

國立臺灣大學醫學院口腔生物科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Oral Biology College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

人類胚胎上顎間質細胞在不同無機鹽聚己內酯複合

材上之成骨細胞活性

Osteoblastic activity of human embryonic palatal mesenchymal cells
cultured on different inorganic-polycaprolactone composites



Yu-Lun Pao

指導教授：李伯訓 副教授

郭彥彬 教授

Advisor: Bor-Shiunn Lee, Associate Professor

Yen-Ping Kuo, Professor

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

目 錄

口試委員會審定書.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
第一章 背景	
1.1 骨生理概述.....	1
1.1.1 骨骼的生長.....	1
1.1.2 骨骼的形成和再塑過程.....	3
1.1.3 骨生理相關基因.....	5
1.1.4 骨誘導.....	8
1.2 骨無機相礦物基質組成.....	12
1.3 骨填補材的市場需求及產品現況.....	13
1.4 骨填補材生醫陶瓷.....	14
1.4.1 磷酸鈣鹽類生醫陶瓷.....	15
1.4.2 硫酸鈣類生醫陶瓷.....	17
1.5 複合型骨填補材的選擇.....	18
1.5.1 聚己內酯(PCL, Poly(e- caprolactone))	19
1.5.2 共構聚己內酯及氫氧化鋁之複合型骨填補材.....	21
1.6 幹細胞與幹性相關基因.....	22

1.6.1 幹細胞.....	22
1.6.2 幹性相關基因.....	23
1.7 實驗目的.....	25

第二章 研究材料與方法

2.1 所使用細胞株及細胞培養條件.....	28
2.2 人類胚胎上頸間質細胞分裂複製能力試驗.....	29
2.3 人類胚胎上頸間質細胞免疫染色.....	30
2.4 人類胚胎上頸間質細胞誘導實驗.....	31
2.4.1 人類胚胎上頸間質細胞鹼性磷酸酵素染色法.....	31
2.4.2 人類胚胎上頸間質細胞礦物質沉積染色.....	33
2.4.3 人類胚胎上頸間質細胞礦物質穿透式電子顯微鏡檢測	34
2.5 材料的合成.....	34
2.5.1 鹽類的選擇與製備.....	34
2.5.2 複合材混合液及二維薄膜型、三維支架型與複合材微粒製備方法.....	35
2.5.2.1 複合材混合液製備.....	35
2.5.2.2 二維(2D)薄膜型複合材製備方法.....	35
2.5.2.3 三維(3D)支架型複合材製備方法.....	36

2.6 掃瞄式電子顯微鏡之樣本製備.....	36
2.7 二維薄膜細胞培養方法.....	37
2.8 生物毒性測試.....	37
2.9 核糖核酸的製備與定量與反轉錄聚合酶反應.....	38
2.9.1 核糖核酸的製備與定量.....	38
2.9.2 反轉錄聚合酶反應.....	39
2.10 及時定量聚合酵素鏈鎖反應.....	40
2.11 動物實驗.....	41

第三章 結果

3.1 人類胚胎上頸間質細胞分裂複製能力試驗實驗結果.....	43
3.2 人類胚胎上頸間質細胞幹性相關基因免疫染色實驗結果	43
3.3 間質細胞表面抗原免疫染色實驗結果.....	44
3.4 人類胚胎上頸間質細胞誘導實驗.....	45
3.4.1 鹼性磷酸酵素染色實驗結果.....	45
3.4.2 礦物質沉積染色實驗結果.....	45
3.4.3 及時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗結果.....	46
3.4.4 礦化物質穿透式電子顯微鏡實驗結果.....	46
3.4.4.1 骨誘導礦化物質穿透式電子顯微鏡實驗結果.....	46

3.4.4.2 造牙本質母細胞誘導礦化物質穿透式電子顯微鏡實驗結果.....	47
3.5 生物毒性測試實驗結果.....	47
3.6 掃瞄式電子顯微鏡實驗結果.....	48
3.7 及時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗結果.....	50
3.8 動物實驗斷層掃描結果.....	50
3.9 動物實驗組織切片結果.....	51
第四章 討論	
4.1 人類胚胎上頸間質細胞作於實驗模式細胞之合適性.....	52
4.2 合成材料之生物毒性檢驗.....	53
4.3 選擇合成材料之不同製程.....	54
4.4 二維薄膜即時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗.....	55
4.5 動物實驗.....	56
表	57
圖	63
參考文獻.....	120



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

人類胚胎上頸間質細胞在不同無機鹽聚己內酯複合材
上之成骨細胞活性

Osteoblastic activity of human embryonic palatal
mesenchymal cells cultured on different
inorganic-polycaarprolactone composites

本論文係由包鈺綸君 R94450017 在國立臺灣大學口腔生物科學
研究所完成之碩士學位論文，於民國 97 年 07 月 24 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：

李伯元

(簽名)

高雲翔 (指導教授)

張麗君

系主任、所長

鄧惠君

(簽名)

中文摘要

人工骨填補材種類繁多，可吸收高分子與生醫陶瓷所結合成的複合型骨填補材，在許多研究中均被證實可獲得兩類材料的優點與更多元的操作可塑性。聚己內酯其高度生物相容性已在動物實驗中獲得證實。在生物降解性藥物釋放載體及作為骨填補材支架的研究應用已相當廣泛，且有更優勢的價格及取得便利性。實驗設計以不同相的磷酸鈣鹽類生醫陶瓷，包括有 Hydroxyapatite 、Calcium Diphosphate 與 Calcium phosphate dibasic，及傳統硫酸鈣類生醫陶瓷：二水合硫酸鈣，分別與聚己內酯共構成複合型骨填補材。經過多種溶劑及製程的嘗試，我們找出使用 1,4 Dioxan 為溶劑佐以冷凍乾燥法可製作出具有規則孔洞的三維立體支架。本實驗開發出能將複合型骨填補材製做為平整的二維薄膜、具有均勻孔洞的三維支架，使得材料可分別對應於骨缺損處覆蓋與填補。

在材料特性的檢測上，體外細胞實驗使用人類胚胎上顎間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells) 為實驗模型，觀察不同組合的材料，對於骨型成時期出現的 ALP 、 OC 、 BMP-2 基因交互關係與骨引導性 (osteoconductive) 、骨誘導性 (osteoinductive) 。實驗中，細胞可在所有實驗組 2-D 平面薄膜貼附生長，生長速率卻無法

達到培養皿同等水平，然而部分實驗組在初期時間點可誘導出 400 倍以上高量的 ALP 基因表現。但在動物實驗中發現，實驗組材料對於骨誘導再生與在斷層掃描下發現骨質密度並不理想，且在切片上有看到發炎細胞的存在，所以我們推測的原因為實驗組材料的吸收速率較實驗動物骨形成的速度慢，雖然材料具有骨引導性與骨誘導性，但在細胞生長所需空間的讓位上並不理想，所以可從加速材料的崩解並降低發炎反應時間的傾向上，再度對材料的製程做設計。



Abstract

There are lots of artificial bone grafts. It was proved in many experiments that combined type of high polymer and bioceramic bone grafts have more benefits and plasticities. The biocompatible characters of the polycaprolactone were proved in many animal experiments. And it was applied frequently in drug-released carriers with low cost and using convenient. Based on the dynamic-balancing of bone apatite, we tried to rule out the bone healing effects of different phase of apatites and Calcium Sulfate, for find the good composite bone graft materials. The material characters of different kinds of Polycaprolactone composited bioceramics including Hydroxyapatite 、 Calcium Diphosphate 、 Calcium phosphate dibasic and Calcium Sulfate were compared in this examination . After many trial and error, we figured out that good porous scaffolds could be fabricated by Freeze-dried method with 1,4 Dioxan as solvent. The human embryonic palatal mesenchymal cells was selected as cell mode for observing the osteo-induction 、 osteo-conduction effects and the serial expressions of bone related genes including ALP 、 OC 、 BMP2. We found that the cell adherence of our all materials can reach the level of the control dishes. We found that the cell adherence of our all materials can reach the level of the control dishes. And the high ALP expression was noted 24 days after cell seeding. But the CT scan bone densities in animal experiments of our all composite materials were not so good to our expectation. We suppose that the absorption rates of the materials were slower than the bony formation, and the degradable small polymer particle may cause enhanced inflammation effects.

第一章 背景

1.1 骨生理概述

1.1.1 骨骼的生長

骨骼的功能為支撐身體軟組織，使身體形態和姿勢得以維持，並保護頭部和胸腔內的重要器官，還可當作礦物質的儲存場所，尤其是鈣、磷。除此之外，在骨骼的骨髓可產生血球，以進行造血功能。因此骨骼所牽涉的生理功能非常廣泛，是人體的重要器官。

骨骼主要分成骨幹 (Diaphysis)、骨端 (Epiphysis) 和骨後端 (Metaphysis)。骨幹是骨骼體幹的主要部分，骨端則位於兩者連接處，是一層鈣化軟骨，在骨發展過程最後會被骨所取代。骨膜 (Periosteum) 在骨周圍表面的白色緻密纖維膜，外面纖維層含進入骨內血管淋巴管、神經等結締組織，裡面成骨層則含有彈性纖維、血管和成骨細胞。骨髓在骨幹中，骨內膜 (Endosteum) 為內襯於骨髓腔的一層成骨細胞，含有分散的蝕骨細胞。鬆質骨 (Cancellous bone) 為骨小樑 (Trabeculi) 所組成的格子結構，裡面充滿骨髓，也是儲存骨髓處。密質骨 (compact bone) 附在鬆質骨外，具保護和支持作用，其腔隙中有骨細胞 (Osteocyte)，此細胞無產生新骨組織的能力。

在骨骼骨化的過程當中，骨骼縱向的生長以軟骨內骨化

(Endochondral ossification) 而成。軟骨內骨化過程在長骨進行，是透明軟骨被骨組織取代的過程。開始於骨幹的中心，此區域稱為初級骨化中心，骨骼的生成由此開始向兩端的軟骨組織進行。在這期間，骨膜中的成骨細胞經由膜內骨化作用生成緻密骨，包著初級骨化中心。此時，骨端的軟骨繼續地發育。隨後，次級骨化中心在骨端中出現，海綿骨在此形成。

在生長板中的軟骨細胞也會參與長度增長的活動，當軟骨細胞成熟增大後，破裂死亡所留下的細胞骨架會由骨細胞於其上進行造骨作用，形成海綿骨的單位，稱之為骨小樑 (Trabeculae)。骨骼的成熟主要是依骨化的速度而定，當骨骼生長板完全骨化，亦即閉合時，骨骼的縱向生長便中止而達成熟階段。海綿骨分為兩區，為初級海綿骨區 (Primary spongiosa) 與次級海綿骨區 (Secondary spongiosa)。初級海綿骨區位於生長板下方，為不完全骨化區，此區的骨小樑上仍可看見殘存的生長板軟骨細胞支架；次級海綿骨區為骨化完全的區，此區的骨小樑上僅能見到成骨細胞 (Osteoblasts) 與蝕骨細胞 (Osteoclast)。海綿骨區的骨骼組織是反應骨代謝最明顯，也是對機械性負荷敏感度最高的區域。

1.1.2 骨骼的形成和再塑過程

骨生成 (Osteogenic) 細胞是由具有多種能力的間葉細胞分化而來，間葉細胞不僅可分化成硬骨原始細胞 (Osteoprogenitor)，還包括軟骨細胞 (Chondrocyte)、脂肪細胞 (Adipocytes)、纖維母細胞 (Fibroblasts)、肌細胞 (Myoblasts) 等細胞群系。硬骨原始細胞 (Osteoprogenitor) 可分化為骨母細胞，其主要功能是分泌膠原蛋白 (Collagen)、彈性蛋白 (Elastin)、勝肽醣肝醣原 (Proteoglycan)、葡萄糖氨基肝醣原 (Glycosaminoglycan) 等，形成類骨質，並分泌鹼性磷酸酵素 (Alkaline phosphatase) 參與鈣化，使最後形成的骨骼基質礦物質化 (Mineralization)。

新的骨骼組織形成時，有些骨骼組織會被移除，這個過程稱為“再塑作用”，骨骼的形成主要是由骨母細胞所完成，而吸收移除則由蝕骨細胞 (Osteoclast) 之作用。蝕骨細胞由單核細胞或巨噬細胞 (Monocyte- macrophage family)，結合成多核的蝕骨細胞後，移動至骨區域進行細胞外間質之分解及骨重塑現象。成骨細胞是骨骼組織中硬骨原始細胞 (Osteoprogenitor) 分化達成最後穩定的型態，當骨母細胞經過製造骨質的活性期後，大部分會轉型成不活化狀態的骨細胞，存在於陷窩 (Lacunae) 中，每個細胞有許多突起 (Process)，經過

骨小管 (Canalculus) 傳輸養份，以裂隙結合 (Gap junction) 和其它細胞連接，主要負責骨骼基質的維持。

當骨組織因外傷或病變而做手術切除造成缺陷時，其缺陷處會自行修復，其依照順序分為五階段。首先在損傷後大約 48 小時為誘導期 (Induction phase)，骨缺損區形成血塊 (Hematoma)，發生壞死、血小板聚集、釋放活性介質並產生化學性趨因子 (Chemo factor)，PDGF、EGF、TGF- β 等生長因子。此期時間很短，於約 48 小時後出現發炎細胞時即告結束。第 2 至 14 日的發炎期 (Inflammation) 中，骨缺損部位會聚集多量的多形核中性粒細胞、淋巴細胞、單核細胞、巨噬細胞和肥大細胞，吞噬清除壞死組織和細胞殘渣然後進入第 2 至 8 週的軟骨痂期 (Soft callus)，該時期中血管會長入骨缺損間隙，大量的膠原基質沈積替代纖維血管基質。之後第 2 至 12 個月的硬骨痂期 (Hard callus) 與重建期 (Remodeling) 中，軟骨骨痂經軟骨內成骨化轉化成緻密骨並受應力之影響，成骨細胞和破骨細胞共同活動以恢復骨的正常外形。

骨缺陷形成新骨之方式可簡述為以下三種：

1. 骨發生 (Osteogenesis) — 成骨前趨細胞向骨缺陷端驅移，透過適當之刺激或誘導成具活性成骨細胞。

2. 骨誘導 (Osteoinduction) — 間質細胞 (Mesenchymal cell) 受某些生長因子影響而分化為骨母細胞而發生骨組織。
3. 骨引導 (Osteoconduction) — 其和局部環境中形成的骨模板 (Bone template) 有關提供一個類似骨組織生理性結構的多孔環境。

1.1.3 骨生理相關基因

■ Core binding factor alpha 1 (Cbfa1)

Cbfa1 是屬於 runt-domain gene family 的一種 transcription factor (Komori, 2000)。Cbfa1 knockout mouse 完全缺乏骨生成的能力，這證明了 Cbfa1 的重要性在於它是骨骼發展的過程中所必需。

■ 第一型膠原蛋白 (Type I collagen)

骨骼的有機基質裡，第一型膠原蛋白佔了將近 90%的比重 (Kamiya and Takagi, 2001)。

■ 鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase)

一般認為骨骼胞外基質的礦物質化是由鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase) 所起始的。鹼性磷酸酶是一種糖蛋白，與細胞膜外表的 glycan-phosphatidylinositol-anchor 產生共價鍵。鹼性磷酸酶以 soluble ALP 和 membrane-bound ALP，兩種不同的形式從細胞膜釋放

出來。其中 Soluble ALP 藉由 GPI-phospholipases 水解 GPI-anchor 而釋放出來；Membrane-bound ALP 則是以 membrane vesicles 的型態被製造出來。在生物體外實驗裡，soluble ALP 和 membrane-bound ALP 都能夠誘發鈣化，但是 membrane-bound ALP 以及原本黏在細胞膜上的 ALP，這兩者所引發的礦物質化效率比較高 (Banovac and Koren, 2000)。

■ Osteonectin (ON)

Osteonectin 是一種磷酸化醣蛋白，也是一種骨骼胞外非膠原蛋白。由於它是一種磷酸化醣蛋白，呈現酸性的性質，所以它對鈣離子以及氫氧磷灰石有很強的吸引力。除此之外，它也能和第一型膠原蛋白結合。當 osteonectin 和第一型膠原蛋白結合時，它同時也抓住了游離的鈣離子並且和氫氧磷灰石結合在一起。所以，它也可以當作是骨質沉積的礦物質化核心。由於骨細胞和造骨母細胞，分化程度不同，對 osteonectin 的附著能力也不同，所以，在骨分化的過程中，osteonectin 也能調節細胞與胞外基質間的交互作用 (Aarden et al., 1996)。

■ Osteopontin (OP)

Osteopontin 是一種磷酸化的醣蛋白。Osteopontin 能夠黏附氫氧磷灰石、能夠抓住鈣離子。所以 osteopontin 能將骨骼基質裡，有機的部分和無機的部分連結起來，提供了組織黏附的能力。

■ Bone sialoprotein (BSP)

Bone sialoprotein 是存在於骨骼胞外基質裡的一種醣化蛋白。由於 BSP 在骨骼礦物質化時，擔任的是礦物質化的核心 (nucleator)，所以，當骨骼胞外基質出現 BSP 時，骨骼的礦物質化即開始 (Hunter et al., 2001)。

■ Osteocalcin (OC)

在整個骨骼發展的過程中，最後一個出現的胞外基質蛋白是 osteocalcin。骨分化的過程中，造骨前驅細胞會表現 ALP 和 ON；未成熟的造骨母細胞會表現 ALP、ON 和 OP；pre-osteoblasts 會表現 ALP、ON、OP 和 BSP；成熟的造骨母細胞會表現 ALP、ON、OP、BSP 和 OC (Komori, 2000)。



■ Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)

BMP-2是transforming growth factor superfamily的一份子。1990年學者Wang等人將純化的BMP-2注入老鼠皮下，於注入後7天與14天時間點分別可發現軟骨與硬骨的形成，證明其有促進骨生成的潛力 (Wang et al., 1990)。BMP-2也可以被添加在細胞培養液裡，用來刺激造骨母細胞的分化。1997年，Hanada從8 個禮拜大的成年F344大鼠的長骨裡取得骨髓造骨母細胞，將細胞曝露在50ng/ml 的BMP-2的作用之下。結果用Von Kossa染色，發現骨結節的數量增加了；測鈣離子

濃度，發現鈣離子的量也增加了。Hanada認為BMP-2的確能促進造骨母細胞的分化，有利於骨質的生成與沉積 (Hanada et al., 1997)。1999年，Gori為了探討骨髓間質細胞的adipogenic differentiation和osteogenic differentiation這兩個路徑之間的相關性，他以人類細胞株hMS作為實驗模型，在細胞培養液裡添加BMP-2。結果發現Cbfa1、ALP和osteocalcin的基因表現都加強了，骨結節沉積的量也增加了。但是脂肪分化末期的指標leptin的表現是受到抑制的。所以BMP-2有助於造骨母細胞的分化，但抑制細胞往脂肪細胞的方向分化 (Gori et al., 1999)。



1.1.4 骨誘導

在生物體內，誘導造骨母細胞生長、分化、成熟所需要的因子，可以由造骨母細胞周圍的細胞來供應。但是，在生物體外，這些造骨母細胞生長、分化、成熟所需要的因子與環境則是完全憑靠我們添加在細胞培養液裡面的物質來供應與模擬。目前已經知道有很多因子可以添加在細胞培養液裡，來加強促進造骨母細胞的生長、分化、成熟與胞外基質的礦物質化。根據大量的骨相關實驗，骨誘導相關最佳化之藥品有 β -glycerophosphate、Ascorbic acid (A.A) 及Dexamethasone之混合物。

■ β -glycerophosphate (BGP)

β -glycerophosphate或稱作glycerol 2-phosphate，是一種經常被使用來誘導造骨母細胞胞外基質礦物質化的成分之一。1992年Bellows以大鼠頭蓋骨造骨母細胞作為測試對象的實驗裡證明，在造骨母細胞胞外基質開始礦物質化時，BGP會被鹼性磷酸酶分解切開、釋放出磷離子。所以說BGP是骨質生成、礦物質化過程中，供給氫氧磷灰石的磷離子的來源之一 (Bellows et al., 1992)。1996年，Chen以大鼠胎兒頭蓋骨造骨母細胞作為研究對象，發現 β -glycerophosphate對於造骨母細胞的鹼性磷酸酶的活性和造骨相關基因的表現有促進效果 (Chen et al., 1996)。

■ Ascorbic acid (A.A)

Ascorbic acid 即是vitamin C。我們可在細胞培養液裡添加ascorbic acid來促進造骨母細胞的生長與分化功能。Ascorbic acid對於骨胞外基質中的膠原蛋白的合成相當重要。它在膠原蛋白的hydroxylation 過程中，扮演了proline hydroxylase 和lysine hydroxylase cofactor 的角色 (Ganta et al., 1997)。1991年Harada認為ascorbic acid能促進膠原蛋白的合成 (Harada et al., 1991)。1994年，Dean 等學者實驗結果發現 β -glycerophosphate和ascorbic acid合併使用則會提高

matrix vesicle內 metalloproteinase的含量，使得細胞外基質礦物質化的量增加 (Dean et al., 1994)。1997年，Blumberg等學者於人類造骨母細胞培養液中，同時添加了 ascorbate和 β -glycerophosphate，結果發現decorin和biglycan這兩種small proteoglycan的合成更新速度加快了，有助於造骨母細胞細胞外基質的礦物質化 (Blumberg et al., 1997)。

■ Dexamethasone

Dexamethasone是一種合成的glucocorticoid類固醇。一般認為dexamethasone對於造骨母細胞的生長與分化是有促進效果。所以dexamethasone也是經常被添加在細胞培養液裡，用來促進骨質的生成與沉積。1986年McCulloch雞胚胎實驗發現利用dexamethasone加以誘導之後，組織染色呈現ALP (+) 的細胞數量會增加(McCulloch and Tenenbaum, 1986)。1996年，Ishida在大鼠造骨母細胞實驗發現細胞培養液添加dexamethasone 之後，鹼性磷酸酶活性會加強、骨沉積的量也變多 (Ishida et al., 1996)。1994年，Beresford發現添加 10^{-8} M dexamethasone培養成年人類骨髓間質造骨母細胞時，表現ALP (+) 的細胞數量增加，有助於造骨母細胞的分化 (Beresford et al., 1994)。Yang等學者在2003年於人類的腸骨造骨母細胞培養液裡添加 10^{-8} M dexamethasone後，細胞的鹼性磷酸酶和osteocalcin的表現都加強了。所以Yang認為 10^{-8} M dexamethasone有

助於造骨母細胞的生長與分化 (Yang et al., 2003)。2003年Atmani等學者認為添加dexamethasone能幫助造骨母細胞的生長與分化 (Atmani et al., 2003)。

雖然dexamethasone經常被添加在細胞培養液裡，用來促進造骨母細胞的生長與分化。但是，詳細回顧相關的文獻，我們不難發現，有些學者的研究報告，他們所透露的訊息並無法完全支持這樣的看法。有些學者發現在他們的實驗裡，dexamethasone的確在分化上對於細胞是很有幫助的，但是，在細胞生長方面卻呈現抑制的效果。

1994年，Cheng等學者從人類肋骨取骨髓造骨母細胞培養在 α -MEM裡，發現添加 10^{-7} M dexamethasone後，會抑制骨母細胞的生長 (Cheng et al., 1994)。2001年Walsh等學者實驗結果顯示，給予 10^{-8} M 的濃度時細胞量最多、生長最好。當濃度低於 10^{-8} M 或超過 10^{-8} M 時，細胞的生長反而減緩。而在分化方面，給予的dexamethasone濃度越高，ALP (+) 的細胞越多，顯示dexamethasone對於細胞的分化是有促進的效果。實驗結果認為，當dexamethasone濃度超過 10^{-8} M 時，濃度越高對生長的抑制越明顯 (Walsh et al., 2001)。

1.2 骨無機相礦物基質組成

骨細胞外的主要基質有兩大類，有機相的膠原蛋白纖維與無機相的骨礦物結晶，在乾燥情況下此兩者佔骨組織 95% 的重量。

對於無機相較為正確的描述為骨礦物結晶的組成，近似於以氫氧化基磷灰石 $[HA, Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2, Ca:P = 1.66]$ 為基本組成的結構，而在不同實驗設計所得結果指出，骨磷灰石的鈣磷比值約介於 1.65 至 1.77 之間 (Driessens, 1980)，甚至在部份實驗中出現鈣磷比值 1.37 及 1.87 等結果 (Posner, 1969)。

文獻所得多種骨組成元素整理成表 1。

可以觀察到鈣磷及碳酸根的百分比值有較大的差異，符合與現在對骨磷灰石的形成過程之了解，包括由造骨母細胞沈澱了鈣磷比值介於 1.44 至 1.55 之間的骨磷灰石後，組織液中無機相骨組成元素會處於動態平衡下自發地結晶於其上，與碳酸根參與骨磷灰石的形成過程。研究亦顯示在體外實驗中，不同的鈣磷百分比值對於結晶過程與形態均有影響 (Boskey and Posner, 1976)。

1.3 骨填補材的市場需求及產品現況

骨填補材的研究目的為當骨組織因受外力造成傷害或因病變切除後，以植入骨組織缺陷中，使骨組織能快速的再生，恢復其基本的生理功能。

隨著平均餘命的延長與生活品質的要求、醫療技術的提升，2000年的資料指出全美每年使用骨填補材的手術約五十萬次 (Lewandrowski et al., 1996)，而在 2002 年的統計顯示此類手術的執行次數已上升至每年超過六十萬次，且不斷成長。對應於此龐大需求，研究開發具有良好骨修復能力與較低成本的骨填補材是迫切而必需的。

目前臨床應用上可取得的市售產品選列有：

1. 經去礦質化的同種與異種骨製填補材：Bio-oss[®]、Grafton[®]。
2. 磷灰石類生醫陶瓷：以氫氧化基磷灰石 (HA) 為主體的生醫陶瓷：Apapore[®]、Endobon[®]、Pro Osteon[®]等，產品間分別有不等孔洞係數及從牛骨、珊瑚等不同製造來源上之差異。以氫氧化基磷灰石 (HA) 為主的生醫陶瓷複合體有OsSatura[®]、Bonesave[®]分別含有 20% 與 40% 的三鈣磷酸鹽 (TCP)；在氫氧化基磷灰石 (HA) 上吸附一層碳酸鈣的Pro Osteon-R[®]、Norian[®]。

3. 以氫氧化基磷灰石 (HA) 外鹽類為主體的生醫陶瓷包括有以硫酸鈣構成的Osteoset[®];以三鈣磷酸鹽 (TCP) 為主體的Vitoss[®]。
4. 以高分子為主體者：使用膠原蛋白製成海綿狀填補材並複合第二型骨形成蛋白 (BMP-2) 之Infuse[®]。
5. 其他：如使用鉭金屬 (tantalum) 的Hedrocel trabecular metal[®]。

各類產品都有其特性與適應症，但根據被視為骨填補材黃金標準的自體骨移植 (autograft) 之觀點來看，骨填補材的最高目標為促使缺損區形成符合骨生理的新骨再生。所以材料的特性須兼顧與體內修復機轉間的適合性。



1.4 骨填補材生醫陶瓷

使用在人體的生醫陶瓷甚多，主要包括：

磷酸鈣鹽類生醫陶瓷：氫氧化基磷灰石 (Hydroxyapatite ; HA)、三鈣磷酸鹽等。硫酸鈣類生醫陶瓷：硫酸鈣、硫酸鈣骨水泥等。矽酸鈣類生醫陶瓷：三鈣矽酸等。

1.4.1 磷酸鈣鹽類生醫陶瓷

骨修復的過程中，磷酸鈣陶瓷等人工合成材料的參與，將具有三個功能：首先，其植入缺陷部位將可避免受損部位自然的萎縮，達到暫時性固定周圍骨組織的效果。其二，磷酸鈣陶瓷所降解之鈣與磷離子將供給骨鈣化以及骨基質的生成。而多孔性磷酸鈣材料可提供較大的空間使骨細胞於受損部位活動，較大的比表面積更可引導骨細胞的貼附與遷移。其三，磷酸鈣因降解、再沉澱以及離子交換使其具有骨鍵結的能力，如此將賦予新生骨與週遭骨組織結合。許多研究已指出有關磷酸鈣陶瓷於受損部位修復的程序。包括：(1) 陶瓷的溶解；(2) 磷酸鈣由溶液中沉澱至陶瓷表面；(3) 陶瓷與組織界面進行離子交換和結構重組；(4) 組織中磷酸鈣內部擴散進入陶瓷中；(5) 溶液中微環境變化調節周圍骨細胞活性；(6) 將細胞所產生之無機質或有機質等細胞外機質，沉降於陶瓷表面；(7) 細胞外基質沉降入陶瓷與組織界面；(8) 細胞外基質修飾陶瓷表面性質；(9) 細胞貼附並進行增生；(10) 細胞進一步分化；(11) 大量產生細胞外基質，達成磷酸鈣陶瓷與組織及細胞結合。由於磷酸鈣鹽類生醫陶瓷具有良好的生物適應性，而被廣泛應用做為骨科及齒科置換材料，常被使用的有氫氧基磷灰石 (hydroxyapatite; HAP)、二鈣磷酸鹽 (dicalcium phosphates;

DCP)、三鈣磷酸鹽 (tricalcium phosphates; TCP) ，其中更以氫氧基磷灰石 (hydroxyapatite) 為最。

■ 氢氧基磷灰石 (Hydroxyapatite)

氫氧基磷灰石不論是在結構或是在成分上都與硬骨組織中的無機質相似 (Walsh et al., 1994)，研究也認為氫氧基磷灰石具有很優異的生物相容性及骨鍵結 (bone-binding) 特性，故氫氧基磷灰石被廣泛的整合於人工骨填補材料運用在骨科及齒科材料中。除了作為移植材料外，HA 表面的官能基具有很強的吸附能力，可以作為載體吸附一些小分子藥物，如 Ampicillin (Queiroz et al., 2001)。研究指出 HA 表面和蛋白質可進行吸附的官能基主要有，(1) 氢氧基 (hydroxy radical)，利用氫鍵 (hydrogen bonds) 和蛋白質鍵結；(2) 磷酸根 (phosphates)，和蛋白質中帶正電的胺基產生鍵結；(3) 鈣原子，和蛋白質的羰基 (carbonyl group) 產生鍵結 (Gorbunoff and Timasheff, 1984)。

