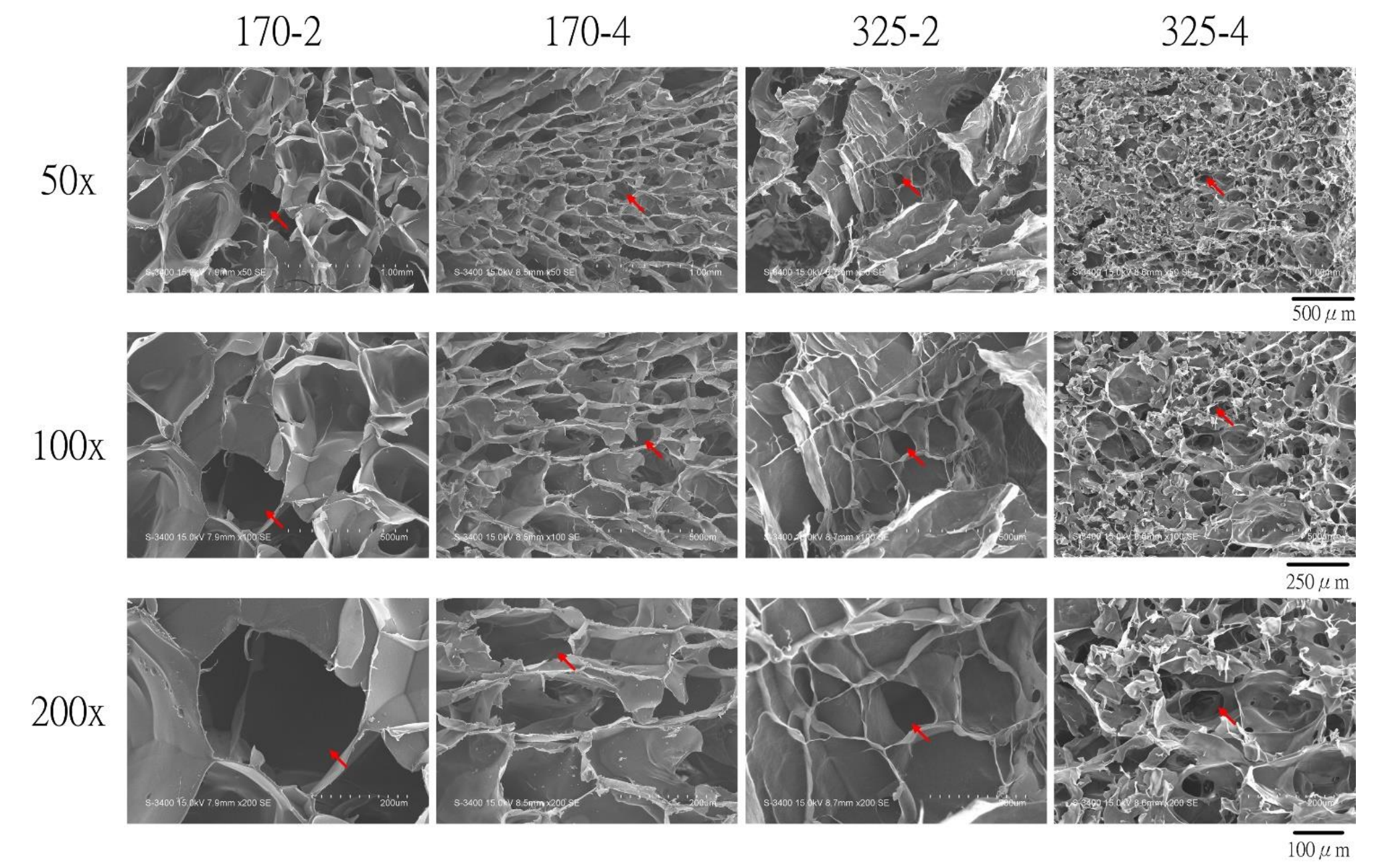
- 支架內部，孔洞緻密，為連通孔。
- 大倍率觀察下孔洞呈現平滑狀，未見殘留造孔劑。(圖五)

