

CBD-RGD 胜肽應用於組織修復材料： 一、於聚胺基甲酸酯材料上之使用條件

褚文平¹ 徐善慧² 陳震漢³

關鍵詞：含 RGD 胜肽、纖維黏連蛋白、integrin 受體。

摘 要

本研究是利用蛋白質之非特定性吸附原理，於聚胺基甲酸酯(polyurethane, PU)表面塗佈一種由基因工程製造含 RGD (arginine-glycine-aspartate)之蛋白質進行表面改質，因為 RGD 是細胞貼壁因子 fibronectin 中促進細胞貼壁的最小功能單位，所以本實驗主要在找出此種含 RGD 之蛋白質於聚胺基甲酸酯上對不同細胞貼附生長之影響，以及是否改變原材料之血液相容性。經由體外細胞培養測試，可以評估 RGD 在材料表面是否發生吸附及其是否發揮促進各種細胞貼附之功能；而血小板附著活化測試則可瞭解 RGD 對凝血之影響。數據結果顯示本研究所用之含 RGD 蛋白質兼具促進細胞貼附之效果和抗血栓之特性。

APPLICATION OF THE CBD-RGD PEPTIDE IN BIOMATERIALS FOR TISSUE REPAIR I. USE OF CBD-RGD ON POLYURETHANE

Wen-Ping Chu¹, Shan-hui Hsu² and David Chanhen Chen³

^{1,2}Department of Chemical Engineering

³Graduate Institute of Veterinary Microbiology

National Chung-Hsing University Taichung, Taiwan 40227, R.O.C.

Key Words: RGD-containing peptides, fibronectin, integrin receptor.

Abstract

In this study, an RGD-containing peptide produced by genetic engineering was adsorbed to the surface of polyurethane (PU) biomaterial through non-specific binding. Since RGD is the functional sequence responsible for the cellular adhesion in RGD-containing matrix proteins such as fibronectin and collagen, it was expected that cellular attachment and growth on the modified PU should be promoted experimentally, in the cell culture and platelet activation were utilized to evaluate the influence of our RGD on cytocompatibility and blood compatibility. Results demonstrated our RGD could enhance both cellular and blood compatibility of polyurethane.

一、前 言

聚胺基甲酸酯材料具有優異之機械性質與生物相容性，在生醫材料上已被廣泛應用。但因細胞生長附

著情形不良[1]，以致於在組織細胞修復等組織工程[2]的應用上受到限制。一般常用離子植佈[3,4]、電漿處理[5]或將肝磷脂(heparin)與明膠(gelatin)塗佈在材料上進行表面改質，而本研究則是利用含 RGD 之蛋白質

¹國立中興大學化學工程學系專題生

²國立中興大學化學工程學系教授

³國立中興大學獸醫微生物學研究所副教授

進行表面改質。

RGD 序列是細胞貼壁因子 fibronectin 中促進細胞貼壁的最小功能單位。在體內，它可以受到細胞表面 integrin receptor 的辨識結合後發動細胞內化學訊息的傳遞，令細胞發生細胞架構的重組，使細胞產生型態及生理上的改變，細胞因而吸附於胞外間質上[6-10]。已有廠商利用基因工程生產含 RGD 胜肽[11]，其用途之一即是用在組織修復材料上，利用 RGD 胜肽的引入，促進細胞的貼附。

心臟血管材料常需具抗血栓特性，而許多人工合成的低分子量 RGD[12]也被證實具有這樣的作用[13]，同理猜測，基因工程製造[14]的較高分子量 RGD 蛋白質可能也會有抑制血小板凝集的作用。由於 RGD 分子對附著與抑制血小板的雙重影響，在心臟血管生醫材料上應頗具潛力。但是，雖然有研究使用化學共價鍵結法將低分子量的 RGD 固定在材料上[15,16]，來增加其材料對內皮細胞的附著量，與材料在做成小血管後內皮細胞植覆成功的機率，但這些研究卻從未探討以上的改質是否同時能具有抑制血小板凝集的作用。同時並非所有的 RGD-containing peptides 都能同時具有影響附著與抗凝血這兩種作用，有些甚至會促進血小板附著[17]，因此必須逐一進行測試才可獲知。

本實驗所用之 CBD-RGD (cellulose binding domain)為一種由基因工程製造之含 RGD 序列之蛋白質，一開始乃是設計吸附於纖維素材料上，其目的在將懸浮培養所使用的纖維素做表面改質，以改進其細胞貼附性質[18,19]。本研究則主要是探討是否可利用 CBD-RGD 對聚胺基甲酸酯生醫材料進行表面改質以增加其細胞貼附性質，並且由血液相容性測試得知是否具有抗血栓之特性。因為一般細胞培養實驗中所使用之培養基 (medium) 含有血清，血清中的成分 fibronectin 有可能會影響到實驗之顯著性，因此實驗後半部也進行關於無血清之實驗[20]，以釐清 RGD 真正的效果。

二、實驗部分

2.1 材料的製備

本實驗所用的 PU，為美國 Upjohn 公司生產的商品 Pellethane® 2363-80A。THF (tetrahydrofuran) 為美國 Tedia 公司生產，是 HPLC 級藥品。

製備 PU 薄膜[21]，首先先取含有 3wt.%PU 的 THF 溶液，利用玻璃滴管緩慢滴落溶液於 15mm 玻璃蓋玻

片上並使其均勻分佈，然後將其放入 50°C 的烘箱中烘乾 8 小時，待溶劑揮發之後，於 50°C 的烘箱中再進行真空抽氣 8 小時，去除殘留之有機溶劑。

研究中所用之 CBD-RGD 是利用 PCR (polymerase chain reaction) 的方式修改了 *Trichoderma koningii* 的 CBD 的基因，結果表現出一段對纖維素有親合力且同時具有促進細胞貼壁的融合蛋白質[18,19]，此蛋白質中僅具一個 RGD 序列，其分子量約為 13KDa。

