

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 化學科

第三名

050208

細胞的社會住宅—開發應用於幹細胞培養具磁
分離能力之纖維素微球

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 葉亮均 高二 曾育晨	指導老師： 陳鴻仁
-------------------------	--------------

關鍵詞：微球、磁性奈米氧化鐵、幹細胞培養

摘要

幹細胞治療為全球再生醫學趨勢。

微球是一種三維細胞培養的方式，目前最普及的微球Cytodex具價格高、需額外透析膜來分離材料與細胞等缺點，引發我們開發磁性奈米氧化鐵纖維素微球的動機。

藉由共沉澱法合成磁性奈米氧化鐵，再以乳化法將其包覆於羧甲基纖維素微球中，表面透過交聯反應使微球更加穩固。我們嘗試四種變因調控微球製程參數，成功使微球粒徑大小達到與 Cytodex 相近的長邊204.886 μm ，且驗證幹細胞能於微球表面生長，並透過磁性分離快速獲得幹細胞。

本研究成果相較於市售微球透析膜方式，方便、環保且低成本。未來可進一步探討微球的光熱性質使細胞脫離微球表面，避免細胞傷害，利用化學材料設計與合成磁性微球放大幹細胞，提供更新穎的細胞培養分離方式。

壹、前言

一、研究動機

近年來，微球在臨床醫療上的應用越來越廣泛，其研究為藥物開發及細胞培養帶來更大的前景。應用在藥物開發的微球，通常通過皮下或肌肉注射的方式進入體內，它具有延長藥物作用時間及療效、使藥物聚集於標靶組織或器官進而減少藥物副作用、透過調整微球材料調節藥物釋放速度和程度、包裹不同藥物成分於微球內進而提高其生物相容性等優勢。現在市面上有許多藥物應用的微球，例如晚期前列腺癌的標準療法 Lupron Depot 以及促性腺激素釋放激素促效劑 Triptorelin。

微球在細胞培養的重要性更不可忽視，隨著再生醫學市場規模越來越大，細胞培養逐漸成為了未來趨勢，再生醫學包含三大領域:器官修復、免疫細胞治療、幹細胞療法。在器官修復的領域中，透過幹細胞治療或移植體外培養的組織器官都是治療器官損壞的方法；免疫細胞治療也是再生醫學的一種，透過細胞培養增殖自體免疫細胞增加免疫細胞數量以及自身免疫能力；在三個領域的再生醫學中，因幹細胞強大的分化能力使幹細胞療法在臨床醫學上最受矚目，幹細胞療法對於癌症、神經疾病都有不錯的效果。無論何種領域的再生醫學應用都需要大量培養細胞，因此，提高細胞培養效率成了其關鍵，而微球正是一種能夠有效提高細胞培養效率的新型細胞培養方法。

關於微球在細胞培養的應用中，相較於傳統二維細胞培養，微球的三維特性具有諸多優勢。首先，三維培養提供貼附型細胞懸浮培養的環境條件，使細胞的每單位體積培養表面積成倍增加，進而提高細胞培養效率；其次，二維細胞培養會造成細胞不自然的貼平培養基生長，與體內細胞自然成團生長不同，且細胞附著在微球表面生長，亦可以避免細胞的不正常聚集，進而提高細胞培養效果；另外，三維細胞培養相較於二維培養更能維持細胞的高存活率，並在進行藥物毒性或病毒感染測試研究時，更能準確模擬體內細胞環境。

現在市面上最為廣泛應用體外懸浮培養系統的微球是由 Cytiva™ 生技公司生產的以葡聚糖為基質之微球 Cytodex系列，經過論文搜索及整理，我們發現了Cytodex系列的三項缺點：一，使用 Cytodex微球進行細胞培養的其中一步驟需利用胰蛋白酶切割附著在微球上的細胞，有些研究顯示此舉會損害細胞，例如降低 CD105 的表達；二，收集培養的細胞過程中，在以胰蛋白酶分離細胞及微球後，需使用擁有專利而價格昂貴的透析膜過濾，以分離細胞與微球；三，Cytodex系列市售價格高(6500 NTD, 25g)，其所使用的微球材料成分葡聚糖價格也偏高。上述三項缺點中，第一項酵素作用是否會損害細胞目前仍然存在爭議性，因此本研究著重在解決上述後二項缺點著手製成磁性氧化鐵纖維素微球。

二、研究目的

- (一) 藉共沉澱法合成磁性奈米氧化鐵。
- (二) 探討攪拌速率、介面活性劑濃度、油相種類及注射速率對微球合成之影響。
- (三) 將臍帶血間葉幹細胞株(cord-blood mesenchymal stem cell；CbMSC)培養於磁性奈米氧化鐵纖維素微球，測試細胞對於此微球的貼覆性及微球之磁分離能力。

三、文獻回顧

(一) 間質幹細胞醫療應用

幹細胞醫療技術臨床應用起源於1968年，當年完成了世界第一例骨髓移植術，而後現平均每年全球約進行6萬例骨髓移植術，截至2014年，全球進行了接近4萬例臍帶血移植術。自1960年代以來，間質幹細胞(Mesenchymal Stem Cell；MSC)逐漸步入醫療研究應用，成為主流，如今臨床應用層面廣泛：透過其對人體的免疫抑制作用有效降低人類免疫細胞過度表現[1]、傷口癒合[2][3]、人體組織修補及糖尿病性潰瘍組織修復[4][5][6][7]等等。根據上述幹細胞的應用，臨床醫療不免遇到幹細胞現有數目不足以供應需求的問題，而對於幹細胞數量的問題，傳統應對方法是採用二維細胞培養方式供應幹細胞醫療需求，

然而近年種種關於幹細胞治療的研究與應用急遽增加，大大提高了臨床對於幹細胞的需求量，因此，幹細胞培養的改善問題成了眾人關切的一大重點。

(二) 二維細胞培養以及微球

再生醫學的臨床研究需要龐大的細胞數量，如間質幹細胞的臨床應用需要數十億個細胞[8]，然而傳統的二維細胞培養在大量培養上成本高且存在下列缺點:首先，在比較體外二維細胞培養效果與體內細胞生長型態後發現，不同於體內細胞自然地成團、互相緊貼生長，二維培養會導致細胞不自然貼平培養基底面，且細胞只接觸到培養基，而非緊密貼合；另外，體內的細胞間質可以提供細胞各方向平均的拉力，但二維細胞培養會使細胞受到不平均的向下引力；相較於細胞在體內可形成完整組織型態，細胞在培養基上只能形成單層的細胞層，因此二維細胞培養的細胞型態與體內生長的細胞存在很大的不同[9]；最後，近年來有越來越多證據顯示二維系統培養的細胞活性或其表現與在體內反應擁有明顯差異，例如癌細胞的一些重要特徵無法在二維培養系統中被表現[10]。直到1967年，Van Wezel提出利用DEAE-Sephadex A 50(一種葡聚糖)製作出第一種以三維培養方法的微球取代傳統二維細胞培養[11]，如今市面上已有多種不同材料合成的微球，如明膠[12]、聚苯乙烯[13]、海藻酸鹽[14]、瓊脂糖[15]、聚己內酯[16]、聚乳酸-乙醇酸[17]、甲殼質[18]、殼聚糖[19]等等，常見的Cytodex1[20]和Cytodex®3[21]使用的則是交聯葡聚糖。相較於傳統二維細胞培養，三維培養具有二大優勢。首先，微球培養提供貼附型細胞懸浮培養的環境條件，使細胞的每單位體積培養表面積成倍增加以節省培養基的消耗，旨在用最少的培養基養出最多的細胞，例如3 mg/mL Cytodex 1每公升可以提供 1.32×10^4 cm²的表面積，相當於176個75 cm²的組織培養瓶，減少了占用實驗室的空間和每個步驟的處理數量，從而降低勞動成本和污染風險[22]；另一方面，無論是細胞型態、立體性、生物代謝能力、模擬體內生長環境等方面，三維細胞培養都更貼近於真實體內細胞生長環境，可以反映細胞真實的樣態，提高培養的模擬準確度。

貳、研究器材及設備

一、藥品

名稱	名稱	名稱
氫氧化鈉(NaOH)	液態氮(N ₂)	氯化亞鐵(FeCl ₂)
氯化鐵(FeCl ₃)	去離子水(DD water)	鹽酸(HCl _(aq))
甲苯 (toluene)	尿素 (urea)	羧甲基纖維素 (carboxymethyl cellulose sodium salt ; CMCNa)
山梨醇酐油酸酯 (span 80)	礦物油 (mineral oil)	三羥甲基丙烷三縮水甘油 醚 (trimethylolpropanetri glycidyl ether ; TMPTGE)
油酸 (oleic acid ; OA)	95% 酒精 (95% ethanol)	Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium powder
臍帶血間葉幹細胞株 (cord-blood mesenchymal stem cell ; CbMSC)	磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered saline ; PBS)	胰蛋白酶

二、實驗器材

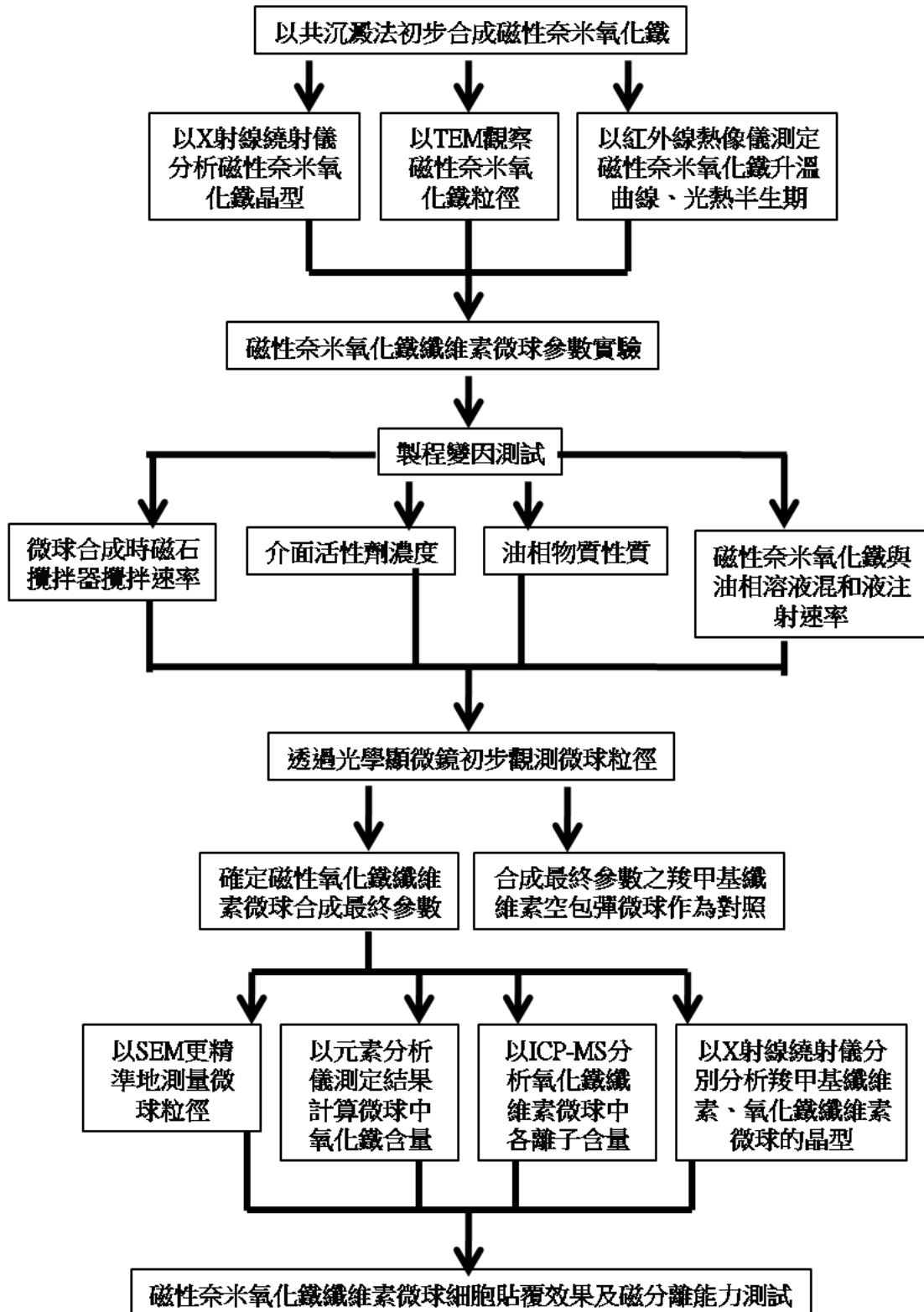
物鏡測微尺	磁石攪拌器	注射幫浦	多用途試管震盪器	超音波細胞震碎機
離心機	桌上型冷凍乾燥機	強力磁鐵	高溫高壓蒸氣滅菌器	細胞培養搖床

三、實驗儀器

光學顯微鏡	自動細胞計數儀	穿透式電子顯微鏡	紅外線熱像儀	元素分析儀
掃描式電子顯微鏡	桌上型酸鹼度測試儀	X射線繞射儀	電感耦合電漿質譜儀	倒立式雷射掃描式共軛焦顯微影像系統

參、研究過程或方法

一、研究流程圖



二、合成磁性奈米氧化鐵

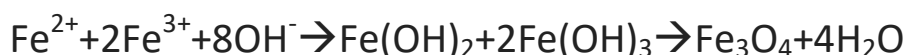
本實驗旨在利用共沉澱法(Co-precipitation)，合成具磁性的奈米氧化鐵，此實驗產物將被包覆於纖維素微球內，以實現利用磁吸分離微球與細胞的可能。實驗設計與過程如下：

(一) 實驗介紹：

合成磁性奈米氧化鐵的方法基本上可以分為兩種，分別是熱分解及共沉澱法。根據Lu等人在2007年於*Angewandte Chemie International Edition*期刊所提出，熱分解法合成磁性奈米氧化鐵是「透過有機金屬化合物在含有穩定表面活性劑的高沸點有機溶劑中的熱分解來合成」；共沉澱法為「在室溫或高溫下，於充滿惰性氣體添加鹼，使 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 在水溶液中合成氧化鐵。」

本研究所使用的共沉澱法相較於熱分解法對環境造成的負擔較小，熱分解法用到正己烷和大量溶劑，對環境影響較大。共沉澱法的另一優點為有效控制晶種成核反應條件及晶體成長反應條件後，共沉澱法比起需在 240~320°C 梯度升溫進行熱裂解反應的熱分解法更易進行大規模製備。

共沉澱法主要反應如下：



(二) 實驗步驟：

1. 調配0.1 M NaOH水溶液50 mL，抽真空後使用氮氣淨化5 分鐘。
2. 加熱NaOH水溶液至95°C，置於磁石攪拌器以轉速1000 rpm持續攪拌10 分鐘。
3. 再加入 FeCl_2 0.402 g及 FeCl_3 1.029 g迅速混合於20 mL DD water內，並等待10 分鐘。
4. 注入OA溶液3 mL，注射速率為每分鐘0.2 mL，等待反應10 分鐘。
5. 先以1 M HCl沖洗後再以DD water沖洗，將溶液分散於100 mL甲苯中。
6. 室溫下靜置24 小時後，先以2000 rpm離心6 分鐘，再以3500 rpm離心6 分鐘。
7. 磁吸蒐集本研究實驗產物。

