

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 100034

參展科別 工程學

作品名稱 探討造孔劑粒徑與添加量對天然水膠軟骨支架
之孔洞型態影響

得獎獎項 美國材料資訊協會獎

就讀學校 國立鳳山高級中學

高雄市私立道明高級中學

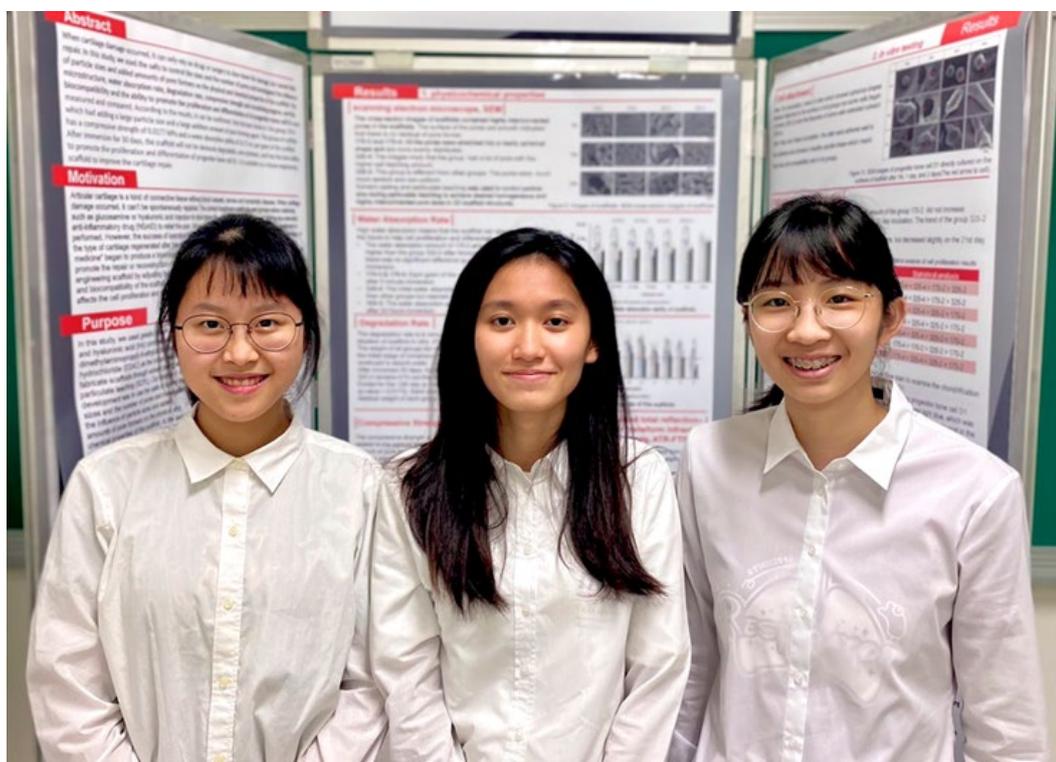
高雄市立高雄女子高級中學

指導教師 吳家進、柯嘉泠

作者姓名 鄭雅心、陳昱希、廖晨妤

關鍵詞 軟骨支架、孔洞型態、物化性質

作者簡介



鄭雅心(左)：我來自鳳山高中，我的父母常常帶我參加探究與實做的營隊，因此從小就對科學十分有興趣，喜歡在團隊裡提出問題並與隊友一同解決，這項特質使我想成為科學家。謝謝大家參觀我們的作品，希望你能在我們的作品中有所收穫！

陳昱希(右)：我來自高雄道明中學，從以前就對自然科學實驗非常有興趣，在因緣際會之下有了這個機會參與科展。希望能藉由本次活動提升個人知識能力，並且在表達與台風上有所進步，也希望能在本次作品中有所收穫。

廖晨妤(中)：我來自高雄女中。現在是社會組學生，因為對這個題目非常有興趣，所以就跟朋友組隊參加。希望能在這個比賽中跟其他的組別交流，學習不同的知識，同時鍛煉自己的語文能力。

我們三人雖來自不同學校，但因是無話不談的好夥伴，有著相互合作扶持的好默契，因此一起研究、挑戰這次國際科展。

中文摘要

軟骨修復目前仍是臨床治療上的挑戰，組織工程扮演著可行性的解決方案。軟骨修復中，軟骨支架是關鍵的要素。本研究使用天然高分子水膠透過溶劑鑄造鹽洗法製備軟骨支架，去探討造孔劑粒徑大小（大粒徑:170；小粒徑：250）與添加量（低量：2克；高量4克）是否會影響製成軟骨支架的物化性質，以及會影響前驅骨母細胞分化的能力。透過觀察所製成的四種軟骨支架顯微結構，分別測試其吸水量、降解性、抗壓強度與交聯度，並測試其生物相容性與促進前驅骨母細胞增生及分化之能力。結果發現，造孔劑粒徑大且高添加量的軟骨支架（170-4組別），雖抗壓強度僅 0.0177 MPa，每克支架吸水量達 14.72 mL，浸泡於試劑 30 天後，支架不會明顯降解，且不具細胞毒性，促進前驅骨母細胞增生與分化的能力最佳，因此可作為適用於軟骨缺損修復之組織工程支架，提高軟骨修復之成效。

英文摘要(Abstract)

Cartilage repair by far is still a challenging issue by all current clinical interventions, tissue engineering has begun to play a promising role in providing better solutions. However, a necessary ability for cartilage scaffold has been known to play a critical influence on cartilage repair, including a high compressive strength, a high water absorption rate, a low degradability; in addition, a good biocompatibility, a good ability to promote the proliferation and differentiation for precursor osteoblasts. In this study The cartilage scaffold was prepared from a natural polymer water-intake glue using the solvent casting and particulate leaching method. In order to investigate the influence of different particle size (large: 170 group; small: 325 group, respectively) or add amount (low: 2 g; high: 4 g, respectively) pore-forming agent for 4 cartilage scaffolds, the physical and chemical properties, the microstructure, the water absorption rate, the degradability, the compressive strength and the degree of cross-linking were analyzed. After 4 scaffolds co-cultured with osteoblast precursor, in addition, the biocompatibility, the ability to promote the proliferation and differentiation of the scaffolds for of precursor osteoblasts were investigated. The results showed that the cartilage scaffolds prepared from large particle size, high add amount pore-forming agent (170-4 group), although the compressive strength is only 0.0177 MPa, the water absorption per gram of the scaffold reaches 14.72 mL, after soaking in the reagent for 30 days, the scaffold does not obviously degrade and has no cytotoxicity. It has the best ability to promote the proliferation and differentiation for osteoblasts precursor in all 4 cartilage scaffolds. Therefore, the cartilage scaffolds prepared from large particle size, high add amount pore-forming agent has the potential for tissue engineering or as cartilage graft substitute.

壹、前言

一、研究背景

台灣目前已步入老年化社會，隨著年齡增長，不可避免會遭遇組織或器官功能退化的問題，最常見的就是好發於老年人的退化性關節炎，主因是因為關節面持續受到應力作用，引起軟骨磨耗缺損，初期症狀可能為略感不適以及酸痛，若是軟骨缺損面積大，甚至可能導致無法行走的問題，但目前對於關節軟骨如何磨耗，甚至如何自行降解之成因與機轉，仍甚不清楚。

過去人體組織器官若出現損傷，僅能選用移植或者人工合成材料取代原有的組織器官，像是器官移植或是人工心臟等。組織工程學 (tissue engineering)，自美國國家科學基金委員會在1987年提出後，此後的二十多年期間快速發展，自此這項技術對於世界上許許多多因器官衰竭而亟待修復的患者來說，無疑是一大福音。組織工程主要是致力於組織和器官的再生與形成，利用材料科學與生物科技的進步，模仿組織與器官形狀的材料中種入細胞，使細胞依著模型來長成新的組織與器官，以供修復人體的組織缺損。關節軟骨屬於沒有血管、神經及淋巴組織的結締組織，當關節軟骨受到損傷時，自行恢復的能力相當有限。截至目前為止，針對退化性關節炎常用的治療方式，包括口服維骨力(成分為葡萄糖胺類，Glucosamine)或注射玻尿酸(Hyaluronic acid)以刺激蛋白聚醣 (proteoglycan) 合成和增加關節潤滑液的分泌與潤滑性；或是服用非類固醇抗發炎藥，來減輕病患疼痛感；當關節炎已經惡化至重度時，最後只能倚靠透過置換關節手術改善疼痛，因此透過『軟骨支架 (cartilage scaffold)』達到軟骨修復(cartilage repair)目前是許多學者挑戰的研究目標之一。

組織工程 (tissue engineering)的三要素是由細胞 (cell)、細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 及生長訊息系統 (signaling system)所構成，橫跨了三大領域的應用，分別是臨床醫學應用 (細胞)、工程材料知識 (支架) 與生命科學原理 (刺激訊號)。首先需要製作一個具有生物相容性的組織替代物，用來修復、重建受損的組織器官功能或取代病變的組織器官。這個組織替代物，其實就是一個支架，除了用來支撐細胞外，還是組成完整組織所需要的框架，

所以一個好的生物支架是組織工程中不可或缺的元素。組織工程的另外兩要素，其實就是細胞療法的概念，若能從自體取得足夠數量的軟骨細胞，將其種植於支架上，搭配體外誘導培養，在增加軟骨細胞數量的同時，促進軟骨細胞進行分化，再將此一富含軟骨細胞的支架植回患處，則可增加修復軟骨缺損的機率，達到減輕退化關節炎病患的不適，恢復其生活機能的作用。

因此，我們希望製備一組織工程之軟骨支架，透過調整製程參數，探討對軟骨支架之物化性質影響，並測試軟骨支架的生物相容性，最後與前驅骨母細胞細胞共培養，確認不同參數的軟骨支架是否會影響細胞增生與分化的能力。

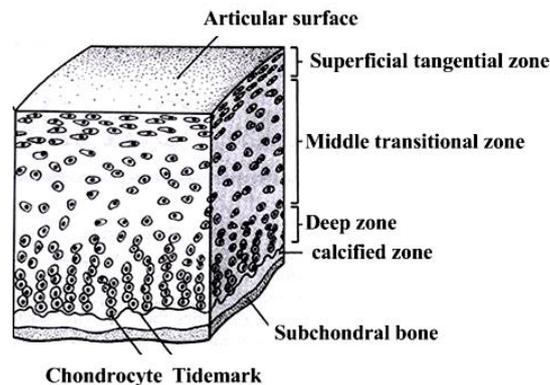
二、文獻探討

(一) 軟骨介紹

軟骨屬於結締組織，其內室沒有血管及神經通過，僅有軟骨細胞 (chondrocytes) 及細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 組成，其中超過 95% 為細胞外基質。軟骨基質又屬於高度水合的組織，60-80 % 由水分構成，其他則為膠原蛋白及肽聚醣-玻尿酸 (hyaluronan) 聚合體，有助於代謝物質在軟骨與周遭組織間擴散，維持軟骨組織的活性。隨著細胞外基質組成成份的不同，可分成三種軟骨，分別為透明軟骨 (hyaline cartilage)、彈性軟骨 (elastic cartilage) 和纖維軟骨 (fibrocartilage) (Hunter, W., 1995)。人體內的關節軟骨就是屬於透明軟骨，組成為 75% 的水份、5 % 的軟骨細胞以及 20 % 的細胞外基質；其中細胞外基質是由蛋白聚醣 (proteoglycans, PGs)、醣蛋白 (glycoproteins) 及纖維性膠原蛋白所組成；纖維性膠原蛋白中有 90-95 % 為第二型膠原蛋白 (type II collagen) (Levangie et al, 2001)。

