

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 工程學(二)科

探究精神獎

052402

天然花青素光交聯複合水凝膠支架之 3D 列印研究

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 鐘莘妮	指導老師： 陳祖望
---------------	--------------

關鍵詞：花青素、光交聯水凝膠、3D 列印

摘要

本研究利用天然花青素作為光交聯劑，成功製作出低毒性的光交聯水凝膠，並可利用 3D 列印技術，應用於生醫領域三維支架。

於不同比例的甲基丙烯酸明膠及甲基丙烯酸透明質酸中分別加入花青素或光起始劑 Irgacure2959，並使用 365 nm 波長紫外光作為交聯光源以製備複合水凝膠支架。

利用 NMR、FTIR、SEM 及溶脹性、降解性、攀附情形測試，確認分子結構及材料特性分析。體外試驗進行細胞相容性測試，結果顯示加入花青素的光交聯水凝膠對細胞的毒性遠低於添加 I-2959 的。最後使用 3D 列印機將花青素光交聯水凝膠堆疊列印成三維支架。本研究顯示花青素光交聯水凝膠未來可成為生物 3D 列印的原料，應用於組織工程領域。

壹、前言

一、研究動機

隨著生物科技日新月異的發展，組織工程與生物 3D 列印的技術日益進步且運用廣泛，現今大多的三維多孔支架是以化學合成的高分子為主，或是使用有機溶劑進行交聯，而且現今被廣泛使用的光起始劑 Irgacure 2959，其所產生的自由基具有高度的細胞毒性。而花青素為一種水溶性的天然色素，存在於許多日常易取得的植物中，因此本研究希望能以天然、低毒性的交聯劑取代高分子有機溶劑，製備出較簡單且易取得的生物 3D 列印原料。

二、研究目的

- (一) 合成甲基丙烯酸明膠及甲基丙烯酸透明質酸，並探討其性質
- (二) 探討以光起始劑 I2959、花青素進行光交聯之複合水凝膠性質差異
- (三) 探討光交聯複合水凝膠之細胞存活率和攀附情形、溶脹率和降解率
- (四) 嘗試以光交聯複合水凝膠進行 3D 列印

三、文獻回顧

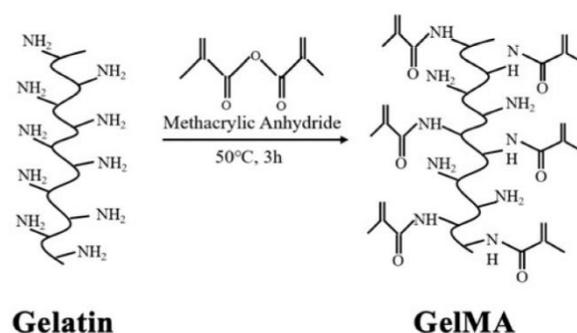
(一) 生物材料

生物材料是只可使用在生理環境下的材料，對生物體進行診斷、治療和置換損壞的組織、器官，亦或是增進其功能的材料。常見生物材料大致可分為金屬與合金材料、陶瓷材料、高分子有機聚合材料及生物組織材料。生物材料旨在用於修復診斷、治療等應用，因此有幾個選擇要件：生物相容性、毒性、便宜經濟、耐用度等等。

1. 甲基丙烯酸明膠

明膠 (Gelatin) 是由膠原蛋白的部分水解產生的，成分中 85 - 92 % 為蛋白

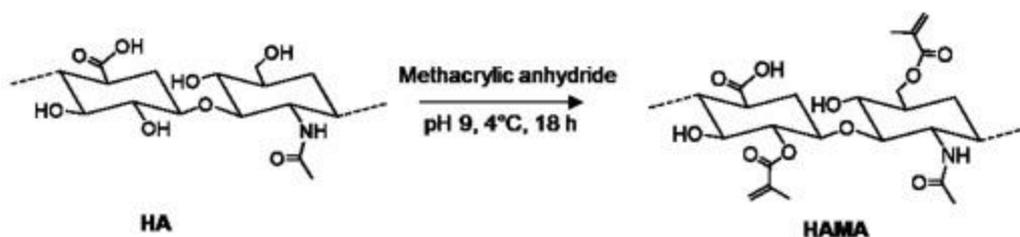
質，其餘以礦物鹽和水組成，明膠在高於 30° C 的環境可融化在水中，明膠的主要來源包括牛骨（骨膠原）以及牛皮和豬皮。在食品工業中，可用作膠凝劑、增稠劑或穩定劑，也會用在製藥、化妝品等各個行業。明膠因為其胺基酸組成與膠原蛋白相似，更接近人體且沒有免疫原性，成為組織工程中最常用的天然材料之一。由於明膠的機械性能較差，在這裡透過明膠中賴氨酸的含胺側基上接枝甲基丙烯酸酯（Methacrylated acid, MA）來修飾，合成 GelMA 的反應如圖一，修飾完後的 GelMA 於水相中加入光啟始劑，透過照射符合光啟始劑的波長光，使 GelMA 光聚合後可以有效改善明膠機械性能較差的問題。



圖一、Synthesis of Gelatin Methacrylate

2. 甲基丙烯酸透明質酸

透明質酸（Hyaluronic acid, HA）是一種非硫酸化的醣胺聚醣，由 N-乙醯氨基葡萄糖和 D-葡萄糖醛酸的重複二醣單元組成，透明質酸廣泛存在於結締組織、軟骨、眼球玻璃體、神經元和皮膚。HA 還具有高度親水性、低免疫反應、高生物相容性及生物可降解性，常應用於藥理學和藥物輸送、手術和傷口癒合、皮膚科和整形外科、骨外科和眼科等等，但由於 HA 較差的機械性能和降解較快速，因此在這裡透過化學修飾來克服這些缺點，在透明質酸的結構，其側基由甲基丙烯酸酯基團取代而形成之光敏性材料，反應式如圖二，此光敏性材料為甲基丙烯酸透明質酸（Hyaluronic acid methacrylate, HAMA），有效提高機械性能及降低生物降解速率，使 HAMA 水凝膠在生物醫學領域能有廣泛的應用。



圖二、Synthesis of Hyaluronic acid methacrylate

3. 花青素

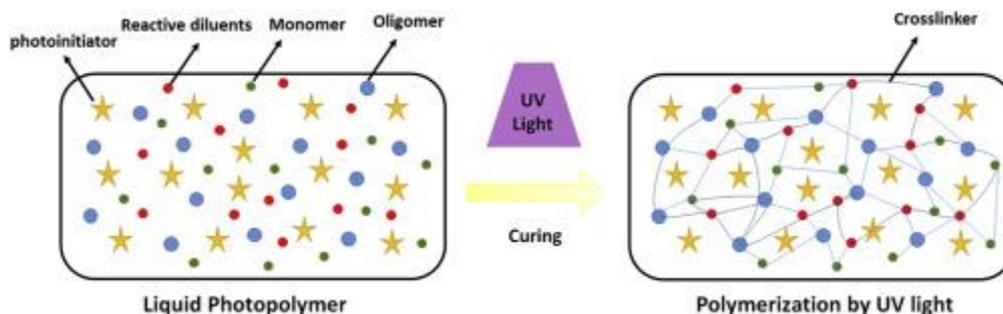
花青素是植物中天然存在黃酮類化合物的一個主要亞類，也是影響植物組織顏色的水溶性有機化合物。經研究花青素作為水溶性天然色素，是存在於高等植物中的酚類化合物，主要存在於花和果實中，花青素會受以下外部因素影響，例如溫度、氧化、光和 pH 值。花青素亦可增強胰腺 β 細胞的胰島素分泌以及花青素的抗氧化特性使它們成為一種天然的自由基清除劑，有助於預防自由基引起的多種疾病、降低罹患心血管疾病的風險，並具有抗發炎、抗糖尿病、抗癌活性和免疫增強作用；此外，黃酮類也被研究指出可通過抑制破骨細胞生成來防止骨質流失。這些結果皆表明花青素是有潛力被作為醫學預防和治療的藥物之研究。

(二) 光聚合水凝膠

水凝膠具有高度含水量、良好的生物相容性和相似於人體組織的結構和機械強度，使水凝膠成為組織工程常被使用的材料。材料從液態轉變形成水凝膠的過程，可以通過物理或是化學交聯來達成，其中，化學交聯更常被人使用，因為交聯後更加的穩定，並可以改善水凝膠在組織工程應用中的機械強度和降解性，常見的化學交聯方法包括酶反應、鍵擊化學和光聚合等等。

光聚合交聯反應如圖三，可在水凝膠交聯時的時間和空間結構做調整，製作出複雜的網絡結構，這也利於用在操控細胞生長行為和藥物釋放，同時水凝膠本身具有高流動性，加上反應條件對人體較友善，只需在一般 pH 值或常溫下就可以進行反應，光聚合水凝膠也可以利用 3D 列印機，透過精確細微的操作，列印出已設計好

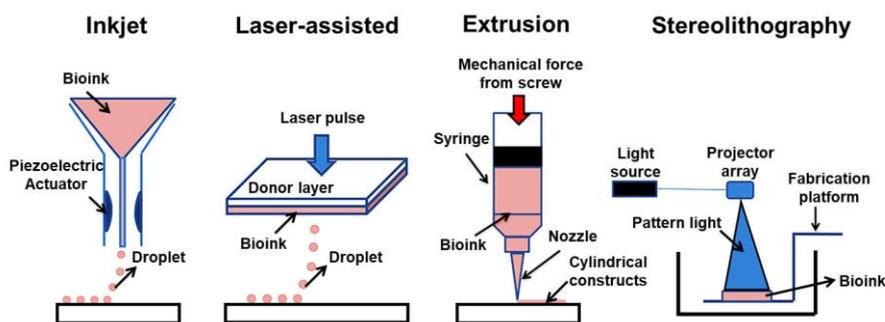
的 3D 圖形結構，或是類似身體組織、器官等複雜結構，綜上所述，光聚合水凝膠在組織工程領域應用，具有相當大的潛力。



圖三、光聚合交聯示意圖

(三) 3D 列印

3D 列印 (3D printing)，又稱立體列印、增材製造、積層製造，可泛指任何列印三維物體的過程，在電腦控制下層疊原材料的過程，3D 列印的內容可以來源於三維模型或其他電子資料，其列印出的三維物體可以擁有任何形狀和幾何特徵。在生物支架上常使用的列印方式如圖四分為噴墨列印 (Inkjet Printing)、雷射輔助列印 (Laser-assisted Printing)、光固化成型列印 (Stereolithography Printing)、擠壓成型列印 (Extrusion Printing) 四大種類。



圖四、生物 3D 列印種類

擠壓 3D 生物列印技術原理與傳統 3D 列印一樣，生物墨水通過一個噴嘴被逐層擠壓成預先指定的形狀，然而隨著科技進步，通過電腦數位控制加工工藝，擠出的生物列印可按照 3D 模型切片中生成的工具路徑，逐層精確分配生物相容性材料，使用者也可以更自由地使用更廣泛的生物材料，多方運用於組織工程。