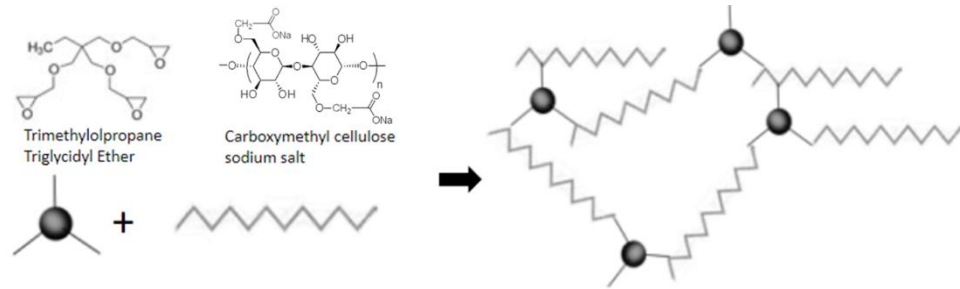
三、探討各項參數對磁性奈米氧化鐵纖維素微球合成之影響

本實驗旨在透過乳化法，將磁性奈米氧化鐵包裹在纖維素微球中，並利用TMPTGE釋放環張力進行交聯作用，使微球結構更加穩固。透過調整乳化法中不同的參數，嘗試合成出與Cytodex®3微球相似的磁性奈米氧化鐵纖維素微球。實

驗設計與過程如下:

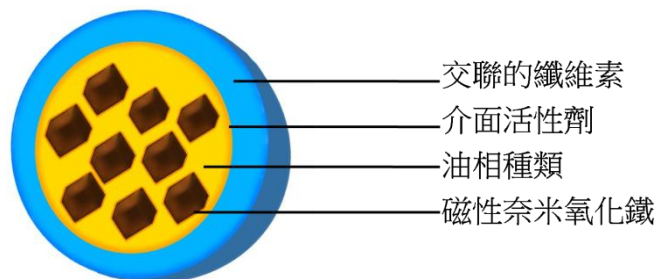
(一) 實驗介紹:

在製備完成磁性奈米氧化鐵之後，本研究設計以乳化法製成磁性奈米氧化鐵纖維素微球，並加入TMPTGE進行交聯。將油相加入水相(水包油)的方式是產生油球最基本、快速上手的方法，且製程穩定。在將油滴到水相經由機械力攪拌之後，再以被分散的小油珠作為模板，存在於油相的TMPTGE接觸到羧甲基纖維素。其交聯作用反應途徑如下:



其中，本研究在溶解羧甲基纖維素時加入NaOH及尿素的原因，是因為Huhe等人在2020年於*Cellulose*期刊中提到:「在尿素溶劑中加入NaOH可以使水分子更靠近纖維素分子，水和纖維素之間的氫鍵在此溶劑中比其他溶劑中更可能形成。」

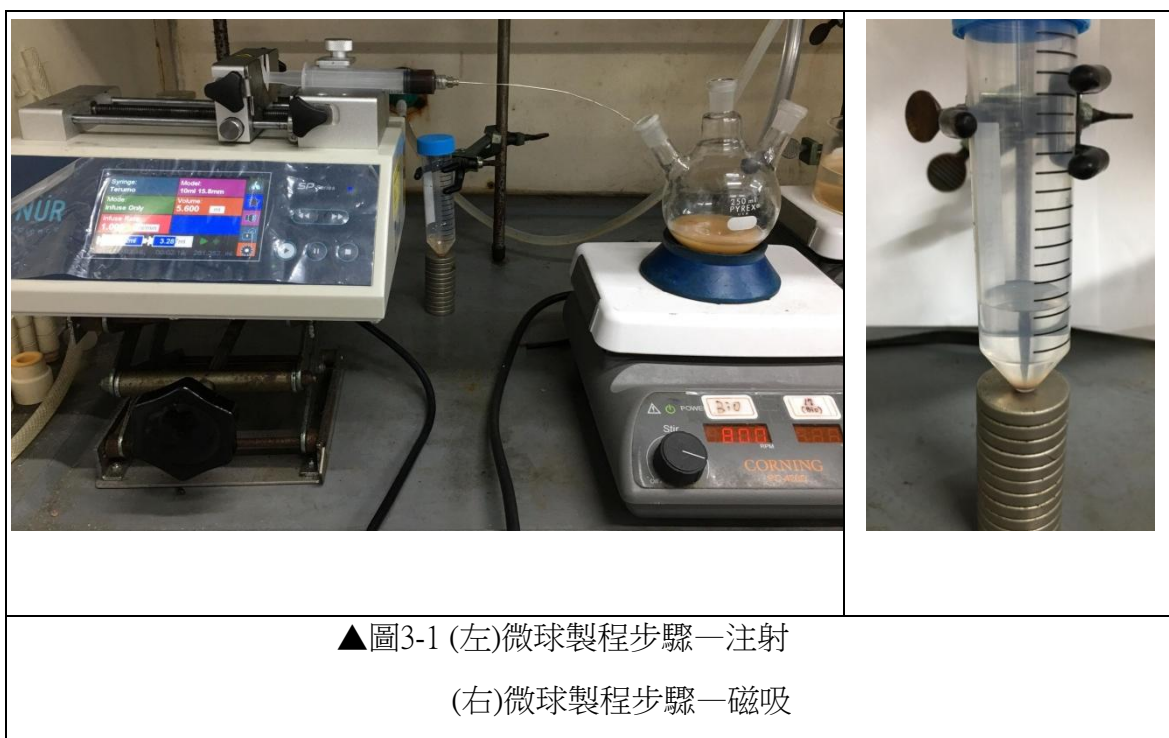
下圖為預想的磁性奈米氧化鐵纖維素微球結構圖。



(二) 實驗步驟:

1. 取NaOH 2.12 g及尿素3.30 g加入25 mL DD water中，並置於磁石攪拌器上攪拌10分鐘，轉速800 rpm。
2. 取CMCNa 0.32 g緩慢加入上述溶液中，因CMCNa溶解度小，加入時要注意是否結塊，置於磁石攪拌器上攪拌60分鐘，轉速800 rpm，其中CMCNa需完全溶解。
3. 依序混合介面活性劑(實驗二：改變介面活性劑濃度)、油相物質(實驗三：改變油相種類) 1.5 mL、TMPTGE 1.5 mL、磁性奈米氧化鐵 2 mL，注入NaOH及urea混合溶液(實驗四：改變注射速率)。

4. 在室溫下置於磁石攪拌器(實驗一：改變攪拌速率)持續攪拌96 小時，使交聯作用進行得更完全。
5. 利用強力磁鐵以磁分離的方式使磁性奈米氧化鐵纖維素微球與上清液分層，倒掉上清液，加入15 mL體積比95% 酒精: DD water為1:2的水溶液。
6. 利用多用途試管震盪器重新均勻混合氧化鐵纖維素所在溶液，再次用強力磁鐵以磁力的方式將磁性奈米氧化鐵纖維素微球收集至離心管底部，靜置15分鐘後倒掉上清液，重複步驟8次。
7. 加入15 mL DD water至離心管內，以多用途試管震盪器混合均勻後以光學顯微鏡初步判斷微球外表型態、粒徑大小。
8. 將離心管放至桌上型冷凍乾燥機，移去溶劑，得到粉末狀產物磁性奈米氧化鐵纖維素微球。



(二)參數調控組別:

	實驗內容	實驗組別	操縱變因
實驗一	微球合成時磁石攪拌器攪拌速率	組別1-1	攪拌子轉速400 rpm
		組別1-2	攪拌子轉速800 rpm
實驗二	介面活性劑span 80濃度	組別2-1	span 80重量百分濃度0.0324% (span 80取0.010 g)
		組別2-2	span 80重量百分濃度0.324% (span 80取0.10 g)

		組別2-3	span 80重量百分濃度3.24% (span 80取1.032 g)
實驗三	油相種類的改變	組別3-1	礦物油1.5 mL
		組別3-2	甲苯1.5 mL
實驗四	磁性奈米氧化鐵與油相溶液 混合液注射速率	組別4-1	注射速率每分鐘1 mL
		組別4-2	注射速率每分鐘5 mL
		組別4-3	注射速率每分鐘0.5 mL
實驗五	最終合成參數之磁性奈米氧化鐵纖維素微球重複性實驗	組別a	同磁性奈米氧化鐵纖維素微球最終合成參數
		組別b	
		組別c	
		組別d	
實驗六	以磁性奈米氧化鐵纖維素微球最終參數合成纖維素空包彈微球	組別6	將磁性奈米氧化鐵 2 mL改為同體積之甲苯

五、磁性奈米氧化鐵纖維素微球細胞貼覆效果及磁分離能力測試

(一)實驗介紹:

在合成出粒徑大小與市售微球相近的磁性奈米化鐵纖維素微球後，本研究實際將微球應用於CbMSC細胞培養，以證實細胞能夠貼附於透過乳化法合成的磁性奈米氧化鐵纖維素微球，並能夠在加入胰蛋白酶使細胞自微球上脫落後，利用磁吸法分離細胞及微球。

(二)實驗組(使用磁性奈米氧化鐵纖維素微球培養細胞)實驗步驟:

1. 取0.1 g之磁性奈米氧化鐵纖維素微球。
2. 以10 mL PBS洗滌2次，每次靜置3分鐘後，將微球至於10 mL PBS中。
3. 以磁吸法使微球沉降後，放入高溫高壓蒸氣滅菌器中滅菌。
4. 利用強力磁鐵吸引微球移除上清液後，將CbMSC及磁性奈米氧化鐵纖維素微球置於裝有10 mL 細胞培養基的50 mL離心管中。
5. 將裝有細胞及微球的離心管放入細胞培養搖床。
6. 以光學顯微鏡觀察細胞貼附於微球之情形。
7. 利用強力磁鐵移除細胞培養基後，加入0.5 mL 胰蛋白酶，靜置5分鐘。
8. 加入2 mL 細胞培養基後，觀察以強力磁鐵磁吸分離細胞與微球之情形。

(三)對照組(使用市售微球Cytodex®3培養細胞)實驗步驟:

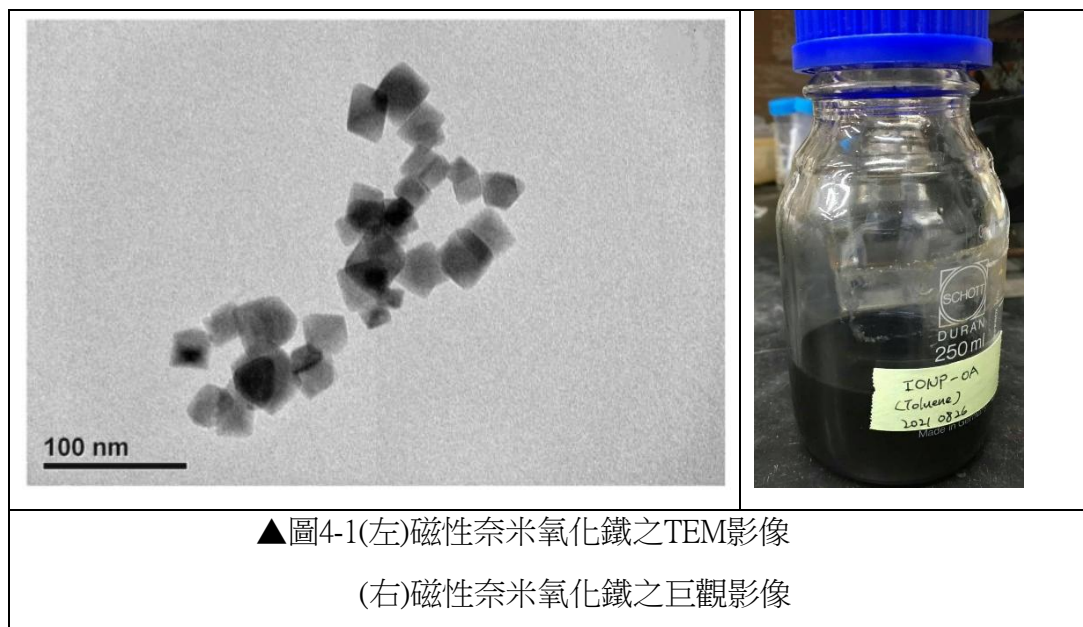
1. 取0.1 g之Cytodex®3微球。

2. 將Cytodex® 3微球靜置於裝有10 mL PBS之離心管3 小時。
3. 於高溫高壓蒸氣滅菌器滅菌後，以1000 rpm之轉速離心5 分鐘後倒掉上清液。
4. 將CbMSC及Cytodex®3微球置於裝有10 mL 細胞培養基的離心管中。
5. 將裝有細胞及微球的離心管放入細胞培養搖床。
6. 以光學顯微鏡觀察細胞貼附於微球之情形。
7. 加入0.5 mL 胰蛋白酶，靜置5 分鐘。
8. 以1000 rpm之轉速離心5 分鐘，觀察微球與細胞分離情形。

肆、研究結果

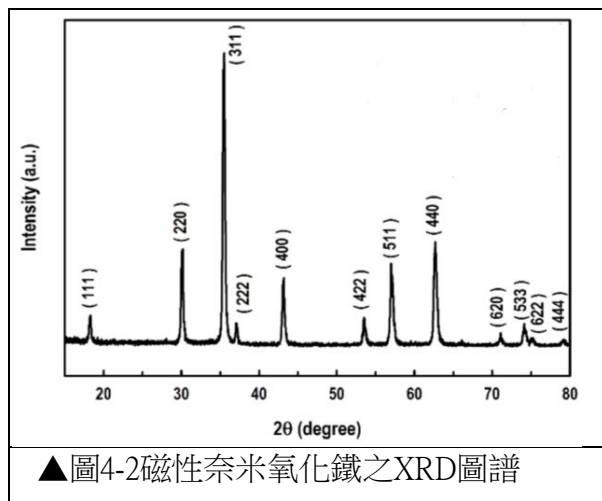
一、磁性奈米氧化鐵之合成

(一)以穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察磁性奈米氧化鐵粒徑



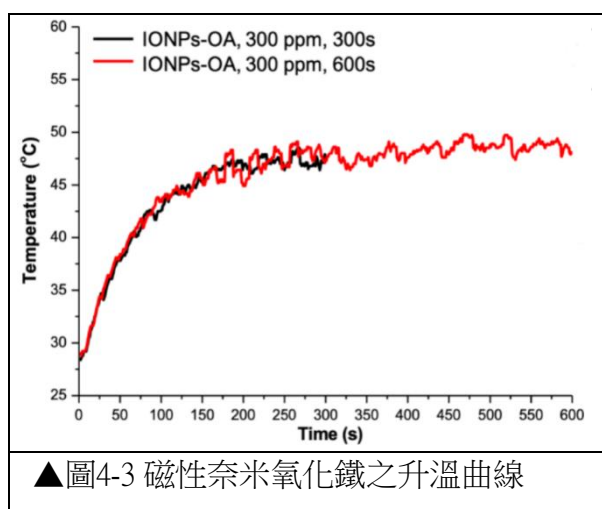
在設定共沉澱法合成磁性奈米化鐵之合成目標時，有鑑於微球目標是應用在幹細胞培養之再生醫學領域，因此在搜索文獻資料時有看到林昆諒於2011年提到「所有的醫學應用必須要求這些磁性奈米粒子需要較高的磁化率，而且須小於100奈米層次並顆粒分明、生物相容性高。」，因此本研究將磁性奈米氧化鐵之合成目標設定為100 nm以下。根據TEM結果顯示，磁性奈米氧化鐵之大小位於10~20 nm之間，且形態呈現顆粒分明之方塊狀，符合目標。

