

## 摘要

為了達成誘導牙周組織再生(guided tissue regeneration)目的而使用的再生膜可分為兩種:不可吸收性(non-biodegradable), 或生物可吸收性(biodegradable)的再生膜。生物可吸收性的再生膜能避免不可吸收性的再生膜需要二次手術取出造成的缺點。本實驗探討的再生膜屬於可吸收性的膠狀聚乳酸(poly-lactic acid polymer—PLA polymer)再生膜內含溶劑 N-methyl-2-pyrrolidone-1 (NMP), 這種材料有許多的優點包括:(1)容易操作, (2)牙根表面絕佳的貼合性等。然而, 當此材料應用在牙周環境中對患者口腔組織, 尤其是在細胞階層影響的相關的文獻卻少見發表。本實驗的目的—為了探討膠狀聚乳酸再生膜對培養的人類牙齦纖維母細胞生長所造成影響, 並尋求最佳的臨床使用條件。實驗分為七組: (1)模擬廠商建議的原位施用組 in situ group, (2)模擬廠商建議的盒製組 in kit group, (3)只含 100% 溶劑 NMP-1 group, (4)只含 63% 溶劑 NMP-2 group, (5)增加沖水體積 wash-1 group, (6)增加浸泡時間 wash-2 group, (7)控制組。結果顯示膠狀聚乳酸再生膜, 可以減緩牙齦纖維母細胞的生長至少達五天之久, 造成 PLA polymer 周圍的細胞形態的改變或導致細胞死亡, 形成環狀細胞淨空區(clear zone)。由細胞形態的觀察及細胞生長動力學分析的結果證實溶劑 NMP 的濃度越高, 細胞存活率越低, 增加沖水的體積或延長浸泡的時間, 能顯著的降低細胞死亡率。因此建議臨床上膠狀聚乳酸的應用, 若能利用大量沖水或延長浸泡的時間, 儘量避免 NMP 的殘留, 在早期癒合階段, 應能提供最佳的臨床使用效果。

## **Abstract**

The barrier membranes used in guided tissue regeneration procedures are subdivided into two major types: non-biodegradable and biodegradable. One of the main advantages of the latter is that they are metabolized and biodegraded slowly by the tissue. The use of biodegradable membranes, thereby, circumvents the necessity and drawbacks of the second surgical removal of non-biodegradable membranes. The biodegradable membrane used in this study was made from poly-lactic acid (PLA) dissolved in N- methyl- 2- pyrrolidone (NMP) and is jellified once NMP is replaced by pure water or saline. Advantages of this type of membrane, as claimed by the manufacturer, include: easy to handle, excellent fitting to the root surface. Albeit the membrane is gaining popularity among dentists, there are many aspects and questions remain to be explored further. Especially, reactions and changes occurring at the cellular level when the membrane is applied to the periodontal environment have rarely been reported. Thus, the purpose of this study is to learn more about the interactions between PLA polymers and cultured human gingival fibroblasts (HGF). Furthermore, based on our findings, refinements about how to optimize the application of the membrane will be suggested. The experiment was diversified into seven groups, including (1) in situ group, (2) in kit group, (3) NMP-1 group, (4) NMP-2 group, (5) wash-1 group, (6) wash-2 group, and (7) control group. Our data showed that the gel-type PLA membrane retards the growth of HGF for at least 5 days by leaving a clear zone immediately

surrounding the polymerized membrane. Both changes in cell morphology and analyses of growth kinetics demonstrated a NMP-dose-dependent reaction. Based on our data, we suggest that the damages caused by the membrane might be improved by increasing the volume of irrigation water or prolonging the duration of water immersion might be helpful in optimizing the use of the membrane.

Key words: guided tissue regeneration, non-biodegradable, biodegradable, poly-lactic acid (PLA), N-methyl-2-pyrrolidone-1 (NMP), human gingival fibroblasts (HGF), clear zone.

## 壹.前言

傳統牙周病的治療到了 1982 年有了重大的變革，Nyman 及 Lindhe 等幾位學者，提出了牙周組織誘導再生(guided tissue regeneration---GTR)的觀念，能成功的應用在人類手術上，藉由再生膜建立空間 (space making) 誘導牙周組織的再生，以恢復原有的支持功能。近年來針對再生膜的研究日新月異，從不可吸收性的 Millipore filter，ePTFE(expanded polytetrafluorethylene)材質，到因應臨床的要求所發展出的可吸收性的材質，包括：collagen barriers，cargile membranes，polyglactin，Polylactic acid polymer 等各項材質。不論何種材質的再生膜，都必須符合無毒性，及生物相容性的基本要求，其中操作簡便，貼合性佳，可被組織水解代謝的聚乳酸聚合物 Polylactic acid (PLA) polymer，臨床應用上有許多優越的特質，但臨床觀察上，卻曾有少數病例，術後在早期修復階段(術後至 14—21 天)會有發炎反應的發生--手術區使用膠狀 PLA barrier 發生 gingival ulceration 的現象，引發我們對聚乳酸聚合物材料特性的疑問。由於膠狀 PLA polymer barrier 在細胞學方面相關的細胞毒性與生物相容性的研究，比較欠缺，因此本實驗模擬膠狀聚乳酸聚合物臨床應用的方式，在體外培養的細胞上，以觀察對牙齦纖維母細胞的生長所造成影響，並尋找出最佳的臨床使用條件。

## 貳.文獻回顧

### 一. 傳統牙周病治療

由於傳統牙周病的處理-包括了洗牙(scaling) , 牙齦下牙根刮平(subgingival root planning) , 軟組織的刮除(soft tissue curettage) , 治療後 , 因為原先發炎牙齦的收縮 , 促使發炎的牙齦恢復健康外形 , 及部分囊袋(pocket)的底部形成新的結締組織連結 ( new connective tissue attachment ) , 因而降低囊袋(pocket)的深度(Yunger 1899 ; McCall 1926)。然而傳統牙周病治療後 , 只能得到牙周組織的修復(repair) , 即牙齦結締組織(gingival connective tissue)與上皮組織 ( epithelial tissue ) 的增生 , 無法恢復原有的支持功能 , 並未獲得真正牙周組織的再生(regeneration)。

“再生”(Regeneration)的定義為再造(reproduction)或重建(reconstitution)已喪失或受損的組織 , 並完整修復其結構與功能(Glossary of periodontal terms,1992)。

## 二. 再生性牙周手術

“再生性牙周手術”(Regenerative periodontal surgery)-是特別為了重建已喪失牙周組織的支持功能所設計，亦可以稱為”再連結”(reattachment)或”新的連結”(new attachment)的治療方式。這種”再連結”(reattachment) 的治療目標，是藉由手術或機械性的治療方式，促使受到牙周病破壞了原有纖維連接的病變區內的剩餘牙周韌帶(periodontal ligament-PDL)細胞再生新的纖維，並連接牙根表面(Nyman et al , 1982)。

更進一步的定義”新的連結”(new attachment)的治療目標，藉由牙周韌帶(PDL)細胞再生新的膠原纖維(collagen fibers)，延伸至牙根表面新生成的牙莖質(new cementum)中，以復原受到牙周病或機械性的破壞的病變區(Isidor et al , 1985)。

### 三. 牙周組織誘導再生(Guided Tissue Regeneration, GTR)

自從 1982 年 S. Nyman 及 J. Lindhe 等幾位學者，提出了牙周組織誘導再生(Guided Tissue Regeneration, GTR)的觀念-利用聚合物(polymer)阻隔遷移速度較快的上皮組織(epithelial tissue)及牙齦結締組織(gingival connective tissue)向下生長，便能引導周圍的牙周韌帶(PDL)細胞再分化，再生新的牙周支持組織，包括新的牙周韌帶及骨細胞.新的結締組織連結 ( new connective tissue attachment ) 與新的牙莖質(new cementum)細胞，以恢復原有的支持功能 ( Gottlow, 1984 )。經過 20 年臨床及基礎研究的驗證，確立了其臨床應用性。

#### 四. 牙周組織誘導再生膜(Guided Tissue Regeneration Barriers)

牙周組織誘導再生的觀念成功的應用在人類手術上，並得到組織學上的證實(S. Nyman, J. Lindhe, 1982)之後， 牙周組織誘導再生膜(Guided Tissue Regeneration Barriers)的研究，從不可吸收性的 ePTFE(expanded polytetrafluorethylene)材質，到針對臨床的要求發展出的可吸收性 collagen barrier, polyglactin, polylactic acid (PLA)等各項材質。不論何種材質的再生膜，都必須符合以下幾項要求：

1. 足夠堅硬(stiffness)，以建立空間(space making)，讓底下的牙周韌帶組織有足夠時間，空間獲得新骨再生(Zellin, 1995)。
2. 延長降解(degradation)時間，再生膜必須延長吸收時間以得到完全的組織再生(Aaboe, 1993)。
3. 良好的組織相容性(biocompatibility)，材料本身特性不會干擾組織的修復，以避免引起免疫反應，造成過敏，或引發慢性發炎反應。
4. 組織整合(tissue integration)的目標，是讓生長快速的上皮組織，長入再生膜中，但並不穿通再生膜，以避免上皮組織向下生長，並且穩定外層覆蓋的皮瓣(Warrer et al.1992)。
5. 臨床上便於操作，容易剪裁與置入。



## 五. 不可吸收性的再生膜

最先應用在臨床上，不可吸收性的 ePTFE(expanded polytetrafluorethylene) membrane，雖然有其優點--生物相容性佳，臨床上的應用能預期牙周組織的再生，例如形成新骨 ( new bone )，新的結締組織連結 ( new connective tissue attachment )，新的牙堊質( new cellular cementum) ，但是 ePTFE membrane 必須在置入 1-3 個月後作第二次手術(Becker，1988)，將不可吸收的再生膜移除，拉長了患者手術後傷口修復的時間 ( Caton，1992 )，且在操作剪裁及第二次手術的過程，可能造成細菌的感染，提高失敗率，因而影響組織再生的效果(Selvig & Nilvus，1992)。

## 六. 可吸收性的膠狀聚乳酸聚合物 polylactic acid (PLA) polymer 再生膜

為了避免二次手術造成的缺點，因此學者積極研發可吸收性的再生膜，其中操作簡便，貼合性佳，以 NMP (N-methyl-2-pyrrolidone) 為溶劑的膠狀 polylactic acid (PLA) polymer 再生膜，只要將透明膠狀的聚乳酸聚合物直接覆蓋在填滿骨粉的骨缺損區(原位施用法-in situ application)，噴水其上，等到材料變成白色固體的狀態即可。其優點包括: 1. 良好的貼合性， 2. 可以被吸收 (Magnusson, 1988)，不需二次手術取出(Gottlow, 1994)且吸收時間恰當(2-6 個月)， 3. 避免操作剪裁的過程造成細菌的感染， 4. 操作簡便， 5. 縮短手術時間， 6. 結合骨粉的使用以達成良好的空間阻隔效果。

