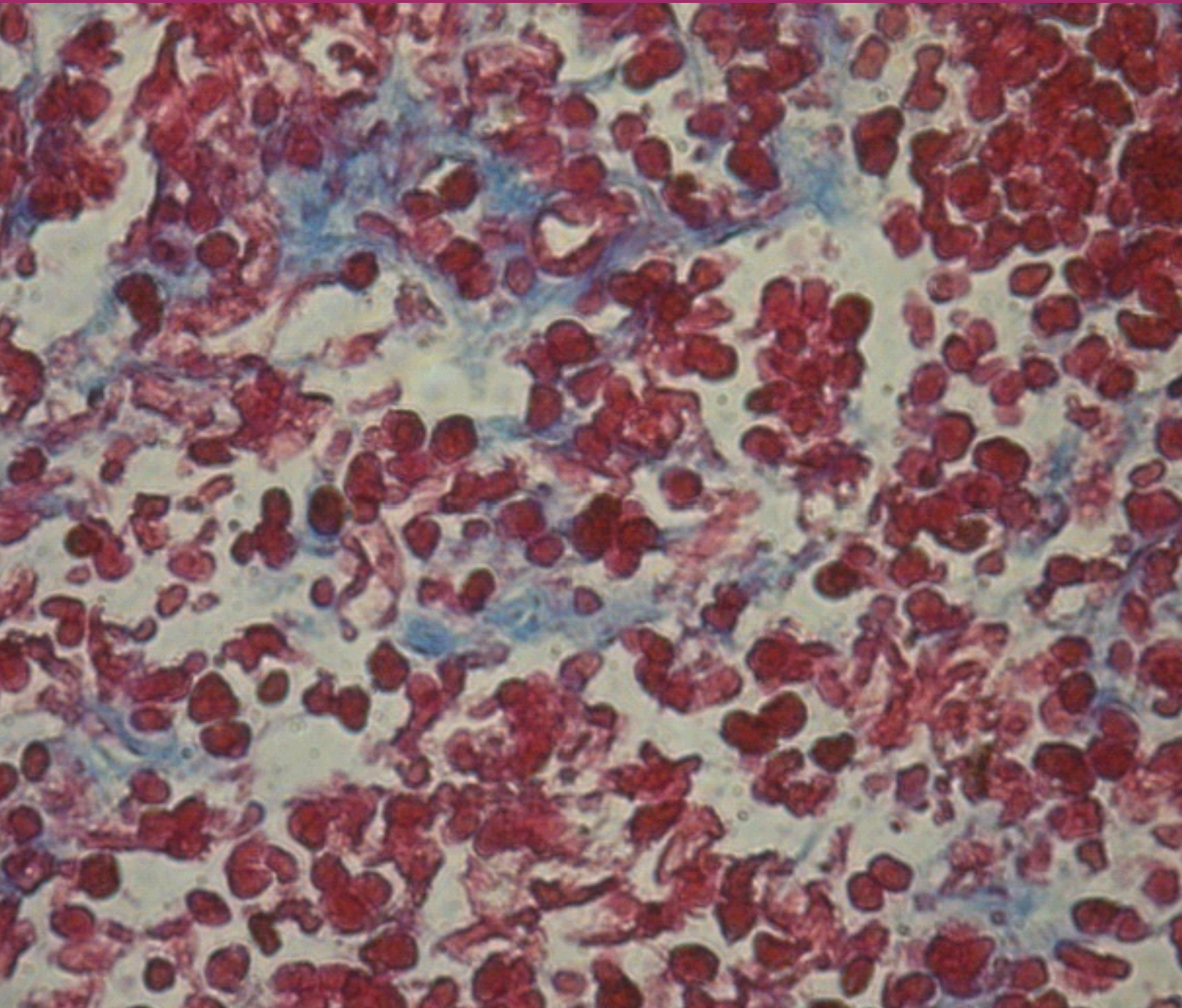


Spring 2009

義大 研訊

SEARCH & DISCOVERY

RESEARCH AT ISU & EDH



肝球小體之組織切片



I-SHOU UNIVERSITY



E-DA HOSPITAL

目錄

2 消息報導

7 文摘

膠原蛋白奈米微粒製備及於細胞培養之影響

構築奈米級生物分子於軟骨修復之應用

構築奈米級生物分子於肝細胞培養影響之研究

從醫學看奈米材料

頸部食道重建所用之游離結腸與空腸腸瓣在運動功能上之差異

34 活動

38 機會

43 編輯室



義守大學校長傅勝利獲頒IEEE院士



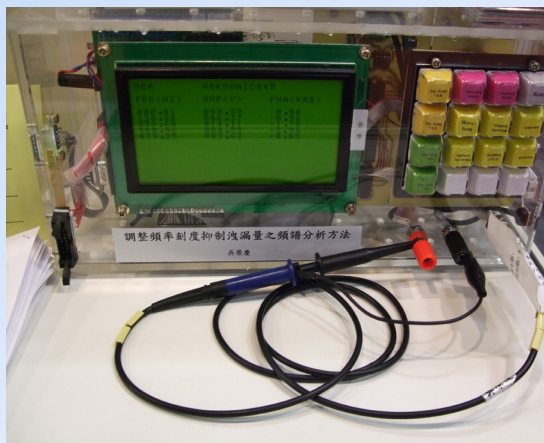
義大之光 義守大學校長傅勝利獲頒IEEE院士義守大學校長傅勝利博士對於推動台灣封裝科技教育貢獻良多，備受國際推崇，獲頒國際電子電機工程師學會 (Institute of Electrical and Electronics Engineers，簡稱IEEE) 院士。這項榮耀肯定傅勝利博士對於半導體產業的貢獻及工程教育的努力，同時也是義守大學全體師生的榮譽，堪稱義大之光。

國際電機及電子工程師學會 (Institute of Electrical and Electronics Engineers，簡稱IEEE) 是全球最大規模的科技專業組織，在全球有涵蓋150個國家超過365,000成員。IEEE在電腦科學、電子電訊、工程等領域均擔當舉足輕重的角色，IEEE的院士(Fellow)都是在業界最頂尖的專家與學者，每年都經過嚴格評審而產生。剛公佈的2009新當選的IEEE Fellow中，傅勝利憑藉其在電子元件、電子封裝和電子製造方面的傑出貢獻而入選。

傅勝利於2004年獲頒國際微電子學會(IMAPS) 國際貢獻獎，以及電子電機工程學會(IEEE) 元件封裝與製造技術 (CPMT) 分會 2007年之會長特別表揚獎，今年更是獲頒國際電機及電子工程師學會院士之榮耀，再度肯定他的卓越貢獻。

義守大學發明專利申請件數 私校第一

專利是刺激個人創造力的制度，讓具有實際使用價值並具新穎性的發明可以獲得保護，而發明專利的數量則是機構研發能量的具體呈現！根據2008年智財局的統計，國內私校發明專利申請提出最多的是義守大學，案數達70件，在全國超過150所大專院校中名列第九，於私校名列第一，與許多一流國立學校相比毫不遜色，充分展現義守大學師生智慧與創造力的無窮潛能！



最佳化頻譜分析法

義守大學對於校內研發成果申請發明專利一直採取積極正面的鼓勵態度，申請的案件數也逐年增加，本年度電機系、資工系、機動系、材料系的成果特別豐碩，使得全校提出的發明專利案躍升為全國私校的第一名，義守大學鼓勵教師從事研究，對於研發成果的專利化程序更提供了許多必要的協助，讓教授與研究生可以專注於研究的本體而非繁瑣的專利申請過程！

義大副校長柯明道當選「台灣十大傑出發明家」



年 僅四十餘歲的義守大學研究副校長柯明道從事積體電路之靜電防護設計已超過15年，研發之專業技術涵蓋電機電子各相關子領域，包括半導體製程、元件結構、佈局設計、電路設計等，成果獲廠商實際採用並量產。累計至今，獲得美國發明專利高達134件、而中華民國專利有142件，研發成果對社會貢獻良多，堪稱為義守大學「金頭腦」博士，今年度更榮獲「台灣十大傑出發明家」獎勵。

柯明道表示「機會是留給有準備的人」，只要平時多用心、多努力，累積自己的實力，等到機會來臨，必然水到渠成。此外，他常常鼓勵學生「莫入寶山空手回」，只要方向走對了，學生便會願意跟隨前人腳步，投入心思埋首研究，總會有一天挖到寶。柯明道積極從事積體電路與微電子系統之可靠性研究一直在國際上獲得高度肯定，讓他於去年榮獲 IEEE 院士的榮譽，使他成為電機資訊領域中目前國內最年輕的 IEEE 院士之一。



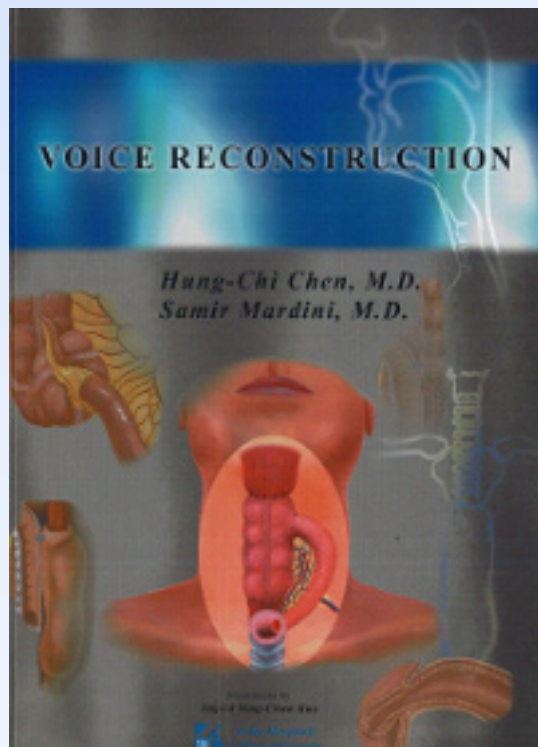
享譽國際盛名之顯微重建專家-義大醫院院長陳宏基



義大醫院院長陳宏基教授是顯微及重建外科的專家，並以消化道進行發聲器重建之高獨特性的手術方式享有國際盛名，每年多次應大型醫學會之邀請演講他的手術經驗，並在2007年出版「Voice Reconstruction」，本書是全世界第一本以腸道顯微手術進行發聲器重建的專書，內容包括生理解剖學、重建方式及手術技巧…等，此書成為許多至本院學習之外籍fellow必拜讀之大作。目前更計畫發行5大類的顯微手術專書：聲帶重建、頭頸部顯微重建、淋巴水腫重建、顯微組織皮瓣之併發症、及頸部食道重建。

2008年11月，在韓國以Live Demo發表新概念的手術方式—「運用盲腸及結腸進行子宮頸及陰道重建手術」；該類疾病在以前一般是使用皮瓣或植皮及其它簡易的傳統方法，因此接受過此類手術的婦女，勢必沒有辦法生育，因此也造成許多女性有所遺憾或產生抗拒的心理；此一創新，可幫助先天畸形或後天疾病造成必須進行子宮頸及陰道重建的女性，提高受孕的機率，對於該類患者而言，是一大治療的進步與福音。

陳宏基教授除在臨床上優異且獨特的表現外，更不忘推動國際交流：自義大醫院成立以來，各國外籍醫師申請前來本院學習各相關手術，並且參與實驗、手術討論及經驗交流；而各國外籍醫師也在回國後，相繼傳來卓越表現與成就。另外，在研究的部分，也進行腸道生理學的基礎研究及醫學工程的研發，並鼓勵同仁進修以提升專業方面的實力，為義大醫院未來發展鋪下一條康莊大道。



2007年出版 聲帶重建專書

義守大學國際學院招生訊息

全球競爭力的提升・跨國人才的搖籃

特色-

義守大學國際學院之設立宗旨為培育具跨文化、創造力及國際競爭力之專業人才。國際學院之特色為全英語教學環境、外籍專業師資、精心規劃之國際化課程，並提供雙聯學制之海外留學及跨國實習機會，以奠定專業知識技能，並拓展全球視野。

課程-

與歐美大學接軌，必選修專業課程採英語教學，學生可選修多國語言的課程，及選擇至海外姐妹校修讀學分或雙學位，可於大一至大三於本國上課，第四年安排至歐美等國際知名合作姐妹校修讀及實習，取得義守大學學位；或參加雙聯計劃，取得本校或海外姐妹校學位或雙學位。

未來發展-

國際學院學生經過四年培訓之後，將具有多元文化適應力與國際溝通能力，將來無論於國內外繼續追求學術進程或躋身國際職涯，發展面向皆具競爭力。

學系簡介-

• 國際企業經營學系 Department of Business Management

國際企業經營學系之設立宗旨，在於培育具國際競爭力的企業經營人才。本系禮聘國內外優秀之專業師資，提供全外語授課之學習環境。課程規畫注重國際企業經營專業知識、溝通能力及培養國際觀；

課程設計以一、二年級基礎課程，強化基礎管理知識、外文能力及電腦資訊技能，提升學生對本領域之基礎認知及培育專業技能；三、四年級安排進階選修課程，依學生興趣選擇適合之課程，拓展學習深度



及廣度；基礎課程皆於本校完成，選修課程則可於本校或國外姊妹校修習，提供學生體驗國際學習及多元生活文化之機會。學生未來於國內外升學或就業，都具有永續學習之競爭力。

- 國際財務金融學系 Department of International Finance

國際財務金融學系之設立宗旨，在於培育具國際觀的財金人才。本系課程規劃目標，在於培養學生良好的財金專業知識、語文能力及多元國際觀，課程設計以一、二年級基礎課程，培育學生基本管理知識、電腦資訊處理及財金相關基礎課程之能力，三、四年級課程則涵蓋財務管理、投資及金融機構三種領域深化課程；修課方式為一、二年級於本校奠定良好基礎後，三、四年級可選擇於本校或藉由國際交換學生之機會繼續深造之國際修習課程。在國際化之學習環境薰陶下，提昇本系學生之全球學習視野，畢業後不論是升學或就業，都將具備國際化競爭力之附加價值。

- 觀光餐旅學系 Department of Tourism & Hospitality

觀光餐旅學系課程規劃結合餐旅、旅遊與會議展覽三領域之課程，並加重語文能力的訓練，以培育具外語溝通能力與觀光產業整合規劃能力的管理人才。除了通識課程及基本管理類課程，如管理學、經濟學及會計學等之外，亦在觀光餐旅專業領域規劃如餐旅業概論、觀光導論及觀光餐旅資訊系統等基礎課程，使本系學生對觀光餐旅相關領域具備基礎認知及必要技能，便於日後依其本身興趣選擇適合之國外姐妹校繼續修習進階課程。

招生網址：<http://www.isu.edu.tw/admission>

諮詢專線：07-6577711轉2133周黃先生



膠原蛋白奈米微粒製備及於細胞培養之影響

郭士民¹、馬亞尼¹、白敏賢²、楊辰智¹

¹義守大學生物醫學工程系 ²義守大學電子工程系

摘 要

將帶有人工培養的活性細胞或組織等移植到體內，使損傷的臟器或組織得以再生恢復健康之醫療策略，是目前組織工程研究中受到矚目的方向之一。一般而言，構成組織工程的三要素：一為細胞，二為支撐細胞生長所需的支架，三為影響細胞行為的訊息因子。除了細胞的來源與培養佔著重要的角色外，支架的組成型態與訊息因子的刺激影響著細胞的生長、趨向與分化。本研究包含細胞外基質(第一型膠原蛋白與第二型膠原蛋白)的純化萃取、奈米級微粒生物分子(支架)之製備及此奈米級微粒生物分子對肝細胞與軟骨細胞培養之影響。初步結果顯示添加適量第一型膠原蛋白奈米微粒於培養基中會促進肝細胞增生及生理功能，且在平面培養上發現添加膠原蛋白奈米微粒可有效維持肝細胞之白蛋白分泌能力。在生物反應器系統中添加膠原蛋白奈米微粒可使肝細胞於五天內快速形成約5毫米直徑之肝小球體。在與軟骨細胞培養研究上，於平面培養實驗結果中發現添加 10^{-4} mg/ml的第二型膠原蛋白奈米微粒有較佳之增生活性。在攪拌式生物反應器培養結果顯示，與第二型膠原蛋白奈

米微粒共同培養之軟骨細胞，於增生活性或醣胺蛋白分泌含量皆較控制組(無添加)佳。且軟骨細胞間會透過其所分泌之細胞外基質連結聚集在一起，並維持其正常球狀之細胞型態。

關鍵詞：奈米級生物分子、膠原蛋白、肝細胞、軟骨細胞、生物反應器



(由左至右) 馬亞尼教授、郭士民教授

前言

一般咸信，藉由細胞外基質上特定生物分子與細胞膜上受器之辨識及專一性結合，可引發細胞內部之訊息傳遞，進而啟動基因表現以調控細胞的生長、趨向與分化。其中，膠原蛋白上含有RGD (Arg-Gly-Asp)及DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala)兩段特殊的胺基酸序列，可與細胞膜上之整合蛋白做專一性之結合，進而引發特定之訊息傳導途徑以誘導細胞增殖、生長分化與凋亡等重要的細胞反應，因此膠原蛋白於細胞增生上扮演一重要的角色。

