

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 *
* : 以微生物聚醣作為傷口敷料基材之評估 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 陳慧如
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-029-B
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02日

行政院國家科學委員會補助

大專生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : 以微生物聚醣作為傷口敷料基材之評估 *
* 名稱 *

*

執行計畫學生：陳慧如

學生計畫編號：NSC 98-2815-C-040-029-B

研究期間：98年7月1日至99年2月28日止

指導教授：李明偉 老師

計畫書內容：

1. 摘要
2. 研究動機
3. 前言及文獻回顧
 - 3.1 傷口癒合機制
 - 3.2 敷材分類
 - 3.3 生物性材料在創口癒合之特色
 - 3.4 目前作為表皮敷材之生醫材料現況與市售產品之優缺點
4. 微生物聚醣介紹
 - 4.1 微生物聚醣之來源
 - 4.2 微生物聚醣運用在生醫材料之優點
 - 4.3 Gellan gum 來源與結構
 - 4.4 Gellan gum 基本性質
 - 4.5 Gellan gum 作為生醫材料之優點
5. 實驗方法
 - 5.1 研究方法
 - 5.2 Gellan-EDC 之作用機制
 - 5.3 Gellan-Glutaraldehyde 之作用機制
 - 5.4 Gellan-EDC 之紅外線光譜儀之測試
 - 5.5 Gellan-EDC 之拉伸測試
 - 5.6 Gellan-EDC 之 Gel-content、Water-content
 - 5.7 Gellan-EDC 之上皮細胞增生測試
 - 5.8 Gellan-EDC 之 Nitric oxide(NO)抗發炎測試
 - 5.9 Gellan-EDC 之動物表皮貼附測試
6. 實驗結果及討論
7. 結論
8. 參考文獻

1. 摘要

Gellan gum 是微生物所分泌的微生物聚醣，其具有良好的生物相容性及生物可分解性，且因其是由微生物所製造，純化方式單純，不會引發免疫反應，因此以 Gellan 做為基材的敷料是一新型用於皮膚創傷之生醫材料。但因以微生物聚醣類製出的薄膜性質較為脆硬，容易破裂，須以 EDC 及 Glutaraldehyde 等交聯劑交聯，以改變他過於脆硬的性質，以增強膜的機械強度及柔韌度。因此本研究即以 Gellan 為創傷敷料為基材，再以交聯劑交聯改質後，分別進行動物體內、外之評估。

體外研究方面，以紅外線光譜儀測定確定交聯劑有交聯反應，在 1720nm 處出現波峰，為 C=O 官能基之變化。以拉伸測試交聯後其機械強度於交聯劑條件在 40~60% 酒精下交聯有明顯增強，能符合我們所希望的改變其脆硬、容易破裂的性質。測試含膠量及含水量，發現含膠量測試中，以 40~60% 酒精作為交聯劑溶液之條件下，含膠量達最高。最後是 NO 毒性測試，發現 Gellan 在第一天時有抑制發炎的效果，但隨時間增加，此效果會漸漸退去；而文獻中指出，交聯劑 EDC 於高濃度下具細胞毒性，Gellan-EDC 在 NO 毒性測試中也出現 NO stress，與文獻吻合。

生物體內評估，是設計在開放性傷口的狀況下，以產品、Gellan 及 Gellan-EDC 覆蓋於大鼠傷口上，做傷口的組織切片，發現在第 24 天後傷口恢復情形良好，發炎現象逐漸趨緩，也無組織空洞化之情形。

以上之基本研究是確信 Gellan 作為新型生物性敷傷材料的第一步，還需很多後續的研究去增加其特性，如可以添加一些抗發炎的材質在 Gellan 中，可以使其作為生物性敷傷材料的優點更多，更加完美。

2. 研究動機

現今用於深度皮膚受傷如燒燙傷的救治所使用的方法其實並不完善，尤其是對大面積燒傷的病患，因傷口面積太大，不可選用一般敷材治療，救治方式還是用傳統的 Wound Dressing，也就是用塗抹抗生素等軟膏的方式做到殺菌的效果，但病人的傷口復原力及存活率是不高的。在一般人工敷料像是植皮方面，且有保存時間短、具潛在免疫反應、容易污染等等的缺點。而目前市面上所販售的人工敷料，如 Integra[10、11]、Apligraf[12、13]等，這樣的產品除了製程本身繁雜程度極高之外，加上製作成本十分昂貴，造成病人使用時必須付出高額的代價，因此臨床實用性的評估並不理想。而且大多數材都是不可降解，在換藥時會有把新生肉芽組織拔起、或可能造成積液的缺點。

為了改進以上人工敷料的缺點，我們開發出一種具生物相容性、生物可分解性、可自行降解的新型敷料：Gellan film，他是一種由微生物分泌的微生物聚醣，具有良好的生物相容性，不會像由異體植皮或動物提煉出的材料容易引發人體免疫反應、或傳染疾病問題，或是像目前市面上的人工敷料會有積液的問題，也因其具有生物可分解性，所以不會有因換藥而把新生肉芽組織拔起的問題。且品質不會受到原物料優劣而發生變化，其製造、純化方式並不困難，很適合開發成新興

的生醫材料。而其性質和已開發成多種生醫材料產品的透明質酸有一定的相似之處。

而 Gellan 和一般微生物聚醣一樣，做成薄膜後性質較脆硬，延展性不佳，需加入交聯劑來增加本身的機械強度，且可增加其柔韌度，更可延長材料使用在人體的壽命。[14, 15]

3.前言及文獻回顧

3.1 傷口癒合機制[1][2]

傷口發生時，首先凝血機制會被啟動來控制出血情況，包括血管收縮、血小板凝集、纖維蛋白沉積，促成血塊形成，接下來進行一連串的傷口修復反應，而其實傷口癒合是一種動態並且有許多因素交互作用，包括血球細胞、細胞外基質、實質細胞、調控因子。一般傷口癒合分為四個時期：