根據文獻的記載 (Coonts, 1998)，在動物學的實驗中證實 PLA polymer 良好的生物相容性 (biocompatibility)，但根據我們的臨床觀察紀錄，卻曾有少數病例，術後在早期修復階段(術後至 14 —21 天)會有發炎反應的病例--手術區使用膠狀 PLA barrier 發生 gingival ulceration 的現象，但回顧其他學者的研究報告，在動物學的研究及人類的臨床報告，都指稱其為良好生物相容性的材料，少有化膿發炎的反應產生，然而卻獨缺在細胞學的相關研究的發表，引發我們對膠狀聚乳酸聚合物材料特性的疑問。

## 七. 聚乳酸聚合物材料的成分與特性

本實驗使用的聚乳酸聚合物材料(Atrisorb™)，是可吸收性的再生膜(Polson, 1985)， Poly(lactic acid barrier) 可被人體細胞內的 kreb's Cycle 水解。主要成份包括: poly(DL-lactide) 以 37% 的比例溶於 N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) 63% 中，NMP 是 PLA 的溶劑。Atrisorb 與水混合後，NMP 會從 Poly(lactic acid barrier) 滲出 (diffuse) 溶於水中，剩下的 poly(lactic acid (DL-PLA) 會進行多元聚合化而逐漸硬化，以模板加壓硬化的 PLA(in kit method)，其孔洞的大小( pore size )小於 10  $\mu$ m，而且平均厚度是 675  $\mu$ m (Coonts, 1998)，而直接放置於手術區不加壓的直接原位施用法 (in situ method)，其孔洞大小及厚度則不易控制。不過兩者均可成功隔離軟組織與骨頭，防止牙齦纖維母細胞長進骨缺損區。

## 八. 實驗設計及目的

本實驗的目的是-研究膠狀聚乳酸聚合物與牙齦纖維母細胞之間的生物相容性及細胞毒性，並尋找出最佳的臨床使用條件。

實驗操作是模擬廠商建議的臨床使用方法，(1) 直接將 PLA polymer 加在培養細胞上做細胞培養觀察的 in situ group，(2) 將膠狀的 PLA polymer 以 cDMEM 浸泡 5 分鐘後，釋放出有機溶劑 NMP 形成固體狀的 PLA 後，再與細胞共同培養的 in kit group，(3) NMP group 是將 in situ group 按照廠商配製濃度換算出的 NMP 原液的濃度，將其加入細胞培養中觀察。比較這三組對細胞的影響，以推測是 PLA；NMP 或 PLA polymer 造成細胞較大的傷害，並設計不同的沖洗方式，以尋找出最佳的臨床使用條件。實驗觀察項目包含了：

- 一、 細胞形態的變化--細胞膜的完整性、胞器的變化、毒性反應。
- 二、 細胞生長的趨勢。
- 三、 細胞死亡的可能途徑。

## 參.材料與方法

### 一.藥品與試劑的製備

細胞培養液 cDMEM (complete Dulbecco's Modified Eagle Medium), 包含了 10% FBS, 1% AA, 89% DMEM。

下列用於細胞培養的各種溶液, 試劑及藥劑等, 如 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS), Trypsin, Trypan Blue stain 0.4%, 皆購自美國 Life Technologies 公司。

Antibiotic-Antimycotic(AA)混合抗生素藥劑也是購自美國 Life Technologies 公司-- prepared with 10,000 units/ml penicillinG sodium &100 ug/ml streptomycin sulfate and 0.25% amphotericin B as Fungizone in 0.85% saline。

膠狀聚乳酸聚合物 Polylactic acid (PLA) polymer 購自 Atrix Laboratories, Inc., Fort Collins,CO。

## 二.細胞來源

由健康成人的口腔中取得正常的牙齦組織，將取得的樣本以 10 倍的抗生素混合液 [取 1 ml 100 倍的 AA (Antibiotic-Antimycotic) 加入 9ml PBS- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 稀釋] 經兩分鐘的浸泡，予以消毒處理兩次後，將其切割成  $1\text{ mm}^3$  的小方塊，放在 60 mm dish 中做為初代培養，再加入 FBS (Fetal bovine serum) ，直到新生細胞。當牙齦纖維母細胞長到七八分滿時，將細胞繼代培養，維持 3-10 代牙齦纖維母細胞做實驗用。而培養用的 medium 為 cDMEM ( 10% FBS, 1 %AA , 89% DMEM )。

### 三.加藥方法

將牙齦纖維母細胞分別植入 24-well plates 中 ( $2 \times 10^4$  cells/ well) 隔天加藥。

\*實驗分為 7 組包括---

(1).原位組(in situ group)---將 PLA polymer( 20ul/well )直接加在細胞上再加入 1ml 的 cDMEM 做光學顯微鏡(Nikon ECLIPSE TS100 , made in JAPAN)下的觀察 ( 模擬廠商建議的使用方法 )。

(2).盒製組(in kit group)---將 PLA polymer( 20ul/well ) 加在 cover glass 上 , 再以 1ml cDMEM 浸泡 5 分鐘後 , 再將 PLA 取出放在細胞上加入 1ml 的 cDMEM , 做光學顯微鏡下的觀察 ( 模擬廠商建議的使用方法 )。

(3).NMP-1 group ---將 12.6 ul 的 NMP 原液加入 1cc 的 cDMEM 後,將含有 NMP 的培養液加在細胞上, 做光學顯微鏡下的觀察 ( 將方法 ( 1 ) 按照廠商配置濃度換算出的 NMP 濃度做觀察 )。

(4). NMP-2 group ---將 20 ul 的 63% NMP 加入 1cc 的 cDMEM 後,將含有 NMP 的培養液加在細胞上, 做光學顯微鏡下的觀察 ( 將方法 ( 1 ) 按照廠商配置濃度換算出的 NMP 濃度做觀察 )。

(5). 水洗組 1(wash 1 group)---以 20ml 二次水，沖洗 20ul 的 PLA polymer ， 直到透明膠狀的 PLA polymer 變成白色固體 ， 再將 PLA 取出放在細胞上加入 1ml 的 cDMEM ， 做光學顯微鏡下的觀察（ 模擬廠商建議原位組的使用方法 ， 增加沖洗液的體積 ）。

(6). 水洗組 2(wash 2 group)--- 以 1ml PBS 浸泡 PLA polymer 30 分鐘 ， 等到透明膠狀的 PLA polymer 變成白色固體 ， 再以 1ml PBS 沖洗 PLA polymer ， 將 PLA 取出放在細胞上加入 1ml 的 cDMEM ， 做光學顯微鏡下的觀察（ 模擬廠商建議的盒製組使用方法 ， 延長浸泡的時間 ）。

(7). 對照組---將細胞上加入 1ml 的 cDMEM ， 做光學顯微鏡下的觀察。



#### 四.細胞死亡率(Death rate)的測定—trypan blue exclusion

為了測量比較各實驗組之間的細胞毒性，將加藥後的各組，分別在第 1, 2, 3, 4, 5, 6 天，按照拆細胞的步驟進行處理，將最後一次離心後的細胞，打散在 cDMEM 中，取 0.4% 的 trypan blue 20ul 加入細胞懸浮液 20ul 中，充分混合後，靜待一分鐘後，放入血球計數板，計算所有的細胞數，及染成藍色的細胞數目(細胞死亡的數目)。

$$\text{細胞死亡率} = \frac{\text{細胞死亡數}}{\text{細胞總數}} \times 100\%$$

## 五.Colorimetric analysis

在 96 well plate 其中的 30 個 well 中， 每個 well 置入  $3 \times 10^3$  的牙齦纖維母細胞，培養 24 小時後，分為 10 組，每組的 well 中加入不同濃度的 NMP 原液溶液，包括：0.063% ， 0.126% ， 0.252% ， 0.4% ， 0.504% ， 1.008% ， 及控制組(不加藥)，以及另外將 NMP 原液先稀釋成不同濃度 63% ， 31.5% ， 15.75% ，在每組含培養液 cDMEM 200ul 的 well 中，加入 4 ul 不同濃度的 NMP 稀釋溶液。培養細胞 24 小時後，以 100 ul 的 2.5% Glutaraldehyde 作為固定液，再加入 20ul 的 1% crystal violet 作為染劑，在室溫下作用 15 分鐘後，水洗 3 次。每個 well 中再加入 100 ul 的 10% acetic acid。將 96 well plate 放入已設定波長 550nm 的 microplate reader (Model Ó960 , Metertech inc.)中，測定吸光度。

## 六.計畫性細胞死亡 ( Programmed Cell Death , PCD ) 之測定

為了證實造成細胞死亡的途徑是否為 PCD , 將原位組(in situ group)加藥 24 小時後的細胞自培養皿中刮下 , 放入 15 ml 離心管 , 把 pellet 中加入 PBS , 放入離心機(Hitachi, CF15D, JAPAN), 在 37 以 15,000 rpm 離心 1 分鐘, 吸去 PBS , 在離心管中留下的 pellet 中加入 50 ul 的 lysis buffer(1 % NP-40 , 20 mM EDTA , 50 mM Tris-HCL (pH7.5) , d2H<sub>2</sub>O) , 作用 10 秒後 , 以 1600 rpm 離心 5 分鐘。收集懸浮液 (S1) , 留下沉澱物 , 重複離心的步驟 , 在離心管中留下的 pellet 中加入 50 ul 的 lysis buffer , 作用 10 秒後 , 以 1600 rpm 離心 5 分鐘 , 收集懸浮液 (S2) , 將第二次離心留下的沉澱物作為控制組(C)。在各組中分別加入 1% SDS 及 RNase A (最後濃度為 5 ug/ul) , 置於 56 水浴槽作用 2 小時 再加入 proteinase K (最後濃度為 2.5 ug/ul) , 置於 37 水浴槽作用至少 2 小時。最後加入 1/10 vol. (pH 5.2) 3M 的 NaOAC 與 2 vol. 的 100% Ethanol 置於 -20 冰箱 , 放至隔夜 , 以 75% 酒精沖洗 , 再以 12000 rpm 離心 15 分鐘 , 將 pellet 晾乾 , 以 2% agarose gel 跑電泳。

## 七. 掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察

分別將加藥五天後的各組細胞，加入預熱 37 °C，pH 7.4 的固定液[ 2.5% Glutaraldehyde，4% paraformaldehyde，及 1% tannic acid 溶在 0.1M cacodylate buffer & 0.1 M sucrose buffer-( Caco/Su buffer ) ]，作用 30 分鐘後，在 37 °C，以 1 % osmium tetroxide 溶在 0.1 M Caco/Su buffer( pH 7.4)，處理細胞 1 小時後，脫水。再將之包埋，吹乾後，製成標本，以 JEOL 35S (Japan)掃描式電子顯微鏡(SEM)做觀察。

