

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



熔融沉積成型之三維列印聚乳酸支架結構對於類骨細胞生長與礦化之影響

Effects of Fused Deposition Modeling 3D-Printed Polylactic Acid Scaffolds with Different Structures on the Growth and Mineralization of Osteoblast-like Cells

蘇容慧

Jung-Hui Su

指導教授：陳敏慧 博士

Advisor: Min-Huey Chen, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July 2019

誌謝



能夠完成這本論文，首先必須感謝的是我的指導教授陳敏慧老師。相當感謝老師在我念研究所期間給我的指導與鼓勵，並且體諒我容易緊張的個性而在我的實驗不很順利時仍然寬待我、包容我，真的很感謝！另外，也很幸運能夠在有著深厚學養和待人處事風範極佳的老師的身旁接受耳濡目染的影響，希望自己經過研究所這段期間的訓練不只學到了做實驗的精神和方法，在行事為人上也能夠向著老師這樣的榜樣努力繼續精進。

再者，我要感謝擔任我的論文口試委員的陳羿貞老師和周涵怡老師，兩位老師都提出重要而寶貴的意見和問題，使我在口試完畢後能針對不足處再做些修改，使這本論文能更完善。

謝謝在我學習做實驗的這條路上，不吝給予我指導的蓉書學姊和勝豪學長，蓉書學姊總能化繁為簡將事理分析得清楚易懂；也很感謝勝豪學長在實驗用材料上給予的大力協助，和不厭其煩、井然有條的回答我的問題。感謝醫工所的昊穎學長，總是超級好心腸地幫助實驗做得不是很順利的我，回答我各種技術和知識上的問題。謝謝柔芳學姊總是靈巧、細心又不居功地幫助我們配製培養液和各種實驗藥品，讓我們的實驗能夠正常平安的進行！

感謝我的父母親，在我求學期間不辭辛勞地接送我往來實驗室，儘管我是一個老研究生了，謝謝父母親仍然對我嘘寒問暖，關心我的食衣住行各項生活細節。謝謝父親在幫我看實驗所拍的細胞培養於支架上的 SEM 時，有一個很好的靈感並告訴我細胞生長到一定的數量時在兩條平行的支柱間的間隙空間中好像「架橋」一樣，連接起了左右兩側原本相隔開來生長的細胞團。

最後，我也感謝最疼愛我的外公外婆，希望將這本論文獻給我的外婆，並且我也要對在我求學期間過世的外公獻上感謝，謝謝您！

蘇容慧 謹誌

中文摘要



過去研究指出骨組織工程支架的最適孔徑為 100~350 μm ，近期則另有文獻指出類骨細胞被培養於孔徑為 700 μm 的支架中與被培養於孔徑為 350 μm 的支架中七天後的增生情形無統計上顯著差異。然而以往文獻中採用的支架大部分為多孔性支架，而較缺乏探討具有狹長形溝槽狀構造且其溝槽寬度在 200 μm 以下的支架其最適於骨細胞生長與沉積骨質的溝槽寬度各為何。本研究的目的是探討當類骨細胞被培養於具有狹長形溝槽狀構造且其溝槽寬度範圍在 200 μm 以下的支架上時，最適於類骨細胞生長與成骨分化的溝槽寬度值各為何。本實驗中藉由熔融沉積成型之三維列印機列印具有「支柱(strut)-間隙(gap)-支柱(strut)-間隙(gap)」重複出現之結構的支架(scaffolds)。我們設計了三種具有不同間隙寬度(gap width)的溝槽式結構支架，其間隙寬度的預設值分別為 100、150 和 200 μm ，並依序給予簡稱為 G100 組、G150 組和 G200 組，至於支柱寬度(strut width)之預設值則皆為 270 μm 。我們也另外製作了一組具有完全平坦表面的全平型組支架(flat type scaffolds)作為正控制組。當支架列印完成後，我們首先於光學顯微鏡下檢視支架其內部結構的實際尺寸；也進行了支架體外靜態降解實驗、利用示差掃描量熱儀(DSC)分析列印前與列印後聚乳酸材料的熱性質變化以及利用凝膠滲透層析儀(GPC)測量列印前後材料的分子量與分子量分布的變化。最後一部分則是將 MG-63 類骨細胞培養於各組支架上經過 1, 4, 7 天後，再透過 MTT 試驗比較各組細胞增生情形的差異；另外也透過 ARS 試驗比較當類骨細胞被培養於各組支架上並受到成骨分化誘導後經過 4, 7, 10 天後，其鈣沉積量是否各有差異。

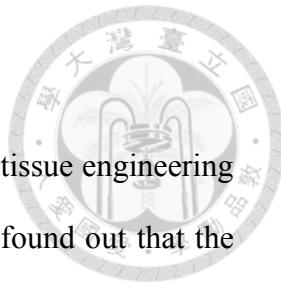
實驗結果顯示，G100 組、G150 組和 G200 組各組實際的間隙寬度分別為 87.8 ± 23.7 、 142.5 ± 20.0 、 $188.3 \pm 23.5 \mu\text{m}$ ，而各組實際的支柱寬度分別為 279.4 ± 15.6 、 274.8 ± 14.0 和 $276.5 \pm 14.1 \mu\text{m}$ 。本研究所製備之聚乳酸支架經過 22 週的體外降解期程後，並未觀察到有明顯的重量損失現象，而降解液也未有因聚乳酸降解而導

致的較明顯的酸鹼值下降現象。DSC 分析顯示經過列印後的聚乳酸其玻璃轉移溫度(T_g)在圖形上變得不明顯，此乃因列印後的聚乳酸的結晶度升高所致。GPC 結果顯示列印後聚乳酸的分子量下降、分子量分布則變窄，顯示列印過程會導致較大分子的聚乳酸裂解為較小的分子。MTT 試驗結果顯示，當 MG-63 類骨細胞被培養於各組支架上七天後，細胞於 G100 組支架上的增生量有顯著差異地高於 G200 組和全平型組，但與 G150 組相比則無顯著差異；至於細胞於 TCPS 上的增生量乃是所有組別中最高的且與其餘四組相比皆有統計上顯著差異。由 ARS 結果得知，於第四天和第七天時，皆以 G100 組和 G150 組其上細胞的鈣沉積量較高；於第十天時，則以 G150 組和 G200 組其上細胞的鈣沉積量較高；然而於第四天和第十天時，細胞在 TCPS 上的鈣沉積量仍顯著地高於各組支架。

本實驗成功製作出尺寸精度屬於可接受的三維列印支架，並釐清了當類骨細胞被培養在一系列設計有特定溝槽寬度的狹長形溝槽狀構造的支架上經過 7 天(觀察細胞增生)和 10 天(觀察細胞經成骨誘導後的鈣沉積量)後，最適於其增生與成骨分化的溝槽寬度約落在 $142.5 \pm 20.0 \mu\text{m}$ (即本實驗中的 G150 組支架)，期望本研究之成果能作為未來骨再生相關研究的參考。

關鍵字 骨組織工程 熔融沉積成型 聚乳酸 支架結構 MG-63 類骨細胞 細胞增生 成骨分化

英文摘要



Previous studies pointed out that the optimum pore size for bone tissue engineering scaffolds was in the range of 100-350 μm . Recently another study found out that the proliferation of osteosarcoma cells cultured in scaffolds with pore size of 700 μm has no significant difference with that of the cells cultured in scaffolds with pore size of 350 μm for 7 days. However, most of the experiments described in the literature mainly investigated the effects of pore sizes of scaffolds on bone cell proliferation through fabrication of several types of porous scaffolds with various pore sizes, and so in the literature there is a lack of understanding of the effect of the structure of scaffolds with narrow groove-like configuration and groove widths of 200 μm or less designed within them on the bone cell proliferation and differentiation.

The purpose of this study is to investigate the optimal groove width between struts within the scaffolds for the growth and osteogenic differentiation of osteoblast-like cells when they are cultured on scaffolds with narrow groove-like configuration and groove widths of 200 μm or less. In this experiment, scaffolds having a structure in which a basic unit that consists of a strut and an adjacent gap reappears ("strut-gap-strut-gap" structure) was printed by a fused deposition modeling type 3D printer. We have designed three kinds of scaffolds with different preset gap widths of 100, 150 and 200 μm and referred to as G100 scaffolds, G150 scaffolds and G200 scaffolds, respectively, and the preset value of the strut width in all three groups was 270 μm . We also created a kind of flat type scaffold with fully flat surfaces as the positive control group. When the printing of the scaffolds was completed, we at first examined the actual widths of the struts and gaps within the scaffolds under an optical microscope. The in vitro static degradation experiment of the scaffolds was also carried out, and the pre-printing and

post-printing materials were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) to explore the changes of the thermal properties caused by the printing process. The change in molecular weight and molecular weight distribution of the materials before and after printing was measured by gel permeation chromatography (GPC). In the last part, MG-63 osteoblast-like cells were cultured on each scaffold group for 1, 4, and 7 days, and then the MTT assay was performed to compare the differences between each group in cell proliferation. In addition, the ARS assay was performed to compare whether the amount of calcium deposited by osteoblast-like cells cultured on each group of scaffolds and induced by osteogenic induction medium for 4, 7, 10 days was different between each group.

The experimental results show that the actual gap widths within the G100, G150, and G200 scaffolds are 87.8 ± 23.7 , 142.5 ± 20.0 , 188.3 ± 23.5 μm , respectively, and the actual strut width within each group of scaffolds are 279.4 ± 15.6 , 274.8 ± 14.0 and 276.5 ± 14.1 μm , respectively. After the 22-week in vitro degradation period of the 3D-printed polylactic acid scaffolds prepared in this study, no obvious weight loss was observed, and the degradation fluid did not show a significant decrease in acid-base value due to degradation of polylactic acid. DSC analysis showed that the T_g (glass transition temperature) of the printed polylactic acid became inconspicuous in the pattern due to an increase in crystallinity of the printed polylactic acid. The GPC results showed that the molecular weight of the polylactic acid decreased and the molecular weight distribution became narrower after the 3D-printing procedure. The results of MTT assay showed that after MG-63 osteoblast-like cells were cultured in each group for seven days, the proliferation of cells on the G100 scaffolds was significantly higher than that of cells on the G200 scaffolds and on the flat-type scaffolds, but there was no significant difference when the proliferation of cells on the G100 scaffolds was compared with that

of cells on the G150 scaffolds; as for the amount of proliferation of cells on TCPS, it was the highest in all groups and there was a statistically significant difference compared with the other four groups. According to the ARS results, on the 4th and the 7th days after osteogenic induction started, the cells cultured on the G100 and the G150 scaffolds had higher calcium deposition results; on the 10th day, the cells cultured on the G150 and the G200 scaffolds had higher calcium deposition results; however, on the 4th and 10th day, the calcium deposition results of cells on TCPS were still significantly better than that of cells on all the other four groups.

In this experiment, we successfully fabricated three-dimensional printed scaffolds with acceptable dimensional accuracy, and we discovered the optimum gap width for the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 osteoblast-like cells when they were cultured on scaffolds with narrow groove-like configuration for a short-term culture days (7 days for cell proliferation and 10 days for osteogenic differentiation) is between 142.5 ± 20.0 μm . (The scaffold type which resulted in the best osteoblast-like cells' proliferation performance within 7 days and the best osteoblast-like cells' osteogenic differentiation performance within 10 days is G150 scaffolds in our experiment.) We hope that our experimental results can attribute to the advancement of the field of bone tissue engineering.

Keywords: Bone tissue engineering, Fused deposition modeling, Polylactic acid, Scaffold architecture, MG-63 osteoblast-like cells, cell proliferation, osteogenic differentiation

目錄



誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
目錄.....	vii
圖目錄.....	xi
表目錄.....	xiii
第一章 緒論.....	1
1-1 骨缺損成因及目前重建的方式	1
第二章 文獻回顧.....	2
2-1 組織工程簡介	2
2-2 常用於骨組織工程的研究中的細胞種類	3
2-3 骨組織工程支架所需具備的特性	4
2-4 骨組織工程支架常用材料的種類	6
2-5 骨組織工程支架的各種製作方式	7
2-5-1 傳統製程的製作方式	7
2-5-2 新興製程的製作方式	8
2-6 各種三維列印技術其原理與應用	8
2-6-1 Three Dimensional Printing (3DP)	9
2-6-2 熔融沉積成型式三維列印(Fused deposition modeling, FDM)	9
2-6-3 Stereolithography (SLA)	9
2-6-4 Selective laser sintering/melting (SLS).....	10
2-6-5 3D Plotting/Direct-write bioprinting.....	10
2-7 最適合骨細胞生長的支架孔徑	11

2-8 聚乳酸(Poly(lactic acid) or Polylactide, PLA)	11
2-9 聚乳酸的降解機制	12
2-10 研究動機與目的和實驗流程規劃	12
第三章 材料與方法.....	14
3-1 實驗設備	14
3-2 實驗原料、藥品與試劑	16
3-3 支架製作流程簡介	17
3-4 三維列印聚乳酸支架之尺寸精度分析	19
3-4-1 利用倒立式相位差光學顯微鏡觀察、拍照並分析支架尺寸精度	19
3-4-2 利用掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察各組支架表面型態	19
3-5 三維列印聚乳酸支架的靜態降解研究	20
3-5-1 支架重量損失量測	20
3-5-2 pH 值變化的量測	21
3-6 以示差掃描量熱法(DSC)分析聚乳酸材料於三維列印前後的熱性質變化	21
3-7 聚乳酸材料於三維列印前後之分子量變化及分子量分布的變化之探討	22
3-8 對培養於具有不同預設相鄰支柱彼此間隙寬度值的聚乳酸支架上之 MG-63 類骨細胞進行生長和分化行為分析	23
3-8-1 細胞培養(cell culture)	23
3-8-2 支架之準備和消毒	24
3-8-3 細胞種植(cell seeding)	24
3-8-4 細胞生長行為分析	25
3-8-4-1 MTT 細胞生長試驗 (MTT assay)	25

3-8-4-2 SEM 標本製備和以 SEM 觀察細胞於支架上的生長情形	26
3-8-5 細胞分化行為分析	27
3-8-5-1 用於誘導 MG-63 類骨細胞成骨分化之礦化培養液製備	27
3-8-5-2 茜素紅 S 染色及其定量分析試驗 (Alizarin Red S staining and its quantification assay)	27
3-9 統計分析	28
第四章 結果	29
4-1 對三組具有不同預設間隙寬度值的三維列印聚乳酸支架進行尺寸精度分析	29
4-2 三維列印聚乳酸支架之體外靜態降解測試(in vitro static degradation test)	29
4-2-1 支架失重率	29
4-2-2 浸泡支架之 PBS 溶液之 pH 值變化	30
4-3 示差掃描量熱儀(DSC)分析於三維列印前與列印後聚乳酸材料的熱性質變化	30
4-4 聚乳酸材料於列印前與列印後之分子量及分子量分布之變化	30
4-5 對培養於具有不同預設間隙寬度值的各組聚乳酸支架上之 MG-63 類骨細胞進行生長和分化行為分析	31
4-5-1 MTT 細胞活性測試	31
4-5-2 以 SEM 觀察支架上細胞型態和生長情形	32
4-5-3 茜素紅 S 染色及其定量分析試驗 (Alizarin Red S staining and its quantification assay)	33
第五章 討論	36
5-1 三維列印聚乳酸支架尺寸精度探討	36
5-2 熔融沉積成型式三維列印聚乳酸支架之體外靜態降解現象探討	36

5-3 經過熔融沉積成型式三維列印製程以後聚乳酸材料的熱性質變化探討	37
5-4 聚乳酸材料經以熔融沉積成型式三維列印前後之分子量以及分子量分布之變化.....	37
5-5 對培養於具有不同間隙寬度值的各組三維列印聚乳酸支架上之 MG-63 類骨細胞的生長行為之探討.....	38
5-6 對培養於具有不同間隙寬度值的各組三維列印聚乳酸支架上之 MG-63 類骨細胞的分化行為之探討.....	38
第六章 結論.....	40
第七章 未來研究方向.....	42
第八章 參考文獻.....	43
附圖.....	47
附表.....	75

圖目錄



圖 2-1 組織工程理論「三支柱」圖	47
圖 2-2 組織工程之流程圖	47
圖 2-3 Three dimensional printing(3DP)機器原理	48
圖 2-4 FDM 機器原理	48
圖 2-5 SLA 機器原理	49
圖 2-6 SLS 機器原理	49
圖 2-7 3D Plotting/ Direct write bioprinting 原理	50
圖 2-8 乳酸的兩種立體異構物	50
圖 2-9 實驗規劃流程圖	51

圖 3-1 本研究採用三維列印方式印製聚乳酸支架流程圖	52
圖 3-2 CAD 軟體所繪製之支架外形側視圖(A)及設定的支架尺寸規格示意圖(B)	53
圖 3-3 三片列印完成的 PLA 支架試片樣本。	54
圖 3-4 光學顯微鏡下所見三組支架的結構。	54

圖 4-1 各組三維列印聚乳酸支架之電子顯微鏡圖	55
圖 4-2 各組三維列印聚乳酸支架於為期 22 週之體外靜態降解實驗進行期間的重量損失率圖(A)和各組三維列印聚乳酸支架歷經 22 週之體外靜態降解實驗期間被測得的 PBS 溶液(降解液)的酸鹼值變化圖(B)	56

圖 4- 3 聚乳酸線材以及本研究中經三維列印製程而製成的 G100 組、 G150 組和全平型支架的熱分析圖.....	57
圖 4- 4 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上 經過一天、四天和七天以 MTT 試驗進行生長測試之結果.....	58
圖 4- 5 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上 一天的 SEM	59
圖 4- 6 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上 三天的 SEM	61
圖 4- 7 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上 五天的 SEM 。	63
圖 4- 8 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上 七天的 SEM	65
圖 4- 9 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上以及 TCPS 上經 OIM 誘導後四天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖	67
圖 4- 10 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架及 TCPS 上經 OIM 誘導後七天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖	69
圖 4- 11 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架及 TCPS 上經 OIM 誘導後十天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖	71
圖 4- 12 以 OIM 誘導 MG-63 類骨細胞於不同組別支架上及 TCPS 上分 化而後於第四天、七天和十天進行 ARS 染色之結果(A)以及 ARS 染色定量分析之結果(B)	73

表目錄



表 2- 1 屬於脂肪族聚酯類的高分子化合物	75
表 3- 1 本研究中製作之三種具有不同預設間隙寬度值以及另一全平型 三維列印聚乳酸支架其各項構型相關參數設定值列表.....	76
表 4- 1 本研究中製作之三種具有不同預設間隙寬度值的三維列印聚乳 酸支架其間隙寬度與支柱寬度之理論值與實測值.....	77
表 4- 2 尚未經熔融沉積成型式三維列印以前的聚乳酸線材以及經過三 維列印製程而製成的 G100 組、G150 組和全平型支架，上述四種 材料樣品的 T_g (玻璃轉移溫度)和 T_m (熔點)	78
表 4- 3 尚未經熔融沉積成型式三維列印以前的聚乳酸線材以及經過三 維列印製程而製成的聚乳酸支架其 M_w 、 M_n 及 M_w/M_n	78

第一章 緒論

1-1 骨缺損成因及目前重建的方式

當患者因較嚴重的創傷、感染或腫瘤等原因而直接或間接導致較大範圍之骨缺損狀況，進而需要進行較大範圍之骨缺損重建時，便需要進行骨移植手術。骨移植植物依其來源的不同，可分為自體骨移植(autograft)、異體骨移植(allograft)和異種骨移植(xenograft)。自體骨移植乃是取自患者的自體骨組織，沒有免疫排斥的問題，是目前的黃金標準治療方式(Giannoudis, Dinopoulos, & Tsiridis, 2005)。然而，採行自體骨移植仍須面臨一些問題和限制，包括：必須在捐贈區(donor site)創造出一額外的傷口，以及所能從捐贈位置取得之骨量受限於該處之骨骼型態。若採取異體骨移植，其為同種異體移植，其缺點則包含：可能有傳染性疾病由捐贈者傳染給受贈者的風險，以及免疫排斥問題而使受贈者日後需終生服用免疫抑制劑。至於異種骨移植，所衍生的問題將更形複雜。

自從 Langer 與 Vacanti 提出組織工程的理論與應用後(Langer & Vacanti, 1993)，運用組織工程的原理以達到再生組織或器官的目標就成為科學家致力於研究的方向。



第二章 文獻回顧



2-1 組織工程簡介

人體的各種器官或組織可能因先天或後天的病變或創傷等因素而致其無法發揮原本應有的功能，而影響該個體的健康，甚至危及其生命。隨著醫學的進步，醫生已能藉由為病人進行器官移植(Harrison, Merrill, & Murray, 1956)、進行手術重建或使用諸如腎透析器的裝置(Kolff & Berk, 1944)來治療器官或組織之功能喪失，但這些治療方式仍有其限制和當前所面臨的挑戰。以器官移植手術而言，器官捐贈者人數仍舊明顯少於等待接受器官移植以延長其生命的病患人數。再就醫生藉由血液透析機的運作來替代腎衰竭病患已部分喪失的腎臟功能進而維持患者的生理機能而言，雖然此治療方式造福了無數病患，但終究血液透析機不能執行腎臟的所有功能，因此不能防止患者病情逐漸惡化。

上述所列舉的當前對於喪失其器官或組織功能的病患所能採取的某些醫療方法於實際執行時會遭遇的困難，將有可能隨著組織工程這一門新興學科在知識與技術上的持續發展與不斷突破而得到解決。

「組織工程」這一名詞，首先於 1987 年春季在位於華盛頓特區的美國國家科學基金會 (National Science Foundation, (NSF)) 所舉行的一個生物工程小組會議上被提出(R. M. Nerem, 1991)。及至 1988 年初，第一次的組織工程會議在加利福尼亞州的 Lake Tahoe 舉行，正是在這次會議上，制定了對於「組織工程」的定義(Skalak & Fox, 1988):

組織工程是將工程學和生命科學的原理和方法應用於對正常和病理性的哺乳動物組織中結構/功能關係的基本理解以及對於用於修復、維持或改善組織功能的生物替代物的開發。

圖2-1所示為組織工程的三支柱(pillars)——細胞、支架和信號。關於其所運用的細胞，可以是幹細胞(stem cells)或前驅細胞(progenitor cells)，甚至是完全分化的



細胞(fully differentiated cells)。組織工程也可以同時結合幾種不同類型的細胞作運用。支架可以由合成的生醫材料製成或者是由天然細胞外基質構成。在製造替代的組織的過程中支架可能是被需要的，或者其被用作為細胞療法(cell therapy)中負責遞送細胞的載體。信號可以是多種類型，包括生長因子和趨化因子(Robert M. Nerem & Schutte, 2014)。前述細胞、支架和信號雖然是組織工程的基本範例(basic paradigm)中的三支柱，但這三者不一定要同時被運用。在組織工程所採取的各種方法中，有一些譬如引導組織再生的技術僅需要基質(matrix)而不需要細胞的參與，另外有些方法則僅依賴細胞而不需要支架。然而組織工程領域中的多數研究者乃是使用與基質結合的細胞來達成新的組織形成，其概念可由圖2-2(Vacanti & Langer, 1999)簡單地呈現，首先從生物體上取下自體細胞或異體細胞，在體外環境下培養這些細胞使其增殖至足夠數量或能在特定條件刺激下形成特定組織，再將細胞或組織種植於支架上，而後將此攜帶有細胞或組織的支架植入宿主體內以其修復、維持或改善原有受損組織的功能。

2-2 常用於骨組織工程的研究中的細胞種類

骨組織工程支架依其被植入宿主體內時是否攜帶有細胞，被分為兩大類：無細胞支架(acellular scaffolds)和帶有細胞的支架(cellular scaffolds)(Atala, Kasper, & Mikos, 2012)，前者藉著支架植入宿主體內後產生吸引周圍細胞聚集的效果然後進一步達成組織新生的目的；後者則是作為一個細胞移植的載體，將不論是宿主的自體細胞或是異體細胞先於體外培養(in vitro cultivation)並增殖後，再藉由支架將細胞攜入宿主體內，其目標是在支架植入部位發生組織再生或修復(Vacanti & Langer, 1999)。

骨組織工程的研究中所使用的細胞種類，包括具有分化為其他細胞的能力的「幹細胞」以及已分化完全的「成熟細胞」；另外，也有使用屬於細胞株(cell line)

