



中國醫藥大學  
基礎醫學研究所  
碩士學位論文

探討膠原蛋白-奈米金複合基材誘導間葉幹細胞修  
復血管內皮組織之影響

**Novel collagen-gold nanocomposite for mesenchymal stem  
cells differentiation and ability of vascularization**

指導教授：洪慧珊 教授 Huey-Shan Hung Ph.D

研究生：朱美芸 Mei-Yun Chu

中華民國一百年七月

July 2011

## 致謝

時光飛逝，此兩年研究所生活使我接觸到與以往所學迥然不同之學習領域，但也造成研究過程中有著極大壓力。而就讀研究所為我長久以來之夢想，使我堅持研究努力學習，而此至今獲益良多；這些都歸功於師長的提攜，父母、家人、朋友的鼓勵支持，沒有你們的栽培，則無今日的我。

此本論文的完成，首先要感謝我的指導教授洪慧珊老師，引領我進入基礎醫學及生物科技的領域，並悉心指導，使我的研究生涯充實而廣闊。也感激口試委員湯正明老師、周志謂老師的論析與建議，使我重新檢視論文未臻祥進之處，令我獲益良多。因為您們的耐心教導，讓我在研究所學習過程中有所成長。

在研究及撰寫過程中，我遇到的許多挫折與瓶頸，但因為有李佩玲學姐的鼓勵及協助、林建勳同學的幫忙及討論，總能使我迷惘困惑時有勇氣突破困境。並感謝研究室中的學長姐、同學與學弟的幫忙及體諒讓我順利走過這兩年，完成學業。

最後要感謝我的父母朱華標、鍾秀桃，因為您們的呵護、支持與栽培，使我無後顧之憂的轉換跑道，順利完成學業及夢想；以及哥哥、姊姊與大嫂的關懷與鼓勵，使我一路幸福成長。僅將這份榮耀與我家人、親友一起分享，感謝你們一路陪伴，並至上我最深的感激。

學生 朱美芸 謹誌於  
中國醫藥大學 基礎醫學研究所  
中華民國一百年七月

## 中文摘要

膠原蛋白 (collagen-I, Col) 為細胞外基質 (Extracellular Matrix, ECM) 之組成蛋白，而奈米金 (gold nanoparticle, Au) 則為一種廣泛應用於生物醫學上之材料。因此，本實驗利用 Col (0.5 mg/ml) 及 Au ( $\approx 5$  nm, 43.5 ppm) 相互混合，形成新穎之奈米金複合基材：Col-Au。並探討基材影響臍帶間葉幹細胞 (umbilical cord-Mesenchymal Stem Cells, MSCs) 之生物行為，進而應用於治療心血管疾病。首先利用傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 檢驗出，當 Col 與 Au 混合後，以 NH group 相互作用合成複合基材。並以原子力學顯微鏡 (AFM) 觀測 Col 與 Col-Au 基材之表面特性。結果顯示 Col-Au (16.14 nm) 表面顆粒大於 Col (9.47 nm)，可增進 MSCs 貼附於基材上；此外，更證實若 Col 添加入 Au 後，基材具有較佳之生物相容性，其中包括：血小板貼附率減少、活性氧化物質 (ROS) 的下降、降低巨噬細胞之活化及增加細胞增生效應；並可誘導生化路徑中相關蛋白之表現，包括：Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)、serine threonine protein kinase (p-Akt)、focal adhesion kinase (FAK)/Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2)...等，促使細胞增殖、遷移與貼附行為。最後則以動物實驗證實，此種複合基材之效用。利用體外動態培養使 MSCs 貼附於 Col-Au 表面，並植入大鼠股動脈中存留一個月，觀察其生物相容性，且以免疫組織染色證實，Col-Au 具有良好之生物相容性，

且可誘導組織內皮化，修復受損之內皮細胞，因而減少血栓及血管壁過度增生，成功維持血管組織正常修復情形。此實驗證實 Col-Au 利於用在血管生物材料之塗佈，藉以提供臨床血管奈米組織工程治療策略研發之參考。

Key words: 第一型膠原蛋白、奈米金粒子、臍帶間葉幹細胞、血管奈米組織工程



## 英文摘要 (Abstract)

An extracellular matrix collagen I (Col) incorporated with small amount (43.5 ppm) of gold nanoparticle (approximately 5 nm) was prepared in this study. This project was concerned about the interaction between mesenchymal stem cells (MSCs) and nanocomposites for cardiovascular diseases therapeutic application. The AFM surface morphology of collagen I (Col), collagen-Au (Col-Au) was showed that the average domain size of Col was 9.47 nm and the Col-Au was 16.14 nm. It can be observed the chemical composition of Col-Au had exhibited more HN group cross-link on original Col by using the FTIR analysis. Furthermore, the biocompatibility effect (proliferation, monocyte activation, free radical scavenging ability) of materials was also observed. The Col-Au enhanced MSCs proliferation and promoted better biocompatibility compared with the original Col. It was agreed on the surface morphology accounted for the general improvement of all performance. In addition, the higher levels of eNOS/p-Akt proteins and focal adhesion kinase (FAK)/MMP-2 proteins also induced by Col-Au. It was suggested that the Col-Au can be related through the activation of this signaling pathway promote MSCs proliferation and migration. We expected that Col-Au can be offer as novel biomaterials for neovascularization.

Key words : collagen typr I, gold nanoparticle, umbilical cord mesenchymal  
stem cells, nano vascular tissue engineering



# 總目錄

致謝 .....	I
中文摘要 .....	II
英文摘要 (Abstract).....	IV
總目錄 .....	VI
圖目錄 .....	VIII
英文縮寫表 .....	X
第一章 前言 .....	1
第一節 緒論 .....	1
第二節 研究背景 .....	2
一、心血管疾病簡介 .....	2
二、奈米再生醫學 .....	6
三、血管奈米醫學 .....	16
第三節 研究動機及目的 .....	21
第二章 研究方法 .....	22
第一節 實驗材料 .....	22
第二節 實驗方法 .....	28
一、製備及分析奈米基材 .....	28
二、生物相容性試驗 .....	30
三、細胞生化表現路徑及蛋白質的表現 .....	35
四、動物實驗 .....	41
第三節 研究設計與大綱 .....	44
第四節 統計方法 .....	46
第三章 研究結果 .....	47
一、奈米基材特性分析 .....	47
二、臍帶間葉幹細胞之特性鑑定分析 .....	48
三、膠原蛋白-奈米金基材 (Col-Au) 之生物相容性測試 .....	48
四、細胞生化表現路徑及蛋白質的表現 .....	51

五、VEGF 與 SDF-1 之上下游關係之釐清.....	54
六、動物實驗.....	56
第四章 討論.....	59
第五章 結論.....	65
參考文獻.....	67
圖表.....	79





## 圖目錄

<b>Figure 1.</b> AFM images of surface topography.....	79
<b>Figure 2.</b> UV-Vis spectrophotometer .....	80
<b>Figure 3.</b> ATR-FTIR spectra of nanocomposites. ....	81
<b>Figure 4.</b> Characterization of MSCs .....	82
<b>Figure 5.</b> Test the concentration of gold nanocomposite .....	83
<b>Figure 6.</b> MTT assay .....	84
<b>Figure 7.</b> Platelet activation test.....	85
<b>Figure 8.</b> Human monocytes adhered and activated.....	86
<b>Figure 9.</b> Cell morphology and adhesion ability .....	87
<b>Figure 10.</b> Reactive oxygen species (ROS).....	88
<b>Figure 11.</b> Western blot of p-Akt and p-eNOS proteins.....	90
<b>Figure 12.</b> Western blot of p-FAK, p-Cdc42 and p-RhoA proteins .....	92
<b>Figure 13.</b> Gelatin Zymography analysis .....	93
<b>Figure 14.</b> Immunofluorescent of eNOS. ....	94
<b>Figure 15.</b> $\alpha 5\beta 3$ and CXCR4 expression of MSCs .....	95
<b>Figure 16.</b> Concentration of transfected siRNA .....	96
<b>Figure 17.</b> SDF-1 stimulated migration of MSCs on Col-Au through $\alpha 5\beta 3$ and CXCR4. ....	98
<b>Figure 18.</b> The expressions of eNOS, p-RhoA, p-Akt, p-FAK and p-Cdc42 proteins .....	100
<b>Figure 19.</b> The MMP-2 enzymatic activity of MSCs culture on the Col and Col-Au .....	101
<b>Figure 20.</b> Cell migration.....	103
<b>Figure 21.</b> The expressions of eNOS proteins.....	104
<b>Figure 22.</b> Preparation of vascular graft .....	105
<b>Figure 23.</b> Transplantation nanocomposites of vascular graft in vivo .....	106

**Figure 24.** Immunostained of human CD31 ..... 108  
**Figure 25.** Hematoxylin-eosin (H&E) staining ..... 109  
**Figure 26.** Masson trichrome staining ..... 110



## 英文縮寫表

Col : Collagen

Col-Au : Collagen-gold nanocomposite

MSCs : Umbilical cord-Mesenchymal stem cells

EPCs : endothelial progenitor cells

VEGF : vascular endothelial growth factor

SDF-1 : stromal cell derived factor-1

FAK : focal adhesion kinase

MMP : matrix metalloproteinase

ECs : endothelial cells

BM : bone marrow

ECM : extracellular matrix

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

TCPS : tissue culture plates

FN : fibronectin

AFM : atomic force microscope

FTIR : fourier transform infrared spectrometer

SEM : scanning electron microscope

NO : nitric oxide

# 第一章 前言

## 第一節 緒論

心血管疾病於西方國家之死亡率始終高居第一位；2004 年世界衛生組織報告中亦指出全球十大死因中，心血管疾病排名第一，且估計一年約有 1710 萬人因此而死亡，占全球死因的 29% [1]。在我國歷年疾病統計中「心臟病及腦血管疾病」一直盤踞於十大死因之中，並有逐年上升之傾向，由此可知此疾病對於國人及全球之衝擊性甚大；這是因為全身的器官皆需要適當的血液供應才得以運作，當心血管系統發生病變時，動脈充氧血供應受損，因而使組織或細胞功能嚴重損傷，形成身體機能缺損及壞死；此時若未及時給予妥善醫療處置，將會嚴重影響心血管病患之身心健康。而現今對於血管阻塞之介入性治療方法多為氣球擴張術合併放置血管支架，但因傳統支架會使內皮細胞過度增生，影響血管內皮修復造成再次阻塞之情形產生。因此本研究利用現今已證實具有高生物相容性之兩種物質：分別為膠原蛋白與奈米金微粒，製成奈米生醫材料，並合併幹細胞療法，藉以改質血管支架表面，期望可促進血管內皮修復維持血流通暢，達到最佳的生物相容性。以提供現今臨床改良支架之參考，藉此提升治療方式及醫療品質，為心血管病患帶來曙光，促進病患之身心健康。

## 第二節 研究背景

### 一、 心血管疾病簡介

#### 1. 血管系統

心血管系統又稱為循環系統主要供應身體各部位的養分及氧氣，其最主要的功能為運送養分至身體各個部位，並移去細胞代謝所產生的廢物，也做為運輸激素的通道。在構造上心臟為提供循環系統的主要動力來源，心臟的搏動將含有養分及氧氣的血液輸入動脈，流經提供物質擴散與交換的微血管，最後靜脈將缺氧血輸送回心臟 [2]。而不論大口徑或小口徑的動脈或靜脈，血管管壁大致可分為三層構造：

- (1) 內膜 (tunica intima) 為血管壁最內層，以血管內皮細胞 (endothelial lining) 襯著血管的內面，這些細胞位於基底膜上，而在內皮細胞之下是內皮層 (subendothelial layer)，在此為疏鬆結締組織，平滑肌細胞和結締組織的纖維皆為縱向排列。
- (2) 中膜 (tunica media) 為中間層，主要由平滑肌細胞所組成，周圍有膠原纖維、彈性纖維和醣蛋白所包圍，這些都是由平滑肌細胞所分泌的物質。膠原纖維為主要提供平滑肌細胞支持性的架構，並限制血管壁擴張的能力，因此靜脈較動脈含有較多量的膠原纖維。
- (3) 外膜 (tunica externa) 此層主要由縱向的膠原纖維與彈性纖維組成。這些結締組織內有神經、小血管和淋巴管，此外膜層逐漸與其供應器官的外層結締組織相接近。

## 2. 血管阻塞性疾病

心臟血管疾病是全球最嚴重的健康問題之一而其中最為普遍的則是血管阻塞性疾病，其可分為兩大類，一為冠狀動脈疾病，冠狀動脈是環繞在心臟上的血管，提供心臟所需的氧氣及營養，當冠狀動脈血管狹窄、硬化或阻塞時，會導致心臟的血液供應不足而引起心臟缺氧及心肌梗塞，因而稱為冠狀動脈心臟疾病。第二大類則周邊血管疾病，常見致病原因主要有：動脈硬化、血栓、栓塞、血管受傷、發炎而造成血管阻塞等情形。疾病初期會造成疼痛、和肢體潰瘍而形成間歇性跛行影響病患生活作息，嚴重至末期血管完全阻塞時對病人及家屬來說會是一個重大負擔，因組織無法順利獲取養分導致潰瘍日益嚴重，最後甚至會演變成截肢的結果。

血管阻塞疾病是一種多重因素引發之疾病，隨年齡而增加。主要是因為局部血管內膜，堆積脂質、複雜糖分子、血塊、纖維組織及鈣化物，使血管內膜產生病理變化，造成血管狹窄及硬化 [8]，隨著國人經濟的進步與生活習慣的改變，管狀動脈粥狀硬化引起的相關疾病也開始成為國人常見疾病的一種。治療方式包括生活及飲食的積極改變、藥物治療、冠狀動脈繞道手術以及目前發展迅速的經皮冠狀動脈介入性治療 [9]。因本研究期望可改善現今侵入性治療中血管支架之不足，故以下將著重於介紹現今血管支架之治療方式及成效。

### 3. 動脈粥狀硬化病理過程

動脈粥狀硬化是現今社會常見的疾病之一，因社會型態的改變，此疾病不再是老年人的專利，其發病的年齡層也逐漸下降之中，而至目前為止造成血管阻塞病變的致病因素仍有許多假說存在，其內容通常會與血管內皮功能障礙、發炎、膽固醇的積累，細胞凋亡，細胞外基質的降解和氧化應刺激都有相關 [3,6]，目前最多證據支持的假說為 Ross 及 Glomset 等人所提出的『損傷反應假說』 (response to injury hypothesis)，而所謂的『損傷』主要是指『內皮細胞損傷』 (endothelial injury) 或『內皮細胞功能異常』 (endothelial dysfunction)。內皮功能受損的因素有很多種，如：機械性傷害，像執行經皮穿腔冠狀動脈血管成形術；血流動力學異常，如高血；免疫複合體 (immune complex) 沉積；病毒感染；及化學傷害，如抽煙之尼古丁刺激、糖尿病之高血糖刺激、高脂血、自由基、及氧化低密度脂蛋白膽固醇 (oxidized low density lipoprotein cholesterol (oxLDL cholesterol)... 等 [4,6]。動脈粥狀硬化的發展過程中包括：(1) 內皮損傷，(2) 膽固醇的堆積、單核球浸潤和泡沫細胞形成，(3) 平滑肌細胞與細胞遷移和增殖，(4) 血栓形成二次組織，(5) 鈣化和/或斑塊破裂，(6) 斑塊破裂/血栓的形成最後血管閉塞 [5]。

血管內皮細胞損傷時會產生發炎反應，當發炎反應持續進行時則改變了正常穩定型態的內皮組織，造成血管內皮功能障礙，身體為了代償此病理狀態故增加血管壁通透性，造成血液中的單核球從內皮細胞間隙

擠入內膜；而內皮細胞因發炎所分泌的化學激素會促使單核球增生及活化巨噬細胞，並將低密度脂蛋白 (Low-density lipoprotein, LDL) 顆粒吞噬，形成塞滿脂肪的巨噬細胞，也就是所謂的泡沫細胞，接著泡沫細胞堆積於血管內皮之中形成脂肪斑 (fatty streak)，此為第二階段膽固醇的堆積、單核球浸潤和泡沫細胞形成。此外發炎也會誘導內皮組織活化血管活性分子、細胞因子和生長因子的分泌使得抗凝血作用轉變為凝血反應，刺激平滑肌細胞往病灶區遷移和增殖，造成平滑肌細胞因增殖及遷移所以不斷的積累於血管內皮上，形成纖維質外膜，又稱為動脈硬化斑塊，造成血管內壁纖維突起。進而造成動脈粥狀硬化的產生 [5,6,7]。冠狀動脈病變中平滑肌明顯由收縮型態轉變為和成形態，這些細胞會刺激細胞大量增生、合成並分泌很多細胞外間質蛋白，造成血管內膜再度增生、斑塊硬化、血管內皮擴張，並吸引單核球進入內膜形成巨噬細胞、泡沫細胞，最後導致血管內皮重組產生血管壁細胞增生，造成再狹窄的發生 [6]。

#### 4. 血管阻塞介入性治療---血管支架

1969 Dotter 首度利用血管支架將狹窄血管維持再通暢來治療血管阻塞，在 1977 年瑞士的 Andreas Gruentzig 醫師更發展出將心導管前端附上氣球，藉擴張的力量來打通血管的方法，此技術稱為經皮導管冠狀動脈氣球擴張術 (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty, PTCA)



及血管支架的技術至今已發展近 40 年之久 [10]。最早血管支架只能使用於治療冠狀動脈此種大血管，而今因支架的材質及技術的進步，已可使用在治療周邊血管阻塞疾病如：腸股動脈及膝髖動脈，其主要是提供類似鷹架般維持血管通暢性 [11]，在臨床中許多病患在放入血管之架後，仍會有血管再次阻塞的現象，而其原因是因為血液相容性不佳，導至血栓沉積及之架殖入時對血管壁造成傷害，而引發也管內皮細胞過度增生 [12]，其病生理機轉與動脈硬化生成相似之處很多。而引起如同上述之發炎反應，使血管組塞的情形再次發生。所以自 2003 年起，科學家更利用現代生物科技的技術將可抑制血管內皮細胞或平滑肌細胞過度增生的一些藥物如：抗發炎藥物、金屬蛋白酶抑制劑及抑制腫瘤新生的藥物塗佈於支架表面，藉以抑制血管內徑得再狹窄稱之為藥物支架，然而在藥物抑制內皮組織病變而變肥後造成再次阻塞的同時，也抑制、延緩了血管內膜的修復，因此造成置入後併發之架血栓。所以如何改良現行支架一直是介入性治療關注的問題 [13]，而如何降低術後再狹窄率亦為當前心血管疾病的研究重點。

## 二、奈米再生醫學

### 1.組織工程簡介

組織工程 (Tissue engineering) 的定義為依循著或模仿著自然界的

法則，應用跨領域的生命科學，及應用工程知識原理與方法發展生物性替代物，其最主要的目的是將因受傷或疾病所造成的組織功能喪失部位與以更換，通常會利用兩種組織工程方法已達到其目標。一為在體外將細胞培養於生物支架上，待形成新的器官後一植入體內；第二種方法為在受損組織位置植入高分子物質協助其原本組織細胞修復重塑 [12]。然而，以往傳統生物材料表面接以微米或更大尺寸為基礎 [15,16]，但事實上天然組織的表面特徵皆為奈米尺寸 [15]。故許多專家、學者認為，若將傳統的生物材料改良形成奈米尺寸之表面則可促進不同細胞類型的功能 [15,17,18]；因此近年來奈米技術使組織工程的進步，證實了若生物基材表面採用新型奈米材質的特徵，可增加組織的再生。更有許多研究報告指出，奈米技術可加快各種再生療法，如：骨、血管、皮膚、心臟、軟骨及膀胱組織 [15,16,62,63,64,65]。

重要的是，組織工程在結合奈米技術的同時須考量生物相容性之問題，將三種元素（細胞、細胞外基質、訊號系統）結合，架構出生物替代組織或器官，用已恢復、維持或增進組織功能 [12]，成為以仿生為目標之組織再生醫學。

## 2. 奈米金的特性與應用

早在西元 1681 年 Francisci Antonii 醫學博士於著作中提及金可以用於治療疾病如：心臟病、痢疾、癩癩與梅毒。隨著時代的改變奈米金已

廣泛的用於許多專業的研究領域之中。此外在日本金也當作一種養生食品，天加在茶、酒及各種食材中 [21]；更有研究指出金具有極佳的生物相容性，在醫學常製成假牙、骨組織修復、藥物傳輸的載體以及分子影像的工具，因此奈米金現今已成為生物醫學主要研究方向 [16,65,66]。

由於奈米金生物相容性佳以及易於與其他生物分子共軛接合奈米金易於和蛋白質相結合，常是透過三種鍵結的力量，包括靜電力 (electrostatic factor)、疏水鍵 (hydrophobic) 與共價鍵 (covalent)；通常蛋白質表面的胺基酸，如離胺酸 (Lysine) 或精胺酸 (arginine) 若是處於低 PH 質的環境下則會帶有很強的正電荷。而疏水鍵結則主要來自蛋白質上的非極性胺基酸，如色胺酸 (tryptophan)、纈胺酸 (valine)、白胺酸 (leucine)、異白胺酸 (isoleucine) 和脯胺酸 (proline) 等。蛋白質與奈米金的距離夠近時 (大約是 1 nm)，這些處於蛋白質表面的胺基酸容易與疏水性的金產生作用力，而硫-金鍵結能力為最強，若是蛋白質上有甲硫胺酸 (methionine) 或是半胱胺酸 (cysteine) 就會與金形成共價鍵結而造就此二物質的強烈結合 [14]。所以奈米金於各種生物醫學應用中一直是廣泛被提出討論和研究的一種奈米材料 [19,20]；Hung et al, Hsu et al, Tang et al ... 等研究皆提出，如以奈米金混合高分子材料後運用於材料性質檢測、生物相容性的檢驗、抗菌試驗、細胞培養後行為表現、探討細胞生長於奈米金基材上之生物化學路徑甚至於運用於體內動物實驗，結果都顯示奈米金具有相當大的潛能且不管於體內或體外的研究上都有

相當良好的反應 [47,50,51,61]。因此有鑑於先前的研究發現奈米金之多種優點，故將「奈米金」做為本研究之主要核心材料。

奈米金有許多別於其他金屬所不同的特性，包括表面電漿帶 (surface plasma band) 以及表面易與蛋白質結合等。因為此兩種特性所以奈米金常被科學家用在生物技術及醫學上。近年來對於仿生材料而言，於設計上有所新的改變，認為當材料表面為奈米尺寸時，組織、細胞與奈米物質之間會產生重要訊號。且尺寸不同時細胞反應亦會有所不同；因而影響細胞的貼附、增生、遷移、分化、細胞凋亡、及細胞骨架的構型改變 [22]。並會影響細胞訊息分子的傳遞，因此奈米尺寸被認為在未來之中具有強大功能的工具，可增強細胞與生物基材之間訊息傳遞並誘導細胞功能 [23]，故奈米科技亦被應用於細胞培養上且和組織工程結合。希望能達到組織再生之目的。先前研究發現奈米金與血管再生醫學，若將奈米金微粒（濃度範圍為 17.4 ppm to 174 ppm）加入聚胺酯 (polyurethane-PU) 之中會造成材料之表面形態改變。且將細胞培養於各不同濃度之 PU-Au 之上，測量細胞貼附、增生、遷移的能力胞生物反應，觀察到其最佳濃度為 43.5 ppm，可增加細胞生物活性及減少巨噬細胞的貼附 [24,25]，因此間接反應出奈米金或許具有某部分之抗發炎效果。因此奈米金微粒可能是一種應用於血管再生醫學中很好的生醫材料。

### 3.血管組織工程

### 3.1.血液幹細胞

在生物體中，是由細胞組織而成的，細胞是生物體的基本單位，而後才能組成各種組織跟器官，來彼此分工各司其職，成為一個個體。足夠的細胞數與功能正常的細胞品質是組織工程成功的要件，一般而言細胞的來源包括：體細胞與幹細胞。但以往許多實驗都證實將體細胞植入人體仍有一些難題尚待解決（例如：老年人或是某些種類的細胞在體外增殖能力太差，以及體外培養環境是否能讓細胞維持正常功能...等），因為這些難題造成了使用自體成熟體細胞於組織工程（Tissue Engineering）或細胞治療（cell therapy）應用的限制 [14,26]，故近年多數組織工程研究漸漸偏向幹細胞療法，幹細胞自我新生（self renew）能力之特性為組織工程的細胞來源開啟了另一種研究方向。

血管組織工程中內皮細胞扮演著重要的角色，對於血管形成，血管平衡，滲透性、調節炎症與預防動脈粥狀硬化中都關乎於內皮功能的作用 [27]，因此，在血管組織工程的研究中，將已受損或死亡的內皮細胞修復是至關重要的。在以往許多血管組織工程的研究中發現將成熟的內皮細胞植入血管之中後，可促改善血液貫流、及細胞的生長，但成熟的內皮細胞增殖能力有限，因此而限制了組織修復的效果 [28,29]。現今不論是成人幹細胞或胚胎幹細胞的應用研究，都已經成為組織工程與細胞治療非常重要的一環 [12]。

內皮前驅細胞（Endothelial Progenitor Cell：EPCs）存在於成人骨髓

中的造血幹細胞，是未成熟的細胞能夠分化為成熟內皮細胞 [30,31]，而這些細胞能夠有助於維護完整的內皮細胞層 [30]，當血管內皮受損時便會移往組織，並且誘導細胞因子或生長因子信號從外圍進入血管外組織，並且利用細胞膜上的 integrating 促進訊號進入細胞之中使生長因子的分泌增加，從而修復受損的內皮細胞層，但有研究指出 EPCs 的來源為骨髓中的造血幹細胞，平常可以由血液單核球的模式存在於血循之中，但其量極少（約占 <0.05% 之白血球），且對於 EPCs 確切的來源及如何演變其實至目前為止仍有爭議，主要在於並非所有的造血幹細胞均可變化成為 EPCs，事實上只極有少數的骨髓造血幹細胞及單核球具有分化成為真正的血管內皮細胞或類似血管內皮細胞的能力 [31]，若使用此細胞治療血管疾病仍會有所限制及障礙，因此在往後的研究發展方向漸趨偏向以幹細胞治療為主。

間葉幹細胞 (MSCs) 具有自我更新，多重分化潛能 [32]，其胞膜上之標誌 (CD maker) CD105；CD73；CD166；CD90 和 CD44 皆會呈現陽性反應。MSCs 可以從不同的組織之中分離出來，並且於適當的培養環境下可誘導分化成不同的細胞類型，例如：骨細胞、內皮細胞、脂肪細胞 [28,32,33]。骨髓為 MSCs 最主要的來源，且其可分化成類內皮的細胞 (endothelial-like cells) [28,34]，但取得骨髓之間葉幹細胞 (Bone marrow Mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 須以高侵入性治療之方式由捐贈者之骨髓中取出，且隨著捐贈者之年齡增長，細胞分化及增生能力隨之下

降之缺點。而由臍帶組織所分離出之臍帶間葉幹細胞 (Umbilical cord Mesenchymal stem cells, UC-MSCs)，因取得容易，且捐贈者不需經過骨髓抽取之侵入性治療過程，且不表現組織相容性複合體 II 類 (major histocompatibility complex, MHC-II) 及 human leukocyte antigen (HLA-DR) 抗原，植入體內不會有免疫排斥之反應，表示 UC-MSCs 是一個有利用於移植的細胞來源 [28]。