(二)以X射線繞射儀分析磁性奈米氧化鐵成分



將所合成的奈米氧化鐵經過 XRD 檢測後，以origin軟體將初始數據的Angle和 Intensity數據編輯成圖4-2，接著比對資料庫JCPDS裡的75-0033編號，可以看出資料庫裡的 Fe_3O_4 之八種明顯繞射峰(111、220、311、222、400、422、511、440)和所測量的樣品之明顯繞射峰呈現一致，故可推知此利用共沉澱法所合成的奈米氧化鐵主要成分為具磁性的 Fe_3O_4 。

(三) 以紅外線熱像儀測定磁性奈米氧化鐵升溫曲線



由圖4-3可知，本研究合成出的磁性奈米氧化鐵在180 秒左右溫度開始趨於穩定，並在測試600 秒(紅線)之曲線變化後，確認其溫度約穩定於攝氏45 度上下。

(四) 以紅外線熱像儀測定磁性奈米氧化鐵光熱半生期

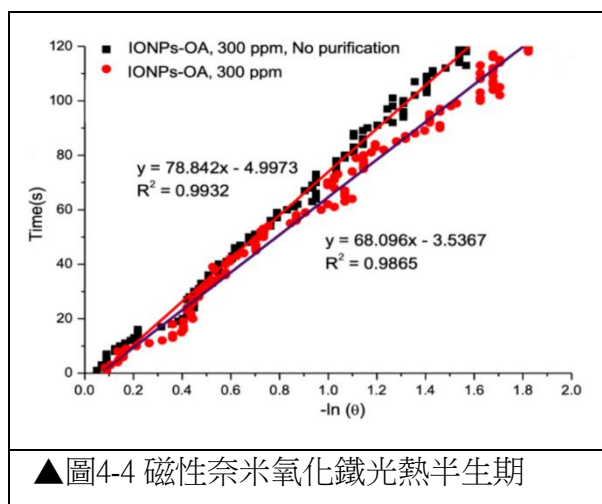
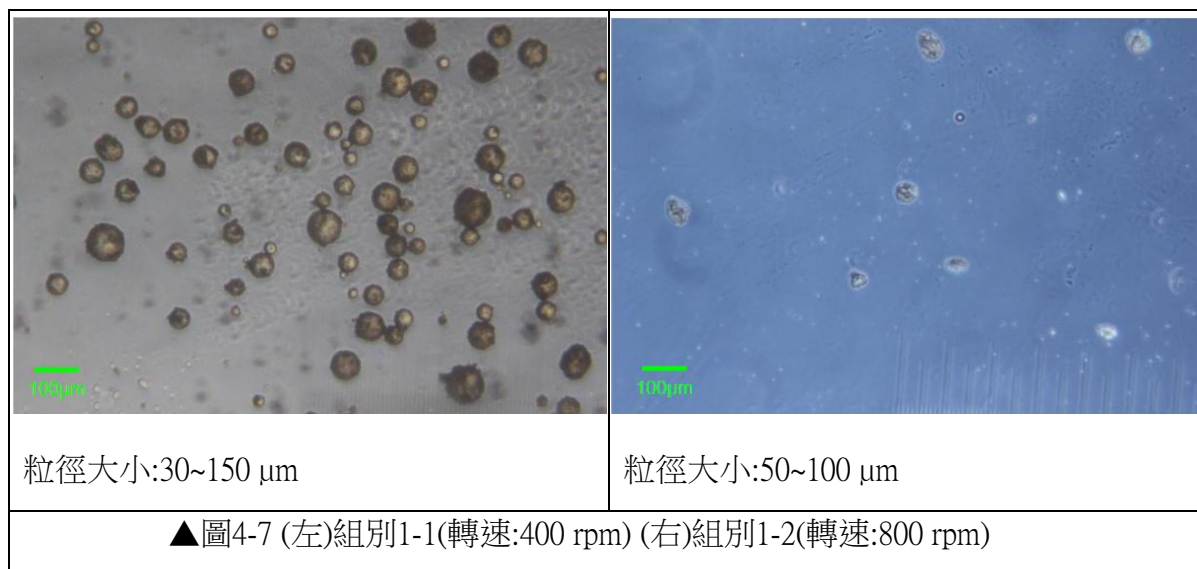


圖4-4中，黑點表示收集磁性奈米氧化鐵後並未純化的樣品；紅點表示磁性奈米氧化鐵合成後經純化的樣品。由圖可知，未經純化的組別之光熱半生期為78.842秒；經純化的組別其光熱半生期為68.096秒，兩者僅相差10.746秒。其中，本研究合成的磁性奈米氧化鐵的光熱半生期大約為68秒，此半生期有潛力使其發展為溫控載體。

二、探討各項參數對磁性奈米氧化鐵纖維素微球合成之影響

(一)實驗一:探討微球合成時攪拌速率對合成的影響



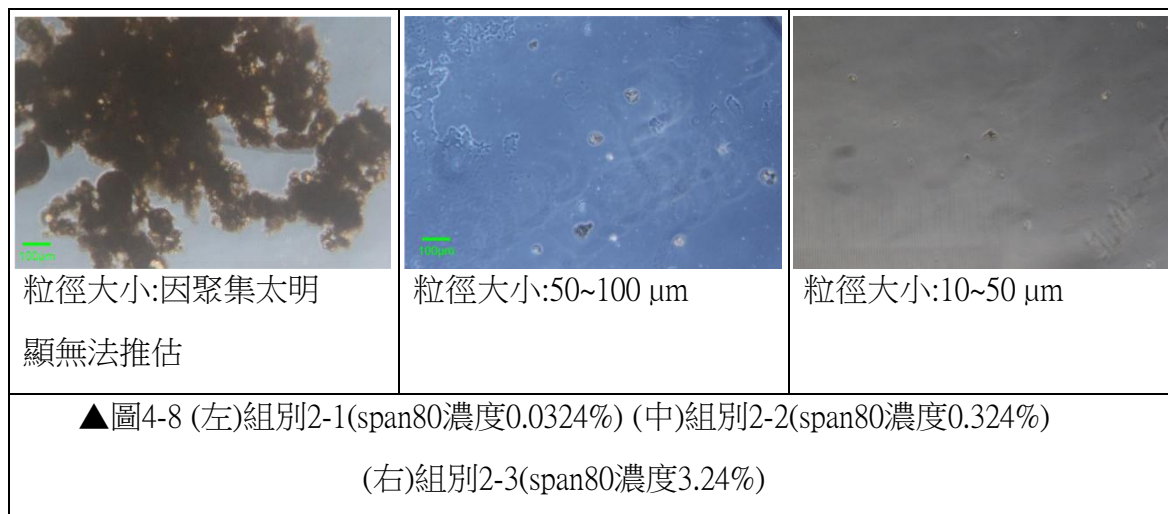
實驗結果顯示當微球合成時磁石攪拌器的攪拌速率為400 rpm時，其所合成出的磁性奈米氧化鐵纖維素微球粒徑差異極大，即使部分微球的粒徑可以到達與市售微球Cytodex®3相近的標準，但根據圖4-7之光學顯微鏡視野，仍有許多微球的粒徑大小在100 μm以下，甚至小於50 μm，因此考量微球粒徑均勻度，即使磁石攪拌器轉速為800 rpm之組別1-2合成的微球粒徑大小較小，本研究選擇以

800 rpm作為後續合成實驗中的攪拌速率。

實驗一小結論: 後續合成條件中微球合成時磁石攪拌器的攪拌速率為800rpm。

後續參數調控實驗應著重於達到增加微球粒徑的目標。

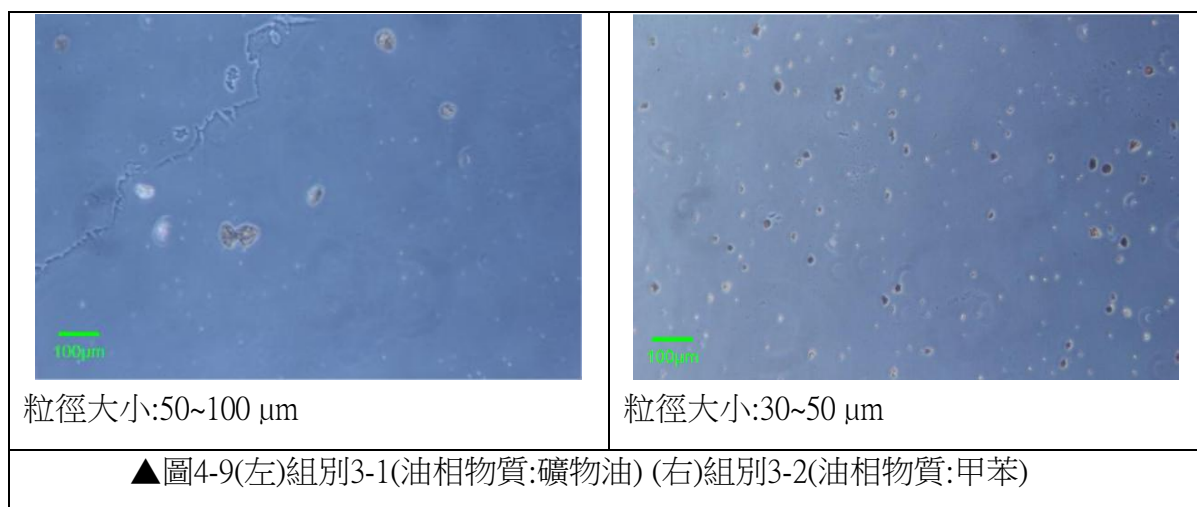
(二)實驗二:探討不同介面活性劑span80濃度對微球粒徑大小的影響



實驗發現當介面活性劑span80重量百分濃度為0.0324%時，其製備產物產生大型塊狀聚集，與市售微球Cytodex® 3之球狀型態並不相似，且本研究發現在製備期間因介面活性劑的量減少，在注射環節有困難；當介面活性劑span80重量百分濃度為3.24%時，其所合成出的微球粒徑明顯小於組別2-2(重量百分濃度0.324%)所合成出的磁性奈米氧化鐵纖維素微球粒徑。綜合三者數據比較，本研究選擇以0.324%作為合成條件中的介面活性劑span80重量百分濃度。

實驗二小結論: 後續合成條件中介面活性劑span80重量百分濃度為0.324%。

(三) 實驗三:改變油相種類

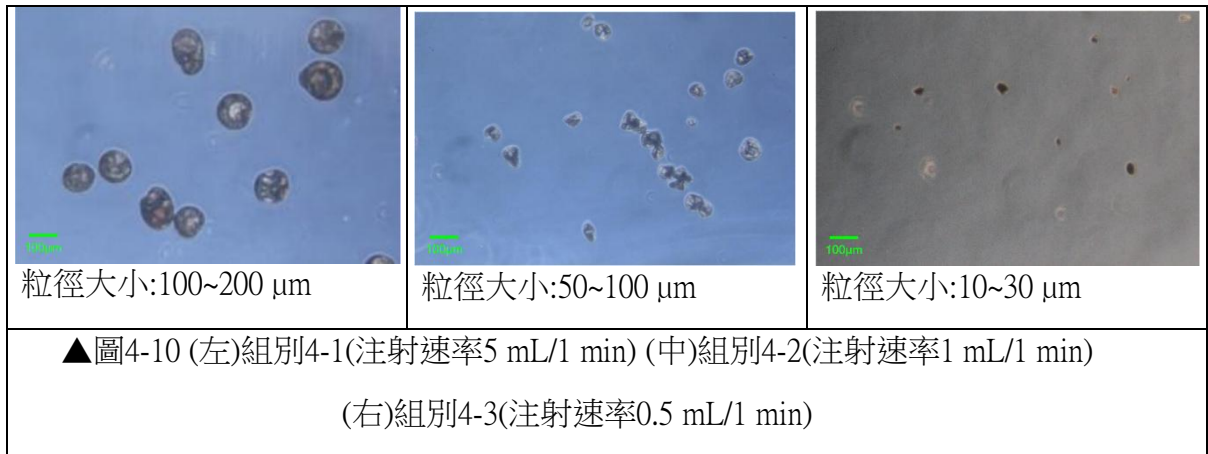


實驗結果顯示，油相物質選用甲苯合成之磁性奈米氧化鐵纖維素微球成品，透過光學顯微鏡搭配物鏡測微尺初步觀察，粒徑大小位於30~50 μm 之間，小於

以礦物油當作油相物質的微球成品。

實驗三小結論: 後續合成條件中選用礦物油作為微球合成之油相物質。

(四)實驗四:改變氧化鐵與油相混合溶液之注射速率



實驗發現當以每分鐘5 mL作為注射速率時，其所合成出的磁性奈米氧化鐵纖維素微球粒徑經過光學顯微鏡觀察，發現其粒徑大小約介於100~200 μm之間；當以每分鐘1 mL作為注射速率時，合成之微球粒徑為50~100 μm，小於注射速率每分鐘5 mL的組別4-1；當磁性奈米氧化鐵與油相混合溶液之注射速率為每分鐘0.5 mL時，其所合成出的微球粒徑大小明顯小於以每分鐘1 mL作為注射速率所合成出的氧化鐵纖維素微球粒徑，其粒徑僅10~30 μm。其明顯呈現了注射速率越快，微球粒徑越大的趨勢。

根據實驗結果，注射速率每分鐘5 mL的組別較組別4-2(注射速率每分鐘1 mL)所合成出的磁性奈米氧化鐵纖維素微球更符合市售微球Cytodex® 3之粒徑大小(141~211μm)，故選擇每分鐘5 mL作為最終合成條件中氧化鐵與油相混合溶液之注射速率，並進一步進行SEM拍攝以更精準地測量其粒徑大小。

實驗四小結論: 最終合成條件中氧化鐵與油相混合溶液之注射速率為每分鐘5 mL。


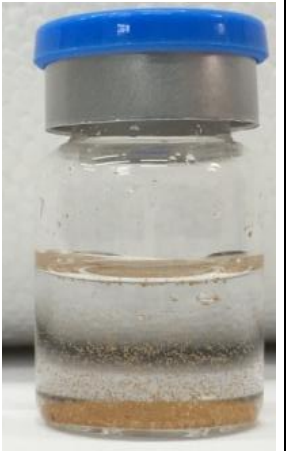

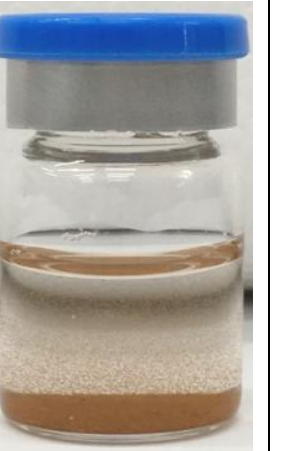
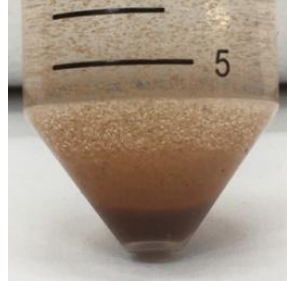
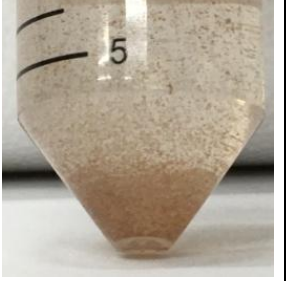
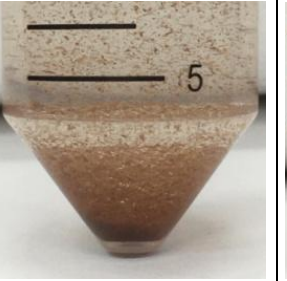
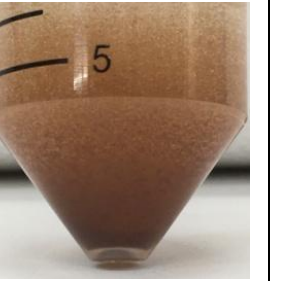


