



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

研發搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體

在牙髓組織再生的應用

Development of Biphasic Hyaluronic Acid Gel with
Lovastatin in Pulp Tissue Regeneration

高俊傑

Chun-Chieh Kao

指導教授：李苑玲 博士

Advisor : Yuan-Ling Lee, Ph.D.

中華民國 107 年 6 月

June 2018

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



研發搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸水膠
在牙髓組織再生的應用

Development of Biphasic Hyaluronic Acid Hydrogel
with Lovastatin in Pulp Tissue Regeneration

本論文係高俊傑君(R04422018)在國立臺灣大學臨床牙醫研究所完成之碩博士學位論文，於民國107年06月28日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

李苑玲

(簽名)

(指導教授)

林煥煥

李伯訓

陳敏慧

牙醫所
所長 陳敏慧

系主任、所長

(簽名)

誌謝



在研究所的這段時光，很謝謝一路上給予許多幫助與指導的師長、同學、學長姐與學弟妹以及我的家人，在各方面給了我有形與無形的支持，讓我能夠順利的完成碩士班的學業。

研究所的日子裡很感謝我的指導教授，李苑玲老師，在臨床門診與研究實驗都是按部就班的給予方向讓我前進，也很感念老師一次又一次的逐字幫我修改文書資料，辛苦且耗時的付出，期許自己也能從中逐漸地建立邏輯性的思考方式以及嚴謹的做事態度。另外感謝李伯訓老師，教導研究實驗中許多儀器的原理與操作，面臨問題時，也提供了很多建議與改善方式。也很謝謝林峯輝老師在生醫材料上的指點與研究資源的支持，讓我面對材料的研究困境時，能夠順利地排除困難。

實驗室中非常感謝一路上有佩勳和蓉榕的幫忙，讓我能順利完成研究實驗的每一個部分。也很謝謝一起在實驗室打拼的士緯、青青、寬程，能和大家分享臨床牙所中的甘苦，也在互相討論中有所成長。宛瑜學姊和竣為在這三年中不論是實驗或是臨床也都給予了我許多寶貴的意見和鼓勵，讓我能保持正面的心態面對一路來的挑戰。

念研究所的這段時間也很感謝家人的支持與包容，讓我能夠沒有後顧之憂的完成碩士班的學業。一直陪伴在我身旁的昱璇，每天發生的事情不論是好是壞，都和我一起分享與承擔。這段求學路程中有辛苦與甜美的一面，都會成為我人生的一段美好回憶。


中文摘要



應用組織工程的理念，使用齒源性幹細胞並配合適當的支架材料，重建因感染而被移除的牙髓組織已成為活髓治療的新趨勢。然而誘導功能性牙本質與牙髓組織的再生並重建血流供應仍是目前牙髓組織再生研究的瓶頸。而雙相型透明質酸膠體以交聯型玻尿酸（crosslinked HA, cHA）為主要結構提供支架材料穩定性與強度，添加非交聯玻尿酸（non-crosslinked HA, ncHA）使其經酵素分解而具備釋放低分子量玻尿酸特性以調控細胞反應，並且可藉由調整交聯程度與膠體顆粒大小來控制材料具備可注射性質，非常適合用於牙髓組織再生醫療。因此本研究的目的是以可注射式雙相型透明質酸膠體為基礎，應用藥物釋放材料的理念，以 PLGA 奈米顆粒作為載體，搭載具有促進鈣化組織蛋白與血管增生因子表現效果的洛伐他汀（lovastatin），研發新型的牙髓再生組織工程的支架材料。

使用 1,4-丁二醇二縮水甘油醚（1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE）做為交聯劑製備濃度為 2% 而顆粒大小為 420 μm 的交聯型透明質酸膠體顆粒（hyaluronic acid granules, HAG）。之後分別將重量比 10%~40% 之 ncHA 與 HAG 以物理性方法混合，製備雙相型透明質酸膠體顆粒（biphasic hyaluronic acid granules, biHAG）。接著再與洛伐他汀之聚乳酸聚甘醇酸奈米顆粒（PLGA-Lova）進行物理性混合，製備出搭載 PLGA-Lova 之雙相型透明酸膠體（Lova@biHAG）。並且進一步評估材料的物理性質、藥物釋放行為與生物相容性。

研究結果顯示，材料的 BDDE 殘留量皆小於 FDA 規定。隨著 nHA 添加比例增加，biHAG 膨脹係數有明顯增加的趨勢，且其流體性質與可注射性都有明顯上升。而添加 PLGA-Lova 會略微提升材料的流動性，但對整體流變性質沒有顯著影響。其中流體性質最差的 HAG100 可以順利通過 23G 的針頭，而 biHAG 與 Lova@biHAG 組別則可使用 25G 針頭進行注射。顯微結構上，HAG 與 biHAG 呈現多孔性蜂巢狀結構。相較於 HAG100 的結構，biHAG 的組別可觀察到較細微的



網狀結構，推測與 nHA 的添加有關。而 Lova@biHAG 與 biHAG 材料結構沒有明顯差異，可觀察到少許的 PLGA-Lova 粉末散佈在材料中。Lova@biHAG 的藥物釋放行為和 PLGA-Lova 類似，但在總體藥物釋放量上，Lova@biHAG 則僅有 PLGA-Lova 的六成。將材料與牙髓幹細胞（dental pulp stem cell, DPSC）共同培養一天的結果顯示，所有材料組別的細胞多呈現圓球或半球狀，僅有少部分細胞呈現伸出觸角的形態。HAG100 和 biHAG 組的細胞表面完整，但 Lova@biHAG 組則可觀察到部分細胞表面出現微小破孔或是凹陷的缺損，推測可能與萃取液模型中測得過高的 lovastatin 釋放濃度有關。共同培養五天的觀察結果顯示，所有組別的細胞數量都有明顯增加，顯示 biHAG 適合 DPSC 細胞生長。使用材料萃取液與 DPSC 共同培養的結果發現，所有組別的材料在細胞存活率與死亡率的表現與控制組沒有顯著差異，都表現良好的生物相容性。但與大鼠細胞株（mineralizing rat pulpal cell line, MRPC-1）共同培養的細胞死亡率分析結果顯示，Lova@biHAG 會造成約六成的細胞死亡率，明顯高於控制組與 biHAG 組，具有潛在毒性。

總結來說，本研究所研發之 biHAG 具有合適的流體性質與可注射性，同時表現出良好的生物相容性，適合 DPSC 生長分裂，具有應用於牙髓組織再生醫療的潛力。此外本研究建立混合 PLGA-Lova 和 biHAG 的方法並成功製備出 Lova@biHAG 材料，使 biHAG 不會影響 PLGA-Lova 所具有的藥物緩釋效果。但 Lova@biHAG 所釋放的藥物濃度過高，未來需要調整添加量降低釋放濃度以獲得促進牙本質再生與血管增生的效果。

關鍵字：支架、透明質酸、流變性質、洛伐他汀、生物相容性、牙髓幹細胞、牙髓組織再生。

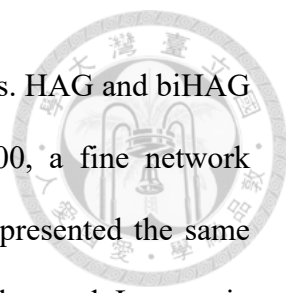
英文摘要



Based on the principles of tissue engineering, the strategy to regenerate the damaged pulp tissue by using dental-derived stem cells with proper biomaterials as scaffold becomes the most potential treatment model in vital pulp therapy. However, regeneration of functional dentin and pulp tissue with vascularization is still a big challenge. The biphasic hyaluronic acid gel, containing cross-linked hyaluronic acid (cHA) as the major component for the strength and stability and non-crosslinked HA (ncHA) as additive for releasing small HA fragments to modulate cell function, could present the injectability via proper degree of cross-linkage and particle sizes, which are beneficial for pulp regeneration. In this study, we developed a novel scaffold for pulp regeneration based on biphasic hyaluronic acid granules (biHAG) with long-term and static statin releasing to stimulate the mineralization proteins and angiogenesis factor via drug delivery system of lovastatin using PLGA as carrier.

The 2% cross-linked hyaluronic acid granules (HAG) with particle size of 420 μm were prepared via the crosslinking agent of 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE). biHAG were prepared by physical mixing 10% to 40% (wt%) of ncHA with HAG, then polylactic-co-glycolic acid nanoparticles with lovastatin (PLGA-Lova) were added to obtain the biHAG with PLGA-Lova (Lova@biHAG). The physical properties, drug release behavior and biocompatibility of the materials were further investigated.

The results showed the residual BDDE in HAG fitted to the FDA regulation. The swelling ratio, fluid properties and injectability of biHAG increased significantly when the ratio of ncHA increasing. The addition of PLGA-Lova slightly enhanced their fluid properties but no significant effects on the general rheological properties. In addition, biHAG and Lova@biHAG could be injected through 25G needle, but HAG100 only



could be easy injected through 23G needle due to less fluid properties. HAG and biHAG presented the honeycomb microstructure. Compared with HAG100, a fine network structure related to nHA were observed in biHAG. Lova@biHAG presented the same microstructure with biHAG except few PLGA-Lova particles were observed. Lovastatin release behavior of Lova@biHAG were similar to that of PLGA-Lova, but only 60% of lovastatin releasing were found in Lova@biHAG compared to PLGA-Lova. After co-culture with dental pulp stem cells (DPSC) for 1 day, similar cell morphology was observed in all groups, in which most cells presented spherical or hemispherical shape and some with spread-out morphology. Unlike intact cell surface found in HAG100 and biHAG, the cells with defects of small holes and depression were observed in Lova@biHAG, which may relate to excessive concentration of lovastatin detected in extract model. After co-culture for 5 days, the cell numbers increased significantly in all groups, indicating biHAG were suitable for DPSC cell growth. Using extract model, no significant differences in cell viability and cell death of DPSC were found among all groups, proving the good biocompatibility of materials. However, the potential cytotoxicity of Lova@biHAG to mineralizing rat pulpal cell-1 (MRPC-1) was found by showing over 60% cell death compared to that of control and biHAG.

In summary, biHAG presented the proper fluid properties and good injectability and biocompatibility, indicating their potential using in pulp regeneration. In addition, we established a protocol to mix biHAG with PLGA-Lova and obtain Lova@biHAG successfully. No detrimental effect of biHAG on lovastatin release behavior of PLGA-Lova was found. But, excessive releasing of lovastatin of Lova@biHAG caused the potential toxicity. The proper mixing ratio of PLGA-Lova to biHAG should be further investigated in the future to stimulate dentin regeneration and angiogenesis.

Key words: scaffold, hyaluronic acid, rheology, lovastatin, biocompatibility, dental pulp stem cell, pulp tissue regeneration.



目錄



誌謝	i
中文摘要	ii
英文摘要	iv
目錄	vii
圖目錄	x
表目錄	xii
縮寫表	xiii
第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	3
2.1 保存牙髓之重要性	3
2.2 組織工程應用於牙髓組織再生的發展	4
2.3 幹細胞	6
2.4 支架	8
2.4.1 支架於牙髓組織再生的發展	8
2.4.2 透明質酸在醫學的應用	9
2.5 生長因子	11
2.5.1 生長因子於牙髓組織再生的應用	11
2.5.2 Statin 類藥物的功效	11
2.4.3 Statin 類藥物於牙髓組織再生的應用	13
第三章 動機與目的	14
第四章 材料與方法	15
4.1 儀器裝置	15
4.2 藥品材料	15

4.3 材料製備	16
4.3.1 製備交聯型透明質酸膠體 (HAG) 材料	16
4.3.2 製備洛伐他汀之聚乳酸聚甘醇酸奈米顆粒 (PLGA-Lova) 材料	17
4.3.3 製備雙相型透明質酸膠體 (biHAG) 及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體 (Lova@biHAG) 材料	17
4.4 物理性質分析	18
4.4.1 製程產物之 1,4-丁二醇二縮水甘油醚 (BDDE) 殘留量分析	18
4.4.2 膨脹係數分析	19
4.4.3 流變性質分析	19
4.4.4 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 分析	19
4.4.5 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 分析	20
4.4.6 洛伐他汀 (lovastatin) 釋放行為	20
4.5 細胞生長行為之分析	21
4.5.1 細胞選擇與培養	21
4.5.2 細胞生長行為之分析	21
4.6 生物相容性分析	22
4.6.1 細胞選擇與培養	22
4.6.2 材料萃取液製備	23
4.6.3 細胞存活率	23
4.6.4 細胞死亡率	24
4.6.6 統計分析	24
第五章 結果	25
5.1 物理性質分析	25
5.1.1 產物製程之 BDDE 殘留量分析	25
5.1.2 膨脹係數 (swelling ratio) 分析	25




5.1.3	流變性質 (rheology property) 分析	25
5.1.4	傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 分析	26
5.1.5	掃描式電子顯微鏡 (SEM) 分析	27
5.1.6	洛伐他汀 (lovastatin) 釋放行為	27
5.2	生物相容性研究	28
5.2.1	細胞生長形態之觀察	28
5.2.2	細胞存活率分析	29
5.2.3	細胞死亡率分析	29
第六章	討論	30
6.1	材料製程的探討	30
6.2	膨脹係數 (swelling ratio) 探討	31
6.3	雙相型透明質酸膠體流變性質 (rheology) 探討	33
6.4	雙相型透明質酸膠體官能基之探討	34
6.5	雙相型透明質酸膠體顯微結構之探討	35
6.6	洛伐他汀 (lovastatin) 控制釋放探討	35
6.7	雙相型透明質酸膠體生物相容性之探討	36
第七章	結論	39
	參考文獻	41
	附錄	46

圖目錄



圖 1：交聯型透明質酸膠體 (HAG) 材料製備流程圖。	46
圖 2：包覆洛伐他汀之聚乳酸聚甘醇酸奈米顆粒 (PLGA-Lova) 材料製備流程。	47
圖 3：各種雙相型透明質酸膠體流變性質分析。(A) 儲存模數 (Storage modulus); (B) 損耗模數 (Loss modulus); (C) 損耗因子 (Tan δ)。	48
圖 4：各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體流變性質分析。(A) 儲存模數 (Storage modulus); (B) 損耗模數 (Loss modulus); (C) 市售透明質酸儲存模數分析。	49
圖 5：各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體之損耗因子 (Tan δ) 分析。	50
圖 6：(A) 各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體之複黏度 (Complex viscosity)。(B) 市售透明質酸膠體之複黏度分析。	51
圖 7：(A) 各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體之黏稠度 (Viscosity)。(B) 市售透明質酸膠體的黏稠度分析。	52
圖 8：各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體之傅里葉轉換紅外光譜。	53
圖 9：各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體材料結構分析。	54
圖 10：PLGA-Lova 粉末結構分析。	55
圖 11：Lova@HAG80 結構分析。	56
圖 12：Lova@HAG60 結構分析。	57
圖 13：(A) 各種搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體 (Lova@biHAG) 與 PLGA-Lova 於 PBS 釋放 lovastatin 行為。(B) 材料萃取液模型中各種材料	



釋放 lovastatin 的濃度分析 (μM , Mean \pm SD)。	58
圖 14 : DPSC 與 HAG100 共同培養一天與五天之 DPSC 細胞生長形態。	59
圖 15 : DPSC 與 HAG80 共同培養一天與五天之 DPSC 細胞生長形態。	60
圖 16 : DPSC 與 HAG60 共同培養一天與五天之 DPSC 細胞生長形態。	61
圖 17 : DPSC 與 Lova@HAG80 共同培養一天與五天之 DPSC 細胞生長形態。	62
圖 18 : DPSC 與 Lova@HAG60 共同培養一天與五天之 DPSC 細胞生長形態。	63

表目錄



表 1	HAG 材料名稱與組成	64
表 2	不同透析時間 HAG 產物製程之 BDDE 殘餘量分析 (ppm)	64
表 3	HAG 塊材與雙相型透明質酸膠體膨脹係數分析	65
表 4	雙相型透明質酸膠體培養 1 天與 5 天於 SEM 觀察細胞顆數分析	65
表 5	材料萃取液模型培養一天 DPSC 細胞存活分析結果	66
表 6	材料萃取液模型培養一天 DPSC 細胞死亡分析結果	67
表 7	材料萃取液模型培養一天 MRPC-1 細胞存活分析結果	68

縮寫表



縮寫	全名
BDDE	1,4 - butanediol diglycidyl ether
DPSC	Dental pulp stem cell
FBS	Fetal bovine serum
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
HA	Hyaluronic acid
cHA	Crosslinked hyaluronic acid gel
HAG	Crosslinked hyaluronic acid granules
biHAG	Biphasic hyaluronic acid granules
HPLC	High performance liquid chromatography
LDH	Lactic dehydrogenase
Lova	Lovastatin
Lova@biHAG	Biphasic hyaluronic acid granules with lovastatin
MRPC-1	Mineralizing rat pulpal cell line
PBS	Phosphate buffered saline
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)
PLGA-Lova	Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticle with lovastatin
PVA	Polyvinyl alcohol
SEM	Scanning electron microscope


第一章 前言



當未發育成熟的恆牙 (immature permanent tooth) 因為外傷、齲齒、解剖構造等因素造成牙髓疾病時，如果無法移除感染源並保留牙髓活性，便會造成牙齒生長發育停止而使得結構脆弱，最後常導致這些牙齒因為斷裂或是齒質無法修復而需要被拔除。因此在面對這一類牙齒，治療上應優先進行活髓治療 (vital pulp therapy)，保留殘存牙髓組織並進一步誘導牙髓組織再生 (pulp tissue regeneration) 來重建喪失的組織結構，讓牙齒及牙根可以持續生長而有更完整的齒質結構。對於根尖發育完成的恆牙 (mature permanent tooth) 發生牙髓感染或壞死時，非手術性治療是常見的選擇，雖然治療成功率高達 70%~90% (Friedman & Mor, 2004)，但是經過根管治療的牙齒因缺乏活髓組織，因此對外界刺激失去感知的能力，往往無法在齲齒剛發生時便能感知而介入適時的治療，而使得齲齒持續進行造成齒質嚴重的破壞，最後導致牙齒無法保留。如果可以重建發育成熟恆牙的牙髓組織，恢復它的感知能力，就可以有效地提高這些牙齒在口腔的存活時間。

牙髓組織再生中多以組織工程 (tissue engineering, TE) 的策略來再生牙髓組織及牙本質，目前組織工程於牙髓組織再生醫學應用的研究策略主要分為兩大方向 (Huang., 2011)：(1) 無細胞牙髓組織工程再生 (non-cell-based pulp tissue regeneration)。(2) 幹細胞牙髓組織工程再生 (stem cell-based pulp tissue regeneration)。無細胞牙髓組織工程再生由於不需要幹細胞參與，其實驗設計較簡單，同時也避免了幹細胞醫學倫理的問題，但是目前的研究顯示無法有效地再生功能性的牙髓及牙本質組織。而幹細胞牙髓組織工程再生雖然可以達到牙髓組織及牙本質組織的再生，但是在血流供應以及再生完整結構的牙髓組織上仍有尚待解決的困境。

組織工程包含三大要素：幹細胞 (stem cells)、生長因子 (growth factors)、支架 (scaffold)。研究顯示成體齒源性幹細胞會表現出間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 特性的標記，像是 STRO-1、CD13、CD24、CD29、CD44、CD73、CD90、



CD105、CD106、CD146、Oct4、Nanog、beta2 integrin 等(Huang., 2011)，最常被用於牙髓組織再生研究的領域，其中表現出 CD105 的齒源性幹細胞具有血管增生的效果(Liu et al., 2009)，應用在牙髓組織再生將有助於血管新生與再生組織血流供應的重建。此外在進行牙髓組織再生時，生醫支架材料需置放於狹小且不規則的根管空間，常用的固態材料在置放上有其困難，而膠原蛋白 (collagen) 類的材料，雖然可以製成具有注射性的膠體，但是較容易被生物分解以及使用上有跨物種免疫反應的疑慮。透明質酸 (hyaluronic acid, HA) 為一個廣泛應用於醫學上並有可注射性的膠體生醫材料，具有可容易置入根管空間的優點。同時研究證實小分子的透明質酸具有誘導血管生成的功效(Pardue et al., 2008)，在牙髓組織再生的應用上是一個具有潛力的材料。在生長因子方面，利用藥物來刺激細胞分泌生長因子是常用的策略。其中 statins 做為降血脂用藥外，後期的研究顯示合適濃度的 statin 具有促進血管生成與牙本質生成的功效(Min et al., 2010)，近年來被應用於牙髓組織再生中。

如果能整合表現出 CD105 的齒源性幹細胞、具可注射性的透明質酸基底材料製成的生醫支架材料合併 statin 類藥物來刺激生長因子，預期應可達到促進血管生成的目的，並研發出一個新型且適合應用在牙髓組織再生中的生醫材料，突破目前牙髓組織再生研究領域中的瓶頸。

第二章 文獻回顧




2.1 保存牙髓之重要性

未發育成熟的恆牙常因為齲齒、外傷或是異常解剖構造而容易導致牙髓疾病，如果無法維持牙髓活性，牙齒生長發育會停滯使得結構脆弱，最後常導致這些牙齒因為斷裂或是齒質無法修復而需要被拔除。此時若仍有殘存牙髓組織，以活髓治療來保留殘存牙髓組織甚至是誘導牙髓組織再生，以維持牙髓的活性，並讓牙齒及牙根持續生長而有齒質結構的完整性，讓牙齒有較好的預後。若是未發育成熟但牙髓完全壞死的恆牙，過去會採取根尖形成術 (apexification) 來處理，但是不論是早期使用氫氧化鈣的根尖形成術還是近期以三氧礦化聚合物 (mineral trioxide aggregate, MTA) 操作的根尖形成術，治療後牙齒失去牙髓組織，牙根無法持續生長發育且齒質結構脆弱，發生斷裂的機會也較高(Katebzadeh et al., 1998)。因此面對這一類的患齒，若是採取牙髓組織再生的技術，除了移除感染源之外，進一步的誘導牙髓組織再生，重建牙髓組織並恢復牙齒感知以及使牙齒持續生長，讓牙齒有更好的預後。

發育成熟的恆牙在臨床上面臨牙髓疾病，目前常以傳統根管治療處理，後續再合併贖復假牙的治療，臨床治療成功率可高達 70%~90% (Friedman & Mor, 2004)。但是經過根管治療的牙齒會喪失對刺激的反應，使的發生齲齒時無法感知，導致齲齒持續進行最後造成齒質無法修復而無法保留牙齒。另一方面，根管治療中髓腔開擴 (access opening) 以及清創加上原先因齲齒所造成的齒質結構缺損，也使得經過根管治療的牙齒發生斷裂的機會也比較高(Sedgley & Messer, 1992)。因此當此類患齒發生牙髓疾病時，移除感染源並控制減緩牙髓組織的發炎反應後，使殘存的牙髓組織恢復到健康正常狀態，並且進一步誘導牙髓組織再生，除了讓牙齒能保有對外界刺激的感知能力外，還能維持齒質結構的完整性，讓牙齒留存於口腔的時間增長。