### 3.2 細胞外基質

身體各部位能正常運作仰賴細胞的運行，細胞執行的功能包括產生能源，運輸氧氣及製作蛋白質，此時 ECM 提供了支架，來容納細胞本身和他們支援的血液和淋巴管網絡 [34]。而在細胞的外部空間充斥著由細胞分泌的蛋白質，這些蛋白質聚集形成網狀結構則形成 ECM [12]，並與鄰近的細胞群聚成不可分的連結系統，ECM 是一個不溶性的高分子聚合物，在不同的器官中結構會稍有不同，但大致上是由幾個類型的分子所組織而成纖維連接蛋白 (fibronectin)、彈性蛋白 (elastin)、連粘蛋白 (laminin)，以及膠原蛋白 (collagens) [15,22]。許多證據顯示細胞可藉由表面的接受器與 ECM 產生鍵結以進行某些行為及功能之調控。例如：細胞的遷移 (migration)、增生 (proliferation) 及分化 (differentiation)，且 ECM 亦提供儲存的場所，儲存著各種生長因子及細胞激素進而活化細胞間與細胞內的訊息傳遞 [12,15]。

因此，近年來在組織工程生物材料的努力發展已納入集中在 ECM 的

胜肽或蛋白質為生物材料，以模仿天然細胞外基質，其最終的目標是設計一種仿生的生物材料可以永久所被人體使用不需更換，使細胞能於材料上執行正常生理功能，故現今許多組織材料皆以 ECM 的特性來進行材料表面改質，須分別考慮（1）物理性質（細胞環境的彈性，硬度，韌性），（2）特定的化學訊號細胞外基質表面的胜肽抗，以及（3）奈米微環境的表面形態 [22]。

### 3.2.1 膠原蛋白 (collagen)

膠原蛋白是一種廣泛被研究的細胞外基質，因為它是脊椎動物主要的結構蛋白，且生物相容性佳具有生物可分解性 [36,37,38]，其分子結構是以三條多胜肽鏈所組成之三股螺旋結構，並由二十種胺基酸以不同排列聚合成一條胜肽 [12]，因其多胜肽鏈上每三個胺基酸便有一個 glycine，而 proline 及 hydroxyproline 的環狀結構與氫能上三股螺旋穩定，若是遇熱或是化學物質破壞會使這些建結分子結構的螺旋打開，則稱為「變性」，當膠原蛋白處於 pH~7.4 時，且溫度接近生理條件 37°C，膠原蛋白便會重組成膠，此時亦可於其組成中進行各種修飾作用 [38]，應用於生醫材料之中。膠原蛋白可經重組活化處理形成多種型態：薄膜 (membrane)、管狀 (tubular)、海綿狀 (sponge)、多孔狀 (porous)、粉末 (powder)、柔軟的纖維狀 (fibrillar) 及注射劑 (injectables)，目前廣泛應用在止血材料、神經重建、組織整形、燒燙傷敷料、藥物釋放、眼科、修補心瓣膜、血管壁手術材料...等 [12,39]。



膠原蛋白醫學上的應用很廣，在醫學上仍以使用 type I collagen 為主，是一種普遍存在於動物組織中的構造型蛋白，存在於脊椎動物之皮膚、韌帶、血管、骨骼及各器官的結締組織。因為第一型膠原蛋白是組成血管細胞外基質的主要蛋白質，由功能上看來膠原纖維伸張能力大可以抵抗血流沖刷的壓力保護血管壁避免血管受損 [40,41]，所以目前已有許多文獻將 collagen 運用於血管再生醫學的研究 [24,25,47,50]，且膠原蛋白具有低抗原性，低炎症和低的細胞毒性反應低，同時也具有良好之生物降解性，由此可知 collagen 確實為一種理想的人工血管材料 [40,42]。此外更有研究都指出不論在體內 (in vivo) 或體外 (in vitro) 實驗中發現 type I collagen 具有很強可刺激血管新生的功能，這可能與血管內皮細胞上之整合素接受體 (integrin receptors) 有相關 [43,41]。綜觀以往的血管支架材料研究中，已有許多學者利用不同的方法將膠原蛋白運用於血管支架組成上。例如：1986 年，溫伯格和貝爾等學者發現膠原蛋白具有良好的血管重建效果 [44]。近來更有研究證實 collagen 添加入其他高分子如：Poly-Glutamic Acid (PGA) and poly ( lactic-co-glycolic acid)( PLGA)，強化血管支架之機械性質 [40]。因此，這些相關研究可知膠原蛋白在血管修復，及改質血管支架發展方確實具有重要性，而且 collagen 亦為組織再生支架的一個合適的高分子生醫材料 [40]。

### 3.2.2. 整合蛋白 (Integrins)

Integrins 是最早被確認細胞於 ECM 上貼附的接受器，是唯一連接細

胞外基質與細胞骨架之跨膜的蛋白分子複合物，整合蛋白是由  $\alpha$ -subunit 及  $\beta$ -subunit 所組成之異雙偶體 (heterodimer)，其與細胞外基質或其他細胞表面受體結合，而其中於 collagens 已發現  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ...等，進而造成細胞與細胞間、細胞與 ECM 間的吸附作用 [22]。

在各種 ECM 分子中皆具有特定之胺基酸序列，能和細胞表面接受器做直接且做專一性的結合，其中已被定義出能與整合蛋白作用的結合位是一特殊的胺基酸序列：精胺酸-甘胺酸-天冬胺酸 (Arg-Gly-Asp, RGD)，此種序列於許多細胞外基質分子中都有被發現，包括纖維連結蛋白 (fibronectin, FN)、膠原蛋白及血清層連蛋白 (laminin)...等 [22]。而亦有文獻指出此種特定之蛋白與血管新生有相關，且其與細胞膜上之  $\alpha v\beta 3$  會造成特異性結合之能力，因此當所製成之生物材料中有此二種接受體及蛋白時，可能可以間接影響細胞中訊息傳遞，造成細胞分化增生形成血管修復及新生之效果。細胞和 ECM 的相互作用直接參與控制細胞分化，形態發生，增殖和遷移，而許多 ECM 則與細胞膜上整合素相互作用參與細胞生化機轉，並且許多外來的訊息會與細胞膜上的整合素作用進而調控細胞，而整合素與細胞中的 focal adhesion plaque (一種複合性的骨架蛋白及訊息分子包括 paxillin, talin, vinculin,  $\alpha$ -actinin and focal adhesion kinase (FAK) 相結合 [59]，進而影響 GTPase RhoA pathway，而已有研究證實  $\alpha 5\beta 3$  integrins 與血管內皮細胞增殖與遷移及血管新生

有相關 [58]。

### 三、血管奈米醫學

現今使用於臨床中以化學合成使用於血管支架的高分子材料大致可分為三種類型，一為非生物降解的 Teflon、Dacron、polyethylene (PE)、silicon、polytetrafluoroethylene (ePTFE) 和 polyurethane (PU)，此種材料雖機械性質佳但只能使用於大口徑 (>4 mm)、高流速的血管區域之血管移植替代物，用於小口徑的血管時，容易與血管接合處產生物質堆積和內膜過度增生的情形，引起血管再次產生狹窄及阻塞 [45]。而第二種為分解性材料如：poly- L-lactic acid (PLLA)、poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) 雖然在移植後會於體內降解，但過程中所產生之產物會釋放酸性物質，造成周圍組織局部過酸的現象產生，進而引發慢性發炎反應 [12]，形成類似粥狀動脈硬化之病理變化，因而造成再次血管栓塞。第三種則是天然高分子材料包括膠原蛋白、動物性明膠 (Gelatin)、纖維蛋白、基丁質 (chitin) 等具有較高的生物相容性不易引起發炎反應，但機械性質仍顯不足，在體內降解時間較快，而無法有效維持主要架構直至自體細胞修補恢復完全 [45]。由此可知目前為止市面上所合成的血管材，仍無法長期且正常在體內運作及有效發揮功能，且容易造成血栓導至治療成果失敗。因此，如何研發一種成功的血管組織工程材料需要考量相關重要影響因素：一為必須能達到可覆蓋住以往舊的血栓保持血

管通暢並能阻抗新血栓之形成，第二是具有生物功能性及相容性，能阻抗血流衝擊以及管腔內膜增厚所造成的狹窄並能抗發炎、促進血管修復 [46,47]。

## 1. 奈米基材與血管組織

材料的奈米結構可以修飾天然血管組織的細胞外基質，進而提高細胞附著力；已有文獻指出，材料表面為奈米尺寸者可顯著改善血管內皮細胞的增殖 [47]，由此可知若考量此種特點則可能發展成為較成功之血管組織工程策略。目前使用奈米基材對於細胞以及血管修復之相關生醫材料有：水膠 (hydrogels) 是最常用於觀察血管 (tube formation) 形成的物質，其上含有一些生長因子以及細胞外基質胜肽，置於生物基材上後可增加其功效，提供細胞分化及組織修復 [48]，也有研究指出若將奈米纖維材表面含有胜肽物質 (例如：Arginine-glycine-aspartic, RGD)，也會增加細胞貼附表現。更有許多高分子所製成之奈米生醫基材作用在內皮細胞方面，Hung et al. 2001, 指出當使用一些高分子奈米基材時亦可增加內皮細胞的貼附、增生、生物相容性甚至是血管化的情形。

**Table 1:** Summary of key materials of vascular tissue engineering

Materials	Effect	Cell type
1. Poly(dimethylsiloxane)(PDMS)	↑ cell elongation	ECs
2. Poly(caprolactone) nanofiber	↑ modulation adhesion	ECs

3. Nano-bionic surface modification	↑ blood compatibility	ECs
4. Poly(L-lactic acid)-co-poly(epsilon-caprolactone) nanofibers	↑ viability, attachment and preserve phenotype	ECs, SMC
5. Poly(methyl methacrylate (PMMA) and PDMS nanopatter grating	↑ cell-surface interaction	ECs
6. Poly-L-lactic acid (PLLA)nanofibers	↑ cell guided aligned and proliferation	OEC
7. POSS modified polycarbonate urea-urethane (PCU)	↑ endothelialization	ECs
8. PCU-based nanocomposites polymer incorporating POSS nanoages	↑ anti-thrombogenicity, and biostbility	ECs

ECs: Endothelial cells; SMC: Smooth muscle cells; OEC: Outgrowth endothelial cell

Reprint was permitted by Hung et al. 2011

## 2. 細胞分子訊息與血管奈米組織

由過去血管組織工程的研究中發現，「奈米」已漸漸成為現今主要之研究趨勢，在許多生醫材料中現今多為參考細胞外基質之模式，仿細胞外基質之特性，希望藉基質的分子訊息與細胞相互反應，進而以奈米基材表面特徵及分子訊息去影響細胞功能，以加強細胞各種生物功能。但奈米生物材料影響細胞內部訊息之機轉仍尚未釐清，而這些相關的信號分子，扮演著重要的角色，一但研究透徹後則可利用此機制控制細胞修復血管的能力。胞外基質誘導細胞內訊息路徑與整合素和黏著分子複合物 [47,49]，Hung et al. ...等亦於期刊中發表現今已發現細胞外基質與細胞間的訊號分子機制。圖表如下：

**Table 2:** Molecular and cellular interaction between nanobiomaterials and vascular microenvironment

Nanomaterials	Molecular mechanism
1. Aluminum oxide nanoparticles	↓ expression tight junction protein in brain vasculature
2. Cupper nanoparticles	↑ regenerating crosslinked and fibrillar elastin matrices
3. Nanostructured hydroxyapatite (HA) crystal	↑ FGF-2 expression and promotion of angiogenesis
4. Heparin-binding peptide amphiphiles (HBPA)s nanostructured	delivery growth factor to facilitate for islet transplantation
5. Nanostructured PLGA	↑ adhesive proteins adsorbed (virtronectin and fibronectin)
6. Nanosphere-aided targeting of mutant Raf-1	regression tumor progression
7. Viscoelastic nanocomposites	↑ VEGF-R2 and TGF-β expression
8. Poly(glycolide)(PGA) nanofibrous	↑ VEGF-R2 and integrin V expression
9. Polyurethane-gold and silver (Au and silver) nanocomposites	activate FAK and PI3K/Akt signaling, ↑ cytoplasmic Ca <sup>2+</sup> releasing
10. Carbon nanoparticles	induced platelets activation and enhance vascular thrombosis

**PLGA:** poly(lactic-co-glycolic acid); **VEGF-R2:** Vascular endothelial growth factor-receptor 2; **TGF-β:** Transformer growth factor-beta; **FAK:** focal adhesion kinase; **PI3K/Akt:** Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt; **Ca<sup>2+</sup>:** Calcium.

Reprint was permitted by Hung et al. 2011

於本實驗室先前研究 Polyurethane-gold and silver (Au and Ag) nanocomposites 中發現若將內皮細胞培養於此材料上，會增加細胞貼附於材料表面的能力[24,25,59,60]，可能是因為奈米基材與細胞相互反應

後細胞間鈣離子濃度增加後造成訊號機制打開，內皮細胞會依照兩種訊系路徑去增加生物反應，一為 NO-dependent 依著 PI3K/Akt 訊息路徑增加 eNOS，進而增加 NO 表現，促進內皮細胞遷移的表現，而基質細胞衍生因子-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12) 其為 CXC 趨化因子的一種成員，於 SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 相互作用下，發現胚胎發育過程中其扮演著造血、血管發育與心臟再生發展之重要角色。SDF-1 可經由活化 activate PI3K/Akt/eNOS 影響內皮細胞增殖與存活 [80]。另一路徑為 NO-independ pathway，粘著斑激酶 (FAK) 為細胞質激酶藉細胞膜，與細胞外基質 (ECM) /整合素介導的信號通路與細胞遷移相關細胞膜整合蛋白 (Integrins) [80]，與基材相結合後增加 FAK、RhoA 與 MMP2 的表現進而調節細胞生物活性 [24,25,40,52]。由此可知當細胞與奈米基質交互作用時可能是藉由此二條路徑達到血管新生、及血管修復之效果。

在基材表面接種細胞增加可生物相容性，並改良血管移殖物的表面，直接幫助幹細胞分化成血管型。這種前景看好的的生物材料是利用調節細胞黏附能力，抑制血栓形成和血栓形成來增加生物相容性，使此奈米生醫材料更適於體內環境，因而增加了血管奈米組織工程之進步，這些訊息可以提供參考決定哪些組織來源比較適合血管的工程組織和幫助發展幹細胞移植療法對各種血管疾病之策略。

### 第三節 研究動機及目的

現今對血管阻塞之治療多分為兩類一為內科療法，第二類則為介入性治療：經皮冠狀動脈擴張術，利用血管支架撐開血管維持血液暢流，但施行手術後再次栓塞之比例仍居高不下，故有鑑於此，本實驗以組織工程與再生醫學為背景，利用現今已被許多研究所証實的兩種生醫材料，奈米金與第一型膠原蛋白仿製成細胞外基質，進行細胞學之研究，探討幹細胞生長於此種基材之細胞反應、生物路徑以及生物相容性。並且更進一步將此生醫奈米基質塗佈於血管材料上，配合幹細胞療法，將間葉幹細胞培養於材料上，同時移植入動物體內，以觀察及研究血管修復及新生之情形，做為組織工程促進組織修復及再生研究之依據，進而探討及提供現今臨床使用於人工血管支架移植之參考，進而提升治療方式及醫療品質。



## 第二章 研究方法

### 第一節 實驗材料

#### 1. 動物

實驗動物為 Sprague-Dawley Rat (SD female rat) 購自台灣樂斯科生物科技股份有限公司 (BioLasco Taiwan Co., Ltd)，實驗時體重範圍為 250~300g。

#### 2. 細胞株

人類臍帶間葉幹細胞簡稱 MSCs 由臍帶組織分離出，細胞使用代數為 P8~P20 代之間。

#### 3. 藥品與試劑

##### A. 細胞培養試劑及生長因子

Fetal bovine serum (FBS)	Invitrogen, USA
Hight glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (H-DMEM)	Invitrogen, USA
Penicillin-streptomycin	Invitrogen, USA
Sodium pyruvate	Invitrogen, USA
Sodium bicarbonate	Sigma, USA
Trypsin-EDTA	Invitrogen, USA
Human Stromal Cell-Derived Factor-1 alpha	Prospec, USA

(SDF-1)	
Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Prospec, USA

### B. 奈米基材試劑

Au nanoparticle solution	Global Nano Tech, Taiwan
Acetic acid	島久藥品株式會社, Japan
Collagen typeI	BD, NJ USA

### C. 電泳 (Electrophoresis) 及西方點墨法 (Western blot) 試劑及抗體

Acrylamide-Bis (29:1)	SERVA, Germany
Ammonium persulfate (APS)	J.T.Baker, USA
Glycine	J.T.Baker, USA
Methanol	J.T.Baker, USA
N,N,N,N-Tetramethyl ethylene diamine (TEMED)	Sigma, USA
Phosphatase	Roche , Switzerland

Protease Inhibitor	Roche , Switzerland
Protein assay kits	Bio-Rad, USA
SDS-PAGE molecular weight standard Prestained marker	Fermentas, Canada
Sodium dodecylsulfate (SDS)	J.T.Baker, USA
Tris-base	J.T.Baker, USA
Tween 20	J.T.Baker, USA
Western Blot detection reagent (ECL kit)	perkinElmer, USA
Coomassie brilliant blue R-250 staining	Bio-Rad, USA
Gelatin	Invitrogen, USA
CaCl <sub>2</sub>	Invitrogen, USA

### 抗體

Actin mouse monoclonal antibody	Cell Signaling, USA
Phospho-Akt antibody	Cell Signaling, USA
Phospho-FAK antibody	Cell Signaling, USA
Phospho-eNOS antibody	Abcam, USA
Phospho-ERK antibody	Cell Signaling, USA

Phospho-RhoA antibody	Santa cruz, USA
Phospho-Rac/Cdc42 antibody	Cell Signaling, USA
HRP-goat anti-mouse antibody	Abcam, USA
HRP-goat anti-rabibt antibody	Abcam, USA

#### D. 螢光抗體與試劑

CD29- conjugate PE antibody	MACS, USA
CD34- conjugate PE antibody	MACS, USA
CD44- conjugate PE antibody	MACS, USA
CD73- conjugate PE antibody	MACS, USA
CD105- conjugated PE antibody	MACS, USA
CD45- conjugate FITC antibody	MACS, USA
CD90- conjugate FITC antibody	MACS, USA
Fluorescein (FITC)-conjugate AffiniPure Goat anti-rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, USA
Cy <sup>TM</sup> 5-conjugated AffiniPure Goat anti-mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, USA

CXCR4 antibody	Santa Cruz, USA
$\alpha v\beta 3$ antibody	Santa Cruz, USA
NOS3 antibody	Santa Cruz, USA
Flk-1(VEGF-R2) antibody	Santa Cruz, USA
4,6-Diamidion-2-phenylindole (DAPI)	Invitrogen, USA
Rhodamine phalloidin	Sigma, USA

#### E. 其他試劑

Glutaraldehyde	Sigma, USA
2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-dA)	Sigma, USA
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	Sigma, USA
lipofectamine	Santa Cruz, USA
VEGF siRNA	Santa Cruz, USA
Scramble siRNA	Santa Cruz, USA
Calcein-AM	Invitrogen, USA
Quantum dot	Invitrogen, USA
Hematoxylin-eosin (H&E) staining	DAKO, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD31	DAKO, USA

Mounting gel	Invitrogen, USA
--------------	-----------------

#### 4. 實驗儀器與耗材

可見光/紫外光分光光度計：(UV/Visible spectrophotometer)

無菌操作台：laminar flow (HAG-120, Chung Fu , Taiwan)

水浴槽：Water bath (WB212-B2, Chung Fu , Taiwan)

細胞離心機：centrifuge (X-22R, Beckman,USA)

螢光顯微鏡：Fluorescent microscopy (ZEISS AXIO IMAGER A1,USA)

倒立顯微鏡：Phase contrast microscope (ZEISS AXIO Z1,USA)

掃描式電子顯微鏡：Scanning electron microscopy SEM (JEOL JEM-5200, USA)

二氧化碳細胞培養箱：CO<sub>2</sub> Incubator (Thermoforma 370, bioway, USA)

旋轉震盪器：Orbital shaker (Barnstead 4630, Taiwan)

蛋白質電泳組：Protein III (Bio-Rad, USA)

蛋白質電泳電流供應器：Power supply (Bio-Rad, USA)

濕式蛋白質轉漬器：Wet mini trans-blot cell (Bio-Rad, USA)

流式細胞分析儀：Flow Cytometer (LSR II, BD, USA)

留置針表面改質電漿設備：Plasma treat equipment (Openair®, Steinhagen, Germany)

靜脈留置針：Intravascular Catheter (Insyte™ Autoguard™, BD, USA)

## 第二節 實驗方法

### 一、製備及分析奈米基材

#### 1. 製備膠原蛋白-金 (collagen-gold nanocomposite: Col-Au) 之奈米複合物薄膜

Collagen type I (Col) 來源購自 BD；將 Col 以滅菌後之 0.2N 之醋酸稀釋至 0.5 mg/ml，接著利用 0.22  $\mu\text{m}$  過濾篩過濾溶液，則可視為無菌之第一型膠原蛋白 (Col) 溶液。奈米金微粒懸浮液 (約 50 ppm/ml) 則由台灣台北 Global Nanotech Industries 公司所提供，利用電子顯微鏡觀察出其直徑範圍為 4-7 nm (平均 5 nm)；以 0.5 mg/ml 之 Col-I 將奈米金微粒稀釋成濃度為 43.5 ppm 後，充分攪拌混合，最後以 0.22  $\mu\text{m}$  過濾篩過濾即成為無菌之膠原蛋白-奈米金 (Col-Au) 奈米複合物溶液。

此實驗中所製備之奈米複合物薄膜為利用上述之 Col-I、Col-Au 之溶液，將配製完成的無菌奈米複合溶液塗佈於 15 mm 之圓形玻片或細胞培養盤中，靜置 30 分鐘使之充分與玻片表面接觸與貼附，接著移除多餘溶液並以 PBS 沖洗 1~2 次，即成為實驗中所使用之複合物薄膜基材，最後利用原子力學顯微鏡 (Atomic force microscopy: AFM) 觀察、檢驗薄膜表面型態，以備使用於以下各種細胞及動物實驗之用。

## 2. 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 之官能基分析

減弱全反射-傅立葉轉換紅外線光譜儀 (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared, ATR-FTIR) 是利用電磁波通過不同的介質界面，造成電磁波折射率的不同，射入的輻射線通過介質後，介質會吸收些許能量使得反射波所含之能量相較於射入波少，因此可知輻射波能量的改變是由於介質上之化學分子吸收所造成，故偵測反射波的能量則可分析材料表面分子結構之震動行為，藉此分析材料表面所帶有的化學分子結構。

本研究利用圓形玻璃片為基材，其表面分別經過 Col-I、Col-Au 所塗佈，形成不同表面薄膜材料，於室溫下利用 ATR-FTIR 來觀察，掃描範圍為  $600\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 。藉以觀察表面官能基的改變，證明材料改質的組成差異。

## 3. 可見光/紫外光分光光度計鑑別分子鍵結

可見光/紫外光分光光度計是量測物質不同波長的光吸收，用以鑑別分子鍵結或結構，本實驗測量三組樣品，分別為: ddH<sub>2</sub>O、Col-I、Col-Au 溶液，儀器之測量光波為 190~1100 nm 之間。首先以去離子水 (ddH<sub>2</sub>O) 重複清洗石英管並使用拭鏡紙將石英管以同一方向拭乾避免形成刮痕影響數值，接著將 ddH<sub>2</sub>O 置入石英管中測量做為 background spectrum，完成後則依序測量每個 sample 之吸收波長；並且於測量不同 sample 之



間皆以 ddH<sub>2</sub>O 清洗石英管，避免先前物質殘留而干擾數據。最後利用 originlab 軟體分析量化數據。

#### 4. 原子力學顯微鏡觀察基材表面形態

原子力學顯微鏡 (Atomic force microscopy, AFM) 可觀察奈米金改變 Collagen 表面形態 (topographic) 變化，將所配製好的 Col-I 及 Col-Au 溶液塗佈於圓形玻璃片，最後將其室溫乾燥 12 小時。最後以原子力學顯微鏡將兩個樣品分別進行分析測驗以觀察金所造成的表面形態改變。

## 二、生物相容性試驗

### 1. 培養臍帶間葉幹細胞

臍帶間葉幹細胞來源由臍帶所分離出來，實驗過程選用之細胞代數為 8~20 代，培養於 10 cm<sup>2</sup> dish 培養，使用之培養基為 H-DMEM 另外補充 10% FBS、100 U/ml penicillin-streptomycin、1% sodium pyruvate (Invitrogen) 直至增殖至 9 分滿 (約 3~4 天) 後，以 0.05% trypsin-EDTA 將細胞取下繼代，並置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 細胞培養箱之中，做為維持及細胞繼代之系統。

實驗組則將 2×10<sup>5</sup> 顆細胞種於細胞培養盤 (培養盤中各塗佈上不同的奈米生物基材)，使用 growth medium 培養液 (約 8 小時)，隔日將未貼

附之細胞移除，更換未含 10% 胎牛血清之培養液，使細胞飢餓 (serum starvation) 培養 24 小時，接著更換 growth medium 於並實驗組別中分別加入生長因子 VEGF (50 ng/ml) 及 SDF-1 (50 ng/ml) 培養 2 天，以促進間葉幹細胞之分化。

## 2. 臍帶間葉幹細胞之表面蛋白分析

利用流式細胞儀分析細胞之表面蛋白，以 0.05% Trypsin-EDTA (Invitrogen) 將細胞由培養盤取下，利用 PBS 清洗 2 次已確定將細胞上之培養基沖洗乾淨，離心 1000 rpm，5 分鐘並去除上清液，加入 50ul PBS 回溶細胞，同時加入 5 ul 之螢光抗體 (CD34、CD44、CD105、CD73、CD29-conjugated phycoerythrin；CD45、CD90-conjugated fluorescein isothiocyanate) 室溫下避光反應 30 分鐘，接著以 500 ul 之 PBS 回溶細胞，最後使用流式細胞儀 (BD) 分析，並以僅含有二級抗體之組別 FITC-conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit IgG (H+L)、PE-conjugated AffiniPure Goat anti-rabbit IgG (H+L) 做為控制組，而接有 CD marker 之螢光組別為實驗組，進而判別細胞表面蛋白所表現之 CD marker。最後利用 FCS express 4 軟體，分析定量細胞膜上所表現之 CD maker。

## 3. 細胞增殖試驗 (*MTT assay*)

以 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

(MTT) 為受質，測量存活細胞中的粒線體去氫酶 (dehydrogenase) 之活性，以測定細胞增殖率。在 96 wells 的細胞培養盤中分為 9 組分別為：控制組、塗佈 Collagen 及 Col-Au 的基材三大組，並於每一大組分為三小組：無藥物處理、以 VEGF (50 ng/ml) 或 SDF-1 (50 ng/ml) 處理的細胞，並於每個 well 中加入  $4 \times 10^3$  個細胞，待 24、48、72 小時之後，在每個 well 加入 100  $\mu$ l MTT (0.5 mg/ml) 溶液，置於 37°C 培養箱作用 2~4 小時之後，再加入 100  $\mu$ l DMSO 反應 15-30 分鐘；以 ELISA reader 讀取 570 nm 吸光值，以未加任何藥物的組別作為對照組。以實驗組之吸光值除以對照組之吸光值，即可計算出細胞之相對增殖比。

#### 4. 血小板貼附型態觀察 (*Platelet activation test*)

將血小板培養於 glass、Col、Col-Au 之材料表面，置於 37°C / 5% CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中 1 小時，接著使用 2.5% 戊二醛溶液將血小板固定至少 8 小時，PBS 沖洗兩次後再分別以 30%~100% 之酒精濃度階段性脫水，最後進行臨界點乾燥後，取至 SEM 觀察並估算血小板之貼附率。

#### 5. 單核球活化試驗 (*monocyte activation test*)

人類血液單核球是由健康成人之靜脈抽取出全血加以分離所得，將抽取出之全血 (約 20 ml) 以 PBS 稀釋之 (比例為 1:1)，取 15ml 離心管加入 3 ml ficoll，並加入約 9 ml PBS 稀釋血液，離心 2000 rpm，20 min，

