

2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 100012
參展科別 工程學
作品名稱 光控生產不同硬度之蛋白質電紡絲生醫材料

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學
指導教師 郭柏齡、吳雅嵐
作者姓名 唐子晴

關鍵詞 蛋白質奈米纖維、光交聯、細胞型態

作者照片



摘要

隨著大數據與人工智慧的發展，新藥的研發周期大幅縮短，模擬體內微環境的體外細胞培養平台能降低動物試驗成本，滿足快速提供新藥檢測資訊的需求。本實驗開發一種以膠原蛋白衍生物建構的支架型三維細胞培養平台，以貼近體內環境為目標。我們以甲基丙烯酸酐化明膠(Gelatin Methacryloyl, GelMA)的電紡絲奈米級纖維製作支架，藉由不同紫外光照時間，調整支架軟硬度，觀察 NIH 3T3 培養於支架上的細胞形態變化。材料拉伸試驗顯示在照光 3 分鐘(光能量 2.88 焦耳)和照光 25 分鐘(光能量 23.96 焦耳)條件下，分別可得到楊氏模量 293 kPa 及 1035 kPa，能在硬度上近似人體血管和皮膚。

Abstract

The blooming of big data and artificial intelligence greatly shortens the development period of new drugs. *In vitro* cell culture platforms simulating *in vivo* microenvironment could reduce the cost for animal study and fulfill the need to promptly screen the developed drugs. In this experiment, a -three-dimensional cell culture platform comprising scaffold synthesized by collagen derivatives aiming for recapitulating *in vivo* environment was developed. . We fabricated scaffolds using gelatin methacryloyl (GelMA) electrospun nanofibers with stiffness tuned by changes in UV exposure time. The changes in cell morphology of NIH 3T3 cells cultured on the scaffold were observed. Material tensile test revealed that the Young's modulus of the scaffold fabricated by UV exposure for 3 minutes (light energy 2.88J) and 25 minutes (light energy 23.96 J) was 293 kPa and 1035 kPa respectively, approximating that of human blood vessels and skin.

壹、前言

一、研究動機

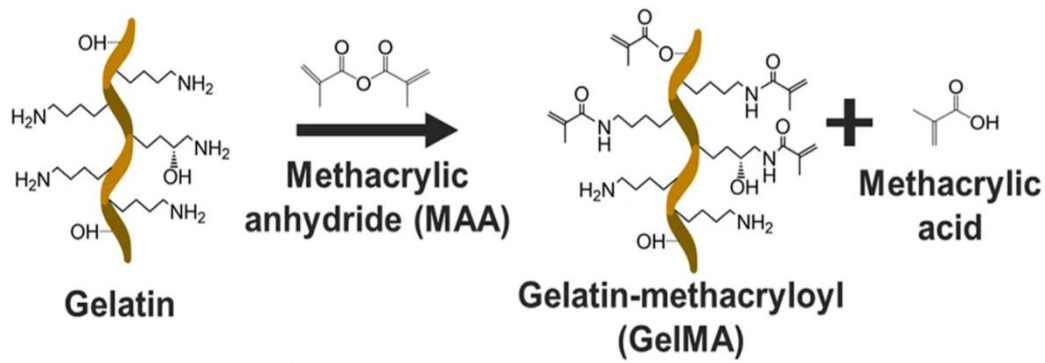
過去新藥研發為了獲得多方面的實證耗費大量的時間與金錢，又因應動物福祉議題，科學家不斷挑戰設計越「仿生」的體外培養系統，達到減少動物實驗。因此我想做出立體、能因應各種生理環境的細胞培養平台，用一個培養系統獲得多筆培養條件對細胞生長影響的資料。

本實驗中我們利用電紡絲技術製作多層次空間結構的支架型細胞培養平台，利用甲基丙烯酸酐(Methacrylic anhydride, MA)官能基修飾後的 GelMA，因為 MA 官能基在紫外光作用下能促進聚合物形成網狀結構，因此提供 GelMA 電紡絲不同的光能量，利用光交聯程度差異製作出不同硬度，讓支架型細胞培養平台像人體組織器官一樣有軟質、硬質，更加符合生物體體內環境，增加細胞培養平台的實用性。

二、研究背景介紹

(一) GelMA

GelMA 水凝膠是一種高親水性的網狀結構，由 Gelatin(明膠)以強酸或強鹼將動物結締組織的膠原蛋白提煉而成，兼顧膠原蛋白的優勢，有著極高的生物相容性；明膠本身可以形成凝膠結構，但是熔點較低(31.7-34.2°C)，而人的體溫平常約維持在 37°C 左右，使用時可能受到限制，後來科學家發現在明膠中添加甲基丙烯酸酐 (MA) 可將明膠中的游離胺基替換為甲基丙烯酸基團，讓 Gelatin 變成 GelMA，並擁有更強的機械性質和熱性質，能適用於更多不同的人體環境。(Sasinan Bupphathong, et al, 2022)

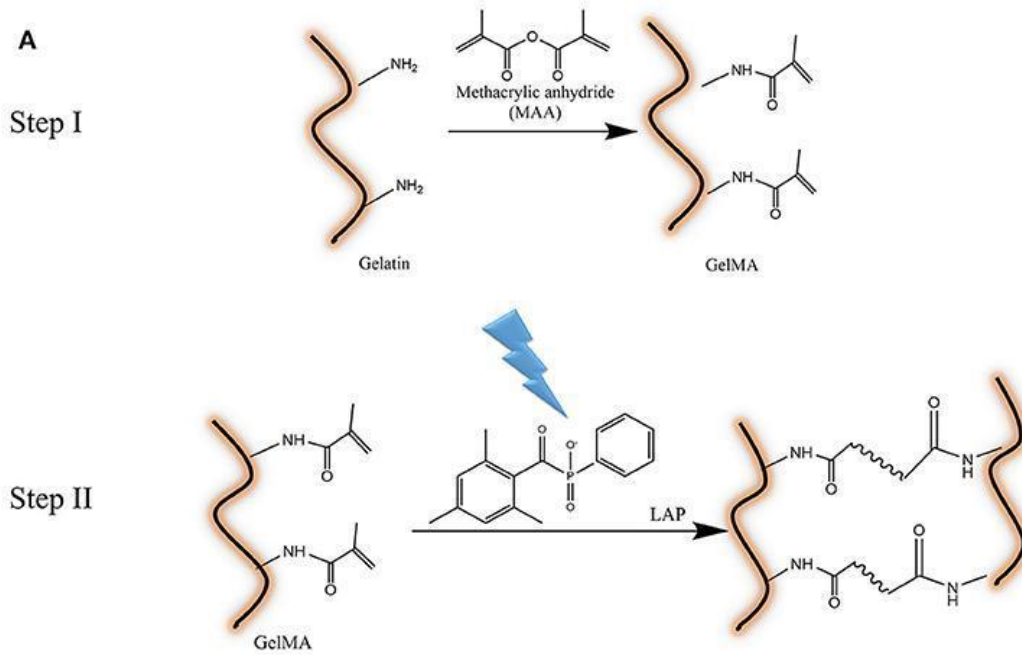


圖一、GelMA 結構圖 (CHEN, Zaozao, et al,2020)。

GelMA 擁有良好的生物相容性、可降解性、溶解性……如今成為一種價格低廉又方便應用的生物材料，熔點高於明膠。GelMA 可以通過多種方法製造，例如軟印刷、電噴、3D 列印、微流控芯片和乳化，每種方法可以為不同的目的生成不同結構的 GelMA，因此可以配合不同應用的需求。(Sasnan Bupphathong, et al, 2022)

