

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

醫療用骨材臨床前生物試驗之應用研究

Bio-test of medical use bone material prior to clinical use

計畫編號：992001INER074

受委託機關(構)：南台科技大學

計畫主持人：林鴻儒

核研所聯絡人員：同位素組 蔡寧真 (伍德馨)

聯絡電話：(06)2533131 轉 6935

E-mail address：hrlin@mail.stut.edu.tw

報告日期：九十九年十二月十五日

目錄

目錄	i
圖目錄.....	iii
表目錄.....	iv
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
作者及所屬單位.....	3
壹、計畫緣起與目的.....	3
組織工程	3
1-1 生物可降解性合成高分子材料.....	6
1-2 生物可吸收性天然高分子材料.....	7
1-3 幾丁聚醣之國內外相關研究.....	8
1-4 聚丙烯酸之國內外相關研究.....	12
1-5 奈米二氧化矽之國內外相關研究.....	14
1-6 生長因子-血小板膠	14
1-7 PAA-Ch-Si 水膠之製備及相關機械性質之研究	16
(1). 計畫目標	16
貳、研究方法與過程.....	17
2-1 以 UV 光聚合法製備 PAA、PAA-Ch、PAA-Si 及 PAA-Ch-Si 水膠..	17
2-2 FT-IR 光譜分析.....	18
2-3 膨潤度與含水率測試.....	18
2-4 SEM 表面形態觀察	19
2-5 TEM 粒徑觀察	19
2-6 機械性質測試-壓縮試驗	19
2-7 摩擦試驗.....	20
2-8 動態流變儀試驗.....	21
2-9 DSC 測試.....	21
2-10 降解試驗.....	22
參、主要發現與結論.....	23
3-1 水膠結構之探討.....	23

3-2	FT-IR 光譜分析	26
3-3	膨潤度與含水率測試.....	26
3-4	SEM 型態觀察	27
3-5	TEM 粒徑觀察	28
3-6	機械性質測試-壓縮測試	30
3-7	摩擦試驗.....	33
3-8	動態流變儀試驗.....	34
3-9	DSC 測試.....	36
3-10	降解試驗.....	37
3-11	結論.....	38
肆、參考文獻.....		39

圖目錄

圖一 水溶性幾丁聚醣之分子結構.....	10
圖二 聚丙烯酸之分子結構.....	13
圖三 奈米二氧化矽之分子結構.....	14
圖四 PAA-Ch-Si 水膠之反應機制示意圖 (a)PAA 網狀結構機制圖 (b)PAA 與 Silica 反應機制圖 (c)Chitosan 自身形成網狀結構機 制圖 (d)PAA-Ch-Si 水膠反應機制圖	25
圖五 不同組成水膠之 FTIR 圖	26
圖六 不同組成水膠之膨潤曲線圖(PBS pH=7.4, 37°C).....	27
圖七 不同組成水膠之 SEM 圖(a)PAA (b)PAA-Ch (c)PAA-Si (d)PAA-Ch-Si ($\times 500$, 60 μm)	28
圖八 不同組成水膠之 TEM 圖(a)純 Silica (b)PAA-Si (c)PAA-Ch-Si (d)PAA-Ch-Si 放大圖.....	29
圖九 壓縮試驗之 PAA-Ch 與 PAA-Ch-Si 水膠應力-應變典型圖	32
圖十 壓縮測試圖(a)PAA (b)PAA-Ch-Si 水膠.....	33

表目錄

表一 不同組成水膠之機械性質.....	33
表二 不同組成水膠之摩擦係數.....	34
表三 不同組成之水膠改變不同時間之流變測試.....	35
表四 不同組成之水膠改變不同頻率之流變測試.....	35
表五 以 DSC 分析不同水膠支架，觀察水膠中是否有未反應物質存在.....	37

中文摘要

目前大部分的水膠是來自於天然或人工合成的，但一般來說它們的機械性質都偏低。本研究利用 UV 光聚合製備高強度 PAA-Ch-Si 水膠應用於組織工程中。由 FTIR 可證明利用 UV 光聚合製備的 PAA-Ch-Si 水膠可成功的互相摻合。此水膠為親水性且其含水率可達 80%。由機械性質結果可以得知當 PAA 分別與 Chitosan 或 Silica 摻合時其機械性質只些微高於純 PAA 水膠。但當 PAA 與兩者同時摻合時，其最大壓縮強度由 4.94 MPa 明顯提升至 42.26 MPa。機械強度提升的主要因為 PAA 與 Chitosan 之間形成互穿型網狀結構 (full-IPN)，並以奈米 Silica 作為填料。水膠韌性從 0.76 J 增加至 5.23 J，其交聯密度也從 $0.195 \times 10^{-5} \text{ mol/cm}^3$ 增加至 $2.293 \times 10^{-5} \text{ mol/cm}^3$ 。PAA 為基材的四組水膠其靜態與動態摩擦係數大約為 10^{-4} ，接近人類骨頭所承受的摩擦力。在動態流變儀試驗中，以 PAA 為基材的水膠當同時摻混 Chitosan 及 Silica 後，損失模數與 $\tan \delta$ 都會增加。Silica 可以增加水膠的黏彈性，使水膠變軟並分散所承受之荷重。以上這些性質很適合將此水膠應用於組織工程上。

英文摘要

Most of hydrogels derived from either natural or synthetic sources suffer from lack of mechanical strength. In this study, high strength poly(acrylic acid)-chitosan-silica (PAA-Ch-Si) hydrogels were prepared by UV polymerization for tissue engineering application. The characteristic absorption peaks from FTIR provide evidence for the successful preparation of PAA-Ch-Si hydrogel through UV polymerization. These hydrogels were hydrophilic with water content above 80%. The results of the mechanical properties indicate that the maximum compressive strength of PAA-based hydrogels increased slightly when PAA was solely incorporated with chitosan or silica solution, respectively. But, the maximum compressive strength was significantly increased from 4.94 MPa to 42.26 MPa when both chitosan and silica were incorporated. The high strength is caused by the formation of an interpenetrating network (IPN) structure between PAA and chitosan with nano-silica as filler. The corresponding toughness of hydrogels also increased from 0.76 to 5.23 J and the cross-linking density increased from 0.195×10^{-5} to 2.293×10^{-5} mol/cm³. The static and dynamic friction coefficients of PAA-base hydrogels were all in the order of 10^{-4} , which is close to that of human joints. The loss modules

and $\tan \delta$ of PAA-based hydrogel increased when both chitosan and silica were incorporated. Silica appears to enhance the viscoelastic properties in such a manner that it produces a soft hydrogel that can disperse the damping under dynamic loading. These properties are beneficial for hydrogels to be used as scaffold for tissue engineering application.

作者及所屬單位

醫療用骨材臨床前生物試驗之應用研究

Bio-test of medical use bone material prior to clinical use

林鴻儒*¹, 徐楓茜¹, 凌銘鴻¹ and 林育娟²

¹ 南台科技大學化學工程暨材料工程所

² 中華醫事科技大學護理系

E-mail: hrlin@mail.stut.edu.tw

壹、計畫緣起與目的

組織工程

全球每年有無以數計的病患需要接受骨骼修復的治療。傳統上骨骼修復的技術主要是利用自體移植法或同種異體移植法以加速破損骨骼的成長。此類的骨骼修復法雖然有其優點，然而仍潛藏著許多執行上及後續的問題。前者的缺點為適當大小的移植物取得不易，且自體日後在移植位置上，易形成不規則的外形及增加此位置的罹

病率。後者的弊病則是外來的移植物在被移植體上產生排斥及細胞性免疫反應等問題[1]。因此，對於骨骼的修復這些方法並非長久之計，必須尋找其它更合適的替代方法。其中利用金屬、陶瓷及高分子等人工移植材料進行骨骼修復成為新的趨勢。

截至目前為止，固定斷裂骨骼上最常使用的移植金屬材料為不銹鋼，鈦及鈷-鉻合金等生物體相容性較佳的金屬。雖然它們於骨骼復原過程中，在固定及控制移動上提供應有的強度及剛性；但由於其強度高於骨骼(彈性模數 $E_{\text{metal}} = 100 \sim 200 \text{ GPa}$, $E_{\text{bone}} = 6 \sim 20 \text{ GPa}$)[2]，因此承受大部分的負載，結果造成受應力屏蔽下的骨骼 (Stress-shield bone) 無法完全康復，很容易再發生斷裂，且可能因金屬腐蝕而引發局部性的組織病變。分解性高分子及高分子/陶瓷復合材料之彈性模數與骨骼相近，且在骨骼復原過程中隨著骨骼變得較剛硬時而逐漸降解。因此使用這類材料進行骨骼修復時，可獲得較不剛硬的系統，並且能避免產生腐蝕及不需執行二次手術將移植材料移除。組織工程就是利用這些材料做成支架(Scaffold)在斷裂骨骼的修復上提供一個有效且可行的方法。簡言之，三維的多孔材料需提供細胞一個良好的生存環境，能夠有利於細胞貼附及增生。而支架的設計不僅須滿足骨缺損部位，也須達到新組織修復前而逐漸降解功能。因此，用於組織工程的高分子材料至少必須滿足以下幾點：
(1)為生物體相容性及生物體分解性佳之材質；(2)其降解性產物應不

具毒性，並易於經由代謝途徑排泄掉；(3) 支架應是 Osteoconductive，所以骨母細胞可以貼附在上面，並在上面遷移；(4) 必須具備足夠的機械強度，使細胞在培養的過程中，仍可維持支架結構的完整性；(5) 易於製成所需的形狀，並具備多孔結構，利於細胞的成長及組織的再生[3]。

從實際組織修復的觀點而言，若將單獨細胞從捐贈者的組織先隔離出來，並在適當的支架上培養，再移植到受傷之組織上，便可達到移植之目的[4]。支架在活體外培養及後續的活體內移植時扮演著隔離細胞的支撐物及黏著性基質之角色。細胞移植之成功與否，取決於基質材料對細胞培養的合適性。相關的研究文獻顯示生物分解性高分子可讓移植細胞在被細胞本身所分泌的骨骼基質取代前充當暫時性的支架，並促成組織的再生。因此，利用天然或合成生物分解性高分子材料可使細胞移植技術應用於許多生物體內組織之再生，如硬骨[5]、軟骨[6]、神經[7]、血管[8]、皮膚[9]、胃腸組織及泌尿器官等部位[10]。然而所選用的支架必須能夠支撐細胞貼附、增生及分化，或是能夠搭載藥物做為藥物載體[11]，而且選擇的支架能夠在組織再生與修復後產生降解，因此使用生物可降解性材料為支架之基材成為必要之選擇[12]。若將此類型的高分子材料製成適當的三維結構，可讓骨母細胞在上面生長，並使骨骼基質在上面沉積，待骨骼基質之基礎鞏固後便會自動分解。

