國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry
School of Dentistry
National Taiwan University

Master Thesis

研發含聚麩胺酸及明膠之水膠攜帶 TGF-β1 之磷酸鈣水泥於活髓治療之研究：材料物理性質、生物活性、生物相容性及動物實驗

Development of a Calcium Phosphate Cement with γ-PGA/ Gelatin Hydrogel Carrying TGF-β1 for Vital Pulp Therapy

王毓襄

Yu-Hsiang Wang

指導教授：林俊彬 博士

Advisor : Chun-Pin Lin, Ph.D.

中華民國一百零四年六月

June 2015

謝誌

要謝的太多了。

感謝許多前輩師長以及同學這一路上包容與幫助。謝謝老師的提攜與包容，謝謝凱鈞學長一路照顧，謝謝丁丁、玉婷、Poya 以及許多實驗室的貴人幫忙，謝謝明樺學長提供許多專業指導，謝謝耀仁也辛苦你了，謝謝 Chris、辰瑩、竣為、舜中、偲嫻，謝謝學思跟家人，還有更多幫助過我的人。這個階段有大家幫忙才能順利結束，感激在心。

中文摘要

活髓治療的目的在使牙髓保持活性並形成修復性牙本質，維持牙齒正常生理結構、功能、及牙根發育。活髓治療發展至今在臨床上仍然沒有理想之材料。磷酸鈣骨水泥為一生醫陶瓷材料,在骨科及牙科廣泛應用作為骨缺損的修補材料。然而，磷酸鈣骨水泥於活髓治療的研究中，效果並未優於目前臨床效果最佳的三氧礦化物。因此藉由聚麩胺酸-明膠結合生長因子 TGF-β1 添加至磷酸鈣骨水泥，以研究其誘導牙本質牙髓組織再生的效果。本研究分為四大部分，第一部分為材料物理性質測試，分析包含固化時間、機械性質、降解測試、晶相結構。第二部分為生物相容性分析，以 ISO-10993 標準評估材料之細胞存活率與細胞毒性。第三部分為體外生物活性測試，研究材料對牙髓細胞之促進鈣化生成的效果。第四部份為建立大動物實驗模型，以犬隻評估所研發之生醫材料與市售材料於牙髓組織再生之差異。

研究結果顯示添加聚麩胺酸-明膠不影響磷酸鈣骨水泥隨時間降解及再結晶之生醫陶瓷性質，也不會降低抗壓強度，其初始硬化時間大約五分鐘，最終硬化時間大約九分鐘，符合臨床操作需求。至於生物活性方面，磷酸鈣結合聚麩胺酸-明膠攜帶 TGF-β1 之生物相容性良好，且體外活性測試發現可較三氧礦化物提早誘導鈣化結節生成，於動物實驗中亦證實可成功誘導完整的牙本質橋生成。

磷酸鈣結合聚麩胺酸-明膠攜帶 TGF-β1 結合了磷酸鈣的良好物理性質及操作性質、磷酸鈣與聚麩胺酸-明膠的生物相容性，以及充分發揮了 TGF-β1 促進牙本質在生的優勢，因此磷酸鈣結合聚麩胺酸-明膠攜帶 TGF-β1 之活髓治療材料的臨床應用，是極具潛力的。

關鍵詞：磷酸鈣骨水泥、活髓治療、生物相容性、TGF-β1

Abstract

Vital pulp therapy is to preserve the pulp vitality as well as to form the reparative dentin for maintaining the normal physical structures and functions of teeth. After years of research and development of the biomaterials, there is no ideal material for vital pulp therapy. Bioactive calcium phosphate cements (CPCs) have been widely used for repairing bone defects because of their excellent biocompatibility and bioactivity. However, CPCs only demonstrated comparative effect with commercial MTA in studies in vital pulp therapy. In this study we evaluated the alpha-tricalcium phosphate cement (α -TCP) with γ-PGA/ gelatin hydrogel carrying TGF-β1 application on vital pulp therapy. Poly-γ-glumatic acid (γ-PGA) is suitable candidate for drug carrier. And TGF-β1 can induce differentiation of dental pulp cell.

The purpose of this study is to evaluate effect of CPC/ hydrogel/ TGF-β1 on pulp-dentin regeneration and vital pulp therapy. We examined the possible intervening effects of hydrogel on the clinical compliance of CPC with assessment of its setting time, compressive strength, degradation, crystallinity, and microscopic structure. Biocompatibility, in vitro bioactivity on cultured human dental pulp cell was evaluated and also animal study was performed to evaluate the ability of CPC/ hydrogel/ TGF-β1 to induce hard tissue formation in vivo. The results showed that the setting time and compressive strength of CPC/ hydrogel exhibited no significant difference compared with CPC. The cell viability and cytotoxicity exhibited no harm to the dental pulp cell and animal study

presents this CPC/ hydrogel/ TGF-β1 can induce calcified tissue formation. Based on the results, the developed CPC/ hydrogel/ TGF-β1 has great potential as a material for vital pulp therapy.

Keyword : calcium phosphate cements, alpha-tricalcium phosphate, vital pulp therapy, TGF-β1

目 錄

中文摘要 i

Abstract iii

第一章：前言 3

第二章：文獻回顧 5

2.1 牙髓功能與重要性 5

2.1.1 牙髓牙本質複合體 (Pulp-dentin Complex) 5

2.1.2 保留牙髓的重要性 6

2.2 活髓治療（Vital Pulp Therapy） 7

2.3 現今活髓治療材料之作用機轉與臨床限制 10

2.3.1 氫氧化鈣（$Ca(OH)_2$） 10

2.3.2 三氧礦化物（Mineral Trioxide Aggregate, MTA） 11

2.4 磷酸鈣生醫陶瓷應用於活髓治療之潛力 11

2.4.1 近惰性生醫陶瓷 (Nearly inert bioceramics) 12

2.4.2 生物吸收性陶瓷 (Resorbable bioceramics) 12

2.4.3 表面活性生醫陶瓷（Surface-active bioceramics） 13

2.5 磷酸鈣骨水泥於組織再生工程之應用及活髓治療之優勢 14

2.6 TGF-β對牙本質再生之效果 15

2.7 聚麩胺酸 (γ-PGA) 及明膠 (Gelatin) 16

第三章：動機與目的 17

第四章：材料與方法 19

4.1 CPC/ hydrogel/ TGF-β1 製備 19

4.2 材料物理性質分析 21
4.2.1 硬化時間 (Setting Time) 21
4.2.2 Compressive strength 21
4.2.3 降解測試 23
4.2.4 X 光繞射分析 (X-ray Diffraction Analysis) 23
4.2.5 表面型態觀察- 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 24
4.3 生物相容性評估 25
4.3.1 細胞培養技術 25
4.3.2 人類牙髓細胞 (human pulp cell) 之初級培養 (primary culture) 26
4.3.3 萃取液備製 28
4.3.4 WST-1 28
4.3.5 LDH 30
4.3.6 Alamar blue 32
4.3.7 電子顯微鏡觀察細胞貼附 (Cell adhesion) 33
4.4 體外生物活性 (In vitro bioactivity) 35
4.4.1 Alizarin Red S 定性染色 35
4.4.2 Alizarin Red S 定量染色 36
4.5 動物實驗 (Animal study) 37
4.5.1 動物實驗 37
4.5.2 實驗步驟 37
4.5.3 動物灌流 38
4.5.4 標本備置 39

4.5.5 Micro CT 42
4.5.6 Evaluation 43
第五章：結果與討論 44
5.1 材料製備與物理性質評估 44
5.1.1 硬化時間 (Setting Time) 45
5.1.2 抗壓強度 (Compressive strength) 46
5.1.3 降解測試 47
5.1.4 X 光繞射分析 (X-ray Diffraction Analysis) 48
5.1.5 SEM 觀察材料水合後之顯微結構 51
5.2 生物相容性評估 59
5.2.1 細胞貼附試驗 59
5.2.2 WST-1 62
5.2.3 LDH 64
5.2.4 Alamar blue 65
5.3 體外生物活性 67
5.3.1 Alizarin Red S 定性染色 67
5.3.2 Alizarin Red S 定量染色 70
5.4 Animal study 72
第六章：結論 75
第七章：未來研究方向 76
參考文獻 77

圖目錄

圖 4-1 CPC/ hydrogel/ TGF-β1 製備流程圖 20

圖 4-2 動物實驗活髓治療步驟。 42

圖 5-1 γ-PGA 和 gelatin 含量對 CPC/ hydrogel 初始與最終硬化時間影響 45

圖 5-2 γ-PGA 和 gelatin 含量對 CPC/ hydrogel 抗壓強度之影響 46

圖 5-3 CPC 與 CPH (CPC/ 1% gelatin/ 1% γ-PGA) 浸泡於 PBS 之重量損失率 48

圖 5-4 CPC 及 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 水合三天後之 XRD 產物晶相分析 49

圖 5-5 CPC 及 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 水合七天後之 XRD 產物晶相分析 50

圖 5-6 CPC 及 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 水合十四天後之 XRD 產物晶相分析 50

圖 5-7 CPC 及 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 水合三天後之 XRD 產物晶相分析 51

圖 5-8 SEM 觀察 CPC 浸泡於 PBS 不同時間點之水合產物表面顯微結構圖 ... 55

圖 5-9 SEM 觀察 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 不同時間點之水合產物表面顯微結構圖 58

圖 5-10 牙髓細胞於 CPC 表面貼附四小時後情形 59

圖 5-11 牙髓細胞於 CPC 表面貼附二十四小時後情形 60

圖 5-12 牙髓細胞於 CPH 表面貼附四小時後情形 60

圖 5-13 牙髓細胞於 CPH 表面貼附二十四小時後情形 61

圖 5-14 牙髓細胞於 MTA 表面貼附四小時後情形 61

圖 5-15 牙髓細胞於 MTA 表面貼附二十四小時後情形 62

圖 5-16 牙髓細胞一天 WST-1 測試結果 63

圖 5-17 牙髓細胞三天 WST-1 測試結果 63

圖 5-18 牙髓細胞一天 LDH 測試結果 64

圖 5-19 牙髓細胞三天 LDH 測試結果..... 64

圖 5-20 牙髓細胞三天 Alamar blue 測試結果..... 65

圖 5-21 牙髓細胞七天 Alamar blue 測試結果..... 66

圖 5-22 牙髓細胞十四天 Alamar blue 測試結果..... 66

圖 5-23 牙髓細胞二十一天 alamar blue 測試結果..... 67

圖 5-24 牙髓細胞十四天 Alizarin red S 定性染色. 68

圖 5-25 牙髓細胞二十一天 Alizarin red S 定性染色. 69

圖 5-26 牙髓細胞十四天 Alizarin red S 定量測試 71

圖 5-27 牙髓細胞二十一天 Alizarin red S 定量測試 71

圖 5-28 CPC/ hydrogel 之動物實驗兩個月 μ-CT 影像。 72

圖 5-29 CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1 之動物實驗兩個月 μ-CT 影像。 73

圖 5-30 MTA 之動物實驗兩個月 μ-CT 影像。 73

表目錄

表 4-1 牙本質橋生成評估表 43

表 5-1 μ-CT 影像硬組織生成評估 74

第一章：前言

牙髓可行使供應養分、感受外界刺激的功能，並且在遭受刺激時，牙髓的修復功能可以促使牙本質再生，進而防禦病原進一步入侵。 然而深度齲齒、外傷、或醫源性的傷害容易使牙髓暴露，此時入侵的細菌引起牙髓發炎、壞死，甚至造成牙根尖周圍的發炎與膿腫。在前述的狀況下，傳統的治療方式為移除牙髓組織的碎片，合併使用根管內沖洗液及藥物以幫助殺菌，並藉由根管的緻密充填阻隔細菌的再侵犯，此即為傳統的根管治療。

隨著醫療技術的進步，根管治療的成功率已較數十年前提升，而目前傳統根管治療的成功率約為八成。複雜的根管系統常常是造成根管治療失敗的原因之一：例如在過於彎曲的根管、C 型等複雜的根管系統中，難以執行徹底的清潔與緻密的根管充填，這些狀況將會提高根尖外感染的風險。而未發育完成的年輕恆牙之牙本質較薄，易有斷裂的危險，若以傳統的根管方式做治療，將牙髓完全去除後，牙齒就喪失了齒質再生及根尖關閉的可能性，當齒質太薄弱，牙齒將來被拔除的機率便會大大提高。而活髓治療的目的即是保留牙髓的活性，並刺激牙髓與牙本質的再生。

活髓治療的理想要素包括了保留健康的牙髓組織、放置可促進牙髓再生的覆髓材料、以及可抵擋細菌入侵的補綴材料。為了使覆髓材料達到最佳效果，許多研究嘗試在覆髓材料加入各種生長因子，例如 BMP-2, BMP-4, TGF-β1 等等。

生長因子 TGF-β1 在牙本質再生中扮演重要的角色。TGF-β1 能誘導牙髓細胞分化為類牙本質細胞，並且刺激胞外基質的分泌[1]。然而，在臨床活髓治療中，由於生長因子的半衰期短、價格昂貴，又容易被血流稀釋而使降低療效，使得投

與 TGF-β1 事倍功半，因此必須就由載體來攜帶並控制其釋放。本團隊先前由張凱鈞學長研究之聚麩胺酸-明膠結合 TGF-β1 添加至磷酸鈣-硫酸鈣雙相材料系統證實，在覆髓材料中加入聚麩胺酸-明膠，可做為 TGF-β1 之載體，強化覆髓材料誘導牙本質生成的效果。

現今活髓治療之最新研究方向，希望能以組織再生工程的觀點，針對牙髓組織提供支架、誘導生長因子、甚至具有再生能力之幹細胞，以促進牙髓之修復甚至再生。因此本研究選擇使用 α-TCP/ hydroxyapatite，為具有生物活性且可被生物吸收之生醫材料，並加入聚麩胺酸-明膠，做為生長因子 TGF-β1 之載體，使具有誘導或引導牙髓組織再生之能力，促使組織修復，期能發展出理想的覆髓治療材料。

第二章：文獻回顧

2.1 牙髓功能與重要性

2.1.1 牙髓牙本質複合體 (Pulp-dentin Complex)

牙髓組織位於牙齒及牙根的中心，主要由神經、血管、間質組織、組織間液、牙本質母細胞 (odontoblasts)、纖維母細胞 (fibroblasts) 及免疫細胞等所組成。牙髓可行使供應養分、感受外界刺激的功能，並且在遭受刺激時，牙本質母細胞可行使修復作用，促使牙本質再生，進而防禦病原進一步入侵。當外來的刺激較輕微時,牙本質母細胞會分泌修復性牙本質 (reactionary dentin) 形成屏障保護牙髓，若刺激太劇烈而導致牙本質母細胞死亡，則牙髓幹細胞 (dental mesenchymal cell) 會分化為類牙本質母細胞 (odontoblast-like cell) ，分泌修復性牙質 (reparatory dentin) 避免牙髓受到傷害。由於牙髓與牙本質在功能上密不可分，因此通常兩者合稱為牙髓牙本質複合體 (pulp-dentin complex)[1]。

深度齲齒、外傷、或醫源性的傷害容易使牙髓暴露，此時入侵的細菌引起牙髓發炎、壞死，甚至造成牙根尖周圍的發炎與膿腫，此時一般的治療方法即傳統的根管治療，目前傳統根管治療的成功率約為八成[2]，其治療程序包括了以根管銼針或鎳鈦旋轉器械移除牙髓組織的碎片，合併使用根管內沖洗液及藥物以幫助殺菌，並藉由根管的緻密充填阻隔細菌的再侵犯。複雜的根管系統常常是造成根管治療失敗的原因之一：過於彎曲的根管常因器械偏移、根管破孔導致清創的困難；而根管修行器械在 C 型的根管系統中，也無法將複雜的主根管空間完全清潔與封填[3]；更別提牙根靠近末端部分，具有許多微小的側枝根管，這些側枝根管

容易窩藏細菌，同時也無法以器械或藥物達到有效滅菌，這些狀況都提高了根尖外感染的風險[4]。

2.1.2 保留牙髓的重要性

Cvek 等學者在 1992 年的研究中指出，未發育完成的年輕恆牙之牙本質較薄，易有斷裂的危險[5]，根尖處寬闊的喇叭狀開口亦提高根管封填的困難。若以傳統的根管方式做治療，將牙髓完全去除後，牙齒就喪失了齒質再生及根尖關閉的可能性，當齒質太薄弱，牙齒將來被拔除的機率便會大大提高。以活髓治療保留牙髓的活性，刺激牙髓與牙本質的再生，使牙齒完成發育，達到應有的牙根長度與根管壁厚度，牙齒將可得到足夠的強度，以提高牙齒存活壽命。

另外，移除牙髓後，牙齒喪失了感受外界刺激的能力，也無法提供牙齒第一線的免疫防禦功能，減少細菌入侵的速度。根據 Cvek 的研究，當健康的牙髓暴露在充滿細菌的口腔中七天，在具有牙髓的牙齒中，牙髓發炎的情況只會侷限在暴露處以下兩毫米的深度內，然而若是牙髓壞死，或是根管治療後的牙髓腔暴露於口腔中，細菌在很短的時間內就能直接到達根尖[6]。因此，也有學者提出一個概念：維持健康具有活性的牙髓，即能有效地避免根尖周圍炎 (apical periodontitis)，而這也是牙髓治療/活髓治療的最終目的[7]。

2.2 活髓治療（Vital Pulp Therapy）

活髓治療 (vital pulp therapy) 是指以維持牙髓的活性與功能為目的的治療術式。其適應症為在牙髓遭受傷害但仍具活性及回復能力 (即可逆性傷害) 時，給予保護性的覆蓋材料，避免額外的傷害，以幫助牙髓的癒合與修復[8]。活髓治療會先移除感染發炎的牙髓組織，並在牙髓外覆蓋保護性的材料作為屏障，避免外來的傷害，確保牙髓處於健康無發炎狀態。活髓治療成功的要素有 3 點：(1) 去除感染部位，移除細菌等感染原，是牙髓能復原的主要關鍵； (2) 置放適合的材料於暴露牙髓表面，可保護牙髓並誘導組織細胞分化，以修復組織； (3) 提供一個封閉性良好的填補物，以預防微滲漏，避免細菌或毒素再次進入牙髓造成刺激[9]。

目前活髓治療的種類，分為直接或間接覆髓 (direct or indirect pulp capping) 與斷髓治療 (pulpotomy) 。間接覆髓適用於深度齲齒或外力等因素並未造成牙髓暴露時；若牙髓已經暴露於口腔，根據牙髓發炎的深度及牙髓保留的程度，則執行直接覆髓或斷髓治療。直接覆髓與斷髓治療均為將藥物、敷劑或是適當材料置放於暴露之牙髓組織上，以保存牙髓組織之活性。兩者差別為直接覆髓治療時並不移除任何牙髓組織，而斷髓治療至少移除深度 2-3 mm 或是更多牙髓組織，將壞死或嚴重發炎組織完全移除。殘存的牙髓組織中未分化之細胞，會分化成造牙本質細胞 (odontoblast) 或類牙本質細胞 (odontoblasts-like cell)，而這些細胞會生成牙本質，形成屏障，保護牙髓組織。活髓治療過程所需時間不等，期間需定期追蹤觀察，一旦發生牙髓不可逆之發炎反應、牙髓壞死、或是牙根內吸收，均必須進行進一步根管治療，甚至可能須進行根尖手術，或在後續疾病太嚴重時拔除牙

