

## 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

探討膜材孔洞結構以及不飽和脂肪酸調節對於應用於硬骨再生之聚己內酯/氫氧基磷灰石與硫酸鈣燒結物複合膜生物活性的影響

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 100-2221-E-040-001-

執行期間：100年08月01日至101年11月30日

執行單位：中山醫學大學口腔科學研究所

計畫主持人：湯正明

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：劉忠益

碩士班研究生-兼任助理人員：陳柏翔

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102 年 03 月 01 日

中文摘要：本研究發現高結晶度的聚己內酯膜材相較於低結晶度的聚己內酯膜材具有較高的降解性，而 PCL-HA 膜材在生物礦化表現上也以低結晶度聚己內酯膜材表現較好，但在 PCL-C18-HA 膜材上呈現結果則相反，油酸可促使氫氧基磷灰石分散於膜材中，而較高的結晶度的聚己內酯可促使粉體分散於膜材內部，當浸泡於模擬體液時降解所產生的孔洞，可增加粉體暴露於模擬體液中加快生物礦化的速度，因此，聚己內酯適合的結晶度以及改質劑-油酸的添加可提供導引骨質再生一個良好的環境。因此，本研究選擇以具生物可降性的聚己內酯 (PCL) 作為支架構成材料，添加氫氧基磷灰石 (HA) 以提高支架表面的親水性及骨傳導性，藉由抽真空-冷凍乾燥法形成多孔支架，本研究以油酸 (C18) 作為界面活性劑，改善複合材料相分離的程度。測量支架的液體通透性及改變流體流動路線，發現 PCL-C18-HA 支架通透性遠高於其他種類支架，推測與其孔洞結構有關。動物實驗中觀察到 PCL-C18-HA 支架有較薄的纖維組織產生，推測油酸與氫氧基磷灰石粒子能形成穩定產物可均勻分布在支架內部，因而減少釋放的速度，而降低組織反應的程度。並且可導引組織進入支架內部，期望未來可用於牙周及齒槽骨組織導引再生等應用。

中文關鍵詞：導引硬骨再生、結晶度、氫氧基磷灰石、聚己內酯、油酸、奈米複合材料、膠體穩定性

英文摘要：In our study was found that the higher crystallinity of polycaprolactone (PCL) membranes compared to membranes with higher degradation and lower crystallinity of PCL, PCL-HA membranes biomineralization performance to a lower crystallinity of PCL membranes better performance, but on the PCL-C18-HA membranes rendering the results were reversed, the oleic acid can procure hydroxyapatite dispersed in the membrane, while a higher crystallinity of PCL may promote the powder dispersed in the membrane interior, degrade when soaked in a simulated body fluid (SBF) generated by the pores, increase the powder exposed to the SBF speed biomineralization, PCL suitable degree of crystallinity and the modifier - oleic acid added to provide a good environment for guided bone regeneration. Tissue engineering scaffolds provide an three-dimensional environment for cell adhesion, growth and differentiation. In our study, a

biodegradable PCL as scaffold material and hydroxyapatite (HA) was added to improve the osteoconduction and hydrophilicity of scaffold. Porous scaffolds were prepared by vacuum - freeze drying method. Phase separations often generated in scaffold and reduce the mechanical properties. Therefore, phase separation degree of composite scaffold was decreased by oleic acid (C18) as a surfactant. Measurement of liquid permeability of the scaffold, route changing of fluid flow, PCL-C18-HA scaffold is much higher than other types of scaffold, lead to pore structure and distribution. An animal experiment was observed that the PCL-C18-HA scaffolds have thinner fibrous tissues than the other scaffold. Oleic acid and hydroxyapatite particles can form a stable product can be evenly distributed within the scaffold. Thus reducing the release rate of irritating substances then reduced the extent of tissue reaction and guided tissue into the scaffolds. In the future, our study can be used for the application of guided regeneration of periodontal and alveolar bone.

英文關鍵詞： guided bone formation, crystallinity, hydroxyapatite, polycaprolactone, oleic acid, nanocomposite, colloidal stability.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

探討膜材孔洞結構以及不飽和脂肪酸調節對於應用於硬骨再生之  
聚己內酯/氫氧基磷灰石與硫酸鈣燒結物複合膜生物活性的影響

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 100-2221-E-040 -001 -

執行期間：101 年 8 月 1 日至 102 年 11 月 30 日

執行機構及系所：中山醫學大學口腔科學研究所

計畫主持人：湯正明

共同主持人：

計畫參與人員：劉忠益 兼任碩士級研究助理

陳柏翔 兼任碩士級研究助理

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

中 華 民 國 一 百 零 二 年 二 月 二 十 八 日



## 摘要

本研究發現高結晶度的聚己內酯膜材相較於低結晶度的聚己內酯膜材具有較高的降解性，而 PCL-HA 膜材在生物礦化表現上也以低結晶度聚己內酯膜材表現較好，但在 PCL-C18-HA 膜材上呈現結果則相反，油酸可促使氫氧基磷灰石分散於膜材中，而較高的結晶度的聚己內酯可促使粉體分散於膜材內部，當浸泡於模擬體液時降解所產生的孔洞，可增加粉體暴露於模擬體液中加快生物礦化的速度，因此，聚己內酯適合的結晶度以及改質劑-油酸的添加可提供導引骨質再生一個良好的環境。因此，本研究選擇以具生物可降性的聚己內酯(PCL)作為支架構成材料，添加氫氧基磷灰石(HA)以提高支架表面的親水性及骨傳導性，藉由抽真空-冷凍乾燥法形成多孔支架，本研究以油酸(C18)作為界面活性劑，改善複合材料相分離的程度。測量支架的液體通透性及改變流體流動路線，發現 PCL-C18-HA 支架通透性遠高於其他種類支架，推測與其孔洞結構有關。動物實驗中觀察到 PCL-C18-HA 支架有較薄的纖維組織產生，推測油酸與氫氧基磷灰石粒子能形成穩定產物可均勻分布在支架內部，因而減少釋放的速度，而降低組織反應的程度。並且可導引組織進入支架內部，期望未來可用於牙周及齒槽骨組織導引再生等應用。

