

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

玻璃纖維培養韌帶細胞之可行性評估

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2622-E-002-026-CC3

執行期間：93年11月01日至94年10月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學工程學研究所

計畫主持人：楊台鴻

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫為提升產業技術及人才培育研究計畫，不提供公開查詢

中 華 民 國 94 年 12 月 31 日

組織工程計畫結案報告

I. 簡介 (Introduction) 與背景說明

根據 Langer 的統計，美國每年至少有十二萬的病人需要進行肌腱或韌帶置換的手術，在台灣也因為機車為普遍之交通工具，導致車禍前十字韌帶斷裂之情形較國外更為常見[1]。目前臨床上處理韌帶或肌腱的斷裂大多是採用自體或異體移植的方式，或是以人工合成之材料作為取代物。然而目前為止，以合成材料作為取代物之手術雖然在臨床上相當普及，但材料經過長時間之後仍會有老化等問題發生，而異體移植目前仍處於臨床試驗之階段，主要的問題為仍無法有效抑制免疫及發炎反應的發生。因此，找尋合適的方法幫助撕裂肌腱及韌帶之修復仍是臨床上亟欲解決之課題。

一般生醫材料多為身體組織損壞時之替代品，因此需具有良好之穩定與持久性、適當的物理化學性質，及良好的生物相容性。並於生醫材料植入人體後能維持其生理機能。近幾年來由於生醫材料大部分需植入人體，良好生醫材料加上日益進步的膝部韌帶修復手術技術，將可開發出促進韌帶修復並縮短復健時間的生醫材料(將此二生醫材料混合製成支架)，另外，在支架內我們也會加入促進韌帶修復之生長因子及自體韌帶細胞，使該支架一方面可以促進韌帶組織之修復，另一方面擁有相當的機械強度可以預防手術後韌帶再次斷裂，再則此一生醫支架不會引起細胞組織的毒性反應，本計畫預計將玻璃纖維材料做成支架以增進韌帶的修補。

近年來國外專家學者對細胞培養的研究結果顯示，生醫材料的應用中，生物體往往只接觸到生醫材料的表面，故材料表面構造的重要性遠大於整體 (bulk) 構造，(整體構造與機械性質或其他性質較有關聯)，而根據過去本實驗室的研究也發現，材料表面結構的改變確實會對於細胞的貼附及生長有很大的影響，因此實驗的初步將先探討不同表面性質對於韌帶及肌腱細胞貼附及生長的影響。

組織中的活細胞是藉由一層細胞外基質(extracellular matrices, ECMs)進行貼附和生長行為，ECM 大部分是由蛋白質(protein) 和聚葡萄糖胺(glycosaminoglycans) 所構成。而 ECM 已經被確認能調節細胞的多種行為，例如細胞的貼附、生長、移動和分化等等。而構成這些 ECM 的生物分子成份包含有如 fibronectin, collagen, vitronectin, polylysine 和 laminine 諸如此類具有黏著性的蛋白質[2-7]。因此有鑑於此，本研究將比較有塗佈 collagen 之玻璃纖維跟未塗佈之玻璃纖維去培養韌帶細胞之後的結果，塗佈較適合韌帶及肌腱細胞生長之細胞外間質(Extracellular matrix 簡稱 ECM)。根據文獻，肌腱為連接骨骼與肌肉的組織，而韌帶則為連接骨骼與骨骼之間的組織，在肌腱及韌帶的周圍都被大量的第一型膠原蛋白(type-I collagen)及少量的聚葡萄糖胺(glycosaminoglycans)所環繞[8-10]。因此，本研究探討在聚乳酸薄膜表面塗佈不同的 ECM 如 type I collagen、fibronectin 等，找尋最適於內側副韌帶細胞及前十字韌帶細胞之 ECM。

II 關鍵材料及方法(Subject and Methods)

