

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計 畫 \*  
\* : Gllan film,Gellan-迷迭香酸對傷口癒合之研究 \*  
\* 名 稱 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 曹書瑋  
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-003-E  
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月  
指導教授： 李明偉

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中華民國 99年04月19日

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\*\*\*\*\*  
計畫  
\* : Gellan film,Gellan-迷迭香酸對傷口癒合之研究 \*  
\* 名稱 \*  
\*\*\*\*\*

執行計畫學生：曹書瑋

學生計畫編號：NSC98-2815-C-040-003-E

研究期間：98年7月1日至99年2月底止，計8個月

指導教授：李明偉 教授

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可  
公開查詢

執行單位：中山醫學大學 醫事檢驗暨生物技術學系(醫事檢驗組)

中華民國 99年4月18日

題目：Gellan film,Gellan-迷迭香酸對傷口癒合之研究

二、研究計畫內容（以 10 頁為限）：

(一) 摘要

(二) 研究動機與研究問題

(三) 文獻回顧與探討

(三).1 迷迭香酸

(三).1.1 抗氧化劑與傷口癒合的關係

(三).1.2 迷迭香酸(Rosmarinic acid，Ros A)的來源和結構

(三).2Gellan gum 作為傷口敷料之構想

(三).2.1Gellam gum 來源和結構

(三).2.2Gellam gum 作為生醫材料的優點

(三).2.3Gellan gum 生化和物化特性

(四) 研究方法及步驟

(四).1 膜的制備

(四).2 膜的透氣性

(四).3 膜的拉伸性

(四).4 IR 光譜圖

(四).5 膜的 gel contain 及 water contain

(四).6 6cell culture

(四).7 animal model

(四).8 SEM

(四).9 Interleukin-6 (IL-6) ELISA

(五) 預期結果

(六)參考文獻

(七)需要指導教授指導內容

(如篇幅不足，另紙繕附)

## (一) 摘要

傷口發炎反應產生紅腫熱痛，常因為傷口表面和空氣接觸產生氧化現象或是自由基產生所引起的，為了避免這種情況發生，常見是用紗布或是人工皮膚(常見是豬皮)覆蓋於傷口表面，但效果不彰，雖可避免傷口和空氣接觸但無法消去自由基，所以此次計畫選用 gellan 和迷迭香酸。

利用微生物聚醣，例如：Gellan gum，可作為生醫材料或組織工程之基材，因為微生物聚醣具有生物可降解性、良好的生物相容性、原料取得容易以及易於改質等特質符合生醫材料上的需求。Gellan gum是一種微生物胞外多醣(Exopolysaccharide, EPS)，又稱微生物代謝膠。Gellan gum源自於一種非病原性的菌株-*Sphingomonas elodea*(舊時名稱為*Pseudomonas elodea*，*Sphingomonas elodea*)為一種好氧性革蘭氏陰性菌。

選用迷迭香酸的原因，因迷迭香酸具有極強的清除體內自由基的活性。其抗氧化活性強於咖啡酸、綠原酸、葉酸等，由於其抗氧化活性還能抑制內皮細胞調節的低密度脂蛋白的氧化，所以迷迭香酸的清除自由基和抗氧化作用被認為是它的主要抗炎作用機制之一。因為迷迭香酸可以消除自由基作用而氧化成醌式，也會抑制 C3/C5 convertase 的活性、TNF- 等等因子，所以能抑制發炎現象。

作為敷傷材料，必須兼顧生物相容性、降解性質、能抗自由基、抗氧化及抗發炎等等條件，選擇將 gellan gum 和迷迭香酸結合能發揮本身的特性，已達到預期的效果。

## (二) 研究動機與研究探討

Gellan gum 是一種有效的膠凝劑、在熱環境和低 pH 下都很穩定、組織結構可以從脆性和彈性之間互換、抗老化且不易酶解，再加上微生物聚醣具有生物可降解性、良好的生物相容性、原料取得容易以及易於改質等特質符合生醫上的需求。能和其他試劑互相配合而不會互相干擾等條件之下搭配迷迭香酸。

迷迭香酸具有極強的清除體內自由基的活性、抗氧化活性，以及迷迭香酸能抑制內皮細胞調節的低密度脂蛋白的氧化，又迷迭香酸具有很強的抗病毒活性和抑制透明質酸酶的活性，可保持透明質酸在表皮細胞長時間存在，一起抗感染、去色斑、抗氧化、增加彈性，去疤痕等作用。迷迭香酸能抗氧化、延緩衰老可以消除人體內產生過多的自由基，消滅單重氧(例如： $\cdot O_2$ )效果比超氧化物歧化酶(SOD)更好，保護細胞膜的結構，減緩人體衰老的優點。將兩者互相搭配在一起，最為敷傷材料，能發揮材料本身的優點，且不互相影響之下，以期待有更好的結果。

## (三) 文獻回顧與探討

### 三.1 迷迭香酸

#### 三.1.1 抗氧化劑與傷口癒合的關係

迷迭香酸具有極強的清除體內自由基的活性。其抗氧化活性強於咖啡酸、綠原酸、葉酸等，其抗氧化活性還能抑制內皮細胞調節的低密度脂蛋白的氧化。由於迷迭

香酸具有很強的抗病毒活性，很強的抗氧化活性，因此國際上迷迭香酸用於化妝品已有多項專利。迷迭香酸能抑制透明質酸酶的活性，可保持透明質酸在表皮細胞長時間存在，一起抗感染、去色斑、抗氧化、增加彈性，去疤痕等作用。迷迭香酸能抗氧化、延緩衰老可以消除人體內產生過多的自由基，消滅單重氧保護細胞膜的結構，減緩人體衰老的優點。

迷迭香酸清除自由基和抗氧化作用被認為是主要抗炎作用機制之一。迷迭香酸能抑制中性粒細胞超氧陰離子和過氧化氫以及脂質過氧化產物丙二醛（MDA）的產生<sup>[1]</sup>，還能減少溶菌酶及-葡萄糖醛酸苷酶的釋放，結果表明迷迭香酸能抑制中性粒細胞呼吸爆發和脂質過氧化及通過降低細胞內鈣離子濃度而抑制溶酶體的釋放。具有多種藥理作用，特別是它對心肌細胞損傷的保護作用，抗神經細胞凋亡，誘導T細胞凋亡，抗癌，及對阿茲海默氏症的- $\alpha$ -sheet型澱粉樣原纖維有很強的抗澱粉樣產生的作用。迷迭香酸與脂質過氧基結合，以終止脂質過氧化的連鎖反應<sup>[2]</sup>。迷迭香酸有極強的清除體內自由基的活性，可消除自由基作用而氧化成醌式，能捕獲I·52自由基，在-tocopherol和迷迭香酸間存在協同作用，其抗氧化活性強於咖啡酸、綠原酸等；它還能抑制內皮細胞調節的低密度脂蛋白的氧化<sup>[3]</sup>。能夠抑制C3/C5 convertase的活性，同樣地也會抑制C3b，推測其原因為迷迭香酸是具有多酚氧基的苯環(polyhydroxylated phenyl ring)容易與C3b以雙硫鍵鍵結，因此迷迭香酸會藉由與C3b結合而抑制補體系統<sup>[4]</sup>。迷迭香酸抑制TNF- $\alpha$ 表現的分子機制，當發炎現象誘發時NF- $\kappa$ B受到活化，進而使CCL11、CCR3基因表現增加，此2者基因表現量和TNF- $\alpha$ 分泌量成正比。若迷迭香酸存在下會透過抑制IKK- $\beta$ 的活性使NF- $\kappa$ B的訊息傳遞減弱，再抑制CCL11、CCR3基因的表現，降低TNF- $\alpha$ 分泌量達到抗發炎的效果<sup>[5]</sup>。迷迭香酸除了抗發炎另一個和傷口癒合相關的功能就是抗血管增生，血管增生指的是在原有的血管周圍形成更多的微血管網，此過程主要是因為內皮細胞受到生長因子的刺激而被活化，當基底膜受到酵素分解時，內皮細胞就會從基底膜去貼附，移行到血管周圍並進行增生形成新血管。此機制也是腹腔手術後加速組織沾黏的原因之一。上述所提的生長因子主要是VEGF、bFGF、TNF- $\alpha$ 和IL-8<sup>[6]</sup>。

### 三.1.2 迷迭香酸(Rosmarinic acid, Ros A)的來源和結構

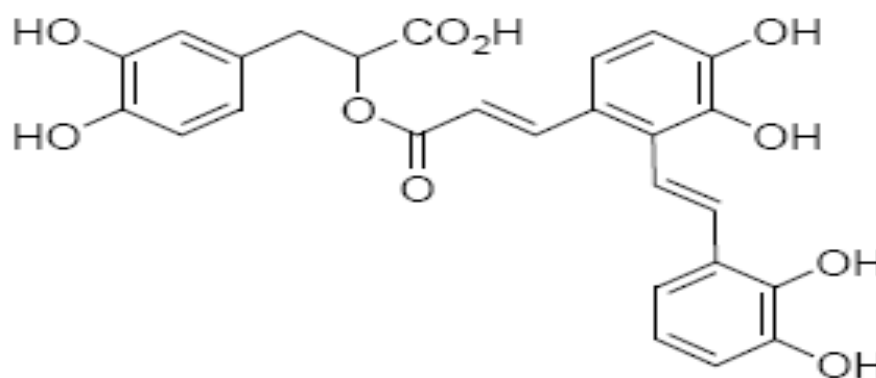
迷迭香(rosemary, *Rosmarinus officinalis*)，屬唇形花科，常綠多年生灌木最早由Ellis自迷迭香中發現，故而得名，為原生於地中海地區，其精油及乾燥後產物常用在食品及香料業。迷迭香酸別名又較羅丹酚酸，迷迭香酸是有一定生物活性的酚酸類化合物。1955年Ostic-Matijasevic首先提出以迷迭香萃取物當作抗氧化劑，此後，也出現許多關於利用迷迭香萃取物延遲脂質氧化之研究。迷迭香之抗氧化力主要來自三種酚類物質：鼠尾草酸(carnosic acid)、鼠尾草苦內酯(carnosol)、以及迷迭香酸(rosmarinic acid)。主要探討是迷迭香酸(rosmarinic acid, Ros A, 又稱

-o-Caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyl lactic acid)分子式： $C_{18}H_{16}O_8$ 、分子量：360.33<sup>[7]</sup>。迷迭香酸是咖啡酸和3,4-二羥苯基乳酸形成的酯類。屬於咖啡酸的一種衍生物。它的生物合成從L-phenylalanine和L-tyrosine開始。在8種酶的參與下，咖啡酸從苯丙胺酸上獲得酚環，二羥苯基乳酸從酪胺酸上獲得酚環，再經過一系列化學過程而合成<sup>[8]</sup>。





