

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

組織工程用、生物可分解鷹架之特性對於軟骨細胞特定分化 功能表現之影響研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2218-E-002-032-

執行期間：91 年 10 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：蔡偉博

計畫參與人員：陳俊宏、王閔正

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 1 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☒ 成果報告
☐ 期中進度報告

組織工程用、生物可分解鷹架之特性對於軟骨細胞特
定分化功能表現之影響研究

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 91－2218－E－002－032－

執行期間：91 年 10 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

計畫主持人：蔡偉博

共同主持人：

計畫參與人員：陳俊宏、王閔正

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

☐ 赴國外出差或研習心得報告一份

☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份

☐ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☐ 一年☐ 二年後可公開查詢

執行單位：

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

中、英文摘要及關鍵字

中文摘要

在組織工程中，鷹架的選擇可能會嚴重地影響新生組織的成功與否，理想上，鷹架基材必須能夠幫助細胞貼附、生長和其分化功能。鷹架的特性，例如材料種類、孔徑大小和孔隙度，會影響細胞的貼附、生長以及分化功能，其中是細胞在基材上特定分化的功能，對於所形成組織的功能有決定性的影響。生物可分解高分子因為具有生物相容性、易加工和再造性等優點，應用在組織工程鷹架的製作上已經有一段歷史，許多研究也集中在 PLLA，PGA 和 PLGA 等美國 FDA 通過的材料，與軟骨細胞間的交互作用，但是大多數的研究只集中在軟骨細胞貼附和生長，關於材料特性對於軟骨細胞分化功能的影響，所做的研究仍然嫌不足，這對於組織工程的發展必定造成阻礙。

本研究計畫的重點就在探討鷹架的特性，對於關節軟骨細胞的影響，尤其是對於軟骨細胞特定分化功能的表現。本研究發現軟骨細胞在 PDLLA 上不論就細胞數或是軟骨細胞特有的基因表現上，都優於其他材料，相反的 PCL，是表現最差的材料，此結果可以作為挑選材料的依據。

英文摘要

The choice of scaffold materials has the potential to dramatically affect the outcome of engineered tissues. Ideally, the scaffold material must support cell adhesion, growth, and differentiated cell functions. Many properties of scaffolds for tissue engineering might influence these cell behaviors, such as the types of materials, pore sizes and porosity of scaffolds. Synthetic biodegradable polymers, with the advantages of biocompatibility, easy processing, and reproducible, are a group of a group of materials for use as tissue engineering scaffolds. Much research has focused on chondrocyte interactions with the scaffolds made of those biodegradable polymers that are FDA approved: polyglycolic acid (PGA), poly(L-lactic acid) (PLLA), and their copolymer, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). Nevertheless, most of the studies focused on how well chondrocytes attach to and grow in the scaffolds. On the other hand, few studies are concerning another important aspect, how the scaffolds support chondrocyte-specific functions. The lack of knowledge regarding the effects of scaffold properties on differentiated cell functions hampers the development in the field of engineered tissues.

前言

在過去的研究過程中，認識到醫療器材的成功與否，生醫材料與細胞／蛋白質之間的交互作用扮演著決定性的角色，細胞和材料接觸後所產生的反應，例如細胞貼附、生長、移動、甚至計畫性死亡，都會受到材料特性的影響。本研究計畫的重點也在探討在組織工程的應用中，細胞在可分解高分子基材上的細胞生理反應，特別是在細胞特定分化功能上的影響，希望藉由對於細胞和材料之間交互作用機轉之瞭解，做為日後設計組織工程用鷹架的參考。

研究目的

本研究計畫是基於一種假設，就是一般常用來製成組織工程用鷹架的可分解高分子，其種類、材料特性、表面特性，以及孔隙度和孔徑大小，會影響軟骨細胞的生長和基因表現，進而影響正常軟骨組織的生成。本研究計畫的目的，在於研究鷹架的性質對於軟骨細胞的影響，比較軟骨細胞和數種材料的交互作用，對於貼附和生長的現象，軟骨細胞的分化功能，尤其是在轉錄和轉譯層次，以及所形成軟骨組織，作有系統的研究，希望能透過研究的結果，得到如何選擇材料，以及培養條件的知識，進而改進目前組織工程的不足。鷹架的特性可能會影響到細胞生長的因素很多，本研究計畫將討論三個因素：製成鷹架的基材種類，孔隙大小和孔隙度，至於其它的因素，例如製作方法、結構等，則不在討論的範圍。

