行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

中文摘要：請於五百字內就本計畫要點作一概述，並依本計畫性質自訂關鍵詞。關鍵詞：豬皮膠原蛋白膜; 巨噬細胞; 血小板誘導生長因子;轉換生長因子; 牙周再生

最近幾年，我們曾就可吸收之豬皮膠原蛋白膜(PDCM)，進行有關 biocompatibility, biodegradation，及對 osteopromotion 之效果．結果顯示 PDCM 用戊二醛(GA)交鏈化以後，仍可保持其 biocompatibility，biodegradation，與非細胞毒性的特質。同時由相關之體液性及細胞性之免疫研究顯示，GA 交鏈化可降低 PDCM 之免疫生成性，而且於短期內(10-14 天)可引發延遲型過敏反應(delayed type hypersensitivity, DTH)．因此我們也逐漸描繪出 PDCM 引起細胞性免疫反應之模式圖。由於在此 DTH 中，Macrophages 所扮演之功能，目前於相關文獻中尚未完全明瞭．因此本研究專題仍以 12 隻 S.D.rats 為實驗對象，分 7.10.14 天之標本獲取，以 ABC 染色法針對 PDGF-(Platelet-derived growth factor-α/β)及 TGF-β(transforming growth factor-β)於兩組植入膜片知組織進行定位並設計 semi-quantitation 之方法，以觀察於 PDCM 與 e-PTFE(positive control)及控制組表皮與結締組織周圍 (A,B,C zone)所引起之細胞性免疫反應中 PDGF-α/β與 TGF–β之分佈強度，並以 Wilcoxon Rank Sum test 進行統計分析。結果顯示於 PDGF-α/β方面，無論是或控制組之 A,B,及 C 區域之比較，於 7 天，10 天，或 14 天皆無統計上之差異($P>0.05$)，但 PDCM 與 e-PTFE 比較於控制組，無論 PDGF-α或 PDGF-β都非常接近 $P<0.05$ 之邊緣。 而於 TGF-β方面，則於第 7 天之結締組織與膜片之界面處，PDCM 與 e-PTFE 兩組皆會引起較強之免疫染色反應，而於第 10 天與第 14 天，則 e-PTFE 組之 A 區域(表皮層)與膜片界面之 TGF-β免疫染色強度，與控制組產生統計上之差異性($P<0.05$)。本實驗之結果顯示 PDCM 與 e-PTFE 對表皮或結締組織皆會刺激引發 PDGF 與 TGF-β之產生，於 GTR technique 中可能間接引起 osteoblast activity 與 fibroblast activity，尤以 e-PTFE 更會引起鈣化之機轉，最後可導致牙周組織再生之結果。根據所知，雖然可吸收性膠原蛋白膜已應用於牙周臨床多時，但至今並沒有一個明確之機轉來解釋膠原白膜與牙周組織的關係，因此藉由此研究計劃，希望能提供學界一個合理確實的答案．

英文摘要：請於五百字內就本計畫要點作一概述，並依本計畫性質自訂關鍵詞。
Keywords：PDCM; macrophages; PDGF-α/β;TGF-β; periodontal regeneration

We have conducted several studies that are associated with the properties of PDCM. It was concluded that cross-linked PDCM is a biocompatible, bioresorbable, and non-cytotoxic material. In the study of humoral immunity and cellular immunity induced by PDCM, it was suggested that the cross-linking effect of GA might reduce the humoral immunogenicity of PDCM. The early wound healing (10-14 days) of cellular activity adjacent to PDCM belongs to delay type hypersensitivity (DTH). We propose an inferential model for explanation of cellular immunity induced by PDCM, however, the role of macrophages in the sequential cascade of this model is still ambiguous. The subsequent study is to implant PDCM into the intra-muscular space of hind legs of 12 rats (Spraque Dawley) to elicit DTH activity. With ABC method, the immunolocalization of PDGF-α and PDGF-β, and TGF-β in the implanted wound were semi-quantitively measured in order to ensure the hypothetical model of the cellular immunity elicited by PDCM. The results indicate that, as compared to control group, the secretion of PDGF-α and PDGF-β around PDCM or e-PTFE do not show any significant difference ($P>0.05$) during 7,10,14 days specimens when the data were analysis with Wilcoxon Rank Sum test, but the P value is marginal. On the day 7, the intensity of TGF-β immunohistochemical stain of both PDCM and e-PTFE group showed significant difference to controlled group in the connective tissue zone (zone B). On the day 10 and day 14, e-PTFE group presented a stronger TGF-β intensity than that of control group. It appears that both PDFE and e-PTFE may stimulate surrounding cells to secret PDGF-α/β and TGF-β in the epithelium and connective tissue of early healing wound. They may indirectly cause osteoblast activity and fibroblast activity and achieve new tissue regeneration in the long run..

