

嘉南藥理科技大學專題研究計劃成果報告

溶劑及濃度對海藻膠鹽支架性質之研究

計畫編號：CNAC-92-14

執行期限：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

主持人：郭俊榕 醫藥化學系。

共同主持人：李進送 醫藥化學系

計畫參與人員：蘇國翔 胡仕欣 醫藥化學系

中文摘要

本研究利用相分離／冷凍乾燥法製備出海藻酸鹽 (Alginate) 的複合三維支架，除了有系統的探討不同黏度海藻酸鹽及其適當混合比對製成支架物性的改變外，並深入研究添加氫氧基磷灰石 (HAP) 粉末及氯化鈉溶液對支架機械性質的影響。本研究的主要目的是製備出機械性質及降解行為優良的天然高分子海綿體，使其更適合作為組織工程之模板，應用於骨的組織再生及修復。

海藻酸支架是經由三個步驟製備而得，首先是使用二價的鈣離子使海藻酸鹽溶液形成水膠，然後冷凍使水結成冰晶，最後再經由冷凍乾燥的過程將冰晶昇華，製備出三維並具有孔洞的支架。研究製得的海藻酸複合支架不但具有良好的孔洞連結性，孔隙率高，並發現以氫氧基磷灰石 (HA) 粉末及氯化鈉溶液為添加物，其機械性質比純態的支架強。支架的降解行為可由混合中、低黏度的海藻酸鹽及加入 0.8% 氯化鈉溶液而獲得明顯改善。

關鍵詞：生醫材料、海藻酸支架、高分子移植材料

Abstract

A different weight ratio of various viscosity sodium alginate mixed with sodium chloride solution was fabricated a highly macroporous biodegradable alginate scaffolds. A particular hydroxyapatite powder was used as an additive to enhance the mechanical properties of scaffolds. Compared to the pure alginate scaffolds, these scaffolds demonstrate superior mechanical properties and anti-degradable behaviors.

The results shown scaffolds made from mixed medium and low viscosity of sodium alginate with weight ratio of 1 /1 with 0.8% sodium chloride solution have highly interconnected, open pore structure, greater mechanical properties and anti-degradable behaviors.

Keywords: Alginate scaffold, Biomaterial, Polymeric implant material

緒言

隨著生物科技的進步與生醫材料的改良，骨科病人治療的方式也更加多元化，除了利用患者本身的骨骼或捐贈的骨骼做移植外，還可以配合生醫材料將幹細胞或骨骼細胞於其上增生及培養，利用細胞培養技術並配合相關生物活性因子去複製出新的組織，最後再做移植，應用在因疾病或外力所造成的肢體傷害的修補與重建，無論在運動功能的恢復或移植肢體的使用年限均獲得跨時代的突破。

骨組織工程目前被認為是在骨移植策略上的一個解決方案。骨組織工程為應用三維的多孔性生醫材料，做為支架培養成骨細胞 (osteoblast)，並且作為組織再生的模板 (template)，有次序的生成具功能性的三維骨組織。但是支架材料的設計以及一些添加物則可能會影響活體內及活體外細胞的培養及生長^(7, 8)，因此我們可以依據缺損的部位而作成所要的形狀，並且加入一些有利於細胞生長的因子，增加移植成功的機會。

海藻酸鈉是用弱鹼從褐藻中提煉的碳水化合物，就是 Polyuronic Acid 的鈉鹽。主要是從海藻的褐藻類 (Phaeophyceae, 大部分為 Laminaria) 所提煉出來。海藻酸是線性結構且無分枝的共聚物，包含兩種殘基 (residue)，有 β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-甘露糖醛酸 (mannuronic acid; **M**) 以及 β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked L-古羅酸 (guluronic acid; **G**)。海藻酸在生物醫學上具有多種功用，如傷口的披覆材料，牙科材料，藥物釋放控制及細胞固定化介質，且屬於天然性生物可降解之聚合體，是適合選用為多孔性骨的再生模板材料。氫氧基磷灰石是骨骼的成分之一，有研究報告指出，HA 會直接與骨骼產生鍵結，是良好的骨誘導物質。因此本研究使用海藻酸鈉及 HA 為素材，以相分離／冷凍乾燥法製備出海藻酸/HA 的複合三維支架