當牙髓組織因為齲齒、外傷或是異常解剖構造等原因產生發炎反應時，牙髓的傷害若是比較侷限的情況，可以採用活髓治療的治療策略，移除刺激或是感染源同

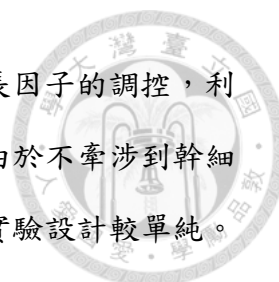


時控制牙髓組織的發炎反應後，盡可能保留殘存的牙髓組織，可以讓牙齒保有對刺激的反應，也減少對齒質結構的弱化，同時能維持齒質的結構完整性，也讓牙齒存活於口腔的時間增長。但是當牙髓組織因嚴重齲齒或是過度發炎反應造成牙髓完全壞死，牙髓組織失去活性，無法形成三級牙本質 (tertiary dentin)。面對這樣的問題，根管系統中固然要進行完整的清創來移除感染和發炎，為了保持牙齒對外在刺激的反應以及盡可能保存齒質結構，若是能以牙髓組織再生的技術誘導牙髓組織的再生，重現因感染或嚴重發炎而失去的牙髓組織，恢復牙齒的功能並且延長牙齒存活於口腔的時間(Huang., 2011)。

2.2 組織工程應用於牙髓組織再生的發展


組織工程是在一個模仿組織與器官形狀的生醫支架材料中植入幹細胞，再搭配適當的生長因子來調控細胞的生長與分化，使細胞長成新的組織與器官，以提供人體缺損的組織與器官(Langer & Vacanti, 1993)。目前已經廣泛應用在再生醫學的領域上，像是利用組織工程技術於體外培養骨骼組織作為骨骼缺損的修復(Reichert & Hutmacher, 2011)或者是體外培養皮膚組織移植至人體，修補因燒燙傷等因素而受到損害的皮膚 (Mansbridge, 2008)。組織工程和再生醫學包括三大要素：幹細胞、生長因子、支架，目前有許多學者從組織工程的概念著手進行研究，希望達到牙髓組織再生的目的，進而恢復牙齒的功能(Huang., 2011)。

回顧牙髓組織再生的發展，最早可回溯至 1970 年代，由 Nygaard Ostby 在根管中創造血塊達到局限性的纖維結締組織再生，並非牙髓組織再生，因此在當時並沒有進一步的發展(Nygaard-Ostby & Hjortdal, 1971)。後續到了 2000 年左右，Shi 的研究團隊成功的從成人的牙齒中純化出牙髓幹細胞 (dental pulp stem cell, DPSC) (Gronthos et al., 2000)，可做為幹細胞的來源，使組織工程技術應用於牙髓組織再生研究開始蓬勃發展。牙髓組織再生工程中的兩個主要研究策略方式，分別是無細胞牙髓組織再生以及幹細胞牙髓組織再生(Huang., 2011)。



無細胞牙髓組織再生的策略主要是研發生醫支架材料和生長因子的調控，利用殘存的牙髓組織和細胞作為牙髓組織及牙本質再生的來源，由於不牽涉到幹細胞的介入也避免了幹細胞衍生的醫學倫理相關問題，在操作及實驗設計較單純。相關的研究結果顯示，在部分牙髓組織被移除的髓腔中植入含有生長因子的支架材料，可以誘導殘存的牙髓組織生成修復性牙本質，但無法吸引殘存牙髓組織中的細胞遷移到支架材料中生長(Rutherford & Gu, 2000)。而在臨床上以血管再形成(revascularization)的術式，對於牙髓完全壞死且根尖未發育完全的恆牙，完成根管系統的清創之後，刻意刺激根尖周圍組織引起根管內出血形成血塊(blood clot)，希望以血塊作為支架以及生長因子的來源，以此術式治療的牙齒，在放射線影像學的結果可以觀察到根尖病變的癒合、牙根管壁增厚、牙根長度增加以及根尖開口的閉合。但在組織學的結果顯示，新生長的鈣化組織是類牙骨質組織(cementum-like tissue)或是類骨組織(bone-like tissue)，以血管再形成的術式無法達到真正的牙髓組織再生(Banchs & Trope, 2004; Wang et al., 2010)。

幹細胞牙髓組織再生的策略則是利用齒源性幹細胞作為組織再生的細胞來源，搭配生醫支架材料和生長因子來調控以及誘導齒源性幹細胞生長與分化，進而達到牙髓組織的再生。由於幹細胞的生長以及分化能力可以做為組織再生的來源，面對大範圍的組織缺損是比較有效的。其中，有學者利用齒源性幹細胞搭配生醫材料植入生物體時，可以成功誘導類牙本質結構組織的生成(Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003; Sonoyama et al., 2006)。但是牙髓組織再生仍有許多尚待解決的問題，像是組織再生中必須要有足夠的血液供應才能支持組織生長、分化等。接著是再生的組織需要能像正常的牙髓要有相似的細胞密度和胞外基質結構，將幹細胞混合生醫材料植入活體的組織學結果顯示在新形成的類牙本質周圍有類似牙本質母細胞的排列出現，但是跟正常牙本質母細胞呈現的特徵仍有不同，排列較不規則，細胞核並無偏向。Huang 等人的研究團隊將人類被拔除後的牙齒，將其根管的內容物移除，一端以 MTA 封填，把幹細胞混合支架放入一段

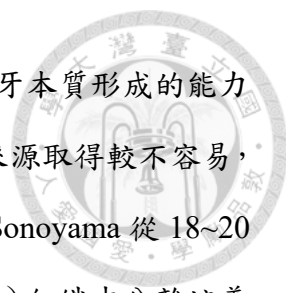


長度約 6~8 mm 牙齒片段，接著將此牙齒片段放入免疫抑制老鼠背部，3~4 個月後犧牲，組織學觀察下有牙髓組織和牙本質的形成，顯示了以幹細胞牙髓組織再生的方式來達到牙本質及牙髓組織再生的上較具有潛力(Huang et al., 2010)。研究的結果顯示根尖開口必須有一定的大小(1~2.5mm)才能有良好的血液供應，但是過大的根尖開口會弱化牙齒的齒質結構，在臨床操作上並不實際，且內部血液的供應主要來自宿主(Huang et al., 2010)，所植入的幹細胞並沒有辦法形成血管細胞，也是後續必須進一步克服的問題。以及新生牙髓組織中無神經細胞組織的出現，受到外來刺激並不會產生反應和感知。這些尚待解決的問題，也是目前牙髓組織再生中的主要研究方向(Huang., 2011)。

2.3 幹細胞

幹細胞按照發育過程而有不同的分化能力。胚胎幹細胞(embryonic stem cell)出現在胚胎發育早期的囊胚中，擁有分化為三個胚層的細胞的潛能，可形成生物體的各种結構(Odorico et al., 2001)。成體幹細胞(adult stem cell)在發育後的整個身體中發現，存在成體各式各樣的組織中，是未分化的細胞，透過細胞分裂而增殖補充死亡的細胞並再生受損的組織(Baksh et al., 2004)。胚胎幹細胞有良好的分化能力，但是應用上有道德、宗教與法律上的問題，像是目前分離胚胎幹細胞的方法會無可避免地損傷胚胎，相關胚胎幹細胞的研究與醫學上的應用有其侷限性。成體幹細胞的分化能力雖較差，若是能找到理想的前驅細胞，有適當的調控因子與環境，較容易分化成所需的細胞與組織，因此目前醫學上組織工程大多使用成體幹細胞。

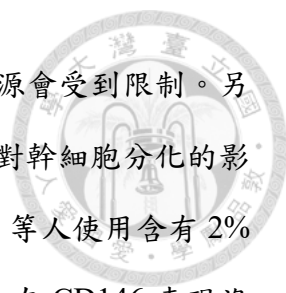
與牙髓組織再生相關的成體幹細胞方面，Gronthos 等學者的研究團隊自人類牙齒分離培養出 DPSC，並將 DPSC 和氫氧基磷灰石(hydroxyapatite, HA)與三鈣磷酸鹽(tricalcium phosphate, TCP)進行活體實驗，可以發現類牙本質結構的形成(Gronthos et al., 2000)。後續同一個研究團隊從人類脫落的乳牙分離培養出人類乳牙牙髓幹細胞(stem cell from human exfoliated deciduous teeth, SHED)，SHED 在活



體的研究也顯示會長鈣化的組織，但是相較 DPSC 而言，促進牙本質形成的能力較差。SHED 最大的特徵為具有分化為神經細胞的能力，但由於來源取得較不容易，應用在牙髓組織再生的困難性較高(Miura et al., 2003)。2006 年 Sonoyama 從 18~20 歲的成人未發育完全的第三大白齒根尖的根尖乳突 (apical papilla) 組織中分離培養出牙乳突幹細胞 (stem cell from apical papilla, SCAP)，利用 SCAP 和 HA/TCP 植入活體的實驗結果，也可以觀察到類牙本質以及類牙本質母細胞(Sonoyama et al., 2006)。基於這樣的研究結果，上述和牙齒有關的成體幹細胞應用在牙髓組織再生中非常具有潛力。

就目前已純化出和牙髓組織再生有關的成體幹細胞像是 DPSC、SHED、SCAP，皆有表現出作為牙髓組織及牙本質再生所需的幹細胞特性。這些幹細胞都會表現出間葉幹細胞的細胞標記 (cell marker)，像是陽性細胞標記 (positive cell marker)：STRO-1、CD13、CD24、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD106、CD146、Oct4、Nanog、beta2 integrin 等，以及陰性細胞標記 (negative markers)：CD14、CD34、CD45、HLA-DR 等，在應用上也以此作為幹細胞的標定、辨識、分選等 (Huang., 2011)。大部分學者常用的幹細胞標記有 CD44、CD105、CD146 以及具齒源性幹細胞特異性的 STRO-1 (Huang et al., 2009)。此外相關研究也指出，體外實驗證實表現 CD105 的幹細胞具有分化形成血管內皮細胞的能力，而將表現 CD105 的胚胎幹細胞移植到缺血性腦缺損的區域的動物實驗中，顯示表現 CD105 的幹細胞具有分化成血管等多種不同細胞的能力(Liu et al., 2009)。由於目前牙髓組織再生在重建血流供應的瓶頸，若是能分選純化出表現出與血管生成有關幹細胞標記的齒源性幹細胞，搭配適當生醫材料支架和誘導血管生成的生長因子，有機會重建並且促進牙髓組織再生中的血流供應。

在幹細胞的培養方面，最初 Gronthos 學者的研究團隊使用高濃度(大於 10%) 血清的細胞培養液，有助於細胞的生長以及貼附。但是在高濃度血清的長期培養下，齒源性幹細胞會逐漸分化而失去了幹細胞的特性。面對這樣的問題，學者大多採用



第 3 至第 8 代的齒源性幹細胞來確保分化能力，如此幹細胞來源會受到限制。另外一個策略則是使用低濃度（2%）血清的細胞培養液降低血清對幹細胞分化的影響，同時再加上一些生長因子，來維持幹細胞的特性。Karbanová 等人使用含有 2% 胎牛血清的研究顯示使用高濃度（10%）血清培養條件下 DPSC 在 CD146 表現沒有明顯差別。但是同一株細胞使用低濃度血清培養條件加上表皮生長因子（epidermal growth factor, EGF）與血小板衍生生長因子（platelet-derived growth factor, PDGF）的 DPSC，CD146 的表現量有下降的趨勢，所以使用低濃度血清培養 DPSC 比較不適合使用 CD146 做為幹細胞篩選的標記(Karbanová et al., 2011)。

2.4 支架

2.4.1 支架於牙髓組織再生的發展

組織工程中生醫支架材料提供一個三維空間讓細胞生長、貼附、分化等等，在組織再生中也是重要的因素。為了讓生醫支架能夠給細胞一個良好的生長環境，生醫支架材料通常需要有適當的強度、生物相容性、相互連接的孔隙、具有生物可分解的性質及適當的分解速率以配合細胞的繁殖速率(Galler et al., 2011)。

過去文獻，研究團隊為了模擬實際根管的形態，使用了牙齒的切片 (tooth slice) 或者是牙齒的片段 (tooth fragment)，將幹細胞混合膠原蛋白或是聚乳酸和聚乳酸聚甘醇酸後進行活體動物實驗，實驗結果顯示有牙髓組織以及牙本質組織再生 (Cordeiro et al., 2008; Huang et al., 2010; Prescott et al., 2008; Sakai et al., 2010)。這些在文獻中使用過的支架材料，都表現不錯的生物相容性以及可被分解的性質。但是實際的根管系統空間為一個狹長的空間，使用固態支架材料較難均勻分布到整個根管空間。而膠原蛋白為天然的聚合物，來源的取得上可能來自不同的物種而有跨物種免疫反應的疑慮，以及較容易被生物分解(Galler et al., 2011)。為了改善這些問題，研究策略上開始嘗試使用其他的支架材料。由於根管空間體積狹小且不規則，具備可注射性的膠體材料便是其中一個理想的選項之一。其中透明質酸屬於一個


天然的聚合物，具有良好的生物相容性以及可被生物分解的特性，是常被使用的膠體類支架材料之一，在醫學的領域上已被廣泛使用，像是作為關節注射液或者是皮下注射的填充物等(Kim & Sykes, 2011)。



2.4.2 透明質酸在醫學的應用

透明質酸為 1934 年 Meyer 從牛眼的玻璃體純化出一個物質，雙醣結構組成的糖胺聚醣 (glycosaminoglycan)，其中一個結構是醣醛酸 (uronic acid)，於是將他命名透明質酸 (hyaluronic acid, HA)，命名是衍生自希臘字「Hyalo-」意思是透明的、像玻璃一樣的。HA 第一個在人體醫療上的應用在 1950 年代左右，於眼科手術中玻璃體置換中使用，最初從人的臍帶分離，之後從雞冠分離出高度純化和高分子量形式，後續 HA 在實驗室中可以從許多來源純化獲得。化學結構上為直鏈多醣，由重複二糖單元組成：通過交替的 β -1,4-和 β -1,3-糖苷鍵附連，由於其大分子結構占據整體中軸的位置，而小分子卡住中軸其餘部分，使其形成一個直鏈狀天然聚合物。HA 廣泛存在於結締組織、上皮組織和神經組織中，在一個 70 公斤的成人大約有 15 克的 HA，人體中的 HA 存在於許多組織以及器官像是皮膚、肺和腸。除此之外，在關節滑液、軟骨、臍帶、血管壁等組織間質中也可發現 HA 的存在。早期 HA 主要來源是臍帶，目前 HA 產品可以從動物組織，像是雞冠、眼玻璃體、軟骨、關節液中提取，也可以由細菌像是鏈球菌等發酵。發酵法生產 HA 容易規模化生產以及控制所得 HA 分子量，逐漸地普及於市場(De Bouille et al., 2013; Kim & Sykes, 2011)。

HA 做為細胞外基質的主要成分之一，對細胞增殖和遷移有重要作用，其中不同分子量的 HA 對於細胞的調控作用也有所不同，高分子量 (high molecular weight, HMW) HA 和小分子量的 HA (HA oligomers) 均可與細胞膜上的受體結合，像是與 CD44、TLR-4、RHAMM 等受體結合表現出不同的調控作用。高分子量的 HA 會成為組織以及胞外基質的主體，對細胞有保護的作用，抗氧化、抗發炎等等，也



會阻礙細胞之間的交互作用，抑制血管生成。而小分子量的 HA 屬於活性因子，與受體結合後，則會促進發炎細胞分泌發炎反應相關的細胞因子 (cytokine)，進而誘導內皮細胞、間葉幹細胞的遷移與增生，促進細胞分泌血管增生因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 與腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 等以進行血管新生作用，也促進傷口癒合(Pardue et al., 2008)

不過天然 HA 屬於直鏈狀結構，在人體中半衰期約只有 24~48 小時(Stern, 2004)，醫學應用上必須加以修飾方能使用(De Bouille et al., 2013)，市面上作為關節液注射或是皮下注射填充物的 HA，皆是透過添加交聯劑使得直鏈狀結構變成網狀結構，提升材料強度並延長降解的時間。其中 adipic acid dihydrazide (ADH)、divinyl sulfone (DVS)、1,4-butanediol diglycidal ether (BDDE) 是常使用的交聯劑，又以 BDDE 使用的歷史長久，長期使用的報告並無不良反應以及可被生物分解，目前作為規模化生產交聯 HA 基底材料交聯劑的首選(De Bouille et al., 2013)。

牙髓組織再生領域中，由於根管系統屬於狹窄且不規則的空間，在生醫支架材料設計採用具可注射性的材料有利於均勻分布至根管空間。一般經過機械性清創後的根管口徑大小約介於 0.3 mm 至 0.4 mm 之間，HA 在應用上可以控制其粒徑大小調整可注射性以利於應用於根管空間中。目前常見市售皮下填充物注射的透明質酸產品，根據不同注射部位，粒徑大小介於 150~2000 μm 之間(Gold, 2007)，較細微的粒徑大小商品可以使用尺寸為 29G 的注射針頭注射，可以有效地注射至根管空間中。HA 可以藉由交聯劑形成交聯型透明質酸 (crosslinked hyaluronic acid) 來強化材料結構強度及延長材料降解時間，並且混合適當比例的未交聯 HA，利用分解後釋放出小分子 HA 具有促進血管生成的作用，同時可以均質化交聯後的 HA 膠體顆粒分布，如此生醫材料設計在牙髓組織再生應用上具有研究發展潛力。




2.5 生長因子

2.5.1 生長因子於牙髓組織再生的應用

在組織工程中，生長因子具有調控及誘導幹細胞於支架材料上的生長與分化行為。牙髓組織再生的研究領域上應用生長因子的策略有幾個大方向，可以選用牙齒發育過程中所參與的生長因子，或是使用在牙本質基質中的生長因子，最後一個是三級牙本質形成所參與的生長因子(Kim. et al., 2012)。目前已被確認以及應用的包括轉化生長因子 (transforming growth factor, TGF)、骨成形蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMP)、類胰島素生長因子 (insulin-like growth factors, IGF) 等，這些生長因子大多是促進鈣化組織的生長因子，其中和血管生成有關的生長因子是 VEGF (Roberts-Clark & Smith, 2000)。由於生長因子多為小分子的蛋白質，在活體中雖然能促進幹細胞分化的能力，但是對光及溫度的敏感度較高，所以容易被分解而無法表現穩定的有效作用濃度，使得於臨床治療應用時無法得到預期促進生長分化之效果。後續在鈣化組織再生工程研究領域，學者嘗試利用藥物刺激細胞分泌表現所需的生長因子的間接方式來達到調控的目的，例如使用可促進骨分化蛋白表現的 dexamethasone、ascorbate-2-phosphate、vitamin D3、statins、insulin、indomethacin 等(Huang et al., 2006; Okamoto et al., 2009; Wei et al., 2007)。由於血流供應的重建是目前牙髓組織再生研究中的瓶頸，藉由藥物刺激調控 VEGF 的分泌行為進而達到促進血管增生作用的結果，是目前牙髓組織再生研究的新課題。其中 statins 類藥物被發現同時具有促進鈣化組織生成及血管生成的功效(Min et al., 2010)，因此利用 statins 類藥物來刺激齒源性幹細胞應用在牙髓組織再生較具有潛力。

2.5.2 Statin 類藥物的功效

醫療上的 statins 類藥物最早可回溯至 1973 年，日本三共製藥公司第一次從桔



青黴菌 (*penicillium citrinum*) 中分離出了一種 HMG-CoA 還原酶抑制劑 mevastatin (Liao & Laufs, 2005)，但由於其潛在的毒性未能上市 (Stirewalt et al., 2003)。1979 年，默克公司從土麴黴 (*aspergillus terreus*) 中分離出 lovastatin，並進行 lovastatin 相關研究，在動物安全性研究未顯示負面作用後，於 1980 年代開始臨床試驗。隨後 lovastatin 於 1987 在美國上市，使用歷史悠久，主要作為降膽固醇的用藥，當血液中膽固醇過高，容易導致動脈阻塞引發心臟病和中風，statins 用於心血管疾病，為 HMG-CoA 還原酶的抑制劑，能減少膽固醇的合成，降低總膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇及提升高密度脂蛋白膽固醇，可降低冠狀動脈疾病的發生率，漸漸地成為治療高膽固醇血症最重要的藥物。市場上常見的 statin 類降血脂藥物包括 lovastatin、simvastatin、fluvastatin、atorvastatin 和 pravastatin 等，其中 lovastatin、pravastatin 和 simvastatin 屬於天然的 statins，是利用黴菌發酵所產生，而 fluvastatin、atorvastatin 和 cerivastatin 則是完全人工合成的產物，化學結構是與天然 statins 截然不同。statins 除了 pravastatin 和 fluvastatin 具親水性 (hydrophilic) 外，其餘皆屬於親脂性 (lipophilic) (Williams & Feely, 2002)。

Statins 類藥物在經過長期的臨床使用後，其他的功效也逐漸被發現。在誘導根尖病灶的大鼠研究模型，注射 statin 可以有效抑止根尖病灶形成並能抑制組織的發炎反應(Lin et al., 2009)，日本的研究團隊在老鼠實驗模型上觀察可以促進骨頭組織癒合 (Skoglund et al., 2002)。在體外實驗研究結果也證實 statin 可刺激細胞表現 VEGF，具有促進血管生成功效(Min et al., 2010)。對於血管生成的功效，相關研究顯示不同濃度的 statin 具有不同的效果，低劑量的 statins 可激活內皮細胞中的 Akt 信號，進而促進血管生成，而高劑量的 statins 會抑制甲羥戊酸 (mevalonate) 的非甾醇產物 (non-sterol product) 的合成，對細胞生長產生毒性，反而抑制了血管生成(Skaletz-Rorowski & Walsh, 2003; Weis et al., 2002)。由於上述提及的 statin 類藥物的其他功效，此類藥物開始被應用於牙髓組織再生的領域。



