

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

佳作

052415

海藻酸鹽雙層水膠搭載聚電解奈米粒子應用於
慢性傷口之研究

學校名稱：復旦學校財團法人桃園市復旦高級中等學
校

作者： 高二 羅婕寧	指導老師： 陳智忠
---------------	--------------

關鍵詞：水膠、聚電解奈米粒子、慢性傷口

摘要

本研究嘗試以海藻酸鹽設計製作雙層水膠，並搭載奈米粒子於雙層水膠中，達到兼具治療與保護傷口的效果。

透過實驗數據驗證，此雙層水膠之儲存模數相比人體細胞外間質，得知水膠足以提供傷口張應力。而表面帶負電之奈米粒子，其粒徑尺寸 $\sim 184 \pm 9 \text{nm}$ ，以及界達電位負電峰值為 $-19.9 \pm 0.2 \text{mV}$ ，能夠有效地吸附帶正電之生長因子並持續釋放。另外，藉由水膠不同的降解速率及載藥特性，達到首先減緩發炎反應，並給予血管新生功效。動物實驗成功建立模型，由一般傷口證實，加入水膠與抗發炎因子 IL-10/促血管新生因子 VEGF+PDGF 療法的實驗組別，其修復期較短，由 db/db 糖尿病鼠模型證實生長因子的釋放有助於傷口癒合。說明研究中的海藻酸鹽雙層水膠系統，極具持續開發與應用的價值。

壹、前言

一、研究動機

現今日常生活飲食所具有的高鹽、高糖、高油脂、高熱量的型態，使得成人健康面臨三高問題（高血糖、高血脂、高血壓），這也是未來醫療必須面對的嚴肅課題。由健保署提出的資料顯示，近年來第二型糖尿病患人數逐年上升，民國 100 年第二型患者數約 110 萬人，到 109 年竟飆升至 160 萬人左右。根據國民健康署統計，全國約有 200 多萬名糖尿病的患者，且每年以 25,000 名人數的速度持續增加，糖尿病對人們健康的影響與醫療量能的負擔不容小覷。

由於糖尿病患者常有傷口周圍血管病變等因素，導致傷口癒合速度變慢，因此糖尿病患者經常飽受慢性傷口所苦，而慢性傷口即為無法進行正常階段傷口癒合之傷口。通常，慢性傷口的發炎階段停滯不前，由於促炎細胞因子、蛋白酶、活性氧原體 (Reactive oxygen species, 以下簡稱 ROS) 和衰老細胞水準過高，使幹細胞功能失調，微生物刺激免疫細胞不斷湧入，導致組織損傷。此外，蛋白酶的升高導致細胞外間質 (Extra cellular matrix, 以下簡稱 ECM) 的破壞和生長因子及其受體的降解。ECM 的破壞不僅阻止傷口向前進入增生期，且吸引更多的炎症細胞，從而放大炎症循環。另外，免疫細胞產生 ROS，低濃度的 ROS 可防禦微生物，然而在慢性傷口中，主要的缺氧和炎症環境會增加 ROS 的產生，從而破壞 ECM 蛋白並導致細胞損傷。

研究者的姑婆是糖尿病患者也是慢性傷口患者，曾因腳部傷口反覆治療無法痊癒，而引發蜂窩性組織炎，導致雙腿先後截肢，並終身使用輪椅。因現代醫療尚未有相當成熟的技術面對慢性傷口之照護與治療，僅能接受清創及使用抗生素，而一般常用的敷材則是紗布。紗布雖然擁有價格便宜之優點，卻不容易吸收調節慢性傷口發炎後，滲出的大量組織液與膿性分泌物，而且濕潤的傷口環境，極易滋生細菌，例如金黃色葡萄球菌、化膿性鏈球菌、腸球菌和銅綠假單胞菌，細菌與傷口搶奪營養素與氧氣，進而使傷口壞死，從最初的局部感染，再發展成為全身性的感染、敗血症或多重器官功能障礙，並且可能危及生命。

於是研究者開始搜尋資料與進行文獻探討，嘗試設計出兼具治療與保護傷口之敷材。海

藻酸是存在於褐藻細胞壁中的一種天然多醣高分子，具有生物可降解性與生物相容性，經常被應用於醫藥領域之中。海藻酸水膠做為一個低成本及高生物相容性的材料，有極大的機會成為新一代的人工敷料候選者。帶負電的海藻酸鹽，容易與金屬陽離子螯合形成立體網狀結構的水凝膠，可作為組織工程的支架和藥物傳輸的載體，或作為止血材料..等諸多生物醫學上的應用。不論是從成本面考量，海藻酸水膠相較於其他生醫材料取得成本較低，或是從實際應用面考量，海藻酸水膠成膠機制簡單，海藻酸材料的研究，是目前生醫領域之新興應用的重要領域。

隨著人口結構高齡化，醫療衛生保健相關應用領域，也是現今國家產業發展的重點，如何達到精準治療並且快速見效，是目前醫療領域面對的重要課題。希望藉著此研究，為慢性傷口患者帶來一些貢獻。

二、研究目的

本研究嘗試使用海藻酸鹽進行設計與製作雙層水膠，並搭載奈米粒子於雙層水膠之中，依照時間順序性釋放生長因子，探討生長因子療法，是否能夠兼具治療慢性傷口，並達成抑制發炎同時促進傷口修復的效果。研究中將使用流變儀、動態光散射儀、分光光度儀…等儀器，確認此水膠的材料性質是否能達到修復與保護慢性傷口的目的，最後也會以動物模型驗證此療法是否具有一定的成效。

貳、文獻探討

一、慢性傷口成因與目前治療方式

傷口癒合分為四個階段，依序為止血、發炎、癒合與新生，而慢性傷口停留於發炎階段，無法進階至下個癒合階段。一旦傷口出血得到控制，嗜中性粒細胞、巨噬細胞和淋巴細胞等致發炎細胞遷移到傷口，並促進發炎，嗜中性粒細胞為傷口發炎顯著的指標，它的功能為清除入侵的微生物、細菌和凋亡的細胞碎片，並釋放基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases, 以下簡稱 MMPs)與活性氧原體(ROS)。活性氧原體為體內代謝產物，屬於不穩定之自由基，在發炎環境下，其過多的數量將導致內皮和組織損傷[1]。癒合階段前期通常與發炎階段重疊，伴隨著抗發炎因子與生長因子乙型轉化生長因子(transforming growth factor Beta, 以下簡稱 TGF- β)、血小板衍生長因子(Platelet-derived growth factor, 以下簡稱 PDGF)、血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factor, 以下簡稱 VEGF)、白細胞介素 6 (Interleukin6, 以下簡稱 IL-6)和白細胞介素 10(Interleukin10, 以下簡稱 IL-10)等的釋放[2]，在癒合過程中，成纖維細胞和內皮細胞支持毛細血管生長、膠原形成和肉芽組織的形成[3]。年齡、疾病等因子將影響發炎與癒合階段，慢性傷口惡化的原因為發炎的惡性循環，嗜中性粒細胞導致降解過多本該幫助細胞成長的金屬蛋白酶 (MMPs)，釋出活性氧原體(ROS)損害周圍組織，並招來更多嗜中性粒細胞。最終導致成纖維細胞無法聚集於細胞外基質(ECM)與膠原蛋白的降解[4]。

慢性傷口是指傷口癒合超過應當癒合的時間(一般指大於等於三周)，大多數慢性傷口與糖尿病相關的潰瘍、壓瘡或壓力有關，然而，目前技術以清創以紗布給予壓力止血或是切除壞死組織為主，新興療法包含新型敷料與生長因子療法。

新型的敷料包括人工皮、水凝膠、海藻酸鹽敷料、泡沫和膠原蛋白產品等[5]，然而各種敷料均有其優點與限制。例如：和海藻酸一樣為天然高分子之膠原蛋白敷料生物相容性高，且具備生物可分解吸收性，可提供細胞水分，避免脫水，但缺點是組織液容易滲出，敷料含水量高，容易使細菌生成。而生長因子治療，主要是以模擬生理信號，注射遞送組織再生的生長因子為主，它們可以向特定細胞受器發出信號，恢復組織功能。然而，生長因子的不穩定性，使此項治療難以達成，因此水膠成為生長因子遞送的新趨勢，提供生長因子一個穩定

且持續的遞送環境[6]。然而，待克服的問題包含如何設計適合慢性傷口惡劣環境的敷材與遞送生長因子方法，還有生長因子易受組織液清除與降解[7]。

二、海藻酸鹽水膠於傷口治療之應用

一種好的傷口敷料應具備下列幾點特徵，提供或維持濕潤環境、促進血管生成和結締組織合成、允許受傷組織與環境之間進行氣體交換、保持適當的組織溫度以改善血流到傷口、防止細菌感染、不黏附傷口且易去除、無菌、無毒和不過敏的特性[8]。海藻酸鹽被廣泛運用之生醫材料，不僅通過美國食品藥物管理局(FDA)認證，且已有多間公司在醫療領域販售以海藻酸為基底之貼片。然而，多數公司上市產品以貼片為主，雖然克服紗布的問題，卻仍無治療功能，且面對較深的傷口，仍需第二層敷料提供止血應力，此外，海藻酸貼片無法治療乾性傷口，因此水膠體的三維仿 ECM 結構與其高含水量成為新解方。海藻酸鹽由醣類 D-甘露醣醛酸和 L-古洛醣醛酸以不同比例重複單元組成，已被廣泛應用由於其各種交聯形式。因古洛醣醛酸嵌段的結構與二價離子高度配位，海藻酸鹽對二價陽離子(例如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+})具有很強的親和力，形成不溶性凝膠網絡[9]。目前已知 CaCl_2 被證明為最佳鈣離子來源[10]。此產生的交聯結構具有有序性，從而提高了機械性能[11]，由於凝膠與組織液內單價陽離子的交換反應釋放二價離子到周圍介質中，使其具備易降解能力。此外，從凝膠中釋放的鈣離子可促進止血，而凝膠可作為血小板和紅細胞聚集的基質[12]。另外，共價交聯也是目前被廣泛研究的成膠方法，其良好的機械性能與鍵結穩定，有助於保持水膠水分與搭載藥物。作為天然多醣高分子的明膠，因為它類似於細胞外基質的性質，為良好的組織黏合劑，而交聯劑(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide / N-Hydroxysuccinimide，以下簡稱 EDC/NHS)可牽引海藻酸鹽的羧基與明膠的胺基形成穩定鍵結。

三、聚電解奈米粒子搭載生長因子

生長因子可幫助細胞分化、生長等，主要原理為細胞受器接收生長因子訊號，導致一連串磷酸化反應，使細胞核激活而加速細胞週期。白細胞介素 10(IL-10)為抑制發炎之生長因子，

白細胞介素 6 (IL-6) 產生中性粒細胞和單核細胞為啟動癒合反應之主要細胞。而血管內皮生長因子(VEGF)與血小板衍生長因子(PDGF)為兩種主要促血管新生之生長因子。由於生長因子遞送是屬體內反應，如需應用於治療時，生長因子遞送為一大問題，不但須精準投放藥物，且無法一次施加大量於患部，將引起免疫反應等。在許多研究指出，醣胺聚醣 (Glycosaminoglycans, GAGs)由於其外支鏈帶負電可與蛋白正電結合，並穩定運送生長因子。在研究中，硫酸乙醯肝素(Heparan Sulfate, 以下簡稱 HS)已被證明可以穩定或增強遞送多種生長因子，包括乙型轉化生長因子(TGF-β)、血管內皮生長因子(VEGF)和血小板衍生長因子(PDGF)[13]。而聚電解奈米粒子設計仿照醣胺聚醣原理，其外圍負電層可與生長因子結合，並穩定且緩慢釋放生長因子與受體結合，並在釋放生長因子後將發炎因子帶離患部。