高溫燒結 (sintered) 的陶瓷性氫氧基磷灰石可初步依據物理特性分為緻密型 (dense) 與多孔型 (porous) 與小顆粒三種種。緻密性氫氧基磷灰石具有優異的壓縮強度但其餘之生物力學參數性質不佳，而且在骨組織內不會被吸收且會有纖維化的發生 (Friedman et al., 1998)。多孔型氫氧基磷灰石雖然骨組織會往內生長，但其在體內仍

不會被骨組織所完全吸收。小顆粒之氫氧基磷灰石在體內長時間後易被組織所吸收，所以可被使用當成可吸收性之骨填補材料。但顆粒狀之氫氧基磷灰石在體內會有移動之現象，故常以加入膠原蛋白 (collagen) (Sugaya et al., 1989) 或明膠 (gelatin) (Nagase et al., 1989) 以形成一固體塊狀之填補材料。

■ 磷灰石

磷灰石是指具有 $M_{10}(RO_4)_6X_2$ 的結晶，R通常是phosphorus，M為金屬，X 通常則是hydroxide或halogen。骨磷灰石屬於磷酸鈣類，該類所具有的相如表 2 包括：



1.4.2 硫酸鈣類生醫陶瓷

1892 年所進行以熟石膏填入骨骼內缺陷的臨床實驗，發現以熟石灰做為骨骼的替代品，對組織不會產生不良影響 (Dressman and Fleisher, 1986)，所以至 1965 年約 70 年的時間，熟石膏被做為骨骼填充劑及骨骼置換材料的來源，一直到 1996 年，美國FDA核准以硫酸鈣類生醫陶瓷所製成的骨填補材產品Osteoset[®] (Wright Medical, Arlington, TN)，不過相較於其他類生醫陶瓷，由於其被吸收或被排除

的速度較快，可能在新生骨細胞未完全形成時便裂成碎片而被吸收代謝。

1.5 複合型骨填補材的選擇

從骨生理的角度來審視，理想之骨填補材應具有下列之條件 (Kalfas, 2001)：具有骨誘導性 (osteoinductive)、骨引導性 (osteocompulsive)、穩定之生物機械性質 (biomechanically stable) 及不具有疾病傳染及感染之危險 (disease free)。

自體骨移植 (autograft) 雖能免除免疫問題，且含有骨形成蛋白質 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 與數種活的骨細胞，故可加速骨組織之癒合，但有取得過程之傷害與限制。而同種異體移植 (allograft) 與異種移植 (xenograft)，亦有免疫上的問題和較高的取得成本，所以近期的趨勢走向發展人造材料來填補骨缺損。

可降解與吸收高分子材料因具有酯基 (ester)、醯胺基 (amide)、尿素基 (urea) 等鍵結而可以自行分解或被微生物、酵素作用而分解。根據材料的來源，可分為天然與合成兩大類，後者又可次分為化學合成和生物合成兩類。

主要的天然可降解吸收生物材料有幾丁質 (chitin)、幾丁聚醣 (chitosan)、纖維蛋白 (fibrin)、膠原蛋白 (collagen)、明膠 (gelatin)、

透明質酸 (hyaluronic acid)、褐藻酸 (alginate)和纖維素 (cellulose)。

典型的化學合成可降解吸收生物材料包括 PLA、PGA 及其共聚物、

聚原酸酯 (polyorthoester, POE)、聚己內酯 (polycaprolactone, PCL)、

聚酸酐 (polyanhydride, PAH)、聚縮醛 (polyoxymethylene, POM)。生

物合成的可降解吸收生物材料主要為 PHB 和聚羥基戊酸酯

(polyhydroxyvalerate, PHV)，由微生物合成。

雖然天然可降解與吸收生物材料具有良好的生物相容性並利於細胞吸附增生，但機械強度較差，抵抗分解的能力與分解速度的控制較不易，常需要進行改質或與其材料複合才能具備合適的材料功能。

合成可降解與吸收生物材料除了有良好的生物相容性和生物安全性外，和天然材料相比，這類材料的結構、性能可進行更廣泛的修飾和調整，而更為符合目的材料功能。

1.5.1 聚己內酯 (PCL, Poly(e-caprolactone))

聚己內酯為一廣經證實對骨及韌帶組織的修復應用具有高度潛力可吸收聚酯類聚合物，且其高度生物相容性已在含有左諾杰垂 (levonorgesterel) 的長效型避孕藥以Capronor[®]作的實驗中獲得證實。動物實驗證實聚己內酯幾乎沒有毒性。

此外聚己內酯在生物降解性藥物釋放載體及作為骨填補材支架的研究應用已相當廣泛，加上相對於部份高單位價格的可架解合成高分子材料，聚己內酯有更具優勢的價格及取得便利性。

其單體是己內酯，經由開環聚合反應形成，其結構重複單元上有5個甲基-CH₂-和一個極性酯基-COO-的直鏈形單聚合物，各單體間以酯鍵連結，這樣的結構使得聚己內酯有良好的柔韌及加工特性。並依結晶程度的不同，熔點範圍在59~64°C間，玻璃轉換溫度(T_g)為-60°C。它可溶解在氯化類或芳香類碳氫化合物，環己酮(cyclohexanone)，以及2-硝基丙烷(2-nitropropane)中，而不溶於脂肪族碳氫化合物、乙醚和醇類。

生物降解性由動物實驗得知，聚己內酯的降解機制包含兩個階段：第一階段是聚合物長鏈上的酯鍵(ester linkages)經水解而在隨機的部位發生斷鏈。在此階段中聚合物分子量的降低但不發生形變與失重；第二階段指經水解後產生的碎片分子量降至5000以下，且形成的小粒子會被巨噬細胞吞噬，因此在第二階段時有重量減少的現象。被吞噬後主要的代謝物是e-羥基己酸(e-hydroxycaproic acid)。

1.5.2 共構聚己內酯及氫氧化基磷灰石之複合型骨填補材

使用在人體的生醫陶瓷甚多，主要包括有磷酸鈣鹽類生醫陶瓷：氫氧化基磷灰石 (Hydroxyapatite ; HA)、三鈣磷酸鹽等；硫酸鈣類生醫陶瓷：硫酸鈣、硫酸鈣骨水泥等；矽酸鈣類生醫陶瓷：三鈣矽酸等。這些材料仍具有不同的材料特性與限制，所以在單一使用的情況下，如緻密型 (dense) HA 降解時間每年以 5 %~15 % 速率進行，對臨床骨修復而言時間過長，三鈣磷酸鹽 (α -TCP) 雖然其降解速率比 HA 來的快，但由於其亦為塊狀結構，同時無法完全符合患部形態之骨填補物，侷限了材料的使用性，至於硫酸鈣，其降解速度大約六到八週，並不符合骨再生大約六個月的生長週期，而且硫酸鈣骨水泥在固化過程中會產生放熱反應，對組織容易造成傷害。三鈣矽酸鹽除了在固化過程中會產生放熱反應外，材料的高 pH 值亦是問題。

人工骨填補材料中以可吸收高分子生醫陶瓷所結合成的複合型骨填補材在許多研究中均被證實其可獲得兩類材料的分別優點與更多元的操作可塑性。

首先對於單純生醫陶瓷的脆性而無法受力的問題、單純可吸收高分子材在降解產物引起的低 pH 值、發炎反應 (Schiller and Epple, 2003) (Agrawal and Athanasiou, 1997) 均在複合型材料中獲得改善，

此外複合型材料更可獲得額外的材料性質：如可依混合比率調整的材料吸收速率 (Agrawal and Athanasiou, 1997)，促進細胞增生的能力 (Kim et al., 2004)。

可塑性的操作上，複合型骨填補材可藉由材料的選擇與製程，達到期望的特性。研究指出，骨填補材中的孔隙大小超過 $50 \mu\text{m}$ 時，新骨會以更高的速率向材料內生長，此外材料孔洞間的連通性對於血管網的生長亦相當重要，以骨磷灰石為填補材料得到的實驗結果，具 $260 \mu\text{m}$ 連通孔洞的材料會有最好的骨生長結果 (Kuhne et al., 1994)。

1999 年學者已將聚己內酯及氫氧基磷灰石之複合型骨填補材製成具有孔洞的錠片狀植入兔子體內 (Marra et al., 1999) 並且在其之後的實驗陸續證實這類複合型骨填補材能持續釋放攜帶藥物 (Coombes et al., 2004) 且具有骨引導性 (Causa et al., 2006)。

1.6 幹細胞與幹性相關基因

1.6.1 幹細胞

幹細胞 (stem cells, SC) 有以下幾個特點：(1) 幹細胞本身不是終末分化細胞 (terminal differentiated cell)，即幹細胞不是處於分化途徑的末端；(2) 幹細胞相對於體細胞能趨近無限分裂增殖；(3) 幹細胞

是一群尚未完全分化的細胞，同時具有分裂增殖成另一個與本身完全相同的細胞 (asymmetrical self-renewing divisions)，以及分化成為多種特定功能的體細胞兩種特性 (pluripotent with the capacity to differentiate into all fetal and adult cell lineages)。幹細胞具有自我更新的能力，在一定條件下，它可以分化成各種功能細胞。按分化潛能的大小，幹細胞基本上可分為以下三種類型：全能性幹細胞 (totipotent stem cell)；具有形成完整個體的分化潛能，有很強的分化能力，可以無限增殖，並分化成為全身兩百多種細胞類型，進一步形成有機體的所有組織、器官。而全能性幹細胞侷限於受精卵以及blastomere早期；多能性幹細胞 (pluripotent stem cell) 這種幹細胞具有分化出多種組織細胞的潛能，但卻失去了發育成完整個體的能力，發育潛能受到一定的限制。例如胚胎癌細胞 (embryonic carcinoma cells, EC)；單能性幹細胞 (unipotent stem cell) 也稱專能性或偏能性幹細胞。這類幹細胞只能向一種類型或密切相關的兩種類型的細胞分化。例如肌肉中的衛星細胞 (satellite cell)。

1.6.2 幹性相關基因

■ Oct4 (Oct3)

Oct4又命名為Oct3，具有357個氨基酸，Oct4為屬於POU (Pit-Oct-Unc) 家族中的轉錄因數 (transcription factor)，藉由和此八個

序列 (octemeric sequence motif) ATGCAAAT和標的基因結合來刺激標的基因的表現。Oct4幾乎表現於所有的幹細胞當中，在胚胎發育的過程當中，Oct4起初表現於blastomeres當中，隨著發育的過程，Oct4的表現侷限於內細胞團 (inner cell mass)，而在 trophectoderm (TE) 當中的表現量會下降。在定量方面的分析，Oct4的表現量高時會使得ES cell走向Extraembryonic mesoderm或是Extraembryonic endoderm的分化路徑，當Oct4表現量低時，ES cell則會分化成trophectoderm，僅有正常量的Oct4表現，才能維持 ES cell的 pluripotency (Niwa, 2001)。由於Oct4屬於POU家族，而POU家族最重要的特徵即是 POU domain，POU domain主要由兩個獨立的subdomain組成，分別是：在N端是由75個氨基酸組成的POUs domain (POU specific domain)，而在C端則是由60個氨基酸組成的POUh domain (POU homeodomain)17，兩個subdomain以15-56個不等的氨基酸相接合(Klemm et al., 1994)。POU domain主要藉由結構上的helix-turn-helix和DNA作結合，而位於POU domain兩側的氨基酸序列對DNA的結合並不重要，位於POU domain N端的稱之為N domain，主要富含proline以及一些酸性的氨基酸，而C domain則富含 proline、serine、threonine (Brehm et al., 1997)。Oct4的表現量的高低會影響ES cell走向不同的路徑，僅有正常表現量的Oct4才能使得ES cell維持pluripotency的功能，所以，有別於傳統已

知的轉錄調控因數 (transcription regulators) 屬於開或關 (on-off) 的方式，Oct4對下游基因的調控是屬於量化方式 (quantitative fashion)。

■ Sox2

Sox2 是一個具有 HMG DNA-binding domain 的轉錄因數，當 Oct4 和 Sox2 分別相鄰結合於 FGF4 的 enhancer 上，以協同作用 (synergistic) 的方式來刺激 FGF4 基因的表現，而 FGF4 是 ES cell 特有的生長因數 (growth factor)，如此證明 Oct4 藉由和 Sox2 的結合來刺激 ES cell 維持其 pluripotency 的功能(Yuan et al., 1995) 。

1.7 實驗目的



牙科的治療領域中，齒槽骨的缺損形式與程度，對於後續的治療選項及癒後常有相當大的關連性。相較於大尺度的骨折創傷，牙科常見的骨缺損形式多位處於齒槽中，因此對於填補材受力與否並非絕對性之需求，更期待的是材料具有良好的骨誘導性 (osteoinductive) 和骨引導性 (osteocompactive) 而獲得較佳的骨再生結果。此外，在部分口腔手術的施行過程中，會出現較不易以固態骨填補材處理的病灶區，如牙根分岔處。流動可注射的材料在對應此需求時相對具有優勢。而材料的取得可行性、製造成本、臨床操作的便利性亦為重要的考量因素。

研究過程可分為下述步驟：

1. 材料的合成

使用在人體的生醫陶瓷甚多，主要包括有磷酸鈣鹽類生醫陶瓷：氫氧基磷灰石 (Hydroxyapatite ; HA)、三鈣磷酸鹽等；硫酸鈣類生醫陶瓷：硫酸鈣、硫酸鈣骨水泥等。然而實驗證明以可吸收高分子生醫陶瓷所結合成的複合型骨填補材可獲得兩類材料的分別優點與更多元的操作可塑性，因此我們將以經過長期驗證的聚己內酯為可吸收高分子基材，分別與氫氧基磷灰石 (Hydroxyapatite ; HA)、二磷酸鈣 (Calcium Diphosphate)、二水合磷酸鈣 (Calcium Diphosphate dibasic)、二水合硫酸鈣 (Calcium Sulfate dibasic) 共同製成二維、三維複合型骨填補材與填補微粒並檢驗其性質。

2. 材料的檢測

所製造的複合型骨填補材之對應目標為具骨缺損形式之齒槽骨，當材料填入缺損區後，巨觀下材料的孔洞大小及孔洞間連通性皆與材料之骨引導性 (osteocompactive) 有關，此外，新骨的形成除了靠既有的骨母細胞 (osteoblast) 發生成熟為骨細胞，存在於缺損區中的骨間葉幹細胞 (bone mesenchymal stem cell) 是否受誘導向骨細胞分化，亦即骨誘導性 (osteoinductive) 同為重要因素。因此，我們除了初步檢測製成的材料之孔洞大小等性質外，更以涵蓋骨生成過程的人

類胚胎上頸骨間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells)

種植在材料上，以不同培養時間點檢測材料對於造骨母細胞及骨髓幹

細胞所誘導出的骨生成相關基因，來評估材料與骨生理間的對應性。

3. 動物實驗並與市售骨填補材作比較

經由體外試驗而得到良好的骨引導性與骨誘導性的複合材料

後，我們將以紐西蘭兔為實驗模型，與市售骨填補材作比較。

藉由以上研究的整體規劃，預計研發出一種良好對應於齒槽骨缺
損的複合型骨填補材。



第二章 研究材料與方法

2.1 所使用細胞株及細胞培養條件

所使用細胞株有：

- 人類胚胎上頸骨間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells)
- 人類骨髓間質幹細胞株 (human bone mesenchymal stem cells)
- 人類牙齦纖維母細胞 (human gingival fibroblasts)
- 人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED)

所有細胞皆培養於 H_2O -saturated atmosphere , 5% CO_2 ,
95% Air 之 $37^\circ C$ 恒溫培養箱中。

人類牙齦纖維母細胞 (human gingival fibroblasts) 使用

DMEM1640 培養基 (pH 7.4) , 人類胚胎上頸骨間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells) 、人類間質幹細胞株 (human mesenchymal stem cells) 培養於低葡萄糖的 DMEM 培養基 (pH 7.4) ,
兩種培養基均內含 10% 胎牛血清。人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED)
培養基則含 20% 胎牛血清。所有培養基均含 Streptomycin (100 $\mu g/ml$)
和 ampicillin (100 U/ml) 。

人類牙齦纖維母細胞 (human gingival fibroblasts) 以 5×10^5 的細胞數 seeding，在 10 公分培養盤上每三天為一週期作繼代培養。人類胚胎上頸骨間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells)、人類間質幹細胞株 (human mesenchymal stem cells)、人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 以 10^5 的細胞數 seeding，每五天為一週期作繼代培養。

2.2 人類胚胎上頸骨間質細胞分裂複製能力試驗

溴脫氧尿嘧啶核苷試驗



染色體在含有溴脫氧尿嘧啶核苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 的培養液中經過兩次複製，溴脫氧尿嘧啶核苷會鑲嵌進染色體，所以之後用 Giemsa 染色，或在打開染色體立體結構後以抗體染色並呈色，在實驗期間新發生細胞分裂複製的細胞，其染色體會鑲嵌進溴脫氧尿嘧啶核苷，因為在 BrdU 中所合成的 DNA 鏈著色很淺，跟原來的鏈明顯不同，於是就出現所謂色差染色體 (harlequin chromosomes) 或細胞核染色的結果。

溴脫氧尿嘧啶核苷實驗步驟為將人類胚胎上頸骨間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells)、人類骨髓間質幹細胞株 (human bone mesenchymal stem cells)、人類牙齦纖維母細胞 (human

gingival fibroblasts) 以 0.05% 的 Trypsin-EDTA solution (Sigma T4049) 打散，以 3500 個細胞/well 的濃度，將細胞用 α -MEM+10% FBS 培養在 24 well plate 內，其中每個 well 內含有 2 ml 的細胞培養液。待細胞完整貼覆後加入 10 μ l/ml BrdU 於細胞培養液中，24 小時後以 Zymed BrdU assay staining kit 染色。

2.3 人類胚胎上頸骨間質細胞免疫染色

人類胚胎上頸骨間質細胞免疫染色實驗步驟為將人類胚胎上頸骨間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells)、人類骨髓間質幹細胞株 (human bone mesenchymal stem cells)、人類牙齦纖維母細胞 (human gingival fibroblasts)、人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 以 0.05% 的 Trypsin-EDTA solution (Sigma T4049) 打散，以 1000 個細胞 /well 的濃度，將細胞用 α -MEM+10% FBS 培養在 96 well plate 內。待 8 小時細胞完全貼覆後以 4% paraformaldehyde + 0.2% piric acid 室溫下固定 30 mins，以 PBS 清洗 well 二至三次，加入以 PBS 100X 稀釋之抗體後置放於冰箱 16 hours。取出依序以 AEC single solution、Chromogen 10-15 mins、Hematoxylin 1-2 mins 染色成像，並拍照存檔。

2.4 人類胚胎上頸骨間質細胞誘導實驗

人類胚胎上頸骨間質細胞誘導實驗為將HEPM細胞以0.05% 的 Trypsin-EDTA solution (Sigma T4049) 打散，以7000個細胞/well的濃度將細胞用 α -MEM+10% FBS 培養在12 well plate內，待約48-72小時細胞完全長滿12 well plate面積時，加入10 mM β -glycerophosphate、0.1 mM Ascorbic acid、10 nM Dexamethasone 成為骨誘導培養液 (osteogenic medium)，與10 mM β -glycerophosphate、0.2 mM ascorbic acid-2 phosphate、100 nM dexamethasone成為牙本質母細胞誘導培養液 (odontogenic medium)，每72小時更換一次誘導培養液。

2.4.1 人類胚胎上頸骨間質細胞鹼性磷酸酵素染色法

前驅骨母細胞 (pre-osteoblast) 到成熟的骨母細胞會分泌一種酵素稱為鹼性磷酸酵素，它是結合在細胞膜表面由雙硫鍵聯接 (disulfide-linked) 的兩股多生肽 (polypeptide) 雙體，主要和基質礦物質化的形成有關。而成熟的骨母細胞及成骨細胞則會分泌一種非膠原蛋白 (noncollagenous protein, NCP)，稱為osteocalcin，它對鈣離子具有適度的親和力。在體外實驗中，osteocalcin會抑制溶液中HAP結晶的生長，主要作用機轉還不甚清楚，其推論可能是調節鹼性磷酸

酵素的作用，使骨骼基質在適當的時間和空間條件下礦物質化。所以當骨骼組織中的間葉細胞分化為骨母細胞及成骨細胞愈完全，則相對的其鹼性磷酸酵素的活性和osteocalcin的分泌量也就愈高。因此，我們使用這兩種生化產物作為我們評估其分化能力的指標。

鹼性磷酸酵素是一種漿膜酵素 (plasma membrane enzyme)，是由雙硫鍵所聯結的雙體 (disulfide-linked dimer) 組成，它依靠 phosphatidyl inositol linkage和細胞膜表面鍵結。有許多相關的 isozymes，分別來自下列不同的基因，placental isozyme、intestinal isozyme、germ cell isozyme及tissue nonspecific isozyme，而tissue nonspecific isozyme可在骨骼、肝臟和腎臟中大量發現，少量存在於 skin fibroblasts, leukocytes。而在骨細胞中的鹼性磷酸酵素主要是由骨母細胞所製造，在骨骼合成發展時會大量表現，其功能是在 endochondral和woven bone形成的早期階段促進礦物質的沉澱。鹼性磷酸酵素在體外於pH=8~10環境下，能催化水解單酯磷酸 (monoester phosphate)，故利用此原理加入一單酯磷酸受質naphthol AS-BI phosphate，鹼性磷酸酵素會將其磷酸水解，剩下的naphthol AS-BI 可和 diazonium salt fast blue base 形成不可溶的紫色色素沉澱，因此可將骨母細胞的鹼性磷酸酵素活化位染成藍紫色，故對骨母細胞染色有專一性。

人類胚胎上頸骨間質細胞骨誘導鹼性磷酸酵素染色法實驗步驟

為將經過骨誘導步驟處理2~3 weeks之培養盤內的細胞培養液抽乾以10% 福馬林固定15分鐘後，添加 Alkaline phosphatase staining working solution，室溫避光作用30分鐘。DD water完整清洗，Meyers haematoxylin，染色7分鐘後以顯微鏡觀察染色成果，並拍照存檔。

2.4.2 人類胚胎上頸骨間質細胞礦物質沉積染色

Alizarin Red S Staining

以組織染色的方式染出造骨母細胞所堆積的bone nodule 矿物質沉積。

Alizarin Red S staining 染色步驟為將經過骨誘導步驟處理2~3 weeks之培養盤內的細胞以4% 福馬林固定15分鐘。加入Alizarin Red S staining working solution室溫作用15分鐘。(使用前確認Alizarin Red S staining working solution的pH值為4.1~4.3)，DD water完整清洗後以顯微鏡觀察染色成果，並拍照存檔。

2.4.3 人類胚胎上頸骨間質細胞礦物質穿透式電子顯微鏡之檢測

將細胞鈣化產物以絕對酒精懸浮後，以銅網 (200 網目；表面鍍碳，鍍碳是為了要強化電子光束的穩定度)撈起，再用拭鏡紙將表面水分拭乾，接著抽真空 10 分鐘，即可將銅網放入 single title holder 內，加電壓 200kV 觀察試片，並以電子繞射與 EDS 檢測。

2.5 材料的合成

2.5.1 鹽類的選擇

使用在人體的生醫陶瓷甚多，主要包括有磷酸鈣鹽類生醫陶瓷：氫氧基磷灰石 (Hydroxyapatite ; HA)、三鈣磷酸鹽等；硫酸鈣類生醫陶瓷：硫酸鈣、硫酸鈣骨水泥等等。因此我們分別從這三大類鹽類中選出的實驗目標鹽類如下：

■ 磷酸鹽類

1. Hydroxyapatite (Sigma-Aldrich, product no.289396, M=502.3)
2. Calcium Diphosphate (Wako, product no. 03415055, M=254.10)
3. Calcium phosphate dibasic (Sigma-Aldrich, product no. C7263, M=136.06)

■ 硫酸鹽類

Calcium Sulfate Dihydrate (Flluka, product no.21244, M=172.10)

2.5.2 混合液及二維薄膜型、三維支架型與複合材微粒製備方法

2.5.2.1 複合材混合液製備

將上述五種鹽類包括氫氧基磷灰石 (Hydroxyapatite ; HA) 、二磷
酸鈣 (Calcium Diphosphate) 、二水合磷酸鈣 (Calcium Diphosphate
dibasic) 、二水合硫酸鈣 (Calcium Sulfate dibasic) ，分別以 5 % 重量
百分濃度與 10 % 重量百分濃度的聚己內酯
(polycaprolactone, Aldrich, product no. 440744) 以 1,4 Dioxan 及
Chloroform 溶解，於 40°C 條件下持續攪拌 8 小時以得均勻的複合材
混合液。流程如圖 1 所示。



2.5.2.2 二維(2D)薄膜型複合材製備方法

以 500 μm 之刮棒將複合材混合液在玻璃板上刮出等厚薄膜，然
後置於 37°C 烘箱中 24 小時充分乾燥得到二維 (2D) 薄膜型複合
材，並以切圓器將之裁切為直徑 1.5 及 10 公分的圓片。流程如圖 2
所示。

2.5.2.3 三維 (3D) 支架型複合材製備方法

採用溶劑鑄造/鹽析法 (solvent casting / particulate leaching)，將氯化鈉結晶研碎並以篩網 (Retch) 篩取顆粒大小小於 106 μm 的顆粒，取 12 公克將其加入 3 公克之複合材混合液中，充分混合均勻後倒入多個 1.5ml 的 eppendorf 並置於烘箱 24 小時充分乾燥，然後將包覆有氯化鈉結晶的複合材硬塊置於緩慢流動之去離子水中 48 小時，待其中氯化鈉結晶充分溶解出而得到三維 (3D) 支架型複合材。

冷凍乾燥法，將均勻的複合材混合液置於-80°C 結凍 8 小時後，轉至-40°C 高真空之冷凍乾燥機 72 小時，將溶劑完全揮發。流程如圖 3 所示。



2.6 掃瞄式電子顯微鏡之樣本製備

將樣本置於 37°C 烘箱 72 小時完整乾燥後，迅速將樣本黏貼於掃瞄式電子顯微鏡專用之樣品載臺上，隨後置入離子覆膜機中，進行黃金覆膜 (10mA, 1KV, 120 sec, 厚度約 200Å)，覆膜後的樣品即可置入掃瞄式電子顯微鏡中觀察。

2.7 二維薄膜細胞培養方法

將上列四種鹽類與純聚己內酯製成的薄膜，以切圓器裁切為圓片，置入實驗所選用培養盤或培養皿並以 70% 酒精噴灑處理 90 分鐘，並以紫外線雙面各照射八小時以達滅菌效果後，seeding 人類胚胎上顎骨間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells) 於其上。

2.8 生物毒性測試



MTT Assay 的原理是當細胞新陳代謝時，會將原本呈現黃色的 Methylthiazol tetrazolium 還原成暗紫色、不溶於水溶液的 formazan crystal 沉澱物。細胞的新陳代謝越活躍，MTT 被消耗的量越多、產生的 formazan crystal 沉澱物也越多。之後，再用 DMSO 把 formazan crystal 沉澱物溶解掉，well 內溶液呈現暗紫色。混合均勻之後，用 ELISA reader 即可判讀出吸光度。當 formazan crystal 沉澱物越多，溶液呈現的暗紫色也越深，用 ELISA reader 讀出的吸光度也越大。

MTT assay 實驗流程為將細胞以 0.05% 的 Trypsin-EDTA solution (Sigma T4049) 打散，以 1000 個細胞/well 的濃度，將細胞用 α-MEM+10% FBS 培養在預先貼黏好 2D 材料薄膜之 96 well plate。每

兩天將一實驗組加20 μ l MTT working solution，避光持續作用4.5 小時，每個well加100 μ l DMSO (J.T. Baker 9224-01)，用ELISA reader 在570 nm的波長下測吸光度，並更新其餘細胞培養液。

2.9 核糖核酸的製備與定量反轉錄聚合酶反應

2.9.1 核糖核酸的製備與定量

對於 10 cm dish 中的 2D 薄膜上的細胞先除去medium，於室溫下加入 1ml REZOLTM C & T，搖勻之後待細胞被均勻的lyse，將溶液移至 1.5 ml 的 eppendorf tube 中，於室溫作用 5 min，使其反應完全。接著，加入 0.2 ml chloroform 劇烈 vortex 15 秒，再靜置於室溫 2 分鐘，以 12,000 g、4°C，離心 15 分鐘，將上層部分取出至新的 eppendorf 中，加入等體積的 isopropanol 混合均勻，靜置室溫 10 分鐘。繼之以 12,000 g、4°C，離心 10 分鐘，離心後產生白色 pellet，以 1 ml 75% ethanol 清洗白色 pellet，再次以 12,000 g、4°C，離心 5 分鐘後，置於冰上乾燥，最後以 DEPC 水溶解之。取 2 μ l RNA 加入 98 μ l 無菌水中，測 260 nm 及 280 nm 之吸光值。利用 $OD_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$ 之公式，換算出溶液中 RNA 的含量。

2.9.2 反轉錄聚合酶反應 (Reverse transcription-polymerases chain reaction)

從每個樣本等量取 3 μ g 的 RNA，加熱至 70°C 等待 10 分鐘用以解開二級結構，10 分鐘後放置冰上。配置含有 4 μ L Reverse Transcription 5 \times Buffer、1 μ L dNTP Mixture, 10 mM、15 u Reverse Transcriptase、0.5 μ g Oligo (dT) primer、3 μ g Total RNA 並以 Nuclease Free Water 補至總體積為 20 μ L 的反應混合液，將反應混合液放置於 42°C 水浴槽中 1 小時，使 RNA 可被反轉錄成為 cDNA。反應時間完成後將混合液加熱 95°C 5 分鐘之後靜置於冰上 5 分鐘，使反轉錄酶失去活性。置備聚合酶鏈鎖反應所需試劑 2 μ L 從反轉錄反應所得到的 cDNA、3 μ L 10 \times DNA Polymerase Buffer、0.5 μ L 10mM dNTP、0.3 μ L Taq polymerase、1 μ L primer F、1 μ L primer R 與 21.2 μ L DDW，所組成總體積為 30 μ L 的反應混合液。

2.10 及時定量聚合酵素鏈鎖反應

及時定量聚合酵素鏈鎖反應(Real-time PCR)

計算原理

$Y = X \cdot (1 + e)^n$ ，在 $e = 100\% = 1$ $Y = X \cdot 2^n$ ， X ：原來濃度

n : cycles

計算公式

$Ct_{target\ gene} - Ct_{Endogenous\ control} = \Delta Ct$

$\Delta Ct_{Sample} - Ct_{Calibrator\ (control)} = \Delta\Delta Ct$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$

Ct : threshold cycle

樣本準備

Reagent premix, cDNA稀釋後 至少取 $5\mu\text{l}/\text{well}$ (10~100 ng) 以減少 pipette error。Template濃度是以進行RT所用的total RNA/RT volumn 換算而來。每種Probe至少準備一管NTC (其最後Ct值應為 40)。Sample 以三重複方式操作，每一反應管加入TaqMan Universal PCR Master Mix (2×) $7.5\mu\text{l}$ 、TaqMan Gene Expression Assay Mix (20×) $0.75\mu\text{l}$ 、 H_2O $1.75\mu\text{l}$ cDNA diluted in RNase-free water $5\mu\text{l}$ 。以 (Real-time PCR) ABI 7700 上機反應。

2.11 動物實驗

實驗動物選用紐西蘭成兔。在每隻動物兩側股骨內側皮質骨 (cortical bone) 處，依序分別植入市售骨填補材：1. CollaPlug®、2.

