

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

台大一號心室輔助器長期動物實驗 及生物控制器的研發 新膠原蛋白合層研製及其內皮細胞化之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89 - 2314 - B - 002 - 310 - M08

執行期間： 89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：王水深 教授

共同主持人：鍾次文 教授

阮若屈 副教授

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：國立台灣大學醫學院外科

中原大學醫學工程學系

中原大學化學工程學系

中 華 民 國 90 年 10 月 20 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

台大一號心室輔助器長期動物實驗及生物控制器的研發 - 新膠原蛋白合層研製及其內皮細胞化之研究

The preparation of new collagen layer on PU surface and the effect on the growth of endothelial cells

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-310-M08

執行期限：89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

主持人：王水深 國立台灣大學醫學院外科

共同主持人：鍾次文 中原大學醫學工程學系

阮若屈 中原大學化學工程學系

計畫參與人員：呂雅芬(專任助理) 國立台灣大學醫學院外科

一、中文摘要

PU 或 PTFE 表面的內皮細胞化是降低 LVAD 導管血栓的主要方法之一。本研究即以光化學方式將不同濃度 Gly-Arg-Gly-Asp(GRGD) peptide 接枝於 PU-PEG 材料表面，並探討內皮細胞在材料上貼附及成長情形。另外對 PTFE 薄膜，我們則以 C_2H_2/N_2 電漿處理，以期改善材料表面，並試圖使內皮細胞成長於其上。至於以 collagen layer coating 在 PU surface 上，由於其它學者研究已成熟，不具研究價值，因此只作適當的探討，其結果不列於文中。

研究結果如下：以 ATR-FTIR 測定經改質的 PU 表面，發現有 GRGD peptide 的特性峰存在；經 ESCA 分析，GRGD peptide 接枝濃度愈高，材料其 N_{1s} 及 O_{1s} 比率也隨之升高；上述資料顯示 GRGD peptide 確實已成功接枝於 PU-PEG 表面上。內皮細胞之培養，經 MTT 測試，細胞的貼附率隨接枝 peptide 濃度升高而增加。同樣地，將四聚氟乙烯(PTFE)薄膜利用電漿(C_2H_2/N_2)作表面處理，經由 ESCA 分析，其 N/C 比率分別增加 2 倍以上，且 F/C 比率亦減少了 6

倍以上(data not show)，由此顯示 PTFE 薄膜表面成功地被電漿披覆。經內皮細胞培養後，以 MTT 測試發現經電漿改質的材料表面確實可促進內皮細胞貼附生長(圖四)。

關鍵詞：聚胺基甲酸酯、光化學反應、聚四氟乙烯、電漿、內皮細胞

Abstract

Surface endothelization of PU or PTFE is an important way to reduce thrombosis and enhance its blood compatibility. This project tried to photochemically graft GRGD peptide to PU-PEG surface and plasma treat PTFE membrane with C_2H_2/N_2 for endothelization of those materials. The results showed that GRGD peptide were successfully grafted to PU-PEG surface confirmed by analysis of ATR-FTIR and ESCA. Moreover, MTT tests for cell metabolism showed that the higher the peptide concentration grafted, the more the cells adhered and proliferated on the matrix.

In regards to plasma treatment on PTFE membrane, surface N/C and F/C ratios were two times increases and six times decreases respectively, that indicated successful the

modifications of PTFE surface. Moreover, post-treatment PTFE membrane could adhere and proliferate endothelial cells confirmed by photograph and MTT tests while non-treatment one was not good for cell adhesion.

In conclusion, surface modification with peptide for PU-PEG film and C₂H₂/N₂ plasma treatment for PTFE membrane could enhance endothelial cells adhesion and proliferation.

