

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

高分子奈米複合材料應用在膜導引組織再生:大氣電漿表面
改質對聚己內酯與氫氧基磷灰石複合材料之生物相容性的
影響

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2218-E-040-001-
執行期間：98年03月01日至99年02月28日
執行單位：中山醫學大學口腔生物暨材料科學研究所

計畫主持人：湯正明
共同主持人：徐善慧、高嘉澤
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：林秀芃
碩士班研究生-兼任助理人員：白玉林
碩士班研究生-兼任助理人員：田奕紘
碩士班研究生-兼任助理人員：黃欽

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

中華民國 99年05月28日

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

高分子奈米複合材料應用在膜導引組織再生：

大氣電漿表面改質對聚己內酯與氫氧基磷灰石複合材料之生
物相容性的影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2218-E-040-001-

執行期間：98年3月1日至99年2月28日

計畫主持人：湯正明

共同主持人：徐善慧、高嘉澤

計畫參與人員：林秀芃、白玉林、田弈泓、黃欽

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

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
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

執行單位：中山醫學大學口腔生物暨材料科學研究所

中 華 民 國 九 十 九 年 五 月 二 十 八 日

中文摘要

氫氧基磷灰石(HA)為硬骨中主要的無機成份，具有良好的生物相容性及骨傳導性。其缺點為在人體中吸收緩慢。直到氫氧基磷灰石發展前，硫酸鈣(CS)以做為骨缺陷之填補材。本研究第一部份為製備出一雙相陶瓷複合材料，其中包含有磷灰石相(HA)與可吸收相(CS)。於HA當中添加不同重量比例CS(1%、5%、10%CS於HA)混合後加壓成形並進行燒結。在不同的升溫速率下，燒結後組別比未燒結組別具有較高的徑向拉伸強度，尤其是在升溫速率為20 °C/min(S20)。並且，HA的機械強度隨添加CS而增加。然而，燒結程序的改變對複合物的FTIR的圖譜沒有顯著的變化。由X光繞射圖譜看出燒結後之複合材料比燒結之HA有較高的繞射峰。結果顯示經過燒結(S20)與適量的CS添加(5%)可提升燒結物之結晶度，主要因燒結時添加的CS誘導HA晶體結構產生型態改變。另一方面，硬骨是種天然的陶瓷/生物高分子複合材料，本研究以聚己內酯(PCL)與陶瓷燒結物(S20-CS5)發展出一類骨複合材料。以不同種類之直鏈性脂肪酸[正己酸(C6)，月桂酸(C12)與油酸(C18)]作為界面活性劑，提高陶瓷在聚合物溶液中的膠體穩定性。由TEM圖顯示，藉由脂肪酸的調節(特別添加1%的C18)，陶瓷奈米粒子均勻分散於高分子基材，添加1% C18之奈米複合材料其抗拉強度遠比其他組別高。而添加1% C6及C12之高分子基質則伸長率增加。將膜材浸泡於模擬體液中評估材料之生物活性。經浸泡一個月後，奈米複合材料表面之生成磷灰石較控制組(PCL)多，此結果指出奈米複合材料具有較高的生物活性。因此，藉由油酸調節之奈米複合材料預期能應用在骨再生方面。

關鍵字：氫氧基磷灰石、硫酸鈣、聚己內酯、奈米複合材料、界面活性劑、膠體穩定性

英文摘要

Hydroxyapatite (HA), a major mineral component of bone, shows suitable biocompatibility and osteoconduction. One of the main drawbacks of HA has slow resorption in the human body. Calcium sulfate (CS) shows had long been used as a filling material for bone defects until HA was developed. In first part of study, to obtain a material containing two phases: one is apatite phase (HA) and another one is restorable phase (CS). The varied weight ratios of minerals powder (1%, 5% and 10% CS in HA) will be mixed, pressed and sintered. Under different heating rate, the sinter composite had a higher diameter tensile strength than non-sinter composite and HA, especially in S20 (20°C/min). Moreover, the mechanical strength of HA was significantly increased by the existence of a CS. The change of sinter process did not cause a remarkable change in the FTIR spectra of composite. Because of the XRD pattern, composite had a higher diffract peak than sinter HA. The result indicated that the crystallinity of sinter was enhanced when the small amount of CS added, especially in CS5 (5% calcium sulfate in HA). Therefore, it was concluded that CS induced some morphological changes of the HA crystal structure under sinter process. In the other hand, Because of bone is a natural ceramic/biopolymer composite, our study was developed a bone-like composite with polycaprolactone (PCL) and sinter ceramic (CS5 by S20). And linear fatty acid [Hexanoic acid (C6), Dodecanoic acid (C12), Oleic acid (C18)] as surfactant was added to enhance colloidal stability of ceramic particles in polymer solution. Because of TEM image show the ceramic nanoparticles was uniform dispersion in the polymer matrix, especially in 1% C18 was added. The tensile strength of nanocomposite with 1% C18 was greater than the other entire sample. However, the elongation was increased when C6 or C12 was added in polymer matrix. The bioactive of sample was evaluated by simulated body fluid (SBF) immerse. Immersed one month later, nanocomposite surface had more apatite formation than control group (PCL). This above result indicates nanocomposite is high bioactive. This ceramic sinter-PCL nanocomposite mediated by oleic acid is expected to be useful in the bone regeneration field.

