

# 中華民國第 59 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

052002

作繭不自縛—以蠶繭為支架的細胞生長研究

學校名稱：國立武陵高級中學

<p>作者：</p> <p>高二 朱恒祺</p> <p>高二 胡宸瑋</p> <p>高二 黃彥鈞</p>	<p>指導老師：</p> <p>蔡靜宜</p>
--	-------------------------

關鍵詞：天然蠶繭、平面蠶繭、細胞培養

## 摘要

蠶絲對人體具有生物相容性，不易引起免疫反應，且其三維結構提供適合細胞生長的立體空間，是作為細胞培養支架良好的材料。相較於天然蠶繭，平面蠶繭除了可省略繁瑣的製備步驟之外，其表面平整結構均勻，使植入的細胞可更為平均地附著於平面蠶繭上。此外，平面蠶繭亦突破天然蠶繭形狀及大小固定的限制，利於配合不同用途改變固定架形狀大小，甚至可以擴大固定架以快速培養大量細胞。本研究結果證明平面蠶繭在細胞培養的應用上較天然蠶繭更適合做為大面積敷料之生醫材料。

## 壹、研究動機

臨床上外科手術理想之醫療材料，可在人體容易分解及不容易引起發炎或過敏反應。高中選修生物「人體的防禦」單元提及人體免疫系統的機制與免疫失調，引起我們的動機：尋求既不會對人體產生免疫反應，也可於體內分解的材料--動物編織物，查詢資料後發現蠶絲蛋白具有許多適合作為生醫材料的優點，且於人體可經過長時間自行吸收，在醫學領域上為許多研究提供臨床治療材料的選擇，因此我們開始大量飼養蠶寶寶，並以蠶繭作為細胞附著支架，觀察細胞於蠶繭上的生長情形。在搜尋資料的同時，意外發現苗栗農改場有成功研發出平面蠶繭技術，但平面蠶繭在細胞培養的文獻資料中較少報導，因此我們決定以蠶繭為題材，探討細胞在平面蠶繭上的生長情形，以期作為臨床改良細胞支架之方法。

## 貳、研究目的

蠶絲在生物體內的降解時間長、無明顯發炎反應，且若對其進行加工後，擁有良好的組織相容性及血液相容性，絲素蛋白的二級結構有較高的強度和彈性，在生物力學性能方面與生物肌腱的相近。綜上所述，蠶絲「生物相容性」、「生物可分解性」及「良好的力學性能」等特性可利用於外科縫線、組織工程等用途，提供良好的癒合條件。

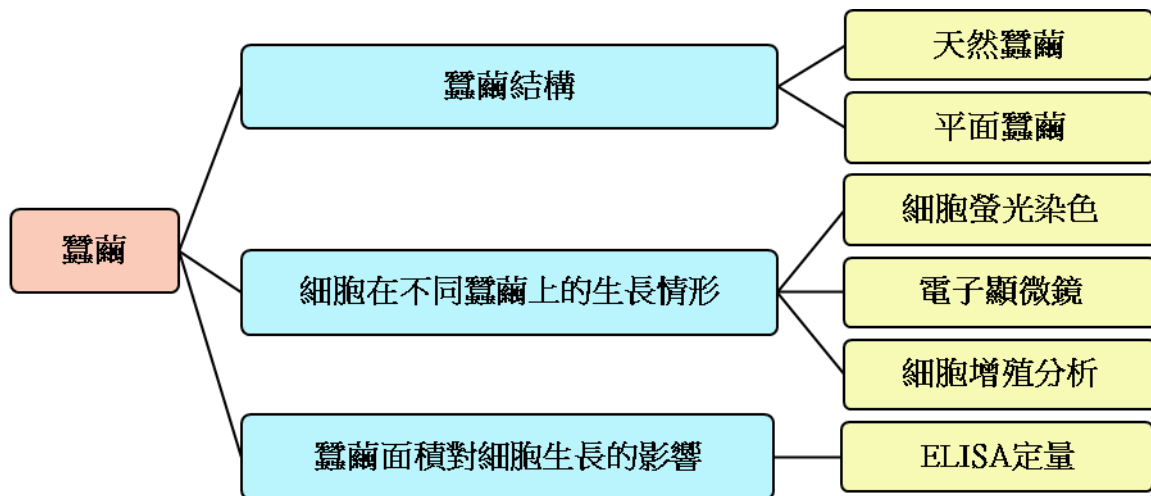
而平面蠶繭是將吐絲中的蠶置於細格子鐵絲網蠶架上，利用蠶向上爬和避光的特性來設

計的習性，將蠶架傾斜，使蠶一面往上爬、一面吐絲，織好一邊後，換另一邊傾斜。平面蠶繭相較於天然蠶繭不僅省略取出蠶蛹、繅絲的過程，同時組織綿密扎實、厚薄均勻、汗損比例低、較一般蠶絲不易糾纏，且平面外觀、立體結構更提供了良好的培養環境，因此我們希望能透過細胞培養的方式，檢測以平面蠶繭作為培養細胞支架的成效。

### 參、研究設備及器材

蠶絲	天然蠶繭—家蠶 <i>Bombyx mori</i> (取自苗栗農改場) 自行飼養所結的蠶繭 平面蠶繭—外購
蠶絲固定架	桌墊聚丙烯塑膠 (PP 板) 或丙烯腈-丁二烯-苯乙烯塑膠板 (ABS 板)、鑽孔機、線鋸機、螺絲、鋼釘、美工刀、剪刀
去膠	0.02M 碳酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 溶液、加熱槽、鍋子、烘箱
細胞培養	小鼠胰臟上皮細胞 MS1VEGF 細胞株 (經基因轉殖血管生成因子, 具有於 32 °C 可大量表現血管生成因子的特性)、細胞培養液、細胞培養箱、冷凍離心機、電動吸管、微量吸管分注器、細胞計數器、烘箱、領帶盒 (7cm×3.5cm)、正方形培養皿 (10.5cm×10.5cm)、計算機
分析方法	光學顯微鏡、螢光顯微鏡、掃描式電子顯微鏡 紅色螢光染色劑 CM-Dil 細胞增殖試劑 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 酵素免疫分析法 (ELISA)

## 肆、研究方法



圖一：實驗流程圖

### 一、觀察不同蠶繭的結構差異：

觀察不同蠶繭的表面巨觀結構，並藉電子顯微鏡觀察其微結構

#### (一) 蠶繭表面結構

1. 將兩種蠶繭置於玻片以鐵夾固定，利用光由下往上透射觀察其表面結構。
2. 藉由觸摸及觀察找出兩種蠶繭的粗糙面及光滑面，定義平面蠶繭粗糙面為外側，光滑面為內側。

#### (二) 蠶繭微結構—以電子顯微鏡觀察蠶繭內外側微結構

1. 以不同倍率的電子顯微照片，觀察天然蠶繭內外側結構差異。
2. 以不同倍率的電子顯微照片，觀察平面蠶繭內外側結構差異。

## 二、比較天然蠶繭與平面蠶繭上的細胞生長情形

組合蠶繭支架後，進行細胞計數，再將細胞置於蠶絲上，並以活細胞螢光染色劑 CM-Dil、電子顯微鏡、細胞增殖試劑 CCK-8 三種方式進行觀察。

### (一) 組合蠶繭固定架：

#### 1. 天然蠶繭固定架：

將蠶繭兩端剪開並取出蠶蛹，在蠶繭側邊剪一刀剪開。將其套在螺旋狀鐵絲上以上述去膠流程煮 45 分鐘直到蠶繭軟化易於攤平。將攤平後之蠶繭分別使用兩塊支架夾住，以螺絲或鐵釘固定，蠶繭粗糙面須朝上。再去膠 45 分鐘，將蠶絲支架取出，以蒸餾水洗滌蠶絲表面，並將其烘乾。



