

開發含有自銅藻萃取之褐藻醣膠之膠原蛋白/硫酸軟骨素/幾
丁聚醣之三維海綿敷料於全皮膚損傷修復之應用

結案報告

海洋委員會補助研究

中華民國 111 年 09 月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考，並不代表該會政策，該會保留採用與否之權利。」

開發含有自銅藻萃取之褐藻醣膠之膠原蛋白/硫酸軟骨素/幾丁聚醣之三維
海綿敷料於全皮膚損傷修復之應用
(結案報告)

學校：亞洲大學

指導教授：沈育芳 博士

學生：廖昱翔

研究期程：中華民國 111 年 5 月至 111 年 10 月

研究經費：新臺幣 8 萬元

海洋委員會補助研究

中華民國 111 年 10 月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考，並不代表該會政策，

該會保留採用與否之權利。」

目次

目次.....	2
圖次.....	3
表次.....	4
摘要.....	5
壹、研究內容說明.....	6
一、 研究主旨（主題、緣起、預期目標）.....	6
二、 研究背景及有關研究之檢討.....	6
2.1 銅藻的介紹及其在台灣海域的問題.....	6
2.2 褐藻醣膠的功效.....	7
貳、預期目標與進度說明.....	8
一、 預期目標.....	8
二、 進度說明.....	9
參、研究方法及過程.....	9
肆、結果與討論.....	12
伍、參考文獻.....	17

圖次

圖一.....	7
圖二.....	7
圖三.....	8
圖四.....	12
圖五.....	13
圖六.....	13
圖七.....	13
圖八.....	14
圖九.....	14
圖十.....	15
圖十一.....	15
圖十二.....	16
圖十三.....	16

表次

表一.....	12
表二.....	12
表三.....	17
表四.....	17

摘要

銅藻 (*Sargassum horneri*) 是一種溫帶性海洋大型褐藻，廣泛分布於中國、韓國和日本沿海等地區。由於台灣處於副熱帶氣候地區，因此並沒有在地的野生銅藻。但是，漂流性銅藻在冬末春初大陸沿岸冷流來到時，會順著冷水團渡過台灣海峽，來到台灣的中、北部海岸及澎湖海岸，成為台灣海洋的廢棄物，甚至造成漁船故障、近海的魚貝類受困死亡，海岸惡臭的環境問題。雖然大量漂流來的銅藻帶來了海洋問題，但銅藻所含有的褐藻醣膠具有多種生物活性，如抗菌、抗氧化、抗病毒、抗炎、抗腫瘤、抗凝血和免疫調節活性等功能。有鑑於褐藻醣膠具有調節與傷口修復相關的轉化生長因子 $\beta 1$ 的作用，並且能促進新生血管和纖維狀膠原基質的形成等幫助皮膚修復的潛力。因此，本研究結合過去在開發人工真皮的經驗，將台灣海岸銅藻所萃取的褐藻醣膠應用於全皮膚損傷修復之三維海綿敷料的開發。本研究目前已開發含褐藻醣膠的三維海綿敷料的製程及配比，及評估其物理性質及生物相容性。未來將進行組織學及皮膚組織修復能力結果評估。本計畫將台灣海域銅藻萃取之褐藻醣膠應用於傷口敷料開發將有助於提升傷口醫療修復的發展，並且幫助提升銅藻的經濟價值，及解決銅藻成為海洋廢棄物的問題。

壹、研究內容說明

一、研究主旨（主題、緣起、預期目標）

銅藻（*Sargassum horneri*）是一種溫帶性海洋大型褐藻，廣泛分布於中國、韓國和日本沿海等地區。由於台灣處於副熱帶氣候地區，因此並沒有在地的野生銅藻[1]。但是，漂流性銅藻在冬末春初大陸沿岸冷流來到時，會順著冷水團渡過台灣海峽[2]，來到台灣的中、北部海岸及澎湖海岸，成為台灣海洋的廢棄物，甚至造成漁船故障、近海的魚貝類受困死亡，海岸惡臭的環境問題[3]。

雖然大量漂流來的銅藻帶來了海洋問題，但銅藻所含有的褐藻醣膠具有多種生物活性，如抗菌、抗氧化、抗病毒、抗炎、抗腫瘤、抗凝血和免疫調節活性等功能[4]。因此，若能將銅藻應用在醫療生技產業，將能更大的提升其應用價值及經濟效益，使其成為海洋珍品，解決海洋廢棄物問題。

美國國立衛生研究院（National Institutes of Health, NIH）的統計指出每年花費在治療慢性傷口上的經費高達 10 億美元[5]。此外，在 2019 年全球貼布及敷料市場產值上可高達新台幣 183 億。由於已開發國家人口趨向高齡化、糖尿病及肥胖人口增加，且部分亞洲市場尚未開發，因此可預期未來傷口照護的需求龐大[5]。儘管市售已有多種人工敷料及人工皮膚，但其仍然具有局限性。有鑑於褐藻醣膠具有調節與傷口修復相關的轉化生長因子 $\beta 1$ 的作用[6]，並且能促進新生血管和纖維狀膠原基質的形成等幫助皮膚修復的潛力。因此，本研究將結合過去在開發人工真皮的經驗，將台灣海岸銅藻所萃取的褐藻醣膠應用於全皮膚損傷修復之三維海綿敷料的開發。本計畫包括三項主要目標，分別為：（1）提升銅藻之褐藻醣膠的萃取量及品質。（2）開發含褐藻醣膠之三維海綿敷料的製程，評估其物理性質及生物相容性。（3）開發含最佳配比之褐藻醣膠之三維海綿敷料，並進行物理性質、組織學、動物實驗及皮膚組織修復能力結果評估。總結，本計畫將台灣海域銅藻萃取之褐藻醣膠應用於傷口敷料開發將有助於提升傷口醫療修復的發展，並且幫助提升銅藻的經濟價值，及解決銅藻成為海洋廢棄物的問題。

二、研究背景及有關研究之檢討

2.1 銅藻的介紹及其在台灣海域的問題

銅藻（學名：*Sargassum horneri*）又稱柱囊馬尾藻、草茜、竹茜菜，是一種分布在日本、韓國及中國北方海域，常形成海藻林的常見溫帶馬尾藻[1]。其可在每年的冬末、春初量繁殖，每天可以長約一公尺，最長可達十公尺[1]。由於銅藻較喜愛生長在低水溫環境，因此這些漂流性銅藻在冬末春初大陸沿岸冷流來到時，會順著冷水團渡過台灣海峽，來到台灣的中、北部海岸及澎湖海岸[2]。在 2012 年 3 月，台灣海岸經歷了最大的一次銅藻在中、北部海岸堆積的紀錄。在淡水八里運走 500 公噸以上外，在三芝、石門、金山、萬里等處也受到銅藻占據潮間帶的衝擊[2]。在 2019 年春夏之交，於野柳地質公園也清出 30 公噸的銅藻及垃圾[3]。此外，在 2020 年 2 月，馬祖北竿塘后澳沙灘亦看到大量銅藻被潮水推向岸邊(圖一)[7]。大量隨洋流漂而來的銅藻不只是海洋廢棄物，甚至會造成漁船螺