2.2 細胞貼附生長測試

實驗所用培養基 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 為以色列 Biological Industries 公司生產。緩衝溶液 PBS (phosphate-buffered saline)，由 1000ml 的二次去離子水，加入 9 克 NaCl、0.795 克 Na₂HPO₄·7H₂O 與 0.144 克 KH₂PO₄ 配製而成，其中所含三種藥品皆由美國 Sigma 公司生產。細胞培養基 DMEM 的組成是以二次去離子水為溶劑的 DMEM 溶液，內含 10% 胎牛血清 FBS (fetal bovine serum) 與 1% 抗生素 PSA (Penicillin-streptomycin-Amphotericin)；無血清之實驗不加入血清，但加入 0.1% 經過 heat-inactivated 的牛血清蛋白 (bovine serum albumin)。實驗所用之細胞有 ATCC 之纖維母細胞 (NCTC clone 929；簡稱 FB)、牛腎上皮細胞 (Madin-Darby bovine kidney；簡稱 MDBK)。實驗所用為倒立式光學顯微鏡 (inverted microscope)，型號 TE300，為日本公司產品。

材料首先進行滅菌，然後在表面上塗佈 CBD-RGD。塗佈前先將冷藏於 -20°C 的 RGD 置於常溫下退冰，視實驗而定將 RGD 用 0.22 μm 醋酸纖維素 (cellulose acetate, CA) 濾膜過濾，取此 RGD (濃度：0.1~0.2 mg/ml) 20 μl，將其均勻塗佈於材料上，然後靜置 30 分鐘即可使用。將處理好之材料分別置入含 24 個培養孔 (24-well) 的組織細胞培養盤 (tissue culture plate) 中 (孔徑為 15mm)，並以一個只有玻璃蓋玻片的作為對照組 (control)。用 trypsin 將細胞由 T 型容器 (T-flask) 上打下來，以高速離心機分離出細胞，再加入新的培養基，配製成起始細胞密度為 5×10⁴ cells/ml 的細胞懸浮液 (suspension)。接著，於每個培養孔中，各注入 1ml 細胞懸浮液，再將整個細胞培養盤置於 5% 二氧化碳 (CO₂) 與 95% 空氣的細胞培養箱 (incubator) 中，在 37°C 下進行培養；經過 1、3、6、12、24 及 48 小時後，利用顯微鏡於不同位置觀察拍照，並計算約 70 個細胞中已伸展的百分比。然後將培養孔內溶液以吸量管吸乾，分別以 1ml PBS 溶液沖洗，之後加入 0.3ml trypsin 溶液作用 5 分鐘，使附著在材料表面的細胞完

一、於聚胺基甲酸酯材料上之使用條件

全脫落，再加入 0.3ml medium，以中和 trypsin 的作用。最後，用血球計數器(hemocytometer)與倒立式顯微鏡，計算細胞個數。

2.3 血小板附著與活化測試

將欲進行之材料滅菌後置於 24well 中，然後注入 0.5ml 的富血小板血漿，放入細胞培養箱中 1 小時。將 24well 取出並以 1ml 的 HBS 溶液沖洗兩次，然後以 0.3ml 的 trypsin 將血小板打下來，再用 0.2ml 的 HBS 溶液沖洗，並將之收集，最後將樣品送至血液分析儀 (C.B.C.) 檢測。若要估算血小板之平均活化率 (average degree of activation) 和求得血小板的活化個數 (normalized number of platelet activation)，則將 24well 取出時就要以含 2.5% vol 戊二醛的 HBS 溶液將血小板固定，接著做階段脫水，準備進行臨界乾燥 (C.P.D.) 後以掃描式電子顯微鏡觀察。對於血小板的活化情形我們分為五個階段，分別為：Round、Dendritic、Spread-dendritic、Spreading、Fully spread，我們分別定義其活化程度為 0、0.25、0.5、0.75、1，以此為依據，分別估算每個血小板的活化程度求得平均之活化程度。

三、實驗結果

3.1 RGD 處理方式之影響

實驗之初必須先固定整個利用 CBD-RGD 做測試時的流程，所以針對其中一些步驟做測試，以找出最佳的實驗方法。CBD-RGD 未使用時是保存於 -20°C，欲使用時才拿至常溫下回溫退冰，由於我們所使用的 CBD-RGD 純度約為 80%，所以尚會含有其它物質若於常溫下置放太久則可能就會有酵素將 CBD-RGD 上的 RGD 切斷，如此也會造成對細胞貼附負面的影響，因此一使用完立即就要放入 -20°C 保存。因為尚有一些其它物質，所以一開始要使用前可先用 0.22 μ m 醋酸纖維素濾膜過濾，利用 FB 於 PU2363 上做測試其效果大概會降低 5% 左右 (圖一)。造成細胞貼附效果降低的主要原因應該是在過濾時亦會有部分的 CBD-RGD 吸附於濾膜上。而 CBD-RGD 溶液中的離子濃度亦會對細胞貼附效果造成影響 (如表一所示)，表中的數值是經過 RGD 處理的細胞貼附量對未經處理的比例。結果顯示，離子濃度低的時候，RGD 胜肽促進細胞貼附的效果較佳，其原因可能是因為離子濃度會影響蛋白質的構型，當 RGD 未裸露於結構的外表時其效果就會降低。

因為 RGD 胜肽一般較昂貴，因此必須決定

CBD-RGD 之用量，期望僅使用少量卻能夠具有顯著效果。經由 FB 細胞株於 PU2363 上測試的結果 (如圖二所示)，由此圖可發現使用 20 μ l 的 CBD-RGD 就已產生足夠的效果。過量的 CBD-RGD 並未進一步增加其功效，這可能是因為蛋白質在過飽和吸附後就會有些懸浮於溶液中，這些未貼附之 RGD 胜肽只會因競爭細胞而對細胞貼附於材料上造成抑制效果，因此過量之 RGD 並未增加細胞貼附量。

在 RGD 的使用濃度方面，其目的與用量相仿，主要是找出一個有效的最低濃度，經過 FB 於 PU2363 上的測試後 (結果如圖三) 可發現，濃度控制在 0.1~0.2mg/ml 即可達到最佳的效果，因此隨後的實驗濃度均一律定為 0.2 mg/ml。

RGD 除了提高細胞在材料上的貼附量外 (圖四)，同時也會加速細胞在材料表面伸展 (表二)，經過 RGD 處理的材料，其上貼附的細胞會較為伸展而呈現扁平狀；而在未經 RGD 處理的表面，細胞大多尚未伸展，故呈成圓球狀。

