

中國醫藥大學  
醫學研究所  
碩士學位論文

體外震波於體外人體間質幹細胞之效應

Effects of extracorporeal shock wave on  
human mesenchymal stem cells  
in vitro



指導教授：許弘昌

共同指導教授：吳介信

研究生：許晉榮

中華民國九十三年七月

## 中文摘要：

**背景** 震波之產生是在水中產生爆炸且引發高能之聲波，此聲波藉由半橢圓之反射面聚焦再傳遞到特定組織位置。人類間質幹細胞存在於成人骨髓中，它可以像未分化細胞複製且有分化成各種細胞，如骨頭、軟骨、脂肪、韌帶及骨基質。過去 30 年在泌尿科，體外震波碎石已成為治療泌尿系統結石之標準治療方式。這種世界性進化之方法已完全取代侵襲性手術。最近體外震波治療被應用在骨科疾病上，如骨折癒合不良、肘外上髁炎、足底筋膜炎以及肩鈣化性肌腱炎，並可得到骨折癒合及肌腱之修復。然而，震波如何促進骨折癒合及肌腱修復之機轉以及理想之震波劑量仍是未知。

**方法** 為了探究人體間質幹細胞對於震波之反應以及它對於不同能量密度及震波次數之關係我們分別使用 0.14、0.29、0.55、 $\text{mJ}/\text{mm}^2$ ，以及 0、250、500、750、1000 次分別作用於幹細胞，每種試驗均進行三次。為了測量人類間質幹細胞經過震波治療之生存能力，我們採取 MTT 分析。且於震波治療後 1 小時來測定。另外於震波治療後 6、12、24、48 小時來淬取懸浮液，利用 ELISA 方法來測量 TGF- $\beta$ 1、basic FGF、VEGF 濃度。

**結果** MTT 分析中其結果可發現在 0.14  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  作用 250 次其 Viability

和對照組並無統計學上之意義 p 值大於 0.05。而其餘條件下其 Viability 和對照組併有統計學上之意義 p 值小於 0.05。

另外於震波治療後 6、12、24、48 小時來淬取懸浮液，利用 ELISA 方法來測量 TGF- $\beta$ 1、basic FGF、VEGF 濃度。我們可發現體外震波對於人體間質幹細胞，均可促進細胞分泌 TGF- $\beta$ 1, basic FGF 和 VEGF。此外我們可發現在不同劑量下，其 basic FGF、VEGF, TGF- $\beta$ 1 於 24 小時所得到之濃度可達到高峰。

**結論** 本研究中顯示體外震波治療依據不同之能階次數對於人類間質幹細胞產生不同之結果。就細胞存活率而言，其在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 250 次，震波治療下，其細胞存活率不受影響。且體外震波治療對於人類間質幹細胞具有促進分泌 TGF- $\beta$ 1、VEGF、b-FGF 之效果，其濃度約於 24 小時可達到高峰。

## 英文摘要:

Background Shock wave is created by high voltage spark discharge under the water causing an explosive evaporation of water and producing high-energy acoustic waves. The acoustic waves are focused on a semiellipsoid reflector and therefore can be transmitted into a specific tissue site. Human mesenchymal stem cells are present in adult marrow, that can replicate as undifferentiated cells and that have the potential to differentiate to lineages of mesenchymal tissues, including bone, cartilage, fat, tendon, muscle, and bone stroma. Over the past 30 years in the field of urology, extracorporeal shock wave lithotripsy is considered to be the golden standard in stone therapy. The worldwide revolutionary method has almost completely replaced invasive surgery. More recently extracorporeal shock wave therapy (ESWT) has been used in the treatment of conditions of the locomotor system such as nonunion of fractures, lateral epicondylitis, plantar fasciitis, and calcifying tendonitis of the shoulders and has a promising effect on promotion of bone fracture healing and repair of tendinopathies. The mechanism

by which shock wave enhances fracture healing and repair of tendinopathies are still unclear.

Methods To gain insight in the effects of shockwaves on human mesenchymal stem cells the relationship between the energy flux density and the number of shockwaves as well as their effect on normal mesenchymal stem cells was studied. At energy flux density of 0.14, 0.29, and 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> were subjected to 0, 250, 500, 750, and 1000 impulses. Each test was performed three times. At 1 hour after shock waves treatment, we used MTT assay to analysis the viability. In the other hand, at 6, 12, 24 and 48 hours after shock waves treatment, the cultured supernatants were harvested for measurement of TGF- $\beta$ 1, VEGF and basic FGF. The productions of TGF- $\beta$ 1, VEGF and basic FGF were determined by ELISA.

Results In MTT assay, it showed there was statistically difference between the viability of treatment group and the control group except when the energy density is at 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> and impulses are 250 ( $p > 0.05$ ).

In the other hand, at 6、 12、 24 and 48 hours after shock waves treatment, the cultured supernatants were harvested for measurement of TGF- 1、 VEGF and basic FGF. The productions of TGF- 1、 VEGF and basic FGF were determined by ELISA. It showed shock wave treatment group could induce the production of TGF- 1, basic FGF and VEGF. We also could find at different dosage, the production of TGF- 1, basic FGF and VEGF could reach the highest level at post-shock wave treatment 24 hours.

Conclusion Our study showed the shock waves treatment could induce different results according the different energy density and impulses. To the cell viability, it showed there was no statistically difference between the treatment group and the control group when the energy density is at  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  and impulses are 250 ( $P>0.05$ ). In the other hand, shock waves treatment could induce the production of TGF- 1, basic FGF and VEGF. We also could find at different dosage, the production of TGF- 1, basic FGF and VEGF could reach the highest level at 24 hours after shock wave treatment.

## 誌謝辭

本研究的進行承蒙中國醫藥大學附醫院許多單位及人員之協助得以順利進行，首先要萬分感謝我的指導教授許弘昌教授，在這過去這一段日子裡給予我的關懷照顧，不論在學術上或是做人處世之態度均受益非淺。同時也要感謝吳介信教授指導我研究之觀念以及疑難問題之排解。此外要感謝曾國峰醫師大力相助，提供指導幹細胞之萃取、培養。也要感謝陳靜雯、黃鈺媚以及宜津在實驗過程中的鼎力相助。由於這些人的授手，本研究得以完成，在此向他們表達最大之謝意。

雖然研究工作才開始跨出第一步，未來仍有許許多多的挑戰，希望自己能夠堅定目標、不畏因難、勇敢向前邁進。最後感謝醫院給予我進修之機會以及我深愛的父母、對我萬分支持的愛妻珮齡，以及我可愛的兒女家綺、家翔。

# 目錄

內容	頁次
中文摘要	1
英文摘要	3
誌謝	6
目錄	7
圖目錄	10
符號與縮寫	13
第一章 前言	
第一節 研究緣起	15
第二節 研究目的	17
第二章 文獻探討	
第一節 震波定義及基本物理特性	18
第二節 震波治療之臨床應用	22
肩部鈣化性肌腱炎	23
足底筋膜炎	25
手肘外髁肌腱炎	26
骨癒合不全或延遲癒合	28
第三節 震波之作用機轉	30



第四節	人體間質幹細胞	31
第五節	轉化生長因子 TGF- 1	33
第六節	血管內皮生長因子 VEGF	35
第七節	基礎成纖維細胞生長因子 Basic-FGF	37
第三章	研究架構與研究設計	38
第一節	研究設計	
第二節	研究假說	
第四章	研究材料及統計方法	
第一節	研究材料及資料收集方法	39
人類間質幹細胞萃取和培養		39
震波之給予		40
細胞生存能力		41
TGF- 1 之測定		43
VEGF 之測定		45
Basic FGF 之測定		47
第二節	資料處理與分析方法	49
第五章	研究結果	
第一節	細胞生存能力	50
第二節	TGF- 1 之測定結果	52

第三節 VEGF 之測定結果	62
第四節 Basic FGF 之測定結果	72
第六章 討論	82
第七章 結論與建議	
第一節 結論	87
第二節 建議	89
參考文獻	90
簡單自述	104
博碩士論文電子檔上網授權書	

## 圖目錄

圖一 電動液壓式生成器。	18
圖二 電磁式生成器。	19
圖三 壓電效應式生成器。	20
圖四 震波圖。	21
圖五 德國 OrthoWave 骨科震波治療設備圖。	40
圖六 人類間質幹細胞經過震波治療後 1 小時之生存能力。	51
圖七 震波治療後 6 小時 TGF- $\beta$ 1 之濃度。	54
圖八 震波治療後 12 小時 TGF- $\beta$ 1 之濃度。	55
圖九 震波治療後 24 小時 TGF- $\beta$ 1 之濃度。	56
圖十 震波治療後 48 小時 TGF- $\beta$ 1 之濃度。	57
圖十一 在 0.14 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時 TGF- $\beta$ 1 之濃度。	58
圖十二 在 0.29 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時 TGF- $\beta$ 1 之濃度。	59
圖十三 在 0.55 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時 TGF- $\beta$ 1 之濃度。	60
圖十四 同一能量下其作用能階和作用次數對於分泌 TGF- $\beta$ 1 之效應。	61
圖十五 震波治療後 6 小時 VEGF 之濃度。	64

圖十六 震波治療後 12 小時 VEGF 之濃度。	65
圖十七 震波治療後 24 小時 VEGF 之濃度。	66
圖十八 震波治療後 48 小時 VEGF 之濃度。	67
圖十九 在 0.14 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時 VEGF 之濃度。	68
圖二十 在 0.29 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時 VEGF 之濃度。	69
圖二十一 在 0.29 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時 VEGF 之濃度。	70
圖二十二 同一能量下其作用能階和作用次數對於分泌 VEGF 之效應。	71
圖二十三 震波治療後 6 小時 basic FGF 之濃度。	74
圖二十四 震波治療後 12 小時 basic FGF 之濃度。	75
圖二十五 震波治療後 24 小時 basic FGF 之濃度。	76
圖二十六 震波治療後 48 小時 basic FGF 之濃度。	77
圖二十七 在 0.14 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時 basic FGF 之濃度。	78
圖二十八 在 0.29 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時 basic FGF 之濃度。	79
圖二十九 在 0.55 mJ/mm <sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波	

治療於 6、12、24、48 小時 basic FGF 之濃度。

80

圖三十 同一能量下其作用能階和作用次數對於分泌 basic FGF 之效應。

81

## 符號與縮寫

Basic FGF	Basic fibroblast growth factor
BMPs	Bone morphogenetic proteins
CBFA1	Core binding factor A1
DMEM	Dulbecco ' s modified Eagle ' s medium
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENOS	Endothelial nitric oxide synthase
ESWT	Extracorporeal shock wave therapy
FBS	Fetal bovine serum
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
IGF	Insulin-like growth factor
MIS	Mullerian inhibitor substance
Mpa	Mega pascal
MSC	Mesenchymal stem cells
MTT	3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell antinuclear antigen

TGF- 1      Transforming growth factor- 1  
VEGF        Vascular Endothelial Growth Factor  
VPF         Vascular permeability factor

## 六、論文正文：

### 第一章 前言

#### 第一節 研究緣起

過去 30 年在泌尿科，體外震波碎石已成為治療泌尿系統結石之標準治療方式。這種世界性進化之方法已完全取代侵襲性手術。最近體外震波治療被應用在骨科疾病上，如骨折癒合不良、肘外上髁炎、足底筋膜炎以及肩鈣化性肌腱炎，並可得到骨折癒合及肌腱之修復。

震波之產生是在水中產生爆炸且引發高能之聲波，此聲波藉由半橢圓之反射面聚焦再傳遞到特定組織位置。然而，震波如何促進骨折癒合及肌腱修復之機轉仍不清楚。人類間質幹細胞存在於成人骨髓中，它可以像未分化細胞複製且有分化成各種細胞，如骨頭、軟骨、脂肪、韌帶及骨基質。骨髓內間質幹細胞分化成骨頭前趨物質在骨折癒合過程中扮演一定之角色，經由震波治療促使骨頭及韌帶之再生的現象，可推測震波藉由如 TGF-1、basic FGF、VEGF 之分泌，來進行修復或分化。

為了探究人體間質幹細胞對於震波之反應，以及它對於不同能量密度及震波次數之關係，我們分別使用 0.14、0.29、0.55 mJ/mm<sup>2</sup>，以及 0、250、500、750、1000 次分別作用於幹細胞，每種試驗均進行三次。並且於震波



治療後 6、12、24、48 小時來淬取懸浮液，由 ELISA 方法來測量 TGF- $\beta$ 1、basic FGF、VEGF 之濃度變化。

## 第二節 研究目的

此實驗之目的是求了解不同劑量之震波對於人體間質幹細胞之影響，此外它提供有關不同劑量下之震波對於 TGF- $\beta$  1 及 basic FGF、VEGF 生成之影響力。

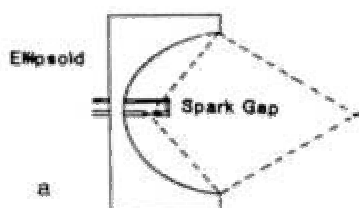
## 第二章 文獻探討

### 第一節 震波定義及基本物理特性

震波為聲波之一種，常伴隨於我們日常生活中，但很少被注意。例如雷雨聲、爆炸聲、拍手聲均為實際之例子：且震波均伴演重要之角色。此外地震和水中氣泡破裂均能產生震波，且藉由震波能量可傳遞很遠之距離。噴射機可產生巨大聲響，它可穿越隔音隔，並且使得櫥櫃之玻璃晃動。此種震波可由噴射機傳遞到玻璃。

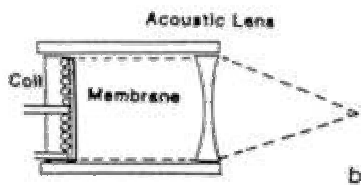
現今世面上有三種震波生成器

第一種是電動液壓式生成器（electrohydraulic generator）。它藉由電極棒的尖端作為能量生成點。此電極棒被放置於半橢圓形之第一焦點；之後高電壓在電極棒之尖端啟動。在電極棒尖端間產生電極火星被且震波在電極棒尖端間將水汽化後開始產生，此種圓形的震波，經由橢圓形金屬物質反射，然後聚焦於第二焦點，此第二焦點被調整為人體內之治療目標。此原理於圖一表示。



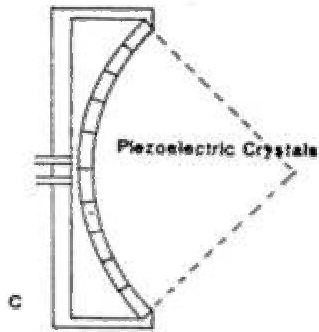
圖一 電動液壓式生成器

第二種為電磁式生成器。它是藉由電磁線圈以及相反面之金屬薄膜。經由高電流流經線圈產生強大之磁場，使得相對應之薄膜產生變化。此種電磁力加速金屬薄膜遠離線圈產生一種慢速且低壓之聲波。藉由聲波透鏡將震波聚焦。此聚焦點被定義為透鏡之焦距。當聲傳播於焦點時，此聲波之振幅呈非線形增加。震波之主成時間約十億分之 1 秒，另外一種結構為柱形，它產生高壓流通之脈波形成柱之壓力波藉由雙曲線形金屬反射器達到聚焦。相同的方式此震波主成時間約於十億分之 1 秒，此原理於圖二表示。



圖二 電磁式生成器

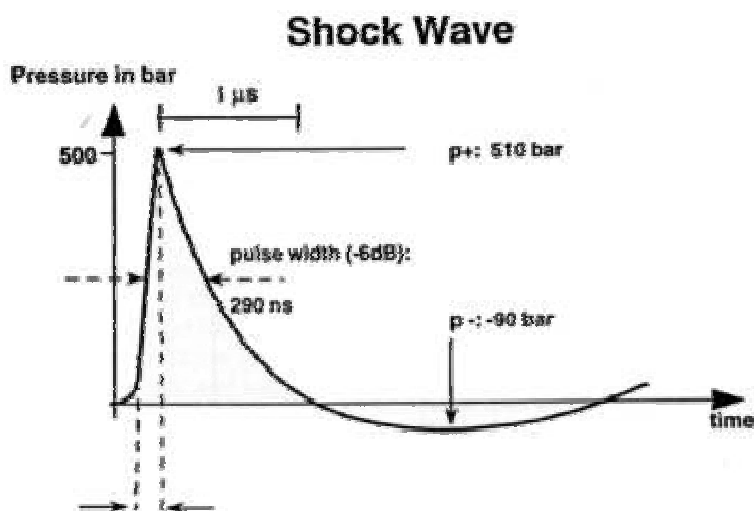
第三種形成震波之模式為壓電效應式生成器。成百成千的壓電水晶被裝置於圓球表面，當高壓脈波擊發水晶的同時，它們快速緊縮且擴張併於周邊水液中產生低壓力波動，此系統可自動聚焦於球形之焦點。相同的是此震波之產生是藉由非線性提昇振幅，此原理可於圖三中顯示。(以上摘錄自 [www.ismst.com](http://www.ismst.com))



圖三 壓電效應式生成器

一般來說，震波可被描述為一單一波動，它伴隨著寬廣之頻率範圍(可達到 20MHz)，高壓力振幅(可達到 120 MPa) 低張力波(達到 10 MPa) 很小的波寬(-6dB) 在很短之生成時間。在小於一億分之一秒中可產生正向振幅。由於形成時間非常短暫，因此水中壓力測量器必須要有高能力之分辨力，特別在於電動液壓震波生成系統。震波之波形為於毫秒內一正向壓力振幅伴隨著因繞射所生成之張力波。此能量密度可達到  $1.5 \text{ mJ/mm}^2$ 。因此能量由此時間空間內所分佈之壓力區間來決定，此能量密度由每次脈動所通過一毫米平方之區域可達到最高聲波之能量來計算。總結而言，震波之特性為於極短之時間內產生一高正向壓且伴隨著負向壓力張力波(圖四) [1-3]。其和超音波之區別點在於後者藉由正弦波長傳遞低正向壓力波且於體內產生熱。相反地體外震波利用高能量脈波伴隨著低重覆次數，因此於焦點所引起之溫度上升可以被忽視且不需考慮副作用之情形。電動液壓震波是在水中，藉由高電壓火花於電造成爆炸般的水份蒸發而產生高能