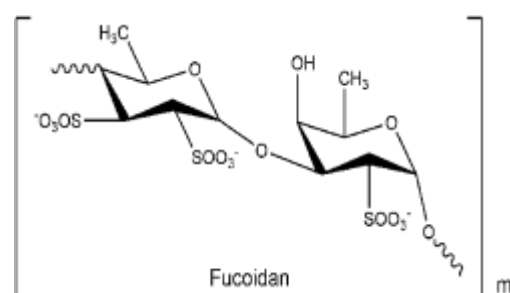
旋槳故障、漁網絞網、近海的魚貝類受困死亡等，並且其飄上岸曝曬後帶來的惡臭也造成海岸的環境問題[3]。儘管海保署目前有獎勵漁民撈起海漂垃圾及海藻、與海巡署監控海漂垃圾熱點等處理機制，但是因為獎勵機制誘因不大，因此配合的漁民實屬有限[3]。儘管已有日本業者來台，與水產加工業者合作將銅藻作為食品原料之建議[8]，但若能把銅藻應用在醫療生技產業，將能更大的提升其應用價值及經濟效益，使其成為海洋珍品，解決海洋廢棄物問題。



圖一：馬祖北竿塘后澳沙灘可見被潮水推向岸邊的大量銅藻。[7]

2.2 褐藻醣膠的功效

銅藻自古以來就被用作東北地區的當地食品。最近，其受到越來越多的關注，因為幾項使用動物模型的研究表明，某些活性成分含量較高，對促進健康和預防疾病具有有益作用[9,10]。銅藻含有高濃度的多醣，例如褐藻醣膠(Fuoidan)和海藻酸鹽(Alginate)。褐藻醣膠是一種含硫酸化岩藻糖的多醣(圖二)[11]，在動物和體外研究中已被證明具有



圖二：褐藻醣膠的結構。[11]

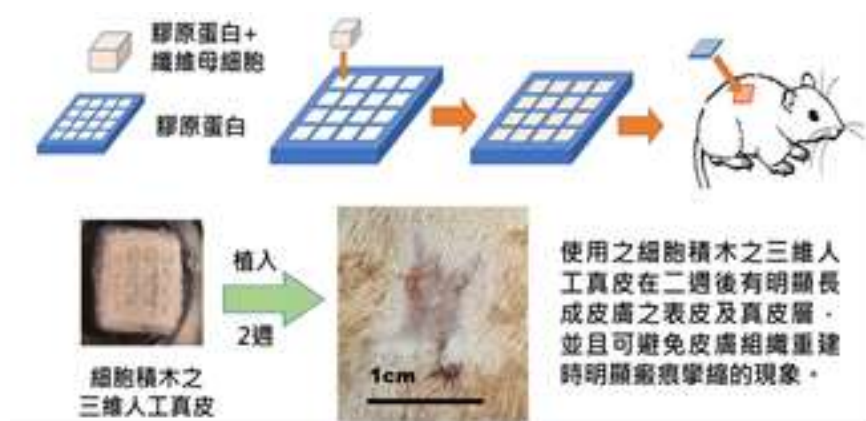
多種生物活性，包括抗癌、抗凝血、免疫調節、抗炎、抗病毒、抗肥胖和抗糖尿病作用[12,13]。此外，褐藻醣膠的結構各不相同，包括單醣組成、糖苷鍵位置、支鏈、硫酸根含量、硫酸基取代位置、硫酸化程度、分子量等，主要受品種、藻類特性、地理位置的影響、收穫季節、提取條件和其他因素[14-17]。考慮到上述影響因素，獲得的每一種新的褐藻醣膠都可能是一種具有獨特結構特徵並具有良好生物活性的新化合物[18]。因此，本研究將萃取台灣海域銅藻的褐藻醣膠，並探討其在傷口敷料的應用性。

2.3 傷口敷料的市場與褐藻醣膠的應用

全球先進傷口敷料的市場規模在2020年估算為58億4,620萬美元，在2021年~2027年間預計將以2.5%的年複合成長率增長，到2027年末將達到72億3,130萬美元，就各地區來看，北美為最

大市場佔約 41%，其次為歐洲約 39%，中國約 7%[19]。由於創傷數量的增加和病理生理條件的多樣性，嚴重影響人們生命和健康的皮膚傷口在全球範圍內受到了廣泛關注[20]。傷口癒合是一個高度複雜和多方面的生物過程，包括止血、炎症、細胞增殖和細胞外基質(Extracellular matrix, ECM)重塑[21]。在過去的研究中已報導了許多傷口敷料，它們具有各種化學成分（例如，聚乙烯醇、膠原蛋白、纖維素、絲綢、殼聚糖和藻酸鹽）以及不同的結構（例如，納米纖維、泡沫、水凝膠、水膠體和海綿）[4]。然而，滿足加速傷口閉合、減少疤痕形成、刺激血管生成和促進毛髮再生的要求的傷口敷料仍然是一個巨大的挑戰[4]。

眾所周知，天然聚合物具有固有的生化、生物力學和結構功能，並具有出色的生物相容性和生物降解性，因此適合用於開發傷口敷料[22]。特別是在各種生物來源（如海藻、甲殼類動物、微生物等）中發現的低成本且豐富的海洋多醣基生物材料在傷口癒合應用中引起了廣泛關注[23]。其中的褐藻醣膠具有多種生物活性，如結合生長因子並增強其活性和形成，促進新生血管和纖維狀膠原基質的形成，抗菌、抗氧化、抗病毒、抗炎、抗腫瘤、抗凝血和免疫調節活性[4]。重要的是，褐藻醣膠還能調節與傷口修復相關的轉化生長因子 $\beta 1$ 的作用[6]。在 Sezer 的團隊報導了一種含有褐藻醣膠的薄殼聚糖薄膜，可促進皮膚傷口癒合[24]。在 Murakami 的團隊開發了一種藻酸鹽/幾丁質/殼聚糖/褐藻醣膠水凝膠片，可增強治療傷口的修復[25]。在 2020 年，Yuanping 的團隊報導海藻酸鹽/殼聚糖/褐藻醣膠複合海綿敷料具有大孔隙率、高強度和高比表面積，有利於滿足更高的透氣性、可調節的水蒸氣蒸發、更多的傷口滲液吸收（>20 倍乾重）的需求，並且具有增強血管生成和毛髮再生及促進全層傷口癒合的能力[4]。在本研究將以過去以創新細胞積木應用三維人工真皮開發為研究獲得第十六屆國家新創獎及第十七-十八屆新創精進獎(2019-2021)的經驗，將以膠原蛋白(Collagen)為基底，製備具褐藻醣膠、硫酸軟骨素(Chondroitin sulfate)及幾丁聚醣(Chitosan)的複合海綿敷料。期望藉此提升銅藻萃取之褐藻醣膠之經濟價值，並幫助皮膚損傷治療之發展。