170-2及170-4：孔洞分佈較平均。

325-4：因造孔劑粒徑小，顆粒數量較多，孔洞數量多。

325-2：差異最大，雖有孔洞，但分佈不均。

- 隨著造孔劑粒徑及添加量不同，支架內部孔洞數量及大小有極大的差異，代表製程中可利用造孔劑，來調整支架內部的孔洞大小、分佈與緻密程度。



圖五、以SEM觀察不同參數軟骨支架之結果

吸水量分析

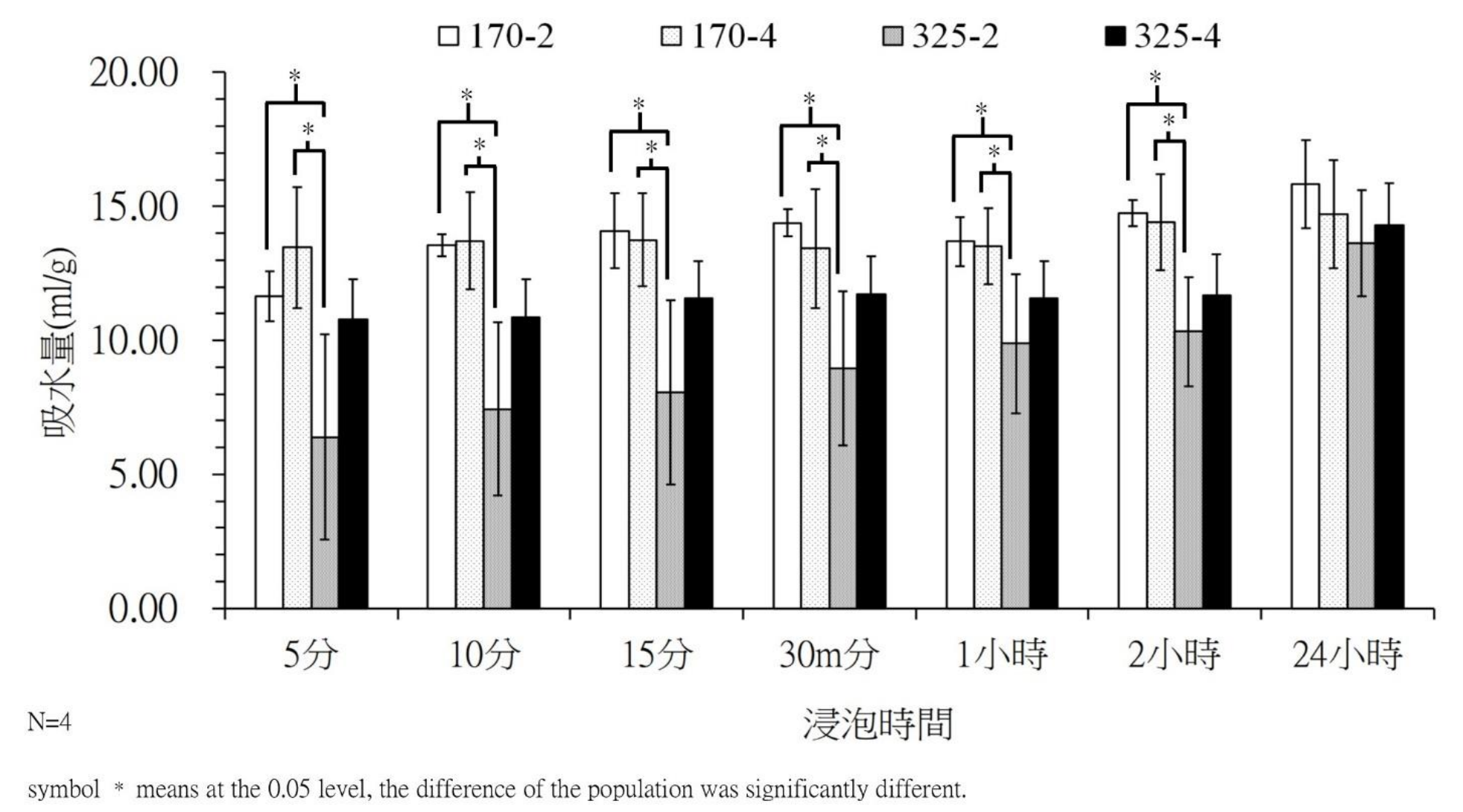
- 吸水量高，代表支架可吸付較多養分，幫助細胞增生及分化(圖六)。
- 170-2、170-4與325-4，趨勢類似。

170-2與170-4：5分鐘後，每克支架可吸附13~15mL。

325-4：初期吸水量較少(10~11mL)，24小時後為13~14 mL。

325-2：吸水量隨浸泡時間而增加。由 6 mL上升至13mL (24小時)。

- 各組從浸泡後 5 分鐘開始，到 2 小時為止，170-2與 170-4的吸水量明顯多於 325-2 這組；只有浸泡 24小時的各組間吸水量沒有顯著差異 (p -value = 0.4098)。