齒。提升活髓治療之成功率，即可免除失敗後續治療上之困難以及降低牙齒提早遭到拔除的風險。

成功的活髓治療常伴隨著硬組織的生成，因此在治療處的牙髓生成牙本質橋 (dentin bridge) 或是硬組織常被認為是成功保留牙髓活性或是進行牙髓再生成功的一個現象。也有學者認為健康的牙髓組織會在受到傷害破壞的地方進行牙本質再生 (dentinogenesis)，使此處形成一個正常牙本質牙髓的交界[10]。雖然硬組織的生成並非活髓治療的最終目的，但是在多數的實驗與治療中仍常用硬組織或是類牙本質的生成來作為牙髓成功修復的判斷依據[11]。現今測試活髓材料的實驗中，判斷活髓治療成功的依據，除了觀察牙本質橋生成外，也包括細胞的發炎或壞死以及微生物的出現與否[12]。然而不論是觀察牙本質橋是否生成、以及細胞是否發炎壞死，都只能判斷活髓治療是否達到終止發炎與感染、細胞修復 (reparation)的效果，而現今的活髓治療仍無法達到組織再生之功效。

現今的活髓治療材料，雖然以臨床觀點來看，例如牙齒存活率、X 光片判讀、牙齒活性及症狀測試等等，成功率與根管治療不相上下甚至略高，然而在組織學上，目前活髓治療的效果較偏向受傷組織之修復 (reparation) 而非再生 (regeneration) 。治療後生成之牙本質可能為類骨性牙本質 (osteodentin) 或類似疤痕的軟組織修復 (scar-like soft tissue)，這些都會被視為是成功的治療表現，然而新生成的這些硬組織，其結構可能無法像真正的 dentin，可以保護牙髓不受強烈的外來刺激傷害[12] 判斷綜觀文獻回顧與材料科學的進展，生醫材料發展多年，迄今仍然沒有理想之活髓治療材料，隨著組織再生觀念的進步與生醫材料的發展，具

生物活性之材料如磷酸鈣生醫陶瓷，因生物相容性良好且具有誘導鈣化組織生成的能力，活體治療方面具有相當的潛力[13]。

2.3 現今活髓治療材料之作用機轉與臨床限制

目前臨床上較常使用的活髓治療材料包括氫氧化鈣 ($Ca(OH)_2$) 及三氧礦化物 (mineral trioxide aggregate) 。這兩種材料分別在臨床上遭遇一些問題，例如操作性不佳、硬化時間長、造成齒質變色等等，以下分別就兩種材料做介紹。

2.3.1 氫氧化鈣（$Ca(OH)_2$）

氫氧化鈣是傳統活髓治療使用的材料，用於直接覆髓術（Direct Pulp Capping），以氫氧化鈣做活髓治療，雖然可觀察到牙本質橋生成，但其鈣化屏障卻是有孔隙通道(Tunnel defect) 的缺損[14]，此外，氫氧化鈣容易被生物組織吸收代謝，因此在使用氫氧化鈣進行活髓治療時，常會觀察到氫氧化鈣被吸收而留下的空間（Dead Space），除了有細菌再進入侵犯的危險外，同時對於牙冠復形物的支撐力也會有不足的現象，這些可能是造成術後復發性牙髓發炎的主要原因[15]。但根據 Cox 等人的研究則指出約有 41%的病例會出現復發性的牙髓發炎現象，因此其治療成功率並不高[16]。整體而言，應用氫氧化鈣於各種活髓術式的確有成功的病例報告，然而其整體的治療成功率並不高，因此氫氧化鈣並不是一個理想的活髓治療材料。氫氧化鈣的使用歷史悠久可誘導牙本質橋生成，成為目前最普遍的活髓治療材料，氫氧化鈣是傳統活髓治療使用的材料。氫氧化鈣具有高鹼性（pH=12.5），會造成接觸之組織表層液狀壞死，再深一層的組織為凝結性壞死，但僅僅造成下層牙髓輕微的發炎刺激反應，在沒有細菌存在的情況下，這種輕微反應可以適度刺激修復牙本質的增生[15]。

2.3.2 三氧礦化物（Mineral Trioxide Aggregate, MTA）

三氧礦化物(mineral trioxide aggregate, MTA) 是 1993 年由 Linda University 所發表，成分包含：矽酸三鈣 (tricalcium silicate, C3S)，鋁酸三鈣 (tricalcium aluminate, C3A) ，氧化鈣和氧化矽等金屬氧化物，屬於鈣矽生醫陶瓷 (Calcium-silicate cement, CSC) 的一種。在許多體內和體外試驗中發現 MTA 的良好的封閉性和生物相容性。MTA 的 pH 值較高，可以提供一個不利細菌生長的環境，是一種是適合根管治療的良好材料。但是目前市售的 MTA 有些缺點是需要改進的，最大的缺點是硬化時間過長，其硬化時間約為 2 小時 45 分鐘[17]，而硬化時間過長使得最終填補物需待第二次約診才能施行，在兩次約診之間，只能給予臨時填補物替代，並需挪出空間放置濕棉球，以利水合反應進行使材料硬化，因此增添了牙髓再次受到細菌感染的風險及填補物強度與填補空間不足的顧慮。而 MTA 的操作性不佳，也提高在臨床上使用的困難度。

近來材料研究發展雖改善縮短硬化水合時間，但許多環境因素在 MTA 硬化其間對其材料性質之表現造成影響，如酸性環境會對 MTA 的水合反應造成抑制作用，並且影響到硬度等材料性質[18]，及組織反應是否受影響仍有待深入研究。因此 MTA 作為一個理想牙髓病治療修補生醫活性材料，仍有許多改進的空間。

2.4 磷酸鈣生醫陶瓷應用於活髓治療之潛力

陶瓷材料應用於生體醫學始於十九世紀，主要著眼於陶瓷材料在生物體中十分穩定，不易釋出對生物體有害的物質，與生物體親和性良好，對人體有高度的

生物相容性。而近百年來，因陶瓷製造技術的改革，高強度生醫陶瓷（bioceramics）發展成功，使生醫陶瓷在生醫的應用上逐漸受到重視。一般而言，生醫陶瓷主要可分為三類：（1）生化惰性陶瓷（nearly inert bioceramics），其與體液或暴露環境幾乎不會有化學作用，材料乃是利用機械性的連結與骨組織結合；主要應用於結構支持的植入物，如骨釘、骨板、股骨頭等。（2）生化活性陶瓷（surface-reactive bioceramics），其組成成份被設計在體液中會與組織發生化學反應，在植入之生醫陶瓷與組織之間形成化學性的結合。（3）生化吸收性陶瓷（resorbable bioceramics）[19, 20]，此類材料的成分可被生物體正常的代謝路徑所分解，然後其所佔據的空間慢慢為周圍的組織所取代，臨床主要可應用在骨缺損的治療。

2.4.1 近惰性生醫陶瓷 (Nearly inert bioceramics)

此類材料置於液體中非常穩定，不會與周圍組織產生反應，不產生鍵結，也不會釋出離子，具有生理化學安定性、良好的強度、耐蝕性和抗血栓性，主要用於要求受力和耐磨的人工關節頭。此類材料包括了 ZrO_2、Al_2O_3 等。

2.4.2 生物吸收性陶瓷 (Resorbable bioceramics)

可吸收性生醫陶瓷(bioabsorption bioceramics) 置於人體後，會逐漸溶解而被其周圍組織而取代。這一類陶瓷有三鈣磷酸鹽 ($Ca_3((PO)_4)_2$, TCP)、四鈣磷酸鹽 (tetracalcium phosphate, TTCP) 、二鈣磷酸鹽 (dicalcium phosphate anhydrous,

DCPA 或 dicalcium phosphate dihydrate, DCPD)。材料蛻化或被吸收速率因材料成分、結晶相與顯微結構之不同有明顯的差異[21]。

2.4.3 表面活性生醫陶瓷（Surface-active bioceramics）

生物活性 (bioactivity) 是指材料植入活體內可與活組織產生直接連結。一般而言，人造材料植入活體後，會於材料周圍產生纖維組織，不與缺損部位組織產生黏合，而生物活性陶瓷會與活組織反應產生一層直接黏合的鍵結面，稱為生物性薄膜 (biological apatite)。此外，材料能促進骨質再生而被應用於人工植入材：如氫氧基磷灰石(hydroxylapatite, HAp)、生醫玻璃 (bioglass) 等[22]。

2.5 磷酸鈣骨水泥於組織再生工程之應用及活髓治療之優勢

磷酸鈣骨水泥被廣泛應用在骨科、顏顎面外科，因其促進骨骼修復再生之效果極佳。其成分相似於骨骼，且作為修復材料時，具有以下優勢： (1) 具有骨傳導性 (osteoconductivity)，在組織進行修復時，可作為支架[23]，並有助於前驅細胞及新生血管貼附； (2) 磷酸鈣材料與生物組織之間的良好互動，可以促使未分化細胞分化為具有成骨能力之細胞； (3) 材料與新生骨骼尖可直接鍵結，藉由控制材料的吸收速率，也可以適當的促進硬組織的生成及取代材料，磷酸鈣骨水泥已被證實在骨缺損處可以促進骨質新生 (osteogenesis)[24]，即真正的組織再生 (regeneration)，而非修復 (reparation)。以現有的材料例如氫氧化鈣、三氧礦化物做活髓治療，雖然成功率與根管治療相當或略高，然而牙本質生成的範圍受限於牙髓-材料介面的位置，且生成之牙本質結構較原生的牙本質多缺陷。將磷酸鈣骨水泥於骨科的優勢應用於活髓治療，結合高分子膠體以攜帶可誘導牙本質生成的生長因子，有極大的潛力使活髓治療的品質更提升。

2.6 TGF-β對牙本質再生之效果

TGF β superfamily 在牙髓的修復過程中扮演關鍵角色[11, 25-27]。其中TGF-β1 能誘導牙本質包外基質生成，同時在牙髓面對傷害時，可以幫助調控修復與防禦[28,29] 。TGF-β1 在的牙齒發育中扮演重要的角色，在生牙本質細胞與牙髓細胞上有 TGF-β 受體 I 及 II 來調控細胞[30]，也在牙本質中被發現[31]，被認為與第一級牙本質的生成有關。學者認為牙髓受傷後生牙本質前驅細胞 (sub-odontoblast cell) 中活化的 TGF-β1 表現與類生牙本質細胞 (odontoblast-like cells) 的分化有關，參與牙本質的修復過程[30]。 TGF-β1 以證實可刺激牙髓細胞增生[32]、第一類膠原蛋白合成[33]、鹼性磷酸酶活化[34]、並促使生牙本質細胞的分化[35]和 predentin 的分泌。不論是在體外的實驗或動物實驗，TGF-β1 都被證實能刺激生牙本質細胞與修復性牙本質的分泌與生成[11, 25, 27, 36, 37]。過去的研究認為 TGF-β1 藉由誘導牙本質的包外基質分泌而開啟牙髓的修復過程，但至今TGF-β1 調控牙髓細胞的機制尚未完全了解。

2.7 聚麩胺酸（γ-PGA）及明膠 (Gelatin)

聚麩胺酸 (γ-Poly glutamic acid, γ-PGA) 是一天然胺基酸聚合物，它是以麩胺酸及葡萄糖為原料，由納豆菌純粹培養發酵而形成。聚麩胺酸吸水及親水性佳，具生物降解性，無毒性，且擁有良好的生物相容性。因其特有之親水、保水能力，可溶解鈣鹽及鎂鹽而形成錯鹽化離子之功能，可有效地促進鈣之吸收，而具高度的營養功能。該材料於醫學領域的應用目前的發展有：攜帶藥物或蛋白質的載體[38]、生物敷料或生物膠[39]等等已有相當的研究成果，因 γ-PGA 高分子可隨我們要求的材料性質調整進而調控其膠合鏈結時間、降解時間，因此對於發展牙髓修復再生材料是一項優勢，我們可以因所需應用條件不同調整材料的性質，且γ-PGA 的親水性、高度生物相容性及容易攜帶 bioactive molecular 從牙髓修復治療的觀點而言是材料的優勢。

明膠是由豬或牛的皮膚或骨頭經酸鹼處理提煉而成的天然聚合物，具有生物降解性與生物相容性，並且就由溫度變化能形成膠狀，在醫藥方面的應用相當廣泛，加入在藥物或血漿中，或作為人造血管的密封劑。學者們藉由不同的化學修飾來增強明膠的機械性質，並嘗試控制其降解速度，來改善其攜帶藥物的能力[40, 41]。在體外的實驗中可以改變其交聯的程度與降解的速度來調整其藥物釋放之速度，因此明膠擁有作為攜帶藥物之載體的良好性質。

第三章：動機與目的

隨著醫療的進步，牙髓治療的觀念從以往的去除病灶，慢慢演變為讓組織修復甚至再生，以保守的治療，讓組織可以回復到原來的功能。

MTA 是目前牙科活髓治療使用的材料中成功率最高的，然而其硬化時間過長以及操作性質差，使臨床治療上面臨許多的挑戰。而 MTA 及氫氧化鈣等雖然可成功誘導牙本質橋生成，然而其牙本質橋是否能完整抵禦外來刺激，以及是否可以促使組織再生，目前並沒有一種材料可以有效的達到理想的活髓治療效果。因此，為了提高活髓治療的成功率，發展具有潛力的生醫活性材料，以符合理想牙髓組織再生治療的目的，仍有待研究。

因此本研究目的為研發三鈣磷酸鹽 (alpha-tricalcium phosphate) 與 氫氧機磷灰石 (hydroxyapatite) 的磷酸鈣 (CPC) 生醫材料，並以聚麩胺酸-明膠結合生長因子 TGF-β1 添加至 CPC，探討與細胞組織交互作用的機轉，及其誘導牙本質牙髓組織再生的效果。本研究分為四大部分，

1. 材料與聚麩胺酸-明膠交聯之水膠 (hydrogel) 調配，並測試其物理性質，以選擇適合臨床使用的聚麩胺酸-明膠濃度。包括其觀察硬化時間、抗壓強度、 X 光繞射，並以電子顯微鏡觀察表面結晶。
2. 觀察 CPC 加入 hydrogel 及 TGF-β1 後之生物相容性，包括以電子顯微鏡觀察牙髓細胞貼附，並以 ISO-10993 標準評估細胞存活率、細胞毒性。

3. 觀察 CPC 加入 hydrogel 及 TGF-β1 後之生物活性，以人類牙髓細胞進行礦化能力測試，包括以茜素紅 (alizarin red staining) 做鈣化生成量之定性染色分析與定量分析，評估材料是否有助於人類類牙髓細胞的礦化行為。

4. 動物實驗。以狗之動物模型評估材料料在活體上之表現。以 μ-CT 攝影評估硬組織之生成。

第四章：材料與方法

4.1 CPC/ hydrogel/ TGF-β1 製備

本實驗所使用之 CPC 為 75%α-TCP 與 25% hydroxyapatite (皆購自 Sigma Co.)混合而成。 γ-PGA 是由味丹生技製造，平均分子量約為 1020 kDa，Gelatin 為 type A (porcine skin, 175 Bloom)，購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。

合成步驟如下：

1. 於 100 ml 水中加入 1 gγ-PGA 與 1 g gelatin，於 25 ℃室溫中持續攪拌 24 小時。
2. 分別加入100 ng/ml及400 ng/ml兩種濃度的TGF-β1 (Peprotech Co.)，攪拌均勻。
3. 加入EDC/NHS 活化γ-PGA/Gelatin 反應成水膠
4. 將hydrogel和CPC以水粉比 1：3，於玻璃調板上以金屬調刀均勻調拌。
5. 調拌後將材料填入直徑 5 mm、高度 5 mm 之圓形模具中，置於 100%濕度、溫度 37℃的環境中備用。

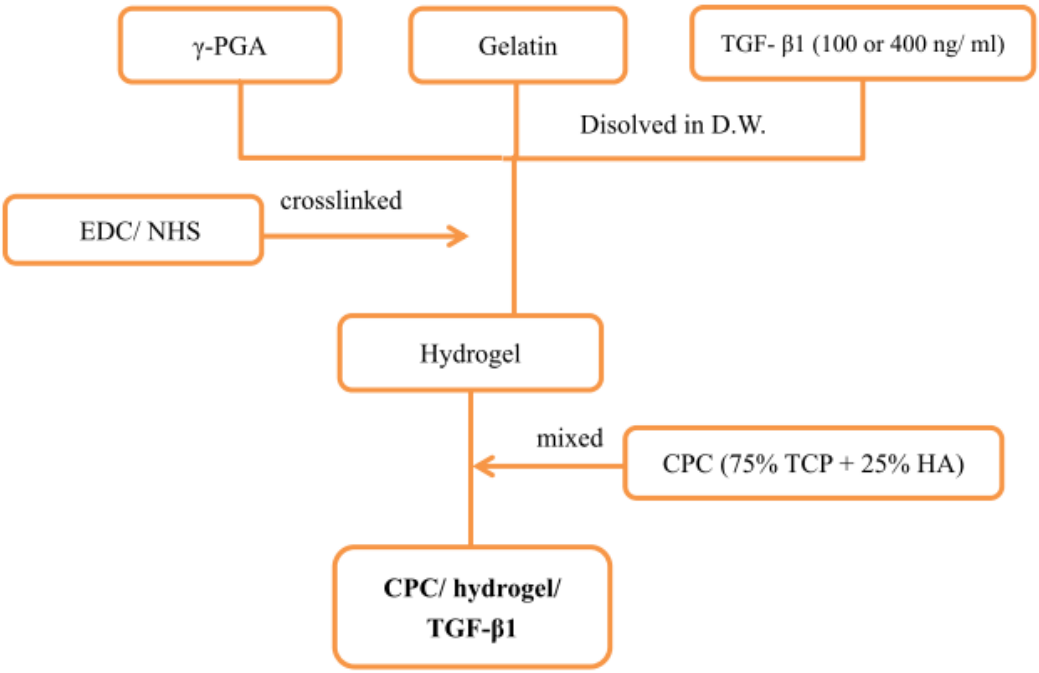


圖 4-1 CPC/ hydrogel/ TGF-β1 製備流程圖

4.2 材料物理性質分析

4.2.1硬化時間 (Setting Time)

研究各組材料水合硬化所需之時間，包含初始硬化及最終硬化時間。

1. 測試樣本備製

硬化時間測試之研究模型主要參考 ISO-6876 牙科材料硬化時間之規範。將材料調勻後填入內徑為 10 mm，高度為 1 mm 之壓克力圓形模具中。置於溫度 37℃，溫度大於 95%之環境中。

2. 測試方法

樣本備製完成後將樣本取出，將 Gillmore 針輕置於其上，直到完全沒有壓痕時即為硬化時間。初始硬化時間 (initial setting time) 之測試使用重量為 100 克，針尖直徑 2 mm 之初凝針 (initial setting needle)；最終硬化時間(final setting time) 之測試使用重量為 300 克、針尖直徑 1.13 mm 之末凝針 (final setting needle)。測試重複五次並進行統計分析。

4.2.2 Compressive strength

測試材料之機械性質，使用萬能拉力機進行測試分析，抗壓等強度之測試方法以應力-應變性質測試。

1. 測試樣本備製

將材料依前述條件混合後填入直徑 4 mm，高度 6 mm 之圓形孔洞金

屬模具中，置於 100%濕度、溫度 37℃的環境中。於四小時、一天、七天之時間點取出脫模，進行抗壓強度測試，每一組實驗之樣本數為 6。

2. 測試方法

測試儀器：萬能拉力測試機(Instron 5566, Canton, MA)。

操作條件：壓速率：1 mm/sec。

負荷單元：500 N。

靈敏度：40%。

操作條件：compressive extension control。

數據記錄：每 0.5 秒讀取資料一次並記錄。

電腦軟體：Bluehill software。

3. 公式計算

將每組 7 個實驗樣本所測得材料破壞之最大下壓負荷換算為抗壓強度，並求其平均值及標準差，換算公式為：

$$\text{抗壓強度 (MPa)} = \frac{4 \times \text{最大下壓負荷 (Compresive load : N)}}{\text{接觸面面積 } (\pi D^2 : mm^2)}$$