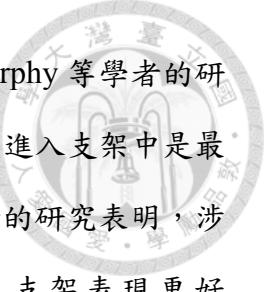
的類骨細胞(osteoblast-like cells)。幹細胞，依其細胞來源又分為成體幹細胞、胚胎幹細胞和誘導多能幹細胞(induced pluripotent stem cells (iPSCs))。近二十年來，由於分離幹細胞的技術和後續體外細胞培養的技術不斷進步，所以有越來越多的研究使用幹細胞作為實驗中的細胞模型(Meinel et al., 2004; Yousefi et al., 2016)。

多數的研究只觀察和探討一種特定的細胞(通常是幹細胞、骨母細胞或類骨細胞)被培養於支架上經過一段時間後，其細胞的生長或分化行為。其餘的研究則採共培養(co-culture)兩種細胞於支架上以探討細胞受支架影響下以及兩種細胞互相影響下細胞各自的行为表現。

2-3 骨組織工程支架所需具備的特性

骨組織工程中所運用的支架需具備的一些基本特性(Bose, Roy, & Bandyopadhyay, 2012)包括：

1. 生物相容性(biocompatible)：支架的生物相容性被描述為其支持正常細胞活性(包括分子傳信系統(molecular signaling systems))的能力，並且對宿主組織沒有任何局部和系統的毒性作用(Williams, 2008)。
2. 具有適當的機械性質(mechanical properties)：理想骨支架的機械性質應與宿主的骨骼之機械性質相匹配，並且也相當重要的是需具有適當的負荷轉移(load transfer)。從海綿狀骨到皮質骨，骨的機械性質差異很大。皮質骨的楊氏模數在15到20 GPa之間，海綿狀骨的楊氏模數在0.1到2 GPa之間。皮質骨的抗壓強度在100到200 MPa之間，海綿狀骨的抗壓強度在2到20 MPa之間。由於人體骨骼之機械性能和幾何形狀的巨大變化使得難以設計「理想的骨支架」(Olszta et al., 2007)。
3. 支架內孔洞的大小(pore size)：一項必須具備的支架性質是相互連通的孔洞，其中孔洞的直徑應至少為100 μm ，以便使必需營養素和氧氣成功擴散以提高細胞



存活率(Rouwkema, Rivron, & van Blitterswijk, 2008)。然而，Murphy 等學者的研究發現介於 200 至 350 μm 範圍內的孔徑對於骨組織向內生長進入支架中是最佳的(Murphy, Haugh, & O'Brien, 2010)。此外，Woodard 等學者的研究表明，涉及微觀和巨觀孔隙的多尺度多孔支架可以比僅巨觀多孔支架表現更好(Woodard et al., 2007)。不幸的是，孔隙率降低了機械性能，例如壓縮強度，並增加了可重複的支架製造的複雜性。研究人員使用聚合物、陶瓷、複合材料和金屬探索了多孔支架。緻密生物陶瓷材料的強度與皮質骨接近，但陶瓷-聚合物複合支架通常比骨更弱。多孔金屬支架符合骨骼的機械要求，但未能提供必要的種植體-組織整合，並增加了與金屬離子浸出相關的問題(Rezwan, Chen, Blaker, & Boccaccini, 2006)。

4. 生物可吸收性(bioresorbability)：生物可吸收性是支架在骨組織再生中的另一個關鍵因素(Williams, 2008)。一個理想的支架不僅應具有與宿主組織相似的機械性質，還應該可以在體內(*in vivo*)隨著時間降解，如果可能的話最好是能夠在一個受控制的吸收速率下降解，並且最終將為新的骨組織生長留出空間。設計和製造具有包括靶向生物分子(targeted biomolecules)、機械性質和生物可吸收性等這些理想組成分的多尺度多孔支架(multi-scale porous scaffolds)，是當今在骨組織工程中支架能被成功實施的一些關鍵挑戰(Lichte, Pape, Pufe, Kobbe, & Fischer, 2011; Olszta et al., 2007)。
5. 要能促進血管生成(vascularization)

另一個關鍵特徵是支架的生物活性(bioactivity)，即其與周圍活組織或器官相互作用的能力(Roseti et al., 2017)。傳統的被動的(passive)生醫材料顯示出低或無效的與環境交談(cross-talk with the environment)的能力。具生物活性的支架則被設計用於促進適當的細胞遷移或分化、組織新生成(tissue neoformation)及其與宿主體內組織的整合，避免不良過程如瘢痕的形成(Chen, Roether, & Boccaccini, 2008)。

再者，擁有高的孔隙率(porosity)和孔洞間互相連通性也被認為是好的支架須具備的特性，以使氧氣和養分得以擴散至支架較內部的區域，供應該處細胞正常行使功能、增生或分化時之所需。之前被報告的能使細胞適當的向其內部生長和具有適當的營養擴散的支架，其孔隙率約為90%(Polo-Corrales, Latorre-Esteves, & Ramirez-Vick, 2014)。然而Gregor等學者測試了兩種具有不同孔隙率因此而有不同機械強度的3D列印聚乳酸支架，發現可能沒有必要將用於骨組織置換(bone tissue replacement)的支架的建議孔隙率維持在約90%，換言之，即建議之支架孔隙率可以有所下降，以提升支架本身的強度。此外，他們也證明了單個孔洞的尺寸可以是之前文獻(Whang et al., 1999)中所建議範圍(0.2- 0.35 mm)的兩倍(亦即0.7 mm)，而不影響細胞增殖(Gregor et al., 2017)。

2-4 骨組織工程支架常用材料的種類

文獻上已有許多種類別的材料被運用來製作骨組織工程支架，大致上可分為五大類：天然聚合物、合成聚合物、陶瓷類、金屬類和複合材料(Polo-Corrales et al., 2014)。

1. 天然聚合物：包括膠原蛋白(collagen)、幾丁聚醣(chitosan)、絲(silk)、海藻酸鹽(alginate)、透明質酸(hyaluronic acid)與肽水凝膠(peptide hydrogel)。
2. 合成聚合物：包括聚酯類(polyesters)和共聚物(copolymers)。聚酯類中，以屬於脂肪族聚酯類(aliphatic polyesters)的聚甘醇酸(polyglycolic acid)、聚乳酸(polylactic acid)和聚己內酯(polycaprolactone)為組織工程中最常用的支架材料(表 2-1)，它們降解後的產物存在於人體內，可通過天然代謝途徑被排出體外。共聚物是由超過一種類別的單體所共同聚合而成的聚合物，可藉由改變共聚物中各單體成分的比例以對共聚物的機械性質、降解速率等特性進行調整。
3. 陶瓷類：生物陶瓷被認為是生物相容的、堅硬的脆性材料，具有相對差的抗張



強度，但具有優異的抗壓強度與高耐磨性。不論是單獨被使用或與其他有機物或聚合物材料做結合使用的天然或合成的生物陶瓷，是應用於硬組織和軟組織替換的所有生物材料中最有希望的(Hutmacher, Schantz, Lam, Tan, & Lim, 2007)。

4. 金屬類：由於金屬是具有高機械強度和斷裂韌性的材料，因此它們經常在牙科和骨科領域中被用作金屬生物材料，以替代並為受傷和癒合中的骨骼提供支撐。常被用作為標準手術植入物的金屬包含不鏽鋼 316 L、以鈷為基底的合金和鈦合金。但金屬類支架的缺點有由於腐蝕和磨耗過程而有釋放出有毒金屬離子的可能性，造成發炎和過敏反應，進而導致生物相容性不足或組織喪失。此外，由於其彈性模數與天然骨組織的彈性模數不相仿，它們對新骨生長所提供的刺激很小。儘管如此，已有文獻指出，以鈦為基底的金屬(Ti-based metals)由於其彈性、機械性質、形狀記憶效應，多孔結構(porous structure)和生物相容性而可用作骨替代物(Polo-Corrales et al., 2014)。
5. 複合材料：依其所結合運用的材料種類之不同，可分為聚合物/陶瓷、金屬/陶瓷和金屬/聚合物這三類。

2-5 骨組織工程支架的各種製作方式

為了製作出具有多孔洞結構的支架而有好幾種不同的製程被研發出，依其研發時間的先後大致上可分為傳統(conventional)製程和新興(advanced)製程。傳統製程包含有氣體發泡(gas foaming)、冷凍乾燥(freeze drying)和溶劑鑄造(solvent casting)；屬於新興製程的則有靜電紡絲(electrospinning)和快速原型(rapid prototyping)(Roseti et al., 2017)。

2-5-1 傳統製程的製作方式

溶劑澆鑄和顆粒浸出是將聚合物溶液溶解在具有特定尺寸的均勻分佈的鹽顆

粒的溶劑中的技術。溶劑蒸發，留下鹽顆粒嵌入的基質；將其浸入水中，鹽浸出，產生高度多孔的結構。這種技術相對容易，性能設備成本是可持續的。主要優點是高支架孔隙率和調整孔徑的可行性，可以更好地達到骨樣組織結構(Bajaj, Schweller, Khademhosseini, West, & Bashir, 2014; Thavornyutikarn, Chantarapanich, Sitthiseripratip, Thouas, & Chen, 2014)。

2-5-2 新興製程的製作方式

靜電紡絲利用電荷通過注射泵抽取高達奈米級的細纖維，並用收集器產生具有能夠吸附蛋白質和結合位點到細胞膜受體的表面區域的奈米纖維結構。標準系統需要四個主要部件：帶金屬針的旋轉器，注射泵，高壓電源和接地收集器。電場強度克服了液滴的表面張力，並產生帶電液體射流，然後通過靜電排斥將其拉長並連續攪打，直到它沉積在接地的集電極上。溶劑在該過程中蒸發，噴射固化形成非纖造纖維膜(Bajaj et al., 2014; Pignatello, 2013)。

新興製程除了靜電紡絲法外，再來就以三維列印技術為主。下一節將對三維列印技術作介紹。

2-6 各種三維列印技術其原理與應用

三維列印技術相較於傳統減法加工製程，其優勢在於能夠於較短時間內，客製化製作工件，而且由於其採用電腦輔助設計(CAD)/電腦輔助製造(CAM)，再加上運用加法加工(或層加工)的原理，故可列印出傳統減法加工製程所難以製作出之具有某些特定或複雜形狀的成品。又三維列印技術應用在醫學領域時，可以利用病人的醫學影像檔案(例如：電腦斷層影像檔、磁振造影檔案)作為其欲列印的圖檔，進而客製化產生出完全符合人體解剖型態的贗復物。

製作組織工程支架可以運用的幾項三維列印技術其特色和優缺點簡述如下。



2-6-1 Three Dimensional Printing (3DP)

三維印刷 (3DP) 在麻省理工學院發明，通過噴墨印刷液體粘合劑溶液在粉末床上製造 3D 結構(Cima et al., 1994; Griffith et al., 1997; B. M. Wu et al., 1996)。由於大多數生物材料以固態或液態存在，因此在印刷中已經使用了多種材料。該過程首先將一層細粉末材料均勻地鋪展在活塞上。通過選擇性地將粘合劑液滴沉積到粉末層上，X-Y 定位系統和列印頭同步列印所需的 2D 圖案(Billiet, Vandenhante, Schelfhout, Van Vlierberghe, & Dubruel, 2012)。降低活塞，粉末床和部件，並鋪開下一層粉末。重複丟棄-展開-列印循環，直到整個部件完成。去除未結合的粉末顯示出製造的部分。可以通過指定適當的列印頭來沉積預定體積的適當粘合劑來操縱局部組合物。可以通過在製造期間改變印刷參數來控制局部微結構(Benjamin M Wu, Cima, & Science, 1999)。微通道的結合有效地在裝置內部分佈了額外的種子表面，增加了有效的接種密度和均勻性(圖 2-3)。

2-6-2 熔融沉積成型式三維列印(Fused deposition modeling, FDM)

熔融沉積成型式三維列印，也稱作熔絲製造(Fused filament fabrication, FFF)，因其列印機價格較其他形式的三維列印機便宜，而且其相容的列印材料包括幾種生物醫學上常用的熱塑性材料(如：PLA、PCL、ABS)，因此其也是在組織工程支架製作上被廣為應用的三維列印技術之一。其原理為，藉由齒輪將線料輸送至預熱的噴嘴，線料熔融後被擠出至基板上，經由層層堆疊最後成為具有特定形狀的工件(圖 2-4)(Chia & Wu, 2015)。

2-6-3 Stereolithography (SLA)

立體光刻 (SLA) 被認為是第一個快速成型過程，並於 20 世紀 80 年代後期被開發[32]。最初的 SLA 對 HeCd 激光束進行光柵掃描，以空間方式控制光固化樹脂在 2D 圖案中的聚合(Fisher, Dean, & Mikos, 2002)。在每層固化後，附著有固化結

構的平台隨後在自下而上的方法中下降，而另一層未固化的液體樹脂在頂部上擴散。最頂層現在已準備好進行圖案化。對於自上而下的方法，光被投射到透明板上，該透明板最初位於容納液態樹脂的容器底部附近(圖 2-5)(Melchels, Feijen, & Grijpma, 2010)。在通過透明板圖案化層之後，將固化結構與透明板分離。提升固化結構以允許未固化的液體樹脂填充結構和透明板之間的空間。現在，下一層已準備好進行圖案化。由於光柵激光可能很慢，特別是對於大型部件，掩模燈技術被開發用於一次固化整個光聚合物層。在構建結構後，通過排水除去未聚合的液體樹脂。在 UV 烤箱中進行後固化可以轉換任何未反應的基團並強化部件(Wang, Cheah, Fuh, & Lu, 1996)。

2-6-4 Selective laser sintering/melting (SLS)

選擇性激光燒結 (SLS) 由德克薩斯大學於 1989 年開發。除了使用 CO₂ 激光束外，SLS 類似於 3DP 將粉末顆粒粘合在一起 (圖 2-6) (Pattanayak et al., 2011)。激光以特定的 2D 圖案掃描粉末狀聚合物顆粒的表面，通過將它們加熱到玻璃轉移溫度以上來燒結。在燒結過程中，沿著顆粒最外表面的分子擴散導致相鄰顆粒之間形成頸部。在形成一層之後，降低包含該部件的活塞並且在頂部表面上滾動新的粉末材料層。形成後續層並將其綁定到前一層。零件完成後，將未結合的鬆散粉末除去，並進行熱處理以達到完全密度。與 SLA 不同，不需要臨時支撐結構，因為未結合的固體顆粒支撐任何懸臂結構。由於燒結不會導致粉末顆粒完全熔化，因此可以保持原始顆粒之間的孔隙率，並且可以加工各種純度和材料混合物(Chia & Wu, 2015)。

2-6-5 3D Plotting/Direct-write bioprinting

3D plotting 於 2000 年在弗萊堡材料研究中心被開發出來，用於創建軟組織支架。3D plotting 基於將來自加壓注射器的粘性液體材料 (通常為溶液，糊劑或分散

體)擠出到具有匹配密度的液體介質中。將材料沉積在一條長的連續線中或從噴嘴或注射器中的單個點中沉積，以產生所需的 3D 形狀的陶瓷、聚合物或水凝膠 (Landers, Mülhaupt, & Engineering, 2000)。該方法可以在室溫或高溫下進行，但不涉及 FDM 中的熱塑性塑料的使用。該方法特別適用於天然生物材料以產生水凝膠 (圖 2-7)(Chia & Wu, 2015)。

2-7 最適合骨細胞生長的支架孔徑

Yang 等學者於 2001 年發表的文獻綜述裡，整理了下列幾種細胞其各自最適合生長的孔徑大小：對於血管新生(neovascularization)最適宜的孔徑大小為 5 μm ；纖維母細胞最適於長入(ingrowth)直徑 5-15 μm 的孔洞；肝臟細胞最適於長入直徑 20 μm 的孔洞中；對於成體哺乳動物皮膚細胞的再生其最適孔徑大小為 20-125 μm ；類骨質(osteoid)最適於長入直徑 40-100 μm 的孔洞中；骨再生的最適孔徑大小為 100-350 μm 。纖維血管組織(fibrovascular tissues)需要大於 500 μm 孔徑以利快速的血管形成和被移植細胞的存活(Yang, Leong, Du, & Chua, 2001)。

然而 Gregor 等學者測試了兩種具有不同孔徑(0.35 mm / 0.7 mm)的 3D 列印聚乳酸支架，發現當骨肉瘤細胞(osteosarcoma cells)被培養於其上經過一、三、七天後，細胞的增生(proliferation)情形在兩組間沒有統計上顯著差異，因此其結果證明了支架中單個孔洞的尺寸可以是先前文獻(Whang et al., 1999)中建議範圍(0.2- 0.35 mm)的兩倍(亦即 0.7 mm)，而不影響細胞增殖(Gregor et al., 2017)。

2-8 聚乳酸(Poly(lactic acid) or Polylactide, PLA)

聚乳酸，是一種生物可降解(biodegradable)與生物可吸收(bioresorbable)的高分子聚合物。聚乳酸是由乳酸(lactic acid)單體聚合而成。乳酸 (2-羥基丙酸)，化學式為 $\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$ ，是最廣泛存在的羥基羧酸(Madhavan Nampoothiri, Nair, &

John, 2010)。乳酸是一種 PLA 的組成單元，由於乳酸是一種掌性分子(chiral molecule)，因此它具有兩種鏡像異構物：L-乳酸和 D-乳酸(圖 2-8)。PLA 具有立體異構物，如 poly(L-lactide) (PLLA), poly(D-lactide) (PDLA), and poly(DL lactide) (PDLLA)。乳酸可以經由發酵取自可再生資源(例如:甘蔗或玉米澱粉)的糖來製備。因此，PLA 是一種生態友好型產品(Farah, Anderson, & Langer, 2016)。其可以經由化學合成或經由發酵產生。

聚乳酸在人體內的降解產物為乳酸，乳酸可以進入克氏循環被代謝，最後由肺和腎排泄。

2-9 聚乳酸的降解機制

聚乳酸的降解，主要是靠著聚酯類聚合物中酯鍵的水解反應。聚乳酸的水解是一個複雜的過程，包含以下數種現象：水的吸收、酯鍵的斷裂、可溶寡聚物的擴散及碎片的溶解。這些現象受很多因素的影響，如基材的結構、化學成分組成、分子量、大小及降解的介質的特性等。聚乳酸的結晶度較高時，也會阻礙其生物分解(Li, 2017)。

2-10 研究動機與目的和實驗流程規劃

文獻中有關於最適宜骨再生的支架孔徑大小的研究中，所使用的支架其結構多為多孔性支架；相對的，有關於具有其他特定立體結構支架對於骨細胞生長和沉積骨質之影響的研究卻較少。本研究的目的是探討當類骨細胞被培養於具有狹長形溝槽狀構造且其溝槽寬度範圍在 200 μm 以下的支架上時，最適於類骨細胞生長與成骨分化的溝槽寬度值各為何。因此本研究希望藉由三維列印技術其可以精確控制所列印出的支架之結構和尺寸的優點，製作幾種彼此間擁有不同溝槽寬度的聚乳酸支架，再將 MG-63 類骨細胞培養於各組支架上，比較細胞在擁有不同溝槽

寬度的支架上增生和分化的情形，以決定具有何種溝槽寬度的支架是最適於類骨細胞於其上的增生和分化的。

本研究的實驗流程規劃如圖 2-9 所示。



第三章 材料與方法



3-1 實驗設備

1. 熔融沉積成型式三維列印機

廠牌: Ultimaker

型號: Ultimaker 2⁺

單位: 台大牙醫系

2. 倒立式相位差光學顯微鏡

廠牌: Zeiss

型號: Axiovert 200M

單位: 台大牙醫系

3. 掃描式電子顯微鏡

廠牌: HITACHI

型號: TM3000

單位: 台大理學院電子顯微鏡室(科技部貴重儀器中心)

4. 真空鍍膜儀器

廠牌: HITACHI

型號: E101 Ion sputter

單位: 台大理學院電子顯微鏡室(科技部貴重儀器中心)

5. 臨界點乾燥機(Critical Point Dryer)

廠牌: HITACHI

型號: HCP-2

單位: 台大理學院電子顯微鏡室(科技部貴重儀器中心)

6. 精密電子天平:

廠牌: A&D



型號: HR-200

單位:台大牙醫系

7. 酸鹼度測定計之機體(pH meter)

廠牌: JENCO

型號: 6010M

單位:台大牙醫系

8. 酸鹼度測定計之量測探針(probe)

廠牌: JENCO

型號: PH690

單位:台大牙醫系

9. 示差掃描量熱儀(Differential scanning calorimetry, DSC)

廠牌: TA Instrument

型號: DSC Q20

單位:台大牙醫系

10. 示差掃描量熱儀配件(Refrigerated Cooling System)

廠牌: TA Instrument

型號: Refrigerated Cooling System 40

單位:台大牙醫系

11. 凝膠液相層析儀 (Gel Permeation Chromatography)

廠牌: Malvern Panalytical

型號: Viscotek GPCmax VE 2001 GPC SOLVENT/SAMPLE MODULE

單位:台大材料系

12. 酵素免疫分析自動判讀機(ELISA reader)

廠牌: BioTek

型號: Synergy HT



3-2 實驗原料、藥品與試劑

1. 聚乳酸線 (PLA filament):

廠牌: Ultimaker

型號:PLA TRANSPARENT 9020

2. 乙醇 Ethanol: 99.5%

廠牌: Ferak Berlin GmbH

3. 二甲基亞楓 Dimethyl sulfoxide (DMSO), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$:

廠牌: SIGMA-ALDRICH

4. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT):

廠牌: SIGMA-ALDRICH

5. 4%多聚甲醛 (4% Paraformaldehyde):

廠牌: CIS-Biotechnology, Taichung city, Taiwan

6. 抗壞血酸(維他命 C):

廠牌: SIGMA-ALDRICH

7. β -glycerophosphate:

廠牌: SIGMA-ALDRICH

8. Dexamethasone:

廠牌: SIGMA-ALDRICH

9. 茜素紅 S 染色劑(mineralization assay kit solution I):

廠牌: CIS-Biotechnology, Taichung city, Taiwan

10. Mineralization assay kit solution II

廠牌: CIS-Biotechnology, Taichung city, Taiwan



11. Dulbecco's Modified Eagle Medium (High glucose)

廠牌: gibco, Life Technologies Corporation

REF: 12800-017 10 X 1L

12. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

廠牌: gibco, Life Technologies Corporation

REF: 21600-010 10 X 1L

13. Fetal Bovine Serum (FBS)

廠牌: gibco, Life Technologies Corporation

REF: 10437-028 500 mL

LOT: 1947369

14. Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B Solution

廠牌: BI, Biological Industries

REF: 03-033-1B 100ml

15. Trypsin EDTA x10

廠牌: BI, Biological Industries

REF: 03-051-5B 100ml

3-3 支架製作流程簡介

用三維列印原理印製聚乳酸支架的流程如圖 3-1 所示。首先，於 CAD 軟體 (computer-aided design software) SketchUp 中繪製支架外形，支架之外形側視圖及設定的支架尺寸規格示意圖如圖 3-2 所示。由於本研究欲探討具有不同「相鄰支柱彼此間隙寬度 (the gap width between adjacent struts)」之三維列印聚乳酸支架對於人類類骨細胞生長與分化情形的影響，因此支架構型中的相鄰支柱彼此間隙寬度 (the gap width between adjacent struts) 將成為實驗中的操作變因，其設定數值於各組



別中將彼此不同；至於其餘與支架構型相關的參數，包含支柱寬度(strut width)、支柱高度(strut height)以及底板厚度(baseplate height)，則屬於實驗中的控制變因，亦即於各組別支架中這些參數皆相同。本實驗一共製作了三組具有不同預設相鄰支柱彼此間隙寬度值的支架，其間隙寬度之設定值分別為 100、150 及 200 μm ，並依序給予簡稱為 G100 組、G150 組和 G200 組。除了製作前述三組具有不同預設間隙寬度值的支架外，亦另行製作一組具有完全平坦的表面的聚乳酸支架(以下簡稱為全平型支架(flat type scaffolds))以作為正控制組(positive control)。故本研究一共製作有四組不同的三維列印聚乳酸支架，其各自之支架構型之各項參數設定值列示於表 3-1。