2.4.3 Statin 類藥物於牙髓組織再生的應用

Statins 依特性可分為親水性與親脂性 statins，以親水性 statins 和親脂性 statin 於體外進行對於刺激成骨細胞 (osteoblastic cell) VEGF 基因表現的研究結果顯示，親脂性 statin 有促進細胞 VEGF 的基因表現，而親水性 statin 像是 pravastatin 對於促進血管生成沒有明顯功效 (Maeda et al., 2003)。因此在牙髓組織再生應用上需要選擇親脂性的 statins。親脂性的 statins 藥物中，lovastatin 和 simvastatin 屬於天然合成 statins，也是目前常用的 statins，而 lovastatin 與 simvastatin 相較對熱穩定以及具有取得容易的優點。另一方面 Okamoto 的研究團隊發表了 simvastatin 和牙髓細胞進行交互作用的研究實驗，結果顯示發現 simvastatin 在體外實驗模型有促進 DPSC 表現鈣化組織相關基因表現，而活體動物實驗則顯示 simvastatin 有促進 DPSC 分化並形成鈣化組織的能力，但是過高的 simvastatin 濃度 (大於 $10\mu\text{M}$) 則是對於 DPSC 會有抑制生長的功效 (Okamoto et al., 2009)。因此若是能利用藥物控制釋放材料設計的原理，將 statin 與支架材料做結合，藉由控制 statin 藥物釋放濃度來抑制發炎反應並且穩定的促進鈣化組織蛋白與 VEGF 的分泌，將可有效的誘導牙本質再生和血管新生作用而能重建牙髓組織的血流供應。但是親脂性 statins 需溶於有機溶劑中，而大部分有機溶劑都具有毒性，因此如何結合親脂性 statins 和支架材料則是一個挑戰。

台大口生所李伯訓教授研究團隊的研究文獻顯示，使用雙重乳化法經由聚乙烯醇做為界面活性劑可成功以聚乳酸聚甘醇酸 (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 作為載體來搭載不同濃度的 lovastatin，達到 lovastatin 藥物控制釋放且延長藥物作用時間。其中 lovastatin 混合濃度為 0.1 wt% 的製程有最佳的包覆率，應用於動物實驗中老鼠的骨缺損發現有促進鈣化組織生成的功效 (Ho et al., 2011; Lin et al., 2017)。如果可以結合 PLGA-Lova 具有長期釋放藥物的材料與合適可注射性的支架材料，利用 statin 可以促進鈣化組織生成與血管增生因子的分泌，除了可以促進血管新生的效果，也可以誘導牙髓組織再生，進而克服目前牙髓組織再生研究的困境。

第三章 動機與目的



本研究從組織工程的角度切入，從組織工程的三要素著手，希望達到再生牙髓組織和牙本質的目的。在幹細胞方面，希望標選出具有幹細胞特性，如 STRO-1、CD44，同時表現促進血管增生之 CD105 的 DPSC。在生醫支架材料設計上希望可以研發具有可注射性的支架材料，同時有足夠的材料強度的交聯型 HA 以及容易釋放小分子的未交聯 HA，有促進血管生成功效的雙相型透明質酸膠體。生長因子使用 PLGA 作為 lovastatin 的載體來達到藥物的控制釋放的效果，延長藥物作用的時間來達到促進鈣化組織生成及血管新生。結合這三者嘗試研發搭載 lovastatin 之雙相型透明質酸膠體，並進一步探討其物理性質、流變性質、藥物釋放行為與生物相容性。使材料能夠用於根管系統空間中，並具有誘導幹細胞生成鈣化組織、促進血管生成的潛力，突破目前牙髓組織再生的困境，達到功能性的牙髓組織及牙本質組織的再生。

第四章 材料與方法



4.1 儀器裝置

- A. Agilent 1200 Series HPLC System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- B. FTIR-4200 spectrometer (JASCO Inc., Easton, USA)
- C. FDU 1200 freeze dryer (EMELA, Tokyo, Japan)
- D. Misonix Sonicator 3000 Ultrasonic Cell Disruptors (Cole-Parmer, Vernon Hills, USA)
- E. Q150R S Rotary-Pumped Sputter Coater (Quorum Technologies, Lewes, UK)
- F. Rheometer AR200ex (TA Instruments, New Castle, USA)
- G. Scanning Electronic Microscope
 - S-2400 (Hitachi, Tokyo, Japan)
 - TM3000 (Hitachi, Tokyo, Japan)

4.2 藥品材料

- A. 1,4-Butanediol diglycidyl ether (Sigma-Aldrich)
- B. Acetonitrile (Honeywell)
- C. Acetophenone (Alfa Aesar)
- D. Alpha minimum essential media (Sigma-Aldrich)
- E. Bovine testis hyaluronidase (Sigma-Aldrich)
- F. Chloroform (J.T.Baker)
- G. Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich)
- H. Formic acid (Sigma-Aldrich)
- I. Glutaraldehyde (Sigma-Aldrich)



J. Hyaluronic acid sodium salt (mol wt 1.5-1.8 x 10⁶ Da) (Sigma-Aldrich)

K. Lactose dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay kit (Thermo)

L. Lovastatin (Syngen Biotech)

M. Nicotinamide (Sigma-Aldrich)

N. Phosphoric acid (J.T.Baker)

O. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) (lactide:glycolide (50:50))
(Sigma- Aldrich)

P. Polyvinyl alcohol (Sigma-Aldrich)

Q. Potassium hydroxide (J.T.Baker)

R. Sodium hydroxide (UniRegion Bio-Tech)

S. Water soluble tetrazolium (WST-1) assay, (Roche)

4.3 材料製備

4.3.1 製備交聯型透明質酸膠體 (HAG) 材料

根據 Malson 和 Lindqvist 對於交聯透明質酸製備方法的專利，本實驗選擇經動物實驗驗證具有良好生物相容性的製程來製備交聯型透明質酸膠體(Malson & Lindqvist, 1987)，圖 1 為材料製備的流程圖。首先於 3ml 1% NaOH 水溶液加入 40 μ l BDDE，接著加入 0.4g (13.3%) 透明質酸鈉鹽，待透明質酸完全溶解並混合均勻，於 50°C 烘箱中進行交聯反應 2 小時。接著放置於室溫下過夜，將交聯型透明質酸膠體裁切成小塊 (<5mm)，以二次蒸餾水作為透析緩衝液，進行透析以移除未反應完全之 BDDE 及雜質。接著於室溫下以抽風櫃乾燥三至四天，乾燥後材料添加 PBS 溶液調整材料的濃度，以獲得 2% 的交聯型透明質酸膠體。之後將材料過篩(420 μ m)，製備出具可注射性的交聯型透明質酸膠體顆粒 (Hyaluronic acid granules, HAG)。

4.3.2 製備洛伐他汀之聚乳酸聚甘醇酸奈米顆粒 (PLGA-Lova) 材料

根據台灣大學口生所李伯訓教授研究團隊的研究文獻顯示，以不同濃度的 lovastatin 與 PLGA 溶於氯仿中，經由聚乙烯醇 (PVA) 作為界面活性劑，使用雙重乳化法可成功製備 PLGA-lova 材料。其中以 lovastatin 混合濃度為 0.1 wt% 的製程有最佳的包覆率，因此選用此製程進行本實驗(Ho et al., 2011; Lin et al., 2017)。

圖 2 為材料製備的流程圖，首先將 180mg (3 wt%) PLGA 和 6mg (0.1 wt%) lovastatin 溶於氯仿 (4ml) 中，並以磁石攪拌至溶解，隨後加入 800 μ l PBS 溶液，使用超音波探針 (Misonix Sonicator 3000 Ultrasonic Cell Disruptors) 以震幅 30% 震盪 2 分鐘，完成第一次乳化溶液。

配置 1 wt% PVA (0.24g) 溶於 24ml 二次蒸餾水之水相溶液，接著加入第一次乳化溶液，使用超音波探針以震幅 50% 震盪 10 分鐘，完成第二次乳化溶液。將經二次乳化的溶液放置於抽風櫃中持續攪拌 24 小時，使氯仿揮發。隔天以 4°C、12000 rpm 條件下離心 25 分鐘，使材料顆粒沉澱，並倒除上清液，再加入二次蒸餾水，重複此步驟三次，以洗去多餘、殘留的 PVA，最後獲得 PLGA-Lova 材料進行冷凍乾燥並保存。

4.3.3 製備雙相型透明質酸膠體 (biHAG) 及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體 (Lova@biHAG) 材料

利用物理性混合方法，將 2% 透明質酸水溶液與交聯型透明質酸膠體 (HAG) 依設定比例混合，製備雙相型透明質酸膠體 (biHAG)。

首先將透明質酸鈉鹽溶於 PBS 溶液配置成 2% 透明質酸水溶液，接著將 2% 透明質酸水溶液以重量百分比濃度 0%~40% 的比例與 HAG 混合。混合方式為將材料分別置入兩個注射針筒內並以 Luer 連接器相連，來回推送數次將材料混合均勻之後。材料依 HAG 所占重量百分比分別製備出 HAG100、HAG90、HAG80、HAG70、

HAG60 的雙相型透明質酸膠體顆粒 (biphasic hyaluronic acid granules, biHAG) (表 1)。

在搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體製備中，首先將適量的 PLGA-Lova 加入 2% 透明質酸水溶液中，以物理性方式混合，攪拌混合均勻後置放到注射針筒中。接著將 HAG 置於另一個注射針筒中，兩個注射針筒以 Luer 連接器相連，來回推送數次將材料混合均勻之後，製備出 Lova@biHAG (2mg PLGA-Lova in 1g biHAG)。各個材料設定的重量比例詳見表 1。

4.4 物理性質分析

4.4.1 製程產物之 1,4-丁二醇二縮水甘油醚 (BDDE) 殘留量分析

分別取製程中經 4 天與 5 天透析時間的製程產物，進行 BDDE 殘留量分析。每個樣本的重量為 5g，每組樣本數為 3 個。首先將活性濃度 150U 的牛睪丸透明質酸酶 (bovine testis hyaluronidase, BTH) 加入 10ml PBS，接著加入 5g 待測材料，放置於 37°C 烘箱中進行反應 24 小時，接著移至 100°C 水浴中 10 分鐘終止酵素分解反應，取出待測材料在 2000 rpm 及 5 分鐘條件下離心，離心後取出上清液，以上清液作為待測溶液進行螢光分光光度法測定 HAG 中 BDDE 交聯劑的殘留量 (Feng & Zhang, 2012)。

接著將 100µl 待測溶液和 50µl 0.125 mmol/L 菸鹼醯胺 (nicotinamide) 水溶液混合，放置 37°C 水浴中 120 分鐘，接著加入 0.5ml 15% 苯乙酮 (acetophenone) 和 0.5ml 1 mol/L 氫氧化鉀水溶液，混合均勻之後置於冰浴 10 分鐘，並加入 2.5 ml 甲酸 (formic acid)，置放於 60°C 水浴 5 分鐘，接著冰浴冷卻 10 分鐘，最後靜置於室溫 15 分鐘，使用螢光分光光度法進行檢測，激發和發射波長分別設定為 370 nm 和 450 nm，得到 BDDE 螢光吸收訊號值。以 PBS 進行序列性稀釋配置濃度分別為 16、8、4、2、1、0.5、0 µg/ml 的 BDDE 溶液，進行螢光分光光度法的檢測以



建立檢量線，並回推待測溶液中 BDDE 的濃度。

4.4.2 膨脹係數分析

本項實驗包括交聯型透明質酸膠體塊材與顆粒型的雙相型透明質酸膠體 (HAG100、HAG80、HAG60)，每一組別的樣本數為 3 個。

塊材的部分，首先秤取待測材料最初重量 (W_i)，接著放入過量的水中，於 24 小時後將塊材取出，移除表面水分後，秤取材料吸水膨脹的重量 (W_s)。再將吸水膨脹後的材料冷凍乾燥後，秤取乾燥的重量 (W_d)。

由於顆粒型膠體材料放於水中不容易秤重，所以本實驗使用透析膜作為顆粒型膠體的容器裝置，首先秤取最初重量 (W_i)，接著將待測材料放入透析袋，移置於過量的水中，24 小時後秤取吸水膨脹後的重量 (W_s)，冷凍乾燥後秤取乾燥的重量 (W_d)。膨脹係數的計算為 W_s / W_d 。

4.4.3 流變性質分析

檢測材料為雙相型透明質酸膠體以及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體，以流變儀 (Rheometer AR200ex) 進行流變性質分析，檢測的溫度為 37°C ，上下夾板的間距為 1.0mm，分別以震盪模式 (oscillation mode) 與剪力模式 (shearing mode) 進行測試。在震盪模式下以頻率 0.1~10 赫茲 (Hz) 和 0.01 應變 (strain) 的參數設定，分析儲存模數 (storage modulus; G')、損耗模數 (loss modulus; G'')、損耗正切 ($\tan \delta = G'' / G'$) 以及複黏度 (complex viscosity)。在剪力模式以 $1\sim 1000\text{ s}^{-1}$ 的剪切速率下分析黏稠度 (viscosity)。所得結果使用 Rheology Advantage Data Analysis 軟體分析。

4.4.4 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 分析

將冷凍乾燥後的各種材料以傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR-4200 spectrometer)

進行檢測分析，使用 Spectra Manager Version 2/ Spectra analysis 軟體，掃描範圍為 4000 - 650 cm^{-1} ，所得光譜數據進行分析產物之官能基鍵結情形，並使用透明質酸鈉鹽粉末作為標準品比對。



4.4.5 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 分析

將各種材料進行冷凍乾燥移除水分並維持材料結構，接著材料做金覆模的處理，以掃描式電子顯微鏡 (SEM S-2400 & SEM TM3000) 觀察材料的結構。

4.4.6 洛伐他汀 (lovastatin) 釋放行為

檢測材料有搭載洛伐他汀的雙相型透明質酸膠體，分別有 Lova@HAG80、Lova@HAG60，每個樣本的重量為 5g，每一組別樣本數為 3 個。並取 10mg PLGA-Lova 做為比較控制組。並以 HPLC (Agilent 1200 Series HPLC System) 進行 lovastatin 的檢測。

首先加入活性濃度 150U BTH 於 10 ml PBS 的離心管中，接著加入待測材料，置於 37°C 烘箱中，於設定時間點 1、3、7、10、14、21、28、40 天下取出待測材料，在 2000 rpm 以及 5 分鐘條件下離心，取出 200 μl 上清液做為待測溶液，同時回補 200 μl PBS 至離心管溶液中，並將待測溶液放於 100°C 水浴 10 分鐘中停止酵素分解反應。以 HPLC 檢測樣品的 lovastatin 波峰訊號並以檢量線回算濃度。

HPLC 檢測設定，使用長度為 150 mm、直徑為 4.6 mm、吸附劑顆粒大小為 5 μm 的 C18 分析柱。將乙腈 (acetonitrile) 和 0.1% 磷酸 (phosphoric acid) 混合比例為 65:35 作為分散相 (mobile phase)，在波長 238 nm、流速 1.5 ml/min 條件下偵測，偵測時間為 10 分鐘 (Silva et al., 2012)。Lovastatin 檢量線首先配製 0.01 g/ml 的 lovastatin 溶於二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide) 中，以 PBS 進行序列稀釋 50、40、30、20、10、5、0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。



4.5 細胞生長行為之分析

4.5.1 細胞選擇與培養

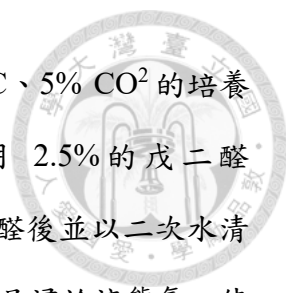
本項實驗細胞是根據 Gronthos 所發表的文獻(Gronthos et al., 2002)，從人類第三大白齒牙髓組織中，利用酵素分解的方式進行 DPSC 的初代培養，不同的是在繼代培養時使用 Karbanová 等人提出之低血清培養液的配方(Karbanová et al., 2011)，配方為含有 0.2 mM ascorbic acid 2-phosphate、50 nM dexamethasone、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin 以及 100 µg/ml streptomycin 的 2% 胎牛血清的 α -MEM，另外再加入 10 ng/ml EGF 以及 10 ng/ml PDGF-BB。培養的 DPSC 在繼代培養的第 3 至 20 代時，使用螢光免疫 (immunofluorescence) 以及流式細胞儀 (flow cytometry) 鑑定其幹細胞特性。流式細胞儀的分析結果確認繼代培養的第 3 至 20 代的 DPSC 均有表現 CD44 與 CD105 的幹細胞標記，且表現量都大於 98%。在免疫螢光的分析結果證實會表現 STRO-1、CD44、CD105 的幹細胞標記。本實驗將使用經分選及鑑定後的 DPSC 進行細胞生長行為分析。

4.5.2 細胞生長行為之分析

本樣分析的材料組別為 HAG100、HAG80、HAG60、Lova@HAG80、Lova@HAG60 (N=3)，所有的材料先以 120°C 下高溫高壓滅菌 20 分鐘。

在細胞生長行為分析使用直接接觸法，將細胞直接培養在材料上。本實驗設置一個鐵氟龍模具，由三個鐵氟龍環所組成，最小鐵氟龍環內徑為 4.7mm、高度為 3mm，並利用三個鐵氟龍環模具與兩個透析膜將細胞與材料限制在模具中，模具與透析膜在實驗前先以高溫高壓滅菌。

將細胞懸浮液與滅菌後的膠體材料以 1:9 的比例，分別置放於兩個注射針筒內並以 Luer 連接器連接，來回推送數次將細胞懸浮液與膠體材料混合均勻配置出細胞濃度為 5×10^4 cells/ml 的膠體材料。將含有 DPSC 細胞的膠體材料注射於鐵氟



龍模具中，置入 24 孔盤，加入 1.5ml α -MEM 培養液，在 37°C、5% CO² 的培養箱中培養一天及五天。於設定的時間下取出樣本，使用 2.5% 的戊二醛 (glutaraldehyde, Sigma) 於 4°C 下固定細胞 3 小時，移除戊二醛後並以二次水清洗三次，之後進行 -80°C 冷凍及冷凍乾燥移除水分，乾燥後之樣品浸於液態氮，使其變脆取剖斷面並以碳膠黏於鋁台上，以金覆膜後。使用掃描式電子顯微鏡 (SEM S-2400 & SEM TM3000) 觀察細胞生長行為。同時計算 biHAG 在不同時間的細胞數量變化，每一個樣本隨機選擇五個位置，每個樣本以 SEM 在放大 500 倍下觀察並計算細胞數量，並以 t test 分析同一個材料不同天數的變化，以雙因子變異數分析 (two way ANOVA) 分析不同材料組別的細胞數量差異，而組間的差異使用事後比較檢定 (post hoc test) 進行分析。

4.6 生物相容性分析

根據 ISO 10993-5 的評估醫療器材生物相容性的規範，須通過體外細胞毒性試驗，而體外細胞毒性試驗是材料於生物相容性的初期測試。生醫材料的生物相容性可以用直接接觸法與材料萃取液的模型，其中材料萃取液測試方式較為容易、花費較低且可重複性高，也是在臨床上最常使用的細胞毒性測試方法。本實驗使用材料萃取液的模型來進行材料的生物相容性評估。

4.6.1 細胞選擇與培養

本研究材料未來會應用於臨床牙髓組織再生的治療上，因此選擇篩選經過鑑定後的 DPSC 以模擬臨床治療應用的狀況。此外根據體外細胞毒性試驗 (ISO 10993-5) 對於生醫材料進行體外細胞毒性測試方法的規範，建議以細胞株 (cell line) 作為毒性測試的細胞，可以加強實驗的重複性，因此也使用大鼠牙髓細胞株 (mineralizing rat pulpal cell line, MRPC-1)。



DPSC 的繼代培養方法如 4.4.1。MRPC-1 細胞繼代培養使用含有 10% FBS、2 mM L-glutamine、100 U/mL penicillin、100 μ m/mL streptomycin 的 α -MEM。細胞培養於 37°C 及 5% CO₂ 的培養箱中，每兩天置換一次培養液。

將 DPSC 和 MRPC-1 細胞以 1×10^4 cells/well 的濃度培養於 96 孔盤，在 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養 24 小時後，後續進行細胞存活率與死亡率的分析。

4.6.2 材料萃取液製備

本實驗檢測材料為 HAG100、HAG80、HAG60、Lova@HAG80、Lova@HAG60，每一組的樣本數為 5 個。以材料萃取液進行生物相容性分析。將滅菌後的材料依據 ISO 10993-12 之規範，依材料表面積與培養液體積為 1.25 cm²/ml 的比例，將研發材料置入 α -MEM 中進行材料萃取液的製備。首先將 350 μ l 的待測膠體材料置於 24 孔培養盤，覆蓋透析膜後，以矽氧樹脂圓環 (silicone ring)、塑膠管及上蓋輕壓膠體材料，限制膠體膨脹體積，也避免材料混入材料萃取液中，接著加入 1.6ml α -MEM 培養液，於 37°C 恆溫箱培養 24 小時後，取出材料上方的細胞培養液，製備出材料萃取液。取出的材料萃取液以 HPLC 進行 lovastatin 濃度檢測，並於 24 小時內進行細胞存活率與死亡率檢測評估。

4.6.3 細胞存活率

細胞存活率的是使用 WST-1 細胞增生檢測試劑進行分析。 α -MEM 培養液作為控制組。實驗組則使用 DPSC 進行實驗，移除培養 24 小時的 DPSC 的細胞培養液，將材料萃取液與 DPSC 細胞共同培養 24 小時，每一個材料萃取液以三重複進行檢測。

首先於製備完成的材料萃取液中添加 2% FBS 後，與 DPSC 細胞在 37°C、5% CO₂、100% 濕度條件下共同培養 24 小時。接著更換培養液並加入 10 μ l WST-1 試劑，於培養箱培養 30 分鐘後，搖晃使其溶解均勻，利用光譜儀在 450 nm 波長讀



取吸收值。細胞存活率的計算方式如下：

$$\text{細胞存活率} = (\text{實驗組吸光值} / \text{控制組吸光值}) \times 100\%$$

4.5.4 細胞死亡率

細胞死亡率的是使用乳酸脫氫酶法 (lactose dehydrogenase, LDH) 進行細胞死亡率的分析。控制組包括 α -MEM 培養液控制組以及最大細胞死亡組。實驗組則使用 DPSC、MRPC-1 進行實驗，移除培養 24 小時的 DPSC、MRPC-1 的細胞培養液，將材料萃取液與 DPSC、MRPC-1 細胞共同培養 24 小時，每一個材料萃取液以三重複進行檢測。