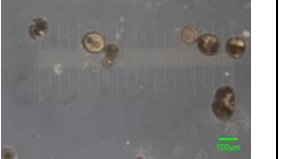
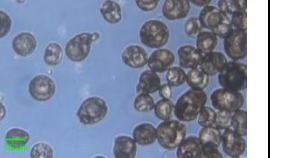
四、磁性奈米氧化鐵纖維素微球最終合成參數成品與纖維素空包彈微球

(一)確認最終磁性奈米氧化鐵纖維素微球合成之各項參數

磁石攪拌器攪拌子轉速	800 rpm
介面活性劑span80重量百分濃度	0.324%
油相種類	礦物油
油相混合液注射速率	5 mL/1 min

(二)最終合成參數之磁性奈米氧化鐵纖維素微球之重複性實驗

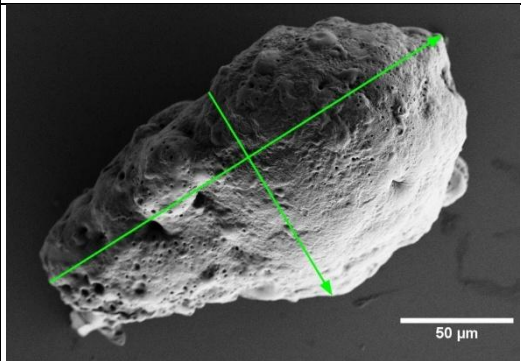
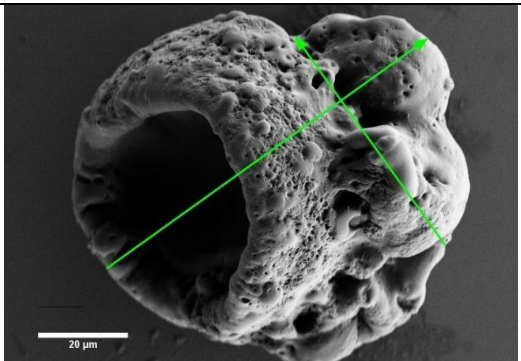
1.巨觀及光學顯微鏡觀察結果

組別a	組別b	組別c	組別d
			
			
			
粒徑:90~150 μm	粒徑:120~200 μm	粒徑:100~180 μm	粒徑: 90~200 μm

▲圖4-11 以最終合成參數合成之磁性奈米氧化鐵纖維素微球

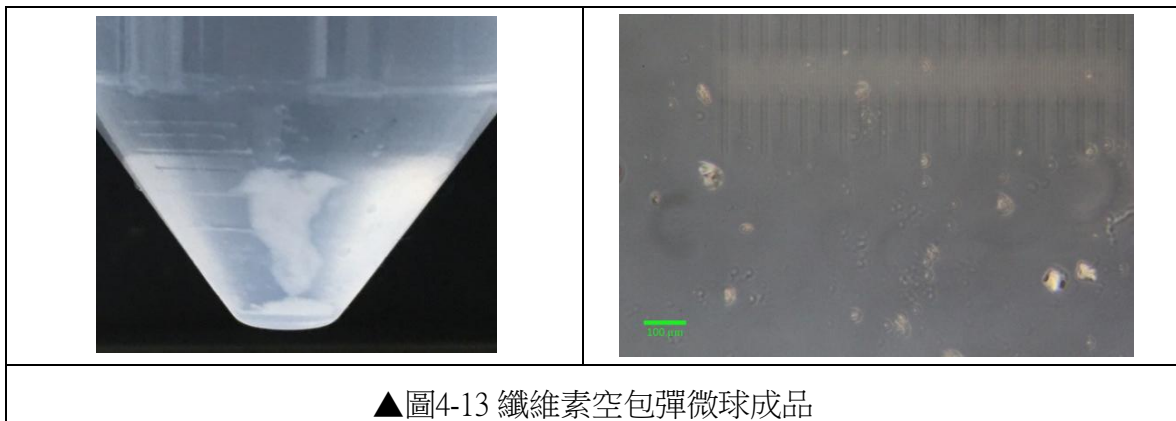
利用光學顯微鏡搭配物鏡測微尺測量四組使用最終合成參數所合成之磁性奈米氧化鐵纖維素微球組別，發現其粒徑大小皆分布在100~200 μm之間，與市售微球Cytodex®3之粒徑大小 (141~211 μm) 相近。

2. 掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察結果

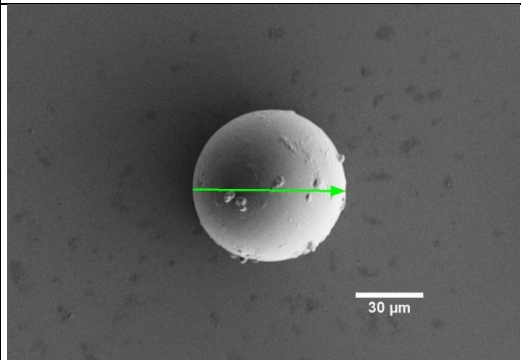
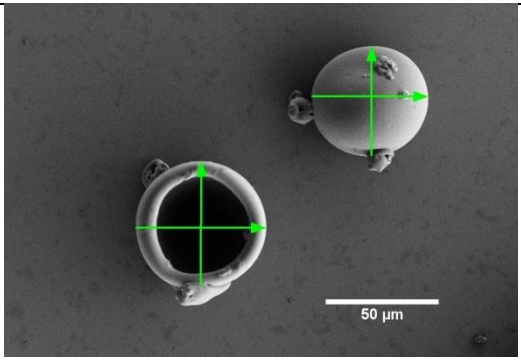
	組別a-1	組別a-2
SEM 影像		
粒徑 (μm)	長邊: 204.886, 短邊: 104.922	長邊: 87.470, 短邊: 57.053
▲圖4-12氧化鐵纖維素微球最終合成參數成品於SEM視野下之型態		

(三)纖維素空包彈微球成品

1. 巨觀及光學顯微鏡觀察結果



2. 掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察結果

	組別5-1	組別5-2	
SEM 影像			
粒徑 (μm)	長邊: 67.781, 短邊: X	長邊: 57.778 短邊: 55.113	長邊: 51.778 短邊: 49.112
▲圖4-14纖維素空包彈微球成品於SEM視野下之型態			

以溶劑塗佈於1 cm*1 cm的矽晶片表面後進行真空及表面鍍金之處理，並以

SEM觀測，發現其粒徑為長邊204.886 μm 、短邊104.922 μm 與市售微球Cytodex® 3之粒徑大小 (141~211 μm) 相近，然而在微觀視野下可以看到其微球形狀並非球體而是呈現不規則狀，但是因為本研究並未探討微球形狀與細胞培養成效的關係，因此微觀形狀的差異暫不列入探討。此外，組別a-2之影像為未成功包覆到磁性奈米氧化鐵之纖維素微球，其中間凹槽應為原包覆磁性奈米氧化鐵之處，由此可知透過乳化法合成磁性奈米氧化鐵纖維素微球是可以成功使纖維素包覆磁性奈米氧化鐵的方法。

在纖維素空包彈微球成品拍攝掃描式電子顯微鏡的部分，其粒徑大小在50~60 μm 左右，可以看到它的微觀形狀與市售微球Cytodex®3相似，接近球體，因此可以斷定此組纖維素空包彈微球成品是磁性奈米氧化鐵纖維素微球之良好對照，且可以驗證本研究的微球製程是可以被肯定的一微球中央確實有形成包覆磁性奈米氧化鐵的空間。

(四)以元素分析儀測定並推算氧化鐵纖維素微球中鐵離子占比

1. 磁性奈米氧化鐵纖維素微球最終合成參數成品

	Weight(mg)	N%	C%	H%	O%
組別a-1-1	4.017	0.11	48.58	7.88	X
組別a-2-1	3.303	0.10	48.47	7.84	X
組別a-1-2	2.162	X	X	X	32.19
組別a-2-2	2.050	X	X	X	32.22

2. 纖維素空包彈微球成品

	Weight(mg)	N%	C%	H%	O%
組別6-1-1	2.516	0.00	50.11	8.10	X
組別6-2-1	3.094	0.00	50.00	8.15	X
組別6-1-2	2.335	X	X	X	32.36
組別6-2-2	2.292	X	X	X	32.26

利用元素分析儀所測定的數據，本研究回推概算該微球樣本中鐵離子所含的重量，其中算法如下：

我們先假設微球中的成分分為磁性奈米氧化鐵和磁性奈米氧化鐵以外的空殼部分。接下來，因為碳在空殼中所佔的比重是固定的，因此求出一值k，使得當空殼組別所含C的重量乘以k時與磁性奈米氧化鐵組別中所含C的重量相同：

$$k=(W_{\text{球}}*C_{\text{球}}\%)/(W_{\text{空}}*C_{\text{空}}\%)$$

($W_{\text{球}}$ =磁性奈米氧化鐵組別的總重； $W_{\text{空}}$ =空殼組別的總重； $C_{\text{球}}\%$ =磁性奈米氧化鐵組別中所含C的重量百分率； $C_{\text{空}}\%$ =空殼組別中所含C的重量百分率)

接著，將空殼組別的總重量乘以同一k值，此值即為磁性奈米氧化鐵組別中所含空殼重，再將磁性奈米氧化鐵組別的總重減去前述即為其所含 Fe_3O_4 的重量($W_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$):

$$W_{\text{Fe}_3\text{O}_4}=W_{\text{球}}-W_{\text{空}}*k$$

最後，將磁性奈米氧化鐵組別所含 Fe_3O_4 的重量除以磁性奈米氧化鐵組別的總重，便得到磁性奈米氧化鐵組別所含 Fe_3O_4 的重量百分率(X):

$$X=W_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/W_{\text{球}}$$

通過簡化上述的算式可得到磁性奈米氧化鐵纖維素微球中 Fe_3O_4 所占重量百分比=

$$X=1-\frac{\text{磁性奈米氧化鐵組別中C的重量百分比}}{\text{空殼組別中C的重量百分比}}$$

同理，藉H在磁性奈米氧化鐵及空殼組別分別所占重量百分比計算一次。

最終所得數據如下:

數據組別	由C比重算出的 Fe_3O_4 比重	由H比重算出的 Fe_3O_4 比重
a-1-1&6-1-1	3.033%	2.716%
a-2-1&6-1-1	2.840%	3.131%
a-1-1&6-2-1	3.273%	3.210%
a-2-1&6-2-1	3.060%	3.804%

將上述八組計算結果再次平均得到 Fe_3O_4 比重是3.159%，換算含有2.288%鐵離子。

(五)以電感耦合電漿質譜儀(ICP-MS)分析磁性奈米氧化鐵纖維素微球中鐵離子含量

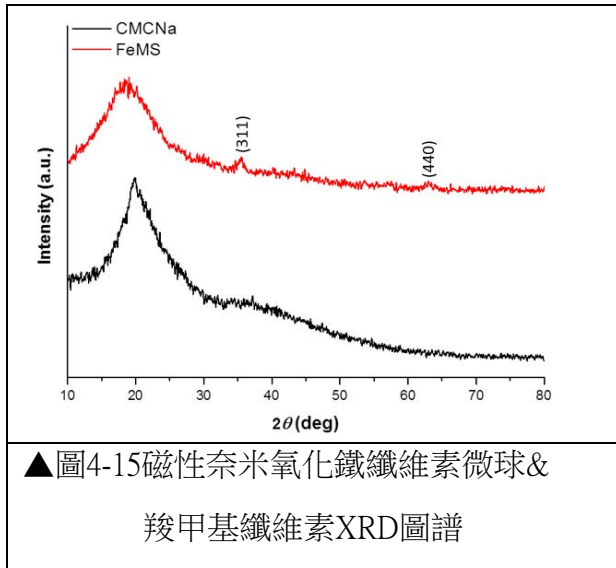
1. 磁性奈米氧化鐵纖維素微球最終合成參數成品

	送測樣品	樣品中鐵離子
重量(g)	0.01400	0.00123

透過ICP-MS數據結果分析，可推算磁性奈米氧化鐵纖維素微球所含鐵離子重量百分比為 8.786%。

(六)以X射線繞射儀(XRD)分析磁性奈米氧化鐵纖維素微球晶型

1. 磁性奈米氧化鐵纖維素微球最終合成參數成品



將磁性奈米氧化鐵纖維素微球(FeMS)經過 XRD 檢測後繪製成圖4-15，接著比對羧甲基纖維素(CMCNa)XRD圖譜，可以看出其與羧甲基纖維素所產生的311及440繞射峰相符，且訊號極為明顯。後續本研究將用FeMS的圖譜數據和先前測得的磁性奈米氧化鐵進行比對和討論。

五、磁性奈米氧化鐵纖維素微球之細胞貼附效果及磁分離能力測試

(一)以光學顯微鏡觀察細胞貼附情形

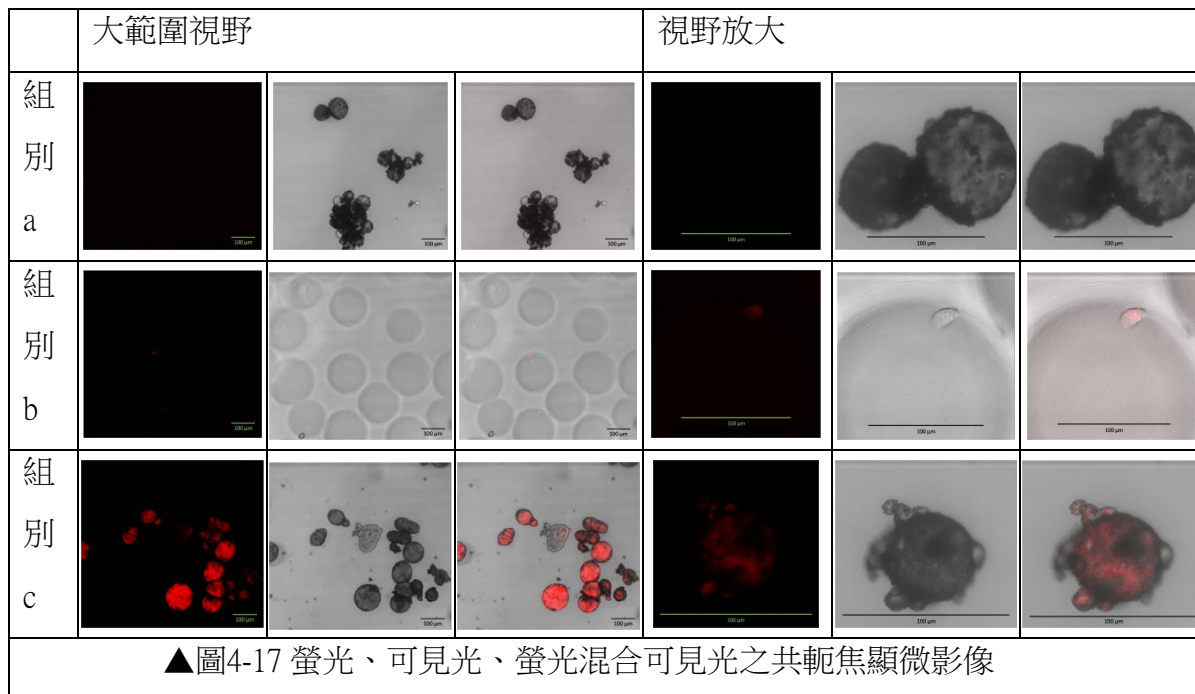


▲圖4-16 (左)CbMSC貼附於磁性奈米氧化鐵微球
(右)CbMSC貼附於Cytodex®3

分別以磁性奈米氧化鐵纖維素微球及Cytodex®3培養CbMSC20 小時，透過光學顯微鏡可以觀察到細胞在兩組微球上的貼附情形，如圖4-16所示，可發現在CbMSC細胞在Cytodex®3有明顯的貼附(如箭頭標示處)，而在磁性奈米氧化鐵纖維素微球上，因微球包覆磁性奈米氧化鐵顏色較深，僅能在微球側面觀察到細胞的貼附(如箭頭標示處)，因此本研究進一步以螢光顯微鏡觀察細胞於兩種微球上的貼附情形。

