

第一章 緒論

1-1 前言

現在的台灣已將要邁入老年化的社會，據估計在未來50年內，65歲以上的人口將增加至少3倍；如此多的老化人口伴隨而來的就是需要增加龐大的醫療資源。在老化的疾病當中，器官失去作用占極高的比例，許多器官無再生能力，一旦失去作用，就會造成身體無法彌補的傷害；這時可能便要進行器官移植或其他重大手術，以維持身體的正常運作，但是這將耗費相當大的醫療成本，如果能只需修復或使受損的器官再生，便能繼續維持身體的正常機能，而不需做器官移植，如此便能大幅降低病人的負擔與醫療成本，相信這是許多醫療過程最希望的結果，組織工程正是朝這方面努力的新興技術。

目前一般組織或器官修復以採取外科治療為主，大致有4種方式：

1. 自體移植：擷取病患本身身體某部份進行移植，雖不會有疾病傳染及免疫排斥的問題，但來源有限，數量往往不敷使用，且需於組織來源處進行手術，會造成二次傷害。
2. 異體移植：由其它人的組織或器官取得，包括親人或捐贈等途徑，雖來源較自體為多，但數量仍有限，且會有疾病傳染及免疫排斥的問題，另外病患借用他人器官的心理也會影響復原。
3. 異種移植：由他種動物的組織或器官取得，如豬、牛、猩猩、猿猴等，雖來源較多，但仍會有疾病傳染及免疫排斥的問題。
4. 人造材料：如合金或塑化材質，但此種材料生物相容性低，且易耗損需多次替換。

相對於沒有生命力的材料而言，組織工程便是希望在體外培養一個具生命力的組織或器官以應用於病人身上，使病人復原良好，減少手術

次數，改善病人生活品質，進而大幅降低住院及醫療費用。組織工程目前的應用範圍除了涵蓋組織及器官替換，如人工皮膚、心血管替代品，神經系統，以及肝、胰等代謝器官修復，還延伸到細胞治療與藥物傳輸等領域。

1-2 組織工程

組織工程學(Tissue Engineering)為應用生物與工程的原理以發展活組織的取代物，來修復、維持或改善人體組織的功能，而此取代物將成為病人身體的一部份，對於疾病提供特定的治療⁽¹⁾。組織工程涵蓋三大主要元素(參見圖 1-1)，分別是細胞(cells)、促使細胞生長及分化所需的傳導訊號(signals)及提供細胞生長所需的支架(scaffold)。

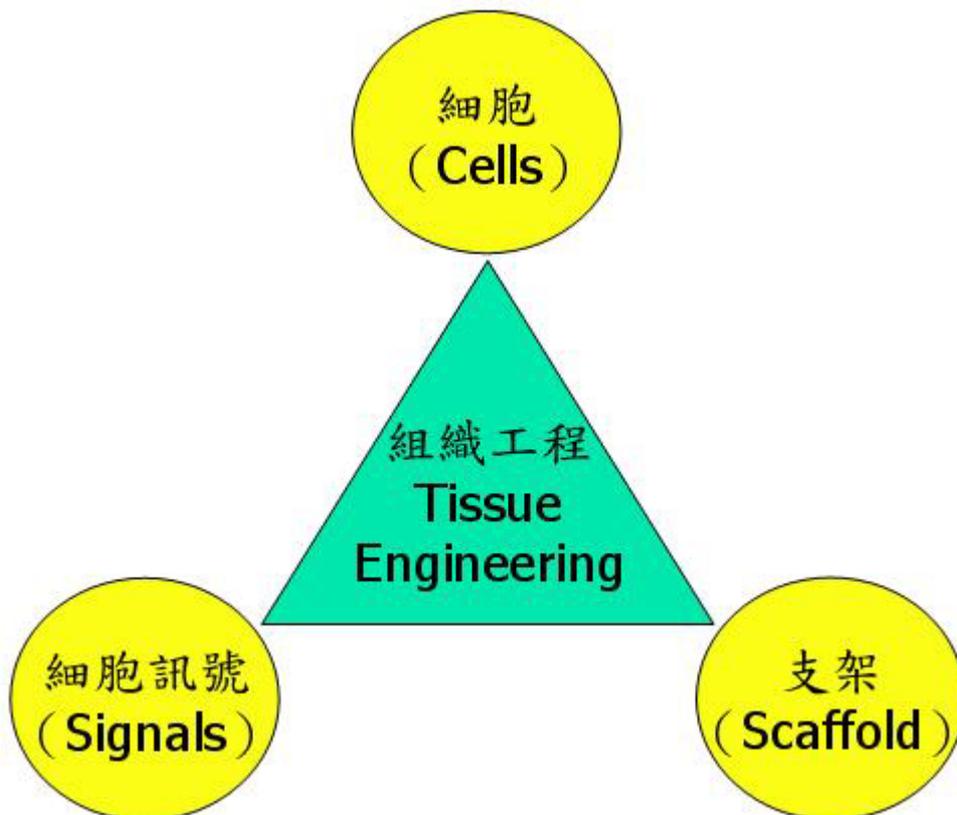


圖 1-1 組織工程三大要素

1-2-1 細胞

足夠的細胞數與功能正常的細胞是組織工程成功的要件。一般而言，細胞的來源包括成熟細胞(adult cell)和幹細胞(stem cell)，為避免免疫排斥的問題，成熟細胞以自體來源最為理想，因此須先從病人身體採集適當的組織樣品，於體外分離出所需的細胞，然後培養到足夠數量，再植入支架進行組織培養。但目前仍有一些尚待克服與解決的問題，例如，可採集的健康組織數量太少、老年人或某些種類的細胞在體外增殖能力太差、以及體外培養的環境是否能讓細胞維持正常的功能 等等，這些都限制了使用自體成熟細胞於組織工程的應用。

幹細胞可以在體外無限增殖，因此為組織工程理想的細胞來源，自體幹細胞除可由臍帶血取得外，目前已能由骨髓、肌肉、脂肪、神經中取得，其中又以骨髓取得最為容易，骨髓中的幹細胞有兩種：一種是造血幹細胞(hematopoietic stem cells)，負責形成體內的血球細胞，如紅血球、白血球、淋巴球等；另一種是間質幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)，可以分化成硬骨、軟骨、脂肪、結締組織及支持血球細胞形成的網狀結構⁽²⁻⁴⁾。

間質幹細胞擁有多樣分化發展能力，即使被冰凍保存後，他們仍可以被培養到 38 ± 4 代，而不會失去骨質再生的能力^(5,6)，研究顯示間質幹細胞已能應用於組織工程中的骨質再生及骨骼基因工程、軟骨生成及修補、肌腱修補等^(7,8)，本研究就是使用從兔體腸骨抽取骨髓培養而得的間質幹細胞，在體外植入生醫材料所製成的支架中，培養一段時間後使支架具有生命力，再植回自體兔體頭蓋骨以評估其可行性。

1-2-2 訊號

間質幹細胞在體外培養時，左右細胞生長、趨向、與分化的重要因素就是各種生長因子與荷爾蒙。這些物質與細胞的受體結合後會於細胞內引發一系列的化學反應，而啟動某些基因的表現，影響細胞的許多行為，如生長、趨向與分化，組織才得以成型。因此組織工程的進行除了需要考慮細胞、支架的因素外，缺乏這類訊號也難竟全功。例如要誘導骨髓間質幹細胞分化為軟骨時，需要加入生長因子 TGF (Transforming growth factor)，若要誘導它們變成骨骼細胞，則要加入 BMP (Bone morphogenetic protein) 等⁽⁹⁾。

近年來許多的研究積極致力於生長因子和機械性刺激對細胞訊號傳遞的影響⁽¹⁰⁾，在生長因子方面，1988 年 Maniopoulos 等人首先從老鼠取得骨髓間質幹細胞，經體外培養後使用糖皮質激素(dexamethasone)刺激骨先驅細胞的分化，所需刺激的濃度範圍從 10^{-7} ~ 10^{-9} M，若超出此濃度範圍，細胞會破裂進而影響骨形成的機制； β -glycerophosphate 作為有機磷的來源，幫助基質的礦化，其合適濃度的範圍從 5~10 mM，過量的濃度會造成失調的礦化作用，影響細胞進一步的分化，且危及骨基質的生成；配合著 ascorbic acid 刺激培養出骨的型態和其生化特徵^(2,3)。

骨碎補為水龍骨科(Polypodiaceae)多年生蕨類植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm.的乾燥根莖，在中醫臨床上可用於治療骨折，因此便以其功用命名為骨碎補。根據本研究室之前的研究顯示，骨碎補能促進骨母細胞增生及分化，本研究希望經由體外及體內測試驗證骨碎補是否也能促進間質幹細胞增生並朝骨母細胞分化，而在間質幹細胞分化為骨母細胞時扮演分化劑的角色。

在物理性刺激方面，一般靜態的體外培養養分給予細胞生長所須的能量，卻忽略了細胞的代謝，在靜態培養下支架中的細胞養分輸送和代謝物擴散速率並不能滿足，導致細胞生長的抑制和細胞型態的表現，在組織工程中生物反應器(bioreactor)已漸漸被應用，來解決上述的問題。

生物反應器在組織工程中提供了以下幾種功能：

1. 改善支架中細胞分布不均的問題。
2. 維持培養液中氣體和養分的濃度。
3. 提供生長的組織有效率的物質傳導。
4. 使生長中的組織處於物理性的刺激。

組織培養生物反應器有各種不同的型式⁽¹¹⁾，如圖 1-2 所示，1.靜態和軌道式混合有蓋培養皿(orbitally mixed Petri dishes)，2.靜態和磁攪拌培養瓶(magnetically stirred flasks)，3.旋轉型：低轉速和高轉速，4.佈滿型：使用磁共振線圈和旋轉容器。每種生物反應器有不同的功能，可依據不同的需要選擇使用⁽¹²⁾。

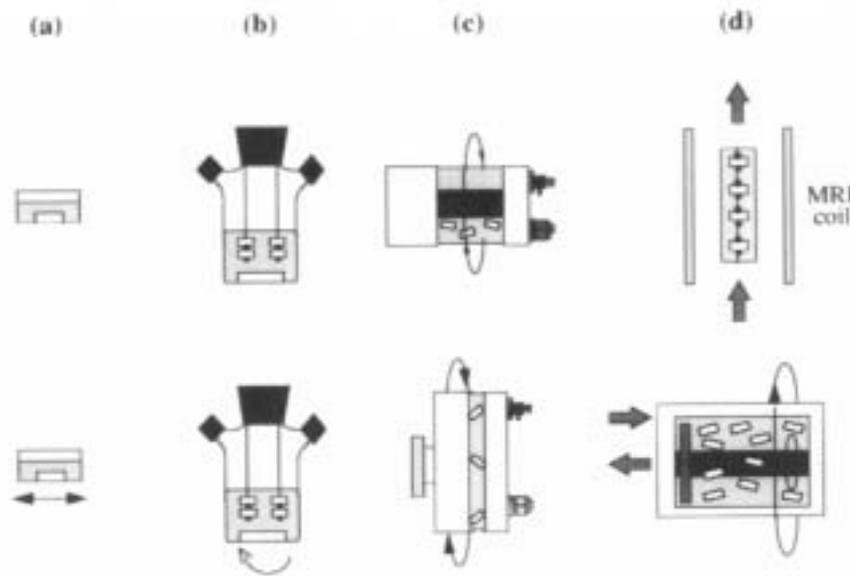


圖 1-2 組織培養生物反應器(a)靜態和軌道式混合有蓋培養皿，(b)靜態和磁攪拌培養瓶，(c)旋轉型：低轉速(上)和高轉速(下)，(d)佈滿型：使用磁共振線圈(上)和旋轉容器(下)

1-2-3 支架

要在體外進行人工組織培養，首先須取出病患或捐贈者一部份組織，經體外大量培養取得所需的細胞後，植入生物可分解性的多孔性支架，利用支架的三度空間，在體外進行組織培養，讓細胞貼附並生長，再植回病患所需修補的部位。因此，發展適合的生物可分解多孔性支架提供細胞及組織生長，便為組織工程相當重要的關鍵技術。

良好的硬骨組織工程支架，應具備以下特性以應用於體外組織培養，並能植回病患體內。

1. 良好的生物適應性，不具生物毒性，使細胞及組織能貼附並生長。
2. 為生物可吸收分解性材料，而且吸收分解的速度要能配合新生骨組織形成與取代的速度。
3. 具備高孔隙率，使細胞有較多的生長空間。
4. 具備適當的孔洞尺寸，以提供骨母細胞生長。
5. 所製備孔洞之間須有良好的連通性，以使細胞能均勻植入各孔洞，體外培養及植入生物體時，養分及廢物能順利的進出。
6. 具備適當的機械強度。

本研究室之前的研究顯示，以適當比例綠梔子素、明膠及三鈣磷酸鹽混合進行交聯反應所製成的骨科替代材料 GGT 為一擁有良好的生物適應性，具備骨引導與促進骨再生能力的生物可降解材料⁽¹³⁾，在此基礎上本研究於製備材料過程中加入氯化鈉顆粒，製成多孔性結構以應用於組織工程。

1-3 研究動機及目的

本研究的主要目的為結合組織工程三要素：支架(Scaffold)、細胞(Cells)、訊號(Signals)進行動物體內及體外試驗以評估本研究室所研製之多孔性骨科材料(多孔性 GGT)，於體外培養間質幹細胞後應用於臨床硬骨移植的可行性，並探討中藥骨碎補於間質幹細胞於分化為骨母細胞的過程是否能扮演加速細胞增生及分化的角色。

在 1994 年 Yao 等人的研究中，選擇在生物體內具有降解性(biodegradable)的三鈣磷酸鹽(tricalcium phosphate)陶瓷粉末，以可吸收性高分子材料的明膠(gelatin)作為與陶瓷粉末混合的黏結劑(binding agent)，並利用戊二醛(glutaraldehyde)充當交聯劑(cross-linking agent)，使明膠發生交聯反應，此簡稱 GTG 複合材料，一方面可控制材料在生物體內的物理變化，另一方面亦可降低明膠的排斥反應；雖然在上述的研究中，無論於體外(in vitro)或是體內(in vivo)的評估結果，均顯現出三鈣磷酸鹽與交聯明膠複合材料具有良好的生物適應性與新生骨引導能力⁽¹⁴⁻¹⁶⁾，但要應用於生物體內戊二醛的生物毒性仍是不得不考慮的問題。

在 2004 年 Liu 等人，將交聯劑改為生物毒性遠低於戊二醛的天然交聯劑綠梔子素(genipin)，簡稱 GGT 複合材料，經體外及體內測試結果證實為具有良好的生物適應性，具備骨引導與促進骨再生能力的生物可降解材料⁽¹³⁾。同年 Jeng 等人將 GGT 複合材料結合中藥龜鹿膠及骨碎補製成內含生藥的人造骨科複合材料，於體外及體內測試均證實添加中藥對骨缺陷的修復具有明顯的促進作用⁽¹⁷⁾。

本研究便是要將 GGT 材料，發展為可應用於組織工程的多孔性支架，並選擇間質幹細胞為來源細胞，在體外培養至足夠數量後，將細胞植入支架中進行培養，再將培養後的組織植回兔體頭蓋骨以進行相關的評估。

第二章 文獻回顧

2-1 骨骼的組織與組成

骨骼為一種特殊的結締組織，以鈣化的網狀膠質作為人體的骨架。其中礦物質(mineral)/有機物(organic)的比例為 3/1，而礦物質的主要成分是氫氧基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)； $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ ，有機物則為膠原蛋白(collagen)。本研究即根據乾燥骨骼中無機礦物質與有機基質的重量比例，選擇三鈣磷酸鹽粉末與明膠的重量比為 3：1，加以適當的水分均勻混合而成。

骨並非一個完全的固態均勻物質，事實上在其堅固的成分之間有一些空隙。這些空隙可作為血管的通道以供應骨細胞的營養，同時使骨變輕。依照這些空隙的大小及分布情形，可將骨分成海綿骨及緻密骨等區域。海綿骨含有很多充滿紅骨髓的大空隙，他構成大部份的短骨、扁平骨及不規則骨的骨組織與大部分長骨的骨端，他亦提供一部份骨髓的貯存區以及支持作用。相反的緻密骨含有極少的空隙，他的骨幹層較骨端層為厚。緻密骨提供保護作用及支持作用，並幫助長骨對抗加在其上的重量壓力。

海綿骨與緻密骨組織的差異可參考圖 2-1，其中最主要的差異為緻密骨有一同心環的結構，而海綿骨則無。血管與神經由骨外膜及骨內膜經佛克曼管(Volkman's canals)穿過緻密骨，這些管內的血管與骨髓腔及哈佛氏管(Haversian canals)內的血管相連接。哈佛氏管貫穿骨的縱軸，由骨板(lamellae)圍繞其外，骨板是硬的鈣化細胞間質所形成的同心圓，在骨板之間的小空間稱為腔隙(lacunae)，為骨細胞的存在位置。骨細胞(osteocytes)為成熟的造骨細胞，已經喪失了製造新骨組織的能力。由腔隙向各個方向發射的微小管子稱骨小管(canalliculi)，含有骨細胞的細長突起。這些骨小管與其他腔隙相連結，最後與哈佛氏管相連。因此整個骨形成一個複雜的網狀結構，它提供很多的途徑，使得營養物能抵達骨

細胞，同時廢物也能被移除。每一個哈佛氏管與其周圍的骨板、腔隙、骨細胞及骨小管形成哈佛氏系統(Haversian system)或稱骨元(osteon)。在哈佛氏系統之間的區域稱為間板(interstitial lamellae)，這些間板亦含有腔隙、骨細胞及骨小管，但它們的骨板經常與哈佛氏系統無關，而是硬骨重塑時舊骨元被破壞所留下的片斷。

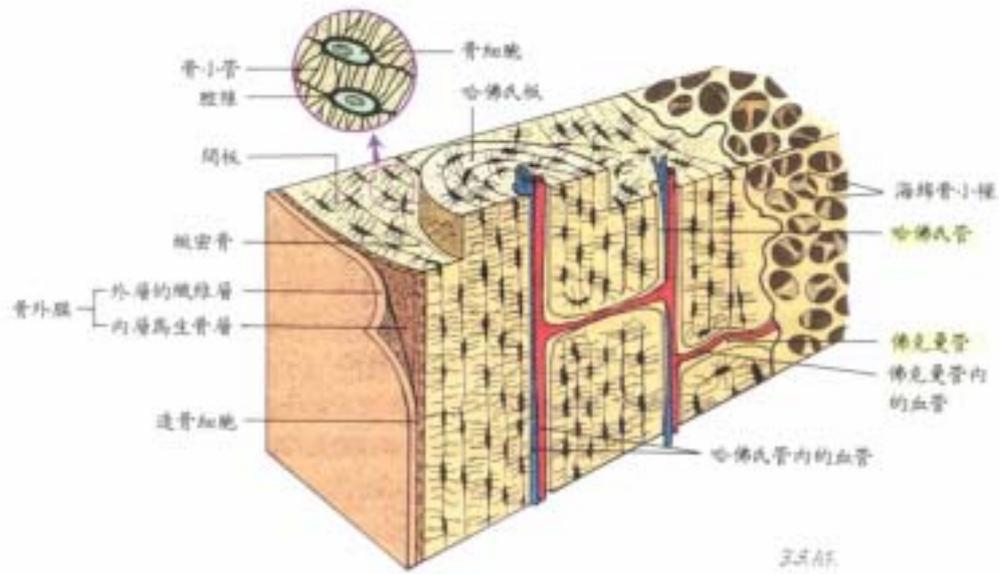


圖 2-1 緻密骨與海綿骨結構比較圖⁽¹⁸⁾

與緻密骨相反的，海綿骨並不含有真正的哈佛氏系統，他是由稱為骨小梁(trabeculae)的細骨板所形成之格子構造組成。某些骨的骨小梁之間充滿了紅骨髓，紅骨髓細胞負責製造血球。骨小梁內的腔隙含有骨細胞，這些骨細胞直接由循環經過骨髓腔的血液獲取養分。

2-2 骨細胞與骨骼重建機制

骨骼中主要含有三種型式的細胞分別為骨母細胞(osteoblast; OB)、成骨細胞(osteocyte)及蝕骨細胞(osteoclast; OC)^(19,20)。新生骨組織在形成的過程中，是經由特定型態的細胞來進行骨骼的模化(shaped)和重塑⁽²¹⁾，如圖 2-2 所示，新骨的形成是經由骨母細胞完成，舊骨的吸收及移除則由蝕骨細胞所負責，成骨細胞則對骨母細胞及蝕骨細胞兩者的活動具有間接協調的功能。

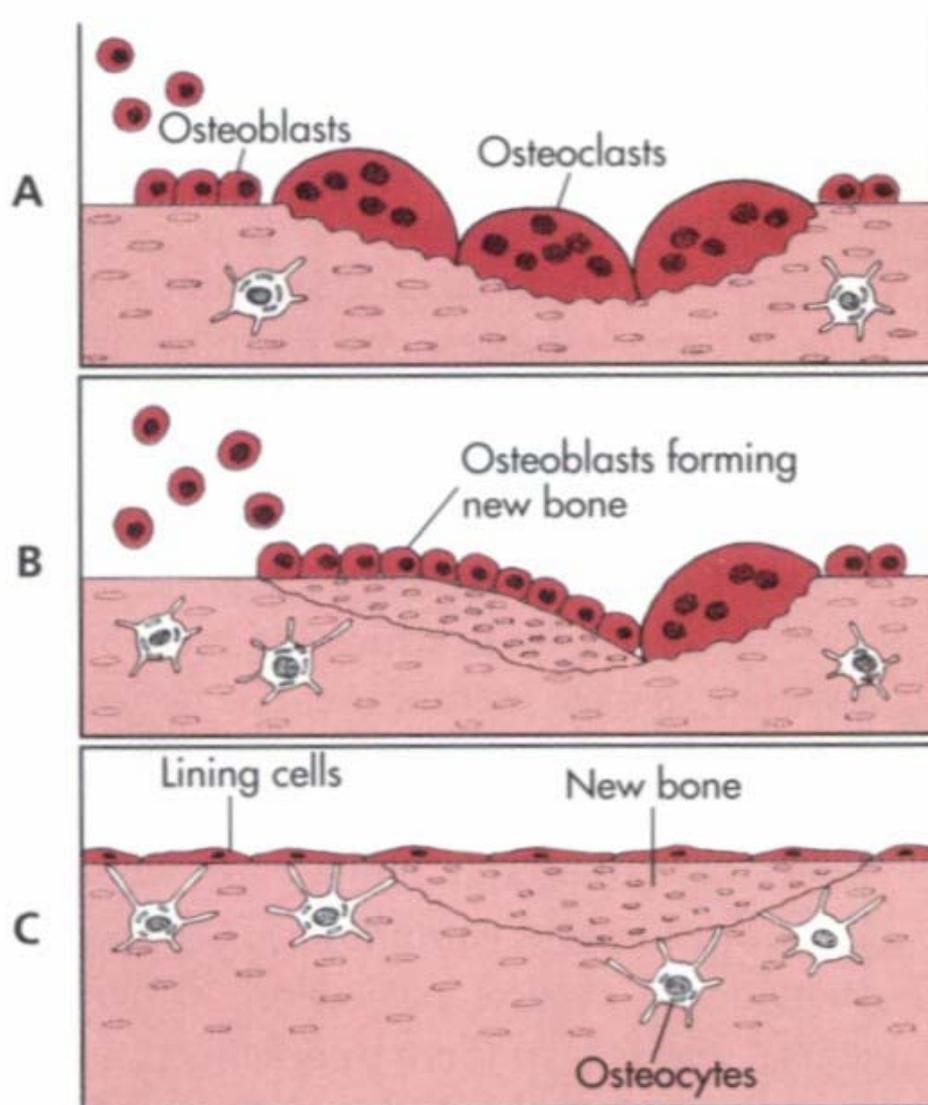


圖 2-2 骨骼的形成和重塑過程⁽²¹⁾

2-2-1 骨細胞成分

骨母細胞是促使骨骼重建的特殊細胞，乃由結締組織中的間葉細胞(mesenchymal cell)分化而來，其中必須先經過骨髓網狀細胞(reticulated cells of bone marrow)及骨前趨細胞(osteoprogenitor cell)兩個過度細胞型態，其功能主要為形成彈性蛋白、合成膠原纖維及參與鈣化。在骨形成過程中，存在於間葉細胞區的巨大細胞(可能為 osteoblast)一開始是被膠原纖維圍繞住，然後逐漸連結在一起而形成一段段未鈣化的骨基質，此稱為類骨質(osteoid)。這些類骨質段接著進行骨礦化步驟，此時骨母細胞轉化為成骨細胞，所以在骨形成與鈣化的步驟中，骨母細胞扮演著主要的角色。

成骨細胞是骨組織中細胞轉化達到最後穩定型態的活細胞，當骨母細胞經過製造骨基質活性期後，大部分又回到不活化狀態，變成扁平紡錘狀，貼近不活化的骨表面，但有一些骨母細胞則被正在鈣化的骨基質所包圍，而存在於骨小腔(lacuna)中，稱為成骨細胞，其在骨骼重建上是不具直接的作用，即使發生骨組織的受傷亦不會使成骨細胞反應，然而在骨組織進行鈣化作用時，可維持骨組織中無機質與有機質的恆定性(homeostasis)，使鈣、磷和其他礦物質在激素的調控下，維持血漿中所須的濃度⁽²²⁾，因此正常骨骼和其他的組織一樣，一直都能穩定地被吸收(resorption)和被形成(formation)以進行新陳代謝。

蝕骨細胞由多核巨細胞(multinuclear giant cell, MNGC)組成，直徑約為 100 μm ，含有 2~50 個核及豐富的細胞質，蝕骨細胞的數量較少，其主要功能是在骨生長或修復時，負責重吸收骨質，是破壞及吸收骨組織的細胞，通常僅見於骨骼被吸收區，不會出現於新形成骨的地方，蝕骨細胞最容易發現於已鈣化的骨表面所形成貝殼狀凹陷處，這些凹陷處稱之為吸收灣(resorption bay)或 Howship's 陷窩(Howship's lacula)^(23,24)。

2-2-2 骨骼重建機制

自然骨組織在正常的情況下會進行骨生長、骨鈣化及骨新陳代謝等骨骼重塑作用，此作用可依據骨母細胞的數量、蝕骨細胞的數目、類骨質的邊緣寬度及新生骨的鈣化程度，來判定骨組織自行替換的情況⁽²⁵⁾。當骨骼發生骨折或因嚴重骨腫瘤病變而被破壞時，所造成的骨缺陷亦會進行骨骼重建，一般自然骨癒合的過程主要由三個方面所組成，即骨癒合需要有啟動的成骨細胞、骨誘導因子以產生骨基質和骨傳導介面，重建機制詳細說明如下：

一、成骨作用：骨折修復初期，骨斷裂處附近會形成骨痂(callus)，在此時骨膜深層的細胞增生相當快速，由骨髓腔內的間葉細胞經由增生血管提供養分，繼續快速分化成骨前趨細胞，接著骨前趨細胞經過適當的刺激(調節或誘導)繼續分化成具活性的骨母細胞，最後形成具有成骨能力的成骨細胞。

二、骨誘導作用：間葉細胞與骨前趨細胞本身並無成骨作用，必須經過誘導作用分化為成骨細胞才具有成骨作用。由於骨折間隙內最初並不含有軟骨細胞(chondrocyte)或骨母細胞，這些細胞在骨癒合過程中的出現，必然只是骨誘導作用的結果，產生誘導作用的因素或物質稱為誘導體(inductor)，其誘導過程稱之為骨誘導作用(osteoiduction)。

三、骨傳導作用：骨傳導作用與在局部環境中形成的骨模板(template)有關，啟動後的成骨細胞會在骨模板上產生新骨，而骨傳導作用則有利於新骨在三維空間內的產生和沉積，增加癒合過程中對大塊骨缺損及節段性骨缺損的橋接能力。其中膠原蛋白、氫氧基磷灰石以及骨中絕大部分的有機基質與無機鹽類成分都是骨傳導物質的原型。

2-3 生醫骨科材料

生醫材料是指用來輔助或代替生物體部分組織或器官功能，而且會與生物體的細胞(cell)、血液(blood)、組織(tissue)或蛋白質(protein)直接接觸的材料稱之。生醫材料已廣泛的應用於生物體內及體外，如局部植入物(implants)、導管(catheters)、人工器官(artificial organs)、藥物釋放(drug delivery)系統、毒物去除(toxin removal)系統、創傷外敷材料(wound dress)及隱形眼鏡(contact lenses)等，也可用在生醫感測器(biosensor)或是生物科技工業上的一些製程，如細胞載體(cell carriers)、酵素擔體(enzyme supports)以及需要隔離或純淨化的系統⁽²⁶⁾。

2-3-1 生醫骨科材料須具備的條件

由於生醫材料需要與體液或組織接觸，所以對材料品質要求十分嚴謹及精確，因此生醫材料需具備以下基本條件：

1. 材料需具有無毒性(non-toxicity)，不會引發溶血、免疫、發炎等反應。
2. 材料需具有基本的功能性(functionality)，才可作為受損組織及器官的替代物或修補物。
3. 材料需具有可消毒性(sterilizability)，可使用壓力鍋、環氧乙烷(ethylene oxide, E.O.)、氣漿(gas plasma)、臭氧(ozone)或 γ 射線等技術進行消毒。
4. 材料需具有良好的生物適應性(biocompatibility)。
5. 材料需具有可降解性(degradability)，這是目前先進生醫材料最需具備的條件。

對於應用於硬骨組織的替代材料而言，除了應具有上述基本條件之外，理想的生醫骨科材料不但希望能刺激骨細胞的增生(proliferation)及分化(differentiation)，加速骨缺陷的復元；此外價格便宜、容易製作及方

便大量生產、手術植入程序簡單等條件，更是在研製生醫骨科材料時，不可或缺的考慮因素。

2-3-2 生醫骨科材料的分類

在臨床上由於意外傷害或外科手術所引起的骨缺陷，常因為骨骼受傷癒合期太長而苦惱，主要是由於骨骼是一個複雜的結締組織，從患處舊骨被蝕骨細胞(osteoclast)重吸收(resorbing)，到骨母細胞(osteoblast)形成新生骨組織的重塑(remodeling)過程，就需長達6個月以上⁽²⁰⁾，若需更進一步使骨質礦質化(mineralization)達到一定強度，則所需時間將更長。但若骨組織斷裂缺口過大，則會造成傷口延遲癒合(delayed union)或不癒合(nonunion)的問題。當骨骼缺口太大而超過五分之一骨骼直徑時，通常此間隙無法自然接合，這時骨科替代材料的填補或置換是目前最常被使用的治療方式。

人類利用生醫骨科材料來填充骨折間隙，其作用如同一個骨架，可提供新生骨細胞排列其間，經過重塑過程及替代作用之後，新生骨組織將取代材料，以進行修復或置換受創的骨骼⁽²⁷⁾。若以取得來源進行骨科替代材料的分類，大致可分為自然性骨科材料和人工合成材料兩大類，下面就這兩類材料作詳細說明。

2-3-2-1 自然性骨科材料

由動物體內取得骨組織的自然性骨科材料，依據動物基因的相異性及造成免疫問題等觀點，可分為下列三種形式⁽²⁸⁾，臨床應用的優劣點分別闡述如下：

一、自體骨骼材料(*autologous bone*)：利用取自病患本身的骨骼以促進骨癒合或取代缺失骨骼，這是最理想的骨骼材料，具有成骨能力且不會發生免疫排斥現象及疾病傳播問題。但由於數量有限，未能提供夠強的大塊骨移植塊，容易造成取骨處二度傷害及感染，因此應用範圍受限。

二、異體骨骼材料(*allogous bone*)：即取自其他人捐贈骨骼進行骨移植，即一般的骨銀行，這些骨骼在使用前要經過嚴格的篩檢過程，並經特殊處理(如低溫冰凍、冷凍乾燥、輻射處理等)，降低抗原性，以減小排斥現象，並且確定無感染病原後才可使用。異體骨骼材料數量較大，且可提供大塊具足夠強度的骨移植塊，目前臨床上雖常被應用，但仍無法完全排除免疫排斥及疾病感染的疑慮，因此也限制了臨床的運用。

三、異種骨骼材料(*xenologous bone*)：將與人類不同種屬的個體骨骼經處理後，即去除骨塊的蛋白質及脂肪，只留下礦質化的完整結構，亦可供為骨移植使用。這些經過處理的異種骨骼材料，因只留下礦質化結構，所以只能提供漸進式替換作用的骨架，而不能作為真正促使骨質新生的骨移植材料。異種骨移植塊所具有的骨質新生潛能很小，但對充填骨骼缺損空間及維護骨切開部位的完整結構很有用。臨床上曾使用過的異種移植骨塊包括牛骨、豬骨、珊瑚等，但同樣面臨免疫排斥及疾病感染的問題。

2-3-2-1 人工合成骨科材料

現今常被用來研究作為人工合成骨科替代材料，大致可分為金屬、陶瓷、高分子及複合材料等四種⁽²⁹⁻³²⁾，以下將依序就這幾種材料的發展演進進行說明：

一、金屬材料：自從 1775 年首先成功地使用鐵線於修復骨折的手術，1860 年使用銀線於長骨折裂的固定，1886 年開始使用鋼板於骨折固定，1902 年 Jones 利用黃金薄片包覆在關節端，以達到永久性植入的效果，1938 年 Bives 利用鈦、鈮合金作第一個金屬的完整人工置換骨。而自十九世紀末期，金屬在生醫骨科材料的應用發展更加迅速，目前移植用的金屬材料大約有一半由不鏽鋼製成，另一半是由抗腐蝕性、高強度的鈦合金及鈷-鉻合金製成⁽³³⁾。

