

中文摘要

冠狀動脈繞道手術需要利用小管徑的血管取代物，但是由於小管徑的血管血流速度較慢，無法成功的利用人工合成大管徑血管的材料作為取代物。目前標準的小管徑血管取代物是採用自身的其他血管，但是包含病患已有其他的血管疾病、截肢、以及之前已做過置換手術等因素，限制了自身血管的使用，而組織工程技術則提供了一個製造合適的人工血管取代物的新方法。一個好的血管取代物須具備下列兩個重要條件：完整且具血液相容性的內皮層，以及具備良好的物理性質。在過去的研究中有相當多建構人工血管的方法，但是這些方法具有許多缺點，包含機械強度不足、以及最重要的：不具有完整的內皮細胞層。在本實驗中，我們提出了一個新的方法，利用羊膜作為骨架來建構人工血管。羊膜已經被成功的用於眼角膜移植的骨架，且不具免疫排斥性，並可以提供一層完整且具彈性的基底膜，我們並證明了羊膜可以促進內皮細胞形成有功能的內皮層。在結果中，我們從豬的主動脈分離並培養內皮細胞及平滑肌細胞，利用免疫螢光染色確定細胞的純度。我們將血管內皮細胞及平滑肌細胞培養在羊膜及具生物分解特性的 PLGA 或 PCL 網膜上，並曾嘗試以幾種不同的模式來建構人工血管。初步的動物實驗結果顯示，在移植後四星期時，雖以超音波觀察到血液仍在人工血管中流動，但不久後血管仍因血栓及內皮層增生而產生堵塞。此外，螺旋管狀成型的缺陷、以及羊膜與聚合物間的不相容性仍急待解決。利用化學交聯的多層羊膜具有良好的物理性質，且可以克服上述方法的缺陷，但動物實驗的結果顯示，內皮細胞仍不足以抵抗血流產生的刮力並導致血栓的產生，未來可利用生物反應器加強內皮細胞對切應力的耐受性。

關鍵詞：全生物性人工血管、羊膜、製作

英文摘要

Small-caliber blood vessel grafts are required for coronary artery bypass surgery. But the lower blood flow velocities of small-diameter vessels have led to the failure of synthetic materials that are successful for large-diameter vessel grafts. Autologous vessels are the standard for small-diameter vessel grafts now, but there are many limitations including other vascular diseases, amputation, and previous harvest. Tissue engineering provides a promising way to generate available vessel grafts. There are two important criteria for blood vessel equivalent (BVE): an integral endothelium to create a hemocompatible lining and smooth muscle cells to provide mechanical strength. In previous studies, several ways have been designed to construct tissue engineered blood vessels (TEBVs). But there are several disadvantages in each ways including inadequacy in mechanical strength and most important, no integral and functional endothelium available. Here, we propose a new method to fabricate a biological blood vessel equivalent by amniotic membrane (AM). AM is a nonimmunogenic substrate and can provide an integral, elastic basement membrane. AM has been successfully used as a scaffold in tissue engineered human corneal transplantation. We also demonstrated that AM could induce the formation of a functional endothelium. We isolated porcine vascular endothelial cells and smooth muscle cell. In the fabrication of BVE, vascular ECs and SMCs were cultured on AM and biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) or poly- ϵ -caprolactone (PCL) scaffolds. Several models have been tested to fabricate the BVE. The preliminary results from the animal studies indicated that the BVE remained unobstructed under ultrasound examination at 4 weeks after transplantation.

However, the blood flows of BVEs were blocked by thrombosis and intimal hyperplasia thereafter. In addition, the flaw of the rolling method during BVE preparation and the incompatibility between AM and the polymer were still existed. BVE constructed by cross-linked AM showed high mechanical properties and seemed to overcome the disadvantages described above. However, the ECs couldn't sustain the shear stress from the blood flow and led to thrombus formation. In the future, bioreactor will be used to improve the tolerance of ECs to shear stress.

Keywords: Blood vessel equivalent, amniotic membrane, fabrication

前言

冠狀動脈疾病是好發於先進國家的疾病之一，由動脈粥狀硬化(atherosclerosis)造成的血管壁增厚會導致動脈管徑縮小，使血流量降低，導致心肌缺血、引發心臟病(Glass and Witztum, 2001)。目前有許多方法被應用來治療冠狀動脈疾病，包括藥物控制、冠狀動脈繞道手術(coronary artery bypass grafting, CAPG)、及經皮介入性治療(percutaneous coronary intervention, PCI；如氣球擴張術)。由於經皮介入性治療具有傷口小、恢復時間短等優點，在近幾年被大量的使用於冠狀動脈疾病的治療；但是有許多的病患(如多區域阻塞)並不適用於經皮介入性治療，且經皮介入性治療亦有再狹窄等問題，因此冠狀動脈繞道手術仍為重要的治療方式，且每年維持一定數量的手術治療(Rosamond et al., 2008)。要執行冠狀動脈繞道手術，必須要有合適的血管來進行移植，目前標準的替代血管為患者自身的其他血管，如隱靜脈(saphenous vein)和內乳動脈(internal mammary artery)。使用自身血管的優點在於不會有排斥反應，且血管的性質接近於原本的冠狀動脈；但是並不是所有的病患都具有合適的血管可用於移植，罹患冠狀動脈疾病的病患有可能同時有其他的血管疾病發生於其他血管，過去的手術及截肢亦可能造成合適血管的缺乏。基於以上原因，必須利用人工合成或其他方法來製造人工血管，以改善此問題。化工合成的高分子材料如 Dacron、expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)、polyurethane (PU)等，由於具有良好的物理特性且可製成任意的長度、大小，被認為是適當的人工血管材料(Kannan et al., 2005)，且被成功的應用於大管徑血管的替代手術中；但是在小管徑血管($< 6\text{mm}$, 如冠狀動脈)的置換、繞道手術中，由於小管

徑血管內的血流流速較低，化工合成的人工血管容易產生血栓(thrombus)及排斥反應(foreign body reaction)，因此不適用。故利用組織工程技術來建構具有生物相容性的人工血管變成為研究的重要方向(Thomas et al., 2003)。

