

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以免疫組織染色法定位介於培養牙齦組織及豬皮膠原蛋白膜間之黏連分子的存在

**Immunohistologic localization of adhesion molecules in the interface between Porcine Dermal Collagen membrane and gingival tissue.**

計劃編號: NSC-88-2314-B-038-138

執行期限: 87/08/01-88/07/31

主持人姓名: 呂炫堃

執行機構: 台北醫學院牙醫學系

一、中文摘要

本研究的目的是要來探討將豬皮膠原蛋白(PDCM)於植入活體之模式中，是否會與結締組織產生黏連的作用，以進一步瞭解膜片於組織中被吸收之機轉。本實驗首先直接採用 3%GA-PDCM 植入老鼠牙齦下，以每組 2 隻老鼠分 9 組，經由 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 天，犧牲老鼠。取出標本之後，五分之一的標本用福馬林固定，石蠟包埋；其餘部分直接急速冷凍包埋。再利用 H&E stain、Alcian blue-PAS stain，觀察形態及組織中基質的變化及利用免疫染色 ABC 法染色觀察 fibronectin、integrin  $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_6\beta_1$  的分佈。

在此活體實驗中發現，牙齦結締組織與膜片接觸良好，具有組織整合的現象。於第一到三天時多為

**Abstract**

The purposes of this study were to study the phenomenon of tissue

neutrophils 的浸潤，實驗期間 fibronectin、integrin  $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$  於組織中呈現陽性反應，促使細胞、血管往膜片移動，使得膜片漸漸被纖維囊包圍。於第十四天時 integrin  $\alpha_6\beta_1$  有明顯出現於組織中表示血管伴隨組織侵入膜片，且根據 Alcian blue-PAS stain 發現組織中不僅細胞外基質多另外還有新生成之膠原蛋白堆積，組織中血管開始明顯增加。本實驗之結果表示 3%GA-PDCM 於組織中第十四天後開始產生組織整合性，符合引導組織再生膜於臨床應用的要求。

關鍵辭：豬皮膠原蛋白膜；黏連；組織整合性。

integration of porcine dermal collagen membrane (PDCM) *in vivo*. In this study, 3% GA-PDCM was implanted in

the upper jaw of 18 Wistar rats. The specimens were harvested from each 2 rats 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, and 28 days after the surgery. One-fifth of the specimens were processed for H&E stain、Alcian blue-PAS stain, and the rest of the specimens were frozen immediately and processed for immunohistochemical stain (ABC method) to localize the distribution of integrin  $\alpha_2$ 、integrin  $\alpha_3$ 、integrin  $\alpha_6\beta_1$ 、fibronectin. The results indicates positive reaction of integrin  $\alpha_2$ 、integrin  $\alpha_3$  and fibronectin in the specimens during all the period of this study. On fourteenth days, there were obvious positive reaction of integrin  $\alpha_6\beta_1$  and

## 二、緣由與目的

在 1993 年時，Scantlebury 回顧引導組織再生膜片應符合下列五大要求：1) 生物相容性 (biocompatibility)；2) 細胞分隔 (cell separation)；3) 適合臨床操作性 (clinically manageable)；4) 維持空間性 (space making)；5) 組織整合性 (tissue integration)<sup>1</sup>。根據以上要求，我們於 1992 年即著手進行豬皮膠原蛋白膜 (porcine dermal collagen membrane；PDCM) 之相關研究，希望能將 PDCM 應用於上述牙周再生之臨床技術中。

在我們 1996 年發表之研究中，參考 ASTM (The American Society for Testing

PAS stain. 3%GA-PDCM starts to achieve good tissue integration on the day of fourteenth. There were no significant pathologic reaction and evidence of tissue damage. In conclusion, these results indicated that PDCM possesses a good quality of tissue integration with adjacent connective tissue. PDCM fulfills the requirement of tissue integration in guided tissue regeneration.

Key words: porcine dermal collagen membrane (PDCM); adhesion; tissue integration.

and Materials) 之【F981】，針對 PDCM 的生物相容性有詳盡的研究<sup>2</sup>。結果證明 PDCM 於植入肌肉層後第三週，組織反應即由亞急性期逐漸轉成慢性期，而且於膜片周圍形成一道完整之纖維囊。另外 3% 戊二醛可充分聚化 PDCM，延緩其於組織中被吸收的時間，並提供新肉芽組織附著與生長之機會。根據我們另一個非活體研究，以不同大小的氧化鋁顆粒對 PDCM 做通透性的測試，結果發現在不同濃度戊二醛處理之四種膜片中以 3% PDCM 具有最低的通透性，PDCM 是屬於半通透性 (semi-permeable) 膜片。由此可知 3% PDCM 能符合細胞分隔的要求。同時由 PDCM 的

