

國立交通大學

機械工程學系

碩士論文

以電氣紡絲法製備 PLA/PCL 小管徑人工血管支架
之性質及其細胞生長研究

Study of Properties and Cell Culture of Small-Diameter
Synthetic PLA/PCL Vascular Scaffold via Electrospinning

研究生：王基信

指導教授：徐瑞坤 教授

中華民國一百零一年九月

以電氣紡絲法製備 PLA/PCL 小管徑人工血管支架之性質及其細胞生長研究

Study of Properties and Cell Culture of Small-Diameter Synthetic PLA/PCL Vascular Scaffold via Electrospinning

研究生：王基信

Student：Chi-Hsin Wang

指導教授：徐瑞坤

Advisor：Ray-Quan Hsu

國立交通大學

機械工程學系

碩士論文

A Thesis

Submitted to Department of Mechanical Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Science

In

Mechanical Engineering

September 2012

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百零一年九月

以電氣紡絲法製備 PLA/PCL 小管徑人工血管支架 之性質及其細胞生長研究

研究生：王基信

指導教授：徐瑞坤教授

國立交通大學機械工程學系碩士班

摘要

本研究以聚乳酸(PLA)與聚己內酯(PCL)為材料，依不同比例進行溶液之調配，藉由不同的收集速度以電氣紡絲法製作出纖維排列具有不同方向之小管徑人工血管細胞生長支架，支架內徑 4.1mm，外徑 5mm，壁厚 0.45mm，並對製作出來的人工血管細胞生長支架進行表面結構之觀察及接觸角(親水性)、孔隙率(porosity)與機械性質之量測。另外動態植覆血管內皮細胞後進行靜態培養，觀測不同製作條件之人工血管細胞生長支架其細胞的生長情形與細胞活性，最後為了模擬人體的血流環境，對血管內皮細胞進行靜脈與動脈流速之動態培養，並觀察其細胞生長情形。

實驗結果發現纖維排列不具有方向性的人工血管細胞生長支架其孔隙率較高，在靜態與動態培養上其細胞數量都明顯較高，不過纖維排列具有方向性的人工血管細胞生長支架其細胞會沿著纖維方向生長而具有方向性。藉由不同比例的調配方式與收集速度確實可以製作出不同機械性質的人工血管細胞生長支架，可以視需求選擇調配比例與收集速度。

關鍵字：電氣紡絲、心血管組織工程、細胞生長支架、內皮細胞、聚乳酸、聚己內酯、孔隙率

Study of Properties and Cell Culture of Small-Diameter Synthetic PLA/PCL Vascular Scaffold via Electrospinning

Student : Chi-Hsin Wang

Advisor : Dr. Ray-Quen Hsu

Department of Mechanical Engineering
National Chiao Tung University

ABSTRACT

In this study, we mix polylactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL) solutions with different ratio for the purpose of electrospinning. The fiber were then collected under different speed for manufacturing small diameter artificial vascular scaffolds (inner diameter of 4.1mm, outer diameter of 5mm, wall thickness of 0.45mm). Vascular scaffolds fabricated this way showed different fiber orientations. Then we observed the surface structure and measured the contact angle (hydrophilic), the porosity and mechanical properties of the scaffolds. The vascular scaffolds were used for culturing endothelial cells under static and rotational state to find out the growth and activity of the cells. Finally in order to simulate the environment of the human body's blood flow, the cells were cultured under the flow velocity of the venous and arterial, and observe cell growth situations.

The experimental results showed the cell numbers in static and dynamic state with random orientations of fibers are higher than ones with aligned fibers. This phenomenon might arise from the fact that scaffolds with random fiber orientation have higher porosity. However, the cells do grow along the fibers direction in the artificial vascular scaffolds with aligned fibers. The artificial blood vessel scaffolds with the different solutions mixture and collection speed have different mechanical properties. We can select the ratio of the solution and the collection speed as needed.

Keyword : Electrospinning, Cardiovascular Tissue Engineering, Scaffold, Endothelial Cells, PLA, PCL, Porosity

致謝

碩士修業期間，由衷地感謝指導教授徐瑞坤老師的悉心指導，每每指出我們在研究中不夠完善的部分並給予建議，讓我們了解做研究的方法和態度，受益匪淺。也十分感謝論文口試委員陳仁浩與黃正昇教授，對論文提供了相當多的指導與建議。另外，感謝楊倍昌所長與張晃猷教授提供細胞株，交大生科系提供超純水，吳東昆教授師門於工程五館停電期間出借二氧化碳培養箱，日技精密企業社的老闆提供塑膠齒輪，讓實驗可以順利進行。

在實驗的過程中，承蒙高豐生、陳威良、梁達嵐、江維堂、李艾璵、黃宣諭、曾國銓、陳亮瑜、張洪誌等學長及同學的幫忙，指出研究中不足的部分，在遇到難題時也幫助我解惑，非常感謝。何昇融、魯鎮宇、謝其晟、陳侑群、黃怡菁、徐韶謙、曹植培、陳柏廷、鍾權任、蕭國賢、林治濤、劉佳文、曾炫凱、陳瑋奇、吳偉仁、葉人瑜等其他學弟妹們也非常感謝你們在我實驗以及生活上的各種幫助。另外，特別感謝大學同學陳裕旻、練懿海以及陳大潘師門的林柏儒、駱炳江等人。

最後要感謝我的家人，謝謝你們對我的支持與鼓勵，讓我能順利完成學業。在生活及學業上曾經幫助過我的家人和朋友們，再次感謝你們。

基信 謹識

2012.09

目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
致謝	iii
目錄	iv
圖目錄	viii
表目錄	x
第一章 序論	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究動機與目的	3
第二章 文獻回顧	7
2.1 人類的心血管系統	7
2.1.1 血管的構造	7
2.1.2 常見的心血管疾病與治療	9
2.1.3 人工血管的發展	10
2.1.4 血管移植之人工血管	11
2.1.5 血管之順應性	13
2.2 組織工程簡介	14
2.2.1 組織工程學的發展	14

2.2.2	組織工程的定義與基本概念	16
2.2.3	細胞生長支架	18
2.3	生物醫學上常用之高分子材料	20
2.3.1	聚乳酸(PLA)	20
2.3.2	聚己內酯(PCL)	21
2.4	電氣紡絲	22
2.4.1	電氣紡絲的發展	22
2.4.2	電氣紡絲的原理	23
2.5	電氣紡絲在組織工程領域之應用	26
2.5.1	心血管組織工程	26
2.5.2	方向性纖維支架結構	27
第三章	研究材料與方法	32
3.1	研究流程	32
3.2	小管徑人工血管細胞生長支架之製備	33
3.2.1	實驗設備	33
3.2.2	製備步驟	35
3.2.3	溶液配製與實驗參數	36
3.3	人工血管細胞生長支架纖維結構之觀察	37
3.3.1	實驗設備	37

3.3.2	實驗方法	37
3.4	接觸角量測	38
3.4.1	實驗設備	38
3.4.2	實驗方法	38
3.5	內皮細胞之培養	38
3.5.1	實驗設備	39
3.5.2	實驗藥品	40
3.5.3	動態植覆的實驗方法	42
3.5.4	靜態培養的實驗方法	43
3.5.5	動態培養的實驗方法	44
3.6	蘇木精-伊紅(HE)染色法	44
3.6.1	實驗設備	44
3.6.2	實驗藥品	45
3.6.3	實驗方法	45
3.7	MTT 活性試驗	46
3.7.1	實驗設備	46
3.7.2	實驗藥品	46
3.7.3	實驗方法	47
3.8	孔隙率量測	48

3.8.1	實驗設備	48
3.8.2	實驗方法	48
3.9	機械性質量測	49
3.9.1	實驗設備	49
3.9.2	實驗方法	49
第四章	實驗結果與討論	53
4.1	小管徑人工血管細胞生長支架之纖維結構觀察	53
4.1.1	不同比例與收集速度之纖維排列方向性	53
4.1.2	不同比例與收集速度之纖維粗細分析	53
4.2	接觸角量測	54
4.3	蘇木精-伊紅(HE)染色結果	55
4.4	MTT 活性試驗	55
4.5	孔隙率量測	56
4.6	機械性質量測	57
第五章	結論與未來展望	81
5.1	結論	81
5.2	未來展望	82
	參考文獻	84

圖目錄

圖 1-1 Formhals 的電氣紡絲專利設計[3].....	6
圖 1-2 電氣紡絲法之示意圖[5].....	6
圖 2-1 體外再生方式 (in vitro) [17].....	29
圖 2-2 體內再生方式 (in vivo) [17]	29
圖 2-3 高分子薄膜製備之管狀結構(a)剖面視角 (b)等視角[50]	30
圖 2-4 光學顯微鏡觀測下之具直線性纖維支架[51].....	30
圖 2-5 使用碟型收集器高速轉動收集直線纖維之裝置[51].....	31
圖 2-6 以兩平行放置導體方式收集方向性纖維[58].....	31
圖 3-1 實驗流程圖.....	50
圖 3-2 以電氣紡絲法製備小管徑人工血管細胞生長支架之示意圖	50
圖 3-3 電氣紡絲架構之設備圖	51
圖 3-4 氣仿.....	51
圖 3-5 滾輪式混合器.....	52
圖 3-6 蠕動幫浦.....	52
圖 4-1 15%(w/v)PLA 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖	63
圖 4-2 15%(w/v)PCL 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖	64
圖 4-3 3 : 1 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖	65
圖 4-4 1 : 1 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖	66

圖 4-5 1：3 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖	67
圖 4-6 小管徑人工血管細胞生長支架之纖維直徑趨勢圖	68
圖 4-7 親水性量測結果.....	68
圖 4-8 15%(w/v)PLA 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖	69
圖 4-9 3：1 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖	70
圖 4-10 1：1 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖	71
圖 4-11 1：3 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖	72
圖 4-12 15%(w/v)PCL 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖	73
圖 4-13 1：1 4500rpm 人工血管細胞生長支架的全部 HE 染色圖	74
圖 4-14 動態植覆一天靜態培養六天動態流速培養六天後 HE 染色圖.....	75
圖 4-15 動態植覆一天靜態培養兩天動態流速培養六天後 HE 染色圖.....	76
圖 4-16 動態植覆一天動態流速培養六天後 HE 染色圖	77
圖 4-17 動態植覆一天 MTT 活性測試結果.....	78
圖 4-18 動態植覆一天靜態培養兩天 MTT 活性測試結果.....	78
圖 4-19 動態植覆一天靜態培養六天 MTT 活性測試結果.....	79
圖 4-20 孔隙率量測結果.....	79
圖 4-21 楊氏係數機械性質量測結果	80
圖 4-22 降服強度機械性質量測結果	80

表目錄

表 4-1 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之纖維平均直徑(μm)關係表	59
表 4-2 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之接觸角($^{\circ}$)關係表	59
表 4-3 動態植覆一天 MTT 試驗之吸光(OD)值	60
表 4-4 動態植覆一天靜態培養兩天 MTT 試驗之吸光(OD)值	60
表 4-5 動態植覆一天靜態培養六天 MTT 試驗之吸光(OD)值	61
表 4-6 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之孔隙率(%)關係表	61
表 4-7 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之楊氏係數(MPa)關係表	62
表 4-8 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之降服強度(MPa)關係表	62



第一章 序論

1.1 研究背景

隨著醫藥技術的進步，現今社會年齡結構趨於老化，退化性疾病也不斷地困擾著老年人，其中器官損壞占極高的比例，許多的器官並無自發性之再生能力，一旦失去作用，就會造成身體無法彌補的傷害。

目前器官損壞後，除了器官移植外，醫藥界缺乏有效的方法可使組織或器官恢復正常運作，但是國內器官捐贈風氣不盛行，讓許多需要器官移植的病患往往等不到適合的捐贈者。如果能修復受損的器官或是使其再生，以繼續維持身體的正常機能，並且大幅地降低病患的負擔與醫療成本，相信是許多醫療過程最希望看到的結果，組織工程正是朝著這方面努力的新興生物技術。

近年來由於生物醫學領域的興起，帶動了組織工程技術的快速發展，纖維支架在醫療的使用以及藥物的研發都有著更廣泛的應用。

纖維支架結構主要有以下五種製作方法[1]：

1. 模板合成法 (Template Synthesis)
2. 拉伸法 (Drawing)
3. 相分離法 (Phase Separation)
4. 自組裝法 (Self-assembly)
5. 電氣紡絲法 (Electrospinning)

以上五種方法各有其優缺點。模板合成法與拉伸法的方法雖然簡易，但是不易控制纖維的粗細與長度，所以很少被使用。相分離法為利用材料兩相間的物性不同而將其分離，可製備出細胞外間質大小等級之纖維，並且形成三維的多孔纖維網構造，但是材料的選用有其限制，製作程序耗費時間長，且要製作出具直線性及特定直徑的纖維有其困難。自組裝法是利用縮氨酸來製作纖維支架，但是需要進行特定的物理與化學反應，所以會限制其化學與機械性質。電氣紡絲法可使用任何種類的高分子材料，製備出不同尺寸等級的連續纖維，而且製程相對簡單，不易受到器材限制，具有很高的發展性。因為電氣紡絲法製備出的纖維支架結構具有多孔性的特質、多樣的表面地形結構以及較高的面積體積比，這些特徵都有助於細胞的附著、增殖和遷移，所以近年來被廣泛的運用於組織工程上，因此對於電氣紡絲法製作組織工程細胞生長支架方面的研究有明顯上升的趨勢。

電氣紡絲法是 Formhals 於 1934 年所開發出的專利技術，圖 1-1 為其在 1939 年的設計[2][3][4]，因為此生產技術必須應用到靜電力 (Electrostatic Force)，所以稱為電氣紡絲法。電氣紡絲法可視需求而選擇適合的材料種類，因此可運用於很多方面。當溶液被推入通電的金屬噴嘴，高壓電場會使噴嘴外圍的液體形狀成三角錐狀，稱為泰勒錐 (Taylor Cone)。接著微細的纖維會噴射出來，纖維從噴射出至到達收集板表面期間會有側向的不穩定運動，最後在收集板上得到多孔性薄膜，圖 1-2 為電氣紡絲法之示意圖[5]。

控制薄膜形態主要有以下四個參數：

1. 液體濃度 (Solution Concentration)
2. 電壓強度 (Voltage Strength)
3. 沈積距離 (Deposition Distance)
4. 沈積時間 (Deposition Time)。

液體濃度影響纖維的成像，電壓強度影響纖維的寬度，沈積距離影響纖維截面的圓整度，沈積時間可控制薄膜的厚度。雖然可以藉由以上四個參數來控制薄膜的成長形態，但是噴射出的高分子纖維以亂數重疊排列，所以會有孔洞大小不一及薄膜厚度不勻的缺點。

1.2 研究動機與目的

雖然現今的醫藥技術發達，很多疾病都已經可以治癒，國人平均壽命增長，但是依舊有不少疾病奪走了國人的生命，根據行政院衛生署 100 年度死因統計，國人十大主要死因前三名以惡性腫瘤占 28.0% 最多；其次分別為心臟疾病占 10.9%、腦血管疾病占 7.1%。

腫瘤分為良性與惡性腫瘤，血管新生是腫瘤擴大過程中的重要步驟[6]，所以抑制血管新生是控制惡性腫瘤的重要研究方向之一。心臟疾病中常見的冠心病為冠狀動脈硬化所引起。腦血管疾病為腦血管栓塞或出血所引起。由此可見對於血管的相關研究非常地重要，如果可以在體外研製出組織工

程的人工血管，不只可以當成置換用的人工血管，而且還可以拿來先在體外對於血管新生、硬化、栓塞及出血的成因作深入地研究，相信可以大大地降低血管相關疾病的死亡率。

心血管疾病於開發中以及已開發國家的十大死因裡是前幾名的常客，因此，如何治療心血管疾病並降低其發生率乃是全世界努力的目標之一。如果心血管疾病的患者病情嚴重，無法利用藥物進行有效的治療，則必須藉由嵌入支架或進行切除、移植、繞道等外科手術的醫療方式。臨床上優先以自體血管來進行血管移植手術，自體移植血管具有最好的生物相容性而且沒有免疫上的問題，但是其缺點是來源有限，而同種異體與異種移植血管則有免疫上的問題。國內外對於心血管支架以及人工血管都有相當程度的發展，目前在臨床上大管徑(>6mm)人工血管已經被廣泛地應用，但是小管徑(≤ 6 mm)人工血管在移植到人體後會有血栓的問題，尚無有效的替代品，在應用上有其限制，所以為了解決小管徑血管在移植上所遭遇到的問題，國內外都盡力發展組織工程技術，希望藉由此技術研發出相似於人體血管的替代品。如果可以使用人工血管細胞生長支架在體外培養細胞，不但可以模擬人體內細胞生長的情形，而且可以作為藥物研發的載台，甚至可以作為移植用的人工血管，相信一定可以大大地提升醫療技術。

因此本研究希望藉由電氣紡絲加工技術，製作出類似人體構造的小管徑人工血管，將聚乳酸(Polylactic Acid, PLA)與聚己內酯(Polycaprolactone,

PCL)以不同比例混合進行射出加工，再以不同收集棒轉速進行收集，藉此製備出不同性質(方向性、幾何與機械性質等)的人工血管細胞生長支架(Scaffold)。為了讓細胞可以均勻地分佈於人工血管細胞生長支架的內壁，先動態植覆血管內皮細胞後再進行細胞的靜態培養，另外，為了模擬人體的血流環境，對血管內皮細胞進行靜脈與動脈流速之動態培養，觀察細胞生長情形。希望可以藉由此研究讓人可以視其需求，選擇適合使用的人工血管細胞生長支架，以提高在血管組織工程領域上的應用，並且製作出在體外實驗與體內移植上適合使用的人工血管。



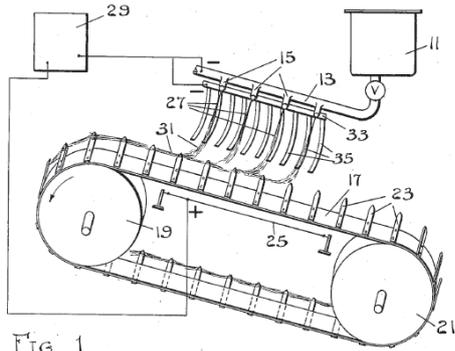


FIG. 1.

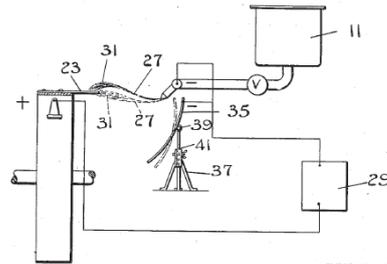


FIG. 2.

INVENTORS.
Richard Schreiber Gastell and
BY Anton Formhals
John W. W. W.
ATTORNEY.

圖 1-1 Formhals 的電氣紡絲專利設計[3]

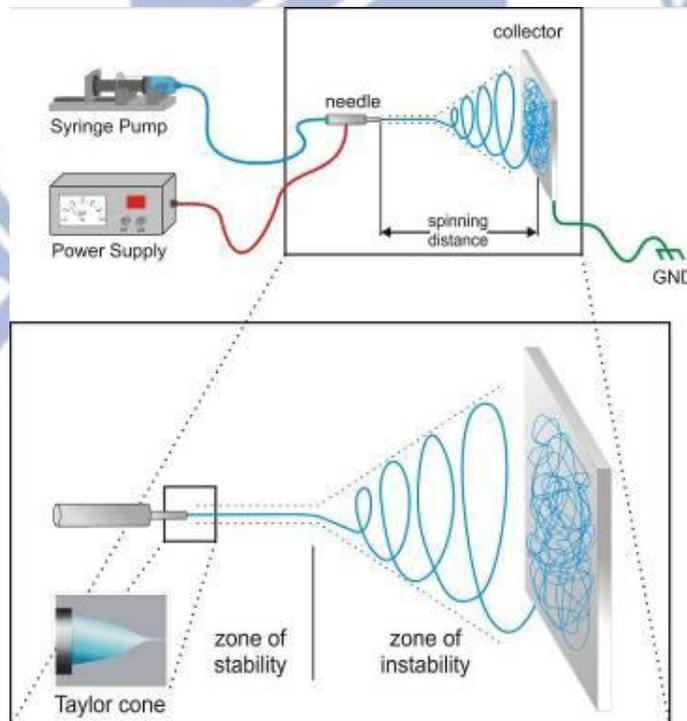


圖 1-2 電氣紡絲法之示意圖[5]

第二章 文獻回顧

2.1 人類的心血管系統

2.1.1 血管的構造

人類的循環系統(Circulatory System)由心血管系統與淋巴系統所組成，循環系統主要功能在運送養分與氧氣以供應身體各部位的細胞，移去細胞代謝作用所產生的廢物與二氧化碳，將內分泌腺所產生的激素運輸到激素所作用的器官以執行調節功能，維持體溫的恆定，藉由白血球執行血液的免疫功能，凝血機制會在血管受損時防止血液流失。

心血管系統(Cardiovascular System)是由心臟與血管所組成，血管分為將血液輸送離開心臟的動脈(Artery)，提供物質交換的微血管(Capillary)，將血液導回心臟的靜脈(Vein)。所有的血管在構造上都有許多共同的特性，但也因應不同的生理需求，而有所不同。

動脈與靜脈的管壁由三層膜(Tunic)所組成，最內層稱為內膜(Tunica Interna; Tunica Intima)，由三部分組成，其最內層為由內皮細胞(Endothelial Cell)所組成，襯於所有血管的管腔內，主要是用來保護血管。基底膜覆蓋在一些結締組織纖維上，一層彈性纖維或稱彈性蛋白(Elastin)所組成，形成內在彈力層(Internal Elastic Lamina)。固有層為基底膜向外位置之纖維肌肉層，內含肌肉細胞及結締組織。中間層稱為中膜(Tunica Media)，由平滑肌

細胞(Smooth Muscle Cell)環繞而成。最外層稱為外膜(Tunica Externa ; Tunica Adventitia)，由結締組織組成。動脈因為必須承受較大的血壓，所以其內膜、中膜與外膜都比靜脈還厚，另外靜脈裡有瓣膜，而動脈沒有[7]。微血管的管壁只由一層內皮細胞構成，缺乏平滑肌與結締組織層[8]。由於微血管管壁只由一層內皮細胞構成，易進行擴散作用，因此身體細胞與血液間的氣體與養份在此位置極易進行交換工作[9]。

血管最主要的細胞為內皮細胞及平滑肌細胞。大部分心血管疾病皆起因於內膜的內皮細胞受到損傷，而衍生出其他併發症，如動脈硬化與血管瘤等。以下為血管中內皮細胞的功能[10]：

1. 作為血管與心臟的自然內襯，血液與其他血管部分的物理屏障，使血球不會粘著於此。
2. 作為可通透性的屏障，調節血管的物質運輸。
3. 分泌一些作用於鄰近血管平滑肌上與血管擴張及收縮有關的物質，如血管擴張素及血管收縮素，進而影響血管的收縮與舒張。
4. 分泌一些刺激血管新生、抑制與增生血管平滑肌細胞的物質。
5. 分泌具有調節血小板聚集、凝血及抗凝血的物質。
6. 受損時會製造生長因子。
7. 經由訊息偵測及釋放旁泌素，作用於血管管壁上的鄰近細胞，在血管重建上扮演重要的角色。

8. 在動脈粥狀硬化疾病中會影響血管平滑肌的增生。
9. 有助於細胞外液基質的形成及維持。
10. 於免疫反應期間分泌細胞介素。
11. 將不具活性的前驅物變成具活性的荷爾蒙，可將荷爾蒙及其他介質吸收及分解。

2.1.2 常見的心血管疾病與治療

常見的心血管疾病主要為動脈硬化與動脈瘤等，動脈硬化是因為過多的脂肪及膽固醇堆積在血管壁上使得血管變硬和變窄，進而影響到血液的輸送。動脈瘤是因為血管壁變薄或失去其原有的機械強度，管內的血壓把血管撐成球形，這種地方通常比較薄弱容易造成血管破裂形成大出血[7]。

動脈粥狀硬化是動脈硬化最常見的形式，在動脈粥狀硬化發生的起因主要是血管內皮細胞損傷及功能異常，其危險因子主要是高血膽固醇、高半胱胺酸、高血壓、糖尿病、抽煙、肥胖等。動脈粥狀硬化是一種動脈的疾病，主要特徵是動脈部分血管管壁變厚，使管腔變窄，其原因有：大量不正常的平滑肌細胞、巨噬細胞與淋巴球；膽固醇及其他脂溶性物質在這些細胞與細胞外的沈積；結締組織基質緻密層變厚[10]。動脈粥狀硬化的過程是內皮細胞及底下的平滑肌受到傷害，導致發炎及增生反應，造成泡沫細胞堆積，並且由於平滑肌細胞的過度增生而阻塞動脈。動脈粥狀硬化時，