3.2 細胞初濃度的影響

細胞的初濃度會影響細胞貼附的速率，由實驗結果 (圖五) 中可發現，若細胞濃度太高，則 RGD 的效應會被遮蔽；而細胞濃度太低，則細胞無法成功生長。在組織工程產品使用 RGD 時必須尋求一適當之初濃度，故較佳的濃度範圍應該為 3×10^4 ~ 5×10^4 cells/ml。

3.3 無血清實驗結果

如前言所述因為細胞培養加入的血清中含有 fibronectin，fibronectin 中的 RGD 序列會影響到實驗的顯著性。但是培養基不加血清，細胞於短時間就會死亡，如此則無法進行實驗，所以必須於培養基中加入 0.1% 牛血清蛋白以維護膠體滲透壓來延長細胞的壽命。由 MDBK 於 PU2363 上的實驗結果 (圖六) 可發現，在短時間不加血清的效果會加倍，但是到了 12 小時之後差異就會變小。對於細胞伸展方面，RGD 於無血清實驗也會在短時間促進細胞在材料表面的伸展 (圖七)，提高已伸展細胞在材料上所佔的比例 (如表三所示)，其效果較在有血清實驗中 (表二) 更為顯著。

3.4 血小板附著與活化測試

在經過細胞貼附生長測試之後確定 RGD 具有短時間誘導細胞貼附及伸展之功能，若是使用在與血液接觸的組織工程產品，則必須確定此 RGD 不會對血

液相容性造成負面影響。由血小板附著量與平均活化度的數據(表四)得知,經過 RGD 表面改質之材料不但血小板貼附量減少(圖八),而且在材料表面的活化程度亦降低(圖九)。其原因為 RGD 會佔據本來應該被 fibrinogen 佔據的血小板 gp II b/III a receptor, 因此造成血小板的吸附量及活化程度皆降低[22]。

四、討論

生物活性蛋白質的使用,其效果常與使用的狀況相關,故以上實驗主要的目的在於測試由基因工程製造的獨特 CBD-RGD 蛋白質的功效並且固定其使用方法,完成一系列基礎實驗以作為日後設計如人工血管、人工軟骨等組織工程產品使用時之基本參考數據。經過各種實驗參數的測試之後,我們能夠確定 CBD-RGD 之使用方法為:(1)RGD 使用前必須冷藏於 -20°C 之下,而使用時應先將其置於常溫下回溫,不可使用恆溫槽。(2)由實驗時間之長短,決定是否要先將 RGD 過濾。若為長時間實驗則需要過濾,短時間或測試其吸附之實驗則不用。在實驗應用時,為避免細菌感染仍以過濾為宜。過濾選用之薄膜以醋酸纖維素材質之效果最佳。(3)在使用時,取 RGD 水溶液(濃度: 0.2 mg/ml ; NaCl 濃度: 0.1 mol/ml) $20\ \mu\text{l}$, 將其均勻塗佈於材料上,然後在室溫下靜置 30 分鐘後即可進行細胞貼附。而選用的細胞初濃度也盡量固定為 $5 \times 10^4\text{ cells/ml}$ 左右。在以上的使用狀況下, RGD 促進細胞在材料上貼附與伸展的效果會最為顯著。

經由各種測試,得知對於細胞株在短時間(如六小時內)觀察, RGD 之效果會較顯著,其主要原因乃為時間一久,懸浮狀態的細胞由於重力作用最後仍會到達表面進行貼附。但是若將細胞株換為原始細胞(primary cell),細胞在懸浮液中的存活時間較短,若無法迅速貼附,則會死亡。因此我們期望在未來使用原始細胞進行實驗時, RGD 的效果應更明顯。此外,由本實驗結果亦發現 RGD 不僅促進細胞於短時間內貼附而且也會促進細胞在材料表面伸展。貼附的形狀能影響到細胞貼附的緊密程度,對於必須在剪應力(如血管內皮細胞)或壓縮應力(如軟骨細胞)情形下進行貼附的細胞,其細胞在表面上的存留率將因貼附的緊密程度有所影響。譬如短時間誘導內皮細胞在人工小血管表面貼附與伸展,則植覆於血管內部的細胞將不易被血液沖刷掉,植覆的成功率亦會增加。

對於不同細胞 RGD 效果也會有差異,其原因可能就在於不同細胞表面的 integrin receptor 數量會不

同,之後的實驗將會探討 RGD 對於不同細胞的效果差異。對於各種細胞效果會有不同,整體而言,利用此方法進行表面改質之效果也優於電漿改質法[23]。至於 CBD-RGD 於 PU2363 上的吸附應該是屬於非特定性吸附,而其真正吸附的原因則需要再做一些其它的分析方可判斷。但是由結果不難看出, CBD-RGD 確實有吸附於 PU2363 上,且能在注入細胞懸浮液後及細胞貼附前仍維持在表面上。未來的實驗將會探討 RGD 於不同材料上對細胞培養的效果,因為材料表面性質的差異將會影響到蛋白質的吸附及其在表面上的滯留時間。

在血液相容性測試中發現 CBD-RGD 具有抗血栓之性質,不僅可以減低血小板附著量,亦可降低其活化程度。可見 CBD-RGD 不但具有誘導細胞於短時間貼附之性質而且又有抗血栓之特性,這種具雙重優點的較大分子量的 RGD 胜狀相當罕見,所以本研究所用之 CBD-RGD 應當適用於心臟血管生醫材料之表面改質。

最後無血清實驗最主要是要降低影響實驗顯著性的因子,但由於細胞於無血清的狀況下生長情形會較差且容易死亡,所以至今只有 MDBK 的實驗成功,這是因為其細胞生存力較強韌之故,但是未來仍會找出其它的方法來進行無血清實驗,例如加入生長因子等,無血清實驗是將來本研究的方向,因為少了血清影響 CBD-RGD 的顯著性將會提高,且無血清情形較接近實際應用時的狀況。除了本實驗提及的濃度、用量、細胞濃度及有無使用血清之外,其實影響 CBD-RGD 的因子尚有很多,像是溶液的離子強度、二價陽離子濃度[5]或是蛋白質構形中 RGD 序列是否裸露於其表面皆會影響到此 RGD 的效果;此外,在材料方面本研究僅使用聚胺基甲酸酯,在細胞方面僅使用纖維母細胞與牛腎上皮細胞,不同細胞或材料也會影響到 RGD 的效果。在未來的實驗中將會對此作更進一步的探討。

