

國立交通大學

機械工程學系

小管徑人工血管支架之研製

Study of Manufacturing Small-Diameter Artificial Scaffold with
Nanofiber

研究生：魯鎮宇

指導教授：徐瑞坤 教授

中華民國一百年八月

小管徑人工血管支架之研製

**Study of Manufacturing Small-Diameter Artificial Scaffold
with Nanofiber**

研究生：魯鎮宇

Student : Chen-Yu Lu

指導教授：徐瑞坤

Advisor : Ray-Quan Hsu



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

Computer and Information Science

August 2011
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百年八月

小管徑人工血管支架之研製

研究生：魯鎮宇

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

近年來生醫領域的興起，組織工程快速發展，人工血管支架也在組織工程的研究中扮演重要的一環。目前人工血管支架有許多不同種類的材料與製程，有些甚至已經可以在臨床上實用。但至今為止，發展成熟的人工血管支架僅只於管徑大於 4mm 之管狀支架，小管徑的人工血管支架其實在體外的人工器官培養、臨床周邊循環系統上的需求實際上也並不亞於大管徑的血管支架，但現今並無有效製備小管徑人工血管支架的方法。尤其是在類似微血管的人工血管支架研究上，目前皆尚未能完全滿足類似微血管的性質需求。

本研究以聚乳酸及聚乙二醇為原料，以電氣紡絲加工技術製備出富含孔隙的小管徑人工血管支架，支架內徑僅 0.18-0.20mm，管壁約 30-40 μ m，並對聚乳酸和聚乙二醇在電氣紡絲加工穩定的狀態下所產生的纖維及孔隙大小變化作探討，另外進行親水性的量測以及內皮細胞的養殖，確認在同樣總表面孔隙度下的支架，擁有較小平均孔隙和較佳親水性的支架上會有較佳的細胞生長貼附情形。

關鍵字：電氣紡絲、心血管組織工程、細胞生長支架、人工微血管

Study of Manufacturing Small-Diameter Artificial Scaffold with Nanofiber

Student : Chen-Yu Lu

Advisor : Dr. Ray-Quen Hsu

Department of Mechanical Engineering
National Chiao Tung University

ABSTRACT

The development of bioengineering and tissue engineering in recent years, leads to the evolution of artificial scaffold in many applications. Many different methods of making artificial scaffold are adopted, but none of these process can be utilized for manufacturing a small-diameter artificial scaffold. Especially for the microvascular-like artificial scaffold, almost no study up to this date can satisfy the characteristic of real human microvascular. Microvascular-like small-diameter artificial scaffold which is necessary in research, like the cultivation of artificial organs in vitro and clinical of the peripheral circulatory system, becomes an urgent topic in the field of tissue engineering.

This study proposed to establish a process of manufacturing small-diameter artificial scaffold by electrospinning, using polylactic acid (PLA) and polyethylene oxide (PEO) as materials. The small-diameter artificial scaffold has inner diameter of 0.18-0.20mm and wall thickness 30-40 μ m. Characteristics of the small-diameter artificial scaffold's fiber diameter, pore size and contact angle were measured. Culturing endothelial cells on these scaffolds were also conducted. The result showed that cells had better attachment and grew situation when scaffold have the same total pore area with small average pore area.

Keyword : electrospinning, blood vessel engineering, scaffold, artificial capillaries

致謝

碩士修業的兩年期間，由衷的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與建議，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洪景華老師、陳仁浩老師以及楊秉祥老師，對論文提供了相當多的指導與建議。另外也要謝謝國家奈米元件實驗室的陳惠民老師對實驗的建議，讓本論文得以更趨完善。

在實驗的過程中，承蒙梁達嵐、江維堂、黃宣諭、吳偉仁、葉人瑜、高豐生、王基信等學長的幫忙，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。同學何昇融、陳瑋奇、謝其晟在課業上我們互相幫忙、在生活上的歡笑皆銘記在心。陳侑群、陳柏廷、曹植培、鍾權任、徐韶謙、黃怡菁等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。

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。

鎮宇 謹識

2011.08

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
致謝.....	iii
目錄.....	iv
圖目錄.....	vii
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.....	6
2.1 組織工程學.....	6
2.1.1 組織工程學的發展.....	6
2.1.2 組織工程的定義與基本概念.....	7
2.1.3 細胞生長支架.....	9
2.1.4 人工血管當前發展.....	10
2.2 電氣紡絲.....	12
2.2.1 電氣紡絲的發展.....	12
2.2.2 電氣紡絲的原理.....	13

2.2.3	電氣紡絲在組織工程領域的應用	15
2.3	生物醫學上常用之高分子材料.....	17
2.3.1	聚乳酸	17
2.3.2	聚乙二醇	18
第三章	研究材料與方法.....	24
3.1	研究流程概述.....	24
3.2	實驗設備.....	25
3.2.1	電氣紡絲實驗設備	25
3.2.2	場發射掃描式電子顯微鏡.....	26
3.3	小管徑人工血管支架之製備.....	27
3.3.1	小管徑管狀人工支架基本製備步驟.....	27
3.3.2	溶液配製與實驗參數	28
3.4	孔隙大小計算方法.....	29
3.4.1	表面孔隙大小（二維孔隙大小）	29
3.4.2	管壁滲透實驗（三維孔隙大小）	29
3.5	內皮細胞培養.....	30
3.5.1	MTT活性試驗.....	30
第四章	實驗結果與討論.....	41
4.1	小管人工血管支架之幾何特性.....	41

4.1.1	小管徑人工血管支架之表面觀測	41
4.1.2	聚乙二醇含量對纖維粗細之影響	41
4.2	孔隙大小與PLA-PEO濃度比例之關係	43
4.2.1	表面孔隙大小（二維孔隙大小）	43
4.2.2	管壁滲透實驗（三維孔隙大小）	43
4.3	親水性量測結果.....	44
4.4	內皮細胞之活性測試結果.....	45
第五章	結論與未來展望.....	62
5.1	結論.....	62
5.2	未來展望.....	63
參考文獻	64



圖目錄

圖 1- 1 Formhals的電氣紡絲設計.....	5
圖 1- 2 電氣紡絲法示意圖.....	5
圖 2- 1 體外再生方式 (in vitro)	20
圖 2- 2 體內再生方式 (in vivo)	20
圖 2- 3 Thomas Neumann等人以在尼龍線上養殖細胞方式製備人工血管	21
圖 2- 4 Thomas Neumann等人以在尼龍線上養殖細胞方式製備人工血管之剖面	22
圖 2- 5 泰勒錐.....	22
圖 2- 6 高分子薄膜製備之管狀結構(a)剖面視角 (b)等視角	23
圖 3- 1 實驗流程圖	33
圖 3- 2 高壓電源供應器	33
圖 3- 3 注射式針筒幫浦	34
圖 3- 4 壓克力絕緣箱	34
圖 3- 5 不鏽鋼針頭(平頭，規格為#21).....	35
圖 3- 6 以電氣紡絲法製備小管徑人工血管支架示意圖.....	35
圖 3- 7 葡萄糖.....	36
圖 3- 8 ϕ 0.20mm x 40mm 針灸針	36
圖 3- 9 ϕ 0.18mm x 40mm 針灸針	37
圖 3- 10 聚乳酸顆粒	37
圖 3- 11 聚乙二醇	38
圖 3- 12 氣仿	38
圖 3- 13 管壁滲透實驗示意圖.....	39
圖 3- 14 混合後之micro particle溶液.....	39
圖 3- 15 染色劑蘇木精 (左) 和伊紅 (右)	40
圖 3- 16 MTT試驗產生的顏色	40
圖 4- 1 小管徑人工血管支架SEM剖面圖	48
圖 4- 2 高倍率下SEM拍攝之電氣紡絲纖維表面	49
圖 4- 3 10% PLA (w/v) 之電氣紡絲纖維.....	50
圖 4- 4 10% PLA (w/v) 與 7% PEO (w/v) 以 4:1 混合之電氣紡絲纖維	50
圖 4- 5 12% PLA (w/v) 電氣紡絲之纖維.....	51
圖 4- 6 3% PEO (w/v) 電氣紡絲之纖維.....	51

- 圖 4-7 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO的體積比電氣紡絲之纖維，倍率 5000 下。PLA:PEO=(A) 9:1 (B) 8:2 (C) 7:3 (D) 6:4 (E) 5:5 (F) 4:6 52
- 圖 4-8 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO的體積比電氣紡絲之纖維直徑趨勢圖 52
- 圖 4-9 倍率 1000 下之小管徑人工血管支架表面，10% PLA (w/v) (左)與 10% PLA (w/v) 與 7% PEO (w/v) (右)..... 53
- 圖 4-10 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO(w/v)的體積比之小管徑人工血管支架，倍率 100 下。PLA:PEO=(A) 9:1 (B) 8:2 (C) 7:3 (D) 6:4 (E) 5:5 (F) 4:6 53
- 圖 4-11 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO(w/v)的體積比之小管徑人工血管支架，倍率 500 下。PLA:PEO=(A) 9:1 (B) 8:2 (C) 7:3 (D) 6:4 (E) 5:5 (F) 4:6 54
- 圖 4-12 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO(w/v)的體積比之小管徑人工血管支架，倍率 1000 下。PLA:PEO=(A) 9:1 (B) 8:2 (C) 7:3 (D) 6:4 (E) 5:5 (F) 4:6 54
- 圖 4-13 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO(w/v)的體積比之小管徑人工血管支架表面孔隙大小趨勢圖 55
- 圖 4-14 光學顯微鏡 400 倍下觀察micro particle混合溶液注入 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 9:1 製備之小管徑人工血管支架側邊流出溶液 55
- 圖 4-15 光學顯微鏡 400 倍下觀察micro particle混合溶液注入 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 5:5 製備之小管徑人工血管支架側邊流出溶液 56
- 圖 4-16 直徑 12 μ m之micro particle從 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 製備之小管徑人工血管支架側邊流出平均個數56
- 圖 4-17 直徑 10 μ m之micro particle從 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 製備之小管徑人工血管支架側邊流出平均個數57

圖 4- 18	12% PLA (w/v) 製備之薄膜親水性實驗照片	57
圖 4- 19	12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 3:7 製備之薄膜親水性實驗照片	58
圖 4- 20	12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 各體積比之親水性實驗結果	58
圖 4- 21	12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 9:1 製備之薄膜支架養殖內皮細胞情形	59
圖 4- 22	12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 8:2 製備之薄膜支架養殖內皮細胞情形	59
圖 4- 23	12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 7:3 製備之薄膜支架養殖內皮細胞情形	60
圖 4- 24	12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 5:5 製備之薄膜支架養殖內皮細胞情形	60
圖 4- 25	五組MTT活性測試結果	61
圖 4- 26	於小管徑人工血管支架上養殖細胞 14 日後之染色觀察	61

表目錄

表 3-1 實驗參數.....	32
表 4-1 改變 12% PLA (w/v) 與 3% PEO (w/v) 的體積比電氣紡絲之纖維直徑	46
表 4-2 10% PLA (w/v) 及 10% PLA (w/v) 加 7% PEO (w/v) (體積比 4:1) 倍率 1000 下表面孔隙比較.....	46
表 4-3 12% PLA (w/v) 以及 3% PEO (w/v) 製備的小管徑人工血管支架表面孔隙大小	46
表 4-4 micro particle 混合溶液注入 12% PLA(w/v) 和 3% PEO(w/v) 製備之小管徑人工血管支架側邊流出的溶液在光學顯微鏡 400 倍下觀察之平均顆粒個數.....	47
表 4-5 不同比例之 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 支架養殖細胞後作 MTT 試驗之吸光值.....	47

第一章 序論

1.1 研究背景

因為近年來生物醫學領域的興起，使得組織工程技術快速發展，纖維支架結構得以邁入更細微的層級，在醫療的使用以及藥物的研發上都有著更廣泛的應用。

一般而言，心血管疾病的醫療方式為利用各類血管移植物來取代或修補受損的血管，臨床上多半是取用自體的血管來做移植手術。自體移植血管是屬於動物組織人工血管的一種，擁有最好的生物相容性而且沒有免疫問題、壽命也最長，但是來源有限，因此在像動脈硬化症這種可能為全面性的疾病時就需要用到合成人工血管。其他動物組織人工血管也有相同情況，而且可能會造成免疫系統的問題。在藥物研發方面也相同，要於人體外進行多次模擬試驗。因此合成人工血管的研究是有其必要性的。

製作纖維支架結構主要有以下五種方法[1]：

1. 模板合成法 (Template synthesis)
2. 抽絲法 (Fiber-drawing Method)
3. 相分離法 (Phase separation)
4. 自我組裝技術 (Self-assembly Method)
5. 電氣紡絲法 (Electrospinning)

以上五種方法各有各的優缺點。模板合成法與抽絲法屬於比較簡易的

方法，但由於無法控制纖維粗細，因此無法有效製造較細的纖維。相分離法可以製備出細胞外間質大小等級之纖維，並形成三維的多孔纖維網，但此方法很難去控制製造出具直線性及特定直徑的纖維。自我組裝技術是利用縮氨酸來製作纖維支架，但此方法需要進行特定的物理和化學反應，在化學和機械性質上會有所限制；上述兩種方法都已趨成熟，因此容易受到器材和儀器的限制。電氣紡絲法所作之纖維支架結構近來被廣泛的運用在組織工程上，因為其同時具有多孔性的特質、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，因此對於利用電氣紡絲製作組織工程的結構材料方面的研究近年來有明顯上升的趨勢。此外，電器紡絲法可以製備任何種類的高分子材料、製造出不同尺寸等級的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。

電氣紡絲法是 Formhals 在 1934 年所開發的專利技術，圖 1-1 為他在 1939 年的設計[2-4]，因為整個生產技術必須應用到靜電力（Electrostatic Force），所以稱為電氣紡絲法。電氣紡絲法可運用於很多面向，因此所使用的原料也因需求而有所不同。如製備染料敏化太陽能電池時，可能使用的原料為聚醋酸乙烯酯（Polyvinyl acetate, PVAc）；而生產生物可分解奈米纖維時，通常使用的原料為長鏈分子之聚合物溶液，如生物可分解的膠原蛋白（Collagen）或聚乳酸（PLA）。當溶液被擠入通電的金屬噴嘴後，高壓電場會使得噴嘴外圍產生一倒三角錐狀的液體形狀，稱為泰勒錐（Taylor

Cone)。接著纖維會噴射出來，噴射時並不會依照直線路線噴射至蒐集表面，所以可以藉由旋轉蒐集板編織出多孔性薄膜。圖 1-2 為電氣紡絲法之原理示意圖。

控制薄膜型態主要有四個參數：液體濃度（Solution Concentration）、電壓強度（Voltage Strength）、沉積距離（Deposition Distance）以及沉積時間（Deposition Time）。其中液體濃度影響纖維絲的成像、電壓強度影響纖維絲的寬度、沉積距離影響纖維絲截面的圓整度，而沉積時間則是控制薄膜的厚度。雖然可以藉由以上參數來控制薄膜的成長形態，但噴出的高分子纖維是以亂數重疊排列，所以會有孔洞大小不一以及膜厚不勻的缺點。



1.2 研究動機與目的

近期人工血管的使用需求不斷增加，目前臨床的使用上，大管徑的人工血管已經被廣泛使用，但是小管徑的人工血管因為在製造和實用上有其困難，尚無較有效的替代品，在應用上會受到許多限制，因此改良人工血管的特性是研究的重要一環。使用人工血管支架在生物體外培養細胞作為模擬生物體內生長的情況、或作為藥物研發的載台時也有相同情形：目前體外培養各類細胞研究的機制都僅止於在平板狀的支架或管徑較大之血管支架，不同於細胞在生物體內的生長方式，在培養時尚無一架構能完整模

擬生物體內的循環系統。此結果也造成無法準確的瞭解細胞生長的情況，在研究上也可能產生偏差。為了解決此情況，理論上應該製作一小管徑人工血管支架與目前的人工血管支架作結合來正確模擬細胞的生長機制。但是以目前的研究而言，並無法有效的製作出類似生物體微血管的小管徑人工血管支架結構。

因此本研究試著利用電氣紡絲加工技術，製作出富含孔洞性及生物相仿性的小管徑人工血管支架結構。並測試在何種參數下利於製作小管徑血管支架並使纖維有較佳的細化效果，藉此提高支架的孔洞性。並測量支架之親水性以及在支架上培養人體內皮細胞，提高其在血管組織工程領域上的應用。



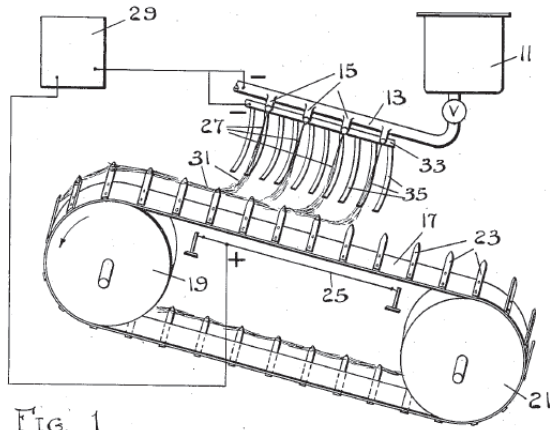


FIG. 1.

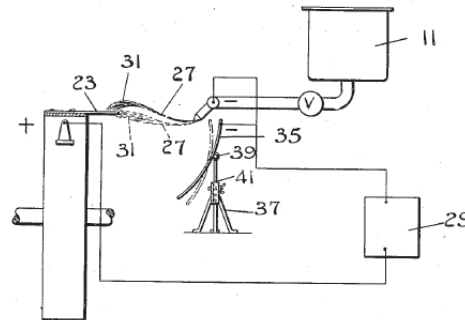


FIG. 2.

INVENTORS:
Richard Schreiber Gastell and
Linton Formhals
BY Louis DeWitt
ATTORNEY.