動脈粥狀瘤凸出到動脈管腔中，因此會降低血流，動脈粥狀瘤也成為血栓形成的地方，而進一步阻斷血流供應[8]。

如果心血管疾病的病情較輕者或在某種不允許手術的情況下，可藉由藥物治療，病情較重者則需進行氣球血管成形術或血管支架置放術等手術方式治療，最嚴重者則必須進行心臟移植或將血管切除並以人工血管進行外科手術來重建，以維持心血管系統的正常運作。

2.1.3 人工血管的發展

人工血管的發展與血管外科手術有很大的關係，有必要先了解血管外科手術早期的發展。在 1888 年 Rudolph Matas 提出以動脈瘤內部縫合術治療動脈的方法。在 1897 年俄國 Eck 氏首先提出以 Side-to-side 方式將試驗動物的門靜脈與下腔靜脈接通在一起的血管吻合術 (Anastomosis)。在 1902 年 Alexis Carrel 與 Guthrie 提出探討動脈與靜脈癒合過程的基本型態及不同型態縫合線的生理反應，以及討論經由血管縫合以維持循環系統運作以進行器官移植的可行性。在 1906 年 Goyanes 使用膈靜脈來代替形成動脈瘤病變的膈動脈以重建動脈，此為第一個體內血管移植。在 1907 年 Lexer 提出以隱靜脈替代動脈的自體移植。在 1952 年哥倫比亞大學的 Voorhees、Jaretski 與 Blakemore 使用 Vinyon-N 製作出管壁具有孔洞性的人工血管成功替代狗身上的動脈[11]，此後各國學者測試以各種材料來製作人工血管。在 1957

年以達克龍做為動脈血管替代物的人工血管材料正式商品化上市。在 1970 年代鐵氟龍被開發成為新的合成人工血管材料，但是其在使用成效上並無明顯優於達克龍之處，因此在臨床人工血管移植的使用上仍以達克龍為主 [12]。現在大管徑的人工血管已經廣泛地運用在研究及臨床上，但是小管徑的人工血管因為長期暢通率不佳的關係，在應用上仍受到許多限制。

2.1.4 血管移植之人工血管

人工血管之使用目的是作為受傷之動脈及靜脈的移植替代物、阻塞動脈之分流或洗腎患者進行血液透析所需的動靜脈移植瘻管。

理想的人工血管應具備以下特性[9]：

1. 容易取得與滅菌。
2. 具良好的生物相容性與抗血栓性。
3. 感染率低。
4. 植入後具有恆定可靠的強度。
5. 縫合性良好。
6. 植入後具高暢通率，不易糾折。
7. 不會參與其他血管的退化，不會引起周圍組織產生不良反應。
8. 材質順應性與自生血管相近，避免引起吻合處產生應力。

目前常用的人工血管分為三大類[7]：

1. 生物組織型人工血管(Biological Vascular Graft)
2. 合成型人工血管(Synthetic Vascular Graft)
3. 生物混合型人工血管(Biohybrid Vascular Graft)

生物組織型人工血管是從生物體內取得的天然血管，依來源可分為自體移植(Autograft)、同種異體移植(Allograft)及異種移植(Xenograft)血管。自體移植血管是從病患自身取下的血管，通常為腿部的隱靜脈或胸部的內胸動脈，此類血管不會因免疫系統的排斥而受到攻擊，是小管徑人工血管之中表現最好的，其缺點為血管的來源有限。同種異體移植血管為取自同種異體的血管，主要從往生者體內取得，經抗生素滅菌處理並低溫保存，但是其免疫反應的排斥作用較自體移植血管嚴重，來源有限，並有傳染疾病的顧慮。異種移植血管為取自異種生物體的血管，主要從哺乳類動物(牛、馬、羊和豬等)身上取得，經化學及滅菌處理，以降低其抗體原力及增強其血液相容性與機械強度，但移植後容易發生血栓、血管糾結與動脈瘤等病變。

合成型人工血管是利用合成的方法得到高分子材料，經加工技術製成人工血管，此類材料通常具有較好的機械性質，但是其生物相容性較不好，目前已商業化的材料有達克龍(Dacron)與鐵氟龍(ePTFE)等。達克龍人工血管是目前已商品化的人工血管之一，以編織的方式製成，可分成針織與梭織，具有良好的機械性質，適用於血壓較高的主動脈與大管徑動脈。由於

是利用編織的方法製作，其孔徑較大，在手術前必須先經預凝血處理，以避免移植後發生漏血的情形。此外，達克龍的血液相容性不佳，在小管徑血管的應用上常易發生阻塞，不適合當作小管徑的人工血管。鐵氟龍為一種化學抵抗力極佳的高分子材料，鐵氟龍人工血管的表面具高負電性，其血液相容性佳，不需預凝血，容易縫合，但是其缺乏縱向彈性，移植後易導致血管壁生成假性動脈瘤。

生物混合型人工血管是在高分子材料的人工血管表面鍍上一層生物性材料，以提高其生物相容性。常用的生物材料有蛋白素(Albumin)與明膠(Gelatin)等。為了防止人工血管的血栓產生和血管壁的異常增厚，將患者本身的內皮細胞分離出來後種植在人工血管的內層，這種將人工血管內皮細胞化的做法，就是組織工程人工血管的一種[13]，組織工程人工血管是利用組織工程製作出類似人體血管的替代物。

本研究旨在製作出類似人體血管構造之小管徑人工血管，從體外的細胞培養開始，希望可以早日應用於組織工程上。

2.1.5 血管之順應性

順應性(Compliance)是指某項結構被牽扯的容易程度。血管的順應性可定義為單位壓力改變下體積的改變，可以用 $\Delta V/\Delta P$ 符號表示。Baird和Abbott在1976年提出假設，人工移植血管缺乏順應性會造成擾流是小管徑動

脈血管移植失敗的主要原因[14]，並且由Abbott等人證實移植血管與被移植者血管順應性不匹配是有害的[15]。從血液動力學的觀點來看，若人工移植血管與被移植處血管的順應性不匹配，會導致血液流經縫合處附近時形成擾流，因而造成血栓與血管內膜增生，進而造成血管移植失敗，尤其是在小管徑血管的移植，因此在小管徑人工血管的發展上，血管順應性的匹配值得重視。血管順應性與楊氏係數(Young's Modulus)等機械性質有關，楊氏係數愈大則血管順應性愈小，反之亦然。

2.2 組織工程簡介

組織工程學是一門包含生物學、現代醫學、材料與工程學的跨領域學科，組織工程學主要應用於替代、修復或改善人體各種受到損害的組織或器官，使其恢復功能。目前國際間技術發展以研發製作人工皮膚、軟骨、硬骨、肝、血管、眼角膜、肌腱、結締組織、內分泌腺體還有神經再生、細胞治療及幹細胞等為主要項目。

2.2.1 組織工程學的發展

早期組織工程研究的發展會伴隨著人造生醫材料的發展而進步。在1960年代，開始嘗試使用人造材料合成的人工皮膚來治療燒燙傷的病人。在1970年代末，麻省理工學院的Eugene Bell實驗室成功在體外培養出皮

膚與血管等組織。在 1980 年代，麻省理工學院化工系教授 Robert Langer 與哈佛醫學院教授、麻州總醫院外科醫師的 Joseph Vacanti 等人想到利用科學的方法製造人體組織與器官的零件，以解決器官捐贈來源不足的問題，因此他們結合醫學與工程材料的知識，研發能修復人體組織與器官的零件，此為組織工程研究的開端。1992 年他們透過實驗證實了使用可分解的多孔狀結構高分子材料植入軟骨細胞可培養出新生的軟骨組織[16]，並且在老鼠背上成功地培養出人耳形狀的軟骨。

組織工程概念的確立是在 1987 年，由美國國家科學基金會提出和確定，並在 1988 年於加州太后湖舉行第一次組織工程會議。在 1990 年舉辦第一屆組織工程學術研討會。在 1995 年專業期刊《組織工程》(Tissue Engineering) 正式發行。美國與世界的組織工程學會分別於 1996 和 1998 年正式成立，此後組織工程成為生物技術研究領域的顯學[17]。許多國家都投入了大量的人力物力，進行包括軟骨、硬骨、肌腱、皮膚、神經、肝臟和胰臟等組織工程的研究，對於輸尿管、尿道、食道、小腸、腎臟和血管等的組織工程化研究也取得某些進展。

目前人體整形或受損組織修復替代的發展已經提升到高水平程度，除了腦以及大多數內分泌器官外，都可利用自體、同種異體、異種或人工的組織與器官來代替以達到美容或恢復受損組織的部分功能等目的。但是仍然存在異物排斥反應的可能性，像大面積燒燙傷病患在自體完好皮膚非常

有限的情況下，只能以覆蓋移植豬皮、遺體捐贈皮膚或含藥物敷料的方式來進行手術與治療，否則會有生命危險，但是往往可能存在嚴重的排斥反應，使其長時間得不到自體組織或器官的接受，最後造成手術與治療失敗。

因此，如何在體外培養出對人體無排斥與免疫反應正常的組織以提供醫療上的使用，這是醫學界和生物醫學工程學界共同追求的目標。組織工程使此目標得以實現，未來也許可以藉由組織工程在工廠生產大量的組織或器官，再利用手術替換因生病或傷害引起的受損組織，甚至是沒長好的組織或器官。

2.2.2 組織工程的定義與基本概念

組織工程的定義為應用生物與工程的原理發展活組織的取代物，用來修復、維持或改善人體組織的功能，此取代物將成為人體的一部分，並可對疾病提供特定的醫療，也就是移植具有正常或類似功能的人工組織或器官於損傷處，以期能夠達到修復之目的[18]。

組織工程的基本做法如下：

1. 由人體取出細胞。
2. 在體外將細胞培養至足夠數量。
3. 將細胞植入並培養於人工支架內。
4. 必要時添加一些所需的化學藥劑或生長因子以促進細胞的生長與

分化。

5. 將此體外培養的人工組織移植到人體內。

組織工程的三大要素如下：

1. 細胞 (Cell)
2. 支撐細胞生長所需的支架 (Scaffold)
3. 影響細胞行為的訊息因子 (Signal)

細胞可分為已分化完全的成熟細胞、具有分化成其他細胞能力的幹細胞與基因改質細胞。成熟細胞可依其來源分為自體、同種異體及異種細胞。自體細胞是最理想的細胞來源，不會產生免疫排斥的問題。如何有效地促進成熟細胞在體外的增生能力與取得來源受限等問題是其有待解決的課題。幹細胞是指未分化且分裂增生能力極強的原始細胞。找出誘導幹細胞分化為特定成熟細胞的方法是其主要研究方向。基因改質細胞是利用基因工程技術改質後具有特殊功能的細胞。支撐細胞生長所需的支架主要是利用可分解的天然或合成高分子材料製備而成，具有多孔性的結構，以模擬原本體內細胞外間質的環境，使細胞能夠遷入並增生，之後支架會逐漸分解，讓受損的組織逐漸再生與修復。影響細胞行為的訊息因子是指各種生長因子與荷爾蒙，這些物質與細胞的受體結合後會於細胞內引發化學反應，啟動某些基因的表現，影響細胞生長、趨向與分化的行為，使組織可以成型。

組織工程可利用體外 (In Vitro) 或體內 (In Vivo) 的方式來進行，如

圖 2-1 與圖 2-2 所示[17]。所謂體外的方式，是指結合上述組織工程的三大要素，在實驗室無菌操作的環境下，培養出人體組織與器官，再由外科醫師植入人體；而體內的方式，則是僅提供人工細胞外間質與生長信息蛋白質分子，由醫師植入患部，使周遭組織與器官的細胞自行完成修復的動作。

本研究主要研討的對象，著重於支撐細胞生長所需的支架結構上，研究如何製備出可應用在組織工程上之管狀細胞生長支架結構。

2.2.3 細胞生長支架

組織的構成包括細胞、細胞外液體以及細胞外間質（Extracellular Matrix），細胞外間質是由基底層與許多相互交聯網狀結構的蛋白質和多醣所組成，其中最重要的是膠原蛋白（Collagen）纖維。膠原蛋白分為很多型式，各組織間或同組織的不同區域內所含之膠原蛋白形式會有所不同。這些細胞外間質及網狀纖維結構基本上就是細胞生長支架，支撐著組織的形狀。

胚胎的發育先由受精卵分裂，大約至桑葚期（約 128 個細胞時）細胞開始製造分泌細胞外間質（初期只是膠原蛋白），如果此時膠原蛋白的合成受到抑制，胚胎的發育就會停頓，由此可見細胞外間質對於細胞分裂以及組織的形成極為重要。而組織工程的做法卻相反，首先架好支架，讓細胞依附與生長在支架上，再逐漸形成組織。細胞生長支架的外型可以依照所

需來建構，以配合將植入人體組織的缺陷處。

細胞生長支架的來源有很多，可以分為天然與人工兩類。目前最常用的天然材料是由動物取得的膠原蛋白和一些含水膠質（如藻膠與洋菜膠）；人工合成的材料則有更多種類，如聚乳酸與聚甘醇酸（Polyglycolate, PLGA）等。膠原蛋白、聚乳酸與聚甘醇酸等高分子化合物經常被塑造成多孔性的結構，如同我們日常使用的海綿縮影，以便讓細胞進入黏附。

理想的細胞生長支架必須具有以下特性：

1. 材料在架構和功能上與天然的細胞外間質相似，具有良好的生物相容性（Biocompatibility）（無毒、無菌且不會引發其他免疫系統問題）、生物可分解性（Biodegradability）還有生物可吸收性（Bioresorbability）。
2. 製作方法簡易、快速且利於應用，並可以調節材料在物理、化學、生物及力學等多方面的性能。
3. 架構穩定，具有一定力學強度以支援新生組織的生長。

電氣紡絲所製作之纖維支架因為具有高孔隙率與面積體積比，所以很適合作為細胞生長的環境。

組織工程主要致力於組織和器官的再生與形成之研究，藉由材料科學、醫藥技術、生物科技與工程相關領域的進步，在模仿人體組織與器官形狀的模型支架中植入細胞，使細胞依模型生長成新的組織或器官，以修復人

體。此項技術對許多因器官衰竭而急需救治的患者而言，無疑是一大福音。

2.3 生物醫學上常用之高分子材料

生物可降解高分子材料各有其優缺點，例如聚乳酸(PLA)機械強度高，但是柔韌性(Flexibility)低；聚己內酯(PCL)柔韌性高，相對地，機械強度低。本研究以不同比例混合聚乳酸與聚己內酯，並且以不同收集速度製備人工血管細胞生長支架，以求擴大其適用的機械性質範圍，增加其應用性。

2.3.1 聚乳酸(PLA)

聚乳酸(又稱聚丙交酯)是具有塑性特質的高分子材料[19]，它是一種利用人工合成的生物可吸收性白色半結晶玻璃態高分子，其玻璃轉化溫度為 57°C ，熔點為 174°C 。在活體內，聚乳酸會經水解去酯作用而變成乳酸，乳酸為所有有機體內碳水化合物代謝的中間或最終產物，可藉由乳酸脫氫酶的催化而氧化成焦葡萄糖酸鹽，再應用於葡萄糖的合成或經檸檬酸循環被代謝成二氧化碳和水，從肺和腎排出。

聚乳酸被活體吸收的時間範圍相當大。在動物體內，聚乳酸被完全吸收掉的時間範圍從32周到超過4年；而於人體內，在植入後約12到18個月才會開始被吸收[20]。影響聚乳酸被吸收的因素包含其分子量、結晶性、植入部位、所製成植體的大小和形狀以及其製造和消毒方法等。

聚乳酸的生物分解性良好，能完全被自然降解，最終生成二氧化碳及水，不會造成環境的汙染，對人體也無害。其生物相容性與可降解性良好，在醫學藥物領域方面，可生產免拆型手術縫合線等，低分子量聚乳酸可作為藥物緩釋包裝劑等。其機械及物理性能良好，但是最大的缺點是柔韌性不佳，使得其本身的應用受到限制。

2.3.2 聚己內酯(PCL)

聚己內酯是具有半結晶生物可降解吸收的聚酯類高分子材料，其玻璃轉化溫度為 -60°C ，熔點為 60°C ，在室溫下呈橡膠態。聚己內酯可經由水解的過程而降解，其降解速度比聚乳酸慢，在人體內完全吸收和排除的時間為2到4年，分子量越大，吸收時間越長。聚己內酯具有生物相容性，且不具有毒性。聚己內酯對小分子藥物有很好的通透性，在生物降解聚酯材料中，其藥物通透性最好。聚己內酯可與其他聚酯嵌段和接枝共聚，形成具有多組分微觀相分離結構特徵的聚合物[21]。聚己內酯可以廣泛地應用於很多的方面[22]，例如：藥物釋放系統[23]，骨骼的支架[24]，而且其降解較慢的特性也可用於尿道支架[25]及肌肉骨骼組織工程[26]。

聚己內酯具有生物相容性、生物可分解性以及高的柔韌性，但是機械強度較低，所以限制了其在許多範圍上的應用，不過聚己內酯適合與多數的聚合物進行摻合，因而常用來與其它材料共混，以提高在市場上的應用

與競爭力。

2.4 電氣紡絲

電氣紡絲的原理早在 1900 年就被發現，當時人們將熔融狀態的封蠟置於一高壓電場中，發現會有固態的纖維由高壓端被射出，最後形成薄膜狀沈積物。

電氣紡絲是採用高壓電場的帶電荷噴嘴，將溶液或熔融狀態的高分子聚合物液體射出，溶劑揮發或冷卻而固化成紡絲後，形成纖維網材。電氣紡絲法在 70 多年前就已經被開發成功，但是直到 20 世紀末，因為奈米科技的興起才開始受到重視，其中又以過濾、生醫以及感測為主要應用領域。

電氣紡絲所製作之纖維特點為孔洞性高、面積體積比大，可進一步應用於生醫領域，其中又以藥物控制施放、組織工程以及創傷敷材為主。近年來電氣紡絲在細胞生長支架領域的研究應用有大幅增加的趨勢。

2.4.1 電氣紡絲的發展

在 1882 年 Rayleigh 最早開始研究導電液體在電場中的行為[27]。在 1914 年 Zeleny 等學者便開始研究電氣紡絲，但此時的研究還侷限於熔融狀態的物質[28][29]。

在 1934 年 Formhals 申請了第一個電氣紡絲的專利，是一種利用流體電荷

斥力拉伸製備高分子纖維的裝置，此後研究方向便著重於溶液狀態的物質上，Formhals Anton發明的電氣紡絲技術是現今技術發展的先驅。在1964年以後，隨著光學攝影技術的進步，Taylor便利用連續式光學攝影的方式，找出了臨界電壓以及液滴的平衡外型，也就是俗稱的泰勒錐（Taylor Cone）[30][31][32][33]，平衡半角（Semi-vertical Angle）為 49.3° 。

在1966年Simons以電氣紡絲法成功製作出輕薄的不織布型態薄膜[34]。在1970年任職於Dupont的Baumgarten發表一系列以高速攝影機拍下的電氣紡絲相片，使電氣紡絲的過程和運作方式更為人所知。1971年Baumgarten更利用電氣紡絲製作出直徑只有0.05~1.1微米的纖維[35]，電氣紡絲已經進步到可製作出奈米尺寸纖維的能力。在1993年美國俄亥俄州AKRON大學的Reneker教授研究團隊以此技術成功製備出多種高分子奈米纖維[36][37]，才使得此技術引起人們注意。由於此技術製程簡單，功能性強，而且具有應用的潛力，吸引了不少人進行相關的研究，近年來相關的專業期刊論文快速增加[38]。

2.4.2 電氣紡絲的原理

電氣紡絲的基本原理是利用一高壓電場作為驅動力[39]，將含有高分子的離子溶液或熔融狀態的高分子置於毛細管（Capillary）中，接上高壓電，使其中產生高電壓差。穩定的製程中可分為基料（base）、液柱（jet）、展開

(splaying) 以及收集 (collection) 四個部分[36]，當高分子溶液從針頭前端流出時，初始之半圓形液滴會因高壓電場作用而形成泰勒錐，當電壓逐漸升高後，電場電壓會大於溶液的表面張力（內聚力），便會從泰勒錐頂端噴射出一高分子溶液之飛行軌跡(jet)。當此高分子溶液逐漸接近收集板時，由於拉扯的電場面積變大，便會發生展開的現象，使高分子溶液分裂成更細小的纖維，沈積於收集板上。纖維與纖維間會形成交錯連結的網路結構[40]，擁有良好的張力強度。

電氣紡絲能藉由射出電壓、溶液黏度、飛行距離和收集時間等條件來控制，製作出單一直徑大小的纖維[37]，進而可以精準控制孔洞率、孔徑等，來達到不同目的及效果的需求。

在收集距離的研究方面，在 2002 年 Magelski 等人的研究發現纖維在形態及直徑上並不會因為收集距離而改變[41]，Buchko 等人的研究中則指出，當收集距離縮短，纖維型態會由圓形變扁平[42]。Magelski 的研究中另外也有溶液流量對纖維型態和直徑的研究，研究指出當流量上升時纖維直徑有明顯變大的趨勢，而 Zong 等人的研究更指出當流量上升時不但纖維直徑會變大，而且還會出現大量珠狀或紡錘狀的結構[43]。

電氣紡絲法是一種物理性質的加工方式，可將溶液或熔融狀態的高分子紡織成不織布型態的薄膜，並具有下列優點：

1. 纖維尺寸可達奈米級。

2. 纖維結構與直徑大小可由溶液黏度 (Solution Viscosity)、電場強度 (Electric Field Intensity)、收集距離 (Deposition Distance) 以及收集時間 (Deposition Time) 等精準調控。[44]
3. 成形後之不織布薄膜適合當作藥物載體，可加入抗生素 (Antibiotics) 或成長因子 (Growth Factor) 等功能性載子，使薄膜的功能性增加 [45]。
4. 電氣紡絲法屬於單一加工過程 (Single Process) [46][47]。
5. 所需設備不易受到限制。

歸納以上電氣紡絲的優點，配合生醫用的生物可分解與相容性材料，

可應用電氣紡絲的優勢於幾個主要領域：

1. 藥物控制釋放：可進一步解決藥物釋放不均等現階段藥物技術的問題。
2. 組織工程：因為電氣紡絲所製作之纖維結構的高面積體積比以及高孔隙性，十分適合生物細胞的生長，因此可培養人體或動物細胞。
3. 創傷敷料：質量輕薄，搭配藥物控制施放可改善傳統創傷治療材料。

2.5 電氣紡絲在組織工程領域之應用

2.5.1 心血管組織工程

血管系統的主要功能是運送氧氣及養分到組織及器官，帶走其中的二氧化碳及代謝廢物並傳送訊息因子。近年來，台灣十大死因中，心臟血管疾病一直高居第二位，其中冠狀動脈疾病又高居心血管疾病的第三位。動脈粥狀硬化不論發生在冠狀動脈或周邊血管是造成成人死亡的主要原因。目前治療方式選擇並不多，包括氣球血管成形術及血管支架置放術，或截取自體及其他生體的血管作繞道手術，所以在治療動脈阻塞的外科手術中，常常須要替代血管。但以上這些方法都有不低的再阻塞率。組織工程的發展可為冠狀動脈硬化的患者提供另一種選擇，但移植血管所需具備生物相容性和血管特有的生物活性，是人工製造血管的一大挑戰。

基於以上的需求，心血管組織工程的研究方向轉為以尋找合適的替代人工血管為主流[48]。人工移植替代血管的主要挑戰是必須承受血液流動時血管脈動引起的高壓力及高血液流速。人工替代血管的另一個困難點為在設計製作最佳人工血管的材料、結構和製作方式的同時，又要讓細胞有良好的附著性並生成完整的單細胞層以減少血栓的形成。

目前人工製作管狀結構的方式有：

- 1.微機電方式：以半導體技術中的黃光製程與微電鑄技術製作出不銹鋼及矽晶片基板之母模，再利用微熱壓技術製作出高分子材料微管

道[49]。

2. 高分子薄膜成形：先將高分子材料製作成具網狀結構之薄膜，再將

薄膜捲成管狀結構[50]，圖2-3。

3. 電氣紡絲：以高壓電將高分子溶液進行噴灑，收集在以一軸心旋轉的

棒材上，製成管狀結構。

以電氣紡絲製作細胞支架在人工血管移植方面，具有很大的發展潛力，因為其具有較良好的機械及結構性質，產品製作較易控制且易於再製造等優點。所以近年來逐漸被製造來作為心血管組織構造替代的用途[51][52][53][54][55]。