文獻探討

在關節軟骨組織工程中，許多研究將藉助鷹架的協助，許多天然衍生和人工合成的材料都曾被製成的鷹架，用在關節軟骨修補，也有一些不錯的成果[1-9]。但是目前在體外生成與正常關節軟骨型態與機械性質類似的組織工程關節軟骨，仍然是一件非常不容易的事。應用 PLGA 所製成的鷹架，已經廣泛的使用在關節軟骨組織再生的研究上，也能夠在其中形成組織[1]，但是從細胞外基質的結構來看，第 I 型和第 II 型的膠原蛋白都有，可能會形成纖維化軟骨。在另一個研究中，利用 PLA 所製成的鷹架，結果產生的膠原蛋白有 81% 是第 I 型，只有 19% 是第 II 型，並且 GAG 的量只有正常軟骨細胞的三分之一[10]，所以目前的研究中，沒有看到軟骨細胞保持百分之百的特定分化功能。

究其原因，軟骨細胞在體外生長時，因為和體內的環境不同，經常會改變其特有的分化功能。軟骨細胞最主要的功能是分泌提供關節軟骨作用的細胞外基質分子，包括第 II 型膠原蛋白和含蛋白多醣。第 II 型膠原蛋白是軟骨細胞的標記分子 (model chondrocyte marker)，所有的軟骨先驅細胞 (chondroprogenitor cells) 都會表現，並且在成熟的軟骨細胞中可以大量分泌[11]。目前最常用的軟骨細胞繁殖技術是在單層培養 (monolayer culture)，為了要達到足夠的細胞數目，通常需要數週的時間，在這過程中，軟骨細胞不可避免地會失去原有的功能，變成類似纖維母細胞 (fibroblast-like)，最明顯便是在外型上，從球形變成纖維母細胞的形狀，在分化功能上停止分泌原先應該產生第 II 型膠原蛋白，改為分泌第 I 型膠原蛋白，並且停止產生 aggrecan，這種現象稱為去分化 (de-differentiation)。許多研究顯示，將這些去分化的“軟骨細胞”重新培養在三度空間的載體中，例如洋菜膠

(agarose)，膠原蛋白凝膠 (collagen gel) 等，它們會重新分泌第二型膠原蛋白和 aggrecan[12]，不過這並不能表示這些細胞已經是百分之百回復成正常的軟骨細胞，其實它們同時也分泌第 I 型膠原蛋白，並且軟骨細胞在體外培養時間過久，去分化的細胞就無法回到原有的特性。這些去分化的軟骨細胞所產生的軟骨組織，事實上並不具有關節軟骨特有玻璃狀軟骨組織，而是機械性質較差的纖維化軟骨，無法擔任關節軟骨應有的功能。軟骨細胞的貼附、生長和細胞外基質的分泌等行為，會受得材料的表面特性影響，例如軟骨細胞生長在鈦 (titanium) 金屬表面比在一般塑膠表面，有高出許多的 alkaline phosphatase 活性[13]。另一項研究顯示，軟骨細胞養在親水性的 HDPE (high density polyethylene) 上，所分泌的第二型膠原蛋白比在疏水性的 HDPE 上多[14]。

研究方法

當軟骨細胞接種在生物可分解的鷹架上時，會有一些事件發生，首先是細胞貼附與增生 (cell adhesion and proliferation)，分泌關節軟骨特有的細胞外基質，接下來隨著鷹架的分解，軟骨細胞進一步增生以及分泌細胞外間質以填充因為鷹架分解所產生的空間。本研究計畫將分析軟骨細胞在鷹架中不同階段時的細胞分化狀態，探討材料種類、孔隙度和孔徑大小對於軟骨細胞的影響。

本研究一開始先探討材料種類對於細胞在增生與基因表現的影響，多種常用於組織工程鷹架的可分解高分子，包括 PDLLA、PLLA (PURAC) PLGA(85/15)、PCL (Aldrich) 等先塗佈在玻璃上，塗佈的結果可以用水的接觸角來驗證。

細胞的種類是使用成熟豬的軟骨細胞，從市場購買新鮮之豬腳，用手術刀把膝關節軟骨切下來，置入無菌的 PBS 溶液中，再把軟骨切片切成截面積約 1mm^2 大小，用 PBS 洗兩次後，置入 digestion mixture 中 (其中包含 collagenase 和 hyaluronidase)，在培養箱 (37°C ; $5\% \text{CO}_2$) 中靜置 18 小時後，以 $70\text{ }\mu\text{m}$ 濾膜過濾，以 1000 rpm 離心 10 分鐘，便得到軟骨細胞。細胞數量使用血球計算板 (Hemocytometer) 來決定。所得到的軟骨細胞，在 150 ml 角型培養瓶 (flask) 裡 (底面積： 75cm^2) 中培養，培養基為 DMEM/F12 加入 10% fetal calf serum，置於培養箱中培養，每三天換一次細胞培養基。