一、止血發炎期(hemostasis and inflammation phase)受傷後，由於血管內皮受到傷害，而誘發凝血機制，所產生的纖維蛋白(fibrin)和血球細胞，會在受傷處上方交錯形成血塊(fibrin clot)，一方面避免體液繼續滲出，另一方面則保護傷口不再曝露於外界環境中。此時，嗜中性白血球(neutrophil)和巨噬細胞(macrophage)，會受到血塊釋放的一些生長因子和感染物吸引而聚集，進行清除受傷組織細胞及吞噬感染物的工作，同時分泌生長因子，誘導周圍血管進行血管新生作用(neovascularization)。

二、纖維增生期(fibroplasia phase)受傷後第四天到第十二天，血球分泌的因子，會吸引纖維母細胞(fibroblast)向傷口處移動，並進行增生及分泌細胞外基質，形成暫時性的結締組織，稱為粒狀組織(granulation tissue)，而表皮內層的角質細胞(keratinocyte)會沿著傷口邊緣移動，進行所謂的上皮新生(reepithelization)。

三、收縮合成期(contraction and synthetic phase)受傷後第四天起，傷口的纖維母細胞，受到生長因子的影響，特別是 TGF- β 1，轉型為肌纖維母細胞(myofibroblast)，大量表現 a-actin 收縮傷口，達到減少傷口面積的目的，受傷約十天後，膠原蛋白纖維並大量合成及沈積在傷口處。

四、傷口重建期(remodeling phase)受傷後第四星期開始一直到約六個月，膠原蛋白纖維重新排列，無法與正常皮膚呈現相同排列狀態的膠原蛋白，形成疤痕(scar)組織，疤痕組織會重塑，使外形及機能接近原先之正常組織。有時，有些傷口在癒合的過程中，會有不正常的修復情形，如疤痕肥厚(hypertrophic scar)及疤痕腫瘤(keloid)的發生。疤痕肥厚的情形，有時可以透氣膠帶覆蓋於傷口上，使產生壓力而避免之。不過，疤痕腫瘤屬於個人體質性的問題，有此體質的人一旦受傷，在修復過程就會產生疤痕腫瘤，而常無法預防。

3.2 敷材分類

目前用來解決深度皮膚受傷的方法：

1. 使用自體移植，是指當皮膚受傷而以其他部分的皮膚組織，運用手術的方式移植到受損的部位，這種方法有相當好的療效，但捐出的位置仍會留疤，且可供值得組織有限。
2. 異體移植，將他人的皮膚移植到受損的位置，但易有免疫反應。

3. 異種移植，取其他動物的皮膚組織，但常會引發免疫反應而移植失敗，有時也會有疾病傳染問題。4. 以自身的細胞用體外培養方式做出表皮組織，培養時間需2~3週，且尚無法以體外方式培養真皮組織，此方法耗時且成功率不高。5. 生物性材料部分：如膠原蛋白、明膠、矽膠或是PE薄膜等複合性材料。近年來在生物醫學領域對於具生物活性、生物可降解性、生物可吸收性材料、無細胞毒性之材料用在主要基材上，故都選用膠原蛋白、明膠、幾丁聚醣、海藻醣等，以上材料尤其是用以微生物製成的如微生物聚醣或是交原蛋白，作為未來開發新式敷料的主要成分，功能主要在促進傷口加速痊癒、無痛治療。而我們開發的Gellan就是屬於微生物聚醣材料這一類，是有別於其他類別的方式，對傷口癒合的效力較高，受到其他不必要的感染或污染的機會降低，所以這是一種值得開發的新型敷料。

3.3 生物性材料在傷口癒合之特色

生物性材料製成的敷料因具有良好的貼合性及保水性，能使傷口迅速恢復防水蒸氣蒸發的障壁和防止脫水的功能，也能減少水蒸氣散失所造成的熱損失。可管理傷口分泌物，減少蛋白質和電解質的流失。不用因換藥而把新興肉芽組織拔起，而可促進傷口癒合速度，提供一個適合癒合的封閉環境，濕、溫、偏酸，提供有利於細胞的移動與增生的基地。減少疼痛且與外界隔絕，避免細菌感染傷口引發敗血症。在癒合最後的傷口收縮及細胞外基質重整時能改進癒合品質，防止造成纖維細胞過度增生，及減少收縮，使傷口較為平整。

生物性材料中的微生物聚醣材料更以取得容易、來源穩定；較不會因原物料品質不穩定而影響到材料性質；造過程容易掌控；有良好的生物相容性，所以作為敷料不會引發免疫反應；受到汙染的機會小，而優於其他由各種生物體中所提煉出的生物性材料。

3.4 目前作為表皮敷材之生醫材料現況與市售產品之優缺點

國外對於創傷敷料研發歷史較久，例舉已商品化的人工皮膚有以下幾種等等：Aligraf™: Organogenesis (MA, U.S.A.)所生產的 Apligraf™為目前美國 FDA 唯一核准用來治療糖尿病所引起的潰瘍及靜脈潰瘍的人工皮膚替代品(Human Skin Equivalent, HSE)。二層的人工皮膚，其做法是先將人類真皮纖維母細胞種植在 type I 牛膠原蛋白基質中，6 天後，細胞成長並分泌細胞外間質，形成類似真皮層的組織，再將來自人類新生兒包皮的角質細胞種植上去，讓角質細胞附著在真皮上，讓角質細胞開始分裂分化並形成表皮層，再將此雙層人工皮膚撕下，繼續培養在空氣及培養基的界面(air-liquid interface)，誘導表皮層更加成熟，最後再包裝運送。其優點是癒合後表皮細胞仍舊由患者本身細胞所取代，但病人不須再承受傷口癒合撕裂的痛苦，可以一次完成表皮和真皮層的重建。但製造程序複雜，很難拿捏並具易碎性，且容易被降解，更由於含有異體細胞，有病毒傳入及產生免疫反應的危險性。且保存期限只有 5 天。

Intergra™(Intergra Life Science Corp.): 美國 FDA 在 1996 年已核准 Intergra™使用在燒燙傷治療，這種膜對蒸氣和細菌具有暫時性屏障作用，也是真皮再生的保