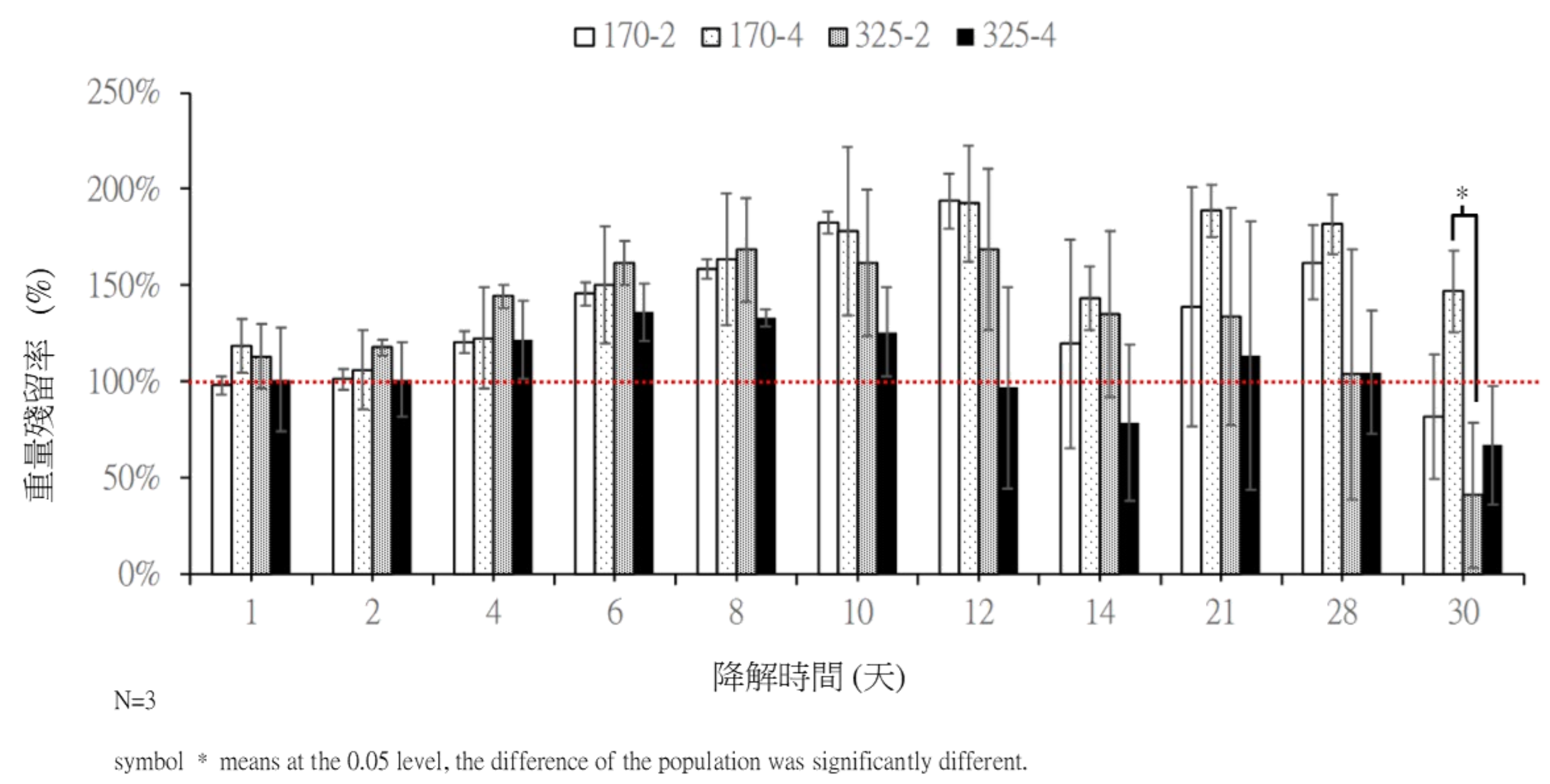


圖六、各組軟骨支架測試每克材料吸水量之結果

降解性分析

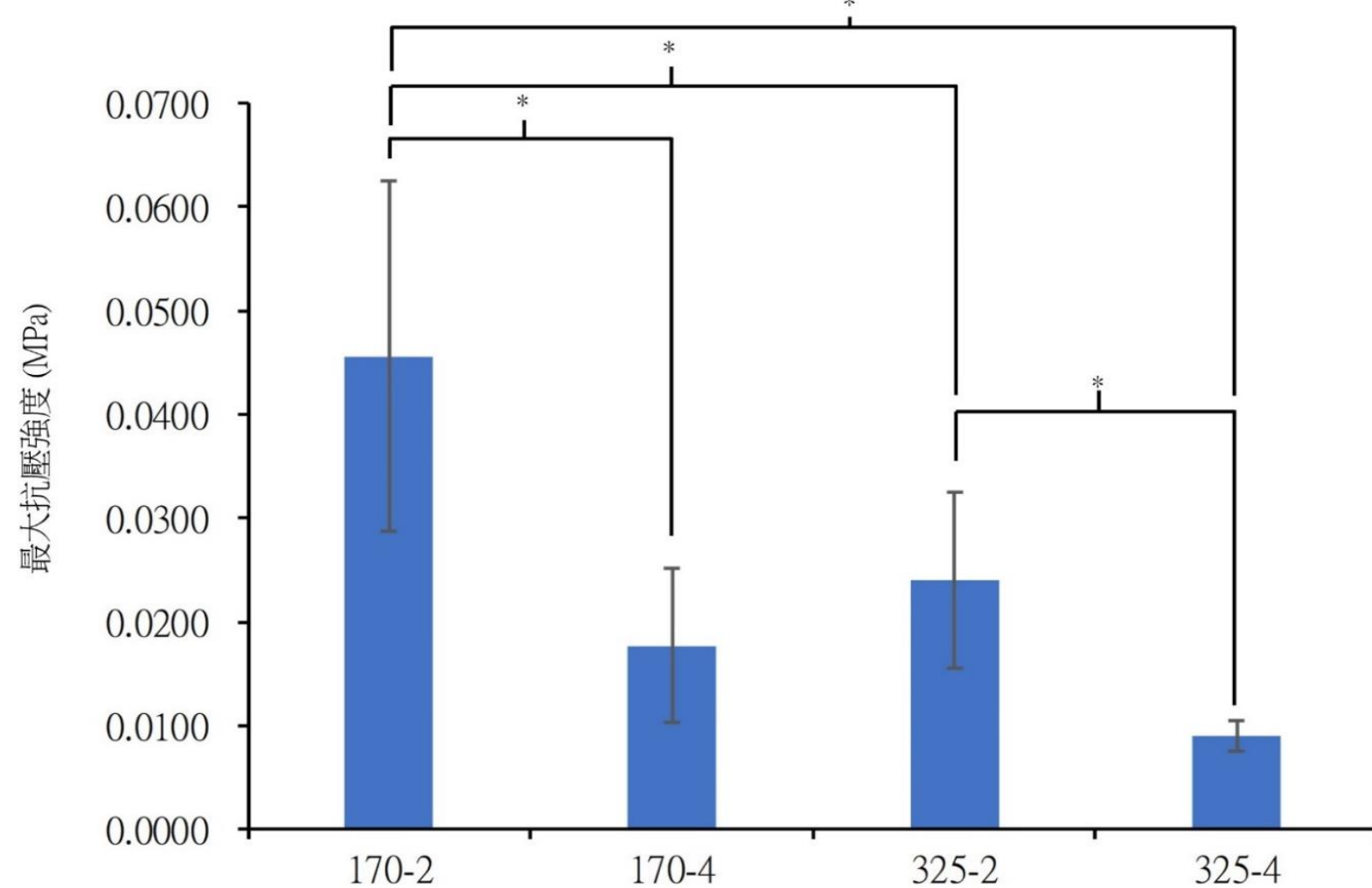
降解性，是為了模擬支架植入體內後，被人體完全降解的天數。(圖七)。

- 4組在浸泡初期重量不減反增，代表支架持續吸水。
- 直到第12天後，才開始降解。
- 降解最快：325-2，到浸泡 30 天時，重量殘留率剩下41%。其他組重量殘留率都超過 50% 以上。
- 除第12天(p -value = 0.0395)及第30天(p -value = 0.0173)，其餘時間點各組重量殘留率沒顯著差異。