2.5.2 方向性纖維支架結構

早期的研究宣稱奈米級的結構特性會影響細胞的行為。近來的報告中驗證了細胞會具有較佳的附著性及組織性在甚至比細胞還小的纖維結構上[56]。在天然的動脈中間層裡，具有呈線性且方向性排列的次微米肌肉纖維結構，即細胞外間質(ECM)。因此Boland等人在2004年發表了使用膠原蛋白及彈性蛋白為材料，以電氣紡絲方式，試圖做出與天然動脈構造相仿的纖維支架[57]。後來Xu等人嘗試電氣紡絲方式，以P[LLA-CL](75:25)為材料，做出具直線排列特徵的可降解纖維結構[51]，如圖2-4所示。並證實了相對於平面式的高分子薄膜，在直線排列的奈米纖維支架結構下，平滑肌細胞

的附著性及繁殖速率都具有顯著的改善。

以電氣紡絲製作方向性纖維已有許多的研究及探討，如 C.Y.Xu 等人利用大直徑轉盤邊緣的高切線速度，來使纖維在收集後呈現在同一個的方向的排列方式，如圖 2-5 所示，可以得到直線性的纖維結構[51]。Dan Li 等人，則提出以兩個平行放置的導體為收集端，纖維在落下過程中，會受到電場力的拉扯，當接近收集端時，纖維會被庫倫力向兩邊的導體拉直，最後纖維非常接近收集端時，則會受到凡得瓦力拉扯，使的纖維兩端收集在兩平行放置接地導體時，以垂直於導體方向排列[58]，如圖 2-6 所示。



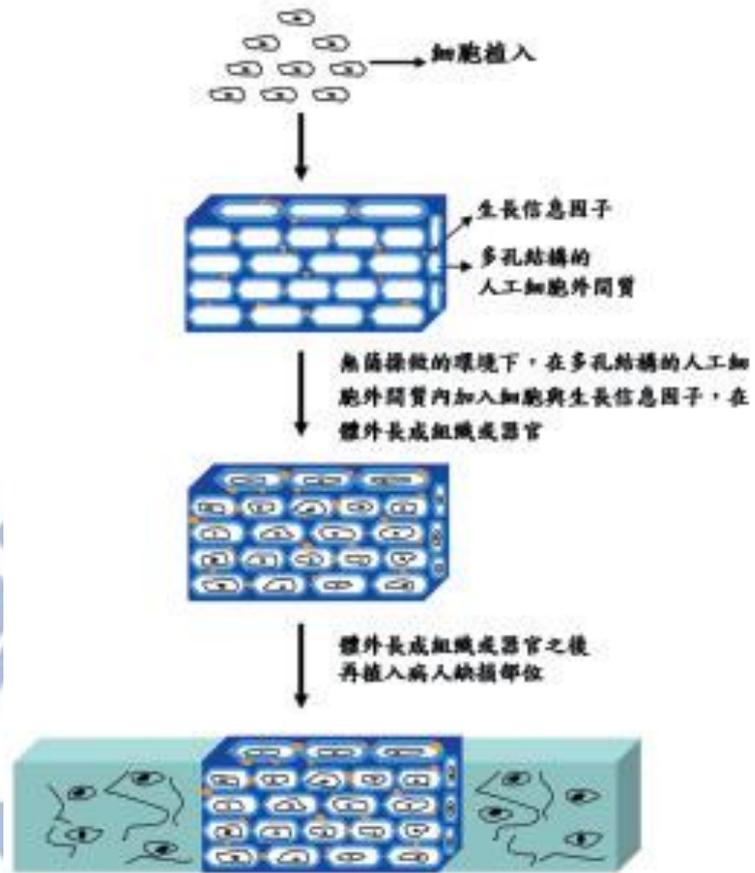


圖 2-1 體外再生方式 (in vitro) [17]

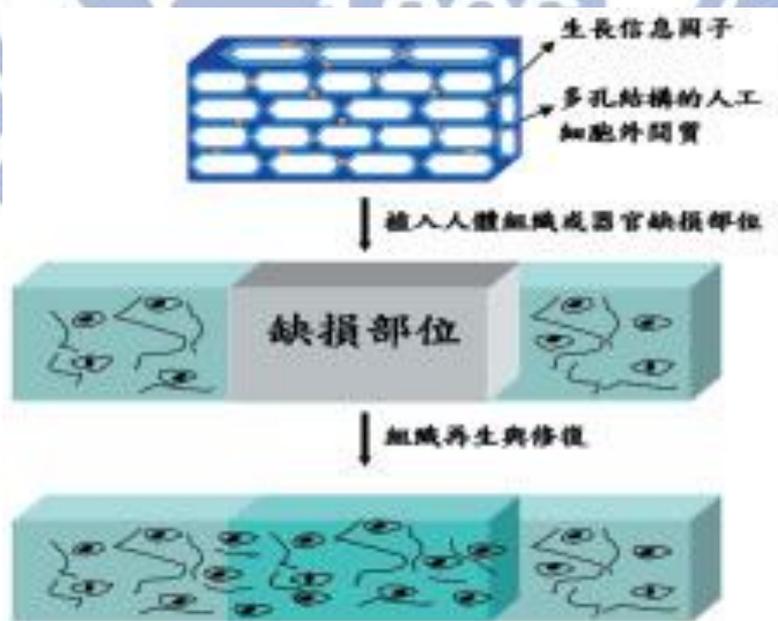


圖 2-2 體內再生方式 (in vivo) [17]

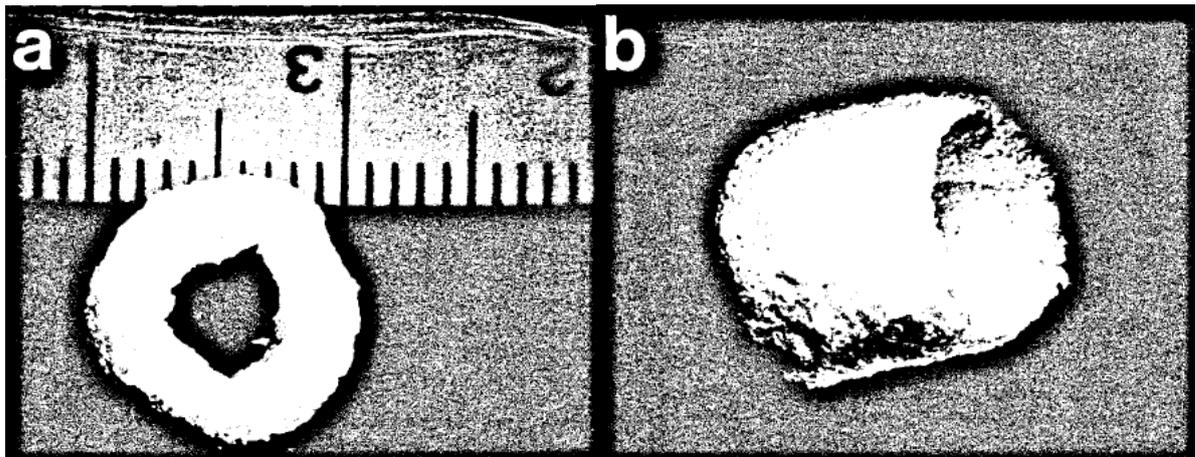


圖 2-3 高分子薄膜製備之管狀結構(a)剖面視角 (b)等視角[50]



圖 2-4 光學顯微鏡觀測下之具直線性纖維支架[51]

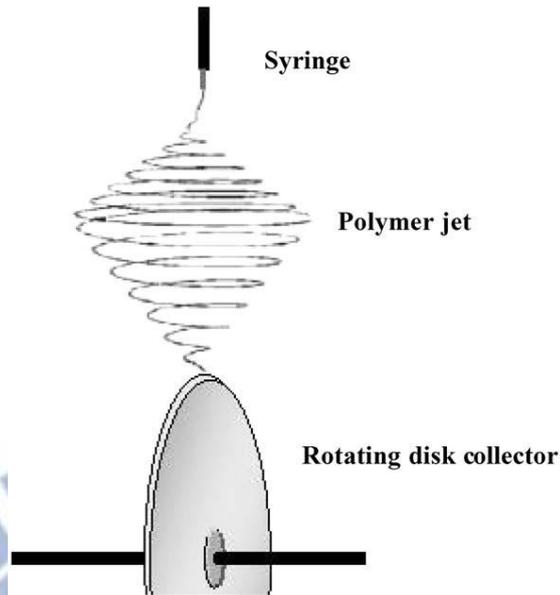


圖 2-5 使用碟型收集器高速轉動收集直線纖維之裝置[51]

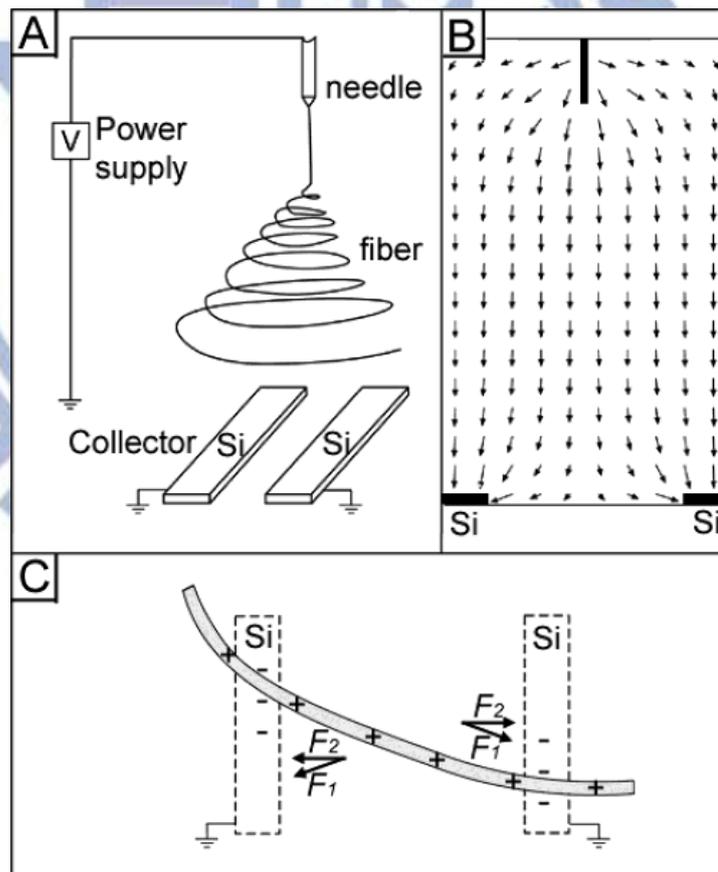


圖 2-6 以兩平行放置導體方式收集方向性纖維[58]

第三章 研究材料與方法

3.1 研究流程

本研究主要目的是以電氣紡絲法製備小管徑纖維結構之生物可分解人工血管細胞生長支架，測試 PLA/PCL 以不同比例與收集速度所產生之纖維直徑與排列情形，並且觀測其幾何結構、機械性質、親水性、孔隙率，並且將製備出的人工血管細胞生長支架在體外植覆血管內皮細胞進行靜態培養，藉由 HE 染色以觀察細胞生長情形，並且量測血管內皮細胞在人工血管細胞生長支架上靜態培養後的細胞活性，最後為了模擬人體的血流環境，將動態植覆與靜態培養後的人工血管細胞生長支架以靜脈與動脈流速進行動態培養。期望可以因此在體外培養出組織工程人工血管，使小管徑人工血管細胞生長支架有機會應用在組織工程、體外試驗與臨床移植上。

使用的原料為聚乳酸、聚己內酯的高分子材料混合溶液，首先確立基本的小管徑人工血管細胞生長支架之製備流程和實驗儀器，以相同濃度不同體積比例與收集棒轉速製備小管徑人工血管細胞生長支架，之後對所製備的成品做觀測與分析，並且植覆血管內皮細胞觀測細胞生長情形。研究的流程大致如圖 3-1 所示，主要可分成七個部分：

1. 首先確立實驗設備與方法。
2. 利用 15%(w/v)濃度的 PLA/PCL 以不同體積比例(純 PLA、3:1、1:1、1:3 與純 PCL)混合，並以不同的收集棒轉速(60、1500、3000、

4500、6000、7500、9000 與 10500rpm)進行電氣紡絲之收集，製備人工血管細胞生長支架。

3. 觀察人工血管細胞生長支架之纖維結構，並分析不同比例及轉速其纖維直徑及方向性之關係。
4. 親水性之量測。
5. 在人工血管細胞生長支架上動態植覆血管內皮細胞後進行靜態培養，並且觀察其細胞生長情形與測量細胞活性，另外在動態植覆與靜態培養後進行靜脈與動脈流速之動態培養，並且觀察其細胞生長情形。
6. 孔隙率之量測。
7. 機械性質之量測。

以上研究的流程和方法將會在以下幾個小節裡詳細介紹。

3.2 小管徑人工血管細胞生長支架之製備

3.2.1 實驗設備

小管徑人工血管細胞生長支架之製備主要實驗儀器與設備如下：

1. 高壓電源供應器，友聲電子 (YSTC)，1V~30KV，台灣製。
2. 注射式針筒幫浦，KDS-100，KDscientific，美國製。
3. 壓克力絕緣箱。

4. 不鏽鋼平口針頭，規格 21G，針長 1 英吋，內徑 0.02 英吋，外徑 0.032 英吋，拿順企業有限公司。
5. 玻璃注射筒，10cc。
6. 棒狀收集器及馬達座。
7. 穩壓式直流電源供應器，Topward，台灣製。
8. 正立反射式光學顯微鏡型號為 Olympus SD30，日本製，主要功能為初步觀察電氣紡絲的成絲情形。

整體的實驗架設示意圖如圖 3-2 所示，直流高壓電源供應器用以控制實驗的操作電壓，可操作範圍在 1V~30KV 間，正極接頭接於不鏽鋼針頭上，而接地接頭接於收集處。隨著電壓的高低不同，電氣紡絲所產生的纖維粗細也會有比例的變化；注射式針筒幫浦用來控制流速，當流速有所改變時，電氣紡絲所產生的纖維型態會有所不同；壓克力是良好的絕緣材料，可將實驗操作環境與外界隔絕，降低外界環境對高壓電場的影響，減低實驗誤差。

藉由聯軸器將收集棒與直流馬達連接起來，利用改變直流馬達的工作電壓來控制收集棒旋轉速度以製作不同方向性的小管徑人工血管支架。穩壓式直流電源供應器供應馬達一穩定的電壓，使馬達能以一定的轉速持續穩定地作動。

設備配置一般可分為兩種，其一為臥式，溶液射出方向為水平方向，

電場之壓差為水平方向，收集板垂直於地面；另一種為立式，溶液射出方向為垂直方向，電場之壓差為垂直方向，高壓由上方通入，收集板和接地位置設置於下方、與地面平行。因為在溶液濃度較高時針頭處容易堆積，堆積一定時間後會自然掉落，使用立式電氣紡絲在堆積溶液掉落時可能會造成收集物損毀，因此本實驗採用的是臥式電氣紡絲架構，圖 3-3 為整個電氣紡絲架構之設備圖。

3.2.2 製備步驟

小管徑人工血管支架基本製備步驟如下：

1. 溶液配製。摺疊注射筒前方連結之橡皮管與針頭倒入溶液時盡量使溶液直接滴至底部、避免碰觸筒壁。在溶液倒入注射筒後須迅速倒置，擠壓推筒使空氣排出避免在電氣紡絲時產生氣泡。
2. 電氣紡絲儀器架設。在馬達下以聯軸器接續一金屬棒（馬達與金屬棒並未接觸），金屬棒以絕緣矽膠管包覆收集處的上端，並保留足夠穿過培林並固定於聯軸器的長度。
3. 將直徑 4mm 不鏽鋼收集棒收集處裹上融融的葡萄糖以便脫模，冷卻後量測其外徑，控制其外徑約為 4.1mm。為避免殘留的葡萄糖會對實驗造成影響，本實驗使用細胞培養用之葡萄糖。
4. 在電氣紡絲穩定情況下收集，依比例與轉速的不同收集時間會有差

異，本實驗所使用的收集棒長度約為 26.5cm，收集處長度 15cm。

5. 將收集完成之棒材浸入水中適當時間後進行脫膜，繼續浸泡新的水中 4 小時以上後取出放置乾燥。
6. 將製備之小管徑人工血管細胞生長支架作適當的剪裁(去掉前後端外徑差異較大的部分)。

本實驗經由上述步驟製作出內徑約 4.1mm、外徑約 5.0mm、管壁厚約 0.45mm 之小管徑人工血管支架。

3.2.3 溶液配製與實驗參數

本實驗所採用的器材與材料如下：

1. 電子天平，PB303，Mettler，瑞士製。
2. 聚乳酸，(PLLA：PDLA；95：5)，分子量 180000-200000，偉盟工業，台灣製。
3. 聚己內酯，Aldrich，美國製，分子量 70000-90000。
4. 氯仿 (Chloroform)，試藥級，美國製，圖 3-4。

以上兩種高分子材料聚乳酸及聚己內酯皆以氯仿為溶劑，本實驗首先找出 PLA 與 PCL 在相同濃度不同體積混合比例(純 PLA、3：1、1：1、1：3 與純 PCL)的最低成絲濃度，再提高濃度觀察成絲情形，找出最符合本實驗需要的濃度為 15%(w/v)。實驗控制參數：操作電壓 7000V、幫浦流速：

1.5ml/hr、工作距離(針頭至收集處的距離)：20cm、馬達轉速：60、1500、3000、4500、6000、7500、9000 與 10500rpm。

3.3 人工血管細胞生長支架纖維結構之觀察

3.3.1 實驗設備

人工血管細胞生長支架纖維結構觀察的主要實驗設備為掃描式電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope ; SEM)，自從 1942 年發展出實驗室用掃描式電子顯微鏡之後，掃描式電子顯微鏡就在微小材料的結構研究分析上扮演著重要的腳色。隨著各類材料的演進，研發上也有許多不同的觀測需求，因此掃描式電子顯微鏡的功能也不斷地被擴充，像是電子背向散射繞射 (EBSD) 可以協助分析晶粒的成長取向、陰極發光偵測器 (CL) 可以由各種不同發光波長的訊號來成像。近年來場發射掃描式顯微鏡 (Field Emission Scanning Electron Microscope) 因為影像的解析度可以達到奈米等級，在研究微小材料上有著廣泛的應用。

3.3.2 實驗方法

將人工血管細胞生長支架裁切成適當大小後，用雙面膠貼於載台上，先鍍上白金後，放入掃描式電子顯微鏡中，拍攝並截取影像。

3.4 接觸角量測

3.4.1 實驗設備

接觸角量測主要實驗儀器與設備為接觸角探針量測儀，用於量測材料的親疏水性，藉由側面的 CCD 去觀測材料的接觸角，接觸角大於 90° 表示材料具疏水性，接觸角小於 90° 表示材料具親水性。本研究中所使用之接觸角探針量測儀其廠牌及型號為 FENTAD FTA-98095，分析軟體為 FTA32。

3.4.2 實驗方法

為了量測人工血管細胞生長支架之親水性，本實驗使用座滴法將定量 $8\mu\text{l}$ 的超純水滴到試片表面上，藉由側面的 CCD 去觀測其接觸角，再利用分析軟體計算得到人工血管細胞生長支架之接觸角。

3.5 內皮細胞之培養

內皮細胞之培養主要分為動態植覆、靜態培養與動態培養三個部份。一般細胞培養都是將細胞懸浮液加於要培養表面上利用重力使細胞貼附，不過由於人工血管細胞生長支架為曲面，細胞會集中貼附於底面，為了使細胞均勻地貼附於人工血管細胞生長支架的內壁，動態植覆細胞比重力植

覆的方式為佳[59]。另外，為了模擬血管內皮細胞所生長的血流環境，利用流動的培養液來培養細胞。

3.5.1 實驗設備

內皮細胞之培養主要儀器與設備如下：

1. 恆溫水浴槽，YIH DER。
2. 無菌操作台，HERA Safe。
3. 二氧化碳培養箱，HERA Cell 150。
4. 高溫高壓滅菌爐。
5. 倒立透射式光學顯微鏡，型號為 Leica DMIL，德國製品，主要功能為觀察細胞的生長情形，具有明視野、暗視野、相位差、螢光觀察、影像截取等功能。
6. 血球計數盤。
7. 滾輪式混合器，圖 3-5。
8. 蠕動幫浦，圖 3-6。

其中滾輪式混合器為本人自行設計加工組裝，首先購得減速馬達、減速齒輪組、齒輪、培林、工程塑膠棒與不鏽鋼棒，將減速齒輪組裝設完成，並將工程塑膠棒軸心鑽孔並插入不鏽鋼棒以製作成滾軸，將不鏽鋼棒串入齒輪中心，利用齒輪使滾軸具有相同的旋轉方向與速度，另外，將設計好

的壓克力架交由奇華廣告事業有限公司製作完成後，組裝成簡易式滾輪式混合器，並利用直流電源供應器調整輸入電壓與電流以控制轉速。

3.5.2 實驗藥品

內皮細胞之培養主要藥品如下：

1. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS) , Gibco。
2. Trypsin-EDTA Solution , Sigma。
3. Trypan Blue Solution , Sigma。
4. MCDB 131 , Gibco。
5. Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose(DMEM Low Glucose) , Gibco。
6. Sodium Bicarbonate , Sigma。
7. Fetal Bovine Serum(FBS) , HyClone。
8. Hydrocortisone , Sigma。
9. Ethanol Absolute , Panreac。
10. Recombinant Human EGF Lyophilized(HEGF) , Gibco。
11. L-Glutamine , Gibco。
12. Penicillin Streptomycin(PS) , Gibco。

DMEM Low Glucose 培養液之調配方式如下：

1. 將 DMEM Low Glucose 粉末培養基溶於 650ml 超純水中，攪拌使其溶解。
2. 稱取 1.5 g/L 之碳酸氫鈉(Sodium Bicarbonate)粉末溶於 200ml 超純水中，攪拌使其溶解。
3. 將溶解的碳酸氫鈉溶液加入溶解的培養基中混合，並添加超純水至溶液體積為 900ml，繼續攪拌至完全溶解。
4. 以 0.22 μ m 無菌過濾膜過濾培養基，並以每瓶 450ml 的容量分裝至滅菌後的血清瓶中，於 4 $^{\circ}$ C 保存備用。
5. 要用前將 50ml FBS、5ml PS 與 450ml 培養基放在 37 $^{\circ}$ C 恆溫水浴槽中溫熱後於無菌操作台調配成 DMEM Low Glucose 培養液。

MCDB 131 培養液之調配方式如下：

1. 以 1mg/ml 的濃度將 Hydrocortisone 溶於純酒精，以 MCDB 131 培養基稀釋體積成 20 倍，使其濃度為 50 μ g/ml，以 0.22 μ m 無菌過濾膜過濾後分裝成 10ml 至無菌離心管中，於-20 $^{\circ}$ C 冷凍保存備用。
2. 以 10 μ g/ml 的濃度將 HEGF 溶於 MCDB 131 培養基中，以 0.22 μ m 無菌過濾膜過濾後分裝成 0.5ml 至無菌離心管中，於-20 $^{\circ}$ C 冷凍保存

備用。

3. 將 MCDB 131 培養基放在 37°C 恆溫水浴槽中溫熱後於無菌操作台以每瓶 440ml 的容量分裝至滅菌後的血清瓶中，於 4°C 保存備用。
4. 要用前將 50ml FBS、10ml Hydrocortisone、0.5ml HEGF、5ml PS 與 440ml 培養基放在 37°C 恆溫水浴槽中溫熱後於無菌操作台調配成 MCDB 131 培養液。

依據張晃猷師門提供的 HMEC-1 細胞株培養液調配方式，將 DMEM Low Glucose 培養液與 MCDB 131 培養液以 1:1 等體積混合，並加入適量的 L-glutamine，調配成 HMEC-1 細胞株的培養液。

3.5.3 動態植覆的實驗方法

本研究是用 HMEC-1 細胞株於人工血管細胞生長支架上植覆細胞以進行實驗，細胞代數為 26~35 代，培養液主要成分為 MCDB 131 培養液和 DMEM Low Glucose 培養液以等體積混合。為了使血管內皮細胞於人工血管細胞生長支架內壁均勻貼附，實驗於小管徑人工血管細胞生長支架內壁動態植覆細胞，人工血管細胞生長支架長度控制為 5mm，首先浸泡 70% 酒精與照射紫外光 1 小時進行滅菌，以滅菌過的超純水浸泡 3 次，每次 10 分鐘，去除酒精殘留，最後浸泡 DPBS 溶液中備用，要植覆細胞前將人工血

