

私立台北醫學大學口腔醫學院

牙醫系研究所碩士論文

Graduate Institute of Dentistry

College of Oral Medicine

Taipei Medical University

指導教授: 林哲堂 教授 (Che-Tong, Lin)

共同指導教授: 李勝揚 教授 (Sheng-Yang, Lee)

黃豪銘 副教授 (Haw-Ming, Huang)

靜磁場促進培養於聚乳酸試片似骨母細胞的生長

Static Magnetic Fields Promote Osteoblast-like Cell

Growth on The Poly(L-lactide) Surface

研究生: 馮聖偉 (Sheng-Wei, Feng) 撰

中華民國九十六年七月

July, 2007

致謝

轉眼間，三年研究所的課程已經結束了，回想起來，投入了時間和心力，經歷了許多辛苦和歡樂的事情，自己不僅學到了做實驗的技巧，也得到了做人處事的道理。首先感謝林哲堂院長和李勝楊所長給了我進入牙醫系賡復組研究所的機會，臨床上在林哲堂院長、陳玫秀醫師、曲國田老師、柯恩生醫師、馬隆祥老師和張維仁醫師的指導下，不斷的從看診中和錯誤中學習，我從惶恐無知的新手，變成熟練的臨床醫師，並且懂的如何尋找治療病人的最好方法，謝謝上述老師醫師們的教導。

感謝黃豪銘老師願意讓我加入卡文迪西研究實驗室，在學習如何研究和做實驗的過程裡，每個禮拜大家要聚在一起報告討論，我們在黃老師嚴格又和善諄諄教誨下，學習作實驗的技術和報告的技巧，慢慢學會如何獨立思考和做研究。也謝謝共同儀器中心陳惠敏小姐在電子顯微鏡上的協助。更加感謝一起從事細胞實驗的夥伴們，包括麒安、君彥、景徽、艷柔和兆男，謝謝你們的幫忙，並且不厭其煩的教導我如何培養細胞和做實驗，同時，也懷念大夥一起打球的快樂日子。當然還要感謝賡復組學的伙伴們：成哲、俊仰、治宇、致平、家泓、凱榮、雅勤、煜哲、玉華和薇芳，大家的感情就像手足般的珍貴，我會永遠記得。最後感謝我的父母和女朋友雅玲，遇到不如意的時候，他們會支持我；有歡樂的事，我們會一起分享，謝謝你們。

聖偉 2007/07/25

論 文 摘 要

論文名稱：靜磁場促進培養於聚乳酸試片似骨母細胞的生長

私立台北醫學大學 口腔醫學院牙醫系碩士班

研究生：馮聖偉

畢業時間：95 學年度第 2 學期

指導教授：林哲堂 教授

李勝揚 教授

黃豪銘 副教授

口腔及顱顏手術或意外傷害若造成骨缺損時，常須以適當的骨填補物填入骨缺損，來促進骨頭癒合。近年來生物可吸收性的聚乳酸材料常被應用於顱顏骨缺損的重建，原因在於聚乳酸 PLLA (Poly L-lactide) 具有高度生物相容性，生物降解性，與良好的力學強度，容易加工等優點。但是聚乳酸有疏水性強、細胞的親和力差和細胞活性或增殖速度會被抑制降低等缺點，因此有許多研究利用材料表面型態的改變或利用化學方法，來改善細胞生長於聚乳酸表面的能力。本研究則利用靜磁場，以非侵入性的方法促進聚乳酸試片上的似骨母細胞生長，並且探討靜磁場可以促進聚乳酸試片上的似骨母細胞生長的假設是否正確。

首先將 MG63 和 MC3T3-E1 似骨母細胞株以強度 4000 高斯的靜磁場連續

暴露 5 天，靜磁場影響細胞增生與活性的作用以 MTT 分析，而細胞型態與細胞外基質的分泌，則利用掃描式電子顯微鏡來觀察。此外，靜磁場對培養於聚乳酸片上之似骨母細胞表現鹼性磷酸酶活性的影響亦被加以分析。

在掃描式電子顯微鏡實驗中，我們發現靜磁場會促進培養於聚乳酸試片上 MG63 和 MC3T3-E1 細胞表現更多的細胞外基質。在 MTT 實驗中，MG63 暴露組會有較低的 MTT 值，但是 MC3T3-E1 暴露組卻有較高的 MTT 值。MG63 細胞於靜磁場暴露 1 天後，暴露組的鹼性磷酸酶活性達到最高值，而且明顯比未暴露組增加 1.5 倍($p<0.05$)。然而，MC3T3-E1 細胞在靜磁場暴露第 3 天和第 4 天時，鹼性磷酸酶活性明顯比未暴露組來的低($p<0.05$)。

本研究結果顯示，培養於聚乳酸片上的 MG63 細胞，在接受靜磁場暴露之後會比控制組細胞表現出更為成熟的細胞型態與更多的分化調控因子。而靜磁場則會影響培養於聚乳酸片上 MC3T3-E1 細胞生長，增加整體細胞數目。

關鍵詞：靜磁場、聚乳酸、MG63 細胞、MC3T3-E1 細胞、生長、

分化

Abstract

**Title of Thesis: Static Magnetic Fields Promote Osteoblast-like Cell
Growth on The Poly(lactic acid) Surface**

Author: Sheng-Wei, Feng

Thesis directed by: Che-Tong, Lin, PHD

Sheng-Yang, Lee, DDS, MS, PHD

Haw-Ming, Huang, PHD

Accident-induced craniomaxillofacial injury frequently results in large bony defects which require the bone grafts to enhance the bone healing. Biodegradable polymer [Poly(L-lactide), PLLA] scaffolds are the devices which are popular used in the reconstruction of craniomaxillofacial defects because of their good biocompatibility, biodegradability and low toxicity after degradation in vivo. However, low proliferation rate and poor cell attachment were found when culturing cell on the PLLA membrane. So many geometrical and chemical strategies were undertaken to improve cells growth on the PLLA surface.

In this study, static magnetic fields were non-invasively applied to our cell cultured system to improve the osteoblast-like cells growth on the PLLA membrane. Cellular models (MG63 and MC3T3-E1, osteoblast-like cells) were carried out to examine the hypothesis that static magnetic fields (SMF) affect osteoblast-like cells growth on the PLLA membrane.

The cells were continuously exposed to 4000 Gauss-SMF for 5 days. The proliferation effects of SMF were tested by MTT assay. The morphologic changes and extracellular matrix release were observed by the scanning electron microscopy. In addition, the effects of SMF on the alkaline phosphatase activity

levels were compared between the exposed and unexposed cells.

Scanning electron microscopy studies indicated that SMF promoted MG63 cells and MC3T3-E1 cells express extracellular matrix on the PLLA membrane. The SMF exposed MG63 cells exhibited decreased MTT values at 2 and 3 days of culture. Besides, the SMF exposed MC3T3-E1 cells exhibited increased MTT values at 3 and 4 days of culture. At 1 day of observation, the alkaline phosphatase-specific activity of the SMF exposed MG63 cells demonstrated a maximum level and significantly larger than that of the unexposed cells ($p<0.05$) with an increasing ratio of 1.5 folds. The SMF exposed MC3T3-E1 cells express the lower alkaline phosphatase-specific activity than that of the unexposed cells at 3 and 4 days of culture ($p<0.05$).

These results reveal that MG63 cells, seeding on the PLLA membrane, treated with SMF exhibit a more differentiated morphology and express a more differentiated regulatory marker. Furthermore, SMF can promote MC3T3-E1 cells growth on the PLLA membrane.

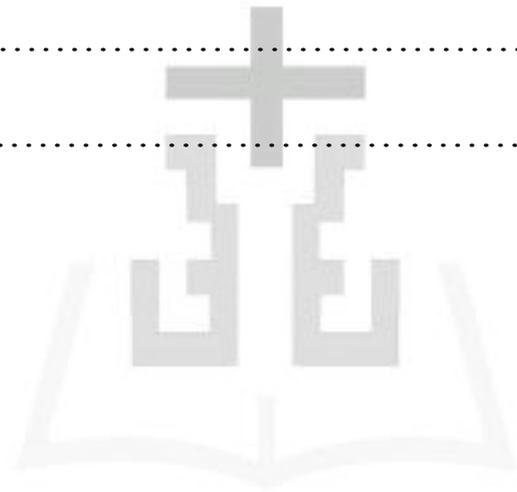
Keywords: Static magnetic field, Poly(lactic acid), MG63 cell, MC3T3-E1 cell, Growth, Differentiation

目錄

致謝.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
目錄.....	VI
第一章、緒論	
第一節 研究動機與重要性.....	1
第二節 研究目的.....	3
第三節 研究假設.....	4
第四節 名詞界定.....	5
第二章、文獻查證	
第一節 聚乳酸於醫學與牙科的重要性與運用.....	8
第二節 改善細胞生長於聚乳酸的處理方式.....	9
第三節 靜磁場對骨母細胞的影響.....	14
第四節 Mechanotransduction 概念.....	17
第三章、研究材料與方法	
第一節 聚乳酸試片的製備與清洗.....	20
第二節 靜磁鐵之製備及靜磁場之檢測.....	20
第三節 實驗之細胞培養方法.....	21

第四節	掃描式電子顯微鏡對培養於聚乳酸試片上似骨母細胞型態之觀察.....	25
第五節	細胞活性MTT的測量.....	26
第六節	鹼性磷酸酶活性之偵測.....	26
第七節	聚乳酸試片表面粗糙度的測量.....	28
第八節	聚乳酸試片表面接觸角的測量.....	28
第九節	統計分析.....	29
第四章、分析與結果		
第一節	靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MG63 似骨母細胞生長型態之影響.....	30
第二節	靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MC3T3-E1 似骨母細胞生長型態之影響.....	31
第三節	靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MG63 似骨母細胞生長之影響.....	32
第四節	靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MC3T3-E1 似骨母細胞生長.....	33
第五節	靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MG63 似骨母細胞成熟分化之影響.....	34

第六節	靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MC3T3-E1 似骨母細胞成熟分化之影響.....	34
第七節	靜磁場對聚乳酸試片粗糙度之影響.....	35
第八節	靜磁場對聚乳酸試片接觸角之影響.....	35
第五章、討論.....		36
第六章、結論與建議.....		42
第七章、參考文獻.....		43
附錄.....		50



第一章、緒論

第一節、研究動機與重要性

醫學治療上遇到車禍意外或手術產生的骨折或骨頭缺損時，傳統治療方式會希望從患者身體其他部位取得自體移植骨來填補骨缺損，但是此治療步驟需要第二次手術，取得的自體移植骨量有限，而且可能會造成手術部位傷害、細菌感染等問題。因此，尋找適合的骨替代物來取代自體移植骨方式，是目前最受關注的研究，骨替代物當中以聚乳酸【poly(lactic acid)】(PLA)和聚乳酸-甘醇酸之共聚合【poly(lactide-co-glycolide)】(PLGA)最廣為使用，而且在組織工程上(Karp et al., 2003; Yang et al., 2002)和藥物運用上(Jain et al., 2000)是最常被使用的聚合物，主要是因為 PLA 和 PLGA 具有良好的生物相容性、生物可降解性和在體內降解後產生無毒產物的特性，雖然 PLA 已被證實具有良好的生物相容性，但目前所使用的生物可降解支架材料還有需要改善的空間，例如 PLA 之疏水性強、與細胞的親和力差和細胞活性或增殖速度會被抑制降低(Ishaug et al., 1994; Barbanti et al., 2004)。基於這些缺點還需要克服，所以很多學者嘗試以各種物理或化學的方法來改善聚乳酸表面的特性，藉以增加材料與細胞之間的親和力，並促進細胞生長分化於聚乳酸材料上。

由文獻得知，改善的方法可以分成三大類，(1)表面型態改變 (2)化學方法 (3)機械性的刺激(Badami et al., 2006)。前兩種方法已經證實可以增加細胞的貼

附能力和生長(Liu et al., 2004; Suh et al., 2001) ，第三種方式之機械性刺激包括有脈衝式電磁場、低強度超音波和靜磁場等。實驗已經證實低強度超音波不只對一般細胞培養再生有正面效果，而且對 PLGA 導管內的神經細胞再生一樣有幫助(Chang et al., 2005)。

靜磁場所產生的靜磁力對細胞而言，也是屬於機械性刺激，細胞實驗已証實似骨母細胞在靜磁場刺激下，會藉由影響局部分化因子的釋放來促進似骨母細胞走向分化(Huang et al.,2006)。當利用表面型態改變和化學方法來改善細胞生長於聚乳酸表面時，這些改善方式有可能使得聚乳酸表面型態受到破壞，或者殘留一些自由基，進而影響細胞生長。所以我們嘗試利用靜磁場刺激，以非侵入性的機械外力刺激聚乳酸試片表面上的似骨母細胞，來研究培養於聚乳酸試片上的似骨母細胞在經過靜磁場刺激後，其生長情況或分化程度是否可以提升。

第二節、研究目的

聚乳酸於醫學上的應用日益重要，尤其是製作成生物支架(scaffold)，更可以使用在因車禍或手術所造成的骨缺損，但是聚乳酸之疏水性強、與細胞的親和力差和細胞活性或增殖速度會被抑制降低等缺點(Ishaug et al., 1994; Barbanti et al., 2004)。因此有越來越多的研究投入於促進細胞生長於聚乳酸上，包括利用表面型態改變和化學方法來改善細胞生長於聚乳酸表面，而本研究的目的是，利用非侵入性的機械外力刺激培養於聚乳酸試片上似骨母細胞，觀察其是否可以促進聚乳酸試片上似骨母細胞的生長速率，和觀察是否可以增加聚乳酸試片上似骨母細胞的生長分化程度。

第三節、研究假設

本研究假設培養於聚乳酸試片上的似骨母細胞，在經過靜磁場刺激後，似骨母細胞會有生長速率或是分化程度上的改變，進而促使似骨母細胞生長於聚乳酸試片上。即靜磁場對似骨母細胞生長於聚乳酸表面上的作用是正面的，未來在醫學臨床應用上，靜磁場不只可以提高聚乳酸材料當作骨質替代物的成功率，更可以加快骨母細胞生長分化，促進傷口癒合。



第四節、名詞界定

1. 靜磁場

磁鐵的形式依其產生的方式可分為永久磁鐵(permanent magnet)與電磁鐵(electromagnet)，其中電磁鐵依其供電方式的不同又可以產生不同的磁場形式；分別為交流磁場(alternative current electromagnetic field, ACMF)、直流脈衝式磁場(pulsed electromagnetic field, PEMF)及直流靜磁場(static electromagnetic field, SMF)三種，而永久磁鐵是由磁性物質充磁後產生，其磁場強度不會因時間的改變而改變，因此亦為靜磁場的一種。靜磁場為非時變的磁場，可經由穩定的電流(DC 電流)通過導線或線圈造成。靜磁場的常用單位為高斯(Gauss)或泰斯拉(Tesla, $1T=10000$ Gause)，為磁力線密度的單位。

2. MG63 似骨母細胞株

似骨母細胞 MG63 原為人類骨癌細胞株，此細胞株之生化行為已被許多文獻證實具有骨母細胞的特性，在 Boyan 等人(1998)的研究亦發現，MG63 對物理環境改變後的反應與骨母細胞相類似。

3. MC3T3-E1 似骨母細胞株

似骨母細胞株 MC3T3-E1 來自新生老鼠的頭頂骨，細胞型態類似纖維母細胞，而且屬於貼附的細胞，此細胞株在早期生長的階段，會有較低的鹼性磷酸酶活性，隨者 MC3T3-E1 細胞的數目增多，鹼性磷酸酶活性也逐漸增加，並且開始有礦化的特徵表現，以及細胞生長成多層的型態(Sudo et al, 1983)。

4. 聚乳酸 PLA(Poly lactide)

聚乳酸 (PLA) 是目前研究應用較多的一種生物可降解材料，在製作上可以澱粉發酵得到的乳酸為基本原料，具有塑性性質，為人工合成和生物可吸收性高分子，屬於 poly-alpha hydroxy acids，其玻璃轉換溫度為 57°C，熔點為 174°C，化學結構型式有四種，視其立體結構為 L 型(L-configuration)或 D 型(D-configuration)而定；PLA 在體內的降解，會經水解去酯作用(hydrolytic deesterfication)變成乳酸，乳酸可藉由乳酸脫氫酵素(lactate dehydrogenase)的催化而氧化成焦葡萄糖酸鹽(pyruvate)，然後焦葡萄糖酸鹽可合成葡萄糖，或經檸檬酸循環代謝成水或二氧化碳，再由肺或腎排出(圖 1-1)，所以不會產生副作用，有相當好的生物相容性。此外，聚乳酸高分子是涵蓋相當廣的共聚物，有 L 型、D 型和 L 型與 D 型以不同比例混合的聚乳酸。目前聚左乳酸 PLLA(Poly L-lactide)(圖 1-2)是最接近理想的硬組織固定材，深具發展潛力(Rozema et al.,1992)，1996 年美國 FDA 首度批准 Lacsorb®使用於顏顎手術，主要就是因

為聚左乳酸 PLLA 具有高度生物相容性、生物可降解性、良好力學強度和容易加工的特性(Vert et al., 1998)。

5.生物可降解性材料

生物可降解性高分子材料(biodegradable polymers)指的是應用於生物技術或生物醫學領域之可降解性天然或合成的高分子材料，會在應用的期間降解吸收，因此以生物可降解性高分子作為體內植入物材料，有避免二次手術移除的優點。



第二章、文獻查證

第一節、聚乳酸於醫學與牙科的重要性與應用

因為車禍意外或手術產生的骨折或骨頭缺損，傳統治療方式會希望從身體其他部位取得自體移植骨來填補骨缺損，但是此治療步驟需要第二次手術，而取得的自體移植骨量有限，且可能會造成手術部位傷害、細菌感染等問題。因此，尋找適當的骨替代物來取代自體移植骨方式，是目前最受關注的研究，人工合成的骨替代物包括陶瓷類的材料和生物可吸收的聚合物，陶瓷類的骨替代物已經被研究應用有一段時間，生物可吸收的聚合物則還在實驗的階段。以生物可吸收的聚合物製作成的骨頭替代物的優點包括，形狀和體積大小可以很容易地塑造成骨缺損的樣子，以及新生成的骨頭會慢慢取代逐漸降解的聚合物。聚左乳酸 PLLA(Poly L-lactide)是最接近理想之硬組織固定材，深具發展潛力，近年來，有關硬組織固定材和組織支架(Scsffold)的進一步研究多集中於 PLLA 上。1996 年美國 FDA 首度批准 Lacsorb®使用於顏頰手術，主要就是因為聚左乳酸 PLLA 具有高度生物相容性，生物降解性，良好力學強度和容易加工(Vert et al., 1998)

聚乳酸(PLA)和聚乳酸-甘醇酸之共聚合(PLGA)是組織工程上(Karp et al., 2003; Yang et al., 2002)和藥物運用上(Jain et al., 2000)最廣為使用的聚合物之一，主要是因為 PLA 和 PLGA 具有良好的生物相容性、生物可降解性和在體

內降解後產生無毒產物的特性。聚乳酸亦運用在牙科的牙周人工合成膜，當牙周炎和植牙周圍炎發生時，齒槽脊的骨缺損會配合使用骨粉和合成再生膜。此為引導組織再生(GTR)的概念，作法是以對牙齒或植牙周圍骨缺損的部位填入骨粉後，再以合成再生膜貼附隔絕軟組織(牙齦細胞)，使得骨頭或牙周韌帶得以再生和促進傷口癒合。

另外，組織工程逐漸注重生物支架(scaffold)的發展，2005年 Gugala 等人嘗試發展由 Poly(L/DL-lactic acid) 80/20%所組成的三度空間生物支架，細胞實驗發現骨母細胞可以貼附和生長於支架上，證明此聚乳酸生物支架有良好的細胞相容性(cytocompatibility)和骨質導引作用(osteoconduction)，因此聚乳酸材料的生物支架未來有潛力成為合適的骨填充材替代物。