護性材料。Intergra™具有一些孔洞可讓纖維母細胞、淋巴球及血小板生成，防止水分蒸散、真皮層能與傷口結合等優點。可用於防止癥痕攣縮，促進新生真皮形成。已在單個和多個中心試驗獲得成功。在燒傷治療中發揮了重要作用。但是它有發生皮下積膿的可能，且在移除敷料時會將部分已成長的肉芽組織拔起，所以仍具有改善的空間。

Epicel™:Genzyme Tissue Repair Corp (MA, U.S.A.)的產品，將病人本身的角質細胞在實驗室中放大培養，在移植後不具有免疫排斥的問題。其大部分用在大面積燒燙傷的病人，每 50 平方公分大小的人工表皮價格高達美金 790 元，平均每一位病人使用到 100 張人工表皮，價格十分昂貴。

以上這些已上市的人工敷料，不是臨床效果不盡完美，就是價格十分昂貴，一般民眾無法使用，都存在著極大的改善空間。所以我們以微生物聚醣作為開發重點，利用其良好的生物相容性及可降解性，再加上價格便宜，製作出新型的人工敷材。

4. 微生物聚醣介紹

4.1 微生物聚醣之來源

細菌包外聚合物(extracellular polymeric substance EPS)主要來源於細菌分泌、細菌表面物質脫落、細菌溶解以及對周圍環境物質的吸附。抑或是由真菌發酵而來。EPS 是由莢膜、年亦層及其他表面物質組成，其有機部份包括多醣、蛋白質、核酸、磷脂、褐藻酸、腐質酸等。主要是多醣和蛋白質；其無機部份約佔總量的 10%-20%[3]

4.2 微生物聚醣運用在生醫材料之優點

運用微生物製成高分子材料具特性穩定、品質高，可滿足醫藥應用上的要求。此種生產方法具污染性低、產品價值高、不會出現像是從動物提煉出而有免疫反應，且品質不會受到原物料優劣而發生變化，且其發酵、純化的步驟都不至於太複雜，頗適合現今環保意是高漲的社會發展生技產業。

以透明質酸(HA)為例:HA 也可由微生物發酵來取得，已廣泛運用於生醫材料上，因 HA 具有生物可吸收性、生物相容性、黏稠性、保水性以及抗沾粘性，所以應用範圍很廣，舉凡心臟血管外科、關節炎、外科手術房沾黏劑、眼科、整形外科及獸醫等。所以我們開發新的微生物聚醣 Gellan，是因其性質和 HA 在醫學上的應用有相似之處。

4.3 Gellan gum 來源

Gellan gum 也是一種細菌的胞外多醣(EPS)分泌物，中文稱作結冷膠或結蘭膠，英文又稱作 polysaccharide S-60 [5]，它是取自於一種非病原性的菌株 -*Sphingomonas elodea* ATCC 31461 所分泌的膠體。*S. elodea* 是一種帶有 1 根鞭毛的需氧菌，呈現桿狀。在專用的培養基(defined medium)上(以葡萄糖為碳源，硝酸銨為氮源)，會形成圓形、黃色並帶有黏液狀的菌落[6]。

工業上利用發酵的製程，來大量取得 Gellan gum。Fig. 1 所表示的是實驗室規模的 Gellan gum 製程，首先將 *S. elodea* ATCC 31461 利用固態培養基進行培養及保

存，再將菌株利用肉湯來進行大量的增殖與發酵。接著加入 isopropyl alcohol 進行酒精沉澱以取得多醣，最後再利用冷凍乾燥以取得 Gellan gum 的粉末。

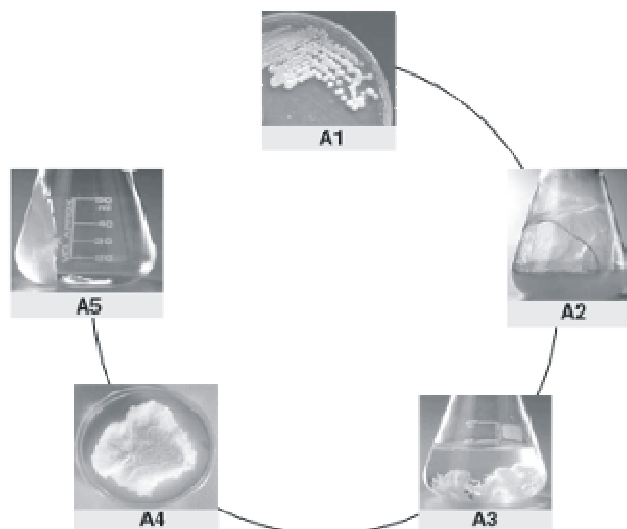


Fig. 1：典型的 Gellan gum 發酵流程及實驗室純化[7]。A1：*S. elodea* ATCC 31461 於固態培養基上的形態；A2：經過 72 小時的肉湯培養；A3：Gellan gum 以 isopropyl alcohol 進行酒精沉澱；A4：冷凍乾燥；A5：Gellan gum。

4.4 Gellan gum 基本性質

Gellan gum 粉末呈朱黃色、無特殊味道。分子量為 5×10^5 ，單體結構為 β -D-1,3-glucose, β -D-1,4-glucuronic acid, β -D-1,4-glucose, 和 α -L-1,4-rhamnose。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^+)作用，這些陽離子導致聚合物分子結合並形成凝膠。裂解溫度約 $150^\circ C$ ，當濃度大於 0.05% 也可形成澄清透明的凝膠，通常的用量為 0.1%~0.3%。Gellan gum 不溶解於非極性有機溶劑也不溶於冷水，須加熱至 $85^\circ C$ 才可以溶解成透明溶液，冷卻後因氫鍵作用分子以螺旋片段形成透明的凝膠。Gellan gum 形成的凝膠是熱可逆性凝膠，一般凝膠溫度在 $20-50^\circ C$ 之間，膠溶溫度在 $65-120^\circ C$ 之間。Gellan gum 凝膠一般在 pH 4-10 之間較穩定，但以 pH 4-7 條件下性能最好。壓力對凝膠的形成亦有影響，日本的 Michiko Fuchigami[8]發現，在 0.1-686 MPa 及 $-20^\circ C$ 條件下，隨著加壓凝膠會產生凍結，然而在 200-500 MPa 壓力範圍內，Gellan gum 卻不會產生凍結。而當壓力釋放後在相同的溫度條件下卻發生凍結，此現象稱之為變壓凍結現象。