Keyword: hydroxyapatite, calcium sulfate, polycaprolactone, nanocomposite, surfactant, colloidal stability

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)的概念被引導入臨床口腔治療[2, 3]。臨床廣泛使用具拉伸性之聚四氟乙烯(e-PTFE)進行膜導引組織再生術，e-PTFE 具有眾多優點如細胞隔絕性及空間創造性、組織整合性、生物相容性及良好的穩定性及可靠性，然而 e-PTFE 在於生物體內不能被降解吸收，植入後 4-8 週後須經二次手術取出，但會破壞新形成的牙周附著，並且膜片暴露時易造成細菌感染而影響硬骨生長。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，然而複合材料中的陶瓷粉體與高分子基質微相分離的產生，降低複合材料機械性質及加快材料的降解，因此如何提高降低膜材之相分離成為一個待解決的問題。

二、研究目的

本研究以氫氧基磷灰石與硫酸鈣等具有骨傳導性與骨引導功能之陶瓷粉體進行混合燒結，藉由分析試片的機械強度、晶形結構及化學組成，探討適合的粉體混合比例及燒結條件(升溫速率及平衡時間)。其次使用聚己內酯與燒結之陶瓷粉體作為膜導引組織再生的複合材料，並藉由添加定量直鏈型脂肪酸(正己酸、月桂酸與油酸)於溶劑中，脂肪酸分子可產生重組形成類似微胞之結構，增加陶瓷粉體於高分子溶液中的穩定性，降低高分子複合材料之相分離的程度，分析膜材之機械強度與熱性質與表面性質(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(MG63)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。並以物理吸附或以大氣電漿改質將人類酸性纖維母細胞生長因子(hFGF-1)固定於膜材表面以評估對於細胞之生長與分化效應。

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(Hydroxyapatite, HA)顆粒並以溶劑鑄造法(solvent casting)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(poly-L-lactide, PLLA)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(NIH3T3)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 陶瓷複合粉物顆粒的製備與其性質分析

秤取氫氧基磷灰石(HA)與硫酸鈣(CS)以不同重量比進行混合與除泡處理後，置入模具壓製成圓形試片進行燒結，燒結後之試片分別測量其直徑、厚度與重量，以桌上型試驗機量測試片之徑向拉伸強度 (Diameter Tensile Strength, DTS)，施力速率為 1mm/min，施力方向為對徑壓縮。所得到的數據單位為牛頓(N)，將其換算成 MPa，換算公式如下： $DTS(MPa) = (2N/\Phi) \times 3.14 \times h$ ，其中 N 為最大斷裂力量(牛頓)， Φ 為樣品直徑(mm) 以及 h 代表試片厚度(mm)。將試片研磨粉碎後進行 X 光粉末繞射(X-ray powder diffraction, XRD)分析，當粉末試樣在受到特定波長的 X 光照射時，當試樣中某些晶體之晶格面(hkl)之面間距 d，對入射之 X 光傾斜 θ 角恰符合布拉格 (Bragg's) 公式： $n\lambda = 2d\sin\theta$ ，此時入射之 X 光就會被此晶格面所繞射，本研究選擇掃瞄範圍為 10° 至 70° ，以每分鐘 4° 的速率進行掃描，探討燒結前後之粉體之結晶構造與晶相變化。而粉體的結晶度(X_c)藉由以下公式求得， $X_c = 1 - (V_{211/300}/I_{300})$ ，其中 $V_{211/300}$ 為 HA 在(211)繞射面與(300)繞射面間峰谷的強度， I_{300} 則為(300)繞射面的強度，而 I_{300} 則為(300)繞射面的強度[10]。而粉體的化學結構則透過傅利葉轉換-紅外光光譜(FTIR)進行分析，紅外光是波長在 2.5~25 μ 的電磁輻射，透過分子吸收紅外光區輻射作用引起振動和轉動能階的遷移所產生的紅外線吸收光譜可用來觀察分子的基本結構，取 10mg 的陶瓷粉體與溴化鉀混合並加以研磨後，將混合物壓成透明薄片，掃描波數