貳、研究設備及器材

一、設備

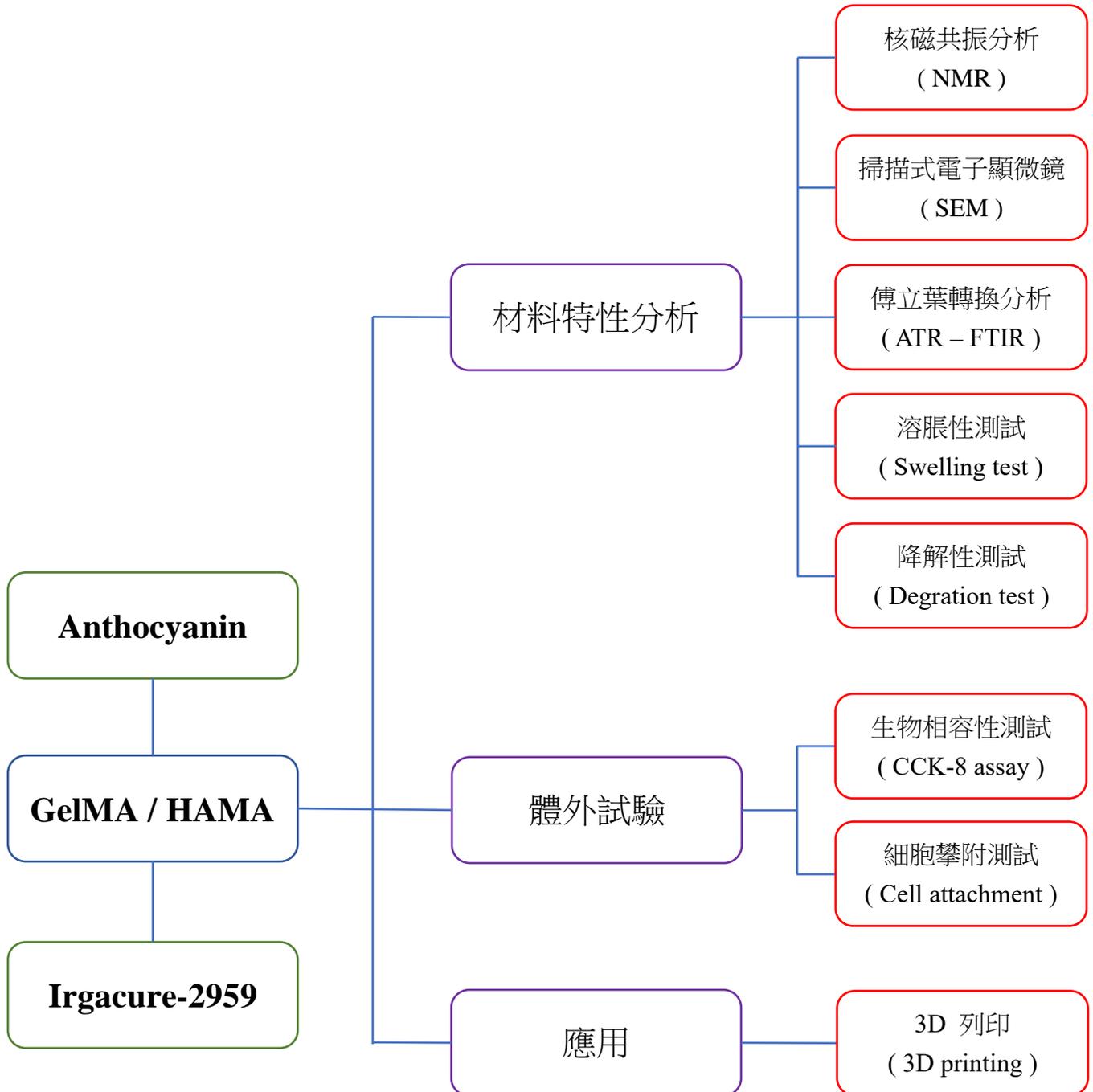
電子式天秤	溫控式加熱板	冷凍乾燥機	無菌操作台
桌上型離心機	恆溫培養箱	手持 UV 燈	細胞計數器
掃描式電子顯微鏡 (SEM)	核磁共振分析儀 (NMR)	多功能微孔板檢測儀 (ELISA reader)	傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR)
光學顯微鏡	3D 列印機	12-14K Da 透析袋	

二、器材

花青素 (anthocyanin)	光起始劑 (Irgacure 2959)	明膠 (Gelatin)	透明質酸 (Hyaluronic acid)
甲基丙烯酸酐 (Methacrylic anhydride)	甲基丙烯酸明膠 (GelMA)	甲基丙烯酸透明質酸 (HAMA)	錐蟲藍染劑溶液
達爾伯克氏必需基本 培養基 (medium)	磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS)	胰蛋白酶 (Trypsin)	老鼠纖維母細胞 (L929)

參、研究過程與方法

一、實驗流程圖



二、方法與步驟

(一) 甲基丙烯酸化明膠 (GelMA) 製備

1. 將 10% Gelatin 倒入 60 度的 100 mL PBS 使其完全溶解。
2. 滴定 5% MA 進行修飾，反應 3 小時，過程中使用 5M 氫氧化鈉溶液，讓 PH 值維持 7.4 ~ 8.0 之間。
3. 加入 5 倍量的 PBS 以終止反應。
4. 裝入 12 - 13k Da 透析袋，透析 5 天，去除未反應的 MA 及副產物後，再進行凍乾。

(二) 甲基丙烯酸化透明質酸 (HAMA) 製備

1. 於前一天將 5g HA 與 500 mL DI water 混合，並在 4° C 下以磁石攪拌均勻直到 HA 完全溶解。
2. 以速率 0.25 mL / min 加入 MA 進行側基的修飾，在加入 MA 前以 5N NaOH 維持 pH 值 7.4 ~ 8.0 之間 在 4° C 下反應 24 小時。
3. 進行透析 3 天後，接著將樣品凍乾。

(三) 甲基丙烯酸化明膠 (GelMA) / 甲基丙烯酸化透明質酸 (HAMA) 複合水凝膠製備

1. 製備四種不同比例的複合水凝膠：分別為 20 wt% 甲基丙烯酸化明膠、30 wt% 甲基丙烯酸化明膠、20 wt% 甲基丙烯酸化明膠 + 1wt% 甲基丙烯酸化透明質酸、30 wt% 甲基丙烯酸化明膠 + 1 wt% 甲基丙烯酸化透明質酸。
2. 將上述四種不同比例複合水凝膠，分別加入 0.05 wt% 花青素和 0.3 wt% Irgacure 2959。
3. 上述材料分別加入花青素及 Irgacure 2959 之後，使用波長 365 nm 紫外光照射 15 分鐘左右即可得到複合水凝膠。

(四) 以核磁共振圖譜 (NMR) 分析甲基丙烯酸明膠 (GelMA) 及甲基丙烯酸透明質酸 (HAMA)

1. 將 GelMA / HAMA 溶解於 deuterium oxide (D_2O) 配置成濃度 10 mg / mL。
2. 設定參數條件後，校正內部磁場。
3. 待校正完成後，即可以核磁共振光譜儀觀察樣品結構。

(五) 以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察複合水凝膠內部交聯微結構

1. 將 GelMA / HAMA 交聯之後的複合水凝膠先鍍金 15 分鐘，以利後續在顯微鏡下的觀察。
2. 調整拍攝的倍率，拍攝四種不同比例複合水凝膠的內部微結構。

(六) 將 GelMA / HAMA 複合水凝膠進行結構測試 (FTIR)

1. 將 GelMA / HAMA 複合水凝膠裝入儀器專用容器。
2. 以正確方向裝入儀器。
3. 使用配套軟體分析。

(七) 將 GelMA / HAMA 複合水凝膠進行溶脹性測試 (swelling test)

1. 製備完的 GelMA / HAMA 複合水凝膠，於冷凍乾燥機中進行凍乾。
2. 進行秤重得到起始乾重 (W_0)。
3. 將樣品泡入裝有 20 mL 磷酸鹽緩衝溶液的樣品瓶中，並將樣品瓶置於 37° C 恆溫烘箱中，於不同時間點取出。
4. 當樣品於磷酸鹽緩衝溶液取出後秤重得到浸泡後濕重 (W_t)。
5. 並且計算重量變化，如以下公式：

$$\text{溶脹率} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100\%$$

W_0 = 材料的起始乾重

W_t = 材料的濕重

(八) 將 GelMA / HAMA 複合水凝膠進行降解性測試

1. 製備完的 GelMA / HAMA 複合水凝膠，於冷凍乾燥機中進行凍乾。
2. 進行秤重得到起始乾重 (W_0)。
3. 將樣品泡入裝有 20 mL 磷酸鹽緩衝溶液的樣品瓶中，並將樣品瓶置於 37° C 恆溫烘箱中，於不同時間點取出。
4. 當樣品於磷酸鹽緩衝溶液取出後，放入冷凍乾燥機進行凍乾，凍乾後秤重得到浸泡後乾重 (W_w)。
5. 並且計算重量損失，如以下公式：

$$\text{降解率} = \frac{W_0 - W_w}{W_0} \times 100\%$$

W_0 = 材料的起始乾重

W_w = 材料的降解乾重

(九) 生物相容性測試 – 細胞繼代

1. 將舊的 medium 吸出。
2. 使用 PBS 將細胞培養瓶洗滌。
3. 加入適量 Trypsin 並置入細胞培養箱 5 分鐘，再加入等量的 medium 以終止反應。（因 medium 中含有 trypsin inhibitor，可以終止 Trypsin 作用）
4. 吸取上述溶液到離心管，離心 5 min。
5. 將上清液倒出，加入適量 medium，使用移液管使細胞均勻混合。
6. 將 60 μ L 錐蟲藍染劑與 20 μ L 細胞懸浮液混和均勻。
7. 取 20 μ L 混和液至入細胞計數器中，在光學顯微鏡放大下計數。
8. 將利用公式算出一定量的細胞懸浮液，吸入到含有適量培養液的細胞培養瓶。
9. 移入細胞培養箱。

(十) 生物相容性測試 – CCK - 8 分析

1. 將製備好的 GelMA / HAMA 複合水凝膠，放入 24 孔盤中並在每孔種下 5×10^4 個細胞，加入 1 mL medium，並於每三天更換一次新鮮的 medium。
2. 於需要的時間點取出當中的 medium，使用磷酸鹽緩衝溶液清洗，每孔加入 1:9 比例的 CCK - 8 和 medium 混合試劑，再放回細胞培養箱反應 2 小時。
3. 每孔取液體 100 μ L 至 96 孔細胞培養盤中。
4. 以波長 450 nm 進行吸光值檢測。