Keywords: PU、UV chemical reaction、PTFE、Plasma、Endothelial cell

二、緣由與目的

聚胺基甲酯 (polyurethane ; PU) 由於其優良的物理特性(如：耐久性、彈性佳、抗疲乏等)及相對於其他生物材料有較佳的生物相容性，因此從 1980s 中期起開始應用於人工血管、各式導管、人工心臟等生醫材料上[1,2]。但在經常性的臨床應用裝置上，還是會因纖維蛋白原(fibrinogen)的黏著而誘導表面形成血栓所限制[3]。Herring 等人，首先嘗試將內皮細胞 (endothelial cell) 移植於人工血管(dacron)上，而可有效改善血管內血栓形成[4]。同樣的，將內皮細胞植於 PTFE 上，經過體內 (in vivo) 測試發現可顯著的降低血小板的聚集。但經過 Gospodarwicz 等人研究顯示，內皮細胞在 PU 表面生長情形相當不好[5]，除非表面經過預先塗層一種吸附基質或配體物質 (ligand) 來促進細胞貼附 (attachment)；例如包括 RGD peptide 序列的蛋白質，因為它是內皮細胞貼附分子的基礎胺基酸序列。本單位先前研究，利用光化學反應，將 GRGD 接枝於已預先修飾 PEG 的 PU 表面上，並改變不同的 GRGD 濃度，作為內皮細胞附著生長的條件，以達到改善 PU 表面長期抗凝血的目標[6]。

國內外學者亦曾以塗佈或化學鍵結方法將 collagen 披覆於 PU 基層上，皆可提高 Ecs 貼附及生長[7,8,9]。因此膠原蛋白確實可促進生醫材料內皮細胞化，然而在 PU 上類似之研究已達成熟，研究價值已不高；因此本研究著重於其他基材的改質，

如：PTFE。雖然 PTFE 極惰性但由於其微孔構造，使得表面很粗糙，易誘發血栓的形成[10]。我們嘗試以電漿處理 PTFE 表面，並探討其對內皮細胞貼附的情形，以提高 PTFE 血液相容性。

三、結果與討論

以光化學反應將不同濃度的 GRGD peptide 序列成功接枝於 PU 表面上，經由 ATR-FTIR 分析表面結構如圖一所示。其中 PU-PEG-GRGD 於 1615.89cm⁻¹ 處產生胺基的特性峰值，以及在 1343.6cm⁻¹ 處出現 GRGD 序列中的甘胺酸結構 (-CH₂-C=O-) 吸收波峰；另外分別在 1279.2 及 964.59 cm⁻¹ 也出現特性波峰，分別為天門冬胺酸之 CH-CH₂-COOH 官能基與 COOH 官能基。並由 ESCA 分析得知 (表一) 氮元素比例隨著 GRGD 接枝濃度增加而增加；這結果和 Lin 等人所分析的結果類似[11]。

Materials	C(%)	O(%)	N(%)	N/C
PU-PEG	64.7	34.0	1.4	0.02
PU-PEG-GRGD _{0.002M}	66.3	31.8	1.8	0.03
PU-PEG-GRGD _{0.01M}	63.3	34.6	2.1	0.03
PU-PEG-GRGD _{0.05M}	62.1	35.9	2.8	0.04

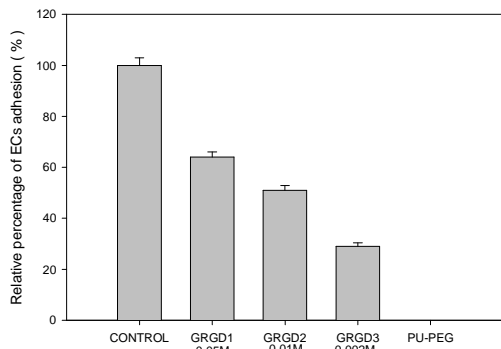
PU : polyurethane ; PEG : polyethylene glycol ;