圖二：天然蠶繭固定架

#### 2. 平面蠶繭固定架：

另剪下固定架相同大小的平面蠶繭，分別使用兩塊支架夾住大小相同的平面蠶繭，以螺絲或鐵釘固定，蠶繭粗糙面須朝上，對此蠶繭支架進行去膠。

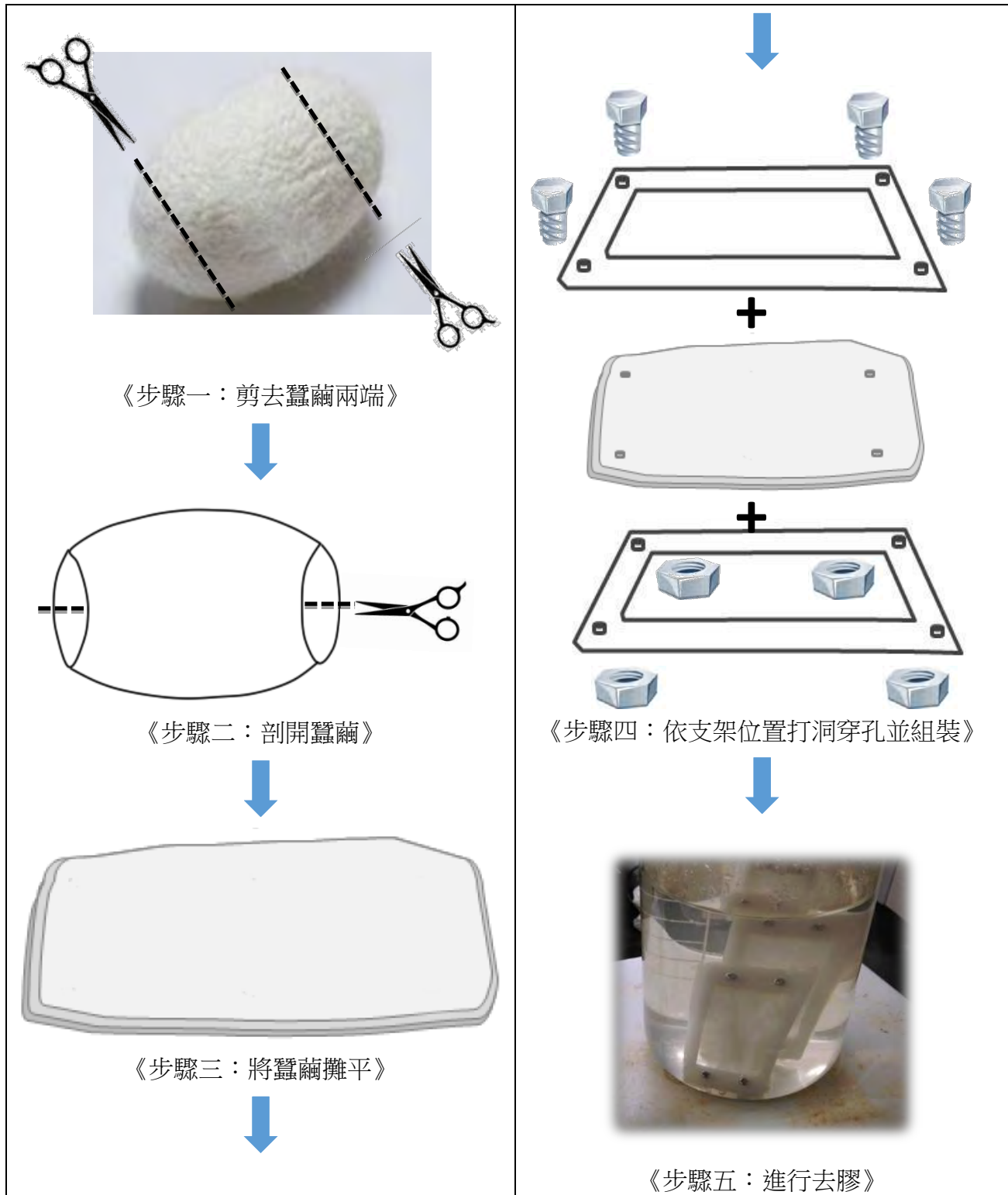


圖三：平面蠶繭固定架

3. 去膠：

(1)目的：蠶絲外圍的絲膠蛋白為過敏原，故實驗前需將其去除。

(2)流程：將蠶絲以螺絲或鋼釘固定架置入 0.02M 碳酸鈉溶液於 80°C 水浴 45 分鐘，後更換一次新鮮碳酸鈉溶液於 80°C 水浴 45 分鐘，再以清水沖洗。



圖四：天然蠶繭處理過程

## (二) 細胞計數

1. 將含有細胞培養液的培養皿傾斜四十五度角，並將培養液自邊緣吸出。
2. 將細胞 PBS 自培養皿邊緣滴加，輕微搖晃以潤洗細胞。
3. 吸取 2ml 的酵素溶液加入培養皿，放入攝氏 37 度培養箱培養五分鐘。
4. 將培養皿從培養箱取出，確認細胞是否不再黏附於培養皿，再加入 2ml 新培養液。
5. 使用電動吸管將培養液和細胞混合均勻。
6. 取出均勻溶液後，加入 5ml 的細胞，以 PBS 沖洗培養皿，取出剩餘細胞。
7. 以微量滴管吸取 50 $\mu$ l 細胞培養液及 50 $\mu$ l 染劑於微量離心管中。
8. 以微量滴管從微量離心管中各吸取 10 $\mu$ l 滴入計數玻片上二個 chamber。
9. 以計數器計算二個 chamber 中，九格中五格的總細胞數。
10. 將在二個 chamber 所計算共十格的細胞數除以十，乘上二（細胞被染劑稀釋），再乘上 10 的四次方（每格為 1 mm x1 mm），再乘上細胞培養液的總體積，便是細胞總數。

## (三) 將細胞培養於天然蠶繭與平面蠶繭

1. 以領帶盒為蠶絲固定架的細胞培養皿，將蠶絲固定架及領帶盒預先置於紫外光下照射數小時。
2. 得細胞總數後，計算  $5 \times 10^5$  個細胞所對應的體積，取出  $5 \times 10^5$  個細胞於離心管中。
3. 將離心管以每分 300 的轉速離心 5 分鐘。
4. 將上方殘餘溶液倒出，加入 5ml 細胞培養液將沉澱的細胞懸浮並混合均勻。
5. 在培養皿上放入已滅菌的蠶絲支架，在各蠶絲支架上滴上 1ml 細胞溶液，使每組蠶絲皆有  $10^5$  個細胞。
6. 置入培養箱數分鐘使其附著。
7. 取出培養皿，在容器內部加入恰能覆蓋固定架高度的培養液，進行細胞培養數天。

## (四) 活細胞螢光染色劑—CM-Dil 染色法

1. 1ml 細胞培養液和 10 $\mu$ l CM-Dil 配置成 working reagent。

2. 取  $1 \times 10^6$  個細胞離心，加入 200 $\mu$ l 的 working reagent，於攝氏 37 度環境培養 30 分鐘。
3. 取出後將其置於冰浴中 15 分鐘。
4. 以 1500rpm 離心 5 分鐘，將上層溶液倒出，進行 PBS 清洗。
5. 再以 1500rpm 離心 5 分鐘，將上層溶液倒出。
6. 加入適量細胞培養液後將細胞滴於蠶絲之上，置入培養箱數分鐘使其附著。
7. 將培養皿取出，在容器內部周圍加入恰能覆蓋支架高度的培養液，進行細胞培養數天。
8. 將細胞以福馬林固定於蠶絲上，利用螢光顯微鏡觀察蠶絲上的螢光，觀察平面蠶絲及一般蠶絲上細胞生長情形。

#### (五) 利用電子顯微鏡觀察細胞附著於平面蠶繭的情形

1. 以不同倍率的電子顯微照片，觀察細胞生長於三維結構的蠶絲生長情形。

#### (六) 利用細胞增殖試劑 (CCK-8) 定量比較有無蠶繭支架的細胞生長情形

1. 進行細胞計數，製備細胞懸液。
2. 將細胞置於 96well 培養皿中，每個 well 加入約 100 $\mu$ l、細胞數量相同細胞懸液。
3. 另將蠶繭切塊分別置於 96well 中，每 well 加入約 100 $\mu$ l、細胞數量相同細胞懸液。
4. 37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養 24 小時使細胞附著。
5. 每格加入 10 $\mu$ l CCK-8 放回培養箱再培養 1 個多小時。
6. 活細胞具有代謝 CCK-8 的能力，死細胞則無，藉由測定兩樣本 450nm 吸光度，將得到結果換算成細胞數量。
7. 同理得到 4 天、8 天、12 天細胞的生長狀況。
8. 將得到的結果以時間為橫坐標，細胞數為縱坐標做成直條圖，觀察有無蠶繭支架是否影響細胞的生長狀況。



### 三、評估平面蠶繭是否可大面積培養細胞

自製 1、2、4、6 倍固定架，用於大面積蠶繭的去膠，並進行細胞培養，以 ELISA 分析其面積是否影響細胞生長。

#### (一) 自製蠶絲固定架

1. 以日常生活使用的桌墊(聚丙烯塑膠)為材料
2. 以 2cm x 4cm 的方格為單位面積，利用美工刀切割其 2、4、6 倍面積的固定架，並於中間保留分隔。
3. 使用學校的鑽孔機在各分隔交點打洞。
4. 將兩片支架與蠶繭使用螺絲及螺帽於打洞處進行固定，進行去膠後即可培養細胞。

#### (二) 將細胞培養於不同面積大小的平面蠶繭

1. 將蠶絲支架置入培養皿中，並使粗糙面朝上放置。
2. 取  $10^5$  個細胞滴於面積 1 倍之蠶絲上，兩格各滴  $10^5$  個細胞於面積 2 倍的蠶絲上，面積 4、6 倍同理。
3. 置入培養箱數分鐘使其附著。
4. 將培養皿取出，在容器內部周圍加入恰能覆蓋固定架高度的培養液(1 倍、2 倍、4 倍、6 倍皆等量)，進行細胞培養數天。

#### (三) 以酵素免疫分析法 (ELISA) 測定細胞分泌血管生成因子量

1. 利用 96well 微陣列盤，在每 well 加入對血管生成因子具專一性之抗體，使其附著於底部。
2. 將培養數天的細胞培養液取出。
3. 在 well 內滴入上述培養液，使其中的血管生成因子附著於抗體上，並用緩衝液沖出剩餘溶液。
4. 在每個 well 加入對血管生成因子具專一性之抗體，其上附著酵素，並用緩衝液沖出剩餘溶液。
5. 在每個 well 加入受質使其經酵素催化後呈色，並測其吸光度。





6. 將得到的吸光度換算成血管生成因子分泌量，以血管生成因子分泌量代表細胞數，並將蠶繭面積為橫坐標，細胞數為縱坐標進行繪圖比較。

## 伍、研究結果

### 一、觀察不同蠶繭的結構差異

#### (一) 蠶繭表面結構

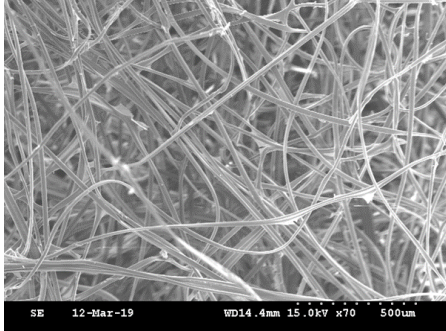
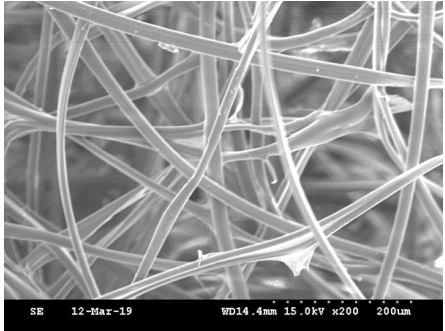
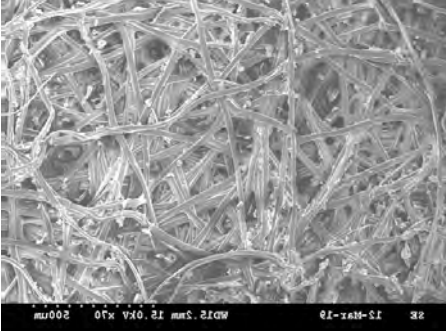

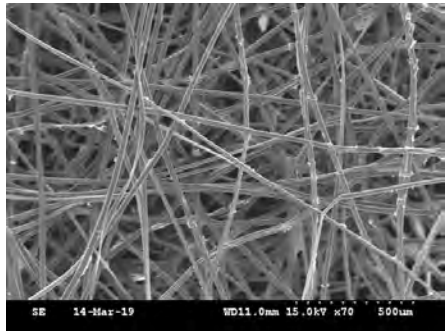
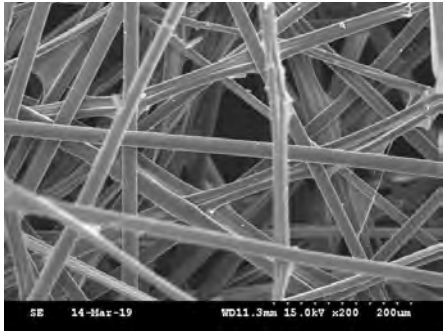