當完成支架外形之繪製後，將 SketchUp 軟體中繪製好的圖形存成 DAE 檔，然後將此 DAE 檔輸出至 Blender 軟體，Blender 軟體可將 DAE 檔轉檔為 STL 檔；接著，再將此 STL 檔匯入至 Cura 軟體，Cura 軟體為一款切層軟體，得以對三維的 STL 圖檔進行切層(slicing)運算，當其完成切層運算後會產生三維列印機的執行檔 gcode 檔，而後讓三維列印機(本研究室使用之三維列印機為熔融沉積成型式三維列印機 Ultimaker²⁺)讀取 gcode 檔後，其便會執行列印步驟。

本研究選用聚乳酸作為三維列印支架的材料。於三維列印機預備進行列印前，須先對列印機進行各項列印參數設定，參數之設定取決於選用之列印材料、對列印成品的尺寸精度(dimensional accuracy)的要求、對列印成品的表面精細度的要求等因素。本研究中選用的噴嘴孔徑大小為 250 μm 。於列印前，將噴嘴溫度設定在 190 $^{\circ}\text{C}$ ，亦須先將玻璃底板預熱至 60 $^{\circ}\text{C}$ (對本實驗列印聚乳酸支架的條件下而言)，以利接下來材料順利貼附至底板上。待材料被從噴嘴擠出至底板上再經過冷卻成形後，小心地將成品從玻璃底板上移開，準備進行接下來的實驗。



3-4 三維列印聚乳酸支架之尺寸精度(dimensional accuracy)分析

3-4-1 利用倒立式相位差光學顯微鏡(inverted phase contrast light microscope)觀察、拍照並分析支架尺寸精度

將經由熔融沉積成型式三維列印製成之聚乳酸支架置於倒立式相位差光學顯微鏡載物台上，於 10 倍物鏡下(目鏡倍率為 10 倍)分別觀察各組支架之顯微結構並拍攝顯微照片，然後利用 Axiovert 軟體(Zeiss, Germany)內建的量測功能去量測 G100 組、G150 組和 G200 組這三組支架其各自的間隙寬度(gap width)與支柱寬度(strut width)之實際值。本項對於三維列印支架尺寸精度之量測與分析研究中，對於 G100 組、G150 組和 G200 組這三種類別支架皆各選取 3 片樣本(如圖 3-3)置於顯微鏡下觀察，並且從每一片樣本皆各拍攝 10 張不同位置的顯微照片。由於在 10 倍物鏡下拍攝而得的每一張顯微照片將會包含 3~4 條支柱(struts)以及 2~4 個間隙(gaps)(如圖 3-4)，所以最終當吾人對於拍攝自每一種類別支架的 30 張不同視野下的顯微照片其中所涵蓋的所有支柱和間隙進行寬度量測時，各種類別的支架將各被選取算入 72~106 個間隙寬度(gap width)值與 71~105 個支柱寬度(strut width)值，而經統計分析後會將各種類別支架的間隙寬度實際值和支柱寬度實際值以平均值±標準差(standard deviation)表示。

3-4-2 利用掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscope, SEM)觀察各組支架表面型態

將三維列印聚乳酸支架裁剪成面積小於掃描式電子顯微鏡所配備之載台之面積的薄片型樣本，以碳膠帶固定各種類別支架樣本於載台上，然後放入真空鍍膜儀器中鍍金(gold sputtered coating)，再於掃描式電子顯微鏡下觀察各種類別支架之表面形態。



3-5 三維列印聚乳酸支架的靜態降解研究

本實驗設定之降解環境乃是於恆溫 37°C 環境中，靜態(static degradation)下，各組支架於實驗起始時分別被浸泡於 pH 值為 7.4、一倍的磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffer saline, PBS, 1X) 中，每隔一段時間後，藉由觀測各組支架之重量變化以及浸泡各組支架的 PBS 其酸鹼值的變化，來對各組三維列印聚乳酸支架的降解速率及支架降解過程中是否會帶給周遭環境明顯的酸鹼值變化進行量化研究，並比較不同組別間是否互有差異。

靜態降解測試是將待測的各組支架試片樣品個別浸泡於裝有 PBS 的樣品瓶中，然後靜置於 37°C 恒溫細胞培養箱中，之後固定每隔兩週量測記錄一次支架試片樣品的重量和浸泡支架試片樣品的 PBS 的 pH 值。

3-5-1 支架重量損失量測

本實驗欲觀測並分析其降解過程之重量損失率的材料對象包括：G100 組、G150 組和 G200 組這三種類別的支架以及一組作為正控制組的具有完全平坦的表面的全平型支架(flat type PLA scaffold)。由每種類別的支架材料中各剪取 5 片試片($n=5$)，一一量測各試片之初始重量(W_i)後(所有試片之初始重量皆介於 40~65 mg 之範圍內)，將各片試片個別裝入一個盛裝有 5 mL 的 PBS 之 20 mL 樣品瓶中，並於樣品瓶上做好各試片的編號紀錄後，將樣品瓶口以 parafilm 纏繞數圈後密封之(期能減少培養箱中 CO₂ 對實驗的干擾)，然後置入 37°C 恒溫細胞培養箱中存放。當預定量測支架材料試片之重量損失的時間點到來時，將各試片自樣品瓶中取出，先以二次水沖洗過各試片表面，以將留置於試片表面上的來自 PBS 中的鹽類分子去除，再用 75% 酒精沖洗各試片以期藉由酒精之揮發作用將試片表面之水分帶走，而後以拭鏡紙吸乾各試片表面殘餘之水分。完成前述步驟後，將各試片置入 40°C 烘箱中乾燥 120 分鐘，然後取出並個別秤其重量，依下列公式計算降解後的重量損失



率。令 W_i 為降解前的初始乾重， W_d 為在該時間點的乾重，因此由下式可以得到重量損失率：

$$\text{重量損失率} = \frac{W_i - W_d}{W_i} \times 100\% \quad (\text{式 3-1})$$

由於本實驗觀測支架降解的時程長達 22 週，因此於每一次量測完各時間點各試片的乾重後，會再將各試片放回其原先所對應的盛裝有 PBS 的樣品瓶中，並且將樣品瓶口以 parafilm 纏繞數圈後密封之，再放回 37°C 恆溫細胞培養箱中存放直到下一次量測重量變化的時間點來臨時再將各試片取出並再次進行此段所述關於降解過程中的重量損失的量測步驟。

3-5-2 pH 值變化的量測

將 G100 組、G150 組和 G200 組這三組支架以及另一作為正控制組的全平型支架中，各自裁切三片形狀皆為直徑 1.5 公分的圓形試片，為使各組圓形試片皆能被置入 20 mL 樣品瓶中，須再將每一個圓形試片對半剪成兩個半圓形試片。將屬於同一組別支架的 6 個半圓形試片浸入盛裝有 15 mL PBS 的一個 20 mL 樣品瓶中。對於每一組支架，皆準備 3 個盛裝有如上述內容物的樣品瓶($n=3$)，然後以 parafilm 密封其瓶口後，存放於 37°C 恆溫細胞培養箱中。另外須再加入一組只盛裝有 15 mL PBS 於樣品瓶中而未置入支架試片的對照組，以記錄因細胞培養箱中 CO_2 溶於瓶內 PBS 中所導致 pH 值下降的幅度的多寡。

於觀測時間點到來時，以酸鹼度測定計測量各組樣品瓶內 PBS 的 pH 值。由於本實驗觀測期程長達 22 週，因此於每一次量測完各時間點各樣品瓶內 PBS 的酸鹼值後，會再以 parafilm 密封各樣品瓶口後，放回 37°C 恆溫細胞培養箱中存放，待下一次觀測時間點來臨時再取出做量測。

3-6 以示差掃描量熱法(differential scanning calorimetry, DSC)分析聚



乳酸材料於三維列印前後的熱性質變化

本實驗以聚乳酸線為實驗用原料，使其經過熔融沉積成型式三維列印之製程之後，成為了具有特定結構的支架進而可以被運用於後續探討支架的不同結構對於體外培養之類骨細胞的生長與分化行為之影響的實驗中。對於聚乳酸材料於熔融沉積成型式三維列印前與列印後的熱化學性質(如：玻璃轉移溫度(T_g)和熔點(T_m))的改變是吾人欲探究的，故準備了聚乳酸原料線材的樣品以及經過熔融沉積成型式三維列印之製程而得的 G100 組、G150 組和全平型這三組支架材料的樣品，藉由示差掃描量熱儀對以上四種樣品進行分析，以獲得所欲探究的各種樣品的熱化學性質。

示差掃描量熱法，根據International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC)於2014年公布的熱分析學的名詞解釋，為一種測量進入一個待測樣品與一個參考品物質的熱流率之間的差異的技術(Lever et al., 2014)。

實驗時需要準備兩組鋁盤和鋁盤蓋：其中一組作為參考品盤，其內不須放置任何樣品；另一組則是樣品盤，將材料樣品先秤重(樣品重量約介於 3~5 mg 間)，然後將其置於樣品盤內。記錄材料樣品不含鋁盤及鋁盤蓋的重量。將上述兩組鋁盤和鋁盤蓋各自壓製成兩個試片，亦即一為參考品試片，另一為樣品試片(內含待測樣品)。開始對樣品材料進行熱分析前，需先對儀器執行除水程序以除去加熱爐內的水氣，避免殘餘水氣干擾分析結果。完成除水程序後，再將樣品試片以及參考品試片放入示差掃描量熱儀之加熱爐內準備對該樣品材料進行熱分析，以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 之升溫速率在 $-10^\circ\text{C} \sim 220^\circ\text{C}$ 的範圍內進行實驗。

3-7 聚乳酸材料於三維列印前後之分子量變化及分子量分布的變化之探討

高分子聚合物實際上是由一群具有不同分子量的同系物共同組成的，所以其



分子量是一個平均值而非一個均一值，此性質稱為「多分散性(dispersity)」。至於高分子聚合物的平均分子量之表示法，有透過數目平均分子量(M_n)來表示之，也有透過重量平均分子量(M_w)表示之。

多分散性可以用多分散性係數 d 來做一個具有定量特性的表示，此係數被定義為 M_w/M_n 。當分子量完全均一時， $d=1$ ；當分子量分布越寬時， d 值就越大。

凝膠滲透層析儀(Gel permeation chromatography, GPC)被運用來分析高分子的各種平均分子量以及分子量分布。因幫浦加壓使溶劑沿定向在系統中流動，而當存在移動相(通常即指溶劑)中的高分子樣品開始進入被填充有多孔微粒填料於其內的層析管柱中的時候，由於具有不同分子量的高分子，其體積大小也彼此不同，體積較大的高分子(其分子量也較大)因無法擴散進入填充材料的孔洞中，所以會較快地被從管柱中沖提出來；至於體積較小的高分子(其分子量也較小)則因其會擴散進入孔洞深處而導致其被沖提出來所需的時間較長。

3-8 對培養於具有不同預設相鄰支柱彼此間隙寬度值的聚乳酸支架上之 MG-63 類骨細胞進行生長和分化行為分析

3-8-1 細胞培養(cell culture)

本實驗以 MG-63 類骨細胞作為研究用細胞模型(cell model)。

將 MG-63 類骨細胞培養於裝有 7~9 mL 之添加有 10% FBS(fetal bovine serum) 和 1% penicillin/streptomycin 的 DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose) 培養液的 10-cm dish 中，每 2~3 天更換一次培養液。當細胞生長達到約 70~80% confluence 時，便將 10-cm dish 中之培養液抽掉，以 PBS 清洗兩次後，加入 1 mL 0.05% Trypsin-EDTA 然後將 dish 放入培養箱中等待 4~5 分鐘，待 Trypsin 切斷細胞與培養盤底部之鍵結後，加入 3 mL 含有 10% FBS 之培養液緩和 Trypsin-EDTA 對細胞之作用，然後將培養盤中總共 4 mL 充滿懸浮著的細胞的液體以 pipette

吸取移至離心管內，放入離心機以 1000 rpm 的離心速率離心 5 分鐘。離心完成後，抽掉上清液，重新加入適量培養液於離心管中，並接著以 pipette 將沉澱在離心管底部的細胞 pellet 打散，使細胞再次懸浮於新加入的培養液中，而後以 1:3~1:4 的比例將細胞分盤，完成細胞的繼代培養。

3-8-2 支架之準備和消毒

將經由三維列印製成的三組(即 G100 組、G150 組和 G200 組)具有不同預設相鄰支柱彼此間隙寬度值的支架以及作為正控制組的完全平坦不具間隙的支架各自裁切成多個直徑約 1.5 公分的圓形試片，分類置入透明夾鏈袋中，而後將置於夾鏈袋中的各類試片一一鋪平於無菌操作台上，開啟無菌操作台之紫外線殺菌燈(此時試片仍被包覆於夾鏈袋中，但每一試片皆可完全接受到紫外光之照射)，使所有試片之正面皆受紫外光照射 4 小時。4 小時後，將所有試片翻面(此時試片仍被包覆於夾鏈袋中)，讓所有試片之反面亦受紫外光照射 4 小時。

完成上述之紫外光照射殺菌步驟後，將每一片試片置於 24-well plate(Costar, U.S.A.)的每一個well底部，並用已經過高溫高壓滅菌的O型環(加耐力油封公司，台灣)固定之。隨後於每個置有支架試片的well中以及未置有支架試片但於接下來實驗時亦會使用到的tissue culture polystyrene well (TCPS well)中加入75%酒精泡消 1 小時。之後以 PBS 沖洗前述經 75% 酒精泡消過的 wells 兩次，以確保酒精被完全洗淨。最後將每個well內的 PBS 吸除乾淨，準備進入下一步驟——將細胞種植於支架試片上及 TCPS wells 內。

3-8-3 細胞種植(cell seeding)

使用錐蟲藍排除法(Trypan blue exclusion assay)進行細胞計數，並依據實驗需求將細胞溶液調配至所需的細胞密度(cell density)後，將已調配至特定細胞密度的細胞溶液以 1 mL/well 的量加入置放有支架試片的 wells 中以及作為 TCPS 對照組



的不含支架試片的 wells 中(本論文中所進行的探討關於細胞於支架上之生長及分化情形的實驗均使用 24-well plate)，然後，放入細胞培養箱中培養。每兩天更換一次培養液。

3-8-4 細胞生長行為分析

3-8-4-1 MTT 細胞生長試驗 (MTT assay)

MTT assay 又稱為 tetrazolium assay，早期應用於免疫學領域，近年來則被應用到生物相容性評估中，為一般常用之細胞活性試驗方法。其為一種快速呈色法，MTT 中黃色水溶性之 tetrazolium 鹽類可與粒線體中之琥珀酸去氫酶(dehydrogenase)作用，將 tetrazolium ring 切斷，形成紫藍色之 fromazan 晶體，再利用二甲基亞楓(dimethyl sulfoxide, DMSO)將晶體溶解，形成紫色溶液。此溶液可由波長約 570nm 之黃光進行吸光測量並定量。由於活細胞才具有粒線體酵素，故所測得之吸光值會與活細胞數量成正比，藉此將細胞粒線體的活性量化進而反映出細胞的生長情形 (Mosmann, 1983)。

本研究為比較 MG-63 類骨細胞於具有不同預設間隙寬度值之三維列印 PLA 支架上之生長情形，將細胞以 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 之密度培養於預設間隙寬度值各為 100 μm (G100 組)、150 μm (G150 組)及 200 μm (G200 組)的三維列印 PLA 支架上，以及培養於作為正控制組的完全平坦無間隙的 flat type(全平型)三維列印 PLA 支架上，和作為負控制組的 TCPS 上，並於 1、4 和 7 天分別進行 MTT 試驗，以對細胞在此四種型式支架上和 TCPS 上的增殖速率進行量化的評估。

實驗步驟如下：抽出 24-well plate 中的培養液後，以 PBS 清洗每個 well 兩次，接著於每個 well 中各加入 100 μL 的 2 mg/mL MTT 溶液，然後放入 37°C 恒溫細胞培養箱中使反應 3 小時。待反應完成後小心移除 MTT 溶液，再加入 200 μL 的 DMSO 溶液，反應 14 分鐘，反應時將培養盤置於震盪器上以約 50 rpm 的速率適度搖晃之使已形成的紫色結晶溶解，接著從每個 well 取出 100 μL 溶液移至 96 well-

plate 中以酵素免疫分析儀(ELISA reader)測定波長為 570 nm 時的吸光值。所測得的每一個 well 的吸光值皆須再減去背景值，才是實際上反映細胞數量多寡的吸光值。此實驗全程步驟皆須避光以免反應的產物因吸收其他光源造成衰退。



3-8-4-2 SEM 標本製備和以 SEM 觀察細胞於支架上的生長情形

為實際觀察並比較 MG-63 類骨細胞於具有不同預設間隙寬度值之三維列印 PLA 支架上之生長情形，將細胞以 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 之密度培養於 G100 組、G150 組、G200 組以及另一組作為正控制組的完全平坦無間隙(flat type)的三維列印 PLA 支架上(上述支架皆經裁切成為直徑約 1.5 公分之圓形試片，並將之置於 24-well 培養盤的 well 中)，和作為負控制組(negative control)的 TCPS 上，並於培養 1 天、3 天、5 天和 7 天後依照下述實驗步驟進行 SEM 標本製備以利後續以 SEM 觀察細胞型態。

從培養箱中取出 24-well 細胞培養盤，去除培養基，先以 PBS 清洗兩次，接著於每個 well 中各加入 300 μL 的 4% paraformaldehyde (PFA)於室溫下固定細胞 20 分鐘，然後以 PBS 清洗並浸泡每個 well 兩次，每次 15 分鐘。接著依序將不同濃度的酒精(50%-60%-70%-80%-90%-100%-100%)，每一種濃度的酒精皆以 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的量浸泡樣本 10 分鐘，藉由酒精濃度差逐漸使樣本脫水，直到 100% 酒精，並重複 100% 酒精浸泡的步驟一次，以使脫水更完全。若無法於完成樣本之序列性酒精脫水步驟後立即接著對樣本做臨界點乾燥的處理，則需將樣本浸泡於 100% 酒精中並以保鮮膜緊密包覆培養盤後存放在 4°C 冰箱中。之後將浸泡於 100% 酒精中的樣本小心取出，放入臨界點乾燥機(critical point dryer)內進行臨界點乾燥(critical point drying, CPD)。最後，須將樣本表面鍍金(gold sputter)，才能於電子顯微鏡下觀察各時間點所收集的各支架樣本上細胞之型態和生長情形。

本實驗使用位於台大理工學院的科技部貴儀中心的電子顯微鏡於 5kV 加速電壓下觀察類骨細胞被培養於各組別支架上經 1、3、5 和 7 天後各自的生長情形。



3-8-5 細胞分化行為分析

3-8-5-1 用於誘導 MG-63 類骨細胞成骨分化之礦化培養液製備

本研究中所用之促進基質礦化的培養液(osteogenic induction medium, OIM)除了含有 100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 以及 10% FBS 的 DMEMHG 外，再加上 50 µg/mL 之 ascorbic acid 與 10 mM 之 β -glycerophosphate，以及 5×10^{-8} M 之 dexamethasone，此三種成分是一般在誘導細胞基質礦化實驗時常使用的成分(Nohutcu, McCauley, Koh, & Somerman, 1997)。

3-8-5-2 茜素紅 S 染色及其定量分析試驗 (Alizarin Red S staining and its quantification assay)

本實驗利用 Alizarin Red S staining(ARS)來觀察當以 osteogenic induction medium (OIM)培養 MG-63 類骨細胞於 G100 組、G150 組、G200 組支架以及作為正控制組的全平型支架上經過特定時間後，類骨細胞於各組別支架上所沉積的細胞基質中含鈣質的量的多寡(礦化程度高低)是否互有差別。

將 MG-63 類骨細胞以 1.9×10^4 /mL 之細胞密度種植於各組支架及 TCPS 上，並於種植細胞完成後 24 小時以後將培養液由一般培養液更換為 OIM，之後每兩天更換一次 OIM。選定進行 ARS 染色及其定量分析試驗的時間點為自更換為 OIM 來誘導細胞開始分化之時起算經過四天、七天和十天後。實驗步驟敘述如下：將培養有類骨細胞於其上的各組別支架所在的 well 中的培養液吸乾，每個 well 中各加入 300 µL 的 4% PFA 於室溫下固定細胞 20 分鐘，而後吸掉 4% PFA，以二次水沖洗三次(0.5mL ddH₂O/well/次)，再於每個 well 中緩緩加入 0.5 mL ARS 溶液(mineralization assay kit solution I, CIS-Biotechnology, Taichung city, Taiwan)，然後靜置 30 分鐘。時間到後，移除 well 內的 ARS 染色劑，並立即以二次水沖洗 3~4 次，每次加入等量的二次水(0.5 mL/well)並於震盪器上搖晃一分鐘。由於 ARS 染色劑會敏感地隨著 pH 值之變化而改變其顏色，因此沖洗的次數與用量必須一致，避免

此步驟所造成的誤差。樣品若為陽性反應，會呈現紅色小斑塊狀染色情形。最後加入少許(100 μ L/well)二次水保存樣品，避免細胞因乾燥而破壞其型態。拍照記錄巨觀下各組別經 ARS 染色後之結果，亦於顯微鏡下觀察並拍攝各組別染色後的情況。完成巨觀及微觀的拍照紀錄後，最後加入 200 μ L/well 的 mineralization assay kit solution II (CIS-Biotechnology, Taichung city, Taiwan)，在室溫下震盪一小時後，吸取 100 μ L/well 置於 96-well plate 的 well 中，以 ELISA reader 讀取其 562 nm 吸光值。

3-9 統計分析

本實驗使用 SigmaPlot 軟體(SigmaPlot version 12.5, Systat Software Inc.)對各組別的實驗數據資料進行統計分析，每兩兩一組進行 t test，當 p 值小於 0.05 時表示該兩組數據資料各自的平均值彼此間的差異有達到統計上顯著意義。當軟體檢查出該兩組輸入的數據資料不符合執行 t test 的前提假設時(1. 依變數(dependent variable)的母群體必須是常態分佈；2. 兩組樣本的變異數須為常態分佈，且符合變異數同質性。)，改採 Mann-Whitney Rank Sum Test，當 p 值小於 0.05 時表示該兩組數據資料各自的中位數彼此間的差異有達到統計上顯著意義。

第四章 結果



4-1 對三組具有不同預設間隙寬度值的三維列印聚乳酸支架進行尺寸精度分析

對本實驗以三維列印製成之 G100 組、G150 組和 G200 組這三組支架，經由以量測軟體量測其被置於光學顯微鏡下所擷取的照片，得到各組支架其各自的支柱寬度(strut width)和間隙寬度(gap width)的實測值，以平均值±標準差(standard deviation)呈現，結果列於表 4-1。

G100 組、G150 組和 G200 組三組的間隙寬度實際值各為 $87.8 \pm 23.7 \mu\text{m}$ 、 $142.5 \pm 20.0 \mu\text{m}$ 和 $188.3 \pm 23.5 \mu\text{m}$ 。由以上數值可以觀察到，各組的間隙寬度實際值的平均值都較預設值為小，另外各組的間隙寬度實際值的標準差有一致性(約 $20 \sim 23.7 \mu\text{m}$)。

另 G100 組、G150 組、G200 組和全平型組支架的電子顯微鏡照片如圖 4-1 所示。

4-2 三維列印聚乳酸支架之體外靜態降解測試(*in vitro static degradation test*)

4-2-1 支架失重率

本實驗觀測各組三維列印聚乳酸支架浸泡於 37°C 、一倍 PBS 內經過特定時間的靜態降解後其重量損失率曲線圖如圖 4-2(A)所示。G150 組支架試片於降解實驗進行到第 16 週時出現了平均為 0.04%的重量損失率，而當第 18 週時其平均重量損失率升至 0.076%(約為第 16 週時重量損失率 0.04%的兩倍)，然而此後就維持在 0.076%而不再有增加趨勢。G100 組、G200 組和全平型組這三組在整個降解實驗