五、謝誌

感謝國科會大專生參與專題研究計劃(NSC 89-2815-C-005-043-B)的支持,特此致上謝忱。

六、參考文獻

1. Nichols N. K., Gospodarwicz D., Kessler T. R. and Oslen D. B., "Increased adherence of vascular endothelial cells to Biomer precoated with

一、於聚胺基甲酸酯材料上之使用條件

- extracellular matrix”, *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, Vol. 27, pp. 208-211 (1981).
2. Vacanti C. A., “An introduction to tissue engineering”, *Biomaterials Forum*, Vol. 18, No. 5, pp. 17-19 (1996).
 3. Nakao A., Kaibara M., Iwaki M., Suzuki Y. and Kusakabe M., “XPS and SERS studies of cell adhesion-controlled polymer modified by ion implantation”, *Surf. Interf. Anal.*, Vol. 24, pp. 252-256 (1996).
 4. Pignataro B., Conte E., Scandurra A. and Marletta G., “Improved cell adhesion to ion beam-irradiated polymer surface”, *Biomaterials*, Vol. 18, pp. 1461-1470 (1997).
 5. Dejun L. and Zhao J., “The structure and biomedical behaviour of ion bombarded and plasma polymerized segmented polyurethane”, *Appl. Surf. Sci.*, Vol. 78, pp. 195-200 (1994).
 6. Cheres D. A., “Integrins: structure, function and biological properties”, *Adv. Mol. Cell Biol.*, Vol. 6, pp. 225-237 (1993).
 7. Giancotti F. G. and Ruoslahti E., “Integrin Signaling”, *Science*, Vol. 285, pp. 1028-1032 (1999).
 8. Ruoslahti E. and Pierschbacher M. D., “New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins”, *Science*, Vol. 238, pp. 491-497 (1987).
 9. Yasuda T., Shimizu K., Nakagawa Y., Ishikawa H., Nishihara H. and Nakamura T., “Possible Involvement of RGD (Arg-Gly-Asp)-Containing Extracellular Matrix Proteins in Rat Growth Plate Chondrocyte Differentiation in Culture”, *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 11, No. 10, pp. 1430-1437 (1996).
 10. Ohno S. et al., “RGD-CAP (β ig-h3) Enhances the Spreading of Chondrocytes and Fibroblast Via Integrin α 1 β 1”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1451, pp. 196-205 (1999).
 11. US Patent pending (No.5514581).
 12. Penke B., Hajnal R., Lonovics J., Holzinger G., Kadar T., Telegdy G. and River J., “Synthesis of potent heptapeptide analogues of cholecystokinin”, *J. Med. Chem.*, 27, pp. 845-849 (1984).
 13. Torday L., Balogh G. E., Pataricza J., Zarandi J., Papp J. Gy. and Penke B., “Vasorelaxant properties and mechanism of action of some RGD (Arg-Gly-Asp-containing)-peptides”, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Vol. 26, LXXXVI, No. 339 (1994).
 14. Varani J., Inman D. R., Fligiel S. E. G. and Hillegas W. J., “Use of recombinant and synthetic peptides as attachment factors for cells on microcarriers. Cytotechnology”, *Cytotechnology*, Vol. 13, pp. 89-98 (1993).
 15. Lin H., Garcia-Echeverria C., Asakura S., Sun W., Mosher D. F. and Cooper S. L., “Endothelial cell adhesion on polyurethanes containing covalently attached RGD-peptides”, *Biomaterials*, Vol. 13, pp. 905-914 (1992).
 16. Patterson R. G., Messier A. and Valentini R. F., “Effects of radiofrequency glow discharge and oligopeptides on the attachment of human endothelial cells to polyurethane”, *ASAIO J.*, Vol. 41, pp. M625-M629 (1995).
 17. Hsu J. J. et al., “Effects of different PU grafted surface on activation of platelets under shear flow”, *Global Chinese Symposium on Biomaterials and Controlled Release*, pp. 642-645 (1999).
 18. 陳韻如, “開發 CBD-RGD 融合蛋白質應用於固定化細胞培養”, 中興大學獸醫微生物學研究所碩士論文, 台中(1997)。
 19. TW Patent pending (No.86114 750), US Patent pending (No.09/166,966).
 20. Grzesiak J. J., Pierschbacher M. D., Amodeo M. F., Malaney T. I. and Glass J. R., “Enhancement of Cell Interactions with Collagen/Glycosaminoglycan Matrices by RGD Derivatization”, *Biomaterials*, Vol. 18, pp. 1625-1632 (1997).
 21. Lee P. C. et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 32, No. 1 (1996).
 22. Samanen J., Ali F., Romoff T., Calvo R., Sorenson E., Vasko J., Store B., Berry D., Bennett D., Strohsacker M., Powers D., Stadel J. and Nichols A., “Development of a small RGD peptide fibrinogen antagonist with potent antiaggregatory activity in vitro”, *J. Med. Chem.*, Vol. 34, pp. 3114-3125 (1991).
 23. 張素華等, “以 CBD-RGD 蛋白質改質與電漿改質對 PU 材料細胞附著與血小板活化影響之比較”, 醫學工程科技研討會論文集, 第 447-448 頁(1998)。

表一、CBD-RGD 溶液中離子濃度對於細胞貼附效果之測試

Table 1. The effect of ion concentrations in CBD-RGD solutions on cellular attachment.

生長時間 (hours)	3	24
離子濃度 (mol/ml)		
0.1	1.40±0.02	1.21±0.11
0.3	1.26±0.03	1.16±0.12

表二、RGD 用於 PU2363 上對 FB 於短時間細胞伸展比率之影響

Table 2. The effect of RGD on spreading ratio of fibroblasts adhered to PU2363.