圖七、各組的軟骨支架測試不同浸泡時間之重量殘留率

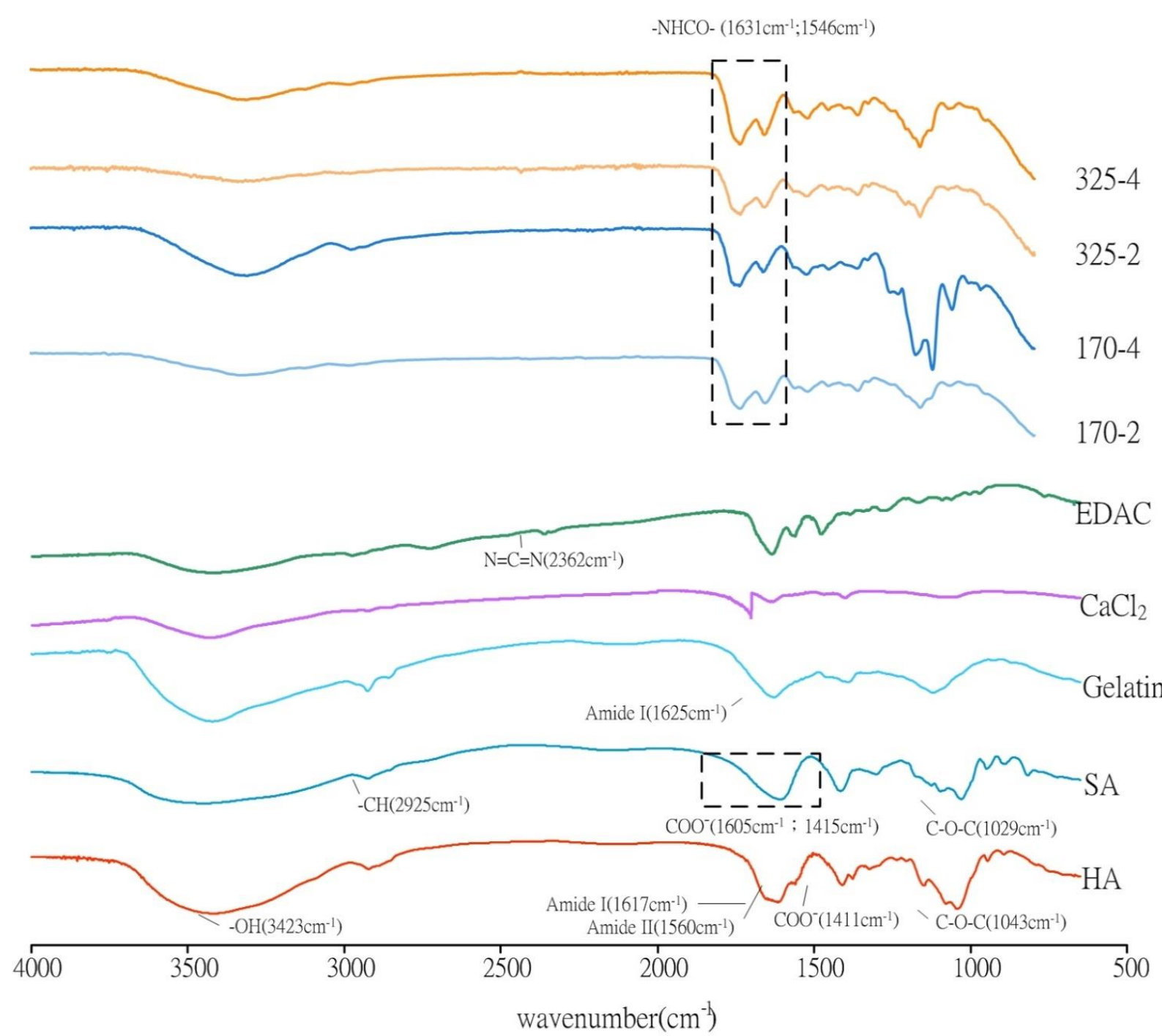
抗壓強度



強度：170-2 > 325-2 > 170-4 > 325-4。
與造孔劑粒徑、添加量有關。
170-2 顯著大於其他三組
325-2 高於325-4(p -value < 0.0001)。
170-2高於170-4 325-4(p -value < 0.0001)。

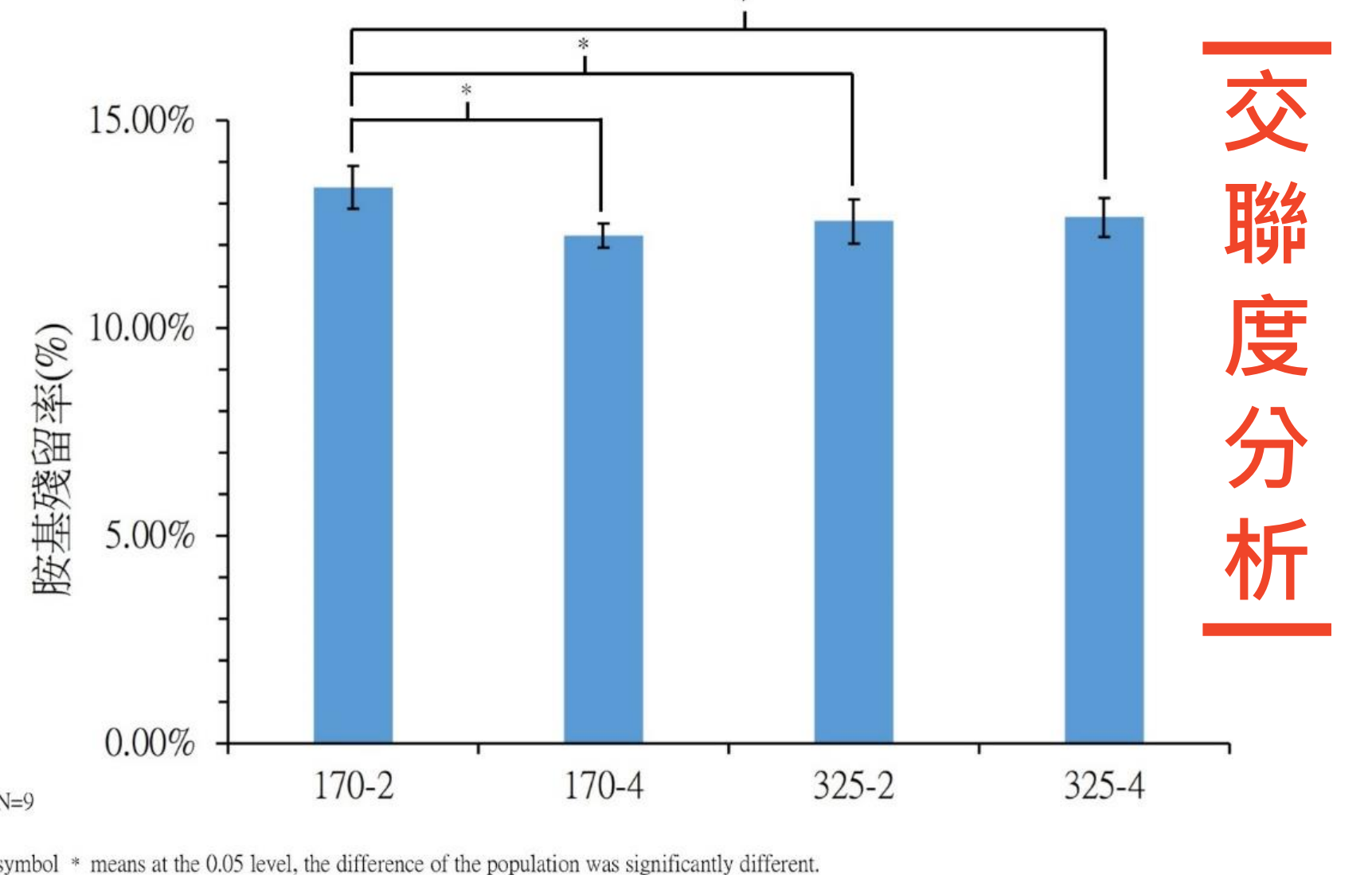
圖八、軟骨支架測試抗壓強度之結果

衰減式全反射傅立葉紅外線光譜儀分析(ATR-FTIR)