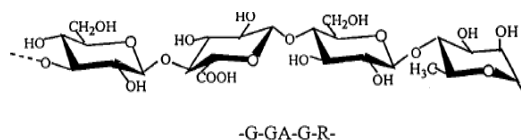


Fig. 2(G= β -D-1,3-glucose, GA= β -D-1,4-glucuronic acid, R= α -L-1,4-rhamnose)

市售的 Gellan gum 大多經過去乙酰化處理，Gellan gum 主鏈上的乙酰基含量會影響其流變性質。經過化學 deacylate 處理的 Gellan gum 會由原先柔軟具有彈性

的熱還原膠體，在凝膠的情形會變得較硬且脆。

4.5 Gellan gum 作為生醫材料之優點

Gellan gum 作為新型生醫材料具有以下之優點：

1. Gellan gum 是通過美國 FDA 及歐盟認可的材料，可以應用在食品及藥品，當作凝膠、穩定劑及分散劑來使用。
2. Gellan gum 是一種多醣，其生物相容性及可降解性是生醫材料必備的優點(不過尚未有相關 paper 提出完整的數據)。
3. 與其他的多醣做比較，Gellan gum 有許多的優點，包括對熱及酸較穩定、可以調整的彈性及堅硬度、高透光度等。因此可依據應用上的需求進行材料型態上的變化。
4. Gellan gum 是由微生物發酵而來，不論是發酵流程或是純化步驟都不至於太複雜，將來很適合做產業開發，目前國內則尚未有相關業界進行研究。
5. Gellan gum 是已經商品化的材料(食品添加劑)，因此取得上也較容易。市售的 Gellan gum 商品有各種乙醯基含量產品，如 Phytigel™、Gelrite®、Kelcogel® F 及 Kelcogel® LT100 等[9]。因此在研究進行時，可依照需求的不同進行採購。
6. Gellan 製成薄膜後透明度佳，作為敷材可直接觀察到傷口狀況，隨時監控傷口癒合的情形。

5. 實驗方法

5.1 研究方法

因 Gellan film 的性質較為硬脆，所以以交聯的方式增加 Gellan 薄膜的柔軟度及延展性，增加其機械性質。目前交聯劑交聯的方式可分為 2 種，一種是直接與材料上的自由胺基形成穩固的交聯(crosslinking)鍵結，如 Glutaraldehyde、genipin 等等，另一種則是交聯劑先活化材料上的酸基，再與另一自由胺基形成鍵結，如 carbodiimide。[16,17]

5.2 Gellan film 製備

去酯化 Gellan 0.6g 溶入 60c.c D.D water，加熱 90°C 至完全溶解，呈透明為膠狀液體，調 pH 值至 pH6.4，離心 3000rpm，10min，將其雜質離掉，倒入直徑 15cm 玻璃培養皿中，烘乾，脫膜，Gellan film 即製作完成。

5.3 Gellan-Glutaraldehyde 之作用機制[16]

目前 Glutaraldehyde 是比較常見之交聯劑，是因 Glutaraldehyde 直接與 Gellan 上的 OH 基和 COOH 基結合上，形成穩定的連結。而在 Glutaraldehyde 常用在與膠原蛋白等交聯，其機制則是透過其鍵上的醛基(CHO)與膠原蛋白上的氨基形成共價鍵，構成分子間交聯，從而保持分子的穩定性。但在近年的文獻指出，以 Glutaraldehyde 作為交聯劑雖交聯效果強且穩定，常用來做交聯是否成功之比較組，但相對的毒性也十分高，所以經多方考量後，我們選用 EDC 來做為理想交聯劑。

5.4 Gellan-EDC 之作用機制[16]

交聯劑 carbodiimide，[1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide](EDC)是個催化劑，他催化 Gellan 上的 OH 基團和 COOH 基團進行結合形成脂鍵。 EDC 常被使用於 peptide synthesis protein 的結合與其複合物的生成及修飾膠原蛋白，其機制是先活化材料上的酸基，再與另一自由胺基形成肽鍵。文獻中指出 EDC 交聯在濃度高時(>50Mn)下會具有細胞毒性，而在 15Mn 以下之細胞毒性較低。所以我們以 15Mn 為基準，再以霍氏紅外線光譜儀鑑定分析是否有成功交聯。

交聯方式:將交聯劑(EDC)以 20%~100%酒精為溶劑泡成濃度 15mM 的交聯試劑，將製好的 Gellan film 泡入，交聯反應 24 小時，再用酒精脫去殘餘交聯劑，交聯即完成。

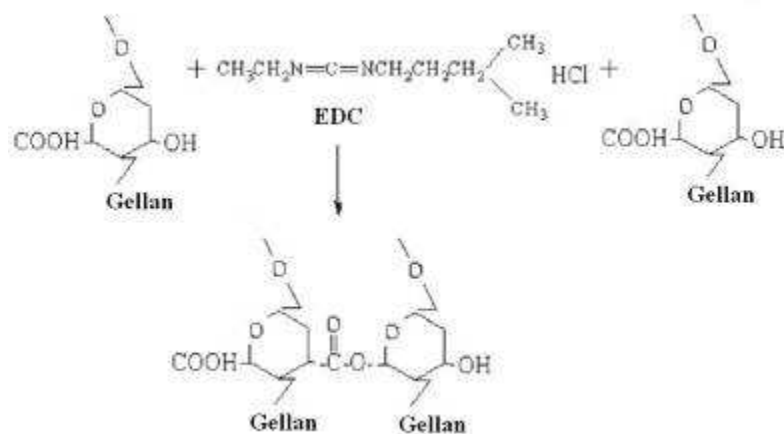


Fig.3 以 EDC 交聯 Gellan gum 之反應機制。

5.5 Gellan-EDC 之紅外線光譜儀之測試

IR 是用來鑑定有機化合物得一種工具，是研究化學分子或化學物種因為吸收或發射紅外線輻射，而在某些震動的模式下產生波動，藉助於紅外線光譜的分析使化合物的結構及含量可以測定。