第二節、改善細胞生長於聚乳酸的處理方式

雖然 PLLA 已被證實具有良好的生物相容性，但目前所使用的生物可降解性的支架材料還有改善的空間，例如：PLLA 之疏水性強、與細胞的親和力差和細胞活性或增殖速度會被抑制降低(Ishaug et al., 1994; Barbanti et al., 2004)。近年來生物材料的需求日益增加，大家關心的已經不只是生物材料可以提供或支持細胞貼附，還要更進一步增進細胞的功能，因此有很多學者嘗試以各種物理或化學的方法來改善聚乳酸表面的特性，藉以增加材料與細胞之間的親和力，並促進細胞生長於聚乳酸材料上。

由文獻得知，改善的方法可以分成三大類，(1)表面型態改變 (2)化學方法 (3)機械性的刺激(Badami et al., 2006)。表面型態的改變，泛指使用化學性或物理性的方法，來改善聚乳酸生物材料，例如：創造出微米或奈米等級的凸起、不規則的形狀或深度不同的溝痕，使得細胞容易貼附和生長。而研究已經證實具有細微溝紋表面的聚乳酸確實可以影響骨細胞的型態和分化程度 (Matsuzaka et al., 2000)，近年來利用微影技術(photolithography) (Braber et al., 1998)和電化學微形製作技術(electrochemical micromachining) (Zinger et al., 2005)已可以在聚乳酸表面製作出規則的結構，其中規則平行線條已被證明可以刺激細胞生長和誘導細胞貼附於生物材料上(Braber et al., 1998)，並且促進鹼性磷酸酶的活性和礦質的分泌增加。

1999年 Matsuzaka 等人利用微影技術在聚苯乙烯(polystyrene, PS)和聚乳酸(PLA)表面上製作出不同深度(0.5、1.0、1.5 μm)和不同寬度(1、2、5、10 μm)的規則平行溝紋，然後在這些材料表面上培養似骨母細胞，觀察細胞的的型態和生長情況，結果發現經過表面處理過聚乳酸和聚苯乙烯的組別，培養於其上的細胞會比培養在平滑表面上的細胞，有較高的鹼性磷酸酶活性和較多的礦化基質的沉積。特別是溝紋深度 1.5 μm 、寬度 1 μm 和 2 μm 的組別，其似骨母細胞會有最高的鈣化程度。另外有學者製作出粗糙度不同的聚乳酸表面；緻密的、多孔洞的和微粒結構的，並在聚乳酸表面培養 MG63 似骨母細胞，經連續四天實驗，掃描式電子顯微鏡觀察發現，MG63 似骨母細胞生長在

多孔洞和具微粒結構的聚乳酸表面上，其細胞型態比較扁平且伸展狀況較好，此表示細胞在聚乳酸上可以貼附的更好。另外，在 MTT 細胞活性檢測實驗中，具微粒結構的組別經過四天的細胞培養後，其 MTT 值會高於其他兩組。此外在鹼性磷酸酶活性實驗方面，培養於具微粒結構組別的聚乳酸上的 MG63 細胞在第一天和第四天均有較高的鹼性磷酸酶活性，顯示似骨母細胞培養於具微粒結構的聚乳酸表面，不但可使細胞的貼附能力和細胞活性增加，而且細胞分化程度會變高(Liu et al., 2004)。

所謂的化學方法，是指將化學物質吸附或植入聚乳酸生物材料，來調控細胞型態和生長行為。界面間的化學作用會藉由改變基質密度來影響細胞貼附(Healy et al., 1996)和吸附細胞外基質蛋白(如: fibronectin, vitronectin)的結構(Webb et al., 2000; Keselowsky et al., 2003)，聚乳酸表面經過植入第一型膠原蛋白後，表面接觸角比聚乳酸(PLA)或臭氧處理過的聚乳酸都來的小，表示第一型膠原蛋白會增加聚乳酸的水濕性，掃描式電子顯微鏡發現，有第一型膠原蛋白處理過的聚乳酸表面(PLA+COL)變的比控制組(TCPS)粗糙，上述兩項結果皆有利於骨母細胞的貼附。此外，細胞貼附實驗發現，經過 3 個小時之後，PLA 上的細胞貼附數量比控制組來的低，但是 PLA 加入第一型膠原蛋白(PLA+COL)後，細胞貼附能力獲得改善，甚至比控制組來的高，且鹼性磷酸酶活性和膠原蛋白合成量也都有所改善(Suh et al., 2001)。

聚乳酸和聚乙醇酸生物材料有疏水性的特質，此特性會影響到細胞的貼

附特性並改變骨母細胞的生長表現(Stephansson et al., 2002)。所以學者嘗試配合加入親水性的物質來改善聚乳酸疏水性的特質，如：聚乳酸配合使用 poly(ethylene glycol)(PEG)來增加聚乳酸的親水性，實驗發現聚乳酸表面加入 PEG 的濃度超過 10%，反而會降低細胞的貼附和生長速率，但是配合使用 10% PEG，似骨母細胞培養到第 10 天時，其鹼性磷酸酶活性和礦化的程度明顯地比單純的 PLA 和 TCPS 來的高(Lieb et al., 2003)。也有研究利用低溫射頻電漿處理聚乳酸膜表面，功能包括表面清潔、酸蝕、使表面粗糙和附著一些官能基，以增加聚乳酸表面的水濕性。實驗發現經過氨和氧官能基電漿處理過的聚乳酸膜表面，有助於培養於其上的骨母細胞的貼附能力、生長能力和鹼性磷酸酶活性表現(Gugala et al., 2006)。

機械性的刺激泛指各種接觸性和非接觸性的機械外力，輔助促進聚乳酸生物材料上的細胞生長，在方法上包括有脈衝式電磁場(圖 1-3)、低強度超音波(圖 1-4)等。脈衝式電磁場已經成功的應用在臨床的治療上，包括骨折、骨頭壞死和骨質疏鬆的治療(Bassett CA, 1993)。最近幾年，開始有研究將脈衝式電磁場應用於組織工程學上，在這一系列的研究裡，他們先將 SAOS-2 似骨母細胞培養在聚氨酯(polyurethane)合成的細胞支架(scaffold)裡，等待細胞完全貼附後，再加入脈衝式電磁場(magnetic field intensity, 2mT; frequency, 75Hz)的刺激，在連續刺激 24 天後，掃描式電子顯微鏡發現 SAOS-2 似骨母細胞在聚氨酯細胞支架生長情況良好。其中有脈衝式電磁場刺激的組別，細胞數目明顯

增多而且呈現多層細胞的生長，而細胞數也達到控制組的兩倍。除此之外，細胞分化因子 decorin、Type I collagen 和 osteocalcin 的分泌在脈衝式電磁場刺激下，明顯的比未刺激組有更多的表現。實驗結果推測，脈衝式電磁場似乎會促進鈣化基質貼附於聚氨酯細胞支架上，進一步增強材料的生化相容性 (Fassina et al. 2006)。

低強度超音波(1MHz; with pulse duration 2 ms, and intensity of 0.05 W/cm²) 已被應用於促進聚乳酸-甘醇酸上(PLGA)導管內神經細胞生長。在許旺細胞的實驗中，利用低強度超音波刺激 24 小時和 48 小時的實驗組，其 LDH 值會降低，MTT 值會升高，此表示超音波刺激可以降低許旺細胞凋亡數目並增加許旺細胞生長速度。而在動物實驗中，亦有將 17mm 長的 PLGA 導管植入大白鼠體內，連接長達 17mm 的神經缺損。在手術完成 24 小時後，再連續以低強度超音波(0.3W/cm², 5 min/day)刺激 8 週，結果發現，PLGA 導管植入大白鼠體內的成功率會在超音波刺激下，從 37.5%提升到 50%。8 週刺激後，將實驗的大白鼠犧牲並做組織切片分析發現，在低強度超音波刺激的組別中，不論有無配合植入許旺細胞，其 PLGA 導管內再生的許旺細胞軸突數量或範圍都會明顯的增多。因此，PLGA 生物材料對於神經再生組織工程而言，是個較適合的材料，而且低強度超音波不只對神經細胞再生有正面作用，對 PLGA 導管內的神經細胞再生一樣有幫助(Chang et al., 2005)。

第三節、靜磁場對骨母細胞的影響

磁附連體是口腔醫學常使用的一種裝置，其最早的應用多集中於全口假牙的固定及作為牙齒贖復的连接裝置(Javid, 1971)。然而由於早期的磁附連體材料如鋁-鎳-鈷合金(AlNiCo)或鈷-鉑合金(PtCo)的磁力強度仍然不足，因此在應用上仍有相當的限制。近幾年來，由於稀土金屬(rear earth metal)磁附連體製作技術的進步，尤其是鈷鐵硼磁附連體(NdFeB)的發明，使得磁附連體得以在小型化之後仍能擁有足夠的磁力，這不僅使得磁附連體可以提供贖復義齒所需的結合力(Melissa et al., 2001; Ai and Shiau, 2004)，更可作為臨床矯正所需的力量來源(Darendeliler et al., 1997)，或應用靜磁場來促進前驅骨母細胞分化(Huang et al., 2006)。

磁鐵的形式依其產生的原因可以分為電磁鐵與永久磁鐵，其中電磁鐵依其供電方式的不同又可以產生不同的磁場形式；分別為交流磁場、直流脈衝式磁場及直流靜磁場三種。

由於脈衝式電磁場刺激骨癒合的成功率可以達到 80%以上，且幾乎不受骨折位置、不癒合期及手術次數的影響(Garland et al., 1991)，因此早在 1979 年美國食品藥物管理局(FDA)即已核准這項治療技術，迄今已實際普遍的應用在臨床治療上，並獲致很好的療效(Gossing et al., 1992; Trock, 2000)。

在靜磁場對骨質或骨細胞的影響上，臨床觀察曾發現，永久磁鐵產生的靜磁場與脈衝式磁場有相同的作用，均會加速牙齒的移動速度(Tengku et al.,

2000)。雖然他們具此推論認為，靜磁場也可以增加未成熟的前驅細胞成熟為骨母細胞的速度，加速骨質的新陳代謝，因此使得牙齒的移動速度加速，但其結論仍屬推論性質，並無任何深入的實驗數據加以證明。1987年 Bruce 等人曾以兔子為實驗對象，在脛骨施以人工骨折之後，將永久磁鐵置於骨折位置，並在另一側植入未充磁的磁鐵為對照組，四週後發現暴露側的骨頭力學強度比未暴露側的高出 20 倍以上，即靜磁場的暴露對骨組織有正面的效應。後續的似骨母細胞(osteoblast-like cell TE-85)實驗亦發現靜磁場明顯的增加了 IGF-II receptor 的數目(Fitzsimmon et al., 1995)。

骨母前驅細胞的基因表現主要可以分為三個時期：增殖期(proliferation)、細胞外基質成熟期(extracellular matrix maturation)、礦化期(mineralization)。在整個骨質形成過程中有兩個限制點(restriction point)，在沒有訊號的情形下，細胞是無法跨過這兩個限制點的：第一個限制點是當增殖表現減少，而與細胞外基質成熟期有關的基因表現被引發時。第二個限制點是當礦化發生時。一開始活化的增生細胞表現細胞週期(histone)及細胞生長(*c-myc*, *c-fos*)調控基因，並開始製造 type I collagen、fibronectin、TGF- β 1 (準備進入細胞外基質成熟期)。接著，細胞增生減少而與細胞外基質成熟期有關的基因便會開始表現。一旦細胞增殖被抑制，細胞會開始將富含鹼性磷酸酶的基質小泡(matrix vesicle)分泌至細胞外形成骨基質(bone matrix)，使得骨母前驅細胞分化(differentiate)成骨母細胞所具有的特異性標記(marker)如鹼性磷酸酶活性馬上

增加十倍，此外造骨蛋白(osteopontin)也會大量的表現。接著在進入礦化期時，骨鈣素(osteocalcin)及造骨蛋白的表現會增加。

簡言之，骨母前驅細胞在分化成為較成熟的骨母細胞前，會先發生增殖抑制的現象。此外，研究結果亦發現當 collagen 堆積增加時，會增強骨母細胞或似骨母細胞特異性的表現，這表示細胞外基質對關閉細胞增殖期，及將前驅細胞分化成骨母細胞 phenotype 這兩個階段均有貢獻 (Stein et al., 1990)。而骨母前驅細胞這種分裂與分化之間具有相關性的特性並非特異，如 leukemia (可以分化成 monocytic, macrophage, myogranulocytic)及 adipocytes (由 3T3-11 分化成)等細胞也具有這樣的特性(Stein et al., 1990)。

靜磁場對似骨母細胞的影響實驗發現，在 4000 高斯的靜磁場暴露下，特定的初始細胞培養密度下(1×10^4 cells/ml)，細胞數目會在第 24 小時開始被抑制，生長速率會明顯低於未暴露組，掃描式和穿透式電子顯微鏡觀察實驗裡，發現似骨母細胞在靜磁場刺激下表現出更成熟的型態和更多的細胞外基質，此外，靜磁場暴露組的鹼性磷酸酶活性、膠原蛋白、TGF- β 、骨鈣素(osteocalcium)和造骨蛋白(osteopontin)表現都明顯增加。此研究證明了似骨母細胞在靜磁場刺激下，會藉由影響局部分化因子的釋放來促進似骨母細胞的分化程度 (Huang et al., 2006)。此研究作者更進一步推論，靜磁場促進似骨母細胞分化是藉由影響細胞膜流動性，進而激發細胞內訊息傳遞路徑，而有之後似骨母細胞分化的表現。

近年來，由於牙科植體的盛行，許多關於加快植體表面骨整合的研究紛紛被提出，其中有研究提到靜磁場於牙科植體上的應用性(Kim et al. 2004)，實驗設計配合牙科臨床磁性質復物的實際情況。在臨床上，磁體距離牙科植體約 3~5mm，此處的磁力強度約 10mT，實驗結果發現，培養在鈦金屬片上的 TE-85 似骨母細胞，在靜磁場的刺激下，雖然 fibronectin peptide 貼附於鈦金屬的量和控制組一樣，然而，在 1mT 的靜磁場刺激下，TE-85 似骨母細胞的貼附能力和生長速率皆比未刺激組來的高。此外，TE-85 似骨母細胞在靜磁場的刺激下，外觀趨向更平坦的型態。作者提到靜磁場影響組織細胞可能的機轉，其中之一是 magnetomechanical effect，也就是靜磁場可能會對細胞產生力矩般的機械外力，進而導致細胞生長分化上的改變，至於正確的機轉則還須釐清 (Kim et al. 2004)。

第四節、Mechanotransduction 的概念

人體生活的物理環境是隨時接觸多樣的機械外力，例如：施予人體上的重力和肌肉作用於骨頭上的拉力。其它包括，步行和運動時在軟骨細胞與骨細胞上所造成的壓力(compressive force)、血液流動在血管內所造成的靜液體壓力 (hydrostatic pressure) 與剪應力(shear stress)等均屬於力學作用。同樣地，肺臟組織也是週期性地受到呼吸所造成的機械力，其他如心臟也不斷受到因為血液體積和壓力改變而產生的機械力。近年來實驗發現組織的生長和重新

塑造會因為機械外力刺激的改變而有反應，證明機械力負載、力學傳遞機制和細胞生化反應間有密切的關係。其中，這些對機械力敏感的細胞，包含：纖維母細胞、軟骨細胞、骨母細胞、內皮細胞、平滑肌細胞(Wang et al., 2006)，幾乎涵蓋全身組織，至於細胞如何感受到機械力和如何將機械訊息轉換成生物反應，目前還未明瞭，所以，一項新興的科學稱為力學生物(mechanobiology)應運而生。並且在最近幾年逐漸受到重視。

1993年 Juliana 等人，便指出細胞可以感覺到機械力，然後產生進一步反應，而影響到細胞外基質的合成(ECM)，至於細胞如何將感受到的機械外力轉換成生物化學訊息還未知，但是已經有一些可能的訊息傳遞路徑被提出。ECM-integrin-cytoskeleton pathway 是其中一項傳遞路徑，指的是細胞藉由 integrin 貼附到細胞外基質(ECM)，而 integrin 會連接到細胞骨架(cytoskeleton)，這個結構的連接提供一條傳導機械訊息的路徑，導致整個力學能量可由細胞外傳遞至細胞內，進而開啟許多細胞內的訊息傳遞路徑。隨著這方面的研究蓬勃發展，歸納出主要參與細胞力學傳遞機制的分子，如：integrin、G coupled receptor protein、receptor tyrosine kinase (酪胺酸磷酸酶受器)與 stretch-activated ion channels(拉伸-誘導的離子通道)等(Coppolino and Dedhar., 2000; Clark et al., 2002)。關於力學誘導細胞內分子生物訊息之啟動、傳遞路徑之研究，此一傳導路徑稱為力學訊息傳遞路徑(Mechanotransduction)。

近年來已有許多有關骨母細胞力學生物學的實驗，當在培養的骨母細胞

上給予流動的液體時，流體在細胞膜表面產生剪切力，可明顯觀察出有大量並快速的一氧化氮與前列腺素 E2 釋放(Walker et al., 2000)。另外也有實驗把細胞培養在可被外力曲折的培養皿上(Peake et al., 2000)，然後施予機械力，研究觀察到許多不同的生化反應，如生長因子、賀爾蒙的合成。此外，醫學上很早便認為超音波對骨折後的恢復極有幫助，分子生物學的研究也指出，經超音波刺激的人類似骨母細胞(MG63)，其鹼性磷酸酶與骨鈣素(Osteocalcin) mRNA 的表現量有明顯的上昇(Maddi et al., 2006)。超音波本身即是一種機械波，此種機械波作用於細胞上，亦使細胞受到力量。目前已知，此亦為力學生物學之作用。所以物理性的機械力在骨母細胞上，確實有重要的角色。然而目前雖然已清楚知道機械力與細胞間的生理關係，但仍不清楚細胞如何感受機械力並且轉換這類力學訊號至生物反應。

第三章、研究材料與方法

第一節、聚乳酸試片之製備與清洗

本研究所使用的聚乳酸試片生物材料為分子量 140,000Da 的聚乳酸複合材(Bio-tech one Incorporation, Taipei, Taiwan)，由 95%聚左乳酸(Poly-L-lactic acid, PLLA)和 5%聚右乳酸(Poly-DL-lactide, PDLA)組成，利用自動射出成形機器(圖 1-5、圖 1-6 和圖 1-7)製備成聚乳酸圓形試片，直徑 14 mm (此尺寸與 24-well 培養皿相同，並利用 24-well 培養皿作為細胞培養載具)，厚度 1 mm(圖 1-9)，經 γ -ray(20kGy)滅菌後(分子量 100,000-140,000kGy)，分批真空包裝並保存於防潮箱內。進行細胞實驗之前，先將聚乳酸試片放入燒杯內並加入洗潔劑，於震盪器內震盪 5 分鐘，再以蒸餾水沖洗並震盪 5 分鐘，蒸餾水清洗乾淨後，再以 70 %酒精浸泡消毒 20 分鐘，聚乳酸試片於細胞培養箱裡隔夜乾燥後，再於聚乳酸試片上培養似骨母細胞。

第二節、靜磁鐵之製備及靜磁場之檢測

受測之培養細胞分為兩組，一組置於磁化的鈷鐵硼磁鐵上 (圖 1-10)，另一組細胞置於距離 25 公分的同一培養箱中，而實驗的靜磁鐵其中心表磁 4000 高斯。根據 McDonald (1993)的報告，磁場方向對細胞的效應影響不大，因此在本研究計劃中，所有實驗之細胞一律控制暴露於 N 極下。在假暴露組中，

細胞放置於相同尺寸之未充磁銻鐵硼金屬塊。在所有的實驗中，細胞在受磁場暴露前均先培養 24 小時以待細胞貼附，並以此時間定義為 0 小時。觀察時間為 0、1、2、3、4 和 5 天。

第三節、實驗之細胞培養方法

1. 藥品製備

(1) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培養基(購自 HyClone Co.):

實驗中所使用之培養基為 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)，提供 MG63 似骨母細胞生長所需之養分。配置方法為加入 10 % 的胎牛血清(BS)(購自 HyClone Co.)和加入 1% penicillin (購自 HyClone Co.)，然後分裝並冷藏在 4°C 冰箱裡。

(2) α -modified MEM 培養基(購自 HyClone Co.):