膠原蛋白是哺乳動物結締組織中含量最為豐富之結構性蛋白質，並廣泛分布於皮膚、骨骼、肌腱、牙齒、筋膜、軟骨等組織中。膠原蛋白之功能除提供結締組織所需之彈性、張力強度、黏彈力等機械性質外，膠原蛋白亦是細胞外基質最主要的成份，與細胞的吸附生長、分化、生理功能及基因表現有極密切的關係。膠原蛋白含有RGD (Arg-Gly-Asp)及DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala)兩段特殊的胺基酸序列，可與細胞膜上之整合蛋白做專一性之結合，進而引發特定之訊息傳導途徑以調控細胞之分化及生理功能。

整合蛋白廣泛存在於各種脊椎動物細胞膜上，整合蛋白除了是細胞與細胞外基質間之連接橋樑，也可傳遞細胞內外之生物訊息。許多研究發現在細胞外基質分子中皆具有特定之胺基酸motifs 能夠與細胞之表面受器進行專一性的結合。其中最早被定義出與整合蛋白作用之結合部位，為fibronectin中之Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) 序列，其他如laminin、thrombin、fibrinogen、vitronectin及膠原蛋白等細胞外基質分子也相繼證實皆具有此一特殊之胺基酸序列。隨著細胞學

及分子生物學之研究結果顯示細胞外基質在細胞生理行為及功能的調控上扮演著主動且複雜的角色。細胞與細胞外基質間的吸附結合，對於胚胎的發育、細胞之遷移、增生、分化，乃至於生理功能表現，均有著舉足輕重的影響。

設計製備新穎的奈米級生醫材料做為細胞之生長基材，並觸發與細胞相關之生理特定功能是目前較受重視的研究方向之一。先前本實驗室(生醫材料實驗室)已成功利用高壓電場系統製備出奈米級之第二型膠原蛋白微粒。本研究中係利用高壓電場系統製備第一型及第二型膠原蛋白奈米微粒，探討其對肝細胞及軟骨細胞培養之影響，並企圖瞭解此奈米生物分子與細胞整合蛋白之結合模式之影響。其次，亦擬將此膠原蛋白奈米微粒添加於生物反應器內進行肝細胞與軟骨細胞之懸浮性培養，期能透過膠原蛋白奈米微粒快速與整合蛋白結合達到細胞大量增生之功效。

材料與方法

1. 膠原蛋白奈米構形之製備

研究中利用高壓電場系統製備所需之第一型及第二型膠原蛋白奈米微粒 (如圖-1所示)。並經由穿透式電子顯微鏡觀察評估其膠原蛋白奈米微粒尺寸大小及型態。將含有膠原蛋白奈米微粒之溶液滴於覆有forma 膜的TEM 銅網上，並以2%Tungstophosphoric acid hydrate進行負染色後乾燥以穿透式電子顯微鏡(Philip CM-200)觀察。

2. 肝細胞分離培養

肝細胞之萃取與培養係參照Seglen 之二階段膠原蛋白酶灌流法來進行。步驟簡述如下：取七至九週大之SD大鼠麻醉後，於無菌條件下打開腹腔，並將靜脈留置針插入肝

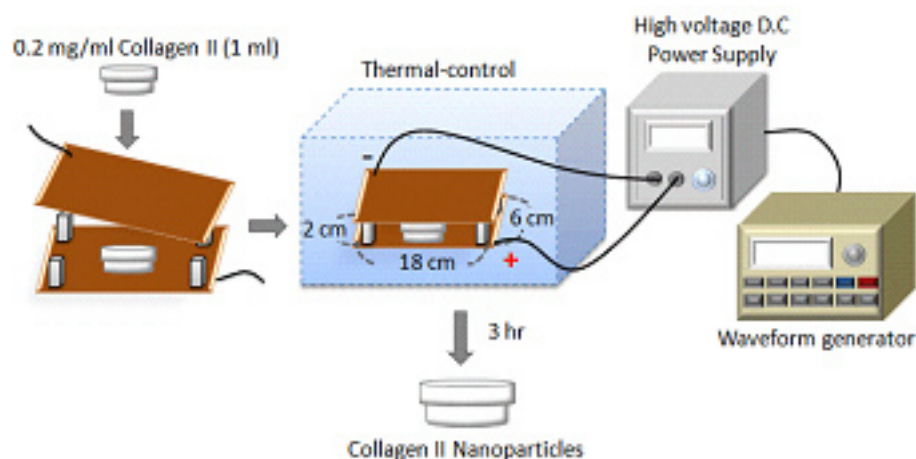


圖-1高壓電場系統製備膠原蛋白奈米微粒示意圖

門靜脈。先以含0.1% EDTA-Hank緩衝液預灌流，以灌流將血液及血球細胞沖出，灌流溫度保持於37°C。其次以含Hank緩衝溶液、0.5%膠原蛋白酶及鈣離子緩衝溶液(活化膠原蛋白酶)做第二階段灌流，邊灌流邊剪斷肝臟與周圍組織之連接，經細胞篩網過濾後短暫離心(500rpm, 5 mins)，拋棄上層懸浮液後取下層沉澱物即為肝細胞，經磷酸緩衝溶液反覆清洗離心以除去血球細胞及其他組織液得純化肝細胞。

3. 初代軟骨細胞分離培養

準備數隻一個月之幼兔，以過量之KCl於心臟注射犧牲後，將其膝關節軟骨切丁取下，浸泡於protease (2 mg/ml)反應2小時將proteoglycans溶解後改浸入第二型膠原蛋白酶(2mg/ml)反應3小時將膠原蛋白纖維分解，此時軟骨細胞會被釋放於溶液中，將此溶液以1500 rpm 離心10分鐘後，移除上澄清液並以F-12 培養基 (10%胎牛血清，200 U/mL 抗生素 (penicillin/streptomycin)) 將沉澱細胞混合均勻後分注至75T 培養皿培養。軟骨細胞每天以磷酸緩衝溶液清洗數次後更換新的F-12培養基，待細胞培養至第二代後立即進行細胞實驗。

4. 肝細胞與第一型膠原蛋白奈米微粒於生物反應器中培養

以肝細胞密度 5×10^4 cells/ml與添加 5×10^{-4} mg/ml的膠原蛋白奈米微粒，並於50 ml離管內結合培養3小時後，置入攪拌式生物反應器中，攪拌式生物反應器之轉速約為15 rpm，每日取出適量培養液進行MTT測試及白蛋白分泌量測定。

5. 軟骨細胞與第二型膠原蛋白奈米微粒於生物反應器中培養

以細胞密度 5×10^4 cells/ml與添加 10^{-4} mg/ml的膠原蛋白奈米微粒，並於50 ml離管內結合培養3小時後，置入攪拌式生物反應器中，攪拌式生物反應器之轉速約為15 rpm，每日取出適量培養液進行MTT測試及醣胺蛋白含量測定。

6. SEM細胞型態觀察

培養數天後，將細胞取出固定脫水處理，並以掃描式電子顯微鏡觀察。首先將樣品浸泡於2.5%戊二醛 2小時進行前固定，前固定完成後以磷酸緩衝溶液沖洗數次，改浸入1% 鉻酸1小時進行後固定。後固定完成後再以磷酸緩衝溶液沖洗數次，以酒精脫水後，

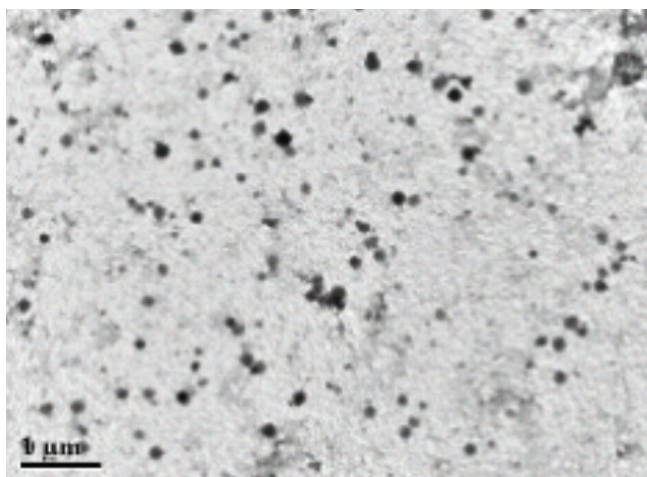


圖-2 第二型膠原蛋白奈米微粒

利用臨界點乾燥機乾燥、表面鍍金以掃描式電子顯微鏡觀察。

7. 白蛋白分泌量測定

白蛋白分泌量測定方式如下：取細胞之培養液並於-20°C保存，使用QuantiChrom™ BCP Albumin Assay kit利用ELISA於波長610 nm下進行分析測定。

8. 醣胺蛋白含量測定

軟骨細胞於培養過程中所分泌之醣胺蛋白含量可利用酵素免疫分析法測定之：利用Blyscan Assay Kit來量測培養基中醣胺蛋白的含量，先用標準溶液作出標準曲線作為吸光值與濃度的換算依據，從每個樣品中取出100 μl的培養液加入1 ml的Dye reagent，使其均勻混合30分鐘。待其反應後，離心吸出上

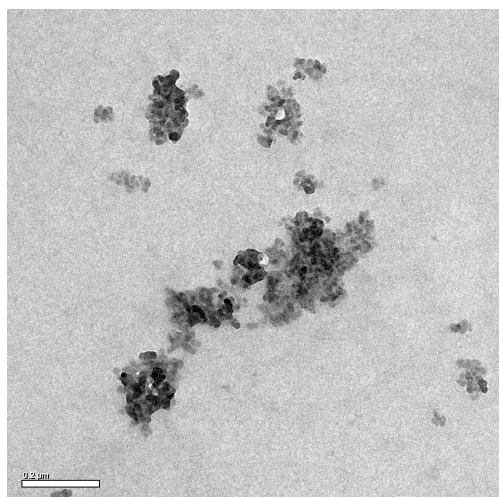


圖-3 第一型膠原蛋白奈米微粒

澄液，再加入Dissociation reagent 1ml 均勻混合，20 分鐘後使用ELISA 於波長650nm 量測其吸收值。

9. 細胞型態觀察

取出培養後之樣品以4%福馬林保存，藉由酒精梯度之脫水後進行石蠟的包埋，後以5 μm之厚度進行切片並以蘇木-曙紅及Masson氏染色後，以光學顯微鏡觀察，而部份樣品則以戊二醛及鐵酸固定後，經酒精之脫水處理，並以臨界點乾燥機乾燥、鍍金後以掃描式電子顯微鏡觀察。

結果與討論

1. 膠原蛋白奈米微粒觀察

經由高壓電場系統製備之第一型及第二型膠原蛋白奈米微粒如(圖-2、圖-3)所示。由於第一型膠原蛋白對溫度所造成的自發性重組現象較為明顯，所製備出的第一型膠原蛋白奈米微粒的型態較不均勻，且有聚集的情況發生。當溫度設定至37°C時，第一型膠原蛋白會出現重組之膠原蛋白纖維(圖-4)。反之，第二型膠原蛋白則能形成較佳的圓球型。大致而言，膠原蛋白在本研究中所架設的高壓電場及設定實驗條件中均能製備出奈米級之生物分子。

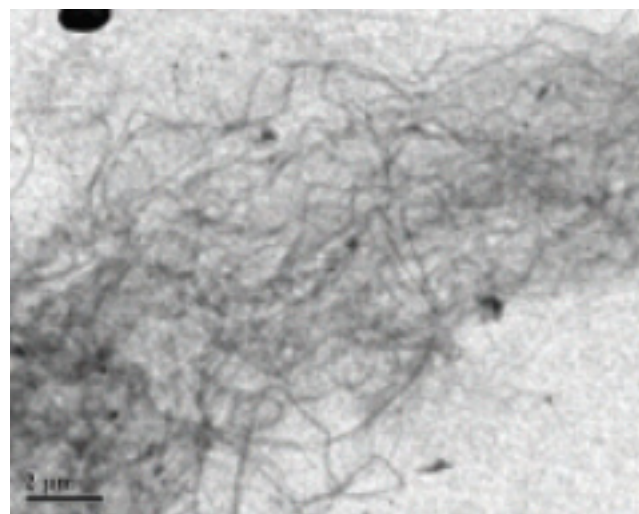


圖-4 添加第一型膠原蛋白奈米微粒於肝細胞共培養之細胞活性

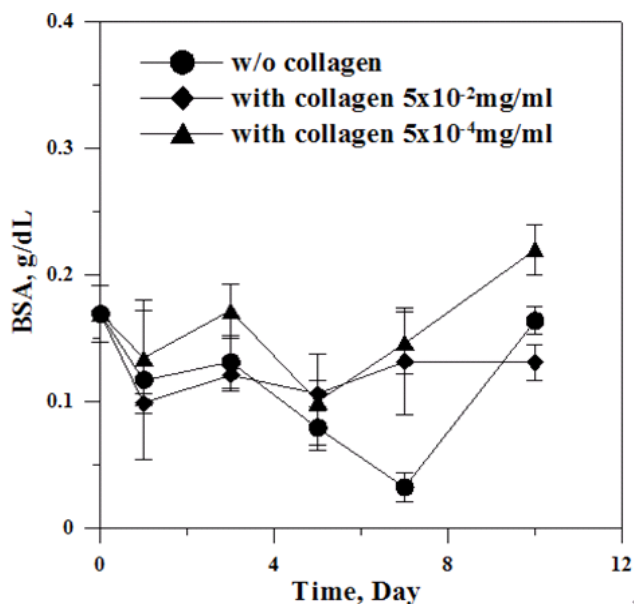


圖-5 添加第一型膠原蛋白奈米微粒於肝細胞共培養之白蛋白分泌變化

2. 肝細胞與第一型膠原蛋白奈米微粒共同培養

MTT測試是以偵測粒線體中琥珀磷酸酶之含量，來推測細胞活性。白蛋白是肝細胞所分泌之特異蛋白，若肝細胞失去其活性則無法分泌之。由初步培養結果顯示肝細胞在培養72小時內，會先失去約50%的細胞活性，在經10天培養後，添加膠原蛋白奈米微粒之肝細胞則恢復至萃取時之細胞活性。且肝細胞之白蛋白分泌量優於無添加之控制組(如圖-5)。顯示膠原蛋白奈米微粒在肝細胞培養上具有維持其生理功能之功效。肝細胞於生物反應器之培養研究中顯示添加膠原蛋白奈米微粒於培養基中，可在五天內產生長度約5 mm之肝球小體(如圖-6)，此一快速形成肝球小體的發現是優於其他研究者的成果。由電子顯微鏡及組織切片的觀察結果顯示，肝球小體中之肝細胞仍維持其原有細胞型態及分泌膠原蛋白之能力(如圖-7、圖-8)。

3. 軟骨細胞與第二型膠原蛋白奈米微粒共同培養



圖-6 肝細胞於生物反應器中培養五天後所產生長度約 5 mm之肝球小體

將軟骨細胞經由攪拌式生物反應器培養兩天後，可觀察到添加第二型膠原蛋白奈米微粒(10^{-4} mg/ml)之軟骨細胞有較多的細胞團塊形成(如圖-9)。電子顯微鏡觀察亦可發現軟骨細胞間會透過其所分泌之細胞外基質連結聚集在一起，且軟骨細胞皆能維持其正常球狀之細胞型態(如圖-10)。且軟骨細胞仍具有正常分泌醣胺蛋白(glycosaminoglycan)的功能，添加第二型膠原蛋白奈米微粒於培養基培養軟骨細胞，其軟骨細胞分泌glycosaminoglycan的功能較控制組好(如圖-11)，顯示第二型膠原