Gelform[®]，與本研究製成的複合型骨填補材。材料植入時間分別為 2、5 週 (圖 4)。

手術方法

首先於兔子肌肉上施行ketamine (50 mg/Kg) 注射，進行麻醉，待兔隻無抵抗後，再以生理食鹽水行靜脈點滴注射，並以thiopental sodium (0.01 g/ml) 及ketamine來維持麻醉狀態，同時給予atropine 0.2 mg 靜脈注射，以減少上呼吸道分泌物，避免窒息 (suffocation)。麻醉後，剃除兩側下肢的兔毛，以優碘消毒後，進行手術。首先於兩側股骨遠端及股骨近端切一縱走約 5 公分之刀口，先露出股骨內側，將皮下組織剝離看見骨膜，將骨膜切開後，以直徑 1.6 mm 之鑽頭垂直脛骨表面鑽出四個寬約 1.7 mm 且相距 2.5 mm 以上之孔，將 2×2×2mm 立方的填補材包括PCL、HA、CP、CPD、CSD 3D支架與等大小CollaPlug[®]、Gelform[®]放置入孔內，並留一空孔不放任何材料作為對照組，然後以 4-0 尼龍線將傷口縫合，術後並以靜脈注射廣效性抗生素cephalothin sodium (Keflin), 40 mg/Kg 來預防傷口感染 (圖 5)。實驗兔隻於飼養到期後，加以犧牲。犧牲時，先肌肉注射ketamine (50 mg/Kg)，再以靜脈注射 5c.c. 15% Potassium chloride。待兔隻犧牲後，先觀察手術傷口癒合情形，然後沿著原來傷口切開，取下股骨。先以肉眼觀察植入物和周遭骨骼相密合情形，然後將標本泡入 10%

Neutral Buffered Formalin一天後，再以Formic acid-Sodium citrate Method進行脫鈣，直至可以用細針頭刺穿骨骼後，以鑲有細碎鑽之超薄線鋸橫切植入物及骨骼，厚度約 2mm，並以paraffin包埋，然後切成 5-8 μ m 厚之切片，再經酒精復水後，以Hematoxylin及Eosin染色，封片製成玻片，放置顯微鏡下觀察細胞形態變化。



第三章 結果

3.1 人類胚胎上頸骨間質細胞分裂複製能力試驗實驗結果

實驗以拍照方式計數，細胞總數為分母，細胞核有染上 BrdU 之細胞數為分子，依此可將單位時間內不同種細胞的分裂複製能力定量。

人類胚胎上頸骨間質細胞 (HEPM) 之細胞的分裂複製能力為 81%；人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 為 79%；人類牙齦纖維母細胞 (GF) 為 46% (圖 6)。由實驗結果得知，人類胚胎上頸骨間質細胞 (HEPM) 之細胞的分裂複製能力高於人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 與人類牙齦纖維母細胞 (GF)。

3.2 人類胚胎上頸骨間質細胞幹性相關基因細胞免疫染色實驗結果

實驗選用的幹性相關基因有 Oct-4、Sox-2、Stro-1，並以細胞免疫染色實驗方式，比較人類胚胎上頸骨間質細胞 (HEPM)、人類骨髓間質幹細胞株 (BMSC)、人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 與人類牙齦纖維母細胞 (GF) 在幹性相關基因表現上的差異 (圖 7)。結果整理於(表 3)。

人類牙齦纖維母細胞 (GF) 在幹性相關基因上均無表現；人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 之 Stro-1 基因有高度表現但 Oct-4、Sox-2 基因則不明顯；人類胚胎上頸骨間質細胞 (HEPM) 與人類骨髓間質幹細胞株 (BMSC) 之 Oct-4、Sox-2、Stro-1 幹性相關基因均有表現，而且

HEPM 之 Stro-1 基因表現量更高於 BMSC。得到結果為對於其他三種細胞，HEPM 之幹性高於其他實驗細胞。

3.3 間質細胞表面抗原免疫染色實驗結果

實驗選用的間質細胞表面抗原有 CD29、CD44、CD90、CD105、CD146，並以細胞免疫染色實驗方式，比較人類胚胎上頸骨間質細胞 (HEPM)、人類骨髓間質幹細胞株 (BMSC)、人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 與人類牙齦纖維母細胞 (GF) 在間質細胞表面抗原表現上的差異 (圖 8-11)。實驗得到結果為人類胚胎上頸骨間質細胞 (HEPM) 在 CD29、CD44、CD90、CD105、CD146 這 5 種間質細胞表面抗原之表現模式上，最相似於人類骨髓間質幹細胞株 (BMSC)，整理於 (表 4)。

3.4 人類胚胎上頸間質細胞誘導實驗

3.4.1 鹼性磷酸酵素染色實驗結果

實驗方式為分別將人類胚胎上頸間質細胞 (HEPM) 培養於對照組 DMEM 培養基，及實驗組骨誘導培養基與牙本質母細胞誘導培養

基，兩週與三週後施以鹼性磷酸酵素染色（圖 12）。實驗結果為，人類胚胎上頸間質細胞培養於 DMEM 培養基三週，鹼性磷酸酵素染色呈色高於兩週，顯示 HEPM 有自發表現 ALP 基因之性質。而在實驗組，培養於骨誘導培養基與牙本質母細胞誘導培養基中，不管是兩週或三週，其鹼性磷酸酵素染色均明顯於對照組，且牙本質母細胞誘導培養基組又稍高於骨誘導培養基組，得知兩種誘導培養基對於 HEPM 均有誘發表現 ALP 基因之性質。

3.4.2 磷物質沉積染色實驗結果

實驗方式為分別將人類胚胎上頸間質細胞培養於對照組 DMEM 培養基，實驗組包括培養兩週及三週於骨誘導培養基與牙本質母細胞誘導培養基，並以 Aliza Red 對其磷化物質做染色處理（圖 13）。實驗結果顯示，人類胚胎上頸間質細胞培養於 DMEM 培養基兩週與三週，均無磷物質沉積染色。在實驗組，培養於骨誘導培養基與牙本質母細胞誘導培養基中，不管是兩週或三週，均有明顯的磷物質沉積染色。顯示 HEPM 在受到骨誘導培養基與牙本質母細胞誘導培養基處理時，有產生磷化物質之能力。

3.4.3 骨誘導培養即時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗結果

實驗以人類胚胎上頸間質細胞，分別培養於骨誘導培養基與對照組 DMEM 培養基兩週後，檢測其 ALP、OC 基因 mRNA 表現量。ALP 基因 mRNA 表現量增為 891 倍，OC 基因 mRNA 表現量增為 43 倍，可說明人類胚胎上頸間質細胞會受到誘導而表現骨形成相關與造骨母細胞相關基因（圖 14）。

3.4.4 磷化物質穿透式電子顯微鏡實驗結果

3.4.4.1 骨誘導磷化物質穿透式電子顯微鏡實驗結果

人類胚胎上頸間質細胞培養於骨誘導培養基三週後，以塑膠刮棒刮取培養皿表面磷化物質，使用絕對酒精懸浮滴於銅網載台後，以穿透式電子顯微鏡觀察，可看到型態不規則的物塊，使用 EDX 檢測證明其由 Ca、P、O、H 元素所組成之 $Ca/P = 1.866$ 的磷化物。但其於電子繞射處理下卻無法清晰成像，因而說明以骨誘導培養基處理人類胚胎上頸間質細胞三週的條件，可形成磷化物，但結晶不理想（圖 15-17）（表 5）。

3.4.4.2 造牙本質母細胞誘導磷化物質穿透式電子顯微鏡實驗結果

人類胚胎上頸間質細胞培養於造牙本質母細胞誘導培養基三週後，以塑膠刮棒刮取培養皿表面礦化物質以穿透式電子顯微鏡觀察，可看到型態較類似結晶的物塊，使用 EDX 檢測可證明其由 Ca、P、O、H 元素所組成 $Ca/P = 2.016$ 的礦化物。並於電子繞射下可觀察到三明顯環圈，經計算三者 d 值分別為 5.62\AA 、 2.74\AA 、 1.86\AA ，然而卻無法於資料庫中對應出由 Ca、P、O、H 元素所組成單一結晶物。實驗說明以造牙本質母細胞誘導培養基處理人類胚胎上頸間質細胞三週的條件，可形成礦化物，且結晶優於骨誘導培養基（圖 18~20）

（表 6）



3.5 生物毒性測試實驗結果

在生物毒性測試實驗中。人類胚胎上頸骨間質細胞 (human embryonic palatal mesenchymal cells) 在所有合成的 2-D 薄膜上之 MTT 吸光度質，呈極微幅增加趨勢，推測材料均可供細胞貼附生長，但生長量明顯低於對照組培養皿（圖 21）。

3.6 掃瞄式電子顯微鏡實驗結果

平面刮膜法中以 Chloroform 為溶劑製作複合材溶液所得之 2D 薄膜在掃描式電子顯微鏡下可發現，未含無機鹽類的 PCL 實驗組表面相當平滑（圖 22）。HA 實驗組可發現表面並不平整，鹽類結晶型態

明顯，且分布不一致（圖 23）。CP 實驗組表面雖不平整但鹽類結晶分布相對均勻（圖 24）。CPD 實驗組結果類似於 CP 實驗組，鹽類結晶分布相對均勻並與材料融合（圖 25）。CSD 實驗組表面相對其他組材料相對平整且鹽類結晶與材料良好融合（圖 26）。

以 1,4-Dioxane 為溶劑製作複合材溶液所得之二維薄膜在掃描式電子顯微鏡下可發現，未含無機鹽類的 PCL 實驗組相似於以 Chloroform 為溶劑所得表面相當平滑（圖 27）。HA 實驗組可發現表面並不平整，分布不一致顯示無機鹽被材料完整包覆故結晶型態不明顯，有立體結構孔洞出現（圖 28）。CP 實驗組表面雖不平整但鹽類結晶分布相對均勻，無機結晶與材料融合，沒有明顯立體結構孔洞出現（圖 29）。CPD、CSD 實驗組結果類似於未含無機鹽類的 PCL 實驗組，未能明顯觀察到鹽類結晶，結構相對均勻並與材料高度融合（圖 30、31），可發現使用兩種溶劑所得之二維薄膜兩者均沒有明顯立體結構孔洞出現，但無機鹽類的分布上以 1,4-Dioxane 為溶劑製作二維薄膜表現較佳。

而在鹽析法製程掃描式電子顯微鏡結果顯示，以 Chloroform 或 1,4-Dioxane 為溶劑製作 3D 支架，除了在 1,4-Dioxane 為溶劑 CSD 實驗組之外，所有實驗結果均類似，出現多量立方體結構而沒有預期的

孔洞結構 (圖 32~40)。以 1,4-Dioxane 為溶劑 CSD 實驗組中，卻無類似的方體結構出現 (圖 41)。

以 Chloroform 配合冷凍乾燥製作 3D 支架為製程，在掃式電子顯微鏡結果顯示未含無機鹽類的 PCL 實驗組表面呈皺褶狀且皺褶間並無孔洞 (圖 42)。HA 實驗組的表面會隨無機鹽分布量呈現兩種型態，分別是無明顯孔洞的微幅皺摺狀與大量無機鹽結晶散布狀 (圖 43)。CP 實驗組亦可發現表面呈現兩種型態，分別是微幅皺摺狀與不均質孔洞狀 (圖 44)。CPD 實驗組結果是表面皺褶間出現微小孔洞，但無具孔洞的立體結構出現 (圖 45)。CSD 實驗組類似於 CPD 實驗組，沒有立體孔洞結構出現，表面呈皺褶狀 (圖 46)。

在以 1,4-Dioxane 為溶劑配合冷凍乾燥為製程所得製作 3D 支架，所有實驗組表面呈類似蜂巢狀結構，立體孔洞結構型態規則而均勻，且可觀察到孔洞結構間具連通性且型態相當一致 (圖 47~51)。

3.7 及時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗結果

基因 ALP mRNA 之表現，材料組於兩天時間點 HA 及 CP 組有高度的表現量外，其餘均無明顯表現。骨誘導培養基組則於十二天起 ALP mRNA 之表現有上升趨勢 (圖 52)。基因 BMP2 mRNA 之表現，於兩天時間點 IND 及 CP 組與二十四天時間點 CPD 組的表現量有微幅上升外，其餘均無明顯表現 (圖 53)。基因 OC mRNA 之於所有組別於兩天時間點均有微幅上升外，除了 IND 組於十二天時間點後表現量有明顯提高其餘均無明顯表現 (圖 54)。基因 PTGS2 mRNA 則於純高分子組 PCL 與骨培養基誘導組 IND 於十二天時間點後表現量有明顯提高其餘均無明顯表現 (圖 55)，數據見(表 7~10)

3.8 動物實驗斷層掃描結果

紐西蘭白兔骨填補材植入 5 週後左股骨斷層掃描結果可發現，以對照組骨質相對密度最高，其它實驗組骨質密度均較低。(圖 56、57)。定量數據見 (表 11)

3.9 動物實驗組織切片結果

紐西蘭白兔骨填補材植入 2 週後股骨組織切片結果發現，所有實驗組均可發現材料型態均完整。對照組中有觀察到明顯的骨質再生與血管新生（圖 58）。植入 5 週後股骨組織切片結果顯示，實驗組均可發現材料未完全崩解及有少量骨質新生。對照組則可發現骨質已大部分癒合（圖 59）。

與市售骨填補材比較，Gelform[®]、CollaPlug[®]相較於對照組，兩組市售填補材實驗組的骨再生量較多，皮質骨內側近髓腔表面更為平整，無再生量不足的凹陷（圖 60）。



第四章 討論

4.1 人類胚胎上頸間質細胞作於實驗模式細胞之合適性

骨再生是一複雜的過程，其中牽涉了骨誘導、骨引導作用與多種細胞。本實驗所製作的骨填補之終極目標是人體應用，為了能使前導體外細胞實驗之實驗結果與體內實驗差距較小，因此本實驗選用初級培養之人類胚胎上頸間質細胞，而未使用細胞株。

我們在細胞分裂複製能力實驗結果（圖 6）中，單位時間內人類胚胎上頸間質細胞細胞核染上 BrdU 之比率（81%）高於人類乳牙牙髓幹細胞（SHED）79% 與人類牙齦纖維母細胞（GF）為 46%。幹性相關基因細胞免疫染色實驗結果（圖 7）（表 3），間質細胞表面抗原免疫染色實驗結果（圖 8~11）（表 4）總結出人類胚胎上頸間質細胞會表現幹細胞相關之基因並具有高分裂能力之幹細胞特性，且表面抗原表現模式近似於人類骨髓幹細胞（BMSC）。

為了要評估人類胚胎上頸間質細胞是否具鈣化物沉積與骨質形成的能力，我們使用含有骨誘導相關最佳化之藥品 β -glycerophosphate、Ascorbic acid 及 Dexamethasone 之骨培養液予以骨誘導處理。在鹼性磷酸酵素染色實驗結果與骨礦物質沉積染色實驗結果中可發現，未經骨誘導的人類胚胎上頸間質細胞本身就有鹼性磷酸酶的表現（圖 12 A），且隨培養時間延長有上升的趨勢（圖 12 D）。經骨誘導或造牙本質母細胞誘導後表現量更為明顯且亦有隨時間上

升之趨勢（圖 12 B、E）（圖 12 C、F）。骨礦物質沉積染色實驗結果則顯示。人類胚胎上頸間質細胞培養於低葡萄糖 DMEM 培養基 2 週與 3 週均不會出現骨礦物質沉積染色（圖 13 A、D），經骨誘導造牙本質母細胞誘導處理後 2 週與 3 週均出現明顯骨礦物質染色沉積（圖 13 B、E）（圖 13C、F）。即時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗結果也顯示，人類胚胎上頸間質細胞經骨誘導處理 2 週後，ALP 基因 mRNA 表現量增為 891 倍，OC 基因 mRNA 表現量增為 43 倍（圖 14）。骨誘導實驗證明人類胚胎上頸間質細胞具骨形成潛力。



4.2 合成材料之生物毒性檢驗

將人類胚胎上頸間質細胞培養於 2D 薄膜上以 MTT Assay 作生物毒性測試，實驗結果為人類胚胎上頸間質細胞均可貼覆生長於所有的 2D 平面膜上，然而卻不如培養皿對照組（圖 21），證明本實驗所合成之材料均不具生物毒性但不若培養皿般適合細胞生長。

4.3 選擇合成材料之不同製程

平面刮膜法中以 Chloroform 或以 1,4-Dioxane 為溶劑製作複合材
溶液所得之二維薄膜在掃描式電子顯微鏡下可發現使用兩種溶劑所
得之二維薄膜兩者均沒有明顯立體結構孔洞出現，但無機鹽類的分布
上以 1,4-Dioxane 為溶劑製作二維薄膜表現較佳。

而在鹽析法製程掃描式電子顯微鏡結果顯示，以 Chloroform 或
1,4-Dioxane 為溶劑製作 3D 支架，除了在 1,4-Dioxane 為溶劑 CSD 實
驗組之外，所有實驗結果均類似，出現多量立方體結構而沒有預期的
孔洞結構，在更高倍觀察下發現立方體結構表面包覆了一層類似於高
分子材料的物質，故推測立方體結構的形成可能與高分子材料包覆氯
化鈉結晶使其未能在後續的脫鹽步驟中去除 (圖 32~40)。以
1,4-Dioxane 為溶劑 CSD 實驗組中，卻無類似的方體結構出現，推測
原因可能是以 1,4-Dioxane 為溶劑製作成的複合材溶液並未將氯化鈉
結晶完整包覆，且二水合硫酸鈣 (CSD) 亦可發生水合作用，使得 3D
支架結構在脫鹽步驟中形成，但可合理的推測二水合硫酸鈣 (CSD)
已發生改變 (圖 41)。

以 Chloroform 配合冷凍乾燥製作 3D 支架為製程，在掃描式電子
顯微鏡結果顯示未含無機鹽類的 PCL 實驗組表面呈皺褶狀且皺褶間
並無孔洞 (圖 42)。HA 實驗組的表面會隨無機鹽分布量呈現兩種型
態，分別是無明顯孔洞的微幅皺摺狀與大量無機鹽結晶散布狀 (圖

43)。CP 實驗組亦可發現表面呈現兩種型態，分別是微幅皺摺狀與不均質孔洞狀 (圖 44)。CPD 實驗組結果是表面皺褶間出現微小孔洞，但無具孔洞的立體結構出現 (圖 45)。CSD 實驗組類似於 CPD 實驗組，沒有立體孔洞結構出現，表面呈皺褶狀 (圖 46)。

但在以 1,4-Dioxane 為溶劑配合冷凍乾燥為製程所得製作 3D 支架，所有實驗組表面呈類似蜂巢狀結構，立體孔洞結構型態規則而均勻，且可觀察到孔洞結構間具連通性且型態相當一致 (圖 47~51)。所以我們推測，Chloroform 與 1,4-Dioxane 的 Melting Point 值分別為 -63 °C 與 10-12 °C，實驗所使用的冷凍乾燥機於真空乾燥時定溫於 -40 °C，在這溫度 Chloroform 與 1,4-Dioxane 分別處於液相跟固相，固相 1,4-Dioxane 所占據的空間會因真空抽取而讓位形成規則連通孔洞，液相 Chloroform 則否，解釋冷凍乾燥描式電子顯微鏡結果。所以我們選擇以 1,4-Dioxane 為溶劑平面刮膜法與配合冷凍乾燥之製程，所製得二維薄膜及三維支架分別進行細胞實驗與動物實驗。

4.4 二維薄膜即時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗

將人類胚胎上頸間質細胞，種於 2D 薄膜上對不同基因作即時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗，其中基因 ALP mRNA 在表現趨勢上，材

料組 HA 及 CP 於兩天時間點有高度的表現量外，其餘均無明顯表現。骨誘導培養基組則於十二天起 ALP mRNA 之表現有上升趨勢。

基因 OC mRNA 表現僅骨誘導組 IND 在實驗後期 12、24 天時會上升，其他實驗組則無此趨勢。推斷在骨誘導培養基促進下，人類胚胎上頸間質細胞分化為造骨母細胞而使得基因 OC mRNA 表現量上升。

基因 BMP2 mRNA 之表現，於兩天時間點 IND 及 CP 組與二十四天時間點 CPD 組的表現量有微幅上升外，其餘均無明顯表現。相似於基因 PTGS2 mRNA 之表現，兩者均有骨誘導組 IND 在實驗後期上升趨勢，但改變量均在十倍以內並不甚顯著。

歸結出 2D 薄膜對於人類胚胎上頸間質細胞不同基因表現之影響，只有在初期部分組別 HA、CP 對鹼性磷酸酶 (ALP) 有高度促進上升之影響，不如骨誘導組 IND 在實驗後期上升趨勢，而且對 BMP-2、OC 之影響亦不如骨誘導組 IND，，因此我們無法認定實驗所合成之材料對骨生成有絕對性助益 (圖 52~55) (表 7~10)。

4.5 動物實驗

將材料種植入紐西蘭白兔股骨 5 週後，以斷層掃描檢測各材料的結果顯示，所有合成材料實驗組的骨質密度均低於鑽孔後不放置任

何材料的對照組（圖 56~57）（表 11）。植入材料 2 週股骨後之組織切片結果亦可看出，於不放置任何材料的對照組骨缺損兩側已有新生成之骨質，而所有實驗組均無。植入材料 5 週後之股骨切片，對照組骨缺損雖不如市售材料實驗組般接近完全修復皮質骨的厚度，但人造的骨缺損已恢復相連，反觀填補本實驗合成複合材之實驗組，材料經 5 週後仍可於玻片上所見，亦可觀察到類似發炎細胞的群聚現象，所填補區域骨再生均不完全，而得到在兔子為實驗動物模型上，本實驗合成複合材對骨生成並無極佳的幫助。

我們推測原因為實驗組材料的吸收速率較實驗動物骨形成的速度慢，雖然材料具有骨引導性與骨誘導性，但在細胞生長所需空間的讓位上並不理想，所以可從加速材料的崩解並降低發炎反應時間的傾向上，再度對材料的製程做設計。

表

Reference	Ca	P	Mg	Na	K	CO ₃	F	Cl	Ca:P ratio
(Driessens, 1980)	36.7	16.0	0.46	0.77	-	8.00	0.04	-	1.77
(Aoki et al., 1991)	34.0	15.0	0.50	0.80	0.20	1.60	0.08	0.2	1.75
(Le Geros et al., 1993)	24.5	11.5	0.55	0.70	0.03	5.80	0.02	0.10	1.65

表 1. 骨組成元素整理



	Emperical Formulas	Ca: P ratio
Dicalcium phosphate dihydrate	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1.00
Dicalcium phosphate	CaHPO ₄	1.00
Octacalcium phosphate	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ ·5H ₂ O	1.33
β-Tricalcium phosphate	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.50
Hydroxyapatite	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1.67
Tricalcium phosphate monoxide	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2.0
Calcium-deficient apatites	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x}	(10-X):6

表 2. 磷灰石相整理

	HEPM	BMSC	SHED	GF
Oct 4	+	+	-/+	-
Sox 2	+	+	-/+	-
Stro 1	++	+	++	-

表 3. 人類胚胎上頸間質細胞、人類骨髓間質幹細胞株 (HEPM)、人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED)、人類牙齦纖維母細胞 (GF) 幹性相關基因 Oct-4、Sox-2、Stro-1 細胞免疫染色實驗結果表格。

	HEPM	BMSC	SHED	GF
CD29	-/+	-/+	++	+
CD44	++	++	++	++
CD90	+	+	+	-/+
CD105	+	-/+	-/+	-/+
CD146	++	+	-/+	+

表 4. 人類胚胎上頸間質細胞、人類骨髓間質幹細胞株 (HEPM)、人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED)、人類牙齦纖維母細胞 (GF) 間質細胞表面抗原 CD29、CD44、CD90、CD105、CD146 免疫染色實驗結果表格。

Element	Weight %	Atomic %
O	46.7	66.5
P	18.6	13.7
Ca	34.7	19.8
Total	100.0	100.0

$$\text{Ca} / \text{P} = 1.866$$

表 5. 骨誘導礦化物質 EDX 實驗結果。

Element	Weight %	Atomic %
O K	42.1	62.4
P K	19.2	14.7
CaK	38.7	22.9
Total	100.0	100.0

$$\text{Ca} / \text{P} = 2.016$$

表 6. 造牙本質母細胞誘導礦化物質 EDX 實驗結果。

	2days	4days	8days	12days	24days
PCL	6.528116	0.069028	0.435275	3.749418	0.227405
HA	458.2528	0.063813	0.026522	18.50701	0.102002
CP	735.8834	0.069028	0.031178	0.831238	0.188591
CPD	1.798341	18.4643	1.41095	22.05958	0.36942
CSD	19.78955	0.097847	0.705475	12.26663	0.269184
IND	32.22258	0.119355	0.109576	107.6347	198.0883

表 7. 基因 ALP mRNA 表現量即時定量聚合酵素鏈鎖反應結果。

	2days	4days	8days	12days	24days
PCL	2.975915	0.239816	0.652176	0.733736	0.423373
HA	2.372925	0.485205	0.799221	0.191666	0.47522
CP	3.697799	1.295342	0.82169	0.406126	0.89296
CPD	0.304955	0.872564	1.208597	0.968171	3.066657
CSD	0.542113	0.66128	0.876606	0.686184	0.042788
IND	5.553254	1.011619	0.116899	0.364334	0.000939

表 8. 基因 BMP2 mRNA 表現量即時定量聚合酵素鏈鎖反應結果。

	2days	4days	8days	12days	24days
PCL	4.267329	0.485205	0.740549	1.565547	0.766664
HA	14.6213	0.382447	0.530957	0.713672	1.028114
CP	6.007092	0.569066	1.021012	1.977028	0.384219
CPD	0.687771	0.775572	0.764895	2.153475	3.264058
CSD	15.77972	0.508152	0.510506	2.508225	0.350301
IND	2.584706	0.581023	0.343885	9.691142	71.01245

表 9. 基因 OC mRNA 表現量即時定量聚合酵素鏈鎖反應結果。

	2days	4days	8days	12days	24days
PCL	1.741101	1.427344	1.565547	3.031433	4.121968
HA	1.639588	0.569066	0.819794	0.790041	0.251739
CP	1.39797	0.430276	0.403321	0.049721	1.536875
CPD	0.504642	1.372367	1.450617	1.076738	0.656712
CSD	0.172739	0.609909	1.03766	1.639588	0.482968
IND	0.866537	0.285851	1.831891	3.045474	8.243936

表 10. 基因 PTGS2 mRNA 表現量即時定量聚合酵素鏈鎖反應結果。

	PCL	HA	CP	CPD	CSD	Control
HD	64	61	77	36	87	99

表 11.紐西蘭白兔骨填補材植入 5 週後股骨斷層掃描骨質密度相對定量結果。以對照組骨質相對密度最高，其它實驗組骨質密度均較低。



圖

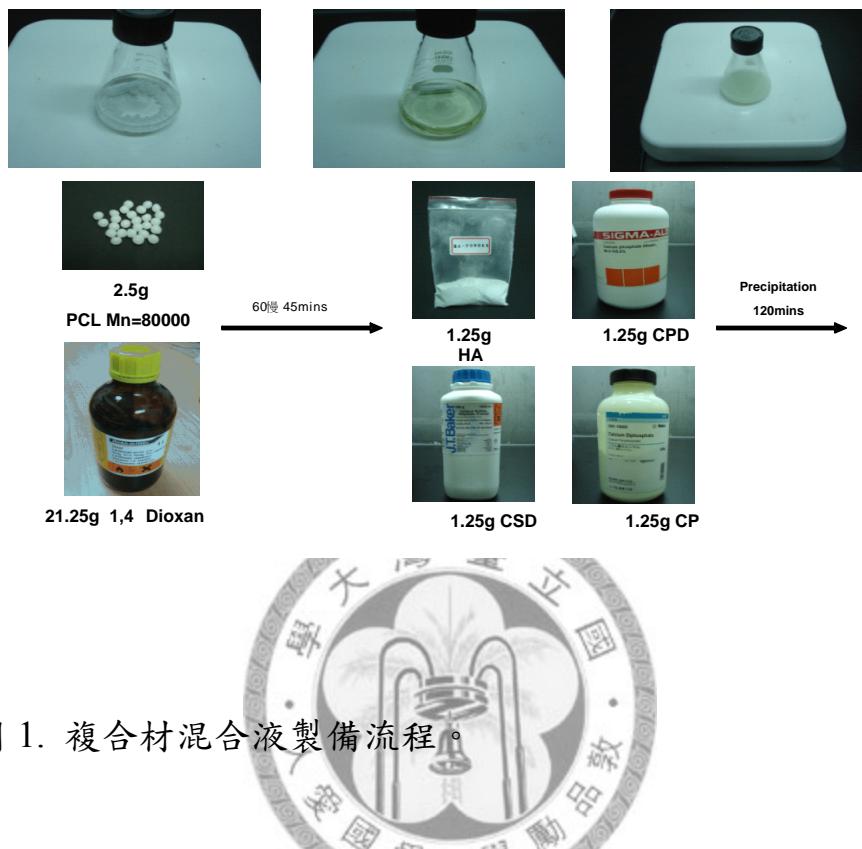


圖 1. 複合材混合液製備流程。

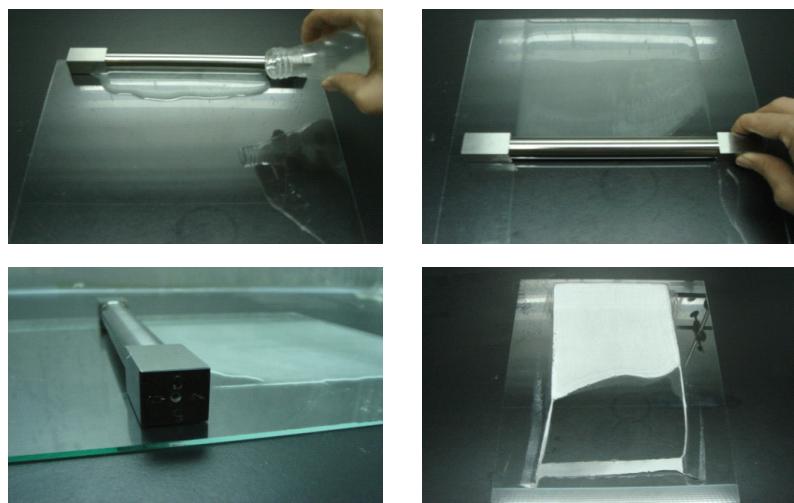


圖 2. 二維(2D)薄膜型複合材製備流程。



圖 3. 三維(3D)支架型複合材冷凍乾燥法製備流程。



圖 4. 動物實驗所需物品與動物。 (A) CollaPlug®。 (B) Gelform®。 (C) 本研究製成的複合型骨填補材。 (D) ketamine； atropine； thiopental sodium； cephalothin sodium (Keflin)；組織膠。 (E) 剃毛器；鑽骨器。 (F) 紐西蘭白兔。

