

# 2012 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

編號：090005

## 作品名稱

探討生物材料對骨髓間質幹細胞成骨分化效率之影響

## 得獎獎項

大會獎：四等獎

作者姓名：高子甯、許芳瑜、陳莉蓁

就讀學校：臺北市立第一女子高級中學

指導教師：林泰元、李宏孝

關鍵字：骨髓間質幹細胞、生物材料

## 作者簡介



我是高子甯，就讀於北一女中數理資優班，從小到大被數理深深吸引，對於科學研究的認識與掌握愈來愈好，熱情亦是有增無減。

回想起來，從學習基本技巧，到整體實驗設計了然於胸，我的技巧熟悉度提高許多，更能事前在腦中進行組織，考慮到一切狀況、細節的安排，這樣的訓練是教科書上學不來的，我很珍惜這樣的機會，也將專題研究視為高中生活的重心之一。在學校也參與樂隊社團活動以及投入於班級事務的領導，雖然每件事都忙得團團轉，各方面都做了些犧牲，但這樣的高中生活卻是充實而美好，我不後悔自己參與了這一切。

對實驗的態度，一年來轉變、成熟了許多。結果的解釋與反思、每一個細節縝密的思量與檢討，這些學習歷程，怎麼能讓人不投注其中、不對新事物躍躍欲試？很高興自己選擇這條路，參與如此令人愉悅又能滿足旺盛好奇心的事，將是我人生經歷中的一道深深烙印、一段重要蛻變。



我是許芳瑜，就讀北一女中高二，自高一下開始進行專題研究，這段期間我學到了很多新知，也對做實驗有更深一層的了解。

從一開始對實驗完全沒概念到現在，我真的成長了很多。學校的教育通常就是灌輸大量的知識給學生吸收，但在實驗室裡不僅要能吸收新知，更要提出一些自己的假設或質疑，而不是一味的吸收;而在實驗過程中，我們也遇過不少問題與瓶頸，有時看到結果不太理想的數據都會覺得很沮喪，但在失望之餘，我們也要對實驗結果提出討論與結論，可以培養獨立思考和研究的能力，以及不屈不撓的研究精神。

在實驗室的日子裡我不只學習到許多課堂上學不到的知識，也對科學實驗有更進一步的了解。很高興能有機會進入國際科展複審，這段期間感謝不辭辛苦指導我們的教授、老師、學長，也感謝同伴們的互相扶持與鼓勵和在背後支持我的家人，相信這段時間會是我往後人生一段很美好的回憶。



我是陳莉蓁，目前就讀於北一女中二年級，因為對自然科學的興趣，而且本著對生物的熱愛，我選擇了生物專題研究。

專題研究給我很大的學習空間，我努力吸收每件事情，把它做到最好。從沒接觸過的新藥品和儀器，和各種新操作，到最後的數據分析，每件事情對我而言都很新奇。實驗過程中不乏面臨瓶頸的時候，這時實驗夥伴們就會一起加油打氣、互相支持，產生繼續奮發的鬥志。實驗教給我最多的是細心和耐心，不可忽略小細節，要追根究底找出錯誤的原因，還有永不放棄的精神，無論多麼挫折也要屢仆屢起。專題研究對我來說不是附加額外的學習，而逐漸成為生活的一大重心，也是繁忙課業中的調劑；雖然漫長，但絕對令人甘之如飴。

這次參加國際科展，讓我重新審視了實驗對我的價值，也很高興有這機會能參與，感謝一直以來指導我們的教授、老師、學長，也謝謝我的實驗夥伴們，未來我們一定會在實驗這條路持續有恆地走下去。

## 摘要

本實驗之目的在利用骨髓間質幹細胞 (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs) 培養為平台，篩選能提升 BMSCs 成骨分化效率的生物材料。實驗中利用 osteogenic induction medium (OIM) 使 BMSCs 朝成骨分化路徑進行，分別在第 7(前期)、14(中期)、21(後期)天作 Alizarin Red Stain assay(ARS assay) 測定鈣沉積之效率作為評估標準，而後於平面上塗覆不同生物材料進行測試，根據實驗結果顯示，Gelatin 主要在中期就可達到最高成骨分化效率，而 PCL 與 HA 到後期亦能顯著提高成骨分化效率。當進入 3D 立體成骨誘導試驗時，我們發現 Gelatin、HA 的複合材料能保持平面之特性且結合二者優點，並且更能有效提升成骨分化之效率。

The purpose of this experiment is to employ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells' (BMSCs) culturing as a platform to select the biomaterial that could enhance their efficiency in osteogenesis. In this experiment, we use osteogenic induction medium (OIM) to induce BMSCs osteogenesis. Analyses and evaluations of the calcium-rich deposits are made on day7 (earlier stage), day14 (middle stage) and day21 (later stage) by Alizarin Red Stain assay(ARS assay). Then the experiment is done with different biomaterials coating on a flat surface. The data indicates that Gelatin primarily enhances the efficiency of the middle stage of BMSCs osteogenesis, while PCL and HA enhance its later one. During the 3D scaffold experiment, we discover that the composite scaffold of HA and Gelatin can maintain their coating characteristics and combine their advantages. Moreover, it can more significantly enhance the efficiency of osteogenesis.