去除血漿層並取 buffy coat，接著以 PBS 沖洗 二次，最後以 trypan blue 做活細胞的鑑定，計算細胞，接著利用其中包含 10% FBS and 1% (v/v) antibiotics (10000 U ml/ penicillin G 與 10 mg ml/ streptomycin) 的培養液調整細胞濃度為  $1 \times 10^5$  顆分別約 1 ml 的細胞標準培養液加入有塗佈 Col 或 Col-Au 之 24 well plate，分別培養再 37°C 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱 96 個小時後取出，並以 trypsin 將細胞由 24 well 分離下來，最後以顯微鏡觀察並計算單核球和巨噬細胞之比例。

#### 6. 細胞型態與貼附試驗 (*Cell morphology and Adhesion ability*)

利用掃描式電子顯微鏡 Scanning electron microscopy (SEM) 觀察 MSCs 生長於不同基材上之型態與貼附能力。將  $1 \times 10^4$  顆細胞培養於 glass、Col、Col-Au 之基材上，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 48 小時，接著使用 2.5% 戊二醛溶液將 MSCs 固定至少 8 小時，PBS 沖洗兩次後再分別以 30%~100% 之酒精濃度階段性脫水，最後進行臨界點乾燥，再以 SEM 觀察檢測 MSCs 於不同基材上之型態。

#### 7. 細胞骨架螢光染色

取  $1 \times 10^4$  顆 MSCs 種在 TCPS、Col、Col-Au 之基材上，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中分別培養 8、24、48 小時後，以 PBS 沖洗三次後，接著分別加入 4% 福馬林 (paraformaldehyde, PFA) 固定細胞 10 分鐘、

0.5% Triton X-100 in PBS 室溫下反應 10 分鐘、以 PBS 稀釋 phalloidin，稀釋倍率為 1:100 之螢光染劑於室溫下避光反應 10~20 分鐘。最後是 PBS 稀釋 DAPI (4,6-diamidion-2-phenylindole) 染劑，室溫下避光反應 10~20 分鐘。以上各個步驟間皆須以 PBS 沖洗細胞三次。最後將 15 mm 之玻片反蓋於在玻片上，周圍以封片膠 (mounting gel) 封住待乾，並以鋁箔紙避光保護之，利用正立式螢光顯微鏡觀察並記錄細胞骨架型態。

## 8. 測定活性氧化物質 (*Reactive oxygen species*)

利用螢光探針 DCFH - dA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 進行活性過氧化物的物質檢測，DCFH - dA 本身沒有螢光，可以自由的穿過細胞膜，進而進入細胞中，而被細胞內的脂解酶水解成為 DCFH，而 DCFH 無法穿越細胞膜，進而使探針很容易裝載到細胞內，細胞內的活性過氧化物質可以氧化無螢光的 DCFH，生成有螢光的 DCF (dichlorofluorescein)，故此時檢測 DCF 的螢光強度則可了解細胞內活性氧之表現。

將 MSCs 由不同基材 (TCPS、Col、Col-Au) 上取至離心管中，以 PBS 清洗細胞兩次，離心後去除上清液，隨後加入 ROS 染劑- DCFH - dA (20 uM) 每管 500  $\mu$ l，此外須有一管 blank 不加染劑，並加入 500  $\mu$ l 之 PBS，將 sample 置入 37°C 水浴槽中避光反應 30 分鐘，最後以流式細胞儀 (flow cytometry) 偵測並分析細胞內活性氧化物質的生情形。最後利用 FCS Express 4 軟體分析量化 ROS 之表現量。

### 三、細胞生化表現路徑及蛋白質的表現

#### 1. 細胞轉染作用 (*siRNA Transfection*)

利用 lipofectamine 轉染 (transfection), 將 VEGF siRNA 轉染入 MSCs 中。

Sequence	Sense	Antisense
<b>Santa Cruz</b> <b>(29520)</b>	GAUUAUGCGGAUCAAAACCUTT	AGGUUUGAUCCGCAUAAUUCTT

將 MSCs 以  $2 \times 10^5$  顆細胞種於有塗佈 Col、Col-Au 之細胞培養盤，至於  $37^\circ\text{C}$  培養超過 8 小時，此時細胞已貼附於培養盤上，方可行轉染。

將 VEGF siRNA 與 lipofectaminet 溶液以 1:2 之比例混合，靜置室溫下 30 分鐘，再以無血清之培養液將其以 1:1000 稀釋倍率稀釋，接著將細胞原本之培養液移除，PBS 清洗三次後加入已配置好之 Transfection 溶液培養約 12~16 小時造成 VEGF 基因表現削減，再以 PBS 清洗三次後，更換含有 10% FBS 之培養液並且分別於特定之組別加入 SDF-1 (50 ng/ml)，培養 48 小時。最後利用西方墨點法、免疫熒光染色分析、流式細胞儀分析這些技術來觀察細胞內蛋白 (p-eNOS、p-FAK、p-RhoA、P-Cdc42) 的表現量以及細胞膜上之接受器 (CXCR4、 $\alpha\text{v}\beta 3$  integrin) 表現程度。

#### 2. 西方墨點法 (*Western blot analysis*)

西方點墨是實驗室中找特定蛋白質最常用的方法，是利用特定的抗體可專一性的與抗原蛋白質結合的原理，來對樣品進行著色，因此可檢測特定蛋白質在所分析的細胞或組織中的表現高低，來分析檢測特定蛋白質的生物學檢測技術。細胞或組織必須進行以下三大步驟方能定量並檢測出其特定蛋白質的表現能力。

### (1) 全蛋白質萃取

取  $2 \times 10^5$  顆 MSCs 培養於  $10 \text{ cm}^2$  的細胞培養盤中，培養至少 12 小時後（細胞約五分滿）即更換無血清之培養液約 24 h (cell starvation)。接著進行加藥處理，分別將 VEGF (50 ng/ml) 或 SDF-1 (50 ng/ml) 加入含血清之培養基培養 48 小，即可分別萃取蛋白質，吸除培養基，利用 0.05% trypsin-EDTA 將細胞收取至離心管並以 PBS 沖洗細胞，加入 lysis buffer 靜置 20 分鐘  $4^\circ\text{C}$  使細胞破裂，離心 ( $4^\circ\text{C}$ ，13000 rpm，20 min)，最後取上清液置於 1.5 ml 離心管，即為全細胞蛋白質。

### (2) 蛋白質濃度測定

蛋白質濃度是以 BCA (bicinchoninic acid) 方法來測定，此試劑唯一可溶於水之淺綠色化合物，在蛋白質及鹼性硫酸銅溶液下，兩分子的 BCA 即與一價銅離子結合成深紫色混合物，此物於 595 nm 下有吸光，且吸光強度與蛋白質含量成正比，因此可用以定量蛋白質。以下簡述分析程序。

製備一組 BSA (160 mg/ml) 標準品，並以二次水稀釋 BCA (4:1)，接

著將稀釋後之 BCA 稀釋 BSA 成以下一系列濃度：32 mg/ml、16 mg/ml、8 mg/ml、4 mg/ml、0 mg/ml，溫和的均勻混合，再以 ELISA reader 測量 595 nm 光源下的吸光質，畫出標準曲線。樣品則以每毫升稀釋好之 BCA 加入 2  $\mu$ l 樣本溶液，溫和的均勻混合，測出於 595 nm 光源下的吸光值後，根據標準曲線定量出樣品所含的蛋白質含量。

### (3) 西方點墨法

將定量後之蛋白質取出固定蛋白質的量與 loading buffer 混合後，製成待測樣本 (sample)，以聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE) 將蛋白質分離，並依 sample 分子量之不同而使用不同比例之 running gel。之後採用 Bio-Rad 公司之 Mini PROTEAN System 儀器設備以 60~120 voltage 的電壓進行電泳約 90~120 分鐘，待 protein maker 展開至適當距離後即停止電泳。電泳結束後，取下膠片隨即進行蛋白質轉印；取轉印紙 PVDF 裁切成膠體大小，先以甲醇 (methanol) 浸泡約一分鐘活化之，將膠體及 PVDF 按 Bio-Rad 之 Mini PROTEAN System 蛋白質轉印設備之指示放入轉印槽中，並將 transfer buffer (Tris-base 3 g、Glycine 14.4 g、100% Methanol 150 ml、ddH<sub>2</sub>O 1000 ml) 加入轉印槽，以 400 毫安培，4°C 下轉印 1 小時，完成後取出 PVDF，接著浸泡於含有 5% 脫脂奶粉之 TBST (Tris-HCl 60.57g、Tween-20 5 ml、NaCl 85 g、ddH<sub>2</sub>O 1000 ml)，室溫下搖晃一小時，進行阻斷作用 (blocking step) 以牛奶蛋白將 PVDF 上之非專一性蛋白結合位空間予以填塞。利用 TBST 以 1：500 之稀釋倍率稀



釋一級抗體：p-Akt、p-eNOS、p-RhoA、P-Cdc42、p-FAK、 $\beta$ -actin，將經過 blocking step 之 PVDF 浸泡於其中 4°C 隔夜以辨識標的蛋白質。接著以 TBST buffer 清洗 10 分鐘四次，再與 1：2000~8000 稀釋倍率稀釋之二級抗體室溫下反應 1 小時接著以 TBST buffer 清洗 10 分鐘四次，加上顯影劑 ECL (enhanced chemiluminescence)，與至暗房壓片，觀察蛋白片段的出現，最後利用 Gel-Pro Analyzer 4.0 分析定量蛋白質之表現量。

### 3. 金屬蛋白酶偵測法 (*Gelatin Zymography analysis*)

取  $2 \times 10^5$  顆 MSCs 培養於 10 cm<sup>2</sup> 的細胞培養盤中，培養至少 12 小時後(細胞約五分滿)即更換無血清之培養液約 24 小時 (cell starvation)。接著進行加藥處理，分別將 VEGF (50 ng/ml) 或 SDF-1 (50 ng/ml) 加入含血清之培養基培養 48 小時後，吸取培養基偵測 MSCs 所分泌之金屬蛋白酶 (metalloelastase)，接下來將配製含 2% gelatin 之 8% SDS-PAGE

電泳。8%之上膠片：

dd H <sub>2</sub> O	5 ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5 ml
Acrymide: Bis (29:1)	2 ml
10 % SDS	0.1 ml
APS (10 mg/ml)	35 $\lambda$
2 % Gelatin	0.5 ml
TEMED	10 $\lambda$
<b>Total Volume</b>	<b>8ml</b>

(2% Gelatin 以 2g/100ml ddH<sub>2</sub>O，在 55°C 溶解)

上膠則和西方點墨法一致。將之置於含有電泳緩衝容液的電泳槽中，以聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE) 將蛋白質分離，之後採用

Bio-Rad 公司之 Mini PROTEAN System 儀器設備以 60~120 voltage 的電壓進行電泳約 90~120 分鐘，待 protein maker 展開至適當距離後即停止電泳。在電泳結束後以 washing buffer (40 mM Tris-HCl pH 8.5、0.2M NaCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、2.5% Triton X-100) 室溫下沖洗 30 min 2 次，然後加入 Reaction Buffer (40mM Tris-HCl pH 8.5、0.2M NaCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、0.01% NaN<sub>3</sub>) 在 37°C 恆溫箱中反應 12 小時，最後反應完之膠片以 Coomassie blue (0.2% Coomassie blue R-250、50% methanol、10% acetic acid) 染色 30 分鐘，再以褪色液 (10% acetic acid 和 20% methanol) 退染，待退染完成，將膠體掃描，並以 Gel-Pro Analyzer 4.0 分析定量蛋白質之表現量。

#### 4. 免疫熒光染色分析 (*Immunofluorescence analysis*)

取  $1 \times 10^4$  顆 MSCs 種在 glass、塗佈 Col、Col-Au 之基材上，並分別加入 VEGF (50 ng/ml) 或 SDF-1 (50 ng/ml) 於培養液中，接著於置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中，分別培養 24 小時、48 小時後移除培養基，以 PBS 清洗細胞三次，加入 4% 福馬林 (paraformaldehyd, PFA) 15 分鐘固定細胞後，PBS 洗去多餘福馬林。接著利用 0.1% 的 Triton X- 100 打破細胞膜，以 PBS 清洗細胞三次，再加入 5% FBS 進行進行阻斷作用 (blocking step) 後，以 1 : 100 稀釋之一級抗體：eNOS、CXCR4、 $\alpha v \beta 3$  integrin，4°C 下 8 小時以上，接著以 PBS 清洗細胞 3 次，再分別加入以

PBS 稀釋之 fluoresce isothiocyanate-conjugated 之 goat anti-mouse secondary IgG、goat anti-rabbit secondary IgG (1:100) 室溫下 1 小時，最後將 15 mm 之玻片反蓋於在玻片上，周圍以封片膠封住待乾，並以鋁箔紙避光保護之，利用正立式螢光顯微鏡觀察並記錄。

### 5. 流式細胞儀分析 (*Flow cytometric FACS analysis*)

將  $2 \times 10^4$  顆 MSCs 種在 TCPS、塗佈 Col、Col-Au 之六孔盤內，並分別加入 VEGF (50 ng/ml) 或 SDF-1 (50 ng/ml) 於 medium 中，接著於置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱中培養 48 小時後，利用 0.05% trypsin-EDTA 將細胞收取至離心管並以 PBS 沖洗三次，利用 PBS 以 1:100 之稀釋倍率稀釋一級抗體：CXCR4、 $\alpha\beta$ 3 integrin、CD31，室溫下 1 小時，接著以 PBS 清洗細胞 3 次並以 1000 rpm、5 分鐘離心，吸掉多餘之一級抗體，再分別加入以 PBS 稀釋之 fluoresce isothiocyanate-conjugated 之 goat anti-mouse secondary IgG、goat anti-rabbit secondary IgG (1:100) 室溫下 30 分鐘，最後以 PBS 回溶細胞，進行流式細胞儀 (BD) 分析；以僅含有二級抗體者之組別做為控制組，而接有螢光之組別為實驗組，進而判別細胞蛋白之表現量。並以 FCS Express 4 軟體分析量化細胞表現之 CXCR4、 $\alpha\beta$ 3 integrin、CD31 表現量。

## 6. 細胞遷移實驗 (*migration assay*)

將 migration assay 之專用 96 well 中塗佈生物基材 Col、Col-Au，並將專用卡夾放入，最後種入  $2 \times 10^5$  顆 MSCs 於每個組別中，培養約 8 小時後轉染 VEGF siRNA 於特定組別 12 小時。接著取出專用卡夾並將細胞以 calcein AM 染色 30 分鐘，並於特定之組別加入 SDF-1 (50 ng/ml)，培養 48 小時其中於成功傳染 siRNA 後之 0、12、24、36、48 小時，於螢光顯微鏡下觀察細胞 migration 之情形。並以 photcape 軟體分析細胞 migration 之程度。

## 四、動物實驗

### 1. 製備 Col-Au 奈米基材導管

#### 1.1 大氣電漿處理

奈米金粒子 (Global NanoTech, Taiwan) 原濃度為 180 ppm 與 Col 混合後最後形成 43.5 ppm 之 Col-Au 奈米複合基材，導管取用臨床中所使用之靜脈留置針 (22 G 針頭)，軟針長度 30 mm。首先將靜脈留置針表面以等離子大氣電漿設備處理 (Openair®, Steinhagen, Germany)，此裝置包括發電機、高壓電源的變壓器和旋轉噴頭。處理過程由三方儀器公司所協助提供，選用氣體為一般空氣 (80% 氮氣，20% 氧氣)，等離子空氣是從一個旋轉的噴嘴噴出，離子體的溫度在噴嘴出口是 65°C。移動速度 10 m/min，噴嘴距離材料 10 mm。經過大氣電漿處理之導管立即浸

泡入已配製完成之 Col-I、Col-Au 之奈米混合溶液 (37°C) 約 4 小時，取出後放入無菌操作台內室溫直到奈米混合溶液完全乾燥為止，並放入乾燥箱保存之。待取用前以 75%酒精浸泡 5 分鐘後接著以 PBS 浸泡 15~30 分鐘，則完成留置導管之製作。製做過程見 figure.22。

## 1.2 體外動態培養間葉幹細胞 (MSCs) 貼附於靜脈留置導管

取 MSCs (細胞代數為 14 代)，以 quantum dots (20 nM) 細胞做為標定 (此標定過程根據 Invitrogen, USA 所提供之實驗流程進行)。取上述大氣電漿處理且塗佈奈米基材之導管放入無菌之 3 ml 空針針筒內，並加入  $2 \times 10^5$  cells/ml 之細胞懸浮液。置於震動擺盪機上培養 (5% CO<sub>2</sub> 於 37 °C) 以每小時 40 轉之速度持續 48 小時，最後以免疫螢光顯微鏡觀察細胞貼附於導管上之情形，即成為移植入大鼠之 Col-Au 奈米基材導管見 figure. 22。以上實驗於植入動物體內前 48 小時執行。

## 2. 大鼠股動脈植入 Col-Au 奈米基材導管實驗

取 SD (Sprague-Dawley) 大鼠共 35 隻分為以下八組，每組各 4 隻。  
Group 1：控制組 (單純植入臨床中之留置針)；Group 2：植入臨床中之留置針 + 肌肉注射 VEGF (於股動脈四周)；Group 3：留置針上有貼附 MSCs；Group 4：有貼附細胞之留置針 + 肌肉注射 VEGF；Group 5：塗佈 Col 及貼附 MSCs 之留置針；Group 6：塗佈 Col 及貼附 MSCs 之留

置針 + 肌肉注射 VEGF；Group 7：塗佈 Col-Au 及貼附 MSCs 之留置針；  
Group 8：塗佈 Col-Au 及貼附 MSCs 之留置針+肌肉注射 VEGF。實驗組別  
見 figure. 23 (a)。

將 12.5 ml Rompun 與 Zoletil 125 mg 相互混合後以 1.2 ml 後以無菌  
蒸餾水稀釋，後麻醉大鼠，約 250 g 之大鼠以腹部注射方注入約 0.15 ml  
之麻醉劑，待大鼠完全麻醉後切開大鼠右側腹股溝皮膚，找出股動脈，  
接著將經動態培養之靜脈留置針導管插入股動脈，深度約 10 mm，接著  
利用縫線固定導管，並且止血之，最後將傷口縫合，並分別在 Group 4、  
Group 6、Group 8 此三組實驗動物開刀傷口周圍肌肉注射 VEGF (0.2  
ug/0.5ml)。術後兩天以 Cephalothin 30 mg/kg 之劑量皮下注射抗生素，預  
防傷口感染。以上動物實驗流程見 figure. 23 (b)。

經過一個月後以 CO<sub>2</sub> 將大鼠安樂死後犧牲，取出大鼠之股動脈導管，  
並利用組織染色及免疫螢光染色觀察血管內皮化，及血管修復情形。

### 3. 組織學及免疫螢光組織染色

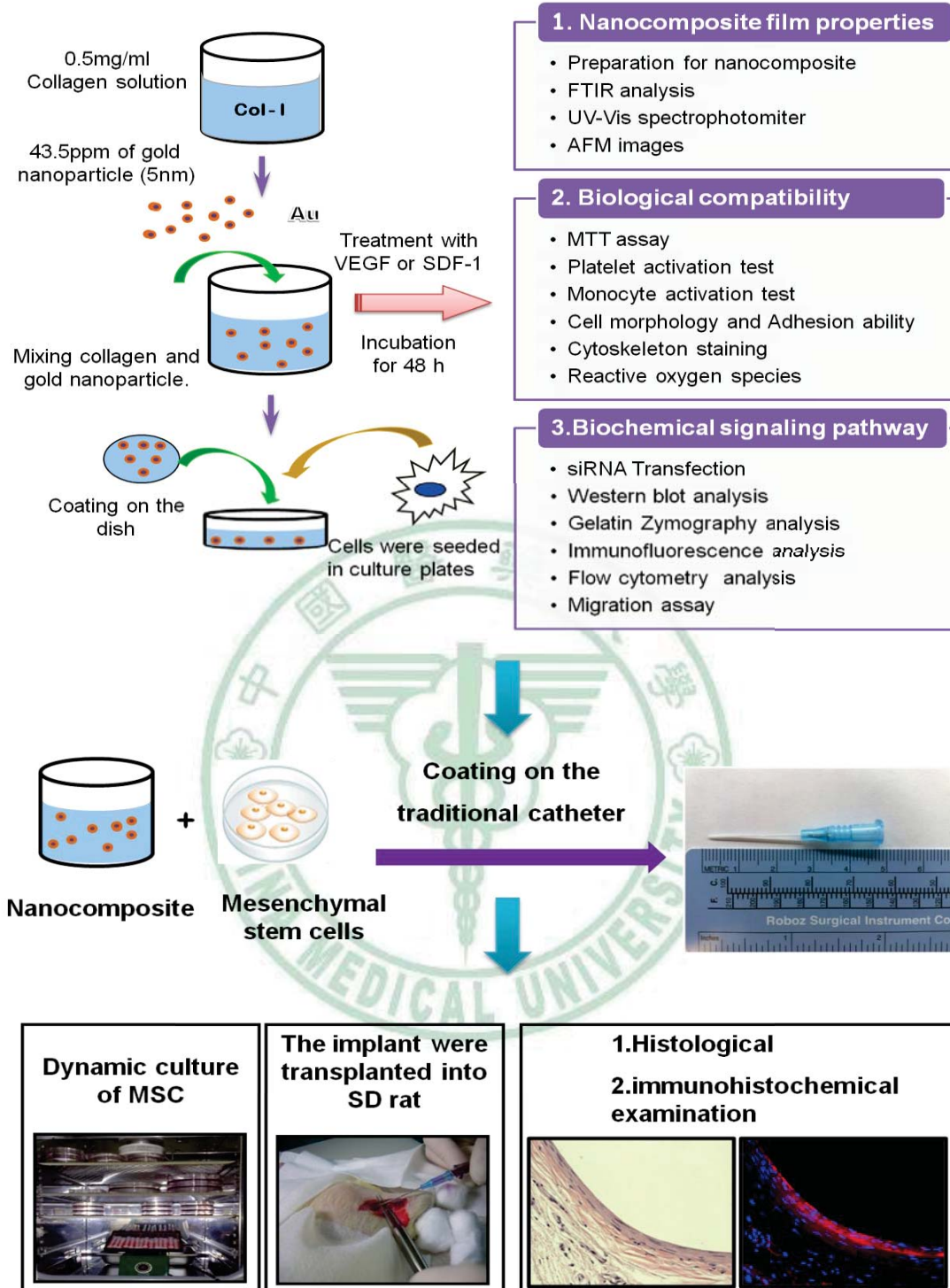
將大鼠股動脈取下後以 4% PFA 固定，乙醇 (ethanol) 階段性脫水，  
最後石蠟包埋。標本切成 4 毫米厚，以蘇木紫-伊紅染色，彈性蛋白及膠  
原蛋白分別以 Gieson's method and Masson's 三色染色法觀察。免疫組  
織化學染色則使用以下抗體：CD31 (DAKO)、Cy<sup>TM</sup>5-conjugated

AffiniPure Goat anti-mouse IgG (H+L)，並靜脈留置針當作控制組，觀察血管修復之情形。免疫組織化學以螢光顯微鏡觀察之。

### 第三節 研究設計與大綱

本研究不僅利用生物體中富含之膠原蛋白 (Collagen type I) 製做成血管支架塗佈之基材，更添加現今新穎科技中之奈米金微粒於基材之中提高塗佈材料與血管之間的生物相容性。此外同時探討間葉幹細胞貼附於此種奈米基材後的細胞功能性、訊息傳遞路徑、生物相容性並以動物實驗驗證此基質材對於血管修復、組織再生、抗血栓之效果。以下為本研究內容之結構圖。





本研究設計內容之結構圖。將 0.5 mg/ml 之膠原蛋白與 43.5 ppm 的奈米金微粒相互混合，經過 0.22  $\mu\text{m}$  之過濾篩過濾後，塗佈於培養盤或動物移植物上，並將細胞培養於此奈米基材上，最後研究奈米基材特性、細胞生物功能、驗證生物相容性及血管修復能力。



#### 第四節 統計方法

實驗數據以平均值±標準偏差 (Mean ± SD) 表示而每組實驗數目均在三次以上，實驗組別之間互相差異 Student's t-test 加以評估， $p < 0.05$  者表示具統計學上的差異。



## 第三章 研究結果

### 一、奈米基材特性分析

#### 1. 原子力學顯微鏡觀察基材表面形態

利用 AFM 分析 Col、Col-Au (43.5 ppm) 兩種基材表面形態。如 Figure.1 所示，topography (Figure.1 左側) 為分析材料表面深淺，深色代表表面低的位置，淺色代表材料表面高的位置。Phase (Fig.1 右側)，觀察材料軟硬程度，深色代表較軟的區域，而淺色代表較硬的區域，顯示 Col-Au (16.14 nm)；Col (9.47 nm) 材料表面 size domain。而由 phase 圖可以看出，加入 Au 的奈米基材，分子鏈有明顯凝聚的現象，因而反應於表面尺寸，造成 Col-Au 表面尺寸較大。

#### 2. 可見光/紫外光分光光度計鑑別分子鍵結

以可見光/紫外光分光光度計測量 Col、Col-Au (43.5 ppm)、pure Au solution (43.5 ppm) 之吸收波長，Figure 2. 結果顯示，Col-Au 主要有兩波峰出現，一為 290 nm 此處波峰代表溶液中內含蛋白質，第二個峰出現於 520 nm，表示 Au 溶液之吸光值於此位置。Col-Au 於此二處出現波峰，而 Col 於 290 nm 吸光值高於 Col-Au，推測為 Col 與奈米金微粒混合後造成 Col 物理結構上的改變使莫爾吸光係數下降。

### 3. 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (ATR-FTIR) 之官能基分析

將奈米基材以 ATR-FTIR 觀察材料表面官能基，於 Figure 3. 中顯示  $3350\text{ cm}^{-1}$  區域吸收值分析 Col 和 Col-Au 的結構，在此區域 pure Col 具明顯吸收峰，加入奈米金微粒後則吸收值增加，表示加入金後會造成基材表面上的 N-H，移至基材內部。且當 Col 與金混合後則出現  $1249\text{ cm}^{-1}$  (C-N group)、 $1035\text{ cm}^{-1}$  (C-O) group 波峰，表示與奈米金混合後造成官能基彎曲震動，代表奈米金粒子與 Col 相互吸引因而造成 Col 結構有物理上之改變，其結果與分光光度計實驗結果相同。

## 二、臍帶間葉幹細胞之特性鑑定分析

臍帶間葉幹細胞 (UC-MSCs) 之特徵型態分析，UC-MSC 細胞為貼覆型，呈現紡錘狀。細胞表面具特定 cell markers；因此本實驗中利用帶有螢光 CD29、CD14、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90 及 CD105 的抗體進行人類臍帶間葉幹細胞的細胞表面抗原蛋白染色。並利用顯微鏡下觀察細胞之外觀型態。Figure 4. 顯示 (a) 為細胞之外觀型態之觀察。而 (b) 為細胞表面蛋白，呈現陽性反應者為：CD29、CD44、CD73、CD90 及 CD105，呈陰性反應的有 CD34、CD45 及 CD14。

## 三、膠原蛋白-奈米金基材 (Col-Au) 之生物相容性測試

### 1. 細胞增殖試驗 (MTT assay)

試將 MSCs 培養於不同濃度的奈米金 (17.4、43.5、174 ppm) 複合基材上觀察增殖情形，於 Figure 5. 中顯示，在 24 h、48 h、72 h，Col-Au 基材可促進胞增殖，而且又以 43.5 ppm 濃度的奈米金微粒促進細胞增殖的能力，與其他組別比較更為顯著。因此，本研究選擇 43.5 ppm 為適合濃度。為了瞭解 MSCs 加入生長因子後是否會更加促進細胞增殖，因此分別加入生長因子: VEGF (50 ng/ml)、SDF-1 (50 ng/ml) 後觀察細胞增殖情形。Figure 6. 顯示，(a) MSCs 培養於不同材料上 TCPS、Col、Col-Au (43.5 ppm)，由結果顯示確實細胞於 Col-Au 基材上具有較佳之增殖效果。而 (b)、(c)、(d) 圖為加入生長因子後不同時間下所觀察之增殖效果。結果顯示加入生長因子後確實於 Col-Au 上可顯著增加細胞增殖，並於 48 小時 最具特異性。因此本研究以 48 小時 為實驗條件，觀察細胞之各項行為表現。