圖 1-1 Formhals 的電氣紡絲設計

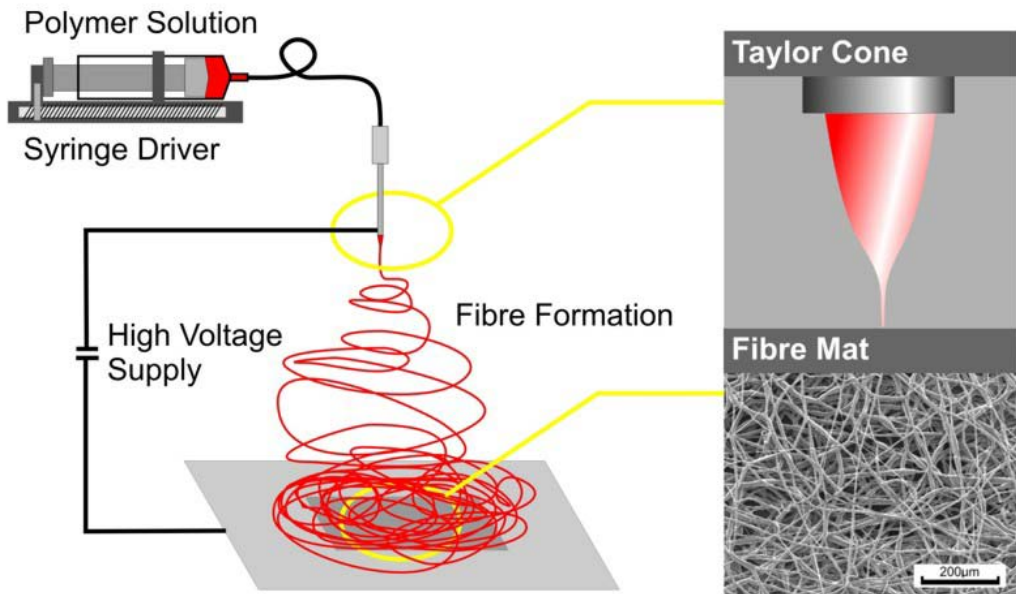



圖 1-2 電氣紡絲法示意圖[5]

第二章 文獻回顧

2.1 組織工程學

組織工程學包含生物學、現代醫學、材料與工程學的跨領域學科，因此，組織工程學不但可應用於替代、修復或改善人體各種組織或器官損害，更可以帶動相關跨領域學科的發展，推動生物材料、生物反應等高技術產業和產業群的形成。目前國際間技術發展的主要項目是研發製造人工皮膚、軟骨、硬骨、肝、血管、眼角膜還有神經再生、細胞治療、幹細胞等項目。

2.1.1 組織工程學的發展



組織工程的研究發展是伴隨人造生醫材料的發展而進步的，早在 1960 年代就開始嘗試使用人造材料合成的人造皮膚來治療燒傷的病人。1970 年代末，麻省理工學院的 Eugene Bell 實驗室在成功地體外培養出了皮膚、血管等組織。1980 年代，由麻省理工學院的 Robert Langer 教授、哈佛醫學院的 Joseph Vacanti 和其弟 Charles Vacanti 等人，透過一系列的實驗證實新生的軟骨組織可利用降解的高分子材料結合細胞的植入培養而成。

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 1990 年舉辦了第一屆組織工程學術研討會。1995 年，專業周刊《組織工程》（Tissue Engineering）正式發行，美國與世界的組織工程學會也分別於 1996 和 1998 年正式成立，組織工程自此成為生物技術研究領域的顯學。

目前人體整形或病損組織的修復替代，已發展至高水平，除了腦以及大多數內分泌器官外，都可用人工或異種、同種異體組織或器官來代替，以達到病損組織的部分功能恢復或美容的目的。許多國家都投入了大量的人力物力在此基礎上，進行包括軟骨、硬骨、肌腱、皮膚、肝臟和胰臟等組織工程的研究，對輸尿管、尿道、食道、小腸、腎臟和血管等的組織工程研究也取得了某些進展。但是依然存在異物排斥反應的可能性，像大面積燒傷病人在自體完好皮膚非常有限的情況下，必須透過豬皮、遺體捐贈皮膚或含藥物敷料來覆蓋移植，否則會有生命危險，這種覆蓋移植往往存在嚴重的排斥反應，長時間得不到自體組織或器官的承認，造成手術或治療失敗的可能。

因此，如何在體外培養出免疫系統反應正常、人體無排斥的組織來提供手術使用，是醫學界和生物醫學工程學界共同追求的目標。組織工程的出現，使此目標的實現更往前一步，未來也許可以從組織工程的工廠得到組織或器官，再通過外科手術替換一些生病或傷害的受損組織，甚至是一些長的不漂亮的組織或器官。

2.1.2 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，來修復、維持或改善人體組織的功能，此取代物也將成為人體體內的一部分，

可用來醫療特定的疾病，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，以期能夠達到修復的目的[6]。

組織工程的基本做法：

1. 由人體取出細胞
2. 在體外將細胞培養至足夠數量
3. 將細胞填入人工支架內並培養
4. 有必要時加入一些化學藥劑或生長因子促進細胞分化
5. 將人工組織移植至人體內

由上述組織工程的基本作法，可以歸納出組織工程有三大要素：

1. 細胞 (cell)
2. 支撐細胞生長所需的支架 (scaffold)
3. 影響細胞行為之訊息因子 (signal)

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

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、圖 2-2 所示。所謂體外的方式，是指結合上述組織工程的三要素，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，使周遭組織與器官的細胞完成修復的動作。

2.1.3 細胞生長支架

組織的構成包括了細胞、組織液和細胞外基質 (extracellular matrix)，細胞外基質是由基底層 (basement membrane) 與許多相互交聯網狀結構的蛋白質和多醣所組成，其中最重要的當屬膠原蛋白 (collagens) 纖維。膠原蛋白又分為很多種類，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。這些細胞外基質及網狀纖維結構基本上就是支架，支撐著組織的形狀。

胚胎的發育由受精卵分裂，大約至桑葚期 (Blastula) 細胞開始製造分泌細胞外基質，如果此時膠原蛋白的合成受到抑制，胚胎的發育就會停頓，由此可見細胞外基質對於細胞分裂以及組織的形成是不可或缺的。而組織工程的做法恰恰與細胞的生長相反，必須先架好支架，讓細胞依附、生長在支架上，再逐漸形成組織。支架的外型可以依照所需來建構，以配合嵌入人體組織的缺陷處。

支架的來源有很多，大致可以區分為天然以及人工兩類。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、洋菜膠；人工合成的材料則有更多種類，如聚乳酸 (polylactate)、具甘醇酸 (polyglycolate) 等。膠原蛋白、聚乳酸、具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點：

1. 材料在架構和功能上與天然的細胞外基質相似，具有良好的生物兼容性(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洞率、面積體積比，所以很適合作為細胞生長的環境。

總而言之，組織工程主要是致力於組織和器官的再生與形成，利用材料科學與生物科技的進步，在一個模仿組織與器官形狀的材料中植入細胞，使細胞依模型長成新的組織或器官，以修復人體的組織缺損。此技術對因器官衰竭而急待修復的患者而言，無疑是一大福音。

2.1.4 人工血管當前發展

人類用人工血管來醫治傷患一開始的發展是以血管移植為主軸，直到20世紀初，各國學者開始採用金屬、玻璃、聚乙烯以及矽橡膠等等材料製成管狀物進行大量動物實驗，但因為製作成品無孔洞性而容易短時間內產生血栓而未能能在臨床上得到廣泛應用。

1952 年，Voorhees 以聚乙烯醇縮甲醛纖維製成人工血管改變了以往人工血管管壁的無孔洞性[7]，並在接下來的幾年與 Blakemore 和 Jaretzki 做了大量的臨床試驗，研製帶有網孔的人工血管，這是人工血管發展上的一個里程碑。在這之後各國學者測試了各種材料來製作人工血管，現今大管徑的人工血管已經廣泛的被運用在研究及臨床上，但是小管徑的人工血管因為管壁容易過厚、暢通率不佳以及製作不易的關係，在應用上受到許多限制。所以在小管徑人工血管的研究上，Thomas Neumann 等人將平滑肌細胞培養覆蓋於直徑為 127 μm 的尼龍線上，在經過二十八天的培養後，覆蓋的平滑肌細胞厚達 150 μm ，將尼龍線抽去即可成為人工血管[8]。但此方法製作之人工血管所形成支管壁過厚，如圖 2-3、圖 2-4 所示。一般微血管管壁是以單層之內皮細胞所構成，稍厚者也僅兩至三層，也就是大約數 μm 至數十 μm 左右，目的是為了讓血液與周邊細胞組織達成養分與氧氣的交換，以此方法製作無法達到所要求。

目前臨床上實際使用之人工血管，直徑多半大於 4mm，然而實際上組織工程中對直徑小於 4mm 的血管需求並不亞於大管徑的人工血管，尤其是對一些周邊血液循環系統（peripheral circulation）需求更是迫切。因此本研究旨在製作接近人體微血管構造之小管徑人工血管支架，從細胞的體外培養開始，希望能早日實用於組織工程上。

2.2 電氣紡絲

電氣紡絲的原理最早被發現在 1900 年，當時人們將熔融狀態的封蠟 (Sealing Wax) 置於一高壓電場中，發現會有固態的纖維由高壓端被射出，最後形成薄膜狀沉積物。

電氣紡絲是採用高壓電場的帶電荷噴嘴，將高分子聚合物溶液之紡絲溶劑乾燥揮發後，形成纖維網材。電氣紡絲法在 70 多年前就被發現，但直到 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。

2.2.1 電氣紡絲的發展

1882年，Rayleigh最早開始研究導電液體在電場中的行為[9]。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[10-11]。

直至1934年，Formhals申請了第一個電氣紡絲的專利，描述利用靜電力場製作高分子纖維之裝置，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。1964年後，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) [12-15]，平衡半角 (Semi-vertical Angle) 為 49.3° ，示意圖如圖2-5所示。

1966年，Simons利用電氣紡絲法成功的製作出輕薄的不織布型態薄膜 [16]。1970年，任職於Dupont的Baumgarten發表了一系列利用高速攝影機拍下的電紡絲相片，使電紡絲的過程和運作方式更為人們所熟悉。隔年 Baumgarten更利用電紡絲製作出直徑只有0.05~1.1微米的纖維[17]。發展至此，電紡絲已經進步到可製作出奈米尺寸纖維的能力。

2.2.2 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[18]，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[19]，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)，便會從泰勒錐底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，沉積於收集板上。纖維與纖維間會形成交錯連結的網路結構

[20]，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[21]，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。許多學者對此有深入的研究：

在收集距離的研究方面，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[22]，Buchko 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[23]。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[24]。

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。[25]
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。

[26]

4. 電氣紡絲法屬於單一加工過程 (Single Process)。[27][28]
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洞性，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。



2.2.3 電氣紡絲在組織工程領域的應用

電氣紡絲在組織工程領域的應用主要是在新血管組織工程部分。血管系統的主要功能是運送氧氣以及養分到身體各部位的組織和器官，並帶走其中的二氧化碳和代謝廢物並傳送訊息。近年來，台灣十大死因當中，心血管疾病一直高居第二名，其中冠狀動脈疾病 (CAD) 又高居心血管疾病中的第三位。動脈粥狀硬化 (Atherosclerosis) 不論發生在冠狀動脈 (Coronary Artery) 或是周邊血管 (Peripheral Vessel) 都是造成死亡的主因，目前治療的方式並不多，包括血管成形術和血管支架置放術，亦或是截取自體或其

他生物體的血管做繞道手術(bypass)，所以在治療動脈阻塞的外科手術中，常常需要用到替代血管 (Vessel Graft)，但以上這些方法都有不低的再阻塞率 (restenosis)。組織工程的發展可為冠狀動脈硬化症的患者提供另一種選擇，但移植血管須具備生物相容性和血管特有的生物活性 (active tone)，是製備人工血管的一大挑戰。

基於以上需求，心血管組織工程研究方向的主流為尋找合適的替代人工血管[29]。人工移植替代血管主要會遇到的問題點為必須承受血液流動時血管脈動引起的壓力和血液流速，而在設計製作最佳人工血管的材料、結構與製作方式的同時，又必須兼顧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。

目前製作人工管狀結構的方式有三種：


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鏽鋼以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。[30]
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，如圖 2-6。[31]
3. 電氣紡絲法：電氣紡絲在製作細胞支架、人工血管移植方面，由於具有較良好的機械和結構性質，以及製作參數較好控制等優點，具有很大的發展潛力，所以近年來逐漸被用來作為心血管組織構造替

代的用途。[32-36]

2.3 生物醫學上常用之高分子材料

聚乳酸 (Polylactic acid, PLA) 近年來受到了相當的注目，尤其在生物醫學領域上更被廣泛地研究與運用。本研究欲研製管狀的纖維支架結構，因此須具備一定的彈性和撓性，以及利於細胞附著的親水性，但聚乳酸纖維結構比較缺乏這些特性。因此選擇加入聚乙二醇 (Polyethylene oxide, PEO)，增加其應用性。

2.3.1 聚乳酸



聚乳酸是一種具有塑性 (Plastic) 特質的高分子材料[37]，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℃，熔點為 174℃。在活體內，聚乳酸會經水解去酯作用 (Hydrolytic De-esterfication) 而變成乳酸，乳酸為所有有機體內碳水化合物的最終產物，可藉由乳酸脫氫酵素 (Lactate Dehydrogenase) 的催化而氧化成焦葡萄糖鹽 (Pyruvate)，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很廣。在動物體內，聚乳酸被完全吸收掉的時間從 32 周到超過 4 年都有；而在人體中，大概在植入後約 12 到 18

個月才會開始被吸收[38]。影響聚乳酸被吸收的因素包含其分子量、結晶性、植入部位以及植體大小和形狀等。聚乳酸有四種不同的化學結構，當添加的低分子量聚乳酸含量愈多，將會有愈高的生物分解率。

簡而言之，聚乳酸具有以下幾項優勢，有助於作為纖維結構的材料：

1. 生物分解性良好，在完成作用後能完全被自然降解，最終生成二氧化碳及水，對環境完全不造成汙染，對人體也無害。
2. 機械性能以及物理性能良好。
3. 細胞相容性與可降解性良好，在醫學藥物領域方面，可生產免拆型的手術縫合線等，低分子的聚乳酸也可作為藥物緩釋裝劑等。



2.3.2 聚乙二醇

聚乙二醇是一種線狀 (linear) 或枝狀 (branched) 中性的高分子材料，其分子的表示式為： $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 。當聚乙二醇的分子量小於一千時，為一種具有黏度且無色的液體；而當分子量大於一千時，為蠟狀且白色的固體。運用於生醫和生化科技領域的分子量在幾百到兩萬之間，其固態分子的熔點與自身的分子量呈正比關係，平均大約為 67°C 左右。聚乙二醇的命名也與分子量有關，通常分子量低於兩萬者稱為 PEG (polyethylene glycol)，而大於兩萬者才稱為 PEO (polyethylene oxide)。

聚乙二醇有其特殊的溶解特性，其可溶於水以及大多有機溶劑當中，

如甲苯、乙醇、丙酮等等，但並不溶於己烷。聚乙二醇的溶解度與溫度成反比關係，其濁點（cloud point）大約為 100°C，因此當溶液升溫至 100°C 時，聚乙二醇便會開始析出。此外，在溶液內加入鹽類或有機物也會使濁點下降。

由於聚乙二醇本身不具有毒性，具有相當良好的生物相容性，因此被廣泛地應用在生物科技發展的合成材料。目前已經有相當多種的聚乙二醇衍生物運用在各種不同的研究與應用中，如抗細胞吸附等[39]。



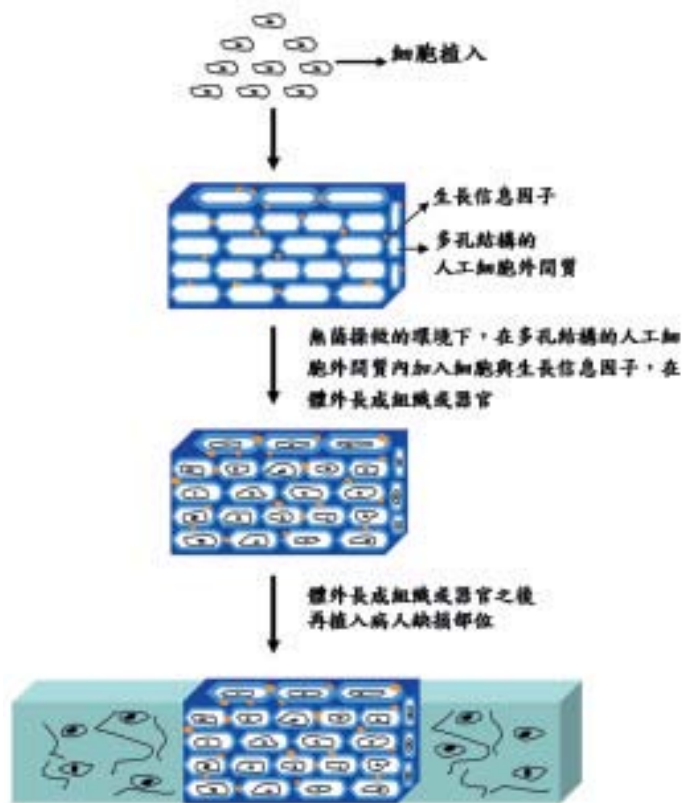


圖 2-1 體外再生方式 (in vitro) [5]

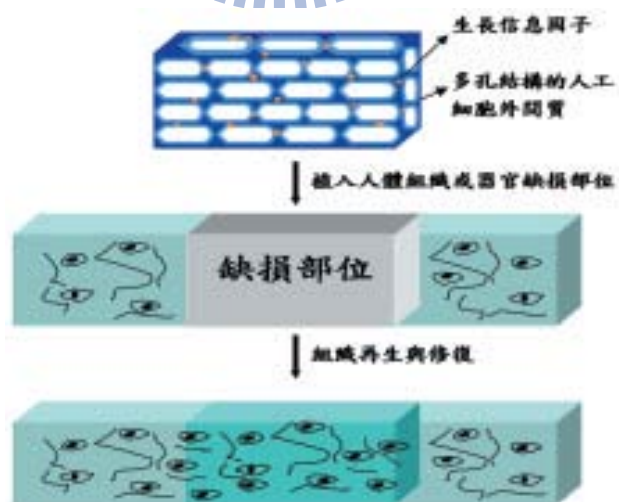


圖 2-2 體內再生方式 (in vivo) [5]

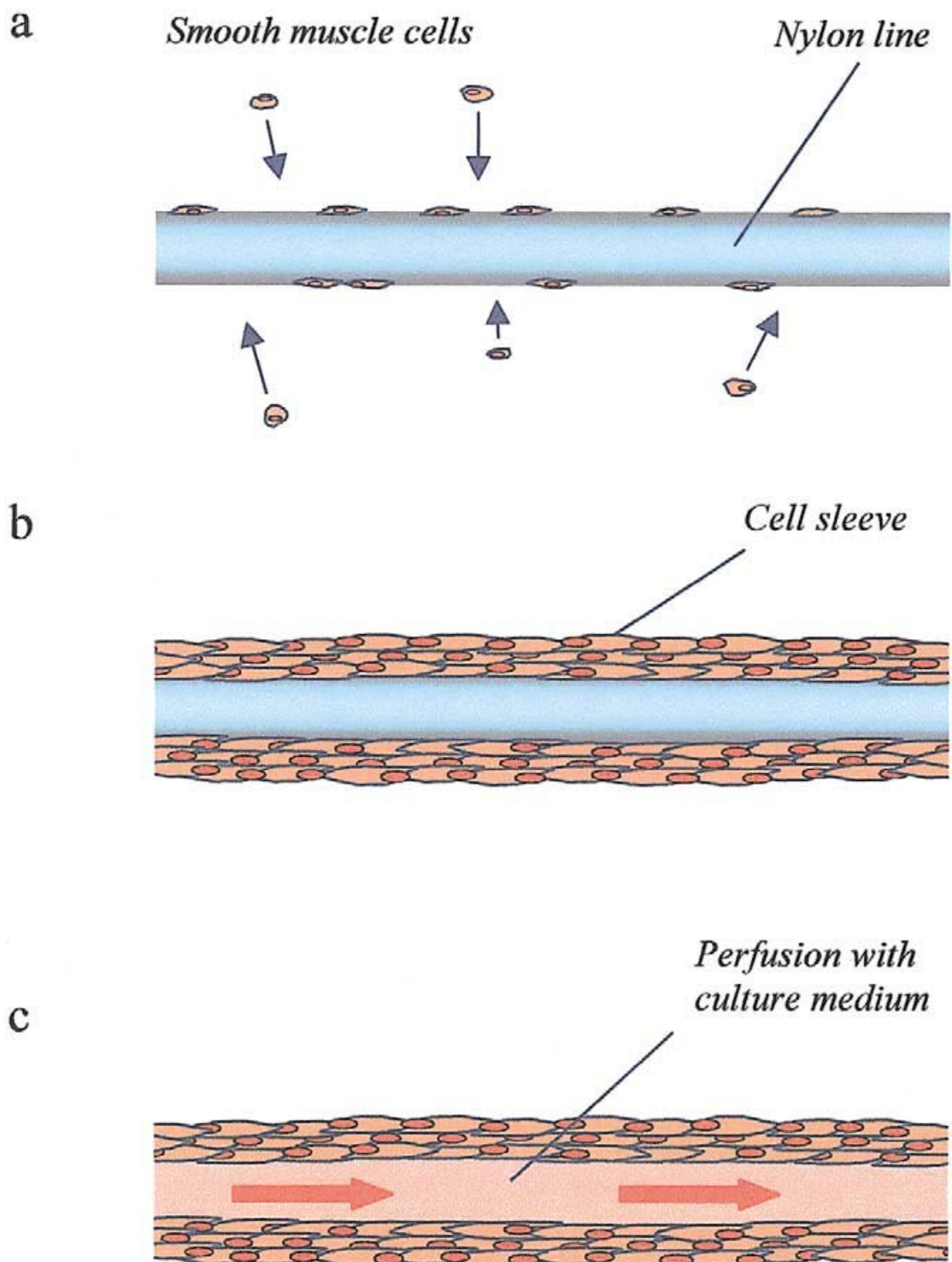


圖 2- 3 Thomas Neumann 等人以在尼龍線上養殖細胞方式製備人工血管[8]