材料和方法

材料：

海藻酸鈉購自 Sigma 公司。氫氧基磷灰石和葡萄糖酸鈣是由 Fluka 公司購得。氯化鈉和氯化鈣購自 Alfa Aesar 公司。

支架的製備：

多孔性海藻酸支架的製備條件詳列於表一。製備方法如下：(1)在25mL ddH₂O中，加入適量的填充材料(HA)。將高速均質機之轉速設定在26,000 rpm，於室溫下均勻攪拌1分鐘。(2)將混合不同黏度比例率的海藻酸鹽 (3% w/v ; Low+Medium 1 : 0, 2 : 1, 1 : 1 ; Low+High 85 : 15) 1.084g 加入上述溶液中，高速均質機攪拌5分鐘。(3)將步驟3之溶液使用超音波震盪機(BRANSONIC 3210)震盪10分鐘，減少溶液中因高速攪拌所產生的氣泡。(4)再加入10 mL交聯劑 0.01M 葡萄糖酸鈣於溶液中，使用磁攪拌器攪拌24小時製成溶膠。(5)將適量溶膠倒入試片小銅盒內，並將小銅盒放入大銅盒中，再放入-40℃冷凍櫃。(6)冰凍4小時後取出，置於冷凍乾燥機抽乾至隔天，製成複合支架。

支架性質的評估：

以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察各種海藻酸複合支架其表面孔洞形狀及其內部構造變化。使用材料拉力試驗機測量各種支架的機械性質強度。孔隙率 (porosity)的評估：由比重瓶測得原料粉末的密度，測量三次取其平均值，將測得的密度數值代入公式(1)及(2)，則可計算出支架孔隙率的實際值。

(1) 純Alginate 支架孔隙率計算：

$$\text{porosity} = (1 - \frac{\rho_s}{\rho_a}) \times 100\% \quad \rho_s: \text{Alginate 支架的密度}; \rho_a: \text{Alginate 原料粉末的密度}$$

(2) Alginate/HAP 複合支架孔隙率計算：

$$\text{porosity} = (1 - \frac{\rho_{cs}}{\rho_c}) \times 100\% \quad \rho_{cs}: \text{Alginate/HAP 複合支架的密度}; \rho_c: \text{Alginate / HAP 或 Alginate / NaCl 混合粉末的密度}$$

孔洞大小(pore size)的評估：使用純Alginate 支架及複合支架在倍率為100X攝得的SEM照片，以尺分別測量出支架孔洞的長軸 l_1 及短軸 l_2 長度，代入下列公式可計算出支架孔洞的大小，數據的表示是任意量

測50個孔洞，經公式($d = \sqrt{l_1 \times l_2}$)計算後取其平均值。

支架降解實驗的進行是首先將處理過的多孔性支架切成大小適當的圓形試片，秤量實驗前重量 W_i 並置於24孔盤內，再加入約1.5mL模擬體液(Ringers solution)於孔盤中，放入37℃恆溫恆濕箱。在28天的觀察期中每7天量測一次，取出多孔性支架後使用超音波震盪機以大量的 dd H₂O 清洗數次，將可能殘留的模擬體液的成份鹽類洗掉，送入冷凍真空乾燥機24小時，秤重得 W_d ，並以公式(3)求得降解比率：

$$(3) \text{ Degradation ratio} = \frac{W_i - W_d}{W_i} \times 100\%$$

結果和討論

本研究成功地利用相分離方式製備出高孔隙率的複合支架。相分離的原理大致簡述如下：在溶液中可分為二相，一是含高分子較多的相 (polymer-rich phase)，另一為含高分子較少的相 (polymer-poor phase)；在 polymer-poor phase 當中，大多為溶劑，在此為水。當水分子遇冷之後則凝結為冰晶，利用冷凍乾燥的方式將冰晶去除留下 polymer-rich phase 而形成具有孔洞的結構。

圖一(A)是添加 HP 的海藻酸複合支架之 SEM 剖面結構照片，結果顯示複合支架具有高度孔洞性及連結性佳的特性。且空間上結構形態與以純態之海藻酸鹽製備成的支架比較，並沒有明顯的改變。圖一(B)SEM 照片展示出添加之 HA 顆粒均勻地分布在支架的孔洞壁上，這說明了使用 HP 作為海藻酸支架的複合材料，不僅能保持其原有之高孔隙率及連結性，且能有效複合於海藻酸之聚合體中，強化支架的抗應力。