最大應力、最大荷重、彈性模數測試得知,隨著戊二醛修飾濃度的提高上述三者也隨而增加,可見 3%PDCM 具有較好之物理性質以維持空間。另外 PDCM 之膨脹比率可能影響膜片維持空間的結果,如果 PDCM 因為不同之濃度梯度 (concentration gradient) 而吸收水份導致膨脹太大可能會導致膜片隔離的空間被膜片佔據。經證實 3%戊二醛處理之 PDCM 膨脹比率最小,故推論應有較好之維持空間效果<sup>3</sup>。

除此之外,在我們的非活體實驗中,發現人體牙齦纖維母細胞 (human gingival fibroblast; HGF) 或人體牙周韌帶纖維母細胞 (human periodontal ligament fibroblast; HPLF) 與 PDCM 一起於 10% 血清濃度的 DMEM (Dulbecco's minimum essential medium) 下培養,皆未產生任何細胞排斥、變形甚或死亡現象,可見 PDCM 於非活體培養狀態下,亦具有良好之生物相容性。再者,交鏈化愈高的 PDCM,對細菌性膠原蛋白酶的分解抗性愈強<sup>4</sup>。

早期我們所製造的膜片雖然有不錯的柔韌度,但是質地滑溜且操作過程中與器械碰觸時極易破損,另外膜片一碰到液體就呈現透明狀態影響操作。現在我們已改

良 PDCM, 以適合臨床操作。因此在吳 (1995) 的研究中,發現以戊二醛修飾膠原蛋白膜,可以降低免疫生成性,延緩 PDCM 被組織分解吸收的速率。交鏈化較高之 PDCM 具備較佳之維持空間性,可應用於骨質促進術 (guided bone regeneration, GBR)<sup>5</sup>。

另外在針對 PDCM 所引發之細胞性免疫的活體實驗中,我們將 PDCM 植入動物肌肉層中,針對 CD4、CD8、CD11b 做免疫染色,結果發現經四種不同濃度戊二醛處理之 PDCM 所引起之免疫反應皆為 CD4 為主之細胞性免疫,且交鏈程度 (cross-link) 越高,被吸收分解的時間越長,其引發之炎症反應越持久,表示高交鏈程度之 PDCM 較不易被吸收,在組織中刺激產生異物反應也越持久。雖然交鏈程度較高之 PDCM 引發之炎症反應較持久,但是卻沒有造成大量 IgG、IgM 之表現或組織嚴重破壞,可見其具有高度之生物相容性。於植入手術後第七到第十天 CD4/CD8 呈 2:1 的比例<sup>6</sup>。

本研究的目的是要探討豬皮膠原蛋白於活體之模式中,是否會與結締組織產生黏連 (adhesion) 的作用,以證實 PDCM 與結締組織於傷口癒合初期,會產生組織整合的

現象

### 三、結果與討論

#### H&E stain

一天：膜片周圍充滿炎症細胞，大多數炎症細胞為neutrophils。發炎情形還擴展至周圍組織甚至臨近肌肉組織也遭炎症細胞侵潤。

兩天：周圍組織因手術外傷所造成之急性發炎仍然十分嚴重，到處充滿neutrophils及erythrocytes，外圍膜片內網狀基質有增加之現象。

三天：膜片周圍組織出現紡錘型細胞核大之細胞且開始侵入周圍膜片；另外靠近膜片的紡錘型細胞有呈平行排列的趨勢，這些紡錘型細胞核大的細胞應為處於活性期的fibroblast；neutrophils仍多，lymphocytes開始增加。

五天：Fibroblasts開始由周圍侵入膜片，這些細胞大多呈現紡錘型且細胞核大，neutrophils減少，lymphocytes增加，少量macrophages出現；膜片周圍fibroblasts呈平行排列，且可看到有epithelioid cells。

七天：膜片周圍多被平行排列之fibroblasts包圍，且其周圍有macrophages及epithelioid cells出現，靠周圍膜片有新長入之肉芽組織內含新生血管；但膜片中央未被新生之肉芽組織侵入，僅有erythrocytes及少數炎症

細胞侵入膜片較中央處，炎症細胞多為lymphocytes。

十天：膜片周圍被fibroblasts包圍，可看到epithelioid cells及giant cells，外圍膜片有些呈現碎片狀，表示giant cells開始吸收膜片。新生之肉芽組織漸漸侵入膜片中，肉芽組織所到之處都伴隨有新生之小血管；膜片中央處仍然未被肉芽組織侵入，僅有erythrocytes及lymphocytes和macrophages。