## 肆.實驗流程

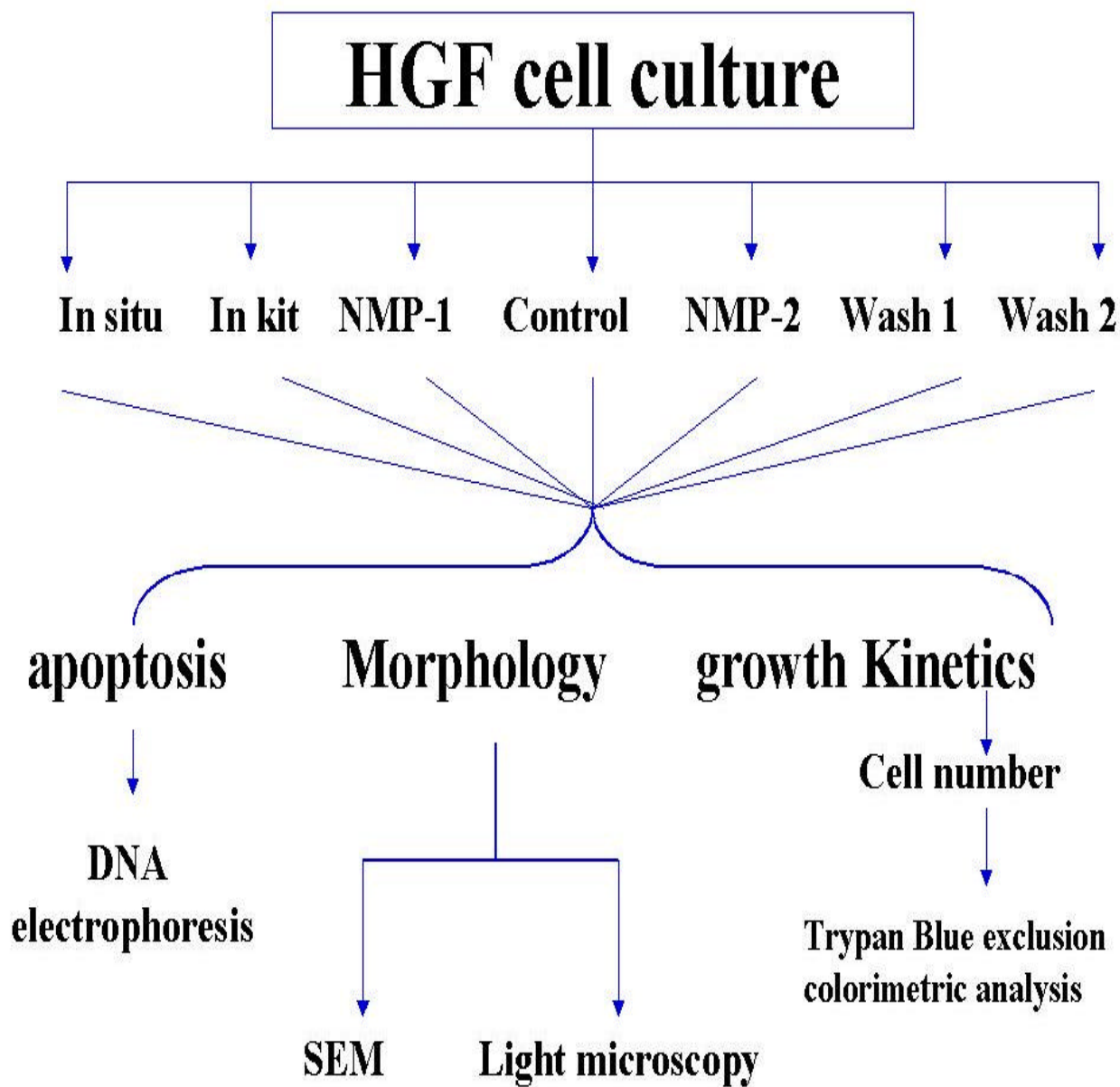


圖.1 流程圖

## 伍.結果

### 1.形態學的觀察

在低倍的光學顯微鏡下作形態觀察：40X 下的圖 2A 照片，為控制組-培養一天後，在光學顯微鏡下觀察，外型呈現狹長梭狀的典型牙齦纖維母細胞，良好的貼附 (attachment) 在培養皿的底部，培養液清澈透明，顯示出健康活性的細胞培養。圖 2B 是 in situ group 的 40X 下照片，可以發現在培養一天後長滿細胞的 well 中，再加入 PLA polymer 一小時後，左上黑色部分為 PLA polymer，右下密佈的是 cell，PLA polymer 周圍的細胞縮小變成不規則的形狀，細胞培養液中有一些懸浮的細胞，可發現有 detach 的現象產生，顯示周圍細胞受到影響，導致部分細胞逐漸死亡。圖 2C 在 in kit group，PLA polymer 加入一小時後，40X 下觀察，就能清楚的看見左上黑色的 PLA polymer 周圍呈現細胞 detach，形成 clear zone (cell-free area)。圖 2D 在 NMP group，加入 NMP 溶液一小時後的觀察比較，發現 40X 下觀察，培養液中有懸浮的細胞，輕拍培養皿的底部可造成細胞的漂動，細胞有 detach 的現象產生，形成多處 clear zone (cell-free area)。

在高倍的光學顯微鏡下作形態觀察：圖 3A 是 in situ group，200X 下的照片可以發現在在培養一天後，長滿細胞的 well 中，加入 PLA polymer 二小時後，上面黑色部分為 PLA polymer，PLA polymer 周圍的細胞縮小變成不規則的形狀，或是發亮的球形，細胞的外形基本上變為球形且略帶腫脹的形狀，在某些細胞表面

形成巨大包膜空泡(membrane blisters or ballooning)，空泡內未見明顯的胞器，這些空泡最後會完全破裂，造成細胞膜的完整性受損害。在細胞質方面的變化，包括了顏色加深的顆粒質化(granularity)，及大量的空泡 ( vacuole ) 產生。在細胞核的變化是由於異染色質退化，造成白化 ( albuminous degeneration ) 或稱為雲霧狀肥大(cloudy swelling)的現象。細胞培養液中有一些懸浮的細胞，可發現有 detach 的現象產生，顯示周圍細胞受到影響，導致部分細胞死亡。圖 3B 在 in situ group，200X 下的照片，加入 PLA polymer 24 小時後，PLA polymer 周圍的細胞附著力變弱，細胞縮小並未完全平展開來，呈現不規則的形狀，或是發亮的球形，細胞的主要變化大致一樣，但細胞數目明顯減少，細胞顆粒質化更嚴重，細胞本體更為緻密而變小，細胞核與細胞質已經無法分辨，ballooning 的程度更為嚴重。培養液中有大量懸浮的細胞，輕拍培養皿的底部即可造成細胞的漂動。

圖 4 為 in situ group 的經時觀察：圖 4A 是控制組，未加入 PLA polymer，100X 下的照片，外型呈現狹長梭狀的典型牙齦纖維母細胞，良好的貼附 ( attach ) 在培養皿的底部。圖 4B 是 in situ group，加入 PLA polymer 一天後，40X 下的照片，PLA polymer 周圍有 clear zone (cell-free area) 形成。圖 4C 是 in situ group，加入 PLA polymer 一天後，將圖 4B 放大倍數，100X 下的照片，PLA polymer 周圍有 clear zone 的形成。圖 4D 是 in situ group，100X 下的照片，加入 PLA polymer 二天後，clear zone (cell-free area) 變大，細胞突(process)變的細長。圖 4E 是 in situ group，100X 下的照片，加入 PLA polymer 七天後，細胞已經增生從外圍長入原先的 clear zone，但

是仍見細胞突(process)變的細長的形態。圖 4F 是 in situ group, 100X 下的照片, 加入 PLA polymer 11 天後, PLA polymer 對細胞的影響逐漸的消退中, 細胞總數增多, 開始密集, 但是仍見細胞突(process)變的細長的形態。圖 4G 是 in situ group, 100X 下的照片, 加入 PLA polymer 15 天後, 細胞已經相當的密集, clear zone 完全消失, 形態上已趨近狹長梭狀的典型牙齦纖維母細胞。

圖 5 為 NMP group 的經時觀察：圖 5A 為控制組, 加入 NMP 前, 100X 下的照片, 外型呈現狹長梭狀的典型牙齦纖維母細胞, 良好的貼附 (attach) 在培養皿的底部。圖 5B 為 NMP group, 加入 NMP 一天後, 細胞呈現不規則的形狀, 或是發亮的球形, 細胞有 detach 的現象產生。圖 5C 為 NMP group, 加入 NMP 二天後, 細胞培養液中有些懸浮的細胞, 輕拍培養皿的底部即可造成細胞的漂動。圖 5D 為 NMP group, 加入 NMP 三天後, 細胞培養液中有大量懸浮的細胞, 及細胞的殘屑。圖 5E 為 NMP group, 加入 NMP 第六天後, 細胞培養液中仍有大量懸浮的細胞, 及細胞的殘屑, 但已經可以看見有少量再附著的細胞。圖 5F 為 NMP group, 加入 NMP 第九天後, 細胞培養液中殘存微量懸浮的細胞及細胞的殘屑, 而且已經有大量細胞的再附著。

圖 6 是電子顯微鏡的觀察：圖 6A 是控制組, 在 35X 的電子顯微鏡 (SEM) 的觀察, 可以發現許多平行排列成渦輪狀 (whorl-like) 的典型牙齦纖維母細胞聚集。圖 6B 是 in situ group, 在 35X 的的觀察中, 可見 PLA polymer 呈現麵糰狀



(dough-shaped)的外形，且 PLA polymer 的表面有許多孔洞，在其右上角可見細胞 detach 的現象產生，有 clear zone 的形成，將右上角區域放大成 200X 的圖 6C。圖 6C 是 in situ group，200X 的觀察，可以發現左下角 PLA polymer 的表面呈現密集且排列有序的孔洞，右上角可清楚的看見細胞 detach 的現象產生，周圍僅存在牙齦纖維母細胞的碎屑，有 clear zone 的形成。