為 $400-4000\text{cm}^{-1}$ ，掃描次數：8 次。解析度為 2cm^{-1} 。

4-2 陶瓷粉體懸浮液之製備及穩定性評估

離子晶體類陶瓷在非極性溶劑溶解度低易產生凝集與沉降行為，影響粉體在聚合物基質中之均勻性。本研究先將上述步驟燒結之陶瓷粒子添加至 1,4-二氧陸園(1,4-dioxane)中並攪拌一小時，做為控制組；另外，將 1% 直鏈狀脂肪酸(正己酸、月桂酸、油酸)加入 1,4-dioxane 形成均勻溶液，再將陶瓷粉體加入脂肪酸溶液中進行攪拌一小時，將溶液靜置後依不同時間點觀察粉體沉降並計算其沉降率，計算公式如左列，沉降率($\%$)= $[1 - (H_t/H_0)] \times 100\%$ ，其中 H_t 代表時間點 t 的陶瓷粉體沉降液面高度， H_0 為陶瓷粉體最初的液面高度。

4-3 陶瓷/聚己內酯複合材料的製備與性質評估

秤取聚己內酯(poly- ϵ -caprolactone, PCL)溶於 10ml 的 1,4-dioxane 中，配製成 15%(w/v) 的高分子溶液，將溶液倒入圓盤狀模具，置於排煙櫃中使溶劑揮發，做為控制組。實驗組方面，取相同量之 PCL 加入上述陶瓷粒子懸浮液(見 4-2 節)中攪拌均勻後，將混合溶液倒入圓盤狀模具形成均勻的液膜，置於排煙櫃中使溶劑揮發取得膜材。

將膜材裁切成「I」字形，以萬能材料試驗機以定速度拉伸(100mm/min)直至試片斷裂，取得膜材之最大力量、斷點強度、抗拉強度及伸長率。另外，取樣品 5-10 mg 裝入鋁盤加上鋁蓋壓成錠狀，以示差掃描式熱分析儀(DSC)中進行熱性質分析，100%結晶度之 PCL 熔化熱焓為 139.5J/g [11]，可計算膜材中 PCL 結晶度(X_c)的變化。膜材表面形態與化學組成分別以場發射掃描式電子顯微鏡(FESEM)與全反射式傅立葉轉換紅外光譜儀(ATR-FTIR)分析，而膜材之結晶形態則以 XRD 進行評估。

4-4 複合材料之生物活性

硬骨於體內的生成屬於生物礦化的現象，Kokubo 等人[12]研製一模擬體液(simulated body fluid, SBF)，與人體血漿具有相似的酸鹼值 ($\text{pH}=7.25$)，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。

4-5 複合材料之生物相容性與表面改質

膜材置於 24 孔細胞培養盤再以 70%酒精滅菌，植入 5×10^4 cell/ml 的人類類骨母細胞(MG-63)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。由於硬骨分化的過程中鹼性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)的表現量以及活性都會上升，因此 ALP 的活性可做為硬骨分化的一個指標。本研究將膜材以酒精滅菌後，接著以 PBS 清洗後置於 24 孔細胞培養盤內，將 5×10^4 cells/well 的細胞植入培養盤中，經過 7 天與 12 天後，用 TBST 溶液(0.5% TWEEN-20)將細胞反覆清洗，將細胞膜打破以釋出 ALP，再加入 p-nitrophenyl phosphate solution 於 37°C 下反應一小時，再加入 NaOH 溶液中止反應，以紫外光/可見光光譜儀測定溶液之吸光值(波長= 405nm)以推算出 ALP 之活性。

另一方面，人類酸性纖維母細胞生長因子(Human acidic fibroblast growth factor, hFGF-1)於體外實驗中可刺激骨母細胞株的增生以及引起骨母細胞(Osteoblast cells)產生骨結 [13-15]，以去卵巢大鼠為動物模式，以不同注射方式(局部及系統)發現可增加新骨之生成與骨質密度，其中以系統注射 FGF-1 可防止缺乏雌激素之大鼠骨質流失及骨的微結構重建 [16]。本研究將 hFGF-1 以磷酸鹽緩衝溶液(PBS)配製成濃度 10-100 ng/ml 的溶液，再以 $0.22\ \mu\text{m}$ 濾膜進行滅菌，將 FGF-1 溶液加入已培養 5×10^4 cell/ml 的人類類骨母細胞(MG-63)之細胞培養盤中，分別測定細胞貼附、生長與分化的情形。

五、結果與討論 (含結論與建議)