量之聲波。此種聲波藉由半橢圓形之反射器而被傳遞於特殊組織位置。於體外震波治療由於聲波阻抗系數於骨骼和軟組織有著很大之差異性，故骨骼組織被視為高吸收能量之區域。物質聲波組抗系數如下：水 1.53、脂肪 1.38、肌肉 1.65~1.74、骨頭 3.2~7.4 (  $10^5 \text{kg/m}^2 \text{per second}$  )。此種差異性代表壓力波於骨骼上有強大之直接作用 [4]。



圖四 震波為極短之時間內產生一高正向壓且伴隨著負向壓力張力波

## 第二節 震波治療之臨床應用

於過去 30 年中，泌尿科體外震波碎石之發民已取代過去傳統外科手術，而成為處理結石之主要手段。最近體外震波治療針對骨骼肌肉系統所產生之問題如癒合不良性骨折，手肘外髌肌腱炎、足底筋膜炎或是肩關節鈣化性肌腱炎均可得到骨頭癒合或肌腱修復之結果。以下便提到以上四疾病臨床上之文獻報告。

## 肩部鈣化性肌腱炎

治癒肩部鈣化性肌腱炎的保守療法，一般之原則為減低疼痛，併提昇功能。有許多之治癒方法例如休息、伸展肌肉強化運動，非類固醇之抗發炎藥物、類固醇之注射，以及體外震波治療。

Rompe 等學者針對 40 病人患有持續疼痛之肩部鈣化性肌腱炎病患作預期性之研究。每位病人給予單一次之體外震波治療，於 6 週及 24 週作追問性之檢查，其結果可發現於主觀及客觀均有統計學上之差異性。且其中 6 成之病人可達 constant score 之正常標準 [5]。

Loew 等學者針對 20 位病人患有肩部鈣化性肌腱炎作預期性之研究，每位病人分給予二次體外震波治療於 6 星期及 12 星期作追問。於 12 星期時可發現其中 15 位病人 (75%) 有明顯症狀改善。客觀的評估 (利用 constant score) 可發現平均進步 30%，而在放射性影像學發現有五位病人之鈣化有部份消失，且 7 位病人鈣化點可完全消失，但其中 14 位病人有短暫之皮下血腫 [6]。

Spindler 等學者針對三位患有肩部鈣化性肌腱炎給予外震波治療。作者提出經過 24 小時後，病人完全無疼痛且完全得到活動範圍。經過二年追



？，病人完全無症狀且放射線檢查完全消失。這些病人完全無副作用 [7]。

Wang 等學者，比較了震波治療於治療組及對照組之結果，其中治療組有 37 位病人，而對照組有 6 位病人。針對治療組中完全無疼痛有 60.6%，明顯疼痛改善有 30.3%，稍許改善約 3%，完全無改善有 6.1%，只有二位病人以較低之疼痛頻率復發。而對照組中，有 5 位病人無改善，其中一位較為改善 [8-9]。

整體而言，體外震波治療肩部鈣化性肌腱炎成功率均為 47% 至 93.9% [3-9]。

## 足底筋膜炎

針對足底筋膜炎之保守治療主要是針對減輕疼痛，併改善功能。而到目前為止，仍有許多不同方式之治療方法包括了休息、伸展、強化運動，非類固醇之抗發炎藥物，石膏固定或是類固醇注射以及體外震波治療。

Rompe 等學者針對 30 位患有慢性足底筋膜炎且症狀持續超過一年之患者分為對照組和實驗組，在體外震波治療前 6 星期停止一切治療，實驗組病人每週接受一次 1000 次  $0.06 \text{ mJ/mm}^2$  之震波能量治療，共三週。治療完後病人被允許自由負重。所有病人於第 3 週、6 週、12 週及 24 週接受追蹤檢查。實驗組病人在疼痛之減輕以及走路能力均有顯著進步 [10]。

Wang 等學者治療 79 病人（共 85 足跟）患有足底筋膜炎，包括 59 位女性 20 位男性患者平均年齡為 47 歲（範圍 15 到 75 歲）接受震波治療，一年後之追蹤發現，75.3% 病人完全無疼痛，18.8% 明顯改善，5.9% 病人輕微改善，而沒有變差或無改善。復發率為 5% [11]。

許多臨床針對足底筋膜炎使用體外震波治療，整體而言，體外震波治療足底筋膜炎成功率均為 34% 至 88% [3, 10-13]。

## 手肘外髁肌腱炎

針對手肘外髁肌腱炎之保守治療主要是針對減輕疼痛，併改善功能。而到目前為止，仍有許多不同方式之治療方法包括了休息、伸展、強化運動，非類固醇之抗發炎藥物或是類固醇注射以及體外震波治療。

Wang 等學者針對 57 位病人患有手肘外髁肌腱炎以 6 位病人作為對照組，追? 時間為 12 到 26 個月。整體治療組之結果完全疼痛消失有 27 位病人佔了 61.4%，明顯改善有 13 位病人，佔了 29.5%，而稍許改善有三位病人佔了 6.8%而沒有任何變化有 1 人（2.3%）。再發率為 6.8%（3 位病人）。而在對照組，6 位病人完全沒有改善[14]。

Ko 等學者針對 53 位患有手肘外髁肌腱炎病人，使用之劑量為在 24KV 下作用 1000 次之震波能量治療。在三個月之追? 顯示 13.2% 病人為極佳，44.7%病人為很好，而有 36.8% 病人可接受，5.3% 病人而沒有任何變化。在六個月之追? 顯示 30.8% 病人為極佳，42.3%病人為很好，而有 26.9% 病人可接受，沒有病人完全沒有改善[15]。

Rompe 等學者針對 100 位病人患有手肘外髁肌腱炎，將病人分為治療

組及對照組，治療組給予 3000 次， $0.08\text{mJ}/\text{mm}^2$  之震波能量治療。在追？結果顯示 48% 病人為極佳或很好，而有 42% 病人可接受，和對照組比較，結果顯示 6% 病人為極佳或很好，而有 24% 病人可接受 [16]。

許多臨床針對手肘外髌肌腱炎使用體外震波治療其成功率文獻報告從 48% 至 73% 均有人報告 [3, 14-16]。

## 骨癒合不全或延遲癒合

Wang 等學者使用體外震波治療 72 位患有長骨骨癒合不全或延遲癒合之病人。其使用之劑量依照部位不同而有所差異，對於脛骨及大腿骨使用之劑量為在 28KV 下作用 6000 次，對於肱骨使用之劑量為在 28KV 下作用 3000 次，對於橈尺骨使用之劑量為在 24KV 下作用 2000 次，對於掌骨使用之劑量為在 24KV 下作用 1000 次，在三個月之追? 顯示有 49% 病人已癒合且伴隨完全症狀緩解。在六個月之追? 顯示，有 82.4% 之癒合率。在一年之追? 顯示有 88% 之癒合率 [17]。

於 2001 年 Rompe 等學者針對 43 位患有骨癒合不全或延遲癒合之病人給予 3000 次， $0.6\text{mJ}/\text{mm}^2$  之震波能量治療。其 4 個月後追? 發現有 31 位病人可達到 consolidation (72%) [18]。

於 2001 年 Schaden 等學者針對 115 位患有骨癒合不全或延遲癒合之病人給予 3000 次， $0.6\text{mJ}/\text{mm}^2$  之震波能量治療。其結果顯示有 87 位 (75.7%) 病人已癒合且伴隨完全症狀緩解。且幾乎無副作用如局部腫脹、血塊、淤青等被發現 [19]。

許多針對骨癒合不全或延遲癒合，使用體外震波治療，其成功率由 50% 到 90% 均有人報告 [3, 17-21]。

由以上可得知針對骨科病患，體外震波治療可以得到不錯之治療成果，而其所引起之併發症非常少見。故在未來之日子中，體外震波治療可以說是治療骨科患者之大利器。針對體外震波治療引起之併發症文獻中指出，體外震波治療對於腎結石或？囊結石均有產生副作用，而其副作用之產生取決於能量之設定以及脈波次數之多寡所決定[22-23]。而在基礎研究上可發現高能量之震波能造成自由基之製造改變細胞內鈣離之平衡，因此造成細胞或是組織之死亡[24]。在動物實驗中也可發現，高能量之體外震波對於老之骨？缺血性壞死併骨細胞死亡[25]。回朔這些治療人體之震波，對於能階之設定以及脈波次數的多寡仍有許多爭議而使用之範圍相當寬廣。故可得知，理想之震波劑量仍是未知。

### 第三節 震波之作用機轉

震波之作用機轉仍是未知，但是震波治療和泌尿科的體外震波碎石是不相同的。其差異點在於泌尿科之震波是用來分解石頭而震波治療是針對細胞間質或細胞外產生反應，進而達到治療之目的[1-2]。許多學者提出不同的特法。有些學者提出 ESWT 造成微小骨折或微小損傷或升腫塊生成進而引起骨生成的活性，而產生骨癒合成和達到骨頭修復之目的[1-2,4]。而有學者指出震波治療之所以減緩疼痛在於高頻率刺激所提昇的疼痛閾值進一步達到麻醉之效果。而 Wang 等學者提出震波治療可引起顯著性的新生血管生成[3,26]。在早期，震波治療組釋放了許多血管生成調控因子和增主因子，包括了 eNOS、VEGF、PCNA。eNOS 和 VEGF 在一星期時上升且持續在 8 星期時仍維持高水平。在 12 週後下降。而 PCNA 和新生血管於 4 星期增加且持續到 12 週。故根據上述結果，Wang 等學者認為震波治療包含了早期釋放血管生成相關因子，造成新生血管生成併改善在韌帶骨頭交界處之血液循環。其它基礎研究可發現 superoxide 調控震波所引導 CBFA-1 生成和使得幹細胞往骨骼前趨細胞分化[27]。此外體外震波促使骨髓幹細胞成長且往骨骼前趨細胞分化併伴隨 TGF- $\beta$ 1、VEGF 之生成物理震波對於骨髓內幹細胞可調控細胞膜過極化和 Ras 活化[28-30]。

#### 第四節 人體間質幹細胞 (MSC)

幹細胞的「幹」譯自英文「Stem」，意為樹幹或起源的意思；幹細胞是一群尚未完全分化的細胞，具有兩種特性，可大量分裂增殖與本身完全相同的細胞，亦可分化成為多種其他組織特定功能的細胞，例如轉變成腦、內臟、骨頭、肌肉等其它類型之細胞。若依幹細胞可分化之能力與限制，可分為全能性幹細胞 (totipotent stem cells)、多能性幹細胞 (pluripotent stem cells)、多潛能幹細胞 (multipotent stem cells) 及單能幹細胞 (unipotent stem cells) 四種。多潛能幹細胞則是內細胞團細胞 (胚胎幹細胞) 繼續分化而成，這些多潛能細胞能分化成同一胚層的所有組織細胞，例如最近研究發展十分迅速的骨髓間質幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells, 簡稱 MSC) [31-34]。Caplan 教授及其共同工作者提出骨髓間質幹細胞有能力分化成骨頭、軟體、韌帶、肌腱、肌肉、骨髓脂肪和其它結締組織 [35]。骨髓間質細胞在適宜的培養環境及特殊的生長因子刺激影響下，可分化成脂肪，神經及骨骼肌肉細胞，發現可用以治療相關疾病，骨髓間質幹細胞經多種生長因子作用後，可於體外繁殖，所須生長因子包括 PDGF (platelet-derived growth factor)，EGF (epidermal growth factor)，basic fibroblast growth factor，transforming growth factor-b，insulin-like growth factor-1 等等 [36-37]。



我們知道臨床上關節的受損包含硬骨與軟骨兩個部份，其中，因軟骨是一種特殊的結締組織，由軟骨細胞及細胞外基質所組成，一旦受到破壞後，自行修復能力相當有限；而硬骨若受相當嚴重的創傷，經常使用的治療方法為自體或異體骨移植。目前，最常使用的修復方法是由自體組織分離細胞，在體外大量培養後，將細胞包覆在生物性材料內，再植入自體受損部位修復患部[38]。其最常遇到的問題是，由自體組織所分離出來的組織特异性細胞，經體外培養後，會漸漸喪失其原有性質，再植入患部，生長出來不同的組織，故某些研究學者會在植入前利用適當的生長因子或化學要素刺激細胞有正確的分化。亦有些研究學者主張使用組織前驅細胞來培養，如骨髓間質幹細胞，並利用少量患部組織或適當刺激，促使再生及分化能力強的幹細胞生長成所需的組織[39]。成人幹細胞具有再生與分化的能力，經過適當的誘導，可應用在組織工程。在骨組織工程中，已有利用骨髓間質幹細胞培養成骨母細胞、軟骨細胞、脂肪細胞及骨骼母細胞等。

故骨髓間質幹細胞分化成特殊之組織取決於一起作用之生長因子、細胞激素和物理刺激。

## 第五節 轉化生長因子 TGF- 1

轉化生長因子 ( transforming growth factor- , TGF- ) 屬於結構調控蛋白質之超級大家庭。它包含了三種哺乳? 之 TGF- 1、 TGF- 2、 TGF- 3 以及活化素 ( activins )、抑制素 ( inhibins )、? 勒氏管抑制質 ( Mullerian inhibitor substance, MIS ) 和骨形成蛋白 ( bone morphogenetic proteins, BMPs )。一般在細胞分化活躍的組織常含有較高水平的 TGF- , 如成骨細胞、腎臟、骨髓和肝臟的造血細胞。TGF- 1 在人血小板和哺乳動物骨中含量最高 ; TGF- 2 在? 血小板和哺乳動物骨中含量最高 ; TGF- 3 以間質起源的細胞產生為主。TGF- 是由兩個結構相同或相近的、分子量 12.5kDa 單位藉由雙硫鍵結的? 體。

TGF- 1 它可以在所有細胞或分化過程之任一時期被分泌、製造 , 而且對於細胞形態具有調控之能力。它是一種具有多功能細胞激素 , 包含有 AUTOCRINE 各 PARACRINE 機轉 , 此種分子兼具有刺激及抑制細胞複製 , 且它擁有控制製造細胞外間質成分的能力。此種有影響力之細胞激素現今被認知能調節細胞分化、骨頭生成、血管新生、血液細胞生成、細胞週期進展、細胞移動以及細胞外間質製造 組織發育和傷口癒合 [40-43]。此外 TGF- 1 於神經保護 ( Neuroprotection ) 也佔了重要角色。它刺激星狀細胞生成神經生長因子 , 且預防神經元死亡 [44-45]。

而 TGF- $\beta$ 1 於骨科所扮演之角色如將 TGF- $\beta$ 1 局部給予局部傷口，可發現它可改善傷口癒合情形。另外在傷口發生前給予單劑量 TGF- $\beta$ 1，發現它可加速改善傷口癒合 [46-47]。此外 TGF- $\beta$ 1 於骨頭修復扮演重要角色。在老鼠之動物實驗中，給予少於 1 毫克之 TGF- $\beta$ 1，則頭蓋骨之傷害無法癒合。且 TGF- $\beta$ 1 的主成在骨折之修復扮演了分化以及調控之角色 [48-51]。

## 第六節 血管內皮生長因子

(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)

血管內皮生長因子是一種具有強力刺激血管新生效果的細胞素 (cytokine), 它是一種可溶性的肝素鍵結醣蛋白分子 (heparin-binding glycoprotein), 分子量約為 34-46kD, 早先被? 作血管? 透因子 (Vascular Permeability Factor VPF) 和血管? 理素 (Vasculotropin), 亦? 血管通透因子 (VPF), 具有多种功能。。目前已知有五種異構物 (isoforms) 均以二聚体形式存在, 分別具有 121、145、165、189 及 206 個胺基酸基, 稱為 VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>145</sub>、VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>189</sub> 及 VEGF<sub>206</sub>, 其中以 VEGF<sub>165</sub> 的效力最強。而這五個異構物是來源於同一個基因, 經由選擇性切割 (alternative splicing) 轉譯而來 [52]。

血管內皮生長因子概念的產生可追溯到西元 1961 年福克曼醫師 (Moses Judah Folkman) 在美國海軍實驗室中的觀察而引發的假說。然而經過長時間辛苦的研究後, 血管內皮生長因子直到西元 1989 年才由 Ferrara 及 Gospodarowicz 等人分離出來 [53-54]。它主要的作用在刺激血管新生, 可促進血管內蛋白質自腫瘤血管的滲漏 (extravasation), 並能改變血管張力 [55-57]。研究顯示, 血管內皮生長因子基因的表現受到腫瘤、低血氧、

發炎反應、乳酸，甚至低血糖的調控 [58-59]。許多疾病所引發的血管增生（如糖尿病患之視網膜病變、傷口修復等），也與血管內皮生長因子有關 [60-62]。

血管內皮生長因子對骨骼發展佔有重要之角色。於動物實驗中，VEGF 被發現可促進老鼠骨折處之血管生成及骨癒生成。若將 VEGF 之基因從老鼠刪除，則造成骨骼生長發生問題且損壞新生血管生成。於骨軟骨生成中，它？烈地促使？皮？胞分裂增殖、增生、轉移，增加血管通透性併促進新血管生成 [63-67]。

## 第七節 成纖維細胞生長因子 ( fibroblast growth factor, FGF )

Basic FGF 或稱之為 FGF-2 或 Heparin-binding growth factor-2 ( HBGF-2 ) 是現今被廣泛研究之蛋白質。Basic FGF 可由許多器官或組織分離出包括：神經細胞、腦下垂體、腎上腺皮質黃體或是胎盤。自然萃取而來的 basic FGF 其分子量約為 18kDa。Basic FGF 其功能可以刺激中胚層或神經外胚層細胞之增生，包含了纖維母細胞，內皮細胞是狀細胞、寡樹突細胞、神經母細胞、骨成骨母細胞及滑肌細胞等。除此之外，它的作用是促進？皮？胞的游走併能？促使新血管形成，修復？害的？皮？胞，而 basic FGF 具有化學趨化作用 [68-70]。