1-1 生物可降解性合成高分子材料

近年來，可降解性高分子材料常與細胞做結合，並透過訊息因子的刺激，來達到修復骨缺損目的[13]。由文獻得知，poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)[14]，poly(ethylene glycol) (PEG)[15-16]，poly(vinyl alcohol) (PVA)[17-18]，polyurethane (PU)[19]，poly(carpolactones) (PCL)[20]等系列的高分子為常用之支架基材。例如2003年，Y. K. Luu等人[21]，利用PLA、PGA及PLGA此系列高分子，以電紡絲方法製備多孔性3-D網狀結構支架。結果顯示：利用電紡所製備出奈米纖維網狀結構有助於細胞的貼附與增生，且能提高細胞外基質(Extracellular matrix, ECM)產生。但是使用這一系列材料的缺點為在支架降解時，會釋放出酸性產物，降低移植周圍血管新生能力，降低其代謝能力，進而導致炎症反應(Inflammatory reaction)的發生[22-24]。PCL為一種半結晶性脂肪族系列高分子，常被應用於組織工程及軟-硬組織替換[25]，其性質類似PLA及PGA，具有較慢之降解速率[26]，廣泛被使用並結合藥物做為長期治療型載體之一。另外，2007年，Se Heang Oh等人[27]，利用PCL結合Pluronic，利用融熔法將兩種高分子摻混，再用低溫冷乾製成多孔性複合支架，分別比較纖維母細胞(NIH/3T3)、骨母細胞(chondrocytes)及造骨細胞(osteoblasts)於不同孔徑下細胞的增生情況。結果得知380~405 μm 有利於chondrocyte及osteoblast生長，而

186~200 μm 有利於纖維母細胞增生，由動物實驗結果可得知，該 PCL/Pluronic 複合材料有助於新生骨的形成。然而，選擇這一系列高分子必須克服支架降解時，所釋放出酸性產物將會影響血管新生能力、周圍組織發炎現象、代謝能力及降解速率等問題。一般天然高分子材料可透過細菌、酵素、pH 及溫度環境等影響使其降解，且天然高分子材料最終會被生物體代謝及排除，因此選擇天然高分子應用於組織工程上為不二選擇。

1-2 生物可吸收性天然高分子材料

生物高分子材料(Biopolymers)係由自然界中生物體本身構造一部份或代謝合成的產物，可經由生物技術或化學合成的方式聚合出分子量高的材料，是近年來頗受重視的生技產品，此材料可應用於產業和生物醫學工程的發展。目前常使用的生物高分子材料的種類很多如膠原蛋白(Collagen)[28]、幾丁質(Chitin)、幾丁聚醣(Chitosan)[17, 29-30]、海藻酸鹽(Alginate)[31]、透明質酸(Hyaluronic acid)、纖維素物質(Cellulosic materials)、明膠(Gelatin)[32]及澱粉等[33]。至於生物高分子材料的來源可為微生物產物、真菌產物、昆蟲、蕈類、甲殼類廢棄物等。這些生物高分子材料都因具有生物分解性和生物吸收性而被應用，統稱為生物吸收性材料，在生物有機體內會逐漸裂解，而最終將被生物體代謝或排泄出去。這些生物高分子

材料可用來輔助或替代生物體組織、器官功能而會與生物體的細胞、血液、組織、蛋白質直接接觸，廣泛應用於生物體內或生物體外，如局部植入物、導管、人工器官、藥物釋放系統、創傷外敷材料、隱形眼鏡等，也可用在生醫感測器或是做為細胞載體、酵素擔體等 [34]。例如 2001 年，M. Kikuchi 等人 [35]，利用 Hydroxyapatite/collagen (Hap/Col) 奈米複合材料做為人工骨頭置換材料，以 Cold isostatic pressure (CIP) 方法控制 pH 值(pH 9)及溫度(40°C)使其反應製得支架，並搭載 Recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rh-BMP2)[36-37]增加細胞增生率。但是，將 Hap/Col 支架移入體內後，發現支架裂解及被吸收的速度緩慢，因此修復能力有限。2004 年，S. Sotome 等人 [38]，製備新穎性的 Hydroxyapatite/collagen-alginate 水膠，作為骨添料與藥物釋放載體。由動物實驗結果顯示，作為骨添料在第四周時就可發現有血管新生之情形；而搭載生長因子(BMP-2)的水膠載體移植於軟組織中，第五周時就可以發現新骨增生；另外，Alginate 容易被酵素所分解，因此在缺損部位組織再生後會逐漸降解。以下就本計畫所使用之材料及其在國內外之相關研究做一概略介紹。

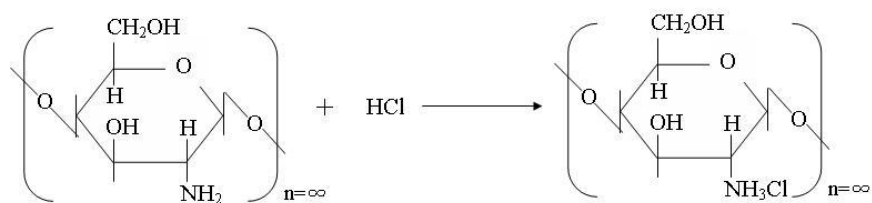
1-3 幾丁聚醣之國內外相關研究

幾丁聚醣是由幾丁質而來，為一種胺基葡萄糖所聚合而成之

高分子多醣體{(1,4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glucan}，是自然界中第二大的天然高分子僅次於纖維素，且是自然界中唯一的多醣類陽離子型高分子。幾丁質通常與蛋白質結合成為黏多醣形式，存在如海洋無脊椎動物、動物的上角皮層組織、植物細胞壁中、昆蟲外殼以及真菌菌體的細胞壁裡，其中以甲殼類的蝦蟹殼幾丁質含量最高，具有保護及支持生物體的作用。在過去十年，幾丁質與幾丁聚醣廣泛的被應用在醫藥、化妝品、生物科技、農業、工業及食品業[39]。在醫藥方面，幾丁聚醣具有良好的生物降解性，在體內無毒性[40]，也有良好的抗菌效果，以及生物相容性佳，所以有一些特殊的應用[41]，例如（1）先進生醫材料，可作為敷料、修復骨組織材料、藥物釋放載體等。（2）抑制生物合成，幾丁聚醣可阻止RNA的生成又可降低菌體活性，因此可達到抑制細菌的生長[42-43]；在化妝品方面具有保濕、抗菌、增稠性及成膜性[39]；在工業方面，將幾丁聚醣添加於材料中可提升耐磨性、耐刮性及耐腐蝕性；在農業方面，屬於無公害農藥，有促進生長的功用；在環境方面，因蝦蟹殼與烏賊軟骨相當的多，如果能回收提煉，就可大幅降低此類的環境汙染，由此製造的幾丁質與幾丁聚醣，又可有效的吸附重金屬，對環境可說是百利而無一害[44]。

幾丁聚醣因具有較多胺基及去乙酰作用的關係，溶解性較幾丁質

佳，但是還是需要以弱酸，例如：冰醋酸，才可使之溶解，若使用有機溶劑則無法溶解，因為幾丁聚醣帶有胺基且結晶性高[45]，所以對人體的助益並不大。因此水溶性幾丁聚醣的發展顯得更為重要(圖一)，而人體的元素結構與水溶性幾丁聚醣非常相似且相容性高。因為人體約有70 %是水份，只有水溶性的幾丁聚醣，才可以被人體完全吸收，所以為了讓幾丁聚醣能夠發揮原有的功能，水溶性是一項絕對必要的條件[46]。



圖一 水溶性幾丁聚醣之分子結構

2006年 G. S. Sailaja 等人[43]，成功地利用 Chitosan、Acrylic acid (AAc)和 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAP)製備出可降解型複合材料，評估此複合材料是否可應用於修復骨缺損。利用 Human osteosarcoma cells (HOS)植覆於複合材料表面，以光學顯微鏡觀察 HOS 細胞貼附於材料上之生長情況，並利用 MTT 測試細胞的增生情形，斷定此複合材料為生物相容性高之材料。2006年 T. Jiang 等人[47]，成功地製備出 Chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) (PLAGA)多孔性複合材料。其結果顯示出，隨著燒結溫度(100~115°C)越高，孔徑(170~200 μm)越小，其壓縮強度也隨之增加(3.69~15.56 MPa)。並利用 MC3T3-E1

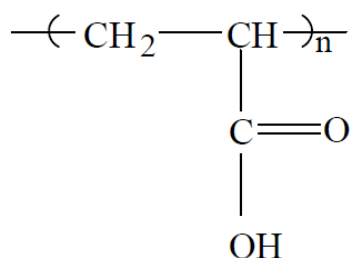
Osteoblast 細胞，植覆於此複合材料上，由數據得知，此複合材料可讓 MC3T3-E1 細胞成功地增生，能應用於骨組織之修復。2009 年 R. Zeng 等人[48]，成功地利用 Chitosan 為基材，以離子鍵結方式結合 Tripolyphosphate (TPP) 製備出奈米複合材料。使用 Bovine serum albumin (BSA) 當作模擬藥物，觀察體外之藥物釋放，由數據顯示添加 Chitosan 後之載體可延緩藥物釋放速率。另外，再將此複合材料浸泡於 Synthetic body fluids (SBF) 中，觀察是否可成功誘導出 Nanohydroxyapatite，並利用 TEM、XRD 證實，可成功地誘導出 Nanohydroxyapatite。研究成果顯示，以 Chitosan 為基材之複合材料可應用於控制藥物釋放及骨組織之誘導。民國九十四年，鍾美竹製備多孔性明膠-幾丁聚醣/奈米二氧化矽複合支架，並藉由浸泡方法將氫氧基磷灰石(HA)披覆於多孔性複合支架表面以提升支架材料的生物活性與細胞界面之相容性，探討複合支架的熱性質。結果顯示：添加無機奈米二氧化矽，以及天然高分子明膠、幾丁聚醣與二氧化矽三者間的交聯鍵結，不但提升支架的熱性質，也降緩複合支架材料的生物降解速率，以及提升支架孔洞結構的抗壓強度，達到修復骨組織的條件；再者毒物性測試結果顯示，複合支架材料的製備過程，含有殘留的界面活性劑，導致細胞有輕微毒性的反應[49]。民國九十五年，陳泰宏製備透明質酸(HA)-幾丁聚醣(Chitosan)/聚氮-異丙基丙烯醯胺(PNIPAM) (HA-CPN)水膠載體，應用於修復骨組織。由