實驗中提供 MC3T3-E1 似骨母細胞生長所需之養分，所使用之培養基為 α -modified MEM。配置方法須加入 10 % FBS (購自 HyClone Co.)和 1% penicillin(購自 HyClone Co.)，然後分裝並冷藏在 4°C 冰箱裡。

(2) PBS (phosphate-buffered saline)

PBS 為一種緩衝溶液，在繼代過程中，可將培養皿內殘留的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 離子洗去，使細胞呈現懸浮狀態以利計數，本研究所使用的 PBS(PH 7.2)

配方如下：先將0.2克的KCl、0.24克的 K_2HPO_4 、0.14克的 Na_2HPO_4 及8克的NaCl加入二次水至1000毫升，再以 $121^\circ C$ ， 1.2 kg/cm^2 之高溫高壓消毒，冷卻後，冷藏於 $4^\circ C$ 。

2. 細胞選取

MG63

骨母細胞(osteoblast, OB)之來源為人類骨髓中之前驅細胞(stromal cell precursors)，它們可以分泌鹼性磷酸酶、骨鈣素、第一型膠原蛋白，及其他細胞外基質蛋白如 osteonectin 和 osteopontin，以合成細胞外基質(matrix)。此外，骨母細胞可受多種激素，生長因子影響及調控(如 PTH、PGE2、TGF- β ， $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ 等)。此外骨母細胞本身尚能合成並分泌一些生長因子，包括 PDGF，IGFs，TGF- β 及 endothelin-1 等，它們可能對本身或其他骨母細胞產生調控作用。骨母細胞之細胞型態隨著造骨過程之進展而改變，其前驅細胞(pre-osteoblasts)之核較大較圓，當造骨進行後，其核會愈來愈平。骨母細胞也參與骨質之礦化(mineralization)過程，它分泌之鹼性磷酸酶可與 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ 相互作用，使 Ca^{2+} 與 PO_4^{3-} 形成不規則的鈣磷混合物(amorphous calcium phosphate) 及其後之 calcium hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)。此外它分泌之基質蛋白(matrix proteins) 為含有 90%第一型膠原蛋白(type I collagen)及其它非膠原蛋白類(non-collagenous)蛋白質，(如 BGP，osteocalcin，osteopontin 等)對骨礦化過程也扮有重要角色。

本研究所使用的 MG63 細胞株(ATCC CRL-1427)來源為人類前驅骨癌細胞 (human osteogenic sarcoma)。其具有單層生長及如同纖維母細胞般的梭狀型態 (圖 1-11)。由於此細胞可以表現許多的骨母細胞特徵，因此已被廣泛用於骨母細胞相關的研究。例如，其會在 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 刺激下表現高度的鹼性磷酸酶活性、合成骨鈣素、抑制生長再生、並表現不同的細胞型態(Franceschi et al., 1985)，並在 PTH 及 PGE2 的刺激下產生環腺苷磷酸(cyclic AMP)(Sollazzo et al., 1997; Lohmann et al., 2000)，此外 MG63 細胞具有表現基質小泡(matrix vesicles) 的能力(Bassett, 1993)。Boyan 等人(1998)的研究亦發現，MG63 對物理環境改變後的反應與骨母細胞相類似。因此 MG63 細胞被視為似骨母細胞 (osteoblast-like cell)，並廣泛用為骨母細胞增殖、分化與功能的體外實驗(in vitro)模型。

MC3T3-E1 細胞株

此細胞株來自新生的老鼠頭蓋骨，細胞生長是屬於貼附的方式，外型類似纖維母細胞的型態(圖 1-12)，和此細胞之間會有大量的纖維產生(Sudo et al, 1983)。Quarles 等人(1992)的研究對 MC3T3-E1 似骨母細胞的生長做了分析，在培養初期(1-9 天) MC3T3-E1 細胞複製速度很活躍，並有大量的 DNA 合成和細胞數目增加，細胞呈現紡錘形的型態，而鹼性磷酸酶活性和礦物化的細胞外基質表現並不明顯。MC3T3-E1 細胞生長到了第 9 天，呈現立方體的型

態，生長速度趨緩，並且達到單層細胞貼滿的狀態，同時，開始表現骨母細胞的功能，包括鹼性磷酸酶活性、膠原蛋白和細胞外基質的沉積。細胞外基質則在培養 16 天之後開始礦物化。

3. 細胞培養方法:

培養細胞是將細胞浸泡在前述的培養基中。細胞在生長時，會有生長曲線的表現，當細胞生長至高密度時，生長空間會過小而導致培養液的養分不足及細胞的廢棄物過多，細胞會發生死亡的現象，若是細胞長到過滿才施以繼代，也可能導致繼代後的細胞生長情形過差。因此，當細胞在培養皿裡達到近八成飽和狀態時，必須將細胞行以繼代培養（subculture），以確保細胞可以持續的生長。

實驗中使用濃度為0.05% Trypsin -0.53 mM EDTA · 4Na來進行繼代細胞培養，胰蛋白酶可將蛋白質分解成片段的酵素，使細胞由培養皿上脫落，再將細胞培養於新的培養皿中，以達到細胞繼代培養的目的。實施繼代培養的步驟如下：先吸取舊培養液丟棄，和利用10 ml PBS 緩衝溶液清洗2次，以去除Ca²⁺、Mg²⁺離子及殘留在培養皿中的培養液，加入胰蛋白酶1 ml，輕拍培養皿使細胞脫附，當細胞呈現懸浮狀態時，加入新鮮的培養液9 ml 中止胰蛋白酶的作用。將懸浮液吸入離心管中，使用離心機離心5分鐘，轉速為2000 rpm，吸取離心管上層的培養液丟棄，加入新鮮培養液10 ml，混合均勻後，依稀釋

比例轉移至新的培養皿中。實驗進行時，所有細胞均先等24小時，以使細胞貼附。此時始進行實驗，並定義此時間為0小時。

第四節、掃描式電子顯微鏡對培養於聚乳酸試片上似骨母細胞的型態之觀察

為了分析培養於聚乳酸試片表面的 MG63 細胞和 MC3T3-E1 細胞在受到靜磁場暴露之後型態上的變化，本研究另以掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscopy, SEM)對細胞的型態進行觀察。實驗進行時將細胞培養於已置入聚乳酸試片的 24 孔培養盤中，實驗分為暴露組與未暴露組，時間點到時，對細胞進行前處理。首先去除細胞培養液，並以 PBS 清洗細胞三次，接著將細胞以 2.5% 戊二醛(glutaraldehyde)及 2% 三聚甲醛(paraformaldehyde)固定 20 分鐘，然後再以 1% (in 0.1 M PBS) 四氧化銻(osmium tetroxide)固定 30 分鐘。在初步固定之後，樣品再以 1% 鐵酸後固定 1 小時。接著將樣品以 PBS 清洗並依序以 70%、80%、90%、95% 及 100% 酒精進行脫水與臨界點乾燥(HCP-2, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)。脫水乾燥後的樣品以鍍金器(IB-2, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)噴鍍一層鈀金(palladium gold)。處理後的細胞利用 Hitachi S-2400 電子顯微鏡系統加以觀察(Hitachi, Ltd, Tokyo, Japan)。每一實驗組準備 3 個樣品，每個樣品均對九個區域進行觀察與攝影。

第五節、細胞活性 MTT 的測量

本實驗將於 24 孔盤中進行，分為兩組，即實驗組(磁鐵暴露)、對照組(磁鐵未暴露)，每一時間點有 4 個細胞樣品，並以所使用的培養基為空白組(blank)。因為生長因子的作用主要為增加骨細胞存活率與活性(Hill et al., 1997)，因此在本研究中以 MTT: 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)檢驗組套與細胞數目來定量分析細胞活性的狀況。

在 MTT 實驗方面，在前述的測試時間(0~5 天)，於細胞培養液內加入 MTT 50 μ l，並放回細胞培養器中等待 MTT 作用 4 小時，MTT 在被活細胞代謝之後會變成帶有顏色的 formazan，細胞活性越高，則其所呈現的顏色越深。在加入 MTT 等 4 個小時後，小心移除細胞培養液，加入 DMSO 500 μ l。5 分鐘後可由免疫酵素分析儀(Model 2020, Anthos Labtec Instruments, Austria)以 570/690 nm 的波長讀取吸光值。

第六節、鹼性磷酸酶活性之偵測

鹼性磷酸酶是骨前驅細胞走向分化的早期標記，鹼性磷酸酶活性(activity)的增加，表示細胞有增強分化的作用。因此藉由偵測MG63細胞和MC3T3-E1細胞受靜磁場暴露後的鹼性磷酸酶活性變化，可以探知此細胞走向分化的程度。在方法上是藉由觀察在pH值10.2時，細胞培養液將對硝基苯酚磷酸鹽

(p-nitrophenyl phosphate, pNPP)轉換為對硝基苯酚(p-nitrophenol)的速率，以作為鹼性磷酸酶的活性(Boyan et al., 1989)。實驗進行時首先將MG63細胞和MC3T3-E1細胞培養在內置有聚乳酸試片的培養盤，在每一個觀察時間點去除細胞培養液，並以PBS清洗細胞。接著加入胰蛋白酶300 μ l將MG63細胞和MC3T3-E1細胞從聚乳酸試片上脫離，然後移至1.5ml的試管內，經2000rpm離心5分鐘後，移除上清液，接著再加入200 μ l的cell lysis (CellLyticTMMT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent, SIGMA)將MG63細胞和MC3T3-E1細胞打破。接著取出100 μ l的細胞液加入微量讀盤中以鹼性磷酸酶偵測組套(No. 104, Sigma, St. Louis, USA)進行反應，並利用微盤分光光度計(Model 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria)，以波長405/690 nm讀取吸收值。

在本實驗中，細胞液也被用來作為細胞全蛋白(cell total protein)的偵測。參考文獻步驟(Bonewald et al., 1987)以BCA法(bicinchoninic acid)定量蛋白質濃度(BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL)。BCA法是二價銅離子在鹼性的條件下，可以被蛋白質還原成一價銅離子(biuret reaction)，一價銅離子和BCA溶液(含有BCA)相互作用產生敏感的颜色反應。當兩分子的BCA螯合一箇銅離子，會形成紫色的反應複合物，該水溶性的複合物具有強烈的吸光性，且吸光度和蛋白質濃度有良好的線性關係，因此根據吸光值可以推算出蛋白質濃度。實驗前將BCA溶液稀釋5倍，實驗進行時，先取出40 μ l細胞液至96孔

盤中，接著加入160 μ l的BCA溶液作用10分鐘，然後再以微盤分光光度計(Model 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria)偵測590/690 nm的吸光度。鹼性磷酸酶的活性以一定時間內單位濃度的細胞全蛋白質可以轉換多少pNPP作為單位。

第七節、聚乳酸試片表面粗糙度的測量

為了分析聚乳酸試片在受到靜磁場暴露之後，材料本身表面粗糙度是否會有變化，聚乳酸試片分成實驗組(磁鐵暴露)和對照組(磁鐵未暴露)，每組有3個樣品，實驗組放在靜磁場下連續暴露5天，再以表面粗糙度測量儀(TalyScan 150; Taylor/Hobson Ltd., Leicester, GB)來測試(圖 1-13)，每一樣本測量5個位置，分別是上(U)下(L)左(CL)右(CR)和中間(C)，實驗選擇鑽石感應探頭來偵測(尖端直徑為2 μ m，與樣本垂直90°)，在每一個位置選取0.5x0.5 mm²作為偵測掃描的範圍，測量速度為1000 μ m/s，鑽石感應探頭垂直移動的距離定義為表面粗糙度(Sz)。

第八節、聚乳酸試片表面接觸角的測量

為了分析聚乳酸試片在受到靜磁場暴露之後，材料本身表面能量是否會有變化，實驗以水和聚乳酸試片間的接觸角來測量，聚乳酸試片分成實驗組(磁鐵暴露)和對照組(磁鐵未暴露)，每組有3個樣品，實驗組放在靜磁場下

連續暴露 5 天，再以接觸角量測儀(FTA 125;First Ten Ångstroms;USA)來測試其表面親水性，接觸角量測範圍：0-180°;最小讀值 $\leq 0.01^\circ$ 讀取精度 $\leq 0.1^\circ$ 。實驗時，以手動控制液滴大小，當水滴滴落於聚乳酸試片上，形成半弧形時，再利用電腦控制 CCD 相機(取像速度為 60 像/秒)將實驗結果轉換成影像檔，可以自動求得水接觸角和表面能量，每一樣本測量 3 個點，並且重複 3 次。

第九節、統計分析

本研究中的所有分析和觀察均進行三次獨立實驗，每次實驗時，每一種條件均各有 4 個樣本數，實驗結果的數據則以平均值 \pm 標準差(SD)表示，各實驗組內的差異則以 Student's *t*-test 進行比較。所有的統計分析以 *p* 值 < 0.05 表示有統計學上的差異。

第四章、分析與結果

第一節、靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MG63 似骨母細胞生長型態之影響

在 SEM 的細胞超微型態觀察實驗中，MG63 似骨母細胞生長貼附於聚乳酸試片的情形良好，細胞剛開始貼附時，型態呈現梭狀，並且有細胞外基質的分泌，來促使細胞加速貼附，培養 2 天後，MG63 細胞數目逐漸增多，似骨母細胞型態呈現扁平狀且更緊密地貼附於聚乳酸試片上。實驗觀察發現，未受靜磁場暴露的 MG63 細胞在第 1 天的時候表現出梭狀和單層的生長型態(圖 2-1)，而培養於聚乳酸試片上的 MG63 細胞，在接受靜磁場刺激 1 天後(圖 2-2)，雖然細胞數沒有差異，但是表現出多角扁平的細胞型態，而且細胞外基質的分泌量(如箭頭所示)則明顯比未暴露組來的多。到了第 3 天時，MG63 細胞數目明顯變多，而且細胞型態變的更扁平，未暴露組 MG63 細胞表現出多角形但未見到明顯的細胞突觸(圖 2-3)，但接受靜磁場暴露的 MG63 細胞則可以見到細胞突觸且比未暴露組來的明顯(圖 2-4)。

第二節、靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MC3T3-E1 似骨母細胞生長型態之影響

在 SEM 的細胞超微型態觀察實驗中，MC3T3-E1 似骨母細胞生長貼附於聚乳酸試片的情形良好，一開始細胞貼附相當扁平，並且有細胞外基質的分泌，來促使細胞加速貼附，3 天後 MC3T3-E1 細胞數目逐漸增多，似骨母細胞型態呈現立方體形且更緊密地貼附於聚乳酸試片上。實驗觀察發現，未受靜磁場暴露的 MC3T3-E1 細胞在第 1 天的時候，表現出梭狀和單層的生長型態(圖 2-5)，而培養於聚乳酸試片上的 MC3T3-E1 細胞，在接受靜磁場刺激 1 天後(圖 2-6)，雖然細胞數沒有差異，但是細胞外基質和類似膠原蛋白的分泌物(如箭頭所示)則明顯比未暴露組來的多。到了第 2 天時，MC3T3-E1 細胞數目明顯變多，而且細胞型態變的更扁平，暴露組(圖 2-8)和未暴露組(圖 2-7)的 MC3T3-E1 細胞，皆表現出更扁平 and 單層的型態，而且細胞外圍分泌更多類似膠原蛋白的顆粒。實驗第 3 天時，MC3T3-E1 細胞數目明顯增多，而且細胞型態變的更扁平，暴露組(圖 2-10)和未暴露組(圖 2-9)的 MC3T3-E1 細胞，皆表現出立方體和多層的型態，而且細胞之間的突觸明顯變多。

第三節、靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MG63 似骨母細胞生長之影響

由 MG63 細胞的生長曲線發現，在 5 天的觀察期間，培養於聚乳酸試片上的 MG63 細胞均表現出良好的生長情形，在靜磁場暴露實驗中，不論是靜磁場暴露組或是未暴露組，在實驗期間 MG63 細胞數目均有正常增加的趨勢。如圖 3-1 所示，當於聚乳酸試片上以 1×10^4 cells/ml 的初始細胞密度進行培養，受靜磁場暴露組於第 4 天時，其 MTT 的 O.D. 值(0.366 ± 0.017)明顯比未暴露組(0.326 ± 0.003)來的低($p < 0.05$)。於聚乳酸試片上以 2.5×10^4 cells/ml 的初始密度培養時(圖 3-2)，受靜磁場暴露組於第 2 天的 MTT 值(0.6565 ± 0.022)和第 3 天的 MTT 值(0.9854 ± 0.052)，與未暴露組第 2 天的 MTT 值(0.805 ± 0.066)和第 3 天的 MTT 值(1.133 ± 0.044)有明顯的差異($p < 0.05$)。於聚乳酸試片上以 5×10^4 cells/ml 的初始密度培養時，受靜磁場暴露組的細胞於第 1 天時，其 MTT 值(0.476 ± 0.023)明顯與未暴露組 (0.552 ± 0.038)有明顯的差異($p < 0.05$)(圖 3-3)。因此本研究發現，培養於聚乳酸試片上的 MG63 細胞，在靜磁場暴露之下，不論在 1×10^4 cells/ml、 2.5×10^4 cells/ml 和 5×10^4 cells/ml 其細胞增殖的情形會明顯受到抑制，特別是在 2.5×10^4 cells/ml 細胞密度下會更明顯。基於這樣的結果，所以在後續的實驗中，本研究均以 2.5×10^4 cells/ml 作為細胞初始培養密度。

第四節、靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MC3T3-E1 似骨母細胞生長之影響

在連續 5 天的細胞培養期間，培養於聚乳酸試片上的 MC3T3-E1 似骨母細胞均有良好的生長情形，而在靜磁場暴露實驗中，不論是靜磁場暴露組或是未暴露組，MC3T3-E1 似骨母細胞皆有正常的生長曲線。如圖 3-4 所示，當聚乳酸試片上以 1×10^4 cells/ml 的初始細胞密度進行培養，受靜磁場暴露組於第 3 天的 MTT 值(0.401 ± 0.028)和第 4 天的 MTT 值(0.473 ± 0.042)皆明顯比未暴露組第 3 天的 MTT 值(0.299 ± 0.014)和第 4 天的 MTT 值(0.399 ± 0.029)來的高 ($p < 0.05$)。而 MC3T3-E1 似骨母細胞以 2.5×10^4 cells/ml 的初始密度，培養於聚乳酸試片上時(圖 3-5)，受靜磁場暴露組於第 4 天的 MTT 值(0.580 ± 0.013)與未暴露組的 MTT 值(0.526 ± 0.032)有統計學上的差異($p < 0.05$)。當聚乳酸試片上的細胞以 5×10^4 cells/ml 的初始密度培養時，受靜磁場暴露組的細胞則於第 3 天時，其 MTT 值(0.648 ± 0.011) 明顯與未暴露組的值(0.610 ± 0.022)有明顯的差異 ($p < 0.05$)(圖 3-6)。因此本實驗發現，培養於聚乳酸試片上的 MC3T3-E1 細胞，在靜磁場暴露下，不論在 1×10^4 cells/ml、 2.5×10^4 cells/ml 和 5×10^4 cells/ml，其細胞數目均會明顯地變多，特別是在 1×10^4 cells/ml 細胞密度下會更明顯。基於這樣的結果，所以在後續的 MC3T3-E1 細胞實驗中，本研究均以 1×10^4 cells/ml 作為細胞初始培養密度。

第五節、靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MG63 似骨母細胞成熟分化之影響

在分化因子的分析方面，實驗以鹼性磷酸酶活性來檢測。在圖 4-1 中，培養於聚乳酸試片上的 MG63 細胞，靜磁場暴露組和暴露組的細胞表現鹼性磷酸酶的活性在剛開始時會逐漸增加，而在受到靜磁場暴露 1 天後，不論是靜磁場暴露組的鹼性磷酸酶活性(11.926 ± 1.293)或是未暴露組的鹼性磷酸酶活性(7.944 ± 1.374)均達到最高值，而且靜磁場暴露組的鹼性磷酸酶活性比未暴露組的高出 1.5 倍，第二天以後，兩組之鹼性磷酸酶活性則逐漸下降，而且沒有明顯的差異。