Fig 1 迷迭香植物外觀圖



Rosmarinic acid

Fig 2 迷迭香酸之結構圖

### 三.2 Gellan gum 作為傷口敷料之構想

#### 三.2.1 Gellan gum 來源和結構

Gellan gum 中文稱為結蘭膠或是結冷膠，合成附著在細胞表面或分泌到胞外溶液中的無定形黏液，即是微生物胞外多醣(Exopolysaccharide, EPS)<sup>[9]</sup>，又稱微生物代謝膠。舊稱雜多醣PS-60，於20世紀70年代末發現，直到1982才有了有關結蘭膠實驗室規模發酵生產成功的報導。源自於一種非病原性的菌株-*Sphingomonas elodea*(舊時名稱

為 *Pseudomonas elodea*, *Sphingomonas elodea*) 為一種好氧性革蘭氏陰性菌，能以葡萄糖、蔗糖、麥芽糖等醣類作碳源，含無機或有機氮源及磷酸鹽和微量元素的培養基中生長，其最適培養溫度為 30°C<sup>[10]</sup>。Gellan gum 為 *Sphingomonas elodea* 所分泌的膠狀直鍊式多糖物質，若要形成膠狀物質需要一價或是二價陽離子存在之下才行，又以二價陽離子優於一價陽離子，所凝固的膠狀物體類似於洋菜膠。

結蘭膠成品為白色粉末狀，分子量為  $5 \times 10^5$ ，單體結構為 -D-1,3-glucose, -D-1,4-glucuronic acid, -D-1,4 -glucose, 和 -L-1,4-rhamnose<sup>[11]</sup>。它可藉著廣泛且多樣化的陽離子形成凝膠，也可與酸中的氫離子(H<sup>+</sup>)作用，這些陽離子導致聚合物分子結合並行成凝膠。其中兩個葡萄糖個別接有乙酯和甘油酯基。Gellan gum 自然形式中，以每單位約有 1.5 個 O-醯基基團，其中既有 O-乙醯取代基，又有 O-甘油醯取代基，後者多於前者，甘油醯基位於 3-連接成鍵的葡萄糖殘基的 2 位，乙醯基則在 6 位上。O-醯基很容易被鹼脫除，從而由自然形式的 Gellan gum 得到脫醯基形式<sup>[11]</sup>。Gellan gum 的單體結構當中，其中兩個葡萄糖個別接有乙酯和甘油酯基。Gellan gum 自然形式中，以每單位約有 1.5 個 O-醯基基團，其中既有 O-乙醯取代基，又有 O-甘油醯取代基，後者多於前者，甘油醯基位於 3-連接成鍵的葡萄糖殘基的 2 位，乙醯基則在 6 位上。O-醯基很容易被鹼脫除，從而由自然形式的 Gellan gum 得到脫醯基形式<sup>[12]</sup>。而葡萄糖醛酸會被中和而被 K、Na、Ca、Mg 等的鹽類，且還原端的羥基可能與官油酸或是乙酸的羥基形成糖苷酯<sup>[13]</sup>。

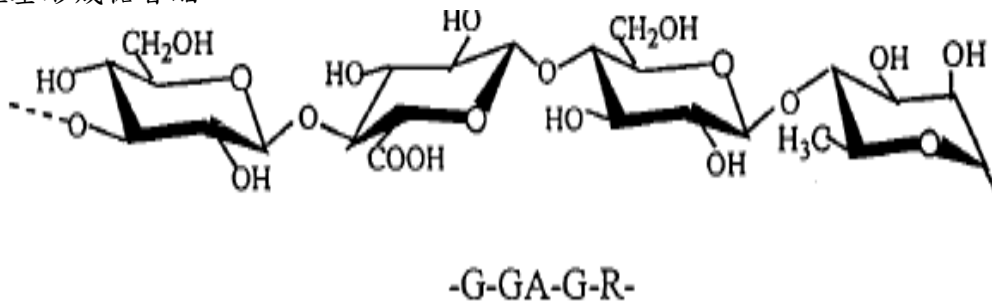


Fig 3 Gellan gum 之單體結構圖

(G= -D-1,3-glucose, GA= -D-1,4-glucuronic acid, R= -L-1,4-rhamnose)

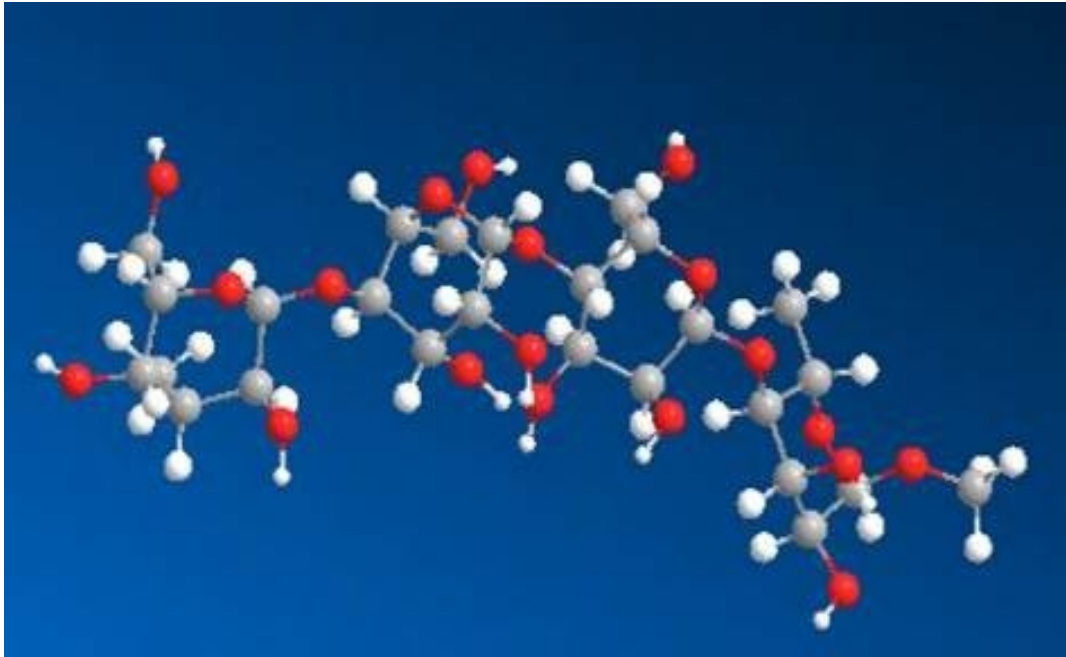


Fig 4 低醯基結冷膠的分子立體構型

### 三.2.2 Gellan gum 作為生醫材料的優點<sup>[14]</sup>

編號	特性	功效
1	在低濃度(0.05-0.25%)下就可形成優質凝膠	結蘭膠是一種非常有效的膠凝劑
2	加熱和低pH條件下都非常穩定	1)加熱殺菌對凝膠的影響很小； 2)酸性凝膠的貨架期相當長
3	由鈉或鉀離子形成的凝膠，加熱後可以復原，而鎂或鈣鹽的凝膠無法復原	可分別製成熱可逆的和熱不可逆的凝膠
4	與其它膠類可順利配伍，如澱粉、黃原膠、刺槐豆膠、卡拉膠的混合物	組織結構可從脆的到有彈性的任意轉變
5	與其它配料有良好的相容性	可廣泛地適用於各種配方
6	結蘭膠在pH3.5-7.0之間均能形成凝膠	在酸性至中性食品配方中都能獲得優質凝膠和預期的凝膠強度
7	不容易導致酶解	為食品加工提供了很好的靈活性,在微生物培養基和植物組織培養中也有優良的特性。

唯一一個用生物發酵方法生產的多醣膠質膠凝劑，有著用量低、透明度高、香氣釋放能力強、耐酸、耐酶等優點。Gellan gum的常見的一種脆性膠，對剪切力非常敏感，食用時有入口就化的感覺。且可以在極低的使用量下產生凝膠，比agarose的1/5用量，故可以減少用量達到最大用途。Gellan gum能擔任多功能膠凝劑、懸浮劑、增



稠劑、穩定劑、乳化劑，也能單獨或結合其它產品復配後使用。

### 三.2.3 Gellan gum 生化和物化特性

結蘭膠(Gellan gum)本身是屬於一種線性聚合物，有Shear-thinning現象被歸於多醣體僵直較有次序的分子構形，並產生聚集或結構鬆散的弱凝膠(Weak gels)<sup>[15,16]</sup>。相較於以雜亂分子構形所形成的凝膠，這類由僵直較有次序的分子構形所形成的凝膠，分子間的結合力較弱，原因是構形本身較為固定，形成網狀結構時熵的損失並不大，僅需較弱的分子間吸引力<sup>[17]</sup>。可藉著廣泛且多樣化的陽離子形成凝膠，也可與酸中的氫離子(H<sup>+</sup>)作用，這些陽離子導致聚合物分子結合並形成凝膠。Gellan gum對溫度、酸、酶都有很強的抗性，溫度上升時Gellan gum粘度迅速下降，但冷卻後粘度又能完全恢復，當溫度降低到凝膠溫度後迅速形成凝膠，高於凝膠溫度時，結冷膠溶解在水溶液中是無序的捲曲，冷卻到某一特定的溫度時，轉變為大致協調的雙螺旋構象。結冷膠的凝膠溫度和融化溫度相差很大，凝膠溫度在30-40℃左右，而融化溫度高達120℃，這對於Gellan gum的應用非常有利。冷卻速度對凝膠也有影響，較低保溫溫度(0℃~4℃)形成彈性凝膠，成膠速度快，而較高保溫溫度(10℃)形成的凝膠彈性較小，而且凝膠的延遲期很長，一般形成凝膠後放置幾小時才會達到最大的強度。Gellan gum水溶液粘度隨濃度的升高增大，溫度升高而減小，pH值影響很小。流變學角度而言Gellan gum在0.01%~0.04%的範圍呈假塑性流體特性，當結冷膠含量大於0.05%時，則基本上呈凝膠狀液體。低質量分數的Gellan gum的流變學類型接近Cross模型，該體系具有剪切稀化性、觸變性及屈服應力，三者均隨Gellan gum質量分數的增大而增大。Gellan gum流變學特性依賴於膠體濃度，溶液溫度，45℃，1.5%的體系中呈現牛頓特性；5~20℃，0.5%的溶液呈非牛頓特性。不添加鹽離子的Gellan gum溶液表現出牛頓特性，添加單價和二價鹽離子，有很強的非牛頓特性，如表現出屈服應力、觸變性和高度的剪切稀釋特徵，這些是典型的“流體凝膠”特徵<sup>[18]</sup>。天然Gellan gum的主鏈上因為連接有醯基，也會因醯基比率差異不同而不同，醯基的目的是使得所形成的凝膠能比較柔軟，富有彈性而且粘著力強。脫醯基的Gellan gum由於主鏈上的醯基部分或全部被除去，使得分子間空間阻礙作用明顯減弱，形成凝膠能力增強，具有強度大、易脆裂的特點。雖然高醯基Gellan gum體比低醯基Gellan gum膠體柔軟，但是在高溫下高醯基結冷膠比低醯基Gellan gum在構象上更有次序，因此高醯基Gellan gum的結構本質卻更穩定。兩者混合時，高醯基Gellan gum含量越多保水性、彈性越好，混合膠可形變能力可比低醯基Gellan gum大為兩好，凝膠溫度也高於低醯基Gellan gum，從而可見高醯基/低醯基的比例對膠體性質的影響比較大<sup>[19]</sup>。