Basic FGF 可誘導骨折愈合的血管形成與增殖，但有實驗發？ basic FGF 對正常骨折癒合併與？與新生血管及免疫功能調控，部分參與炎症反應、血管形成及骨、軟骨代謝，調控骨折癒合 [71-73]。此外 Basic FGF 具有直接或間接作用於骨蝕骨細胞之生成和骨質之吸收，且對於骨折具有促進血管形成及重新塑造之能力 [74-76] 。

### 第三章 研究架構與研究假說

#### 第一節 研究架構

我們的研究分成兩個部份，第一部份是利用 MTT assay 來測量人類間質幹細胞經過震波治療之生存能力。第二部份是利用 ELISA 方法來測量人類間質幹細胞經過震波治療後蛋白質分泌情形。

#### 第二節 研究假說

人體體外震波治療，對於能階之設定以及脈波次數的多寡仍有許多爭議而使用之範圍相當寬廣。故可得知，理想之震波劑量仍是未知。我們假設理想之震波劑量對於人類間質幹細胞應為於 MTT assay 測量中，人類間質幹細胞之生存能力不受影響，而 TGF- $\beta$ 1、basic FGF、VEGF 之分泌能達到高峰。故我們的研究試圖藉由能階之設定以及脈波次數的多寡來尋找體外震波對於人類間質幹細胞之理想之震波劑量。

## 第四章 研究材料及統計方法

### 第一節 研究材料及資料收集方法

#### 方法和材料

##### 人類間質幹細胞淬取和培養

將年輕病人因長骨折需接受開刀於開刀前取得同意書。利用空針從此病人之坐骨前上? 抽取 20cc 骨髓 (全身麻醉後於手術進行中)。在抽取骨髓前, 空針內有加入 2cc 的肝素以預防凝結。淬取人? 間質幹細胞之步驟包含了加入 2cc 的 PBS, 於攝氏 25 度下離心 (300rpm) 將上清液用吸管移除。然後加入 5cc PBS 和剩餘液體混合, 以及 5cc Percoll (1.073g/ml, 95%) 然後再重覆於攝氏 25 度下離心 (3000rpm) 將中間層移到另一試管, 再加入 5cc 的 PBS, 再離心十分鐘。再將上清物頡去除。留下次物質加入 5CC 的 DMEM 和 10% 的小牛血清。細胞生長且上清液每三天更換一次, 之後細胞被移植於 96 孔洞之細胞盤以準備接受震波治療。



## 震波之給予

\* 使用之機器：利用德國 OrthoWave 骨科震波治療設備圖(MTS Medical



圖五 OrthoWave 骨科震波儀器

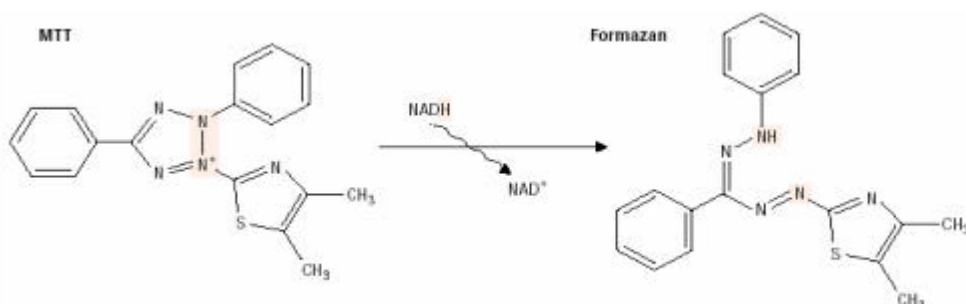
- \* 震波是由電極棒於水中產生
- \* 每個孔洞 (well) 內含有 20000 顆細胞，分別接受 0.14、0.29、0.55mJ/mm<sup>2</sup>，次數分別為 0、250、500、750，1000 次。震波之作用時間依據次數和能階不同而有所差異其範圍為 2 至 20 分鐘。在給予震波前細胞盤 (plate) 上覆蓋保護塑膠膜而在前膠膜上塗上凝膠作為震波傳導介質。

## \* 細胞生存能力

為了測量人? 間質幹細胞經過震波治療之生存能力，我們採取 MTT 分析。為了依探究竟人體間質幹細胞對於震波之反應以及它對於不同能量密度及震波次數之關係我們分別使用 0.14、0.29、0.55 mJ/mm<sup>2</sup>，以及 Q 250、500、750、1000 次分別作用於幹細胞，每種試驗均進行三次。且於震波治療後 1 小時來測定。

原理：

MTT assay 是一種應用常見於分析細胞增生(cell proliferation)、存活率(percent of viable cells)和細胞毒性(cytotoxicity)之的分析方法。此種分析方式是利用檢測細胞之粒線體內的酵素(succinate-tetrazolium reductase)活性來測定細胞的生長狀態，進而得知相對的細胞比例。只有正常存活的細胞可將MTT 代謝成水不溶性的formazan，其反應是如下：



使用試劑：

(1) MTT 配製：(避光4 儲存)

(2) Solubilization solution 配製：(室溫儲存)

步驟：

- 將細胞分到平底96-well plates中。
- 以serum-free 之medium 將細胞同步化24 小時。
- 將medium置換成15% serum之medium，並分別加入不同濃度藥物到總體積為100  $\mu$  l。另外還各需一組positive control 和negative control。
- 過20 小時後，避光下於各wells 加入10  $\mu$  l 的MTT (添加量為medium 體積的1/10)。
- 再經過4 小時後各wells 加入100  $\mu$  l 的solubilization solution 終止反應並溶解formazan salt。
- 放於培養箱中經過隔夜(overnight)，以ELISA reader 在0.D 590 下測定。

注意事項：

1. 可加熱37 幫助SDS 溶解，再加入HCl。
2. 一般使用96-well plates 時，四周的wells 不進行實驗，只需加入200  $\mu$  l 之PBS 或DDW防止水分蒸發而影響實驗數據。

## TGF- 1

為了依探究人體間質幹細胞對於震波之反應以及它對於不同能量密度及震波次數之關係我們分別使用 0.14、0.29、0.55 mJ/mm<sup>2</sup>，以及 Q 250、500、750、1000 次分別作用於幹細胞，每種試驗均進行三次。且於震波治療後 6、12、24、48 小時來淬取上清液來測量 TGF- 1 之濃度。將上清液分離後，冰存攝氏零下 70 度留待檢驗。

使用德國 R&D Systems 公司製造之 Human TGF-beta1 Immunoassay 商業化酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測劑測定。

### 步驟：

- ↓加入 0.1ml 的 1N HCl 至 0.5ml 的 cell culture supernatant 中混勻後，  
於室溫中 incubated 10 分鐘
- ↓加入 0.1ml 的 1.2N NaOH/0.5M HEPES 後，即可立即分析  
(4X dilute →125 μl 的 activated sample 加 375 μl 的 calibrator diluent RD 6M)
- ↓準備所有試劑，並取出 96 well plate

- ↓每一個 well 中加入 200  $\mu$ l 的 standard control 或是 activated sample, 使用 adhesive strip 覆蓋, 於室溫中 incubated 2 小時
- ↓使用 wash buffer 清洗 3 次(每個 well 加入 400  $\mu$ l)
- ↓盡量將 plate 中的水分清除乾淨
- ↓加入 200  $\mu$ l 的 TGF- $\beta$ 1 conjugate 至每一個 well 中後, 使用 adhesive strip 覆蓋, 於室溫中 incubated 1.5 小時
- ↓使用 wash buffer 清洗 3 次(每個 well 加入 400  $\mu$ l)
- ↓盡量將 plate 中的水分清除乾淨
- ↓加入 200  $\mu$ l 的 substrate solution 至每一個 well 中, 使用 adhesive strip 覆蓋, 於室溫中 incubated 30 分鐘(color reagent A 加 color reagent B, 使用前 15 分鐘配置, 需要避光)
- ↓加入 50  $\mu$ l 的 stop solution 至每一個 well 中
- ↓使用 450 nm 測吸光值  
correction 為 540nm 或 570 nm

§注意事項：

- (1)culture medium 若有使用 FBS, 因為 FBS 中含有大量的 TGF- $\beta$ 1, 所以必須在扣除 FBS 中的 TGF- $\beta$ 1 含量。

## VEGF

為了依探究人體間質幹細胞對於震波之反應以及它對於不同能量密度及震波次數之關係我們分別使用 0.14、0.29、0.55 mJ/mm<sup>2</sup>，以及 Q 250、500、750、1000 次分別作用於幹細胞，每種試驗均進行三次。且於震波治療後 6、12、24、48 小時來淬取上清液來測量 VEGF 之濃度。將上清液分離後，冰存攝氏零下 70 度留待檢驗。

使用德國 R&D Systems 公司製造之 Human VEGF Immunoassay 商業化酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測劑測定。

### 步驟：

- ↓準備所有試劑，並取出 96 well plate
- ↓加入 50 μl 的 assay diluent RD1W 至每一個 well 中
- ↓加入 50 μl 的 standard 或是 control sample 至每一個 well 中，使用 adhesive strip 覆蓋，於室溫中 incubated 2 小時
- ↓使用 wash buffer 清洗 3 次(每個 well 加入 400 μl)

↓盡量將 plate 中的水分清除乾淨

↓加入 200  $\mu$ l 的 VEGF conjugate 至每一個 well 中後，使用 adhesive strip 覆蓋，於室溫中 incubated 2 小時

↓使用 wash buffer 清洗 3 次(每個 well 加入 400  $\mu$ l)

↓盡量將 plate 中的水分清除乾淨

↓加入 200  $\mu$ l 的 substrate solution 至每一個 well 中，使用 adhesive strip 覆蓋，於室溫中 incubated 30 分鐘(color reagent A 加 color reagent B，使用前 15 分鐘配置，需要避光)

↓加入 50  $\mu$ l 的 stop solution 至每一個 well 中

↓使用 450 nm 測吸光值

correction 為 540nm 或 570 nm

## Basic FGF

為了依探究人體間質幹細胞對於震波之反應以及它對於不同能量密度及震波次數之關係我們分別使用 0.14、0.29、0.55 mJ/mm<sup>2</sup>，以及 Q 250、500、750、1000 次分別作用於幹細胞，每種試驗均進行三次。且於震波治療後 6、12、24、48 小時來淬取上清液來測量 basic FGF 之濃度。將上清液分離後，冰存攝氏零下 70 度留待檢驗。

使用德國 R&D Systems 公司製造之 Human basic FGF Immunoassay 商業化酵素連結免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測劑測定。

### 步驟：

- ↓準備所有試劑，並取出 96 well plate
- ↓加入 100 μl 的 assay diluent RD1-43 至每一個 well 中後
- ↓加入 100 μl 的 standard 或 sample 至每一個 well 中，使用 adhesive strip 覆蓋，於室溫中 incubated 2 小時
- ↓使用 wash buffer 清洗 3 次(每個 well 加入 400 μl)
- ↓盡量將 plate 中的水分清除乾淨



- ↓加入 200  $\mu$  l 的 FGF basic conjugate 至每一個 well 中後，使用 adhesive strip 覆蓋，於室溫中 incubated 2 小時
- ↓使用 wash buffer 清洗 3 次(每個 well 加入 400  $\mu$  l)
- ↓盡量將 plate 中的水分清除乾淨
- ↓加入 200  $\mu$  l 的 substrate solution 至每一個 well 中，使用 adhesive strip 覆蓋，於室溫中 incubated 30 分鐘(color reagent A 加 color reagent B，使用前 15 分鐘配置，需要避光)
- ↓加入 50  $\mu$  l 的 stop solution 至每一個 well 中
- ↓使用 450 nm 測吸光值  
correction 為 540nm 或 570 nm

## 資料處理與分析方法

實驗結果以平均值 ± 標準差 (Mean ± SD) 表示，統計誤差使用 Student ' s t - test 來決定實驗組與對照組之差異。當  $p < 0.05$  時，顯示統計上具顯著差異。本論文每一試驗，每處理至少三重複。

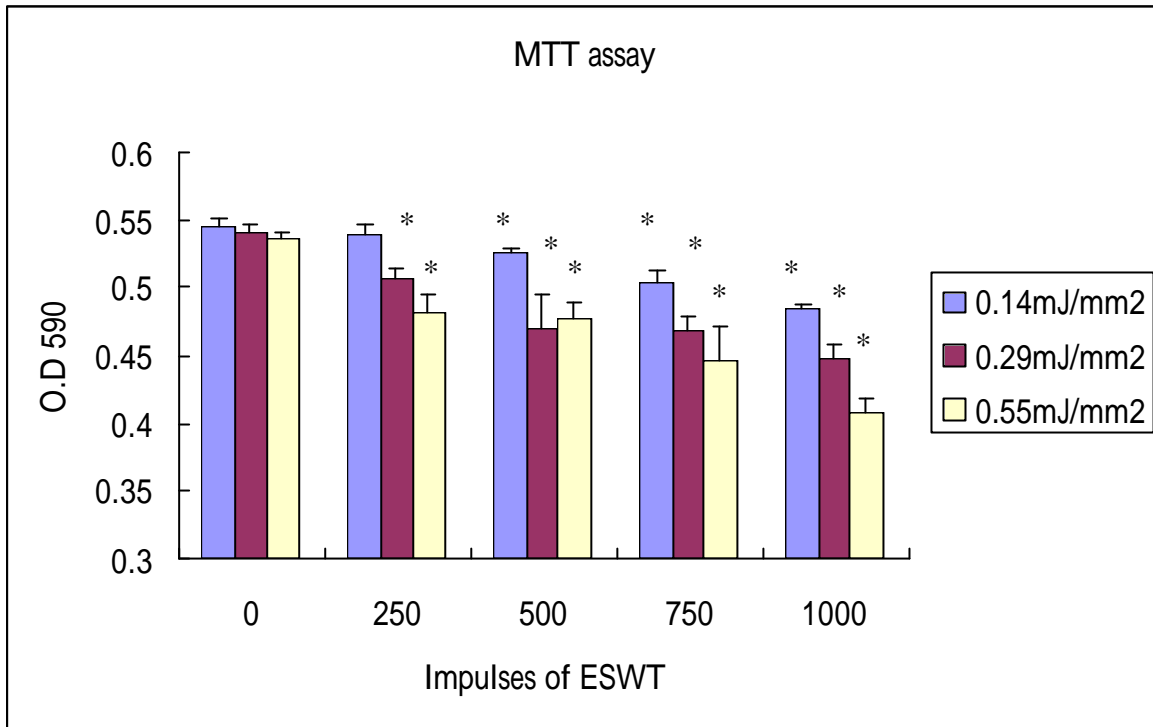
## 第五章 研究結果

### ● 細胞生存能力 (Viability)

為了測量人? 間質幹細胞經過震波治療之生存能力，我們採取 MTT 分析。為了依探究竟人體間質幹細胞對於震波之反應以及它對於不同能量密度及震波次數之關係我們分別使用 0.14、0.29、0.55 mJ/mm<sup>2</sup>，以及 Q 250、500、750、1000 次分別作用於幹細胞，每種試驗均進行三次。且於震波治療後 1 小時來測定。其結果可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>作用 250 次其 Viability 和對照組無顯著統計學差異 (p >0.05)。而其餘條件下 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 500、750、1000 次，0.29 mJ/mm<sup>2</sup>作用 250、500、750、1000 次及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 250、500、750、1000 次下其 Viability 和對照組均有顯著統計學差異 (p <0.05) [圖六]。

在相同脈波次數下，使用 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 能階其 Viability 和使用 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階具有顯著統計學差異 (p<0.05)。

就 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 下作用 1000 次、0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 下作用 500 次以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 下作用 250 次就其細胞存活率而言，三者之間並無統計學之差異(p 值大於 0.05)。



圖六 人類間質幹細胞經過震波治療後 1 小時之生存能力。可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 250 次其 Viability 和對照組無顯著統計學差異 (p > 0.05)。而其餘條件下和對照組均有顯著統計學差異 (p < 0.05)。\* 符號代表和對照組相比具有顯著統計學差異 (p < 0.05)。