第六節、靜磁場對培養於聚乳酸試片上 MC3T3-E1 似骨母細胞成熟分化之影響

在 MC3T3-E1 似骨母細胞分化因子的分析方面，以鹼性磷酸酶活性實驗來測試。在圖 4-2 中，培養於聚乳酸試片上的 MC3T3-E1 細胞，靜磁場暴露組和暴露組的細胞表現鹼性磷酸酶的活性，在剛開始時，表現並不明顯，隨著時間增加，MC3T3-E1 細胞在第 5 天，表現出最大的鹼性磷酸酶活性。在受到靜磁場暴露第 3 天(1.554 ± 0.193)和第 4 天(4.763 ± 0.571)的鹼性磷酸酶活性都比未暴露組在第 3 天(2.059 ± 0.221)和第 4 天(5.716 ± 0.441)時的值來的低。

第七節、靜磁場對聚乳酸試片表面粗糙度之影響

為了分析聚乳酸試片在受到靜磁場暴露之後，材料本身表面粗糙度是否會有變化，實驗組放在靜磁場下連續暴露 5 天，再以表面粗糙度測量儀 (TalyScan 150; Taylor/Hobson PRECISION; USA) 來測試，如圖 5-1 所示，本實驗使用的聚乳酸試片的表面粗糙度，約 $3\mu\text{m}$ ，每一樣本測量 5 個點，分別是上(U)下(L)左(CL)右(CR)和中間(C)，統計結果如圖 5-2 所示，有無靜磁場暴露的聚乳酸試片，其表面粗糙度並沒有影響。

第八節、靜磁場對聚乳酸試片接觸角之影響

聚乳酸試片分成實驗組(磁鐵暴露)和對照組(磁鐵未暴露)，實驗組放在靜磁場下連續暴露 5 天，再以接觸角 (FTA 125; First Ten Ångstroms; USA) 測量儀來測試，結果如圖 5-3 所示，實驗組的表面接觸角 ($65.428^\circ \pm 2.636^\circ$) 與未暴露組 ($64.142^\circ \pm 4.598^\circ$)，並無統計上的差異。

第五章、討論

磁附連體是口腔醫學常使用的一種裝置，其最早的應用多集中於全口假牙的固定及作為牙齒贖復的連接裝置(Javid, 1971)。近幾年來，由於稀土金屬(rear earth metal)磁附連體製作技術的進步，尤其是鈷鐵硼(NdFeB)磁附連體的發明，使得磁附連體得以在小型化之後仍能擁有足夠的磁力，這不僅使得磁附連體可以提供贖復義齒所需的結合力(Melissa et al., 2001; Ai and Shiau, 2004)，更可作為臨床矯正所需的力量來源(Darendeliler et al., 1997)。此外靜磁場亦在修復動物骨折實驗(Bruce et al., 1987)，或是似骨母細胞實驗(Fitzsimmon et al., 1995; Huang et al., 2006)，得到正面的效應。

本研究目的在藉由靜磁場的應用，促使似骨母細胞可以在聚乳酸生物材料上生長的更好。我們以掃描式電子顯微鏡來觀察，似骨母細胞受到靜磁場刺激後，型態上的改變。MG63 細胞受靜磁場暴露後，會表現出更多的細胞外基質和細胞突觸，而且型態上趨向於成熟(圖 2-2；圖 2-4)。而 MC3T3-E1 細胞在受到磁場暴露後，則會表現更多的細胞外基質和類似膠原蛋白的顆粒(圖 2-6；圖 2-8；圖 2-10)，培養到了生長後期時，靜磁場暴露組與未暴露組的 MC3T3-E1 細胞會開始呈現多層的型態，並且有更多的突觸表現(圖 2-6 至圖 2-10)。靜磁場會影響似骨母細胞的型態，其類似的結果亦可見於 2005 年 Kim 等人的研究，他們利用靜磁場促進似骨母細胞(TE-85)貼附於鈦金屬片表面上，在掃描電子顯微鏡實驗中，結果發現在 1mT 的靜磁場強度影響下，TE-85

細胞型態會表現較扁平的細胞型態。

在 MTT 實驗結果中，培養於聚乳酸試片上之 MG63 細胞的生長速率，會受靜磁場的影響而變的緩慢，此結果與 2006 年 Huang 等人發現相同。另外，培養於聚乳酸試片上之 MC3T3-E1 細胞的生長速率，則會受靜磁場的影響而加快。類似的結果可見於，2002 年 Diniz 等人發現 MC3T3-E1 細胞在脈衝式電磁場的刺激下，細胞生長速率會加快。而在這我們的研究中，MG63 細胞在靜磁場暴露的第 2 天(圖 3-1)，生長速率會受靜磁場影響而變緩慢，MC3T3-E1 細胞則是在第 3 天(圖 3-4)，生長速率會受靜磁場影響而變快，兩種細胞皆是在增生期(proliferation stage)受到影響而有變化。此外，MG63 細胞和 MC3T3-E1 細胞的生長速率的影響，皆只有在特定的低細胞濃度時，才会有較明顯的表現。當細胞增生達到全滿時，靜磁場影響細胞生長的現象就會消失。同樣的，2002 年 Diniz 等人也指出脈衝式電磁場只會影響早期骨母細胞的增生速度，而不會增加晚期骨母細胞的全部數量。

靜磁場對細胞的作用，有研究認為是影響到細胞膜上的磷脂質成份，並使其排列方向改變，這會使脂質雙層和鑲嵌其上的蛋白質分子受到外力而扭曲變形(Luben, 1991)。當培養於聚乳酸試片的細胞密度太大時，因為細胞間的接觸作用力也增加，結果有可能遮蔽靜磁場的作用力，而培養於聚乳酸試片的細胞密度太小時，其生長情況會因為聚乳酸的疏水性和親和力不佳，而影響細胞貼附和生長速率，這說明為何培養於聚乳酸試片上的 MG63 細胞(圖 3-1

至圖 3-3)和 MC3T3-E1 細胞(圖 3-4 至圖 3-6)，受靜磁場的影響會與初始培養細胞密度有關。

2000 年 Lo 等人研究不同堅硬程度的基質對細胞生長移動的影響，實驗發現 3T3 纖維母細胞會從較軟的基質移動到較硬的基質，但當細胞由較硬的基質移動到較軟的基質時，會沿著交接邊緣轉向，而不通過，這表示力學環境的因素會影響細胞的行為。而這研究也指出，如果初始細胞培養濃度較高的時候，細胞和細胞間的接觸力量會使的細胞受到材料機械性質的影響變的不明顯。類似的情形也可在我們的實驗中觀察到，在初始細胞培養濃度較高時，似乎細胞間的接觸或推擠力量，會大過於物理性的刺激，使得細胞生長速率不會有變化。2006 年 Huang 等人亦發現靜磁場抑制細胞生長速率只會在特定的培養密度時出現，且具有暴露劑量相關(dose dependence)的特性，此結果與我們的研究結果一致。

最近幾年來，物理性的刺激逐漸受到重視，並且應用到組織工程上。其中，有研究將脈衝式電磁場應用於組織工程學上，他們將 SAOS-2 似骨母細胞培養在聚氨酯(polyurethane)合成的細胞支架(scaffold)裡，有脈衝式電磁場刺激的組別，細胞數目會明顯增多而且呈現多層細胞的生長，和細胞數也達到控制組的兩倍，另外，細胞分化因子 decorin、Type I collagen 和 osteocalcin 的表現在脈衝式電磁場刺激下，明顯比未刺激組表現更多。由此實驗結果推論，脈衝式電磁場似乎會促進鈣化基質貼附於聚氨酯細胞支架上，進一步增強材

料的生物相容性(Fassina et al. 2006)。2005 年 Chang 等學者將低強度超音波應用於促進聚乳酸-甘醇酸上(PLGA)導管內神經細胞生長，在許旺細胞實驗中，也發現到接受低強度超音波的刺激後，可以減少培養於導管內的許旺細胞凋亡，並同時增加了其生長的速率。其原因推測超音波有可能會促進細胞膜的流動性和彈性，而提高許旺細胞的存活率(Chang et al., 2005)。2005 年 Kim 等人則利用靜磁場促進似骨母細胞(TE-85)貼附於鈦金屬片表面上，他們先將鈦金屬片置於具有 fibronectin 的溶液中，並且放置於不同強度的靜磁場上，隔夜後，結果發現靜磁場並不會改變 fibronectin 吸附於鈦金屬片表面上的量，然而，在細胞貼附和細胞生長實驗中，靜磁場卻可以促進 TE-85 細胞的貼附能力和細胞生長速率。作者提到低強度靜磁場的生物效應機制，可能是經由改變 fibronectin 的結構和方向性，或者是影響細胞訊息傳遞路線，如鈣離子。以上這些研究得知，物理性刺激逐漸受到重視。至於促進似骨母細胞生長的作用機制，還需要進一步的研究來證明。

骨母前驅細胞的基因表現主要可以分為三個時期：增殖期、細胞外基質成熟期、礦化期。一開始活化的增生細胞表現細胞週期(histone)及細胞生長(*c-myc*, *c-fos*)有關的調控基因，並開始製造第一型膠原蛋白、fibronectin、TGF-1。接著，細胞增生減少而與細胞外基質成熟期有關的基因便會開始表現。一旦細胞增殖被抑制，細胞會開始將富含鹼性磷酸酶的基質小泡(matrix vesicle)分泌至細胞外形成骨基質(bone matrix)，使得骨母前驅細胞分化成骨母

細胞所具有的特異性標記，如鹼性磷酸酶活性馬上增加十倍 (Stein et al., 1990)。所以鹼性磷酸酶活性是骨母細胞早期分化的一個標記，

本研究發現培養於聚乳酸試片上的 MG63 細胞，在受到靜磁場暴露 1 天後，其鹼性磷酸酶活性達到最大值(圖 3-1)，而且比控制組來的高。另外，在受到靜磁場暴露第 2 天和第 3 天時，培養於聚乳酸試片上之 MG63 細胞的生長速率，會比未暴露組來的低，再加上電子顯微鏡的影像證據，我們初步推論認為培養於聚乳酸試片上的 MG63 細胞，在受到靜磁場刺激下，雖然細胞生長速率會降低，同時也顯示 MG63 細胞是走向分化成熟的階段。

培養於聚乳酸試片上的 MC3T3-E1 細胞，在受到靜磁場刺激後，表現出來的特徵與 MG63 細胞並不同，MC3T3-E1 細胞在受到靜磁場暴露第 3 天和第 4 天時，鹼性磷酸酶活性會比未暴露組來的低(圖 4-2)，而且 MTT 實驗顯示受靜磁場暴露的 MC3T3-E1 細胞，其細胞數目反而是增加的。由結果得知，不一樣的細胞在受到物理性刺激後，會有不同的表現，有的可能會趨向分化，或者是促進細胞增殖。而由於 MG63 是屬於骨母細胞早期的模型，MC3T3-E1 則為較成熟的細胞，因此我們認為靜磁場對骨母細胞的影響與細胞成熟程度有很大的關係。對於較不成熟的細胞，SMF 會促使其走向分化，而對於較成熟的細胞，SMF 則促使其細胞的生長。

Fukada 在 1995 年提到聚乳酸材料具有壓電性質，因此可經由電刺激或機械外力來改變聚乳酸的材料性質。在這研究中，為了釐清聚乳酸生物材料是

否會受到靜磁場的影響，本研究也分析聚乳酸材料的表面粗糙度和表面接觸角。結果顯示以預先暴露 SMF 與未暴露組的 PLLA 基質，並沒有差異，這也說明了靜磁場促進似骨母細胞生長於聚乳酸試片上的行為，並不是經由改變聚乳酸材料的特性所造成的。

基於本研究之體外細胞實驗的結果發現，在靜磁場所造成的機械外力刺激下，培養於聚乳酸試片上的似骨母細胞，依其分化程度的不同，而有可能促進其分化的程度或增加其生長的速度，即靜磁場對似骨母細胞生長於聚乳酸表面上的作用是正面的。



第六章、結論與建議

本研究將靜磁場應用到生物材料與細胞生長之間的關係，來探討培養於聚乳酸試片上的似骨母細胞，在受到靜磁場刺激後，是否可以加速似骨母細胞的生長或成熟化。結果顯示不同似骨母細胞受到機械性的刺激，會有不同的表現，有可能趨向分化，或者是促進增殖。在掃描式電子顯微鏡觀察實驗中，MG63 和 MC3T3-E1 細胞在受到靜磁場暴露後，MG63 會表現較多的細胞外基質和突觸，而 MC3T3-E1 會表現較多的細胞外基質。這些特徵皆可以增加似骨母細胞在聚乳酸試片上的貼附能力。由於 MG63 是屬於骨母細胞早期的模型，而 MC3T3-E1 則為較成熟的細胞，由 MTT 實驗和鹼性磷酸酶實驗中推論，對於較不成熟的似骨母細胞，SMF 會促使其走向分化，而對於較成熟的似骨母細胞，SMF 則促使其細胞的生長。因此，靜磁場對似骨母細胞生長於聚乳酸表面上的作用是正面的，而且會因為似骨母細胞的成熟度不同，而會有不同的影響。

期望本研究成果，未來有可能應用於醫學組織工程上，不只可以提高聚乳酸材料當作骨質替代物的成功率，更可以加快骨母細胞生長分化。至於靜磁場作用的機轉，則有可能與機械力傳導路徑有關，靜磁場可能先影響到細胞膜流動性，啟動了傳導路徑，而產生了我們觀查到的現象。至於詳細的原因，仍需更進一步的實驗來證明。

第七章、参考文献

- Ai M, Shiau YY. Magnetic applications in clinical dentistry. In Ai M, Shiau YY editors: New Magnetic applications in clinical dentistry. Osaka Japan, Quintessence Co. 2004 pp:22-27.**
- Barbanti SH, Santos AR Jr, Zavaglia CA, Duek EA. Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: in vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture. J Mater Sci Mater Med, 15: 1315-1321, 2004.**
- Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. Biomaterials, 27: 596-606, 2006.**
- Bassett CA. Beneficial effects of electromagnetic fields. J Cell Biochem, 51: 387-393, 1993.**
- Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)₂D₃. J Biomed Mater Res, 39: 77-85, 1998.**
- Bruce GK, Howlett CR, Huckstep RL. Effect of a static magnetic field on fracture healing in a rabbit radius: preliminary results. Clin Orthop Relat Res, 222: 300-306, 1987.**
- Chang CJ, Hsu SH, Lin FT, Chang H, Chang CS. Low-intensity-ultrasound-accelerated nerve regeneration using cell-seeded poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) conduits: an in vivo and in vitro study. J Biomed Mater Res B, 75: 99-107, 2005.**

- Clark CB, McKnight NL, Frangos JA. Strain and strain rate activation of G proteins in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 299: 258-262, 2002.**
- Coppolino MG, Dedhar S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol*, 32: 171-188, 2000.**
- Darendeliler MA, Darendeliler A, Mandurino M. Clinical application of magnets in orthodontics and biological implications: a review. *Eur J Orthod*, 19: 431-442, 1997.**
- Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics*, 23: 398-405, 2002.**
- den Braber ET, de Ruijter JE, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA. Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed Mater Res*, 40: 291–300, 1998.**
- Fassina L, Visai L, Benazzo F, Benedetti L, Calligaro A, De Angelis MG, Farina A, Maliardi V, Magenes G. Effects of electromagnetic stimulation on calcified matrix production by SAOS-2 cells over a polyurethane porous scaffold. *Tissue Eng*, 12: 1985-1999, 2006.**
- Fitzsimmon RJ, Ryaby JT, Magee FP, Baylink DJ. IGF-II receptor number is increased in TE-85 osteosarcoma cells by combined magnetic fields. *J Bone Miner Res*, 10: 812-819, 1995.**
- Fukada E. Piezoelectricity of biopolymers. *Biorheology*, 32: 593-609, 1995.**
- Garland DE, Moses B, Salyer W. Long-term follow-up of fracture nonunions treated with PEMFs. *Contemp Orthop*, 22: 295-302, 1991.**

- Gossling HR, Bernstein RA, Abbott J. Treatment of ununited tibial fracture: a comparison surgery and pulsed electromagnetic fields (PEMF). Orthop, 15: 711-719, 1992.**
- Gugala Z, Gogolewski S. The in vitro growth and activity of sheep osteoblasts on three-dimensional scaffolds from poly(L/DL-lactide) 80/20%. J Biomed Mater Res A, 75: 702-709, 2005.**
- Gugala Z, Gogolewski S. Attachment, growth, and activity of rat osteoblasts on polylactide membranes treated with various low-temperature radiofrequency plasmas. J Biomed Mater Res A, 76: 288-299, 2006.**
- Healy KE, Thomas CH, Rezania A, Kim JE, McKeown PJ, Lomb, Hockberger PE. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. Biomaterials, 17: 195–208, 1996.**
- Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. Endocrinol, 138: 3849-3858, 1997.**
- Huang HM, Lee SY, Yao WC, Lin CT, Yeh CY. Static magnetic fields up-regulate osteoblast maturity by affecting local differentiation factors. Clin Orthop Relat Res, 447: 201-208, 2006.**
- Ishaug SL, Yaszemski MJ, Bizios R, Mikos AG. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. J Biomed Mater Res, 28: 1445-1453, 1994.**
- Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. Biomaterials, 21: 2475–2490, 2000.**
- Javid N. The use of magnets in a maxillofacial prosthesis. J Prosth Dent, 25: 334-341, 1971.**

- Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. J Cell Biol, 120: 577-585, 1993.**
- Karp JM, Shoichet MS, Davies JE. Bone formation on two-dimensional (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds in vitro. J Biomed Mater Res A, 64: 388–396, 2003.**
- Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. J Biomed Mater Res A, 66: 247–259, 2003.**
- Kim HJ, Chang IT, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Jang JH. Effect of magnetic field on the fibronectin adsorption, cell attachment and proliferation on titanium surface. Clin Oral Implants Res, 16: 557-562, 2005.**
- Lieb E, Tessmar J, Hacker M, Fischbach C, Rose D, Blunk T, Mikos AG, Göpferich A, Schulz MB. Poly(D,L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers control adhesion and osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. Tissue Eng, 9: 71–84, 2003.**
- Liu HC, Lee IC, Wang JH, Yang SH, Young TH. Preparation of PLLA membranes with different morphologies for culture of MG63 Cells. Biomaterials, 25: 4047-4056, 2004.**
- Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Duerkov H, Dean DD. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local production. J Orthop Res, 18: 637-646, 2000.**
- Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophys J, 79: 144-152, 2000.**
- Luben RA. Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. Health Phys,**

61: 15-28, 1991.

Maddi A, Hai H, Ong ST, Sharp L, Harris M, Meghji S. Long wave ultrasound may enhance bone regeneration by altering OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. Bone, 39: 283-288, 2006.

Matsuzaka K, Walboomers XF, de Ruijter JE, Jansen JA. The effect of poly L-lactic acid with parallel surface microgroove on osteoblast-like cells in vitro. Biomaterials, 20: 1293–1301, 1999.

Matsuzaka K, Walboomers F, de Ruijter A, Jansen JA. Effect of microgrooved poly-l-lactic (PLA) surfaces on proliferation, cytoskeletal organization, and mineralized matrix formation of rat bone marrow cells. Clin Oral Implants Res, 11: 325-333, 2000.

Melissa AR, Anthony DW, Ivor RH. Magnets in prosthetic dentistry. J Prosth Dent, 86: 137-142, 2001.

Peake MA, Cooling LM, Magnay JL, Thomas PB, El Haj AJ. Selected contribution: regulatory pathways involved in mechanical induction of c-fos gene expression in bone cells. J Appl Physiol, 89: 2498-2507, 2000.

Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. J Bone Miner Res, 7: 683-692, 1992.

Rozema FR, Otten E, Bos RR, Boering G, van Willigen JD. Computer-aided optimization of choice and positioning of bone plates and screws used for internal fixation of mandibular fractures. Int J Oral Maxillofac Surg, 21: 373-377, 1992.

- Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. J Cell Biol, 96: 191-198, 1983.**
- Suh H, Hwang YS, Lee JE, Han CD, Park JC. Behavior of osteoblasts on a type I atelocollagen grafted ozone oxidized poly L-lactic acid membrane. Biomaterials, 22: 219-230, 2001.**
- Sollazzo V, Traina GC, DeMattei M, Pellati A, Pezzetti F, Caruso A. Response of human MG63 osteosarcoma cell line and human osteoblast-like cells to pulsed electromagnetic fields. Bioelectromagnetics, 18: 541-547, 1997.**
- Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J, 4: 3111-3123, 1990.**
- Stephansson SN, Byers BA, Garcia AJ. Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. Biomaterials, 23: 2527-2534, 2002.**
- Tengku BS, Joseph BK, Harbrow D, Taverne AAR, Symons AL. Effect of a static magnetic field on orthodontic tooth movement in the rat. Eur J Orthod, 22: 475-487, 2000.**
- Trock DH. Electromagnetic fields and magnets – investigational treatment for musculoskeletal discords. Rheum Dis Clin North Am, 26: 51-62, 2000.**
- Vert M, Schwach G, Engel R, Coudane J. Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers. J Control Release, 53: 85-92, 1998.**
- Walker LM, Publicover SJ, Preston MR, Said Ahmed MA, El Haj AJ. Calcium-channel activation and matrix protein upregulation in bone cells**

- in response to mechanical strain. J Cell Biochem, 79: 648-661, 2000.**
- Wang JH, Thampatty BP. An introductory review of cell mechanobiology. Biomech Model Mechanobiol, 5: 1-16, 2006.**
- Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces. J Biomed Mater Res, 49: 362–368, 2000.**
- Yamamoto Y, Ohsaki Y, Goto T, Nakasima A, Iijima T. Effects of static magnetic fields on bone formation in rat osteoblast cultures. J Dent Res, 82: 962-966, 2003.**
- Yang J, Shi GX, Bei JZ, Wang SG, Cao YL, Shang QX, Yang GG, Wang WJ. Fabrication and surface modification of macroporous poly(L- lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. J Biomed Mater Res, 62: 438–446, 2002.**
- Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. Biomaterials, 26: 1837–1847, 2005.**

附錄

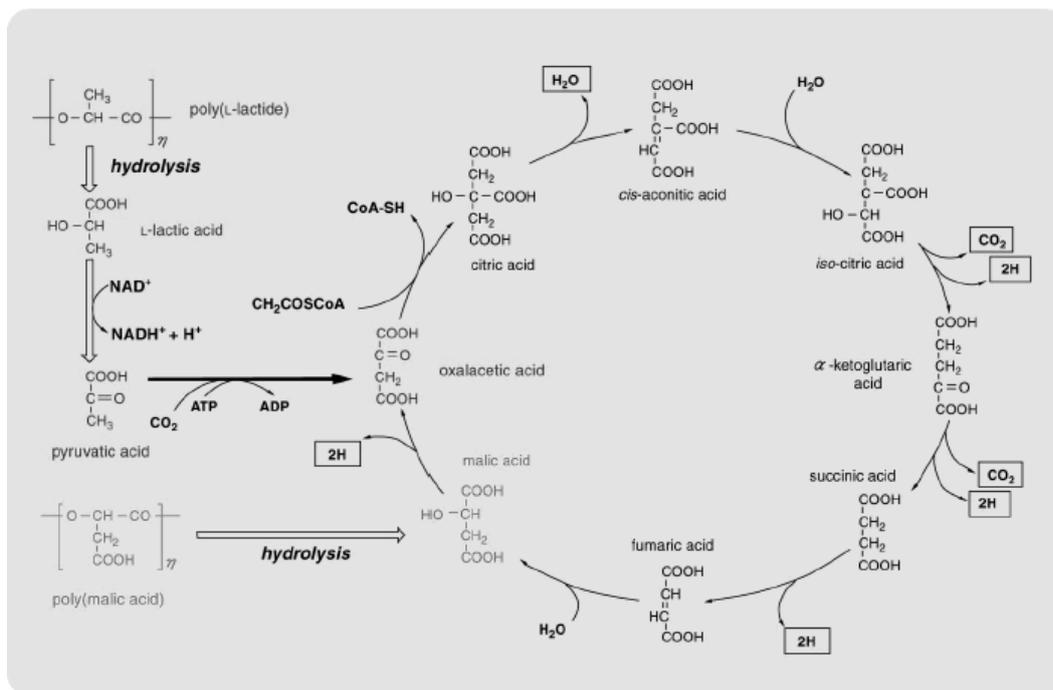


圖 1-1: PLA 在體內的降解，會經水解去酯作用(hydrolytic deesterfication)變成乳酸，乳酸可藉由乳酸脫氫酵素(lactate dehydrogenase)的催化而氧化成焦葡萄糖酸鹽(pyruvate)，然後焦葡萄糖酸鹽可合成葡萄糖，或經檸檬酸循環代謝成水或二氧化碳，再由肺或腎排出。

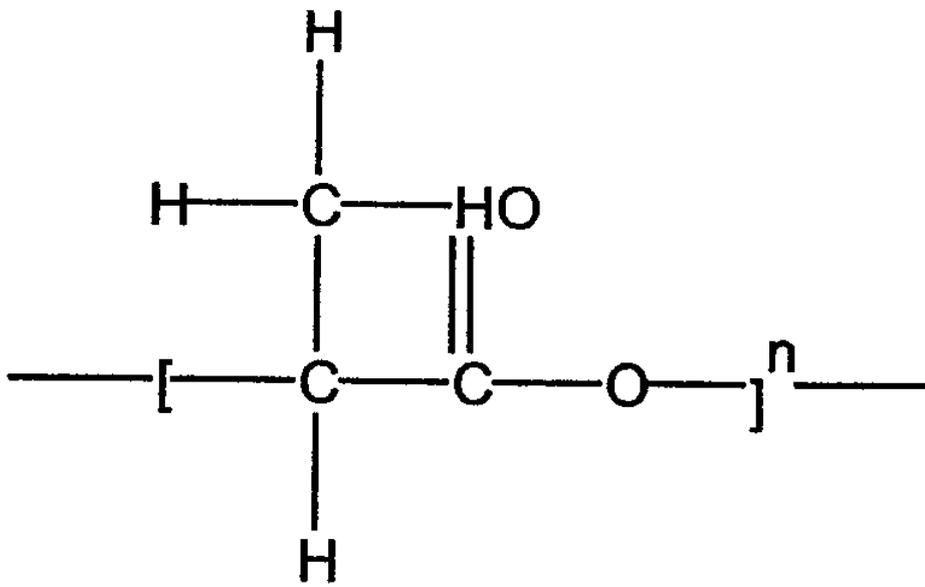


圖 1-2: L-form 的 PLLA





圖 1-3: 脈衝式電磁波機器，一種非侵入性促進骨頭成長及癒合之儀器。



圖 1-4：醫學用低強度超音波儀器。

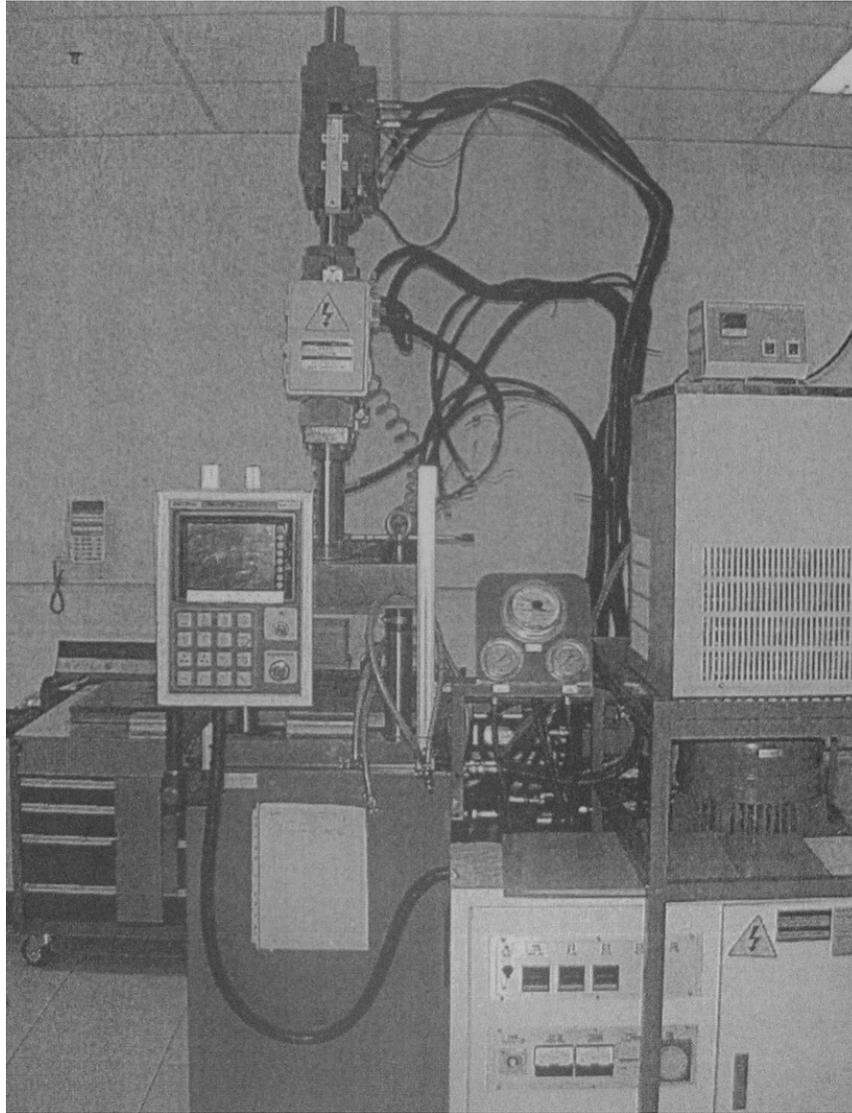


圖 1-5：合成本研究聚乳酸試片所使用的射出成型機。

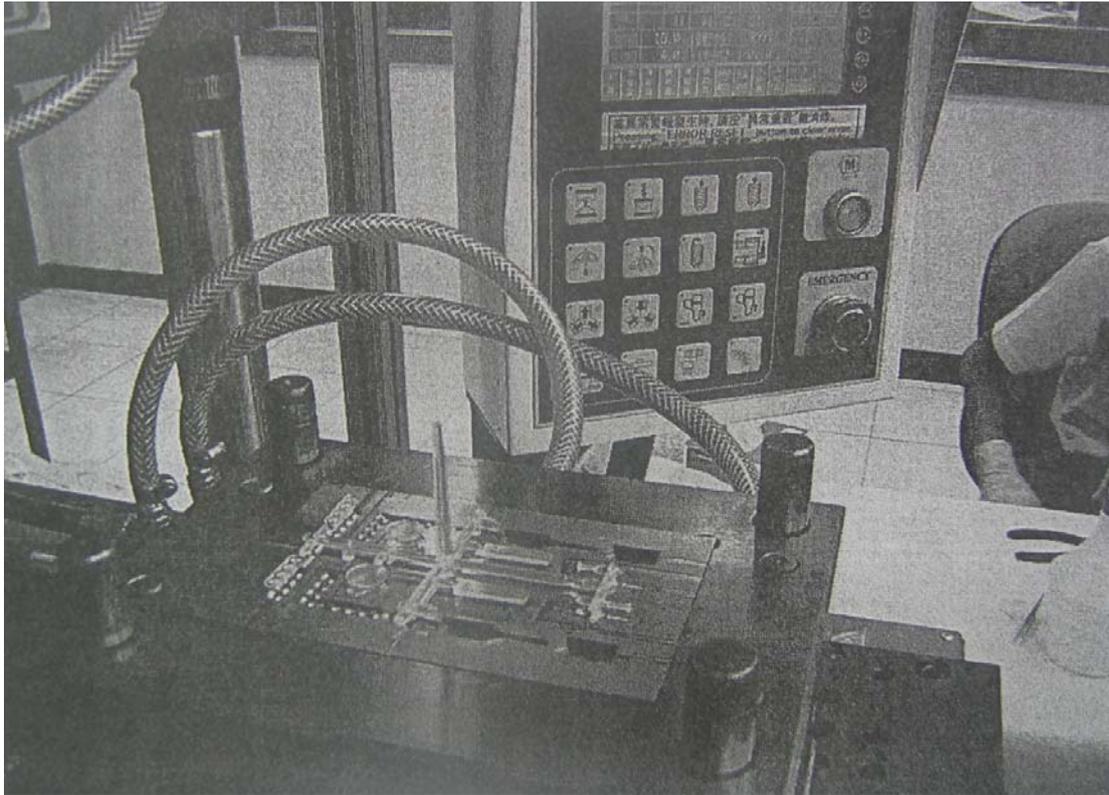


圖 1-6:合成本研究聚乳酸所使用之射出模具

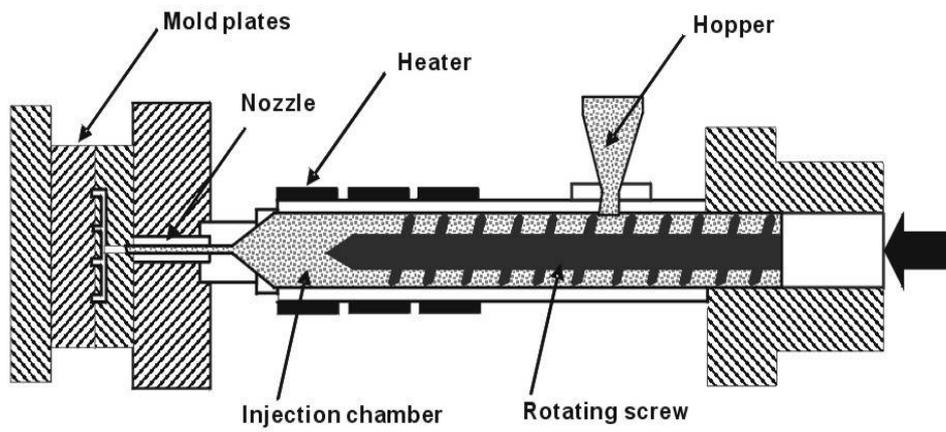


圖 1-7:合成本研究聚乳酸所使用之自動射出模具之說明圖

Zone	Barrel temperature setting, (°C)
Feed throat	25
Feed section	170
Compression section	175
Metering section	180
Hot runner	185
Nozzle tips	185