實驗結果顯示，在硬骨細胞培養過程中，根據 ALP 活性分析、鈣生成量分析及組織染色之結果，證實將間葉幹細胞培養於 HA-CPN 水膠內，可成功地被誘導分化成骨母細胞，且水膠載體的機械強度會隨著誘導分化時間的增加而顯著獲得提昇[50]。民國九十七年，林彥志利用第一型膠原蛋白、玻尿酸及幾丁聚醣製備多孔隙複合支架，由結果顯示，發現具有良好的孔隙相連性與抗壓強度；在細胞培養方面，第 14 天時複合支架皆能維持細胞良好的活性、正常形態及良好的細胞外基質分泌量；在動物（大白豬）實驗方面，將材料植入動物體內後，再經由組織染色切片發現，該支架對於軟骨損傷具有良好之修復效果，可於損傷處產生新生之透明軟骨並維持其新生軟骨細胞之正常形態[51]。

1-4 聚丙烯酸之國內外相關研究

聚丙烯酸(圖二)為生物黏著性高分子材料，常使用於黏著劑，因具有能解離的親水性-COOH基，解離後分子鏈間靜電排斥力增加，使其具有良好的吸水性質[52]。吸水性的高分子材料是具有親水性或水溶性的分子以化學或物理性交聯產生三維網狀立體空間結構，可以使水分進入網狀結構中並能保存在網狀結構的網孔中不流失。一般認為含水量超過總重量的20%以上稱為吸水性高分子；若含水量超過總重量的95%以上則稱為超吸水性高分子[53]。

舊式的吸水性材料，例如：海綿、紙漿等，保水度差，直到發現使用丙烯酸製成的材料可具有良好的保水度，自此聚丙烯酸開始蓬勃的發展。在早期聚丙烯酸多應用於生理用品與紙尿布上，但隨著科技的發達且人工合成技術的快速發展，聚丙烯酸應用的範圍也越來越廣泛，例如在生醫材料、化妝用品、隱形眼鏡材料、藥物釋放載體、生理感測材料等具高附加價值的成品中。



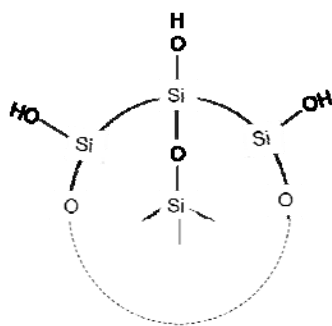
圖二 聚丙烯酸之分子結構

由國內外文獻報導，2004年Young Chang Nho等人[54]，利用 γ -ray照射(radiation dose: 5–20 kGy, dose rate: 2.15 kGy/h)聚合先形成 poly(ethylene oxide) (PEO)水膠，再依相同方法接枝聚合acrylic acid (AAc)，即可形成具有pH感應型的PEO-AAc水膠載體。其測試結果顯示，將此pH感應型水膠載體搭載insulin藥物，利用UV/VIS觀察其藥物於血液濃度的含量，由數據顯示此pH感應型水膠具有緩釋效果，即可降低血液中血糖濃度。2009年，X. Shi等人[55]，利用溶膠凝膠法製備SiO₂-Polyacrylic acid(SS-AA)水膠，由結果顯示，SS/AA比例為0.13時，水膠壓縮強度可達到45.6 kPa；含水率可達99.1%，膨潤度則為1017.2 g/g，可作為具生物活性的支架。

1-5 奈米二氧化矽之國內外相關研究

奈米二氧化矽(圖三)可分為有機與無機，而有機二氧化矽，例如：TEOS，常用於一般模板聚合製造二氧化矽的多孔性結構。無機奈米二氧化矽是一種無定型白色粉末，無毒、無味、無污染的非金屬材料，表面存在不飽和的殘鍵及不同鍵結狀態的烴基，呈缺氧而偏離穩態的矽氧結構，即以 SiO_{2-x} 表示之。一般無機奈米二氧化矽應用非常廣泛：(1) 可做為抗紫外線劑應用於化妝品上，(2) 做為塑料之增韌及抗老化劑，(3) 做為塗料添加劑以抗紫外線及提高耐洗刷性，(4) 做為補強及抗老化之橡膠添加劑等。

近年來無機奈米二氧化矽在生醫材料上極具吸引力，因為有良好的生物相容性及具有優越的功能性，特別是製備中空奈米二氧化矽，可將酵素或其他生物分子裝進孔洞內部且固定用於藥物釋放上 [56] 可達到緩釋的效果。



圖三 奈米二氧化矽之分子結構

1-6 生長因子-血小板膠

組織工程包括三大部分：細胞、支架以及生長因子。其中生長因

子居誘導和調控的角色，對細胞的分化、間質的分泌都有決定性的影響。本研究採用血小板凝膠做為生長因子，血小板在血液中除了有凝血、止血的功能外；最近幾年的醫學研究，發現它在組織修復和再生過程中，也擔任一個非常重要的角色。有些蛋白質的誘導物質平常儲存在血小板細胞質的 α 顆粒內，這些 α 顆粒儲存有許多生長因子如 Platelet derived growth factor (PDGF)、Transforming growth factor- β (TGF- β)、Vascular endothelial growth factor (VEGF) 及 Epidermal growth factor (EGF) [57]。當血小板受到激化後，這些蛋白質會釋放出來，開始刺激微血管生長，這些物質就是所謂的生長分化因子。研究證實血小板被激化後，所釋出的生長分化因子的量和血小板的量成正比關係，也就是說血小板的數目越高，釋出的生長分化因子也越多。近年來針對幹細胞(Stem cells)的研究，證實骨髓間質幹細胞的細胞膜上具有上述生長分化因子的接受體。當這些誘導物質和幹細胞的細胞膜上的接受體結合後，會促進幹細胞分化、細胞數目增加，同時刺激誘導幹細胞成為骨骼結締組織的先驅細胞、產生類骨，也會刺激血管新生。因此血小板的角色不僅能發揮止血的功能，還能釋放一些物質誘導幹細胞，促進骨組織再生，所以具有加速軟組織癒合和骨組織再生的能力。血小板必須以一定劑量的活化劑來激發，讓它們釋出生長因子，才能誘導細胞來加速軟組織癒合和骨組織的再生。例如，三軍總醫院陳天牧醫師所組成的團

隊利用 HA/TCP 骨傳導微粒混合自體血小板膠重建大白兔全層顱骨缺損，進而修補臨床病患之顱骨缺損[58]。血小板膠除了可誘發硬骨細胞外，也可誘發軟骨細胞新生，於 2008 年台灣國家新創獎學術研究組，方旭偉等人利用軟骨碎片、血小板膠與間葉幹細胞之混合物，移植於裸鼠皮下，結果呈現出走向玻璃軟骨(Hyaline cartilage)之軟骨細胞型態，並分泌大量的葡萄糖胺(GAG)[59]。因此，將這些成功之案例作為參考，本計劃模仿人體凝血的最後步驟，以凝血酶當作活化劑，混合血小板濃厚血漿(Platelet-rich plasma, PRP)形成血小板凝膠並搭載於水膠載體中，評估是否能修復骨組織缺損。

1-7 PAA-Ch-Si 水膠之製備及相關機械性質之研究

(1). 計畫目標

本實驗選用親水性佳的丙烯酸(Acrylic acid, AAc)為單體，與具降解性天然高分子幾丁聚醣(Chitosan, Ch)，製備 PAA-Ch 水膠，並以具增韌效果的 Silica (Si)為添料，期望製備高強度 PAA-Ch-Si 水膠載體並搭載血小板膠，進而修復軟-硬骨之缺損，本實驗將預定測試項目為機械性質（壓縮測試、交聯密度、摩擦試驗、流變試驗）、膨潤及含水率測試、表面型態觀察、DSC 測試。

貳、 研究方法與過程

2-1 以 UV 光聚合法製備 PAA、PAA-Ch、PAA-Si 及 PAA-Ch-Si 水膠

取 40 ml 的去離子水，加入 0.062 g 的交聯劑 NMBA 及 0.091 g 的起始劑 APS 攪拌至完全溶解，再加入單體 AAc 24.71 ml (如表 3.1)，持續攪拌後，加入交聯劑 100 μ l GA。混合均勻後，注入直徑 1.5 公分的圓柱形玻璃模具中，移至 UV 光照射 1 小時 (2200W)，聚合形成 PAA 水膠，隨後將聚合完成之水膠置於去離子水中水洗 3 次，以除去未反應之單體。

取 40 ml 的去離子水添加 4 g 水溶性 Chitosan 粉末、0.062 g NMBA、0.091 g APS 均勻攪拌，再添加濃度為 9 M 24.71 ml 的 AAc 持續攪拌，並加入交聯劑 100 μ l GA，靜置 3 小時後，注入直徑 1.5 公分的圓柱形玻璃模具中，移至 UV 光照射 1 小時(2200W)，聚合形成 PAA-Ch 水膠，隨後將聚合完成之水膠置於去離子水中水洗 3 次，以除去未反應之單體。

取 40 ml 的去離子水添加 0.062 g NMBA、0.091 g APS 均勻攪拌，再加入 50 ml 的 9% (v/v) Silica 水溶液後，持續攪拌，此時加入濃度為 9 M 24.71 ml 的 AAc 持續攪拌，並加入交聯劑 100 μ l GA，靜置 3 小時後，注入直徑 1.5 公分的圓柱形玻璃模具中，移至 UV 光照射 1 小時(2200W)，聚合形成 PAA-Si 水膠，隨後將聚合完成之水膠

置於去離子水中水洗 3 次，以除去未反應之單體。

取 40 ml 的去離子水添加 4 g 水溶性 Chitosan 粉末、0.062 g NMBA、0.091 g APS 均勻攪拌，再加入 50 ml 9% (v/v) Silica 水溶液後，持續攪拌，此時加入濃度為 9 M 24.71 ml 的 AAc 持續攪拌，並加入交聯劑 100 μ l GA，靜置 3 小時後，注入直徑 1.5 公分的圓柱形玻璃模具中，移至 UV 光照射 1 小時(2200W)，聚合形成 PAA-Ch-Si 水膠，隨後將聚合完成之水膠置於去離子水中水洗 3 次，以除去未反應之單體。

2-2 FT-IR 光譜分析

將常溫乾燥後所得之水膠研磨成細粉，並與溴化鉀 (KBr) 以 1 : 99 的比例混合均勻後，再壓製成錠，以 FTIR (Perkin Elmer FTIR, Model: Spectrum One) 觀察本研究在自由基聚合反應所得到的聚合物其特性吸收峰。