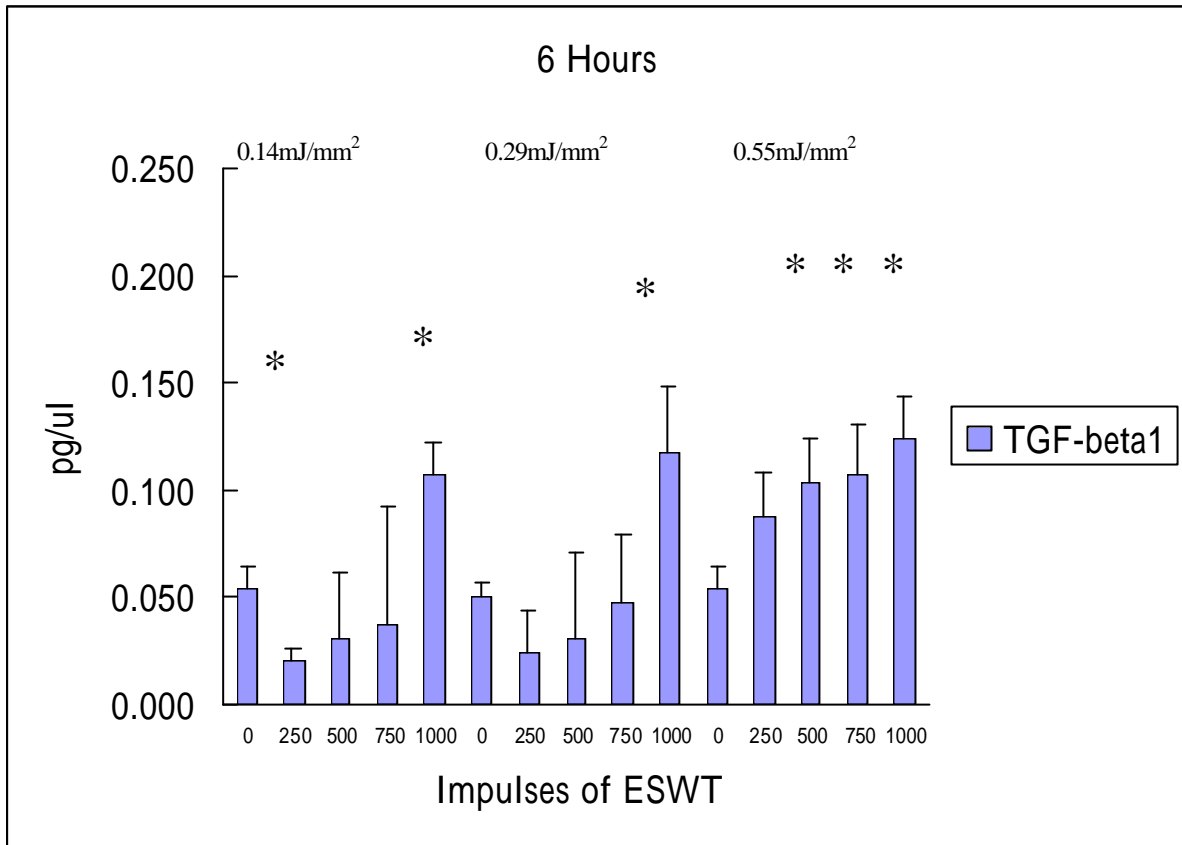
## TGF- 1

將人類間質幹細胞種植在 96 孔盤中,分別以  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  之能量給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6 小時淬取上清液,利用 ELISA 法得到 TGF- 1 之濃度 [圖七-十]。其中可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250 次、1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 1000 次震波治療, 以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 500、750、1000 次震波治療, 其 TGF- 1 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 12 小時所得到之結果可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 750、1000 次震波治療, 以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 500、750、1000 次震波治療, 其 TGF- 1 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 24 小時所得到之結果可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 500、750、1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療, 以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250 次震波治療, 其 TGF- 1 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 48 小時所得到之結果可發現在  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 750、1000 次震波治療, 其 TGF- 1 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。

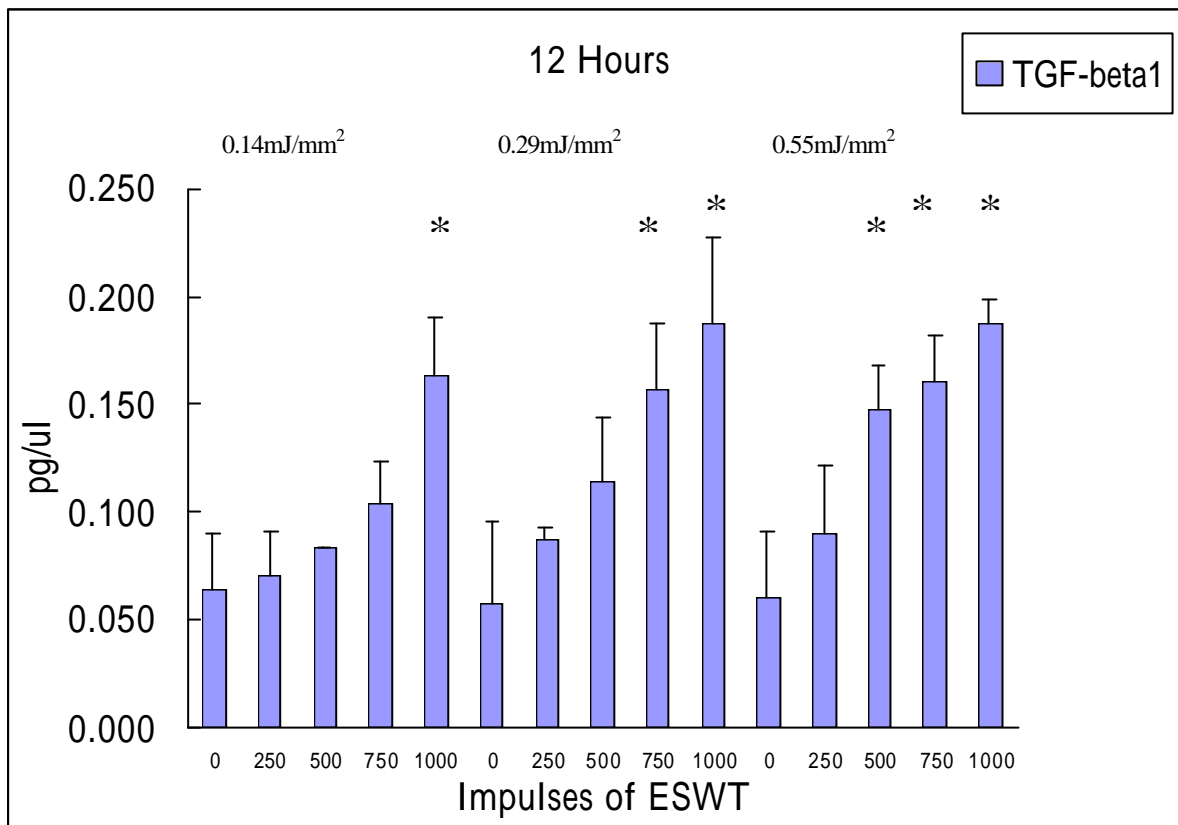
此外我們可發現在相同能階下, 於震波治療於 12、24 小時後其 TGF- 1 之分泌濃度隨著震波次數的增加而上升, 除了在  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下作

用 24 小時後其 TGF- $\beta$  1 之分泌濃度並不隨著震波次數而上升[圖十一-十三]。此外我們可發現在不同劑量下，其 TGF- $\beta$  1 於 24 小時所得到之濃度達到高峰，除了在 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下作用 750-1000 次震波治療，而其 TGF- $\beta$  1 分泌濃度之高峰提早於震波治療後 12 小時[圖十一-十三]。

在同一能量下，我們觀察作用能階和作用次數之效應。我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 1000 次震波治療，於 6、12 小時其 TGF- $\beta$  1 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 500 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250 次震波治療[圖十四]。

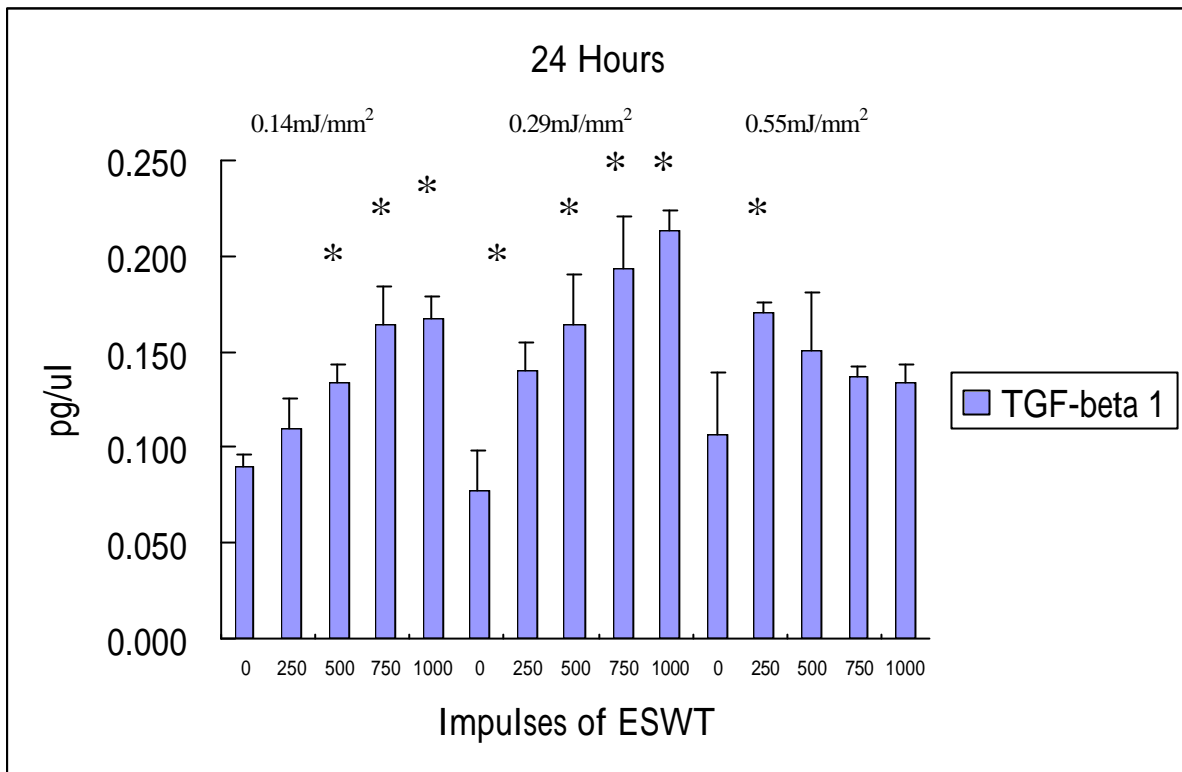


圖七 震波治療後 6 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 TGF- 1 之濃度。\* 符號代表 TGF- 1 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 (  $p < 0.05$  )。

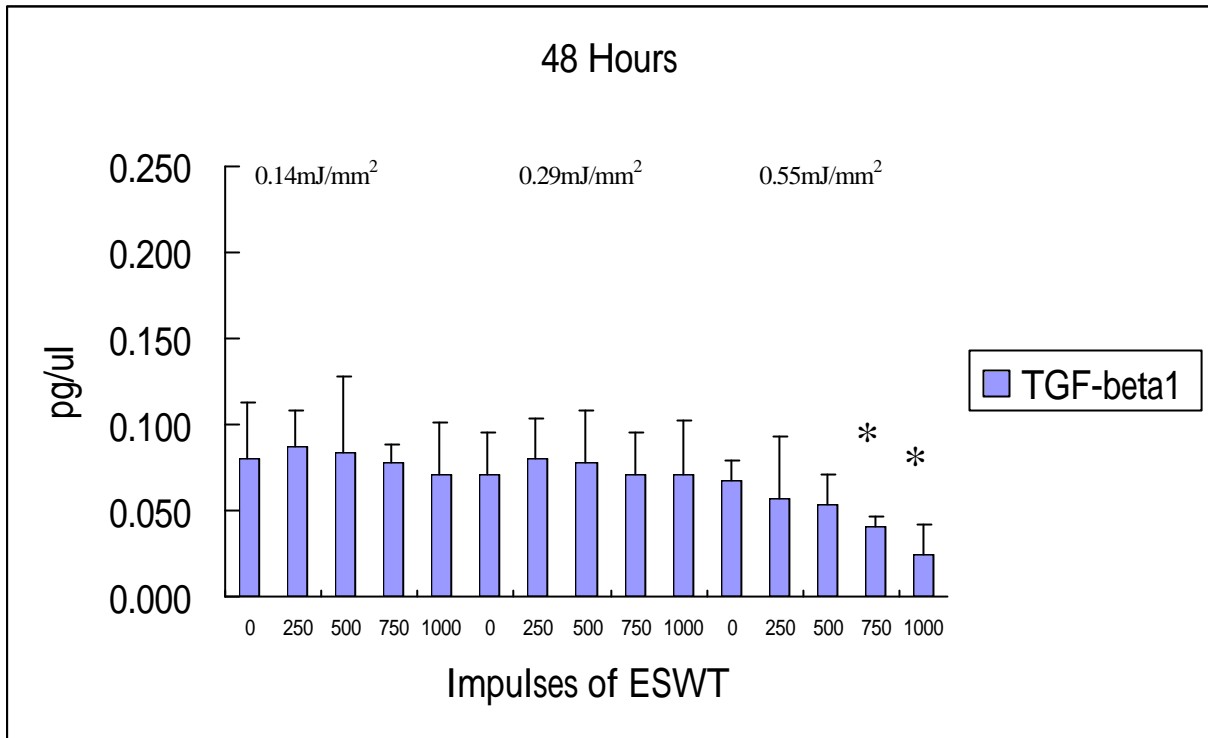


圖八 震波治療後 12 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 TGF- 1 之濃度。\* 符號代表 TGF- 1 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 (  $p < 0.05$  )。

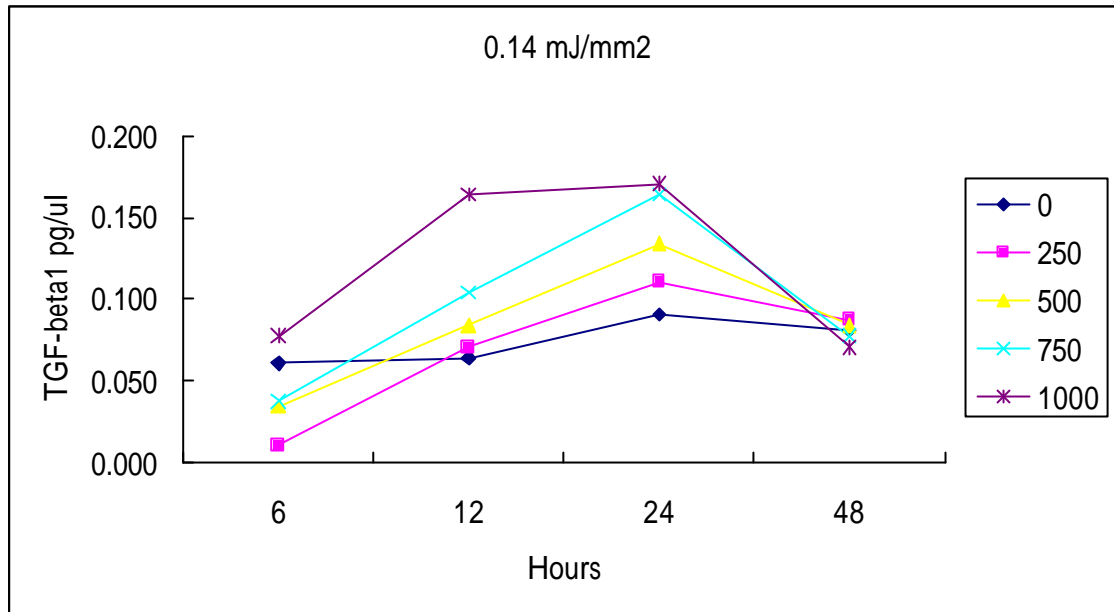




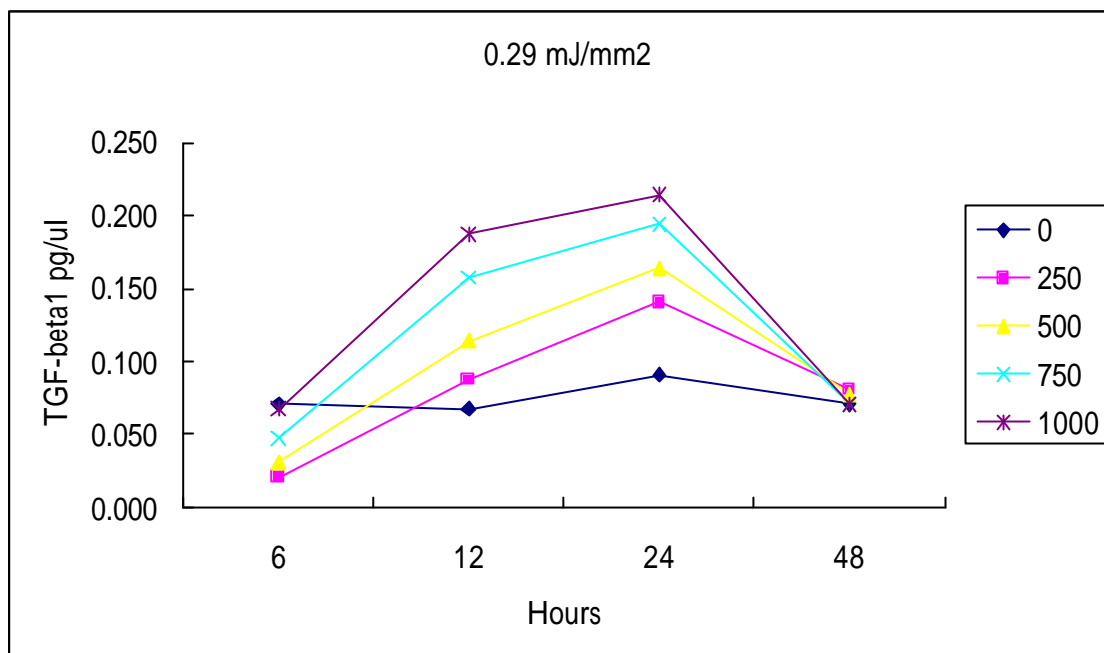
圖九 震波治療後 24 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 TGF- 1 之濃度。\* 符號代表 TGF- 1 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 (  $p < 0.05$  )。



