

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

可降解細胞載體用於軟骨修復之研究 Cartilage Repair Using Chondrocyte Seeding in a Biodegradable Carrier

計畫編號：NSC 89-2320-B-002-160-M08

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：蔡清霖 台灣大學醫學院骨科部

摘要

利用天然和合成材料製成具多孔性之可生物降解性複合載體，注入培養的軟骨細胞(chondrocyte)後再行動物體內移植，以評估受傷的軟骨組織修復情形。

關鍵詞：軟骨細胞，細胞載體，組織修復

Combined natural and synthetic materials, and manufactured new complex scaffolds. Then seeded chondrocyte into the scaffolds. The cell carriers implanted into the joint of rabbits. The regeneration of cartilage could be evaluated.

Keywords: chondrocytes, cell carrier, regeneration of cartilage

前言

成熟後的軟骨因細胞量稀少而不易癒合，受傷後的修復通常纖維化嚴重且機械性質不佳並常造成進一步的關節退化，因此利用體外培養之軟骨細胞在軟骨受傷部位進行移植是目前軟骨修復研究的新方向。

利用人工生醫基材來培養軟骨細胞並植入人體，則此基材必須能被人體吸收，且降解時不能產生毒性，要與體內細胞相容，此即所謂具生物相容性之可生物降解性高分子。在骨科手術上用得最多的是聚酯類，特別是 polylactic acid (PLA)和 polyglycolic acid (PGA)以及它們的共聚物(PLGA)[1]。

雖然軟骨的修復一直是醫學上的一大挑戰，PGA 及 PLA 等可降解高分子在軟骨上的應用開始較晚，1991 年 von Shroeder et al. [2]用 PLA 來修復兔子膝蓋的軟骨缺陷，結果發現能促進軟骨的形成，之後才開始有 PGA 及 PLA 在動物軟骨修復上的研究[3,4,5]，這些研究都使用商品化的具孔洞性之 PGA 及 PLA，注入軟骨[3]或軟骨膜細胞[4,5]培養後移入動物(鼠或兔)軟骨的傷口中，此乃因為孔狀結構的廣大表面積可吸附大量的細胞之故。目前的研究都

是體外或動物實驗，因此此類可降解高分子在軟骨修復的應用方面尚未有人體的試驗。

除了人工合成的可降解高分子之外，自 1993 年後，亦有研究使用天然的高分子做為軟骨的修復基材，主要利用 collagen[6]。利用 collagen 的軟骨修復，結果發現組織癒合良好且 proteoglycan 的合成在第 14 天達到最高值。在上述以天然的高分子做為軟骨修復基材的研究上，目前亦尚未有人體的試驗。

自 1991 年後到現在的九年間，雖然各方面關於軟骨修復材料的研究開始興起，但仍屬早期研究階段，尚未有研究探討新形成的軟骨組織其構造、組成與機械性質是否與原先的組織匹配，且未以材料的觀點探討不同修復材料的物性、化性或降解速率快慢對軟骨組織修復的影響。因此本研究將從材料的選擇開始，來找出一個最適的細胞-載體結合體，觀察軟骨基質的合成與其結構，並定量其中 GAG 的組成與測量基質的機械性質；最後再進行動物實驗以確定癒合良好[7]，且形成的軟骨基質具有與損傷前組織類似的性質。

實驗方法

將聚乳酸 [poly(L-lactide) ，簡稱 PLLA] 及聚甘醇酸 50/50 [50:50 poly(lactid-co-glycolide) ，簡稱 PLGA50/50] 兩種高分子以重量比例 1: 3 混合溶解於 dioxane 中，接著以冷凍乾燥法製成多孔性載體載體材料[簡稱 blend]。接著浸鑄在 1%collagen type II 溶液中，再次以冷凍乾燥法製得改質型載體[簡稱 collagen-blend]。將改質和未改質載體植入紐西蘭白兔初代關節軟骨細胞，培養 1 天後，分別植入三隻兔子之後腿。實驗用的兔子要在肌肉中注射 Ketamine (100mg/每公斤體重)和 Xylazine (8mg/每公斤體重)進行麻醉，接著利用外科用的鑽子，在每個 condyle 上鑽出直徑 3.7mm、深 3mm 的人為傷口，將前述的軟骨細胞載體植入此傷口。於三個月和六個月後，取出植入部位進行解剖觀察和機械性質分析，以瞭解修復的情形，並於期間觀察動物行動情形。