(二) 光交聯

光交聯是利用光敏劑引發化學反應，聚合物中形成交聯結構的過程。通常需要使用光進行激發，激發光會被光敏劑吸收並引發化學反應，形成交聯結構，可以提高凝膠的結構強度。傳統常用的熱或化學交聯法，所需製作時間較長且製作出來的膠因形狀、厚度固定，較難符合特殊形狀或深度較深之需求，使得實際應用上受到了較大的限制。而光交聯由於照光前是液態的，可以塗抹成自己想要的形狀，因此現在被廣泛使用。(Hseuh Chien Hsiao, 2017)



圖二、GelMA 光交聯示意圖 (CHEN, Zaozao, et al.,2020)。

光交聯可以提高材料的機械性質和穩定性，也可以促進細胞分化和組織修復，過去主要使用的光敏劑 Igacure 水溶性差，吸收範圍僅達到 UV-A 365nm，需要大量曝露於紫外光的時間，容易導致細胞突變或死亡。目前研究 GelMA 光交聯最常使用水溶性高、交聯反應速度快的 LAP(Lithium phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinate)，因為 LAP 具有好的水溶解度、交聯結構穩定均勻，反應後產生的副產物相對少，能維持 GelMA 生物相容性。(Chen, Y.-Y, et al.,2020)

(三) 靜電紡絲 (Electrospin)

靜電紡絲技術是利用電場強度(電場=電壓÷距離)，利用高電壓產生的高電場，讓注射器的有機溶液帶有靜電，靜電力使液滴克服本身的表面張力，形成聚合物細絲。靜電紡絲的纖維品質受到許多因素的影響，例如:可揮發溶劑的物理化學性質、聚合物特性、推動速度、外加電壓、針規(針徑…等)、注射器與收集器距離，以及環境溫濕度等實驗參數，因此科學家可藉由調控

這些參數客製化需要的纖維。靜電紡絲製造出的纖維具有高表面積、多孔結構，適合使用在各種類型的細胞，模擬生命系統中細胞外基質(ECM Protein)結構。目前靜電紡絲技術在組織工程、再生醫學和藥物傳輸上有相當大的發展空間與機會。(Ameer, J. M., et al., 2019)。

(三)基質特性的研究面向

基質 GelMA 纖維會受到光交聯而改變的因素主要有下面幾種:

- (1) 曲率 crimping degree：拍 SEM 觀察彎曲的程度 ImageJ 分析，以端點間直線距離／端點間實際長度表示
- (2) 直徑：拍 SEM 觀察，用 ImageJ 分析
- (3) 硬度：用拉伸機夾住兩側，測量施力和形變的關係，以楊氏模量(Young' s modulus)表示

楊氏模量是一個用來描述固體在一個方向上承受拉伸或壓縮的彈性，有時也稱為彈性模量。楊氏模量等於縱向應力/應變量。

以一個橫截面積 A 的棒狀物體舉例，當兩端受到 F 的力拉動，從原始長度 L 變成新的長度 L_n ，應力= F/A ，長度變化是 (L_n-L) ，應變量= $(L_n-L)/L$ 。因此楊氏模量=應力/應變= $(F/A)/[(L_n-L)/L]$ 。

要特別注意的是，楊氏模量只有在應力和應變成線性正比，且除去外力物體可自行恢復成原尺寸時才具有意義。當材料永久形變或是破裂時，楊氏模量失去意義。

(四)基質軟硬度對細胞生長的影響

目前的研究顯示，基質的軟硬度確實會影響細胞的生長狀況。在 Substrate stiffness combined with hepatocyte growth factor modulates endothelial cell behavior(Hao,Chang, et al, 2016)實驗以 poly(L-lysine)/hyaluronan(PLL/HA)材料為基質做出不同軟硬度的薄膜來養人類臍帶內皮細胞，結果呈現在軟性基質中

細胞的完整性較高、功能性較好(基因表現量高)；在硬性基質中細胞擴散速度快、分布密度較高。

科學家認為細胞會透過細胞骨架成分和細胞核來感知環境，並對周遭環境的機械性質做出回應。基質硬度可以調節細胞行為，細胞可以重塑基質，彼此保持密不可分的關係，因此科學家也在交聯、成分、支架結構以及分子相互作用等領域努力研究，致力於製備硬度可調整的基質，以作為細胞培養平台，進行組織工程研究。(Yi, Bingcheng, et al, 2022)



三、研究目的及研究問題

透過光交聯機制，探討 GelMA 電紡絲與細胞生長的關係。

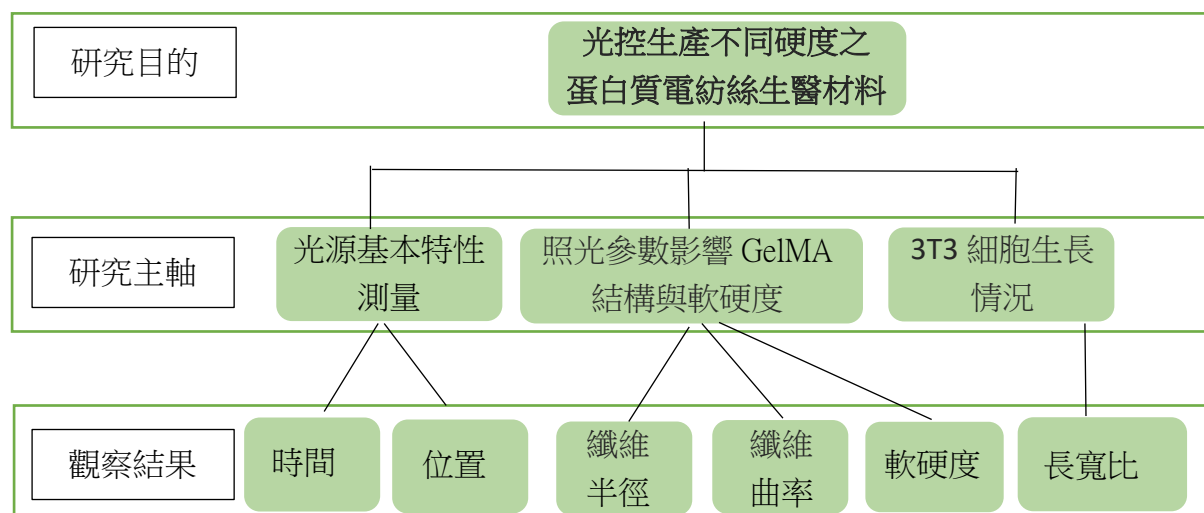
- (一)紫外光光源機的光照亮度與能量關係
- (二)不同光能量對 GelMA 交聯程度的影響
- (三)基質軟硬度和細胞生長的關係

貳、研究方法過程

一、研究設備

<p>紫外光投影機(365 nm)</p> 	<p>光度計</p> 	<p>拉伸機</p> 
<p>靜電紡絲模組</p> 	<p>細胞計數器</p> 	<p>離心機</p> 
<p>掃描式電子顯微鏡</p> 	<p>螢光顯微鏡</p> 	<p>二氧化碳培養箱</p> 

