

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

自由基對軟骨基質成分黏彈性質之影響

The Effect of Free Radicals on the Viscoelasticity of Cartilage Matrix Components

計畫編號：NSC88-2314-B-002-258

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：蔡清霖 國立臺灣大學醫學院骨科

## 一、中文摘要

關節炎是臺灣地區常見的疾病之一，為了解軟骨病變，需要軟骨組織的基礎研究配合以了解軟骨病變發生的機制，從而預防或做更有效的治療。本研究利用胃蛋白酶分解酸溶解法萃取軟骨胞外基質的成分膠原蛋白，量測膠原蛋白溶液及關節滑液的黏彈性質，並引入自由基後黏彈性質之改變。研究結果(1) 在量測的角速度範圍內，Type II collagen分子有發生鏈糾纏的現象，引入自由基後喪失黏彈性質。(2)對關節滑液的黏彈性的影響，自由基攻擊的大於濃度稀釋。

關鍵詞：軟骨、膠原蛋白、關節滑液、黏彈性

## Abstract

Arthritis is the common rheumatologic disease in Taiwan. In order to develop an effective cure for such disease, we have to promote the basic research concerning the pathological mechanism so that it can be understood. Type II collagen extracted from cartilage by using limited pepsin digestion and synovial fluid were investigated by rheometer for viscoelastic properties. It was found that: (1) Collagen molecules were entangled in the measured rad speed range. Free radicals were introduced into the collagen solution, and collagen loss viscoelastic properties. (2) The effect of free radicals on the

viscoelasticity of synovial fluids is more than that of dilution.

Keywords: Cartilage, Collagen, Synovial Fluid, Viscoelasticity

## 三、計畫緣由與目的

骨關節炎是老年人口三大疾病之一，因為關節軟骨的磨損。造成兩關節表面無法自由移動，失去關節的穩定度並產生疼痛，為了解軟骨病變，除了要積極發展受傷軟骨的修復技術之外，也需要有與軟骨組織相關的基礎研究，才能了解軟骨病變發生的機制，從而預防或做更有效的治療。[1]

軟骨是由少數軟骨細胞分散於佔決大部份的胞外基質中。其胞外基質是由水、膠原蛋白 (collagen) 和蛋白聚糖 (proteoglycan, PG) 等構成 [2]。大部份的 collagen 是屬於 type II。在此研究中，我們首先將純化軟骨胞外基質的成分如 collagen、PG 與透明質酸 (hyaluronic acid; HA) 等，然後將軟骨各純化成分以特定之比例、固定之體積並在不同的離子濃度下混合後形成重組凝膠，創造一個軟骨的模擬系統。此一系統可望為軟骨質建立一分子/形態學的模型，其好處在可直接以顯微鏡觀察軟骨質中分子的交互作用，又可以測量各種性質，包括機械特性、溶質擴散輸送與電學特性等。此模擬系統同時又可以做為軟骨修復技術中軟骨細胞載體植入的體外試驗場所，因此兼具基礎與應用價值。

本研究利用動態流變儀測量重組凝膠的黏彈性，其好處在於：(1)可在凝膠重組時控制離子濃度，而無須在測量時將試樣浸在不同濃度的平衡槽裡；(2)可直接用黏彈儀量測其彈性儲存模數和黏性損耗模數，以了解受力時能量的分散方式。因軟骨的胞外基質為高分子組成，使得軟骨兼具黏彈性，而傳統機械性質的量測皆測其彈性模數，再以複雜的非線性黏彈模型加以闡釋。軟骨的機械性質與距離關節表面深度有關，使結果更加複雜，此外，試樣處理方式和測試方法也會影響數據。

自由基(free radical)是指具有不成對電子的原子、原子團、或是分子，如 $O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 等，它們具有很強的氧化性，在人體內會攻擊細胞和組織，而造成病變[3]；一般而言，人體雖會不斷的產生這一類的物質，但人體也會產生酵素 SOD (superoxide dismutase)，它會和自由基反應來維持平衡，以免自由基生成太多而使人體受到傷害[4]；但當自由基大量聚集時，人體組織會出現發炎現象，因此而造成嚴重的傷害；產生自由基的系統有兩種，一種為酵素生成系統，包括 xanthine oxidase(XO)、aldehyde oxidase等，另一種為非酵素生成系統，包括 $H_2O_2$ 、 $Fe^{2+}$ 與其它過渡金屬元素等的混合系統。

研究指出，軟骨病變是由於軟骨成分受到自由基的攻擊產生降解所造成的，特別是膠原蛋白纖維、透明質酸、和蛋白聚糖[5]；當關節軟骨受到 $H_2O_2$ 的攻擊時，蛋白聚糖分子便減低了和透明質酸鍵結的能力，造成了蛋白質和透明質酸分枝鏈的殘缺不堪[6]；透明質酸是關節滑液保持黏稠度的重要物質，所以受傷關節軟骨的關節滑液中，不但黏稠度降低，而且被發現含有降解的透明質酸[7]；膠原蛋白同時也會因為自由基的攻擊而降解，特別是 xanthine oxidase(XO)存在的環境；因此本研究針對前述軟骨基質中的成分，檢測在引入自由基前後，其黏彈性的變化，進而推測自由基在關節軟骨病變中所扮演的角色。