結果與討論

1.解剖分析

將手術部位以手術剪刀剪開，觀察其是否有組織炎性反應以及關節植入細胞載體處是否為呈復原狀態。由圖一和圖二發現植入動物體內三個月後，經由 collagen type II 改質型載體比 blend 少有炎性反應發生，而且經由改質後之組織修復較為良好。由圖三和圖四發現植入動物體內六個月後，經由 collagen type II 改質之載體能將受傷軟骨組織完全修復，然而未改質載體發生更嚴重之炎性反應。將所有觀察結果如表一所示。Collagen-blend 載體能在六個月內降解完畢與修復軟骨缺陷並且外觀和正常軟骨無二致，然而 blend 載體不但沒降解，更造成嚴重炎性反應和軟骨更嚴重的缺陷。

2.機械性質分析

由於 blend 載體植入動物體後造成軟骨缺陷修復不全，故無法進行其機械性質測試。故以動態機械性質分析儀(DMA)測量 collagen-blend 和正常軟骨(normal)之機械強度，其分析條件為壓縮模式多頻掃瞄，strain = 0.2%，頻率 = 5、2、1hz，溫度 = 37°C，static force = 0.001N，auto static force = 125%，分析三次。

結果如表二所示，發現植入三個月機械強度為 0.104MPa，植入六個月機械強度為 0.117 MPa，植入時間越久機械強度並不會上升，而呈穩定趨式。雖然正常軟骨之機械強度為 0.526 Mpa，但其標準差為 0.472 Mpa，所以 collagen-blend 修復後之軟骨組織機械強度仍落在正常範圍。

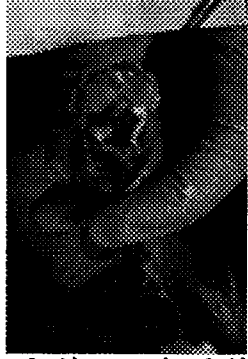
結論與展望

由動物實驗可以更明確了解在材料的選擇與組織工程修復的密切關係。本研究發現以 collagen 改質合成材料，是一能獲得軟骨缺陷組織的完全修復之最佳材料配方。並期望未來此一配方能在其它動物種類獲得相同成功結果，最後更能應用在人類臨床醫學上，造福社會。

參考文獻

- [1] Athanasiou KA et. al: Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996; 17: 93-102.
- [2] von Schroeder HP et. al: The use of polylactic acid matrix and periosteal grafts for the reconstruction of rabbit knee articular defects. *J Biomed mater Res* 1991; 25: 329-339.
- [3] Freed LE et. al: Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 1993; 27:11-23.
- [4] Chu CR et. al: In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices. *Biomaterials* 1995; 16: 1381-1384.
- [5] Chu CR et. al: Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): A tissue-engineering study. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 1147-1154.
- [6] Nixon AJ et. al: Temporal matrix synthesis and histologic features of a chondrocyte-laden porous collagen cartilage analogue. *Am J Vet Res* 1993;54: 349-356.
- [7] Sadahito K et. al: Articular cartilage repair: rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand* 1998;69(1),56

圖一、載入 collagen-blend 植入三個月結果



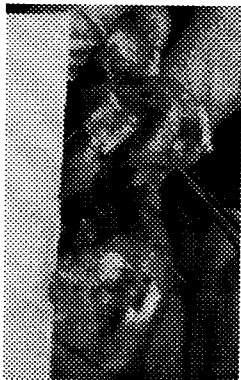
圖二、載入 **blend** 植入三個月結果



圖三、載入 **collagen-blend** 植入六個月結果



圖四、載入 **blend** 植入六個月結果



表一、解剖結果分析

植入支架種類	植入時間(月)	解剖後觀察
Collagen-blend	6	材料降解。軟骨沒有缺損。
Blend	6	材料未降解。關節發炎。軟骨缺損。
Collagen-blend	3	材料降解。軟骨沒有缺損。
Blend	3	關節發炎。軟骨缺損。

表二、改質型載體之機械性質分析

Sample	Storage Modulus(MPa)	STDEV
Collagen-blend 6 months	0.114	0.039
Collagen-blend 3 months	0.107	0.099
nomal	0.526	0.472