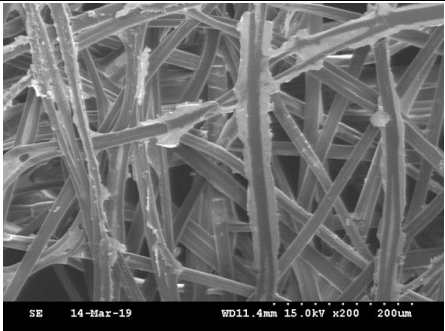
由外觀及觸感可明顯區分出蠶繭具有兩面：天然蠶繭的內側（接近蠶蛹側）質感較為光滑細緻，而外側質感較為粗糙；平面蠶繭雖無內外之分，但在觸感上仍能些許分別出兩面。首先我們以肉眼直接觀察攤平後的蠶繭：

	外 側	內 側
天然蠶繭		
平面蠶繭		

圖五：天然蠶繭與平面蠶繭表面結構差異

結果：天然蠶繭原本是圓筒狀，將其壓平後會有許多皺褶；天然蠶繭外側和內側在外觀上便有明顯差異；平面蠶繭的兩面在外觀上無太大差異

(二) 蠶繭微結構

天然蠶繭外側		
	70X	200 X
天然蠶繭內側		
	70 X	200 X
平面蠶繭外側		
	70X	200 X
平面蠶繭內側		
	70X	200 X

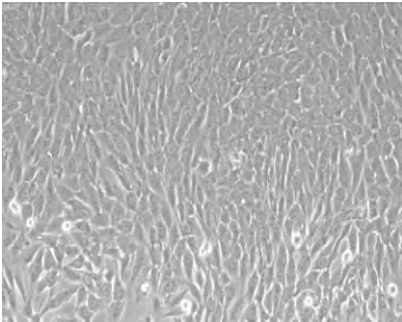
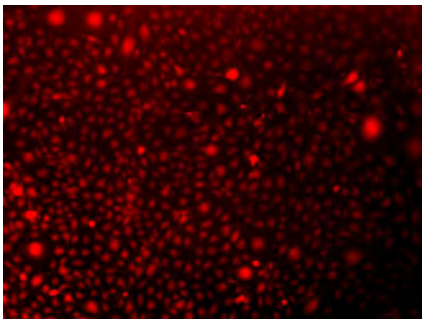
圖六：天然蠶繭與平面蠶繭的外側與內側微結構差異

結果：天然蠶繭的外側纖維排列較鬆散，而內側纖維排列較緻密；平面蠶繭無明顯差別

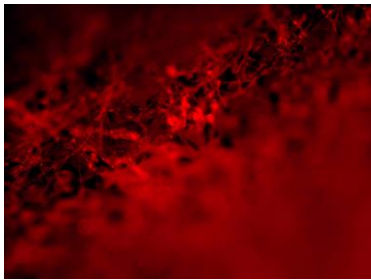
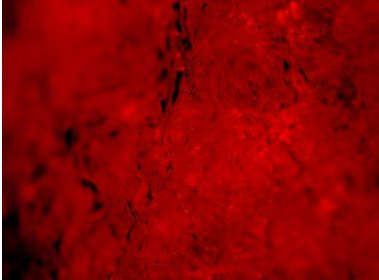
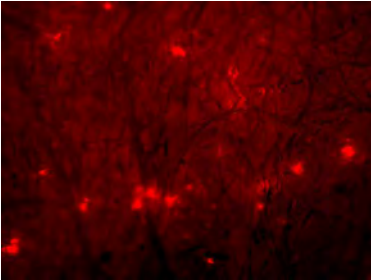

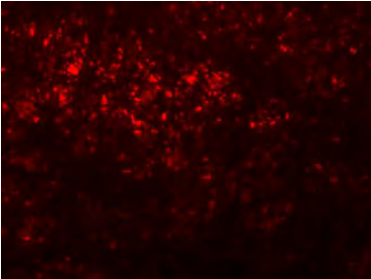
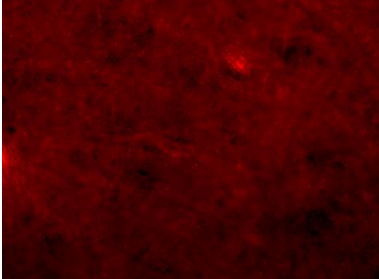
## 二、比較天然蠶繭與平面蠶繭上的細胞生長情形

### (一) 活細胞螢光染色劑—CM-Dil 染色法

藉由 CM-Dil 螢光染色觀察細胞是否能在蠶繭上附著、生長以及其生長情形

直接生長於培養皿之細胞（無蠶繭） （尚未染色）	直接生長於培養皿之細胞（無蠶繭） （以 CM-Dil 螢光染色）
	

圖七：直接生長於培養皿（無蠶繭）之細胞生長狀況

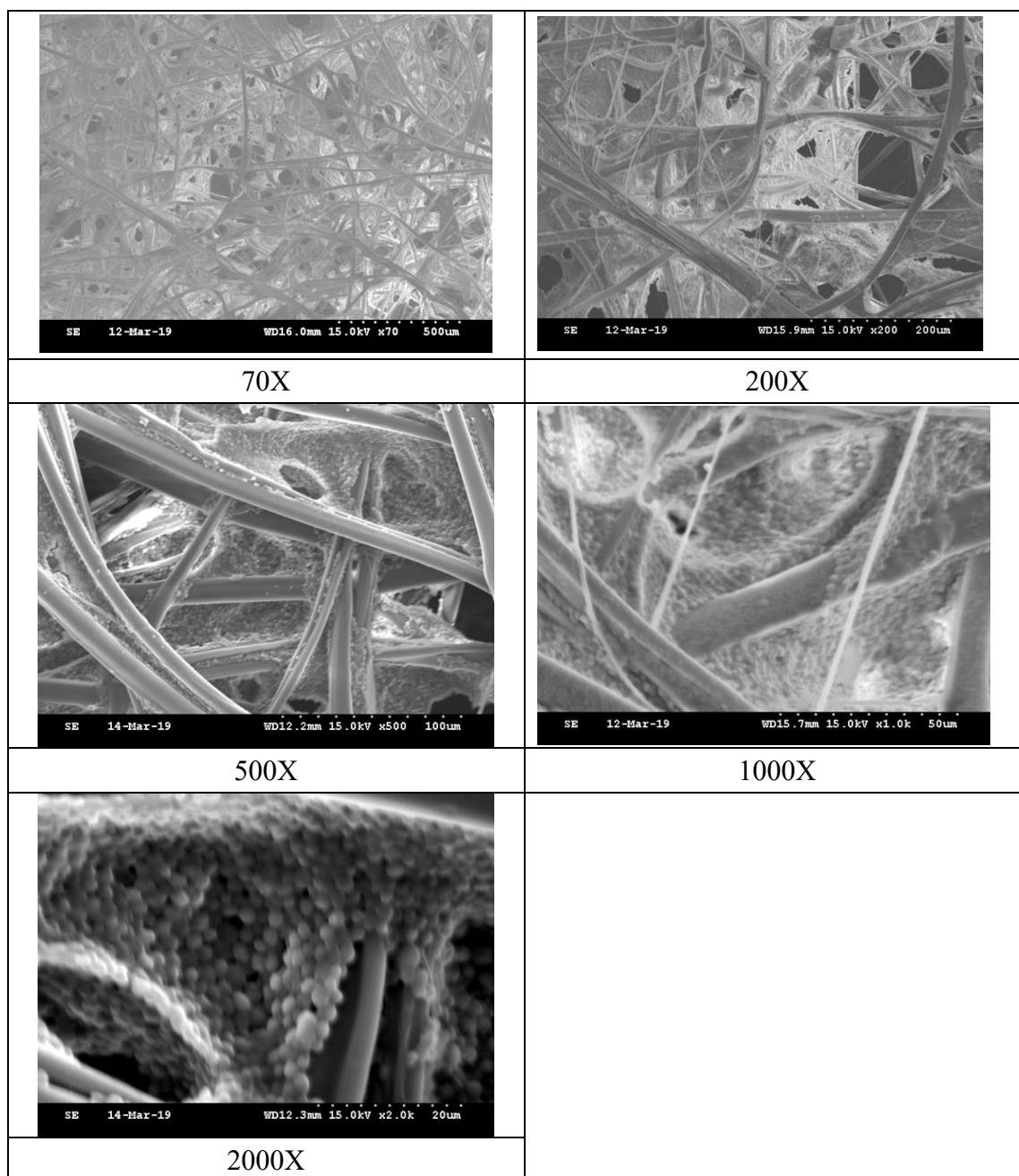
天然蠶繭	平面蠶繭
	
	
	

圖八：生長於天然蠶繭與平面蠶繭之細胞生長狀況（以 CM-Dil 螢光染色）

結果：天然蠶繭的螢光分布較不均勻，推測是天然蠶繭在壓平時產生的皺褶造成的，凹陷處有細胞聚集而凸出處細胞較不易附著。平面蠶繭或天然蠶繭均呈現螢光，表示細胞在兩種蠶繭上均可以附著、生長。