時間 (hours)	6	12
材料		
PU2363	1.9±0.9%	12.4±3.0%
PU2363+RGD	15.2±4.4%	64.6±5.0%

表三、RGD 用於 PU2363 上對 MDBK 之無血清實驗於短時間細胞伸展比率之影響

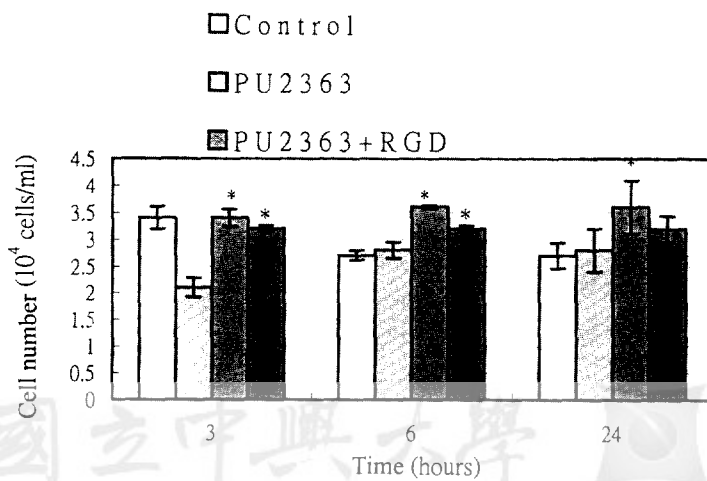
Table 3. The effect of RGD on spreading ratio of MDBK adhered to PU2363 in serum-free medium.

時間 (hours)	1	3
材料		
PU2363	0.9±0.8%	1.9±0.9%
PU2363+RGD	65.9±2.6%	82.8±1.4%

表四、血液相容性測試(濃度：8.44±0.5×10⁸/ml)

Table 4. The platelet activation test (with the initial platelet concentration 8.44±0.5×10⁸/ml).

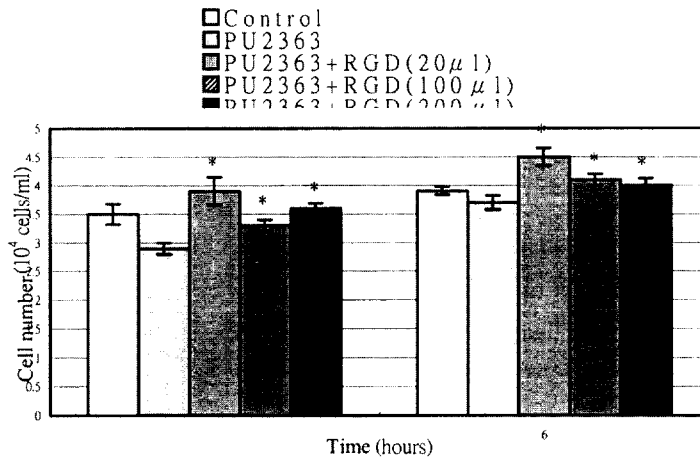
	PU2363	PU2363 +RGD
Platelets adhered (×10 ⁷)	6.48±0.16	4.88±0.64
Average degree of activation	0.70±0.05	0.25±0.01
Normalized number of platelet activation(×10 ⁷)	4.54±0.44	1.22±0.21



圖一、RGD 過濾後於 PU2363 上對 FB 效果之測試(*表示與 PU2363 相比有 p<0.05 的顯著性)

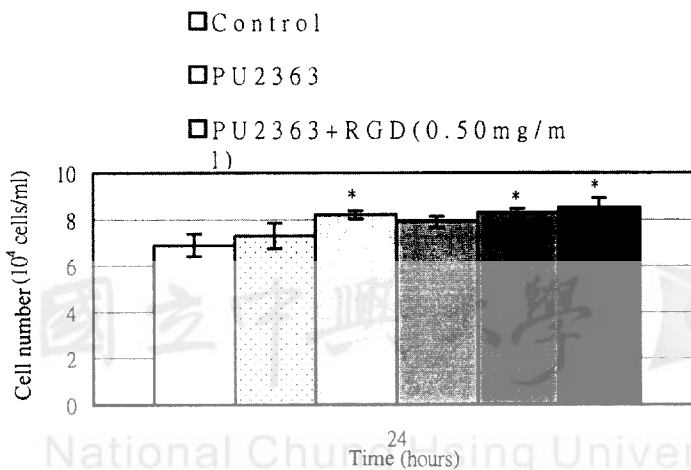
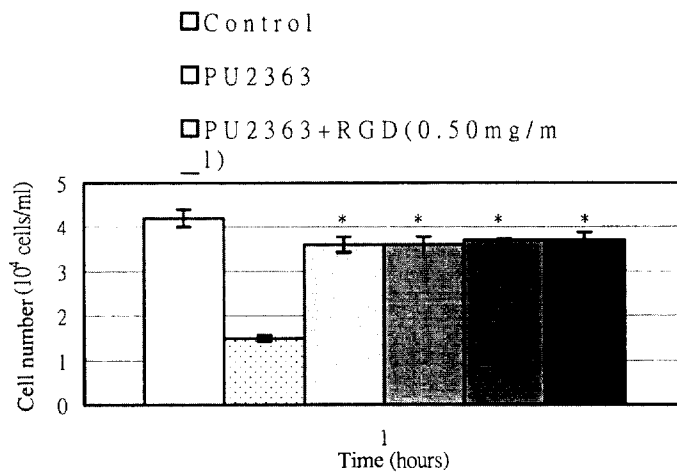
Fig. 1. The effect of filtered RGD on FB attachment to PU2363. (*p<0.05)