圖 1-8:自動射出成型機器各處的溫度表示



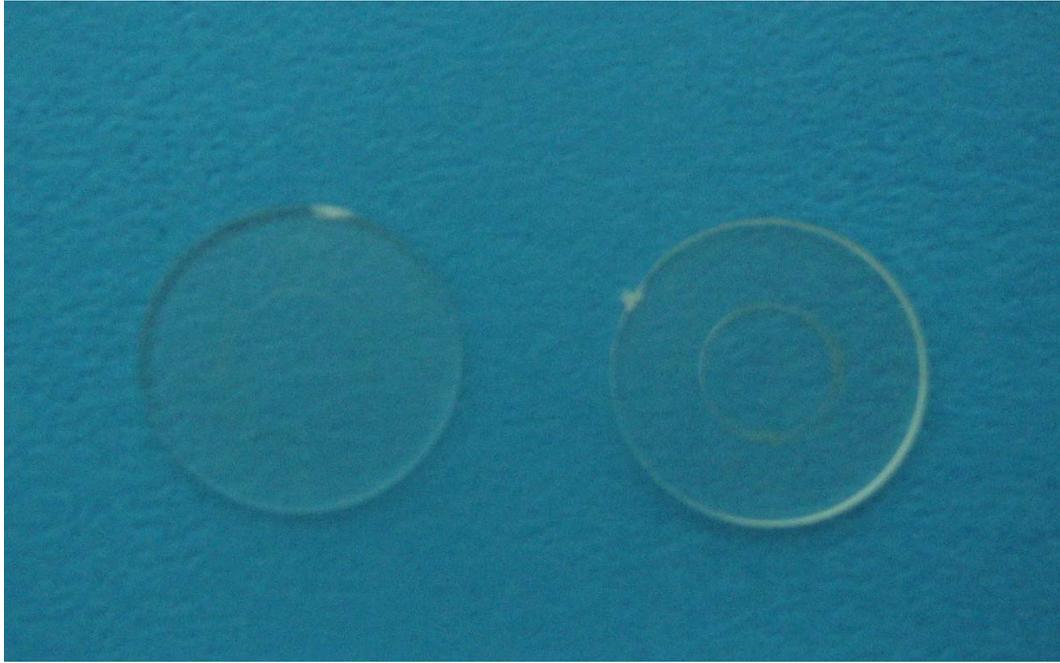


圖 1-9：本研究所使用的聚乳酸試片



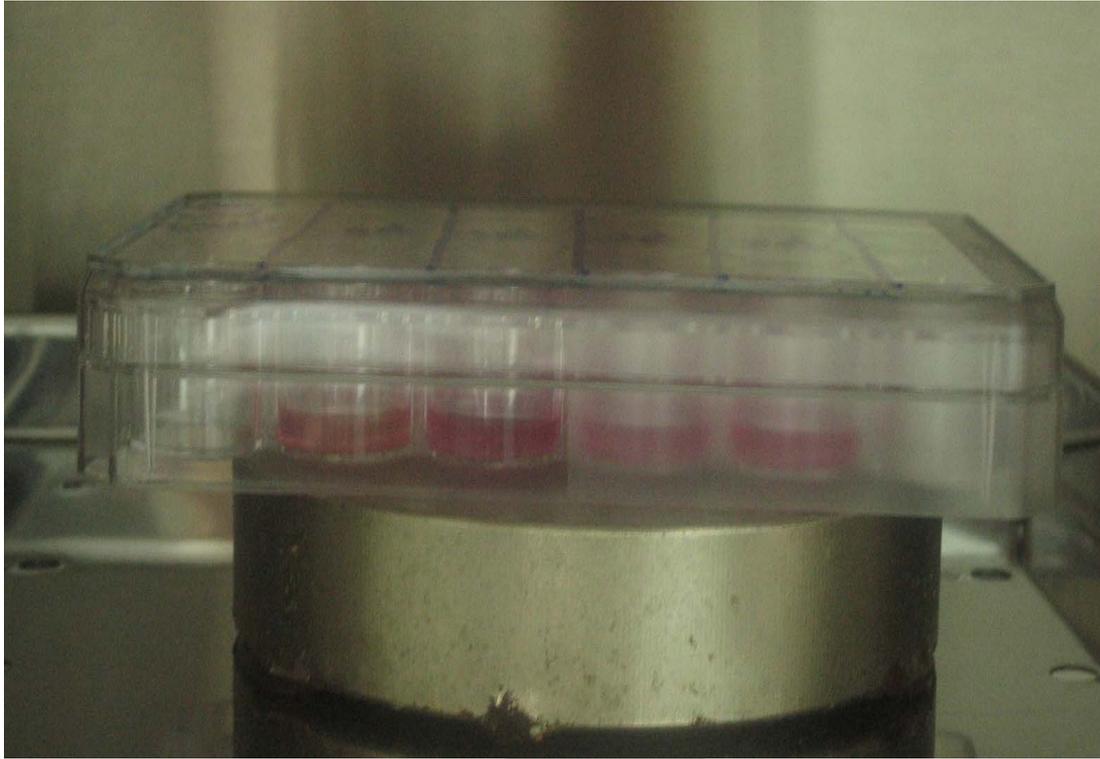


圖 1-10: 本研究實驗時，將 MG63 似骨母細胞和 MC3T3-E1 似骨母細胞培養於 24 孔盤內的聚乳酸試片上，再暴露於靜磁場上。

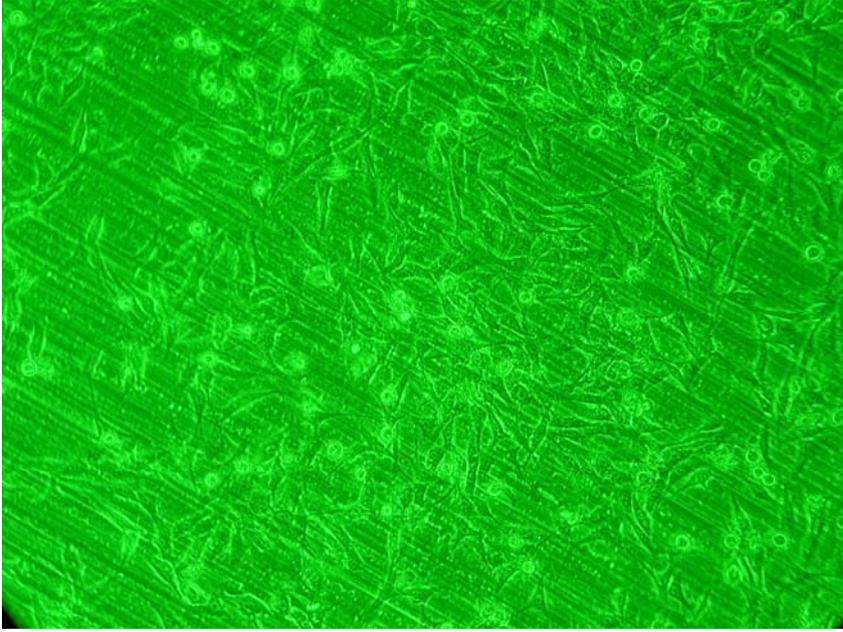


圖 1-11：培養 MG63 細胞於聚乳酸試片上。

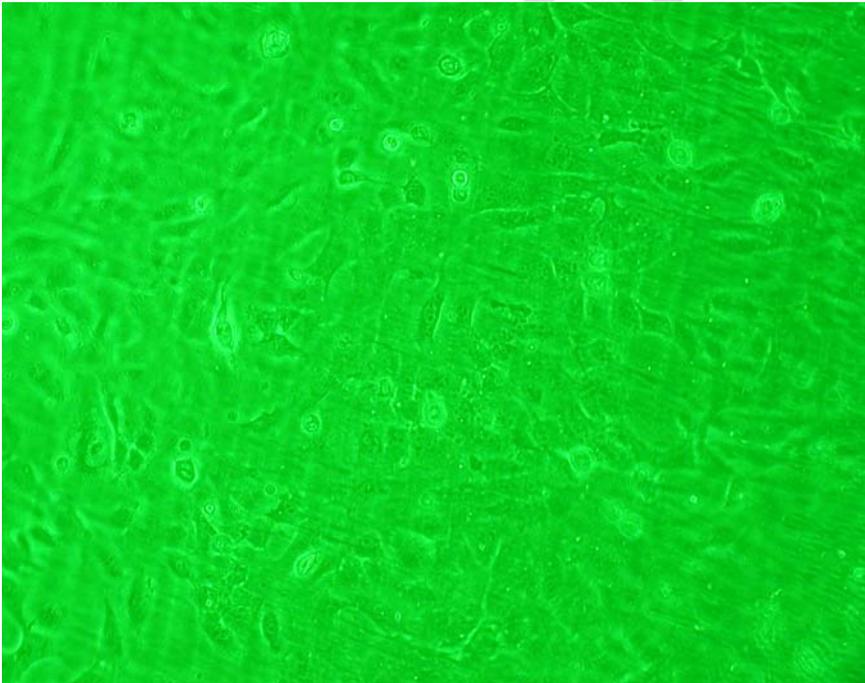


圖 1-12：培養 MC3T3-E1 細胞於聚乳酸試片上。

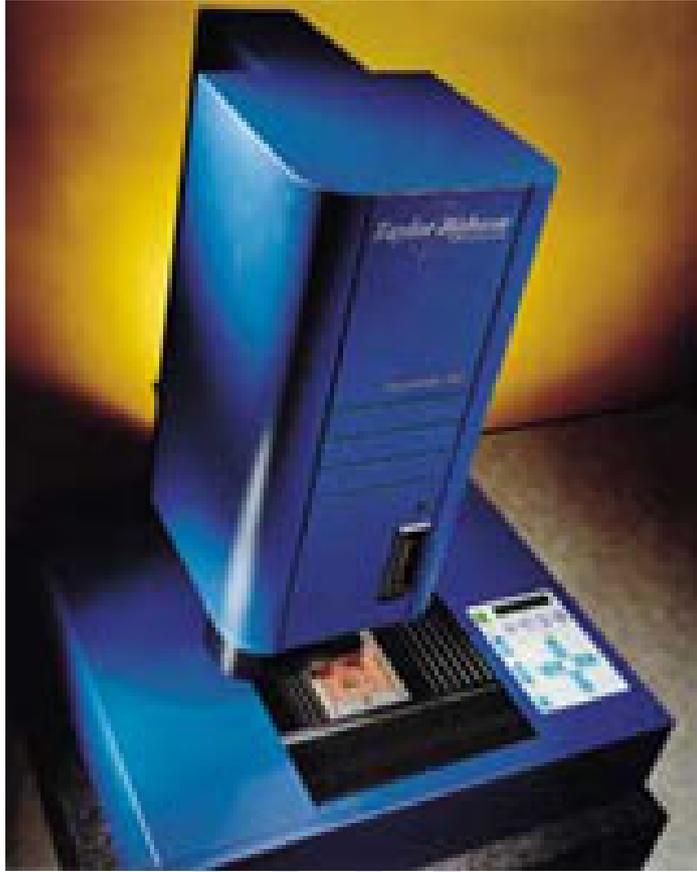


圖 1-13：表面粗超度測量儀(TalyScan 150;Taylor/Hobson Ltd., Leicester, GB)。

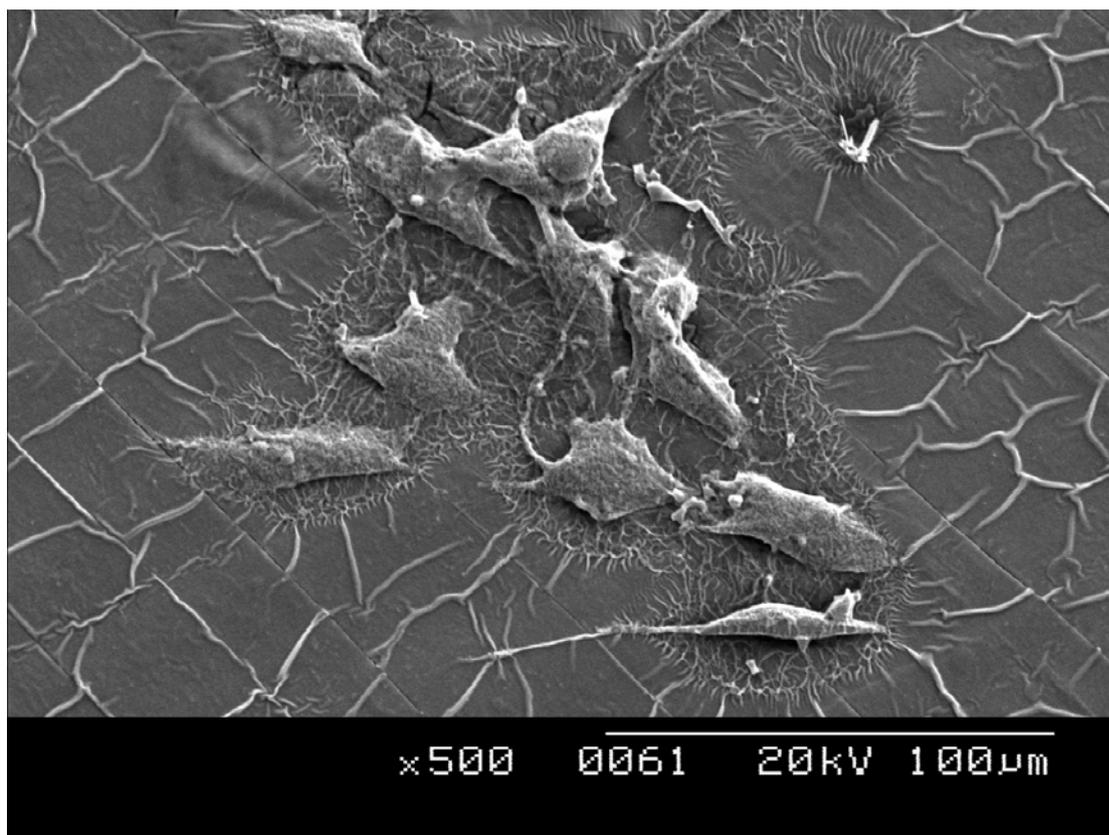


圖 2-1: 控制組 MG63 細胞生長於聚乳酸試片上的情形，在第 1 天時細胞貼附良好，和觀察到 MG63 細胞分泌細胞外基質，並且表現出梭狀與單層的生長型態。

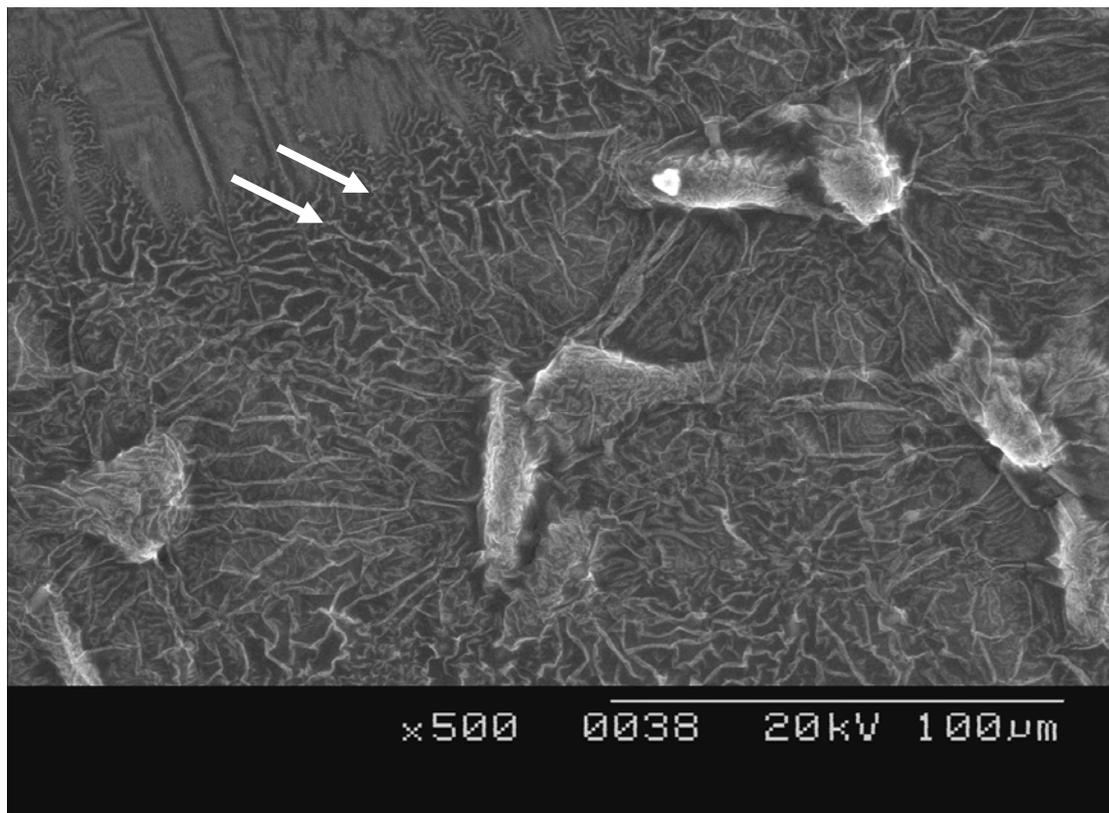


圖 2-2: 生長於聚乳酸試片上的 MG63 細胞，在受到靜磁場暴露 1 天後，細胞貼附情況良好，並且觀察到 MG63 細胞表現細胞外基質的情形，明顯比控制組來的多(白色箭頭處)。

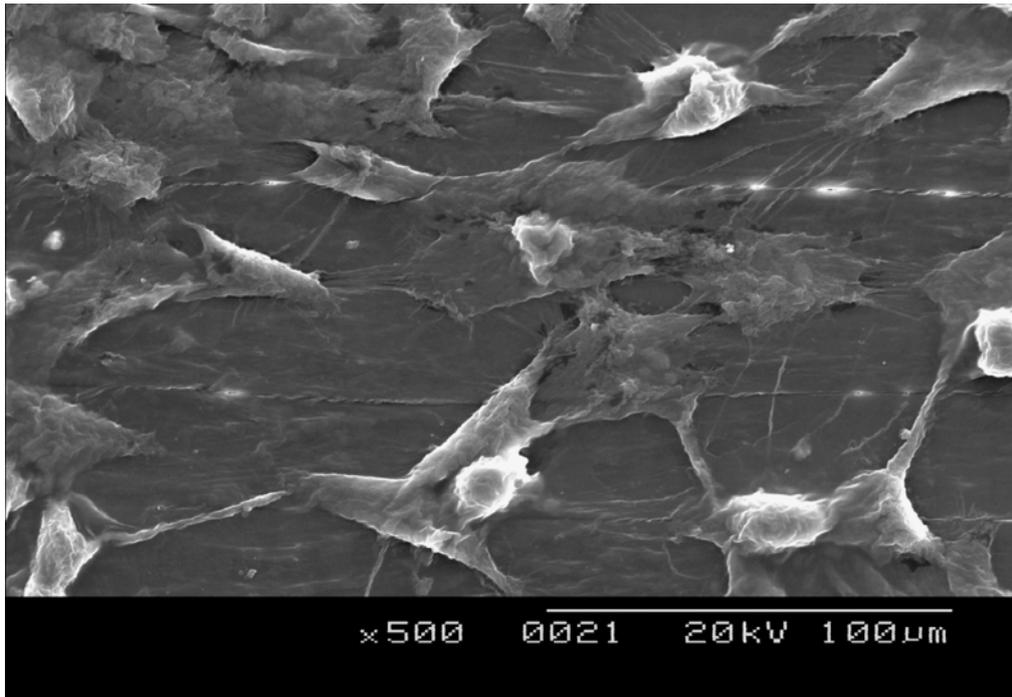


圖 2-3: 控制組 MG63 細胞在第 3 天時，表現出單層扁平的型態，並未見到明顯的突觸。

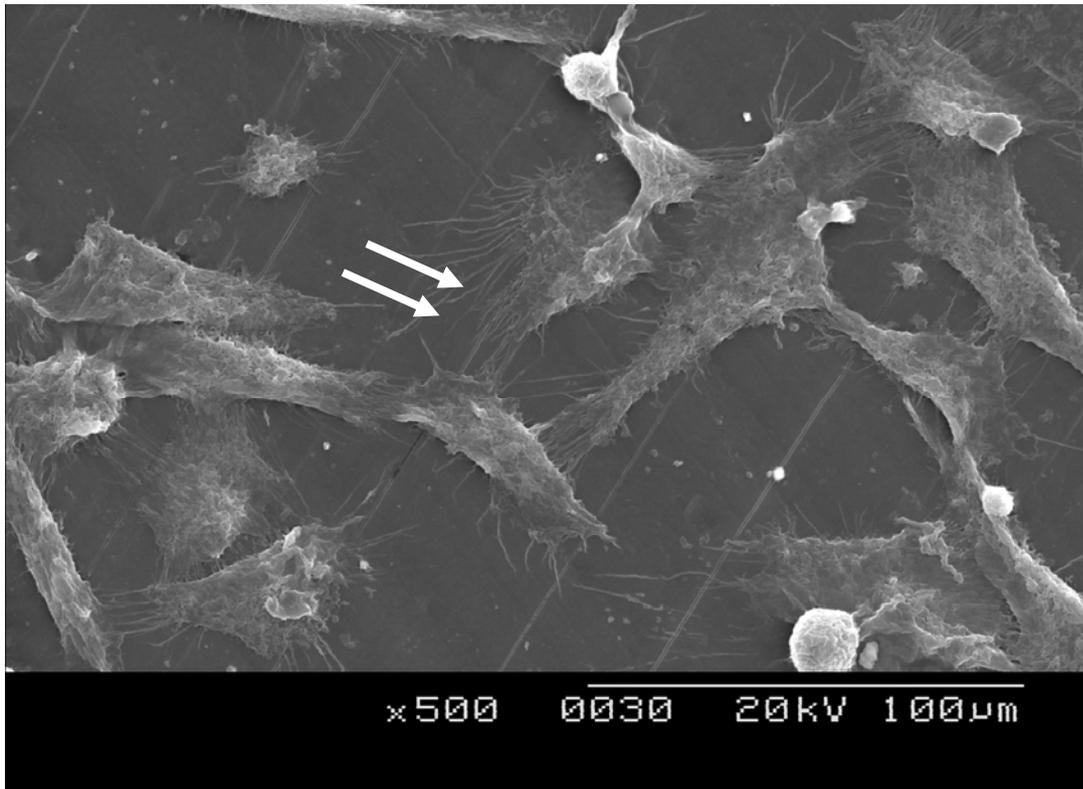


圖 2-4: 受靜磁場暴露 MG63 細胞生長於聚乳酸試片上的情形，在第 3 天時細胞貼附良好，而且可以見到細胞周圍有明顯的突觸產生。

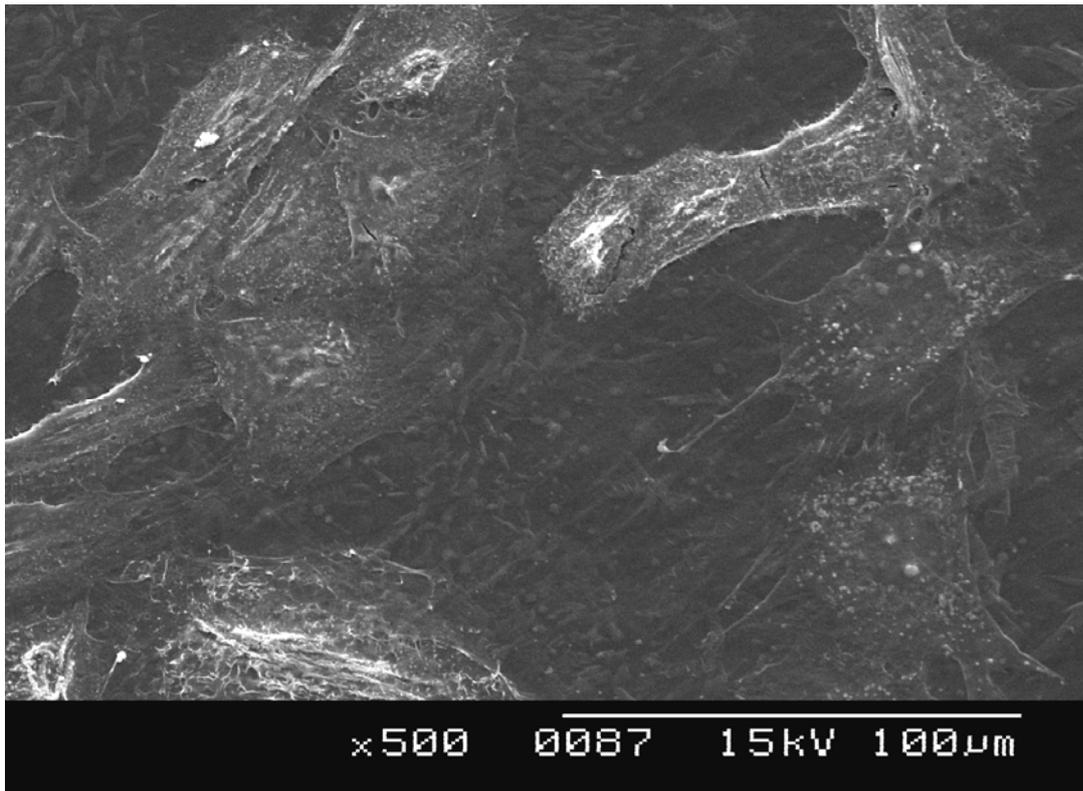


圖 2-5: 控制組 MC3T3-E1 細胞生長於聚乳酸試片上的情形，在第 1 天時，細胞貼附情況良好，以及觀察到 MC3T3-E1 細胞周圍的細胞外基質，和表現出梭狀與單層的型態。