關鍵詞：導引硬骨再生、結晶度、氫氧基磷灰石、聚己內酯、油酸、奈米複合材料、膠體穩定性。

## Abstract

In our study was found that the higher crystallinity of polycaprolactone (PCL) membranes compared to membranes with higher degradation and lower crystallinity of PCL, PCL-HA membranes biomineralization performance to a lower crystallinity of PCL membranes better performance, but on the PCL-C18-HA membranes rendering the results were reversed, the oleic acid can procure hydroxyapatite dispersed in the membrane, while a higher crystallinity of PCL may promote the powder dispersed in the membrane interior, degrade when soaked in a simulated body fluid (SBF) generated by the pores, increase the powder exposed to the SBF speed biomineralization, PCL suitable degree of crystallinity and the modifier - oleic acid added to provide a good environment for guided bone regeneration. Tissue engineering scaffolds provide an three-dimensional environment for cell adhesion, growth and differentiation. In our study, a biodegradable PCL as scaffold material and hydroxyapatite (HA) was added to improve the osteoconduction and hydrophilicity of scaffold. Porous scaffolds were prepared by vacuum - freeze drying method. Phase separations often generated in scaffold and reduce the mechanical properties. Therefore, phase separation degree of composite scaffold was decreased by oleic acid (C18) as a surfactant. Measurement of liquid permeability of the scaffold, route changing of fluid flow, PCL-C18-HA scaffold is much higher than other types of scaffold, lead to pore structure and distribution. An animal experiment was observed that the PCL-C18-HA scaffolds have thinner fibrous tissues than the other scaffold. Oleic acid and hydroxyapatite particles can form a stable product can be evenly distributed within the scaffold. Thus reducing the release rate of irritating substances then reduced the extent of tissue reaction and guided tissue into the scaffolds. In the future, our study can be used for the application of guided regeneration of periodontal and alveolar bone.

Keywords: guided bone formation, crystallinity, hydroxyapatite, polycaprolactone, oleic acid, nanocomposite, colloidal stability.

## 報告內容

### 一、前言

牙周病之治療與顎骨重建為臨床上口腔治療的常見病例，民國95年全民健康保險醫療統計資料中牙醫門診人數統計指出，齒齦與牙周疾病約占年度總門診件數中之28.7%，與民國九十一年相比(26.4%)，比例有緩慢上升的趨勢，顯示牙周病已嚴重影響國人健康，並增加政府全民健康保險的負擔[1]。牙周病泛指的是牙齒的支持組織(如牙齦、齒槽骨、牙周韌帶等)受細菌感染所導致的一種慢性且持續性的疾病，牙周病的後期治療著重在使患者萎縮的牙周組織再生或重建受損齒槽骨與牙周韌帶，建立穩定的基礎利於植牙手術的進行。為促進了牙周韌帶與硬骨細胞的再生，自上個世紀80年代開始，導引組織再生(Guided tissue regeneration, GTR)與導引骨質再生(Guided bone regeneration, GBR)的概念被引入臨床口腔治療[2, 3]。為避免二次手術取出膜材而破壞新形成的牙周附著，並且造成細菌感染而影響硬骨生長的風險，具有生物相容性與生物可降解性的高分子膜材廣泛應用於硬骨與組織再生方面。目前膜導引組織再生的發展趨向複合材料的應用，主要將具有骨誘導性之陶瓷粉體與具生物可降解性高分子進行結合，除提高材料之骨誘導性，並可強化材料的機械強度與生物活性。

### 二、研究目的

本研究藉由添加不飽和脂肪酸解決複合材料中的陶瓷粉體與高分子基質微相分離的產生，並對所形成的複合膜材的物化性質及材料的生物特性進行探討。以定量之氫氧基磷灰石粉末混摻入聚己內酯溶液，藉由鑄模法與真空-冷凍乾燥法製備成高分子/陶瓷奈米複合膜材。此外，本研究在溶劑中預先加入油酸(界面活性劑)以產生微胞結構，使氫氧基磷灰石顆粒均勻分布在聚己內酯溶液中，分析膜材的孔洞大小及結構、化學組成，熱性質與表面性質(接觸角、晶型結構、表面型態及化學組成)以探討脂肪酸對膜材的影響。由於促進骨引導的膜材必須與活體骨直接產生化學鍵結，其材料表面需使細胞貼附、分化，並需利於細胞外基質的生成。藉由將膜材浸泡於模擬體液後觀察膜材表面磷灰石形成的程度及晶形結構以評估膜材的生物活性。植入硬骨細胞株(NIH 3T3)於膜材上，觀察細胞於膜材表面貼附、生長及分化行為以評估膜材之生物相容性。

### 三、文獻探討

#### 3-1 奈米複合材料及其在醫學上的應用

近年來廣泛的探討以高分子為基材，加入不同形狀的奈米粒子以形成高分子奈米複合材料。相對於單一相的高分子，高分子奈米複合材料由於奈米分子的加入，往往能改善材料之物理性質(如抗腐蝕性或易燃性等)與熱機械性質等(如熱膨脹係數或剛性等)。而結合具有生物活性的陶瓷與可降解高分子所形成之高分子/陶瓷奈米複合材料應用於組織導引再生膜的發展，主要將具有骨誘導性之無機鹽類與生物可降解性高分子進行結合，除提高材料之骨誘導性，並增強材料的機械強度與生物活性，1995年Jansen等人[4]首先將poly(ethyleneglycol terephthalate)/poly(butylenes terephthalate)(PEG/PBT)混入不同比例之氫氧基磷灰石顆粒並以溶劑鑄造法製備成膜材，並分別植入於山羊背部之皮下及牙周下，經過12週後，組織學分析結果指出複合材料對周遭組織具有良好的生物相容性，沒有明顯的外來物反應，其中又以PEG/PBT共聚合比例為60/40，植入12週時沒有降解的產生，研究者評估可作為膜導引組織再生應用。1999年Shikinami等人[5]將氫氧基磷灰石微米級粒子與聚乳酸製成複合材料以作為骨板與骨釘之用，研究中指出此複合材料具有高的斷裂強度及生物相容性。由以上結果可知高分子材料結合無機磷灰石粒子對於材料之機械性質與生物相容性皆有相當之幫助。

#### 3-2 奈米粒子的分散性對生物相容性的影響

由於奈米粒子的表面積/體積比極大導致表面能升高，奈米粒子傾向藉由凡德瓦爾力及氫鍵產生聚集的行為以降低表面積/體積比已降低表面能，此自發性現象將造成奈米粒子在複合材料中的分散性下降而易產生相分離現象。增加奈米粒子穩定性有數種方式，文獻中常使用界面活性劑、聚合物、或其他有機物鍵結或包覆於奈米粒子表面，以立體排斥效應的方式使奈米粒子產生較佳的分散效果，2006年Lee等人[6]將氫氧基磷灰石奈米粒子(HAp)直接以開環聚合的方式接上聚己內酯(PCL)，並且比較不同長度之氫氧基對接枝率的影響，其發現PCL之接枝數量與接枝率受到HAp表面之氫氧基立體環境與