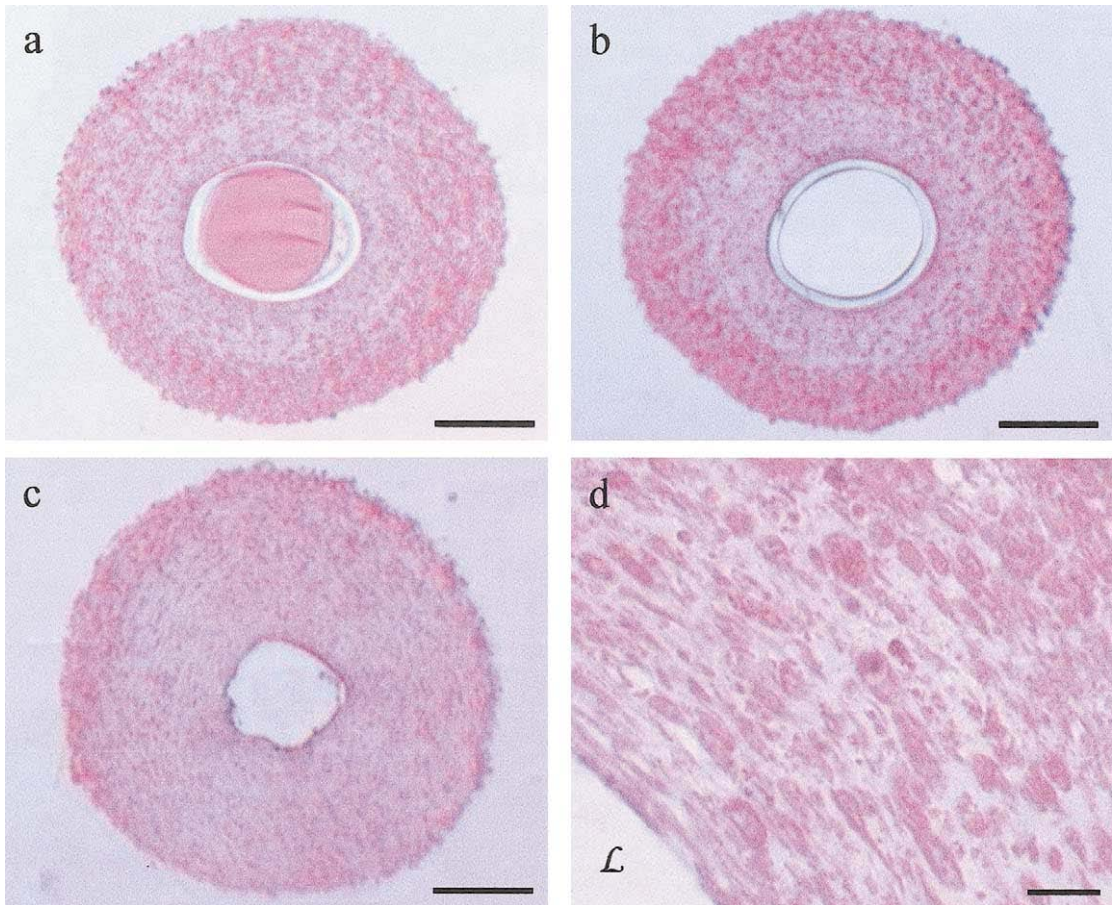


圖 2- 4 Thomas Neumann 等人以在尼龍線上養殖細胞方式製備人工血管之剖面[8]

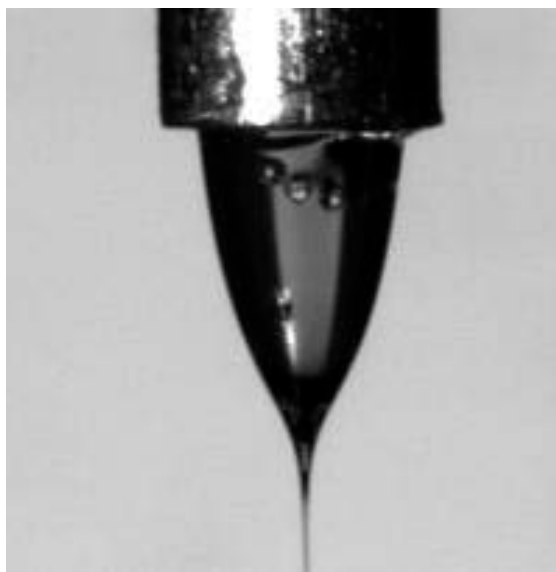


圖 2- 5 泰勒錐[5]

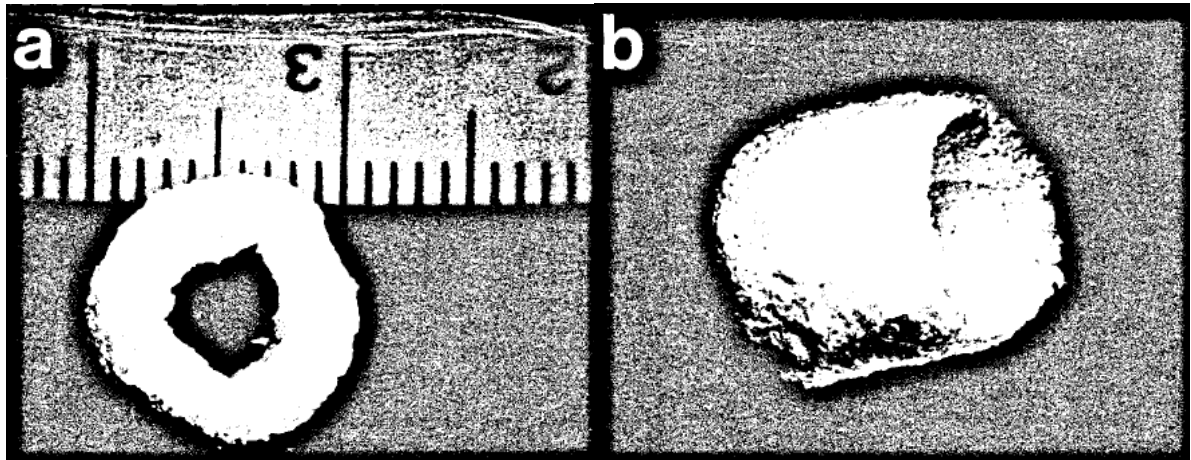


圖 2-6 高分子薄膜製備之管狀結構(a)剖面視角 (b)等視角[31]



第三章 研究材料與方法

3.1 研究流程概述

本研究的主要目的為以電氣紡絲法製備小管徑纖維結構之生物可分解管狀結構，並測試以各種 PLA-PEO 濃度參數所產生之纖維直徑，藉此改善製備之小管徑人工血管支架之孔洞性。以製備出的成品在生物體外培養內皮細胞，測量內皮細胞在支架上培養後之活性，確認人工血管支架的孔洞性與細胞生長活性的關係。期望能以此為開端，未來可以建立在體外的循環系統，甚至讓小管徑的人工血管支架也有機會在臨床上實用。

使用的原料為聚乳酸、聚乙二酸的高分子材料混合溶液，先確立基本的小管徑人工血管支架之製備流程和實驗儀器，再以不同濃度比例參數製備。之後對所製備的成品做觀測與分析，並養殖內皮細胞測量其活性。研究的流程大致如圖 3-1 所示，大致可分為四個部分：

1. 確立以電氣紡絲法製備小管徑人工血管支架的實驗方法及設備
2. 觀測不同 PLA-PEO 濃度比例製備之支架
3. 分析計算纖維直徑和孔隙度與 PLA-PEO 濃度比例之關係
4. 養殖內皮細胞及活性試驗

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 實驗設備

3.2.1 電氣紡絲實驗設備

電氣紡絲主要實驗儀器與設備如下：

1. 直流高壓電源供應器，友聲電子 (YSTC)，5V~30V，台灣。圖 3-2。
2. 注射式針筒幫浦，KDS-100，KDscientific，USA。圖 3-3。
3. 壓克力箱。圖 3-4。
4. 不鏽鋼針頭（平頭），規格#21，top corporation，日本。圖 3-5。
5. 玻璃注射筒，10cc，KOREA。
6. 穩壓式直流電源供應器，Topward，台灣。
7. 直流減速馬達，12V，60rpm，PHOTONIC。

整體的實驗架設示意圖如圖 3-6 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 5V~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。

直流減速馬達是用來使收集棒材旋轉以製作小管徑人工血管支架，由於使用的收集材為直徑微小的針灸針，為了避免針灸針產生甩動的情況，

所以使用轉速較低的馬達。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在針頭處容易堆積，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。

3.2.2 場發射掃描式電子顯微鏡

自從 1942 年發展出實驗室用掃描式電子顯微鏡（Scanning Electron Microscope；SEM）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。

本實驗先以倒立式光學顯微鏡初步觀察人工支架之表面構造以及癌細

胞成長情形，再以場發射掃描式電子顯微鏡作更精密的觀測。場發射掃描電子顯微鏡是以電場發射原理產生電子，場發射槍為鎢針尖，當施加一負偏壓於電子槍時，強大的電場會集中於針尖，藉此游離電子，再將游離的電子聚焦，用電子束衝撞材料表面，偵測兩次或背向散射電子。場發射掃描式電子顯微鏡主要是用來查看物質表面的影像，解析度可達 15\AA 。

3.3 小管徑人工血管支架之製備

3.3.1 小管徑管狀人工支架基本製備步驟

小管徑管狀人工支架基本製備步驟如下：

1. 溶液配製。本實驗使用之器材和高分子材料將在 3.3.2 介紹。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。在馬達下以接續一金屬棒（馬達與金屬棒並未接觸），金屬棒以絕緣橡皮管包覆，在金屬棒下接續針灸針作為收集棒材，絕緣橡皮管中間切開一段以電線接電源供應器負極接頭，讓針灸針得以導電方便收集。
3. 將收集棒材裹上葡萄糖漿以便脫模。本實驗使用葡萄糖為培養細胞用之葡萄糖，圖 3-7。但經測試一般藥局市售之葡萄糖粉作為脫模

劑也並無影響。

4. 在電氣紡絲穩定情況下收集約 20 秒，依高分子材料和濃度的不同可能有些許差異。收集棒材長度也會有所影響，本實驗所使用的針灸針長度為 40mm，圖 3-8、圖 3-9。
5. 將收集完成之棒材浸入水中 3~4 小時後取出放置乾燥。
6. 輕推取下製備之小管徑人工血管支架並剪裁(去掉前後端不均勻部分)。

本實驗經由上述步驟製作出內徑約 0.18~0.2mm、長度約 20mm~30mm、管壁厚約 30~40 μ m 之小管徑人工血管支架。

3.3.2 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。
2. 聚乳酸，(PLLA；PDLA／95：5)，偉盟工業，台灣。圖 3-10。
3. 聚乙二醇，ALDRICH，USA，分子量 300000。圖 3-11。
4. 氯仿 (Chloroform)，試藥級，美國。圖 3-12。

以上兩種高分子材料聚乳酸及聚乙二醇以皆以氯仿為溶劑，本實驗將以不同重量體積比 (w/v)，調配出不同 PLA-PEO 混合溶液來製作小管徑人工血管支架，詳細的實驗參數如表 3-1。

3.4 孔隙大小計算方法

3.4.1 表面孔隙大小（二維孔隙大小）

以場發射掃描式顯微鏡對製作之小管徑人工血管支架做觀察後，將觀測照片色調稍作加強後，以軟體 Matrox Inspector 作孔洞大小的計算。軟體 Matrox Inspector 是機械上金相實驗中用來分析晶粒尺寸的軟體，並可對攝得之相片作進一步的處理，讓影像單純化修正影像問題。

本實驗以場發射掃描式顯微鏡攝得之照片清晰度遠高於一般金相處理之試片，因此軟體內過濾雜訊的一些功能本實驗並無使用，僅單純使用其計算孔隙的功能。唯因為製作之小管徑人工血管支架包含多層次，因此必須加強表面纖維影像，大致取至構成孔隙的第一層表面，也就是表面往下堆疊的第四層纖維左右。此外，用來計算的觀測區域如果太大可能因為層次高低差而造成部分區域辨識不易產生誤差，區域太小又會因數據過少而有所偏差，考量到以上兩者，本實驗最終以放大倍率一千倍的觀測影像作表面孔隙度計算。

3.4.2 管壁滲透實驗（三維孔隙大小）

以 3.5.1 節的方法雖然能計算出支架表層的孔洞大小，但是本研究製作出的小管徑人工血管支架屬於多層次的結構，整體的孔洞也是三維結構。因此為了瞭解支架實際可通透的顆粒大小，本實驗將包含 micro particle 的

溶液經混和之後注入支架，觀測其從側邊流出的溶液，示意圖如圖 3-13。

使用的 micro particle 溶液內包含的顆粒直徑大小為 $1\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 以及 $12\mu\text{m}$ ，取包含各顆粒的溶液跟純水以 1:1:1:1:1 混合稀釋，混合後的溶液的如圖 3-14。

3.5 內皮細胞培養

本研究是用 HMEC-1 內皮細胞於支架上進行養殖實驗，培養液主要成分為 MCDB 131 和 DMEM low glucose。由於小管徑人工血管支架無法有效控制養殖細胞時滴入的細胞數目，而且屬於多層次的結構，不易透光，觀測上會有所困難，因此將以同樣參數下製作之薄膜支架進行養殖實驗為主，以此了解何種 PLA-PEO 比例參數製備的支架上較適合細胞生長。實驗將於 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 大小的薄膜支架上滴入約 3×10^4 之細胞數。另外依然會於小管徑人工血管支架上作養殖，確認細胞於曲面的小管徑人工血管支架上也與平面的薄膜支架同樣可供生長，以蘇木精 (Hematoxylin 3870) 和伊紅 (Eosin Alcoholic 3871) 染色觀測，如圖 3-15。

3.5.1 MTT 活性試驗

MTT 的全稱為 3-(4,5)-dimethylthiazolium (-z-y1)-3,5-diphenyltetrazolium bromide，是一種淺黃色的試劑。MTT 活性試驗是利用活細

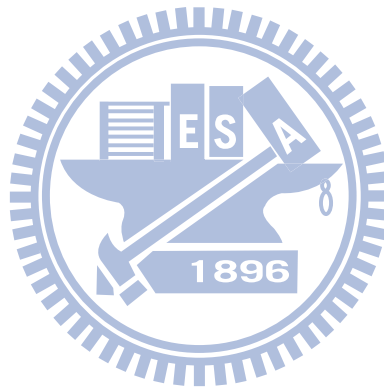
胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶能使MTT溶液還原為紫色的不可溶性甲臍結晶 (Formazan)，沉積於細胞中。再以二甲基亞砜(DMSO; Dimethyl sulfoxide) 或酸性異丙醇溶解甲臍結晶，以酵素連結免疫吸附分析顯示儀測量吸光值 (OD)，藉此了解細胞的生長情況。圖 3-16 展現了MTT活性試驗後的溶液顏色。



表 3-1 實驗參數

12% PLA (w/v)與 3% PEO 的體積比

PLA:PEO Volume Ratio	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	0:10
Total PEO Concentration (w/v)	0%	0.3%	0.6%	0.9%	1.2%	1.5%	1.8%	2.1%	3.0%



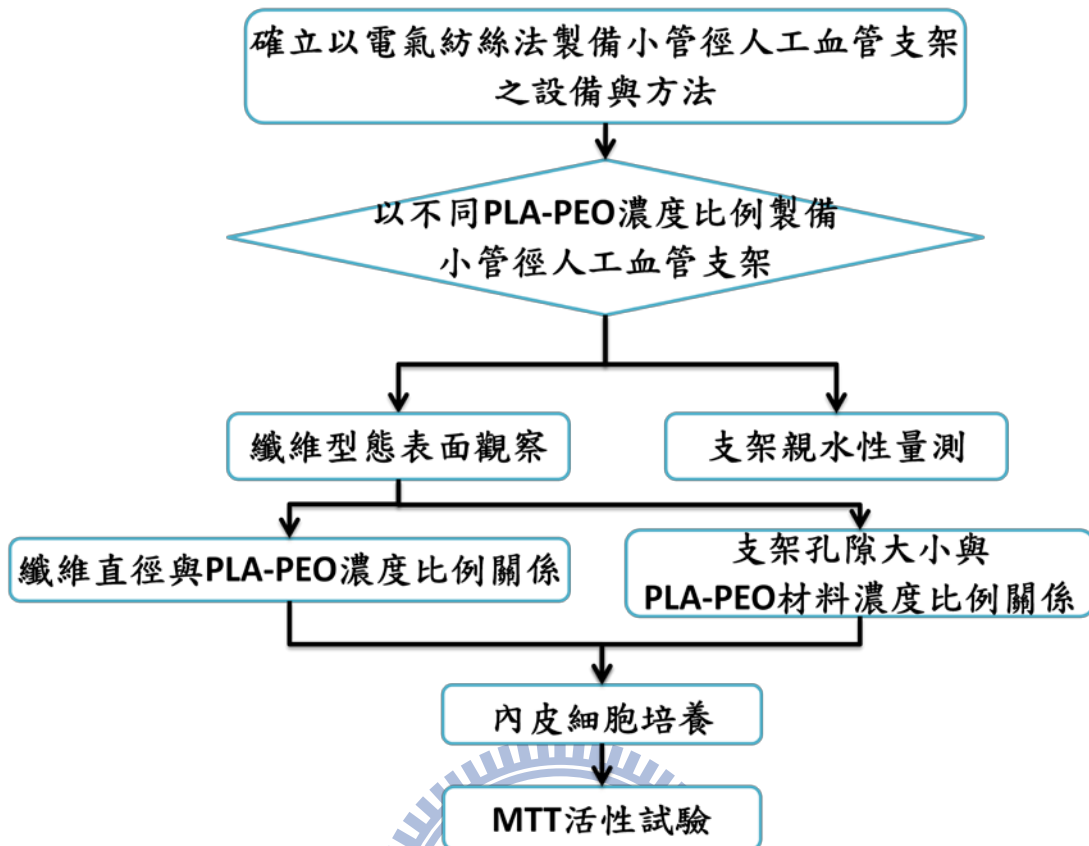


圖 3-1 實驗流程圖



圖 3-2 高壓電源供應器



圖 3-3 注射式針筒幫浦



圖 3-4 壓克力絕緣箱

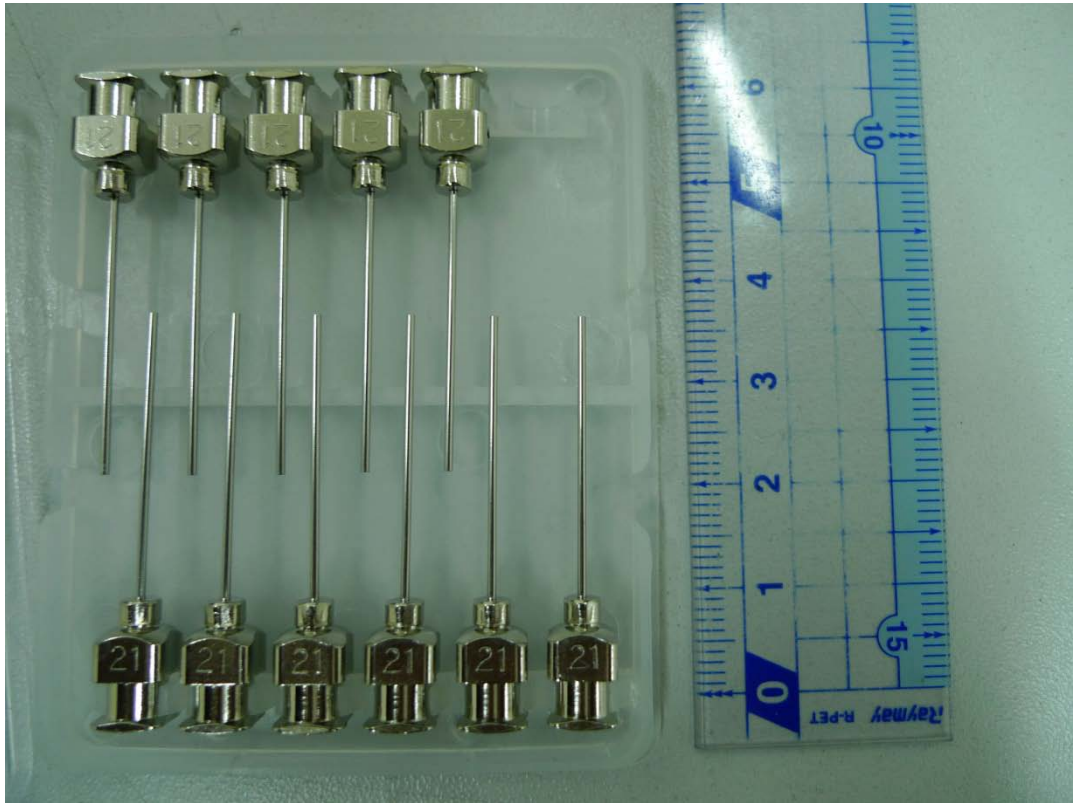


圖 3-5 不鏽鋼針頭(平頭，規格為#21)