## 五、 步驟與方法

(22) Type collagen 的萃取：取用出生約兩個月的藍瑞斯品種小豬的肋骨末端軟骨。將非軟骨組織完全除去，軟骨組織切成薄片，以二次水充分清洗後，冷凍乾燥後，用液態氮磨成粉末，以下步驟皆在 $4^\circ C$ 進行。加入 4M 的 guanidinium hydrochloride(in 0.05M Tris-HCl, 20mM EDTA, 10mM PMSF, pH 7.4)，攪拌24小時，其比例為10mg 軟骨粉末加入2ml。接著，離心1小時(5000g)，取出沉澱物，加入 1mg/1ml的 pepsin(in 0.5 acetic acid)，在 $4^\circ C$ 下攪拌48小時，接著在 $4^\circ C$ 下離心1小時(5000g)，取上清液。上清液加 NaCl 至 0.9M，放置隔夜。在 $4^\circ C$ 下離心1小時(5000g)，將沉澱物溶於 0.5M acetic acid，以 0.5M acetic acid 進行透析。接著將純化後的 collagen 溶液冷凍乾燥，得到 Type collagen。[8-10]

(23) Collagen的黏彈性：將已經冷凍乾燥的 type collagen 溶解於二次水中，濃度為2%，之後在室溫下利用標準動態黏彈儀(rheometer)來測量試樣的黏彈性質。所用的黏彈儀為 Rheometrics 公司出產的 Rheometrics Dynamic Analyzer RDA II；幾何形狀(geometry)為 cone and plate，其中 cone 的半徑為 50 mm，角度為 0.02 rad，gap 為 0.048 mm，樣品的體積則為 655  $\mu l$ 。

(3) 自由基的引入：使用非酵素生成系統，則使用的試劑為 $H_2O_2$ ，再添加如 $Co^{2+}$ 或 $Cu^{2+}$ 的過渡金屬元素作催化，它主要產生的自由基為 $\cdot OH$ 。將30%(v/v)的 $H_2O_2$ 水溶液稀釋成0~240 mM的濃度[6]，再混入適量的過渡金屬元素，依序加入欲測量的軟骨基質成分中，同樣置於 $37^\circ C$ 的環境中一定時間後取出，量測其黏彈性，並觀察其變化；

在本研究中所使用的黏彈性測試方式(modes)包括：

1. Stress relaxation：在10%或125%的初應

變下鬆弛30秒。

3. Dynamic frequency sweep : 在應變等於5% 下 , 由  $\omega=0.1$  rad./sec 掃到  $\omega=100$  rad./sec。
4. Dynamic strain sweep : 在角頻率等於1 rad/s 下 , 由 strain=1% 掃到 strain=200%。
5. Steady shear sweep : 由剪切速率0.1 ( $S^{-1}$ ) 掃到100 ( $S^{-1}$ )。

## 七、 結果與討論

圖一 是2%的type collagen溶液加入二次水(collagen溶液體積:二次水體積=10:1)做黏彈性測量後,所獲得的典型動態黏彈性曲線。由圖一觀察得知 $G'$ 、 $G''$ 在角速度接近80 rad/sec (即 $\omega_c$ ) 時便發生相交(crossover),顯示在此角速度範圍內,Type collagen 分子有發生鏈糾纏(entanglement)的現象,因在低角速度範圍下 $G''$ 應大於 $G'$ ,表示樣品的鬆弛時間(relaxation time)較小,對輸入的應變能立即反應,所以表現較像黏性流體;而在高角速度範圍下 $G'$ 應大於 $G''$ ,表示高分子鏈與鏈之間已發生了糾纏,此時樣品的鬆弛時間較大,無法對輸入的應變能立即反應,表現會較像彈性固體。Type collagen黏彈性可做為重組凝膠的軟骨系統分子的基本性質,進而了解軟骨機械性質產生的機制。

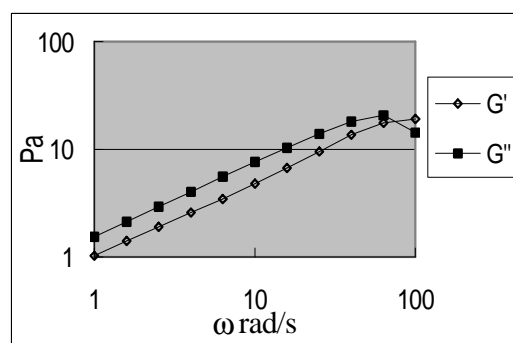
引入自由基的研究,2%的type collagen溶液加入自由基產生系統(3%  $H_2O_2$ , 0.01mM  $CoCl_2$ ), collagen溶液體積:自由基溶液體積為10:1,反應2天後,進行黏彈性測量,發現溶液性質如水一般,不同於原先具有黏彈性的type collagen溶液,故其黏彈性質已落在儀器可偵測之範圍外。

