

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 豬皮膠原蛋白膜之細胞毒性測試 An in vitro test for the cytotoxicity of glutaraldehyde-crosslinked porcine dermal collagen membrane

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2314-B-038-047

執行期間：89年 8月 1日至 91年 6月 30日

計畫主持人：吳金俊

共同主持人：呂炫坤、王正怡

計畫參與人員：柯孟宗

本成果報告包括以下應繳交之附件：

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

執行單位：台北醫學大學牙醫學系

中華民國 91 年 9 月 30 日

豬皮膠原蛋白膜之細胞毒性測試

An in vitro test for the cytotoxicity of glutaraldehyde-crosslinked porcine dermal collagen membrane

計畫編號：NSC 89-2314-B-038-047

執行期限：89年8月1日至91年6月30日

主持人：吳金俊 執行機構：台北醫學大學牙醫學系

共同主持人：呂炫坤、王正怡 執行機構：台北醫學大學牙醫學系

計畫參與人員：柯孟宗 執行機構：台北醫學大學牙醫學系

一、中英文摘要

膠原蛋白與人體組織成分相似，具有促進新的膠原蛋白形成且不會干擾傷口癒合的特性，所以近來被廣泛地應用於各種醫療用途；自九三年開始，臺北醫學院口研所自豬皮萃取製得膠原蛋白膜，並以戊二醛修飾，改變膠原蛋白膜之結構。目前關於此膠原蛋白膜性質的測試所獲結果，包括此膜具低的免疫生成性、導引骨質再生性、理想的彈性模數、可控制的分解速率、適宜的細胞通透性及可控制的膨脹率等，惟此膜之細胞毒性尚不明。

本實驗採用纖維母細胞與材料直接接觸或與其浸泡液接觸方式進行毒性測試，細胞與材料經不同接觸時間(1, 3, 5, 7天)或與不同時間(1, 3, 5, 7天)的浸泡液接觸後，在電子顯微鏡下觀察細胞形態，同時進行活性測試；分別以 MTT 檢測、neutral red 染色法測定之。實驗結果顯示纖維母細胞可均勻分佈於經戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白膜表面，其外型呈紡錘狀，部分細胞垂直排列於纖維四周，顯示細胞活性正常；MTT 檢測及 neutral red 檢測皆顯示細胞與經戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白膜反應強度皆大於對照組(1, 3, 5, 7天；ANOVA test,  $P < 0.05$ )。而不同濃度之戊二醛(0%, 0.01%, 0.05%, 3%)修飾該豬皮膠原蛋白膜對纖維母細胞之活性，並無顯著差異，可見本豬皮膠原蛋白膜製備過程中，以 PBS 充分清洗後，即不會因戊二醛殘留導致其具有細胞毒性，符合臨床醫療使用之基本要求。  
關鍵詞：豬皮膠原蛋白膜；戊二醛；細胞毒性；MTT 檢測。

Abstract

Collagen from animal sources, which is chemically and structurally similar to human collagen, has been recently applied in medical field. Since 1993, the staff of The Graduate Institute of Oral Rehabilitation, Taipei Medical College, have successfully prepared porcine dermal collagen membrane (PDCM). Based on the previous studies, it was known that PDCM possess guided tissue regeneration effect, acceptable elastic modulus, controllable biodegradation rate and swelling ratio and low immunogenicity. All of these properties are requisite for biomedical material used clinically. In the present study, we attempt to evaluate

the possible cytotoxicity of PDCM on primary human gingival fibroblast.

In this study, human gingival fibroblast are cultured together with test PDCMs in various different times (1,3,5,7 days) with medium change every 24 hours or with the extracts of PDCM (1-,3-,5-,7- day extracts) for 24 hours. The possible effects on fibroblasts are measured by morphological observation under SEM, and functional assays that include MTT test, neutral red permeability staining. Fibroblast culture with no PDCM served as the negative control. The results reveal that fibroblasts could scattered on the fibrils of PDCM with in spindle shape, and some arranged in perpendicular direction, it indicated that the viability of cell were normal. MTT and neutral red test reveal that the viability of fibroblasts cultured with PDCM were stronger than the controls (day 1,3,5,7; ANOVA test,  $P < 0.05$ ). These indicated that PDCM didn't express the character the cytotoxicity and would be suitable for clinical application.