## 研究動機

臨床上骨骼傷害需長時間癒合，通常要半年以上才能長出新的骨骼，並且還要有一定的立體結構強度以支撐身體重量。而幹細胞一直是熱門的再生醫學研究議題，利用幹細胞可以培養出適合病人的組織器官。因此，我們思考是否能操縱變因加快分化速率，讓病患不只能接受適合的組織器官，還能加速其復原速度？

過去的研究顯示骨髓間質幹細胞具有多向分化潛能，可分化為成骨細胞、脂肪細胞與軟骨細胞等，在適當的誘導條件下可使其朝成骨細胞分化，並且有動物實驗證實移植骨髓間質幹細胞確實能促進組織的修復與再生，可應用於骨質再生及骨骼組織工程，然而尋找適當的條件以增加骨質生成之效率仍有待進一步的探討，因此我們決定以其作為研究材料。至於變因的部分，我們取生物材料能用於製造生物體修復組織或器官素材之特性，例如明膠在生醫材料上經交聯修飾後可以用來做為傷口敷料，膠原蛋白可作為製做各式人工器官的基材，而透明質酸可應用在傷口癒合，所以我們決定以此作為實驗變因，探討最能有效提升骨髓間質幹細胞成骨分化之方法，進而在3D立體結構成骨探討其是否亦能保持平面之效果。

## 研究目的

分析數種不同生物材料對骨髓間質幹細胞成骨分化 (Osteogenesis)效率之影響

## 研究問題

探討數種生物材料對於平面、立體結構中成骨之影響。

## 研究材料

### 壹、人類骨髓間質幹細胞 (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs) (圖 1-1.)

間質幹細胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)又稱為多能間質幹細胞，是由骨髓、胚胎或其他成體組織中分離而來，能夠分化成源自胚胎時期胚層的各种組織細胞，如脂肪細胞、成骨細胞及軟骨細胞。間質幹細胞可在體外增殖培養，且可以貼附在培養皿的底部，並長成纖維母細胞群落形成單位 (fibroblast colony forming-units)。除此之外，與懸浮型的造血幹細胞不同，間質幹細胞的細胞表面不具有 CD11b、CD14、CD34、CD45 及 HLA-DR 這些細胞表面標記，而是會表現出 CD73、CD90 及 CD105。



圖1. 骨髓間質幹細胞 (BMSCs)

### 貳、生物材料 (Biomaterial)

- 一、 Gelatin (Type A)
- 二、 Poly  $\epsilon$ -Caprolactone (PCL)
- 三、 Hyaluronic acid sodium salt (HA)
- 四、 Polyethylene glycol (PEG)
- 五、 Chitosan

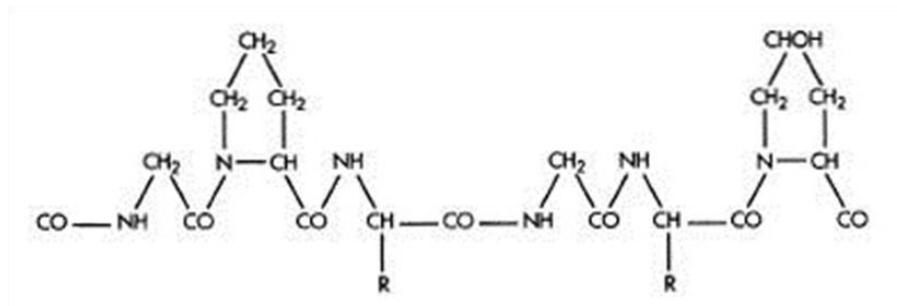


圖1-2. Gelatin (Type A)

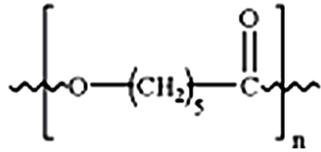


圖1-3. Poly  $\epsilon$ -Caprolactone (PCL)

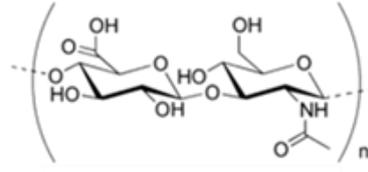


圖1-4. Hyaluronic acid sodium salt (HA)

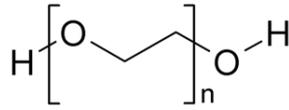


圖1-5. Polyethylene glycol (PEG)

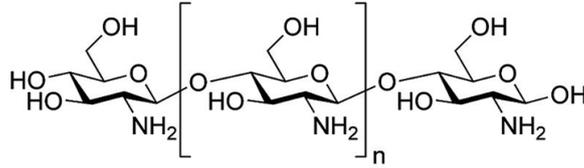


圖1-6. Chitosan

### 參、藥品

#### 一、control medium

成分
DMEM-high glucose
10% Fetal Bovine Serum
1% L-glutamine
1% penicillin/streptomycin

#### 二、Osteogenic Induction Medium (OIM)

成分
control medium
$\beta$ -glycerophosphate (10mM)
Ascorbic acid (50 $\mu$ g/mL)
Dexamethasone ( $10^{-7}$ M)