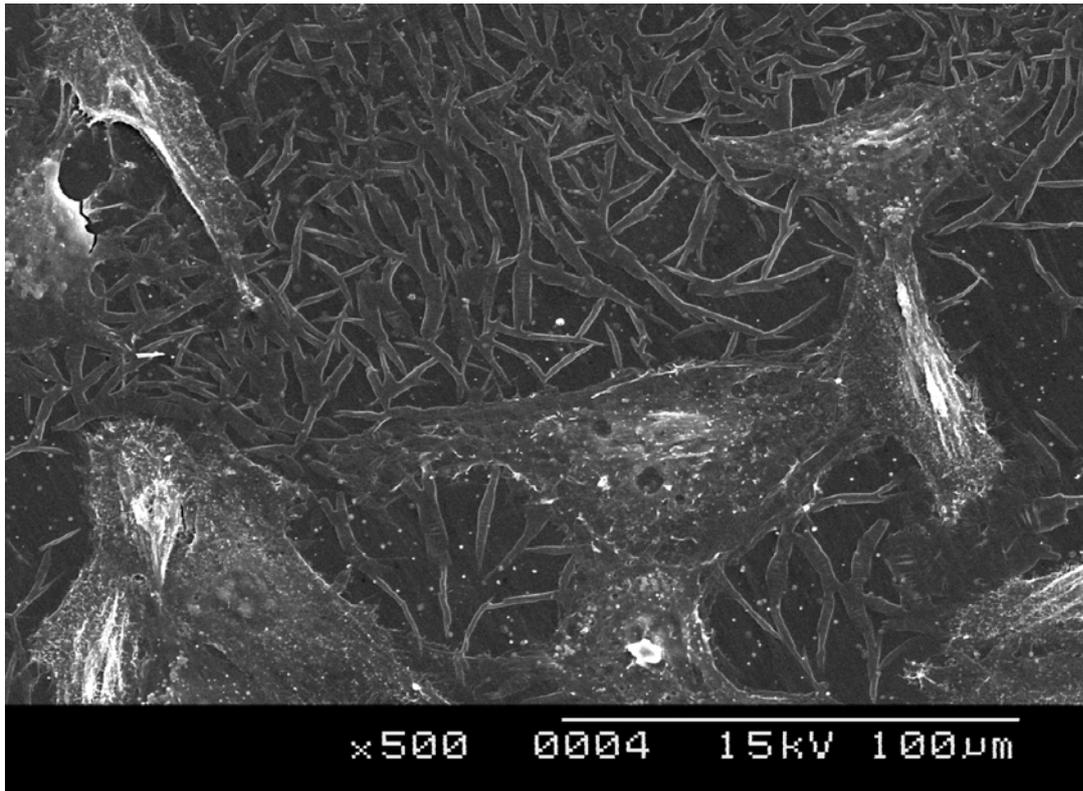


圖 2-6: MC3T3-E1 細胞在靜磁場暴露 1 天後，細胞周圍有細胞外基質和類似
膠原蛋白的分泌，明顯比未暴露組來的多。

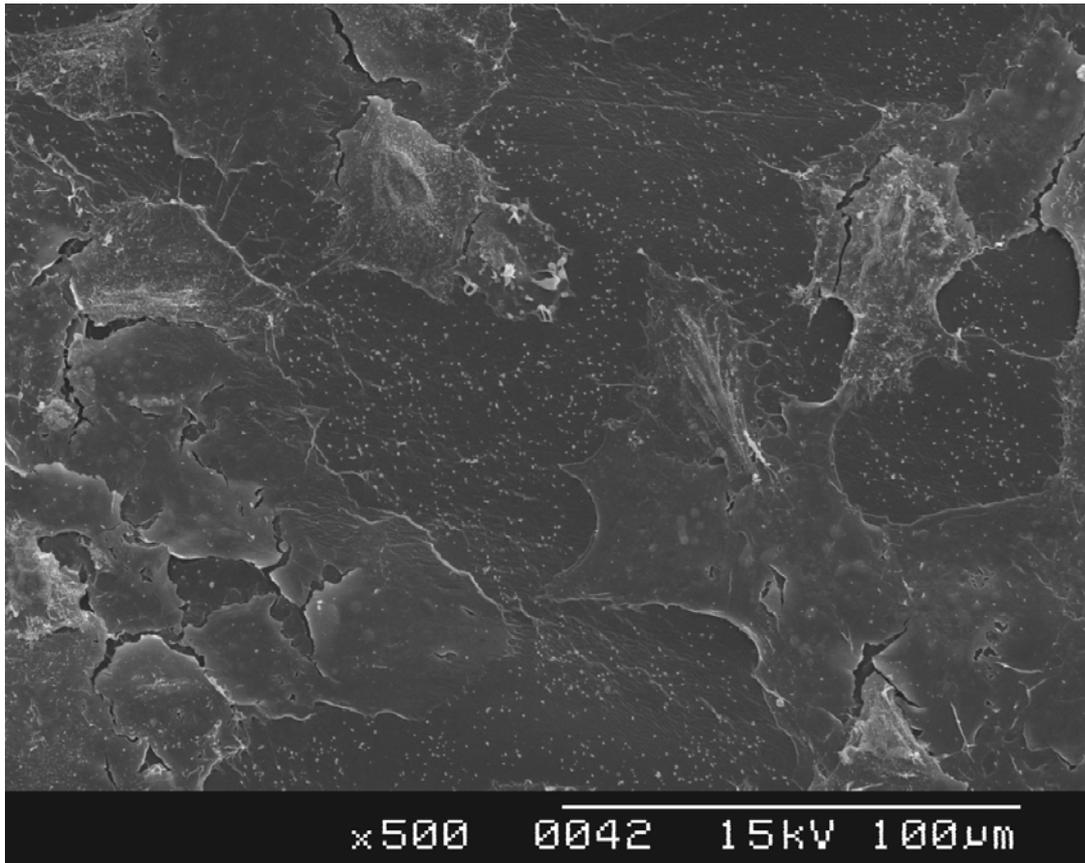


圖 2-7: 未暴露組 MC3T3-E1 在培養 2 天後，細胞還是呈現扁平 and 單層的形態，而且細胞周圍分泌更多類似膠原蛋白的顆粒。

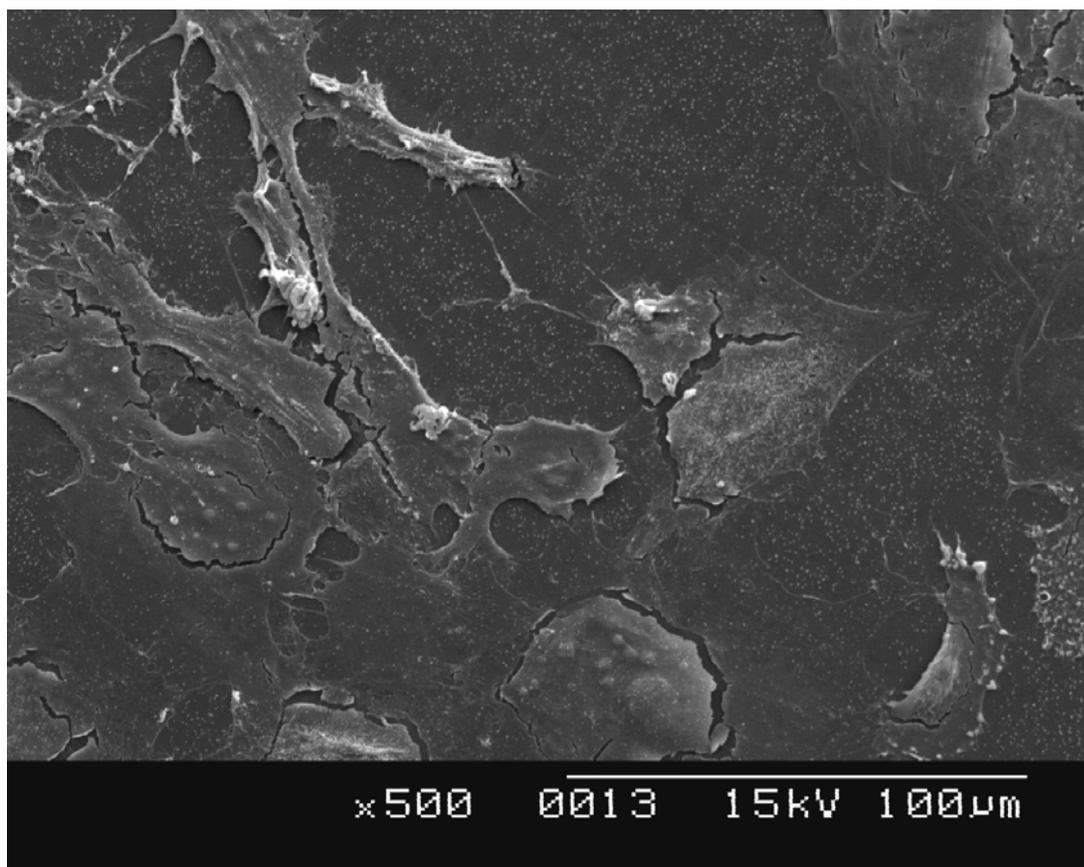


圖 2-8: MC3T3-E1 細胞於靜磁場暴露 2 天後，細胞呈現扁平 and 單層的型態，而且細胞周圍分泌更多類似膠原蛋白的顆粒。

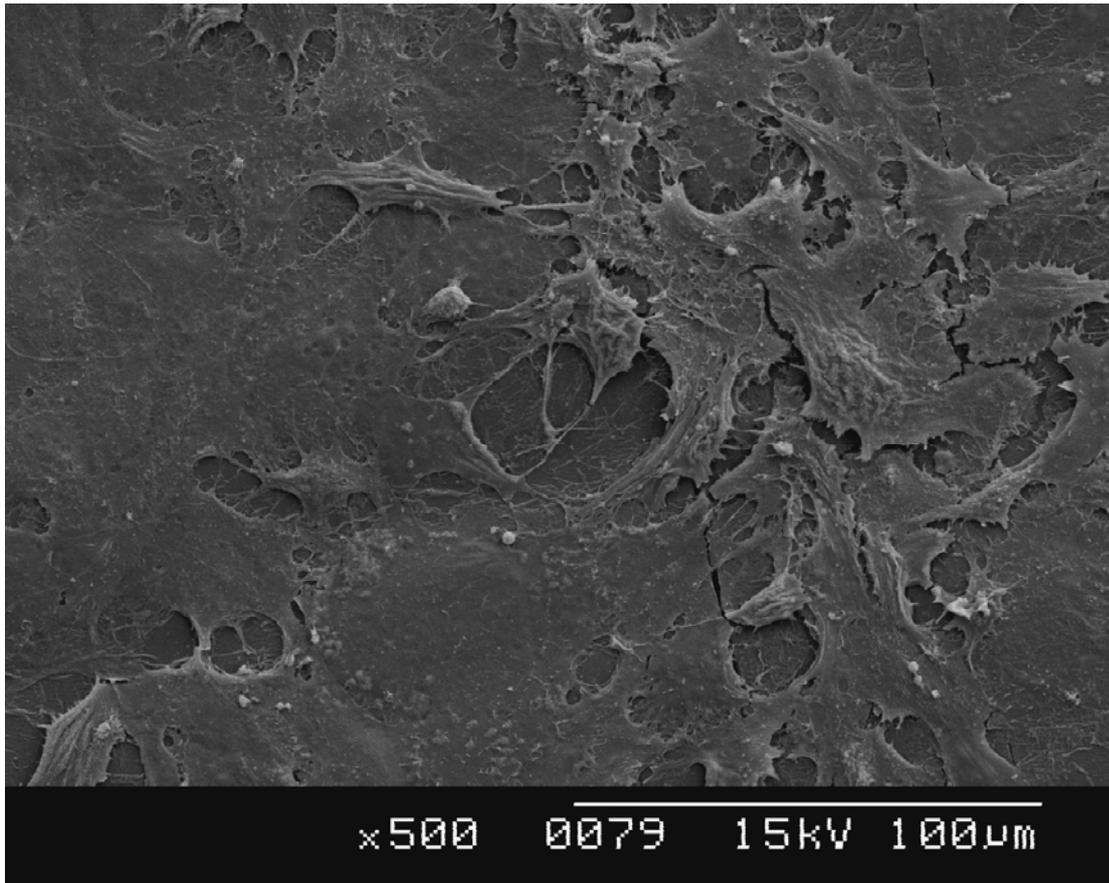


圖 2-9:未暴露組 MC3T3-E1 在培養 3 天後，細胞開始呈現立方體和多層的型態，而且細胞周圍的突觸明顯增加。

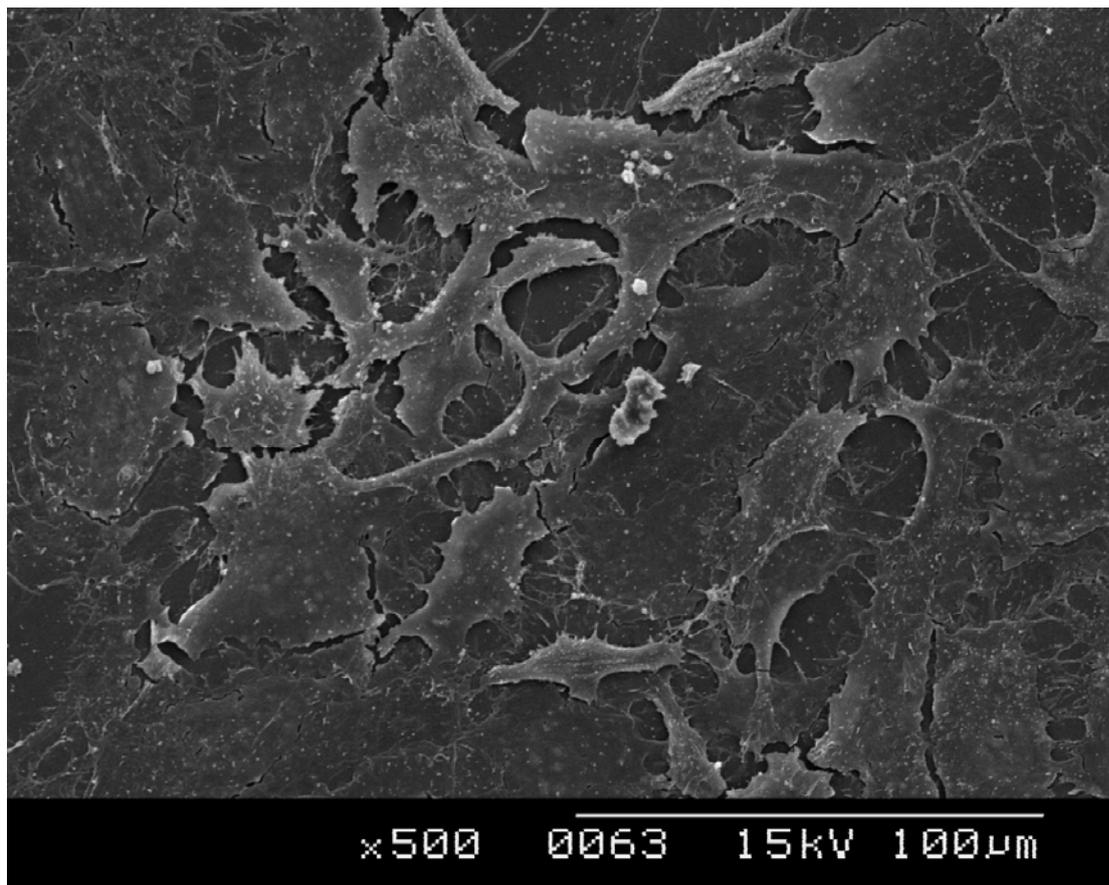


圖 2-10: MC3T3-E1 細胞於靜磁場暴露 3 天後，細胞開始呈現立方體和多層的型態，而且細胞周圍的突觸明顯增加。

。

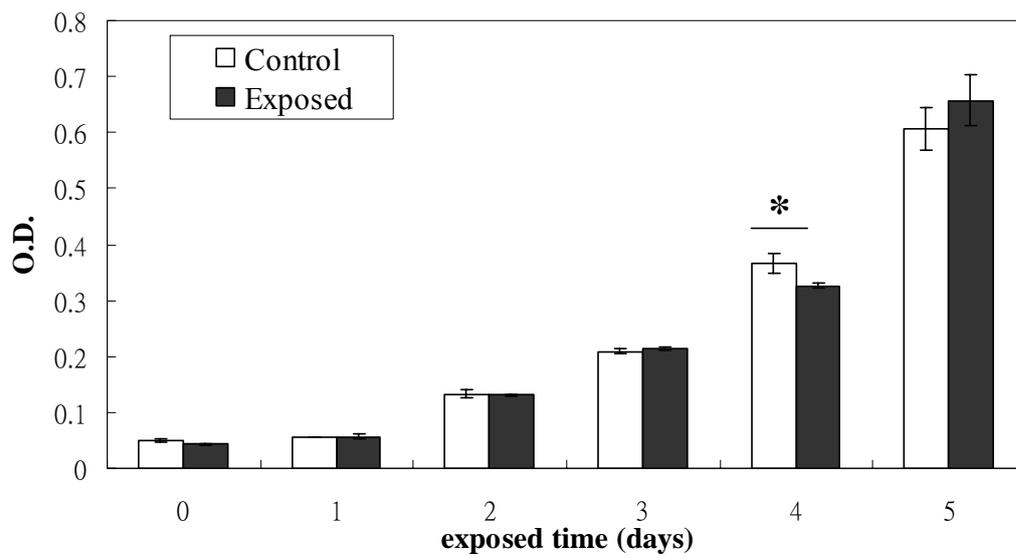


圖 3-1: MG63 細胞於聚乳酸試片上以 1×10^4 cells/ml 的初始培養下，受靜磁場暴露組於第 4 天時，其 MTT 值明顯與未暴露組有明顯的差異。

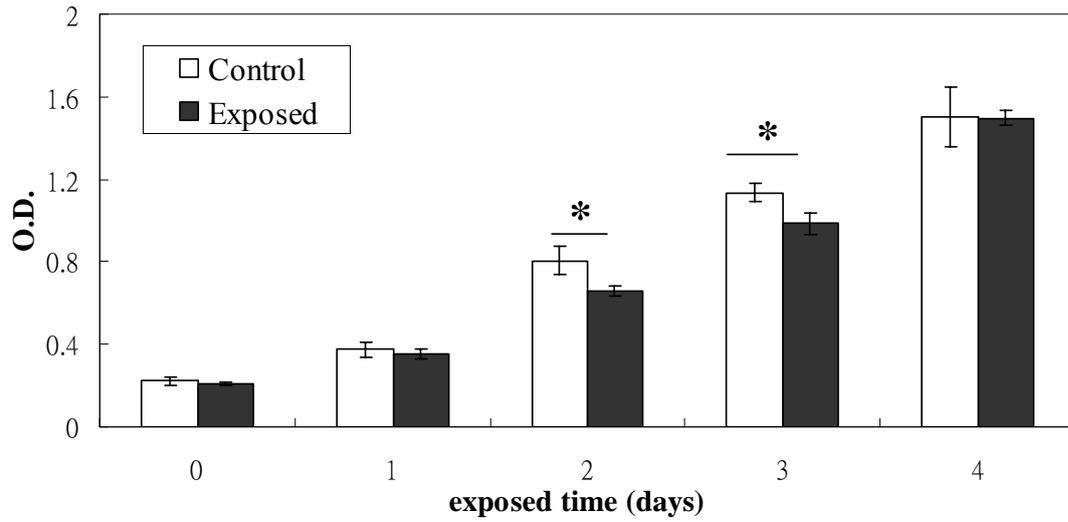


圖 3-2: MG63 細胞於聚乳酸試片上以 2.5×10^4 cells/ml 的初始培養下，受靜磁場暴露組於第 2 天和第 3 天時，其 MTT 值明顯與未暴露組有明顯的差異。