5-1 陶瓷粉體的製備與其性質分析

氫氧基磷灰石(HA)、硫酸鈣(CS)以及其混合粉體(CS5)的燒結條件以熱收縮率分析儀進行評估，當溫度升至 1000°C 時試片之收縮率即不再改變，顯示試片結構已趨於穩定。燒結的試片收縮率顯著降低，由表 1 可知混合粉體以較快的升溫速率燒結時收縮率最明顯。

表 1 燒結速率對陶瓷試片收縮率的影響

Sinter rate (°C/min)	Hydroxyapatite (HA)	Calcium sulfate (CS)	CS5(5%CS in HA)
10 (S10)	78.8	60.5	77.0
20 (S20)	43.9	38.0	30.1

而以 XRD 觀察 HA、CS 以及 CS5 之結晶型態，由圖 1 可看出燒結後的試片並無新繞射峰形成，燒結後試片較未燒結的試片之繞射峰有明顯的提升，顯示試片產生 Ostwald ripening 現象，粉體中較小的顆粒透過 Gibbs-Thomson 效應提供粉體顆粒成長的動力形成較大顆粒，即粉體透過相變化(phase transition)以降低系統能量進而達到穩定狀態。由表 1 中可知較慢的燒結速率促進 HA 的結晶度提升，而添加微量 CS 的混合粉體以較快的升溫速率進行燒結，其中的 HA 的結晶度也有顯著提升。

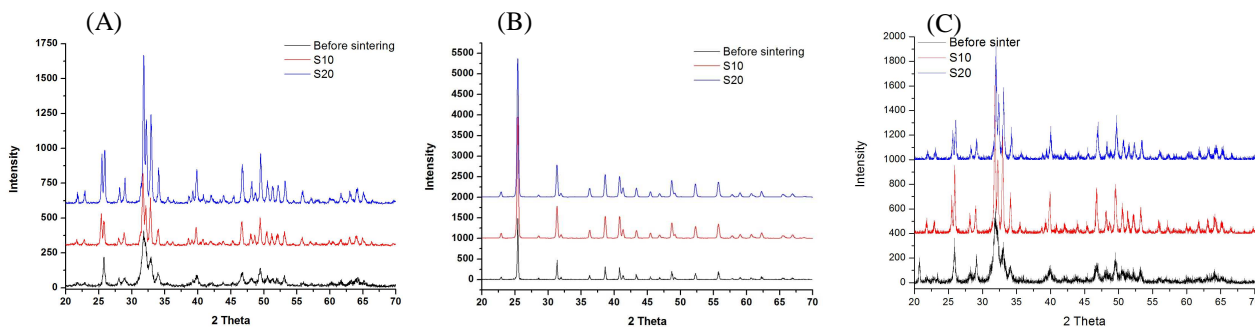


圖 1 不同燒結速率對(A)氫氧基磷灰石、(B)硫酸鈣及(C)氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合粉體(CS5)結晶結構的影響

表 2 燒結速率對於粉體中氫氧基磷灰石結晶度的變化

Sinter rate (°C/min)	Before sinter	10 (S10)	20 (S20)
Hydroxyapatite (HA)	92.2±2.5	97.1±0.7 ^{*,+}	93.0±0.9
CS5(5%CS in HA)	91.1±1.9	97.2±1.0 ^{**,+}	97.5±0.7 ^{**,+}

Significance ($p < 0.05$): *:greater than before sinter and S20 group of HA; ** greater than before sinter group of CS5; + greater than all the other sample.

試片機械性質以徑向拉伸強度(DTS)測試評估，較慢的升溫速率下混摻入 CS 的試片強度皆高於 HA，但除 CS40 以外，彼此間並無差異。而使用較快的升溫速率，CS5 與 CS10 與 HA 的機械強度沒有顯著差異，但 CS1、CS20 及 CS40 皆小於 HA。證實添加適量的硫酸鈣燒結後不會降低試片的機械強度(見圖 2)。

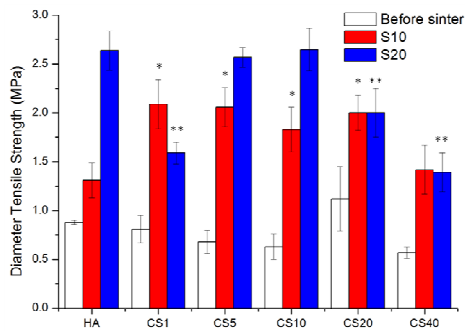


圖 2 燒結速率對陶瓷試片的徑向拉伸強度的影響

由 FTIR 分析粉體的化學組成，經過 1000°C 的高溫燒結之硫酸鈣其特性峰並沒有消失，但粉體在 3200-3600cm⁻¹ OH 官能基明顯減小，代表粉體之氫氧基團因燒結而損失，另外在 CS5 組中 PO₄³⁻官能基在粉體燒結後有觀察到衰減的現象。