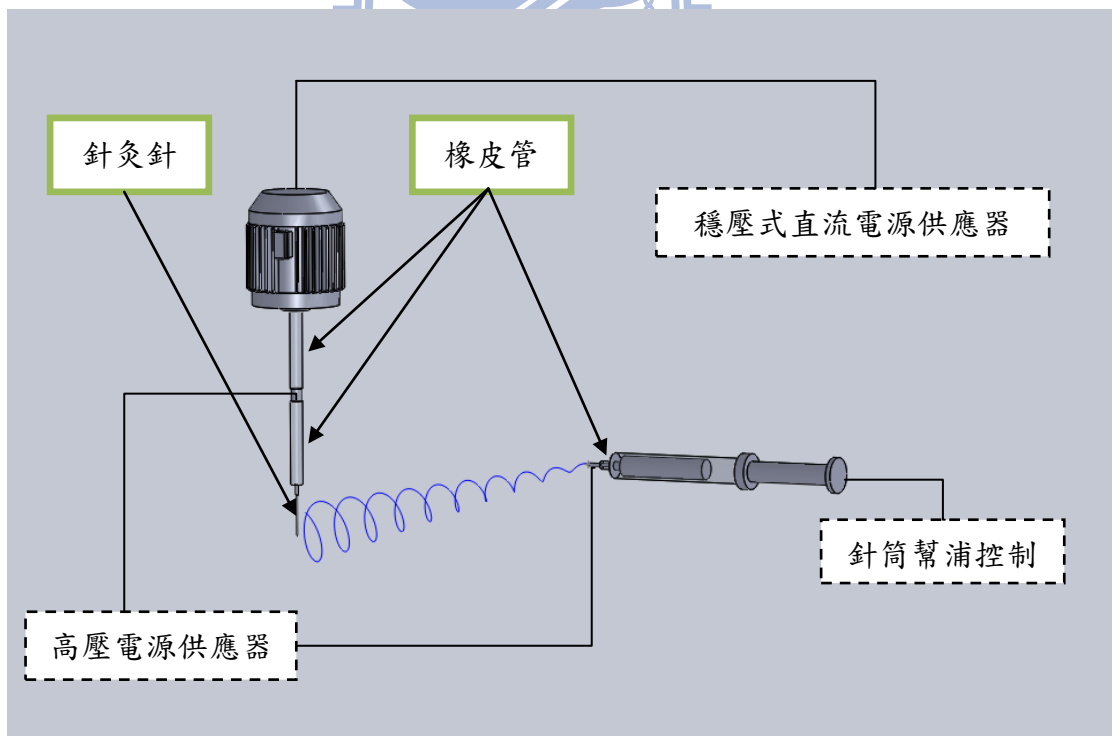


圖 3-6 以電氣紡絲法製備小管徑人工血管支架示意圖

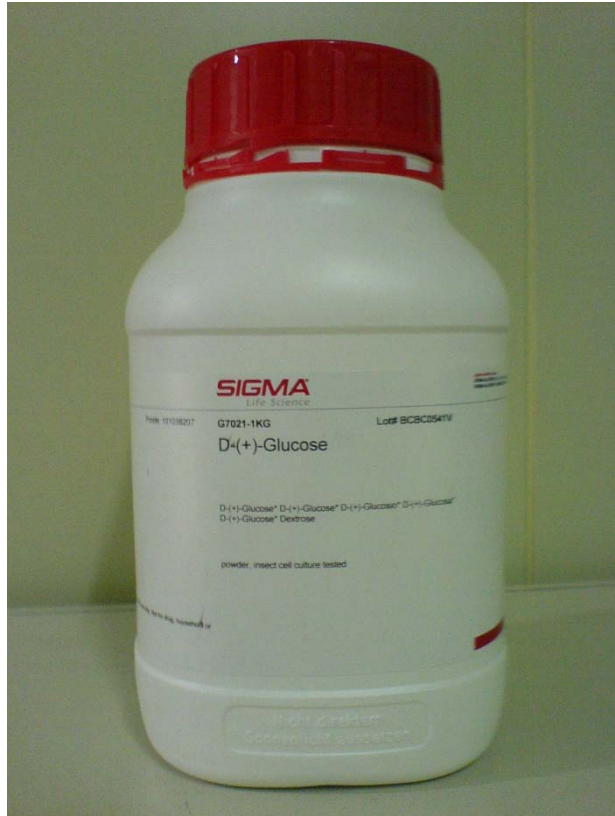


圖 3- 7 葡萄糖



圖 3- 8 ϕ 0.20mm x 40mm 針灸針



圖 3-9 $\phi 0.18\text{mm} \times 40\text{mm}$ 針灸針



圖 3-10 聚乳酸顆粒



圖 3-11 聚乙二醇

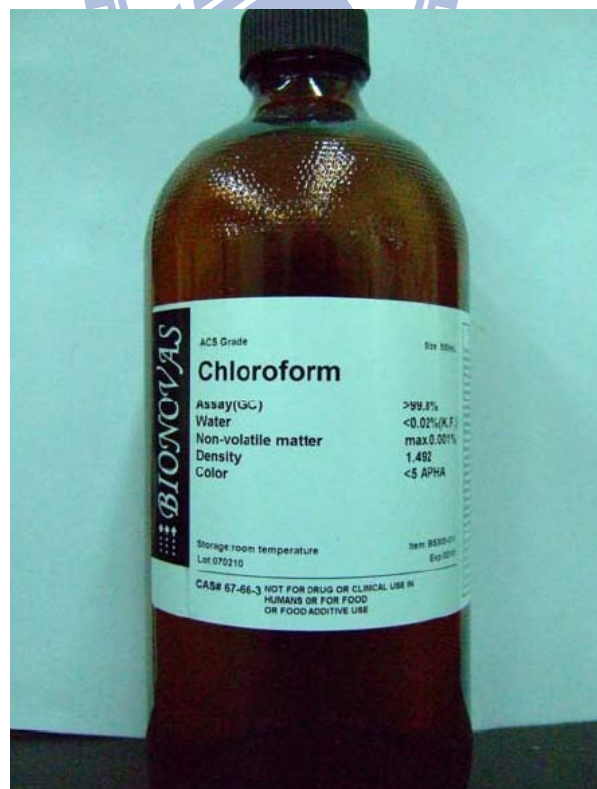


圖 3-12 氯仿

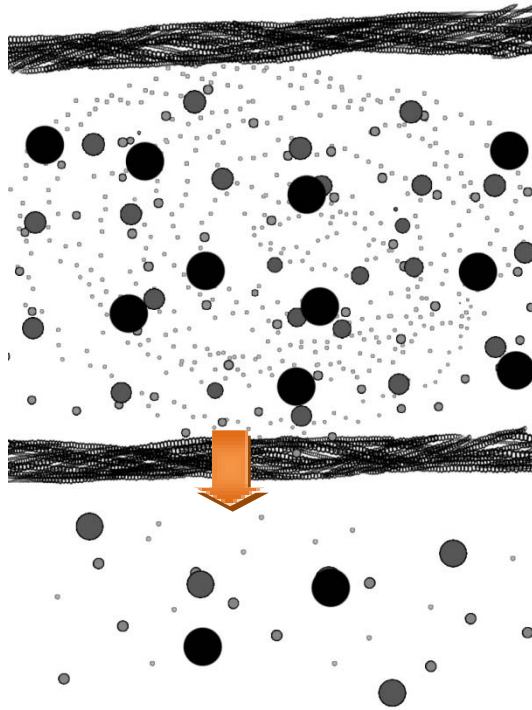


圖 3-13 管壁滲透實驗示意圖

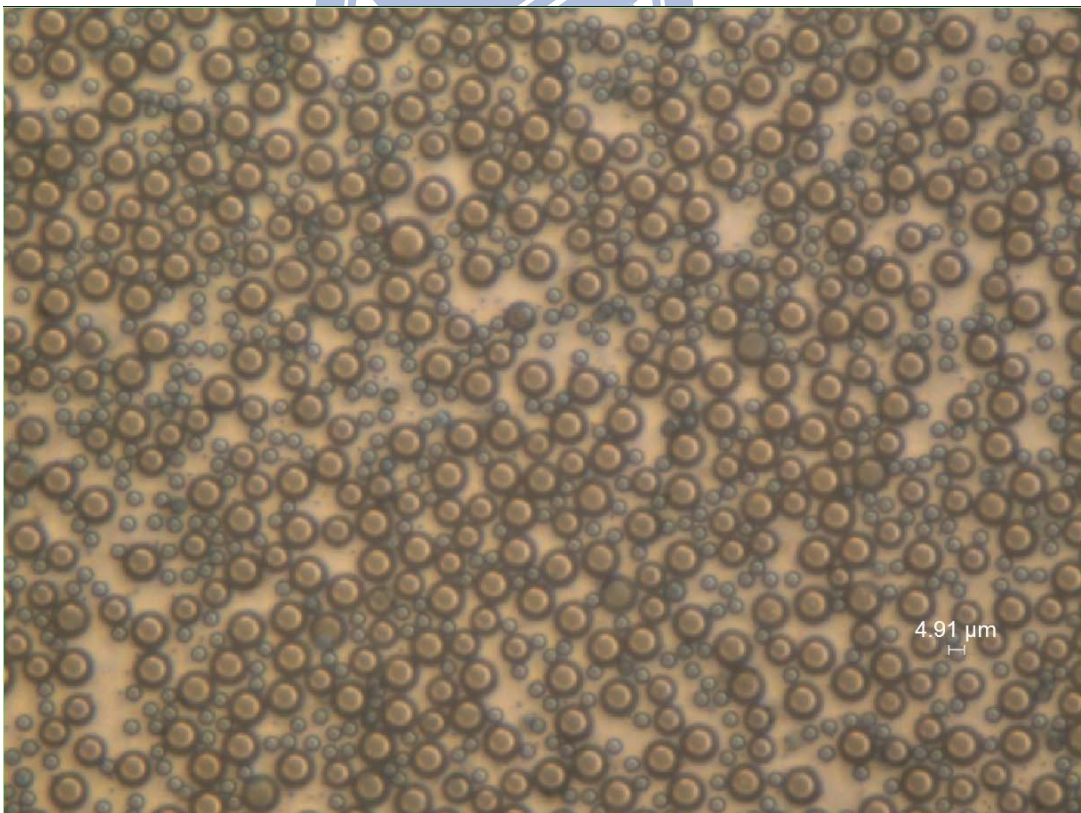


圖 3-14 混合後之 micro particle 溶液



圖 3-15 染色劑蘇木精（左）和伊紅（右）

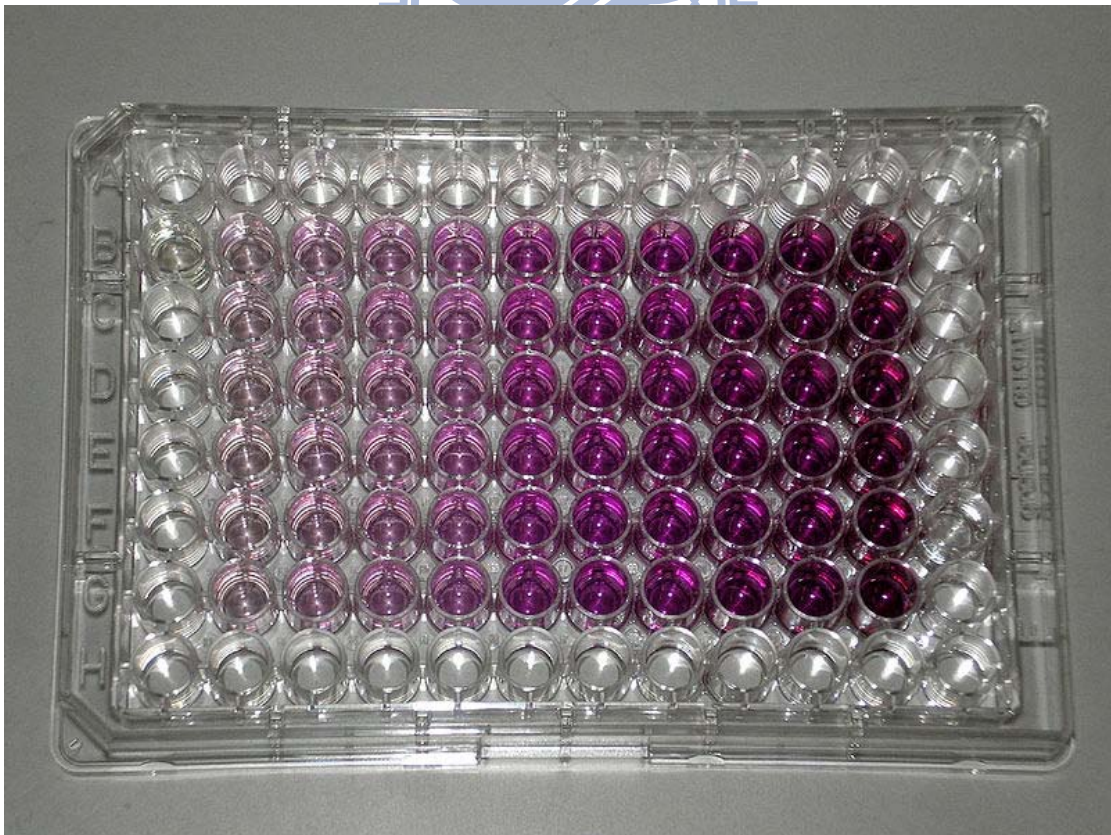


圖 3-16 MTT 試驗產生的顏色

第四章 實驗結果與討論

4.1 小管人工血管支架之幾何特性

4.1.1 小管徑人工血管支架之表面觀測

本研究以 3.3.1 節所述之步驟製備小管徑人工血管支架，製備出聚乳酸及聚乙二醇以不同濃度及比例混合條件之管狀支架，並以光學顯微鏡和場發射掃描式顯微鏡觀測。

在場發射掃描式顯微鏡的觀測下，可以知道以電氣紡絲法製備之支架的確擁有充分的孔洞性，十分符合小管徑人工血管支架所需，而各濃度比例下因所產生的纖維粗細有所差異，連帶使得以纖維編織而成的管狀支架的孔洞大小產生變化，此部分會在之後的章節作探討。

從剖面可以觀測出所製作之小管徑人工血管支架的模厚約在 30~40 μm ，如圖 4-1，支架內徑即為作為收集材之針灸針的直徑，約為 0.18mm~0.20mm。另外在高倍率下觀察所產生之電氣紡絲纖維，如圖 4-2，觀察到纖維的表面呈現不平滑的坑洞狀，此種特徵在培養細胞時也有利於細胞的附著。

4.1.2 聚乙二醇含量對纖維粗細之影響

從許多文獻當中可以觀察到以聚乙二醇作為電氣紡絲的原料可以產生直徑極為細小的纖維，甚至可以達到奈米等級[40]，在與其他高分子材料混合後也有著纖維細化的效果。但多數的文獻中的成絲情形並不穩定，也就

是纖維的粗細並不均勻，無法提供資料給需要穩定成絲之纖維的人工血管支架。因此本研究將以聚乳酸-聚乙二醇的混合溶液對纖維粗細作探討。

先以 10% PLA (w/v) 及 10% PLA (w/v) 與 7% PEO (w/v) 以 4:1 體積比混合的溶液測試之下，確認添加 PEO 的確有助於電氣紡絲纖維的細化，如圖 4-3、圖 4-4，10% PLA (w/v) 的纖維直徑約為 5.92 μm ，加入 PEO 後減少到了 4.84 μm 。並實驗測試得知在 8600V、幫浦流速 1.5ml/h、工作距離 20cm 之實驗參數下會有較穩定的成絲情形，PLA 與 PEO 在本研究中所使用的氣仿溶劑之最低穩定成絲濃度分別為 12% (w/v) 以及 3% (w/v)，因此以下的實驗皆以此參數製備。

由表 4-1 及圖 4-5 至圖 4-8 可以看出，當 PEO 的比例含量變高，電氣紡絲的纖維的確有逐漸細化的趨勢，當 PLA-PEO 比例為 9:1 時纖維直徑將近 6 μm ，到了 PLA-PEO 比例為 4:6 時減少到 4 μm 。純 PEO 電氣紡絲之纖維甚至只有 2 μm ，跟純 PLA 電氣紡絲的纖維達到了 4 μm 以上的差距。此外，當整體的 PEO 濃度超過 2% (w/v)，產生的纖維就會變得非常綿密且柔軟，收集也會變得相對不均勻且毛燥，而且脫模變得困難許多，當整體的 PEO 濃度超過 3% (w/v) 以上，將無法製成小管徑人工血管支架。

4.2 孔隙大小與 PLA-PEO 濃度比例之關係

4.2.1 表面孔隙大小（二維孔隙大小）

在 4.1 節確認 PEO 加入後對電氣紡絲纖維的細化效果後，本研究為了探討纖維的細化對孔隙度的影響，以軟體 Matrox Inspector 作支架表面孔隙大小的計算。10% PLA (w/v) 及 10% PLA (w/v) 與 7% PEO (w/v) 以 4:1 體積比混合的溶液製品如圖 4-9，由 Matrox Inspector 計算結果可知，當纖維粗細減小時，整體的孔洞面積並不會產生太大的變化，通透性依然足夠，但是平均孔隙大小卻會縮小許多，如表 4-2。

12% PLA (w/v) 以及 3% PEO (w/v) 製備的成品如圖 4-10 至圖 4-12，計算的結果如表 4-3，趨勢圖如圖 4-13，可看出孔隙大小的確有因為纖維的細化而逐漸減少，在培養細胞時因其較小的孔隙可避免多數的細胞經孔隙流出而無法附著。

4.2.2 管壁滲透實驗（三維孔隙大小）

micro particle 實驗的結果從光學顯微鏡照片中可以明顯的看出，比起圖 3-14 剛混合完的 micro particle 溶液，從小管徑人工血管支架流出的溶液內所包含的 micro particle 數量減少相當多，PLA-PEO 比例 9:1 的照片如圖 4-14、PLA-PEO 比例 5:5 的照片如圖 4-15。當 PLA-PEO 比例到 6:4 以下的時候，直徑 12 μ m 大小的 micro particle 平均僅剩不到 10 個能通過，也就表示在養

殖細胞時，多數細胞可以留在支架內得以有貼附生長的機會，培養液也可以順利流出供應養份。

數次實驗後計算在光學顯微鏡 400 倍照片下側邊滲透的液滴內 micro particle 之數量，取平均後如表 4-4 所示，由於本研究所養殖的內皮細胞直徑大小約為 15 μm ，因此取較接近的 12 μm 和 10 μm 作趨勢圖，如圖 4-16、圖 4-17，皆可看出整體的孔隙大小同表面孔隙大小一樣逐漸趨小。三維孔隙大小因為是立體空間，因此實際的孔隙部分會比計算表面孔隙時稍大，也較符合實際情形，但由計算表面孔隙大小可以大致推算出實際孔隙情形的趨勢。



4.3 親水性量測結果

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，在徐一峰[41]的論文中關於材料親水性的測試中也證實了這點。

PEO 比起 PLA 是親水性較高的材料，所以理論上製成的支架如果包含的 PEO 比例較高，支架的親水性也會提升。實驗結果顯示，在比較實驗中最極端的兩種比例，的確是有明確的親水性上升效果，如圖 4-18、圖 4-19，但中間比例親水性上升的效果就不是很明顯，原因應為雖然體積比例 PEO 的確有增高，但是換算成整體濃度時每種比例的 PEO 只增加 0.3%，增高幅

度不足以大幅影響親水性，各比例結果如圖 4-20。但總體看來，PEO 比例較高時的确會有較佳的親水性。

4.4 內皮細胞之活性測試結果

光學顯微鏡下觀測養殖七日的照片如圖 4-21 至圖 4-24，可以看到在孔隙大小較小的支架上細胞貼附生長的數量比孔隙大小較大的支架多上不少，MTT 活性測試後的數據如表 4-5 及圖 4-25 所示，在孔隙大小較小、親水性較佳的支架下細胞確實活性較高、有較佳的貼附情形。

於小管徑人工血管支架上養殖之細胞在染色後證明在小管徑的管狀支架上也可養殖細胞，並不會因為其管壁為曲面而無法貼附，養殖 14 日後染色的照片如圖 4-26 所示。



表 4-1 改變 12% PLA (w/v) 與 3% PEO (w/v) 的體積比電氣紡絲之纖維直徑

PLA:PEO Volume Ratio	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	0:10
Total PEO Concentration (w/v)	0%	0.3%	0.6%	0.9%	1.2%	1.5%	1.8%	3%
Fiber Diameter(μm)	6.418	5.778	5.817	5.185	4.995	4.141	4.148	2.093