依震動又可分為：

特徵頻率區(4000~1300cm⁻¹) 其可顯現分子的一些官能基的吸收頻率。

指紋區(1300cm⁻¹以下)可顯現分子結構的細微差異。

由此可以比對 Gella-EDC 和 Gellan-Glutaraldehyde 在分子結構及官能基的差異。

5.6 Gellan-EDC 之拉伸測試

由於 Gellan film 是要作為表皮貼附之用，所以需要有一定的彈性及柔軟度，且想要知道交聯過後其機械強度是否有增強，所以要測試其可拉伸的程度。

Flory 所提出的橡膠彈性理論是描述水膠剪力和應力之間的關係。彈性模數(G)可利用壓縮或拉長的方式測量其剪應力變化而計算。

根據向交談性理論，高分子網路在施家外力拉伸下，其剪力和應力具一平衡關係。在一範圍內的形變，假設形變時改變體積為一定，則剪應力的相對關係如下：

$$F/A = -G(\lambda - \lambda^{-2})$$

F:施以形變的力

A:受力面積

G:彈性模數

λ :L/Lo(L和Lo分別為水膠受力形變後及原本長度)

5.7 Gellan-EDC 之 Gel-content、Water-content

要了解 Gellan film 的含水量及含膠量，及測試是否交聯成功，所以需做此實驗：

膜含水量測試(water content):將 Gellan 及 Gellan-EDC 薄膜裁成 1cmX2cm 大小， $n>5$ ，置入烘箱內乾燥，待膜重量不再改變秤得乾重 W_d 。將膜浸在 PBS 中，於室溫 24hr 後取出，將膜以濾紙吸乾膜表面水分後再秤重，秤得濕重 W_w 。

$$\text{含水量(water content)} = \frac{W_w - W_d}{W_w} \times 100\%$$

膜含膠量測試

將膜裁成 2X2 大小，置入烘箱內乾燥，待膜重量不再改變秤得重量為 W_a 。在浸泡生理食鹽水 24hr，取出秤重 W_b 。

$$\text{含膠量(gel content)} = \frac{W_a}{W_b} \times 100\%$$

5.8 Gellan-EDC 之 Nitric oxide(NO)抗發炎測試

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 L-citrullin 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 Lipopolysaccharde (LPS)進行誘導。方法是將 gellan 膜、Gellan-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 NO_2^- ，將反應後 H-DMEM 先與 1% sulfanilamide 作用將 H-DMEM 中的 NO_2^- 偶氮化，接著和 0.1% α -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。

5.9 Gellan-EDC 之動物表皮貼附測試

以動物實驗證明 Gellan 膜的生物相容性、生物可分解性、是否真正能作為敷傷材料及傷口癒合的實際情形。從樂斯科公司購入 300g 的 rat(品種：SD) 將製好的 Gellan-EDC 及 control 組 Gellan 膜裁成 2X2cm，置於 75%酒精中 24 小時滅菌，後移植入老鼠表面共 15 隻，在 5，15，24 天觀察老鼠傷口發炎情況及傷口癒合情況的改變，並畫下傷口癒合情況以利於比較各個時間點的差異。

6. 實驗結果

去酯化 Gellan 0.6g 溶入 60c.c D.D water，加熱 90°C 至完全溶解，呈透明、膠狀液體，調 pH 值至 pH6.4，離心 3000rpm，10min，將其雜質離掉，倒入直徑 15cm

玻璃培養皿中，烘乾，脫膜，Gellan film 即製作完成。

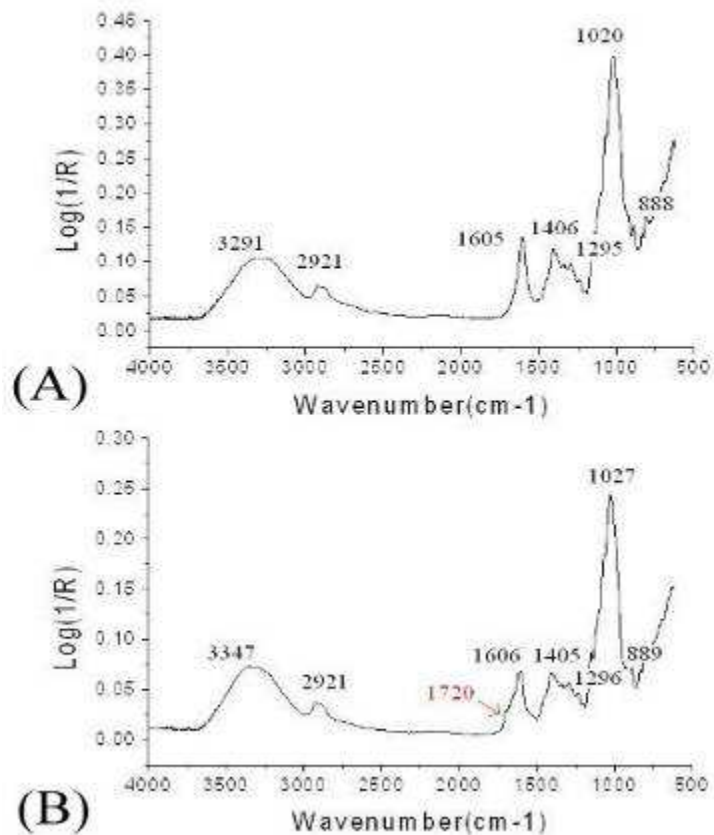
如 Fig 4.，為直徑 15cm、透明度佳，完整的 Gellan film。



Fig. 4 Gellan film, 直徑 15cm.