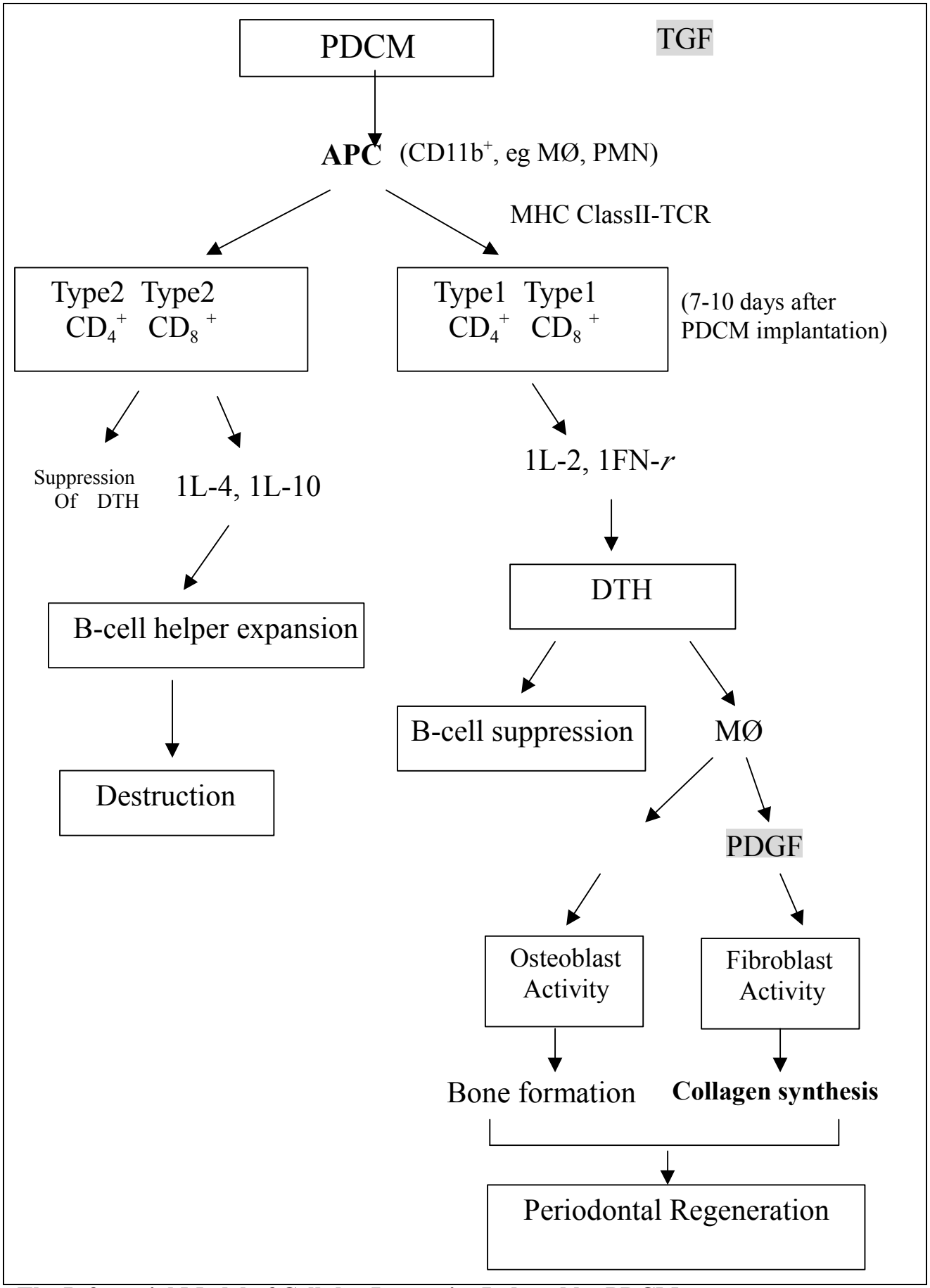
研究計畫之背景及目的：當前臨床牙周病治療的目標, 已由牙周囊袋的消除和阻止牙周炎性反應的進行,進而希望達到預期牙周組織的再生, 和牙齒功能的重建。 到目前為止, 已有許多專家學者嘗試以各種不同的治療方法, 試圖達到牙周重建 (periodontal reconstruction)的目的[1]。 然而根據組織學上牙周再生的條件, 多數的研究結果仍然未能達到預期的目標或一致的結果。