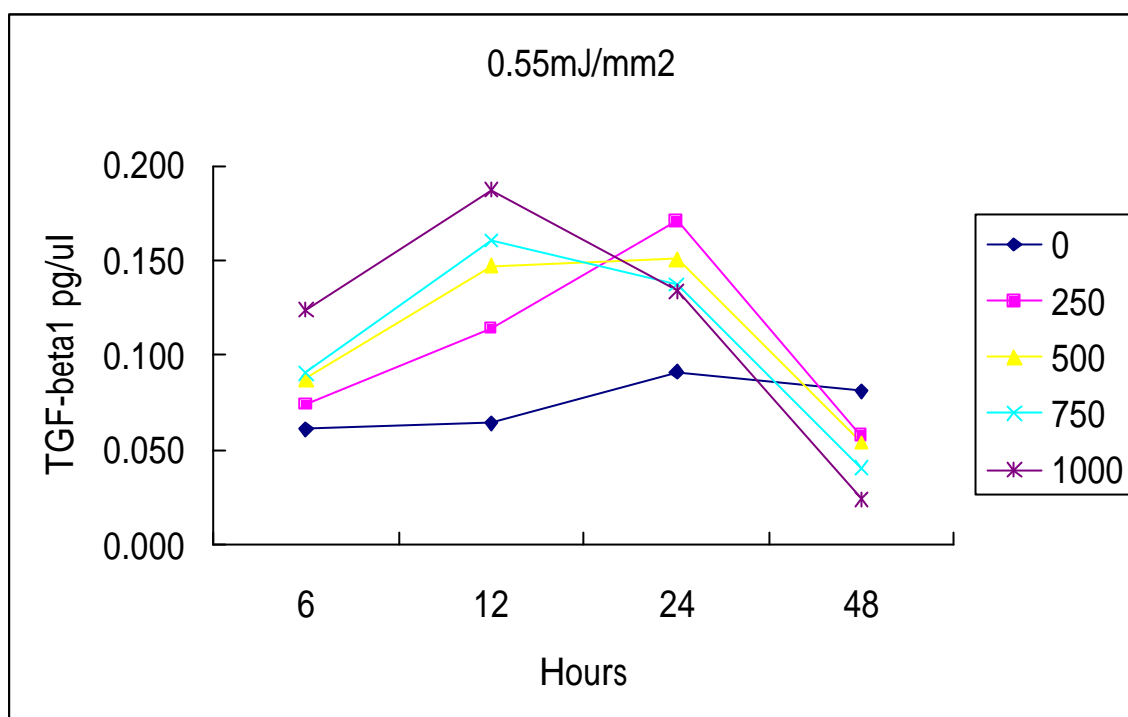
圖十 震波治療後 48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 TGF- 1 之濃度。\* 符號代表 TGF- 1 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 (  $p < 0.05$  )。



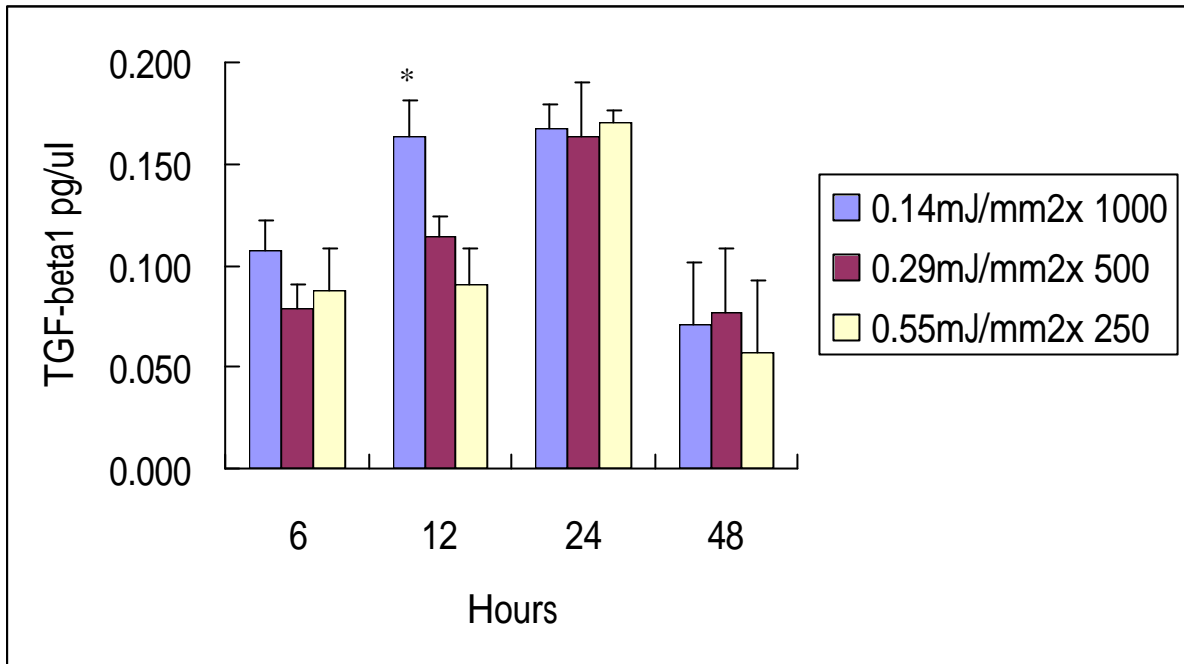
圖十一 在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 TGF-β1 之濃度。我們可發現在不同震波治療次數下，其 TGF-β1 於 24 小時所得到之濃度達到高峰且 TGF-β1 分泌之濃度隨著次數增加而上升。



圖十二 在  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 TGF- $\beta$ 1 之濃度。我們可發現在不同震波治療次數下，其 TGF- $\beta$ 1 於 24 小時所得到之濃度達到高峰且 TGF- $\beta$ 1 分泌之濃度隨著次數增加而上升。



圖十三 在  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 TGF- $\beta$ 1 之濃度。我們可發現震波治療在 0、250、500 次數下，其 TGF- $\beta$ 1 於 24 小時得到之濃度達到高峰。其中接受 750、1000 次震波治療組中，其 TGF- $\beta$ 1 之濃度於 12 小時得到之濃度高峰。



圖十四 同一能量下其作用能階和作用次數對於分泌 TGF- $\beta$ 1 濃度之效應。我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 1000 次震波治療，於 6、12 小時其 TGF- $\beta$ 1 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 500 次震波治療,以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 250 次震波治療。\* 符號代表具有顯著統計學差異 ( p<0.05 )。

- VEGF

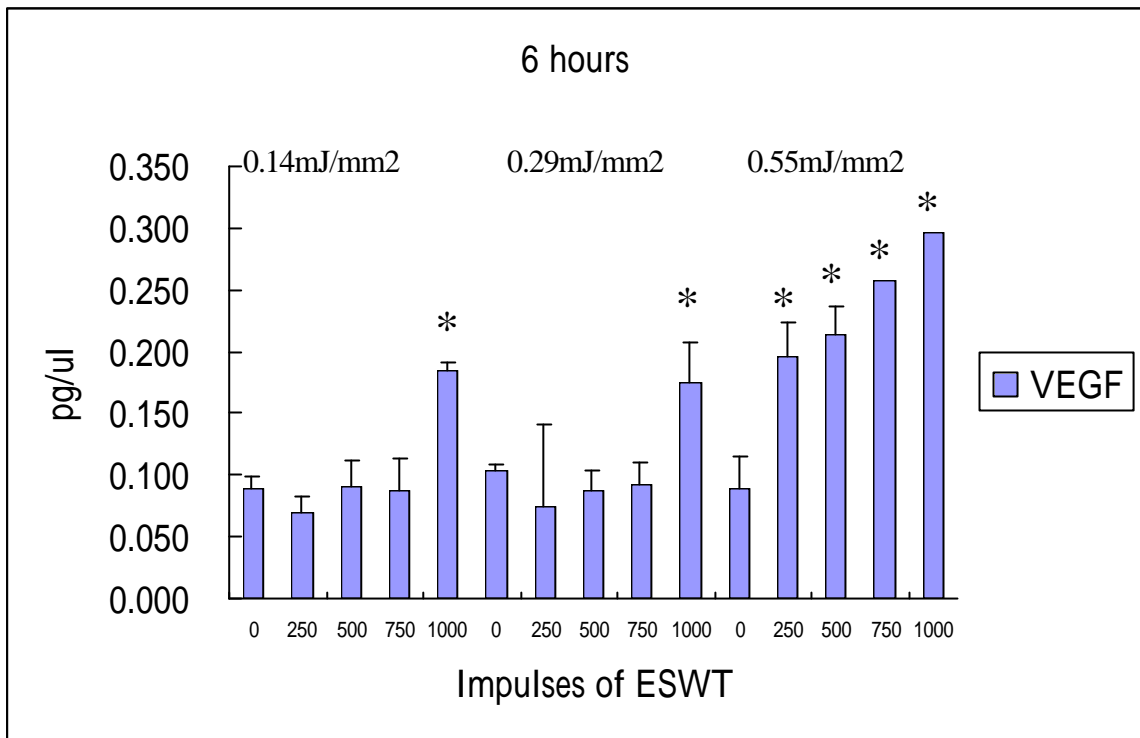
將人類間質幹細胞種植在 96 孔盤中,分別以  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  之能量給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6 小時淬取上清液,利用 ELISA 法得到 VEGF 之濃度[圖十五-十八]。其中可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 1000 次震波治療,以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療,其 VEGF 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 12 小時所得到之結果可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療,以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療,其 VEGF 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 24 小時所得到之結果可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 500、750、1000 次震波治療,以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療,其 VEGF 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 48 小時所得到之結果可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500 次震波治療,以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 500、1000 次震波治療,其 VEGF 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。

此外我們可發現在相同能階下，如 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>、0.29 mJ/mm<sup>2</sup>、0.55 mJ/mm<sup>2</sup>能階下，於震波治療於 24 小時後其 VEGF 分泌濃度隨著震波次數的增加而上升。此外我們可發現在不同劑量下，其 VEGF 濃度於 24 小時達到高峰，除了在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 250、500、750 次震波治療和在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 250 次震波治療作用 48 小時後，其 VEGF 之分泌濃度並不下降反而持續向上攀升[圖十九-二十一]。

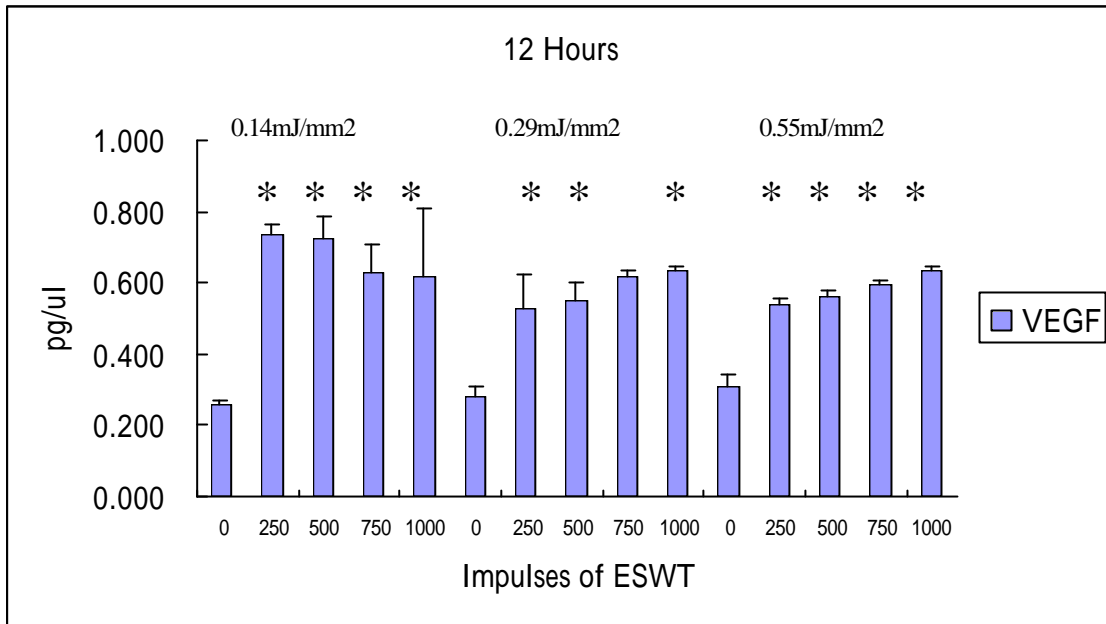
此外我們可發現在相同脈波次數下，0.55 mJ/mm<sup>2</sup>下其 VEGF 在 24 小時之生成濃度和 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>、0.29 mJ/mm<sup>2</sup>相比具有顯著統計學差異( $p < 0.05$ ) [圖十七]。此外我們可發現在相同脈波次數下，0.14 mJ/mm<sup>2</sup>下其 VEGF 在 48 小時之生成濃度和 0.29 mJ/mm<sup>2</sup>、0.55 mJ/mm<sup>2</sup>相比具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ ) [圖十八]。

在同一能量下，我們觀察作用能階和作用次數之效應。我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 1000 次震波治療，於 24、48 小時其 VEGF 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 500 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 250 次震波治療[圖二十二]。



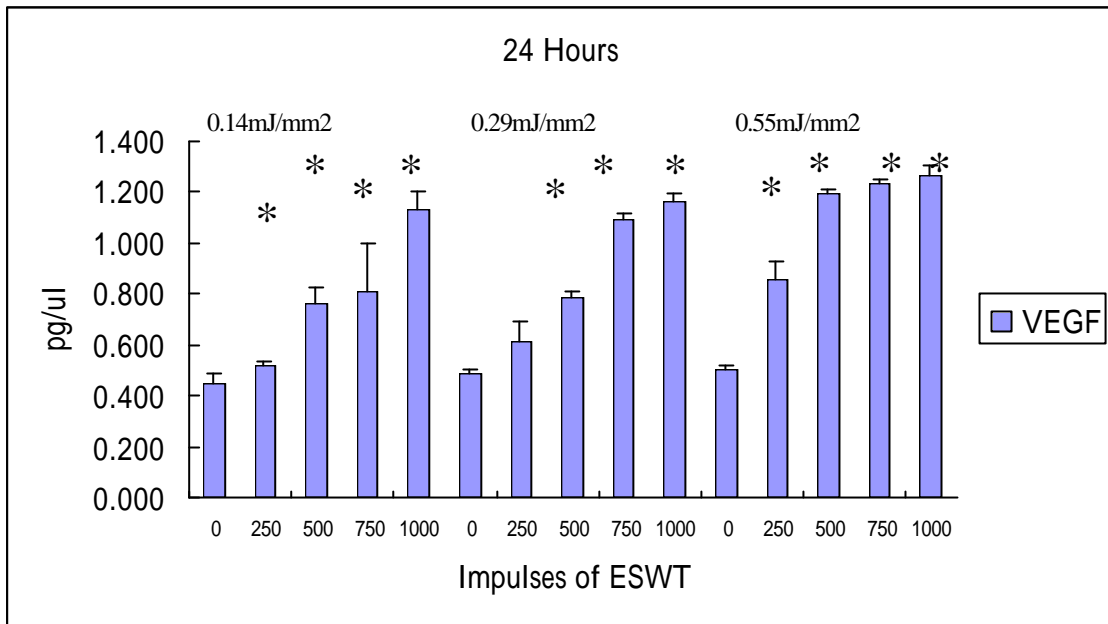


圖十五 震波治療後 6 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 VEGF 之濃度。\* 符號代表 VEGF 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 (  $p < 0.05$  )。

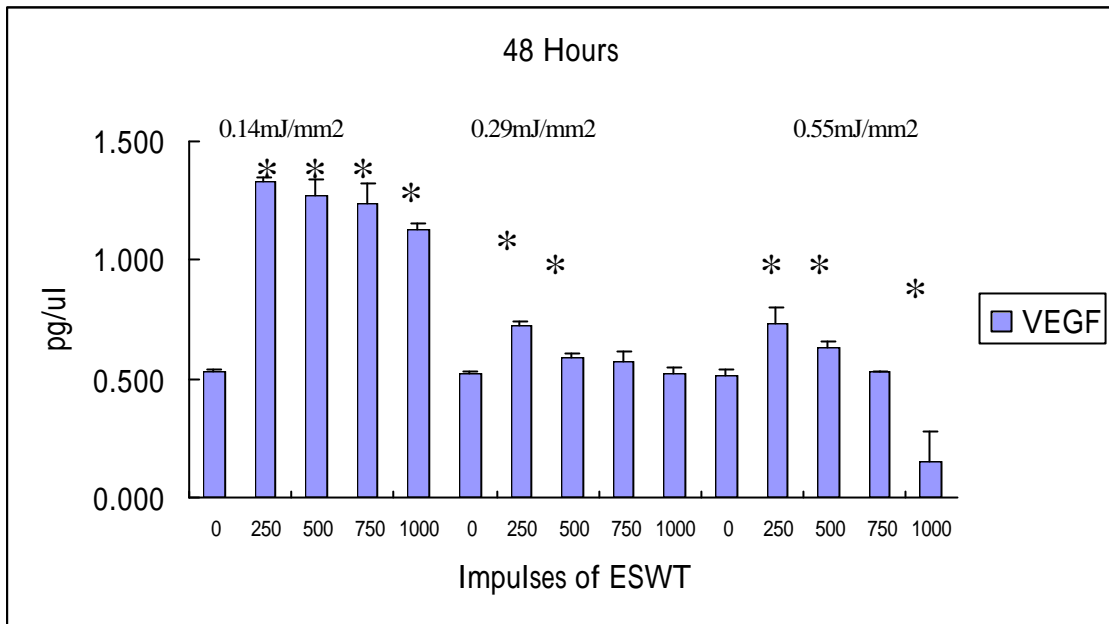


圖十六 震波治療後 12 小時淬取上清液, 利用 ELISA 法得到 VEGF 之濃度

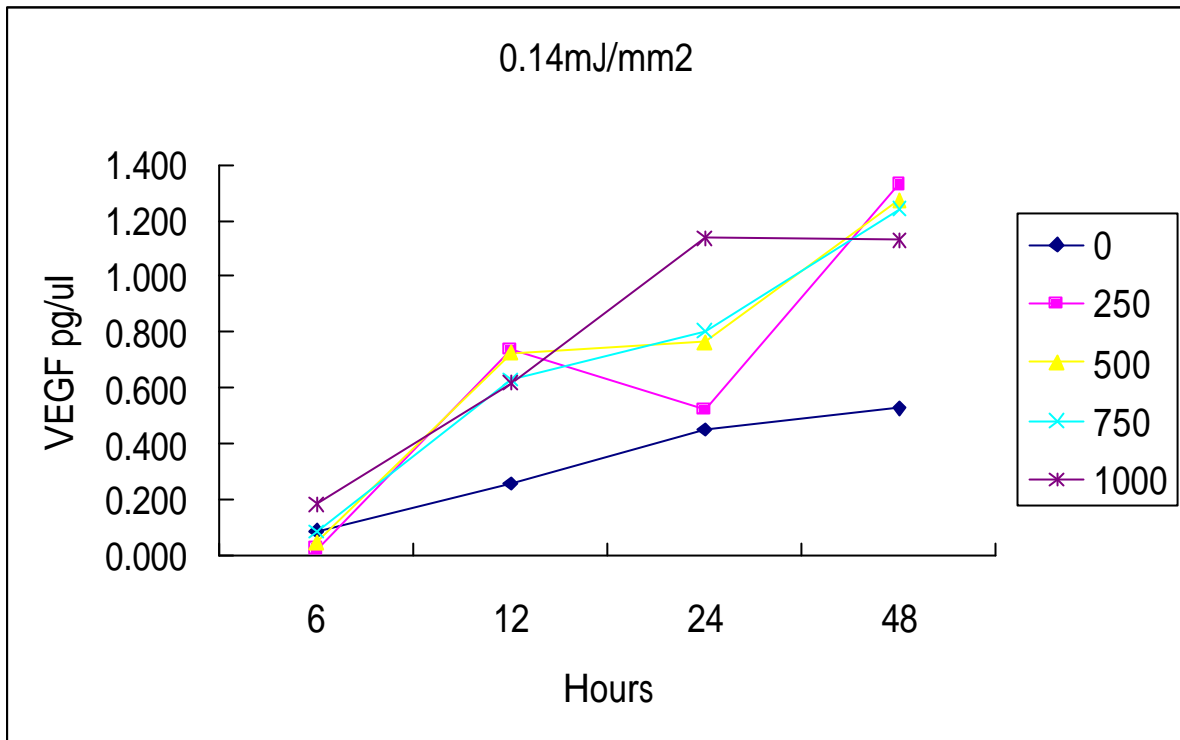
\* 符號代表 VEGF 之濃度和對照組相比具有顯著統計學差異 (  $p < 0.05$  )。