表 4-2 10% PLA (w/v) 及 10% PLA (w/v) 加 7% PEO (w/v) (體積比 4:1) 倍率 1000 下表面孔隙比較

Material	Total Pore Area (pixel²)	Average Pore Area (μm^2)
10% PLA	63104	70.08
10% PLA + 7% PEO (Volume Ratio 8:2)	62114	40.51

表 4-3 12% PLA (w/v) 以及 3% PEO (w/v) 製備的小管徑人工血管支架表面孔隙大小

PLA:PEO (Volume Ratio)	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6
Average Pore Area (μm^2)	71.02	67.49	64.94	65.89	47.73	45.64

表 4-4 micro particle 混合溶液注入 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 製備之小管徑人工血管支架側邊流出的溶液在光學顯微鏡 400 倍下觀察之平均顆粒個數

Particle Diameter(μm)	PLA:PEO					
	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
12	79.3	68.3	27.0	10.3	8.0	0.7
10	110.3	65.3	36.7	29.7	22.3	11.7
5	332.0	96.7	80.7	83.0	77.0	94.0

單位:個

表 4-5 不同比例之 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 支架養殖細胞後作 MTT 試驗之吸光值

Group	PLA:PEO Days	PLA:PEO				
		9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
i	1 days	0.180	0.213	0.220	0.226	
ii	1 days	0.192	0.224	0.260	0.248	0.226
iii	1 days	0.138	0.215	0.281	0.276	0.282
iv	1 days	0.412	0.438	0.482	0.477	0.487
v	1 days	0.423	0.441	0.437	0.392	0.438
i	3 days	0.339	0.333	0.386	0.427	
ii	3 days	0.333	0.341	0.337		0.292
iii	3 days	0.489	0.510	0.522	0.628	
iv	3 days	0.631	0.644	0.598	0.700	
v	3 days	0.711	0.790	0.843	0.855	0.864

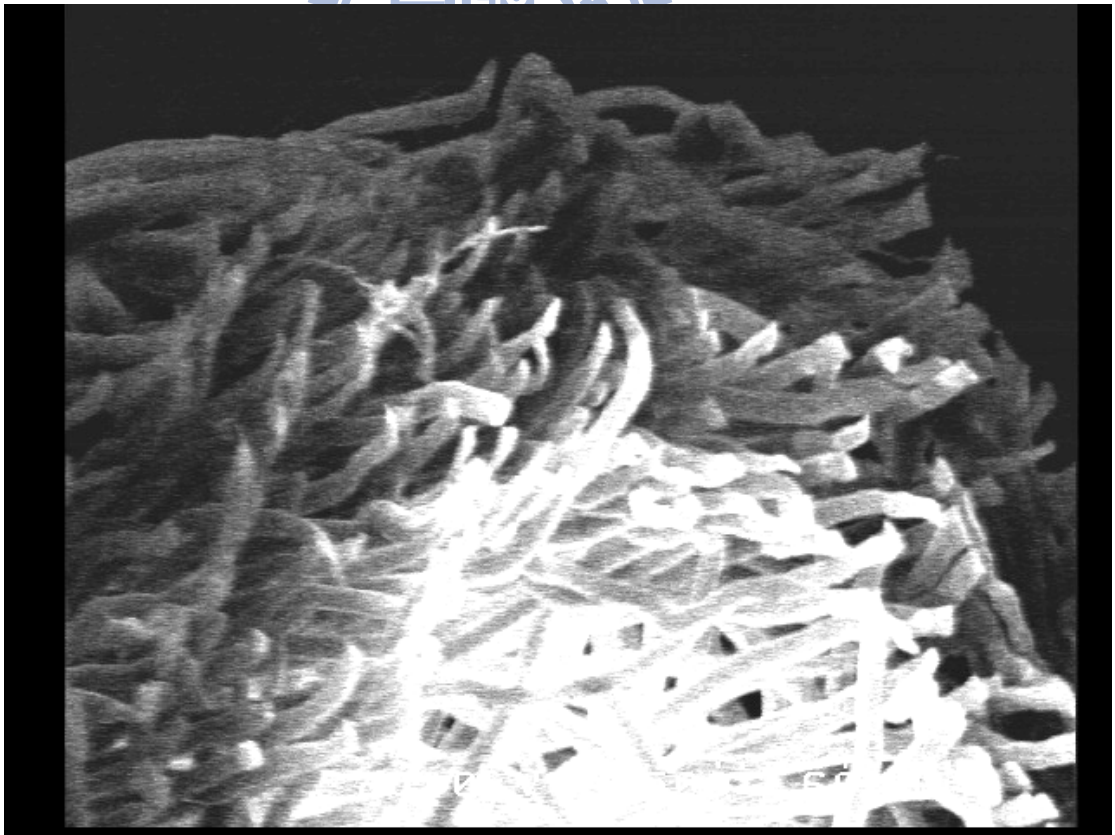
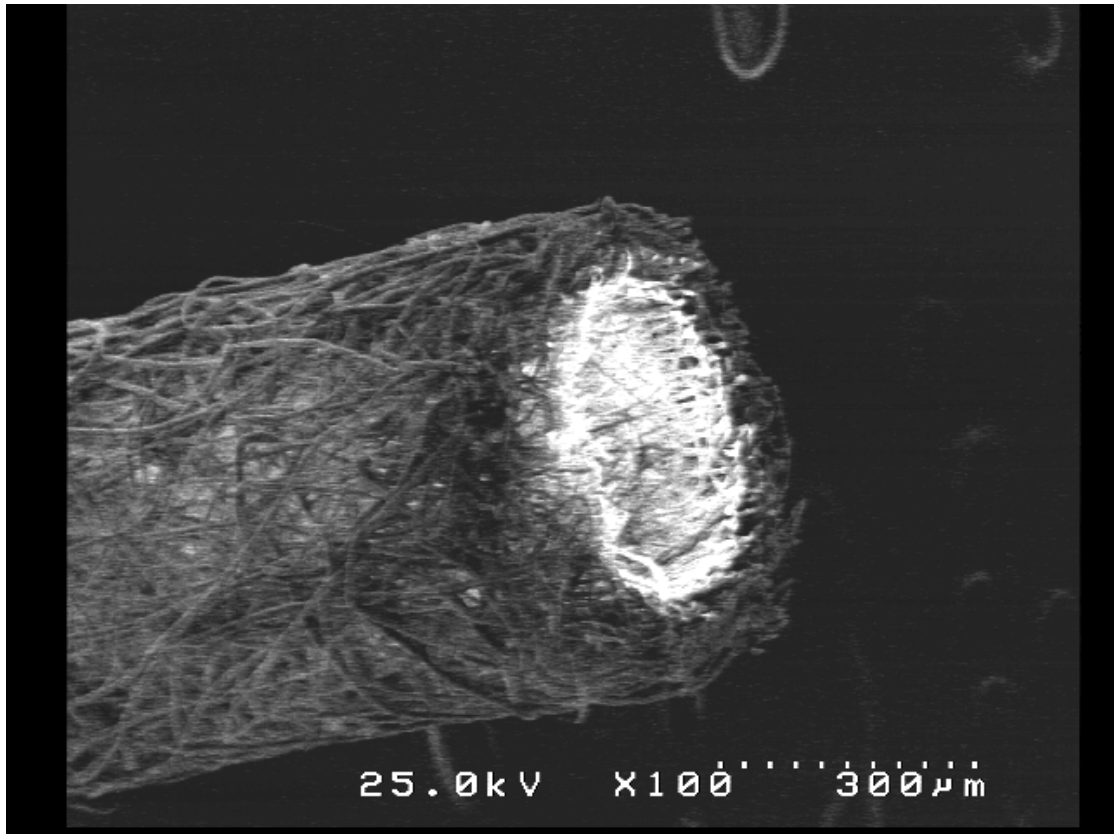


圖 4-1 小管徑人工血管支架 SEM 剖面圖

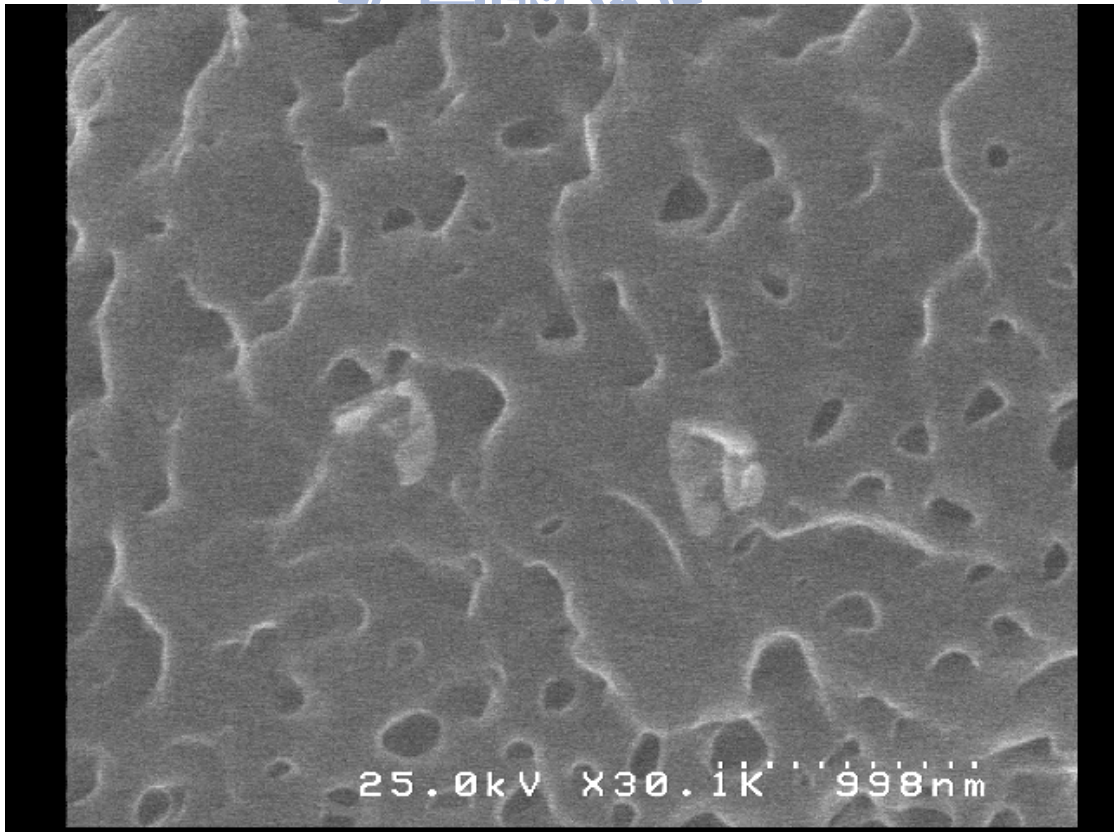
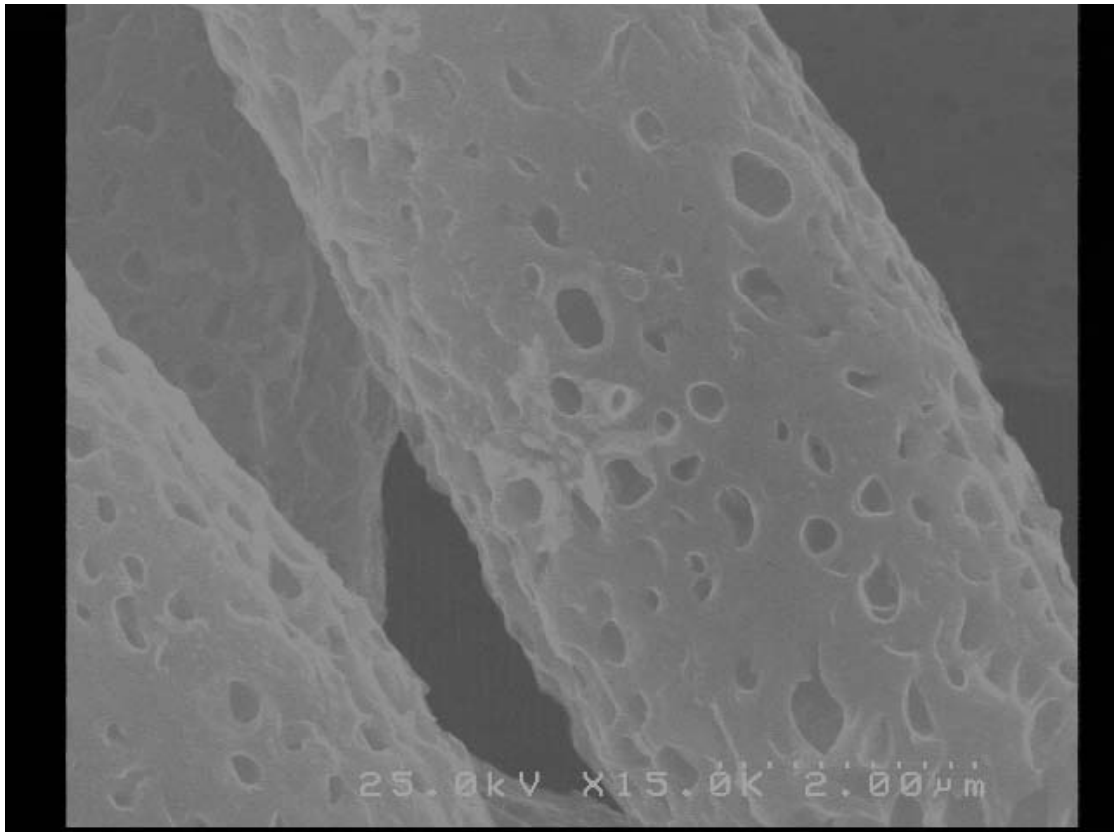