### 肆、試劑

#### 一、Alizarin Red Stain (ARS)

#### 二、MTT ,Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium (MTT)

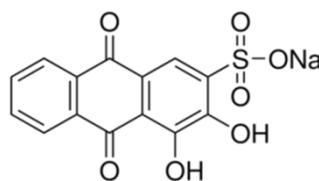


圖1-7. Alizarin Red S

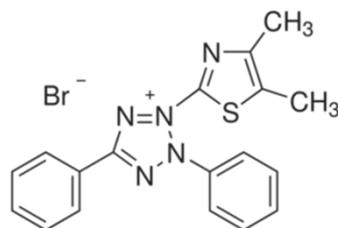


圖1-8. MTT, Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium

## 研究方法

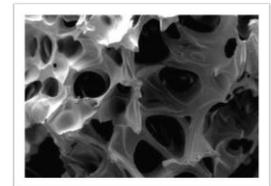
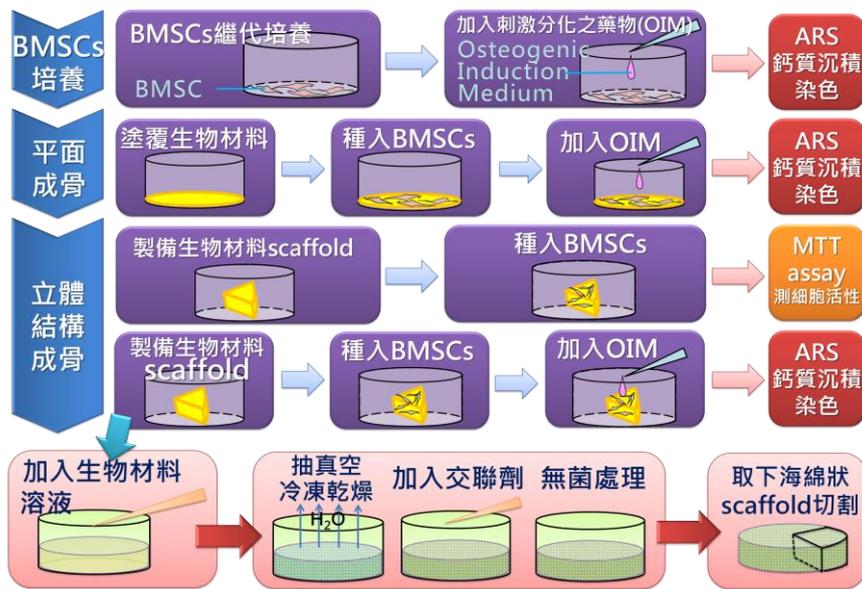


圖2. Scaffold 內部結構

### 壹、BMSCs 繼代培養：

BMSCs 培養於 control medium (DMEM-high glucose with 10% Fetal Bovine Serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin)，置於 37°C，5.0% CO<sub>2</sub> 培養箱。

### 貳、BMSCs 之成骨分化

#### 一、誘導 BMSCs 分化成成骨細胞：

將 BMSCs 移入 OIM (Osteogenic Induction Medium, DMEM with  $\beta$ -glycerophosphate (10mM), Ascorbic acid (50 $\mu$ g/mL), Dexamethasone (10<sup>-7</sup>M))

#### 二、成骨分化效率分析

定性分析：

ARS (Alizarin Red Staining assay<sup>[1]</sup>)鈣質沉積染色（於第 7、14、21 天）

## 1. ARS assay 原理

ARS Stain 可聚集  $\text{Ca}^{2+}$  和一些無機磷酸鹽，可作為  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  的成核劑， $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  是骨骼裡主要的無機成分。

## 2. 步驟：

首先，以 500 $\mu\text{L}$  10%PBS 沖洗 24 孔盤，並以 250 $\mu\text{L}$  10% 甲醛 (formaldehyde) 於室溫下固定 15 分鐘。接著，先以 500 $\mu\text{L}$  一次水沖洗兩次，再加入 40mM ARS (pH4.1) 染劑 200 $\mu\text{L}$ ，以 shaker 於室溫下緩緩搖晃 20 分鐘。抽出未與鈣質作用的染劑並以 1000 $\mu\text{L}$  一次水沖洗四次，每次以 shaker 搖晃 5 分鐘。最後將 24 孔盤傾斜置於室溫風乾 1 天，再置於  $-20^\circ\text{C}$ 。

## 定量分析：

### 1. 步驟：

在每個 well 中加入 400 $\mu\text{L}$  10% 醋酸，於室溫下以 shaker 搖晃 30 分鐘。接著將細胞刮下，連同醋酸吸取至 1.5 ml 微量離心管，震盪 30 秒後加入 500 $\mu\text{L}$  礦物油，以  $85^\circ\text{C}$  加熱 10 分鐘，置於冰中冷卻 5 分鐘。再以 20000g 離心 15 分鐘，取出 350 $\mu\text{L}$  上清液置於另一微量離心管中，加入 150 $\mu\text{L}$  10% 氨水中和使其 pH 值介於 4.1~4.5 後，抽取 150 $\mu\text{L}$  之中和後溶液加至 96 孔盤，並做三重複，最後以蛋白定量光度計 (spectrophotometer) 讀取 405nm 之吸光值。

## 參、平面成骨 (篩選生物材料)

一、將欲測試之生物材料依下列步驟處理，塗覆在 24 孔盤底部

### 1. Hyaluronic acid sodium salt (HA)

將 1%HA 溶液（溶於 0.5M 醋酸）配好後，加入 24 孔盤內，置於操作台隔夜風乾。

## 2. Gelatin (Type A)

在 40°C 將 1%Gelatin 溶液（溶於 0.1N 醋酸）配好後，在 37°C 下加入 24 孔盤內，置於操作台隔夜風乾。

## 3. Poly $\epsilon$ -Caprolactone (PCL)

將 1%PCL 溶液（溶於 99.9%醋酸）配好後，在 25°C 下加入 24 孔盤底部，置於操作台隔夜風乾。

## 4. Polyethylene glycol (PEG)

將 1%PEG 溶液（溶於 99.9%乙醇）配好後，在 37°C 下加入 24 孔盤底部，置於操作台隔夜風乾。

## 5. Chitosan

在 60°C 將 1%去乙酰化的 chitosan 溶液（溶於 0.1N 醋酸）配好後，加入 24 孔盤底部，置於操作台隔夜風乾。

二、種入 BMSCs  $2 \times 10^4$  個，約 4~5 天後加入 OIM 使其成骨分化，並在分化後第 7、14、21 天進行 ARS 鈣質沉積染色，並作定量分析，以分析其成骨分化效率。

## 肆、立體成骨

### 一、Gelatin 和 HA 之 scaffold 置備

#### 1. Gelatin 之 scaffold 置備

在 37°C 以一次水配置 10% Gelatin 溶液，持續攪拌 30 分鐘直至溶

解為止。將溶液置入 24 孔盤內，置於 $-80^{\circ}\text{C}$ 約 24~48 小時，再置入冷凍乾燥機，持續乾燥 24~72 小時，使其形成海綿狀結構。將製備好之 Gelatin scaffold 以 1% 戊二醛 (glutaraldehyde, GA) (以 70% 酒精為溶劑)作為交聯劑 (cross-linker) 交聯 1 小時。接著浸泡於 0.5M 氨基乙酸 (glycine) 30 分鐘，以減低交聯毒性，再以一次水洗 3 次，每次水洗 10 分鐘，最後浸泡於 70% 酒精進行滅菌。