一、於聚胺基甲酸酯材料上之使用條件



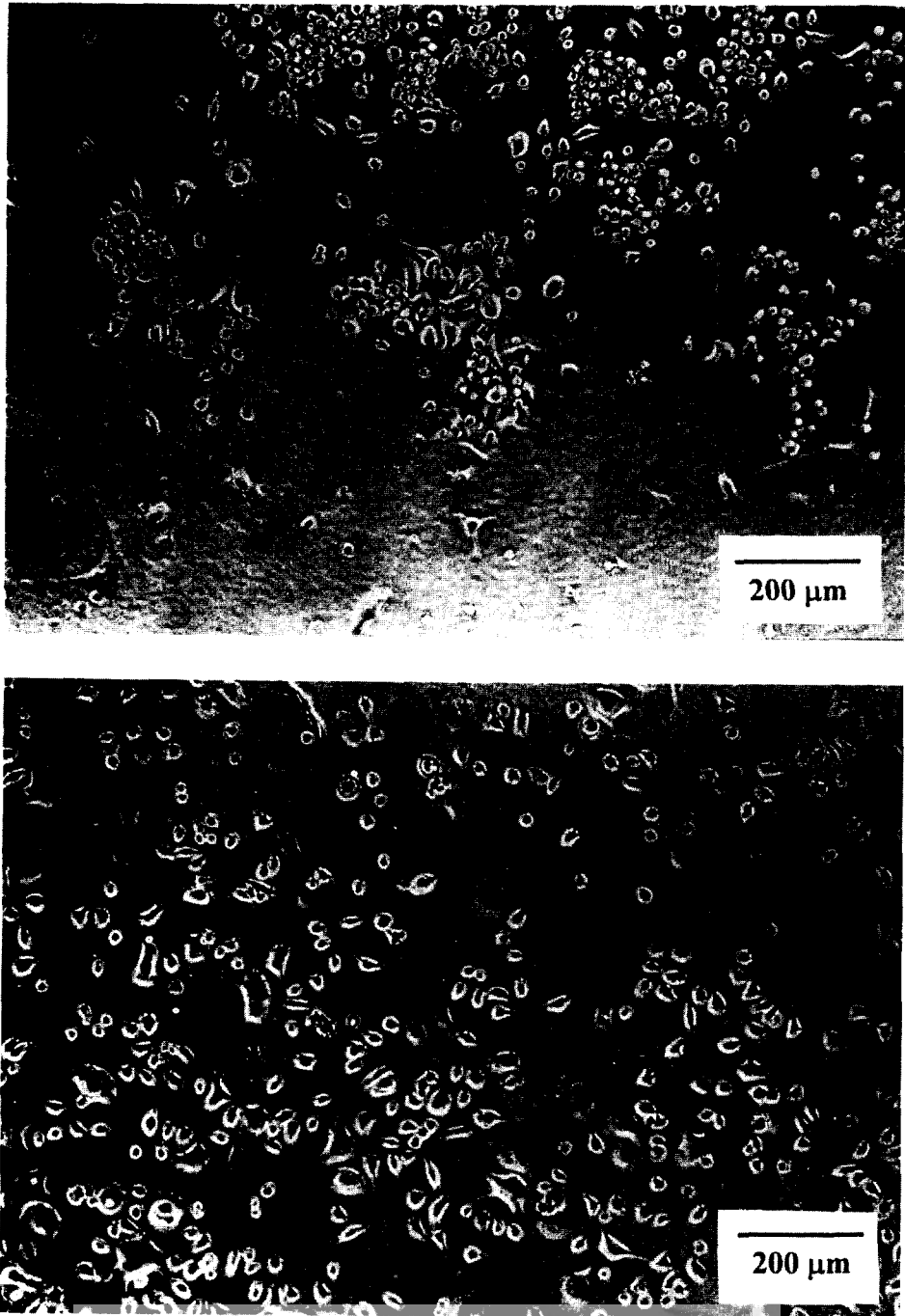
圖二、RGD 用量於 PU2363 上對 FB 效果之測試(*表示與 PU2363 相比有 $p < 0.05$ 的顯著性)

Fig. 2. The effect of amount of RGD on FB attachment to PU2363. (* $p < 0.05$)



圖三、RGD 濃度於 PU2363 上對 FB 效果 (a)經過 1 小時(b)經過 24 小時之測試 (*表示與 PU2363 相比有 $p < 0.05$ 的顯著性)

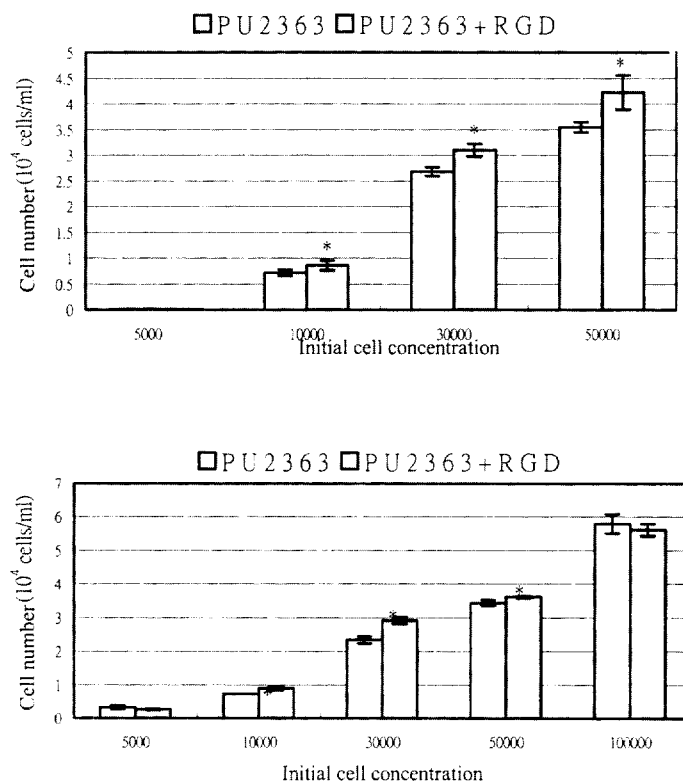
Fig. 3. The effect of concentration of RGD on FB attachment to PU2363. (* $p < 0.05$)