(十一) GelMA / HAMA 複合水凝膠細胞攀附情形測試

1. 將製備好的 GelMA / HAMA 複合水凝膠，以 1cm \times 1cm 的方塊跟細胞 L929 共培養 3 天。
2. 將複合水凝膠浸泡於 4% 的福馬林中，再漸次以 50%、60%、70%、80%、90%、99% 酒精進行序列脫水。
3. 使用六甲基二矽氮烷乾燥，抽真空一夜。
4. 使用掃描式電子顯微鏡觀察複合水凝膠上細胞攀附情形。

(十二) 3D 列印 GelMA / HAMA 複合水凝膠支架

1. 將不同比例的 GelMA / HAMA 複合水凝膠裝入 3D 列印機的針筒中。
2. 使用配套軟體繪出模型。
3. 調整針筒內壓力、列印位置。
4. 開始列印。

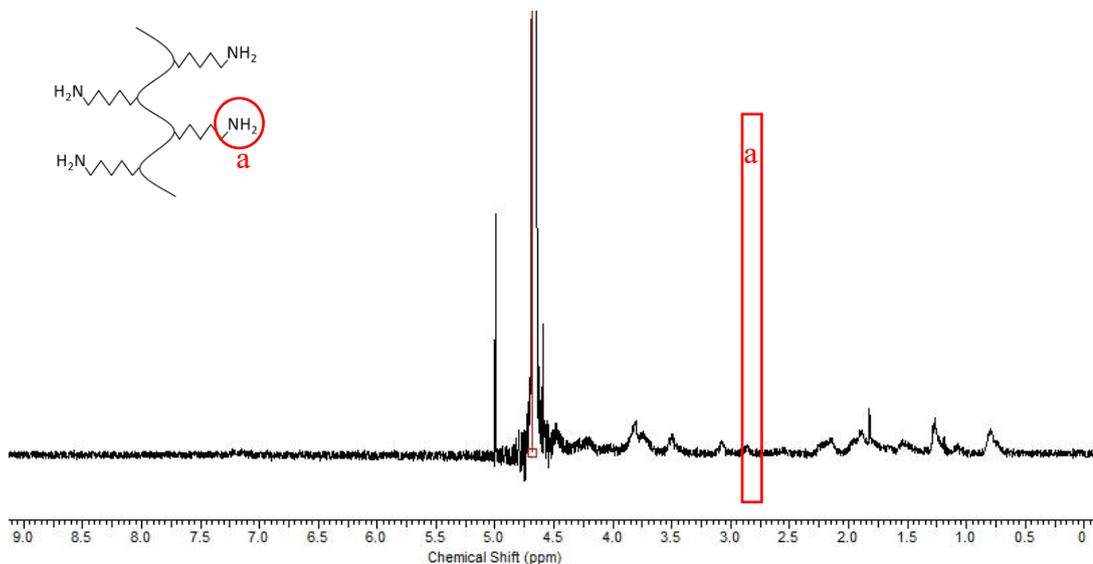
肆、研究結果與討論

一、以核磁共振圖譜(NMR)分析甲基丙烯酸明膠(GelMA)及甲基丙烯酸透明質酸(HAMA)合成狀況：

實驗原理：核磁共振光譜儀是透過儀器給予原子核一個恆定的外在磁場，因不同種原子核都會發生不同的共振頻率，透過傅立葉轉換將測量到的訊號轉換為頻譜，就可以深入分析出分子中的原子核構成及分子結構。

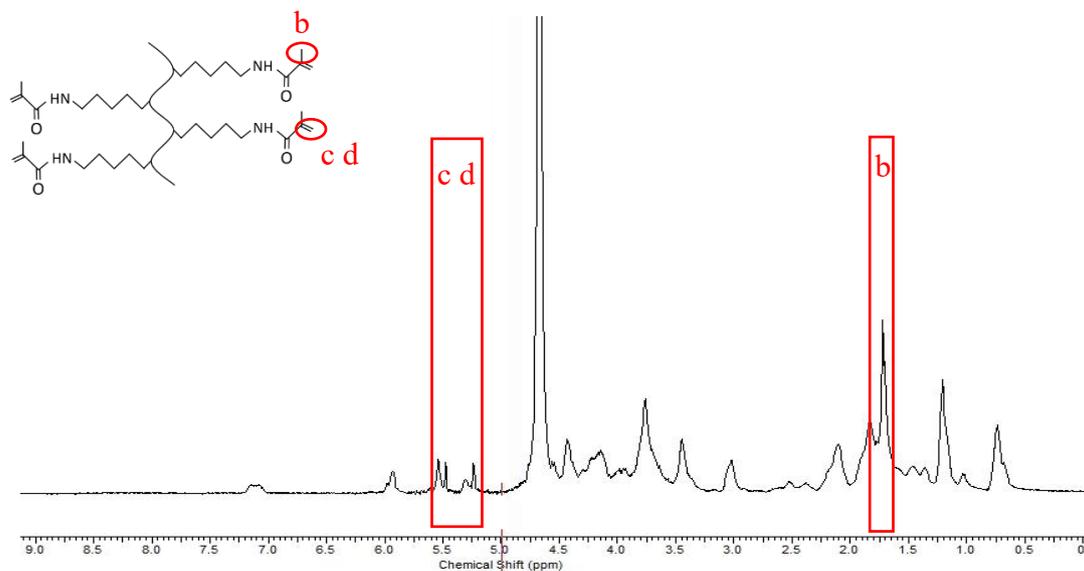
實驗結果：明膠(Gelatin)透過甲基丙烯酸酯(MA)修飾，來合成甲基丙烯酸明膠(GelMA)，以核磁共振光譜分析來確定合成是否成功，圖五為明膠、圖六為甲基丙烯酸明膠，在 1.9 ppm 為甲基官能基團，在 2.9 ppm 為離氨酸的亞甲基峰值，位於 5.2-5.7 ppm 為丙烯酸雙鍵，顯示出成功合成甲基丙烯酸明膠。透明質酸(HA)透過甲基丙烯酸酯(MA)修飾，來合成甲基丙烯酸透明質酸(HAMA)，圖七為透明質酸、圖八為甲基丙烯酸透明質酸，在 1.9 ppm 為甲基官能基團，和在 5.2-5.7 ppm 為丙烯酸雙鍵，顯示出成功合成甲基丙烯酸透明質酸。