## 1. 2.細胞生長的趨勢

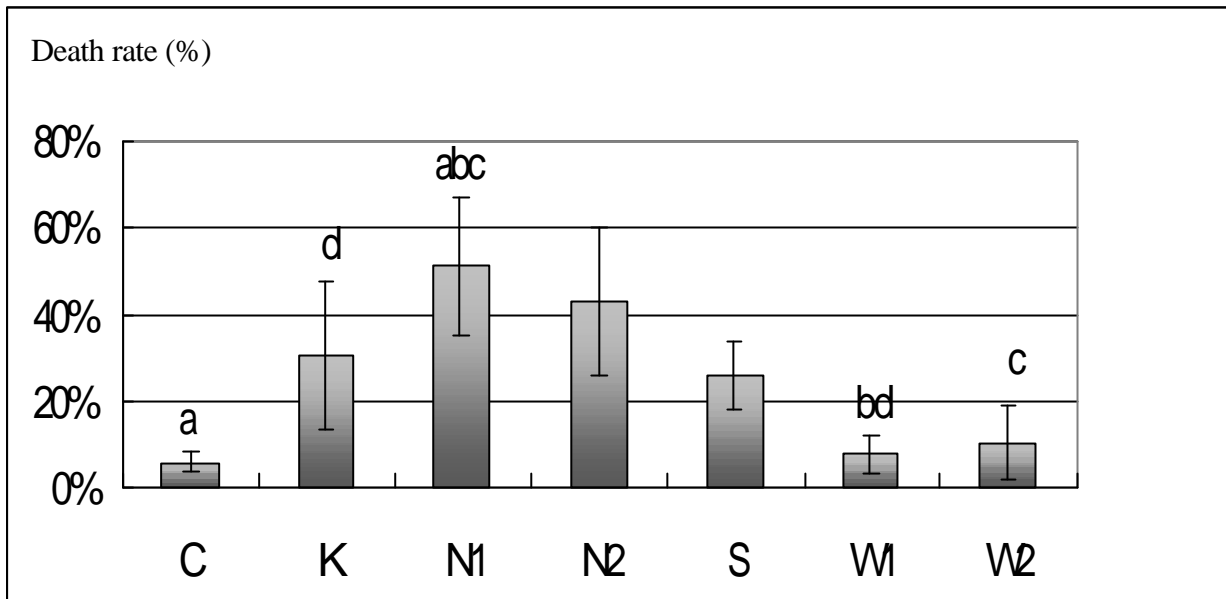


圖 7

加入 NMP 與 PLA polymer 一天後，如圖 7，以 Student's t test 作統計學分析，發現 NMP-1 group 的 death rate( $51.2\% \pm 16\%$ )分別與 wash 1 group ( $7.8\% \pm 4.5\%$ ), wash 2 group ( $10.36\% \pm 8.6\%$ ), 及 control group ( $6.1\% \pm 2.2\%$ ), 兩兩之間有統計學上的顯著差異，顯示 NMP 的成分可能對細胞造成毒害，因而造成明顯增加的細胞死亡率。

In kit group 的 death rate ( $30.8\% \pm 17\%$ )與 wash 1 group ( $7.8\% \pm 4.5\%$ ) 有統計學上的顯著差異，顯示增加沖水的水量能夠減少 PLA polymer 內的溶劑 NMP 含量，有效的降低細胞死亡率。

然而 control group 與 wash 1 group, wash 2 group 間並無統計學上的顯著差異，顯示增加沖水的水量與延長水洗的時間，均能夠有效的除去 PLA polymer 的

成分對細胞的影響。

Death rate 的比較上，第一天的觀察可以發現 NMP-1 group 的 death rate( 51.2%  $\pm$  16%)約為 in situ group ( 25.79%  $\pm$  7.8% ) 的 2 倍，且 in situ group 與 In kit group 的 death rate 高於 wash-2group ， control group 及 wash-1 group ，顯示出殘留較多的 NMP 可能會造成較高的 death rate ，與光學顯微鏡下所觀察細胞的生長情況相似。

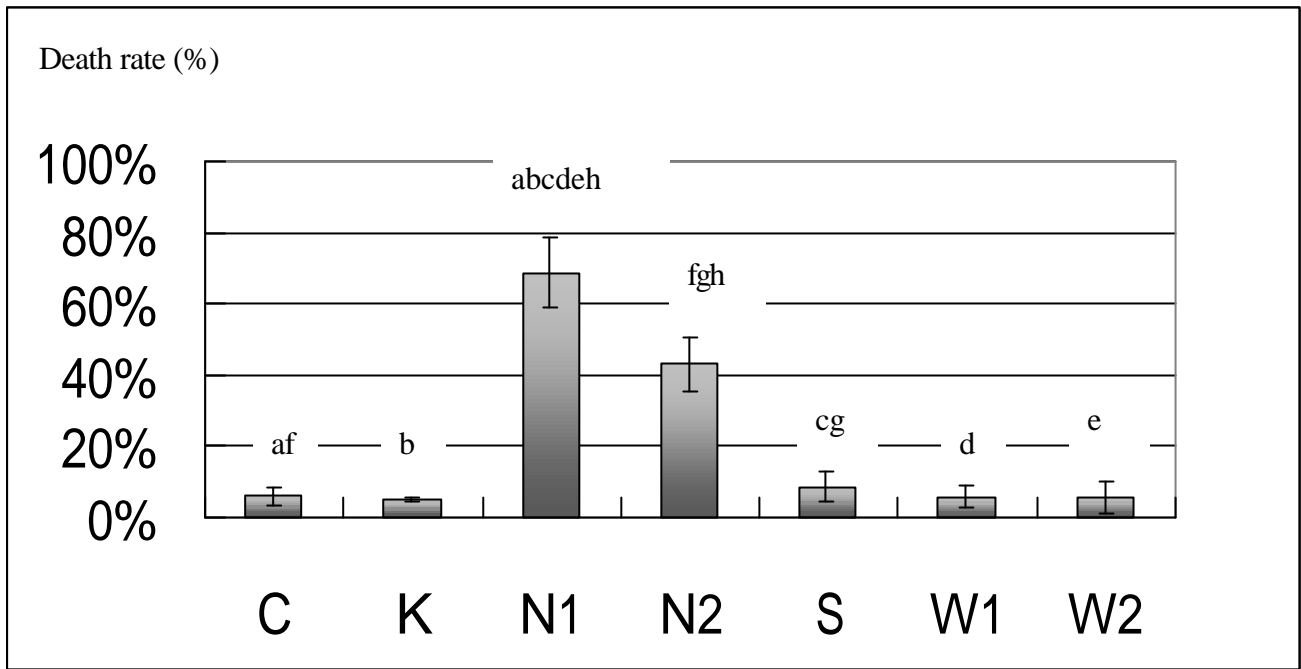


圖 8

如圖 8，第二天 NMP-1 group (  $68.7\% \pm 9.7\%$  ) 的 death rate 分別與 wash 1 group (  $5.853\% \pm 3.2\%$  ), wash 2 group (  $5.827\% \pm 4.4\%$  ), control group (  $6.1\% \pm 2.6\%$  ), In kit group (  $5.02\% \pm 0.7\%$  ), 及 In situ group (  $8.59\% \pm 4.2\%$  ), 兩者之間有統計學上的顯著差異。顯示 NMP 的原液對細胞的生長造成很大的影響。

In situ group (  $8.59\% \pm 4.2\%$  ) 分別與 NMP-1 group (  $68.7\% \pm 9.7\%$  ), 及 NMP-2 group (  $43.06\% \pm 7.6\%$  ) 有統計學上的顯著差異，顯示雖然內含相同濃度的 NMP，但是 In situ group 並未將 NMP 完全釋放出來，所以對細胞的傷害比較小。

然而 control group 與 wash 1 group，wash 2 group 間並無統計學上的顯著差異，顯示出增加沖水量與延長浸泡，能有效降低 NMP 對細胞的影響。

NMP-1 group 與 NMP-2 group 兩者之間有統計學上的顯著差異。顯示 NMP 的原液比稀釋成 63% 的 NMP 溶液而言，對細胞的生長造成更大的影響。

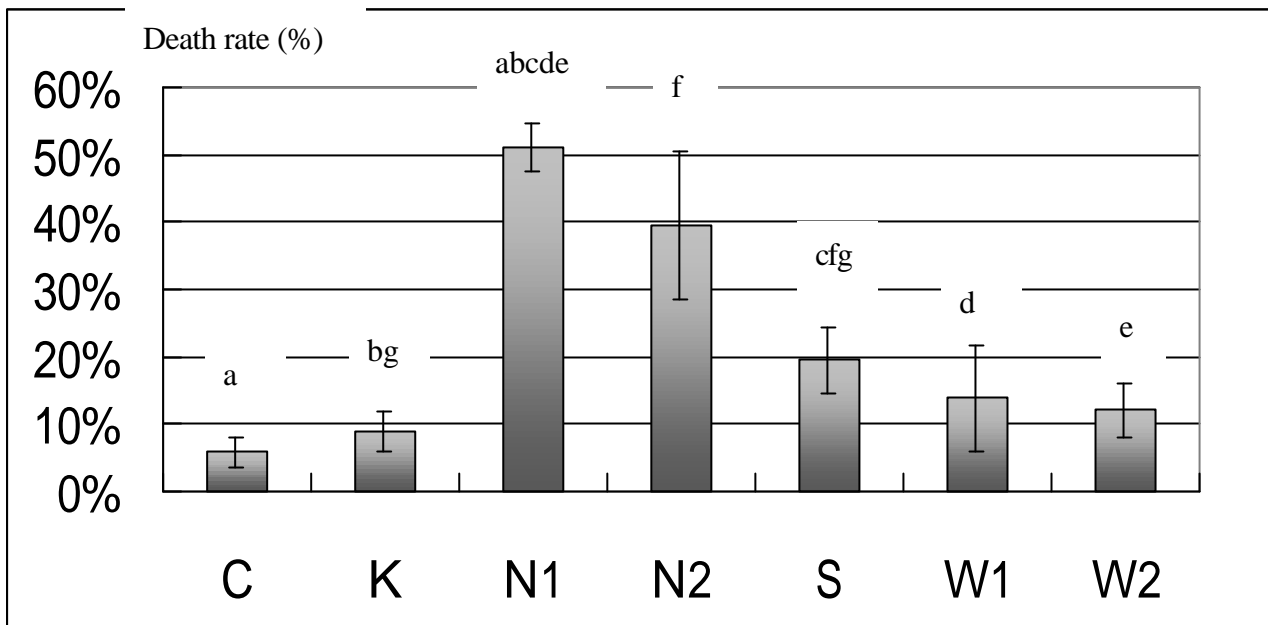


圖 9

第三天如圖 9 的 death rate，為 NMP-1 group (  $51.11\% \pm 3.5\%$  ) > NMP-2 group (  $39.49\% \pm 11\%$  ) > In situ group (  $19.48\% \pm 4.9\%$  ) > In kit group (  $9\% \pm 3\%$  ) > control group (  $5.96\% \pm 2.2\%$  )，顯示出殘留較多的 NMP 可能會造成較高的 death rate。

wash 1 group (  $13.91\% \pm 7.9\%$  ) 與 NMP-1 group (  $51.11\% \pm 3.5\%$  )，兩者之間的 death rate 有統計學上的顯著差異，顯示增加水洗的體積能夠有效的降低 NMP 對細胞的毒害。