(二)以倒立式雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察細胞貼附情形

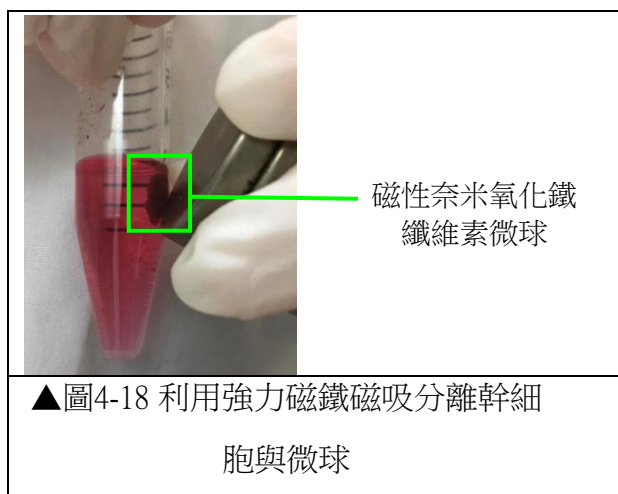
本研究以掃描式共軛焦顯微鏡觀察三個組別，拍攝對象分別是組別a:磁性奈米氧化鐵纖維素微球；組別b:CbMSC培養於Cytodex®3；組別c:CbMSC培養於磁性奈米氧化鐵纖維素微球。



由圖4-17，組別a(磁性奈米氧化鐵纖維素微球)之共軛焦顯微影像並未看到紅色螢光，以此對照組別c所顯示的紅色螢光並非微球本身之訊號；比較組別b及c之共軛焦顯微影像可知，兩組微球皆有CbMSC貼附於表面，對照組b(CbMSC培養於Cytodex®3)，可得出「CbMSC可貼附於磁性奈米氧化鐵纖維素微球」之結果。

(三)以磁吸法分離細胞與微球之情形

在實驗組(CbMSC培養於磁性奈米氧化鐵纖維素微球)中加入胰蛋白酶使CbMSC從微球表面脫落後，本研究進行磁性奈米氧化鐵纖維素微球之磁分離測試。透過測試結果(圖4-18)可知，細胞貼附於表面的磁性奈米氧化鐵纖維素微球具磁分離能力，可輕易的被強力磁鐵吸引，藉以達到分離微球與細胞之目的。



▲圖4-18 利用強力磁鐵磁吸分離幹細胞與微球

(四)CbMSC細胞回收率計算

在磁性奈米氧化鐵纖維素微球磁分離測試實驗後，本研究將兩組細胞培養實驗分別進行不同處理。將實驗組(CbMSC培養於磁性奈米氧化鐵纖維素微球)以強力磁鐵吸引，取出上清液部分，經處理後利用細胞計數儀算取細胞總數；將對照組(CbMSC培養於Cytodex®3)放入離心機以1000 rpm之轉速離心5分鐘，取出上清液並計算所含細胞數。最後，以兩組之上清液所含細胞總數推算細胞回收率。

	原始細胞數目 (個)	三微培養後之 細胞數目(個)	細胞回收率
實驗組	2.00×10^6	1.62×10^6	81.00%
對照組	2.00×10^6	4.89×10^5	24.45%

伍、討論

一、各項參數對磁性奈米氧化鐵纖維素微球合成之探討

(一) 改變微球合成時磁石攪拌器的攪拌速率

在經過文獻搜索以後，本研究搜尋到不同磁石攪拌器攪拌子轉速會產生不同型態的微球，因此本研究首先以磁石攪拌器攪拌子轉速著手。磁石攪拌器提供磁性奈米氧化鐵與油相混合溶液滴入羧甲基纖維素溶液後的剪切力來源，其中磁石攪拌器的攪拌速率越快，剪切力越大，因此，我們預期攪拌子轉速400 rpm的組別1-1因受剪切力小於組別1-2攪拌子轉速800 rpm，微球粒徑會較大。

根據圖4-7實驗結果顯示，組別1-1:攪拌子轉速400 rpm的微球成品的確導致

粒徑大小增加，然而其呈現的不均勻粒徑大小分布不符合本研究需要達成的微球優化目標，因為不均勻的粒徑大小分布可能會影響後續細胞培養使其呈現差異，因此即使400 rpm之攪拌速率成功使部分微球粒徑增加，本研究仍需尋找另一個能均勻增加微球粒徑的方法。

(二) 改變介面活性劑span80重量百分濃度

實驗一探討磁石攪拌器攪拌子轉速對於微球合成的影響後，發現組別1-1(轉速:400 rpm)有微球粒徑差異太大的問題，而組別1-2(轉速:800 rpm)則是微球粒徑明顯小於市售Cytodex3微球，因此本研究後續參數探討將著重於微球粒徑大小的優化。

乳化法合成微球的實驗概念是將油相物質加入水相溶液中，其中介面活性劑影響油水交界面之性質，因此希望透過調整介面活性劑span 80濃度，達到增加微球粒徑的目標。span80作為水相羧甲基纖維素包覆溶於油相的磁性奈米氧化鐵之介面活性劑，我們推測span80濃度越高，乳化效果越佳，越容易形成油水交界面，故微球粒徑會越小，組別2-1:span80重量百分濃度0.0324%之微球粒徑 >組別2-2: span 80重量百分濃度0.324%之微球粒徑 >組別2-3: span 80重量百分濃度3.24%之微球粒徑。

圖4-8實驗結果顯示，當span80濃度為3.24%時，其微球粒徑明顯小於組別2-2濃度0.324%所合成之微球粒徑，與預期結果相符。當span80濃度為0.0324%時，其製備產物產生大型塊狀聚集，雖然粒徑大小隨span80濃度越高而增加與預期的結果相同，但其呈現的型態為巨型塊狀沉澱，此型態與市售微球Cytodex® 3相異之大，因此，比較上述三組實驗結果後，本研究選擇以重量百分濃度0.324%作為乳化法中介面活性劑span80之最終濃度。

(三) 改變油相種類(礦物油與甲苯之比較)：

在確定攪拌速率選用800 rpm，介面活性劑span 80濃度選用0.324%以後，下一參數調控實驗是透過改變油相，嘗試合成具有更大粒徑的磁性奈米氧化鐵纖維素微球。比較甲苯與礦物油，甲苯的疏水性較大，有助於氧化鐵在水相中內聚，而礦物油的黏滯度(719.7 $\mu\text{Pa} \cdot \text{s}$)較甲苯(554.2 \pm 3.3 $\mu\text{Pa} \cdot \text{s}$)大，且礦物油的極性(43.7)亦比甲苯的極性(2.4)大，基於以上三點不同性質的比較，本研究選用礦物油和甲苯作為改變油項參數之操縱變因。

透過圖4-9光學顯微鏡觀察，實驗結果顯示油相物質為礦物油的組別3-1實驗

成品之微球粒徑大小皆位於50~100 μm 之間，油相物質為甲苯的組別3-2之微球成品粒徑位於30~50 μm 之間，其中組別3-1之微球粒徑較大，且此微球合成的最終目標是應用於細胞培養，考慮甲苯對於細胞毒性的影響，雖然可以透過清洗的方式將甲苯抽乾，但其過程極其繁雜，且若以甲苯作為油相物質卻又加以抽乾，可能會降低微球本身的穩固性，因此同時考量合成微球之粒徑大小及細胞培養之應用，磁性奈米氧化鐵纖維素微球最終合成參數應選擇以礦物油作為微球合成之油相性質。

(四) 改變氧化鐵與油相混合溶液之注射速率

嘗試改變油相種類、介面活性劑濃度以增加微球粒徑未果後，本研究再次回到剪切力的討論。我們認為，當磁性奈米氧化鐵與油相混合溶液滴入羧甲基纖維素溶液受到磁石攪拌器提供的剪切力後，滴進速率越慢，每滴油珠有更長的時間會受磁石攪拌器作用分散成小油珠，因此，在交聯劑TMPTGE尚未與羧甲基纖維素交聯完全時，小油珠會較滴入速率快的組別被分散的更細小，故所形成之微球粒徑應較小。綜合以上想法，本研究嘗試不同滴入速率之變因，並預期微球粒徑大小結果為 組別4-1:注射速率每分鐘5mL>組別4-2:注射速率每分鐘1mL>組別4-3:注射速率每分鐘0.5mL。

由圖4-10可知，實驗結果顯示，微球粒徑大小組別4-1:注射速率每分鐘5mL最大，組別4-2注射速率每分鐘1 mL次之，組別4-3:注射速率每分鐘0.5 mL最小，與預期結果相符，並且組別4-1(注射速率每分鐘5 mL)合成出的微球與Cytodex®3微球的粒徑大小相近，達到實驗目標，因此，本研究選擇以每分鐘5 mL作為微球合成中氧化鐵與油相溶液混合液注入羧甲基纖維素溶液的注射速率。

二、磁性奈米氧化鐵纖維素微球成分檢測

(一)磁性奈米氧化鐵、CMCNa、磁性奈米氧化鐵纖維素微球之XRD圖譜比較

由圖4-2 及圖4-15 的三條圖譜線，可以在磁性奈米氧化鐵纖維素微球(FeMS)看到位於311及440的繞射峰較為明顯，其可以作為磁性奈米氧化鐵纖維素微球中包覆磁性奈米氧化鐵之佐證。

然而，磁性奈米氧化鐵在FeMS的圖譜中很明顯訊號微弱，幾乎被羧甲基纖維素的繞射峰遮蔽，使得FeMS中僅能觀察到磁性奈米氧化鐵311及440的繞射峰。但是透過這樣的XRD圖譜呈現，可以得到另一個結論: 磁性奈米氧化鐵纖維素微球中，羧甲基纖維素外殼包裹得十分嚴實，使大部分磁性奈米氧化鐵訊號被遮

擋，由於當磁性奈米氧化鐵纖維素微球被實際應用到細胞培養的時候，磁性奈米氧化鐵外漏的現象有可能會對細胞造成傷害，因此磁性奈米氧化鐵被包裹得十分緊密的事實是我們樂見的。

(二) 比較ICP-MS之測定結果與元素分析儀之結果推算的鐵離子含量

元素分析結果推算磁性奈米氧化鐵纖維素微球中鐵離子所佔之重量百分比為2.288%；ICP-MS結果呈現鐵離子所佔之重量百分比為8.786%。

在元素分析推算數據中，因本研究無法確保磁性奈米氧化鐵纖維素微球所含之氧化鐵皆以 Fe_3O_4 形式存在，故僅透過簡單化學定量無法精準計算，因此元素分析結果經推算後會與ICP-MS測定結果產生一定誤差。由此推之ICP-MS所測定的磁性奈米氧化鐵纖維素微球中鐵離子所佔之重量百分比應較為正確。

三、磁性奈米氧化鐵纖維素微球之細胞貼附及回收率

(一) 細胞貼附情形

由圖4-16、4-17可知，無論透過光學顯微鏡或是倒立式雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察，皆可明顯看到幹細胞貼附於磁性奈米氧化鐵纖維素微球，由此證明利用乳化法製成的磁性奈米氧化鐵纖維素微球並沒有因為加入TMPTGE交聯，或是如掃描式電子顯微鏡結果所示微球非呈現圓形、表面有些許孔洞等因素，導致CbMSC無法貼附於其表面。

(二) 細胞回收率

在細胞回收率的實驗中，對照組(CbMSC培養於Cytodex®3)的細胞回收率僅有24.45%，其原因應為本研究並未設計使用透析膜進行細胞與微球的分離，而是僅用了轉速1000 rpm之5分鐘離心的方式分離上清液，使得密度相較於細胞培養基較大之CbMSC及Cytodex®3沉降於50 mL離心管底部，細胞並未位於上清液中，因此Cytodex®3在未使用透析膜的情況下，細胞回收率低。

反觀實驗組(CbMSC培養於磁性奈米氧化鐵纖維素微球)，利用強力磁鐵吸引與細胞分離的磁性奈米氧化鐵纖維素微球後，取出上清液部分，其中細胞回收率高達81%，過程快速簡便且成本極低。

通過兩組實驗之細胞回收率比較可發現，Cytodex®3之細胞培養方法需透析膜的協助方可提高至一定成效，而磁性奈米氧化鐵纖維素微球可利用磁吸法達到分離細胞與微球的效果，驗證本研究達成「利用微米載體之磁性能力分離幹細胞以達到取代市售Cytodex所需的細胞分離透析膜」之研究目標。

陸、結論

- 一、藉共沉澱法合成奈米級磁性氧化鐵，作為氧化鐵纖維素微球結構之一部分。
- 二、磁性奈米氧化鐵之成分經過X射線繞射儀分析後進行比對，確認主要為具磁性的 Fe_3O_4 ，並經ICP-MS分析微球中含鐵離子為8.786%，此確保了包覆磁性奈米氧化鐵以實現磁吸收集的目標。
- 三、根據實驗，將「磁性奈米氧化鐵」包覆在纖維素的想法經過驗證是可行方案，利用乳化法將存在於油相介質的磁性奈米氧化鐵包覆在水相羧甲基纖維素中，並透過TMPTGE交聯劑使微球結構更加穩固，確保磁性奈米氧化鐵的包覆不會使微球裂解導致磁性奈米氧化鐵外漏，且利用強力磁鐵磁吸收集微球成品方式十分簡便。
- 四、研究顯示調整磁石攪拌器攪拌子轉速800 rpm、介面活性劑span80濃度0.324%、油相物質選定礦物油、油相混合液注射速率每分鐘5 mL等四項優化參數，可以合成出與Cytodex®3微球具相近粒徑大小的磁性奈米氧化鐵纖維素微球。
- 五、本研究完成磁性奈米氧化鐵纖維素微球之CbMSC貼附能力及磁分離能力測試，驗證磁性奈米氧化鐵纖維素微球做為幹細胞培養的三維微米載體之可行性。
- 六、在未來展望中，由磁性奈米氧化鐵的光熱半生期可知，其光熱性質顯示未來此包覆磁性奈米氧化鐵之纖維素微球有潛力發展為有助於細胞的貼附和脫離的溫控載體；另外，可以視需要在微球表面進行修飾，增加其生物相容性。