## 2. HA 之 scaffold 置備

在室溫以一次水配置 1% HA 溶液，持續攪拌 30 分鐘直至溶解為止。將溶液置入 24 孔盤內，置於 $-80^{\circ}\text{C}$ 約 24~48 小時，再置入冷凍乾燥機，持續乾燥 24~72 小時，使其形成海綿狀結構。將製備好之 HA scaffold 以 100mM EDC (ethyl N,N-dimethylaminopropyl carbodiimide) 與 50mM NHS (N-Hydroxysuccinimide)以 70% 酒精為溶劑，並以體積比 1:1 混合作為交聯劑交聯 1 小時。接著浸泡於 0.5M 氨基乙酸 (glycine) 30 分鐘，以減低交聯毒性，再以一次水洗 3 次，每次水洗 10 分鐘，最後浸泡於 70% 酒精進行滅菌。

## 二、BMSCs 於 scaffold 內之生長情形觀察

在 Gelatin 和 HA 的 scaffold (已切成 1/4 塊)中分別種入 BMSCs  $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$  個，加入 control medium 培養之，並於第 2、4、6 天進行下列細胞活性分析。

MTT assay (於第 2、4、6 天)

### 1. MTT assay 原理

MTT (3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞粒線體

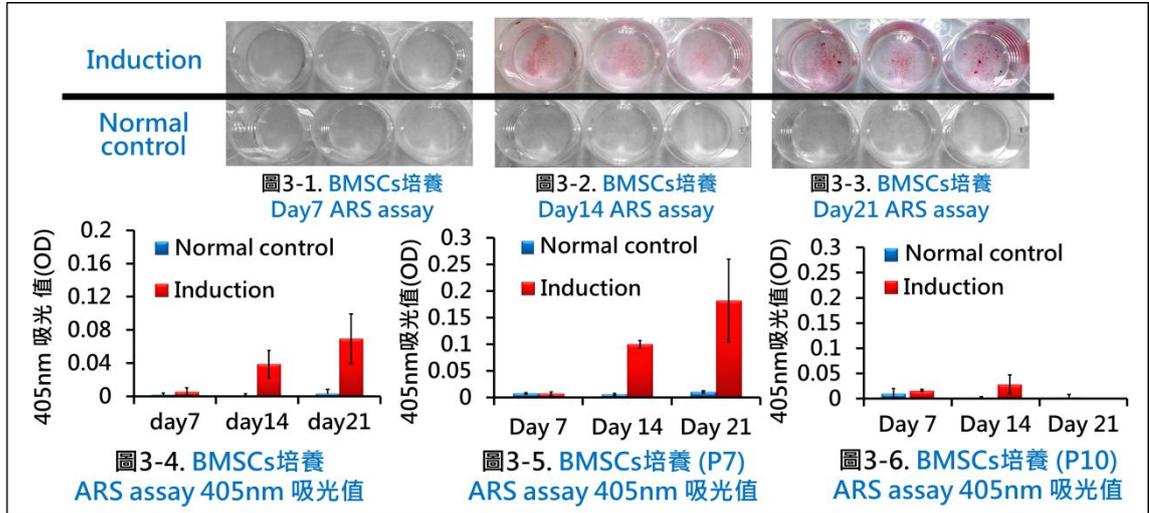
中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶 (Succinate dehydrogenase, SDH)和細胞色素 C 的作用下 tetrazolium 環開裂，生成藍色的 formazan 結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比（死細胞中琥珀酸脫氫酶消失，不能將 MTT 還原），可利用測 O.D.值得知細胞還原 MTT 的能力，此 O.D.值代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故 MTT assay 可用作細胞存活率的指標。

## 2. 步驟（全程需避光）

將 scaffold 以鑷子夾取至 12-well，加入以 control medium 稀釋 10 倍的 1X MTT (約 2.5mL)，使之可覆蓋 scaffold，再放入 incubator (37 °C，5% CO<sub>2</sub>)反應 3 至 4 小時。將反應後的 scaffold 以鑷子夾取至 15mL 離心管，加入 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 500μL，使結晶溶解至 DMSO 中且混合均勻。避光反應 5 至 10 分鐘使其充分反應後，再次持續 pipetting 與擠壓 scaffold 使溶液混合均勻，抽取 100μL 反應後溶液至 96 孔盤，並做三重複。最後以蛋白定量光度計 (spectrophotometer)讀取 570nm 之吸光值。

## 研究結果與討論

### 壹、成骨分化效率分析



一、前人研究指出 BMSCs 約在第 21 到 28 天會分化為成骨細胞，於是我們以 7、14、21 天做分界，將 BMSCs 之分化週期概分為前、中、後三期。

二、經由 ARS 之量化結果顯示，BMSCs 在第 7 天時鈣沉積量少，尚未明顯分化；第 14 天時有 induction 的 BMSCs 才有明顯鈣質沉積，顯示已分化為成骨細胞；第 21 天的鈣質沉積量更為顯著。