(一) Gelatin



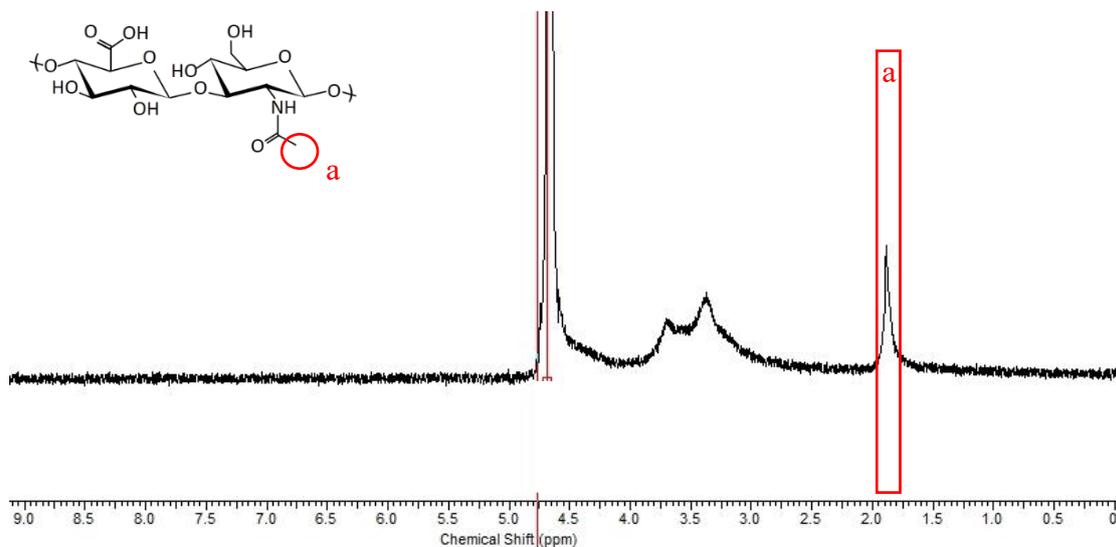
圖五、將明膠透過核磁共振圖譜(NMR)分析

(二) GelMA



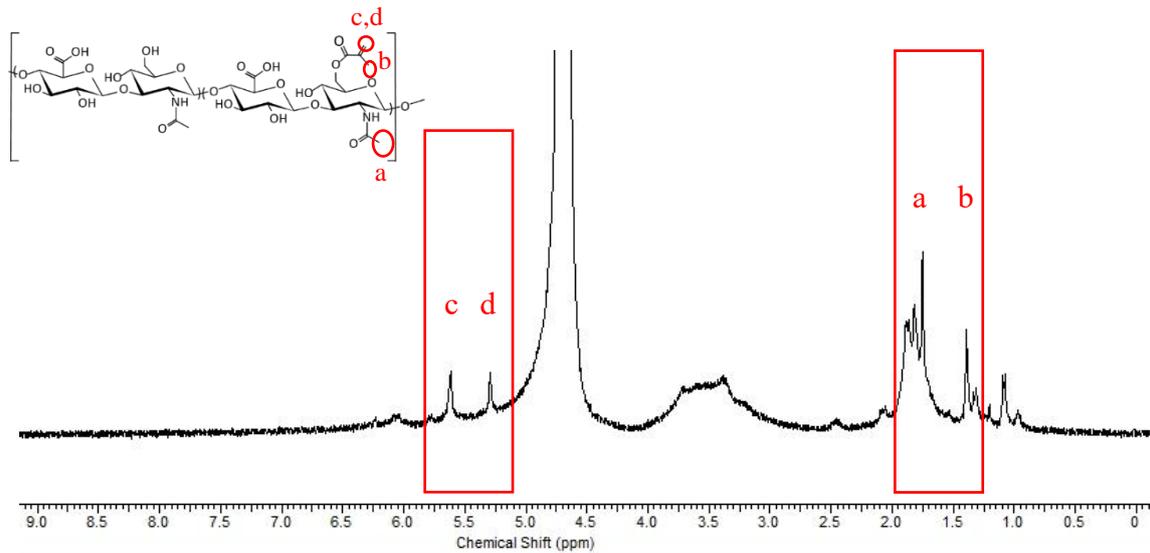
圖六、將甲基丙烯酸明膠 (GelMA) 透過核磁共振圖譜 (NMR) 分析

(三) HA



圖七、將透明質酸透過核磁共振圖譜 (NMR) 分析

(四) HAMA

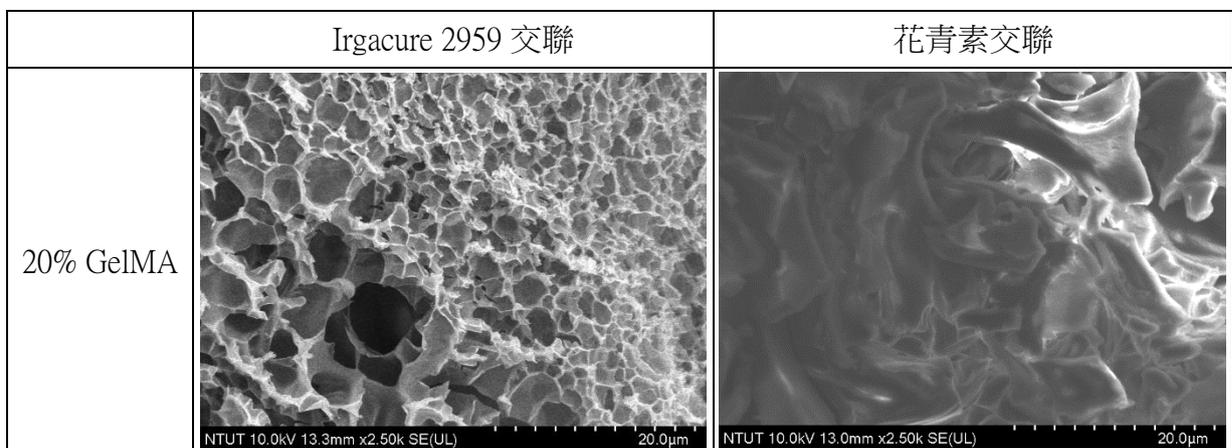


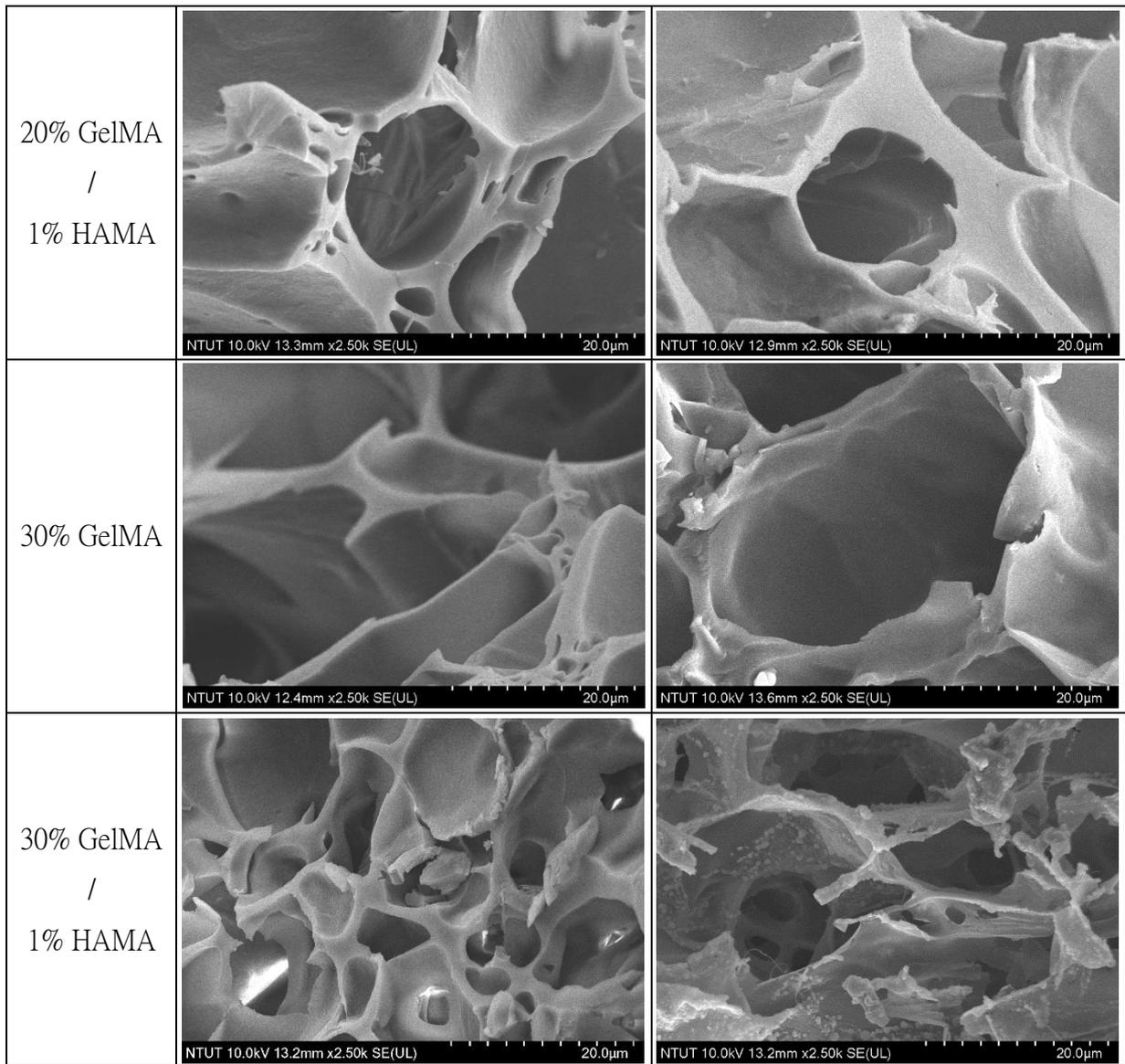
圖八、將甲基丙烯酸透明質酸（HAMA）透過核磁共振圖譜（NMR）分析

二、以場發射掃描式電子顯微鏡（FE-SEM）觀察複合水凝膠內部交聯微結構

實驗原理：場發射掃描式電子顯微鏡（Field Emission Scanning Electron Microscope，FE-SEM），是在極高的真空中，利用入射電子束與樣品產生的二次電子或背向散射電子等來成像之一種高解析度表面形貌檢測儀器，但如果樣品為非導體，需在表面鍍上一層金屬導電層，就可進行掃描拍攝，用於觀察表面結構、大小尺寸等。

實驗結果：經由冷凍乾燥後，進行掃描式電子顯微鏡觀察形態，可以看到複合水凝膠支架都有形成許多的孔洞結構。





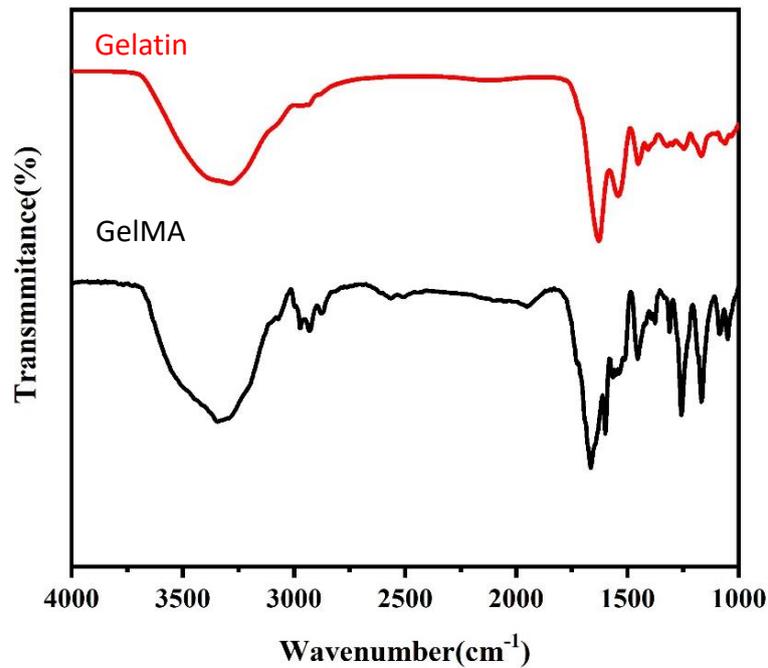
表一、透過場發射掃描式電子顯微鏡觀察複合水凝膠內部交聯微結構

三、GelMA / HAMA 複合水凝膠進行結構測試 (FTIR)

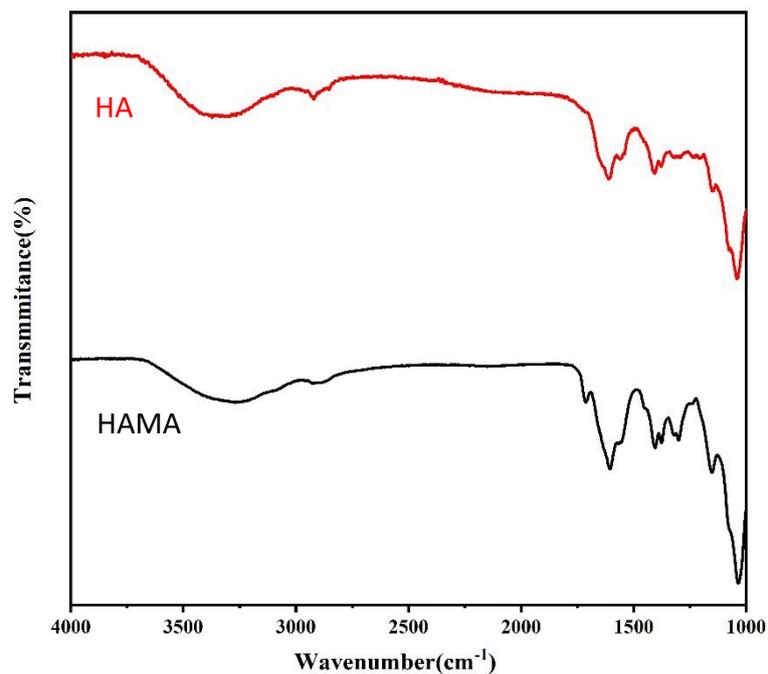
實驗原理：傅立葉轉換紅外線光譜儀，藉由麥克森干涉儀所得到的紅外光線來激發分子，且不同的分子官能基振動、轉動模式會吸收特定頻率的紅外光，最後進行躍升激發態。再由接收器收集紅外光能量，經傅立葉轉換形成紅外光光譜圖，就可對光譜圖做定性及定量分析。

實驗結果：由圖九得知，甲基丙烯酸明膠 (GelMA) 在 3300 cm^{-1} 位置有 O-H，在 1634 cm^{-1} 具有一級胺 C=O 伸縮振動的特徵峰， 1540 cm^{-1} 則具有二級胺 N-H 彎曲振動的特徵峰， 1448 cm^{-1} 位置為 C-N/N-H 平面振動之特徵峰，藉由上述峰值證明本材料已成

功合成；由圖十得知，甲基丙烯酸透明質酸（HAMA）在 3280 cm^{-1} 位置有 O-H，在 2924 cm^{-1} 具有 C-H 伸縮振動的特徵峰， 1613 cm^{-1} 則具有 C=C 伸縮振動的特徵峰，在 1555 cm^{-1} 則具有二級胺 N-H 彎曲振動的特徵峰， 1408 cm^{-1} 位置則為 CH_2 、 CH_3 之特徵峰，藉由上述峰值證明本材料已成功合成。