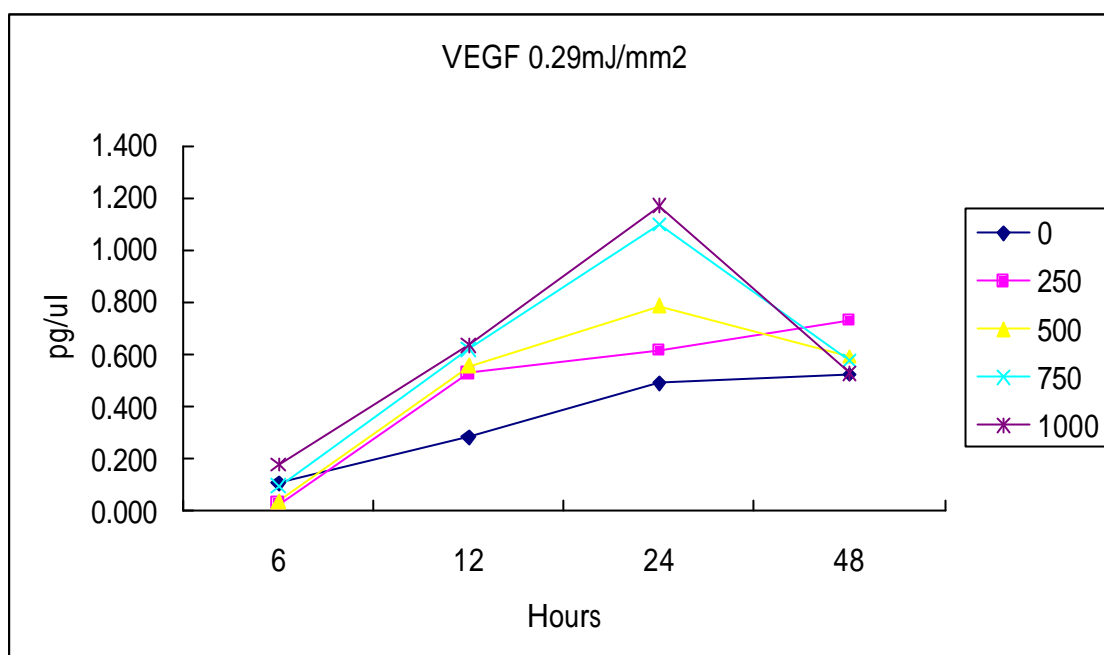
圖十七 震波治療後 24 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 VEGF 之濃度。\* 符號代表 VEGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 (  $p < 0.05$  )。此外我們可發現在相同脈波次數下，0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 下其 VEGF 之生成濃度和 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>、0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 相比具有顯著統計學差異 (  $p < 0.05$  )。



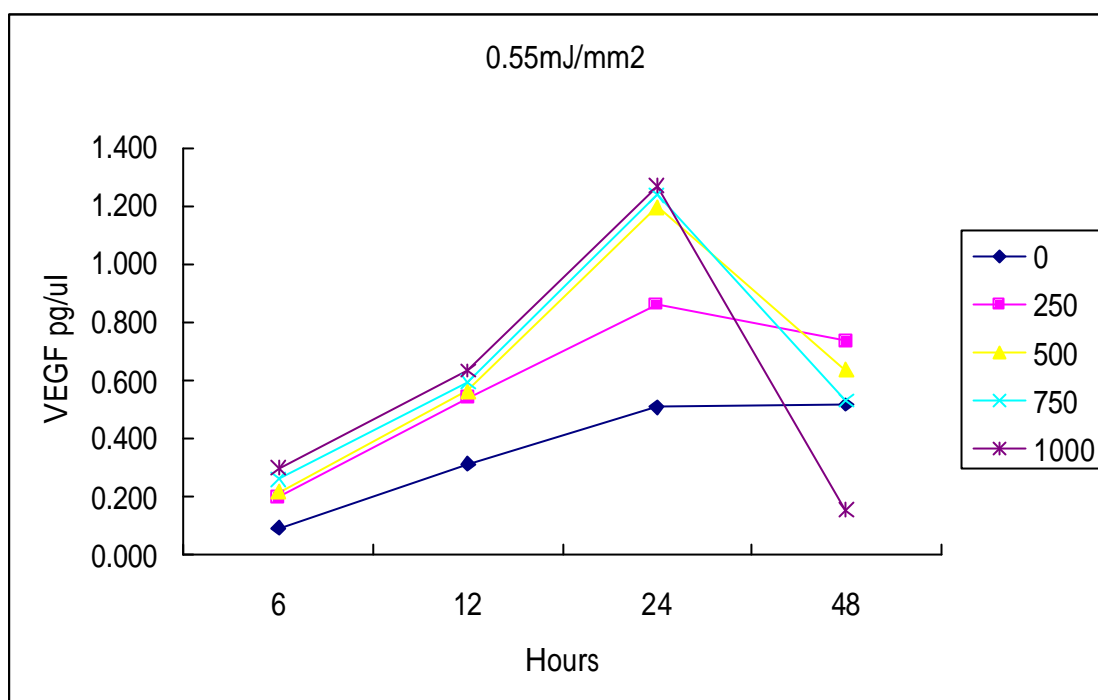
圖十八 震波治療後 48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 VEGF 之濃度。\* 符號代表 VEGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 (  $p < 0.05$  )。此外我們可發現在相同脈波次數下， $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  下其 VEGF 之生成濃度和  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  相比具有顯著統計學差異 (  $p < 0.05$  )。



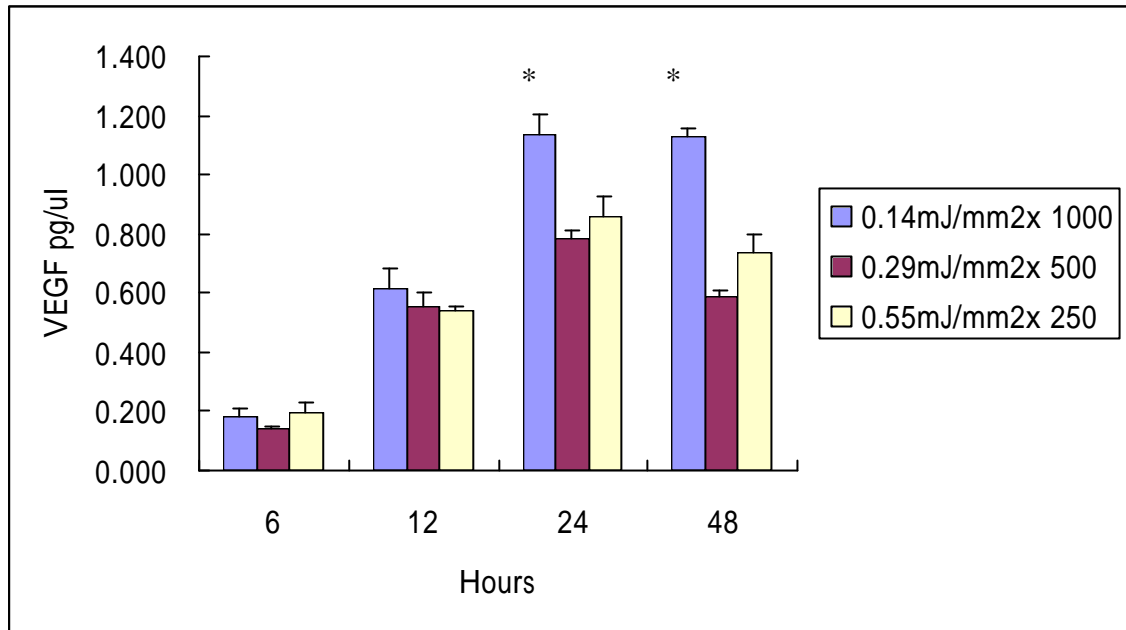
圖十九 在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 VEGF 之濃度。我們可發現在不同震波治療次數下，其 VEGF 於 6 小時就開始上升，然後持續上升。除了接受 1000 次震波治療組中，其 VEGF 分泌濃度於 48 小時開始下降。



圖二十 在  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時萃取上清液，利用 ELISA 法得到 VEGF 之濃度。我們可發現在不同震波治療次數下，其 VEGF 於於 6 小時就開始上升，24 小時所得到之濃度達到高峰，於 48 小時開始下降。除了接受 250 次震波治療組中，其 VEGF 於於 48 小時仍持續上升。



圖二十一 在  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 VEGF 之濃度。我們可發現在不同震波治療次數下，其 VEGF 於於 6 小時就開始上升，24 小時所得到之濃度達到高峰，於 48 小時開始下降。



圖二十二 在同一能量下，我們觀察作用能階和作用次數之效應。我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 1000 次震波治療，於 24、48 小時其 VEGF 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 500 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250 次震波治療。\* 符號代表具有統計學顯著差異 ( p<0.05 )。



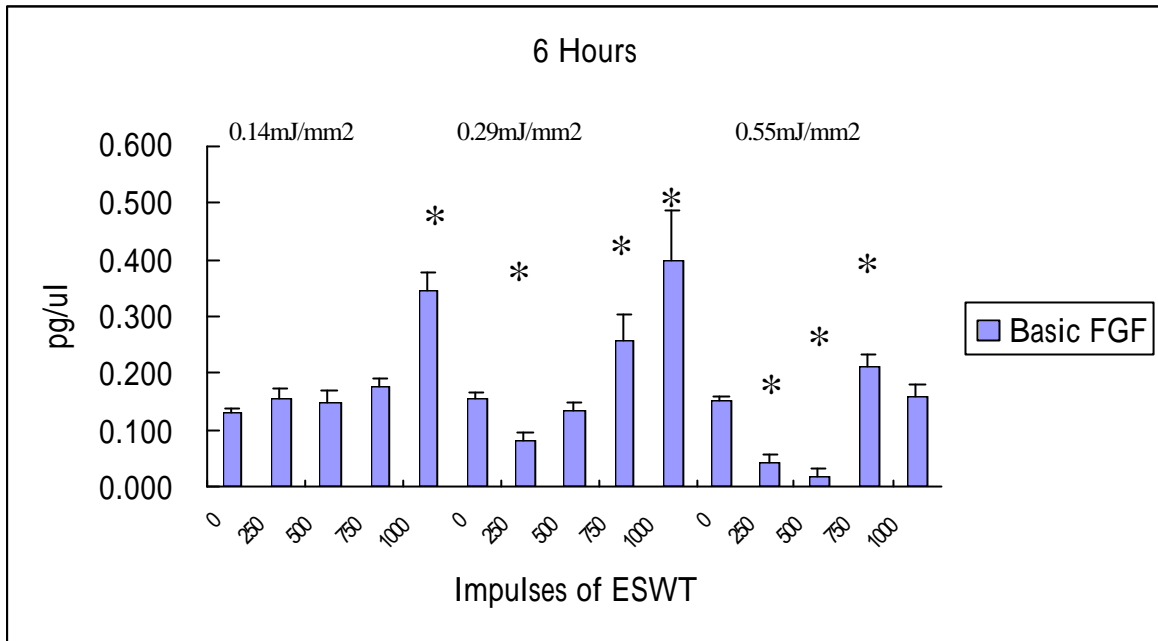
## Basic FGF

將人類間質幹細胞種植在 96 孔盤中,分別以  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  之能量給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6 小時淬取上清液,利用 ELISA 法得到 basic FGF 之濃度[圖二十三-二十六]。其中可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 1000 次震波治療,其 basic FGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 12 小時所得到之結果可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 1000 次震波治療,以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 50Q 75Q 1000 次震波治療,其 basic FGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 24 小時所得到之結果可發現在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 25Q 50Q 75Q 1000 次震波治療,  $0.29 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療,以及  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下接受 25Q 50Q 75Q 1000 次震波治療,其 basic FGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 ( $p < 0.05$ )。而依據上述法於 48 小時所得到之結果可發現在不同能量密度及震波次數下,其 basic FGF 之濃度和對照組相比均無具有統計學顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

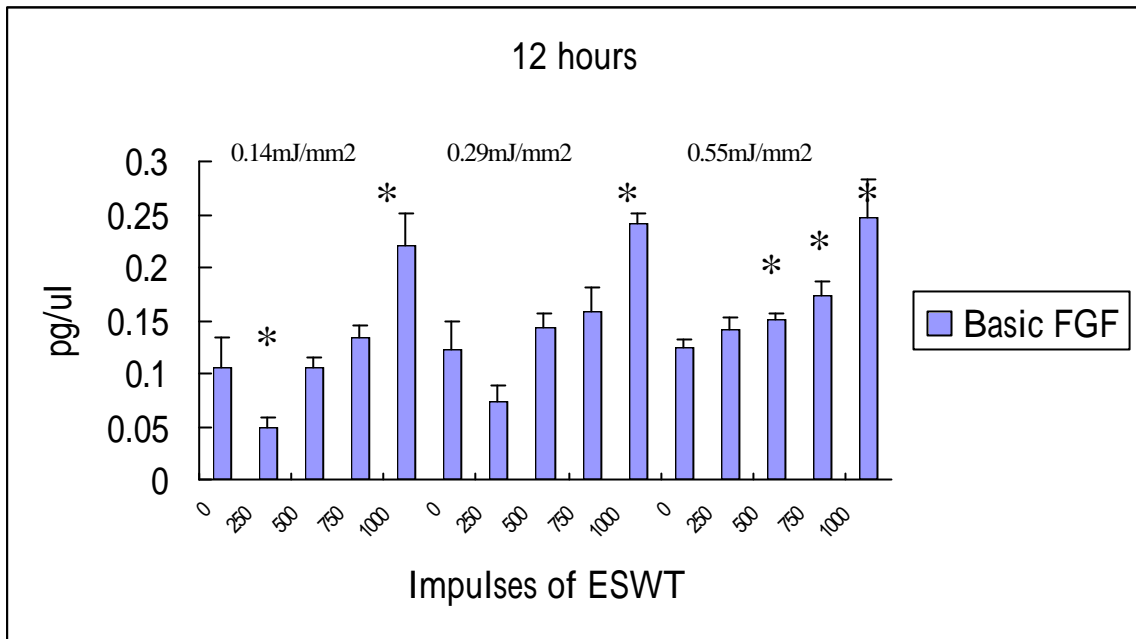
此外我們可發現在相同能階下,如  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.29 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  能階下,於震波治療於 24 小時後其 basic FGF 分泌濃度隨著震波次數的增加而上升並達到高峰[圖二十七-二十九]。

此外我們可發現在相同脈波次數 250、500、750，在 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下震波治療後 24 小時其 Basic FGF 之生成濃度和 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 相比具有顯著統計學差異 (p<0.05)。而對於 0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 下其 Basic FGF 之生成濃度相比則無具有顯著統計學差異 (p>0.05) [圖二十三-二十六]。