進行期間則自始至終都沒有被量測到任何重量的改變量。

4-2-2 浸泡支架之 PBS 溶液之 pH 值變化

本實驗觀測在 37°C 下，浸泡有三維列印聚乳酸支架於其內的 PBS 溶液經過特定時間後其 pH 值變化的情形如圖 4-2(B)所示。包含控制組在內的各組最初的酸鹼值皆約落在 7.43 左右，隨著時間推移，各組於各時間點被測得的酸鹼值仍然與控制組的酸鹼值非常接近，雖然最後各組的酸鹼值皆約落在 6.8 左右，但這一結果應全然是受到培養箱中二氣化碳溶於降解溶液 PBS 中所致。

4-3 示差掃描量熱儀(DSC)分析於三維列印前與列印後聚乳酸材料的熱性質變化

圖 4-3(A)為尚未經熔融沉積成型式三維列印以前的聚乳酸線材(PLA filament)以及經過三維列印製程而製作成的 G100 組、G150 組和全平型支架，上述四種材料樣品的熱分析圖。由圖 4-3(A)可見聚乳酸線材的熱分析圖形上有出現一典型的 Tg 圖形 (圖中藍圈處)，但於經過三維列印製程而製作成的 G100 組、G150 組和全平型支架材料之熱分析圖形上則皆未能見到典型的 Tg 圖形。

由圖 4-3(B)可見到四種材料樣品的熱分析圖的大趨勢是類似的，可見它們都是於攝氏五十幾度的範圍內有一小結晶形成的吸熱峰，然後於攝氏一百至一百三十度的範圍間則都有出現一大結晶重組而形成的放熱峰。

上述四種材料樣品各自的玻璃轉移溫度(Tg)和熔點(Tm)整理如表 4-2 所示。

4-4 聚乳酸材料於列印前與列印後之分子量及分子量分布之變化

由表 4-3 可知，尚未經熔融沉積成型式三維列印製程以前的聚乳酸線材其 Mw

為 103,294，Mn 為 66,880，Mw/Mn 為 1.544；那麼經熔融沉積成型式三維列印製程後所得的支架材料樣品其 Mw 為 54,917，Mn 為 39,065，Mw/Mn 為 1.406。由以上可觀察到列印後的 Mw/Mn 值變得比列印前的為小，顯示經過三維列印製程後確實讓聚乳酸材料的分子量分布變窄，而導致其分子量分布變窄的原因應是列印過程中，溫度以及當熔融態的 PLA 經過噴嘴時的剪切力這兩者共同造成 PLA 聚合物中較大的分子發生分子鏈斷裂，裂解為較小的分子。

4-5 對培養於具有不同預設間隙寬度值的各組聚乳酸支架上之 MG-63 類骨細胞進行生長和分化行為分析

4-5-1 MTT 細胞活性測試

當 MG-63 類骨細胞被以 4×10^4 /mL 之細胞密度種植於各組三維列印聚乳酸支架上，經一天、四天和七天之培養後，進行 MTT 試驗所得結果如下：於一天時，將 G100 組、G150 組和 G200 組這三組各自的 MTT 讀值與全平型組和 TCPS 組這兩組各自的讀值做比較，皆有統計上顯著差異，且 G100 組、G150 組和 G200 組各自的讀值 (0.108 ± 0.029 , 0.123 ± 0.015 , 0.104 ± 0.02) 大約是全平型組和 TCPS 組各自讀值 (0.054 ± 0.025 , 0.058 ± 0.018) 的兩倍；另外則是 G150 組的讀值相比於 G200 組有統計上顯著差異。於四天時，TCPS 組具有最高的讀值 (0.5 ± 0.095) 且與其餘四組相比皆有統計上顯著差異；G100 組、G150 組和 G200 組這三組個別與全平型組相比也都有統計上顯著差異；不過若是從 G100 組、G150 組和 G200 組這三組中任取兩組互相比較，則皆未有顯著差異。於七天時，TCPS 組仍然具有最高的讀值 (1.832 ± 0.132) 且與其餘四組相比皆有統計上顯著差異；TCPS 組以外，則為 G100 組具有較高的讀值 (1.646 ± 0.17)，其讀值若與 G200 組和全平型組這兩組各自的讀值 (1.463 ± 0.156 , 1.254 ± 0.195) 做比較，皆有達到統計上顯著差異，但 G100 組讀值若與 G150 組的讀值 (1.455 ± 0.196) 相比則無統計上顯著差異 (圖 4-4)。



4-5-2 以 SEM 觀察支架上細胞型態和生長情形

當 MG-63 類骨細胞被以 4×10^4 /mL 之細胞密度種植於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上，經一天、三天、五天和七天之培養後，將細胞固定並進行 SEM 標本製備程序以利後續以 SEM 觀察細胞型態。由 SEM 照片觀察到的情形細述如下。當細胞被培養於各組三維列印聚乳酸支架上與 TCPS 上一天時，由 G100 組、G150 組和 G200 組的放大倍率為 500 倍的電子顯微鏡圖可清楚看到在這三組支架上的以下三個區域皆有細胞貼附於其上，分別是：(1)支柱(strut)頂部水平表面上、(2)支柱(strut)垂直側壁表面上與(3)間隙(gap)底部平面上。另外，比較 MG-63 類骨細胞在三維列印聚乳酸支架與 TCPS 兩種不同材料表面上的細胞型態，可以觀察到在 TCPS 上的細胞大多數都呈梭狀且呈現出明顯的細胞質延伸部分(cytoplasmic extension)；至於在聚乳酸支架上的細胞雖然其中呈現梭狀型態的細胞仍占多數，但是相較於 TCPS 而言，聚乳酸支架上的細胞其中有較高比例呈現出非梭狀的其他形狀(包括有扁圓形、圓球狀、三角形以及四邊形)，而且細胞質延伸的長度也明顯較 TCPS 上的細胞來的短(圖 4-5)。

當 MG-63 類骨細胞被培養於各組三維列印聚乳酸支架上與 TCPS 上三天後，於各組各種放大倍率的電子顯微鏡圖上皆可觀察到細胞數量較培養一天時增加許多。由 G100 組、G150 組和 G200 組的放大倍率為 500 倍的電子顯微鏡圖可觀察到細胞無論在支柱(strut)頂部(水平)表面上、支柱(strut)垂直側壁表面上和間隙(gap)底部平面上這三個區域皆有細胞數增多的現象。比較細胞在聚乳酸支架與 TCPS 表面上的型態，可見在 TCPS 上的細胞平均伸出的細胞質延伸部分比起在聚乳酸支架上的細胞所伸出的細胞質延伸部分來得更加細長(圖 4-6)。

當 MG-63 類骨細胞被培養於各組三維列印聚乳酸支架上與 TCPS 上五天後，除了於各組各種放大倍率的電子顯微鏡圖上皆可觀察到細胞數量較培養三天時又增加更多之外，在 G100 組、G150 組和 G200 組這三組的各種放大倍率下的電子顯

微鏡圖中還可以觀察到好幾處狀似「在間隙中搭橋」的細胞生長模式。而在作為正控制組的全平型支架上可觀察到細胞於培養五天後幾乎已達到 100% confluence 的狀態；在作為負控制組的 TCPS 上同樣可見培養五天後的細胞已達 100% confluence 的狀態(圖 4-7)。

當細胞被培養於各組三維列印聚乳酸支架上與 TCPS 上七天後，細胞於 G100 組、G150 組和 G200 組這三組生長的情況大致類似培養五天的情形，所不同的是可以看見有幾處狀似「在間隙中搭橋」的細胞團塊其內的細胞數目變得更多、團塊體積也變得更大了(圖 4-8)。

4-5-3 茜素紅 S 染色及其定量分析試驗 (Alizarin Red S staining and its quantification assay)

MG-63 類骨細胞被以 1.9×10^4 /mL 之細胞密度種植於各組支架及 TCPS 上，經 OIM 誘導培養四天、七天和十天後，進行茜素紅 S 染色後於光學顯微鏡下觀察各組支架及 TCPS 被染色情形如圖 4-9 到圖 4-11 所示。

當類骨細胞被培養於各組三維列印聚乳酸支架上以及 TCPS 上經 OIM 誘導後四天進行 ARS 染色後，於拍攝得到之光學顯微鏡圖上，可見不論是在 G100 組、G150 組或 G200 組支架上，於各組支架內的支柱(strut)頂部平面上以及於間隙(gap)空間中皆有細胞進行鈣沉積活動的現象。至於在全平型組以及在 TCPS 組中，也皆有細胞進行鈣沉積活動的現象被觀察到(圖 4-9)。

當類骨細胞被培養於各組三維列印聚乳酸支架上以及 TCPS 上經 OIM 誘導後七天進行 ARS 染色後，於拍攝得到之光學顯微鏡圖上，可見不論是在 G100 組、G150 組或 G200 組支架上，於各組支架內的支柱(strut)頂部平面上以及於間隙(gap)空間中出現被染紅位置的數目和面積皆較四天時來的更多和更大，而且在 G100 組、G150 組和 G200 組這三組支架中皆可見以下現象：生長於間隙空間中被染紅的一團一團的細胞團塊的數量和面積皆比四天時更多和更大，而且被染成紅色顏色的

深度也較四天時更深。另外，於此時時間點也可觀察到，在間隙寬度較小的 G100 組和 G150 組這兩組支架內，生長於這兩組支架內各自的間隙空間中的細胞團塊其體積已經大到可以於相鄰兩條平行支柱(strut)之間形成「橋」狀的構造了；反觀間隙寬度較大的 G200 組支架，於此時時間點所見其支架內的間隙空間中的細胞團塊其體積大小則尚不足以在相鄰兩條平行支柱(strut)之間形成「橋」狀的構造。至於全平型組和 TCPS 組此時被染成紅色的區域面積亦較四天時更加增大、紅色深度也較四天時更明顯(圖 4-10)。

當類骨細胞被培養於各組三維列印聚乳酸支架上以及 TCPS 上經 OIM 誘導後十天進行 ARS 染色後，於拍攝得到之光學顯微鏡圖上，可見不論是在 G100 組、G150 組或 G200 組支架上，被染紅的區塊其所分布的位置大致上和七天時的情形相似。那至於全平型組和 TCPS 組於第十天的染色情形也和第七天時相似(圖 4-11)。

由 ARS 染色後巨觀下拍照的結果顯示，TCPS 組無論於 4、7 或 10 天時都有肉眼可辨別地較強程度之染色；但是同樣以肉眼試圖分辨 TCPS 組以外其他四組於各天期的染色程度強弱就不容易了(圖 4-12(A))。

茜素紅 S 染色後其定量分析試驗所得結果如圖 4-12(B)所示。

由 ARS 之定量分析結果顯示，若先就各組隨時間進展其讀值的變化趨勢來看，首先可觀察到 G100 組從第四天的讀值(0.17 ± 0.0197)上升至第七天的讀值(0.208 ± 0.0182)這一趨勢，顯示其上的 MG-63 類骨細胞的鈣沉積量逐漸增多，但第十天的讀值只有 0.189 ± 0.0171 ，卻又呈現出第七天至第十天鈣沉積量略減的趨勢。至於 G150 組，由其第四天(0.176 ± 0.0152)、第七天(0.23 ± 0.0298)和第十天(0.233 ± 0.036)之讀值可得知此組其上細胞的鈣沉積量於四至七天之間先逐漸增加，然而於七至十天這段期間可能已達鈣沉積量高峰而漸趨平緩不再增加。再來看到 G200 組，其讀值由第四天(0.135 ± 0.0101)上升至第七天(0.185 ± 0.0184)而後到第十天(0.249 ± 0.0212)仍持續上升，顯示其鈣沉積量在實驗觀察的十天期間內持續增加中。至於全平型組，其讀值由第四天(0.129 ± 0.0125)到第七天(0.123 ± 0.0296)是一個大致持平的趨勢，但



從第七天到第十天(0.178 ± 0.019)則有再上升趨勢。最後，從 TCPS 組於四、七和十天的讀值變化，則大略也可觀察到由第四天到第七天先是一個大致持平的趨勢，但從第七天到第十天則有再上升趨勢。

比較各組 ARS 定量分析結果，可發現於第四天時，雖然 TCPS 組的數值是最高的，但若不論 TCPS 組，而只比較各組聚乳酸支架的表現結果，則可見 G100 組和 G150 組有統計顯著地比 G200 組和全平型組來得有更高量的鈣沉積。於第七天時，可見 G150 組也是有統計顯著地較 G200 組及全平型組來得有更高的鈣沉積量，且 G150 組與 TCPS 組間數值沒有統計上顯著差異，但 G150 組與 G100 組相比則無統計上顯著差異。於第十天時，TCPS 組的數值有統計顯著地高於其餘四組的數值；若不論 TCPS 組，則以 G150 組和 G200 組有較高的鈣沉積量，兩者皆有達統計顯著地高於全平型組；再者，G200 組有統計顯著地高於 G100 組，但 G200 組與 G150 組兩者互比則沒有統計上顯著差異。

第五章 討論



5-1 三維列印聚乳酸支架尺寸精度探討

由 G100 組、G150 組和 G200 組這三組的間隙寬度實際值的平均值都較預設值為小這一結果，推測可能是因為熔融沉積成型擠出的材料因為熱熔融的緣故而變得比實際尺寸寬了一點，所以導致本實驗所製作的支架其支柱(strut)寬度實際值的平均值比設定值略寬，但間隙寬度實際值的平均值則比設定值來的較小。

5-2 熔融沉積成型式三維列印聚乳酸支架之體外靜態降解現象探討

對本研究中之各組聚乳酸支架進行為期 22 週之體外靜態降解實驗後，總結各組被觀測到的情形，可以發現無論是哪一組別，在觀測期間內皆無出現明顯的重量損失現象。G150 組於第 18 週時其平均重量損失率顯示為 0.076%，然而此一結果若與文獻中其他相關實驗的結果相比，仍顯得很小，表示幾乎沒有明顯的重量損失現象。

另對於支架靜態體外降解實驗中所使用的降解溶液的 pH 值所做的量測則顯示在 22 週期間並未有可測得的因聚乳酸降解而致的降解液的 pH 值變化。此一結果與上一段所討論之幾乎測不出重量損失率的結果是吻合的，但是另一方面也有可能是因為實驗設計上選用浸泡在 15mL PBS 降解液中的 6 片(形狀皆近似半徑 0.75 公分的)半圓形聚乳酸支架試片的總表面積太小，導致聚乳酸支架試片的降解現象在為期 22 週的觀測期間內幾乎無法被量化測得。

聚乳酸是一結晶性高分子，當其進行水解時，探討其水解機制，發現水解之初會先由無定型區域進行，而將結晶區留下。由於經過熔融沉積成型式三維列印後，聚乳酸的結晶度會增加，可能因此延緩其水解的速率，所以本降解實驗期間才會觀測不到明顯的聚乳酸的重量損失現象和浸泡支架試片的降解液的 pH 值明顯的下



降的情形。

5-3 經過熔融沉積成型式三維列印製程以後聚乳酸材料的熱性質變化

探討

由尚未經 FDM 三維列印製程的聚乳酸線的熱分析圖中有明顯的 T_g 可被判讀出(約為 53.68°C)，但從 G100 組、G150 組和全平型支架的熱分析圖中卻無法觀察到明顯的 T_g ，推測造成材料於列印前與列印後二者間出現這樣的熱性質變化的原因為：聚乳酸線材其經歷的製程乃是從被加熱至熔融狀態後，直接快速冷卻成型，因此其材料內部所形成的結晶顆粒較小，故此其 T_g 會較明顯；至於經過本實驗所採用的熔融沉積成型式三維列印製程而製作成的各組別支架材料，由於它們皆經歷了從熔融沉積成型式三維列印機中被加熱至高達 190°C 的熔融狀態而後從噴嘴被擠出然後被置於溫度為 60°C 的玻璃平臺(platform)上再自行慢慢冷卻，故其結晶度將提高，而結晶度高的高分子聚合物其熱分析圖之 T_g 本來就不明顯。

5-4 聚乳酸材料經以熔融沉積成型式三維列印前後之分子量以及分子量分布之變化

三維列印前，聚乳酸線材的 M_w/M_n 值是比較大的，顯示於三維列印前的聚乳酸線材其分子量分布較大，亦即在其高分子的同系物的混合物中，有較多長鏈大分子存在；經過三維列印後，聚乳酸支架材料的 M_w/M_n 值變小，這顯示了熔融沉積成型式三維列印製程確實會讓高分子聚合物聚乳酸中的大分子裂解成較短鏈的小分子，才會使得其 M_w/M_n 值變小。推測應是列印過程中，溫度以及當熔融態的 PLA 經過噴嘴時的剪切力這兩者共同造成 PLA 聚合物中較大的分子發生分子鏈斷裂，裂解為較小的分子。



5-5 對培養於具有不同間隙寬度值的各組三維列印聚乳酸支架上之 MG-63 類骨細胞的生長行為之探討

由 MTT 試驗之結果和 SEM 所觀察到的各天期的細胞生長情形，可見 MG-63 類骨細胞在各組支架上都是能夠隨著時間增長而持續分裂增生，故此可以得知利用聚乳酸材料經過熔融沉積成型式三維列印之製程而製得的支架，確實讓能細胞於其上貼附和持續增生。

MTT 試驗結果顯示，當細胞被培養於支架上和 TCPS 上經過七天後，TCPS 組具有最高的細胞增生量且與其餘四組相比皆有統計上顯著差異；TCPS 組以外，則是以 G100 組其上的細胞增生量最高，其細胞增生量(MTT 讀值)若與 G200 組和平型組這兩組各自做比較，皆有達到統計上顯著差異，但 G100 組其細胞增生量(MTT 讀值)若與 G150 組相比則無統計上顯著差異。因此吾人認為當類骨細胞被培養於本實驗所製作之具有不同間隙寬度值的各組聚乳酸支架上經過七天後，以 G100 組支架較有利於細胞於其上的增生，但統計分析結果顯示 G150 組支架其上的細胞增生量和 G100 組支架其上的細胞增生量兩者間無顯著差異，亦即吾人可推論 G150 組支架其上的細胞增生量亦不亞於 G100 組。

5-6 對培養於具有不同間隙寬度值的各組三維列印聚乳酸支架上之 MG-63 類骨細胞的分化行為之探討

由實驗數據結果得知，MG-63 類骨細胞在 TCPS 上的成骨分化表現優於在本實驗所製作的三維列印聚乳酸支架上，但若只探討此細胞於各種具有不同間隙寬度的三維列印聚乳酸支架上的成骨分化表現程度的差異，則於第四天時，G100 組和 G150 組支架其上細胞的鈣沉積量較高；於第七天時，仍是前述兩組有較高的鈣沉積量；於第十天時，則變為以 G150 組和 G200 組有較高的鈣沉積量。推測此現



象可能因培養前期，細胞數量尚不多，因此在間隙寬度值較小的 G100 組和 G150 組中的細胞比起在間隙寬度較大的 G200 組中的細胞更有可能藉著在間隙中「搭橋」生長而彼此互相有所聯繫、互相影響，並有利於細胞於培養的較早期(第七天(含)以前)時就在間隙空間中形成細胞密度較大的細胞團塊(如圖 4-7B、4-7D、4-8B、4-8D、4-9B、4-9D、4-10B 和 4-10D)，而此細胞密度較大的細胞團塊內部細胞可能因為處於高細胞密度環境而促進其往成骨分化的路徑發展，於是呈現出在第四天和第七天時是以 G100 組和 G150 組的成骨分化表現程度較高；及至培養後期，一方面因為此時不論在支架上的支柱(strut)頂部平面區域或者在間隙空間中，細胞密度皆已變大，所以吾人推測在 G100 組上生長的細胞可能因彼此競爭生長空間而開始有細胞凋亡的現象出現，導致其上總細胞數下降，因此即便存活下來的其餘細胞仍持續進行鈣沉積的活動，但總鈣沉積量亦下降。反觀 G200 組，因為其支架結構提供更大的立體空間予細胞生長，在第十天時，細胞較不易有凋亡現象發生，因此吾人推測於 G200 組支架上的細胞總數於第十天時將多於在 G100 組支架上生長的細胞總數，因此導致本實驗所測得的第十天的鈣沉積量以 G200 組較高，有統計顯著地高於 G100 組和全平型組，但其與 G150 組互比則沒有達統計上顯著差異。

第六章 結論



1. 本實驗所列印出來的支架成品雖然其構型中的「相鄰支柱彼此間的間隙寬度」實際值較設定值偏小，但屬於可接受而且能適合於本研究中的後半部之細胞培養實驗中使用。
2. 本實驗以熔融沉積成型式三維列印機所印製出之聚乳酸支架於受測的 22 週之靜態體外降解實驗過程中只能觀察到很微量的降解現象，可推知本實驗所製作之聚乳酸支架於實驗觀測期間內只有很微量的降解。
3. 尚未經過熔融沉積成型式三維列印製程的聚乳酸線其玻璃轉移溫度約為 53.68 °C，熔點為 146.95°C；經熔融沉積成型式三維列印製程的聚乳酸支架則皆無明顯的玻璃轉移溫度可被判讀出，顯示經過 FDM 三維列印製程可使聚乳酸材料的結晶度提高。
4. 熔融沉積成型式三維列印製程會讓高分子聚合物聚乳酸中的大分子裂解成較短鏈的小分子，使其 M_w/M_n 值變小，即使其分子量分布變窄。
5. 由 MTT 測試之結果和電子顯微鏡照片所觀察到的各天期的細胞生長情形，可以得知利用聚乳酸材料經過熔融沉積成型式三維列印之製程而製得的各組支架(包含 G100 組、G150 組、G200 組和全平型組支架)，確實皆能讓 MG-63 類骨細胞於實驗觀察的 7 天期間內於其上貼附和持續地增生。
6. 由 MTT 測試之結果顯示，MG-63 類骨細胞經過 1, 4, 7 天的培養後，除了於第一天時 G100 組、G150 組、G200 組的細胞生長情形有較 TCPS 組好，隨培養天數增長後，於第四天和第七天時皆以 TCPS 組的細胞生長表現最佳；若純粹只比較細胞於各種具不同構型的聚乳酸支架上的生長情形，則第四天時 G100 組、G150 組、G200 組三組細胞生長表現皆高於全平型組，但這三組彼此間皆無差別；於第七天時，則以 G100 組其上的細胞生長表現較佳，有達統計顯著差異地優於全平型組和 G200 組，但若與 G150 組互比則無統計上顯著差異。綜合上述，吾人認為當類骨



細胞被培養於本實驗所製作之具有不同間隙寬度值的各組聚乳酸支架上經過七天後，以 G100 組支架較有利於細胞於其上的增生，但統計分析結果顯示 G150 組支架其上的細胞增生量和 G100 組支架其上的細胞增生量兩者間無顯著差異，亦即吾人可推論 G150 組支架其上的細胞增生量亦不亞於 G100 組。

7. 由 ARS 結果得知，MG-63 類骨細胞經成骨分化誘導培養 10 天後，在 TCPS 上的鈣沉積量高於在本實驗所製作的各組三維列印聚乳酸支架上，皆有達統計顯著差異；但若只探討此細胞於各組支架上的鈣沉積量的差異，則於第四天和第七天時，以 G100 組和 G150 組的鈣沉積量較高；於第十天時，則變為以 G150 組和 G200 組有較高的鈣沉積量。

8. 綜合本研究的 MTT 和 ARS 試驗結果，吾人推論當類骨細胞被培養在設計有特定溝槽寬度的狹長形溝槽狀構造的支架上經過 7 天(觀察細胞增生)和 10 天(觀察細胞經成骨誘導後的鈣沉積量)後，最適於其增生與成骨分化的溝槽寬度約落在 $142.5 \pm 20.0 \mu\text{m}$ (即本實驗中的 G150 組支架)。



第七章 未來研究方向

1. 在進行支架的體外降解實驗時，宜再加入對降解試片的 SEM 觀察、DSC 分析和對分子量變化的分析，以從微觀下支架表面型態的改變、高分子的結晶度變化和其分子量是否發生變化的角度來深入探究支架降解過程中的各種現象。
2. 作為骨組織工程支架必須具有好的機械性質，未來須對支架於降解前和降解後的機械強度作一探討。
3. 由現前實驗結果發現，以本實驗的熔融沉積成型三維列印方式列印的聚乳酸支架其 MTT 和 ARS 試驗結果皆不如作為負控制組的 TCPS 的結果，因為未來考慮可以對列印後的聚乳酸支架進行鹼化的表面處理，或者其他形式的表面處理，以期能改善材料表面與細胞之間的交互作用。
4. 希望將來進行動物實驗，觀察支架在活體內是否有利於組織生長於其上，甚至可以結合生物信號分子於支架上，再將支架植入動物體內以觀察是否能有促進某特定組織生長的情形。