最早提出體外培養人工血管概念的是在 1985 年，Weinberg 及 Bell 將牛的平滑肌細胞與膠原蛋白(collagen)混合，利用灌模的方式製成管狀的構造，最後將內皮細胞培養於此管狀構造的內面，此即第一個人工血管的模型(Weinberg and Bell, 1985; Weinberg and Bell, 1986)，但是由於膠原蛋白膠的物理性質較弱，無法提供足夠的支撐力，因此需要增加高分子材料(Dacron)來提高其強度。截至目前為止，利用組織工程技術建構人工血管的方法主要可以分成三大類(Mitchell and Niklason, 2003; Kakisis et al., 2005):(1)利用細胞外基質[如膠原蛋白、血纖維蛋白(fibrin)]與細胞混合成型，即在 Weinberg 及 Bell 提出的概念下改良(Seliktar et al., 2000; Cummings et al., 2004; Swartz et al., 2005)；(2)將平滑肌細胞及纖維母細胞培養成片狀後，將成片的細胞捲起，形成管狀(Laflamme et al., 2005; L'Heureux et al., 2006; L'Heureux et al., 2007)；(3)先將生物可分解性的高分子材料製成管狀，將細胞培養於高分子材料中，經過長時間的培養後，細胞產生的細胞外基質可逐漸取代高分子材料(Niklason et al., 1999; Williams and Wick, 2005; Heydarkhan-Hagvall et al., 2006)，但均未被廣泛使用。

要建構一個成功的人造血管有兩個基本條件：(1)人造血管必須具有完整、且有功能的內皮層；(2)人造血管必須具備良好的物理性質，如彈性、抗張性、順應性等。在正常的血管中，內皮細胞位於血管壁的最內層，正常的內皮細胞具有抗白血球、血小板沾黏的功能，因此可減少人在血

管中發生血栓及排斥反應的機會。在生理狀況下，血管必須承受及傳導血壓，因此人工血管必須具備足夠的張力，以避免產生血管瘤等問題，同時須具有彈性及順應性，來傳導血壓(Mitchell and Niklason, 2003; Rémy-Zolghadri et al., 2004)。

羊膜(amniotic membrane)目前已經被成功的應用於眼角膜的移植手術上。在結構上，羊膜可被分成三層，依序是上皮細胞層(epithelium)、基底膜(basement membrane)、及基質層(stromal matrix)。羊膜的基底膜在人類組織中屬於較厚的基底膜，具有很強的韌性，其主要成分為膠原蛋白第四型(collagen IV)及 laminin(Timpl, 1996)。在組織工程的使用上，細胞將被培養在此基底膜上。羊膜的基質層為一透明膠狀的組織，被認為具有幫助上皮組織形成、及抑制纖維化的作用(Burman et al., 2004; Solomon et al., 2005)。在應用上，羊膜被發現可以促進眼角膜輪部上皮細胞(limbal epithelial cell)的分化，因此被成功的應用於眼角膜的移植手術上(Tsai et al., 2000; Wang et al., 2003; Tosi et al., 2005)。同時亦有其他的研究利用羊膜進行皮膚的重建(Yang et al., 2006)，顯示羊膜在組織工程上具有潛力。因此本計劃利用羊膜及生物可分解的大分子做為基質，建構出更具生物相容性的人工血管取代物。

目的

本計畫的目的在於利用羊膜以及高分子材料做為架構體外培養的血管內皮細胞及平滑肌細胞，建構具有生物相容性的人工血管取代物。並利用初步的動物實驗觀察人工血管在動物體內的反應及變化，並依此作為改進及調整的方向。

研究方法

羊膜的製備

羊膜以含有 150 U/ml 盤尼西林、150 μ g/ml 鏈黴素、0.25 μ g/ml amphotericin B 之磷酸緩衝液清洗後，切割成適當的大小，儲存於-80°C。使用前，以磷酸緩衝液清洗，置於 dispase II (Roche, 德國) 中於 37°C 作用 25 分鐘。此時羊膜表面的上皮細胞可以被輕易的刮除，並露出基底膜。將基底膜朝上置於培養皿中或置於 PLGA 網膜 (Johnson & Johnson, 美國) 或 PCL 網膜上，待其乾燥後便可使用。

細胞培養

實驗中使用的動物模式為豬，採用一般的食用豬。將豬的主動脈以 phosphate buffered saline (PBS) 清洗乾淨，並去除多餘的結締組織。將血管剪開，內面朝下，於 0.25% trypsin (Hyclone, 美國) 在 37°C 下作用 15 分鐘，此時內皮細胞可以利用解剖刀刮下，並將細胞置於 M199 培養基 (Gibco, 美國) 中，重複刮下的動作五次，以確保所有的內皮細胞都被刮下。培養基內含 10% 胎牛血清 (Gibco, 美國)、150 U/ml 盤尼西林、150 μ g/ml 鏈黴素 (streptomycin)、2.5 μ g/ml 牛腦下垂體萃取液 (Sigma-Aldrich, 美國)、0.25 μ g/ml amphotericin B 及 25 μ g/ml gentamicin (Gibco, 美國)。將細胞置於 37°C、二氧化碳濃度為 5% 的培養箱中進行培養。將已刮除內皮細胞的血管片分切成 2x2 公厘的小塊，將內面朝下至於培養基中培養，每兩天將血管塊移至新的培養皿中，平滑肌細胞會自血管塊中移動到培養皿上，便可進行培養。每兩天更換一

次培養基，等細胞長滿後利用 0.25% trypsin 將細胞取下，進行繼代培養，經過 2 至 3 次繼代培養後可將培養基換成 M199 內含 10%胎牛血清、50 U/ml 盤尼西林、50 μ g/ml 鏈黴素、及 2.5 μ g/ml 牛腦下垂體萃取液。

人工血管的建構(模式一)

將去除上皮的羊膜與 PLGA 網膜(Johnson & Johnson，美國)結合，裁成 5x6 公分的大小，利用特殊設計的不鏽鋼分隔架，在羊膜長邊的前 1.6 公分的範圍內培養內皮細胞(10^5 cells/cm²)，其他區域則培養平滑肌細胞(10^4 cells/cm²)。培養五天後，利用鐵氟龍管當作軸心，自內皮細胞端將羊膜捲起，即可產生內皮細胞在最內層、平滑肌細胞在外層的管狀構造(圖一)。

人工血管的建構(模式二)

將羊膜在上，生物性人工網膜在下，然後經乾燥，捲成管狀，最內層仍是羊膜，加裝在特殊設計的懸吊裝置中，之後再將平滑肌細胞製成懸浮液灌入，使平滑肌細胞停留在管狀結構中生長，待平滑細胞填滿之後，取下，在內層灌入內皮細胞，使內皮細胞生長在羊膜上。(圖二)

人工血管的建構(模式三)

將去除上皮的羊膜與 poly- ϵ -caprolactone (PCL)網膜(取自化學工程系喬緒明教授實驗室)結合，使羊膜面朝下平鋪於培養皿中。將平滑肌細胞與血纖維蛋白膠(fibrin gel) (Sigma-Aldrich，美國)混合，使其最終濃度為平滑肌細胞 10^6 cells/ml、血纖維蛋白 25 mg/ml，將其填滿 PCL 網膜的孔隙，培養五天後將此複合網膜翻面，使羊膜朝上，將內皮細胞培養