## 2. 血小板貼附及活化測試

將血小板培養於 glass、有塗佈 Col 或 Col-Au 之 24 well plate 中，一小時後，利用 2.5% 戊二醛 (Glutaraldehyd) PBS 溶液將血小板固定，再以階段性脫水準備做臨界點乾燥，最後以 SEM 觀察血小板的活化程度，結果如 Figure 7. 所示，塗佈 Col-Au 基材，較不會造成血小板的貼附作用，因此若將此基材植入血管內，血小板貼附而形成血栓的機率較低。

### 3. 發炎反應測式 (monocyte activation test)

單核球 (15  $\mu\text{m}$ ) 屬於白血球細胞的一種，其主要存在週邊血液裡一旦發炎作用產生即轉變形態分化為巨噬細胞 (40~50  $\mu\text{m}$ )。故本研究利用單核球轉變分化成巨噬細胞之比例做為發炎程度的初步指標，單核球於材料表面的轉變比例越大，表示材料表面在體外測試中的發炎反應越嚴重。將  $1 \times 10^5$  顆單核球培養於 TCPS、Col 或 Col-Au 之 24 well plate，96 小時後計算單核球及巨噬細胞的貼附數目。由 Figure 8. 得知 TCPS 轉化率為 43.49%，經過表面塗佈 Col 之後轉化率為 10.95%，而塗佈 Col-Au 基材者其轉化率則下降為 7.48%，並具有特異性。由此可知塗佈 Col-Au 後，確實可降低單核球轉變為巨噬細胞，進而顯示 Col-Au 較不會造成發炎反應，並具有較佳的生物相容性。

### 4. 細胞型態與貼附試驗 (Cell morphology and adhesion ability)

MSCs 之細胞懸浮液以濃度  $1 \times 10^4$  cell/ml，加入 glass、Col、Col-Au 之奈米基材，貼附 8 小時及 48 小時後，將細胞骨架 (actin fiber) 以 phalloidin 染色，並以螢光顯微鏡觀察細胞形態。於 Figure 9. (a) 中顯示出當細胞貼附於 glass 上時生長狀況較差，細胞呈現圓形，而細胞貼附於 Col-Au 基材時 actin fiber 延展性較佳，並有較多 lamellipodia 及 filopodia 的產生。

接著利用 SEM 進一步證實細胞貼附形態，Figure 9. (b) 中顯示細胞

貼附於基材上之型態，當MSCs貼附於基材上時具有較多 lamellipodia 及 filopodia 兩種 actin fiber。當細胞進行貼附或是遷移行為時，是利用細胞的 lamellipodia 及 filopodia 此兩種細胞骨架進行遷移。因此，結果顯示當 MSCs 貼附於 Col-Au 上時可產生較多 actin fiber，進而表示當細胞培養於奈米材料時可能促進細胞的遷移能力及貼附力。

## 5. 測定活性氧化物質 (Reactive oxygen species , ROS)

將細胞培養於 Col-Au 基材上，觀察是否會使細胞產生 ROS，而引起細胞的氧化傷害，故將  $2 \times 10^5$  cell/well 培養於塗佈材料的 6 well plate 中 24 小時，觀察細胞所產生 ROS 的量，結果 Figure 10.，當細胞生長於 TCPS 及 Col 細胞內所產生之 ROS 量高於 Col-Au (TCPS : 23% ; 及 Col : 7%)，由此可知 Col-Au 並不會造成細胞內 ROS 量的增加，且相較於 Col 和 TCPS 的組別來說，Col-Au 有較佳抗氧化之效果。推論因而更具良好之生物相容性。

## 四、細胞生化表現路徑及蛋白質的表現

### 1. 一氧化氮依賴型細胞訊號路徑 (NO-dependent pathways)

於我們實驗室中研究出當內皮細胞培養於奈米基材上時，會經由 NO-dependent pathways (eNOS / p-FAK / p-Akt) 增加細胞貼附能力或增殖能力[24,25]。故根據先前研究結果，更進一步探討，MSCs 培養於奈

米基材上，是否會透過相同的機轉，促進細胞增生及遷移的反應。

MSCs 培養於不同基材上並以 VEGF (50 ng/ml) 或 SDF-1 (50 ng/ml) 處理 48 小時後，以西方墨點法分析 p-Akt 和 p-eNOS 蛋白質之活性表現量。Figure 11. 顯示，MSCs 培養於 Col 及 Col-Au 基材上 48 小時，皆會誘導 p-Akt 和 p-eNOS 蛋白質表現量，又以培養於 Col-Au 之誘導效果較佳，當加入生長因子 VEGF (50 ng/ml) 或 SDF-1 (50 ng/ml) 後顯著促進蛋白質的表現，值得注意的是細胞培養於 Col-Au 時，經過 SDF-1 處理組別與單純培養於 Col-Au 上之 p-Akt 及 p-eNOS 具相同表現程度，而加入 VEGF 後 p-Akt 及 p-eNOS 表現更加顯著。

## 2. 非一氧化氮依賴型細胞訊號路徑 (NO-independent pathways)

由之前的研究發現奈米金粒子經由 NO-independent pathways (FAK / RhoA / Cdc42) 調控細胞遷移效應 [24,25]。Figure 12. 顯示 Col-Au 可促進相同調控蛋白表現 (FAK / RhoA / Cdc42)，而在加入生長因子 VEGF (50 ng/ml) 或 SDF-1 (50 ng/ml) 能顯著促進這些蛋白的表現。

MMP-2 為一種金屬蛋白酶 (metalloproteinase-2)。研究指出，MMP-2 與細胞遷移作用相關，會釋放至細胞外，可促進細胞分泌其他生長因子 [50]，Figure 13. 結果顯示，將 MSCs 培養於 Col-Au 上可促進 MMP-2 量，且加入生長因子 (VEGF, SDF-1) 時亦可發現更具有顯著促分泌之成效。

### 3. Col-Au 促進 eNOS 之表現

目前已知，eNOS 可促進內皮細胞增殖或遷移效應 [24,25,28]。先前研究發現，當細胞培養於奈米金粒子上時會經由 NO-dependent pathways，促進細胞表現 eNOS，進而增加細胞的增殖及遷移效應 [24,25]。為了進一步證實此發現，將MSCs培養於 Col-Au 上並以生長因子 (VEGF 50 ng/ml, SDF-1 50 ng/ml) 刺激培養 24 h、48 h 後，利用免疫螢光染色觀察細胞表現 eNOS 之情形，由 Figure 14.中表示，不論 24 h 或 48 h 當細胞培養於 Col 或 Col-Au 並加入生長因子後，皆會刺激細胞分泌 eNOS 表現，且 Col-Au 之組別表現更為顯著。因此可知 Col-Au 可加速促進 MSCs 分化為內皮細胞，並且發現 VEGF 及 SDF-1 其可能是經由 eNOS 增加細胞於基材上之遷移能力。

### 4. Col-Au 促進細胞膜上之 integrin $\alpha 5\beta 3$ 之表現

$\alpha 5\beta 3$  是被確認細胞於 ECM 上貼附的接受器，跟細胞與細胞間、細胞與 ECM 間的吸附作用有相關，其與血管新生有相關，以間接影響細胞中訊息傳遞，造成細胞分化增生形成血管修復及新生之效果。故將細胞培養於塗佈 Col、Col-Au 上觀察其表現情形。Figure 15. 顯示當細胞培養於 Col-Au 上時可促進  $\alpha 5\beta 3$  的表現量，且與 Col 相比其表現更為顯著，而加入生長因子後亦有加成作用，間接證明此材料可促進 MSCs 協助血管修復。



## 五、VEGF 與 SDF-1 之上下游關係之釐清

### 1. 篩選 VEGF siRNA 轉染 (transfection) 之最佳濃度

首先篩選出 VEGF siRNA 轉染入 MSCs 中效率最佳之濃度，故利用 MTT 以及帶有螢光之 VEGF siRNA transfection 入細胞內觀察細胞存活率與進入細胞內之效率。Figure 16. (a) 顯示當 VEGF siRNA 濃度高於 50 nM 會出現細胞毒殺性，細胞增殖率下降。而 Figure 16. (b) 顯示將有螢光之 siRNA-conjugatet (scramble) 傳入細胞後，於螢光顯微鏡下觀察。隨著濃度增加時會呈現 dose dependent 之效果。所以本實驗選擇 25 nM 為 VEGF siRNA 轉染之最佳濃度。

### 2. VEGF 調控 SDF-1 之表現

CXCR4 與 SDF-1 是專一特異性結合因子，在細胞遷移中扮演著重要的角色 [68]，故本研究將觀察抑制 VEGF 基因表現後，是否會影響 SDF-1 量的產生，進而使 CXCR4 表現下降。將 VEGF siRNA 轉染入 MSCs 中，並將 MSCs 培養於 Col、Col-Au 上，再於特定組別加入 SDF-1 (50 ng/ml)，培養 48 小時。最後利用免疫螢光染色分析 CXCR4 及  $\alpha 5\beta 3$  表現量。由 Figure 17. (a) 顯示，確實將 VEGF siRNA 轉染入細胞後會降低 CXCR4 之表現，且加入 SDF-1 後仍然無法恢復表現量。此外當 VEGF 被抑制後細胞膜上之  $\alpha 5\beta 3$  的表現量亦下降的情形產生。更進一步故利用細流式儀偵測細胞膜上之 CXCR4 及  $\alpha 5\beta 3$  之表現，結果

顯示於 Figure 17. (b)，因此推論 VEGF 可調控 SDF-1 的表現，進而造成下游因子：CXCR4 與  $\alpha 5\beta 3$  表現之表現量下降。

### 3. VEGF 與細胞訊號路徑關係

將 MSCs 轉染 VEGF siRNA 後，再培養於 Col、Col-Au 48 小時後以 Western blot 及 MMP assay 觀察 p-Akt、p-eNOS、p-RhoA、p-FAK 蛋白質表現量。於 Figure 18. 顯示消滅 VEGF 基因表現後會造成 p-Akt、P-eNOS、p-RhoA、p-FAK 蛋白表現量減弱，而再加入 SDF-1 後蛋白質表現量具有回復效果；此外 Figure 19. 顯示 MMP-2 亦會因 VEGF 基因被削減而造成分泌量的下降，但在加入 SDF-1 後 MMP-2 分泌量有回復之情形，因此推論 VEGF 為 SDF-1 的上游因子，並會經由細胞訊號路徑：NO-dependent pathways 和 NO-independent pathways，影響細胞遷移和貼附的能力。

### 4. VEGF 參與調控細胞 migration

轉染 siRNA 後分別於特定之組別加入 SDF-1 (50 ng/ml)，並於螢光顯微鏡下觀察細胞後 0、12、24、36、48 h，migration 之情形。Figure 20. 顯示當細胞培養於 Col-Au 時 migration 能力與 Col 及 TCPS 之組別能力相比較佳，且轉染 VEGF siRNA 之組別 migration 能力下降，但若添加回 SDF-1 時則 migration 能力增加。因此可進一步推論

Col-Au 可調控細胞訊號路徑促進細胞 migration 之能力，並且主要透過 VEGF 之訊息活化，進而促進細胞於 Col-Au 上遷移的能力增加。

## 5. VEGF 參與調控細胞表現內皮一氧化氮合成酶 (eNOS)

將 MSCs 轉染 VEGF siRNA 後，接著培養於 Col、Col-Au 48 小時後以免疫螢光染色觀察一氧化氮合成酶之表現量 (eNOS)，結果顯示於 Figure 21.。消滅 VEGF 基因表現後，造成 eNOS 表現量減弱，額外添加 SDF-1 後蛋白質表現量具有回復效果；因此推論 SDF-1 會因為 VEGF 的表現而影響 eNOS 表現量，並會經由細胞訊號路徑：NO-dependent pathways 進而影響細胞的增生與生存。

## 六、動物實驗

### 1. 組織工程血管移植物之製備過程

組織工程血管移植物之製備過程顯示於 Figure 22.，靜脈留置針表面以等離子大氣電漿設備處理後，立即浸泡入已配製完成之 Col、Col-Au 溶液 (37°C) 約 4 小時，取出後放置無菌操作台內室溫直至表面溶液完全乾燥為止。取用前以 75% 酒精浸泡 5 分鐘後，以 PBS 浸泡 15~30 分鐘。Figure 22. (d,e,f) 顯示利用 quantum dot 標記 MSCs，體外動態培養 48 小時後，以螢光顯鏡確認，可順利將 MSCs 貼附於血管移植物表面，且以表面塗佈 Col-Au 之組別，細胞貼附數為最多。由此可知當 catheter

表面經過等離子大氣電漿處理及 Col-Au 塗佈後可增進 MSCs 貼附於其表面。

### 1. 免疫組織染色分析 (Immunohistochemistry staining)

MSCs 以體外動態培養的方式，培養 MSCs 於靜脈留置針表面48小時後，植入大鼠股動脈中 (流程見 Fig. 22,23)，並存留一個月。犧牲大鼠後，將右側植入 catheter 之股動脈，進行免疫組織染色，觀察奈米基材與 MSCs 對於受損血管是否具修復內皮細胞的功能。Figure 24. 顯示血管組織表現人類 CD31 之情形 (a) 為使用DAB 染色法，(b) 則為免疫螢光染色法，Col-Au 和 Col (group 5~8) 的組別顯示，當 MSCs 植入動物體內後於塗佈 Col-Au 者表現 CD31的量為最多，且表現人類 CD31 之細胞慢慢遷移至血管組織內。由此可知體外移殖 MSCs 於 Col-Au 塗佈的血管組織移植物，其上 MSCs 會分化為內皮細胞因而表現出人類內皮細胞的 CD markers：hCD31，且施打 VEGF 後可顯著促進 MSCs 分化為內皮細胞，並且細胞可順利移植入血管壁中，藉以修復受損的血管內皮。

### 2. 蘇木紫-伊紅染色 (Hematoxylin-enosin, H&E)

將血管移植物植入股動脈後一個月後，利用蘇木紫-伊紅染色法檢驗，血管組織修復情形。由 Figure 25. 得知 catheter 的組別具血栓的情形產

生 (如鍵頭所示)；塗佈 Col 組，則有些微血栓粘連於血管壁上之情形；而 Col-Au 之組別並無產生組織異常的表現，推測是因為 Col-Au 具有較好的生物相容性，可降低免疫反應，且 MSCs 分化為內皮細胞，可立即修補血管內皮降低再次栓塞的情形，故血管組織正常無血栓的情形產生。

### 5. 梅生三色染色 (Masson trichrome staining)

將血管移植物植入股動脈後一個月後，利用梅生三色染色，觀察血管內皮組織修復情形，由指出當血管纖維化情形產生會於血管平滑肌處產生膠原纖維，則表示血管纖維化之產生 [81]，故利用梅生三色染色，觀察基材抗纖維化之情形。由 Figure 26. 得知 catheter 的組別血管內皮及平滑肌組織有產生纖維化的情形 (如鍵頭所示)，塗佈 Col 組，則內皮組織具有些微纖維化產生，而 Col-Au 之組別產生則為最少。推測是因為 Col-Au 具有較好的生物相容性，且此種奈米基材較不會造成血管產生組織纖維化，因而適合長期置放於體內，故更適合應用於血管支架塗佈中。

## 第四章 討論

在動物體內原生的血管內皮細胞具有抗凝血及抗血栓的特性，當血管支架進入血管中後，造成內皮損傷進導致血管重塑，使得血管再次狹窄阻塞 [63,64,65]。現今血管移植物最主要的障礙則為：血管管腔中的內皮細胞無法與支架相容 [64]。因此為了提高血管移植物之生物相容性，本研究試圖合成仿生材料，儘可能使基材更加接近原生血管的組成。且再生醫工程之中，對於 ECM 的研究 (例如:表面特性、細胞外基質的重塑以及與細胞之間的相互反應) 非常重要，因生醫工程可藉由使用 ECM 蛋白質，改質材料表面特性或將材料製成仿生模型進而研究細胞生物行為[61]。而膠原蛋白不論在體內或體外實驗中發現，其具有刺激血管新生的功能 [62]，且前研究指出奈米金粒子所製成之生醫奈米基材，可增加內皮細胞貼附，促進細胞增生效應 [24,25]。因此我們使用生物相容性佳之材料:膠原蛋白 (Col) 及奈米金粒子合成之奈米基材 (Col-Au)，可塗佈於血管支架上生醫材料，並配合幹細胞療法，誘導間葉幹細胞 (MSCs)分化為內皮細胞，進而修復受損血管內皮。

於本篇研究中發現當存在少量 Au ( 43.5 ppm) 時會改變膠原蛋白的表面形態，可由 Figure 1 中觀察到，當加入 Au 奈米粒子( $\approx 5$  nm)後基材表面 size domain 變大 Col-Au (16.14 nm); Col (9.47 nm) 且分散性佳無凝聚情形，與先前研究結果相同，當高分子材料 (PU) 加入過量 Au 奈米

粒子後( $\approx 174$  ppm) size domain 變大，並且會有聚積之情形產生 [24,25,51,59,60]。並可由先前研究發現當細胞培養於 Au (43.5 ppm) 皆會促細細胞增生及遷移能力 [24,25,59]。而本實驗則根據先前研究選擇以 Au 濃度 17.4、43.5、174 ppm 測量對於 MSCs 增殖的反應。由 Figure 4 證實，確實 Col 添加入 43.5 ppm Au 奈米粒子者，MSCs 貼附及增為最佳，與內皮細胞表現相同，推測是基材上之奈米粒子濃度，改變 Col 基材上奈米型態 (pattern) 而影響細胞的貼附。

可見光之波長範圍為 400~700 nm，胺基酸的芳香基團在 280 nm 會有吸光現象產生，且奈米金粒子會因為表面電漿共振效應，特別於 520 nm 附近的光作用，當奈米金粒子吸收光的作用後，其表面自由電子會被極化而隨著光波頻率震盪 [14]，造成 520 nm 出現吸收波長。而此結果與 Figure 2 相同。而根據比爾-朗伯定律 (Beer-Lambert law)， $A = \epsilon bc$  ( $A =$  吸光度， $\epsilon =$  莫耳吸光係數， $b =$  光程長度， $c =$  濃度) 當 Col 加入奈米金例子後蛋白質吸光係數下降，表示 Col 有物理上的改變，因而造成莫爾吸光係數的下降。

膠原蛋白具有特殊三螺旋構象，其特點是在紅外波段光譜 (FTIR) 具有醯胺鍵建結 [66]，且於 Lirong et al. 提出天然之 collagen 以 procyanidin 做為膠連劑穩定 collagen 之間的鍵結，並經由 FTIR 掃描後於  $3350\text{ cm}^{-1}$  有吸收波峰出現 [67]，而本研究將 collagen 混合奈米金粒子後亦有此波峰出現，但於 Figure 3. 中發現加入奈米金粒子後會造成

3350  $\text{cm}^{-1}$  吸收值上升，表示基材表面上的醯胺鍵 $[(\text{C}=\text{O}) \text{N}-\text{H}]$ ，移至基材內部，造成 collagen 物理上的改變，使材料更加穩定。

有研究指出金會影響奈米金基材上之氫鍵形成、熱能、化學能、基材的軟硬程度以及自由基清除的能力 [70,71,72]，且於 Chou et al.的研究中指出當 43.5 ppm 之奈米金粒子與 PU 相混合後，可穩定基材的鏈結，預防氧化作用的產生、減少基材在生物體內的降解速率及抗發炎之作用 [72]；而於我們的研究發現濃度 17.4 ppm~174 ppm 的奈米金粒子與 collagen 混合後，測出 43.5 ppm 為最適合 MSCs 生長之濃度可促進其貼附及增殖 (Fig.5, Fig.7)。且與單純之 Col 相比更具抗發炎 (Fig.9) 及抗血小板貼附 (Fig.7) 的效果；因此推測 43.5ppm 之金奈米粒子可穩定基材及減少 Col 的降解程度，因此增加生物穩定性 (biostability) 和生物相容性 (biocompatibility)。

目前已知，本研究所使用之 collagen type I 可運用於血管組織工程中，製做成細胞外基質，若將 ECs 及 EPCs 可於其基質上培養 7 天後，可形成微血管密度 [74]；並可運用於醫療上改善血液灌流 [68,73]。但成熟之內皮細胞其增殖能力有限，而及 EPCs 有礙於取得方面的限制；因而造成在組織工程 (tissue engineering) 或細胞治療 (cell therapy) 中受到諸多限制 [75,70]，促使現今研究趨向幹細胞療法。因此本實驗除了以 collagen 混合奈米金微粒，製成血管基材外，更配合使用具有自我更新且多重分化功能及增生能力佳之 MSCs [64,65,69,76]。



生物材料與細胞會經由細胞與材料間及細胞和細胞間的相互反應，表現出細胞形態及細胞功能 [52,53]，根據我們先前的研究發現將 EPCs 培養於 PU-Au 上時會藉由 CXCR4/SDF-1 訊息路徑誘導分化為 ECs，此外 PU-Au 具有良好之生物相容性及生物穩定性，當 ECs 或是 EPCs 貼附於奈米金基材 (PU-Au) 上時可以透過活化 NO-dependent pathway (PI3k/Akt 刺激 eNOS 表現) 造成 EPCs 分化為 ECs 以及增加細胞增生與遷移能力、NO-independent pathways (FAK/RhoA/MMP-2) 調節細胞的遷移及貼附行為的改變 [50,54]。而本研究發現將 MSCs 培養於 Col-Au 上時亦會造成此兩條生化路徑中的調控蛋白表現量上升 (Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14)，此結果與 ECs 及 EPCs 相同。因此當細胞培養於不同奈米基材 (PU-Au 和 Col-Au) 上時會利用相同訊息機制調控細胞貼附、遷移與增生，因此可知「奈米金」扮演重要的調控角色。但是 Au 是如何透過上游訊息調控因子來刺激細胞遷移與增生，目前仍不明確，故本研究以轉染 VEGF siRNA 去進一步探討。

Stromal derived factor-1 (SDF-1) 與 VEGF 皆可促進血管新生 [64,77]。(SDF-1) 可以動員 (mobilization) EPCs，並促進細胞表現 eNOS 進而影響細胞分化為 ECs 進而造成血管新生 [64,78,79]。且 VEGF 可以刺激幹細胞產生回歸效應 (homing) 至血管受損的部位，促使內皮修復生長 [64,78]。於研究中發現細胞培養於 Col-Au 時再加入同生長因子 (VEGF 或 SDF-1) 後，可顯著提升 CXCR4、 $\alpha 5\beta 3$  以及 eNOS 的表現 (Fig. 14,

Fig. 15)，但確切上游調控因子仍未釐清，因此我們利用轉染入 VEGF siRN 來了解 SDF-1 與 VEGF 之間的關係，結果顯示 VEGF 可調控 SDF-1 之表現 (Fig.17)，而影響 eNOS 的表現 (Fig.21)，進一步調控細胞遷移效應 (Fig.14) 以及 MSCs 分化為內皮細胞的能力。由此可知 Col-Au 可促進細胞的行為表現，並且可協同 VEGF 調控 SDF-1 進一步增加 MSCs 的增生與遷移效應。

現今臨床普遍治療動脈栓塞的技術為經皮導管冠狀動脈氣球擴張術 (PTCA) 及血管支架的技術 [10]，但放入血管支架後，會因為血液相容性不佳，導至血栓沉積，並且於殖入支架時會對血管內皮細胞造成傷害，而引發血管平滑肌重塑及過度增生 [11,14]。就目前血管奈米組織工程發展而言，將血管支架外塗佈奈米材料後，可降低阻塞之再復發率[45]。但仍有許多限制存在，如：機械性質差、生物相容性不佳，須外加塗佈免疫抑制劑。而本實驗之 Col-Au 於體外細胞實驗中証實具有很好的生物相容性 (Fig. 8, Fig.7, Fig.10) 不會造成發炎反應，並可塗佈於血管支架表面解決生物相容性之問題。且先前的研究發現若將 EPCs 培養於 PU-Au 奈米塗佈基材上，植入動物體內 14 天後，血管受損部位可顯著表現 CD31 及 CD34。因此可知，奈米金基材確實可促進細胞內皮化，並誘導 EPCs homing 至血管受損部位，但 EPCs 取得具有限制。為了解決此種限制，本實驗使用 Col-Au 基材合併 MSCs 製成血管塗佈材料，植入大鼠體內，進而証實 MSCs 與 EPC 皆可促血管損部位表現

CD31 且未有血栓及發炎知情況產生 (Fig.24, Fig.25)。由此可知金奈米粒子確實可誘導幹細胞分化為內皮細胞，進而修復血管內皮組織。最後我們的研究結果顯示，Col-Au 可增強 MSCs 於受損部位可分化為內皮細胞 (Fig.24)，且植入的 MSCs 可融合入血管內皮細胞組織中 [74]，因而形成類似的原生血管組織。因此我們設計出 MSCs 培養於 Col-Au 上的奈米塗佈基材，可減少再次血栓的機會。此為一種來將很有前途的方法，供一種新的方式為應用臨床的設置，提升理想的血管移植物。



## 第五章 結論

本研究中製成之新穎奈米塗層材料經過表面特性檢驗、生物相容性、細胞生物化學途徑實驗及動物實驗分析得以下結論：

於 Col (0.5 mg/ml) 中添加 Au (43.5 ppm) 後所製成之複合物，以紫外光分光光度計與 FTIR 証實成功合成奈米基材，且表面特徵較原始 Col 之 size domain 大，但分散性佳無聚集之現象，形成表面顆粒大小均於之薄層，因而細胞適合生長於其上。

生物相容性及細胞生化實驗分析中可知，本基材具有良好之生物相容性，不會造成發炎反應及血小板的貼附，且可促進 MSCs 的增生、貼附及遷移，當 MSCs 培養於 Col-Au 基材上時可能是透過 NO-dependent pathways 與 NO-independent pathways 訊息路徑調控細胞貼附、增生與遷移行為。此外利用轉染 VEGF siRNA 証實；VEGF 為 SDF-1 上游訊息調控因子，可會調節 SDF-1 的分泌，相互協同進而加成 MSCs 生長於 Col-Au 上之能力，影響下游蛋白質之表現 (p-FAK, p-RhoA, p-eNOS, p-Akt, MMP-2, CXCR4,  $\alpha 5\beta 3$ )，造成細胞於 Col-Au 上之遷移與增生能力的增加。

在動物實驗方面，將所製成之 Col-Au 移植物，植入大鼠股動脈中 1 個月後，其生物相容性佳，不會產生血塊粘連以及其他的免疫反應產生，且移植於 Col-Au 後 MSCs 可漸漸分化為內皮細胞表現 CD31，並遷

移入血管壁中，修復受損之血管內皮組織，促進血管內皮細胞新生及修復，避免血栓的再次發生，且以梅生三色染色法證明，使用此種奈米複合基材較不會引起組織纖維化，適合存放於體內，而達到仿生效果。因此本實驗之 Col-Au 奈米複合基材料可提供現今臨床作為血管生物材料塗佈物質之參考。



## 參考文獻

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/zh/index.html>
2. M.H. Ross, L.J.Romrell, 1996 , Histology : a text and atlas , 合計出版社。
3. Corti, R., Hutter, R., Badimon, J.J. & Fuster, V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* **17**, 35-44 (2004).
4. [http://www.mre.vghtpe.gov.tw/laboratory/Atherosclerosis and Coronary Artery Disease/index.html](http://www.mre.vghtpe.gov.tw/laboratory/Atherosclerosis%20and%20Coronary%20Artery%20Disease/index.html).
5. Hanke, H., Lenz, C. & Finking, G. The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis--a review. *Acta Chir Belg* **101**, 162-169 (2001).
6. Dzau, V.J., Braun-Dullaeus, R.C. & Sedding, D.G. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* **8**, 1249-1256 (2002).
7. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126 (1999).
8. Abraham L. Kierszenbaum 原著/簡基憲等編譯，2005，組織學及細胞生物學:病理學入門，第一版，藝軒圖書出版社。

9. 劉中平，藥物釋放型支架於冠狀動脈疾病之臨床應用 高雄醫師會誌 58， 2008， 民 97.01， 頁 8-13。
10. Kereiakes, D.J. Safety of drug-eluting stents. *Rev Cardiovasc Med* **11**, 187-199; quiz 200 (2010).
11. 施俊哲，血管支架簡介，臨床醫學，2008，26，頁 454-470
12. 吳錫芬，組織工程之血管移植替代物，臺灣大學：93 年，醫學工程學研究所，
13. Chen, Y.H., *et al.* Electron microscopic studies of phenotypic modulation of smooth muscle cells in coronary arteries of patients with unstable angina pectoris and postangioplasty restenosis. *Circulation* **95**, 1169-1175 (1997).
14. 蔡朝淵，奈米金在奈米生物技術與奈米醫學上的應用，國立成功大學：95 年，基礎醫學研究所。
15. Khang, D., Carpenter, J., Chun, Y.W., Pareta, R. & Webster, T.J. Nanotechnology for regenerative medicine. *Biomed Microdevices* **12**, 575-587 (2010).
16. Price, R.L., Gutwein, L.G., Kaledin, L., Tepper, F. & Webster, T.J. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. *J Biomed Mater Res A* **67**, 1284-1293 (2003).

