

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
軟骨細胞聚合陶瓷複體於關節軟骨修補的研究(II)
Chondrocyte-polymer-ceramic composite for a articular cartilage repair(II)

計畫編號：NSC 89-2320-B-002-089-

執行期限：88年08月01日至89年07月31日

計畫主持人：林繼昌 臺大醫學院附設醫院骨科部

協同主持人：林峰輝 臺大醫學院醫工研究所

中文摘要

骨科手術經常會遇到一些因先天異常或外傷感染而導至關節軟骨受損缺陷的問題，目前處理的對策包括切骨手術轉移受損區免受壓地區、軟骨下硬骨成形修補，直接從鄰近地區取得骨軟骨瓣、外骨膜移植等移植手術或是人工代用品置換。近年來軟骨細胞培養移植技術能使軟骨再生及恢復其機能，但長在培養皿上的單層軟骨細胞會有去分化的現象，使得所造出來軟骨材料有變異，以纖維軟骨為主，其抗壓耐磨力比原來的軟骨差，因此經過一段時間後，仍會退化受損。其主要的關鍵在於單純的軟骨細胞沒有足夠的骨架做支撐，本研究計畫即為發辰軟骨細胞聚合陶瓷複體，以實體動物實驗檢視其關節軟骨修補的能力。

實驗組即選用3mm外徑，2mm內徑，高3mm之二鈣磷酸鹽陶瓷圓筒材料，內部裝填上培養出來的軟骨細胞，一組只與膠原纖維混合，一組與聚乳酸聚合物結合，將此軟骨細胞陶瓷圓筒複體填入缺陷中。術後第四、八、十二週分次犧牲六隻，取股骨遠段做測試，包括軟骨壓跡之生物力學試驗及組織學觀察軟骨及硬骨組織再生及本體與植入物間結合的關係。

結果顯示因膠原纖維呈半硬固狀，在植入中軟骨細胞容易流失；聚乳酸聚合結之混合物較堅固，可減少軟骨細胞流失。陶瓷圓筒強度仍感不足，置入缺陷中有一半會發生圓筒破裂。植入後第八週時有軟骨細胞含聚乳酸之實驗組，可看出軟骨細胞簇集及深染之軟骨基質，含膠原纖維者

較少有軟骨細胞簇集，與無軟骨細胞之控制組相若。及至第十二週時，有軟骨細胞含聚乳酸之實驗組軟骨數量增多且較成熟，含膠原纖維者其軟骨細胞及軟骨數量比八週時顯著增加，無軟骨細胞之控制組，也有少數軟骨成分出現，但數量寥寥可數。所長出之組織在關節表面均無法呈現光滑平整，以致使軟骨壓跡試驗判讀，無法與正常未著墨之軟硬骨缺陷周圍前後做實質得比較。

膠原纖維呈半硬固無法牽制軟骨細胞的流失，以致植入後所產生的軟骨細胞與軟骨數量及品質，不如聚乳酸為介質者。不含軟骨細胞之控制組在初期只有纖維組織填塞，但時間拉長到第八至第十二週時，也會出現少量之軟骨細胞與軟骨。陶瓷圓筒再本實驗並未顯示有刺激加速軟骨細胞及軟骨數量成長之誘因。

關鍵詞：關節軟骨、軟骨缺陷修補、軟骨細胞培養、聚乳酸聚合物、磷酸鹽陶瓷

英文摘要 Abstracts

Articular cartilage injuries are common problems in orthopaedic clinical practice resulting in chronic pain, joint dysfunction, long-term disability. Before the last decision with joint arthroplasty, lots of surgical attempts may be tried such as osteotomy to shift the load over the affected area or filling the articular cartilage defect with any kind of tissues or materials of chondrogenic potential. However, all the procedures were found unreliable to rebuild a true articular structure. The poor quality of the regenerated cartilage has been thought due to the absence of adequate mechanical support during implantation, fibrocartilage may be found

when the cartilages are loaded with inadequate pressure. Recent research strategies adopted porous polylactic acid matrices or calcium phosphate plate seeded with cultured chondrocytes to improve the quality of the transplanted cartilage. The present study involves development of a chondrocyte-polymer-ceramics composite to fill the articular cartilage defect. Chondrocytes are expanded through culture and mixed with polylactic acid (PLA) polymer. The mixers are plugged into a dicalcium phosphate ceramic vessel for filling into the presized articular cartilage defect in a rabbit model for investigation of the capacity of cartilage repair.