## (二) 利用電子顯微鏡觀察細胞附著於平面蠶繭的情形

為了進一步觀察細胞在蠶繭纖維上的附著情況，我們以電子顯微鏡觀察不同放大倍率下細胞生長於平面蠶繭纖維的狀況：

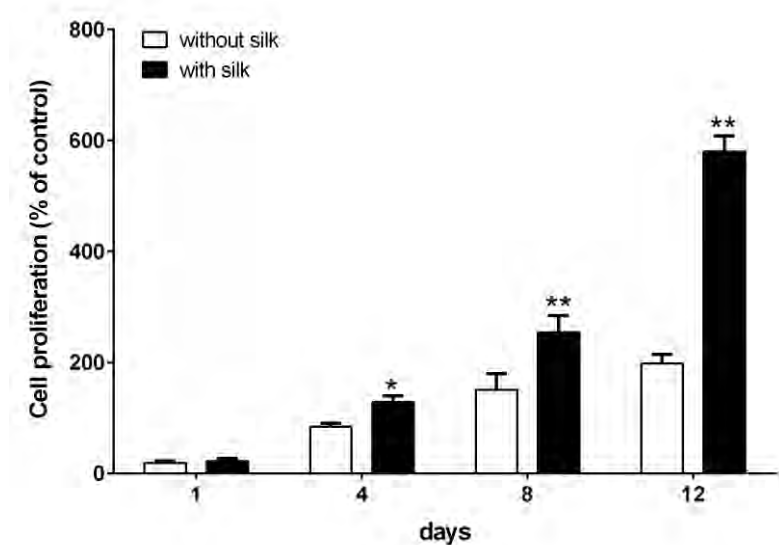


圖九：生長於平面蠶繭之細胞生長狀況（以電子顯微鏡觀察）

結果：在倍率 70X 和倍率 200X 兩圖中可以看到纖維和纖維之間有附著並堆疊成膜狀的細胞生長。放大至倍率 500X 和倍率 1000X 已可以漸漸看到每一個細胞輪廓。當放大至倍率 2000X 時可以清楚辨識出纖維之間有多個細胞貼附並堆疊。而比較細

胞在培養皿(圖七左)與蠶繭上之生長，可發現細胞生長於培養皿時僅能生長單層，而細胞生長於蠶繭上由於蠶繭提供細胞附著支架，故可以多個堆疊，且細胞生長形狀較為立體。

### (三) 利用細胞增殖試劑 (CCK-8) 定量比較有無蠶繭為支架的細胞生長情形



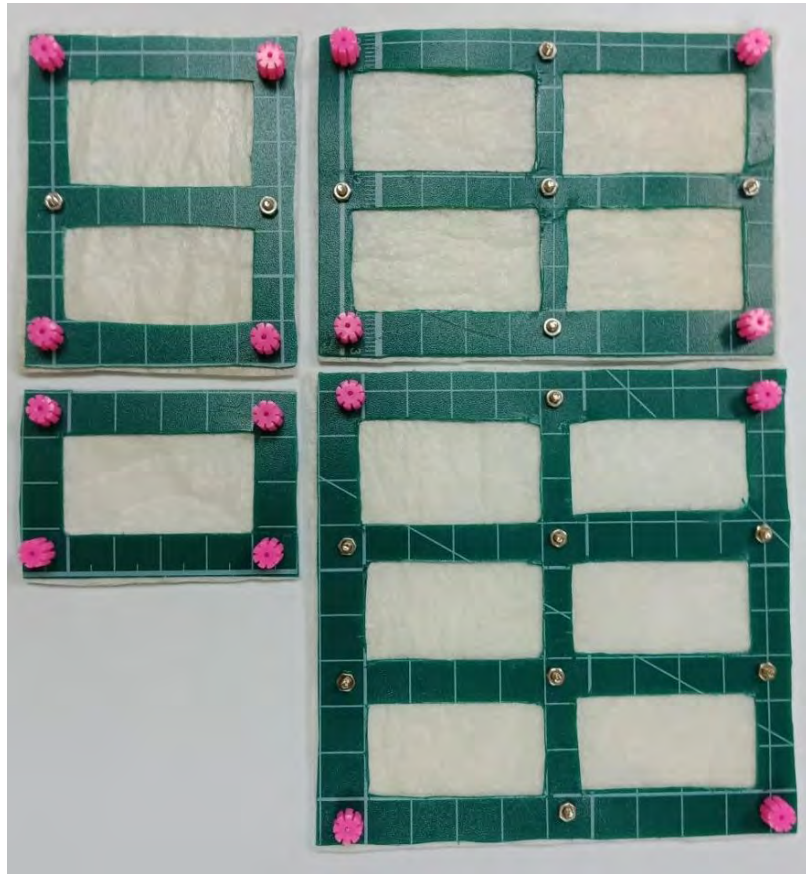
圖十：定量比較有無蠶繭為支架的細胞生長情形

結果：橫軸為培養時間，縱軸為以吸光度換算的細胞生長比率，從此圖可看出，一到四天時細胞在培養皿及蠶繭上的生長和分裂速率無明顯差異，而第四天開始，培養皿上生長空間逐漸不足，細胞進入生長停滯、凋亡階段，由此我們可確定，蠶繭作為細胞支架不影響細胞生長速率，且其細胞能有更佳生長。

### 三、評估平面蠶繭是否可大面積培養細胞

#### (一) 將細胞培養於不同面積大小的平面蠶繭

由於坊間醫療上較欠缺大面積敷料，大面積燒燙傷或需要植皮的患者深受困擾，因此我們嘗試以不同面積的平面蠶繭測試細胞的生長情形比較。由於蠶繭面積較大時蠶繭中央易塌陷，因此我們將大面積平面蠶繭的固定架中間保留分隔，使大面積蠶繭可保持水平而不致塌陷。

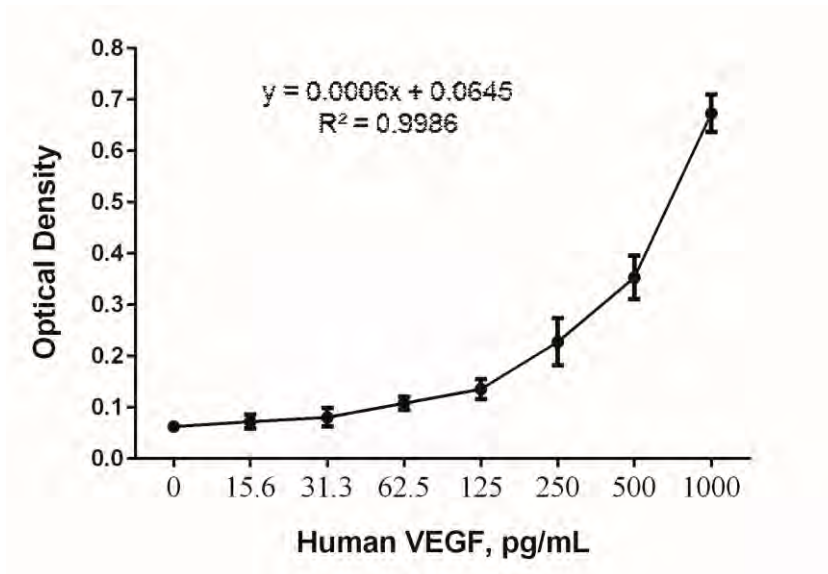


圖十一：自製不同面積大小的蠶繭固定架

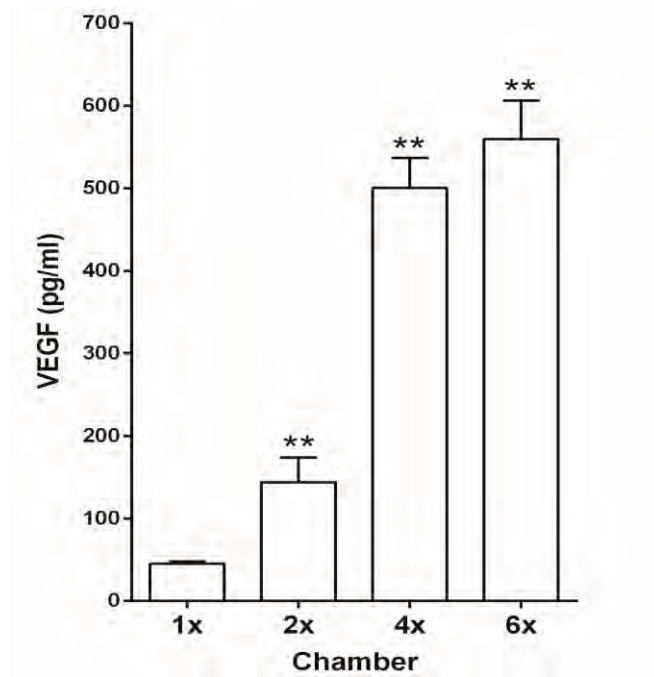
結果：作為開發大面積敷料的依據，繼續探討細胞是否可以生長於大面積的平面蠶繭。由於蠶繭因去膠後結構鬆散且面積較大時蠶繭中央易塌陷。因此我們自製蠶絲固定架，以美工刀切割桌墊塑膠材料，以 2 cm x 4 cm 內框為單位。分別製作 1X、2X、4X 及 6X 等不同單位的蠶絲固定架作為以不同面積的平面蠶繭測試細胞的生長情形比較。

## (二) 以酵素免疫分析法 (ELISA) 測定血管生成因子的分泌量

為了得知擴大蠶繭面積後的細胞生長情形，因此我們以 ELISA 進行定量分析。我們使用的 MS1VEGF 細胞株是經基因轉殖血管生成因子的胰臟上皮細胞，於 32°C 可表現血管生成因子，由於血管生成因子為分泌型蛋白質，因此只需收集細胞培養液，便可利用 ELISA 測定其內血管生成因子的分泌量，間接量化細胞的生長情形。



圖十二：以吸光度換算血管生成因子量



圖十三：不同蠶繭面積的血管生成因子分泌量

結果：此圖橫軸為放大平面蠶繭的倍率，縱軸為血管生成因子的濃度，由結果可以得知，隨蠶繭面積由 2X 放大至 4X，血管生成因子分泌量超過倍數增加，代表細胞數量明顯增加，由此實驗可知擴大蠶繭面積有助於培養大量細胞。