In kit group 的 death rate (  $9\% \pm 3\%$  ) 與 In situ group (  $19.48\% \pm 0.027$  )，兩者之間有統計學上的顯著差異，顯示 In situ group 緩慢釋放出的 NMP 濃度高於 In kit group，因此有較高的 death rate，且仍比 control group 高出 3-4 倍。

然而 control group 與 wash 1 group，wash 2 group，及 In kit group 間並無統計學上的顯著差異。

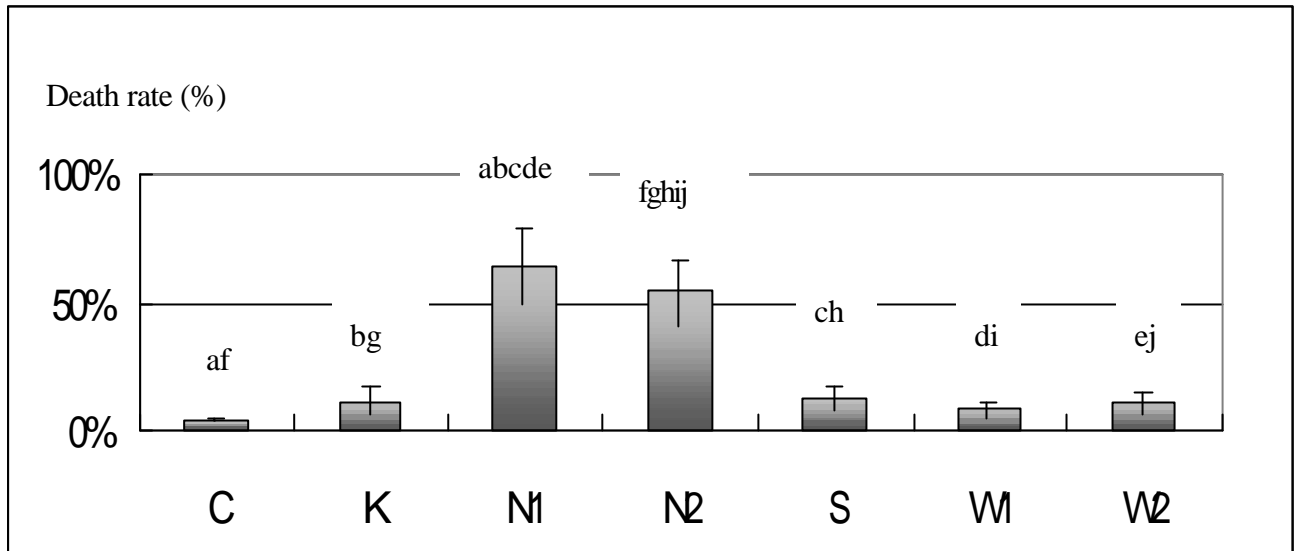


圖 10

如圖 10，第四天 NMP-1 group 的 death rate ( $64.18\% \pm 3.5\%$ ) 分別與 wash 1 group ( $8.22\% \pm 7.9\%$ ), wash 2 group ( $10.69\% \pm 4.0\%$ ), control group ( $4.14\% \pm 2.2\%$ ), In kit group ( $11.77\% \pm 3\%$ ), 及 In situ group ( $12.07\% \pm 4.9\%$ ) 之間有統計學上的顯著差異。

NMP-2 group 的 death rate ( $53.93\% \pm 11\%$ ) 與 wash 1 group ( $8.22\% \pm 7.9\%$ ), wash 2 group ( $10.69\% \pm 4.0\%$ ), control group ( $4.14\% \pm 2.2\%$ ), In kit group ( $11.77\% \pm 3\%$ ), 及 In situ group ( $12.07\% \pm 4.9\%$ ) 之間也有統計學上的顯著差異。

然而 control group 的 death rate 與 wash 1 group, wash 2 group, In kit group, 及 in situ group 間並無統計學上的顯著差異。

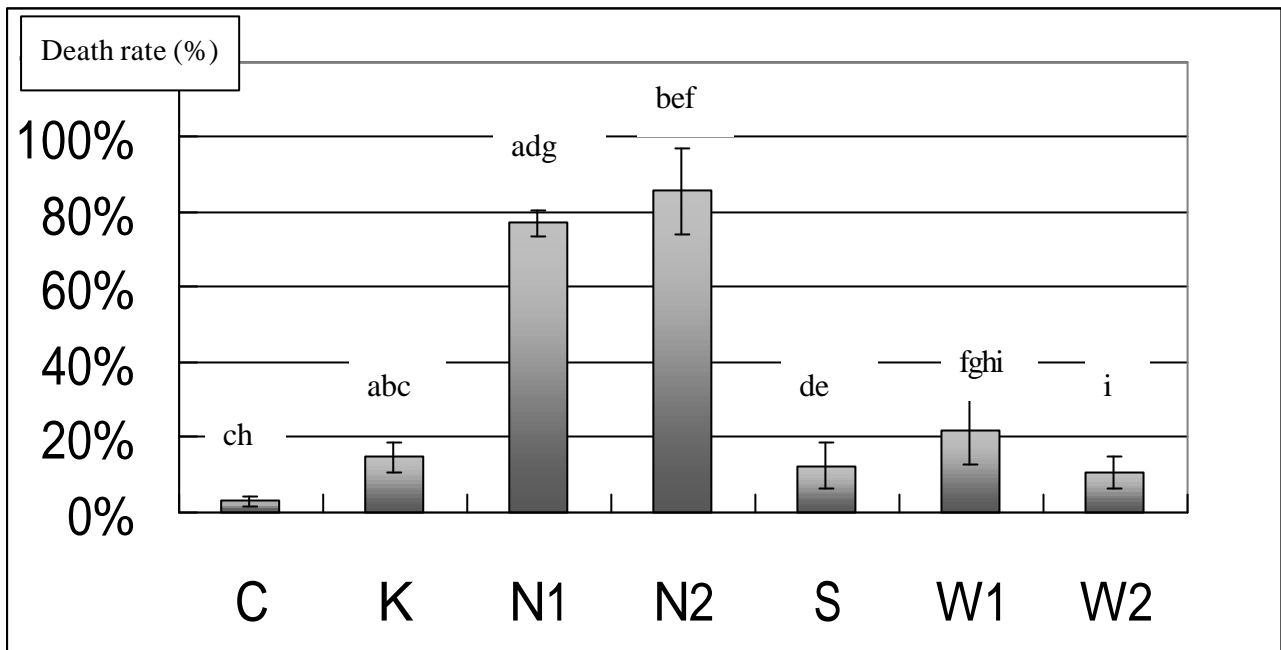


圖 11

第五天如圖 11 , In situ group 的 death rate (  $12.53\% \pm 6\%$  ) 分別與 NMP-1 group (  $77.3\% \pm 3.5\%$  ) , NMP-2 group (  $85.66\% \pm 11.3\%$  ) 之間有統計學上的顯著差異。

In kit group 的 death rate (  $11.7\% \pm 4.1\%$  ) 分別與 NMP-1 group (  $77.3\% \pm 3.5\%$  ) , NMP-2 group (  $85.66\% \pm 11.3\%$  ) , 及 control group (  $3\% \pm 1.2\%$  ) , 兩者之間有統計學上的顯著差異。

wash 1 group 的 death rate (  $21.87\% \pm 9\%$  ) 與 wash 2 group (  $10.81\% \pm 4.4\%$  ) 兩者之間有統計學上的顯著差異 , 且 wash 1 group 的 death rate 與 control group 兩者之間也有統計學上的顯著差異 , 但是 control group 的 death rate 與 wash 2 group 兩者之間並無統計學上的顯著差異 , 顯示長時間的浸泡比大量沖水更能有效的除去 NMP , 所以長時間的浸泡能夠得到與控制組相似的结果。

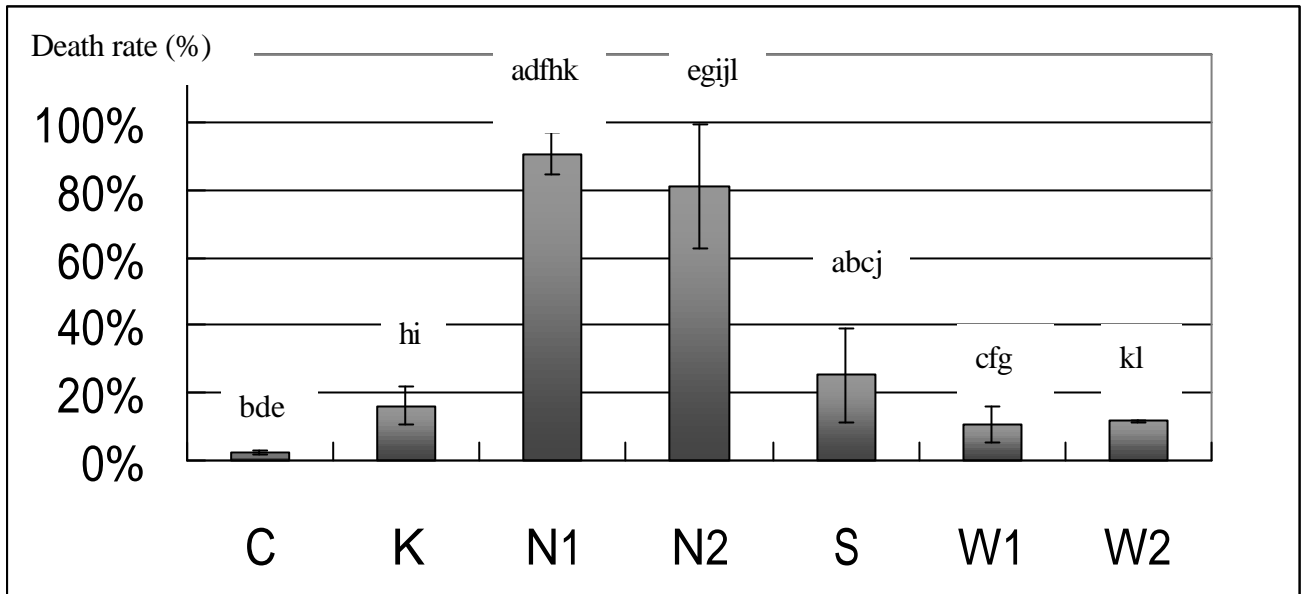


圖 12

第六天如圖 12， In situ group ( 25.15% ± 13.8% ) 的 death rate 與 control group ( 2.45% ± 0.5% )，及 wash 1 group ( 10.47% ± 5.3% ) 之間有統計學上的顯著差異，顯示出 In situ group 到了第六天，仍然殘留較多的 NMP，因此造成明顯差異的死亡率。

In kit group 的 death rate ( 16.14% ± 5.6% ) 與 NMP-1 group ( 90.6% ± 6.3% )，及 NMP-2 group ( 81.11% ± 18.5% ) 之間有統計學上的顯著差異。