GRGD : Gly-Asp-Gly-Asp

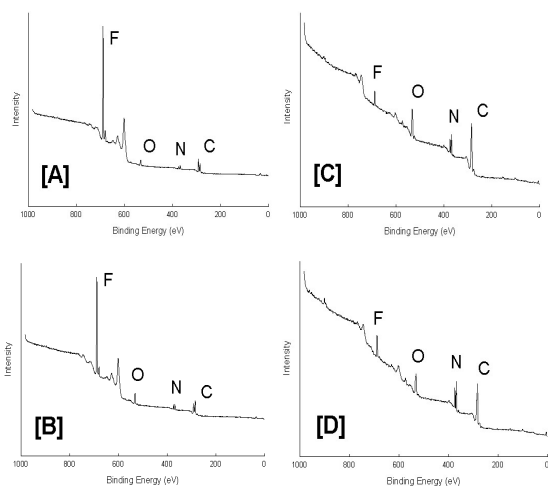
表一：表面改質之各材料經 ESCA 全掃描分析其化學組成元素比例

我們將內皮細胞培植於不同濃度 GRGD 所接枝的 PU-PEG 材料上，測試細胞在各種材料上的貼附效率，其結果如圖一所示。實驗中的對照組，我們採用 polystyrene 材質的組織培養盤為貼附材料。MTT 試劑可與細胞反應產生細胞素，我們將對照組所測得的內皮細胞活性視為相對貼附率 100 %。在相同條件下，我們發現細胞貼附率隨著 GRGD 接枝濃度的增加而增加，其相對貼附率分別為 29 %、51 %、64 %；再者於未接枝 GRGD 的表面(也就是

PU-PEG 材料), 內皮細胞並不會貼附在其上。因此, 經 MTT TEST 分析, 得知內皮細胞可以順利貼附於經 GRGD 接枝後的 PU-PEG 材料上。而且所接枝 GRGD 濃度愈高, 內皮細胞貼附生長的情形愈佳。



聚四氟乙烯(ePTFE)薄膜採用宇明泰公司所提供之薄膜, 結構型態皆為雙軸延伸, 但表面再燒結(resintering)溫度分別為 260 和 340 , 各命名為 A 型與 C 型膜。以 C₂H₂/N₂(6sccm/4sccm) 的電漿處理, 處理條件為 “30W ; 1 分鐘”, 此材料由中原大學化工系提供。

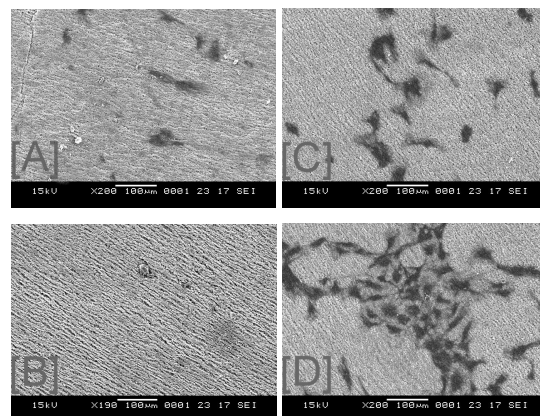
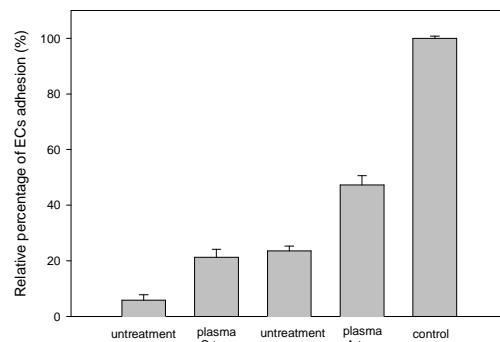


圖二：PTFE 薄膜利用電漿改質前後其 ESCA 全掃描圖；[A]A 型未處理；[B]C 型未處理；[C]A 型電漿處理；[D]C 型電漿處理

PTFE 薄膜經電漿處理, 從 ESCA 分析得知, A 型膜其碳元素由 46.5% 76.5% ;