自1980年以來, 已有數種生醫材料使用於牙周導引再生手術(guided tissue regeneration, GTR)中[1,2], 以促進牙根分叉病變或牙周骨下缺損之組織再生; 如鐵弗龍膜片、微孔過濾膜片(Millipore filter)、多聚合乳酸膜片(polylactic acid)、多聚合酯酸膜片(polyglycolic acid), 與膠原蛋白膜片等等。由文獻回顧可知，已有數位學者將膠原蛋白膜片以活體實驗的方式植入動物之牙周骨缺損區[3,4,5,6]，證實各種動物膠原蛋白膜片確有引導結締組織再生及部份阻擋表皮細胞沿牙根表面向下生長的能力。膠原蛋白對於牙周組織之纖維母細胞具有趨向性, 並於傷口中可提供空間架構, 供血小板之附著, 並可促進纖維素與血塊之聚集與成形; 再者, 動物膠原蛋白膜片屬生物可分解之物質,於GTR手術後,可省略第二次抽取膜片之程序,因此日漸被廣為採用。[8]。

Quetish等人[9]與Hyder等人[10]分別提出研究相關膠原蛋白膜之報告，Quetish等人以人類之牙周韌帶纖維母細胞(human periodontal ligament fibroblasts, HPLF)、牙齦纖維母細胞(human gingival fibroblasts, HGF)與由人體胎盤萃取出之膠原蛋白共同培養，結果發現此二種細胞可在膜片周圍以與之成垂直的方向生長至膜片上。而Hyder等人[10] 則以HPLF、HGF與由牛隻萃取出之膠原蛋白共同培養，結果顯示此二種細胞數目皆有明顯之增加。這些結果都說明了上述兩種膠原蛋白於非活體實驗中, 對人類之牙周細胞確實具有高度生物相容性。因此我們也經由非活體實驗，證明經特殊製備之PDCM對人類之牙周與牙齦纖維母細胞不具細胞毒性; 而且吾人可經由戊二醛之濃度來控制PDCM之酵素分解抗性[11]。 鑒於以上的研究結果, 顯示PDCM於牙周再生的過程中, 具有biological barrier的作用。

Leibovitch和Ross[12]於1976年即曾對傷口中之巨噬細胞所扮演之角色做過研究; 他們發現於組織痊癒初期, 活化的巨噬細胞對纖維芽細胞的增殖是不可或缺的。 於1981年, Martin et al.[13]才以生化方式, 肯定巨噬細胞會分泌一種生長素(macrophage derived growth factor; MDGF); 此種生長素現已肯定是一種遇熱不安定, 無法透析的縮氨酸類物質。 此種生長素可促進多種間質細胞, 如纖維芽細胞, 內皮細胞, 或平滑肌細胞的增殖。 Terranova et al.[14] 於最近(1988)亦曾提出生化上細胞外間質和縮氨酸類生長素可能對牙周間質細胞之增殖和再附著於牙本質表面,有正面的促進作用。由免疫學之觀點解釋，本研究PDCM周圍所產生之macrophages於DTH反應中可能是扮演抗原呈現細胞（Antigen presenting cell, APC）的角色[15]。這些巨噬細胞於急性期可能會釋放出某些cytokines，如TNF-α，PGE2，IL-1等等; 於慢性期則可刺激fibroblasts之增生與膠原蛋白之生成，釋放PDGF(platelet derived growth factor)，可強效促進fibroblasts之增生，而釋放TGF (transforming growth factor)，則可增強fibroblasts製造膠原蛋白，促進傷口之癒合。