柒、參考文獻資料

- 一、Marta E Castro-Manrreza, Juan J Montesinos. (2015). Immunoregulation By Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Hindawi*. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/394917/>
- 二、Andria N. Smith, Elise Willis, Vincent T. Chan, Lara A. Muffley, F. Frank Isik, Nicole S. Gibran, and Anne M. Hocking. (2010). Mesenchymal Stem Cells Induce Dermal Fibroblast Response to Injury. *ScienceDirect*, 316, 1, 48-54. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482709003449?via%3Dihub>
- 三、Luis Rodriguez-Menocal, Shahjahan Shareef, Marcela Salgado, Arsalan Shabbir, and Evangelos Van Badiavas corresponding author. (2015). Role of Whole Bone Marrow, Whole Bone Marrow Cultured Cells, and Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wound Healing. *PMC*. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4414366/>
- 四、Mohsen Khosravi Maharlooeei, Mansooreh Bagheri, Zhabiz Solhjoui, Ahmad Monabati, Ali Noorafshan, Gholamhossein Ranjbar Omrani. (2011). Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cell (AD-MSC) Promotes Skin Wound Healing in Diabetic Rats. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 93, 2, 228-234. Retrieved February 6, 2022, from [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(11\)00223-3/fulltext](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(11)00223-3/fulltext)
- 五、Ján Vojtassák, L'ubos Danisovic, Miroslav Kubes, Dusan Bakos, L'ubomír Jarábek, Marcela Ulicná, Milan Blasko. (2006). Autologous Biograft and Mesenchymal Stem Cells in Treatment of the Diabetic Foot. *National Library of Medicine*. Retrieved February 6, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17159798/>
- 六、Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Shigehiro Ikemoto, Kazuya Aoyagi, Akira Takeda, Eiju Uchinuma. Osteogenic Potential of Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stromal Cells Cultured with Umbilical Cord Blood-derived Autoserum. (2012). *ScienceDirect*, 40, 8, 768-772. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1010518212000480>
- 七、M Takewaki, M Kajiya, K Takeda, S Sasaki, S Motoike, N Komatsu, S Matsuda, K Ouhara, N Mizuno, T Fujita, H Kurihara. (2017). MSC/ECM Cellular Complexes Induce Periodontal Tissue Regeneration. *Journal of Dental Research*. Retrieved February 6, 2022, from https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034517708770?url_ver=Z39.88-2003&rfr

[id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr dat=cr pub++0pubmed&](#)

八、Jon Rowley, Eytan Abraham, Andrew Campbell, Harvey Brandwein and Steve Oh. (2012). Meeting Lot-Size Challenges of Manufacturing Adherent Cells for Therapy. *BioProcess*, 10, 16-22. Retrieved February 6, 2022, from

<https://bioprocessintl.com/manufacturing/cell-therapies/meeting-lot-size-challenges-of-manufacturing-adherent-cells-for-therapy-328093/>

九、2D培養和3D培養差異比較-3D細胞培養模擬人體環境(2021年11月29日)・世翔國際有限公司・取自

<https://biocommander.com/news/research/2d%E5%9F%B9%E9%A4%8A%E5%92%8C3d%E5%9F%B9%E9%A4%8A%E5%B7%AE%E7%95%B0%E6%AF%94%E8%BC%83/>

十、張力云(2018年8月10日)・細胞的培養世界與微流體系統・臺大醫院醫學研究部共同研究室電子報，56・取自

<https://ntuhmc.ntuh.gov.tw/epaper-56th.htm>

十一、A. L. VAN WEZEL. (1967). Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture. *Nature*, 216, 64 – 65. Retrieved February 6, 2022, from

<https://www.nature.com/articles/216064a0>

十二、Fredrik R M Huss 1, Johan P E Junker, Hans Johnson, Gunnar Kratz. (2007).

Macroporous Gelatine Spheres as Culture Substrate, Transplantation Vehicle, and Biodegradable Scaffold for Guided Regeneration of Soft Tissues. In Vivo Study in Nude Mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 60, 543-555. Retrieved February 6, 2022, from

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17399665/>

十三、Max J. Lerman, Josephine Lembong, Shin Muramoto, Greg Gillen, and John P. Fisher. (2018). The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. *Tissue Engineering*, 24, 359-372. Retrieved February 6, 2022, from

<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2018.0056>

十四、Chunge Li, Yufeng Qian, Shuang Zhaoa, Yuji Yin, Junjie Li. (2016). Alginate/PEG Based Microcarriers with Cleavable Crosslinkage for Expansion and Non-invasive Harvest of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells. *Materials Science and Engineering*, 24, 359-372. Retrieved February 6, 2022, from

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092849311630265X>

十五、Hammed Tanimowo Aiyelabegan, Malihe Ebadi, Gholam Ali Kardar, Nasrin Lotfibakhshaiesh, Farid Abedin Dorkoosh, Somayeh Ebrahimi Barough & Esmaeil Sadroddiny. (2018). k-Casein Upregulates Osteogenic Differentiation on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cultured on Agarose

- Microcarriers. *Int J Polym Mater*, 69, 373-380. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00914037.2019.1570511?journalCode=gpom20>
- 十六、Asha Shekaran, Alan Lam, Eileen Sim, Lee Jialing, Li Jian, Jessica Toh Pei Wen, Jerry Kok Yen Chan, Mahesh Choolani, ShaulReuveny, William Birch, Steve Oh. (2016). Biodegradable ECM-coated PCL Microcarriers Support Scalable Human Early MSC Expansion and in Vivo Bone Formation. *Cytotherapy*, 18, 1332-1344. Retrieved February 6, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27503763/>
- 十七、Marie Morille, Tran Van-Thanh, Xavier Garric, Jérôme Cayon, Jean Coudane, Danièle Noël, Marie-Claire Venier-Julienne, Claudia N Montero-Menei. (2013). New PLGA-P188-PLGA Matrix Enhances TGF- β 3 Release from Pharmacologically Active Microcarriers and Promotes Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *J Control Release*, 170, 99-110. Retrieved February 6, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23648834/>
- 十八、Bo Duan, Xing Zheng, Zhixiong Xia, Xiaoli Fan, Lin Guo, Jianfeng Liu, Yanfeng Wang, Qifa Ye, Lina Zhang. (2015). Highly Biocompatible Nanofibrous Microspheres Self-assembled from Chitin in NaOH/urea Aqueous Solution as Cell Carriers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54, 5152-5156. Retrieved February 6, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25712796/>
- 十九、Chih-Yao Chui, AkinloluOdeleye, Linh Nguyen, Naresh Kasoju, Erfan Soliman, Hua Ye. (2019). ElectrosprayedGenipinCross-linked Alginate-chitosan Microcarriers for Ex Vivo Expansion of Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Mater Res A*, 107, 122-133. Retrieved February 6, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30256517/>
- 廿、Iori Takahashi, Keigo Sato, Hisashi Mera, Shigeyuki Wakitani, and Mutsumi Takagi. (2017). Effects of Agitation Rate on Aggregation DuringBeads-to-beads Subcultivation of Microcarrier Culture of Human Mesenchymal Stem Cells. *HindawiCytotechnology*, 69, 503-509. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5461241/>
- 廿一、Natalia Rozwadowska, Agnieszka Malcher, Ewa Baumann, Tomasz Jan Kolanowski, Marek Rucinski, Tomasz Mietkiewski, Katarzyna Fiedorowicz, Maciej Kurpisz. (2016). In Vitro Culture of Primary Human Myoblasts by Using the Dextran Microcarriers Cytodex3®. *HistochemCytobiol*, 54, 81-90. Retrieved February 6, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27270505/>
- 廿二、Allen Kuan-Liang Chen, ShaulReuveny, Steve KahWengOh. (2013). Application of

- Human Mesenchymal and Pluripotent Stem Cell Microcarrier Cultures in Cellular Therapy: Achievements and Future Direction. *Biotechnology Advances*, 31, 1032-1046. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975013000657>
- 廿三、Saerom Park, Yujin Oh, Dahun Jung, & Sang Hyun Lee. (2020). Effect of Cellulose Solvents on the Characteristics of Cellulose/Fe₂O₃ Hydrogel Microspheres as Enzyme Supports. *Polymers*, 12(9). Retrieved February 6, 2022, from <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/9/1869>
- 廿四、Kenichi Nagase, Teruo Okano. (2016). Thermoresponsive-polymer-based Materials for Temperature-modulated Bioanalysis and Bioseparations. *Journal of Materials Chemistry B*, Issue 39. Retrieved February 6, 2022, from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/tb/c6tb01003b>
- 廿五、Ramin Ramezani Kalmer, Maedeh Mohammadi, Afzal Karimi, Ghasem Najafpour, Yaghoob Haghigatnia. (2019). Fabrication and Evaluation of Carboxymethylated Diethylaminoethyl cellulose microcarriers as support for cellular applications. *Carbohydrate Polymers*, 226, 115284. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861719309518>
- 廿六、Gulen Oytun Akalin, Mehlika Pulat. (2018). Preparation and Characterization of Nanoporous Sodium Carboxymethyl Cellulose Hydrogel Beads. *Hindaw*, 2018(8):1-12. Retrieved February 6, 2022, from https://www.researchgate.net/publication/324541500_Preparation_and_Characterization_of_Nanoporous_Sodium_Carboxymethyl_Cellulose_Hydrogel_Beads
- 廿七、M Bogataj, A Mrhar, L Korosec. (1999). Influence of Physicochemical and Biological Parameters on Drug Release from Microspheres Adhered on Vesical and Intestinal Mucosa. *Int J Pharm*, 177(2):211-20. Retrieved February 6, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10205615/>
- 廿八、Francielle Calegaria, Bruno C. da Silva, João Tedim, Mário G.S. Ferreira, Marcos A.C. Berton, Cláudia E.B. Marino. (2020). Benzotriazole Encapsulation in Spray-dried Carboxymethylcellulose Microspheres for Active Corrosion Protection of Carbon Steel. *Progress in Organic Coatings*, 138, 105329. Retrieved February 6, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300944018308853>
- 廿九、Mitra Jelvehgari, Hadi Valizadeh, Ramin Jalali Motlagh, Hassan Montazam. (2014). Formulation and Physicochemical Characterization of Buccoadhesive Microspheres Containing Diclofenac Sodium. *Adv Pharm Bull*, 4(3):295-301. Retrieved February 6, 2022, from

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24754015/>

卅、Xiaogang Luo, Jian Zeng, Shilin Liu, Lina Zhang. (2015). An Effective and Recyclable Adsorbent for the Removal of Heavy Metal Ions from Aqueous System: Magnetic Chitosan/Cellulose Microspheres. *Bioresour Technol*, 194:403-6. Retrieved February 6, 2022, from

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216781/>

卅一、Sahoo, S. K.; Mallick, A. A.; Barik, B. B.; Senapati, P. C. (2007). Preparation and in Vitro Evaluation of Ethyl Cellulose Microspheres Containing Stavudine by the Double Emulsion Method. *Pharmazie*, 62(2):117-21. Retrieved February 6, 2022, from

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17341031/>

卅二、BalqisAz-ZahraaNorizan, NurulShuhadahMahadi, NurulNazatulatikaMohdNizam, SaraniZakaria, Muhammad FauziDaud, Sharifah Nabihah Syed Jaafar. (2018). Fabrication of Cellulose Microspheres from Modified Cotton Linter and Oil Palm Trunk Fibre Via Emulsion Method. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 22(5):915-921. Retrieved February 6, 2022,

from https://www.researchgate.net/publication/329464535_Fabrication_of_cellulose_microspheres_from_modified_cotton_linter_and_oil_palm_trunk_fibre_via_emulsion_method

卅三、Eugene Huhe, Ji-Hyun Yang, Chang-Ha Lee, Ik-Sung Ahn & ByungJinMhin. (2020). Thermodynamic Analysis of Cellulose Complex in NaOH – urea Solution Using Reference Interaction Site Model. *Cellulose*, 27,6767-6775. Retrieved February 6, 2022, from

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-020-03202-w>

卅四、An-Hui Lu Dr., E. L. Salabas Dr., Ferdi Schüth Prof. Dr. (2007). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46,8,1222-1244. Retrieved February 6, 2022, from

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.200602866>

卅五、林昆諒(2011)・開發多功能性磁性奈米粒子用於胰臟癌的早期診斷(碩士論文)・臺北:國立交通大學生物科技學系研究所・取自

<https://ir.nctu.edu.tw/bitstream/11536/47715/1/850601.pdf>

【評語】 050208

本研究開新型的微米載體用於幹細胞研究。特色是加入磁性奈米氧化鐵所以可以進行磁性分離，加快分離的效率，提供更新穎的細胞培養分離方式。合成的載體形狀似乎不尋常。也還需要更進一步的細胞實驗。對照實驗的數目也可以增加，但實驗有新意，值得鼓勵。下面的一些建議值得同學思考：

1. 討論含與不含磁性奈米氧化鐵之纖維素微球是否對細胞生長有影響？是否有相關文獻報導？
2. 根據 TEM 結果顯示，磁性奈米氧化鐵之大小位於 10~20 nm 之間，是 nm 還是 μm ？是因為包裹纖維素才變大的嗎？
3. 有比較本研究使用的氧化鐵包覆於纖維素的磁性微球(實驗組)與市售微球 Cytodex(對照組)效果。實驗組三微培養後之細胞數目(個)及回收率都比對照組高。但對照組(CbMSC 培養於 Cytodex®3)的細胞回收率僅有 24.45%，其原因應為本研究並未設計使用透析膜進行細胞與微球的分離，應用透析膜分離後做比較。

作品簡報

細胞的社會住宅—

開發應用於幹細胞培養
具磁分離能力之纖維素微球

組別：高級中等學校組

科別：化學科

前言

細胞需求

- 再生醫學興起
(2027, 2.4 billion)
- 細胞治療
→ 臨床應用需龐大細胞數量

Research and Market , 3D Cell Culture - Global Market Trajectory & Analytics, February 2022

提高培養效率

- 微球
 1. 每單位體積培養表面積增加
 2. 避免細胞聚集

市售微球缺點

- 難避免離心回收後細胞收集效率問題
→ 需搭配昂貴的細胞透析過濾系統。

Thermo scientific, Harvestainer BPC Microcarrier Separation Systems

發展磁性微球

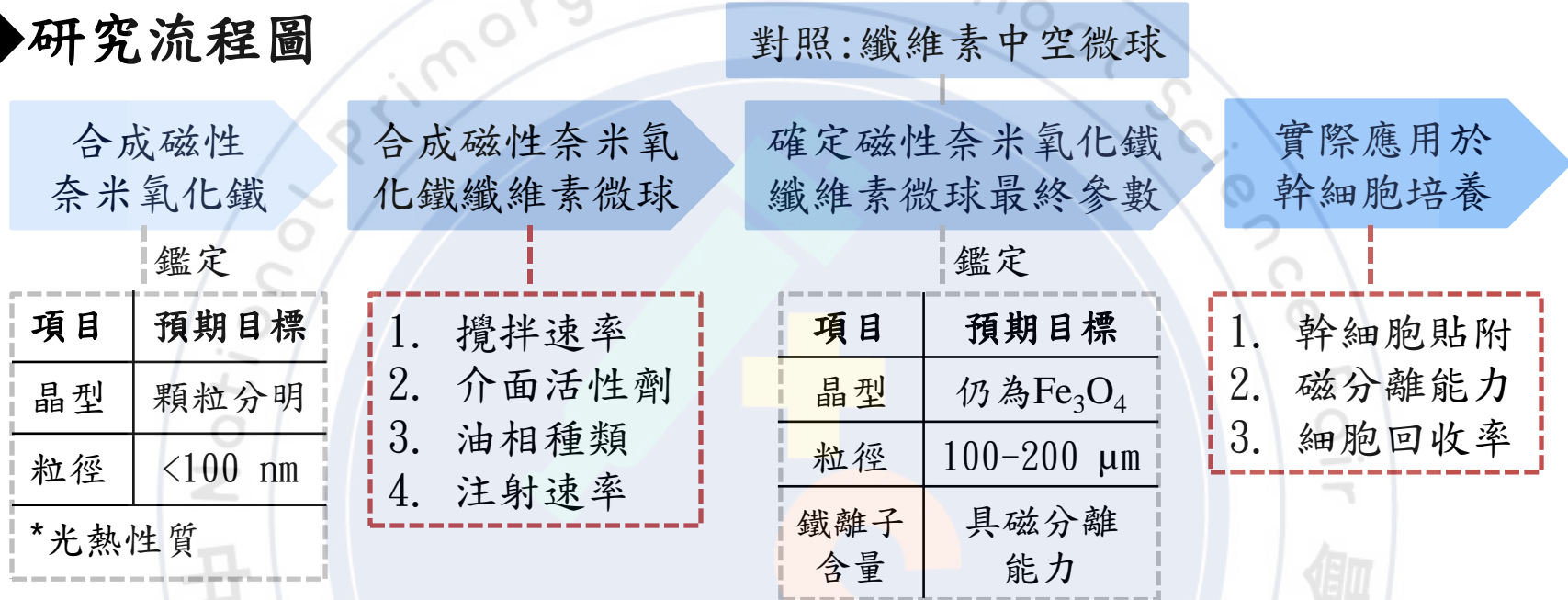
- 價格低廉
- 適合細胞生長
- 快速載體分離

◆ 研究目的: 發展適合幹細胞生長的磁性微球

- 一、藉共沉澱法合成磁性奈米氧化鐵
- 二、探討攪拌速率、介面活性劑濃度、油相種類及注射速率對微球合成之影響
- 三、將臍帶血間葉幹細胞株(cord-blood mesenchymal stem cell ; CbMSC)培養於磁性奈米氧化鐵纖維素微球，測試細胞對於此微球的貼覆性及微球之磁分離能力