於羊膜上(10^5 cells/cm²)。再經過五天的培養後，將此複合網膜直接捲起縫合，形成管狀結構(圖三)。

人工血管的建構(模式四)

在濕潤的狀態下將去除上皮的羊膜捲於鐵氟龍管上，使其成為約10~15層的多層構造，將此多層的羊膜置於無菌層流操作台中風乾，此時多層的羊膜會相互結合形成一管狀結構。利用0.1%二戊醛(溶於0.01N醋酸中)於4°C下作用24小時以進行化學交聯反應(cross-linking)，接著將管狀構造浸於0.1M甘胺酸(glycine)中，並在超音波震盪下作用30分鐘，以覆蓋未作用完全的醛基。最後利用無菌水清洗後，並在內層培養內皮細胞(2×10^5 cells/cm²)至少5天，即形成完全由羊膜及細胞組成的人工血管(圖四)。

動物實驗

實驗使用的豬隻為三品種豬(杜洛克×藍瑞斯×約克夏)，先利用ketamine注射劑使豬隻麻痺，劑量為10mg/kg，接著利用isoflurane進行長時間氣體麻醉。手術在台中榮民總醫院動物實驗室進行，由一般外科鄭紹彬醫師及心臟外科魏皓智醫師進行血管置換手術。手術前30分鐘經肌肉注射給予抗生素(penicillin G)以減少傷口感染，先清除頸動脈周邊的結締組織、將血管分離出來後，將血管的兩端用止血鉗固定。將部分的頸動脈剪下，用七號的Prolene縫線(Johnson & Johnson，美國)將人工血管與頸動脈接合，取代原有的血管，縫合過程中持續利用葡萄糖生理食鹽水維持人工血管的濕潤度。確定血流暢通後將傷口縫合，術後每天給予口服阿斯匹靈(40 mg/day)以減少血栓形成的機會，並給予

肌肉注射 Dexamethasone (0.4 mg/kg)以降低發炎及排斥反應。在手術後 1 天、2 天、1 週、2 週、4 週、8 週、12 週將動物犧牲，取出血管進行分析。

石蠟切片及組織染色

將人工血管以 PBS 清洗後，切成長約 1 至 2 公分的小片段，以 4% 甲醛於室溫下固定 1.5 小時，利用 50%、75%、85%、95%及 100%的酒精梯度進行脫水(各 10 分鐘)，接著以酒精對二甲苯(xylene)的比例 3:1、1:1、1:3 及 100%二甲苯的梯度進行置換(各 15 分鐘)，再以二甲苯對石蠟(Fisher Scientific，美國)的比例 3:1、1:1、1:3 的梯度於 58°C 置換為石蠟(各 1 小時)，最後在純石蠟中於 58°C 作用過夜並以石蠟包埋。利用切片機(Leica，德國)將標本切成 5-10 微米的薄片，固定於覆有聚離胺酸(poly-L-lysine) (Sigma-Aldrich，美國)的載玻片上，利用二甲苯及酒精梯度脫蠟，利用 hematoxyline (Sigma-Aldrich，美國)染色 10 分鐘並接著以 eosin (Sigma-Aldrich，美國)染色 30 秒，以對細胞核及細胞質作雙重染色，封片後以光學顯微鏡及數位照相系統(Nikon，日本)觀察並照相。

結果與討論

人工血管的建構及動物實驗(模式一)

本子計畫的主要目的在於利用羊膜建構人工血管，為了要建構一個結構上接近正常血管的人工血管，我們設計了一個共同培養的方法。但由於羊膜的物理性質十分的柔軟，使得在培養細胞及捲成管狀結構的過程中，以及之後的血管縫合，操作很困難，因此在原設計的模式之下多

加一層可分解的生物性人工網膜，以增加羊膜之支撐力和可塑性，並且不破壞羊膜之特性。血管內皮細胞及平滑肌細胞培養在羊膜-PLGA 網膜複合物上，經過 5 至 10 天的培養後，利用鐵氟龍管捲起，即形成管狀的結構(圖五 A、B)。在高倍顯微鏡觀察下，內皮細胞呈現單層的構造並位於管壁的最內層，外側則有呈現多層構造的平滑肌細胞(圖五 C)，在兩層細胞之間有明顯的空隙，是由 PLGA 網膜所造成。根據實驗的構想，將此人工血管置於生物反應器上使其成熟，平滑肌細胞的增生及移行可填滿此空隙。但是將人工血管置於生物反應器一個月之後，由於 PLGA 網膜的分解，造成支撐力不足，使血管的構型崩塌(圖五 D)，同時細胞均已死亡。

由於生物反應器結果的失敗，我們嘗試將人工血管先直接移植到動物體內，期望體內的微環境可幫助血管成形。我們將長約 3 公分的人工血管移植到豬的股靜脈(圖六 A)，三周後將血管取出，利用組織切片觀察發現有嚴重的血栓產生(圖六 B)。我們判斷是由於人工血管的最內層有一個自由端，這個構造容易導致血栓的生成；同時我們也觀察到，在人工血管的層與層之間有血液侵入的現象。以上的結果表示，這個模型可能不適合用來建構人工血管。

人工血管的建構(模式二)

我們設計了一種方法，試圖改進細胞填滿率不佳的問題。將不含細胞的羊膜-PLGA 網膜捲起後，將平滑肌細胞灌入羊膜間的間隙，使其附著於 PLGA 網膜的纖維上生長，希望藉此方法使平滑肌細胞生長並分泌細胞外基質，填滿由 PLGA 網膜產生的空隙。經過四週的培養後，經由組織切片可觀察到平滑肌細胞成功的附著並生長在 PLGA 網膜上，並填

補羊膜間隙(圖七)。但是在開始培養後的第五週，因為 PLGA 網膜開始分解，且細胞無法生成足夠的細胞外基質以增進支撐力，使血管的結構因支撐力不足而塌陷。同時利用此方法需要使用大量的平滑肌細胞，才能達到足夠的細胞貼附率，在未來的應用上會受到限制。

人工血管的建構及動物實驗(模式三)

為了解決上述的問題，我們從兩個不同的方向來著手。首先，我們希望改進高分子網膜的性質，延長其分解的時間，以及具有較小的孔徑。我們利用東海大學化學工程系喬緒明教授實驗室提供的 PCL 網膜，PCL 的分解時間大於 6 個月且孔徑可以控制約為 100 微米。另一方面，我們改進了人工血管成型的方法，以降低產生血栓的機率，同時可避免血液侵入的現象(圖三)。利用此方法改進的人工血管亦可形成完整的管狀(圖八 A)，將人工血管移植到豬的頸動脈(圖八 B)，四周後利用超音波觀察血流狀況，顯示血流仍通暢，但有內皮層增厚的情況(圖八 C)。移植後五周將血管取出進行切片觀察，結果顯示有嚴重的內皮層增生，同時也有輕微的血栓產生(圖八 D)。以上的結果顯示，此方法確實可改善先前所遇到的問題，即使改善的幅度仍有限；但是此方法亦有其缺點，在縫合的過程中，羊膜不易固定在 PCL 網膜上並產生剝離現象，會降低建構人工血管的成功率並增加手術的困難度。