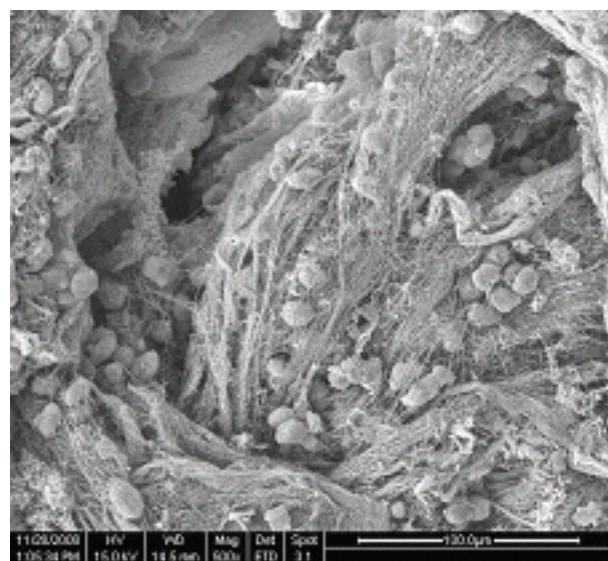


圖-7 肝球小體之電子顯微鏡觀察

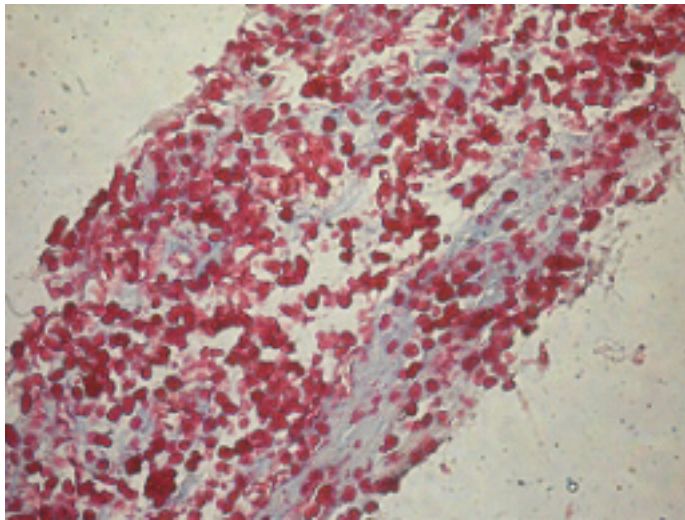


圖-8 肝球小體之組織切片，藍色部份顯示肝細胞所分泌之膠原蛋白，紅色部份為肝細胞。

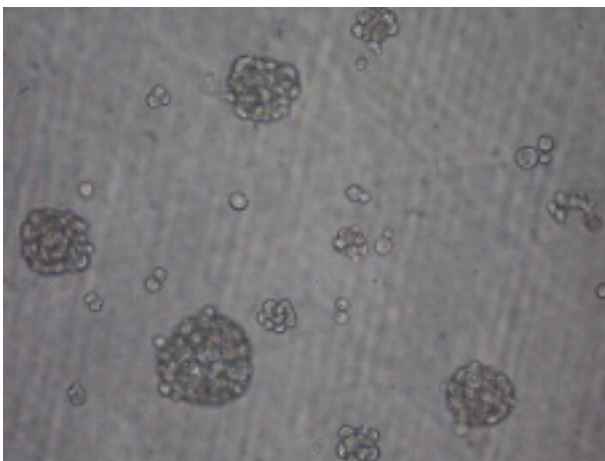


圖-9 添加第二型膠原蛋白奈米微粒於生物反應器共培養2天 所形成之軟骨細胞團塊

蛋白奈米微粒除能維軟骨細胞生長外，更可促進軟骨細胞分泌醣胺蛋白。

本研究探討添加膠原蛋白奈米微粒於培養基中對肝細胞及軟骨細胞之增生及功能表現之影響。於生物反應器系統中添加膠原蛋白奈米微粒能明顯提升肝細胞與軟骨細胞之MTT活性，亦能有效維持肝細胞分泌白蛋白及刺激軟骨細胞分泌醣胺蛋白等功能。另外，肝細胞與軟骨細胞在生物反應器中添加膠原蛋白奈米微粒培養後，能快速形成細胞團塊。

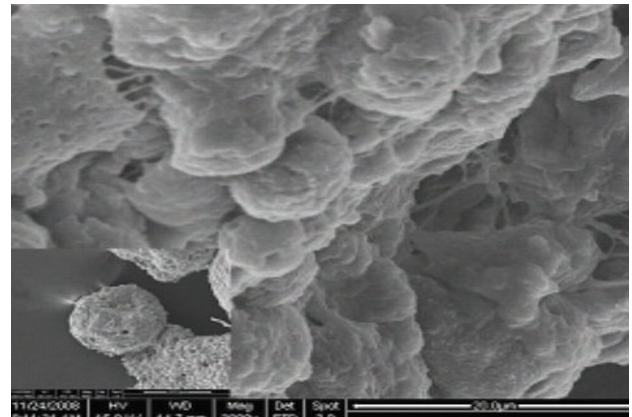


圖-10 軟骨細胞團塊之電子顯微鏡觀察

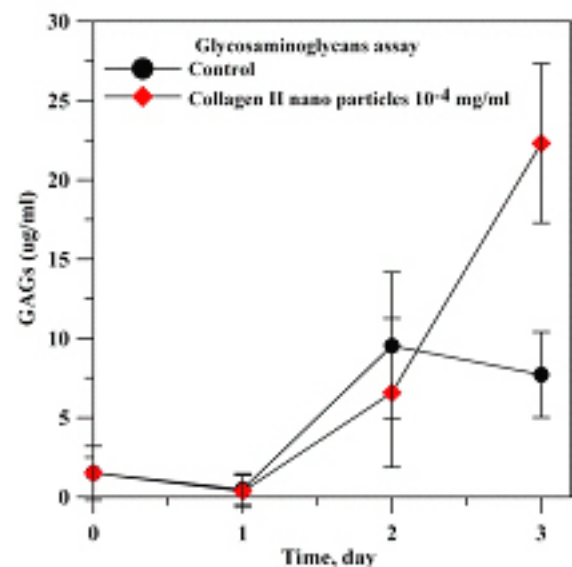


圖-11 添加第二型膠原蛋白奈米微粒與軟骨細胞共培養之醣胺蛋白分泌情形

討論

在本研究中所提出的構想係奠基於高壓電場系統製備膠原蛋白奈米微粒之技術，進一步拓展至其他生物分子奈米構形製備方法之建立。另外，並假設奈米構形之生物分子較易與細胞膜上之受體接近且與之結合，進而啟動後續之訊息傳遞系統及細胞生理反應。若此一假設獲得證實，則可對奈米構形生物分子於細胞培養及組織工程上之開發另一應用潛力。是以，此研究對於生物科技與市場上的需求當能有所貢獻並提供嶄新之思考模式及應用潛力。以膠原蛋白奈米微粒製

備技術，延伸至其他生物分子之奈米構形(含微粒形與纖維形)製備，相繼共同探討此奈米構形生物分子於其他細胞之培養上之應用。朝向改良或增進市售生物反應器於細胞大量增殖之功效上思考。建立省時、省力之細胞培養模式，對日後之組織工程發展上當能貢獻些許之助益。

參考文獻

1. Ruiyun Zhanga nd Peter X. Ma, “Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with pre-designed macroporous architectures”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(2): 430-438, 2000.
2. C. H. Lee, Y. J. Wang, S. M. Kuo and S. J. Chang, “Microencapsulation of parathyroid tissue with photosensitive poly(l-lysine) and short chain alginate-co-MPEG”, *Artificial Organs*, 28(6): 537-542, 2004.
3. S. J. Chang, G. C. C. Niu, S. M. Kuo, C. C. Ho and M. S. Bair, “Preparation of Nano-Sized Particles from Collagen II by a High-Voltage Electrostatic Field System”, *Nanobiotechnology*, 153(1): 1-6, 2006.
4. Laurence Besseau, Bernard Coulomb, Corinne Lebreton-Decoster and Marie-Madeleine Giraud-Guille, “Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture”, *Biomaterials*, 23: 27-36, 2002.
5. S. M. Kuo, S. J. Chang, L. C. Lin and C. J. Chen, “Evaluating chitosan/ β -tricalcium phosphate/poly(methyl methacrylate) cement composites as bone-repairing materials”, *Journal of Applied Polymer Science*, 89(14): 3897-3904, 2003.
6. L. C. Lin, S. J. Chang, S. M. Luo, G. C. C. Niu, H. K. Keng and P. H. Tsai, “Preparation and Evaluation of β -TCP /Polylactide Microspheres as Osteogenesis Materials”, *Journal of Applied Polymer Science*, 108(5): 3210-3217, 2008.
7. S. J. Chang, G. C. C. Niu, S. M. Kuo and S. F. Chen, “Preparation and Preliminary Characterization of Concentric of Multi-Walled Chitosan Microspheres”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81A(3): 554-566, 2007.
8. Hideki Murakami, Masao Kobayashi, Hirofumi Takeuchi and Yoshiaki Kawashima, “Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles”, *Powder Technology*, 107: 137-143, 2000.
9. X. Y. Guo, J. E. Gough, P. Xiao, J. Liu and Z. J. Shen, “Fabrication of nanostructured hydroxyapatite and analysis of human osteoblastic cellular response”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82A(4): 1022-1032, 2007.
10. S. M. Kuo, G. C. C. Niu, S. J. Chang, C. H. Kuo and M. S. Bair, “A one-step method for fabricating chitosan microspheres”, *Journal of Applied polymer science*, 94(5): 2150-2157, 2004.



Back

構築奈米級生物分子於軟骨修復之應用

張淑真 郭士民 江敏瑜 閻思尹

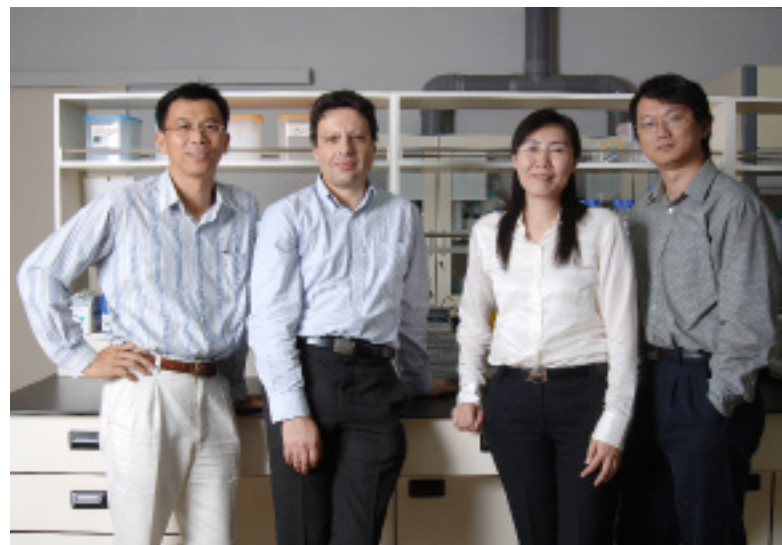
義守大學生物醫學工程系

摘要

將帶有人工培養的活性細胞或組織等移植到體內，使受損的人體臟器或組織再生，進而恢復健康之醫療策略，是目前組織工程研究中受到矚目的方向之一。然而，細胞培養成功與否實是此之關鍵所在。藉助於生物學及化學相關知識、技術之進展，設計製備嶄新的生醫材料做為細胞之生長基材並觸發細胞相關之生理特定功能遂得以蓬勃發展。對於吸附性細胞而言，此一人工生長基材之效能將取決於固定於基材表面配體之生物及理化特性。藉由特定生物分子與細胞膜上受器之辨識及專一性結合，可引發一連串之訊息傳遞，進而啟動基因表現以調控細胞的生長、趨向與分化。細胞外基質包含許多不同的分子，其中最重要的屬膠原蛋白，細胞經由整合素附著於膠原蛋白上時，會誘導細胞增殖、生長分化與凋亡等重要的細胞反應，因此膠原蛋白於細胞增生上可扮演一重要的角色。第二型膠原蛋白為軟骨組織細胞外間質之主要成分，軟骨細胞於膠原蛋白基材上亦可維持良好之生長效果及功能表現，且本實驗室先前已成功利用高壓電場製備出之第二型膠原蛋白奈米微粒，是以，本研究擬以此項技術為基礎，開發第二

型膠原蛋白奈米構形分子，並探討其與軟骨細胞上整合素之結合情形，企圖瞭解其對FAK磷酸化之影響。研究結果顯示，利用高壓電場已可製備出第二型膠原蛋白奈米微粒；由MTT細胞活性測試結果顯示，第二型膠原蛋白奈米微粒對軟骨細胞於增生上扮演重要角色，且軟骨細胞與奈米微粒共同培養後可維持其正常球狀之細胞型態。

關鍵詞：奈米微粒、膠原蛋白、軟骨細胞培養、組織工程



（由左至右）郭士民教授、馬亞尼教授，張淑真教授、藍正文教授

前言與目的

膠原蛋白是哺乳動物結締組織中含量最爲豐富之結構性蛋白質，於生理環境中會自行重組排列組成纖維狀。膠原蛋白目前已廣泛應用於藥物運送或細胞培養的載體。然而多數的研究是以三維結構的膠原蛋白基材，做爲細胞培養的載體進行研究探討。因此製備新穎的奈米級膠原蛋白做爲細胞之生長基材，並觸發與細胞相關之生理特定功能是極具潛力的研究方向之一。

微粒/奈米微粒具優異之表面積/體積比及易擴散、可預測質傳行爲之優點。而當微粒爲奈米級時，則會產生不同於毫米級微粒之獨特物性及化性。鑑於奈米微粒具有優異表面積/體積比及擴散性佳等特點，形式上之應用也較無限制，所以各領域上具有極大之應用潛力。製備奈米微粒方式有化學氣相沉積法、交聯法及乳化法等，但其製得之微粒大多有均圓度不佳、粒徑大小不一或粒徑偏大等問題。本實驗室先前已成功利用高壓電場製備出膠原蛋白奈米微粒，是以，本研究利用高壓電場系統所製備出之奈米級第二型膠原蛋白微粒分子，探討其對軟骨細胞培養之影響。

膠原蛋白爲現今組織工程中最常使用作爲支架的生醫材料之一，而近來於組織工程中缺損的治療包括自體細胞植入可吸收的支架並促進缺損部位的組織再生被廣爲研究。於製備細胞載體作爲植入物時的一個關鍵參數爲培養基材型式（其中多以海綿形式）。於細胞培養過程中通常會於培養基中添加包括血清或生長因子來供給細胞生長時養分，並評估這些要素對於細胞培養時之細胞遷移、生長或分化等行爲，然而，基材型式、

細胞來源及生長因子的使用於培養過程中也都會影響細胞行爲；此外，生長因子普遍價格昂貴，其作用時間短且細胞相關反應與生長因子劑量有關。

是以，本研究的主要目的即是在不添加生長因子，以平面培養及三維的生物反應器培養兩種不同培養條件下，探討添加具奈米結構的第二型膠原蛋白分子(纖維、微粒)對軟骨細胞培養之影響，以瞭解此奈米生物分子構形與細胞整合蛋白之結合模式與其對FAK磷酸化之影響，並進一步探討其對軟骨細胞培養過程中細胞型態維持及特定生理功能表現之裨益。

研究方法

1. 初代軟骨細胞分離培養

準備數隻一個月大幼兔，以過量之KCl於心臟注射犧牲後，將其膝關節軟骨切丁取下，浸泡於pronase E (2mg/ml)反應2小時將proteoglycans溶解後改浸入collagenase II(2mg/ml)反應3小時將膠原蛋白纖維分解，此時軟骨細胞會被釋放於溶液中，將此collagenase solution 以1500rpm離心10分鐘後，移除上澄清液並以F-12 medium(10%胎牛血清，200 U/mL 抗生素(penicillin/streptomycin)) 將沉澱物混合均勻後分注至75T flask 培養。軟骨細胞每天以PBS清洗數次後更換新的F-12 medium，待細胞培養至第二代後立即進行細胞實驗。

2. 膠原蛋白奈米構形之製備

研究中所使用之膠原蛋白奈米微粒主要係由高壓電場方式製備而得。藉由各項製備條件及參數之設定，製得不同形態及尺寸大小之膠原蛋白奈米微粒供本研究使用。

穿透式電子顯微鏡是現今少數可以觀察奈米尺度的儀器之一，於本實驗所製備

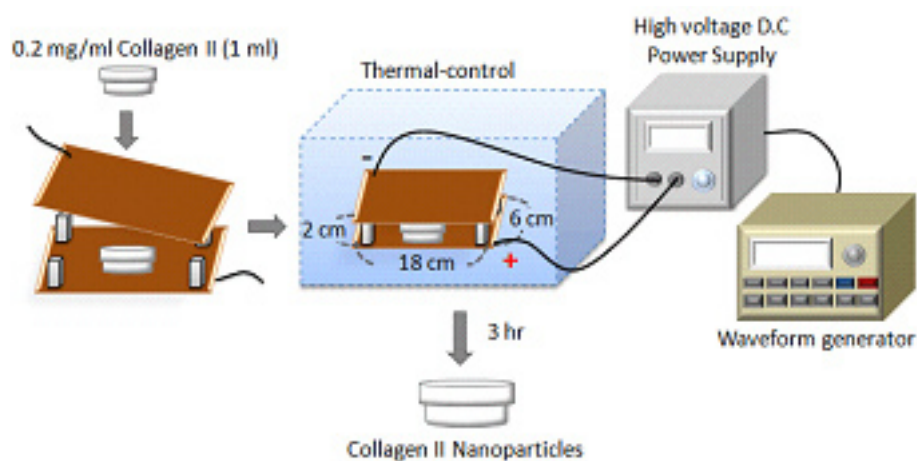


圖-1. 高壓電場製備第二型膠原蛋白奈米微粒示意圖

之膠原蛋白奈米微粒，須經由穿透式電子顯微鏡的觀察以評估其微粒大小及尺寸分布。在本實驗中，主要是利用負染色的方式將膠原蛋白奈米微粒於TEM 銅網上顯現以證實其存在。將含有膠原蛋白奈米微粒之溶液滴於覆有formam膜的TEM銅網上，並以2% Tungstophosphoric acid hydrate進行負染色後乾燥以穿透式電子顯微鏡(Philip CM-200)觀察。

3. 軟骨細胞與奈米微粒之結合培養

將軟骨細胞培養至第一代後，以0.25%的trypsin溶液將軟骨細胞分離至15ml離管內，分別以細胞密度 5×10^4 cells/ml分裝至兩組條件，控制組以F-12 medium培養，實驗組則分別再添加 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 與 10^{-5} mg/ml的第二型膠原蛋白奈米微粒，並於50 ml離管內結合培養3小時，而實驗將分成靜態培養與動態培養，靜態培養在結合培養3小時後將含有細胞與奈米微粒之培養液置入24孔培養盤中培養；而動態培養則於3小時後將含有細胞與奈米微粒之培養液置入攪拌式生物反應器中，攪拌式生物反應器之轉速約為15rpm。靜態與動態培養皆於每日取出適量培養液進行MTT測試及glycosaminoglycan含量測定。