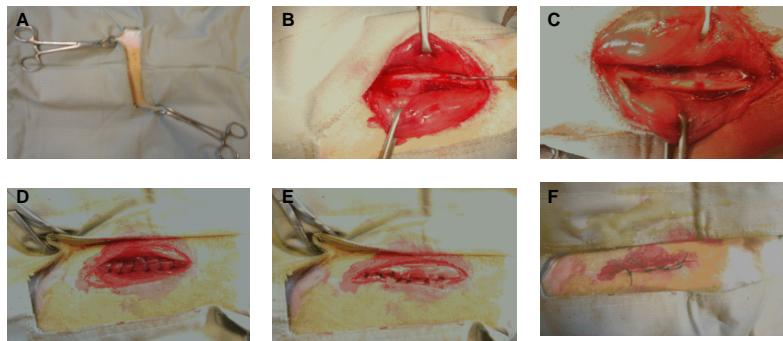


圖 5. 動物實驗手術流程。(A) 剃除兩側下肢的兔毛，以優碘消毒。 (B) 兩側股骨遠端及股骨近端切一縱走約 5 公分之刀口，先露出股骨外側，將皮下組織剝離看見骨膜。 (C) 將骨膜切開後以直徑 1.6 mm 之鑽頭垂直脛骨表面鑽出寬約 1.7 mm 且相距 2.5 mm 以上之孔，將 $2 \times 2 \times 2$ mm 立方的填補材包括 PCL、HA、CP、CPD、CSD 3D 支架與等大小 CollaPlug®、Gelform® 放置入孔內，並留一空孔不放置任何材料作為對照組，(D) (E) (F) 傷口縫合。

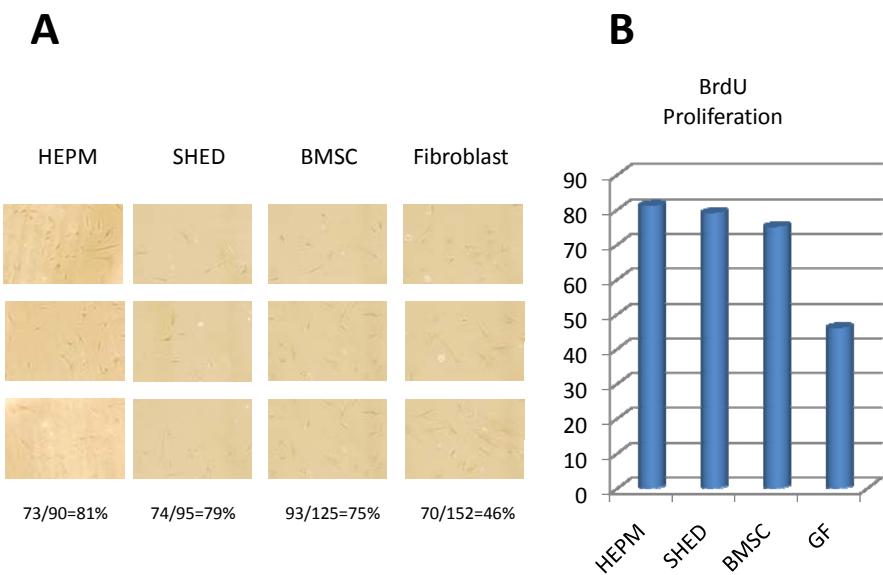


圖 6. 人類胚胎上頸間質細胞分裂複製能力試驗實驗結果。(A)

實驗以拍照數算細胞總數為分母，細胞核有染上 BrdU 之細胞數為分子，依此可定量化單位時間內不同種細胞的分裂複製能力。(B) 人類胚胎上頸骨間質細胞 (HEPM) 之細胞的分裂複製能力為 81%；人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 為 79%；人類骨髓間質幹細胞株 (BMSC) 為 75%；人類牙齦纖維母細胞 (GF) 為 46%。

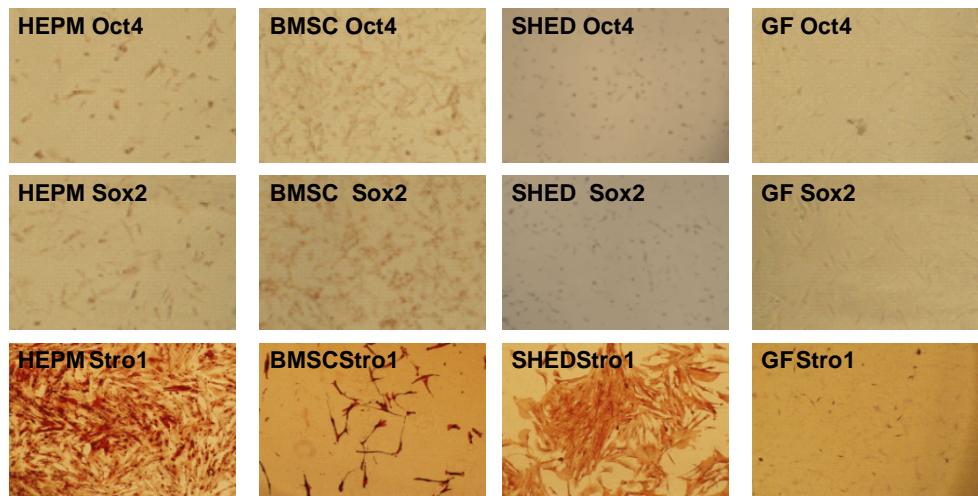


圖 7. 人類胚胎上頸骨間質細胞幹性相關基因Oct-4、Sox-2、
Stro-1細胞免疫染色實驗結果，並與人類骨髓間質幹細胞株
(BMSC)、人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED)、人類牙齦纖維母細胞 (GF)
做比較。

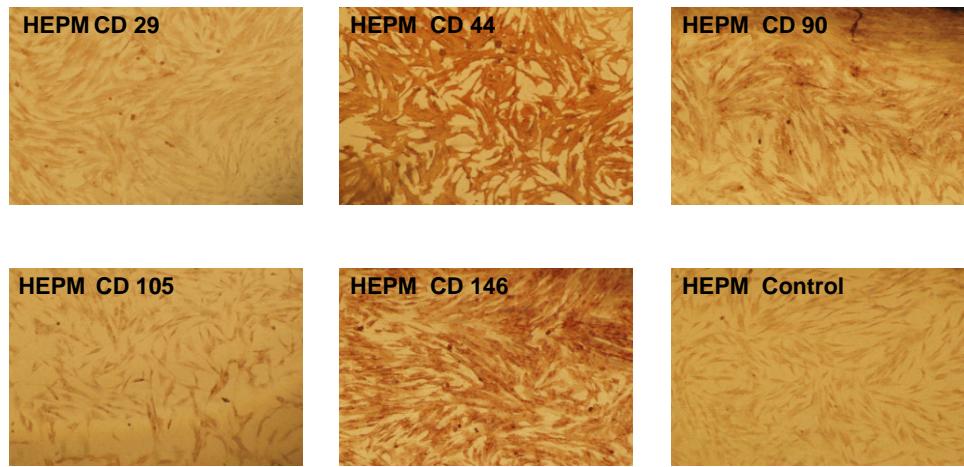


圖 8. 人類胚胎上頸間質細胞間質細胞表面抗原 CD29、CD44、CD90、CD105、CD146 免疫染色實驗結果。



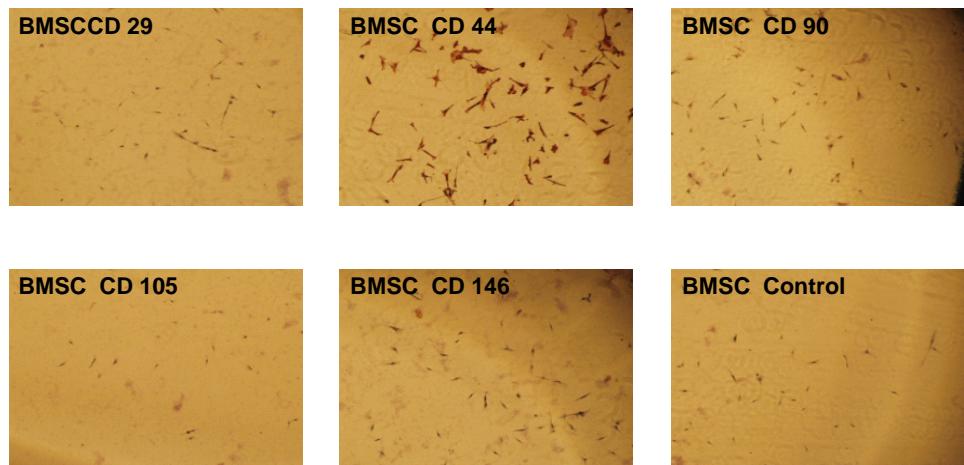


圖 9. 人類骨髓間質幹細胞間質細胞表面抗原 CD29、CD44、CD90、CD105、CD146 免疫染色實驗結果。

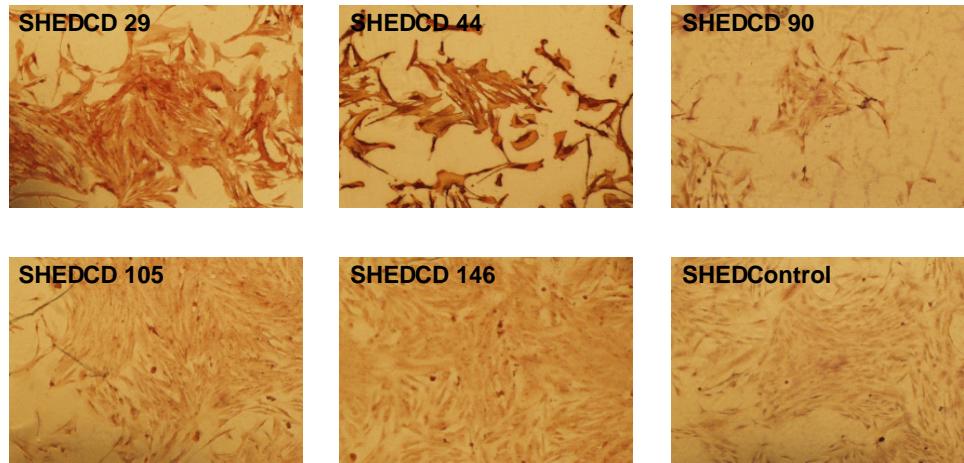


圖 10. 人類乳牙牙髓幹細胞 (SHED) 間質細胞表面抗原
CD29、CD44、CD90、CD105、CD146 免疫染色實驗結果。

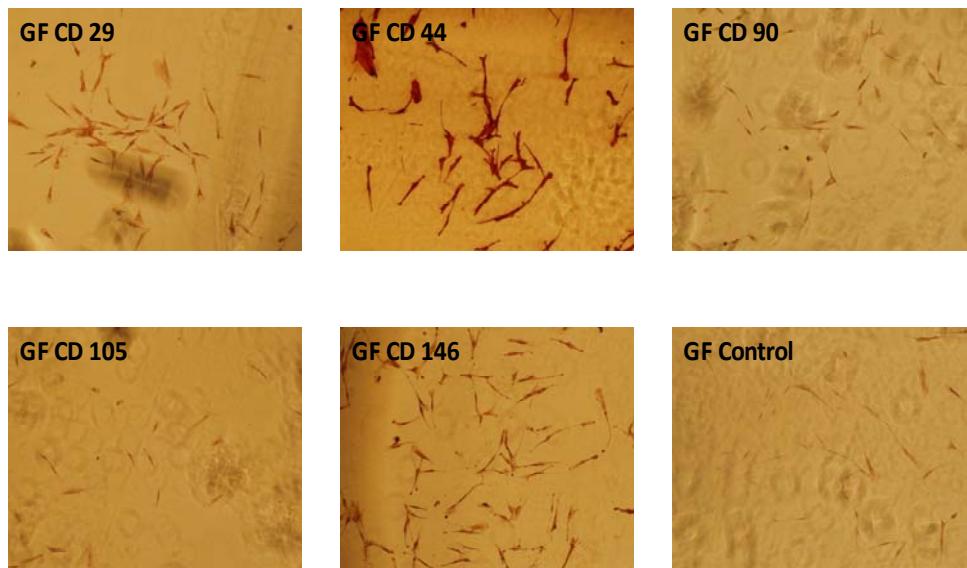


圖 11. 人類牙齦纖維母細胞 (human gingival fibroblasts) 間質細胞表面抗原 CD29、CD44、CD90、CD105、CD146 免疫染色實驗結果。

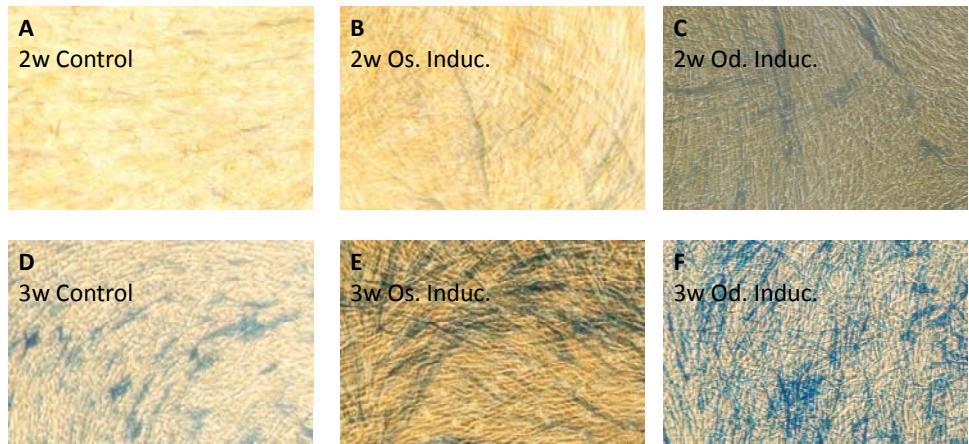


圖 12. 鹼性磷酸酵素染色實驗結果。(A) 人類胚胎上頸間質細胞培養於 DMEM 培養基兩週，鹼性磷酸酵素染色少於 (B) 培養於骨誘導培養基兩週。(C) 人類胚胎上頸間質細胞培養於牙本質母細胞誘導培養基三週 (E) 人類胚胎上頸間質細胞培養於骨誘導培養基三週，鹼性磷酸酵素染色高於 (D) 培養於 DMEM 培養基三週但少於 (F) 培養於牙本質母細胞誘導培養基三週。

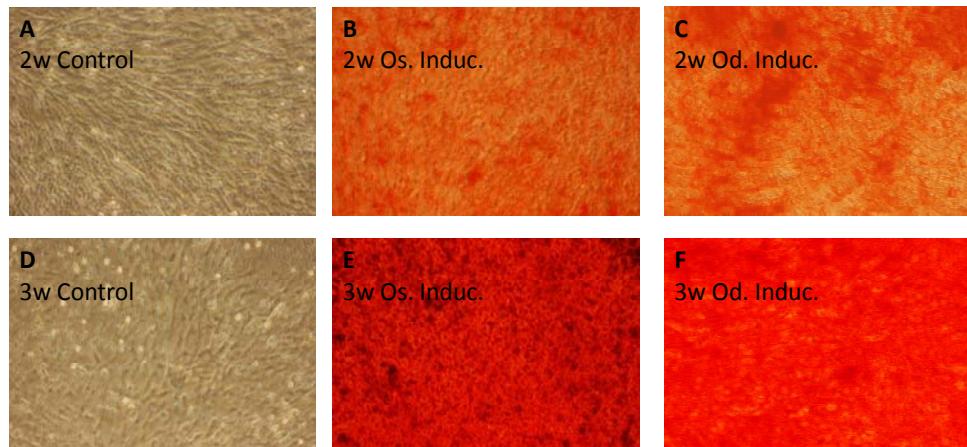


圖 13. 骨礦物質沉積染色實驗結果。(A) 人類胚胎上頸間質細胞培養於低葡萄糖 DMEM 培養基兩週，骨礦物質沉積染色少於 (B) 培養於骨誘導培養基兩週及 (C) 牙本質母細胞誘導培養基兩週。(D) 人類胚胎上頸間質細胞培養於低葡萄糖 DMEM 培養基三週，骨礦物質沉積染色少於 (E) 培養於骨誘導培養基三週及 (F) 牙本質母細胞誘導培養基三週。

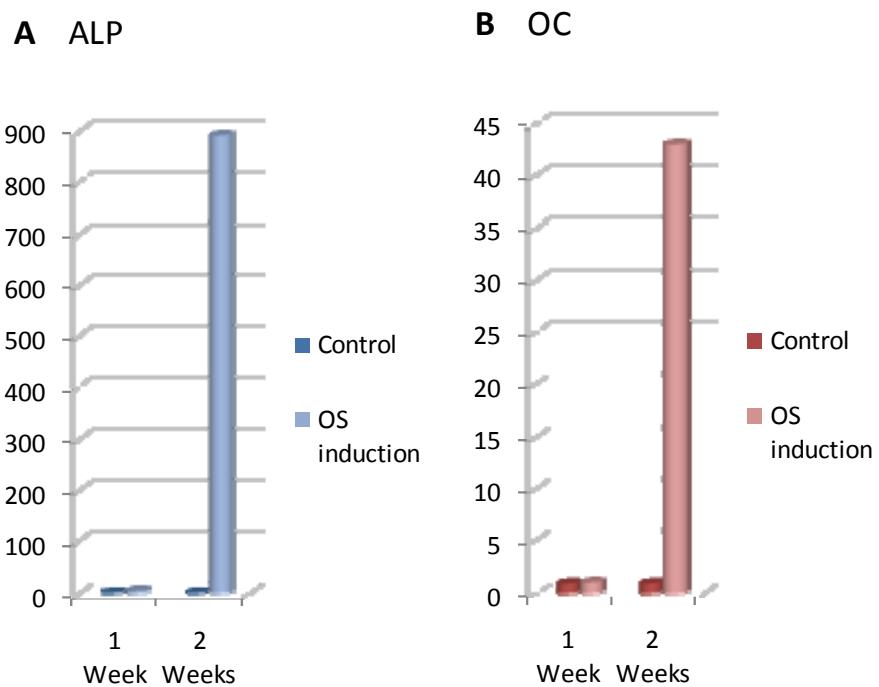


圖 14. 及時定量聚合酵素鏈鎖反應實驗結果。(A) 人類胚胎上頸間質細胞培養於骨誘導培養基兩週相較於培養於低葡萄糖 DMEM 培養基兩週，ALP 基因 mRNA 表現量增為 891 倍。(B) 人類胚胎上頸間質細胞培養於骨誘導培養基兩週相較於培養於低葡萄糖 DMEM 培養基兩週，OC 基因 mRNA 表現量增為 43 倍。

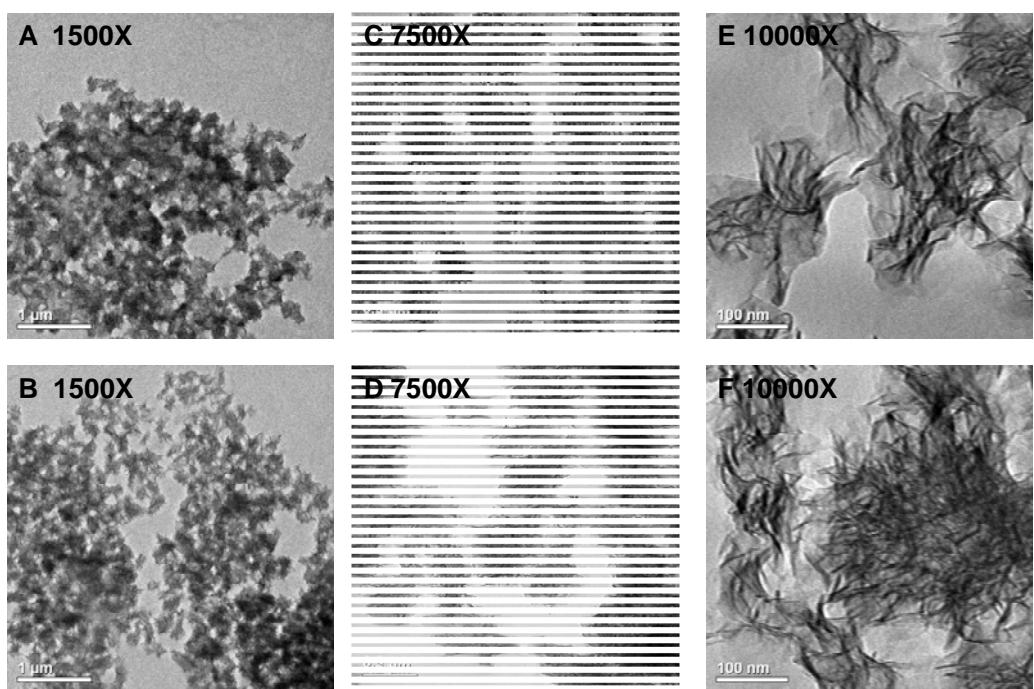


圖 15. 骨誘導礦化物質穿透式電子顯微鏡實驗結果。(A) (B) 矿化物質 1500X 穿透式電子顯微鏡實驗結果。(C) (D) 矿化物質 7500X 穿透式電子顯微鏡實驗結果。(E) (F) 矿化物質 10000X 穿透式電子顯微鏡實驗結果。

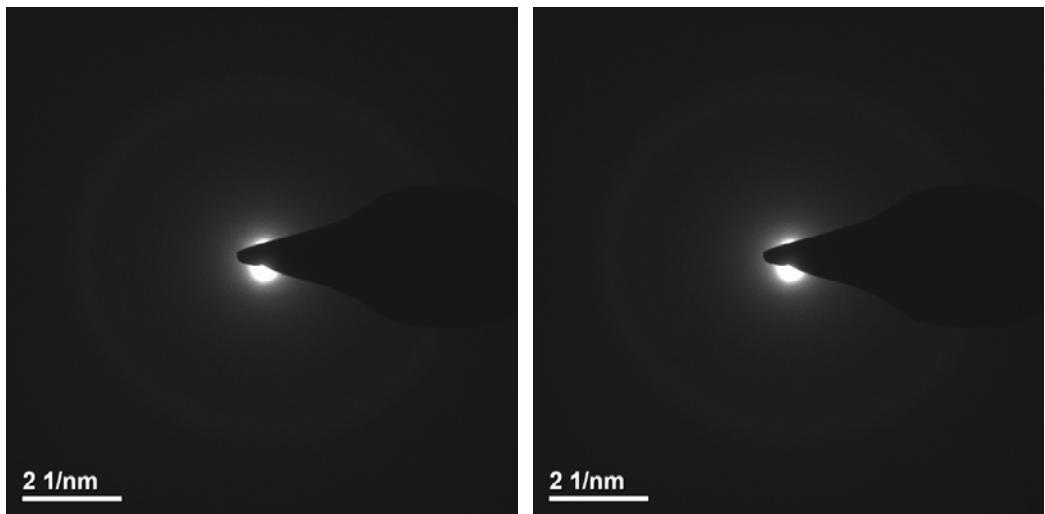


圖 16. 骨誘導礦化物質電子繞射實驗結果。未發現明顯結晶繞射圖譜。



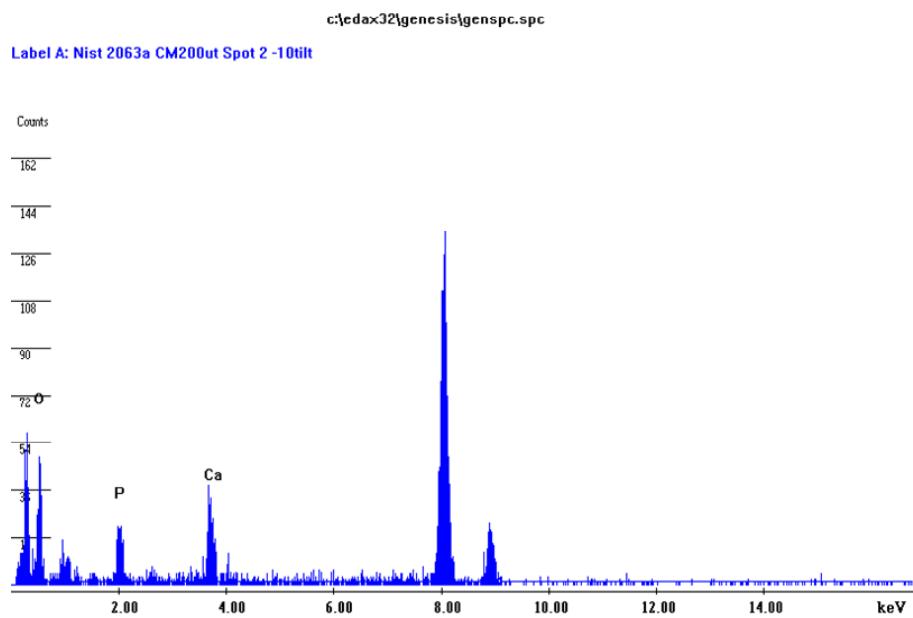


圖 17. 骨誘導礦化物質 EDX 實驗結果。確認礦化產物主要由 O 、 P 、 Ca 元素所構成。8.00 keV 處兩個峰為銅網載台之影響。

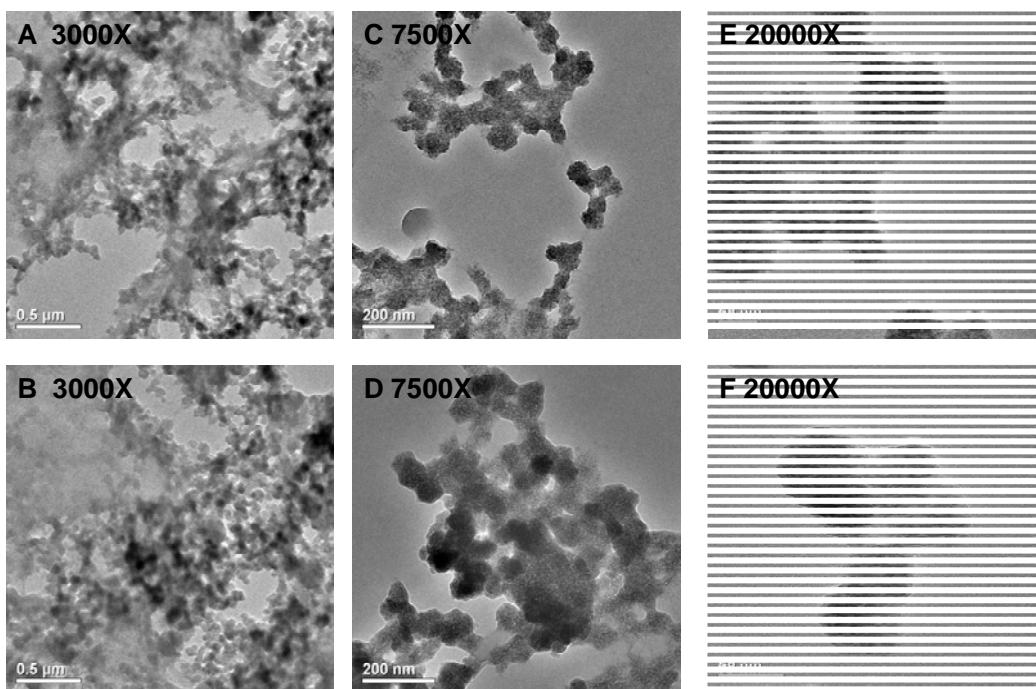


圖 18. 造牙本質母細胞誘導礦化物質穿透式電子顯微鏡實驗結果。
(A) (B) 矿化物質 3000X 穿透式電子顯微鏡實驗結果。 (C) (D)
矿化物質 7500X 穿透式電子顯微鏡實驗結果。 (E) (F) 矿化物質
20000X 穿透式電子顯微鏡實驗結果。

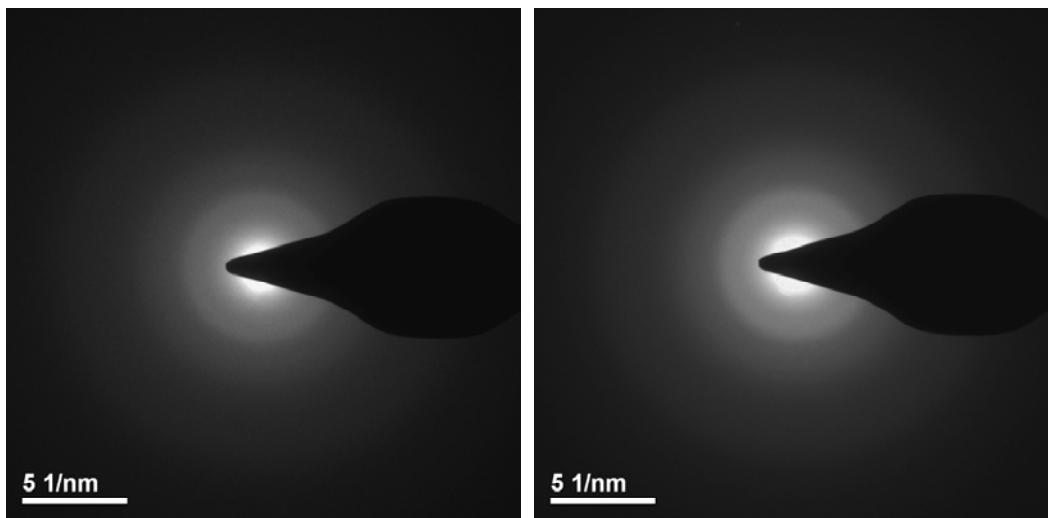


圖 19. 造牙本質母細胞誘導礦化物質電子繞射實驗結果。



c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: Nist 2063a CM200ut Spot 2 -10tilt