待欲接種細胞於可分解高分子薄膜前，用胰蛋白酶 (trypsin) 將細胞從培養瓶中分離下來，加入已經塗佈高分子膜的培養皿裡面，放到培養箱裡培養。佈殖密度為 1×10^4 cells/ cm^2 。培養若干天後，將細胞取出，測細胞數，以及分離 mRNA，利用 RT-PCR 來鑑定若干軟骨細胞的特定蛋白質之表現。

細胞計數是使用 Hoest 33258 dye 方法。細胞在培養 7 天及 14 天後，先用 10mM EDTA 水溶液 ($\text{pH}=12$) 將細胞溶解，再用 1M KH_2PO_4 ($\text{pH}=4.0$) 中和其鹼性。再和 Hoest 33258 dye (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 反應，用 photometry 以波長 365nm 的光激發，測 458nm 的發射光強度。再跟用已知細胞密度測出的標準曲線比較。就可以用內插法算出細胞數目。

抽取 mRNA 的方法是將培養 7 天及 14 天的細胞溶解，使用現成的 kit (RNeasy mini kit (QIAGEN 74104)) 來純化 mRNA，其步驟依照製造廠商的說明書。mRNA 抽出後，使用 SuperScriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase kit，將 mRNA 反轉錄成單股的 cDNA。然後進行 Polymerase chain reaction (PCR) 反應，檢驗四種蛋白質的基因表現 collagen type I、collagen type II、aggrecan 和 β -actin。所用引子(primer)的 DNA 序列以及溫度循環 (cycle) 設定如下：

β -actin : 5'-AACGGCTCCGGCATGTGC-3'

5'-GGGCAGGGGTGTTGAAGG-3'

($94^\circ\text{C}/5\text{min}$, $35 \times 94^\circ\text{C}/30\text{s}$ $55^\circ\text{C}/30\text{sec}$ $72^\circ\text{C}/45\text{sec}$, $72^\circ\text{C}/10\text{min}$, $4^\circ\text{C}/\infty$)

Collagen type I : 5'-GCTGGCCAACTATGCCTC-3'

5'-GAAACAGACTGGGCCAATG-3'

($94^\circ\text{C}/5\text{min}$, $25 \times 94^\circ\text{C}/30\text{s}$ $55^\circ\text{C}/30\text{sec}$ $72^\circ\text{C}/45\text{sec}$, $72^\circ\text{C}/10\text{min}$, $4^\circ\text{C}/\infty$)

Collagen type II : 5'-TGCCTACCTGGACGAAGC-3'

5'-CCCAGTTCAGGCTCTTAG-3'

(94°C/5min, 25X 94°C/30s 55°C/30sec 72°C/45sec, 72°C/10min, 4°C/∞)

PCR 的產物以電泳來觀察，用 1.5 wt% agarose gel 來跑 (100 伏特 30 分鐘)，跑完之後用 EtBr(aq) 染色，在 UV 照射下拍照，然後使用 One-Dscan 2.03 軟體(Scanalytic Inc.)來分析其強度，type I collagen、type II collagen 和 aggrecan 的相對強度，是將原有強度除以 β -actin 的強度。

結果

這項研究首先分析不同材料所製成的薄膜來作初步的分析，首先將可分解高分子塗佈在玻璃培養皿上，可是由於玻璃的表面較為親水，這些高分子相對疏水，因此在浸入培養基幾天後，高分子薄膜會脫離玻璃表面，因此在玻璃表面上先塗佈一層 Repel-silane ES，在塗佈可分解高分子，就不會從表面上脫離，可分解高分子的塗佈，可以從表面接觸角的改變來決定 (圖一)。

豬的軟骨細胞經過分離後，在培養皿中繼代一次後，就接種在材料表面上，經過七天以及十四天後，將細胞取出計數，以及抽取 mRNA 和進行 RT-PCR。這些實驗都重複三次以上。在細胞數方面，細胞在 PDLLA 表面上，一開始的數目最多，可是在十四天時數目反而減少，在 PLLA 和 PCL 也有類似的現象，在 PLGA 上細胞數有增加了現象，在控制組 TCPS 上則數量大致不變。綜觀來說，在十四天時，PCL 上的細胞最少，PLLA 次之，其他三個表面則差不多。