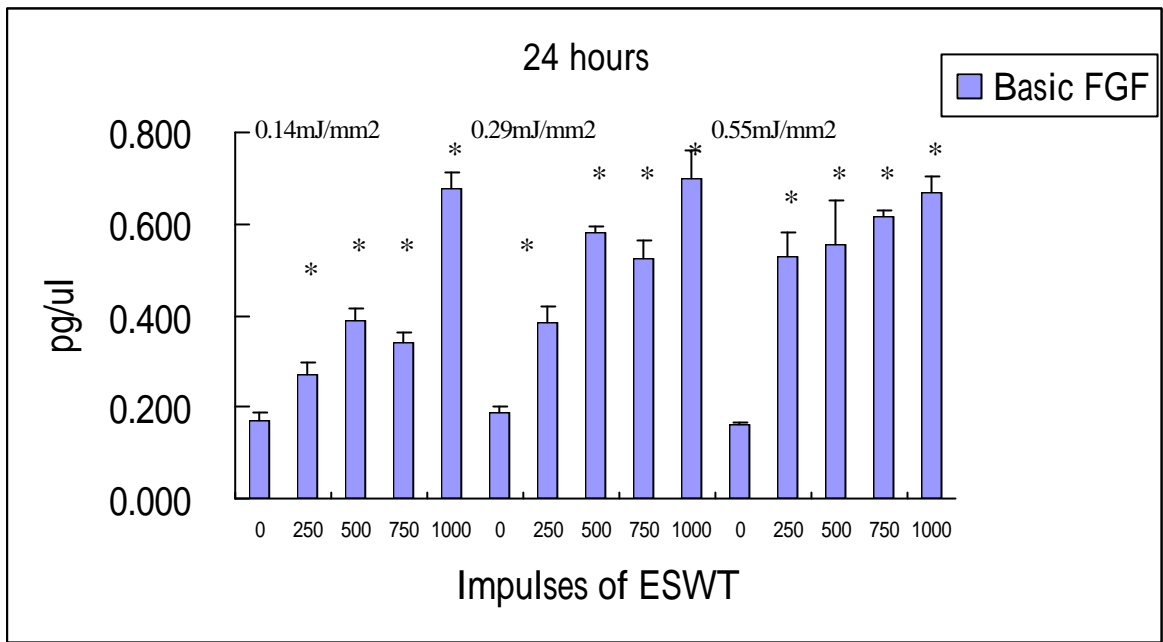
在同一能量下，我們觀察作用能階和作用次數之效應。我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 1000 次震波治療，於 6、12、24 小時其 basic FGF 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 500 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250 次震波治療 [圖三十]。



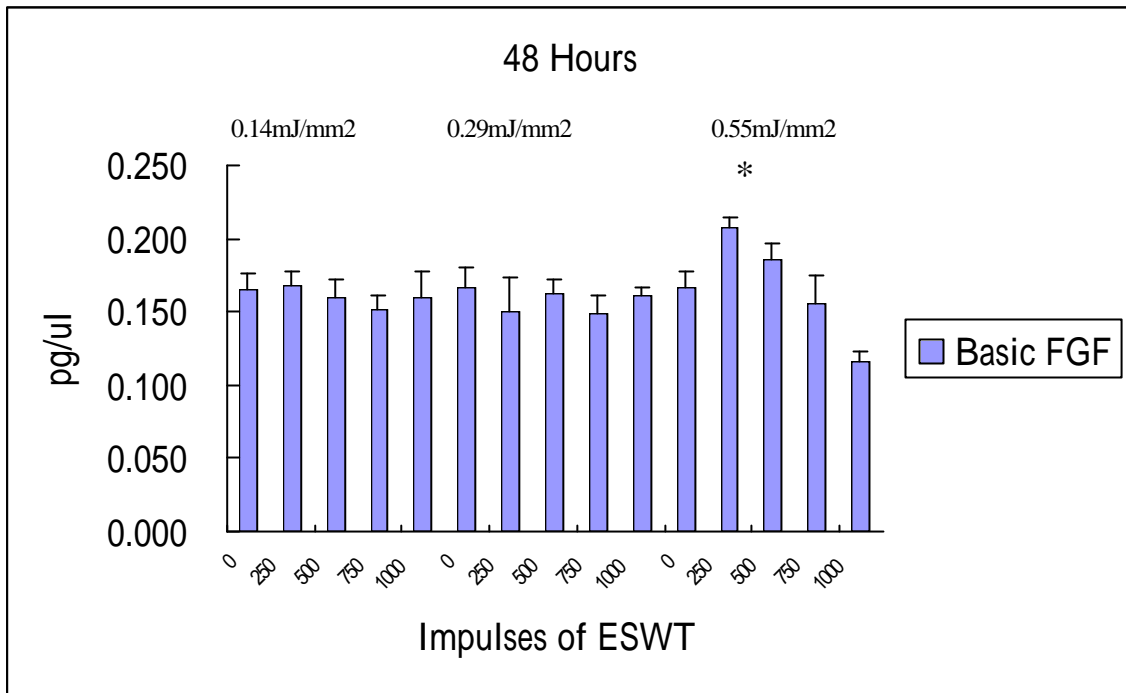
圖二十三 震波治療後 6 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 Basic FGF 之濃度。\* 符號代表 Basic FGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 (  $p < 0.05$  )。



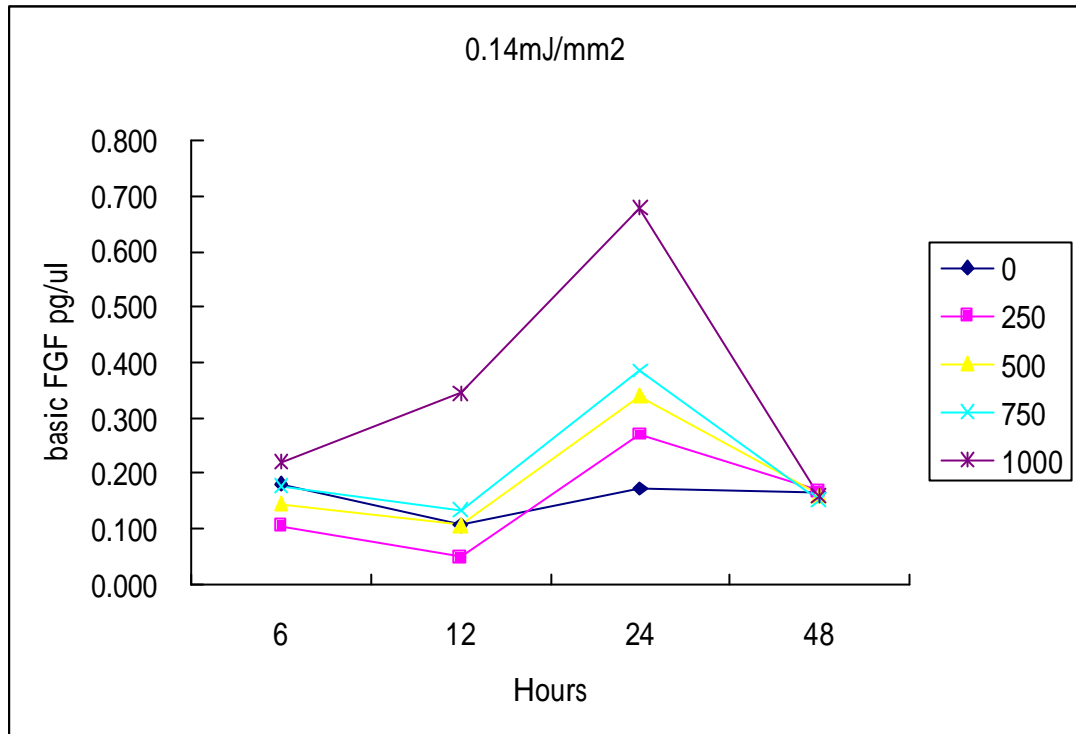
圖二十四 震波治療後 12 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 Basic FGF 之濃度。\* 符號代表 Basic FGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 (  $p < 0.05$  )。



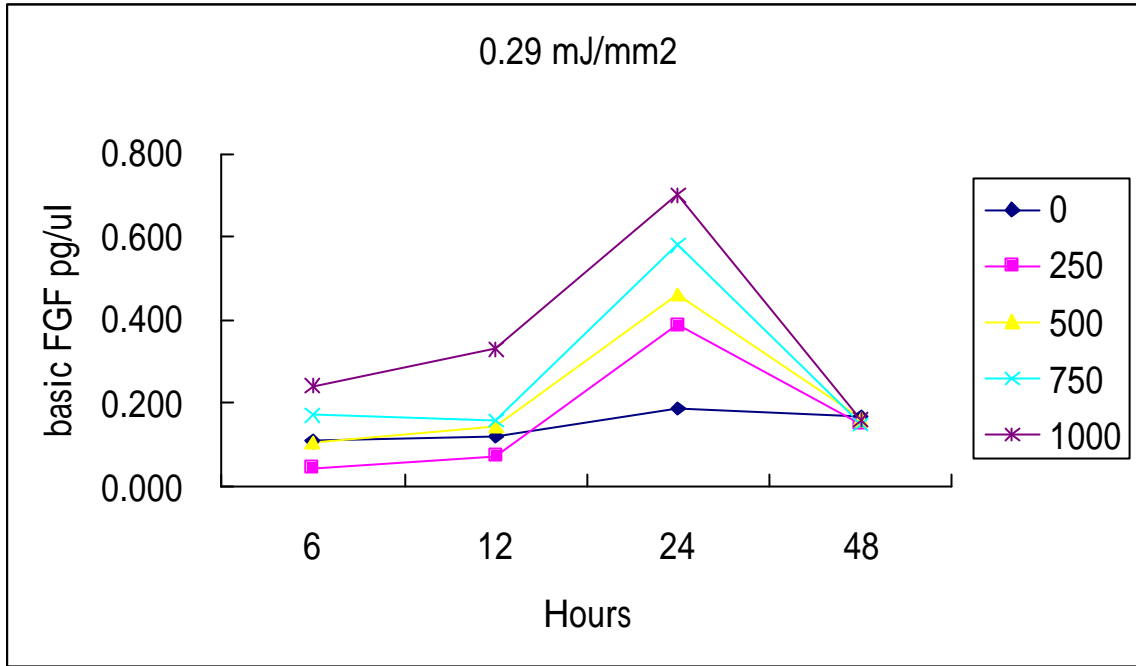
圖二十五 震波治療後24小時淬取上清液,利用ELISA法得到Basic FGF之濃度。\* 符號代表 Basic FGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 (p<0.05) 此外我們可發現在相同脈波次數 250, 500, 750 下, 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 下其 Basic FGF 之生成濃度和 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 下相比具有顯著統計學差異 (p<0.05)。



圖二十六 震波治療後48小時淬取上清液,利用ELISA法得到Basic FGF之濃度。\* 符號代表 Basic FGF 之濃度和對照組相比具有統計學顯著差異 (  $p < 0.05$  )。

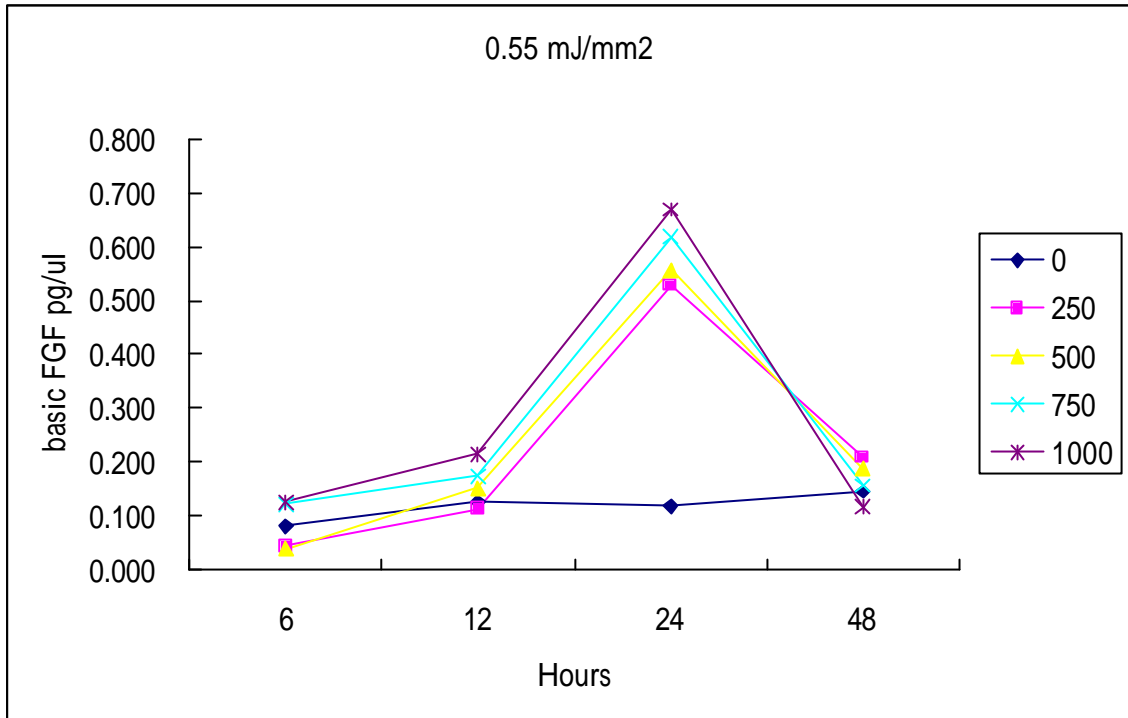


圖二十七 在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 basic FGF 之濃度。我們可發現在不同震波治療次數下，其 basic FGF 於 24 小時達到高峰，然後開始下降。其中接受 1000 次震波治療組中，其 basic FGF 之濃度於 12 小時就開始上升，此具有統計學顯著差異(p<0.05)。

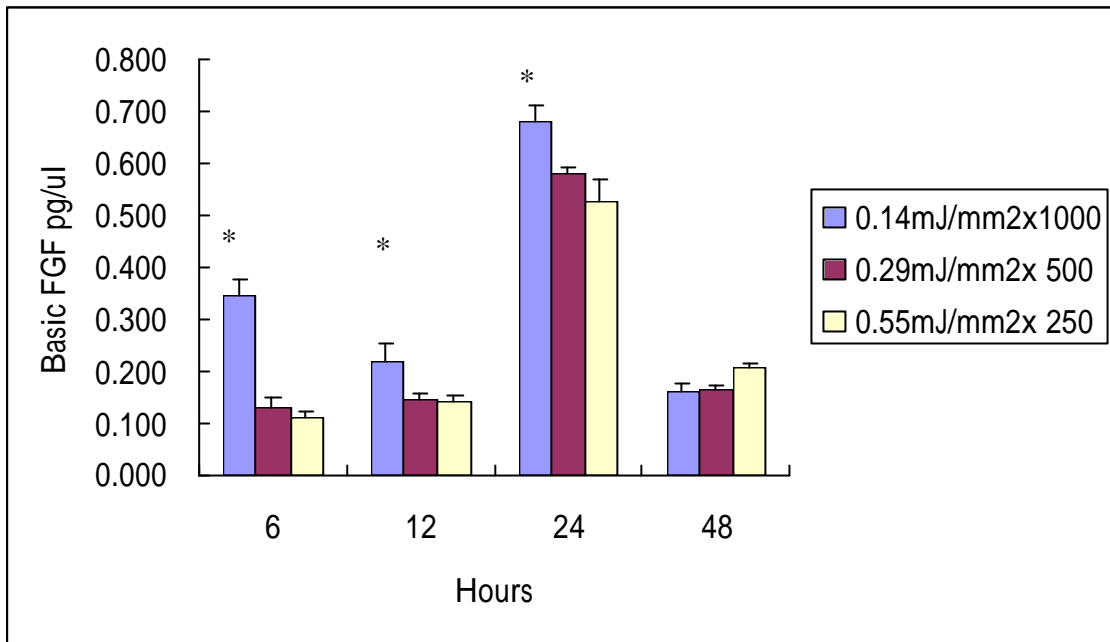


圖二十八 在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時萃取上清液，利用 ELISA 法得到 basic FGF 之濃度。我們可發現在不同震波治療次數下，其 basic FGF 於 24 小時達到高峰，然後開始下降。其中接受 1000 次震波治療組中，其 basic FGF 之濃度於 12 小時就開始上升，此具有統計學顯著差異 (p<0.05)。





圖二十九 在  $0.55 \text{ mJ/mm}^2$  之能階下給予 0、250、500、750、1000 次之震波治療於 6、12、24、48 小時淬取上清液，利用 ELISA 法得到 basic FGF 之濃度。我們可發現在不同震波治療次數下，其 basic FGF 於 24 小時達到高峰，此具有統計學顯著差異 ( $p < 0.05$ )。 ，然後開始下降。



圖三十 在同一能量下，我們觀察作用能階和作用次數之效應。我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 1000 次震波治療，於 6 12 24 小時其 basic FGF 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 500 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup>能階下接受 250 次震波治療。\* 符號代表具有統計學顯著差異 (p<0.05)。

## 第六章 討論

針對體外震波於骨科臨床之應用如肩部鈣化性肌腱炎、肘外髁肌腱炎、足底筋膜炎以及骨癒合不全，大致上可區分成二大類：一為肌腱連接到骨頭處發生問題，另一方面為骨頭發生問題。針對 Wang 等學者針對肌腱骨頭交接處於兔子的實驗中可發現，而推論震波治療引起新生血管和組織之再生且伴隨著血管生長因子之釋放包含了 eNOS、VEGF。此種新生血管之生成導致改善局部血液循環，進一步促進於肌腱骨骼交接處韌帶之再生 [3,26]。而另一方面針對骨骼癒合不全之情形，我們知道在上述此種情形於癒合不良之地方，臨床上可發現充滿了低血流量之結締組織，此種組織阻止了骨頭之癒合，而許多實驗中可發現體外震波治療可促使骨頭內間質幹細胞朝向骨頭方向分化且伴隨著 TGF- $\beta$ 1、VEGF 生成，引起細胞膜之過極化現象，且引起 Ras 之活化，最後達到骨頭之癒合 [27-30]。

在我們研究中可發現接受震波治療之實驗組其產生 VEGF、basic FGF、TGF- $\beta$ 1 濃度明顯大於對照組且其濃度約於震波治療後 24 小時或 48 小時達到最高值。由 Wang 對學者所提出體外震波之作用機轉之推論，認為當細胞或是組織接受到震波之物理刺激時，會藉由釋放或分泌出蛋白質如 VEGF、PCNA、eNOS，隨著這些分子之產生，進而改善局部血流量，達到組織再生

而得到骨骼或韌帶之修補。而在我們之研究中可發現當人體間質幹細胞接受到體外震波之能量，會引起 VEGF、basic FGF、TGF- $\beta$  1 之濃度上升，和 Wang 學者所提出震波機轉有相吻合之處[3]。