圖三：國家新創獎：創新細胞積木應用三維人工真皮開發。

貳、預期目標與進度說明

一、 預期目標

- (1) 完成銅藻採集及褐藻醣膠的萃取與分離。
- (2) 完成膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的製備。
- (3) 完成海綿敷料的傅立葉轉換紅外線光譜、掃描式電子顯微鏡及 X 射線衍射 (XRD) 光譜分析。
- (4) 完成海綿敷料的孔隙率測定、楊氏模數分析及體外降解速率分析
- (5) 完成海綿敷料的體外凝血實驗及生物相容性分析。
- (6) 完成動物實驗及切片與染色，評估膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的皮膚組織修復能力。
- (7) 期中報告撰寫
- (8) 期末報告撰寫
- (9) 正式報告撰寫
- (10) 成果壁報繳交

二、 進度說明

- (1) 完成銅藻採集。
- (2) 完成膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的製備。
- (3) 完成海綿敷料的傅立葉轉換紅外線光譜、掃描式電子顯微鏡及 X 射線衍射 (XRD) 光譜分析。
- (4) 完成海綿敷料的掃描式電子顯微鏡
- (5) 完成海綿敷料的體外降解速率分析
- (6) 完成海綿敷料的生物相容性分析。
- (7) 完成海綿敷料的孔隙率及膨潤度測定
- (8) 完成海綿敷料的體外凝血實驗及生物相容性分析
- (9) 期中報告撰寫
- (10) 期末報告撰寫
- (11) 正式報告撰寫
- (12) 成果壁報繳交

參、研究方法及過程

褐藻醣膠的萃取與分離

至台灣北海岸收集重約 1 公斤的銅藻。用蒸餾水洗滌收集的銅藻以去除鹽分、沙子和附生植物，然後在室溫下在空氣中陰乾 5 天。使用混合研磨機將遮光乾燥的樣品切碎並製成粉末。參考文獻[26]以逐次提取法提取褐藻醣膠。將 100 g 粉末樣品浸泡在 500 mL 氯仿/甲醇 (1:1 v/v) 溶劑中過夜以去除色素。然後，將殘餘物依次用 2% CaCl_2 (2 × 100 mL, 70 °C 3 h) 萃取，然後用 0.01 N HCl (2 × 100 mL, 70 °C 3 h) 和 3% Na_2CO_3 (1 × 100 mL 在 70 °C 下 3 小時)。將在 2% CaCl_2 和 0.01 N HCl 中獲得的提取物合併並使用冷凍乾燥器濃縮為粗製褐藻醣膠。記錄粗製褐藻醣膠中的總糖[27]和硫酸鹽含量[28]。岩藻糖、半乳糖和甘露糖是從通過苯酚-硫酸法[27]製備的相應單體標準圖估計的，使用吸光度測量以估計總糖量。

使用濃度增加的 200 mL NaCl (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 M) 通過 DEAE-纖維素 52 管柱 (42 × 3 cm) 分離重 200 mg 的粗製褐藻醣膠。收集 25 mL 洗脫液，直至通過酚-硫酸法對照 L-岩藻糖標準檢測到洗脫液中不再有糖分[27]。根據糖含量，將第 42、43、44、45 和 46 的連續洗脫液合併，並通過定性測試確認存在 1-岩藻糖含量[29]。然後，將合併的洗脫液在蒸餾水中透析 (截止 3.5 kDa) 24 小時，然後凍乾並稱重 (46 mg)。使用苯酚-硫酸法[27]，以葡萄糖為標準計算總糖，並使用其標準圖記錄純化的褐藻醣膠中的單個單體如岩藻糖、半乳糖和甘露糖。記錄純化的褐藻醣膠的硫酸鹽含量[28]。

膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的製備

一般市售人工皮膚之似真皮層之膠原蛋白基底雖具有內部孔隙，但不具有三維結構，藉由三維列印技術製造模具(圖一)以製成具結構之海綿敷料。以 3D 列印數位光處理技術搭配本團隊開發之具生物相容性及彈性的光固化型胺基樹脂列印標準化尺寸模具，倒入配置含不同濃度褐藻醣膠之膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料，並測試特定冷凍抽乾參數製成複合式海綿敷料，以期找出具優良生物相容性並與天然皮膚相近之楊氏模數的材料配比。圖二為本研究前置實驗以膠原蛋白為基底材料之實際製備圖。從前置實驗中，我們得知冷凍抽乾參數對製成的海綿敷料之楊氏模數具有影響，因此在本研究中除了找出最佳化材料配方外，最佳化冷凍抽乾參數也是研究的重點。

傅立葉轉換紅外線光譜(FTIR)分析

Nicolet iN10 FTIR 光譜儀 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 用於表徵 500-4000 cm^{-1} 範圍內樣品 (即不同配比膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料) 的 FTIR 光譜，在 32 次掃描期間以 2 cm^{-1} 的掃描分辨率進行掃描。

X 射線衍射 (XRD) 光譜分析

XRD 光譜由 DX2700 (D8 Advance, Bruker AXS GmbH) 進行, 以鑑定晶體結構。樣品在 5 到 50 ° (2θ) 之間以每分鐘 0.03° (2θ) 的掃描速率在 40 kV 和 30 mA 的電壓下運行, 配備 Cu Kα 輻射 (λ = 1.5418 Å)。

掃描式電子顯微鏡(SEM)分析

使用在 10 kV 加速電壓下操作的 SEM (VEGA3, TESCAN, Czech) 觀察不同配比膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的結構。在成像之前, 樣品被濺射鍍金以增加導電性。使用 Image J 軟件測量孔徑。

複合海綿敷料的膨潤度測定

將海綿樣品浸入 PBS 中 24 小時。在浸入 PBS 之前和之後測量海綿樣品的重量。膨潤度使用以下公式計算:

$$\text{膨潤度} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100\%$$

式中 W1 和 W2 分別為樣品在 PBS 中浸泡前後的重量。

體外凝血實驗

根據報導的文獻進行凝血試驗[30]。將不同配比膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料製成圓形 (直徑約 20 毫米) 並放置在培養皿上。之後, 將 200 μL 的血液滴到每個樣品的表面, 將其在 37°C 下孵育 5 分鐘。之後, 將 50 mL 去離子水從邊緣緩慢倒入培養皿中。沒有被困在血凝塊中的紅細胞將在水中溶血, 然後將含有血紅蛋白的溶液轉移到比色管中測量 OD540 nm, 以確定複合海綿對凝血的影響。