在製備混合高低黏度的海藻酸支架過程中，添加不同濃度的 NaCl 溶液，會影響三維支架的外在形體。圖二說明 NaCl 溶液濃度對海藻酸支架試片形態的影響。當加入越高濃度的 NaCl 溶液，則支架的外在形體改變越大；在 NaCl 濃度達至 2.0% w/w 以上，整體結構顯示出大幅的改變，且性質呈現易脆性。因此海藻酸支架的製備，需將控制 NaCl 溶液在 0.8% w/w 以下，才不致影響支架性質的探討分析及後續細胞培養研究。

支架製備過程中，需將海藻酸溶膠放置在設定-40℃的低溫冷凍櫃中。當溶膠的溫度處在相當低溫時，水因呈現出過冷狀態，低於其冰點以下，此時結晶開始形成並釋放結晶熱，所釋放的熱量會使溫度上升到冰晶融點以上，結果，在冷凍溶膠中形成水和冰晶的混合物最後再利用冷凍乾燥法，藉由冰晶的昇華使試片結構形成孔洞，而這些孔洞將來可以提供微血管增生的空間，維持細胞功能及生長。

觀察加入 HA 其對支架孔洞大小的影響，結果顯示複合 HA 支架的平均孔洞大小要比純海藻酸支架來得大。這樣的觀察結果及上述的推論，需要更進一步的實驗研究探討來切確證實。表二綜合說明不同黏度的純海藻酸支架及複合支架的表面和剖面孔洞平均尺寸大小。

研究過程中，同時也發現製備支架的溶劑由水改變成 NaCl 溶液，支架的孔洞大小會受到影響，大體而言，支架孔洞的大小隨著 NaCl 濃度增高有漸增的趨勢。這種結果是由於較高的 NaCl 溶液濃度其凝固點下降的現象相對地較明顯，造成海藻酸溶膠在冷凍凝結過程中，內部冰晶形成的速率較慢，導致顆粒較大的冰晶產生，所以形成的孔洞也就較大。比較支架其孔洞大小間的差異量，發現製備支架的 NaCl 溶液濃度在 0.6% 及 0.8% 間，孔洞大小差異量較高，而使用 NaCl 濃度在 0.8% 及 1.0%

間，支架平均孔洞大小差異量比較小。此現象的產生主要是導源於使用 1.0% NaCl 溶液濃度製備的支架，雖然製程中可形成較大的冰晶，但因整體上高分子的量相對較小，在冰晶昇華後，高分子孔洞壁無法提供有效的支撐強度，使結構收縮崩塌，形成孔洞尺寸較小的結構。表三列出加入 0.8%NaCl 溶液所製成不同黏度海藻酸支架，其表面及剖面孔洞平均尺寸大小。

製備高孔隙率的支架具有以下幾個優點：

(1)當細胞種植上去之後，可以提供細胞較大的遷移空間。(2)當材料移植到生物體之後，可以加速血管新生，並且與周邊的組織產生整合。(3)可以有較好的營養以及氧氣的供應，使得細胞的存活率增加。

不同的黏度及添加物條件下，製備出支架的孔隙率詳列於表四與表五。在控制的黏度及不同的添加物的條件下，製備出支架的孔隙率均可達 97.19% 以上，同時也發現添加物及混合不同黏度的海藻酸鹽，並不會對支架的孔隙率產生太大的影響。

在不同黏度的海藻酸支架中及添加不同濃度 NaCl 溶液 0.8% w/w 所製得之支架，其結構均無明顯變化。圖三是製程上使用 NaCl 溶液製得支架的 SEM 剖面照片。圖四是比較製程上有無使用 NaCl 溶液之海藻酸/HP 複合支架的 SEM 剖面照片，仔細分析孔洞壁上的微結構發現，使用不同濃度 NaCl 溶液製成的海藻酸複合支架的孔洞壁上均有極小的結晶顆粒分佈，這些結晶顆粒的形成是來自於添加的 NaCl 溶液，在冷凍乾燥過程中，因為水被移除而使 NaCl 結晶附著於孔洞壁上。後續的降解試驗可證實此一推論，由於進行降解試驗前需先浸泡 1.0M CaCl₂ 改良支架的降解性質，發現浸泡後支架內部結晶微結構部分消失如圖五所示，由此可證實小結晶顆粒為 NaCl 溶液乾燥後之結晶。

圖六分別比較說明壓縮強度及壓縮模數與海藻酸支架間的關係，結果顯示出製備支架的海藻酸黏度越高時，壓縮強度和壓縮模數亦隨之增強，且加入 HA 顆粒和使用 NaCl 溶液時對於不同黏度之海藻酸支架的機械強度也呈現明顯增加。支架製備使用高黏度海藻酸和添加 HA 製成之複合支架其壓縮強度和壓縮模數可高達 230.8KPa 及 63.8MPa，且以 1:1 比例混合低黏度和中黏度製得海藻酸支架表現出最佳的機械強度性質。