氮元素由 0.6% 2.2% ; C 型膜其碳元素亦由 53.2% 70% ; 氮元素由 0.5% 2.6% , 見左圖二所示。顯示 PTFE 薄膜表面成功地被修飾。

同樣地, 我們以 MTT 試劑測試內皮細胞在各種材料上的貼附情形[12], 其結果如圖三所示。發現 A、C 型 PTFE 膜經電漿處理後其細胞相對貼附率各別由 23.6% 上升為 47.3% ; 5.8% 增加為 21.2%。且以顯微鏡觀察 ECs 貼附的形態, 發現細胞並不會貼附在未經處理之 PTFE 材料表面上, 但是細胞卻可以順利貼附於經電漿處理的 PTFE 薄膜上。由電子顯微鏡圖觀察, 發現經 plasma 處理之 C 型膜比經 plasma 處理之 A 型膜反而貼附較多的內皮細胞, 這是因為細胞與 A 型膜表面作用力不強, 因而使細胞容易至材料表面脫離。



圖四：內皮細胞在各材料貼附情形之電子顯微鏡圖；[A]A 型未處理；[B]C 型未處理；[C]A 型電漿處理；[D]C 型電漿處理

四、計畫成果自評

上年度的計畫研究，已成功的將 GRGD 以光化學反應方式接枝於 PU 材料上，並經內皮細胞貼附測試結果發現所接枝 GRGD 濃度愈高，內皮細胞貼附生長的情形愈佳，未來我們將試圖找出最適合內皮細胞生長條件，以達 PU 材料內皮化為目的。另外，在今年度計畫中我們將 PTFE 材料以電漿改質後對其培養內皮細胞成果作探討。發現經 plasma 改質的 PTFE 薄膜可以促進 ECs 貼附生長，但局限於某些區域，這是因為電漿處理不夠均勻，導致材料表面部分活化。未來電漿改質均勻度是個要克服的問題；另外將探討 PTFE 材料本身結構等特質是否對細胞貼附有所影響。在此我們給臺大一號人工心臟(LVAD)的材料多一個新選擇的機會，未來計畫研究將繼續測試此一材料的功能性。

五、參考文獻

- [1] Zdrahala R.J., Zdrahala I.J., *J. Biomed. Appl.*, 14, 67-90, 1999.
- [2] Lin H.B., Wen S., Mosher D.F., Carlos G.E., Schaufelberger K., Lelkes P.I., Cooper S.L., *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 329-42, 1994.
- [3] Szycher M., *Lancaster, USA*. pp.1-33, 1983.
- [4] M. Herring, A. Gardner, and J.A. Glover, *Surgery*, 84, 498-504, 1978.
- [5] N.K. Nichols, D. Gospodarwicz, T.R. Kessler and D.B. Oslen, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 27, 208-211, 1981.
- [6] Y.S. Lin, S.S. Wang, T.W. Chung et al., *Artificial Organs*, 25(8), 617-621, 2001.
- [7] P.A. Schneider, S.R. Hanson, T.M. Price, and L.A. Harker, *J. Vasc. Surg.*, 8, 229-235, 1988.
- [8] J. F. Friedrich, *Surface coating technol.*, 59, 371-378, 1993.
- [9] Lynn L. H. Huang, P.C. Lee, L. W. Chen, K. H. Hsieh, *J. Biomed. Mater. Res.*, 39, 630-636, 1998.
- [10] Jeschke M.G., Hermanutz V., Wolf S.E., and Koveker G.B., *J. Vasc. Surg.*, 29, 168-176, 1999.
- [11] H. B. Lin, W. Sun, D. F. Mosher, C. G. Echeverria, P. I. Lelkes, and S. L. Cooper, *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 329-342, 1994.
- [12] D. Gerlier and Nicole Thomasset, *Journal of Immunological Methods*, 94, 57-63, 1986.