體外降解速率分析

將海綿敷料浸泡於磷酸緩衝溶液(Phosphate-buffered saline, PBS)1 天, 取出後利用吸水紙將水分吸乾後, 再以電子微量天秤量測支架重量 (W1)。再將浸泡於 2ml 磷酸緩衝溶液, pH 值控制為符合人體生理狀態約 7.4, 且維持在 37°C 恆溫環境中。浸泡的磷酸緩衝溶液每週更換 1 次, 並在更換前用去離子水清洗, 分別在第 1、3、5、7、14、30 及 60 天, 將海綿敷料取出以吸水紙吸乾, 量測量測重量(WX), 並紀錄其表面的降解變化。計算支架降解率(即重量減少比率)之公式如下:

一般自體的血管及纖維母細胞長成新"真皮"需要 2 至 4 週的成熟期並幫助組織同化過程, 因此

$$\text{降解率(即重量減少比率)} = \frac{W_1 - W_x}{W_1} \times 100\%$$

複合海綿敷料的孔隙率測定

採用液體置換法測定不同配比膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的孔隙率。簡而言之，將海綿樣品浸入無水乙醇中以達到飽和。在浸入乙醇之前和之後測量海綿樣品的重量。孔隙率使用以下公式計算：

$$P = \frac{W_2 - W_1}{\rho V} \times 100\%$$

式中 W_1 和 W_2 分別為樣品在乙醇中浸泡前後的重量； V 是浸泡前的樣品體積， ρ 是乙醇的密度。

生物相容性分析

將成纖維細胞培養在不同配比膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料 1 及 3 天進行細胞增生結果分析，以期找出相對細胞存活率在 80% 以上之具優良生物相容性之海綿敷料材料配方。

肆、結果與討論

雖然大量漂流來的銅藻帶來了海洋問題，但銅藻所含有的褐藻醣膠具有多種生物活性，如抗菌、抗氧化、抗病毒、抗炎、抗腫瘤、抗凝血和免疫調節活性等功能[4]。有鑑於褐藻醣膠具有調節與傷口修復相關的轉化生長因子 $\beta 1$ 的作用，並且能促進新生血管和纖維狀膠原基質的形成等幫助皮膚修復的潛力。因此，本研究結合過去在開發人工真皮的經驗，將台灣海岸銅藻所萃取的褐藻醣膠應用於全皮膚損傷修復之三維海綿敷料的開發。

在本研究中，我們以膠原蛋白為基底配方，添加硫酸軟骨素、幾丁聚醣及褐藻醣膠以期找出最佳化配方之三維海綿敷料。在過去的研究中顯示膠原蛋白本身根據大小有液狀、膠狀、粉狀無法定型成支架，因而需使用第二種巨分子物質黏多醣糖胺聚醣(Glycosaminoglycan, GAG)以使膠原蛋白延緩被吸收並形成膜狀物而有更高的彈性較不會斷裂。此外，加入 GAG 不只是一要讓膠原蛋白不容易被水解還使其具有較適合作為傷口敷料的物理性質。再者，有加入 GAG 的膠原蛋白比較容易形成有空洞的結構，可提供細胞長入的空間，並且 GAG 沒有抗原性，會被分解成無毒的寡醣。在本研究中，我們所添加的硫酸軟骨素即為一種 GAG。此外，在本研究中將研究不同褐藻醣膠的配比對製備之應用於全皮膚損傷修復之三維海綿敷料的物理性質和生物相容性的影響。

在研究中，使用 DLP 數位光固化處理 3D 列印機進行模具製備。表一為具生物相容性及彈性的光固化型胺基樹脂的配方，用以製備模具。此外，我們將配置好的不同配方(表二)的三維海綿敷料材料倒入模具(圖四)中，進行冷凍乾燥，以製成三維海綿敷料(圖五)。從圖五可見製備之三維海綿敷料皆具有良好的三維立體結構。再者，經過壓縮、彎曲之後，我們發現添加了褐藻醣膠的海綿敷料具有良好的壓縮及彎曲恢復力(圖六)。

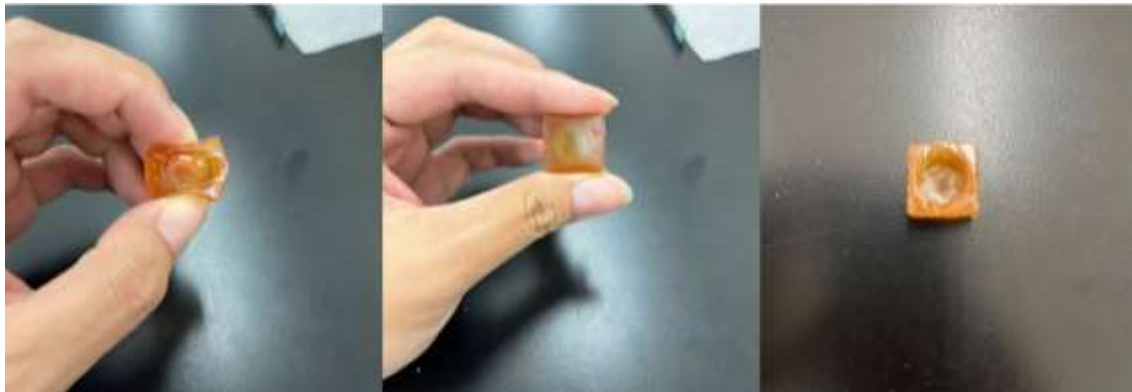
表一：具生物相容性及彈性的光固化型胺基樹脂的配方表

AR+Dopamine	50%
Tris Buffer PH8.5	25%
HEMA	23.39%
HMBS	0.1%
TEMPO	0.01%
TPO	1.5%

說明：AR：氨基樹脂(三聚氰胺-甲醛、苯代三聚氰胺甲醛和尿素甲醛(尿醛)樹脂)；Dopamine：多巴胺(dihydroxyphenyl ethylamine)；Tris buffer：三羥甲基胺基甲烷(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)；HEMA：甲基丙烯酸羥乙酯(2-Hydroxyethyl methacrylate)；HMBS：2-羥基-4-甲氧基二苯甲酮-5-磺酸(2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenone-5-Sulfonic Acid)；TPO：甲基丙烯酸酯(4-Methacryloyloxy-TEMPO Free Radical TEMPO Methacrylate)；TPO：二苯基 2,4,6-三甲基苯甲酰基氧化膦。

表二: 膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的材料比例配置

	第 1 組	第 2 組	第 3 組	第 4 組	第 5 組
膠原蛋白	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
幾丁聚醣	0%	0.15%	0.15%	0.15%	0.15%
硫酸軟骨素	0%	0.08%	0.08%	0.08%	0.08%
褐藻醣膠	0%	0%	0.5%	1%	2%