2-3 膨潤度與含水率測試

將乾燥後之水膠分別置於 37°C 之模擬體液 (PBS) 中，分別於不同時間點取出以濾紙擦拭秤重，直至重量不再變化，再代入下列公式換算成膨潤度及含水率。

水膠之膨潤度為：膨潤度 (w/w) = $(W_s - W_o) / W_o$ (1)

水膠之含水率為： 含水率 (%) = $(W_t - W_0) / W_t * 100$ (2)

(W_0 ：水膠乾燥重； W_s ：水膠吸水後重； W_t ：水膠吸水達平衡後重)

* 模擬體液 (PBS)：KCl=0.2 g、NaCl=8 g、Na₂HPO₄=2.16 g、KH₂PO₄=0.2 g加去離子水至1000 ml

2-4 SEM 表面形態觀察

將備製完成水膠置於25°C之去離子水中充分膨潤至平衡，置於-40°C下冷凍，取出後以冷凍乾燥機去除水分。再利用SEM觀察水膠之截面型態。

2-5 TEM 粒徑觀察

將製備好的水膠放置烘箱中乾燥，將乾燥之水膠以環氧樹脂包埋烘乾，利用超微切割機進行裁切，再利用TEM觀察其水膠表面形態。

2-6 機械性質測試-壓縮試驗

將製備好的圓柱形水膠(1.5×1 cm)，置於25°C之PBS中，直到水膠膨潤達平衡，利用萬能材料試驗機(AG – IS：Shimadzu / Japan) 以單軸壓縮的方式進行壓縮試驗，壓縮速率為10 mm/min，測試水膠之壓縮強度及彈性模數，而為了避免損害壓盤，確保實驗之安全性，

進行實驗時我們以肉眼觀察水膠之變化。在壓縮試驗進行中，一當發現水膠出現微裂縫時，就立即停止試驗，以確保實驗之安全性。再者將壓縮測試所獲得數據之荷重（F：單位牛頓）換算成應力（ τ ：stress），以應力為縱軸， $-(\lambda-\lambda^{-2})$ 為橫軸作圖，求得斜率G（剪切模數），並帶入公式(6) 以求得水膠之交聯密度[60]。

$$\tau = F \times 1000 / (9.8A) \dots\dots\dots(3)$$

τ ：膨潤水膠單位面積所承受之應力（ g/cm^2 ）

A：受力面積（ cm^2 ）

$$\lambda = \Delta L / L_0 \dots\dots\dots(4)$$

ΔL ：膠體的原始厚度與壓縮後之厚度的差值（mm）

L_0 ：膠體的原始厚度（mm）

$$\tau = -G (\lambda - \lambda^{-2}) \dots\dots\dots(5)$$

$$\rho_x = G v_2^{-1/3} / RT \dots\dots\dots(6)$$

v_2 ：溫度T時，平衡狀態下高分子的體積分率

R：氣體常數

T：絕對溫度

ρ_x ：交聯密度

2-7 摩擦試驗

將樣品製作成平板狀(15×10×0.5 cm)的水膠置於25°C之PBS中，

直到水膠膨潤達平衡後，利用萬能材料試驗機（AG-IS：Shimadzu / Japan）以單向試驗進行表面摩擦試驗，標準荷重為0.2 kg，試驗滑動速率為150 mm/min。

2-8 動態流變儀試驗

將配製完成的圓柱形水膠(1.5×0.5 cm)置於37°C PBS中充分膨潤至平衡，利用流變儀進行動態黏彈性測試，扭轉應力為1 KPa，頻率為1 Hz，溫度為37°C，測試時間為10分鐘，觀察在不同組成下，Tan δ 、儲存模數（G'）和損失模數（G''）之變化。

將配製完成水膠置於37°C PBS中充分膨潤至平衡，利用流變儀進行動態黏彈性測試，扭轉應力為1 KPa，頻率為0.1、1、10 Hz，溫度為37°C，觀察在不同組成下，Tan δ 、儲存模數（G'）和損失模數（G''）之變化。

2-9 DSC 測試

將配製完成的水膠置於25°C之去離子水中充分洗滌，洗滌後的去離子水pH值需為7.4，再將水膠裁成固定的重量，以10 °C/min升溫速度升溫，觀察水膠 ΔH 的變化情形。

2-10 降解試驗

將剛配製完成水膠置於25°C之PBS中充分膨潤至平衡，置於-40°C下冷凍，取出以冷凍乾燥機除去水分，之後取出水膠秤其重量。再將其置於37°C之PBS中進行觀察，每隔一段時間取出置於-40°C下冷凍，再以冷凍乾燥機進行冷乾並秤重紀錄。藉由前後重量之變化，可觀察水膠在長時間浸泡於PBS中是否會產生降解現象。

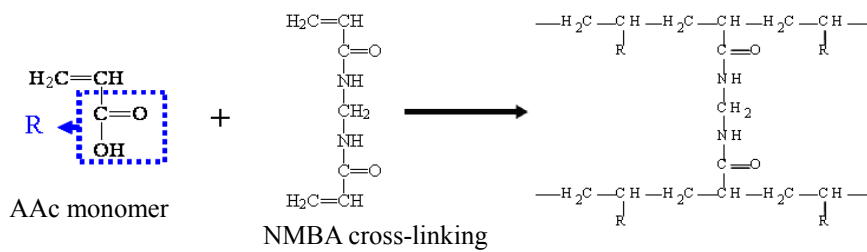
參、 主要發現與結論

3-1 水膠結構之探討

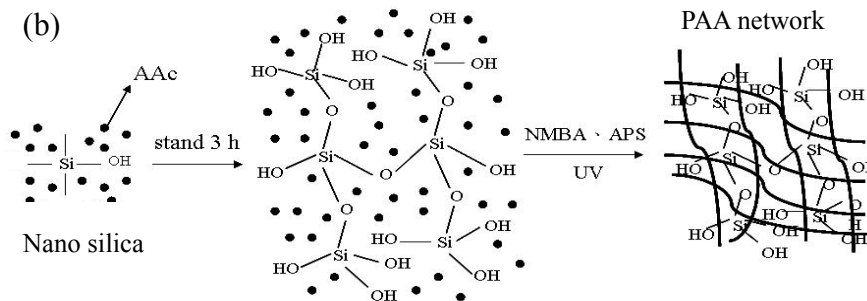
本研究以PAA為基材利用UV光照射聚合形成水膠，其反應為自由基加成聚合反應，對於降低毒性方面有極大的改善[61]。UV光聚合水膠是以高能量的方式打斷鍵結形成聚合，可縮短聚合時間，達到較低毒性及快速聚合之目的，其反應機制如圖四所示。將AAc、NMBA、APS混合，因APS使AAc產生自由基，經UV光照射後聚合成PAA，其中NMBA為交聯劑可做為PAA分子鏈間之架橋，形成PAA網狀結構其反應如圖四(a)所示。由文獻報導，經自由基聚合反應產生之PAA網狀結構在顯微組織中可能會產生孔洞(Void)之型態[62]。當奈米Silica分散於AAc水溶液中，經UV光照射聚合形成之PAA網狀結構，同時會與奈米Silica產生氫鍵鍵結[55]如圖四(b)及(d)所示；又因Silica粒徑為奈米級且具有團聚現象產生，所以在分散的同時有可能會進入PAA網狀結構所形成的void中，一旦Silica與PAA產生氫鍵鍵結後將會於void中形成較緊密的網狀形結構體。圖四(c)為Ch與GA在酸性環境下自身形成網狀結構[63]。GA與Ch會藉由共價鍵鍵結而產生內外部交聯[64]（GA的醛基會與Chitosan的氨基產生縮合反應），更能增加鍵結的強度[65]。另外，因PAA帶有負電荷而Ch帶正電荷，本實驗可能之反應機制為PAA網狀結構與Ch網狀結構，藉由兩者間之靜電庫倫力互相穿插在一起[66]。為了讓整體PAA-Ch-Si水

膠之反應機制更清楚表達，我們將反應機制圖式化，由圖四(d)所示，黑色實線為PAA網狀結構，紅色虛線為Ch網狀結構，兩者會互相穿插在一起，而奈米Silica則是分散於AAc水溶液中，因此經UV光照射聚合後，即形成PAA-Ch-Si互穿形網狀結構（Full-IPN）。本論文將聚合形成之水膠做後續物性探討及生物相容性方面試驗，探討此水膠是否可應用於修復骨組織缺損之載體。

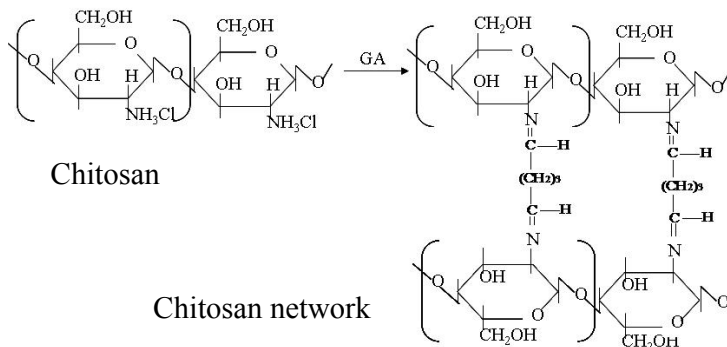
(a)

