

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

內皮細胞化之左心室輔助導管材料對葉克膜體外維生系統
病患血小板及其聚集之探討

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-002-143-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：王水深

計畫參與人員：王水深

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 12 月 8 日

台大一號心室輔助器長期動物實驗及生物控制器的研發-內皮細胞化

之左心室輔助導管材料對葉克膜體外維生系統病患血小板及其聚集

之探討

緣由與目的

本研究原來擬將 PU 或其它材料如：幾丁聚醣膜，改質後，再進行細胞培養，將含有細胞於表面的材料，進行病患的血液接觸並測試血液接觸後，材料表面血液貼附的情形。本研究首先進行

- 一、PU 薄膜表面內皮細胞化的建立。
- 二、以 MTT 法確定細胞活性。
- 三、病患使用 ECMO 後之血液進行材料接觸分析。作為 ECMO 病患血液中血小板對材料內皮細胞化之效應。

本研究順利完成一及二項。另外，對幾丁聚醣材料經不同固化劑固化後，對血液相容性進行測試。然而對第三項，病患血液之相容性之測定，因為本年度三月初到六月中旬，SARS 疫情在國內發生，為了學生及研究者的安全因素及醫院管理上限制而未進行。以下的報告，將完成的成果，列於下。

實驗步驟

- (1)PU, PU-PEG, PU-PEG-GRGD, chitosan 薄膜製備。

以分子量 2000 的 PEG 接枝於 PU 材料表面，形成 PU-PEG[1, 2]，再以光化學反應的方式使 GRGD 接枝於 PU-PEG 材料表面形成 PU-PEG-GRGD[2, 3]。

- (2)Chitosan 以酒精、sodium citrate 及 TPP 固化。

- (3)PU 系統 - 細胞培養，MTT 細胞活性測試。

PU-PEG、PU-PEG-GRGD 等材料進行細胞培養，以螢光顯微鏡觀察細胞生長的情況並做 MTT 細胞活性測試。

- (4)Chitosan - 血小板黏著測試。

結果與討論

圖 1 與圖 2 為 PU-PEG、PU-PEG-GRGD 材料表面經原子力顯微鏡測量之表面型態[4]。內皮細胞放置於材料表面貼附生長 24 小時，製備完成的 PU-PEG、PU-PEG-GRGD 薄膜表面上皆有內皮細胞黏著貼附，如圖 3、圖 4 所示，PU-PEG-GRGD 的細胞貼附密度比 PU-PEG 高 40%；Arg-Gly-Asp (RGD) peptide 為可供細胞辨識並與之黏著的最小序列蛋白質結構；所以，接枝上 GRGD peptides 的材料表面，細胞生長情形較好。PU-PEG 與 PU-PEG-GRGD 做 MTT 細胞活性測試來比較其細胞生長情形；由圖 5 可知，PU-PEG-GRGD 的生長速率亦較佳於 PU-PEG，得知 PU-PEG-GRGD 材料表面細胞貼附生長的效果較好。

圖 6、圖 7 為內皮細胞在材料上 24 小時之生長情形。由圖所示，chitosan 接枝上 GRGD 的材料，其內皮細胞貼附生長密度比未接枝的

chitosan 材料高。

Chitosan 材料經由 Sodium citrate 固化，在細胞培養中，經由培養液處理後，血小板之吸附量為酒精法處理之吸附量的 1/100 左右(如圖 8 圖 9)；同時對細胞培養沒有影響，故可確認 Sodium citrate 處理的 chitosan 膜具有最佳組織工程化之材料條件。

未來建議

tirofiban 是抑制血小板 GP IIb/IIIa 的活化，來達到抑制血小板凝集的作用，用於患有冠狀動脈缺血症狀而須接受冠狀動脈血管成形術，氣球擴張術，避免血栓阻塞冠狀動脈。如圖 10 所示，本實驗室以藥物釋放的方式包覆 tirofiban 能有效的防止血小板活化所導致凝血現象，所以未來本系統可加入 tirofiban 以提升抑制凝血的功效。

謝誌

感謝國科會計畫獎助 NSC 91- 2320- B-002- 143- 使本論文得已完成。

參考文獻

- [1] Y. H. Wang, J. J. Hsu , Y. S. Lin, J. Y. Lai, T. W. Chung, “A viscometric method to study the effects of hematocrit of blood and different surfaces of biomaterials on blood clot formation,” J Chin Inst Chen Eng, Sci., 31, 27–32(2000).
- [2] Y. S. Lin, S. S. Wang, T. W. Chung, Y. H. Wang, S. H. Chiou, J. J. Hsu, N. K. Chou, K. H. Hsieh, S. H. Chu, “Growth of endothelial cells on different concentrations of

Gly–Arg–Gly–Asp photochemically grafted in polyethylene glycol modified polyurethane,” Artif Organs, Sci., 25, 617–21(2001).

- [3] T. W. Chung, Y. F. Lu, S. S. Wang , Y. S. Lin, S. H. Chu, “Growth of human endothelial cells on photochemically grafted Gly Arg–Gly Asp (GRGD) chitosans,” Biomaterials , Sci., 23, 4803–9 (2002).
- [4] K. Kieswetter, Z. Schwartz, T. W. Hummert, D. L. Cochran, J. Simpson, D. D. Dean, B. D. Boyan, “Surface roughness modulated the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells,” J Biomed Mater Res, Sci., 32, 55–63 (1996) .