性質影響，以穿透式電子顯微鏡分析指出表面改質過之HAp在二氯甲烷中分散較未改質之HAp均勻並有效提升膠體穩定性。分別以接枝與未接枝之HAp製成複合材料，結果顯示有接枝之HAp可增加複合材料之抗拉強度與硬度。2007年Lee等人[7]證實先行接枝之HAp製備之複合材料表面，與未接枝之HAp所製備之複合材料相比，蛋白質吸附與纖維母細胞株(NIH 3T3)的貼附與增生有正面的效果。以上結果並未針對接枝之HAp於體內降解速率進行探討，接枝之HAp需要破壞高分子與HAp之間的鍵結再進行水解，當HAp降解速率變慢，導致材料周遭鈣磷離子釋放量降低，對於骨母細胞之增生與貼附會造成影響。另外，2007年Kim[8]以油酸混入三氯化碳中形成混合溶液，再依序混入HAp與PCL製備成奈米複合材料，藉由油酸的調節，其研究發現HAp (<1 microm)可均勻分布於高分子基質中但不產生凝集，與傳統PCL/HAp複合材料及PCL相比其機械強度顯著增加，骨母細胞亦顯著增生。另外，利用表面鍵結的帶電官能基使粒子藉由凡德瓦力產生靜電排斥。Leeuwenburgh等人[9]使用不同種類的分散劑(檸檬酸鈉、檸檬酸等)製備含有奈米分散礦物相之明膠/磷灰石複合材料作為骨修復的材料，由沈降實驗中發現檸檬酸鈉可有效穩定磷酸鈣(CaP)的懸浮液，主要由於檸檬酸根可吸附於CaP奈米晶體上而使晶體外側表面負電荷強力增加，因而增加粒子間的排斥力並抵銷粒子間的van der Waals forces。其研究發現奈米複合材料中CaP與檸檬酸根比例為4.0時顯示形成之奈米結構礦物相而沒有CaP微米級粒子產生。

#### 四、研究方法

4-1 支架的製備與性質評估：聚己內酯(polycaprolactone, PCL)溶於1,4-二氧陸園 (1,4-dioxane)中配製成15%(w/v)的高分子溶液作為對照組，另外將油酸(Oleic acid, C18)添加至 1,4-dioxane中攪拌均勻，添加20%之氫氧基磷灰石(HA)粉體攪拌1小時後，再加入PCL混合攪拌24小時以形成均勻的溶液。將以上溶液倒入模具(直徑=50mm，表面鐵氟龍塗層)中，經冷凍24小時，以冷凍乾燥機抽真空乾燥取得多孔支架。以電子顯微鏡(FESEM)觀察支架的顯微結構，使用影像軟體Image-Pro 4.5將孔洞面積進行定量分析。以能量散佈分析儀(EDS)鑑定試片的組成元素。使用  $\chi$  光繞射(XRD)來分析試片的結晶結構。

4-2 體外模擬礦化測試：硬骨於體內的生成屬於生物礦化的現象，Kokubo等人[10]研製一模擬體液(simulated body fluid, SBF)，與人體血漿具有相似的酸鹼值 (pH=7.25)，無機成分也極為相似。模擬體液的浸泡實驗可有效評估材料在生物體內是否具有生物活性及其活性強弱。本研究將試片切割成固定尺寸，以70%乙醇滅菌，再以無菌去離子水清洗試片，將試片浸泡於10mL之SBF中，放置於37°C恆溫水槽中，以FESEM觀察觀察複合材料表面形態隨時間之變化。將試片浸泡在75%酒精進行滅菌，再以無菌水清洗試片三次，分別以靜態與動態模擬的方式對所形成的支架加以評估；靜態的方式是將試片置入裝有10mL之模擬體液(simulated body fluid, SBF)的離心試管中，並置於 37°C的恆溫水槽中；動態組則是以蠕動幫浦將模擬體液注入支架 24 小時後，將支架取出以去離子水清洗兩次，接著在-20 °C的冰箱中冷凍 24 小時，再放入預冷至-45°C 的抽真空-冷凍乾燥機中抽取溶劑進行乾燥，以電子顯微鏡觀察支架表面磷灰石的生成及分布，以能量散佈分析儀(EDS)判斷表面組成，以XRD對支架進行晶型分析。

4-3 體外模擬降解測試：為了解高分子結晶度改變以及油酸的添加，對膜材的降解性質是否產生影響，將膜材切割成1cm<sup>2</sup>大小，以70%乙醇水溶液進行滅菌，再以無菌之去離子水清洗試片數次，將試片浸泡於10mL之PBS溶液溶液(37°C，pH值=7.4)中，經過一定時間後，將試片取出以去離子水清洗兩次以去除附著的雜質後冷凍，再以抽真空-冷凍乾燥機中進行乾燥，觀察浸泡前後重量的損失百分率，以FESEM觀察表面形貌的變化，以EDS分析膜材的表面組成。

#### 4-3 複合膜材之生物相容性

膜材置於24孔細胞培養盤再以70%酒精滅菌，植入 $5 \times 10^4$  cell/ml的人類類骨母細胞(NIH 3T3)分別培養1天與3天後，再以Alamar Blue方法進行細胞增生能力測試。細胞內粒線體的酵素將原本深藍色無螢光性的Alamar Blue 還原成為粉紅色高螢光性的產物進行分析，以波長570nm(氧化態)和600nm(還原態)讀取吸光值，依公式算出細胞還原態之比值。

## 五、結果與討論

### 5-1 複合膜材製作與其性質分析

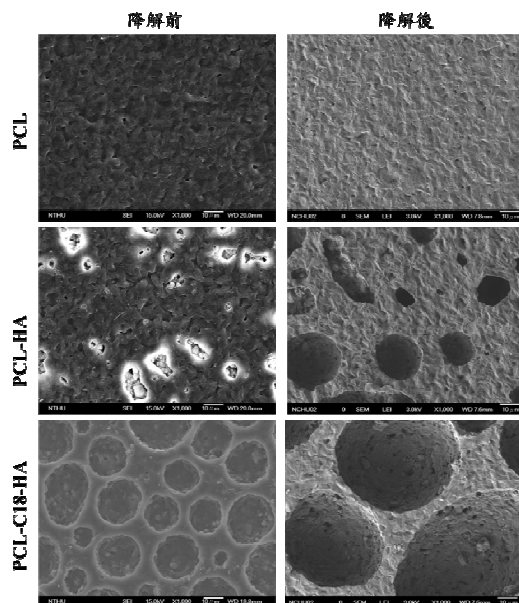
本研究使用不同批號的聚己內酯進行膜材的製備，以示差掃描式熱分析儀(DSC)進行熱性質分析(見表一)，結果顯示批號00807DJ的PCL顆粒結晶度為38.3% (HC)，批號MKBG1739V的PCL顆粒結晶度為30.9% (HC)，當PCL製備成膜材後結晶度都有略微提升，其原因在於高分子鏈分散在1,4-dioxane中可產生規則排列所導致，加入油酸後聚己內酯結晶度有明顯上升的趨勢，代表油酸可增進分子列的規則排列。此外，加入粉體則可以打亂此規則排列的過程，因此添加氫氧基磷灰石的膜材，PCL結晶度呈現大幅下降的趨勢。當油酸與氫氧基磷灰石粉體加入於膜材後，可發現聚己內酯結晶度有上升的趨勢，證明油酸做為界面活性劑，可增加HA粉體在PCL間的分散性，以提升PCL的結晶性。