首先於製備完成的材料萃取液中添加 2% FBS 後，與 DPSC、MRPC-1 細胞在 37°C、5% CO²、100%濕度條件下共同培養 24 小時。最大細胞死亡組加入 10 μ l 細胞裂解緩衝液，混合均勻後放入 37°C 培養箱 45 分鐘，接著抽取 50 μ l 實驗組及控制組細胞培養液，放入 96 孔盤，再加入 50 μ l LDH，避光條件下 30 分鐘，最後加入 50 μ l 停止反應之溶液，利用光譜儀在 490 nm 以及背景 680 nm 波長讀取吸收值。細胞死亡率的計算方式如下：

$$\text{細胞死亡率} = (\text{實驗組吸光值} / \text{最大死亡組吸光值}) \times 100\%$$

4.6.6 統計分析

所有樣本的細胞存活率及死亡率皆使用 SPSS 統計分析軟體，在 $\alpha=0.05$ 的條件下，以單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 進行檢定，而組間的差異使用 Tukey 多變相比較法 (Tukey HSD multiple comparison) 或 Games-Howell 檢定法進行分析。

第五章 結果



5.1 物理性質分析

5.1.1 產物製程之 BDDE 殘留量分析

製程中透析時間四天的 BDDE 的殘留量為 0.70 ± 0.21 ppm，透析時間五天的 BDDE 殘留量為 0.04 ± 0.08 ppm，不同透析時間製程之 HAG 的交聯劑殘留量均小於 FDA 的規範 2.0 ppm，不同透析時間對於 BDDE 殘留量有顯著的差異（表 2）。

5.1.2 膨脹係數（swelling ratio）分析

表 3 為膨脹係數分析結果，交聯型透明質酸膠體塊材和雙相型透明質酸膠體皆有不錯的吸水能力，交聯型透明質酸膠體塊材的膨脹係數為 43.28 ± 1.24 ，在一天之後材料即達到吸水的飽和平衡，即使將膠體材料放置在水中約一周，所增加的重量仍與一天後相同。顆粒型的雙相型透明質酸膠體的膨脹係數約是交聯型透明質酸膠體塊材的三倍以上，介於 135~192 之間，交聯型透明質酸膠體塊材膨脹係數明顯較低。顆粒型的雙相型透明質酸膠體中，隨著未交聯透明質酸係數越高，膨脹係數也越高，HAG100 與 HAG80 的膨脹係數接近，沒有統計上的顯著差異，但是 HAG60 有明顯偏高的情形，和另外兩者有統計上的顯著差異。

5.1.3 流變性質（rheology property）分析

膠體或水膠材料通常需要進行流變性質分析，其中以儲存模數 G' 表現材料彈性性質的程度，以損耗模數 G'' 表現材料流體性質的程度。為了了解未交聯 HA 對 biHAG 流變性質的影響，先分析重量比例從 0% 到 40% 的未聯 HA 對流變性質的影響。研究結果顯示在所有材料組別流變性質中，其 G' 皆大於 G'' ，表現出典型膠體性質而非水膠類的材料。其中 G' 數值沒有明顯差異，但是隨著未交聯 HA 比例增加， G'' 有明顯增加的趨勢，沒有添加未交聯 HA 的 HAG100 有最低的 G''

數值。此外以損耗因子 ($\text{Tan } \delta = G'' / G'$) 代表材料黏性與彈性的相對重要性。隨著未交聯 HA 比例增加, $\text{Tan } \delta$ 有增加的趨勢。其中 HAG90 和 HAG80 接近, HAG70 與 HAG60 接近 (圖 3)。因此在後續的研究中選擇以流體性質相對明顯的 HAG80、HAG60 進行後續搭載 PLGA-Lova 的研究。

在 biHAG 的系統中, 在添加相同未交聯 HA 比例的前提下, PLGA-Lova 的添加對於 G' 與 G'' 沒有明顯的影響 (圖 4A、圖 4B)。而對於 HAG80 的材料添加 PLGA-Lova 對於 HAG80 的 $\text{Tan } \delta$ 略為提高, 但在 HAG60 的數值則是沒有明顯改變 (圖 5)。比較 Lova@HAG80 與 Lova@HAG60, 未交聯 HA 添加量越高時, G' 會明顯下降, 但 G'' 沒有明顯改變 (圖 4A、圖 4B)。在 $\text{Tan } \delta$ 的分析上, 加入未交聯 HA 的比例越高, $\text{Tan } \delta$ 也越高 (圖 5)。

以複黏度 (complex viscosity) 表現在震盪模式下, 隨著頻率增加材料抵抗剪切應力而產生抗拒流動或形變的一種量度。同頻率下未添加 PLGA-Lova 的材料組別複黏度結果顯示, 添加未交聯 HA 的比例越高, 複黏度會越低。有無添加 PLGA-Lova 在複黏度則是無明顯的差異。Lova@biHAG 中隨著未交聯 HA 的比例越高, 複黏度會越低 (圖 6)。

黏稠度 (viscosity) 表示隨著剪切速率逐漸增加材料受剪應力 (shear stress)、張應力 (tensile stress) 而產生抗拒流動或形變的一種量度。HAG100 在剪切速率逐漸增加至 10 s^{-1} 時逐漸喪失黏膠體性質。相同剪切速率下未添加 PLGA-Lova 的材料組別黏稠度結果顯示, 添加未交聯 HA 的比例越高, 黏稠度會越低, 有無添加 PLGA-Lova 在黏稠度則是無明顯的差異。Lova@biHAG 中隨著未交聯 HA 的比例越高, 黏稠度會越低 (圖 7)。

5.1.4 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 分析

分析透明質酸鈉鹽粉末的主要吸收峰 (圖 8), 觀察到和 (C-O) 基有關的吸收峰有 1034 cm^{-1} ; (C-O-C) 基的吸收峰有 1151 cm^{-1} ; (C-H) 基的吸收峰有 1419

cm^{-1} ; (C=O) 基的吸收峰為 1648 cm^{-1} ; (O-H) 基的吸收峰為 3443 cm^{-1} 。而各種 biHAG 以及 Lova@biHAG 所表現的吸收峰和透明質酸鈉鹽粉末的吸收峰一致。



5.1.5 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 分析

觀察各種雙相型透明質酸膠體在移除水分後，皆呈現多孔蜂巢狀的空間，孔洞直徑大小約為 $50 \sim 200 \mu\text{m}$ ，加入未交聯透明質酸的 HAG80 以及 HAG60 除了孔洞狀之外，可以觀察到孔洞之間有較細微的網狀結構，類似未交聯透明質酸的結構，在 HAG100 較不易觀察到此網狀結構 (圖 9)。

PLGA-Lova 的粉末大小約 $100 \mu\text{m}$ ，高倍率觀察類似柱狀結構 (圖 10)。在 Lova@HAG80 以及 Lova@HAG60 的組別顯微結構與 HAG80 及 HAG60 相似，都是多孔蜂巢狀的結構，同時也可以觀察到較細微的網狀結構，PLGA-Lova 粉末以些許零星分散的形式在 biHAG 基底中 (圖 11、圖 12)。

5.1.6 洛伐他汀 (lovastatin) 釋放行為

Lova@biHAG 與 PLGA-Lova 的釋放行為是類似的，1~3 天的藥物釋放快速，7~10 天會達到累積釋放的高峰。但是在釋放總量上，相比同樣重量的 PLGA-Lova，Lova@HAG80 與 Lova@HAG60 的 lovastatin 總釋放量約只有 PLGA-Lova 的六成。

在生物相容性模型所取得之材料萃取液中，第一天萃取液所檢測到的 lovastatin 濃度 Lova@HAG80 與 Lova@HAG60 分別是 $170 \mu\text{M}$ 與 $128.15 \mu\text{M}$ ，兩者沒有統計的顯著差異。而第二天濃度明顯下降，約在 $50 \mu\text{M}$ 以內，Lova@HAG80 略高於 Lova@HAG60 時第二天濃度，其差異有統計的顯著差異 (圖 13)。



5.2 生物相容性研究

5.2.1 細胞生長形態之觀察

HAG100、HAG80、HAG60 與 DPSC 共同培養一天後，在 HAG100 組別，電子顯微鏡下可以觀察到大部分的 DPSC 細胞呈現圓球狀，少部分細胞向四周伸出觸角（圖 14）。HAG80 組別，與 HAG100 類似，大多數細胞呈現圓球狀或是半球狀形態，但是與 HAG100 相比可觀察到有較多的細胞向四周伸出觸角（圖 15）。HAG60 和 HAG80 的細胞生長形態類似，多數細胞呈現圓球狀或是半球狀形態，也可觀察細胞向四周伸出觸角，數目與 HAG80 類似（圖 16）。Lova@biHAG 與 DPSC 共同培養一天後，在 Lova@HAG80 上，可以觀察到大部分細胞呈現圓球狀或是半圓球狀形態，少部分細胞向四周伸出觸角，但是與未添加 PLGA-Lova 的組別相比，Lova@HAG80 可以觀察少數細胞呈現圓球狀且有微小破孔及凹陷情形（圖 17）。Lova@HAG60 和 Lova@HAG80 類似，大部分細胞呈現圓球狀或是半圓球形態，少部分細胞呈現圓球狀且有微小破孔及凹洞（圖 18）。

HAG100、HAG80、HAG60 與 DPSC 共同培養五天後，在 HAG100 中，多數細胞呈現圓球狀或是半球狀形態，但是少數細胞有向四周伸出觸角；與培養一天結果相比，伸出觸角的細胞數量比例有增加的趨勢（圖 14）。在 HAG80 組別中，仍可觀察到圓球狀或是半圓球狀形態，但其比例與培養一天的結果相比，有下降的趨勢且所佔的數量比例降低，而向四周伸出觸角的細胞數量比例有增加的情形（圖 15）。HAG60 的細胞生長型態與 HAG80 相似且無明顯差別（圖 16）。在 Lova@biHAG 中，大部分細胞呈現圓球狀與半圓球狀生長、少數向四周伸出觸角。與 biHAG 相比，可觀察到少數細胞呈現微小破孔及凹陷形態。但是與培養一天相比，呈現微小破孔及凹陷形態的細胞數量則是有減少的趨勢（圖 18）。

從細胞數量的分析上，培養五天後，各組的細胞數量有增加的趨勢，並在統計上有顯著的差異。相同時間下，HAG80 與 HAG60 的細胞數量略高於



HAG100，但是各組之間的細胞數量沒有統計上的顯著差異（表 4）。

5.2.2 細胞存活率分析

表 5 為研發材料的材料萃取液及控制組對於 DPSC 細胞在培養一天後的存活率。其中所有的組別的細胞存活率超過 100%，又以 Lova@HAG80 最高，但只有 HAG80、HAG60、Lova@HAG80 的細胞存活率明顯高於控制組，其差異具有統計分析的顯著意義。

5.2.3 細胞死亡率分析

表 6 為研發材料的材料萃取液、控制組與最大死亡控制組對於 DPSC 細胞在共同培養一天後的細胞死亡率結果。所有組別的細胞死亡率皆遠小於最大死亡率組別（100%），介於 1.81%~6.14%，同時五組的結果與控制組（0%）沒有統計分析上的顯著差異。

表 7 為研發材料的材料萃取液及控制組對於 MRPC-1 細胞在共同培養一天後的細胞死亡率結果。未加入 PLGA-Lova 的組別，細胞死亡率和控制組有統計上的顯著差異，介於為 7.82%~9.37%。但是有添加 PLGA-Lova 的組別，細胞死亡率明顯增加約有六成的細胞死亡率，同時 Lova@HAG80 與 Lova@HAG60 和控制組(0%)的分析結果，有統計分析上的顯著差異。

第六章 討論




6.1 材料製程的探討

天然透明質酸容易降解、在活體內半衰期短，限制了醫學上的應用性，因此需要對透明質酸修飾，來提高其強度及延長降解時間。常使用的方式為使用交聯劑，使透明質酸與交聯劑發生分子間的交聯反應，得到不同交聯程度的網狀結構，藉此提升材料強度性質並延長降解時間(De Bouille et al., 2013)。常使用的透明質酸交聯劑有 ADH、DVS、BDDE(Yeom et al., 2010)，其中 BDDE 是市售透明質酸商品最常使用的交聯劑，在相關醫療研究與治療應用有十年以上的報告，長期使用較安全以及穩定性高、可生物降解(De Bouille et al., 2013)。所以本研究使用 BDDE 做為交聯劑製備交聯型 HA。

根據 1987 年 Malson 發表以 BDDE 做為交聯劑製備交聯型透明質酸的專利，在透明質酸的濃度超過 13.3% (0.4g) 以及氫氧化鈉水溶液的濃度為 1% (3ml) 時，和添加超過 25 μ l 的 BDDE 在 50°C 下反應兩小時以上皆能成功交聯形成膠體 (Malson & Lindqvist, 1987)。專利中十個不同製程所製備的材料，均不會對人類纖維母細胞 (human fibroblast) 造成明顯的毒性，但是也沒有促進細胞增生的結果。專利中進一步選擇製程中使用透明質酸濃度 13.3% 與濃度 1% 的氫氧化鈉水溶液，並添加 40 μ l 的 BDDE 進行交聯反應後形成的交聯型透明質酸膠體，應用在兔子的眼球水晶體置換的活體實驗中，其活體實驗顯示有不錯療效。因此本研究團隊選擇 Malson 專利中進行體外及活體實驗中皆有理想結果的製程反應條件，來製備交聯型 HA。

一般而言交聯型 HA 濃度介於 0.1~2.5% 時具有注射性，可通過直徑 0.9mm 的針頭(Malson & Lindqvist, 1987)。而市售商品用於關節液填充與皮下注射的 HA 材料，其濃度以 2% 為主(Andre, 2008)，像是 Q-Med 公司出產 Perlane 與 Restylane 的 HA 濃度皆為 2%，其流動性質與穩定性的相關研究資料也較多(La Gatta et al.,




2011; Sundaram et al., 2010)，也有應用在牙髓組織再生領域文獻發表，像是評估 Restylane 對於 DPSC 生長效應的文獻發表(Chrepa et al., 2017)，或是 Yang 等學者同樣使用 BDDE 製備的交聯型透明質酸膠體進行牙髓組織再生的研究，其 HA 濃度也是 2%(Yang et al., 2016)。因此本研究在 HA 濃度上選擇 2%來進行牙髓組織再生的支架材料設計。此外 Yang 等學者的研究顯示顆粒大小為 400 μm 的交聯型透明質酸膠體的，擁有良好的可注射性，膠體材料加入牙齒間葉幹細胞 (dental mesenchymal cells, DMCs) 與 BMP-4 於皮下注射的動物實驗中成功誘導骨組織生成，於牙髓組織再生應用上也有良好的結果(Yang et al., 2016)。因此本研究的材料膠體顆粒大小設定為 420 μm 。

BDDE 在和透明質酸交聯反應後，會以三種形態存在：完全交聯、未完全交聯和未交聯。因為 BDDE 化學結構的環氧基有潛在的生物突變性，美國食品藥品監督管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 規範未反應完全的 BDDE 需小於 2 ppm (De Bouille et al., 2013)。本研究在交聯型透明質酸進行交聯反應後，會使用去離子水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水去清洗或是透析來移除未反應完全的 BDDE 與雜質來純化製程產物。Yang 等人的研究團隊以 BDDE 作為交聯劑製備的交聯型透明質酸膠體透析四天後，BDDE 的殘留量會低於檢測方式的最小值 (Yang et al., 2016)。本研究中透明質酸膠體製程中，在製程上分別選擇四天與五天的透析時間，實驗結果顯示不同透析時間 BDDE 殘留量，都符合 FDA 的規範 (小於 2 ppm)，但是透析時間第五天的結果 BDDE 殘留量明顯比第四天還要低，有統計上的顯著差異，因此在製程中透析時間選擇五天。

6.2 膨脹係數 (swelling ratio) 探討

膠體材料膨脹係數和材料交聯程度有關，材料交聯程度越高，膨脹係數則是會越低，相對地材料分解時間也會延長。而材料交聯程度會受到透明質酸膠體製程中交聯劑濃度、反應時的溫度等各項因素有關(De Bouille et al., 2013)。其中交聯劑的



濃度是一個重要的變因，Yang 的研究團隊針對不同 BDDE 添加量 (0.4%~1.0%) 對於交聯程度的影響，進行研究結果顯示反應中 BDDE 濃度為 0.4% 的膨脹係數最高，約為 100 (Yang et al., 2016)。後續利用 BDDE 濃度為 0.4% 的交聯型透明質酸膠體進行皮下植入的活體實驗，單純植入材料的組別在 15 周時材料沒有明顯分解現象，甚至長達 9 個月材料仍然存在。而在材料中加入 DMCs 與 BMP-4 的組別，材料分解時間會加快，在十週時可以從組織學的結果觀察到鈣化組織的形成以及仍有許多材料殘留。根據 Huang 等學者的研究結果顯示，大約在 3~4 個月的時間評估牙髓組織再生的結果，期望支架材料可在 3 個月左右達到一定的分解程度讓牙髓組織再生 (Huang et al., 2010)，所以 Yang 的交聯型透明質酸膠體應用在牙髓組織再生，其分解時間對於可能太長。本研究材料反應時 BDDE 濃度為 1.3%，雖然 BDDE 濃度較高，但是反應中透明質酸濃度不同，相對地材料交聯程度也不盡相同，所製備的顆粒狀的交聯型透明質酸顆粒膨脹係數介於 135~192 之間，遠比 Yang 等人的膠體材料來的高。推測本研究材料較 Yang 等人的材料交聯程度較低，在活體實驗中有更快的分解時間。在本研究的前導動物實驗中，將膠體材料植入老鼠皮下一個月後，HAG100 幾乎沒有材料被分解，而 HAG80 有較多的材料被分解，同時可以看細胞跟血管生長在材料之間，推測 biHAG 的性質可促進血管增生，有應用在牙髓組織再生的潛力。

膨脹係數的能力代表交聯型透明質酸膠體在應用及實際操作上，接觸到水份會吸水而膨脹。在本研究中，膠體的形式也會影響膨脹係數，交聯型透明質酸膠體塊材的膨脹係數是最低，而顆粒大小為 420 μm 的顆粒狀交聯型透明質酸膠體膨脹係數是塊材的三倍以上。推測顆粒狀的膠體材料表面積增加，會提升其吸水能力。此外在 biHAG 中，添加未交聯 HA 的比例增加時，膨脹係數會明顯提升，推測和材料中提供強度的交聯型 HA 比例較低有關。另一方面於實驗中，吸水一天後，HAG100 仍呈現較黏稠的膠體，HAG80 為較具有流動性的膠體，而 HAG60 接近於水溶液，材料吸水後的材料性質有可能會影響和細胞之間的交互作用。




6.3 雙相型透明質酸膠體流變性質 (rheology) 探討

本研究材料需要應用在狹窄且不規則的根管空間中，希望材料有可注射性，而可注射性和流變性質有關，為了了解未交聯 HA 對膠體流變性質的影響，起初先進行未聯 HA 比例從 0%到 40%的流變性質分析。在所有材料組別流變性質中，其 G' 皆大於 G'' ，表現出典型膠體性質而非水膠類的材料。研究結果顯示未交聯 HA 的添加量對於 G' 沒有明顯影響，顯示添加未交聯 HA 不會影響材料的固態性質，但是隨著添加量的增加， G'' 有明顯的影響，顯示未交聯 HA 添加會使得材料流動性增加，較傾向流體性質。

G' 與 G'' 是分別評估材料固態與液態的性質，但是當必須同時評估材料流體與固體的相對性質表現時需要以 $\tan \delta$ 來分析， $\tan \delta$ 的計算方式為 G''/G' 。數值大的材料性質較接近流體，數值小的材料性質較接近固體。在牙髓組織再生的應用上希望材料具有可注射性，需要有一定的流體性質，同時希望材料在根管空間裡能夠有足夠的剛性讓細胞攀爬生長，也要有一定的固體性質。因此 $\tan \delta$ 的數值要能同時代表流體與固體的性質，期望能從中選取最佳化的材料。HAG100 的 $\tan \delta$ 數值最低，相較來說最具有固體性質而流體性質的表現較低。而 HAG90 與 HAG80 的 $\tan \delta$ 數值接近，HAG 70 與 HAG60 的 $\tan \delta$ 數值接近，顯示其性質較類似，本研究分別選擇其中 $\tan \delta$ 數值較高的 HAG80 以及 HAG60 來進行後續添加 PLGA-Lova 的研究。在相同未交聯 HA 的比例下，有加入 PLGA-Lova 之材料組別的 $\tan \delta$ 數值表現略為增加，但是有無添加 PLGA-Lova 對於 biHAG 的流變性質沒有明顯的改變，這和 PLGA-Lova 的粉末只占材料整體中少量有關。有加入 PLGA-Lova 的組別，隨著未交聯 HA 的比例越高， $\tan \delta$ 數值表現越高，顯示增加較具流體的未交聯 HA，流體性質也會越高。

可注射性和材料的黏滯性有關，膠體材料常會使用複黏度以及黏稠度來評估其黏滯性。複黏度為震盪模式下，隨頻率增加材料抵抗剪切應力而產生抗拒流動



或形變的量度。黏稠度為剪切速率逐漸增加時，材料抵抗剪應力與張應力而產生抗拒流動或形變的量度。本研究中 HAG100 的數值較高，其黏滯性較高。而 biHAG 與 Lova@biHAG 中，有無添加 PLGA-Lova 對於黏滯性沒有明顯的改變。另一方面隨著未交聯 HA 的比例增加，複黏度與黏稠度皆較低，相對地黏滯性較低且有較好的可注射性。所以可以推測 HAG100 可注射性較差，HAG60 與 Lova@HAG60 有較好的可注射性。

實際的操作中 HAG100 雖然可以使用 23G、25G 針頭注射，但是使用 25G 針頭注射阻力較大，此現象與流變形質中 HAG100 表現出最高的複黏度與黏稠度有關。而 biHAG 與 Lova@biHAG 使用 25G 針頭注射時的阻力較 HAG100 小，有較好的注射性與操作性質。而一般根管清創修形中，根尖口徑大小常會做到 0.3~0.4 mm 之間，約莫可以使用 25G (0.455mm) 的針頭來輸送材料，所以 HAG100 於應用上的可注射性較差，而 biHAG 與 Lova@biHAG 有較好的可注射性，可使用 25G 針頭輸送材料至根管空間中。若是要應用於更小的根管空間，必須要提升 biHAG 與 Lova@biHAG 的可注射性。

