

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

NO 自由基對軟骨機械性質及基質重組之影響(2/3)
The Effect of Nitric Oxide on the Mechanical Properties and Matrix Turnover of
Cartilage(2/3)

計畫編號：NSC89-2314-B002-539

執行期限：88年8月1日至91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

關節炎是台灣地區常見的疾病之一，為了解軟骨病變，除了積極發展軟骨的修復技術之外，也需要較基礎的研究配合以瞭解軟骨病發生的機制從而預防或做更有效的治療。而本研究將進行體外測試軟骨細胞載是否會引發軟骨產生誘發性NO酵素，檢測機械性質及軟骨基質中蛋白聚醣和膠原蛋白裂解程度的變化。

關鍵詞：軟骨細胞載體、機械性質、
蛋白聚醣、膠原蛋白

Abstract

Arthritis is the common rheumatologic disease, afflicting many senior citizens in Taiwan. In order to develop an effective cure for such disease, we have to not only advance the cartilage repair technique, but also promote the basic research concerning the pathological mechanism so that it can be understood. We investigated the effect of chondrocyte scaffolds induced iNOS synthesis and detect mechanical properties the degradation of proteoglycans and collagen.

Keywords : chondrocyte scaffolds 、
mechanical properties 、
proteoglycans、 collagen

二、計畫緣由與目的

骨關節炎是老年人口三大疾病之一，在臨床上的表徵為兩關節表面無法自由移動，失去關節的穩定度並產生疼痛，這些現象皆與關節軟骨的磨損有密切關係。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(例如發展軟骨之細胞載體以做為修復之橋樑)，另一方面也需要有與軟骨組織相關的基礎研究的配合，才能瞭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 I。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O₂⁻、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。

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醣[5];當關節軟骨受到 H_2O_2 的攻擊時,蛋白聚醣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。

NO 自由基對關節軟骨的影響比其他自由基重要,因為它不僅是會攻擊胞外基質,也對軟骨細胞的多種生化反應參予調節,但是已有的研究卻未探討它對軟骨機械性質的巨觀影響,故本年度將於體外測試軟骨細胞載體是否會引發軟骨細胞內誘發性NO酵素生成,進而產生NO。並以外加 NO donor 產生 NO,將軟骨細胞載進行一連串的生化試驗及檢測其機械性質的改變,以研究 NO 對關節軟骨的機械性質與基質重組的影響,進而瞭解 NO 在關節炎中所扮演的角色。

三、步驟與方法

1. 軟骨取得及培養:

取健康未離乳小豬(約3kg左右)的關節軟骨,除去了非軟骨組織,於無菌操作台內將軟骨切成小碎片,再加入多種酵素將細胞分離出來,將細胞植入載體內,再將載體置於24well培養皿中以DMEM培養液(含10%胎牛血清)培養,並置於37 / 0.5% CO_2 培養箱中培養。

2. 細胞載體製作:

(a).PLLA溶液配製:取0.12g的PLLA固體溶於12ml的dioxane中,形成1% (w/v)的高分子溶液。

(b).blend-B溶液配製:取0.32g的PLGA50/50(BPI)及0.08g的PLLA溶於12ml的dioxane中,形成3.3%的高分子溶液。

(c).blend-P溶液配製:PLLA:PLGA重量比1:6(2.3%)。

將配製好的溶液12ml倒入鍍有四氟乙烯的5cm圓形鐵盤中,置於4 冰箱預冷3min,再放入液態氮中急速冷凍30min後,進行冷凍乾燥48小時。

3. NO釋放的定量:

鑑測釋放量以培養液中 NO_2^- 累積量計算,利用 Griess反應,以 sodium nitrite做標準曲線。收集每日更換的培養液,500 μ l的培養液與500 μ l的反應液(1% sulfanilamide,0.1% N-1-naphthylethylenediamidedihydrochloride)溶解於25% H_3PO_4) 在室溫下反應5分鐘,以 microplate reader測波長550nm的O.D.值[8],而實驗組則於培養液中每日加入1000uM的NO donor,並收集培養液測定。

4. 蛋白聚醣的裂解速率:

收集每日更換的培養液,行冷凍乾燥,再加入分解溶液,於60 下反應24小時,所得之樣品液再加入1,9-dimethyl-methylene blue染劑,測量波長525nm的O.D.值[9]。

5. 膠原蛋白釋放定量:

利用hydroxyproline 做為標準曲線,分析每日更換的培養液中hydroxyproline 的含量,以估算膠原蛋

白裂解的程度。並收集每日更換的培養液及軟骨組織塊，進行冷凍乾燥，加入分解液於60°C下反應24小時，加入等量6N HCL 110°C反應24小時，再將酸化的樣品抽乾，加入Isopropanol, Oxidant solution, Ehrlich's reagent solution，於室溫下反應17小時，以microplate reader測定550nm O.D.值。