圖四: 本研究製造之用以製成三維海綿敷料之具彈性模具。



圖五: 本研究製備之三維海綿敷料支成品圖。

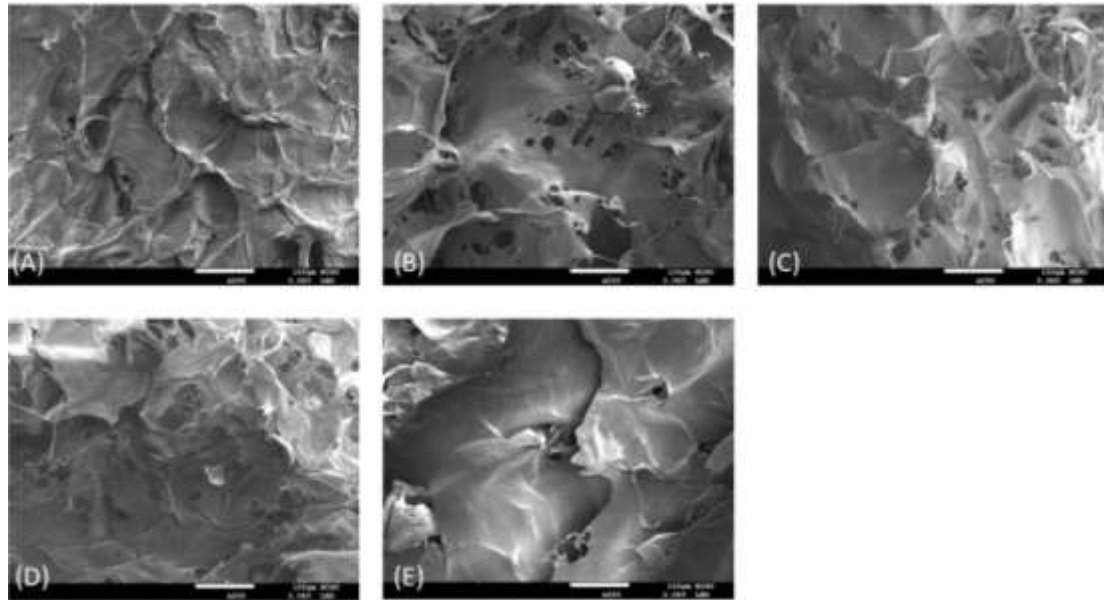


圖六: 含褐藻醣膠之三維海綿敷料經彎曲(上)及壓縮(下)後之結果。

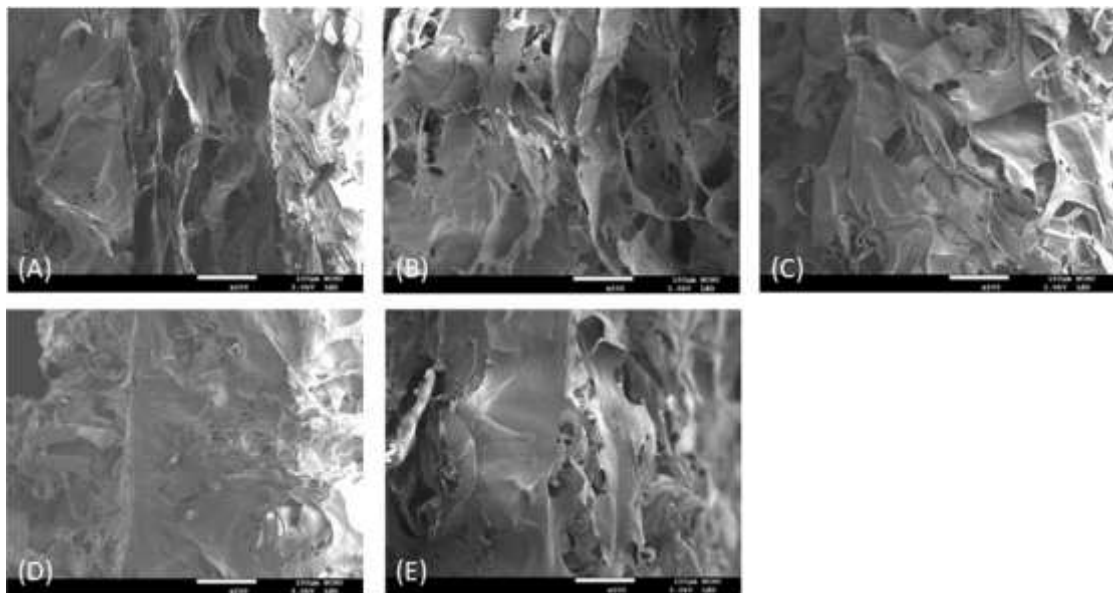
在本研究中,使用數位電子顯微鏡進行分析,觀察不同配比膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的結構(圖六)。結果顯示添加硫酸軟骨素及幾丁聚醣後,可增加膠原蛋白的孔隙大小。

當添加褐藻醣膠後，仍具有孔隙結構，但隨著褐藻醣膠的濃度增加，孔隙結構越緻密，使三維敷料仍具透氣性及細胞生長空間，並且具有更佳物理性質。

圖七(表面)及圖八(剖面)為三維海綿敷料成品再進行一次 SEM 影像測定之結果。結果顯示添加硫酸軟骨素後，較純膠原蛋白配方(圖七 A)具有較粗糙表面及孔隙結構，隨著褐藻醣膠添加比例增加，會使三維海綿敷料表面更粗糙，有助於細胞貼附，且隨著褐藻醣膠添加比例增加其孔隙結構越緻密。表三為孔隙率分析之結果。



圖七:(A)為第一組正面 SEM 影像圖；(B)為第二組正面 SEM 影像圖；(C)為第三組正面 SEM 影像圖；(D)為第四組正面 SEM 影像圖；(E)為第五組正面 SEM 影像圖 (比例尺: 100 μm)。

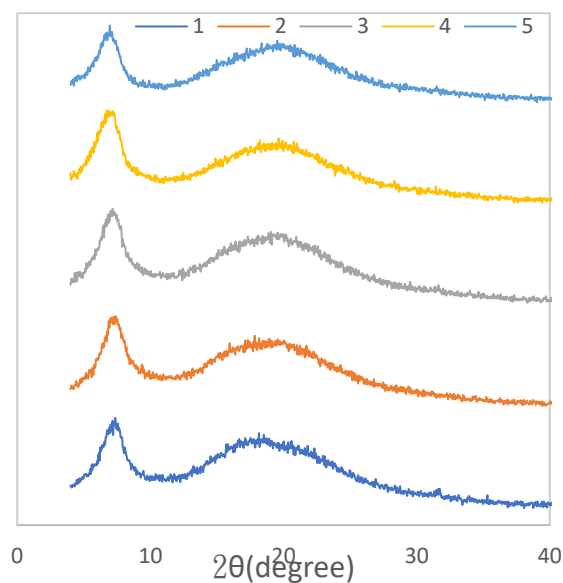


圖八:(A)為第一組剖面 SEM 影像圖；(B)為第二組剖面 SEM 影像圖；(C)為第三組剖面 SEM 影像圖；(D)為第四組剖面 SEM 影像圖；(E)為第五組剖面 SEM 影像圖 (比例尺: 100 μm)。