十四天：膜片中仍然少數區域未被肉芽組織侵入，膜片周圍有giant cells、macrophages、epithelioid cells、plasma cells以及lymphocytes出現但數量上有減少之情形，組織中明顯可觀察到血管出現，fibroblasts隨著血管漸侵入膜片中央，表示此時炎症反應下降，fibroblasts隨著血管開始要進行修復之工作。

二十一天：膜片幾乎已被肉芽組織侵入，組織內含有很多小血管。膜片內多為紡錘型之fibroblasts，lymphocytes很少，還是可見giant cells、macrophages、epithelioid cells於膜片周圍，外圍膜片碎片漸多，膜片有變小的現象。

二十八天：膜片被肉芽組織侵入，組織內含之小血管直

徑變大，組織內以 **fibroblasts** 為主，膜片周圍仍可見 **giant cells**、**macrophages**、**epithelioid cells**，還是有非常少數的 **lymphocytes**，膜片大多呈現碎片狀。

四十二天：

膜片大部份被吸收掉，僅剩殘餘碎片，很多纖維組織位於原來膜片所在位置，且仍舊可見一些殘存膜片位於纖維組織內，其周圍可看到 **giant cells**，可見膜片被吸收後，被 **fibroblasts** 所新生成之膠原蛋白纖維 (**collagen fiber**) 取代。

#### **Alcian blue-PAS stain**

實驗初期，於膜片周圍組織可以觀察到藍色反應，表示組織對於手術所引起之傷害，開始分泌細胞外基質，進行修復之工作。侵潤膜片之炎症細胞間有絲狀的紅色反應，為 **fibrin** 所造成。於五天時，侵入膜片周圍之肉芽組織亦開始有藍色之 **Alcian blue** 陽性反應。藍色反應一直持續存在，表示組織復原還在進行。於第十四天時組織間還出現紅色之 **PAS** 陽性反應，表示侵入膜片之 **fibroblasts** 新生成的膠原蛋白纖維正在取代膜片被吸收的空間，這可能也顯示 **PDCM** 與結締組織已開始產生組織整合性。

#### **Immunohistochemical stain Fibronectin** 於植入膜片

後一、二、三天時，膜片周圍組織、侵入膜片周圍之炎症細胞間及膜片邊緣皆呈現有陽性反應；在第五、七天時，膜片周圍組織陽性反應有增強的趨勢，有些侵入膜片之炎症細胞表面亦呈現陽性反應；到實驗中期時，膜片周圍之纖維組織 (**fibrous tissue**) 漸漸侵入膜片，甚至包圍膜片碎片，此時陽性反應逐漸減弱，大多局限於膜片碎片周圍；於實驗末期時，膜片大多已被纖維組織取代，組織內仍有一些陽性反應。

**Integrin  $\alpha_2$** 、**Integrin  $\alpha_3$**  於整個實驗期間皆可觀察到 **integrin  $\alpha_2$** 、**integrin  $\alpha_3$**  呈現陽性反應於組織間、細胞間、甚至炎症細胞表面；最重要的是細胞與膜片間亦有陽性反應。

**Integrin  $\alpha_6\beta_1$**  **Integrin  $\alpha_6\beta_1$**  之陽性反應主要是出現於血管及炎症細胞，膜片植入牙齦下時，剛開始引起炎症反應，接著肉芽組織侵入膜片，血管亦隨之侵入，有少數之陽性反應出現於侵入組織中，於第十四天時，侵入包圍膜片之纖維組織增加，內有較明顯之 **integrin  $\alpha_6\beta_1$**  之陽性反應。隨著時間增加，可以觀察到 **integrin  $\alpha_6\beta_1$**  之陽性反應亦有增加之情形，可見纖維組織內新血管生成。

討論 在 Pitaru(1987)及 Minabe(1989)的動物臨床報告中證實膠原蛋白膜於活體實驗中，確實與結締組織具有良好之組織整合性，可以抑制上皮細胞往牙根尖方向生長<sup>7,8</sup>。引導組織再生膜片應具有組織整合性，以抑制上皮細胞沿著膜片向下生長，若膜片與牙齦間具有組織整合性，就可以防止膜片提早曝露於口腔中，避免造成污染(contamination)。另外為了要達到組織整合性，異物反應(foreign body reaction)也要盡量減少；嚴重的異物反應會阻礙結締組織整合，膜片本身表面也要提供孔洞結構以供結締組織之 fibroblasts 可以附著生長，並分泌膠原蛋白(collagen)，造成組織整合。