4. 軟骨細胞生長測試

MTT 細胞活性分析法之步驟簡述如下：自懸浮攪拌培養瓶中取出軟骨細胞與第二型膠原蛋白奈米微粒混合培養液取樣1ml，離心後移除上澄清液並加入1 mL含MTT之新鮮培養液(0.5 mg MTT/mL)，置於37°C之培養箱內反應三個小時。移除未反應含有MTT之培養液後，添加500 μ L DMSO，使用vortex 震盪至紫色顆粒溶解為止。取200 μ L溶有formazan之DMSO於酵素免疫分析儀下，於波長570 nm下測量其吸光值，參考波長為650 nm。

5. Glycosaminoglycan染色

軟骨細胞於培養過程中所分泌之glycosaminoglycan利用Alcian blue染色，其步驟簡述如下：將培養後之樣品以pH為1.0、0.1N之鹽酸潤洗數次後，以Alcian blue(Sigma)染色十分鐘，最後再以pH為1.0、0.1N之鹽酸洗去未反應之染劑。

結果

本研究已成功利用高壓電場製備出第二型膠原蛋白奈米微粒，其製備流程如圖1，透過改變高壓電場中如電壓、電極板間距等參數製備出最佳化之膠原蛋白奈米微粒。經高壓電場製備出之第二型膠原蛋白奈米微粒如

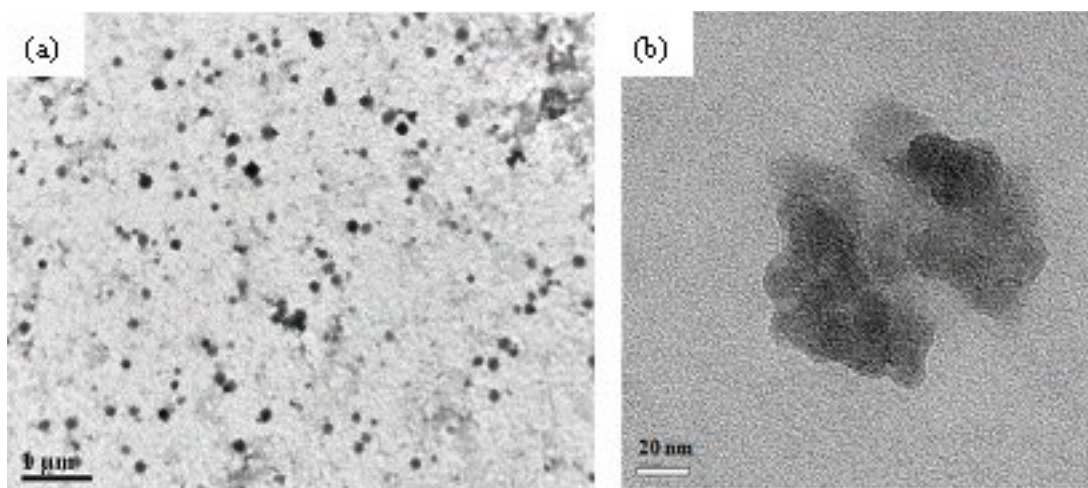


圖-2 第二型膠原蛋白奈米微粒於穿透式電子顯微鏡下之觀察 (a) 低倍率; (b)高倍率

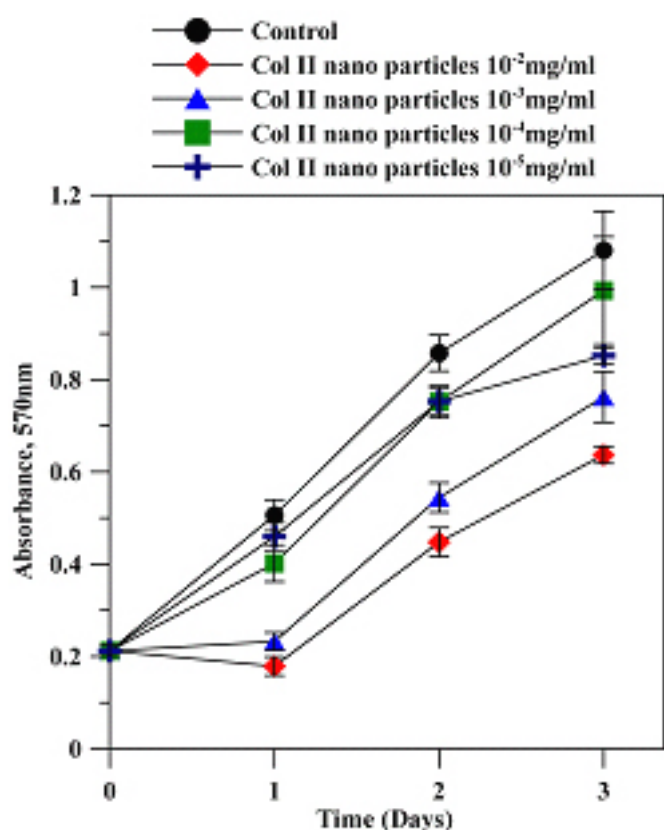


圖-3. 第二型膠原蛋白奈米微粒與軟骨細胞於靜態培養之MTT結果

圖2，將溫度控制為24℃，電場強度為5.4-9 kVcm⁻¹，可發現膠原蛋白單體有聚集在一起形成圓球狀，且實驗結果顯示高壓電場製備之第二型膠原蛋白奈米微粒其均圓度較第一型膠原蛋白奈米微粒佳，其原因可能在於第二型膠原蛋白由三條相同結構之 $\alpha 1$ 所構成。

軟骨細胞與膠原蛋白奈米微粒培養後之增生活性與細胞功能分析利用MTT測試與Alcian blue對醣胺蛋白染色作為探討依據。於靜態培養結果發現，濃度為10⁻⁴ mg/ml之膠原蛋白奈米微粒相較於其他濃度對於軟骨細胞之增生活性較佳(如圖3)，於Alcian blue染色結果顯示(如圖4)，添加第二型膠原蛋白奈米微粒培養之軟骨細胞其於醣胺蛋白分泌有顯著的增加，而濃度越高的第二型膠原蛋白奈米微粒培養之軟骨細胞則可促進醣胺蛋白的分泌。

由靜態培養結果可歸納出，於細胞增生活性方面，濃度10⁻⁴ mg/ml之膠原蛋白奈米微粒有較佳的結果；於細胞生理功能方面，濃度為10⁻² mg/ml之膠原蛋白奈米微粒則有較佳的結果，因此動態培養時選定此二條件與控制組作培養軟骨細胞之比較。於動態培養結果顯示，軟骨細胞經由攪拌式懸浮培養後可形成均圓度佳的細胞團塊(如圖5)，而添加濃度越高的膠原蛋白奈米微粒(10⁻² mg/ml)其培養三天後之細胞團塊較大且較多，其細胞團塊可達2 mm，經SEM觀察細胞團塊可發現軟骨細胞間透過其所分泌之細胞外基質彼此連結聚集在一起形成團塊(如圖6)。

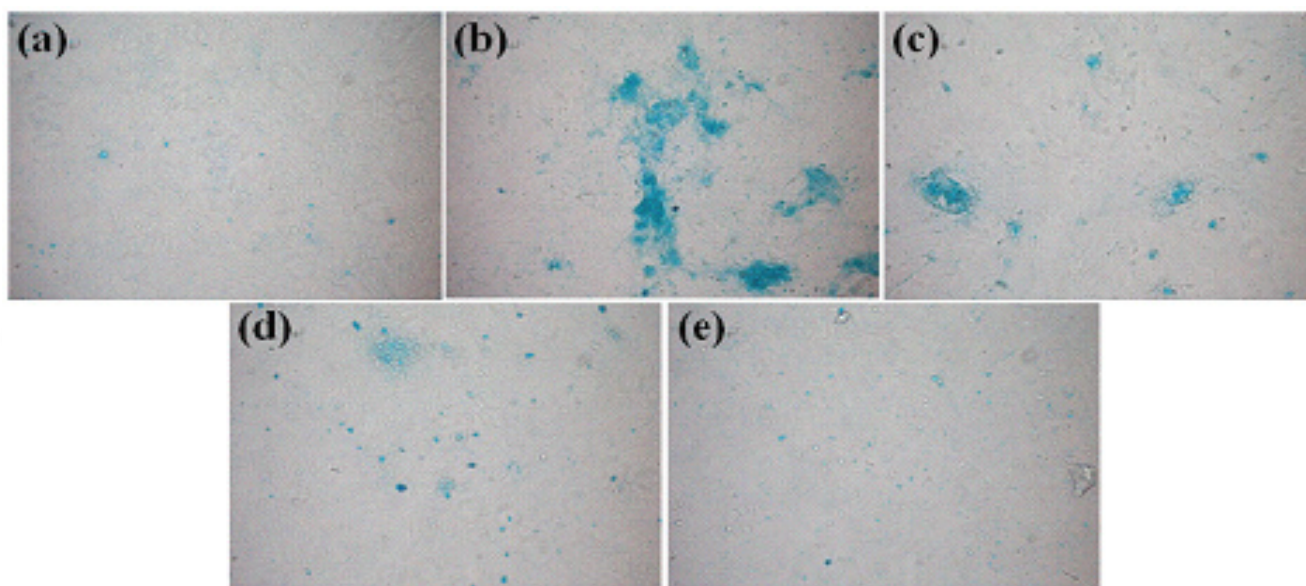


圖-4. 軟骨細胞與第二型膠原蛋白奈米微粒靜態培養之Alcian blue染色結果，(a) Control (150 X). (b) 添加膠原蛋白奈米微粒濃度 10^{-2} mg/ml. (c) 10^{-3} mg/ml. (d) 10^{-4} mg/ml. (e) 10^{-5} mg/ml.

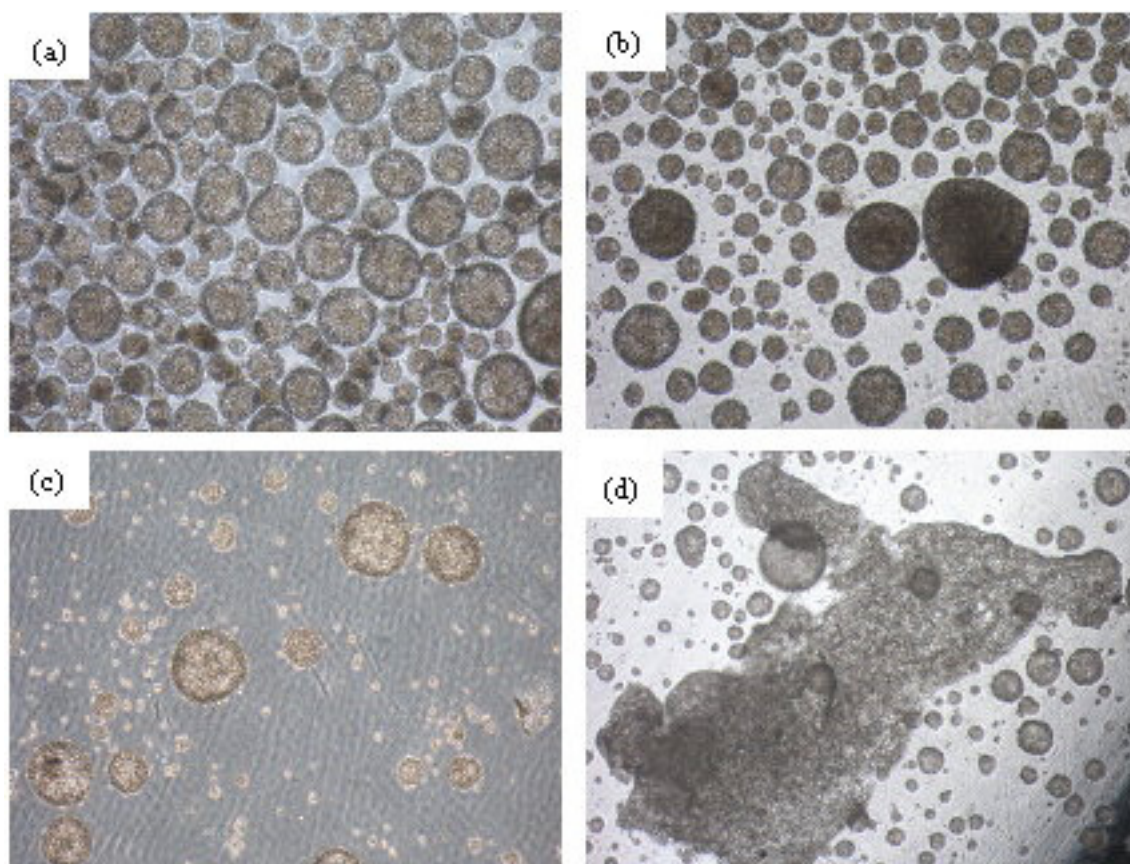


圖-5. 軟骨細胞與膠原蛋白奈米微粒於攪拌式生物反應器中培養三天後形成之細胞團塊, (a), (b) 添加膠原蛋白奈米微粒濃度 10^{-2} mg/ml, (c), (d) 添加膠原蛋白奈米微粒濃度 10^{-4} mg/ml.

本實驗室先前已成功利用高壓電場製備出第一型與第二型膠原蛋白奈米微粒，膠原蛋白在施加高壓電場後會聚集在一起，形成一微粒型態。深入探討膠原蛋白奈米微粒成型機制，吾人假設在施加高壓電場後使得膠

原蛋白其三股螺旋結構分離成三條單獨的 α 鏈，三條 α 鏈再各自捲曲成奈米微粒或奈米分子。

軟骨細胞之初代分離所得之成熟軟骨細胞於培養時，其功能表現易受許多因素影

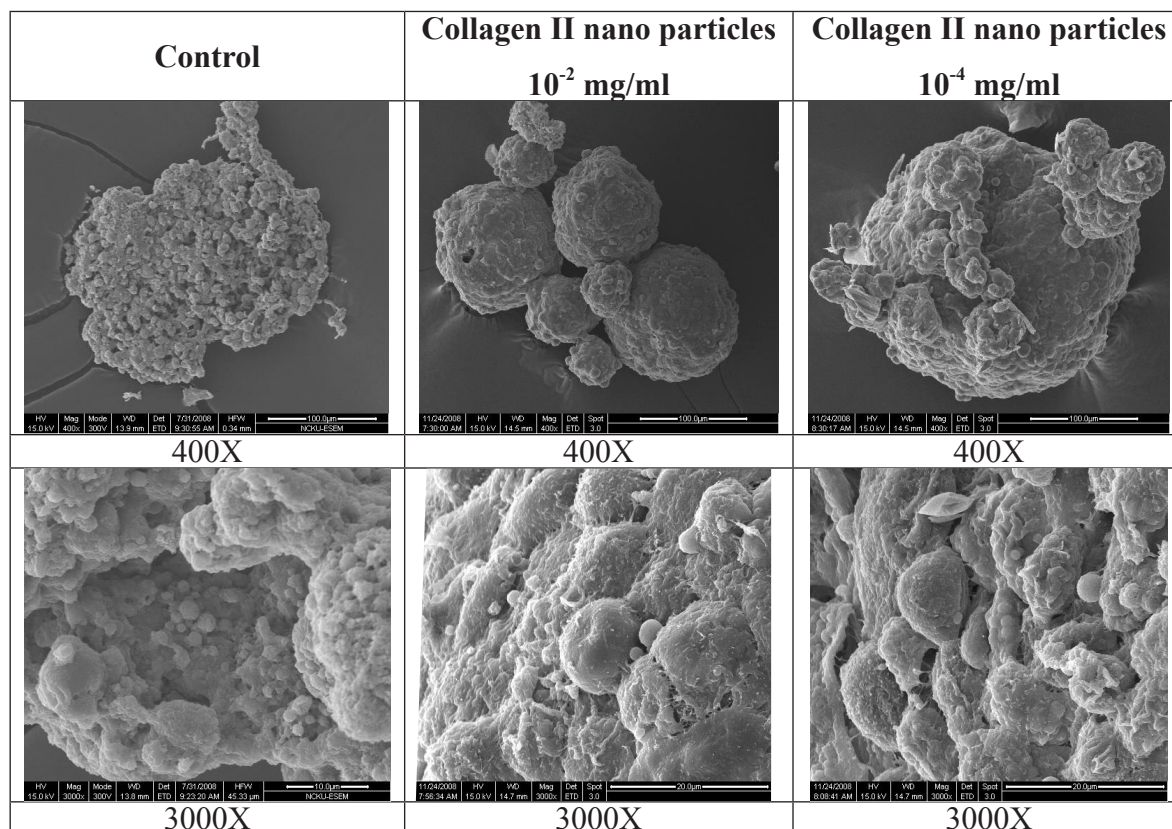


圖-6. 軟骨細胞團塊於掃描式電子顯微鏡下觀察

響，爲了維持軟骨細胞之正常功能表現，其長期體外培養模式廣被研究。一般來說，分離所得之成熟軟骨細胞培養於培養皿上會導致快速地展平，並降低其特定功能表現；相反地，軟骨細胞於攪拌式生物反應器內培養，彼此間會貼附在一起並形成球狀之細胞團塊。於本研究結果發現，軟骨細胞於攪拌式生物反應器內培養可於三天內形成細胞團塊，於SEM下觀察細胞團塊，軟骨細胞仍維持其原始正常型態，且發現軟骨細胞透過其所分泌之細胞外基質連結在一起，更重要的是軟骨細胞於生物反應器內培養可於三天內快速形成細胞團塊，最大可達2 mm。

結果與討論

軟骨細胞團塊的主要應用致力於生物人工關節裝置之研究，此裝置的成功與否取決於許多因素，如於長期培養過程中需維持軟骨細胞型態及功能，細胞團塊的快速成型與

供應。然而，相關未確認結果仍待進一步實驗證實，如膠原蛋白奈米分子與軟骨細胞相互間的影響機制及對軟骨細胞最有益之最適化的第二型膠原蛋白奈米微粒濃度也仍需被評估確認。

本研究已成功利用高壓電場製備出之第二型膠原蛋白奈米微粒，並進行其對軟骨細胞培養影響之探討。實驗結果顯示，於平面培養中 10^{-4} mg/ml第二型膠原蛋白奈米微粒相較於其他濃度 (10^{-2} mg/ml、 10^{-3} mg/ml及 10^{-5} mg/ml)軟骨細胞的增生活性影響較佳。而於生物反應器培養結果顯示，與第二型膠原蛋白奈米微粒共同培養之軟骨細胞，無論於細胞增生或是醣胺蛋白分泌含量皆較控制組佳；經SEM觀察結果顯示，將軟骨細胞利用攪拌式懸浮培養後，軟骨細胞間會透過其所分泌之細胞外基質連結聚集在一起，且軟骨細胞皆能維持其正常球狀之細胞型態。期望

藉由所製備出之第二型膠原蛋白奈米微粒，建立一個可行性之方法，將生醫材料的開發與臨床治療相互結合，並且將其應用於軟骨修復上。

參考文獻

1. Burgering BMT, Bos JL (1995) Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. Trends Biochem Sci 20:18-2
2. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. Clin Orthop Relat Res 1984;186:231-9.
3. Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT, Muir HI. Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. J Cell Sci 1995;108:1991-9.
4. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. J Cell Sci 1994;107:17-27.