人工血管的建構及動物實驗(模式四)

由於羊膜與高分子材料之間的相容性不佳，我們開始思考如何加強羊膜本身的物理性質，在不利用高分子材料的狀況下直接形成管狀構造。我們將羊膜捲成多層構造，並利用化學交連的方法增加其穩定性及

強度。同時有文獻指出，在建構人工血管的過程中，不需在培養時加入平滑肌細胞，在移植後宿主的平滑肌細胞會移行至人工血管的位置補足其功能(L'Heureux et al., 2006; L'Heureux et al., 2007)。因此我們直接將內皮細胞培養於羊膜管的內面(圖九 A)，橫切面顯示出多層羊膜的構造，且內皮細胞可以生長在經化學交連的羊膜上(圖九 B)。化學交連的羊膜管具有良好的支撐力，且具有足夠的爆破壓力(burst pressure, > 300 mmHg)。將人工血管移植到豬的頸動脈(圖九 C)，四周後將血管取出進行切片觀察，血管內壁周圍有平滑肌細胞的增生，管徑中有大量發炎細胞的堆積(圖九 D)。短時間移植的結果顯示出，大部分的內皮細胞在移植後 24 小時內便消失，推測可能是受血流沖刷被剝離，應設法加強內皮細胞的附著力，以增進人工血管的成功率。

自評

本計劃的主要目標在於建構具有生物相容性的人工血管取代物。我們已經成功建立豬的動脈內皮細胞及平滑肌細胞的培養系統，並將細胞成功的培養在羊膜上，在人工血管的建構上，我們嘗試了幾種不同的方法，並將羊膜與不同的高分子材料結合測試。雖然羊膜本身是適合細胞生長的基質，但是高分子材料的分解或與羊膜的物理性質差異卻會導致人工血管無法合成、或降低其實用性。利用化學交聯的多成羊膜所建構的管狀結構具有良好的物理性質，以及手術上的實用性，在動物實驗中卻發現內皮細胞無法承受血流的刮力。未來將繼續利用生物反應器加強人工血管的生物特性，使其更具血流相容性，提高成功率。

參考文獻

- Burman, S., Tejwani, S., Vemuganti, G. K., Gopinathan, U., Sangwan, V. S. (2004) Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: a review of current indications. *Cell Tissue Bank* **5**:161-175.
- Cummings, C. L., Gawlitta, D., Nerem, R. M., Stegemann, J. P. (2004) Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials* **25**:3699-3706.
- Glass, C. K. and Witztum, J. L. (2001) Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* **104**:504-516.
- Heydarkhan-Hagvall, S., Esguerra, M., Helenius, G., Söderberg, R., Johansson, B. R., Risberg, B. (2006) Production of extracellular matrix components in tissue-engineered blood vessels. *Tissue Eng* **12**:831-842.
- Kakisis, J. D., Liapis, C. D., Breuer, C., Sumpio, B. E. (2005) Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg* **41**:349-354.
- Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Butler, P. E., Hamilton, G., Seifalian, A. M. (2005) Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **74**:570-581
- Laflamme, K., Roberge, C. J., Labonté, J., Pouliot, S., D'Orléans-Juste, P., Auger, F. A., Germain, L. (2005) Tissue-engineered human vascular media with a functional endothelin system. *Circulation* **111**:459-464.
- L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T. N., Chronos, N. A., Kyles, A. E., Gregory, C. R., Hoyt, G., Robbins, R. C., McAllister, T. N. (2006) Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* **12**:361-365.

L'Heureux, N., Dusserre, N., Marini, A., Garrido, S., de la Fuente, L., McAllister, T. (2007) Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts--from research to clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4**:389-395.

Mitchell, S. L., Niklason L. E. (2003) Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol* **12**:59-64.

Mitchell, S. L., Niklason L. E. (2003) Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol* **12**:59-64.

Niklason, L. E., Gao, J., Abbott, W. M., Hirschi, K. K., Houser, S., Marini, R., Langer, R. (1999) Functional arteries grown in vitro. *Science* **284**:489-493.

Rémy-Zolghadri, M., Laganière, J., Oligny, J.-F., Germain, L., Auger, F. A. (2004) Endothelium properties of a tissue-engineered blood vessel for small-diameter vascular reconstruction. *J Vasc Surg* **39**:613-620.

Rosamond, W., Flegal, K., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase N., Hailpern, S. M., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., McDermott, M., Meigs, J., Moy, C., Nichol, G., O'Donnell, C., Roger, V., Sorlie, P., Steinberger, J., Thom T., Wilson, M., Hong, Y. (2008) Heart disease and stroke statistics—2008 update. *Circulation* **117**:e25-e146.

Seliktar, D., Black, R. A., Vito, R. P., Nerem, R. M. (2000) Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann Biomed Eng* **28**:351-362.

Solomon, A., Wajngarten, M., Alviano, F., Anteby, I., Elchalal, U., Pe'er, J., Levi-Schaffer, F. (2005) Suppression of inflammatory and fibrotic responses in allergic inflammation by the amniotic stromal matrix. *Clin Exp Allergy* **35**:941-948.

Swartz, D. D., Russell, J. A., Andreadis, S. T. (2005) Engineering of

fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**:H1451-H1460.

Thomas, A. C., Campbell, G. R., Campbell J. H. (2003) Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol* **12**:271-276.

Timpl, R. (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* **8**:618-624.

Tosi, G. M., Massaro-Giordano, M., Caporossi, A., Toti, P. (2005) Amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *J Cell Physiol* **202**:849-851.

Tsai, R. J. F., Li, L. M., Chen, J. K. (2000) Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* **343**:86-93.