參、研究使用設備與材料

一、研究使用設備

分度移液器 (10、200、1000ul)	電磁攪拌器	烘箱	迴轉震盪儀
恆溫儀	冷凍乾燥機	分光光度儀	流變儀
動態光散射儀	vortex	細胞操作台	離心機
細胞培養箱	-80 度冰箱	-20 度冰箱	倒立顯微鏡

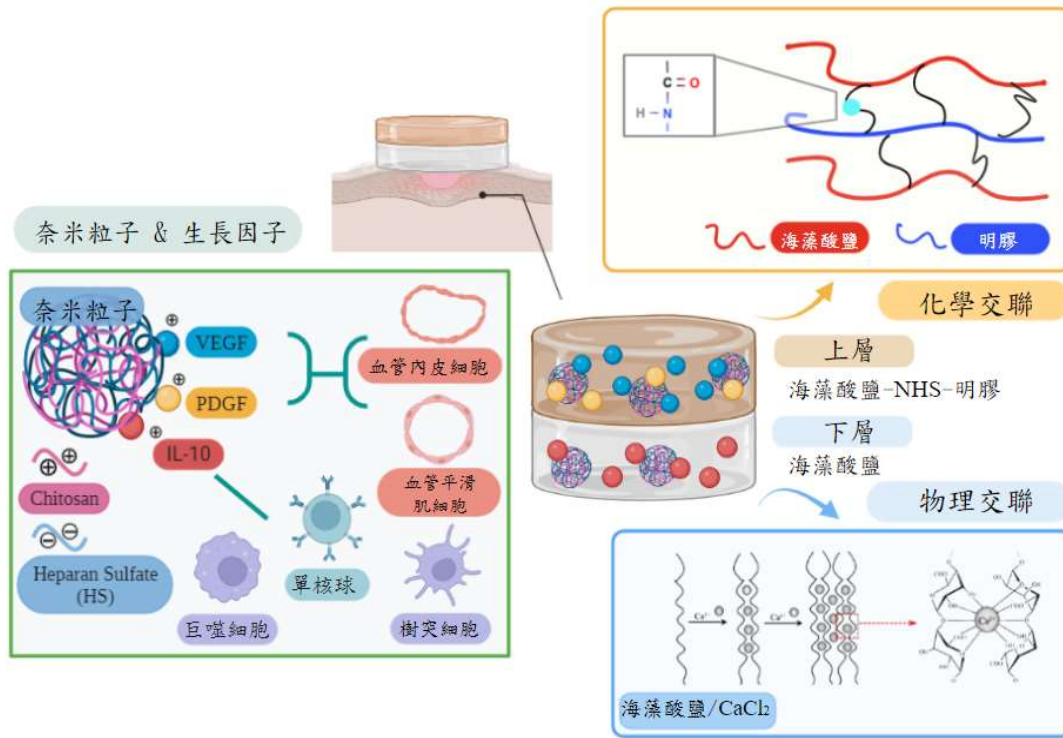
二、研究使用材料

	材料名稱	廠牌	品號
水膠製備	Alginate acid sodium salt 海藻酸鹽	Alfa Aesar	A18565-000000-20A F
	Gelatin from porcine skin 明膠	Sigma-Aldrich	SI-G2500
	Chitosan, low molecular 幾丁聚醣	Aldrich	448869
	Sodium Heparan Sulfate 硫酸乙醯肝素	YickVic	-
	Recombinant Mouse IL-10 白細胞介素 10	biolegend	575804

	Recombinant Murine VEGF ₁₆₅ 血管內皮生長因子	peprotech	100-2
	Recombinant Murine PDGF-BB 血小板衍生生長因子	peprotech	100-14B
	Calcium Chloride (CaCl ₂)氯化鈣	Sigma-Aldrich	10043-52-4
	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich	03450
	N-Hydroxysuccinimide(NHS)	Fluka	FL-56480
	MES Buffer, Free Acid	Sigma-Aldrich	M2933
	Sodium Chloride(NaCl)氯化鈉	JTbaker	JT-3624-69
	Sodium Hydroxide(NaOH)氫氧化鈉	JTBaker	1310-73-2
細胞實驗	Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (DMEM-HG)	Gibco	12100046
	Medium 199	Gibco	11150059
	Trypsin-EDTA 豬胰蛋白酶	Gibco	9000708
	Penicilline/Streptomysin(PS)	Gibco	15140122
	NIH/3T3 小鼠胚胎成纖維細胞	ATCC	
	CellTiter 96® AQueousOne SolutionCell Proliferation Assay	Promega	RG3580
	Trypan Blue	ATCC	15250061

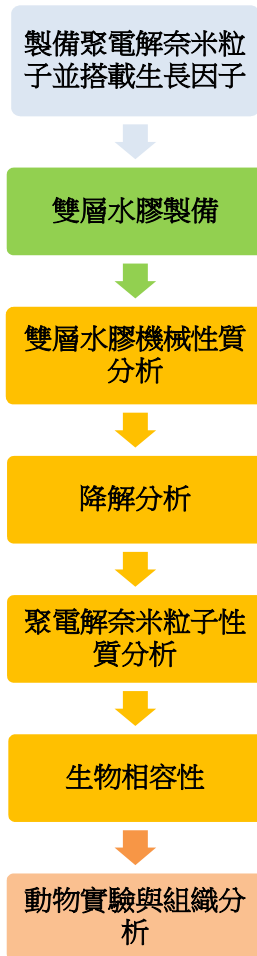
肆、研究程序與方法

一、研究設計



圖一、研究設計與原理圖

此設計依照文獻探討後結果，將下層水膠設計為易降解之物理交聯結構，並搭載含抗發炎生長因子(IL10)之聚電解奈米粒子，而上層則是使用較穩定之共價交聯結構，並搭載含血管新生之生長因子(PDGF、VEGF)。



圖二、 研究流程圖

此研究之規劃之實驗的流程如圖二所示，實驗相關步驟與內容於下文分別敘述之。

二、研究步驟

(一) 聚電解奈米粒子搭載蛋白

1、聚電解奈米粒子製備

- (1) 將硫酸乙醯肝素(HS) (6ml ; 1.2mg/mL) 與幾丁聚醣(Chitosan)(1ml ; 0.6mg/ml) 分別溶於 0.1M 醋酸溶液中，並使用 0.22 um MCE syringe filters 過濾。
- (2) 幾丁聚醣(Chitosan)以 one shot 方式注入攪拌中之 HS 溶液，並持續以 800rpm 攪拌 3 小時。
- (3) 聚電解奈米粒子溶液使用 (MWCO 8000 Da) 透析膜於去離子水中透析 1

天，並在 12 小時後換水，以去除未結合之高分子與醋酸分子。

- (4) 將透析完後之聚電解奈米粒子溶液裝入離心管，至-80 度冰箱冷凍 1 天。
- (5) 隔日放入冷凍乾燥機凍乾 1 天。
- (6) 收完冷凍乾燥成品後，於-20 度冰箱保存。

2、蛋白搭載聚電解奈米粒子

- (1) 將聚電解奈米粒子回溶於水中至 1mg/ml，製備 stock solution 備用。
- (2) 以去離子水稀釋 stock solution，以製備 50ug/ml 之 working solution，並用 vortex 震動直至奈米粒子完全分散。
- (3) 將上步所配之溶液加入 10ug 蛋白(IL-10、VEGF 或 PDGF)中，使生長因子嵌合於聚電解奈米粒子上，並持續攪拌 30 分鐘。
- (4) 放入-80 度冰箱 1 天進行冷凍乾燥，並於-80 度冰箱保存。

(二) 雙層水膠製備

1、上層水膠材料製備

- (1) 配製 10wt%海藻酸鹽(Alginate)與 MES buffer 溶液(簡稱 A 溶液)，並在常溫以 800rpm 攪拌。
- (2) 配製 10wt%明膠(Gelatin)與 MES buffer 溶液(簡稱 B 溶液)，並在攝氏 40 度下以 500rpm 攪拌。
- (3) 配製交聯劑 EDC + MES buffer 80wt%與 NHS + MES buffer 32 wt%。

2、下層水膠材料製備

- (1) 配製 6wt%海藻酸鹽(Alginate)水溶液(簡稱 C 溶液)，並在常溫以 800rpm 攪拌。
- (2) 配製 30wt%氯化鈣(CaCl₂)水溶液(簡稱 D 溶液)。

3、雙層水膠合成

- (1) 將已搭載上蛋白之聚電解奈米粒子以 1ml 去離子水回溶(共三管，分別含抗發炎因子 IL-10、生長因子 VEGF 與 PDGF)。

- (2) 將水膠模具放置於攝氏 40 度之恆溫槽中，以利成膠穩定。
- (3) 將含 VEGF 與 PDGF 聚電解奈米粒子與 A 溶液混和均勻，並抽取 125ul 至模具中。
- (4) 加入 10ul EDC 與 NHS 交聯劑，並加入 125ul B 溶液。
- (5) 加入 C 溶液，並放上迴轉震盪儀以 800rpm 之速度旋轉，使表面平整。
- (6) 將 D 溶液加入噴霧瓶，並在模具旋轉時均勻噴灑，使其滲透交聯，並等待 30 分鐘脫膜。

(三) 機械性質分析

使用流變儀 sweep frequency 檢測其儲存模數 G' 與損耗模數 G'' 。流變儀測量頭 (measuring head) 包含驅動馬達 (drive motor) 和編碼器 (encoder)，用於測量測量扭矩 (torque)、偏轉角 (deflection angle) 和速度。

(四) 降解實驗

分別製作上層水膠與下層水膠兩組各 24 個，並放入玻璃樣本瓶中，加入磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, 以下簡稱 PBS) 至 1/2 高度。取 Day 0 (未降解)、1 天後、3 天後、4 天後、5 天後、14 天後、21 天後、28 天後之剩餘百分比，每組各 3 個數據之平均繪製降解圖。

$$\text{計算公式：} \frac{\text{總重} - \text{玻璃瓶重量}}{\text{Day0 水膠重量}} \times 100\%$$

(五) 聚電奈米粒子性質分析

使用動態光散射儀測量奈米粒子粒徑尺寸、粒度分布與電性。其原理利用散射光產生之建設性或破壞性干涉，偵測溶液中因布朗運動的粒子隨時間波動的曲線。

(六) 生物相容性測試

實驗設計：將水膠滅菌後放入培養基中自然降解一天，並使用培養基浸泡細胞測試

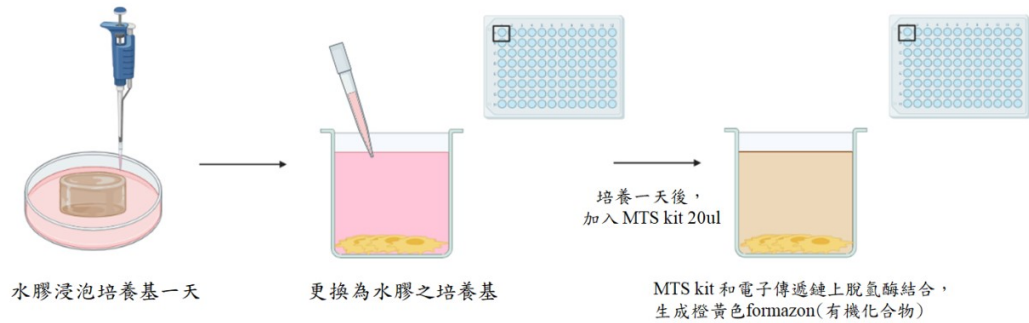
是否對細胞造成毒性。實驗共分成三組：控制組(無水膠，純培養基)、上層水膠與下層水膠組，各組重複 5 次。使用 96 孔盤 3*5 格，每格 10000 個細胞，加上保留值，共需準備 $2*10^5$ 個細胞。