The protocol involves animal study on 30 adult New-Zealand white rabbits. Bilateral femoral condyles are exposed through anteromedial arthrotomy to create a 3mm sized, 3mm deep osteochondral defect on the medial condyle. Chondrocytes culture is prepared from the perichondrium of ribs of different young rabbits. A PLA block is immersed in the expanded volume of the cells and cut into a cube of 2mm to fill into the dicalcium phosphate ceramic vessel (O.D.3mm, I.D. 2mm) These composites are ready for filling of the prepared 3mm osteochondral defect. Another one is mixed with type I collagens in the similar procedure. The contralateral femoral condyle is treated with the same material without chondrocytes seeding. The animals are kept and sequentially sacrificed in 4, 8 and 12 weeks. The distal femoral specimens were collected for cartilage indentation test and histological investigation.

Our result shows PLA is better for holding the cells in the DCP ceramic container that the chondrocytes and cartilage amount gets steadily increase with the time of implantation. There are fibrous filling in the initial 4 week, followed by gradual increase of the amount of chondrocytes and volume of cartilage. Some cartilages did develop even in the implant without cells seeding in the end of 12 week. The reformed volume of articular cartilage seems inadequate in mechanical strength for cartilage indentation test. Although DCP ceramic has high affinity to bone tissue and provide good mechanical support but it did not show more benefit in the cartilage formation..

Keywords : Articular cartilage, cartilage defect repair; chondrocyte culture, polylactic acid, calcium phosphate ceramics

計畫緣由與目的、

關節軟骨外傷受損在骨科臨床領域相當常見，軟骨受損的程度不同，所產生的後果也有很大的差異，當整層關節軟骨受傷剝落時，易導致慢性關節周圍疼痛、關節功能失當以及行動不慢，若其範圍擴大並深及關節軟骨下硬骨時，其症候更將惡化，最後的歸宿可能只有行人工關節置換手術始能改觀。關節軟骨受損後在未達行人工關節置換手術地步前，臨床處理的對策有二：一為切骨手術，轉移受損區至免受壓地區；二為軟骨受損區直接或間接提供有再生能力的組織期待新的軟骨長成，其手段包括直接從鄰近地區取得骨軟骨瓣 osteochondral flap、外骨膜 periosteum 移植至原受損缺陷部位(1,2,3)；或是使用 abrasion chondroplasty 關節軟骨研模成形術，由骨髓內中胚層活力之組織細胞和新生血管長入，提供再生軟骨。然而自體軟骨從他處移植到軟骨受損區，不僅捐骨部位難尋，數量也相當有限。以上方式可暫時解決臨床症狀，但關節軟骨受損部位軟骨的數量和品質並未復原，最後仍難避免軟骨繼續退化的噩運。

近年來的細胞培養技術，已能夠將少量的軟骨細胞培養擴增，使其數量達到理想的數值並能製造足夠的軟骨間質填滿缺陷能，此模型下之的最大問題是後期卻仍會發生軟骨品質變差。軟骨移植若沒有足夠的骨架如軟骨下之硬骨 subchondral bone 的支撐，軟骨缺陷部位修復再生的組織負載能力便不正常，是新生軟骨質形不足及過早變性的重要原因之一(9,10)。軟骨受到壓力時，組織必須改變性質。在軟骨移植的過程中常會加入一些有機或無機材料，如膠原纖維 collagen、聚乳酸化物 polylactic acid、鐵弗龍