Back

構築奈米級生物分子於肝細胞培養影響之研究

藍正文 張淑真 郭士民 馬亞尼 劉丁維

義守大學生物醫學工程系

摘要

本研究主要探討奈米級分子生物對於初代肝細胞培養於平面及生物反應器之裨益。初步結果顯示添加適量第一型膠原蛋白奈米構型分子對於肝細胞增生及生理功能皆優於控制組，肝細胞粒線體之功能於萃取後72小時後皆降低約50%，而添加膠原蛋白奈米構型分子可使肝細胞於10天後恢復至原始功能，且在平面培養上發現添加膠原蛋白奈米構型分子可有效維持肝細胞之白蛋白分泌能力。而在生物反應器系統中添加膠原蛋白奈米構型分子進行培養，可使肝細胞於五天內快速形成約5mm直徑之肝小球體，且在

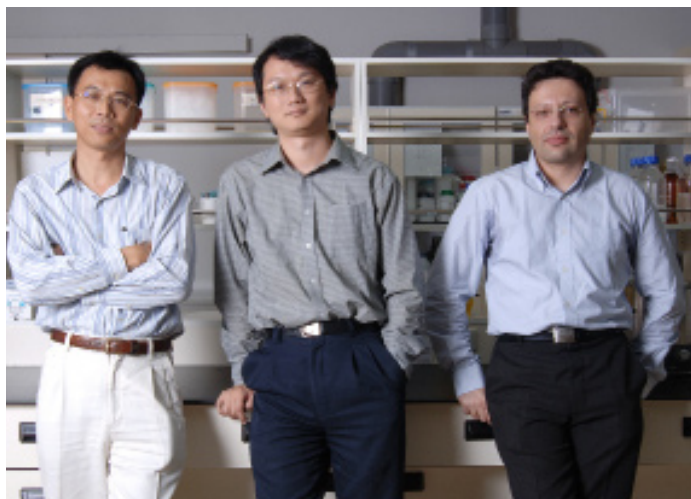
組織學及電子掃描式顯微鏡觀察下，肝小球體仍具其增生及良好之分化能力。

關鍵詞：奈米級生物分子、第一型膠原蛋白、肝細胞、生物反應器

前言

膠原蛋白為細胞外基質之主要成分，在生理環境中，膠原蛋白可自我聚集而形成纖維結構(或稱纖維化)。膠原蛋白在生醫材料領域被廣泛應用於載體製成，制放藥物、蛋白質、及基因等[1-3]，然而許多研究也著重於3-D膠原基材的製備以仿生式對細胞進行培養，結果皆顯示膠原蛋白基材可促進細胞體外培養之增生及分化能力[4]。然而，迄今膠原蛋白應用於生醫材料仍被受限於其纖維結構[5-7]，對於其研究多著重於巨觀型態上的製成。

至今，奈米材料的開發突破傳統材料之特性對於科學上的研究具舉足輕重之影響[8-11]，做為人工生長基材供吸附性細胞而言，其效能將取決於固定於基材表面配體之生物及理化特性。藉由特定生物分子與細胞膜上受器之辨識及專一性結合，可引發一連串之訊息傳遞，進而啟動基因表現以調控細



(由左至右) 郭士民教授、藍正文教授、馬亞尼教授

胞的生長、趨向與分化。因此藉由許多方法如乳化-脫水、乳化-分散及沉澱等[12-14]乾燥及脫水的製粉法[15,16]，皆有效改變生物性材料之尺寸，但生物性材料在製備上仍存有尺寸範圍無法控制、尺寸不均的難題。因此，本實驗室針對奈米材製備之研製，經設計架構出高壓電場系統，利用控制電場強度、環境溫度及膠原蛋白之濃度，則可有效將膠原蛋白製備成奈米微粒構型[17]。而為解決肝細胞在體外培養增生不易及功能性維持之困難，本研究主要評估添加第一型膠原蛋白奈米構型微粒，取代生長因子的應用，在平面及生物反應器培養中加入適量之膠原蛋白奈米構型微粒，來評估奈米構型之膠原蛋白對於肝細胞體外培養之裨益。

肝細胞萃取及培養

研究方法

本研究肝細胞分離法採用SD鼠係參照Seglen之二階段膠原蛋白酶灌流法。其步驟簡述如下：取七至九週大之大鼠麻醉後，於無菌條件下打開腹腔，並將靜脈留置針插入肝門靜脈。首先以含0.1%EDTA-Hank緩衝液做預灌流，以做灌流將血液及血球細胞沖出，灌流溫度保持於37℃。其次以含Hank緩衝溶液、0.5%膠原蛋白酶及鈣離子緩衝溶液(活化膠原蛋白酶)做第二階段灌流，邊灌流邊剪斷肝臟與周圍組織之連接，經細胞篩網過濾後短暫離心(500 rpm, 5mins)，拋棄上層懸浮液後取下層沉澱物即為肝細胞，經PBS反覆清洗離心以除去血球細胞及其他組織液得純化肝細胞。

膠原蛋白奈米構形之製備

本研究所使用之膠原蛋白奈米構形以高壓電場方式製備而得。其製備過程簡述如下：將已知濃度之膠原蛋白以磷酸緩衝溶液

分別稀釋成0.1 mg/ml濃度之膠原蛋白溶液，取1 mL膠原蛋白溶液加入塑膠皿中。將其放入規格為18 cm × 6 cm × 2 cm 之電場夾板，於7℃下以電場強度1.5kV/cm下反應一小時。反應完後將其取出約20μl滴入銅網，由1.5%磷鎢酸染色後，以穿透式電子顯微鏡觀察其微結構。

添加膠原蛋白奈米構型分子於肝細胞之培養

本實驗室為評估膠原蛋白奈米構型微粒對於肝細胞裨益，以平面及以生物反應培養方式做多項性之測試。平面培養：為達到膠原蛋白奈米構型微粒能有效結合肝細胞，採用添加不同濃度之膠原蛋白奈米構型微粒以肝細胞密度 10^4 cell/ml於離管內做前培養三小時，再注入24-well中進行貼附性培養測試(培養條件為37℃、5% CO₂)，而生物反應器之培養方式，則採用前處理後置入含一轉動軸之生物反應器中，而以同培養條件未添加膠原蛋白奈米構型微粒做為控制組。

肝細胞增生測試

MTT 細胞活性分析法之步驟簡述如下：將待測細胞樣本中的培養液吸除後，以PBS沖洗數次。加入1 mL 含MTT 之新鮮培養液(0.5 mg MTT/mL)，並置於37℃之培養箱內反應三個小時。移除未反應含有MTT 之培養液後，添加500 μL DMSO，使用vortex 震盪至紫色formazan 顆粒完成溶解為止。取200 μL 溶有formazan 之DMSO 於酵素免疫分析儀(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)下，於波長570 nm 下測量其吸光值，參考波長為650 nm。

白蛋白分泌量測定

白蛋白測試方式簡述如下：取細胞之培養液並於-20℃保存之，於收集至培養10天後

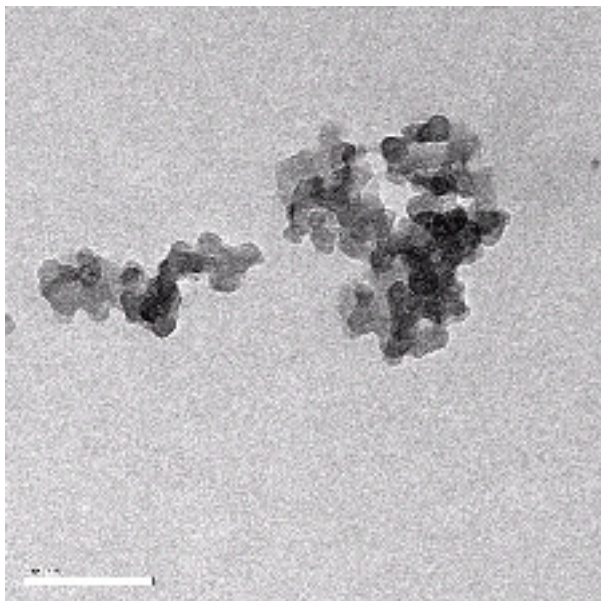


圖-1 第一型膠原蛋白奈米微粒

利用QuantiChrom™ BCP Albumin Assay kit來進行白蛋白鍵結成色，並使用ELISA於波長610nm下分析。

組織學觀察

組織學觀察主要針對經生物反應器培養後之肝小球體，取出部分以10%福馬林保存並以蟻酸進行去鈣化，藉由酒精梯度之脫水後進行石蠟的包埋，後以5 μm之厚度進行切片並以蘇木-曙紅及Masson氏染色後，以光學顯微鏡觀察，而部份肝小球體則分別以戊二醛及俄酸固定蛋白質及脂質後，經酒精低度之脫水處理，並以臨界點乾燥機使肝小球體完全去水，鍍金後以掃描式電子顯微鏡觀察。

結果

本實驗室利用高壓電場系統製備之第一型膠原蛋白奈米構型微粒如附圖(如圖-1所示)，可由TEM圖觀察到在本實驗室控制之條件下可成功製備出奈米構型膠原蛋白，而在其他條件則可發現其奈米構性不具完整性抑或無法成為微粒狀，而本實驗室測試在肝細胞培養條件下(37℃)，發現膠原蛋白奈米構並無奈米構型之破壞，而產生纖維化之現象。

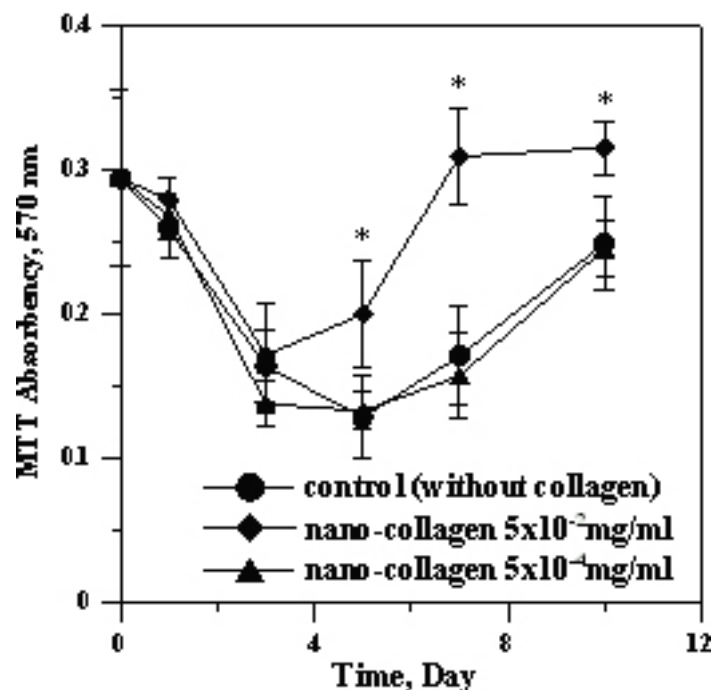


圖-2 添加第一型膠原蛋白奈米微粒於肝細胞共培養之細胞活性

本實驗室在添加第一型膠原蛋白對於肝細胞增生效益上，以MTT吸光值做一客觀之評估如附圖(如圖-2所示)。而在肝細胞功能維持上，則選做白蛋白之分泌量做一客觀評估(如圖-3所示)。MTT測試是以偵測粒線體中其琥珀磷酸酶之含量，來推測其細胞活性，白蛋白則是肝細胞所分泌之特異蛋白，若肝細胞失去其活性則無法分泌之。可發現由靜態培養結果上MTT值在萃取細胞至培養72小時後，添加膠原蛋白奈米構型微粒及控制組皆失去其50%活性，而在經10天培養後則發現添加高濃度之膠原蛋白奈米構型微粒可有效對細胞活性產生正向之影響，恢復至萃取時之活性。同樣地，該濃度之白蛋白表現量也優於控制組。而從以上結果得之，添加較高濃度之膠原蛋白奈米構型相較於控制組，對肝細胞培養上，具有促進活性及維持其生理功能之能力。

而在肝細胞於生物反應器之研究，本實驗室延續採用平面培養之結果，以高濃度第一型膠原蛋白奈米構型微粒添加於培養液中

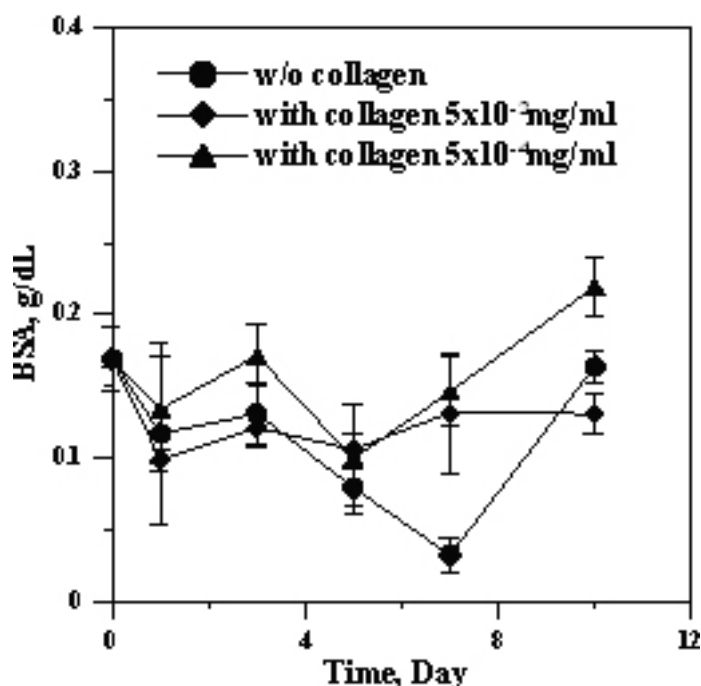


圖-3 添加第一型膠原蛋白奈米微粒於肝細胞共培養之白蛋白分泌變化

進行3-D式培養，研究發現，添加膠原蛋白奈米構型微粒，可有效地在五天内產生大量直徑約5mm之肝球小體如附圖(如圖-4所示)，而長時間培養下肝球小體之結構更趨完整，藉由組織切片的觀察如附圖(如圖-5所示)，可發現由蘇木-曙紅染色下，細胞質及細胞核呈現紅色，而藍色部分則是以Masson氏染色法針對膠原蛋白之呈色。發現肝球小體中皆具有膠原蛋白之存在，表肝球小體可能還具有分泌膠原蛋白之能力；而由SEM觀察下如附圖(如圖-6所示)，可發現肝球小體中具大量膠原蛋白纖維形成之可能性。

結果與討論

許多研究指出改變培養液成分(抑或添加不同化學物或生物分子)對於肝細胞體外培養之型態及生理功能上皆會有不同之效益，但迄今仍未發現能有效維持肝細胞於體內之生理功能之有效成分，而為克服此難題，本實驗是採用同於一般細胞之培養液，相同比例之血清濃度及抗生素，而以添加第一型膠原蛋白奈米構型微粒做為肝細胞培養的主要調



