

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

透明質酸-膠原蛋白偶合物製備及作為軟骨組織工程細胞載體之評估(第2年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2218-E-040-001-MY2
執行期間：97年08月01日至98年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

計畫主持人：李明偉
共同主持人：王盈錦
計畫參與人員：教授-主持人(含共同主持人)：王盈錦
 助理教授-主持人(含共同主持人)：李明偉
 博士-兼任助理人員：陳永貴
 碩士-兼任助理人員：郭仲帆

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

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 98 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

計畫名稱：

透明質酸-膠原蛋白偶合物製備及作為軟骨組織工程細胞載體之評估

計畫編號：NSC 97-2218-E-040-001-MY2

期限：97.01.01~98.07.31

主持人：李明偉 助理教授

共同計畫主持人：王盈錦 教授

執行機構：中山醫學大學醫事檢驗暨生物技術學系

國立陽明大學醫學工程研究所

1. 前言

退化性關節炎是人類關節疾病中最常見的一種。關節炎的形成和老化有直接的關係，主要病變的地方是在股骨與脛骨相對的關節面（關節軟骨）。關節軟骨是由軟骨細胞和細胞外基質所組成，而細胞外基質中 proteoglycan 和 type II collagen 就佔了總重量的 90%。在老化的過程中，proteoglycan 和 type II collagen 受到蛋白酶的作用而產生降解，體內也無法生產足夠的 proteoglycan 和 type II collagen 來維持健康的軟骨結構，而導致軟骨的彈性喪失、含水量減少、無法承受外來的壓力、誘發炎症反應導致關節軟骨的損傷和關節功能的退化。

proteoglycan 的降解開始於 proteoglycan 的核心蛋白遭到蛋白酶水

解，目前已知有兩類的酵素參予此過程，分別是 MMPs(matrix metalloproteinases)和 aggrecanases。早在 20 世紀，研究就發現，在 OA 和 RA 患者的關節液中，MMPs 的表現明顯增加並且發現關節液中存在有 MMPs 水解 proteoglycan 後產生的片斷。在軟骨中 MMP-1、-2、-3、-7、-8、-9、-10、-12、-13 和-14 均可以切割 proteoglycan 核心蛋白球間區上的 Asn-Phe 間的 peptid 鍵，產生含有 G1 區的 C 端為 VDIPEN 的片段。此過程已被證實在軟骨降解的晚期扮演著重要的作用。另外一類 proteoglycan 水解酵素則是 aggrecanase，它是屬於 ADAMTS 家族（A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs），其中的 ADAMTS-4 又稱為 aggrecanase-1，ADAMTS-5 又稱為

aggrecanase-2。兩酵素都可以切割 proteoglycan 上硫酸軟骨素附著區內 Glu-Leu 間的 peptid 鍵產生 G1-RNITEGE 片段。此過程則是關節軟骨損傷時早期的表現之一。關節軟骨中參與 type II collagen 降解之酵素仍然和 MMPs 家族相關，其中和膠原蛋白降解最相關的是 MMP-1、MMP-8、MMP-13 和 MMP-14，此四種都具有膠原蛋白水解酶的活性且根據研究在退化性關節炎病患中其基因表現有大量增加，其中又以 MMP-8 在致病機轉上扮演的角色最為重要。當 type II collagen 受到膠原蛋白水解酶作用而分解時，軟骨細胞的型態會隨著產生變化，變成肥大細胞並分泌 type X collagen，此過程將導致軟骨細胞走向鈣化甚至引起細胞凋亡並引導細胞外基質礦化。本研究為開發軟骨組織工程用之細胞鷹架，以體外模擬的方式製備直徑 100-150nm 的 type II collagen fibril。為延遲其降解，將透明質酸 (Hyaluronic acid、HA) 透過 1,1'-Carbonyldiimidazole(CDI) 為架橋以共價鍵方式結合在 type II collagen fibril 的表面。除了對此複合材料進行性質分析，並選擇人類骨髓幹細胞在此複合材料上進行軟骨誘導 (chondrogenesis)，評估此複合材料應用在軟骨重建之可行性。本計劃的前半年重點在 HA-CDI、HA-CDI-Collagen 的合成及產物性質分析。計畫的第二年則是以此複合材料作為幹細胞軟骨化的測試，評估此複合材料在軟骨組織工程應用之可能性。

2. 實驗方法

2.1 type II collagen 純化

從牛隻取下膝關節軟骨(其必須於-20°C 中冷凍保存)。首先去除周圍的軟組織，再利用配製好並保存於 4°C 下 0.02M 之 PBS 沖洗數

次，再將軟骨切成 1 mm³ 的大小。泡製 15 倍體積的 4M Guanidine Hydrochloride，並將軟骨浸泡其中 48 小時，再取出軟骨置於 0.5M 醋酸溶液數天，用均質機均勻攪拌數次，目的是讓軟骨中的膠原蛋白 Type II 溶解出來。在溶液中加入 0.5mg/ml 的 pepsin，再利用均質機均勻攪拌後開始靜置。約 20 小時過後，以高速離心 12000rpm 離心 1 小時。取離心後的上清液加入 NaCl，讓溶液中 NaCl 的濃度為 0.86M，且用均質機均勻攪拌後靜置過夜，再以高速離心將沉澱物及上清液分開，其沉澱物即為膠原蛋白 Type II。將離心後所取出的沉澱物(膠原蛋白 Type II)溶至 0.5M NaCl+50m M Tris buffer (pH=7.4) 中，再利用 PBS 對此溶劑作透析至 pH=7.2，再高速離心取其上清液，此上清液即為純化之膠原蛋白 Type II。純化後之 collagen type II 利用膠體電泳法 (SDS-PAGE) 作純度之檢測。在濃度測定則採用 Regina K.P. 所建立之方法。

2.2 以 formamide 為溶劑製備 HA-CDI

本研究的第一個重點是合成 HA-CDI 化合物，由於 HA 是水溶性物質而 CDI 是非水溶性物質，為使反應在同一相進行，選擇 formamide 為溶劑：取 0.5 g HA (MW=16500) 溶於 10ml formamide 加熱至 50°C 使之完全溶解後，待冷卻。冷卻後分別加入 0.0735 g 的 CDI、0.1475 g、0.0368 g 於 50°C 下反應 4hr。用 60ml 酒精使之沉澱。離心取沉澱 (JA14 16000rpm 30min)、加入酒精清洗沉澱物。離心取沉澱，冷凍乾燥。反應步驟如下圖所示。

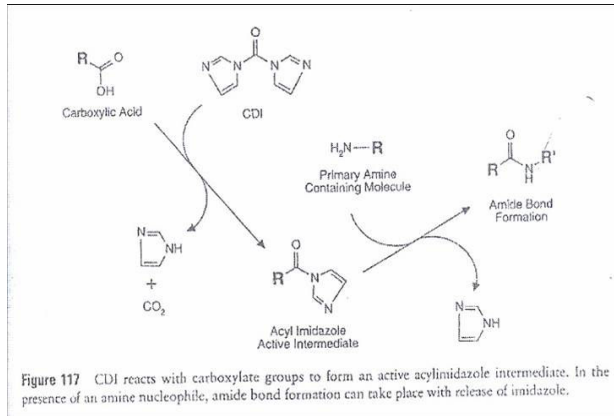


圖 1：HA-CDI 反應機制

2.3. HA 胺鹽化

將 HA 胺鹽化使可溶於 DMSO 中：取 4g Dowex 50WX2-400 用二次水洗 2~3 次。另外將 4g Dowex resin 和 6.6857g TBA (tetrabutylammonium hydroxide solution) solution in 50ml 二次水中混合 1hr at room temp。將 resin solution 加入 1% HA solution(100ml DI water)混合 2hr at room temp，離心 2min at 5000rpm 取上清液進行冷凍乾燥。

2.4 HA-CDI-Collagen 製備

將 SHA-imidazole 29mg (MW16500 Dalton)、LHA-imidazole 129mg(MW 234000 Dalton) 分別溶解在 2 ml 的 formamide。之後加入 20 ml 的 collagen solution(1mg/ml、pH 9.5 之 sodium borate buffer)中混合均勻，於 37°C 下反應 48 小時。之後以硫酸銨將膠原蛋白沉澱，此沉澱純化步驟需重覆 3 次。

2.5 Mesenchymel stem cell 在 HA-collagen 基材上之增生

為評估以 CDI 為架橋製備之 SHA-collagen、LHA-Collagen 基材是否適合做為軟骨組織工程用之細胞鷹架。本研究選擇 ATDC5 幹細胞株作為實驗之細胞來源，ATDC5 是來自於鼠科動物之畸胎瘤細胞，研

究發現 ATDC5 在有 insulin 的存在下能模擬軟骨細胞分化的第一階段進入細胞的收縮期 (condensation、early-phase differentiation)，當形成軟骨結節後 (cartilage nodules) 細胞也將開始表現 type X collagen 進入軟骨細胞的成熟階段，導致肥大軟骨細胞出現和進入細胞礦化。此細胞分化過程和人體胚胎發育為軟骨之過程相近，因此適合做為軟骨組織工程中細胞鷹架功能性評估之細胞來源。本實驗將 ATDC5 和二種基材共同培養，之後以 MTT reagent 測試其細胞內粒線體之活性，