二、陶瓷材料：由於生醫陶瓷及生醫玻璃具有良好的生物適應性，故廣泛地被作為骨科及齒科置換材料。目前對鈣磷系列的生醫陶瓷作為硬組織移植的研究，乃希望材料在生物體內能釋出部分鈣離子以刺激新生骨的形成，但其方式不同於 1920 年 Albee 和 Morrison⁽³⁴⁾利用三鈣磷酸鹽粉末填在骨骼斷裂面，來促進骨骼癒合速度的研究，而是以燒結成型的陶瓷材料為植入材料，以利材料在組織中心固定，由此之後許多相關的研究亦紛紛被提出，在目前所使用的生醫骨科陶瓷材料，以塊狀(dense blocks)或多孔性(porous)的氫氧基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)和三鈣磷酸鹽(tricalcium phosphate, TCP)應用最為廣泛，氫氧基磷灰石和三鈣磷酸鹽對活體組織都有高度的生物適應性，既不會有系統毒性，也不會有免疫的排斥反應，都可促進骨的再生。其他有關生醫玻璃陶瓷的發展，如 1985 年 Yamamuro 等人⁽³⁵⁾發展一種新的玻璃陶瓷，及 1988 年 Lin 等人⁽³⁶⁾對 DP-bioglass 等相關的研究，此類材料所強調的乃是高的機械強度、良好的引導新生骨形成的能力(osteoconductive potentiality)，由此可見鈣磷系陶瓷、生醫玻璃及玻璃陶瓷已成為生醫骨科材料發展的主流。

三、高分子材料：1880 年 Gluck⁽³⁷⁾ 利用樹脂作為牙齒的修補材料，1930 年以後人工合成的高分子被用於關節軟骨的替代材料，1969 年 Shapiro 等人⁽³⁸⁾即以聚甲基丙烯酸甲酯(poly-methylmethacrylate, PMMA) 作為固定或填充材料的骨水泥(bone cement)，1990 年 Alici 等人⁽³⁹⁾發展出高硬度的 polyethylene 等材料作為骨科替代材料。

四、複合材料：複合材料作為骨科替代材料，依其組成成分的不同，主要可分為二種型式，一為利用金屬高強度結合陶瓷的組織親合性與良好的生物適應性，如在不鏽鋼或鈦合金表面鍍上一層氫氧基磷灰石粉體，利用氫氧基磷灰石表面活化陶瓷的特性，試圖增加植入金屬與自然骨組織之間的結合能力⁽⁴⁰⁻⁴²⁾，然而經過臨床應用發現長期植入於生物體內，金屬與陶瓷之間的界面容易發生剝離。另一種複合材料為陶瓷材料與高分子材料的混合，其中高分子材料的選擇，一般以生物可吸收性的高分子材料為主，由於人工合成高分子材料僅具有黏著力與可降解等性質，對骨組織的修復並沒有任何助益，因此許多學者提出利用天然的高分子材料取代人工合成高分子材料，如 1983 年 Mittelmerier 等人⁽⁴³⁾將膠原蛋白(collagen)和氫氧基磷灰石混合進行骨缺陷修補，發現新生骨組織形成的速度有明顯加快的現象；1984 年 Chierici⁽⁴⁴⁾更單獨使用膠原蛋白作為猴子顱骨的填充材料，發現膠原蛋白具有促進新生骨組織的能力。雖然這類複合材料的機械強度並不足以作為需擔當強度的骨科替代材料，然而此複合材料合成的方便性，及可添加促進骨生長的物質，對於無法自然癒合的骨缺陷將是極佳的填充材料。

2-3-3 生醫骨科材料臨床應用

無論是取之於自然性或是由人工合成的骨科材料，根據材料本身物理性質的不同，以及是否具有生物降解的特性，這些材料於臨床應用上最主要可分為兩種型式⁽⁴⁵⁾：

一、架構性材料：這些材料大部份乃由非降解性陶瓷材料、金屬、合金及高分子所製成，其主要被運用來代替自然骨骼的機械性及支撐的功能，因此並不需訴求與自然骨骼一樣的化學組成成分及結構，但是，此類材料需長期存在於生理環境中，所以其穩定性、生物適應性及材料的機械強度是否能與周圍骨骼匹配，即是發展時最重要的考量關鍵，臨床上較常見的有人工關節、內固定器及長骨置換等。

二、蛻化性材料：這類材料臨床應用的主要目的，是提供一個架構或內含可促進新生骨組織生長修復成分的基質，隨著受傷骨組織的復原，植入材料亦逐漸地被降解吸收，最後希望骨缺陷完全癒合成為新的自然骨組織。對此類材料在研製時的考量重點，即為材料的可吸收性(resorbability)與降解速率(degradation rate)的控制，當然材料進行降解時所釋放出的成分，是否會對組織造成生物毒性(cytotoxicity)與排斥反應，亦或會促進組織的生成速度，更是重要的評估因素，而機械強度將不是重要的決定依據，此類材料通常被使用為局部骨缺陷的填充物。

2-4 幹細胞

幹細胞定義為同一源系之細胞間具有自我更生(self-renewal)及多元性分化(multi-lineage differentiation)能力的細胞。就功能上而言，幹細胞是一種具有多方面潛能(multipotent)，可自我更生(self-renewing)的細胞，位於細胞體系(cell lineage)的源頭，並可分化成不同種類的組織⁽⁴⁶⁾。

人類幹細胞可以存在於胚胎或是所有的個體之內，包括幼兒及成人，它的功能是可以提供胚胎發育成長，例如小孩子的成長或是青春期的發育；還有組織修復，例如肝臟、皮膚及骨頭的修復；另外還有組織的正常更新，像是細胞老化的更新等。

就如圖 2-3 所示，幹細胞的分裂可為對稱性分裂(symmetric division)，以擴充本身的數量，如早期的胚胎發展，每一幹細胞分裂與成長成具相同分化潛能的幹細胞；也可為非對稱性分裂(asymmetric division)，一方面自我更新，一方面繁衍成較具分化性的後代⁽⁴⁷⁾。當組織因受傷或疾病而造成細胞退化或死亡，幹細胞就開始進行這種非對稱性的分裂，分裂成一個跟自己完全一樣的幹細胞及另一個準備分化為成熟細胞的起源細胞(progenitor cell)，所以組織一方面維持了長期自行更新的能力，一方面又增加了新細胞可以發展為成熟細胞以替代喪失的部份。

依照來源的不同，或分裂及分化能力的差異來分，幹細胞可分為很多種，但可簡單的分為兩大類，第一類是胚胎幹細胞(embryonic stem cells)，第二類是成人幹細胞(adult stem cells)。

胚胎幹細胞來自於胚胎，能分化為所有組織，被認為是萬能的細胞，其取得會有道德倫理上的爭議，而成人幹細胞(adult stem cells)由成體，包括兒童或成人的任何組織取得，沒有道德倫理上的爭議，隨時可以自病人身上取得，經由體外培養到足夠數量，便可應用於組織工程或細胞療法。以前的觀念認為某種組織內的成人幹細胞只能分化為該組織

的成熟細胞，也就是成人幹細胞的發展受到組織或胚層之間的制約性 (commitment)。但近幾年來這種觀念受到了嚴重的挑戰，研究報告指出骨髓內原本被認為只能分化為血球細胞的造血幹細胞(hematopoietic stem cell)在新的環境下亦能發展成神經細胞、肝細胞或肌肉細胞，而神經細胞亦能變成血球細胞。這種越來越多轉分化(transdifferentiation)現象代表著成人幹細胞的可塑性(plasticity)越來越寬廣，而其應用於組織工程、再生醫學、細胞療法等的角色也將更形重要。

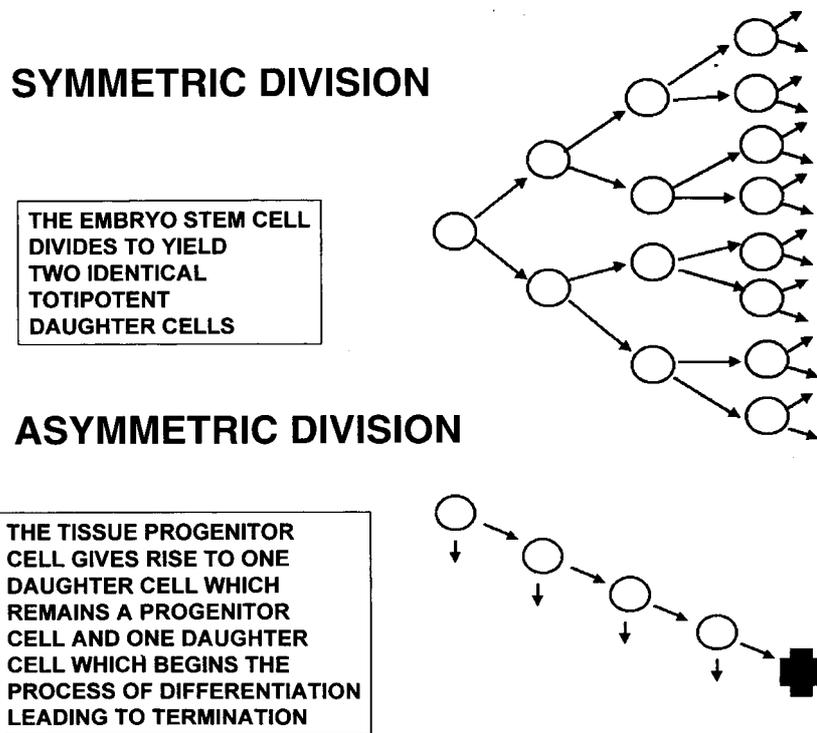


圖 2-3 對稱性與非對稱性分裂

成人幹細胞存在於骨髓、肌肉、脂肪、神經及臍帶血中。其中又以骨髓中取得最為容易，而且沒有時間的限制。骨髓中的幹細胞主要有兩種：一種是造血幹細胞(hematopoietic stem cells)，其細胞表面抗原為 CD34 陽性，可以經分化誘導成紅血球、白血球、血小板及其他血球細胞；另一種是間質幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)，間質幹細胞不同於懸浮性的造血幹細胞，在細胞培養時可貼附於培養皿，因此可利用此特性將其自骨髓中分離出，其細胞表面抗原測試結果顯示和造血幹細胞不同，為 CD34 表面抗原陰性，而 SH2, SH3 及 CD105 等表面抗原則

為陽性反應。就如圖 2-4 中所示，間質幹細胞除了可以分化為中胚層的骨骼肌肉系統外，已被證明可以分化成不同的細胞或組織；包括肝臟細胞、心肌細胞、神經及腦細胞等。

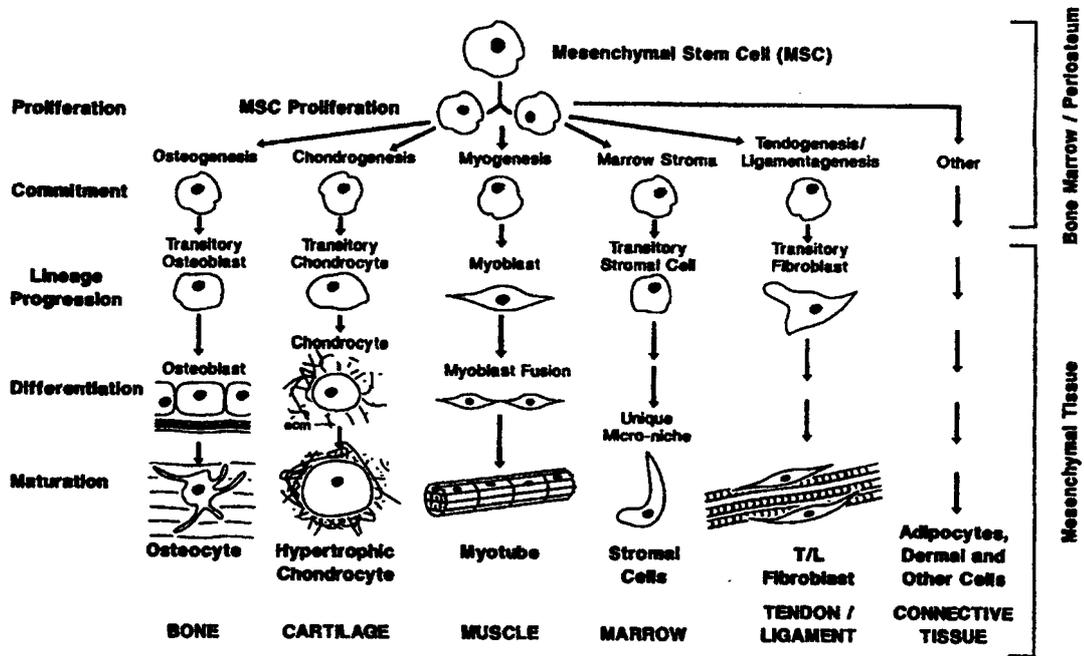


圖 2-4 間質幹細胞分化的可塑性示意圖⁽⁴⁸⁾

2-5 骨碎補本草源流

骨碎補在現代臨床主要應用於骨折、腎虛耳鳴及泄瀉等證，然其藥材來源從唐宋以降就有數種說法，但主要為水龍骨科(Polypodiaceae)及骨碎補科(Davalliaceae)植物⁽⁴⁹⁾，直到 1995 年中國藥典才將其統一為水龍骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的乾燥根莖。其原植物如圖 2-5 所示。



圖 2-5 水龍骨科槲蕨之原植物圖⁽⁴⁹⁾，注意其葉片為深裂

骨碎補在中國最古老的藥典〈神農本草經〉中並未記載，在歷代文獻中首見於唐代陳藏器所著的〈本草拾遺〉中，其書已亡佚，但其內容則見於後代本草著述中，如〈開寶本草〉、〈嘉祐本草〉、〈證類大觀本草〉、〈重修政和經史證類備用本草〉、〈本草綱目〉……等。但〈開寶本草〉及〈嘉祐本草〉亦已亡佚，因此就〈證類大觀本草〉⁽⁵⁰⁾中的內容予以引出。

陳藏器云：「骨碎補似石韋而一根，餘葉生於木，嶺南虔吉亦有，本名猴薑。開元皇帝以其主傷折，補骨碎，故作此名耳。」這一內容說明了原植物具有以下幾個特徵：

1. 型態似石韋而一根：骨碎補的植物型態與石韋相似，同為蕨類植物而具有匍匐於木石之上的根莖，但仔細比較石韋的植物型態（如圖 2-6 所示），其葉緣與水龍骨科植物槲蕨的型態並不一樣，石韋為全緣，而槲蕨為羽狀深裂。
2. 餘葉生於木：表示其為寄生於樹木上之寄生植物，就如蕨類一般。
3. 嶺南虔吉亦有：說明其產地在潮濕、溫暖的南方。



圖 2-6 石韋的原植物圖⁽⁵¹⁾注意圖中其葉片為全緣，而非深裂

而〈開寶本草〉（原書已亡佚，此段文字為自〈證類大觀本草〉中摘出）中則提出：「生江南，根著樹石上，有毛，葉如菴閣。江西人呼為胡孫薑，一名石菴閣，一名骨碎布。」⁽⁵⁰⁾這段文字除產地亦為潮溼溫暖之江南及根著樹石上外，又提出下列幾個特徵：

1. 其根有毛：此特徵與水龍科及骨碎補科之蕨類植物相符。其別名胡孫薑與本草拾遺之猴薑近似，因猴子又稱狒狒，是指其根與薑相似而與猴子一樣有毛。（參見圖 2-7）
2. 葉如菴閣：依〈植物名實圖考〉⁽⁵²⁾（圖 2-8）所載：「李時珍以為葉如菊葉者是。圖經謂：菴閣惟入諸雜治藥中，治痿折，瘀血。大

抵蒿艾之類，供薪蒸者，不知世復有用者否？」菴閣之葉片近似掌狀深裂且葉緣為鈍鋸齒型，此與槲蕨明顯不同。而其別名石菴閣就是指出其為生長在石頭上，但型態與菴閣相似的植物。



圖 2-7 水龍骨科槲蕨原植物的根，似薑而有毛⁽⁴⁹⁾



圖 2-8 引自〈植物名實圖考〉菴閣原植物圖⁽⁵²⁾

〈證類大觀本草〉中尚有引用日華子的一段文字：「猴薑，是樹上寄生草，苗似薑細長。」此段文字亦與上面所述之特點相近。

與宋〈嘉祐本草〉同時，而由蘇頌等所編撰的〈圖經本草〉(原書亦已亡佚，此段文字為自〈證類大觀本草〉⁽⁵⁰⁾中摘出)中提到：「骨碎補，生江南……根生大木或石上，多在背陰處，引根成條，上有黃毛及短葉附之。又有大葉成枝，面青綠色，有黃點，背青白色，有赤紫點。春生葉，至冬乾黃，無花實，惟根入藥。採無時，削去毛用之。本名胡孫薑，唐明皇以其主折傷有奇效，故作此名。……又名石毛薑。」上述文字所描述明顯為蕨類植物，觀其所附之圖(圖 2-9)，戎州骨碎補及舒州骨碎補，與水龍骨科植物較為相似，但葉緣為全緣而非深裂，而海州骨碎補則為骨碎補科植物(圖 2-10)。

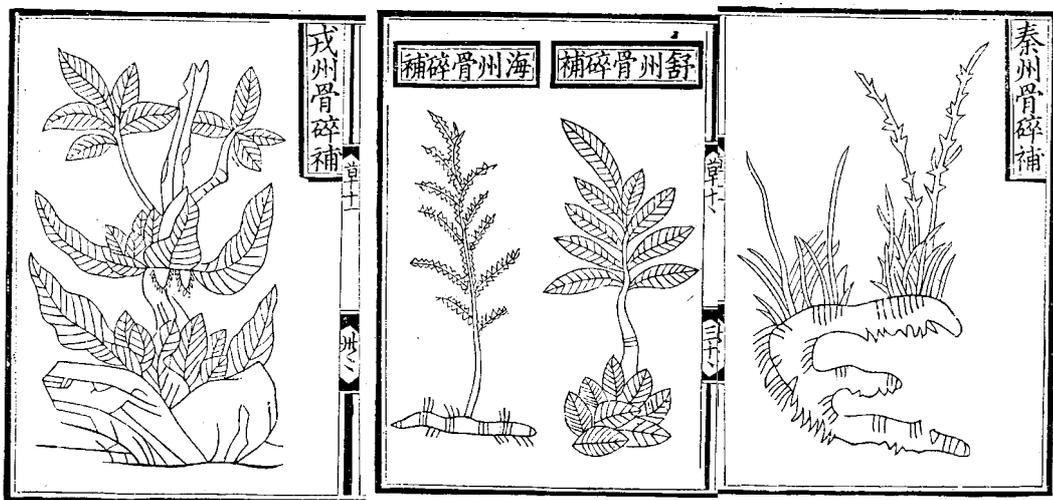


圖 2-9〈大觀本草〉所附之原植物圖⁽⁵⁰⁾

在較晚的〈重修政和經史證類備用本草〉中，除繼續引用上述的說法以外，又引入寇宗奭所著之〈本草衍義〉：「骨碎補苗不似薑，薑苗如葦稍，此物苗每一大葉兩邊小葉槎牙，兩兩相對，葉長有尖瓣也。」⁽⁵⁴⁾此段文字指出了骨碎補的葉子不像薑為全緣，而是兩邊小葉槎牙，兩兩相對，在其所附圖中(圖 2-11)戎州骨碎補葉緣為深裂，而舒州骨碎補則為淺裂，與大觀本草明顯不同。



圖 2-10 引自〈藥用植物學〉之骨碎補科原植物圖⁽⁵³⁾



圖 2-11 〈重修政和經史證類備用本草〉所附之骨碎補植物圖⁽⁵⁴⁾

明朝李時珍〈本草綱目〉⁽⁵⁵⁾云：「其根扁長，略似薑形，其葉有極缺，頗似貫眾葉，謂葉如蒼閭者殊謬，如石韋者亦差。」此段文字亦說明骨碎補之葉有極缺，這點與〈本草衍義〉相似。

清朝吳其濬〈植物名實圖考〉中提到骨碎補一共有四處並各附一圖節錄如下：

- 一、「骨碎補，本草拾遺謂之猴薑，開元時以其主傷折，補骨碎命名。凡古木陰地皆有之。」⁽⁵⁶⁾(見圖 2-12)此段文字僅指出蕨類之生長環境，對其它特點則未提及，但觀其圖與水龍骨科植物相近。

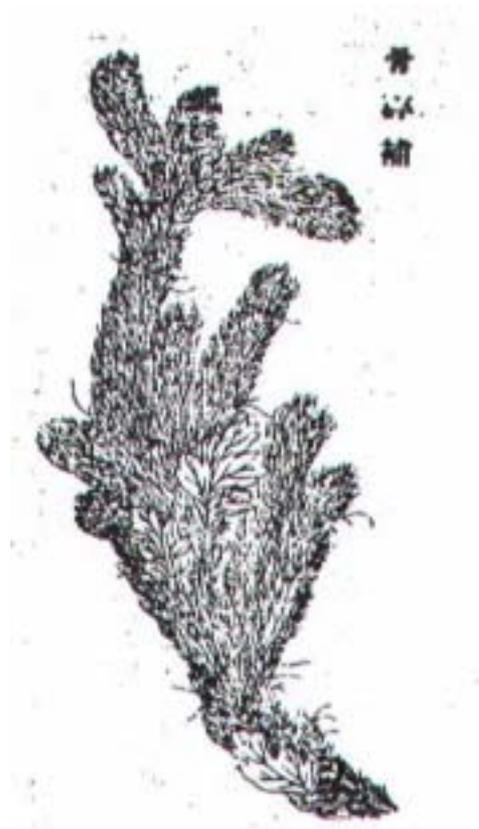


圖 2-12 引自〈植物名實圖考〉之骨碎補⁽⁵⁶⁾

- 二、「骨碎補與猴薑一類，惟猴薑扁闊，骨碎補圓長，滇之採藥者別之。」⁽⁵⁷⁾(見圖 2-13)觀其圖與水龍骨科植物槲蕨相近。

- 三、「過山龍一名骨碎補。似猴薑而色紫，有毛，雲南極多。味苦

性溫，補腎。治耳鳴及腎虛久瀉。」⁽⁵⁸⁾(見圖 2-14)此段文字僅描寫其地下根莖似猴薑而色紫，有毛，對葉子並未述及，無從判斷其為水龍骨科或骨碎補科植物，而觀其圖與此兩科植物之根莖均頗為相近。



圖 2-13 引自〈植物名實圖考〉之骨碎補⁽⁵⁷⁾



圖 2-14 引自〈植物名實圖考〉之過山龍⁽⁵⁸⁾

四、「碎補生雲南山石間。橫根叢莖，莖極勁，細葉如前胡、藁本輩。石草似此種者甚多，而葉細碎無逾於此。」⁽⁵⁹⁾(見圖 2-15)此圖與骨碎補科植物海州骨碎補相近。



圖 2-15 引自〈植物名實圖考〉之碎補⁽⁵⁹⁾

在近代的研究方面，大陸學者周富榮及張小茜對 3 種骨碎補槲蕨、中華槲蕨、大葉骨碎補進行品質評價研究⁽⁶⁰⁾，發現槲蕨含骨碎補之主要成分柚皮甙，中華槲蕨、大葉骨碎補未檢出柚皮甙。另一學者李煥忠亦進行四種骨碎補藥材檢識的研究發現⁽⁶¹⁾，屬槲蕨品種的藥材，含有柚皮甙，而中華槲蕨類未測到柚皮甙。針對柚皮甙大陸學者周銅水等在「骨碎補對大鼠實驗性骨損傷癒合的影響」⁽⁶²⁾之研究中指出，槲蕨根莖主成分柚皮甙與相當劑量的生藥作用效果相當，說明柚皮甙可能是槲蕨促進骨損傷癒合作用的主要活性成分。

綜合古書及近代研究，骨碎補藥材應儘可能的選用含有柚皮甙的水龍骨科植物槲蕨。

第三章 實驗材料與方法

本研究所使用的支架為結合天然交聯劑綠梔子素(Genipin)、高分子材料明膠(Gelatin)及陶瓷粉末三鈣磷酸鹽(Tricalcium phosphate)並以氯化鈉顆粒進行材料孔隙度與孔徑大小之調控，所新研製成的多孔性骨科填充材料稱為多孔性 GGT。細胞為自兔體腸骨抽取骨髓培養所得的間質幹細胞，此細胞經適當的刺激可分化為骨母細胞，訊號則為中藥骨碎補、Dexamethasone、 β -glycerolphate 及 L-ascorbic acid。

3-1 實驗材料

本研究支架所使用的實驗材料包括四部份：陶瓷材料(ceramics)、高分子材料(polymer)、天然交聯劑(naturally occurring cross-linking reagent)、中藥骨碎補，分別描述如下：

3-1-1 陶瓷材料—三鈣磷酸鹽粉末

三鈣磷酸鹽(Tricalcium phosphate, TCP; Merck, Germany)粉末為生物可吸收的(bioresorbable)陶瓷材料，而三鈣磷酸鹽若經不同溫度的熱處理，會有不同的結晶相產生，分別為經 1000 °C 高溫處理的穩定 β 相，以及經 1180 °C 鍛燒後所轉變的不穩定 α 相⁽¹⁴⁾。由於本研究所研製的多孔性骨科複合材料，目的在提供骨缺陷癒合過程的骨引導作用，所以不可有太快的降解速率，因此使用較穩定的 β 相三鈣磷酸鹽粉末。將熱處理後的三鈣磷酸鹽粉末研磨，再以 30 與 40 mesh 的篩網過篩，得到的顆粒大小約 200-300 μm ，即完成本研究所需陶瓷材料成份的製備，待合成多孔性骨科複合材料時使用。

3-1-2 高分子材料—明膠

有機高分子材料常被利用作為陶瓷粉末的黏結劑(binding agent)，其中天然高分子材料如纖維蛋白(fibrin)、膠原蛋白(collagen)及明膠(gelatin)在近來的研究中更是被廣泛的使用。這些高分子材料不僅可黏結陶瓷粉末以避免被體液或血液沖刷流失，更重要的是在骨缺陷癒合初期，扮演加速組織修復與引導血管長入骨缺陷部位的角色^(32,63)。本研究乃選擇豬皮(porcine skin)所提煉的明膠(Bloom number 300, Sigma Chemical Co., USA)作為三鈣磷酸鹽粉末的黏結劑，由產品所提供的資訊得知其平均分子量為 50,000-100,000 道耳吞(dalton)。

明膠係由動物的皮、筋、腱等結締組織以及骨骼中的膠原蛋白轉換而來，含有 85 % 以上的蛋白質及 10 % 左右的水分，乾燥明膠浸於水中會因吸水而膨潤(swelling)，當溫度提高至 35 °C 則明膠開始溶解。一般外科修補材料中，明膠水溶液含量大致為 10-35 %，為防止直接加熱造成明膠燒焦及蛋白質被破壞，故於加熱時採用水浴法，並不時地攪拌成為均質的(homogeneous)明膠溶液，而水浴法溫度的控制必須隨著所要求的明膠濃度而有所改變，一般溶液濃度介於 5-20 % 之間，必須調整溫度在 60-80 °C 之間，若提高溶液濃度至 25-30 % 之間時，則加熱溫度亦隨之提高到 90-100 °C，本研究所調配的明膠溶液濃度為 18 %，故在水浴法加熱時，將溫度控制在 70-75 °C 之間⁽⁶⁴⁾。

3-1-3 天然交聯劑—綠梔子素

生醫材料在臨床應用時，雖可暫時或永久性的取代缺損的組織或器官，然而當生醫材料植入生物體內之後，可能面臨免疫系統及酵素的攻擊，產生局部發炎而被分解，失去預期的功能。因此，為了使材料在生物體內具有抵抗免疫系統及酵素的攻擊能力，以增加材料在生物體內的停留時間，所以生醫材料在植入之前，須先經過交聯劑的交聯處理⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾。

由於人工合成化學交聯劑所產生生物毒性(cytotoxicity)的問題，增加了生醫材料於臨床應用上的不方便性與困擾，為了克服生物毒性問題，本研究採用由中藥梔子的果實(Cape Jasmine Fruit)萃取純化出來的天然交聯劑—綠梔子素(genipin; Challenge Bioproducts Co., Taiwan)。綠梔子素可以和氨基酸或蛋白質自然反應形成深藍色的產物⁽⁶⁸⁾，而這些產物常被食品業作為天然食用色素，梔子的果實為現代中醫臨床常用的清熱解毒藥，早在秦漢年間成書的〈神農本草經〉便記載梔子「苦寒，無毒。主五內邪氣，胃中熱氣，面赤，酒皰鼓鼻，白癩，赤癩，瘡瘍。⁽⁶⁹⁾」明朝李時珍的〈本草綱目〉中亦記載梔子「治吐血、衄血，血痢、下血、血淋，損傷瘀血及傷寒勞復，熱厥頭痛、疝氣，湯火傷。⁽⁷⁰⁾」，在現代中醫臨床常應用於清熱除煩、解毒，如心煩不眠、煩躁、目赤腫痛、咽喉疼痛等，又可清利濕熱、消黃，如肝炎、膽結石、尿道炎等症，還可涼血、止血、活血，可治療肺熱咳血，或因血熱所造成的吐血、衄血、尿血等出血症狀⁽⁷¹⁾，由於綠梔子素在天然食用色素的應用及梔子在傳統中醫臨床的廣泛使用可知，其生物毒性應比一般化學交聯劑來得低，因此本研究選用綠梔子素作為交聯劑。

3-1-4 中藥—骨碎補

骨碎補為水龍骨科(Polypodiaceae)多年生蕨類植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的乾燥根莖，其生藥圖參考圖 3-1。在古代用於治療骨折，因此便以功用命名為骨碎補。明朝李時珍〈本草綱目〉記載：「骨碎補，氣味苦溫無毒。主治破血止血，補傷折。主骨中毒氣，風血疼痛。」⁽⁷²⁾在現代臨床主要應用於骨折、腎虛耳鳴及泄瀉等證，主要成分有柚皮甙、骨碎補雙氫黃酮甙、骨碎補酸等。骨碎補與骨折修復有關的藥理作用主要為促進骨骼對鈣的吸收，並提高血鈣和血磷的水平，有利於骨折的癒合，又可改善軟骨細胞的功能，延遲細胞退行性病變，降低關節病變率⁽⁷³⁾。根據之前的研究顯示在細胞培養液中添加 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的骨碎補水溶液對骨母細胞培養生物適應性良好，能促進骨細胞礦物質化結節的形成，對細胞的增生及分化亦有促進效果⁽⁷⁴⁾，而在以 S-D 大鼠頭蓋骨的器官培養，GGT+骨碎補 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的新生類骨組織所佔骨缺陷表現最好⁽¹⁷⁾，因此本研究採用骨碎補水溶液濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ ，以進行相關的細胞培養與材料製備。



圖 3-1 骨碎補生藥圖

3-2 實驗流程

本研究所進行的實驗流程如圖 3-2 所示，首先結合綠梔子素(Genipin)、明膠(Gelatin)及三鈣磷酸鹽(Tricalcium phosphate)進行材料製備，在製備過程加入過篩之氯化鈉顆粒，以製造出多孔性的骨科填充材料—多孔性 GGT 作為對照組，另外將骨碎補生藥萃取成粉末狀，於材料製備過程中加入作為實驗組，接著對這兩組材料進行分析，包括孔隙度、膨潤度及降解速率測定、掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope, SEM)觀察及能量散射光譜分析儀(Energy dispersive X-ray spectrometry, EDS)元素分析。

在生物適應性評估方面，包括體外及體內測試兩部份，先從兔體腸骨抽取骨髓，進行間質幹細胞培養，待培養 2-3 周後，間質幹細胞達一定數量時，除將一部分植入多孔性 GGT 進行動態培養外，並進行體外測試(in vitro test)。

將繼代培養之間質幹細胞於培養時分成以未添加分化劑培養液培養之對照組、添加分化劑培養液與添加分化劑及中藥骨碎補培養液培養之實驗組，分別於培養 1 週、2 週、4 週時進行鹼性磷酸酶染色法、Von Kossa's 染色法及 MTT 色度分析法，確定間質幹細胞經由分化劑與中藥骨碎補的刺激是否可朝骨母細胞分化，並測定細胞增生情形。

將間質幹細胞植入多孔性 GGT 材料中，置入磁攪拌培養瓶中進行動態培養，培養時於培養液中加入分化劑誘導間質幹細胞朝骨母細胞分化，在培養 1 週、2 週、4 週時分別取出植回兔體頭蓋骨，此時並同時取出一件試片以掃描式電子顯微鏡(SEM)及組織切片進行觀察細胞實際生長情形。

體內測試(in vivo test)部分以未培養間質幹細胞之多孔性 GGT 為對照組，含有自體間質幹細胞之多孔性 GGT 及添加中藥骨碎補之多孔性 GGT 為實驗組，分別植入兔體頭蓋骨，經手術八週後，將兔子犧牲取出

頭蓋骨，作巨視觀察、X光檢驗、掃描式電子顯微鏡及組織切片，以觀察多孔性 GGT 在生物體內被吸收及新生骨組織生長情形，以評估間質幹細胞、中藥骨碎補於體內骨缺陷修復過程所產生之影響。本研究所進行的各流程，將分別於本章後續章節詳細說明之。