1、細胞培養與 MTS assay 準備

- (1) Day0-1 細胞解凍：從-80°C 冰箱取出 NIH/3T3 小鼠胚胎成纖維細胞凍管，立即放入 37°C 水槽解凍。解凍之細胞懸浮液(含抗凍劑 Dimethyl sulfoxide, DMSO)加入 5-10ml 培養基離心 (1000rpm、5 分鐘)，移除上清液，加入新鮮培養基，將細胞均勻混合培養。
- (2) Day0-2 細胞繼代：吸掉舊培養液，利用人工體液 PBS 洗滌培養盤底 1 至 2 次。加入豬胰蛋白酶(trypsin-EDTA)1ml，使纖維母細胞從盤底脫落。加入胎牛血清(Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, 以下簡稱 DMEM)終止蛋白酶作用，離心去除上清液，添加新鮮培養基。
- (3) Day1 水膠滅菌與細胞繼代：水膠浸泡酒精 10 分鐘後，浸泡含 1% Penicilline/Streptomycin(PS)之 PBS，於無菌操作台內使用 UV 燈照射過夜。
- (4) Day2 細胞培養：1ml 細胞懸浮液與 1ml Trypan blue 混合，並於倒立顯微鏡中計數，共 $2.25*10^6$ 個細胞，得 $2*10^5$ 個細胞需取 89ul 之細胞懸浮液。並加入 1191ul 培養基，吸取 20ul 分配至 96 孔盤中。水膠泡培養基。
- (5) Day3 細胞更換培養基：將細胞之培養基更換為水膠之培養基。

2、MTS assay

將 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS kit) 20ul 加入水膠培養基內，並等待其變成橙黃色，使用分光光度儀檢測。其原理為 MTS kit 能和細胞粒腺體電子傳遞鏈上脫氫酶結合，生成橙黃色 formazon (有機化合物)，對其進行分光定量可得細胞存活率[14]。



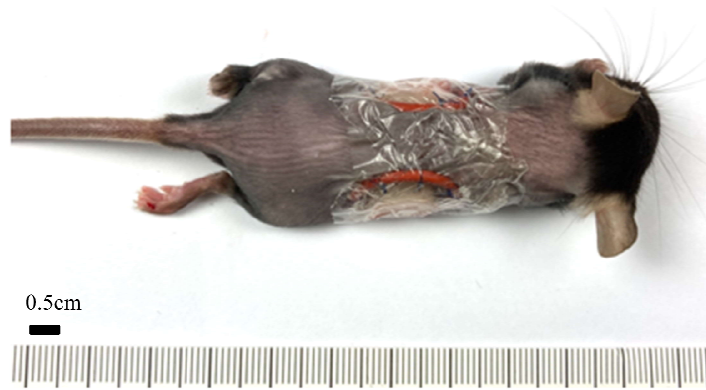
圖三、細胞相容性測試流程圖

(七) 動物實驗模型的建立

動物手術委請整形外科醫師與研究助理協助操作。

本實驗將製作三種傷口模型，分別為 normal wound、鏈脲佐菌素(Streptozotocin，簡稱 STZ)與第二型糖尿病 (簡稱 db/db mice) 模型鼠。我們將使用 STZ 破壞小鼠胰島細胞，使小鼠胰島素製造功能受損，從而導致糖尿病。實驗小鼠注射 STZ 後將持續觀察五週，假使小鼠之血糖維持於 300mg/dl 以上，代表此模型已正確建立，並可開始實驗。而 db/db 小鼠為天生糖尿病鼠。

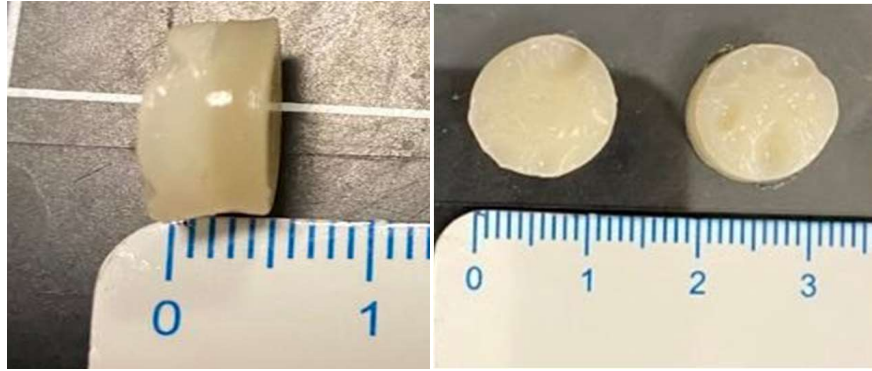
本動物實驗使用直徑 1cm 之一般傷口模型，實驗小鼠為 C57BL/6 近親繁殖小鼠，較能減少實驗上個體差異所造成的誤差。本研究將動物實驗組別分成 (1)控制組 (傷口不處理，只加 PBS)； (2)實驗組: Hydrogel only； (3)實驗組: Hydrogel+上層水膠+下層水膠加入 IL-10 (抗發炎)； (4)實驗組:Hydrogel+上層水膠加入 PDGF+VEGF(促血管新生)+下層水膠； (5)實驗組:Hydrogel+上層水膠加入 VEGF+PDGF(促血管新生)+下層水膠加入 IL-10(抗發炎)。手術前，小鼠以混合麻醉藥：1ml zoletil (50mg/ml) + 0.25ml rompun(23.32mg/ml) + 1.25ml normal saline 麻醉，小鼠秤重後依體重以 1ul/gm 肌肉注射混合麻醉藥，待小鼠完全麻醉後，以電動剃毛刀小心剔除背部毛髮，並以酒精棉片消毒手術部位，隨後利用組織採樣器在兩側腹部各製造一個傷口。傷口製造後，在傷口貼上水膠，接著縫上橘紅色環固定傷口，最後使用 3M Tegaderm™防水透氣敷料固定。修復期間第 7,14,21 天以照相觀察不同組別間傷口癒合之速率，並分析傷口面積大小。以第 0 天面積為分母，其餘天數為分子，計算傷口癒合百分比。



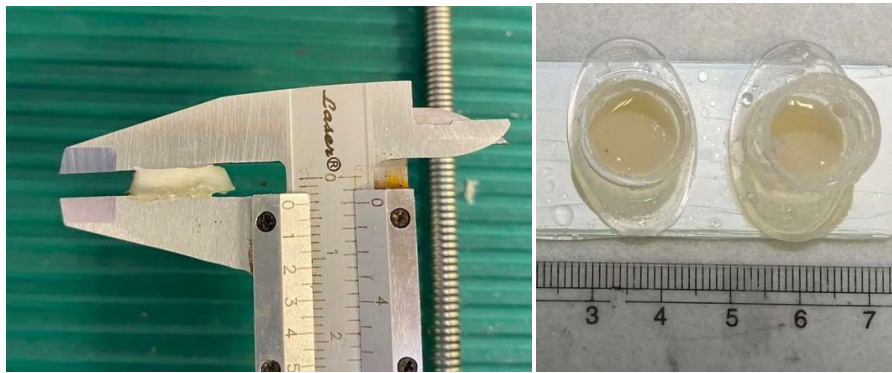
圖四、動物實驗小鼠模型

伍、研究結果與討論

一、雙層水膠外觀



圖五、原水膠厚度與直徑圖

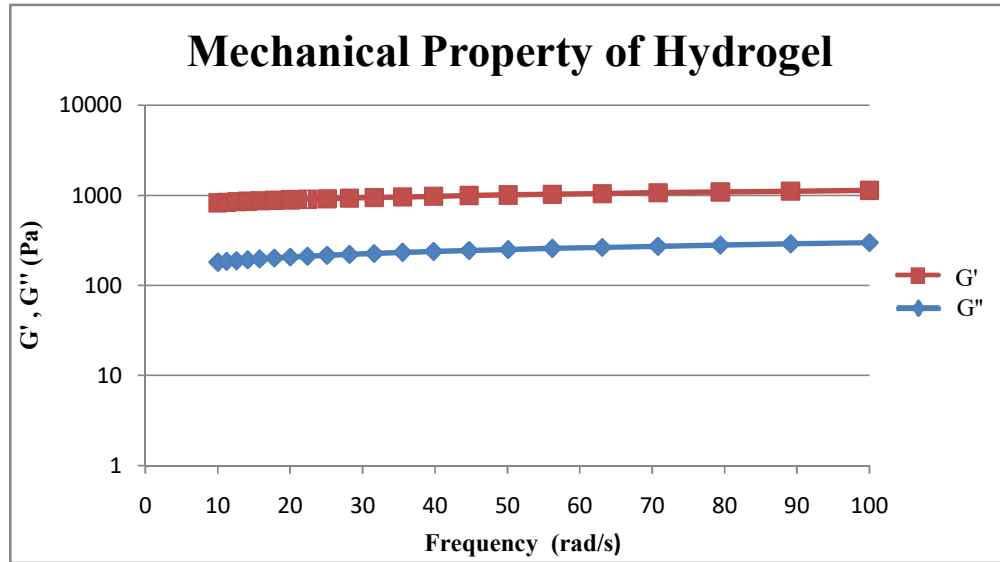


圖六、改良後水膠厚度與直徑圖

我們使用上下層各 400ul 溶液製成水膠，此水膠厚度為 0.5 公分，直徑為 1 公分，如圖五所示。不過考慮到臨床手術縫合的方便，我們將上下層體積改至各 250ul，水膠直徑不變，厚度改為 0.3 公分，如圖六所示。一開始成膠容器使用 24well 孔盤，不過為脫模與攪拌方便，最終設計以 10ml 針筒後方切斷，固定於鐵氟龍包成之載玻片上，作為可拆卸式之模具。由圖六可見，成膠後上下層之顏色明顯差異，揭示上層化學交聯、下層物理交聯之雙層水膠結構。同時，原本下層水膠表面會呈現不平整狀況，如圖五所示，氯化鈣與海藻酸鈉交聯時，

易因氯化鈣液體重重力排開海藻酸鈉溶液，形成不規則圓洞，將導致生長因子釋放不均，經製程調整，使用迴轉震盪儀與噴霧瓶均勻噴灑氯化鈣後，表面平整如圖六所示，成膠狀態穩定。