一般成人的關節軟骨厚度約為 2-5 mm，分為四區，最靠近關節面的為表層正切區 (superficial tangential zone)，第二型膠原蛋白纖維小束平行於關節表面，周圍包圍長而扁的軟骨細胞；第二區為中間斜切區 (intermediate transitional zone)，膠原纖維呈現不規則排列排列，軟骨細胞為圓形並隨意散布；第三區為深層放射區 (deep radial zone)，膠原蛋白纖維與硬骨

長軸平行排列，軟骨細胞為小而圓的型態，但是細胞是成短柱型垂直於軟骨表面；最後為鈣化區 (calcified zone)，存在鈣化基質與小而圓的軟骨細胞，此區與深層區之間有一明顯界線區隔，此界線稱為波紋 (tidemark)。在此線上，軟骨細胞會在軟骨窩中分裂，提供間質性生長 (interstitial growth) 所需的新生軟骨細胞，新生的軟骨細胞會由此層向關節面遷移，關節軟骨組織不同分層間的關係，如下圖所示。由此可知，軟骨內四區的基質特性及軟骨細胞型態有所不同，因此在研發軟骨支架時，應該考慮這四區不同的排列方式。



軟骨分層示意圖 (REF: Hunter, W., 1995)

(二) 組織工程支架及其製備與材料選擇

一個好的組織工程的支架須具有以下特性，包括支架本身有適當強度、擁有適當的孔隙度、孔洞為相互連通的結構；支架本身不具有生物毒性、細胞可貼附於支架表面；最終支架可在體內完全降解，但過程中支架要能支持細胞逐漸產生所需的細胞間質，並逐漸降解，又不至於降解太快，可全程保持一穩定結構等特性(Zuk et al., 2001)。

目前有許多製備支架的方式，如相分離法、溶劑鑄造鹽洗法、融化鑄造法、冷凍乾燥法、顆粒燒結法等(Langer, R., 2000)。每種方式皆有其優缺點，最常用的是相分離法，利用互不相溶的液體（水溶液及高分子溶液）混合均勻後，以冷凍方式使其凝結，再進行冷凍與真空乾燥，可得到多孔性的材料。此方法可得到高孔隙率（90 %左右）及孔洞相互連通的多孔性材料。溶劑鑄造鹽洗法，則是將高分子膠化後，添加鹽類，藉此產生孔洞，待高分子溶液呈現膠體後再將鹽類溶出，即可產生大量的孔洞。此方式的優點為製備方法簡單，且可控制材料的孔徑及孔隙度，但是缺點是若是支架內層不是連續型孔洞時，可能無法完全溶出鹽類（孔

洞製造劑)，會造成支架生物相容性不佳的問題；也可使用有機物質作為發泡劑來製造孔洞，但會造成支架內部會殘留許多的有機溶劑，導致細胞毒性。殘留的造孔劑，可能影響後續的生物相容性，為去除造孔劑，需將支架型態製成薄膜狀，減少厚度，避免造孔劑包覆於內層，無法清乾淨的問題，但薄膜支架又跟軟骨原先的結構有所不同，因此，需特意將支架製作成立方體結構，才能更為貼近軟骨原先的結構。

另外，可用來製造軟骨支架的材料大多為高分子，可分為天然及人工合成兩類。天然高分子，如明膠 (gelatin) (Chou et al, 2006)、膠原蛋白 (collagen) (Pieper et al, 2002)，褐藻膠 (alginate)、瓊膠 (agarose)、透明質酸 (hyaluronan acid, HA) (Park et al, 2002)、微纖維 (fibrin) 與甲殼素 (chitosan) (Lee et al, 2004)等；人工合成高分子，如聚乙醇酸 poly-glycolic acid、聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物，及以太酯類 (polydioxanone) 等(Ma et al, 2005)，其裂解產物為小分子鏈段，這些產物將隨著人體內的新陳代謝過程排出體外，因此，並不會殘留於體內。考量耐磨、彈性暨恢復性等性質之聚己內酯多元醇或聚原酸酯等都是可選擇的材料。

軟骨基質主要由第二型膠原蛋白、彈絲蛋白、醣蛋白、黏附性醣蛋白、葡萄糖胺聚醣所構成，其中醣蛋白聚合體為主成分，結構呈現羽毛狀，是由透明質酸，也就是俗稱玻尿酸，構成結構主體，旁邊有核心蛋白，以共價鍵鏈結兩旁的糖基蛋白 (羽絨)，結合形成聚蛋白聚醣 (aggrecans)。玻尿酸在軟骨組織中可維持軟骨健康，使得關節液被保留在適當的位置，組織的新陳代謝正常，以及預防組織不正常分解。

由以上結果可知，玻尿酸為軟骨基質的基本成分，然玻尿酸含量越多，合成的支架強度越差，會影響支架本體結構的穩定性，導致支架植入後降解速率過快等問題，因此，並不適合單獨使用玻尿酸作為支架之主成分。在本研究中，製作之組織工程支架，在成分中除加入玻尿酸外，還會加入其他天然高分子，如明膠與海藻酸鈉，透過交聯使不同高分子鍵結，模擬玻尿酸與其他蛋白質所形成的基質結構。

此外，製作之軟骨組織工程支架，應考量不同層軟骨孔洞型態差異，在相分離法及冷凍

乾燥法的製程當中，要均勻的控制孔徑及孔洞數量並非容易的事，若以溶劑鑄造鹽洗法、融化鑄造法、顆粒燒結法則須透過控制造孔劑來控制粒徑，因此，在本研究中，欲透過溶劑鑄造鹽洗法，控制內層的孔洞粒徑及孔洞數量，探討不同粒徑大小及添加量的造孔劑對軟骨支架之物化性質影響，但後續則進一步測試支架的生物相容性，確保製程中使用的造孔劑沒有殘留於支架內，最後再測試支架是否具備促進前驅骨母細胞生長及分化的能力。

研究目的

本研究欲使用兩種以上的天然高分子，如明膠與海藻酸鈉，再加入玻尿酸，進行交聯反應，製備具有一定強度的軟骨支架，再透過溶劑鑄造鹽洗法，控制內層的孔洞粒徑及孔洞數量，探討不同粒徑大小與添加量之造孔劑對軟骨支架物化性質之影響，同時測試其生物相容性與促進前驅骨母細胞生長及分化的能力。

貳·研究方法或過程

研究設備及器材

一、原料

下表一列出本研究用來製作軟骨支架之原料以及用於檢驗分析、細胞培養及分析之化學藥品及原料。

表一、使用之原料及藥劑

		中文名稱	英文名稱	廠牌
高分子原料	1	明膠	Gelatine	PanReac
	2	藻酸鈉	Sodium Alginate	Spectrum
	3	玻尿酸	Hyaluronic acid	Foodchemifa
原料 造孔劑與交聯劑	4	蔗糖	Saccharose	KATAYAMA CHEMICAL
	5	氯化鈣	Calcium chloride	PanReac
	6	1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺	3-(ethyliminomethyleneamino)-N,N-dimethyl-propan-1-amine	Sigma
細胞培養所需藥劑	16	DMEM 培養基	Dulbecco's Modified Eagle Medium	gibco
	17	Alpha-MEM 培養基	Minimum Essential Medium α	gibco
	18	磷酸緩衝溶液	Dulbecco's phosphate Buffered saline	gibco
	19	胰蛋白酶	Typsin EDTA Solution	Biological Industries
	20	抗生素溶液	Penicillin Steptomycin	gibco
	21	馬血清	Horse Serum	gibco
	22	胎牛血清	Fetal Bovine Serum	Hyclone
	23	重碳酸氫鈉	Sodium Bicarbonate	Sigma
細胞分析之藥劑	24	XTT細胞增生試劑	XTT Cell Proliferation Kit	Biological Industries
	25	細胞活性試劑	Alamar Blue	Bio-RAD
	26	二甲基亞硫	Dimethyl sulfoxide(DMSO)	Sigma
	27	阿爾辛藍	Alcian Blue	Sigma
	28	甘油	Glycerol	Ajax-Finechem

	29	二聚甲醛	Paraformaldehyde	Panreac
	30	鹽酸	Hydrochloric acid solution	Panreac AppliChem