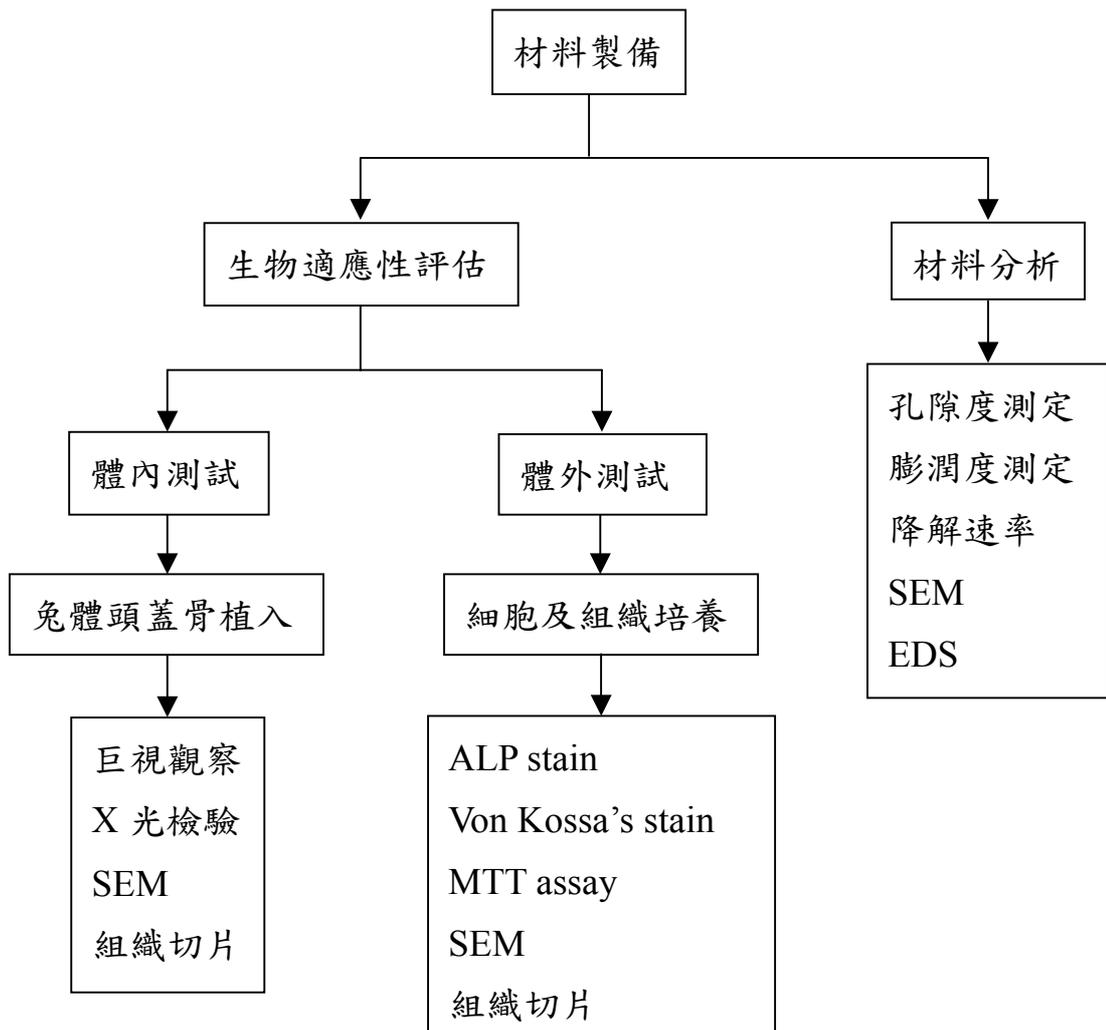


圖 3-2 實驗流程圖

3-3 多孔性骨科複合材料的研製

利用天然交聯劑綠梔子素(Genipin)、高分子材料明膠(Gelatin)及陶瓷粉末三鈣磷酸鹽(Tricalcium phosphate)並以氯化鈉顆粒進行材料孔隙度與孔徑大小之調控，所新研製成的多孔性骨科填充材料稱為多孔性 GGT，本研究給予一個特定名稱—多孔性 GGT(porous composite of genipin cross-linked gelatin with tricalcium phosphate)，對於多孔性 GGT 及添加骨碎補的多孔性 GGT 研製過程分別詳細說明如下：

3-3-1 中藥骨碎補的萃取

本實驗所使用之骨碎補(欣隆藥行，台灣台中市)藥材粉末為自生藥萃取而得，先秤取骨碎補生藥 100 g，再以清水洗去雜質及泥砂，將骨碎補置入煎藥壺中，加清水約 500 ml，先行浸泡 20 分鐘，再加熱萃取二次，將藥液收集於燒杯中，再用濾紙(Filter paper, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan)將藥液過濾，去除雜質。

過濾後之藥液置於燒杯中直接加熱濃縮至約 50 ml 時，改為水浴法加熱以避免燒焦，待濃縮成膏狀時停止加熱，置於室溫冷卻後，移至-80 °C 冰箱冷凍 3 小時後取出，以真空乾燥機脫水成乾燥粉末備用。

3-3-2 多孔性骨科複合材料製備

本研究材料的製備分為對照組及實驗組，對照組為未添加中藥骨碎補的多孔性 GGT，而實驗組則為添加中藥骨碎補多孔性 GGT。

為了製作出多孔性的骨科複合材料，本研究選用穩定又容易為水所溶解的氯化鈉顆粒作為填充劑，在製備過程中先與三鈣磷酸鹽粉末混合均勻，再加入其他材料，待材料成形後，再將其置入水中浸泡，使氯化鈉顆粒溶解於水中，因而製造出多孔性的結構，為使材料孔隙度達 75 % 以上，故本研究採用 GGT 與氯化鈉的重量比為 1 : 3。

首先選取適量的氯化鈉(Sodium Chloride, NaCl; Gerbu, Germany)，以 40 及 60 mesh 的篩網過篩，如此可得到氯化鈉的顆粒大小約 250-470 μm ，將過篩之氯化鈉顆粒置入高溫烘箱中，以 160-180 $^{\circ}\text{C}$ 的高溫烘乾約 4 小時，將氯化鈉中的水分予以去除，再以 40 及 60 mesh 的篩網過篩一次，秤取 108.75 g (GGT : NaCl = 1 : 3) 的氯化鈉，以待材料製備時使用。

由廠商所購得之明膠為乾燥粉末，為了使陶瓷粉末及明膠能充分均勻的混合並發揮黏結效果，須將明膠調配成溶液狀態，先稱取 9 g 明膠粉末備用，將裝有 41 ml 蒸餾水(distilled water)的燒杯，以加熱器將蒸餾水利用水浴法，隔水加熱至 75 $^{\circ}\text{C}$ 左右，將明膠粉末加入蒸餾水中，利用攪拌子(stirrer)持續攪拌約兩分鐘後，讓明膠完全溶解於熱水中而呈現透明的金黃色，此時即完成重量比 18 % 的對照組未添加中藥骨碎補明膠溶液，而添加中藥骨碎補的實驗組則先於蒸餾水中加入 0.82 g 的骨碎補萃取粉末，製成濃度為 20 mg/ml 的中藥水溶液，再將明膠加入溶解。

為了使綠梔子素溶液與明膠溶液的交聯反應達到較為均勻程度，所以在添加綠梔子素溶液之前，先將加熱器關掉，使明膠溶液溫度降至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右，再加入 20 % 綠梔子素溶液於明膠溶液中，持續攪拌約兩分鐘即完成明膠與綠梔子素的混合溶液(gelatin-genipin mixture)。

最後稱取 27 g 的三鈣磷酸鹽粉末，加入先行已經過篩並烘乾之氯化

鈉顆粒攪拌均勻，將混合的三鈣磷酸鹽粉末及氯化鈉顆粒分成等量三份，依序加入上述的明膠與綠梔子素混合溶液中，每次皆迅速攪拌約一分鐘，採取三段式的加入，主要是避免一次加入所有粉末無法達到充分混合的缺失。

當所有材料充分混合後會凝結成膠狀物，將膠狀物置入自製的模具中，並將膠狀物壓實以排出多餘的水分及空氣，待膠狀物成形後置入-80 °C 冰箱中約 30 分鐘，使材料硬化後取出，以刀片切成 1.5 cm 直徑，厚度約 0.2 cm 的圓形試片，置於室溫下交聯反應一天後，如圖 3-3 所示，此時試片中尚含有氯化鈉顆粒，因此將試片放入燒杯中，加水將氯化鈉溶解，溶解時要持續加水約一天，使水流出，以將氯化鈉完全溶解，製造出所要的孔洞。

將試片置入-80 °C 冰箱中一天後取出，以真空乾燥機乾燥，再將試片浸泡入綠梔子素溶液中一天，使交聯反應完全，再冷凍乾燥一次，將試片以封口袋包裝送至中國生化科技股份有限公司利用 γ 射線(15 kGy) 對試片進行滅菌，即完成對照組多孔性 GGT 及實驗組添加中藥骨碎補多孔性 GGT 的製備，完成之成品如圖 3-4 所示。



圖 3-3 添加骨碎補之多孔性 GGT，氯化鈉尚未溶解



圖 3-4 添加骨碎補之多孔性 GGT，氯化鈉已溶解並乾燥

3-4 材料特性分析

對照組多孔性 GGT 及實驗組添加中藥骨碎補多孔性 GGT 製備完成後，針對兩種材料分別進行孔隙度、膨潤度及降解速率測定，並以酒精脫水處理後，再以 S-3000N 掃描式電子顯微鏡進行材料斷面的觀察及攝影，並作 EDS 元素分析以確定是否有氯化鈉殘留。

3-4-1 孔隙度測定

為了了解多孔性材料可提供細胞植入貼附與生長的空間所佔材料外部體積的比例，因此需量測材料孔隙度(Porosity)，孔隙度乃指多孔性材料孔洞所佔之體積與支架外部尺寸計算而得體積之比率，因此須先求得材料實際體積與支架體積方能進行運算。

首先以比重瓶(如圖 3-5)量測材料之比重，量測前先將比重瓶洗淨及烘乾，以電子秤量測空瓶重 W_o ，再將支架切細後倒入比重瓶中，量測支架及空瓶重量 W_p ，將去離子水加入比重瓶中，並將比重瓶外多餘水分擦拭乾淨後，量測其水、支架及比重瓶重 W_t ，最後將支架倒出並沖洗乾淨，再加入去離子水，將比重瓶外之水分擦乾後，量測水及比重瓶重 W_w ，以下列公式求取材料密度。

$$d(\text{密度}) = \text{支架材料重量} / \text{與支架材料同體積水重}$$
$$= \frac{W_p - W_o}{(W_w - W_o) - (W_t - W_p)}$$

W_o ：空瓶重

W_p ：支架及瓶重

W_w ：水及瓶重

W_t ：水, 支架及瓶重

再以微量天平量測支架之重量，由密度與重量便可求得支架材料之

實際體積 V_m 。

最後以電子式游標尺量取支架之直徑與厚度求得支架外部之體積 V_s ，再由下列公式計算孔隙率。

$$\text{孔隙度(Porosity)} = \frac{(V_s - V_m)}{V_s} \times 100\%$$

V_s ：支架外部之體積

V_m ：支架材料之實際體積



圖 3-5 比重瓶

3-4-2 膨潤度測定

由於明膠在經過交聯反應後，共價鍵會在交聯明膠(cross-linked gelatin)的交聯網路中形成，使得愈高交聯度的明膠結構，愈無法維持過量的水分於交聯結構中，所以交聯度愈高的明膠，則會顯示較低之吸水能力(water uptake ability)。

膨潤度(swelling ratio)乃指材料因吸水後所增加的重量比率，因此可將材料浸至水中一段時間後取出，將表面水分吸除，量取吸水前與吸水後之重量而求得，實驗程序述之如下：

首先將 1.5 cm 直徑，厚度約 0.2 cm 多孔性 GGT 及添加中藥骨碎補多孔性 GGT 圓形材料試片，先行冷凍乾燥後，分別於微量天平秤重，此為吸水前重量(W_0)。將兩組材料分別置入裝有 20 ml 去離子水的 50 ml 離心管中，在室溫下分別浸泡 3、6、12、24 及 48 小時。

將試管中材料取出，以擦手紙將材料外表水分吸乾，將材料置於微量天平上秤重，即為吸水後重量(W_t)，以下列公式計算膨潤度。

$$\text{膨潤度(Swelling Ratio)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100\%$$

W_t ：吸水膨潤後重量

W_0 ：原始重量

3-4-3 降解速率測定

本研究所研製之材料為生物可降解材料，希望植入兔體頭蓋骨後，漸漸為兔體吸收，並為新生骨組織所取代，在進行體內及體外測試前需先測定其降解速率，確定不會過快崩解，而無法進行後續實驗。經實際量測所製之材料直徑及厚度計算體積後發現材料體積約 500 mm^3 ，本實驗以 40 倍體積即 20 ml 之去離子水進行浸泡，以進行降解實驗。

首先將材料試片，先行冷凍乾燥後於微量天平秤重(W_o)，再分別置入 50 ml 離心管中，加入去離子水 20 ml，將離心管置於 37°C ，5% CO_2 的細胞培養箱中，分別浸泡 1、2、4、6、8 及 12 週後取出離心管。

將離心管中材料取出，冷凍乾燥後置於微量天平量測降解後重量(W_t)，以下列公式計算降解失重比率。

降解速率(Degradable Weight Loss Ratio)

$$= \frac{(W_o - W_t)}{W_o} \times 100\%$$

W_o ：原始重量

W_t ：降解後重量

3-4-4 SEM 觀察及 EDS 元素分析

為了對製備完成之多孔性 GGT 複合材料進一步觀察孔洞形狀、大小、分布是否平均及孔洞之間的連通性是否良好，因此對材料的斷面進行掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察，並以能量散射光譜分析儀(EDS)分析其所含元素成分。

將製備完成之多孔性 GGT 複合材料及添加中藥骨碎補之多孔性 GGT 複合材料取出，先以去離子水浸泡，使其吸水軟化後，分別以刀片切下約 1/2，再以磷酸緩衝溶液(PBS)清洗 3 次，每次清洗時需浸泡 5-10 分鐘，再分別以 30、50、70、80、90、95、100 %之酒精溶液各浸泡 15 分鐘，以進行脫水。

脫水後將試片取出以臨界點乾燥機(HCP-2 Critical Point Dryer, HITACHI, Japan)(參見圖 3-6)進行臨界點乾燥將酒精去除，再以離子覆膜機(E-1010 Ion Sputter, HITACHI, Japan)(參見圖 3-7)鍍膜，然後以掃描式電子顯微鏡(S-3000N Scanning Electron Microscope, HITACHI, Japan)(參見圖 3-8)進行材料斷面的觀察及攝影，驗證孔洞分佈是否均勻，孔洞連通性是否良好，並以所攝得之照片實際測量孔徑之大小。再以能量散射光譜分析儀(EX-200, Energy dispersive X-ray spectrometry, EDS, Horiba, Japan)作元素分析，確認是否仍有氯化鈉殘留。



圖 3-6 HCP-2 臨界點乾燥機



圖 3-7 E-1010 鍍金機



圖 3-8 S-3000N 掃描式電子顯微鏡

3-5 生物適應性評估

3-5-1 間質幹細胞的取得與培養

骨髓中的幹細胞分為兩大類，一種是造血幹細胞，負責形成體內的血球細胞，如紅血球、白血球、淋巴球等，通常為懸浮性；另一種是間質幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)或稱骨髓基質細胞(bone marrow stromal cell)，可以分化成硬骨、軟骨、脂肪、結締組織及支持血球細胞形成的網狀結構，通常為貼附性⁽³⁴⁾。

本研究所使用的間質幹細胞為自兔體腸骨所抽取的骨髓培養而得，經由初代及繼代的細胞培養，取得所需的間質幹細胞，再以添加分化劑的培養液進行細胞培養，使間質幹細胞分化為骨母細胞，以進行相關的生物適應性評估。

3-5-1-1 間質幹細胞培養液的配製

培養間質幹細胞的培養液中含有 L-DMEM (low-glucose Dulbecco's modified eagles medium; Gibco, USA)、10 %胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1 %抗生素(antibiotics; penicillin G, 100 U/ml; streptomycin, 0.1 mg/ml; amphotericin B, 0.25 mg/ml)及碳酸氫鈉(sodium bicarbonate, NaHCO_3)3.7 g/L。

配製前先將 500 ml 血清瓶 2 瓶、1 L 燒杯 1 個、磁石攪拌器(stir)置於燒杯中及裝有 1 L 去離子水的血清瓶，先行滅菌後置於無菌操作檯(laminar flow)中。將滅菌過之去離子水約 800 ml 倒入 1 L 燒杯中，再將 L-DMEM 一包、碳酸氫鈉 3.7 g 及抗生素 10 ml 加入去離子水中，以鋁箔紙將燒杯覆蓋，移至磁石攪拌器攪拌 20 分鐘，注意轉速不可過快以免產生氣泡。

將燒杯移回無菌操作檯，加入去離子水使溶液體積為 900 ml，取少許溶液以酸鹼測定儀量測酸鹼值後，調整溶液酸鹼值為 7.2，加入 100 ml 胎牛血清，此時溶液體積為 1 L (1000 ml)，在無菌操作檯以 0.22 μm 濾膜過濾，並分裝至 500 ml 血清瓶。將瓶口封好，置入 4 °C 冰箱中保存備用。

3-5-1-2 添加分化劑培養液的配製

當間質幹細胞培養至一定數量時，要促使間質幹細胞往骨母細胞分化，此時需改以添加分化劑培養液予以培養，所添加之藥品及濃度為 10^{-8} M Dexamethasone、10 mM β -glycerolphate 及 50 μ g/ml L-ascorbic acid。

添加分化劑的培養液除上述分化劑外尚含有 DMEM (high-glucose Dulbecco's modified eagles medium; Gibco, USA)、10 %胎牛血清、1 % 抗生素、碳酸氫鈉(sodium bicarbonate, NaHCO_3) 3.7 g/L 及 sodium pyruvate 0.11 g/L。

配製前先將 500 ml 血清瓶 2 瓶、1 L 燒杯 1 個、磁石攪拌器(stir)置於燒杯中及裝有 1 L 去離子水的血清瓶，先行滅菌後置於無菌操作檯中。將滅菌過之去離子水約 800 ml 倒入 1 L 之燒杯中，再將 DMEM 一包、碳酸氫鈉 3.7 g、sodium pyruvate 0.11 g 及抗生素 10 ml 加入去離子水中。

因 Dexamethasone 的濃度只需 10^{-8} M，所以先以微量天平秤取 0.0039 g 加入 10 ml 去離子水中，調成 10^{-3} M 濃度之溶液。再以微量吸量管(Micropipet)抽取 10 μ l 的 10^{-3} M Dexamethasone 溶液加入燒杯中，稀釋後之濃度便為 10^{-8} M，再將 2.16 g β -glycerolphate 及 0.05 g L-ascorbic acid 加入燒杯中。以鋁箔紙將燒杯覆蓋，移至磁石攪拌器攪拌 20 分鐘，注意轉速不可過快以免產生氣泡。

將燒杯移回無菌操作檯，加入去離子水使溶液體積為 900 ml，取少許溶液以酸鹼測定儀量測酸鹼值後，調整溶液酸鹼值為 7.2，加入 100 ml 胎牛血清，此時溶液體積為 1 L (1000 ml)，在無菌操作檯以 0.22 μ m 濾膜過濾，並分裝至 500 ml 血清瓶。將瓶口封好，置入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存備用。

3-5-1-3 兔體骨髓抽取與培養

本實驗以 2500-3000 g 的紐西蘭雄性大白兔作為實驗動物，未添加中藥骨碎補的多孔性 GGT 對照組共 8 隻，分成 4 組，每組 2 隻，其中 1 組兔子頭蓋骨植入未培養間質幹細胞的多孔性 GGT，另外 3 組則分別自腸骨抽取骨髓，經培養約 2-3 週後得到足夠數量的間質幹細胞，將間質幹細胞植入多孔性 GGT 中，置入磁攪拌培養瓶(spinner flask)中進行動態培養，在培養 1 週、2 週及 4 週時分別將含有自體間質幹細胞的多孔性 GGT 植回原兔子頭蓋骨進行體內測試。添加中藥骨碎補的多孔性 GGT 實驗組共 12 隻兔子，也分成 4 組，每組 3 隻，流程與對照組相同。

抽取兔子骨髓前須先在兔子後大腿肌，以肌肉注射方式，將兔子予以全身麻醉。麻醉劑為全痛寧(Ketamin 10 ml/瓶 50 mg/ml，南光，台南)及若朋(Rompun, Bayer, Germany)以 1:1 方式混合，劑量為 0.8~1.5 ml/kg，待兔子熟睡後，以電動剃毛機剃除腸骨上方兔毛，再以優碘及 70%酒精作局部消毒後覆蓋紙洞巾，製造出一個無菌操作空間以避免污染。

於腸骨上方以皮下注射方式做局部麻醉，給予局部麻醉劑 Lidocaine (2 ml/瓶，10 mg/ml，林化學，台南)約 1.0~1.2 ml，待局部麻醉劑吸收後開始抽取骨髓。抽取骨髓前須先以亞魯特注射液(Agglutex injection, Heparin Sodium 5,000 Unit/ml，中國化學，台灣)潤濕 20 ml 注射針筒內側管壁，以免抽骨髓時產生凝血。將注射針頭沿腸骨方向刺入，抽取約 5 ml 骨髓。

將骨髓移至無菌操作檯依序以 18 號、20 號及 22 號針頭於培養皿中將凝結之血塊沖散，再將骨髓抽入 T-75 培養瓶(Flask)中，加入間質幹細胞培養液，置入 37 °C、5% CO₂ 培養箱(Incubator)中培養。

24 小時後取出懸浮液，置於 15 ml 離心管中，原 T-75 培養瓶再加入培養液置回培養箱培養。將裝有懸浮液之離心管以轉速 1500 rpm，離心

5 分鐘後抽去上清液，置入另一培養瓶進行培養，如此數次更換可將懸浮性的造血幹細胞及血球細胞去除，而得到貼附性的初代間質幹細胞。兔子骨髓的抽取實驗如圖 3-9 所示，而實際的細胞培養情形參見圖 3-10。

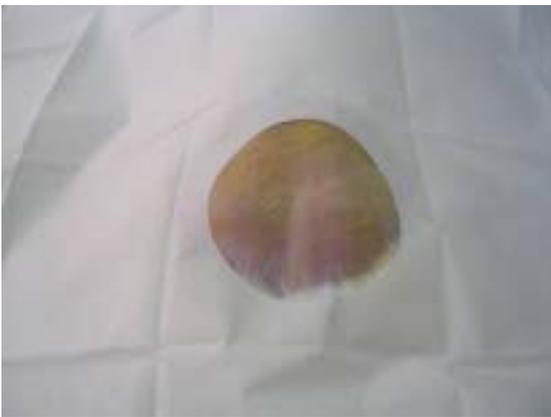
初代間質幹細胞在 T-75 培養瓶中長滿後，將培養瓶自培養箱中取出，以自動吸量管(Pipet-aid)抽除培養液，加入 5 ml 的磷酸緩衝溶液(phosphate buffer solution, PBS, Sigma, USA)兩次予以清洗乾淨，再加入 1 ml 的 0.25 % Trypsin/EDTA (Sigma, USA)溶液，輕搖幾下使溶液均勻覆蓋到所有細胞，置回細胞培養箱中靜置 2-3 分鐘後取出，輕拍培養瓶幾下，於電子顯微鏡下觀察確定間質幹細胞懸浮於 Trypsin/EDTA 溶液中，加入 5 ml 間質幹細胞培養液加以稀釋，將含有細胞之培養液抽入 15 ml 離心管中，以轉速 1500 rpm，離心 5 分鐘後抽去上清液，此時視所需分盤的數目加入適當的培養液，將離心管置於震盪器中將細胞打散均勻，再分裝於培養瓶中，每 2-3 天更換培養液 1 次，待細胞長滿後便得到繼代的間質幹細胞，本實驗即取第 2 代或第 3 代的間質幹細胞作為實驗材料。



(A)



(B)



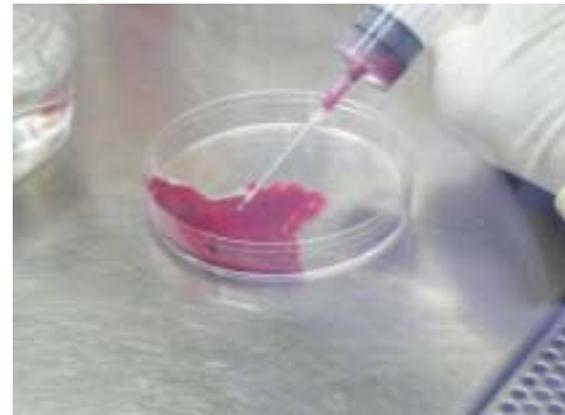
(C)



(D)

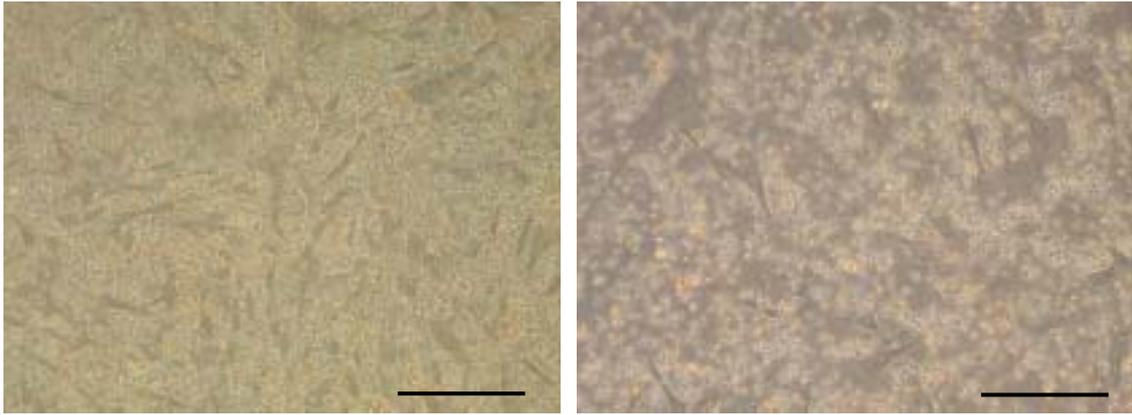


(E)

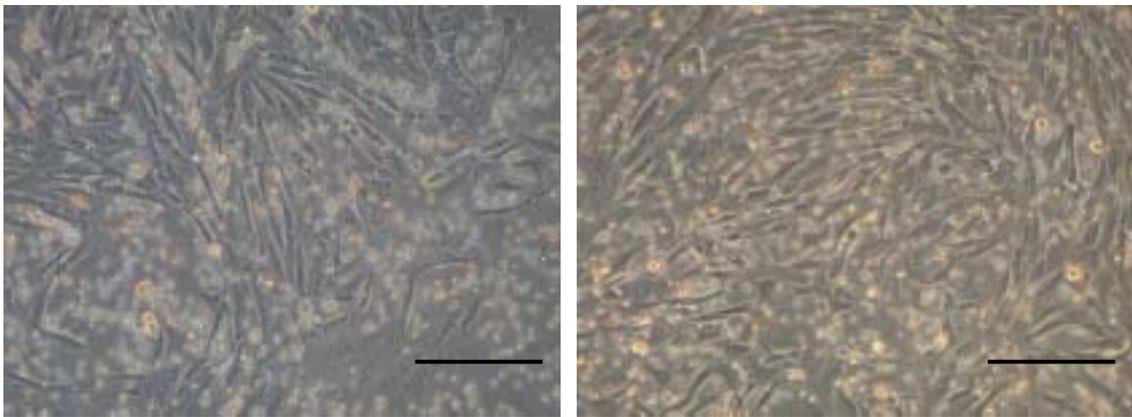


(F)

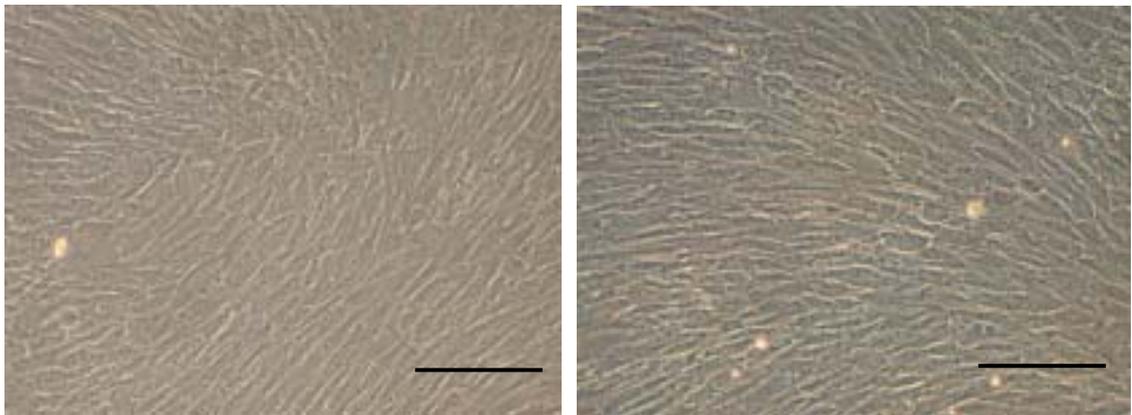
圖 3-9 抽取兔子骨髓的程序，(A)全身麻醉，(B)剃毛，(C)覆蓋洞中，
(D)局部麻醉，(E)抽骨髓，(F)將血塊打散



(A)



(B)



(C)

圖 3-10 間質幹細胞於培養瓶中實際生長情形，(A)培養第 4 天，懸浮細胞很多，間質幹細胞有少量貼附，(B)培養第 6 天及第 8 天，懸浮細胞已減少，間質幹細胞有較多貼附，(C)培養第 12 天，間質幹細胞已長滿，(scale bar=20 μ m)

3-5-2 體外測試

本研究體外測試(in vitro)部份，主要分為鹼性磷酸酶染色法(Alkaline phosphatase stain)、Von Kossa's 染色法及 MTT 色度分析法，間質幹細胞植入材料後並將其取出作 SEM 觀察及組織切片。

在鹼性磷酸酶染色法、Von Kossa's 染色法及 MTT 色度分析法裡均將培養的細胞分成對照組、實驗組(一)及實驗組(二)，每一組的實驗材料均為繼代培養的間質幹細胞，但所添加之細胞培養液則不同，分別敘述如下：

對照組：間質幹細胞培養液，主要成分為 L-DMEM，但未添加分化劑。

實驗組(一)：添加分化劑培養液，主要成分為 DMEM 及 3 種分化劑。

實驗組(二)：添加分化劑培養液再加入中藥骨碎補。每 9 ml 培養液中加入 1 ml 骨碎補溶液，而所加入骨碎補溶液之濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

將長滿繼代間質幹細胞培養瓶自培養箱中取出，經 PBS 溶液清洗後，加入 0.25 % Trypsin/EDTA 溶液，將間質幹細胞打下，作細胞計數。於無菌操作檯中，將 6 孔的培養盤分別標定為對照組、實驗組(一)及實驗組(二)，每組各 3 個培養盤，每孔先分別加入如前述的培養液 2 ml，再分別植入 1×10^4 個間質幹細胞，置入培養箱中培養，每 2-3 天更換培養液。

3-5-2-1 鹼性磷酸酶染色法

鹼性磷酸酶染色法可將骨母細胞的鹼性磷酸酶染成藍紫色，對骨母細胞染色有專一性。依據 Sigma Alkaline Phosphatase Kit 86-R 的程序，敘述如下：

在進行染色前須先配製固定液(Fix Solution)及鹼性磷酸酶染色液(Alkaline Phosphatase Stain Solution)，其程序分述如下：

固定液：取 25 ml Citrate solution、65 ml 丙酮(Acetone)及 8 ml 37 % 甲醛(Formaldehyde)加入 100 ml 血清瓶中，混合均勻後儲存於 2-8 °C 冰箱中，使用前先將其靜置於室溫使其回溫至 18-26 °C。

鹼性磷酸酶染色液：準備 50 ml 的離心管，加入 45 ml 去離子水，使其回溫至 18-26 °C 備用，另取 1 ml Sodium Nitrite Solution 及 1 ml FRV-Alkaline Solution 加入 15 ml 離心管中，蓋緊瓶蓋輕輕搖晃均勻，靜置 2 分鐘，使其反應成 diazonium salt solution，將離心管中的 diazonium salt solution 加入裝有 45 ml 去離子水的離心管中，再加入 1 ml Naphthol AS-BI Alkaline Solution，蓋緊瓶蓋後混合均勻，靜置於室溫下備用。

藥品準備好後，自培養箱中取出細胞進行染色，先以自動吸量管抽除培養液，再以磷酸緩衝溶液(PBS)清洗 2 次。加入固定液，靜置 30 秒後抽除，再加入去離子水，靜置 45 秒後抽除，加入鹼性磷酸酶染色液，避光靜置染色 15 分鐘後抽除，再加入去離子水，靜置 2 分鐘後抽除，最後加入 Hematoxylin Solution 作對比染色 2 分鐘後抽除，再以去離子水沖洗 2 次，將培養盤移至倒立式相位差顯微鏡下觀察確定已染色完成後拍照。

3-5-2-2 Von Kossa's 染色法

Von kossa's 染色法乃利用硝酸銀(silver nitrate, AgNO_3)溶液和礦物質化結節中的磷酸鈣(calcium phosphate, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)反應，生成暗褐色磷酸銀沉澱，評估細胞是否具造骨細胞活性。

在染色前須先配製以下三種染色液：

5%硝酸銀溶液(silver nitrate solution)：稱取 5 g 硝酸銀(silver nitrate, AgNO_3 ，聯工化學製藥，台灣)粉末，置入裝有去離子水 100 ml 的血清瓶中，血清瓶用錫箔紙包覆以避光。

5%硫代硫酸鈉溶液(sodium thiosulfate solution)：稱取 5 g 硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ，聯工化學製藥，台灣)粉末，置入裝有去離子水 100 ml 的血清瓶中。

Nuclear fast red 染色液：先取 0.1g 的 Nuclear fast red 加入 100 ml 的 5%硫酸鋁(Aluminum Sulfate)水溶液，以加熱器加熱使其溶解，待冷卻後加以過濾，如欲保存可加入一些 thymol 的結晶作保存劑。

藥品準備好後，自培養箱中取出細胞進行染色，先以自動吸量管抽除培養液，再以磷酸緩衝溶液沖洗 3 次，加入 2% 戊二醛(glutaraldehyde)溶液固定細胞，作用 20 分鐘後抽除戊二醛溶液，再以去離子水清洗 3 次，加入 5%硝酸銀溶液浸潤細胞層，並置於紫外燈或 60 W 白熱燈下照射 60 分鐘後抽除硝酸銀溶液，以去離子水清洗 3 次，加入 5%硫代硫酸鈉溶液浸潤細胞 2-3 分鐘，以去除殘留的硝酸銀，再以去離子水清洗 3 次，最後加入 Nuclear fast red 染色液 5 分鐘，作對比染色，以去離子水清洗 3 次，將培養盤移至倒立式相位差顯微鏡下觀察並拍照。

3-5-2-3 MTT 色度分析法

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)為可溶於水的黃色染劑，若經過活細胞粒線體中的 dehydrogenase 酵素分解後，會還原形成不溶於水的 MTT-formazan 深藍色結晶，再用溶劑(acid/alcohol-0.04 N HCl in isopropanol)將 formazan 溶解，然後利用 ELISA reader(MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, USA)分別在波長 570 nm 及 650 nm 測定吸光值，所得的吸光值差即和活細胞數目成正比，因此可作為評估細胞存活(survival)和增生(proliferation)能力的評估。

首先配製 MTT 溶液與 formazan 溶劑，再作出 formazan 吸光值與間質幹細胞檢量線，然後以檢量線換算成細胞數，便可求得三種培養液對細胞存活和增生的影響。