二、機械性質分析



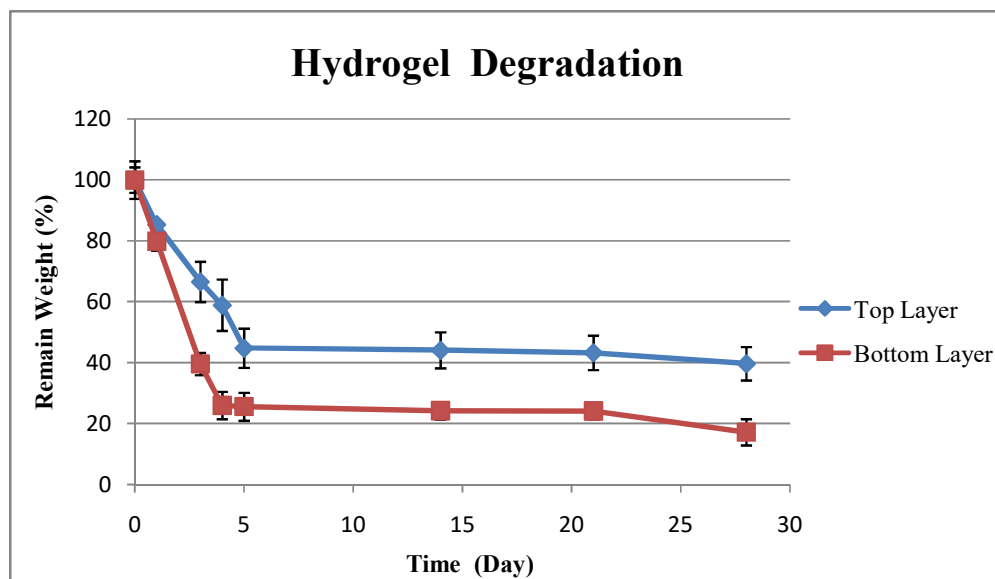
圖七、不同剪切頻率對應水膠流變儲存模數(G')與損耗模數(G'')圖

完美的彈性材料不應具備暫態效應，在受力後應回到平衡狀態；而完美的黏性材料應力速率應正比於應變速率。高分子黏彈性材料介於完美彈性材料與理想黏性材料之間，而儲存模數 G' 與損耗模數 G'' 相當於應力應變。儲存模數 G' 為被儲存的能量 (stored energy)，損耗模數 G'' 為被耗散的能量 (energy dissipated)。Frequency Sweep 為流變儀(Rheology)一種測量項目，通常用於描述樣品在非破壞性變形範圍內的時間相關行為。高頻用於模擬短時間的快速運動，而低頻模擬長時間尺度或靜止時的慢動作，是了解聚合物內部結構以及分散體穩定的有效方法。從此試驗可得到儲存模數 G' 與損耗模數 G'' 數值。

隨著剪切頻率的增加，將不同剪切頻率對應水膠流變損耗模數 G'' 與儲存模數 G' 作成圖七。從流變儀數據驗證得知，本材料之損耗模數 G'' 與儲存模數 G' 分別可達 297 Pa 與 1136 Pa。而從儲存模數大於損耗模數可得知，此水膠為黏彈性固體。而從儲存模數 1136 Pa 相比人體

細胞外間質(ECM)的 G' (10-100 Pa)，得知此水膠可支撐傷口，並給予一定抗張強度，達到傷口修復與填補材之目的。

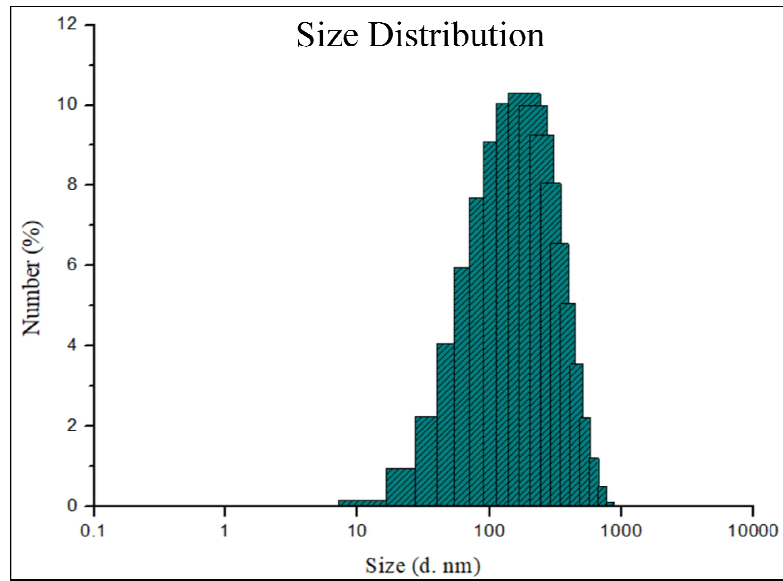
三、降解實驗



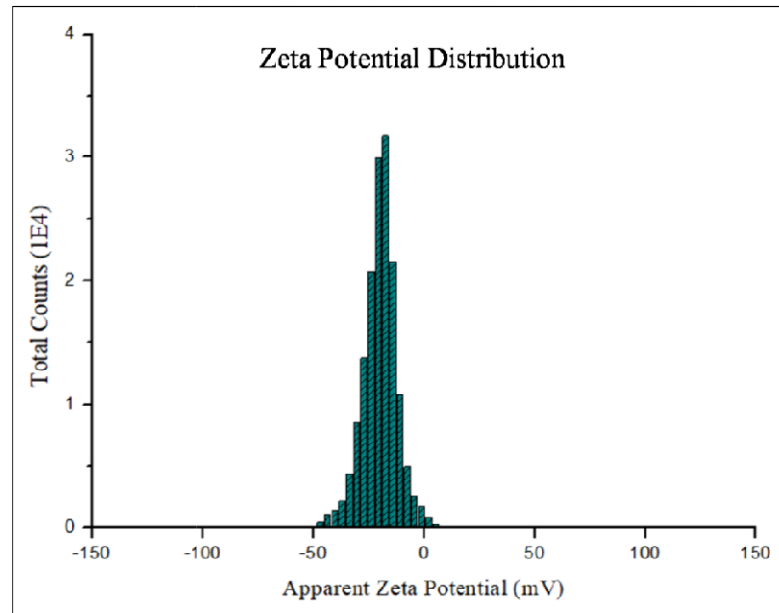
圖八、上下層水膠一個月降解百分率圖

觀察圖八所示之水膠降解(Degradation)曲線可知，海藻酸鹽雙層水膠具有隨時間降解的能力，上層水膠在實驗的第一週，降解 52.1%，隨後緩慢且穩定降解，在 28 天後剩下約 39.53%，而下層水膠則是 74%，並在 28 天後穩定降解至 17.22%。由數據可知，實驗第一週的降解幅度最大，此時為水膠降解與釋放生長因子的關鍵時期。此外，由圖八所示降解曲線可得知，下層水膠降解速度大於上層。由於下層水膠設計為鈣離子與海藻酸鹽物理交聯，結構較共價交聯之上層水膠不堅固，鈣離子容易游離，破壞蛋殼結構並水解。而上層水膠為明膠與海藻酸鹽高分子共價交聯，結構穩定。當人工體液侵入上層水膠時，水膠不會馬上遭破壞，而是先溶脹後才水解，因此水解速度較慢。故可達到先釋放抗發炎藥物(IL-10)，以減緩發炎反應，並在發炎結束後，給予生長因子(PDGF、VEGF)以促進血管新生。

四、聚電奈米粒子性質分析



圖九、聚電解奈米粒子粒徑大小分布圖



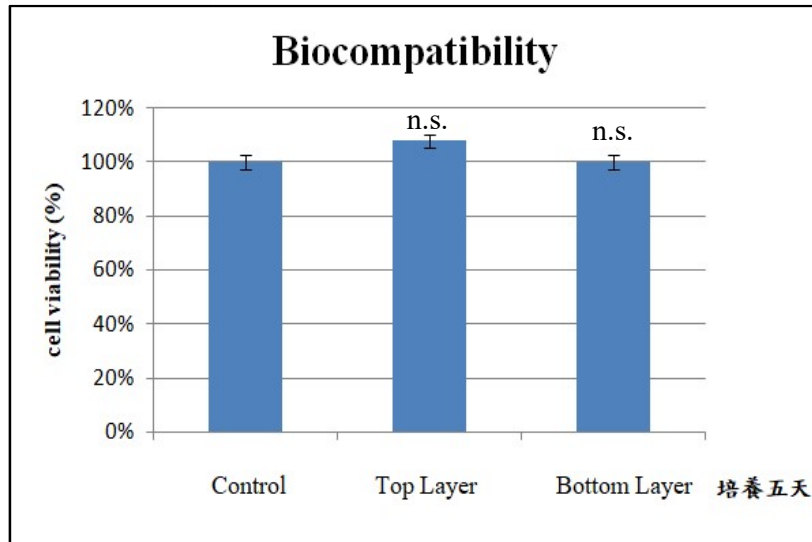
圖十、聚電解奈米粒子表面電性分布圖

Avg. Particle Size
184 ± 9 nm
PDI
0.26 ± 0.1
Zeta Potential
-19.9 ± 0.2 mV

表一、聚電解奈米粒子性質圖

使用動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS)分析奈米粒子，粒徑大約為 $184 \pm 9\text{nm}$ (PDI : 0.26 ± 0.1)，如圖九所示。Zeta potential 負電峰值為 $-19.9 \pm 0.2\text{mV}$ ，如圖十所示，可確認硫酸乙醯肝素(HS)能與幾丁聚醣 (Chitosan)形成聚電解奈米粒子，並呈現幾丁聚醣正電胺基(NH_2)被硫酸乙醯肝素之羧酸基(COOH)與磺酸根(OSO^{3-})包在中間，驗證外層皆為可親和生長因子之帶負電的 HS，可吸附傷口周圍發炎因子的效果。表四所列之 PDI 值為粒子尺寸均勻度，PDI 值 < 0.3 ，表示奈米粒子尺寸平均，因此有助水膠均勻的搭載生長因子，達成於患部均勻地釋放生長因子之效果。

五、生物相容性測試



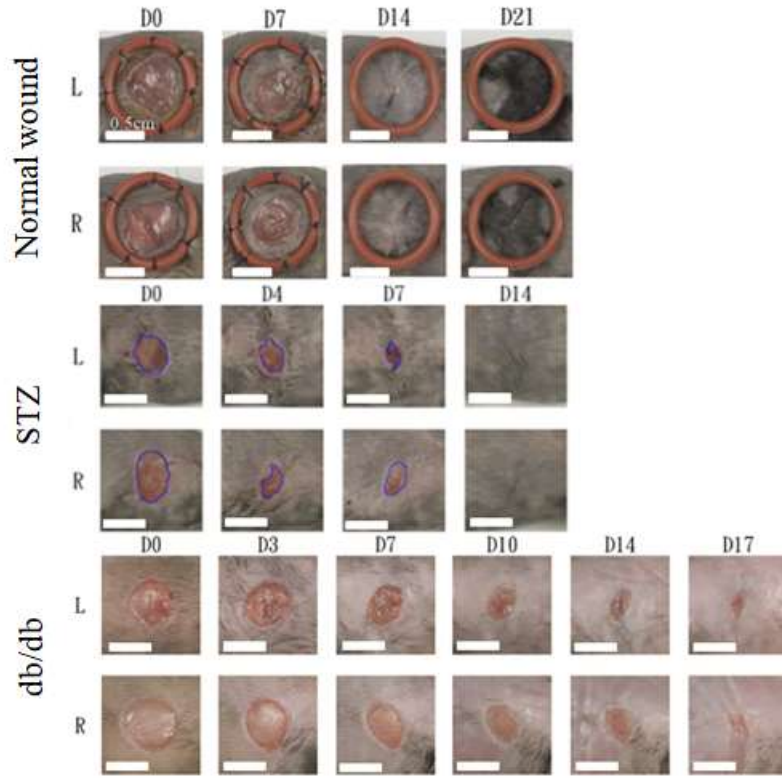
圖十一、上下層水膠與培養五天之 3T3 纖維母細胞，共同培養一天後之細胞存活率比較圖

(統計差異由 t-test 進行，n.s.= no statistical significance)