第八章 參考文獻



- Atala, A., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Engineering complex tissues. *Sci Transl Med*, 4(160), 160rv112. doi:10.1126/scitranslmed.3004890
- Bajaj, P., Schweller, R. M., Khademhosseini, A., West, J. L., & Bashir, R. (2014). 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng*, 16, 247-276. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-105155
- Billiet, T., Vandenhante, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S., & Dubruel, P. (2012). A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*, 33(26), 6020-6041. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.050
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*, 30(10), 546-554. doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005
- Chen, Q., Roether, J. A., & Boccaccini, A. R. (2008). Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials. *Topics in Tissue Engineering*, 4, 1-27.
- Chia, H. N., & Wu, B. M. (2015). Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng*, 9, 4. doi:10.1186/s13036-015-0001-4
- Cima, M., Sachs, E., Cima, L., Yoo, J., Khanuja, S., Borland, S., . . . Giordano, R. (1994). *computer-derived microstructures by 3D Printing: Sio-and Structural Materials*. Paper presented at the 1994 International Solid Freeform Fabrication Symposium.
- Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review. *Adv Drug Deliv Rev*, 107, 367-392. doi:10.1016/j.addr.2016.06.012
- Fisher, J. P., Dean, D., & Mikos, A. G. (2002). Photocrosslinking characteristics and mechanical properties of diethyl fumarate/poly(propylene fumarate) biomaterials. *Biomaterials*, 23(22), 4333-4343. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219823>
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 Suppl 3(3, Supplement), S20-27. doi:10.1016/j.injury.2005.07.029
- Gregor, A., Filova, E., Novak, M., Kronek, J., Chlup, H., Buzgo, M., . . . Hosek, J. (2017). Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *J Biol Eng*, 11, 31. doi:10.1186/s13036-017-0074-3
- Griffith, L. G., Wu, B., Cima, M. J., Powers, M. J., Chaignaud, B., & Vacanti, J. P. (1997). In vitro organogenesis of liver tissue. *Ann N Y Acad Sci*, 831(1), 382-397. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616729>

- Harrison, J. H., Merrill, J. P., & Murray, J. E. (1956). Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum*, 6, 432-436. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13391513>
- Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, C. X., Tan, K. C., & Lim, T. C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med*, 1(4), 245-260. doi:10.1002/term.24
- Kolff, W. J., & Berk, H. T. J. (1944). The artificial kidney: A dialyser with a great area. *Acta Medica Scandinavica*, 117(2), 121-134. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13391513>
- Landers, R., Mülhaupt, R. J. M. M., & Engineering. (2000). Desktop manufacturing of complex objects, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers. 282(1), 17-21.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926. doi:10.1126/science.8493529
- Lever, T., Haines, P., Rouquerol, J., Charsley, E. L., Van Eckeren, P., & Burlett, D. J. (2014). ICTAC nomenclature of thermal analysis (IUPAC Recommendations 2014). *Pure and Applied Chemistry*, 86(4), 545-553. doi:10.1515/pac-2012-0609
- Li, S. (2017). 2 - Synthetic biodegradable medical polyesters. In X. Zhang (Ed.), *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers* (pp. 37-78): Woodhead Publishing.
- Lichte, P., Pape, H. C., Pufe, T., Kobbe, P., & Fischer, H. (2011). Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury*, 42(6), 569-573. doi:10.1016/j.injury.2011.03.033
- Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N. R., & John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol*, 101(22), 8493-8501. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.092
- Meinel, L., Karageorgiou, V., Fajardo, R., Snyder, B., Shinde-Patil, V., Zichner, L., . . . Vunjak-Novakovic, G. (2004). Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: Effects of scaffold material and medium flow. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(1), 112-122. doi:DOI 10.1023/B:ABME.0000007796.48329.b4
- Melchels, F. P., Feijen, J., & Grijpma, D. W. (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 31(24), 6121-6130. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.050
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:

- application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
- Murphy, C. M., Haugh, M. G., & O'Brien, F. J. (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3), 461-466. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.063
- Nerem, R. M. (1991). Cellular engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 19(5), 529-545. doi:10.1007/bf02367396
- Nerem, R. M., & Schutte, S. C. (2014). Chapter 2 - The Challenge of Imitating Nature. In R. Lanza, R. Langer, & J. Vacanti (Eds.), *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)* (pp. 9-24). Boston: Academic Press.
- Nohutcu, R. M., McCauley, L. K., Koh, A. J., & Somerman, M. J. (1997). Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. *J Periodontol*, 68(4), 320-327. doi:10.1902/jop.1997.68.4.320
- Olszta, M. J., Cheng, X. G., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., . . . Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science & Engineering R-Reports*, 58(3-5), 77-116. doi:10.1016/j.mser.2007.05.001
- Pattanayak, D. K., Fukuda, A., Matsushita, T., Takemoto, M., Fujibayashi, S., Sasaki, K., . . . Kokubo, T. (2011). Bioactive Ti metal analogous to human cancellous bone: Fabrication by selective laser melting and chemical treatments. *Acta Biomater*, 7(3), 1398-1406. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.034
- Pignatello, R. (2013). *Advances in biomaterials science and biomedical applications*: BoD–Books on Demand.
- Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., & Ramirez-Vick, J. E. (2014). Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(1), 15-56. doi:10.1166/jnn.2014.9127
- Rezwan, K., Chen, Q., Blaker, J., & Boccaccini, A. R. J. B. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. 27(18), 3413-3431.
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 78, 1246-1262. doi:10.1016/j.msec.2017.05.017
- Rouwkema, J., Rivron, N. C., & van Blitterswijk, C. A. (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 26(8), 434-441. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.009>

- Sin, L. T., Rahmat, A. R., & Rahman, W. A. W. A. (2013). 2 - Synthesis and Production of Poly(lactic Acid). In L. T. Sin, A. R. Rahmat, & W. A. W. A. Rahman (Eds.), *Polylactic Acid* (pp. 71-107). Oxford: William Andrew Publishing.
- Skalak, R., & Fox, C. J. I. N. Y., NY, USA. (1988). *Tissue Engineering*, Alan R. Liss.
- Thavornyutikarn, B., Chantarapanich, N., Sitthiseripratip, K., Thouas, G. A., & Chen, Q. (2014). Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. *Prog Biomater*, 3(2), 61-102. doi:10.1007/s40204-014-0026-7
- Vacanti, J. P., & Langer, R. (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354 Suppl 1, SI32-34. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10437854>
- Wang, W. L., Cheah, C. M., Fuh, J. Y. H., & Lu, L. (1996). Influence of process parameters on stereolithography part shrinkage. *Materials & Design*, 17(4), 205-213. doi:Doi 10.1016/S0261-3069(97)00008-3
- Whang, K., Healy, K. E., Elenz, D. R., Nam, E. K., Tsai, D. C., Thomas, C. H., . . . Sprague, S. M. (1999). Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng*, 5(1), 35-51. doi:10.1089/ten.1999.5.35
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
- Woodard, J. R., Hilldore, A. J., Lan, S. K., Park, C., Morgan, A. W., Eurell, J. A. C., . . . Johnson, A. J. W. J. B. (2007). The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *28(1)*, 45-54.
- Wu, B. M., Borland, S. W., Giordano, R. A., Cima, L. G., Sachs, E. M., & Cima, M. J. (1996). Solid free-form fabrication of drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 40(1-2), 77-87. doi:Doi 10.1016/0168-3659(95)00173-5
- Wu, B. M., Cima, M. J. J. P. E., & Science. (1999). Effects of solvent-particle interaction kinetics on microstructure formation during three-dimensional printing. *39(2)*, 249-260.
- Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., & Chua, C.-K. J. T. e. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *7(6)*, 679-689.
- Yousefi, A.-M., James, P. F., Akbarzadeh, R., Subramanian, A., Flavin, C., & Oudadesse, H. (2016). Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. *Stem cells international*, 2016, 6180487-6180487. doi:10.1155/2016/6180487

附圖

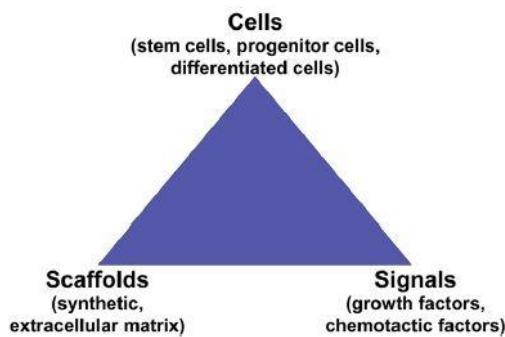


FIGURE 2.1

Illustration of the basic paradigm for tissue engineering and regenerative medicine showing the three 'pillars', i.e., cells, scaffolds, and signals.

圖 2- 1 組織工程理論「三支柱」圖(Robert M. Nerem & Schutte, 2014)

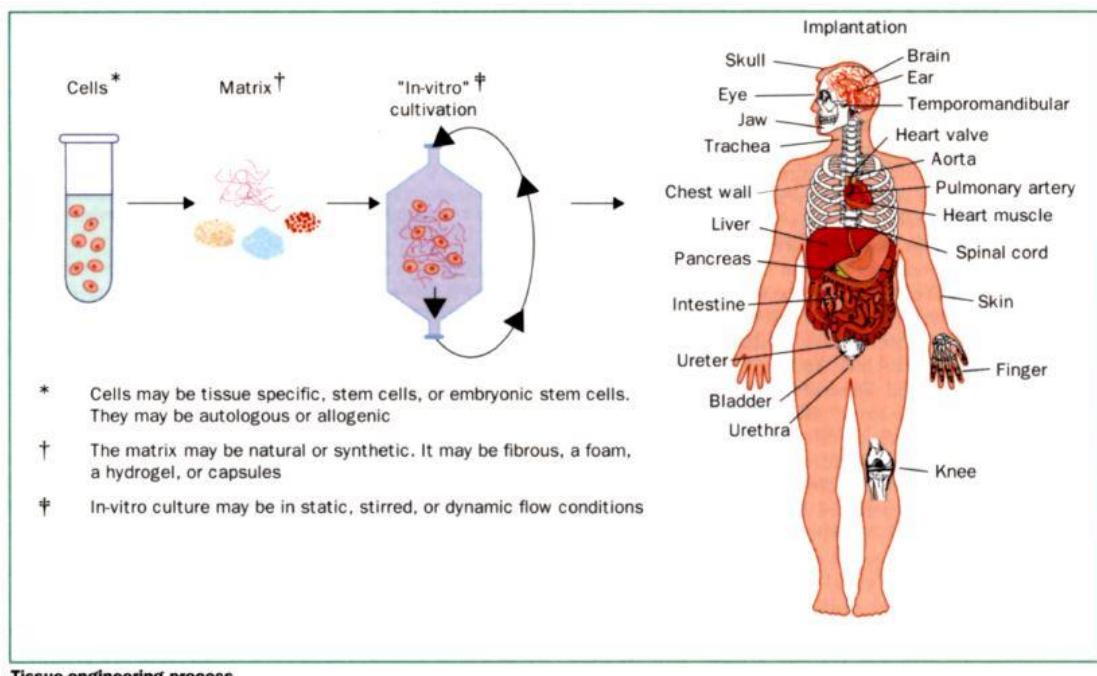


圖 2- 2 組織工程之流程圖(Vacanti & Langer, 1999)

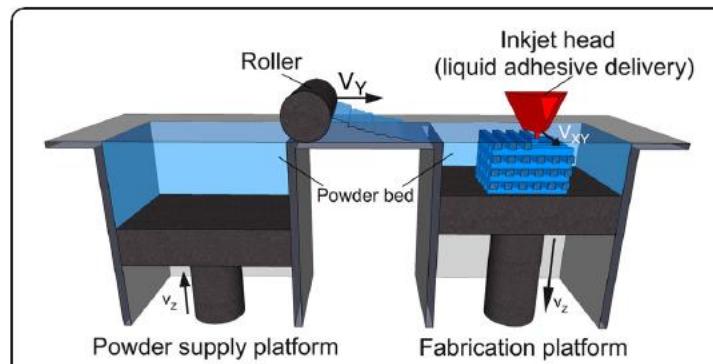


Figure 1 3D Printing schematic. 3D printing is a layer-by-layer process of depositing liquid binder onto thin layers of powder to create a 3D object. Reproduced with permission from [11].

圖 2- 3 Three dimensional printing(3DP)機器原理(Chia & Wu, 2015)

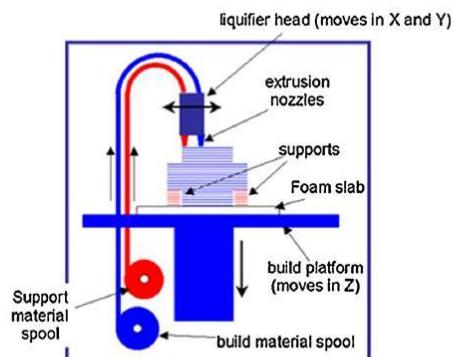


Figure 4 Fused deposition modeling schematic. In fused deposition modeling, a filament of thermoplastic is heated into liquid and extruded through a nozzle in a specific lay-down pattern to create a scaffold. Reprinted with permission from [39].

圖 2- 4 FDM 機器原理(Chia & Wu, 2015)

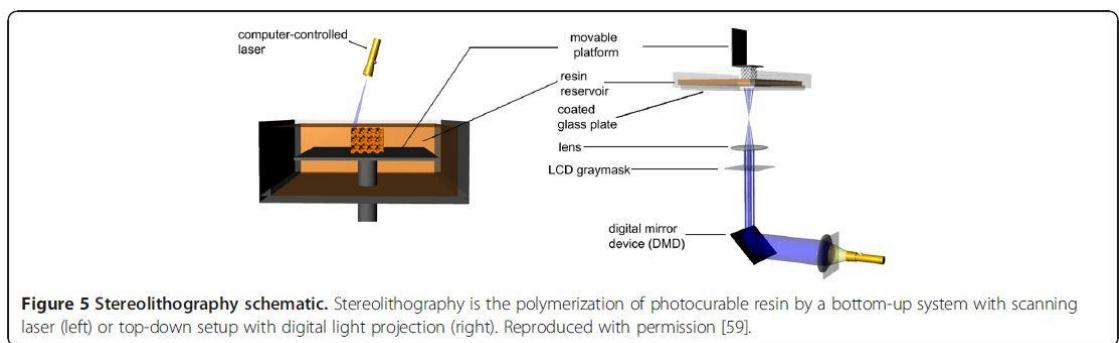


圖 2-5 SLA 機器原理(Chia & Wu, 2015)

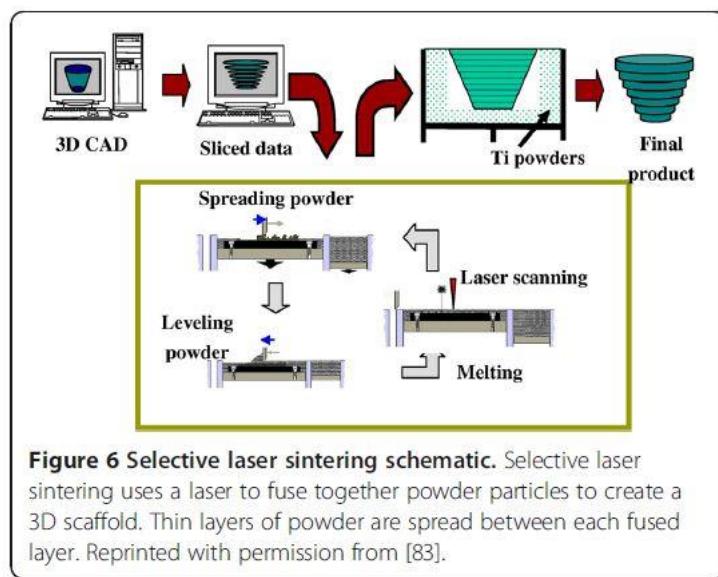


圖 2-6 SLS 機器原理(Chia & Wu, 2015)

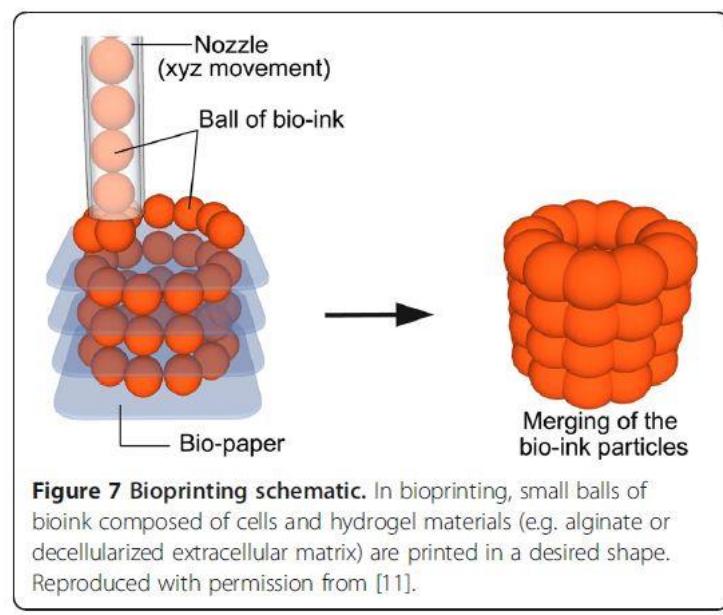


圖 2- 7 3D Plotting/ Direct write bioprinting 原理(Chia & Wu, 2015)

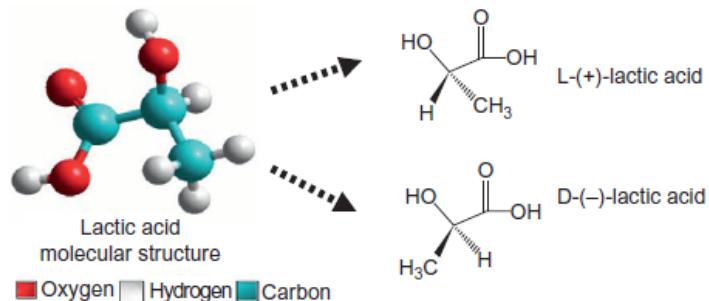


圖 2- 8 乳酸的兩種立體異構物(Sin, Rahmat, & Rahman, 2013)



實驗規劃流程圖

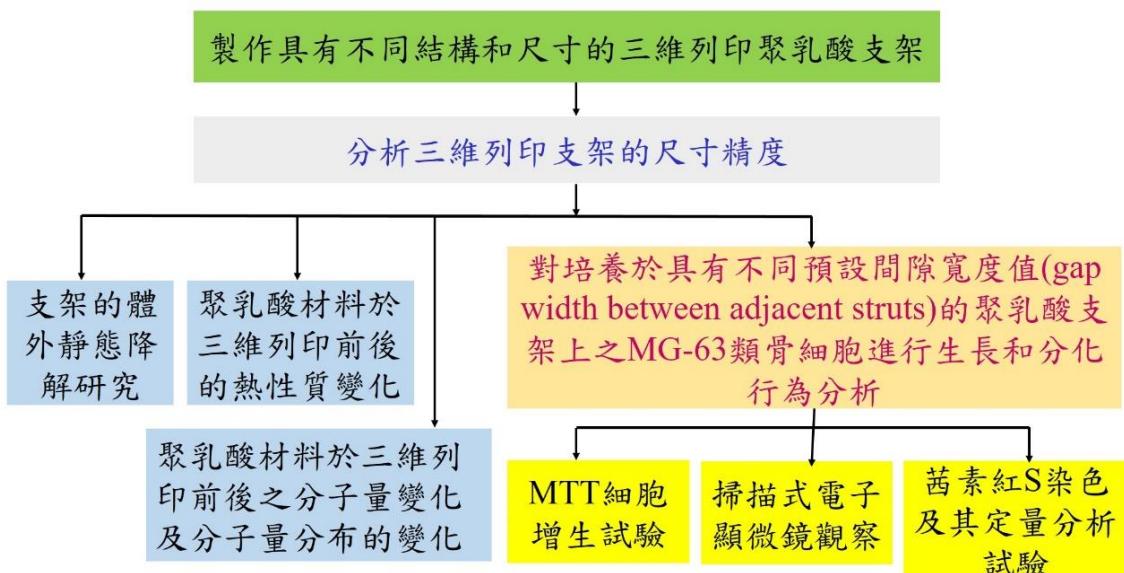


圖 2-9 實驗規劃流程圖

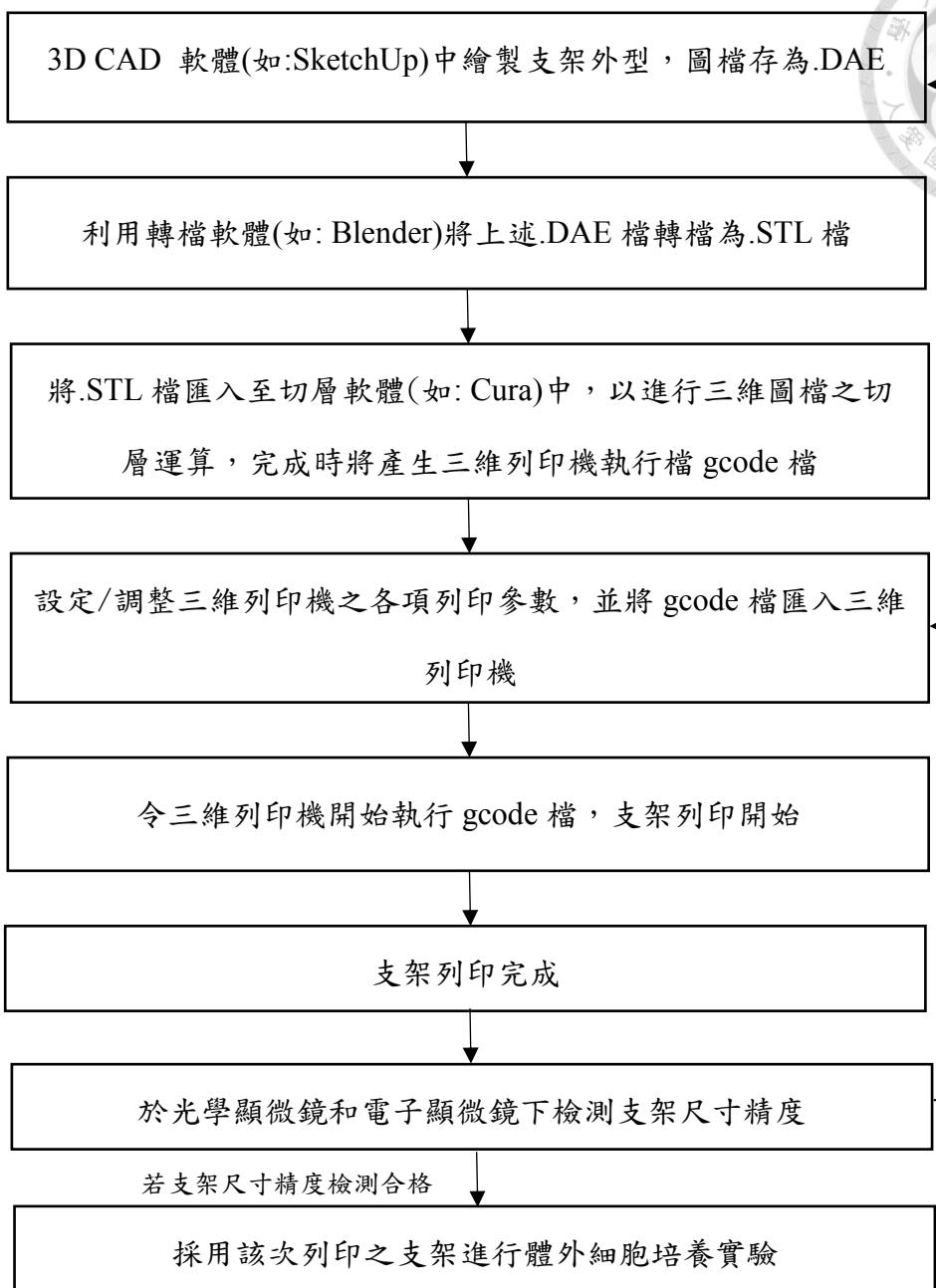
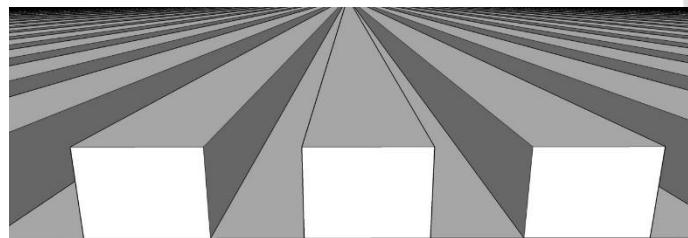