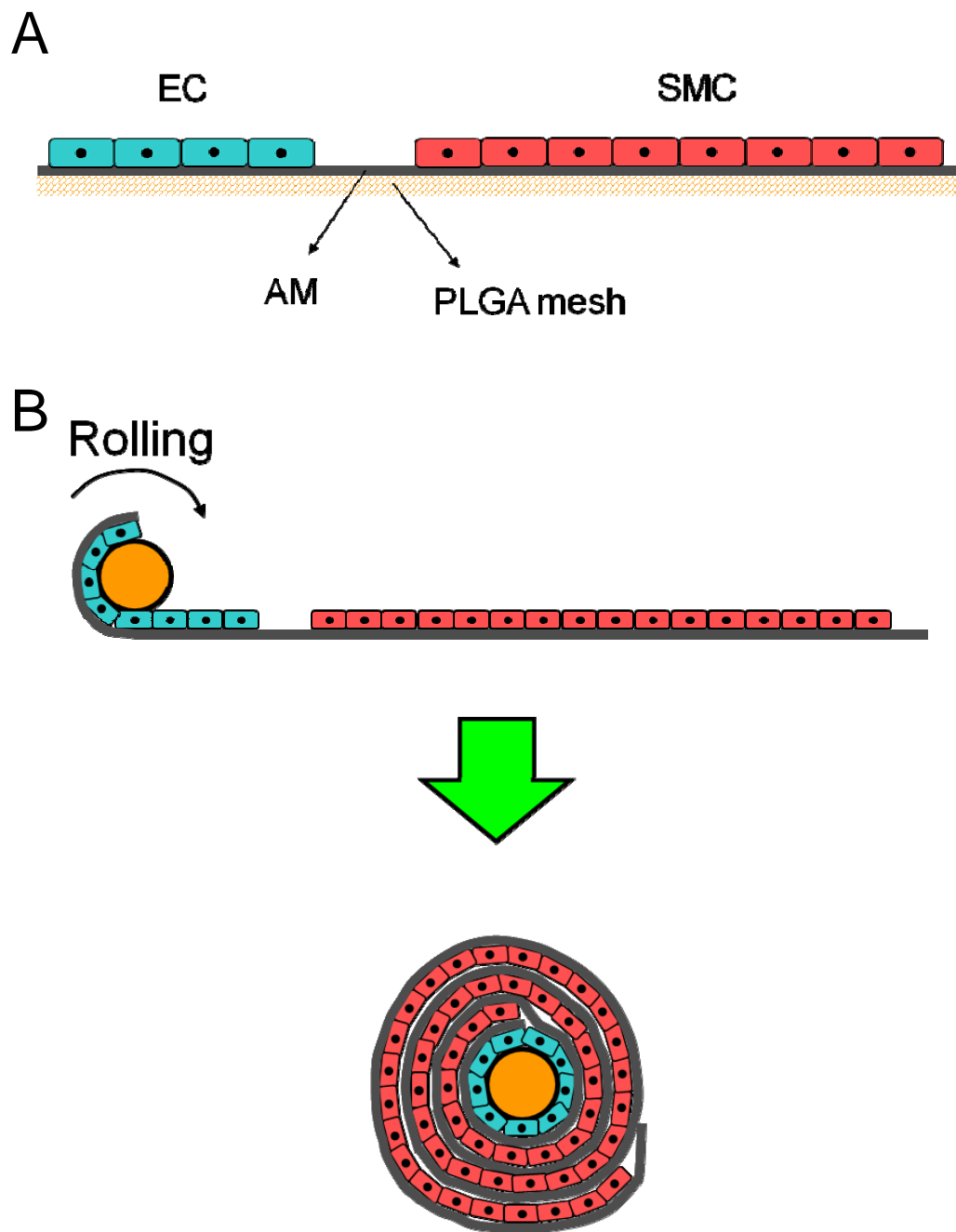
Wang, D. Y., Hsueh, Y. J., Yang, V. C., Chen, J. K. (2003) Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:4698-4704.

Weinberg, C. B., Bell, E. (1985) Regulation of proliferation of bovine aortic endothelial cells, smooth muscle cells, and adventitial fibroblasts in collagen lattices. *J Cell Physiol* **122**:410-414

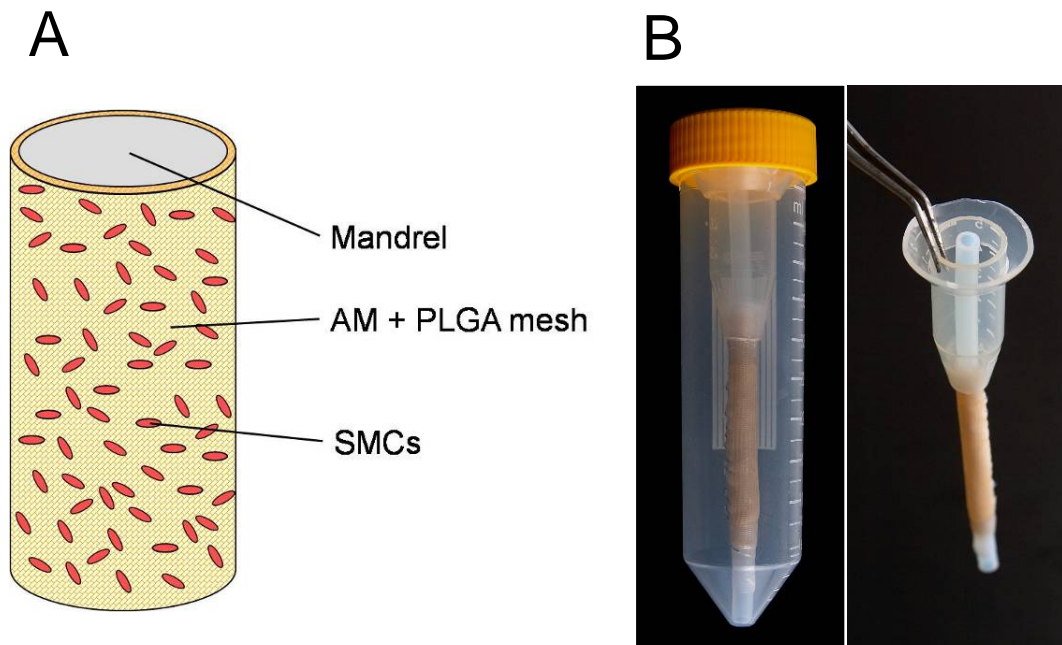
Weinberg, C. B., Bell, E. (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* **231**:397-400

Williams, C., Wick, T. M. (2005) Endothelial cell-smooth muscle cell co-culture in a perfusion bioreactor system. *Ann Biomed Eng* **33**:920-928.

Yang, L., Shirakata, Y., Shudou, M., Dai, X., Tokumaru, S., Hirakawa S., Sayama, K., Hamuro, J., Hashimoto, K. (2006) New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res* **326**:69-77.