※玻璃纖維製備

本實驗之玻璃纖維使用直接融熔法，不需要先製成玻璃球，直接把各種原料按組成比例同時投入窯中熔融，熔態玻璃經澄清後通過窯中的數十塊白金拉絲板的小孔流出而獲得玻璃絲。

※ 穿透式光學顯微鏡之觀察

因為穿透式光學顯微鏡只能觀察光線可通過的樣本，所以只能用穿透式光學顯微鏡觀察培養在 TCPS 和有塗佈 poly-lysine 之 TCPS 上神經細胞生長的情形。

※ 反射式光學顯微鏡之觀察

由於玻璃纖維複合材本身透光程度有限，以一般光學顯微鏡難以觀察神經細胞之生長狀況，因此以反射式光學顯微鏡的觀察、照相，來對做外觀上的觀察。樣本在觀察之前，需要以戊二醛(glutaraldehyde)做固定，再以酒精做序列脫水至無水酒精，最後再換至丙酮(Acetone)。

※ 生物適應性

● 細胞培養

細胞培養主要分為細胞貼附 (cell adhesion) 和細胞成長 (cell growth) 兩種。而細胞培養乃是評估材料生物適合性主要的方法之一。

若材料表面的生物適合性不佳，則細胞不易與材料的表面產生交互作用，也就是細胞不易貼附及成長。反之，若材料表面的生物適合性較佳，則材料表面會貼附細胞並進而增生。

實驗使用的細胞為取自純種紐西蘭白兔的前十字韌帶細胞及內側副韌帶細胞。細胞培養基乃為市售的 MEM 培養液，混合 10% 胎牛血清 FBS (Fetal Bovine Serum) 並加入 1% 的 sodium pyruvate 以及 1% 的三合一抗生素 (antibiotics) 所調配而成。

初代培養步驟：此初代培養步驟之主要目的是取得前十字韌帶 (Anterior Cruciate Ligament) ACL 之韌帶細胞，並將其種在不同表面結構之薄膜上。此韌帶細胞是取自膝關節處，其過程如下：

➤ 韌帶及肌腱細胞之取得：

韌帶或肌腱的纖維細胞培養，採用 Nagineni CN et al 的方法加以改進而來。膝前十字韌帶組織取自人工膝關節置換的病人所切除的前十字韌帶或前十字韌帶斷裂病人，肌腱組織取自接受前十字韌帶重建的病人的髌股韌帶或大腿後方內側的半腱狀肌，係手術中修剪剩下的肌腱、清除相連的肌肉和結締組織，在培養盤上切成小塊的 explant cultures。

➤ 純化細胞：

將取得之組織以 PBS 潤洗 2 次，切碎至 1mm^2 ，置放於培養盤上。置放於 37°C ，5% CO_2 之培養箱中。待細胞長出後，移除小塊的組織，讓細胞繼續增生，直到滿盤。每三天更換新鮮之培養基，直到有足夠之韌帶細胞，再種至準備好之材料上。

將細胞"撒"入有試片的細胞培養皿上，細胞數量控制為 $8 \times 10^4/\text{ml}$ ，置於細胞培養箱中培養。其每個 well 培養基為 1 ml/well。每組薄膜試片均重覆 6 次實驗。

● 評估肌腱及韌帶細胞生長情形：

➤ 光學顯微鏡觀察

因為光學顯微鏡只能觀察光線可通過的樣本，所以只能用光學顯微鏡

觀察培養在對照組上神經細胞生長的情形。

➤ MTT 試驗

MTT test 是利用活細胞中的粒線體可以將黃色的 MTT 代謝為藍色的 formazan 晶體，可以用來測量細胞的存活率，利用 Mosmann et al 所使用之方法，經改善後如下：