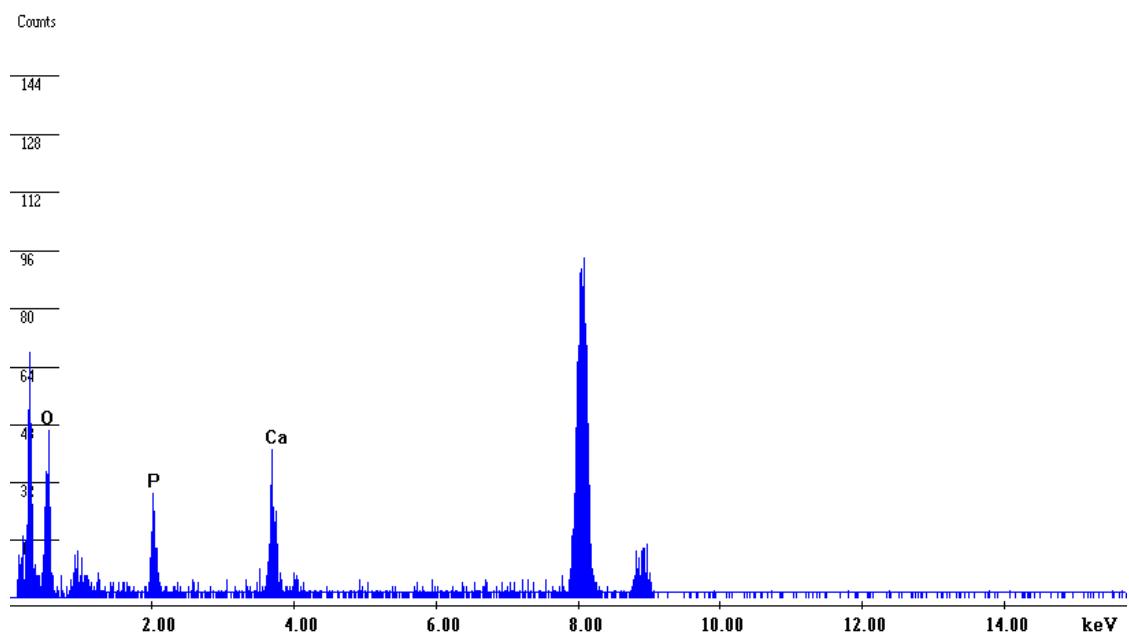


圖 20. 造牙本質母細胞誘導礦化物質 EDX 實驗結果。確認礦化產物主要由 O 、P 、Ca 元素所構成。8.00 keV 處兩個峰為銅網載台之影響。

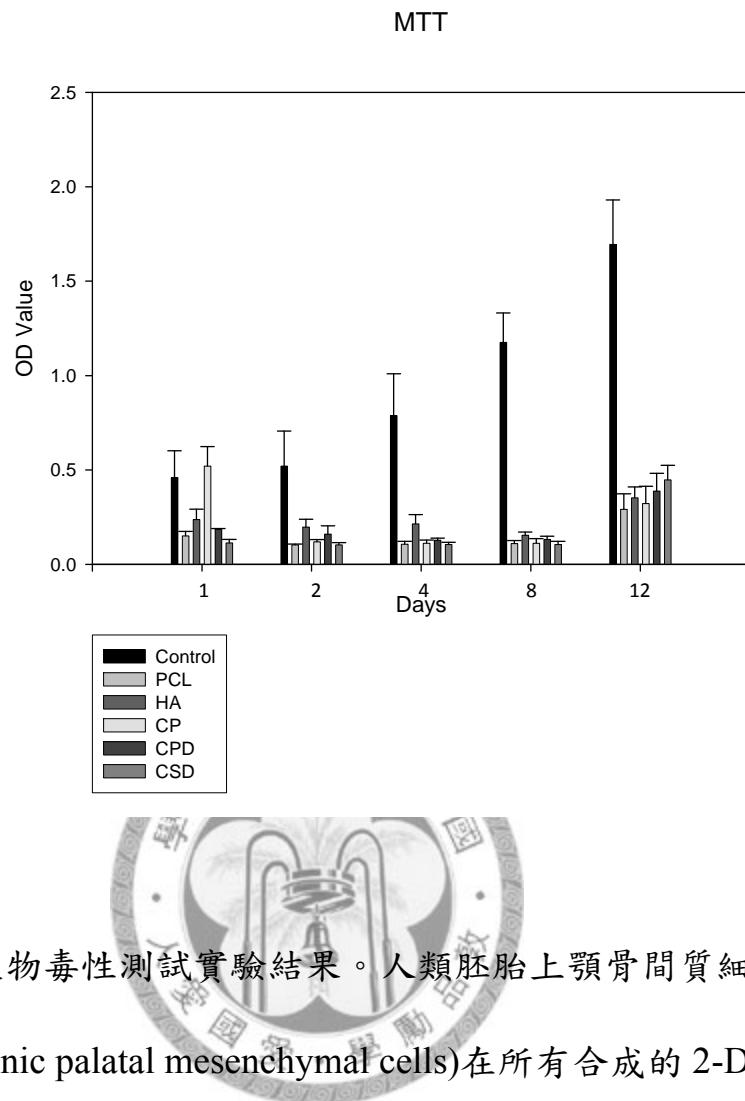


圖 21. 生物毒性測試實驗結果。人類胚胎上頸骨間質細胞
(human embryonic palatal mesenchymal cells)在所有合成的 2-D 薄膜上
均可生長，但生長量明顯低於對照組培養皿。

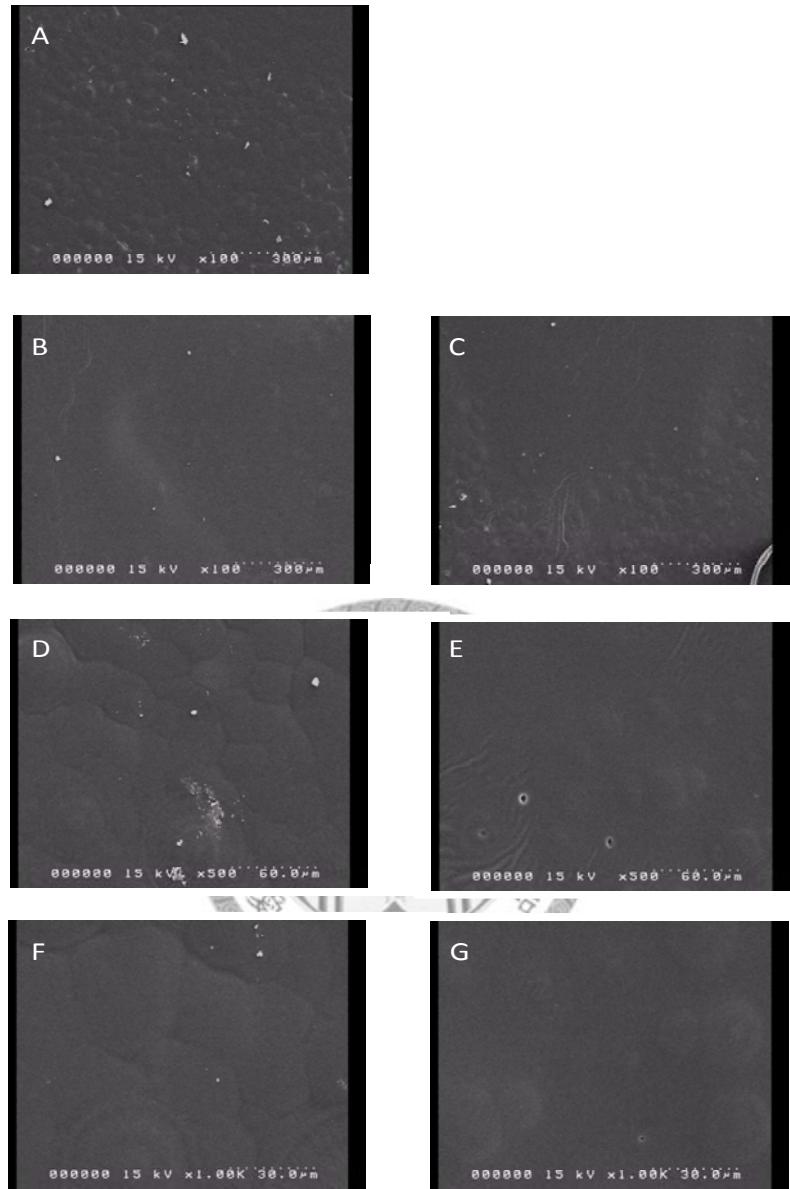


圖 22. PCL / Chloroform 平面刮膜法。 (A) (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面平整無孔洞。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，表面平整無孔洞，有少許凹陷。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果，表面平整無孔洞。

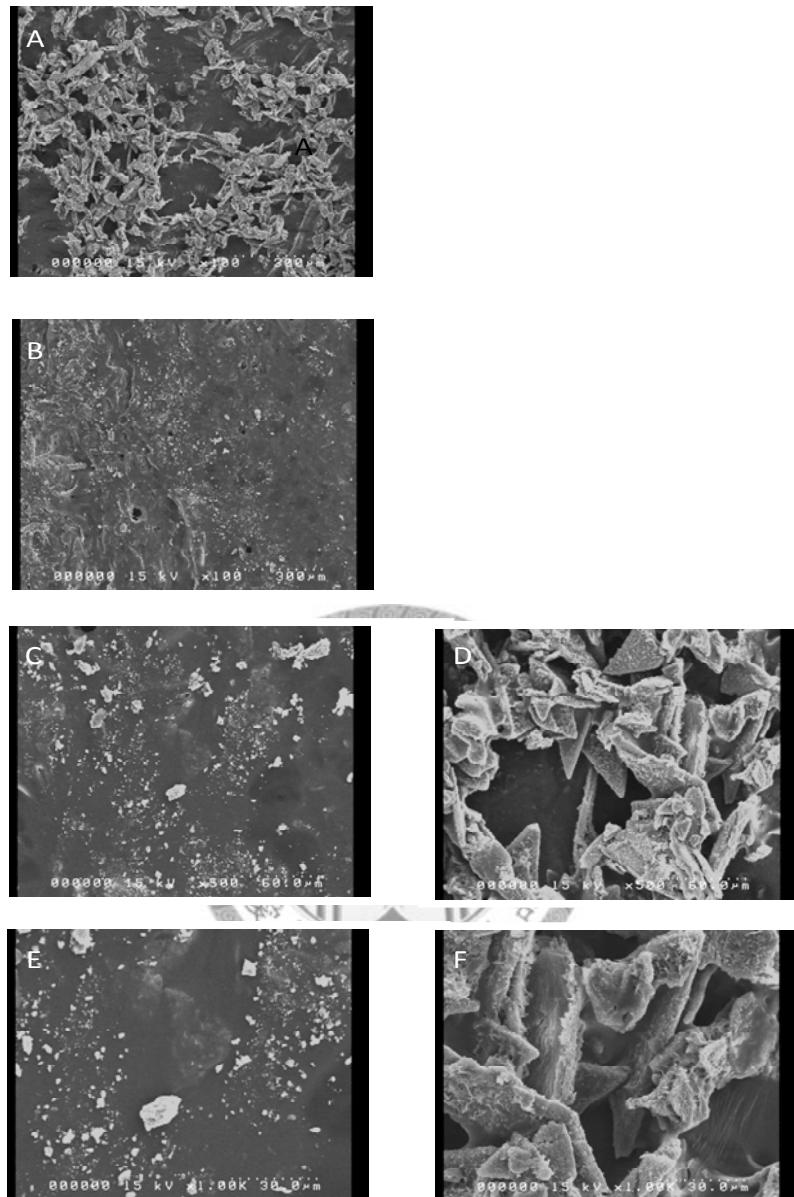


圖 23. HA / PCL / Chloroform 平面刮膜法。 (A) (B) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面有明顯鹽類結晶。 (C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果，表面不平整且鹽類結晶分布量懸殊，量少區域近似於平面，分佈量多區域鹽類結晶堆積成類似立體孔洞結構。

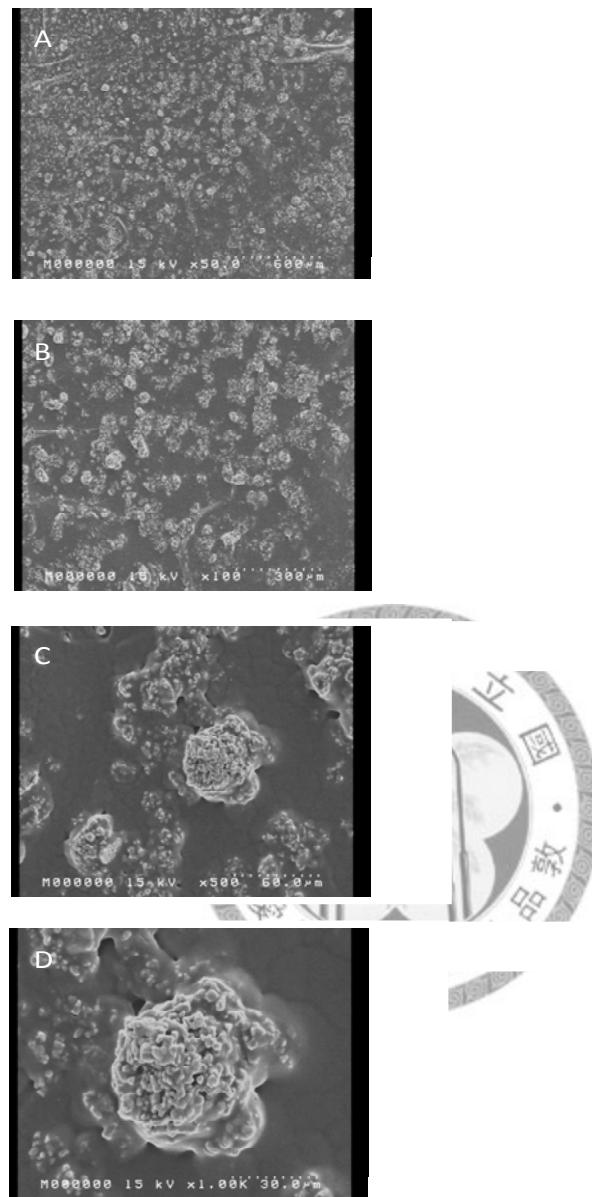


圖 24. CP / PCL / Chloroform 平面刮膜法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。(B) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面並不平整鹽類結晶分布相對均勻。(C) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，表面並不平整有鹽類結晶。(D) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

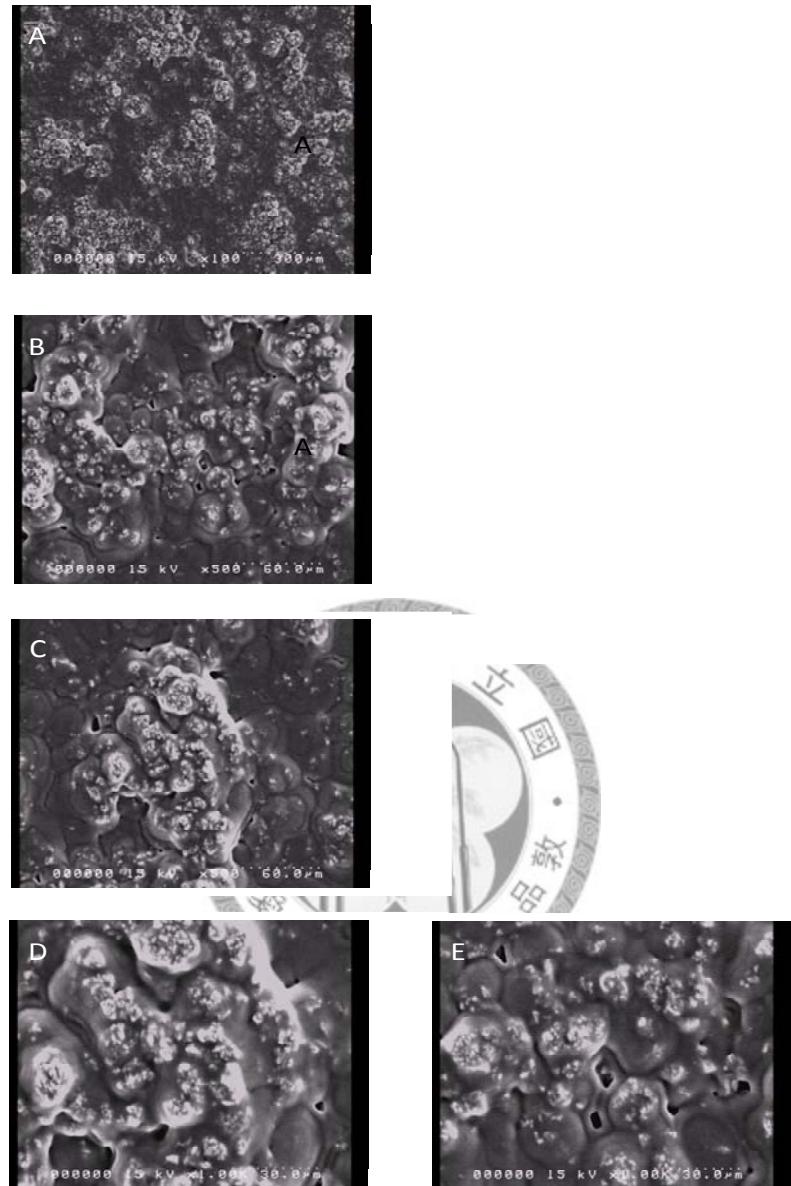


圖 25. CPD / PCL / Chloroform 平面刮膜法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。(B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，表面並不平整，出現的鹽類結晶與材料融合。(D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

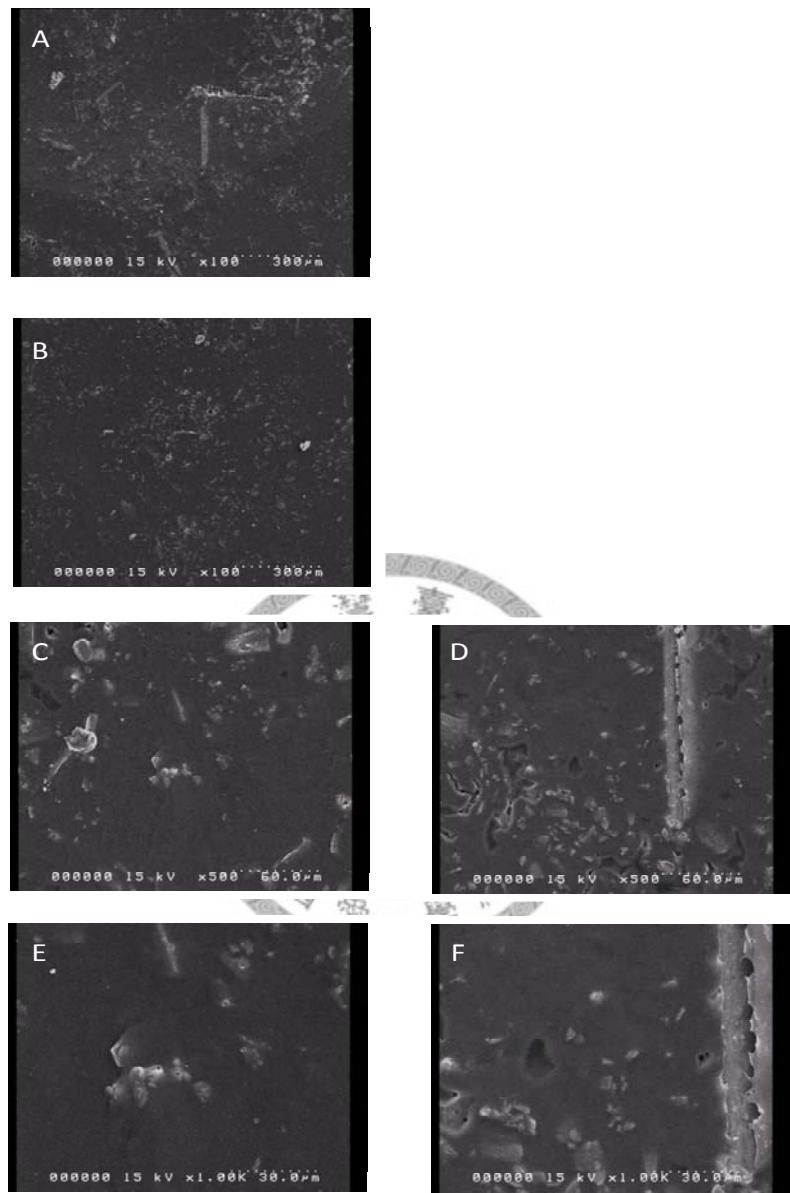


圖 26. CSD / PCL / Chloroform 平面刮膜法。 (A) (B) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，表面相對其他組材料相對平整且鹽類結晶與材料良好融合。(E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

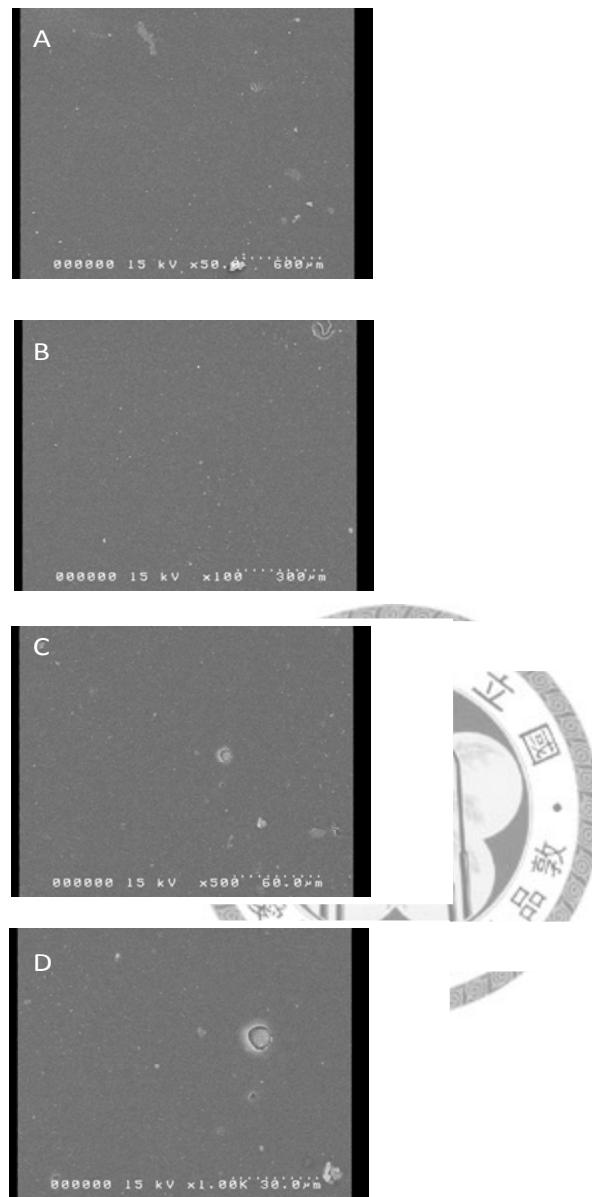


圖 27. PCL / 1,4 Dioxan 平面刮膜法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。(B) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。(C) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。(D) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。均顯示膜面相當平整。

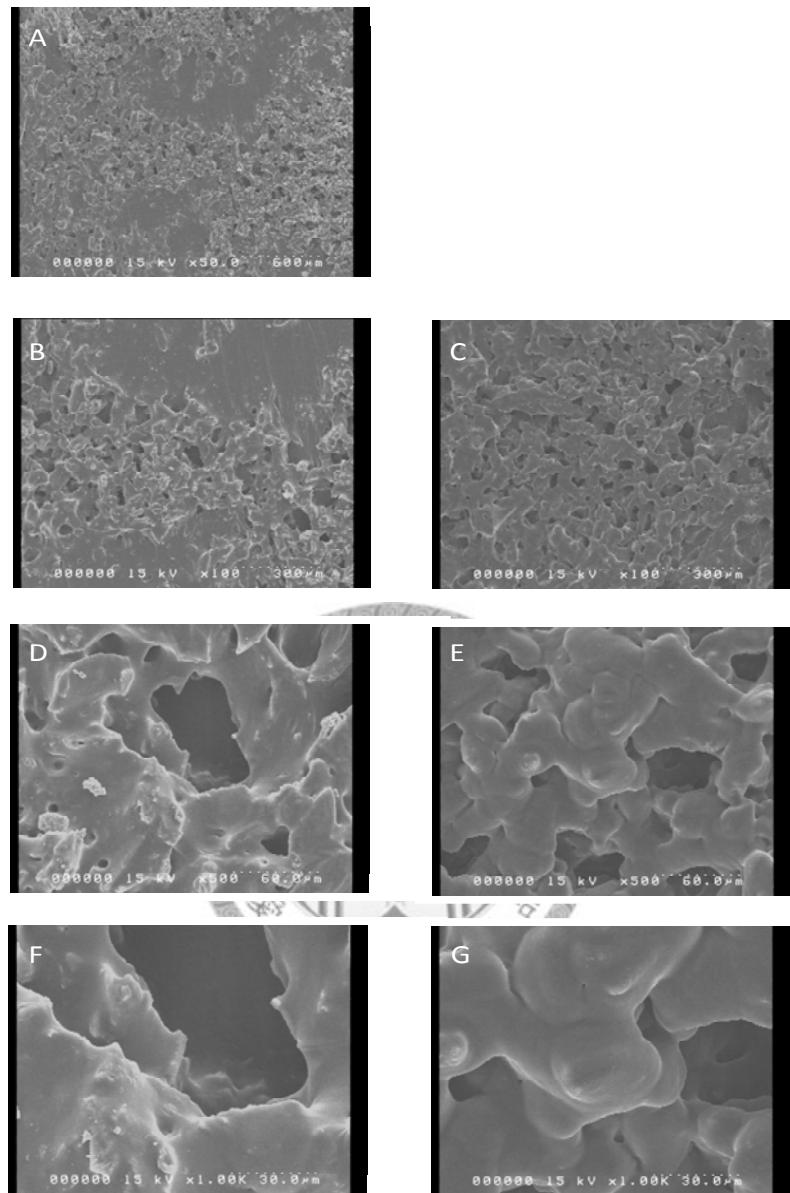


圖 28. HA / PCL / 1,4 Dioxan 平面刮膜法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。顯示無機結晶被材料完整包覆，有立體結構孔洞出現。

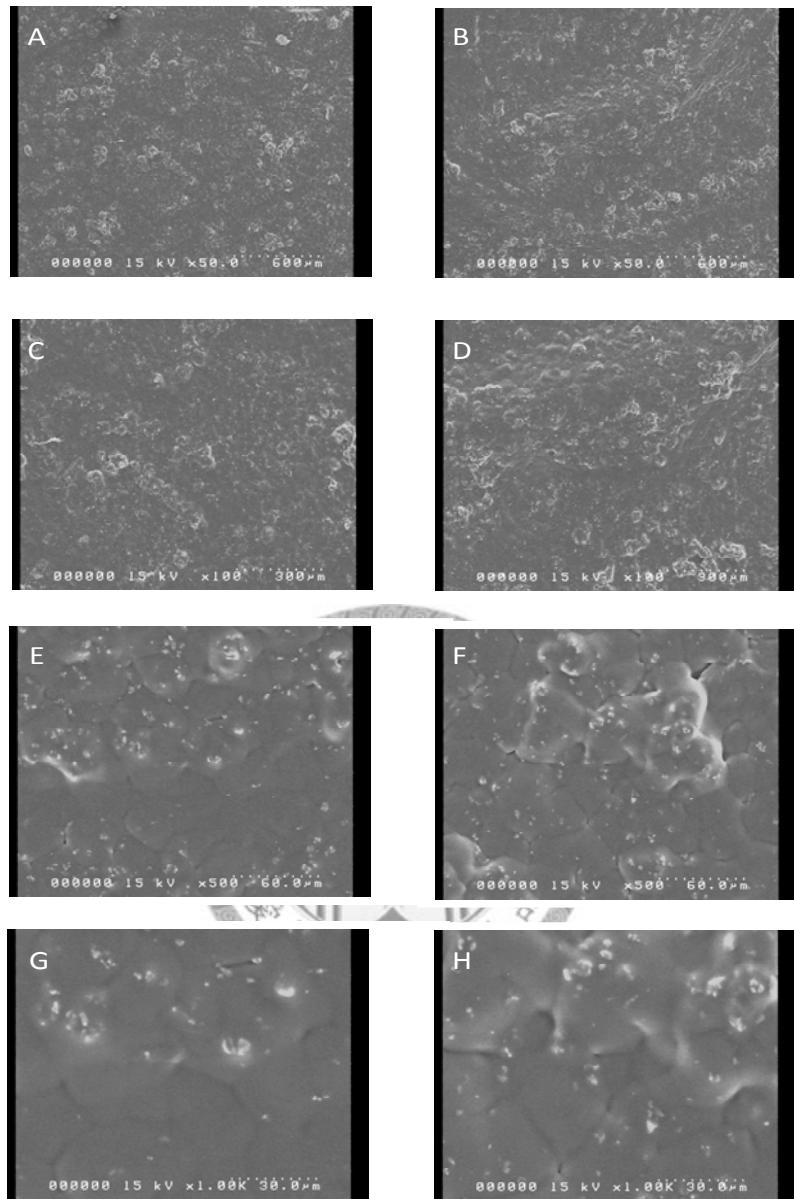


圖 29. CP / PCL / 1,4 Dioxan 平面刮膜法。 (A) (B) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (G) (H) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。無機結晶與材料融合，沒有明顯立體結構孔洞出現。