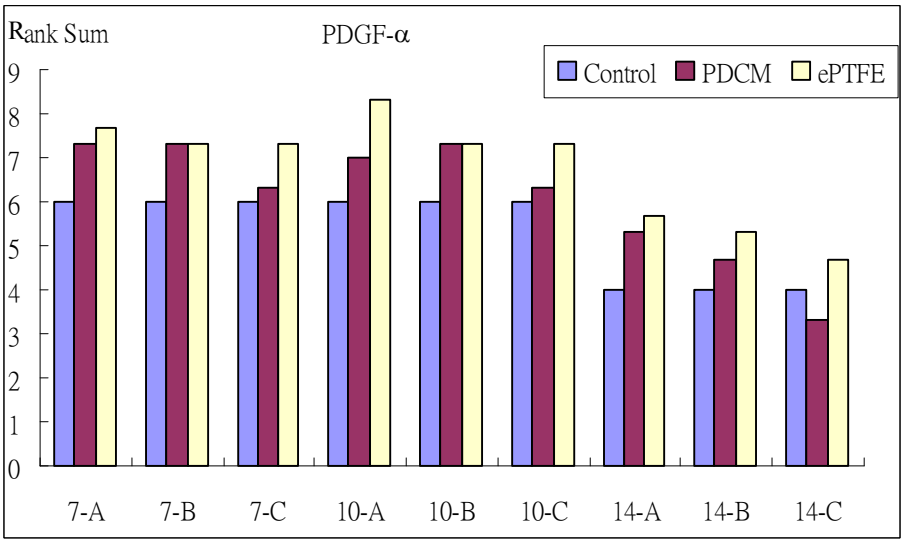
此本研究專題仍以 12 隻 S.D.rats 為實驗對象，分 7.10.14 天之標本，以 ABC 染色法針對 PDGF(Platelet-derived growth factor)及 TGF–β(transforming growth factor-β)進行定位，以觀察於 PDCM 與 e-PTFE(positive control)周圍所引起之細胞性免疫反應，以確立上述模式圖羅輯之推演中，PDCM 會引起 MHC class II complex reaction，並朝 Th1 cellular reaction 發展，最後可能導致 osteoblasts 與 fibroblasts 活動升高，有助於牙周組織再生之結果。



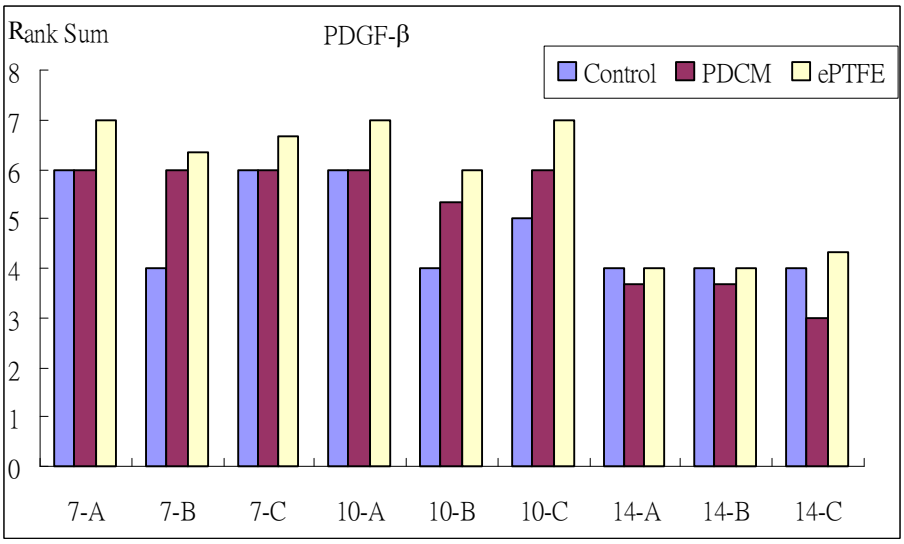
The Inferential Model of Cellular Immunity Induced by PDCM

豬皮膠原蛋白膜引起細胞性免疫反應之推理模式圖 (ed. by Lu H-K)