表一、膜材的熱性質分析

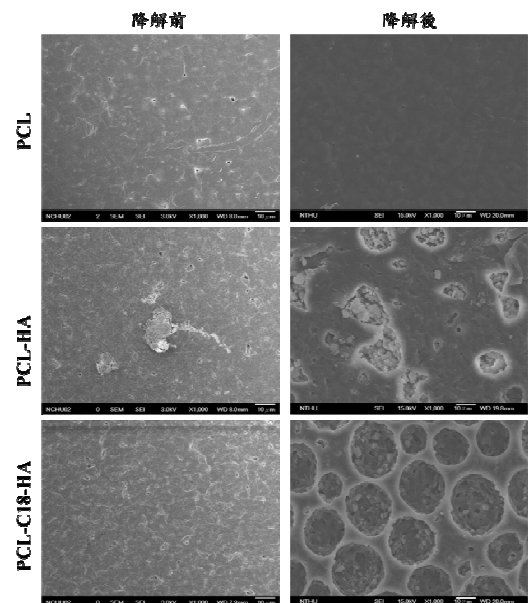
		結晶點(°C)	結晶熱(J/g)	熔點(°C)	熔化熱(J/g)	結晶度(%)
PCL pellet	#1	25.65	50.85	50.49	53.45	38.3
	#2	30.32	48.92	50.50	43.07	30.9
PCL	#1	34.19	54.53	52.67	54.81	39.3
	#2	35.81	54.22	51.19	50.14	35.9
PCL-C18	#1	33.57	54.97	50.15	56.27	40.3
	#2	37.31	55.39	50.94	52.42	37.6
PCL-HA	#1	35.10	47.08	52.385	44.09	31.6
	#2	37.54	39.43	51.22	37.54	26.9
PCL-C18-HA	#1	34.49	45.96	51.20	50.88	36.5
	#2	37.35	41.06	51.16	43.11	30.9

#1: lot#00807DJ; #2: lot#MKBG1739V

觀察膜材表面以及浸泡PBS 7天後的膜材表面(見圖一及圖二)，可以觀察到LC-PCL表面都變得較為覆蓋，尤其PCL-C18-HA組可見從孔洞凹陷處降解明顯，而使用HC-PCL膜材如PCL-HA以及PCL-C18-HA分別有HA裸露與孔洞形成。將HC和LC膜材進行生物活性測試，浸泡SBF溶液7天後，PCL膜材表面並無明顯礦化形成，代表PCL膜材無骨引導性(osteoinductivity)，而PCL-HA與PCL-C18-HA兩種膜材都有明顯磷灰石礦化沉積，其中LC組在PCL-HA組有良好的礦化層，並出現了多層沉積，而PCL-C18-HA組也有明顯礦化層沉積；HC組只有PCL-C18-HA可以看到有明顯礦化覆蓋，推測膜材浸泡於SBF中產生降解所形成的孔洞，可增加HA裸露於膜材表面，因而誘導形成礦化層沉積。



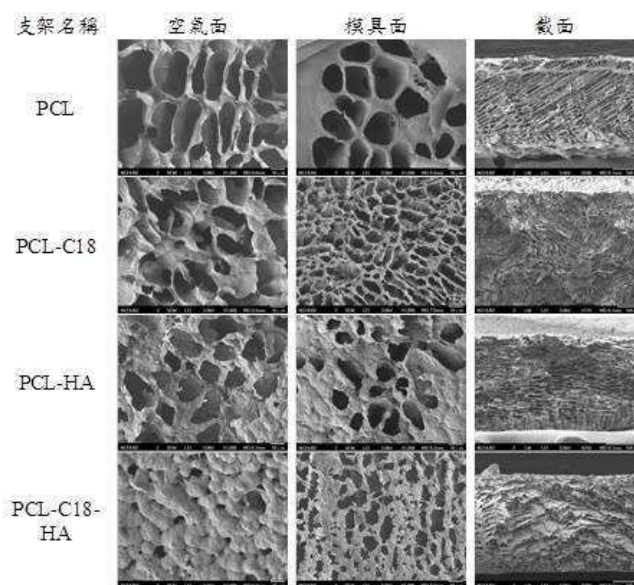
圖一、低結晶度(LC)聚己內酯膜材浸泡前及浸泡於磷酸鹽緩衝溶液七天後的表面形貌。



圖二、高結晶度(HC)聚己內酯膜材浸泡前及浸泡於磷酸鹽緩衝溶液七天後的表面形貌。



本研究以高結晶度之聚己內酯作為主要的複合膜材原料，將支架區分成三個部分進行觀察(見圖三)，首先在空氣面部分，PCL支架的孔洞的數量多於模具面；PCL-C18空氣面孔洞邊緣的型態呈現波浪形；PCL-HA空氣面孔洞的數量較少，並且部分有皮層產生；PCL-C18-HA支架在空氣面形成的孔洞較少，有類似PCL-HA的皮層出現。而在模具面部分，PCL常出現封閉的區域；PCL-C18在模具面的孔洞邊緣型態呈現鋸齒的形狀；PCL-HA支架模具面孔洞部分有皮層產生；PCL-C18-HA支架在模具面孔洞的型態與數量類似PCL-C18支架鋸齒狀孔洞邊緣，但其中有些微皮層的出現。觀察不同支架內部的孔洞結構，其中PCL越接近空氣面有較大的孔洞，並且呈現一45度偏斜的分布。PCL-C18 支架在截面觀察的孔洞形成較無規律。PCL-HA 支架截面可以發現孔洞和模具面形成一平行的狀態，在接近空氣面與模具面的部位有封閉的狀況，但是接近模具面還是有較密集的孔洞出現，孔洞的形成有類似沉積的現象。PCL-C18-HA 支架在截面則發現其孔洞分佈與大小類似於PCL-C18與PCL-HA 支架，Jain TK等人研究指出油酸的加入可降低氧化鐵奈米粒子聚集作用[11]，並且對高分子雙層奈米粒子藥物釋放有延長時間及強度的效果[12]，推測C18的混入可有效提高HA粉體在高分子基質中的分散性，並對於支架內部的孔洞形成有所影響。以能量散佈分析儀(EDS)對支架空氣面與模具面進行元素分析(見表二)。PCL 支架主要由碳原子和氧原子所組成。PCL-C18 支架因含有油酸(C18)，碳原子明顯提升，PCL-HA 支架則觀察到鈣與磷原子，表示HA粒子在支架兩面都有分布，PCL-C18-HA 支架的氧/碳原子比值與PCL 支架類似，接觸角低，代表濕潤性較高，推測原因與支架空氣面或模具面表面孔洞形態有關，而以XRD 觀察支架之結晶型態，在21°與23°可觀察到PCL的特性峰，另外，含有HA的支架在32°與33°會有HA的特性峰出現。