#### (四) 研究方法及步驟

##### 5.1 膜的制備

取以去乙醯化之 gellan 溶入二次水中並加熱使其完全溶化，加入 0.03% sodium azide(由 Sigma 公司購入)防止膜的發霉，待完全溶解之後放置並等待 gellan 溶液降溫至室溫 25℃(因為 pH meter 標定溫度於 25℃)，測量 gellan 溶液的 pH 值是否為弱酸，

若溶液未呈現弱酸(pH6.00~6.40)，可用 0.1N HCl 調整之，之後以離心機離心溶液內未溶解的 gellan 凝膠狀物體或是雜質將其離至管底並丟棄，此時配置迷迭香酸溶液，和以離心完的 gellan 溶液互溶，互溶完之後，再以 pH meter 測 gellan 和迷迭香酸互溶後的溶液 pH 值，若溶液未呈現弱酸時(pH6.00~6.40)，可用 0.1N NaOH 調整之，倒入直徑 15cm 長的培養皿中，放入烘箱中烘乾，待其乾燥之後，放在室溫下並倒入 0.015nmole EDC 酒精溶液作為交聯劑交聯 24 小時後倒去，脫膜後以作為後續實驗之用。

## 5.2 膜的透氣性

根據 ASTM E96 BW 標準之下，作為敷傷材料，必須要考慮到如何將傷口表免的水分散失減到最低及透氣的重要性，將 gellan gum 和迷迭香酸所混和好的膜將其裁成適當大小，並利用透氣度測試機，於室溫下測試，再將其結果求取平均值。

## 5.3 膜的機械強度性(拉伸性)

根據 ASTM D882 標準之下，將膜裁成 2cmX7cm 的長度，放置於拉伸試驗機下已 300mm/min 的拉伸速率測試膜的抗拉強度及深長量變化，再將其結果求取平均值。  
$$L(\text{長度的變化量})/L_0(\text{原長度}) \times 100\%$$

## 5.4 膜的 IR 光譜圖

比較只有 gellan gum 所製成的膜和 gellan gum 溶入迷迭香酸的膜，利用通過吸收光譜和 Z-Scan 技術對材料的光學吸收特性進行了表徵。在吸收光譜中，不同 ZnSe 摩爾分數的樣品的吸收邊相對於 ZnSe 體材料發生了不同程度的藍移，藍移量與複合材料中 ZnSe 奈米晶粒的尺寸有關，根據量子尺寸效應估算了複合材料中 ZnSe 納米晶粒的平均尺寸大約為 3~4nm。利用 Z-Scan 技術測定了 ZnSe 摩爾分數為 0.01 和 0.03 的 ZnSe/SiO<sub>2</sub> 奈米複合材料的雙光子吸收係數。ZnSe/SiO<sub>2</sub> 奈米複合材料在不同強度的入射光的激發下其出射光強度與入射光強度之間的關係呈現光學限幅特徵，呈現出兩者的相異度。

## 5.5 膜的 gel contain 及 water contain

Gellan gum 和迷迭香酸以 EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 行交聯反應，活化 carboxylic acid 或是 phosphate 能快速跟醇基形成酯鍵，亦可合 amide 行成 peptide bond<sup>[20]</sup>，如果交聯程度越高，水份不容易維持於膜內，故吸水量低，反之，交聯程度越低，水份月溶液維持於膜內，其含水量豐富。  
降解失重比率% =  $(W_0 - W_1) / W_0 \times 100\%$  ( $W_0$  表實驗前未置入水中的膜之重量； $W_1$  表置入水中的膜後之重量)

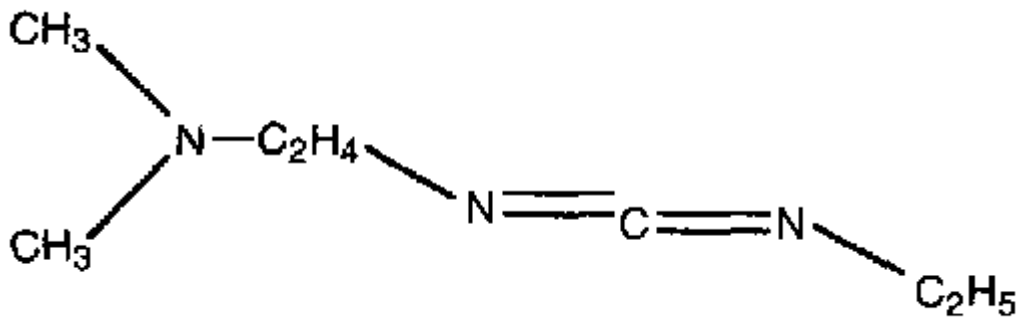


Fig 5 EDC 之結構式圖

### 5.6 cell culture

利用 ATCC 上皮細胞，以 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養，期間放入 gellan gum 和迷迭香酸所製成的膜所膜成的粉末，觀察上皮細胞對 gellan gum 和迷迭香酸所膜成的粉末耐受性如何

### 5.7 animal model

從樂斯科公司購入 300gm 的 rat(品種：SD)將製作好的 gellan gum 和迷迭香酸混合而成的膜，裁成 1.5cmX 1.5cm 的大小，移植入老鼠表面共 15 隻，在 3，10，30 天觀察老鼠傷口表面發炎情況及傷口表面癒合情況的改變，並畫下傷口癒合情況以利於比較各個時間點的差異，於各個時間點取出老鼠組織做病理切片染 H-E stain 觀察組織發炎情況和上皮細胞生長情況，在作 AgNOR(nucleolar organizer regions NORs) Staining，利用鍍銀法將核仁部位染色，光學顯微鏡下觀察到染出之黑點及計算 PMNL (polymorphonuclear leukocyte)數目值。

### 5.8 SEM

將 gellan gum 和迷迭香酸所混和好的膜裁成 1cmX 1cm 的大小，以雙面膠固定於固定盤上，以真空蒸鍍機在膜的表面鍍上一層金的薄膜，然後將鍍好的材料放入高真空掃描式電子顯微鏡，利用電子來撞擊膜的表面後，經接收器接收後轉換成訊號顯示在螢幕中，以利觀察。

### 5.9 Interleukin-6 (IL-6) ELISA

IL-6 是調節發炎反應的細胞激素之一，主要是由單核球及巨噬細胞所產生的。在細胞株剛好也可以測到此細胞激素，可以用低濃度在細胞培養時刺激看 IL-6 的產生有沒有變化。在 microtiter plater 結合上 IL-6 抗體（外購），在每個 well 內加入上述細胞培養液 100µl 在室溫下靜置 2 小時。將培養液吸掉再將 well 洗 4 次。使反應終止然後在 30 分鐘內測 450nm 之吸光值。加入 200µl 的 IL-6 抗體結合物在室溫下靜置 2 小時，再將溶液吸掉 well 洗 4 次。每個 well 內加 200µl 的 substrate solution（內含呈

色劑) 在室溫下靜置 20 分鐘，加入 50 $\mu$ l 的 stop solution。使反應終止然後在 30 分鐘內測 450nm 之吸光值。

#### (五) 預期結果

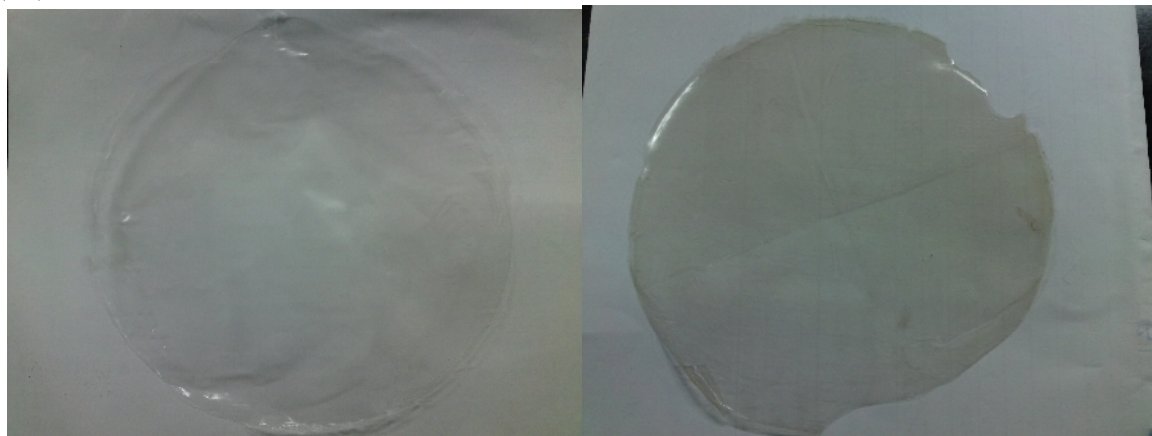


Fig 6 gellan 膜

Fig 7 gellan+迷迭香酸膜

取以去乙酰化之 gellan 溶入二次水中並加熱使其完全溶化，加入 0.03% sodium azide(由 Sigma 公司購入)防止膜的發霉，待完全溶解之後放置並等待 gellan 溶液降溫至室溫 25 $^{\circ}$ C(因為 pH meter 標定溫度於 25 $^{\circ}$ C)，測量 gellan 溶液的 pH 值是否為弱酸，若溶液未呈現弱酸(pH6.00~6.40)，可用 0.1N HCl 調整之，之後以離心機離心溶液內未溶解的 gellan 凝膠狀物體或是雜質將其離至管底並丟棄，此時配置迷迭香酸溶液，和以離心完的 gellan 溶液互溶，互溶完之後，再以 pH meter 測 gellan 和迷迭香酸互溶後的溶液 pH 值，若溶液未呈現弱酸時(pH6.00~6.40)，可用 0.1N NaOH 調整之，倒入直徑 15cm 長的培養皿中，放入烘箱中烘乾，待其乾燥之後，放在室溫下並倒入 0.015nmole EDC 酒精溶液作為交聯劑交聯 24 小時後倒去，脫膜後以作為後續實驗之用。

#### (六) 參考文獻

- [1] 中國中醫藥信息雜誌 2002 年 01 月 第 9 卷 第 1 期
- [2] 美國中華臨床醫學雜誌 2005 年 7 卷 1 期
- [3] 乃海燕.迷迭香酸的研究進展.美國中華臨床醫學雜誌.2005,7(1): 183
- [4] Arvind Sahu, Nenu Rawal and Michael K.Pangburn. Inhibition of complement by covalent attachment of Rosmarinic Acid to activated C3b. *Biochemical Pharmacology*, 1999,57:1439-1446.
- [5] Jongsung Lee, Eunsum Jung, et al., Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK- $\alpha$  in TNF- $\alpha$ -induced upregulation of CCL11 and CCR3. *British Journal of Pharmacology*, 2006. 148: 366-375.
- [6] Naomi Osakabe, Akiko Yasuda, Midori Natsume and Toshikazu Yoshikawa. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 2004,25(4): 549-557.
- [7] Scarpati, M., and G. Oriente. Isolation and constitution of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis*. *Ric. Sci*, 1958. 28: 2329-2333.