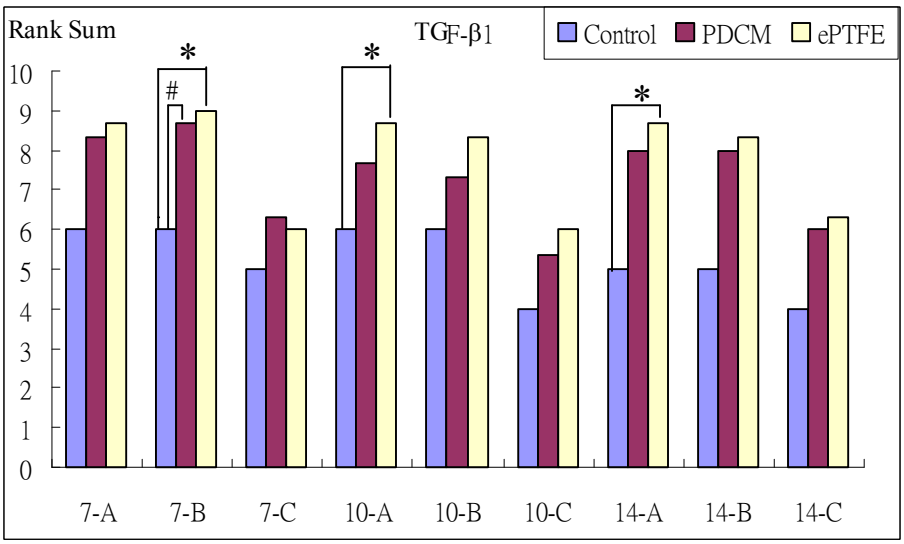
結果與討論



圖一、 顯示無論於手術植入後 7 天，10 天，14 天，PDCM 組與 ePTFE 組於 A zone (表皮組織)， B zone (界面結締組織)， 與 C zone (非界面結締組織) 之 PDGF-α免疫染色強度皆無統計上之差異(Wilcoxon Rank Sum test, P>0.05)。



圖二、 於手術植入後 7 天，10 天，14 天，PDCM 組與 ePTFE 組於 A zone (表皮組織)， B zone (界面結締組織)， 與 C zone (非界面結締組織) 之 PDGF-β免疫染色強度亦無統計上之差異(Wilcoxon Rank Sum test, P>0.05).



圖三、 於第 7 天之結締組織與膜片之界面處，PDCM 與 e-PTFE 兩組皆會引起較強之免疫染色反應，而於第 10 天與第 14 天，則 e-PTFE 組之 A 區域(表皮層)與膜片界面之 TGF-β免疫染色強度，與控制組產生統計上之差異性(P<0.05，indicated as *and#)。

討論

我們於 1994 年起，針對豬皮膠原蛋白膜(porcine dermal collagen membrane, PDCM) 進行一連串的試驗 [7,8,15,19]。在先遣之活體實驗中發現：雖然我們用各種不同濃度之戊二醛（glutaldehyde, GA）（0.01%, 0.05%, 3.0%）來促進 PDCM 交鏈化，並重複以磷酸氫鈉緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS)沖洗後，再將這種 PDCM 植入白鼠腿部深層肌肉組織，結果顯示交鏈化之 PDCM 於生物體中，具有相當之相容性。PDCM 可能刺激炎性細胞分泌生長因子，促進局部未分化之間質細胞開始進一步分化增殖產生纖維結締組織，因此形成類似瘢痕組織之纖維囊，以終止炎性反應之進行 [7]。而在另一個動物實驗中，我們以掃瞄式電子顯微鏡觀察經交鏈化後 PDCM 之表面結構，結果顯示海綿狀之膠原蛋白膜呈現四種不同類形之結構，GA 濃度愈高，則 PDCM 表面纖維狀或孔狀結構愈少。而且交鏈程度較高的 PDCM，具較佳之骨質導引再生作用（guided bone regeneration, GBR）。

於有關PDCM之生物相容性與可吸收性之研究中，我們發現於PDCM種植後第二週，即發現有大量macrophages攀附於PDCM表面[7]。由於PDCM對人體是屬於異種移植蛋白，因此於組織反應初期，macrophages會將此異種蛋白吞噬，並將細胞內漿體(endosome)或分解粒(lysosome)將其分解成小分子，並與class II major histocompatibility complex基因產物結合，然後再呈現於macrophages細胞膜表面，以便與CD4+ helper T cell之antigen receptor結合，激活T cell，造成 T cell分泌interferon-r; interferon-r 又反向激活更多macrophages，因此造成immuno-amplification mechanism 。這些被激活之macrophages於免疫反應進入慢性期時，可製造分泌多種cytokines或growth factors，促