由以上研究結果可知，試片之機械強度受燒結時升溫速率及 CS 比例影響，CS 在試片中扮演晶核的角色，誘導 HA 分子形成結晶並均勻分布，由混合粉體燒結後 XRD 繞射峰強度明顯增加可得證，而升溫速率控制結晶的成長速度，較快的升溫速率促使微晶形成，在適合的 CS 添加量(5%)，微晶能均勻分布在基質中而造成徑向拉伸強度明顯提升。

5-2 陶瓷粉體懸浮液之製備及穩定性評估

本研究取陶瓷粉體與 1,4 dioxane 混合後做為控制組，另外將 1,4 dioxane 與不同脂肪酸配製成 1% 溶液，再將粉體加入均勻攪拌作為實驗組。觀察粉體隨時間之沉降行為以評估其穩定性 (見圖 2)。未燒結與未燒結的 HA 粒子在含有脂肪酸的溶液中其沉降行為有所改善，其中以添加 1% 油酸(C18)最佳。但在 HA/CS 混合粉體(CS5)中，則以添加 1% 正己酸(C6)時粉體在懸浮液中的穩定性最佳。以上結果可知，粉體在懸浮液中的穩定性受粉體的種類以及界面活性劑(脂肪酸)種類而有所改變。

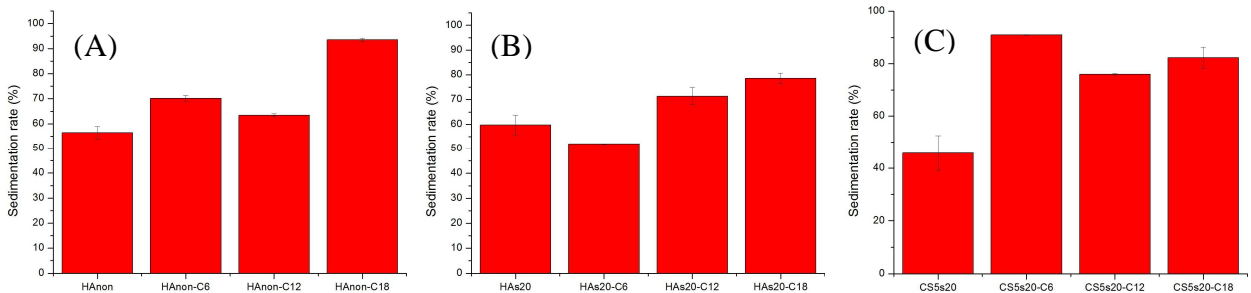


圖 3 氫氧基磷灰石粒子(A)與燒結後氫氧基磷灰石粒子 (B)及與硫酸鈣混合粉體(s20CS5)之沉降行為

5-3 陶瓷/聚己內酯複合材料的製備與性質評估

圖 5(A)顯示添加入正己酸(C6)及月桂酸(C12)的組別抗拉強度明顯下降，然而在添加油酸(C18)的部份，在添加入 1% 量時，膜材強度與無添加油酸的控制組相當，但添加至 5% 時膜材強度又變弱。由以上結果顯示油酸可調節 PCL 與粉體之間的界面。而在伸長率方面(見圖 5(B))，隨著添加 C6 及 C12 的組別的量增加，伸長率也隨之增加。但在 C18 的組別，在 1% C18 含量時，材料還具有延展性。另一方面，比較燒結前後的陶瓷粉體是否對於膜材拉伸強度產生影響，加入燒結的粉體的膜材其抗拉強度皆顯著的高於加入未燒結的粉體的膜材，但不同碳數的脂肪酸間無顯著的差異。