## 陸、討 論

- 一、蠶繭有光滑和粗糙兩面，由電子顯微鏡照片可以看出兩面在微觀結構上的差異，可能也是直接將細胞放於光滑面時細胞無法順利附著的主因。經過查詢，家蠶由外而內結成繭衣、繭層、蛹襯，繭衣（粗糙面）纖維排列鬆散，絲膠含量較多；蛹襯（光滑面）纖維排列緊密，靠近蛹故含油量較大，我們推測是因為含油量和過度緊密的纖維排列使細胞無法順利貼附。
- 二、推測蠶繭的三維結構可以提供細胞較二維結構更大的附著表面積，防止細胞因生長空間不足而進入停滯、凋亡階段。
- 三、蠶絲外圍的絲膠蛋白為過敏原，故實驗前需進行去膠。蠶繭經去膠後結構鬆散、強度減弱、失去絲膠蛋白，無法維持形狀以支撐培養細胞，因此我們以耐熱之固定架加以固定。因應大面積去膠時蠶繭塌陷的問題，我們在製作的固定架時中間保留分隔，使蠶絲可以維持水平而不受重力影響而塌陷。
- 四、蠶繭面積在放大至四倍面積時，其生長數及血管生成因子分泌量較兩倍面積超過三倍增加的效果，推測是平面蠶繭的三維結構可以提供細胞較二維結構更大的附著表面積，防止細胞因生長空間不足而進入停滯、凋亡階段；而為何蠶繭面積在六倍時未能達到更高的血管生成因子分泌量，推測可能是因為細胞培養液消耗量已達上限或 ELISA 試劑的極限的結果。
- 五、隨著蠶繭面積的擴大，細胞生長狀態能依然保持良好，因此可以一次在大面積的平面蠶繭上培養大量細胞。以平面蠶繭作為細胞三維空間培養的支架在面積的大小方面非常具有自由度，細胞生長情形不受面積放大影響，形狀上也可以有相當之自由度，平面蠶繭在臨床大面積敷料使用上能有較天然蠶繭更廣的應用性。
- 六、未來我們期望以 3D 列印，製備不同形狀的蠶繭固定架進行細胞培養；或於蠶繭上培養幹細胞，觀察組織分化情形，抑或組織再生研究等，以期增加蠶繭在學術研究或臨床醫學上的應用。

## 柒、結 論

### 一、不同蠶繭結構有所差異：

天然蠶繭與平面蠶繭的微觀結構幾乎相同，但在巨觀下，天然蠶繭由於蠶繭之立體結構，因此在拉平製成細胞支架後會有皺摺、起伏不均的情況。

### 二、比較天然蠶繭與平面蠶繭上的細胞生長情形：

透過螢光染色結果得知，細胞確實能在蠶繭上附著、生長。利用天然蠶繭培養細胞時，雖然在微觀結構看似和平面蠶繭大同小異，但是經螢光染色後觀察，發現天然蠶繭皺褶凸出處細胞較難附著，細胞密度較小；而凹陷處細胞容易聚集，細胞密度較大。反觀平面蠶繭，除了方便進行細胞培養的前置處理之外，其整體結構也較為平整，細胞分布均勻，細胞生長情形良好，說明了天然蠶繭在外觀上的凹凸確實會影響細胞附著的情形，因此我們選用平面蠶繭進行後續實驗。

透過電子顯微鏡觀察細胞生長情形，發現細胞生長在蠶繭上確實可以在三維空間中堆疊，因而能提供較大的生長表面積供細胞附著生長。

透過 CCK-8 定量結果可知，細胞可以順利附著於蠶繭上進行生長、分裂，在細胞生長初期的階段，無論有無蠶繭作為細胞支架並無明顯差異，而長時間培養後，生長空間的優勢，使蠶繭上可較平面培養更多細胞。

### 三、放大平面蠶繭的面積：

隨著平面蠶繭面積的擴大，血管生成因子的分泌量也隨之上升，說明了細胞生長情形與蠶繭面積大小有關，蠶繭面積增大可使細胞生長數量增多。未來期盼能以蠶繭為生醫材料，透過改變蠶繭面積進行大面積組織修復的醫療應用。

## 捌、參考資料及其他

- 一、江樵熹、吳午龍、金明儒(1980)。蠶絲外科縫線之研究。國防醫學院藥學系，研究論文。
- 二、苗栗區農業改良場(2014)。平面蠶絲被生產技術。  
<https://www.mdais.gov.tw/ws.php?id=4621>
- 三、M. K. Sah and K. Pramanik (2010). Regenerated Silk Fibroin from *B. mori* Silk Cocoon for Tissue Engineering Applications。Int. J Environ Sci and Develop. 1: 404-408 .

## 【評語】 052002

1. 以平面蠶繭於細胞培養的應用，比天然蠶繭更適合為大面積敷料生醫材料。觀察不同蠶繭的表面巨觀結構，並藉電子顯微鏡觀察細胞培養於上面時的微結構。
2. 本研究探討蠶繭在細胞培養上的應用，研究結果證明平面蠶繭在細胞培養的應用上較天然蠶繭更適合做為大面積敷料之生醫材料。
3. 實驗的結果僅僅止於現象的觀察，並沒有真的探討平面蠶繭如何能成為一個優良的生醫材料，他有什麼好的特性，是現在市面上的材料所不能提供的。
4. 研究的深度及廣度宜再加強。

# 摘要

蠶絲對人體具有生物相容性，不易引起免疫反應，且其三維結構提供適合細胞生長的立體空間，是作為細胞培養支架良好的材料。相較於天然蠶繭，平面蠶繭除了可省略繁瑣的製備步驟之外，其表面平整結構均勻，使植入的細胞可更為平均地附著於平面蠶繭上。此外，平面蠶繭亦突破天然蠶繭形狀及大小固定的限制，利於配合不同用途改變固定架形狀大小，甚至可以擴大固定架以快速培養大量細胞。本研究結果證明平面蠶繭在細胞培養的應用上較天然蠶繭更適合做為大面積敷料之生醫材料。

# 研究動機

## 1. 實驗背景：

臨床上外科手術理想之醫療材料，可在人體容易分解及不容易引起發炎或過敏反應。高中選修生物「人體的防禦」單元提及人體免疫系統的機制與免疫失調，引發我們研究的動機：尋求既不會對人體產生免疫反應，也可於體內分解的材料——動物編織物。查詢資料後發現蠶絲蛋白具有「生物相容性」、「生物可分解性」及「良好的力學性能」等特性，目前已有研究指出人工重新紡製的蠶絲已應用於在臨床醫學領域上。

## 2. 實驗設計：

我們從飼養蠶寶寶，自製蠶絲固定架，再將細胞植入蠶絲支架，並觀察細胞於蠶繭上的生長情形。雖細胞可附著生長，但天然蠶繭有大小固定、攤開會產生皺摺等問題，引發尋找改善的方案。我們發現苗栗農改場成功研發平面蠶繭技術，但平面蠶繭在細胞培養的文獻資料中鮮少報導，因此我們決定以平面蠶繭為題材，探討細胞在平面蠶繭上的生長情形及開發大面積敷料之可能，以期作為臨床改良細胞支架之新方法。

## 3. 平面蠶繭技術：(苗栗農改場研發)

利用蠶向上爬和避光的習性，設計傾斜可翻動之蠶架。將正吐絲的蠶置於細格子鐵絲網蠶架上，使蠶一面往上爬、一面吐絲，織好一邊後，換另一邊傾斜而製成大片的平面蠶繭。平面蠶繭相較於天然蠶繭不僅省略取出蠶蛹、繅絲的過程，同時組織綿密扎實、厚薄均勻、汗損比例低、較不易糾纏，且平面外觀、立體結構更提供了良好的培養環境。

# 研究設備及器材

## 1. 蠶繭：

蠶絲外圍的絲膠蛋白為過敏原，實驗前需將之去除。將蠶絲以螺絲或鋼釘固定架置入0.02 M碳酸鈉溶液於80°C水浴45分鐘，後更換一次新鮮碳酸鈉溶液於80°C水浴45分鐘，再以清水沖洗。

## 2. 自製蠶絲固定架：

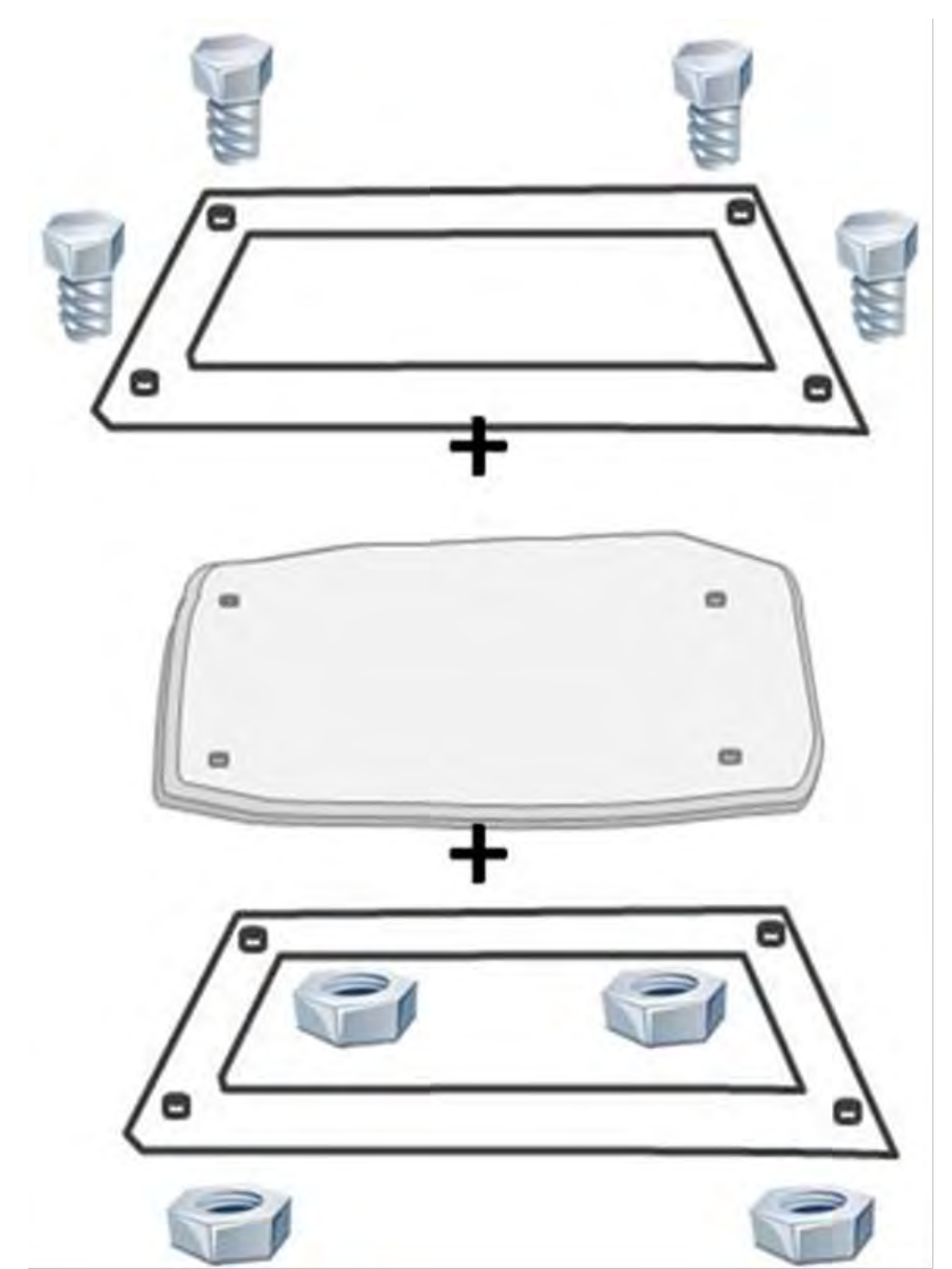
以美工刀切割聚丙烯塑膠的桌墊材料或丙烯腈-丁二烯-苯乙烯塑膠板，以2 cm x 4 cm內框為單位之自製蠶絲固定架。