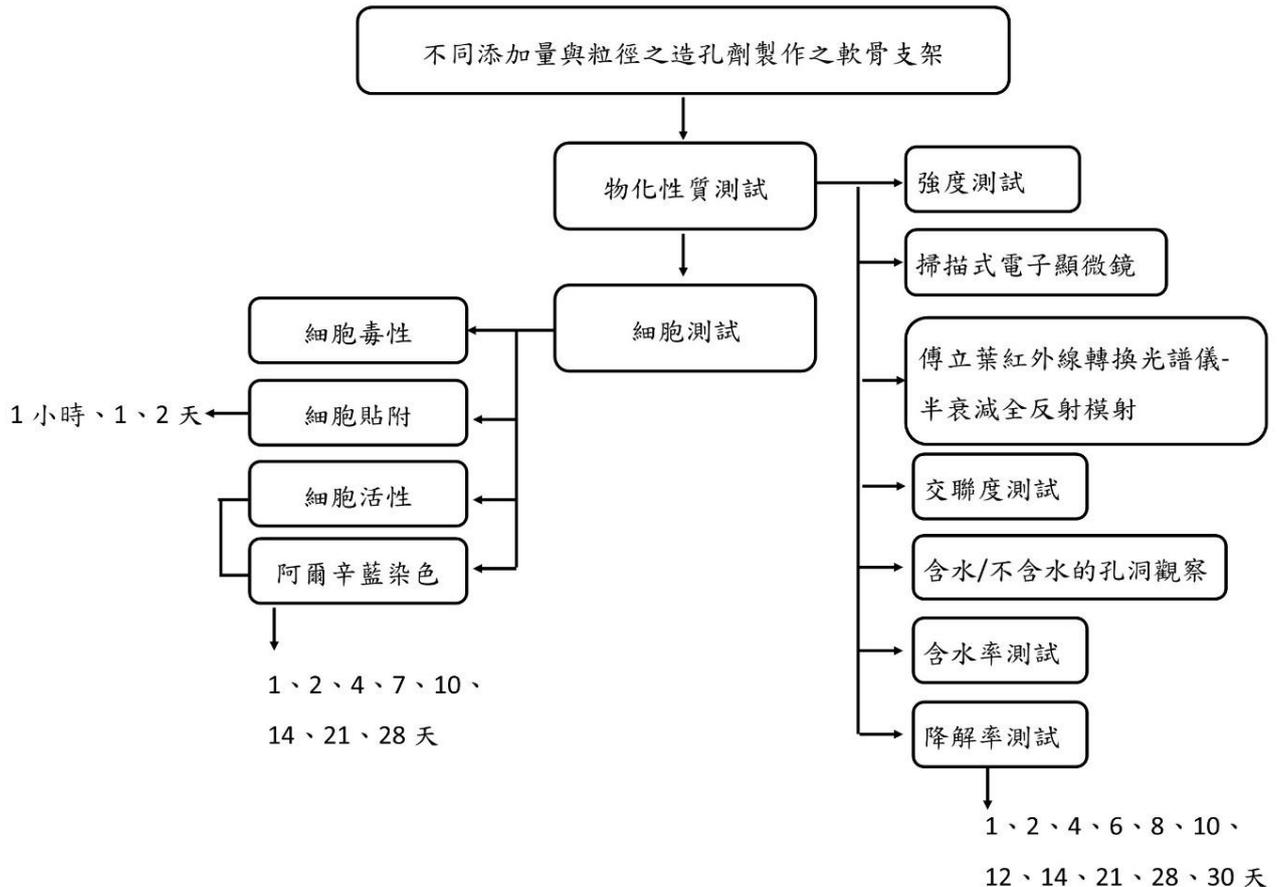
二、研究設備

下表二為本研究用來製作軟骨支架以及用於檢驗分析、細胞培養及分析之儀器設備。

表二、使用之儀器及設備

	名稱	廠牌	型號		名稱	廠牌	型號
製程設備I							
1	電子天平	SHMADZU	TW423L	2	電子天平	SHMADZU	UW2200H
3	超純水系統	ELGA	-	4	4度冰箱	KING COOL	KC-4579
5	-20度冰箱	FRIGIDAIRE	FFU21F5HW	6	冷凍乾燥機	EYELA	FDU-830
檢驗設備							
7	電子天平	SHMADZU	ATX224	8	傅里葉轉換紅外線光譜儀	THERMO	NICOLET 6700
9	萬能試驗機	弘達	HT-2402	10	反射式顯微鏡	ZEISS	Primotech
11	掃描式電子顯微鏡	HITACHI	S-3400N	12	恆溫水槽	DENG YNG	G-20
細胞培養及分析設備							
25	無菌操作台	三雄	-	26	細胞用顯微鏡	OLYMPUS	CK
27	細胞培養箱	Thermo	Forma 310	28	搖晃式培養箱	YIHDER	LM-400D
29	離心機	Hsiang Tail	CN 10001	30	酵素免疫分析儀	BMG LAB	SPECTRO

研究過程或方法



實驗流程圖

一、材料與方法

(一) 製備膠體溶液

混合 0.8 g 明膠 gelatin (from bovine skin , type B)、0.008 g 玻尿酸 (hyaluronic acid , 簡稱 HA , 分子量 range from 8 to 10000 kDa , 與 0.2 g 海藻酸鈉作為支架的主體。

粉末均勻混合, 後隨即加入至少 50 °C 的二次去離子水, 共 20 mL, 使三種高分子液化, 並與水形成膠體; 將此混合均勻之膠體溶液, 加入經過粒徑控制之造孔劑, 用以製造不同大小均質孔洞。造孔劑含量為每 mL 膠體分別加入不同粒徑 (70 mesh 以上, 未過 170 mesh , 粒徑範圍 88 μ m ~ 177 μ m 及過 170 mesh 未過 325 mesh , 粒徑範圍 44 μ m ~ 74 μ m) 與不同重量 (2 g、4 g) 的蔗糖做為造孔劑, 探討以不同粒徑與克數之造孔劑製備軟骨支架, 對其物化性質及生物相容性之影響。

(二) 交聯劑的配置

使用的交聯劑溶液為 1 vol % 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳醯二亞胺(N-(3-Dimethylaminopropyl) - N'- ethylcarbodiimide hydro – chloride, 簡稱 EDAC) 及 0.5 % 氯化鈣 (CaCl₂)。

(三) 製備支架

將膠體均勻調拌後，第一天是利用將樣本泡入 100mL 的硬化劑溶液當中，使其交聯硬化為支架的半成品。將第一次交聯劑去除並秤樣品重量，以樣品重比交聯劑為 1 比 2 的比例加入第二次交聯劑，第二天使用的交聯劑 1 vol% EDAC，交聯 1 天。待樣本完成交聯後，即可將支架主體切成適當大小之樣本型態(長條型)，然後為了將支架內所含造孔劑完全溶蝕，半成品支架本體須浸泡去離子水中，以洗去殘留於 scaffold 表面及內部之造孔劑後，去除第二次交聯劑並水洗 3 小時，水洗後冰 -20°C 4 小時，再冷凍乾燥 3 天，即可取得軟骨支架。

表三、組別代號

組別代號	造孔劑粒徑	造孔劑含量
170-2	88μm ~ 177 μm	2g
170-4	88μm ~ 177 μm	4g
325-2	44μm ~ 74μm	2g
325-4	44μm ~ 74μm	4g

二、材料物化性質、顯微結構與官能基之分析

(一) 光學顯微鏡分析

在本研究中，使用光學顯微鏡進行乾燥支架與含水支架之觀察，觀察支架大量吸水後，結構與孔洞形態是否有改變。乾燥支架是取支架完成品，切除表面薄層後，置於玻片上進行光學顯微觀察。含水支架須先將支架之完成品置於微量離心管中，加入 1 mL 的二次去離子水，隨即將 1.5 mL 微量離心管以封口蠟膜封蓋，置於 37°C 恆溫水槽中 24 小時後，取出含水支架，置於玻片上進行光學顯微觀察。

(二) 吸水量分析

將切除表面薄層之支架完成品以四位數電子天平紀錄未含水之支架重量 (乾重)，再將支架放入微量離心管中，加入 1 mL 的二次去離子水，將微量離心管以封口蠟膜封蓋後置於 37°C 恆溫水槽中，分別在浸泡 5、10、15、30 分及 1、2、24 小時取出測試，測試方法是將支架

從離心管中取出，以吸飽水的海棉吸掉表面多餘的水分後，再以四位數電子天平秤重，即可得到支架含水的重量(濕重)，經過計算後可得到不同條件下，每公克支架可以吸附之水量。

$$(\text{濕重}-\text{乾重}) / \text{乾重} = \text{每公克支架之含水量 (mL / g)}。$$

(三) 支架降解性測試

將切除表面薄層之支架完成品，以四位數電子天平秤重後，紀錄未含水之支架重量(乾重)，再將支架放入 10 mL 離心管中，加入 5 mL 的二次去離子水，封蓋後置於 37 °C 恆溫水槽中 1、2、4、6、8、10、12、14、21、28、30 天，時間到後測量，到達設定時間後將樣本從離心管中移出置於吸飽水的海綿上，吸除多餘的水分後，再以四位數電子天平秤重測得浸泡後剩餘支架重量(濕重)。

$$\text{重量殘留率 (\%)} = 1 - [(\text{濕重} - \text{乾重}) / \text{乾重}] \times 100\%$$

(四) 掃描式電子顯微鏡

將不同條件支架之完成品，切成薄片後，再將薄片置於金屬載台的碳膠上，並以離子覆膜機鍍白金，再使用掃描式電子顯微鏡觀察支架的表面及孔隙狀況；同時也可應用於試片直接觀察及細胞培養後之細胞固定試片形態觀察。

(五) 抗壓強度-乾壓

挑選大小一致之支架之完成品，切除表面薄層後，測量並記錄其長(L)、寬(W)，高(H)，再以桌上型萬能試驗機測試支架之抗壓強度，記錄抗壓後的曲線變化，經由面積的計算可得應力(stress)、高度或長度的變化可得應變(strain)，取其線性斜率後可得到支架承受之最大力及彈性模數(modulus)。

(六) 衰減式全反射傅立葉紅外線光譜儀(ATR-FTIR)分析

紅外線光譜儀可確認是否有新的官能基生成。穿透式試片製作方式為取適量粉末或樣本壓碎，並將背景粉末 KBr 以 1: 100 的比例充分混合，壓成半透明圓形薄片，將壓製好的半透明薄片置於儀器中進行測試。衰減式全反射模組 (Attenuated total reflectance, ATR) 利用高反射率介質(鑽石)入射低反射率介質(樣本)達到光波打至樣本產生全反射，分析其樣本吸收及釋放之波長，達到檢測的效果。波數與打入深度成正比，所以波長越長，訊號也越強。由此可見光譜強度與 Sample 厚度無關，所以樣品不需經過前處理，在聚合物測試上可達到較為準確的效果。

(七) 交聯度測試

本研究為評估支架經交聯劑反應後，判斷其交聯能力之差異。交聯度原理是利用支架的自由胺基與交聯劑反應的百分率，此數據是利用茚三酮試劑來測量支架上未反應的自由胺基含量，再經由公式計算而得。茚三酮試劑 (Ninhydrin reagent)，又稱寧希德林，為一種有機物，主要用於檢測胺、一級和二級胺，茚三酮分子上的羰基會與胺基發生縮合反應，反應後產生藍紫色產物，再以比色法測定胺基的含量，隨著胺基含量越多所呈現的藍色越深，藉由酵素免疫分析測讀儀(ELISA Reader)分析比較，推算胺基的含量。茚三酮比色法測定胺基含量不僅操作簡單、成本較低而且較易取得較佳的測量結果，因此茚三酮比色法已被廣泛應用於檢測胺基含量。在本研究中，若支架表面殘留的胺基多，則反應溶液的顏色越深，也就是未反應的官能基多，代表交聯度差；反應溶液顏色淺，代表支架表面殘留的胺基少，代表交聯度好。

測試方法如下，取樣本 0.01 克加 2 mL 的去離子水，放 37 °C 恆溫水槽 1 小時，可取得樣本萃取液。再取樣本萃取液：茚三酮溶液 = 2 : 1，均勻混合後，在沸水中反應十分鐘，待放涼即可測試。

$$\frac{[(\text{NHN reactive amine})_{\text{fresh}} - (\text{NHN reactive amine})_{\text{fixed}}]}{[(\text{NHN reactive amine})]_{\text{fresh}}} \times 100\%$$

(NHN reactive amine)fresh : 樣本交聯前自由胺基含量

(NHN reactive amine)fixed : 樣本在交聯後剩餘的自由胺基含量

三、體外細胞實驗分析 (*in-vitro test*)

(一) 生物相容性測試

1. 細胞毒性測試 (Cytotoxicity test)(Follo ISO 10993-5)

使用 L929 cell line，培養基為 alpha- modified Eagle's medium (α -MEM, Gibco[®], Invitrogen Taiwan Ltd., MD)，內含馬血清 (house serum) (Biologend Co., US)，培養於 37 °C 含有 5% CO₂ 的培養箱中，2 天置換培養基一次，當細胞生長至八分滿時，可進行繼代培養。本實驗的陽性對照組 (positive control) 為 15% 的二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)，每 1 mL 的細胞培養液中含 150 μ L 的 DMSO，經由 0.22 μ m 的過濾膜過濾滅菌後備用。陰性對照組 (negative control) 使用高密度聚乙烯，重量對培養基體積比 (g/ml) 為 1: 5，置於 37°C 恆溫槽中培養 24 小時，吸取上層澄清液，此即為陰性對照組的萃取液。Control 組使用正常的

細胞培養基。實驗組使用薄膜狀支架，厚度約 0.5 mm，其萃取液的準備方式為計算好樣本上下層的面積後，將試片置入細胞培養基中，以面積對培養基體積比 (g/ml) 為 6 cm²: 1 mL 的比例，加入培養基，完成後置於 37 °C 恆溫槽中培養 24 小時，到達培養時間後吸取上層澄清液，此即為測試材料的萃取液，每組做六重複 (n = 6)。