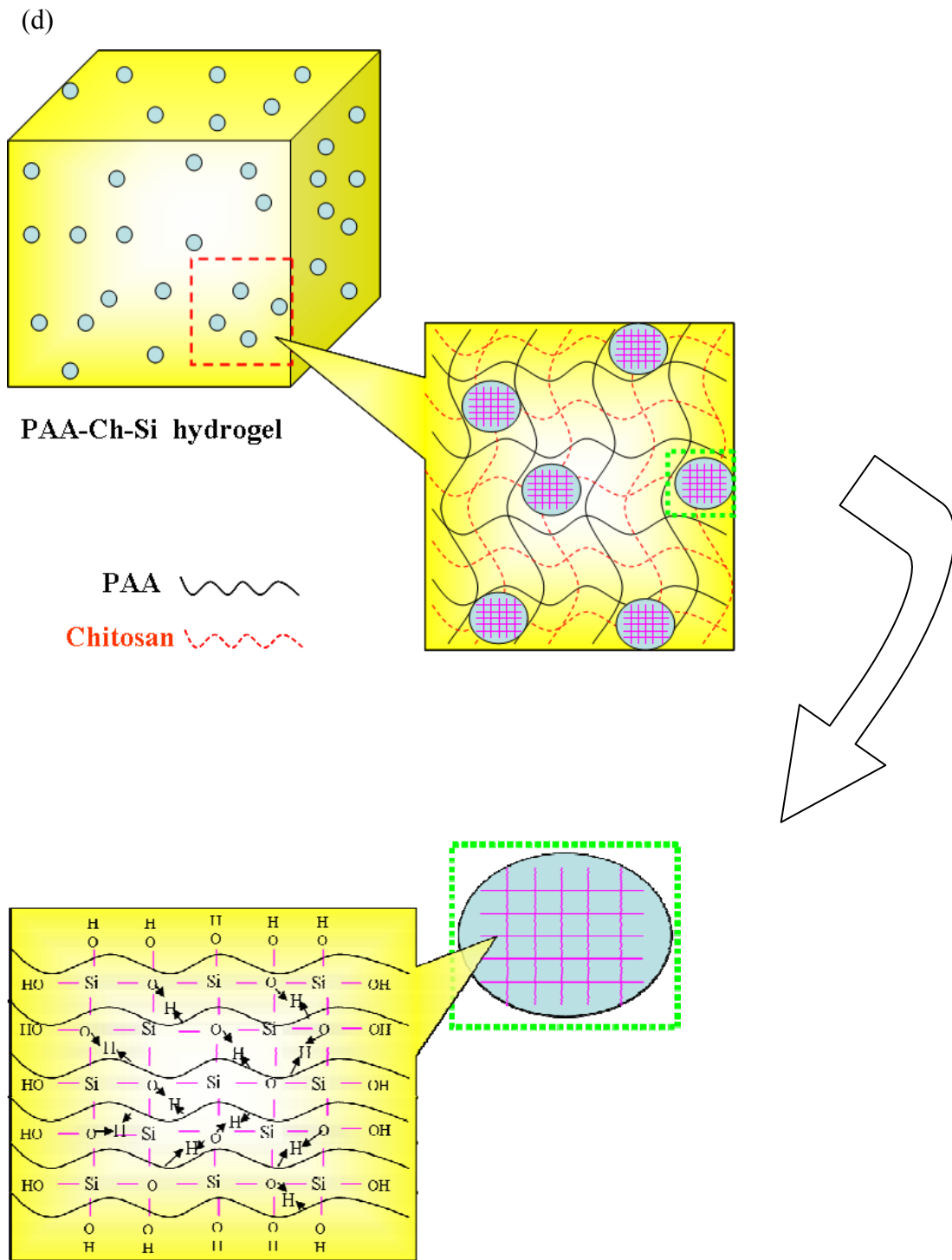


(b)



(c)

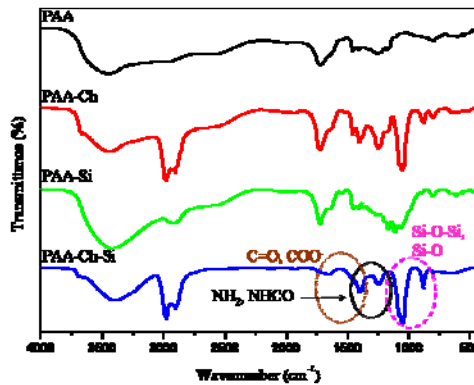




圖四 PAA-Ch-Si 水膠之反應機制示意圖 (a)PAA 網狀結構機制圖 (b)PAA 與 Silica 反應機制圖 (c)Chitosan 自身形成網狀結構機制圖 (d)PAA-Ch-Si 水膠反應機制圖

3-2 FT-IR光譜分析

為了證實 Chitosan 與 Silica 是否成功與 PAA 產生摻合，我們利用 FT-IR 來分析證明 PAA、PAA-Ch、PAA-Si、PAA-Ch-Si 水膠之特性吸收峰。由圖五所示，PAA 在 $1413-1558\text{ cm}^{-1}$ 和 $1694-1710\text{ cm}^{-1}$ 分別有 COO^- 和 $\text{C}=\text{O}$ 之特性吸收峰；PAA-Ch 在 1380 cm^{-1} 和 1598 cm^{-1} 有 NHCO 和 NH_2 之特性吸收峰；PAA-Si 在 939 cm^{-1} 、 1020 cm^{-1} 有 Si-O 和 Si-O-Si 之特性吸收峰，而 PAA-Ch-Si 則包含所有的特性吸收峰，因此由 FTIR 可以推測 Ch 與 Si 可與 PAA 摻合[41]。

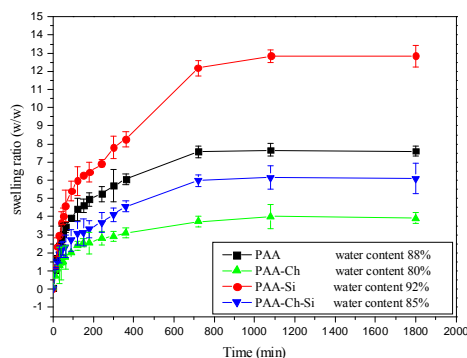


圖五 不同組成水膠之 FTIR 圖

3-3 膨潤度與含水率測試

若將水膠應用於修復骨缺損之載體，就必須具備良好的膨潤度及含水率，因為當水膠有良好的吸水性時，將能吸附藥物及釋放藥物之特性，因此我們將水膠置於 37°C PBS 中進行膨潤度測試，由圖六可以看出，在 37°C 時 PAA-Si 水膠膨潤度比其它幾組來的高，是因為 PAA-Si 水膠本身帶有的 $-\text{COOH}$ 與 $-\text{OH}$ 基團，會與水分子產生更多的氫鍵鍵結，使得吸水性增加，故膨潤度與含水率最高。PAA-Ch 水

膠膨潤度與含水率最低，原因推測為當天然高分子Ch與PAA比例相等時，內部產生物理糾纏，使得孔洞變小造成吸水率降低[67]，所以PAA-Ch水膠含水率較其他三者來的差，因此PAA-Ch水膠的膨潤度與含水率皆比其它幾組來得低。但是PAA、PAA-Ch、PAA-Si和PAA-Ch-Si四組水膠含水率皆在80%以上。因此可得知本研究所製備的水膠載體皆具有良好的含水率，一旦水膠在吸附藥物時能提高藥物之吸附率。

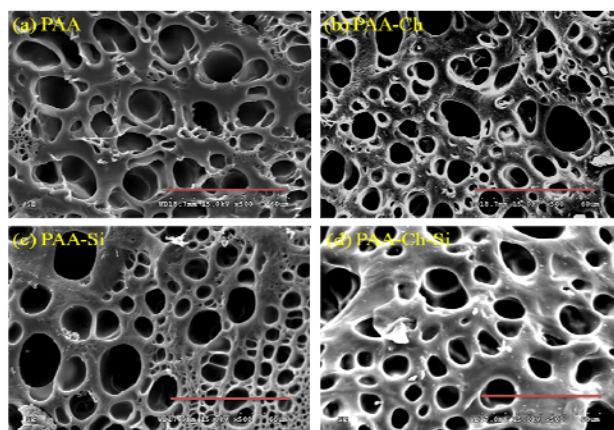


圖六 不同組成水膠之膨潤曲線圖(PBS pH=7.4, 37°C)

3-4 SEM型態觀察

水膠載體應用於修復骨缺損，就必須具有良好的孔洞連結性，以確保應用於人體時，可讓體液與其他水溶性物質滲透通過；另外，體液的滲透並能將所攜帶之藥物快速釋放出來，來達到快速治療之功效。因此為了不破壞孔洞結構我們將水膠冷凍乾燥後，利用SEM觀察水膠的表面形態。由圖七可看出，PAA與PAA-Ch水膠平均孔徑皆比PAA-Si和PAA-Ch-Si水膠來的大，其原因推測為添加奈米Silica

後會使孔洞變得較為緻密，因奈米Silica具有團聚現象，使其形成較為緊密之網狀結構，並由圖七(c)和(d)之水膠形態皆呈現出大孔洞內含有小孔洞，且圖七(d)之水膠的骨幹(cell-struct)上具有較緊密的小孔洞。四組水膠之孔洞結構，皆有助於當移植於骨組織缺損後，可吸收體液來保持一定量的含水率，並能讓營養物流通。



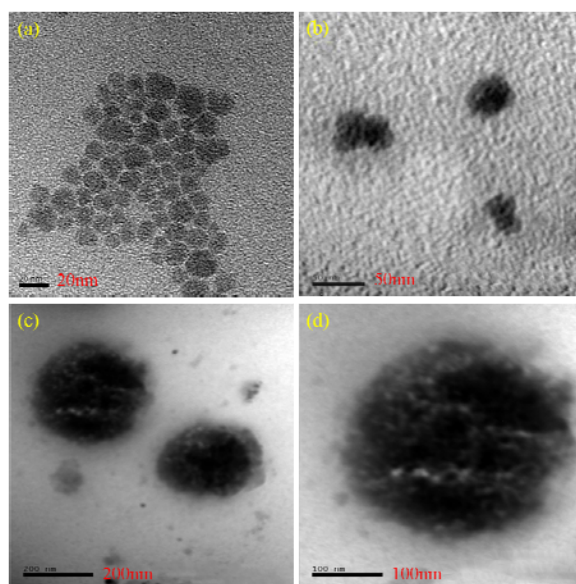
圖七 不同組成水膠之 SEM 圖(a)PAA (b)PAA-Ch (c)PAA-Si (d)PAA-Ch-Si ($\times 500$, $60 \mu\text{m}$)

3-5 TEM粒徑觀察

本實驗製程中所添加填料為奈米Silica，為了驗證是否具有團聚且產生鍵結，我們利用TEM來觀察經反應後之PAA-Si與PAA-Ch-Si水膠。如圖八所示，(a)為純的Silica，可以看到純的Silica粒徑大約為20~30 nm，(b)為PAA水膠添加Silica後所形成的PAA-Si水膠，粒徑有變大趨勢，大約為50 nm，由圖四水膠結構之探討中可以得知，因所添加的奈米Silica有可能進入PAA所形成的Void中，使得PAA與

Silica產生氫鍵鍵結[55]；由於奈米Silica粒徑為20~30 nm，且具有團聚現象，可進入PAA所形成的void中，一旦奈米Silica進入void中的數量越多的話，與PAA產生的氫鍵就越多，因此所觀察到的粒徑就隨之增大。圖(c)為PAA-Ch-Si水膠，由圖可發現水膠的粒徑約為200 nm，此水膠粒徑遠大於純Silica(圖(a))與PAA-Si水膠(圖(b))，原因推測其PAA與Silica產生氫鍵，有較大吸引力可與Silica粒子產生鍵結，之後帶負電的PAA又與帶正電的Ch互相吸引，使PAA-Ch-Si水膠粒徑變大；而圖(d)為圖(c)之放大圖，更能明確得知粒徑大小有所變化。