圖-4 肝細胞於生物反應器中培養五天後所產生長度約5 mm之肝球小體

控因子，膠原蛋白為肝組織細胞外間質之主要成分，是供細胞吸附之重要細胞外基質，與多種細胞的生長、分化、生理功能及基因表現有著密切的關係，亦含有RGD (Arg-Gly-Asp)及DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala)兩段特殊的胺基酸序列，可與細胞膜上之整合蛋白做專一性之結合，進而引發特定之訊息傳導途徑以調控細胞之分化及生理功能，例如整合蛋白，細胞吸附之行爲可藉由整合蛋白與其配體間親和力的改變調控之，是以整合蛋白親和力狀態之調控亦是其重要生理功能表現之一，故本實驗室以大量膠原蛋白吸附於肝細胞表面，進而啟動其特定訊息傳導途徑做為目的，以奈米等級之膠原蛋白做為啟動肝細胞功能訊息活化之鑰。而如何有效且長效維持肝細胞生理特性於體外環境之調控因素過於複雜，現今仍是肝再生研究之一大難題，體外培養多採用平面培養式來大量增生肝細胞，但肝細胞於平面培養將導致細胞骨架過於延展，經長時間的培養則會漸漸失去其特性，相對地，以生物反應器來培養大量肝細胞則漸漸的被研究，經生物反應器培養之肝細胞於體外藉由細胞間的連結，形成肝球小體，而本實驗式針對生物反應器培養肝細胞

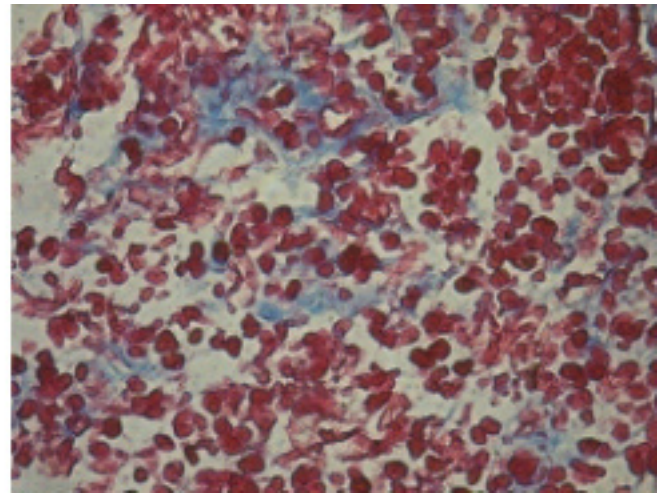
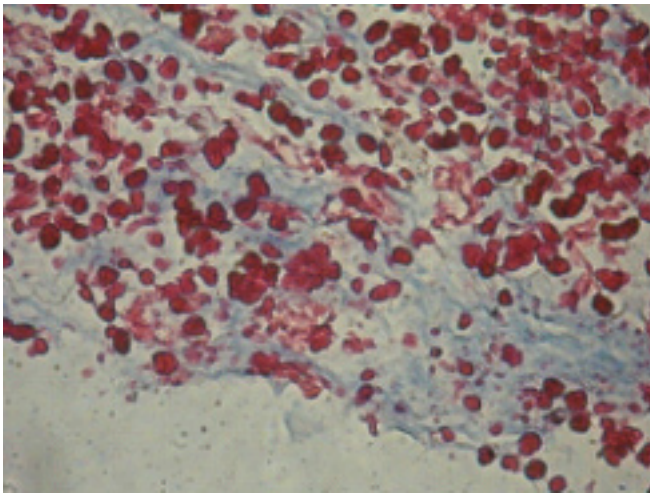


圖-5 肝球小體之組織切片，藍色部份顯示肝細胞所分泌之膠原蛋白，紅色部份為肝細胞

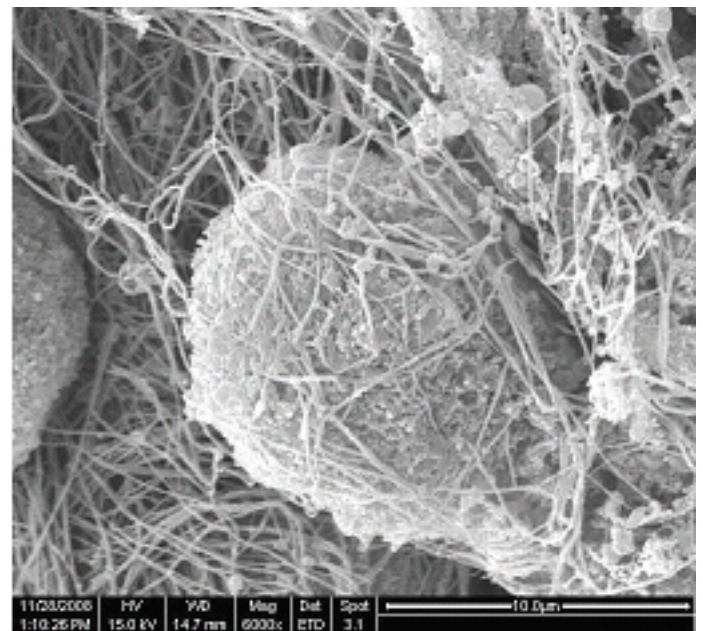
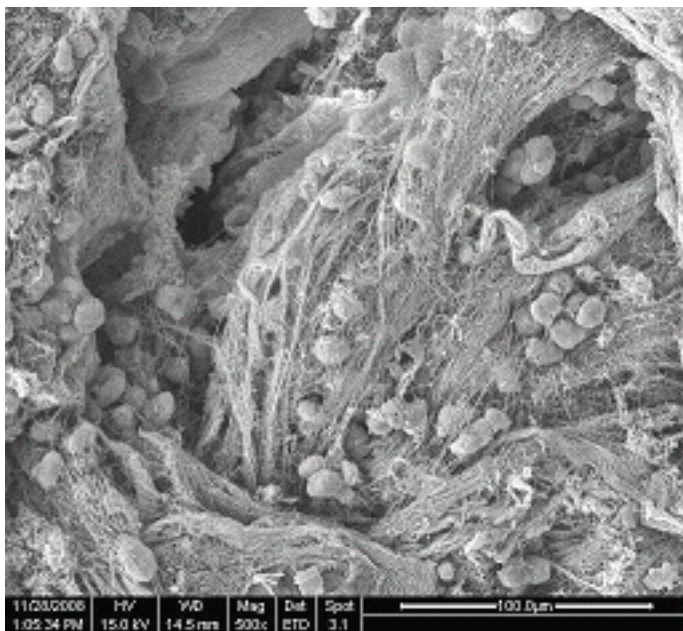


圖-6 肝球小體之電子顯微鏡觀察

已有多年經驗，藉由控制生物反應器之參數及第一型膠原蛋白奈米構型之添加，可於5天內快速得到直徑約5mm之肝球小體，遠比現今肝細胞研究之成果較快速(約在6天形成250 μ m之肝球小體)，且經由相關測試及型態的觀察，皆可呈現肝細胞功能之維持抑或增益。

然而現今肝再生的研究多在於生物性人工肝臟，於體外透析管中置入大量肝細胞，達廢物排除之功效甚至藉由體外獲得肝組織所分泌之生物分子，但如何保有體外肝細胞之生理功能則為一大難題，而在本研究中，添加第一型膠原蛋白奈米構型微粒不僅於短時

形成肝球小體外，在功能維持上亦有正向的效益，因此本研究將會深入討論及研究如何更有效益的形成小球小體外，對於如何肝細胞功能之有效維持投入更多心力，做為臨床應用之評估。

參考文獻

1. Jake A. Gilbert, Amanda E. Simpson, David E. Rudnick, Dayle H. Geroski, Thomas M. Aaberg and Henry F. Edelhauser, "Transscleral permeability and intraocular concentrations of cisplatin from a collagen matrix", Journal of Controlled Release, 89: 409–417, 2003.

2. H. P. Hsu, J. M. Zanella, S. M. Peckham and M. Spector, "Comparing ectopic bone growth induced by rhBMP-2 on an absorbable collagen sponge in rat and rabbit models", *Journal of Orthopaedic Research*, 24(8): 1660-1669, 2006.
3. J. Wang, I. L. Lee, W. S. Lim, S. M. Chia, H. Yu, K. W. Leong and H. Q. Mao, "Evaluation of collagen and methylated collagen as gene carriers", *International Journal of Pharmaceutics*, 279: 115-126, 2004.
4. Laurence Besseau, Bernard Coulomb, Corinne Lebreton-Decoster and Marie-Madeleine Giraud-Guille, "Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture", *Biomaterials*, 23: 27-36, 2002.
5. Robert B. Vernon, Michel D. Gooden, Stephanie L. Lara and Thomas N. Wight, "Native fibrillar collagen membranes of micron-scale and submicron thicknesses for cell support and perfusion", *Biomaterials*, 26: 1109-1117, 2005.
6. D. I. Zeugolis, R. G. Paul and G. Attenburrow, "Extruded collagen-polyethylene glycol fibers for tissue engineering applications", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 85B(2): 343-352, 2008.
7. Ruiyun Zhanga nd Peter X. Ma, "Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures", *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(2): 430-438, 2000.
8. C. H. Lee, Y. J. Wang, S. M. Kuo and S. J. Chang, "Microencapsulation of parathyroid tissue with photosensitive poly(l-lysine) and short chain alginate-co-MPEG", *Artificial Organs*, 28(6): 537-542, 2004.
9. S. M. Kuo, S. J. Chang, L. C. Lin and C. J. Chen, "Evaluating chitosan/ β -tricalcium phosphate/poly(methyl methacrylate) cement composites as bone-repairing materials", *Journal of Applied Polymer Science*, 89(14): 3897-3904, 2003.
10. L. C. Lin, S. J. Chang, S. M. Luo, G. C. C. Niu, H. K. Keng and P. H. Tsai, "Preparation and Evaluation of β -TCP /Polylactide Microspheres as Osteogenesis Materials", *Journal of Applied Polymer Science*, 108(5): 3210-3217, 2008.
11. S. J. Chang, G. C. C. Niu, S. M. Kuo and S. F. Chen, "Preparation and Preliminary Characterization of Concentric of Multi-Walled Chitosan Microspheres", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81A(3): 554-566, 2007.
12. Jayanth Panyam, Manisha M. Dali, Sanjeeb K. Sahoo, Wenxue Ma, Sudhir S. Chakravarthi, Gordon L. Amidon, Robert J. Levy and Vinod Labhasetwar, "Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles", *Journal of Controlled Release*, 92: 173-187, 2003.
13. Hideki Murakami, Masao Kobayashi, Hirofumi Takeuchi and Yoshiaki Kawashima, "Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles", *Powder Technology*, 107: 137-143, 2000.
14. X. Y. Guo, J. E. Gough, P. Xiao, J. Liu and Z. J. Shen, "Fabrication of nanostructured hydroxyapatite and analysis of human osteoblastic cellular response", *Journal of*

Biomedical Materials Research Part A, 82A(4): 1022-1032,2007.

15. S. H. Hong, D. W. Lee and B. K. Kim, “Manufacturing of aluminum flake powder from foil scrap by dry ball milling process”, Journal of Materials Processing Technology, 100: 105-109, 2000.

16. T. H. Hou, C. H. Su and W. L. Liu, “Parameters optimization of a nano-particle wet milling process using the Taguchi method, response surface method and genetic algorithm”, Powder Technology, 173: 153-162, 2007.

17. S. M. Kuo, G. C. C. Niu, S. J. Chang, C. H. Kuo and M. S. Bair, “A one-step method for fabricating chitosan microspheres”, Journal of Applied polymer science, 94(5): 2150-2157, 2004.



Back

從醫學看奈米材料

楊智惠

義守大學生物科技學系

本實驗室主要開發一系列奈米材料應用於智慧型藥物遞送系統(drug delivery system, DDS)。奈米材料具有生物體可分解及生物相容等特性，藉由劑型修飾可控制藥物在人體內的分佈及藥物釋放，進而達到增強藥效與降低藥物副作用的產生。

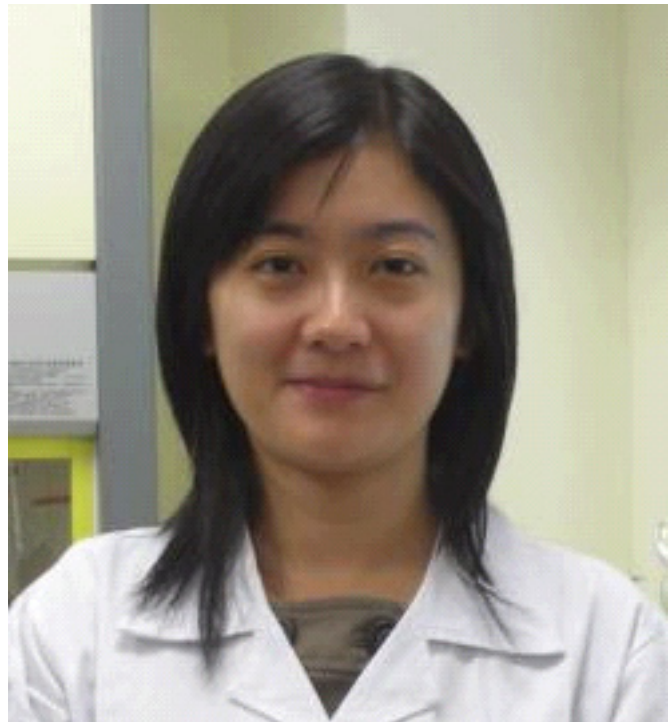
本實驗室目前開發作為智慧型藥物遞送系統之奈米材料有：

1. 奈米量子點 (quantum dots, QDs)：具有生物標籤功能及螢光標定特性，可應用於各種臨床前生醫檢測、細胞行為之觀察及腫瘤標定的研究上。
2. 磁奈米粒子(Fe_3O_4)：具有磁性標靶及磁導向功能，可應用在核磁共振技術及靶向性治療的研究上。
3. 金奈米粒子 (Gold nanomaterials)：具有光熱治療功能，可應用在標的腫瘤的研究上。

以下為各種奈米材料之介紹：

1. 量子點(quantum dots, QDs)：

量子點是二十一世紀奈米電子學最具有應用潛力的奈米材料，量子點是屬於奈米級的半導體材料，因其電子排列相當緊密，所以在外觀上像是一個極小的點狀物。量子點在吸收能量較高的光波後產生「能階躍升」，當電子從高能階的狀態降到低能階



楊智惠教授

的狀態時會發射出波長較長的光，像是偏紅色的光線。因此，不同粒徑的量子點會發射出不同波長的螢光(如圖-1)，例如硒化鎘(CdSe)粒徑在2.1 nm時會激發出藍色螢光，在粒徑5 nm時會發出綠色螢光，當粒徑增大接近10 nm時，則是會激發出接近紅色的螢光。量子點具有高螢光亮度、光穩定性及可用單一波長來激發出多種不同波長的發射波的特性。因此，當具高度特性的量子點與特定的DNA、抗體、胜肽、或生物分子結合時，便可發展出許多新穎的疾病檢測技術，亦可提供有效的藥物或核苷酸傳遞的即時與長期監控，以及針對特定胞器、腫瘤組織進



圖-1 不同粒徑的奈米量子點(CdSe/ZnS)之螢光圖

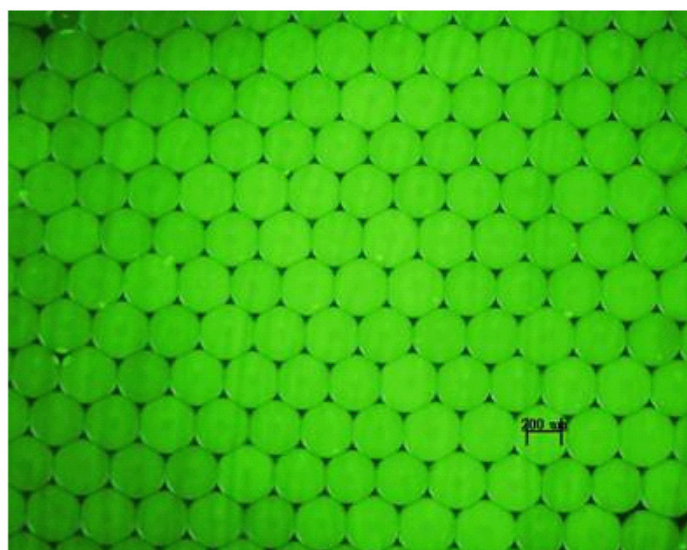
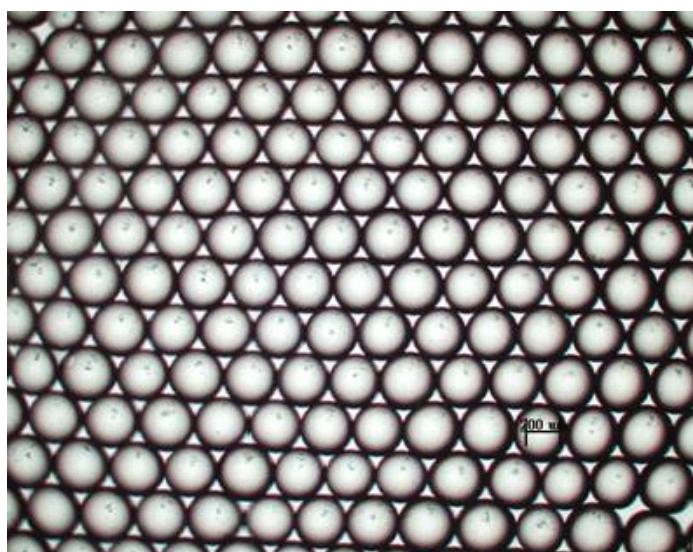