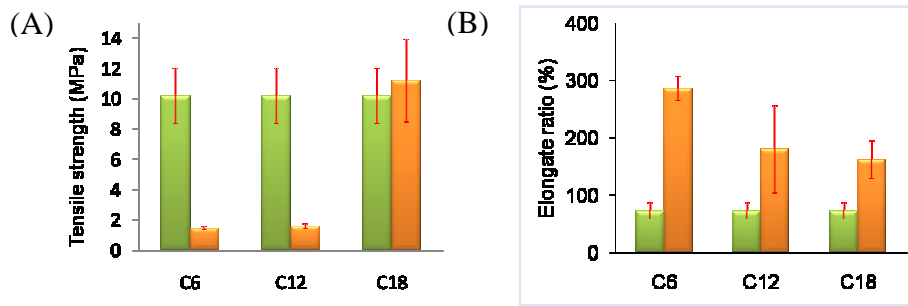


圖 5 脂肪酸種類對於膜材(含有 20%HA)的拉伸強度(A)拉伸強度及(B)伸長率的影響

熱性質分析方面，複合材料相對於 PCL 其熔點產生下降，以熔化熱計算出複合材料中 PCL 結晶度，加入粉體及脂肪酸可促使 PCL 結晶度下降(表 3)，增加高分子鏈的移動性而導致伸長率的增加，然而結晶度下降並沒有明顯改變膜材之拉伸強度，意謂脂肪酸在膜材內部調節了陶瓷與高分子間的界面。

表 3 陶瓷/聚己內酯複合材料熱性質分析

	T_m (°C)	ΔH_m (J/mg)	Crystallinity (%)
PCL	54.1	59.4	42.6
PCL- s20CS5	55.2	43.2	31.0
PCL-C6- s20CS5	54.0	43.8	31.4
PCL-C12-s20CS5	54.1	43.5	31.2
PCL-C18-s20CS5	52.6	45.2	32.4

由圖 4 可知膜材表面形態受脂肪酸影響，在不含脂肪酸的組別可以發現表面有陶瓷顆粒的聚集並浮現於材料表面，而在含有脂肪酸的組別表面平坦，並無任何陶瓷顆粒的發現，藉由脂肪酸的調節導致陶瓷粉體叢集的現象明顯下降，由 ATR-FTIR 分析證實無脂肪酸的添加的膜材表面組別 PO_4^{3-} 官能基($1110cm^{-1}$)的吸收明顯高於有添加脂肪酸的組別，代表膜材表面裸露的 HA 較多，以 TEM 觀察可發現粉體以奈米等級分散於高分子基材中。浸泡於 SBF 一個月後的膜材表面，未含有脂肪酸的組別表面有顆粒狀的陶瓷叢集物，添加入脂肪酸的膜材表面則發現有磷灰石的生成。由圖 4 可看出添加 C18 的膜材表面磷灰石的生成多於其他兩種脂肪酸，但添加 C12 的膜材表面有片狀磷灰石形成。

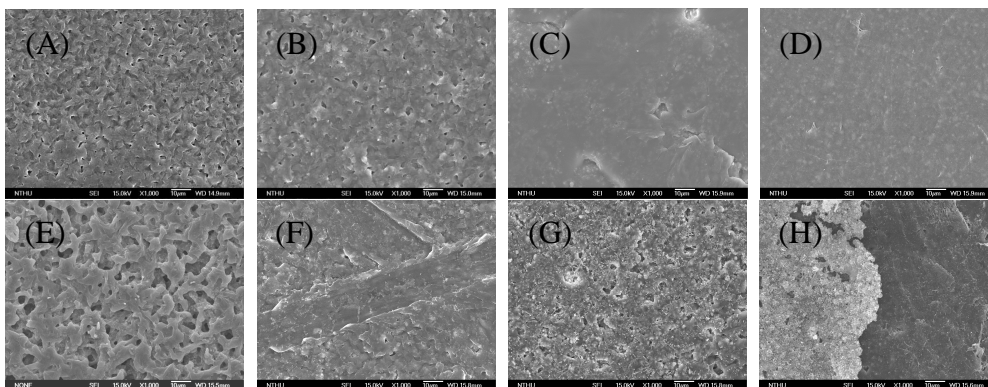


圖 4 以 FESEM 觀察 PCL(A)與 PCL-C6-HA(B)、PCL-C12-HA(C)與 PCL-C18-HA(D)之表面形態；與浸泡模擬體液一個月後之 PCL(E)、PCL-C6-HA(F)、PCL-C12-HA(G)以及 PCL-C18-HA(H)之表面形態。

5-5 複合材料之生物相容性與表面改質

以 MTT 比色法分析膜材表面對人類骨肉瘤(MG-63)細胞的貼附與增生行為產生的影響，圖 5(A)顯示單純脂肪酸加入 PCL 時，僅添加油酸(C18)的組別對於細胞貼附明顯多於 PCL，但在細胞生長方面則沒有明顯增加。而圖 5(B)與 5(C)是膜材混合脂肪酸及粉體(分別為氫氧基磷灰石燒結粉體與氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合燒結粉體)，可發現膜材對於細胞貼附與增生沒有產生明顯差異。但在細胞分化方面，膜材中分別添加正己酸(C6)與月桂酸(C12)細胞分泌鹼性磷酸酶的量遠大於 PCL，但加入 C18 的組別反而低於 PCL[圖 6(A)]。但當膜材加入燒結之氫氧基磷灰石時，細胞分泌鹼性磷酸酶的量與添加 C6 的組別明顯高於 PCL[圖 6(B)]，但更換粉體為氫氧基磷灰石/硫酸鈣混合燒結粉體時，單純添加粉體的膜材細胞鹼性磷酸酶的分泌遠高於其他組別，而脂肪酸的添加反而降低細胞鹼性磷酸酶的分泌。以上結果顯示材料表面組成與細胞分化有密切相關，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，對於細胞分化有明顯誘導的能力。