調控可注射性的另一個策略是控制膠體的顆粒大小，市售的透明質酸產品有不同的顆粒大小，介於 150~2000 μm 之間，顆粒大黏滯性較高，顆粒小的黏滯性較低(Kablik et al., 2009)。本研究材料的黏滯性接近於市售商品 Restylane Sub Q，Restylane Sub Q 在 Restylane 產品系列中有較大的顆粒，約為 1000~2000 μm ，Perlane 次之，Restylane 較小約為 250 μm ，Restylane 的黏滯性較低，可以使用 29G 針頭注射，顯示了縮小顆粒可以增加材料的注射性(Andre, 2008)。本研究中的材料顆粒大小為 420 μm ，倘若未來需應用在更細小的根管空間，可以縮小膠體材料的顆粒，來獲得更理想的流變性質與可注射性。

6.4 雙相型透明質酸膠體官能基之探討

從 FTIR 的分析結果顯示透明質酸以 BDDE 進行交聯後並沒有改變官能基波


峰位置與形態，這可能是交聯後形成的 C=O=C 官能基也存在於透明質酸中，因此即使 BDDE 進行交聯反應後，並未產生新的官能基故未明顯改變官能基波峰位置與形態。未來可使用核磁共振波譜法 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR spectroscopy) 來分析與確認交聯後的官能基變化。此外，加入未交聯透明質酸對於波峰位置也沒有明顯的改變。加入 PLGA-Lova 之 biHAG 對於波峰位置與形態沒有顯著影響，可能和添加量在整體材料中只有少部分有關 (0.2% PLGA-Lova in biHAG)，在 FTIR 觀察不到官能基相對的變化。

6.5 雙相型透明質酸膠體顯微結構之探討

材料在顯微結構分析上，是將材料冷凍後進行乾燥移除水分，接著以金鍍膜進行樣本製備。材料上呈現多孔性的蜂巢狀結構，此孔洞在實際膠體狀態下為液態水存在的空間，此空間大小約莫是 50~200 μm ，這些空間在實際情況下可做為細胞培養液與組織液存在的空間，提供細胞生長的營養來源。此外 biHAG 的顯微結構上，除了有蜂巢狀結構外，可以觀察到部分孔洞的表層有較細微的網狀結構，從單純透明質酸結構中推測細微的網狀結構和未交聯 HA 有關，在 biHAG 和皆可觀察到此結構。Lova@biHAG 整體的結構與同比例的 biHAG 是類似的，但在部份的地方可觀察到 PLGA-Lova 的粉末結構，由於添加的量較少，只能在少數的地方才會觀察到，也顯示本研究中物理性混合方式可以達到 PLGA-Lova 的均勻散布。

6.6 洛伐他汀 (lovastatin) 控制釋放探討

本研究期望藉由混合 PLGA-Lova 能達到藥物緩釋的效果，因此測試方法是參考台大口生所李伯訓教授研究團隊所發表的文獻(Ho et al., 2011; Lin et al., 2017)，觀察 Lova@biHAG 對於 PLGA-Lova 的藥物釋放會不會造成影響，所以以等量的




PLGA-Lova 做為對照組。研究結果顯示 Lova@biHAG 釋放行為基本上與 PLGA-Lova 藥物釋放行為類似，可能是因為本研究材料與 PLGA-Lova 是物理性方式混合，並沒有改變 PLGA-Lova 的結構。此外膠體材料為高含水量的材料，PLGA-Lova 可直接與水接觸釋放藥物而不會被膠體材料包覆而阻擋藥物釋放。Lovastatin 在 PBS 的釋放行為曲線中可以看到兩個斜率，表示藥物有兩個釋放階段。第一個階段是物理性釋放，主要是因為 lovastatin 靠物理的方式吸附在 PLGA 奈米顆粒上，在一開始會有大量釋放，是 PLGA-lovastatin 奈米顆粒最外層的 lovastatin 藥物釋放，為初期釋放。第二階段是 PLGA 瓦解後，包裹在奈米顆粒裡面的 lovastatin 釋放，PLGA 奈米顆粒在水中會呈酸性，外面的酸性被水中和，內層的酸性會使 PLGA 奈米顆粒自我催化，約一周後會瓦解，內層的 lovastatin 會逐漸釋放。

在釋放總量上，膠體材料組別只有 PLGA-Lova 的六成左右。發生的原因可能與材料製備過程中，出現部分的 PLGA-Lova 的耗損有關。另一可能原因為 HPLC 所偵測的 lovastatin 是溶解且游離的 lovastatin，但部分游離的 lovastatin 因為物理親和力會吸附在 HAG 材料上，而在分析的過程中經由離心而被移除，導致所測得的 lovastatin 濃度減少。

利用材料萃取液的模型評估 lovastatin 濃度的釋放，發現第一天 Lova@HAG80 與 Lova@HAG60 釋放濃度分別為 170 μM 及 128 μM ，第二天雖然明顯下降，分別為 50 μM 與 25 μM 。但是與 statin 影響 DPSC 行為的研究文獻所使用的濃度為 0.1~10 μM 相比 (Okamoto et al., 2009)，本研究設計的 lovastatin 濃度較高，約為 10~20 倍左右，有過高的趨勢，推測此濃度可能對細造成潛在的毒性，未來需要針對 lovastatin 濃度進行調整。

6.7 雙相型透明質酸膠體生物相容性之探討


DPSC 在在 HAG100 與 biHAG 生長形態中，大致上是類似的，大多呈現圓球與半圓球的形態，但是 biHAG 可以觀察到較多細胞伸出觸角的現象。本研究



HAG100、HAG80、HAG60 和大部分透明質酸基底的材料類似，都表現出良好的生物相容性、低的細胞毒性。一般透明質酸基底材料會促進細胞遷移。但是在高含水量的水膠或膠體材料中沒有空間讓細胞攤平，而較不利於細胞貼附(Zhu et al., 2006)，和在本研究中 SEM 觀察到形態相似，可以觀察到細胞大多呈現圓球狀或是半圓球狀形態，常會伸出一到兩個觸角，細胞增生後會看到數個細胞在材料的孔洞內，在培養五天後也可以比較容易觀察到材料中有細胞群聚的現象。隨著培養的時間增加，細胞數量有增加的趨勢，圓球狀細胞比例下降，伸出觸角的細胞比例有明顯增加的趨勢。在數量分析上，所有材料組別在培養五天後的細胞數量有明顯增加的趨勢。顯示 biHAG 可以讓 DPSC 在材料中進行分裂與生長的行為。於 SEM 觀察下，相同時間下 HAG80 和 HAG60 的細胞數量略高於 HAG100 多且有較多伸出觸角的細胞，但是沒有統計上的顯著差異，這和未交聯 HA 可能有促進細胞生長分裂行無有關。Lova@biHAG 與同比例的 biHAG 相比較時，DPSC 細胞形態是類似的，呈現球狀與部分伸出觸角的形態，但是不同的是可以觀察到少部分細胞出現微小破孔與凹陷，推測和 lovastatin 濃度過高。導致初期毒性反應出現。即使如此，培養五天後，在 Lova@biHAG 的細胞數量仍然有明顯的增加，微小破孔與凹陷的細胞比例有明顯的減少，推測是培養過程中更換細胞培養液，移除了先前大量釋放的 lovastatin，使細胞生長能力逐漸回復。

材料萃取液對於 DPSC 的存活率與死亡率分析上，沒有明顯的毒性，和 SEM 觀察細胞生長行為有一致的結果。進一步以細胞株 MRPC-1 進行材料萃取液的細胞毒性檢測，發現 Lova@HAG80 及 Lova@HAG60 的 MRPC-1 細胞死亡率約六成。DPSC 為幹細胞，對毒性分子耐受度較高，因此在材料萃取液的研究模型中並沒有表現明顯的毒性。但是在 SEM 觀察細胞生長形態中卻可以觀察到破孔、凹陷的 DPSC 細胞，呈現細胞凋亡的現象，證實 lovastatin 濃度過高對於細胞會產生毒性。

過去研究所使用 statin 濃度範圍落於 0.1~10 μ M，提高 statin 濃度雖然能提升



DPSC 分化鈣化組織能力，但是也會抑制細胞的生長，對細胞的毒性也相對地較大 (Okamoto et al., 2009)，研究中 simvastatin 1 μ M 的濃度細胞毒性較低且有誘導鈣化組織的效果。換算濃度與估算耗損量後，可以選取 50 μ g/ml 的 PLGA-Lova 做為未來研究實驗。另一方面台大李伯訓教授研究團隊中，100 μ g/ml 的 PLGA-Lova 有促進鈣化組織蛋白表現的功效(Ho et al., 2011; Lin et al., 2017)，估算耗損量後，可以選擇 200 μ g/ml 的 PLGA-Lova 進行後續生物相容性測試。整體來說，未來的研究實驗會以 200、100、50 μ g/ml 的 PLGA-Lova 做為與細胞交互作用的濃度，期望能降低毒性同時達到促進 DPSC 細胞分化鈣化組織能力以及促進血管生成的能力。

第七章 結論



本實驗之結果，可以得到以下幾點結論：

1. 本研究使用 BDDE 交聯透明質酸水材料的製程，材料的 BDDE 殘留量皆符合 FDA 的規範。
2. 顆粒型膠體材料之吸水性明顯優於交聯型透明質酸膠體塊材。添加未交聯透明質酸，會影響吸水性質，未交聯透明質酸比例越高，吸水膨脹係數也會越高。
3. biHAG 隨著添加未交聯 HA 比例越高，有較高的液態性質及較低的黏稠度，材料的流動性、可注射性也越好。其中 HAG90 與 HAG80 接近，HAG70 與 HAG60 接近。添加 PLGA-Lova 會略為增加材料的流動性，但是沒有明顯的差異。
4. 利用 FTIR 分析官能基，交聯型透明質酸膠體與各種雙相型透明質酸膠體在 FTIR 分析上與透明質酸鈉鹽標準品並沒有明顯的差異。
5. 膠體材料在移除水分後可以看到多孔性蜂巢狀的空間，此空間大小大約是 50~200 μm ，biHAG 在顯微結構上有較細微的網狀結構。加入 PLGA-Lova 不會改變顯微結構。
6. 不同的膠體組成比例不會影響藥物釋放行為，1~3 天有大量的釋放，7 左右達到高峰。與 PLGA-Lova 相較，Lova@biHAG 在混合藥物過程中耗損量大約是四成。於材料萃取液中 lovastatin 的藥物濃度皆過高，可能會呈現細胞毒性。
7. 未添加 PLGA-Lova 的 biHAG 有良好的 DPSC 細胞生長行為。隨著培養時間增加，細胞數量也會隨之增加。
8. 添加 PLGA-Lova 的 biHAG 的組別，有出現 DPSC 呈現微小破孔與凹陷甚至是細胞凋亡的情形，顯示 Lova@biHA 有潛在的毒性。
9. DPSC 細胞存活率及死亡率的分析中，所有組別的存活率與死亡率都和控制組沒有顯著的差異，顯示有良好的生物相容性。但是 Lova@biHAG 對 MRPC-1

細胞死亡率分析中，則是有約六成的細胞死亡率。

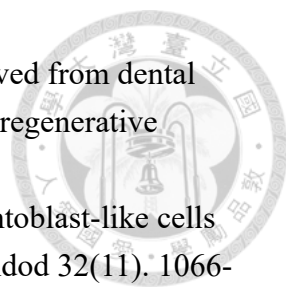
10. 從以上的實驗結果顯示，biHAG 是最適合應用在牙髓組織再生的材料。未來需要去調整 lovastatin 濃度，以獲得最理想的材料設計。

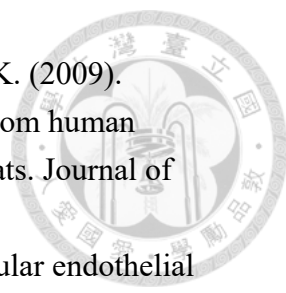


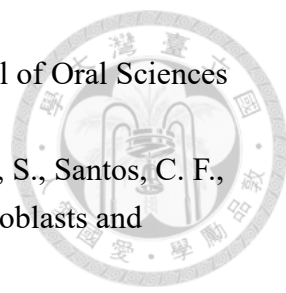
參考文獻

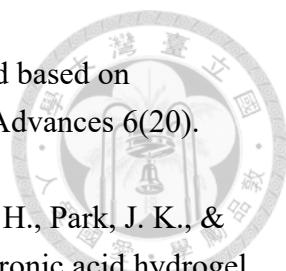


- Andre, P. (2008). New trends in face rejuvenation by hyaluronic acid injections. *J Cosmet Dermatol* 7(4). 251-258.
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine* 8(3). 301-316.
- Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 30(4). 196-200.
- Chrepa, V., Austah, O., & Diogenes, A. (2017). Evaluation of a Commercially Available Hyaluronic Acid Hydrogel (Restylane) as Injectable Scaffold for Dental Pulp Regeneration: An In Vitro Evaluation. *J Endod* 43(2). 257-262.
- Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., Smith, A. J., & Nor, J. E. (2008). Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 34(8). 962-969.
- De Bouille, K., Glogau, R., Kono, T., Nathan, M., Tezel, A., Roca-Martinez, J. X., Paliwal, S., & Stroumpoulis, D. (2013). A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol Surg* 39(12). 1758-1766.
- Feng, H., & Zhang, G. (2012). Determination of free 1, 4-butanediol diglycidyl ether in cross-linked hyaluronic acid gel by fluorospectrophotometry. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* 32(4). 654-657.
- Friedman, S., & Mor, C. (2004). The success of endodontic therapy--healing and functionality. *J Calif Dent Assoc* 32(6). 493-503.
- Galler, K. M., D'Souza, R. N., Hartgerink, J. D., & Schmalz, G. (2011). Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res* 23(3). 333-339.
- Gold, M. H. (2007). Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. *Clinical interventions in aging* 2(3). 369.
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81(8). 531-535.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25). 13625-13630.
- Ho, M. H., Chiang, C. P., Liu, Y. F., Kuo, M. Y., Lin, S. K., Lai, J. Y., & Lee, B. S. (2011). Highly efficient release of lovastatin from poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. *J Orthop Res* 29(10). 1504-1510.

- 
- Huang, Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 88(9). 792-806.
- Huang, Shagramanova, K., & Chan, S. W. (2006). Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod* 32(11). 1066-1073.
- Huang, Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S., & Shi, S. (2010). Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A* 16(2). 605-615.
- Huang. (2011). Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)* 3. 788-800.
- Kablik, J., Monheit, G. D., Yu, L., Chang, G., & Gershkovich, J. (2009). Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol Surg* 35 Suppl 1. 302-312.
- Karbanová, J., Soukup, T., Suchánek, J., Pytlík, R., Corbeil, D., & Mokry, J. (2011). Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low serum-containing medium. *Cells Tissues Organs* 193(6). 344-365.
- Katebzadeh, N., Dalton, B. C., & Trope, M. (1998). Strengthening immature teeth during and after apexification. *J Endod* 24(4). 256-259.
- Kim, J. E., & Sykes, J. M. (2011). Hyaluronic acid fillers: history and overview. *Facial Plast Surg* 27(6). 523-528.
- Kim., Zhou, J., Solomon, C., Zheng, Y., Suzuki, T., Chen, M., Song, S., Jiang, N., Cho, S., & Mao, J. J. (2012). Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dental Clinics* 56(3). 563-575.
- La Gatta, A., Schiraldi, C., Papa, A., & De Rosa, M. (2011). Comparative analysis of commercial dermal fillers based on crosslinked hyaluronan: Physical characterization and in vitro enzymatic degradation. *Polymer degradation and stability* 96(4). 630-636.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science* 260(5110). 920-926.
- Liao, J. K., & Laufs, U. (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45. 89-118.
- Lin, Kok, S.-H., Lee, Y.-L., Hou, K.-L., Lin, Y.-T., Chen, M.-H., Wang, C.-C., & Hong, C.-Y. (2009). Simvastatin as a novel strategy to alleviate periapical lesions. *J Endod* 35(5). 657-662.
- Lin, Tu, H. P., Hsieh, Y. P., & Lee, B. S. (2017). Controlled release of lovastatin from poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for direct pulp capping in rat teeth. *Int J Nanomedicine* 12. 5473-5485.

- 
- Liu, Y.-P., Seçkin, H., İzci, Y., Du, Z. W., Yan, Y.-P., & Başkaya, M. K. (2009). Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 29(4). 780-791.
- Maeda, T., Kawane, T., & Horiuchi, N. (2003). Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology* 144(2). 681-692.
- Malson, T., & Lindqvist, B. L. (1987). Gel of crosslinked hyaluronic acid for use as a vitreous humor substitute.
- Mansbridge, J. (2008). Skin tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 19(8). 955-968.
- Min, K.-S., Lee, Y.-M., Hong, S.-O., & Kim, E.-C. (2010). Simvastatin promotes odontoblastic differentiation and expression of angiogenic factors via heme oxygenase-1 in primary cultured human dental pulp cells. *J Endod* 36(3). 447-452.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10). 5807-5812.
- Nygaard-Ostby, B., & Hjortdal, O. (1971). Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res* 79(5). 333-349.
- Odorico, J. S., Kaufman, D. S., & Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells* 19(3). 193-204.
- Okamoto, Y., Sonoyama, W., Ono, M., Akiyama, K., Fujisawa, T., Oshima, M., Tsuchimoto, Y., Matsuka, Y., Yasuda, T., Shi, S., & Kuboki, T. (2009). Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *J Endod* 35(3). 367-372.
- Pardue, E. L., Ibrahim, S., & Ramamurthi, A. (2008). Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis* 4(4). 203-214.
- Prescott, R. S., Alsanee, R., Fayad, M. I., Johnson, B. R., Wenckus, C. S., Hao, J., John, A. S., & George, A. (2008). In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 34(4). 421-426.
- Reichert, J. C., & Hutmacher, D. W. (2011). Bone tissue engineering *Tissue Engineering* (pp. 431-456): Springer.
- Roberts-Clark, D. J., & Smith, A. J. (2000). Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 45(11). 1013-1016.
- Rutherford, R. B., & Gu, K. (2000). Treatment of inflamed ferret dental pulps with

- 
- recombinant bone morphogenetic protein-7. *European Journal of Oral Sciences* 108(3). 202-206.
- Sakai, V. T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K. G., Machado, M. A., Shi, S., Santos, C. F., & Nor, J. E. (2010). SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 89(8). 791-796.
- Sedgley, C. M., & Messer, H. H. (1992). Are endodontically treated teeth more brittle? *J Endod* 18(7). 332-335.
- Silva, T. D., Oliveira, M. A., de Oliveira, R. B., & Vianna-Soares, C. D. (2012). Development and validation of a simple and fast HPLC method for determination of lovastatin, pravastatin and simvastatin. *J Chromatogr Sci* 50(9). 831-838.
- Skaletz-Rorowski, A., & Walsh, K. (2003). Statin therapy and angiogenesis. *Current opinion in lipidology* 14(6). 599-603.
- Skoglund, B., Forslund, C., & Aspenberg, P. (2002). Simvastatin improves fracture healing in mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 17(11). 2004-2008.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C. Y., Wang, S., & Shi, S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 1. e79.
- Stern, R. (2004). Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* 83(7). 317-325.
- Stirewalt, D., Appelbaum, F., Willman, C., Zager, R., & Banker, D. (2003). Mevastatin can increase toxicity in primary AMLs exposed to standard therapeutic agents, but statin efficacy is not simply associated with ras hotspot mutations or overexpression. *Leukemia research* 27(2). 133-145.
- Sundaram, H., Voigts, B., Beer, K., & Meland, M. (2010). Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid. *Dermatol Surg* 36 Suppl 3. 1859-1865.
- Wang, X., Thibodeau, B., Trope, M., Lin, L. M., & Huang, G. T. (2010). Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 36(1). 56-63.
- Wei, X., Ling, J., Wu, L., Liu, L., & Xiao, Y. (2007). Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod* 33(6). 703-708.
- Weis, M., Heeschen, C., Glassford, A. J., & Cooke, J. P. (2002). Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 105(6). 739-745.
- Williams, D., & Feely, J. (2002). Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 41(5). 343-370.

- 
- Yang, R., Tan, L., Cen, L., & Zhang, Z. (2016). An injectable scaffold based on crosslinked hyaluronic acid gel for tissue regeneration. *RSC Advances* 6(20). 16838-16850.
- Yeom, J., Bhang, S. H., Kim, B. S., Seo, M. S., Hwang, E. J., Cho, I. H., Park, J. K., & Hahn, S. K. (2010). Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration. *Bioconjug Chem* 21(2). 240-247.
- Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L. W., Weinberg, K., Barr, M. L., Demetriou, A., & Wu, G. D. (2006). The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem cells* 24(4). 928-935.