2.6.軟骨化誘導

實驗步驟如圖 2 所示：

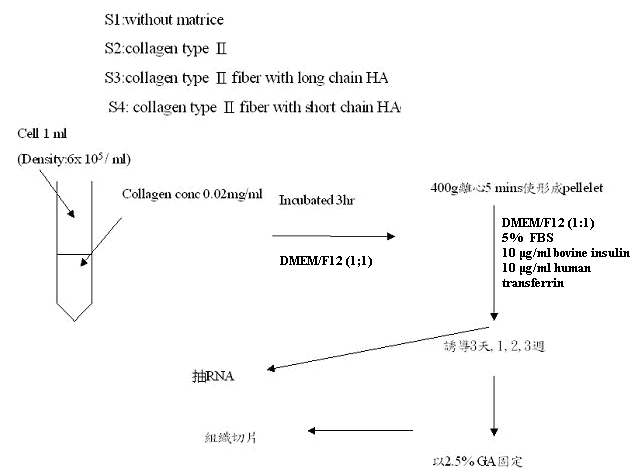


圖 2: 軟骨化誘導步驟。

2.7. 軟骨化之基因表現

將培養 3、7、14、21 天之細胞進行 RNA 純化再以 RT-PCR 進行基因表現分析。

(1) RNA 純化：

加 1 ml 的 Trizol(cell lysis)至 cell pellet(細胞數 10^6 - 10^7)，vortex 後 25°C 下放置 5 min，transfer to eppendroff，每 1ml 的 lysis solvent 加 0.2 ml 的 chloroform，劇烈 vortex 後，25°C 下放置 2 min，12000 g，4°C 下離心 15 min，分層後最上層透明為 RNA 層，取上層 (不要取到白色物) 至新的 eppendroff (約 0.51

ml) 再加入等量的 isopropanol, vortex 均勻後室溫下放置 10 min。12000 g, 4°C 下離心 10 min, 可得白色沉澱物 (RNA), Air dry on ice (可先用棉花棒將 eppendroff 管壁周圍酒精吸乾, pellet 乾躁過程中隨時注意不要完全乾, 否則 RNA 不好溶解), 將 RNA 溶再 20 μ l 的 DEPC 水中, -70°C 保存。

(2) RT (合成 cDNA):

將保存在-70°C 的 RNA 在冰上解凍, 取 1 λ 的 sample 加到 399 λ 的水中(稀釋 400 倍), 測 260/280 之 OD, 計算 RNA 濃度:

$$1 \text{ OD} = 40\mu\text{g/ml} \times 400 = 16000\mu\text{g/ml} = 16\mu\text{g}/\mu\text{l}$$

若所測之 OD 為 0.141 則 RNA 濃度為 $0.141 \times 16 = 2.267\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。取 RNA 的量為 5 μg (體積須由計算得到) 在加 DEPC-H₂O 使最終體積為 11 λ , 加 1 λ 的 oligo dT (若不溶可加熱至 70°C), on ice, 5-10 分鐘。每個 sample 加 mixture solvent 7 λ (10X RT buffer 2 λ , DTT 2 λ , DNTP 10mM 1 λ , DEPC-H₂O 2 λ)。42°C, 2-4 分鐘後, 加 1 λ 的 stration script 1 λ , 42°C, 50 分鐘 (或更長), 70°C, 10 分鐘, -20°C 保存。

(3) PCR:

配製: dH₂O (一般水 17.5 λ)、buffer(2.5 λ)、dNTP(2.5 λ)、cDNA(1 λ)、primer(F)(0.5 λ)、primer(R)(0.5 λ)、Taq(0.5 λ)

電泳膠配製: 3.2 g 的 agarose 溶在 160 ml 的 TAE 水(配膠時加入 EtBr, 130 ml 加 8 λ)。取 Sample 10 λ PCR 產物 + 2 λ dye, 電壓 120V, 35min。

2.8. 幹細胞軟骨化之組織學觀察

將軟骨化之組織置入 10% 福馬林的磷酸緩衝溶液中進行固定。再將組織以 50%、

70%、80%、90%、95%、100% 的酒精溶液進行脫水。脫水後的組織置入二甲苯、二甲苯/石臘溶液 (50/50)、石臘中進行滲臘。將滲臘後的組織置於液態石臘中進行包埋。將包埋後的石臘塊以切片機進行切片, 以顯微鏡觀察。

Hematoxylin-Eosin stain:

HE stain 是利用 Hematoxylin 將細胞核染成藍色, 利用 Eosin 將細胞質染成粉紅色。其染色步驟: Hematoxylin 染 2 分鐘, 以流水沖洗 2 分鐘, 0.5% HCl 1 秒, 再以流水沖洗 15 分鐘。以 Eosin 染 2 分鐘, 95% 酒精 30 秒, 100% 酒精 30 秒 (重複三次), 烘乾 2 分鐘, 浸泡二甲苯 (重複三次), 封片。

Alcian blue stain:

Alcian blue 是針對硫基反應, glucosaminoglycan 在陽性反應中呈現藍色, 可用以評估軟骨組織之細胞外基質。其染色步驟: 以 PBS 將試片清洗, 將 3% 醋酸覆蓋在試片上 2 分鐘, 以流水沖洗, 以 Alcian blue 染色液滴於試片上 30 分鐘, 以流水清洗, 95% 酒精 30 秒, 100% 酒精 30 秒 (重複三次), 烘乾 2 分鐘, 浸泡二甲苯 (重複三次), 封片。

3. 結果與討論

3.1: collagen type II 純化

將純化後之 collagen type II 利用膠體電泳法 (SDS-PAGE) 作純度之檢測, 由電泳圖(圖 3)上 band 的結果, 可推測純化後的產物分子量大於 108KD 左右, 結果符合 Collagen 的分子量, 且電泳圖上並無明顯之雜 band, 顯示純化後之產物沒有其他雜質。Collagen Type I 結構是由兩條 $\alpha 1(I)$ 一條 $\alpha 2$ 所組成的, 而 Collagen Type II 的結構則是由三條 $\alpha 1(II)$ 所組成的。由電泳片的結果可推斷, 萃取出中含有高純度的 collagen Type II。並經

由濃度測試得到萃取出 collagen Type II 濃度為 10 mg/ml。

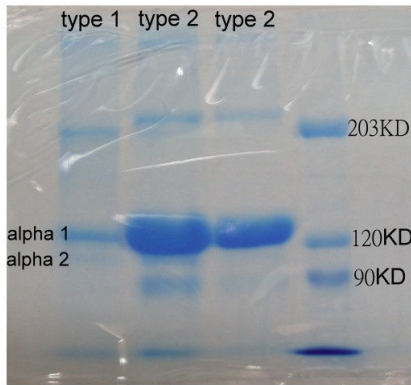


圖 3: collagen type I 和 collagen Type II 之純度檢測。

3.2 collagen type II fibril 製備

膠原蛋白的體外重組受到很多因素的影響，包括重組時之膠原蛋白濃度、溶液 pH 值、重組時間、添加物的存在與否（例如透明質酸存在）以及物理性震盪與攪拌等因素。本研究為了製備直徑和關節軟骨中的膠原蛋白相近，以 0.05 mg/ml 之濃度在 37°C 下靜態重組 48 小時，之後以 TEM 觀察重組之 fibril collagen。由圖 4 可以發現膠原蛋白之直徑介於 100-200 nm，且明顯的可以看出 fibril collagen 之 D period 的結構(約 67nm)，之後即以此條件重組之 fibril collagen 作為改質及幹細胞誘導之基材。

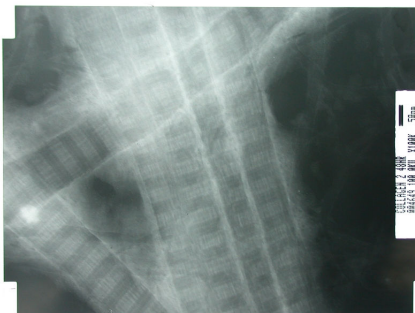


圖 4: 以 0.05 mg/ml 之濃度在 37°C 下靜態重組 48 小時之 fibril collagen type II。

在膠原蛋白的重組機制上，目前已知第 I、II、III、V、XI 型膠原蛋白都具有形成 D period 的能力。膠原蛋白重組動力是一種熱力驅動 (entropy-driven process)，主要是由膠原蛋白單體失去表面水分而開始驅動單體與單體間的 fusion。膠原蛋白單體是由 3 股蛋白鏈纏繞形成螺旋結構，每一單體長度有 4.34D (D=67 nm)，半徑 0.75nm，兩端各稱為 N 端 (尖端) 和 C 端 (鈍端)。重組時分為 side-by-side 和 end-to-end 兩種。side-by-side 是單體間以側邊融合，兩單體間會有 0.34D 的重疊區域。而每五個單體又形成五圓環的結構 (microfibril)，再由此五圓環由內向外堆疊成圓柱狀。end-to-end 則是單體間頭尾相接，使膠原蛋白長度增加，單體間會有一個約 0.66D 長度的 gap。D period 的明帶則是由 side-by-side 的重疊造成，暗帶則是 end-to-end 的 gap 造成。