因此可由 TEM 圖推測此 PAA-Si 及 PAA-Ch-Si 水膠有成功地反應聚合，並可驗證前圖四所提到之反應結構式。



圖八 不同組成水膠之 TEM 圖(a)純 Silica (b)PAA-Si (c)PAA-Ch-Si (d)PAA-Ch-Si 放大圖

3-6 機械性質測試-壓縮測試

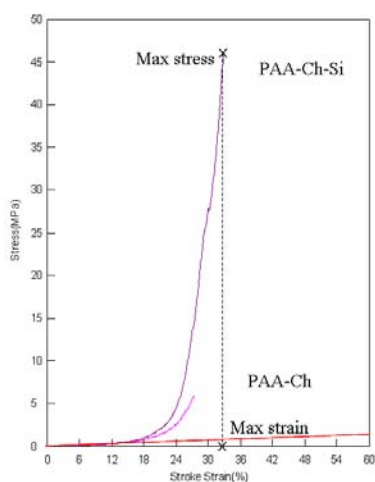
本實驗中使用 AAc 單體，添加交聯劑與起始劑，並利用 UV 光照射聚合形成 PAA 水膠，添加不同材料並比較其機械強度。為了證明本實驗所製備的水膠載體是否可以具有一定的強度來抵抗外來的應力，及避免硬骨因活動而牽動肌肉或關節軟骨需要承受較大的壓力，因造成的不規則擠壓，進而使水膠載體產生破裂，造成骨組織修復中斷，而必須進行二次修復手術，使患者需再忍受另一次的痛楚且延緩癒合的時間。因此，我們利用萬能材料試驗機進行壓縮測試，由於 PAA 與 PAA-Ch 水膠為硬脆型材料，而 PAA-Si 與 PAA-Ch-Si 水膠為軟韌型材料，所以壓縮試驗時會顯現不同的應力-應變行為。為了避免損害壓盤，確保實驗之安全性。進行實驗時我們以肉眼觀察水膠之變化。在壓縮試驗進行中，一當發現水膠出現微裂縫時，就立即停止試驗，以確保實驗之安全性。圖九為典型 PAA-Ch 與 PAA-Ch-Si 水膠壓縮之應力-應變圖。以 PAA-Ch-Si 水膠為例，應力應變曲線中最高點為最大應力值(46 MPa)，最大應力對應之應變為最大之應變(34%)，應力-應變曲線下之積分面積為韌性值，應力-應變曲線直線部分之斜率為水膠之彈性模數；其它水膠皆是利用此方法取得數據，將圖所得之數據整理成表一所示。表一可以看出純 PAA 水膠其壓縮強度約為 5 MPa，而添加 Chitosan 後的 PAA-Ch 水膠壓縮強度提升至 6.3 MPa；使用填料 Silica 所聚合而成的 PAA-Si 水膠壓

縮強度也提升至 8.9 MPa，但前三組水膠載體的機械強度都並未超過 10 MPa，在體內環境有可能因為肌肉的牽動或較大的應力而造成破裂。因此我們同時將 Chitosan 與填料 Silica 混合 AAc 溶液，經聚合後即形成 PAA-Ch-Si 水膠，而此水膠壓縮強度可高達 42 MPa，造成如此大的差異，推測是因為 PAA 網狀結構與 Chitosan 自身所形成的網狀結構相互穿插，而填料 Silica 則在分散的同時有可能進入 PAA 網狀結構中的 void，使得 void 中所產生的網狀結構更緊密且更可能吸收外來所施予的應力，因而整體壓縮強度上升。若將此水膠載體修復軟骨的話，即可符合膝關節軟骨所需之荷重(2~5 MPa)[66]；若是修復硬骨缺損部分，雖無法達到硬骨所需荷重(150 MPa)[68]，但硬骨本身復原能力佳，可惜所需時間較長，因此在硬骨部分可將水膠作為載體，並讓載體吸附生長因子，縮短自我修復時間，故期望 PAA-Ch-Si 水膠可成功地應用於修復軟-硬骨之缺損。

將利用壓縮測試後所得之數據代入公式(6)計算可得交聯密度，整理於表一。由表一中可看出純PAA水膠的交聯密度最低，而添加天然高分子Chitosan的PAA-Ch水膠，交聯密度只有些許上升，但並無太大變化；而將填料Silica加入PAA的PAA-Si水膠後，其交聯密度可提升至約 0.764×10^{-5} mole/cm³左右。PAA-Ch-Si水膠與其它水膠的差異較大，交聯密度高達 2.293×10^{-5} mole/cm³，主要為前面所提到的聚合反應，經UV光聚合形成的PAA網狀結構與Chitosan自身形

成的網狀結構互相穿插，而填料Silica則在分散的同時有可能進入PAA網狀結構中的void內且形成氫鍵鍵結，使水膠的交聯密度提高，相對地也提高此水膠的機械強度[69]，並可以延長水膠降解的時間[70]。另外，韌性和交聯密度可以與壓縮強度相對應，韌性與交聯密度高，壓縮強度也相對提高。相同地壓縮強度越高，水膠所交聯的網狀結構會較為緊密，因此交聯密度也隨之增加。交聯密度也與彈性模數相符合，當交聯密度越高，彈性模數也越高，材料強度就越好。

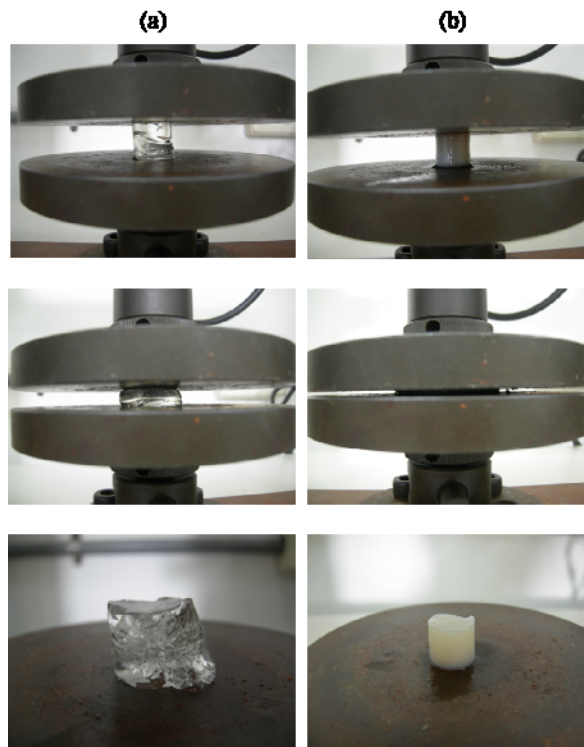
圖九為純 PAA 與 PAA-Ch-Si 水膠經膨潤後壓縮之示意圖，由照片可以明顯地看出，純 PAA 水膠經過壓縮測試後，水膠表面已經破裂，而 PAA-Ch-Si 水膠，經過壓縮測試後，還可以回復至原來形狀。因此由表一與圖九，可證明我們所製備之 PAA-Ch-Si 水膠足以承受骨組織缺損所需之應力。



圖九 壓縮試驗之 PAA-Ch 與 PAA-Ch-Si 水膠應力-應變典型圖

表一 不同組成水膠之機械性質

Name	Elastic modulus (MPa)	Max stress (MPa)	Max strain (%)	Toughness (J)	Cross-link density ($\times 10^8$ mole/cm ³)
PAA	0.91 \pm 0.14	4.94 \pm 1.44	29.33 \pm 3.70	0.76 \pm 0.08	0.195 \pm 0.047
PAA-Ch	1.44 \pm 0.18	6.31 \pm 0.50	32.01 \pm 1.44	1.47 \pm 0.16	0.204 \pm 0.041
PAA-Si	1.49 \pm 0.16	8.92 \pm 1.22	25.92 \pm 1.43	1.99 \pm 0.68	0.764 \pm 0.152
PAA-Ch-Si	2.50 \pm 0.28	42.26 \pm 3.63	25.23 \pm 0.59	5.23 \pm 1.48	2.293 \pm 0.060



圖十 壓縮測試圖(a)PAA (b)PAA-Ch-Si 水膠

3-7 摩擦試驗

一般修復骨組織缺損需有一定的時間，若將材料置於骨缺損中以修復缺損，摩擦係數需越低越好，才不會因摩擦係數太大而造成材料之磨耗，磨耗所釋出之小碎片可能會引發組織病變。所以為了

得知水膠載體之摩擦係數，我們利用萬能材料試驗機測試其摩擦係數。由表二得知，PAA 水膠之靜摩擦係數為 2.17×10^{-4} ，而動摩擦係數為 1.78×10^{-4} ；但是添加 Chitosan 後的 PAA-Ch 水膠之靜擦係數略高於添加 Silica 後的 PAA-Si 水膠之靜摩擦係數，而其動摩擦係數趨於相當。若將水膠載體應用於修復軟骨缺損，由文獻得知軟骨之摩擦係數為 10^{-4} [71]，本研究四組水膠之結果皆符合軟骨所須之摩擦係數；若將水膠載體應用於修補硬骨缺損，必能減少水膠之磨耗，避免造成組織病變。

表二 不同組成水膠之摩擦係數

Unit Sample	First Peak Force (Kgf)	All Mean Force (Kgf)	Static friction coefficient ($\times 10^{-4}$)	Dynamic friction coefficient ($\times 10^{-4}$)
PAA	0.306±0.04	0.23±0.03	2.17±0.37	1.78±0.21
PAA-Ch	0.230±0.03	0.22±0.06	3.18±0.35	2.22±0.29
PAA-Si	0.279±0.08	0.31±0.03	2.44±0.81	2.37±0.42
PAA-Ch-Si	0.185±0.01	0.20±0.01	3.82±0.16	1.94±0.35

3-8 動態流變儀試驗

我們模擬膝關節軟骨受力之情況，首先施予一個扭力於水膠表面上並測試不同組成下之儲存模數 (G')、損失模數 (G'') 及 $\tan\delta$ 之變化。由文獻[72]得知，材料本身開始變軟時，儲存模數會下降，損失模數會開始提高，所以 $\tan\delta$ 也隨之提高。為了得知我們所製備的水膠，是否符合文獻之結果，我們改變時間、固定 37°C 及頻率 1 Hz 來做為比較，由表三可以看出，PAA 水膠的儲存模數 (G') 為 0.73×10^4

Pa，隨著添加Chitosan和Silica後的PAA-Ch-Si水膠，其儲存模數為 0.13×10^4 Pa，而損失模數 (G'') 則由 0.02×10^4 Pa提升至 0.08×10^4 Pa， $Tan\delta$ 則由0.03提升至0.62。另外，為了比較表3.3，我們固定37°C改變不同頻率，由表四可以得知，與先前所測試的結果是一樣的，隨著Chitosan與Silica的添加，儲存模數會隨之下降，而損失模數與 $Tan\delta$ 隨之增加。