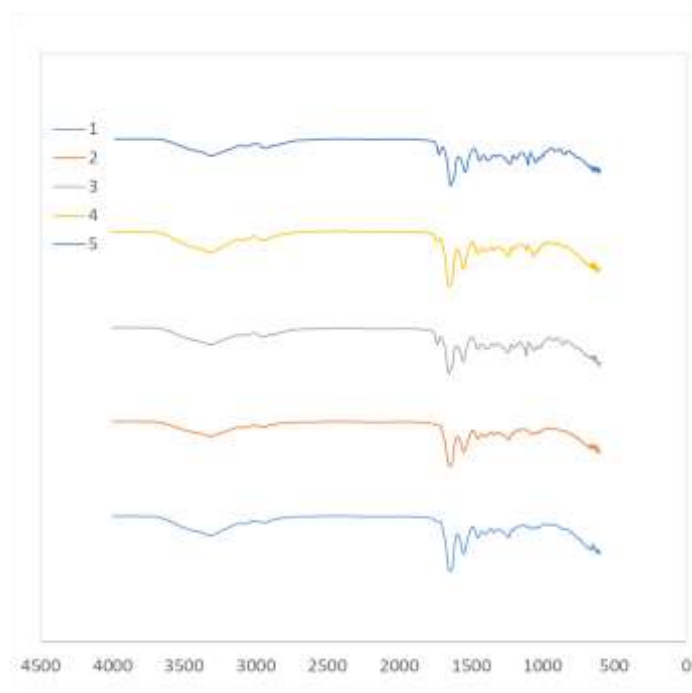
表三: 膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的孔隙率分析

	第 1 組	第 2 組	第 3 組	第 4 組	第 5 組
孔隙率	83.21%	85.01%	86.15%	85.07%	75.35%

圖九為 XRD 之分析結果。結果顯示增加褐藻醣膠後，在 $2\theta=21.5^\circ$ 、 21.8° 和 21.5° 對應的特徵衍射峰減弱。這表示加入褐藻醣膠可以增強三元復合體系中分子間的氫鍵，組分材料的較低結晶度表明複合海綿中材料組分的混溶性更好。FTIR 的吸收峰減少也顯出複合海綿中材料的混合性(圖十)。

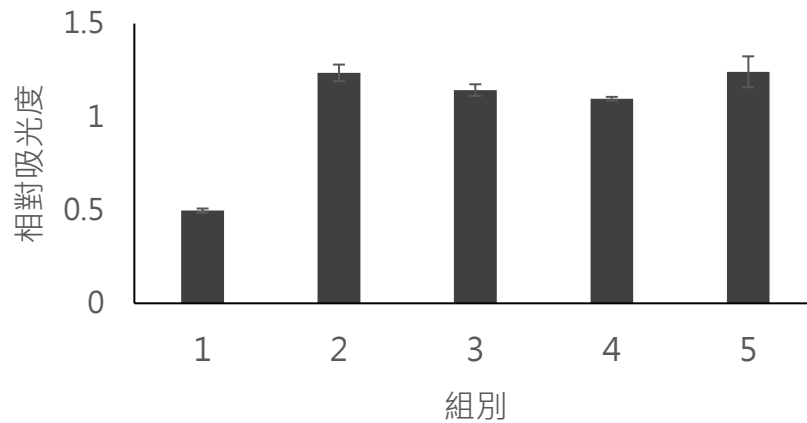


圖九: 膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的 XRD 分析結果



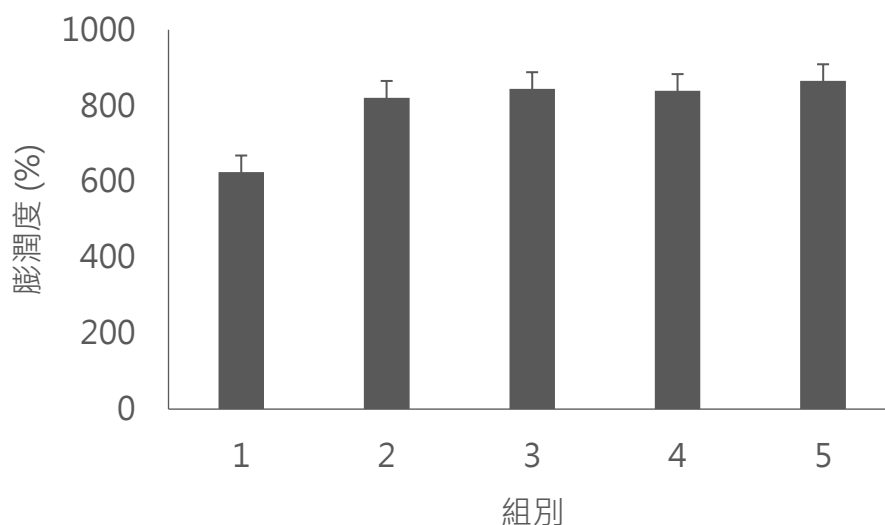
圖十: 膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的 FTIR 分析結果

圖十一為體外抗凝血實驗之結果。因為幾丁聚醣具有抗凝血的功效，因此 2-5 組含有幾丁聚醣的海綿敷料較只含膠原蛋白的海綿敷料有更的抗凝血性，讓血液可滲入海綿敷料中，不是直接凝聚傷口表面，減少疤痕的產生。此外，含較多的褐藻醣膠有助於抗凝血性的提升，讓血液可滲入海綿敷料中。



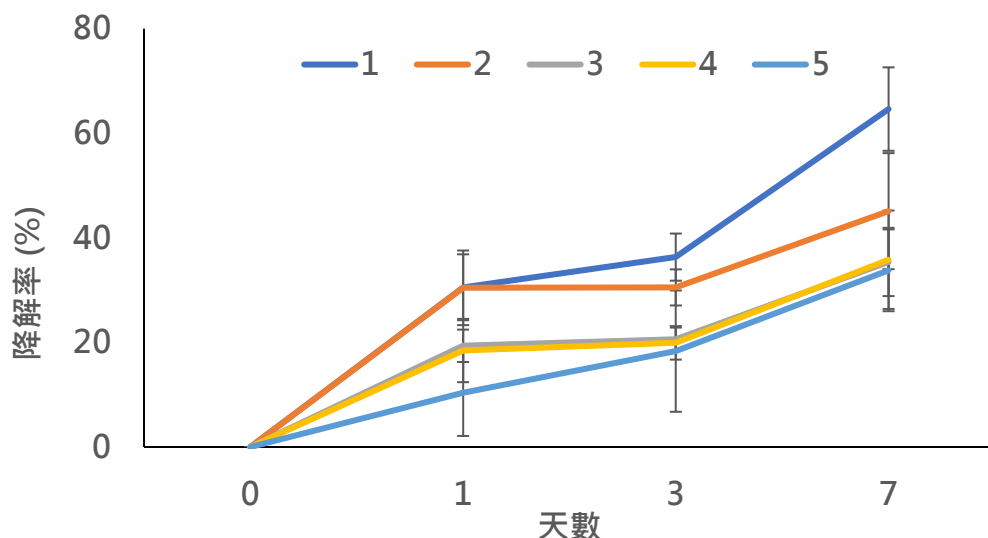
圖十一：膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的體外凝血實驗分析