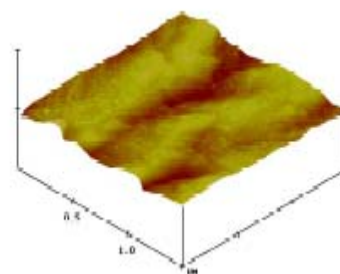


圖 1.PU-PEG 材料表面

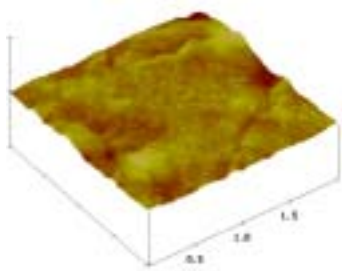


圖 2. PU-PEG-GRGD 材料表面

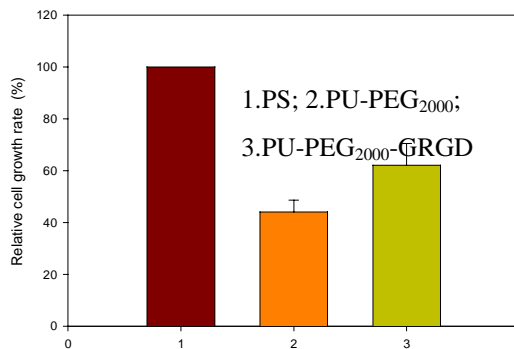


圖 5. MTT 細胞活性測試

結果: PS > PU-PEG₂₀₀₀-GRGD > PU-PEG₂₀₀₀

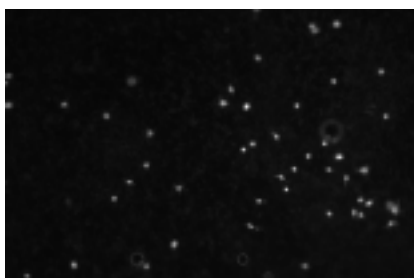


圖 3. PU-PEG 材料表面細胞螢光圖(100x)

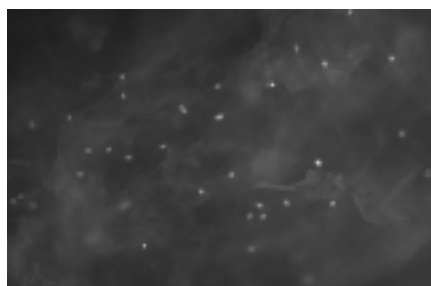


圖 6. chitosan 材料表面細胞螢光圖(100x)

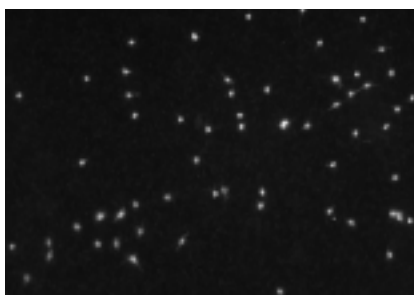


圖 4. PU-PEG-GRGD 材料表面
細胞螢光圖(100x)

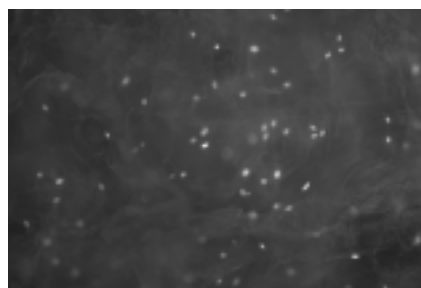


圖 7. chitosan-GRGD 材料表面
細胞螢光圖(100x)

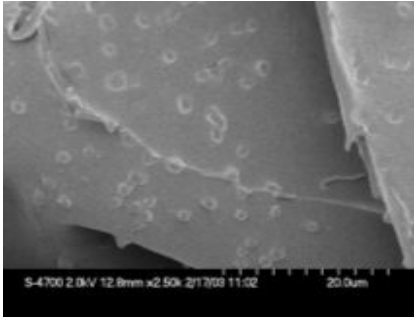


圖 8. 以檸檬酸鈉固化後之 Chitosan 對血小板貼附 SEM 圖

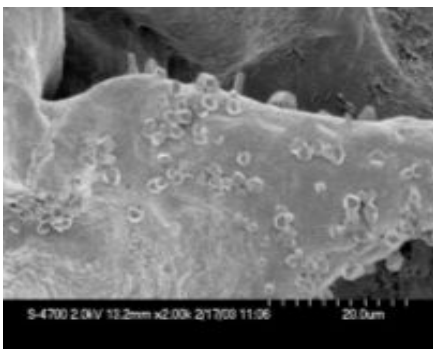


圖 9. 以酒精固化後之 Chitosan 對血小板貼附 SEM 圖

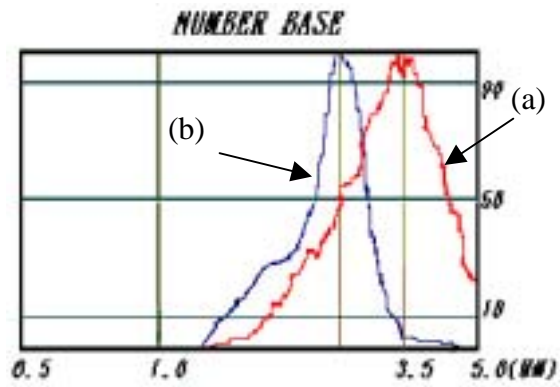


圖 10. (a)已活化的血小板
(b)Tirofiban 釋放後之血小板