進傷口之癒合。於本研究中，我們即發現PDCM於傷口早期之癒合中，確實會引發結締組織之T細胞或巨噬細胞產生PDGF-α與PDGF-β，可於傷口中激發強烈之纖維母細胞增生；而對於TGF-β之分泌，則會增強膠原蛋白之合成，有助於guided tissue regeneration中，促進牙周再生。

我們所製作的豬皮膠原蛋白膜片內所含的膠原蛋白多屬於第一型膠原蛋白，基於未來的臨床應用之考量,研究本膠原蛋白膜片所引發之細胞性免疫反應是本實驗重點之一. 我們也曾選取 anti-rat CD4, anti-rat CD8, 及 anti-rat CD11b 等單株抗體，利用 Avidin-Biotin Peroxidase Complex Method(ABC Method)，於不同之時間觀察 3% cross-linked PDCM 於組織中所引發之 cellular immunogenecity,結果顯示PDCM 會引發 delay type hypersensitivity，整個炎症反應也以 $CD4^+$T 細胞為主，於植入後第七天與第十天時細胞數目達到顛峰，而且 CD4:CD8 比率亦接近 2:1。PDCM 所引起之細胞性免疫反應以 $CD4^+$ T 細胞主導，而且由活躍之巨噬細胞活動看來,其所引起之免疫反應可能比較類似 type IV cell-mediated immune reaction[15]。本研究之 PDCM 引發 PDGF-α/β與 TGF-β之產生，也印證 PDCM 會激發巨噬細胞於 delay type hypersensitivity 中促進 fibrosis。

計畫成果自評

一般用免疫染色來標示 cytokine 或 growth factor 之研究，多用敘述性方式來表達結果，而本研究擬定一套標準，並凝聚四位研究生之合作，以獨特之半量化方式，完成資料之收集與分析，實屬不易；對未來 PDCM 之 Th1/Th2 cytokine profile 研究亦立下一個模式，也對於 PDCM 未來之臨床實驗，投下一個正數。感謝國科會提供研究經費，使本研究能圓滿完成。

Reference:

1. Ratcliff, PA. Periodontal therapy-Reviews of the literature. In world workshop in periodontics. Ramfjord SP, Kerr SH Ash MM., p 227. Ann Arbor. AAP 1986.
2. Polson, AM, Caton J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. J. Periodontol 53(10): 617, 1982.
3. Tanner MG, Solt CW, Vuddhakanok S. An evaluation of new attachment formation using a microfibrillar collagen barrier. J Periodontol 59: 524-530, 1988.
4. Magnusson I, Batich C, Collins BR. New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. J Periodontol 59:1-6, 1988.
5. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Grosskopf A, Noff M. Partial regeneration of periodontal tissue using collagen barriers initial obsverations in the canine. J Periodontol 59:380-386, 1988.
6. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Azar-avidan O, Noff M. Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. J Periodontal Res 22:331-333, 1987.
7. Lu H-K, Chen, C-Y. A study of biocompatibility and biodegradation of porcine dermal collagen. Chin Dent J, 153:150-159, 1996.
8. Lu H-K, Wu, K-J. The effect of porcine dermal collagen membrane on the healing of bony defects in guided bone regeneration technique. Chin Dent J 15(2):106-118, 1996.
9. Quteish D, Singrao S, Dolby AE. Light and electron microscopic evaluation of

biocompatibility, resorption and penetration characteristics of human collagen graft material. J Clin Periodontol 18:305-311, 1991.
10. Hyder PR, Dowell P, Singh G, Dolby AE. Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen: Analysis of properties. J Periodontol 63:182-186, 1992.
11. Lu H-K,Lin F-P, Wu M-F. In vitro tests of porcine dermal collagen membranes biocompatibility and enzymatic degradation rate. Chin Dent J 17(1):15-22, 1998.
12. Leibovitch, S.J., Ross, R.: A macrophage dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. Am. J. Pathol. 78:71, 1975.
13. Martin, B.M., Gimbron, M.A. Jr, Unanue, E.R., and Cotran, R.S.: Stimulation of nonlymphoid mesenchymal cell proliferation by a macrophage-derived growth factor, J. Immunol 126:1510, 1981.
14. Terranova, V.P., and Wikesjo, U.M.E.: Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of periodontium. J Periodontal 58:6:371, 1987.
15. Wu M-F, Lu H-K, Wang C-K. Assays of histopathologic change induced by porcine dermal collagen membrane by using S.D. rats animal model. J Chin Soc Vet Sci ;24 (4):251-256, 1998.