圖七說明使用不同濃度的 NaCl 溶液對製成支架機械性質的改變。製程使用 NaCl 濃度越高其製得支架的機械強度越好，而且加入 HA 為填充物對支架的壓縮強度及壓縮模數產生加乘作用，使支架整體的物理性質表現往上提昇至更近實用的階段。支架的機械性質以濃度使用 1.0% 的 NaCl 溶液為最好，雖然在上述在 SEM 結構觀察中發現 NaCl 濃度上升易使支架孔洞變大，但由於 NaCl 結晶在支架結構的孔洞壁上均勻析出分佈，使單位體積內孔洞壁所能支撐的力量增加，因此強化了整體支架的抗應力。但若考慮支架外在形體，使用 NaCl 濃度 1.0% 溶液製得的支架其外形及結構已產生改變，不利後續加工及其它性質研究，因此僅作機械強度比較，不深入探討其它性質。

為了降低純海藻酸支架的水溶性，在進行降解試驗之前，將製成的支架浸泡於 1.0M CaCl₂ 溶液中作前處理。因為 CaCl₂ 溶液含有大量的鈣離子，鈣離子進入浸泡支架內部，強化了高分子鏈間的交聯效應，使得經過 CaCl₂ 溶液前處理的支架，浸泡於林革溶液 28 天之後，整體外形大致上仍能維持其基本的形狀；添加 HA 系列支架經降解試驗其試片整體外形改變又較純海藻酸支架小。圖八顯示出製備支架降解速率的變化情形。純海藻酸製成的支架，降解速率在 14 到 28 天期間則呈現了一個較平穩的狀態，且添加 HA 對支架的降解速率並無獲得太大的改善。大體而言，支架以高黏度的純海藻酸製成有較低的降解速率，且支架的降解行為是可以經由前處理的過程而被有效改善。

結論

在研究中製備出的海藻酸/HA 複合支架機械強度和降解性質獲得明顯改善，且仍具有良好的孔洞連結性及孔隙率，在未來仍需進一步研究探討對以加強其機械性質和改善降解性質。使製備出的複合支架，能真正應用於組織工程上。

參考文獻

1. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF 1995 The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics* **18**(12):1153-8.
2. Gepstein R, Weiss RE, Hallel T 1987 Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder. A radiographic, histological, and radioisotope-uptake study in rats. *J Bone Joint Surg Am* **69**(7):984-92.
3. Summers BN, Eisenstein SM 1989 Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br* **71**(4):677-80.
4. Coventry MB, Tapper EM 1972 Pelvic instability: a consequence of removing iliac bone for grafting. *J Bone Joint Surg Am* **54**(1):83-101.
5. Younger EM, Chapman MW 1989 Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* **3**(3):192-5.
6. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP 1991 Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* **88**(5):753-9.
7. Mikos AG, Bao Y, Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R 1993 Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *J Biomed Mater Res* **27**(2):183-9.
8. Mikos B, et al. 2000 Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology* **3**.
9. Ueda M 2000 [Tissue engineering: overview]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **45**(13 Suppl):2257-9.
10. Wang HT, Palmer H, Linhardt RJ, Flanagan DR, Schmitt E 1990 Degradation of poly(ester) microspheres. *Biomaterials* **11**(9):679-85.

Captions for figures:

圖 1. L1M1 Alginate/HAP 複合支架剖面 SEM 圖像
(A) 100X ; (B) 1000X

圖 2. NaCl 濃度對 L85H15 海藻酸鹽支架試片形態的影響

圖 3. 不同黏度和不同 NaCl 濃度所製得的複合支架剖面 SEM 照像。(100X)

圖 4. L85H15 Alginate / HAP 複合支架剖面 SEM 像。(1000X) (A) 0% NaCl : (B) 0.6% NaCl : (C) 0.8% NaCl : (D) 1.0% NaCl

圖 5. L85H15 / HAP / 0.8% NaCl 複合支架正面 SEM 照像。(1000X) (A) 未泡 CaCl_2 : (B) 泡過 CaCl_2