- [8] Ellis, B. E. and Towers, G. H. N.. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. The Biochemical Journal 1970.118 : 291-297.
- [9] Kenneth S. Kang, George T. Colegrove, George T. Veeder. Deacetylated polysaccharide S-60. US patent 4326052.
- [10] Kenneth S. Kang, George T. Veeder. Polysaccharide S-60 and bacterial fermentation process for its preparation. US patent 4326053.
- [11] Jansson, P., Lindberg, B., and Sandford, P.A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. Carbohydrate research, 1983.124(1):135-139.
- [12] Jay, A. J., I. J. Colquhoun, M. J. Ridout, G. J. Brownsey, V. J. Morris, A. M. Fialho, ... Analysis of structure and function of gellans with different substitution patterns. Carbohydrate Polymers, 1998.35(3-4):179-188.
- [13] Jurning Tang. Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono-and divalent cations. Carbohydrate Polymer, 1996. 29(1):11-16.
- [14] Fialho, A.M., et al., Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol, 2008.79(6):889-900.
- [15] G. Robinson, G.E. Manning and E.R. Morris, "Food Polymers, Gels, and Colloids", Royal Society of Chemistry, London 1991 pp22-33.
- [16] M. Miyoshi and K. Nishinari, Colloid. Polym. Sci., 277 1999 727.
- [17] Rinaudo, M., Role of Substituents on the Properties of Some Polysaccharides. Biomacromolecules-Washington, 2004.5(4): 1155-1165.
- [18] E.R. Morris and S.B. Ross-Murphy, "Techniques in carbohydrate metabolism", B310 1981, pp1-46.
- [19] 中國糖果工業網 結冷膠的性質及其在甜食中的應用 作者：楊湘慶沈悅 2008-03-21
- [20] 董光義、李明偉、王盈錦 Collagen coupled with hyaluronic acid: synthesis and biomedical application, 醫學工程年會 2008/12

#### (七) 需要指導教授指導內容

本身為醫技系的學生，對於 IL-6、cell culture 等等為主的生物化學及分子生物學部份的知識較為擅長，在學期間學校對於生化及分生極為重視，灌輸相當多的知識，但是化學方面的生合成反應較為生疏，雖說高中及大一時有修過普通化學有機化學，但都是基礎化學只能略知一二，對於實驗當中的物化等等的概念，尚需要指導教授的教導協助，近而對於物化方面的認知能更加認識。



(八) 結果

- (八)1. 膜的拉伸性
- (八)2. 膜的 gel contain 及 water contain
- (八)3. FTIR.
- (八)4. 釋放實驗
- (八)5. NO test
- (八)6. Animal Model

(九) 結論

## (八) 結果

### (八)1. 膜的拉伸性

拉伸試驗是用來測試當 gellan+Ros A 膜(GR 膜)在相同濃度的 EDC 溶於不同濃度的乙醇下進行交聯反應程度，在靜止狀態承受荷重或受到緩慢增加負荷時的抵抗能力彈性變形與塑性變形，當對試桿施一近 5mm/mins 拉力時，構成材料的原子與原子之間的鍵便被拉開來，則使得試桿伸長，當我們將拉力釋放掉時，原子間的鍵回復到原來長度，試桿便縮回到原來尺寸。若應力繼續增加到某一程度，將迫使材料內部的差排開始運動而形成滑移的現象，則材料的塑性變形便產生，若此時將拉力移去，由聯結鍵伸長所造成的彈性變形仍將回復，但由滑移所形成的變形則將永久的存在。降伏強度被定義為產生微量永久變形的應力，也就是在此應力值下，材料內將產生明顯的滑移現象。抗拉強度在應力-應變曲線上的最大應力值，就是材料在試驗過程中承受最大荷重時之應力，即為抗拉強度。在實驗過程當中，以 70% 乙醇濃度下進行交聯反應的 GR 膜在拉伸實驗中結果最佳，可抵抗的最大力為 21.48N，抗拉強度為 57.3MPa，而非之前的 40% 乙醇濃度下，可抵抗的最大力為 10.73 抗拉強度只有 25.84，數值不及於 70% 乙醇溶度環境下，是因為此膜內含 Ros A 並非很平均分布在 gellan 溶液中，因此在拉伸過程當中容易有差排的產生，而在數值上和前面幾項實驗有所出入。