## 3. 細胞培養：

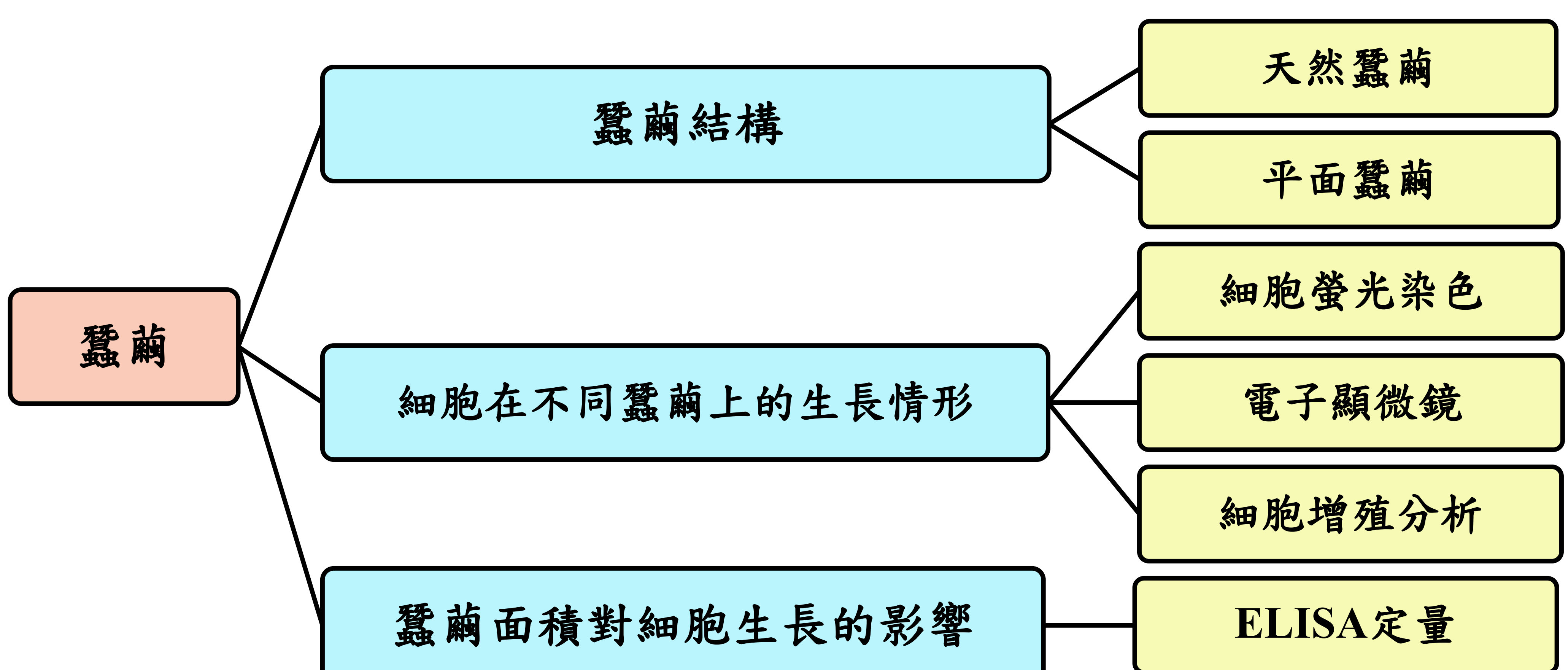
小鼠胰臟上皮細胞MS1VEGF細胞株（經基因轉殖血管生成因子，具有於32°C可大量表現血管生成因子的特性）。