圖 6. 不同黏度的 Alginate 和不同添加物所製得的複合支架之機械強度。(A) 壓縮強度 : (B) 壓縮模數

圖 7. 分別在不同黏度 Alginate 以不同 NaCl 濃度製得支架的機械強度變化 (A) 壓縮強度 (B) 壓縮模數

圖 8. 降解試驗殘留重量比

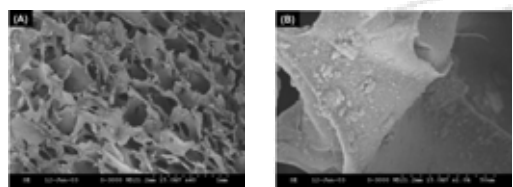


圖 1

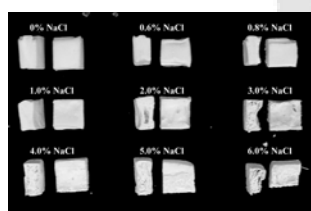


圖 2

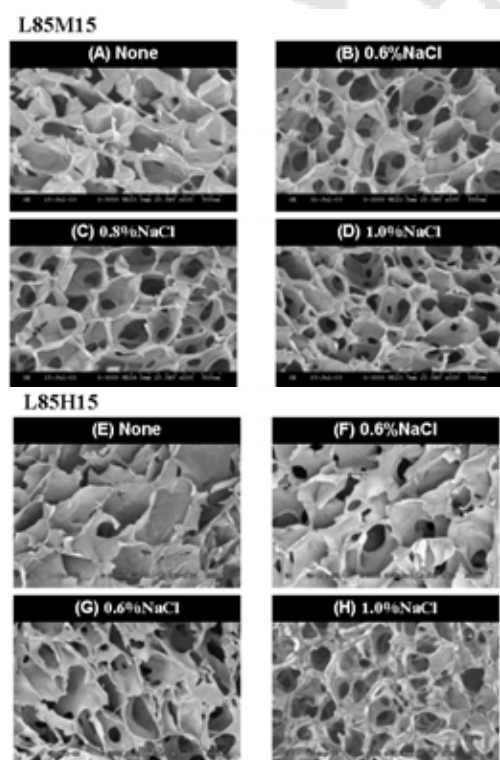


圖 3

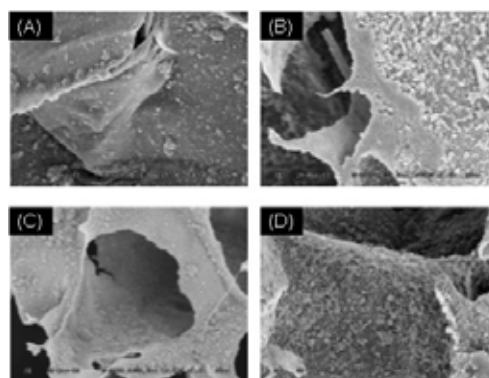


圖 4

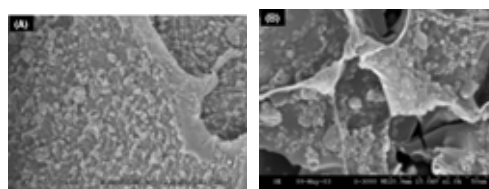


圖 5

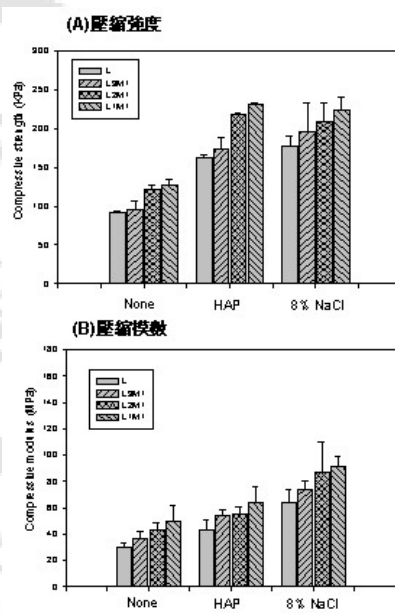


圖 6

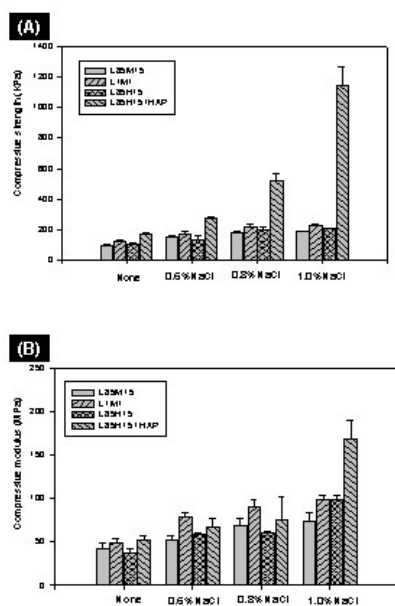


圖 7

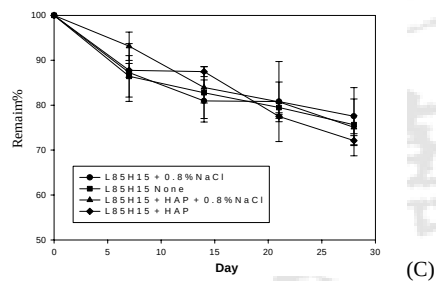
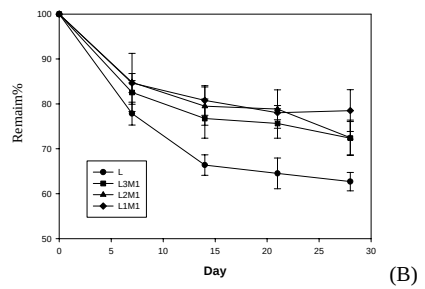
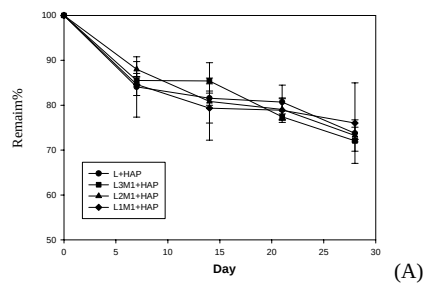


圖 8 (A) None (B) HA (C) HA + NaCl

表一 海藻酸鹽複合支架製備的條件 (3% w/v 海藻酸鹽)

海藻酸鹽混合比	添加物
L	None ; 50% HAP ; 0.8% NaCl
L : M = 3 : 1	None ; 50% HAP ; 0.8% NaCl
L : M = 2 : 1	None ; 50% HAP ; 0.8% NaCl
L : M = 1 : 1	None ; 50% HAP ; 0.6% NaCl ; 0.8% NaCl ; 1.0% NaCl
L : M = 85 : 15	None ; 0.6% NaCl ; 0.8% NaCl ; 1.0% NaCl
L : H = 85 : 15	None ; 50% HAP ; 0.6% NaCl ; 0.8% NaCl ; 1.0% NaCl

(交聯劑 0.01M 葡萄糖鈣)