二、研究架構



圖三、研究架構圖。

三、實驗流程

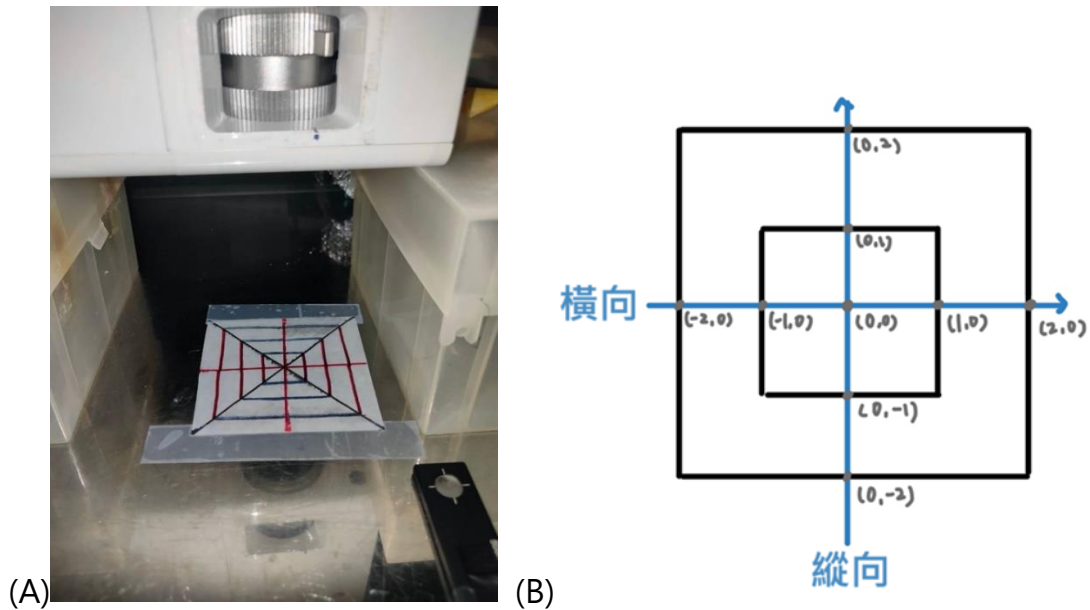
(一) **照光參數試驗:** 本實驗使用紫外光光源機能引發 GelMA 光交聯反應，故先對投影機光源特性進行測量。

1、光度隨時間變化測試實驗

- (1) 先將光度計放在全黑處，用手按住歸零。因為紫外光光源機提供 365nm 的光源，調整光度計量測波長成 365nm
- (2) 將光度計 Sensor 放置光源底下，紀錄該位置的光源強度。

2、光度隨位置變化測試實驗

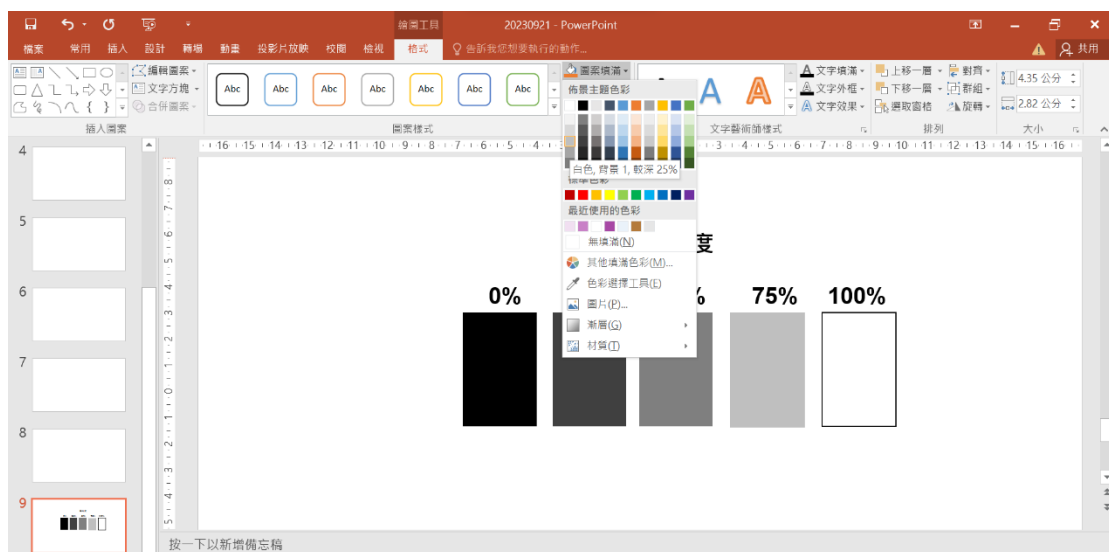
- (1) 先將光度計放在全黑處，用手按住歸零。因為紫外光光源機提供 365nm 的光源，調整光度計量測波長成 365nm
- (2) 分別測量光源區域上下左右中（如圖四，以座標表示）九個位置的光源強度



圖四、光度測試裝置
 (A)投影機與座標圖放置位置 (B)測量光度之座標圖（間距單位：公分）

3、製作不同曝光光度光源

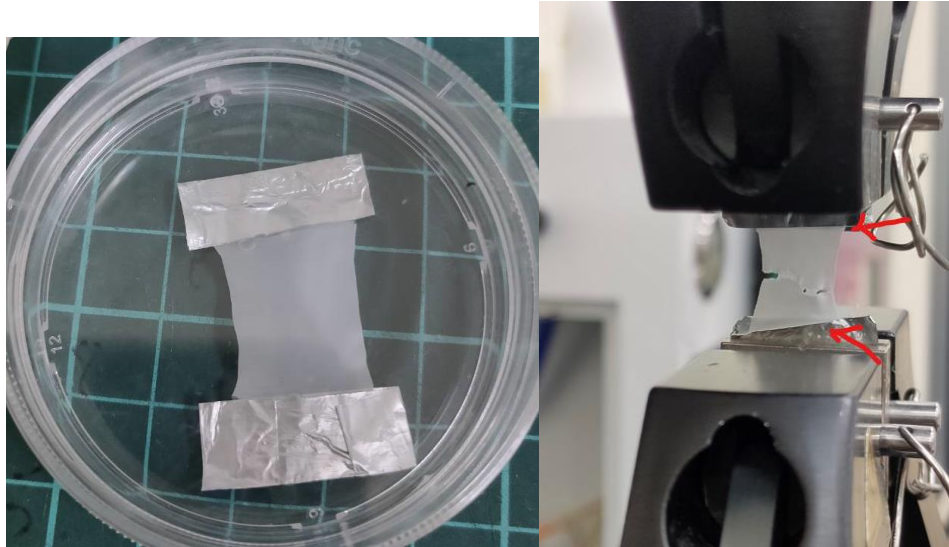
- (1)利用 Microsoft PowerPoint 簡報設計出 0%、5%、15%、25%、35%、50%、75%、85%、95%、100% 投影頁，利用顏色灰階設計曝光度
- (2)將電腦與紫外光投影機連線，即可得到不同曝光度光源
- (3)根據 1.照光時間、2.照光位置試驗，調整樣品位置，利用暖機 3 分鐘後的光源進行光交聯，下個樣本會先冷機後再使用