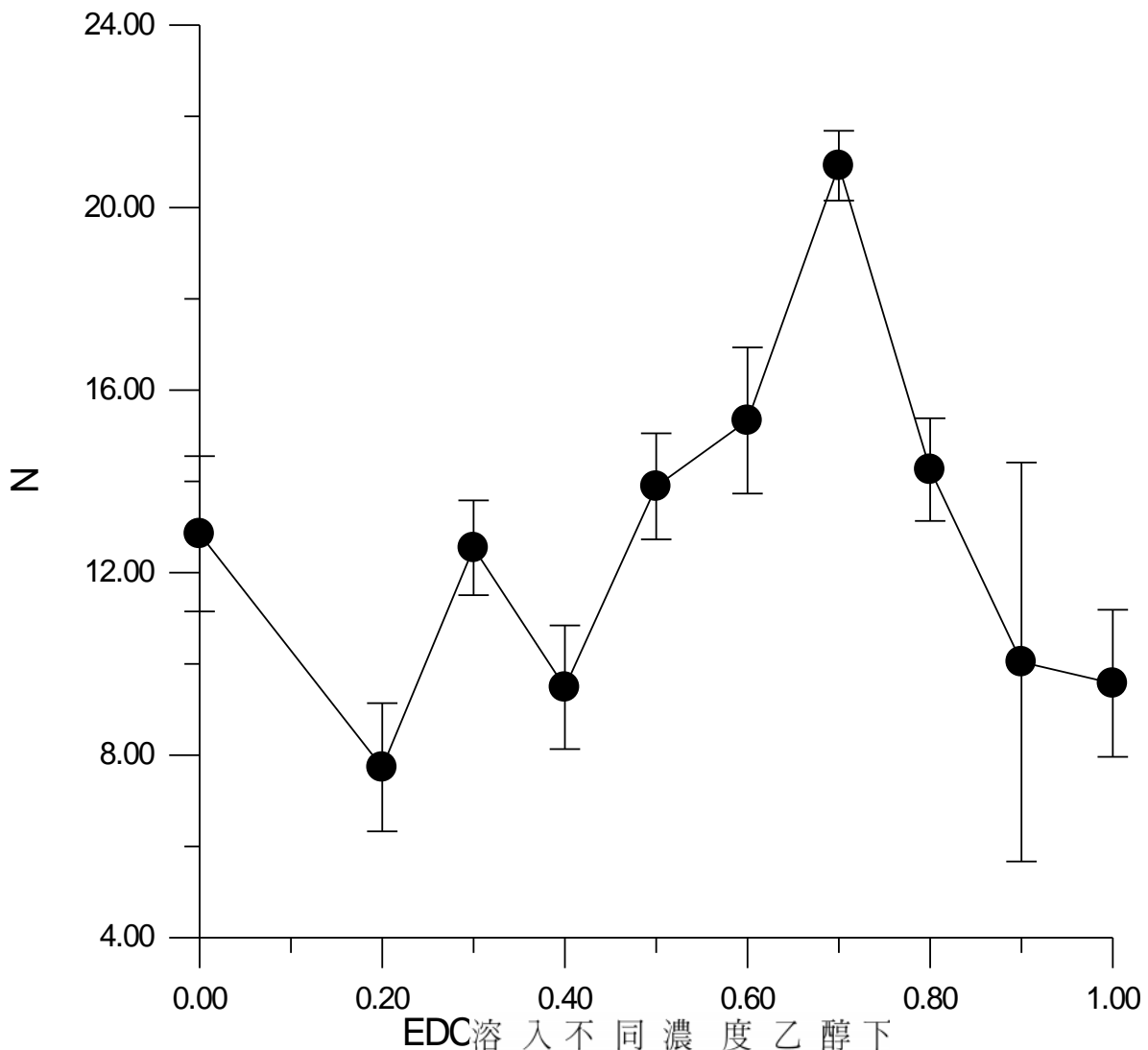


Fig 8 以拉伸測試之拉伸力測試各種不同濃度乙醇下 EDC 的交聯程度

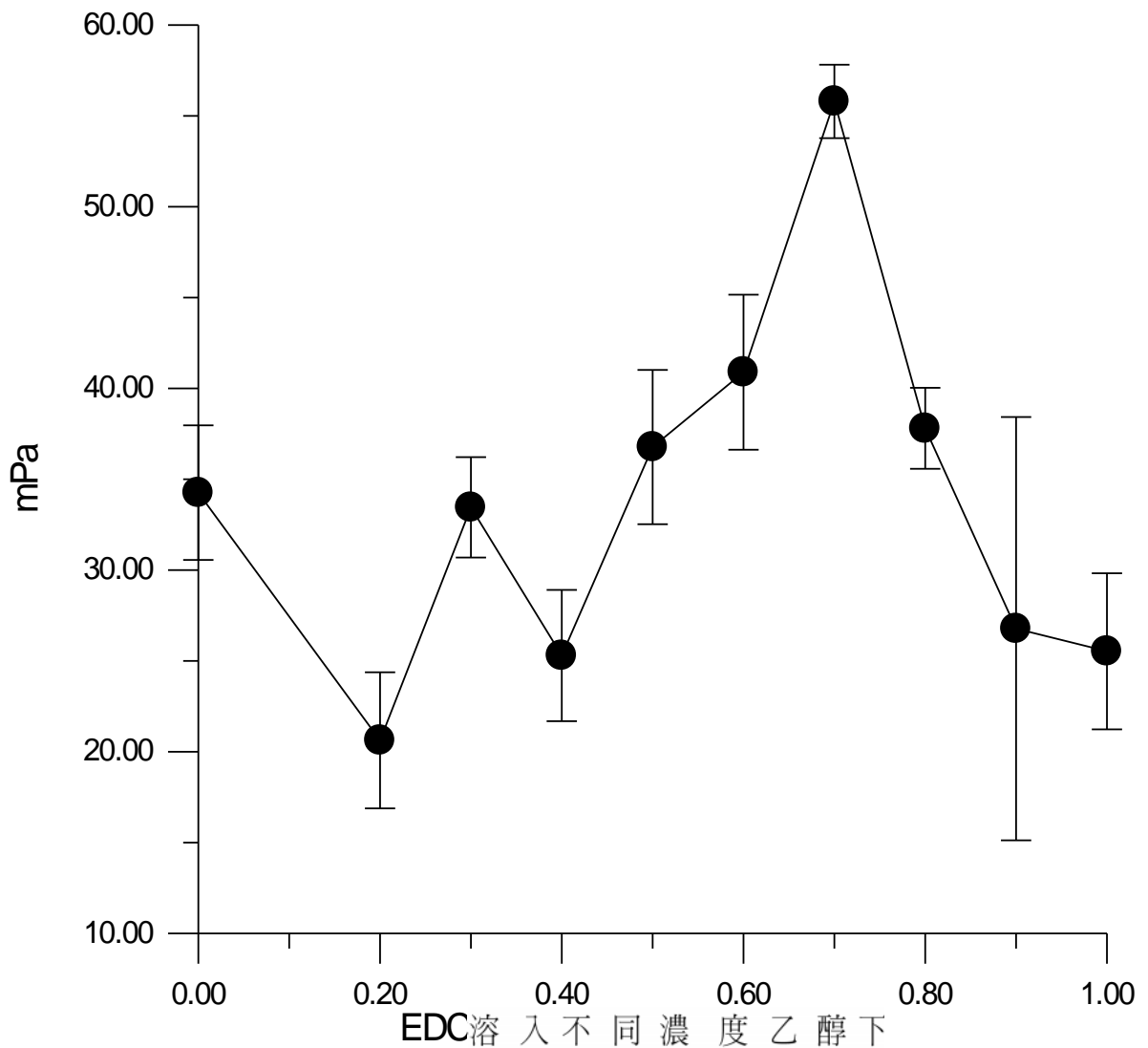


Fig 9 以拉伸測試之拉伸斷裂應力測試各種不同濃度乙醇下 EDC 的交聯程度

#### (八)2. 膜的 gel contain 及 water contain

以 gel contain 和 water contain 來評估相同莫耳濃度的 EDC 溶液下，但使用不同濃度的乙醇溶液及二次水之溶質進行交聯反應。使用二次水及 10% 乙醇溶液進行交聯反應的 GR 膜已被水解，表示交聯反應失敗造成膜的水解產生；使用 20%、80%、90% 及 100% 乙醇溶液進行交聯反應的 GR 膜含水量過高而且秤重過程當中發現 GR 有稍微溶解或是斷裂的情況產生，則表示交聯反應程度不佳所導致；使用 30%~70% 乙醇溶液進行交聯反應的 GR 膜皆能保持膜的完整性，其中 40% 的乙醇溶液其含水量最少，因而可以推論以 40% 之乙醇溶液進行交聯反應後的 GR 膜其交聯程度最高。Water contain 因為膜本身的水分無法有效的去除，ependoff 中多少會含有 GR 膜，經二次水所溶解掉殘存的膠狀物質，尤其是未交聯的 GR 膜溶解情況產生影響更甚，以上種種的因素存在所以 water contain 無法像 gel contain 有明顯的差異產生，因此 water contain 無法作為交聯程度差異程度之評估。

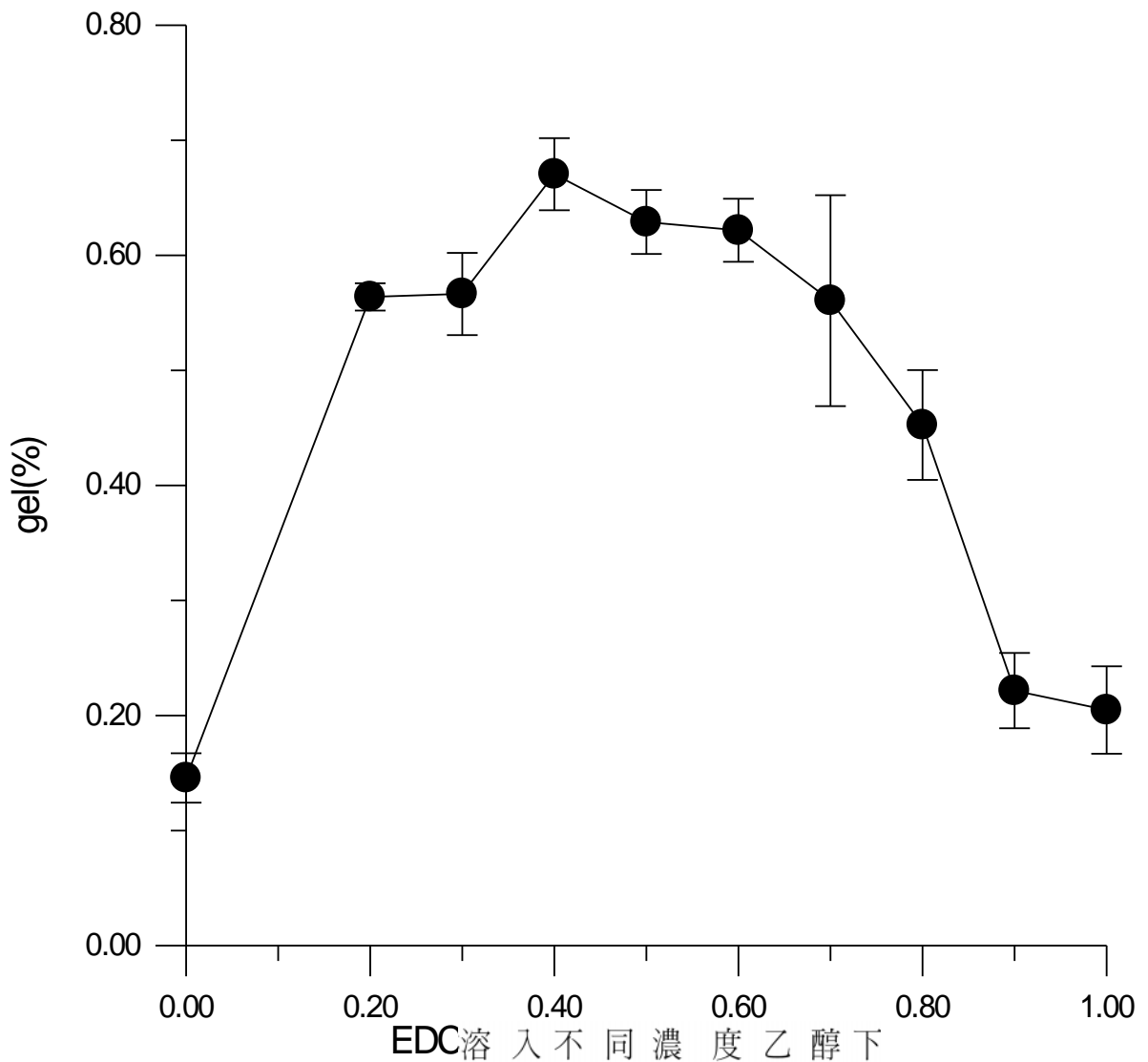


Fig 10 以 gel contain 測試各種不同濃度乙醇下 EDC 的交聯程度

### (八)3. FTIR.

了解 gellan 和 Ros A 彼此是否進行酯化反應彼此形成共價結合，所以將 gellan 膜、GR 膜及 gellan+Ros A 經交聯反應的膜(GRE 膜)分別截取 1cm×1cm 大小的膜，送至清華大學貴重儀器中心利用 FT-IR 測試儀(ATR-ZnSe 晶體)進行測試。從 FTIR 圖中發現，GR 和 GRE 在 2885  $\text{cm}^{-1}$  有新的吸收峰出現，此吸收峰為碳-碳雙鍵(C=C)的吸收峰，是由 Ros A 結構中有一碳-碳雙鍵(C=C)存在，引此可以表示 Ros A 在 GR 和 GRE 中存在。GR 和 GRE 最大的差別有三個位置，分別是(1)氫氧基集團的吸收峰，GR 的氫氧基集團的吸收峰 3325.9  $\text{cm}^{-1}$ ，GRE 的氫氧基集團的吸收峰 3287.5  $\text{cm}^{-1}$ ；(2)在波長 1720  $\text{cm}^{-1}$  也就是酯化反應中的碳氧雙鍵(C=O)，但是這個波峰只有些微變化，但是也可以證明說，gellan 和 Ros A 經 EDC 的作用之下有進行酯化反應；(3)波長 834.9  $\text{cm}^{-1}$  為碳-碳(C-C)的吸收峰，在進行酯化反應時，gellan 中的醇基提供氫離子(gellan 為醇糖)和 Ros A 中的羧酸基進行酯化反應，在反應過程中電子的轉移而形成鍵結後，Ros A 羧酸基為分界兩邊各為一個基團當交聯酯化反應完後，羧酸基會在接上 gellan 的醇基，因此反應完後因 gellan 是擁有四個單糖分子所形成的巨分子化合物，勢必 C-C 鍵結角度必定有所改變，為取得三個基團的平衡。然而，碳-碳雙鍵(C=C)的吸收峰並未改變

