

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

可降解細胞載體用於軟骨修復之研究 (2/3)

Cartilage Repair Using Chondrocyte Seeding in a Biodegradable Carrier

計畫編號：NSC 88-2314-B-002-038-M08

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：蔡清霖 台灣大學醫學院骨科部

摘要—本研究中採取組織工程的方法，以軟骨細胞株 (chondrocyte cell line, IRC) 取代動物細胞之初代培養軟骨細胞方面進行支架材料篩選的可能性方面，由結果可以確認軟骨細胞株在貼附及生長的狀況與正常軟骨細胞類似，且能更迅速判斷。由三種支架構成材料的生物相容性測試結果，可以看出有與表面性質測定相同的趨勢，細胞數量依序為：poly(D,L-lactide-co-glycolide 50:50) (PLGA 50 : 50)>poly-L-lactide (PLLA) >Poly(D,L-lactide-co-glycolide 85:15) (PLGA 85 : 15)，存活率皆有 90 % 以上。由 SEM 觀察支架的表面及截面，不同種類材料間所產生的孔洞主要分佈在 40~60 μm 之間，使用共軛焦雷射顯微鏡 (confocal laser scanning microscope) 觀察多孔性基材在一定深度下，可以看出有相同的趨勢的活細胞的分佈。綜合上述，作為關節軟骨修復可降解軟骨細胞支架為孔洞介於 50 μm 以上、三維立體結構能持久及細胞相容性高的材料，因此本研究評估最適合的支架為 PLGA 50 : 50-s、PLLA - 20C、Blend -20C 等三種。

Abstract — In this study, immortalized rat chondrocytes (IRC) were used to evaluate the polymer scaffold for cartilage repair. The cell adhesion, growth and morphology of chondrocytes were similar to those of IRC. Therefore, IRC can be used as a tool to evaluate the materials as scaffolds. In all experiments, PLGA (polylactide-co-glycolide) 50:50 had

significantly better cytocompatibility than PLLA and PLGA 85:15. SEM observations of the surface and cross-section of the substrates revealed that the pore size was 40-60 μm . A laser confocal microscope examined cell migration into the porous substrates. The amount of cells at a fixed depth for different materials was consistent with that described earlier. In summary, the optimum biodegradable scaffolds for chondrocyte seeding used in repairing the damaged articular cartilage should have a pore size close to 50 μm or up and a stable three-dimensional structure with good cytocompatibility. From our study, the optimum scaffolds were PLGA50:50 by solvent-casting salt leaching, PLLA and blend of PLLA and PLGA50:50 (Blend) by freeze drying (quenched in refrigerator).

計劃的緣由及目的

受傷關節修護上的困難在於軟骨膜的活性大都發生在成長期的年輕個體上，硬骨在患部的生長較軟骨快，患部周遭結締組織會快速增生及患者平時活動會對軟骨造成機械性擦傷，進而傷及關節表面等[1,2]。

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，利用可降解聚合物製備成三維載體，植入軟骨細胞使其能在

載體中生長到某一程度，再植入患部，而不受周遭組織排擠及活動時的磨損，再次受到傷害。良好的載體需能對植入的細胞無毒性，且能促進其生長及附著，並其本身能為人體所吸收分解。

本研究的第一部分是體外試驗，首先嘗試不同的細胞載體，包括合成具有不同分子量的 polylactic acid (PLA)、 polyglycolic acid (PGA)，或天然的 collagen、fibrin 等，將載體作成多孔性。接著進行軟骨細胞或軟骨膜的培養，然後將固定數目的細胞注入前述的細胞載體中，觀察其中細胞的活性(利用螢光染色或其他方法)，和組織學的形態，並嘗試找出載體的物性、化性或降解速率快慢對細胞數目的影響。