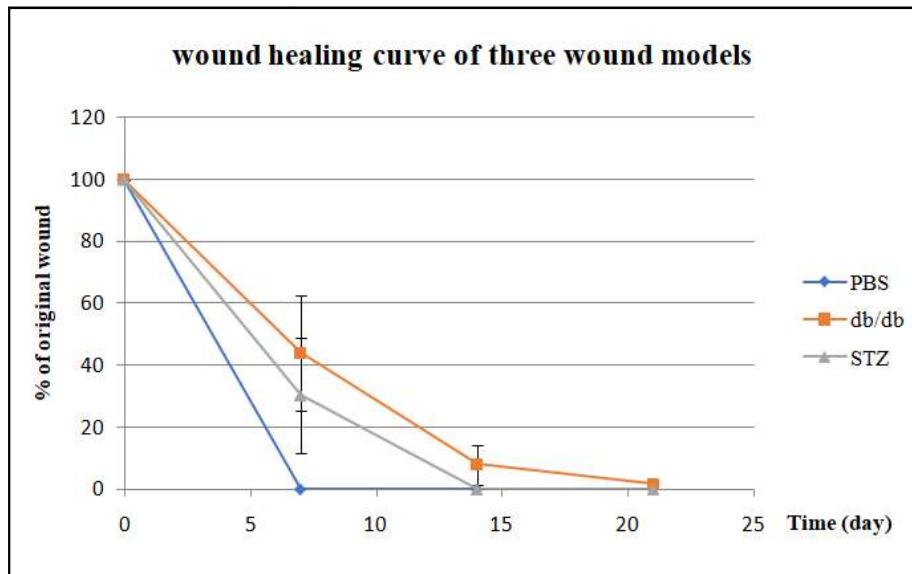
一般檢測生物相容性方法分為種植細胞、共培養與非接觸式，前兩種方式主要為親水性敷料檢測模式，本實驗之海藻酸鹽雙層水膠由於治療對象為慢性傷口，因此設計為乾性敷料。又因為此水膠具有治療的效果，所以它不需要細胞貼附的功能，當患者有換藥需求，乾性敷料的設計，更貼合此實驗的原始目的。因此採用非接觸式之檢測方法，將水膠泡入培養基 (DMEM) 與其共培養一天使其降解，並將此培養液與細胞共培養。

圖十一所示，將上層(alginate-gelatin)、下層(alginate-CaCl₂)與對照組(無水膠)比較，可知 3T3 纖維母細胞之存活率均與對照組沒有統計上的差異，甚至高於對照組現象。證明水膠具有生物相容性，並不會對生物體細胞外間質之纖維母細胞造成毒性，遠高於美國 FDA 標準的 30%。

六、動物實驗模型的建立

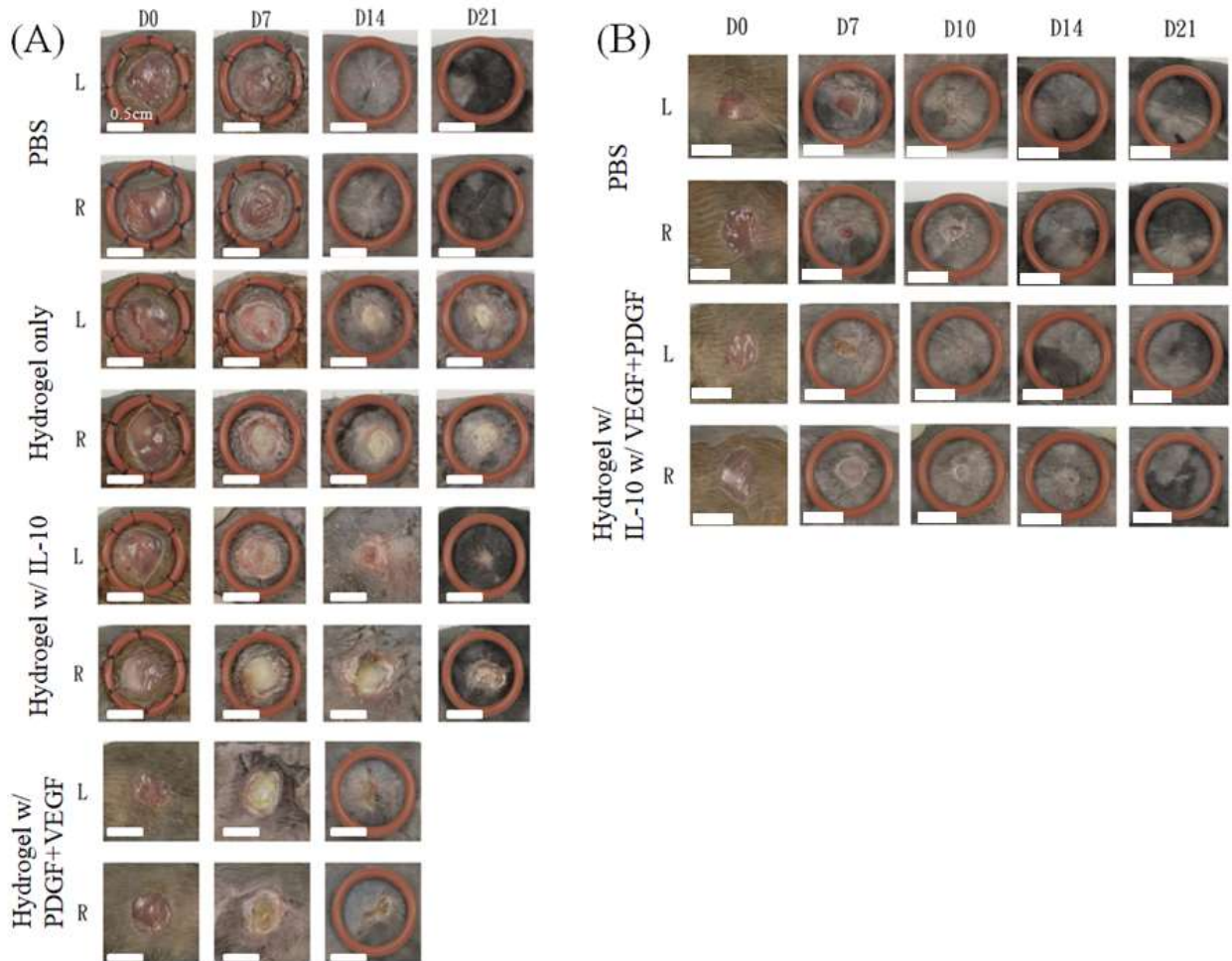


圖十二、動物模型不同組別小鼠傷口癒合情形



圖十三、動物模型不同組別傷口癒合圖

比較三種動物模型，我們發現 STZ 效果與一般傷口模型相同，不如預期慢性傷口模型，因此未來將不使用此模型，而 db/db 小鼠癒合較 normal wound 組慢，db 組小鼠癒合期大於等於 21 天(三周)，且由醫生臨床判斷此傷口具化膿、紅色肉芽組織且具臭味，因此判斷 db 組小鼠慢性傷口模型建立成功，未來我們將使用 db/db 小鼠模型實驗。



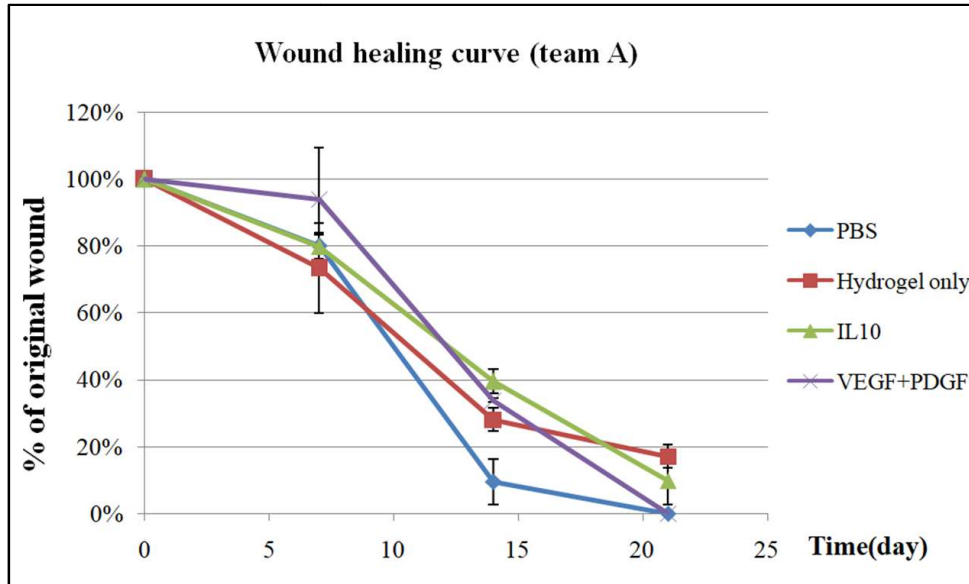
圖十四、(A 組)使用固定環組別傷口之小鼠模型於 D0、D7、D14、D21 的傷口外觀

(B 組) 未使用固定環組別傷口之小鼠模型於 D0、D7、D10、D14、D21 的傷口外觀

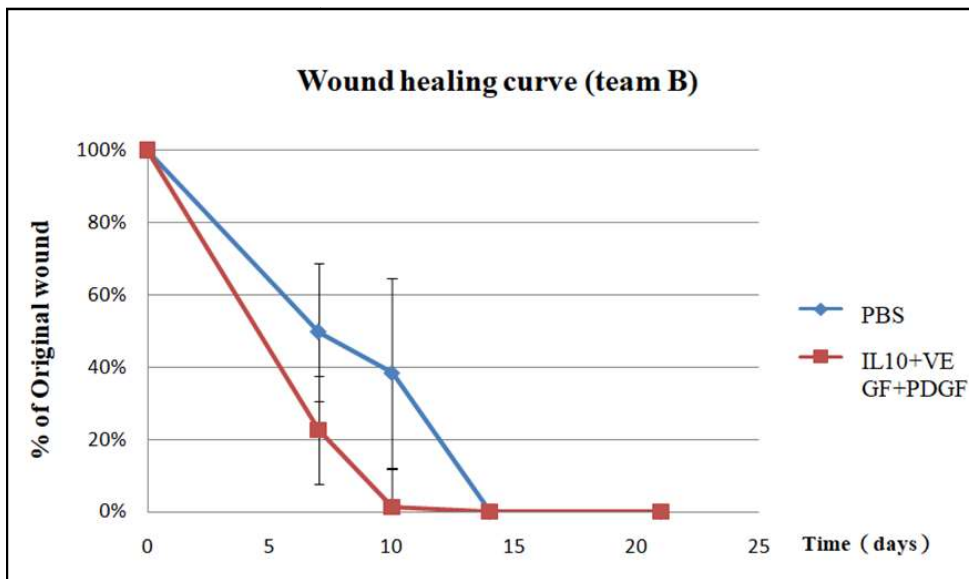
經手術執行過程中我們發現，原本執行的動物模型由於使用橘紅色固定環固定傷口，以避免傷口收縮、便於觀察。然而，固定環的使用同時導致手術過程時間延長至 40 分鐘，而長時間的手術所需之麻醉劑量較高，使半數之小鼠手術完成後，呈現虛弱狀態，或甚至有多隻小鼠手術後無生命徵象，導致存活度降低。圖十二(A 組) 照相觀察發現，由於使用固定環會

造成皮膚之拉扯，傷口修復的時間不如預期，且實驗組間個體差異大，並無統計意義。因此，我們得知此實驗模型仍有改善的空間。

在經過改善之新方式的動物實驗中，我們將固定環從手術過程移除，因此順利將手術過程縮短至 10 分鐘內，且麻醉劑量降低為原先之 1/5，在圖十二(B)組的實驗手術中，小鼠存活率達到 100%。同時，從圖十二(B)傷口觀察照片中可看出，與(B 組)控制組相比起來，加入水膠與 IL-10/VEGF+PDGF 療法的組別的修復期較短，於 D10 傷口已無紅腫發炎狀況。