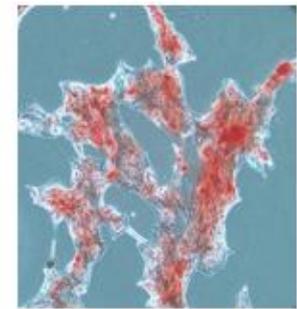


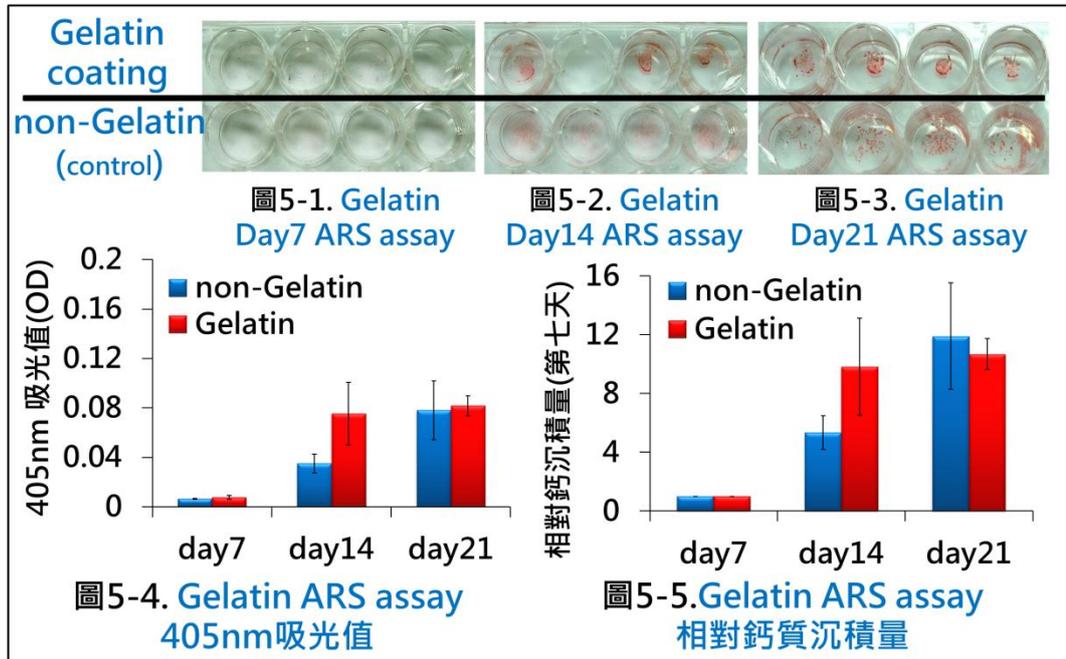
圖 4. BMSCs 培養 ARS assay 取 Day14 Induction 顯微影像(100X)

三、可推知我們所加入的 OIM 確實能使其朝向分化成成骨細胞的路徑進行。

四、根據結果，P10 之 BMSCs 量化吸光值明顯低於 P7，推測細胞已出現分化能力下降之現象，BMSCs 細胞繼代可能有一定代數限制。此結果可作為未來實驗選擇細胞代數之參考，應將細胞代數控制於約 P7 到 P9 間，才較不易出現上述分化能力下降之現象，亦可更有效地降低各組間差異。