本研究的第二部分是體內試驗，即將細胞載體的結合體移植入動物(兔子)的軟骨傷口中，觀察其修復的情形，並利用光學顯微鏡，生化分析和力學測試來測量長出的組織其結構、組成與機械性質是否與原先的組織匹配。

方法

本文所提及之藥品中，聚合物 (poly L-lactide, PLLA) 及 (poly D,L-lactide-co-glycolide, PLGA) 為美國 BPI 公司所生產，氯仿為美國 Fisher 公司出品之 HPLC 級試藥，PLGA 85:15 為莫耳比 85:15 之乳酸-甘醇酸共聚合物，PLGA 50:50 為莫耳比 50:50 之乳酸-甘醇酸共聚合物，氯化鈉為台灣鹽業公司出品，純度 99.5%，所用的水為二次去離子水。軟骨細胞取自四個月大之白兔關節軟骨之第一代細胞，另外所提及之儀器中接觸角計係日本協和科學株式會社產品，倒立式光學顯微鏡為日本 Nikon 產品。

(1)細胞載體製作：將 PLLA 或 PLGA 利用 particulate-leaching 的方法[3]，軟骨載體製造係使用溶劑鑄造法 (solvent casting)，使用之氯化鈉粒徑範圍為 53~500 μ

m，將聚合物與鹽的混合溶液導入培養皿中形成薄膜，溶劑揮發後，讓薄膜和培養皿分離。再將薄膜持續浸泡於去離子水中數日後，置於通風櫥以空氣乾燥後，薄膜再以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察其孔洞結構。至於以天然的 collagen、gelatin 及 PLLA 或 PLGA 做為細胞載體，則以冷凍乾燥法。

(2)軟骨細胞 (chondrocyte) 的細胞培養 (primary culture): 從兔子的肋骨軟骨取下軟骨膜細胞之後，以 MEM 加 10% fetal calf serum 以 37°C 培養約三星期；軟骨細胞的分離則必須將軟骨切成 1mm³ 的小塊，再以 MEM、fetal calf serum 和 type II collagenase 處理，之後並用離心與再懸浮的方法分離軟骨細胞[4]。細胞存活能力可用 trypan blue exclusion 來決定。軟骨細胞的生長曲線是將定量之軟骨細胞，以細胞懸浮液的方式導入 24 孔細胞培養盤底部，放入 37、5% CO₂ 的培養箱中培養。每隔 24 小時，將孔中 DMEM 培養基拋棄，以 PBS 清洗後，再以 trypsin 將附著於底部之軟骨細胞分離，計算細胞密度及存活率，將數據繪製成生長曲線。在載體中細胞的 seeding 可用下面兩種方式：一種是將載體以 70% 的乙醇濕潤，再以 PBS 沖洗多次後，以針頭吸取固定體積(約 50-100 μ l)且細胞數目一定(約 10⁷ 個/cm³ 培養液)的細胞懸浮液，注入前述的細胞載體中，繼續培養數天；另一種方式則是將未經濕潤處理的載體浸入細胞懸浮液中，

結果與討論

本研究中採取組織工程的方法，首先評估以軟骨細胞株 (chondrocyte cell line, IRC) 取代動物細胞之初代培養軟骨細胞方面進行支架材料篩選的可能性方面。將 IRC 及軟骨細胞(RC)植覆於可降解材料表面，經培養 24 及 96 小時後，計數細胞貼附及生長的數量，由結果可以確認軟骨細胞株在貼附及生長的狀況與正常軟骨細胞類似，且能更迅速判斷。