比較 Gellan gum 和 Gellan-EDC 交聯這 2 組的霍氏紅外線光譜儀之圖形後可發現，這 2 組的圖形類似，但 Gellan-EDC 的圖形在吸收頻率 1720 時有些微變化，出現一個小波峰，經對照分子結構式後得知，此波峰是交聯成功後所顯出的差異。是為分子上 C-O 官能基結構的變化。

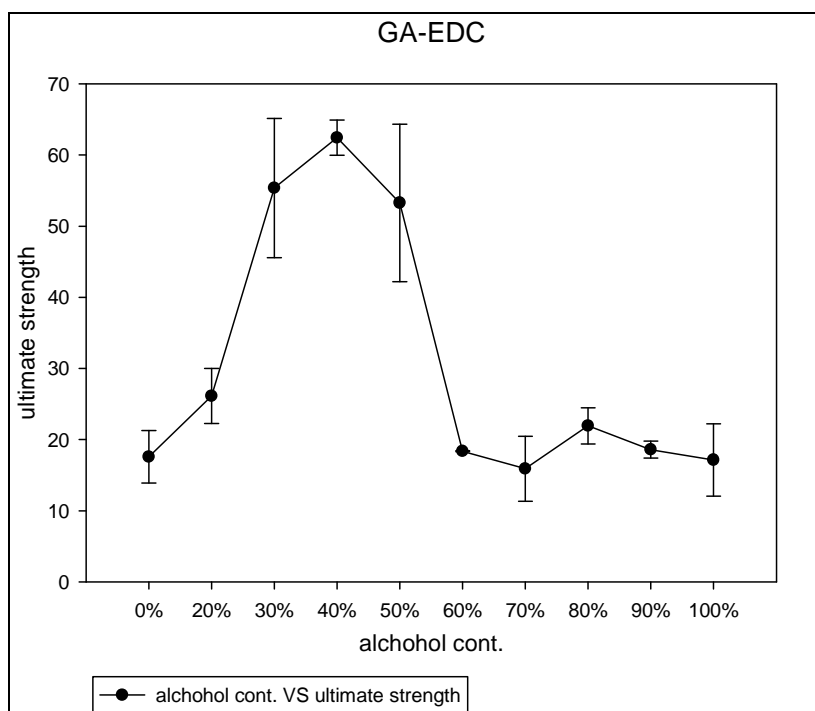
以往都把 Glutaraldehyde 當作交聯劑，原因是他交聯力非常強，形成的交聯程度高，但許多文獻[17][18]指出 Glutaraldehyde 的細胞毒性太強，不適合用於植入體內，所以我們只把它當作一種交聯成功與否的指標，不做進一步的生物測試。



霍氏紅外線光譜儀:Gellan gum 薄膜(A)和 Gellan-EDC 薄膜(B)

以拉伸試驗測試相同莫耳濃度，以 20%~100%的酒精為 EDC 交聯溶液下之

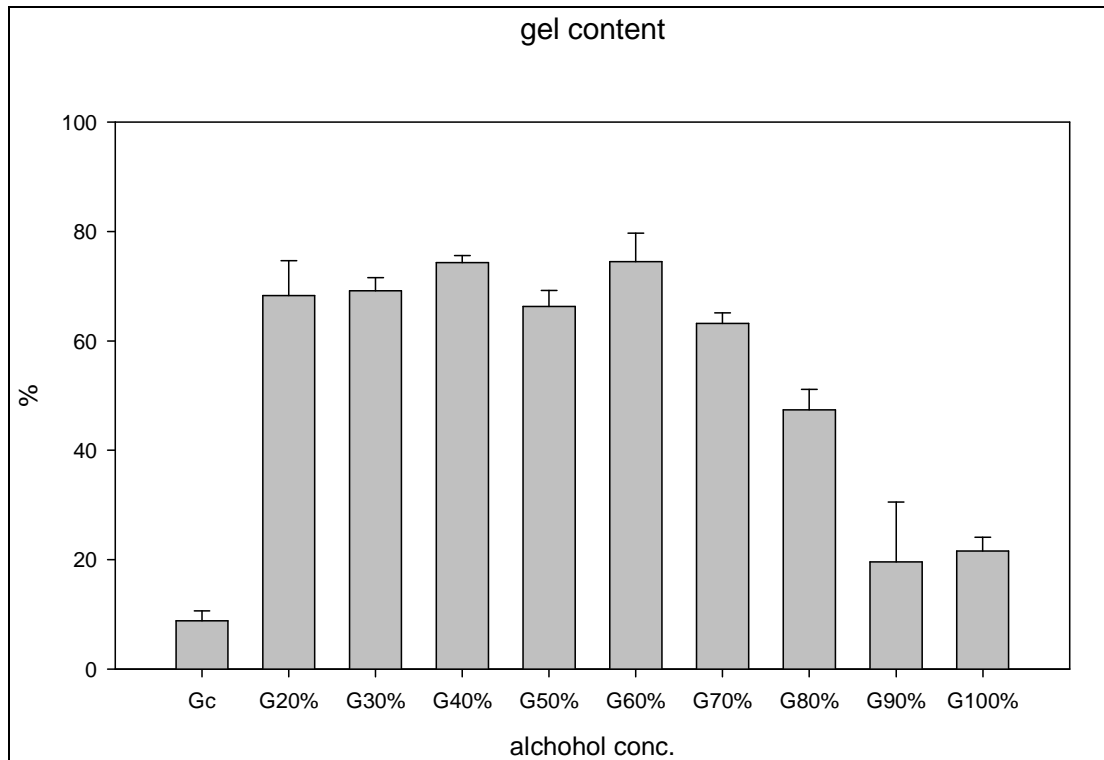
Gellan 膜的機械強度，一般而言，交聯程度越高者，其機械強度越強，還有膜的厚薄度也是影響機械強度的原因，膜越厚，機械強度越強。我們以不同酒精濃度作為交聯劑溶液所製出一系列之 Gellan-EDC 薄膜作拉伸測試的結果顯出，在 40%~60%時薄膜能承受之機械強度最強，整個趨勢成一波峰狀，由 20%最弱，至 40%~60%時為機械強度最強，至 90%~100%時強度又降下來。由圖形可清楚發現，在 40%~60%酒精為交聯劑溶液條件時機械強度達最高，膜的強韌度最佳。