附錄

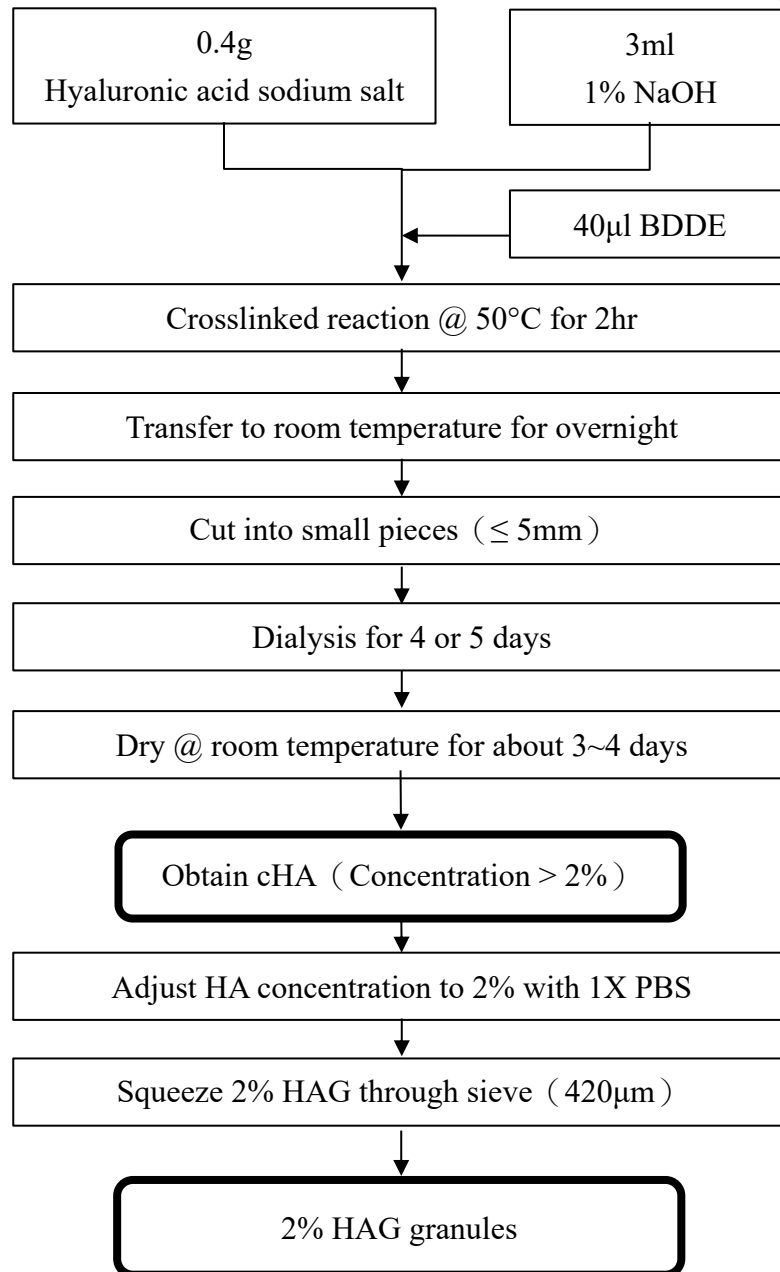


圖 1：交聯型透明質酸膠體（HAG）材料製備流程圖。

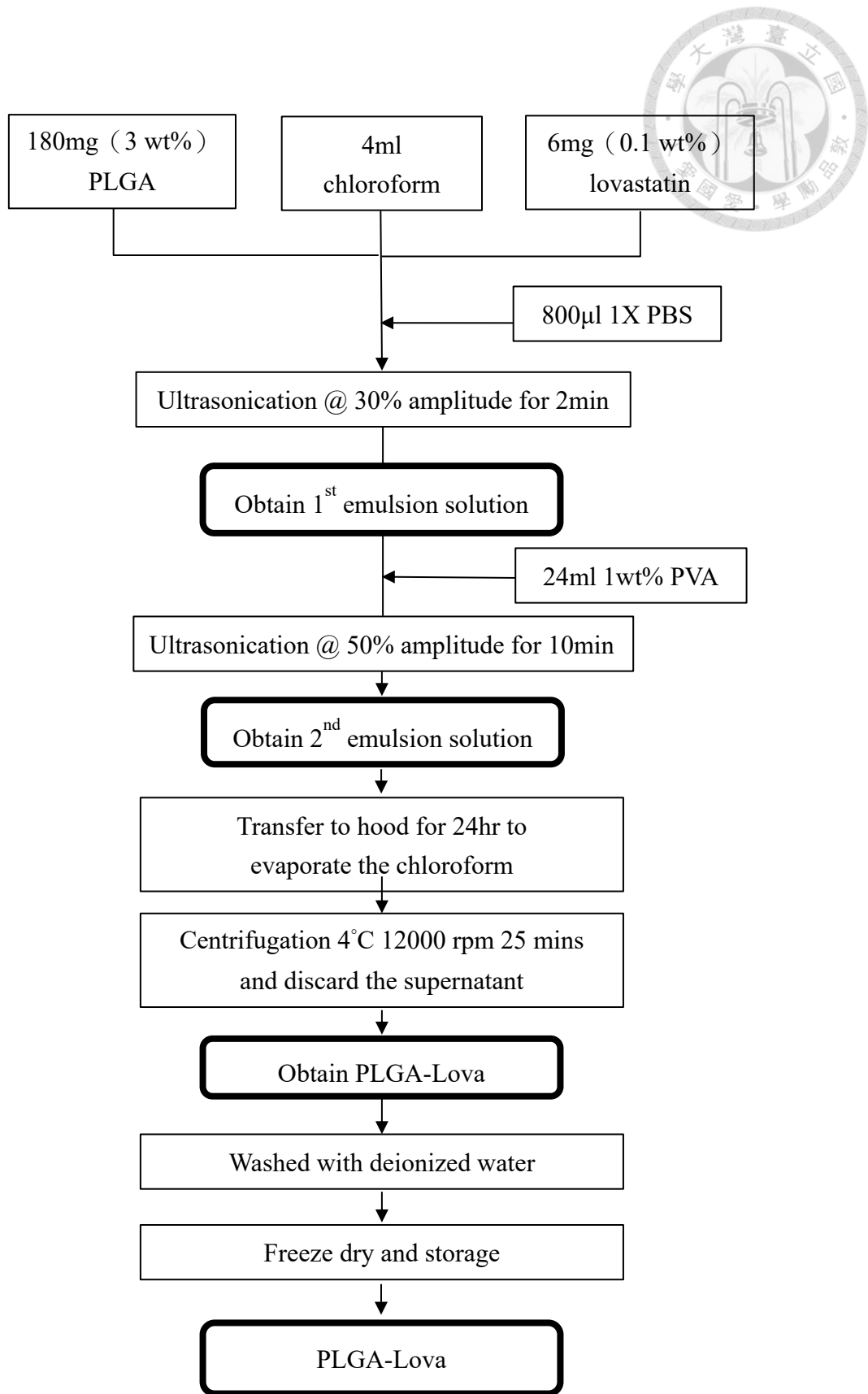


圖 2：包覆洛伐他汀之聚乳酸聚甘醇酸奈米顆粒（PLGA-Lova）材料製備流程。

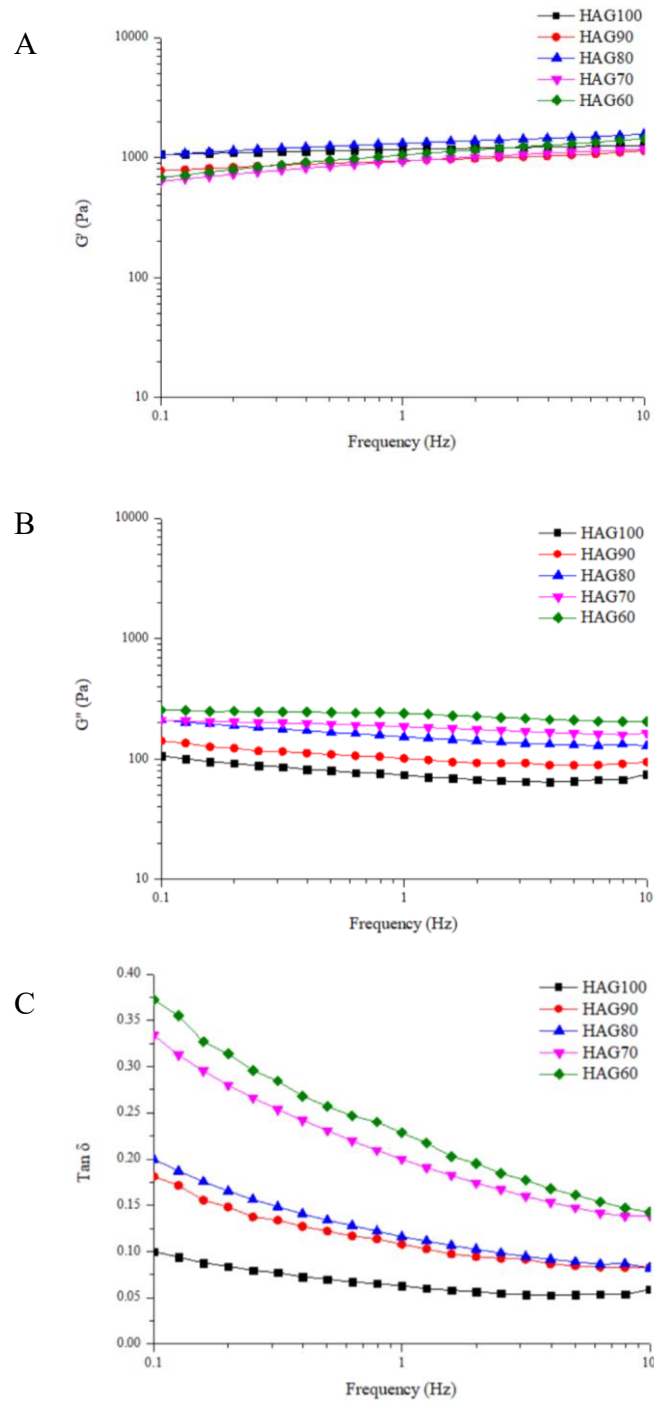


圖 3：各種雙相型透明質酸膠體流變性質分析。(A) 儲存模數 (Storage modulus)；(B) 損耗模數 (Loss modulus)；(C) 損耗因子 (Tan δ)。

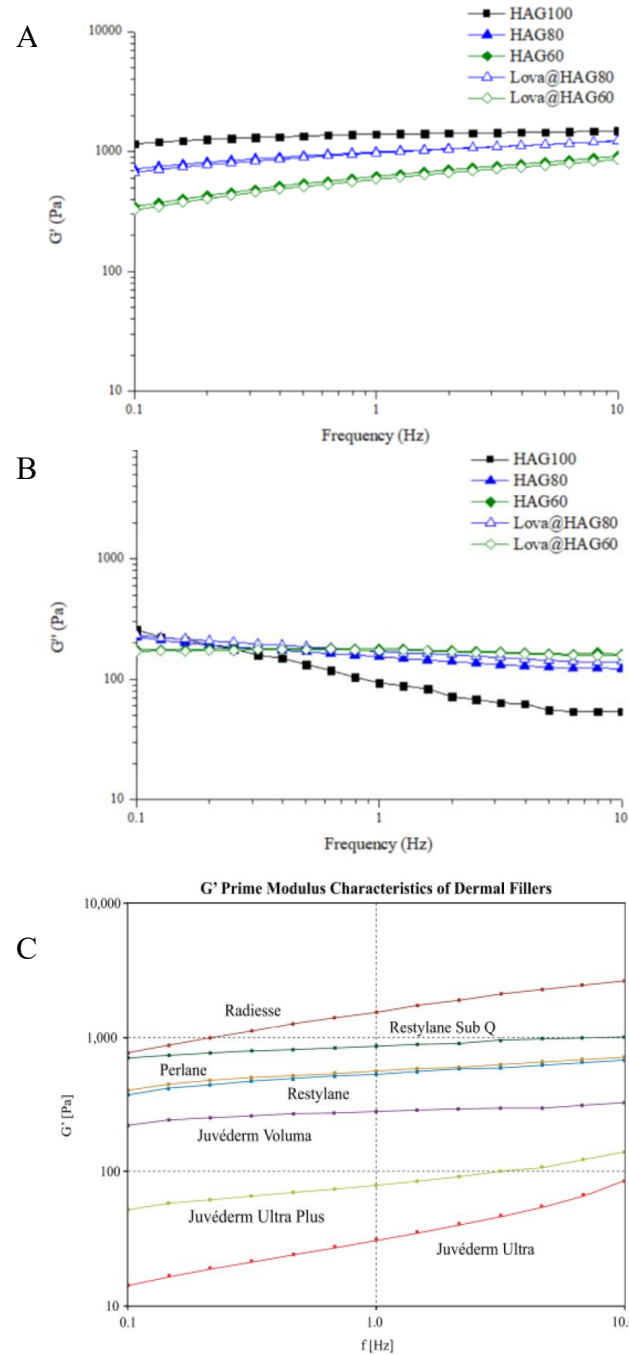


圖 4：各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體流變性質分析。(A) 儲存模數 (Storage modulus)；(B) 損耗模數 (Loss modulus)；(C) 市售透明質酸儲存模數分析。(圖片引用自 Sundaram et al., 2010)。

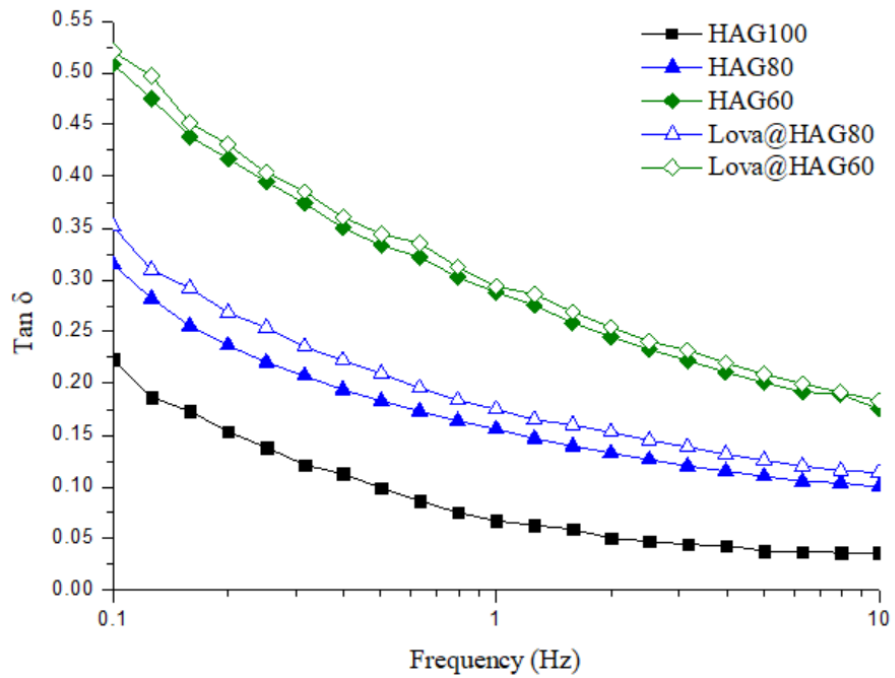


圖 5：各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體之損耗因子 (Tan δ) 分析。

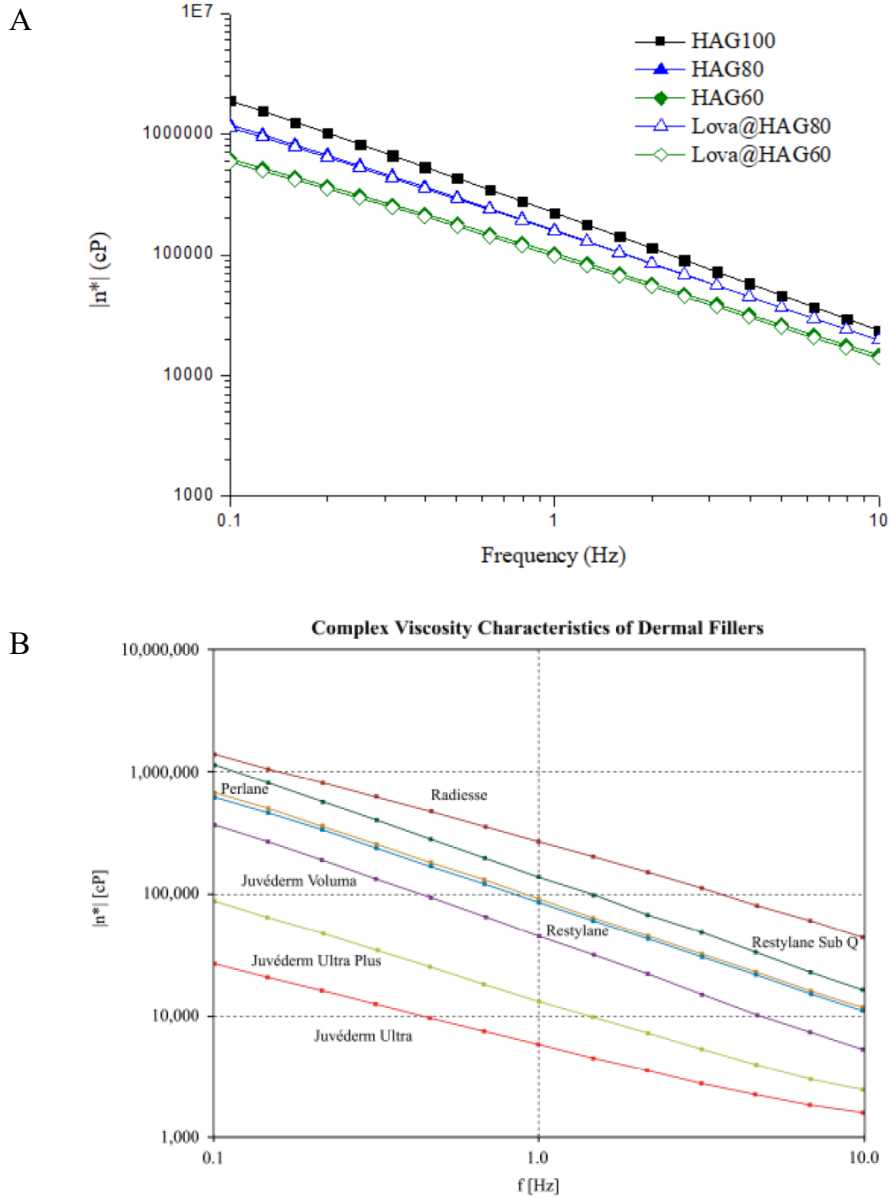


圖 6：(A) 各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體之複黏度 (Complex viscosity)。(B) 市售透明質酸膠體之複黏度分析。(圖片引用自 Sundaram et al., 2010)。

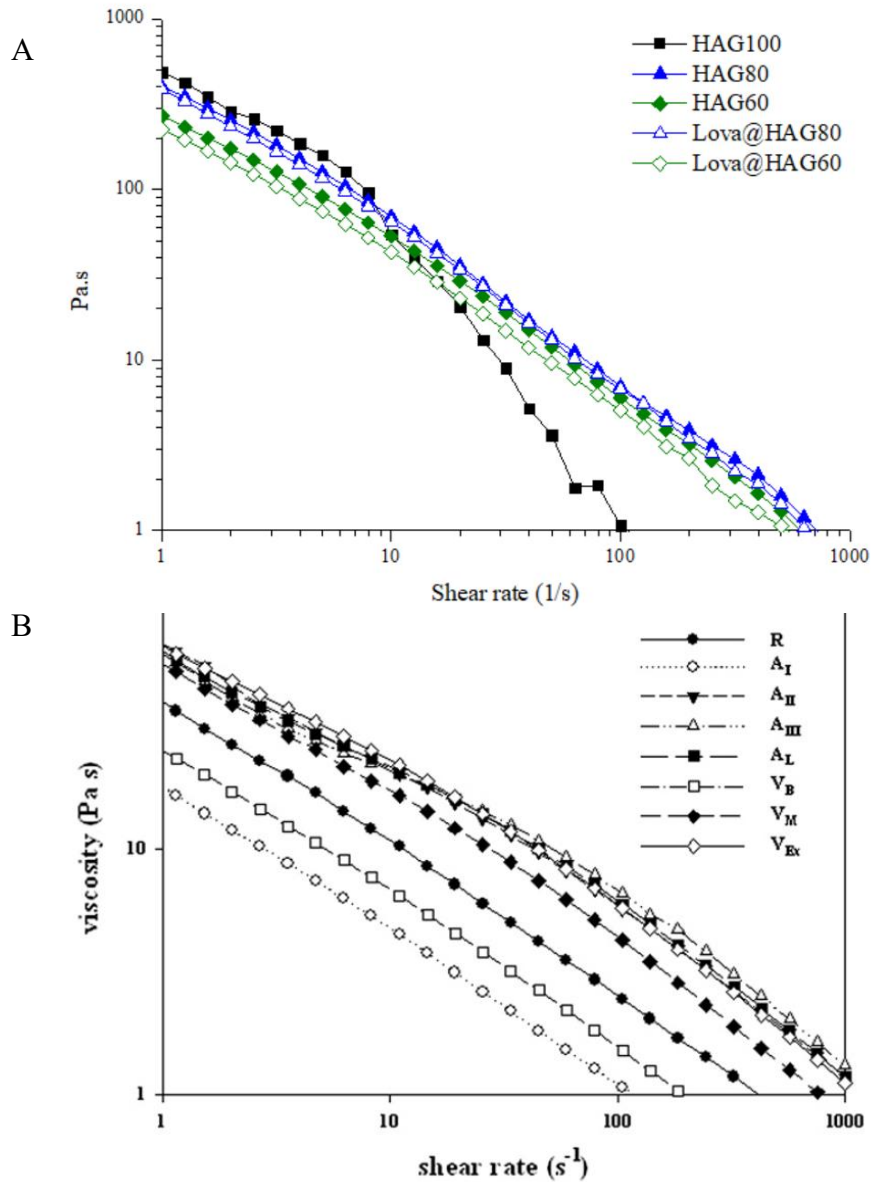


圖 7：(A) 各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體之黏稠度 (Viscosity)。(B) 市售透明質酸膠體的黏稠度分析。(R：Restylane。A_I：Amalian I。A_{II}：Amalian II。A_{III}：Amalian III。A_L：Amalian Lips。V_B：Viscofill Basic。V_M：Viscofill Medium。V_{Ex}：Viscofill Extra。)(圖片引用自 La Gatta et al., 2011)。

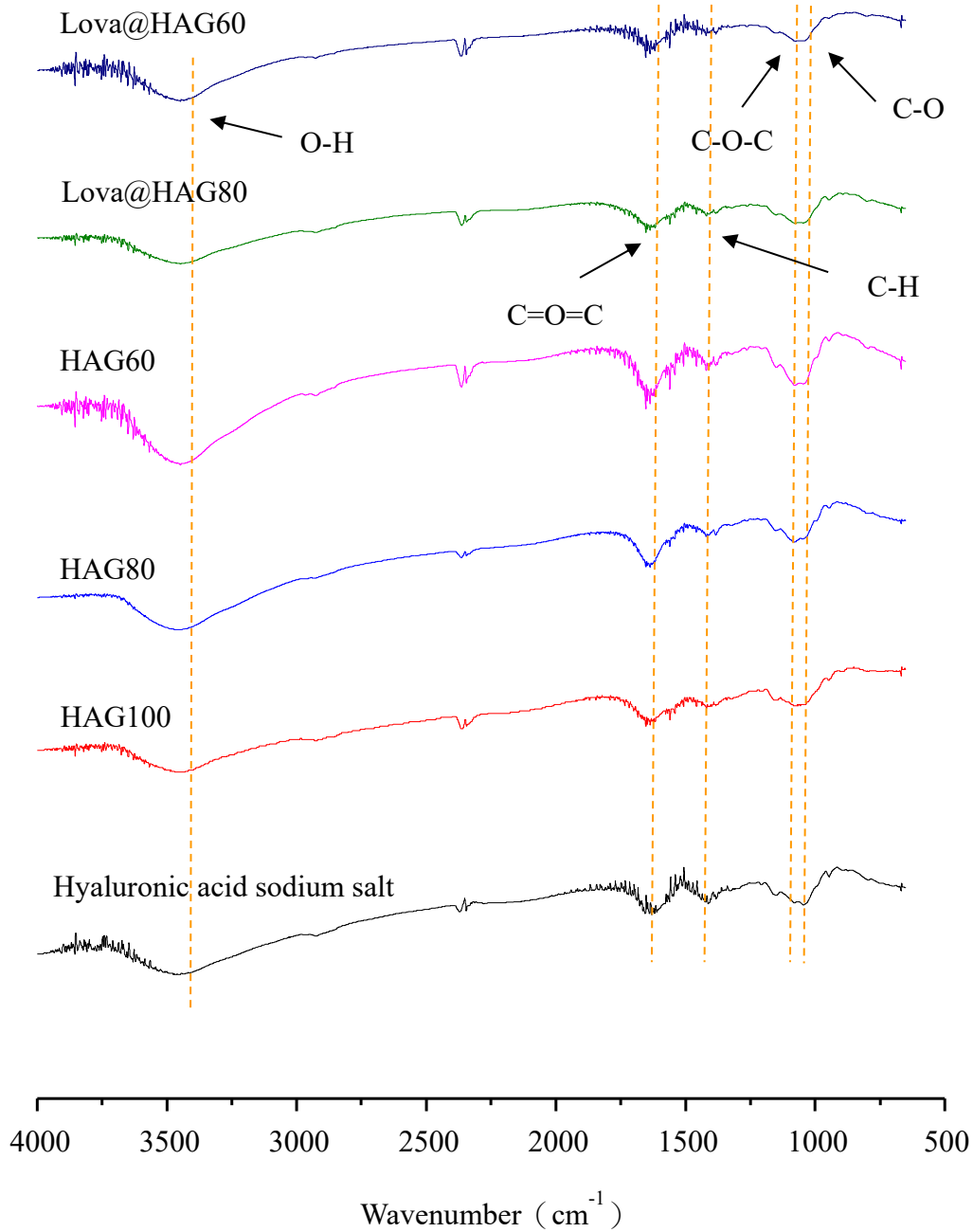
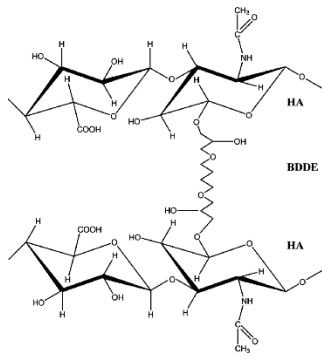