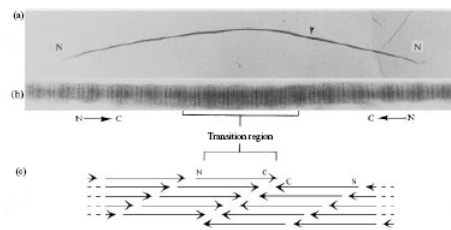


圖 5: collagen 重組模式。

3.3 HA-CDI 之定性分析結果

透明質酸的 (^1H , ^{13}C)-NMR 核磁共振光譜圖，在 1993 年有學者以透明質酸的單體、雙體和雙雙體 (tetramer) 以 ^1H -NMR 光譜圖做細部的光譜分析 (Toffanin, Kvam, Flaibani, Atzori, Biviano, Paoletti, 1993)，圖 6 為透明質酸之 ^1H -NMR 光譜圖，學者分析出幾支較具代表性之 peak，透明質酸上羧酸根旁邊碳上所帶的氫會出現在 $\sigma=4.60\text{ppm}$ 的位置；氮原子旁邊碳上所帶的氫會出現在 $\sigma=4.58\text{ppm}$ 的位置，而透明質酸上之烷基 ($-\text{CH}_3$) 會出現在 $\sigma=2.00\text{ppm}$ 的位置。

藉由 formamide 為溶劑，以 CDI 活化透明質酸上之羧酸根，其 HA-CDI 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖如圖 7，在 $\sigma=7.5\text{ppm}$ 左右的位置和 $\sigma=8.6\text{ppm}$ 左右的位置會出現兩支明顯的 peak，以無反應之 CDI 的 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖做比較，圖 8，可以發現 CDI 環上之氫位置由原本的 $\sigma=7.2\text{ppm}$ & $\sigma=8.0\text{ppm}$ 位移至 $\sigma=7.5\text{ppm}$ & $\sigma=8.6\text{ppm}$ 左右的位置，且以這兩支 peak 的積分面積的比值和無反應之 CDI 的 peak 積分面積比值相同 ($\text{CDI}: 2.045/1.000 = 2.045$) ($\text{HA-CDI}: 2.386/1.131 = 2.1$)，兩支 peak 所代表的氫個數比值皆約為“2”，因此可以推得 HA-CDI 有接枝成功。

接枝率的算法以固定透明質酸上之不反應烷基為 3 個氫為基準，其 CDI peak 在 $\sigma=7.5\text{ppm}$ 位置上之氫定為 2， $\sigma=8.6\text{ppm}$ 位置上之氫定為 1，以積分面積比去探討其接枝量的多寡，其接枝量的公式如下。

HA-CDI A peak 積分面積：

$$\left[\frac{3(\text{HA}-\text{CH}_3) \times (\text{CDI A peak 積分面積})}{2(\text{CDI A peak}) \times (\text{HA}-\text{CH}_3 \text{積分面積})} \right] \times 100\%$$

HA-CDI B peak 積分面積：

$$\left[\frac{3(\text{HA}-\text{CH}_3) \times (\text{CDI B peak 積分面積})}{1(\text{CDI B peak}) \times (\text{HA}-\text{CH}_3 \text{積分面積})} \right] \times 100\%$$

取兩支 peak 之接枝量的平均值，為最後之平均接枝量。

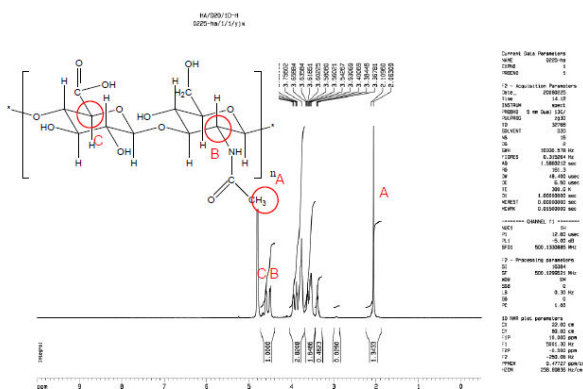


圖 6：透明質酸溶解於 D_2O 中之 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖。A peak：透明質酸上之烷基 ($-\text{CH}_3$)， $\sigma=2.00\text{ppm}$ ；B peak：透明質酸

上於二級氮旁六碳環上之氫離子， $\sigma=4.58\text{ppm}$ ；C peak：透明質酸上於羧酸根旁六碳環上之氫離子， $\sigma=4.60\text{ppm}$ 。

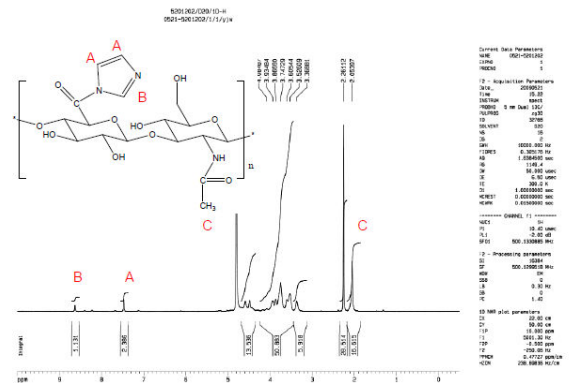


圖 7：HA：CDI=1：2，反應時間 2 小時產物溶解於 D_2O 中之 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖。A peak：HA-CDI，imidazole 環上碳碳雙鍵之氫原子， $\sigma=7.5\text{ppm}$ ；B peak：HA-CDI，imidazole 環上碳氮雙鍵上之氫原子， $\sigma=8.6\text{ppm}$ ；C peak：透明質酸上之烷基 ($-\text{CH}_3$)， $\sigma=2.05\text{ppm}$ 。

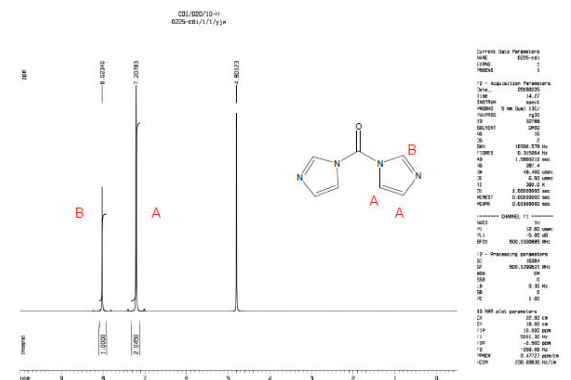


圖 8：CDI 溶解於 D_2O 中之 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖。A peak：CDI，imidazole 環上碳碳雙鍵之氫原子， $\sigma=7.2\text{ppm}$ ；B peak：CDI，imidazole 環上碳氮雙鍵上之氫原子， $\sigma=8.0\text{ppm}$

3.4：純化方式對接枝量的影響

本實驗以 CDI 活化短鏈透明質酸，使透明質酸上的羧酸根帶有 CDI 分子。由於反應

完後之過量的 CDI 會殘留於反應物中，剛開始以 100% acetone 震盪清洗 HA-CDI 沉澱物，以來回震盪離心四次的方式欲將過量 CDI 洗去，但由 ^1H -NMR 光譜圖發現，接枝量有高於 100% 的情況發生，因此對於如何得到一較佳的純化方式，以下表 1 的純化方式去探討接枝量的變化，欲得到一個較有說服力的純化方法。

表 1: HA-CDI 之純化方式

純化方法	100% acetone 震盪清洗 4 次
	以 20% HA-CDI 回溶於水 1 次
	90% acetone 震盪清洗 1 次+20% HA-CDI 回溶於水 1 次
	90% acetone 震盪清洗 3 次+20% HA-CDI 回溶於水 1 次

由 ^1H -NMR 光譜圖結果發現，20% HA-CDI 回溶於水 1 次的純化方式所得到的結果，與 100% acetone 震盪清洗 4 次的結果雷同，並無法有效降低 CDI 殘留的問題，相同的官能基比與反應溫度，其接枝量由 2 小時 140%~150% 到 24 小時的 80%~90%。而 90% acetone 震盪清洗的次數明顯可以有效降低 CDI 接枝量的問題。90% acetone 震盪清洗 3 次後再以 20% HA-CDI 回溶於水 1 次的方式，較能有效降低過量的問題，其接枝量由 2 小時最低的 107% 到 24 小時最低的 46%，因此以 90% acetone 震盪清洗 3 次後再以 20% HA-CDI 回溶於水 1 次的方式所得之接枝量較其他三者來說較有可信度，較能降低 CDI 的殘留問題，因此以此純化方式來做為往後的純化條件，圖 9。