17. Webster (ed.), Nanotechnology for the regeneration of hard and soft tissues World Scientific, Danvers, MA, (2007).
18. Sato, T.J. Webster, Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications *Expert. Rev. Med. Devices* **1(1)**, 105–114 (2004).
19. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*;382:607–9. (1996)
20. Tsai, C.Y., *et al.* Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum* **56**, 544-554 (2007).
21. 嚴鴻仁、徐善慧，奈米金與銀的妙用，科學發展期刊，2008，431期，頁 28~32，。
22. von der Mark, K., Park, J., Bauer, S. & Schmuki, P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* **339**, 131-153 (2010).
23. Shekaran, A. & Garcia, A.J. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 350-360 (2011).
24. Hung, H.S. & Hsu, S.H. The response of endothelial cells to polymer surface composed of nanometric micelles. *N Biotechnol* **25**, 235-243



- (2009).
25. Hung, H.S., Wu, C.C., Chien, S. & Hsu, S.H. The behavior of endothelial cells on polyurethane nanocomposites and the associated signaling pathways. *Biomaterials* **30**, 1502-1511 (2009).
  26. Alivisatos, A.P., Johnsson, K.P., Peng, X., Wilson, T.E., Loweth, C.J., Bruchez, M.P., Jr., and Schultz, P.G. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature* **382**, 609-611. (1996).
  27. Kirton, J.P. & Xu, Q. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res* **79**, 193-199 (2010).
  28. Ming-Yan Chen, Pu-Chang Lie, Zhi-Ling Li, and Xing Wei, Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* **37**:629-640 (2009).
  29. Levenberg, S., *et al.* Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* **23**, 879-884 (2005).
  30. Karsten Lenk, Madlen Uhlemann, Gerhard Schuler, Volker Adams. Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical exercise on atherosclerosis and coronary artery disease. *Articles in PresS. J Appl Physiol* .February 24, (2011).
  31. 黃柏勳、陳肇文、林幸榮, 內皮前驅幹細胞在心血管疾病之角色 臨

床醫學，2009，234 期。

32. Pittenger, M.F., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
33. Lee, O.K., *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**, 1669-1675 (2004).
34. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*.22:377–384(2004)
35. Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G. & Petibois, C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* **395**, 829-837 (2009).
36. Lee, K.Y. & Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* **101**, 1869-1879 (2001).
37. He, L., *et al.* Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int J Biol Macromol* **48**, 354-359 (2011)
38. 陳美瑾、陳俊宏、宋信文，膠原蛋白及其於生醫材料上的應用，2007，11；15 卷，11 期。
39. Khor, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials* **18**, 95-105 (1997).
40. Boccafoschi, F., Habermehl, J., Vesentini, S. & Mantovani, D.

- Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 7410-7417 (2005).
41. Ravi, S. & Chaikof, E.L. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med* **5**, 107-120 (2010).
42. Goissis, G., *et al.* Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials* **20**, 27-34 (1999)
43. Twardowski, T., Fertala, A., Orgel, J.P. & San Antonio, J.D. Type I collagen and collagen mimetics as angiogenesis promoting superpolymers. *Curr Pharm Des* **13**, 3608-3621 (2007).
44. Weinberg, C.B. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* **231**, 397-400 (1986).
45. Grassl, E.D., Oegema, T.R. & Tranquillo, R.T. A fibrin-based arterial media equivalent. *J Biomed Mater Res A* **66**, 550-561 (2003).
46. Mironov, V., Kasyanov, V. & Markwald, R.R. Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication. *Trends Biotechnol* **26**, 338-344 (2008).
47. Hung, H.S., Chen, H.C., Tsai, C.H. & Lin, S.Z. Novel approach by nanobiomaterials in vascular tissue engineering. *Cell Transplant* **20**, 63-70 (2011).

48. Alobaid, N., *et al.* Nanocomposite containing bioactive peptides promote endothelialisation by circulating progenitor cells: an in vitro evaluation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **32**, 76-83 (2006).
49. Prasad, C.K. & Krishnan, L.K. Regulation of endothelial cell phenotype by biomimetic matrix coated on biomaterials for cardiovascular tissue engineering. *Acta Biomater* **4**, 182-191 (2008).
50. Nimeri, G., Ohman, L., Elwing, H., Wettero, J. & Bengtsson, T. The influence of plasma proteins and platelets on oxygen radical production and F-actin distribution in neutrophils adhering to polymer surfaces. *Biomaterials* **23**, 1785-1795 (2002).
51. eixeira, A.I., *et al.* The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials* **27**, 3945-3954 (2006)
52. Hsu, S.H., *et al.* Cell migration rate on poly(epsilon-caprolactone)/poly(ethylene glycol) diblock copolymers and correlation with the material sliding angle. *Macromol Biosci* **7**, 482-490 (2007).
53. Tang, J.M., *et al.* VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovasc Res* (2011).
54. Petit, I., Jin, D. & Rafii, S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a

- molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* **28**, 299-307 (2007).
55. Romagnani, P., Lasagni, L., Annunziato, F., Serio, M. & Romagnani, S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* **25**, 201-209 (2004).
56. J L Jones, R A Walker. Integrins: a role as cell signalling molecules. *J Clin Pathol: Mol Pathol* **52**:208–213(1999)
57. Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. & Geiger, B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* **9**, 858-867 (2007).
58. Khan, O.F. & Sefton, M.V. Endothelialized biomaterials for tissue engineering applications in vivo. *Trends Biotechnol* (2011).
59. Hsu, S.H., Tang, C.M. & Tseng, H.J. Biocompatibility of poly(ether)urethane-gold nanocomposites. *J Biomed Mater Res A* **79**, 759-770 (2006).
60. Hsu, S.H., Tang, C.M. & Tseng, H.J. Biostability and biocompatibility of poly(ester urethane)–gold nanocomposites
61. Helen Hong , Janp. Stegemann. 2D and 3D collagen and fibrin biopolymers promote specific ECM and integrin gene expression by vascular smooth muscle cells. *J Biomater Sci Polym Ed.* **19**(10):1279-93

(2009)

62. Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D, Aimes RT, Quigley JP. Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood*. **97**, 2323-32 (2001).
63. Boccafoschi F, Habermehl J, Vesentini S, Mantovani D. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. **26**, 7410-7(2005).
64. Tang JM, Wang JN, Zhang L, Zheng F, Yang JY, Kong X, Guo LY, Chen L, Huang YZ, Wan Y, Chen SY. VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovasc Res*. **18** (2011).
65. Liao W, Zhong J, Yu J, Xie J, Liu Y, Du L, Yang S, Liu P, Xu J, Wang J, Han Z, Han ZC. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: implications of anti-inflammation and angiogenesis. *Cell Physiol Biochem*. **24**, 307-16.(2009).
66. Doyle BB, Bendit EG, Blout ER. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers*. 14(5):937-57.(1975).
67. He L, Mu C, Shi J, Zhang Q, Shi B, Lin W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int J Biol Macromol*.

- 1;48(2):354-9.(2011).
68. Levenberg, J. Rouwkema and M. Macdonald, Engineering vascularized skeletal muscle tissue, *Nat Biotechnol* **23**, 879–884. (2005).
69. H.S. Goodwin, A.R. Bicknese, S.N. Chien, B.D. Bogucki, C.O. Quinn and D.A. Wall, Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers, *Biol Blood Marrow Transplant* **7**, 581–588 (2001).
70. Hsu S, Chou C, Tseng S. Enhanced thermal and mechanical properties in polyurethane/Au nanocomposites. *Macromol Mater Eng* **289** 1096–1101 (2004)
71. Hsu S, Tang C, Tseng H. Biocompatibility of poly(ether) urethane-gold nanocomposites. *J Biomed Mater Res A* **79** 759–770.(2006)
72. Chih-Wei Chou, Shan-hui Hsu, Pey-Hwa Wang Biostability and biocompatibility of poly(ether)urethane containing gold or silver nanoparticles in a porcine model *J Biomed Mater Res A. Mar* **1;84(3)** 785-94. (2008)
73. Shan-hui Hsu , Hsiang-Jung Tseng , Yu-Chun Lin Endothelial differentiation of Wharton's jelly–derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow–derived mesenchymal stem cells *Exp Hematol.* **37(5):**629-40. (2009)

74. Allen P, Melero-Martin J, Bischoff J. Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks. *J Tissue Eng Regen Med.***5(4)** (2011)
75. Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells *Exp Hematol.***37(5)**, 629-40. (2009)
76. L.L. Hou, M. Zheng and D.M. Wang. Migration and differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in the rat brain, *Sheng Li Xue Bao* **25**,153–159 (2003).
77. Ferrara N. Napoleone Ferrara Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21(1)**, 21-6 (2010)
78. Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* **39(2)**, 363-76 (2005).
79. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1–CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*, **28(7)**, 299-307 (2007)
80. Zheng, Hao PhD; Fu, Guosheng PhD; Dai, Tao PhD; Huang, He MD.



Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway.

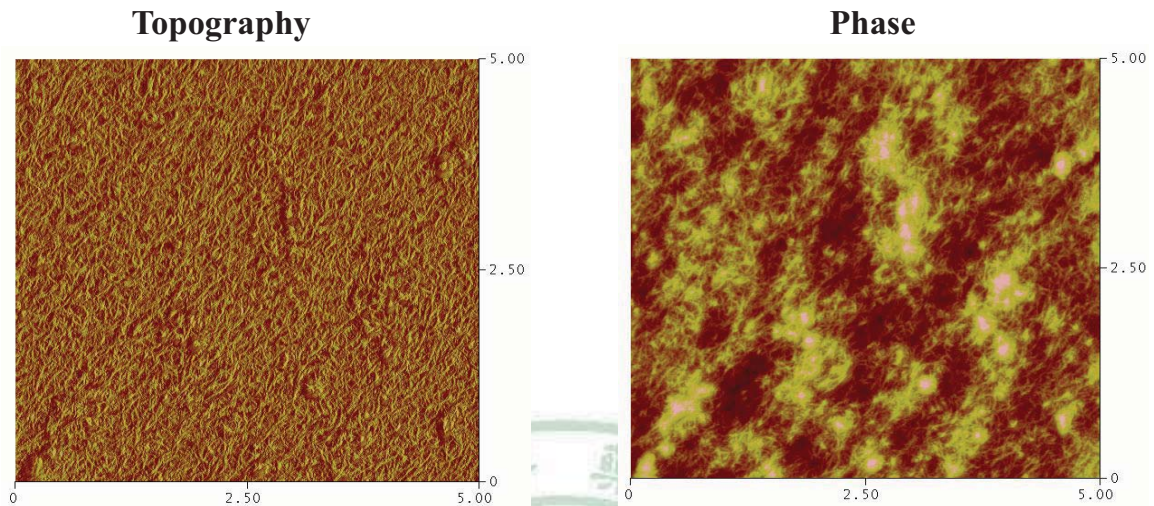
*Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 50 (3)3, 274-280 (2007)

81. Makoto Katoh, Kensuke Egashira, Chu Kataoka, Makoto Usui, Masamichi, Koyanagi, Shiro Kitamoto, Yasushi Ohmachi, Akira Takeshita and Hiroshi Narita. Regression by ACE inhibition of arteriosclerotic changes induced by chronic blockade of NO synthesis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.280 (5):H2306-12 (2001).

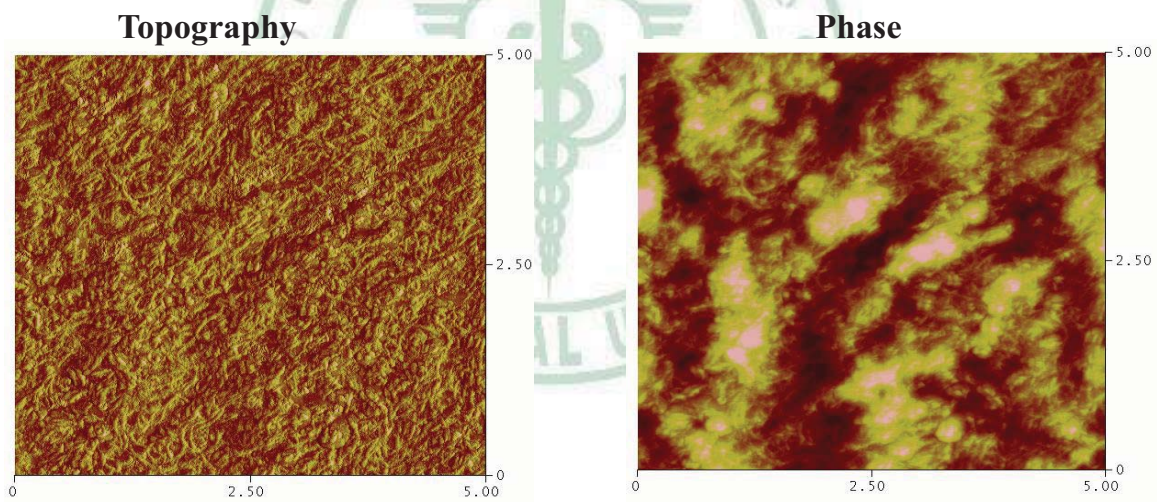


## 圖表

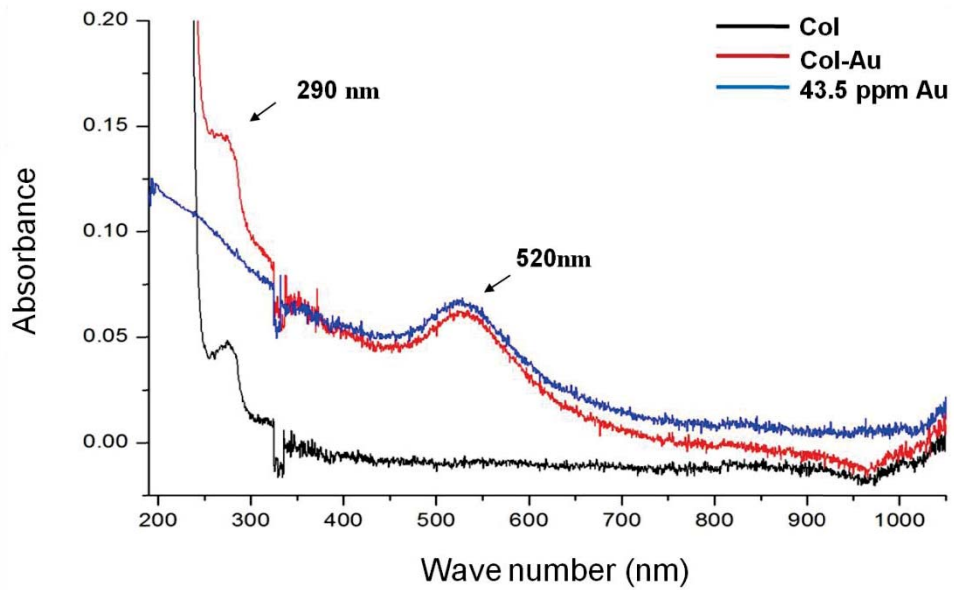
(a) Col



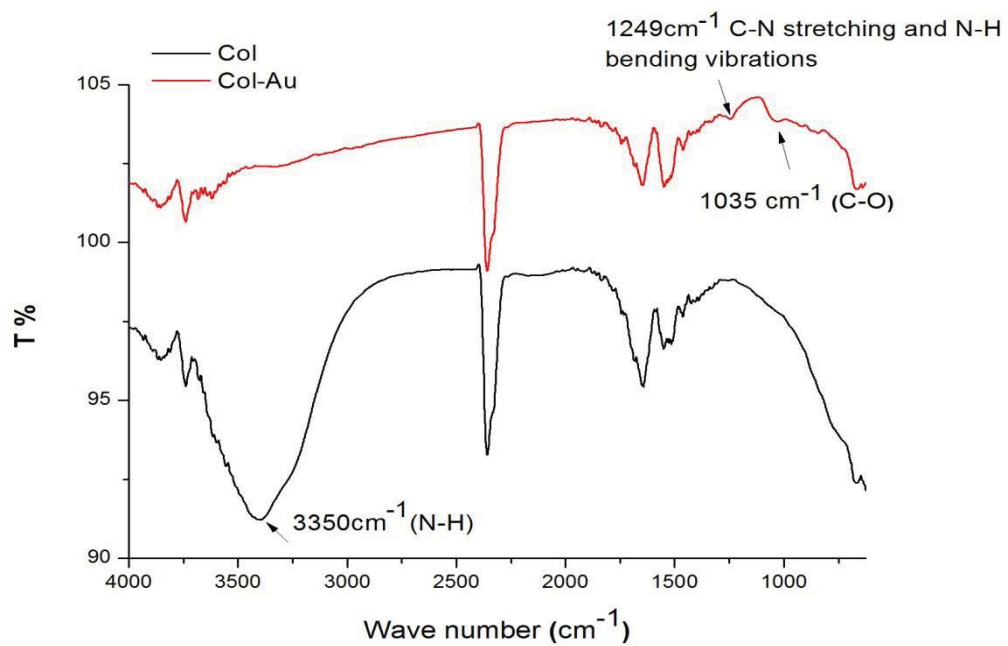
(b) Col-Au



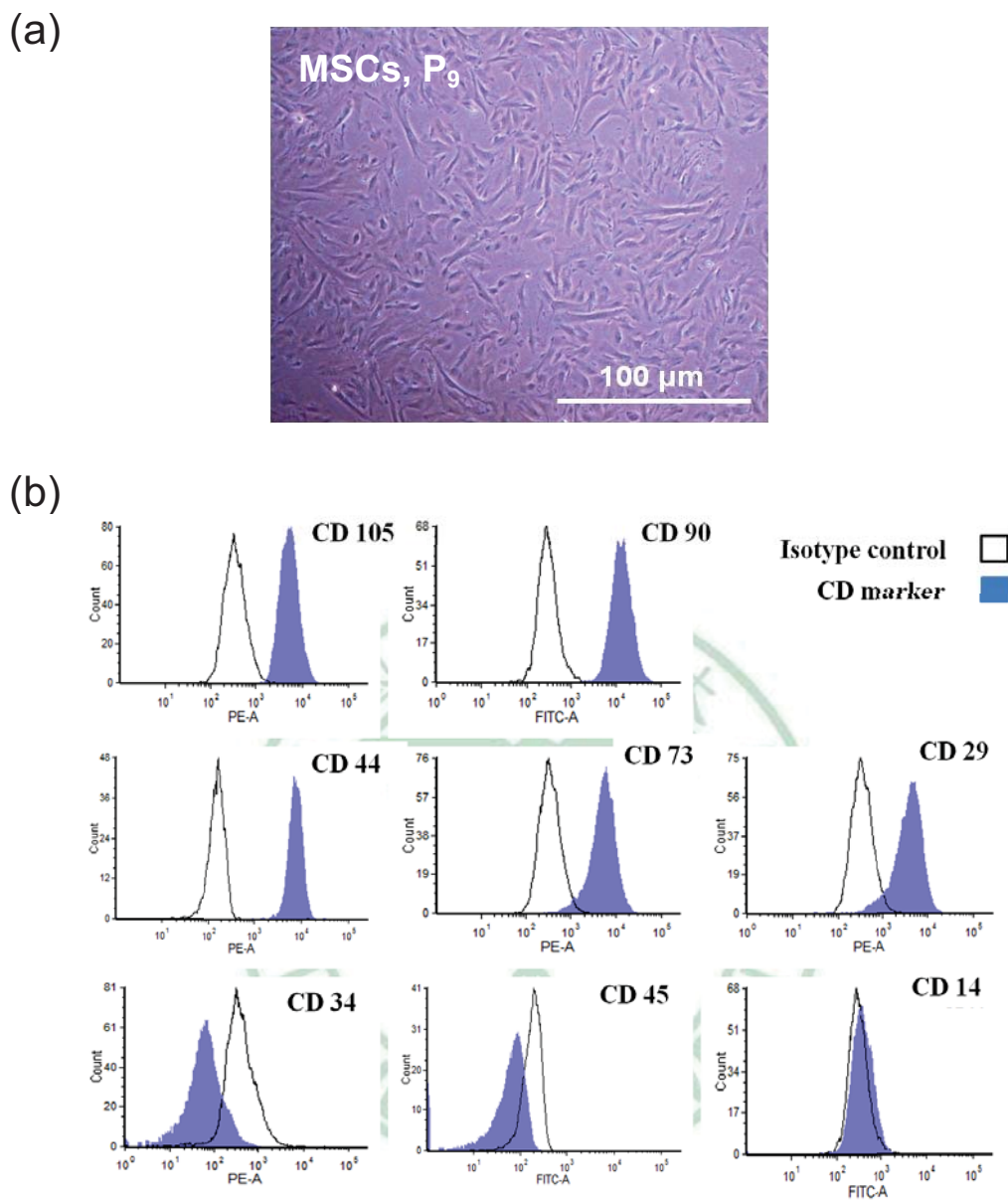
**Figure 1.** AFM images of surface topography. (left) and phase (right) for (a) pure Col, (b) Col–Au nanocomposites containing 43.5 ppm of gold nanoparticles,



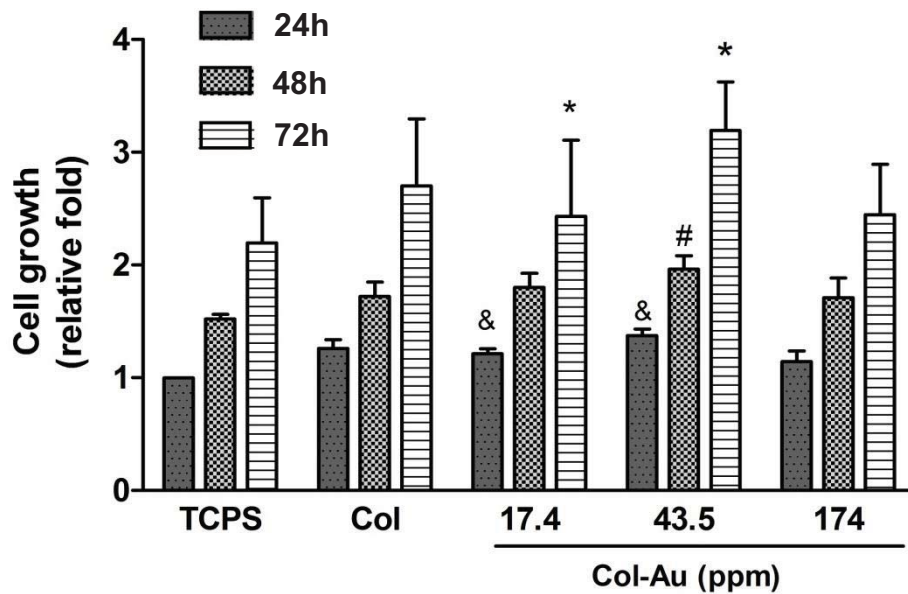
**Figure 2.** UV-Vis spectrophotometer spectra of Col and Col-Au nanocomposites. The pure Col, and Col-Au nanocomposites containing 43.5 ppm of Au nanoparticles were analyzed the absorbance wavelength by UV-Vis spectrophotometer



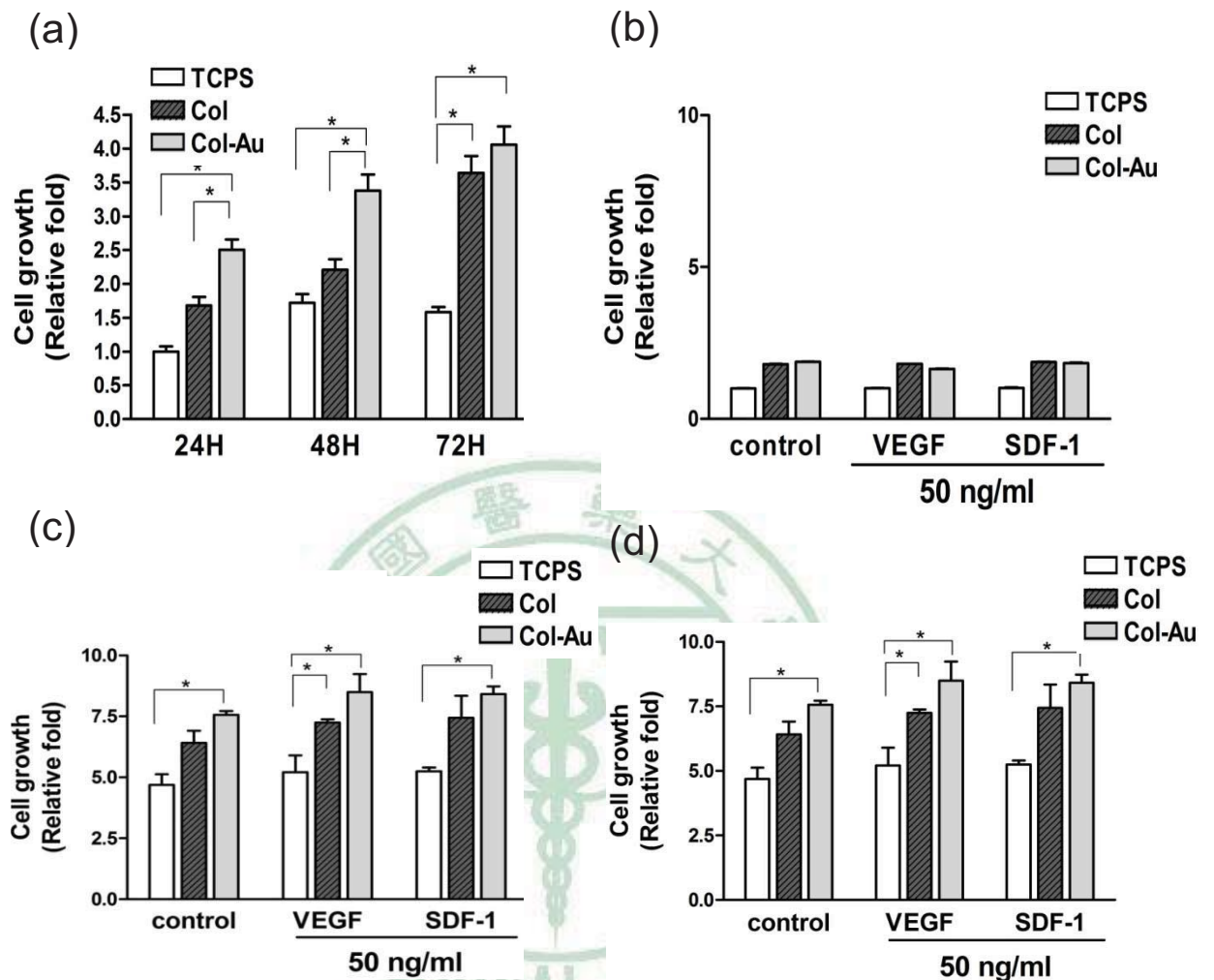
**Figure 3.** ATR-FTIR spectra of the Col and Col-Au nanocomposites. The pure Col, and Col-Au nanocomposites containing 43.5 ppm, of Au nanoparticles were analyzed by the ATR-FTIR.