然而 control group 的 death rate 分別與 wash 1 group，wash 2 group，及 in kit group 之間並無統計學上的顯著差異，顯示第六天 in kit group 殘留的 NMP 較少，對細胞的影響已經消退。



## Colorimetric analysis

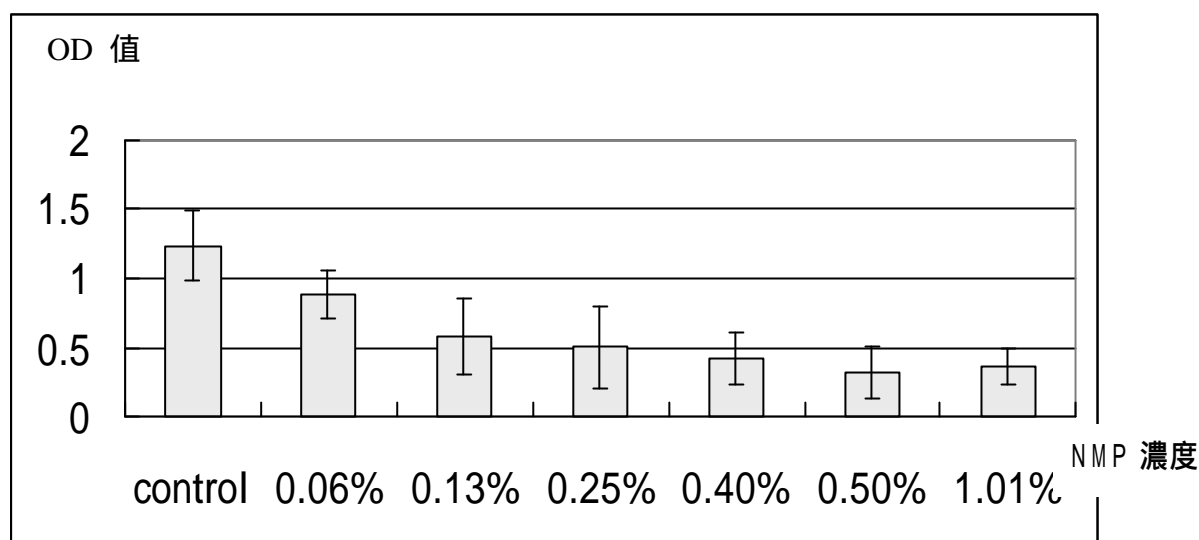


圖 13

本論文中以 OD(Optical Density)值來反映存活的細胞數目，控制組不加 NMP，其他各組在培養液中直接加入不同的 NMP 的原液，以調配成所需的濃度，由圖 13，可知 NMP 濃度越高時，對應的 OD 值越低，表示 NMP 濃度越高時，存活的細胞數目越少，當 NMP 濃度為 0.13% 時，存活細胞只剩下將近控制組存活細胞數目的一半。

### 3.細胞死亡的可能途徑

如下圖 14 所示,在跑 DNA agarose 電泳分析的結果,沒有發現 internucleosomal ladder 的形成,顯示細胞核內的 DNA 並沒有產生斷裂的現象,所以細胞死亡的 pathway 應該並非為 apoptosis。

控制組第一次離心後得到的懸浮液(CS1)

In situ group 第一次離心後得到的懸浮液(SS1)

控制組第二次離心後得到的懸浮液(CS2)

In situ group 第二次離心後得到的懸浮液(SS2)

控制組第二次離心後得到的沈澱物(CP2)

In situ group 第二次離心後得到的沈澱物(SP2)

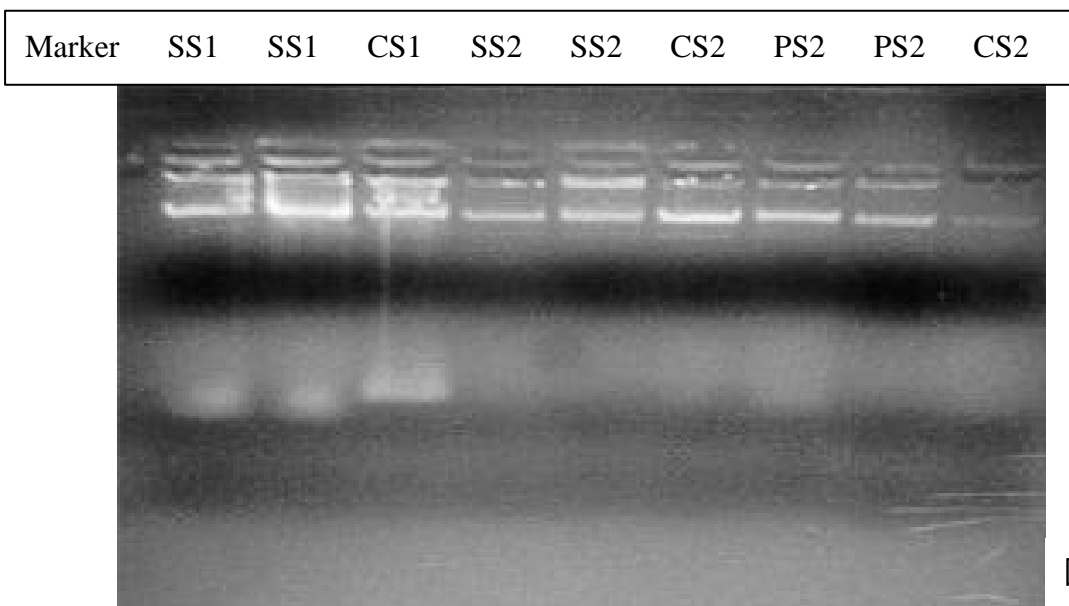


圖 14

## 陸.討論

### 形態學的觀察

在 In situ group 的光學顯微鏡觀察中，加藥一小時後，如圖 2B，膠狀 PLA polymer 周圍細胞有形態上變化，從原先如圖 2A 的狹長梭狀的牙齦纖維母細胞，變成細胞縮小呈不規則的形狀，顯示周圍細胞受到影響。加入 PLA polymer 二小時後，如圖 3A 照片，in situ group 周圍的牙齦纖維母細胞呈現細胞的外形的變化，變為球形且略帶腫脹的形狀，在某些細胞表面形成巨大包膜空泡(membrane blisters or ballooning)，空泡內未見明顯的胞器，這些空泡最後會完全破裂，造成細胞膜的完整性受損害。在細胞質方面的變化，包括了顏色加深的顆粒質化(granularity)，及大量的空泡 (vacuole) 產生。在細胞核的變化是由於異染色質退化，造成白化 (albuminous degeneration) 或稱為雲霧狀肥大(cloudy swelling)的現象。細胞培養液中有一些懸浮的細胞，可發現有 detach 的現象產生，顯示細胞受到影響，導致部分細胞死亡。in situ group 加入 PLA polymer 24 小時後，如圖 3B 在 200X 下的照片，PLA polymer 周圍的細胞附著力變弱，細胞縮小並未完全平展開來，呈現不規則的形狀，或是發亮的球形，細胞的主要變化大致一樣，但細胞數目明顯減少，細胞顆粒質化更嚴重，細胞本體更為緻密而變小，細胞核與細胞質已經無法分辨，ballooning 的程度更為嚴重。培養液中有大量懸浮的細胞，輕拍培養皿的底部即可造成細胞的漂動。直到第七天後，如圖 4E，細胞已經從外圍增生長入原先的 clear zone，顯示細胞在 early healing phase 受到的影響開始恢復(recovery)，但是仍見細胞突(process)變的細長的形態。in situ group，如圖 4F，100X 下的照片，加入 PLA

polymer 11 天後，PLA polymer 對細胞的影響逐漸的消退中，細胞開始密集，但是仍見細胞突(process)變的細長的現象。in situ group，如圖 4G，100X 下的照片，加入 PLA polymer 15 天後，細胞已經相當的密集，形態上已趨近狹長梭狀的健康牙齦纖維母細胞。

在 In kit group 光學顯微鏡的觀察中，如圖 2C，加藥一小時後，膠狀 PLA polymer 周圍的細胞亦可發現有 detach 的現象產生，形成 clear zone，顯示在膠狀 PLA polymer 凝固過程中，雖然事先經過五分鐘的浸泡之後，減少細胞對溶劑 NMP 的接觸，但膠狀 PLA polymer 的影響仍導致細胞死亡。

在 NMP group 光學顯微鏡的觀察中，加藥 24 小時後，如圖 5B，NMP group 的培養液中有大量懸浮的細胞，輕拍培養皿的底部可造成細胞的漂動，細胞有 detach 的現象產生，形成多處 clear zone (cell-free area)。加入 NMP 第六天後，NMP group，如圖 5E，細胞培養液中仍有大量懸浮的細胞，及細胞的殘屑，但已經可以看見有細胞的再附著。

然而，在傷口癒合的過程中，以細胞動力學 (kinetics) 而言，前兩週細胞會達到最高組織再造功能 (repopulation)，第三週之後組織再造的動力學就會減緩 (Iglhaut, 1988)，因此手術置入再生膜後，前兩週癒合的期間(early healing phase)，再生膜與組織間的相容性，對復癒的傷口有很大的影響。由本實驗的結果可知，使用廠商建議 in situ group 的方法，膠狀 PLA polymer 對細胞的影響，到了第七天才會逐漸的消退中，到了第 15 天才會幾乎完全消失，然而膠狀 PLA polymer 在前兩週癒合的期間(early healing phase)對細胞造成的影響，會對細胞生長有較負面的

影響。

在 SEM 的觀察中發現 PLA polymer 的結構中存在大小不同 size 的孔洞，這些孔洞可能殘留 NMP 及降解的產物，當 PLA polymer 經由 cell 代謝表面瓦解後，NMP 及降解的產物便持續釋放出來。

在 PLA polymer 接觸水溶液，從膠狀凝固成固體的過程中，只有表面的 NMP 溶劑被水溶解，其餘的溶劑隨著 polymer 凝固在其內部的孔洞中 (Coots, Whitman, 1998)，當 PLA polymer 在降解的過程中，NMP 溶劑會緩慢的釋放，而影響周圍 cell 生長。然而，由本研究的結果顯示，細胞的死亡率並非呈一穩定的比例，在 7 天的觀察中呈上下振動的曲線，其原因可能與 NMP 自 PLA polymer 中釋放的速率有關。影響 PLA 降解的因素可歸納成以下幾點：1) Polymer 中 Lactic acid 與 glycolid acid 的比率。glycolid acid 的量多則 polymer 的降解時間會增長。2) PLA 的分子量越高則降解時間會增長。3) DL-PLA 的排列不若 L(+)PLA 規則緊密，這使其降解速度增快(Paham GJ, 1991)。4) PLA polymer 在形成固體的過程中會無可避免的在內部形成空泡，空泡會直接影響到 polymer 的結構與緻密性，使 polymer 的降解產生不規則的變化(Liu SJ, 1998)。膠狀 PLA polymer 在硬化形成固態 PLA 的過程中，其分子量的大小會因為操作者壓成的力量、壓成過程中空泡形成及溶劑的殘留量等因素而產生改變。因為 PLA 分子量大小的差異性會影響到降解的速率，可能造成自 polymer 中釋出之 NMP 量呈不確定的變化進而使 cell death rate 呈現高低起伏的變化。