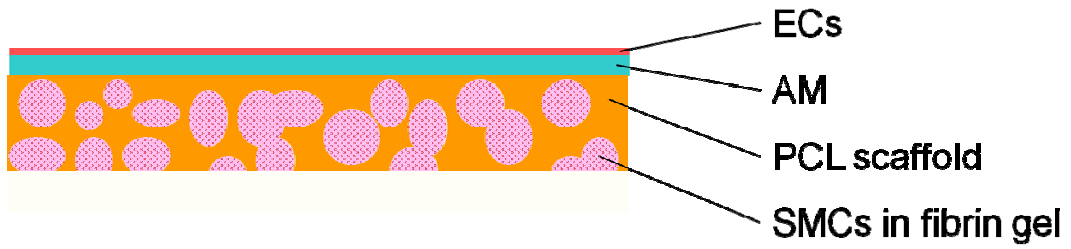


圖一、利用羊膜-PLGA 網膜建構人工血管(模式一)。(A)在羊膜上分別培養內皮細胞及平滑肌細胞。(B)螺旋捲起成型的方法。

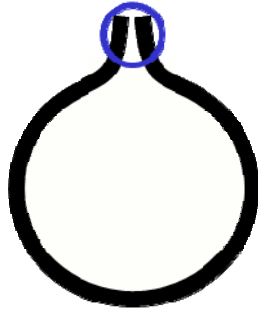


圖二、(A)將平滑肌細胞培養於 PLGA 網膜上的示意圖。(B)利用自行加工的漏斗狀容器，將平滑肌細胞懸浮液灌入羊膜的間隙中。

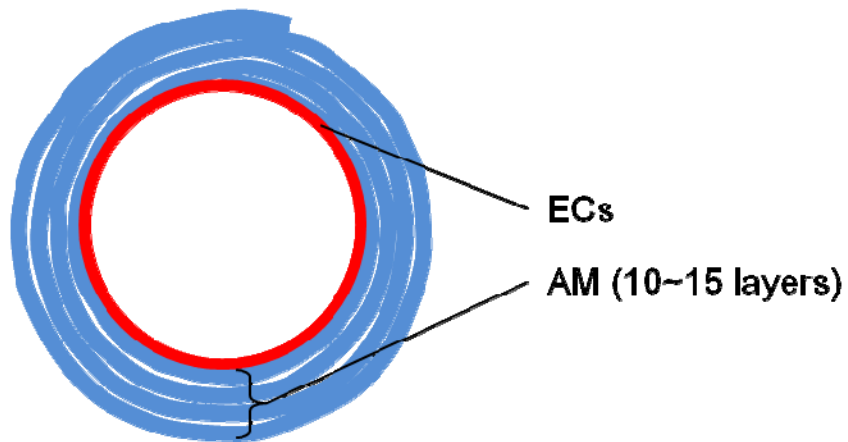
A



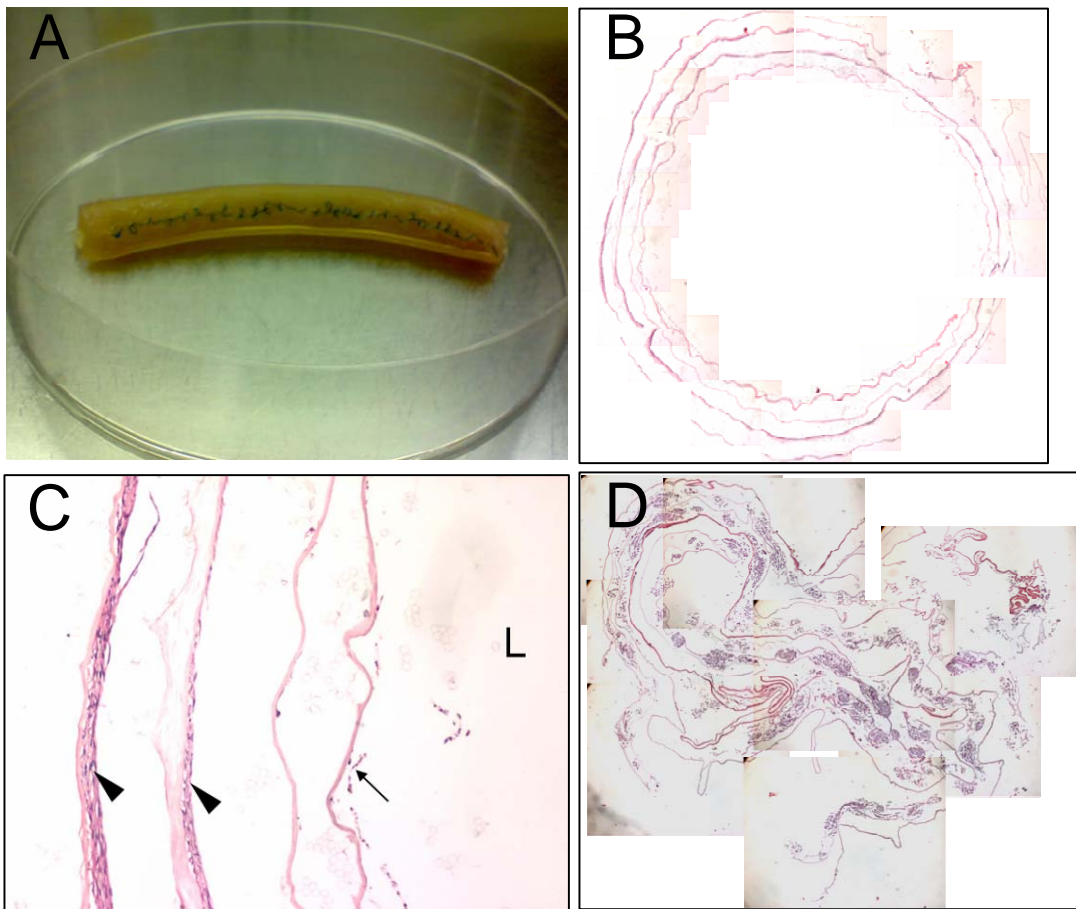
B



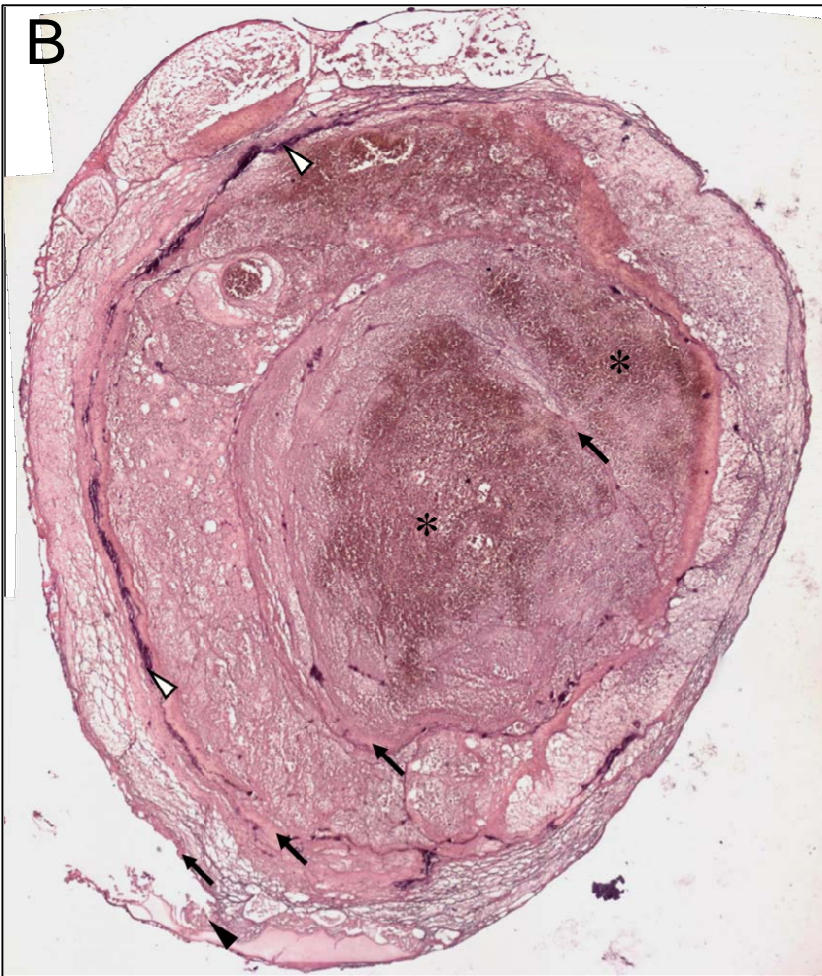