圖-2、均一化包覆QDs-PLGA微粒螢光呈色圖，(左圖) 明視野，(右圖) 暗視野。

行標定。

目前量子點的用途相當廣泛，在生醫學上可製成各種螢光標籤，應用於生物檢測的「螢光基因條碼」或「螢光蛋白質條碼」可用來編譯各種核酸或蛋白質的序列。圖-2為本實驗室製備具螢光特性之聚乳酸-聚甘醇酸共聚物藥物載體，並將此藥物載體噬入小鼠成骨細胞，成為智慧型藥物遞送系統(如圖-3)。

2. 磁奈米粒子(Fe_3O_4)之簡介：

本實驗室開發之磁奈米粒子具有超順磁作用，意指當奈米粒子尺寸小到一臨界值時，在各異向性能減少至可與熱轉動能相比擬，原子磁矩間不再相互作用，磁化方向就不再固定於一個易磁化方向，易磁化方向會

做不規律變化，結果即有超順磁性的出現。

不同種類的奈米磁性粒子所呈現的超順磁臨界尺寸是不相同的，由於超順磁性的特質，可避免在生物體內時未加磁場時粒子的聚集。本實驗室開發以磁場做導向及控制藥物釋放之智慧型藥物遞送系統為主。

圖-4為超順磁性氧化鐵粒子的基本架構，直徑為6~8奈米。顆粒大小不同將影響到其體內分佈特異性和磁性特性。磁奈米粒子在生物技術領域中可應用的範圍包括生物活性物質的修飾與固定化、生物活性物質的分離、生物活性物質與異生物毒素的偵測與檢定、細胞與胞器的修飾及偵測、磁感細菌的應用、藥物與放射性核種的標的、磁共振造影等應

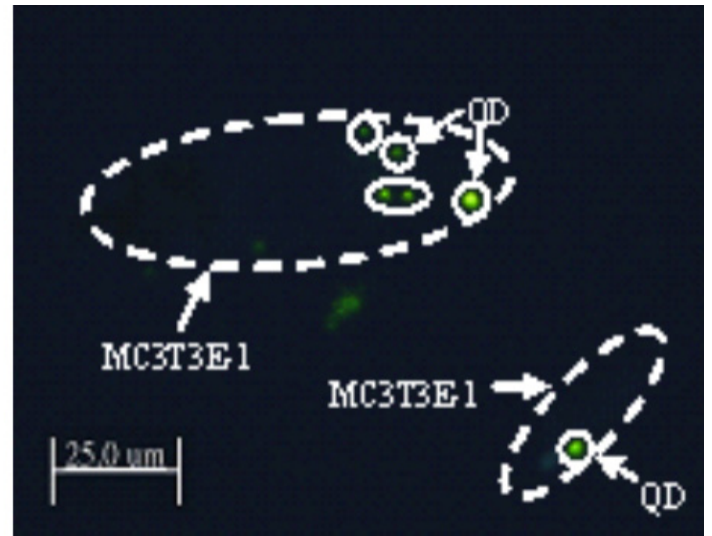
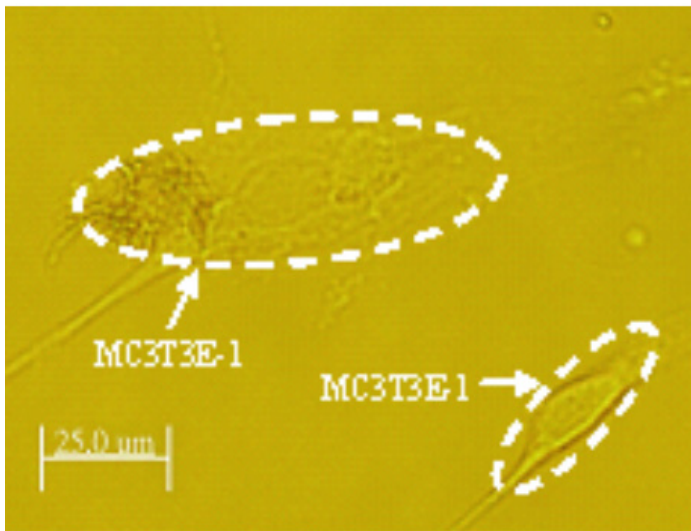


圖-3 聚乳酸-聚甘醇酸包覆奈米量子點微粒內噬入小鼠成骨細胞 的螢光顯微鏡圖(50X)，由圖中綠點可發現奈米微粒已被噬入細胞中(左圖) 明視野，(右圖) 暗視野。

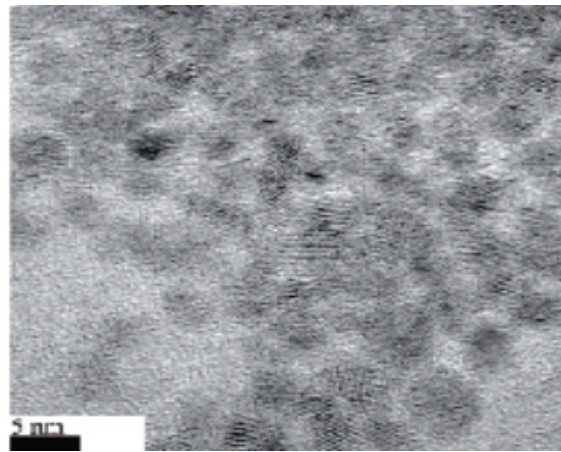
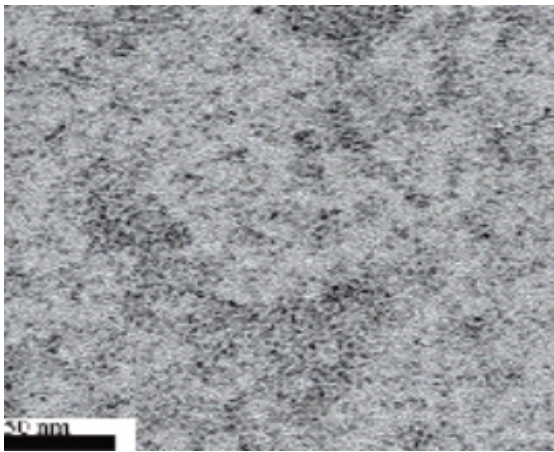


圖-4 本實驗室所製備之超順磁奈米粒子 Fe_3O_4 (於TEM下拍攝)。

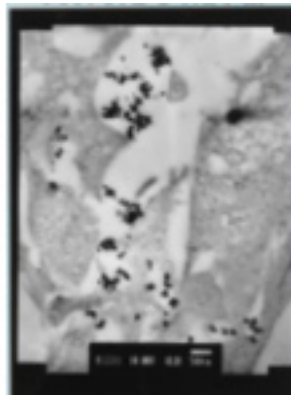
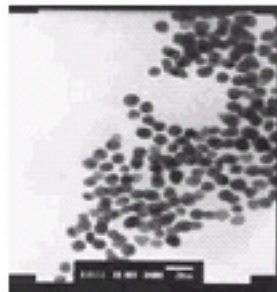
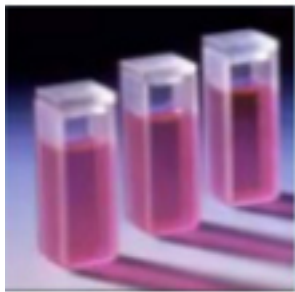


圖-4 (a)金奈米溶液成酒紅色。(b)為本實驗室所開發之金奈米材料

於TEM下之顯微觀測圖。(c)為金奈米噬入細胞之顯微鏡觀測圖。(4) 具有高生物相容性。

金奈米材料可應用於生醫學上之優點為：

- (1) 具有近紅外光區之吸收波峰，可減少皮膚組織的吸收干擾。
- (2) 屬光敏感材質且具有特殊的光學性質。
- (3) 容易進行表面修飾，使金奈米具有靶向性功能。

用。本實驗室開發的磁性標靶藥物能讓藥物準確到達欲作用部位，並減少對其它正常細胞及組織的傷害，可降低毒性與副作用。

3. 金奈米材料(Gold nanomaterials)之簡介：



Back

頸部食道重建所用之游離結腸與空腸腸瓣 在運動功能上之差異

陳宏基
義大醫院院長

前言

近年來，腸瓣 (intestinal flap) 廣泛運用於咽喉癌、食道癌等的重建手術上，此種重建只需單一階段的手術，術後併發症之比率明顯降低，且能加速吞嚥等功能的恢復，明顯優於以往傳統所使用的橈前臂皮瓣 (radial forearm flap)。至於組織瓣的選擇則端視外科醫師之訓練、經驗以及摘除後組織缺損之評估。相較於游離結腸瓣 (free colon flap)，空腸的小口徑通常需要端對端縫合 (end-to-side anastomosis) 或需要依照咽或食道形狀裁修；此外，游離空腸瓣 (free jejunal flap) 內生性的節律運動可能於吞嚥時造成攣縮或套疊 (intussusception)。相對地，游離結腸或迴結腸瓣 (free ileocolon flap) 就較無上述之問題。雖然如此，結腸的手術較易發生縫合處漏損及術後腸阻塞的情況。

以往對於空腸瓣在咽食道重建術後功能的評估通常是採用壓力測量 (manometry) 的方式來進行，然而此法只能提供很少的形態學資訊且病人接受度不高。而近年來，銻 (technetium-99m) 標記之放射性同位素食道造影術 (radionuclide esophageal scintigraphy) 已被證明是一種安全、非侵入性、可定量且敏



陳宏基院長

感的食道運動功能之評估方法。本研究利用此種造影技術評估接受空腸瓣或結腸瓣、迴結腸瓣做食道重建手術的患者，其腸瓣在運動功能上的差異性並與臨床上所觀察到的結果相對照。

實驗方法與結果概述

參與本實驗的受試者共有26位 (24位男性，2位女性)，平均年齡為55歲。其中接受空腸瓣重建手術的受試者共12位，結腸瓣1位，迴結腸瓣13位。本實驗係在獲得受試者的同意並經過本院人體試驗委員會的核可下進行。食道造影在重建手術完成後約10至11週進行。

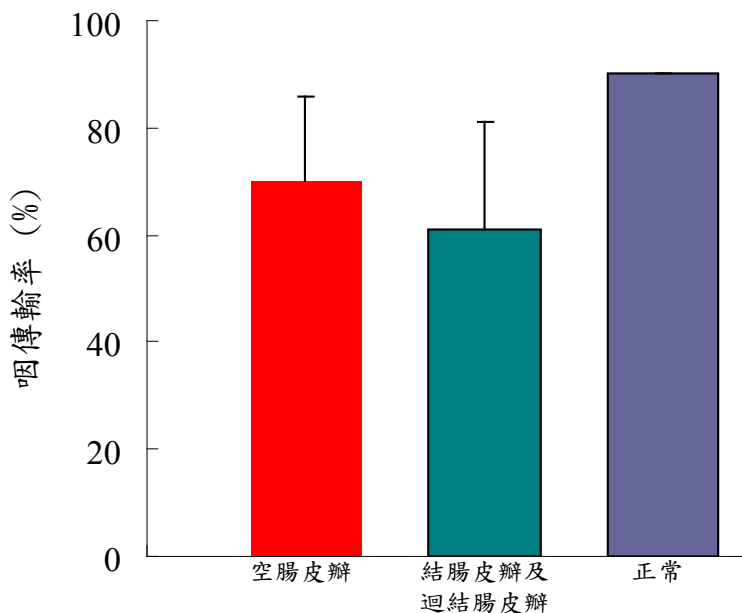


圖-1: 各組的咽傳輸率

本實驗之腸瓣均成功存活。食道傳輸掃描結果顯示空腸與結腸腸瓣兩組的平均起始咽清除率(initial pharyngeal clearance) 或稱咽傳輸率 (pharyngeal transit rate) 均如預期地顯著低於正常值 (結腸瓣或迴結腸瓣組為 $61 \pm 20\%$ ，空腸瓣組則為 $70 \pm 16\%$) (圖-1)，且兩種腸瓣都無法重現正常生理的吞嚥機轉。

在食道清除率 (esophageal clearance) 或稱咽傳輸率 (pharyngeal transit rate) 方面，兩組皆顯著低於正常值，但空腸瓣組明顯優於結腸瓣及迴結腸瓣組 (結腸瓣或迴結腸瓣組為 $50 \pm 27\%$ ，空腸瓣組則為 $69 \pm 17\%$) (圖-2)。

本實驗所觀察到的兩組瓣的差異也反映在臨床的復健治療結果上。兩組病患在吞嚥的復健過程上表現不同，空腸瓣組約在術後一個月可以進食半固體食物，一年後除兩位之外其餘的十位患者皆可進食固體食物；結腸瓣及迴結腸瓣組在復健過程中則進展緩慢，十四位患者當中有六位持續抱怨吞嚥困

難之問題，有些病患必須使鼻子閉塞才得以讓食物往下推進新的咽食道，因此他們的食物剛開始只能是液體，直到吞嚥功能慢慢進步後才轉為半固體及固體。

討論

游離空腸瓣自1958年首次由Seidenberg 及 Hurwitt 發表以來，目前已成為下咽重建的標準選擇，其成功率介於90%及100% 之間。空腸管狀的解剖構造、具有粘膜的內襯及較細薄的特性，使其成為理想的下咽部替代體。而當缺陷部位是始於位置較高的口咽部時，則首見於1992年Kawahara 等人所報告的游離迴結腸瓣是比游離空腸瓣為更佳的選擇，因為其口徑的大小比較適合且可以同時做聲音重建。如果與沒有活動力的皮瓣 (cutaneous flap) 或肌皮瓣 (musculocutaneous flap) 相比，空腸與結腸瓣在移植至新部位後仍能保有其內生性之活動力。當進食之後，空腸會產生節律性的分節式收縮 (segmentation contraction) 將腸腔的食物與消化液混合並加速吸收；結腸的分節式收縮不明顯，但具有順行性及逆

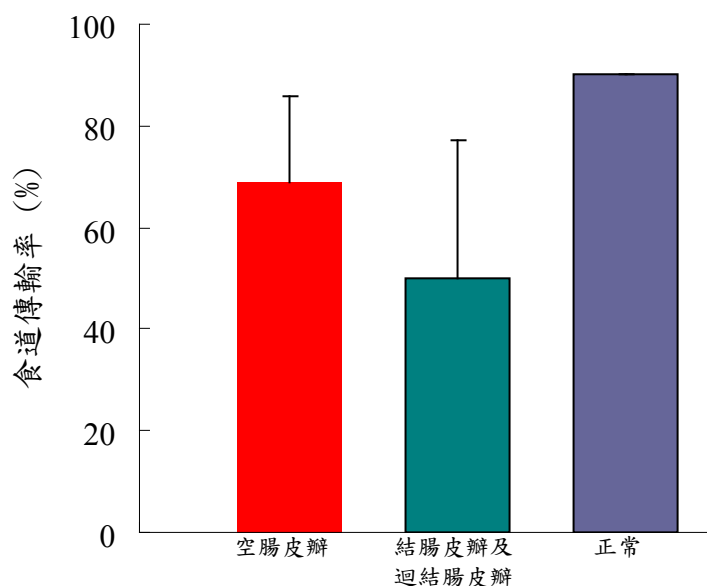


圖-2: 各組的食道傳輸率

行性的質塊運動 (mass movement)。此種內臟器官的活動方式不同於正常生理情況下的咽食道之活動方式，因此強而有力的空腸蠕動收縮或是緩慢的、間歇性的結腸收縮一直被認為是造成以空腸瓣及迴結腸瓣重建術後偶爾會有吞嚥困難 (dysphagia) 的可能原因。

利用壓力量測的評估方法發現空腸瓣較正常的食道具具有較長時間之收縮。雖然患者在吞嚥液體或固體食物時均無困難，放射學檢查則顯示病患在下部空腸接合處上方的口胃部之傳輸稍有延遲。在游離的空腸瓣上可以發現自發性的收縮情形，且不會因為吞嚥水而中斷，因此這可能是造成某些患者術後吞嚥困難的可能原因。而在替代食道的橫結腸之活動力的研究方面，Dantas及Mamede曾以壓力測定法測試十位病人，結果發現移植的結腸腸段通常不會收縮，但當吞嚥水時則該腸段會膨脹，而如果刺激夠大時則會產生收縮；水分的傳輸時間均延長，一半受試者發生吞嚥困難。此一觀察與本實驗結果相似，以其他實驗方法也得到類似的結果。

Smith 等人曾以放射學的方法在犬類進行實驗，比較食道重建的空腸及結腸瓣在功能上之差異。他們強調吞嚥會誘發空腸瓣的蠕動收縮，但此收縮無法與殘存的食道之收縮同步，因此形成“功能性的狹窄” (functional stenosis)。至於結腸瓣則無蠕動產生，但是當充滿液體食團時則會膨脹，排空時則產生收縮。他們的結論是結腸是功能性較自然的頸部食道替代體，因為其能使吞嚥動作整合得更自然。