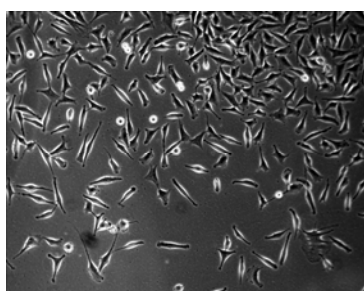
1. 將培養盤中的 medium 抽出並以 PBS 溶液沖洗兩次，將 0.1g 的 MTT 粉末溶於 50ml 的 PBS 溶液中，過濾滅菌，然後在每一個 well 中加入 0.1ml 的 MTT 溶液，置於 incubator 中作用 3 小時，整個過程需避光。
2. 在每個 well 中加入 0.2ml DMSO 溶液，在搖盪器(shaker)上搖 15 分鐘，使其均勻。將細胞內的 MTT 產物 formazan 溶出。
3. 取 0.1ml 溶液置於 96well 的培養盤中，以 ELISA Reader 讀取波長 570 nm 的吸光值。

➤ 乳酸脫氫酶 (LDH) 測試評估神經細胞死亡情形

LDH 為細胞共有的酵素，在細胞死亡後便會因為細胞膜破裂而被釋放，因此和細胞死亡的個數有關。由於它的化學性質穩定，不易隨時間而降解，而且又可以即時偵測，因此經常利用取代細胞計數(cell count)的觀察，作為觀測細胞死亡的指標。其偵測方式如下：

1. 將培養盤中的 medium 抽出離心於 1500rpm 下五分鐘，然後從每一個 well 中抽出 0.1ml medium 加入 96well 盤中，再加入 0.1ml 之 LDH kit，反應作用 30 分鐘，整個過程需避光。
2. 再將 96well 培養盤，以 ELISA Reader 讀取波長 490 nm 的吸光值。

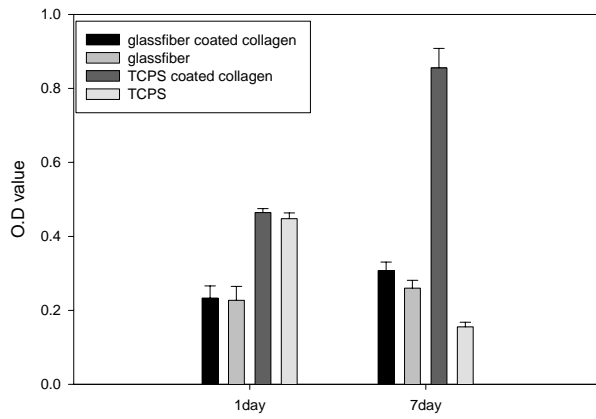
III.結果 (Results)



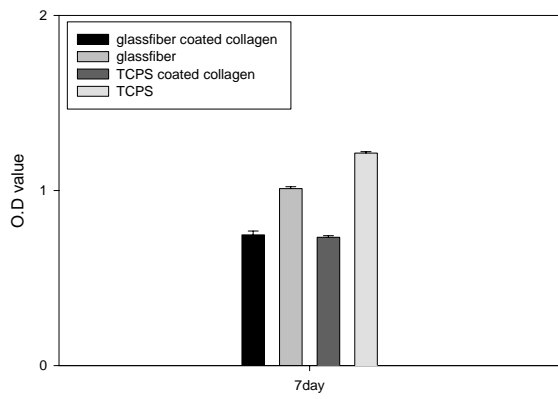
內側副韌帶細胞(100X)

圖一、內側副韌帶細胞(MCL cell)之光學顯微鏡照片

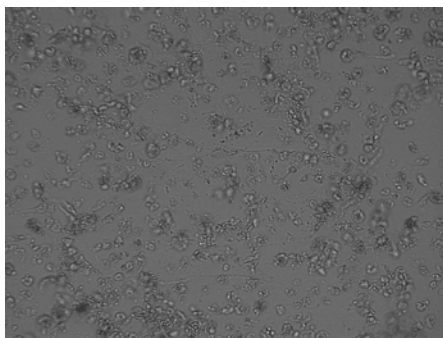
由光學顯微鏡的照片可看出細胞會自組織的周圍遷徙出來，組織的周圍有較多的細胞，距離組織愈遠則細胞呈現愈稀疏的狀態。照片顯示內側副韌帶的細胞為細而小，此情形均與paper所描述雷同[11]，因此可以確定我們所取得之組織確實是內側副韌帶。