圖五、使用投影片顏色示意圖。

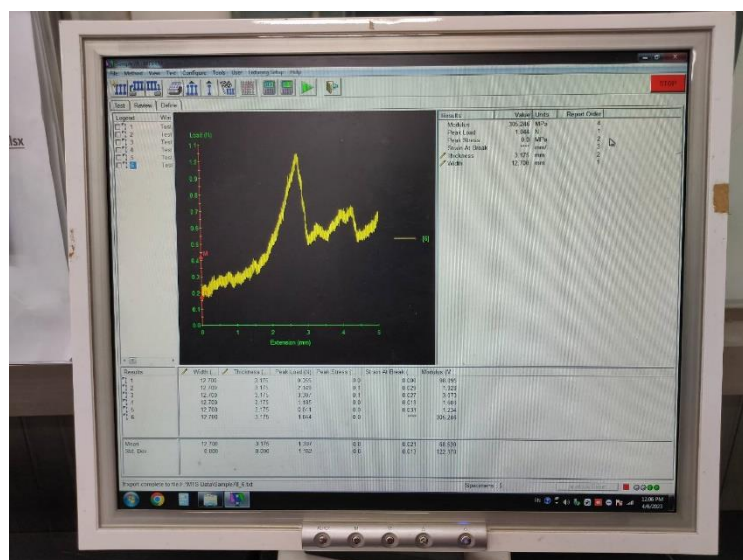
(二)靜電紡絲的機械性質測量

1.楊氏模量測量



圖六、拉伸示意圖。(A)固定測量材料 (B)楊氏模量測量

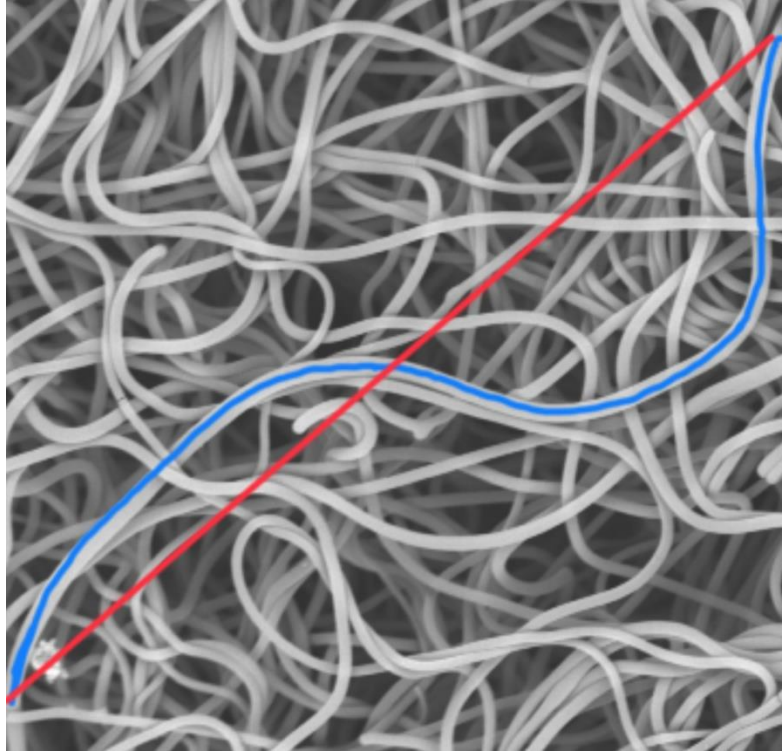
將欲檢測性質之水凝膠做成狗骨頭的形狀，上下用三秒膠黏上鋁箔提供氣壓夾具（10 bar）更好的固定，拉伸速度以 0.05 mm/sec 拉伸，利用配件軟體 MTS EM Tension 收集伸長量與荷重。數據處理得到應力應變曲線(stress strain curve，如圖七)，計算線性區域的斜率，斜率表示該材料的楊氏模量。



圖七、拉伸結果數據顯示圖。

2.計算曲率 crimping degree

將曲率定義為直線距離/曲線長度。所以曲率愈接近 1 表示纖維越直，少彎曲。



圖八、Crimping degree 示意圖。

如圖， $\text{crimping degree} = \text{紅線長度} / \text{藍線長度}$

生長基質的彎曲率會影響不同類型細胞的生長情況，具有明顯應力纖維的細胞，如本實驗使用的 NIH 3T3 是一種纖維母細胞，會避開基質彎曲率太高的地方，如果生長在如球形底部這樣彎曲率很高的地方，就會選擇跨越凹入或凸出的地方生長避免細胞本身的彎曲。(Sebastien J.P.Callens, et al., 2020)

(三) 多層次空間結構的電紡絲培養細胞

- 1.將電紡絲置於紫外光下 30 分鐘，封存備用
- 2.將 8 分滿細胞(本實驗使用 NIH 3T3)用 PBS 沖洗，以 0.25% Trypsin-EDTA 打落培養皿的細胞
- 3.放入 37°C 二氧化碳培養箱，加速酵素作用時間

- 4.2 分鐘後，手輕拍培養皿邊緣，確認細胞皆已脫離培養皿
- 5.集合細胞液到離心管加入 FBS 中止 Trypsin 作用，混合均勻
- 7.取出少量進行細胞計數，其餘細胞液離心處理
- 8.細胞液離心後，抽出澄清液，加入新鮮的培養基與沉澱的細胞混合均勻
- 9.取出步驟 1 封存電紡絲，每片固定種植 10^4 個/cm² 細胞數量

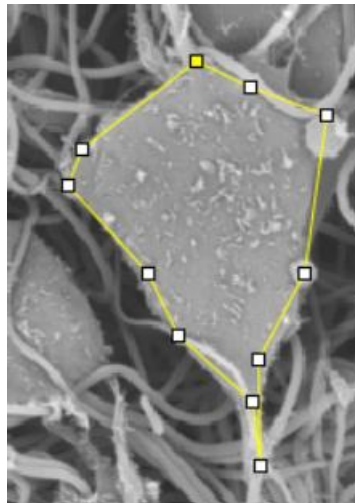
(四) 細胞觀察

1.掃描式電子顯微鏡

將培養 2 天的電紡絲以 PBS 洗淨培養基，待 2.5%戊二醛固定 1 小時，ddH₂O 洗淨、進行乾燥流程，因 GelMA 是非導體，所以須鍍金後，再以掃描式顯微鏡觀察。

2. aspect ratio

aspect ratio 是細胞長軸除以短軸的數值，可以表達出細胞的生長形狀。



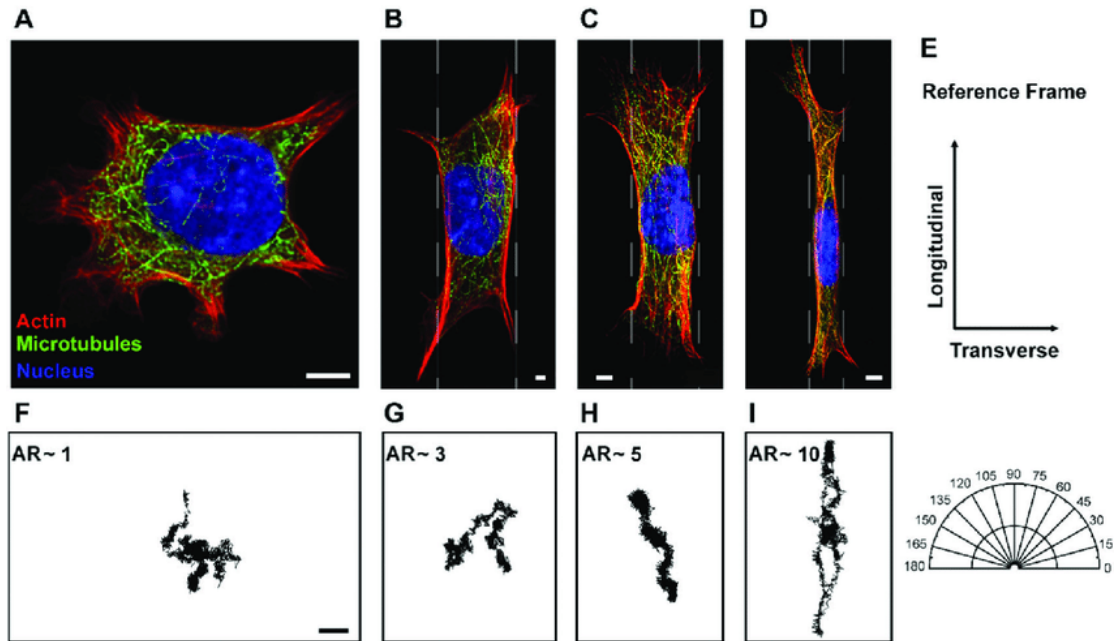
	Label	Area	X	Y	Perim.	Major	Minor	Angle
2	20231018_50 25sl_3.tif	0.265	1.973	3.135	2.376	0.678	0.497	102.308