基材以溶劑鑄造-鹽析方法進行製備，所使用的材料為 PLLA、PLGA 85:15、PLGA

50 : 50 , 所製備之基材分別稱為 PLLA-s、PLGA 85 : 15-s、PLGA 50 : 50-s。以冷凍乾燥-液態氮驟冷及冷凍乾燥-冰箱驟冷方法, 所使用的材料為 PLLA、PLGA 85 : 15, 另外由於 PLGA 50 : 50 經過冷凍乾燥製備成支架後, 整體機械性質太過柔軟, 因此本研究改以 PLGA 50 : 50 混摻 20 % PLLA (以下簡稱 Blend), 以改善支架機械性質, 冷凍乾燥-液態氮驟冷所製備之基材分別稱為 PLLA-N2、Blend-N2, 冷凍乾燥-冰箱驟冷方法所製備之基材分別稱為 PLLA-20C、PLGA 85 : 15 N2、Blend -20C。以上製備方法所得多孔基材為直徑 5 cm、厚度為 2mm 以下之圓形樣品。

冷凍乾燥製成的支架之孔洞與機械強度會與所使用的溶劑與濃度與驟冷溫度有密切相關, 所製備的濃度 (w/v) 為 PLLA 為 1 % , PLGA 85 : 15 為 2 % , Blend 為 3.4 %。

此外, 細胞植覆於材料表面, 在初期細胞可能由於材料表面官能基種類 含量及接觸角大小, 導致細胞懸浮液中細胞貼附於材料的速度有快慢分別, 以及細胞生長型態的差異。由三種支架构成材料的生物相容性測試結果, 可以看出有與表面性質測定相同的趨勢, 在細胞植覆後 24 小時及 96 小時, 在放有 PLGA 50 : 50 的細胞盤孔中, 細胞的數量明顯與其他孔中所貼附的材料有著較顯著的分別, 其次分別是 PLGA 85 : 15 及 PLLA。存活率皆有 90 % 以上。但在薄膜及多孔性基材上貼附數量有明顯的差異, 可能由於孔洞的分布, 促使細胞不能快速貼附上材料表面。因此需較長時間才能有明顯的細胞生長的現象, 細胞植覆後 96 小時, 細胞貼附於多孔性數量以 PLGA 50 : 50 為最多, 其次為 PLLA、PLGA 85:15。

由 SEM 觀察支架的表面及截面, 不同種類材料間所產生的孔洞主要分佈在 40~60 μm 之間, 除製備方法二以外, 因此可以排除孔洞尺寸的效應。將細胞植覆於支架上經 96 小時, 由 SEM 觀察的照片可以看出, PLGA 50 : 50 支架上 IRC 細胞已經完全貼附, 並且表 1、多孔基材體外細胞相容性評估: 使用 IRC、RC 細胞起始數量 5×10^4 cells/well 植覆在多

呈現完全伸展的型態, 和在培養皿培養的型態類似。而 PLGA 50 : 50 與 PLLA 細胞僅有部份細胞產生貼附, 部份細胞捲曲成球狀, 呈現分裂的態勢。此傾向與支架上植附細胞培養 24 及 96 小時後, 細胞計數的結果類似, 而放有 PLGA 50 : 50 的細胞培養盤孔中, 細胞的數量明顯與其他孔中所貼附的材料有著較顯著的領先, 使用共軛焦雷射顯微鏡 (confocal laser scanning microscope) 觀察多孔性基材在一定深度下, 可以看出有相同的趨勢的活細胞的分佈。

製作孔隙度、機械性質與再現性良好的支架結構方面。本研究使用溶劑鑄造-鹽析法、及冷凍乾燥法製備的支架進行比較, 由薄膜及多孔性基材之細胞相容性測試結果, 在人工合成材料上我們選擇 PLGA 50 : 50 做為支架結構材料, 由於 PLGA 50 : 50 使用冷凍乾燥法製備出的支架太過柔軟, 另外考慮其降解速率較快, 因此使用 PLLA 與 PLGA 50 : 50 進行混合製備支架, 以求得細胞相容性與機械強度的平衡, 由 SEM 拍攝的結果, 三種製備方法形成的孔洞大小除製備方法二在 25 μm 左右, 其餘皆在 40-60 μm , 皆有內部相連的孔洞, 符合支架的特點[5-6]。