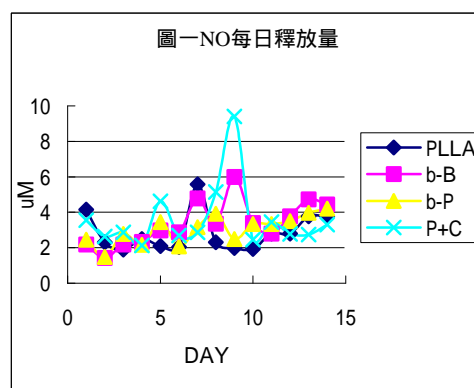
6. DNA測定：

將軟骨細胞載體行凍乾燥24小時，再以分解液於60°C下反應24小時，再加入螢光染劑，利用螢光光譜儀測定吸收度(光源365nm，偵測波長458nm)。

四、結果與討論

本年度的研究重點著重於體外測試軟骨細胞載體是否會引發軟骨細胞內誘發性NO酵素生成，進而產生NO。軟骨細胞載體材料是選用本實驗室所製備的合成材料分別為PLLA、blend-B、blend-P、blend-P + Collagen。所使用的軟骨細胞為小豬關節軟骨細胞，將分離出來的初代軟骨細胞植入足量的細胞密度於細胞載體內，將細胞載體培養於24 well中，每日更換培養液，並將每日更換的培養液收集起來做生化分析，整個實驗共觀察兩週。

圖一為將細胞載體培養於培養液中，並從每日更換掉的培養液中測量培養液中NO₂⁻的含量作為NO產量的指示，比較四種材料間NO每日釋放量，四種材料每天的釋放除了Blend-P的釋放量較呈一平穩狀態其他三種材料在第五、七、九天都有較大量的釋放。

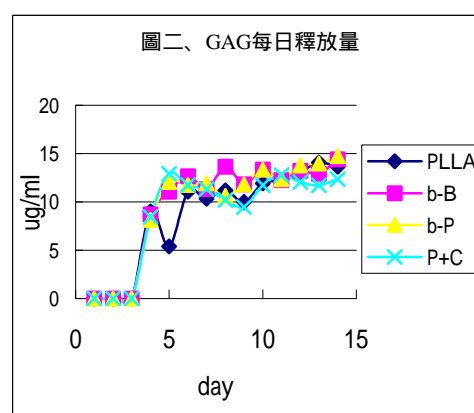


表一、兩週後培養液中NO總累積量

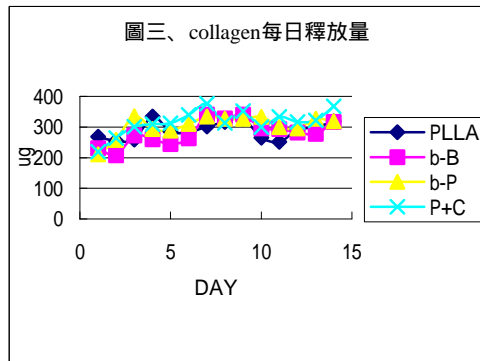
	uM	std
PLLA	39.92	± 20.6
Blend-B	47.27	± 6.2
Blend-P	42.29	± 7
Blend-P+Collagen	50.63	± 11

比較兩週後四種材料NO釋放的總累積量(表一)發現以blend-P + Collagen的總累積量是最多，顯示細胞在這個材料的外來物反應會較大，使得細胞內的誘發性NO酵素顯現進而釋放稍多的NO。

而在基質中蛋白聚醣測試中，是測量每日更換的培養基中細胞所釋放的GAG量，比較四種材料每日的釋放量呈一平穩狀態四種材料之間的差異性並不大。



在collagen的釋放方面(圖三)也有相似的結果，四種材料每天的釋放也呈現一個平穩狀態，彼此之間的差異性不大。



將培養兩週後的軟骨細胞載體取出進行消化預做基質含量的測試，表二為載體內的GAG總含量，由表可看出兩週中載體內GAG的含量非常少但四種材料載體內的GAG含量相差不多。

表二、兩週後載體內GAG總含量

	ug	std
PLLA	12.25	± 1.5
Blend-B	9.83	± 1.1
Blend-P	8.22	± 2.2
Blend-P+Collagen	9.51	± 1.1

而載體內collagen的總含量(表三)情形與GAG相似，四種材料的collagen含量皆相差不多，blend-P+collagen因載體有加collagen所以其值會較高，但若扣掉所塗佈的collagen量，其載體內所生成的collagen量應會與其他載體相似。

表三、兩週後載體內collagen總含量

	ug	std
PLLA	32.35	± 33.2
Blend-B	30.03	± 18.2
Blend-P	36.65	± 19.0
Blend-P+Collagen	90.62	± 46.23