的原因是，酯化反應過程中羧酸的 C=O 雙鍵並未被破壞，所以兩者的 C=O 雙鍵吸收峰沒有很大的差異。

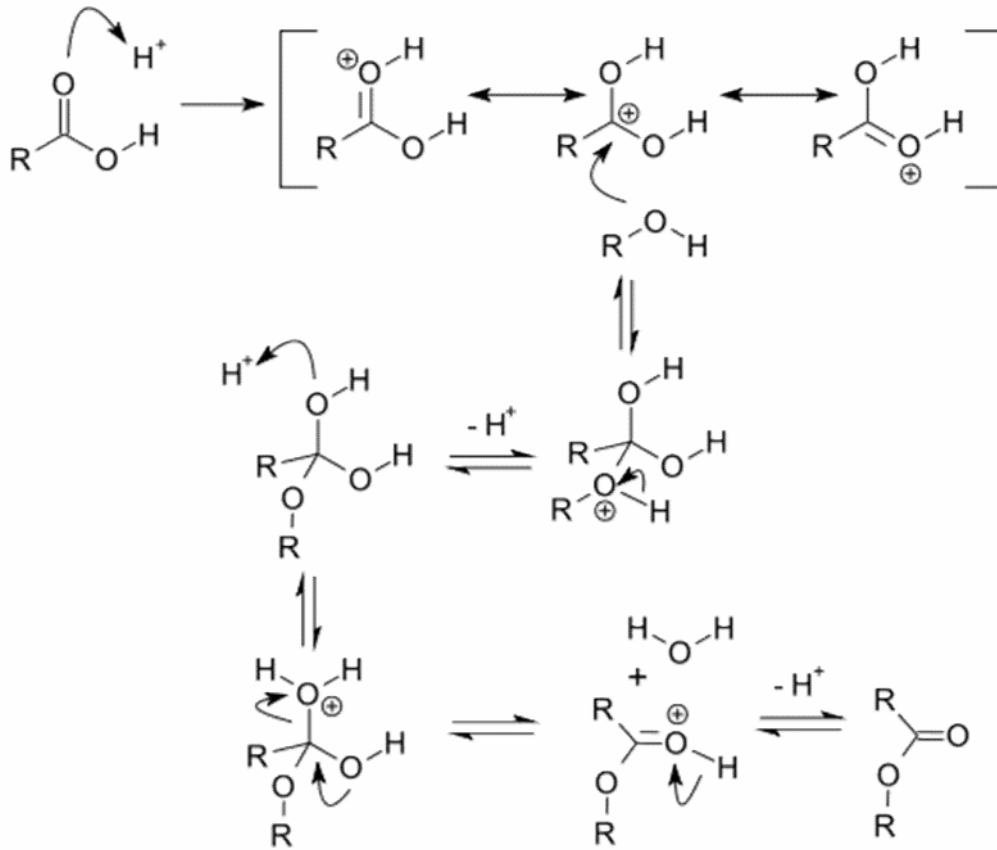


Fig 11 酯鍵形成模式圖

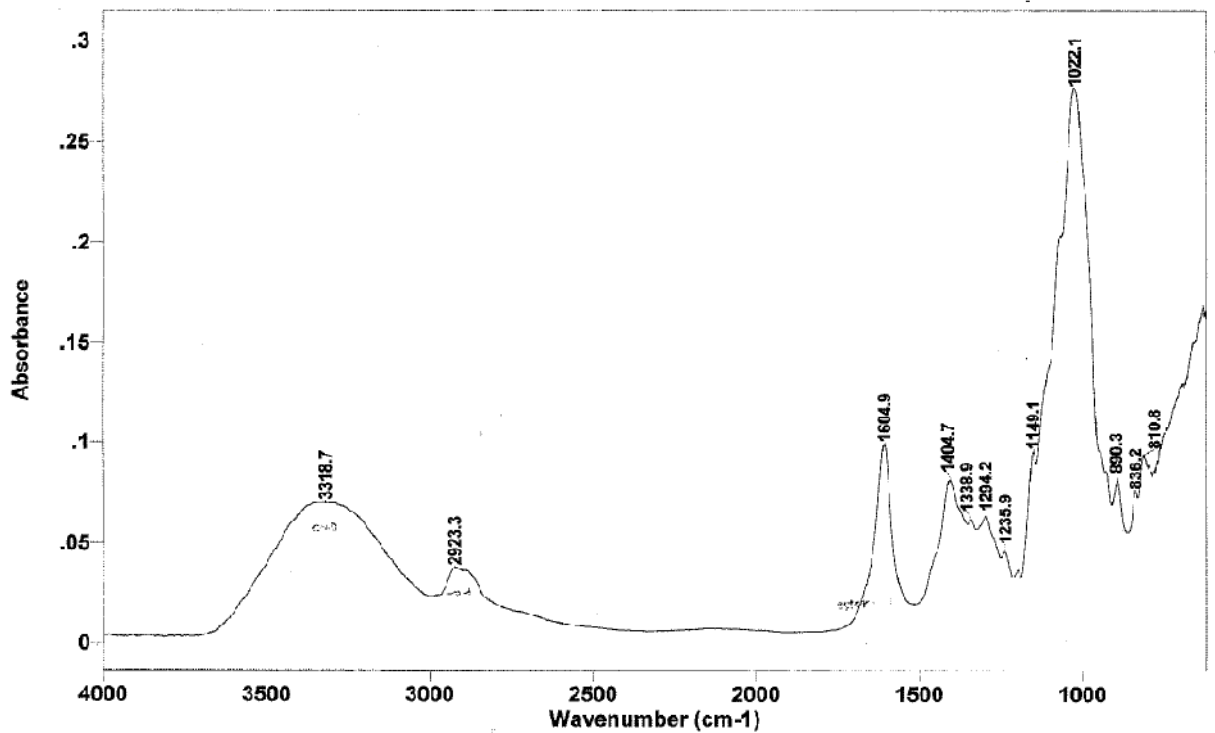


Fig 12-1 gellan gum 之 FTIR 圖



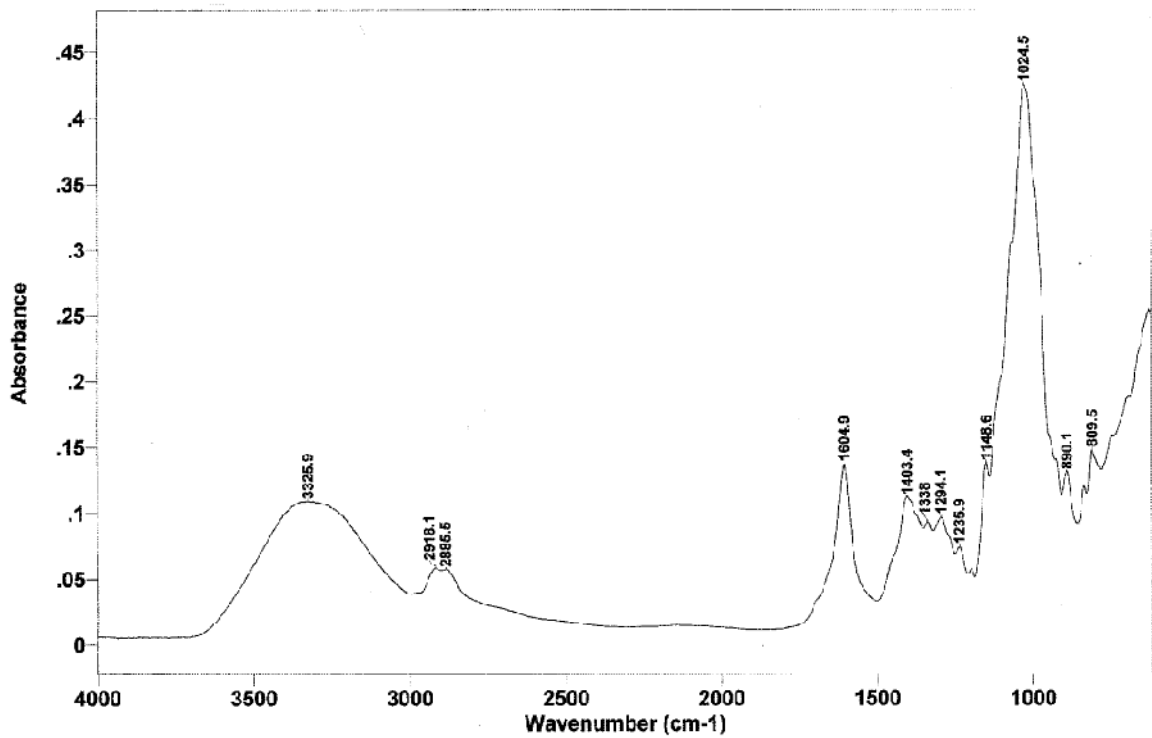


Fig 12-2 GR 之 FTIR 圖

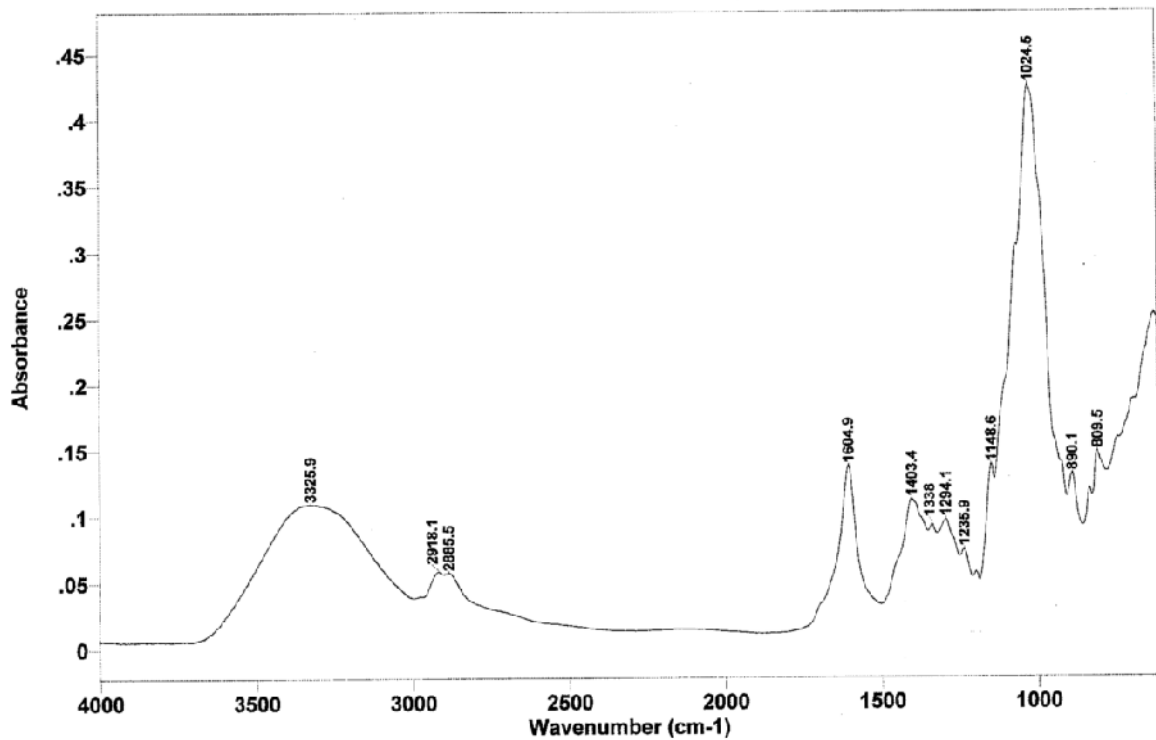


Fig 12-3 GRE 之 FTIR 圖

#### (八)4. 釋放實驗

Ros A 釋放是用來評估 gellan 是否和 Ros A 進行共價結合經交聯作用，再以 Ros A 本身能在 340nm 進行吸光的特性來進行。從圖中解釋 GR 膜在釋放過程中第 3 天、第 6 天、第 9 天將游離的 Ros A 大量釋放到二次水中，因此所偵測到的 Ros A 的吸光值分別為 0.2274、0.0544、0.0309，進行釋放測試第 9 天之後游離的 RosA 殘留不多，因