欲探討 90% acetone 清洗次數對接枝量的影響關係，也為了取的一較有說服力的清洗次數，因此改變其 90% acetone 清洗的次數來做參數觀察接枝表現，其 ^1H -NMR 光譜圖的結果發現，圖 10，以 HA 與 CDI 在 25°C 下反應以 HA : CDI=1 : 6 的條件反應 4 小時或 6 小時，其接枝量很明顯由只以 90% acetone 清洗 1 次下降到清洗 3 次，且在以 90% acetone 清洗 3 次得到一個最低值，因

此，90% acetone 震盪清洗 3 次後再以 20% HA-CDI 回溶於水 1 次的方式確實為最有效降低其 CDI 過量的問題。

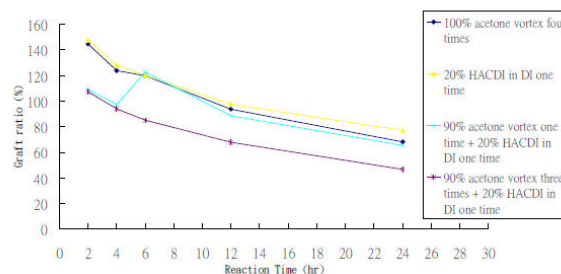


圖 9：不同純化方式對 HA-CDI 的接枝量影響

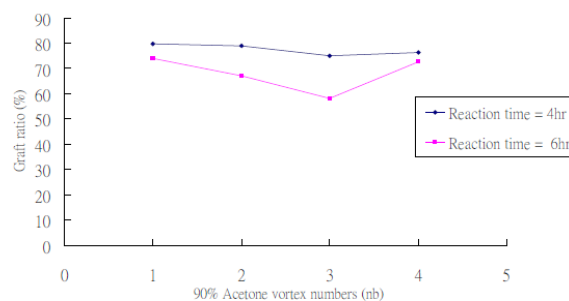


圖 10：HA : CDI=1 : 6，反應時間 4 小時與 6 小時，觀察 90% acetone 清洗次數對接枝量的影響關係。

3.5 溫度對接枝量的影響

本實驗以 25°C 和 50°C 做為參數，以固定反應比例和反應時間來觀察溫度的觀系，由圖 11 可以發現，於 25°C 下反應的定量取線，其任何時間之接枝量皆較 50°C 下反應之接枝量高，推斷是由於溫度增加，會使 HA-CDI 反應更劇烈，但由於 HA-CDI 為一較不穩定的中間體，容易與親核基行第二階段的共價鍵結反應，因此溫度的提升，也促使 HA-CDI 自行交聯的機會，由於 HA 分子間的自行交聯，原本接在 HA 上之 CDI 因此被用於交聯而轉變成 imidazole 在純化的階段就被洗掉，因此，不論是 25°C 或是 50°C 的反應溫度，接枝量皆隨時間而下降，這也是因為反應時間越久，交聯的機會越多，所以接枝量

會隨時間增加而減少。

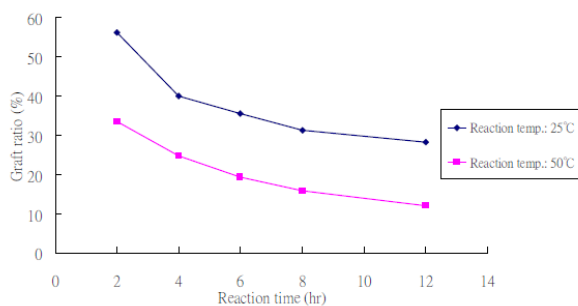


圖 11：HA：CDI=1：4，反應 2 小時，觀察 25°C 與 50°C 對接枝量的影響

3.6 改變 CDI 的量做定量分析的結果

在行透明質酸交聯反應前，欲取得一較佳的 HA-CDI 接枝條件，因此由圖 9；圖 10；圖 11 觀察，可以得到[1]以 90% acetone 震盪清洗 3 次後再以 20%HA-CDI 回溶於水 1 次的方式做為純化；以 25°C 做為反應的溫度設定，再來改變其 HA 和 CDI 的反應比例及反應時間，以取得一較佳的 HA-CDI 的接枝條件，以進一步合成 HAX gel。由圖 12 可得，由於 HA：CDI=1：6 這組還是有明顯 CDI 殘留的問題，因此改以 HA：CDI=1：4，在 25°C 反應 2 小時這組取得一較好的反應條件，來進一步的交聯合成 HAX gel，而其接枝量的表現為 56.16%。

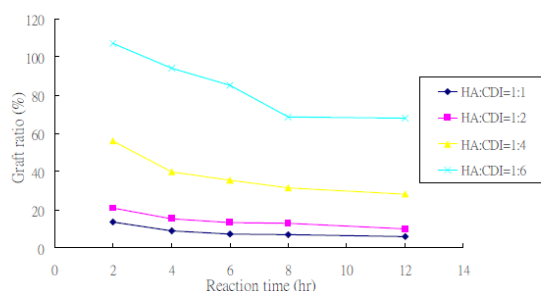


圖 12：改變 HA 與 CDI 官能基比和改變反應時間，固定反應溫度 25°C，作 HA-CDI 定量分析曲線。

3.7 HA-CDI-Collagen 偶合物分析

研究初期我們也先選擇 2 種不同分子量

的 HA (Mw16.5KD 和 234KD) 以 1,1'-Carbonyldiimidazole 活化，之後再和 type II collagen 進行親核取代反應將 HA 和 collagen 偶合。此實驗流程則是先不純化 HA-CDI 直接在 formamide 作為溶劑下同時進行 HA-CDI 和 HA-Collagen 的親核取代反應。圖 13 是將不同反應條件下製備的 HA-collagen 複合物進行 SDS-PAGE(10%)所得之結果。第一個樣品是控制組(type II collagen)，第二及第三是分子量 16.5KD 的 HA 經活化後在 4°C 及 37°C 下和 collagen 偶合之產物，第四及第五是分子量 234KD 的 HA 經活化後在 4°C 及 37°C 下和 collagen 偶合之產物。我們利用電泳圖計算出蛋白移動距離(α chain)/染劑移動距離之比值，作為分子量變化的判斷依據。在控制組其比值為 0.43，SHA-collagen 不論在 4°C 及 37°C 所得之比值也是接近 0.43，LHA-collagen 在 4°C 反應時所得之比值為 0.40 但在 37°C 反應時所得之比值為 0.39。由以上可知 SHA-collagen 的分子量變化難以從電泳數據判斷，但是 LHA-collagen 因為分子量變化差異較大因此電泳的結果可以證實 LHA-collagen 比起單純 collagen 分子量有增加，並且在 37°C 下的反應性比在 4°C 下高，將來我們預計再利用管柱層析的方式將確實的分子量訂出。由初步的結果證實本研究所設計的反應條件是可行的。

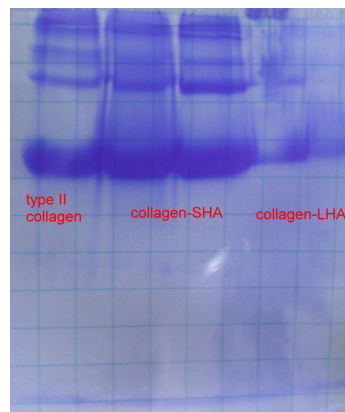


圖 13：HA-Collagen 之電泳圖。

3.8. ATDC5 cell 以 Collagen type II 及 HA 偶合物 fibril 為基材之軟骨化誘導

3.8.1 AGC 表現：如圖 14 所示，第 0 天的 AGC/GADPH 比值定為 1。AGC 表現隨誘導天數增加有增加的趨勢，但表現量的增加倍率都介於 1~2 倍之間，差異最大的是 SHA-CII fibril 誘導 21 天倍率增加為 2.13。以 AGC 表現作為判斷依據 SHA-CII fibril 為較佳之細胞載體

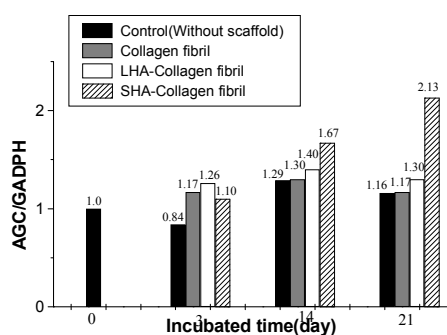


圖 14: AGC 表現半定量分析。

3.8.2 Collagen II 表現：

第 0 天的 CII/GADPH 比值定為 1。CII 表現隨誘導天數增加有增加的趨勢，但表現量的增加倍率都介於 1~2 倍之間，差異最大的是 SHA-CII fibril 誘導 21 天倍率增加為 1.87。以 CII 表現作為判斷依據 SHA-CII fibril 為較佳之細胞載體。(圖 15)。