我們知道體外震波對於組織之衝擊取決於組織之阻抗。於人體中阻抗力最高的為 Bone，在臨床之研究中，我們可發現若是能量超過 0.42 mJ/mm<sup>2</sup> 其至到 0.62 mJ/mm<sup>2</sup> 其骨頭癒合不全之情形可達到癒合且沒有副作用之產生 [18-19]。而在 Chen 等學者針對大白鼠之試驗測是建議能量不超過 0.28 mJ/mm<sup>2</sup> [77]。而在 Wang 等學者於大白鼠所作之研究中指出，理想之震波能量及次數應為 0.16 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 500 次，在此能量下其細胞存活並不會受到影響同時其 TGF- $\beta$  1 分泌濃度最高且骨群落數生成可達最多 [30]。而在我們之研究中，我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用下 250 次其細胞存活比率和對照組沒有差異性，而在其它能階下，其細胞存活率均受到影響，故就人類間質幹細胞存活率而言，在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 250 次是較佳之能階及次數。

但是接受體外震波治療後之存活率是否就可決定後續發展？是否存活率高則代表所分泌 VEGF、basic FGF、TGF- $\beta$  1 之濃度則較高？我們認為是否定的。於我們研究中可發現，在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用下 250 次其 basic FGF 分泌之濃度於 24 小時達到最高值，但是接受其他能階、脈波次數下如在 0.14

mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 500、750、1000 次震波治療，0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療，其 basic FGF 之濃度明顯大於在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 250 次下其 basic FGF 分泌之濃度 (p<0.05)。而在 TGF- $\beta$ 1 分泌之濃度，在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用下 250 次其分泌之濃度於 24 小時達到最高值，但和 basic FGF 相同，在接受其他能階、脈波次數下所分泌之濃度明顯大於在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 250 次下所分泌之濃度。故就人類間質幹細胞接受震波治療後所分泌 basic FGF、TGF- $\beta$ 1 之濃度，不能單由人類間質幹細胞之存活率來決定。

接受體外震波治療後之 VEGF 分泌濃度和上述之 basic FGF、TGF- $\beta$ 1 分泌有不同情形，在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用下接受 250、500、750、1000 次震波治療其 VEGF 分泌濃度於 12 小時就開始上升，然後於 24、48 小時持續向上攀升。但是接受其他能階、脈波次數下如在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250、500、750、1000 次震波治療下，其 VEGF 分泌濃度於 12 小時就開始上升，然後於 24 達到高峰，但在 48 小時則向下降。若考量體外震波治療後之存活率和 VEGF 分泌濃度，似乎在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用下 250 次所得之效益是最大的。故就人類間質幹細胞接受震波治療後所分泌 VEGF 之濃度而言，在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作

用 250 次是最佳之能階及次數。

此外我們考量在相同脈波次數下，對使用不同震波能階是否造成對人類間質幹細胞產生不同之效應？我們可發現在相同脈波次數 250、500、750 下，0.55  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下其 Basic FGF 之生成濃度大於在 0.14  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下所生成濃度，此具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )，而對於 0.29  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下其 Basic FGF 之生成濃度相比則無具有顯著統計學差異 ( $p > 0.05$ )。此外我們可發現在相同脈波次數下，0.55  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下其 VEGF 在 24 小時之生成濃度大於在 0.14  $\text{mJ}/\text{mm}^2$ 、0.29  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下所生成濃度，此具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。此外我們可發現在相同脈波次數下，0.14  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下其 VEGF 在 48 小時之生成濃度大於在 0.29  $\text{mJ}/\text{mm}^2$ 、0.55  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下所生成濃度，此具有顯著統計學差異 ( $p < 0.05$ )。故我們認為在相同脈波次數下，對使用不同震波能階會隨著時間對人類間質幹細胞產生不同之效應。

我們知道單位面積所承受之能量可為作用能階和各作用次數之乘積。如同我們就 0.14  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下作用 1000 次、0.29  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下作用 500 次以及 0.55  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  下作用 250 次，其單位面積所曝露之能量約為 140  $\text{mJ}$ 。就其細胞存活率而言，三者之間並無統計學之差異 ( $p$  值大於 0.05)。但是在這三者條件下針對 VEGF 之分泌濃度而言，我們可發現在 0.14  $\text{mJ}/\text{mm}^2$  能階下

接受 1000 次震波治療，於 24、48 小時其 VEGF 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 500 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250 次震波治療(p 值小於 0.05)。針對 basic FGF 之分泌濃度而言，我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 1000 次震波治療，於 6、12、24 小時其 basic FGF 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 500 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250 次震波治療(p 值小於 0.05)。針對 TGF- $\beta$ 1 之分泌濃度而言，我們可發現在 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 1000 次震波治療，於 12 小時其 TGF- $\beta$ 1 之平均分泌濃度大於在 0.29 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 500 次震波治療，以及 0.55 mJ/mm<sup>2</sup> 能階下接受 250 次震波治療(p 值小於 0.05)。故就人類間質幹細胞接受相同能量而言，似乎使用較低能階及較多震波次數能得到最大效益(0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 作用 1000 次在此是最佳之能階及次數)。

以上分別就使用不同之震波能階、不同之震波次數下，於不同時間來觀察人類間質幹細胞對於震波之效應，藉由以上之討論結果我們認為震波對於人類間質幹細胞受到許多因素所影響，其因素包括時間、震波能階、震波次數、以及所欲觀察之蛋白質，絕非單一因素所能決定。

## 第七章 結論與建議

### 第一節 結論

- 一. 本研究中顯示體外震波治療依據不同之能階次數，對於人類間質幹細胞產生不同之結果。就細胞存活率而言，其在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  作用 250 次，震波治療下，其細胞存活率不受影響，而在其它能階下，其細胞存活率均受到影響，故就人類間質幹細胞存活率而言，在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  作用 250 次是較佳之能階及次數。
- 二. 就人類間質幹細胞接受震波治療後所分泌 basic FGF、TGF- $\beta$  1 之濃度，不能單由人類間質幹細胞之存活率來決定。
- 三. 就人類間質幹細胞接受震波治療後所分泌 VEGF 之濃度而言，在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  作用 250 次是最佳之能階及次數。
- 四. 就人類間質幹細胞接受相同能量而言，似乎使用較低能階及較多震波次數能得到最大效益 ( $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  作用 1000 次在此是最佳之能階及次數)。
- 五. 就人類間質幹細胞接受相同脈波次數下，對使用不同震波能階會隨著時



間對人類間質幹細胞產生不同之效應。

六. 體外震波治療對於人類間質幹細胞均具有促進分泌 TGF- $\beta$  1、VEGF、basic FGF 之效果，其濃度在不同之能階次數下，絕大部分條件下約於 24 小時達到高峰。

七. 藉由以上之討論結果我們認為震波對於人類間質幹細胞受到許多因素所影響，其因素包括時間、震波能階、震波次數、以及所欲觀察之蛋白質，絕非單一因素所能決定。

## 第二節未來研究

1. 對於人類間質幹細胞接受體外震波治療後是否促進分化增生擬再研究探討。
2. 對於人類間質幹細胞接受體外震波治療後是否會朝向骨頭分化擬再研究探討。

## 七、參考文獻及附錄：

1. Coleman AJ, Saunders JE. A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic field used in extracorporeal lithotripsy. *Ultrasonics*. 1993;31(2):75-89.
2. Ogden JA, Alvarez R, Levitt R, Cross GL, Marlow M. Shock wave therapy for chronic proximal plantar fasciitis. *Clin Orthop*. 2001 Jun;(387):47-59.
3. Wang CJ. An overview of shock wave therapy in musculoskeletal disorders. *Chang Gung Med J*. 2003 Apr;26(4):220-32.
4. Delius M, Draenert K, Al Diek Y, Draenert Y. Biological effects of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone. *Ultrasound Med Biol* 1995;21:1219-25.
5. Rompe JD, Rumler F, Hopf C, Nafe B, Heine J. Extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder. *Clin Orthop*. 1995 Dec;(321):196-201
6. Loew M, Jurgowsky W, Mau H, Thomson M: "Treatment of Calcifying Tendonitis of Rotator Cuff by Extracorporeal Shock Waves: A Preliminary Report" *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, Vol. 4, No. 2, pp. 101-06 (1995).

7. Spindler A, Berman A, Lucero E, Braier M: Extracorporeal shock wave treatment for chronic calcific tendinitis of the shoulder. *J Rheumatol* 1998 Jun;25(6):1161-3
8. Wang CJ, Yang KD, Wang FS, Chen HH, Wang JW. Shock wave therapy for calcific tendinitis of the shoulder: a prospective clinical study with two-year follow-up. *Am J Sports Med.* 2003 May-Jun;31(3):425-30.
9. Wang CJ, Ko JY, Chen HS. Treatment of calcifying tendinitis of the shoulder with shock wave therapy. *Clin Orthop.* 2001 Jun;(387):83-9.
10. Rompe JD, Hopf C, Nafe B, Burger R: Low-energy extracorporeal shock wave therapy for painful heel: a prospective controlled single-blind study. *Arch Orthop Trauma Surg* 1996;115(2):75-9
11. Wang CJ, Chen HS, Huang TW. Shockwave therapy for patients with plantar fasciitis: a one-year follow-up study. *Foot Ankle Int.* 2002 Mar;23(3):204-7.
12. Ogden JA, Alvarez R, Levitt R, Cross GL, Marlow M. Shock wave therapy for chronic proximal plantar fasciitis. *Clin Orthop.* 2001 Jun;(387):47-59.

13. Chen HS, Chen LM, Huang TW. Treatment of painful heel syndrome with shock waves. *Clin Orthop*. 2001 Jun;(387):41-6.
14. Wang CJ, Chen HS. Shock wave therapy for patients with lateral epicondylitis of the elbow: a one- to two-year follow-up study. *Am J Sports Med*. 2002 May-Jun;30(3):422-5.
15. Ko JY, Chen HS, Chen LM. Treatment of lateral epicondylitis of the elbow with shock waves. *Clin Orthop*. 2001 Jun;(387):60-7.
16. Rompe JD, Hope C, Kullmer K, Heine J, Burger R: Analgesic effect of extracorporeal shock-wave therapy on chronic tennis elbow. *J Bone Joint Surg Br* 1996 March, than in 78(2):233-7
17. Wang CJ, Chen HS, Chen CE, Yang KD. Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves. *Clin Orthop*. 2001 Jun;(387):95-101.
18. Rompe JD, Rosendahl T, Schollner C, Theis C. High-energy extracorporeal shock wave treatment of nonunions. *Clin Orthop*. 2001 Jun;(387):102-11.
19. Schaden W, Fischer A, Sailler A. Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union. *Clin Orthop*. 2001 Jun;(387):90-4.

20. Vogel J, Hopf C, Eysel P, Rompe JD. Application of extracorporeal shock-waves in the treatment of pseudarthrosis of the lower extremity. Preliminary results. Arch Orthop Trauma Surg. 1997;116(8):480-3.
21. Valchanou VD, Michailov P. High energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures. Int Orthop. 1991;15(3):181-4.
22. Evan AP, Willis LR, Lingeman JE, McAteer JA. Renal trauma and the risk of long-term complications in shock wave lithotripsy. Nephron 1998;78(1):1-8
23. Howard D, Sturtevant B. In vitro study of the mechanical effects of shock-wave lithotripsy. Ultrasound Med Biol 1997;23(7):1107-22
24. Suhr D, Brummer F, Irmer U, Hulser DF. Disturbance of cellular calcium homeostasis by in vitro application of shock waves. Ultrasound Med Biol 1996;22(5):671-9
25. Graff J, Pastor J, Richter K.D. Effect of high-energy shock-waves on bony tissue. Urol Res 1998;16:252
26. Wang CJ, Huang HY, Pai CH. Shock wave-enhanced neovascularization at the tendon-bone junction: an experiment in dogs. J Foot Ankle

- Surg. 2002 Jan-Feb;41(1):16-22.
27. Wang FS, Wang CJ, Sheen-Chen SM, Kuo YR, Chen RF, Yang KD. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors. J Biol Chem. 2002 Mar 29;277(13):10931-7. Epub 2002 Jan 09.
28. Wang FS, Yang KD, Kuo YR, Wang CJ, Sheen-Chen SM, Huang HC, Chen YJ. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect. Bone. 2003 Apr;32(4):387-96.
29. Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, Chung H, Chen RF, Yang KD. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Sep 28;287(3):648-55.
30. Wang FS, Yang KD, Chen RF, Wang CJ, Sheen-Chen SM. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. J Bone Joint Surg Br. 2002 Apr;84(3):457-61.
31. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca

- JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2;284(5411):143-7
32. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 1996 Mar;11(3):312-24
33. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects *J Bone Joint Surg Am* 1998 Jul;80(7):985-96
34. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 1989 Mar;(240):270-80
35. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994 Jul;21(3):429-35
36. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 30;320(3):914-9.
37. Roelen BA, Dijke P. Controlling mesenchymal stem cell



- differentiation by TGFβ family members. *J Orthop Sci.* 2003;8(5):740-8.
38. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L, "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." *N. Engl. J. Med.*, 332:889-895, 1994.
39. Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis Found Symp.* 2003;249:86-96
40. Barnard, J.A., Lyons, R.M. and Moses, H.L. The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Jun 1;1032(1):79-87.
41. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 1987 Sep;105(3):1039-45.
42. Moses, H.L., Yang, E.Y. and Pietsenpol, J.A. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell.* 1990 Oct 19;63(2):245-7.
43. Sporn, M.B. and Roberts, A.B. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 1992

Dec;119(5):1017-21.

44. Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol.* 1992 Apr;117(2):395-400.
45. Prehn JH, Peruche B, Unsicker K, Krieglstein J. Isoform-specific effects of transforming growth factors-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *J Neurochem.* 1993 May;60(5):1665-72.
46. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors.* 1993;8(1):1-9.
47. Beck LS, Deguzman L, Lee WP, Xu Y, McFatridge LA, Gillett NA, Amento EP. Rapid publication. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects. *J Bone Miner Res.* 1991 Nov;6(11):1257-65.
48. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1988;Suppl 355:7-21.
49. Lind M, Schumacker B, Soballe K, et al. Transforming growth factor enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand*

1993;64:533-6.

50. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995;95:881-87.
51. Wang FS, Yang KD, Chen RF, Wang CJ, Sheen-Chen SM. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J Bone Joint Surg Br* 2002 Apr;84(3):457-61
52. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
53. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
54. Gospodarowicz D, Abraham J, Schilling J, et al. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived follicular stellate cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7311-5.
55. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites

- fluid. Science 1983;219:983-5.
56. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989;246:1306-9.
57. Shweiki D, Itin DA, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediated hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992;359:843-5.
58. Xiong M, Elson G, Legarda D, et al. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. Am J Pathol 1998;153:587-98.
59. Harmey JH, Demitriandis E, Kay E, et al. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. Ann Surg Oncol 1998;5:271-8.
60. Aiello L, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. N Eng J Med 1994;331:1480-7.
61. Admis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular

- endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-50.
62. Brown LF, Yeo KT, Berse B, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992;176:1375-9.
63. M.M.L. Deckers, M. Karperien, C. van der Bent, T. Yamshita, S.E. Papapoulos and C.W.G.M. Lowik, Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblasts differentiation. *Endocrinology* 141 (2000), pp. 1667 – 1674.
64. K.A. Thomas, Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), pp. 603 – 606.
65. J. Street, M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F.V. Peale, Jr., N. Ferrara et al., Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002), pp. 9656 – 9661.
66. C. Maes, P. Carmeliet, K. Moermans, I. Stockmans, N. Smets, D.

- Collen et al., Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech. Dev.* 111 (2002), pp. 61–73.
67. C. Ferguson, E. Alpern, T. Miclau and J.A. Helms, Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech. Dev.* 87 (1999), pp. 57–66.
68. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:575-606.
69. Gonzalez AM, Buscaglia M, Ong M, Baird A. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J Cell Biol.* 1990 Mar;110(3):753-65.
70. Baird A, Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family. *Cancer Cells.* 1991 Jun;3(6):239-43.
71. Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal

stem cells. *J Bone Miner Res* 1997 Oct;12(10):1606-14

72. Kotev-Emeth S, Savion N, Pri-chen S, Pitaru S. Effect of maturation on the osteogenic response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor. *Bone* 2000 Dec;27(6):777-83.

73. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res.* 1995 Aug;10(8):1272-81.

74. Zuo J, Jiang J, Dolce C, Holliday LS. Effects of basic fibroblast growth factor on osteoclasts and osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 21;318(1):162-7.

75. Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane

and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res.* 2002 Oct;17(10):1859-71.

76. Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, Doetschman T, Coffin JD, Hurley MM. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(8):1085-93.

77. Chen YJ, Kuo YR, Yang KD, Wang CJ, Huang HC, Wang FS. Shock wave application enhances pertussis toxin protein-sensitive bone formation of segmental femoral defect in rats. *J Bone Miner Res.* 2003 Dec;18(12):2169-79.



## 八、簡單自述

姓 名: 許晉榮

出生日期: 民國 59 年 9 月 1 日

籍 貫: 台灣屏東

通訊方式:

電話 : ( 04 ) 22052121 ext. 2073

通訊地址 : 406 台中市北區育德路 2 號

電子郵件 : monk327@ms35.hinet.net

### 學歷

民國 64 年至民國 70 年 屏東師範附屬國民小學

民國 70 年至民國 73 年 台南縣私立黎明中學

民國 73 年至民國 76 年 台南縣私立黎明高中

民國 77 年至民國 84 年 中國醫藥學院中醫學系醫學士

民國 91 年至民國 93 年 中國醫藥學院醫學研究所臨床組

### 經歷

民國 82 年至民國 84 年 台北國泰醫院實習醫師

民國 86 年至民國 90 年 中國醫藥學院附設醫院骨科部住院醫師

民國 90 年至民國 91 年 中國醫藥學院附設醫院骨科部總住院醫師

民國 91 年至民國 92 年 中國醫藥學院附設醫院骨科部研究醫師

## 現職

民國 92 年迄今

中國醫藥學院附設醫院骨科部主治醫師