此所偵測到的 Ros A 的吸光值也逐漸趨於平緩，進行釋放實驗第 27 天之後 GR 膜將所含的 Ros A 近乎是全部釋放完畢而無法偵測到 Ros A 吸光值，而且未經過交聯反應的 GR 膜進行釋放時驗完後，膜的顏色從原本帶有土黃色變成和 gellan 膜已無差異；而 GRE 膜，在進行釋放測試將第 3 天、第 6 天、第 9 天分別為 0.1357、0.0544、0.0309，和 GR 膜相同再第 9 天之後的所偵測到的 Ros A 的吸光值也逐漸趨於平緩，而 Ros A 的吸光值雖在第 21 天之後就未再偵測到 Ros A 的吸光值，但是觀察進行釋放實驗後的 GRE 膜仍保有 Ros A 為土黃色的顏色，也就表示說 gellan 和 Ros A 經 EDC 作用彼此進行共價結合，因此在釋放過程當中，所釋放出的 Ros A 是為未進行共價結合的游離的 Ros A，而且游離量比未經交聯的來的少。

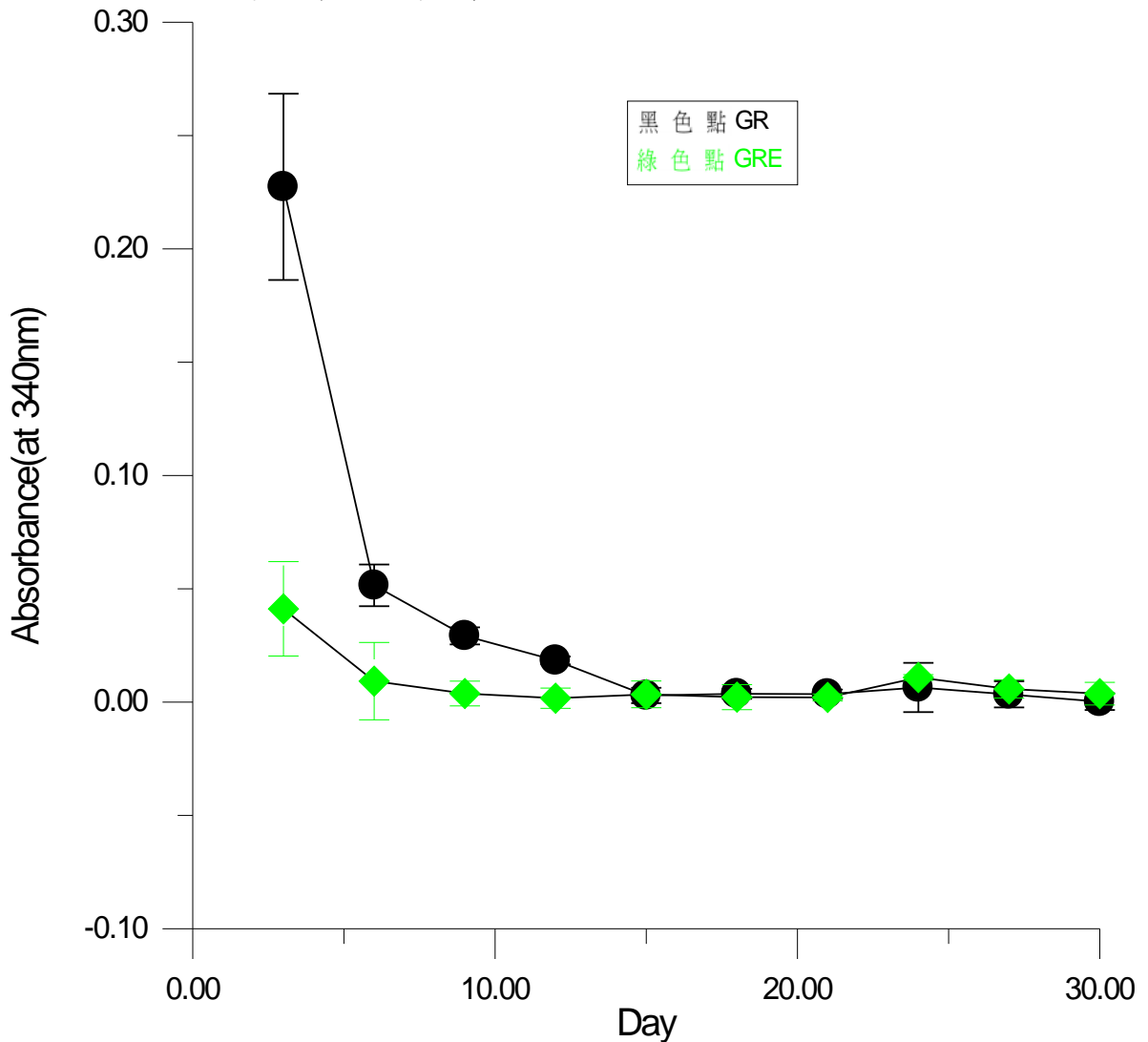


Fig 13 Rosmarinic acid release

(八)5. NO test

由於動物體內適量的發炎反應,可活化免疫細胞進而殺死入侵的病菌,是人體內防禦系統中不可或缺的一環。但是太過劇烈的發炎反應則會造成組織細胞急劇的壞死。而自由基的種類相當繁多,包括(NO, OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>等),其中 NO 在發炎反應過程中扮演相當重要的角色。NO 生成主要是經由活化一氧化氮合成酵素(NOS)而將細胞內之 L-arginine 轉變成為 L-citrulin 及 NO 自由基的釋放。細胞內 NOS 主要分為兩大類；一為結構性 NOS(constitutive NOS; cNOS), 另一種為誘導型 NOS (inducible NOS;

iNOS)。cNOS 產生固定量之 NO 為維持體內正常運作之重要訊息傳遞因子，NO 會藉由促使 GDP 轉變為 cGMP 進而誘發一連串之生理反應，包括血管擴張、子宮平滑肌鬆弛及抑制血小板凝集等作用。相反的，iNOS 所誘導出之大量 NO 自由基則會造成細胞的傷害與血管過度的舒張最後造成嚴重的發炎反應以及併發症，如敗血性休克、中風、DNA 受損、突變所造成細胞的癌化等。這次實驗是利用細菌之細胞壁成份中 Lipopolysaccharide (LPS) 進行誘導。方法是將 gellan 膜、gellan+Ros A 膜及 gellan+Ros A 經 EDC 交聯後的膜浸泡在 H-DMEM (high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium) 未添加 phenol red 中，每天取出 1ml 平均加到 4 個已添加 J774 (ATCC 60140; murine macrophage cell line) 96 孔盤中反應使細胞產生  $\text{NO}_2^-$ ，將反應後 H-DMEM 先與 1% sulfanilamide 作用將 H-DMEM 中的  $\text{NO}_2^-$  偶氮化，接著和 0.1% -naphthylenediamine dihydrochloride 偶合形成水溶性粉紅色之染料 (dye) 化合物，於 550 nm 波長量測其波峰吸收值。產生 NO 而引起發炎反應，測試 gellan 本身和添加 Rosmarinic acid (RA) 後的 gellan 膜析出液是否能有效抑制 LPS 所誘導 NO 的產生。結果表示出 gellan 本身在這 3 天的吸光值增加的程度推論有逐漸增加的趨勢，但是對細胞而言無立即性發炎反應；GR 膜在釋放過程中，釋放出相當量的 Ros A 造成 H-DMEM 背景值增高，因此也間接影響到吸光值有偏高的趨勢；而 GRE 膜，也會釋放出些微的 Ros A，但是其吸光值和 gellan 膜的吸光值相差不大，而且 3 天的吸光值有逐漸減少的情況產生，可以推論 GRE 膜能有效抑制 J774 經 LPS 誘導產生發炎反應之能力。