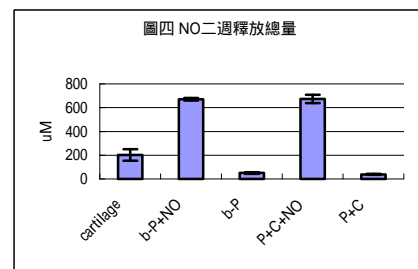
表四是培養兩週後的載體消化後測載體內的細胞量，細胞載體植入的細胞初始密度為 2×10^6 cell，但培養兩週後的載體細胞增殖的量並不高且blend-P+collagen的細胞量有減少的趨勢。

表四、兩週後載體內細胞量

	cell $\times 10^4$	std
PLLA	219.01	± 113.5
Blend-B	226.51	± 59.8
Blend-P	221.18	± 13.7
Blend-P+Collagen	186.88	± 20.6

綜合以上的一些結果，其實四種材料間在短時的培養似乎不能很明顯看出好壞及NO對基質的影響，可能是細胞量太少所以一些生理生化的變化並不明顯，但重複了兩次實驗在blend-P+collagen這個材料，它的NO值會比其它材料稍高且細胞量、基質會長得較少，兩次實驗皆有此一趨勢，可能是此材料的某些成份會刺激軟骨細胞內誘發性NO酵素生成進而使得NO產量較高，所以目前在材料的選擇會選定blend-P+collagen及其未改質的材料blend-P，因為blend-P+collagen的內生性NO會稍高，所以接下來的實驗中可以減少添加外生性NO的量。

材料選定後接培養及測定方式皆如上述，另外再以外加NO donor的方式，觀察基質及機械性質的變化。



圖四為兩週後的NO總量，經處理NO donor的載體其NO量會明顯的提高許多，而在未處理donor的部分，以正常軟骨的NO值會最高。

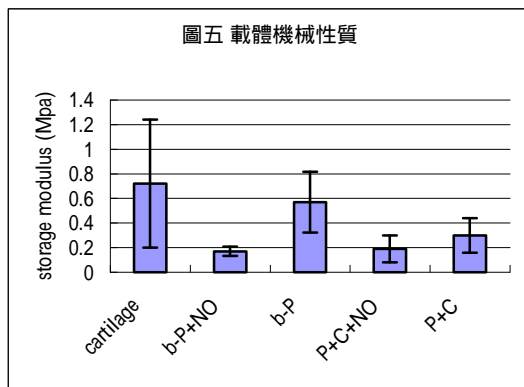
表五、兩週後載體內GAG含量

	ug	stdev
b-P+NO donor	422.01	5.036289
b-P	453.06	21.71677
P+C+NO donor	421.77	2.286685
P+C	428.06	6.569488
Cartilage	545.48	15.8303

表六、兩週後載體內細胞量

	cell*10 ⁴	stdev
b-P+NO donor	107.87	16.09762
b-P	142.12	13.80884
P+C+NO donor	129.01	20.43599
P+C	138.05	30.5646
Cartilage	902.09	122.2198

在基質部份GAG的總量以及載體內細胞量皆以正常軟骨最高，而在載體之間GAG量及細胞量並沒有很顯著的差異性，但在處理過NO donor的載體其GAG量及細胞量皆會比未處理過的載體稍差。



在機械性質中以正常的軟骨的機械性質會最好，而在載體部份雖然標準差很大但大體上皆是以處理過NO donor 的載體其機械性質會比較差，因為軟骨基質與機械性質有很大的關係，而這次實驗只收集到GAG的數據，並未測collagen的量但推測應與GAG有相似的趨勢，會以未處理NO donor較佳，而這次的結果雖皆沒有非常顯著性的差異，可能處理時間或量不夠，才會不明顯，但大致上可以看出處理過NO donor的載體其基質、細胞及機械性質皆會比未處理過的載體差。

五、參考文獻

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

[2] Maroudas 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, pp211-220.

[3] Tang LH, Rosenberg LC, Reihanian H, Jamieson AM, Blackwell J: Proteoglycans from bovine fetal epiphyseal cartilage. Sedimentation velocity and light scattering studies of the effect of link protein on proteoglycan aggregate size and stability. *Conn. Tiss. Res.* 1989, 19:177-193.

[4] Freeman B, Crapo JD: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982, 47:412-426.

[5] Beby C, Goutier R: New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 1990;39:399-405.

[6] Burkhardt H, Schwingel M, Jeninger H, McCartne 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.

[7] Roberts CR, Roughley PJ, Mort JS: Degradation of human proteoglycan aggregate induce by hydrogen peroxide. Protein fragmentation, amino acid modification and hyaluronic acid cleavage. *Biochem J* 1989;259:805-811.

- [8] Green, L. C., S. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum: Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982, 126:131.
- [9] Enobakhare, Brain O., Dan L. Bader, and David A. Lee. Quantification of Sulfated Glycosaminoglycans in Chondrocyte/ Alginate Cultures, by Use of 1,9-Dimethylmethylene Blue. *Analytical Biochemistry* 243, 189-191 (1996).