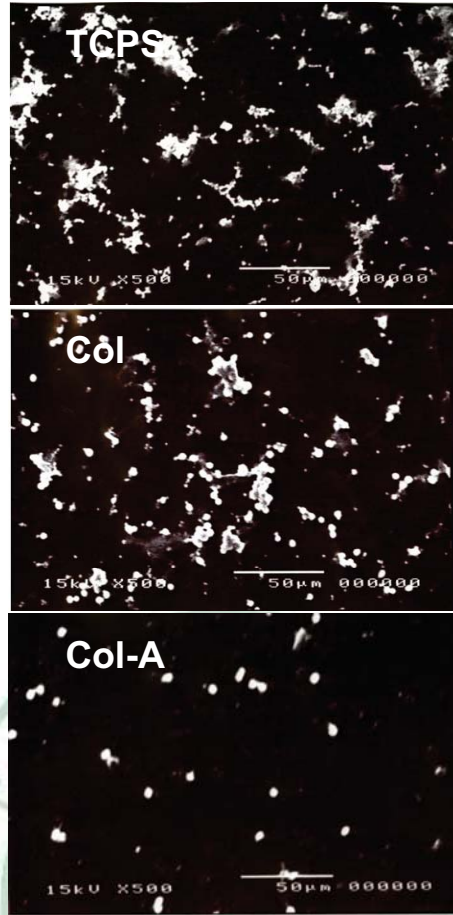
**Figure 4.** Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs). (a) Cell morphology of human umbilical cord MSCs by optical microscope. (b) Detection of MSCs specific makers expression by flow cytometry analysis. An open area represents an antibody isotype control for background fluorescence and a shaded area shows signal from MSCs surface maker. MSCs was stained with PE or FITC-conjugated antibody against the indicated makers : CD105-PE, CD90-PE, CD44-PE, CD73-PE, CD29-PE, CD34-PE, CD45-FITC and CD14-FITC. MSCs at passages 8-9. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 5.** MSCs proliferation was promoted by materials of various Au concentrations, where representative growth on different substrates was shown. MSCs proliferation on the surface of TCPS, Col and Col-Au containing 43.5 various concentration of Au nanoparticles Data are mean  $\pm$  SD. &:  $p < 0.05$ , greater than Col for 24h , #  $p < 0.05$ : greater than Col for 48h . \*  $p < 0.05$ : greater than Col for 72h .



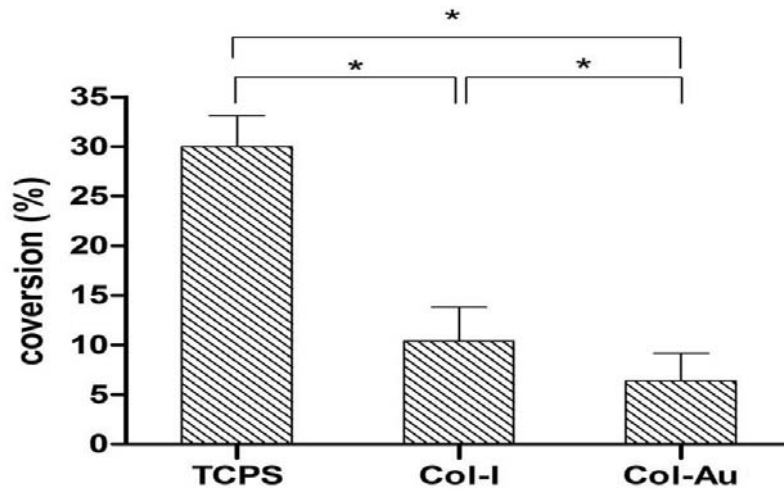
**Figure 6.** MSCs proliferation was promoted by substrates of Col-Au nanocomposites, (a) MSCs proliferation on the various materials for 24h, 48h, 72h .and (b) treatment with VEGF or SDF-1 respectively. Data are mean  $\pm$  SD. \*:  $p < 0.05$ , greater than TCPS for 24h , 48h, 72h .



Materials	Number of adhered platelets ( $\times 10^3$ )	Average degree of activation(0.0-1.0)
TCPS	3.00	$0.91 \pm 0.2$
Col (0.5mg/ml)	2.34	$0.63 \pm 0.1$
Col-Au (43.5ppm)	0.07	$0.19 \pm 0.01$

**Figure 7.** Platelet activation test. SEM images of platelets adhered onto various materials.

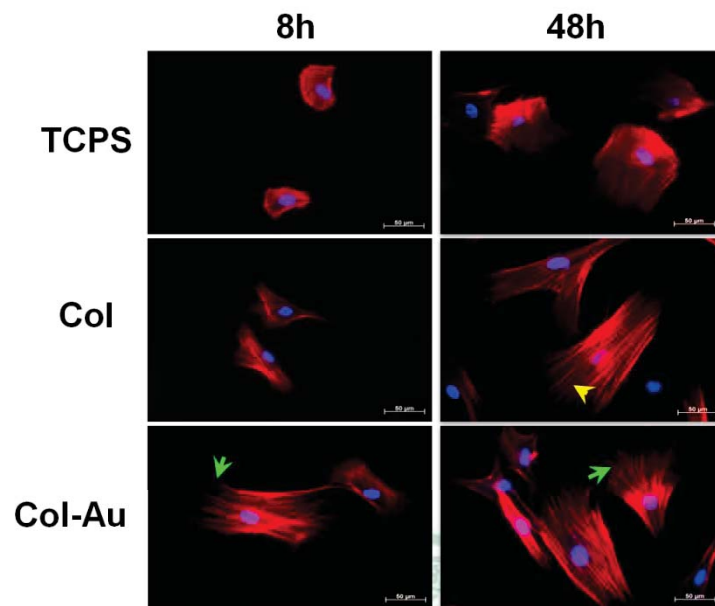




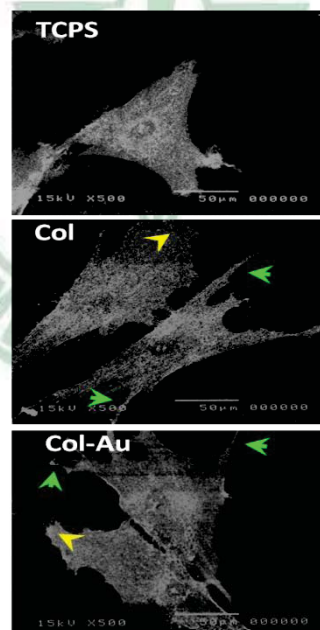
Materials	The number of monocytes( $\times 10^3$ )	The number of macrophages ( $\times 10^3$ )	Conversion yield (%)
TCPS	2.18 $\pm$ 0.3	0.94 $\pm$ 0.2	43.4 $\pm$ 0.7
Col (0.5mg/ml)	2.26 $\pm$ 0.5	0.24 $\pm$ 0.02	10.95 $\pm$ 0.8
Col-Au (43.5ppm)	2.46 $\pm$ 0.5	0.28 $\pm$ 0.05	7.48 $\pm$ 0.6

**Figure 8.** Human monocytes adhered and activated on TCPS, Col and Col-Au after 96 h culture. Col–Au 43.5 ppm had the lowest percentage conversion were comparable in the extent of activation for monocytes \*:  $p < 0.05$ , greater than TCPS.

(a). Phalloidin staining

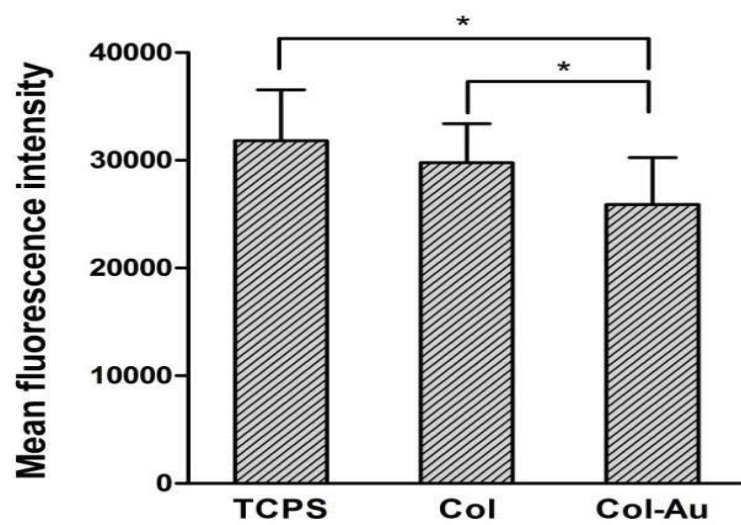


(b). Scanning Electron Microscopy (SEM) images

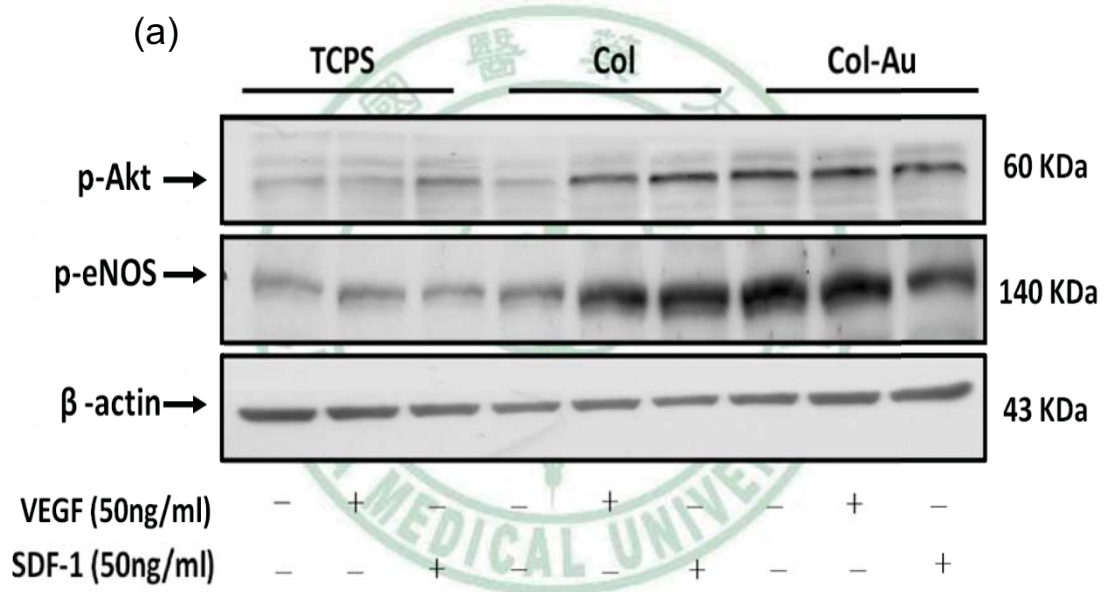


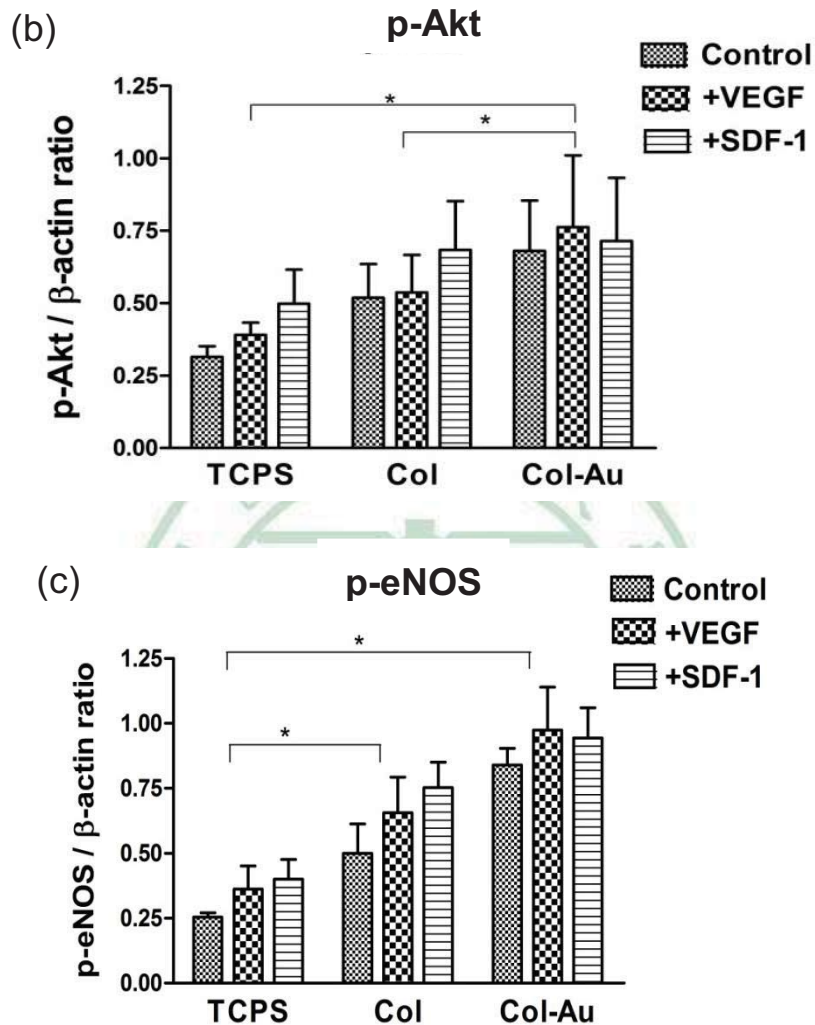
Filopodia / Lamellipodia / DAPI / Actin

**Figure 9.** Cell morphology and adhesion ability. Adhesion ability of MSCs on the different materials. (a) The rhodamine phalloidin staining of actin fiber and (b) SEM images was showed. Yellow arrow: filopodia, Green arrow : lamellipodia , blue color: Nucleus, Red color: Actin



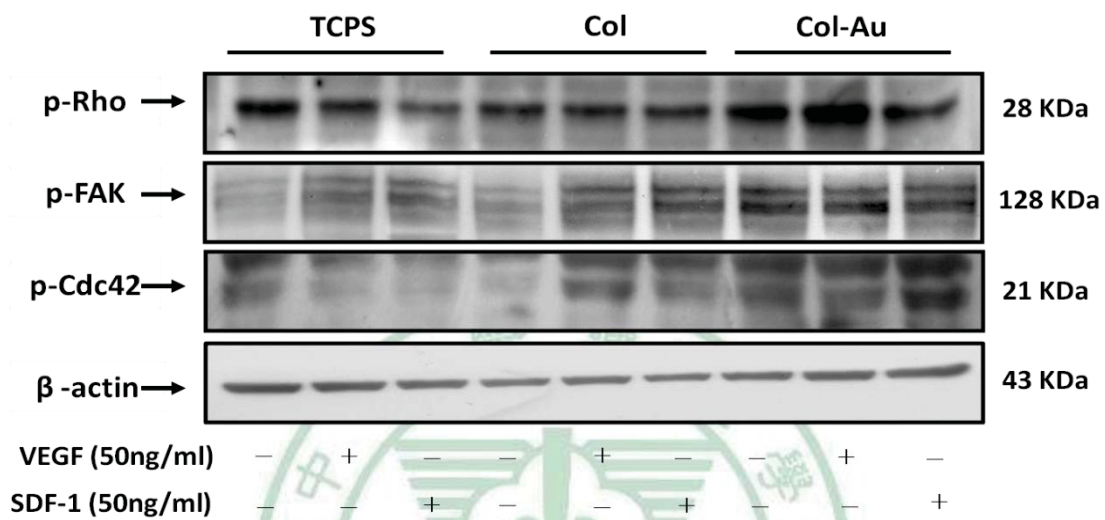
**Figure 10.** Reactive oxygen species (ROS) level detected by 2'7'-dichlorodihydrofluorescein of flow cytometry in MSCs culture on the TCPS, Col, Col-Au. Data are mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  : greater than TCPS



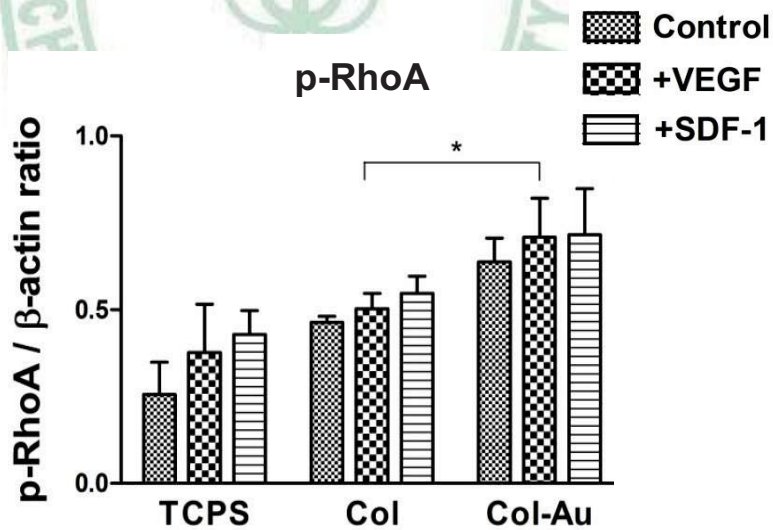


**Figure 11.** The expressions of (a) p-Akt and p-eNOS proteins of MSCs cultured on the TCPS, Col, Col-Au for 48 h . (b,c) Semi-quantitative measurement of Western blots for MSCs cultured on Col–Au showed significantly increased p-Akt and p-eNOS expressions compared with TCPS. Data are mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  : greater than TCPS.

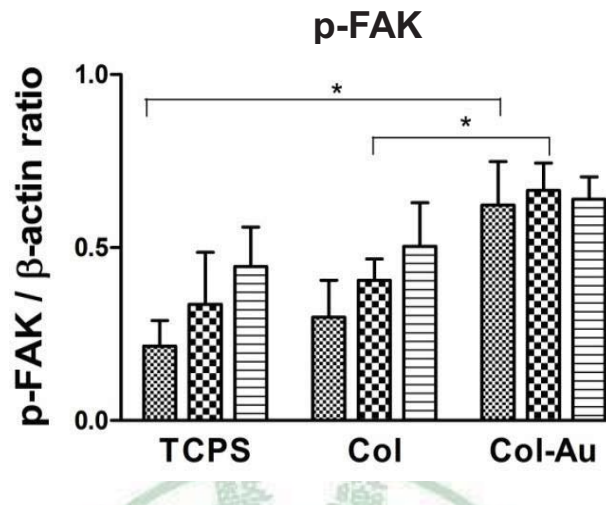
(a)



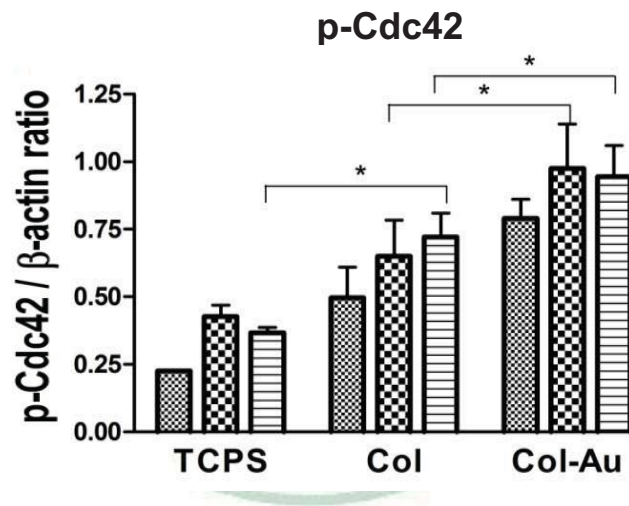
(b)



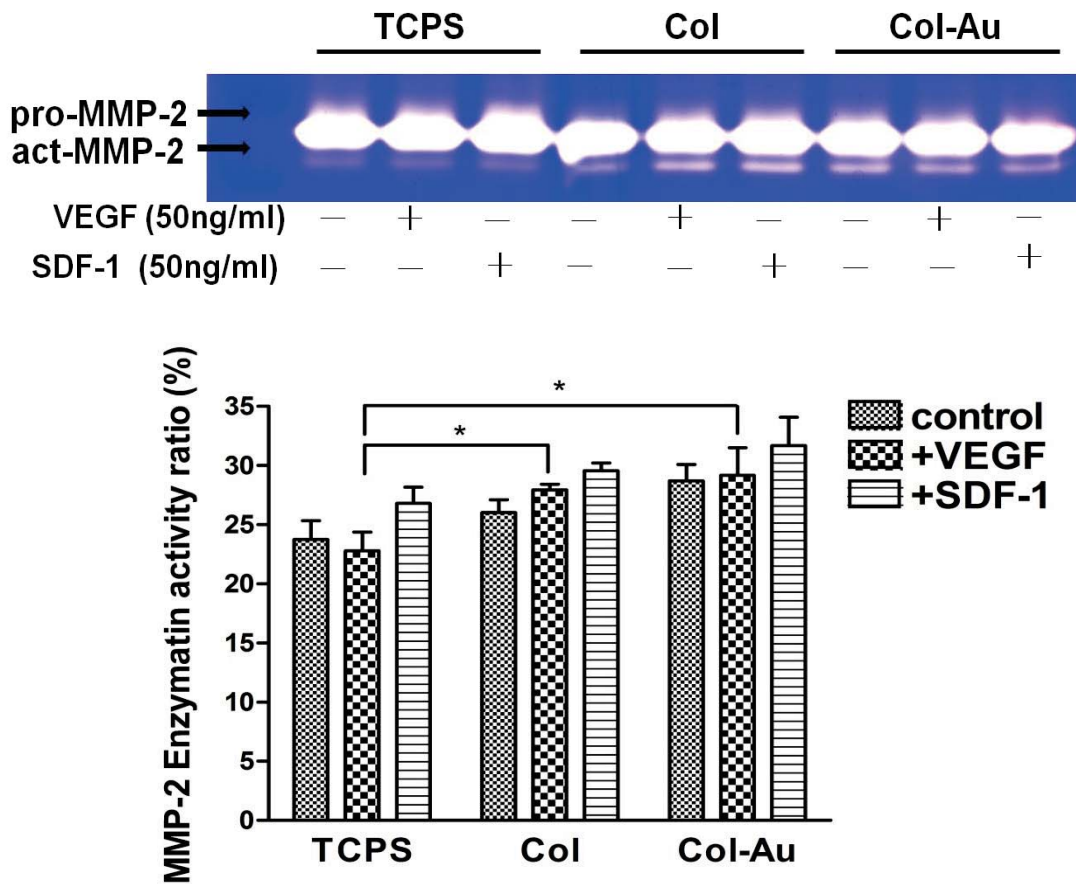
(c)



(d)

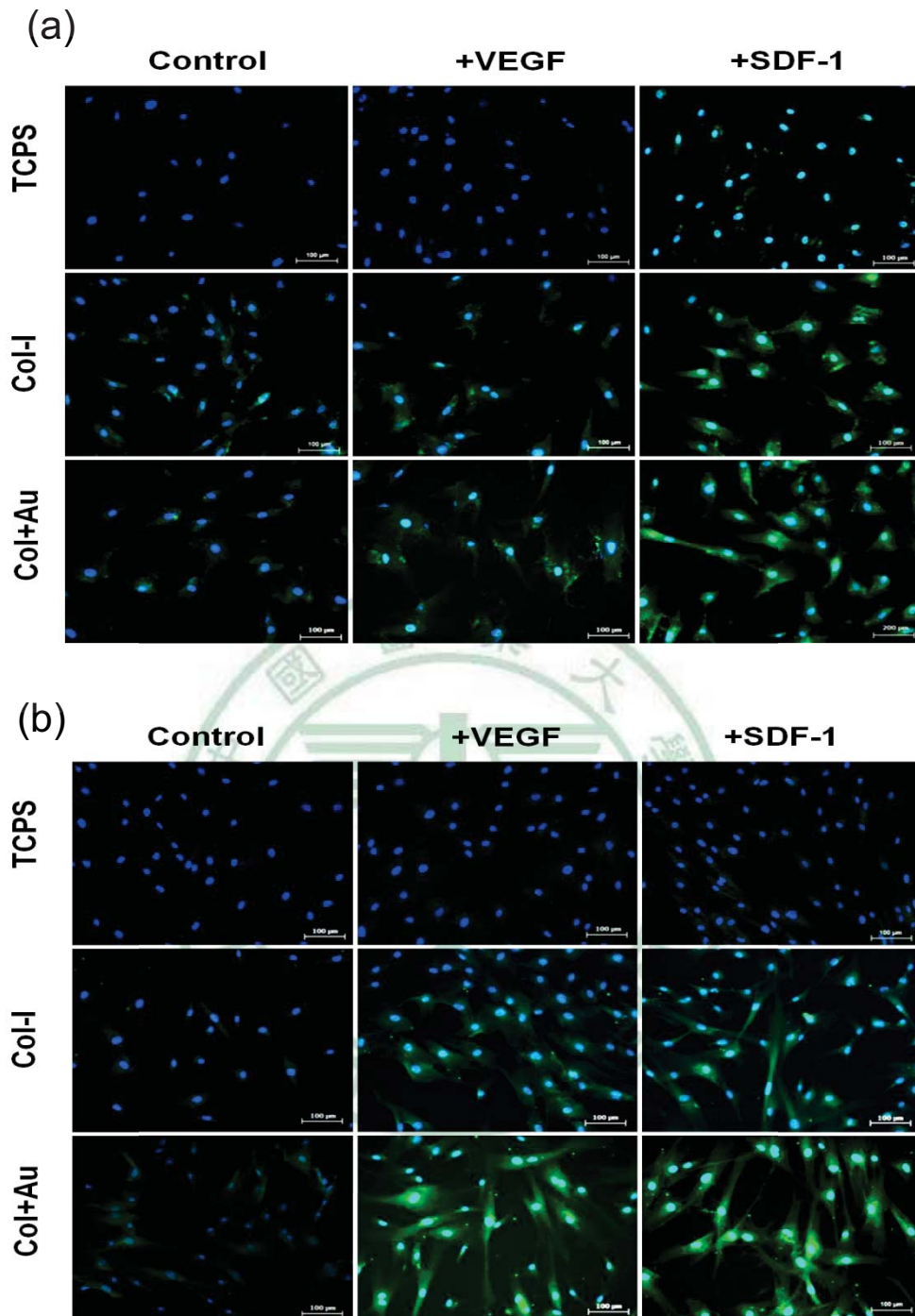


**Figure 12.** The expressions of (a) p-FAK, p-Cdc42 and p-RhoA proteins of MSCs cultured on the TCPS, Col, Col-Au for 48 h . (b,c,d) Semi-quantitative measurement of Western blots for MSCs cultured on Col-Au showed significantly increased p-FAK, p-Cdc42 and p-RhoA expressions compared with TCPS. Data are mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  : greater than TCPS.