4. 統計分析

所有樣本數據使用統計分析軟體，在設定 $p < 0.05$ 的條件下，以單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 與 Tukey's 事後檢定比較不同覆髓材料的組合進行不同天數的水合反應之抗壓強度的差異。

4.2.2降解測試

本實驗經水合後之材料依據 ASTM C830 之規範進行重量損失率之測量。

1. 測試方法

將備製材料依適當水粉比填入模具，保持 37℃ 與 95% 相對濕度使材料硬化後脫模。測得試片乾重 Wd 、含水重 Ww ，重量損失率依下列公式計算：

$$\text{Weight loss ratio (\%)} = \frac{W_d - W_w}{W_d} \times 100\%$$

4.2.4 X 光繞射分析 (X-ray Diffraction Analysis)

分析所製備之各組生醫材料的結晶相、結晶度以及產物純度等。

1. 測試方法

將材料粉末，以 XRD 繞射儀 (Rigaku Geigerflex DMX-2200, Japan) 作繞射角偵測。使用 CuKα（波長=1.5432 nm）之 X 光源，Ni 濾波器，電壓 30 KV，電流20 mA，掃描速度 5 ° /min，掃描角度 2θ = 10° ~ 60 ° 之操作條件做繞射分析。數據分析以 JCPDS資料庫之標準圖譜進行比對晶相結構。

4.2.5 表面型態觀察- 掃描式電子顯微鏡 (SEM)

將浸泡於 1xPBS 樣本於三天、七天、十四天及二十八天取出後，將樣本以酒精做序列性脫水，於 37℃烘箱進行乾燥。接下來以導電碳膠帶與碳膠黏著於載台上，使用鍍膜機（Turbo-Pumped Sputter Coater/Carbon Coater , The Q150R S from Quorum Technologies）進行金覆膜處理。

以 SEM (Hitachi TM3000 SEM，Tokyo，Japan)觀察材料表面與 PBS 溶液接觸後的微觀構造。

1. 儀器規格

   電源：100±10 V AC, 50/60 Hz

   解析度： 4.0 nm

   放大倍率： 15 倍至 30000 倍

   Imaging mode：secondary electron image

2. 操作條件

   工作長度（ working distance, Z-axis）：10 - 50 mm

   加速電壓（acceleration voltage）：15 kV

   鏡徑（aperture）：0.1 mm

   掃描孔徑（spot size）：7.5

   傾斜角度度（ tilting angle）：0 度

4.3 生物相容性評估

根據 ISO-10993 規範進行實驗:選用人類牙髓細胞進行評估。其培養液內含 10% FBS、1% penicillin/ streptomycin 的 DMEM (Dulbecco's modified Eagles's medium) 在 37 ℃，5 % CO_2 培養箱中培養。依標準規範進行實驗，解凍細胞、繼代培養、細胞計數與樣本製備與滅菌等步驟。

4.3.1 細胞培養技術

解凍細胞

1. 取出冷凍細胞小管，於 37℃恆溫水槽解凍至仍有小塊冰塊懸浮，以 70% 酒精擦拭，移至 larminar flow hood 中。
2. 取細胞懸浮液混合 9 ml PBS 於離心管中在 1000 rpm 下離心 5 分鐘。
3. 將上清液吸掉，加入 9.8 ml 培養液再次 1000 rpm 離心 5 分鐘。
4. 將上清液吸掉，加入 1 ml 培養液將細胞打散，加入含有 9 ml 培養液之 10 cm^2 的培養皿中。

繼代培養

1. 細胞養至八分滿，利用 PBS 清洗一次後加入 1 ml trypsin-EDTA。
2. 在 37℃培養箱反應 2 分鐘。
3. 加入 9 ml 培養液中和。

4. 將細胞懸浮液在 1000 rpm 下離心 5 分鐘。

5. 將上清液吸掉，加入 9.8 ml 培養液再次以 1000 rpm 離心 5 分鐘。

6. 將上清液吸掉，加入 3 ml 培養液將細胞打散，取出 1 ml。

7. 加入含有 9 ml 培養液之 10 cm^2 的培養皿中。

細胞計數

1. 與細胞繼代培養步驟 1-5 相同。

2. 加入 3 ml 培養液於離心管中，並均勻打散。

3. 取 20 μl 細胞懸浮液與 20 μl trypan blue 充分均勻混合，取出 10 μl 加在血球計算盤上。

4. 在顯微鏡下觀察(100x)，於大九宮格中選取左上、右上、左下、右下四格計數細胞數目。

5. 細胞數目濃度(number/ml)=(四格細胞總數/4)x2x104，再依所需細胞數加以稀釋。

4.3.2 人類牙髓細胞 (human pulp cell) 之初級培養 (primary culture)

實驗步驟

1. 由人取得相關組織 (來源:臺大醫院)

2. 利用細胞培養技術，進行細胞培養：

為了與將來人體試驗盡量接近，以獲得最擬真的效果，所以在進行體外細胞實驗時，必須盡可能模擬實際人體內的環境：細胞生長的要素，首先就是溫度。37°C 是細胞在體外最理想的生長溫度，此外滲透壓和恆定的酸鹼值(pH7.4)也是細胞生長良好所不可或缺的。必須使用含有血清以及氨基酸、醣類等有機物質，以作為細胞生長之所需。此外，培養過程中的抗生素使用，則是為了避免真菌與細菌的感染，以免影響細胞的生長與健康。

本實驗所細胞培養基乃為市售的 DMEM 培養液，混合 10% 胎牛血清 FBS (Fetal Bovine Serum) 及加入 1% 的三合一抗生素 (antibiotics) 所調配而成。

3. 分離細胞，並建置細胞株，培養可能具有分化誘導或幹細胞特性之細胞：自細胞培養箱 (Incubator，37℃、5% CO_2) 中取出已培養完成的牙髓細胞，先去除培養基後，以 PBS 反覆沖洗，以確保培養基完全去除。然後以體積比為 1：9 的胰蛋白酶 (Trypsin/ EDTA) 溶液加入培養皿中，蓋滿整個培養皿，接著將培養皿放入細胞培養箱(incubator)中 3 至 5 分鐘。

4. 待細胞已完全飄浮至溶液中，將富含細胞的胰蛋白酶溶液裝入離心管中，並以 PBS 稀釋，放入離心機中，以轉速 1500 rpm，時間 5 min 離心，離心完成後取走上層澄清液，並保留下層液約 1 ml 左右，視需分盤的數目加入培養基，並進行細胞的計數。

4.3.3 萃取液備製

本實驗以材料之萃取液進行測試，根據 ISO-10993 牙科材料生物相容性萃取液的規範，材料進行瓦消之後，以 0.1 g/ml 的比例與不含血清的細胞培養液於 37 ℃培養 24 小時。之後將細胞培養液以 14000 rpm 離心 5 分鐘，取出上清液之後以 22 μm 的濾膜過濾得到材料萃取液，之後加入 10%血清備用。

4.3.4 WST-1

為了判斷材料對於細胞的增生影響情形，可以利用 WST-1 細胞增生測試來測量細胞的增生與存活率，可用來評估外來物對細胞生長所造成的影響。WST-1 是一種四錯鹽化物 (tetrazolium salts) ，常被應用在體外細胞增生測試。主要是利利用正常存活細胞中的粒線體酵素 (succinic dehydrogenases) 可將具有淡紅色之 WST-1 代謝轉換成深紅色具結晶狀的 formazan，然而此種酵素只存在於正常存活的細胞中，所以正常細胞數量增加，相對於酵素也會增加，因此細胞增生情況越好，則顏色也越深，細胞毒性大或數量少，則顏色淺，所以我們只要利利用 ELISA 來來觀察吸光值多寡及可評估細胞增生情況。

測試方法

將細胞以 5×10^3 cell/well 的數目鋪在 96-well plate 上，經過 24 小時後吸除培養液，加入 100 μl/well 的材料萃取液，以未加入材料之培養液當作負控制組，

使其在 37℃、5% CO_2 之培養箱中一天與三天的時間，一天的培養時間主要是針對材料的立即性毒性進行評估，而培養三天則是評估材料的一般的細胞毒性性質，細胞之存活率用 Quick cell proliferation assay kit (WST-1) (Biovision, Inc. U.S.A)來檢定。

實驗步驟

1. 移除舊的細胞培養液，並以 PBS 清洗。
2. 移除 PBS 後，加入 100 μl 的 WST-1 solution。
3. 避光且在 37˚C 下反應 2 小時。
4. 測 450 nm 吸光值。

4.3.5 LDH

藉由測量細胞毒性可用來評估外來物對細胞所造成的傷害。LDH 在正常情況下存在細胞質中，主要作用為催化乳酸鹽 (lacate) 轉化為丙酮酸鹽 (pyruvate) ，在此轉化過程中 NAD+將還原成 NADH + H^+。一旦細胞受到傷害，LDH 會因細胞受損或死亡時細胞膜將破裂而大量釋放，而 Tetrazolium 加入時，催化劑 diaphoras 將利利用 NADH + H^+ 把原先為黃色的 Tetrazolium 還原成紅色的 formazan ，再藉由 490 nm 的吸光值即可推測此材料對於細胞的毒性多寡，吸光值高表示 LDH 釋放越多，則毒性越強。

測試方法

將細胞以 5 x 10^3 cell/ well 的數目鋪在 96-well plate 上，經過 24 小時後吸除培養液，加入 100 μl/ well 的材料萃取液，以未加入材料之培養液當作負控制組。加入 100 μl/ well 的實驗組材料萃取液及控制組之培養液至新的 96-well plate，一同在 37℃、5% CO_2 之培養箱中一天與三天的時間，一天的培養時間主要是針對材料的立即性毒性進行評估，而培養三天則是評估材料的一般的細胞毒性性質，細胞毒性以 LDH assay Kit 來檢定。

實驗步驟

1. 上清液 O.D. value
2. 拿出一盤已經培養好細胞的 96 well plate。
3. 將細胞培養液（上清液）50 μl 移至新的 96 well plate。

4. 加入 50 μl reconstitute substrate mix solution。

5. 避光且在 25˚C 下反應 30 分鐘。

6. 加入 50 μl stop solution。

7. 測 490 nm 吸光值。

8. Total lysis O.D. value

(1) 移除剩餘的細胞培養液，並以 PBS 清洗。

(2) 移除 PBS。

(3) 放入-80˚C 冰箱反應 30 分鐘，再移至 37˚C 反應 15 分鐘。

(4) 加入 100 μl 的細胞培養液。

(5) 將細胞培養液 50 μl 移至新的 96 well plate。

(6) 加入 50 μl reconstitute substrate mix solution。

(7) 避光且在 25˚C 下反應 30 分鐘。

(8) 加入 50 μl stop solution。

(9) 測 490 nm 吸光值。

4.3.6 Alamar blue

細胞將原本藍色、無螢光性 alamar blue 染劑吞入後，細胞內粒線體的酵素 (NADH) 會將染劑還原成具螢光性的產物。Alamar blue 與 WST-1 均可測試細胞存活率，其差異在於 (1) alamar blue 不具細胞毒性，因此可以連續測試同一組細胞，或是用來做其他測試的標準化動作； (2) alamar blue 以螢光模式偵測，與吸收光原理相比，靈敏度較高。Alamar blue 在本研究中亦用來作為 alizarin red staining 量化測試的標準化。

測試方法

將細胞以 5 x 103 cell/ well 的數目鋪在 24-well plate 上，經過 24 小時後吸除培養液，加入 100 μl/ well 的材料萃取液，以未加入材料之培養液當作負控制組。加入 100 μl/ well 的實驗組材料萃取液及控制組之培養液至新的 96-well plate，一同在 37℃、5% CO_2 之培養箱中三、七、十四、二十一天的時間後做測試。

實驗步驟

1. 將 alamar blue 與細胞培養液以 1:10 比例混合，避光放置。
2. 吸除 well 中的細胞培養液。
3. 將混合後的 alamar blue 取 1mL 滴入每個 well。
4. 將 24-well plate 放回細胞培養箱中，等待 1.5 小時後取出。
5. 每個 well 取 100 μL 等待測試，過程保持避光。

6. 以螢光 ELISA reader 測試激發 560 nm/ 散射 590 nm 之螢光值。拿出一盤已經培養好細胞的 96 well plate。

4.3.7 電子顯微鏡觀察細胞貼附 (Cell adhesion)

將材料調拌，將調拌完成的混合物置入內徑 5 mm、外徑 6 mm、高 2 mm 的鐵氟龍環，然後將樣本試片儲存於 37℃、100%濕度的環境中水合 24 小時，等待它完成硬化完成。將試片置於無菌操作台以 UV 光將材料上、下兩平面各照射 20 分鐘進行材料表面滅菌。

實驗步驟

1. 以細胞培養液稀釋將細胞濃度調整到 1×10^5 cells/mL。將滅菌之試片樣本置於 24-well 細胞培養盤中，先加入 400 μL 細胞培養液浸泡五分鐘，然後加入 100 μL 含有人類牙髓細胞的培養液，使細胞數目維持在 1×104 cells/well。
2. 接著分別於 37℃、5%CO_2 的培養箱中培養 4 小時、24 小時後，將樣本取出以備後續 SEM 觀察。
3. 將所製備之樣本先以 PBS 沖洗，然後使用 2.5%的戊二醛（Glutaraldehyde）於 4℃固定細胞 30 分鐘，接著以二次水沖洗兩次，每次 5 分鐘，以移除殘餘的戊二醛，之後進行酒精系列濃度脫水，將標本依序浸在 50%、

70%、80%、90%、95%的酒精中各十五分鐘，再以 100%的酒精浸泡兩次，每次各十五分鐘。

4. 將樣本作臨界點乾燥：使用臨界點乾燥器，以二氧化碳進行臨界點乾燥，乾燥後的標本以碳膠黏在鋁台上，以離子覆膜機作金覆膜後進行 SEM 的觀察。

4.4 體外生物活性 (In vitro bioactivity)

4.4.1 Alizarin Red S 定性染色

將細胞以 $5x10^3$ cell/well 的數目鋪在 24-well plate 上，經過 24 小時後吸除培養液，加入 1 ml/well 之材料萃取液，置放於細胞培養箱中分別培養 14 和 21 天，每 3 天更換一次萃取液，之後進行 Alizarin Red S 染色。

實驗步驟

1. 以 alamar blue 測試每組樣本之細胞活性。
2. 將培養液吸除，以 PBS 清洗兩次。
3. 加入 4% paraformaldehyde 固定細胞，靜置 30 分鐘。
4. 吸除固定液，以 PBS 沖洗兩次，加入約 500μl/well 之 2% Alizarin Red S staining working solution (pH 值為 4.1-4.3)，於室溫下靜置 20 分鐘。
5. 移除染劑，以 PBS 清洗多餘染劑並加入 PBS 保存，利用光學顯微鏡觀察細胞型態與染色情況並拍照存檔。

4.4.2 Alizarin Red S 定量染色

將細胞以 $5x10^3$ cell/well 的數目鋪在 24-well plate 上，經過 24 小時後吸除培養液，加入 1 ml/well 之材料萃取液，置放於細胞培養箱中分別培養 14 和 21 天，每 3 天更換一次萃取液，之後進行 Alizarin Red S 定量分析。

實驗步驟

1. 將培養液吸除，以 PBS 清洗兩次。
2. 加入 4% paraformaldehyde 固定細胞，靜置 30 分鐘。
3. 吸除固定液，以 PBS 沖洗兩次，加入約 500 μl/well 之 2% Alizarin Red S staining working solution (pH 值為 4.1-4.3)，於室溫下靜置 20 分鐘。
4. 移除染劑，以 PBS 清洗多餘染劑，並加入 500 μL 10% cetylpyridinium chloride 溶液，在室溫下避光慢速搖晃反應3小時。
5. 利用 ELISA reader 測量波長 550 nm 之吸光值。
    1. 將每組樣本之 550 nm 吸光值以 alamar blue 螢光強度標準化後，進行統計分析。

4.5 動物實驗 (Animal study)

4.5.1 動物實驗

本實驗經國立臺灣大學醫學院暨公衛學院動物實驗管理小組審查同意 (同意書編號：20120057)。實驗使用 2 隻小獵犬，14 顆牙齒，狗年齡平均一歲半，體重約 18 公斤。至少隔離並觀察一個星期後，確保動物健康狀況良好才開始實驗。

每隻狗使用 7 顆牙齒(門齒、犬齒、小臼齒及大臼齒)，分別放入不同覆髓材料:

Group 1: CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGFβ-1 (n=6)

Group 2: CPC/ hydrogel (n=6)

Group 3: ProRoot® MTA (n=2)

手術過後兩個月以福馬林灌流犧牲，手術與動物犧牲前 24 小時開始禁食。

4.5.2 實驗步驟

1. 將狗以藥物（Zoletil 2 ml、Atropin 0.5 ml、2% Rompun 0.1 ml）經皮下注射給予進行全身麻醉，鋪上治療巾隔絕非手術區。
2. 手術區域的軟組織和牙齒以 2% chlorohexidine gluconate 進行消毒。
3. 手術區牙齒頰側前庭以 2% lidocaine（內含 1:80000 epinephrine）一管共 1.7 ml進行局部麻醉。
4. 戴上橡皮帳（Rubber dam）隔絕口水及防止藥水或藥劑滲漏至口中。

5. 使用 75%酒精將手術區域的牙齒以及橡皮帳再次進行消毒。

6. 以高速磨牙手機及圓形鑽石鑽針在牙齒的頰側面齒頸部車出一個 0.5~1 mm 左右 Class V 的窩洞，直到牙髓暴露。

7. 以 10 ml 的生理食鹽水沖洗窩洞處以洗去殘屑。

8. 用已消毒過乾淨的棉球止血。

9. 待止血後將覆髓材料填置於牙髓暴露處，並清除窩洞壁上多餘的覆髓材料，至少露出 2 mm 乾淨的寬度，以避免滲漏。

10. 以玻璃離子體(GC FUJI II^{TM}, GC America Inc.)做冠部封閉(Coronal seal)。以上流程圖如圖4-2。

4.5.3 動物灌流

1. 以藥物（Zoletil- 2 ml、Atropin- 0.5 ml、2% Rompun- 0.1 ml）經皮下注射給予實驗動物進行全身麻醉。過程中隨時注意實驗動物之麻醉藥狀態，視情況隨時補予麻醉藥。