明膠 (gelatine)及玻尿酸 (HA) 帶有醯胺類(amides)，海藻酸鈉(SA)中帶有酯鍵(COO⁻)。經交聯後，在支架上生成醯胺鍵(1631 & 1546 cm^{-1})。生成之醯胺鍵與原料中的醯胺鍵位置不同，可確定軟骨支架在交聯後確實有生成新的官能基。

圖九、軟骨支架之ATR-FTIR分析圖



交聯度分析
圖十、測試交聯度之結果
170-2：胺基殘留率最高，13.59%未反應。高於其他三組 (p -value < 0.0001) 其餘三組在12.2~12.7%之間。

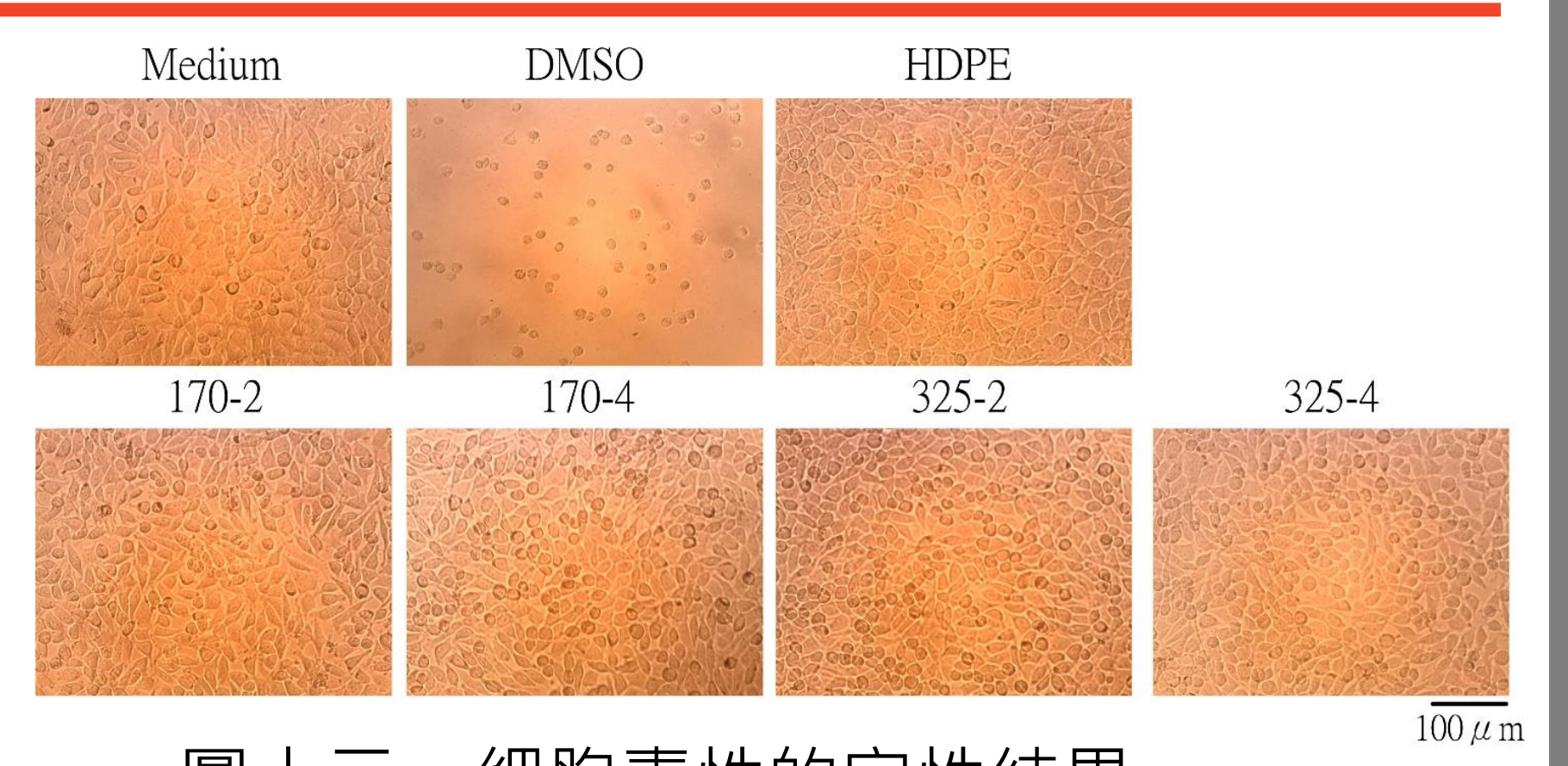
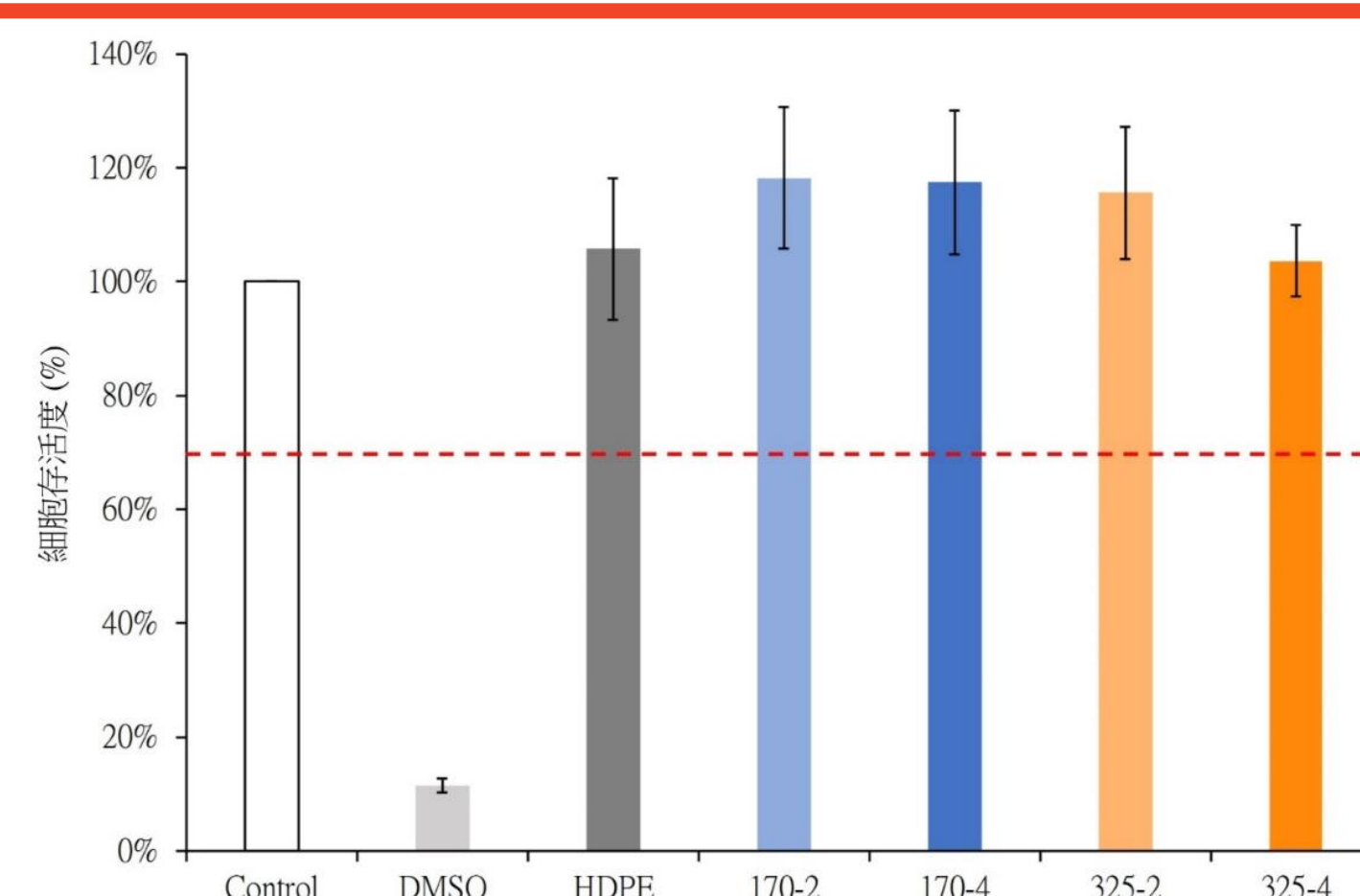
研究結果