MTT 溶液：從-20 °C 冰箱中取出 MTT 粉末(USB, Amersham Life Science)，用微量天平秤取 50 mg，倒入 15 ml 離心管中，移入無菌操作台內，將 10 ml PBS 加入離心管中，蓋上瓶蓋搖晃均勻使 MTT 粉末完全溶解，以 0.22 µm 無菌過濾膜(Millipore, USA)過濾後，裝至 15 ml 無菌離心管中，用鋁箔紙包覆管身以避光，標示後儲存於 4 °C 冰箱中備用。

formazan 溶劑(acid/alcohol-0.04 N HCl in isopropanol)：取 50 ml 無菌離心管，加入 2 ml 1 N HCl，再加入 48 ml 異丙醇(isopropanol，聯工化學試藥，台灣)，標示後儲存於室溫下備用。

將繼代的間質幹細胞在 96 孔培養盤中由左至右依序接種 5×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 cells/well，N=6，每個 well 中先以微量吸管加入 100 µl 間質幹細胞培養液，然後將無菌操作台內的燈光關閉，避光下再加入 10 µl 的 MTT 溶液，將培養盤放入細胞培養箱中培養 4 小時後取出，小心吸除上清液，避免使底部藍色的 formazan 沉澱一併抽除，再用微量吸管每 well 加入 200 µl 的 formazan 溶劑，蓋上蓋子後將培養盤移

至搖盪機平台搖盪約 10 分鐘後，於倒立式顯微鏡下觀察 formazan 結晶是否完全溶解，確定完全溶解後，將培養盤移至 ELISA reader 以雙波長測量波長 570 nm 及 650 nm 的吸光值，將吸光值差對應細胞數作一曲線，並將曲線作回歸，求出 MTT 對應細胞數目的檢量線。

將繼代間質幹細胞在 96 孔培養盤中分別接種 5×10^3 cells/well，每個 well 中先用微量吸管分別加入 180 μ l 間質幹細胞培養液、添加分化劑培養液、添加分化劑與中藥骨碎補培養液，N=5，將培養盤放入細胞培養箱中培養 2 天。

2 天後將培養盤取出，如前加入 MTT 溶液，再培養 4 小時，再加入 formazan 溶劑，將培養盤移至 ELISA reader 以雙波長測量波長 570 nm 及 650 nm 的吸光值，所得吸光值差以 MTT 檢量線換算成細胞數，以評估三種培養液對間質幹細胞存活和增生能力的影響。

3-5-2-4 幹細胞植入材料程序

為模擬細胞在生物體內實際生長情形，並改善三度空間材料於靜態培養時細胞分布不均勻及代謝產物無法及時擴散的缺點，本研究特別引進近年來在組織工程中漸被重視的生物反應器以進行動態培養，其實驗程序詳細說明如下：

間質幹細胞培養至足夠數量時，便可將細胞植入多孔性 GGT 以進行動態培養，經培養 1、2 及 4 週時將多孔性 GGT 複合材料取出，其中一件植入兔體頭蓋骨，另一件作 SEM 觀察與組織切片。

為使材料懸浮於磁攪拌培養瓶(spinner flask)中進行動態培養，故先製作網套及預先綁好線的別針，以供材料置放並固定於培養液中。將網套與綁好線的別針以封口袋密封與磁攪拌培養瓶先行滅菌後置入無菌操作檯備用。

由培養箱中取出已長滿繼代間質幹細胞的培養瓶，於無菌操作檯將培養液抽除後，以 PBS 溶液清洗培養瓶 2 次，加入 0.25 % Trypsin/EDTA 溶液，將細胞打下後，作細胞計數，並調整細胞密度至 2×10^6 cells/ml。

將多孔性 GGT 複合材料置於 12 孔培養盤(12-well plate)中，以微量吸量管抽取 500 μ l(內含 1×10^6 cells)培養液，將培養液滴入多孔性 GGT 複合材料中，滴入時須使培養液均勻散佈於整個材料，將 12 孔培養盤置入培養箱中靜置 1 小時，再將 12 孔培養盤自培養箱取出於無菌操作檯中加入間質幹細胞培養液，加培養液時要從孔緣慢慢注入，以免將細胞沖散，將 12 孔培養盤放回培養箱，培養 1 天，使細胞貼附於多孔性 GGT 複合材料。

自培養箱取出 12 孔培養盤，於無菌操作檯將含有間質幹細胞之多孔性 GGT 取出，置於網套中，將網套以別針固定，懸於磁攪拌培養瓶中，並以瓶蓋鎖緊固定，磁攪拌培養瓶中加入添加分化劑之培養液，使多孔性 GGT 複合材料完全浸潤在培養液中。

調整生物反應器(Bioreactor)之轉速至 70 rpm，將磁攪拌培養瓶置於其上培養 10 小時，使細胞分布均勻，再將生物反應器轉速調整為 50 rpm⁽⁷⁵⁾，於培養箱中進行動態培養，每週更換培養液二次，更換時只抽除一半的培養液，再將培養液加入，幹細胞植入材料實驗參考圖 3-11。



(A)



(B)

圖 3-11 幹細胞植入材料實驗，(A)網套及預先綁好線的別針，(B)將材料懸浮於 spinner flask 中

3-5-2-5 掃描式電子顯微鏡觀察

多孔性 GGT 複合材料於磁攪拌培養瓶中經培養 1、2、4 週時，分別將材料取出植回兔體頭蓋骨，同時取出一件切下約 1/2 進行掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope, SEM)觀察，另 1/2 作組織切片，以觀察間質幹細胞於材料中分化為骨母細胞的實際生長及貼附情形。

將植入間質幹細胞並以添加分化劑培養液培養之多孔性 GGT 複合材料及添加中藥骨碎補之多孔性 GGT 複合材料每隻兔子各取出一件，分別以刀片切下約 1/2，先以磷酸緩衝溶液(PBS)清洗 3 次，每次清洗時需浸泡 5-10 分鐘，清洗後以 2% 戊二醛固定 48 小時，再分別以 30、50、70、80、90、95、100% 酒精溶液各浸泡 15 分鐘，以進行脫水。

脫水後將試片取出以臨界點乾燥機(HCP-2 Critical Point Dryer, HITACHI, Japan)進行臨界點乾燥將酒精去除，再以鍍金機(E-1010 HITACHI, Japan)鍍膜，然後以 S-3000N 掃描式電子顯微鏡進行細胞生長及貼附情形的觀察及攝影。

3-5-2-6 組織切片

上一節中將多孔性 GGT 複合材料於磁攪拌培養瓶中經培養 1、2、4 週時將材料取出切下約 1/2 進行掃描式電子顯微鏡觀察的同時，將另 1/2 以磷酸緩衝溶液清洗 2 次後，以 2% 戊二醛浸泡，待細胞固定後，將材料送至台灣動物科技研究所進行染色、包埋及組織切片，送回後以直立式電子顯微鏡觀察細胞生長及材料切面的實際情形。

3-5-3 兔體頭蓋骨植入一體內測試

本研究所研製的對照組多孔性 GGT 及實驗組添加中藥骨碎補之多孔性 GGT 複合材料在經植入間質幹細胞於磁攪拌培養瓶作動態培養 1、2、4 週後取出，依下列分組將材料植回兔子頭蓋骨進行體內測試。

對照組：分四組，每組各 2 隻兔子，共 8 隻。

1. 植入未培養間質幹細胞之多孔性 GGT。
2. 植入培養自體間質幹細胞 1 週之多孔性 GGT。
3. 植入培養自體間質幹細胞 2 週之多孔性 GGT。
4. 植入培養自體間質幹細胞 4 週之多孔性 GGT。

實驗組：分四組，每組各 3 隻兔子，共 12 隻。

1. 植入未培養間質幹細胞之添加中藥骨碎補多孔性 GGT。
2. 植入培養自體間質幹細胞 1 週之添加中藥骨碎補多孔性 GGT。
3. 植入培養自體間質幹細胞 2 週之添加中藥骨碎補多孔性 GGT。
4. 植入培養自體間質幹細胞 4 週之添加中藥骨碎補多孔性 GGT。

分別於頭蓋骨植入 8 週後，將兔子犧牲取出頭蓋骨，以 X 光照射、組織切片及掃描式電子顯微鏡進行觀察及分析，評估植入間質幹細胞及添加中藥骨碎補對骨缺陷修復的影響和材料在生物體內被吸收及新生骨組織生長情形。

頭蓋骨主要由皮質骨所構成，其中的海綿骨及骨髓含量極少，組織重建能力極差，且手術後較不易產生自殘現象，因此以頭蓋骨作為評估多孔性 GGT 及添加中藥骨碎補之多孔性 GGT 複合材料促進骨缺陷修復的試驗為最佳選擇。其詳細實驗步驟於以下各節分述之。

3-5-3-1 動物手術程序

當間質幹細胞植入材料，經動態培養至所需時間時，便可進行兔體頭蓋骨植入實驗，首先在兔子後大腿肌以肌肉注射方式，將兔子予以全身麻醉。麻醉劑為全痛寧(Ketamin 10ml/瓶 50 mg/ml，南光，台南)及若朋(Rompun 25 ml，Bayer, Germany)以 1：1 方式混合，劑量為 0.8~1.5 ml/kg，待兔子熟睡後，以電動剃毛機剃除頭蓋骨上方兔毛，再以優碘及 70%酒精作局部消毒後覆蓋紙洞巾，製造出一個無菌操作空間以避免污染。

於頭蓋骨上方以皮下注射方式做局部麻醉，給予局部麻醉劑 Lidocaine (2 ml/瓶，10 mg，林化學，台南)約 1.0~1.2 ml，待局部麻醉劑吸收後，以手術刀劃開頭蓋骨上方的皮膚及肌肉層長約 5 cm，並以止血鉗撐開皮膚與肌肉，以鑽磨機將頭蓋骨磨除，待鑽磨機打磨到近硬腦膜處，以骨剪修剪其骨組織，使骨缺陷尺寸與材料一樣為直徑 1.5 cm 的圓形，將傷口以生理食鹽水清洗乾淨。

自培養箱中將含有自體間質幹細胞之多孔性 GGT 複合材料取出，先以生理食鹽水清洗後置入骨缺陷中，用 4-0 尼龍縫線先縫合肌肉層，再縫合皮膚，縫合完整後於手術部位施打約 1 ml 信華注射液 (Cephalosporin 抗生素，Cephazolin Sodium 1 gm/vial, 信東，台灣)並以優碘棉球消毒，以防止傷口感染與發炎。

手術後隨時觀察兔子生命徵象，是否有出血及失溫現象，待清醒時再放回兔籠，手術後連續施打信華注射液三天，劑量為 30 mg/kg。頭蓋骨植入實驗參見圖 3-12。



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

圖 3-12 兔子頭蓋骨植入實驗，(A)剃毛，(B)消毒，(C)覆蓋紙洞中，(D)切開皮膚及肌肉並以止血鉗固定，(E)鑽磨出骨缺陷，(F)置入材料並縫合

3-5-3-2 動物犧牲程序

在兔子頭蓋骨植入實驗 8 週後，將兔子犧牲，並取出頭蓋骨進行評估，首先以固定器固定兔子(參見圖 3-13)，採靜脈注射方式，將麻醉劑 (Urethane1, 1 g/10 ml, Sigma, USA) 4 ml 加 8 ml 空氣打入兔子兩邊耳朵背面血管，將兔子犧牲，以手術刀切開頭蓋骨上方皮膚、肌肉及筋膜組織，可清楚看見材料與骨缺陷，觀察材料植入部位之周圍組織是否有發炎潰爛的情形，再以鑽磨機取下含植入材料之周圍頭蓋骨約長 2.5 cm、寬 2.0 cm 的大小，先以生理食鹽水沖洗組織液與血水，再放入 10 % 福馬林(formaldehyde)固定液中浸泡，將組織固定，以待進一步評估。

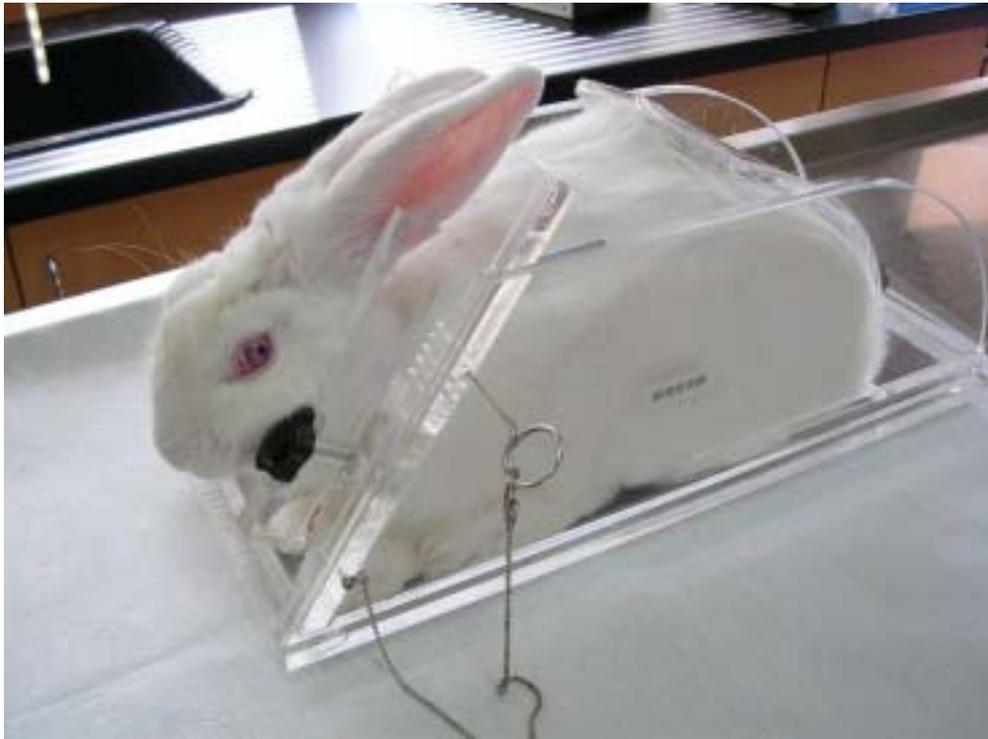


圖 3-13 兔子固定於固定器情形

3-5-3-3 兔體頭蓋骨植入實驗評估

在兔體未犧牲前，先對兔體外觀進行巨視觀察，檢查手術部位是否有紅腫及潰爛的排斥情形，接著在兔體犧牲後，將頭蓋骨外部的皮膚與筋膜切開，觀察材料植入部位周圍頭蓋骨表面組織是否有紅腫及發炎現象，取下頭蓋骨後對腦組織進行觀察是否有發炎、腫脹及萎縮現象。

取下的頭蓋骨以 10 %福馬林固定 48 小時後，以脫鈣液(TBD-1, Rapid Decalcifier, Thermo Shandon, USA)浸泡約一天後，再將頭蓋骨分別切割以掃描式電子顯微鏡與組織切片進行觀察與分析。

要進行掃描式電子顯微鏡觀察的試片分別以 30、50、70、80、90、95、100 %之酒精溶液各浸泡 15 分鐘，以進行脫水，脫水後將試片取出以臨界點乾燥機進行臨界點乾燥將酒精去除，再以離子覆膜機機鍍膜，然後以掃描式電子顯微鏡進行新生骨組織及細胞生長情形的觀察及攝影。

要進行組織切片之試片則送至台灣動物科技研究所進行染色、包埋及組織切片，送回後以直立式電子顯微鏡進行觀察及攝影。

第四章 結果與討論

4-1 材料特性分析

良好的多孔性骨科複合材料除了須具備有良好之生物適應性及適當的機械強度外，更應具有生物可吸收分解的特性，而且吸收分解的速度要能配合新生骨組織形成與取代的速度。另外尚須具備高孔隙率，以讓細胞有較多的生長空間，進行骨缺陷的修復，而就孔洞本身而言，需具備適合骨母細胞生長的孔洞尺寸而且孔洞之間要有良好的連通性，以便體外培養時細胞能均勻長入，且培養液能順利進入為細胞所吸收，細胞之代謝廢物亦能被帶走，植入生物體內時組織液能順利的進出以提供養分及排出廢物。

以下各節分就孔隙度、降解速率、膨潤度測定與掃描式電子顯微鏡觀察與元素分析結果詳細說明。

4-1-1 孔隙度測定

孔隙度的大小關係著細胞植入的數目、孔洞的連通性與材料強度，孔隙度愈大則植入細胞量愈多，能夠提供細胞較大的貼附與生長空間，反之則植入細胞相對減少，另外孔隙度太小還會造成孔洞間連通性不佳，細胞植入時無法均勻的進入各孔洞，以致細胞分布不平均，如果孔隙度太大則材料強度太弱，無法應用於臨床，一般冷凍乾燥支架孔隙度約 80%，經實際量測結果材料孔隙度與此相當。

孔隙度量測程序首先以比重瓶量測材料密度，而後再根據密度與重量換算出材料實際體積，與材料外部體積比較而得。表 4-1 為兩種材料密度與孔隙度量測結果，其中多孔性 GGT 密度為 1.18 ± 0.10 ，添加骨碎補多孔性 GGT 則為 1.20 ± 0.02 ，兩種材料量測結果相近。

根據所量測而得的密度再求出孔隙度，多孔性 GGT 孔隙度為 $82.07\pm 1.51\%$ ，添加骨碎補多孔性 GGT 為 $80.51\pm 0.13\%$ ，兩種材料量測結果相近，且與預估結果相符。

表 4-1 密度與孔隙度量測結果

	密度	孔隙度(%)
多孔性 GGT	1.18 ± 0.10	82.07 ± 1.51
添加骨碎補多孔性 GGT	1.20 ± 0.02	80.51 ± 0.13

4-1-2 膨潤度測定

交聯度愈高的明膠，分子鏈上自由胺基被交聯劑分子交聯比例增加，使得材料中的自由體積(free volume)減少，會導致材料膨潤趨勢下降⁽³⁸⁾，因此膨潤度可用來判斷明膠的交聯程度。

由圖 4-1 膨潤度量測結果顯示，多孔性 GGT 膨潤度較添加骨碎補多孔性 GGT 為高，這結果顯示添加骨碎補多孔性 GGT 交聯程度較多孔性 GGT 為高，這是否意味著骨碎補中的柚皮甙(Naringin, $C_{27}H_{32}O_{14}$, M.W.=580.53)(分子結構式參見圖 4-2)亦能像綠梔子素(Genipin, $C_{11}H_{14}O_5$, M.W.=580.53)(分子結構式參見圖 4-3)結構中的六元環一般與明膠發生交聯反應，則有待進一步的驗證。

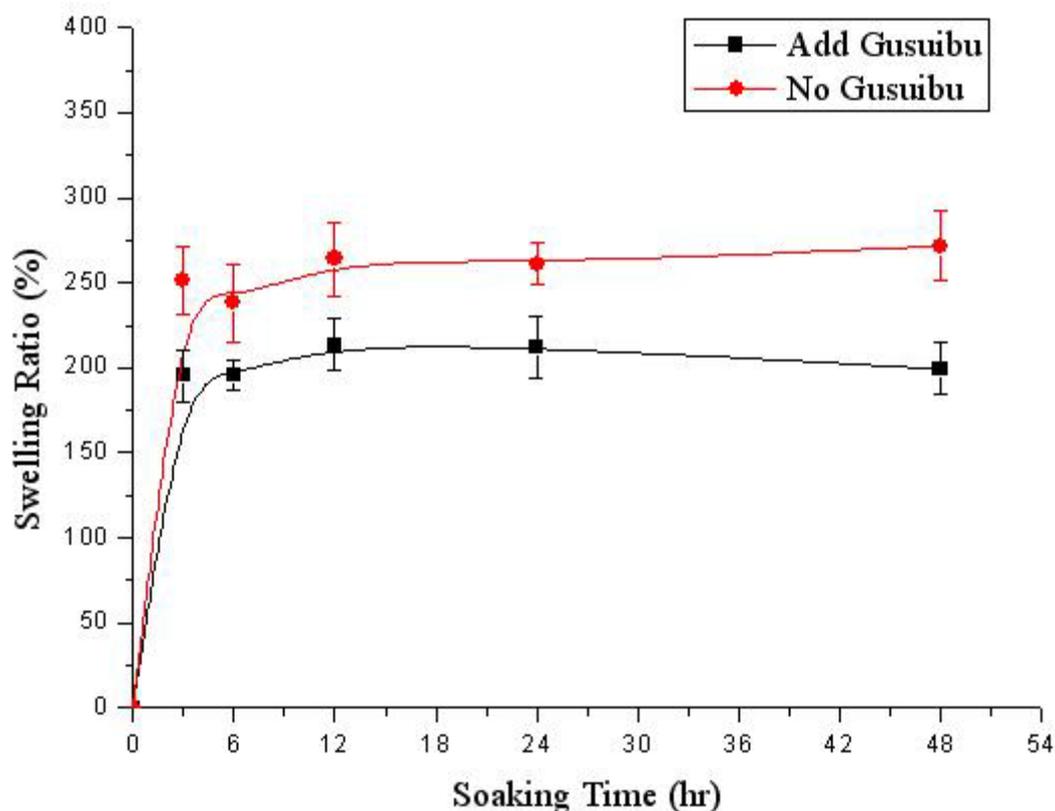


圖 4-1 多孔性 GGT 及添加骨碎補多孔性 GGT 膨潤度量測結果

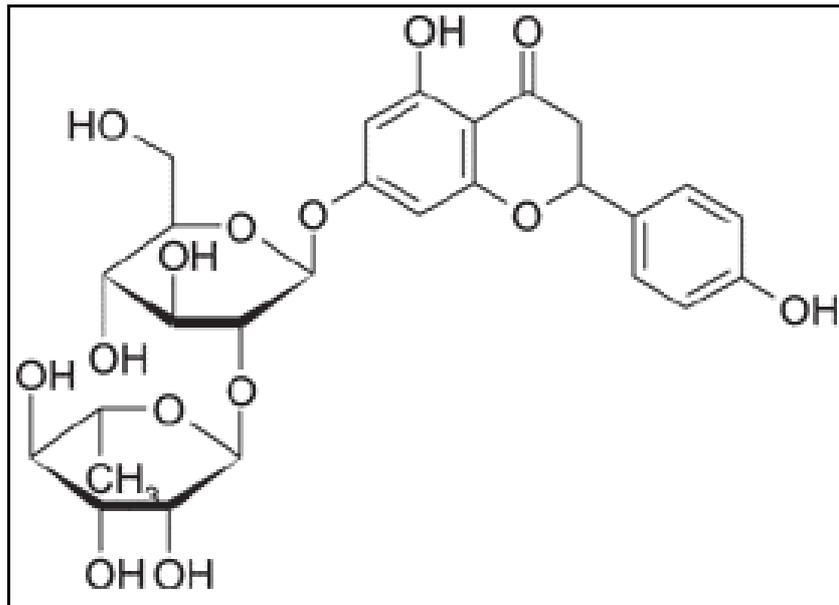


圖 4-2 柚皮甙的分子結構式

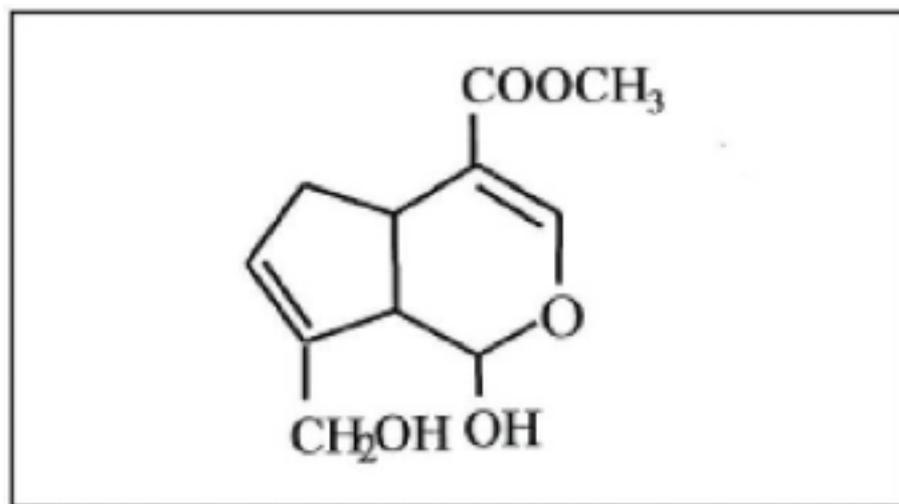


圖 4-3 綠梔子素的分子結構式

另外實驗結果也顯示，在浸泡 12 小時之後，兩組材料的膨潤趨勢皆已呈現平緩現象，此結果較 GGT 要在 24 小時之後才呈現平緩現象還要加速一倍，這是因為多孔性 GGT 的孔洞結構與去離子水接觸面積增加，加速了水分的吸收。

4-1-2 降解速率測定

以去離子水浸泡多孔性 GGT 及添加骨碎補多孔性 GGT，置入細胞培養箱中，分別於 7、14、28、42、56 及 84 天時取出，將材料經冷凍乾燥處理後稱重，計算材料試片的降解失重比例，結果參見圖 4-4。

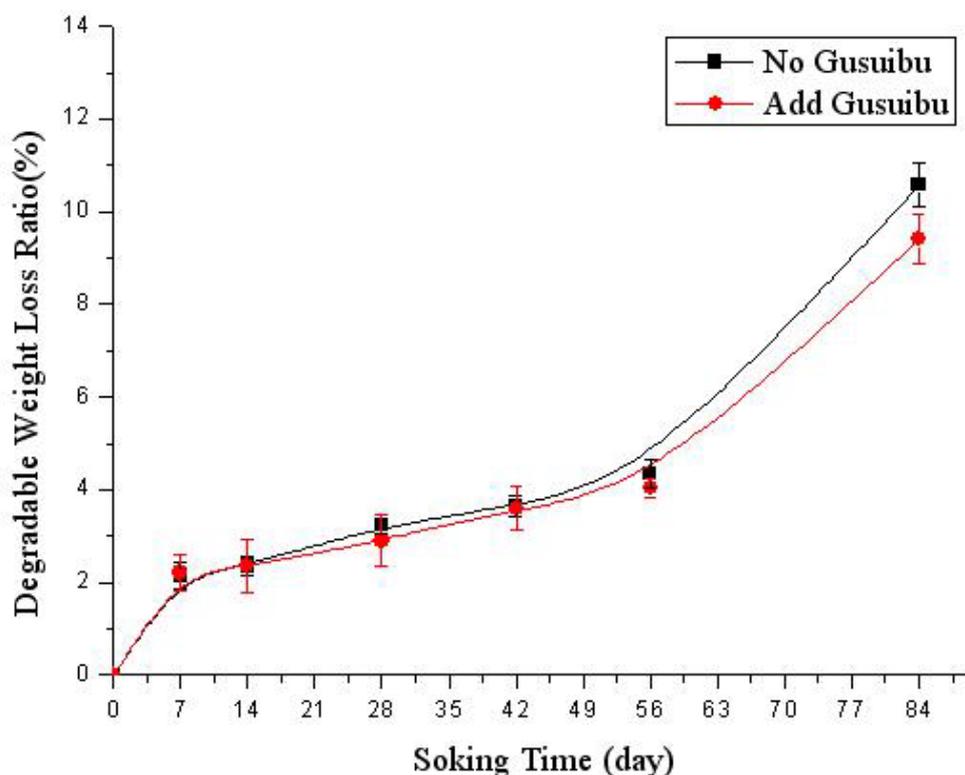


圖 4-4 多孔性 GGT 及添加骨碎補多孔性 GGT 降解率量測結果

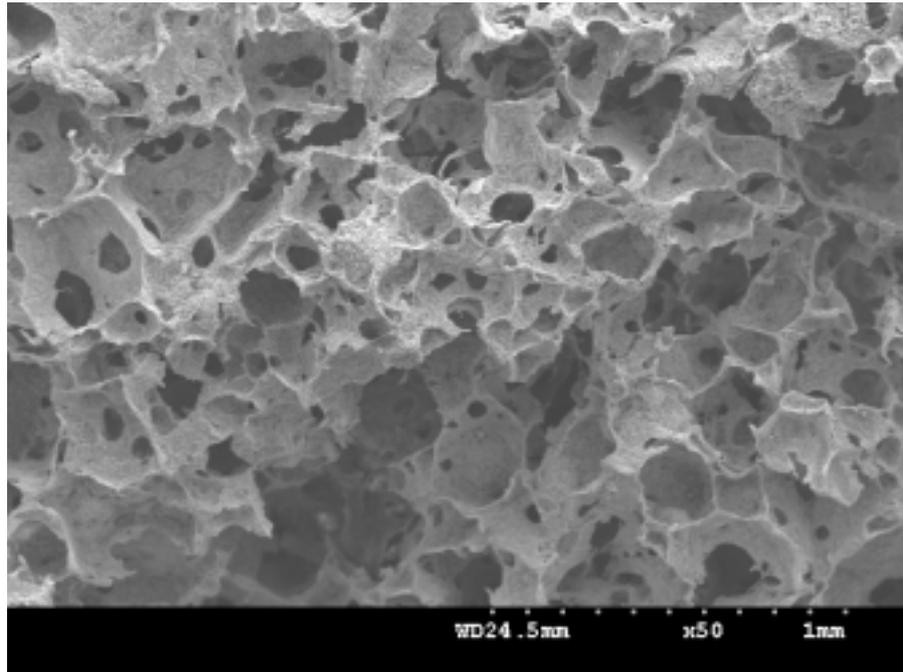
由以上實驗結果顯示：

1. 於剛開始前 7 天降解較為明顯，這可能是未完全與綠梔子素交聯的明膠及三鈣磷酸鹽粉末溶解及釋出所造成。
2. 於浸泡 84 天(12 週)時，降解率約為 10%，這結果與之前 GGT 的降解率 5% 比較，快了將近一倍，推測應與多孔性結構增加接觸面積有關。
3. 多孔性 GGT 的降解率稍大於添加骨碎補多孔性 GGT，這可能是添加骨碎補多孔性 GGT 交聯程度較好所致，這與膨潤度量測結果相符。

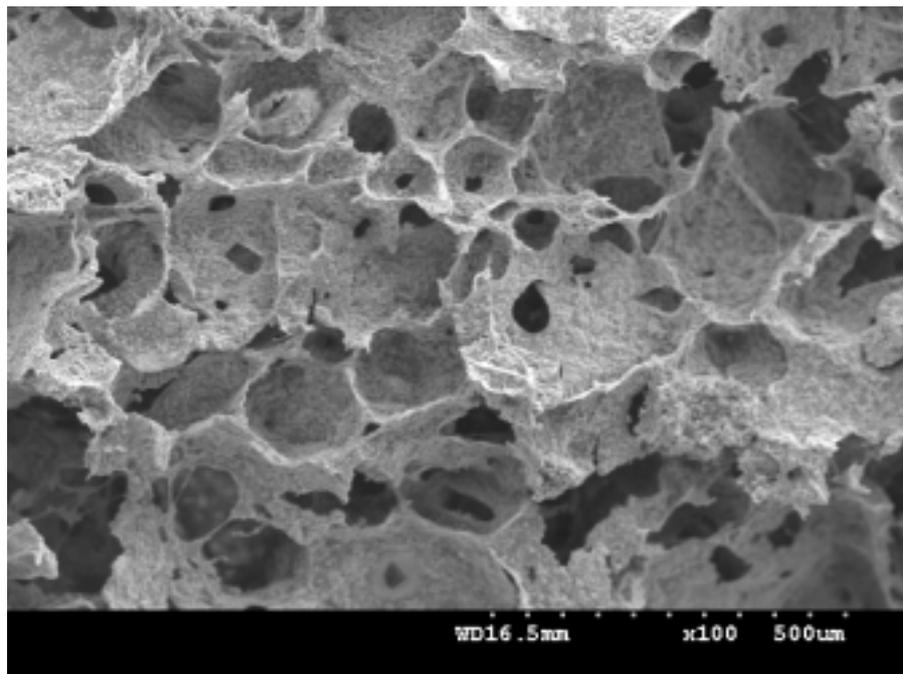
4-1-4 掃描式電子顯微鏡觀察

掃描式電子顯微鏡結果如圖 4-5 所示，(A)圖為多孔性 GGT 50 倍放大圖，(B)圖為添加骨碎補多孔性 GGT 100 倍放大圖，從外觀放大圖可以發現多孔性 GGT 及添加骨碎補多孔性 GGT 為具備三度空間的多孔性結構，孔洞分布均勻沒有材料局部聚集，或局部孔洞過大而無材料分布的情形，因此細胞能均勻植入以進行骨缺陷的修復。

孔洞尺寸經實際量測為 280-430 μm ，符合製備時以 40-60 mesh 篩網過篩，取得 250-470 μm 固定尺寸範圍之氯化鈉顆粒，以產生固定孔徑的預期。另外觀察孔洞之間的孔壁有小孔彼此連通，具備良好連通性，在體外培養時可使細胞能均勻進入貼附與生長，培養液能順利進入為細胞所吸收，代謝產物亦能順利排出，植入生物體內時組織液也能順利的進出以提供養分及排出廢物。



(A)



(B)

圖 4-5 多孔性 GGT 掃描式電子顯微鏡觀察結果，孔洞分布均勻，孔壁間有小孔互相連通，(A)多孔性 GGT 50 倍放大圖，(B)添加骨碎補多孔性 GGT 100 倍放大圖

4-1-5 能量散射光譜分析儀元素分析

以能量散射光譜分析儀對多孔性 GGT 複合材料作元素分析，本步驟最主要為確定所添加的氯化鈉顆粒是否均已為水所溶解而排出，以免於進行細胞培養及植入手術時，因滲透壓過高造成細胞皺縮，甚至脫水死亡。