細胞培養方式為取 100 µl 細胞濃度為 1×10⁵ cells/mL 的細胞懸浮液植入 96 孔培養盤，於培養箱培養隔夜後，吸掉原有的培養基並加入樣本的萃取液 (100 µl / well) 作為培養基來培養細胞。培養 24 小時後，吸掉實驗用的細胞培養基，加入一般的細胞培養基 (100 µl/ well)，與 XTT cell proliferation assay kit (50µl/well) 混合，放入 37 °C，5% CO₂ 的培養箱中 4 小時後，以 ELISA reader 測試 OD 值 (XTT assay OD 值與細胞活性成正比)。

2. 細胞毒性試驗之型態觀察

細胞毒性試驗中的型態觀察，試片萃取液的準備方式如上細胞毒性試驗步驟所述，細胞培養方式則是取 100 µl 細胞濃度為 1×10⁶ cells/mL 的細胞懸浮液植入 48 孔盤養盤中，於培養箱培養 24 小時後，吸掉原有的細胞培養基，加入樣本的萃取液 (1000µl / well)作為培養基來培養細胞。培養 24 小時後，以倒立式顯微鏡觀察細胞之形態拍下不同倍率的照片。

(二) 細胞實驗

1. 細胞培養

細胞貼附、增生、分化能力分析是使用小鼠的前驅骨母細胞 (D1 cell)。使用的細胞培養為 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco[®], Invitrogen Taiwan Ltd., MD)，內含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)(Biologend Co., US)，培養於 37 °C 含有 5% CO₂ 的培養箱中，2 天置換培養基一次，當細胞生長至八分滿時，可進行繼代培養。

此細胞雖然為前驅骨母細胞，但在適當的環境及刺激下，可分化為骨細胞、軟骨細胞或脂肪細胞。選用此細胞株的原因也是為了測試當前驅骨母細胞與製作之軟骨支架共培養時，軟骨支架是否可促使前驅骨母細胞分化為軟骨細胞，若某一參數的軟骨支架可使前驅骨母細胞分化為軟骨細胞，代表未來植入體內後，可能有較好的軟骨修復效果。

2. 細胞貼附型態觀察-cell attachment test and cell morphology observation

將支架切成長、寬、高各為 5 mm，大小一致的立方體試片後，取 100 µl 細胞濃度為 1×10⁵ cells/mL 前驅骨母細胞 (D1 cell) 的細胞懸浮液，與試片做接觸性培養，培養時間為 1

小時、1 天、2 天。到達培養時間後，依序以 2.5% glutaraldehyde 與 paraformaldehyde 固定、不同濃度酒精序列脫水後，將試片鍍金並以掃描式電子顯微鏡觀察細胞與材料接觸之型態及體外培養長時間之變化。

3. 細胞增生測試- cell viability

將支架切成長、寬、高各為 5 mm，大小一致的正方體試片後，取 100 μ l 細胞濃度為 1×10^6 cells/mL 前驅骨母細胞 (D1 cell) 的細胞懸浮液離心後加入 20 μ l 培養基，做接觸性培養，培養時間為 1、4、7、10、14、21、28 天。到達培養時間後，清洗後再以新的細胞培養基與 alamar blue proliferation assay kit 混合，4 小時後用 ELISA reader 測試細胞的光密度(正比於細胞活性)，檢測其光密度 (optical density, 簡稱 OD 值)，測試波長為 570nm 與 595 nm。

4. 細胞分化能力分析-阿爾辛藍染色 (Alcian Blue stain)

此染色方法可染出軟骨基質中的蛋白聚醣，此成分含量越高，則染出的藍色越深。實驗方法如下，將支架切成長、寬、高各為 5 mm，大小一致的正方體試片後，取 100 μ l 細胞濃度為 1×10^6 cells/mL 前驅骨母細胞 (D1 cell) 的細胞懸浮液離心後加入 20 μ l 的培養基，做接觸性培養，培養時間為 1、4、7、10、14、21、28 天。至培養時間後的試片，利用磷酸緩衝溶液清洗 3 次後，利用 4 % paraformaldehyde 溶液於室溫固定 15 分鐘，再經磷酸緩衝溶液清洗後加入濃度為 1 % Alcian blue 溶液作用 30 分鐘，再利用 0.1 N HCl 溶液作用 5 分鐘，用以去除過多的的染劑，最後加入甘油保存並拍照。

四、統計分析

本研究的抗壓強度、吸水性、交聯度、降解度與細胞增生能力，是使用變異數分析(ANOVA)來進行統計分析。變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 是比較多組平均數有沒有差易的統計方法，主要是利用兩個不同變異數估計值來達到比較多組平均數之差異，分別利用組內平方和除以其對應自由度，可了解各組內變異的情形；組間平方和除以其對應自由度，可了解各組平均與總平均之變異情形。可藉由組內平方和與組間平方合之比值，來檢定各組平均數相等之假說，若是比值接近於一，則各組平均數相等之假說成立。

無母數則採用 Kruskal-Wallis Test；有母數的事後檢定採用涂基 HSD 檢定法 (Tukey's honestly significant difference)，涂基 HSD 檢定法適用於各組樣本數相同且要同時比較各組之

平均是否有差異，主要是利用 HSD 方法計算出一差異值，只要任兩組的差異值大於此 HSD 差異值，即有統計顯著差異。

參、研究結果與討論

研究結果

一、軟骨支架材料物化性質分析

(一) 添加不同粒徑或造孔劑含量的軟骨支架之光學及掃描式電子顯微鏡分析

為了解製作之軟骨支架內部孔洞的型態，因此利用光學顯微鏡分別觀察未含水與含水的支架，在進行觀察之前，先以相機拍攝支架外觀照與剖面照 (Fig 1)，一開始製作時，支架為長條形，組別代號 170-2 與 325-2 的支架外觀質感較為疏鬆、不緻密，質感也較硬脆，而組別代號 170-4 與 325-4 的支架外觀，較偏向海綿，是較為軟略帶 Q 彈的質感。Fig 1 可觀察支架之內部結構，170-2 與 325-2 這兩組有明顯之孔洞；其餘兩組，孔洞較為緻密，肉眼則無法直接看見。

Fig 1. 不同粒徑或造孔劑添加量之軟骨支架外觀及剖面照

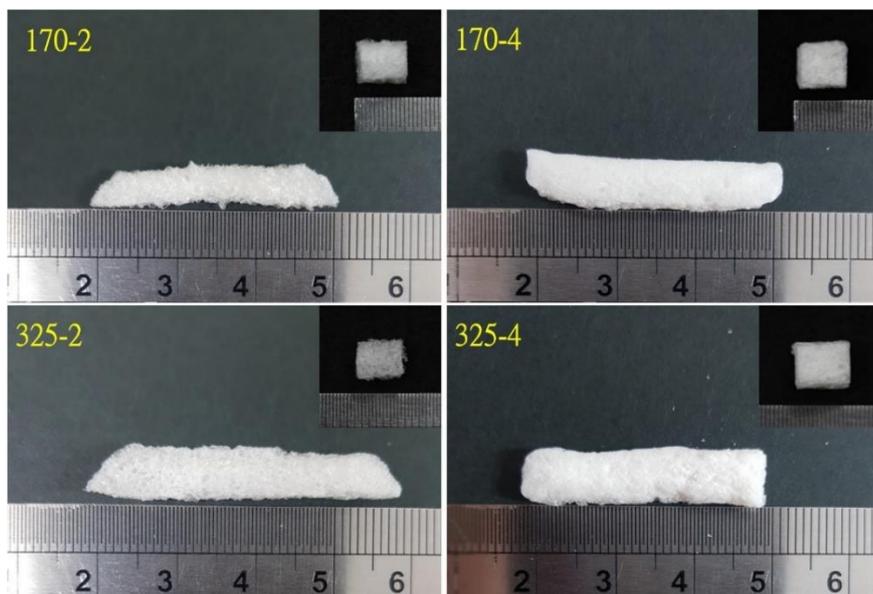
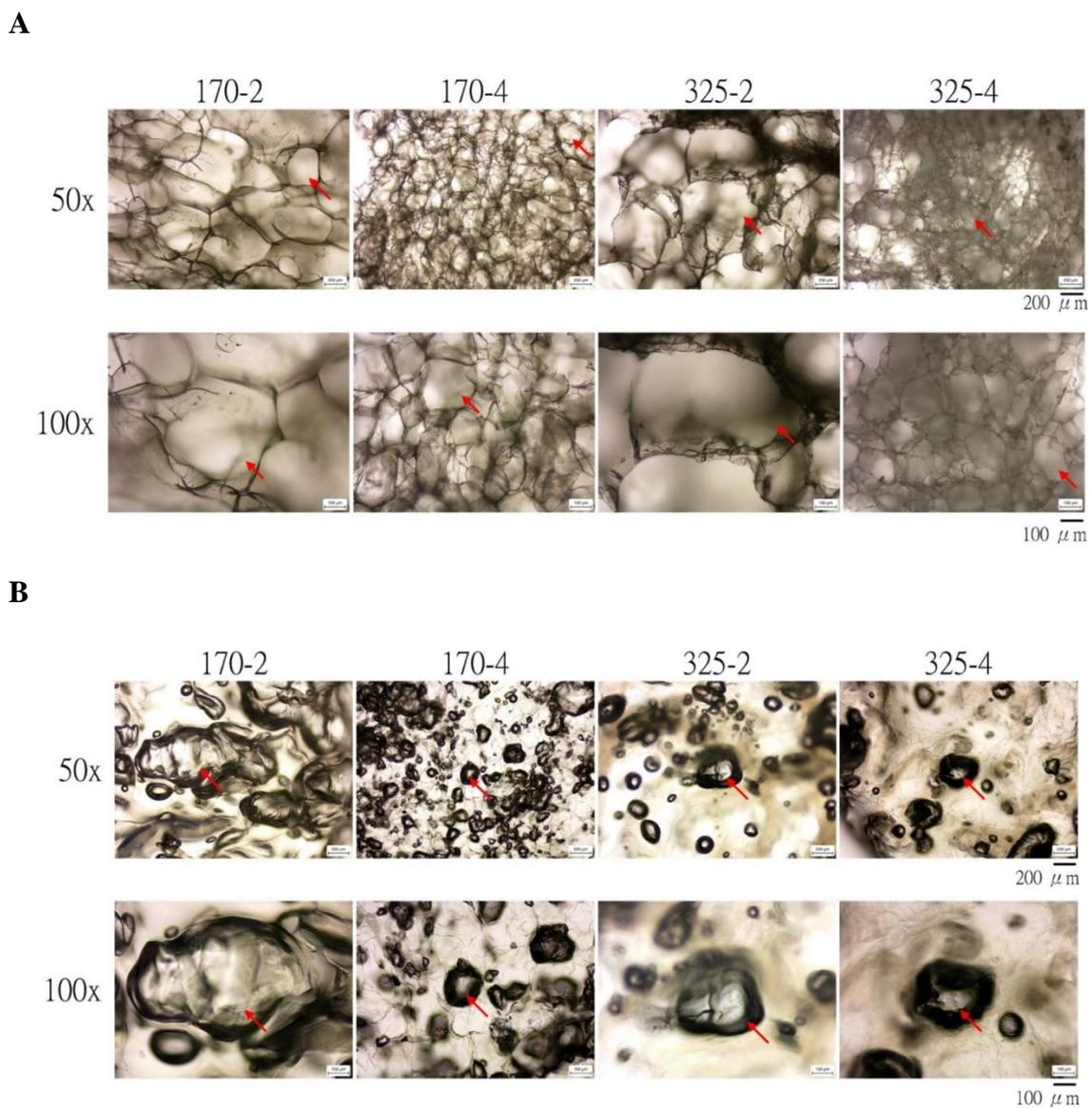