研究方法

◆研究流程圖

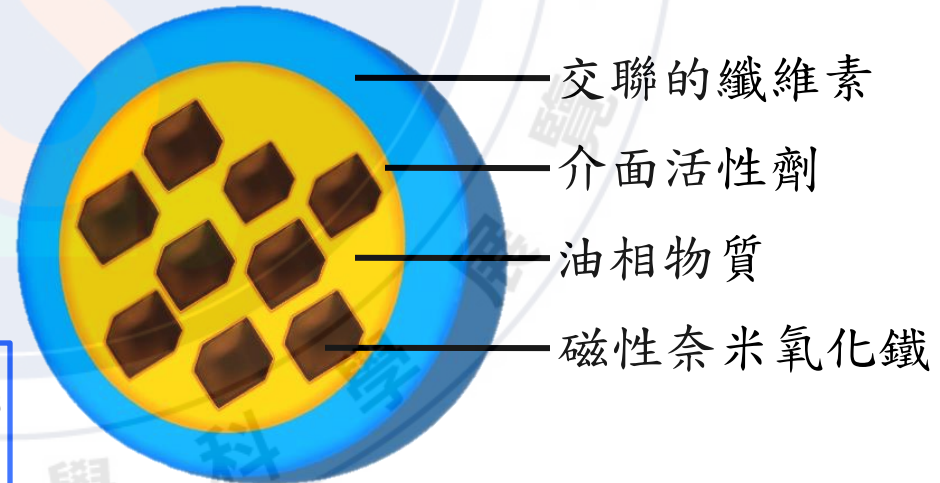
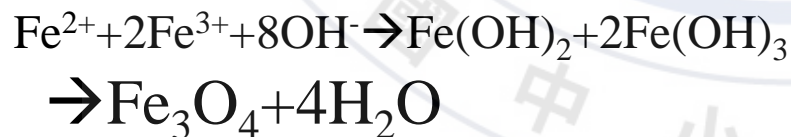


◆合成磁性奈米氧化鐵

共沉澱法：

• 環境負擔小 • 反應製程穩定

• 主要反應：



▲磁性奈米氧化鐵纖維素微球結構示意圖

研究方法

◆微球合成參數調控

找出微球
最終乳化
合成參數

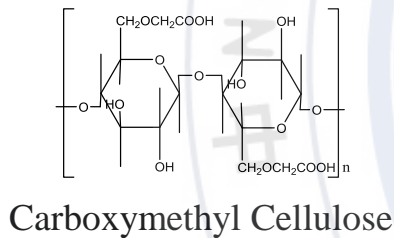
攪拌速率

介面活性
劑濃度

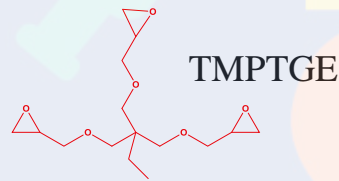
油相種類

注射速率

- ✎ 乳化法合成微球：
- 包覆磁性奈米氧化鐵
 - 藉由TMPTGE開環交聯
 - 加入NaOH及尿素以增加羧甲基纖維素溶解度

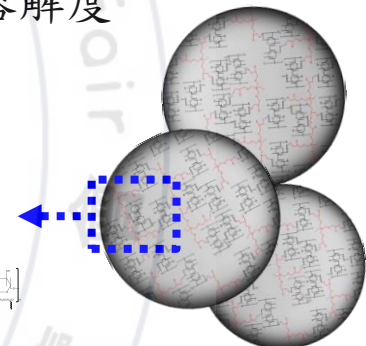
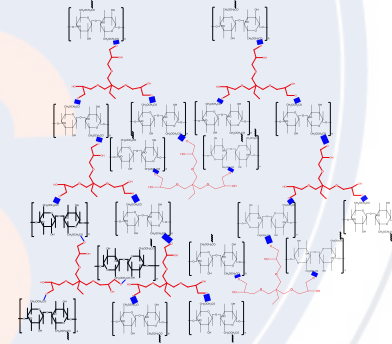
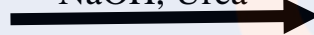


+



Esterification crosslinking

NaOH, Urea



◆臍帶血間葉幹細胞(CbMSC)培養



測試

微球:磁分離能力

幹細胞(轉染RFP):對微球貼覆性

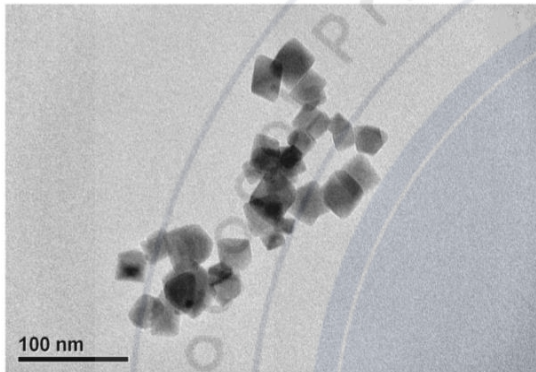
→ 共軛焦螢光顯微鏡

細胞回收率 ↔ Cytodex® 3

*RFP:紅色螢光蛋白

研究結果與討論

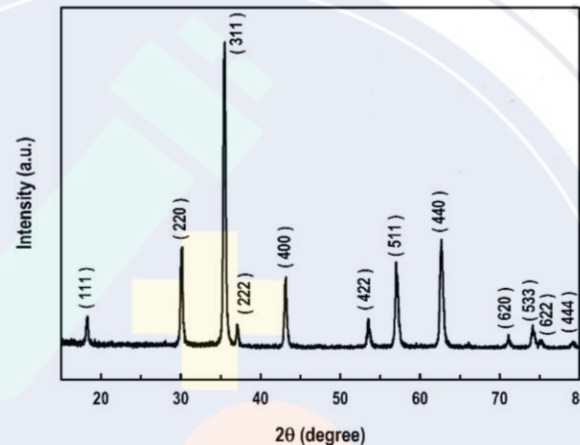
◆ 磁性奈米氧化鐵的合成



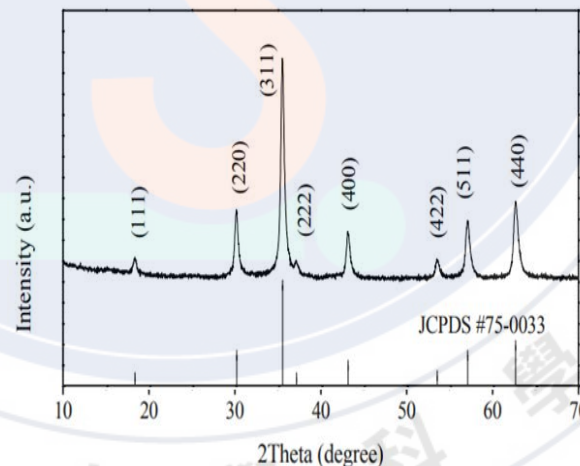
- ▲ 磁性奈米氧化鐵之TEM影像
- 大小: 10~20 nm
- 型態: 顆粒分明之方塊狀



- ▲ 以磁鐵吸引磁性奈米氧化鐵
- 綠色方框:
被強力磁鐵磁吸



▲ 磁性奈米氧化鐵之XRD圖譜



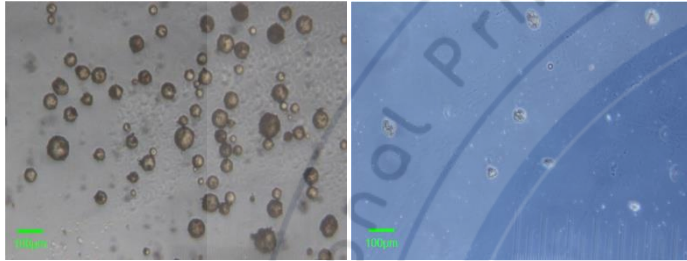
▲ JCPDS#75-0033(Fe_3O_4)

比對

主要成分
 Fe_3O_4

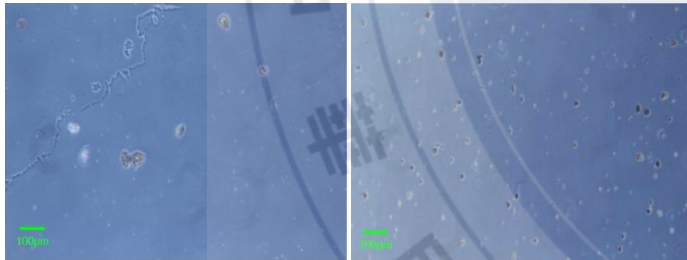
研究結果與討論

◆微球合成參數調控 → 合成目標: 微球粒徑位於100~200 μm 、粒徑均一



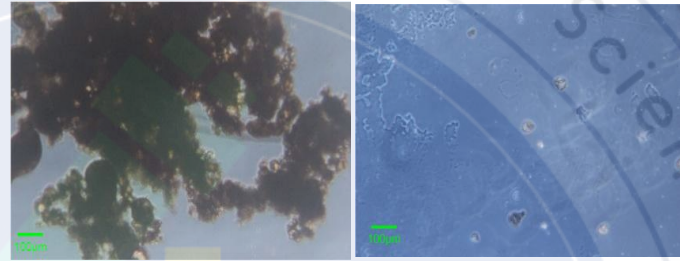
▲ 轉速400 rpm 30~150 μm
▲ 轉速800 rpm 50~100 μm

- 轉速低者合成微球粒徑大。
但400 rpm組別粒徑分布不均
→ 選用800 rpm為最終轉速



▲ 礦物油 50~100 μm
▲ 甲苯 30~50 μm

- 礦物油作油相微球粒徑較大。
→ 選用礦物油為最終油相

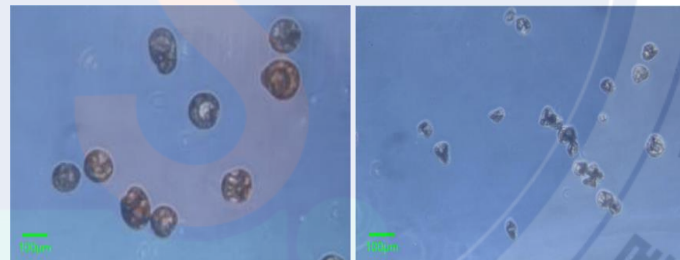


▲ Span80 0.0324% 無法推估
▲ Span80 0.324% 50~100 μm

- Span80 濃度愈低合成微球愈大。
但濃度0.0324%組別呈巨型塊狀沉澱而非微球狀
→ 選用0.0324%為最終介面活性劑濃度



▲ Span80 3.24% 10~50 μm

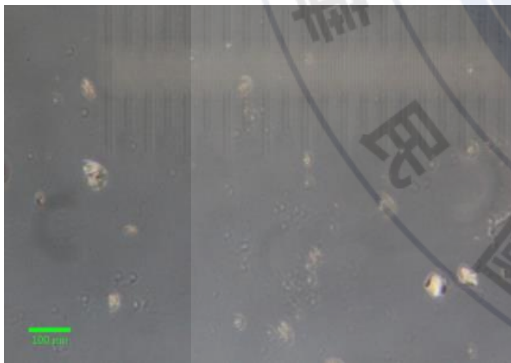
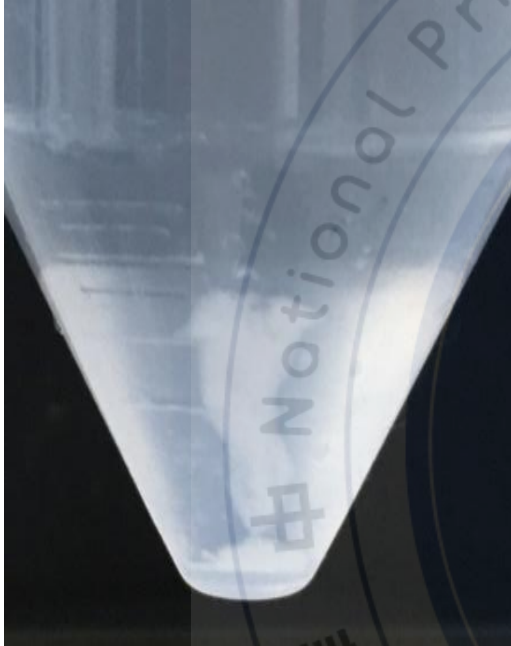


▲ 注射速率 5mL/min 100~200 μm
▲ 注射速率 1mL/min 50~100 μm
▲ 注射速率 0.5mL/min 10~30 μm

- 注射速率愈慢合成微球粒徑愈大。
注射速率5 mL/min 之組別達到約100~200 μm
→ 與Cytodex® 3粒徑 (141~211 μm) 相近，且粒徑均一

研究結果與討論

◆纖維素中空微球

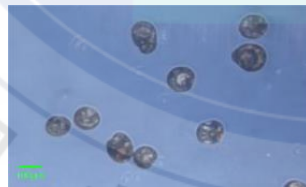
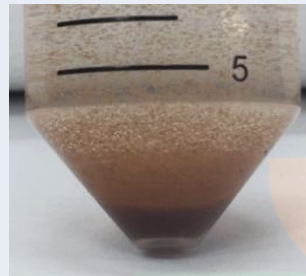


◆最終合成參數—再現性實驗

磁石攪拌器攪拌子轉速	800 rpm
介面活性劑重量百分濃度	0.324%
油相物質	礦物油
油相混和液注射速率	5 mL/1 min

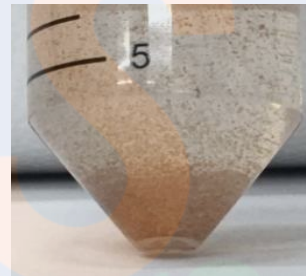
批次1

(日期:2021.10.01)



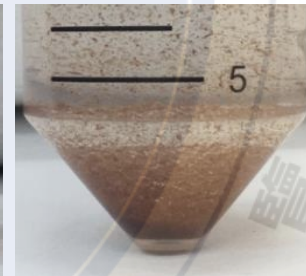
批次2

(日期:2021.10.15)