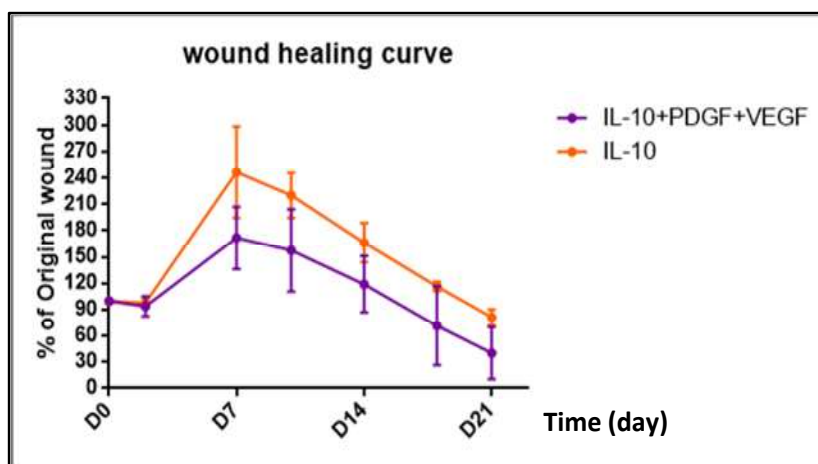


圖十五、A 組中不同組別小鼠傷口癒合圖



圖十六、B 組中不同組別小鼠傷口癒合圖

根據軟體分析並計算平均值後，A 組結果和照相觀察得出的結果相同，PBS(control 組)的癒合速度確實比其他組快，傷口狀況受固定環影響嚴重，無法得出規律。而 B 組將固定環拆除後，Hydrogel+上層水膠加入 VEGF+PDGF(促血管新生)+下層水膠加入 IL-10(抗發炎))與控制組對照之下，發現右側傷口於第十天皆已接近癒合，且傷口修復狀況比 PBS 控制組快，可證明生長因子是能從水膠中釋放且達到修復效果。



圖十七、db/db 小鼠模型 Hydrogel+上層水膠+下層水膠加入 IL-10 和 Hydrogel+上層水膠加入 VEGF+PDGF+下層水膠加入 IL-10 傷口癒合圖

接著，比較 Hydrogel+上層水膠+下層水膠加入 IL-10 和 Hydrogel+上層水膠加入 VEGF+PDGF+下層水膠加入 IL-10 兩曲線，可觀察到雙層水膠均加入生長因子對比只有下層加入 IL10(抗發炎)有助於傷口癒合。

七、和市售敷料之比較

	材料	結構	用途	是否可治療	是否量產
海藻酸鹽雙層水膠	上層為海藻酸鹽與明膠，下層為海藻酸鹽	雙層結構分別搭載不同治療用途之生長因子	治療慢性傷口，保護與治療傷口，維持傷口周圍濕潤以利修復，換藥時不會造成二次傷害。	是	否

M 牌人工皮	矽膠或膠原蛋白	單層片狀	適用燒燙傷與破皮傷口，維持傷口濕潤，吸除組織滲液，撕除時減少二次傷害。	否	是
X 牌水凝膠傷口敷料	生醫高分子材料為基底，添加活性玻尿酸和小分子膠原蛋白	膠體	適用淺層刀傷、撕裂傷與燒燙傷，輔助自體清創，維持傷口濕潤環境。	否	是
A 牌泡棉敷料	Polyurethane Polymer (聚氨酯聚合物)	單層片狀	適用多種有滲液的急性、慢性傷口，吸收傷口滲液，維持適當傷口濕潤環境，促進傷口癒合。	否	是

表二、不同敷料與本研究比較表

經過資料查找後，發現市面上並無針對慢性傷口治療之商業化敷料，因此研究者列出幾樣知名品牌不同類別之敷料與本研究比較。在選材方面，多數品牌以高分子材料製作敷料，與本研究之海藻酸鹽有異曲同工之妙，表示本研究具有商業應用價值。而在結構設計，多數品牌因無生長因子釋放之考量，因此設計單層，具製造過程簡單、簡易黏貼之優勢，目前本研究已成功將水膠厚度降低，試圖達到雙層水膠有單層厚度的效果，將更易於醫生手術或患者換藥，雖然仍無法達到與市售產品相近之輕薄，但雙層水膠提供順序性釋放生長因子提供之療效與應用的優勢將大於單層敷料。在用途方面，多數傷口敷料僅具維持傷口濕潤、減少二次傷害或是吸收組織滲液的功能，其中又只有 A 牌泡棉敷料適用於慢性傷口，可見慢性傷口敷料為市面上急需開發之產品。不過，此水膠目前仍無法達到自動化與連續大量製程，為

此水膠之缺點，然而由於生長因子療法需客製化，針對不同年齡體質給予不同量，客製化與量產兩方面均須考量，期望後續研究能找到解決方法。

八、未來展望

由於此實驗仍在進行中，未來將進行免疫染色與分析，並針對實驗改良。首先，在小鼠模型部分，可利用抽血檢查幾項動物體發炎指標，增加慢性傷口判斷依據，例如 C 反應蛋白、紅血球沉降速率（ESR）或白血球數量（WBC）。接著，慢性傷口成因並非只有糖尿病，為了幫助更多受慢性傷口困擾的病患，未來可針對不同慢性傷口成因設計敷料。細菌感染之傷口可加入輔助治療之抗生素或其他用藥，壓瘡病患因長期傷口受壓迫，導致組織受損或壞死，這時可投以營養素如維生素 C、E[15]，透過搭載不同治療物，可提供更多治療選項。最後，期許未來科技的革新能設計出同時量產水膠，並針對每顆水膠添入不同量生長因子之儀器，將此水膠製作成本降低，幫助更多患者。

陸、結論

糖尿病患是目前慢性傷口族群中的大多數，因長期高血糖併發末梢神經病變，造成失去感覺，下肢血管阻塞、缺血、缺氧而引起組織壞死。常見足部潰瘍感染，甚至惡化到傷口發炎壞疽，據統計指出，糖尿病接受小腿截肢的患者，九成是慢性傷口引起的。其次，理想的傷口敷料，應包含下列性質要求，包括：無毒性、不引起發炎反應、能保持傷口表面濕潤，具有透氣性、不沾黏易剝離、減少傷口癒合後之疤痕，以及精準投藥，達到治療傷口之功能。在臨床應用與商化上，改善敷料產品特性使其容易保存，並使之達到給藥與修復傷口之功能，同時開發低成本的製造方法，是必要的，也是所必須面對的挑戰。

在本研究中，我們成功開發了一針對慢性傷口的智慧雙層水膠，並可調整厚度達到易縫合之功能，對於臨床應用占極大的優勢。再者，水膠之物化性質分析顯示其儲存模數大於人體細胞外間質，可同時止血並提供傷口張應力；並上下層可依時間順序性降解，對傷口先施予抗發炎功效，後修復受損組織與促血管新生。以動態光散射儀測得聚電解奈米粒子可均勻且有效搭載生長因子，輔助療程進行。此外，水膠上下層均有良好生物相容性，對生物體無害。最後實驗正往建立動物模型方向努力，目前已順利建立三種動物實驗模型，經由傷口癒合面積分析，此水膠具有釋放上下層生長因子，輔助癒合之效果。經由與市售產品比較後，此水膠具有可治療之優勢，並期許未來能開發出可大量製程同時兼具客製化設計之儀器。我們在未來會繼續實驗，並進行傷口染色與切片分析，期望此研究後續能運用至醫藥領域，為慢性傷口患者與台灣醫療產業盡一份心力。

柒、參考資料及其他

- [1] Behnen, M., Möller, S., Brozek, A., Klinger, M., & Laskay, T. (2017). Extracellular Acidification Inhibits the ROS-Dependent Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*, 8.
- [2] Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*, 341(10), 738–746.
- [3] Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219–229.
- [4] Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., & Diegelmann, R. F. (2007). Impaired wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), 19–25.
- [5] Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in therapy*, 34(3), 599–610.
- [6] Fischbach, C., & Mooney, D.J. (2006). Polymeric systems for bioinspired delivery of angiogenic molecules. *Advances in Polymer Science*, 203, 191-221.
- [7] Jain, R., Agarwal, A., Kierski, P. R., Schurr, M. J., Murphy, C. J., McAnulty, J. F., & Abbott, N. L. (2013). The use of native chemical functional groups presented by wound beds for the covalent attachment of polymeric microcarriers of bioactive factors. *Biomaterials*, 34(2), 340–352.
- [8] Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings – a review. *BioMedicine*, 5(4).
- [9] Augst, A.D., Kong, H.J. and Mooney, D.J. (2006), Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol. Biosci.*, 6: 623-633.
- [10] Chen, L., Shen, R., Komasa, S., Xue, Y., Jin, B., Hou, Y., Okazaki, J., & Gao, J. (2017). Drug-Loadable Calcium Alginate Hydrogel System for Use in Oral Bone Tissue Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5).
- [11] Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical reviews in immunology*, 32(1), 23–63.

- [12] Berger, A. (2000). Science commentary: Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ : British Medical Journal*, 321(7258), 424.
- [13] Princz, M. A., & Sheardown, H. (2008). Heparin-modified dendrimer cross-linked collagen matrices for the delivery of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 19(9), 1201–1218.
- [14] Ngkelo, A., Meja, K., Yeadon, M., Adcock, I., & Kirkham, P. A. (2012). LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and $G_{i\alpha}$ dependent PI-3kinase signalling. *Journal of inflammation (London, England)*, 9(1), 1.
- [15] Vivcharenko, V., & Przekora, A. (2021). Modifications of Wound Dressings with Bioactive Agents to Achieve Improved Pro-Healing Properties. *Applied Sciences*, 11(9), 4114.

【評語】 052415

本作品合成雙層水凝膠中(明膠、海藻酸鹽)，其中參入帶電高分子奈米粒子(搭載生長因子)，作為傷口敷料。利用小老鼠，進行傷口癒合之觀察，並與對照組相比較。動物實驗結果證實，於一般傷口加入水膠，含抗發炎因子與促血管新生因子療法之實驗組別，其修復期較短，由糖尿病鼠模型證實，生長因子釋放有助於傷口癒合。研究成果驗證海藻酸鹽雙層水膠搭載奈米粒子，極具開發與應用價值。惟過去科展與文獻皆曾探討以水凝膠作為傷口敷料之報導，故創新性較為有限。

作品海報

摘要

本研究嘗試以海藻酸鹽設計製作雙層水膠，並搭載奈米粒子於雙層水膠中，達到兼具治療與保護傷口的效果。

透過實驗數據驗證，此雙層水膠之儲存模數相比人體細胞外間質，得知水膠足以提供傷口張應力。而表面帶負電之奈米粒子，其粒徑尺寸 $\sim 184 \pm 9\text{nm}$ ，以及界達電位負電峰值為 $-19.9 \pm 0.2\text{mV}$ ，能夠有效地吸附帶正電之生長因子並持續釋放。另外，藉由水膠不同的降解速率及載藥特性，達到首先減緩發炎反應，並給予血管新生功效。動物實驗成功建立模型，由一般傷口證實，加入水膠與抗發炎因子IL-10/促血管新生因子VEGF+PDGF療法的實驗組別，其修復期較短，由db/db糖尿病鼠模型證實生長因子的釋放有助於傷口癒合。說明研究中的海藻酸鹽雙層水膠系統，極具持續開發與應用的價值。

研究動機

根據國民健康署統計，全國約有200多萬名糖尿病的患者，且每年以25,000名人數的速度持續增加，糖尿病對人們健康的影響與醫療量能的負擔不容小覷。由於糖尿病患者常有傷口周圍血管病變等因素，導致傷口癒合速度變慢，因此糖尿病患者經常飽受慢性傷口所苦，而慢性傷口即為無法進行正常階段傷口癒合之傷口。

因此本研究嘗試設計出兼具治療與保護傷口之敷材。海藻酸是存在於褐藻細胞壁中的一種天然多醣高分子，具有生物可降解性與生物相容性，經常被應用於醫藥領域之中。不論是從成本面考量，海藻酸水膠相較於其他生醫材料取得成本較低，或是從實際應用面考量，海藻酸水膠成膠機制簡單，海藻酸材料的研究，是目前生醫領域之新興應用的重要領域。