圖三、以電子顯微鏡觀察支架空氣面、模具面以及支架內部的孔洞形態

表二、支架的性質

支架	觀察面	孔洞面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	接觸角	O/C ratio		Ca/P ratio		降解率 (%)
				未浸泡	浸泡PBS 一天	未浸泡	浸泡PBS 一天	
PCL	空氣面	287.0±87.1	77.4±2.8	0.44	0.42	-	-	-3.4±2.4
	模具面	234.4±35.3	83.6±5.3	0.39	0.38	-	-	
PCL-C18	空氣面	160.6±18.5	96.4±3.6	0.34	0.42	-	-	-4.4±1.5
	模具面	136.9±23.1	102.7±1.2	0.33	0.41	-	-	
PCL-HA	空氣面	367.7±72.3	80.4±8.7	0.42	0.45	1.28	1.09	-4.3±1.5
	模具面	300.2±23.3	100.3±8.7	0.40	0.50	1.32	1.41	
PCL-C18-HA	空氣面	72.3±7.1	91.6±2.3	0.39	0.37	1.13	1.1	-2.7±1.5
	模具面	47.4±6.1	107.6±7.4	0.43	0.36	1.14	0.91	

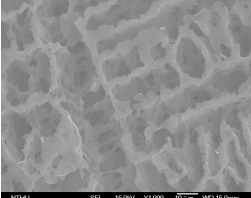
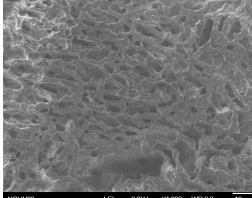
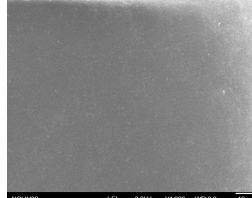
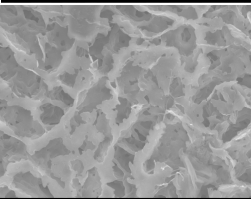
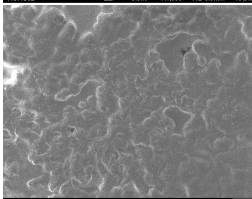
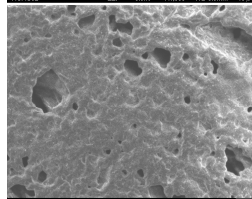
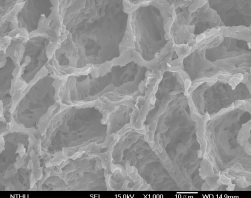
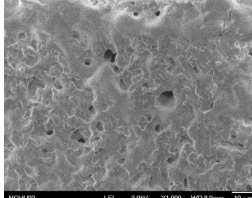
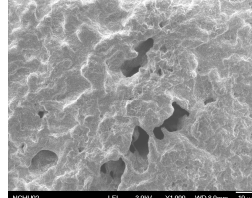
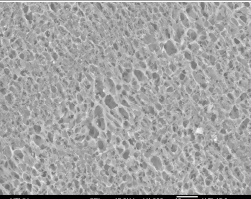
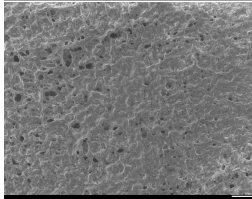
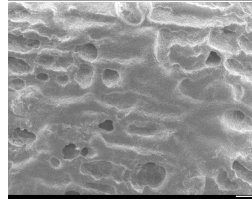
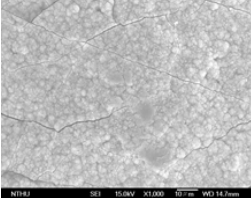
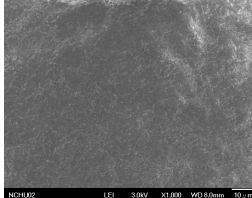
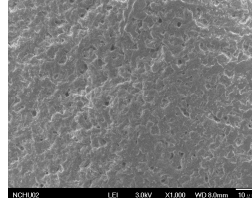
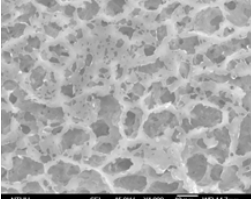
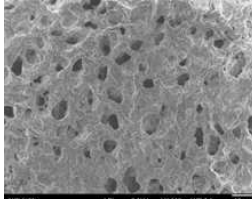
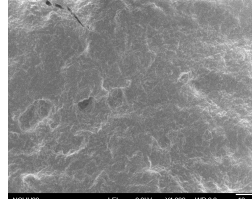
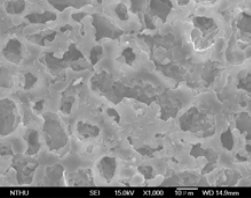
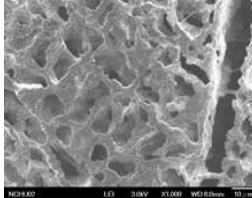
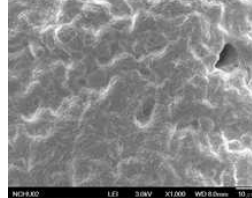
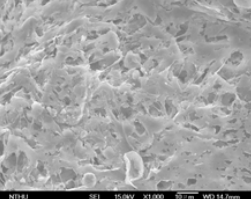
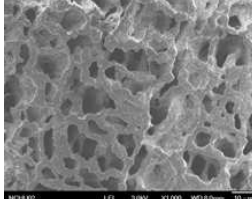
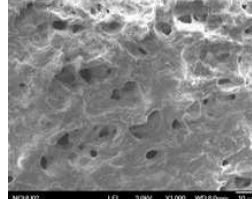
以能量散佈分析儀(EDS)對支架空氣面與模具面進行元素分析(見表二)。PCL支架主要由碳原子和氧原子所組成，但在模具面氧/碳原子比小於空氣面，推測與支架製造過程有關。PCL-C18支架因含有油酸(C18)，碳原子明顯提升，PCL-HA支架則觀察到鈣與磷原子，表示HA粒子在支架兩面都有分布，PCL-C18-HA支架的氧/碳原子比值與PCL支架類似，然而由支架的接觸角量測，PCL支架相較其他支架(PCL-C18、PCL-HA、PCL-C18-HA)接觸角低，代表濕潤性較高，推測原因與支架空氣面或模具面表面孔洞形態有關。膜材的熱性質分析發現，PCL製備成支架後，由於內部結構的改變，熔點、熔解熱與結晶度都會有上升；PCL-C18支架相較於PCL支架熔點有下降的現象，但熔解熱與結晶度上升，推測與油酸的加入改變聚己內酯分子鏈的排列有關；而PCL-HA支架與PCL支架相比，除了熔解熱差異較多之外，熔解溫度與結晶度雖有下降但是差異不大；然而在PCL-C18-HA支架，相對於PCL的支架，其熱性質數據都介於PCL-C18與PCL-HA支架之間，說明支架的形成藉由油酸的加入，可降低因氫氧基磷灰石加入造成支架熱性質影響。