在蛋白質的表現方面，可以看出細胞在個別表面上大致在七天時表現量較大，到了十四天時反而減少。圖三顯示 type I collagen 的表現，到了第十四天時都大幅的減少，而 type II collagen 的表現 (圖四)，在 PDLLA 和 PLLA 表面上反而在第十四天時出現，不過表現的程度並不高，而在 PLGA 和 PCL 上則完全沒有表現。Aggrecan 的表現模式 (圖五) 和 type II collagen 相當類似，在 PDLLA 和 PLLA 表面上在第七天時沒有出現，反而在第十四天時出現，而在 PLGA 和 PCL 上則完全相反。

討論

軟骨細胞在鷹架上的附著、繁殖以及基因表現攸關關節軟骨組織工程的成敗，因此研究者莫不關心細胞在材料上的表現，但是這方面的研究很少集中在比較軟骨細胞在不同材料表面上的特定基因表現，本研究的目標即在評估鷹架之材料特性以及結構對於軟骨細胞功能的影響。

在本研究中所使用的材料，似乎對於細胞的生長並不支持，細胞的生長並不理想，其原因可能是殘留的溶劑所造成。至於基因表現，軟骨細胞應該表現其特有的蛋白質，type II collagen 和 aggrecan，而 type I collagen 是顯示軟骨細胞已經進行去分化，表現類似 fibroblast 的特性。我們發現 type II collagen 和 aggrecan 的表現似乎有關連性，會同時表現或消失，可以驗證軟骨細胞如果保有原有特性，可以同時分泌此二種蛋白質。所使用的材料，如果來進行篩選，PCL 可以說是最不好的材料表面，因為細胞的生長數目最少，而且在第十四天時，僅分泌 type I collagen，而沒有 type II collagen 和 aggrecan。PDLLA 似乎是最理想的材料，因為細胞的數目最多，同時在第十四天時並不表現 type I collagen，但仍保有軟骨細胞的特性，分泌 type II collagen 和 aggrecan。PLGA 在細胞的數目上雖然不少，但是細胞僅分泌 type I collagen，而非 type II collagen 和 aggrecan。

計畫成果自評

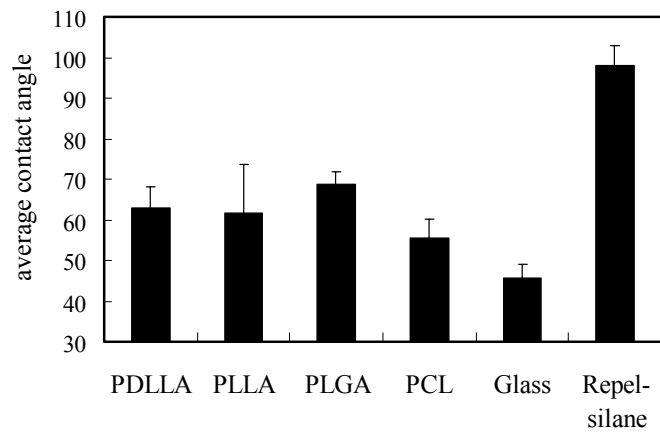
此次計畫執行未能完成全部的目標，完成了第一部份的材料分析，但是對於鷹架的孔洞特性並沒有完全完成，其主要原因為計畫的執行時間從十月才開始，以及由於本人是新進人員，設備的採買較為延遲，學生的訓練需要一段時間。不過鷹架的製作已經完成，細胞的分析也已經開展，應該很快會有成果。而已經完成的部分，其內容具有學術價值，已經提出國際會議的論文，期刊論文也已經開始撰寫，計畫執行已經有了初步的成效。