圖九、aspect ratio 示意圖。

計算方式以圖九為例，將細胞框起來後會量出如圖九的數值，

Major/Minor=aspect ratio 。

Aspect ratio 可以表現出細胞的形狀，數值越大表示細胞越細長，數值越小表示細胞越接近圓形。

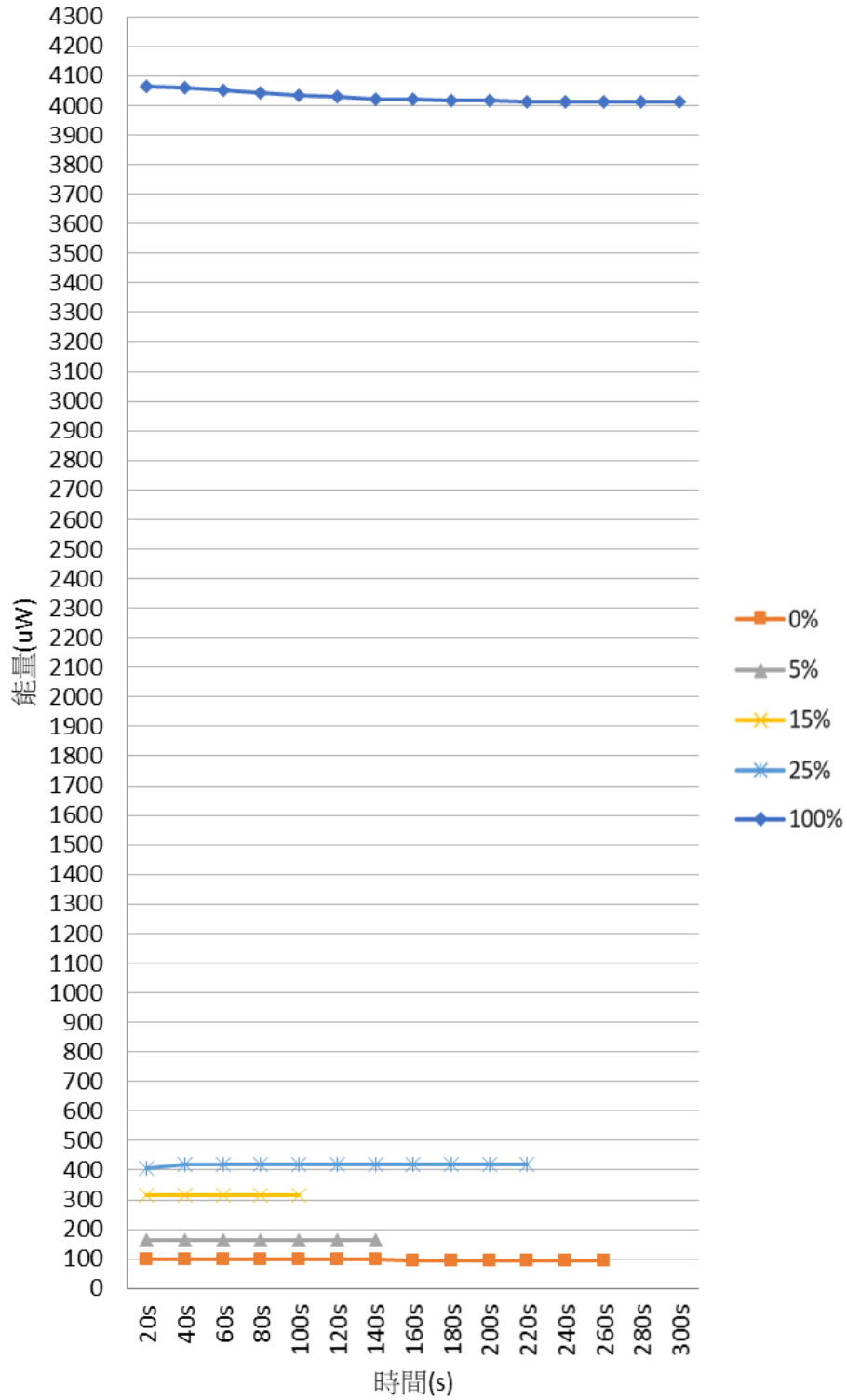


圖十、aspect ratio(圖中簡稱 AR)和細胞形狀的關係
(Satish Kumar Gupta, et all., 2018)

參、研究結果

一、照光參數試驗

(一) 光度隨時間變化測試實驗

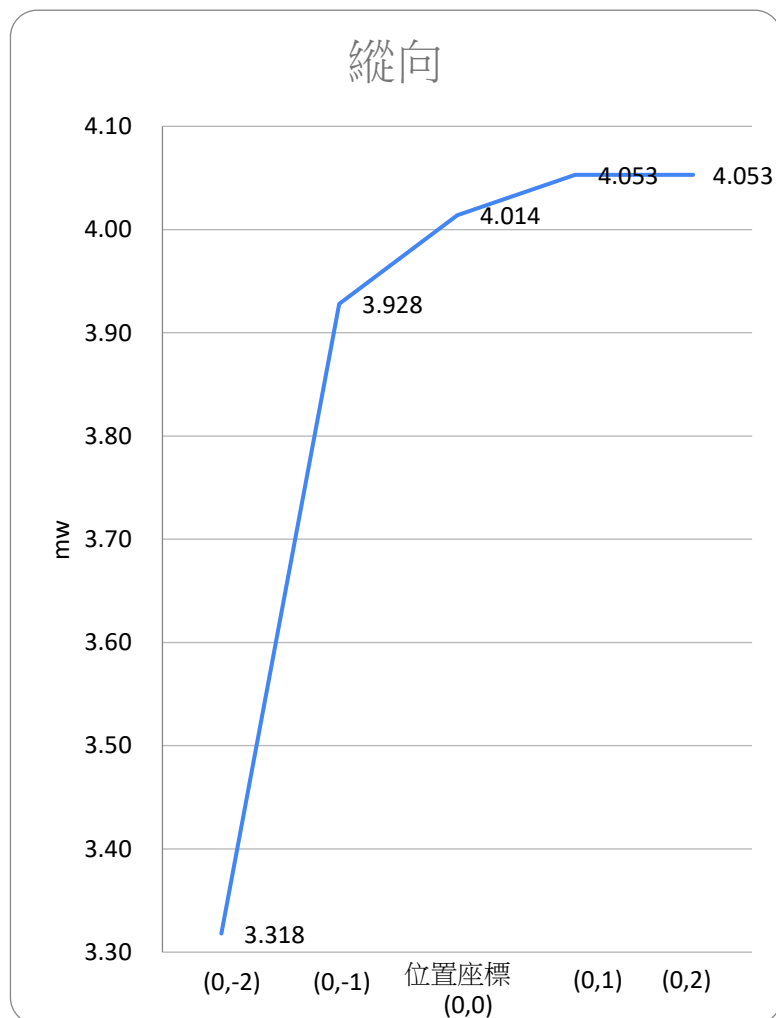


圖十一、光度隨時間變化測試。

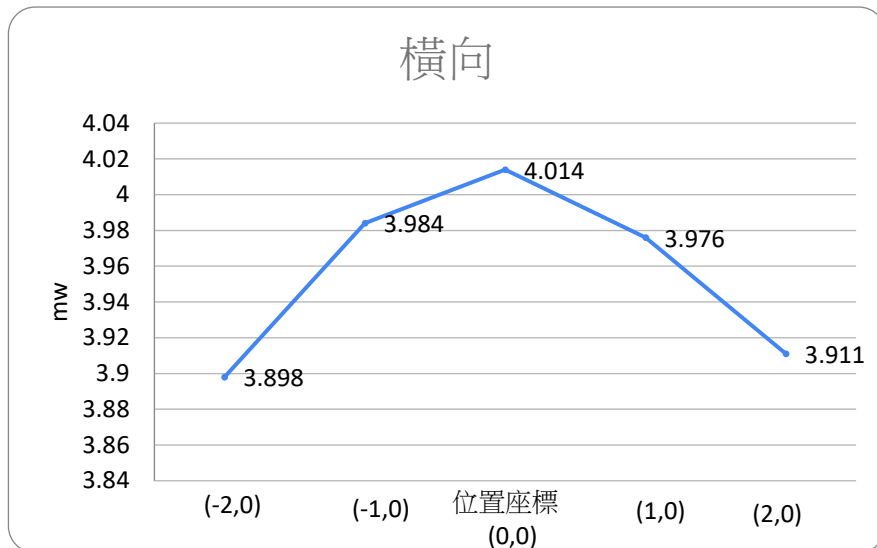
本次實驗的目的是測定光度隨時間是否穩定，我們定義穩定是連續三次(20*3=60 秒)光度都出現相同數值。由圖十可知 100% 花了 300 秒達到穩定、25% 花了 220 秒達到穩定、15% 花了 100 秒達到穩定、5% 花了 140 秒達到穩定、0% 花了 260 秒達到穩定，基本上光的強度愈強愈不穩定。