二、體外細胞實驗分析

細胞毒性測試

- 為了確保支架植入人體後，不會對細胞造成毒性，而進行本實驗。
- 4組細胞存活度皆達70%以上，細胞型態為紡錘狀，代表支架不具細胞毒性。

圖十一、細胞毒性的半定量結果



圖十二、細胞毒性的定性結果

細胞貼附測試

1小時：四組支架表面皆有圓球形細胞貼附。

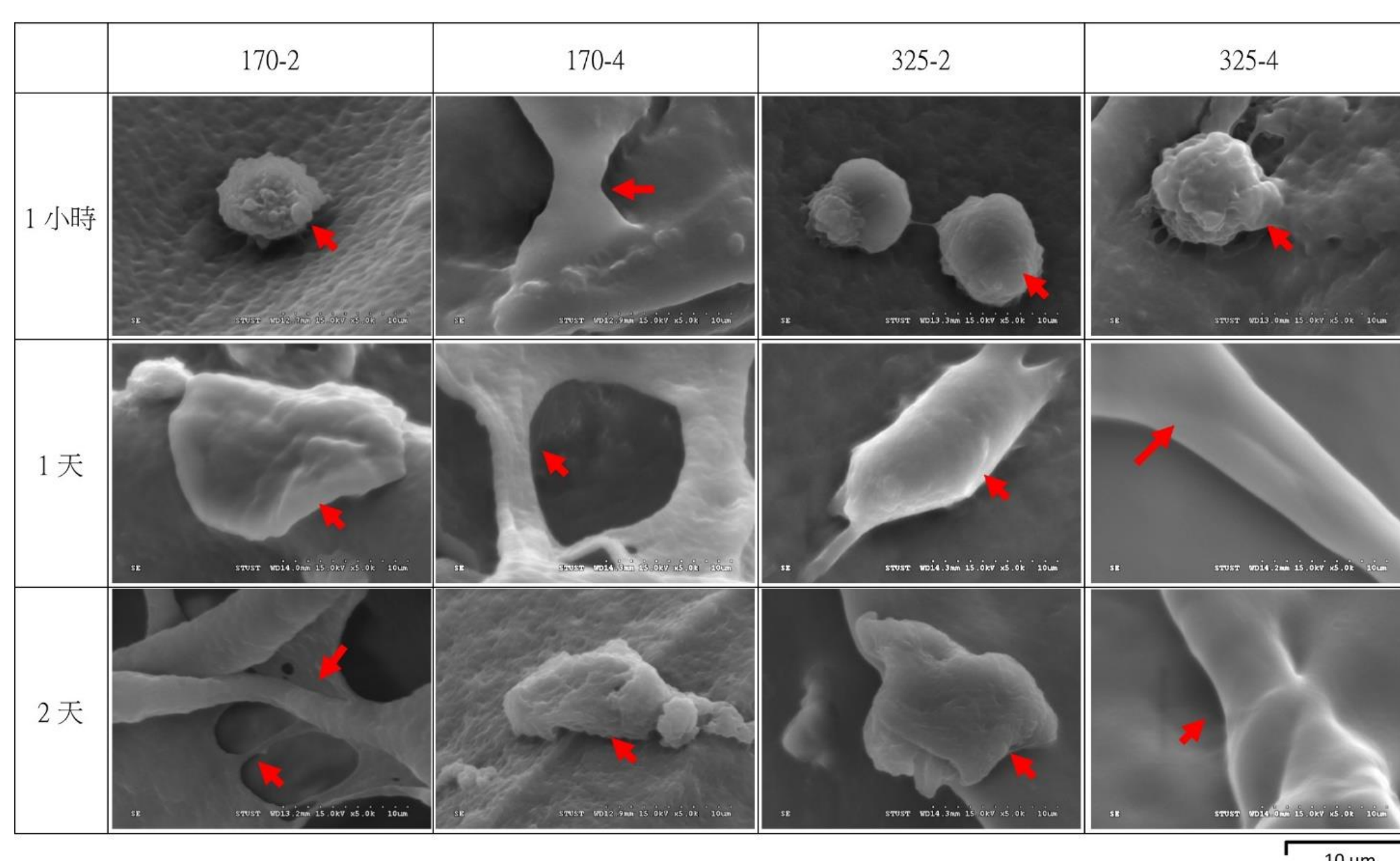
有部分細胞開始分裂 (325-2)