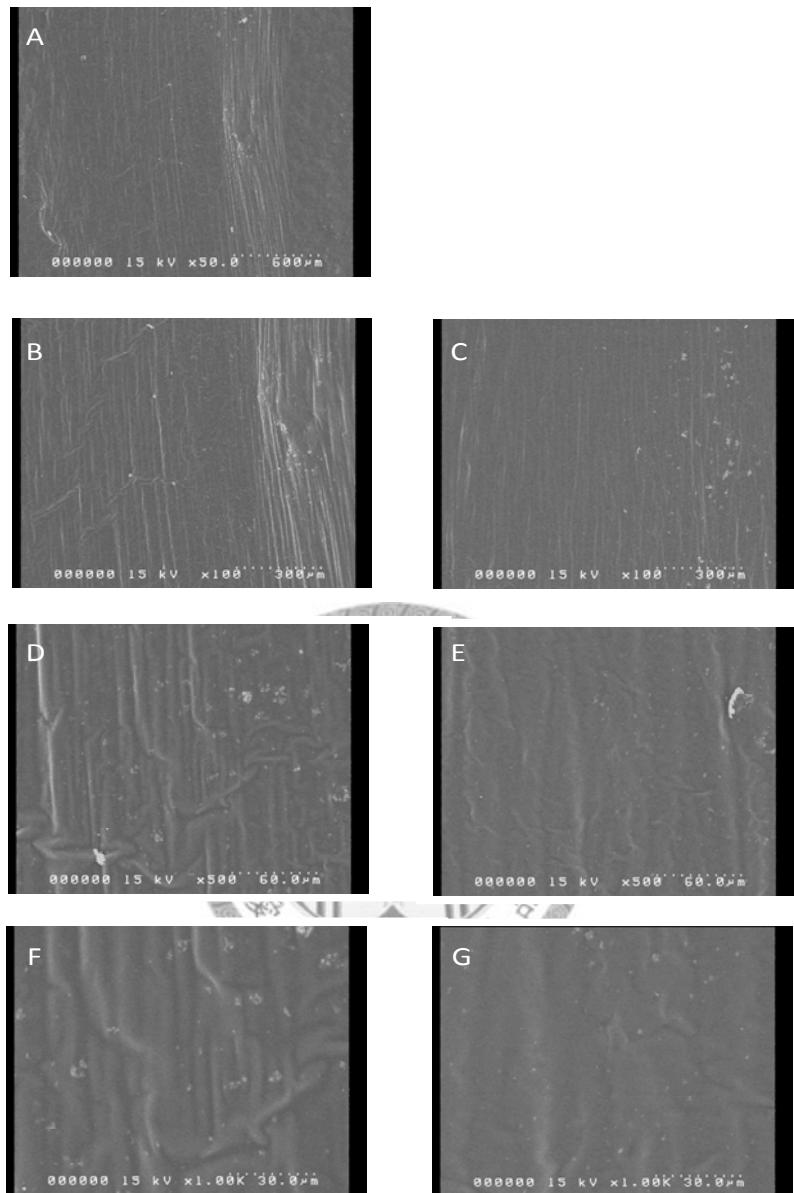


圖 30. CPD / PCL / 1,4 Dioxan 平面刮膜法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。無機鹽類與材料完整融合，膜面平整沒有孔洞出現。

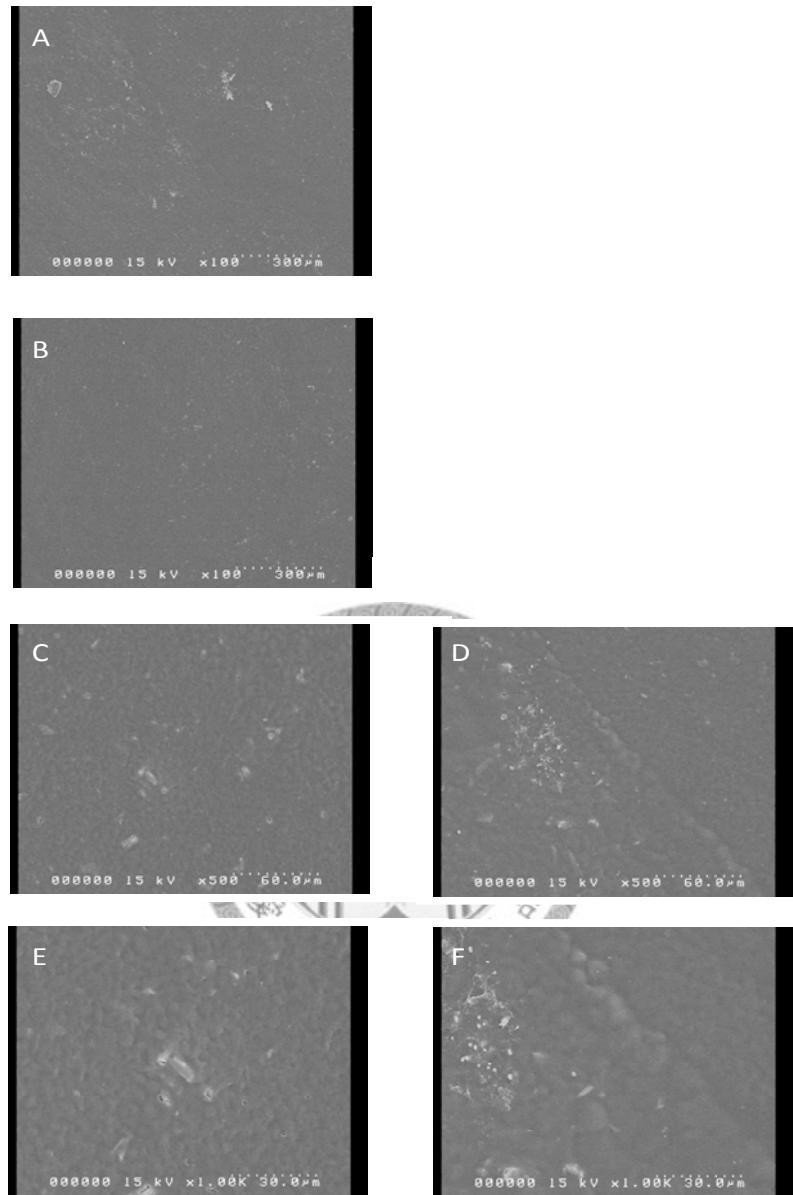


圖 31. CSD / PCL / 1,4 Dioxan 平面刮膜法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (B) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。無機鹽類與材料完整融合，膜面相對平整沒有孔洞出現。

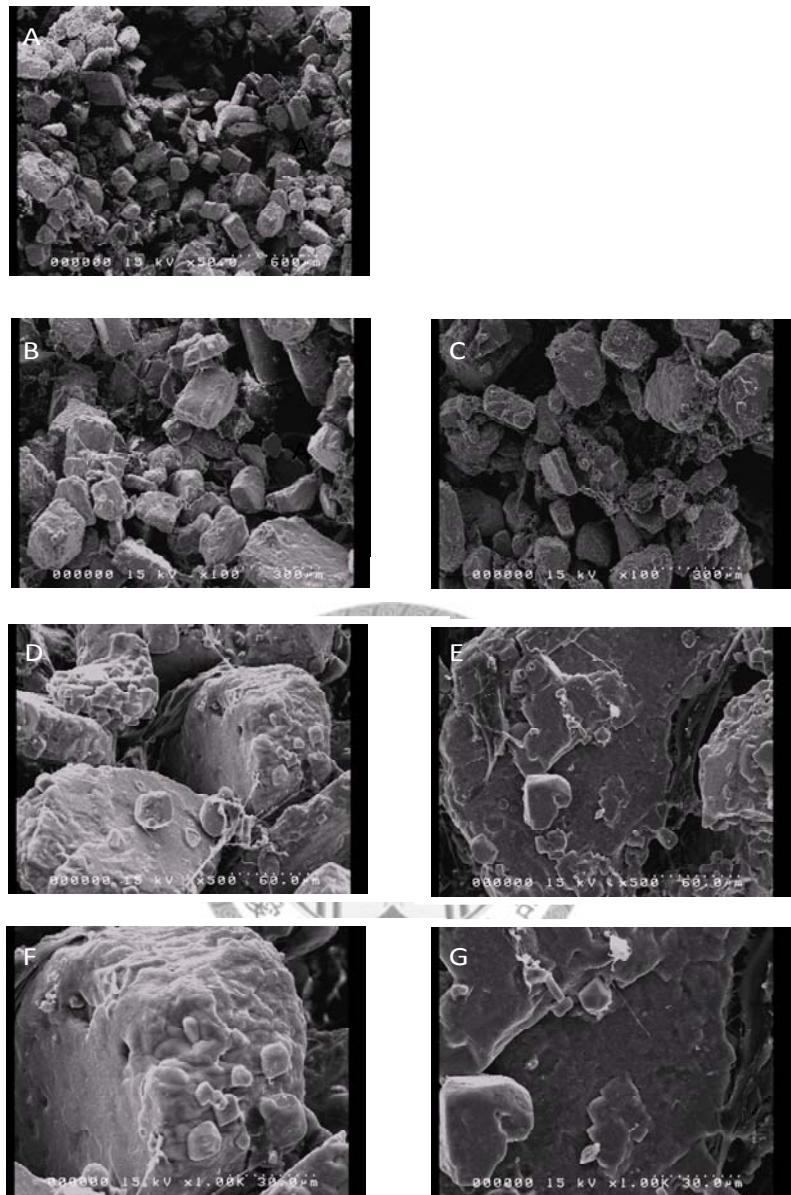


圖 32. PCL / Chloroform 鹽析法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。出現氯化鈉鹽結晶型態的立方顆粒，在放大倍數觀察下可發現立方顆粒表面有高分子材料物質。

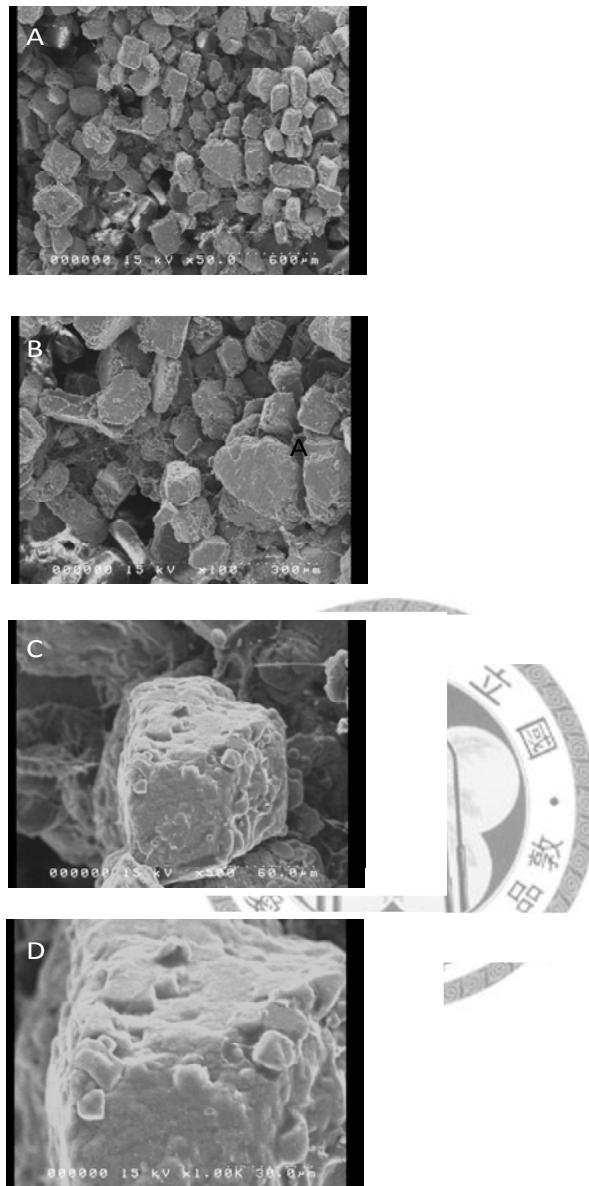


圖 33. HA / PCL / Chloroform 鹽析法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (B) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (C) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (D) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。 出現多量立方顆粒，在放大倍數下可觀察到其表面有高分子材料物質。

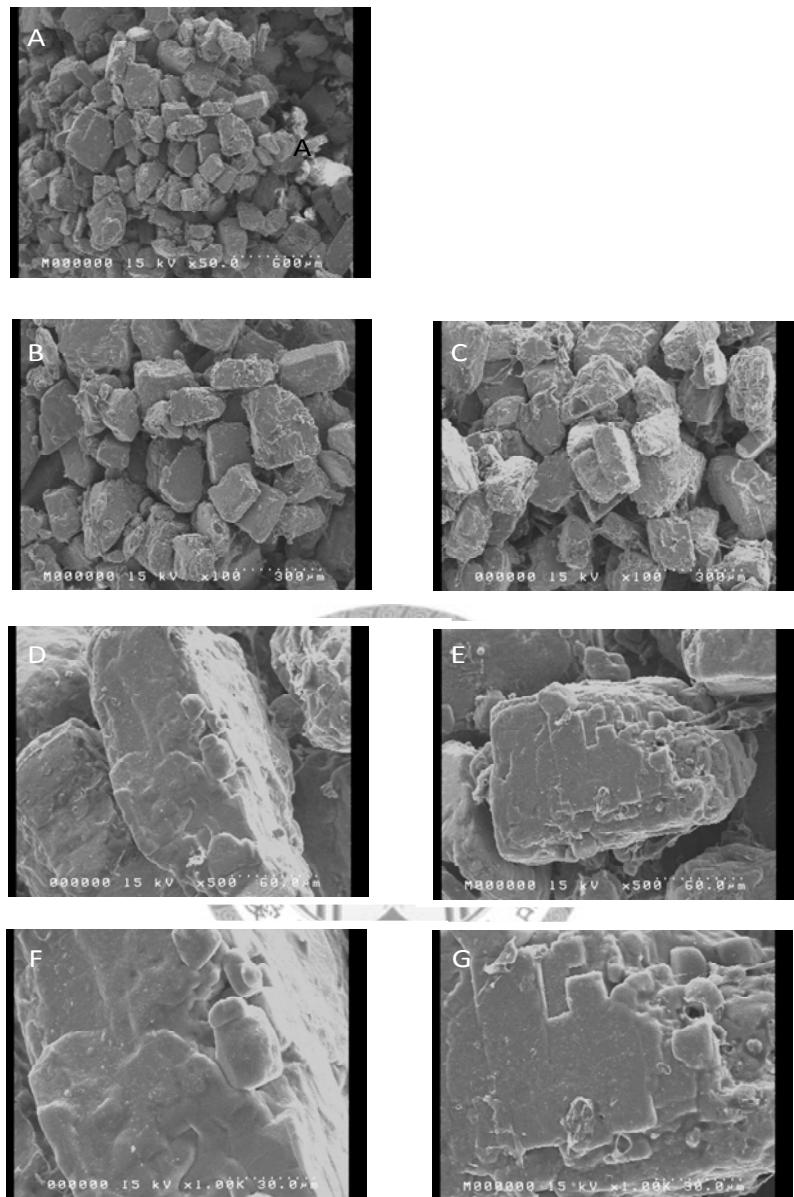


圖 34. CP / PCL / Chloroform 鹽析法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果，出現多量立方顆粒。 (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

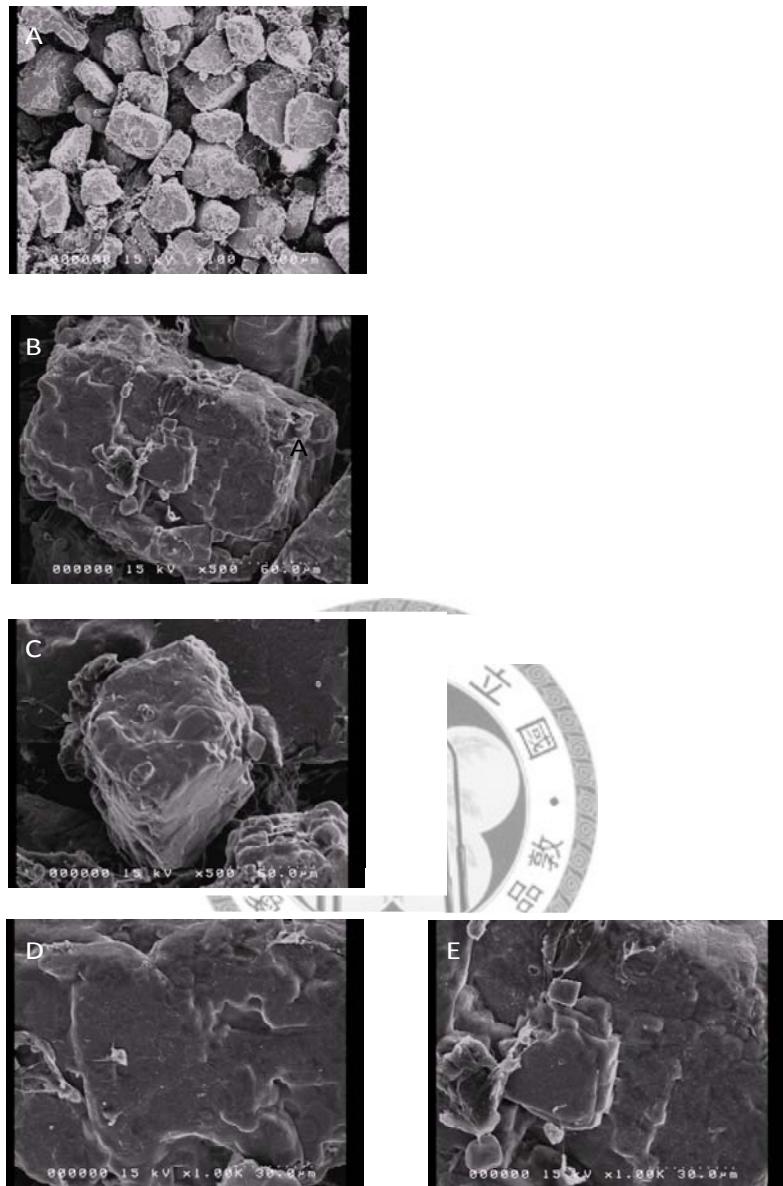


圖 35. CPD / PCL / Chloroform 鹽析法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，出現多量立方顆粒。(B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。(D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

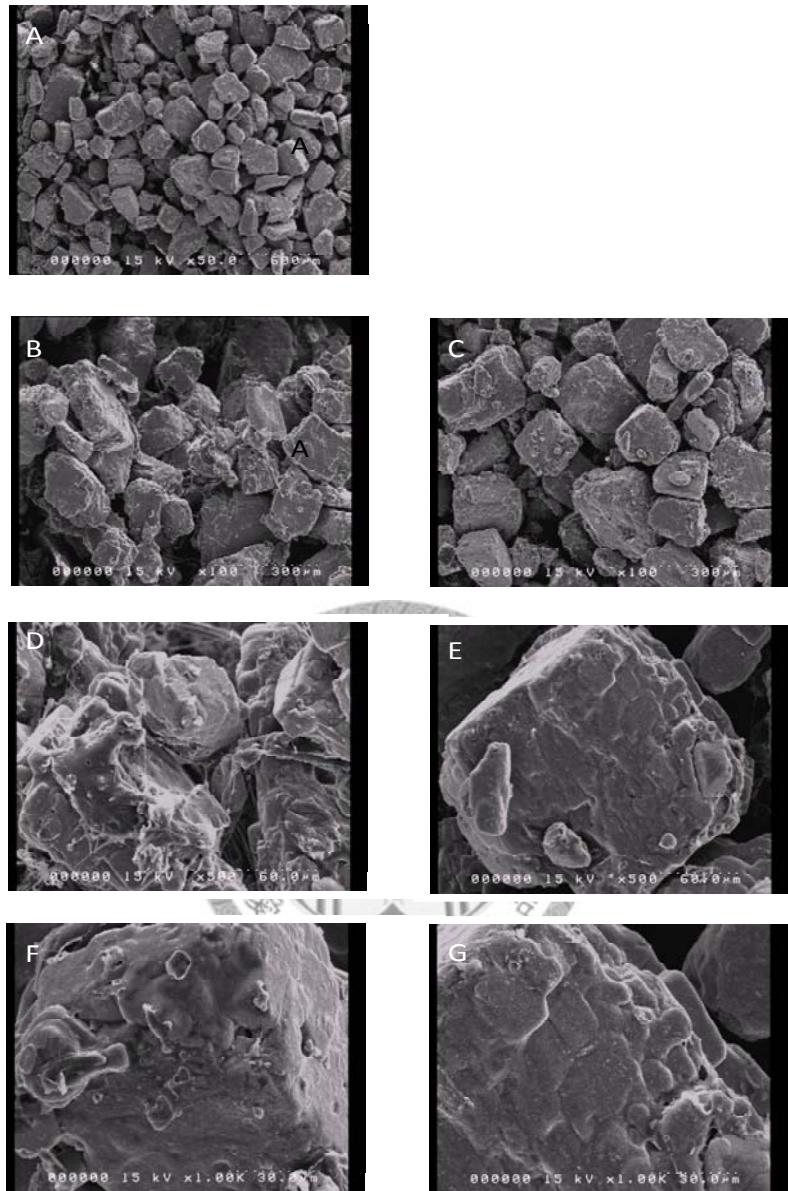


圖 36. CSD / PCL / Chloroform 鹽析法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。(B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，出現多量立方顆粒。(D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。(F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

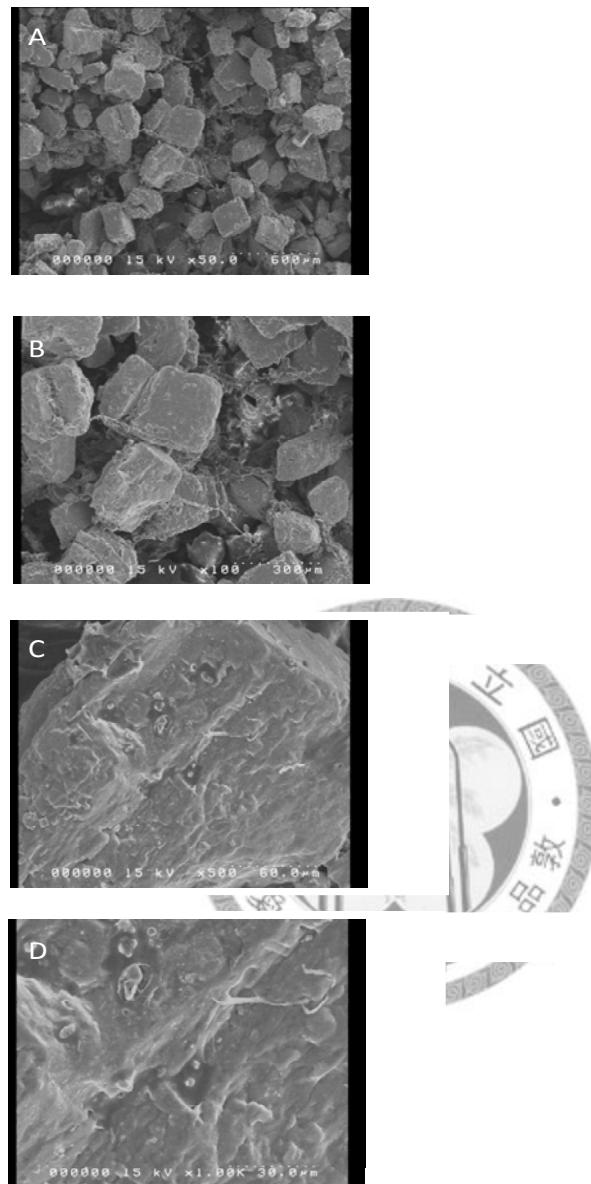


圖 37. PCL / 1,4 Dioxan 鹽析法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果，出現多量立方顆粒。 (B) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (C) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (D) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

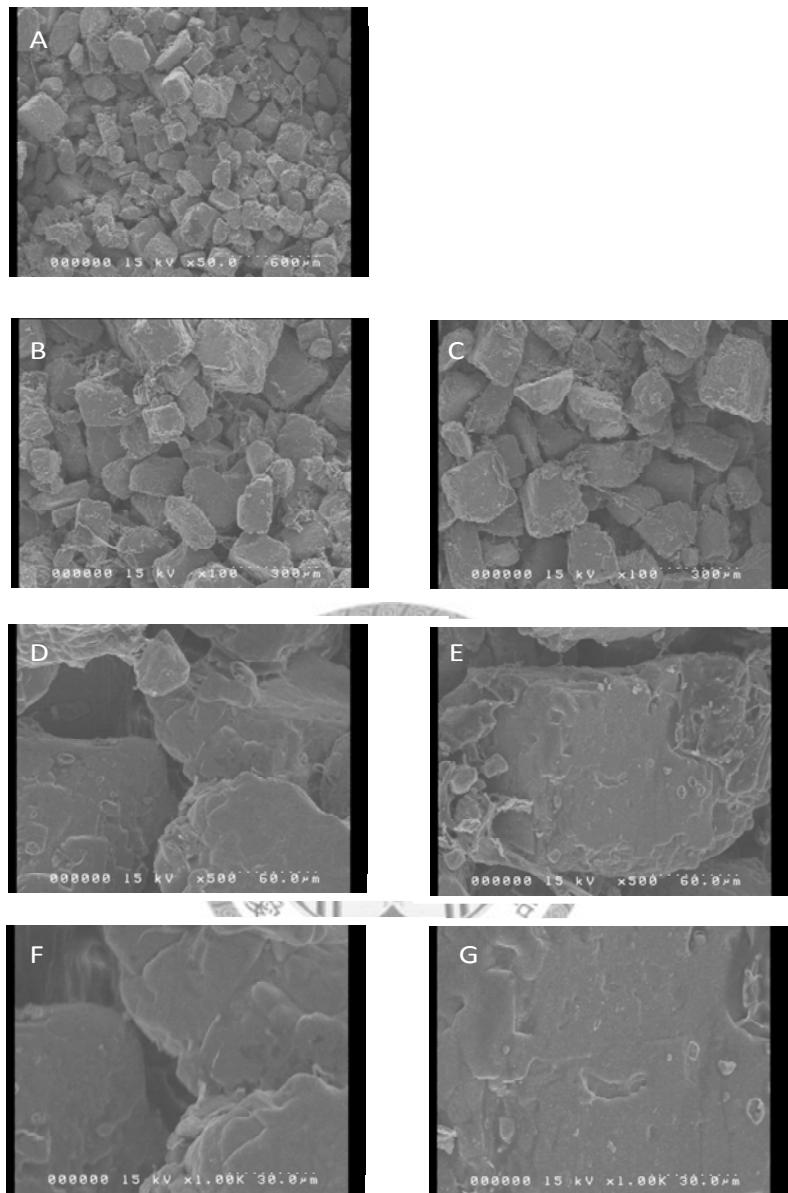


圖 38. HA / PCL / 1,4 Dioxan 鹽析法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，出現多量立方顆粒。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果，在放大倍數觀察下可發現立方顆粒表面有高分子材料物質。

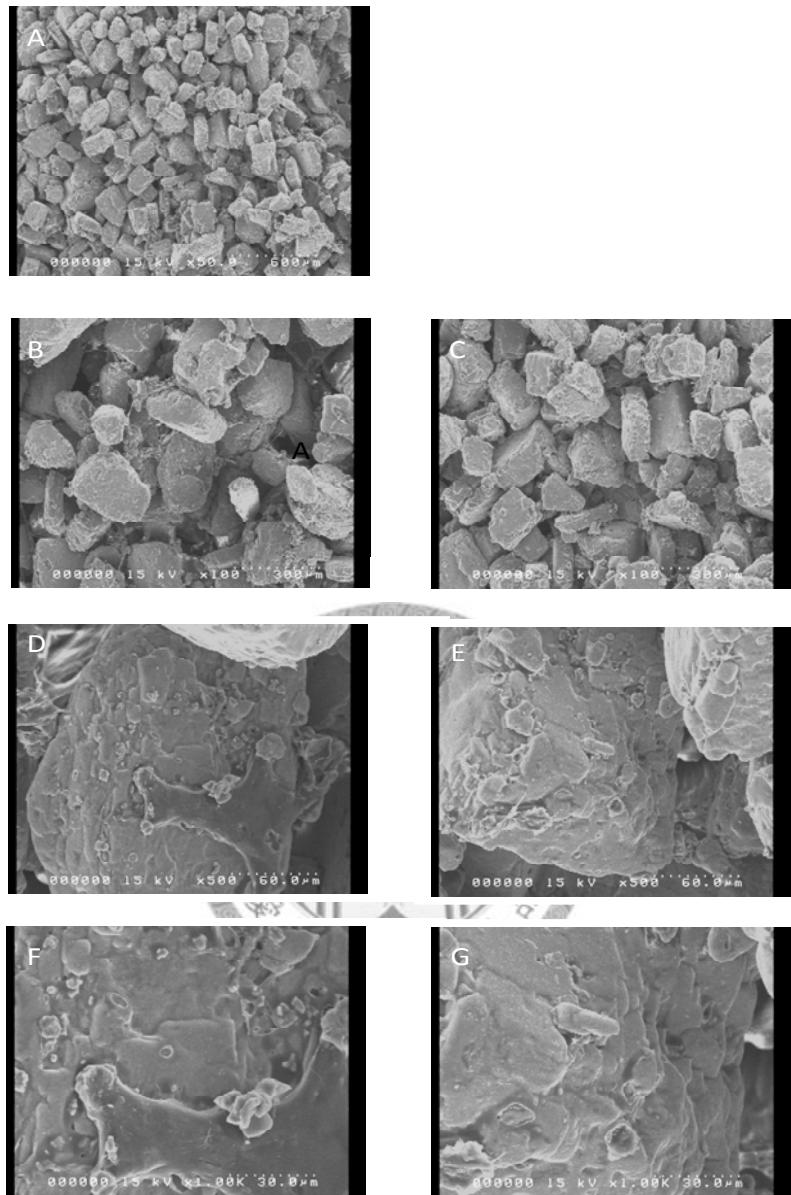


圖 39. CP / PCL / 1,4 Dioxan 鹽析法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。(B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，出現多量立方顆粒。(D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。(F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果，在放大倍數觀察下可發現立方顆粒表面有高分子材料物質。