因為量測出達到穩定需要的最長時間是 300 秒，因此之後的光交聯實驗我們都把投影機開機暖機 300 秒之後才開始照光。

(二) 光度隨位置變化測試實驗



圖十二、光度隨位置變化測試(縱向)

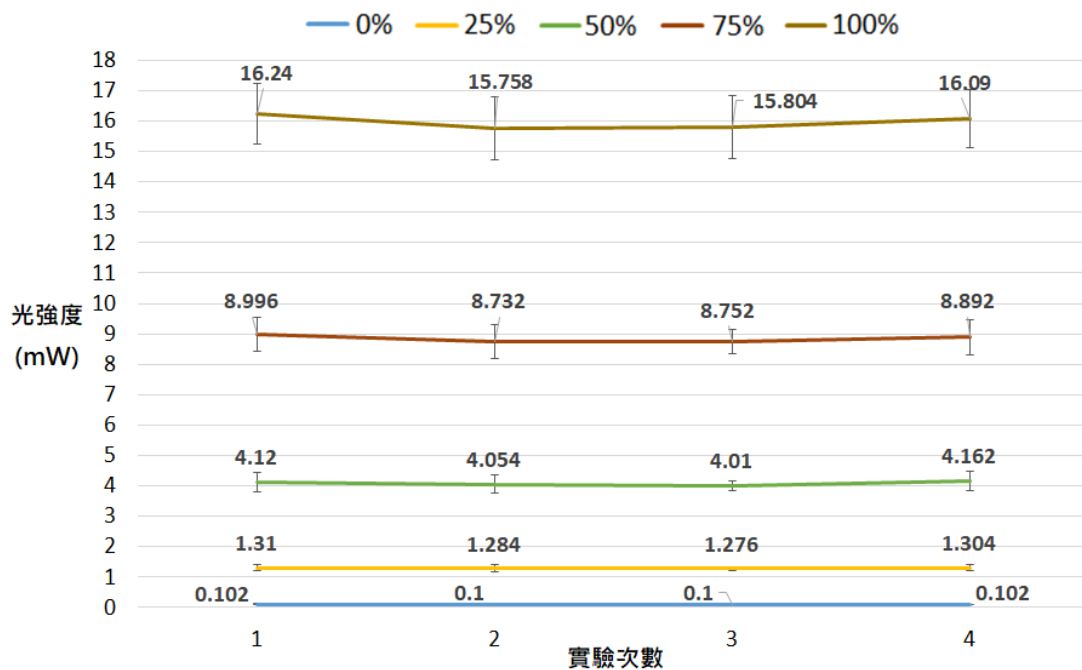


圖十三、光度隨位置變化測試(橫向)

由圖表可以知道，橫向的中間和縱向的上方接收到的能量較強。

其中以(0,1)、(0,2)接收到的能量最強。

(三)不同曝光度的光強度



圖十四、曝光度和光強度關係圖。

由上圖可知光強度越強，曝光度越高。

二、照光參數

表一、曝光度和能量的關係

	4 次平均	照光 3 分鐘	照光 25 分鐘
曝光度	光強度 (W)	光能量 (J)	光能量 (J)
0 % 	0.000101	0.02	0.15
50 % 	0.004087	0.74	6.113
100 % 	0.015973	2.88	23.96

計算方式_ 以 0% 25 分鐘為例：

$$0.000101 \times (60 \frac{\text{sec}}{\text{min}} \times 25\text{min}) = 0.15 \text{ J}$$

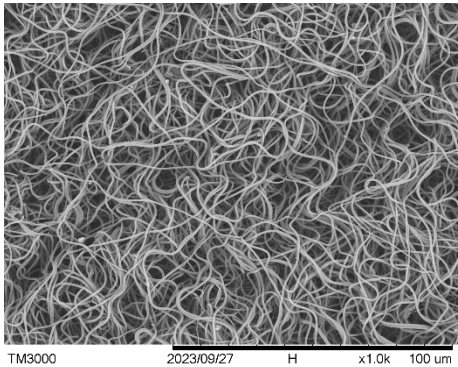
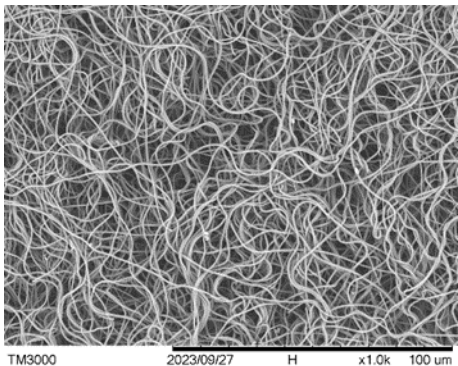
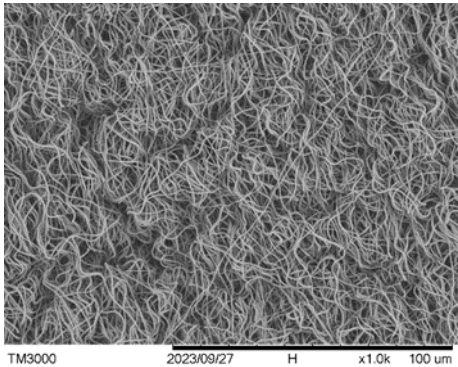
由表一結果可知，色彩灰階 50%單位面積上光強度是 0%的大約 40 倍，色彩灰階 100%單位面積上光強度是 50%的大約 4 倍，光強度並非和 PPT 上的色彩飽和度成正比。

右邊兩欄所顯示的能量數值則是左方光強度乘以經過的時間，得到的總能量。

後來做實驗時選用 0%、50%、100%來照光，但是 0%照完光碰到水或細胞培養液都會直接溶解，所以後續將以 50%跟 100%為製作條件。

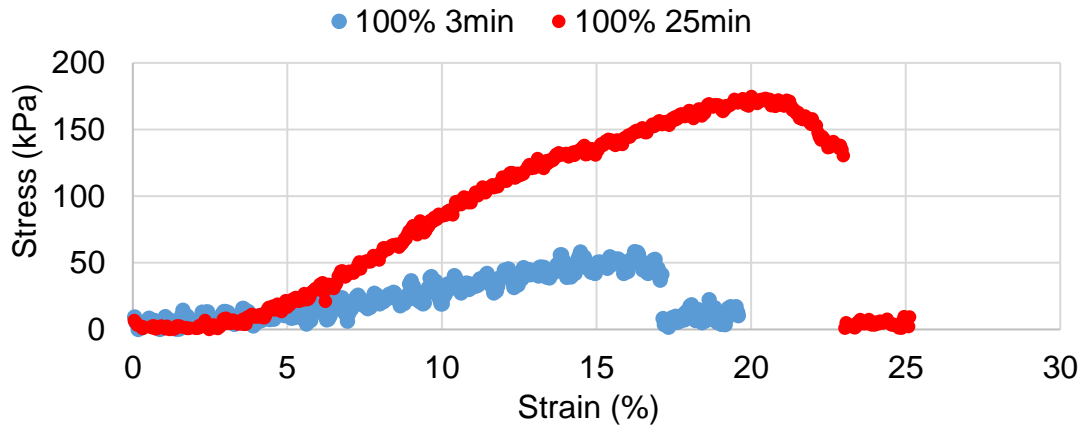
三、 照光參數的調整對電紡絲的影響

表二、照光參數對電紡絲的影響。

照光時間	曝光度	電紡絲型態	半徑 (um)	Crimping degree
照光 3 分鐘	50 %	Fiber 消失		
	100 %		0.68 ±0.122	0.94 ±0.046
照光 25 分鐘	50 %		1.34 ±0.775	0.87 ±0.306
	100 %		0.02 ±0.004	0.92 ±0.052