2. 以剃刀將頸部的毛剃除。

3. 左右邊頸部皮下各注射 2% lidocaine（內含 1:80000 epinephrine）一管，兩側共3.4 ml。

4. 以 15 號手術刀在甲狀軟骨做右兩側約三公分處各做一條約八公分長垂直方向的切線。

5. 撥開筋膜後以黑絲線定位頸外靜脈與頸內動脈。

6. 將 18 號靜脈留置針放入左右頸內動脈，以靜脈注射用管線接合生理食鹽水軟袋，再以黑絲線固定留置針頭。

7. 兩側各以加壓袋施壓約 200-300 mmHg 給予 500 ml 生理食鹽水。

8. 以 18 號靜脈留置針放入一側頸外靜脈，以靜脈注射用管線接合強力吸力幫浦，再以黑絲線固定留置針頭。

9. 兩側頸內動脈各以加壓袋施壓約 200-300 mmHg 換置 1000 ml 10%福馬林。

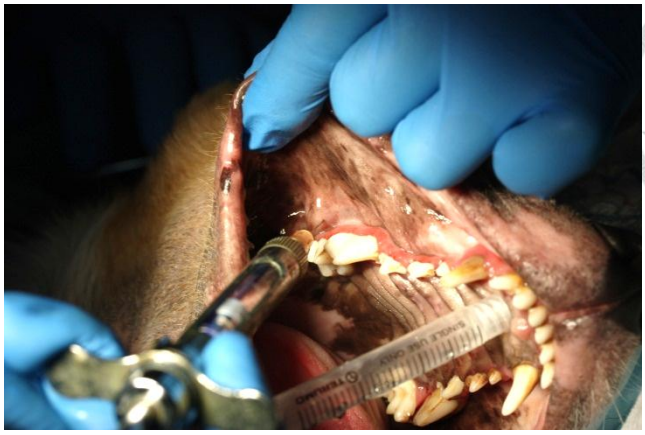
4.5.4 標本備置

1. 上下顎以鋸子鋸下。

2. 牙齒拔除下來並立即砍去根尖 1/3，使固定液充分進入齒內組織。

3. 牙根多餘組織去除，洗淨表面血塊。

4. 牙齒浸泡於 10％ 福馬林中固定一週。

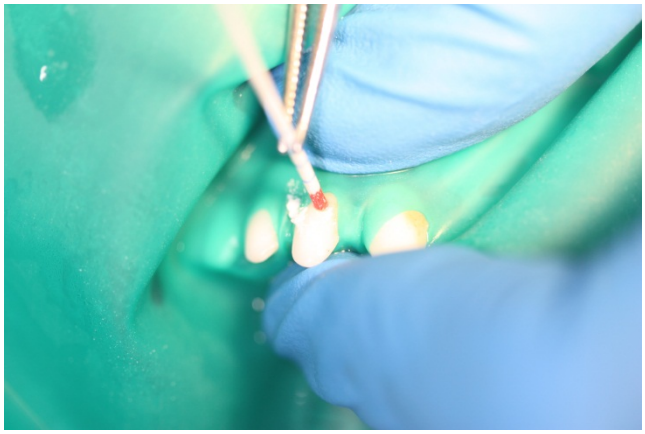


(A)

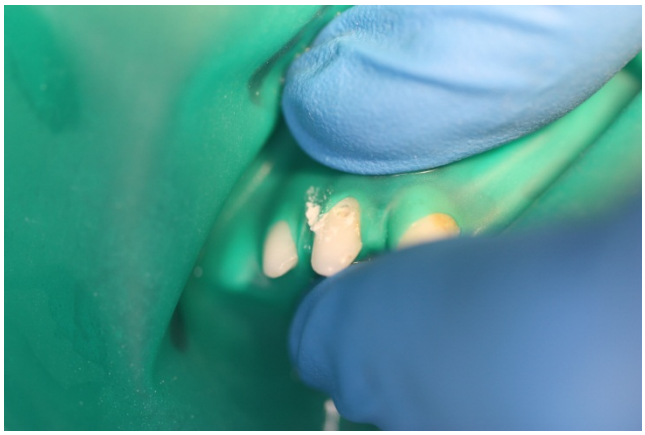
(B)

(C)

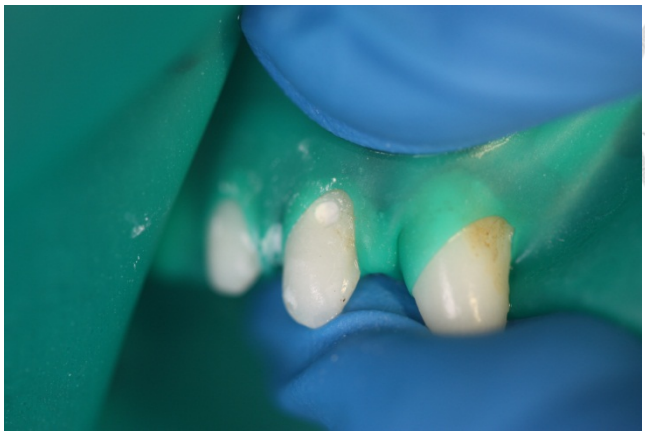
(D)



(E)



(F)



(G)

(H)

圖 4-2 動物實驗活髓治療步驟。(A) 手術區域進行局部麻醉；(B) 以橡皮障隔離後，以高速磨牙機搭配冷卻沖洗，進行窩動修磨；(C) 修磨治牙髓露出；(D) 調拌材料；(E) 將材料填入窩洞進行覆髓，並以紙針吸乾多餘水分；(F) 刮除多餘材料；(G) 覆髓材料填平後，以玻璃離子體覆蓋窩洞 (H) 治療完成後，移除橡皮障。

4.5.5 Micro CT

將 10%福馬林固定一週的牙齒以去離子水沖洗乾淨並擦乾後，以 μ-CT 機器 Skyscan 1176 (SKYSCAN, Kontich, Belgium)照射，照射參數如下：

電壓：90 kV

電流：278 μA

解析度：18 μm

filter：0.1mm 厚度銅

掃描角度：180˚，0.5˚/pic

Average = 3

4.5.6 Evaluation

Accorinte 於 2008 年研究以 MTA 和氫氧化鈣作為人類牙齒覆髓材料之評估，根據 Mestrener 的評估方式加以改良[12]，來評估硬組織的新生，牙髓的發炎反應及其他發現。針對每個評估標準給予分數 1~4 分，分數越小表示結果越好[42]。(見表 4-1)

表 4-1 牙本質橋生成評估表

Score	連續性	厚度
1	形成完整的硬組織橋	>250 μm
2	有硬組織形成，且覆髓材料與牙髓組織間有些地方相連	150 ~ 249 μm
3	只在暴露牙髓組織側壁觀察到硬組織生成	1 ~ 149 μm
4	完全沒有硬組織生成	不完全或無硬組織橋

第五章：結果與討論

5.1 材料製備與物理性質評估

本部分實驗主要探討：

1. 磷酸鈣骨水泥（Calcium Phosphate Cement, CPC）添加不同比例之聚麩胺酸-明膠(γ-PGA-gelatin)之固化時間及機械性質。牙科材料需要有適當的硬化時間，以利臨床操作。若是所需硬化時間太長，將會造成延長治療時間，甚至材料若無法在就診當次硬化，造成無法提供復形材料足夠的厚度空間隔絕細菌，則造成再度感染的風險。另因牙齒為一反覆受力之結構，故活髓材料仍須具有一定的抗壓強度，強度太弱可能造成材料之崩塌則使治療失敗。因此實驗首先研究添加聚麩胺酸-明膠之比例對磷酸鈣骨水泥固化時間及抗壓強度之影響，以此決定所需之聚麩胺酸-明膠比例。

2. 磷酸鈣骨水泥加入聚麩胺酸-明膠之水膠後，對材料降解性質、相變化、微觀結構是否造成影響。

(以下圖表中將磷酸鈣骨水泥簡稱 CPC，磷酸鈣骨水泥添加水膠簡稱 CPH)

5.1.1 硬化時間 (Setting Time)

在水中加入不同比例之聚麩胺酸與明膠交聯後形成水膠。水膠與CPC調拌後，發現聚麩胺酸與明膠的比例若高於 2% γ-PGA + 1% gelatin，則無法形成固化，如圖 5-1 所示。而加入聚麩胺酸與明膠的比例為 1% γ-PGA + 1% gelatin 或 1% γ-PGA + 2% gelatin 時，與 CPC 之固化時間相當，所有組別材料初始固化時間約介於 5-7 分鐘，最終固化時間介於 8-10 分鐘，可符合臨床需求。

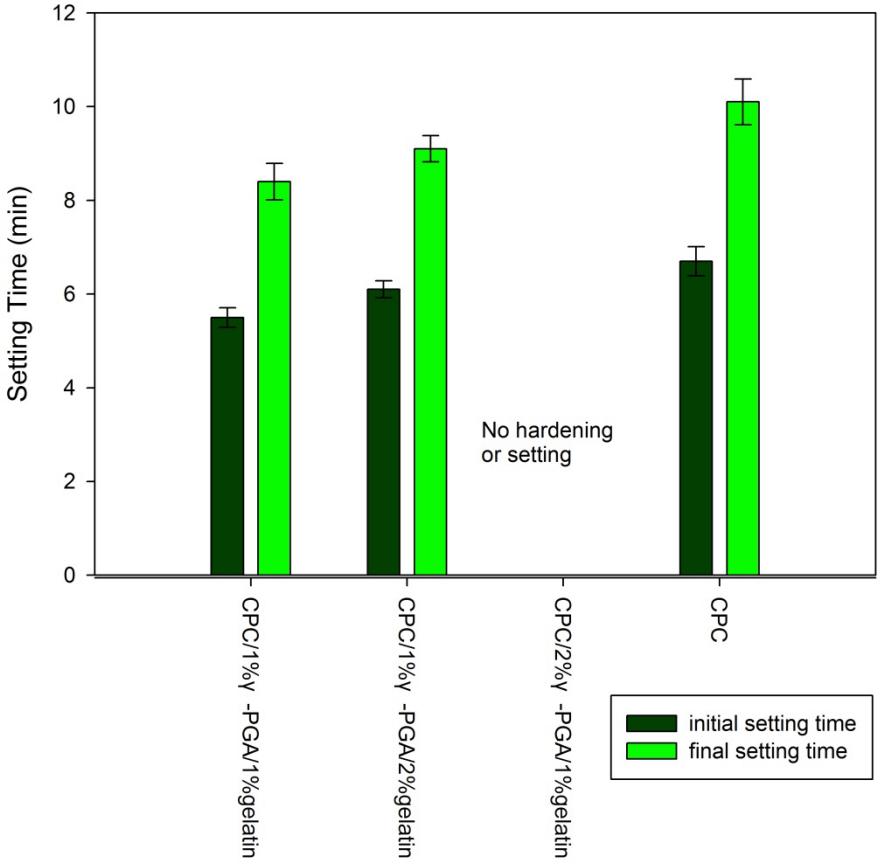


圖 5-1 γ-PGA 和 gelatin 含量對 CPC/ hydrogel 初始與最終硬化時間影響

5.1.2 抗壓強度 (Compressive strength)

以固化時間測試初步篩選出會固化的材料組別，接受抗壓強度測試。於硬化後 4 小時、1 天、7 天的測試結果都可發現 1% γ-PGA + 2% gelatin 的抗壓強度顯著低於 CPC 及 CPC/ 1% γ-PGA/ 1% gelatin 的材料組別。在臨床治療上，若是材料置放的位置太靠近冠部或者外部的復形材料厚度不足，則抗壓強度太低可能會造成治療材料裂掉的風險，尤其 CPC 是一種受力下容易產生裂紋且延伸的材料，因此我們選擇留下強度較佳的 1% γ-PGA + 1% gelatin 水膠組別，並觀察 CPC 與水膠調拌是否會干擾其結晶相的轉變。

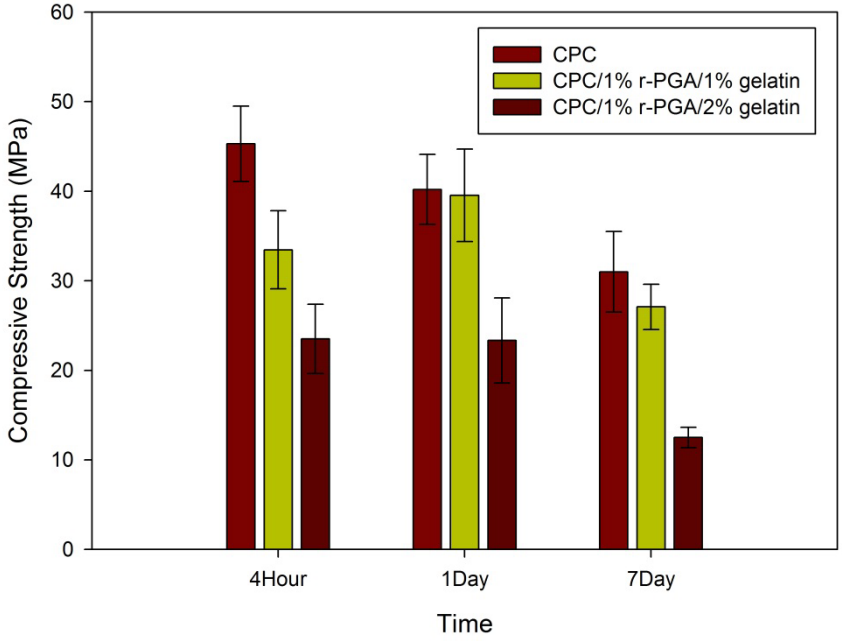


圖 5-2 γ-PGA 和 gelatin 含量對 CPC/ hydrogel 抗壓強度之影響

5.1.3 降解測試

降解測試初步從試片外觀的完整性、溶液的清澈度判斷，也可從試片重量損失較為精確的量測結果來判斷其降解情形。圖 5-3 為 CPC 及 CPH 於 PBS 中一天、三天、七天、十四天、二十八天之重量損失率，由圖可觀察 CPH 整體降解程度較 CPC 高，但兩者皆成同一趨勢，觀察前期的降解速率較快，越後期的降解速率越慢。而放置二十八天的重量損失範圍為 14.9~17.5%。

Wei 的研究中顯示[43]，α-TCP 會在水中溶解，使水溶液形成過飽和狀態，再沉澱再結晶為 hydroxyapatite (HAp) 或 calcium deficient hydroxyapatite (CDHA)，生醫材料的溶解、形成過飽溶液、接下來進行再結晶，可能是本實驗中降解速度隨著時間降低的原因。而材料隨著時間分解，再結晶為多孔性結晶，可能有利於細胞長入與組織生長 (參見圖 5- 8, 5-9)。

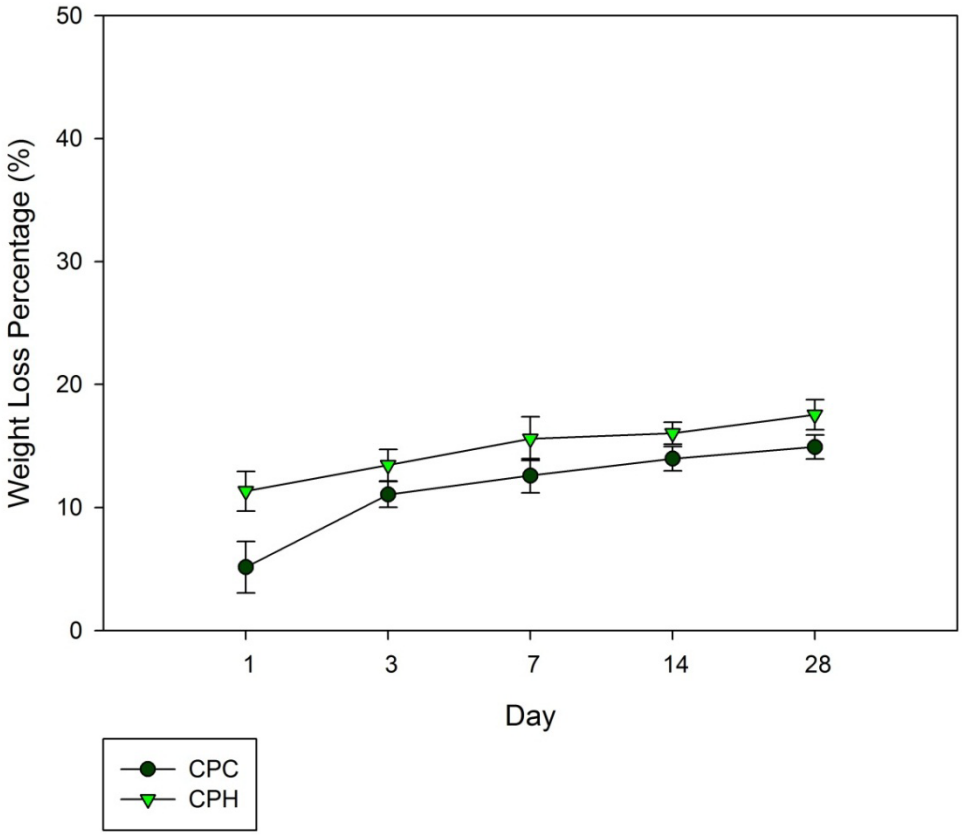


圖 5-3 CPC 與 CPH (CPC/ 1% gelatin/ 1% γ-PGA) 浸泡於 PBS 之重量損失率

5.1.4 X 光繞射分析 (X-ray Diffraction Analysis)

圖 5-4 到圖 5-7 為 CPC 和 CPH 水合三天、七天、十四天、二十八天之 X 光繞射圖形。由 Jade 6 軟體分析比對資料料庫後，確認與材料之主成分 α-TCP(JCPDS 9-348) 及 hydroxyapatite(JCPDS 9-432) 之主要繞射峰符合。

從圖 5-4 到 圖 5-7 可以發現，隨著材料浸泡的時間增加，α-TCP 的主繞射峰強度也逐漸降低，代表 α-TCP 隨著時間降解，而加入 hydrogel 並不影響 α-TCP 隨著時間降解的性質。而 hydroxyapatite 主繞射峰強度則無明顯的隨著時間增加或減弱。

α-TCP 的結晶相轉換會先自 α-TCP 溶解開始，形成過飽和溶液，在開始再度生成 HAp or CDHA，而再結晶的產物決定於反應時的鈣磷比、溶液的酸鹼值、反應溫度。本實驗中無法明確分析再結晶的產物，可能的原因一方面是材料本身即有 25% hydroxyapatite 成分，除非結晶相轉換比例高，否則難以辨識；另一方面則是再結晶過程對反應環境敏感，會影響再結晶的產物種類。

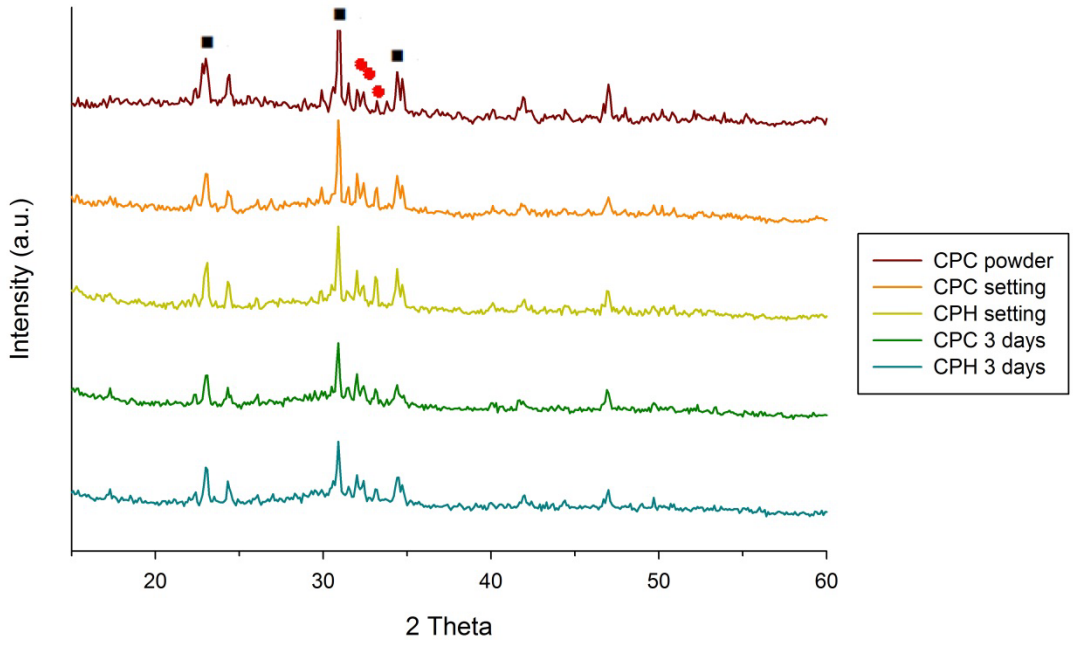


圖 5-4 CPC 及 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 水合三天後之 XRD 產物晶相分析