圖 3-1 本研究採用三維列印方式印製聚乳酸支架流程圖



A



B

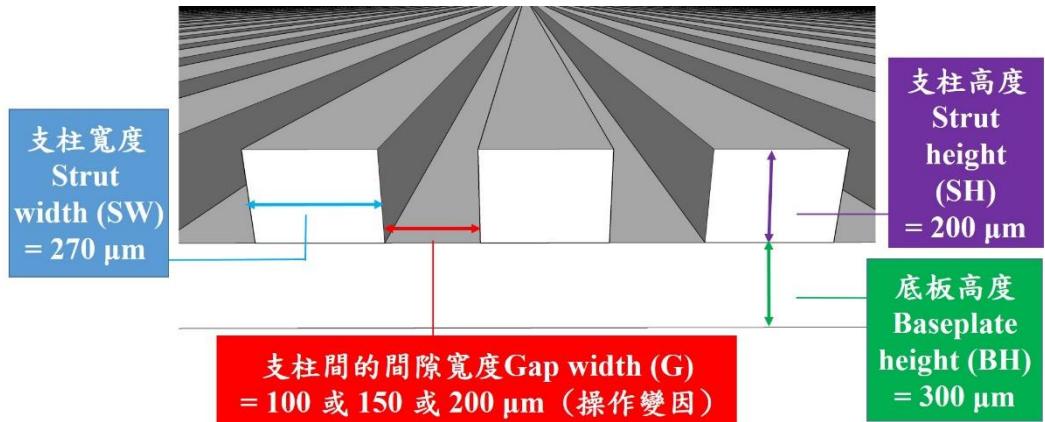


圖 3-2 CAD 軟體所繪製之支架外形側視圖(A)及設定的支架尺寸規格示意圖(B)

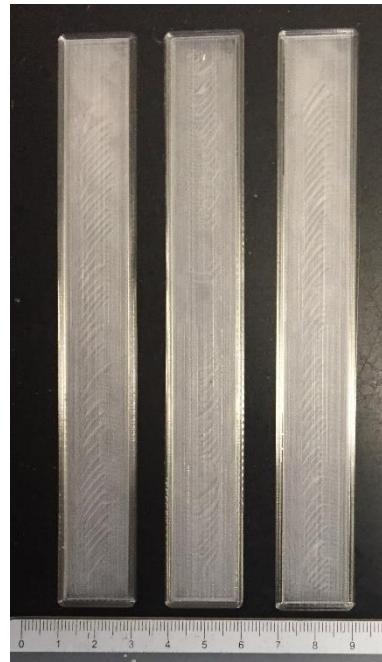


圖 3-3 三片列印完成的 PLA 支架試片樣本。
(比例尺上的最小刻度為 1mm)



圖 3-4 光學顯微鏡下所見三組支架的結構。
(A)G100 組 (B)G150 組 (C) G200 組

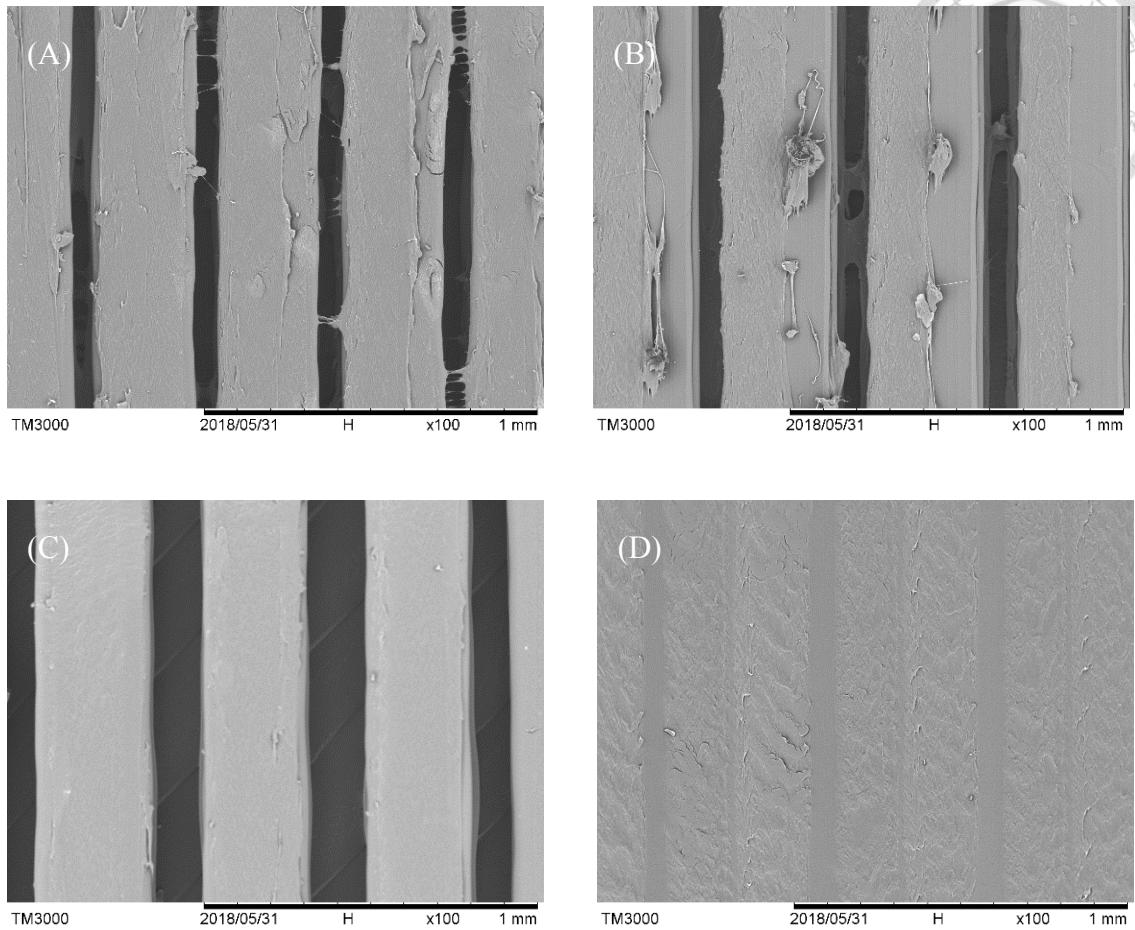
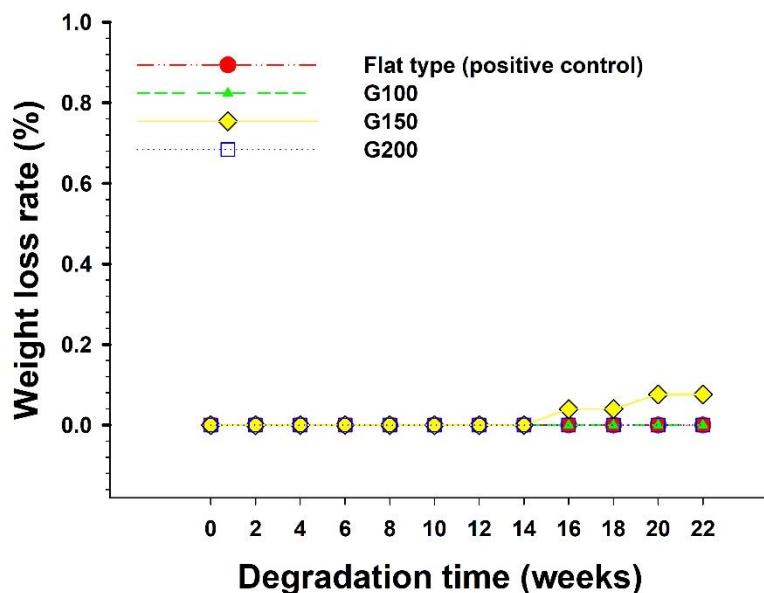


圖 4-1 各組三維列印聚乳酸支架之電子顯微鏡圖。

(A) G100 組 (B) G150 組 (C) G200 組 (D) 全平型組



A



B

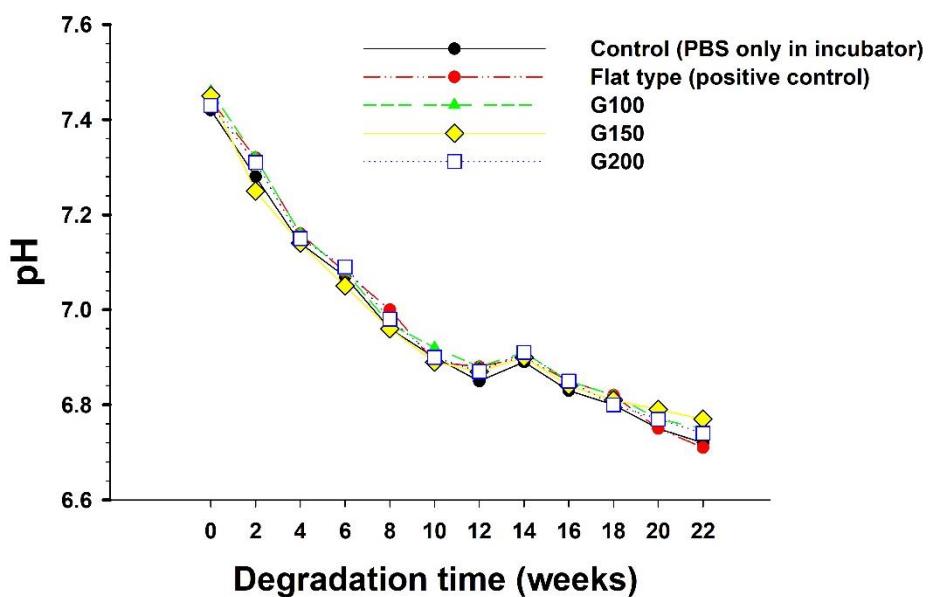
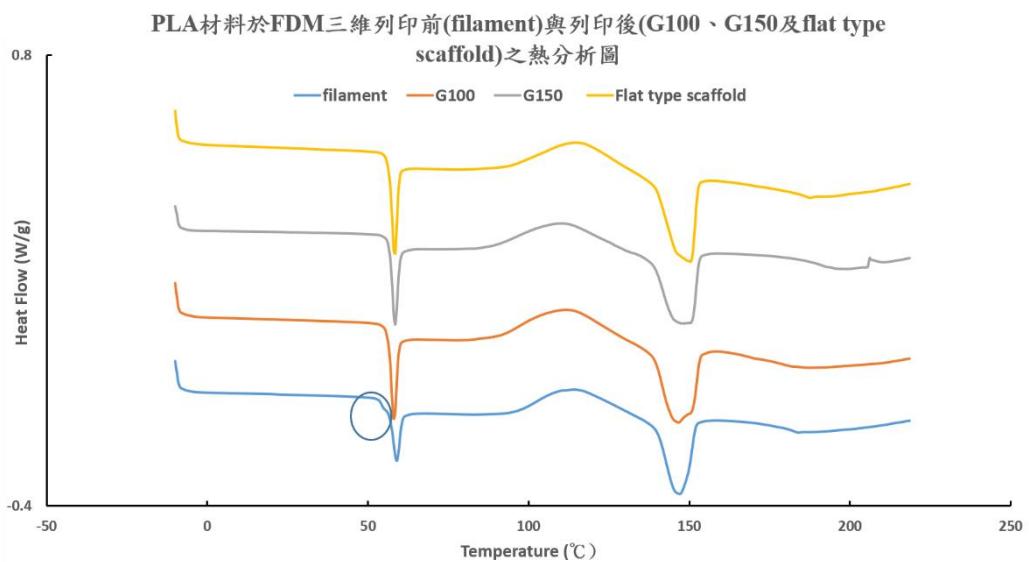


圖 4-2 各組三維列印聚乳酸支架於為期 22 週之體外靜態降解實驗進行期間的重量損失率

圖(A)和各組三維列印聚乳酸支架歷經 22 週之體外靜態降解實驗期間被測得的 PBS 溶液(降解液)的酸鹼值變化圖(B)。



A



B

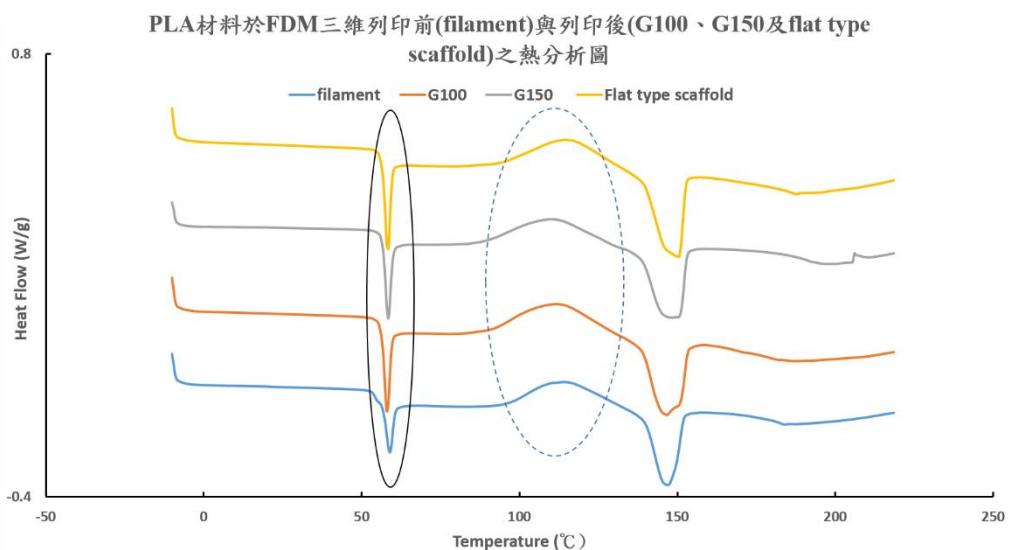


圖 4-3 聚乳酸線材以及本研究中經三維列印製程而製成的 G100 組、G150 組和全平型支架的熱分析圖

(A)圖中實線藍圈處代表此聚乳酸線材的熱分析圖形有呈現出一明顯 T_g 的典型圖形。(B)圖中實線黑色圈起處代表各組材料於對應的該溫度範圍內皆有一小結晶形成的吸熱峰；圖中虛線藍色圈起處代表各組材料於對應的該溫度範圍內皆有一大結晶重組而形成的放熱峰。

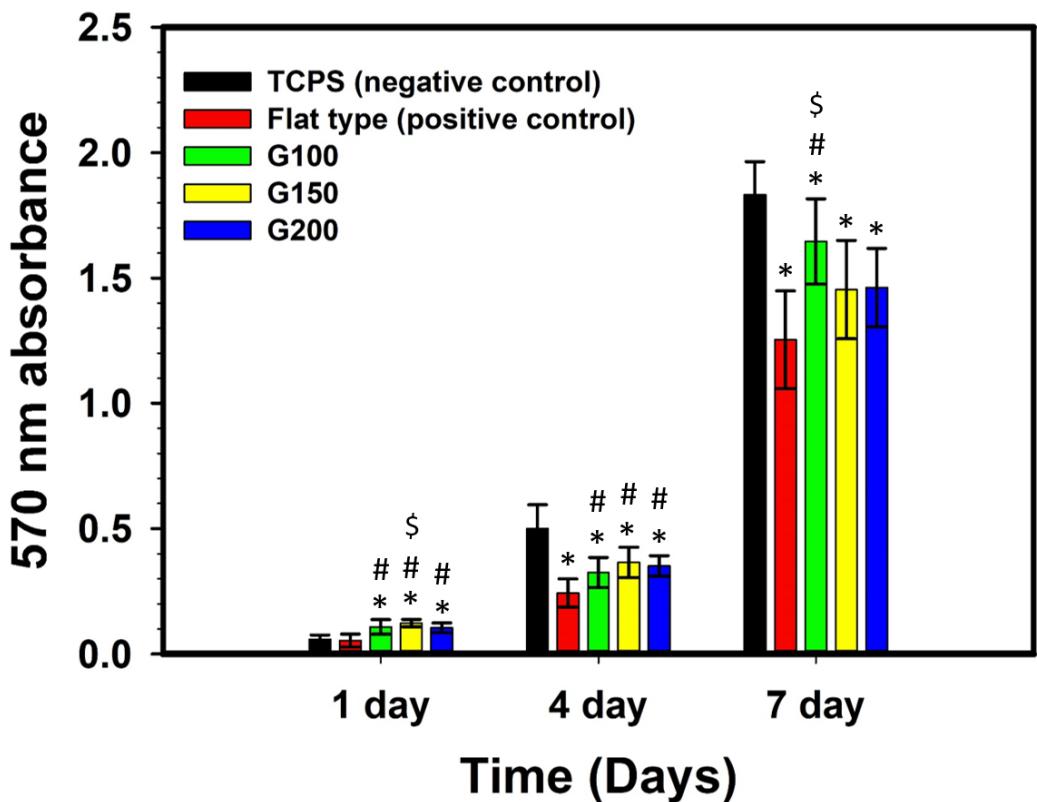


圖 4- 4 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上經過一天、四天和七天以 MTT 試驗進行生長測試之結果 (n=8)

*表示相對於 TCPS 組有統計上顯著差異， $p<0.05$ 。

#表示相對於全平型組支架有統計上顯著差異， $p<0.05$ 。

\$表示相對於 G200 組支架有統計上顯著差異， $p<0.05$ 。

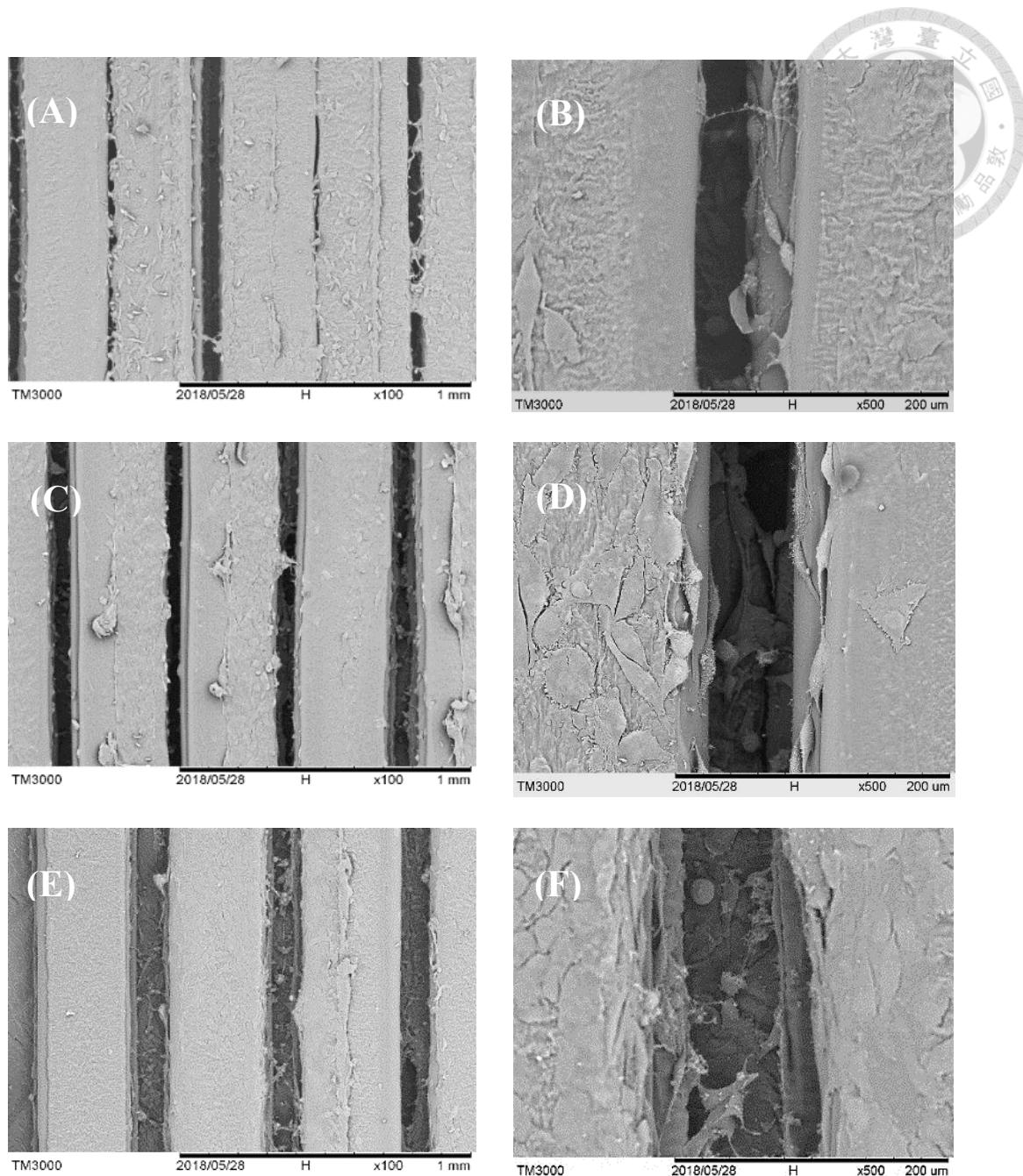


圖 4- 5 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上一天的 SEM

(A) G100 組-100X (B) G100 組-500X

(C) G150 組-100X (D) G150 組-500X

(E) G200 組-100X (F) G200 組-500X (接下頁)

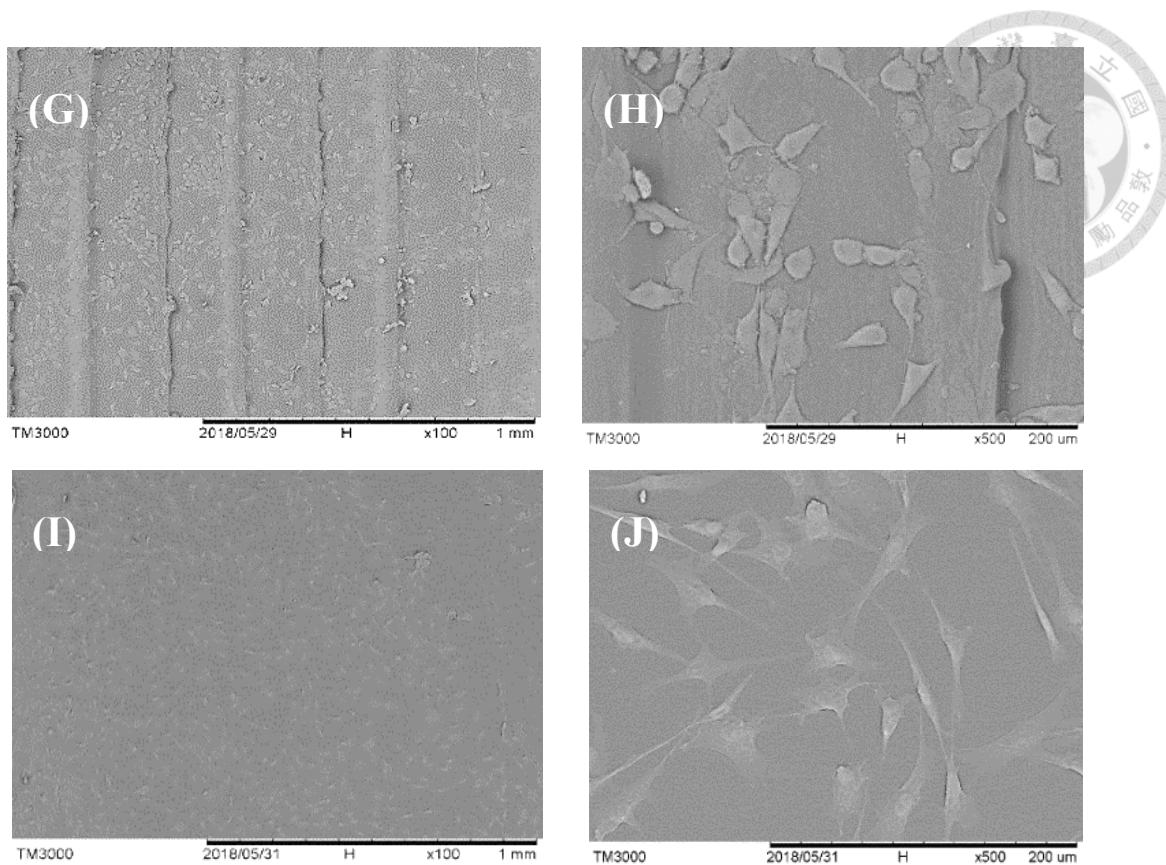


圖 4-5 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上一天的 SEM
(續上頁)