圖 4-2 高倍率下 SEM 拍攝之電氣紡絲纖維表面

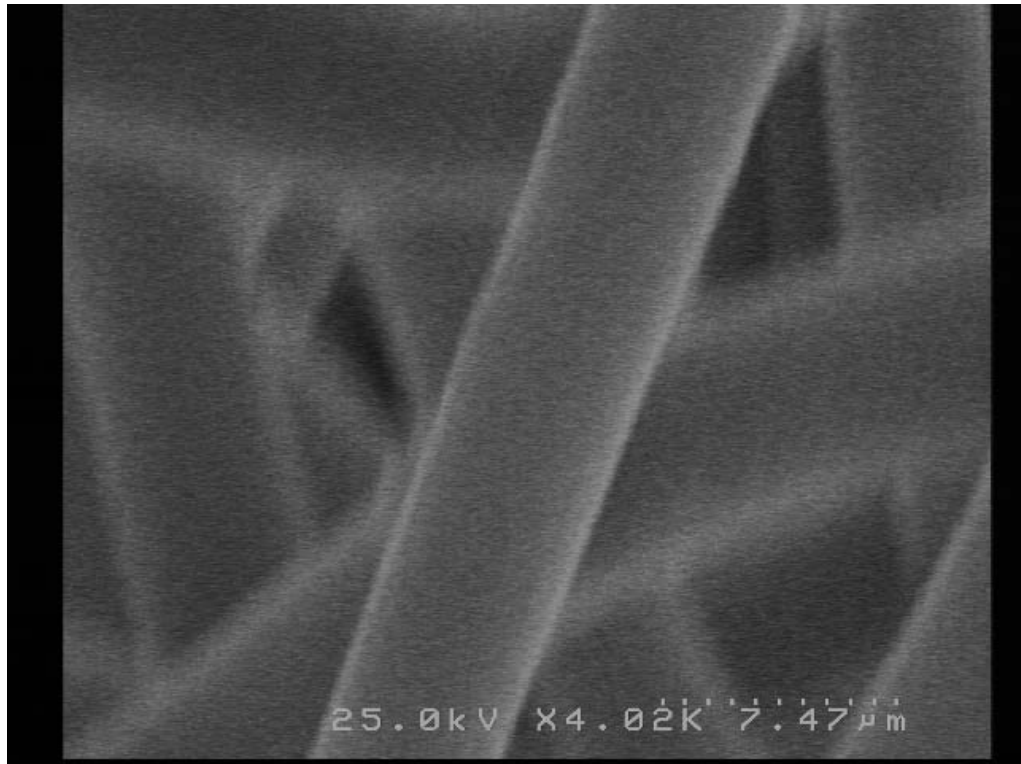


圖 4-3 10% PLA (w/v) 之電氣紡絲纖維

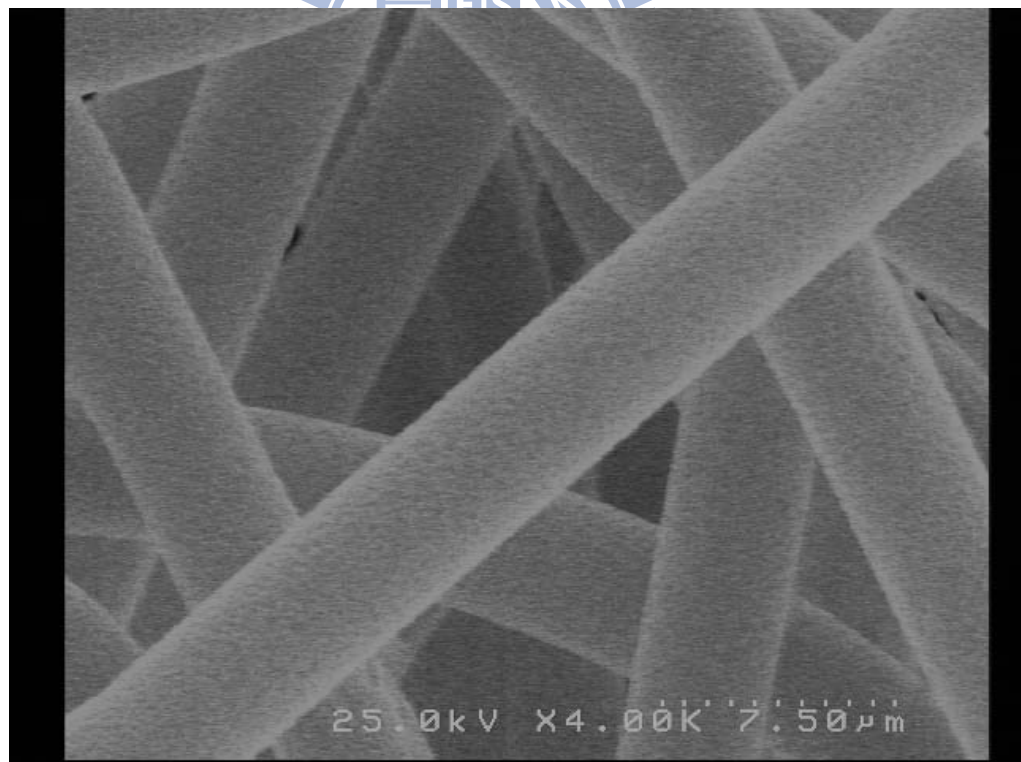


圖 4-4 10% PLA (w/v) 與 7% PEO (w/v) 以 4:1 混合之電氣紡絲纖維

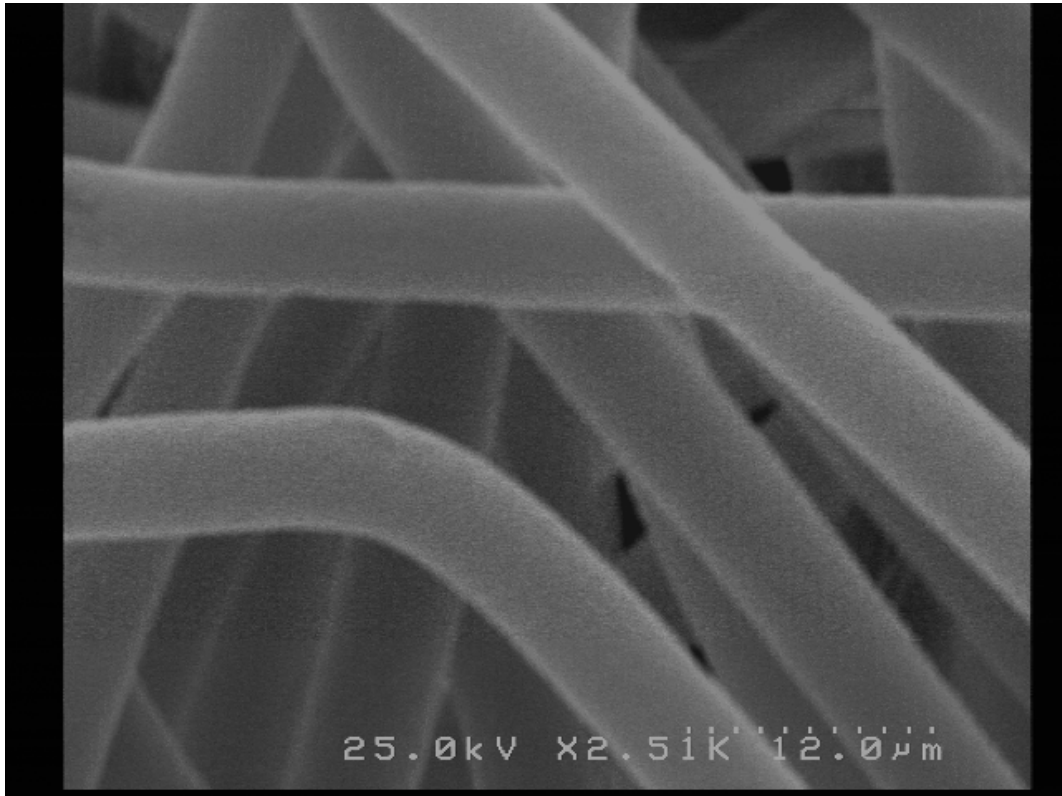


圖 4-5 12% PLA (w/v) 電氣紡絲之纖維

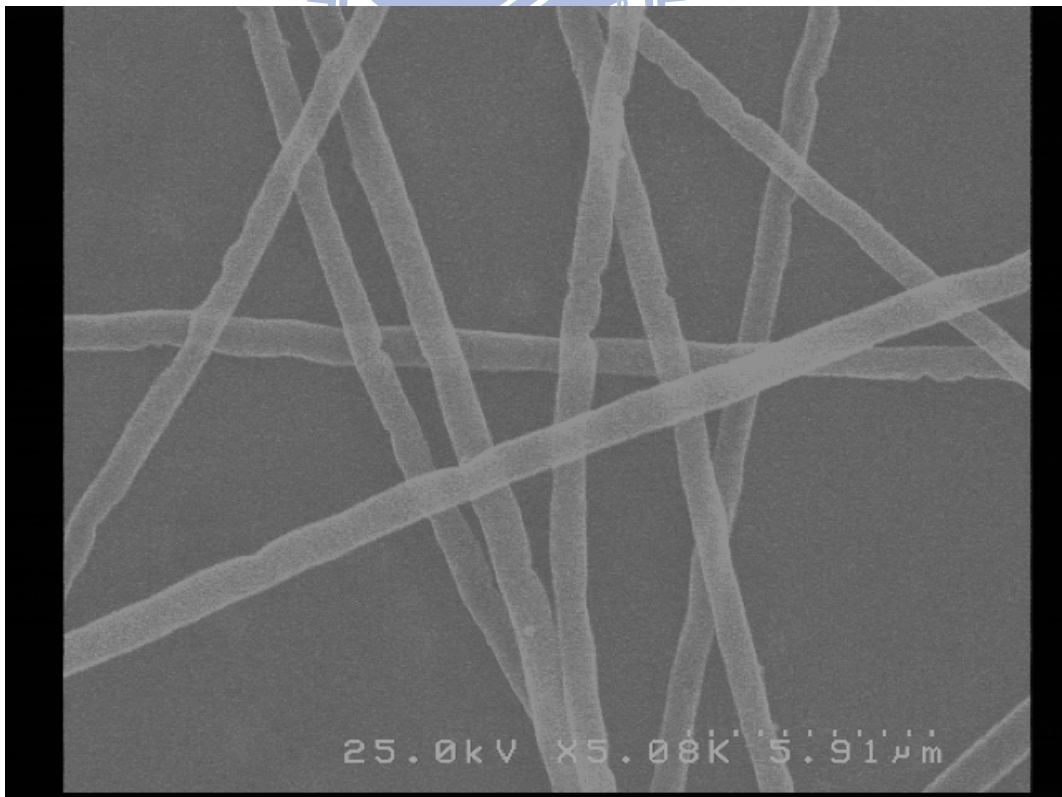


圖 4-6 3% PEO (w/v) 電氣紡絲之纖維

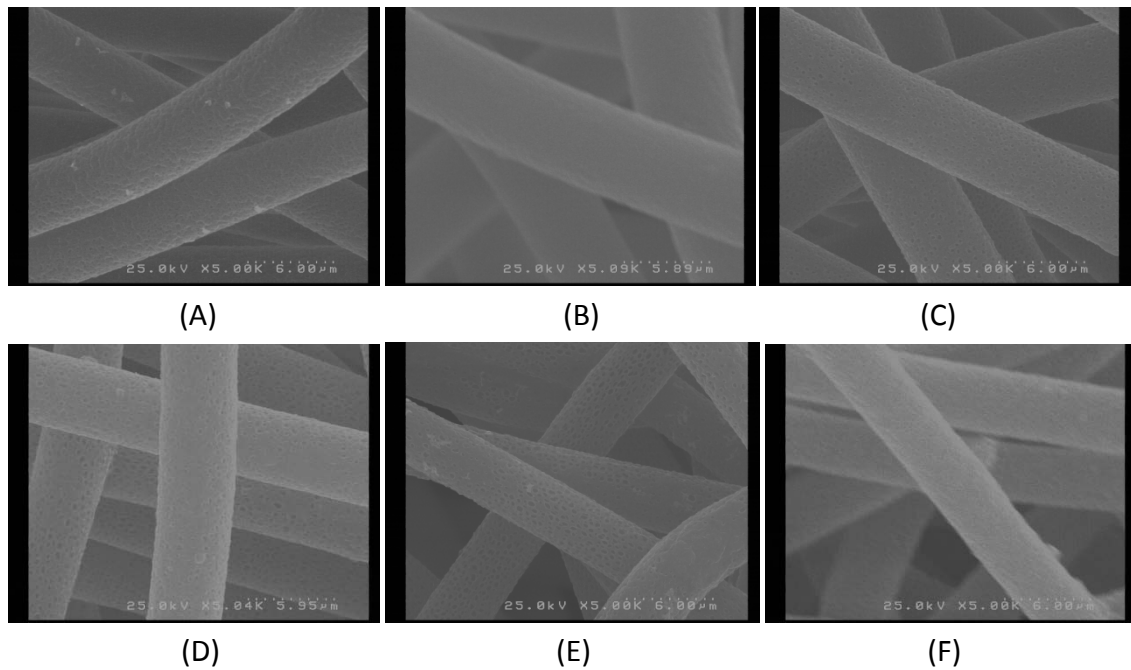


圖 4-7 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO 的體積比電氣紡絲之纖維，倍率 5000 下。PLA:PEO=(A) 9:1 (B) 8:2 (C) 7:3 (D) 6:4 (E) 5:5 (F) 4:6

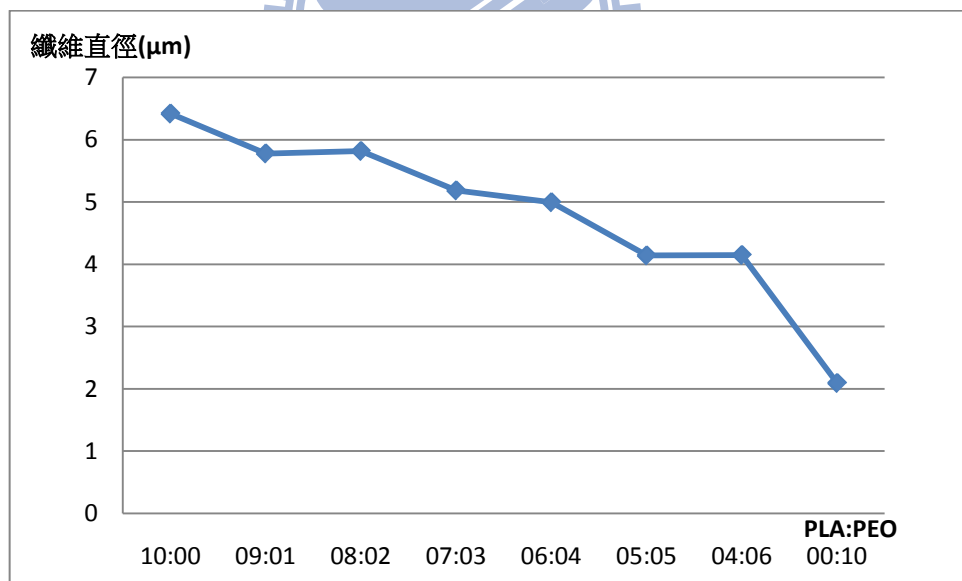


圖 4-8 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO 的體積比電氣紡絲之纖維直徑趨勢圖

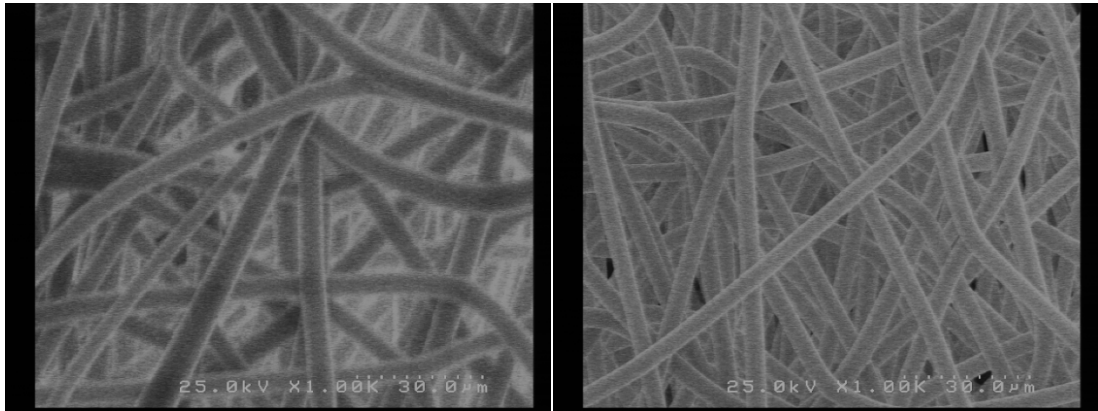


圖 4-9 倍率 1000 下之小管徑人工血管支架表面，10% PLA (w/v) (左)與
10% PLA (w/v) 與 7% PEO (w/v) (右)

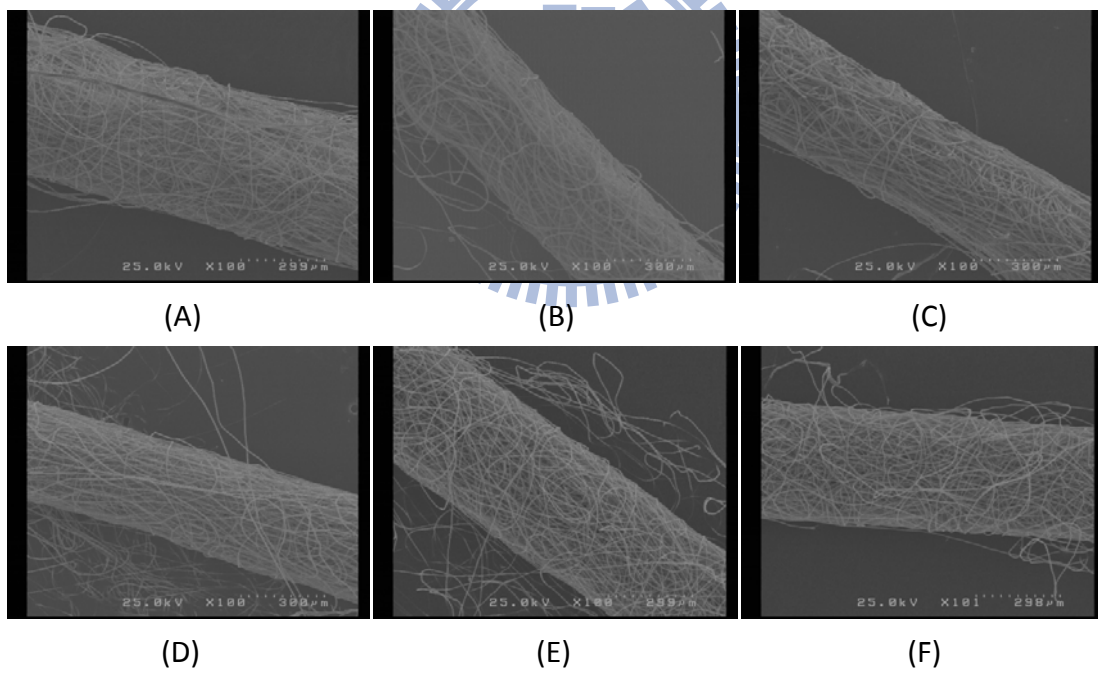


圖 4-10 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO(w/v)的體積比之小管徑人工血管支
架，倍率 100 下。PLA:PEO=(A) 9:1 (B) 8:2 (C) 7:3 (D) 6:4 (E) 5:5 (F) 4:6

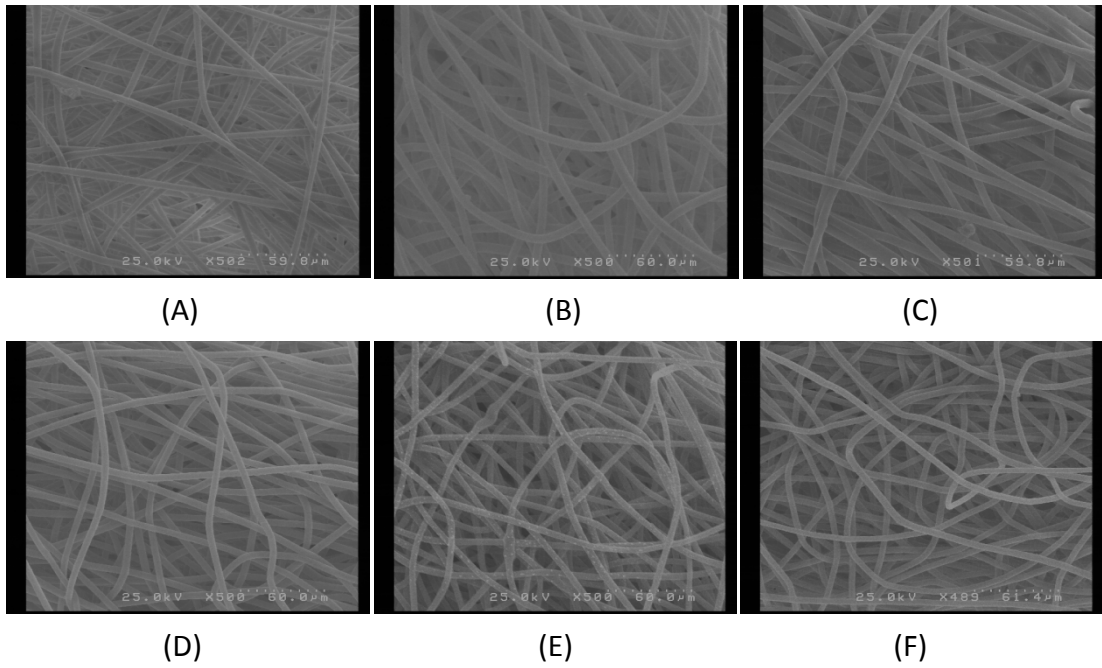


圖 4- 11 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO(w/v)的體積比之小管徑人工血管支架，倍率 500 下。PLA:PEO=(A) 9:1 (B) 8:2 (C) 7:3 (D) 6:4 (E) 5:5 (F) 4:6

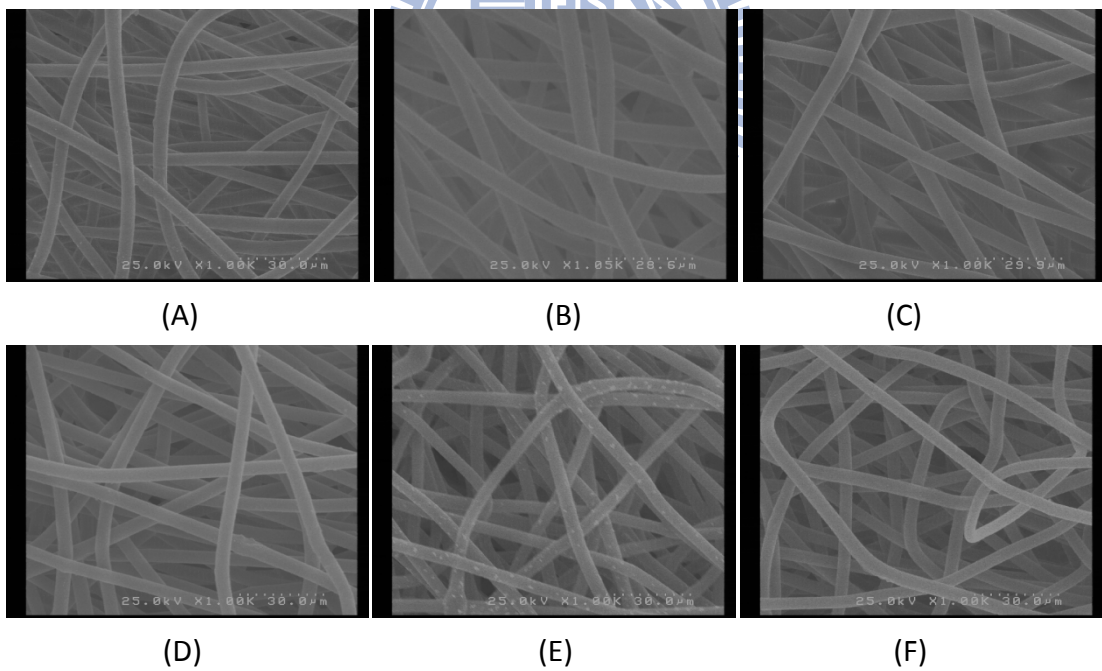


圖 4- 12 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO(w/v)的體積比之小管徑人工血管支架，倍率 1000 下。PLA:PEO=(A) 9:1 (B) 8:2 (C) 7:3 (D) 6:4 (E) 5:5 (F) 4:6

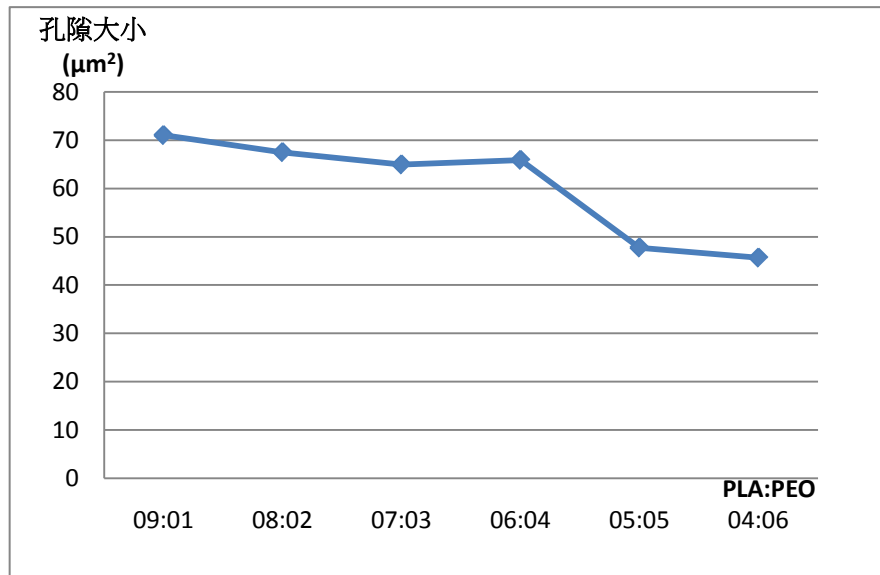


圖 4-13 改變 12% PLA (w/v)與 3% PEO(w/v)的體積比之小管徑人工血管支

架表面孔隙大小趨勢圖

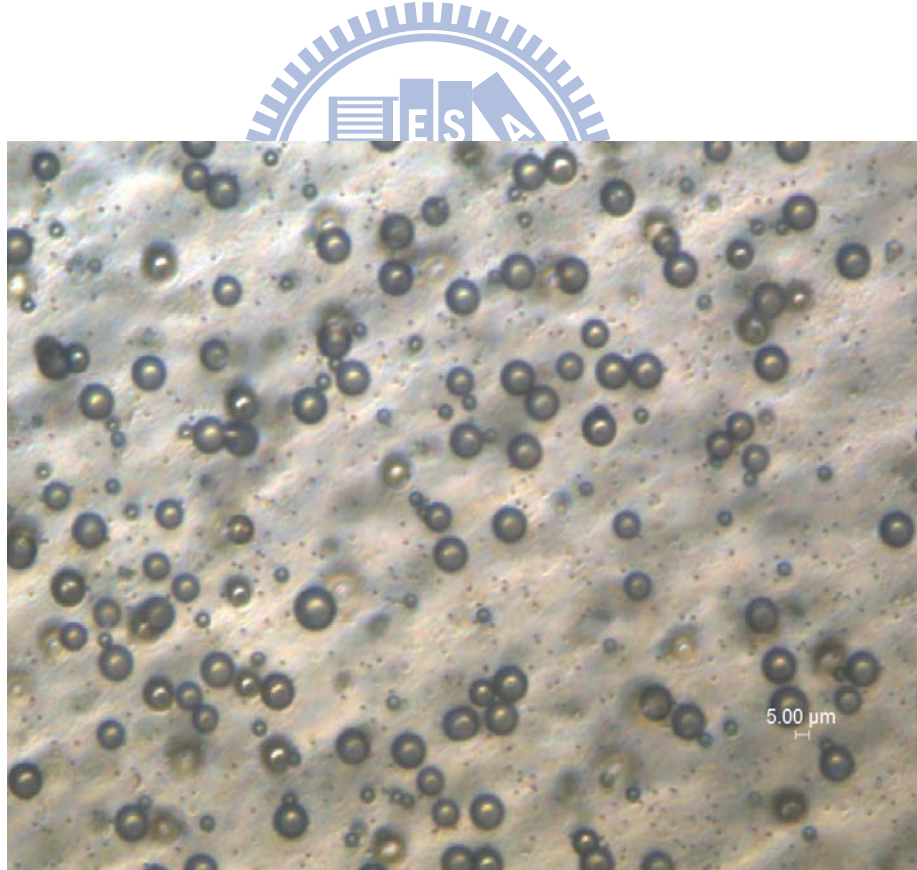


圖 4-14 光學顯微鏡 400 倍下觀察 micro particle 混合溶液注入 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 9:1 製備之小管徑人工血管支架側邊流出溶液