(■ ：α-TCP; ●：hydroxyapatite)

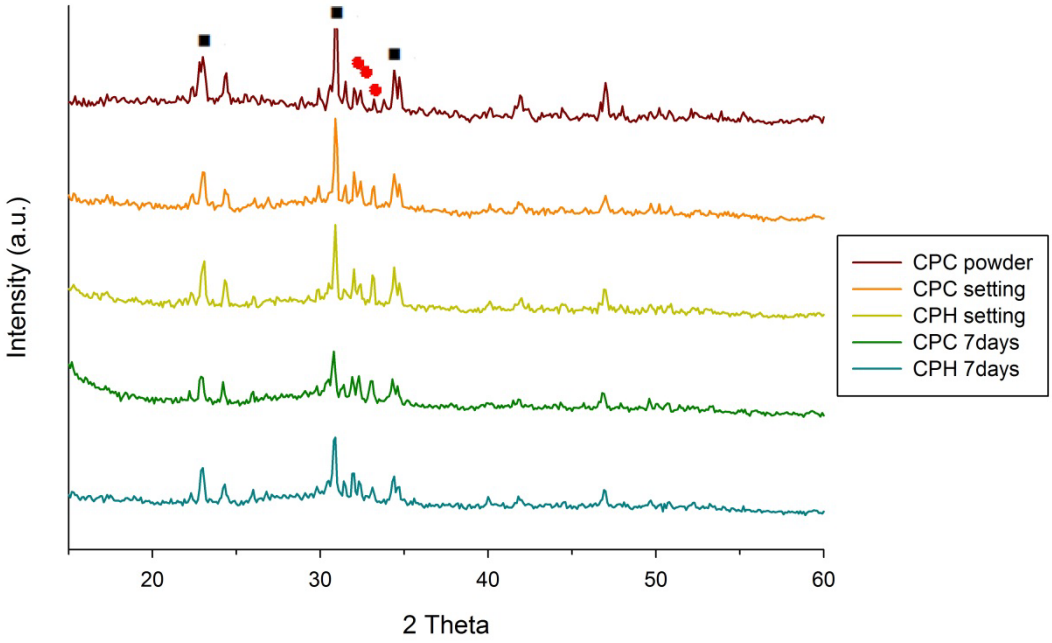


圖 5-5 CPC 及 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 水合七天後之 XRD 產物晶相分析

(■ ：α-TCP; ●：hydroxyapatite)

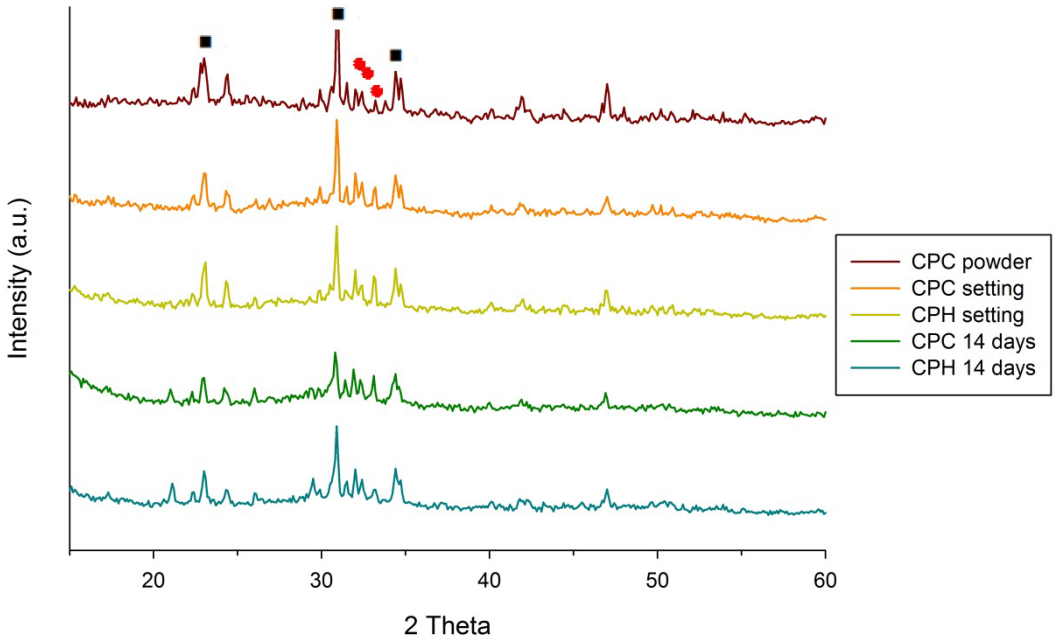


圖 5-6 CPC 及 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 水合十四天後之 XRD 產物晶相分析

(■ ：α-TCP; ●：hydroxyapatite)

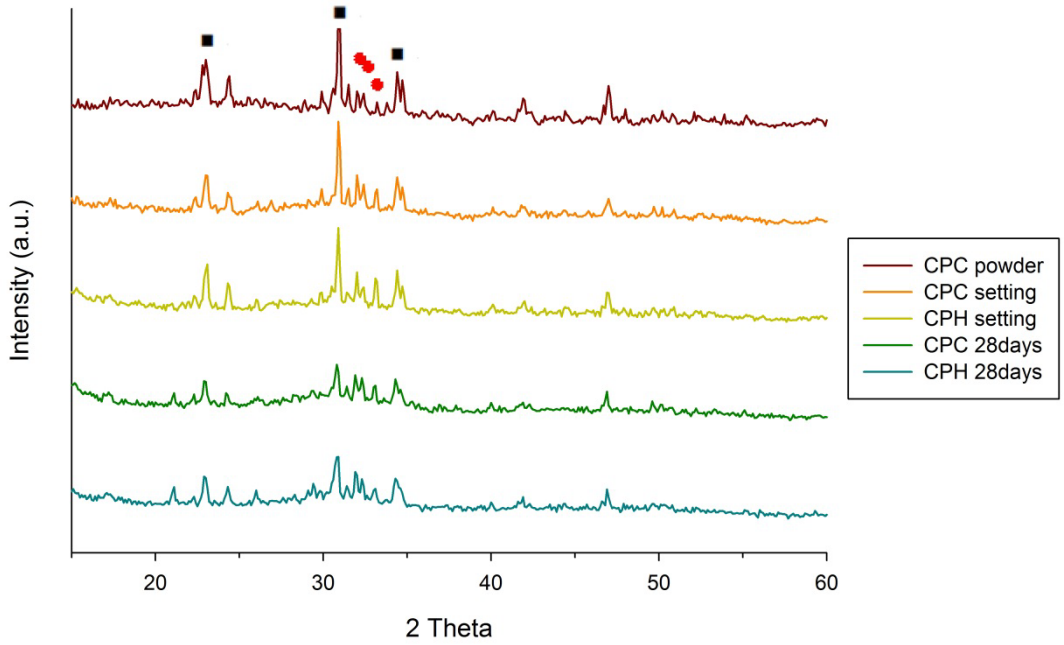


圖 5-7 CPC 及 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 水合三天後之 XRD 產物晶相分析

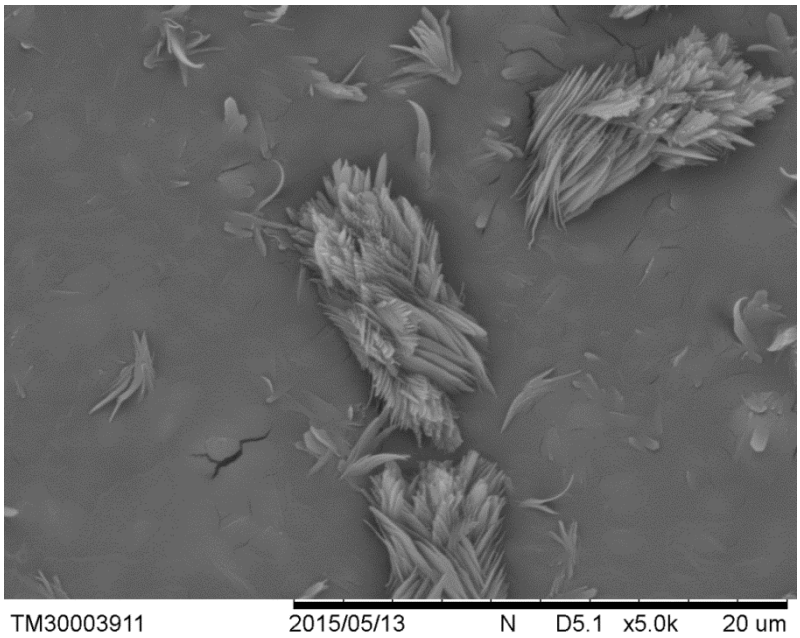
(■ ：α-TCP; ●：hydroxyapatite)

5.1.5 SEM觀察材料水合後之顯微結構

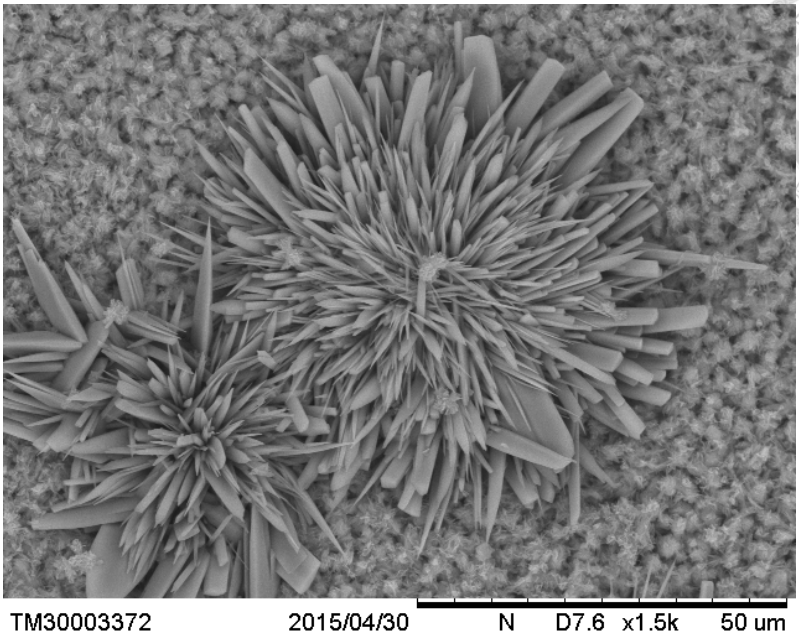
圖 5-8 及 圖 5-9 分別為 CPC 和 CPH 水合第零天、三天、七天、十四天、二十八天之材料表面顯微結構。可以見到不論是 CPC 或 CPH 在第零天就開始有結晶產生，第三天時表面可觀察到完整的 flower-like 結晶，第十四天時開始觀察到多孔狀結構，此多孔結構到了第二十八天更明顯。而 hydrogel 的添加，並不影響結晶相隨著時間改變。

許多研究中在 SEM 可觀察到再結晶的 hydroxyapatite 呈多孔狀的結構[44]，亦有研究發現 hydroxyapatite 結晶也有可能呈 flower-like 狀的結晶[45]，與本實驗的 HAp-like crystal 極為相似。

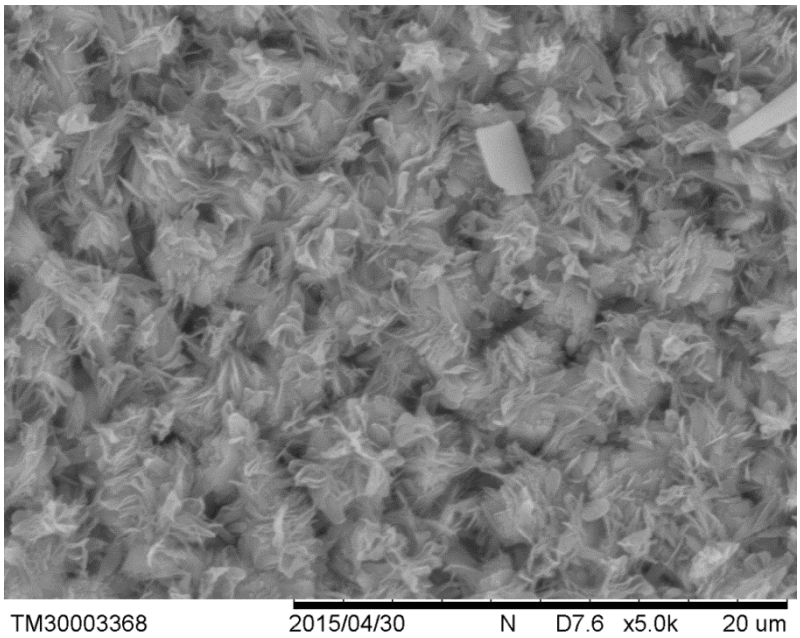
雖然在 X 光繞射中無法分辨材料的再結晶產物，但是 SEM 下觀察材料表面，確實有結晶的生成與轉換，且在 CPC 和 CPH 中，結晶的生成時間與結構是一樣的。



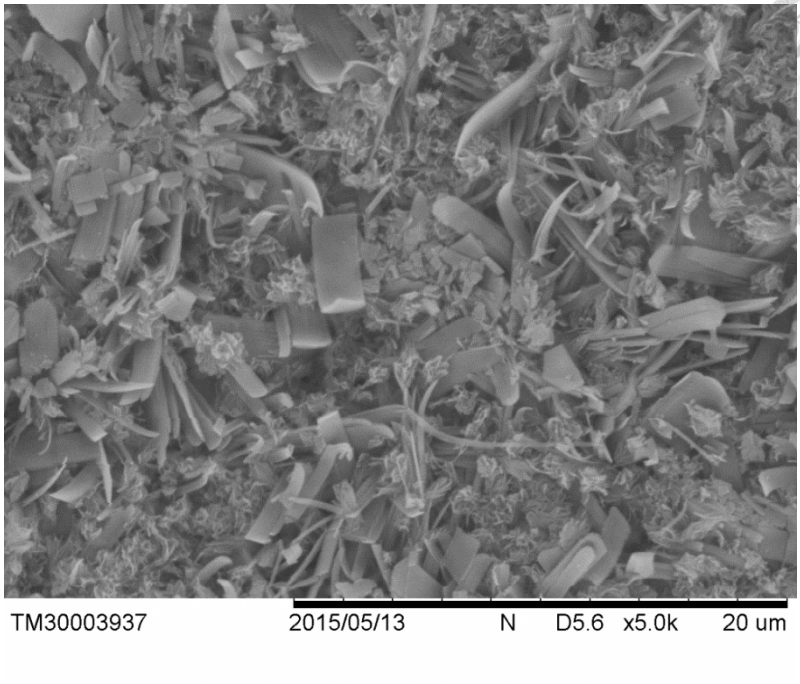
(A)


TM30003372
2015/04/30
N
D7.6
x1.5k
50 um

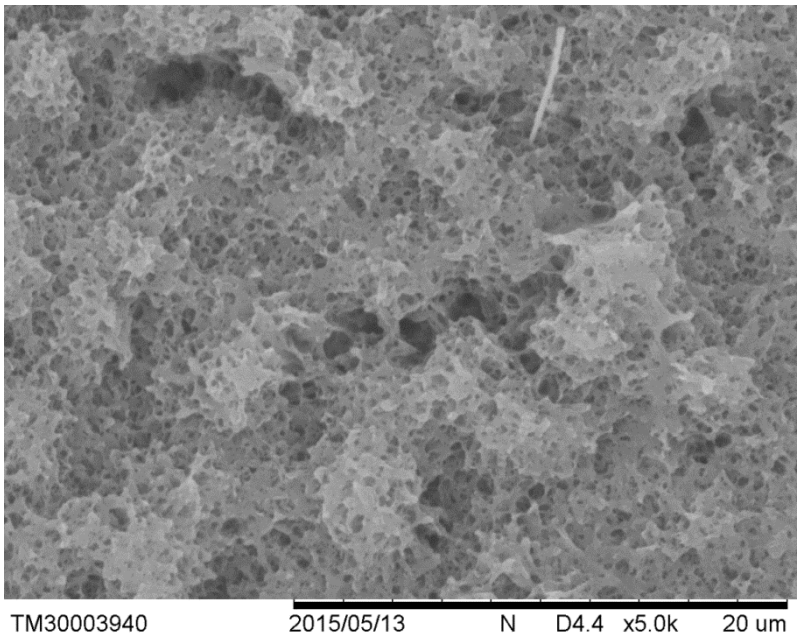
(B)


TM30003368
2015/04/30
N
D7.6
x5.0k
20 um

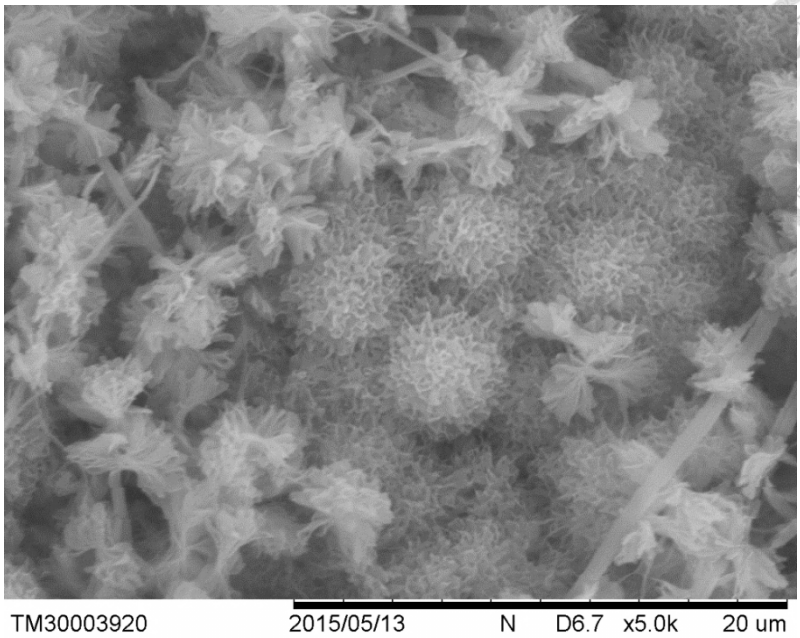
(C)


TM30003937
2015/05/13
N
D5.6
x5.0k
20 um

(D)