(G) 全平型組-100X (H) 全平型組-500X
(I) TCPS-100X (J) TCPS- 500X

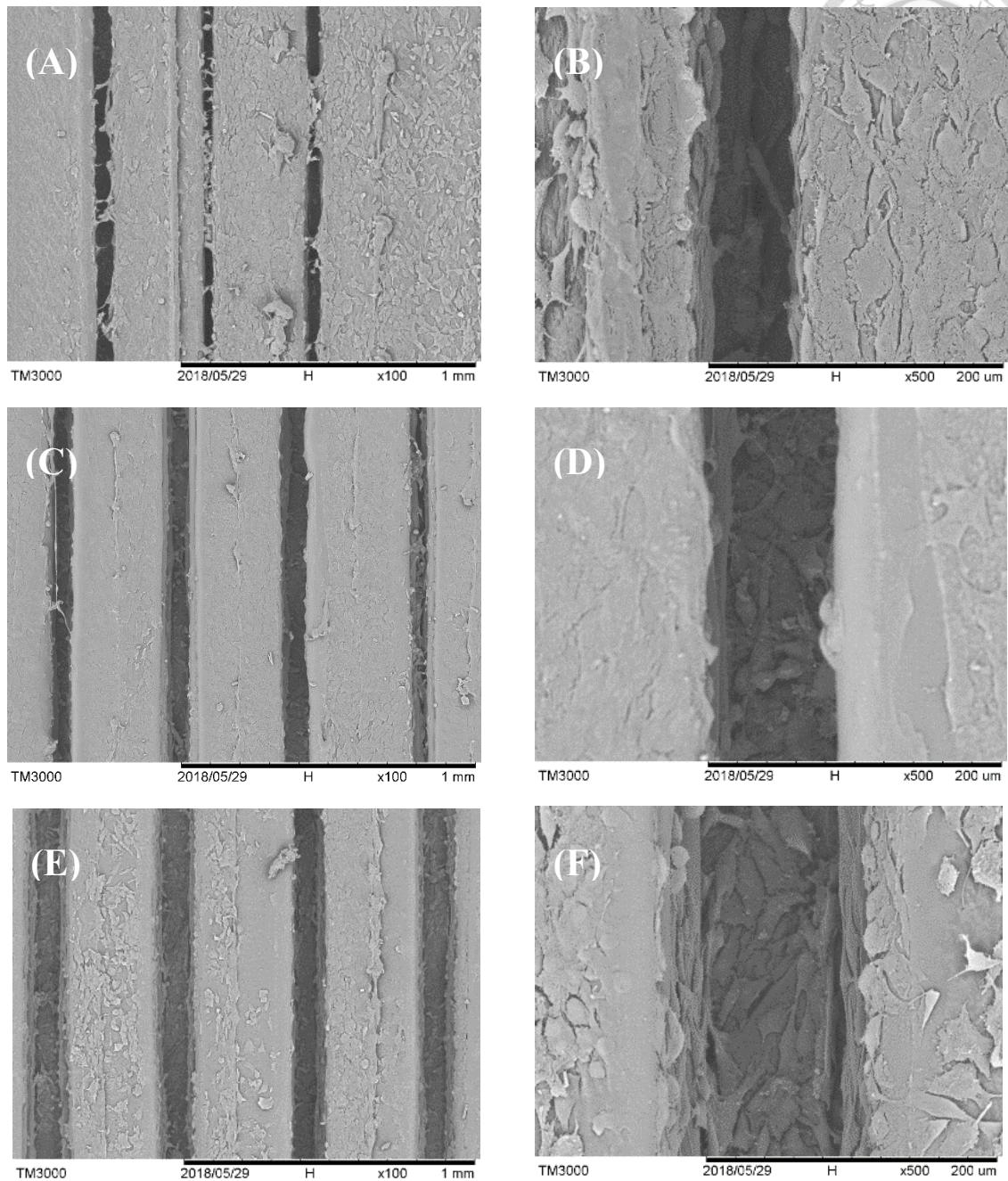


圖 4-6 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上三天的 SEM

- (A) G100 組-100X (B) G100 組-500X
- (C) G150 組-100X (D) G150 組-500X
- (E) G200 組-100X (F) G200 組-500X (接下頁)

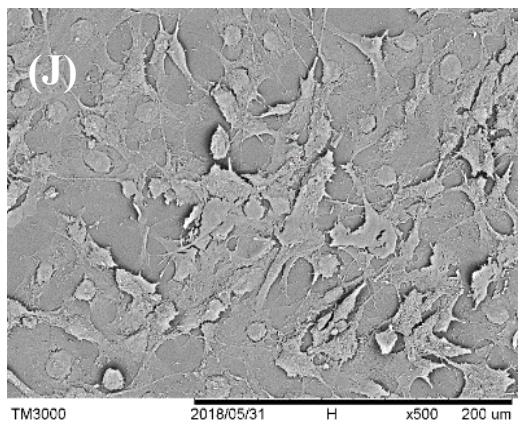
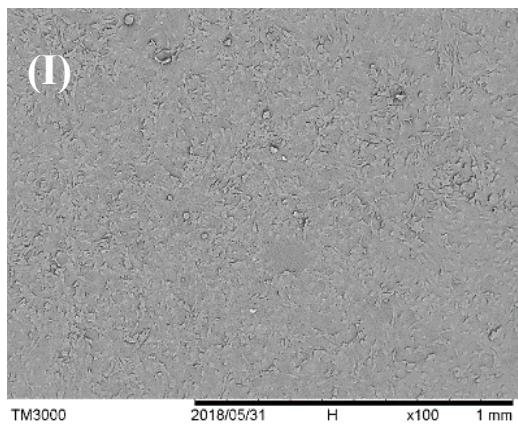
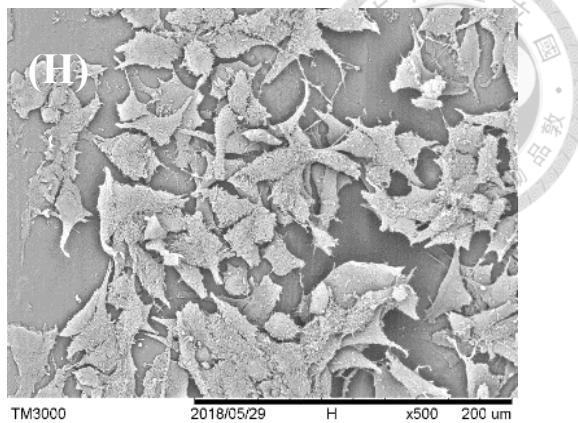
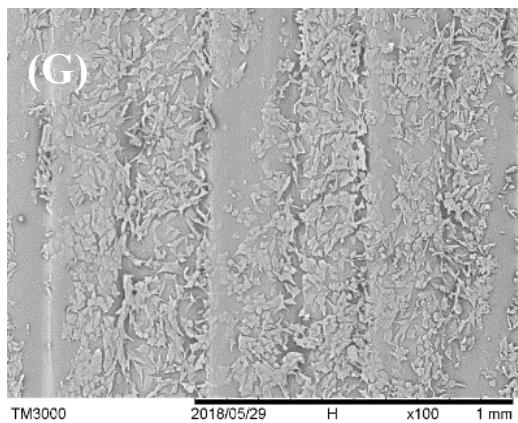


圖 4-6 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上三天的 SEM (續上頁)。

(G) 全平型組-100X (H) 全平型組-500X

(I) TCPS-100X (J) TCPS- 500X

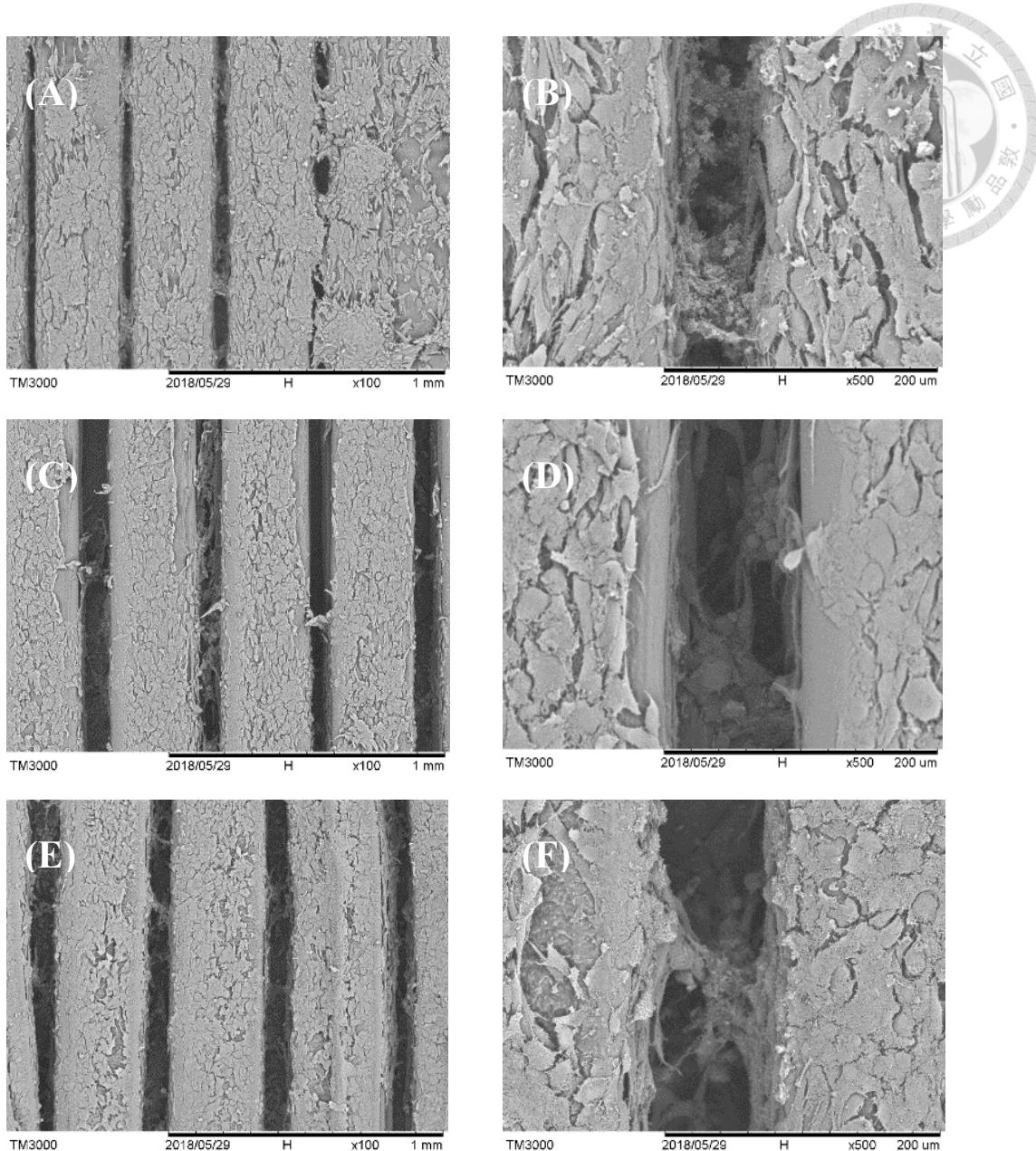


圖 4- 7 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上五天的 SEM 。

- (A) G100 組- 100X (B) G100 組- 500X
 (C) G150 組- 100X (D) G150 組- 500X
 (E) G200 組- 100X (F) G200 組- 500X (接下頁)

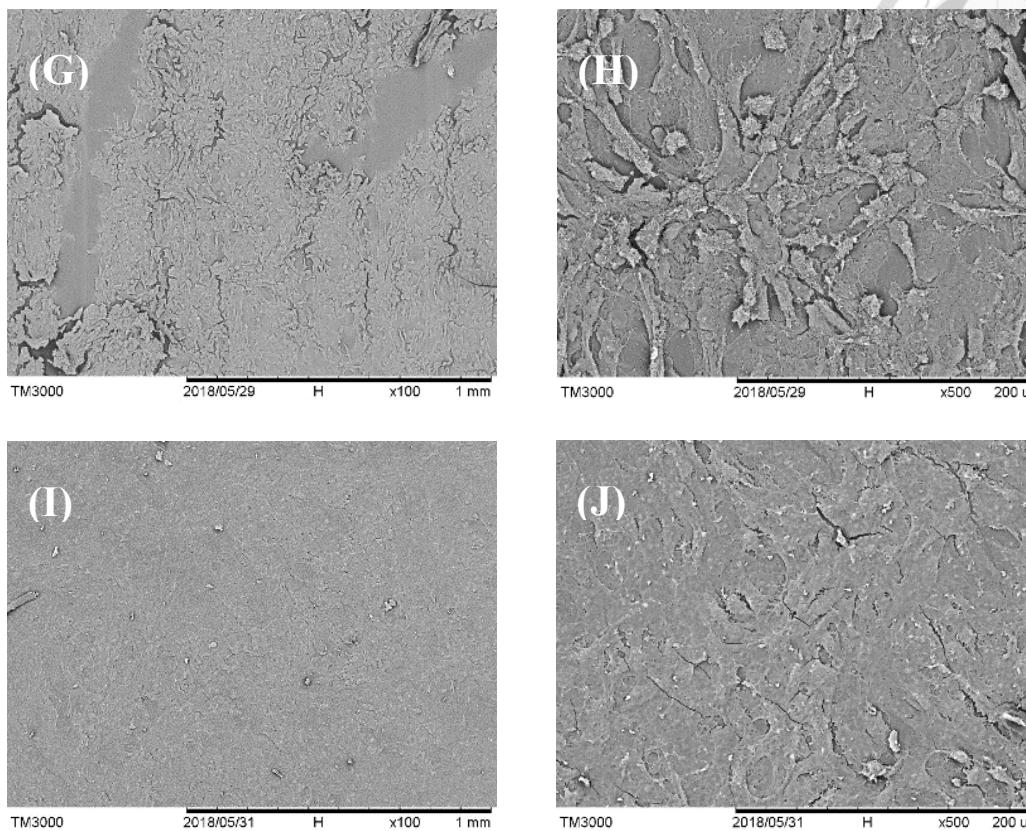


圖 4-7 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上五天的 SEM(續上頁)。

(G)全平型組- 100X (H) 全平型組- 500X

(I)TCPS -100X (J)TCPS- 500X

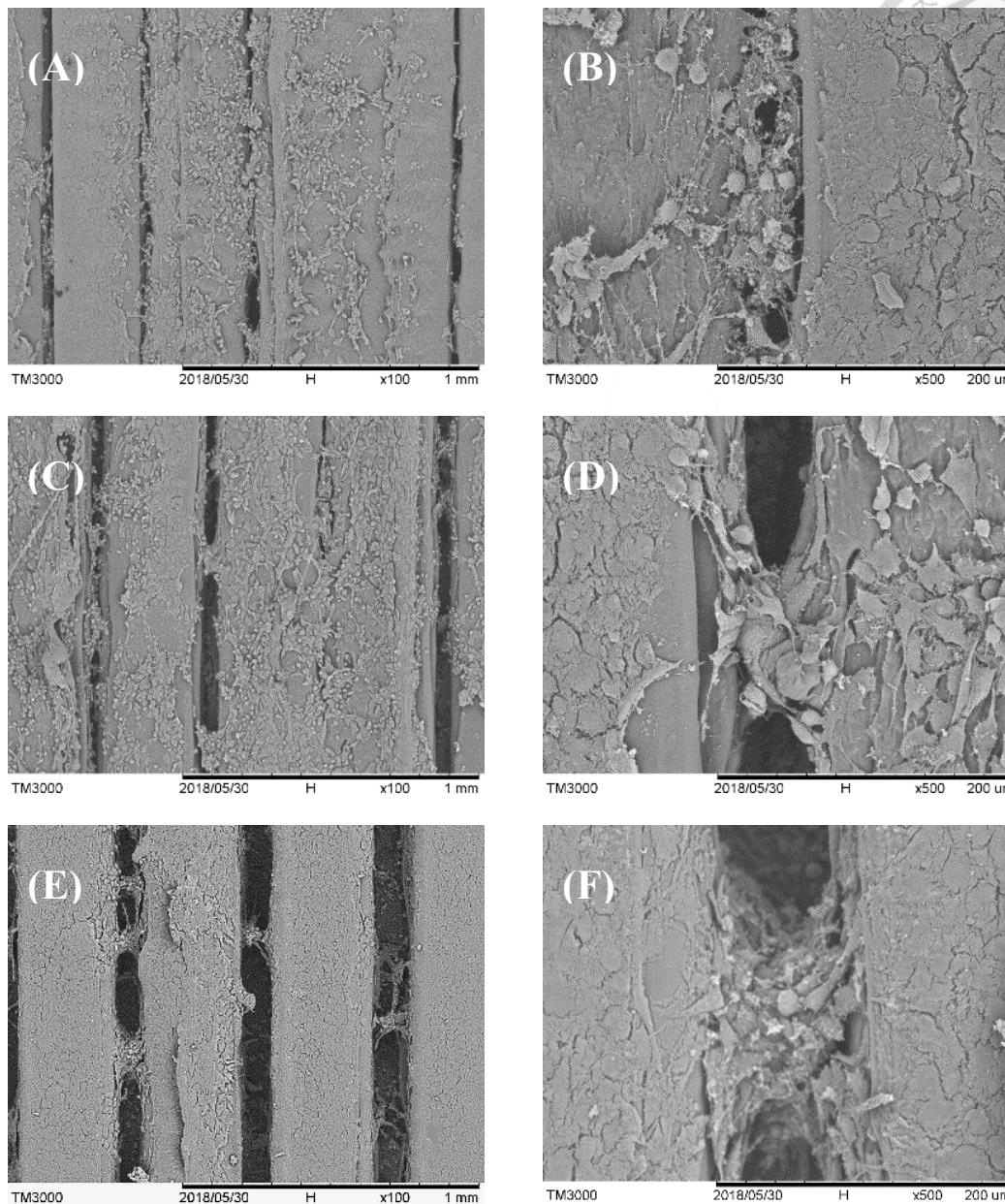


圖 4- 8 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上七天的 SEM

- | | |
|----------------|-----------------|
| (A)G100 組-100X | (B) G100 組-500X |
| (C)G150 組-100X | (D) G150 組-500X |
| (E)G200 組-100X | (F) G200 組-500X |

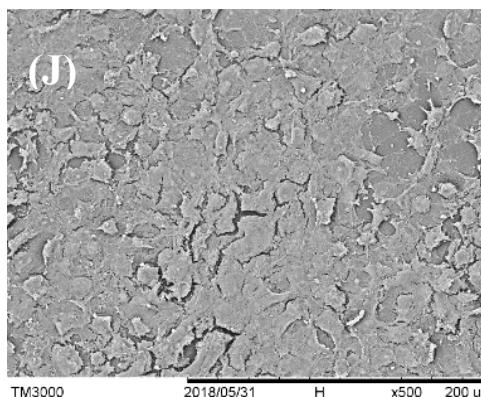
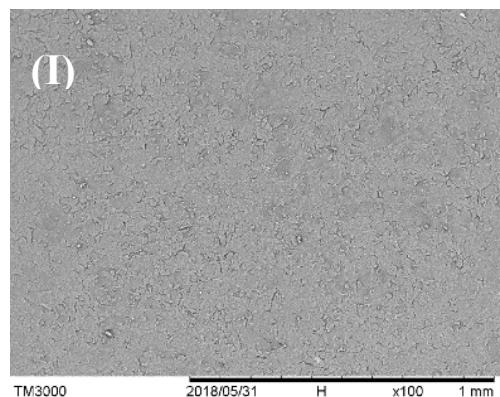
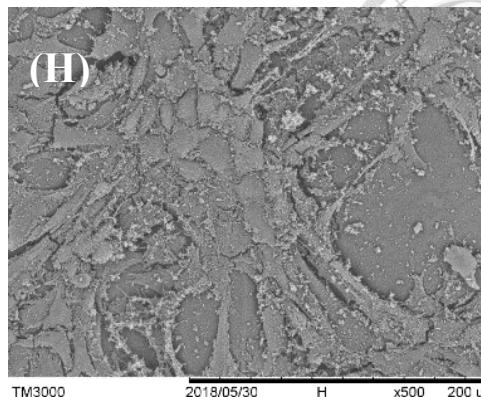
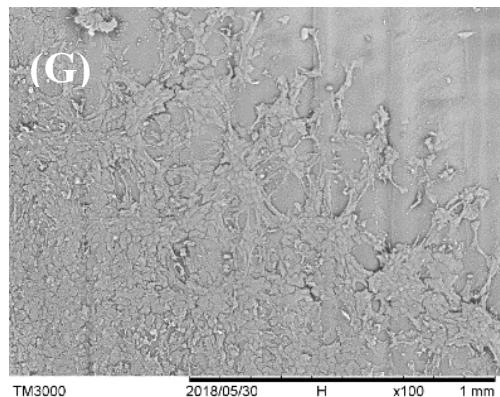


圖 4-8 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上和 TCPS 上七天的 SEM(續上頁)。

(G)全平型組- 100X (H)全平型組- 500X

(I)TCPS -100X (J)TCPS- 500X

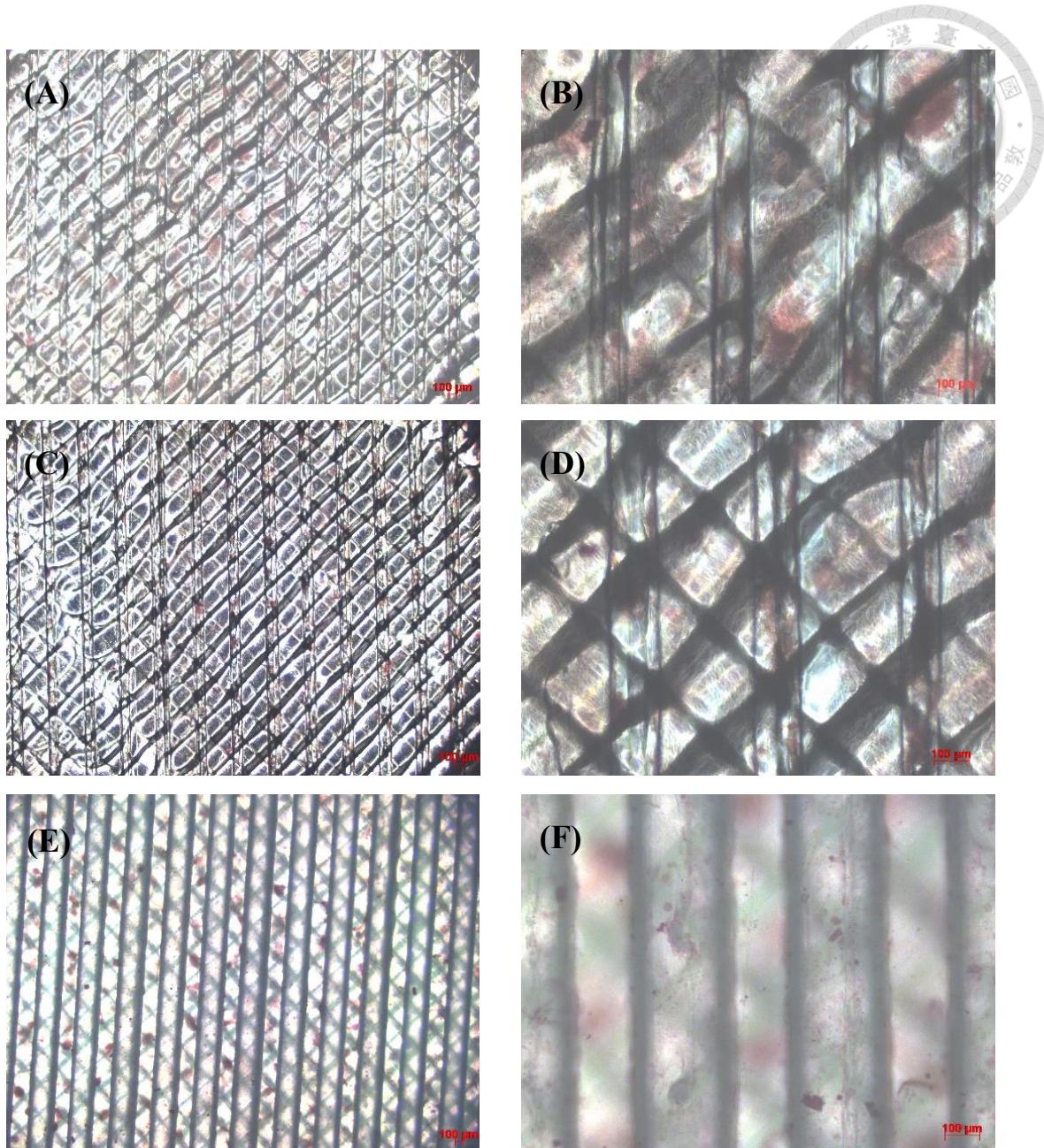


圖 4-9 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架上以及 TCPS 上經 OIM 誘導後四天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖。