管細胞生長支架置入內徑 5mm 的無菌矽膠管內，並且以滅菌過的鐵氟龍塞塞住支架的一端。在無菌操作台吸除培養皿中的舊培養液，將培養皿上的細胞以 DPBS 溶液清洗兩次，將適當濃度的 Trypsin-EDTA 溶液加入培養皿中作用使細胞從培養皿分離，待細胞分離後加入新培養液中止作用，並均勻混合細胞液，以等體積比將細胞液與 Trypan Blue 溶液均勻混合，利用血球計數盤測量細胞液的細胞濃度，調整細胞濃度至 $4.879 \times 10^5 \text{ cells/cm}^3$ ，並將 66 μl 細胞液注入支架內腔後用鐵氟龍塞塞住另一端，植入單位內壁表面積細胞密度為 $5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 的細胞量，在溫度 37°C、5% CO₂ 濃度的二氧化碳培養箱中，以轉速 0.1 rpm 於滾輪式混合器上動態植覆 1 天，使細胞均勻貼附。

3.5.4 靜態培養的實驗方法

將前述不同體積比例(純 PLA、3:1、1:1、1:3 與純 PCL)與不同收集棒轉速(60、1500、3000、4500、6000、7500、9000 與 10500rpm)之人工血管細胞生長支架，動態植覆 1 天後，從矽膠管中取出放入 48well 的培養盤中，先用 DPBS 溶液浸泡後緩緩地吸盡，再加入 0.4 ml 培養液將人工血管細胞生長支架完全浸泡，分別進行靜態培養 2 天與 6 天。

3.5.5 動態培養的實驗方法

另外將製備條件為體積比例 1:1 以及收集棒轉速分別為 1500、3000、4500、7500 與 10500rpm 的人工血管細胞生長支架，分別動態植覆 1 天、動態植覆 1 天後靜態培養 2 天與 6 天之後，將人工血管細胞生長支架移出置入新的無菌矽膠管中，並以止漏帶封住後用矽利康加強密封性，待數小時矽利康固化後，連接到裝入 100ml 培養液的無菌血清瓶管線上，並以蠕動幫浦控制流速，以靜脈流速(12 cm/s)動態培養 2 天後取出人工血管細胞生長支架，進行 HE 染色，並更換新的培養液，將剩下的人工血管細胞生長支架繼續以動脈流速(30 cm/s)動態培養 2 天後，取出進行 HE 染色，並更換新的培養液，最後將剩下的人工血管細胞生長支架以動脈流速(30 cm/s)動態培養 2 天後，取出進行 HE 染色。

3.6 蘇木精-伊紅(HE)染色法

3.6.1 實驗設備

主要實驗設備為倒立透射式光學顯微鏡，廠牌與型號為 Leica DMIL，德國製品，主要功能為觀察蘇木精-伊紅(HE)染色後原本細胞在人工血管細胞生長支架上的生長情形，並且截取所觀察到的影像。

3.6.2 實驗藥品

蘇木精-伊紅(HE)染色法主要藥品如下：

1. DPBS 溶液。
2. 多聚甲醛(Paraformaldehyde)，Sigma。
3. 蘇木精(Hematoxylin 3870)，J.T.Baker。
4. 伊紅(Eosin Alcoholic 3871)，J.T.Baker。
5. 95%酒精(Ethanol)，友和貿易股份有限公司。

4%多聚甲醛(Paraformaldehyde)溶液以每 100ml 的 DPBS 溶液添加 4g 多聚甲醛之比例調配後，隔水加熱，控制水溫在 60~65°C 之間，攪拌到多聚甲醛粉末大致上溶解。

3.6.3 實驗方法

蘇木素-伊紅(HE)染色法之步驟：

1. 先將培養過細胞的人工血管細胞生長支架用 37°C 溫 DPBS 浸泡 3 次以清洗人工血管細胞生長支架，每次 1 分鐘。
2. 用 4% 多聚甲醛(Paraformaldehyde)浸泡至少 30 分鐘以固定細胞。
3. 用超純水(Milli-Q Water)浸泡 1 分鐘。(蒸餾水以上等級即可)
4. 以蘇木精(Hematoxylin 3870)染色 5 分鐘。

5. 自來水(Tap Water)洗 1 分鐘。
6. 以伊紅(Eosin Alcoholic 3871)染色 1 分鐘。
7. 最後，以 95%酒精(Ethanol)浸泡 2 次，每次 2 分鐘，去除酒精後風乾處理。

3.7 MTT 活性試驗

3.7.1 實驗設備

MTT 活性試驗主要實驗儀器與設備為盤式酵素免疫分析儀(ELISA Reader)。此儀器測定的原理是量測被測物在特定波長下的吸光值。研究中使用之盤式酵素免疫分析儀其廠牌及型號為 Biochrom Anthos 2020。

3.7.2 實驗藥品

MTT 活性試驗主要藥品如下：

1. DPBS 溶液。
2. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide(MTT)，Sigma。
3. Dimethyl Sulfoxide(DMSO)，Sigma。
4. 培養液。

以每 1 ml 的 DPBS 溶液加入 5mg 的 MTT 粉末之比例調配出濃度

5mg/ml 的 MTT 溶液，於室溫避光並攪拌均勻後，以 0.22 μ m 的 filter 過濾滅菌，少量分裝後冷凍可保存六個月，要用時 4 $^{\circ}$ C 冷藏保存兩星期內使用。

MTT 的全稱為 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide，是一種淺黃色的試劑。MTT 活性試驗是利用活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶能使 MTT 溶液還原為紫色的不可溶性甲臍結晶，沉積於細胞中。再以二甲基亞砜（DMSO；Dimethyl sulfoxide）或酸性異丙醇溶解甲臍結晶，以酵素連結免疫吸附分析顯示儀測量吸光（OD）值，藉此了解細胞的生長情況。

3.7.3 實驗方法

MTT 活性試驗之步驟：

1. 將濃度 5mg/ml 的 MTT 溶液以 DPBS 溶液稀釋為 0.5mg/ml，再以培養液稀釋為濃度 0.05mg/ml 溶液，避光備用。
2. 將 0.4ml 上述溶液加入 48well 的培養盤中，培養人工血管細胞生長支架上的細胞 4 小時。
3. 將上述培養完細胞後的溶液緩緩地吸盡。
4. 加入等體積 0.4ml 的 DMSO 以溶解結晶。
5. 用振盪混合器以 120rpm 旋轉 10 分鐘，使結晶充分均勻溶解。
6. 吸取 0.2ml 溶液加入 96well 的培養盤中，以 570nm 波長量測吸光值。

3.8 孔隙率量測

3.8.1 實驗設備

孔隙率量測主要實驗儀器與設備為電子天平(PB303, Mettler, 瑞士製), 用於量測人工血管細胞生長支架之重量。

3.8.2 實驗方法

假設人工血管細胞生長支架為實心管, 利用材料密度乘上體積, 可得實心管的重量, 由於密度相同, 重量比即為體積比, 將試片重除以實心管重乘上 100% 可得實體體積所佔比率, 孔隙率=100%-實體體積所佔比率。

PLA 密度=1.25 g/ml

PCL 密度=1.145 g/ml

3 : 1 密度=1.222 g/ml

1 : 1 密度=1.195 g/ml

1 : 3 密度=1.17 g/ml

實心管重=材料密度×實心管體積

實體體積所佔比率(%)=試片重/實心管重×100%

孔隙率(%)=100%-實體體積所佔比率

3.9 機械性質量測

3.9.1 實驗設備

機械性質量測主要實驗儀器與設備為應力量測拉力試驗機，用於進行微拉伸試驗，研究中使用之微拉伸試驗機其廠牌及型號為 SHIMADZU AGS-H/EZ TEST。

試片經過拉伸試驗後可得拉力與位移之關係，經由計算得到應力與應變的曲線圖，可得到一些重要的參數，例如：降伏強度、楊氏係數、最大抗拉強度與破斷強度、延性等材料之機械性質。

3.9.2 實驗方法

機械性質量測是以 ASTM D882 為實驗依據，根據其規範決定試片大小及拉伸速率。

本研究將長度 5mm 的人工血管細胞生長支架沿軸向剪開，製作成寬度 5mm、厚度 0.45mm、長度約 14.3mm 的拉伸試片。將試片兩端夾持住並控制夾持距離 5mm，以拉伸試片原始長度為 5mm，拉伸速率：2mm/min 進行拉伸試驗，量測人工血管細胞生長支架之機械性質。

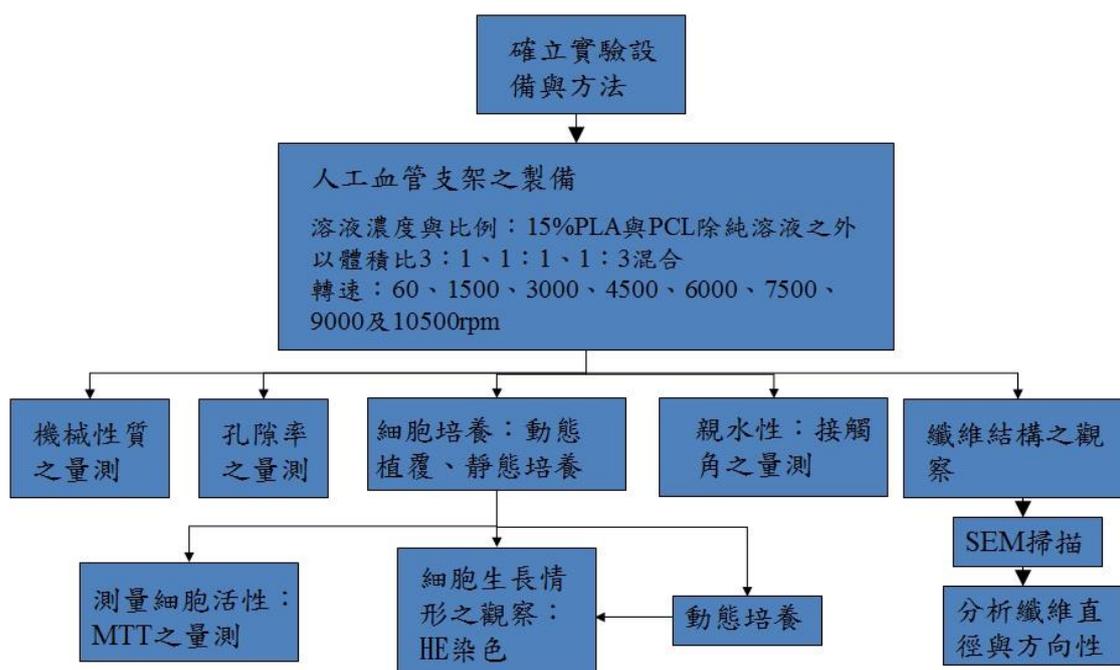


圖 3-1 實驗流程圖

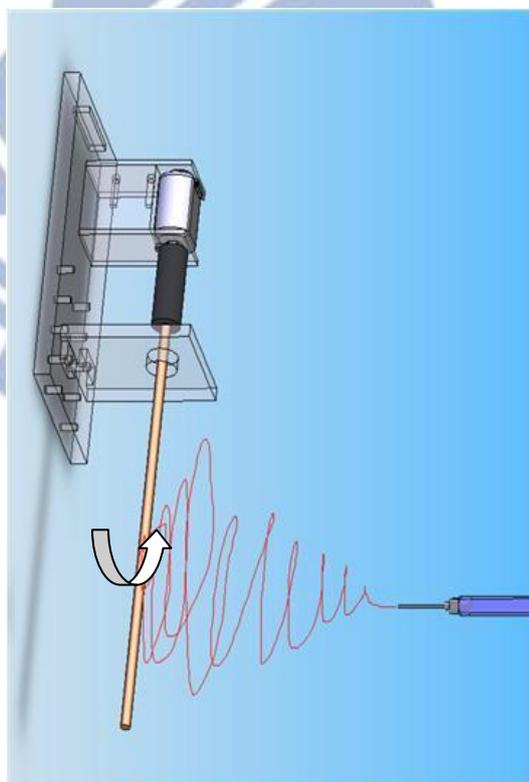


圖 3-2 以電氣紡絲法製備小管徑人工血管細胞生長支架之示意圖

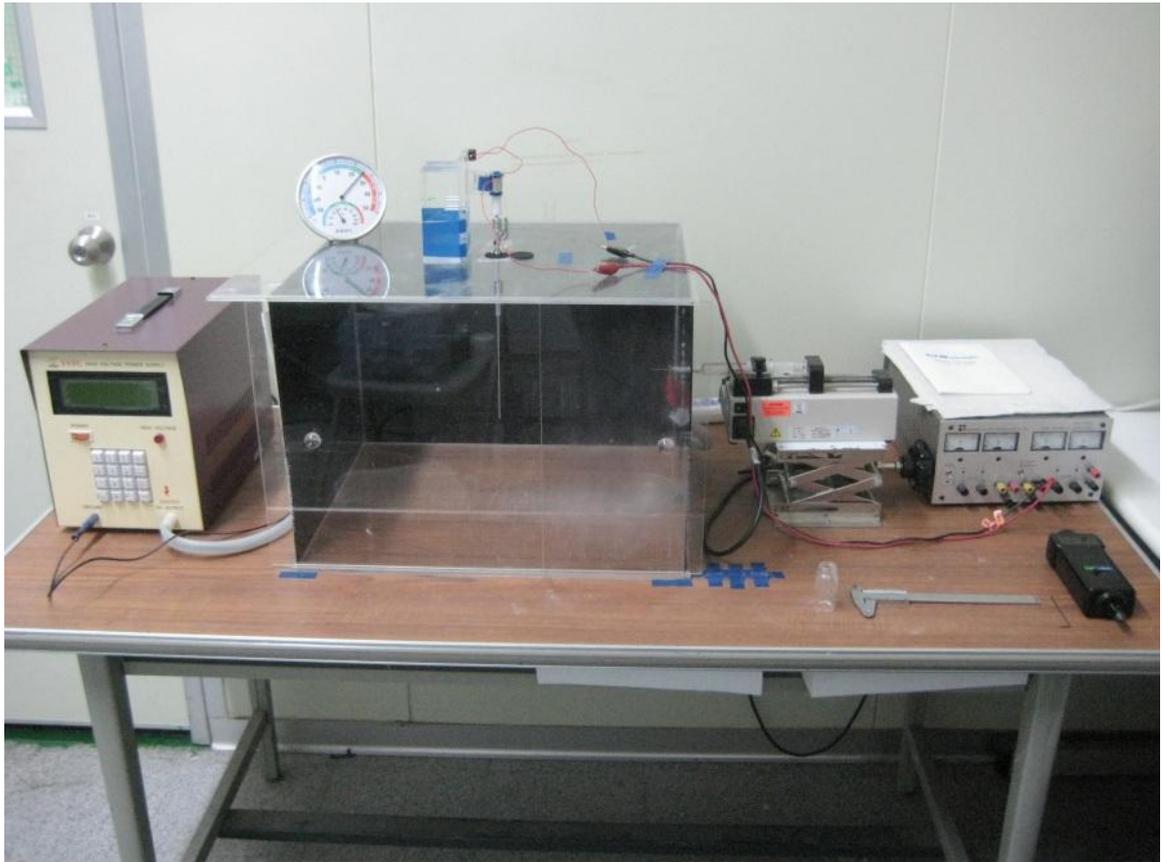


圖 3-3 電氣紡絲架構之設備圖

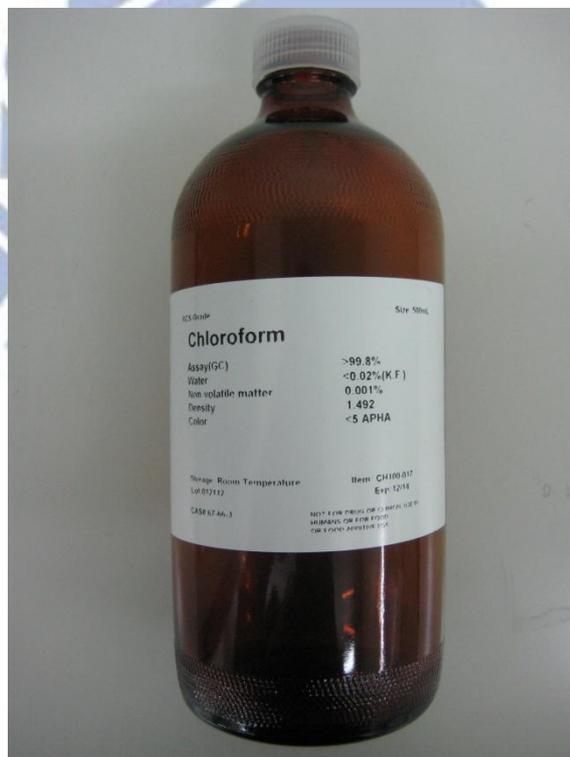


圖 3-4 氯仿

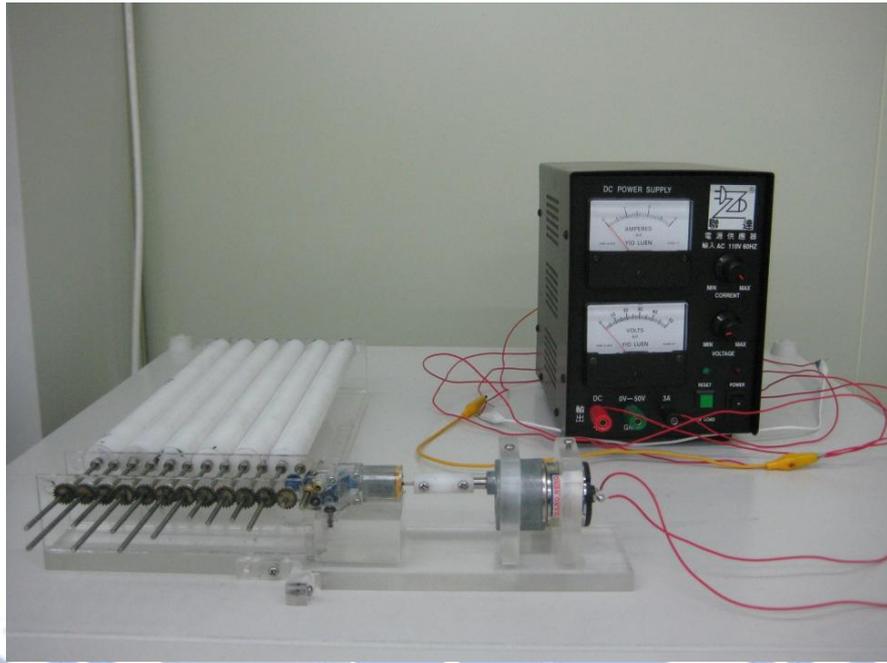


圖 3-5 滾輪式混合器



圖 3-6 蠕動幫浦

第四章 實驗結果與討論

4.1 小管徑人工血管細胞生長支架之纖維結構觀察

4.1.1 不同比例與收集速度之纖維排列方向性

由圖 4-1、圖 4-2、圖 4-3、圖 4-4 與圖 4-5 可知，PLA 與 PCL 以不同比例混合製備出人工血管細胞生長支架之纖維，在收集棒轉速小於等於 3000rpm(切線速度小於等於 64.4cm/s)時，其纖維結構不具有方向性，在收集棒轉速大於等於 4500rpm(切線速度大於等於 96.6cm/s)，其纖維平行排列，出現方向性的結構。起始具有方向性的收集棒轉速介於 3000rpm 到 4500rpm 之間，其切線速度介於 64.4cm/s 到 96.6cm/s 之間。

4.1.2 不同比例與收集速度之纖維粗細分析

由表 4-1 與圖 4-6 可知，在收集棒轉速小於等於 3000rpm(切線速度小於等於 64.4cm/s)時，PLA 纖維平均直徑約為 8.1 μm ，PLA:PCL=3:1 纖維平均直徑約為 8.9 μm ，PLA:PCL=1:1 纖維平均直徑約為 9.2 μm ，PLA:PCL=1:3 纖維平均直徑在 9.2 至 10.3 之間變動，纖維粗細變化較大，PCL 纖維平均直徑約為 10 μm ，在收集棒轉速大於等於 4500rpm(切線速度大於等於 96.6cm/s)到小於等於 10500rpm(切線速度小於等於 225.4cm/s)時，PLA 纖維平均直徑從 7.3 μm 變小到 4.9 μm ，PLA:PCL=3:1 纖維平均直徑從 7.3 μm 變小到 5.4 μm ，PLA:PCL=1:1 纖維平均直徑從 8.2 μm 變小到 5.5 μm ，PLA:

PCL=1:3 纖維平均直徑從 8.3 μm 變小到 5.9 μm ，PCL 纖維平均直徑從 8.8 μm 變小到 6.0 μm 。在收集棒轉速大於等於 4500rpm(切線速度大於等於 96.6cm/s) 時，纖維直徑開始變小。纖維直徑大致上隨著 PCL 含量增高而變大。

4.2 接觸角量測

生醫材料中，親疏水性對於細胞的貼附會有所影響，一般認為在材料的親水性愈高的情況下，能增加細胞的貼附和生長，在徐一峯[60]的論文中關於材料親水性的測試中也證實了這點。

由表 4-2 與圖 4-7 可知，在收集棒轉速小於等於 3000rpm(切線速度小於等於 64.4cm/s)時，PLA 接觸角在 103.5~119.2°之間，PLA:PCL=3:1 接觸角在 117.0~121.7°之間，PLA:PCL=1:1 接觸角在 121.5~124.9°之間，PLA:PCL=1:3 接觸角在 110.3~124.2°之間，PCL 接觸角在 104.2~112.5°之間，在收集棒轉速大於等於 4500rpm(切線速度大於等於 96.6cm/s)到小於等於 10500rpm(切線速度小於等於 225.4cm/s)時，PLA 接觸角在 68.1~85.5°之間，PLA:PCL=3:1 接觸角在 82.8~93.0°之間，PLA:PCL=1:1 接觸角在 89.1~101.0°之間，PLA:PCL=1:3 接觸角在 83.1~92.0°之間，PCL 接觸角在 73.6~98.4°之間。隨著收集棒的轉速提高，纖維開始出現方向性，方向性纖維的接觸角明顯較無方向性的纖維為小，人工血管細胞生長支架的親水性提升。再隨著收集棒的轉速提高，具有方向性的纖維會細化，但是接觸

角並沒有明顯的差異，其親水性的差別並不明顯。

4.3 蘇木精-伊紅(HE)染色結果

由圖 4-8、圖 4-9、圖 4-10、圖 4-11 與圖 4-12 可知，在 PLA/PCL 小管徑人工血管細胞生長支架內培養細胞於染色後證明其可以培養細胞，並不會因為其管壁為曲面而無法貼附，細胞會沿著纖維生長，由於收集棒轉速提高使纖維具有方向性，細胞的生長也從無方向性轉變為具有方向性的生長方式。

由圖 4-13 可知，以靜脈與動脈流速進行動態流速培養後，細胞數量變少，可能有不少細胞被流體沖走，隨著動態流速培養天數愈多其細胞數量也愈多，顯示動態流速培養下細胞仍然可以生長。由圖 4-14、圖 4-15 與圖 4-16 可知，纖維排列無方向性者的細胞數量明顯多於有方向性者，纖維排列無方向性者以 3000rpm 的細胞數量為最多，纖維排列有方向性者以 4500rpm 的細胞數量為最多。動態植覆與靜態培養天數愈多其細胞數量也愈多。

4.4 MTT 活性試驗

由表 4-3 與圖 4-17 可知，細胞動態植覆一天後量測出來的細胞活性彼此間差異不大，看不出明顯趨勢，可能是細胞剛開始貼附其生長還不旺盛

所致。由表 4-4、表 4-5、圖 4-18 與圖 4-19 可知，細胞動態植覆一天後靜態培養兩天與靜態培養六天量測出來的細胞活性開始有趨勢，細胞活性大致上隨著收集棒轉速提高而下降，無方向性的人工血管細胞生長支架其細胞活性明顯較有方向性為高。

4.5 孔隙率量測

由表 4-6 與圖 4-20 可知，在收集棒轉速小於等於 3000rpm(切線速度小於等於 64.4cm/s)時，PLA 孔隙率從 88.1% 下降到 71.2%，PLA:PCL=3:1 孔隙率從 89.1% 下降到 69.2%，PLA:PCL=1:1 孔隙率從 88.6% 下降到 72.8%，PLA:PCL=1:3 孔隙率從 89.4% 下降到 76.1%，PCL 孔隙率從 89.1% 下降到 82.4%，在收集棒轉速大於等於 4500rpm(切線速度大於等於 96.6cm/s)到小於等於 10500rpm(切線速度小於等於 225.4cm/s)時，PLA 孔隙率從 63.2% 下降到 52.7%，PLA:PCL=3:1 孔隙率從 59.0% 下降到 53.4%，PLA:PCL=1:1 孔隙率從 64.7% 下降到 58.4%，PLA:PCL=1:3 孔隙率從 65.4% 下降到 59.2%，PCL 孔隙率從 80.1% 下降到 70.6%，人工血管細胞生長支架之孔隙率大致上隨著收集棒轉速升高而降低，無方向性的人工血管細胞生長支架其孔隙率明顯較有方向性者為高，有方向性後其孔隙率變化不大。人工血管細胞生長支架的 PCL 含量愈高大致上孔隙率也愈高。