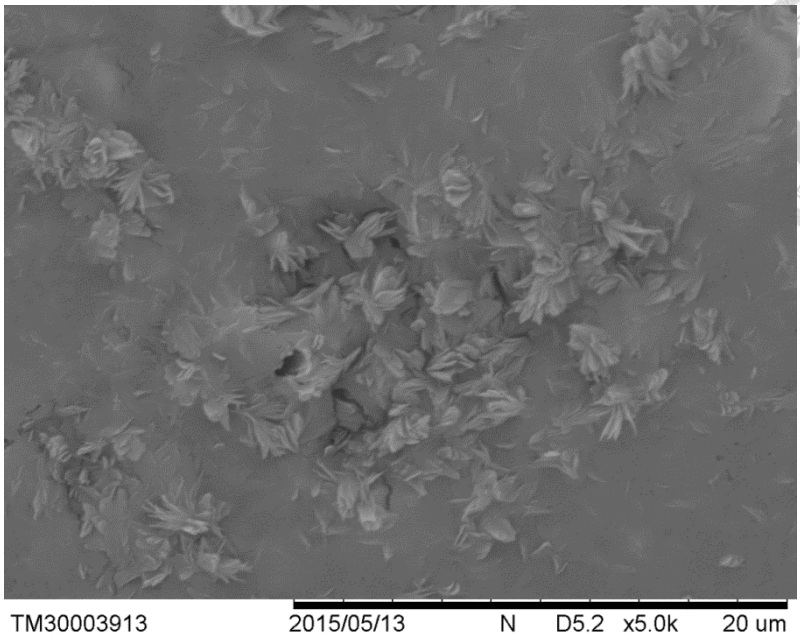

TM30003940
2015/05/13
N
D4.4
x5.0k
20 um

(E)

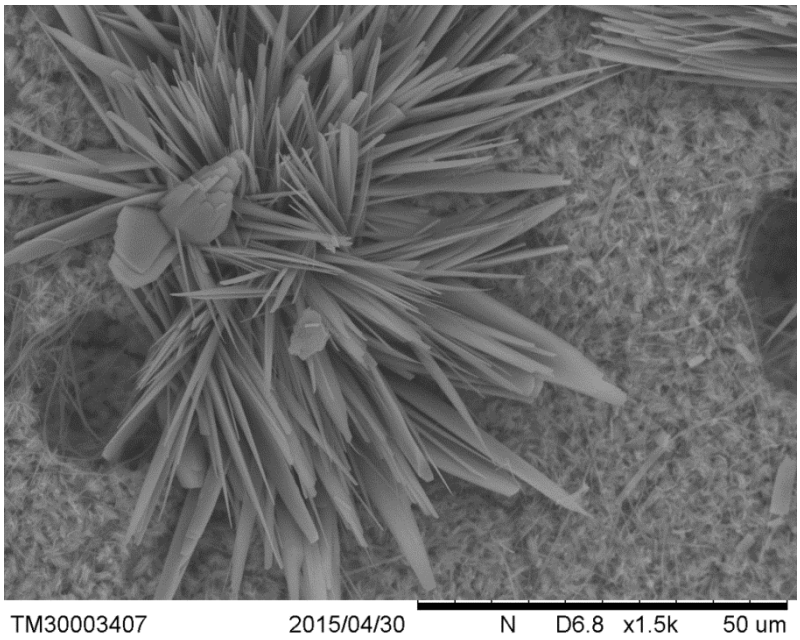


(F)

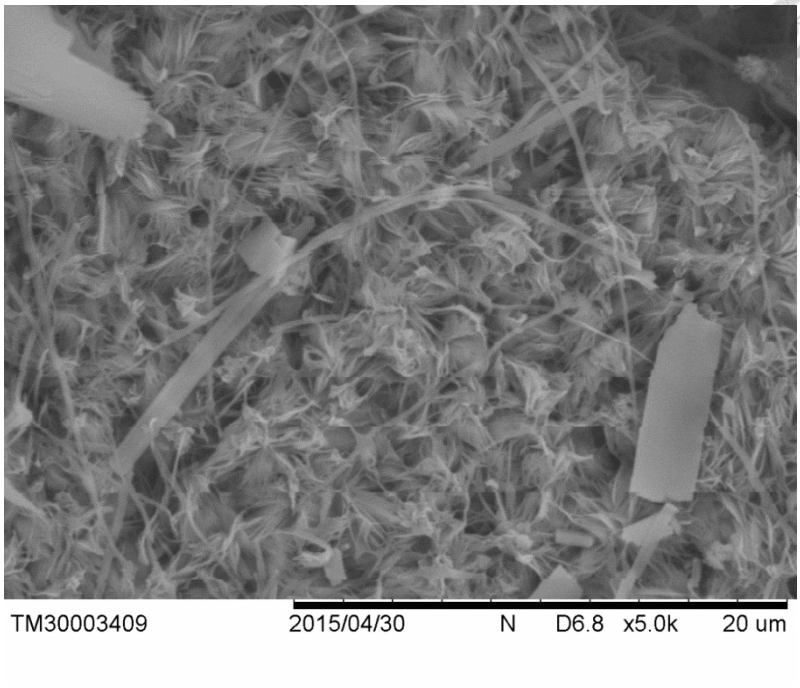
圖 5-8 SEM 觀察 CPC 浸泡於 PBS 不同時間點之水合產物表面顯微結構圖 (A) 第零天 (5000x); (B, C)第三天 (B:1500x; C:5000x); (D)第七天(5000x); (E)第十四天 (5000x); (F) 第二十八天(5000x)


TM30003913
2015/05/13
N
D5.2
x5.0k
20 um

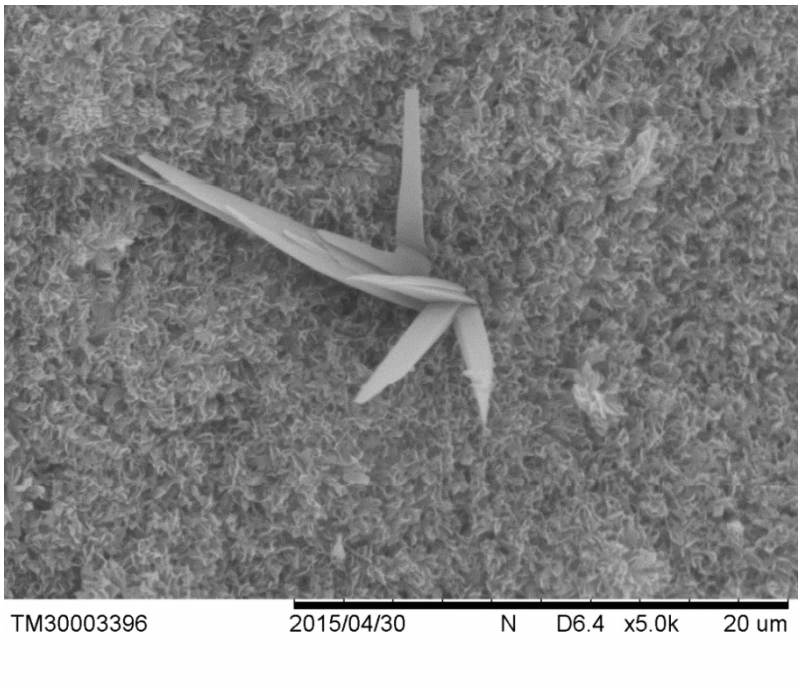
(A)


TM30003407
2015/04/30
N
D6.8
x1.5k
50 um

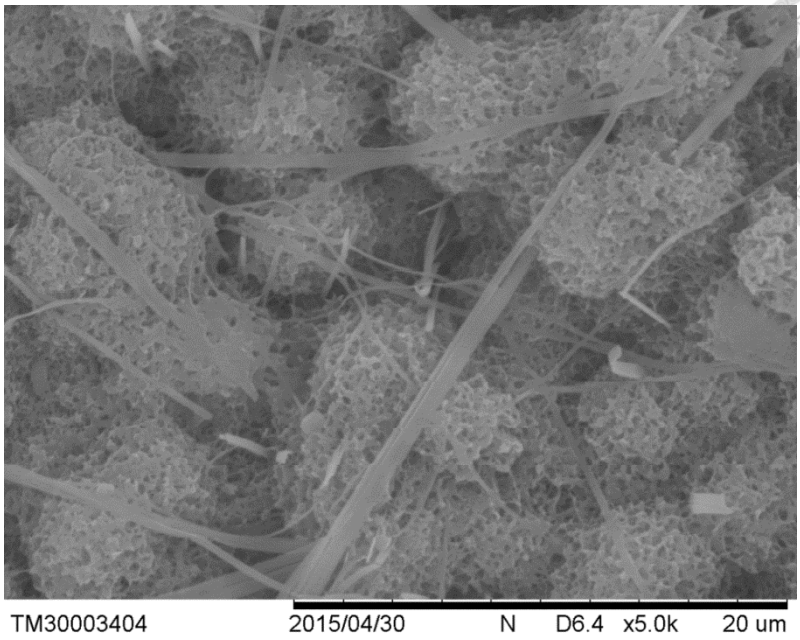
(B)


TM30003409
2015/04/30
N
D6.8
x5.0k
20 um

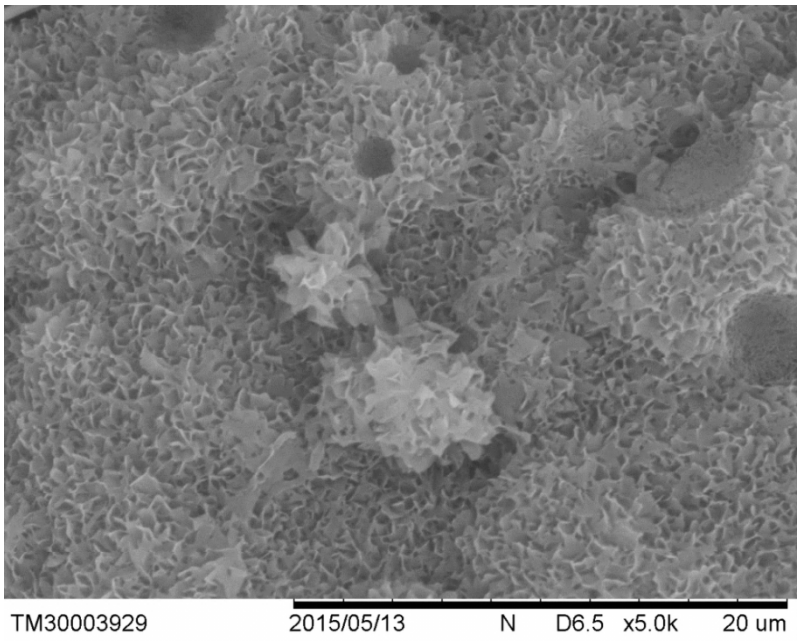
(C)


TM30003396
2015/04/30
N
D6.4
x5.0k
20 um

(D)



(E)



(F)

圖 5-9 SEM 觀察 CPC/ hydrogel 浸泡於 PBS 不同時間點之水合產物表面顯微結構圖 (A)第零天 (5000x); (B, C)第三天 (B:1500x; C:5000x); (D)第七天(5000x); (E)第十四天(5000x); (F) 第二十八天(5000x)

5.2 生物相容性評估

5.2.1 細胞貼附試驗

使用電子顯微鏡下觀察到人類牙髓細胞於材料（MTA、CPC、CPH）表面培養四小時及二十四小時後，多為伸出多個細胞突觸的多角形細胞，同時呈現細胞較為平貼的形態（圖 5-10, 圖 5-11, 圖 5-12, 圖 5-13），此外也可看到細胞與細胞間的突觸有相交連的現象，顯示材料有利於細胞貼附；而對照組 MTA 也有表現細胞貼附，但在四小時細胞突觸只有稍微伸展，直到二十四小時時細胞核仍未平貼，顯示細胞在 MTA 貼附狀況不及 CPC（圖 5-14, 圖 5-15）

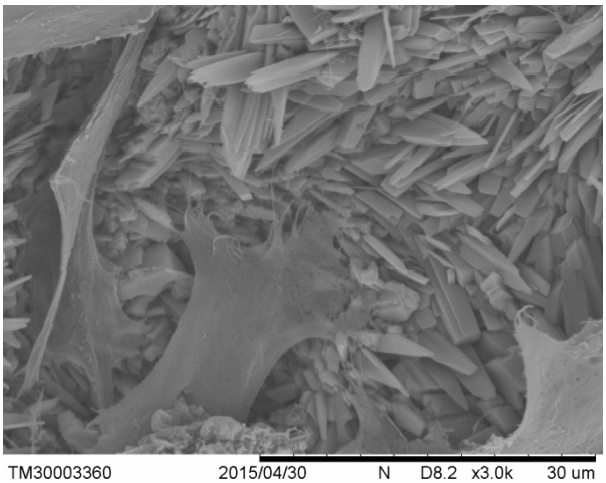


圖 5-10 牙髓細胞於 CPC 表面貼附四小時後情形

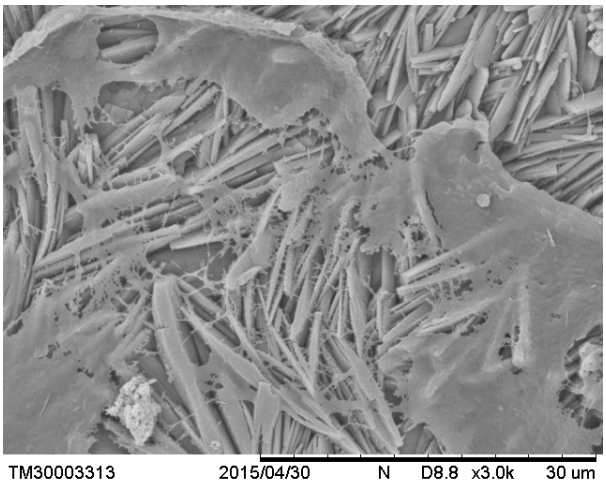


圖 5-11 牙髓細胞於 CPC 表面貼附二十四小時後情形

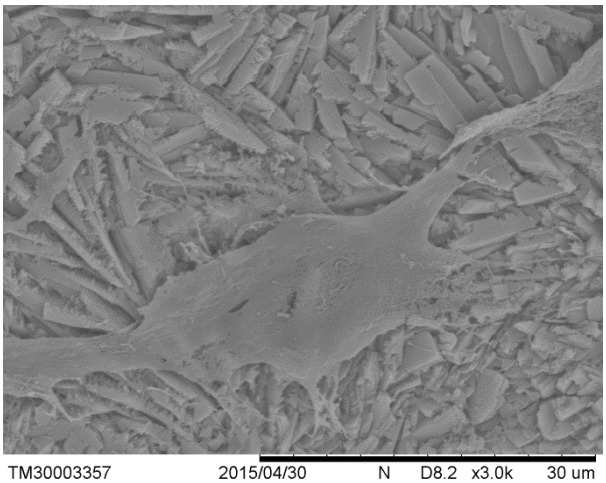


圖 5-12 牙髓細胞於 CPH 表面貼附四小時後情形

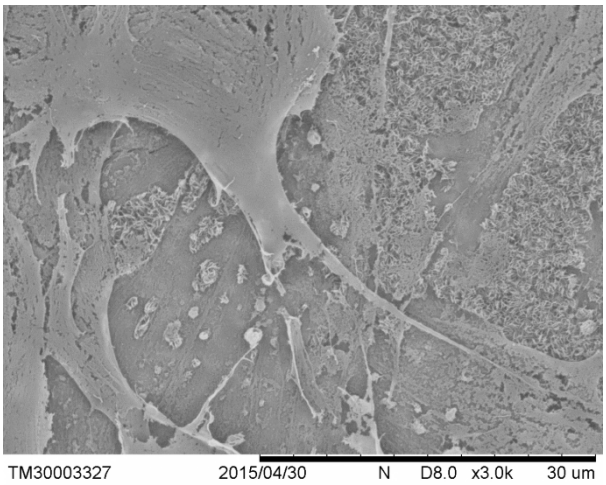


圖 5-13 牙髓細胞於 CPH 表面貼附二十四小時後情形

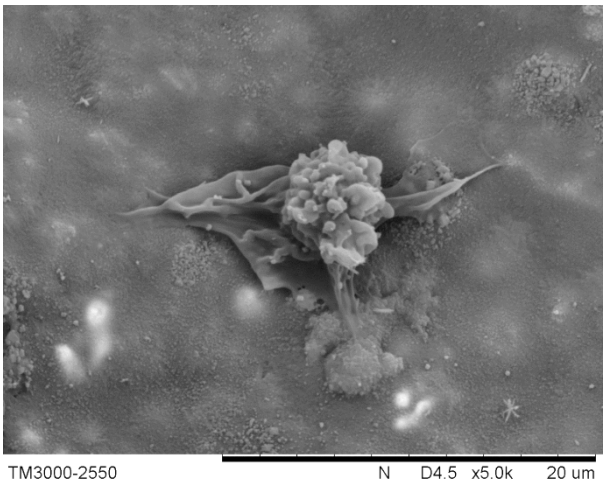


圖 5-14 牙髓細胞於 MTA 表面貼附四小時後情形

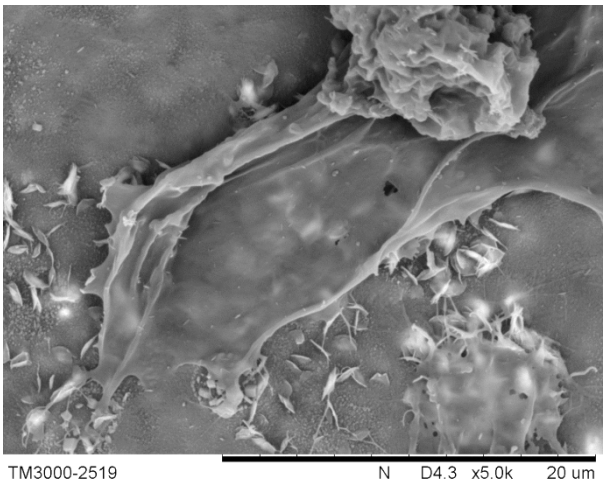


圖 5-15 牙髓細胞於 MTA 表面貼附二十四小時後情形

5.2.2 WST-1

圖 5-16、5-17 為牙髓細胞一天與三天 WST-1 之結果。可以看到牙髓細胞經萃取液培養一天與三天後，其存活率並無太大影響，存活率大約 90%以上，存活率低於七成。和市售材料 MTA 相比，並無達到統計上顯著的差異。

(以下圖中之 100 表示 CPC/ hydrogel/ 100 ng/ml TGF-β1；400 表示 CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1)