圖四、RGD 用於 PU2363 上對 FB 於 12 小時效果之拍照(a)未經過處理(b)經過 RGD 處理

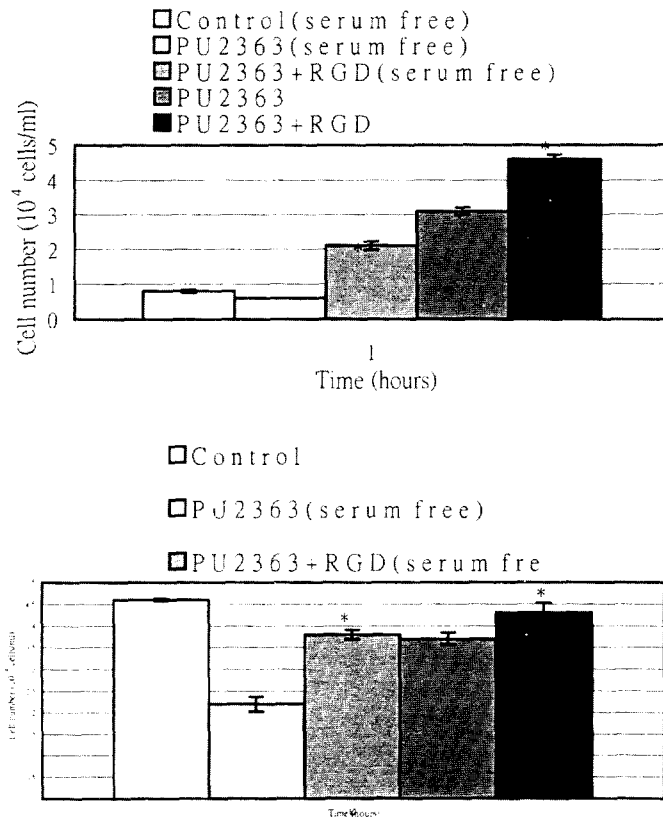
Fig. 4. Photographs showing the effect of RGD on FB attachment to PU2363 at 12h: (a) control (b) with RGD.

一、於聚胺基甲酸酯材料上之使用條件



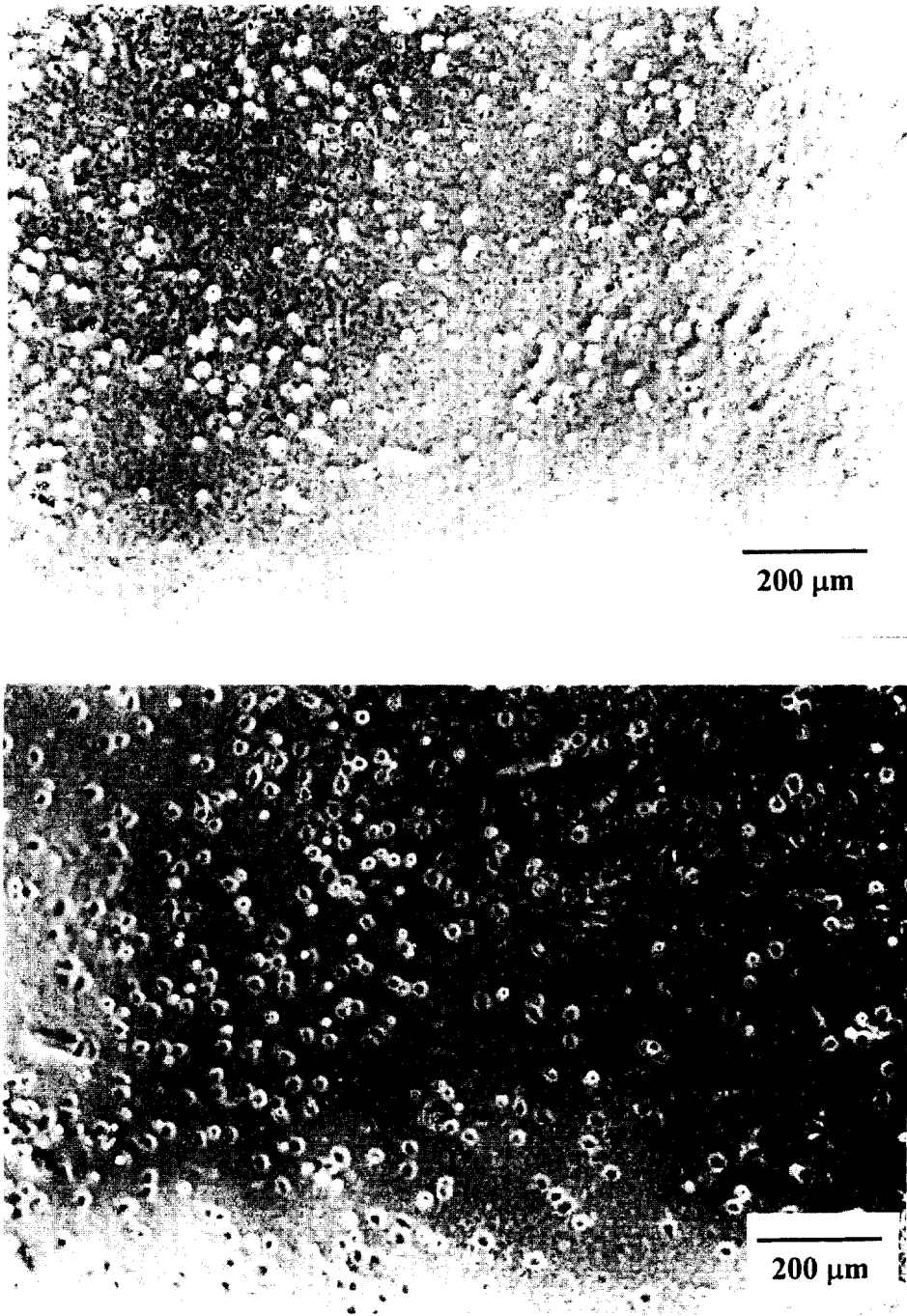
圖五、RGD 用於 PU2363 對 FB 於(a)3 小時(b)12 小時之初濃度測試
 (*表示與 PU2363 相比有 $p < 0.05$ 的顯著性)

Fig. 5. The effect of RGD on FB attachment to PU2363 at (a) 3h (b) 12h. (* $p < 0.05$)