由圖 4-6 及表 4-2 的結果顯示，並無氯或鈉元素存在，顯示氯化鈉顆粒已完全被水所溶解而排出，不會對細胞造成不良影響。

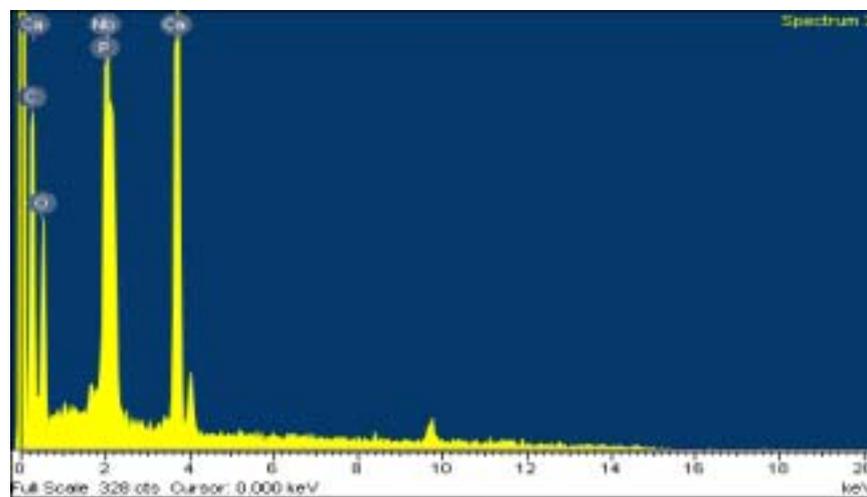


圖 4-6 多孔性 GGT 組成元素分佈圖

表 4-2 多孔性 GGT 組成元素分析表

Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%
C K	4.98	0.5955	29.24	0.29	46.81
O K	4.06	0.4798	29.52	0.29	35.48
P K	3.40	1.4557	8.15	0.10	5.06
Ca K	6.03	0.9885	21.29	0.16	10.21
Nb L	2.61	0.7737	11.80	0.23	2.44
totals			100.00		

4-2 生物適應性評估

本研究生物適應性評估主要分為體外(in-vitro)及體內(in-vivo)測試兩部份，體外主要有鹼性磷酸酶染色法(alkaline phosphatase stain)、Von Kossa's 染色法及 MTT 色度分析法，驗證間質幹細胞經分化劑與中藥骨碎補的刺激可朝骨母細胞分化，並測定細胞增生情形，另外將植入間質幹細胞的多孔性 GGT 以掃描式電子顯微鏡及組織切片進行觀察細胞的貼附與生長情形。

體內測試部分為將材料培養間質幹細胞後植回兔體頭蓋骨，經手術八週後，將兔子犧牲取出頭蓋骨，作巨視觀察、X 光檢驗、掃描式電子顯微鏡及組織切片，觀察多孔性 GGT 在生物體內被吸收及新生骨組織生長情形，以評估間質幹細胞、骨碎補於骨缺陷修復過程所產生之影響。各項測試結果分別於以下各章節詳細說明。

4-2-1 體外測試

4-2-1-1 鹼性磷酸酶染色法

鹼性磷酸酶染色法(alkaline phosphatase stain)可將骨母細胞的鹼性磷酸酶染成藍紫色，對骨母細胞染色有專一性。因此可藉此染色法確定間質幹細胞是否已朝骨母細胞分化。

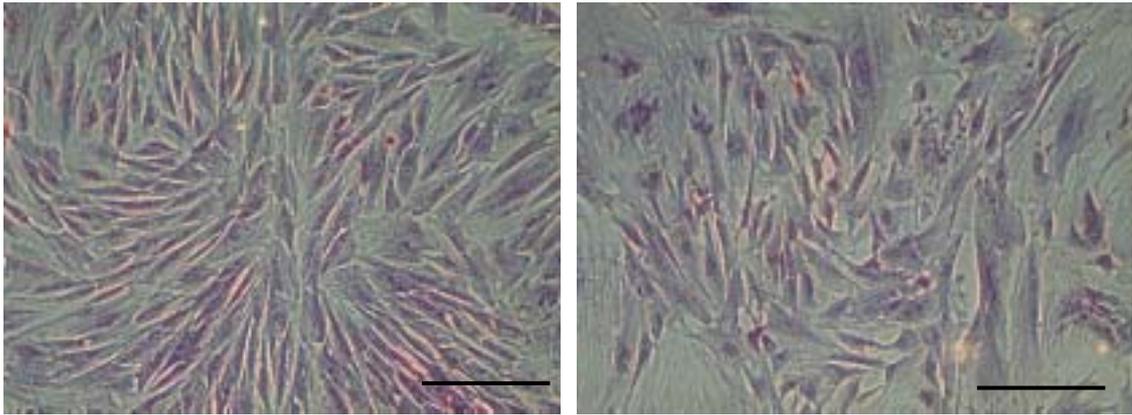
圖 4-7 為以間質幹細胞培養液未添加分化劑培養之鹼性磷酸酶染色結果，由結果可知隨著培養時間增加，藍紫色面積並沒有跟著增加，這表示未添加分化劑對間質幹細胞進行培養，間質幹細胞沒有朝骨母細胞分化。

圖 4-8 為以添加分化劑培養液培養之鹼性磷酸酶染色結果，由結果可知隨著培養時間增加，藍紫色面積跟著增加，這表示添加分化劑對間質幹細胞進行培養，可刺激間質幹細胞朝骨母細胞分化。

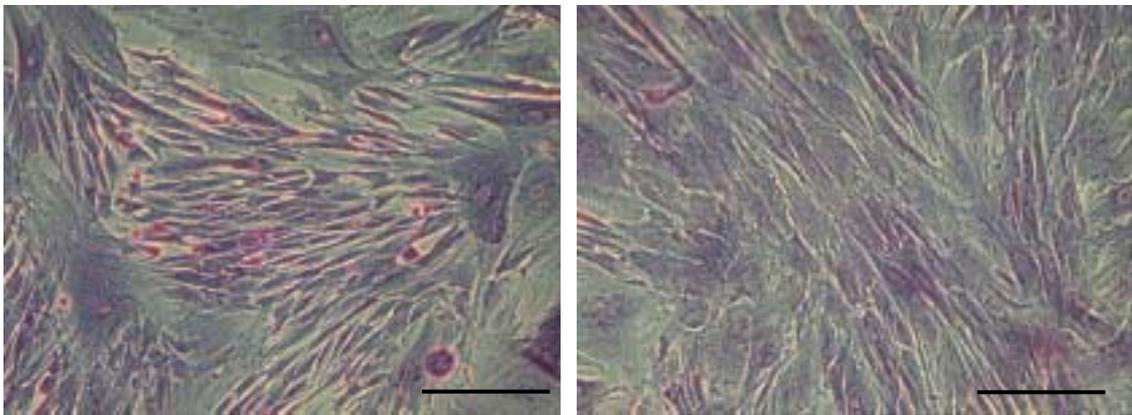
圖 4-9 為以添加分化劑及中藥骨碎補培養液培養之鹼性磷酸酶染色結果，由結果可知隨著培養時間增加，藍紫色面積跟著明顯增加，且於四週時特別明顯，這表示添加分化劑及中藥骨碎補對間質幹細胞進行培養，可刺激間質幹細胞朝骨母細胞分化，且較只添加分化劑更為明顯。

另外圖 4-7，明顯比圖 4-8、圖 4-9 的細胞密度低，這表示分化劑及中藥骨碎補除可刺激間質幹細胞朝骨母細胞分化外，還可促進間質幹細胞的增生。

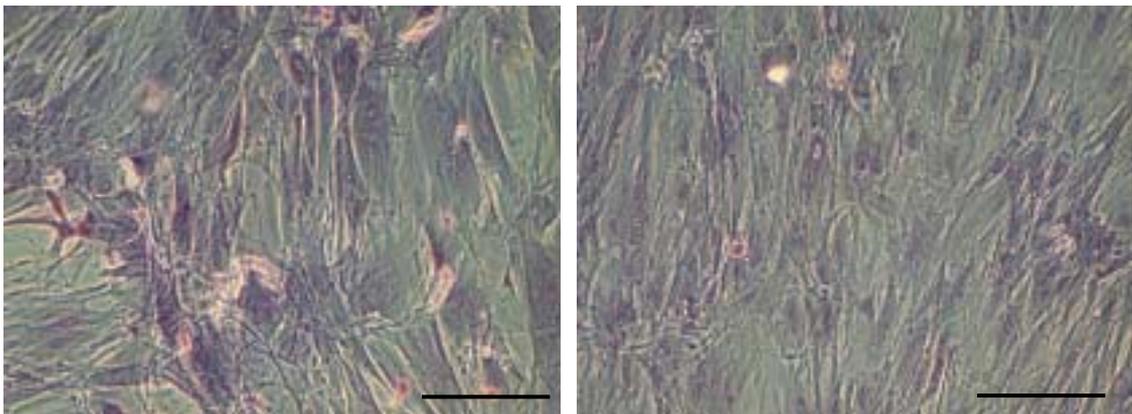
由此可知間質幹細胞在體外培養時確實可以分化劑誘導向骨母細胞分化及增生而應用於硬骨組織的修復，而添加分化劑及中藥骨碎補則更能加快間質幹細胞朝骨母細胞分化及增生。



(A)

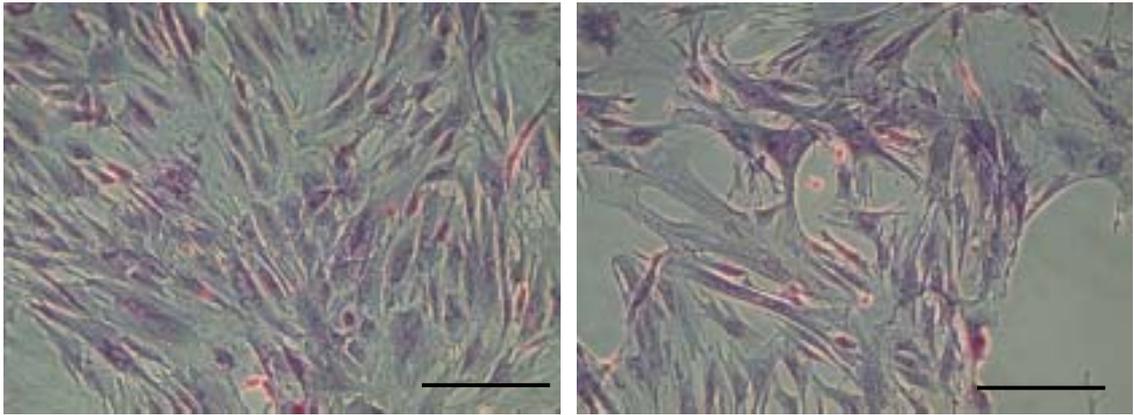


(B)

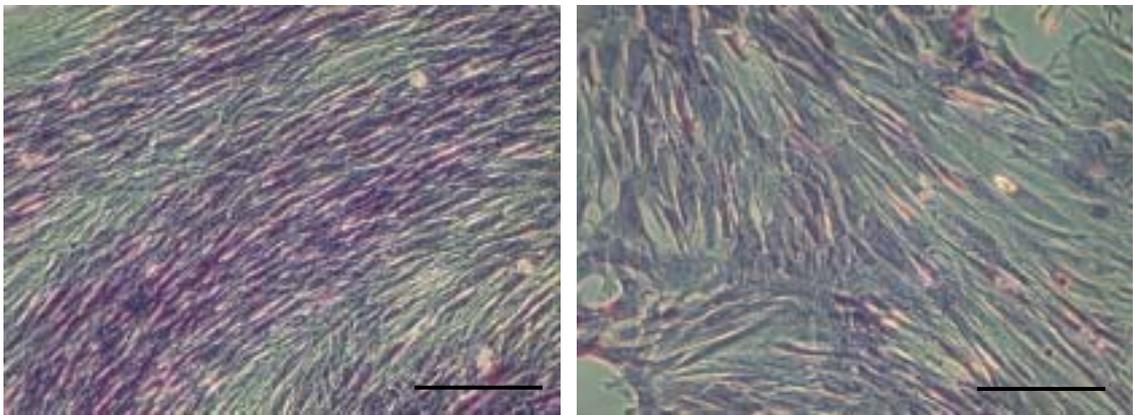


(C)

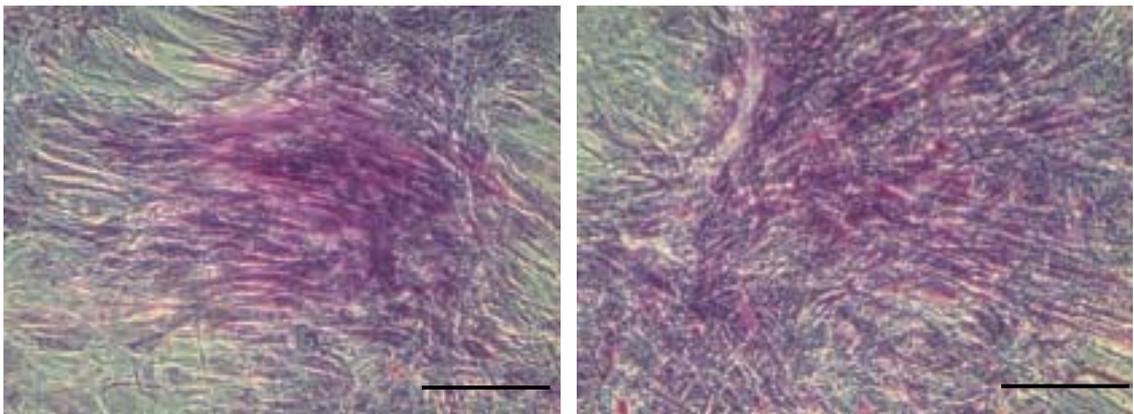
圖 4-7 以間質幹細胞培養液培養鹼性磷酸酶染色結果，隨著培養時間增加，沒有明顯分化現象，(A)1 週，(B)2 週，(C)4 週。(scale bar=20 μm)



(A)

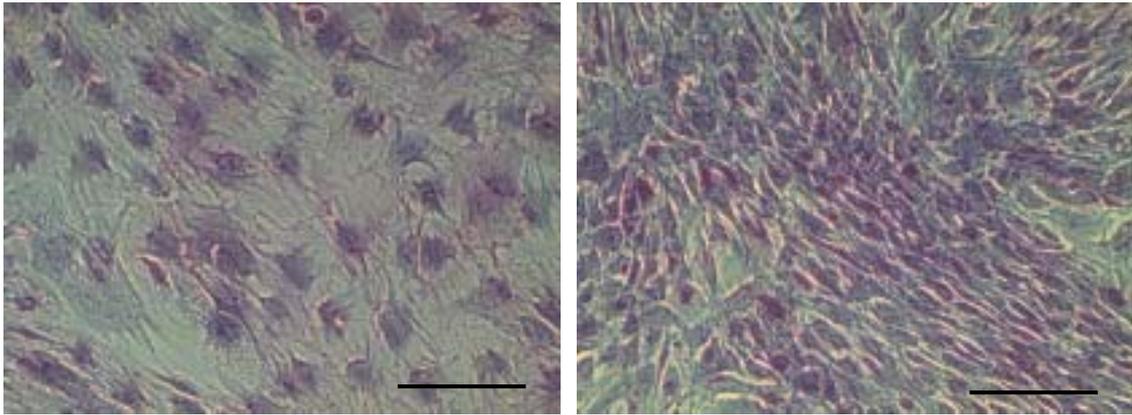


(B)

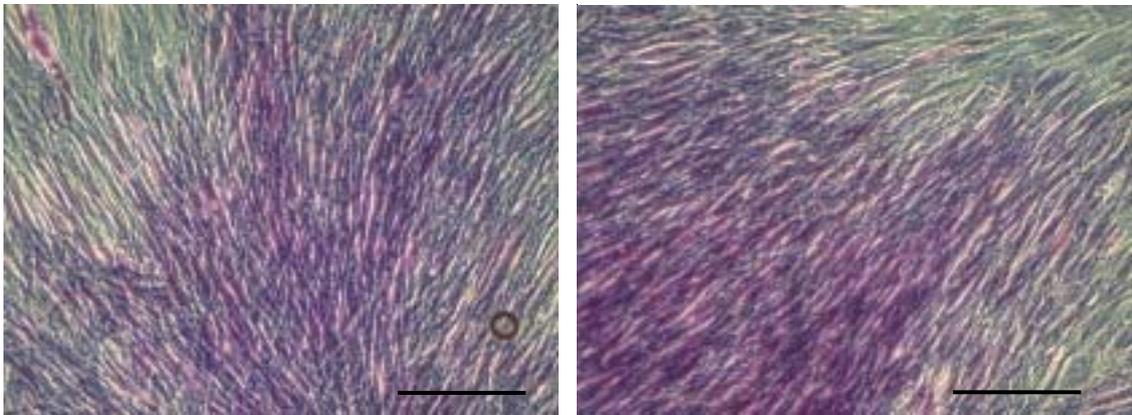


(C)

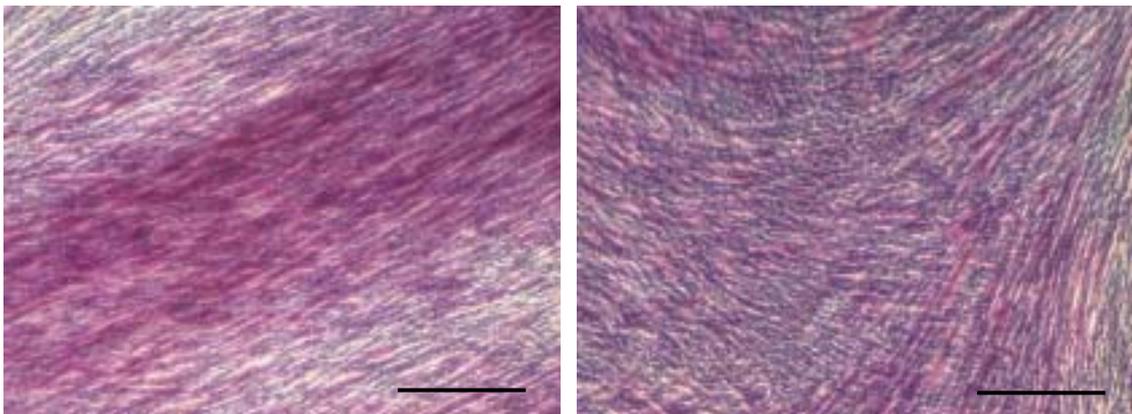
圖 4-8 以添加分化劑培養液培養鹼性磷酸酶染色結果，隨著培養時間增加，有明顯分化現象，(A)1 週，(B)2 週，(C)4 週，(scale bar=20 μ m)



(A)



(B)



(C)

圖 4-9 以添加分化劑及中藥骨碎補培養液培養鹼性磷酸酶染色結果，隨著培養時間增加，有明顯分化現象，(A)1 週，(B)2 週，(C)4 週，(scale bar=20 μm)

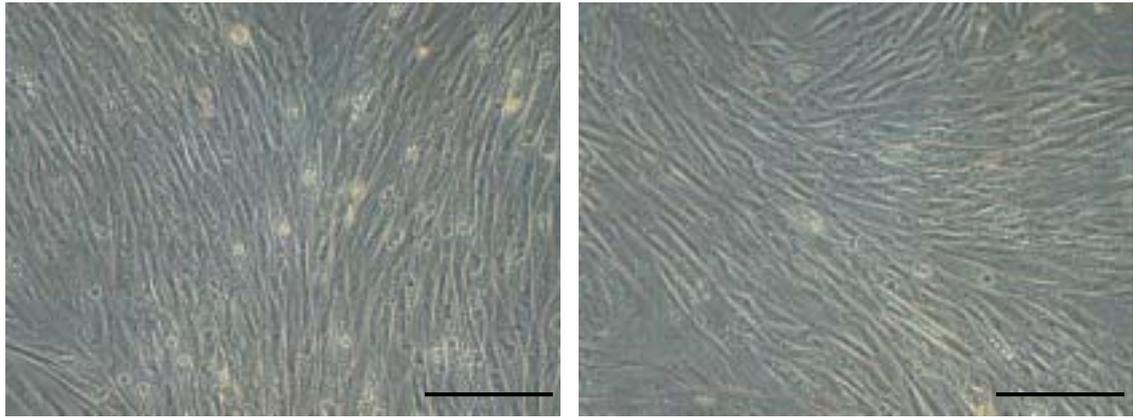
4-2-1-2 Von Kossa's 染色法

Von kossa's 染色法可將骨母細胞礦物質化結節中的磷酸鈣染成暗褐色磷酸銀沉澱，因此可用此來評估細胞是否具造骨細胞活性。

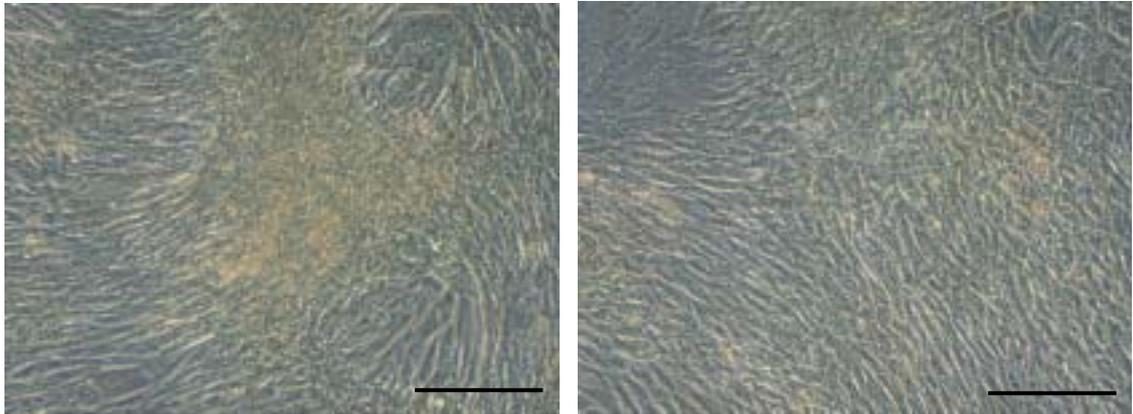
因間質幹細胞以分化劑及中藥骨碎補刺激後朝骨母細胞分化，剛開始為單層紡錘狀的細胞型態，而後成骨細胞會形成多層(multilayer)立體狀的群落(confluency)，如圖 4-10 所示，三種不同培養液分別培養間質幹細胞 2 週後，以倒立式相位差光學顯微鏡觀察結果，(A)圖為以未添加分化劑的間質幹細胞培養液培養，間質幹細胞仍為單層紡錘狀的細胞型態，未形成群落，而(B)圖以添加分化劑及(C)圖以添加分化劑及骨碎補培養液培養間質幹細胞，則已開始形成群落。

圖 4-11，為以三種不同培養液分別培養間質幹細胞 3 週後，顯微鏡觀察結果，(A)圖為以未添加分化劑的間質幹細胞培養液培養，間質幹細胞仍為單層紡錘狀的細胞型態，未形成群落，而(B)圖以添加分化劑及(C)圖以添加分化劑及骨碎補培養液培養，細胞群落已明顯形成，其中(C)圖尤其明顯。

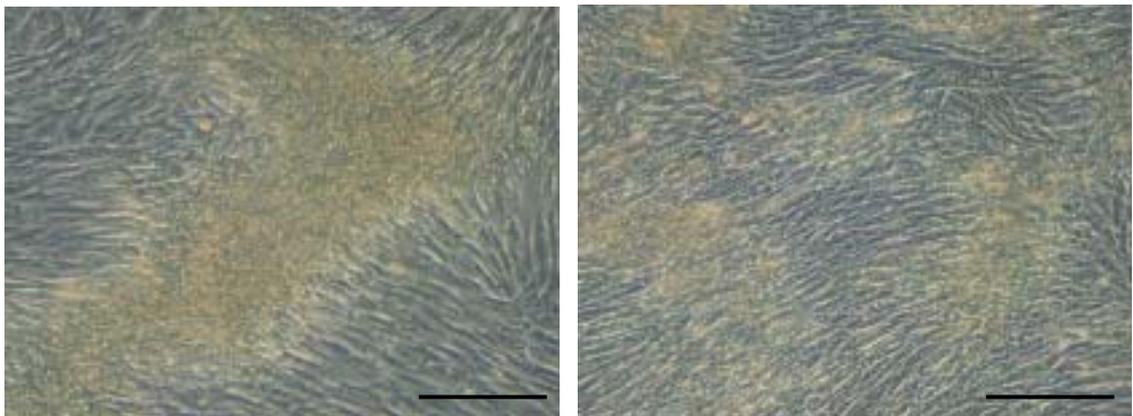
由以上結果可知，未添加分化劑培養的間質幹細胞，於 2 週及 3 週細胞型態仍為單層紡錘狀與間質幹細胞相同，表示間質幹細胞並未朝骨母細胞分化。而(B)圖以添加分化劑及(C)圖以添加分化劑及骨碎補培養液培養間質幹細胞，則群落已明顯形成，而添加骨碎補者尤其明顯。因此於 2、3、4 週對細胞進行 Von kossa's 染色法。



(A)

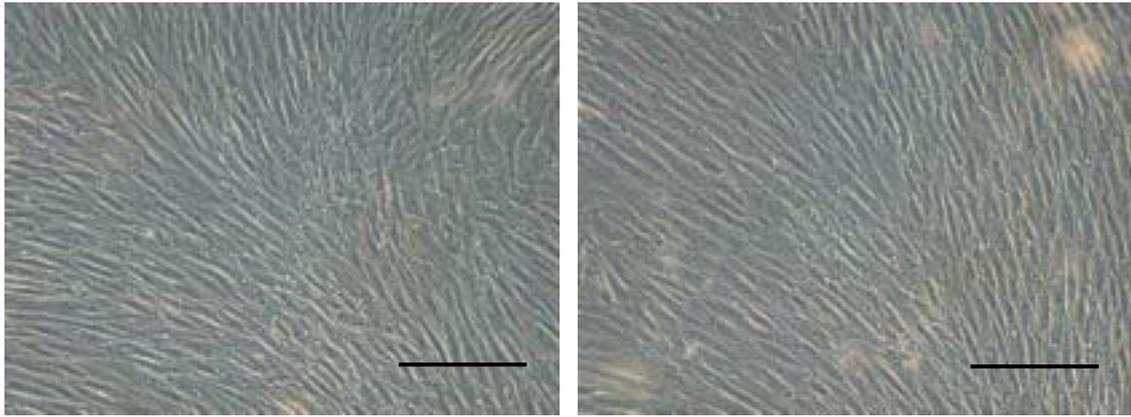


(B)

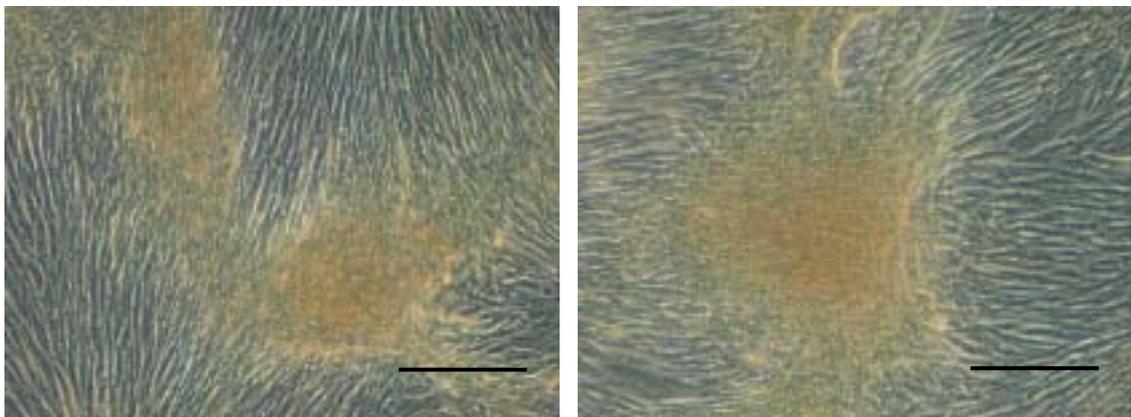


(C)

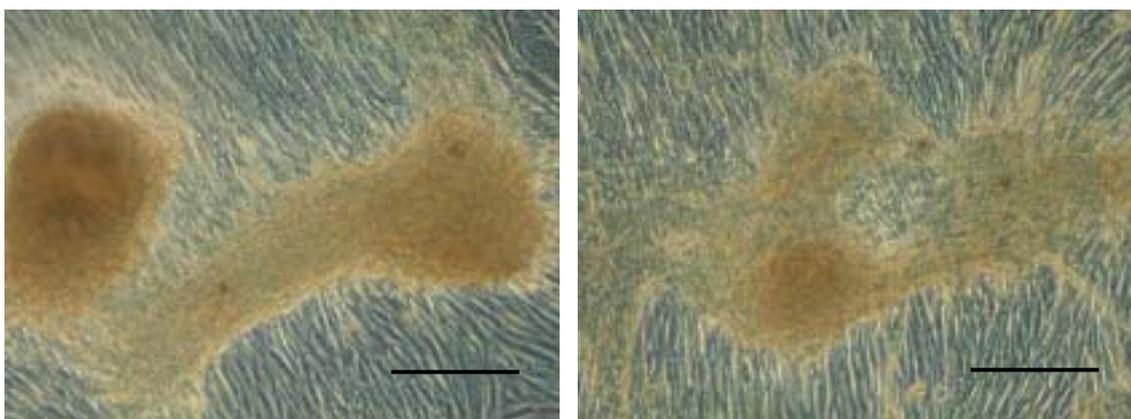
圖 4-10 以三種不同培養液分別培養間質幹細胞 2 週顯微鏡觀察結果，以未添加分化劑培養者，未形成群落，以添加分化劑，添加分化劑及骨碎補培養者，開始形成群落，(A)未添加分化劑，(B)添加分化劑，(C)添加分化劑及骨碎補，(scale bar=20 μ m)



(A)



(B)



(C)

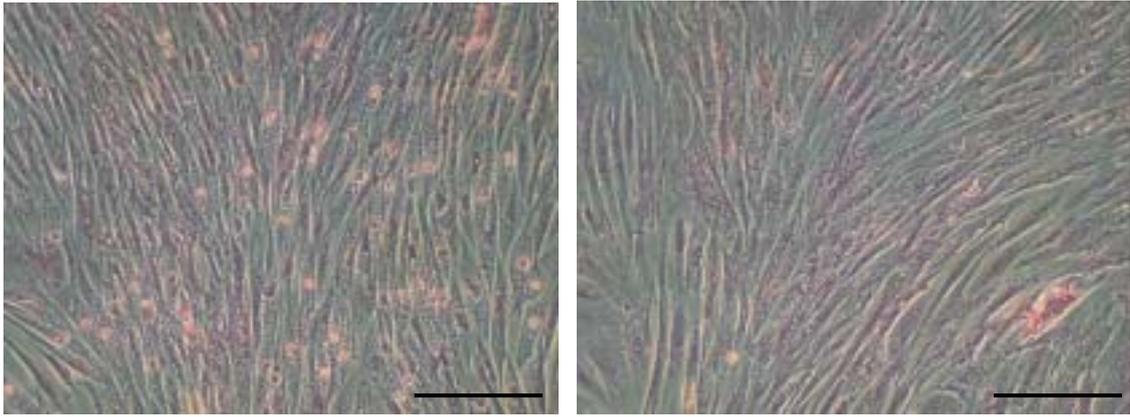
圖 4-11 以三種不同培養液分別培養間質幹細胞 3 週顯微鏡觀察結果，以未添加分化劑培養者，仍未形成群落，以添加分化劑，添加分化劑及骨碎補培養者，已明顯形成群落，(A)未添加分化劑，(B)添加分化劑，(C)添加分化劑及骨碎補，(scale bar=20 μm)

圖 4-12 為以未添加分化劑的間質幹細胞培養液分別培養 2、3、4 週的 Von Kossa's 染色結果，隨著培養時間增加，仍為單層紡錘狀的細胞型態，未形成群落，也沒有暗褐色礦物質化結節產生，表示間質幹細胞未朝骨母細胞分化。

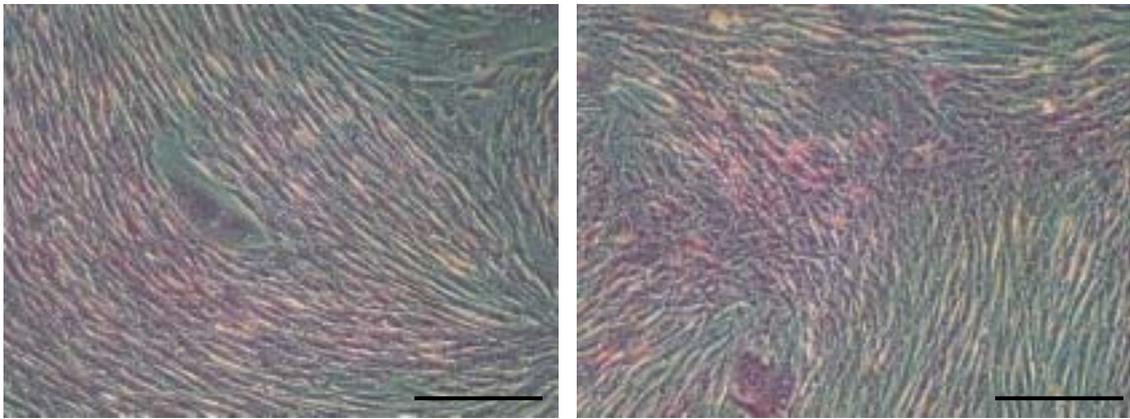
圖 4-13 為以添加分化劑培養液培養間質幹細胞 Von Kossa's 染色結果，2 週時(A 圖)細胞已開始形成群落，但並沒有暗褐色礦物質化結節形成，3 週時(B 圖)細胞明顯形成群落，有暗褐色礦物質化結節開始形成，在 4 週時(C 圖)細胞形成群落更為明顯，且暗褐色礦物質化結節已經形成，表示間質幹細胞已朝骨母細胞分化。

圖 4-14 為以添加分化劑及中藥骨碎補培養液培養間質幹細胞 Von Kossa's 染色結果，2 週時(A 圖)細胞已開始形成群落，但並沒有暗褐色礦物質化結節形成，3 週時(B 圖)細胞明顯形成群落，已有暗褐色礦物質化結節明顯形成，在 4 週時(C 圖)細胞形成群落及暗褐色礦物質化結節形成更為明顯，經與圖 4-13 比較後可發現添加中藥骨碎補對礦物質化結節形成有明顯的催化作用。