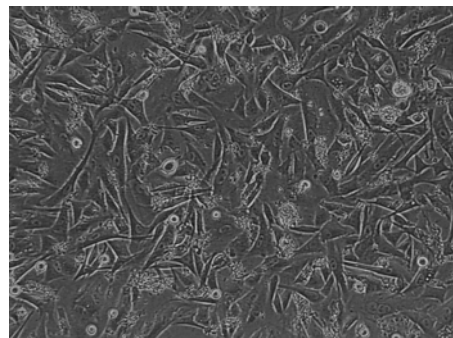
圖二、內側副韌帶細胞(MCL)於不同表面結構之聚乳酸薄膜上培養一天及七天的MTT結果 (n=3)



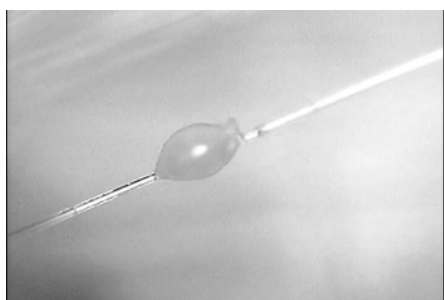
圖三、內側副韌帶細胞(MCL)於不同表面結構之聚乳酸薄膜上培養七天的LDH結果 (n=3)



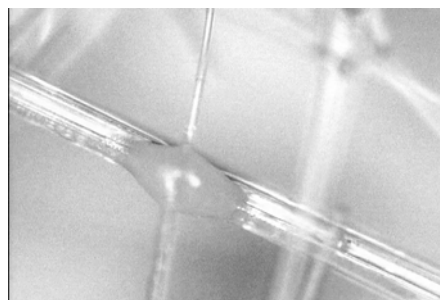
(a)培養皿



(b)塗佈collagen之培養皿



(c)玻璃纖維



(d)塗佈collagen之玻璃纖維

圖四、內側副韌帶細胞(MCL)於不同表面結構之聚乳酸薄膜上培養7天之光學照片

由圖二測量細胞活性(MTT)之試驗可知,在第一天主要是測量細胞之貼附,玻璃纖維MTT值大約在0.22左右而在玻璃纖維塗佈collagen時MTT值大約0.3,比在一般培養皿還有培養皿塗佈collagen時要低,這可能代表玻璃纖維在第一天時並不太能對韌帶細胞的貼附有所幫助,但在第七天之MTT讀值中,玻璃纖維還有塗佈collagen之玻璃纖維之讀值明顯高於一般培養皿,這可代表一般培養皿可能在長時間培養下,隨著韌帶細胞之分化,medium之養份可能已經慢慢耗盡,造成細胞凋零,而在玻璃纖維和玻璃纖維塗佈collagen下,韌帶細胞則沒有明顯分化,貼附在玻璃纖維上,在塗佈collagen之培養皿上,則可看出因有collagen之作用而使得韌帶細胞生長良好,進而使得MTT值大幅升高。

在圖三細胞死亡比(LDH)測試可知,當韌帶細胞培養七天後,在玻璃纖維跟塗佈有collagen之玻璃纖維上皆可發現讀值皆比一般培養皿低,這代表在玻璃纖維上之細胞凋零數目相對不多,尤其在塗佈有collagen之玻璃纖維上更為明顯,而在有塗佈collagen之培養皿上也呈現很低之讀值。

由圖四的光學照片可以看出內側副韌帶細胞在四種不同條件下之生長情形,在培養七天後,其貼附的型態呈現明顯的差異,在一般培養皿下,可以看出細胞呈現較為稀疏且較不攤平成圓球狀,而在有塗佈collagen之培養皿上,細胞則呈現攤平的貼附型態,且細胞數目密集,在玻璃纖維和玻璃纖維塗佈collagen下,細胞則呈現單顆貼附且呈現不分化之狀態,其結果與MTT結果相吻合。