二、緣由與目的

近年來，膠原蛋白製成的膠原蛋白膜片已廣泛被應用到口腔醫學上，尤其是在牙周病之治療、顎骨齒槽區病變及軟組織之修復、拔牙後傷口出血之止血、以及應用於牙周組織導引再生術(guided tissue regeneration)等。Pitaru 曾應用膠原蛋白膜於牙周翻瓣暨導引組織再生手術，有效誘導新的牙骨質、牙周韌帶、以及齒槽骨的形成。此結果顯示膠原蛋白膜具有導引組織再生之能力；Minabe 的研究，則顯示膠原蛋白膜能促進牙周手術後傷口之癒合，減輕術後發炎與異物巨細胞(foreign body giant cell)反應，且能有效阻擋牙齦上皮細胞延牙根表面向下移行，故能有效促進新結締組織之再生；Pfeifer 的研究，則顯示膠原蛋白膜不會使實驗動物體內產生不良副作用，而膠原蛋白具生物相容性與生物可分解性，非常適應用於導引牙周組織再生手術；Quteish 亦指出人類第一型膠原蛋白為牙周韌帶細胞移動附著增殖的介質，對纖維母細胞具趨化性，而膠原蛋白亦具止血效果，能促進組織傷口之癒合，且膠原蛋白膜可經由交鍵聚合的程度而控制其分解速率，更使它臨床實用性大為提高。上述研究結果，確實顯示膠原蛋白膜具有口腔臨床醫療上的實用價值。

以物理或化學方法處理可改變膠原蛋白膜之結構與其分解速率使之更適於臨床醫療應用，目前較常使用的方式包括紫外線、 $\gamma$ 射線或以戊二醛 (glutaraldehyde; GA)類之化學藥劑修飾。

DeLustro 曾比較數種不同方式處理的膠原蛋白製品。發現以戊二醛修飾之膠原蛋白膜具較低的免疫生成性; Griffiths 等人的組織實驗則證實經戊二醛修飾之膠原蛋白膜在動物或人體內皆只引起短暫的發炎反應而測不出任何免疫反應的現象。Nimni 亦認為戊二醛可能會減低膠原蛋白膜的生物可分解性〔biodegradation〕，而戊二醛的交聚效果亦在物理性、化學性上最為穩定且能降低生物可分解性與免疫生成性。因此，基於控制分解速率與聚合效果以及降低免疫生成性的目的，目前常以戊二醛修飾膠原蛋白膜。不過以戊二醛修飾膠原蛋白膜雖具上述優點，文獻中卻指出戊二醛具有細胞毒性，會使接觸細胞和血小板功能改變，對生物體可能產生不良的反應。且隨著戊二醛濃度的增加，處理的時間愈長，含戊二醛的膠原蛋白的毒性愈強。不過 Quteish 認為戊二醛交鍵的膠原蛋白膜只有少數情形出現細胞毒性〔約少於 5%。而且戊二醛的副作用亦可以各種處理來減輕，例如 Hey 指出以戊二醛交鍵膠原蛋白所產生的細胞毒性可藉由廣泛的沖洗〔extensive irrigation〕，並加入內含 66mM〔0.25% w/v〕sodium borohydride 或 71.3mM〔1% w/v〕dimedone 的 5mM L-lysine 來減低。Nimni 則認為殘留於膠原纖維間或組織纖維間的戊二醛的細胞毒性可藉助充分的清洗和化合物的中和反應〔chemical neutralization〕來減低。

膠原蛋白雖具臨床醫療的價值，然而目前使用的進口產品價格昂貴，自製研發可供臨床醫療使用的膠原蛋白膜將能減少醫療支出，造福病患。因此臺北醫學院自一九九三年開始將自豬皮萃取而得之膠原蛋白研發製成膠原蛋白膜，這種膠原蛋白膜是萃取自豬的真皮，以胃蛋白酶消化酵素(pepsin)處理，將具有抗原性的末端氨基酸(telopeptide)切除，再用三種不同濃度(0.01%，0.05%，3.00%)的戊二醛修飾進行交鍵聚合(選擇此三種濃度戊二醛的原因為三者阻斷膠原蛋白上  $\epsilon$ -amino group 的百分比有顯著差異)，藉以改變膠原蛋白膜之結構，延緩膠原蛋白膜在生物體內被分解的速度，並降低其免疫生成性。在製作過程中，並以大量磷酸緩衝液衝洗，防止戊二醛殘留。目前關於此研發中的經戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白半成品之性質的測試，已獲初步成果，包括生物分解性與生物可吸收性之研究、應用豬皮膠原蛋白膜於骨質導引再生術對骨缺損癒合影響之研究、豬皮膠原蛋白膜物性之研究以及豬皮膠原蛋白膜免疫生成性之探討等。這些研究的結果已證實經戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白膜具生物可分解性、具導引骨質再生的效果、以及擁有理想的彈性模數、可控制的分解吸收速率、適宜的細胞通透性、可控制的薄膜膨脹率以及低度免疫生成性。至於，該豬皮膠原蛋白膜是否因戊二醛殘留導致其具有細胞毒性則仍待檢測。