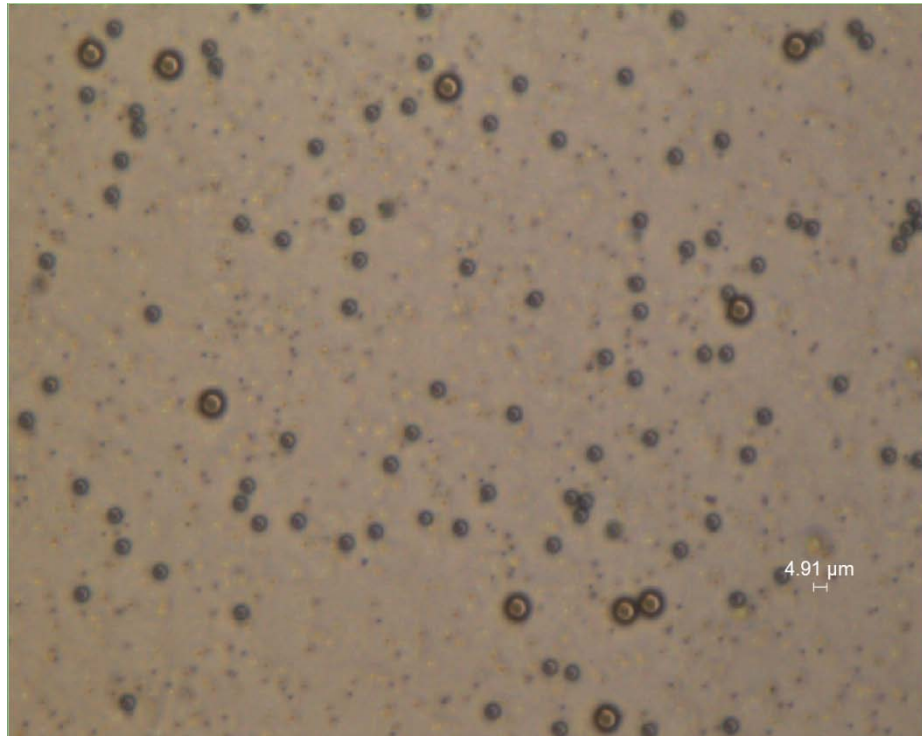


圖 4- 15 光學顯微鏡400倍下觀察 micro particle 混合溶液注入12% PLA(w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 5:5 製備之小管徑人工血管支架側邊流出溶液

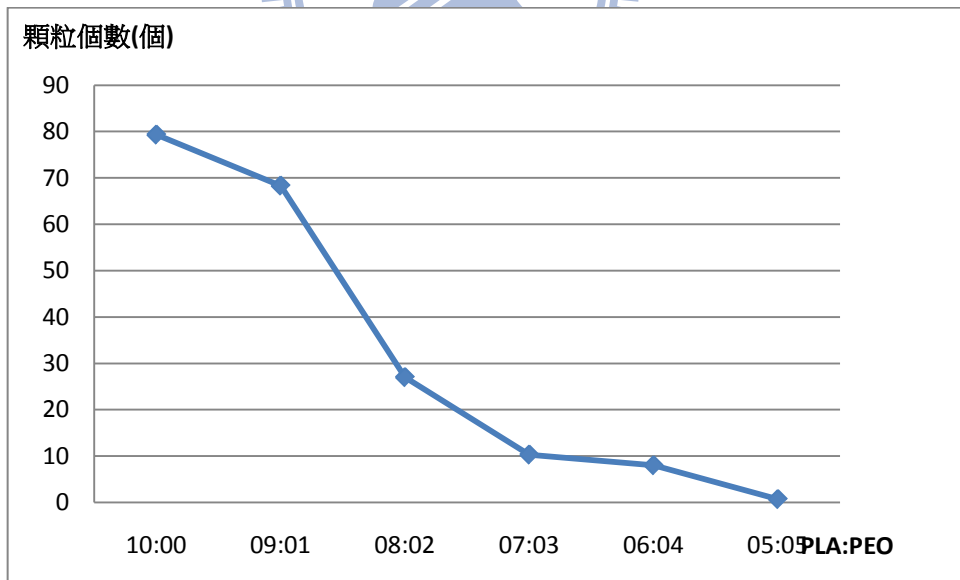


圖 4- 16 直徑 12μm 之 micro particle 從 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 製備之小管徑人工血管支架側邊流出平均個數

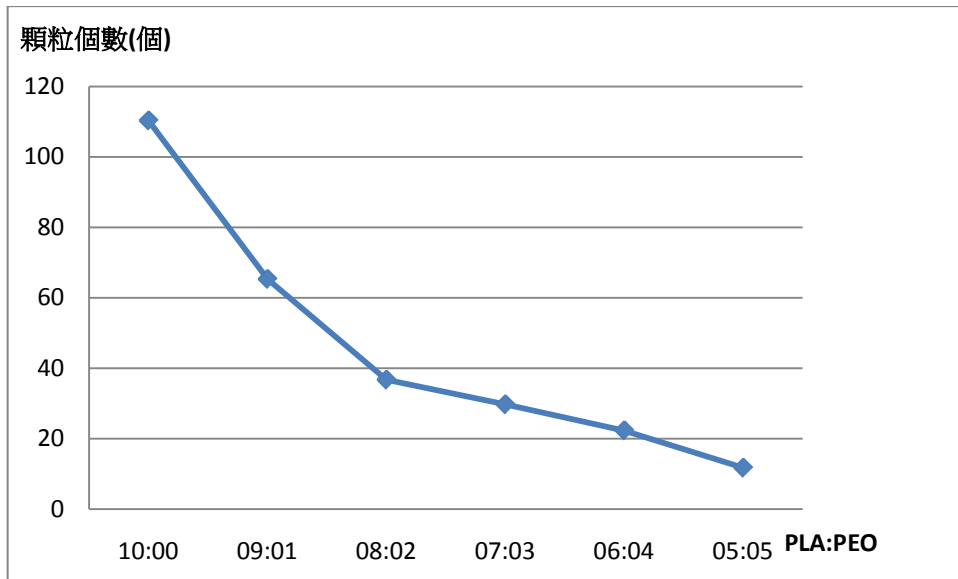


圖 4- 17 直徑 10 μ m 之 micro particle 從 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v)

製備之小管徑人工血管支架側邊流出平均個數

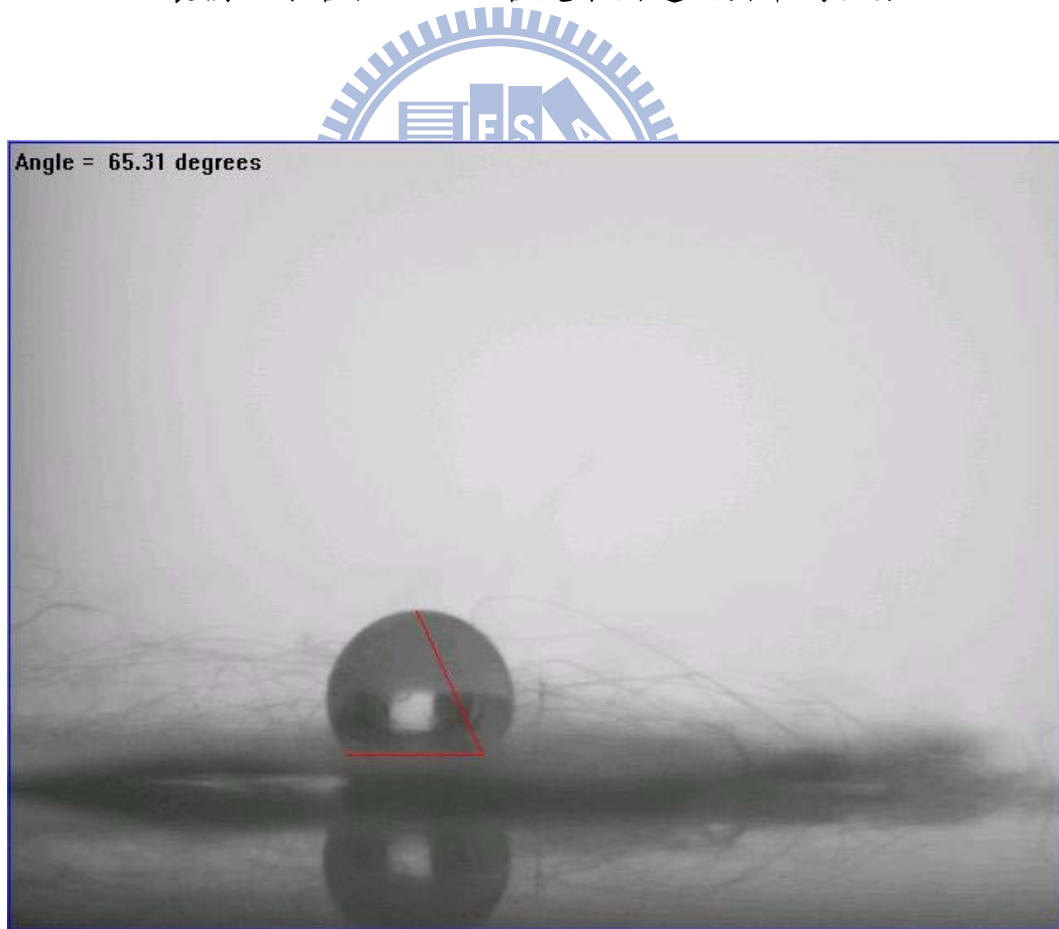


圖 4- 18 12% PLA (w/v) 製備之薄膜親水性實驗照片

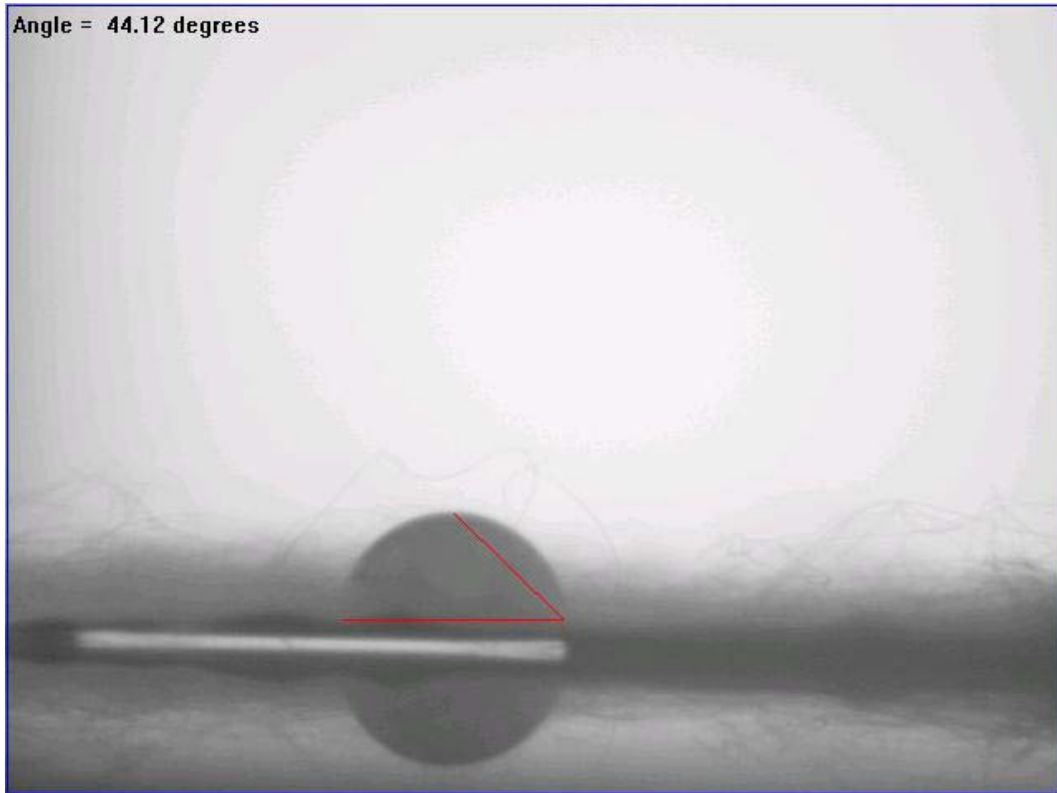


圖 4- 19 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 3:7 製備之薄膜親水性實驗照片

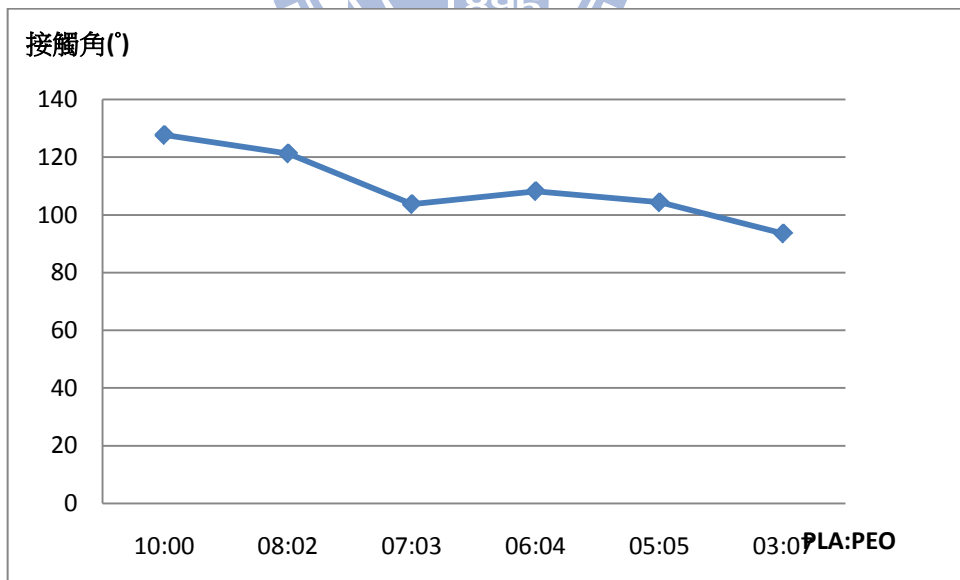


圖 4- 20 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 各體積比之親水性實驗結果

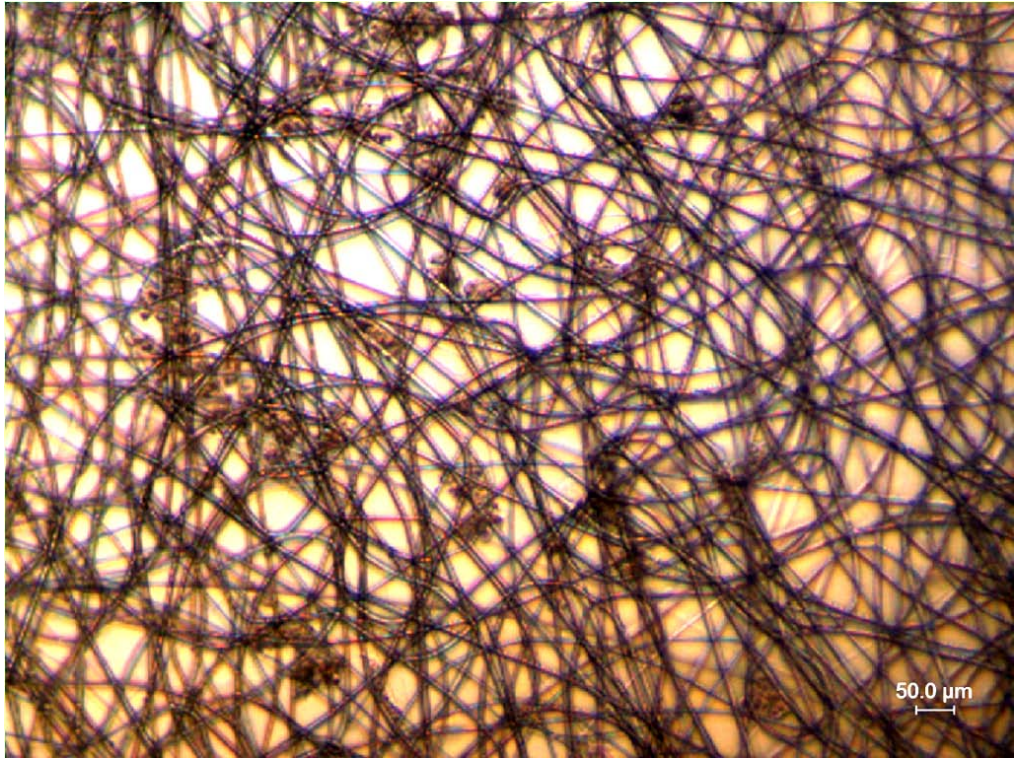


圖 4- 21 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 9:1 製備之薄膜支架
養殖內皮細胞情形

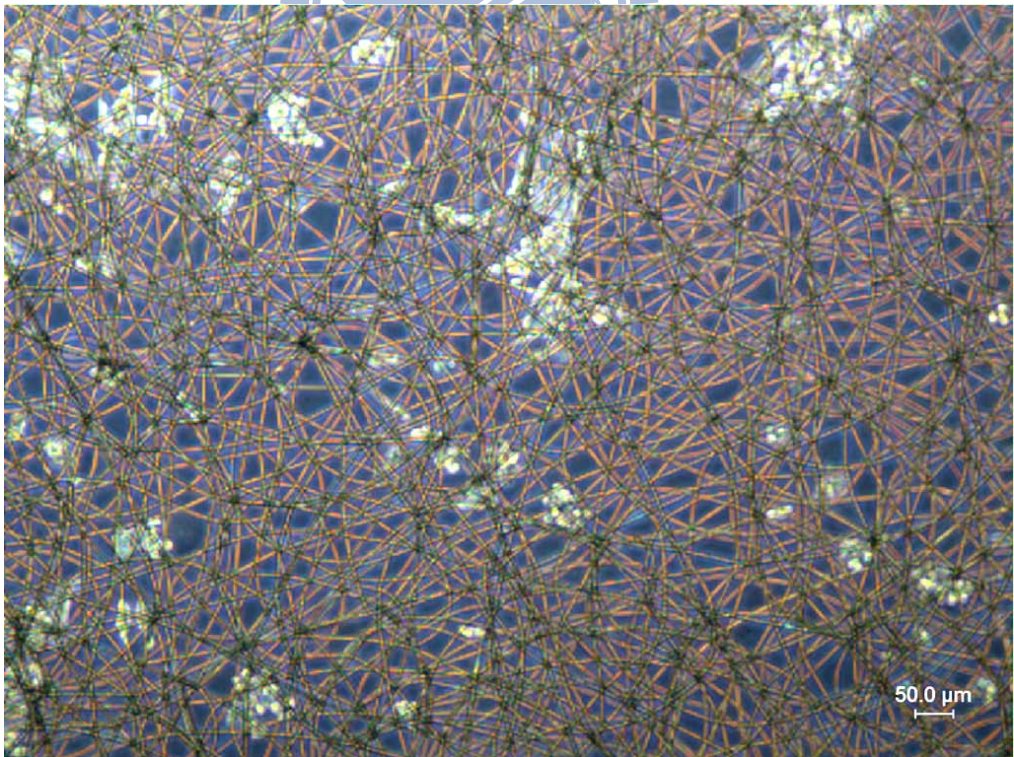


圖 4- 22 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 8:2 製備之薄膜支架
養殖內皮細胞情形