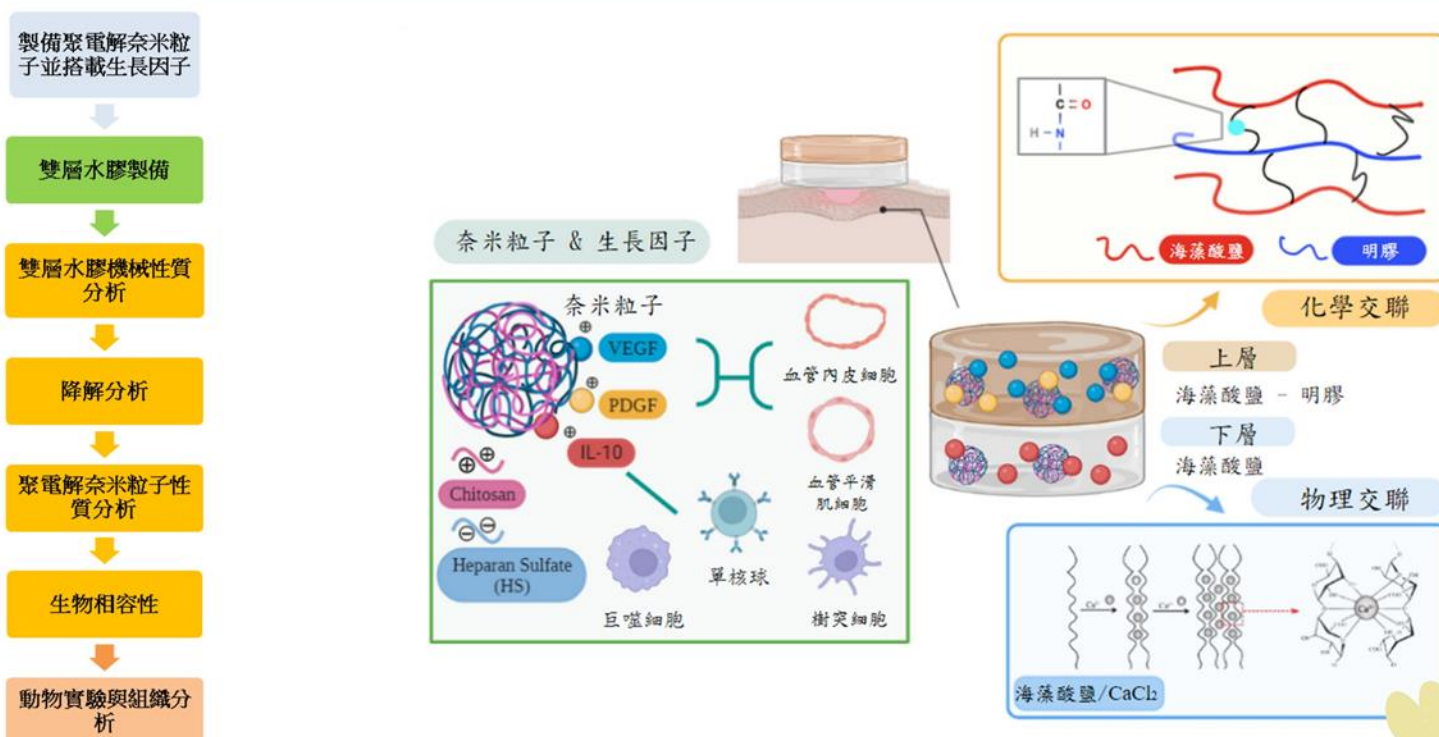
研究目的

本研究嘗試使用海藻酸鹽進行設計與製作雙層水膠，並搭載奈米粒子於雙層水膠之中，並依照時間順序性釋放生長因子，探討生長因子療法，是否能夠兼具治療慢性傷口，並達成抑制發炎同時促進傷口修復的效果。研究中會使用到流變儀、動態光散射儀、分光光度儀..等儀器，進行實驗確認此水膠的材料性質，是否能達到修復與保護慢性傷口的目的，最後也會以動物模型驗證此療法是否具有一定的成效。

研究設備及器材

分度移液器	電磁攪拌器	烘箱	動態光散射儀
恆溫儀	細胞操作台	離心機	流變儀
冷凍乾燥機	vortex	迴轉震盪儀	分光光度儀
細胞培養箱	-80度冰箱	-20度冰箱	倒立顯微鏡

研究程序與方法

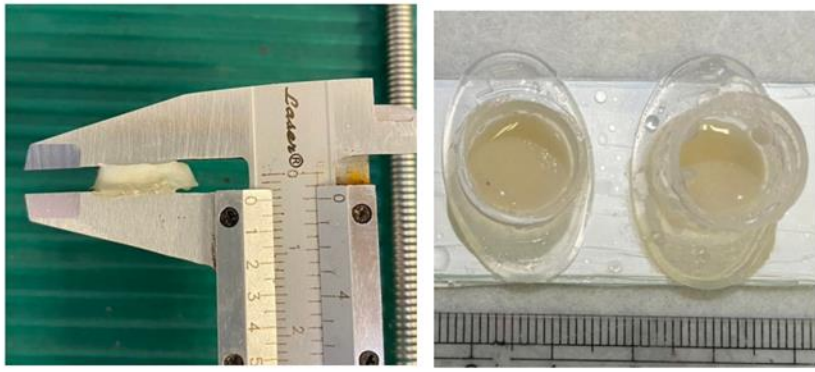


圖一、研究流程圖

圖二、研究設計與原理圖

研究結果與討論

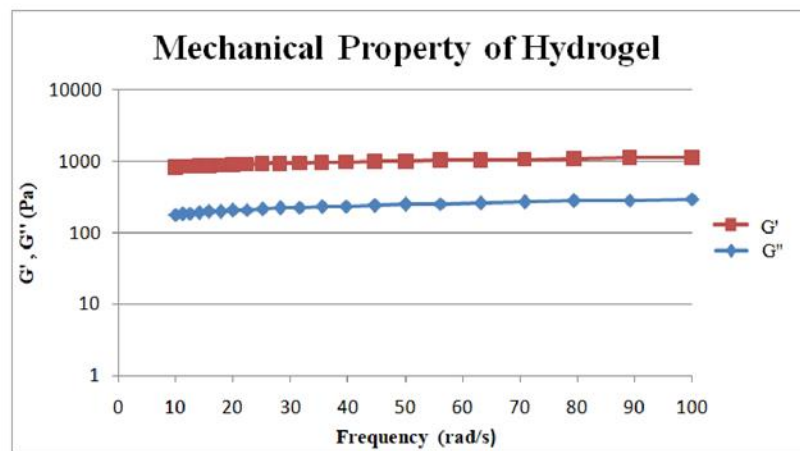
一、雙層水膠外觀



圖三、改良後水膠厚度與直徑圖

考慮到臨床手術縫合的方便，我們將水膠設計為0.3公分，直徑1公分。成膠後上下層之顏色明顯差異，揭示上層化學交聯、下層物理交聯之雙層水膠結構，成膠狀態穩定。

二、機械性質分析

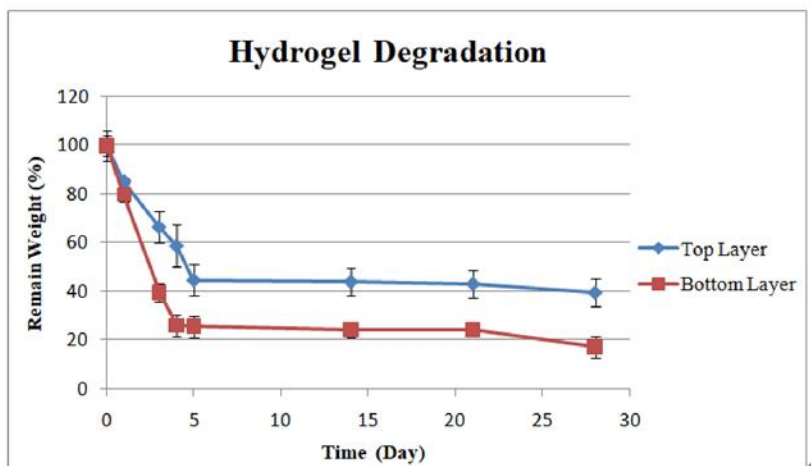


圖四、不同剪切頻率對應水膠流變儲存模數(G')與損耗模數(G'')圖

高分子黏彈性材料介於完美彈性材料與理想黏性材料之間，而儲存模數 G' 與損耗模數 G'' 相當於應力應變。儲存模數 G' 為被儲存的能量 (stored energy)，損耗模數 G'' 為被耗散的能量 (energy dissipated)。

從流變儀數據驗證得知，本材料之損耗模數 G'' 與儲存模數 G' 分別可達 297 Pa 與 1136 Pa。而從儲存模數大於損耗模數可得知，此水膠為黏彈性固體。而從儲存模數 1136 Pa 相比人體細胞外間質 (ECM) 的 G' (10-100 Pa)，得知此水膠可支撐傷口，並給予一定抗張強度，達到傷口修復與填補材之目的。

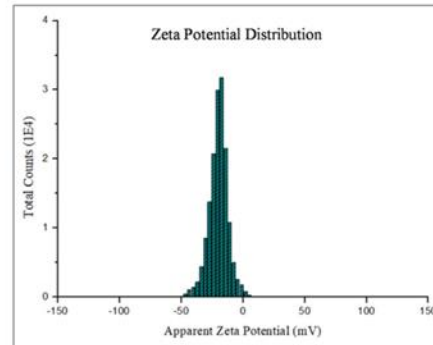
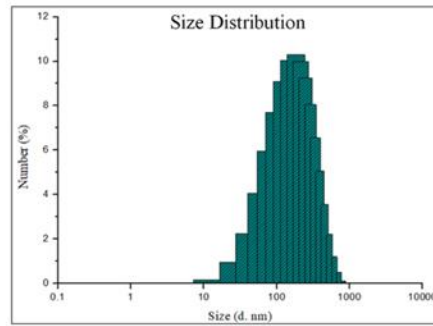
三、降解實驗



圖五、上下層水膠一個月降解百分率圖

觀察水膠降解 (Degradation) 曲線可知，海藻酸鹽雙層水膠具有隨時間降解的能力，且下層水膠降解速度大於上層，故可達到先釋放抗發炎藥物 (IL-10)，以減緩發炎反應，並在發炎結束後，給予生長因子 (PDGF、VEGF) 以促進血管新生。