4.6 機械性質量測

由表 4-7 與圖 4-21 可知，在收集棒轉速小於等於 3000rpm(切線速度小於等於 64.4cm/s)時，PLA 楊氏係數從 17.8MPa 上升到 57.5MPa，PLA:PCL=3:1 楊氏係數從 6.7MPa 上升到 54.9MPa，PLA:PCL=1:1 楊氏係數從 2.4MPa 上升到 23.3MPa，PLA:PCL=1:3 楊氏係數從 2.8MPa 上升到 16.5MPa，PCL 楊氏係數從 1.6MPa 上升到 4.4MPa，在收集棒轉速大於等於 4500rpm(切線速度大於等於 96.6cm/s)到小於等於 10500rpm(切線速度小於等於 225.4cm/s)時，PLA 楊氏係數在 70.9MPa 到 77.8MPa 之間，PLA:PCL=3:1 楊氏係數在 55.4MPa 到 66.0MPa 之間，PLA:PCL=1:1 楊氏係數在 22.9MPa 到 32.4MPa 之間，PLA:PCL=1:3 楊氏係數在 14.3MPa 到 22.8MPa 之間，PCL 楊氏係數在 6.4MPa 到 11.1MPa 之間。

由表 4-8 與圖 4-22 可知，在收集棒轉速小於等於 3000rpm(切線速度小於等於 64.4cm/s)時，PLA 降服強度從 1.1MPa 上升到 9.7MPa，PLA:PCL=3:1 降服強度從 0.3MPa 上升到 6.6MPa，PLA:PCL=1:1 降服強度從 0.3MPa 上升到 4.6MPa，PLA:PCL=1:3 降服強度從 0.2MPa 上升到 3.3MPa，PCL 降服強度從 0.1MPa 上升到 1.5MPa，在收集棒轉速大於等於 4500rpm(切線速度大於等於 96.6cm/s)到小於等於 10500rpm(切線速度小於等於 225.4cm/s)時，PLA 降服強度在 9.8MPa 到 18.6MPa 之間，PLA:PCL=3:1 降服強度在 8.7MPa 到 12.0MPa 之間，PLA:PCL=1:1 降服強度在 5.8MPa 到 8.4MPa

之間，PLA：PCL=1：3 降服強度在 4.2MPa 上升到 6.5MPa，PCL 降服強度從 2.0MPa 上升到 2.6MPa。

PLA 含量愈高其楊氏係數與降服強度愈高，換而言之，PCL 含量愈高其楊氏係數與降服強度愈低。楊氏係數與降服強度大致上隨著收集棒轉速提高而升高，有方向性的人工血管細胞生長支架其楊氏係數與降服強度明顯較無方向性者為高，有方向性後其楊氏係數與降服強度變化不大。



表 4-1 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之纖維平均直徑(μm)關係表

轉速(rpm) \ 材料比例	PLA	3 : 1	1 : 1	1 : 3	PCL
60	7.9	8.9	9.3	9.8	10.1
1500	8.3	9.0	9.2	9.2	9.9
3000	8.1	8.7	9.1	10.3	10.0
4500	7.3	7.3	8.2	8.3	8.8
6000	6.5	7.1	7.3	6.9	7.9
7500	6.0	6.4	6.5	7.1	7.0
9000	5.3	5.8	6.0	6.2	6.2
10500	4.9	5.4	5.5	5.9	6.0

單位： μm

表 4-2 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之接觸角($^{\circ}$)關係表

轉速(rpm) \ 材料比例	PLA	3 : 1	1 : 1	1 : 3	PCL
60	103.5 $^{\circ}$	121.7 $^{\circ}$	121.5 $^{\circ}$	123.2 $^{\circ}$	109.1 $^{\circ}$
1500	119.2 $^{\circ}$	119.0 $^{\circ}$	124.9 $^{\circ}$	124.2 $^{\circ}$	112.5 $^{\circ}$
3000	103.9 $^{\circ}$	117.0 $^{\circ}$	124.0 $^{\circ}$	110.3 $^{\circ}$	104.2 $^{\circ}$
4500	84.1 $^{\circ}$	93.0 $^{\circ}$	101.0 $^{\circ}$	92.0 $^{\circ}$	86.2 $^{\circ}$
6000	73.9 $^{\circ}$	82.8 $^{\circ}$	89.5 $^{\circ}$	87.3 $^{\circ}$	88.0 $^{\circ}$
7500	77.7 $^{\circ}$	85.9 $^{\circ}$	90.9 $^{\circ}$	91.6 $^{\circ}$	98.4 $^{\circ}$
9000	68.1 $^{\circ}$	84.0 $^{\circ}$	90.7 $^{\circ}$	84.7 $^{\circ}$	78.5 $^{\circ}$
10500	85.5 $^{\circ}$	83.0 $^{\circ}$	89.1 $^{\circ}$	83.1 $^{\circ}$	73.6 $^{\circ}$

表 4-3 動態植覆一天 MTT 試驗之吸光(OD)值

轉速(rpm) \ 材料比例	PLA	3 : 1	1 : 1	1 : 3	PCL
60	0.162	0.239	0.268	0.279	0.290
1500	0.157	0.199	0.255	0.312	0.296
3000	0.160	0.251	0.299	0.282	0.296
4500	0.166	0.211	0.274	0.255	0.250
6000	0.171	0.213	0.245	0.258	0.241
7500	0.158	0.194	0.195	0.226	0.291
9000	0.137	0.202	0.212	0.229	0.239
10500	0.175	0.217	0.279	0.245	0.228

表 4-4 動態植覆一天靜態培養兩天 MTT 試驗之吸光(OD)值

轉速(rpm) \ 材料比例	PLA	3 : 1	1 : 1	1 : 3	PCL
60	0.447	0.629	0.703	0.792	0.754
1500	0.435	0.657	0.662	0.693	0.774
3000	0.482	0.622	0.611	0.720	0.691
4500	0.434	0.494	0.580	0.631	0.676
6000	0.376	0.424	0.545	0.571	0.657
7500	0.428	0.521	0.510	0.551	0.661
9000	0.369	0.502	0.457	0.504	0.571
10500	0.332	0.359	0.442	0.499	0.517

表 4-5 動態植覆一天靜態培養六天 MTT 試驗之吸光(OD)值

轉速(rpm) \ 材料比例	PLA	3 : 1	1 : 1	1 : 3	PCL
60	0.669	0.760	0.930	0.935	0.981
1500	0.651	0.805	0.821	0.945	0.973
3000	0.699	0.702	0.822	0.850	0.947
4500	0.602	0.614	0.722	0.752	0.895
6000	0.573	0.653	0.687	0.731	0.86
7500	0.586	0.604	0.671	0.685	0.810
9000	0.575	0.567	0.650	0.658	0.761
10500	0.590	0.575	0.612	0.671	0.815

表 4-6 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之孔隙率(%)關係表

轉速(rpm) \ 材料比例	PLA	3 : 1	1 : 1	1 : 3	PCL
60	88.1%	89.1%	88.6%	89.4%	89.1%
1500	84.3%	84.5%	83.1%	84.9%	86.4%
3000	71.2%	69.2%	72.8%	76.1%	82.4%
4500	63.2%	59.0%	64.7%	65.4%	80.1%
6000	58.2%	61.1%	62.3%	62.5%	76.8%
7500	56.7%	54.5%	59.1%	61.3%	74.7%
9000	60.2%	54.5%	57.7%	60.1%	70.1%
10500	52.7%	53.4%	58.4%	59.2%	70.6%

表 4-7 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之楊氏係數(MPa)關係表

轉速(rpm) \ 材料比例	PLA	3 : 1	1 : 1	1 : 3	PCL
60	17.8	6.7	2.4	2.8	1.6
1500	48.3	23.8	11.6	8.9	4.9
3000	57.5	54.9	23.3	16.5	4.4
4500	71.6	56.4	22.9	20.7	6.4
6000	72.0	66.0	26.6	22.8	6.6
7500	77.8	55.4	29.2	19.1	8.8
9000	70.9	60.2	32.0	14.3	11.1
10500	71.1	59.3	32.4	15.5	9.7

單位：MPa

表 4-8 不同溶液比例與收集棒轉速(rpm)之降服強度(MPa)關係表

轉速(rpm) \ 材料比例	PLA	3 : 1	1 : 1	1 : 3	PCL
60	1.1	0.3	0.3	0.2	0.1
1500	3.3	1.8	2.2	1.6	1.0
3000	9.7	6.6	4.6	3.3	1.5
4500	11.7	9.1	5.8	4.2	2.0
6000	11.3	8.7	6.1	5.2	2.1
7500	12.5	10.1	7.1	5.0	2.2
9000	9.8	11.5	8.4	6.5	2.4
10500	18.6	12.0	7.9	4.9	2.6