圖九、明膠（Gelatin）與甲基丙烯酸明膠（GelMA）傅立葉轉換紅外線光譜分析

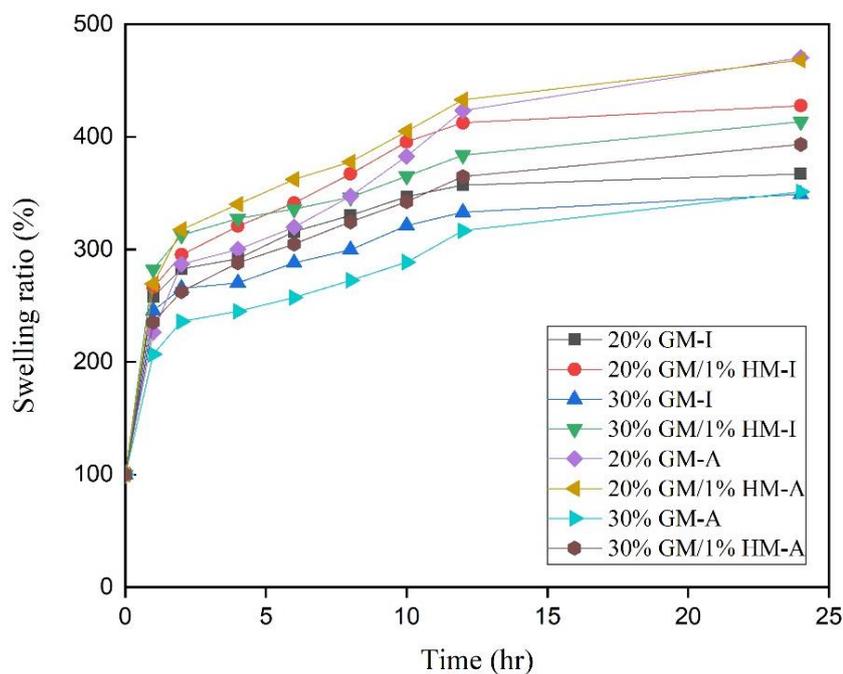


圖十、透明質酸（HA）與甲基丙烯酸透明質酸（HAMA）傅立葉轉換紅外線光譜分析

四、GelMA / HAMA 複合水凝膠溶脹性測試

實驗原理：將製備完的 GelMA / HAMA 複合水凝膠，在 37° C 下泡入 PBS 當中，於不同時間取出秤重，水凝膠因隨著浸泡時間的增加，重量會隨之升高，觀察不同光交聯劑和不同的 GelMA 比例之間不同是否影響溶脹速率。

實驗結果：如圖十一所示，溶脹率隨著 GelMA (GM) 的比例增高而下降，推測是由於 GM 含量增加使交聯程度增加，造成能溶脹的空間減少；而添加 HAMA (HM) 溶脹率隨之上升，推測是由於 HM 的存在，使得材料所能吸水的總量增加。

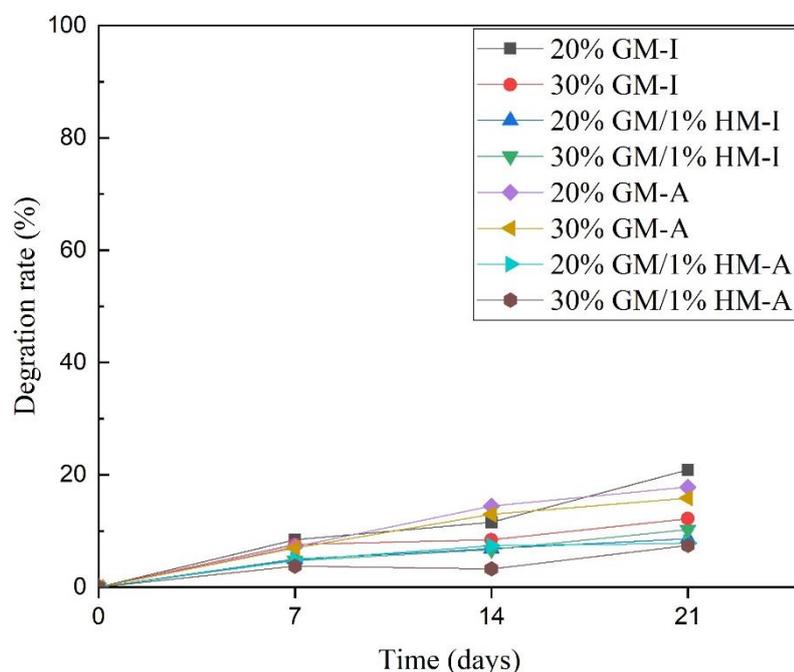


圖十一、複合水凝膠之溶脹性測試結果

五、GelMA / HAMA 複合水凝膠降解性測試

實驗原理：將製備完的 GelMA / HAMA 複合水凝膠，在 37° C 下泡入 PBS 當中，於不同時間取出秤重，水凝膠因隨著浸泡時間的增加，材料降解，凍乾後重量會隨之降低，觀察不同光交聯劑和不同的 GelMA 比例之間不同是否影響降解速率。

實驗結果：如圖十二所示，GelMA(GM)濃度提高，降解速率下降；加入 HAMA(HM)交聯，有效降低降解速率。推測是由於 GelMA 帶負電，HAMA 帶正電，兩者之間可以形成更為緊密的交聯結構和網絡，因此而使結構可維持較長時間。

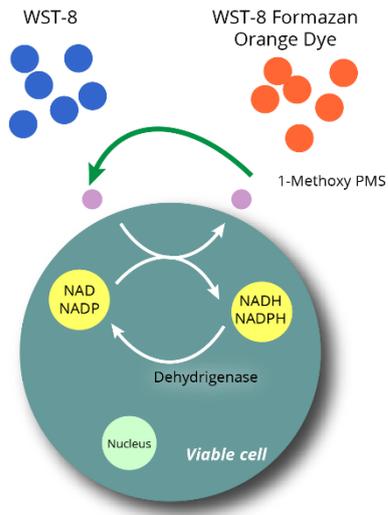


圖十二、複合水凝膠之降解性測試結果

六、生物相容性測試

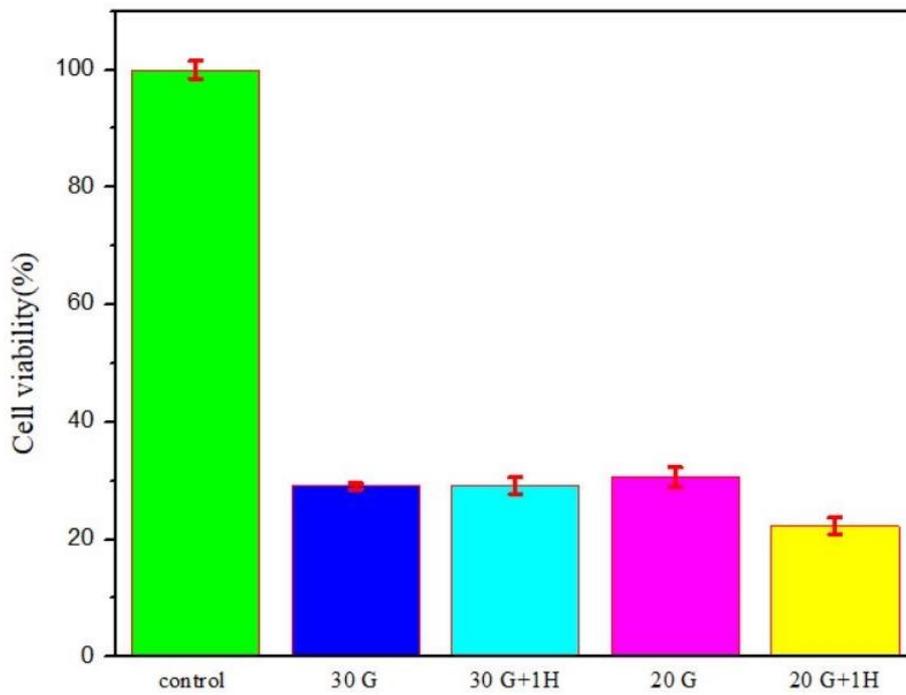
實驗原理：Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 試劑中含有水溶性 tetrazolium salt – WST-8，如圖十三，可因活細胞線粒體中的脫氫酶 (dehydrogenase) 活性，可溶於培養基中的水溶性橘黃色產物 (WST-8 formazan)，當存活細胞的數量愈多時，脫氫酶的活性也會愈多，可形成的水溶性橘黃色產物也會增多，使顏色越深，利用這特性可對材料進行細胞毒性分析。

實驗結果：所有組別對 L929 做細胞毒性測試，在圖十四可以看到 20% GM、30% GM、20% GM / 1% HM 和 30% GM / 1% HM 使用 I-2959 進行光交聯的組別，與 control 組相比，細胞活性大幅下降；然而在圖十五可以看到使用花青素作為交聯劑的組別，表現出較高的細胞存活率，皆在 70% 以上，代表此組別具有良好生物相容性。



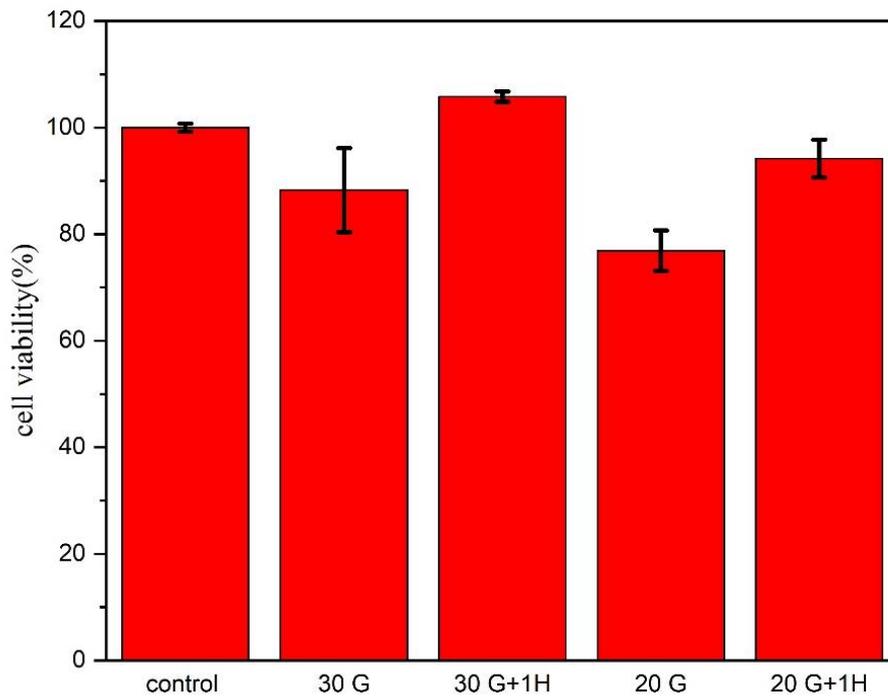
圖十三、CCK-8 assay 實驗原理

(一) Irgacure 2959



圖十四、Irgacure 2959 複合水凝膠生物相容性測試

(二) 花青素

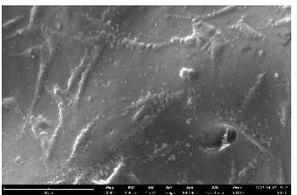


圖十五、花青素複合水凝膠生物相容性測試

七、GelMA / HAMA 複合水凝膠細胞攀附情形測試

實驗原理：細胞在實驗室培養基生長的過程，首先分泌細胞外基質，這些蛋白質黏附在培養皿的表面，然後細胞才透過細胞膜和細胞外基質的作用黏附到培養皿底部。而當一個外部材料具有孔洞，又有優異的生物相容性時，能讓細胞攀附於上，幫助原組織的修復及再生。