圖 8：各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體之傅里葉轉換紅外光譜。

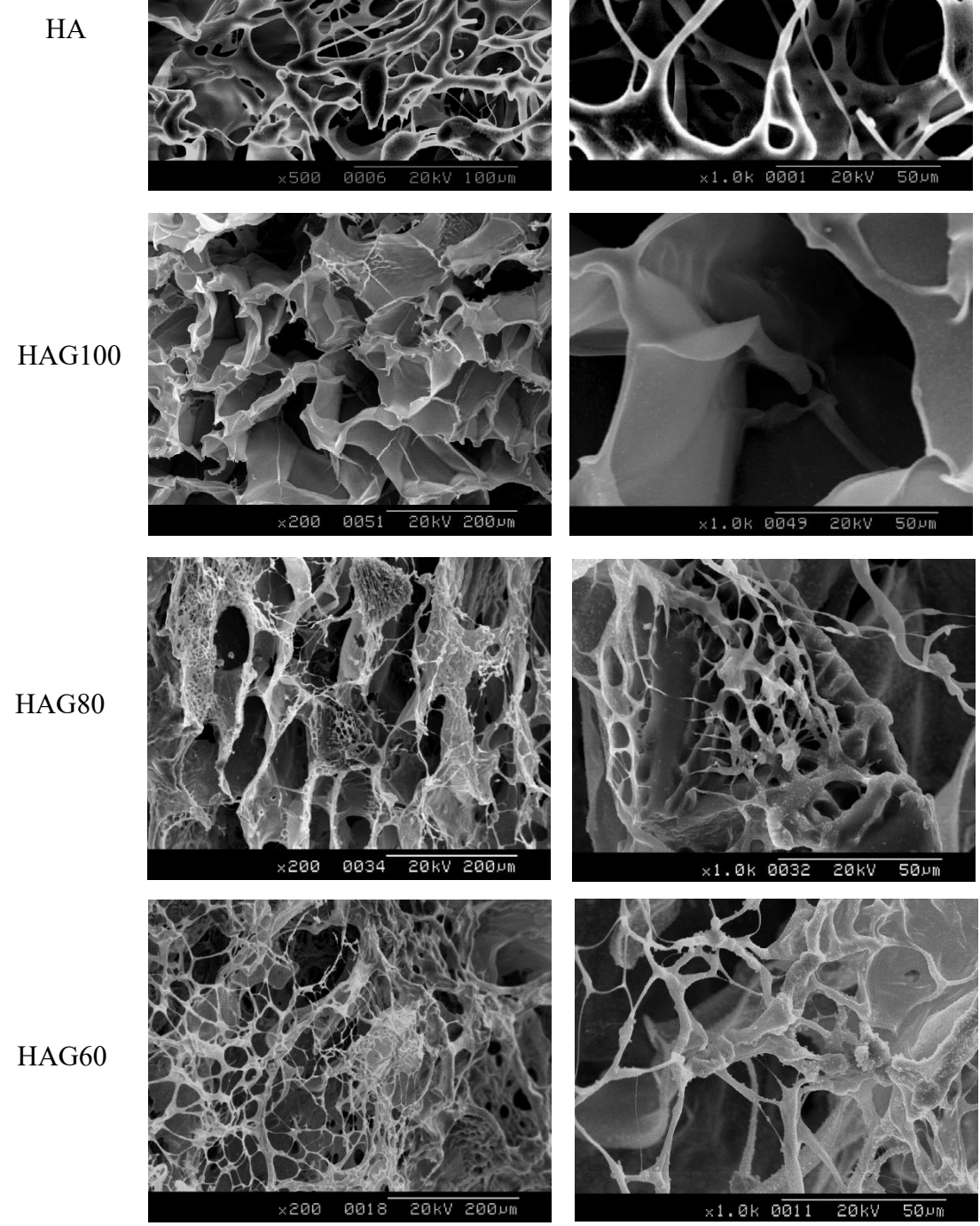
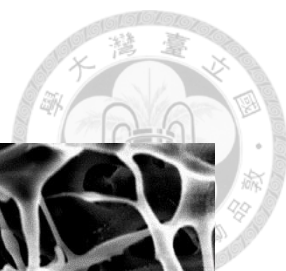


圖 9：各種雙相型透明質酸膠體及搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體材料結構分析。

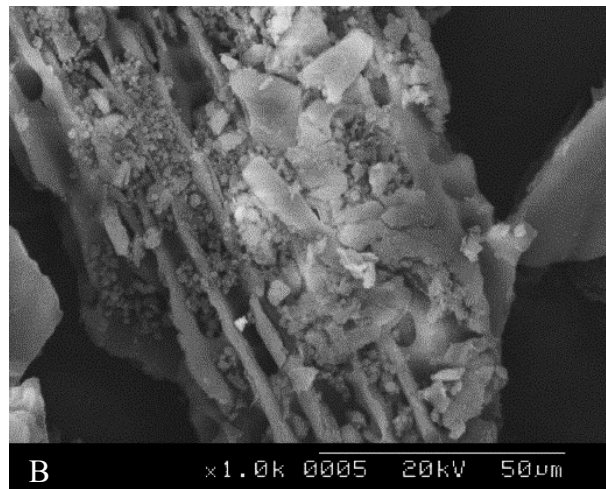
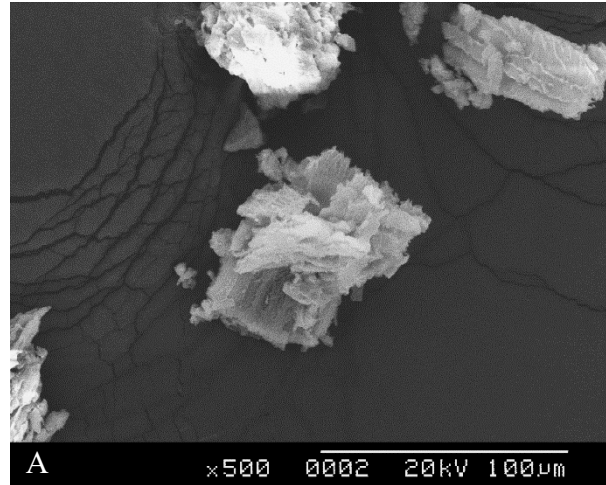


圖 10：PLGA-Lova 粉末結構分析。(A) 放大倍率 500；(B) 放大倍率 1000。

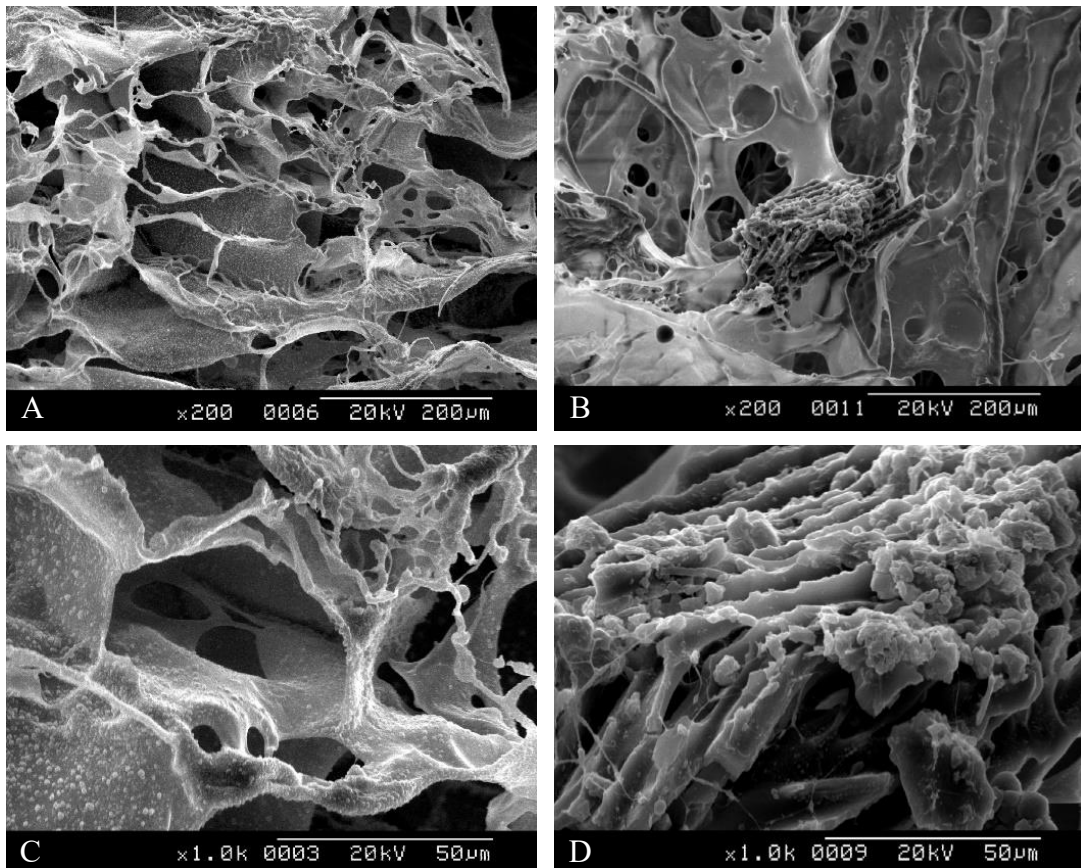


圖 11 : Lova@HAG80 結構分析。

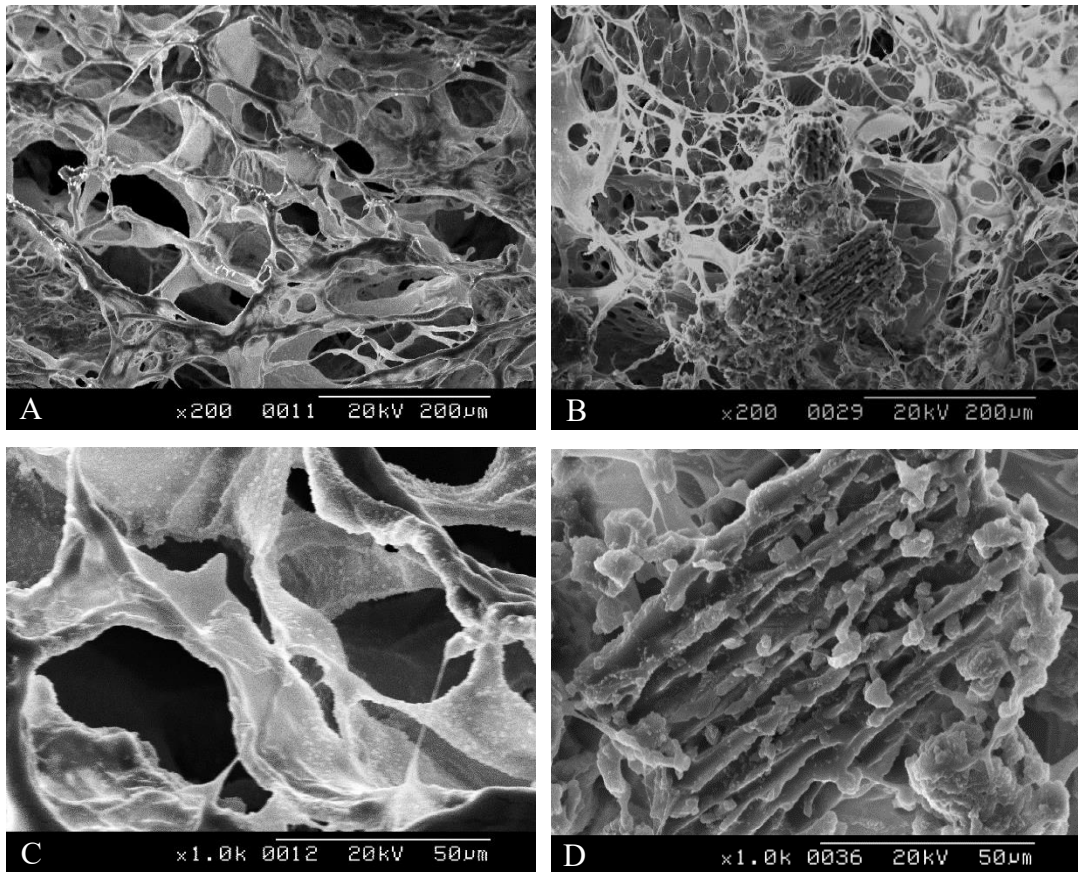
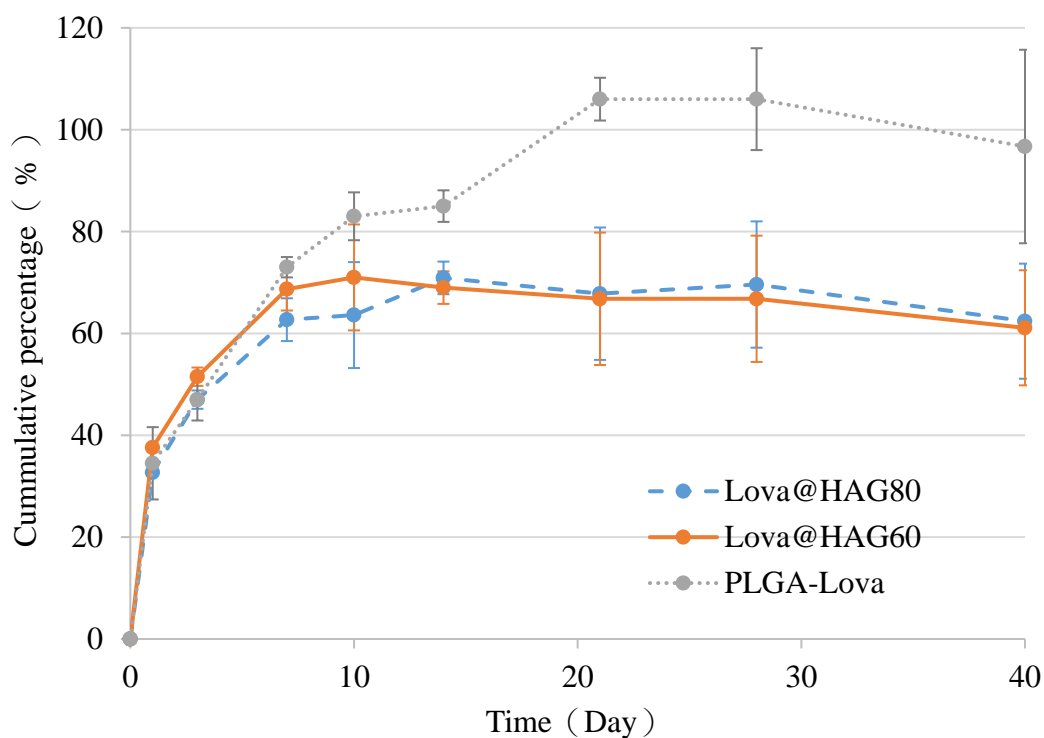


圖 12：Lova@HAG60 結構分析。

A



B

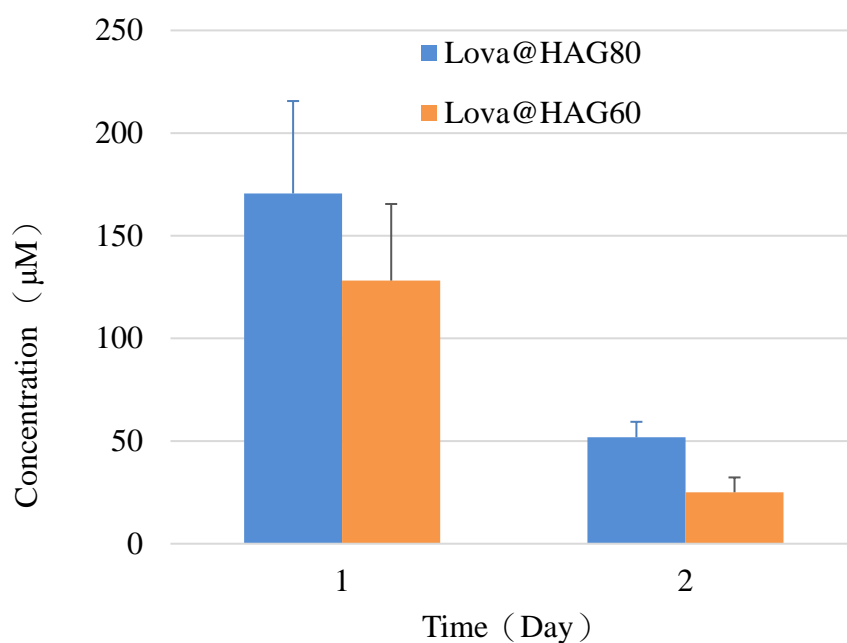
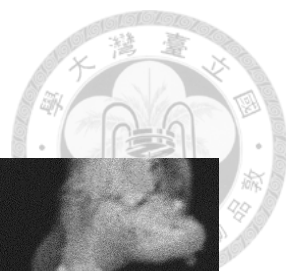


圖 13：(A) 各種搭載洛伐他汀之雙相型透明質酸膠體 (Lova@biHAG) 與 PLGA-Lova 於 PBS 釋放 lovastatin 行為。(B) 材料萃取液模型中各種材料釋放 lovastatin 的濃度分析 (μM , Mean \pm SD)。



一天

五天

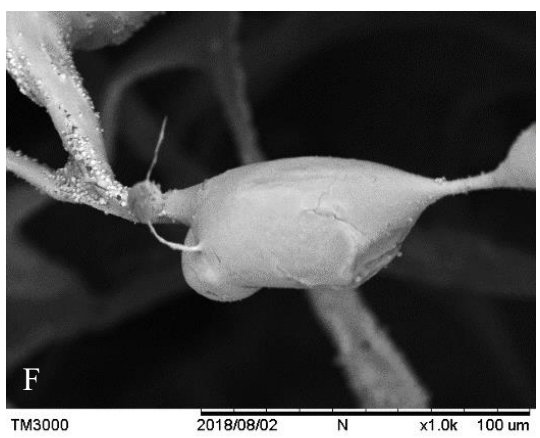
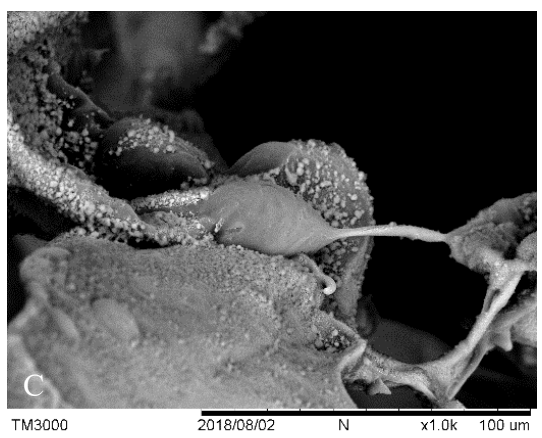
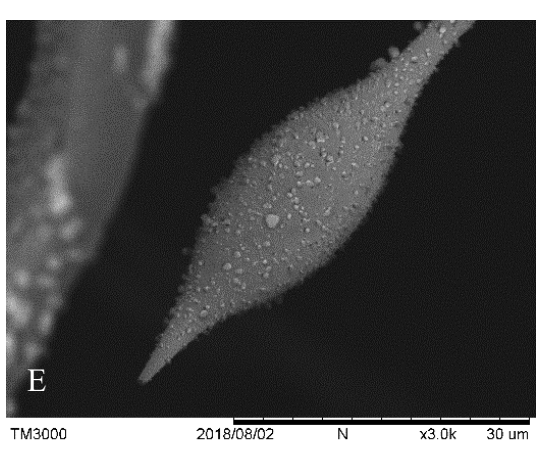
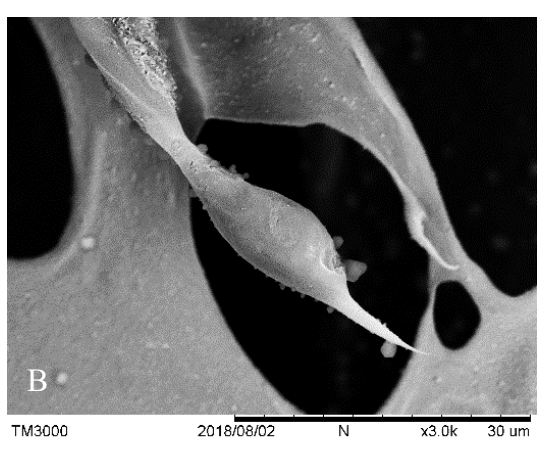
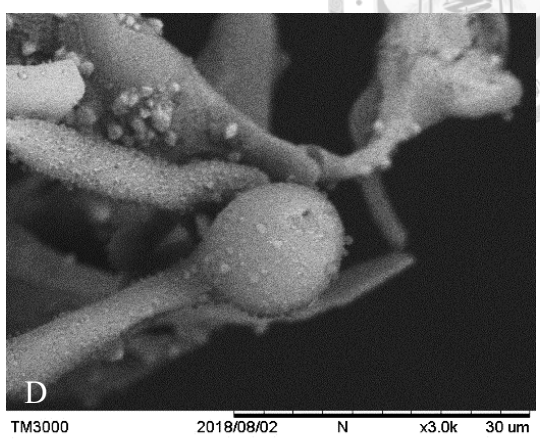
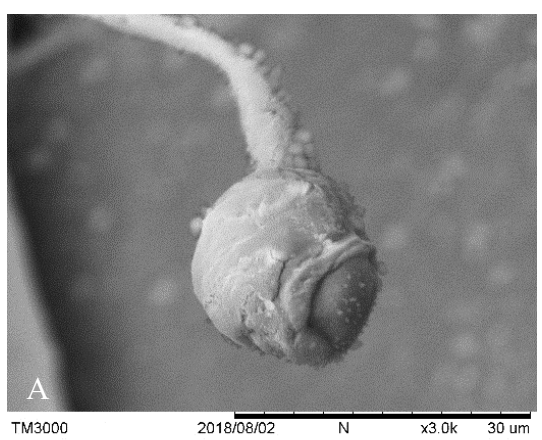
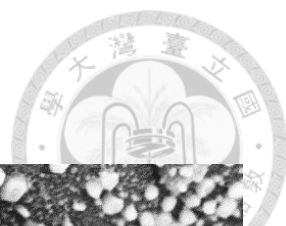