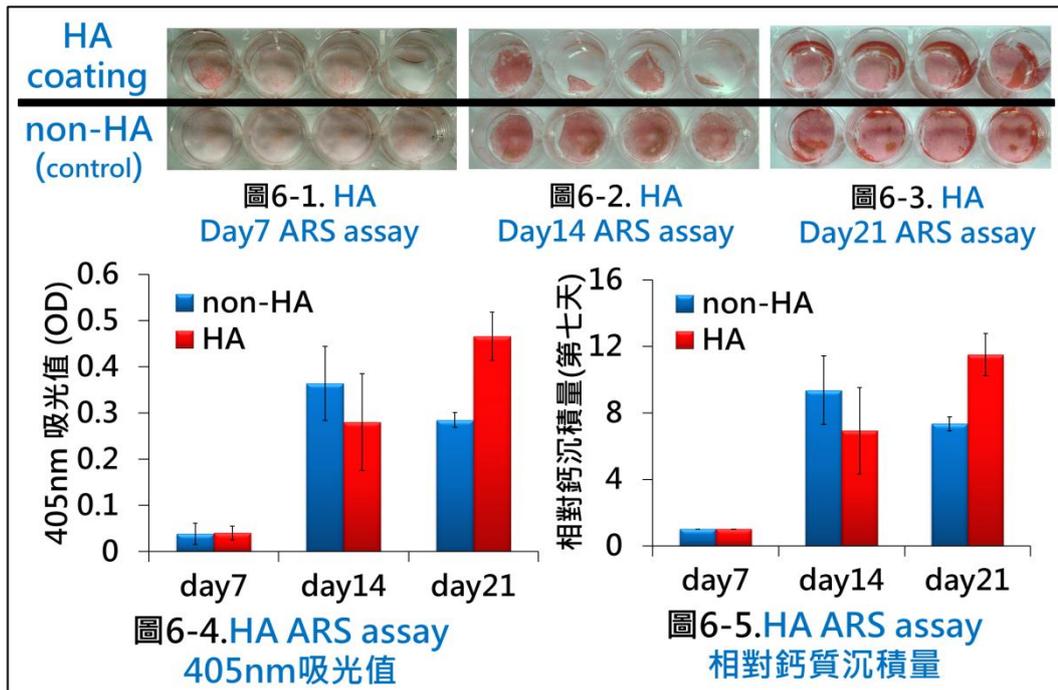
## 貳、數種生物材料之平面成骨效率分析

### 一、Gelatin (Type A)之平面成骨



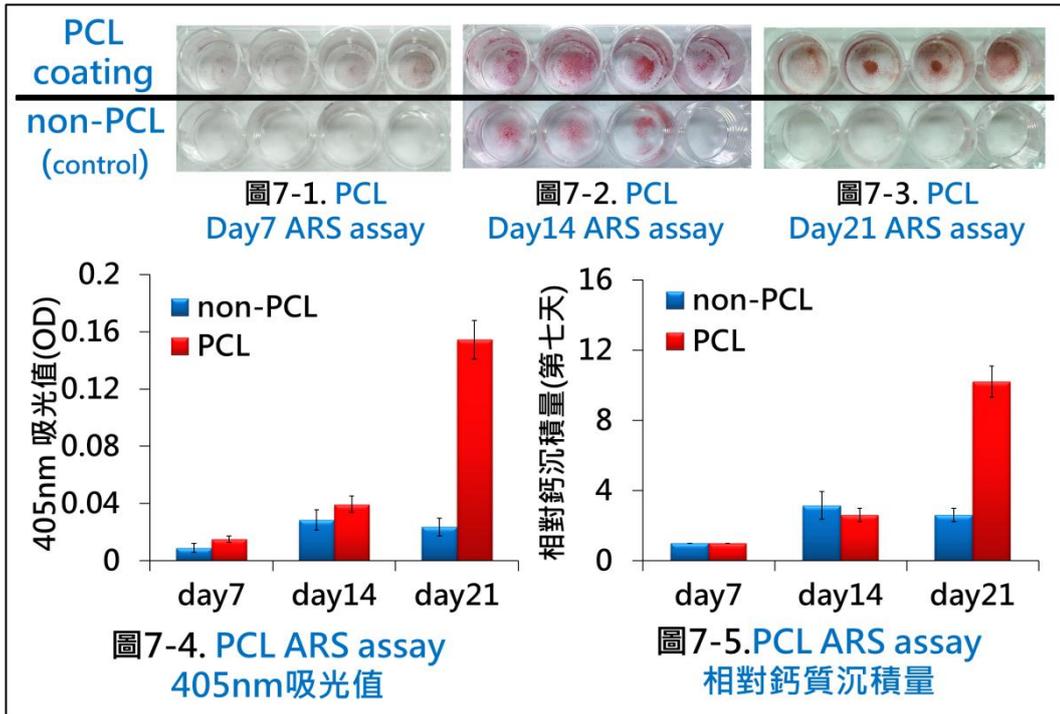
1. 由 ARS 之量化結果顯示，Gelatin coating 組之 BMSCs 在第 7 天時吸光值低，鈣沉積量少，尚未明顯分化；第 14 天及第 21 天時才有明顯鈣質沉積。
2. 由於 BMSCs 個體差異與代數差異均對實驗之數據有一定影響，經實驗後發現各批細胞實驗數據雖可能有所不同，但提升效率之趨勢大致不變，故將各組吸光值相對於第七天之量化數值作相對倍數圖 (圖 5-5)，以下實驗數據之表示亦依此原則，更容易比較各生物材料之間提升效率之異同。
3. 若比較是否塗覆 Gelatin 的影響，Gelatin coating 組在第 14 天 BMSCs 之吸光值明顯較 non-coating 組高，且與第 21 天相近，顯示 Gelatin 對加速 BMSCs 中期成骨分化有很好的效果。

## 二、HA 之平面成骨



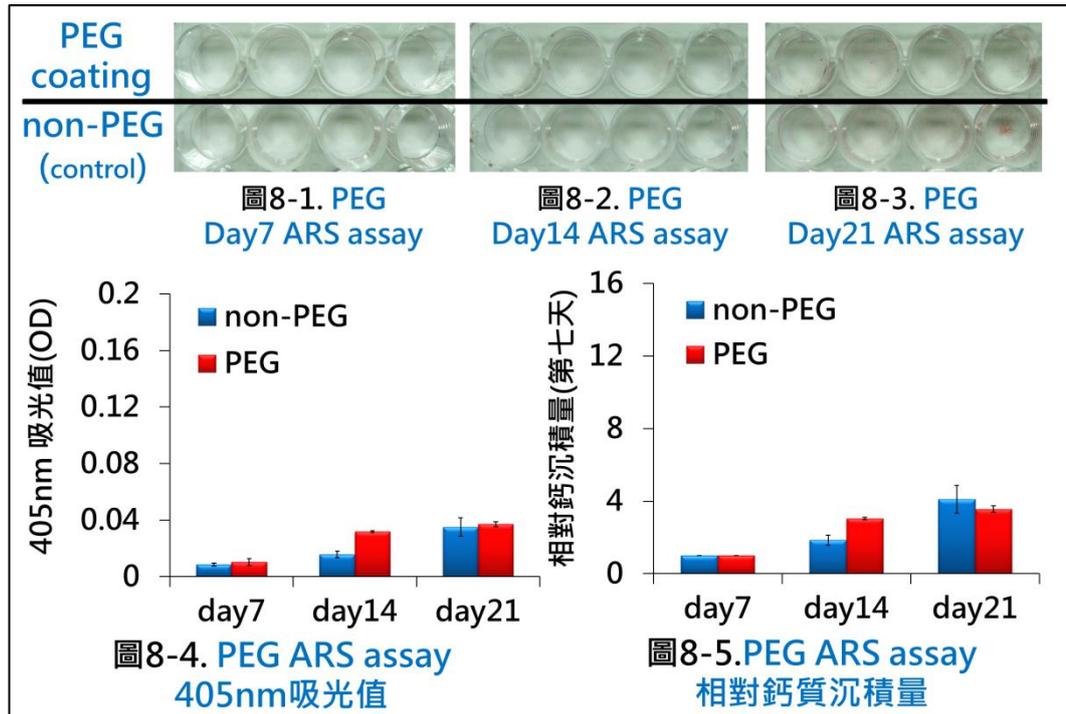
1. 由 ARS 之定量結果顯示，HA coating 組之 BMSCs 在第 7 天時吸光值低，鈣沉積量少，尚未明顯分化；第 14 天及第 21 天時才有明顯鈣質沉積。
2. 若比較是否塗覆 HA 的影響，HA coating 組第 21 天之吸光值明顯較 non-coating 高，顯示其鈣沉積量較多，確實能使 BMSCs 成骨分化效率提升，且 HA coating 呈一斜率漸增之穩定曲線，推測其能顯著提升 BMSCs 之後期分化。

### 三、PCL 之平面成骨



1. 由 ARS 之量化結果顯示，PCL coating 組之 BMSCs 在第 7 天時吸光值低，鈣沉積量少，尚未明顯分化；第 14 天及第 21 天時才有明顯鈣質沉積。
2. 若比較是否塗覆 PCL 的影響，PCL coating 第 21 天之吸光值明顯比 non-coating 高，顯示其鈣沉積量較多，確實能使 BMSCs 成骨分化效率提升，且其 coating 組呈一斜率漸增之曲線，推測其能顯著提升 BMSCs 之後期分化。