表三、支架的熱性質分析

支架	熔點 $^{\circ}\text{C}$	熔解熱J/g	結晶度(%)
PCL powder	51.84	46.96	38.23
PCL	52.21	48.36	35.85
PCL-C18	49.81	57.69	40.27
PCL-HA	52.18	45.13	29.10
PCL-C18-HA	50.85	46.96	34.76

5-2 支架模擬降解實驗：表二顯示不同組成的支架浸泡PBS一天後都有產生重量損失，與浸泡前支架比較，PCL支架表面元素含量與比值差異不大，但PCL-C18支架的的氧/碳原子比值有增加的趨勢，PCL-HA支架的氧/碳原子比值與鈣/磷原子比值增加，相反的，PCL-C18-HA支架的氧/碳原子比值與鈣/磷原子比值呈現下降。PCL支架以FESEM觀察可以發現，經浸泡一天PBS後，孔洞邊緣有降解的情形，而在晶相分析中，XRD圖譜沒有發現新的繞射峰，表示晶體結構並無改變。PCL-C18支架以FESEM觀察發現孔洞外型的改變，元素分析中O/C值有升高的趨勢，可能由於C18的溶出，支架模具面官能基團強度與背景值相比呈現較低的數值。支架的晶相分析發現在 $32^{\circ}$ 有代表HA的繞射峰出現。PCL-HA支架以FESEM的觀察到表面形態的改變，皮質膜層有破裂的情況，支架的降解使HA暴露於支架表面，在ATR-FTIR圖譜顯示在 $1000\text{cm}^{-1}$ 附近的O-P-O基團有強度增加，支架的晶相分析則沒有不同的繞射峰出現。PCL-C18-HA支架以FESEM的觀察到表面形態的改變，空氣面的皮質表面有破裂的情形，ATR-FTIR圖譜顯示在在 $1000\text{cm}^{-1}$ 附近的O-P-O基團有增加的情形，可以推斷在皮質表面破裂後，增加空氣面上HA的暴露。在模具面可觀察可以發現孔洞的外型有崩毀的情形，ATR-FTIR圖譜觀察到在 $1000\text{cm}^{-1}$ 附近的O-P-O基團及在 $1150\text{cm}^{-1}$ 與 $1200\text{cm}^{-1}$ 間的C-O 與C-O-C官能基團有強度增加，推斷模具面孔洞邊緣雖然有崩毀的情形，增加空氣面上HA的暴露。

5-3 支架結構對水的通透率：由支架空氣面經過支架內部而從模具面流出的水量(見表四)，以PCL支架最少，PCL-C18-HA最多。由支架模具面經過支架內部而從空氣面流出的水量，PCL-C18-HA支架與其他支架相比，流出水量最多。將支架以PBS浸泡一天進行預降解處理後後，由支架空氣面經過支架內部而從模具面流出的水量，PCL-C18-HA支架與其他支架相比，流出水量最多。更換流動路徑，由支架模具面經過支架內部而從空氣面流出的水量，PCL-C18-HA支架與其他三種支架有顯著差異。先浸泡PBS一天的支架(預降解組)，液體通透速率較未降解前加快，推測與SEM 圖觀察到支架孔洞降解的情形有關。

支架名稱	靜態模擬 浸泡一天	動態模擬 空氣面流入模具面	動態模擬 模具面流入空氣面
PCL 空氣面			
			
PCL-C18 空氣面			
			
PCL-HA 空氣面			
			
PCL-C18-HA 空氣面			
			

圖四、以電子顯微鏡觀察支架經靜態與動態礦化後的表面形態



表四、支架結構對水的通透率

支架	支架		預降解支架	
	空氣面至模具面 流出體積(mL)	模具面至空氣面 流出體積(mL)	空氣面至模具面 流出體積(mL)	模具面至空氣面 流出體積(mL)
PCL	3.14±0.28	5.58±0.65	5.29±0.16	6.72±0.41
PCL-C18	4.07±0.80	6.52±0.89	5.76±0.40	6.33±0.83
PCL-HA	4.39±0.60	6.43±0.16	5.43±0.40	7.53±0.16
PCL-C18-HA	7.98±0.48	8.04±0.20	8.98±0.50	9.51±0.20

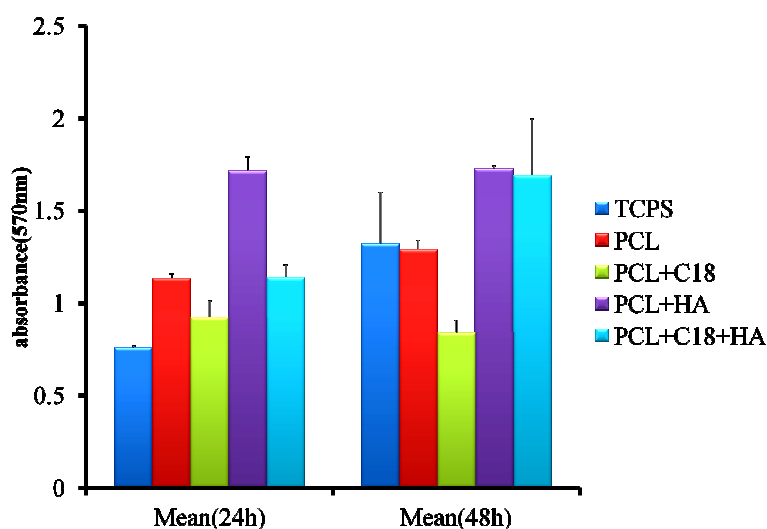
5-4複合材料之生物活性：PCL支架浸泡SBF溶液1天後可發現到有明顯的重量增加後，接著在浸泡7天與28天則發現重量逐漸減少，由支架在PBS中的降解實驗結果推論因PCL降解而造成材料重量的損失，浸泡7天後PCL-C18-HA支架重量增加率達到最高。

表五、支架浸泡於SBF中不同時間的重量變化率

浸泡時間(日)	1	7	28
PCL	7.92±2.93	1.38±0.65	0.57±0.96
PCL-C18	8.32±2.65	1.93±2.13	-0.60±1.46
PCL-HA	-0.16± 2.25	4.61±1.30	-0.35±1.28
PCL-C18-HA	-5.13± 3.37	5.81±0.18	-4.81±6.06