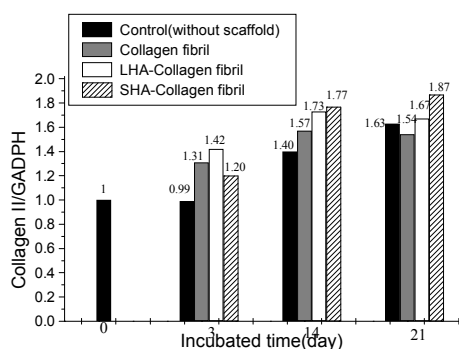


圖 15: Collagen II 表現半定量分析。

3.8.3 ALP 表現

細胞以 pellet 方式培養，ALP 表現都受到抑制，不過沒有材料的組別在誘導的第 3, 14 天都還有 ALP 表現。(圖 16)。

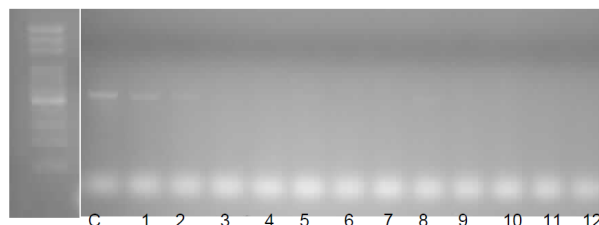


圖 16: ALP 表現。C: 誘導第 0 天 單獨細胞誘導 3, 14, 21 天 分別以 1, 2, 3 表示。細胞+CII fibril 誘導 3, 14, 21 天分別以 4, 5, 6 表示。細胞+LHA-CII fibril 誘導 3, 14, 21 天分別以 7, 8, 9 表示。細胞+SHA-CII fibril 誘導 3, 14, 21 天分別以 10, 11, 12 表示。

3.9 軟骨化誘導之組織學觀察

3.9.1 誘導 3 天之組織變化：不加材料的組別，細胞 pellet 的結構比較難維持其 pellet 型態，較易碎裂。誘導 3 天過後，有加 collagen fibril 之三組細胞出現 lucuna 的現象明顯優於沒有加材料之組別，尤其是 SHA-CII fibril 組，lucuna 最為明顯數量也最多。其次是 LHA-CII fibril 組，如圖 17 所示。

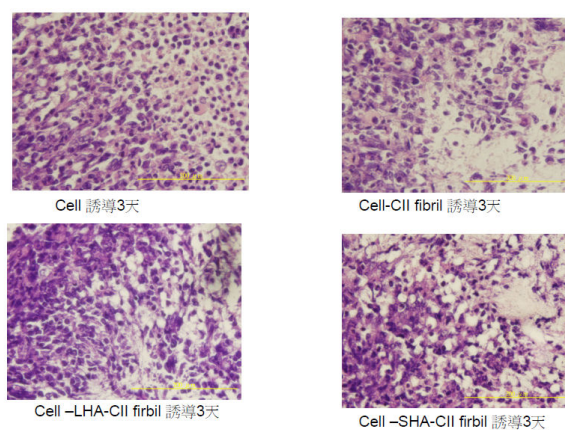


圖 17: 不同基材下軟骨化誘導第 3 天組織學變化(400X)。

3.9.2 誘導 21 天之組織變化：誘導第 21

天，在 LHA-CII fibril 和 SHA-CII fibril 兩組，pellet 明顯分為內外層，外層之細胞外基質明顯較為均勻，內層之細胞外基質則為纖維狀，由此結果可以推論外層之細胞外基質為細胞自己分泌，而內層之細胞外基質為實驗所外加的 collagen fibril。外層的細胞型態明顯相似於軟骨細胞，並且有細胞重排(組織化現象)，而內層之細胞則是會依著外加 collagen fibril 的排列方向生長，細胞排列不具有方向性，細胞的軟骨化特徵只能看到 lacuna，其他軟骨組織的特徵則是不明顯。至於另外不含 HA 的兩組，軟骨組織的特徵則是不明顯，如圖 18 所示。

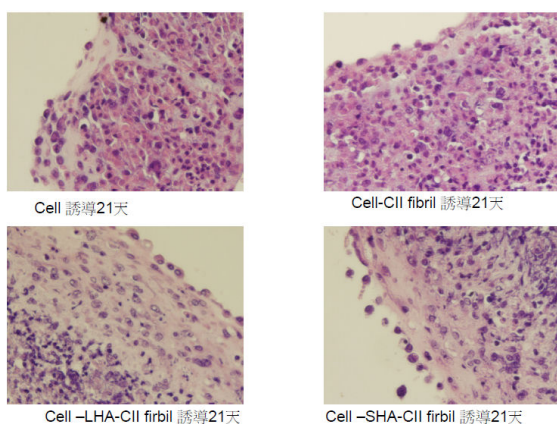


圖 18:不同基材下軟骨化誘導第 21 天組織學變化(400X)。

4. 結論

本研究為了改進透明質酸和膠原蛋白偶合物的製備流程，選擇以 1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI)為架橋，CDI 常被用在生物性分子的交聯反應，特別是多醣體、聚乙烯醇(PEG)或是短肽的合成。CDI 的反應特性就是可以很快速和 hydroxyl group 進行親核反應，達到活化 hydroxyl group 的目的。受活化的基團在鹼性下可再和 RNH₂ 基團進行第二次親核取代反應。因此在反應的過程中並不會有 imidazole 基團的殘留，適合作為生物性分子的活化及交聯試劑。以 CDI 作為透明質酸/膠原蛋白複合物

的架橋最大的優點就是可以藉由調控 CDI 的量，決定 hydroxyl group 基團被活化的比例。亦即可藉由此調控參數決定偶合在膠原蛋白上透明質酸的量，此因素將影響複合物的降解速率及生物活性，我們希望藉由可調控的因子製備出最佳化的膠原蛋白/透明質酸複合物，作為幹細胞軟骨化之載體。此合成法的另一個優點就是醱化的膠原蛋白在透明質酸偶含量不高的情況下，據推測還是具有重組成膠原纖維的能力，因為在反應的過程中大部分的酸基和胺基都未進行反應而被保留下來，和 EDC 活化法相較有極大的差異。以 CDI 偶合透明質酸和膠原蛋白最大的問題，就是中間產物(HA-imidazole)必須在無水的情況下穩定，因此如何使透明質酸溶解在有機溶劑和 CDI 進行親核反應則是一大問題。本研究為建立透明質酸在有機相之反應系統則是選擇 formamide 作為溶劑，並已證實不論是透明質酸或是膠原蛋白都可以均勻分散在 formamide。此系統的建立對於透明質酸或是膠原蛋白的改質有很大的幫助。

另外，以所製備的 Collagen II、Collagen II-SHA、Collagen II-LHA 作為軟骨化誘導之細胞基材則是發現，以 pellet 的方式進行軟骨細胞誘導，材料所扮演的角色是在誘導的初期可以穩固 pellet 的型態，對軟骨化有正面效應，並使軟骨化細胞提早出現。含有 LHA、SHA 之 collagen fibril 在誘導 21 天的組織學中明顯發現有軟骨組織化現象，推測此現象是因為 HA 的存在使軟骨分化速度加快所致，配合基因表現分析亦證實含 HA 之組別 AGC、CII 的表現量均較高。LHA、SHA 對軟骨化之影響比較，組織學上的差異不大。但若以基因表現量分析短鏈 HA 的存在對軟骨化之影響優於長鏈 HA。因此，本研究所製備之基材，將來若應用於臨床軟骨組織之重建，則是建議以 Collagen II-SHA 為

較佳的細胞載體。

5. 參考文獻

- [1]. Johnna S.Temenoff, Antonios G. Mikos
Review : tissue engineering for
regeneration of articular cartilage.
Biomaterials 2000;21:431-440
- [2]. Karen J.L.Burg, Scott Porter, James
F.Kellam. Biomaterial developments for
bone tissue engineering. Biomaterials
2000;21:2347-2359
- [3]. Gross AE. Aubin P. Cheah HK. Davis AM.
Ghazavi MT. A fresh osteochondral
allograft alternative. Journal of
Arthroplasty 2002; 17(4):50-53
- [4]. Richard D.Coutts,Robert M.Healey,Roger
Ostrander,et al. Matrices for cartilage
repair. Clinical orthopedics and related
research 2001; 391S:.S271-279
- [5]. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al.
Treatment of deep cartilage defects in the
knee with autologous chondrocyte
transplantation. N Engl J Med. 1994;
331(14):889-895.
- [6]. T.Noguchi, M Oak, M. Fujino, M. Neo M
& Y.Yamamuro: Repair of osteochondral
defects with grafts of cultured
chondrocytes: comparison of allografts
and isografts. Clin Orthop Relat Res
1994;302: 251-8
- [7]. Sallyr.R Frenkel. and Paul E. Di Cesare
Degradation and repair of articular
cartilage. Frontiers in Bioscience 19994:
d671-685
- [8]. Stefan Nehrer, Cynthia R. Lee, Howard A.
Breinan, Articular Cartilage Chondrocytes
in Type I and Type II Collagen-GAG
Matrices Exhibit Contractile Behavior in
Vitro Tissue Engineering 2000; 6(5):
555-565
- [9]. V.F. Sechriest, Y.J. Miao, C. Niyibizi, A.
Westerhausen-Larson, H.W. Matthew, C.H.
Evans, F.H. Fu and J.K. Suh,
GAG-augmented polysaccharide hydrogel:
a novel biocompatible and biodegradable
material to support chondrogenesis. J
Biomed Mater Res 2000;49(4): 534–541
- [10].Douglas W.Jackson, Mark J.Scheer and
Timothy M. Simon, Cartilage substitutes:
Overview of Basic Science and Treatment
Options.2001; 9(1):37-52
- [11].Andrew D.Rowan Cartilage catabolism in
arthritis: factor that influence homeostasis.
Expert reviews in molecular medicine,July
2001;3:1-20
- [12].Marcel D. Posthumus, Pieter C. Limburg,
Miek A. van Leeuwen, and Martin H. van
Rijswijk. Matrix metalloproteinases in
rheumatoid arthritis.lecture chapter 2
- [13].A R Pool,M kobayashi,T Yasuda,S
Lavery,F Mwale,T kojima,T Sakai,C
Wahl. et al. Type II collagen degradation
and its regulation in articular cartilage in
osteoarthritis. Ann Rheum 2002 :61:78-81
- [14].P.M.van der Kraan,P.Bumat,T.van
Kuppevelt and W.B.van der Berg.
Interaction of chondrocytes,extracellular
matrix and growth factor:relevance for
articular cartilage tissue engineering.
Osteoarthritis and Cartilage
2002;10:631-637
- [15].Cheryl B.Knudson. Hyaluronan-cell
interactions during chondrogenesis and
matrix assembly. Cells and Materials
1998;vol 8:33-56