#### 四、PEG 之平面成骨



1. 由 ARS 之定量結果顯示，PEG coating 組之 BMSCs 在第 7 天時吸光值低，鈣沉積量少，尚未明顯分化；第 14 天及第 21 天時才有明顯鈣質沉積。
2. 若比較是否塗覆 PEG 的影響，PEG coating 組第 14 天雖有明顯提升，但是第 21 天之吸光值和 non-coating 無明顯差異，推測其對 BMSCs 成骨分化效率並無顯著提升。

#### 五、Chitosan 之平面成骨

由於 BMSCs 種入時即表現出明顯不貼附在 Chitosan coating 之情形，因此並未繼續進行探討。

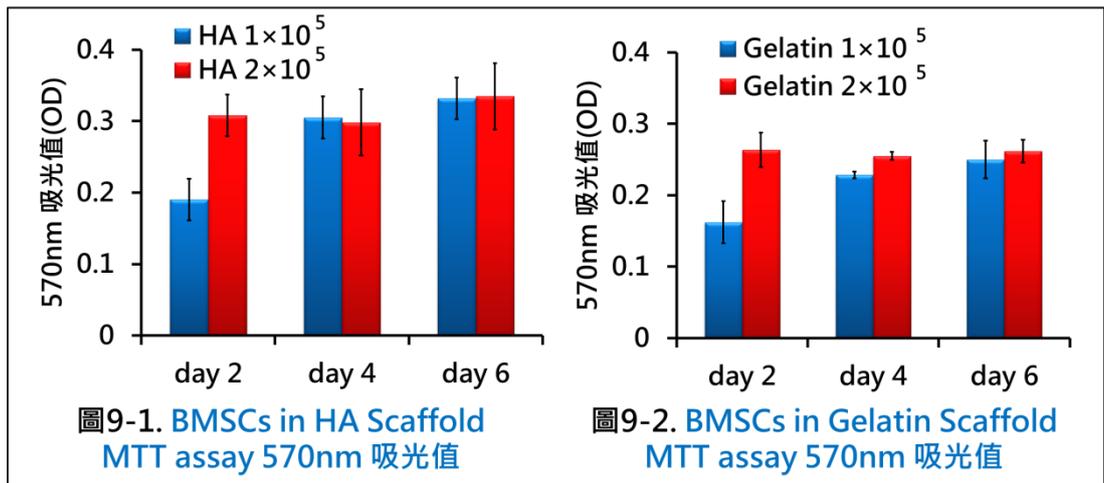
## 六、生物材料提升成骨分化效率相對倍數表

倍數	Day 14	Day 21
Gelatin	9.81	10.68
HA	6.92	11.50
PCL	2.61	10.22
PEG	3.04	3.55

由表可得知 Gelatin 與 HA 可較顯著加速 BMSCs 成骨分化且各自提升不同時期之效率。可試著以適當比例混合與搭配生物材料，探討其是否結合彼此優點，更加提升成骨分化效率。

## 參、立體成骨效率分析

### 一、BMSCs 於 scaffold 內之生長情形觀察

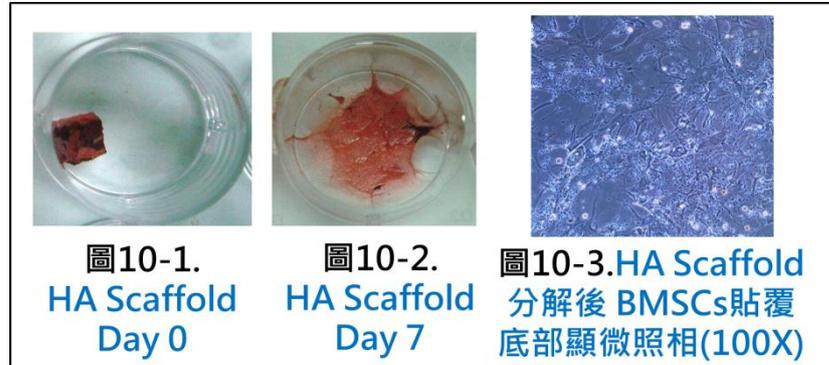


1. 由 MTT 之定量結果顯示，HA 無論是  $1 \times 10^5$  或是  $2 \times 10^5$  活細胞數皆比 Gelatin 多，推測與其濃度、孔徑大小、製程與材料特性有關。
2. 若單比較 Gelatin  $1 \times 10^5$ ，可發現其成一斜率漸緩之曲線，推測於 4~6 天時長滿 Scaffold; 若單比較 Gelatin  $2 \times 10^5$ ，可發現其約成一水平線，推測於 0~2 天內長滿。由此我們可以得知，Gelatin  $1 \times 10^5$  可於種入細胞後 4~6 天 induction，而 Gelatin  $2 \times 10^5$  可於種入細胞後 0~2 天 induction。

3. 若單比較 HA  $1 \times 10^5$ ，可發現其成一斜率漸緩之曲線，推測於 4~6 天時長滿 Scaffold;若單比較 HA  $2 \times 10^5$ ，可發現其約成一水平線，推測於 0~2 天內長滿。由此我們可以得知，HA  $1 \times 10^5$  可於種入細胞後 4~6 天 induction，而 HA  $2 \times 10^5$  可於種入細胞後 0~2 天 induction。
4. 由上述兩點可知，以  $2 \times 10^5$  的細胞量種入，並不會再明顯增多而是維持定值，顯示其已達到飽和；若以  $1 \times 10^5$  的細胞量種入，會再繼續生長，在第 6 天時量值趨近於細胞量為  $2 \times 10^5$  之量。這可作為我們將來進行 scaffold 實驗的參考，我們可視實驗需求調整種入的細胞量。
5. 立體結構成骨較平面成骨更貼近實際情形，由於此二者皆為生物可分解材料，因此會隨著時日增加而逐漸被細胞分解，而此現象於平面成骨 Scaffold 中可清楚地被觀察到，但在平面成骨中卻沒有很明顯。
6. 實驗過程中，我們發現 Gelatin 被細胞分解之速率較慢，但其吸水度較差;而 HA 之吸水度佳但易被分解，推測與其濃度、交聯劑與製成過程有關，未來可依此特性以適當比例混合製成複合材料，以期達到成骨分化之最佳效率。