圖十二為膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料膨潤度分析的結果。交聯狀的高分子物質無法溶解於溶劑中，溶劑只能滲透進入高分子的網狀結構中，使其產生膨脹。若高分子物質的網狀密度愈大，溶劑愈不易侵入網狀結構中，則其膨脹度將愈小。結果顯示第 1 組(只含有膠原蛋白)膨脹係數最低，且透過 SEM 影像觀察，在沒有添加幾丁聚醣，褐藻醣膠，硫酸軟骨素情況下，會有較少孔隙，所以會使溶劑不易滲入。另外，發現加了越高比例的褐藻醣膠會使膨潤度變高，可吸收組織液保持傷口溼潤，加速傷口的癒合。



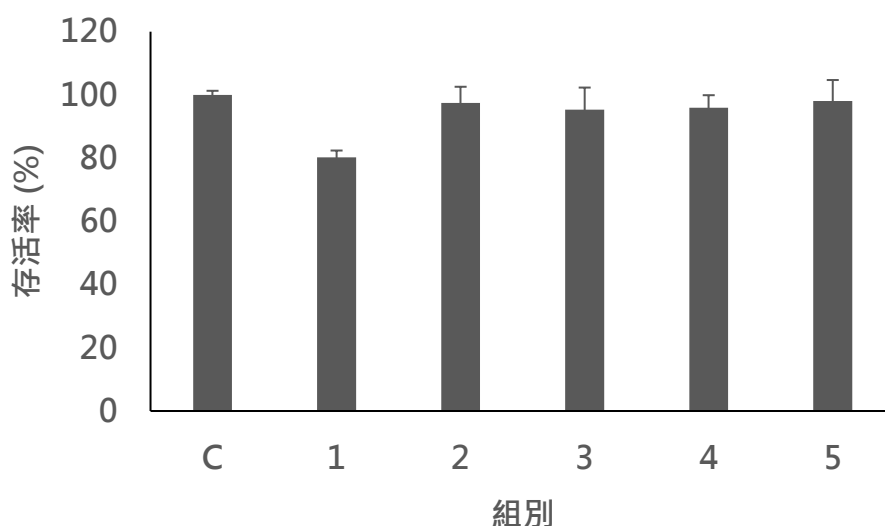
圖十二：膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的膨潤度分析

圖十三為三維海綿敷料進行降解率分析之結果。結果顯示純膠原蛋白敷料於第 7 天將解率已至 64.6%，但一般傷口修復約需 2 週的時間，因此降解速率過快，無法匹配皮膚長成的時間。隨著褐藻醣膠的添加，降解速率下降，其第 7 天降解率可下降至 33.8%，使其仍具有穩定的結構及物理性質。

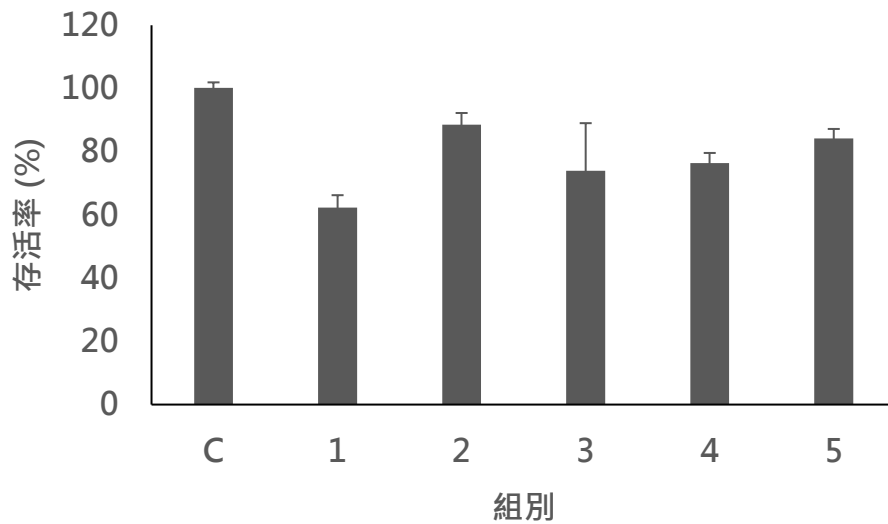


圖十三：膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的第 1、3、7 天降解率。

在生物相容性的測試中(圖十四和十五)，所有樣品第 1 天的相對細胞存活率皆在 80%以上，顯示製備之三維海綿敷料具有良好的生物相容性。此外，添加褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣皆較純膠原蛋白具有較佳的生物相容性。



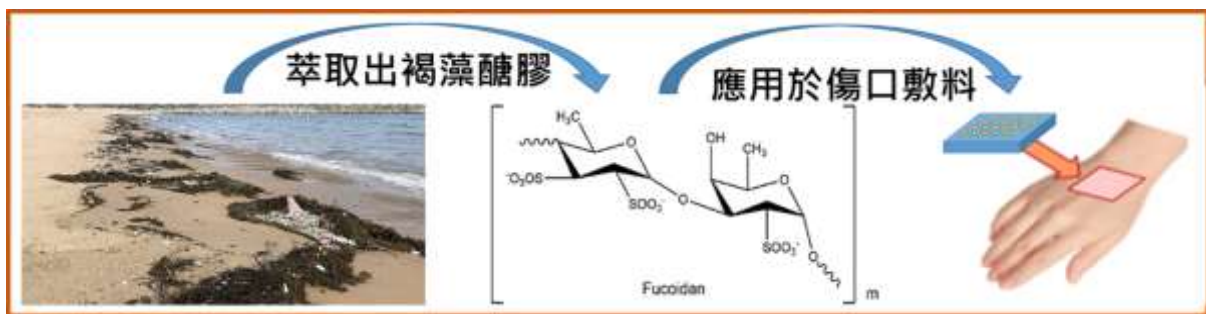
圖十四：膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的第 1 天細胞存活率



圖十五：膠原蛋白/褐藻醣膠/硫酸軟骨素/幾丁聚醣海綿敷料的第3天細胞存活率

伍、結論與展望

本研究採用台灣海岸銅藻所萃取的褐藻醣膠，開發出含褐藻醣膠之膠原蛋白/硫酸軟骨素/幾丁聚醣之三維海綿敷料，其具有良好細胞相容性、三維立體結構及較佳的降解率、孔隙率和膨潤度。未來將進行組織學及皮膚組織修復能力結果評估。所開發之傷口敷料將有助於提升傷口醫療修復的發展，並且幫助提升銅藻的經濟價值，及解決銅藻成為海洋廢棄物的問題。