(A)G100 組- 25X (B)G100 組- 100X
 (C)G150 組- 25X (D)G150 組- 100X
 (E)G200 組- 25X (F)G200 組- 100X (接下頁)

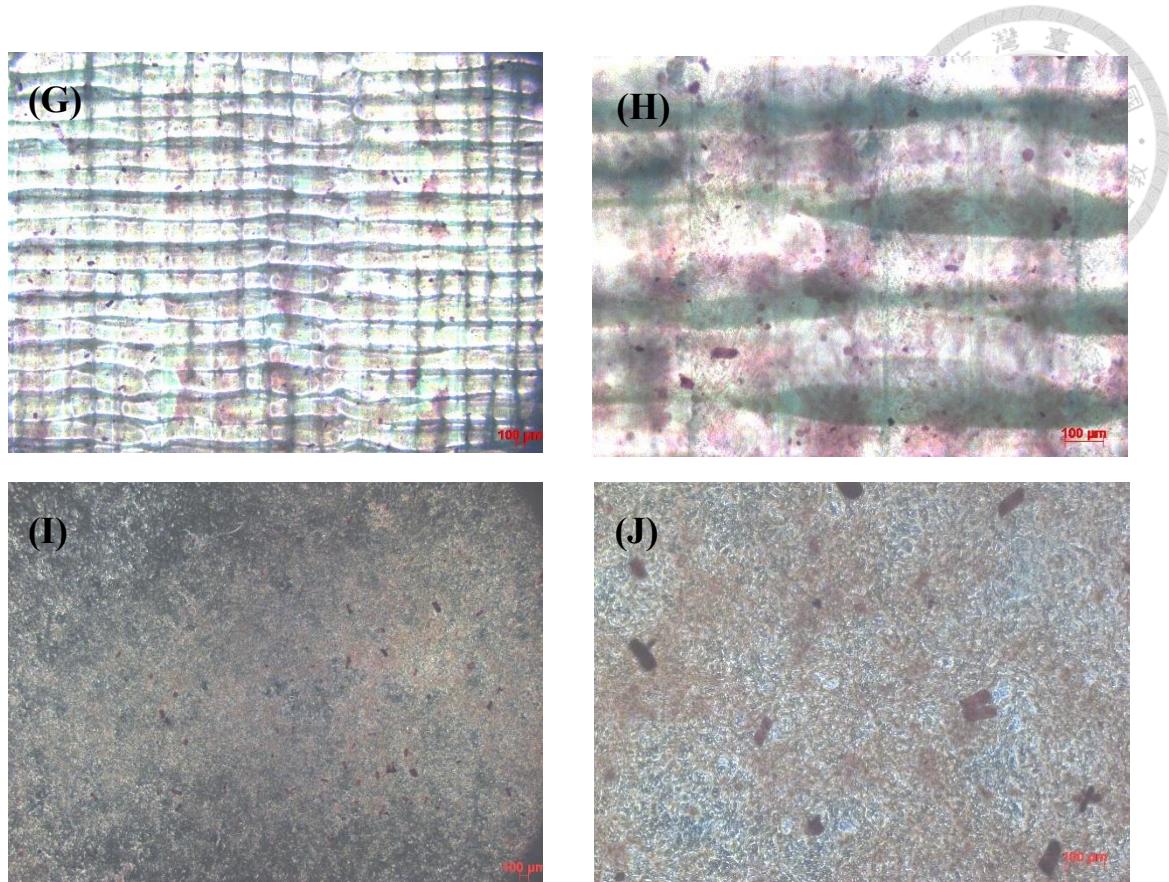


圖 4-9 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架以及 TCPS 上經 OIM 誘導後四天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖。(續上頁)

(G)全平型組- 25X (H)全平型組- 100X

(I)TCPS -25X (J)TCPS- 100X

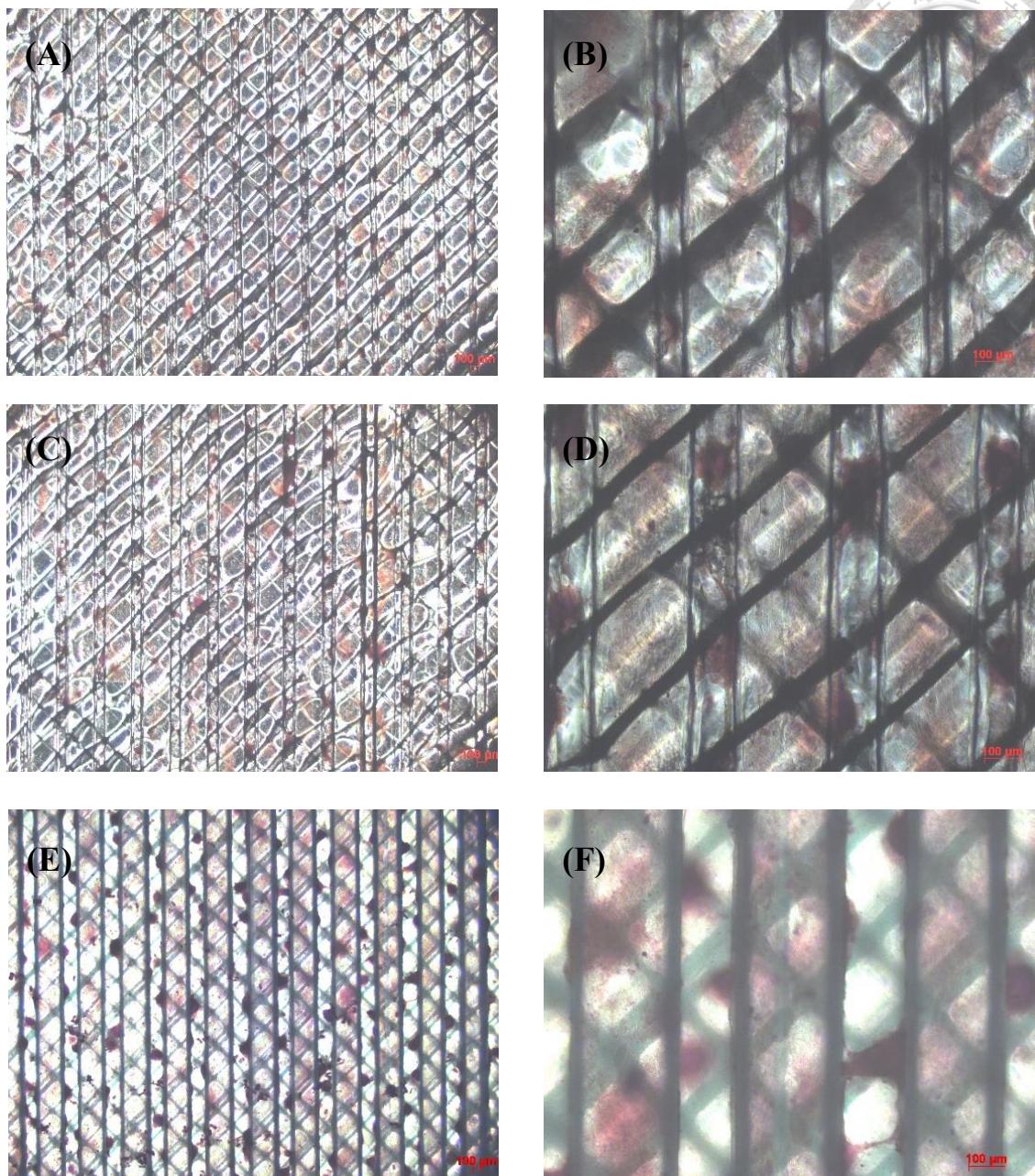


圖 4-10 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架及 TCPS 上經 OIM 誘導後七天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖。

- (A)G100 組- 25X (B)G100 組- 100X
 (C)G150 組- 25X (D)G150 組- 100X
 (E)G200 組- 25X (F)G200 組- 100X (接下頁)

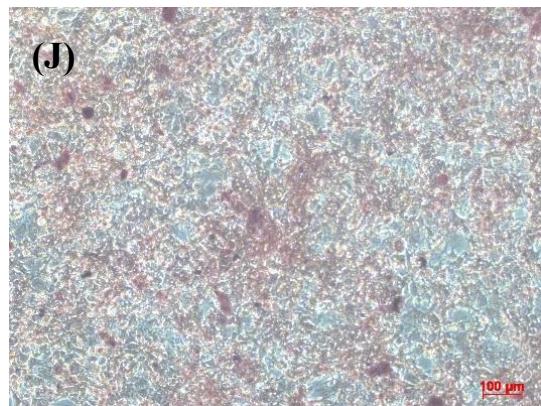
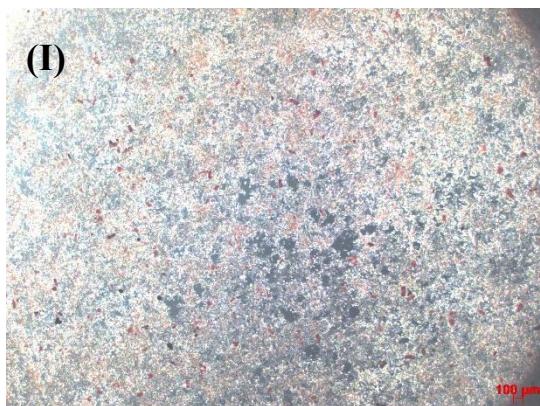
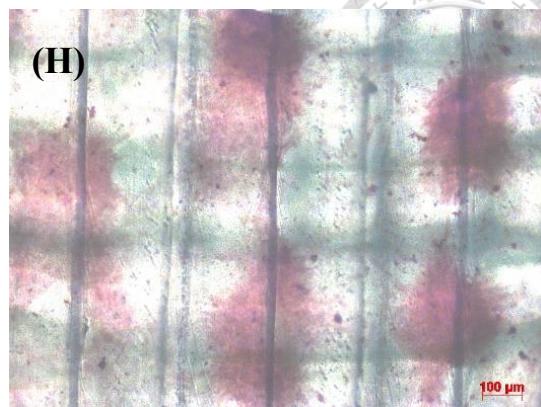


圖 4-10 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架以及 TCPS 上經 OIM 誘導後七天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖。(續上頁)

(G)全平型組- 25X (H)全平型組- 100X

(I)TCPS -25X (J)TCPS- 100X

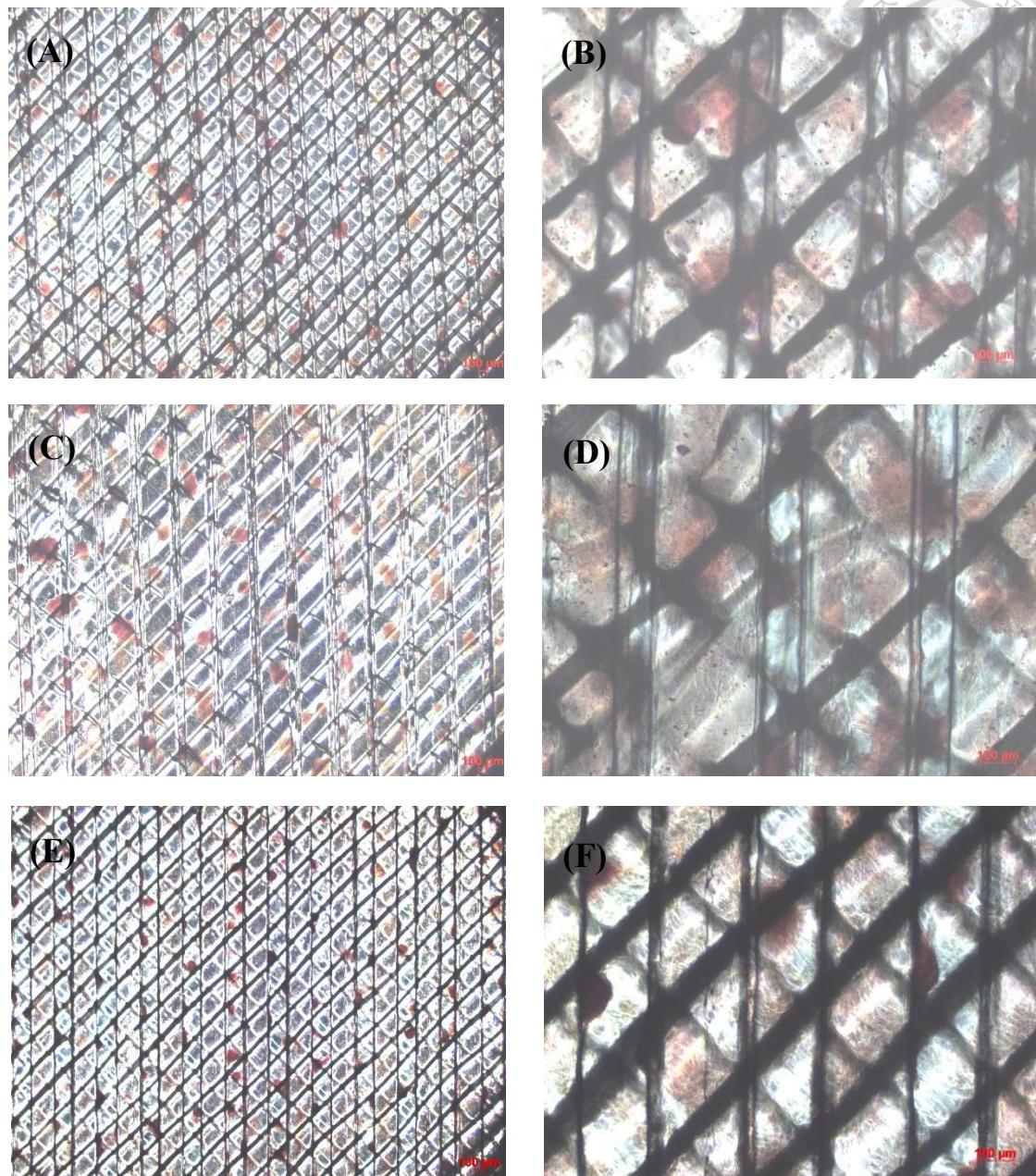


圖 4-11 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架及 TCPS 上經 OIM 誘導後十天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖。

- (A)G100 組- 25X (B)G100 組- 100X
 (C)G150 組- 25X (D)G150 組- 100X
 (E)G200 組- 25X (F)G200 組- 100X (接下頁)

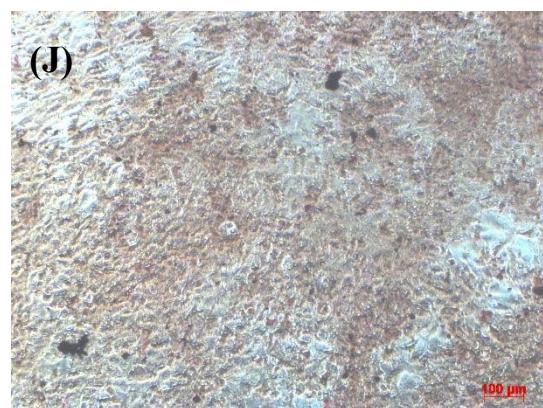
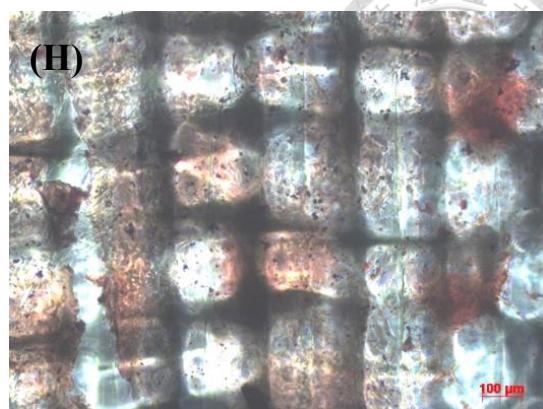


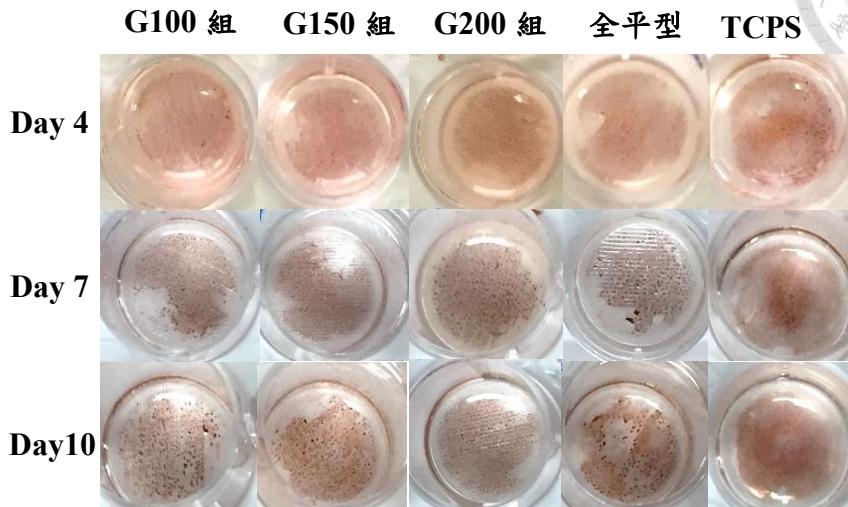
圖 4-11 MG-63 類骨細胞培養於各組三維列印聚乳酸支架及 TCPS 上經 OIM 誘導後十天進行 ARS 染色後拍攝得到之光學顯微鏡圖。(續上頁)

(G)全平型組- 25X (H)全平型組- 100X

(I)TCPS -25X (J)TCPS- 100X



(A)



(B)

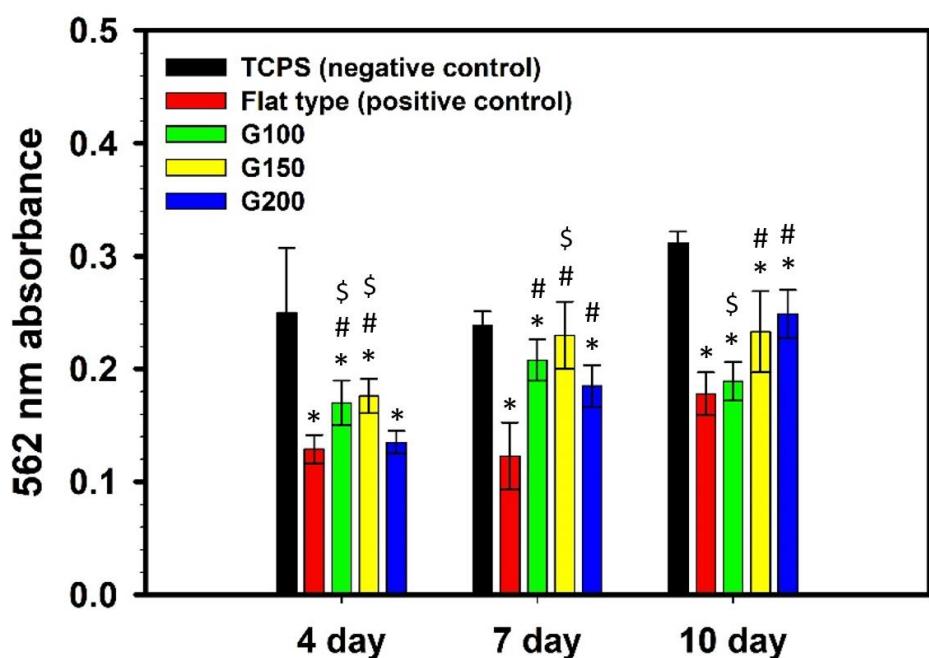


圖 4-12 以 OIM 誘導 MG-63 類骨細胞於不同組別支架上及 TCPS 上分化而後於第四天、七天和十天進行 ARS 染色之結果(A)以及 ARS 染色定量分析之結果(B)(n=4~5)。

*表示相對於 TCPS 有統計上顯著差異，p<0.05；#表示相對於全平型支架組有統

計上顯著差異， $p<0.05$ ；\$表示相對於 G200 支架組有統計上顯著差異， $p<0.05$ 。



附表



表 2-1 屬於脂肪族聚酯類的高分子化合物

Polymer and acronym	Structure
Poly(glycolic acid) (PGA)	$-[-O-CH_2-CO-]_n-$
Poly(lactic acid) (PLA)	$-[-O-\overset{*}{C}(H)-CO-]_n-$
Poly(ϵ -caprolactone) (PCL)	$-[-O-(CH_2)_5-CO-]_n-$
Poly(hydroxybutyrate) (PHB)	$-[-O-\overset{*}{C}(CH_3)-CH_2-CO-]_n-$
Poly(alkylene dicarboxylate)	$-[-O-(CH_2)_X-O-CO-(CH_2)_Y-CO-]_n-$
Poly(β -malic acid) (PMLA)	$-[-O-\overset{*}{C}(H)-CH_2-CO-]_n-$
	$COOH$



表 3-1 本研究中製作之三種具有不同預設間隙寬度值以及另一全平型三維列印聚乳酸支架其各項構型相關參數設定值列表

	理論間隙寬度 (theoretical gap width between adjacent struts) (簡稱 G) (μm)	理論支柱寬度 (theoretical strut width) (簡稱 SW) (μm)	理論支柱高度 (theoretical strut height) (簡稱 SH) (μm)	理論底板高度 (theoretical baseplate height) (簡稱 BH) (μm)
G100 組	100	270	200	300
G150 組	150	270	200	300
G200 組	200	270	200	300
全平型支架 (正控制組)	--	--	--	300



表 4-1 本研究中製作之三種具有不同預設間隙寬度值的三維列印聚乳酸支架其間隙寬度與支柱寬度之理論值與實測值

	理論間隙寬度 (theoretical gap width between adjacent struts) (μm)	實測間隙寬度 (actual gap width between adjacent struts) (μm)	理論支柱寬度 (theoretical strut width) (μm)	實測支柱寬度 (actual strut width) (μm)
G100 組	100	87.8±23.7	270	279.4±15.6
G150 組	150	142.5±20.0	270	274.8±14.0
G200 組	200	188.3±23.5	270	276.5±14.1



表 4- 2 尚未經熔融沉積成型式三維列印以前的聚乳酸線材以及經過三維列印製程而製成的 G100 組、G150 組和全平型支架，上述四種材料樣品的 Tg (玻璃轉移溫度)和 Tm(熔點)

	Tg (°C)	Tm (°C)
聚乳酸線材	53.68	146.95
G100 組支架	N.D.	146.65
G150 組支架	N.D.	147.94
全平型支架	N.D.	150.08

(N.D.: not detectable)

表 4- 3 尚未經熔融沉積成型式三維列印以前的聚乳酸線材以及經過三維列印製程而製成的聚乳酸支架其 Mw 、 Mn 及 Mw/Mn

	Mw (Dalton)	Mn (Dalton)	Mw/Mn
聚乳酸線材	103,294	66,880	1.544
列印後支架	54,917	39,065	1.406