在本實驗中，雖然兩組腸瓣表現不同的運動方式，但在起始咽清除率上並無差別，這可能是因為引發吞嚥動作最重要的因素是舌頭底部的推進力，而兩組病患的舌頭底部

皆有保留。去除喉頭將無法造成喉的上提及上食道括約肌的被動打開，因而影響口咽部的活動及吞嚥動作的咽食道期。本實驗發現兩組在吞嚥的第一期並無功能上的差異，顯見喉切除對下咽部重建的功能並不具有重要的影響力。這可能是因空腸已被證實在移植後仍保有其原有之收縮力，所以在重建的腸段能有較快的排空速率。而有關游離結腸及迴結腸瓣的收縮之研究較少，但一般認為結腸缺乏蠕動，只能視為一個被動的通道，因此排空速度較慢。這些臨床的結果與別的學者在先前所發表的相符，但不同於Smith 等人的結果。

基於上述之實驗結果，我們的結論如下：雖然空腸、結腸或迴結腸等腸瓣的吞嚥功能皆無法與正常一樣，但空腸瓣的食道清除率明顯優於其他腸瓣，因此在頸部食道的重建上，空腸瓣可說是最佳選擇。而結腸瓣或迴結腸瓣則適用於比較近端的口咽缺損之重建及同時需要聲音重建的情況下。



Back

義守大學、義大醫院近期活動

【研討會】

- 2009 International Conference on Environmental Quality Concern
Control and Conservation

會議日期：2009年5月22、23日

會議地點：義守大學（行政大樓-國際會議廳）

主辦單位：義守大學土木與生態工程學系

相關資訊：<http://www2.isu.edu.tw/upload/28/2/discovery/EQC.pdf>

- 2009電子工程技術研討會

會議日期：2009年6月19日

會議地點：義守大學（行政大樓-國際會議廳）

主辦單位：義守大學電子工程學系、義守大學通訊工程學系、義守大學RFID科技人才培育中心

議程及報名表等相關資訊請詳參網址：

http://www.isu.edu.tw/interface/overview.php?dept_mno=130

徵求論文，論文投稿日期：98年4月20日

- 2009資訊技術應用及管理研討會

會議日期：2009年6月20日

會議地點：義守大學（行政大樓-國際會議廳）

主辦單位：義守大學資工系，資管系

議程及報名表等相關資訊請詳參網址：<http://www.isu.edu.tw/itamc>

徵求論文，論文投稿日期：98年5月15日

【演講】

- 講題：中草藥之功能性基因體分析與新藥開發

主講人：鄭添祿 副教授（高雄醫學大學生物醫學暨環境生物學系）

日期：2009年4月1日

地點：燕巢分部教學大樓A0102

- 講題：品酒人生與品酒禮儀

主講人：張楊名 董事長（常瑞貿易有限公司）

日期：2009年4月7日

地點：義守大學行政大樓50916

- 講題：如何在義大醫院作好臨床研究－以食道癌為例

主講人：林肇堂 研究副院長（義大醫院胃腸肝膽科）

日期：2009年4月11日

地點：義大醫院六樓會議廳

- 講題：口腔癌細胞移轉作用之研究

主講人：陳逸夫 助理教授 助理教授（高雄醫學大學生物科技學系）

日期：2009年5月7日

地點：義大醫院六樓會議廳

- 講題：臨床醫師的實驗研究

主講人：陳維昭 特別顧問（義聯集團）

日期：2009年5月9日

地點：義大醫院六樓會議廳

- 講題：淺談日台關係與日本交流協會

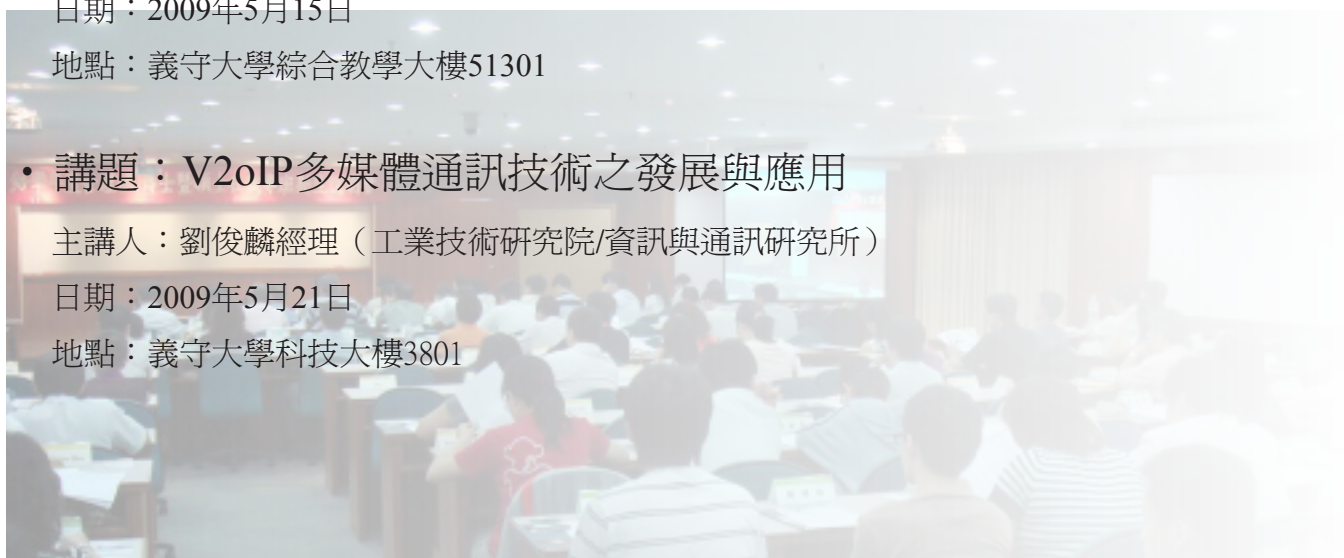
主講人：神戶浩道 所長（財團法人交流協會高雄事務所）

日期：2009年4月15日

地點：義守大學行政大樓50901



- 講題：Context-aware Computing and its applications
主講人：錢炳全教授（台南大學資訊工程學系）
日期：2009年4月16日
地點：義守大學科技大樓3801
- 講題：Bank Basics, Loan Loss Provision, Earnings Management and Its Impacts
主講人：沈中華教授（台灣大學財務金融學系）
日期：2009年4月17日
地點：義守大學綜合教學大樓51301
- 講題：多媒體技術與系統短期課程
主講人：郭宗杰 教授（美國南加州大學）
日期：2009年4月23日
地點：義守大學行政大樓10樓國際會議廳
相關資訊請詳見：<http://www.csie.isu.edu.tw/news/shortclass.htm>
- 講題：中日關係之回顧與展望
主講人：許水德 先生（台灣日本研究學會會長/中日文教基金會董事長）
日期：2009年5月6日
地點：義守大學行政大樓50901
- 講題：分析師預測與利益衝突關連
主講人：林修葳教授（台灣大學國際企業學系）
日期：2009年5月15日
地點：義守大學綜合教學大樓51301
- 講題：V2oIP多媒體通訊技術之發展與應用
主講人：劉俊麟經理（工業技術研究院/資訊與通訊研究所）
日期：2009年5月21日
地點：義守大學科技大樓3801



- 講題：新奇報告基因與蛋白酶之分子照影與醫學應用

主講人：鄭添祿 副教授（高雄醫學大學生物醫學暨環境生物學系）

日期：2009年5月21日

地點：義大醫院六樓會議廳

- 講題：日本語教育－國外的事例

主講人：桜井ちよこ 小姐（財團法人交流協會高雄事務所文化室）

日期：2009年5月27日

地點：義守大學行政大樓50901



Back

國科會消息

• 2010年台法(NSC-ANR)合作研究計畫

國科會與法國國家研究署(ANR)簽署雙邊科技合作協議，共同出資補助台法合作研究計畫，包括台法自由型合作計畫(Program BLANC)，以及台法健康技術團隊合作計畫(Program TecSan)等二類型。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年4月2日

• 98年度「節能減碳教育研究」整合型計畫(構想書已通過者)

為因應全球暖化與傳統化石能源日益枯竭的危機，因此，行政院將「節能減碳」列為國家重大施政方針。行政院國家科學委員會科學教育處以科學教育研究與推廣的機關角色與責任為出發點，特推動「節能減碳教育整合型研究計畫」（以下簡稱本計畫），鼓勵跨系、跨院或跨校之研究團隊與中小學或不同機關團體策略聯盟，提出至多三年期、單一整合型研究計畫，希望能對國內「節能減碳」文化的形成與未來能源與環境科技研究人才的培育盡力。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年4月30日

• 2010台拉立三邊共同合作計畫

國科會為推動國內學術發展暨促進與立陶宛及拉脫維亞之學術合作，於2000年與兩國教育科學部簽訂合作綱領，成立共同基金以補助三邊合作計畫，2010年度合作計畫即日起開始接受申請。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年5月31日

• 2010國科會與奧地利雙邊交流活動申請(雙邊研討會第二期)

國科會為加強與中歐國家之科技合作於1989年分別與瑞士科學基金會(The Swiss National Science Foundation, SNSF)以及奧地利國家科學基金會(The fonds zur Forderung der wissenschaftlichen orschung, FWF)簽署合作協議，並於2002年及2007年度與兩單位於工作會議中議訂以共同補助人員互訪、研討會或合作計畫方式啟動雙方合作。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年7月31日

- 行政院國家科學委員會與加拿大農業部2009年合作培訓博士後研究人員計畫

推動台加科技合作，國科會與加拿大農業部(AAFC)已簽定農業暨農業食品科學技術合作瞭解備忘錄進行研究人員互訪與研究生訓練；和發展合作研究計畫(CRPs)與活動，包括合辦科技研討會。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年7月31日

- 台加(NSC-NRC)博士生及博士後研究培訓計畫

鑒於NRC轄下單位研究成果卓著，尖端研究領域廣泛含蓋自然、工程及生物科技，國科會已與NRC簽署合作協定，同意選送我國相關領域博士生及博士後研究人員前往研習，可提昇我國新進研究人員素質及研究水準，亦有助於促進台加雙邊科技研究合作，國科會特於90年起進行NSC-NRC合作培訓博士生及博士後研究人員計畫。

國科會每年補助博士生5名(已修畢指定學科，具博士資格考試及格證明書之博士候選人)及博士後研究人員5名，至NRC所屬研究單位進行研究訪問。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年7月31日

- 98/99年國內博士班研究生赴德國短期研究【三明治計畫】

為提高國內博士班研究水準，促進台德學術交流，國科會特與德國學術交流總署(DAAD)簽訂合作協定，遴選我國國內博士候選人赴德國大學或研究機構短期研究進修。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年7月31日

- 補助赴國外從事博士後研究

行政院國家科學委員會為配合國家長期發展，鼓勵我國年輕優秀博士赴國外從事博士後研究以提升國際研究能力，汲取先進國家研發經驗。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年7月31日

- 補助博士生赴國外研究(千里馬計畫)

行政院國家科學委員會為配合國家長期科技發展需要，鼓勵國內公私立大學校院培育在校優秀博士生國際研究經驗，

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：2009年7月31日

- 2009年台美雙邊協議下「博士後及臨床醫學研究人員赴國外研究」計畫

國科會透過雙邊科技合作協議，主動遴選博士後及臨床醫學研究人員赴下述協議單位進行研究：1. The Scripps Research Institute (La Jolla, CA) 。2. The Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, Washington) 。3. California Institute of Technology (Pasadena, CA) 。4. Baylor College of Medicine (Houston, TX) 。5. The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center (Houston, TX) 。

訊息相關網址：<http://web1.nsc.gov.tw/>

計畫截止日：隨到隨審

產學合作

- 國科會「補助產學合作研究計畫」

整併原有的大產學、小產學及數位產學相關補助要點，並建構產業需求導向之產學合作模式，以整合運用研發資源，發揮大學及研究機構之研發力量，以期能透過產學的團隊合作與相互回饋的機制，提升國內科技研發的競爭力。分為「先導型」、「應用型」及「開發型」計畫。

訊息相關網址：

http://www.isu.edu.tw/interface/showdoc.php?dept_id=4&levelid=4473&dept_mno=27

計畫截止日：先導型、應用型產學合作計畫，申請日期為2009年3月至4月30日止。開發型產學合作計畫自2008年2月15日起，得隨時於預計開始執行之3個月前向國科會提出申請。

- 經濟部「學界開發產業技術計畫」TDPA --- 「在地型產業加值學界科專計畫」

基於政策推動延續性之考量，並因應在地產學合作之趨勢，經濟部技術處持續開放「在地型產業加值學界科專計畫」受理申請，期能利用學界研發能量扶植特定產業技術或帶動區域產業發展，強化產學合作之連結，達到以產助學、以學輔產之目的。

訊息相關網址：

http://www.isu.edu.tw/interface/showdoc.php?dept_id=4&levelid=5359&dept_mno=27

計畫截止日：自2008年1月1日起受理申請，視計畫收件及預算使用情形再公告截止收件日期。

- 經濟部「學界協助中小企業科技關懷計畫」

「學界協助中小企業科技關懷計畫」係依據行政院協助產業升級、促進台灣經濟發展，由經濟部技術處所規劃，金屬中心結合AITI等其他法人所共同推動之計畫，目的在導入學界豐沛研發能量進入產業，提升中小企業核心技術能量，強化產業競爭力並鼓勵中小企業投入研發並協助研提政府研發補助計畫，促進產業升級轉型。

訊息相關網址：<http://sita.stars.org.tw/>

計畫截止日：自2008年12月1日起受理申請，視計畫收件及預算使用情形再公告截止收件日期。

- 鼓勵中小企業開發新技術 – SBIR (經濟部技術處)

SBIR計畫就是「小型企業創新研發計畫(Small Business Innovation Research)」，它是經濟部為鼓勵國內中小企業加強創新技術或產品的研發，依據「經濟部促進企業開發產業技術辦法」所訂定的計畫，期望能以此協助國內中小企業創新研發，加速提升中小企業之產業競爭力，以迎接面臨之挑戰。

訊息相關網址：<http://www.sbir.org.tw/SBIR/Web/Default.aspx>

計畫截止日：計畫為政府持續推動與支持之計畫，廠商可隨時提出申請，並無特定的申請截止日期。

- 主導性新產品開發輔導計畫(經濟部工業局)

政府為鼓勵民營事業研究開發主導性新產品，發展高科技之新興產業，提升技術層次，調整工業結構，提高國際競爭力，促進經濟成長，依據行政院「加速製造業升級及投資方案」第三項措施「加速資本及技術密集工業之發展」，訂定「主導性新產品開發輔導辦法」，以提供研究開發補助經費方式，鼓勵國內新興高科技工業具有研究發展潛力之廠商，參與本項輔導計畫。

訊息相關網址：<http://leading.itnet.org.tw/index.php>

計畫截止日：計畫為政府持續推動與支持之計畫，廠商可隨時提出申請，並無特定的申請截止日期。

- 經濟部「業界科專計畫」(經濟部技術處)

為鼓勵企業從事技術創新及應用研究，建立研發能量與制度，經濟部開放企業界申請「業界科專」計畫，藉以政府的部分經費補助，降低企業研發創新之風險與成本，且研發成果歸廠商所有，以積極鼓勵業者投入產業技術研發工作，在業界提出申請及執行計畫過程中，輔導業界建立研發管理制度、強化研發組織、培育及運用科技人才、誘發廠商自主研發投入與後續投資，並促進產、學、研之間的交流與合作，健全業界整體發展能力，達到

政府「藏技於民」的美意。

訊息相關網址：

http://www.isu.edu.tw/interface/showdoc.php?dept_id=4&levelid=5358&dept_mno=27

計畫截止日：計畫為政府持續推動與支持之計畫，廠商可隨時提出申請，並無特定的申請截止日期。

- 國科會科學園區補助計畫

南科：科學工業園區創新技術及產學合作獎助計畫 -- 需由廠商提出申請

中科：高科技設備前瞻技術發展計畫 -- 需由廠商提出申請

訊息相關網址：

http://www.isu.edu.tw/interface/showdoc.php?dept_id=4&levelid=5586&dept_mno=27

計畫截止日：計畫為政府持續推動與支持之計畫，廠商可隨時提出申請，並無特定的申請截止日期。



Back



義守大學 研究發展處

高雄縣大樹鄉學城路1段1號

電話：07-657-7711

傳真：07-657-7471

Mail : research@isu.edu.tw



義大醫院 醫學研究部

醫學教育委員會

高雄縣燕巢鄉角宿村義大路1號

電話：07-615-0011

傳真：07-615-5352

Mail : ed102646@edah.org.tw/

ed104365@edah.org.tw

發行人： 傅勝利 校長

陳宏基 院長

總編輯： 柯明道 副校長

陳翰容 副院長

沈季燕 研發長

沈德村 特別助理

編輯部： 黃克穠組長、李重義組長、
劉孟雯小姐、王依雯小姐、
羅伊真小姐

方怡月小姐、李文鼎先生、
謝雅竹小姐



Back