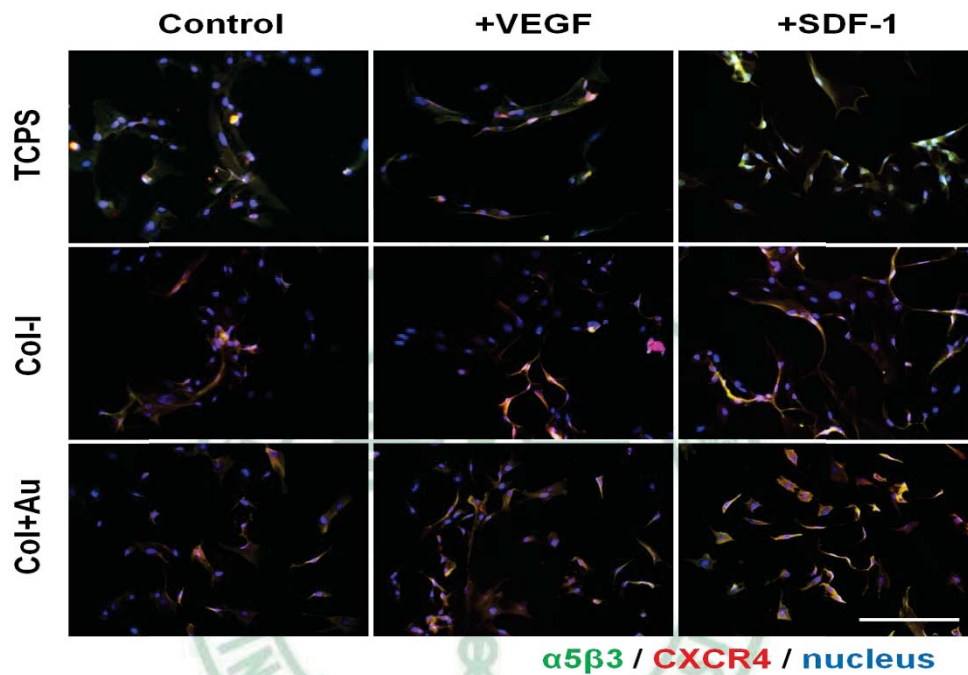


**Figure 13.** The MMP enzymatic activity of MSCs on various materials after VEGF or SDF-1 treatment for 48h. Gelatin zymography analysis of MMP-2 activity that was specificity on Col-Au. Data are mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  : greater than TCPS.

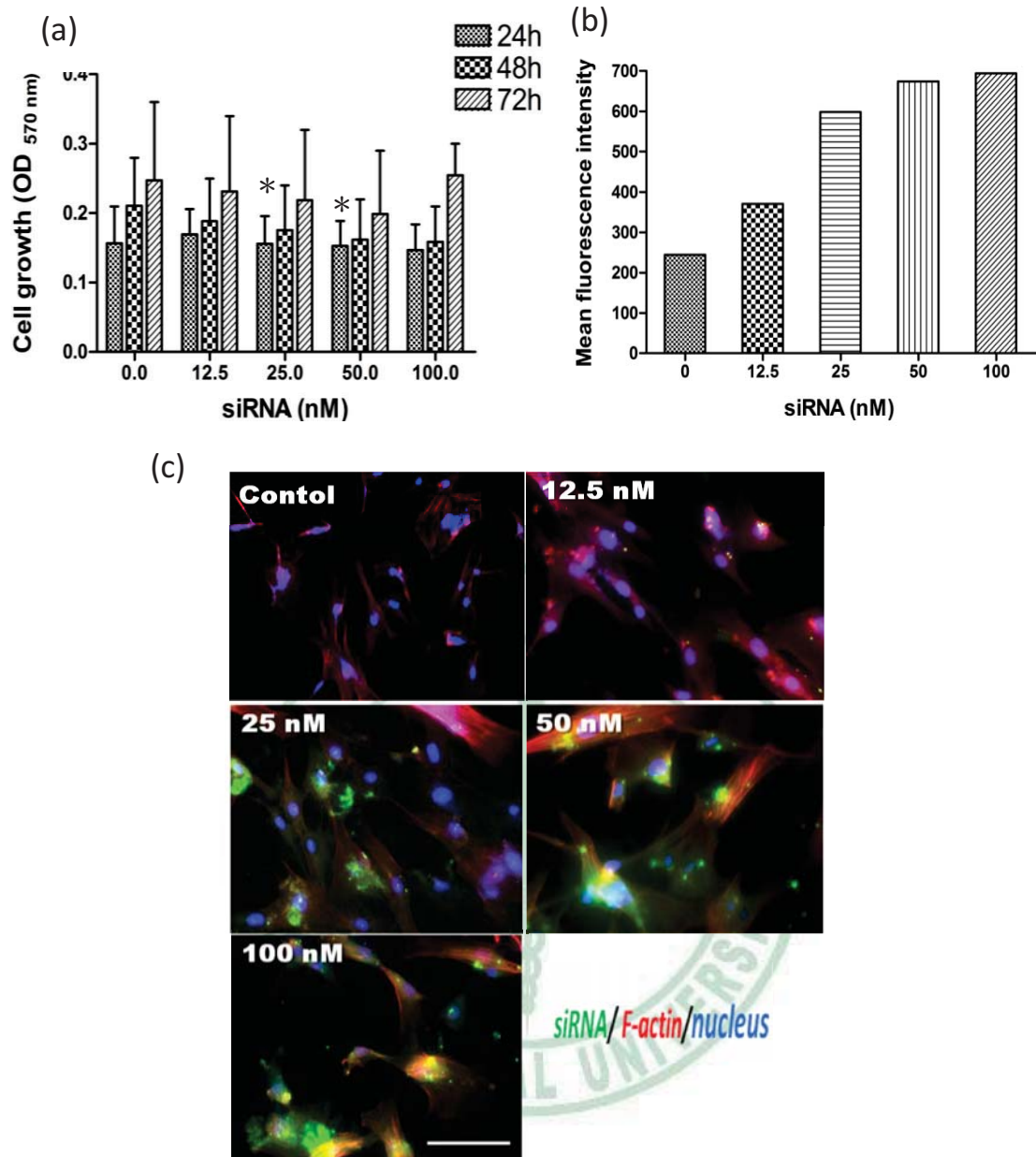




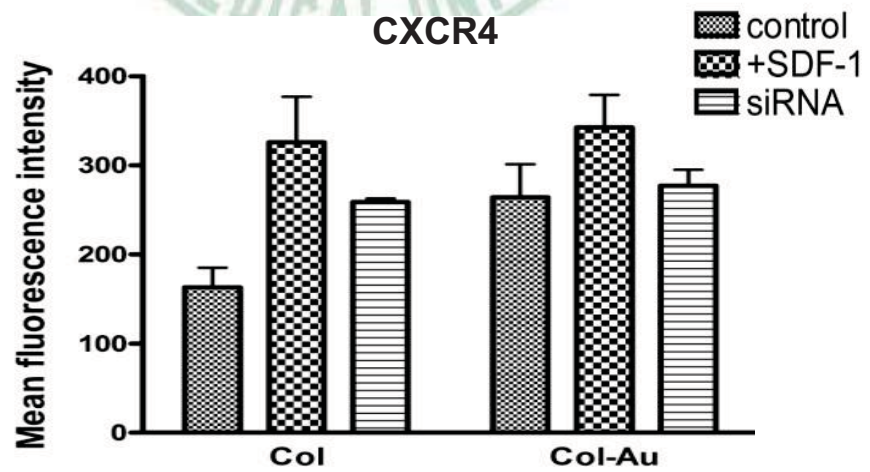
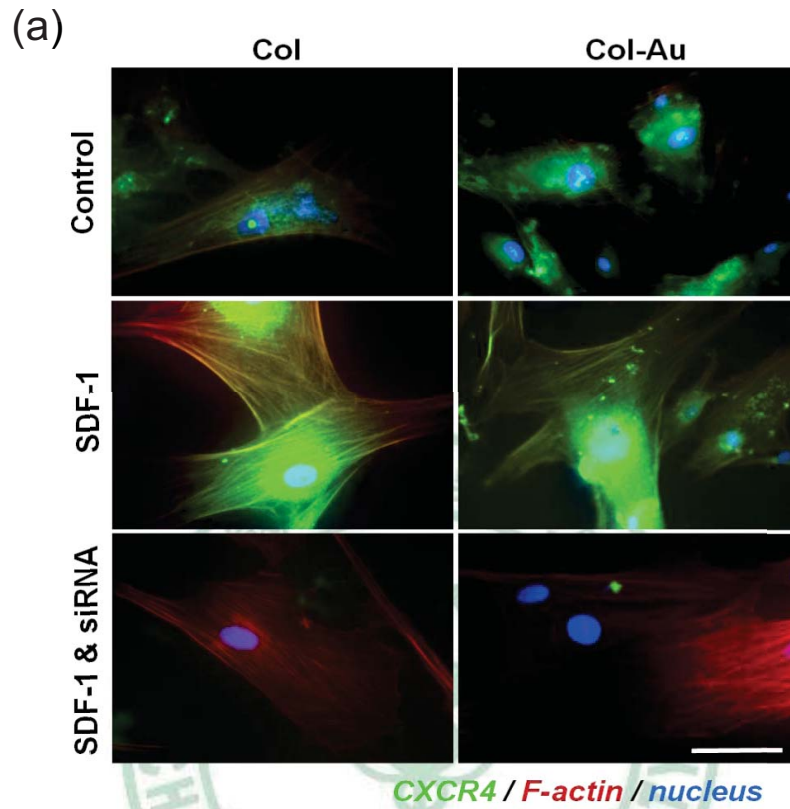
**Figure 14.** eNOS expression of MSCs on various materials after VEGF or SDF-1 stimulation for (a) 24 h and (b) 48 h that were visualized by fluorescent microscopy. Cells were incubated with primary anti-eNOS antibody followed by stained with FITC-conjugated immunoglobulin (green color fluorescence). Bar = 100  $\mu$ m.

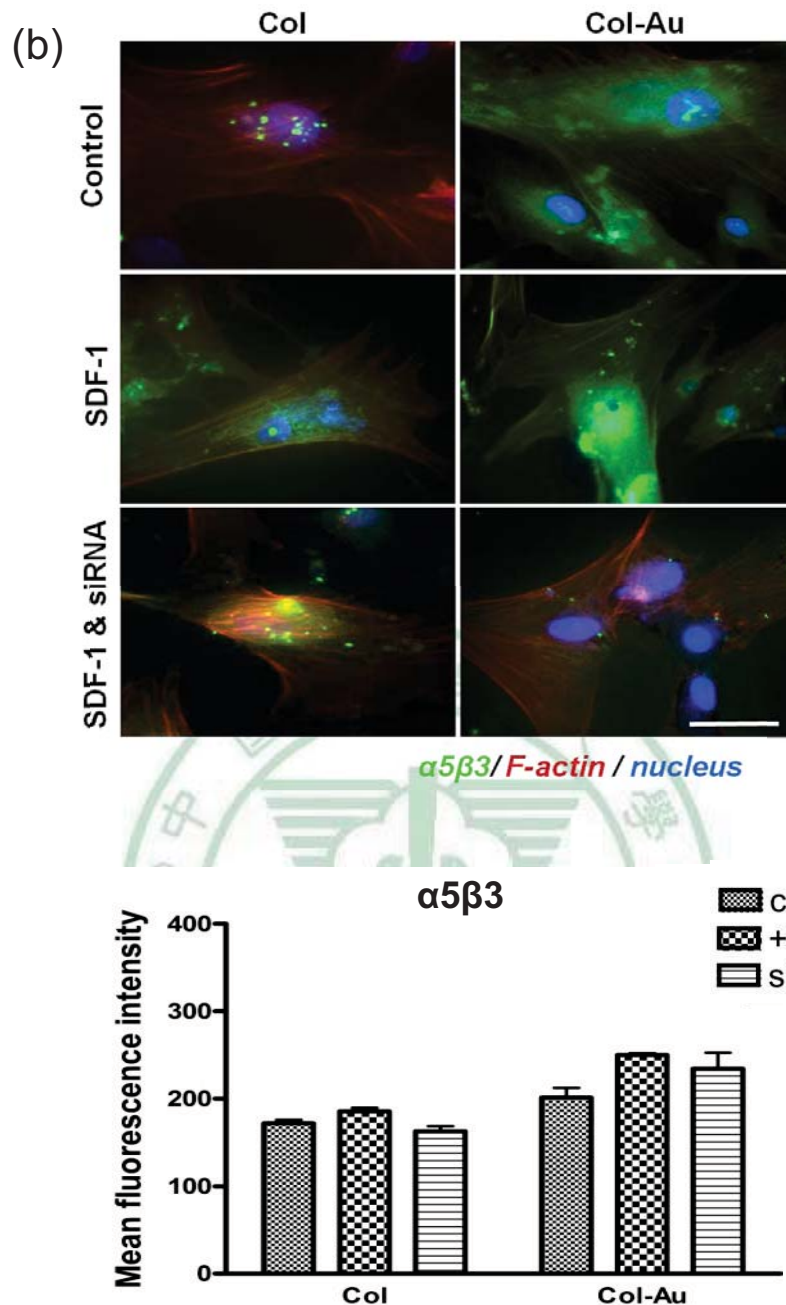


**Figure 15.**  $\alpha 5\beta 3$  and CXCR4 expression of MSCs on various materials by using VEGF or SDF-1 treatment for 48h that were visualized by fluorescent microscopy. Cells were incubated with primary anti- $\alpha 5\beta 3$  and anti-CXCR4 antibody followed by stained with FITC-conjugated ( $\alpha 5\beta 3$ ) and Cy5.5 (CXCR4) immunoglobulin . scale bar = 100um.

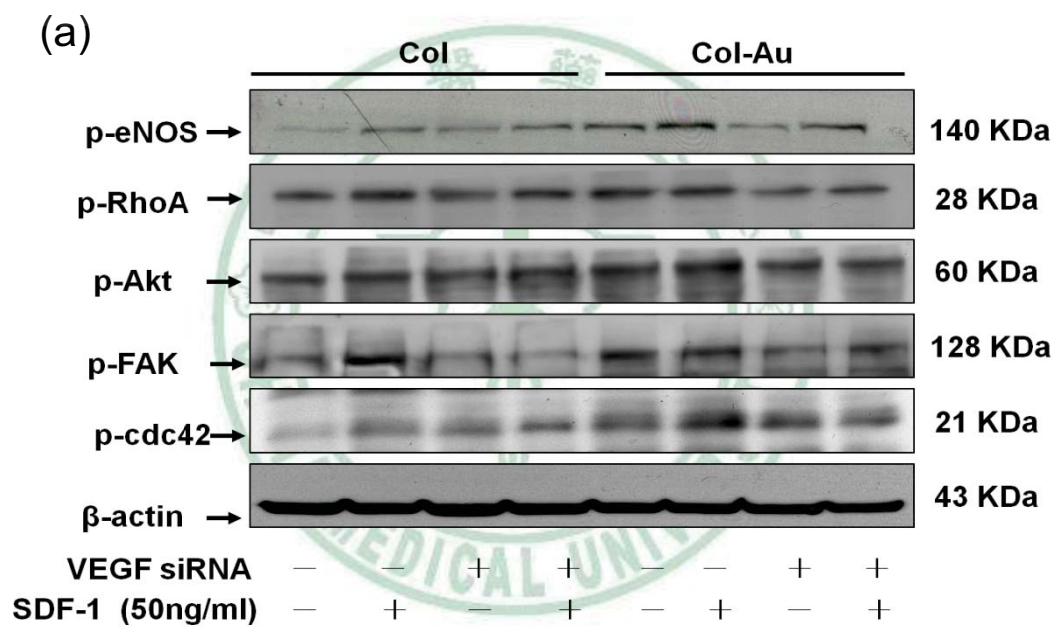


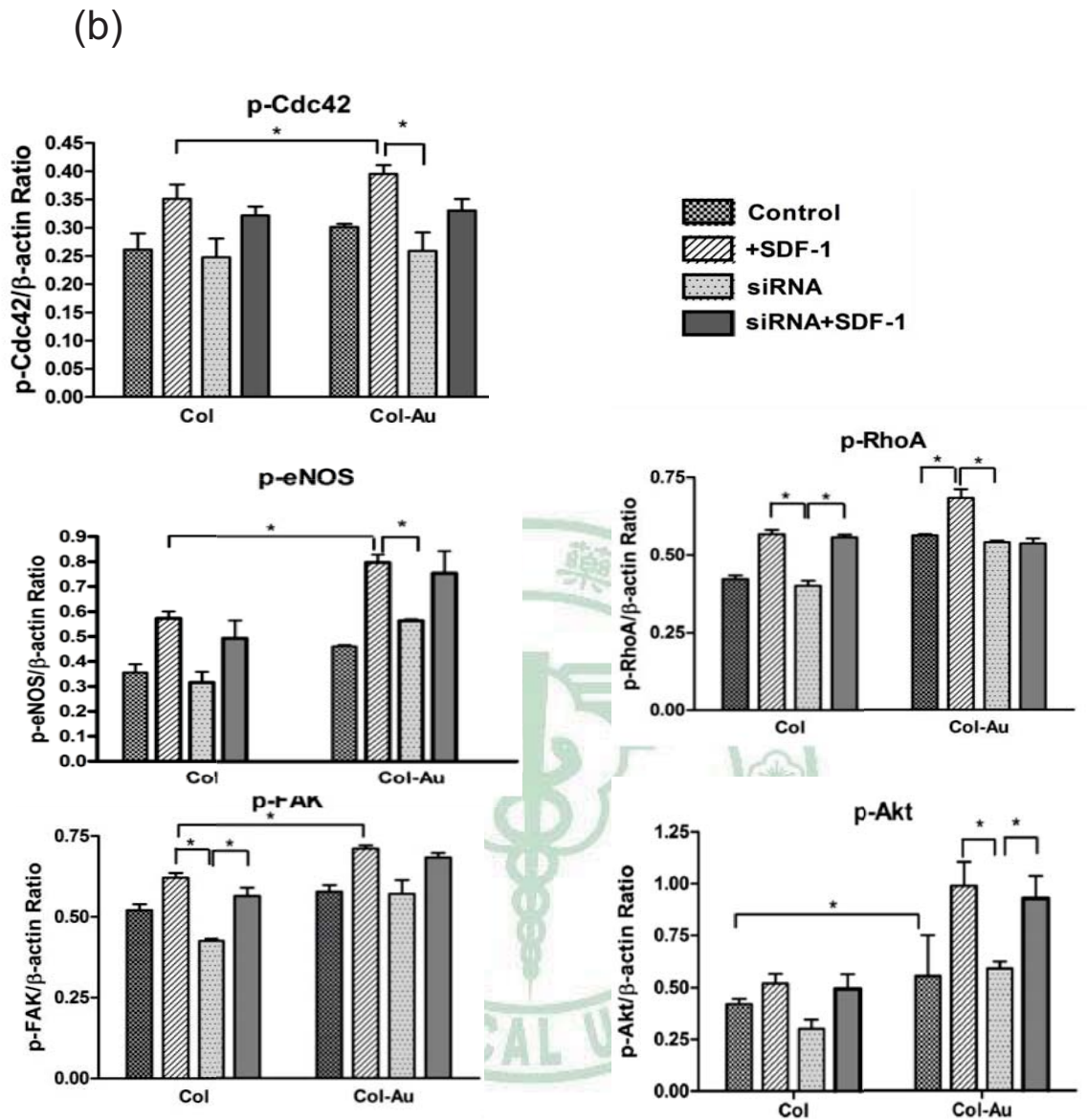
**Figure 16.** Concentration of transfected siRNA. The optimal concentration of transfected siRNA labelled with fluorescence. (a) The cell viability of MSCs after treated with different concentrations of scramble siRNA for 24, 48 and 72 hr by MTT assay. Data are mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  : greater than control (b) scramble siRNA expression were analyzed by a flow cytometry. scramble siRNA FITC-conjugated immunoglobulin (c)The efficacy of MSCs transfected with siRNA by fluorescence labeling (siRNA/FITC, F-actin/phalloidin, Nuclei/DAPI). (scale bar = 100 $\mu$ m)



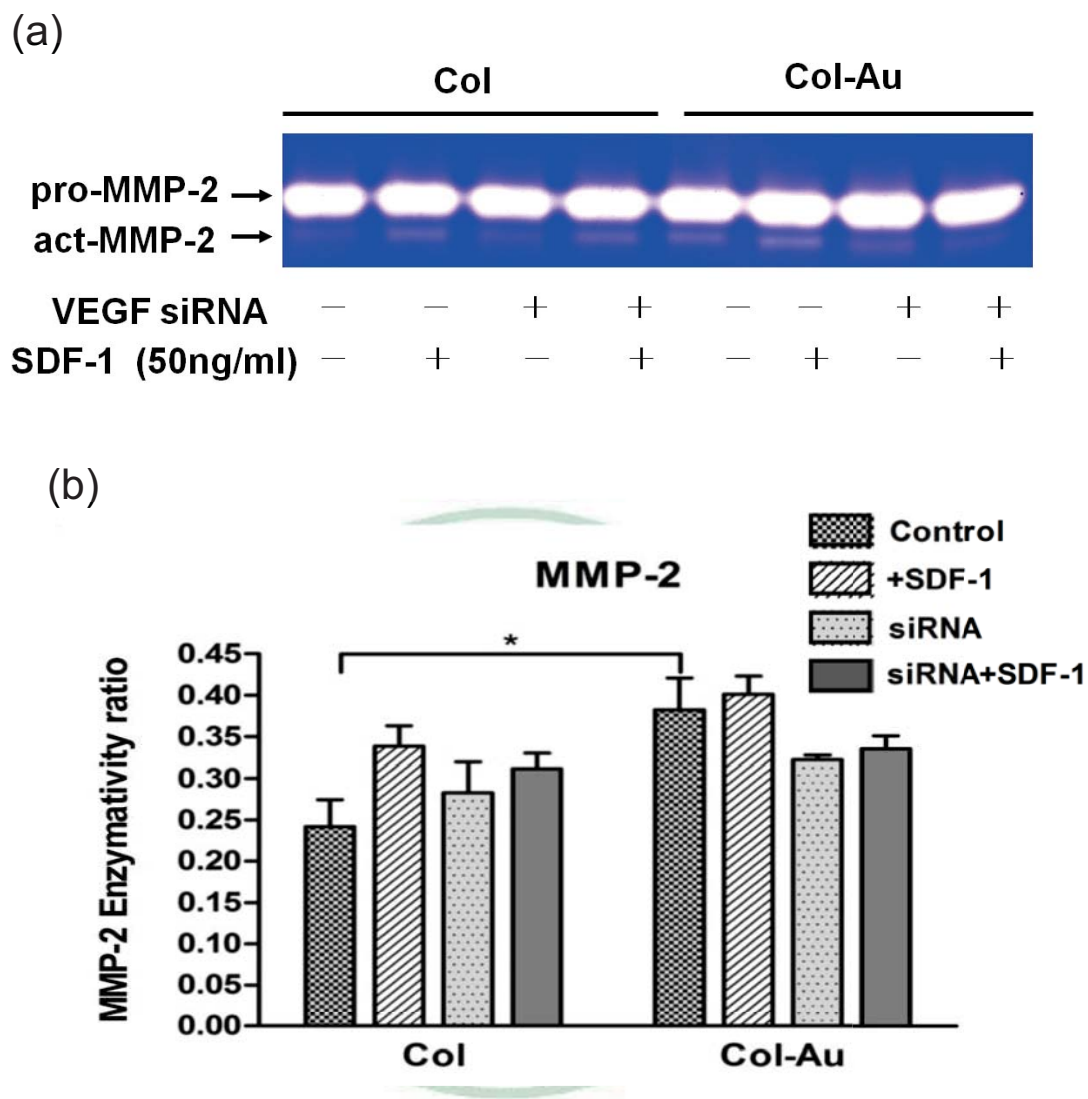


**Figure 17.** SDF-1 stimulated migration of MSCs on Col-Au through  $\alpha 5\beta 3$  and CXCR4. Pretreatment with VEGF siRNA of MSCs and stimulated with or without SDF-1 (50 ng/mL) for 48h. (a)  $\alpha 5\beta 3$  and CXCR4 expression of MSCs on Col and Col-Au by immunofluorescence. (b)  $\alpha 5\beta 3$  and CXCR4 expression were analyzed by a flow cytometry  $\alpha 5\beta 3$  and CXCR4: FITC-conjugated immunoglobulin (green color fluorescence), F-actin : rhodamine phalloidin staining (red color staining), cell nuclear : DAPI (blue color staining) (scale bar = 50 $\mu$ m).





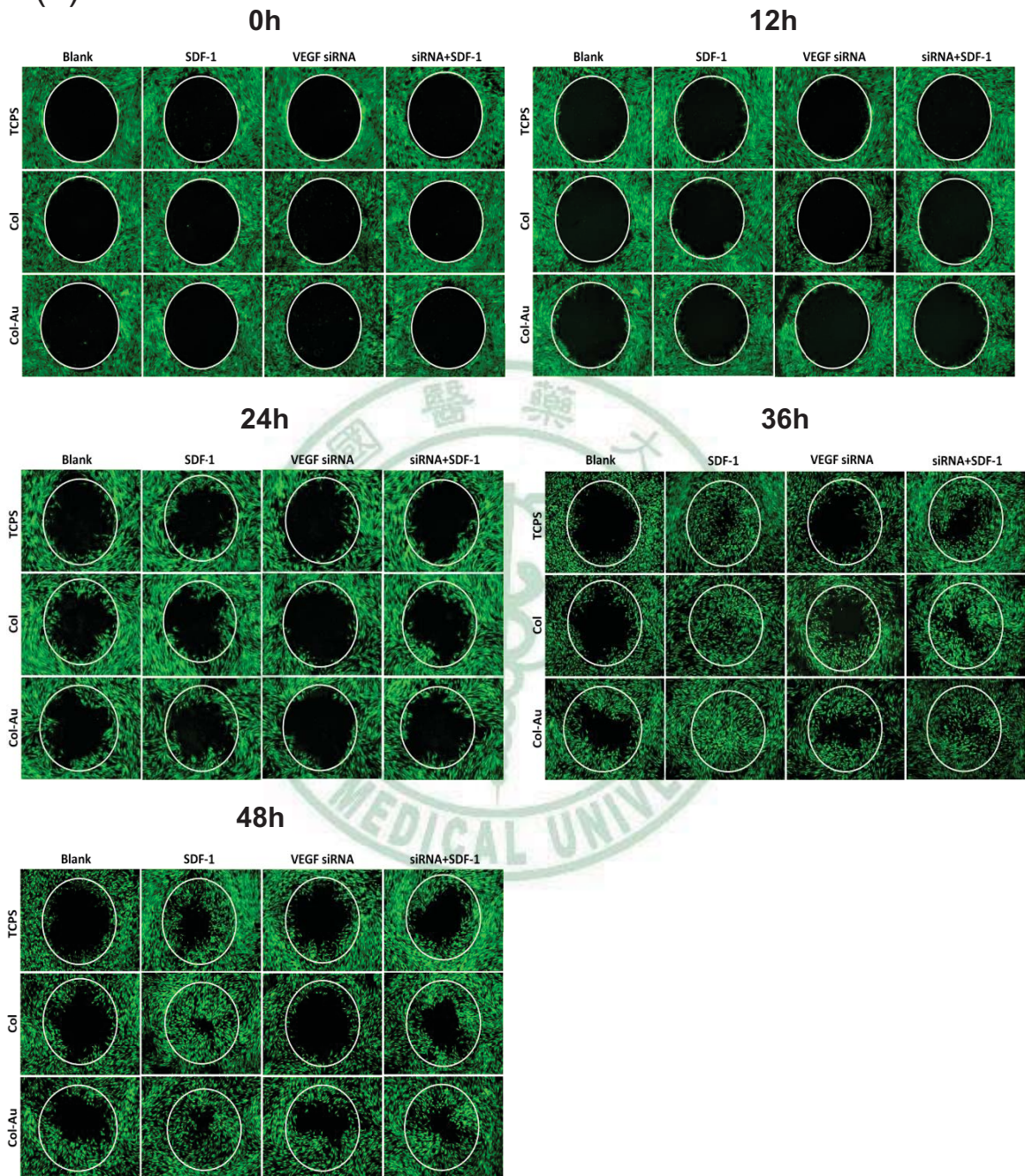
**Figure 18.** The expressions of (a) eNOS, p-RhoA, p-Akt, p-FAK and p-Cdc42 proteins were induced by Col-Au. Pretreatment with VEGF siRNA of MSCs and stimulated with or without SDF-1 (50 ng/mL) for 48h. (b) Semi-quantitative measurement of Western blots for MSCs cultured on Col-Au showed significantly increased eNOS, p-Akt, p-FAK and p-RhoA expressions compared with Col. Data are mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  : greater than control.