陸、參考文獻

1. 銅藻 <https://zh.wikipedia.org/wiki/銅藻>.
2. 海洋環境與保育：外來海藻的生態衝擊
<https://scitechvista.nat.gov.tw/Article/C000003/detail?ID=6933fc4d-cc2b-40cd-a2e1-a1924bc63052>.
3. 春夏之交銅藻報到，臺灣金山萬里沿岸清運50噸海漂垃圾怎麼處理
<https://www.tspweb.com/key/銅藻台灣.html>.
4. Hao, Y.; Zhao, W.; Zhang, L.; Zeng, X.; Sun, Z.; Zhang, D.; Shen, P.; Li, Z.; Han, Y.; Li, P.; Zhou, Q. Bio-multifunctional alginate/chitosan/fucoidan sponges with enhanced angiogenesis and hair follicle regeneration for promoting full-thickness wound healing. *Mater. Des.* 2020, 193, 108863.
5. 產學研醫攜手 首台慢性傷口癒合治療儀問世
https://www.biomedical.org.tw/webpage/front_news_view.aspx?flag=6EbPRJ5C078%3D&id=82f8ba0d-4c44-4627-9583-57e8b268d604.
6. O' Leary, R.; Rerek, M.; Wood, E. J. Fucoidan Modulates the Effect of Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 on Fibroblast Proliferation and Wound Repopulation in in Vitro Models of Dermal Wound Repair. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 266 - 270.
7. 預告馬祖藍眼淚季 澳口沙灘已出現大量銅藻
<https://www.cna.com.tw/news/alloc/202002230033.aspx>.
8. 有關銅藻（馬尾藻）成災翻身變黃金議題之回應
https://www.namr.gov.tw/ch/home.jsp?id=43&parentpath=0,6&mcustomize=clarification_view.jsp&dataserno=127249.
9. Silchenko, A. S.; Rasin, A. B.; Kusaykin, M. I.; Kalinovsky, A. I.; Miansong, Z.; Changheng, L.; Malyarenko, O.; Zueva, A. O.; Zvyagintseva, T. N.; Ermakova, S. P. Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri*. *Carbohydr. Polym.* 2017, 175, 654 - 660.
10. Herath, K. H. I. N. M.; Cho, J.; Kim, A.; Kim, H.-S.; Han, E. J.; Kim, H. J.; Kim, M. S.; Ahn, G.; Jeon, Y.-J.; Jee, Y. Differential modulation of immune response and cytokine profiles of *Sargassum horneri* ethanol extract in murine spleen with or without Concanavalin A stimulation. *Biomed. Pharmacother.* 2019, 110, 930 - 942.
11. 5 Structure Of Fucoidan - Fucoidan Structure
https://www.seekpng.com/ipng/u2w7r5u2w7w7t4q8_5-structure-of-fucoidan-fucoidan-structure/.
12. Kwak, J.-Y. Fucoidan as a Marine Anticancer Agent in Preclinical Development. *Mar. Drugs* 2014, 12.
13. Luthuli, S.; Wu, S.; Cheng, Y.; Zheng, X.; Wu, M.; Tong, H. Therapeutic Effects of Fucoidan: A Review on Recent Studies. *Mar. Drugs* 2019, 17.
14. Rioux, L.-E.; Turgeon, S. L.; Beaulieu, M. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicruris*. *Phytochemistry* 2010, 71, 1586 - 1595.
15. Pereira, M. S.; Mulloy, B.; Mourão, P. A. S. Structure and Anticoagulant Activity of

- Sulfated Fucans: COMPARISON BETWEEN THE REGULAR, REPETITIVE, AND LINEAR FUCANS FROM ECHINODERMS WITH THE MORE HETEROGENEOUS AND BRANCHED POLYMERS FROM BROWN ALGAE *. J. Biol. Chem. 1999, 274, 7656 – 7667.
16. Song, Y.; Wang, Q.; Wang, Q.; He, Y.; Ren, D.; Liu, S.; Wu, L. Structural characterization and antitumor effects of fucoidans from brown algae *Kjellmaniella crassifolia* farmed in northern China. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 119, 125 – 133.
 17. Sun, X.; Duan, M.; Liu, Y.; Luo, T.; Ma, N.; Song, S.; Ai, C. The beneficial effects of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharides on obesity and the gut microbiota in high fat diet-fed mice. *J. Funct. Foods* 2018, 46, 48 – 56.
 18. Ye, J.; Chen, D.; Ye, Z.; Huang, Y.; Zhang, N.; Lui, E. M. K.; Xue, C.; Xiao, M. Fucoidan Isolated from *Saccharina japonica* Inhibits LPS-Induced Inflammation in Macrophages via Blocking NF- κ B, MAPK and JAK-STAT Pathways. *Mar. Drugs* 2020, 18, 328.
 19. 先進傷口敷料的全球市場：考察與預測（2027年）
<https://www.giichinese.com.tw/report/qyrl038382-global-advanced-wound-dressings-market-insights.html>.
 20. Sen, C. K.; Gordillo, G. M.; Roy, S.; Kirsner, R.; Lambert, L.; Hunt, T. K.; Gottrup, F.; Gurtner, G. C.; Longaker, M. T. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* 2009, 17, 763 – 771.
 21. Gurtner, G. C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008, 453, 314 – 321.
 22. Mogoşanu, G. D.; Grumezescu, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int. J. Pharm.* 2014, 463, 127 – 136.
 23. Laurienzo, P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. *Mar. Drugs* 2010, 8.
 24. Sezer, A. D.; Hatipoglu, F.; Cevher, E.; Oğurtan, Z.; Bas, A. L.; Akbuğa, J. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: Preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech* 2007, 8, E94 – E101.
 25. Murakami, K.; Aoki, H.; Nakamura, S.; Nakamura, S.; Takikawa, M.; Hanzawa, M.; Kishimoto, S.; Hattori, H.; Tanaka, Y.; Kiyosawa, T.; Sato, Y.; Ishihara, M. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials* 2010, 31, 83 – 90.
 26. Shanthi, N.; Arumugam, P.; Murugan, M.; Sudhakar, M. P.; Arunkumar, K. Extraction of Fucoidan from *Turbinaria decurrens* and the Synthesis of Fucoidan-Coated AgNPs for Anticoagulant Application. *ACS Omega* 2021, 6, 30998 – 31008.
 27. DuBois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 1956, 28, 350 – 356.
 28. DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* 1962, 84, 106 – 110.
 29. Dische, Z.; Shettles, L. B. A SPECIFIC COLOR REACTION OF METHYLPENTOSEs AND A SPECTROPHOTOMETRIC MICROMETHOD FOR THEIR DETERMINATION. *J. Biol. Chem.* 1948, 175, 595 – 603.

30. Ong, S.-Y.; Wu, J.; Mochhala, S. M.; Tan, M.-H.; Lu, J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials* 2008, 29, 4323 – 4332.