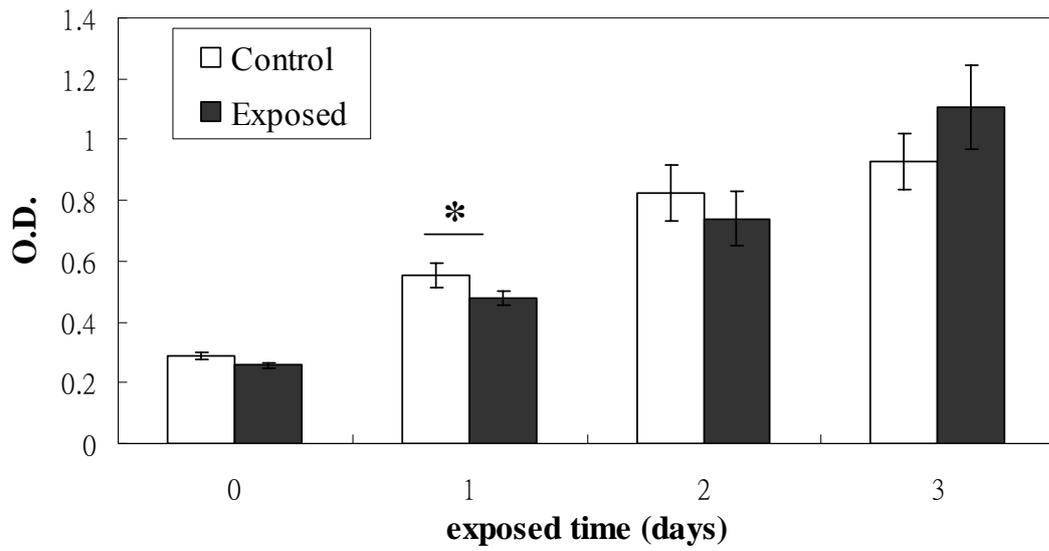


圖 3-3: MG63 細胞於聚乳酸試片上以 5×10^4 cells/ml 的初始培養下，受靜磁場暴露組於第 1 天時，其 MTT 值明顯與未暴露組有明顯的差異。

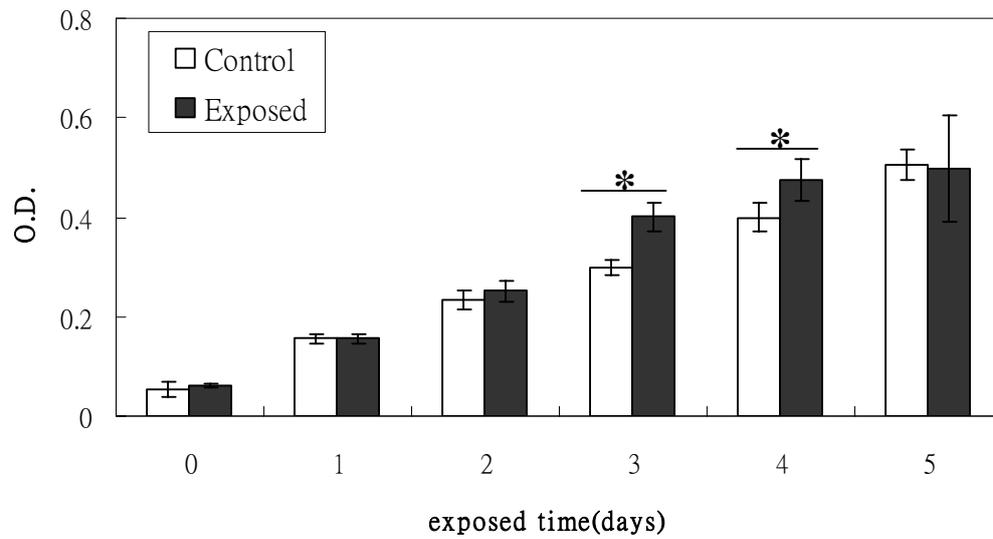


圖 3-4: MC3T3-E1 細胞於聚乳酸試片上以 1×10^4 cells/ml 的初始培養下，受靜磁場暴露組於第 3 天和第 4 天時，其 MTT 值明顯與未暴露組有明顯的差異，生長速率明顯增快。

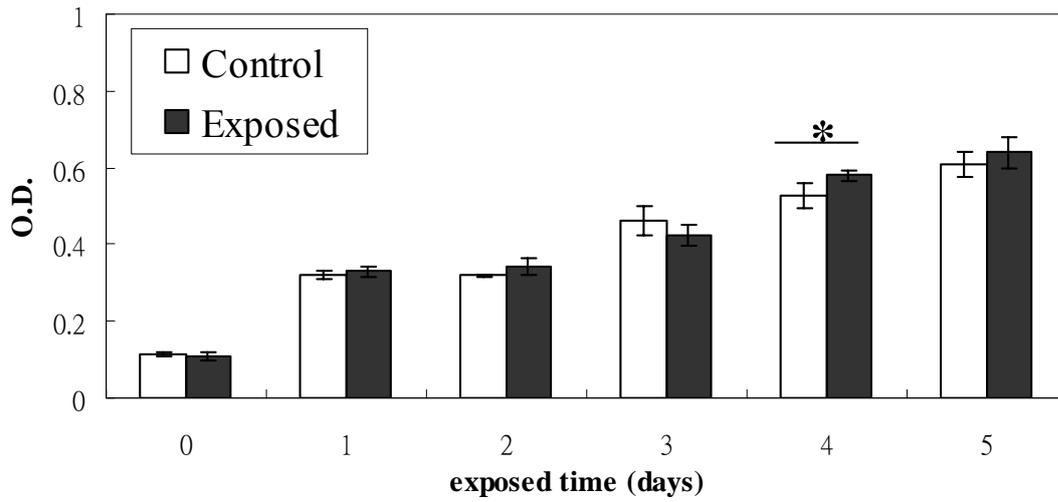


圖 3-5: MC3T3-E1 細胞於聚乳酸試片上以 2.5×10^4 cells/ml 的初始培養下，受靜磁場暴露組於第 4 天時，其 MTT 值明顯與未暴露組有明顯的差異，生長速率明顯增快。

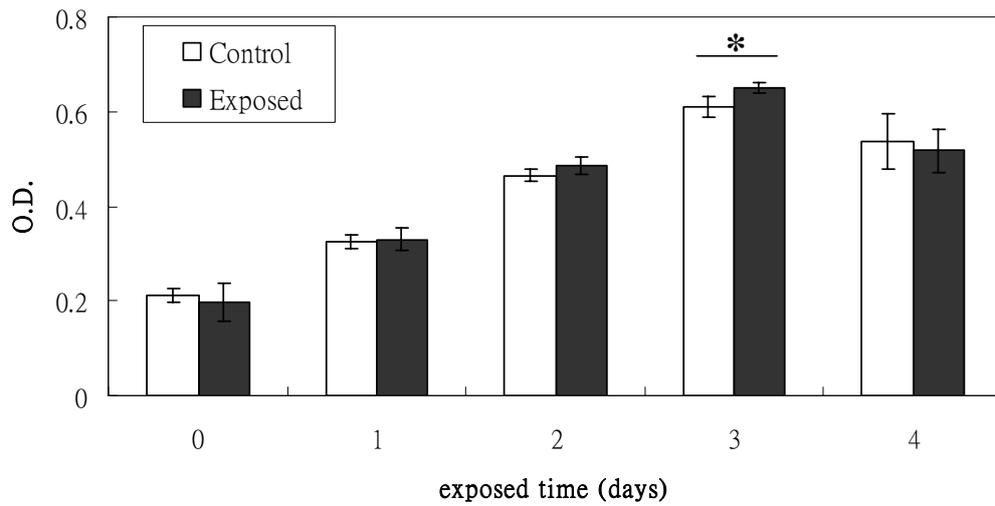


圖 3-6: MC3T3-E1 細胞於聚乳酸試片上以 5×10^4 cells/ml 的初始培養下，受靜磁場暴露組於第 3 天時，其 MTT 值明顯與未暴露組有明顯的差異，生長速率明顯增快。

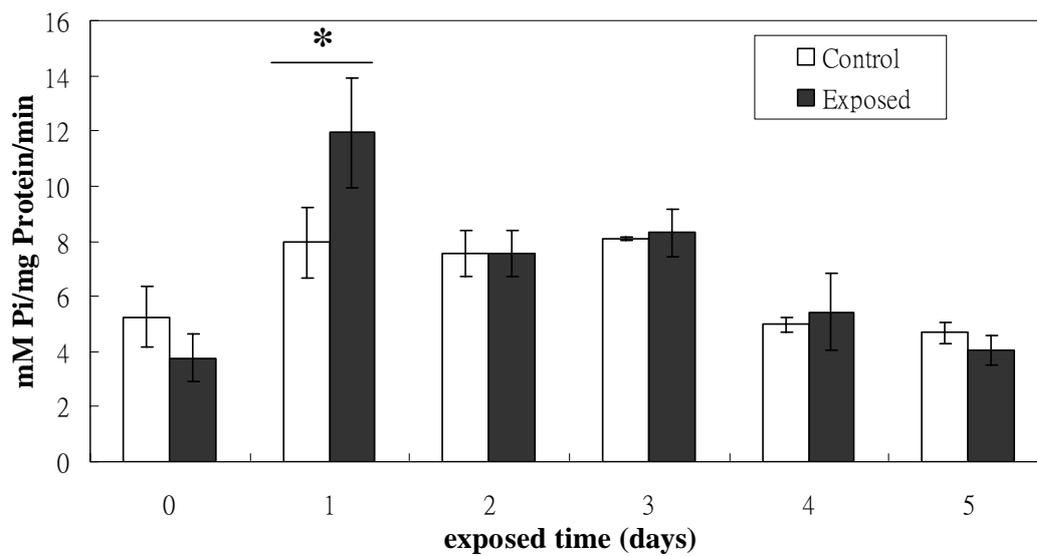


圖 4-1: 培養於聚乳酸試片的 MG63 細胞，受靜磁場暴露組於第 1 天時，其鹼性磷酸酶活性達到最高值，並且與控制組有明顯的差異

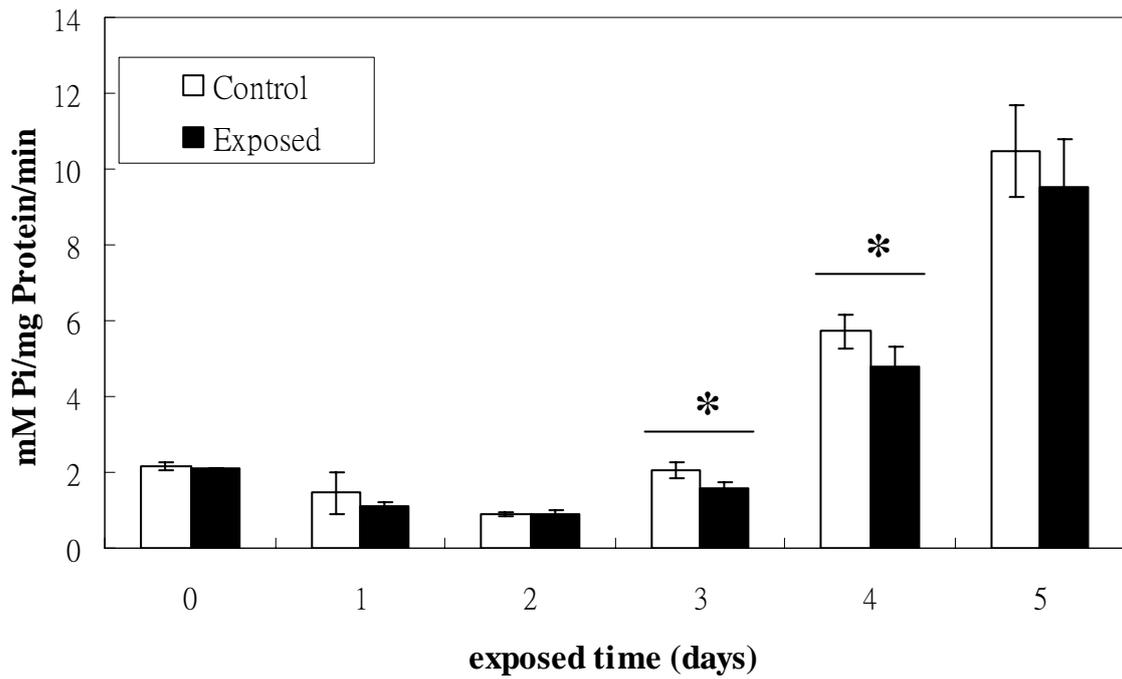
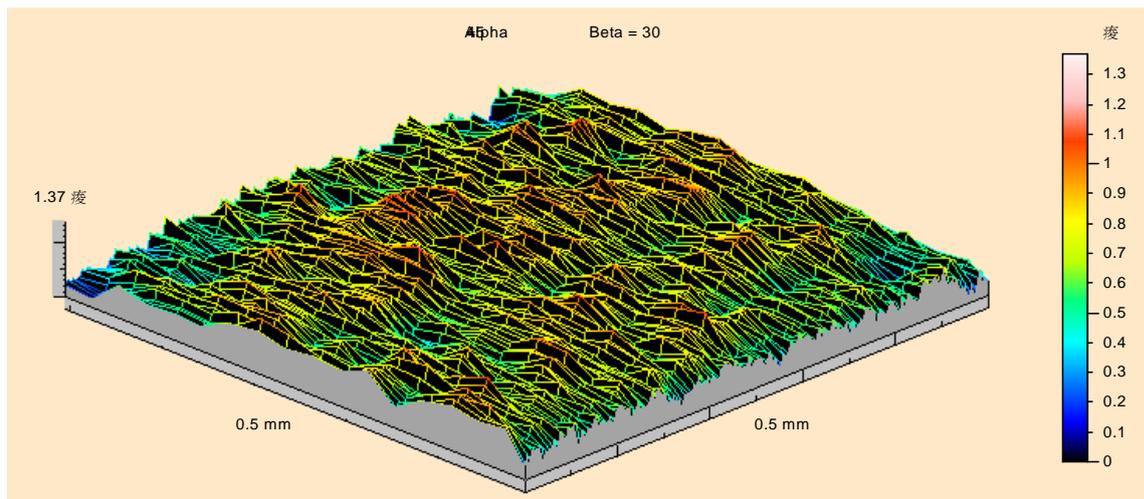
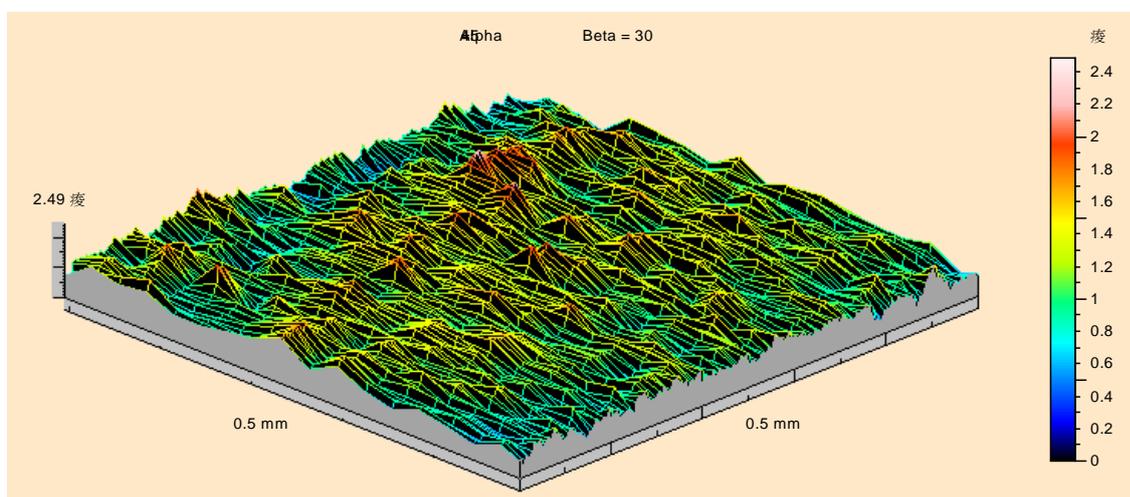


圖 4-2: 培養於聚乳酸試片的 MC3T3-E1 細胞，受靜磁場暴露組於第 3 天和第 4 天時，其鹼性磷酸酶活性比控制組低，並且有明顯的差異。



(M-)



(M+)

圖 5-1: 連續暴露於靜磁場 5 天的聚乳酸試片，於中間(C)的位置其表面粗糙度($2.78\mu\text{m}\pm 0.169\mu\text{m}$)與未暴露組($2.52\mu\text{m}\pm 0.777\mu\text{m}$)比較，並無統計上的差異。

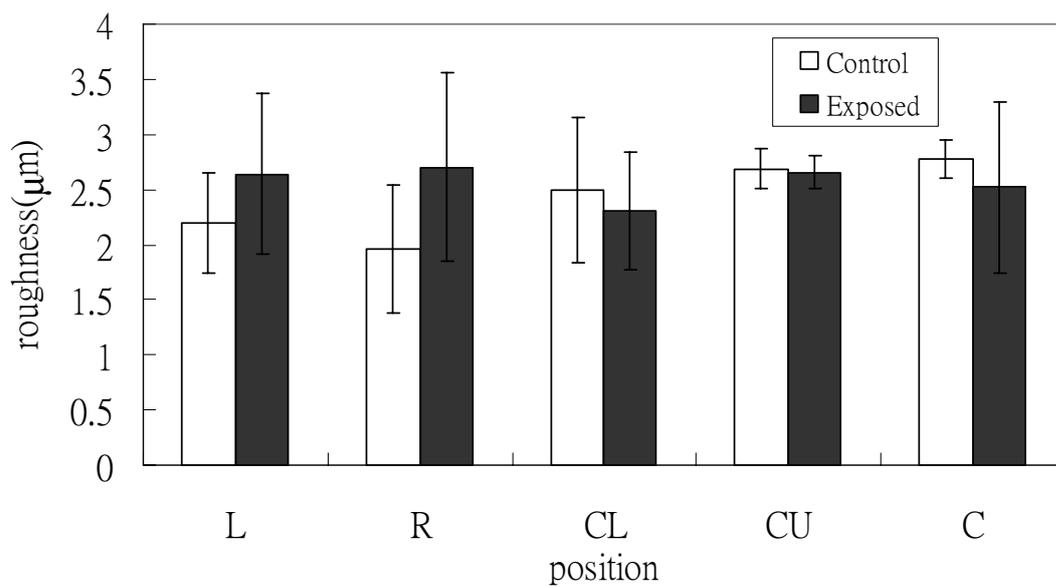


圖 5-2: 暴露於靜磁場 5 天的聚乳酸試片，5 個位置的表面粗糙度與未暴露組比較，並無統計上的差異。

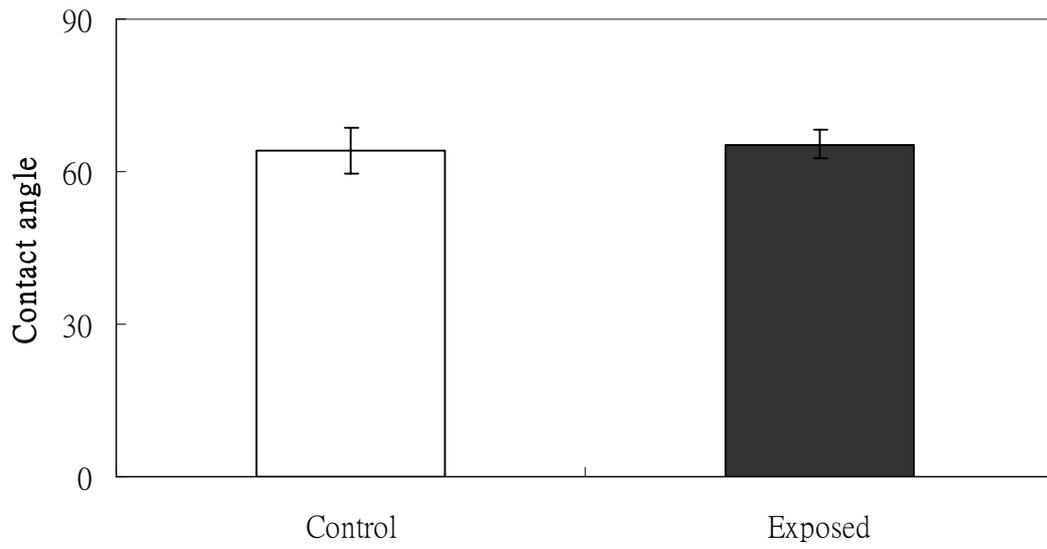


圖 5-3: 暴露於靜磁場 5 天的聚乳酸試片，其接觸角($65.428^{\circ} \pm 2.636^{\circ}$)與未暴露組($64.142^{\circ} \pm 4.598^{\circ}$)比較，並無統計上的差異。