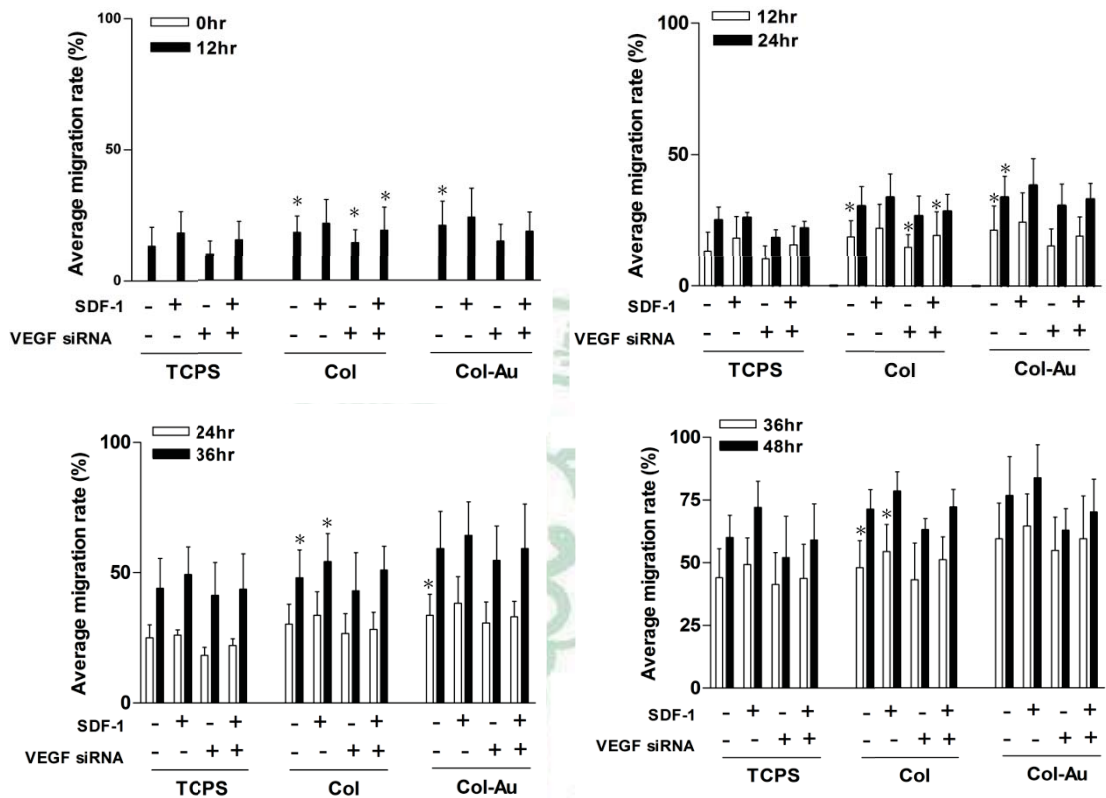
**Figure 19.** The MMP-2 enzymatic activity of MSCs culture on the Col and Col-Au.(a) Transfect VEGF siRNA and treatment with or without SDF-1 (50 ng/mL) to analyze VEGF stimulated MMP-2 expression. (b) Semi-quantitative measurement of Gelatin zymography analysis for MSCs cultured on Col–Au. Data are mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  : greater than control.



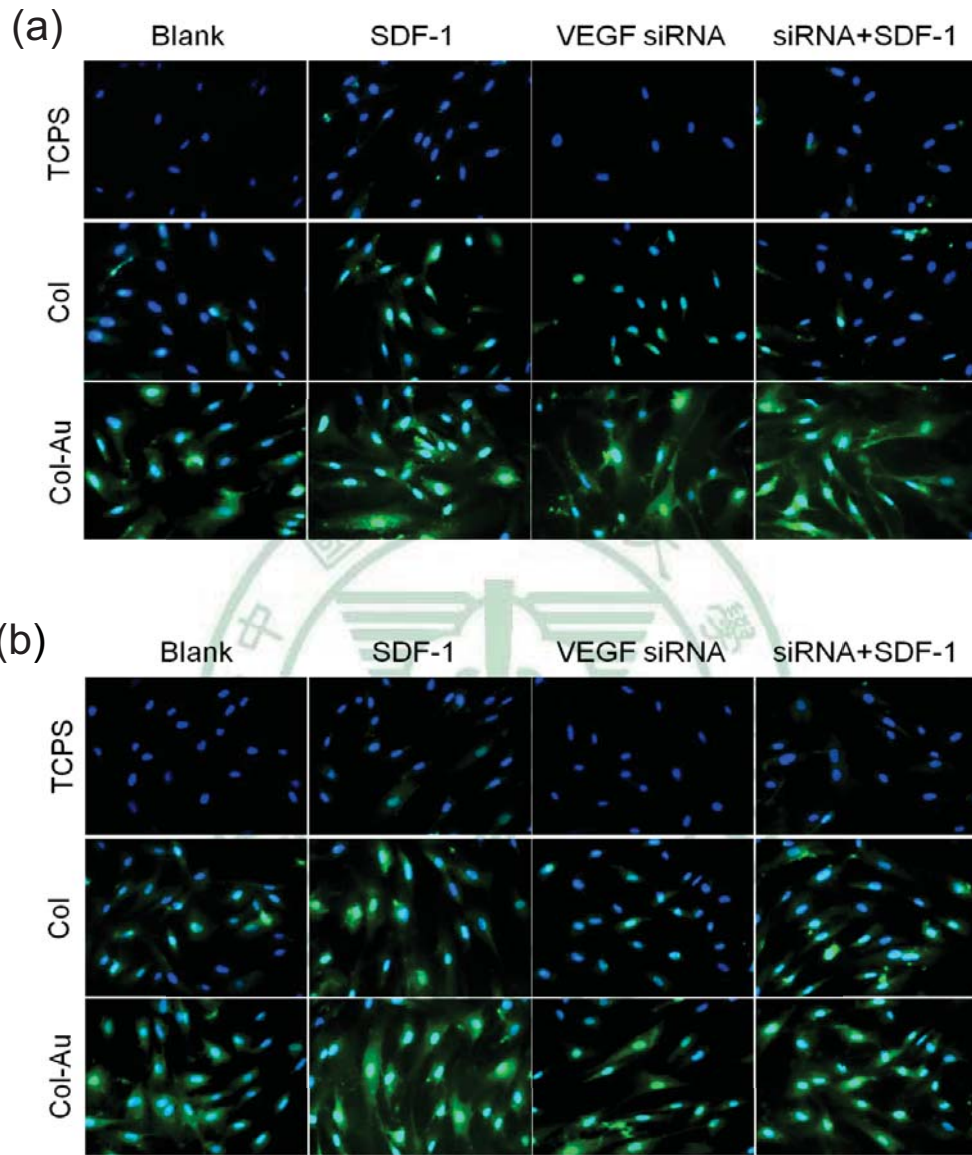
(a)



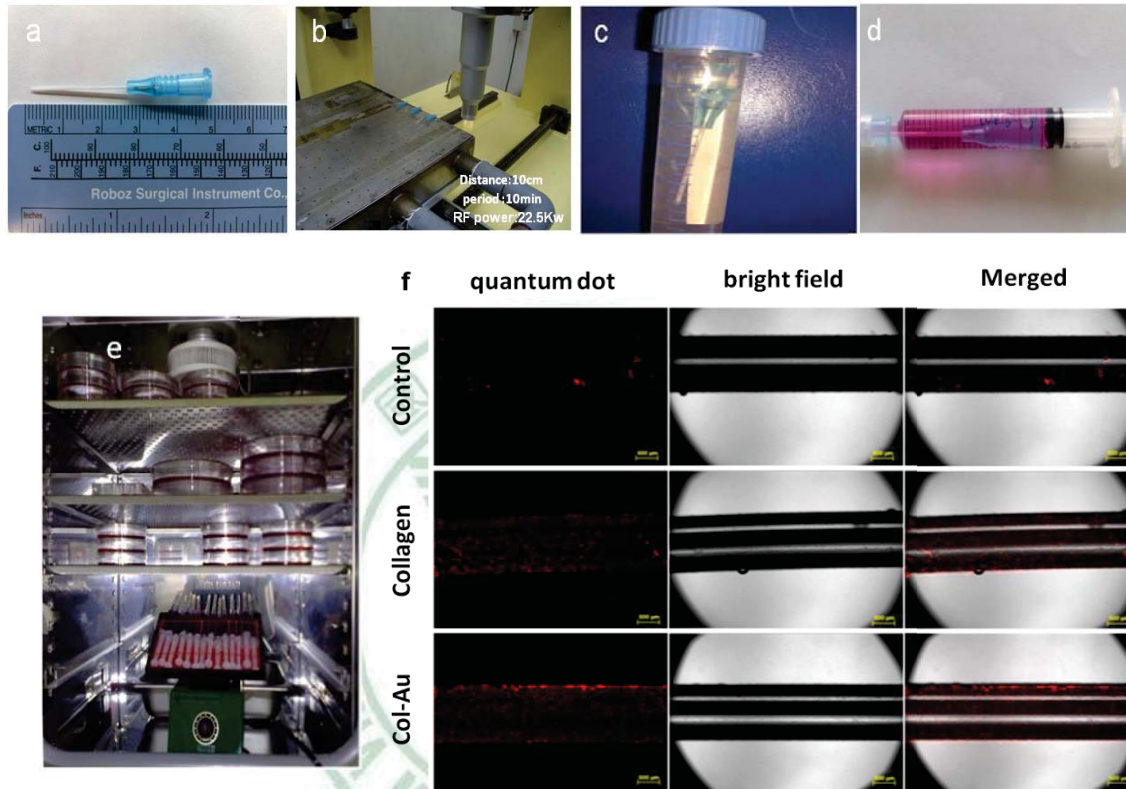
(b)



**Figure 20.** The average cell migration distance of MSCs on different substrates in a period of 48 h. MSCs transfected with VEGF siRNA and stimulated with or without SDF-1 (50 ng/mL) for (a) 0, 12, 24, 36 and 48 h by using immunofluorescence microscopy. (b) Columns, mean of three separate experiments.  $p < 0.05$ : greater than control (TCPS).

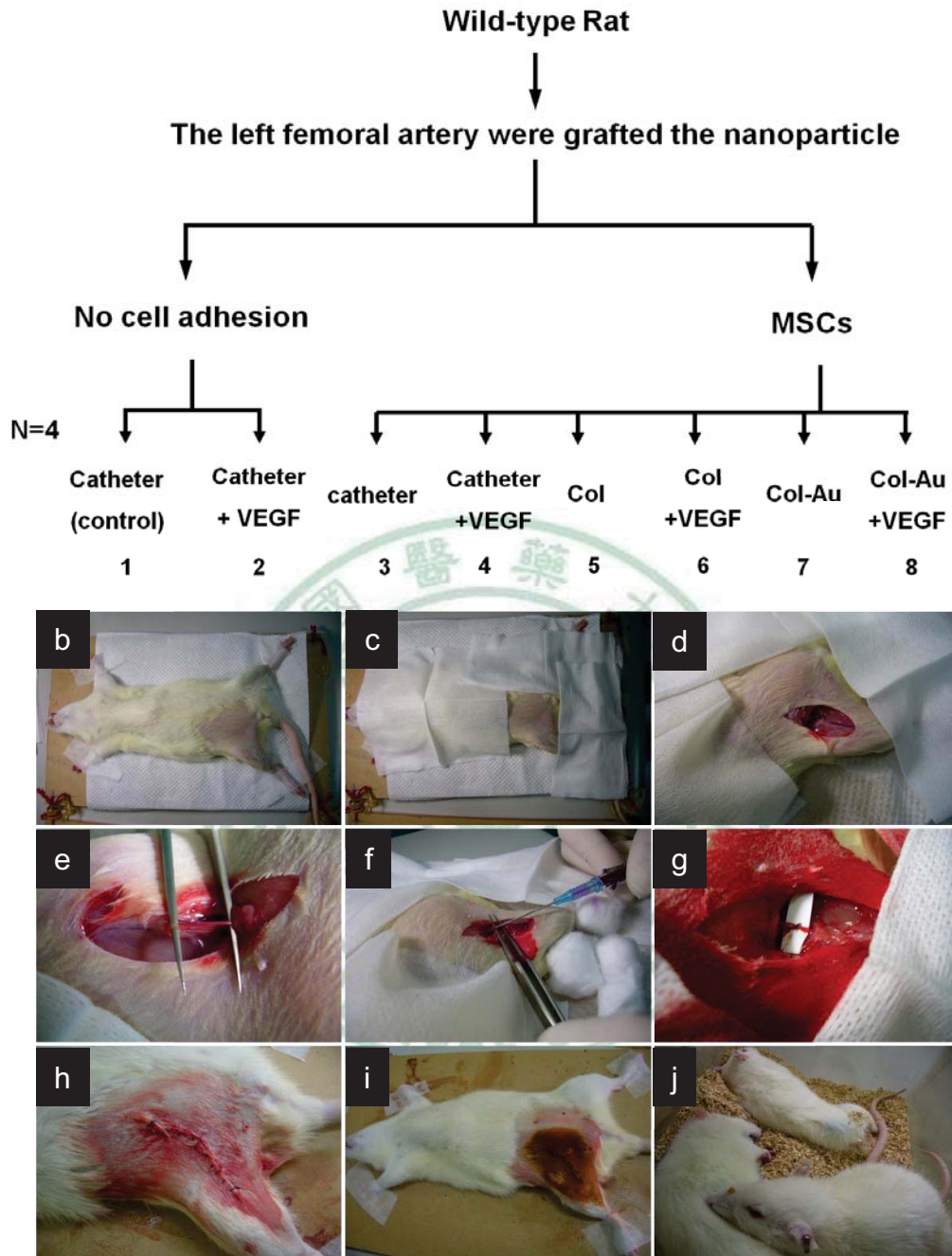


**Figure 21.** The expressions of eNOS proteins were induced by Col-Au. Pretreatment with VEGF siRNA of MSCs and stimulated with or without SDF-1 (50 ng/mL) for (a) 24hr (b) 48h that were visualized by fluorescent microscopy. Cells were incubated with primary anti-eNOS antibody followed by stained with FITC-conjugated immunoglobulin (green color fluorescence). Bar = 100  $\mu$ m.



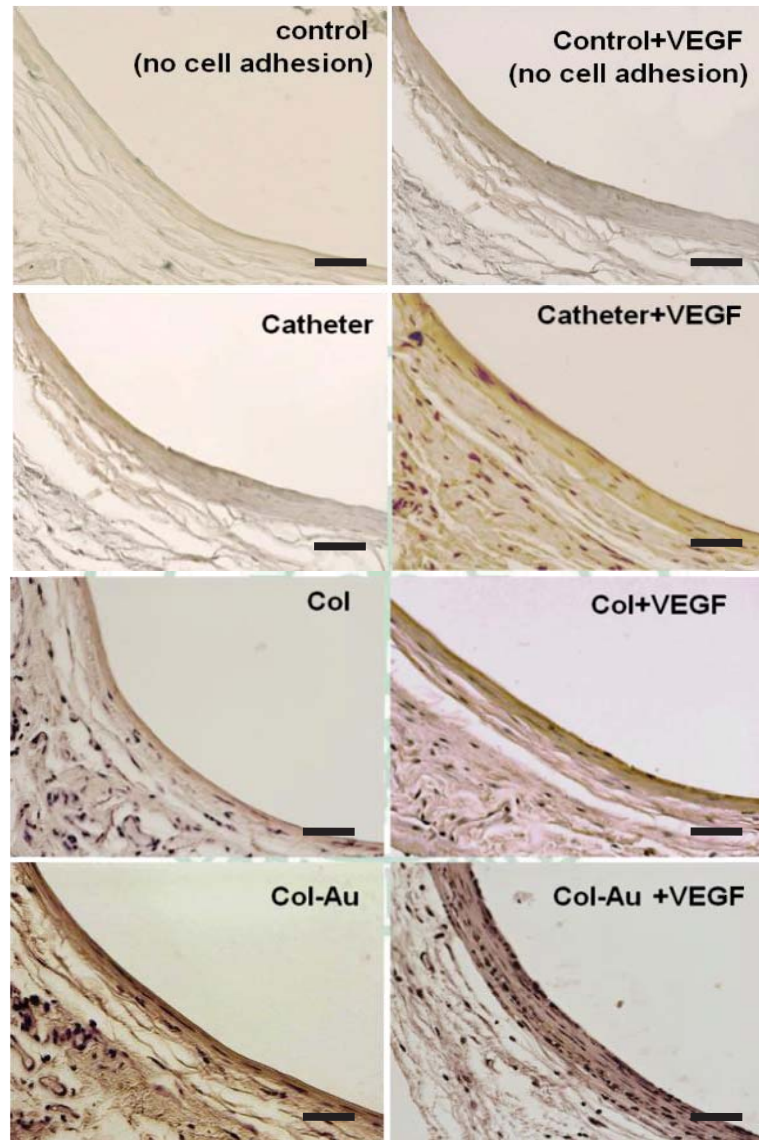
**Figure 22.** Preparation of vascular graft .Construction and examination of tissue-engineered blood vessel graft in vitro. (a) longitudinal view of the catheter (22G needle, 30mm) ◦ (b,c) The Col and Col-Au coating on catheters, the outer surface of the catheters was first activated by air plasma (d)(e) Dynamic culture of MSCs on vascular graft the for 48h . (f) quantum dot label of MSCs indicating that most of the seeded cells (culture for 48 h) were distributed on the surface of vascular graft.

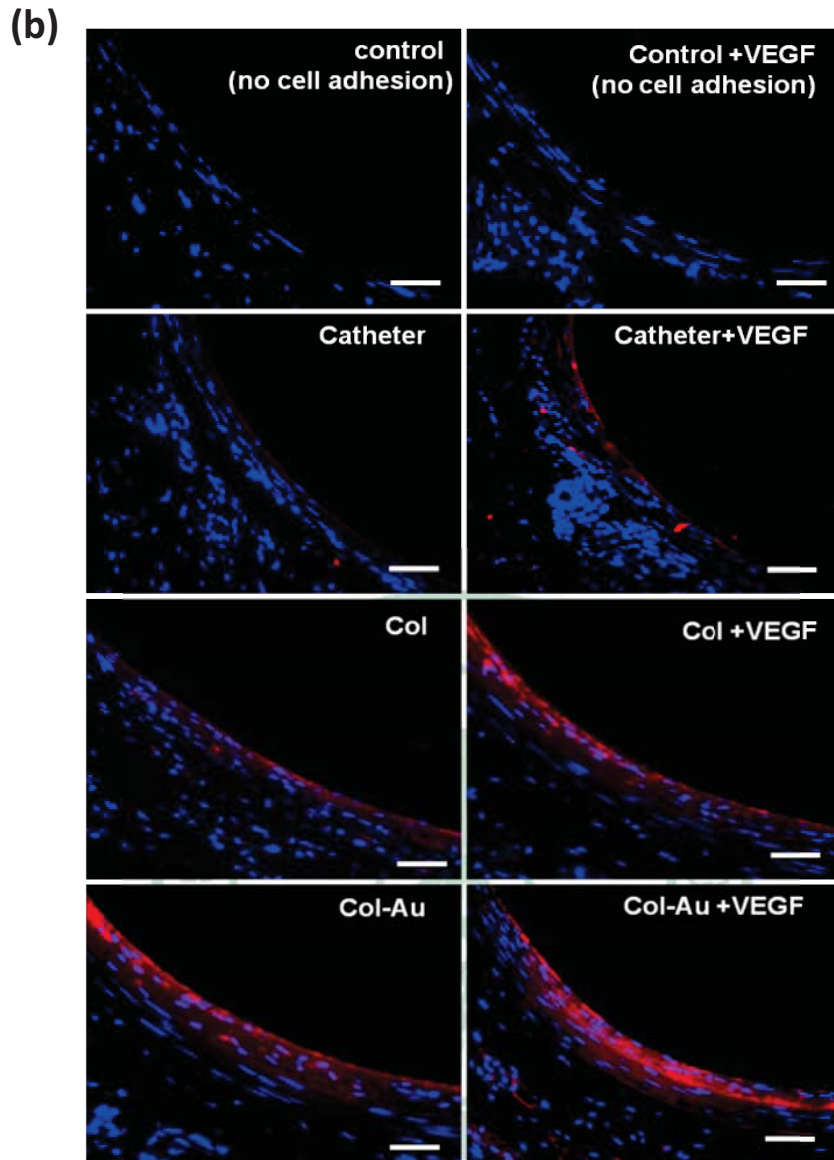
(a)



**Figure 23.** Transplantation nanocomposites of pure catheter · Col · Col-Au vascular graft in vivo. (a) Animals were randomly assigned to either the control or 1 of 8 experimental groups consisting ,n=4 ◦ (b,c) SD Rat fixed on the operating table after anesthesia. Then (d,e) incision of groin and find the femoral artery (f) Implanted vascular graft (about 1cm) ◦ (g) The blood vessel ligation (h · i) Suture and disinfection of wound ◦ (j) Recovery room ◦

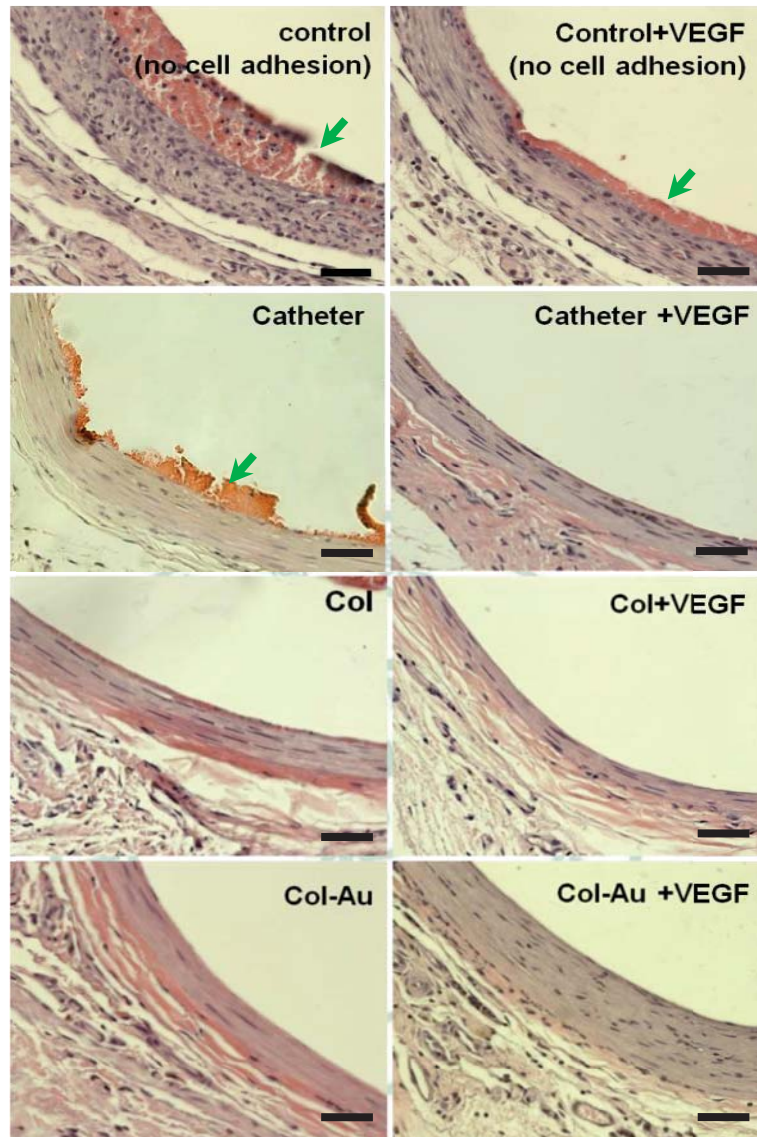
(a)





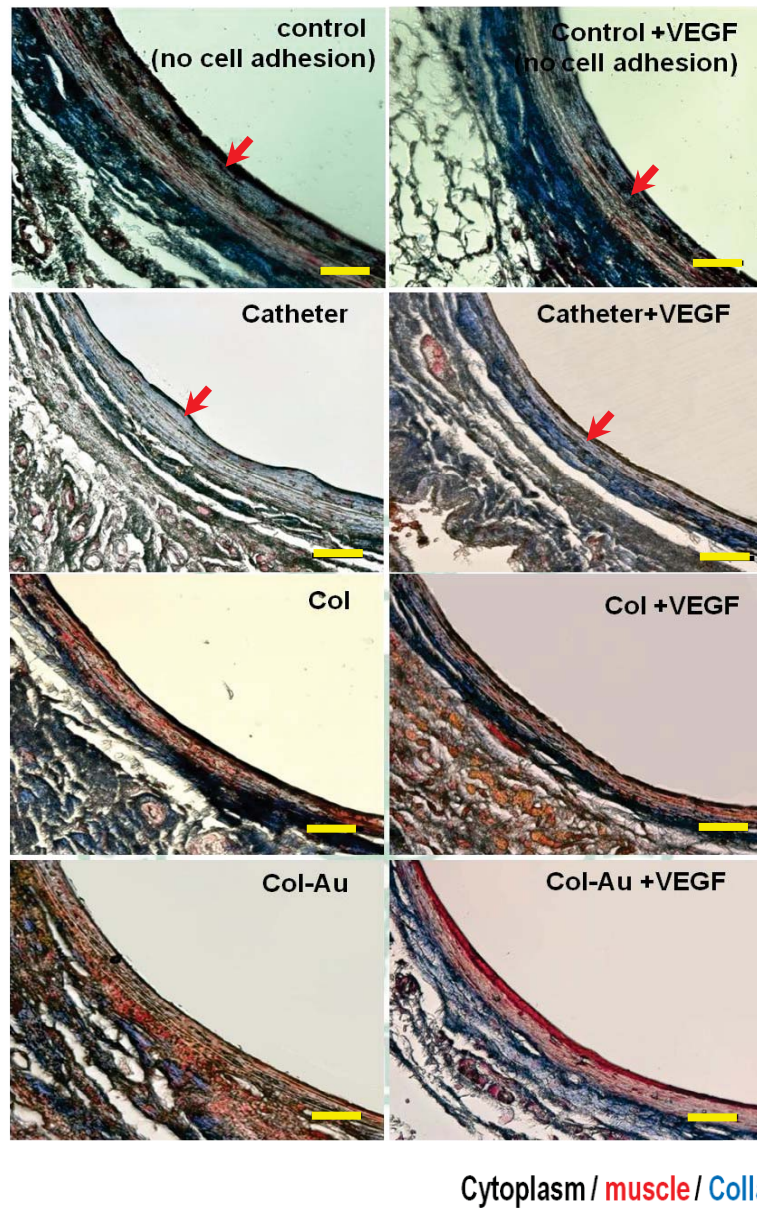
**hCD31 / nucleus**

**Figure 24.** Col-Au nanocomposites promoted MSCs to differentiate into ECs after repairing SD rat femoral artery injured by wire. MSCs were incubated with Col-Au for 48 hr and implantation into femoral artery. The femoral artery were separated from rat and immunostained with anti-CD31 antibody. cells followed by stained with (a) 3,3-Diaminobenzidine (DAB) and stained with (b) Cy<sup>TM5</sup>-conjugated immunoglobulin (red color fluorescence), cell nuclear staining was performed by 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue color staining) (scale bar = 50 $\mu$ m)



**Figure 25.** Cell organization and anti-thrombotic property after 30 day for MSCs implantation on various composites vascular graft in vivo. The samples were stained with Hematoxylin-eosin (H&E) staining was shown. (scale bar = 50 $\mu$ m)





**Figure 26.** Cell organization and anti-fibrosis property after 30 day for MSCs implantation on various composites vascular graft in vivo. The samples were stained with Masson trichrome staining was shown. (scale bar = 50 $\mu$ m)