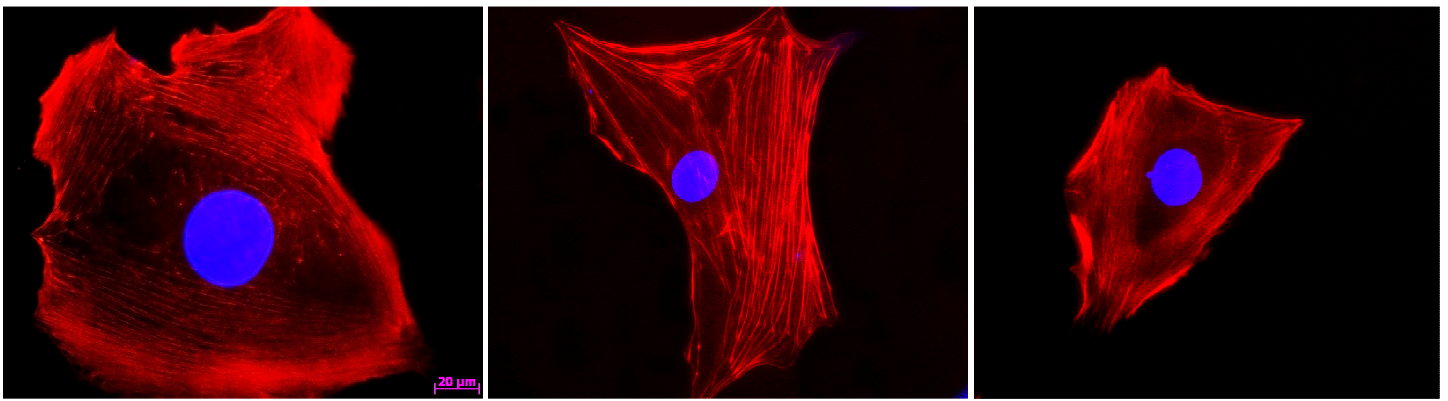
以FESEM觀察浸泡前後支架的表面形貌(見圖四)，發現孔洞皆有變小的狀況，在孔洞周圍有顆粒狀的物質沉積。而經過SBF浸泡的支架ATR-FTIR圖譜顯示， $1100\text{ cm}^{-1}$ 的 $\text{PO}_4^{3-}$ 官能基和在 $1150\text{ cm}^{-1}$ 與 $1200\text{ cm}^{-1}$ 間的C-O 與C-O-C官能基團有強度增加。不同種類的支架透過XRD分析，都有發現 $30\text{-}35^\circ$ HA的繞射峰出現，明顯增加的時間點在浸泡一天之後，推測是因SBF溶液內離子濃度隨著表面礦化後產生不足，造成礦化層分解而釋出離子以維持SBF溶液離子的平衡。

5-5複合材料之生物相容性：本研究將骨髓間葉幹細胞在培養於控制組(TCPS)與其它各組膜材24小時與48小時，以MTT分析細胞貼附與增生的結果(見圖五)。可知聚己內酯混摻氫氧基磷灰石可增加細胞的貼附，但培養48小時後，油酸所調節之高分子支架可加強細胞的增生。由圖六可看出，加入氫氧基磷灰石的膜材，細胞骨架較為明顯有拉伸的趨勢，代表細胞行為偏向增生及遷移，與圖五觀察趨勢類似。



圖五、骨髓間葉幹細胞培養於控制組(TCPS)與其它各組膜材24小時與48小時MTT 分析結果。





圖六、螢光顯微鏡觀察培養於高分子支架48小時後的骨髓間葉幹細胞(MSCs)骨架染色(Rhodamine phalloidin staining):(a) PCL, (b)PCL-HA, and (C) PCL-C18-HA. Scale bar =20  $\mu\text{m}$ 。

## 六、結論

高結晶度的聚己內酯(lot#00807DJ)相較於低結晶度的聚己內酯(lot#MKBG1739)具有較高的降解性，而PCL-HA膜材在生物礦化表現上也以低結晶度聚己內酯膜材表現較好，但在PCL-C18-HA 膜材上呈現結果則相反，推測與油酸可促使氫氧基磷灰石分散於膜材中，而較高的結晶度的聚己內酯可促使粉體分散於膜材內部，當浸泡於模擬體液時降解所產生的孔洞，可增加粉體暴露於模擬體液中加快生物礦化的速度，因此，聚己內酯適合的結晶度以及改質劑-油酸的添加可提供導引骨質再生一個良好的環境。此外，聚己內酯支架之製備過程受限於模具形狀而影響其溶劑的揮發，接近空氣面的部分有較多的孔洞，而形成不對稱孔洞結構，本研究以相轉移的方式製作出具對稱性孔洞結構的支架。另外，在體外生物礦化測試及實驗中可發現，含有氫氧基磷灰石的支架表面礦化速度最快，本研究為改善氫氧基磷灰石在聚己內酯中的分散性，以直鏈型脂肪酸-油酸作為界面活性劑以改善上述問題，可發現油酸(C18)加入PCL 支架製程中造成孔洞變小，推測油酸會影響聚己內酯分子鏈於溶液中的排列所致。而氫氧基磷灰石(HA)則造成支架表面(空氣面與模具面)孔洞數量的降低，支架截面可觀察到孔洞與表面平行排列的狀態。期望未來可用於牙周及齒槽骨組織導引再生等應用。

## 參考文獻

- [1] 中央健康保險局，民國 95 年全民健康保險統計，中央健康保險局，2007.
- [2] Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982; 9(4):290-296.
- [3] Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988; 81(5):672-676.
- [4] Jansen JA, de Ruijter JE, Janssen PT, Paquay YG. Histological evaluation of a biodegradable Polyactive/hydroxyapatite membrane. *Biomaterials.* 1995;16(11):819-827.
- [5] Shikinami Y, Okuno M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials.* 1999;20(9):859-77
- [6] Lee HJ, Choi HW, Kim KJ, Lee SC. Modification of Hydroxyapatite Nanosurfaces for Enhanced Colloidal Stability and Improved Interfacial Adhesion in Nanocomposites. *Chem Mater.* 2006;18(21):5111-5118.
- [7] Lee HJ, Kim SE, Choi HW, Kim CW, Kim KJ and Lee SC. The effect of surface-modified nano-hydroxyapatite on biocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite nanocomposites. *European Polymer Journal* 2007;43(5):1602-1608
- [8] Kim HW. Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by

- surfactant mediation. *J Biomed Mater Res.* 2007;83A:169-177.
- [9] Leeuwenburgh SCG., Ana ID, Jansen JA. Sodium citrate as an effective dispersant for the synthesis of inorganic - organic composites with a nanodispersed mineral phase. *Acta Biomaterialia* 2009; 6:836-844.
- [10] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials.* 2006;27:2907-15.
- [11] Jain TK, Foy SP, Erokwu B, Dimitrijevic S, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biomaterials.* 2009;30:6748-6756.
- [12] Shah PP, Desai PR, Singh M . Effect of oleic acid modified polymeric bilayered nanoparticles on percutaneous delivery of spantide II and ketoprofen. *J Control Release.* 2012;158:336-345.