Fig 2 則是以光學顯微鏡觀察支架內層剖面。發現 170-2 與 325-2 組別，孔洞雖大但數量較少，可透過上層孔洞看到下方孔洞的結構；至於170-4 與 325-4組別，孔洞明顯小於 170-2 與 325-2，但孔洞數量明顯較多，可以看到不同層的孔洞互相交錯的影像 (Fig 2A)。

為了進一步確認孔洞間之連通性，我們將支架浸泡於去離子水後再取出，觀察支架含水後的內層結構狀態，發現四組支架含水後，材料本身雖然有膨脹，支架本體並未崩壞，可維持原有的立方體，內部孔洞也依然為圓形，代表支架擁有一定的強度，可承受吸附液體之重量，但結構不會損壞。支架含水後，可透過最上層的孔洞中，看到下層的孔洞結構，這也證實，製作之軟骨支架內部為孔洞與孔洞間是連通的，因為若是孔洞是封閉的不連通孔，則無法透過孔洞看到下方的孔洞結構 (Fig 2B)。因此，未來軟骨支架在進行細胞培養或是植入體內後，連通的孔洞形態有助於液體流通，幫助細胞代謝廢物及帶來細胞所需養分。

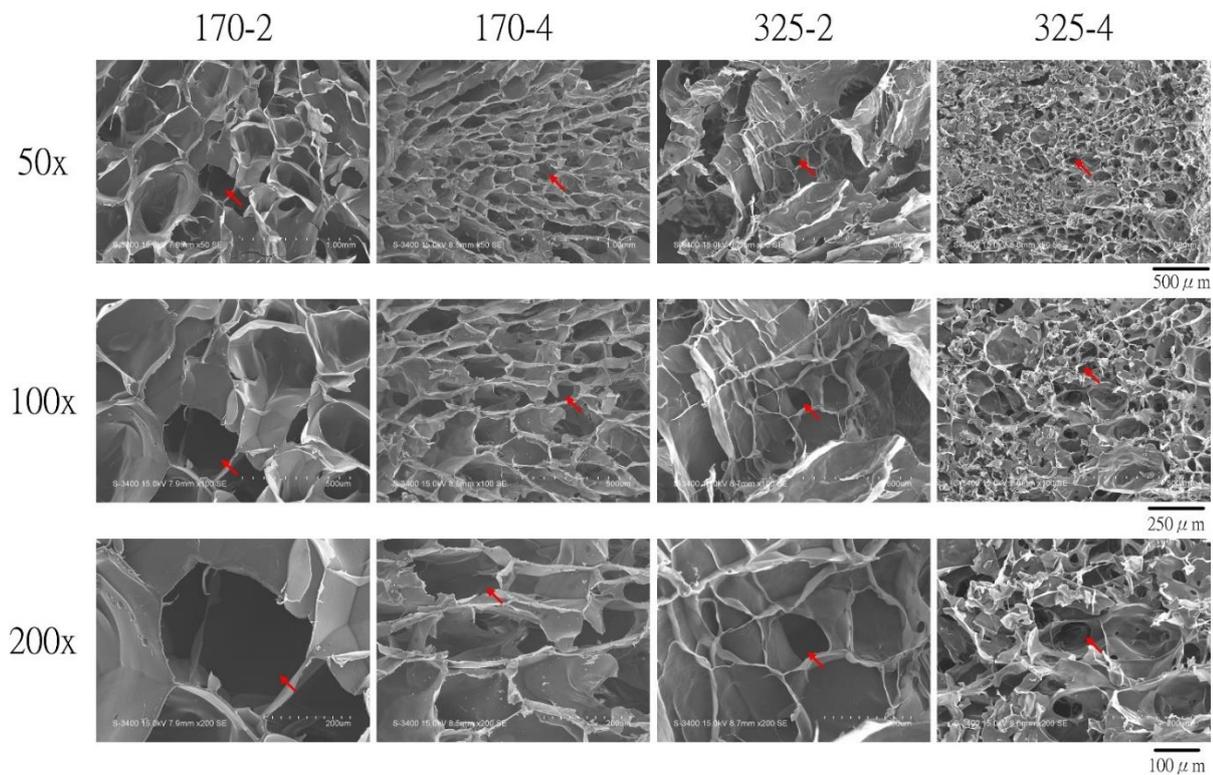
Fig 2、以光學顯微鏡觀察軟骨支架內部之孔洞分佈。A:未含水；B:含水。



透過掃描式電子顯微鏡可以直接觀察到支架內部結構與孔洞大小等情況，支架內部具有相當緻密之孔洞，且孔洞間為相互連通的結構，放大倍率觀察孔洞表面材料呈現平滑狀，沒有觀察到造孔劑的殘留 (Fig 3)。170-2 及 170-4 這兩組，孔洞分布較為平均，畫面中沒有任一部分是沒有孔洞，或是孔洞大小落差甚大的情形。325-4 這組，因為添加的造孔劑重量雖然與 170-4 這組一樣，但因為造孔劑粒徑較小，因此，顆粒數量要較多才能達到一樣的重量，因此，這組也可明顯觀察的孔洞數量。最不一樣的是 325-2 這組，雖然仍有孔洞，但孔洞分布不均勻，有部分區塊是完全沒有孔洞的結構 (Fig 3)。

從掃描式電子顯微鏡觀察結果可以發現，隨著添加的造孔劑粒徑大小及添加量的不同，支架內部孔洞數量及大小有極大的差異，所以代表在此製程中可以放心的利用造孔劑的顆粒大小以及含量多寡，來調整支架所需之孔洞大小、分佈與緻密程度 (Fig 3)。

Fig 3. 以掃描式電子顯微鏡觀察不同粒徑或造孔劑添加量的軟骨支架



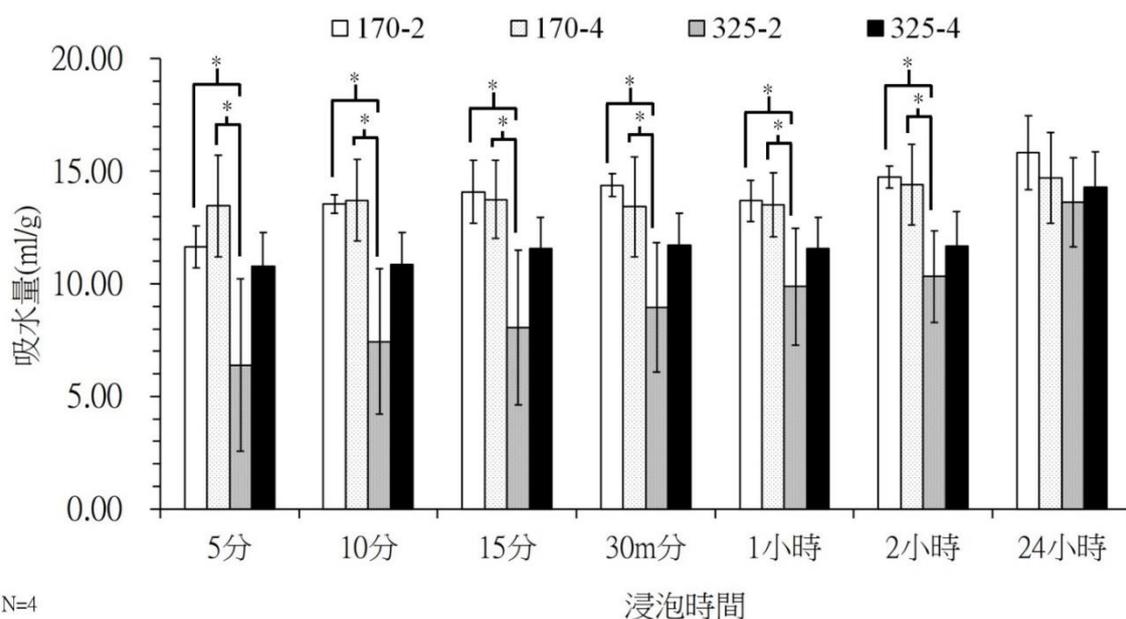
(二) 添加不同粒徑或造孔劑含量的軟骨支架之吸水量分析

吸水量分析，是為了讓我們了解每單位的軟骨支架能夠吸附多少溶液。軟骨支架吸附容易的量越高，代表未來能吸附更多的培養基或血液，就能夠吸附更多的營養物質或生長因子，能幫助細胞增生及分化，更具發展臨床效用的軟骨支架的潛力。

測試四組軟骨支架不同浸泡時間的吸水量，結果如下 Fig 4。組別代號 170-2、170-4 與 325-4 這三組有類似的趨勢，從支架浸泡 5 分鐘後開始，170-2 與 170-4 有類似的吸水量，每克支架約可吸附 13-15 mL 的溶液。325-4 的初期吸水量較少，約在 10-11 mL 左右，24 小時後升為 13-14 mL。趨勢較為不同的則屬 325-2 這組，吸水量是隨著浸泡時間增加而增加，一開始吸水量為 6 mL，後續會緩慢上升，至 24 小時吸水量已變成 13 mL。

比較各組在不同時間點的吸水量，可發現從浸泡後 5 分鐘開始，一直到 2 小時為止，組別代號 170-2 與 170-4 的吸水量都明顯多於 325-2 這組的吸水量；只有浸泡 24 小時的各組間的吸水量沒有顯著差異 (p -value = 0.4098, Fig 4)。

Fig 4. 測試不同粒徑或造孔劑添加量的軟骨支架每克材料的吸水量



N=4

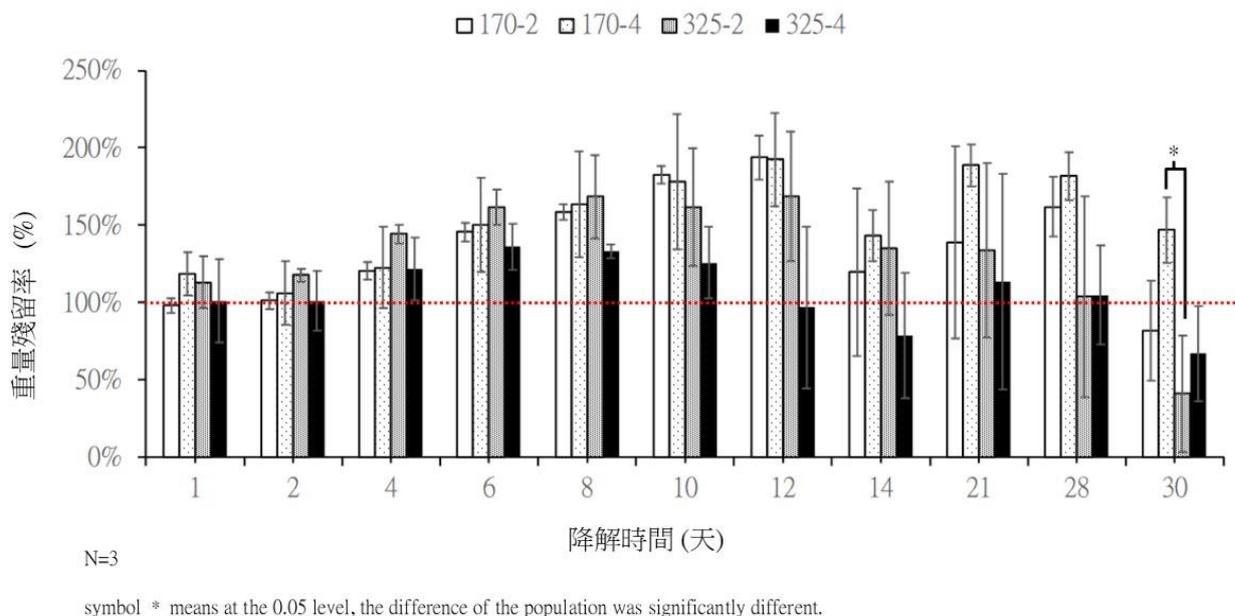
symbol * means at the 0.05 level, the difference of the population was significantly different.