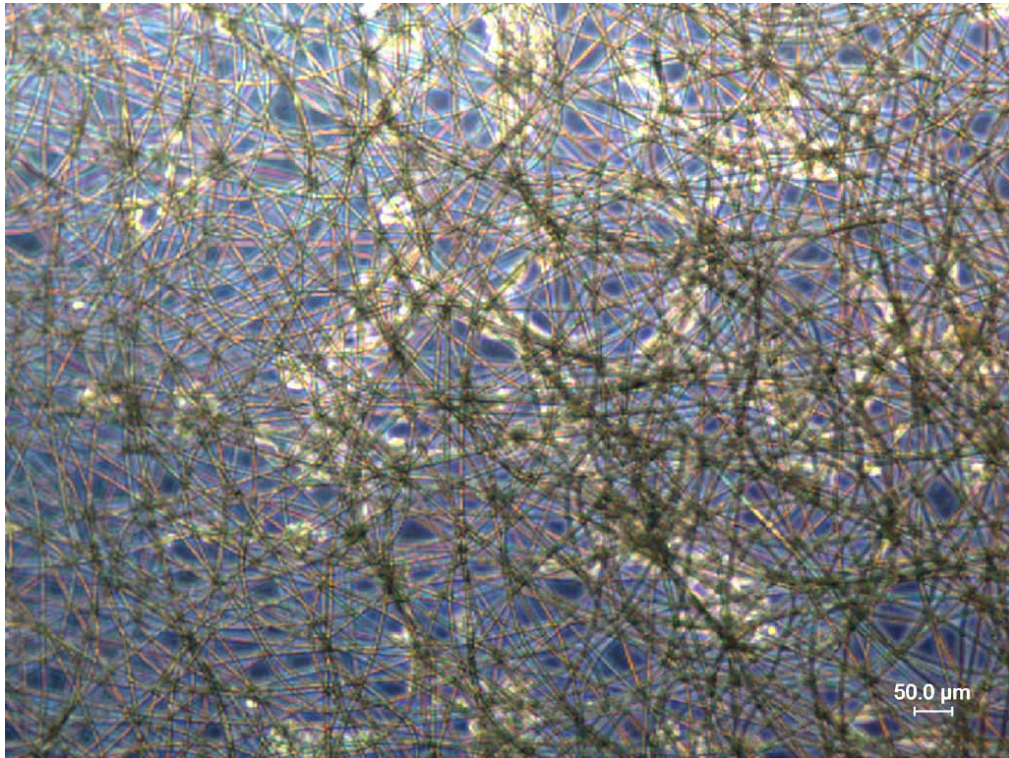


圖 4- 23 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 7:3 製備之薄膜支架
養殖內皮細胞情形

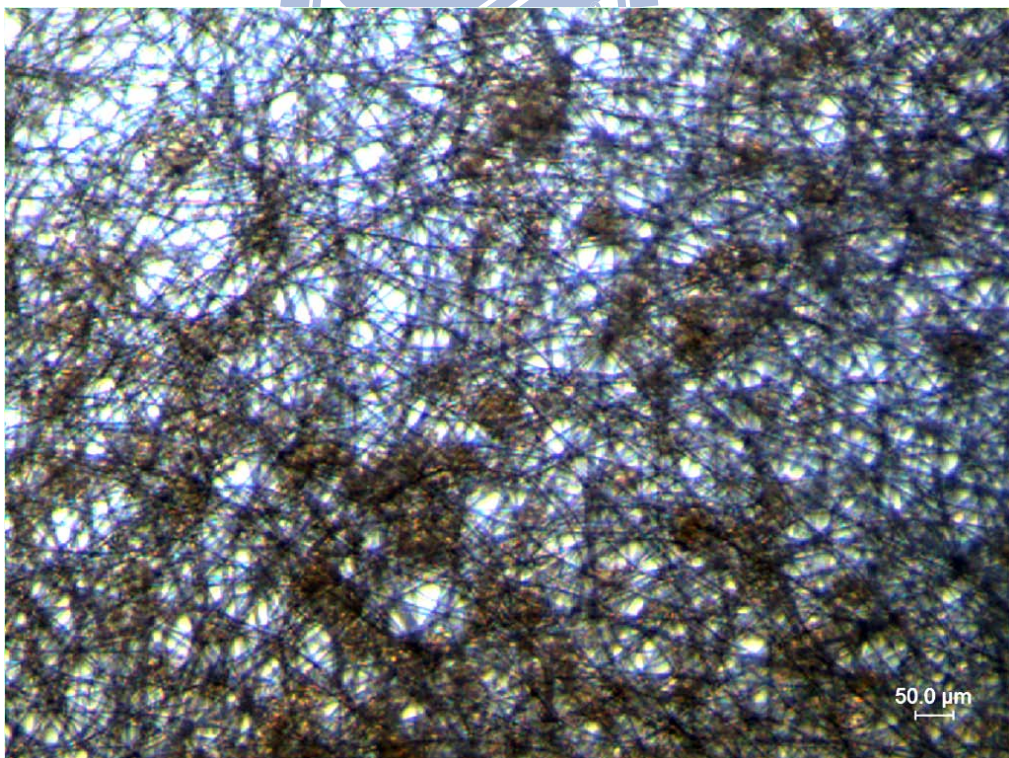


圖 4- 24 12% PLA (w/v) 和 3% PEO (w/v) 以體積比 5:5 製備之薄膜支架
養殖內皮細胞情形

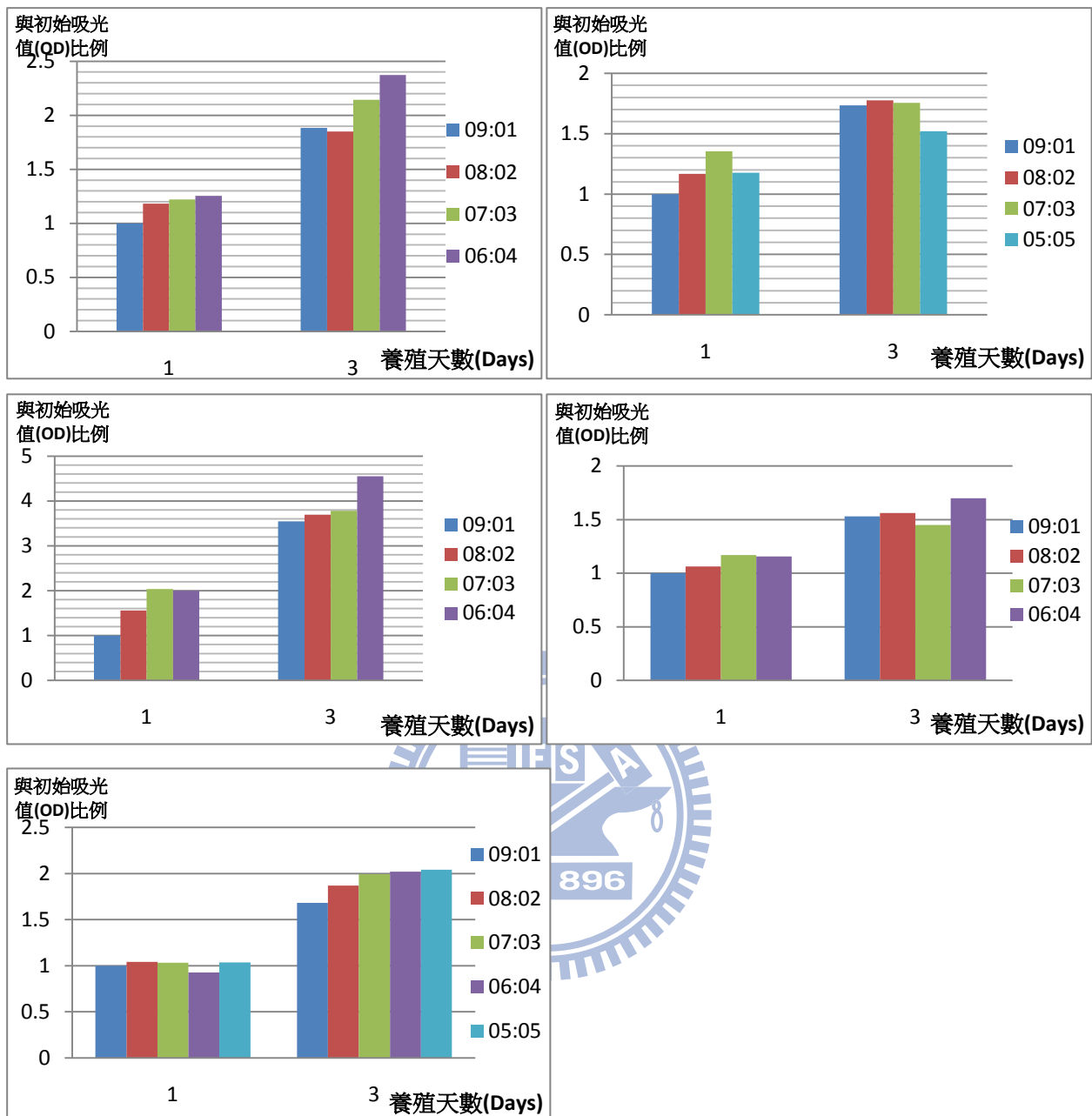


圖 4- 25 五組 MTT 活性測試結果

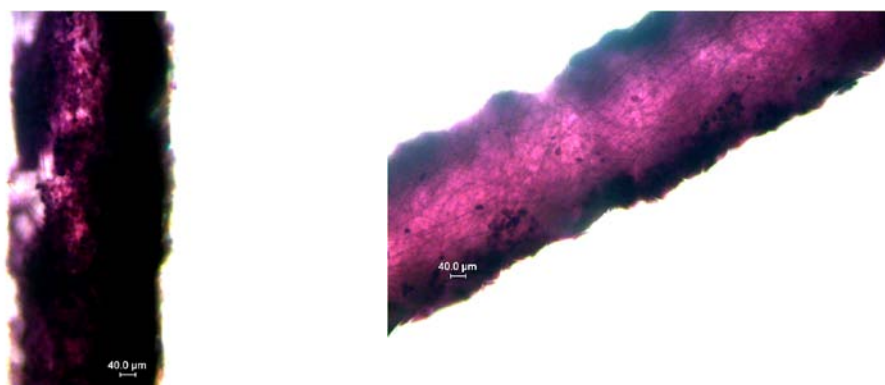


圖 4- 26 於小管徑人工血管支架上養殖細胞 14 日後之染色觀察

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本研究目的在於製備出接近微血管結構的小管徑人工血管支架，因為微血管在管壁部分可以穿透供應細胞養份，因此人工支架也必須擁有相當的孔隙。但對於養殖細胞時，孔隙又必須保持一定大小，以利細胞附著。本研究就是對以上幾點進行探討。

為了製備出通透性足夠的小管徑纖維支架結構，本研究使用電氣紡絲法製備出富含孔洞的小管徑人工血管支架，其基本作法於 3.3 節中介紹。此外還對以下幾點做了探討：

1. 以高分子材料電氣紡絲製備纖維時，加入 PEO 能有效的使纖維有細化的現象，也能使親水性提升，使細胞更容易貼附，但加入的 PEO 愈多支架的結構會愈柔軟，12% PLA (w/v) :3% PEO (w/v) 比例超過 3:7 (PEO 整體濃度約 2%(w/v)) 之後不易製成小管徑人工血管支架。
2. 當纖維愈細時，製備出的人工血管支架所構成的孔隙大小會愈小，但支架整體的孔隙並不會改變。
3. 當支架擁有較小的平均孔隙大小時，細胞確實會有較佳的附著生長情況；細胞於曲面的小管徑人工血管支架上也可以附著，以此方式製備之小管徑人工血管支架是能有所發展的。

5.2 未來展望

本研究確立了以電氣紡絲法製備小管徑人工血管支架的流程與方法，並針對以高分子材料聚乳酸和聚乙二醇製備出的小管徑人工血管支架作了孔隙大小及親水性等分析，但除此之外還有些許方面需要實驗及改進。例如以下幾點：

1. 目前流通的測試僅使用培養液等液體，但血液是黏性流體並含有易產生血栓之血小板，因此必須測試流通多久會產生阻塞，並對減少阻塞做研究。
2. 與現存之人工血管的連結方式，以期構築出一血路系統。
3. 支架於生物體內的降解速率與細胞生長速率的比較，避免在細胞尚未構築成血管前支架就已經降解。
4. 支架的抗壓強度，一般微血管血流的液壓與組織間壓差超過30mmhg時，微血管就會塌陷，也就是製作出的小管徑血管支架應該至少要能支撐此壓差。

類似以上幾個部份都值得去研究，如果能更進一步發展，相信能在將來的生醫研究甚至是臨床上活用。

參考文獻

- [1] Ashammakhi Nureddin, Ndreu A, Nikkola L, Wimpenny I, Yang Y, “Advancing tissue engineering by using electrospun nanofibers”, Regenerative Medicine, 3, 4, pp. 547-574, July 2008.
- [2] A. Formhals PROCESS AND APPARATUS FOB PBEPABING. U.S. Patent 1,975,504, 1934.
- [3] A. Formhals METHOD AND APPARATUS FOR SPINNING. U.S. Patent 2,160,962, 1939.
- [4] A. Formhals ARTIFICIAL THREAD ANDMETHOD OF PRODUCING SAME. U.S. Patent 2,187,306, 1940.
- [5] 黃宣諭，「以電氣紡絲法製備具生物可分解之管狀結構」，國立交通大學，碩士論文，民國 98 年。
- [6] 李宣書，「淺談組織工程」，物理雙月刊，第廿四卷第三期，430~435 頁，2001 年 6 月。
- [7] Arthur B. Voorhees, Jr., Alfred Jaretzki, III, Arthur H. Blakemore, “THE USE OF TUBES CONSTRUCTED FROM VINYON "N" CLOTH IN BRIDGING ARTERIAL DEFECTS”, ANNALS OF SURGERY, 135, 3, pp. 332-336, March 1952.
- [8] Thomas Neumann, Brian S. Nicholson, Joan E. Sanders, “Tissue engineering of perfused microvessels”, Microvascular Research, 66, 1, July 2003.
- [9] Rayleigh L., “On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity”, Philosophical Magazine Series 5, 14, 87, pp. 184-186, 1882.
- [10] John Zeleny, “The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces”, Physical Review, 3, 2, pp. 69-91, February 1914.
- [11] John Zeleny, “Instability of Electrified Liquid Surfaces”, Physical Review, 10, 1, pp. 1-6, July 1917.

- [12] Geoffrey Taylor, “Disintegration of Water Drops in an Electric Field”, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 280, 1382, pp. 383-397, The Royal Society, July 1964.
- [13] G. I. TAYLOR, A. D. McEWAN, “The stability of a horizontal fluid interface in a vertical electric field”, Journal of Fluid Mechanics, 22, pp. 1-15, 1965.
- [14] 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, 290, 1425, pp. 159-166, The Royal Society, April 1966.
- [15] Geoffrey Taylor, “Electrically Driven Jets”, Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 313, 1515, pp. 453-475, The Royal Society, December 1969.
- [16] H.L. Simons PROCESS AND APPARATUS FOR PRODUCING PATTERNED NON-WOVEN FABRICS. U.S. Patent 3,280,229, 1966.
- [17] Peter K. Baumgarten, “Electrostatic spinning of acrylic microfibers”, Journal of Colloid and Interface Science, 36, 1, pp. 71-79, May 1971.
- [18] 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, 19, 6, pp. 921-932, June 1981.
- [19] Darrell H Reneker, Iksoo Chun, “Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning”, Nanotechnology, 7, 3, pp. 216-223, September 1996.
- [20] H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker, “Beaded nanofibers formed during electrospinning”, Polymer, 40, 16, pp. 4585-4592, July 1999.
- [21] Jayesh Doshi, Darrell H. Reneker, “Electrospinning process and applications of electrospun fibers”, Journal of Electrostatics, 35, 2-3, pp. 151-160, 1995.
- [22] Silke Megelski, Jean S. Stephens, D. Bruce Chase, John F. Rabolt, “Micro-

- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers”, Macromolecules, 35, pp. 8456-8466, 2002.
- [23] Christopher J. Buchko a , Loui C. Chen a , Yu Shen a , David C. Martin, “Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films”, Polymer, 40, pp. 7397-7407, 1999.
- [24] Xinhua Zonga, Kwangsok Kima, Dufei Fangb, Shaofeng Rana, Benjamin S. Hsiao, Benjamin Chu, “Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes”, Polymer, 43, 16, pp. 4403-4412, July 2002.
- [25] Michel Vert, Suming Li, Henri Garreau, “New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids”, Clinical Materials, 10, 1-2, pp.3-8, 1992.
- [26] Holten C.H., Müller A., Reh binder D., Lactic acid; properties and chemistry of lactic acid and derivates, Verlag Chemie, 1971.
- [27] Seyed A. Angadjivand, Michael G. Schwartz, Philip D. Eitzman, Marvin E. Jones Method and apparatus for making a nonwoven fibrous electret web from free-fiber and polar liquid. U.S. Patent 6,375,886, 2002.
- [28] Peter P. Tsai, Heidi Schreuder-Gibson, Phillip Gibson, “Different electrostatic methods for making electret filters”, Journal of Electrostatics, 54, 3-4, pp. 333-341, March 2002.
- [29] Arrigoni Chiara, Camozzi Davide, Remuzzi Andrea, “Vascular Tissue Engineering”, Cell Transplantation, 15, pp. 119-125, Cognizant Communication Corporation, 2006.
- [30] 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 91 年。
- [31] Wake MC, Gupta PK, Mikos AG., “Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues”, Cell Transplantation, 5, 4, pp. 465-473, July-August 1996.
- [32] C.Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, “Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering”, Biomaterials, 25, 5, pp. 877-886, February 2004.

- [33] Joel Stitzel, Jie Liu, Sang Jin Lee, Makoto Komura, Joel Berry, Shay Soker, Grace Lim, Mark Van Dyke, Richard Czerw, James J. Yoo, Anthony Atala, “Controlled fabrication of a biological vascular substitute”, Biomaterials, 27, 7, pp. 1088-1094, March 2008.
- [34] Williamson MR, Black R, Kielty C, “PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells”, Biomaterials, 27, 19, pp. 3608-3616, July 2006.
- [35] Zong X, Bien H, Chung CY, Yin L, Fang D, Hsiao BS, Chu B, Entcheva E., “Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs”, Biomaterials, 26, 26, pp. 5330-5338, September 2005.
- [36] Inoguchi H, Kwon IK, Inoue E, Takamizawa K, Maehara Y, Matsuda T., “Mechanical responses of a compliant electrospun poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) small-diameter vascular graft”, Biomaterials, 27, 8, pp. 1470-1478, March 2006.
- [37] Allan K. Schneider POLYMERS OF HIGH MELTING LACTIDE. U.S. Patent 2,703,316, 1955.
- [38] John M. Brady, Duane E. Cutright, Robert A. Miller, Gino C. Battistone, Ervin E. Hunsuck, “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, 7, 2, pp. 155-166, March 1973.
- [39] Xiaowu Fan, Lijun Lin, and Phillip B. Messersmith, “Cell Fouling Resistance of Polymer Brushes Grafted from Ti Substrates by Surface-Initiated Polymerization: Effect of Ethylene Glycol Side Chain Length”, Biomacromolecules, 7, 8, pp. 2443-2448, July 2006.
- [40] Marcel Thiemea, Seema Agarwala, Joachim H. Wendorffa, Andreas Greinera, “Electrospinning and cutting of ultrafine bioerodible poly(lactide-co-ethylene oxide) tri- and multiblock copolymer fibers for inhalation applications”, Research Article, 10.1002, pat.1617, Oct 2009.
- [41] 徐一峰, 「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 98 年。