拉伸測試，0%為無 EDC 交聯

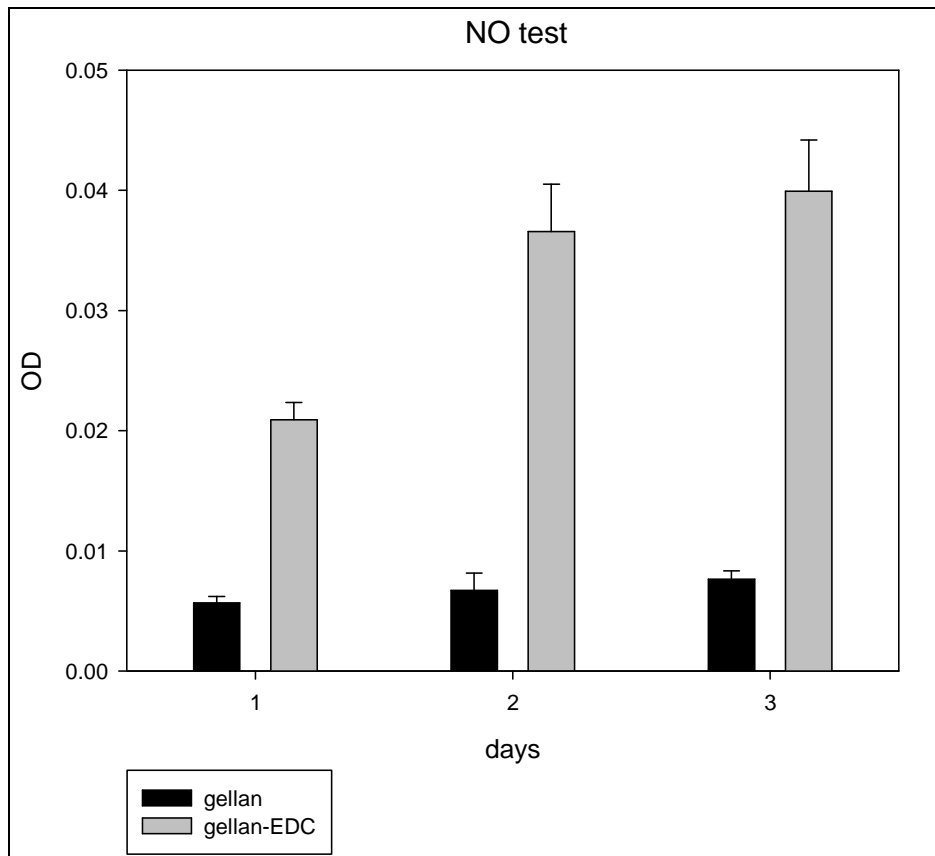
在 Gellan 膜的體外測試中，water content 測試有實行上的困難，water content 的目的在測試膜的含水量，以理論推之，交聯程度越高者，越不容易被水解其含水量應會越低，對照其他體外測試之結果，Gellan 在 water content 中在 EDC 交聯劑以 40%~60%酒精當溶液下所配成的交聯試劑含水量會達最低，但因為 Gellan 的重量太輕，在濕膜秤重時的誤差太大；再加上交聯不完全的膜以水浸潤時容易碎裂，更增加秤重的難度。以上幾點對 water content 的準確度及可信度造成極大的威脅，由此我們決定 water content 的值不可信賴，只有 Gel content 可採用。

Gel content 是以測試膜的含膠量，以含膠量程度來判定於相同莫耳濃度之 EDC 作為 Gellan 交聯劑之交聯程度，含膠量越高，代表膠體於水中水解程度越低，交聯越顯成功，我們已各以 20%~100%的酒精為 EDC 之溶液作交聯劑，來測試交聯效果。在 Gellan 膜的部分，因沒經過交聯，所以浸泡水之後出現斷裂及破碎的現象；而以不同酒精濃度做 EDC 交聯之 Gellan 膜中，我們發現含膠量程度是成一個波峰，由 20%酒精作為交聯溶液時為含膠量低點，往上升，在 40%~60%達含膠量最高，再降下來，至 90%~100%為低點，代表其交聯程度於 40%~60%時最佳。



Gel content

. NO 毒性測試中，以細胞產生 NO 而引起發炎反應，測試 gellan 本身和 EDC 交聯後的 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。文獻中[19]記載之 EDC 交聯濃度大於 50mM 出現明顯之細胞毒性，但是在 5~10mM 之間是可接受之交聯範圍。以 15mM EDC 交聯過後之 Gellan-EDC 膜雖出現 NO stress，於圖型中相較於沒交聯的 Gellan 膜，有明顯的差異，但因交聯濃度為 15mM，尚在可容許範圍內，加上參照動物實驗大鼠表皮貼附測試之結果，發現在 5 天、15 天及 24 天的測試中，只有在 5 天時有明顯之發炎反應，但比照對照組來看是無差異的，視為正常發炎現象，在 15 天及 24 天的測試中，發現 Gellan-EDC 有良好的生物相容性，並無嚴重發炎現象，所以可以證明 15mM EDC 交聯過後的膜雖在 NO 毒性測試中出現 NO stress，但對生物相容性來說是沒有影響的。

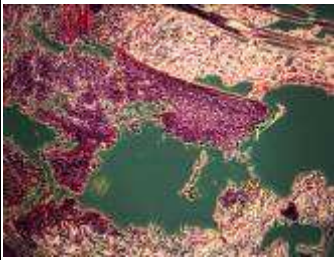
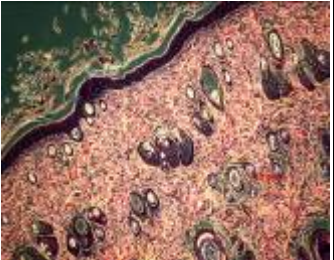