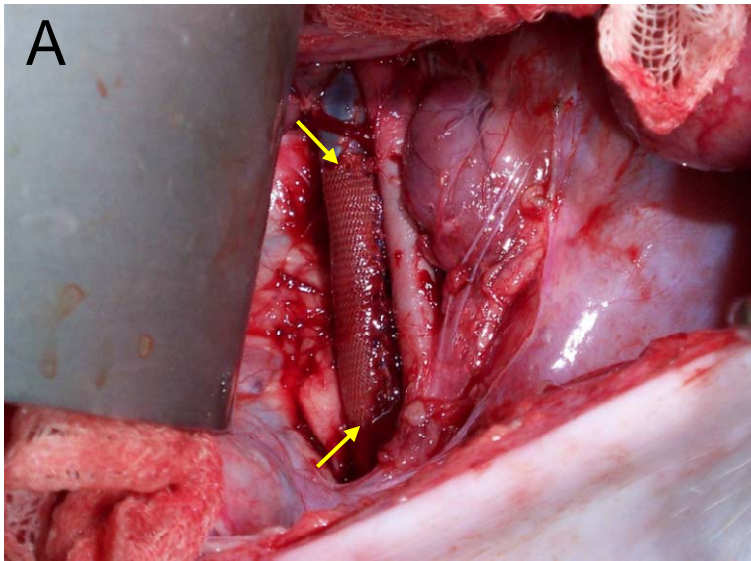
圖三、利用羊膜-PCL 網膜建構人工血管(模式三)。(A)多層式的培養示意圖。(B)捲起對縫示意圖，藍色代表縫線。



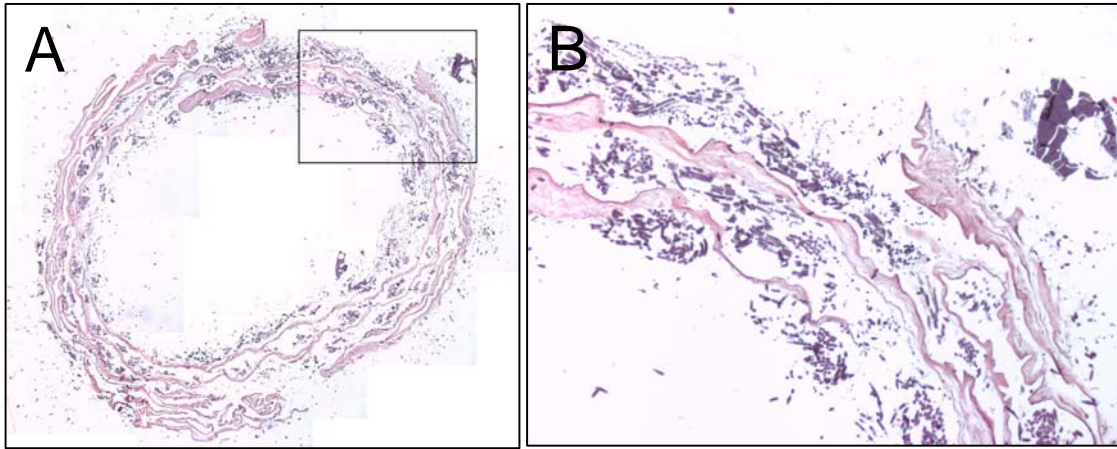
圖四、利用化學交聯法建構管狀羊膜(模式三)，並將內皮細胞培養在管狀結構的內面。



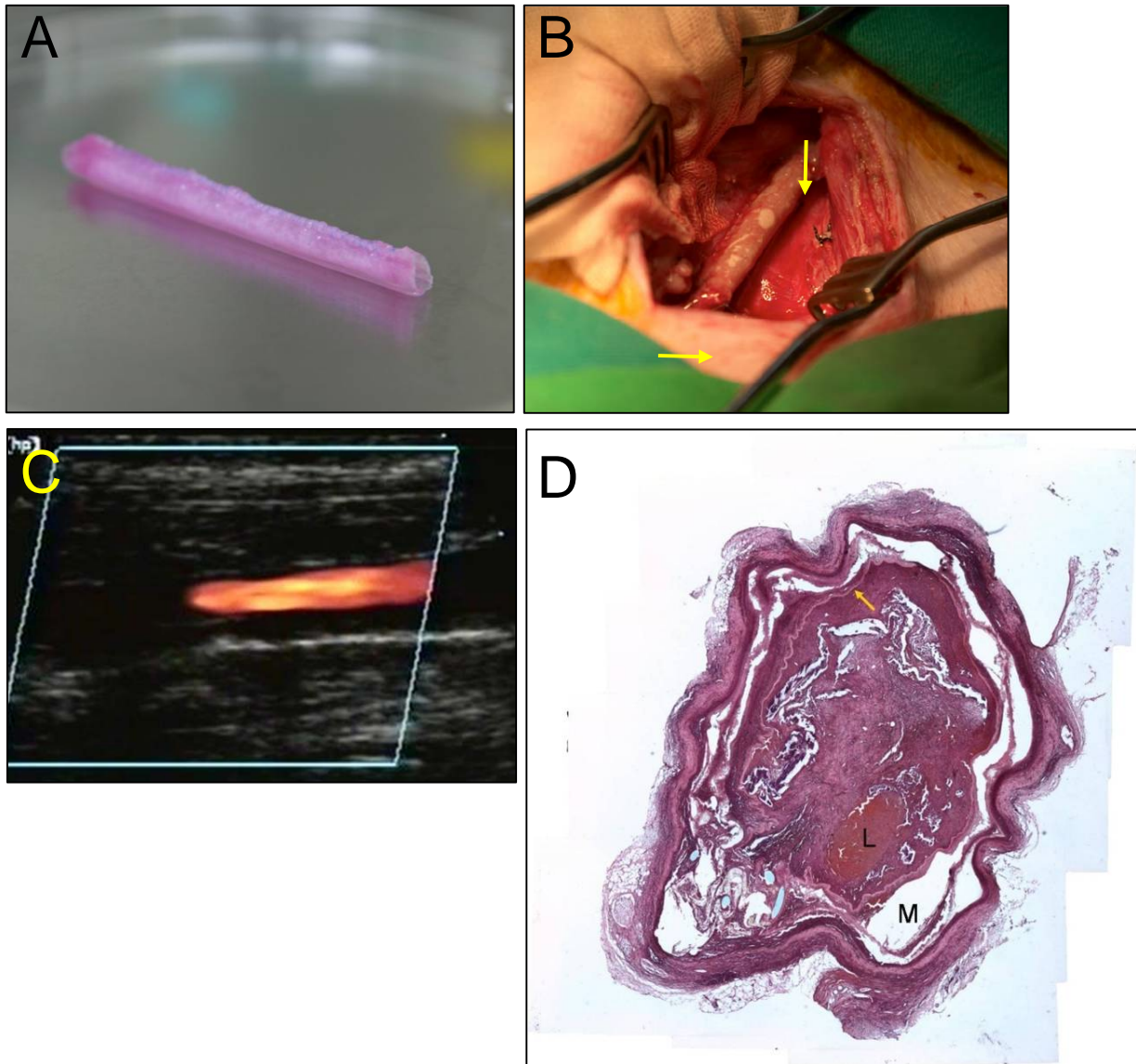
圖五、(A)利用羊膜-PLGA 網膜所建構的人工血管。(B)組織染色的橫切面構造。(C)高倍下可看到內皮細胞及平滑肌細胞的分層。L、血管內腔(lumen)；箭號、內皮細胞；箭頭、平滑肌細胞。(D)在生物反應器上培養一個月後的橫切面。