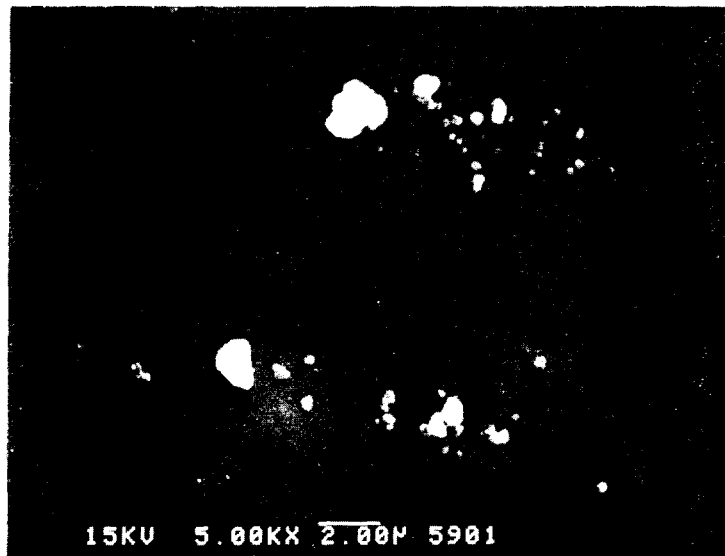
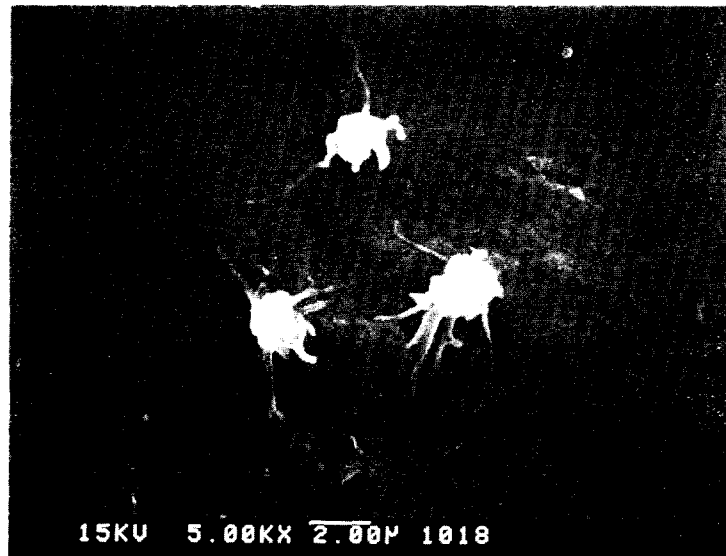
圖六、RGD 用於 PU2363 對 MDBK 之無血清實驗測試(a)1 小時(b)12 小時 (*表示與 PU2363 相比有 $p < 0.05$ 的顯著性)

Fig. 6. The effect of RGD on MDBK attachment to PU2363 in serum-free medium at (a) 1h (b) 12h. (* $p < 0.05$)



圖七、RGD 用於 PU2363 對 MDBK 之無血清實驗於 3 小時拍照(a)未經處理(b)經過 RGD 處理

Fig. 7. Photographs showing the effect of RGD on MDBK attachment to PU2363 in serum-free medium (a) control (b) with RGD.

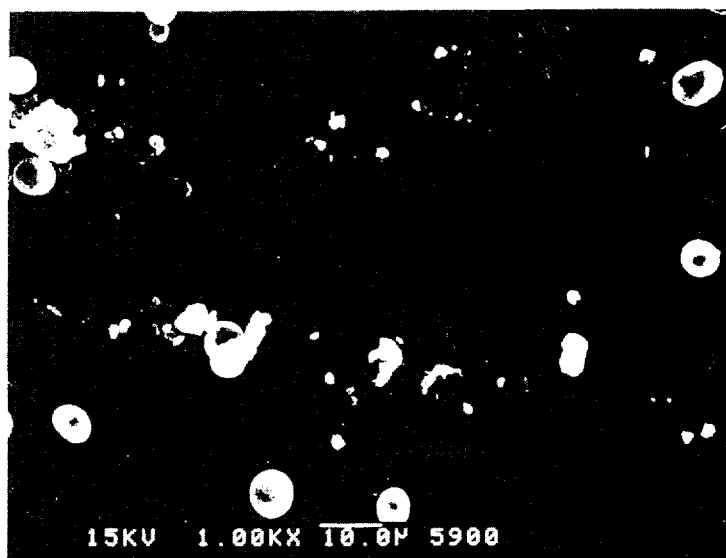
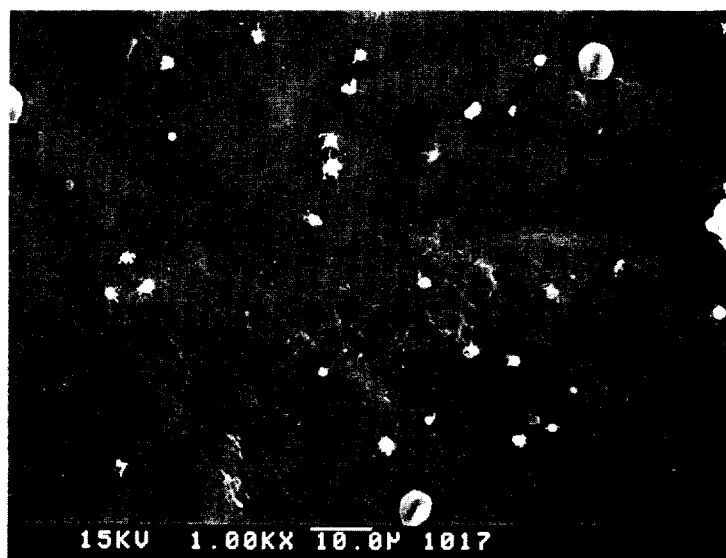


圖八、血液相容性測試拍照 1000 倍 (a)PU2363(b)PU2363+RGD
Fig. 8. The platelet adhesion ($\times 1000$) on (a) PU2363 (b) PU2363+RGD

國立中興大學 

National Chung Hsing University

一、於聚胺基甲酸酯材料上之使用條件



圖九、血液相容性測試拍照 5000 倍 (a)PU2363(b)PU2363+RGD

Fig. 9. The platelet adhesion ($\times 5000$) on (a) PU2363 (b) PU2363+RGD

國立中興大學



National Chung Hsing University

論文收稿日期：89 年 7 月 17 日

論文修訂日期：89 年 8 月 18 日

論文接受日期：89 年 8 月 25 日