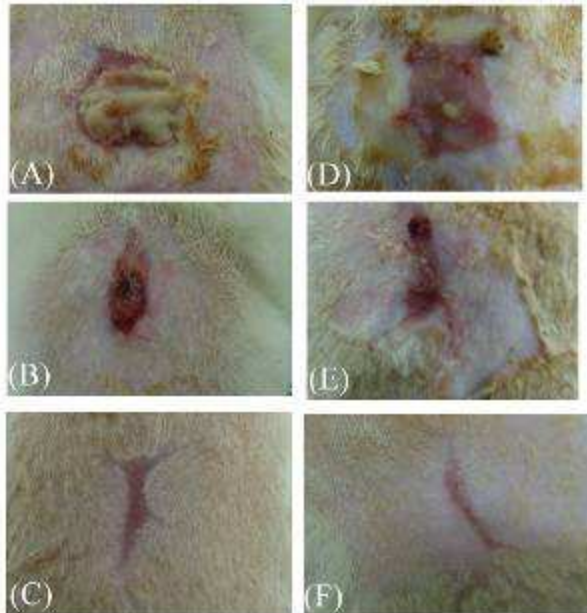
NO toxic test

綜觀物理性體外測試，發現結果成一致性指出以 40%~60%酒精作為 EDC 交聯劑容易之交聯劑做出的 Gellan-EDC 膜期交聯程度最佳。Gellan 以 EDC 改質後，不再有 Gellan 膜脆性高、容易碎裂之缺點，Gellan-EDC 強韌度提升，是作為敷傷材料之一大優點。

動物表皮貼附實驗分別做 5、15、24 天之測試，分別有:HA(透明質酸)作為 Control 組、Gellan、Gellan-EDC 三組，可看出各組在第 5 天時都有出現微量之發炎反應，可看見發炎細胞及白血球；第 15 天時各組之發炎程度減緩，傷口微血管生成，恢復狀況良好，Gellan-EDC 膜也無出現細胞毒性之排斥問題；至第 24 天，傷口恢復完整，表皮、真皮層界線分明，無發炎、皮層空洞化現象，代表恢復程度十分良好，並無排斥及生物相容性之問題。

大鼠表皮貼附實驗

	Control(HA film)	Gellan	Gellam-EDC
5 Days			
15 Days			
24 Days			



2x2 cm² 表皮傷口貼附試驗 對照組5天(A),15天(B)及 24 天(C)
GG-EDC膜 5天(D),15天(E)和24 天(F).

7. 結論

以微生物聚醣 Gellan 作為生醫材料是為一新型材料之開發，目前討論的文獻並不多，我們已 IR 圖形來確定交聯劑是否有交聯成功後，做了一系列體外測定，是為了找出最適當的交聯程度：以拉伸、Gel content 可看出，在以 40%~60%酒精為 EDC 交聯劑之溶液是最佳交聯劑條件，製出的 Gellan-EDC 膜強度最強，含膠量也最高，再以 NO 毒性試驗去測試其產生之細胞毒性，結果 EDC 於 15mM 交聯濃度下製出的膜雖有產生 NO stress，但其毒性仍在可接受範圍內。於動物實驗之表皮貼附測試中可看出，Gellan 及 Gellan-EDC 之膜作表皮貼附，於 24 天後之恢復情況良好，無生物相容性及發炎狀況之問題。

這一系列的實驗是為了確定 Gellan 以 EDC 交聯後所製成的膜是否可以作為敷傷材料的基礎研究，結果顯出，Gellan 作為敷傷材料之基材是可行的，但可以再做進一步的改質，可以添加其他如抗發炎等等的物質在 Gellan 中，看是否能再降低 EDC 交聯所產生的細胞毒性。

8. 參考文獻

- [1] Singer, Adam J. Clark, Richard A.F Massachusetts Medical Society Volume.1999; 341(10)2:p738746.
- [2] Richard A.F Clark, MD Basic of Cutaneous wound repair J Dermatol Surg Oncol.1993; 10:693-706.
- [3] Zhan X Q. Biofilm extracellular polymeric substances: methodology development, spatial distribution and property investigation. r. Int., B. 2000; 61 (1):461.
- [4]Wilén B M , Jin B , Lant P. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties [J].Wat Res . 2003; 37:2127-2139.
- [5]Kenneth S. Kang, George T. Colegrove, George T. Veeder. Deacetylated polysaccharide S-60. US patent 4326052.
- [6]Kenneth S. Kang, George T. Veeder. Polysaccharide S-60 and bacterial fermentation process for its preparation. US patent 4326053.
- [7]Fialho,A.M.,et al., Occurrence,production, and applications of gellan:current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 79(6):889-900.
- [8]Michiko Fuchigami. Ai Teramoto. Texture and structure of high-pressure-frozen gellan gum gel. Food Hydrocolloids. 2003;65(2):895-899.
- [9]Fialho, A. M.,et al., Occurrence, production , and applications of gellan :current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;79(6):889-900.
- [10]Lam, P.K. and E.S. Chan, Integra and cultured epithelium. J Bum Care Rehabil.2001;22(2):p.197-8.
- [11]Pandya, A.N., B. Woodward , and N. Parkhouse. The use of cultured autologous keratinocytes with integra in the resurfacing of acute burns. Plast Reconstr Surg, 1998;102(3):825-8..
- [12]Trent, J.F. and R.S. Kirsner, Tissue engineered Skin: Apligraf, a bi-layered living

akin equivalent. *Int J Pract.* 1998;52(6):p.408-13.

[13]Eaglstain, W.H. and V.Falanga, Tissue engineered and the development of Apligraf, a human skin equivalent.*Cutis.*1998;62(1 Suppl):p.1-8.

[14]Murayama, Y., Satoh, S., Oka, T. Imanishi. J., and Noishiki, Y., Reduction of the antigenicity and immunogenicity of xenografts by a new cross-linking reagent, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organ.*1988; 34: 546549.

[15]Nimni, M. E., Cheung, D., Strates, B., Odama, M. K., Sheikh, K., Bioprosthesis derived from cross-linked and chemically modified collagenous tissue, Nimni, M.E.ed. collagen, *Biotechnology.* Florida, CRC Press, Inc. 1988 ; 3:1-37.

[16]馬純媛，以 Genipin 或 Carbodiimide 交聯生物組織材料的交聯結構與交聯性質探討，國立中央大學化學工程研究所碩士論文。

[17] Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 1980;14(6):753 – 64.

[18] Cooke A, Oliver RF, Edward M. An in vitro cytotoxicity study of aldehyde-treated pig dermal collagen. *Br J Exp Pathol.*1983;64(2):172 – 6.

[19] Heather M. Powella, Steven T. Boyce. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials,* 2006;27:5821–5827.