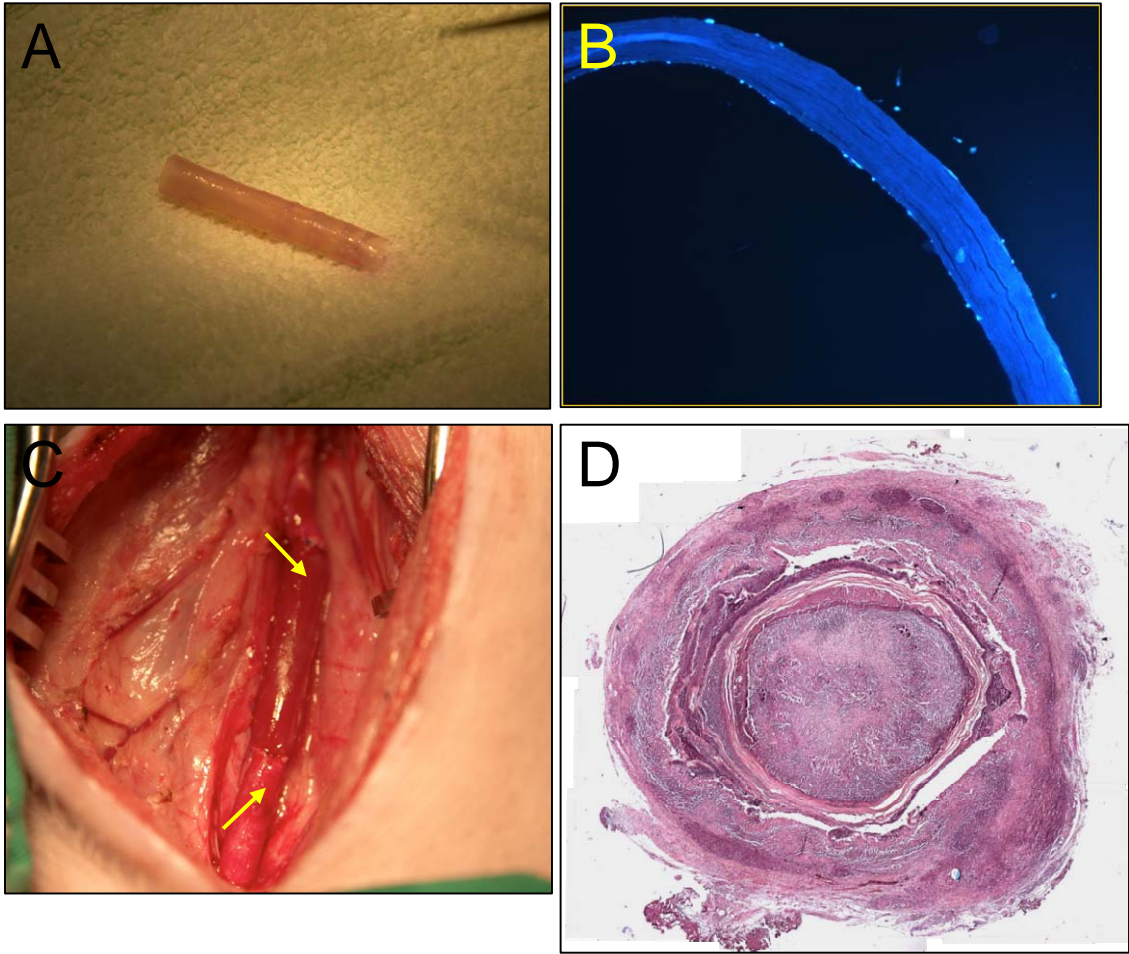
圖六、(A)將人工血管移植於豬的股靜脈，箭號所指的部分即為人工血管的縫合處。(B)移植後三周的血管橫切面。星號、血栓；箭號、羊膜；空心箭頭、平滑肌細胞；實心箭頭、PLGA 網膜。



圖七、利用模式二所建構的人工血管。在培養後四週的橫切面構造 (A)，其中粉紅色的染色為羊膜，紫色則為生長在 PLGA 網膜上的平滑肌細胞。圖(B)為圖(A)的局部放大。



圖八、(A)利用羊膜-PCL 網膜建構人工血管。(B)將人工血管移植於豬的頸動脈，箭號所指的部分即為人工血管的縫合處。(C)以超音波觀察移植後四周的血管。(D)移植後五周的血管橫切面。L、血管內腔；M、PCL 網膜；箭號、羊膜。



圖九、(A)利用化學交聯的羊膜所建構的人工血管。(B)橫切面顯示多層羊膜的構造。(C)將人工血管移植於豬的頸動脈，箭號所指的部分即為人工血管的縫合處。(D)移植後四周的血管橫切面。