單位：MPa

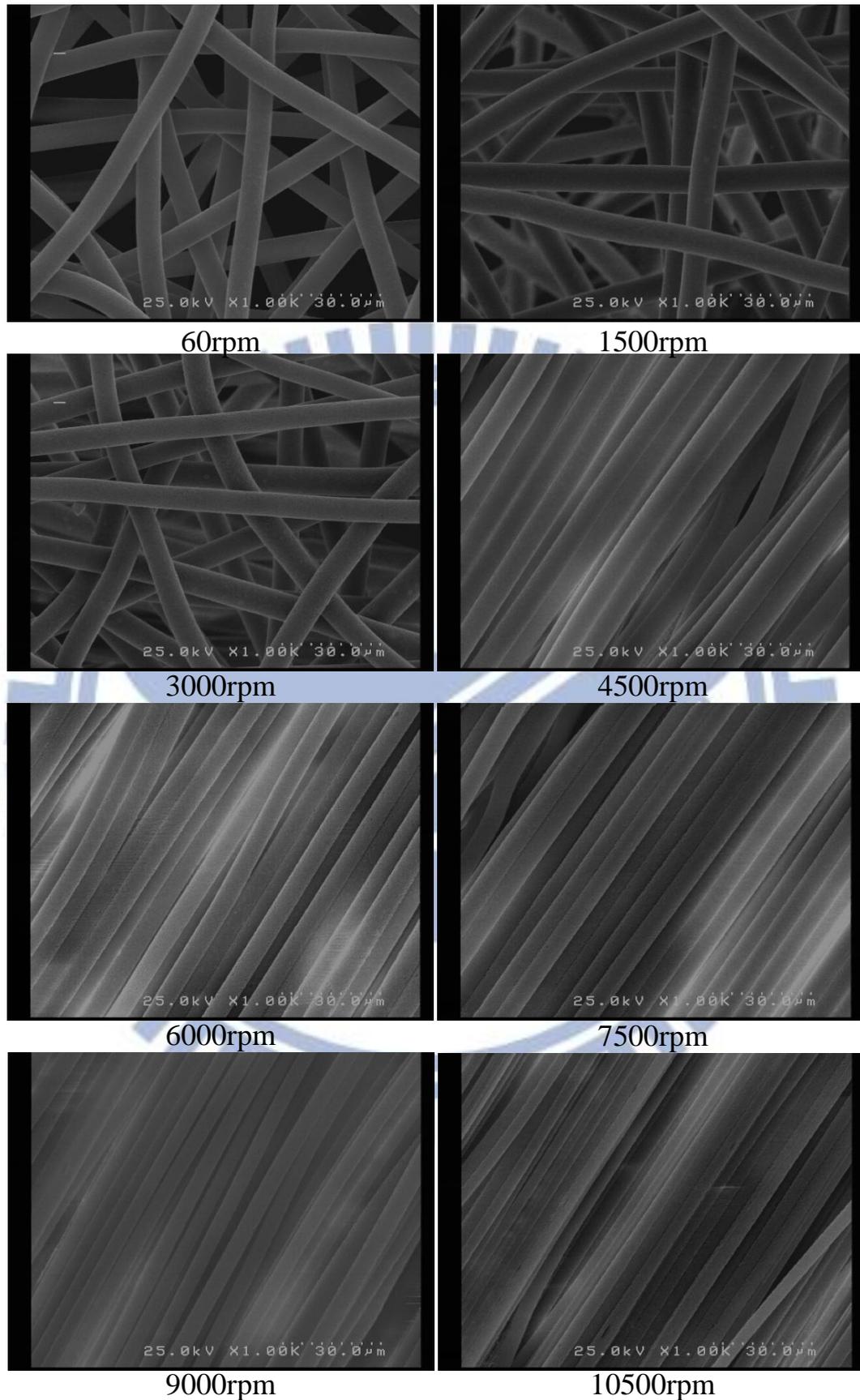


圖 4-1 15%(w/v)PLA 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖

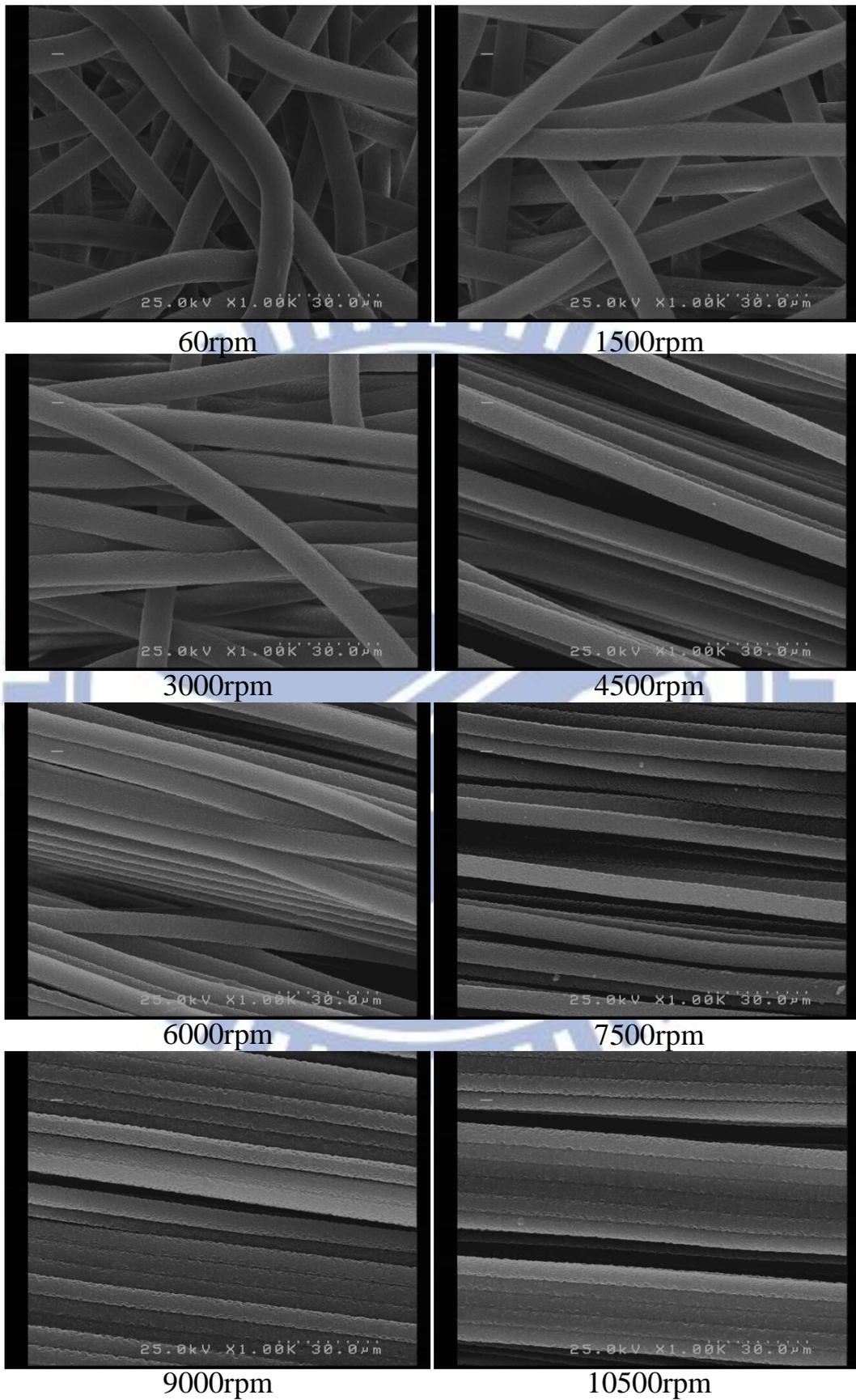


圖 4-2 15%(w/v)PCL 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖

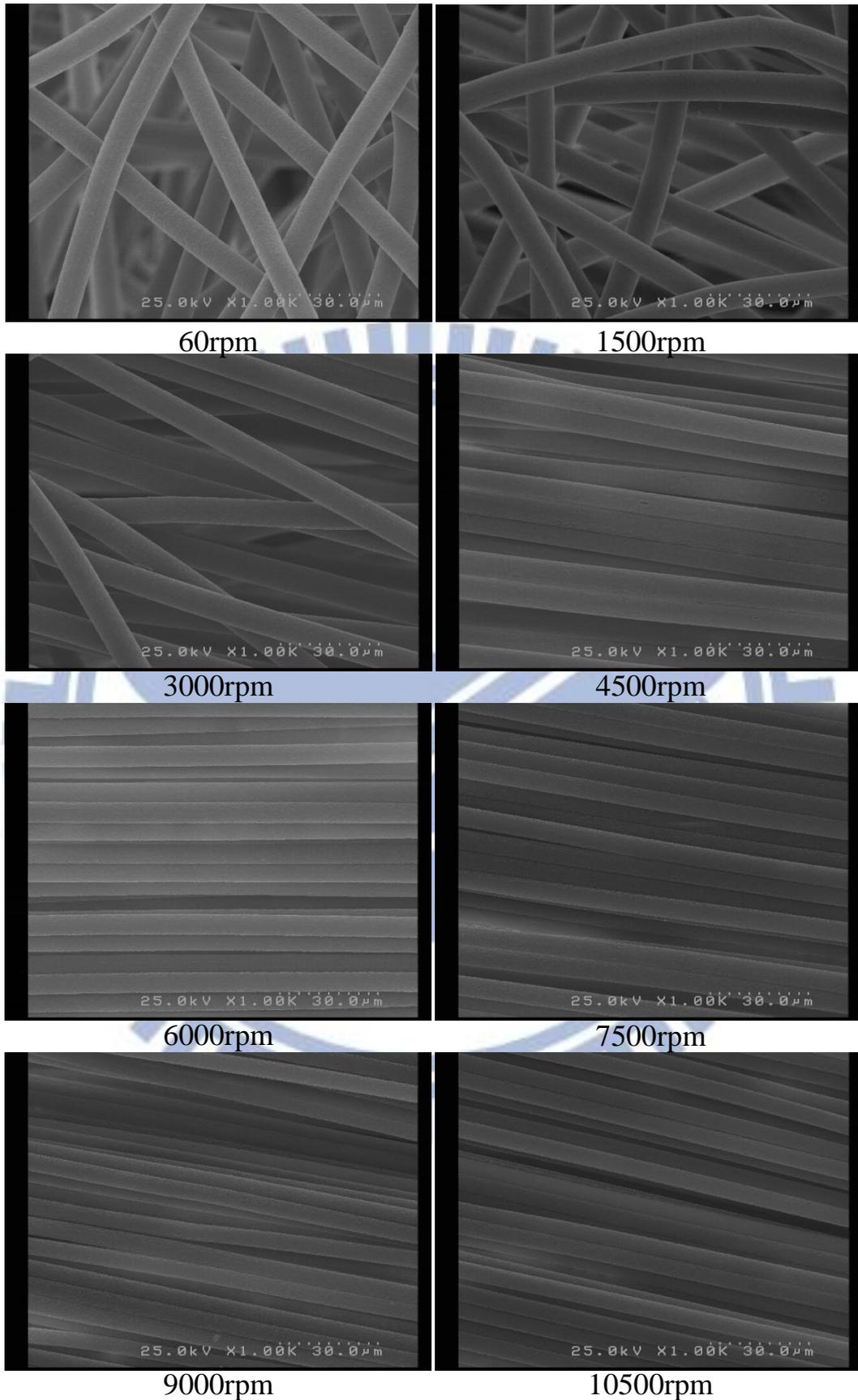


圖 4-3 3：1 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖

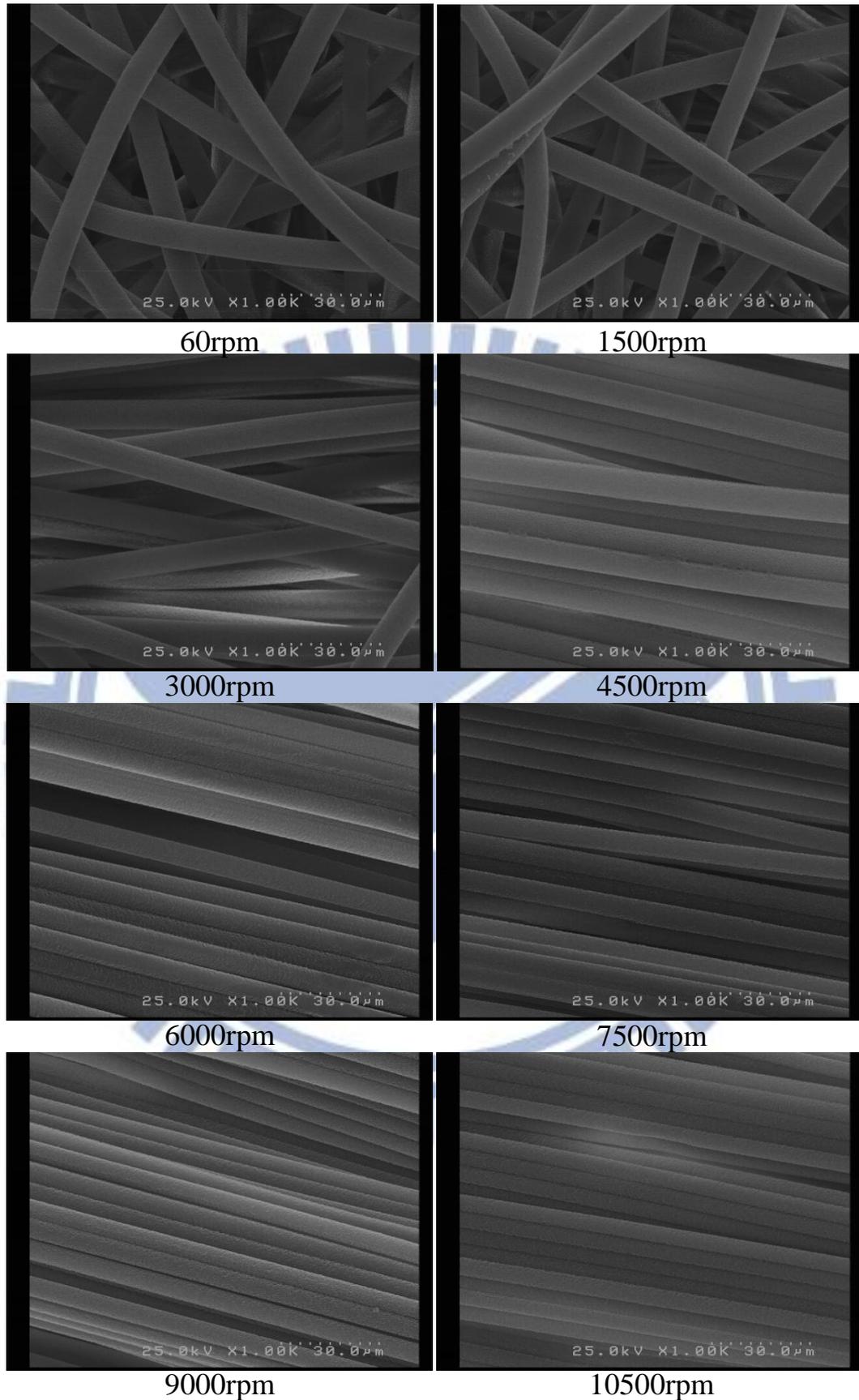


圖 4-4 1：1 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖

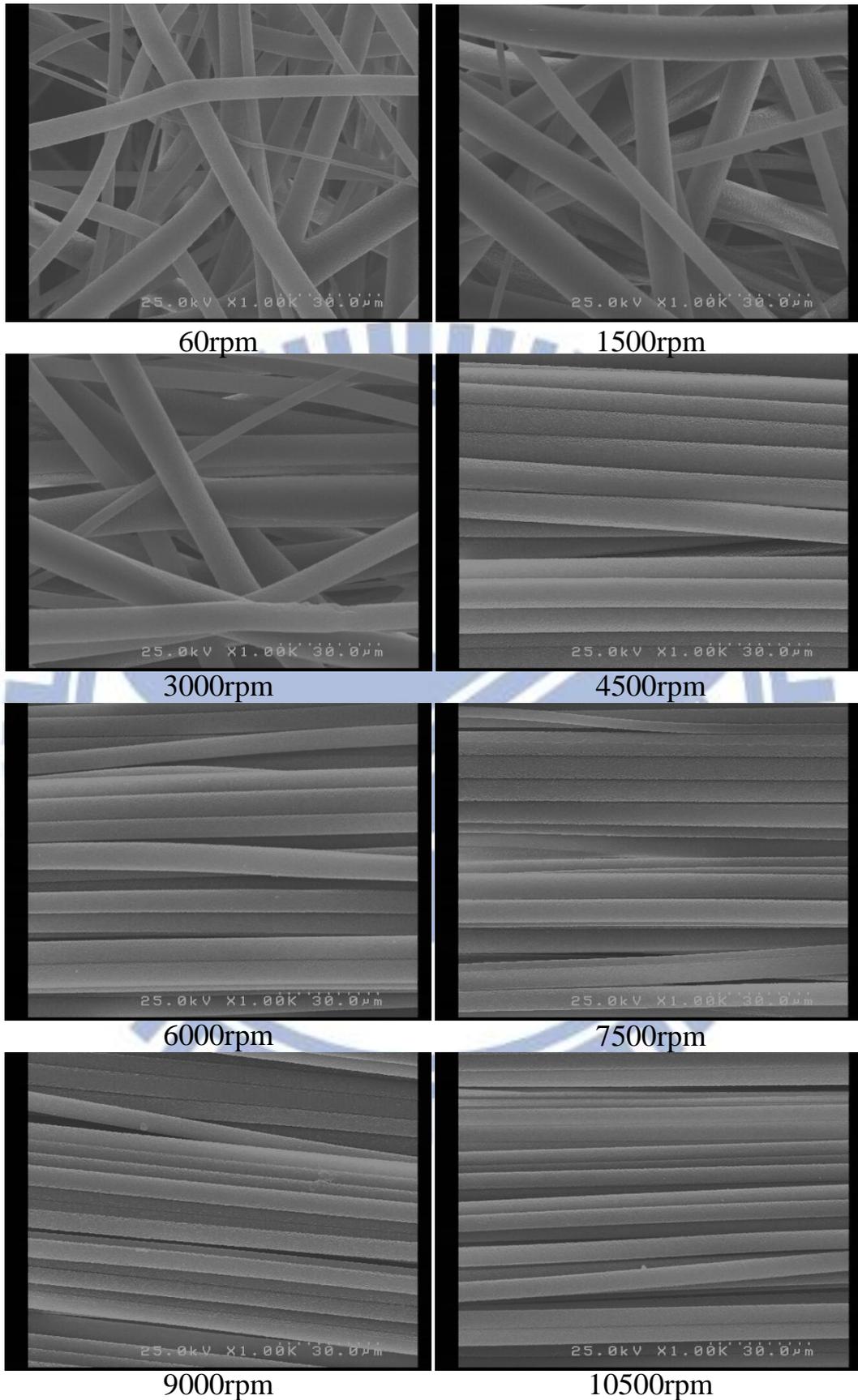


圖 4-5 1：3 小管徑人工血管細胞生長支架內壁 SEM 結構圖

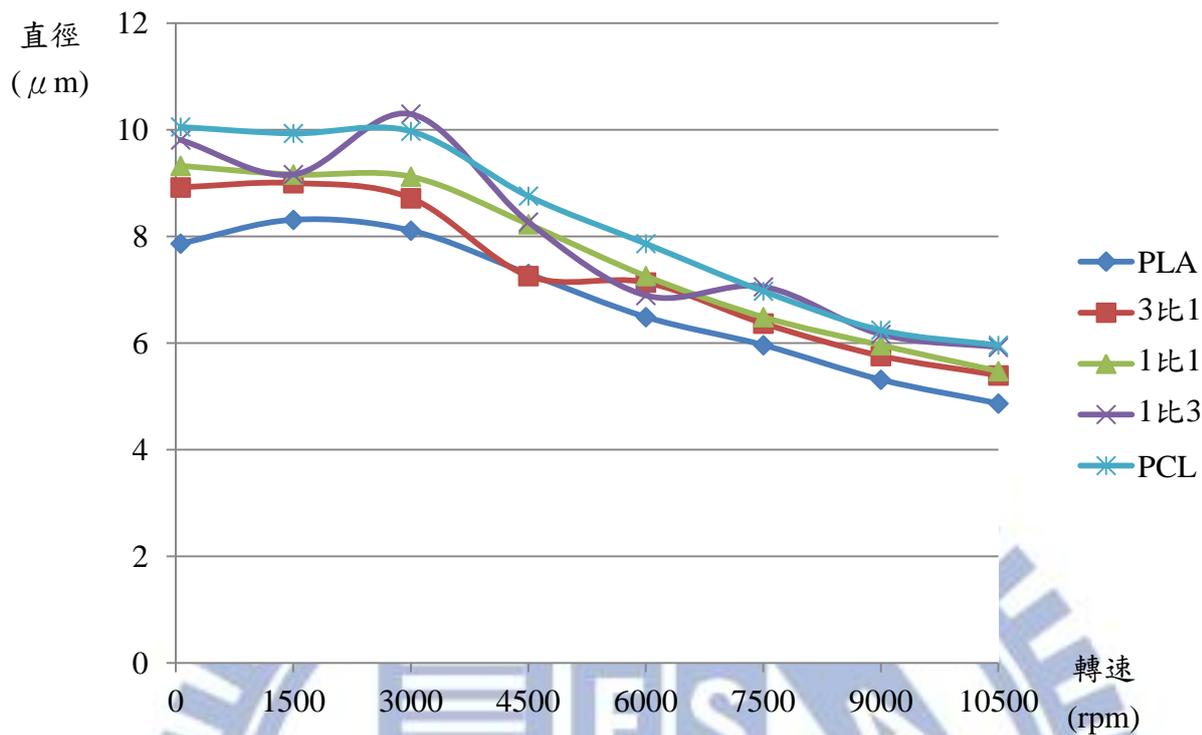


圖 4-6 小管徑人工血管細胞生長支架之纖維直徑趨勢圖

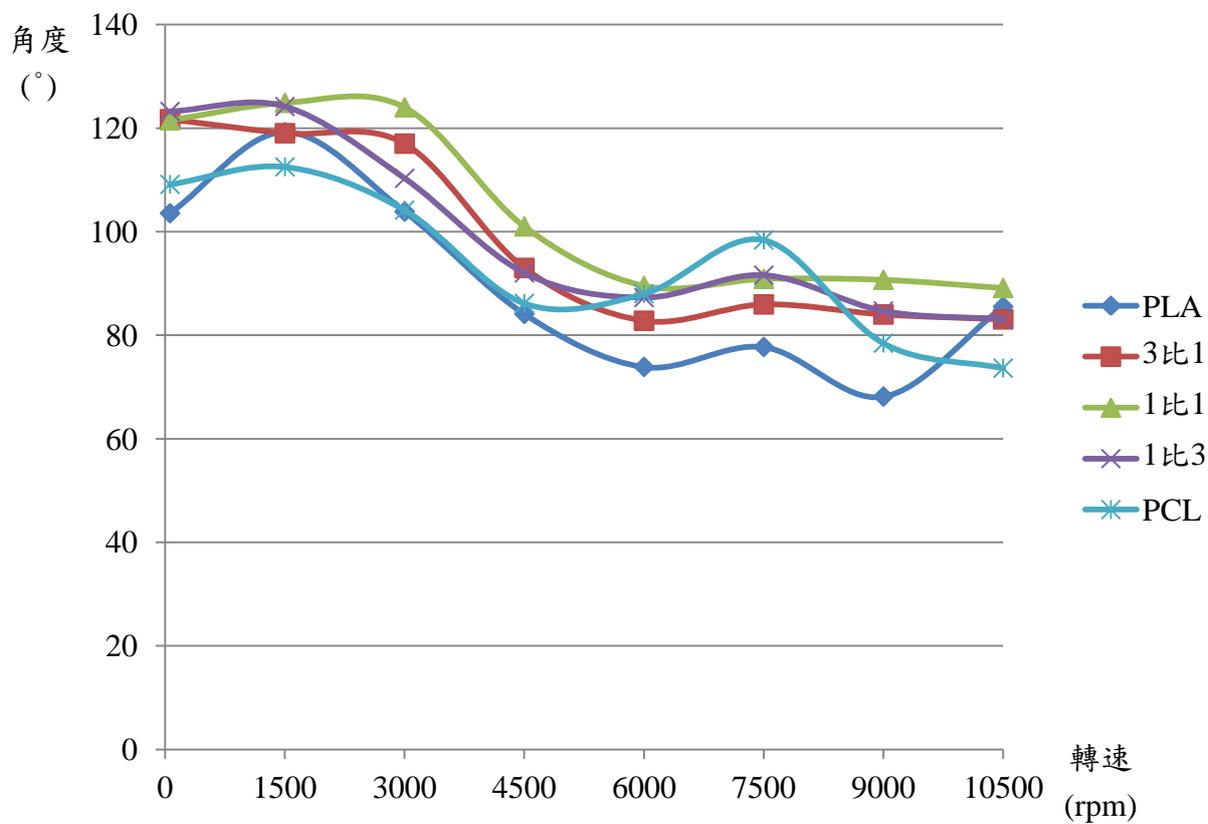


圖 4-7 親水性量測結果

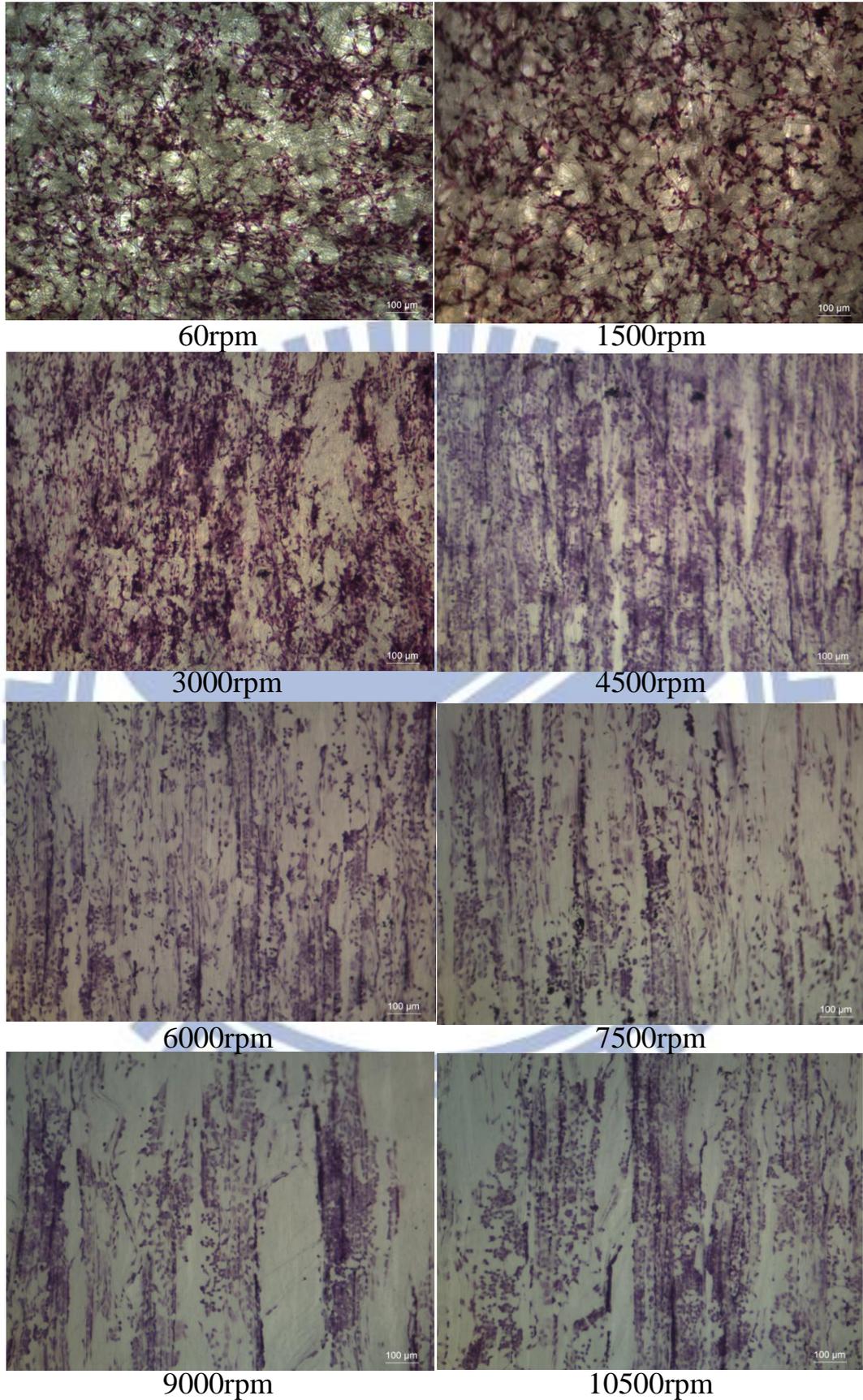


圖 4-8 15% (w/v) PLA 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖

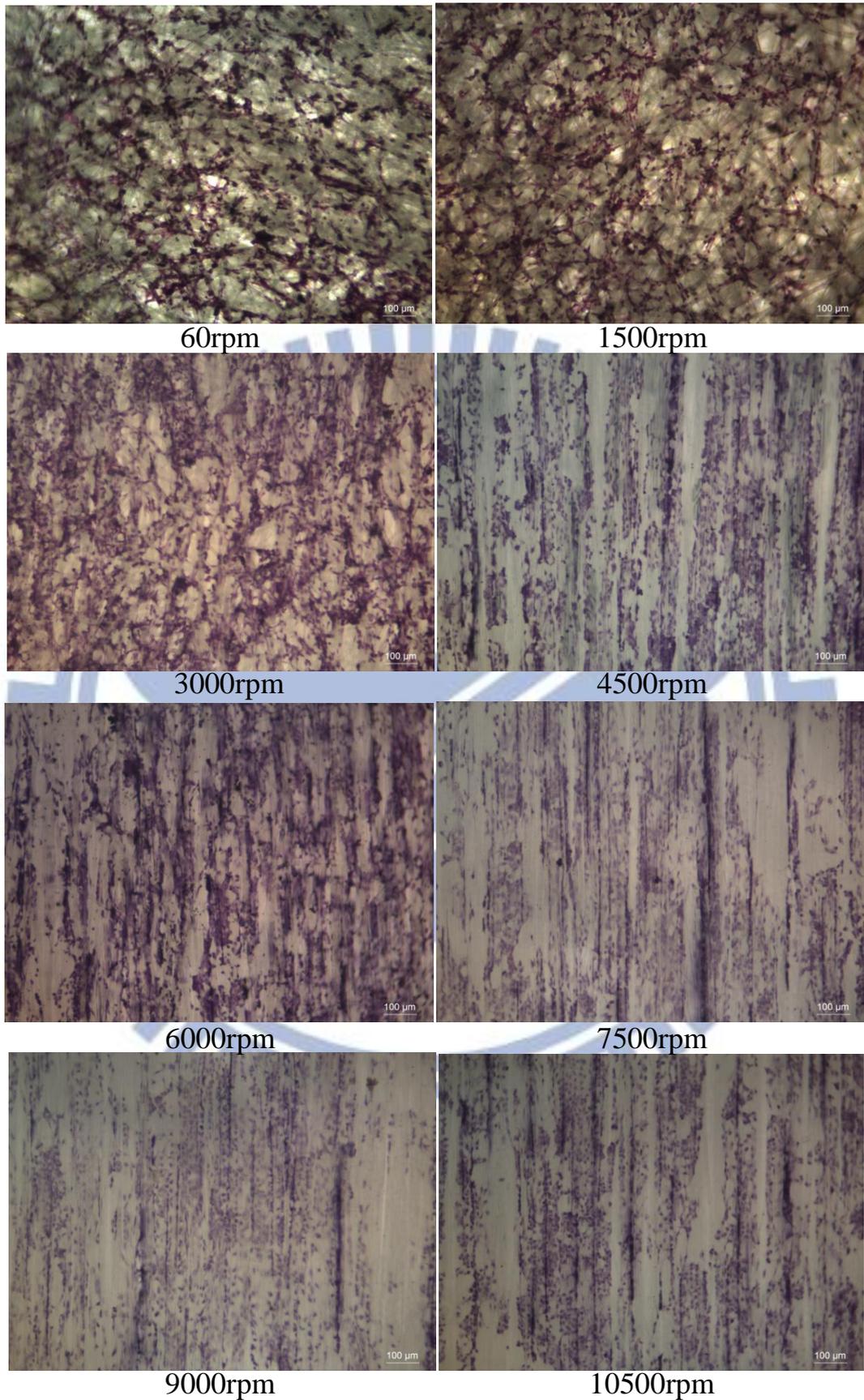


圖 4-9 3：1 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖

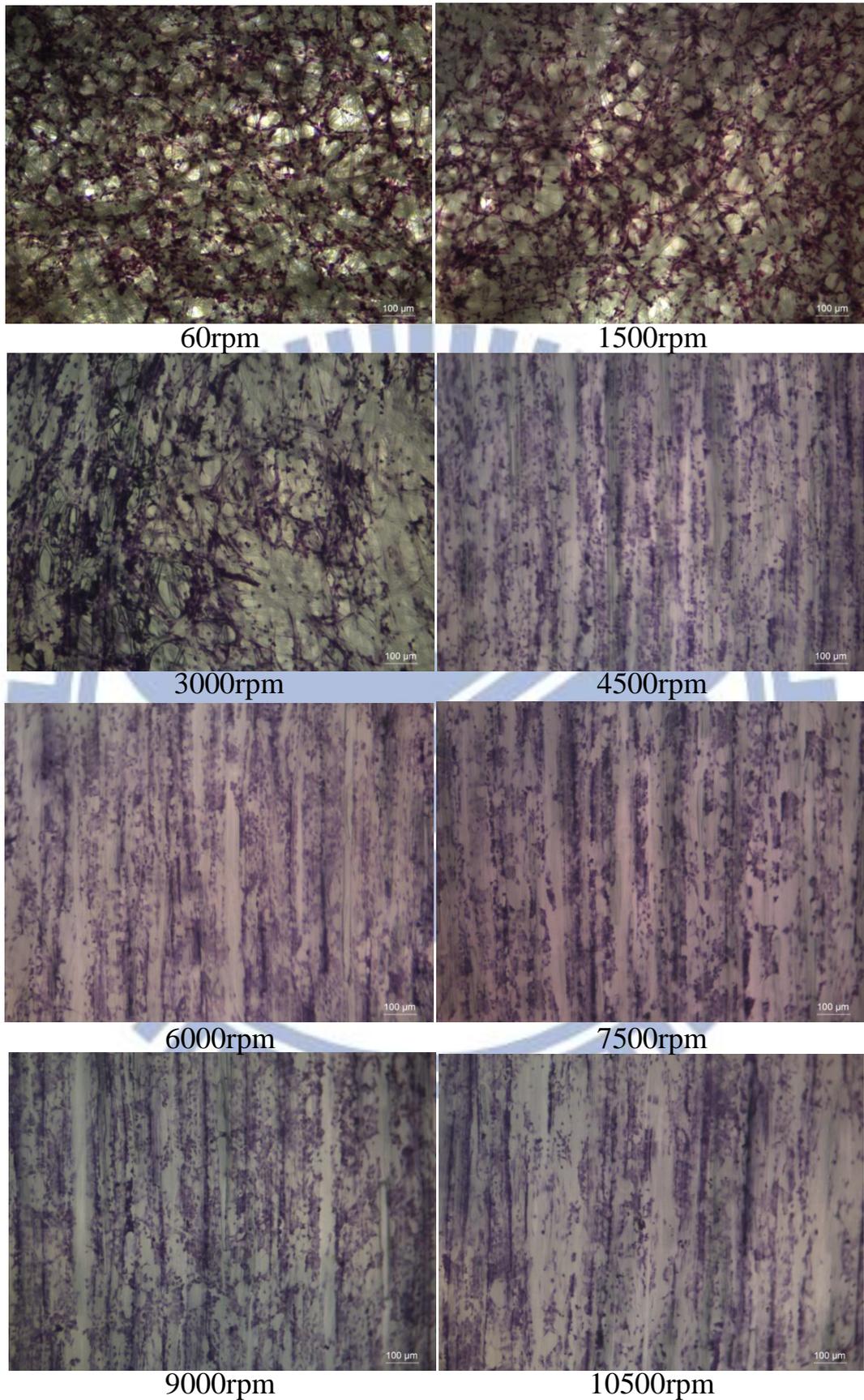


圖 4-10 1：1 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖

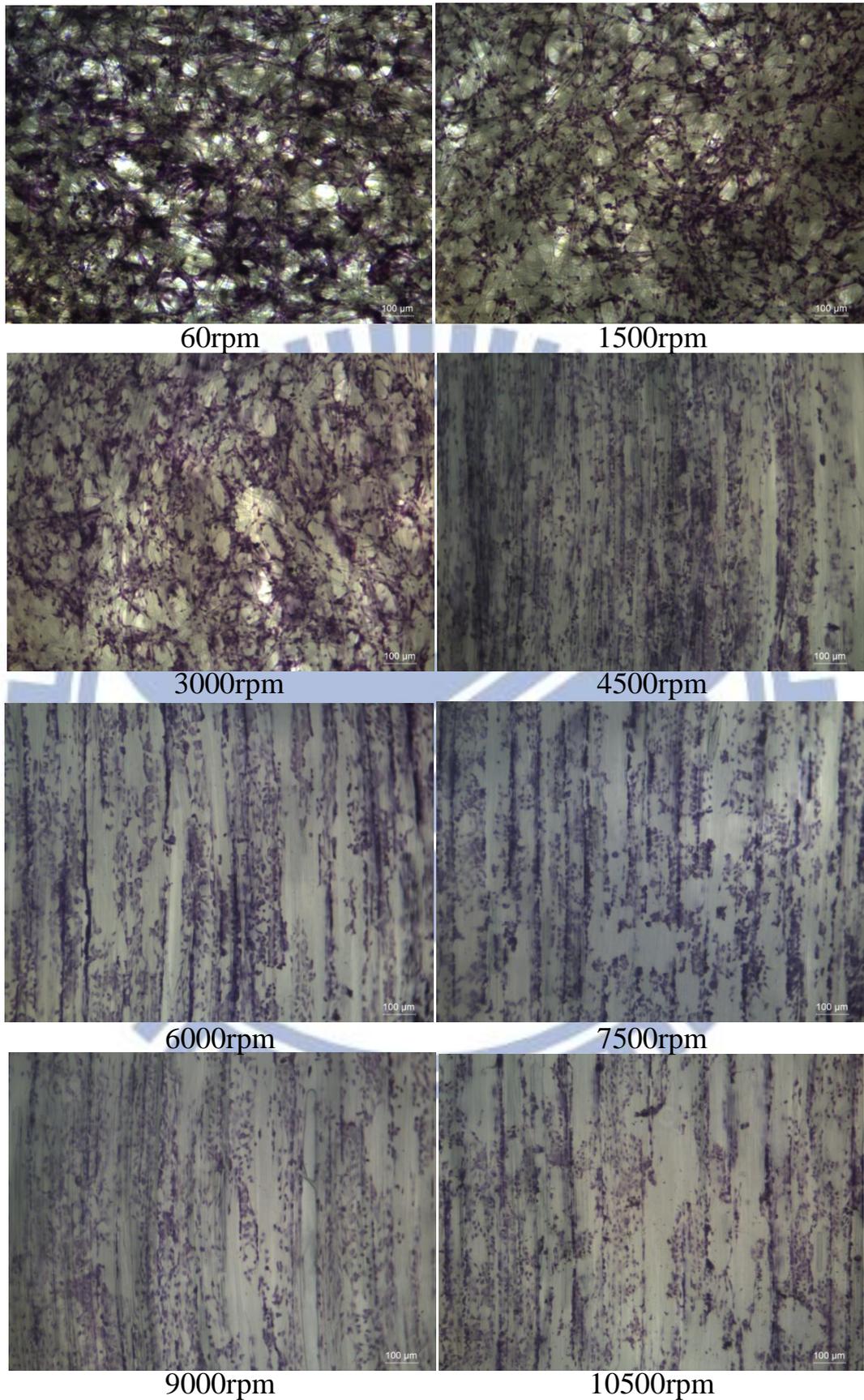


圖 4-11 1：3 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖

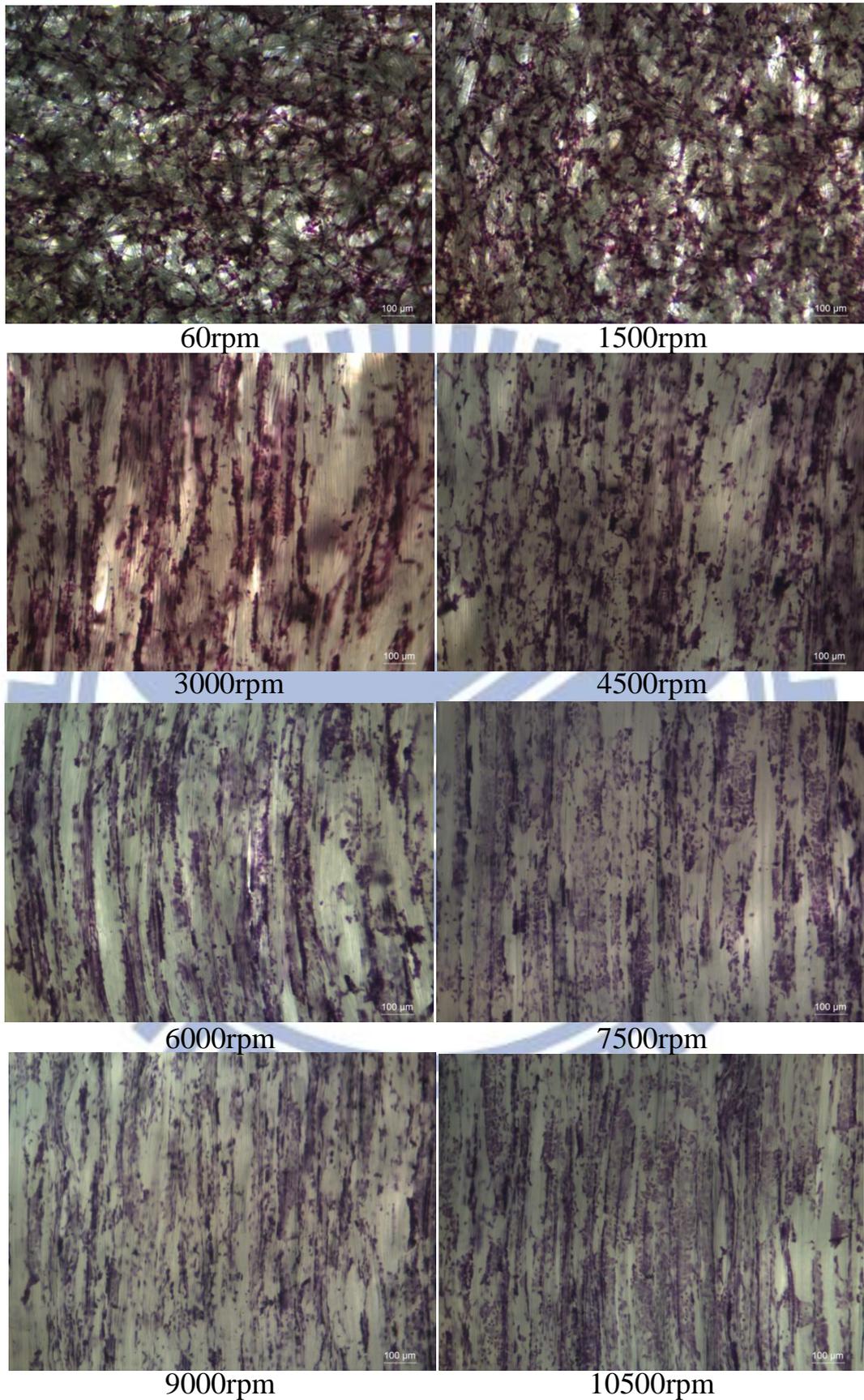


圖 4-12 15% (w/v) PCL 動態植覆一天靜態培養六天後 HE 染色圖

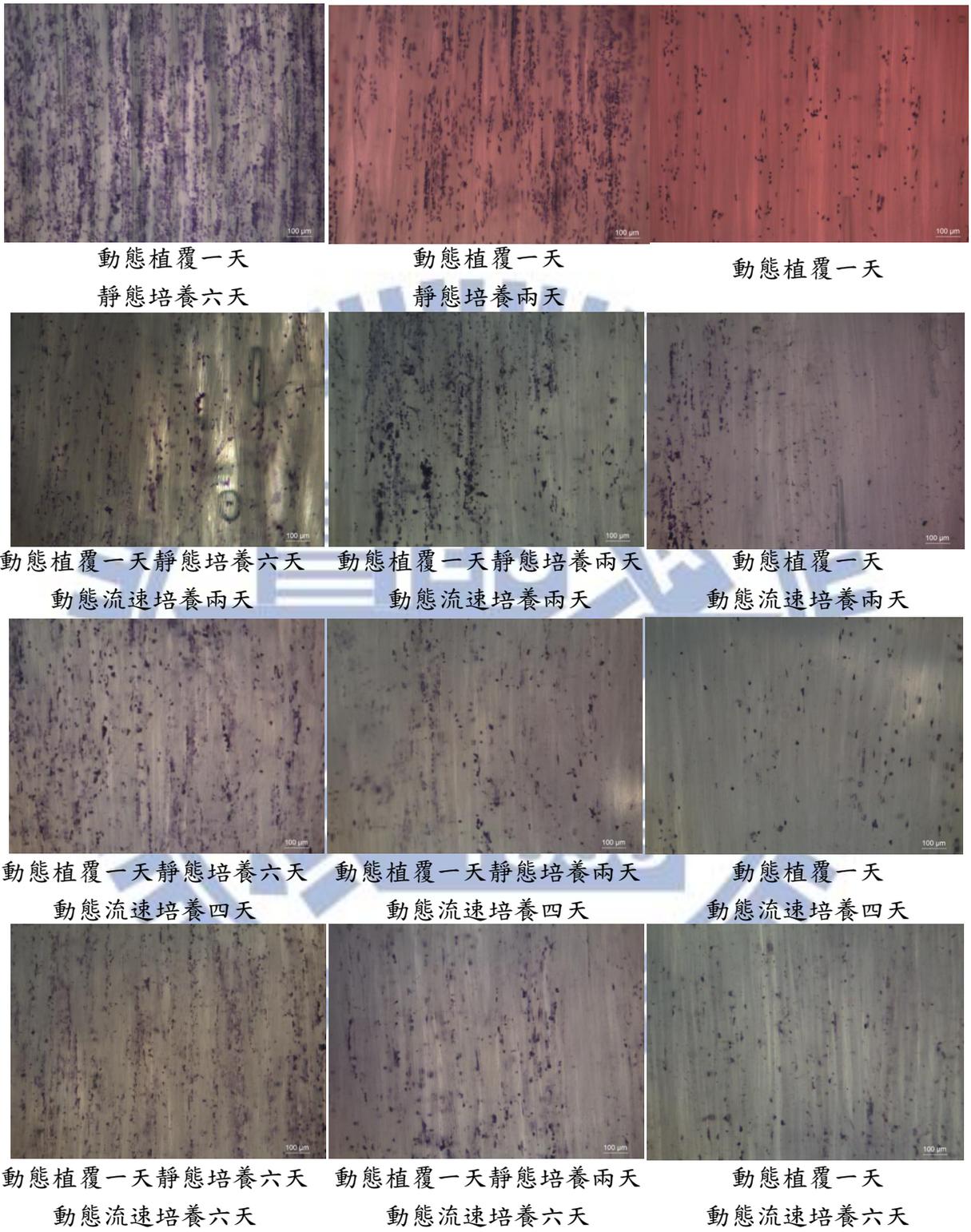


圖 4-13 1 : 1 4500rpm 人工血管細胞生長支架的全部 HE 染色圖

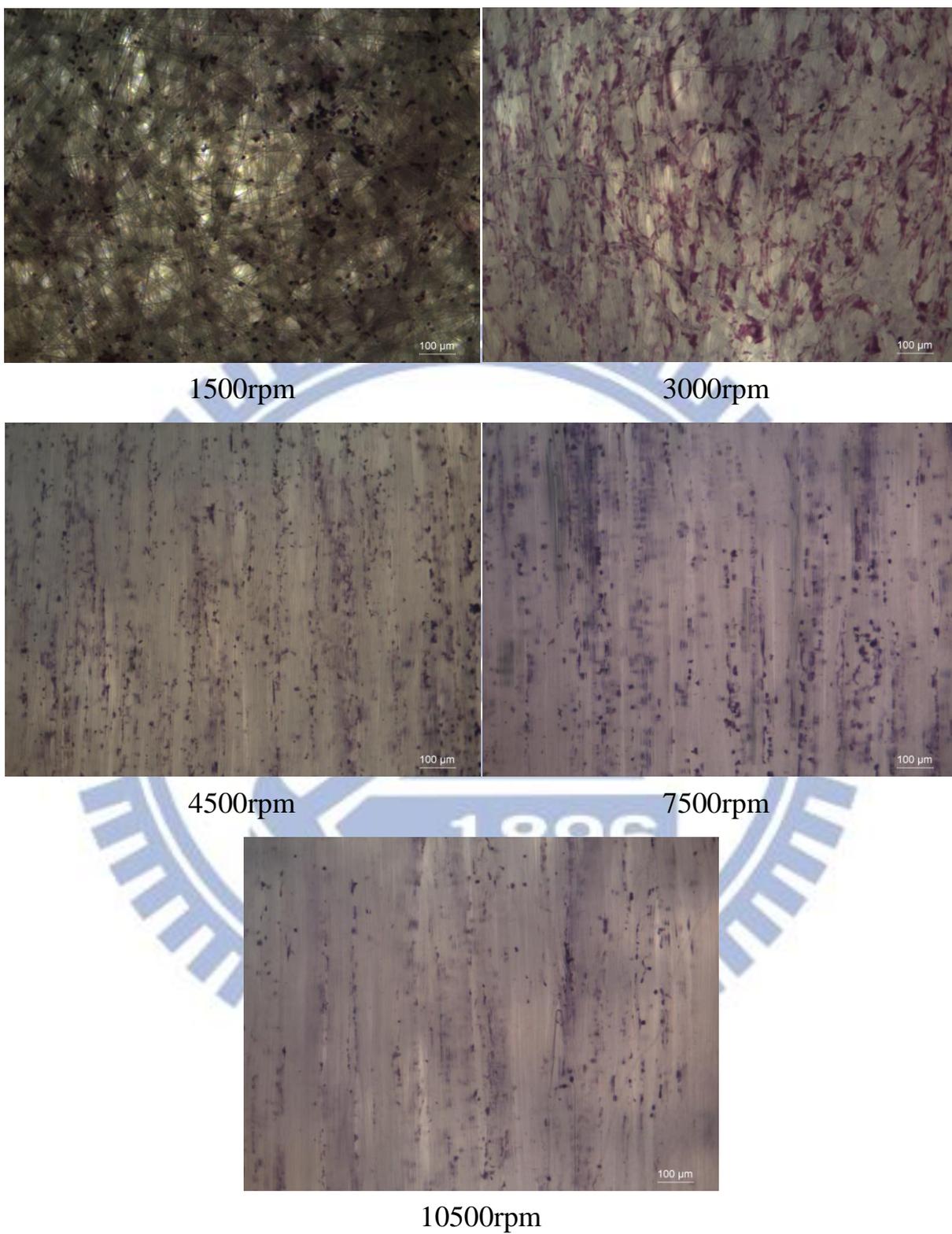


圖 4-14 動態植覆一天靜態培養六天動態流速培養六天後 HE 染色圖

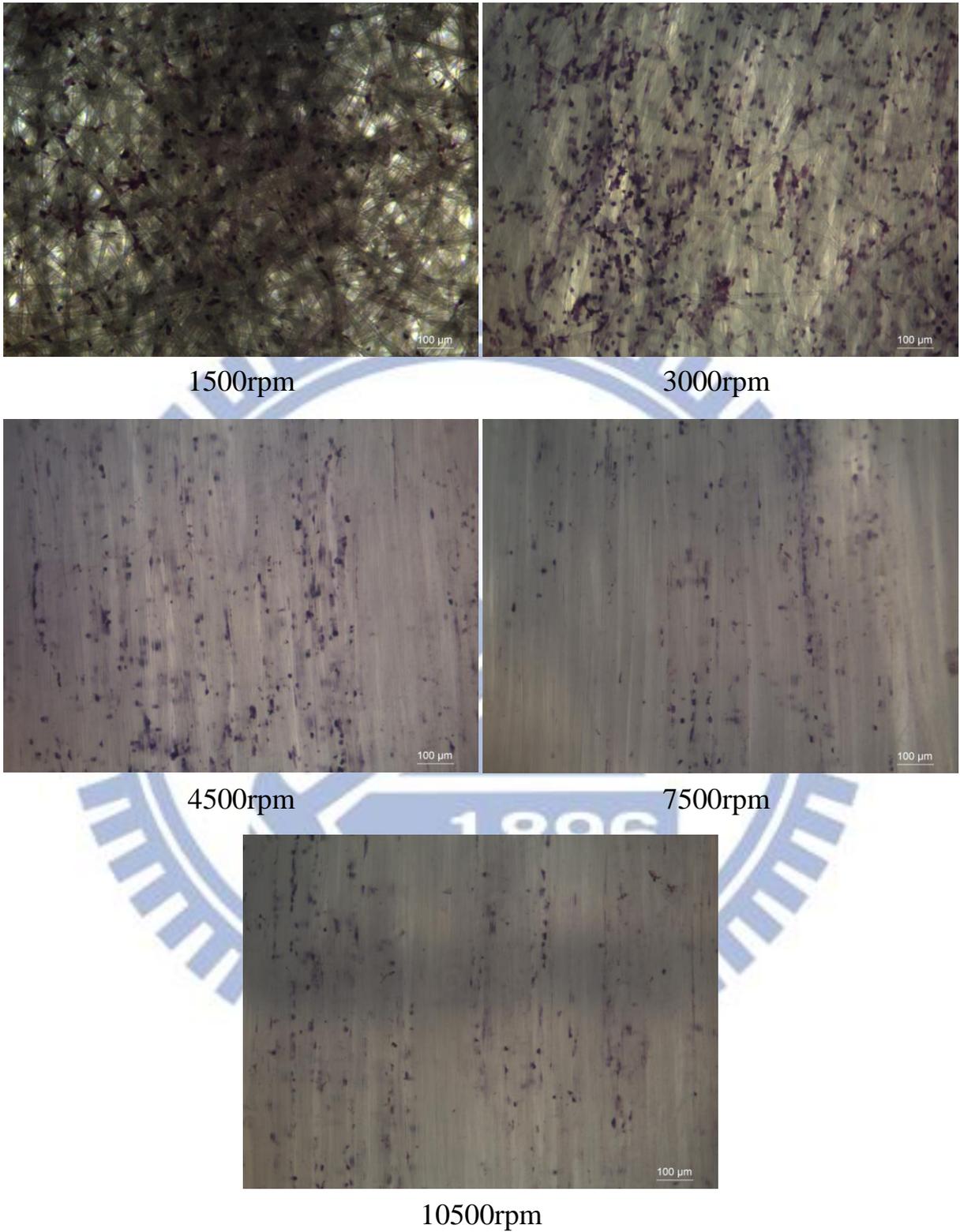


圖 4-15 動態植覆一天靜態培養兩天動態流速培養六天後 HE 染色圖

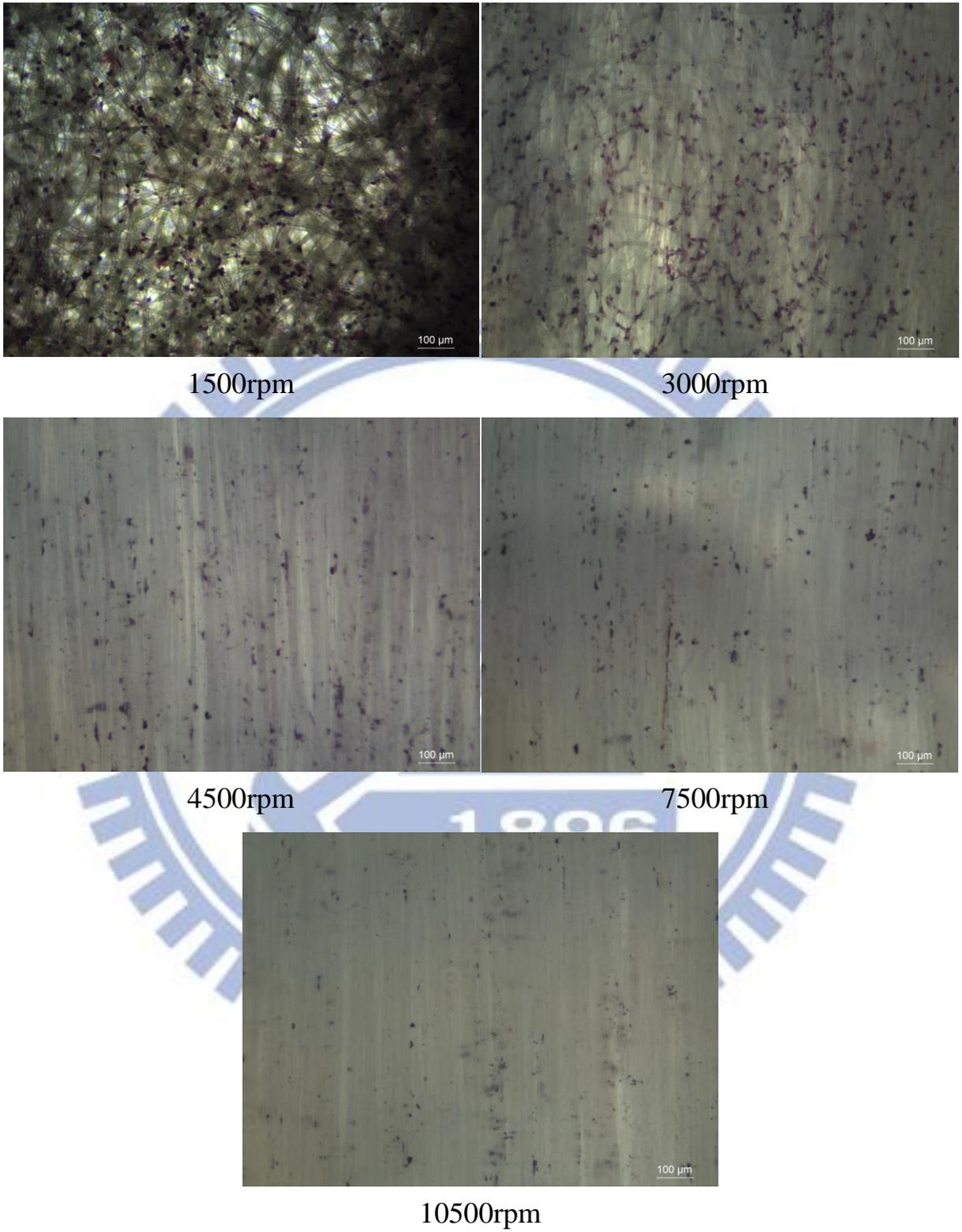


圖 4-16 動態植覆一天動態流速培養六天後 HE 染色圖

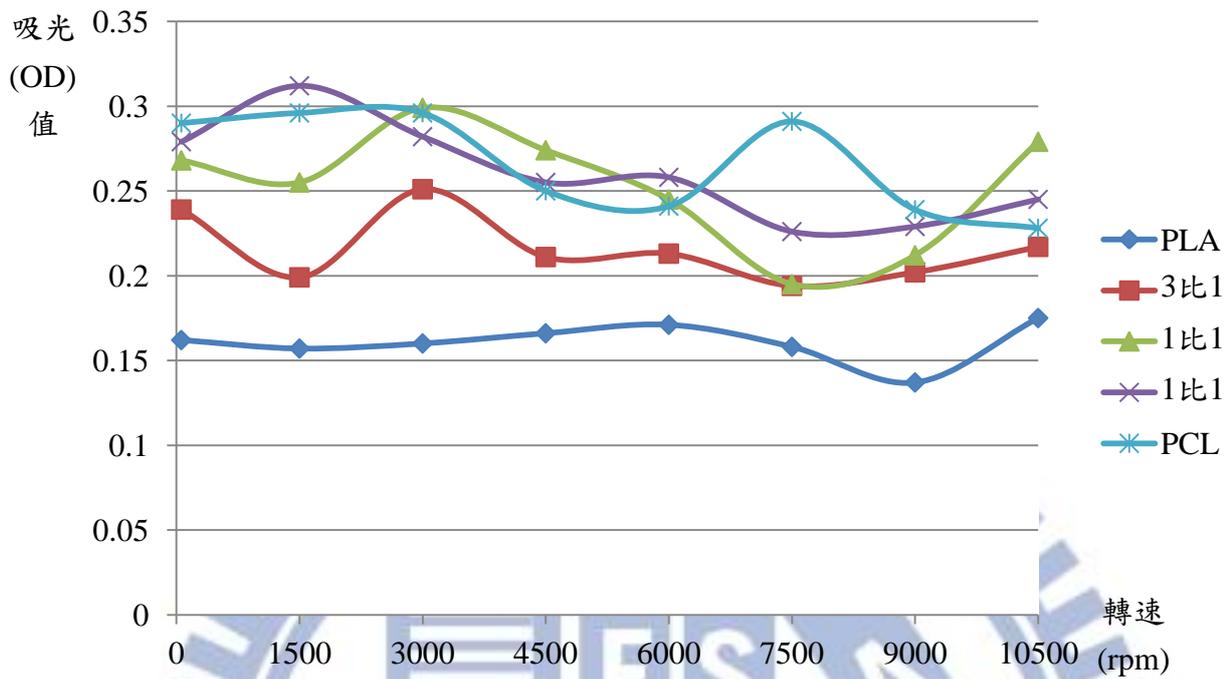


圖 4-17 動態植覆一天 MTT 活性測試結果

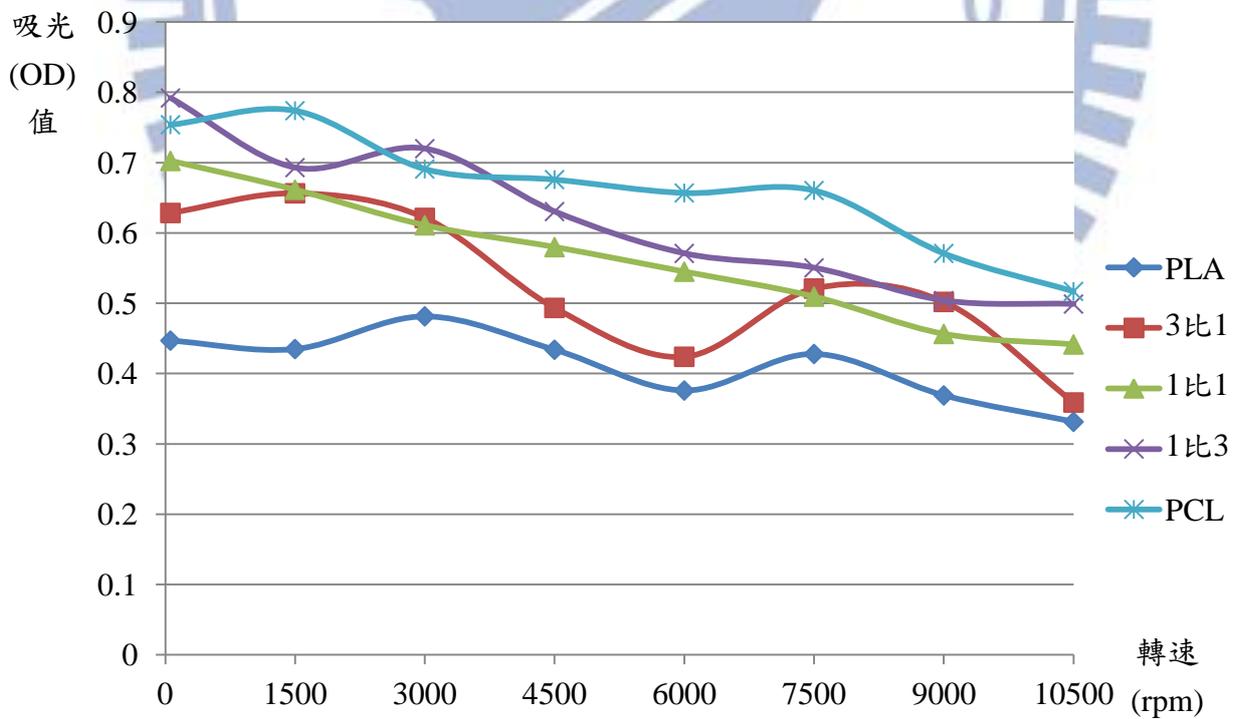


圖 4-18 動態植覆一天靜態培養兩天 MTT 活性測試結果

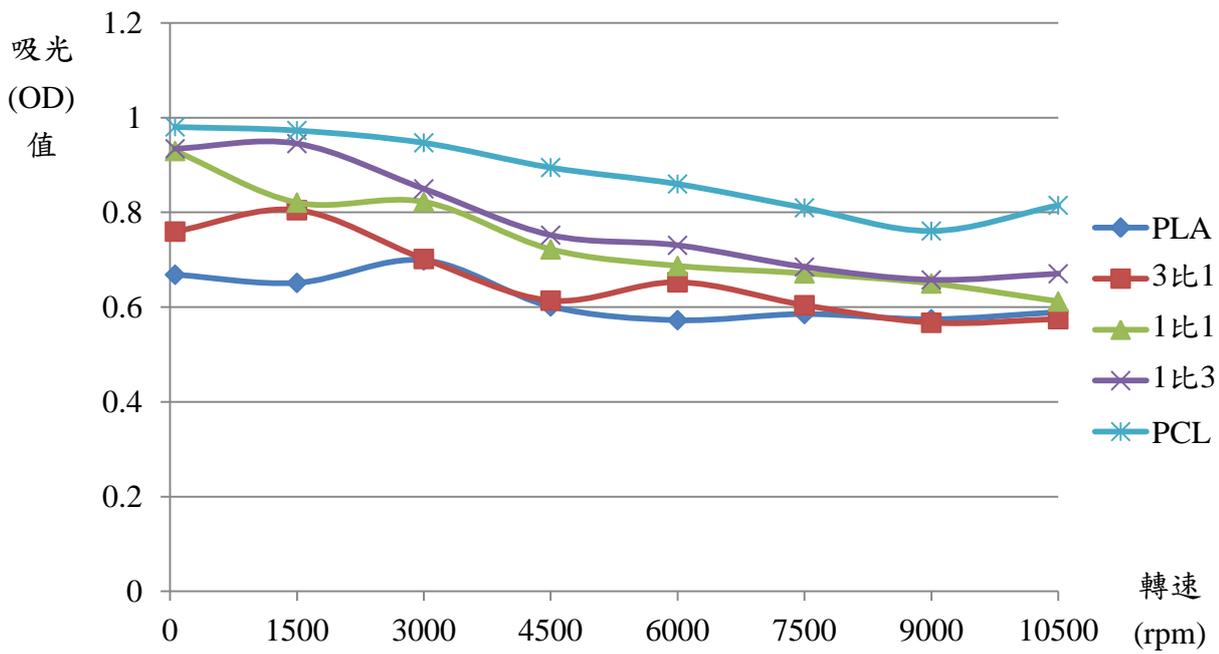


圖 4-19 動態植覆一天靜態培養六天 MTT 活性測試結果

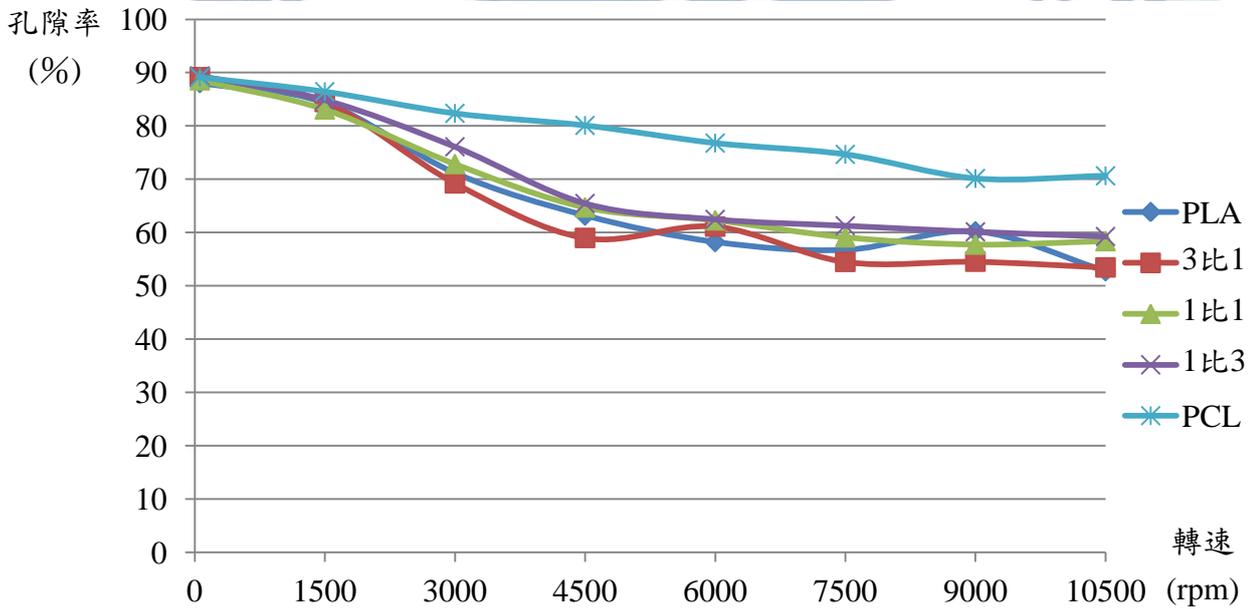


圖 4-20 孔隙率量測結果

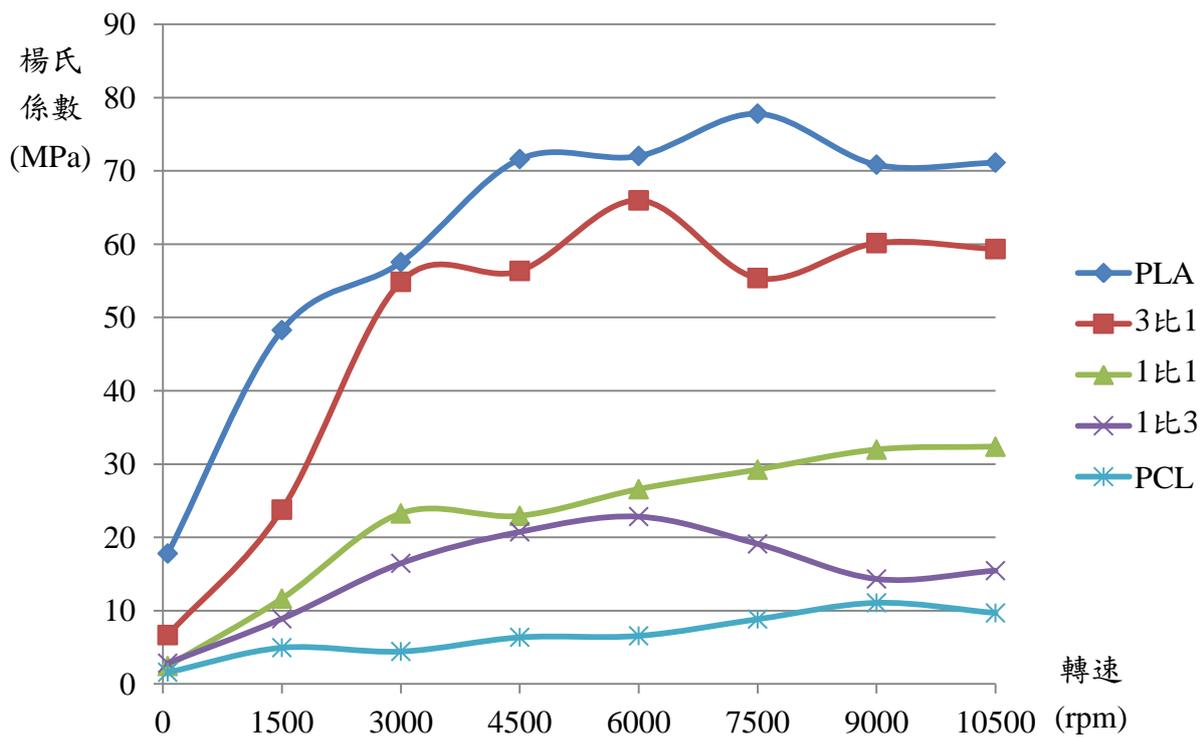


圖 4-21 楊氏係數機械性質測結果

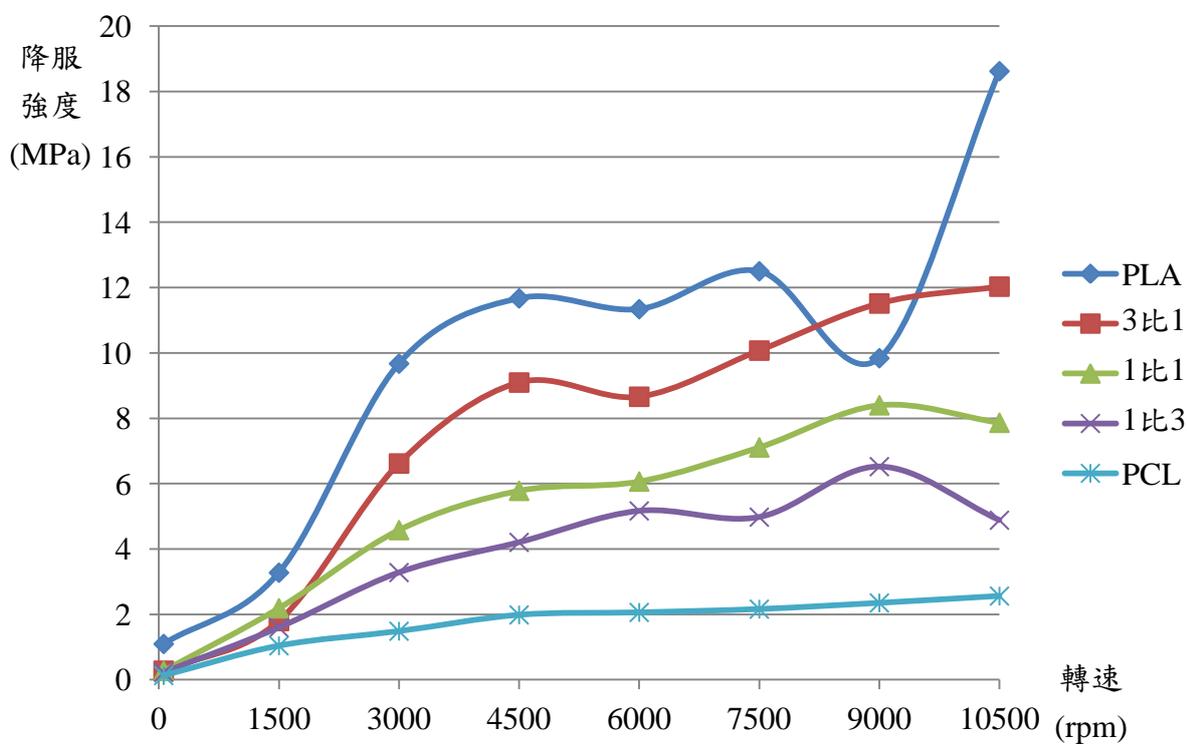


圖 4-22 降服強度機械性質測結果

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

以電氣紡絲法製備 PLA/PCL 小管徑人工血管細胞生長支架時，收集棒轉速提高會影響纖維排列的方向性，4500rpm(切線速度 96.6cm/s)以上的收集棒轉速其纖維排列具有方向性，4500rpm(切線速度 96.6cm/s)以上的收集棒轉速其纖維直徑隨著轉速提高而下降，PCL 含量愈高大致上電氣紡絲直徑愈大。纖維排列具有方向性之人工血管細胞生長支架其細胞會沿著纖維排列之方向生長，亦具有方向性。

在各種收集條件下製備之人工血管細胞生長支架，進行細胞培養時，經過 1 天動態植覆後其活性差別不大，不過經過 2 天與 6 天靜態培養後，無方向性之人工血管支架其細胞活性較具方向性者為高，細胞活性大致上隨著收集棒轉速提高而下降，PCL 含量愈高細胞活性也愈高。

纖維排列無方向性之人工血管細胞生長支架其接觸角較具有方向性者為大，纖維排列具有方向性之人工血管細胞生長支架其親水性較無方向者為佳，纖維排列具有方向性後其接觸角變化不大。人工血管細胞生長支架之孔隙率大致上隨著收集棒轉速升高而降低，纖維排列具有方向性後其孔隙率變化不大。親水性高對細胞的貼附與生長有幫助，但是從細胞活性的量測結果來看，親水性的影響並不明顯，可見有更重要的影響因素。高孔隙率以及互相連通的多孔性結構之人工血管細胞生長支架可使細胞於孔隙

中生長，有助於細胞的長期培養，從細胞活性的量測結果來看，孔隙率是影響細胞生長的主要因素。

在機械性質方面，纖維排列具有方向性之人工血管細胞生長支架其楊氏係數與降服強度較無方向性者為高，PLA 含量愈高其楊氏係數與降服強度也愈高。從機械性質的角度來看，以 3000rpm(切線速度小於等於 64.4cm/s) 到 4500rpm(切線速度 96.6cm/s)的收集棒轉速製作纖維排列具有不同方向性之人工血管細胞生長支架已經足夠，可於此範圍內找出最佳的收集速度。

以靜脈與動脈流速進行動態流速培養後，細胞數量變少，有不少血管細胞生長支架內壁的細胞被流體沖走，細胞被迫往支架的空隙發展，合適的孔隙有利於細胞的生長，纖維排列無方向性者的細胞數量多於有方向性者，細胞數量以 3000rpm 收集棒轉速製作之人工血管細胞生長為最多，纖維排列有方向性者以 4500rpm 的細胞數量為最多，動態植覆、靜態培養與動態流速培養的天數愈多其細胞數量也愈多。孔隙率與培養天數對於動態流速培養有很大的影響。

5.2 未來展望

本研究以電氣紡絲法在不同製作條件下製備小管徑人工血管細胞生長支架，不但確立了實驗的流程與方法，並針對以高分子材料聚乳酸和聚己

內酯製備出的小管徑人工血管細胞生長支架作了纖維結構、親水性、機械性質、孔隙率與細胞生長情形等分析，擴大其適合範圍，使小管徑人工血管細胞生長支架更容易應用於血管組織工程上，但還是有改善與進步的空間。

以下是未來可研究之方向：

1. 將兩種以上的細胞培養於人工血管細胞生長支架上，組成類似人體血管的構造。
2. 製作具有方向性的人工微血管細胞生長支架，以便使人工血管細胞生長支架可適用於更小的尺寸。
3. 製作纖維排列具有方向性且適合培養多層細胞之人工血管細胞生長支架。
4. 對人工血管細胞生長支架的材料進行改質，使細胞更容易貼附與生長。

如果可以對上述幾個方向進行研究，相信對於血管組織工程的發展會有很大的幫助，將來也可以看見組織工程人工血管應用在生醫研究或臨床上。

參考文獻

- [1] Nureddin Ashammakhi, et al., “Advancing tissue engineering by using electrospun nanofibers”, Regenerative Medicine, Vol. 3, No. 4, pp. 547-574, July 2008.
- [2] Anton Formhals, “Process and apparatus for preparing artificial threads”, U.S., Patent 1975504, October 1934.
- [3] Anton Formhals, “Method and apparatus for spinning”, U.S., Patent 2160962, June 1939.
- [4] Anton Formhals, “Artificial thread and method of producing same”, U.S., Patent 2187306, January 1940.