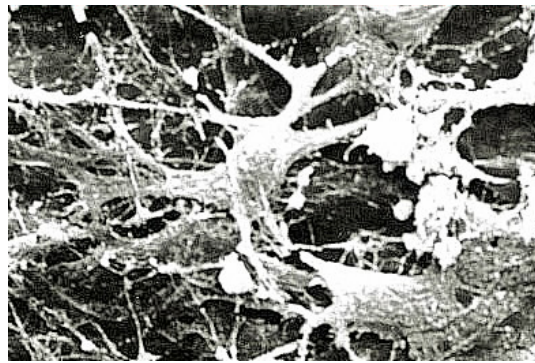
### 三、結果與討論

#### Results

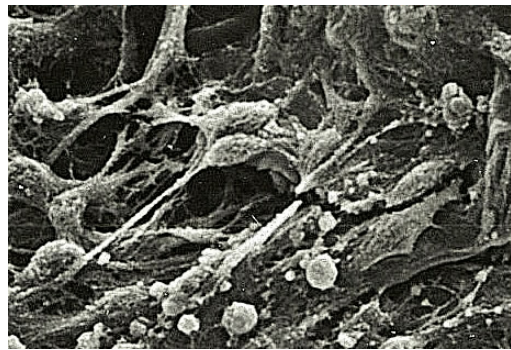
##### 1. 電子顯微鏡

掃描式電子顯微鏡下可見纖維母細胞均勻分佈於經戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白膜表面，其外型呈紡錘狀，部分細胞垂直排列於纖維四周，顯示細胞活性正常。

#### SEM Observation



圖(1). 0% GA-PDCM  $\times$  500

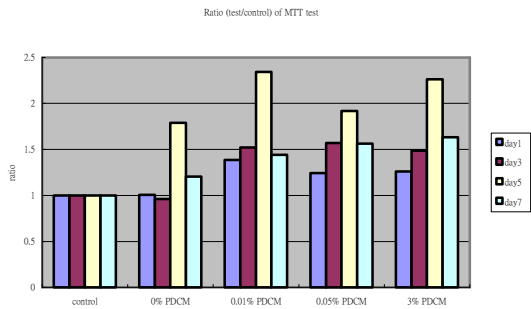


圖(2). 0.01% GA-PDCM  $\times$  500



圖(3). 0.05% GA-PDCM  $\times$  1000

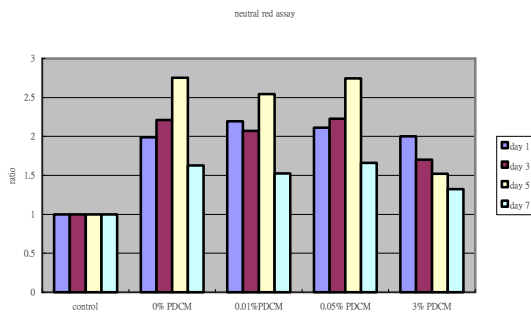
##### 2. MTT test



圖(4) Ratio (test/control) of MTT assay

MTT 檢測皆顯示細胞與經戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白膜反應強度皆大於對照組(1, 3, 5, 7 天; ANOVA test,  $P < 0.05$ )，而不同濃度之戊二醛(0%, 0.01%, 0.05%, 3%)修飾該豬皮膠原蛋白膜對纖維母細胞之活性，並無顯著差異(1, 3, 5, 7 天; ANOVA test,  $P > 0.05$ )。

### 3. Neutral red test



圖(5) Ratio (test/control) of neutral red assay

neutral red 檢測顯示細胞與經戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白膜反應強度皆大於對照組(1, 3, 5, 7 天; ANOVA test,  $P < 0.05$ )，而不同濃度之戊二醛(0%, 0.01%, 0.05%, 3%)修飾該豬皮膠原蛋白膜對纖維母細胞之活性，並無顯著差異(1, 3, 5, 7 天; ANOVA test,  $P > 0.05$ )。

## Discussion

本研究之目的在以各種體外測試法包括〔1〕形態檢定〔morphological assays〕〔2〕功能檢定〔functional assays〕〔3〕通透性檢定〔permeability assays〕等方式探討①此經戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白膜是否具有細胞毒性；②而不同濃度戊二醛修飾之豬皮膠原蛋白膜，是否引起不同程度之毒性反應；③若戊二醛之修飾作用會引起毒性反應，是否能在製作過程加以減低，以期能進一步改良此豬皮膠原蛋白膜半成品，進而將來能提供臨床醫療的使用。