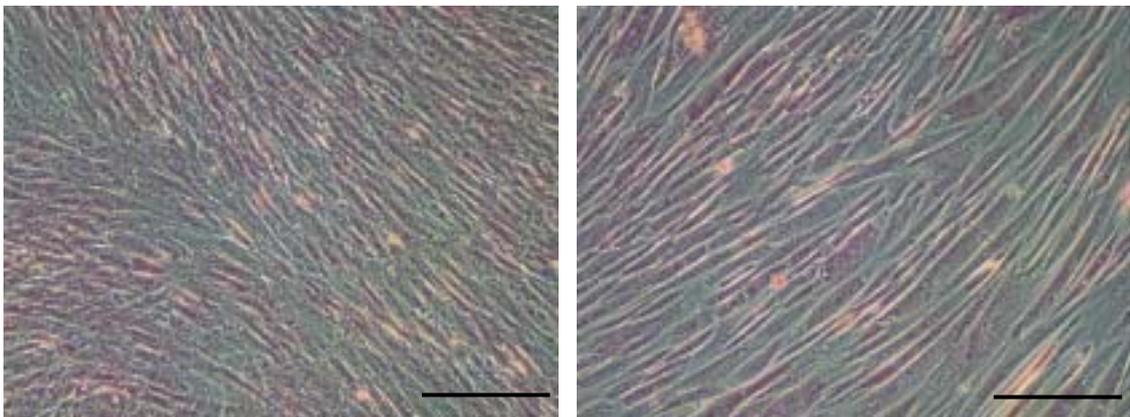
由此可知未添加分化劑對間質幹細胞進行培養，間質幹細胞無法自行朝骨母細胞分化，不能形成群落與礦物質化結節。添加分化劑可刺激間質幹細胞朝骨母細胞分化，形成群落與礦物質化結節，具有造骨細胞活性。若再添加中藥骨碎補則表現特別明顯，所以中藥骨碎補對間質幹細胞朝骨母細胞分化有催化作用。



(A)

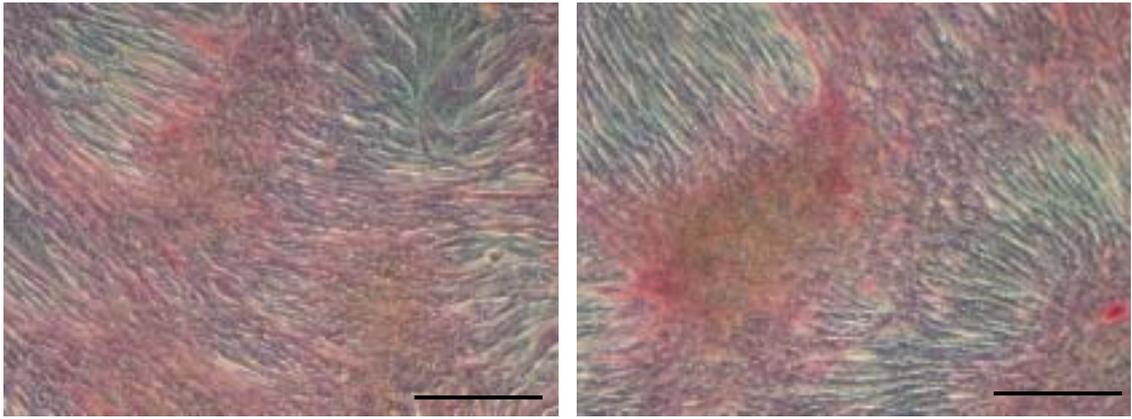


(B)

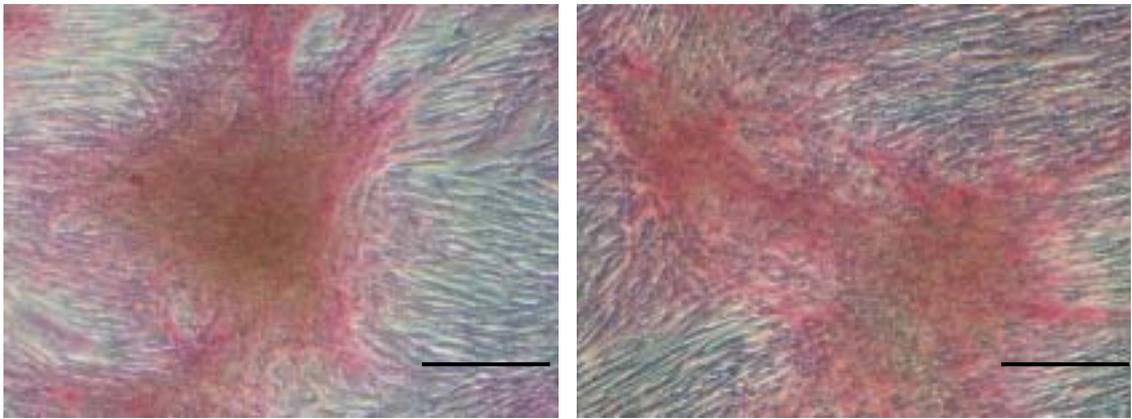


(C)

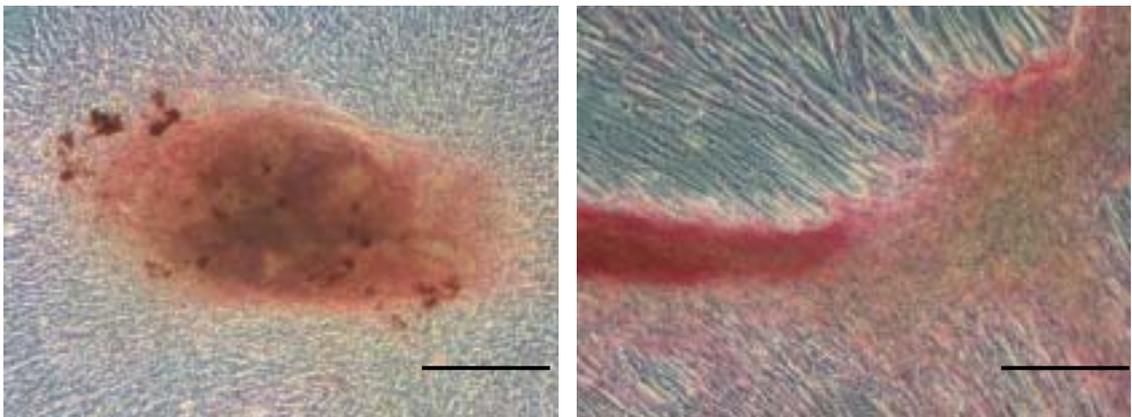
圖 4-12 以間質幹細胞培養液培養 Von Kossa's 染色結果，隨著培養時間增加，仍為單層紡錘狀的細胞型態，未形成群落及礦物質化結節。(A)2 週，(B)3 週，(C)4 週，(scale bar=20 μ m)



(A)

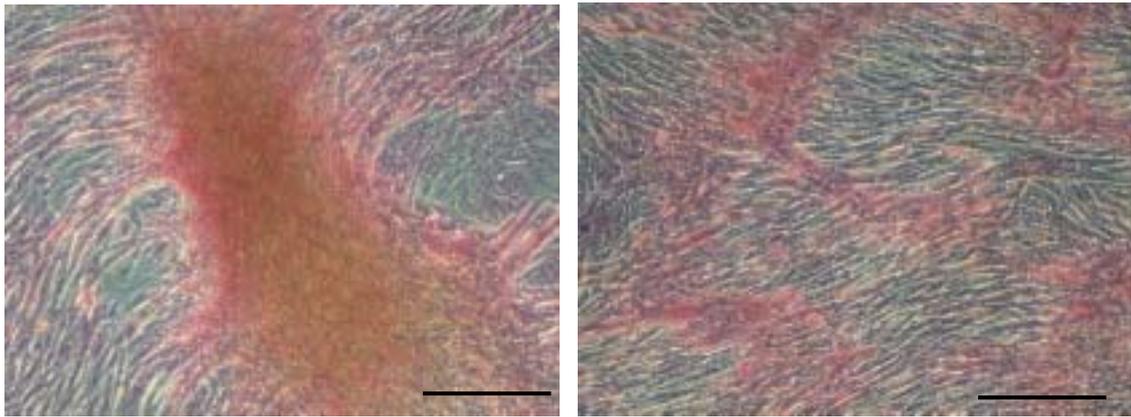


(B)

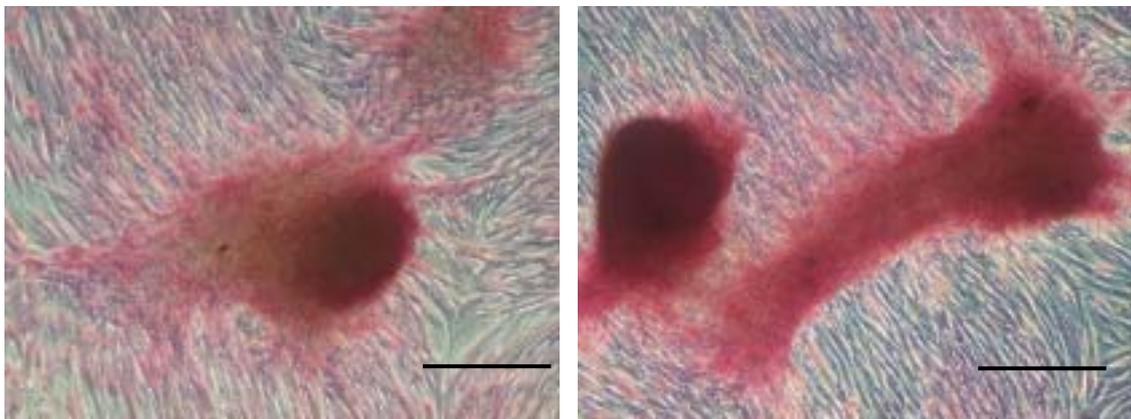


(C)

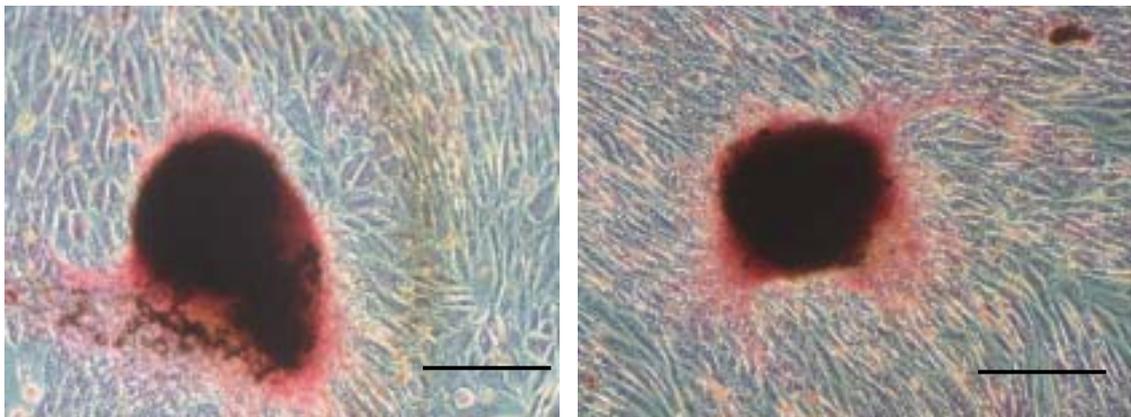
圖 4-13 以添加分化劑培養液培養 Von Kossa's 染色結果，隨著培養時間增加，細胞形成群落，礦物質化結節愈明顯。
(A)2 週，(B)3 週，(C)4 週，(scale bar=20 μ m)



(A)



(B)



(C)

圖 4-14 以添加分化劑及骨碎補培養液培養 Von Kossa's 染色結果，隨著培養時間增加，細胞形成群落，礦物質化結節明顯形成。

(A)2 週，(B)3 週，(C)4 週，(scale bar=20 μm)

4-2-1-3 MTT 色度分析法

經實驗求得間質幹細胞 MTT 檢量線如圖 4-15 所示，間質幹細胞數 (萬)/well 和 formazan 吸光值(O.D.570-650 nm)的對應關係為

$$x=12.5198y-0.8707$$

x: 間質細胞數(萬)/well

y: formazan 吸光值(O.D.570-650 nm)

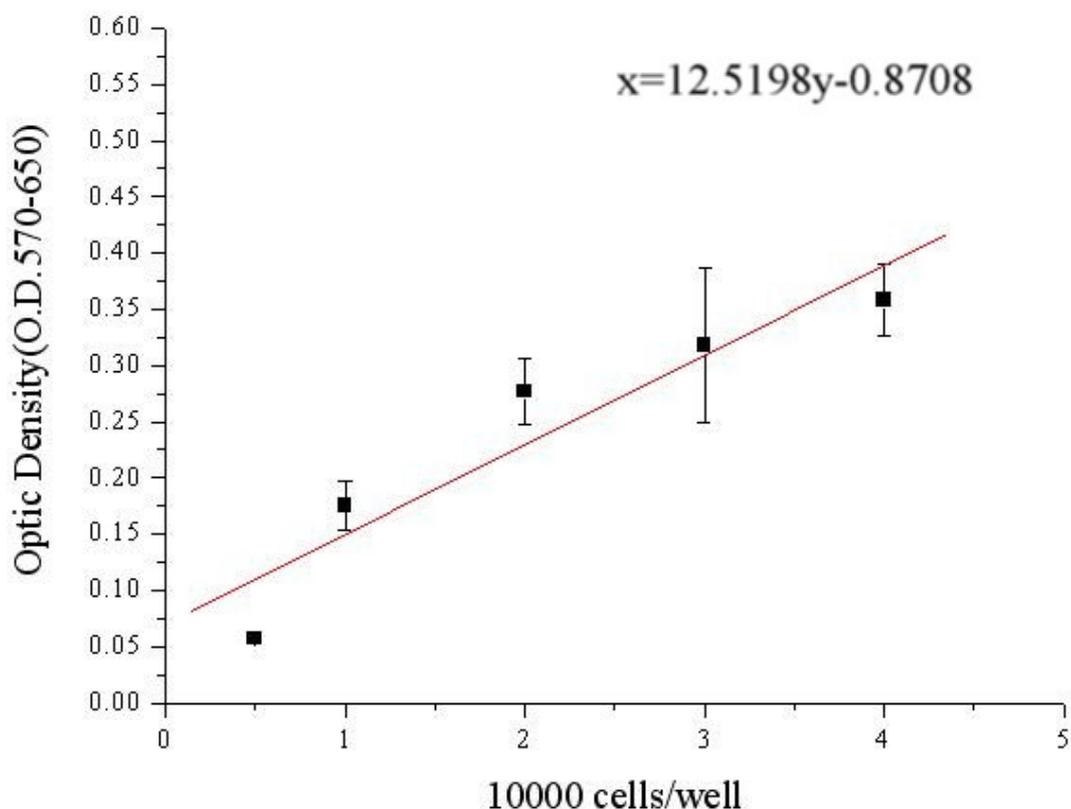


圖 4-15 formazan 吸光值 V.S.間質幹細胞檢量線

將間質幹細胞植入 96 孔培養盤中，分別以間質幹細胞培養液、添加分化劑培養液、添加分化劑及中藥骨碎補培養液分別培養 2 天後，經以 ELISA reader 以雙波長測量波長 570 nm 及 650 nm 的吸光值的差值後，以檢量線換算其細胞數(參見圖 4-16)，發現添加分化劑培養液與添加分化劑及中藥骨碎補的培養液細胞增生均優於間質幹細胞培養液，其中以添加分化劑及中藥骨碎補的培養液更好，表示中藥骨碎補及分化劑均能促使間質幹細胞增生，同時加入有加成效果。

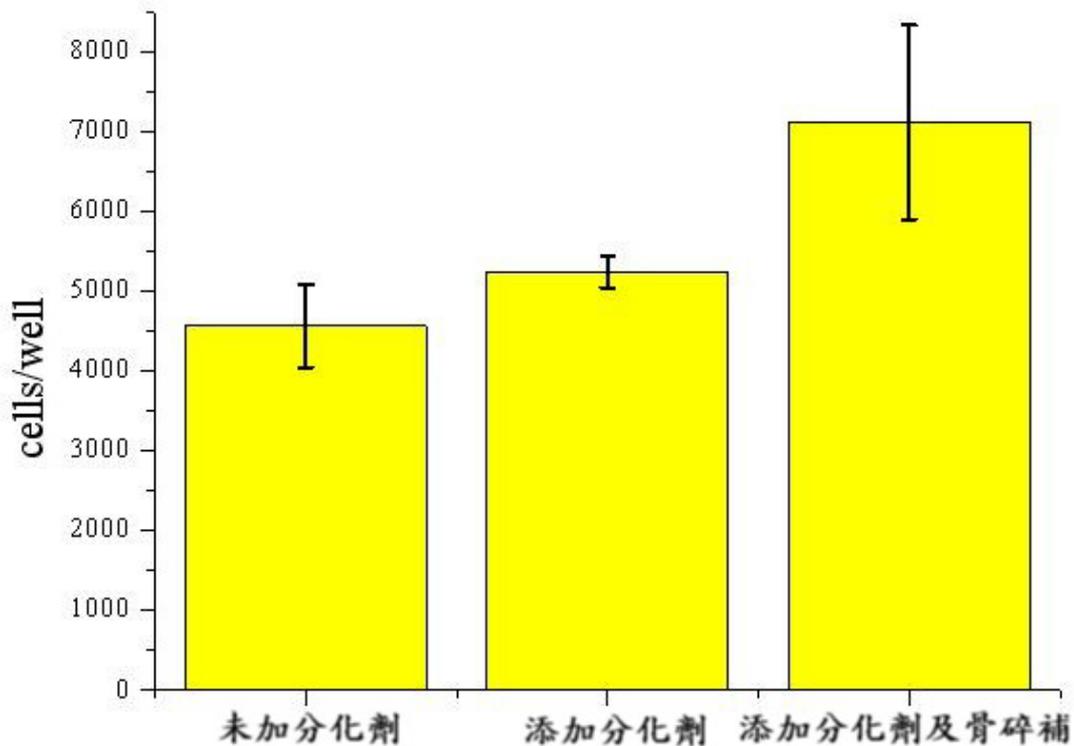
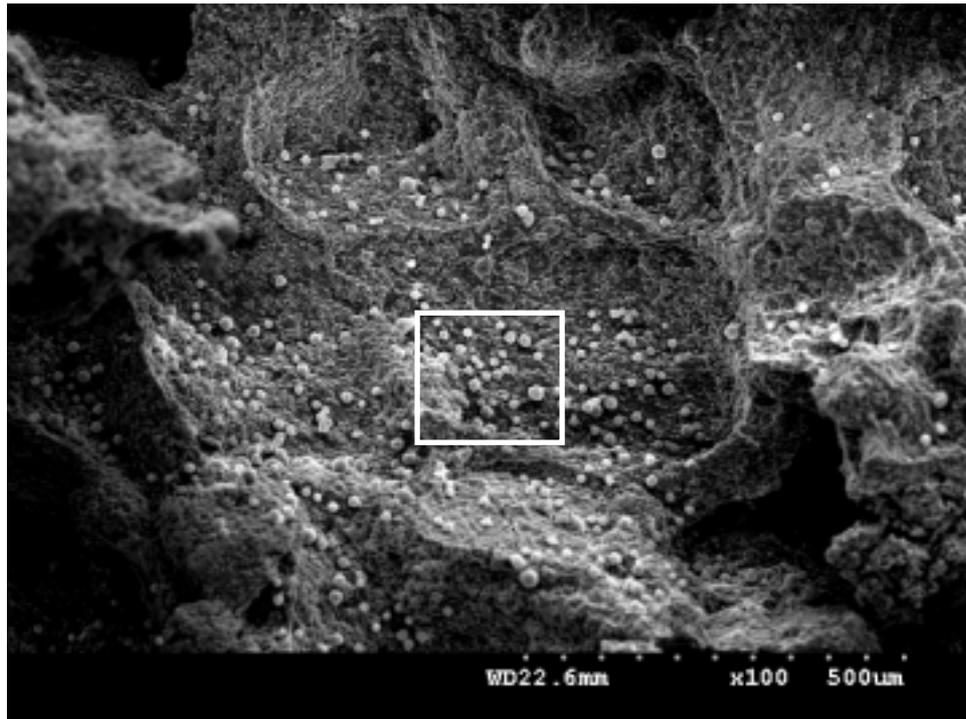


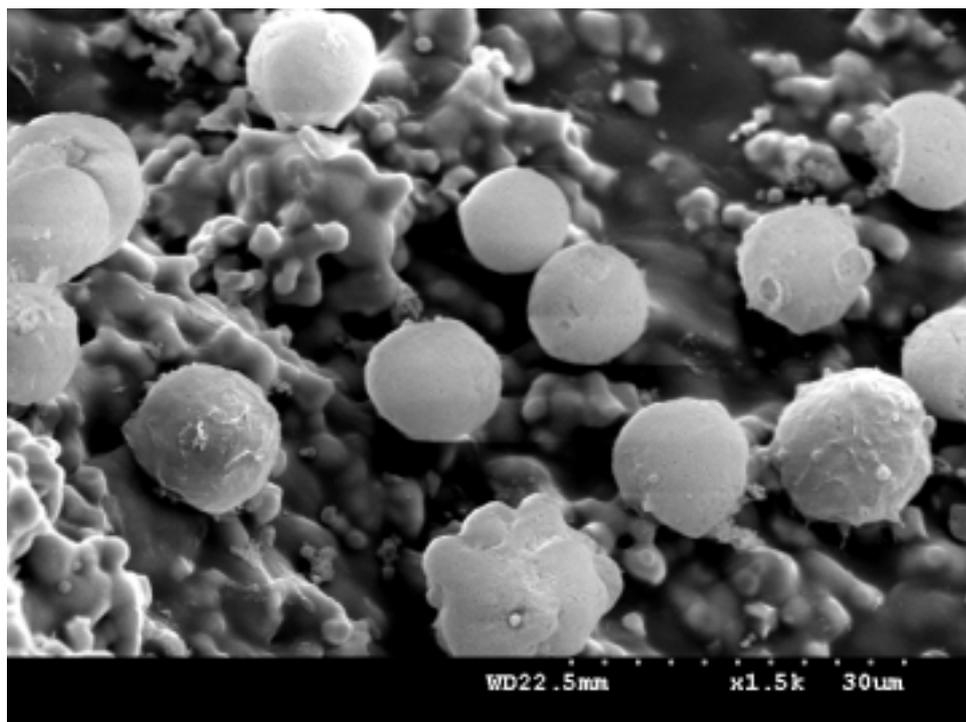
圖 4-16 三種不同培養液相對間質幹細胞增生情形

4-2-1-4 掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察

將間質幹細胞植入多孔性 GGT 複合材料中，將其置於 spinner flask 中以添加分化劑培養液進行動態培養，經過 1、2、4 週時取出切下 1/2，在掃描式電子顯微鏡下觀察材料斷面發現，間質幹細胞在第 1 週時便能均勻進入並密佈於各孔洞中生長(參見圖 4-17)，第 1 週時間質幹細胞貼附較不明顯，但在培養第 2 週(圖 4-18)及第 4 週(圖 4-19)時則有非常明顯的緊密貼附現象，由此可見多孔性 GGT 複合材料具有良好的生物適應性，可在體外培養間質幹細胞或作為間質幹細胞之載體，運用於未來的骨移植手術中。



(A)



(B)

圖 4-17 間質幹細胞植入材料，體外培養 1 週的 SEM 照片，間質幹細胞均勻密佈在各孔洞且貼附於材料表面。(A)100 倍放大圖，(A)1500 倍放大圖

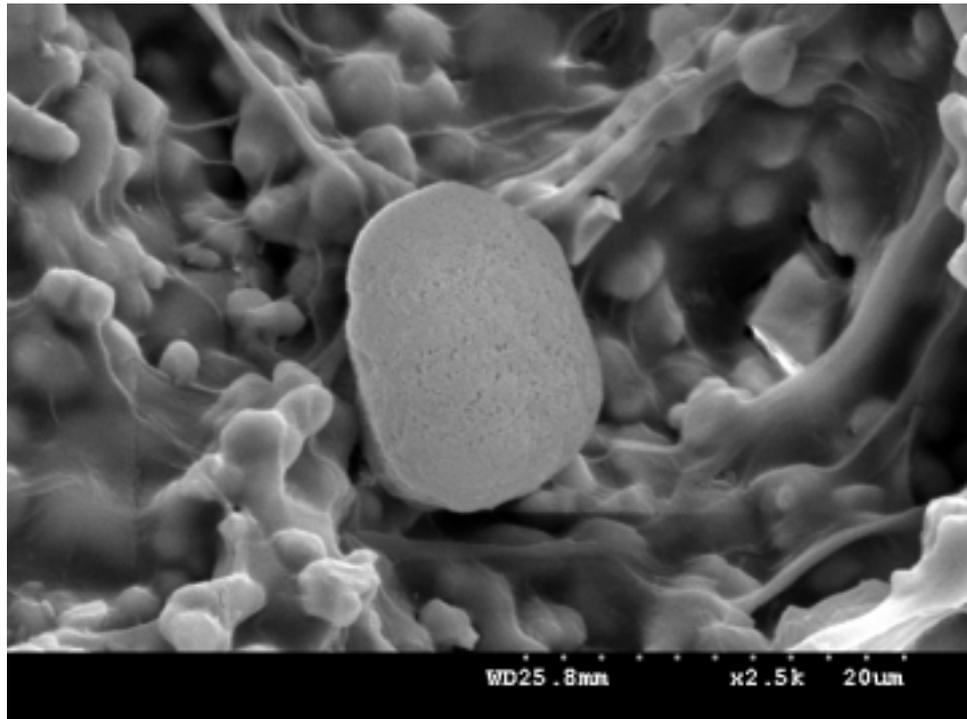


圖 4-18 間質幹細胞植入材料，體外培養 2 週的 SEM 照片，間質幹細胞較為緊密貼附於材料表面。(2500 倍放大圖)

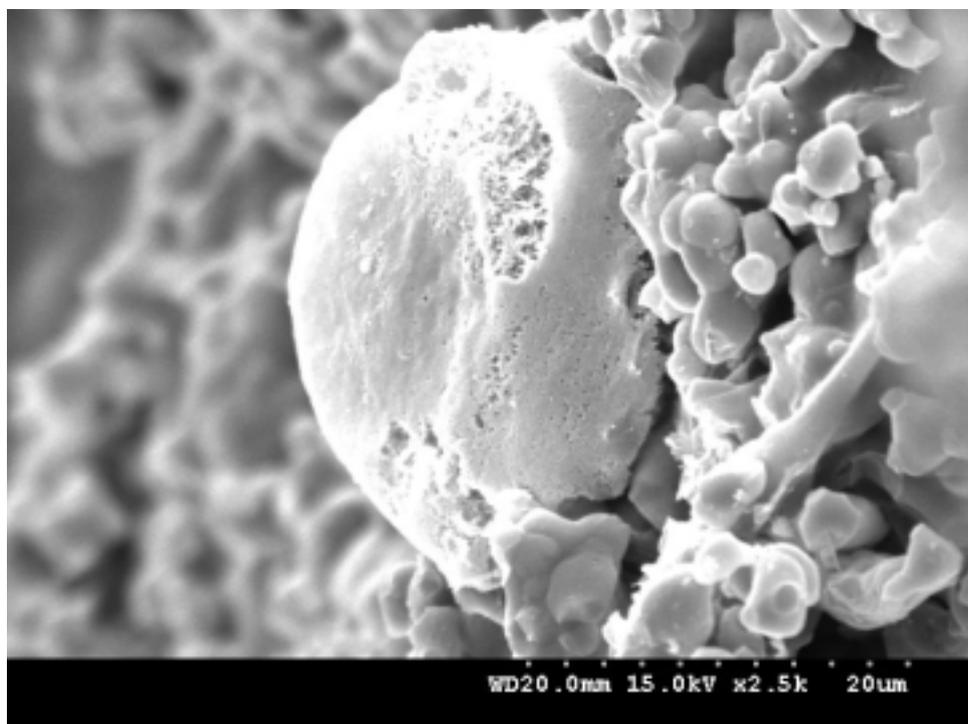
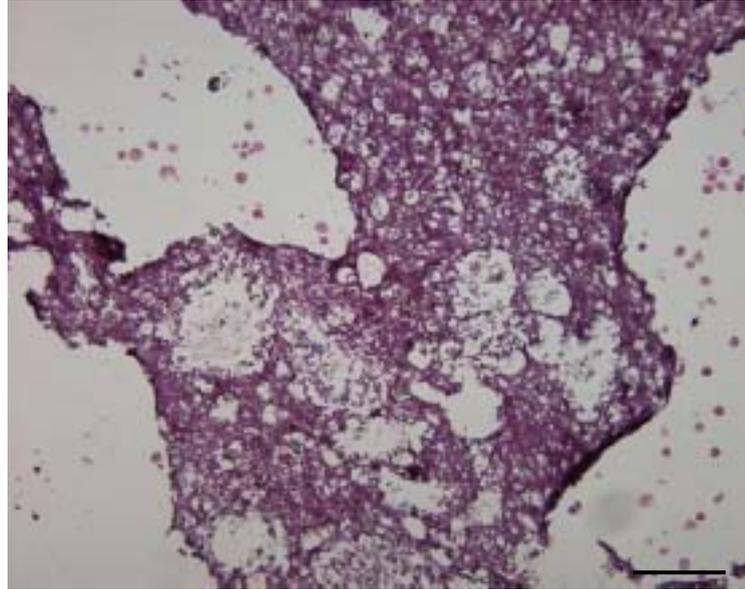


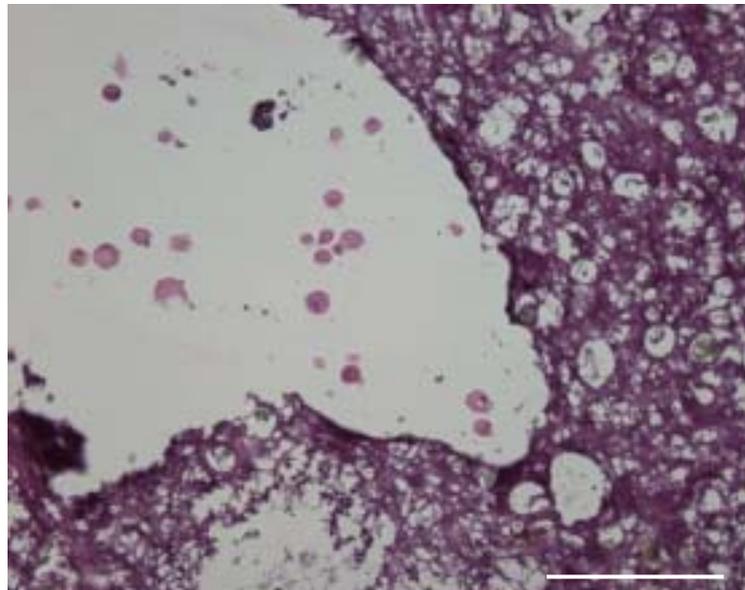
圖 4-19 間質幹細胞植入材料，體外培養 4 週的 SEM 照片，間質幹細胞更為緊密貼附於材料表面。(2500 倍放大圖)

4-2-1-5 組織切片

前一節中取下試片同時將另 1/2 材料進行組織切片結果如圖 4-20 所示，間質幹細胞能進入並分布於孔洞中生長。



(A)



(B)

圖 4-20 間質幹細胞植入材料，體外培養 2 週組織切片，間質幹細胞均勻密佈孔洞中(A)100 倍放大圖，(B)200 倍放大圖，(scale bar=10 μ m)

4-2-2 體內測試

本實驗體內測試部份為以多孔性 GGT 為對照組，添加中藥骨碎補多孔性 GGT 為實驗組，分別植入間質幹細胞於體外培養 1、2、4 週後，植回自體頭蓋骨，經手術八週後，將兔子犧牲取出頭蓋骨，作巨視觀察、X 光檢驗、掃瞄式電子顯微鏡及組織切片，以觀察多孔性 GGT 在生物體內被吸收及新生骨組織生長情形，評估間質幹細胞、骨碎補於骨缺陷修復過程所產生之影響，各項測試結果詳細於以下各節說明之。

4-2-2-1 兔體頭蓋骨巨視觀察

將培養自體間質幹細胞之多孔性 GGT 複合材料植回兔體頭蓋骨後，於 1 週後(參見圖 4-21)對兔子頭部外觀進行觀察發現，兔子的手術傷口處恢復相當良好，並無膿腫或潰爛的症狀產生，2 週時(參見圖 4-22)傷口已恢復，兔毛剃除處已開始長出兔毛，表示手術過程成功，未有感染情況發生。

手術八週後，將頭蓋骨表皮切開(參見圖 4-23)，觀察植入部位骨組織表面無紅腫、發炎及潰爛現象，此結果說明實驗材料在植回兔體頭蓋骨後，不會導致組織的病變或生物適應性不良的現象，進一步觀察實驗材料與周圍骨組織接合程度相當緊密，材料位置仍清晰可見，可見在植入以後材料不會被組織液或血液所沖離或明顯的吸收代謝。

將頭蓋骨取出，觀察腦組織外觀(參見圖 4-24)，沒有產生發炎、腫脹或萎縮之症狀，由以上巨視觀察證明，多孔性 GGT 複合材料不具生物毒性，生物適應性良好，不會造成周圍組織的傷害，而所植入之間質幹細胞為自體骨髓細胞，也不會有排斥現象。



圖 4-21 兔體頭蓋骨手術後 1 週，傷口恢復相當良好，並無膿腫或潰爛的症狀產生



圖 4-22 兔體頭蓋骨手術後 2 週，傷口已恢復，並可明顯看到兔毛剃除處已開始長出兔毛



圖 4-23 多孔性 GGT 複合材料植入兔體頭蓋骨 8 週後，兔體頭蓋骨的植入部位皆無紅腫及發炎現象發生



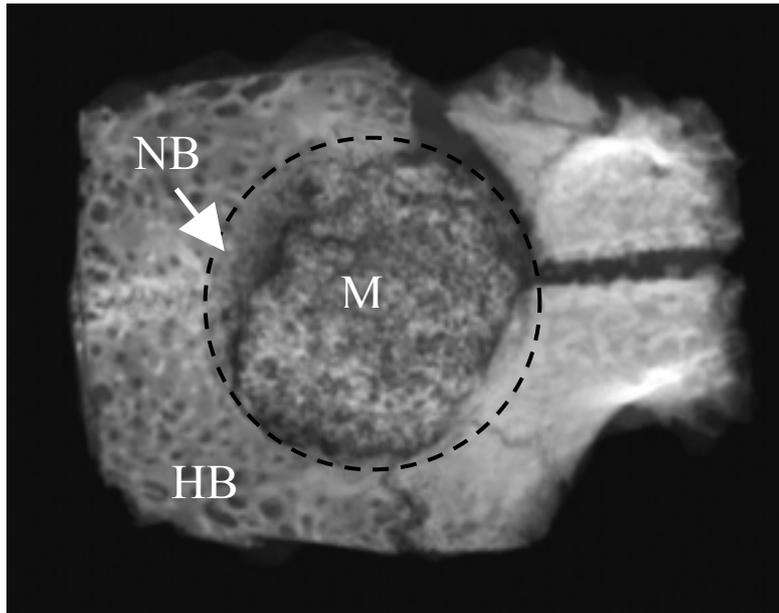
圖 4-24 多孔性 GGT 複合材料植入 8 週後，兔體頭蓋骨下方的腦組織並無產生發炎、腫脹或萎縮之病變