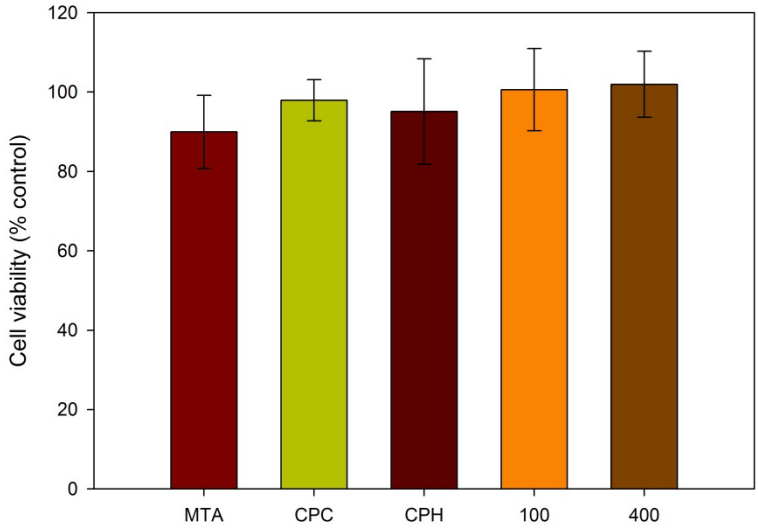


圖 5-16 牙髓細胞一天 WST-1 測試結果

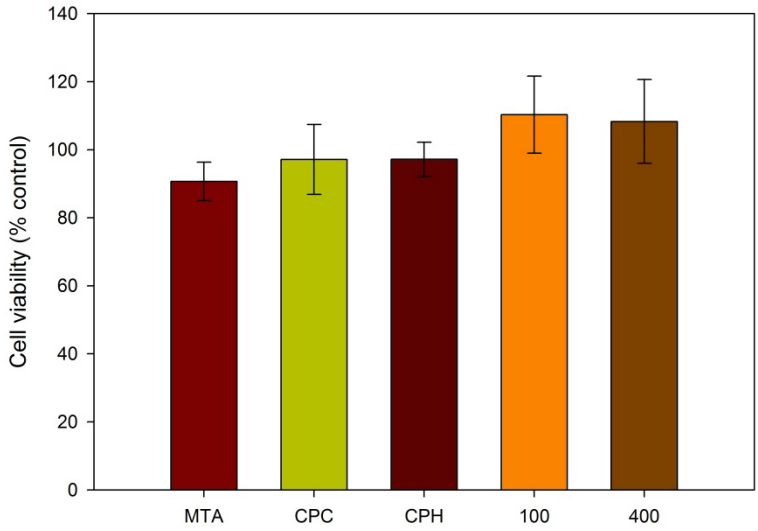


圖 5-17 牙髓細胞三天 WST-1 測試結果

5.2.3 LDH

圖 5-18 到 5-19 為牙髓細胞一天與三天 LDH 之結果。培養一天和三天後其細胞毒性介於 12 ~ 16%；而各組間沒有顯著的差異，皆無細胞毒性。

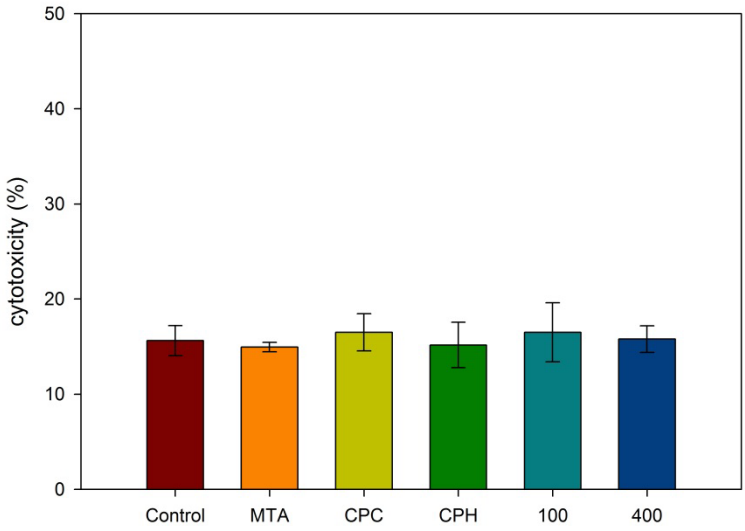


圖 5-18 牙髓細胞一天 LDH 測試結果

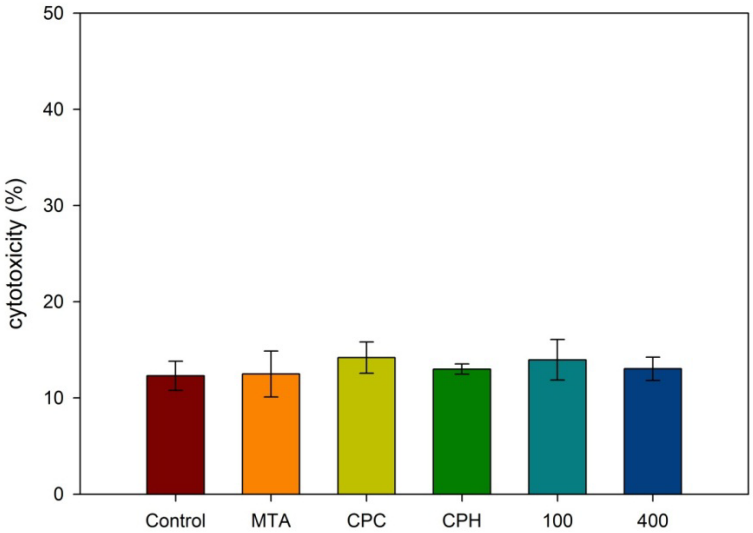


圖 5-19 牙髓細胞三天 LDH 測試結果

5.2.4 Alamar blue

圖 5-20 到 5-23 為牙髓細胞以萃取液培養三天、七天、十四天、二十一天 alamar blue 之結果。與材料培養三天時，所有磷酸鈣材料組別之細胞活性皆顯著高於對照組及 MTA 組，而接下來的七天、十四天、二十一天活性皆無顯著差異。整體來說，材料在第七天時活性最高，到了第十四天、二十一天時，活性開始降低，推測有可能是因細胞主要在前期增生，到了第十四天及二十一天開始分泌生成鈣化，此時活性降低。

綜合細胞存活率與細胞毒性測試結果，顯示 CPC 的生物相容性良好，且加入以 EDC 交聯之 γ-PGA/ gelatin 水膠，以及加入 TGF-β1，都不會造成生物相容性的降低。

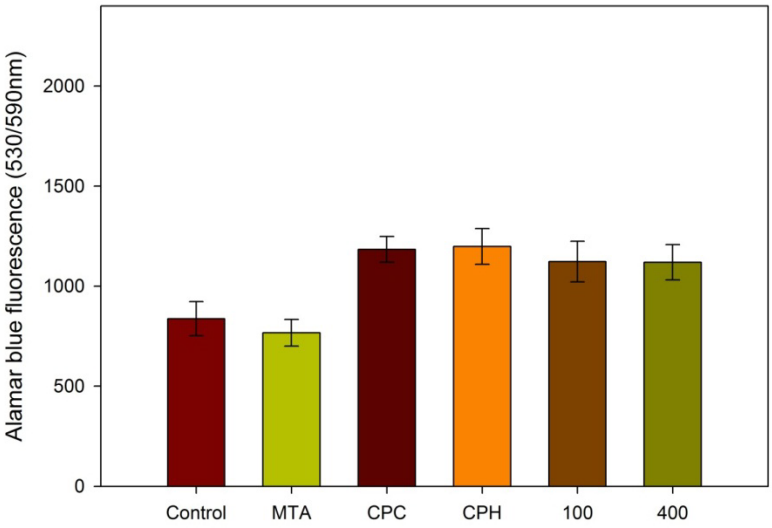


圖 5-20 牙髓細胞三天 alamar blue 測試結果

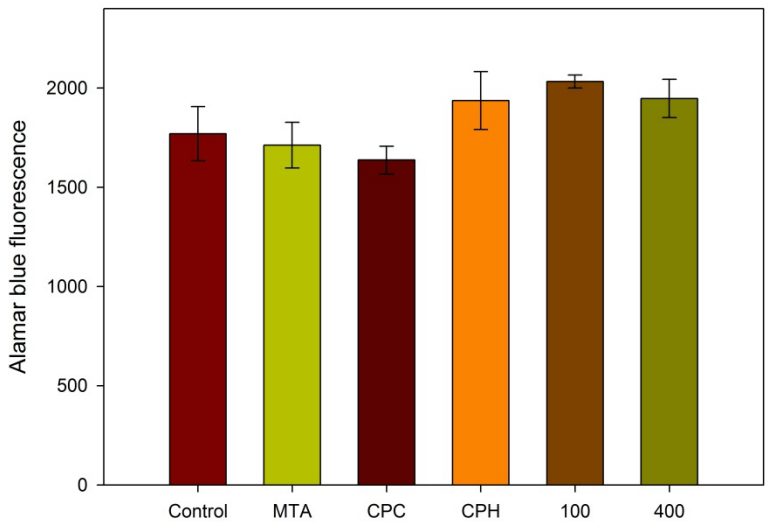


圖 5-21 牙髓細胞七天 Alamar blue 測試結果

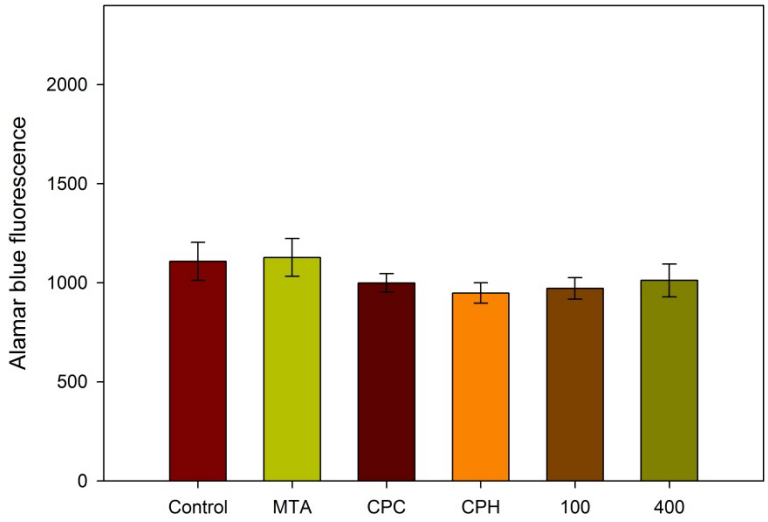


圖 5-22 牙髓細胞十四天 alamar blue 測試結果

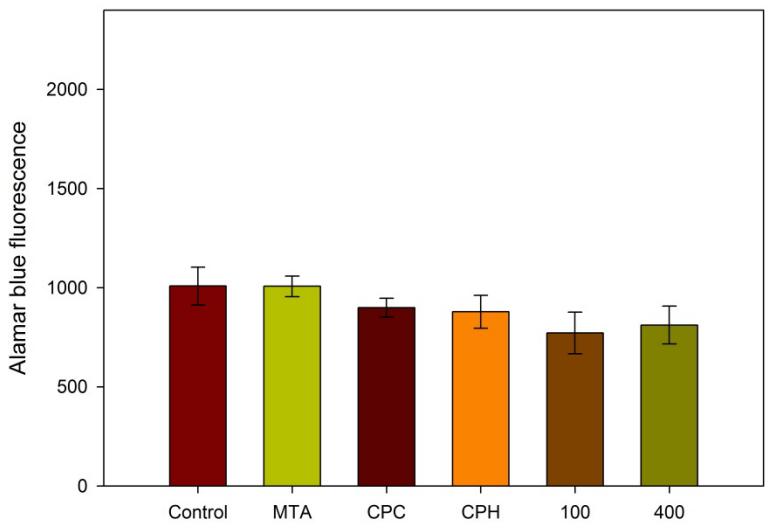


圖 5-23 牙髓細胞二十一天 alamar blue 測試結果

5.3 體外生物活性

5.3.1 Alizarin Red S 定性染色

圖 5-24 和 5-25 分別為牙髓細胞與不同材料萃取液培養 14 天及 21 天後 alizarin red S 之定性染色結果。在顯微鏡下可觀察到在 14 天時有加入 100 & 400 ng/ml TGF-β1 的磷酸鈣-水膠材料組已開始有少量鈣結節(calcification nodule)之生成，而對照組、CPC、MTA 則無觀察到鈣化生成。各組間在 21 天鈣結節差異更加明顯，可觀察到在加入 100 & 400 ng/ml TGF-β1 的磷酸鈣-水膠材料組有大量的鈣化生成，CPC、CPH 也有些許生成，MTA 和對照組則幾乎沒有。

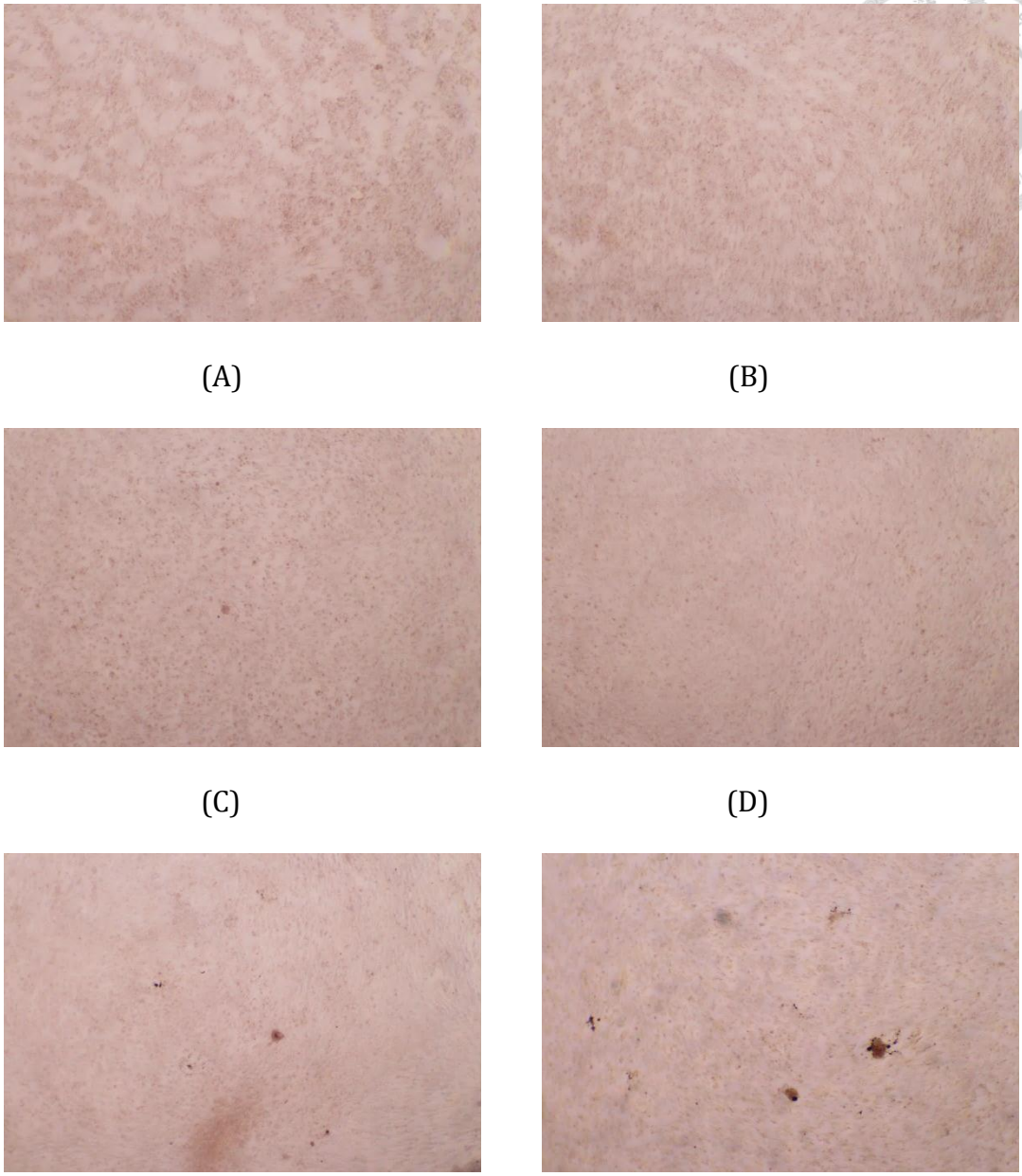
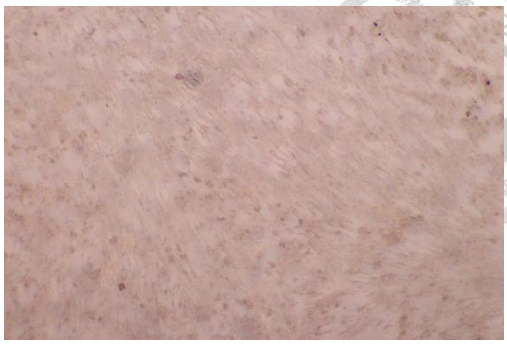
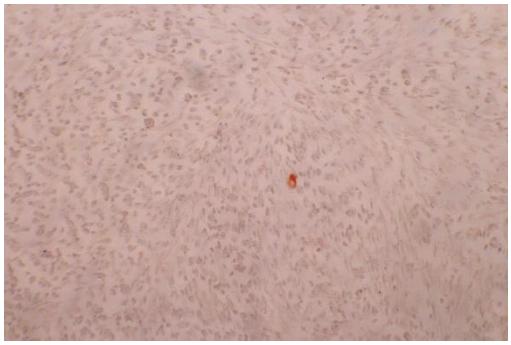


圖 5-24　牙髓細胞十四天 Alizarin red S 定性染色 (A) Negative control; (B) MTA; (C) CPC; (D) CPC/ hydrogel; (E) CPC/ hydrogel/ 100 ng/ml TGF-β1; (F) CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1

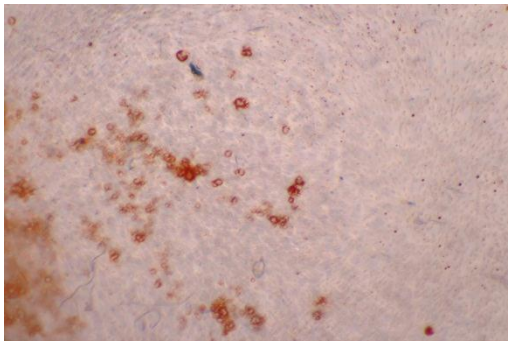
(A)



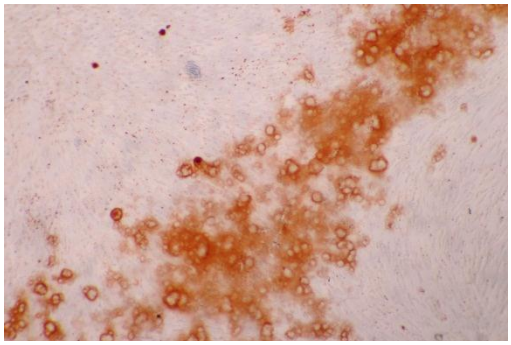
(B)



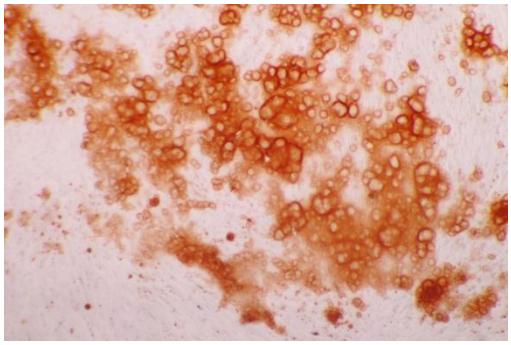
(C)



(D)



(E)



(F)

圖 5-25 牙髓細胞二十一天 Alizarin red S 定性染色 (A) Negative control; (B) MTA; (C) CPC; (D) CPC/ hydrogel; (E) CPC/ hydrogel/ 100 ng/ml TGF-β1; (F) CPC/hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1

5.3.2 Alizarin Red S 定量染色

圖 5-26 和 5-27 分別為牙髓細胞與不同材料萃取液培養 14 天及 21 天後 alizarin red S 之定量測試結果。在第 14 天時，所有磷酸鈣材料組的鈣生成量皆顯著高於 MTA 及對照組。而這個差距在 21 天更加拉大：CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1 鈣化生成量顯著的高過其他所有組別，CPC/ hydrogel/ 100 ng/ml TGF-β1、CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1、及 CPH 則是顯著高於 CPC、MTA、及對照組。

綜合體外生物活性的測試結果，alizarin red S 定性的實驗結果顯示，加入 TGF-β1 磷酸鈣材料組比其他材料更早出現顯微鏡下可見之鈣結節 (calcification nodule) ，且到第二十一天時已出現大量的鈣結節生成，而此時對照組與 MTA 尚未觀察到明顯的鈣結節。而 alizarin red S 定量的結果顯示，在十四天時，所有磷酸鈣組別之鈣生成量已顯著高於對照組與 MTA，可能機制與鈣離子調控有關；而在第二十一天時，加入 400 ng/ml TGF-β1 的促進細胞生成鈣化的效果最顯著，而對照組與 MTA 的鈣化生成量在 14 天及 21 天並無明顯成長，顯示在體外實驗中，磷酸鈣材料加入 TGF-β1 可以促進細胞提早生成鈣化。