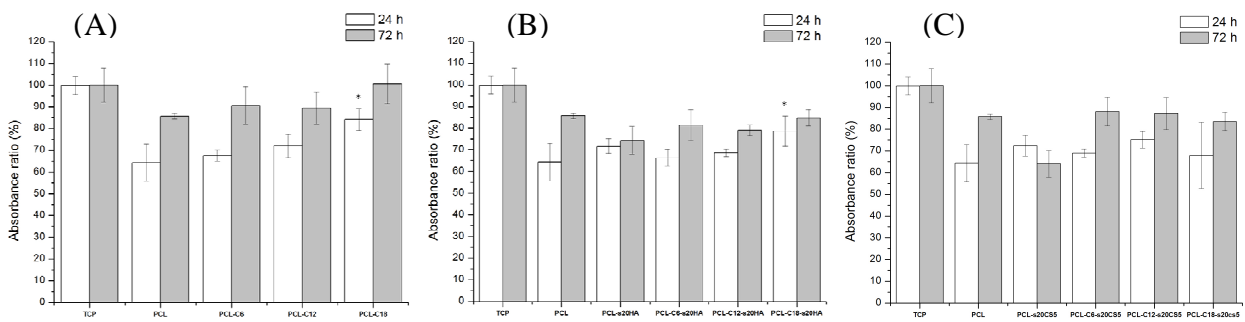


圖 5 人類骨肉瘤細胞分別培養於膜材上 1 天及 3 天後的細胞活性

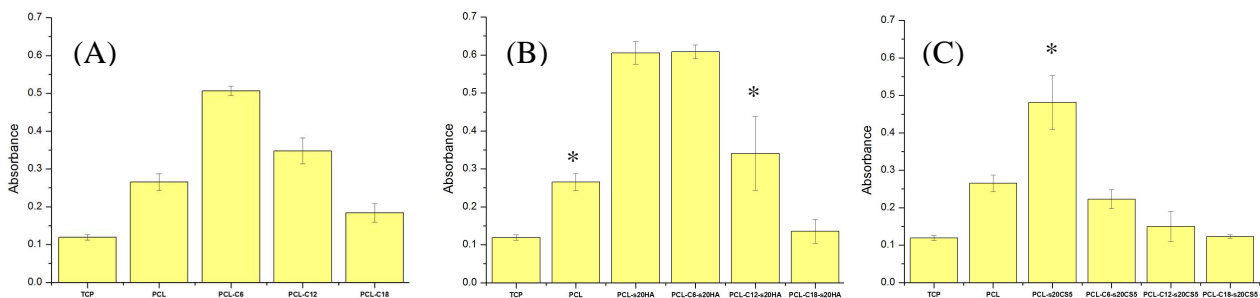


圖 6 人類骨肉瘤細胞培養於膜材上 7 天後鹼性磷酸酶分泌量

人類纖維母細胞生長因子(hFGF-1)接枝於膜材表面以提高膜材表面硬骨細胞的貼附、生長與分化，圖 7(A)顯示不同濃度的 hFGF-1 對於細胞活性的影響，hFGF-1 加(B)細胞培養液中培養 MG-63 細胞 24 小時，組間沒有明顯差異，顯示 hFGF-1 對於細胞貼附沒有明顯影響，然而在培養 72 小時，添加 10ng hFGF-1/ml 的組別，MG63 細胞增生量大於添加 50ng/ml hFGF-1 及控制組(未添加 hFGF-1，組織培養盤)，並遠大於添加 100ng/ml FGF-1 的組別，而在促進細胞分化方面，培養 7 天後細胞鹼性磷酸酶分泌量沒有明顯差異，但培養 12 天後，添加 10 與 50ng hFGF-1/ml 的組別，MG63 細胞分泌的 ALP 大於添加 100ng/ml FGF-1，而有添加 FGF-1 的組別皆遠大於控制組(未添加 hFGF-1，組織培養盤)。由以上結果可知添加 hFGF-1 在 10ng /ml 時對於細胞的分化有明顯的幫助。