Teflon、達克龍 Dacron 等填入缺陷中，有相當不錯的結果(11)。等，其目的在於攜帶軟骨細胞，但大多是無形狀的，受到壓力時，組織會改變性質，因此較難成就出正常功能之軟骨(6,7,8)。選用與關節軟骨同彈性性質的材料如甚至植入較硬固的生醫玻璃或磷酸鹽陶瓷等也可以刺激周圍的軟骨再生(12)。也有將軟骨細胞散播入有骨架形狀的聚合物上，然後將後者依缺陷的大小形狀切割後填入其中，其再生軟骨的性質機能比過去進步許多(13,14,15)。

本研究計畫即為發展軟骨細胞聚合陶瓷復體，主要的目標是評估磷酸鹽陶瓷在關節軟骨受損後再生中可以扮演的角色，除了用軟骨細胞培養技術取得足量的軟骨細胞來源外，將細胞播種入有骨架形狀的聚合物，再在其底部或四圍以磷酸鹽陶瓷成之複體，後者與周圍的骨頭有吸引聯結的能力，使植入物不致於脫離，並提供相當的強度以抗衡來自關節的壓力。本年度計畫目標是藉由發展出來的軟骨細胞聚合陶瓷複體，移植入實體動物的關節軟骨缺陷上，檢視此複體對關節軟骨再生修補的能力。

材料和方法 Materials and Methods

實驗材料:

磷酸鹽陶瓷材料為本科與醫工部門研發之二鈣磷酸鹽 dicalcium phosphate(DCP)

軟骨細胞來源：初級軟骨細胞培養品即為選自成熟紐西蘭白兔的肋骨之軟骨外膜研碎，置於 100mm^2 之細胞培養皿內，培養液為 Gibco 基本培養液 MEM (Minimal Essential Medium)，加上 10%胎牛血清，讓之生長三週為初級軟骨細胞培養品。

聚乳酸聚合物 D,D-L,L-PLA 棒條狀材料 $2\text{x}1\text{x}1.5\text{cm}$ 切成 $3.5\text{x}10\text{mm}$ 的小圓柱體。

軟骨細胞聚乳酸聚合物複體，將培養

出來的初級軟骨細胞，濃度理想為每 1.5 ml 約 $7\text{-}10\text{x}10^6$ cells，將加入 Fisher 瓶中，PLA 圓柱體也加入其中，使軟骨細胞播種入 PLA 內，成為次級軟骨細胞培養品。

主要的實驗步驟為在三十隻成熟紐西蘭白兔兩側膝部之股骨內踝鑽孔造出 3mm 大小之軟硬骨缺陷，在此缺陷上填補實驗材料，在一定的時段內觀察及測試其結果。手術的進行是用 ketamine 15mg/kg 及 xylazine 1.5mg/kg 靜脈麻醉，術後一劑 oxytetracycline HCl 10mg/kg 抗生素注射。手術是將兩側膝部做前內側膝關節切開，用鋼鑽在股骨內踝上鑽一 3mm 大小 3mm 深的孔洞，均穿透過軟骨下 subchondral 之硬骨板 bone plate，製造出軟硬骨缺陷。實驗組即選用 3mm 外徑，2mm 內徑，高 3mm 之二鈣磷酸鹽陶瓷圓筒材料，內部裝填上培養出來的軟骨細胞，與不同媒介 carriers 相結合，包括 A 組為第一型膠原纖維 type 1 collagen，B 組為聚乳酸聚合物 polylactic acid，每組三隻，另一側為控制組，有相同的媒介但不含軟骨細胞，將所有裝填好之陶瓷圓筒複體填入股骨內踝缺陷中。術後仍在籠中飼養，四肢並不用任何道具固定。六隻在第四週犧牲，六隻在第八週，六隻在第十二週。犧牲後，兩側後肢從髌部截下，儲藏於零下二十度冰凍。測試前在攝氏四度下過夜解凍，再在室溫下放置以待測試。

標本測試方法:

組織學檢查：後肢截取股骨和脛骨踝部相連的一段做固定及脫鈣，切片以縱軸 saggital section 經軟硬骨缺陷修補區為準，染色是以伊紅靛藍 H&E 及 AB-PAS (Alcain-Blue & Periodic Acid Schiff) 染色，PAS 染色主要可染軟骨間質 cartilage matrix 的 chondroitin sulfate 及 glycoprotein。