因 21 天的結果中，加入 400 ng/ml TGF-β1 的鈣生成量高於 100 ng/ml TGF-β1，因此動物實驗採用 CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1 材料與 CPC/ hydrogel，評估加入 TGF--β1 於活體的療效，並採用 MTA 作為對照組。

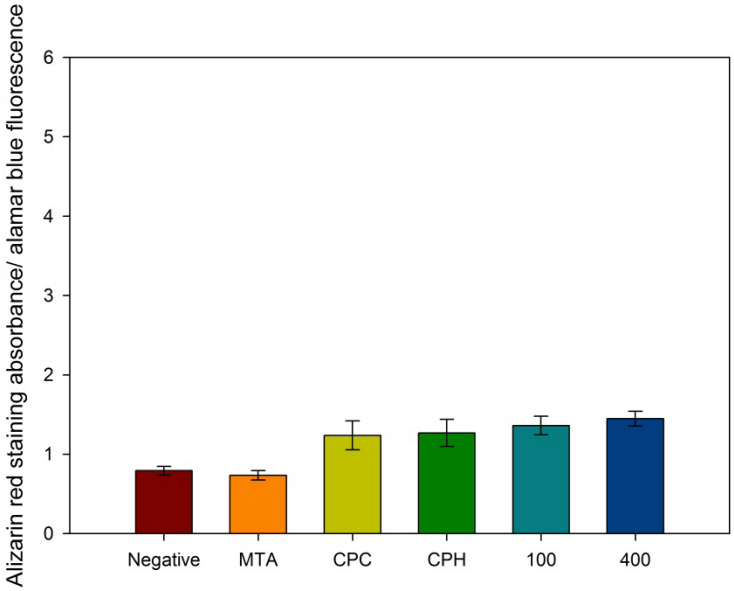


圖 5-26 牙髓細胞十四天 Alizarin red S 定量測試

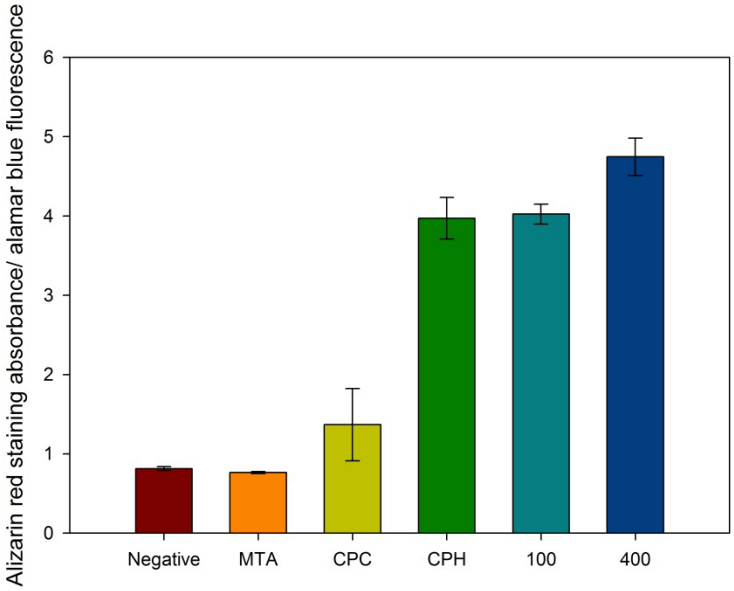
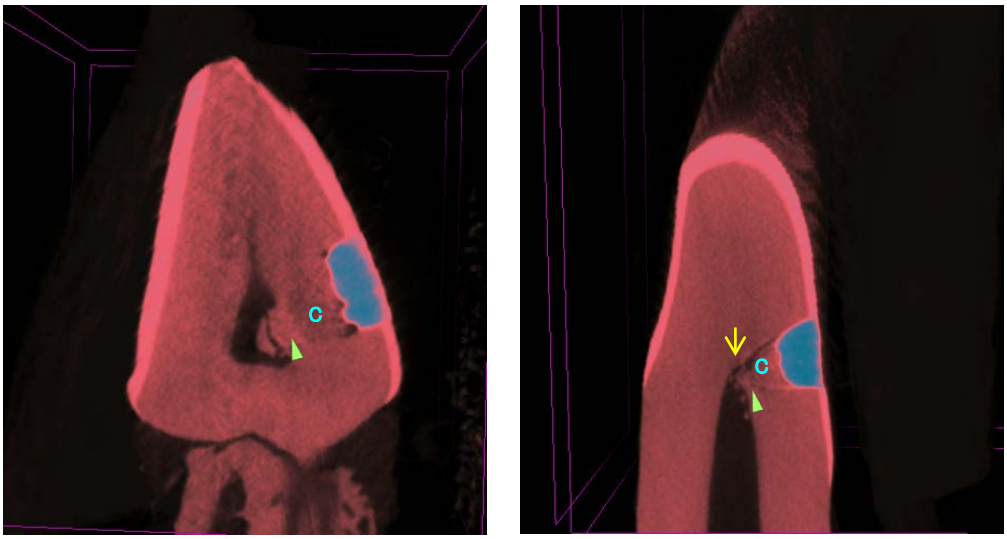


圖 5-27 牙髓細胞二十一天 Alizarin red S 定量測試

5.4 動物實驗

為了在活體中比較 TGF-β1 之效果，實驗比較了使用 CPH、CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1、MTA 做覆髓治療的效果。將接受覆髓治療兩個月的牙齒做 μ-CT 分析 (圖 5-28, 5-29, 5-30)，並且為了區分 CPC 與牙本質，重新套色。影像中可以看到最外層 X 光不透性高的部份是 GIC 填補材，所有組別都可以看到牙髓腔中有 X 光不透性之構造在窩洞邊緣，都可觀察牙本質橋生成的現象。

觀察 CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1 組別中的牙本質橋，所有樣本 (n=6) 都可發現連續的 X 光不透性之構造存在於牙髓腔與材料的交界。而 CPH (n=6) 和 MTA (n=2) 則有(圖 5-28 右圖, 圖 5-30 右圖) 部分樣本呈現不完全連續的牙本質橋，可觀察到部分硬組織形成，然而覆髓材料與牙髓組織間有部分相連 (表 5-1)。



(A) (B)

圖 5-28 CPC/ hydrogel 之動物實驗兩個月 μ-CT 影像。(C: 於實驗中放置之 CPC。箭頭 ▲：牙本質橋生成。箭號 ↓：不連續的牙本質橋)

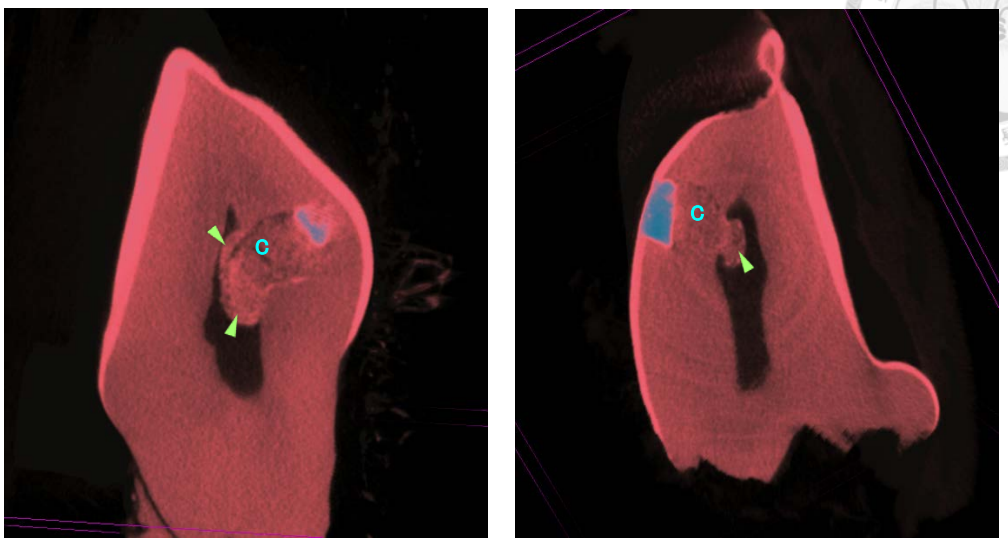


圖 5-29 CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1 之動物實驗兩個月 μ-CT 影像。(C: 於實驗中放置之 CPC。箭頭 ：牙本質橋生成。)

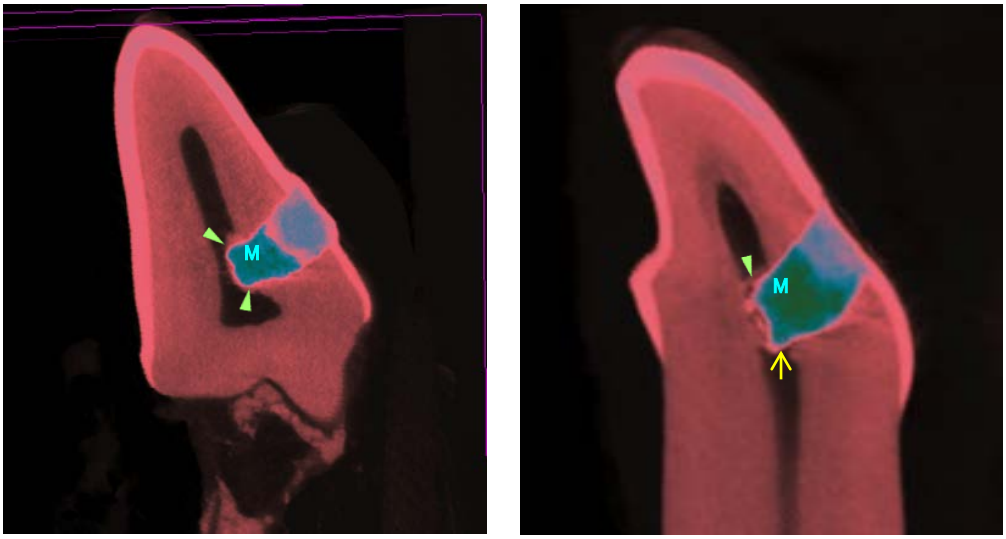


圖 5-30 MTA 之動物實驗兩個月 μ-CT 影像。(M: 於實驗中放置之 MTA。箭頭 ：牙本質橋生成。箭號 ：不連續的牙本質橋)

表 5-1 μ-CT 影像硬組織生成評估

	Hard tissue formation	**Continuity of dentin bridge**
CPH/400ng/mL TGF-β1	6/6 (100%)	6/6 (100%)
CPH	6/6 (100%)	4/6(67%)
MTA	2/2(100%)	1/2(50%)

第六章：結論

1. 本實驗研究之活體材料 CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1，是以聚麩胺酸-明膠所形成之水膠攜帶 TGF-β1，其成分不影響磷酸鈣骨水泥隨時間降解及再結晶之生醫陶瓷性質。
2. 以 1% γ-PGA + 1% gelatin 之水膠與磷酸鈣骨水泥調拌，在一天及七天的測試中，已證實不會降低磷酸鈣骨水泥之抗壓強度；其初始硬化時間大約五分鐘，最終硬化時間大約九分鐘，不論是抗壓強度及硬化時間，皆符合臨床操作需求。
3. 以電子顯微鏡觀察細胞對 CPC 及 CPC/ hydrogel 的貼附情形，發現不論是 CPC 或者 CPC/ hydrogel，都較 MTA 更有利於牙髓細胞貼附。
4. CPC/ hydrogel/ TGF-β1 在體外測試中，不影響牙髓細胞的存活及增生，表示生物相容性良好。
5. 在體外實驗中，CPC/ hydrogel/ TGF-β1 可成功誘導牙髓細胞進行鈣化生成，而對照組 MTA 在 14 天及 21 天的培養，都無明顯的鈣化生成，顯示本材料在體外實驗誘導鈣化生成的效果較 MTA 佳。
6. 在動物實驗中，以 CPC/ hydrogel/ 400 ng/ml TGF-β1 進行活體治療，可促進牙髓生成完整的牙本質橋，而對照組 CPC/ hydrogel 以及 MTA 所生成之牙本質橋有部分不連續，顯示 CPC/ hydrogel 加入 TGF-β1 可誘導硬組織生成，其效果優於 MTA。

第七章：未來研究方向

1. 以組織切片分析動物實驗之結果：細胞發炎程度、牙本質橋生成型態及是否有缺陷、是否有微生物感染，進一步探討本材料對於牙髓再生/修復的效果。
2. 設計更長測試時間、或同一個體連續時間測試的動物實驗，以觀察材料的降解是否伴隨細胞長入及取代材料空間。
3. 分析磷酸鈣材料再結晶相轉換的過程是否有利於鈣離子釋放，以及探討離子釋放對於細胞生成鈣化結節或牙本質橋之影響。

參考文獻

1. Nakashima, M., et al., *Regulatory role of transforming growth factor-β, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells.* Developmental biology, 1994. **162**(1): p. 18-28.
2. Ng, Y.L., V. Mann, and K. Gulabivala, *A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health.* International endodontic journal, 2011. **44**(7): p. 583-609.
3. Jafarzadeh, H. and Y.-N. Wu, *The C-shaped root canal configuration: a review.* Journal of endodontics, 2007. **33**(5): p. 517-523.
4. Peters, O.A., *Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review.* Journal of endodontics, 2004. **30**(8): p. 559-567.
5. Cvek, M., *Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study.* Dental Traumatology, 1992. **8**(2): p. 45-55.
6. Cvek, M., et al., *Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys.* Journal of endodontics, 1982. **8**(9): p. 391-397.
7. Trope, M., *Regenerative potential of dental pulp.* Journal of endodontics, 2008. **34**(7): p. S13-S17.
8. Hargreaves, K.M., et al., *Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold?* Journal of endodontics, 2008. **34**(7): p. S51-S56.
9. Tziafas, D., A. Smith, and H. Lesot, *Designing new treatment strategies in vital pulp therapy.* Journal of dentistry, 2000. **28**(2): p. 77-92.

10. Rutherford, R.B., et al., *Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1.* Archives of Oral Biology, 1993. **38**(7): p. 571-576.

11. Hu, C.-C., et al., *Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors.* Journal of endodontics, 1998. **24**(11): p. 744-751.

12. Zhang, W. and P.C. Yelick, *Vital pulp therapy—current progress of dental pulp regeneration and revascularization.* International journal of dentistry, 2010. **2010**.

13. Lee, J.-B., et al., *Physical properties and biological/odontogenic effects of an experimentally developed fast-setting alpha-tricalcium phosphate-based pulp capping material.* BMC oral health, 2014. **14**(1): p. 87.

14. Accorinte Mde, L., et al., *Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth.* J Endod, 2008. **34**(1): p. 1-6.

15. Sangwan, P., et al., *Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: A review of proposed mechanisms.* International endodontic journal, 2013. 46(1): p. 3-19.

16. Cox, C., et al., *Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping.* Operative Dentistry, 1995. 21(1): p. 4-11.

17. Torabinejad, M., et al., *Physical and chemical properties of a new root-end filling material.* Journal of endodontics, 1995. 21(7): p. 349-353.

18. Zhao, W., et al., *The self-setting properties and in vitro bioactivity of tricalcium silicate.* Biomaterials, 2005. 26(31): p. 6113-6121.

19. Hench, L.L., *Bioceramics: from concept to clinic.* Journal of the American Ceramic Society, 1991. 74(7): p. 1487-1510.

20. Hulbert, S., et al., *History of bioceramics.* Ceramics international, 1982. 8(4): p. 131-140.

21. Langstaff, S., et al., *Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response.* Biomaterials, 2001. 22(2): p. 135-150.

22. Neo, M., et al., *A comparative study of ultrastructures of the interfaces between four kinds of surface-active ceramic and bone.* Journal of biomedical materials research, 1992. 26(11): p. 1419-1432.

23. Niemeyer, P., et al., *Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells.* Cells, tissues, organs, 2003. 177(2): p. 68-78.

24. Al-Sanabani, J.S., A.A. Madfa, and F.A. Al-Sanabani, *Application of calcium phosphate materials in dentistry.* Int J Biomater, 2013. 2013: p. 876132.

25. Dobie, K., et al., *Effects of Alginate Hydrogels and TGF-β1 on Human Dental Pulp Repair In Vitro.* Connective Tissue Research, 2002. 43(2-3): p. 387-390.

26. Hwang, Y.C., et al., *Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis.* J Mol Histol, 2008. 39(2): p. 153-60.

27. Li, Y., et al., *Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF-beta1.* Arch Oral Biol, 2011. 56(11): p. 1221-9.

28. Tziafas, D., et al., *Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principales.* Advances in dental research, 2001. 15(1): p. 96-100.

29. Piattelli, A., et al., *Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis.* International endodontic journal, 2004. **37**(2): p. 114-119.

30. Sloan, A., J. Matthews, and A. Smith, *TGF-β receptor expression in human odontoblasts and pulpal cells.* The Histochemical Journal, 1999. 31(8): p. 565-569.

31. Zhao, S., et al., *Ultrastructural localisation of TGF-β exposure in dentine by chemical treatment.* The Histochemical Journal, 2000. 32(8): p. 489-494.

32. Shirakawa, M., et al., *Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells.* Journal of dental research, 1994. 73(9): p. 1509-1514.

33. Shiba, H., et al., *Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture.* Journal of cellular physiology, 1998. 174(2): p. 194-205.

34. Wei, X., et al., *Expression of mineralization markers in dental pulp cells.* J Endod, 2007. 33(6): p. 703-8.

35. Liang, R.-F., S. Nishimura, and S. Sato, *Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-β on insulin-induced differentiation in rat dental pulp cells.* Archives of oral biology, 1992. 37(10): p. 789-795.

36. Melin, M., et al., *Effects of TGFβ 1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices.* Journal of dental research, 2000. 79(9): p. 1689-1696.

37. About, I., et al., *Human dentin production in vitro.* Exp Cell Res, 2000. 258(1): p. 33-41.

38. Manocha, B. and A. Margaritis, *Production and characterization of gamma-polyglutamic acid nanoparticles for controlled anticancer drug release.* Crit Rev Biotechnol, 2008. 28(2): p. 83-99.

39. Tsao, C.T., et al., *Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan-gamma-poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel.* Carbohydr Res, 2010. 345(12): p. 1774-80.

40. Otani, Y., Y. Tabata, and Y. Ikada, *Hemostatic capability of rapidly curable glues from gelatin, poly (L-glutamic acid), and carbodiimide.* Biomaterials, 1998. **19**(22): p. 2091-2098.

41. Thakur, G., et al., *Crosslinking of gelatin-based drug carriers by genipin induces changes in drug kinetic profiles in vitro.* J Mater Sci Mater Med, 2011. 22(1): p. 115-23.

42. Mestrener, S.R., R. Holland, and E. Dezan, *Influence of age on the behavior of dental pulp of dog teeth after capping with an adhesive system or calcium hydroxide.* Dental Traumatology, 2003. **19**(5): p. 255-261

43. Wei, X., O. Ugurlu, and M. Akinc, *Hydrolysis of ?-Tricalcium Phosphate in Simulated Body Fluid and Dehydration Behavior During the Drying Process.* Journal of the American Ceramic Society, 2007. 90(8): p. 2315-2321.

44. Blom, E., et al., *Transforming growth factor-β1 incorporation in a calcium phosphate bone cement: Material properties and release characteristics.* Journal of biomedical materials research, 2002. **59**(2): p. 265-272.

45. Wang, F., et al., *Facile preparation of hydroxyapatite with a three dimensional architecture and potential application in water treatment.* CrystEngComm, 2011. 13(19): p. 5634.