四、聚電奈米粒子性質分析

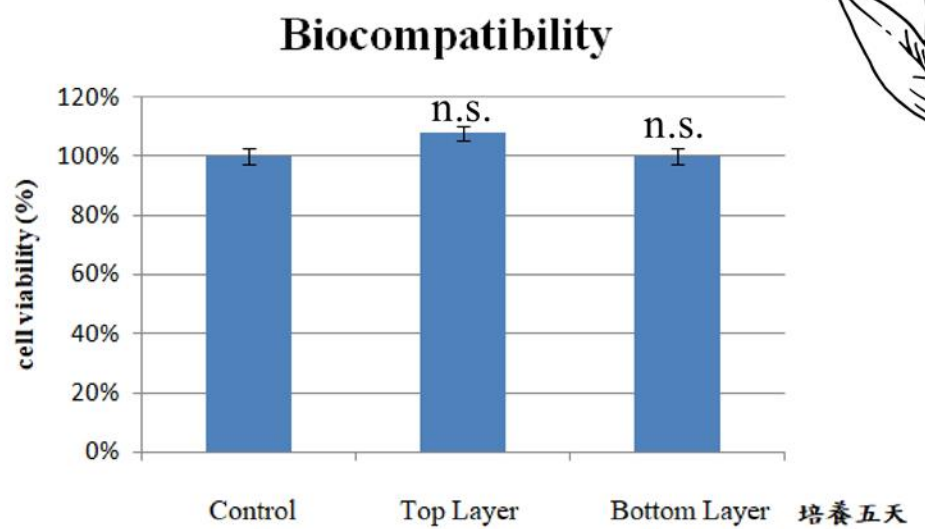


Avg. Particle Size
184 ± 9 nm
PDI
0.26 ± 0.1
Zeta Potential
-19.9 ± 0.2 mV

圖六(左上):聚電解奈米粒子粒徑大小分布圖
圖七(左下):聚電解奈米粒子表面電性分布圖
表一(右上):聚電解奈米粒子性質圖

使用動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS) 分析奈米粒子，粒徑大約為 184 ± 9 nm (PDI: 0.26 ± 0.1)，如圖六所示。Zeta potential 負電峰值為 -19.9 ± 0.2 mV，如圖七所示，可確認硫酸乙醯肝素 (HS) 能與幾丁聚糖 (Chitosan) 形成聚電解奈米粒子，外層皆為可親和生長因子之帶負電的 HS，可吸附傷口周圍發炎因子的效果。PDI 值為粒子尺寸均勻度，據表一 PDI 值 < 0.3 ，表示奈米粒子尺寸平均，因此有助水膠均勻的搭載生長因子，達成於患部均勻地釋放生長因子之效果。

五、生物相容性測試



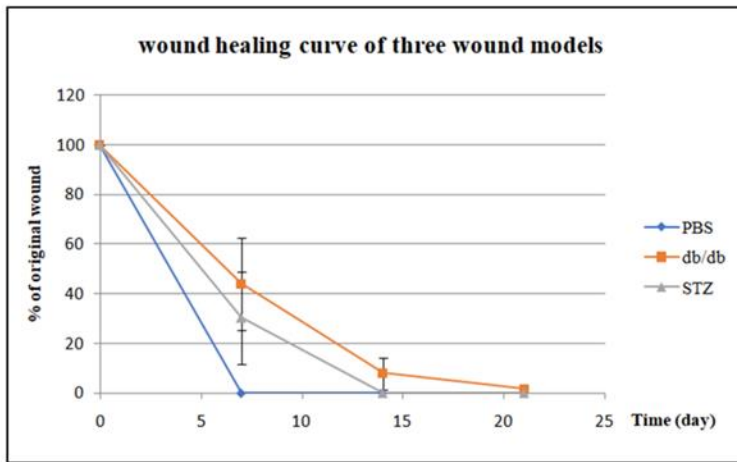
圖八、上下層水膠與培養五天之 3T3 纖維母細胞，共同培養一天後之細胞存活率比較圖 (統計差異由 t-test 進行，n.s. = no statistical significance)

將上層 (alginate-gelatin)、下層 (alginate- CaCl_2) 與對照組 (無水膠) 比較，可知 3T3 纖維母細胞之存活率均與對照組沒有統計上的差異，甚至高於對照組現象。證明水膠具有生物相容性，並不會對生物體細胞外間質之纖維母細胞造成毒性，遠高於美國 FDA 標準的 30%。



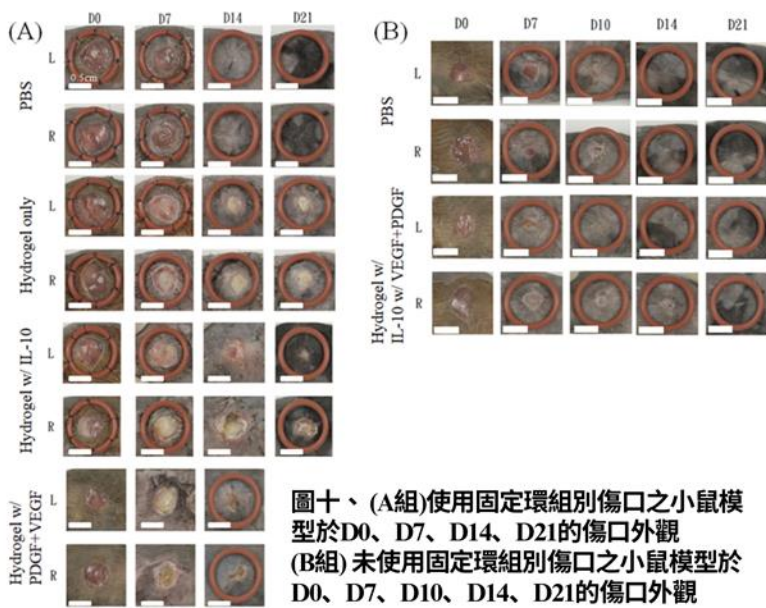
六、動物實驗模型的建立

建立三種動物模型

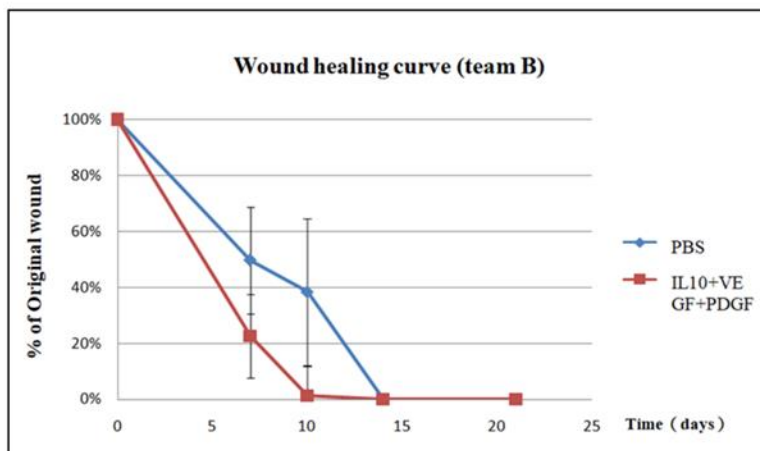


圖九、動物模型不同組別傷口癒合圖

一般傷口模型比較

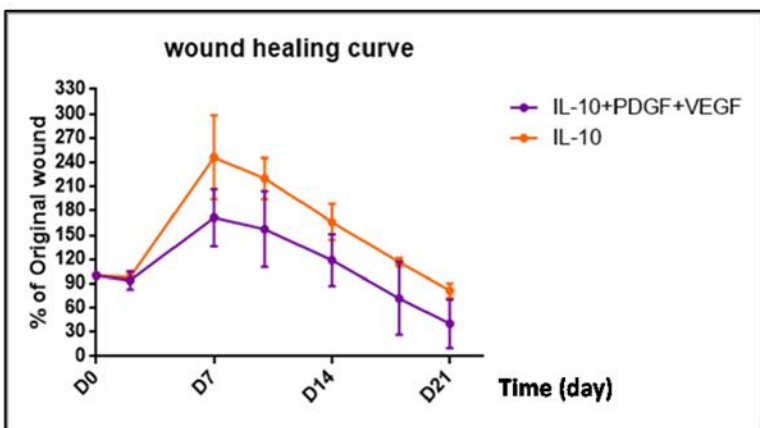


圖十、(A組)使用固定環組別傷口之小鼠模型於D0、D7、D14、D21的傷口外觀 (B組)未使用固定環組別傷口之小鼠模型於D0、D7、D10、D14、D21的傷口外觀



圖十一、B組中不同組別小鼠傷口癒合圖

db/db鼠模型比較



圖十二、db/db小鼠模型Hydrogel+上層水膠+下層水膠加入IL-10和Hydrogel+上層水膠加入VEGF+PDGF+下層水膠加入IL-10傷口癒合圖

比較三種動物模型，我們發現STZ效果與一般傷口模型相同，不如預期慢性傷口模型，因此未來將不使用此模型，而db/db小鼠癒合較normal wound組慢，db組小鼠癒合期大於等於21天(三周)，且由醫生臨床判斷此傷口具化膿、紅色肉芽組織且具臭味，因此判斷db組小鼠慢性傷口模型建立成功，未來我們將使用db/db小鼠模型實驗。

圖十(A組)照相觀察發現，由於使用固定環會造成手術時間延長，使小鼠存活率降低，且造成皮膚之拉扯，傷口修復的時間不如預期，且實驗組間個體差異大，並無統計意義。因此，我們得知此實驗模型仍有改善的空間。

在經過改善新方式的實驗中，我們將固定環從手術過程移除，在圖十(B)組的實驗手術中，小鼠存活率達到100%。同時，從圖十(B)傷口觀察與圖十一分析中可看出，與(B組)控制組相比起來，加入水膠與IL-10/VEGF+PDGF療法的組別的修復期較短，於D10傷口已無紅腫發炎狀況。

接著，比較Hydrogel+上層水膠+下層水膠加入IL-10和Hydrogel+上層水膠加入VEGF+PDGF+下層水膠加入IL-10兩曲線，可觀察到雙層水膠均加入生長因子對比只有下層加入IL10(抗發炎)有助於傷口癒合。

七、與市售敷料之比較

	材料	結構	用途	治療	量產
海藻酸鹽雙層水膠	上層為海藻酸鹽與明膠，下層為海藻酸鹽	雙層結構分別搭載不同治療用途之生長因子	治療慢性傷口，保護與治療傷口	是	否
M牌人工皮	矽膠或膠原蛋白	單層片狀	維持傷口濕潤，吸除組織滲液	否	是
X牌水凝膠傷口敷料	生醫高分子材料和小分子膠原蛋白	膠體	維持傷口濕潤環境。	否	是
A牌泡棉敷料	聚氨酯聚合物	單層片狀	維持適當傷口濕潤環境，促進傷口癒合。	否	是

八、未來展望

由於此實驗仍在進行中，未來將進行免疫染色與分析，並針對實驗改良。首先，在小鼠模型部分，可利用抽血檢查幾項動物體發炎指標，增加慢性傷口判斷依據，例如C反應蛋白、紅血球沉降速率 (ESR) 或白血球數量 (WBC)。接著，慢性傷口成因並非只有糖尿病，為了幫助更多受慢性傷口困擾的病患，未來可針對不同慢性傷口成因設計敷料。細菌感染之傷口可加入輔助治療之抗生素或其他用藥，壓瘡病患因長期傷口受壓迫，導致組織受損或壞死，這時可投以營養素如維生素C、E，透過搭載不同治療物，可提供更多治療選項。最後，期許未來科技的革新能設計出同時量產水膠，並針對每顆水膠添入不同量生長因子之儀器，將此水膠製作成本降低，幫助更多患者。

結論

在本研究中，我們成功開發了一針對慢性傷口的智慧雙層水膠，並可調整厚度達到易縫合之功能，對於臨床應用占極大的優勢。再者，水膠之物化性質分析顯示其儲存模數大於人體細胞外間質，可同時止血並提供傷口張應力；並上下層可依時間順序性降解，對傷口先施予抗發炎功效，後修復受損組織與促血管新生。以動態光散射儀測得聚電解奈米粒子可均勻且有效搭載生長因子，輔助療程進行。此外，水膠上下層均有良好生物相容性，對生物體無害。最後實驗正往建立動物模型方向努力，目前已順利建立三種動物實驗模型，經由傷口癒合面積分析，此水膠具有釋放上下層生長因子，輔助癒合之效果。經由與市售產品比較後，此水膠具有可治療之優勢，並期許未來能開發出可大量製程同時兼具客製化設計之儀器。我們在未來會繼續實驗，並進行傷口染色與切片分析，期望此研究後續能運用至醫藥領域，為慢性傷口患者與台灣醫療產業盡一份心力。