軟骨壓跡試驗 cartilage indentation test，使用口徑 1mm 平頭的壓力桿，

下壓的速率為 0.1mm/min，負載力為 0.25N 約可使軟骨產生 12% 的變形，經壓跡所測試的部位即軟硬骨缺陷中心修補區，同時在其前後各 3mm 處以及脛骨內踝軟骨上也做相同的壓跡試驗。

結果 Result

第一組軟骨細胞陶瓷圓筒複體是與第一型膠原纖維結合，膠原纖維呈半硬固狀，在植入中軟骨細胞容易流失；第二組是與聚乳酸聚合結合，混合物較堅固，可以切割，可減少軟骨細胞流失。再者，陶瓷圓筒強度不足，置入缺陷中可發生圓筒破裂。植入後第四週組織切片，不論有軟骨細胞之實驗組或無軟骨細胞之控制組，在陶瓷圓筒內容物均只見不規則之纖維組織填滿，進入之新生血管不多；第八週時有軟骨細胞含聚乳酸之實驗 B 組，比較上可看出軟骨細胞簇集及深染之軟骨基質，含膠原纖維之實驗 A 組，出現較少的軟骨細胞簇集，成分仍是以纖維組織為主，無軟骨細胞之控制 A 或 B 組，也有少數軟骨細胞簇集，情形與實驗 A 組相若。第十二週時有軟骨細胞含聚乳酸之實驗 B 組繼續呈現軟骨細胞簇集及較成熟深染之軟骨，含膠原纖維之實驗 A 組軟骨細胞數量比八週時顯著增加，深染之軟骨也處處可見，無軟骨細胞之控制 A 或 B 組，也有少數軟骨成分出現，但數量寥寥可數。

以上所長出之組織在關節表面均無法呈現光滑平整之關節面，以致使軟骨壓跡試驗判讀誤差很大，無法與正常未著墨之軟硬骨缺陷周圍前後各 3mm 處以及脛骨內踝軟骨做實質得比較。

討論

軟骨細胞培養的主要缺點是，長在培養皿上的單層軟骨細胞會有去分化的現象，使得所造出來軟骨材料有變

異，以纖維軟骨為主，其間質成分為第一型膠原纖維而非一正統的第二型膠原纖維(5)。亦即關節軟骨的品質並未復原為最初之軟骨形態，此種再生的軟骨抗壓耐磨力比原來的軟骨差，經過一段時間負重仍會退化受損，最後仍難避免軟骨繼續退化的噩運。故維持原有軟骨的品質和功能，是軟骨移植工程中最大的挑戰。

要得到最理想的關節軟骨來修補缺陷，須有充足的軟骨細胞來源，它可以從自體或同種軟骨細胞培養得來，也要有攜帶軟骨細胞的載具 (16)。另外最好是具有形之骨架做支撐，而後者又須與周圍的骨頭有吸引鍵結的能力，使植入物不致於脫離。磷酸鹽陶瓷本身具有與骨頭無機鹽部份相同的組成和結構，彼此互相有吸引鍵結的能力，同時在關節表面上也提供相當的強度，以抵抗來自關節上方的壓力。若在其底部或周圍若能提供磷酸鹽陶瓷壁板，其內再供給培養成之軟骨細胞和相關載具，成一複體移植入關節軟骨缺陷上，預期所再生的軟骨性質應可較接近正常的關節軟骨。