## 4. 分析材料：

光學顯微鏡、掃描式電子顯微鏡、紅色螢光染色劑CM-Dil、細胞增殖試劑（CCK-8）、酵素免疫分析法（ELISA）。



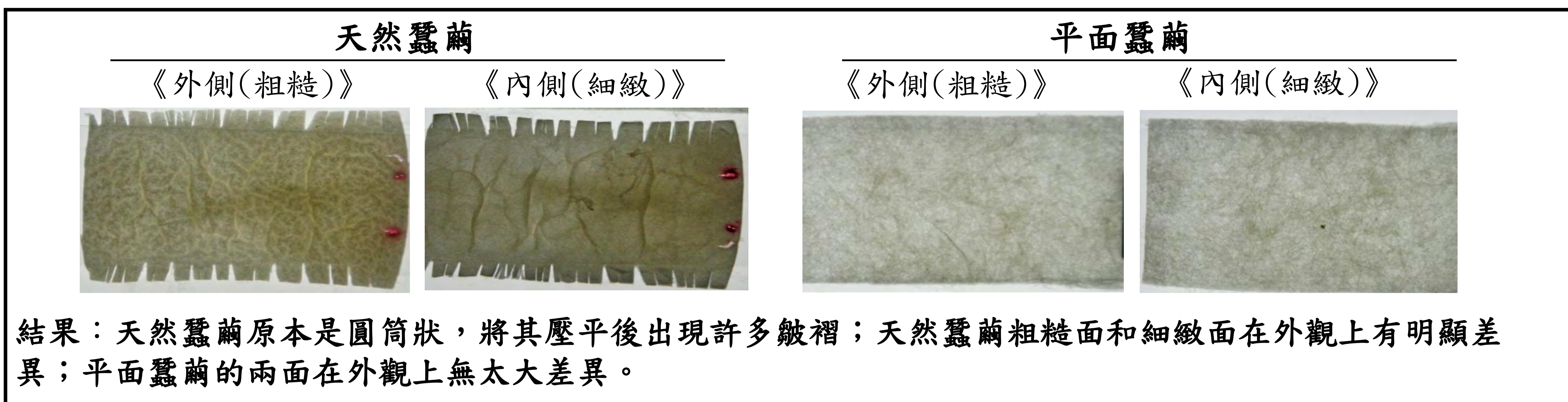
# 研究方法



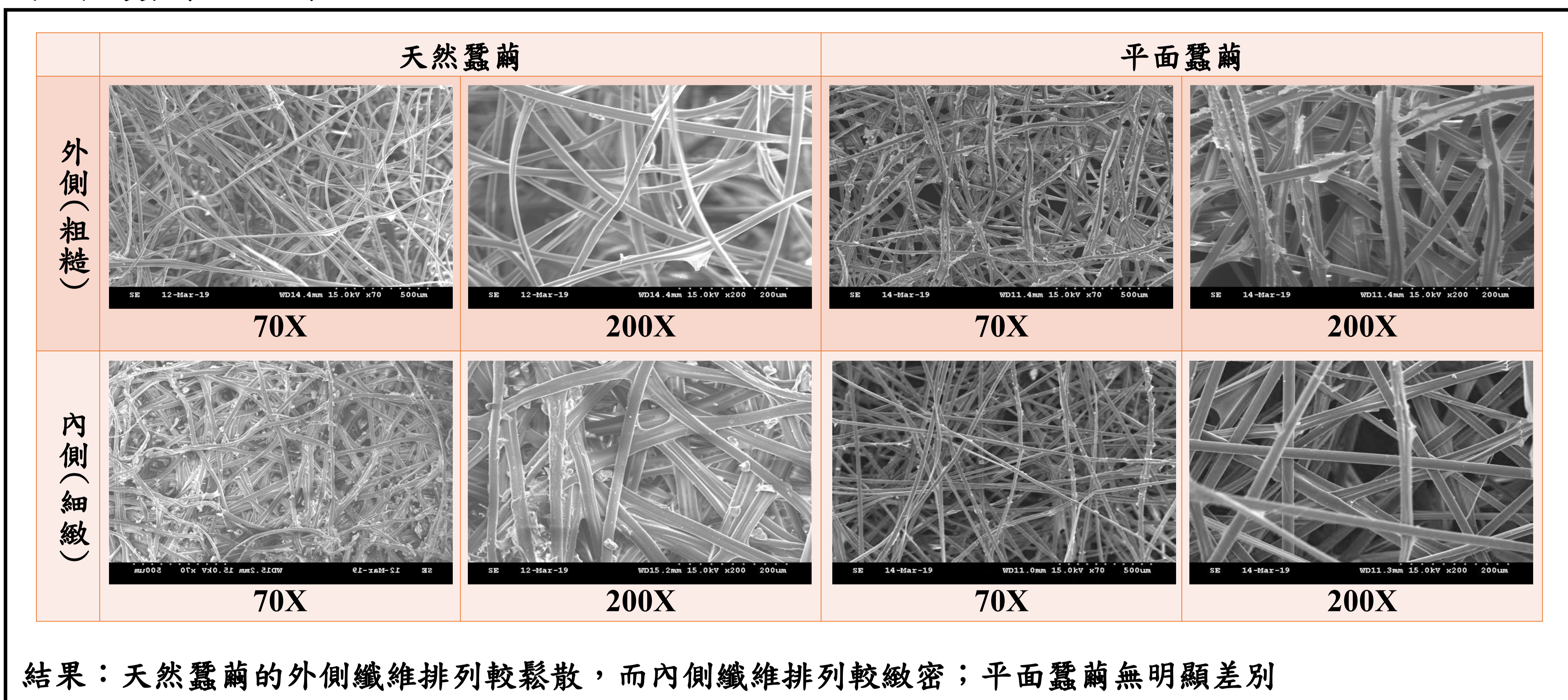
# 研究結果

## 實驗一：觀察不同蠶繭的結構差異

### (一) 蠶繭表面結構

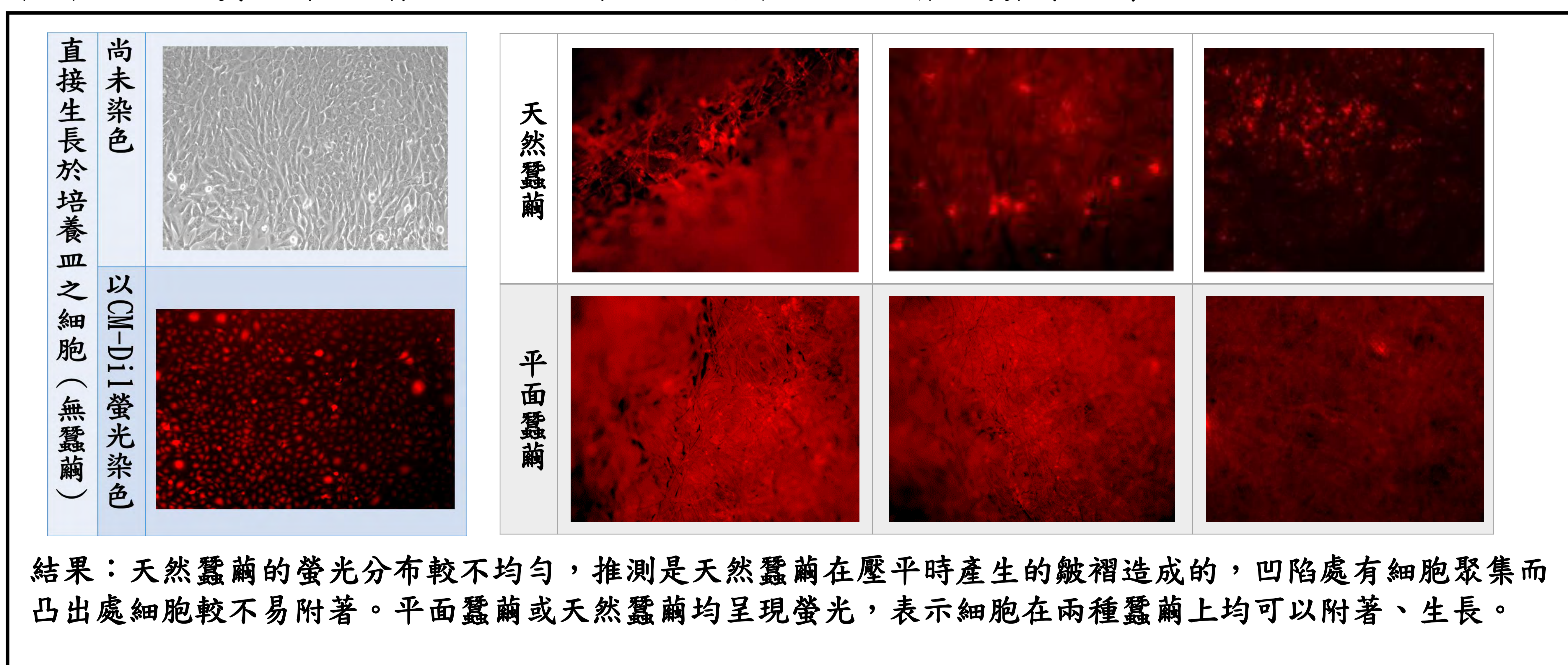


### (二) 蠶繭微結構

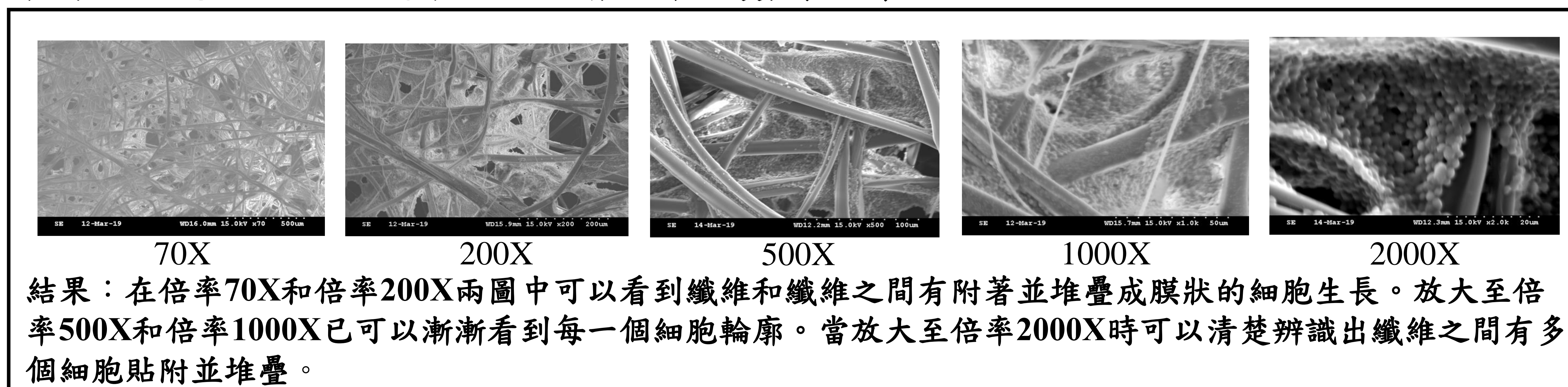


## 實驗二：比較天然蠶繭與平面蠶繭上的細胞生長情形

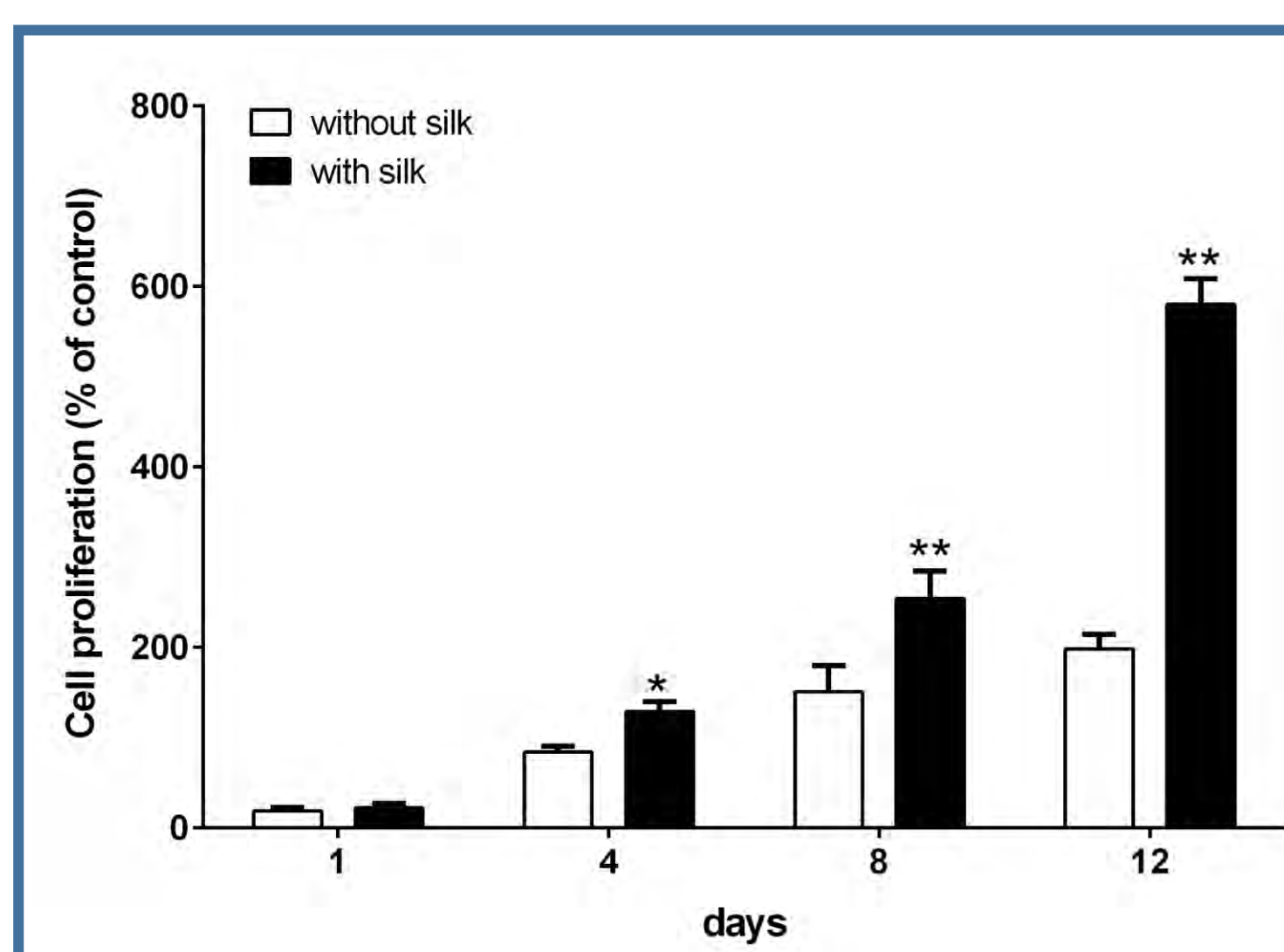
### (一) 活細胞螢光染色劑—CM-Dil染色法觀察細胞附著於蠶繭的情形



### (二) 利用電子顯微鏡觀察細胞附著於平面蠶繭的情形



### (三)利用細胞增殖試劑 (CCK-8) 定量法比較細胞生長於有或無蠶繭支架的情形

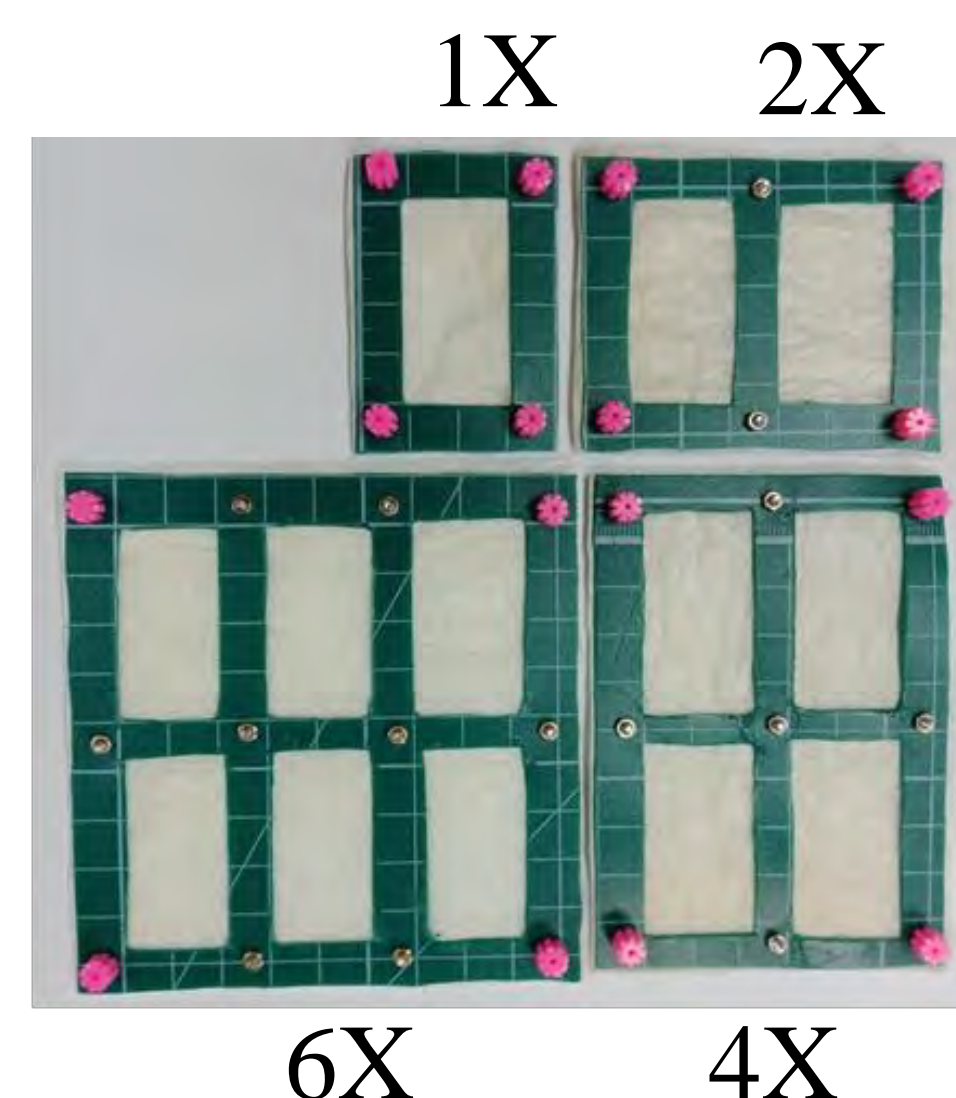


結果：橫軸為培養時間，縱軸為以吸光度換算的細胞生長比率，從此圖可看出，一到四天時細胞在培養皿及蠶繭上的生長和分裂速率無明顯差異，而第四天開始，培養皿上生長空間逐漸不足，細胞進入生長停滯、凋亡階段，由此我們可確定，蠶繭作為細胞支架不影響細胞生長速率，且其細胞能有更佳生長。

### 實驗三：評估可大面積培養細胞的平面蠶繭

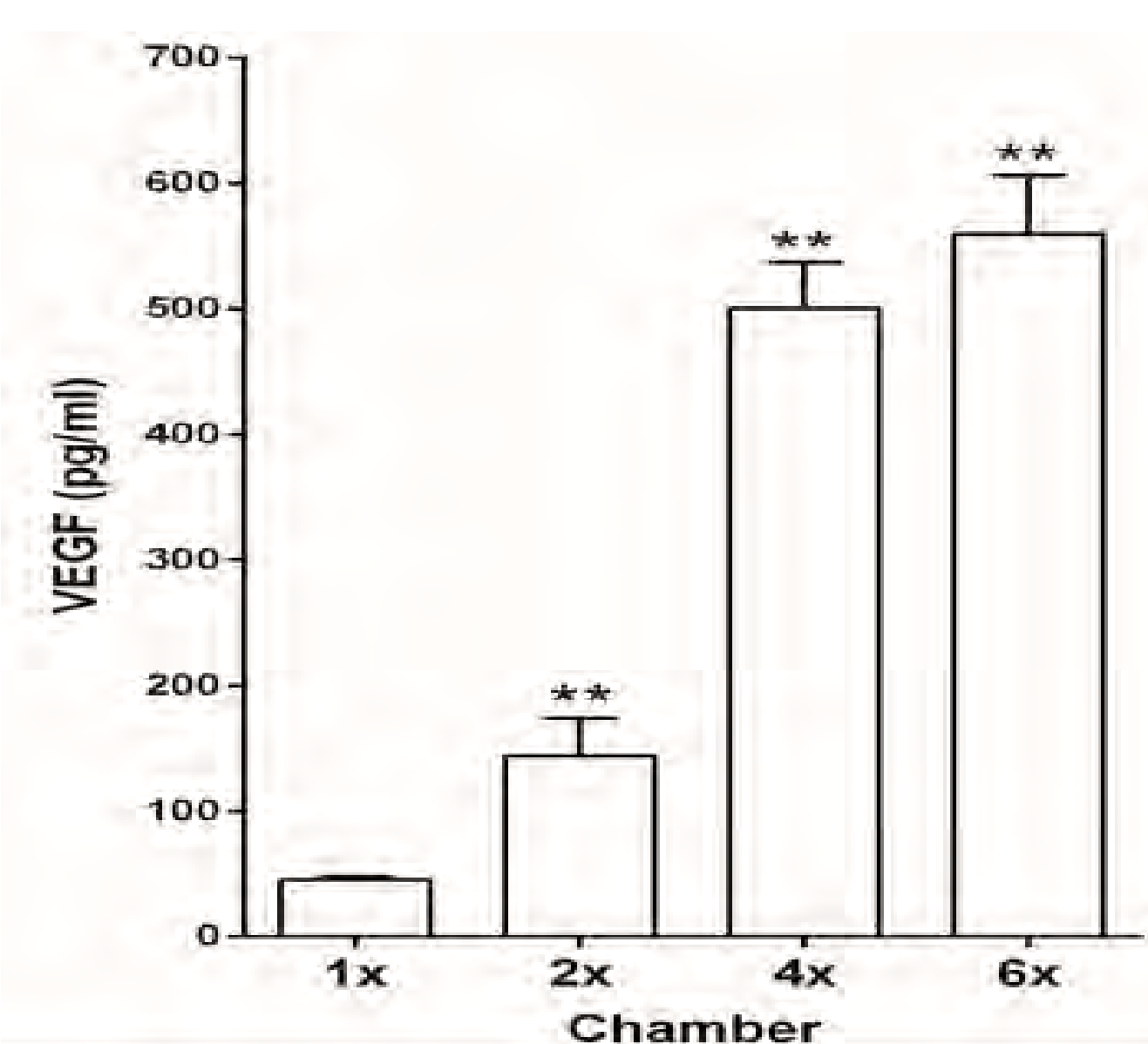
#### (一)自製不同面積大小的平面蠶絲固定架

結果：作為開發大面積敷料的依據，繼續探討細胞是否可以生長於大面積的平面蠶繭。由於蠶繭因去膠後結構鬆散且面積較大時蠶繭中央易塌陷。因此我們自製蠶絲固定架，以美工刀切割桌墊塑膠材料，以2 cm x 4 cm內框為單位。分別製作1X、2X、4X及6X等不同單位的蠶絲固定架作為以不同面積的平面蠶繭測試細胞的生長情形比較。



#### (二)將細胞培養於不同面積大小的平面蠶繭

結果：此圖橫軸為放大平面蠶繭的倍率，縱軸為血管生成因子的濃度，由結果可以得知，隨蠶繭面積由2X放大至4X，血管生成因子分泌量超過倍數增加，代表細胞數量明顯增加，由此實驗可知擴大蠶繭面積有助於培養大量細胞。