由此研究推測退化性關節炎的致病機制與發炎性關節炎的致病機制的不同,退

化性關節炎應是軟骨基質的合成速率減緩,造成軟骨基質濃度下降,逐漸失去關節軟骨承受重立及減緩衝擊的功能,而發炎性關節炎應是由體內的防禦系統劇烈的產生自由基,自由基攻擊軟骨基質,軟骨基質快速降解後溶解於組織液中,造成軟骨基質的流失,進而失去關節軟骨的功能。

另一方面將關節滑液進行相同的處理,以PBS將正常滑液稀釋為原來的90% (V/V), 及用3%雙氧水(含0.01mM  $CoCl_2$ )將自由基引入滑液內,兩滑液系統的粘彈性數據(在  $\omega=1$  rad/s)如表二所示。由表二得知,低濃度與低分子量的HA高分子均會造成正常滑液黏彈性的下降,但自由基對滑液黏彈性影響的效應甚劇於PBS的稀釋效應,即HA分子量的高低可能是決定關節滑液正常與否的關鍵角色。此與最近的學者[9]利用純的HA溶液來探討HA高分子黏彈性的結果是類似的。他們得到的結論是:HA高分子的分子量對HA溶液鏈糾纏的影響程度要比HA溶液的濃度顯著(欲提高HA溶液鏈糾纏程度,增加HA高分子的分子量比增加HA高分子的濃度來得有效),

圖一: Type collagen溶液之黏彈性



表一：稀釋與含自由基滑液黏彈數據（在 $\omega=1\text{rad/s}$ ）比較

	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\eta^*$ (Pa.s)	$\tan \delta$	Gel to sol strain	$\omega_c$
90% 滑液	$1.23 \pm 1.10$ (n=4)	$1.07 \pm 0.61$ (n=4)	$2.05 \pm 1.03$ (n=4)	$0.93 \pm 0.57$ (n=4)	30 80%	$< 0.1 \text{ rad/s}$ or $< 10 \text{ rad/s}$
含自由基 滑液	$0.70 \pm 0.45$ (n=3)	$0.52 \pm 0.24$ (n=3)	$0.76 \pm 0.58$ (n=3)	$1.22 \pm 1.20$ (n=3)	無	無

[1] Oddis CV: New perspective on osteoarthritis. *Am J. Med.* 1996;100(suppl 2A):10S-15S

在含有較高分子量HA的溶液中才有鏈糾纏現象發生，而在較低分子量HA的溶液則無。

氧為人體內不可或缺的原料，在提供各個器官養份及進行生物化學反應之後，便會產生自由基，如hydroxyl radical。自由基具有很強的活性，很容易攻擊並破壞物質，很多不明病因的疾病都會被聯想到與自由基有關。人體內有一種酵素可抑制自由基的產生，即抗氧化酵素（superoxide dismutase, SOD），此酵素在人年紀大了之後產量會減少，很多老年疾病因此而產生。在骨關節炎疾病成因中，一般猜測自由基可能是去攻擊滑液中的HA高分子，導致HA分子量降低，使滑液失去潤滑作用。

#### 八、計畫成果自評

由於PG的萃取困難，尚有問題未克服，因此凝膠系統僅做到Type collagen的部分。此研究於應用方面，萃取之collagen可做為軟骨修復之載體；學術方面，Type collagen的黏彈性與滑液的黏彈性將提供此系統分子的基本性質，經自由基處理後可解釋軟骨病變的機制。

#### 九、參考文獻

- [2] Maoudas A: Different ways of expressing concentration of cartilage constituents with special reference to the tissue's organization and functional properties. In Maroudas A, Kuettner K (ed): *Methods in Cartilage Research*. London, Academic Press, 1990, pp. 211-220.
- [3] Freeman B, Crapo JD: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412-426.
- [4] Deby C, Goutier R: New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 1990;39:399-405.
- [5] Burkhardt H, Schwingel M, Meninger H, McCartney HW, Tschesche H: Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. *Arth Rheum* 1986;29,3:379-387.
- [6] Roberts CR, Roughley PJ, Mort JS: Degradation of human proteoglycan aggregate induced by hydrogen peroxide. Protein fragmentation, amino acid modification and hyaluronic acid cleavage.

*Biochem J* 1989;259:805-811.

- [7] McNeil JD, Wiebkino W, Betts WH: Depolymerisation products of hyaluronic acid after exposure to oxygen derived free radicals. *Ann Rheum Dis* 1985;44:780-789.
- [8] Schurz, J. and Ribitsch, V. Rheology of synovial fluids. *Biorheology* 24, 385-399, 1987.
- [9] Von Der Mark K, Van Menxel M, Wiedemann H: *Eur J Biochem* 1980;124:57-62.
- [10] Paulsson M, Inerot S, Heinegar D: *Biochem J* 1984;211:623-630.