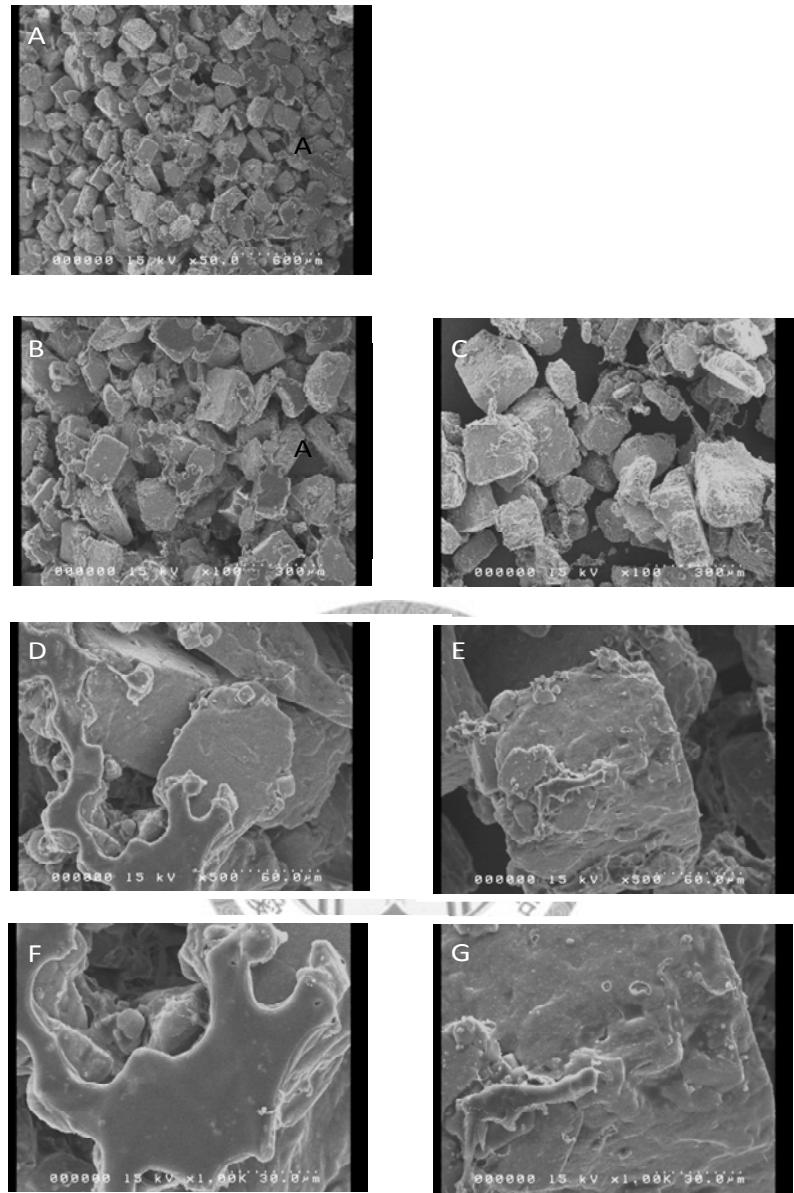


圖 40. CPD / PCL / 1,4 Dioxan 鹽析法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。(B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，出現多量立方顆粒。(D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。(F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果，在放大倍數觀察下可發現立方顆粒表面有高分子材料物質。

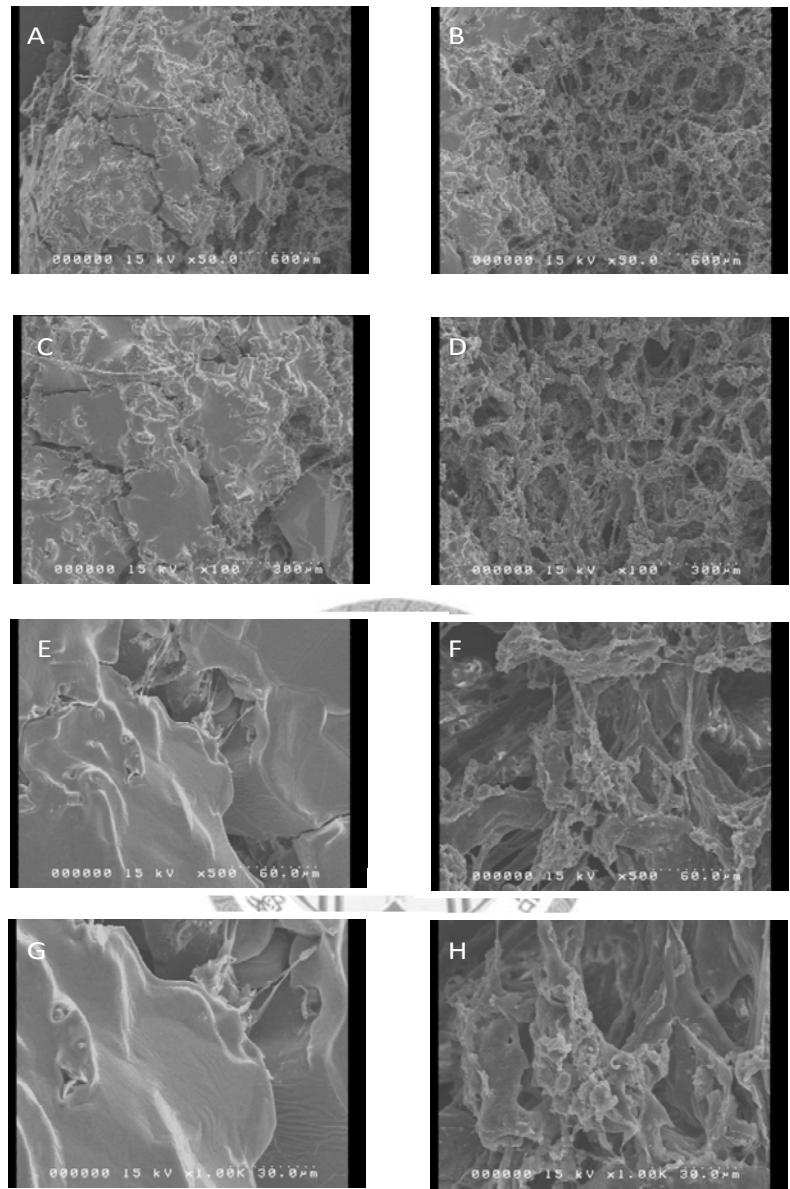


圖 41. CSD / PCL / 1,4 Dioxan 鹽析法。 (A) (B) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (G) (H) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。發現與其它組較不相似，沒有立方體結構，但出現立體聯通性孔洞結構。

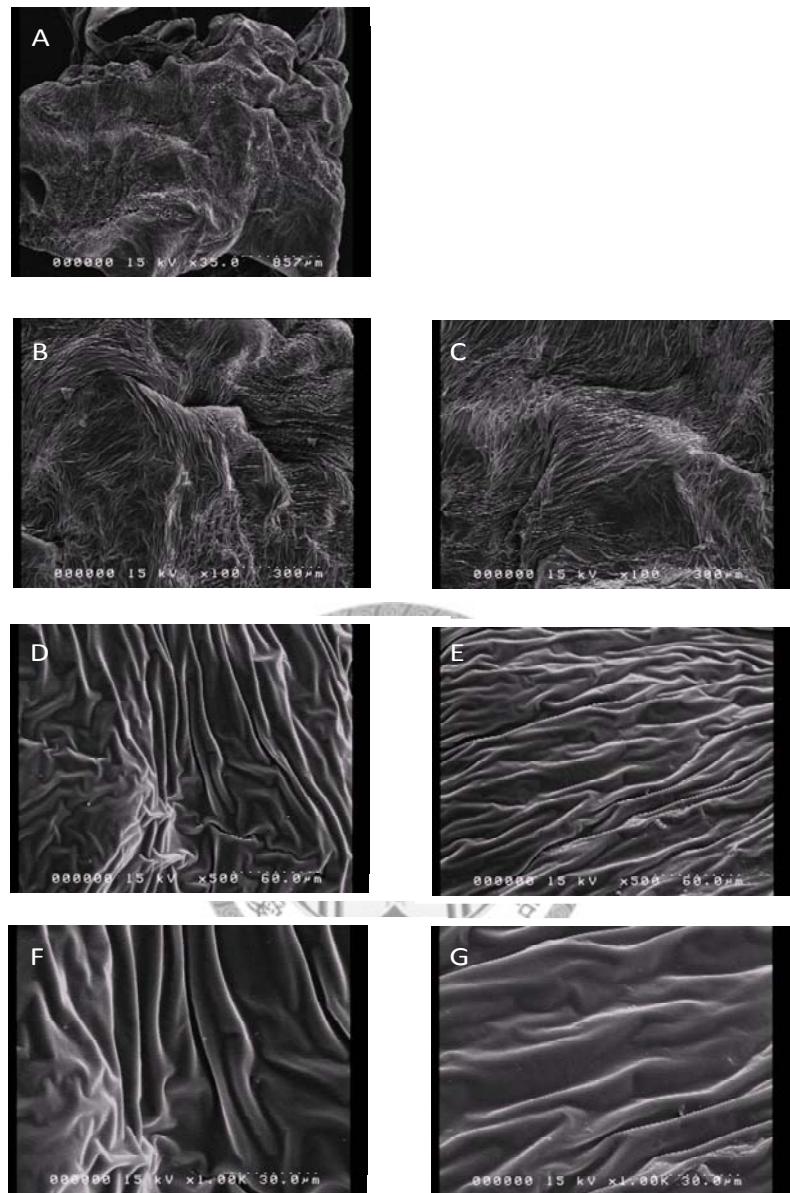


圖 42. PCL / Chloroform 冷凍乾燥法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 35X 結果。 (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面呈皺褶狀。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，表面皺褶間並無孔洞。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

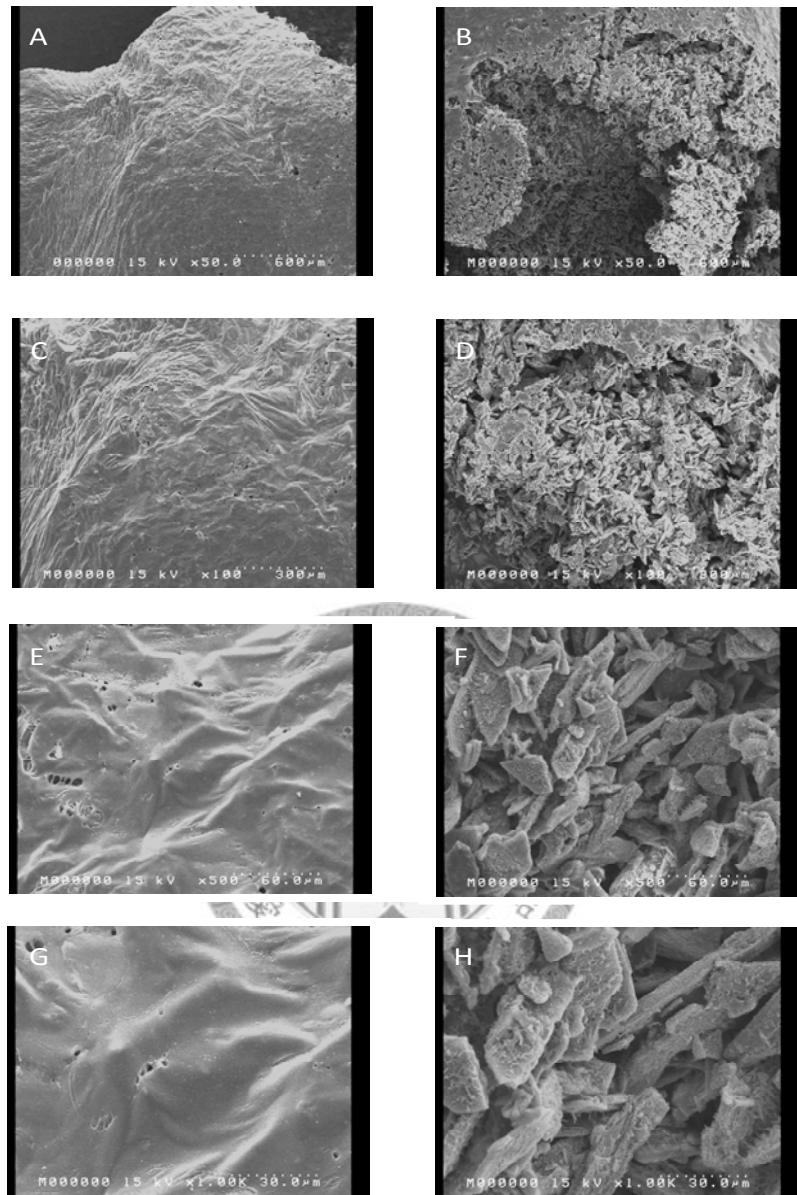


圖 43. HA / PCL / Chloroform 冷凍乾燥法。 (A) (B) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (G) (H) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。發現表面會隨無機鹽分布量呈現兩種型態，分別是微幅皺摺狀與無機鹽結晶散佈狀。

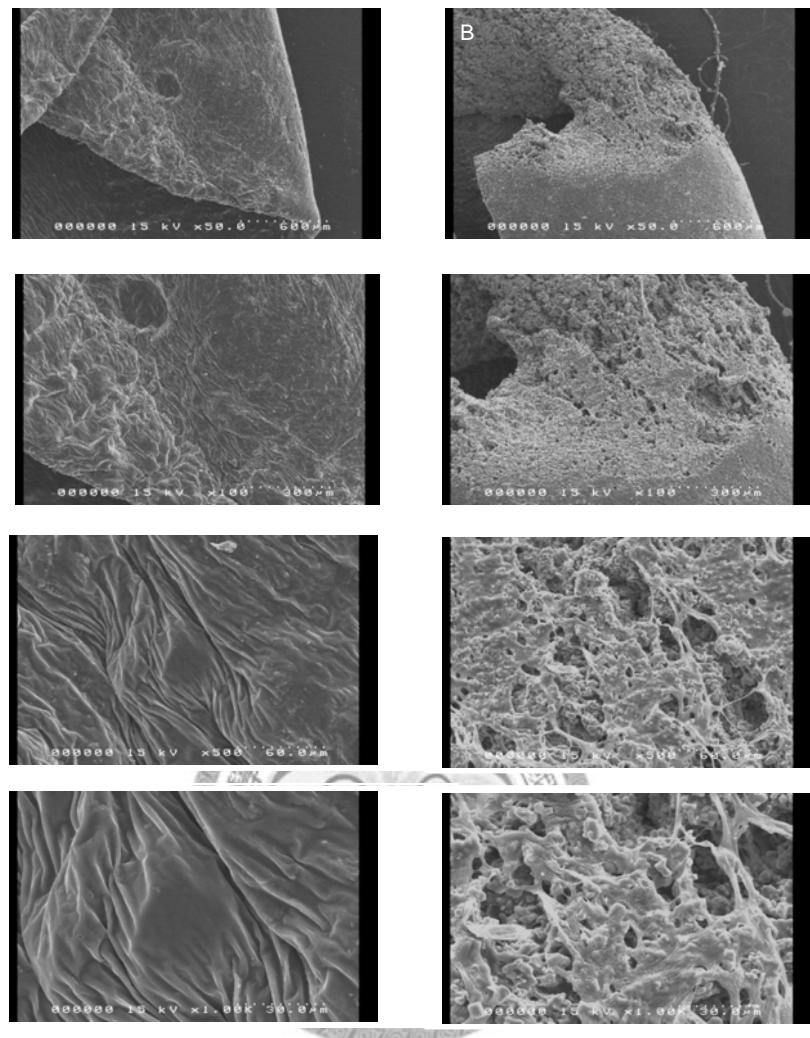


圖 44. CP / PCL / Chloroform 冷凍乾燥法。(A) (B) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。(C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。(E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。(G) (H) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。發現表面會隨無機鹽分布量呈現兩種型態，分別是微幅皺摺狀與不均質孔洞狀。

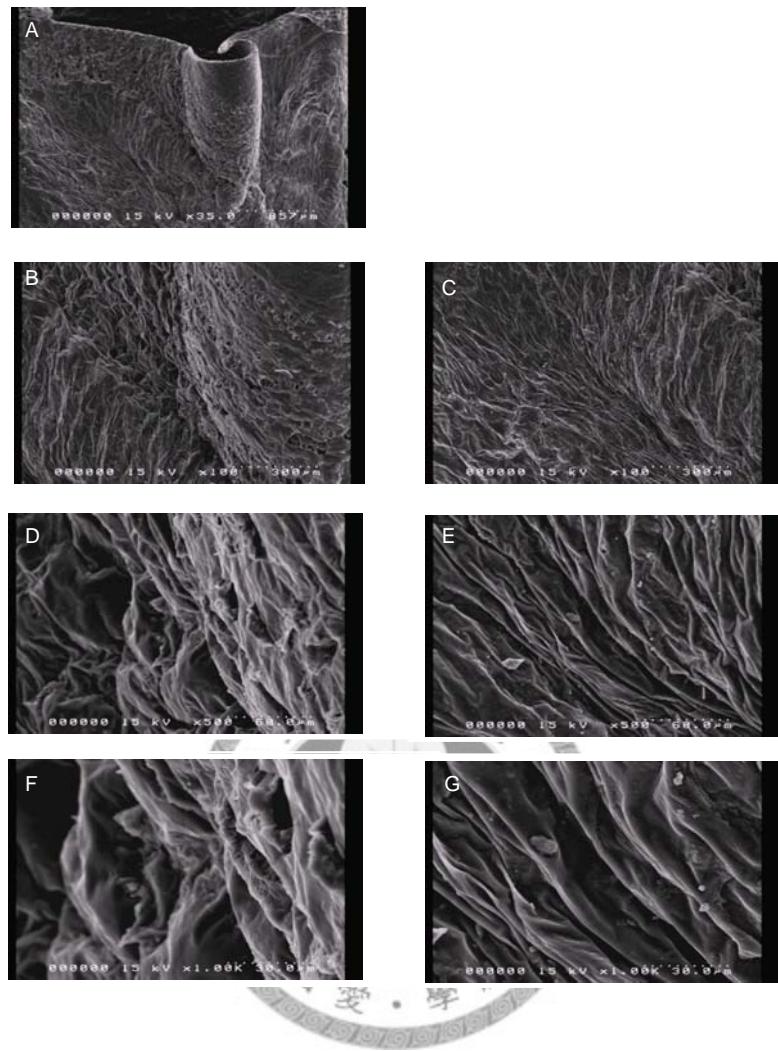


圖 45. CPD / PCL / Chloroform 冷凍乾燥法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 35X 結果。(B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面呈皺褶狀。(D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，表面皺褶間出現微小孔洞。(F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果，皺褶間可觀察到微小孔洞。

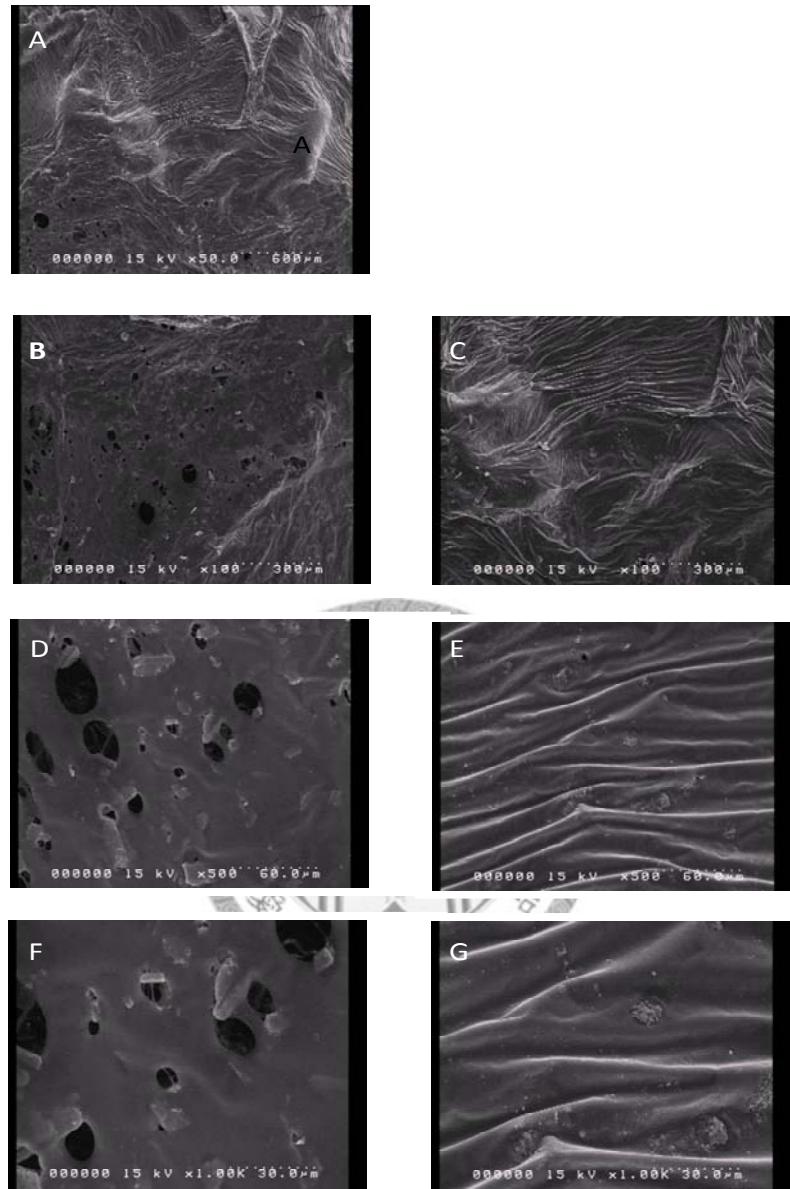


圖 46. CSD / PCL / Chloroform 冷凍乾燥法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。(B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面呈皺褶狀亦出現不等大小孔洞。(D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，發現孔洞大小不一致。(F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

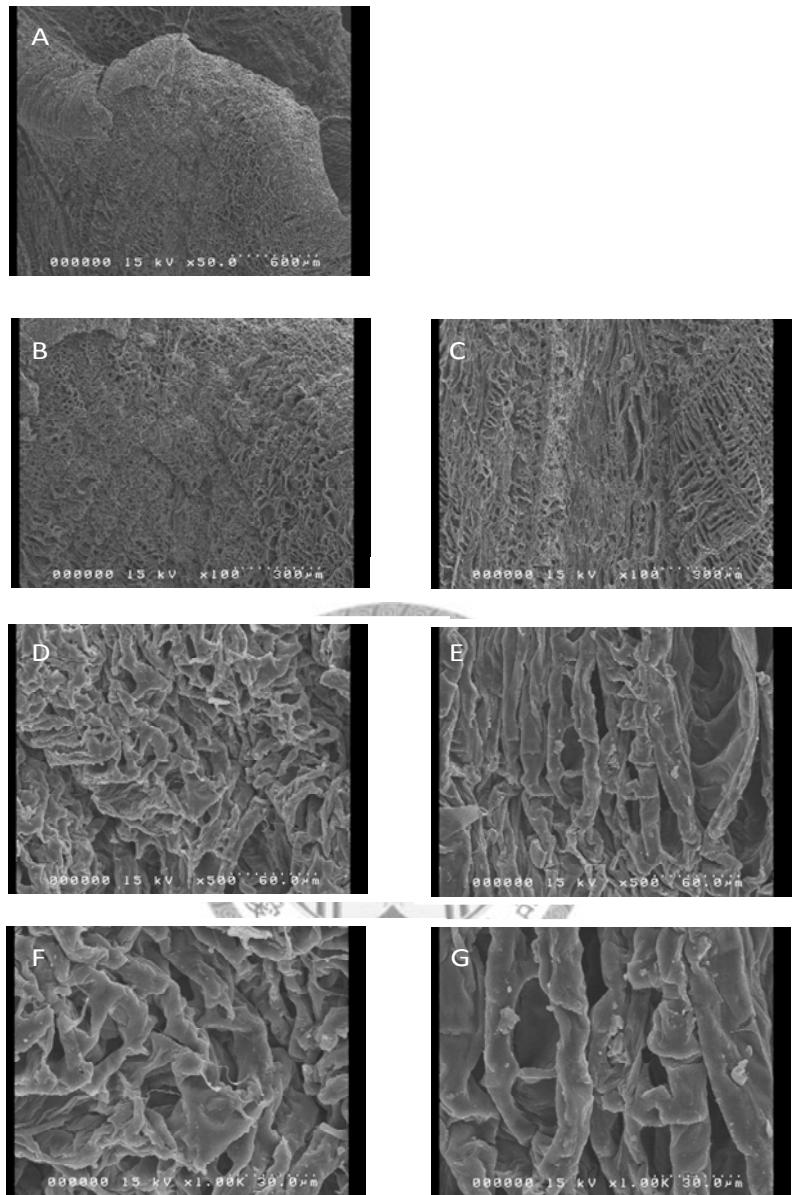


圖 47. PCL / 1,4 Dioxan 冷凍乾燥法。(A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。(B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面呈類似蜂巢狀且出現大量孔洞。(D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。(F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

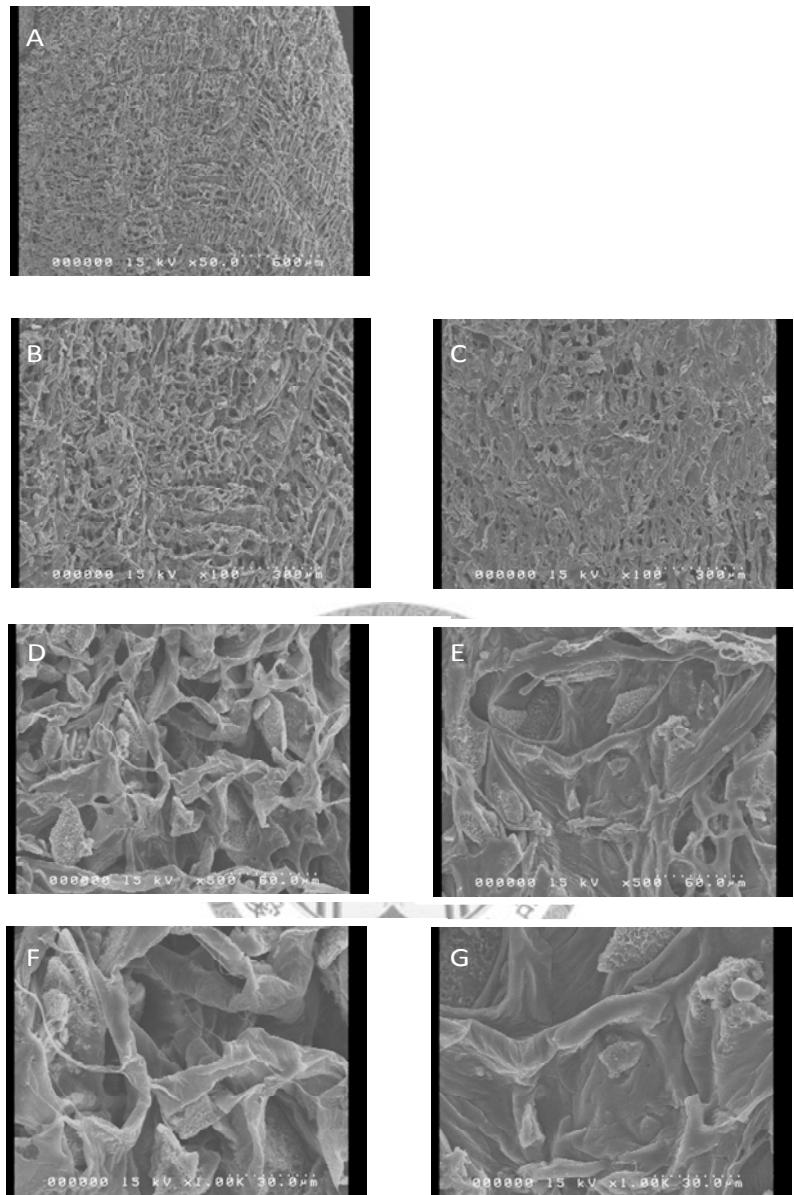


圖 48. HA / PCL / 1,4 Dioxan 冷凍乾燥法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面呈類似蜂巢狀結構且出現大量孔洞。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，可觀察到孔凍結構間具連通性。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

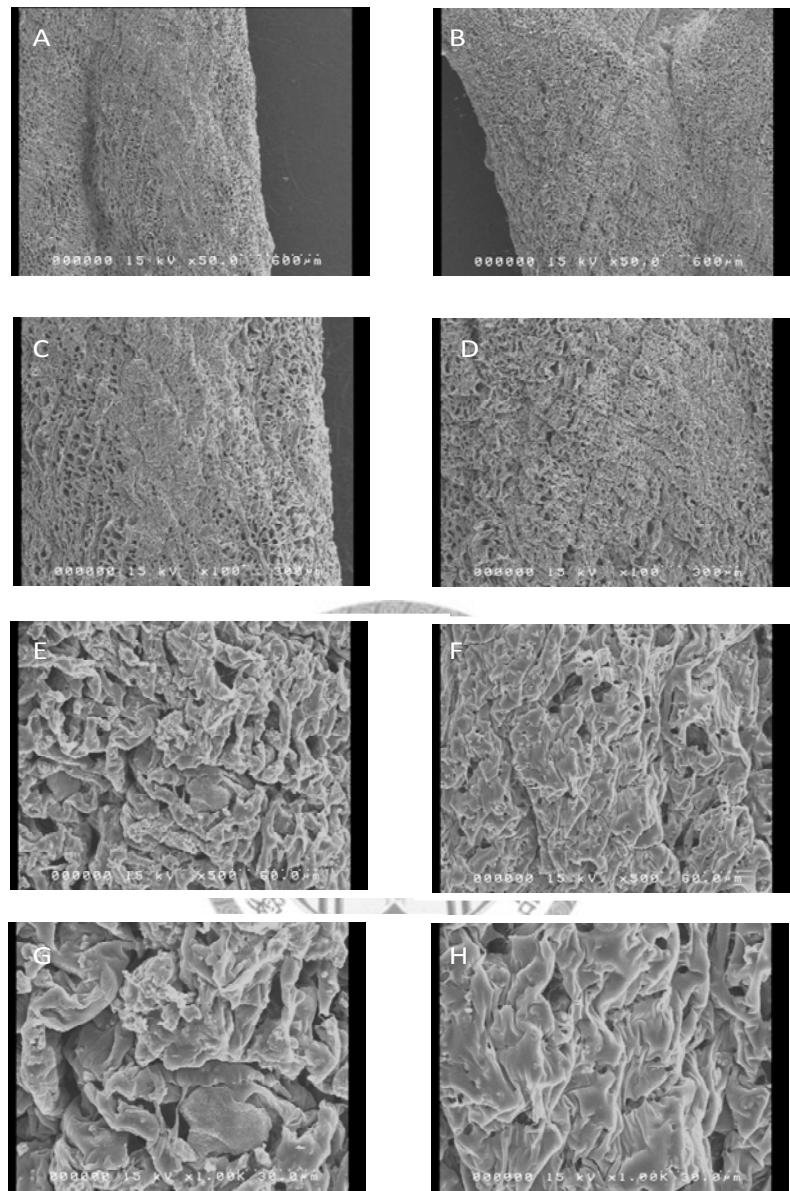


圖 49. CP / PCL / 1,4 Dioxan 冷凍乾燥法。 (A) (B) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果。 (E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (G) (H) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。表面型態一致，呈類似蜂巢狀結構且出現大量孔洞。