中山醫學大學醫技系 李明偉 助理教授

出席多功能、複合奈米材料第一屆大會 心得報告

一、會議背景介紹

First International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials 今年首度舉辦，地點選擇在法國中部的杜爾市(Tours)，時間為 2009 年 3 月 15-19 日。本次會議邀請演講 32 場，口頭報告論文多達 132 篇以上，poster 論文也達 550 篇以上，是屬於大型的學術演討會。本次研討會主席為 Philippe Belleville(*Commissariat à l'Énergie Atomique, France*)、C. Jeffrey Brinker(*University of New Mexico and Sandia National Laboratories, USA*)、Jin-Ho Choy (*Ewha Womans University, Seoul, Korea*)、Clément Sanchez (*Université de Paris VI, France*)。因會議規模過大因此又分成三部份：Symposium A: Biohybrids and Biomaterials(生物複合及生醫材料)、Symposium B: Bottom-up Approaches to Functional Nanomaterials and Nanocomposites(由小而大建構的奈米材料和奈米組合)、Symposium C: Functional Porous Materials (功能孔洞性材料)。每一研討會下又有負責的主席各 6 位。是一個相當有組織的會議。本大會的主要宗旨為了改善人類的的生活，希望能在醫療、環境及能源方面提供新的策略，促進學術上的交流。集合的專家包括高分子化學家、物理學家和工程師、生物材料的化學家、有機化學家、無機化學家、固態化學家、溶膠凝膠化學家、複合材料科學家、膠體化學家和物理學家、納米材料科學家等。透過建立一個獨特的論壇，和不同的研究團體和相關產業進行知識交流，希望能夠提供新的合作的可能性和潛在的協同作用。

二、會議議程

本人此次參與研討會，於 3 月 15 日凌晨搭乘長榮班機前往巴黎，隨即轉搭 TGV 前往 Tours 的會場註冊，回程則是搭乘 3 月 20 號長榮班機回台北，總共 6

天。此次主要是參與生物醫學材料類 (Symposium A: Biohybrids and Biomaterials)，會議議程如附件所示。

三、會議心得

這次參與會議，除了和國外學者進行交流以外，也發表一篇 Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in collagen-HA fibrils。本篇論文主要是利用組織工程技術，以奈米膠原纖維為基材，希望能發展生物性的人造軟骨組織，進行軟骨修復。此次會議中比較少論文有涉及細胞實驗，主要都屬於工業上的材料製造，因此相當多的與會學者提出了非常好的建議，茲就會場所提之問題與回題做一摘錄：

問一：請問膠原蛋白從何而來？

答：本實驗所用之 type II collagen 取自牛關節，經由酸水解與鹽析進行純化。

問二：膠原纖維直徑有辦法控制嗎？

答：本研究常是經由改變各種參數以控制膠原纖維直徑，例如 pH、溫度、時間、添加物等。不過再現性並不好，本篇論文所列之條件，是最佳化條件。

問三：為何要做成 3D 的膠原纖維，很多軟骨組織工程論文並不見得需要 3D 的鷹架？

答：我們認為幹細胞在 3D 的環境中細胞增生、分化能力較強。而且 3D 結構，細胞和材料之間有好的 focal adhesion，對軟骨細胞維持型態的維持有幫助。

問四：退化性關節炎，關節面都不規則，如何將你的 3D 軟骨組織做植入？

答：由於尚未進行動物實驗，此問題尚未有規劃，將來透過骨科醫師的協助是必要的。不過有些 paper 指出，可以用骨膜固定後縫合，是一個可以考慮的方法。

本次會議之所以能夠成行，必須感謝國科會在經費上的補助，由於近幾年國內經濟的衰退，導致研究經費無法擴增，對學術研究發展有很大的影響，即使面對

不景氣，政府單位還是盡其所能的給予年輕學者有發展的機會，透過參與國際研討會，擴展自己的研究領域或獲得新的研究構想，是非常有意義的。

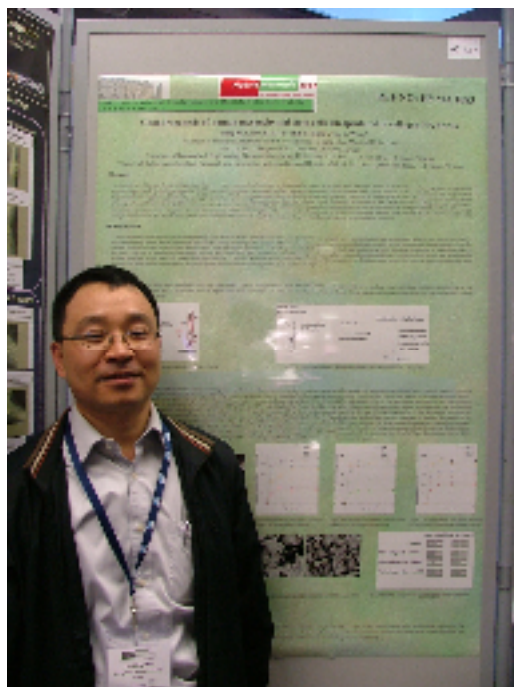


圖:與會照片

表:會議程序表

Sunday 15 March 2009					
12:00	Registration				
14:00	Welcome from Conference Chairs				
14:15	Plenary Lecture 1 – Porous hybrid solids: A new world, G. Férey, <i>Université de Versailles, France</i>				
Symposium A		Symposium B		Symposium C	
15:00	A01 – Hybrid devices based on self-assembled hydrophobin biofilm,	15:00	Featured Lecture BF1 - Functional coatings: The sol-gel approach,	15:00	C01 – Microporous polymers and organic frameworks,
15:20	A02 – Design and creation of bioinspired surfaces with special wettability,	15:30	B01 – Covalent functionalisation of inorganic nanoparticles, A.	15:20	C02 – New MOFs and EOFs for gas storage and catalysis,
15:40	A03 – Water repellency and adhesion properties of dome-spike hybrid film made from self-organized honeycomb-patterned polymer films,	15:40	B02 – Multiresponsive hybrid microgels and hollow capsules with a layered architecture,	15:40	Invited Lecture CI1 - Large-scale synthesis of ordered mesoporous molecular sieves,
16:00	Coffee Break	16:01	Coffee Break	16:00	Coffee Break