也有細胞伸出偽足 (325-4)

1天及2天：細胞已完整貼附，呈現紡錘狀。

四種軟骨支架皆有良好的細胞親和性(圖十三)。

圖十三、軟骨支架與前驅骨母細胞接觸培養之細胞貼附結果 (紅色箭頭為細胞)



細胞存活度與分化能力測試

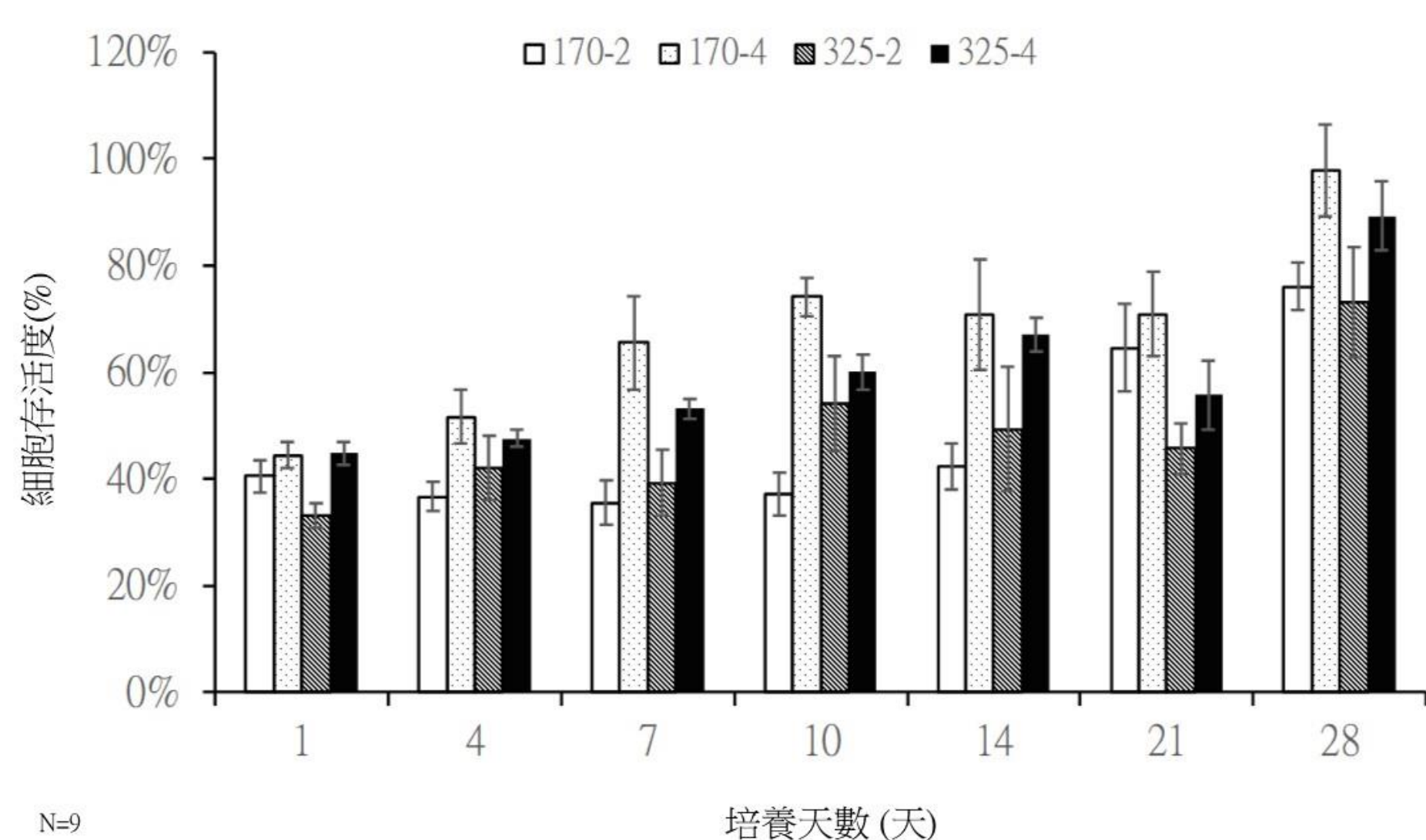
170-4：隨時間增加有增加的趨勢

170-2：從第1~10天，細胞量都沒有明顯增加，直到第21天才有明顯增加的趨勢。

325-2 與 170-2 類似狀況，直到第28天才會明顯增加。

325-4是隨培養天數增加而有上升，但在第21天略為下降，到第28天才又上升(圖十四)。

統計分析同一時間點，各組之間的細胞存活度是否有差異，發現不論哪個培養時間點，各組間的細胞存活度皆差異性，但各時間點的趨勢不同，表現最好的是**170-4**，最差的是**170-2**。