## 二、BMSCs 於 scaffold 內之成骨效率分析

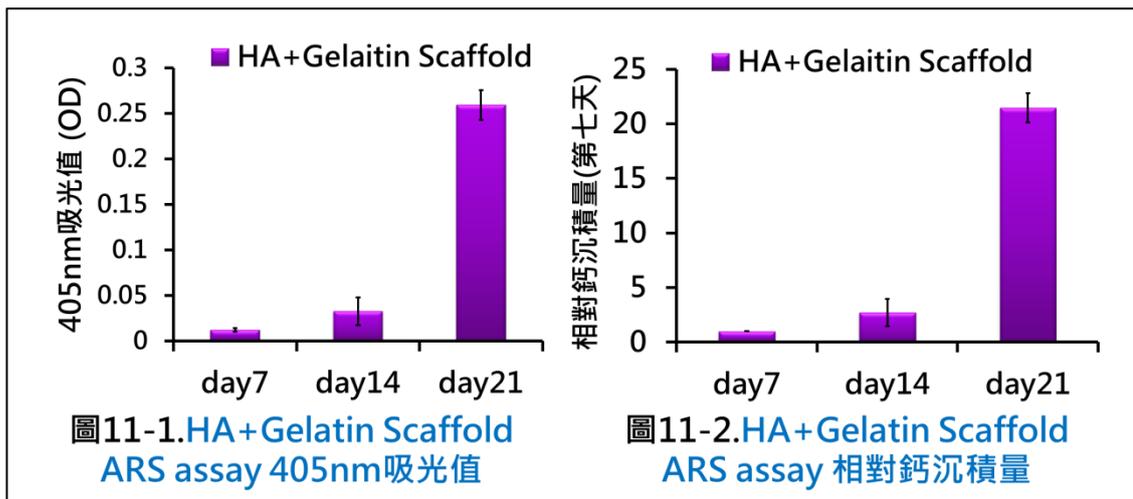
### 1. Hyaluronic acid sodium salt (HA) Scaffold



(1)由於 HA 提升成骨分化效率之效果顯著，但一至兩週後就幾乎完全被細胞分解(圖 10-2)，HA Scaffold 被分解過程中 BMSCs 逐漸降至 well 底部並貼附其上，雖經附著 scaffold 之過程，由圖 10-3 可觀察到其仍穩定生長之情形。

(2)操作細胞種入量之實驗時，發現 Gelatin 吸水性較 HA 差，不至過快被細胞分解，故改以 1:1 體積比混合 HA 與 Gelatin 製成複合材料，使其保留 Gelatin 不易被分解特性且亦能維持 HA 提升晚期成骨分化效率之效果。

### 2.HA+Gelatin Scaffold



(1)由於 HA 提升成骨分化效率之效果最顯著，但在兩個禮拜後就幾乎被細胞分解殆盡，因此我們以 1:1 之體積比混合 HA 與 Gelatin 製成複合材料，使其不易被細胞分解，且亦能維持 HA 提升中晚

期成骨分化效率之效果。

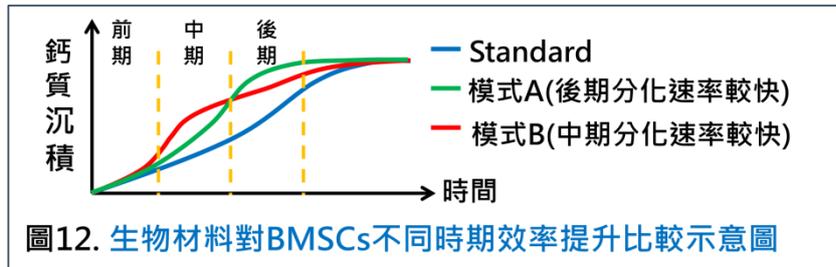
(2)由 ARS 之定量結果顯示，HA+Gelatin scaffold 組之 BMSCs 在第 7 天時吸光值低，鈣沉積量少，尚未明顯分化；至第 21 天時才有明顯鈣質沉積，且其呈現一斜率漸增之曲線，推測其能提升 BMSCs 後期之成骨分化效率。

(3)由相對鈣沉積量可得其成骨分化效率較第七天提升約 20 倍，較平面成骨之效率更佳。

(4)未來我們也將進一步進行 Gelatin scaffold 之實驗，以釐清其對複合材料成骨分化效率之影響。

## 結論與應用

壹、生物材料 Gelatin、HA、PCL、PEG 確實可提升 BMSCs 成骨分化效率。而不同生物材料的提升效果各自不同 (圖 12)。



貳、立體結構成骨較平面成骨更貼近實際情形，因所用生物材料具生物可分解性，且不同生物材料特性不同，可以依此特性製成效果最佳之複合材料，如 HA+Gelatin Scaffold 立體結構成骨確實能維持平面之效果且結合兩者優點，不至分解過快又可提升 BMSCs 後期之成骨分化效率，且提升之效率比平面成骨更佳。

參、利用本實驗設計可確立一套體外篩選合適生物材料之機制，藉由相同的模式，可期未來應用於醫學上，使病患早日接受細胞功能體外篩選，有助於加速其復原速度。

## 參考文獻

- 壹、 Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister A., & Prockop, D. J. (2004) An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*, 329, 77–84.
- 貳、 Schliephake, H. (2010). Application of bone growth factors — the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg*, 14, 17-22.
- 參、 Takada, I., Kouzmenko, A. P., & Kato, S. (2009) Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nature Review Rheumatol*, 5, 442-447.
- 肆、 Neovius, E. , & Engstrand, T. (2010). Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: Review over the last 11 years. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 63, 1615-1623.

## 評語

1. 已有初步 data，成果不錯，應給予肯定。
2. 所有 data 應有統計數據。
3. 以 BMSC 為研究材料，利用 PCL.HA. gelatin 提升成骨分化效率已有類似之報導，應強調與其他報導不一樣的地方，突顯本研究之”新穎性”。