- [5] Julian H.S. George, “Engineering of fibrous scaffolds for use in regenerative medicine”, Imperial College London, Doctor of Philosophy, 2009.
- [6] Judah Folkman, “Angiogenesis”, Annual Review of Medicine, Vol. 57, pp. 1-18, February 2006.
- [7] 宋信文等, 「人工心臟瓣膜及人工血管」, 化工技術, 第 2 卷第 10 期, 94~104 頁, 民國 83 年 10 月。
- [8] Stuart Ira Foxj 著, 人體生理學, 朱勉生等譯, 第十一版, 偉明圖書有限公司, 民國 100 年。
- [9] 陳瑞祥, 「人工血管開發與應用」, 化工資訊, 第 4 卷第 12 期, 10~30 頁, 民國 79 年 12 月。
- [10] Eric P. Widmaier 等著, 人體生理學：身體功能之機轉, 蔡元奮等譯, 藝軒圖書出版社, 民國 95 年。

- [11] Arthur B. Voorhees, Jr., Alfred Jaretzki III, and Arthur H. Blakemore, “The use of tubes constructed from vinyon “N” cloth in bridging arterial defects”, Annals of Surgery, Vol. 135, No.3, pp. 332-336, March 1952.
- [12] 王盈錦等編著，生物醫學材料，合記圖書出版社，民國 91 年。
- [13] Anthony Ratcliffe, “Tissue engineering of vascular grafts”, Matrix Biology, Vol. 19, pp.353-357, August 2000.
- [14] Roger N. Baird, William M. Abbott, “Pulsatile blood-flow in arterial grafts”, The Lancet, Vol. 308, No.7992, pp. 948-950, October 1976.
- [15] William M. Abbott, et al., “Effect of compliance mismatch on vascular graft patency”, Journal of Vascular Surgery, Vol.5, No.2, pp. 376-382, February 1987.
- [16] 徐善慧，陳俊宇，「巧奪天工的人類智慧-組織工程」，科學發展，356 期，4~9 頁，民國 91 年 8 月。
- [17] 宋信文，梁晃千，「建立人類的身體工房—組織工程」，科學發展，362 期，6~11 頁，民國 92 年 2 月。
- [18] 李宣書，「淺談組織工程」，物理雙月刊，第 24 卷第 3 期，430~435 頁，民國 90 年 6 月。
- [19] Allan K. Schneider, “Polymers of high melting lactide”, U.S., Patent 2703316, March 1955.
- [20] John M. Brady, et al., “Resorption rate, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat”, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 7, No.2, pp. 155-166, March 1973.

- [21] 俞耀庭等編著，生物醫用材料，新文京開發出版股份有限公司，民國 93 年。
- [22] 陳建仁，「奈米坑洞對不同種類細胞的貼附、形態與生長之影響」，國立中興大學，碩士論文，民國 93 年。
- [23] So Yeon Kim, et al., “Indomethacin-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymeric nanosphere: pharmacokinetic characteristics of indomethacin in the normal Sprague-Dawley rats”, Biomaterials, Vol. 22, No.14, pp. 2049-2056, 2001.
- [24] Kacey G. Marra, et al., “In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering”, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 47, No.3, pp. 324-335, December 1999.
- [25] David S. Jones, et al., “Poly(ϵ -caprolactone) and poly(ϵ -caprolactone)-polyvinylpyrrolidone-iodine blends as ureteral biomaterials: characterization of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation in vitro”, Biomaterials, Vol. 23, No.23, pp. 4449-4458, December 2002.
- [26] C. Mauli Agrawal, Robert B. Ray, “Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering”, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 55, No.2, pp. 141-150, May 2001.
- [27] Lord Rayleigh, “XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity”, Philosophical Magazine Series 5, Vol. 14, No. 87, pp. 184-186, 1882.
- [28] John Zeleny, “The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces”, Physical

Review, Vol. 3, No. 2, pp. 69-91, February 1914.

- [29] John Zeleny, “Instability of electrified liquid surfaces”, Physical Review, Vol. 10, No. 1, pp. 1-6, July 1917.
- [30] Geoffrey Taylor, “Disintegration of water drops in an electric field”, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, Vol. 280, No. 1382, pp. 383-397, The Royal Society, July 1964.
- [31] G. I. Taylor, A. D. McEwan, “The stability of a horizontal fluid interface in a vertical electric field”, Journal of Fluid Mechanics, Vol. 22, No. 1, pp. 1-15, May 1965.
- [32] Geoffrey Taylor, “Studies in electrohydrodynamics. I. the circulation produced in a drop by electrical field”, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, Vol. 291, No. 1425, pp. 159-166, The Royal Society, April 1966.
- [33] Geoffrey Taylor, “Electrically driven jets”, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, Vol. 313, No. 1515, pp. 453-475, The Royal Society, December 1969.