由本研究結果得知，NMP 會在接觸牙齦母細胞後很短時間內使牙齦母細

胞崩解死亡，而且其作用會至少持續 1 週，然而 PLA polymer 的降解過程卻仍在繼續，因此 NMP 殘留量越多，在 PLA 崩解後所產生的二度傷害就有發生的可能。本研究所探討 residual NMP 對 gingival flap 的早期影響(1 週)與臨床觀察一致，中長期的影響則有待 cell level 與 animal research 的相互印證。

另外可能引起周圍細胞形態改變的假設原因為：(1) PLA polymer 在降解的過程所釋放低 pH 值的產物 (Litsky, 1993; Toyler, 1994)，由於 polymer 內部降解進行的速度比表面更快，所以在降解的過程所釋放低 pH 值的產物在內部累積，不能立即釋放擴散，直到表面降解破裂，內部累積高濃度低 pH 值的產物，突然釋放，可能影響周圍細胞 (Vert, 1992) (2) PLA polymer 在降解的過程所產生的小碎片，引起周圍細胞產生異物反應 (Anderson, 1995)。

除此之外，在其他學者的研究報告中，也曾提及生物降解的 PLA polymer，在植入組織中 6-12 星期後，會引起無菌的瘻管，非特異性的異物反應，及溶骨的反應 (Bostman, 1990)。

## 細胞生長的趨勢

以細胞生長曲線及死亡率的比較，來觀察細胞生長趨勢，發現牙齦纖維母細胞接觸到 PLA polymer 成分中的物質後，會產生細胞膜破損的現象，所以無法像健康的細胞，有完整的細胞膜能將 trypan blue 的染劑阻隔在外，因此可以藉由 trypan blue 的染色去判斷細胞的死亡。

OD 值代表存活細胞的數目，控制組不加 NMP，其他各組在培養液中直接加入適當的 NMP 的原液，以調配成所需的濃度，由圖 13 可知 NMP 濃度越高時，對應的 OD 值越低，表示 NMP 濃度越高時，存活的細胞數目越少，當 NMP 濃度為 0.13% 時，只剩下一半的細胞存活。因此本實驗中的 NMP-1 group 採用的濃度即為 0.13%。

在第一天的 death rate 觀察發現 death rate 由高到低的排列，依次為 NMP group，in kit group，in situ group，wash-1 group，wash-2 group 及 control group，而且 NMP group 與其他各組之間達到統計學上的顯著差異，顯示各組中 NMP 不同的含量會對 human gingival fibroblasts 產生不同程度的細胞毒性。（In kit group，及 in situ group 間並無統計學上的顯著差異）。

比較 In situ group，In kit group 與 NMP group 對細胞的影響，細胞的死亡率會隨著溶劑 NMP 的含量增加而攀升，即使僅有溶劑 NMP 的成份，亦能立即導致大量細胞的死亡。因此可以推論膠狀 PLA polymer 釋放的溶劑 NMP，可能是造成 clear zone 的主要原因。

In kit group 的 death rate ( $30.8\% \pm 17\%$ ) 與 wash 1 group ( $7.8\% \pm 4.5\%$ ) 有

統計學上的顯著差異，顯示增加沖水的水量能夠有效的降低 PLA polymer 的成分對細胞的毒害。

然而 control group 與 wash 1 group, wash 2 group 間並無統計學上的顯著差異，顯示增加沖水的水量與延長水洗的時間，均能夠有效的除去 PLA polymer 的成分對細胞的影響。

## 細胞死亡的 pathway

細胞死亡的方式主要分為三大類：(1) apoptosis- 計畫性細胞死亡 (programmed cell death) (2)necrosis- 意外性細胞死亡 (accidental cell death) ( Kerr et al.1972 ) (3)其他。

Apoptosis 是反應複雜的內在與外在因子交互作用機制調節的細胞死亡方式 ( Majio &Joris1995 ), 非發炎反應，會造成一系列的細胞特徵的改變，包括核染色質及細胞質的濃縮 ( condensation ), DNA 的斷裂 (Swat et al 1981), 細胞結構的拆解，產生各自分散獨立之收縮細胞 (shrinking cell), 最後鄰近細胞會將脫落分開的 apoptotic bodies 給吞噬。

Necrosis 可以引起發炎反應，造成細胞腫脹，外型變圓，突然爆破溢出內容物，不需要能量的破壞細胞膜的完整性，產生一大片彼此相臨接的 expanding cell。

在高倍的光學顯微鏡下作形態觀察：圖 3A，200X 下的照片，in situ group 可以發現在長滿細胞的 well 中，加入 PLA polymer 二小時後，PLA polymer 周圍的細



胞有了顯著的改變，在細胞質方面的變化，包括了顏色加深的顆粒質化 (granularity)，及大量的空泡 (vacuole) 產生，細胞的外形基本上變為球形且略帶腫脹的形狀，在某些細胞表面尚有不含明顯之胞器的巨大包膜空泡(membrane blisters or ballooning)，最後這些空泡會完全破裂，造成細胞膜的完整性受損害，上述這些變化比較傾向 necrosis 的細胞死亡方式。在細胞核方面的變化與計畫性死亡的變化似乎有所不同，在計畫性死亡的細胞核內，染色質是濃縮 (condensation) 與斷裂(fragmentation)，然而圖 3A 所見的細胞核顏色變淡，卻是異染色質退化所造成的白化 (albuminous degeneration) 或稱為雲霧狀肥大(cloudy swelling)的現象。圖 3B，200X 下的照片，in situ group 加入 PLA polymer 24 小時後，PLA polymer 周圍的細胞附著力變弱，細胞縮小並未完全平展開來，呈現不規則的形狀，或是發亮的球形，細胞的主要變化大致一樣，但細胞數目明顯減少，細胞顆粒質化更嚴重，細胞本體更為緻密而變小，細胞核與細胞質已經無法分辨，ballooning 的程度更為嚴重。

再加上 DNA agarous 電泳分析的結果，沒有發現 internucleosomal ladder 的形成，顯示細胞核內的 DNA 並沒有產生斷裂的現象，所以細胞死亡的 pathway 應該並非為 apoptosis。至於是否為 necrosis，則需更進一步的實驗來證明。cell 死亡甚至可能是受到外在毒性因素的急性殺傷反應(acute cell injury)影響。而這個有毒的物質可能就是殘留的 NMP 或降解的產物，在臨床上，這些殘留的 NMP 或降解的產物，在 early healing phase 中對牙齦纖維母細胞的生長造成了影響。

## 柒.結論

根據本實驗的結果推論，NMP 的濃度越高，會導致更多細胞的死亡，兩者之間有密不可分的關係，然而形態學觀察的結果發現，加入 PLA polymer 二小時後，PLA polymer 周圍的細胞有了顯著的改變，在細胞質方面的變化，包括了顏色加深的顆粒質化(granularity)，及大量的空泡 ( vacuole ) 產生，細胞的外形基本上變為球形且略帶腫脹的形狀，在某些細胞表面尚有不合明顯之胞器的巨大包膜空泡 (membrane blisters or ballooning)，最後這些空泡會完全破裂，造成細胞膜的完整性受損害，上述這些變化比較傾向 necrosis 的細胞死亡方式。而且在細胞核方面的變化也與計畫性死亡(apoptosis)的變化似乎有所不同，在計畫性死亡的細胞核內，染色質是濃縮 ( condensation ) 與斷裂(fragmentation)，然而圖 3A 所見的細胞核顏色變淡，卻是異染色質退化所造成的白化 ( albuminous degeneration ) 或稱為雲霧狀肥大(cloudy swelling)的現象。為了進一步的證實細胞死亡的途徑，經由 DNA agarous 電泳分析的結果，沒有發現 internucleosomal ladder 的形成，顯示細胞核內的 DNA 並沒有產生斷裂的現象，所以細胞死亡的 pathway 並非 apoptosis，然而形態學上的觀察，細胞質內產生空泡的現象，是否確實為 necrosis 或是其他外在的因素所造成，則需更進一步的探討。

PLA polymer 與細胞直接接觸 ( in situ ) 的方式置入後，會對周圍細胞造成影響，形成 clear zone，而且需要 15 天才能完全恢復(recovery)，這對組織修復過程，最重要的 early healing phase，有負面的影響，然而實驗中也證實:增加沖水量或延

長浸泡的時間，均能明顯的降低細胞的死亡率，因此建議在臨床使用 PLA polymer 時，若以 in situ 的方式處理 PLA polymer 時，增加沖水量，及適當的壓擠，能有效的將 PLA polymer 表面的 NMP 儘量的沖去，或以 in kit 的方式處理 PLA polymer 時，延長浸泡的時間，避免 NMP 的殘留，讓 PLA polymer 在 early healing phase 對周圍細胞的生長不會造成太大的影響，這對操作簡便，貼合性佳，可吸收性的再生膜而言，更提高了臨床的應用效果。



## 捌. 參考文獻 ( Reference )

1. Alpar B, Leyhausen G, Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin oral investig*, 4: 219-225, 2000.
2. Anderson HH. The effectiveness of a collagen membrane barrier in achieving new attachment in class II furcations. *J Periodontol*, 62: 718, 1991.
3. Aukhil I, Petersson E. Guided tissue regeneration .An experimental procedure in beagle dogs. *J Periodontol*. 57: 727-734, 1986.
4. Becker W, Becker B.Berg L. Pritchard J. Caffesse R. New attachment after treatment with root isolation procedures. Report for treated class III and class II furcation and vertical osseous defects. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. 8: 2-16, 1988.
5. Becker W, .Becker B.E. Pritchard J. Caffesse R.Rosenberg E. Root isolation for new attachment procedures. A surgical and sutured method: three case reports. *J of Peridontology*. 58: 819-825, 1987.
6. Blumenthal NM. The use of collagen membrane barrier in conjunction with combined demineralized bone collagen gel implants in human intrabony defects. *J Periodontol*. 61: 319-327, 1990.
7. Breenstein G & Caton J G.. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontology* 2000. 1: 36-45, 1993.
8. Bostnan O. Absorbable implants for fixation of fractures. *J. Bone Joint Surg*. 73: 148-153, 1991.
9. Bostnan O, Hirvensalo E. Foreign-body reactions to absorbable fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J. Bone Joint Surg*. 72: 592-596, 1990.
10. Caffesse RG, Smith BA. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol*. 59: 589-594, 1988.
11. Caton J, Greenstein G. Synthetic bioabsorbable barrier for regeneraton in human periodontal defects. *J of periodontal*. 65: 103-1045, 1994.