實驗結果顯示豬皮膠原蛋白膜經各種不同濃度戊二醛修飾後，纖維母細胞仍可於其上成功培養 7 天，且相較於對照組，細胞呈現之活性更強，據此

應可推測豬皮膠原蛋白膜亦具促進細胞生長之功效。而不同濃度之戊二醛(0%, 0.01%, 0.05%, 3%)修飾該豬皮膠原蛋白膜對纖維母細胞之活性，並無顯著差異，可見本豬皮膠原蛋白膜製備過程中，以 PBS 充分清洗後，即不會因戊二醛殘留導致其具有細胞毒性。

比較不同作用時間(1, 3, 5, 7 天)之反應，可見自第 1 天至第 5 天，相較於對照組，細胞呈現之活性愈來愈強，而第 7 天則稍降，此應與細胞之衰老有關。

經由本實驗可知豬皮膠原蛋白膜並不具細胞毒性，符合臨床醫療使用之基本要求。

## 四、計畫成果自評

研究內容依原計畫進行，經由細胞與豬皮膠原蛋白膜共同培養，於電子顯微鏡下觀察並進行細胞活性之研究，所得實驗結果應頗具應用價值。本研究成果足以證實臺北醫學院自製之豬皮膠原蛋白膜雖經戊二醛處理但不會因此而具細胞毒性。

本一年期之研究成果具學術應用價值，因此已計畫將之發表於國際性學術研究期刊。

## 五、參考文獻

1. Blumenthal NM. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membranes in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. *J Periodontol* 1993; 64:925-933.
2. Mendieta C, Williams RC. Periodontal regeneration with bioabsorbable membranes. *Current Opinion in Periodontology* 1994:157-167.
3. Quteish D, Dolgy AE. Immune responses to implanted human collagen graft in rats. *J Periodont Res* 1991; 26:114-121.
4. DeLustro F, Condall RA, Nguyen MA, McPherson JM. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J Biomed Mater Res* 1986; 20:109-120.
5. Griffith RW, Shakspeare PG. Human dermal collagen allograft -- a three year histological study. *Br J Plastic Surg* 1982; 35:519-523.
6. Nimni ME. The cross-linking and structure modification of the collagen matrix in the design of cardiovascular prosthesis. *Journal of Cardiac Surgery*. 1988;3(4):523-33.
7. Simmons DM, Kearney JN. Evaluation of collagen cross-linking techniques for the stabilization of tissue matrices. *Biotechnology & Applied Biochemistry*. 1993;17:23-9.
8. Cooke A, Oliver RF, Edward M. An in vitro cytotoxicity study of aldehyde-treated pig dermal collagen. *British Journal of Experimental Pathology*. 1983;64(2):172-176.



9. Quteish D. Singh G. Dolby AE. Development and testing of a human collagen graft material. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1990;24(6):749-60.
10. Cote MF. Doillon CJ. Wettability of cross-linked collagenous biomaterials: invitro study. *Biomaterials*. 1992;13(9):612-6.
11. Hey KB. Lachs CM. Raxworthy MJ. Wood EJ. Crosslinked fibrous collagen for use as a dermal implant: control of the cytotoxic effects of glutaraldehyde and dimethylsuberimidate. *Biotechnology & Applied Biochemistry*. 1990;12(1):85-93.
12. Nimni ME. Cheung D. Strates B. Kodama M. Sheikh K. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. *Journal of Biomedical Materials Research*.
13. Lu HK, Wu KJ. The effect of porcine dermal collagen membrane on the healing of bony defects in guided bone regeneration technique. *Chin Dent J* 1996; 15(2) :106-118.
14. Lu. HK, Lee SY, Lin FP. Elastic modulus, permeation time and swelling ratio of a new porcine dermal collagen membrane. *J Periodont Res* 1998;33:243-248.
15. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. The in vitro effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism. *J. Biomed Mater Res* 1991; 25: 1133-1149.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Jimmunol Methods* 1983; 65: 55-63
17. Schmalz G, Hiller KA, Dorter-Aslan F, New developments in the filter test system for cytotoxicity testing. *J Mat Sci Mater Med* 1994; 5: 43-51
18. Guess WL, Rosenbluth SA, Schmid B and Autian J. Agar diffusion methods for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J pharm Sci* 1965; 54: 1545-1547
19. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985; 24: 199-124
20. Mullbacher A, Parish CR, Mundy JP. An improved colorimetric assay for T cell cytotoxicity in vitro. *J immunol Methods* 1984; 68: 205-215
21. Cook JA, Michel JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 1989,179: 1~7
22. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations, *J Dent* 1994; suppl 2: S6-S11
23. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity, *Int Endod J* 1988; 21: 89-99
24. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immuno Methods* 1986; 89: 271-7
25. Laughton C. Quantification of attached cells in microtiter plates based on Coomassie brilliant blue G-250 staining of total cellular protein. *Anal Biochem* 1984; 140: 417-423
26. Hirst SJ. Barnes PJ, Twort CH. Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum and platelet-derived growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 574-581.