圖 14：DPSC 與 HAG100 共同培養一天（左側）與五天（右側）之 DPSC 細胞生長形態。



一天

五天

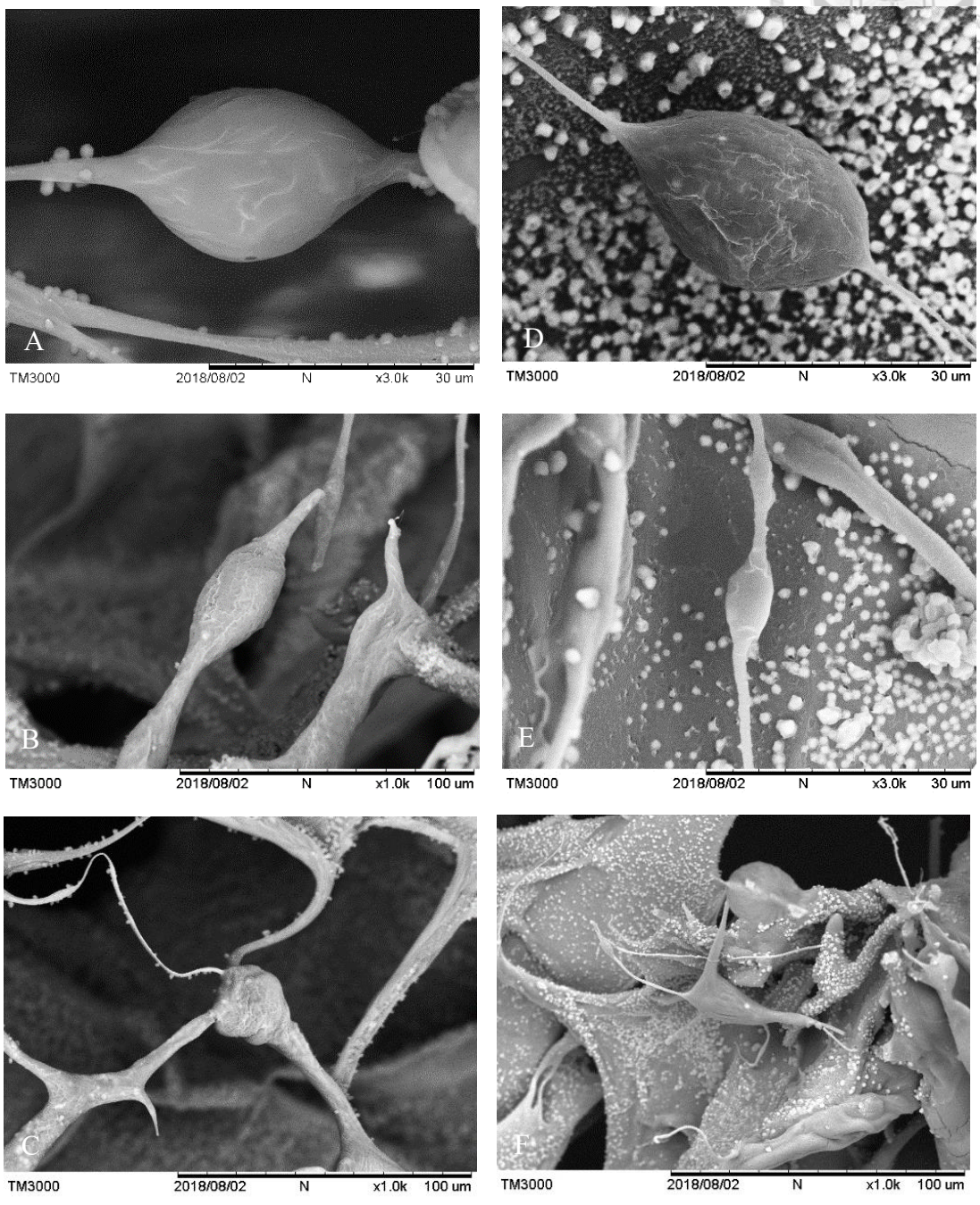


圖 15：DPSC 與 HAG80 共同培養一天（左側）與五天（右側）之 DPSC 細胞生長形態。

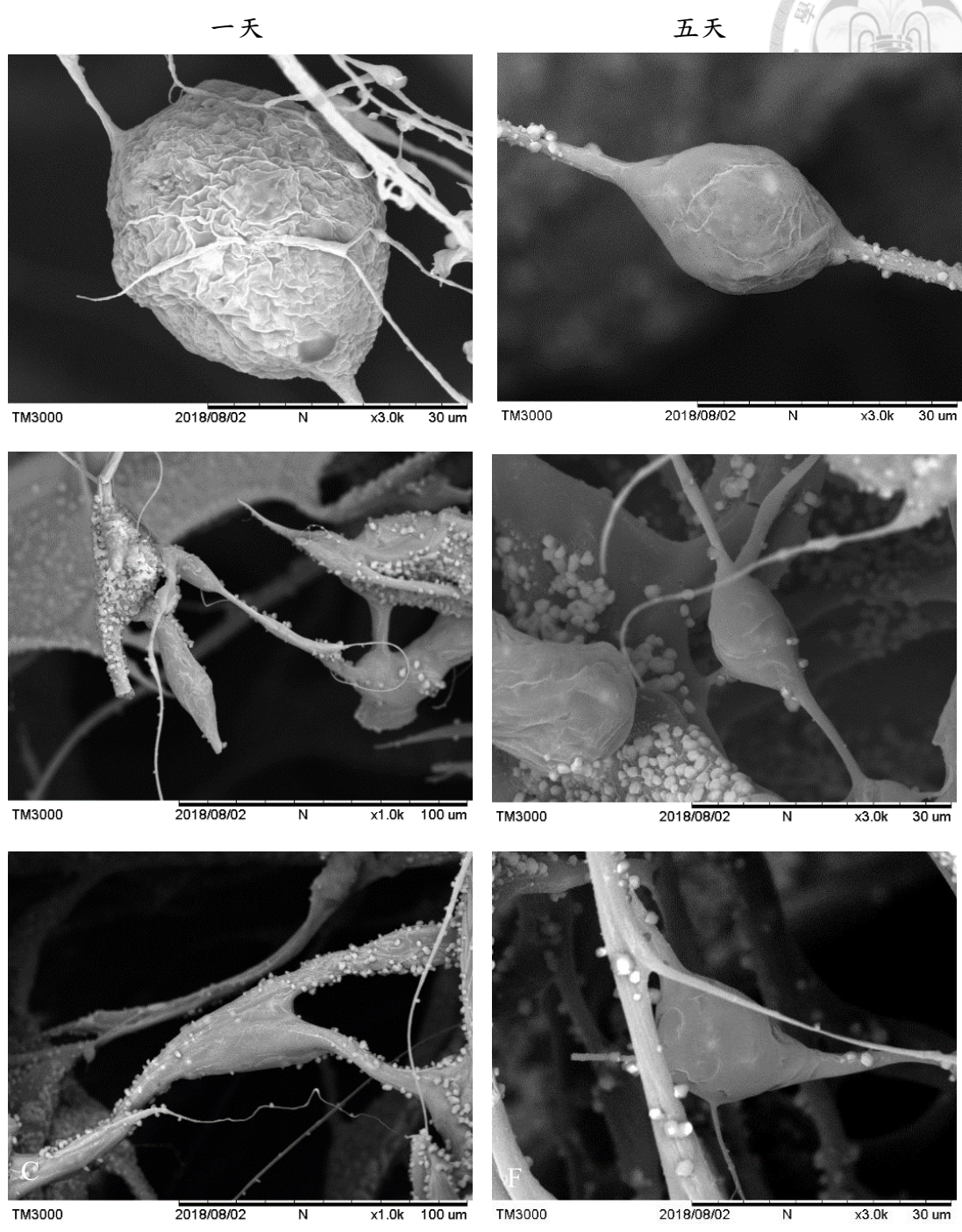


圖 16：DPSC 與 HAG60 共同培養一天（左側）與五天（右側）之 DPSC 細胞生長形態。

一天

五天

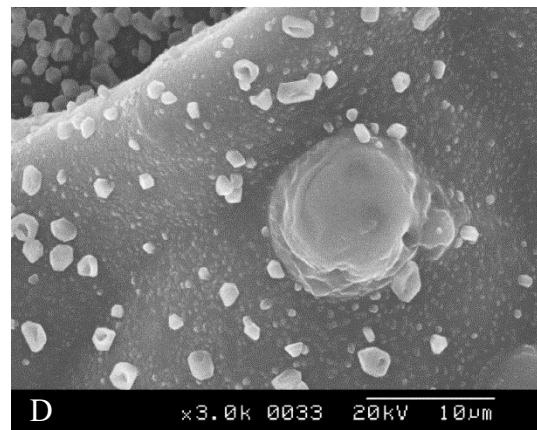
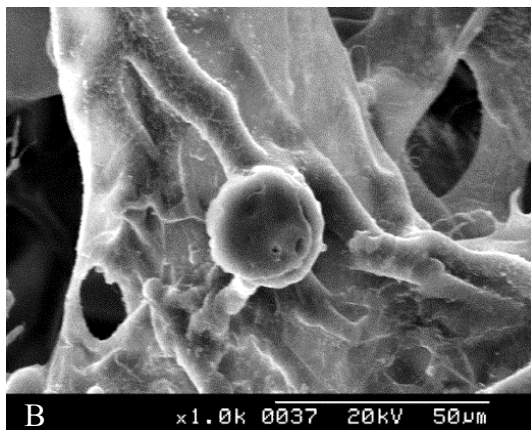
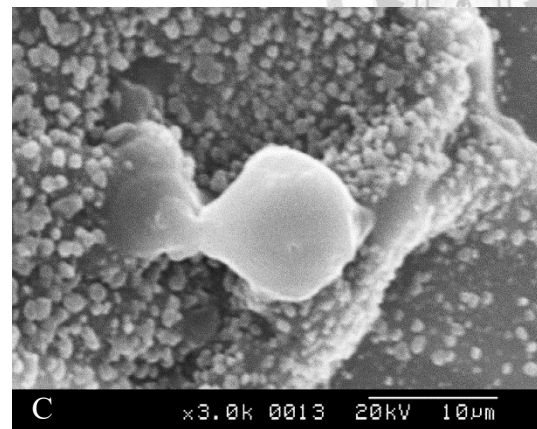
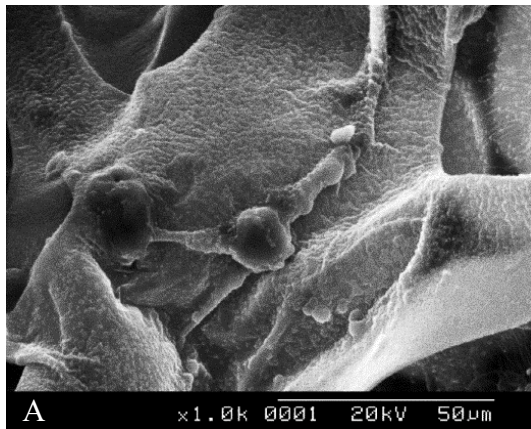
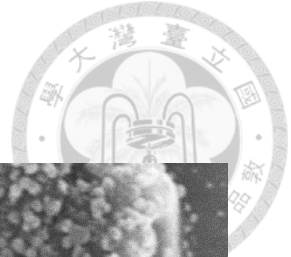


圖 17：DPSC 與 Lova@HAG80 共同培養一天（左側）與五天（右側）之 DPSC 細胞生長形態。

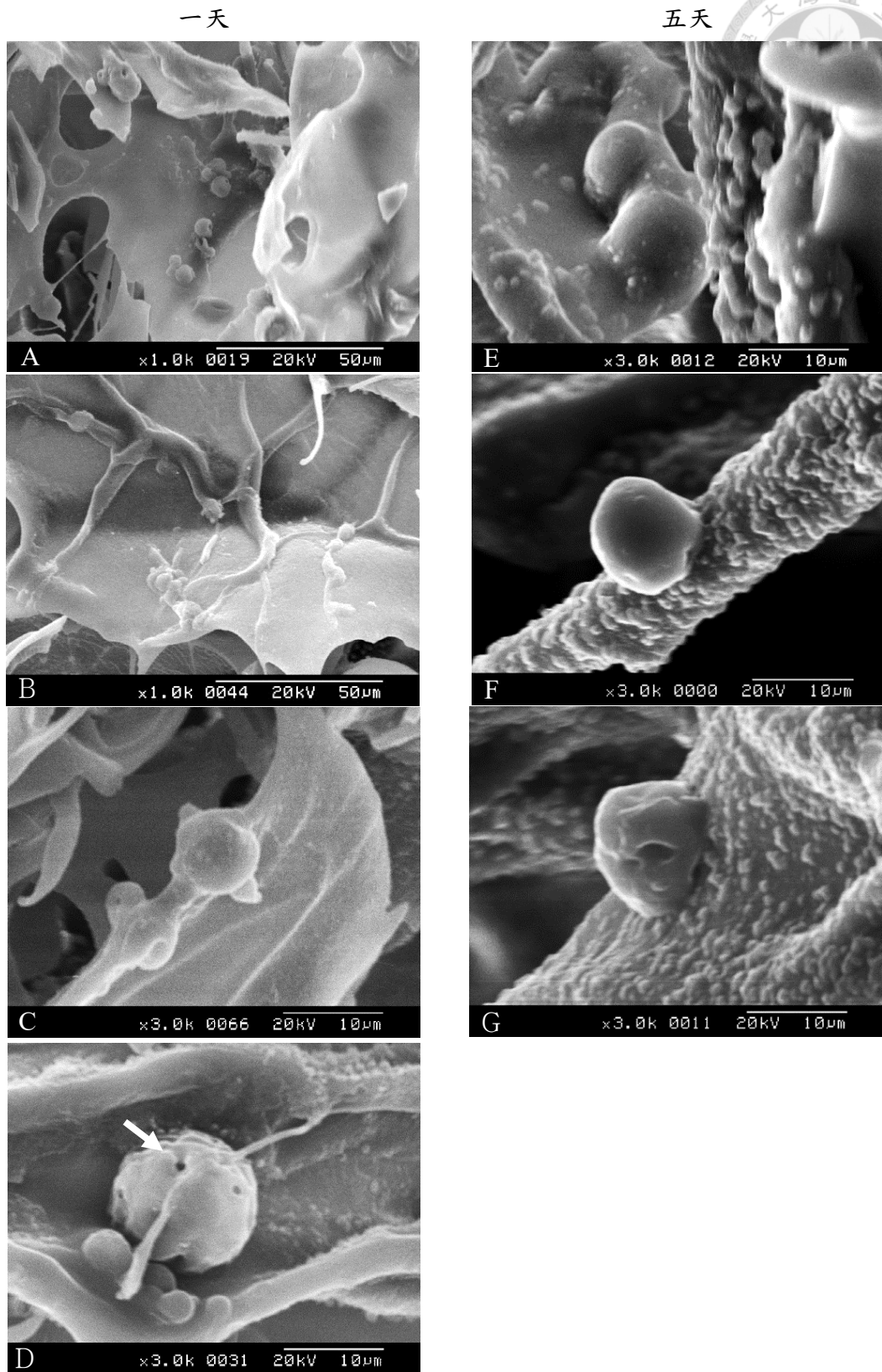


圖 18：DPSC 與 Lova@HAG60 共同培養一天（左側）與五天（右側）之 DPSC 細胞生長形態。



表 1 HAG 材料名稱與組成

材料	名稱	組成		
		2% HAG (w/w%)	2% HA (w/w%)	PLGA-Lova
HAG	HAG100	100%	0	-
biHAG	HAG90	90%	10%	-
	HAG80	80%	20%	-
	HAG70	70%	30%	-
	HAG60	60%	40%	-
Lova@biHAG	Lova@HAG80	80%	20%	+
	Lova@HAG60	60%	40%	+

PLGA-Lova: 0.2% PLGA-Lova in biHAG

表 2 不同透析時間 HAG 產物製程之 BDDE 殘餘量分析 (ppm)

透析時間	4 天	5 天	¹ P value
Mean	0.70	0.04	0.015*
SD	0.21	0.08	

¹Paired sample t test, $\alpha = 0.05$



表 3A HAG 塊材與雙相型透明質酸膠體膨脹係數分析

材料	膨脹係數
HAG 塊材	41.30 ± 1.30
HAG100	135.61 ± 5.16
HAG80	151.12 ± 12.50
HAG60	192.93 ± 5.33

One way ANOVA ($\alpha=0.05$), $P < 0.0001$ 。

表 3B Tukey 多變相比較法 ($\alpha=0.05$)

	HAG 塊材	HAG100	HAG80
HAG 塊材			
HAG100	0.000*		
HAG80	0.000*	0.116	
HAG60	0.000*	0.001*	0.001*

表 4 雙相型透明質酸膠體培養 1 天與 5 天於 SEM 觀察細胞顆數分析

	HAG100	HAG80	HAG60	¹ P-value
1 天	3.0 ± 0.60	3.46 ± 1.10	3.0 ± 0.4	0.143
5 天	6.0 ± 0.34	7.6 ± 0.52	7.2 ± 1.44	
² P-value	0.0017*	0.0041*	0.0082*	

¹ Two way ANOVA, $\alpha=0.05$

² T test, $\alpha=0.05$

表 5A 材料萃取液模型培養一天 DPSC 細胞存活率分析結果

	N	平均值	標準差	平均值 95%		最小值	最大值
				信賴區間			
				下界	上界		
HAG100	5	119.84	13.99	102.46	137.22	108.91	138.99
HAG80	5	118.03	3.32	113.90	122.16	114.16	121.90
HAG60	5	122.06	5.73	114.94	129.19	115.63	131.00
Lova@HAG80	5	126.56	6.00	119.11	134.01	116.17	130.79
Lova@HAG60	5	115.40	11.8	100.74	130.07	103.42	134.63
Control	10	100.00	4.11	97.23	102.76	93.74	106.85

N：樣本數；one way ANOVA ($\alpha=0.05$), $P < 0.001^*$

表 5B Games Howell 檢定 ($\alpha=0.05$)

	HAG100	HAG80	HAG60	Lova@HAG80	Lova@HAG60
HAG80	1.000				
HAG60	0.999	0.748			
Lova@HAG80	0.906	0.183	0.821		
Lova@HAG60	0.992	0.995	0.851	0.487	
Control	0.168	0.000*	0.002*	0.001*	0.210

表 6A 材料萃取液模型培養一天 DPSC 細胞死亡率分析結果

	N	平均值	標準差	平均值 95%		最小值	最大值
				信賴區間			
				下界	上界		
HAG100	5	6.14	4.17	0.96	11.32	2.06	12.38
HAG80	5	4.57	2.92	0.93	8.20	1.93	9.36
HAG60	5	5.55	2.70	2.19	8.91	2.64	8.37
Lova@HAG80	5	2.28	3.01	-1.46	6.02	-1.20	5.85
Lova@HAG60	5	1.81	3.42	-2.43	6.06	-2.19	6.27
Control	6	-0.0003	0.719	-0.75	0.75	-0.83	1.01
mLDH	6	99.99	8.58	90.98	109.01	88.11	109.06


N：樣本數，mLDH: 最大死亡；one way ANOVA ($\alpha=0.05$), $P < 0.001^*$

表 6B Games Howell 檢定 ($\alpha=0.05$)

	HAG100	HAG80	HAG60	Lova@HAG80	Lova@HAG60
HAG80	0.989				
HAG60	1.000	0.997			
Lova@HAG80	0.647	0.870	0.577		
Lova@HAG60	0.585	0.805	0.522	1.000	
Control	0.176	0.148	0.060	0.669	0.879
mLDH	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*

N：樣本數，mLDH: 最大死亡

表 7A 材料萃取液模型培養一天 MRPC-1 細胞死亡率分析結果



	N	平均值	標準差	平均值 95%		最小值	最大值
				信賴區間			
				下界	上界		
HAG100	5	9.37	2.90	5.77	12.98	5.47	13.45
HAG80	5	7.82	2.45	4.77	10.88	6.05	11.55
HAG60	5	8.86	1.74	6.70	11.03	7.26	11.00
Lova@HAG80	5	62.50	3.24	58.47	66.52	57.06	65.10
Lova@HAG60	5	59.20	6.82	50.72	67.67	49.91	66.85
Control	6	0.00	0.20	-0.20	0.21	-0.23	0.26
mLDH	6	100.00	1.61	98.30	101.69	98.04	102.04

N：樣本數，mLDH: 最大死亡；one way ANOVA ($\alpha=0.05$), $P < 0.001^*$

表 7B Games Howell 檢定 ($\alpha=0.05$)

	HAG100	HAG80	HAG60	Lova@HAG80	Lova@HAG60
HAG80	0.960				
HAG60	1.000	0.981			
Lova@HAG80	0.000*	0.000*	0.000*		
Lova@HAG60	0.000*	0.000*	0.000*	0.942	
Control	0.013*	0.014*	0.002*	0.000*	0.000*
mLDH	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.001*

N：樣本數，mLDH: 最大死亡