實驗結果：以掃描式電子顯微鏡觀察複合水凝膠之細胞攀附情形，如表二內各張照片可以看到細胞都有成功攀附到材料上。

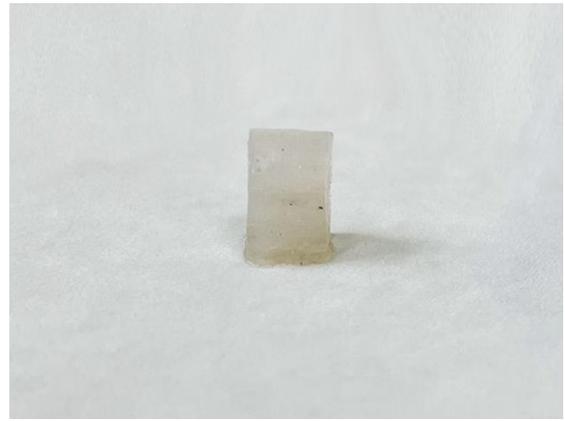
20% GMelA	20% GMelA / 1% HAMA	30% GMelA	30% GMelA / 1% HAMA
			

表二、細胞攀附情形測試

八、3D 列印 GelMA / HAMA 複合水凝膠支架

實驗原理：基於生物 3D 列印機提供氣動的擠出系統，並以適當的列印針頭和內置 UV LED 固化功能，可快速進行生物列印。

實驗結果：使用 3D 列印機配合相應繪圖軟體，成功列印出使用花青素光交聯之複合水凝膠支架，如表三內各張照片均顯示該材料可利用 3D 列印機，製作出各種符合生醫需求之規格與形狀。

	列印一層的水凝膠	列印完整的水凝膠
四角柱		
三角柱		
圓柱		

表三、3D 列印水凝膠

伍、結論

- 一、明膠 (Gelatin) 與甲基丙烯酸酯 (MA) 合成甲基丙烯酸明膠 (GelMA) 中，甲基官能基團為 1.9 ppm，丙烯酸雙鍵為 5.2-5.7 ppm，離氨酸的亞甲基峰值則位於 2.9 ppm，顯示出成功合成甲基丙烯酸明膠。
- 二、透明質酸 (HA) 與甲基丙烯酸酯 (MA) 合成甲基丙烯酸透明質酸 (HAMA) 中，甲基官能基團為 1.9 ppm，丙烯酸雙鍵為 5.2-5.7 ppm 顯示出成功合成甲基丙烯酸透明質酸。
- 三、溶脹性測試發現，溶脹率隨著 GelMA 的比例增高而下降，而添加 HAMA 溶脹率則隨之上升。
- 四、降解性測試發現，隨著 GelMA 濃度提高，則降解速率下降；若加入 HAMA 交聯，能有效降低降解速率。
- 五、在生物相容性測試中，使用 CCK-8 試劑來測試材料對細胞的毒性，所有以 I-2959 進行光交聯的組別，與 control 組相比，細胞活性大幅下降；而在使用花青素作為交聯劑的組別，細胞存活率皆在 70% 以上，代表此組別具有良好生物相容性，證明以花青素光交聯的複合水凝膠未來有望應用於生醫領域。
- 六、使用 SEM 觀察到花青素光交聯之複合水凝膠能成功使細胞攀附於材料上。
- 七、使用 3D 列印機配合相應繪圖軟體，成功列印出使用花青素光交聯之複合水凝膠支架，證明該材料為可用於 3D 列印的生物墨水，而利用 3D 列印機，可製造出配合生醫需求之各種規格、形狀。
- 八、綜合上述各項特性，證實添加花青素的光交聯複合水凝膠，在組織工程材料應用中極具潛力。

陸、參考文獻資料

1. Jeyaram, S., & Geethakrishnan, T. Vibrational spectroscopic, linear and nonlinear optical characteristics of Anthocyanin extracted from blueberry, 2020.
2. Michalak, M., M. Pierzak, B. Kręcis, and E. Suliga, Bioactive Compounds for Skin Health: A Review. *Nutrients*, 2021. 13 (1) : p. 203.
3. Hom, D., Wound Healing in Relation to Scarring. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 1998. 6: p. 111-124
4. Zhe Chen, Donghao Zhao, Binhong Liu, Guodong Nian, Xiaokeng Li, Jun Yin, Shaoxing Qu, Wei Yang, 3D Printing of Multifunctional Hydrogels, 2019.
5. Jinhua Li, Chengtie Wu, Paul K. Chu, Michael Gelinsky, 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications, 2020.
6. Sungmin Hong, Dalton Sycks, Hon Fai Chan, Shaoting Lin, Gabriel P. Lopez, Farshid Guilak, Kam W. Leong, Xuanhe Zhao, 3D Printing of Highly Stretchable and Tough Hydrogels into Complex, Cellularized Structures, 2015.
7. J. Liang, P. J. Dijkstra, A. A. Poot & D. W. Grijpma, Hybrid Hydrogels Based on Methacrylate-Functionalized Gelatin (GelMA) and Synthetic Polymers, 2022.
8. Erlin Arda Safitri, I Putu Mahendra, Anggi Eka Putra, M Alvien Ghifari, Demi Dama Yanti, Yusnaidar Yusnaidar, Bambang Ariwahjoedi, Jose Alberto Mendez, Multicolor PEGDA/LCNF Hydrogel in the Presence of Red Cabbage Anthocyanin Extract, 2021.
9. Allen Zennifer, Sweda Manivannan, Swaminathan Sethuraman, Sangamesh G. Kumbar, Dhakshinamoorthy Sundaramurthi, 3D bioprinting and photocrosslinking: emerging strategies & future perspectives, 2021.
10. Yongping Liang, Jiahui He, Baolin Guo, Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing, 2021.
11. Miri Klein, Elena Poverenov, Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture, 2020.
12. Claire Yu, Jacob Schimelman, Pengrui Wang, Kathleen L. Miller, Xuanyi Ma, Shangting You, Jiaao Guan, Bingjie Sun, Wei Zhu, Shaochen Chen, Photopolymerizable Biomaterials and Light-Based 3D Printing Strategies for Biomedical Applications, 2020.

【評語】 052402

選用天然花青素作為光交聯，透過紫外光交聯甲基丙烯酸明膠及甲基丙烯酸酯化透明質酸，製成具低細胞毒性之光交聯複合水凝膠，進而作為 3D 列印原料並列印成三維支架。相較於利用光起始劑 Irgacure2959 生成複合水凝膠，花青素較為環境友善，但是，本作品與 2022 年碩士論文「可見光交聯之甲基丙烯酸明膠與甲基丙烯酸透明質酸複合水膠敷材之研究」相關性高，偏重探討光交聯複合水凝膠之細胞存活率、攀附情形、溶脹率與降解率測試結果數據分析比較，較缺乏深入探討複合水凝膠 3D 列印之應用性，同時，未詳細說明如何獲得花青素，例如，何處購買或如何萃取。

作品海報

摘要

本研究利用天然花青素作為光交聯劑，成功製作出低毒性的光交聯水凝膠，並可利用3D 列印技術，應用於生醫領域三維支架。

於不同比例的甲基丙烯酸明膠及甲基丙烯酸透明質酸中分別加入花青素或光起始劑 Irgacure2959，並使用365 nm波長紫外光作為交聯光源以製備複合水凝膠支架。

利用NMR、FTIR、SEM及溶脹性、降解性、攀附情形測試，確認分子結構及材料特性分析。體外試驗進行細胞相容性測試，結果顯示加入花青素的光交聯水凝膠對細胞的毒性遠低於添加I2959的。最後使用3D列印機將花青素光交聯水凝膠堆疊列印成三維支架。本研究顯示花青素光交聯水凝膠未來可成為生物3D列印的原料，應用於組織工程領域。