由表二得到的數據可知，照光強度越大的 GelMA，其 Crimping degree 越大(100%的大於 50%的)。另外，半徑方面則是 25 分鐘 50%>3 分鐘 100%>25 分鐘 100%的，其中 25 分鐘 100%的纖維極細，達到約 0.02 微米的寬度。

四、照光參數的調整製作的電紡絲機械強度



圖十五、應力應變曲線

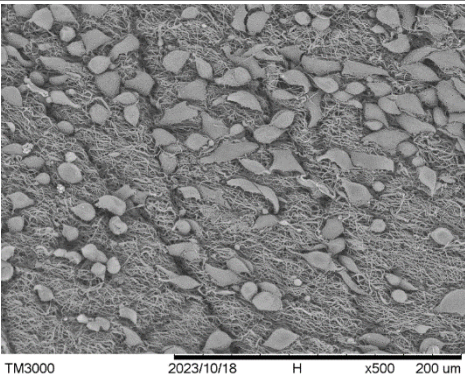
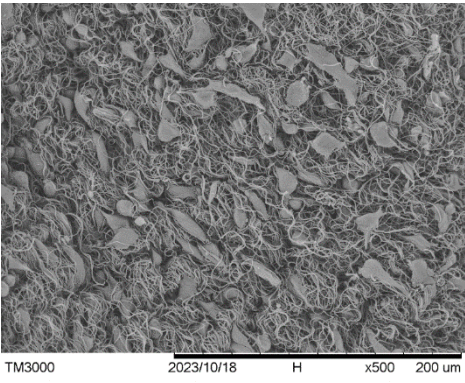
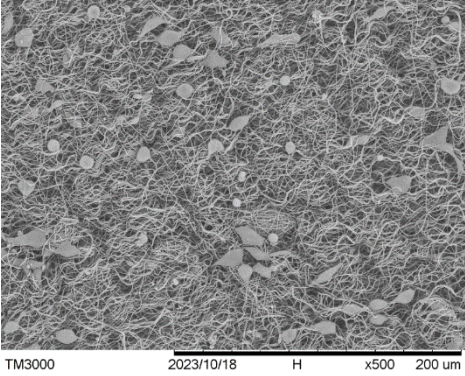
表三、光能量和 GeIMA 硬度的關係

	100 % 照光 3 分鐘	100 % 照光 25 分鐘
光能量 (焦耳, J)	2.88	23.96
Young's modulus (千帕, kPa)	293.28	1035.46

圖十五的結果顯示，經過光交聯的水凝膠硬度在大約在 300~1000kPa 之間，能量越高硬度越高。由表三可知，兩種處理的光能量差約 8 倍，楊氏模量差約 3.5 倍。

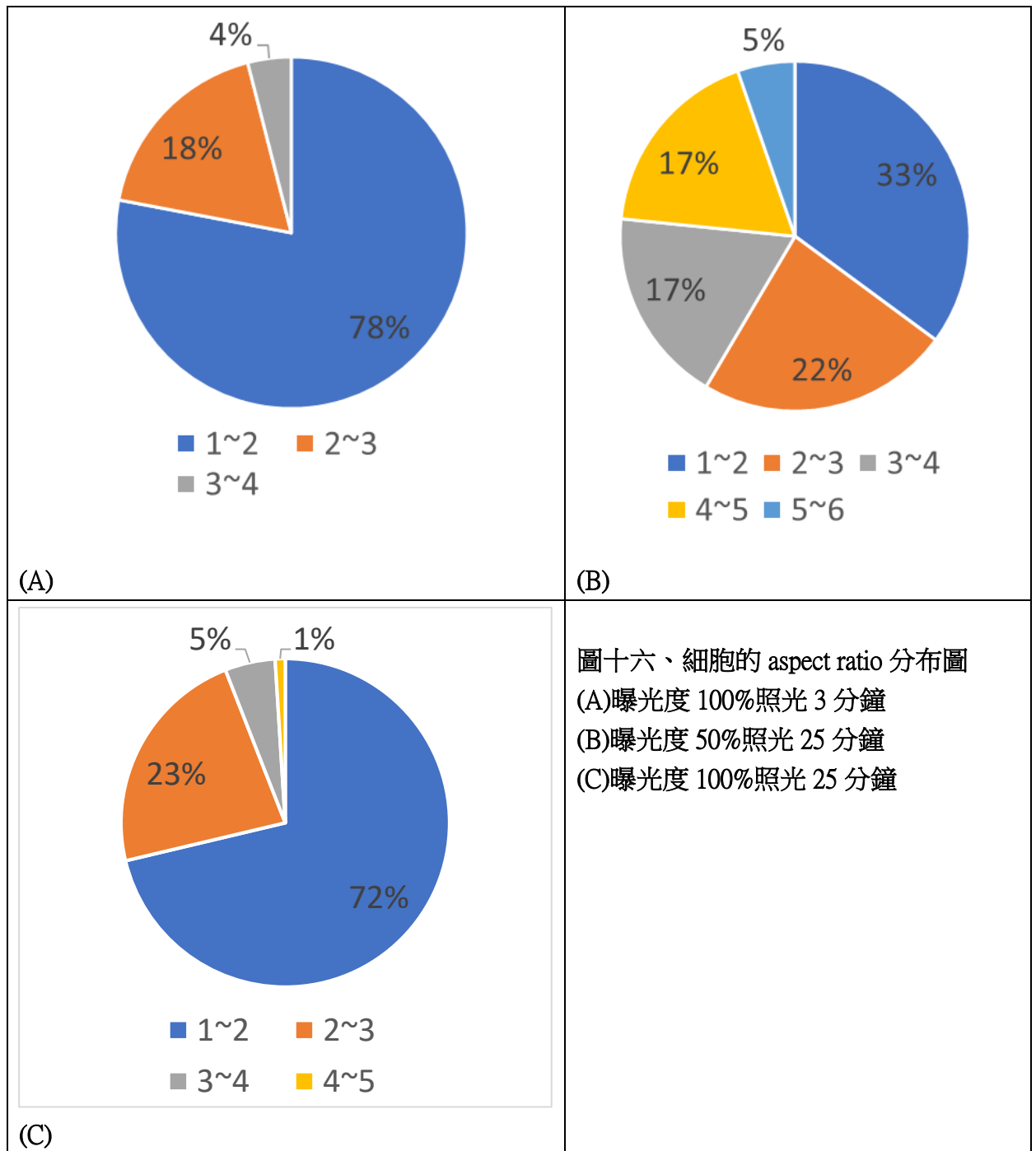
五、不同硬度電紡絲材料的 NIH 3T3 細胞生長結果

表四、照光參數對細胞生長情形的影響

照光時間	曝光度	細胞型態	NIH 3T3 的 Aspect ratio
照光 3 分鐘	50%	Fiber 消失	
	100%		1.71 ±0.206
照光 25 分鐘	50%		3.05 ±1.36
	100%		1.83 ±0.366