## 討論

- 蠶繭面積在放大至四倍面積時，其生長數及血管生成因子分泌量較兩倍面積超過三倍增加的效果，推測是平面蠶繭的三維結構可以提供細胞較二維結構更大的附著表面積，防止細胞因生長空間不足而進入停滯、凋亡階段；而為何蠶繭面積在六倍時未能達到更高的血管生成因子分泌量，推測可能是因為細胞培養液消耗量已達上限或ELISA試劑的極限的結果。
- 隨著蠶繭面積的擴大，細胞生長狀態依然保持良好，證明平面蠶繭可以大面積培養細胞。以平面蠶繭作為支架在面積的大小具有自由度，未來我們期望以3D列印，製備不同形狀的蠶繭固定架進行細胞培養；或於蠶繭上培養幹細胞，觀察組織分化情形，抑或組織再生研究等，以期增加蠶繭在學術研究或臨床醫學上的應用。

## 結論

#### 一. 平面蠶繭適合作為培養分佈均勻及生長良好的細胞的支架

- 螢光染色**結果得知，細胞確實能在不同來源之蠶繭上附著、生長。平面蠶繭具有方便進行細胞培養的前置處理，其整體結構也較為平整，細胞分布均勻、生長情形良好。
- 細胞增殖**分析結果得知，細胞可以順利附著於蠶繭上進行生長、分裂，在細胞生長初期的階段有或無蠶繭作為細胞支架狀況下生長並無明顯差異，而長時間培養後，生長空間的優勢使蠶繭上可較平面培養更多細胞。
- 電子顯微鏡**結果得知，細胞生長在蠶繭上確實可以在三維空間中堆疊，可提供較大的生長表面積供細胞附著生長防止細胞因生長進入停滯、凋亡階段。

#### 二. 平面蠶繭適合做為大面積敷料之生醫材料

隨著平面蠶繭面積的擴大，血管生成因子的分泌量也隨之上升，蠶繭面積增大可使細胞生長數量增多未來期盼能以蠶繭為生醫材料，透過改變蠶繭面積進行大面積組織修復的醫療應用。

## 參考資料及其他

- 苗栗區農業改良場 (2014): 平面蠶絲被生產技術。 <https://www.mdais.gov.tw/ws.php?id=4621>
- M. K. Sah and K. Pramanik (2010). Regenerated Silk Fibroin from B. mori Silk Cocoon for Tissue Engineering Applications. Int. J Environ Sci and Develop. 1: 404-408.
- 江樵熹、吳午龍、金明儒 (1980)。蠶絲外科醫學之研究。國防醫學院藥學系，研究論文。
- 顏文龍、孫思杰 (2004)。一種新型的組織工程材料—蠶絲。武漢理工大學生物科學與技術系。湖北省武漢市。