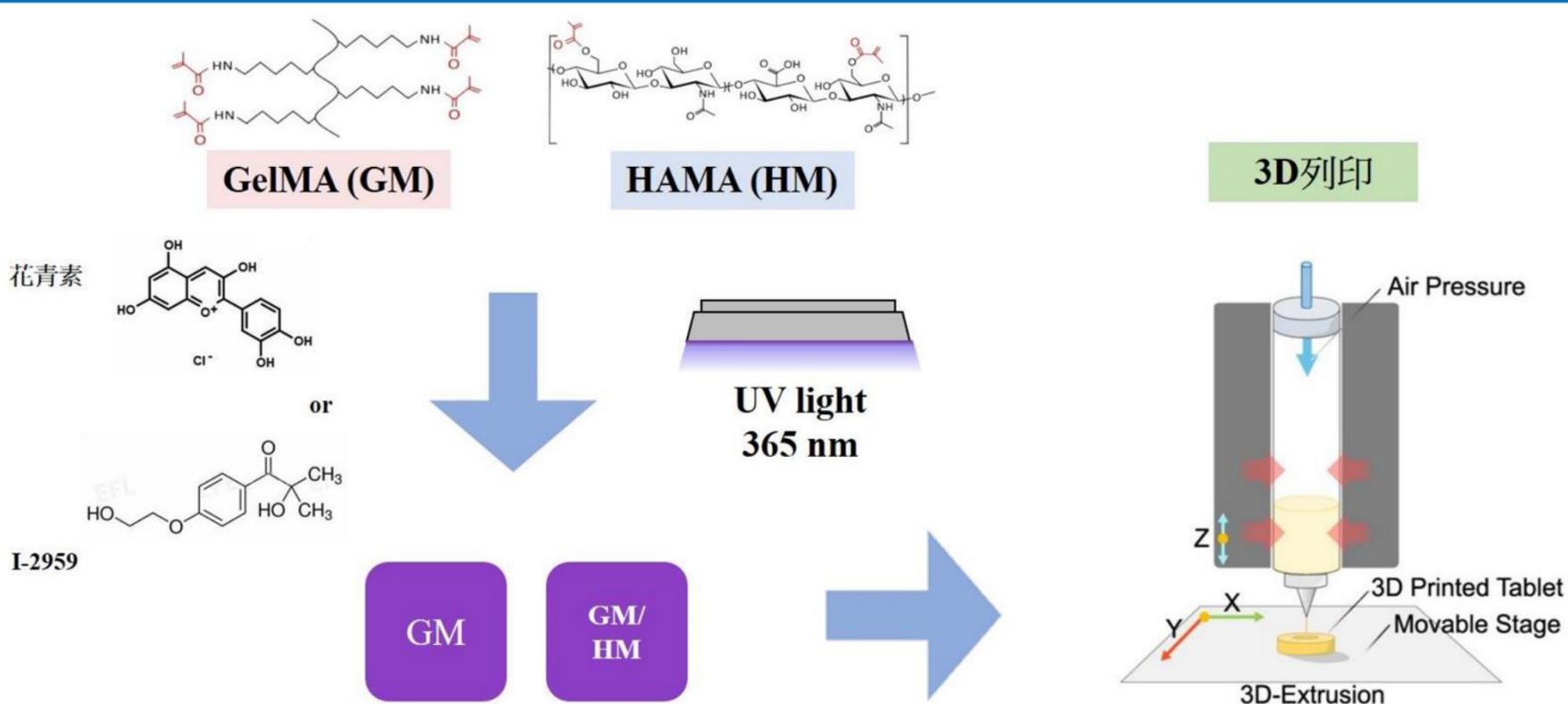
一、研究動機

隨著生物科技日新月異的發展，組織工程與生物3D列印的技術日益進步且運用廣泛，現今大多之三維多孔支架是以化學合成的高分子為主，或是使用有機溶劑進行交聯，而且現今被廣泛使用的光起始劑Irgacure2959，其所產生的自由基具有高度的細胞毒性。而花青素為一種水溶性的天然色素，存在於許多日常易取得的植物中，因此本研究希望能以天然、低毒性的交聯劑取代高分子有機溶劑，製備出較簡單且易取得的生物3D列印原料。

二、研究目的

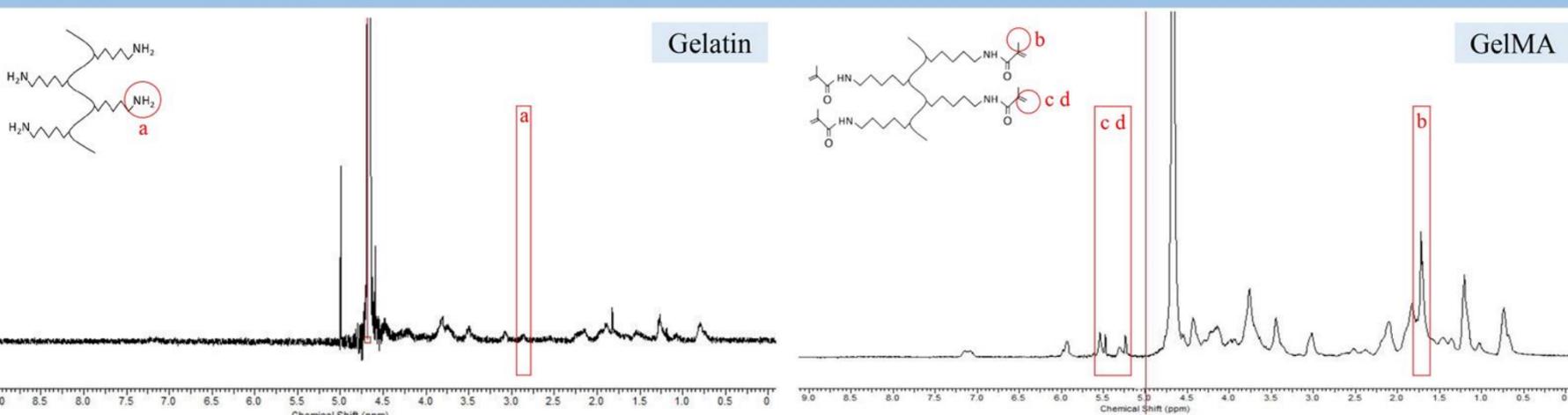
- (一) 合成甲基丙烯酸明膠及甲基丙烯酸透明質酸，並探討其性質
- (二) 探討以光起始劑I2959、花青素進行光交聯之複合水凝膠性質差異
- (三) 探討光交聯複合水凝膠之細胞存活率和攀附情形、溶脹率和降解率
- (四) 嘗試以花青素光交聯複合水凝膠進行3D列印

三、研究設計與方法



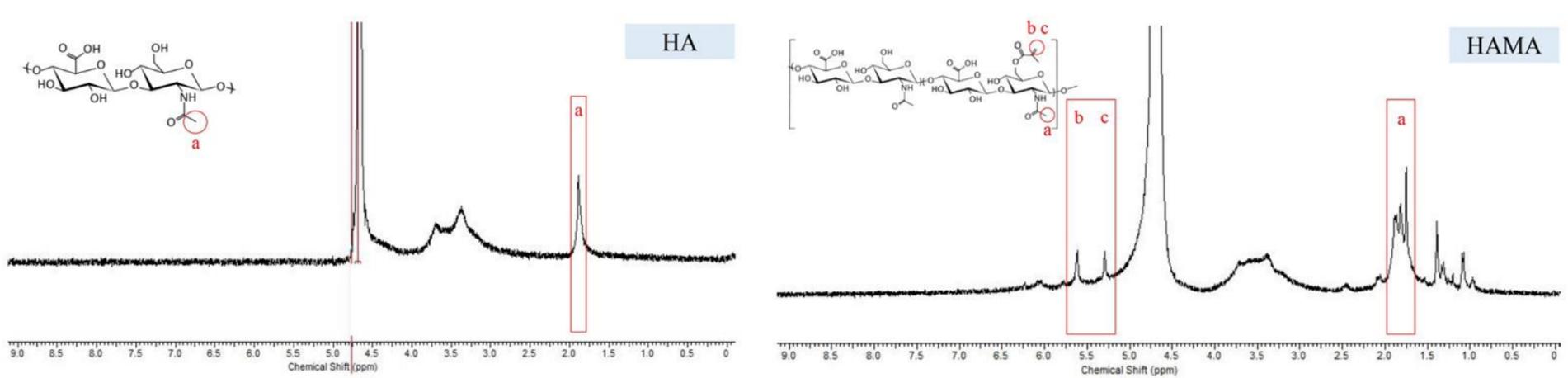
四、研究結果與討論

(一) 核磁共振圖譜 (NMR) 分析



- 1.9ppm 為甲基官能基團
- 2.9ppm 為離氨酸的亞甲基峰值
- 5.2~5.7ppm 為丙烯酸雙鍵

確認GelMA合成成功



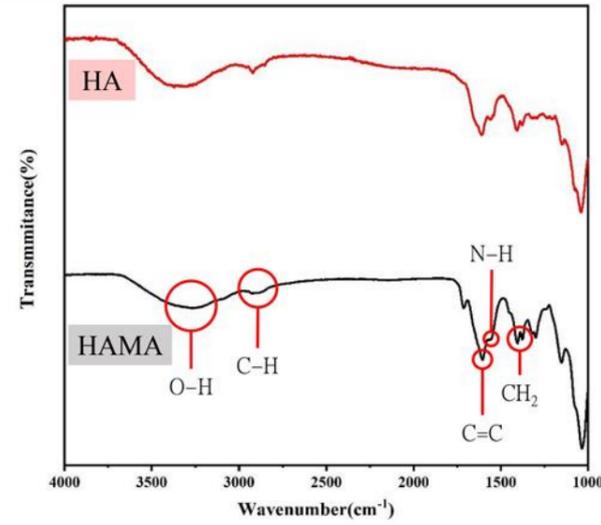
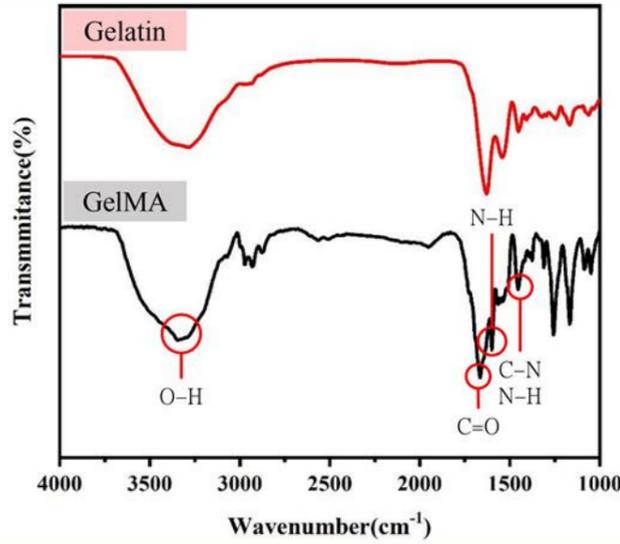
> 1.9ppm 為甲基官能基團

> 5.2~5.7ppm 為丙烯酸雙鍵

確認HAMA合成成功

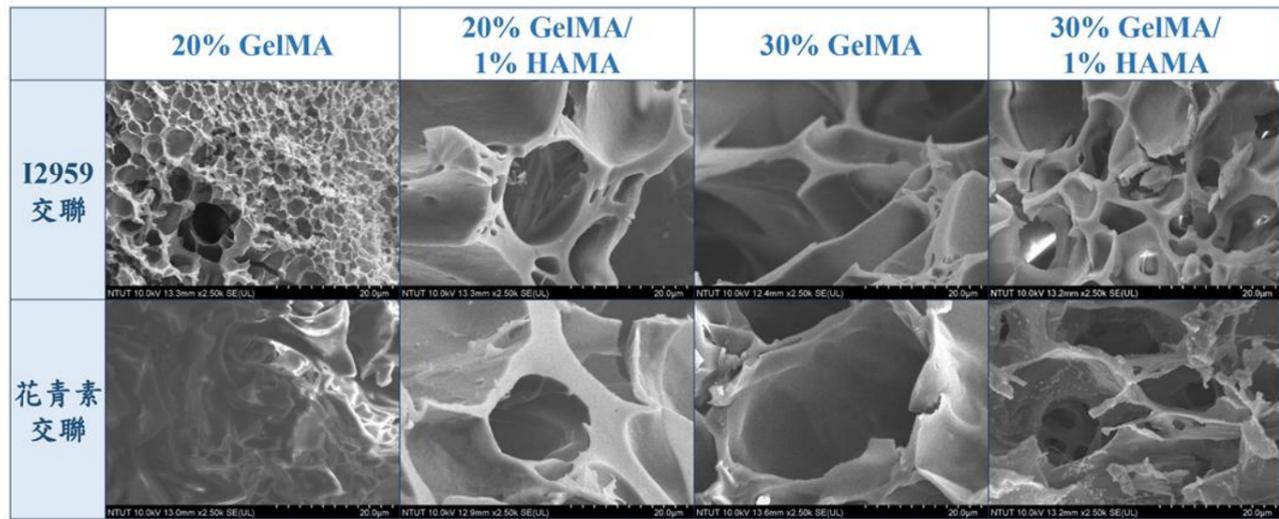
(二) 傅立葉轉換紅外線 (FTIR) 光譜分析

- 甲基丙烯酸明膠、甲基丙烯酸透明質酸均有顯示出官能基團的特徵峰。
- 藉由特徵峰峰值證明兩種材料均已成功合成。



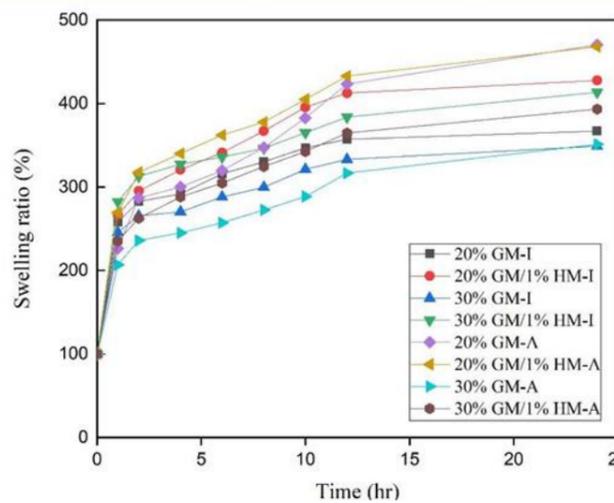
(三) 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察複合水凝膠內部交聯微結構