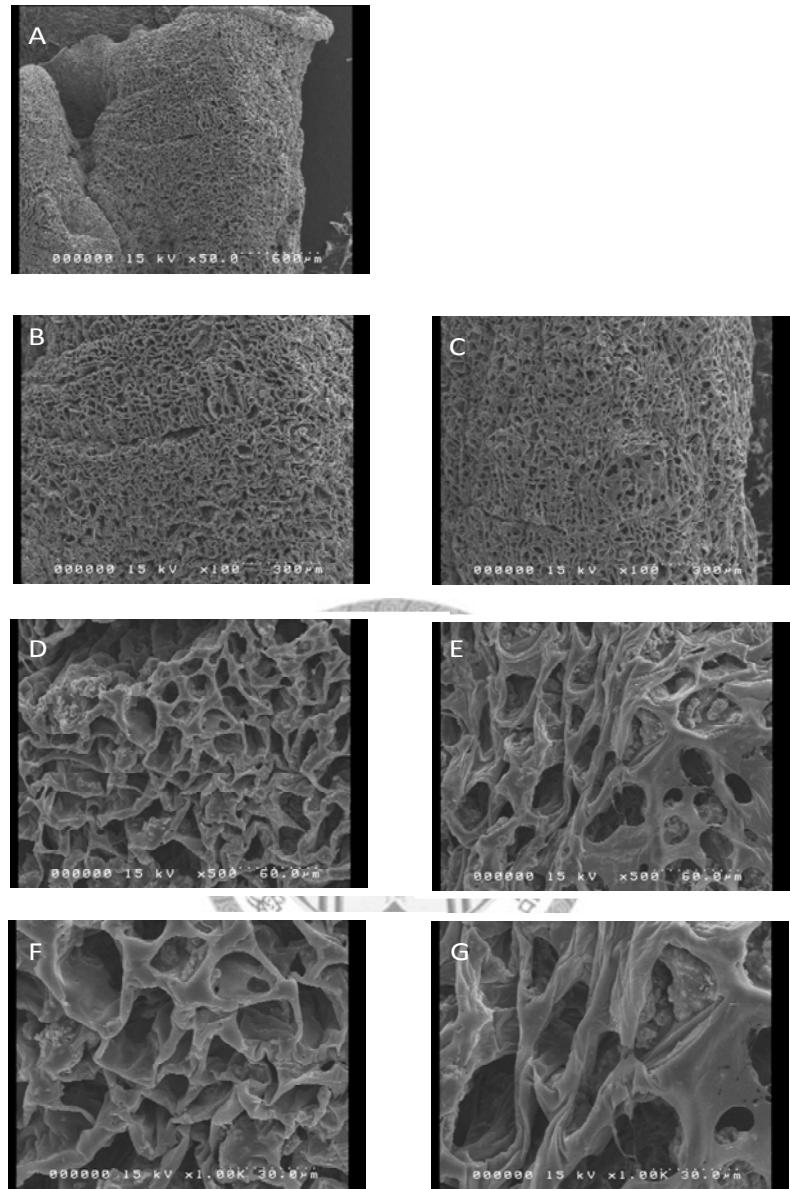


圖 50. CPD / PCL / 1,4 Dioxan 冷凍乾燥法。 (A) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (B) (C) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面呈類似蜂巢狀結構且出現大量孔洞。 (D) (E) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果，可觀察到孔凍結構間具連通性且型態相當一致。 (F) (G) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果。

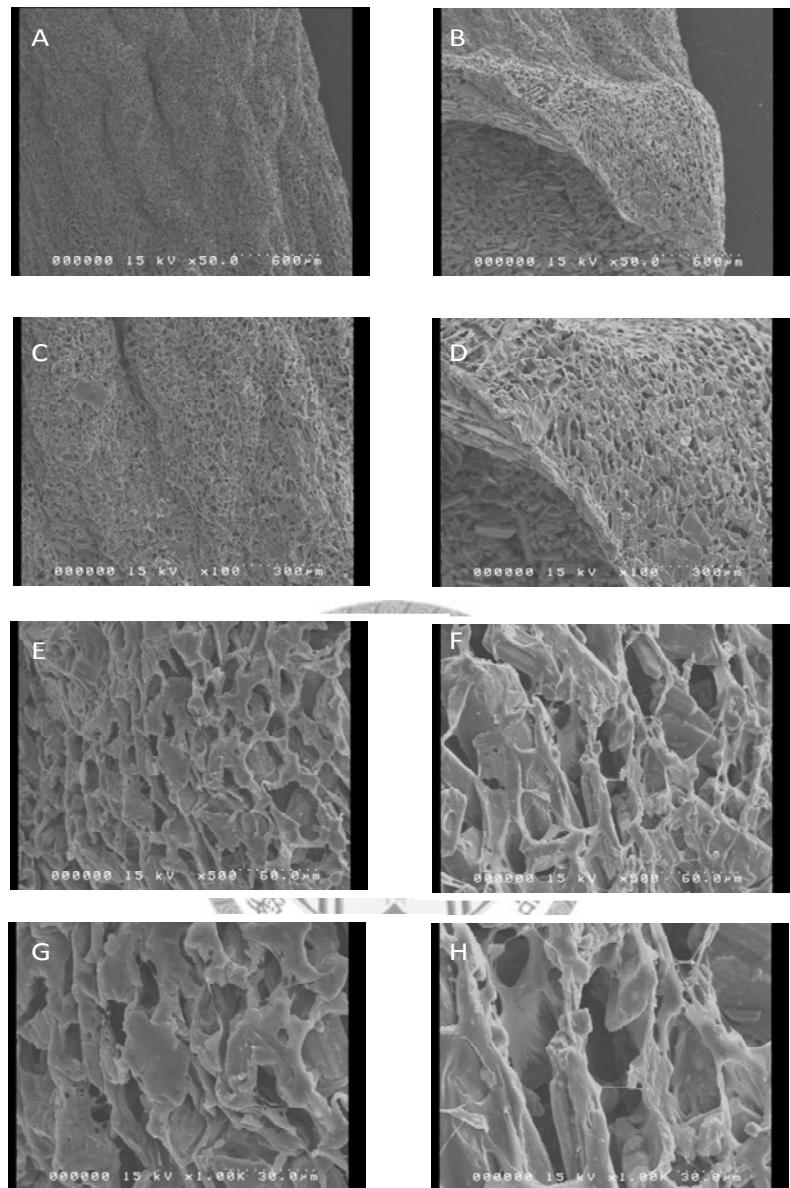


圖 51. CSD / PCL / 1,4 Dioxan 冷凍乾燥法。 (A) (B) 掃描式電子顯微鏡下 50X 結果。 (C) (D) 掃描式電子顯微鏡下 100X 結果，表面型態一致，呈類似蜂巢狀結構且出現大量孔洞。。 (E) (F) 掃描式電子顯微鏡下 500X 結果。 (G) (H) 掃描式電子顯微鏡下 1000X 結果，發現孔洞間具連通性。

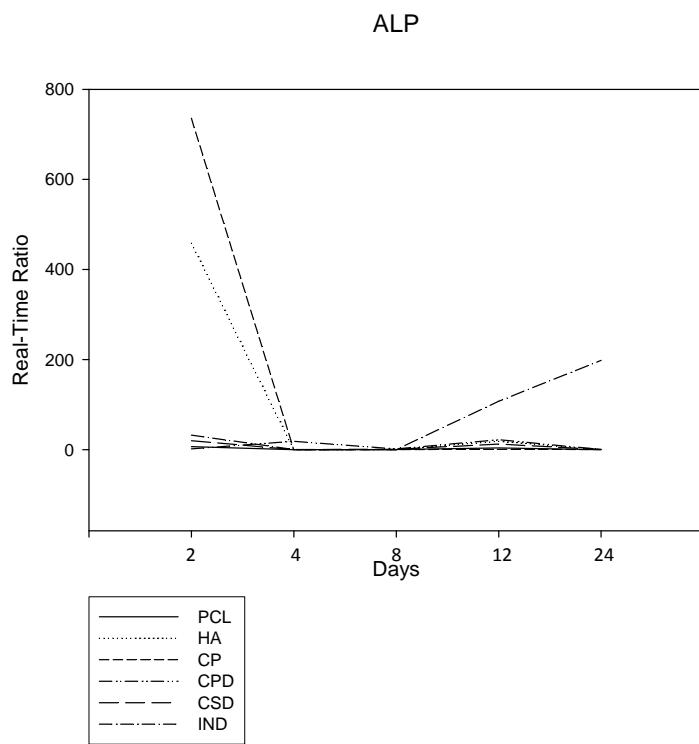


圖 52. 即時定量聚合酵素鏈鎖反應基因 ALP mRNA 表現趨勢

圖。基因 ALP mRNA 之表現，材料組於兩天時間點 HA 及 CP 組有高度的表現量外，其餘均無明顯表現。骨誘導培養基組則於十二天起 ALP mRNA 之表現有上升趨勢。

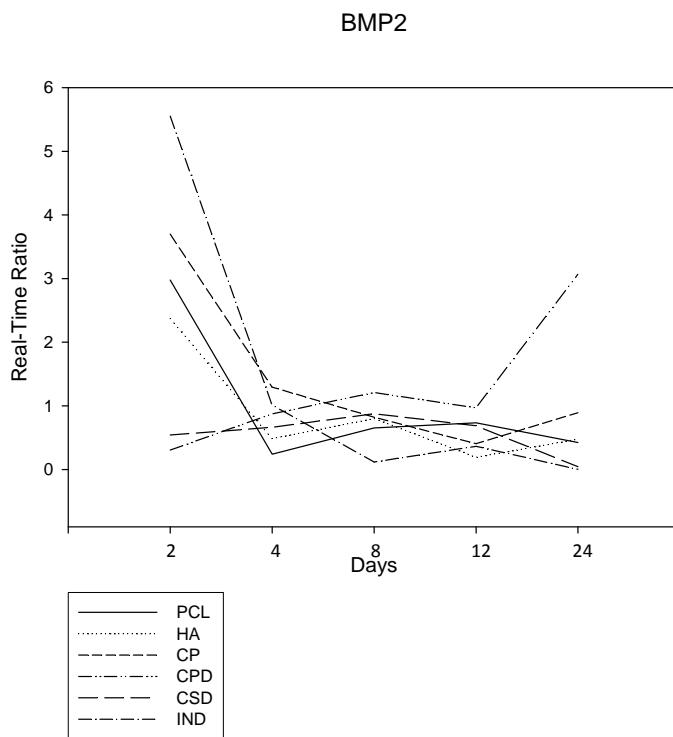


圖 53. 即時定量聚合酵素鏈鎖反應基因 BMP2 mRNA 表現趨勢

圖。基因 BMP2 mRNA 之表現，於兩天時間點 IND 及 CP 組與二十

四天時間點 CPD 組的表現量有微幅上升外，其餘均無明顯表現。

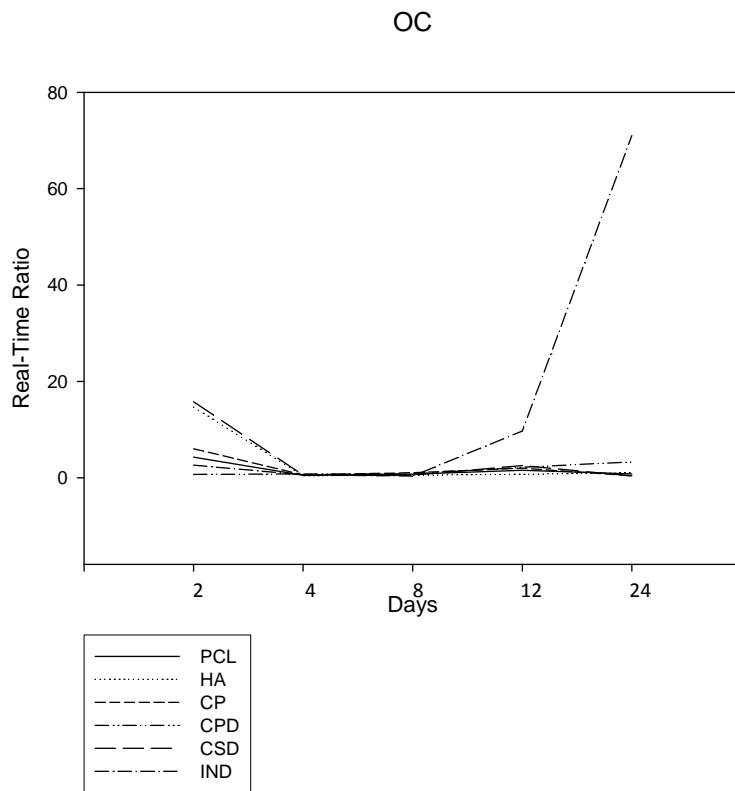


圖 54. 即時定量聚合酵素鏈鎖反應基因 OC mRNA 表現趨勢

圖。基因 OC mRNA 之表現，所有組別於兩天時間點均有微幅上升外，除了 IND 組於十二天時間點後表現量有明顯提高其餘均無明顯表現。

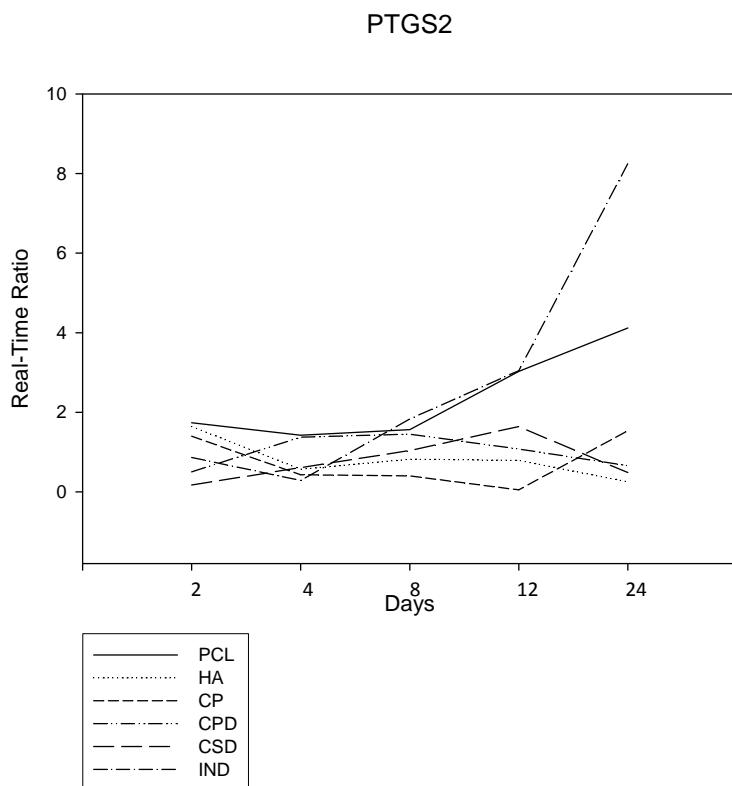


圖 55. 即時定量聚合酵素鏈鎖反應基因 PTGS2 mRNA 表現趨勢圖。
 基因 PTGS2 mRNA 之表現，於純高分子組 PCL 與骨培養基誘導組 IND 於十二天時間點後表現量有明顯提高其餘均無明顯表現。

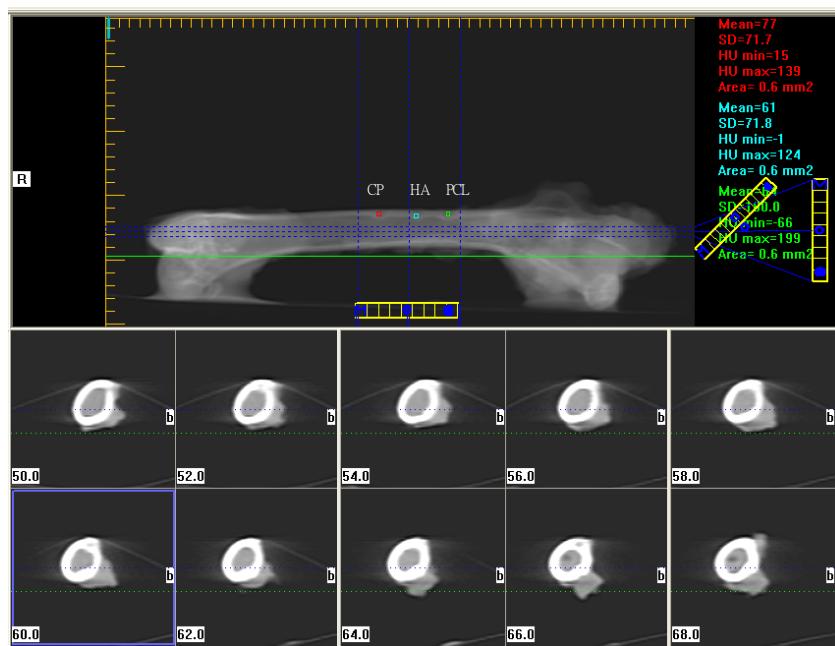


圖 56. 紐西蘭白兔骨填補材植入 5 週後左股骨斷層掃描結果。

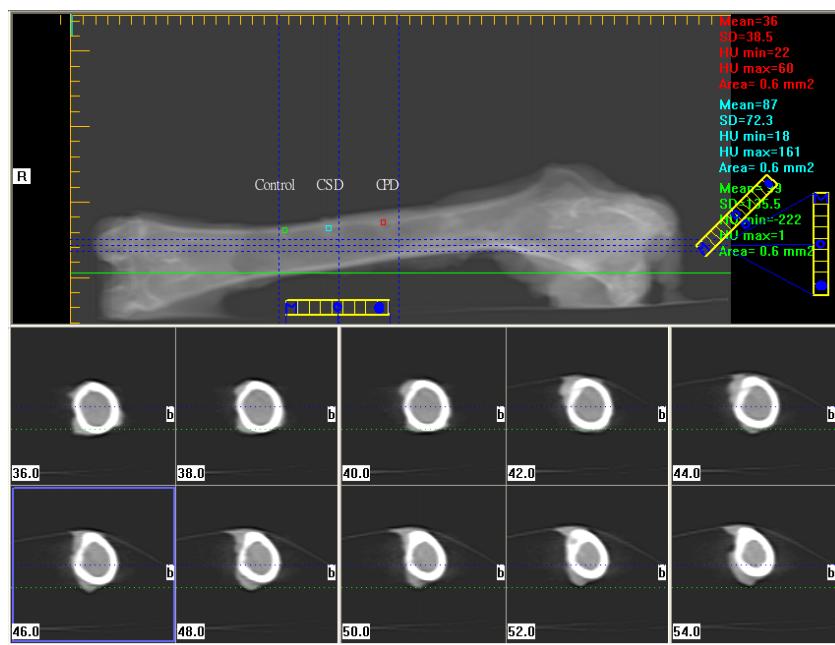


圖 57. 紐西蘭白兔骨填補材植入 5 週後右股骨斷層掃描結果。

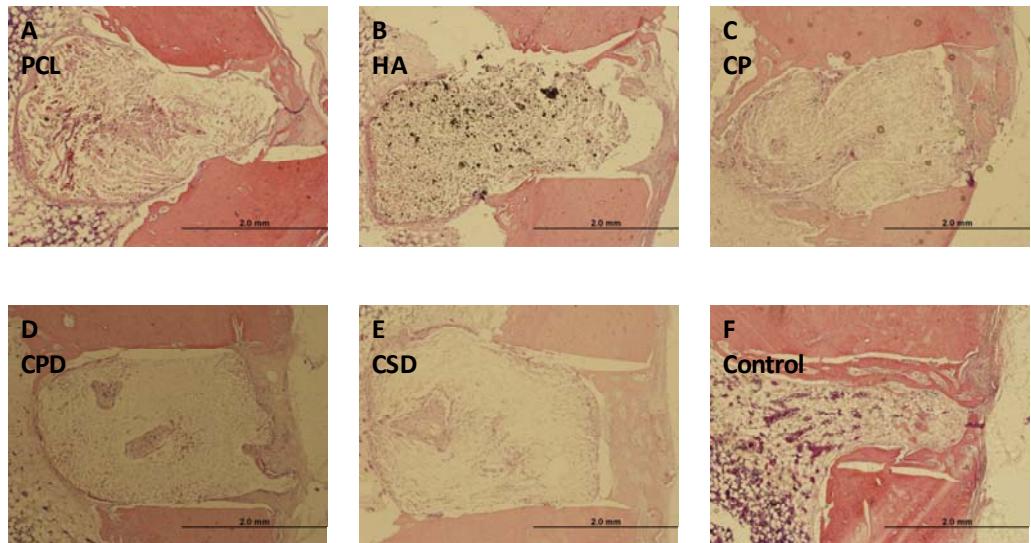


圖 58. 紐西蘭白兔骨填補材植入 2 週後股骨組織切片結果。(A) PCL 實驗組。(B) HA 實驗組。(C) CP 實驗組。(D) CPD 實驗組。(E) CSD 實驗組。(F) 對照組。所有實驗組均可發現材料型態均完整。對照組中有觀察到明顯的骨質再生與血管新生。

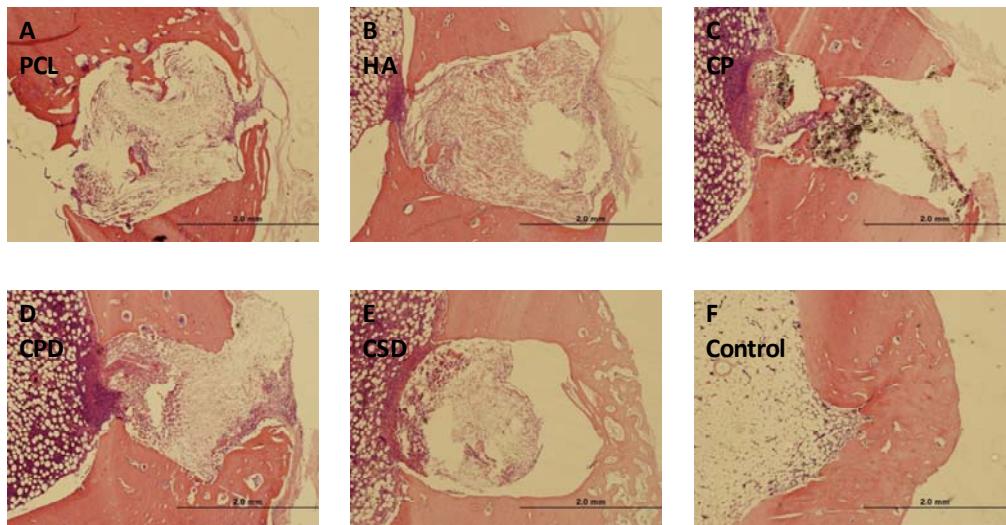


圖 59. 紐西蘭白兔骨填補材植入 5 週後股骨組織切片結果。(A) PCL 實驗組。(B) HA 實驗組。(C) CP 實驗組。(D) CPD 實驗組。(E) CSD 實驗組。(F) 對照組。

實驗組均可發現材料未完全崩解及有少量骨質新生。對照組則可發現骨質已大部分癒合。



圖 60. 紐西蘭白兔骨填補材植入 5 週後股骨組織切片結果。(A)

市售填補材 Gelform® (B) 市售填補材 CollaPlug®。 (C) 對照組。

三者均可發現骨質已大部分癒合，相較於對照組，兩組市售填補材實驗組的骨再生量較多，皮質骨內側近髓腔表面更為平整，無再生量不足的凹陷。

參考文獻

Aarden EM, Wassenaar AM, Alblas MJ, Nijweide PJ (1996). Immunocytochemical demonstration of extracellular matrix proteins in isolated osteocytes. *Histochem Cell Biol* 106(5):495-501.

Agrawal CM, Athanasiou KA (1997). Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *J Biomed Mater Res* 38(2):105-14.

Atmani H, Chappard D, Basle MF (2003). Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *J Cell Biochem* 89(2):364-72.

Banovac K, Koren E (2000). Triiodothyronine stimulates the release of membrane-bound alkaline phosphatase in osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 67(6):460-5.

Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1992). Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner* 17(1):15-29.

Beresford JN, Joyner CJ, Devlin C, Triffitt JT (1994). The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Arch Oral Biol* 39(11):941-7.

Blumberg P, Brenner R, Budny S, Kresse H (1997). Increased turnover of small proteoglycans synthesized by human osteoblasts during cultivation with ascorbate and beta-glycerophosphate. *Calcif Tissue Int* 60(6):554-60.

Boskey AL, Posner AS (1976). Extraction of a calcium-phospholipid-phosphate complex from bone. *Calcif Tissue Res* 19(4):273-83.

Brehm A, Ohbo K, Scholer H (1997). The carboxy-terminal transactivation domain of Oct-4 acquires cell specificity through the POU domain. *Mol Cell Biol* 17(1):154-62.

- Causa F, Netti PA, Ambrosio L, Ciapetti G, Baldini N, Pagani S, et al. (2006). Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *J Biomed Mater Res A* 76(1):151-62.
- Chen L, Scholler J, Foged NT (1996). ALP induction by beta-glycerophosphate during the non-mineralization phase in vitro. *J Tongji Med Univ* 16(1):20-4.
- Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV (1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134(1):277-86.
- Coombes AG, Rizzi SC, Williamson M, Barralet JE, Downes S, Wallace WA (2004). Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials* 25(2):315-25.
- Dean DD, Schwartz Z, Bonewald L, Muniz OE, Morales S, Gomez R, et al. (1994). Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan-degrading metalloproteinases after addition of beta-glycerophosphate and ascorbic acid. *Calcif Tissue Int* 54(5):399-408.
- Dressman JB, Fleisher D (1986). Mixing-tank model for predicting dissolution rate control or oral absorption. *J Pharm Sci* 75(2):109-16.
- Driessens FC (1980). Probable phase composition of the mineral in bone. *Z Naturforsch [C]* 35(5-6):357-62.
- Friedman CD, Costantino PD, Takagi S, Chow LC (1998). BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J Biomed Mater Res* 43(4):428-32.
- Ganta DR, McCarthy MB, Gronowicz GA (1997). Ascorbic acid alters collagen integrins in bone culture. *Endocrinology* 138(9):3606-12.
- Gorbunoff MJ, Timasheff SN (1984). The interaction of proteins with hydroxyapatite. III. Mechanism. *Anal Biochem* 136(2):440-5.
- Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC, Riggs BL (1999). Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases

OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J Bone Miner Res* 14(9):1522-35.

Hanada K, Dennis JE, Caplan AI (1997). Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 12(10):1606-14.

Harada S, Matsumoto T, Ogata E (1991). Role of ascorbic acid in the regulation of proliferation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 6(9):903-8.

Hunter GK, Poitras MS, Underhill TM, Grynpas MD, Goldberg HA (2001). Induction of collagen mineralization by a bone sialoprotein--decorin chimeric protein. *J Biomed Mater Res* 55(4):496-502.

Ishida Y, Tertinegg I, Heersche JN (1996). Progesterone and dexamethasone stimulate proliferation and differentiation of osteoprogenitors and progenitors for adipocytes and macrophages in cell populations derived from adult rat vertebrae. *J Bone Miner Res* 11(7):921-30.

Kalfas IH (2001). Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 10(4):E1.

Kamiya N, Takagi M (2001). Differential expression of dentin matrix protein 1, type I collagen and osteocalcin genes in rat developing mandibular bone. *Histochem J* 33(9-10):545-52.

Kim HW, Knowles JC, Kim HE (2004). Effect of biphasic calcium phosphates on drug release and biological and mechanical properties of poly(epsilon-caprolactone) composite membranes. *J Biomed Mater Res A* 70(3):467-79.

Klemm JD, Rould MA, Aurora R, Herr W, Pabo CO (1994). Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 77(1):21-32.

Komori T (2000). A fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 276(3):813-6.

Kuhne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M (1994). Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 65(3):246-52.

Lewandrowski KU, Venugopalan V, Tomford WW, Schomacker KT, Mankin HJ, Deutsch TF (1996). Kinetics of cortical bone demineralization: controlled demineralization--a new method for modifying cortical bone allografts. *J Biomed Mater Res* 31(3):365-72.

Marra KG, Szem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE (1999). In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 47(3):324-35.

McCulloch CA, Tenenbaum HC (1986). Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anat Rec* 215(4):397-402.

Nagase M, Chen RB, Asada Y, Nakajima T (1989). Radiographic and microscopic evaluation of subperiosteally implanted blocks of hydroxylapatite-gelatin mixture in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 47(1):40-5.

Niwa H (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26(3):137-48.

Posner AS (1969). Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev* 49(4):760-92.

Queiroz AC, Santos JD, Monteiro FJ, Gibson IR, Knowles JC (2001). Adsorption and release studies of sodium ampicillin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 22(11):1393-400.

Schiller C, Epple M (2003). Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. *Biomaterials* 24(12):2037-43.

Sugaya A, Minabe M, Tamura T, Hori T, Watanabe Y (1989). Effects on wound healing of hydroxyapatite-collagen complex implants in periodontal osseous defects in the dog. *J Periodontal Res* 24(4):284-8.

Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN (2001). High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation

or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* 40(1):74-83.

Walsh WR, Labrador DP, Kim HD, Guzelsu N (1994). The effect of in vitro fluoride ion treatment on the ultrasonic properties of cortical bone. *Ann Biomed Eng* 22(4):404-15.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6):2220-4.

Yang L, Tao T, Wang X, Du N, Chen W, Tao S, et al. (2003). Effects of dexamethasone on proliferation, differentiation and apoptosis of adult human osteoblasts in vitro. *Chin Med J (Engl)* 116(9):1357-60.

Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 9(21):2635-45.