(三) 添加不同粒徑或造孔劑含量的軟骨支架之降解性分析

為了測試軟骨支架植入體內後，會被人體降解的天數，我們必需進行軟骨支架的降解性分析。這個實驗利用當支架接觸到溶液後，計算需要共浸泡幾天支架會完全消失，藉此模擬支架在植入體內後，會被人體完全降解的天數。

結果發現，四組支架在浸泡一開始，其重量不減反增，代表一開始支架仍是持續吸水，產生膨潤，因此我們在呈現數據時，為了解釋得更為淺顯易懂，採用重量殘留率來呈現支架，也就是分析剩下多少支架，而不是分析有多少支架已消失不見，因為若是分析降解率，則初期結果皆為負值，不易解釋。各組別的支架都一直要到浸泡第 10 及 12 天後，才開始有支架降解的情形出現，下降趨勢最快的是 325-2 這組，到浸泡第 30 天時，重量殘留率僅剩下 41%，其餘組別重量殘留率都還超過 50% 以上。因此，若用統計分析各時間點不同組別之軟骨支架的重量殘留率，除第 12 天 ($p\text{-value} = 0.0395$) 及第 30 天 ($p\text{-value} = 0.0173$) 之外，其餘時間點，各組的重量殘留率沒有顯著差異 (Fig 5)。

Fig 5. 測試不同粒徑或造孔劑添加量的軟骨支架隨浸泡時間之重量殘留率



(四) 測定不同粒徑或造孔劑添加量的軟骨支架之抗壓強度

我們利用三種實驗方法分別來測定四種參數不同的軟骨支架抗壓強度，來探討不同造孔劑粒徑與添加量，對支架本體強度所造成之影響，理論上當形成支架時所添加的造孔劑量愈多時，會造成支架內部孔洞愈多，整體結構上的抗壓強度則較小。

4.1 乾壓式抗壓強度測定法

從結果來看，造孔劑粒徑最大、添加量最少的組別 170-2，卻有最好的抗壓強度，強度在 0.0456 MPa，標準差為 0.0169 MPa；強度次之的是組別 325-2，強度數值在 0.0240 MPa，標準差為 0.0084 MPa；排行第三的則為 170-4 這組，其強度在 0.0177 MPa，標準差為 0.074 MPa；最後則是造孔劑粒徑最小、含量最多的 325-4 這組，強度僅有 0.0090 MPa，標準差為 0.0014 MPa。當四組一起比較，經由統計分析後發現，170-2 這組的強度顯著大於其他三組，另外 325-2 的強度顯著高於 325-4 ($p\text{-value} < 0.0001$)，但 170-2 與 170-4 這兩組強度則沒有顯著差異(Fig 6A)。

4.2 交聯度抗壓強度測定法-胺基殘留率

交聯度與軟骨支架結構穩定度與抗壓強度有一定的關係，若交聯度不佳，則軟骨支架遇溶液體液時，會很快產生結構不穩的情況，因此，需了解不同造孔劑參數及添加量是否會影響軟骨支架的交聯度。由於交聯度是測試支架表面上未反應的自由胺基含量，從結果來看，發現 170-2 這組的胺基殘留率最高，平均有 13.59 % 的胺基 (標準差為 0.51%) 未被反應。其餘三組的數據則都坐落在12.2-12.7% 之間。經由統計後發現，170-2 這組的胺基殘留率顯著的高於其他三組 ($p\text{-value} < 0.0001$ ，Fig 6B)。

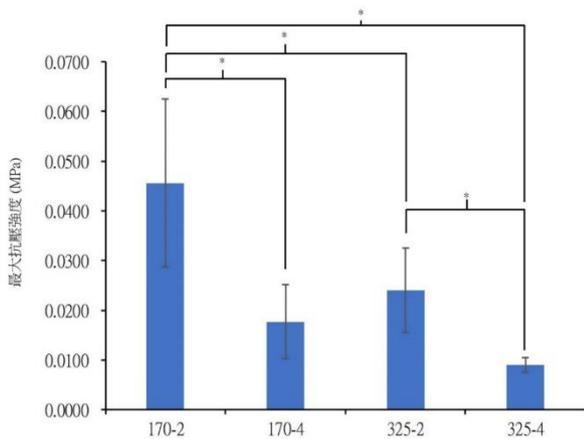
4.3 用衰減式全反射傅立葉紅外線光譜儀(ATR-FTIR)測定抗壓強度-新生成官能基

軟骨支架的原料成分明膠 (gelatine) 及玻尿酸 (HA) 都帶有醯胺類 (amides)，以及海藻酸鈉 (SA) 中，亦帶有酯鍵(COO⁻)，則經交聯反應後，可在軟骨支架特定位置上生成醯胺官能鍵 (1631 & 1546 cm⁻¹)。但若是透過組織工程形成之醯胺鍵，則與原料中的位置有所

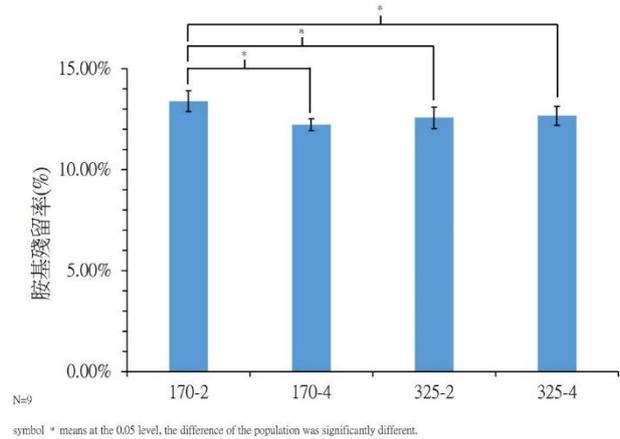
不同，因此透過此實驗，我們可以確定此四組軟骨支架在交聯時都有新生成的官能基，來幫助鍵結，進一步穩定軟骨支架結構，幫助支架抗壓強度(Fig 6C)。

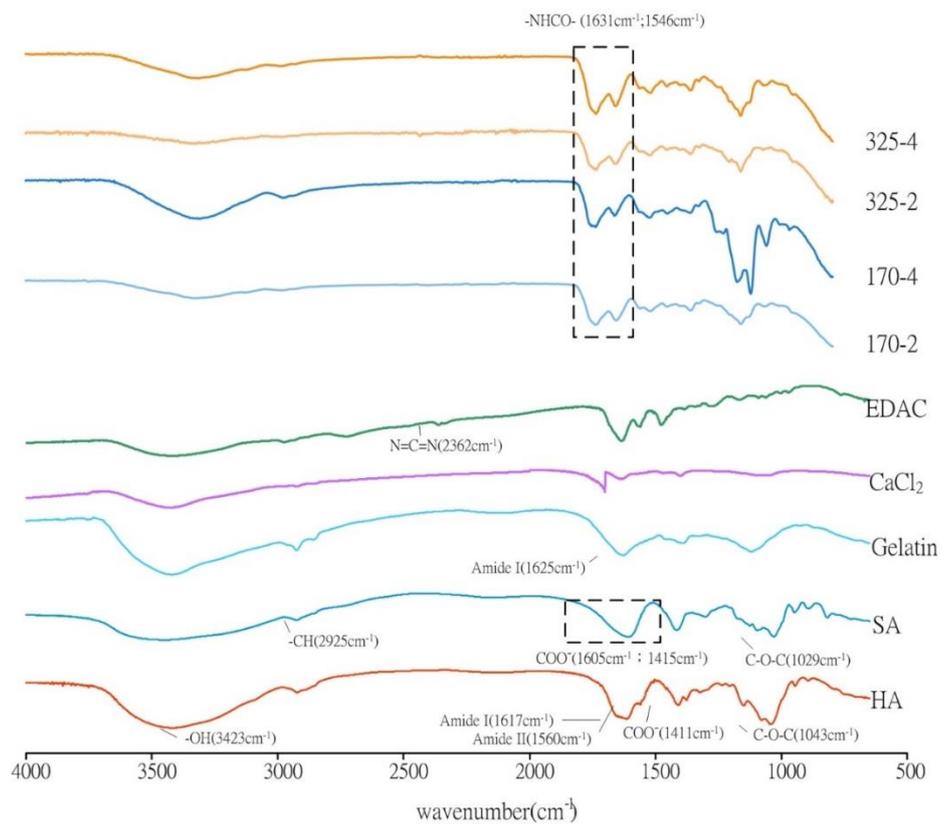
Fig 6. 不同粒徑或造孔劑添加量的軟骨支架之抗壓強度。A: 最大抗壓強度(MPa)；B: 胺基殘留率(%)；C: 新生成官能基位置分析圖(AT-FTIR)

A



B





C

二、軟骨支架體外細胞實驗分析 (*in-vitro* test)

(一) 添加不同粒徑或造孔劑含量的軟骨支架之生物相容性測試

1.1 軟骨支架之細胞毒性測試 (Cytotoxicity test)

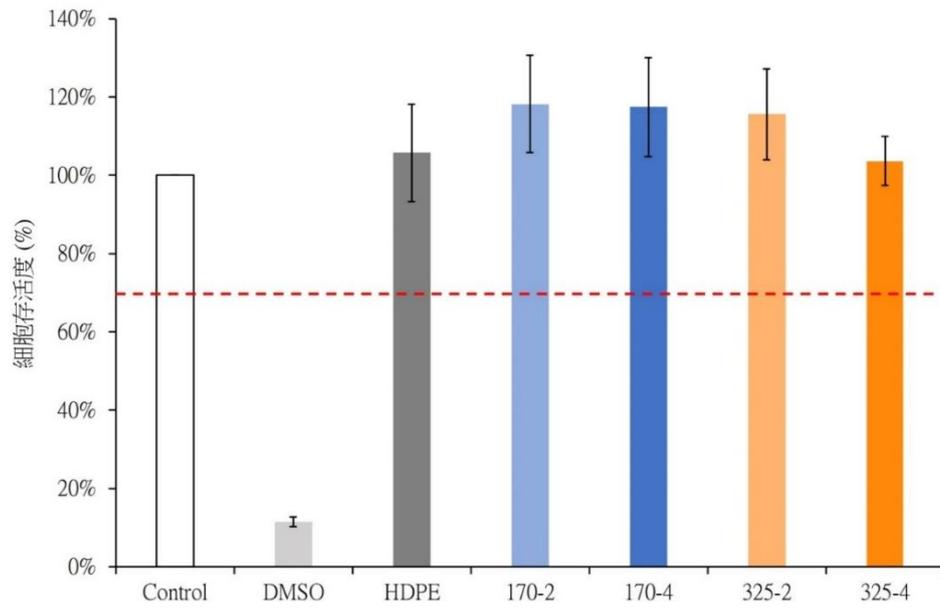
生物組織工程的材料其實跟藥品一樣，因為是要運用在人體內的，使用前除了要考慮它的有效性之外，安全性更是不能忽略。細胞毒性測試，正是為了確保軟骨支架材料在植入人體後，不會對人體細胞造成毒性所應進行的實驗。