- 經由冷凍乾燥後，利用掃描式電子顯微鏡觀察形態。
- 複合水凝膠支架都有形成許多的孔洞結構。

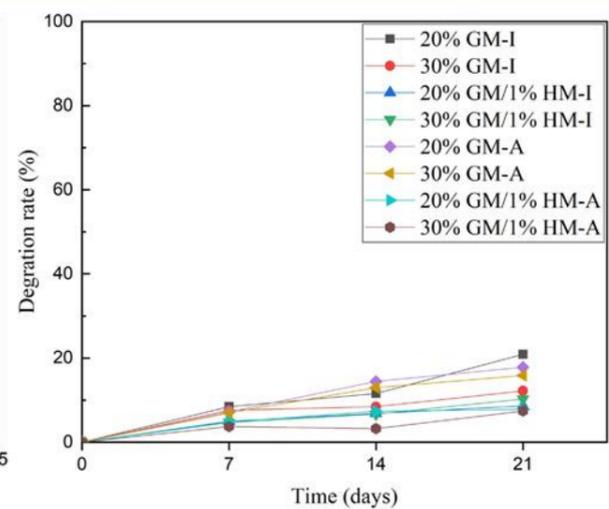


(四) 複合水凝膠之溶脹性、降解性測試

- 溶脹率隨著GelMA的比例增高而下降；添加HAMA，溶脹率隨之上升。
- GelMA濃度提高，降解速率下降；加入HAMA交聯，則可有效降低降解速率。



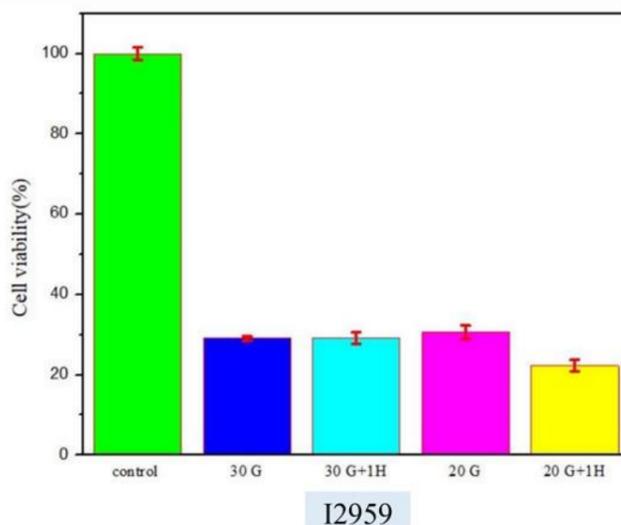
溶脹性



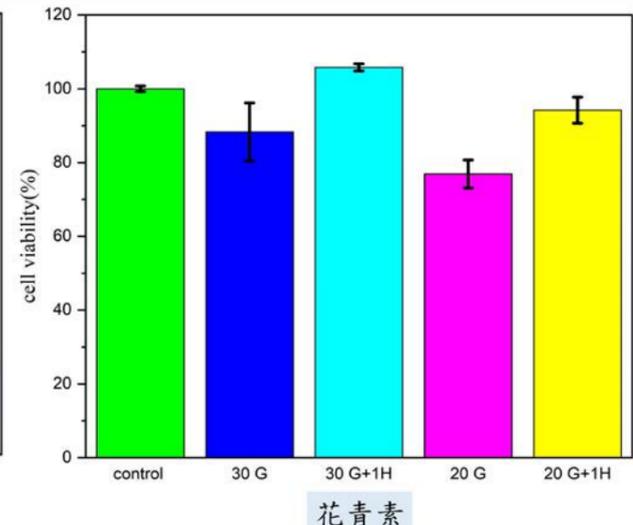
降解性

(五) 複合水凝膠生物相容性測試

- 使用I2959進行光交聯的組別，與control組相比，細胞活性大幅下降。
- 使用花青素作為交聯劑的組別，皆表現出較高的細胞存活率，皆在70%以上。



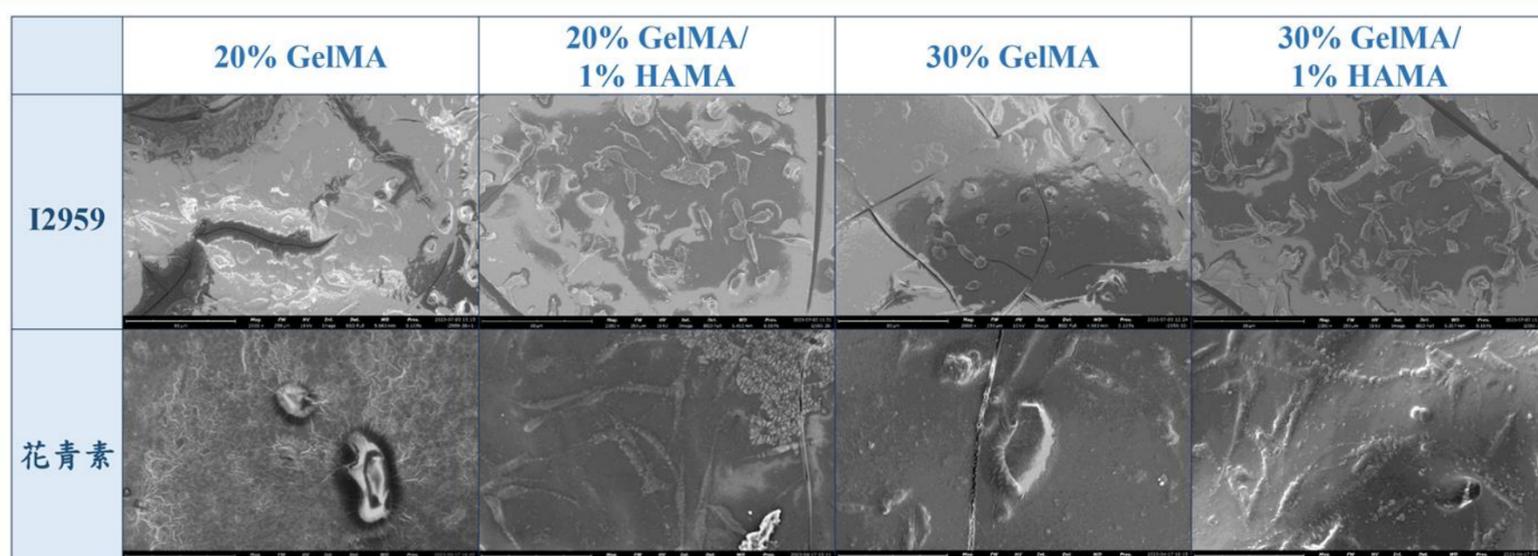
I2959



花青素

(六) 細胞攀附

- 以 SEM 觀察光交聯水凝膠細胞攀附情形。



(七) 3D列印複合水凝膠支架

- 使用3D列印機配合相應繪圖軟體，成功列印出花青素光交聯之複合水凝膠支架。
- 表明該材料基於3D列印機的使用，可更加配合生醫需求之規格、形狀。



五、結論

- 明膠(Gelatin)與甲基丙烯酸酯(MA)合成甲基丙烯酸明膠(GelMA)中，甲基官能基團為1.9ppm，丙烯酸雙鍵為5.2-5.7ppm，離氨酸的亞甲基峰值則位於2.9ppm，顯示出成功合成甲基丙烯酸明膠。
- 透明質酸(HA)與甲基丙烯酸酯(MA)合成甲基丙烯酸透明質酸(HAMA)中，甲基官能基團為1.9ppm，丙烯酸雙鍵為5.2-5.7ppm，顯示出成功合成甲基丙烯酸透明質酸。
- 溶脹性測試發現，溶脹率隨著GelMA的比例增高而下降，而添加HAMA溶脹率則隨之上升。
- 降解性測試發現，隨著GelMA濃度提高，則降解速率下降；若加入HAMA交聯，能有效降低降解速率。
- 在生物相容性測試中，使用CCK-8試劑來測試材料對細胞的毒性，所有以I2959進行光交聯的組別，與control組相比，細胞活性大幅下降；而在使用花青素作為交聯劑的組別，細胞存活率皆在70%以上，代表此組別具有良好生物相容性。
- 使用SEM觀察到花青素光交聯之複合水凝膠能成功使細胞攀附於材料上。
- 使用3D列印機配合相應繪圖軟體，成功列印出使用花青素光交聯之複合水凝膠支架，證明該材料為可用於3D列印的生物墨水，而利用3D列印機，可製造出更加配合生醫需求之各種規格、形狀。

六、未來展望

細胞毒性測試顯示，使用花青素作為交聯劑的組別具有良好的生物相容性，而花青素複合水凝膠經測試確認其為可用於3D列印的生物墨水，且若利用3D列印機，可製造出配合生醫需求之各種規格、形狀，綜合上述各項特性，證實添加花青素的光交聯複合水凝膠，在組織工程材料應用中極具發展潛力，未來可望應用於臨床生醫領域。

七、參考資料

- Jeyaram, S., & Geethakrishnan, T. Vibrational spectroscopic, linear and nonlinear optical characteristics of Anthocyanin extracted from blueberry, 2020.
- J. Liang, P. J. Dijkstra, A. A. Poot & D. W. Grijpma. Hybrid Hydrogels Based on Methacrylate-Functionalized Gelatin (GelMA) and Synthetic Polymers, 2022.
- Jinhua Li, Chengtie Wu, Paul K. Chu, Michael Gelinsky. 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications, 2020.