發展出支架中細胞生長與基質修復程度的評估方式, 由於組織學中染色方式較為複雜, 且原本係使用生體材料, 染色所使用的藥品使用在人工合成材料上, 會影響材料之完整結構, 另外在特定基質之染色判讀上較為困難, 而利用生化性質分析可以得到較為完整且定量的結果, 適於做支架間之比較。綜合上述, 作為關節軟骨修復可降解軟骨細胞支架為孔洞介於 50 μm 以上、三維立體結構能持久及細胞相容性高的材料, 因此本研究評估最適合的支架為 PLGA 50 : 50-s、PLLA - 20C、Blend -20C 等三種。目前嘗試

孔基材上，培養在 37 °C、5% CO₂ 環境下，分別經過 24 及 96 小時進行細胞計數。

基材名稱	細胞數量 ($\times 10^4$ cells)		培養時間	
			24 小時	96 小時
	IRC	RC	IRC	RC
Control	4.67 ± 1.10	4.53 ± 0.16	60.4 ± 3.67	4.00 ± 0.40
PLLA-s	2.60 ± 0.69	1.73 ± 0.23	38.8 ± 4.50	1.60 ± 0.40
PLGA 85 : 15-s	2.47 ± 0.12	2.33 ± 0.31	47.2 ± 4.50	3.20 ± 0.001
PLGA 50 : 50-s	4.13 ± 1.10	4.00 ± 0.20	54.8 ± 3.62	4.13 ± 0.46

表 2、多孔性基材結構分析：利用 SEM 觀察
多孔基材截面孔洞

	Average pore size (μ m)	Water content ratio (%)
PLLA-s	58.3±2.95	84.0
PLGA 85:15-s	46.8±7.75	85.1
PLGA 50:50-s	60.9±2.24	84.7
PLLA N2	18.8±3.13	82.3
Blend N2	34.5±3.13	78.3
PLLA-20C	66.7±7.22	79.5
Blend-20C	68.8±6.25	26.8

表 3、材料表面性質分析-接觸角 (Film Contact Angle)

Sample	contact angle (°)
PLLA	75.3 ± 1.22
PLGA 85 : 15	71.6 ± 0.53
PLGA 50 : 50	70.6 ± 1.56
Blend*	72.2 ± 1.40

支架移植之動物實驗，選擇紐西蘭白兔六隻進行同種異體移植，選擇植入 Blend-20C 及經改質後之 Blend-20C 之支架，手術經過三星期後，觀察移植之紐西蘭白兔傷口復原，無傷口感染及內部發炎發生狀況，兔子運動正常證實手術成功，但內部缺陷是否有完全修復，尚需進一步探討。未來展望嘗試能針對本研究製出之支架以天然材料 collagen 加以改質支架表面，以提高支架之細胞相容性，並增加細胞之遷移性，以提高支架修復缺陷的速度，最終能運用於臨床醫學應用造福人類。

- 1、ROSS 組織學, ROSS 等人原著, 呂嘉陞等編譯, 合記圖書出版社, 85 年出版。
- 2、基礎骨科學, John J. Gartland 原著, 賴祐平醫師編譯, 藝軒圖書出版社, 83 年出版。
- 3、Heidi L. Wald, Georios Sarakinos, Michelle D. Lyman, Antonios G. Mikos, Joseph P. Vacanti and Robert Langer, Cell seeding in porous transplation devices, *Biomaterials* 1993, 14, 270-278.
- 4、Freed LE, Marquis JC, Nohria A., Emmanuel J, Mikos AG, Langer R: Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 1993;27:11-23.
- 5、Pappas and R. S. Langer: Biopolymer II, Springer, 1995: 245-247.
- 6、Ch. Schugens, V. Maquet, Ch. Grandfils, R. Jerome and Ph. Teyssie: Polylactide macroporous biodegradable implant for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase seperation. *J. Biomed Mater Res.* 1996, 30:449-461