12. Chung KM, Salkin LM. Clinical evaluation of biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 61: 732-736, 1990.
13. Cortellini P, Pini Prato G. Guided tissue regeneration with different materials. *Int J Periodont Restorative Dent.*10:137-15, 1990.
14. Coonts BA, Whitman SL. Biodegradation and biocompatibility of a guided tissue regeneration barrier membrane formed from a liquid polymer material. *J. Biomed Mater Res.* 42:303-311, 1998.
15. Cotter F.E. Review Assessment of cell death . *Clin. Lab. Haem.* 20: 327-331, 1998.
16. Delgado A, Evora C, Liabres M. Degradation of DL-PLA-mathadone microspheres during in vitro release. *International Journal of Pharmaceuics.* 140:219-227, 1996.
17. Fier W, Beyaert R, Declercq W. More than one way to die: apoptosis ,necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 18(54): 7719-30, 1999.
18. Franko J, Pomfy M, Prosbova T. Apoptosis and cell death. (mechanisms, pharmacology and promise for the future).*Acta Medica (Hradec Kralove).* 43(2): 63-8, 2000.
19. Fourmouis I, Tonetti MS. Evaluation of tetracyclin fiber therapy with digital image analysis. *J Clin Periodontal.* 25: 737-745, 1998.
20. Feng F, Hou LT. Treatment Of Osseous Defects With Fibroblast-Coated Hydroxylapatite Particles. *J Formosan Med Assoc.* 91: 1068-1074, 1992.
21. Garret.S. Periodontal regeneration around nature teeth. *Ann. Periodontol.* 1: 621-666, 1996.
22. Gottlow J, Nyman S, karring T & Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J of Clin Periodontology.* 11: 494-503, 1984.
23. Glossary of periodontal terms (1992).3<sup>rd</sup> edn.Chicago : The American Academy of Periodontology.
24. Garret S, Polson A.M, Comparison of a bioabsorbable GTR barrier to a non-absorbable barrier in treating human class II furcation defects. A multi- center parallel design randomized single-blind trial. *J .Periodontol.* 68: 667-675, 1997.
25. Hong K, Park S. Preparation of poly (L-lactide) microcapsules for fragrant fiber and their characteristics.*Polymer.* 41: 4567-4572, 2000.
26. Iglhaut J, Aukhil I. Progenitor cells kinetics during guided tissue regeneration in experimental

- periodontal wounds. *J Periodont Res.* 23: 107-117, 1988.
27. Isidor F, Karring T, Nyman S. New attachment-reattachment following reconstructive periodontal surgery. *J of Clin Periodontology.* 12: 728-735, 1985.
  28. Jonathan M. Payne, Charles M. Cobb. Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials. *J Periodontol.* 67: 236-244, 1996.
  29. J Tiollier, H Dumas. Fibroblast Behavior on Gels of Type I, III, and IV Human Placental Collagens. *Experimental Cell Research.* 91: 95-104, 1990.
  30. Karring T, Nyman S, Gottlow J. Development of the biological concept of guided tissue regeneration-Animal and human study. *Periodontol 2000.* 1: 26-35, 1993.
  31. Kerr J.F.R, Wyllie A.H. Curie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer.* 26: 239-257, 1972.
  32. Li S.M, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly poly( -hydroxyacids) in aqueous media.II. Degradation of lactide/glycolide copolymers: PLA37.5GA25 and PLA75GA25. *J Mater Sci Mater Med.* 1: 131-139, 1990.
  33. Liu SJ, Ueng. SW. In vitro Elution of Vancomycin from Biodegradable Beads. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater).* 48: 613-620, 1999.
  34. Litsky AS. Clinical reviews: Biodegradable implants for orthopedic fracture fixation. *J Appl Biomater.* 4: 109-111, 1993.
  35. Majno G. and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of pathology.* 146: 3-16, 1995.
  36. Magmusson I, Batich C . New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J of Periodontol.* 59: 1-6, 1988.
  37. Magmusson I, Claffy N. Root resorption following periodontal flap procedures in monkeys. *J of Periodontal Research.* 20: 79-85, 1985.
  38. Magmusson I, Nyman S, karring T. Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. *J of Periodontal Research.* 20: 201-208,

1985.

39. Markus S, Widmer, Puneet K. Gupta. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. 19: 1945-1955, 1998.
40. McCall J.O. An improved method of inducing reattachment of the gingival tissue in periodontolclasia. Dental Items of Interest. 48: 342-358, 1926.
41. Negrin CM, Delgado A, Llabres M. In vivo-in vitro study of biodegradable methadone delivery systems. Biomaterials. 22: 563-70, 2001.
42. Nyman S, Karring T. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J.Cin .Periodontol. 9: 290-296, 1982.
43. Paul S, Mark A, Gerald M. A technique report on the in situ application of atrisob as a barrier for combination therapy .Int J periodont Rest Dent. 18: 249-255, 1998.
44. Piattelli A., Scarano A. Early tissue reactions to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit. Biomaterials, 19: 889-896, 1998.
45. Polson AM., Garrett S, Stoller NH, Greenstein G, Polson A, Harrold C, Laster L. Guided tissue regeneration in human furcation defects after using a biodegradable barrier: A multi-center feasibility study. J Periodontol, 66:377-385, 1995.
46. Polson AM, Southard G.L, Periodontal healing after guided tissue regeneration with Atrisorb barrier in beagle dogs. Int. J.Peridont. Rest. Dent, 15: 575-589, 1995.
47. Polson AM,.Proye MP. Effect of root surface alteration on periodontal healing. II. Citric acid treatment of the denuded root. J of clinical Peridontology, 9: 441-454, 1982.
48. Rosen PS, Reynolds MA, A Technique Report on the In Situ Application of Atrisorb as a Barrier for Combination Therapy. Int J Periodont Rest Dent. 18: 249-255, 1998.
49. Saito N, Okada T. Biodegradable poly-D,L-lactic acid polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone. J Bone Joint Surg Am.83-A:S92-98, 2001.
50. Schweichel JU and Merker HJ. Teratology. 7: 253-266, 1973.
51. Selvig K, Kersten B. Scanning Electron Microscopic Observations of Cell Population and Bacterial Contamination of Membranes Used for Guided Periodontal Tissue Regeneration in Humans. J

- Periodontol. 61: 515-520, 1990.
52. Selvig K, Nilvus R. Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using e-PTFE barrier membranes. Scanning Electron Microscopic evaluation of retrieved membranes vs clinical healing. J periodontol. 63: 974-978, 1992.
53. Taylor M.S., Daniels A.U.. Six bioabsorbable polymer: In vitro acute toxicity of accumulated degradation products. J Appl Biomater. 5: 151-157, 1994.
54. Therin M, Christel P, Li S.M, Garreau H, Vert M. In vivo degradation of massive poly(-hydroxyacids): Validation of in vitro findings. Biomaterial. 13: 594-600, 1992.
55. Vert M, Li S.M, Garreau H. More about the degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media. J. Controlled Release. 16: 15-26, 1991.
56. Warrer k, Karring T. Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane. J of Periodontal Research. 65: 1029-1036, 1992.
57. Younger WJ. Pyrrhea alveolaris from a bacteriological standpoint with a report of some investigations and remarks on the treatment. Inter Dent J. 20: 413-423, 1899.



## 玖. 圖次

### 圖 2 低倍光學顯微鏡的觀察

2A. 控制組，40X，良好貼附的狹長梭狀牙齦纖維母細胞。

2B. In situ group，加藥一小時後，40X，PLA polymer 周圍的細胞減少，外形變成不規則或圓球狀。

## 圖 2 低倍光學顯微鏡的觀察

2C. In kit group, 加藥一小時後, 40X, PLA polymer 周圍形成 clear zone。

2D. NMP group, 加藥一小時後, 40X, 細胞 detach, 形成多處 clear zone。

### 圖 3 高倍光學顯微鏡的觀察

- 3A. In situ group , 加藥二小時後 , 200X , 外形變成腫脹的圓球狀(R ) , 細胞膜形成巨大包膜空泡(M) , 細胞質顏色加深 - 產生顆粒質化(G)及空泡(V) , 細胞核呈現白化現象(A)。
- 3B. In situ group , 加藥 24 小時後 , 200X , 細胞數目明顯減少 , 細胞本體變小且更為緻密 , 細胞顆粒質化更為嚴重 , 細胞質與細胞核以無法分辨。

圖 4. In situ group 經時觀察

4A. 控制組，100X，良好貼附的梭狀牙齦纖維母細胞。

4B. In situ group，加藥一天後，40X，PLA polymer 周圍形成 clear zone。

4C. In situ group，加藥一天後，100X，PLA polymer 周圍形成 clear zone。

圖 4. In situ group 經時觀察

4D. In situ group , 100X 下的照片 , 加入 PLA polymer 二天後 , clear zone 變大 , 細胞突(process)變的細長。

4E. In situ group , 加藥七天後 , 100X , 細胞自外圍長入 clear zone。

圖 4 In situ group 經時觀察

4E. In situ group , 加藥 11 天後 , 100X , 細胞增生密集 , 細胞外形較細長。

4F. In situ group , 加藥 15 天後 , 100X , 細胞密集 , 細胞外形已恢復典型梭狀。

圖 5.NMP group 經時觀察  
5A.控制組，100X，良好貼附的梭狀牙齦纖維母細胞。  
5B.NMP group，加藥一天後，100X，細胞外形變的不規則或發亮的球形。  
5C.NMP group，加入 NMP 二天後，細胞培養液中有些懸浮的細胞，輕拍培養皿的底部即可造成細胞的漂動。

圖 5 為 NMP group 的經時觀察

5D.NMP group, 加入 NMP 三天後, 細胞培養液中有大量懸浮的細胞, 及細胞的殘屑。

5E.NMP group, 加入 NMP 第六天後, 細胞培養液中仍有大量懸浮的細胞, 及細胞的殘屑, 但已經可以看見有少量再附著的細胞。

5F.NMP group, 加入 NMP 第九天後, 細胞培養液中殘存微量懸浮的細胞及細胞的殘屑, 而且已經有大量細胞的再附著。



圖 6.電子顯微鏡( SEM )  
的觀察：

6A.控制組，35X，平行排列成渦輪狀(whorl-like)的典型牙齦纖維母細胞聚集。

6B.In situ group，35X，PLA polymer 呈現麵糰狀(dough-shaped)的外形且表面有許多孔洞，在其右上角可見細胞 detach 的現象產生，形成 clear zone。

6C.In situ group，200X，左下角 PLA polymer 的表面呈現密集且排列有序的孔洞，右上角可見細胞 detach 的現象，形成 clear zone，周圍僅存在細胞的碎屑。