		0			
16:30	Invited Lecture AI1 – Bioactivity of metal-based materials,	1 6 : 3 0	B03 – Structured hybrid nanoparticles via surface-initiated atRP of methyl methacrylate from ordered mesoporous silica, M.	16 : 3 0	C03 – Unconventional metal organic frameworks: porous cross-linked phosphonates,
17:00	A04 – Easily controlled orientation and effectively optimized activity of lipases immobilized in bidimensional confined spacing,	1 6 : 5 0	B04 – New hybrid silica-core and polymer-shell nanomaterials derived from living anionic polymers,	16 : 5 0	C04 – Heterogeneous hybrid catalysts based on coordination polymer MIL-101 and polyoxometalates for liquid phase selective oxidations,
17:20	A05 – Bio-inspired ultrahydrophobic and self cleaning coatings,	1 7 : 1 0	B05 – Selective immobilization and selective elution (SISE) method for fabrication of organic-inorganic hybrid nanomaterials,	17 : 1 0	Featured Lecture CF1 - Application of pore-expanded mesoporous silica in catalysis and separation,
17:40	Invited Lecture AI2 – How to introduce genetic information into living cells by a combination of calcium phosphate and nucleic acids,	1 7 : 3 0	B06 – A hybrid sensing module: Turn-on photoluminescence response of small CdS clusters to molecular recognition events at the organic- inorganic interface	17 : 4 0	C05 – Ionogels, new hybrid materials for the encapsulation of metal complexes and nanoparticles,
		1 7 : 5 0	B07 – Organic dye/metal oxide hybrid thin film prepared by the liquid phase deposition method,		
18:15	Tutorial 1 – Synthesis and preparation of Hybrid Materials, C. Sanchez, <i>Université de Paris VI, France</i>				
19:00	Poster Session 1 & Welcome Reception				
20:45	End of day 1				
Monday 16 March 2009					
08:45	Plenary Lecture 2 - Nanostructured hybrid materials by ATRP, K. Matyjaszewski, <i>Carnegie Mellon University, USA</i>				
	Symposium A		Symposium B		Symposium C
09:30	Featured Lecture AF1 – 2-Dimensional inorganic nanoparticles with drug delivery and targeting functions	09:30	B08 – Novel functional surfaces, nanoparticles and nanomaterials based on metal atom clusters,	09:30	C06 – Micro and mesoporous light emitters: From lanthanide oxide nanotubes to metal organic frameworks,
10:00	A06 – Low-temperature, kinetically controlled nanofabrication of semiconductor and ferroelectric thin films and nanoparticles,	09:50	B09 – Particle size effect of zinc oxide on the electrical conductivity of polyethylene / polypropylene zinc oxide composites,	09:50	C07 – Novel synthetic route to porous silicon carbide,
10:20	A07 – Individualized silica nanohelices and nanotubes: Tuning inorganic nanostructures using lipidic self-assemblies,	10:10	Featured Lecture BF2 - Functional clusters as nano-sized building blocks for inorganic-organic hybrid materials,	10:10	C08 – Preparation of hierarchically porous monoliths of ethylene-bridged polysilsesquioxane,
10:40	Coffee Break	10:40	Coffee Break	10:30	Coffee Break
11:00	A08 – Hybrid biomimetic membranes: Past, present and beyond...,	11:00	B10 – Some examples of functionalized nanoparticles for in vivo biomedical applications,	11:00	Featured Lecture CF2 - Hierarchically porous monoliths applied to separation science,
11:20	A09 – Bottom-up meets top-down: Large-scale assembly of DNA duplexes and nanotubes,	11:20	B11 – Precursors for magnetic hybrid materials,		
11:40	Featured Lecture AF2 - Sol-gel bio-hybrid materials:	11:40	B12 – Colloidal growth of nanocrystal	11:30	C09 – Integrative chemistry toward eu3+@organo-si(HIPE)

	Specificities, properties and challenges,		heterostructures based on semiconductor and magnetic materials,		macro-mesocellular foams generation: syntheses, characterizations and luminescent properties,
12:10	A10 – Cell patterning based on the micro structured organosilane layer fabricated by VUV lithography,	12:00	B13 – Functionalised nanoparticles for multiphotonic bio-imaging of tumoral cells,	11:50	C10 – Fabrication of porous silicon carbide ceramics from bridged polysilsesquioxane,
		12:20	B14 – Core-Shell and raspberry-like nanosized composites based on hybrid silica nanoparticles and on a functional polycarbazole conducting polymer - a new concept of fabrication for dual phase nanocomposites,	12:10	Featured Lecture CF3 – Hierarchically functional porous materials: Synthesis strategy and applications for nanotechnology and energy conversion,
12:30	Lunch	12:40	Lunch	12:40	Lunch
14:10	Featured Lecture AF3 - Evolution of ceramics in the biomaterials field, M.	14:10	B15 – CNT-PANi hybrid material in PP matrix,	14:10	C11 – Deep x-ray lithography for mesoporous thin films: Integration of bottom-up and top-down nanotechnologies,
14:40	A11 – Peptide-grafted nanodiamonds: Preparation, cytotoxicity and uptake in cells,	14:30	B16 – Synthesis and characterization of bimodal polyorganosiloxane nanoparticles,	14:30	C12 – One-pot functionalization of patterned mesostructured silica by ink-jet printing,
15:00	A12 – Versatile drug delivery systems based on organic-inorganic hybrids,	14:50	Invited Lecture BI1 - Controlled synthesis of metal oxide nanostructures in organic solvents: Extension to microwave chemistry,	14:50	C13 – High-porosity macro/mesoporous silica monoliths applied to HPLC separation medium,
15:20	A13 – Design of mesostructured inorganic matrix for animal cell encapsulation,	15:20	Invited Lecture BI2 - Nanocomposites and nanofluids,	15:10	C14 – Modelling surfactant templated inorganic materials,
15:40	A14 – Insulin Delivery From Glucose-Responsive Microgels,	15:50	B17 – Exfoliation of layered silicates in epoxy resins using hyper-branched polyalkoxy siloxanes (PAOS) and silane couplers,	15:30	C15 – Understanding nano-crystallization of mesoporous materials,
16:00	A15 – Porous metal-organic-frameworks as new drug carriers, P.	16:10	B18 – Unusual jammed nanocomposite structure using hybrid layered double hydroxide filler,	15:50	C16 – New hybrid ordered mesostructures obtained with reversible assemblies of double hydrophilic block copolymers,
16:20	A16 – Time-delayed release of bioencapsulates for bone implant technologies,	16:30	B19 – Polyurethane/nano-clay shape memory polymer nanocomposites,	16:10	Featured Lecture CF4 - Independant textural and morphological control in the synthesis of meso and macroporous silicas by pseudomorphic transformation, A.
16:40	Coffee Break	16:50	Coffee Break	16:40	Coffee Break
17:15	Tutorial 2 – Applications of hybrids, M. Popall, <i>Fraunhofer-Institut für Silicatforschung, Germany</i>				
18.00	Poster Session 2				
19.30	End of day 2				
Tuesday 17 March 2009					
08:45	Plenary Lecture 3 - Biohybrid conjugates of “smart” polymers with proteins and nucleic acids, A.S. Hoffman, <i>University of Washington, Seattle, USA</i>				
Symposium A		Symposium B		Symposium C	
09:30	A17 – Photocurrent generation in peptide-based self-assembled monolayers functionalized with electron transfer antenna chromophores,	09:30	Invited Lecture BI3 - Polymer-inorganic analogues of triblock copolymers: From self-assembly to control of optical properties,	09:30	C17 – Surface diels-alder reactions as a versatile way to synthesise functional porous carbons,
09:50	A18 – Partitioning of oligothiophene labeled	10:00	Featured Lecture BF3 – Controlling nanomaterials	09:50	C18 – Free-standing mesoporous silica/carbon composite films with

	antibodies into pH-sensitive microgels,		properties with ligands, polymers and interfaces,		crystalline silica wall from periodic mesoporous organosilica films,
10:10	A19 – Biosensors based on enzymes immobilized in layered double hydroxides,			10:10	C19 – Dynamics, interfaces and gas diffusion in porous hybrid materials,
10:30	Coffee Break	10:30	Coffee Break	10:30	Coffee Break
10:50	A20 – Fluorescent organic nanocrystals confined in sol-gel matrix for ultra sensitive sensors and bioimaging, E.	10:50	B20 – End-to-end assembly of shape-controlled nanocrystals via a nano-welding approach mediated by gold domains,	10:50	Invited Lecture CI2 - Self-Assembly Synthesis and Functionalization of Mesoporous Carbon Materials for Energy-Related Applications
11:10	A21 – Water soluble, electroactive and photoluminescent oligothiophene-dinucleotide biohybrid materials,	11:10	B21 – Multifunctional magnetic core-shell nanocomposites for biomedical applications,	11:20	C20 – One-pot synthesis of chiral hybrid organic-inorganic mesoporous nanofibers,
11:30	Featured Lecture AF4 - Nanostructural control of sol gels for controlled release of drugs and proteins, P.	11:30	B22 – Evaluation by DOSY NMR of the interfacial affinity of organic ligands for nanoparticles in suspension,	11:40	C21 – Tangential, axial and helical alignment of liquid crystal columns in nanochannels,
		11:50	B23 – Organic-inorganic hybrid cubic liquid crystals: Hybridization of amino-substituted dendrons with surface-modified monodisperse gold nanoparticles,		
12:00	Poster Session 3				
13:30	Free Afternoon & Evening				
Wednesday 18 March 2009					
08:45	Plenary Lecture 4 - Functional polymeric materials: From fluid handling to enzyme mimics and vaccine carriers, J.M.J. Fréchet, <i>University of California at Berkeley, USA</i>				
Symposium A		Symposium B		Symposium C	
09:30	A22 – Biomineralization onto the surface of sol-gel derived doped bioactive glasses : Chemical mapping by PIXE-RBS,	09:30	B24 – Atomic layer deposition to nanostructured metal oxides using nonaqueous sol-gel routes,	09:30	Invited Lecture CI3 - Design of porous materials on the nano and meso scale,
09:50	A23 – Biomaterials and biocompatible derivatives: Future advanced solid state NMR experiments,	09:50	B25 – Design of hybrid nanostructured materials using supercritical fluids,	10:00	Invited Lecture CI4 - Unconventional forms of nanofabrication,
10:10	A24 – Single molecular observations through single labelled nanocrystal using x-rays and electrons,	10:10	B26 – New strategy of hybrid materials for proton exchange membrane fuel cells,		
10:30	Coffee Break	10:30	Coffee Break	10:30	Coffee Break
10:50	Featured Lecture AF5 - Self-assembly and applications of polypeptide material, T.	10:50	B27 – Synthetic routes to lanthanide oxide hybrid materials and nanocomposites,	10:50	C22 – Mesoporous platinum-based materials from nanoparticle-block copolymer self-assembly,
11:20	A25 – Novel insights into diatom cell wall formation: Solid-state NMR and raman mapping studies,	11:10	B28 – Dissymmetric metal deposition on carbon nanotubes,	11:10	C23 – Evidence for monodisperse gold nanoparticles confined within the walls of functionalized mesoporous silica,
11:40	A26 – Magneto-responsive hybrid hollow capsules formed with polyelectrolytes, lipid bilayers, and Fe ₃ O ₄ nanoparticles,	11:30	Invited Lecture BI4 - Structure and properties of nanocomposites from organoclays,	11:30	C24 – Marine diatoms: A bottom-up approach to new optical devices,
12:00	Featured Lecture AF6 - Current and prospective applications of hybrid	12:00	B29 – Towards a better characterization of organic-inorganic interfaces	11:50	C25 – Photo acceleration of molecular transports in azobenzene-tethered silica mesopores,