本實驗結果顯示因膠原纖維呈半硬固狀，在植入中軟骨細胞容易流失；聚乳酸聚合結之混合物較堅固，可減少軟骨細胞流失。陶瓷圓筒強度仍感不足，置入缺陷中有一半會發生圓筒破裂。植入後第八週時有軟骨細胞含聚乳酸之實驗組，可看出軟骨細胞簇集及深染之軟骨基質，含膠原纖維者較少有軟骨細胞簇集，與無軟骨細胞之控制組相若。及至第十二週時，有軟骨細胞含聚乳酸之實驗組軟骨數量增多且較成熟，含膠原纖維者其軟骨細胞及軟骨數量比八週時顯著增加，無軟骨細胞之控制組，也有少數軟骨成分出現，但數量寥寥可數。所長出之組織在關節表面均無法呈現光滑平整，以致使軟骨壓跡試驗判讀，無法與正常未著墨之軟硬骨缺陷

周圍前後做實質得比較。膠原纖維呈半硬固無法牽制軟骨細胞的流失，以致植入後所產生的軟骨細胞與軟骨數量及品質，不如聚乳酸為介質者。不含軟骨細胞之控制組在初期只有纖維組織填塞，但時間拉長到第八至第十二週時，也會出現少量之軟骨細胞與軟骨。陶瓷圓筒再本實驗並未顯示有刺激加速軟骨細胞及軟骨數量成長之誘因。

計畫成果自評

本研究計畫主要的目標是確立磷酸鹽陶瓷在所扮演的角色，因磷酸鹽陶瓷具有與周圍骨頭有吸引聯結的能力，理論上應有一定的效果。加入聚乳酸化物已被證明有提昇軟骨的品質和功能的能力，它與磷酸鹽陶瓷間的關係仍待釐清，因此有二組互相對照實驗，相信本研究計畫可以提高吾人對軟骨移植工程更深一層的認識，也對臨床處理軟骨外傷受損缺陷有所助益。

參考文獻

1. Ghadially FN, Thomas I, Oryschak AF: Long term results of superficial defects in articular cartilage. a scanning electron-microscope study. *J Pathol* 121: 213-217, 1977.
2. Hunziker EB, Schenk RK: A differential treatment protocol for inducing cartilage and bone repair in full-thickness articular cartilage defects. *Trans Orthop Res Soc* 20: 170, 1995.
3. O'riscoll SW, Keeley FW, Salter RE: The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. an experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 68A: 1017-1035, 1986.
4. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M: The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Ortho Res.* :208-218, 1989.
5. Takigawa M, Sirai K, Fukuo K, Tajima Y, Mori Y, Suzuki F: Chondrocytes Dedifferentiated by serial monolayer culture from cartilage nodules in nude mice. *Bone & Mineral* 2:449-462, 1987.
6. Campbell CJ: The healing of cartilage defects. *Clin Orthop* 64:45-64, 1969.
7. Hjertquist:SO, Lemberg: Histological, autoradiographic and microchemical studies of spontaneously healing osteochondral articular defects in adult rabbit.
8. Mankin HJ: The response of articular cartilage to mechanical injury. *J bone Joint Surg* 64A: 460-466, 1982.
9. Messner K, Lohmander LS, Gilquist J: Neocartilage after artificial cartilage repair in the rabbit; histology and proteoglycan fragments in joint fluid. *J Biomed Mat Res* 27: 949-954, 1993.
10. Messner K, Gilquist J: Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle. *Biomaterial* 14: 513-521, 1993.
11. Messner K: Hydroxyapatite supported dacron plugs for repair of isolated full-thickness osteochondral defect of the rabbit femoral condyle: mechanical and histological evaluation from 6-48 weeks. *J Biomed Mat Res* 27: 1527-1532, 1993.
12. Suominen E, Aho kT, Vedel E, Kangasniemi I, Uusipaikka E, Yli-Urpo: Subchondral bone and cartilage repair with bioactive glasses, hydroxyapatite and hydroxyapatite-glass composite. *J Biomed Mat Res* 32: 543-551, 1996.
13. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikes AG, Langer R: Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mat Res* 27: 11-23, 1993.
14. Freed LE, Grande DA, Lingbine Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R: Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mat Res* 28: 891-899, 1994.
15. Chu CR, Cotts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ, Amiel D: Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid: a tissue-engineering study. *J Biomed Mat Res* 29: 1147-1154, 1995.
16. Caplan AR, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg YM: Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 342:254-269, 1997