# 國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：102年2月28日

計畫編號	NSC 100-2221-E-040 -001 -		
計畫名稱	探討膜材孔洞結構以及不飽和脂肪酸調節對於應用於硬骨再生之聚己內酯/氫氧基磷灰石與硫酸鈣燒結物複合膜生物活性的影響		
出國人員姓名	湯正明	服務機構及職稱	中山醫學大學口腔科學研究所
會議時間	102年10月21日至 102年10月24日	會議地點	日本國福岡市九州大學醫學院
會議名稱	第二十四屆醫學陶瓷學會學術大會 24th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24)		
發表論文題目	脂肪酸對應用於硬骨在生之氫氧基磷灰石/聚己內酯)奈米複合膜材的生物降解和生物礦化的影響 Effect of fatty acid on biodegradation and biomineralization of hydroxyapatite/ poly(epsilon-caprolactone) nanocomposite membrane for bone regeneration		

## 一、參加會議經過

1. 101年10月21日下午由桃園國際機場出發至日本福岡國際機場，於九州大學醫學院百年講堂進行報到。
2. 101年10月22日參與大會其他專題演講及參閱大會壁報；與與會各國專家學者交流。
3. 101年10月23日參與大會其他專題演講及參閱大會壁報，並與與會各國專家學者交流。
4. 101年10月24日上午參與大會其他專題演講及參閱大會壁報，並與會各國專家學者交流，下午返回台灣。

## 二、與會心得

本人是第一次參加醫學陶瓷學會學術大會，本次大會主題可分成 Advanced calcium phosphate ceramics, Porous materials, Cement, Coating, In vivo study and clinical application, Cell studies and cell-material interactions, Composites, Drug delivery carriers, Dental materials, Metals, Zircoina and Alumina ceramics, Nano materials, Sol-Gel synthesis and other materials 等十三大項，由於議程的安排是同時兩個主題同時進行，本人僅能選擇數個主題來聽取各國學者的研究成果，在 Advanced calcium phosphate ceramics 主題，多以探討碳酸鈣或是磷酸鈣為基底的材料以不同方法生成氫氧基磷灰石，如日本國名古屋大學 Yong Kim 等人藉由水熱法處理碳酸鈣，可控制氫氧基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)生成單一晶體，其中柱狀氫氧基磷灰石主要形成自方解石晶體{100}平面，而奈米級氫氧基磷灰石主要形成自方解石晶體(111)平面，以上結果也控制了晶體的溶解速度，在設計金屬表面塗層時可作為參考，另外，

日本國東北大學 Natsuko Ito 等人提出磷酸八鈣(octacalcium phosphate, OCP)轉成氫氧基磷灰石的轉型行為觀察，在定溫下維持 240 小時，藉由 XRD 可以觀察到 HA 於 96 小時開始產生，研究者推測是異相成核，本人不禁思考類似的觀察是否可以與現在模擬體液進行模擬礦化時做對照。此次大會數個研究都在探討如何產生規則排序的氫氧基磷灰石晶體，如日本國名古屋大學 Taishi Yoko 等人則以硝酸鈣[Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]與磷酸氫銨[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]在 PAAm 水膠的兩端進行擴散，可發現在水膠中心產生規則排序的磷灰石柱狀物，其巧思在於控制水膠的溫度(4 度，40 度以及 80 度)，所產生磷灰石結構也會有所不同，在低溫下(4 度，40 度)所產生的磷灰石結構多以 OCP 為主，但在攝氏 80 度時所產生則以氫氧基磷灰石晶體為主，主要關鍵在於溫度控制了離子的解離程度所導致。雖然以上的研究沒有牽涉到貴重儀器或是先進儀器的使用，但在製程上不拘泥於傳統做法，所以使得成果讓人為之一亮，而在結果分析方面也著重於解釋機制而不在於其應用是值得我們效法。

### 三、考察參觀活動(無是項活動者略)

無

### 四、建議

國際會議的註冊費逐年明顯提高，以本次大會為例註冊費高達兩萬八千元，國科會補助已顯得不足。

### 五、攜回資料名稱及內容

#### 1. 會議論文集一本

### 六、其他

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/02/26

國科會補助計畫	計畫名稱: 探討膜材孔洞結構以及不飽和脂肪酸調節對於應用於硬骨再生之聚己內酯/氫氧基磷灰石與硫酸鈣燒結物複合膜生物活性的影響
	計畫主持人: 湯正明
	計畫編號: 100-2221-E-040-001- 學門領域: 生醫材料
無研發成果推廣資料	

100 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：湯正明		計畫編號：100-2221-E-040-001-					
計畫名稱：探討膜材孔洞結構以及不飽和脂肪酸調節對於應用於硬骨再生之聚己內酯/氫氧基磷灰石與硫酸鈣燒結物複合膜生物活性的影響							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	發表於 2013 年高分子聯合會議
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	2	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	2	100%	人次	兼任碩士級研究助理兩名，工作總時數 24 個月
		博士生	0	1	100%		改聘任兩名碩士級研究助理
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	撰寫中
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

高分子/陶瓷複合材料的製備與性質分析，主要著重在直鏈形脂肪酸加入複合材料對於高分子/陶瓷粉體界面的探討，一般研究者多採取將粉體的接枝上高分子單體以提高高分子/陶瓷粉體間的作用力減少相分離現象產生，然而本研究發現單純以不同碳數的脂肪酸加入即可有效調節，配合第一部份之研究所製備之陶瓷粉體，發現複合材料膜材之機械強度與高分子膜材沒有明顯差異，但由模擬體液浸泡實驗可發現複合材料膜材之生物活性反而相對提高，以上研究均有達到本研究計畫之預期目標，並且適合發表於學術期刊。但在膜材表面改質與生物相容性評估方面，本研究添加脂肪酸之目的在於改善膜材內部高分子鏈與粉體間的界面，然而由膜材表面型態可知粉體種類對於脂肪酸調節能力產生影響，以 EDX 分析結果證實添加燒結之氫氧基磷灰石之膜材遠比添加氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合燒結粉體之膜材表面有較多粉體裸露，反而對於細胞分化有明顯誘導的效果。此結果與本研究第二部份生物活性的評估結果相反，在後續的研究計畫中擬將膜材預先表面生物礦化處理以提高細胞之生物相容性。總結來說，本研究計畫成功開發一種以脂肪酸調節的複合材料，預期可有效應用於齒槽骨修復及導引組織再生，但尚需進行動物實驗加以確認。