4-2-2-2 X 光觀察

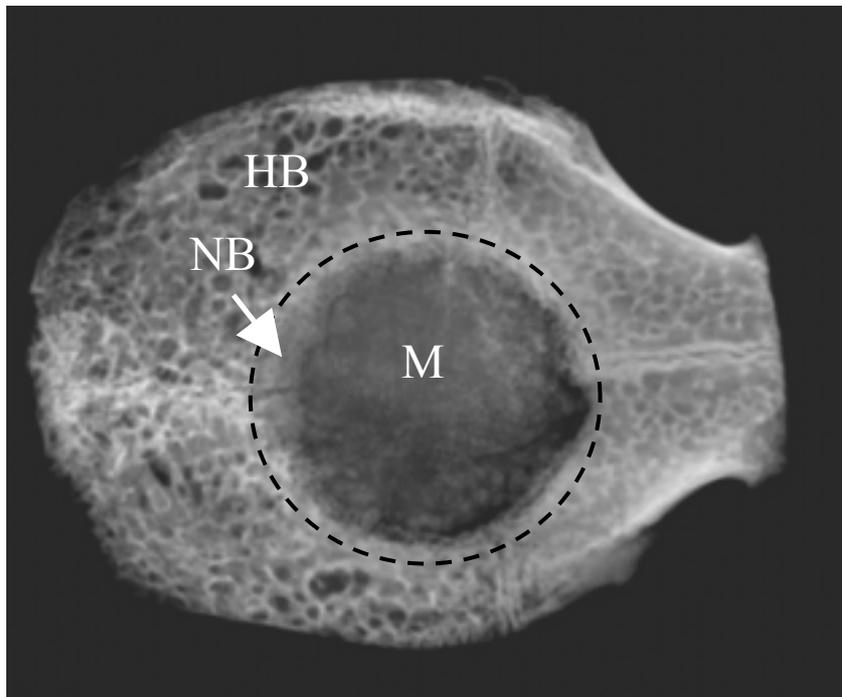
多孔性 GGT 複合材料植入間質幹細胞，於體外培養不同時段，植回自體兔體頭蓋骨八週後，X-ray 照射情形參見圖 4-25，由圖中可明顯看出材料與周圍組織接合緊密，新生骨組織已沿著宿主骨與材料接合面向骨缺陷生長，使得圓形的骨缺陷已變成不規則狀，材料部份降解而為新生骨組織所取代，這結果表示材料生物適應性良好，而且具有骨引導作用，能促進骨缺陷的癒合。

添加骨碎補多孔性 GGT 複合材料的 X-ray 照射情形參見圖 4-26，在圖中可更明顯的看到新生骨組織向骨缺陷生長的情形，圓形的骨缺陷也變成不規則狀，材料已部份降解為新生骨組織所取代，這結果表示添加骨碎補多孔性 GGT 複合材料同樣具有良好生物適應性，並具有骨引導作用，能促進骨缺陷的癒合。

為進一步對新生骨組織作定量評估，因此利用影像分析軟體計算新生骨組織所佔骨缺陷的面積比率以進行比較，由表 4-3 發現未植入間質幹細胞的多孔性 GGT，其新生骨組織佔骨缺陷的總面積比率為 17 %，低於植入間質幹細胞先行在體外培養 1 週(23 %)、2 週(28 %)、4 週(32 %) 以後再植回自體頭蓋骨的材料，而添加骨碎補多孔性 GGT 未植入間質幹細胞為 24 %，也低於植入間質幹細胞體外培養 1 週(28 %)、2 週(33 %)、4 週(38 %)，這顯示先行將間質幹細胞植入材料，間質幹細胞不需等材料之引導作用，可直接進行骨缺陷修復，所以可加速新生骨組織之生成，且隨著體外培養時間增加所佔骨缺陷總面積也隨著增加，表示先行將間質幹細胞植入材料中，進行體外培養使其增生並朝骨母細胞分化可促進新生骨組織的產生，而材料中所添加的骨碎補，於生物體內可緩慢釋放出來以促進骨組織的再生。

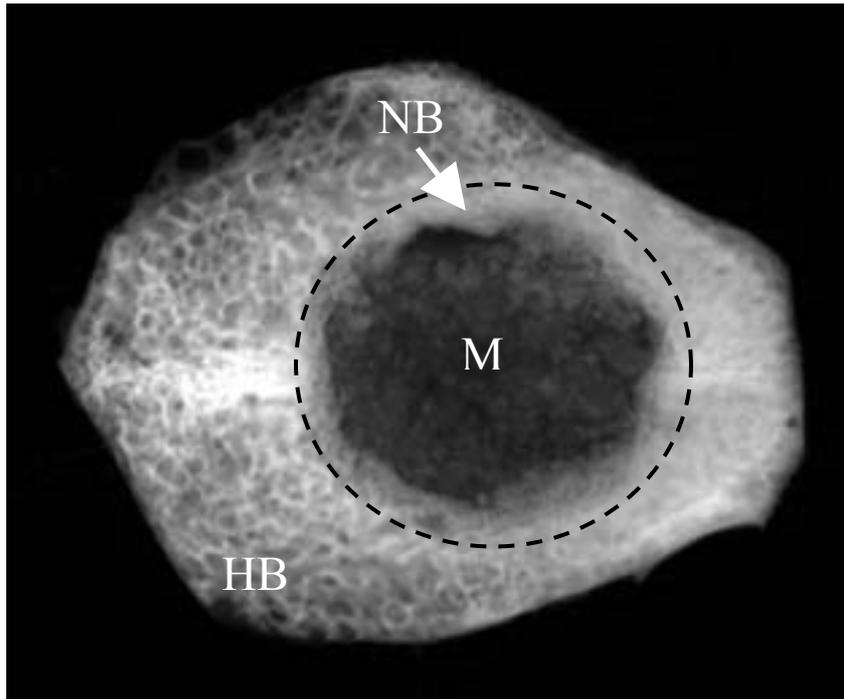


(A)

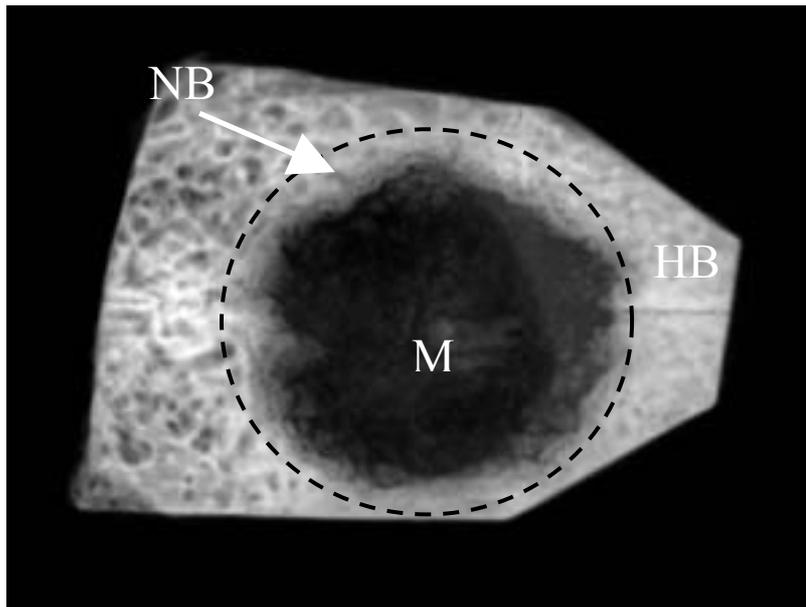


(B)

圖 4-25 多孔性 GGT 複合材料植入間質幹細胞，於體外培養不同時段，植回兔體頭蓋骨八週後，X-ray 照射圖，(A)未植入間質幹細胞，(B)植入間質幹細胞體外培養一週，(C)植入間質幹細胞體外培養二週，(D)植入間質幹細胞體外培養四週，HB 表宿主骨，NB 表新生骨，M 表材料位置，圓形虛線表材料與宿主骨界面

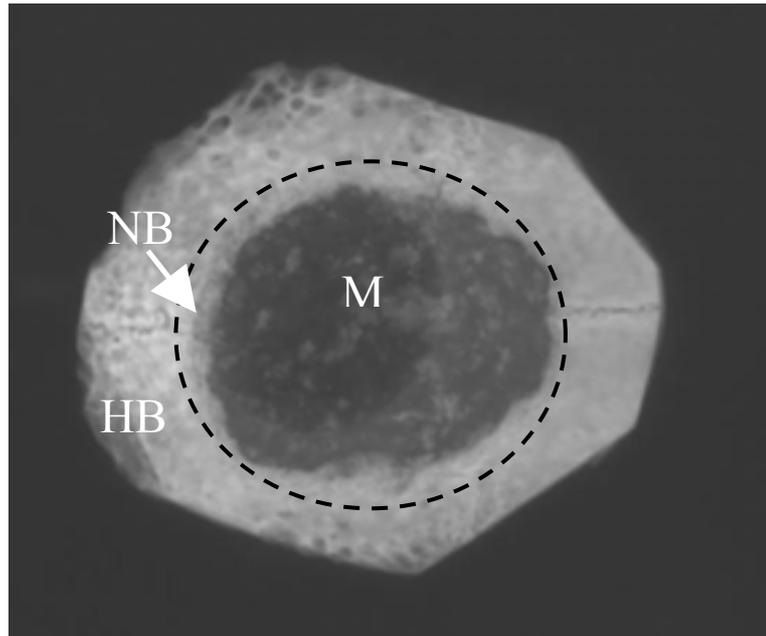


(C)

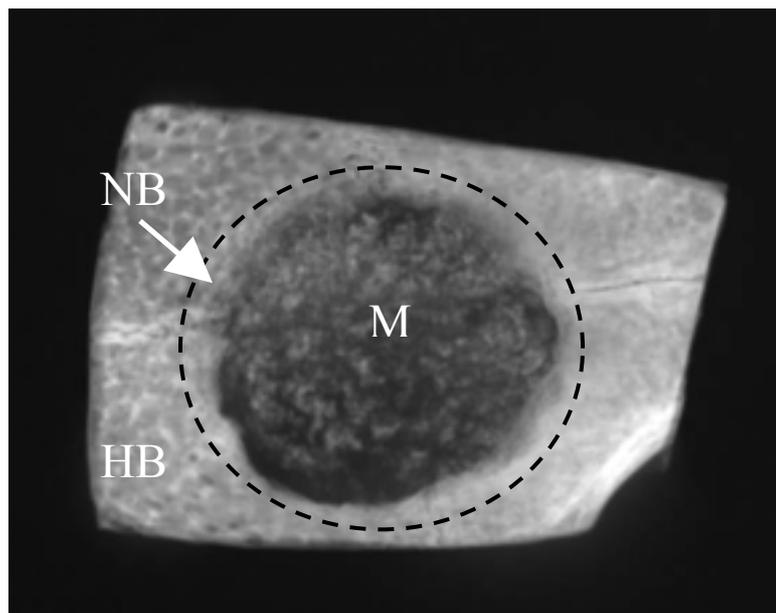


(D)

圖 4-25 續

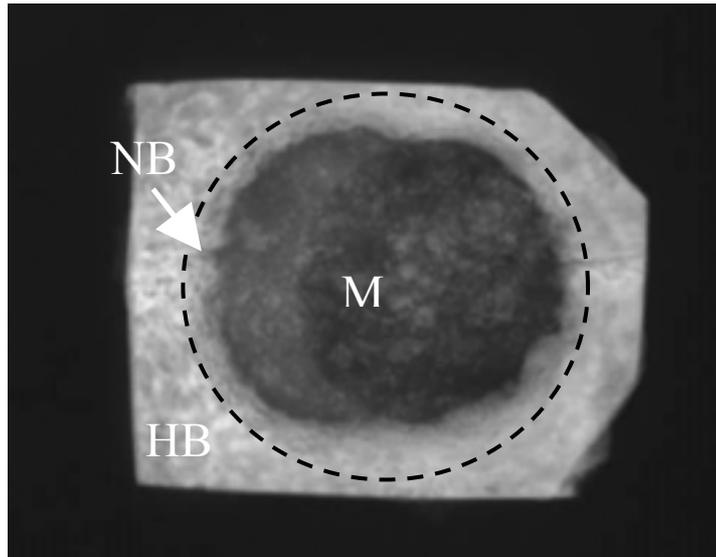


(A)

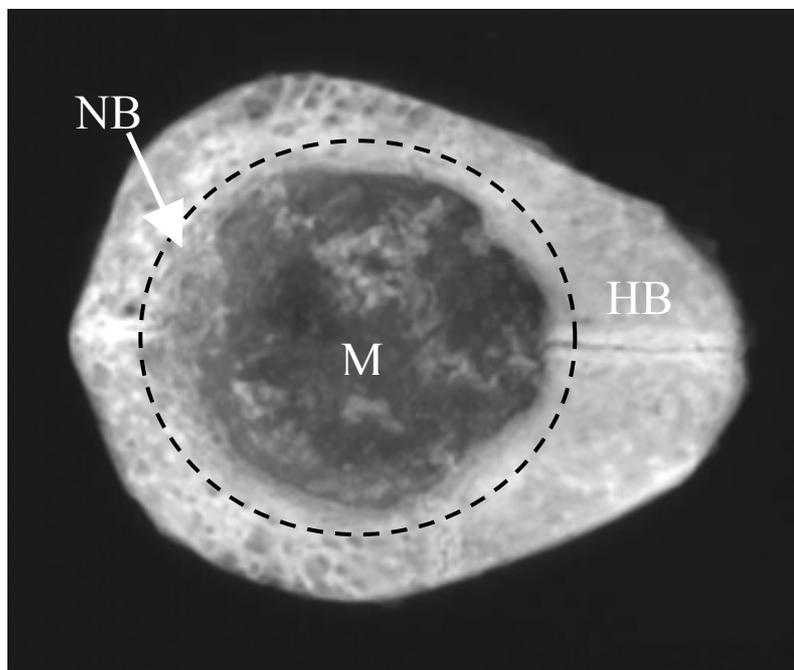


(B)

圖 4-26 添加骨碎補多孔性 GGT 複合材料植入間質幹細胞，於體外培養不同時段，植回兔體頭蓋骨八週後，X-ray 照射圖，(A)未植入間質幹細胞，(B)植入間質幹細胞體外培養一週，(C)植入間質幹細胞體外培養二週，(D)植入間質幹細胞體外培養四週，HB 表宿主骨，NB 表新生骨，M 表材料位置，圓形虛線表材料與宿主骨界面



(C)



(D)

圖 4-26 續

表 4-3 兩種材料於體外培養不同時段後植回兔體頭蓋骨，新生骨組織生成所佔骨缺陷總面積的百分比

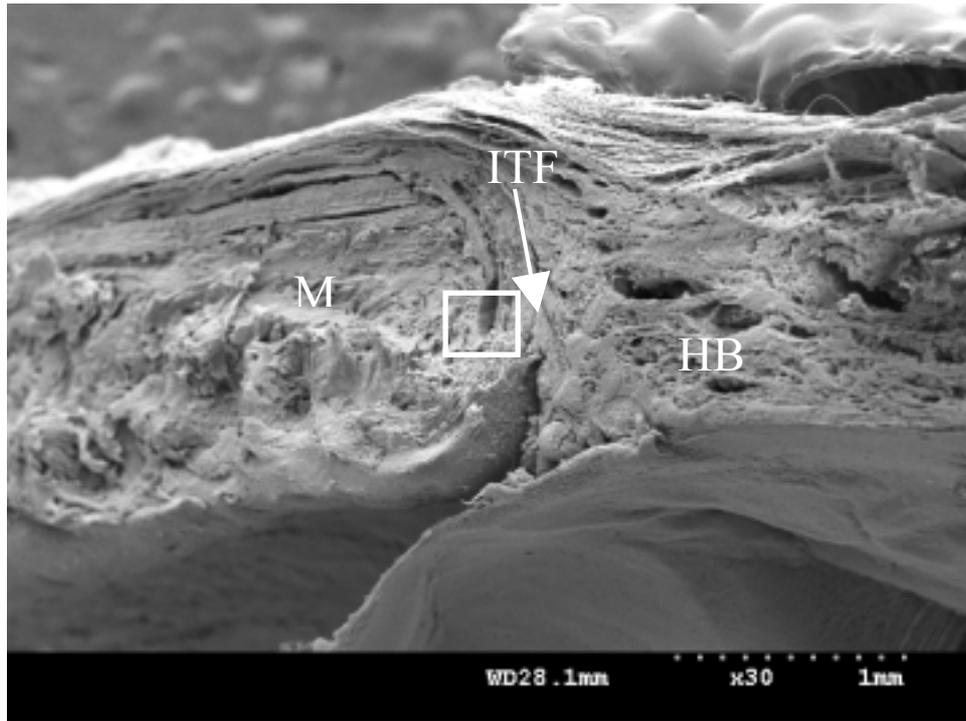
體外培養時間	未植入幹細胞	1 週	2 週	4 週
多孔性 GGT	17	23	28	32
添加骨碎補多孔性 GGT	24	28	33	38

4-2-2-3 掃描式電子顯微鏡觀察

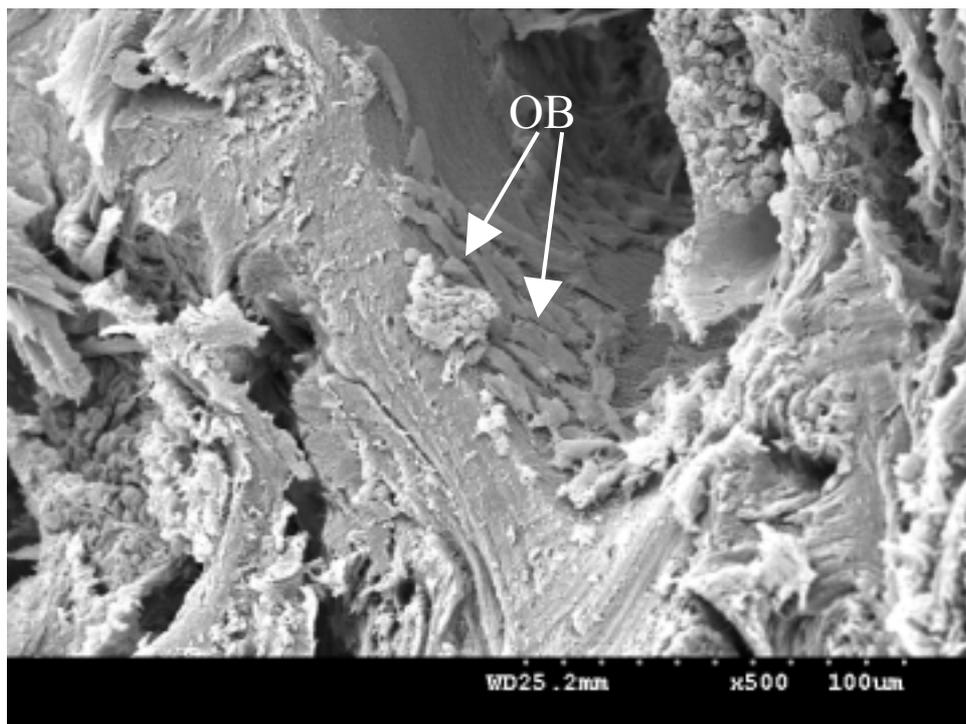
兔子犧牲後，將頭蓋骨取下經處理後，於掃描式電子顯微鏡下觀察主要有以下幾點發現：

- 一、在圖 4-27 中可以發現，位於宿主骨與多孔性 GGT 複合材料的界面附近有骨母細胞聚集生長，且與材料緊密貼附，表示多孔性 GGT 複合材料不具生物毒性，生物適應性良好，並且具備骨引導作用，能引導宿主骨中的骨母細胞沿著接觸界面朝多孔性 GGT 複合材料中生長。
- 二、在圖 4-28 中可以發現，多孔性 GGT 複合材料內部，有明顯的血管生長情形，血管內部並可見到外形像甜甜圈的紅血球 (erythrocytes) 聚集情形，表示將多孔性 GGT 複合材料植入兔體頭蓋骨後，新生血管可於材料之中生長，以執行養分及生長因子等的輸送及廢物的排除，幫助骨組織的修復。
- 三、在圖 4-29 中可以發現在多孔性 GGT 複合材料內部有間質幹細胞所增生及分化細胞聚集的現象，表示經由抽取骨髓培養而得的間質幹細胞，植入多孔性 GGT 複合材料中體外培養一段時間後，植回自體頭蓋骨仍能持續增生及分化，參與骨缺陷的修復。

由以上三點結果可知多孔性 GGT 複合材料為一不具生物毒性、生物適應性良好，具骨引導作用，能引導骨母細胞進入材料之中，並能使新生血管於材料之中生長，擔任養分及廢物之運輸，以促進骨缺陷修復，且所植入之幹細胞能持續增生及分化，為可應用於組織工程以供組織培養的支架。

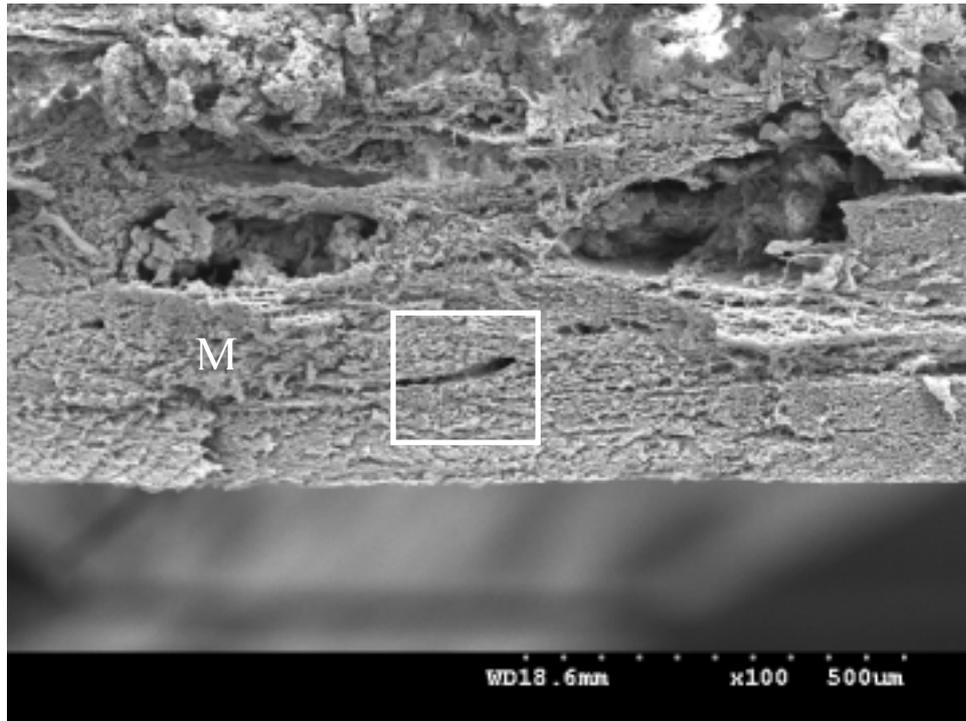


(A)

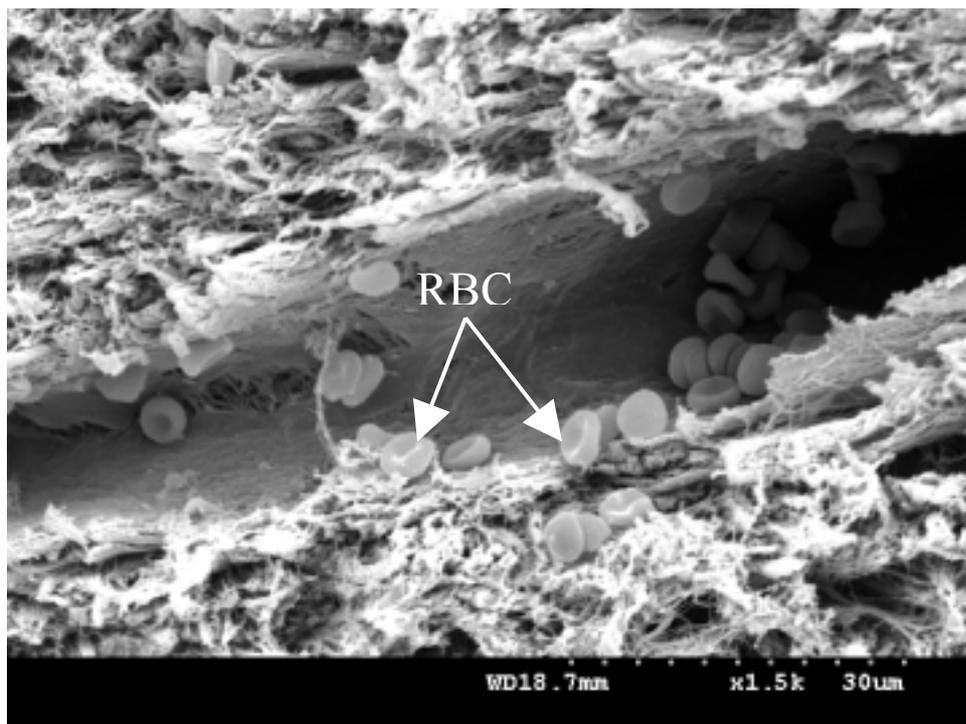


(B)

圖 4-27 兔體頭蓋骨掃描式電子顯微鏡觀察結果，宿主骨與材料界面處有骨母細胞聚集生長現象。(A)30 倍放大圖，(B)500 倍放大圖，HB 表宿主骨，M 表材料位置，ITF 表材料與宿主骨界面，OB 表骨母細胞

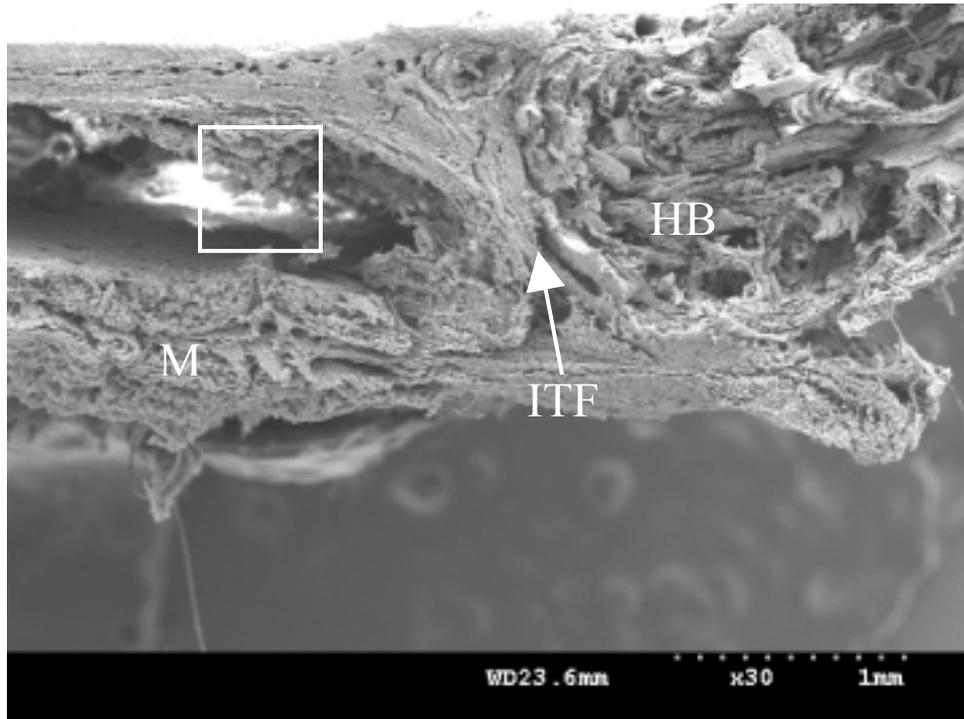


(A)

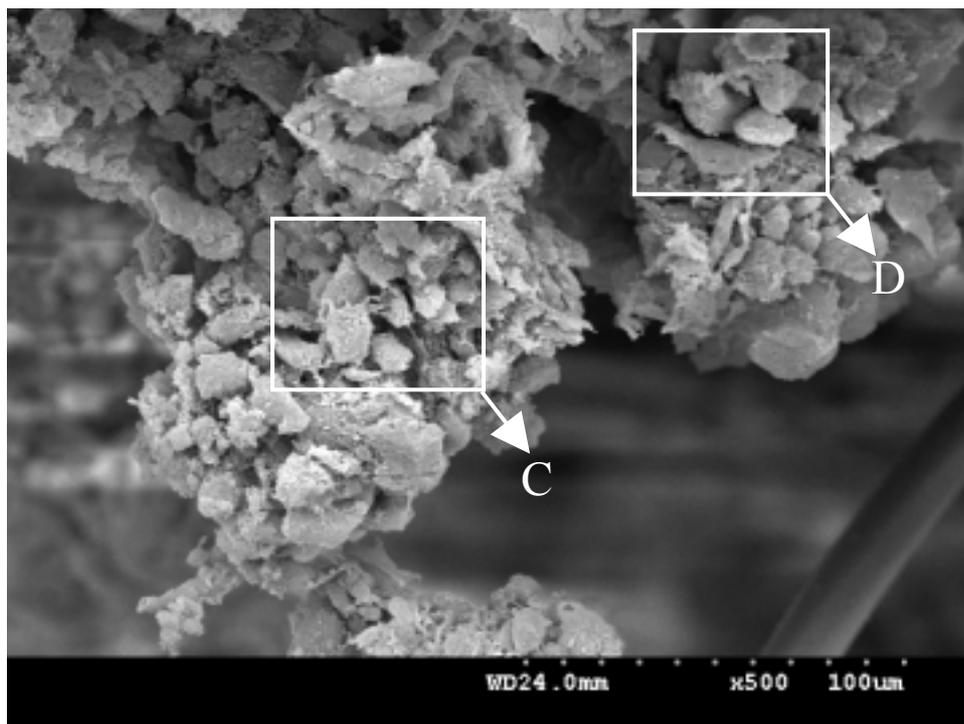


(B)

圖 4-28 兔體頭蓋骨掃描式電子顯微鏡觀察結果，多孔性 GGT 複合材料內部有血管形成，血管內有明顯的紅血球聚集。(A)100 倍放大圖，(B)1500 倍放大圖，M 表材料位置，RBC 表紅血球

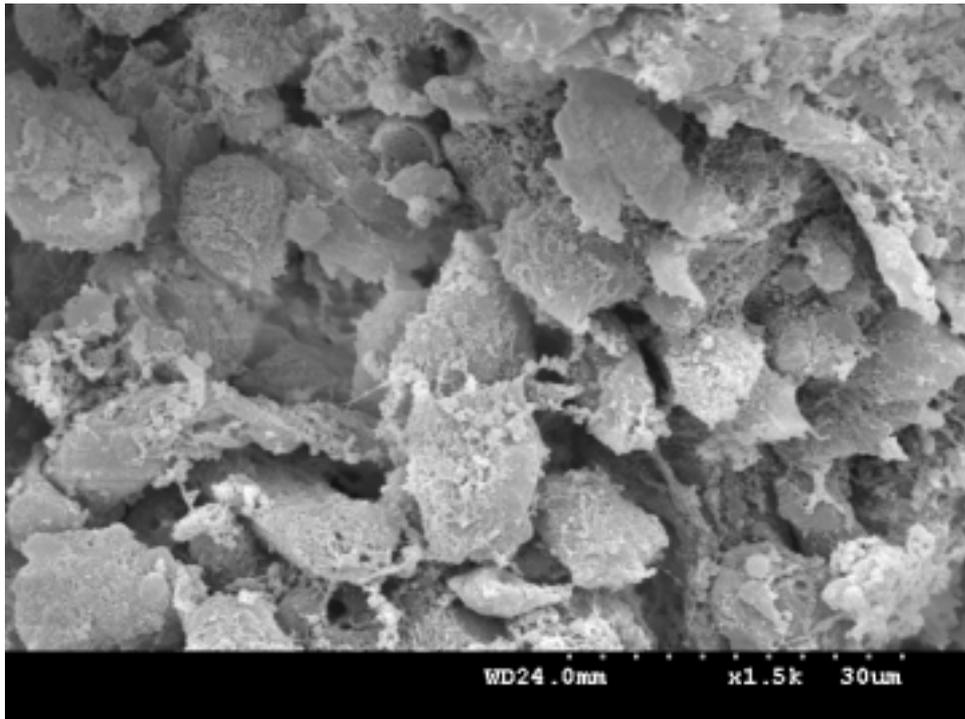


(A)

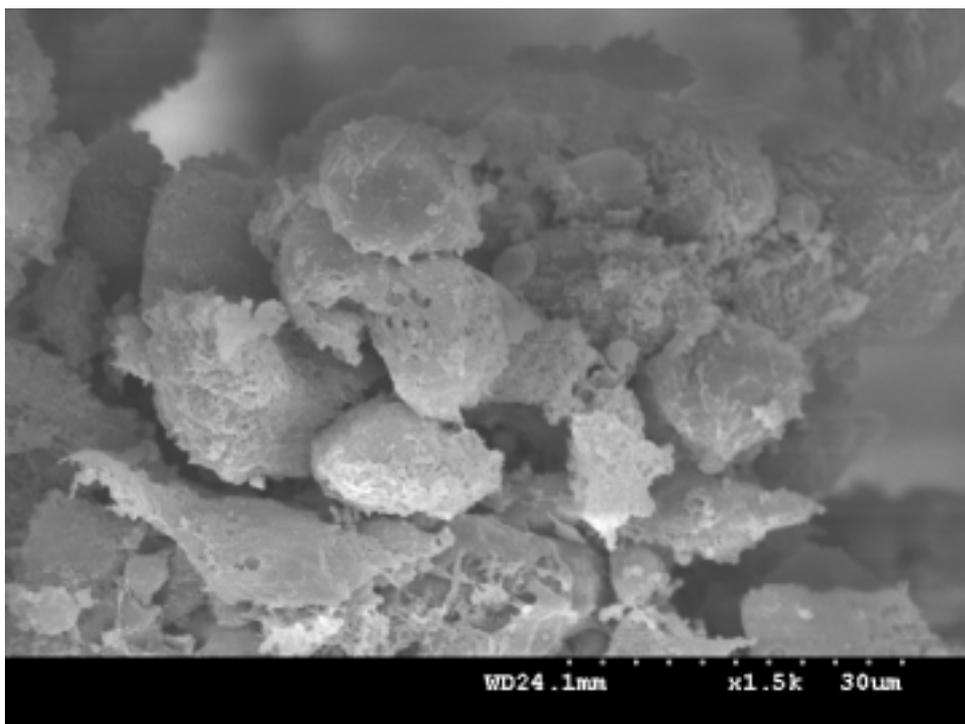


(B)