- [34] Harold L. Simons, “Process and apparatus for producing patterned non-woven fabrics”, U.S., Patent 3280229, October 1966.
- [35] Peter K. Baumgarten, “Electrostatic spinning of acrylic microfibers”, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 36, No. 1, pp. 71-79, May 1971.
- [36] Darrell H. Reneker, Iksoo Chun, “Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning”, Nanotechnology, Vol. 7, No. 3, pp. 216-223, September 1996.

- [37] Jayesh Doshi, Darrell H. Reneker, “Electrospinning process and applications of electrospun fibers”, Journal of Electrostatics, Vol. 35, No. 2-3, pp. 151-160, August 1995.
- [38] 林坤賢等，「以電紡絲製備奈米纖維」，化工，第 52 卷第 5 期，22~39 頁，民國 94 年 10 月。
- [39] L. Larrondo, R. St. John Manley, “Electrostatic fiber spinning from polymer melts. II. Examination of the flow field in an electrically driven jet”, Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, Vol. 19, No. 6, pp. 921-932, June 1981.
- [40] H. Fong, et al., “Beaded nanofibers formed during electrospinning”, Polymer, Vol. 40, No. 16, pp. 4585-4592, July 1999.
- [41] Silke Megelski, et al., “Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers”, Macromolecules, Vol. 35, No. 22, pp. 8456-8466, October 2002.
- [42] Christopher J. Buchko, et al., “Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films”, Polymer, Vol. 40, No. 26, pp. 7397-7407, December 1999.
- [43] Xinhua Zong, et al., “Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes”, Polymer, Vol. 43, No. 16, pp. 4403-4412, July 2002.
- [44] Michel Vert, et al., “New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids”, Clinical Materials, Vol. 10, No. 1-2, pp. 3-8, 1992.
- [45] Holten C.H., et al., Lactic acid; properties and chemistry of lactic acid and

derivatives, Verlag Chemie, 1971.

- [46] Seyed A. Angadjivand, et al., “Method and apparatus for making a nonwoven fibrous electret web from free-fiber and polar liquid”, U.S., Patent 6375886, April 2002.
- [47] Peter P. Tsai, et al., “Different electrostatic methods for making electret filters”, Journal of Electrostatics, Vol. 54, No. 3-4, pp. 333-341, March 2002.
- [48] Chiara Arrigoni, et al., “Vascular Tissue Engineering”, Cell Transplantation, Vol. 15, Supplement 1, pp. S119-S125, 2006.
- [49] 陳季良，「以生醫微機電技術製作組織工程之人工微血管」，國立中興大學，碩士論文，民國 92 年。
- [50] M. Conley Wake, et al., “Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues”, Cell Transplantation, Vol. 5, No. 4, pp. 465-473, July-August 1996.
- [51] C.Y. Xu, et al., “Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering”, Biomaterials, Vol. 25, No. 5, pp. 877-886, February 2004.
- [52] Joel Stitzel, et al., “Controlled fabrication of a biological vascular substitute”, Biomaterials, Vol. 27, No. 7, pp. 1088-1094, March 2006.
- [53] Matthew Richard Williamson, et al., “PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells”, Biomaterials, Vol. 27, No. 19, pp. 3608-3616, July 2006.
- [54] Xinhua Zong, et al., “Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue

constructs”, Biomaterials, Vol. 26, No. 26, pp. 5330-5338, September 2005.

- [55] Hiroyuki Inoguchi, et al., “Mechanical responses of a compliant electrospun poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) small-diameter vascular graft”, Biomaterials, Vol. 27, No. 8, pp. 1470-1478, March 2006.
- [56] C.T. Laurencin, et al., “Tissue engineering: orthopedic applications”, Annual Review of Biomedical Engineering, Vol. 1, No. 1, pp. 19-46, August 1999.
- [57] Eugene D. Boland, et al., “Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering”, Frontiers in Bioscience, Vol. 9, pp. 1422-1432, May 2004.
- [58] Dan Li, et al., “Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays”, Nano Letters, Vol. 3, No. 8, pp. 1167-1171, August 2003.
- [59] 蔡易瑾，「內皮細胞動態植覆、培養與物理刺激於碳酸酯型聚胺酯人工血管之研究」，國立中興大學，碩士論文，民國 92 年。
- [60] 徐一峯，「組織工程人工微血管之製作與細胞培養」，國立中興大學，碩士論文，民國 94 年。