由表四結果，照光 3 分鐘曝光度 100%、照光 25 分鐘曝光度 50%、100% 的材料，細胞皆可在其上生長，但型態略有不同，我們進一步取樣分析細胞的

aspect ratio。照光 3 分鐘曝光度 50%的 Fiber 在培養液中則溶解消失，故無法有細胞隻生長數據。



圖十六、細胞的 aspect ratio 分布圖
 (A)曝光度 100%照光 3 分鐘
 (B)曝光度 50%照光 25 分鐘
 (C)曝光度 100%照光 25 分鐘

在照光 25 分鐘條件下，曝光度 50%照光 25 分鐘則是從圓餅圖可看出分布較不均勻，平均 aspect ratio 高達 3.05(遠高於曝光度 100% 的 1.83)，表示前者細胞型態相較於後者大多比較拉長和攤平。

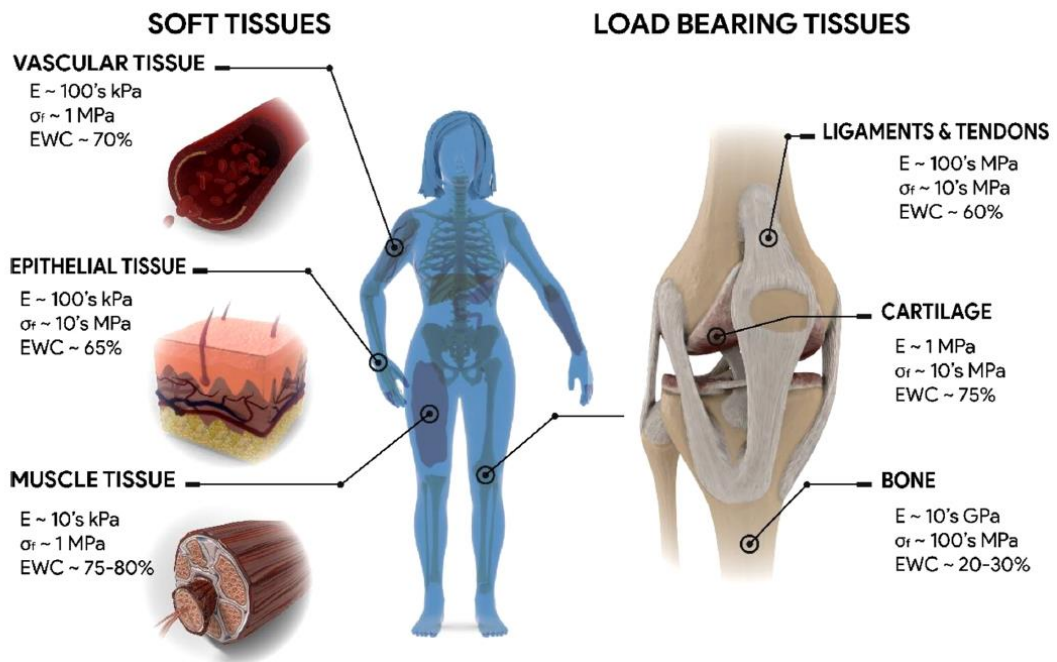
在曝光度 100%條件下，照光 3 分鐘跟照光 25 分鐘的材料，後者硬度明顯較高，但是細胞平均 aspect ratio 並沒有明顯差別，看圓餅圖也可以發現兩者細胞的 aspect ratio 分布很接近，都是在 1~2 之間佔多數約 70%。

肆、討論

利用光交聯控制調整硬度的水凝膠電紡絲，硬度接近人體許多器官組織，加上光交聯的特點是可以任意塗抹成需要的形狀厚度，因此未來非常有機會成為模擬人體內部細胞培養狀況的生物材料。

本次實驗做出的水凝膠楊氏模量大概在 300~1000kPa 之間，因為我們是用拉伸的方式測量的，所以看下圖(圖十七) E 的數值，我們做出的水凝膠軟硬度接近血管和皮膚，因此未來如果需要模擬血管和皮膚的環境來做實驗，可以用電紡絲光交聯水凝膠作為材料。

觀察不同軟硬度水凝膠上細胞的生長情況可以發現，照光 3 分鐘 100%的楊氏模量為 293.28kPa，照光 25 分鐘 100%的楊氏模量則是 1035.46kPa，但是兩者細胞生長的 aspect ratio 沒有差太多，前者為 1.71 後者為 1.83。



圖十七、人體各個器官組織的軟硬度(A. Kristen Means, et al.,2019)

伍、結論

本研究證實調變 GelMA 光交聯參數可製造不同軟硬度的材料，並可讓細胞生長於其中，具生醫材料之潛力，歸納重要研究結論如下：

- (一) 光強度在座標(0,0)、(0,1)、(0,2)位置最強，從照光開始約 300 秒可達強度穩定
- (二) 本實驗做出的水凝膠軟硬度接近人體內血管和皮膚的軟硬度
- (三) 基質硬度不同造成細胞生長情形不同，但就 aspect ratio 方面無顯著差異

陸、未來研究方向

- (一) 測量曝光度 50%，不同照光時間材料的楊氏模量
- (二) 測試血管內皮細胞株在本實驗置備材料的生長情況

柒、參考資料

- Ameer, J. M., Pr, A. K., & Kasoju, N. (2019). Strategies to tune electrospun scaffold porosity for effective cell response in tissue engineering. *Journal of functional biomaterials*, 10(3), 30.
- Bupphathong, S., Quiroz, C., Huang, W., Chung, P. F., Tao, H. Y., & Lin, C. H. (2022). Gelatin methacrylate hydrogel for tissue engineering applications—a review on material modifications. *Pharmaceuticals*, 15(2), 171.
- Callens, S. J., Uyttendaele, R. J., Fratila-Apachitei, L. E., & Zadpoor, A. A. (2020). Substrate curvature as a cue to guide spatiotemporal cell and tissue organization. *Biomaterials*, 232, 119739.
- Chang, H., Liu, X. Q., Hu, M., Zhang, H., Li, B. C., Ren, K. F., ... & Ji, J. (2016). Substrate stiffness combined with hepatocyte growth factor modulates endothelial cell behavior. *Biomacromolecules*, 17(9), 2767-2776.
- Gupta, S. K., Li, Y., & Guo, M. (2019). Anisotropic mechanics and dynamics of a living mammalian cytoplasm. *Soft Matter*, 15(2), 190-199.

Means, A. K., & Grunlan, M. A. (2019). Modern strategies to achieve tissue-mimetic, mechanically robust hydrogels.

Zhou, C., Zhou, L., Liu, J., Xu, L., Xu, Z., Chen, Z., ... & Jia, R. (2020). Kidney extracellular matrix hydrogel enhances therapeutic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells for renal ischemia reperfusion injury. *Acta biomaterialia*, *115*, 250-263.

蕭學謙 (2017)。光交聯蛋白質水膠於傷口復原之應用。〔碩士論文。國立交通大學〕臺灣博碩士論文知識加值系統。

【評語】 100012

本研究探討甲基丙烯酸酐化明膠蛋白質電紡絲奈米纖維製作之支架，在紫外光不同時間照射之下產生交聯，藉此製造不同軟硬度近似人體血管和皮膚之生醫材料，供細胞生長之用途，實驗以生長後細胞之長寬比做為生物相容性之指標，構想創新，分析亦完整，具有生醫產業應用潛力。唯表面形貌對於生物相容性之影響的探討仍有改善空間，鼓勵作者再接再厲，持續精進改善，讓作品更完整。