圖 4-29 兔體頭蓋骨掃描式電子顯微鏡觀察結果，多孔性 GGT 材料有間質幹細胞所增生及分化細胞聚集現象。(A)30 倍放大圖，(B)500 倍放大圖，(C)、(D)1500 倍放大圖，HB 表宿主骨，M 表材料位置，ITF 表材料與宿主骨界面



(C)



(D)

圖 4-29 續

4-2-2-4 組織切片

經以直立式光學顯微鏡觀察組織切片，比較多孔性 GGT 與添加骨碎補多孔性 GGT 骨缺陷修復、新生骨組織生長與材料降解及被取代情形，分別探討如下：

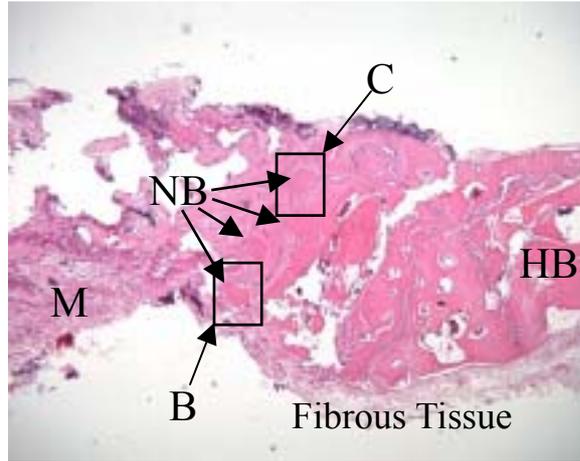
圖 4-30 為未植入間質幹細胞之多孔性 GGT，植入兔體頭蓋骨經八週後取出的組織切片，從(A)40 倍放大圖中可發現在宿主骨與材料界面間有多處新生骨組織生成，由(B)及(C)400 倍放大圖更可明顯看到新生骨組織形成，宿主骨與材料界面因被新生骨組織所取代，無法清楚辨識，表示多孔性 GGT 植入八週後已發揮骨引導作用，引導新生骨組織朝材料方向生長，局部材料並已降解為新生骨組織所取代。在材料下緣可發現被一層平整的纖維組織(fibrous tissue)所包覆，而非形成厚異物膜，此纖維膜介於骨組織與內皮組織之間，並不會阻礙骨組織往材料的方向成長，由此可知多孔性 GGT 擁有良好的生物適應性，具備骨引導作用，能引導骨組織朝材料生長。

圖 4-31 為植入間質幹細胞在體外培養四週的多孔性 GGT，植回自體頭蓋骨經八週後取出的組織切片，從(A)40 倍放大圖中可發現在宿主骨與材料界面間也有多處新生骨組織生成，這點與未植入間質幹細胞的圖 4-30 相似，但在(B)40 倍放大圖及(C)400 倍放大圖中，可發現位於材料內部也有新生骨組織明顯形成，新生骨周圍並有骨母細胞聚集的現象，因此處材料並未與宿主骨接觸，表示所生成的骨組織應為所植入的間質幹細胞所分化而形成。

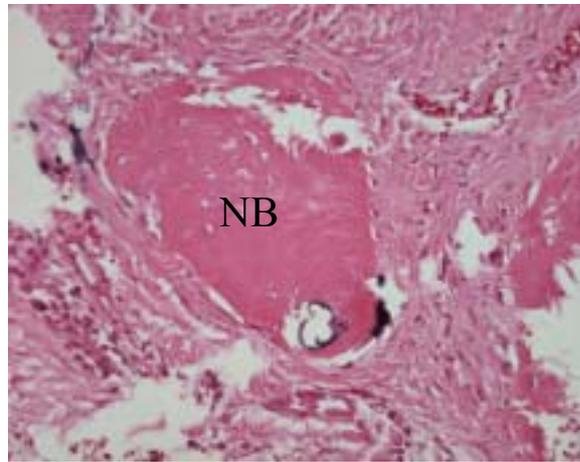
圖 4-32 為未植入間質幹細胞之添加骨碎補多孔性 GGT，植入兔體頭蓋骨經八週後取出的組織切片，從(A)40 倍放大圖中可發現在宿主骨與材料界面間也有多處新生骨組織生成，從(B)100 倍及(C)400 倍放大圖中可以發現新生骨組織中間包覆著深藍色未降解的材料，新生骨組織與材料之間緊密貼附，邊緣成不規則形，表示材料生物適應性良好，在生物體內已逐漸吸收降解，被新生骨組織所取代。

圖 4-33 為植入間質幹細胞在體外培養一週之添加骨碎補多孔性 GGT，植回自體頭蓋骨經八週後取出的組織切片，由(A)40 倍及(B)100 倍放大圖中可發現在材料內部有大面積的類骨組織生成，此處材料未與宿主骨直接接觸，類骨組織應為間質幹細胞所生成，由(C)400 倍放大圖發現未降解材料與新生類骨組織緊密貼附，且材料內部有細胞組織參雜其中，這同樣也證明添加骨碎補多孔性 GGT 具有良好生物適應性，而且間質幹細胞可經由體外培養作為骨組織的來源細胞，參與並加速骨組織修復。

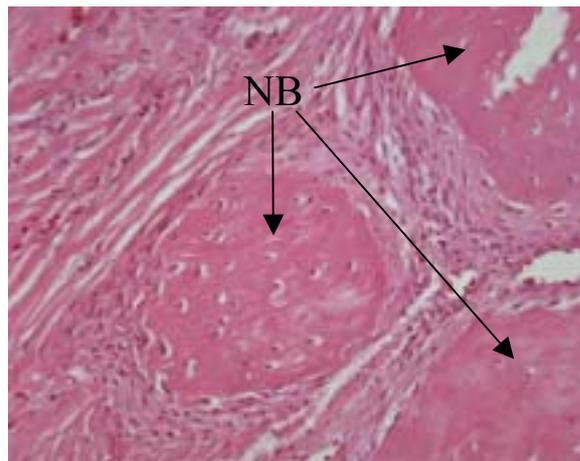
圖 4-34 為植入間質幹細胞在體外培養二週之添加骨碎補多孔性 GGT，植回自體頭蓋骨經八週後取出的組織切片，由圖中可明顯發現有較大面積及數量的新生骨組織沿著宿主骨與材料界面朝材料內部生長，這結果可與 X-ray 照射結果相呼應，即體外植入間質幹細胞及添加骨碎補對骨組織修復有促進作用。



(A)

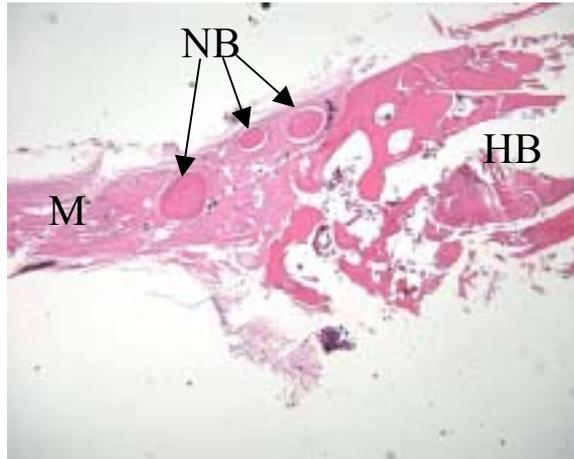


(B)

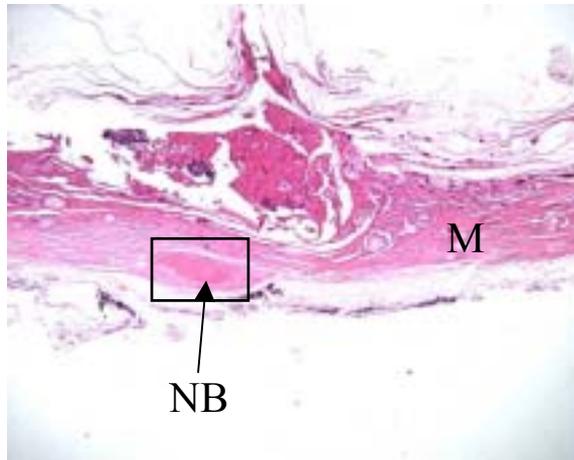


(C)

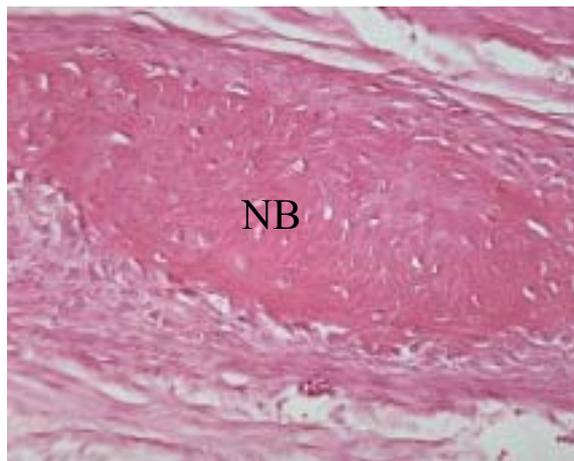
圖 4-30 未植入間質幹細胞多孔性 GGT 頭蓋骨組織切片，在宿主骨與材料間有新生骨生成，(A)40 倍放大圖，(B)(C)400 倍放大圖，HB 表宿主骨，M 表材料位置，NB 表新生骨



(A)

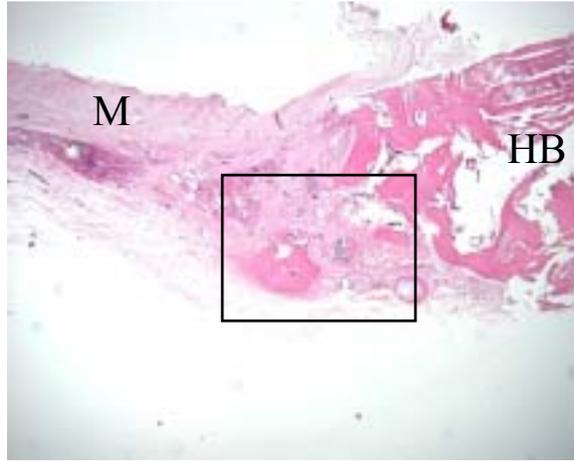


(B)

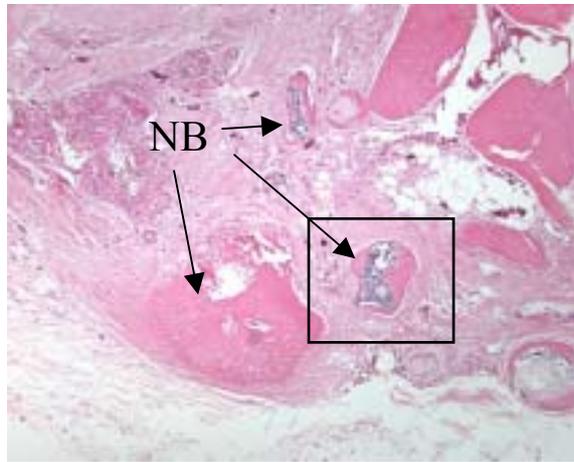


(C)

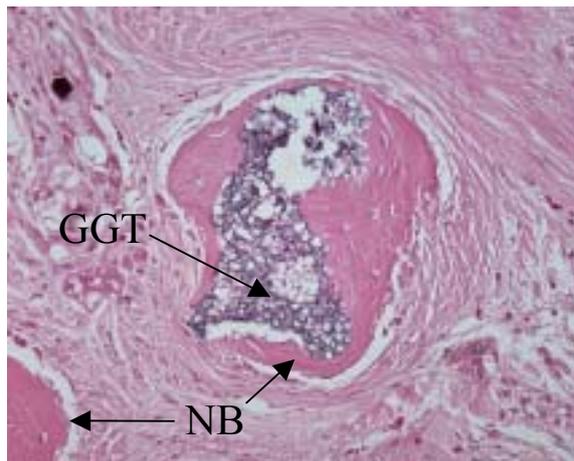
圖 4-31 植入間質幹細胞體外培養四週多孔性 GGT 頭蓋骨組織切片，材料界面與內部都有新生骨生成，(A)(B)40 倍放大圖(C)400 倍放大圖，HB 表宿主骨，M 表材料位置，NB 表新生骨



(A)

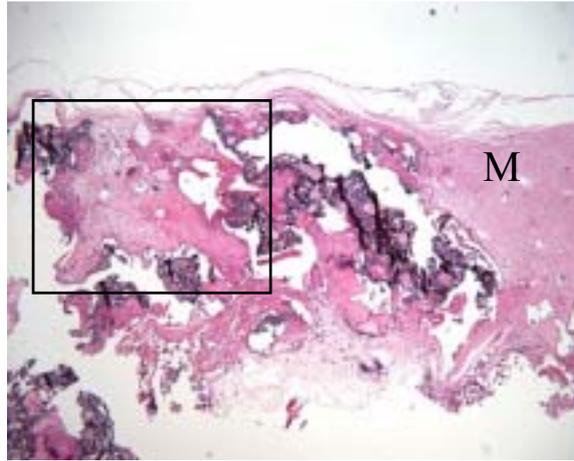


(B)

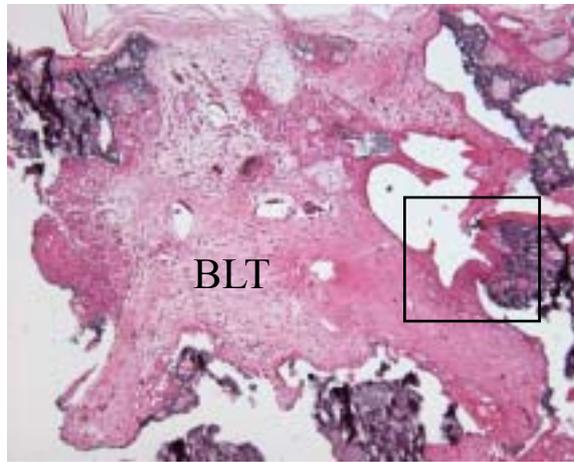


(C)

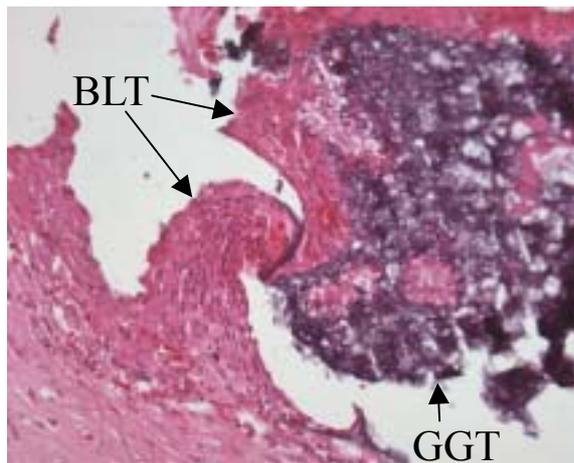
圖 4-32 未植入間質幹細胞添加骨碎補多孔性 GGT 頭蓋骨組織切片，
 (A)40 倍放大圖，(B)100 倍放大圖(C)400 倍放大圖，HB 表宿主
 骨，M 表材料位置，NB 表新生骨，GGT 表未降解材料



(A)

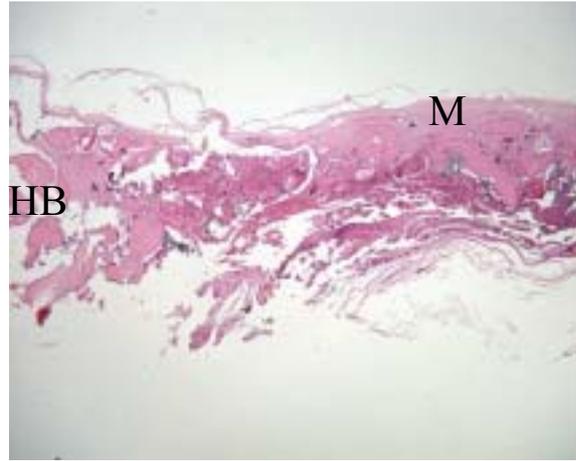


(B)

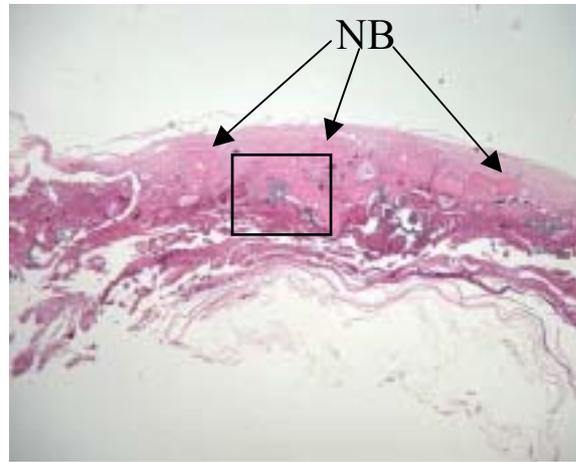


(C)

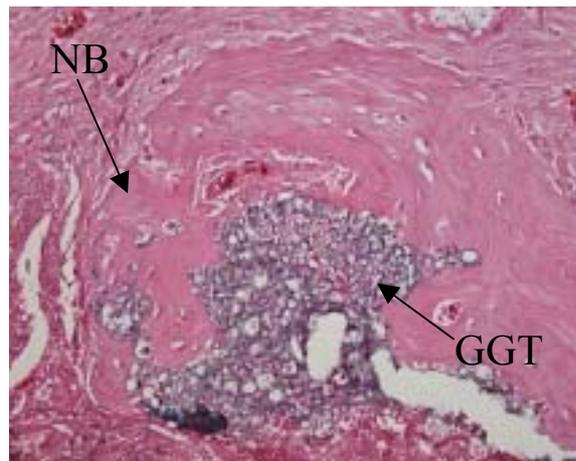
圖 4-33 植入間質幹細胞體外培養一週添加骨碎補多孔性 GGT 頭蓋骨組織切片，(A)40 倍放大圖，(B)100 倍放大圖，(C)400 倍放大圖，M 表材料位置，GGT 表未降解材料，BLT 表類骨組織



(A)



(B)



(C)

圖 4-34 植入間質幹細胞體外培養二週添加骨碎補多孔性 GGT 頭蓋骨組織切片，(A)(B)40 倍放大圖(C)400 倍，HB 表宿主骨，M 表材料位置，NB 表新生骨，GGT 表未降解材料

第五章 結論

本研究的主要目的為結合組織工程三要素：細胞(Cells)、訊號(Signals)、支架(Scaffold)以評估本研究室所研製之多孔性骨科材料(多孔性 GGT)，應用於硬骨組織工程的可行性，並探討中藥骨碎補於間質幹細胞於分化為骨母細胞的過程是否能扮演加速細胞增生及分化的角色。

首先在材料製備裡成功的採用氯化鈉顆粒作為孔洞填充劑，將本研究室之前所研製成功的 GGT 複合材料發展為多孔性的複合材料—多孔性 GGT，經量測孔隙率多孔性 GGT 及添加骨碎補多孔性 GGT 均達 80%，可提供較大的細胞生長空間；降解測試結果發現經浸泡 12 週，材料雖已部份降解，但結構完好，沒有崩解現象，由 SEM 觀察得知為俱備三度空間之多孔性結構，且孔洞大小均勻、孔洞間連通性良好，並經 EDS 元素分析證實，沒有氯及鈉殘留，氯化鈉已完全被水溶出。

在體外的生物適應性評估方面，將繼代間質幹細胞以不同培養液分別培養後，經鹼性磷酸酶染色法及 Von Kossa's 染色法結果發現，未添加分化劑培養的間質幹細胞未朝骨母細胞分化，不能表現鹼性磷酸酶特性及形成礦物質化結節，而以添加分化劑與添加分化劑及中藥骨碎補培養液培養的間質幹細胞，可表現鹼性磷酸酶特性及形成礦物質化結節，且添加骨碎補有更明顯之趨勢，MTT 色度分析法結果發現，添加分化劑與添加分化劑及中藥骨碎補培養液的細胞增生均優於未添加分化劑的間質幹細胞培養液，其中又以分化劑及中藥骨碎補同時加入增生最多，以上結果表示間質幹細胞在體外可經由分化劑的刺激朝骨母細胞分化，可作為骨組織的來源細胞，而中藥骨碎補可加速間質幹細胞增生及朝骨母細胞分化。

將繼代間質幹細胞植入多孔性 GGT 後置入 spinner flask 中分別培養 1、2、4 週後取出，以 SEM 及組織切片觀察，發現間質幹細胞能均勻密佈於各孔洞，細胞生長及貼附情形良好，且隨著培養時間增加，貼附情形更為緊密。由此可知多孔性 GGT 具有良好之生物適應性，可在體外

培養間質幹細胞或作為間質幹細胞的載體，以應用於組織工程。

在體內的生物適應性評估方面，將體外培養後的多孔性 GGT 植回自體兔體頭蓋骨，經八週後將兔子犧牲，以手術刀切開表皮作巨視觀察，發現植入部位骨組織無紅腫發炎及潰爛現象，實驗材料與周圍骨組織緊密接合，材料仍清晰可見；將頭蓋骨取出後，觀察腦組織外觀，沒有產生發炎、腫脹或萎縮的症狀，由此證明多孔性 GGT 複合材料不具生物毒性，生物適應性良好，而所植入的細胞為自體間質幹細胞，因此也沒有排斥的現象。

兔體頭蓋骨以 X-ray 照射後發現材料與周圍骨組織已完全融合在一起，且已有新生骨組織形成，使圓形的骨缺陷變為不規則形狀，表示植入材料已有部分溶解吸收並與宿主骨組織產生骨引導現象，經以影像軟體分析後發現植入間質幹細胞與添加骨碎補對新生骨組織修復有催化作用。

SEM 實際觀察材料於兔體內生長情形後，發現材料與宿主骨組織界面有骨母細胞聚集生長，表示材料具骨引導作用，在材料內部有血管生長可骨組織修復時擔任養分供給與廢物排除的工作，並發現材料內部有間質幹細胞及其所衍生細胞聚集生長，表示所植入的間質幹細胞可參與骨組織的修復。

頭蓋骨組織切片發現在宿主骨與材料界面間有新生骨組織生成，宿主骨與材料界面因被新生骨組織所取代，無法清楚辨識。植入間質幹細胞的材料可發現位於材料內部也有新生骨組織或類骨組織生成，因材料內部並未與宿主骨接觸，表示所生成的骨組織應為所植入的間質幹細胞所分化而成。另發現新生骨組織中間包覆著深藍色未降解的材料，新生骨組織與材料緊密貼附，邊緣成不規則形。由以上結果顯示，多孔性 GGT 複合材料生物適應性良好，具骨引導作用，在生物體內可被吸收降解為新生骨組織所取代，間質幹細胞可參與並加速骨組織的修復。

綜合以上結果顯示，本研究所研製的多孔性複合材料-多孔性

GGT，為一擁有良好生物適應性，具備骨引導與促進骨再生能力的生物可降解材料，可作為細胞及藥物之載體，應用於組織工程。間質幹細胞在體外可經由分化劑刺激朝骨母細胞分化，作為骨組織的來源細胞，以參與骨組織的修復；中藥骨碎補可促進間質幹細胞增生及朝骨母細胞分化。

隨著組織工程技術的成熟，在體外培養人工組織、人工器官應用於臨床，以加速病患復原及降低醫療成本將不再只是夢想。本研究雖成功的將間質幹細胞在體外進行培養，並植入支架中，但並未在體外培養出新生骨組織或類骨組織，這仍有待後續的研究予以突破，以使能應用於臨床的體外培養硬骨組織早日開發成功。

中草藥中對於骨組織修復有促進作用的藥物如何與現代科技結合，應用於組織工程，並探討其作用機轉，甚至對其單一有效成分進行研究，使藥物對症狀的作用更為直接有效，將古人智慧的結晶，更廣泛應用於臨床，則是另一有待開發的領域。

參考文獻

1. 黃玲惠、陳坤鴻、黃昭誠：組織工程發展現況與未來趨勢。台灣醫學 2001;5(6)：646-653
2. 李文婷：成體幹細胞的研究現況與未來發展。化工資訊 2002;7：57-64
3. Davies JE, Karp JM, Baksh D, Mesenchymal Cell Culture：Bone. In Method of Tissue Engineering, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo 2002; pp. 333-341
4. Krupnick AS, Shaaban A, Radu A, Flake AW, Tissue Engineering 2002;pp.145-160
5. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following crypreservation. J Cell Biochem 1997;64:278-294
6. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI: Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone 1992;13:69-80
7. 段崇智、李萬柱、愛德華.卡特森：以間質幹細胞為基礎的骨骼組織工程學。台灣醫學 2001;5(6)：662-668
8. 江鴻生、江清泉、黃義侑：以組織工程進行軟骨培養。台灣醫學 2001;5(6)：669-671
9. 李宣書：淺談組織工程。物理雙月刊 2001;24(3)：430-435
10. 鄭家昇：熔融層積成型系統製成精密支架之細胞植入、分化與生物反應器培養。中興大學化學工程研究所碩士論文，2003。
11. Palsson B, Hubbell JA, Plonsey R, Bronzino JD: Tissue engineering, CRC Press , New York 2003;pp. 23-11
12. Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. J Biomed Mater Res 2001；55：242-253
13. 劉百栓，以天然交聯劑綠梔子素交聯明膠結合三鈣磷酸鹽粉末之新

- 骨科替代材料的研製與評估。中興大學化學工程研究所，2004
14. Lin FH, Yao CH, Sun JS, Liu HC, Huang CW. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin. *Biomaterials* 1998;19:905-917.
 15. Liu HC, Yao CH, Sun JS, Lee CJ, Huang CW, Lin FH. Osteogenic evaluation of glutaraldehyde crosslinked gelatin composite with fetal rat calvarial culture model. *Artif Organs* 2001;25:644-654.
 16. Chen TM, Yao CH, Wang HJ, Chou GH, Lee TW, Lin FH. Evaluation of novel malleable, biodegradable osteoconductive composite in a rabbit cranial defect model. *Materials Chemistry and Physics* 1998;55:44-50.
 17. 鄭基杰：內含生藥之人造骨科材料對造骨細胞功能及骨組織形成的影響。中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文，2004。
 18. 李文森著：解剖生理學。華杏出版股份有限公司，台北 1997;pp.144-146
 19. 朱家瑜、潘俊良、林亮宇編譯，Alan Stevens、James Lowe 原著，組織學。藝軒出版社，1995，pp.233~271.
 20. Huether SE, McCance KL. *Understanding Pathophysiology*. Second edition, 2000.
 21. Frost HM. *Intermediary organization of the skeleton*. Boca Raton, FL: CRC Press 1986.
 22. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechano-transduction. *Biomaterials* 2001 ; 22, 2581-2593.
 23. Dempster DW. Bone remodeling. In: Coe FL, Favus MJ, eds. *Disorder of bone and mineral metabolism*. Raven Press, New York, 1992, p. 355-380.
 24. Parfitt AM. The physiological and clinical significance of bone histomorphometric data. In: Recker RR, ed. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. Boca Raton, FL: CRC, 1983, p. 143-223.
 25. 王世晞，陳德皓，徐志宏編譯，Junquerira 原著，基礎組織學，藝軒圖書出版社，第三版，1988.

26. Ratner BD, Hench L. Editorial overview: Perspectives on biomaterials. *Current Opinion in Solid States & Materials Science* 1999;4;379-380.
27. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop* 2000;10-27.
28. Gisep A. Research on ceramic bone substitutes: current status. *Injury* 2002;33:88-92.
29. Fujibayashi S, Kim HM, Neo M, Uchida M, Kokubo T, Nakamura T. Repair of segmental long bone defect in rabbit femur using bioactive titanium cylindrical mesh cage. *Biomaterials*, 2003 ; 24, 3445-3451.
30. Alam MI, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. *Biomaterials* , 2001 ; 22, 1643-1651.
31. Saito N, Takaoka T. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2003 ; 24, 2287-2293.
32. Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials*, 2001 ; 22, 1705-1711.
33. Ravaglioli A, Krajewski A. *Bioceramics Materials. Properties, Applications.* Chapman and Hall, 1992, pp. 1-5.
34. Albee FH, Morrison HF. Studies in bone growth triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann. Surg.*, 1920 ; 71, 32.
35. Nakamura T, Yamamuro T, Higashi S, Kokubo T, Ito S. A new glass-ceramic for bone replacement: evaluation of its bonding to bone tissue. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1985 ; 19, 685-698.
36. Lin FH, Hon MH, Wu SC. Fabrication and biocompatibility of a porous bioglass ceramic in a Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ system. *J. Biomed. Eng.* 1991 ; 13, 328-334.
37. Jacob K. *Handbook of biomedical engineering.* Acad. Press, Inc., 1988.

38. Shapiro J. In: Acrylic Cement in Orthopaedic Surgery. Personal Communication to J Charneley, E & S Livingstone, Edinburgh and London, 127.
39. Alici E, Alku OZ, Dost S. Prostheses designed for vertebral body replacement. J. Biomech., 1990 ; 23, 799-809.
40. Ishizawa H, Ogino M. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. J Biomed Mater Res 1995;29:65-72.
41. Ishizawa H, Ogino M. Characterization of thin hydroxyapatite layers formed on anodic titanium oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. J Biomed Mater Res 1995;29:1071-1079.
42. Takatsuka K, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T. Bone-bonding behavior of titanium alloy evaluated mechanically with detaching failure load. J Biomed Mater Res 1995;29:157-163.
43. Mittelmeier H, Katthagen BD. Clinical experience with the implantation of collagen-apatite for local bone regeneration. [German] Zeitschrift fur Orthop und Ihre Grenzgebiete 1983;121:115-123.
44. Chieerici G. Biological response to a lyophilised collagen gel implanted in parietal bone defects in a Rhesus monkey. Collagen Corporation Internal Publication, 1984, Report 3, pp. 116.
45. Williams DF. Biocompatibility of clinical implant materials. CRC Press, Inc., 1981 ; vol.1, pp. 199-222.
46. 蔡瑞芳：成人幹細胞之擴展(體外培養)及臨床應用。生物產業 2003;14(2)：92-100
47. Stewart MD: Stem cell handbook, Humana Press Inc., New Jersey 2004;pp. 1-11
48. Stewart MD: Stem cell handbook, Humana Press Inc., New Jersey 2004;pp. 107-117
49. 中國藥典委員會編：新編中國藥典中藥彩色圖集。旺文出版社，台北 1999；pp.330.

50. 宋·唐慎微：經史證類大觀本草。正言出版社，台北 1977；pp.313-314.
51. 中國藥典委員會編：新編中國藥典中藥彩色圖集。旺文出版社，台北 1999；pp.109
52. 清·吳其濬，植物名實圖考，世界書局，台北 1974，pp.255
53. 甘偉松，藥用植物學，國立中國醫藥研究所出版，台北 1997，pp.118
54. 宋·唐慎微編著，金·張存惠重刊，重修政和經史證類備用本草。南天書局，台北 1976，pp.274
55. 明·李時珍，本草綱目。文光書局，台北 1955，pp.800
56. 清·吳其濬，植物名實圖考。世界書局，台北 1974，pp.408-409
57. 清·吳其濬，植物名實圖考。世界書局，台北 1974，pp.440
58. 清·吳其濬，植物名實圖考。世界書局，台北 1974，pp.439
59. 清·吳其濬，植物名實圖考。世界書局，台北 1974，pp.432
60. 周富榮、張小茜，3 種骨碎補的品質評價研究。中國中藥雜誌 1994;19(5):pp.261-263
61. 李煥忠，四種骨碎補藥材檢識的研究。甘肅中醫 2001;14(3):pp.84-86
62. 周銅水、劉曉東、周榮漢，骨碎補對大鼠實驗性骨損傷癒合的影響。中草藥 1994;25(5):pp.249、250、258
63. Yaylaoglu MB, Korkusuz P, Ors U, Korkusuz F, Hasirci V. Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. *Biomaterials*, 1999;20,711-719.
64. 姚俊旭：交聯明膠與三鈣磷酸鹽骨科複合材料之製備與評估。中原大學化學所博士論文，1997。
65. Kosmala JD, Henthorn DB, Brannon-Peppas L. Preparation of interpenetrating networks of gelatin and dextran as degradable biomaterials. *Biomaterials*, 2000;21,2019-2023.
66. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 2001;22,763-768.
67. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*,

- 2002;23,4827-4832.
68. Touyama R, Takeda Y, Inoue K, Kawamura I, Yatsuzuka M, Ikumoto T, Shingu T, Yokoi T, Inouye H. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments. Chem. Pharm. Bull., 1994;42,668-673.
 69. 宋·唐慎微撰：經史證類大觀本草，國立中國醫藥研究所出版，台北 1984;13:pp.367-368
 70. 明·李時珍著：本草綱目。國立中國醫藥研究所出版，台北 1988;pp.1191.
 71. 林景彬編著：常用中藥藥理與應用。中國醫藥學院印行，台中 1985;pp.189-198
 72. 明·李時珍：本草綱目，國立中國醫藥研究所出版，台北 1988;pp.800-801.
 73. 林宗旦、林宗平、林景彬編著：中藥藥理學，華香園出版社，台北 1996;pp.474.
 74. 蔡宏銘：中藥對骨細胞活性的評估。中國醫藥學院中國醫學研究所碩士論文，2003。
 75. 周正鴻：明膠透明質酸軟骨素共聚物作為關節軟骨組織工程海綿狀支架，國立台灣大學醫學工程研究所碩士論文，2002。