參考文獻：

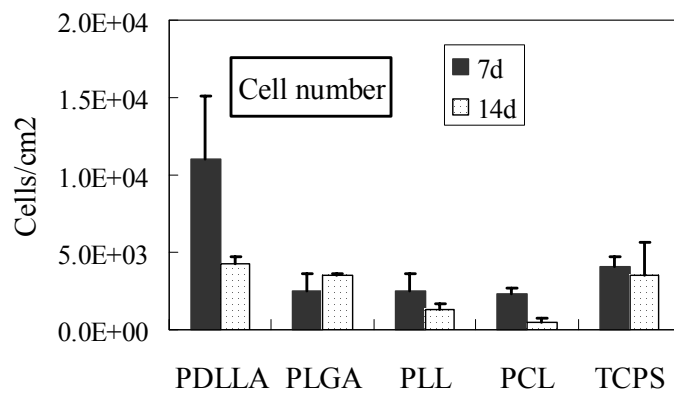
1. L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and R. Langer, *J Biomed Mater Res* 27, 11 (1993).
2. D. A. Grande, C. Halberstadt, G. Naughton, R. Schwartz, and R. Manji, *J Biomed Mater Res* 34, 211 (1997).
3. L. E. Freed, J. C. Marquis, G. Vunjak-Novakovic, J. Emmanuel, and R. Langer, *Biotech. Bioeng.* 43, 605 (1994).
4. D. A. Hendrickson, A. J. Nixon, D. A. Grande, R. J. Todhunter, R. M. Minor, H. Erb, and G. Lust, *J Orthop Res* 12, 485 (1994).
5. S. Nehrer, H. A. Breinan, A. Ramappa, H. P. Hsu, T. Minas, S. Shortkroff, C. B. Sledge, I. V. Yannas, and M. Spector, *Biomaterials* 19, 2313 (1998).
6. S. Nehrer, H. A. Breinan, A. Ramappa, S. Shortkroff, G. Young, T. Minas, C. B. Sledge, I. V. Yannas, and M. Spector, *J Biomed Mater Res* 38, 95 (1997).
7. S. Wakitani, T. Goto, S. J. Pineda, R. G. Young, J. M. Mansour, A. I. Caplan, and V. M. Goldberg, *J Bone Joint Surg Am* 76, 579 (1994).
8. C. A. Vacanti, R. Langer, B. Schloo, and J. P. Vacanti, *Plast Reconstr Surg* 88, 753 (1991).
9. T. Kimura, N. Yasui, S. Ohsawa, and K. Ono, *Clin Orthop*, 231 (1984).
10. C. R. Chu, R. D. Coutts, M. Yoshioka, F. L. Harwood, A. Z. Monosov, and D. Amiel, *J Biomed Mater Res* 29, 1147 (1995).
11. K. S. Cheah, E. T. Lau, P. K. Au, and P. P. Tam, *Development* 111, 945 (1991).
12. P. Benya and J. Schaffer, *Cell* 30, 215 (1982).
13. J. Hambleton, Z. Schwartz, A. Khare, S. W. Windeler, M. Luna, B. P. Brooks, D. D. Dean, and B. D. Boyan, *J Orthop Res* 12, 542 (1994).
14. A. B. LiVecchi, R. M. Tombes, and M. LaBerge, *J Biomed Mater Res* 28, 839 (1994).

附錄

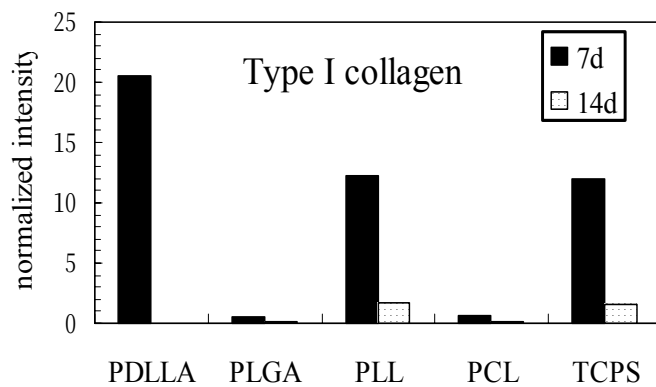
圖一、材料表面的接觸角



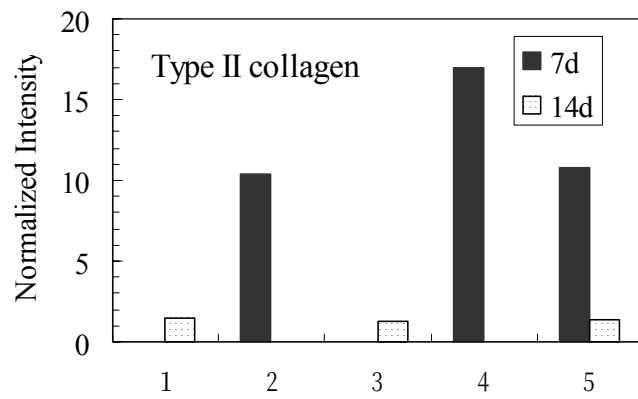
圖二、在不同表面的細胞生長，經過七天以及十四天的數目



圖三、type I collagen 的基因表現



圖四、type II collagen 的基因表現



圖五、aggrecan 的基因表現