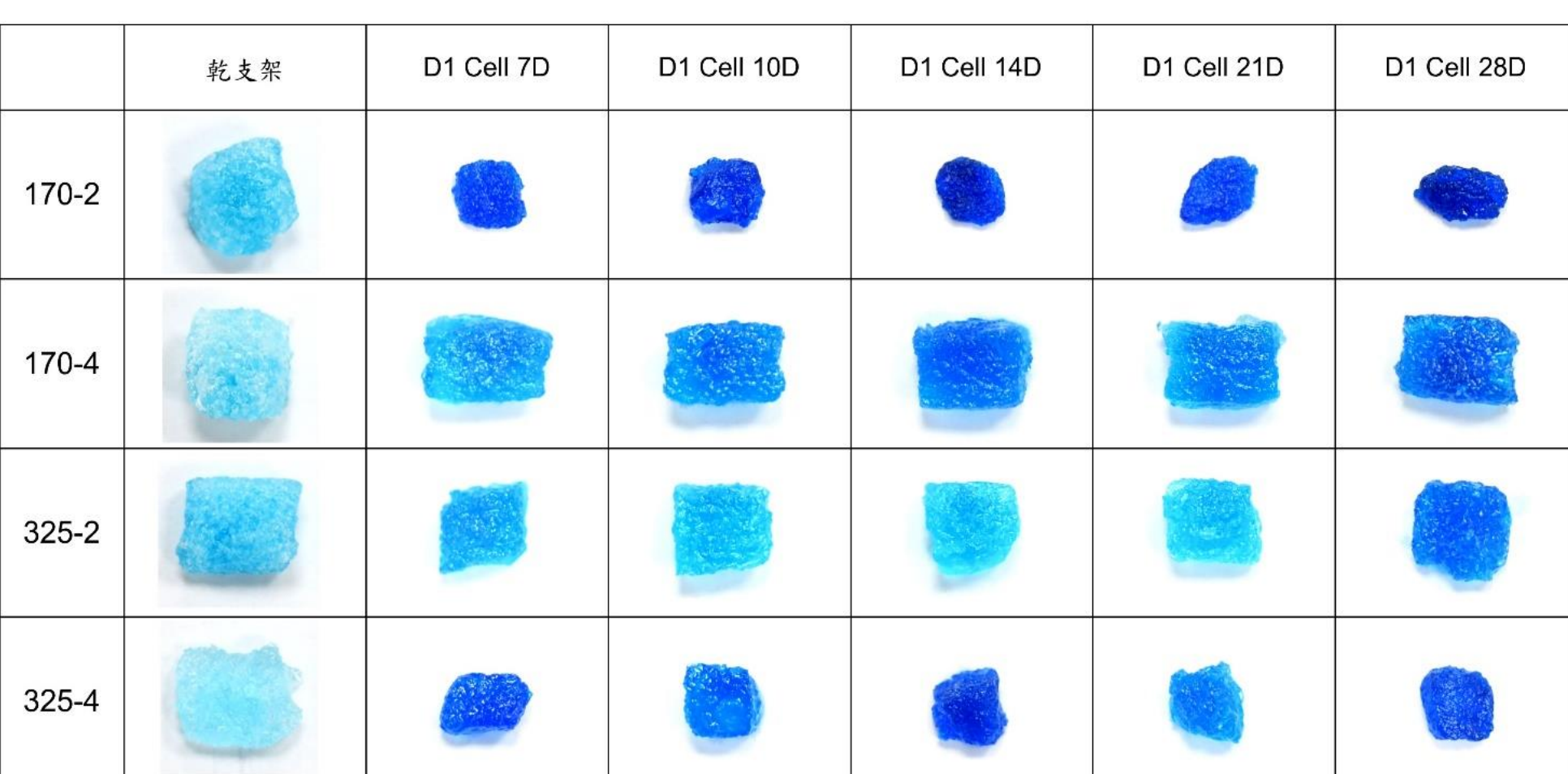
圖十四、軟骨支架與前驅骨母細胞培養之細胞增生結果

表一、四種支架與前驅骨母細胞培養之細胞存活度統計結果

DAY	p-value	統計事後檢定
1	<.0001	170-4 = 325-4 > 170-2 > 325-2
4	<.0001	170-4 = 325-4 > 170-2 > 325-2
7	<.0001	170-4 > 325-4 > 325-2 = 170-2
10	<.0001	170-4 > 325-4 > 325-2 > 170-2
14	<.0001	170-4 = 325-4 > 325-2 = 170-2
21	<.0001	170-4 = 170-2 > 325-2 > 170-2
28	<.0001	170-4 = 325-4 > 325-2 = 170-2

- 利用阿爾辛藍染色 (Alcian Blue Stain) 確定前驅骨母細胞是否軟骨化。染色越深，代表蛋白聚醣越多，軟骨化程度越高。
- 沒種植前驅骨母細胞的軟骨試片，經 Alcian Blue 染色後，試片會呈現淡藍色，這是因原料中的玻尿酸中含蛋白聚醣所致。

圖十五、四種支架之Alcian Blue 染色結果



隨著培養時間增加，顏色越來越深，

代表前驅骨母細胞與支架共培養後，分泌了更多的蛋白聚醣，可使細胞朝向軟骨細胞來分化。

170-2 與 325-4：試片體積明顯縮小，導致細胞聚集於體積極小的支架上，因此染出的顏色也會較深。

325-2：體積沒明顯縮小，但顏色到第28天才會最深。

170-4：試片體積沒有明顯縮小，但染出的藍色越來越深。

討論

- 四種軟骨支架，皆具有多孔性、連通孔、可吸附溶液，且具有一定強度。
- 顯微結構：造孔劑添加量少的170-2、325-2結構壁多；但量多的170-4和325-4，孔洞均勻。
170組：造孔劑在與膠體混合時，因粒徑大、顆粒數少，易將造孔劑均勻分散。
325組：特別是325-4，因粒徑小，顆粒數多，造成造孔劑分散不均，導致孔洞分佈不如其他組均勻。
- 吸水性：大顆粒的170組>小顆粒325組，但小顆粒添加量多的325-4>添加量少325-2。
- 降解率：170組重量殘留率的影響要到長時間的浸泡後才會出現；325組的325-4造孔劑添加量大，材料殘留率少，代表長期浸泡後，其降解率越快。
- 抗壓強度：同樣的造孔劑添加量，粒徑大>粒徑小。
- 交聯度：不隨著造孔劑添加量多寡，而影響。
- 造孔劑添加量影響支架的吸水量及降解性[1]。因支架孔洞若是均勻分布，可將水平均分散於孔洞內，但若支架內部都是結構壁，孔洞數量少，吸水量雖少，但容易造成支架內部重量負擔不均，導致有部分結構一直在受力，增加結構壁崩壞的機率，一旦有一個角崩壞，將無法支撐整體結構，使支架分解，無法維持既有的支架型態，也無法達到作為軟骨支架的功能了[2]。
- 體外細胞實驗：4組生物相容性佳，內部孔洞孔徑在 100 ~ 500μm，為聯通孔，有利於細胞增生、營養物質擴散與去除代謝物質，細胞表現最好的是170-4，其促進前驅骨母細胞增生與分化的能力最佳。

結論

根據結果，可確認造孔劑粒徑大且添加量多的組別**170-4**，雖抗壓強度僅 0.0177 MPa，每克材料吸水量可達14.72 mL，且浸泡試劑 30 天後，支架不會明顯降解，不具細胞毒性，促進前驅骨母細胞增生與分化的能力最佳，適合做為組織工程支架，用於軟骨缺損提高軟骨修復之成效。

參考資料

- [1] Al-Munajjed, A.A., O'Brien, F.J. (2009). Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2, 138-146.
- [2] Oster, G.F., Murray, J.D., Maini, P.K. (1985). A model for chondrogenic condensations in the developing limb: the role of extracellular matrix and cell tractions. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 89, 93-112.