由文獻[73]得知在橡膠的吸震領域中， $Tan\delta$ 高表示吸震效果佳，因此本實驗隨著Chitosan及Silica的添加後 $Tan\delta$ 有增加的趨勢，因此證實我們所製備的PAA-Ch-Si水膠足以吸收外來的能量。若將水膠載體應用於修復軟骨缺損，即可有利的分散人體所承受的應力；若應用於硬骨修復，則能分散肌肉所牽動的力量。

表三 不同組成之水膠改變不同時間之流變測試

Name	G'(10⁴Pa)	G''(10⁴Pa)	Tan delta
PAA	0.731±0.108	0.022±0.005	0.031±0.007
PAA-Ch	0.779±0.170	0.055±0.028	0.078±0.050
PAA-Si	0.151±0.069	0.069±0.018	0.473±0.251
PAA-Ch-Si	0.123±0.031	0.081±0.001	0.624±0.141

表四 不同組成之水膠改變不同頻率之流變測試

Name	G'(10⁴Pa)	G''(10⁴Pa)	Tan_delta
PAA	0.922±0.002	0.014±0.001	0.015±0.003
PAA-Ch	0.772±0.005	0.013±0.008	0.017±0.004
PAA-Si	0.433±0.003	0.047±0.016	0.107±0.032
PAA-Ch-Si	0.369±0.002	0.043±0.001	0.117±0.011

3-9 DSC測試

為了證明本實驗水膠載體在經過 UV 光照射後之未反應的單體、起始劑和交聯劑是否可利用水洗方式將其洗出，進而降低其毒性。我們利用 25°C 的去離子水洗滌，重複洗滌三次，再利用 DSC 測試來觀察 ΔH 的變化，發現經由水洗過後之 PAA-Ch-Si 水膠曲線在 100°C~150°C 間有吸熱之波峰，將吸熱峰下之面積積分可求得 ΔH ；未水洗之 PAA-Ch-Si 水膠在 100°C~130°C 間有吸熱之波峰，同樣地，可求得 ΔH 。將四組水膠曲線經過積分計算後整理成表五。由表五看出，未水洗的水膠之未反應物會干擾高分子鏈在熔點溫度的流動，造成 ΔH 的增加[66]，所以可由結果看出未水洗的 ΔH 為 217~612 J/g，其中添加填料的 PAA-Si 水膠 ΔH 為最高，我們推測因添加入無機奈米二氧化矽，所以導致須提供更高的熱能促使分子鏈流動，所以此組水膠的 ΔH 為最高。而添加高分子 Chitosan 的 PAA-Ch 水膠 ΔH 為最低，我們推測因 PAA 與 Chitosan 在酸性的環境下，會產生氫鍵鍵結，由交聯劑 GA 又可提高內外部交聯，增強鍵結強度，來達到完全聚合之目的，大為降低未反應之單體存在，所以此組水膠之 ΔH 為最低。另外，水膠再經過連續水洗除去未反應的單體後，其水膠 ΔH 皆有顯著的下降，相對的在毒性測試方面也會跟著降低，更能增加後續細胞培養之存活率。

表五 以 DSC 分析不同水膠支架，觀察水膠中是否有未反應物質存在

Name	$\Delta H(\text{no wash})$ (J/g)	$\Delta H(\text{wash})$ (J/g)
PAA	295±29	164±20
PAA-Ch	217±75	167±44
PAA-Si	612±98	363±65
PAA-Ch-Si	594±130	332±81

3-10 降解試驗

為了得知我們所製備的水膠支架能否能長時間的移植於體內不致於降解。我們將水膠置於模擬體液中（37°C），持續觀察八個月。首先從外觀來觀察，第一個月到第四個月時，水膠支架並無太大變化，直到第五個月與第六個月時，材料明顯變軟但是無降解之現象。接著由圖十二可以看出，隨著時間的增加水膠的重量也隨之增加，其原因推測水膠本身因吸取模擬體液達到飽和，其中模擬體液中含有部分鹽類，其鹽類將存在於水膠的孔洞中，當水膠經過冷凍乾燥後，鹽類將存在於孔洞內，因此水膠才會隨著時間的增加，重量也隨之增加。在第七個月的時候，水膠支架開始降解，推測其原因為，幾丁聚醣在體內時會慢慢的被酵素水解，且水膠支架經過水分子破壞其結構，導致於第七個月產生降解現象[73-74]。但由文獻得知，一般骨組織在受傷後會進入發炎期大約 3-5 天，而後開始進入修補期大約一至二個月，此時骨組織中的蝕骨細胞與成骨細胞變得較為活躍，進而形成骨痂，骨痂在初期是很脆弱的，會隨著時間的增加而

增加強度，而當骨痂慢慢消失後，骨骼的形狀與機械強度就可以逐漸回復到受傷之前的狀態，即使是缺損部位仍然有不平整或不順滑的地方，大約一年之後骨骼會自動塑型，而達到其最佳的形狀與強度[75]，因此證明此水膠支架，足以承受骨組織修復之期限。

3-11 結論

我們成功地利用 UV 光照射聚合製備出 PAA-Ch-Si 水膠，並針對所聚合形成之水膠進行物性分析，包含膨潤度、含水率、表面型態觀察、壓縮測試、摩擦係數、動態流變儀試驗、DSC 及降解試驗等。綜合以上結論可以得知，添加奈米 Silica 後，此水膠之膨潤度可提高為 13 w/w，而含水率可高達 92%，其餘幾組水膠皆都符合膝關節軟骨所需之含水率。再者添加奈米 Silica 具有團聚現象，可使水膠之孔洞結構變得較為緻密，此 PAA-Ch-Si 水膠之機械強度約為 42 MPa，能符合軟骨所須之荷重；而硬骨修復方面，亦能符合此應力。在摩擦試驗方面，經膨潤過後之水膠，所測得的表面摩擦係數為 $2.17\sim 3.82\times 10^{-4}$ ，符合一般膝關節軟骨所需之摩擦係數；而硬骨修復方面，此摩擦係數亦能降低組織之傷害。在動態流變儀試驗，所添加 Chitosan 和 Silica 後之 PAA-Ch-Si 水膠，因為 Silica 粒徑為奈米級且具有團聚現象產生，所以在分散的同時有可能會進入 PAA 網狀結構所形成的 void 中，一旦 Silica 與 PAA 產生氫鍵鍵結後將會於 void

中形成較緊密的網狀形結構體，此時 void 會分散所施加之扭力，進而提高 $\text{Tan}\delta$ 。而在 DSC 測試方面，證實了經過水洗後之水膠，能將未反應單體給去除，進而降低其 ΔH 值。

本研究，成功地以 UV 光照射聚合形成 PAA-Ch-Si 水膠，利用高能量方式打斷鍵結達聚合之目的，並可縮短聚合時間，進而降低其水膠之毒性。由以上結果證明本研究之 PAA-Ch-Si 水膠載體應用於修復骨組織缺損極具有潛力。

肆、 參考文獻

1. R. Murugan and S. Ramakrishna, "Development of nanocomposites for bone grafting", *Composites Science and Technology*, 65, 2385–2406, 2005.
2. Vivek Shetty, Angelo A. Caputo, Ian Kelso, "Torsion-axial force characteristics of SR-PLLA screws", *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 25, 19-23, 1997.

3. In Yong Kim, Seog Jin Seo, Hyun Seuk Moon, Mi Kyong Yoo, In Young Park, Bom Chol Kim, Chong Su Cho, “Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications”, *Biotechnology Advances*, 26, 1-21, 2008.
4. R. Cortesini “Stem cells, Tissue engineering and organogenesis in transplantation”, *Transpl Immunol*, 15, 81-9, 2005.
5. JM Williams, A Adewunmi, RM Schek, CL Flanagan, PH Krebsbach, SE Feinberg, “Bone tissue engineering using polycarprolactone scaffold fabricated via selective laser sintering”, *Biomaterials*, 26, 4817-27, 2005.
6. NR Mercier, HR Costantno, MA Tracy, LJ Bonassar, “Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering”, *Biomaterials*, 26, 1945-52, 2005.
7. M Lietz, L Dreesmann, M Hoss, S Oberhoffner, B Schlosshauer, “Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types”, *Biomaterials*, 27, 1425-36, 2006.
8. Vaz CM, van Tuijl S, Bouten CVC, Baaijens FPT, “Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique”, *Acta. Biomater.*, 1, 575-82, 2005.
9. NT Dai, MR Williamson, N Khammo, EF Adams, AGA Coombes,

- “Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin”, *Biomaterials*, 25, 4263-71, 2004.
10. SS Kim, S Kaihara, MS Benvenuto, RS Choi, BS Kim, DJ Mooney, “Regenerative signals for intestinal epithelial organoid units transplanted on biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering of small intestine”, *Transplantation*, 67, 227-33, 1999.
 11. DW Hutmacher, “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage”, *Biomaterials*, 21, 2529-43, 2000.
 12. D. Puppt, F. Chiellini, A.M. Piras, E. Chiellini, “Polymeric materials for bone and cartilage repair”, *Progress in Polymer Science*, 35, 403-440, 2010.
 13. J Watanabe, K Ishihara, “Change in cell adhesion property on cytocompatible interface using phospholipids polymer grafted with poly(D,L-lactic acid) segment for tissue engineering”, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 4, 539-44, 2003.
 14. YC Wu, SY Shaw, HR Lin, TM Lee, CY Yang, “Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds”, *Biomaterials*, 27, 896-904, 2006.
 15. JM Wozney, HJ Seeherman, “Protein-based tissue engineering in

- bone and cartilage repair”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, 392-8, 2004.
16. JB Leach, CE Schmidt, “Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds”, *Biomaterials*, 26, 125-235, 2005.
 17. RH Schmedlen, KS Masters, JL West, “Photocrosslinkable polyvinylalcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering”, *Biomaterials*, 23, 4325-32, 2002.
 18. SH Oh, SG Kang, ES Kim, SH Cho, JH Lee, “Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate leaching method”, *Biomaterials*, 24, 4011-21, 2003.
 19. JP Santerre, K Woodhouse, G Laroche, RS Labow, “Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials”, *Biomaterials*, 26, 7457-70, 2005.
 20. N.K. Vail, L.D Swain, W.C. Fox, T.B. Aufdemorte, G. Lee, and J.W. Barlow, “Materials for biomedical application”, *Materials & Design*, 20, 123-132, 1999.
 21. Y.K. Luu, K. Kim, B.S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou, “Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via

- electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers”, *Journal of Controlled Release*, 89, 341-353, 2003.
22. J.M. Anderson, “Biological responses to materials”, *Annual Review of Materials Research*, 31, 81-110, 2001.
23. DW. Hutmacher, “Scaffold in tissue engineering bone and cartilage”, *Biomaterials*, 21, 2529-2543, 2000.
24. S.J. Peter, M.J. Miller, A.W. Yasko, M.J Yaszemski, A.G. Milos, “Polymer concepts in tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 43, 422-427, 1998.
25. Fv. Burkersroda, L. Schedl, A. Gopferich, “Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion”, *Biomaterials*, 21, 4221-4231, 2002.
26. K.J. Lowry, K.R. Hamson, L. Bear, Y.B. Peng, R. Calaluce, Evans, “Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model “, *Journal of Biomaterials Research*, 36, 536-541, 1997.
27. Se Heang Oh, Il Kyu Park, Jin Man Kim, Jin Ho Lee, “In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method”, *Biomaterials*, 28, 1664–1671, 2007.