Vardaxis 等人(1994)提出表面粗糙之膠原蛋白，有促使結締組織侵入造成組織整合性的效果<sup>9</sup>。我們所製造之 3%GA-PDCM 正符合這樣的特性。在 H&E stain 及 Alcian blue-PAS stain 的觀察中，我們可以發現結締組織於五天時便開始侵入膜片，移植後組織間到處可觀察到 Alcian blue stain 的陽性反應，表示組織分泌基質旺盛，促使傷口復原。於十四天時明顯有紅色之 PAS 陽性反應出現於組織中，表示侵

入膜片之 fibroblasts 開始分泌膠原蛋白，造成 PDCM 與組織之整合。

在 fibronectin 的免疫染色中，我們可以發現 fibronectin 之陽性反應，且於實驗初期即可觀察到。fibronectin 附在膜片上有促進各種間質細胞之趨化性，並可促使 macrophages 吞噬異物及 fibroblasts 分泌細胞外基質，因而促使傷口復原；另外亦可以促使 endothelial cells 來此形成血管，提供養分帶走細胞代謝產物。在活體切片的免疫染色上，我們可以在膜片與組織之界面上，觀察到 integrin  $\alpha_2$ 、integrin  $\alpha_3$  之陽性反應。這兩種接受器是細胞與細胞外基質黏連的接受器，分佈於很多種細胞表面。Integrin  $\alpha_6\beta_1$  在我們的切片中主要表現於 endothelial cells 及炎症細胞上。於十四天時，肉芽組織侵入膜片，血管亦隨之侵入。此時纖維組織內有較明顯之 integrin  $\alpha_6\beta_1$  之陽性反應，表示侵入膜片之纖維組織內血管增加，另外 fibroblasts 於此時開始分泌膠原蛋白，綜合以上結果，表示於第十四天時 3%GA-PDCM 開始與組織形成良好的組織整合性。

由本實驗得知，於傷口初期第二週，PDCM 與結締

組織間具有黏連作用，當傷口收縮(wound contraction)時，膜片與結締組織整合良好，具有保護血塊，穩定傷口的作用，並可防止因傷口收縮造成膜片與結締組織間產生空隙，因此應用於牙周病臨床手術中，可防止上皮細胞沿著空隙往下生長，並導引新分化之牙周細胞產生新附連(new attachment)。而3%GA-PDCM於結締組織中雖會延長炎症反應之時間，但實驗末期炎症反應輕微並未造成組織嚴重破壞，3%GA-PDCM於六週後仍存在於組織中可繼續保持細胞分隔之作用，假使應用於GTR術式中，將可避免外圍組織過早侵入骨缺損，確實符合膜片於牙周病GTR術式

之臨床運用。

#### 四、計劃成果自評

本研究因以免疫染色進行實驗，無法量化比較，故只能以敘述性論文報告結果。本研究按原專題研究計劃進行，並已達到預期之成果。目前本計劃主持人已依以前數個研究擬出一個PDCM完整之分子生物模式圖，希望於日後接續之專題研究計劃中，能順利完成其他有關細胞性免疫、體液性免疫，與組織導引再生之研究，提供後人有關可吸收性膠原蛋白膜於組織中變化之真實機轉，以供牙周病臨床治療之應用。本文目前希望暫不對外發表。

#### 五、參考文獻

1. Scantlebury, T.V. (1993):1982-1992: A decade of technology development for guided tissue regeneration, *Journal of Periodontology* 64: 1129-1137.
2. **Hsein-Kun Lu**, Chau-Yang Chen. A study of biocompatibility and biodegradation of porcine dermal collagen. *Chin Dent J* 1996;15(3):150-159.
3. **Hsein-Kun Lu**, Shan-Yang Lee, Fon-Pih Lin. Elastic modulus, permeation time and swelling ratio of a new porcine dermal collagen membrane. *J Periodont Res* 1998; 33:243-248.
4. **Hsein-Kun Lu**, Fong-Pih Lin, Ming-Fang Wu. In vitro tests of porcine dermal collagen membranes – biocompatibility and enzymatic degradation rate. *Chin Dent J* 1998;17:1:15-22.
5. **Hsein-Kun Lu**, King-Jean Wu. 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.
6. Ming-fang Wu, **Hsein-Kun Lu**, Chao-Jai Wong. 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.

7. Pitaru, S. et al. (1987): Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. *Journal of Periodontal Research* 22:331-333.
8. Minabe, M, Kodama T, Hori T, Watanabe Y (1989): Effects of atelocollagen on the wound healing reaction following palatal gingivectomy in rats. *Journal of Periodontal Research* 24:178-185.
9. Vardaxis, N.J. et al. (1994) Chemical and physical properties of collagen implants influence their fate in vivo as evaluated by light and confocal microscopy, *Journal of biomedical materials research* 28:1013-1025.