	nanoparticles in medicine,		in hybrid materials,		
		12:20	B30 – Optoelectronic printed circuit board: 3D structures written by two-photon absorption in organic-inorganic hybrid polymers,	12:10	C26 – Nanostructured block copolymer films as template in sol-gel reactions,
12:30	Lunch	12:40	Lunch	12:30	Lunch
14:10	Invited Lecture AI3 - Novel inorganic-hybrid nanostructures for biomedical applications,	14:10	B31 – Luminescent sol-gel materials based on transition metal clusters,	14:10	C27 – Nano hybrid material synthesis by supersonic beam codeposition for solar cells applications,
14:40	A27 – Electrodeposition and electrospinning of collagen and hydroxyapatite nanostructured composite coating,	14:30	B32 – Fluorescent nanofibers embedding dye loaded zeolite L crystals,	14:30	C28 – The role of the length of the spacers on the structuring of self-organized di-urea alkylene-bridged silsesquioxanes,
15:00	A28 – Nanoparticle-containing multilamellar vesicles for a new bio-inspired route to metal nanoparticle-based heterogeneous catalysts,	14:50	Featured Lecture BF4 - Synergistic properties in multiphase (hybrid) epoxy nanocomposites by incorporation of inorganic nanoparticles,	14:50	C29 – Multifunctional nanostructured materials: New synthetic methods and potential applications from catalysis to drug delivery and biosensing,
15:20	A29 – Bioinspired control of colloidal silica by using multicomponent polymeric systems	15:20	Invited Lecture BI5 – Functionalized graphenes and graphene nanocomposites derived from graphite oxide,	15:10	C30 – Elaboration of functional membranes by growing responsive polymer brushes from surfaces,
15:40	A30 – Homogeneous organic-inorganic derivatization of cellulose in ionic liquid medium,	15:50	B33 – Mechanical properties of nanostructured hybrid materials,	15:30	C31 – Biomimetically inspired sensing of ionic and neutral species with organically modified mesoporous silica materials,
16:00	A31 – Functionalization of magnetic nanowires by charged biopolymers,	16:10	B34 – Generating functionalized carbon-based nanomaterials and polymer nanocomposites in poly(phosphoric acid),	15:50	C32 – Highly stable bridged silsesquioxane-based hybrid membranes in energy-efficient molecular separation,
16:20	A32 – Bioinspired organic-zirconium oxide layered nanocomposites: Fabrication and mechanical behaviour,	16:30	B35 – Spontaneous polycondensation of trialkoxysilanes in hybrid materials containing osidic moeties potential matrix as silicon carbide precursors and as chiral stationary phases,	16:10	Featured Lecture CF5 - Block copolymer-based approaches to functional nanomaterials and nanocomposites,
16:40	Coffee Break	16:50	Coffee Break	16:40	Coffee Break
17.15	Tutorial 3 – From biogenic silica to silica biotechnology, J. Livage, <i>Collège de France, France</i>				
18.00	End of day 4				
19:30	Optional Conference Dinner				
Thursday 19 March 2009					
08:45	Plenary Lecture 5 - Synthesis and emergence of complex hybrid nanomaterials, S. Mann, <i>University of Bristol, UK</i>				
Symposium A		Symposium B		Symposium C	
09:30	Invited Lecture AI4 - Biohybrid nanomedicines and self-assembling biomaterials,	09:30	B36 – Alkynylorganotin, versatile precursors of class II tin-based hybrid materials and of nanostructured tin dioxide films,	09:30	C33 – Amine functionalized SBA-15 by covalent anchoring of dendritic macromolecules,
10:00	Invited Lecture AI5 - Bioresorbable sol-gel derived SiO ₂ matrices for the controlled release of biologics and small molecular drugs,	09:50	B37 – Covalent and non-covalent functionalization of carbon nanohorns with polymers,	09:50	C34 – Click-modifications in hierarchically organized silica gels,
		10:10	B38 – Tailoring the structure of microporous	10:10	C35 – Novel organic/inorganic hybrid materials by covalent anchoring

			sol-gel derived hybrid materials based on bridged silsesquioxanes,		phenothiazines on mesoporous supports,
10:30	Coffee Break	10:30	Coffee Break	10:30	Coffee Break
10:50	A33 – Lipid bilayer membranes as tools for novel nano-biotechnology applications,	10:50	Invited Lecture BI6 – Polymer and sol-gel chemistries for designing nanostructured polymers: Different routes	10:50	C36 – Design of functional porous and homogeneous mixed oxides from single precursors, A. Lemaire*,
11:10	A34 – Enzymatic synthesis of amorphous calcium phosphate-chitosan nanocomposites and its processing into hierarchical structures,	11:20	Invited Lecture BI7 - Functional nanomaterials through organometallic chemistry,	11:10	C37 – Facile route to layered chiral and photo-switchable magnets,
11:30	A35 – Understanding the formation of biohybrid materials: Interactions of well-defined aluminium species and biological molecules,	11:50	B39 – Patternable hybrid sol-gel materials based on silica network modified with epoxy or acrylic groups,	11:30	C38 – The key role of amines in templated uranyl-vanadate and uranyl-phosphate compounds: Towards porous materials, L.
11:50	A36 – Silica - functionalised gelatin hybrid scaffolds for bone tissue regeneration,	12:10	B40 – Characterization of hybrid organic-inorganic epoxy/amine networks synthesized via sol-gel process,	11:50	Invited Lecture CI5 - New functions of porous coordination polymers,
12:10	A37 – Bioactive silica/ poly gamma-glutamic acid hybrid scaffolds for bone regeneration,	12:30	B41 – Ionogels: New hybrid materials with tunable applications: From optics to catalysis and drug delivery,	12:20	Invited Lecture CI6 - Mimicking the antenna system of green plants,
12:30	A38 – Rational design of a nanostructured porous silica matrix for the immobilization of living plant cells,				
12:50	Lunch	12:50	Lunch	12:50	Lunch
14:00	A39 – New development in the fabrication of bio-composites from natural fibre,	14:00	B42 – Fabrication of enzymatic biosensors based on hybrid inorganic-organic Lb flms,	14:00	C39 – In vivo toxicity studies of new drug nanocarriers: Porous iron carboxylates,
14:20	A40 – In-vivo testing of stealth silica nanoparticles for passive targeting of solid tumour,	14:20	B43 – Titanium oxides nanotube as a new transfection nanovector for cardiomyocyte cells: Functionalization and detection,	14:20	C40 – Tuning the emission colour in mixed lanthanide microporous silicates: Energy transfer, composition and chromaticity,
14:40	A41 – Monomer-free ORMOCER[1] based nano-hybrid composites for dental application,	14:40	B44 – Laterally patterned ultraflat substrates: creating functional organic-inorganic interfaces at nanoscale, y	14:40	C41 – Stimuli-free release films composed by hollow silica capsular container with mesoporous wall,
15:00	A42 – Fluoride-containing bioactive glasses: Reactivity in simulated body solutions and behaviour towards osteoblast cells,	15:00	B45 – Overview on new hybrid inorganic-organic polymer electrolytes,	15:00	C42 – Enumeration of not-yet-synthesized zeolitic zinc imidazolate MOF networks: A combined topological and computational approach,
15:20	A43 – Dendritic polymers with various oligosaccharide architectures: Complexation, stabilization and (bio-)interaction properties,	15:20	B46 – Silver-polystyrene hybrid pincushion films for surface enhanced raman scattering substrates prepared by self-organization and vapor deposition,	15:20	C43 – Functionalization routes to MOFs with basic sites: Application to base catalysis and transesterification of vegetable oils,
15:40	Closing Remarks				
	End of Conference				