本實驗室是根據 ISO 10993-5 規範進行，若是 L-929 細胞存活度低於 70%，則代表其培養液對細胞有毒性 (陽性)；細胞存活度高於 70% 者，代表其萃取液對細胞沒有毒性 (陰性)。實驗結果顯示，僅有陽性對照組 (含有 15% 的 DMSO) 之組別，其細胞存活率低於 70%，其餘組別包含控制組與陰性對照組 (純培養基及 HDPE) 與實驗組四組之軟骨支架樣本，萃取一天後的萃取液經過一天的培養後，L-929 細胞存活度可大於 70%，代表這四種軟骨支架樣本萃取液經一天的培養後，對 L-929 這株細胞來說沒有不良影響，不具有細胞毒性 (Fig 7A)。

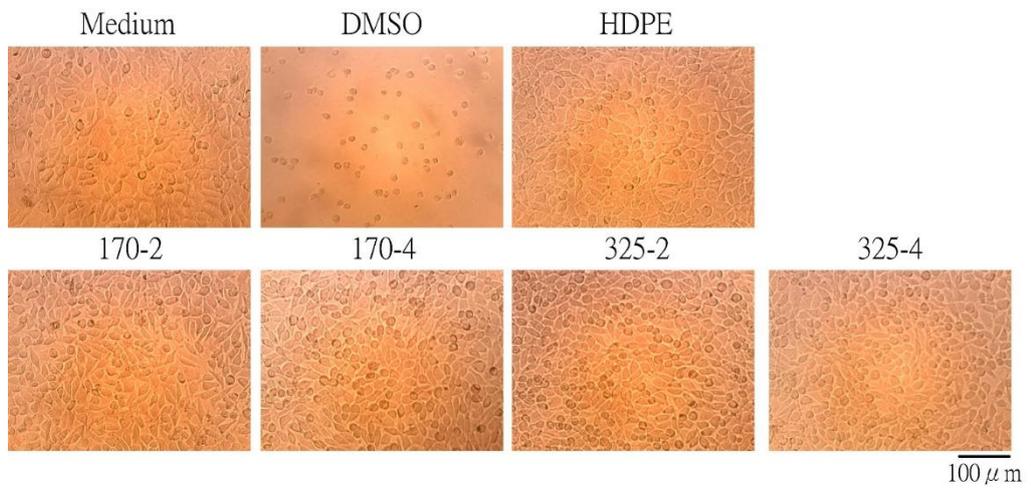
顯微鏡 100 倍的觀察之下發現，經過純培養基 (Medium) 培養的 L-929 細胞，一端為紡錘狀，另一端帶有球形之型態。陽性對照組 15% DMSO 這組，細胞型態為圓球形 (Fig 7B 上中)，代表細胞已死亡，細胞存活度遠低於 70%，代表 15% DMSO 的萃取液對細胞是有毒性的。陰性對照組- HDPE 與四種軟骨支架組別樣本萃取液，細胞型態皆與純培養基組相似，在顯微鏡下觀察到細胞型態為一端為紡錘狀一端帶有球形之型態，萃取液也保持清澈透明，代表對細胞來說，陰性對照組- HDPE 與實驗組的萃取液不具有細胞毒性，此定性觀察結果與細胞毒性半定量測試結果互相佐證可得到，本次實驗的實驗組四種軟骨支架樣本其萃取液經一天的培養後，對 L-929 這株細胞來說沒有不良的影響，不具有細胞毒性 (Fig 7B)。

Fig 7. 測試不同參數軟骨支架細胞毒性的半定量試驗(A)與顯微鏡下觀察的情形(B)。

A



B



(二) 添加不同粒徑或造孔劑含量的軟骨支架之細胞測試

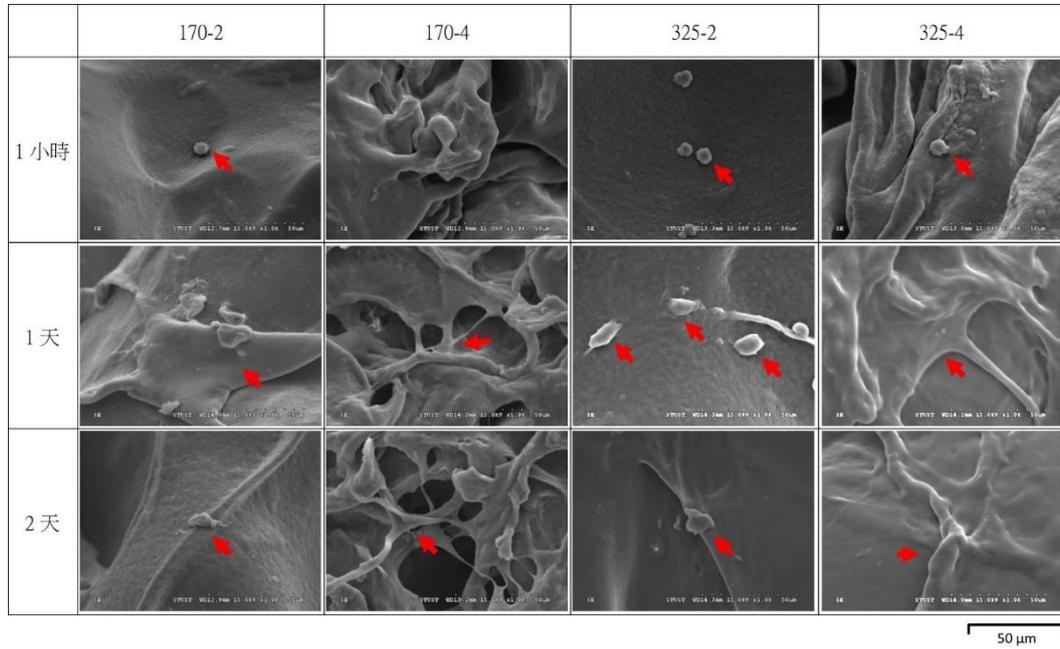
2.1 軟骨支架之細胞貼附測試

因骨細胞屬於貼附型細胞，當軟骨支架的細胞貼附狀況不佳時，則可預期在植入人體內後，骨修復效果一定也不佳，為了進一步觀察軟骨支架是否具有良好的細胞親和性，因此進行細胞貼附測試的實驗。

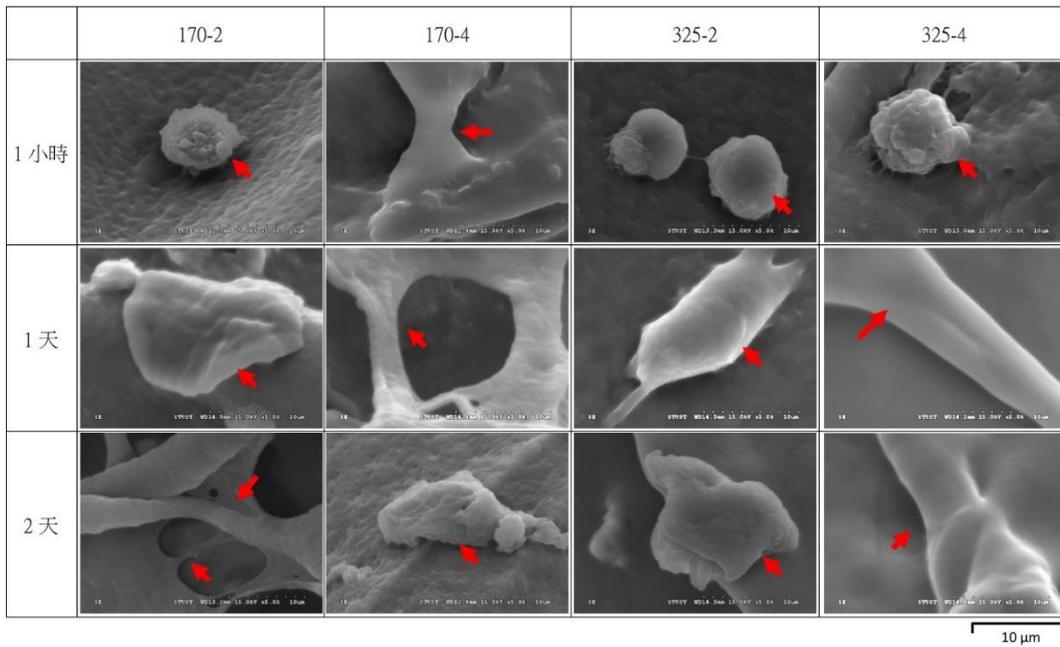
從細胞短期貼附的高低倍顯微鏡結果下可以發現，經 1 小時培養後，四種軟骨支架表面皆有細胞貼附，細胞呈現未完全貼付的圓球形，有部分細胞開始分裂 (325-2組別)，也有細胞以伸出偽足 (325-4組別)；至於經 1 天及 2 天培養之後，細胞已完整貼附，呈現紡錘狀，表面有重新沉澱析出的晶體，因此細胞變得較不明顯。但四種軟骨支架皆可使細胞很快地貼附在表面，可以證明，四種軟骨支架皆具備有良好的細胞親和性 (Fig 8)。

**Fig 8. 顯微鏡下軟骨支架與前驅骨母細胞在短期接觸共培養後之細胞貼附情形。A:低倍率；
B:高倍率。(紅色箭頭代表細胞)。**

A



B



2.2 軟骨支架之細胞存活度與分化能力測試

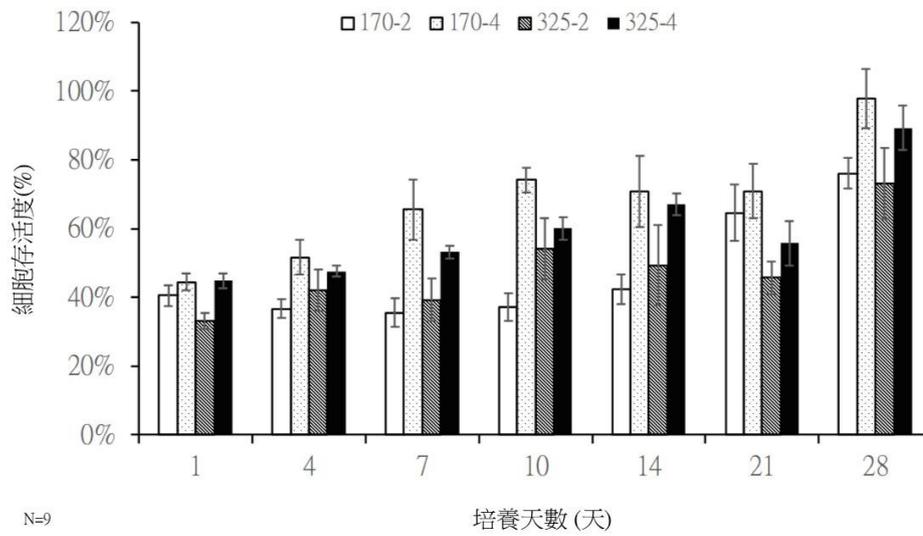
為了確認四種軟骨支架是否具有促進前驅骨母細胞增生及分化的能力，我們透過軟骨細胞會分泌蛋白聚醣的特性，利用阿爾辛藍染色 (Alcian Blue Stain) 進行測試接觸培養的前驅骨母細胞是有朝向軟骨細胞的方向分化，若染色越深，代表蛋白聚醣越多，則越接近軟骨細胞。