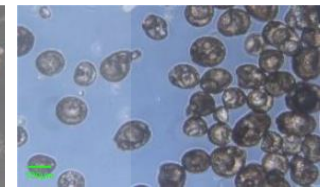
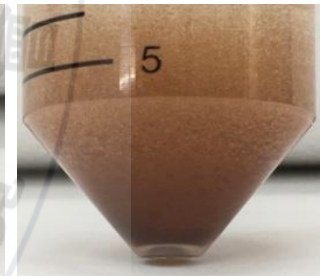
批次3

(日期:2021.10.29)



批次4

(日期:2021.11.05)

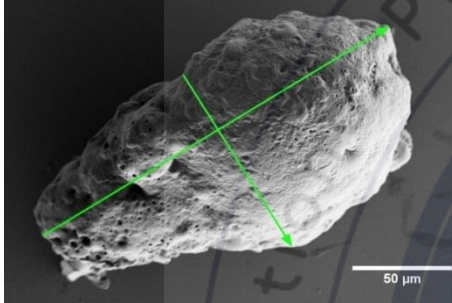


➤ 再現性實驗結果微球粒徑皆位於100~200 μm之間

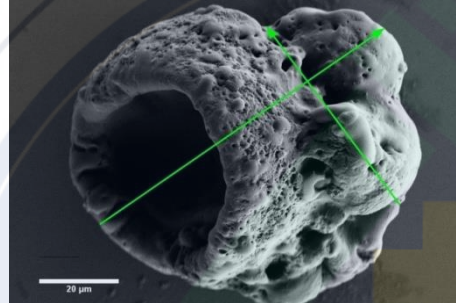
研究結果與討論

◆ 微球SEM拍攝成果

- 磁性奈米氧化鐵纖維素微球

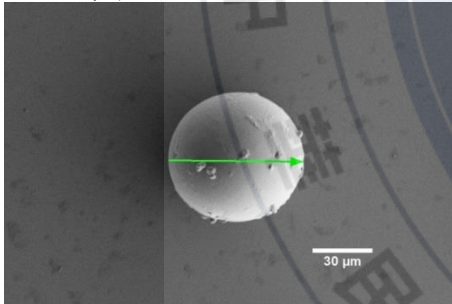


長邊:204.886 μm
短邊:104.992 μm

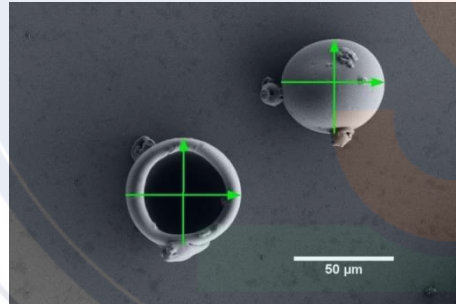


長邊:87.470 μm
短邊:57.053 μm

- 纖維素中空微球



長邊:67.781 μm
短邊:X

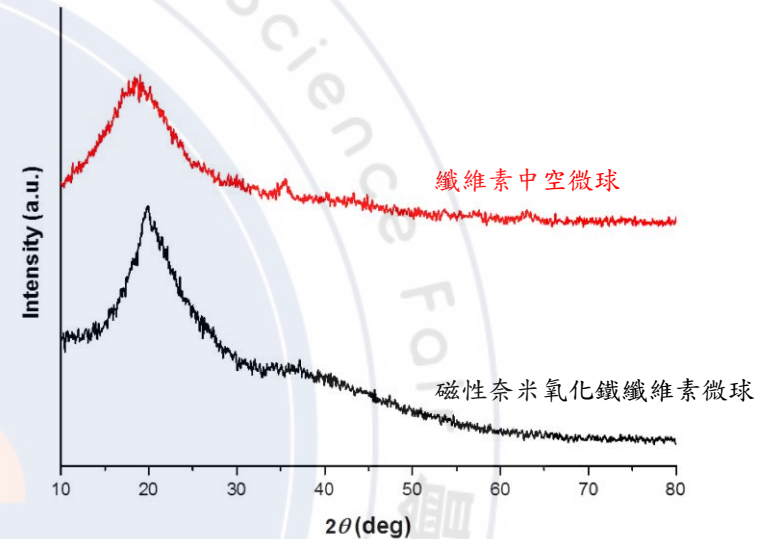


長邊:57.778/51.778 μm
短邊:55.113/49.112 μm

- 可以清楚看見:

1. 微球交聯的纖維素外殼層
2. 纖維素中空微球的中央空腔

◆ 微球XRD檢測分析



◆ 微球ICP-MS元素分析

	送測樣品	鐵離子
重量(g)	0.01400	0.00123

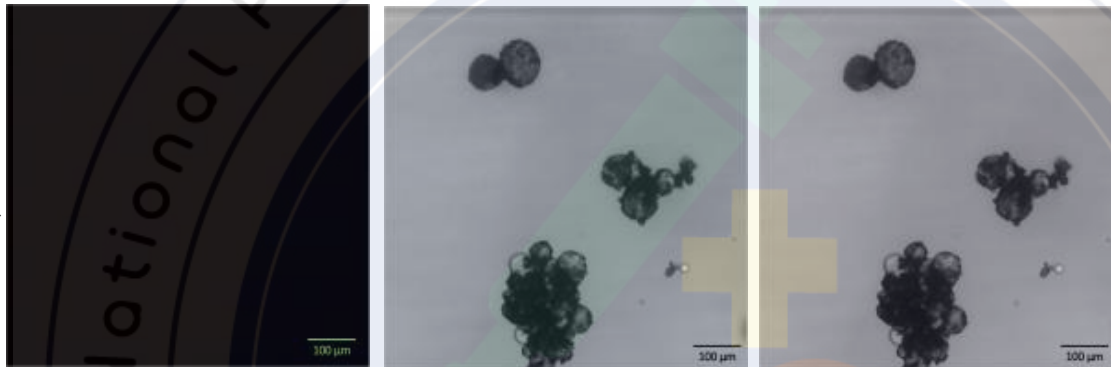
- 磁性奈米氧化鐵纖維素微球所含鐵離子總量為0.00123 g

研究結果與討論

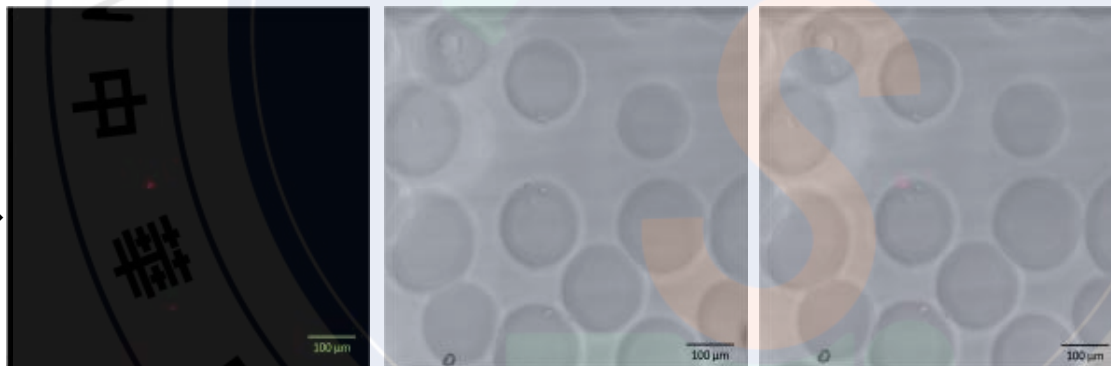
◆微球之幹細胞貼覆效果測試實驗

- 倒立式雷射掃描式共軛焦螢光顯微鏡觀察

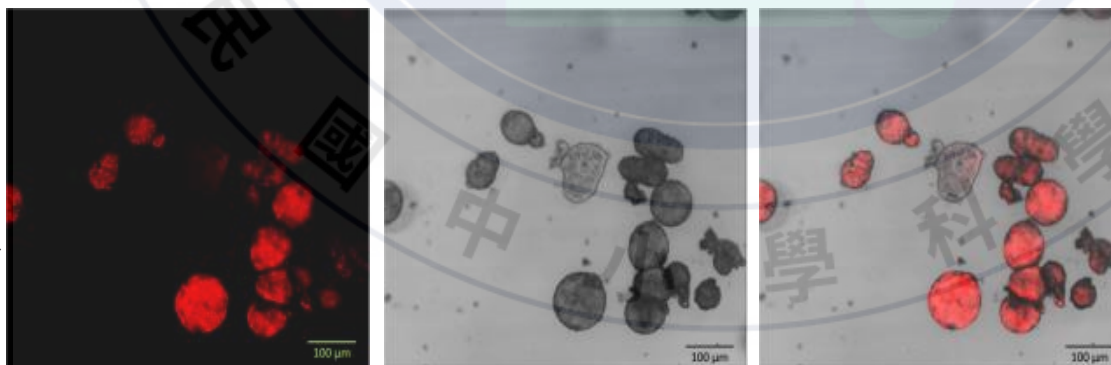
磁性奈米
氧化鐵
纖維素微球 →



CbMSC
培養於
Cytodex® 3 →



CbMSC
培養於
磁性奈米
氧化鐵
纖維素微球 →



☆磁性奈米氧化鐵
纖維素微球：

- 20hr即有細胞貼附
- 細胞貼附速度
較Cytodex® 3快

研究結果與討論

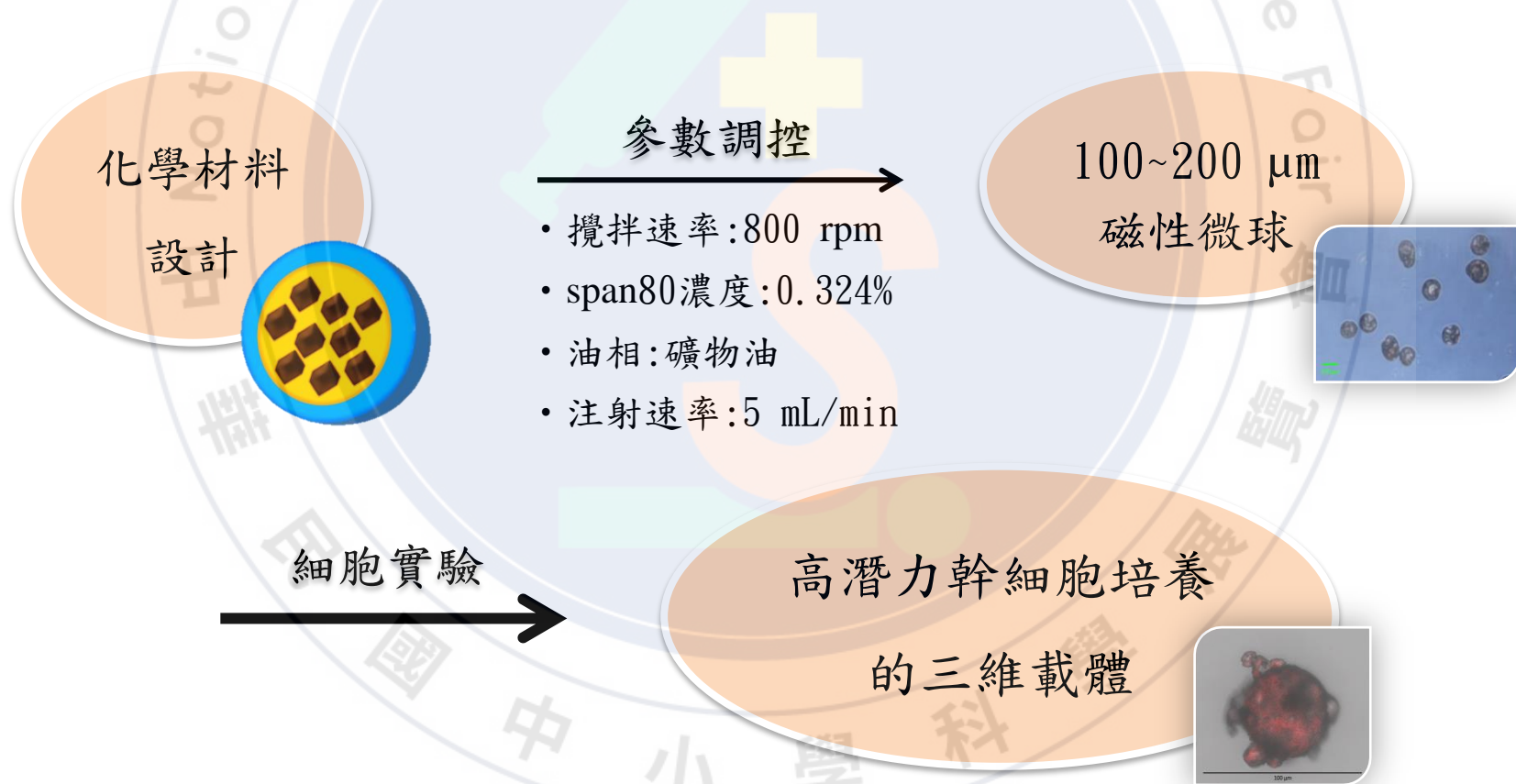
◆微球磁分離能力測試及細胞回收率計算

	磁性奈米氧化鐵纖維素微球	Cytodex®3
細胞貼附速度	40 分鐘即可觀察到CbMSC 貼附於其表面	觀察20 小時僅有零星細胞貼附。
載體回收方式	以強力磁鐵吸引磁性微球以分離載體與細胞	不使用透析模: 利用高速離心(1000 rpm)離心5 分鐘。(離心後倒掉上清液時操作不易)
回收載體所需時間	1~2 秒	5 分鐘

- 磁性奈米氧化鐵纖維素微球不需Cytodex系列微球透析模即可展現81%的細胞回收率。
- 磁性奈米氧化鐵纖維素微球在作為幹細胞培養載體的同時，也可展現快速、高效回收細胞的能力。

結論

- 透過乳化法，成功將磁性奈米氧化鐵包覆於纖維素微球中。
- 經參數調控，合成出與Cytodex® 3相近粒徑的磁性奈米氧化鐵纖維素微球。
- 實際應用於幹細胞培養，驗證其做為幹細胞培養的三維載體之可行性。



未來展望

1. 微球粒徑：嘗試調控更多參數合成不同大小的微球，以進行其它應用。
2. 表面修飾：有潛力透過不同的表面修飾應用於不同類型之細胞。
3. 溫控載體：磁性奈米氧化鐵的光熱性質顯示未來此包覆磁性奈米氧化鐵之纖維素微球有潛力發展為有助於細胞的貼附和脫離的溫控載體。

參考文獻

1. A. L. VAN WEZEL. (1967). Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture. *Nature*, 216, 64 - 65.
2. 張力云(2018年8月10日)·細胞的培養世界與微流體系統·臺大醫院醫學研究部共同研究室電子報，56
3. Natalia Rozwadowska, Agnieszka Malcher, Ewa Baumann, Tomasz Jan Kolanowski, Marek Rucinski, Tomasz Mietkiewski, Katarzyna Fiedorowicz, Maciej Kurpisz. (2016). In Vitro Culture of Primary Human Myoblasts by Using the Dextran Microcarriers Cytodex3®. *HistochemCytobiol*, 54, 81-90.
4. 林昆諒(2011)·開發多功能性磁性奈米粒子用於胰臟癌的早期診斷(碩士論文)·臺北:國立交通大學生物科技學系研究所
5. Balqis Az-Zahraa Norizan , Nurul Shuhadah Mahadi , Nurul Nazatulatika Mohd Nizam, Sarani Zakaria, Muhammad Fauzi Daud, Sharifah Nabihah Syed Jaafar. (2018). Fabrication of Cellulose Microspheres from Modified Cotton Linter and Oil Palm Trunk Fibre Via Emulsion Method. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 22(5):915-921.