28. A Ignatius, H Blessing, A Liedert, C Schmidt, “Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices”, *Biomaterials*, 26, 311-8, 2005.
29. I Adekogbe, A Ghanem, “Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering”, *Biomaterials*, 26, 7241-50, 2005.
30. Y Huang, S Onyeri, M Siewe, A Moshfeghian, “In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering”, *Biomaterials*, 26, 7616-27, 2005.
31. Z Li, HR Ramay, KD Hauch, D Xiao, “Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 26, 3919-28, 2005.
32. X Li, L Jin, G Balian, CT Laurencin, “Demineralized bone matrix gelatin as scaffold for osteochondral tissue engineering”, *Biomaterials*, 27, 2426-33, 2006.
33. Y. Kimura, T. Tsuruta, “In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan bead implant”, *Biomaterials*, 23, 181-191, 2002.
34. 尤明村，生物高分子-PHA 的生物相容性評估，輔仁大學生命科學研究所，中華民國九十二年。

35. M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya, J. Tanaka, "Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo", *Biomaterials*, 22, 1705-1711, 2001.
36. S. Itoh, M. Kikuchi, K. Takakuda, Y. Koyama, H.N. Matsumoto, S. Ichinose, J. Tanaka, T. Kawauchi, K. Shinomiya, "The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of rhBMP-2", *J. Biomed. Mater. Res.*, 54, 445-453, 2001.
37. S. Itoh, M. Kikuchi, K. Takakuda, K. Nagaoka, Y. Koyama, J. Tanaka, K. Shinomiya, "Implantation study of a novel hydroxyapatite/collagen (HAp/col) composite into weight-bearing sites of dogs", *J. Biomed. Mater. Res.*, 63, 507-515, 2002.
38. S. Sotome, T. Uemura, M. Kikuchi, J. Chen, S. Itoh, J. Tanaka, T. Tateishi, K. Shinomiya, "Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen–alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein", *Materials Science and Engineering C*, 24, 341-347, 2004.
39. 范修榕，水溶性幾丁聚醣在O/W/O多重乳化乳液之應用，國立海洋大學/食品科學系/碩士，民國八十八年。

40. J. Liu, Q. Wang, A. Wang, “Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(acrylic acid)/sodium humate superabsorbent ”, *Carbohydrate Polymers*, 70, 166-173, 2007.
41. J. Zhang, Q. Wang, A. Wang, “Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(acrylic acid)/attapulgate superabsorbent composites”, *Carbohydrate Polymers*, 68, 367-374, 2007.
42. A. Saxena, B. P. Tripathi, V. K. Shahi, “An improved process for separation of proteins using modified chitosan-silica cross-linked charged ultrafilter membranes under coupled driving forces: Isoelectric separation of proteins”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 319, 252-262, 2008.
43. G. S. Sailaja, P. Ramesh, T. V. Kumary, H. K. Varma, “Human osteosarcoma cell adhesion behaviour on hydroxyapatite integrated chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex”, *Acta Biomaterialia*, 2, 651-657, 2006.
44. 楊萃渚，水溶性幾丁聚醣單、雙醣衍生物之合成與其一些理化與功能特性之探討，國立臺灣大學/食品科技研究所/博士，民國九十年。
45. K. Y. Lee, S. H. Yuk, “Polymeric protein delivery systems”, *Prog.*

- Polym. Sci.*, 32, 669–697, 2007.
46. 林業祥，水溶性高分子幾丁聚醣共離子複合微球之製備及其血液相容性之探討，國立台灣科技大學/高分子工程系/碩士，民國九十二年。
 47. T. Jiang, W. I. A. Fattah, C. T. Laurencin, “In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials*, 27 (2006) 4894–4903.
 48. R. Zeng, M. Tu, H. Liu, J. Zhao, Z. Zha, C. Zhou, “Preparation, structure, drug release and bioinspired mineralization of chitosan-based nanocomplexes for bone tissue engineering”, *Carbohydrate Polymers*, 78, 107–111, 2009.
 49. 鍾美竹，多孔性明膠-幾丁聚醣/奈米二氧化矽複合支架材料製備與特性研究，中興大學/材料工程所/碩士，民國九十四年。
 50. 陳泰宏，溫度敏感型水膠於透明軟骨、半月板軟骨及硬骨組織工程之應用，長庚大學/化學工程與材料工程所/博士，民國九十五年。
 51. 林彥志，雞冠中膠原蛋白之物化特性分析及其與玻尿酸、幾丁聚醣製備之多孔隙支架於軟骨組織工程之應用，國立中興大學/動物科學所/博士，民國九十七年。

52. L. Yin, L. Fei, F. Cui, C. Tang, C. Yin, “Superporous hydrogels containing poly(acrylic acid-co-acrylamide)/O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks”, *biomaterials*, 28, 1258-1266, 2007.
53. 蔡明峰，不同接枝率的硫酸化軟骨素-甲基丙烯酸酯與丙烯酸交聯聚合水膠之製備及其物性與形態分析，高雄醫學大學/醫藥暨應用化學研究所/碩士，民國九十四年。
54. Young Chang Nho, Youn Mook Lim, Young Moo Lee, “Preparation, properties and biological application of pH-sensitive poly(ethylene oxide) (PEO) hydrogels grafted with acrylic acid(AAc) using gamma-ray irradiation”, *Radiation Physics and Chemistry*, 71 237–240, 2004.
55. X. Shi, S. Xu, J. Lin, S. Feng, J. Wang, “Synthesis of SiO₂-polyacrylic acid hybrid hydrogel with high mechanical properties and salt tolerance using sodium silicate precursor through sol–gel process”, *Materials Letters*, 63, 527–529, 2009.
56. J. Ho, W. Zhu, H. Wang, G. M. Forde, “Mesoporous silica spheres from colloids”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 308, 374-380, 2007.
57. K. Y. Lee, S. H. Yuk, “Polymeric protein delivery systems”, *Prog.*

- Polym. Sci.*, 32, 669–697, 2007.
58. T. M. Chen, “Cranioplasty using osteoconductive scaffold and platelet glue”, *J Trauma*, 65, 1321-1327, 2008.
 59. 方旭偉、張志宏、陳佳君、羅朝棟、王耀宏，以骨髓間葉幹細胞及血小板凝膠進行不需製備支架與體外軟骨細胞培養的方法，2008年國家新創獎學術研究組，台北科技大學/亞東紀念醫院。
 60. W.-F. Lee, C.-T. Huang, “Immobilization of trypsin by thermo-responsive hydrogel for the affinity separation of trypsin inhibitor”, *Desalination*, 234, 195–203, 2008.
 61. 凌銘鴻，低摩擦及高強度水膠應用於修復關節軟骨之研發，南台科技大學/化學工程與材料工程系/碩士，九十六年。
 62. Y. Tanaka, J. P. Gong, Y. Osada, “Novel hydrogels with excellent mechanical performance”, *Prog. Polym. Sci.*, 30, 1-9, 2005.
 63. I. Genta, M. Costantini, A. Asti, B. Conti, L. Montanari, “Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres” *Carbohydrate Polymers*, 36, 81-88, 1998.
 64. 林宴夙，丙烯酸/聚乙二醇甲基醚丙烯酸酯/明膠有機混成凝膠之製備及性質與其對生物相容性之研究，大同大學/化學工程研究所/碩士，民國九十二年。
 65. 陳靜怡，幾丁聚醣/聚丙烯酸奈米纖維孔洞結構之製備及其應

用，國立成功大學/材料科學與工程研究所/碩士，民國九十四年。

66. H.-R. Lin, M.-H. Ling and Y.-J. Lin, “High Strength and Low Friction of a PAA-Alginate-Silica Hydrogel as Potential Material for Artificial Soft Tissues”, *Journal of Biomaterials Science*, 20, 637-652, 2009.
67. Y.-F. Tang, Y.-M. Du, X.-W. Hu, X.-W. Shi, J. F. Kennedy, “Rheological characterization of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel”, *Carbohydrate Polymer*, 67, 491-499, 2007.
68. G. Eskitaşcıoğlu, S. Belli, M. Kalkan, “Evaluation of Two Post Core Systems Using Two Different Methods (Fracture Strength Test and a Finite Elemental Stress Analysis)”, *Journal of Endodontics*, 28, 629-633, 2002.
69. K. S. Wilson, K. Zhang, J. M. Antonucci, “Systematic variation of interfacial phase reactivity in dental nanocomposites”, *Biomaterials*, 26, 5095-5103, 2005.
70. K. M. Park, S. Y. Lee, Y. K. Joung, J. S. Na, M. C. Lee, K. D. Park, “Thermosensitive chitosan–Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration”, *Acta Biomaterialia*, 5, 1956–1965, 2009.

71. J. P. Gong, Y. Katsuyama, T. Kurokawa, Y. Osada, “Double-Network Hydrogels Extremely High Mechanical Strength”, *Advanced Materials*, 14, 1155-1158, 2003.
72. C. Elvira, J. F. Mano, J. San Roman, R. L. Reis, “Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems”, *Biomaterials*, 23, 1955–1966, 2002.
73. 李輝煌，充氣輪胎之遲滯現象之研究，國立成功大學/工程科學所/碩士，中華民國九十二年。
74. Ana F. Bettencourt, Cristina B. Neves, Marise S. de Almeida, Lidia M. Pinheiro, Sofia Arantes e Oliveira, Luis P. Lopes, Matilde F. Castro, “Biodegradation of acrylic based resins: A review”, *dental materials*, 26, e171–e180, 2010.
75. 賴祐平，基礎骨科學，藝軒圖書出版社，八十五年九月