Fig 9A 顯示，170-4 這組的細胞存活度隨著培養時間增加而有緩慢增加的趨勢；170-2 這組，從培養第1天到第10天，細胞量都沒有明顯增加，要一直到第21天為止，細胞存活度才有明顯增加的趨勢；325-2 這組，也與 170-2 有類似的狀況，一直要到第 28 天，細胞存活度才會明顯增加。325-4 的組別，其細胞存活度是隨著培養天數增加而有上升的趨勢，但在第 21天，則略為下降，到第 28 天才又上升；進一步用各時間點分析，結果發現，不論是哪個培養時間點，各組間的細胞存活度皆有明顯差異 ($p\text{-value} < 0.0001$)，總結來說，四組軟骨支架促進前驅骨母細胞增生及分化的能力，表現最好的是 170-4 這組，最差的是 170-2 (**Table 1**)。

另外，從四種軟骨支架與前驅骨母細胞的阿爾辛藍染色發現，經長培養天數後，170-2 與 325-4 試片的體積明顯縮小，代表該軟骨支架殘留體積減少，容易降解，雖呈深藍色卻不具有臨床運用價值；進一步比較 170-4 與 325-2 這兩組別，兩者體積都未明顯縮小，顏色皆為第 28 天才為最深，其中170-4 這組，隨著培養時間增加，試片體積沒有明顯縮小，染出的藍色最為湛藍，代表其為4組支架中誘導前驅骨母細胞分泌了更多的蛋白聚醣來進行分化 (**Fig 9B**)。

Fig 9. 四種軟骨支架與前驅骨母細胞共培養之(A)細胞存活度及(B)阿爾辛藍染色。

A



B

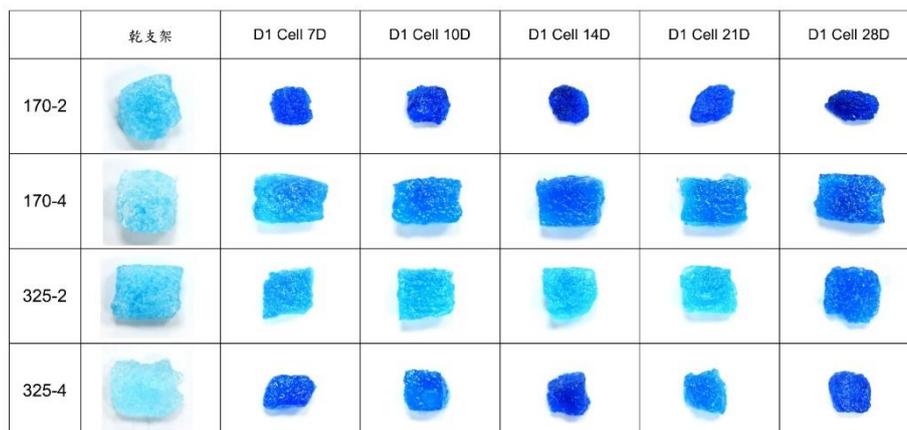


Table 1. 四種軟骨支架與前驅骨母細胞長時間培養之細胞存活度統計結果

培養天數	p-value	統計事後檢定
1	<.0001	170-4 = 325-4 > 170-2 > 325-2
4	<.0001	170-4 = 325-4 > 170-2 > 325-2
7	<.0001	170-4 > 325-4 > 325-2 = 170-2
10	<.0001	170-4 > 325-4 > 325-2 > 170-2
14	<.0001	170-4 = 325-4 > 325-2 = 170-2
21	<.0001	170-4 = 170-2 > 325-2 > 170-2
28	<.0001	170-4 = 325-4 > 325-2 = 170-2

討論

一個理想的軟骨支架，應該要有高孔隙度與連通孔。我們利用溶劑鑄造鹽洗法，在膠體中加入不同添加量與粒徑大小的造孔劑來製孔，最後再溶出造孔劑所製作之四種參數的軟骨支架，所製造出的支架都是具有多孔性、連通性孔洞、可吸附溶液，且有一定強度，緩慢的降解速度足以提供組織長成的支架；並進一步透過體外細胞共培養實驗，証實製成的支架也不會造成細胞毒性，也具有良好的細胞吸附能力。以下依造孔劑添加量與粒徑兩變項分開討論：

一、探討造孔劑的添加量是否會影響軟骨支架的物化性質與體外細胞共培養實驗

從軟骨支架的剖面圖，我們即可觀察到在造孔劑高添加量的組別，其質地偏向海綿狀，孔洞呈肉眼無法輕易辨識之緻密性 (Fig 1)，從光學電子顯微鏡下觀察，可見到孔洞數量明顯多於造孔劑低添加量的組別，也可以看到不同層的孔洞互相交錯的影像 (Fig 2)，進一步從掃描式電子顯微鏡下觀察，更可見隨著添加的造孔劑的添加量的不同，支架內部孔洞數量有極大的差異 (Fig 3)。

在軟骨支架吸水量實驗中發現，造孔劑的高添加量的組別並無利於吸水量的提升 (Fig 4)；在軟骨支架浸泡溶液後的降解率分析，則發現造孔劑添加量的多寡，對重量殘留率本身並無顯著的影響 (Fig 5)；隨著造孔劑的添加量增加，其乾壓最大抗壓強度呈顯著地下降 (Fig 6A)。

在前驅骨母細胞共培養實驗的發現，造孔劑添加量的多寡，在本實驗中並不對細胞造成毒性影響 (Fig 7)；四種軟骨支架皆具備有良好的細胞貼附能力 (Fig 8)；高造孔劑添加量有增加細胞存活度趨勢 (Fig 9A)。

綜合以上的實驗得知，高造孔劑的添加量並不影響軟骨支架的吸水量，降解率的速度，也不會造成細胞毒性，具有良好的細胞吸附能力；然而，相對於添加較低的造孔劑，較高量

的造孔劑，則會影響軟骨支架的孔洞數量，進而降低支架本身的抗壓強度。

二、探討造孔劑的粒徑是否會影響軟骨支架的物化性質與體外細胞共培養實驗

我們無法從軟骨支架的剖面圖，立即觀察出造孔劑粒徑大小(如170和325組別)，對軟骨支架的影響 (Fig 1)，但從光學及掃描式電子顯微鏡下觀察，仍可見到不同層的孔洞互相交錯的影像，大粒徑 170 組別孔洞分布全面且大小平均，325 組別則因粒徑較小而致孔洞分布不均 (Fig 2-3)。

在測試不同粒徑大小製成的軟骨支架吸水量實驗後，我們發現大粒徑組別，吸水性遠優於小粒徑組別 (Fig 4，170組別>325組別)；在軟骨支架浸泡後的降解率分析，則發現在小孔徑的325組別，對重量殘留率的影響要到長時間(30天)的浸泡後才會出現 (Fig 5)；在軟骨支架抗壓強度實驗，粒徑較大的組別，其乾壓最大抗壓強度也優於粒徑小的組別，如：170-2 > 325-2；170-4 > 325-4 (Fig 6A)；在交聯度試驗，在大粒徑的造孔劑組別，其軟骨支架的結構穩定度高於交聯度試驗則遠優於小粒徑組別 (Fig 6B，170組別>325組別)。

在前驅骨母細胞共培養實驗的發現，造孔劑粒徑大小，並不對細胞造成毒性影響 (Fig 7)；對細胞也具有良好的貼附能力 (Fig 8)；大粒徑與高添加量造孔劑組別(170-4組)其阿爾辛藍染色，隨培養時間增加，顏色逐漸加深，代表其為4組支架中誘導前驅骨母細胞分泌了更多的蛋白聚醣來進行分化 (Fig 9B)。

由以上實驗可知，造孔劑的粒徑，會影響孔洞是否平均分布，且大粒徑組別會有較優的吸水性；較佳的抗壓強度；若同時填加高量造孔劑，可誘導更佳的前驅骨母細胞分化能力。

肆、結論與應用

根據以上結果，可以確認，造孔劑粒徑大且添加量多的軟骨支架 (170-4組別)，雖抗壓強度僅 0.0177 MPa，每克材料吸水量仍達 14.72 mL，且浸泡於試劑 30 天後，軟骨支架不會明顯降解，且不具細胞毒性，促進前驅骨母細胞增生與分化的能力最佳，因此可作為適用於軟骨缺損修復之組織工程支架，提高軟骨修復之成效。

伍、參考資料

一、參考文獻

1. Chou, C.H., Cheng, W.T.K., Lin, C.C., Chang, C.H., Tsai, C.C., & Feng, H.L. (2006). TGF-beta1 immobilized tri-co-polymer for articular cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 77(2), 338-348.
2. Hunter, W. (1995). Of the structure and diseases of articulating cartilages. 1743. *Clin Ortho Relat Res*, 470, 514-521.
3. Langer, R. (2000). Tissue engineering. *Mol Ther*, 1(1), 12-15.
4. Lee, J.E., Kim, K.E., Kwon, I.C., Ahn, H.J., Lee, S.H., & Cho, H. (2004). Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials*, 25(18), 4163-4173.
5. Levangie, P.K., Norkin, C.C. (2001). Joint structure and function: a comprehensive analysis, 3rd Edition. *American Journal of Occupational Therapy*, 55, 49-83.
6. Ma, Z., Gao, C., Gong, Y., Shen, J. (2005). Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 26(11), 1253-1259.
7. Park, S.N., Park, J.C., Kim, H.O., Song, M.J., & Suh, H. (2002). Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 23(4), 1205-1212.
8. Pieper J.S., van der Kraan P.M., Hafmans T., Kamp J., Buma P., & van Susante J.L.C. (2002). Cross-linked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering. *Biomaterials*, 23(15), 3183-3192.
9. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenx, H.P., & Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2), 211-228.

【評語】 100034

本作品以組織工程中軟骨修復為其研究課題，使用天然高分子水膠透過溶劑鑄造鹽洗法製備軟骨支架，並探討造孔劑粒徑尺寸與添加量對於軟骨內孔洞型態之觀察，並量測軟骨支架之機械抗壓強度與生醫測試等。研究成果實驗設計豐富已具備作為軟骨缺損修復之支架用。鑑於研究題目為探討材料造孔工程於天然水膠軟骨之孔洞生成行為，建議可多加以探討孔洞形貌、尺寸、密度等以期真正了解生成孔洞對於後續生醫測試之學理關係，更建議後續可考慮進行移植於生物體內之相關延續性研究。