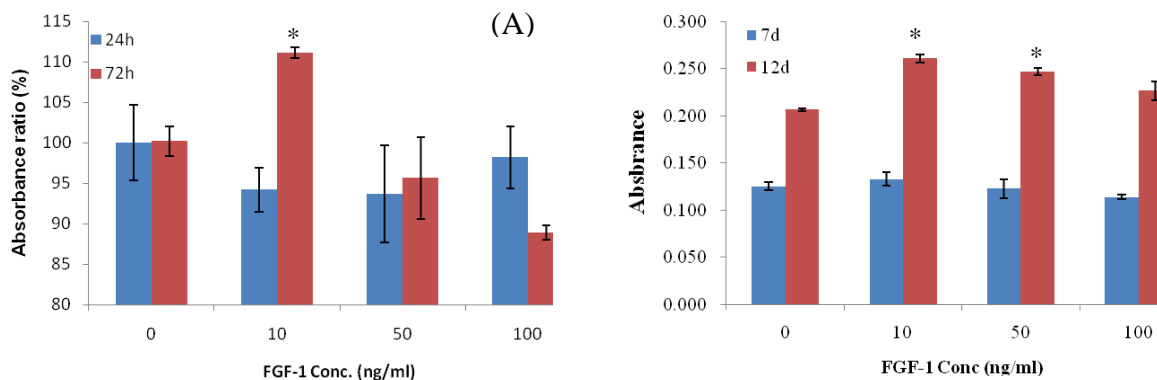


圖 7 人類纖維母細胞生長因子對人類骨肉瘤細胞的(A) 細胞活性與(B) 鹼性磷酸酶分泌量

六、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(ϵ -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] Pang YX, Bao X. Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. *J Eur Ceram Soc* 2003; 10:1697-1704.
- [11] Crescenzi, V, Manzini, G, Calzolari, G, Borri, C. Thermodynamics of Fusion of Poly- β -propiolactone and Poly- ϵ -caprolactone. Comparative Analysis of the Melting of Aliphatic Polylactone and Polyester Chains. *Eur Polym J*, 1972;8:449-463.
- [12] Inanc B, Elcin AE, Elcin YM. Osteogenic induction of human periodontal ligament fibroblasts under two- and three-dimensional culture conditions. *Tissue Eng.*

2006;12:257-66.

- [13] Rodan SB, Wesolowski G, Thomas K, Rodan GA. Growth stimulation of rat calvaria osteoblastic cells by acidic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1987;121:1917-1923.
- [14] Globus RK, Plouet J, Gospodarowicz D. Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology* 1989;124:1539-1547.
- [15] Kato H, Matsuo R, Komiyama O, Tanaka T, Inazu M, Kitagawa H, Yoneda T. Decreased mitogenic and osteogenic responsiveness of calvarial osteoblasts isolated from aged rats to basic fibroblast growth factor. *Gerontology* 1995;41(Suppl 1):2027.
- [16] Dunstan CR, Boyce R, Boyce BF, Garrett IR, Izbicka E, Burgess WH, Mundy GR. Systemic Administration of Acidic Fibroblast Growth Factor (FGF-1) Prevents Bone Loss and Increases New Bone Formation in Ovariectomized Rats. *J Bone Miner Res.* 1999;14(6):953-959.

七計畫成果自評

本研究主要可以分成三大部分，一為陶瓷複合粉體的製備與性質分析，二為高分子/陶瓷複合材料的製備與性質分析，以及最後為膜材表面改質與生物相容性評估。第一部分研究確認陶瓷試片之機械強度受燒結程序之升溫速率及 CS 比例影響，藉由微量 CS 的在試片中扮演晶核的角色，誘導 HA 分子形成結晶並均勻分布，由混合粉體燒結後 XRD 繞射峰強度與結晶度明顯增加可得證，而升溫速率控制結晶的成長速度，較快的升溫速率促使微晶形成，在適合的 CS 添加量(5%)，微晶能均勻分布在基質中而造成徑向拉伸強度明顯提升。本部份之研究結果除可做為製備複合材料之粉體參考外，由於 CS 在生物體內的降解速度遠快於 HA，可預期會使粉體產生微小孔洞以加速 HA 的降解，可應用於硬骨缺陷填充材料。

第二部份高分子/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。此外，在人類纖維母細胞生長因子對細胞貼附、生長與分化行為的體外評估發現，10ng/ml 的生長因子可幫助細胞的生長，但在細胞鹼性磷酸酶的分泌量反而低於本研究研製之複合材料膜材，此結果意味本研究製備之複合材料膜材表面對於細胞分化的調節效果遠大於生長因子，雖然其影響機制尚須實驗加以確認，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。