VI. 討論 (Discussion) 與成果之貢獻

由上述之結果觀之,可以發現到各個材料對韌帶細胞都有顯著不同之影響,韌帶細胞會克服本身的重力遷移到具有三度空間結構之玻璃纖維上,但由於玻璃纖維所構成之孔洞遠比韌帶細胞之本體還要巨大,照一般情形而言細胞應會在底層之培養皿上而非在玻璃纖維上,推測可能玻璃纖維表面可能適合韌帶細胞之貼附,而讓韌帶細胞從培養皿遷移至玻璃纖維上[12]。聚集在玻璃纖維上之韌帶細胞並沒有明顯分化之行為,可由MTT讀值跟光學照片可以得知,其結果可能是受限於所貼附之細胞數或玻璃纖維表面組成結構之影響。而在LDH讀值方面,可能由於韌帶細胞在一般培養皿長天期下所造成的細胞凋亡數目眾多,因此對於LDH讀值有大幅提升之效果,而玻璃纖維上之韌帶細胞則可能不太分裂跟分化,只呈現類似休眠之情形,所以相對於一般培養皿之細胞死亡比低。培養皿塗佈collagen時,不管是在MTT試驗、光學險為照片或者LDH實驗,皆可得到不錯的效果,我們推測原因是type I collagen本來就是內側副韌帶細胞周遭最重要的一種細胞外間質,因此塗佈collagen有模擬體內韌帶環境的效果進而幫助韌帶細胞

後期生長。

此研究發展出一種較為新式的三度空間培養韌帶細胞的方法，可以提供韌帶細胞不僅止於在平面上的貼附及生長，此機制可以進一步應用在斷裂韌帶之輔助修復上。

參考文獻 (References)

1. Jackson DW, Heinrich JT, Simon TM. Biologic and synthetic implants to replace the anterior cruciate ligament. *Arthroscopy* 1994;10(4):442–52 [Review] [57 refs].
2. Bhati RS, Mukherjee DP, McCarthy KJ, Rogers SH, Smith DF, Shalaby SW. The growth of chondrocytes into a fibronectincoated biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res* 2001;56(1):74–82.
3. Ma Z, Gao C, Shen J. Surface modification of poly-L-lactic acid (PLLA) membrane by grafting acrylamide: an effective way to improve cytocompatibility for chondrocytes. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14(1):13–25.
4. Wan Y, Yang J, Yang J, Bei J, Wang S. Cell adhesion on gaseous plasma modified poly-(L-lactide) surface under shear stress field. *Biomaterials* 2003;24(21):3757–64.
5. Ohya Y, Matsunami H, Yamabe E, Ouchi T. Cell attachment and growth on films prepared from poly(depsipeptide-co-lactide) having various functional groups. *J Biomed Mater Res* 2003;65A(1):79–88.
6. Hubbell JA. Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10(2):123–9.
7. Garcia AJ, Vega MD, Boettiger D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol Biol Cell* 1999;1910:785–98.
8. Goulet F, Germain L, Rancourt D, Caron C, Normand A, Auger FA. Tendons and ligaments. In: Lanza R, Langer R, Chick W, editors. *Principles of tissue engineering*. Austin, TX: RG Landes Co. and Academic Press; 1997. p 633–643.
9. Carlstedt CA, Nordin M. Biomechanics of tendons and ligaments. In: Nordin M, Frankel VH, editors. *Basic biomechanics of the musculoskeletal system*. Malvern, PA: Lea & Febiger; 1989. p 59–74.
10. Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA Jr. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1999;1:19–46.
11. C.N. Nagineni, D. Amiel, M. H. Green, M. Berchuck, and W.H.Akeson, “Characterization of the Intrinsic Properties of the Anterior Cruciate and Medial Collateral ligament cells: an in vitro cell culture study”, *Journal of orthopaedic research* **10**(1992) 465-475
12. Processing, characterisation and biocompatibility of iron-phosphate glass fibres for tissue engineering. *Biomaterials*. 2004 Jul; 25(16):3223-32.