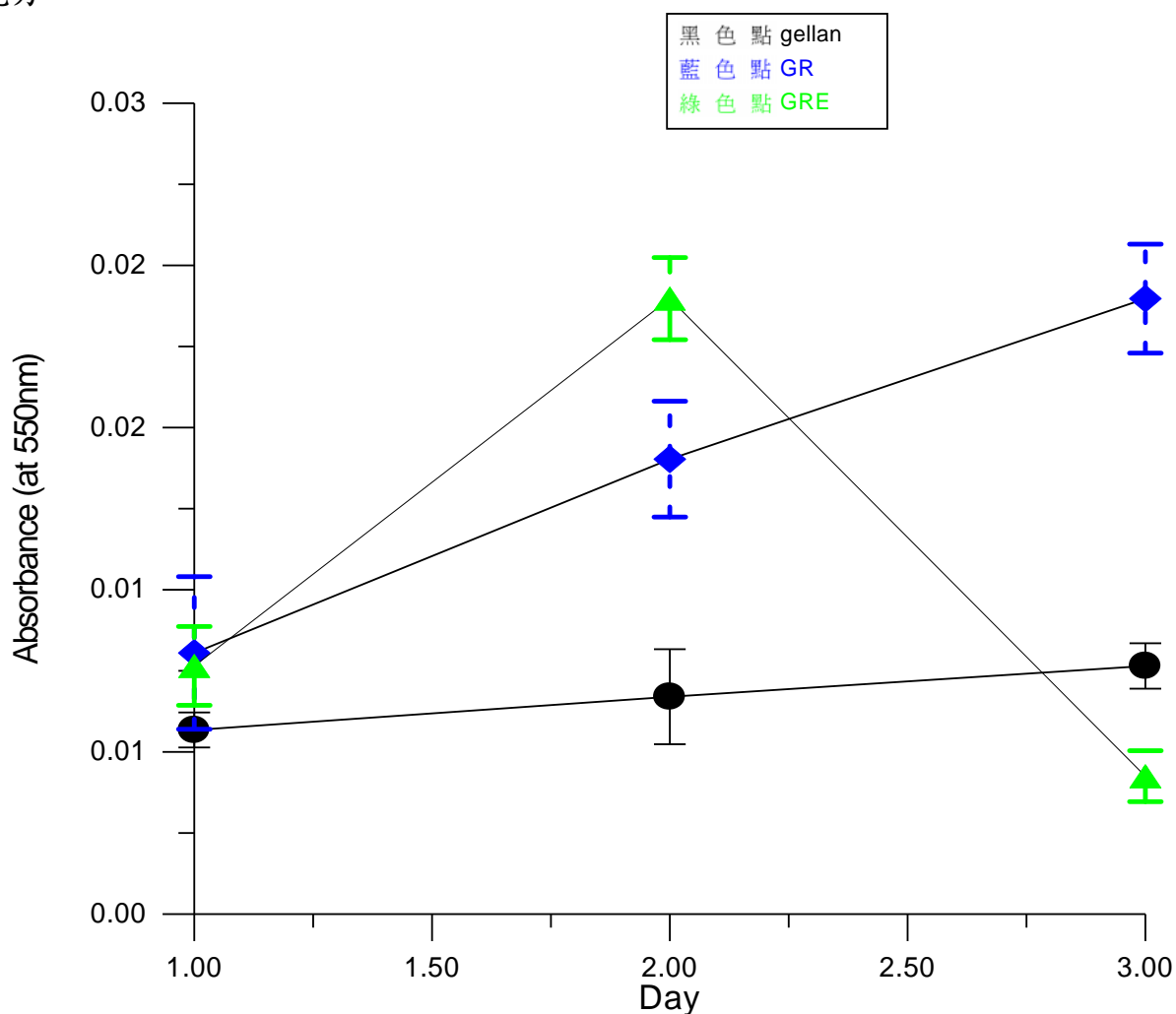


Fig 13 NO 釋放量

## (八)6. Animal Model

將Control、GE膜和GRE膜分別裁成1.5cmX 1.5cm 的大小，移植入老鼠表面共15隻，時間點改成在第5、15、24天病理切片中情況的改變，在組織發炎期的第5天時，觀察表皮的病理切片中發現，三者都有多型核白血球(PMN)的存在，而GRE膜在表皮組織癒合程度最佳，GE膜仍有些許的空洞化情況，而Control所覆蓋的組織空洞化最多。從傷口方面觀察到，GE膜及GRE膜所覆蓋下的傷口能保有溼潤的情況，且以GRE膜保持度最佳，兩者皆未有沾粘性的情況產生，但Control不能保持組織的濕潤性及具有嚴重的沾粘性。因此，在組織發炎期時，GE膜及GRE膜在撕取過程中產生嚴重的沾粘性，可以避免因撕取過程中造成組織的二次傷害；組織修復期的第15天，切片中發現GRE膜傷口癒合程度仍是比其他兩種來的優越，組織空洞的數量最少而PMN也鮮少發現到，GE膜仍是有少量組織空洞現象存在，PMN仍是可發現到，但是已經比第5天時來的少，而Control組織空洞現象最為明顯，PMN仍是散佈在各個新生的組織當中，從傷口上來看，GRE膜及GE膜已經有結痂的情況，以GRE膜結痂範圍最大，Control在傷口部份仍有組織液滲出尚未有結痂產生；組織恢復期的第24天，三種膜對於傷口的修復已大致完全，GRE膜所貼附的傷口下的新生的組織已經修補完成也很緻密，無組織空洞的情況存在，GE膜也是如此但是在顯微鏡400倍下觀察仍可發現微量的空洞現象，而Control雖以修補傷口完畢，但新生的組織不像前兩者緻密，仍有大量的空洞現象存在，因此GRE膜不管在組織發炎期、組織修復期還是組織恢復期都對於傷口組織提供良好的修補環境避免組織沾粘性產生，且能抑制PMN的產生而引起組織發炎。



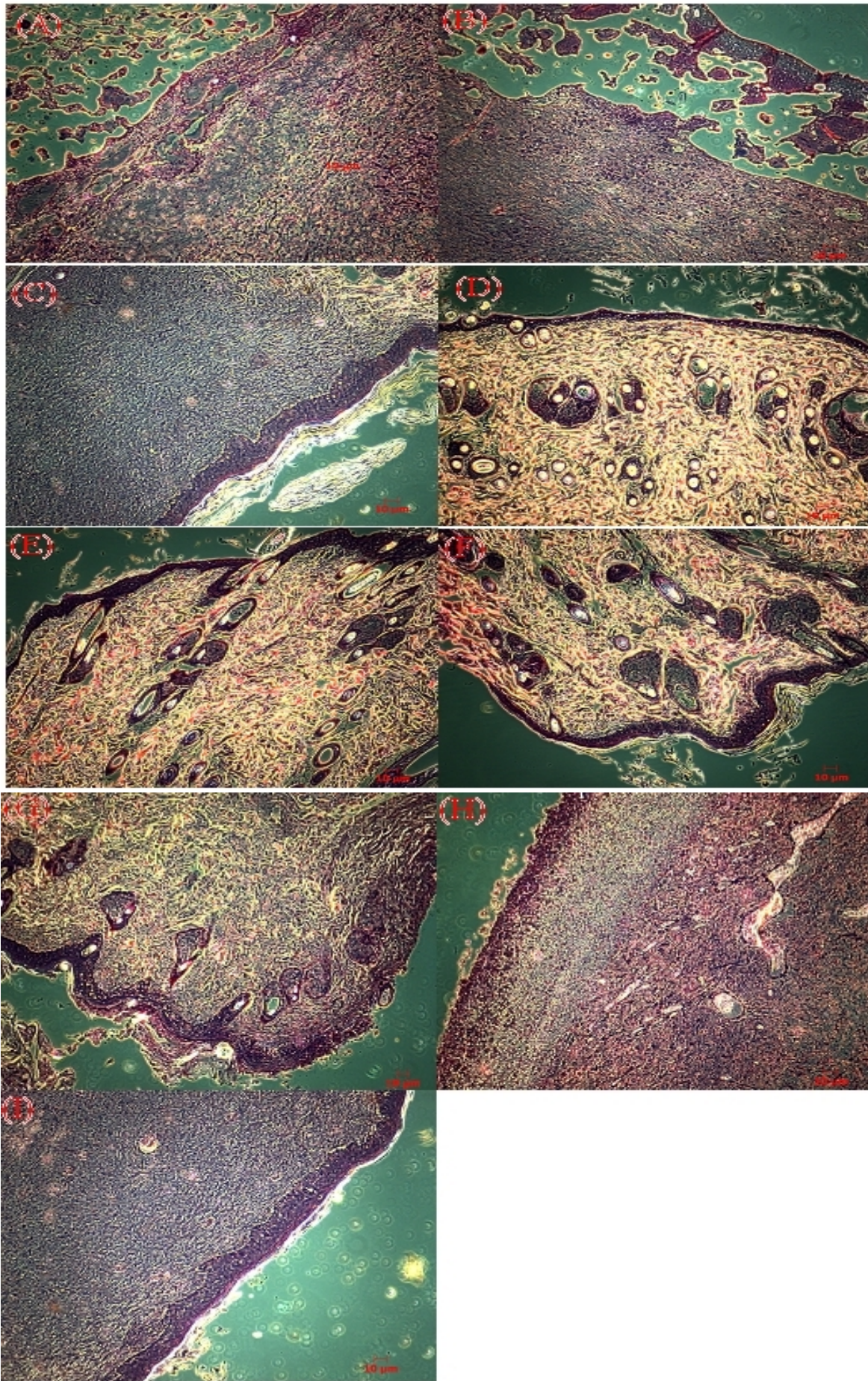


Fig 14 組織切片圖(A)Control 第 5 天(B)GE 膜第 5 天(C)GRE 膜第 5 天(D) Control 第 15 天(E)GE 膜第 15 天(F)GRE 膜第 15 天(G)Control 第 24 天(H)GE 膜第 24 天 (I) GRE 膜第 24 天



## (九) 結論

以FTIR、gel contain、釋放實驗和拉伸測試來判定gellan和迷迭香酸(Ros A)來判斷是否有經EDC作用之下行酯化交聯反應，結果在40%乙醇溶液環境下進行酯化交聯gel contain其含水量最少顯示出交聯程度為最高；FTIR圖中，GRE的氫氧基集團的吸收峰 $3287.5\text{ cm}^{-1}$ 、酯化反應中的碳氧雙鍵(C=O)吸收峰波長 $1720\text{ cm}^{-1}$ ，但是這個波峰只有些微變化，但是也可以證明說，gellan和Ros A經EDC的作用之下有進行酯化反應，以及芳香環上的碳-碳(C-C)的吸收峰波長 $834.9\text{ cm}^{-1}$ ，經酯化交聯反應後有顯著吸收峰的差異存在；而拉伸測試中，雖已70%乙醇溶液下所進行交聯反應的GRE膜拉伸性最佳，而非是40%的乙醇溶液。但以FTIR和gel contain的數值顯示出40%的乙醇溶液進行的交聯程度最高，但拉伸性不如70%的乙醇溶液，可能需要再重新評估交聯反應的條件，已提高gellan和Ros A的交聯程度。而釋放實驗中，GRE和GR的釋放，在第12天以前GR所釋放量遠比於GRE的釋放量還多，第12天以後兩者已無顯著的差異。由釋放圖中得知，GRE膜能穩定的釋放出Ros A，而GR膜快速大量釋放出Ros A，可以間接評估gellan和Ros A是否有進行交聯反應。

NO test和animal model中都顯示出Ros A可以抑制組織的發炎反應，NO test中GRE膜的吸光值雖然和gellan一樣，可能是未將進行交聯反應的Ros A清洗乾淨，融入medium中，而造成吸光值偏高，從數值中了解到，GRE膜的數值有逐漸降低的趨勢，因此，可以評估Ros A能抑制J774經lipopolysacchride誘導之後產生NO的作用。Animal model中，GRE膜不管在組織發炎期、組織修復期還是組織恢復期都對於傷口組織提供良好的修補環境避免組織沾粘性產生，且能抑制PMN的產生而引起組織發炎。