表二 HA 添加物對海藻酸複合支架之孔洞大小(μm)的影響

	L		L3M1		L2M1		L1M1	
	表面	剖面	表面	剖面	表面	剖面	表面	剖面
None	77(± 3)	117(± 7)	97(± 6)	133(± 8)	95(± 6)	129(± 8)	92(± 4)	137(± 6)
HAP	149(± 7)	145(± 12)	125(± 3)	155(± 14)	140(± 9)	168(± 10)	140(± 7)	244(± 25)

表三 不同黏度 Alginate 複合支架在加入 0.8%NaCl 之孔洞大小(μm)的影響

	L	L : M = 3 : 1	L : M = 2 : 1	L : M = 1 : 1	L : M = 85 : 15	L : H = 85 : 15
表面	83(± 5)	127(± 7)	90(± 3)	114(± 4)	129(± 10)	128(± 8)
剖面	111(± 7)	116(± 7)	122(± 10)	146(± 5)	143(± 9)	115(± 7)

表四 不同添加物對於不同黏度海藻酸鈉之孔隙率(%)的影響

Alginate Viscosity	None	HAP	0.8%NaCl
Low	98.10(± 0.03)	97.64(± 0.07)	97.45(± 0.06)
L3M1	97.62(± 0.04)	97.85(± 0.02)	97.3(± 0.04)
L2M1	97.73(± 0.01)	97.58(± 0.04)	97.43(± 0.05)
L1M1	98.21(± 0.09)	97.76(± 0.20)	97.19(± 0.11)

表五 不同 NaCl 濃度溶液對 Alginate 複合支架之孔隙率(%)的影響

Alginate Viscosity	None	0.6%NaCl	0.8%NaCl	1.0%NaCl
L1M1	98.21(± 0.09)	97.15(± 0.08)	97.19(± 0.11)	97.18(± 0.04)
L85H15	98.26(± 0.08)	97.37(± 0.07)	98.24(± 0.03)	97.58(± 0.06)
L85M15	98.18(± 0.09)	97.38(± 0.03)	97.23(± 0.09)	97.26(± 0.06)