

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

機械性壓縮對於關節軟骨組織工程的影響評估—彈性鷹架
和可壓縮性生物反應器的製作、和人工軟骨組織的培養

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2214-E-002-035-

執行期間：92年08月01日至93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 93 年 11 月 2 日

機械性壓縮對於關節軟骨組織工程的影響評估—彈性鷹架和
可壓縮性生物反應器的設計與製作、和人工軟骨組織的培養

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92 - 2218 - E - 002 - 032 -

執行期間： 92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

計畫主持人：蔡偉博

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：台灣大學化工系

中 華 民 國 93 年 10 月 31 日

中、英文摘要及關鍵字

中文摘要

從以前在關節軟骨修補的組織工程研究中，瞭解到要有達到成功的組織工程產品，除了軟骨細胞、基材和生長因子外，物理性的刺激也可以增加成功產品的機會，不過這方面的研究非常少。本研究計畫的目的在探討在機械性壓縮對於關節軟骨組織工程的影響。目前已經完成彈性可分解高分子的合成、組織工程用鷹架的製備，可壓縮式生物反應器的設計與製作，軟骨細胞的分離與培養，生化分析方法的建立。

英文摘要

From previous researches related to articular cartilage tissue engineering, we understand that beside chondrocytes, scaffolds and growth factors, mechanical stimulus is also a key element to successful tissue engineering products. However, the related studies are scarce. The goal of this project is to study the effects of mechanical compression on articular cartilage tissue engineering. We already finished the synthesis of elastic biodegradable polymers, the fabrication of tissue engineering scaffolds, the design and the construction of compressible bioreactors, isolation and culture of chondrocytes, and development of biochemical assays.

關鍵字

軟骨細胞、關節軟骨組織工程、彈性可分解高分子、可壓縮式生物反應器

前言

從以前在關節軟骨修補的組織工程研究中，瞭解到要有達到成功的組織工程產品，除了軟骨細胞、基材和生長因子外，物理性的刺激也可以增加成功產品的機會，不過這方面的研究非常少。本研究計畫的目的在探討在機械性壓縮對於關節軟骨組織工程的影響。

研究目的

本研究計畫的目的是研究週期性的機械性壓縮對於關節軟骨組織工程的影響。本研究計畫將探討機械壓縮對於關節軟骨組織工程的影響。為了達成研究目的，本計畫必須完成三個重要部分：合成具有和軟骨類似機械性質的鷹架、有壓縮作用的生物反應器和人工軟骨的培養。

文獻探討

關節軟骨在滑膜關節（synovial joints）中經常受到靜態（static）或是動態（dynamic）的機械負荷（mechanical loads^[1,2]，例如在人類進行爬樓梯的活動時，所受到的壓力最高可達到 10-20 MPa^[3]。在關節軟骨受到長期或是靜態壓縮時，可能會發生 15-45%的形變，而短期（高頻率）的運動只會造成幾個百分比的形變^[2,4]。而關節軟骨之所以能夠支撐生理上所受到的壓縮力、拉伸力和剪力，是靠其 ECM 的組成和結構性的完整所決定的，軟骨細胞扮演著生成、組織、維護和分解這些 ECM 成分的角色，來維持關節軟骨的功能。長久以來，研究者已經接受機械性的刺激可以改變軟骨細胞生成和分解 ECM 成分，知道機械性的壓縮（mechanical compress）會調節關節軟骨的生化（biochemical）以及生物機械方面（biomechanical）的性質。關節軟骨細胞的功能需要經常有機械性的壓縮來加以刺激，在體內的實驗中，發現膝關節長期固定不動，會造成關節軟骨的萎縮（atrophy），呈現壓抑 sulfated-glycosaminoglycan 的生成，proteoglycans 的流失，還有壓縮性質的降低。這種特性是並不是因為缺少關節的移動，而是因為關節軟骨受力的減少。

因此許多研究集中在機械性的刺激對於軟骨細胞功能的影響。由於體內的試驗很難進行，因此在體外採用關節軟骨移出物（explants）或是將軟骨細胞分離出來，置於 3-D 的結構中，例如瓊膠（agarose）或是褐藻膠（alginate gel），進行研究，探討靜態和動態的機械

負荷，對於軟骨組織在生成（synthesis）、釋放（release）和聚集（accumulation）細胞外間質蛋白質的影響^[5-11]。一般來說，靜態壓縮顯著地抑制 proteoglycans 的生成，例如當軟骨組織受到靜態壓縮在 0.05-1.0MPa，和 50-60%的 strains 的情況下，會抑制細胞外間質的生成^{35,39,43}。相反地，動態的壓縮，能夠造成組織間液體的流動，和組織動態的形變，在特定的強度和頻率下，可以刺激基質分子的合成。當軟骨組織在 10-20%的 strain 下，頻率介於 0.002-0.1 赫茲，S-GAG 在軟骨檢體的分泌量可以增加達 50%^[9,12]。此外間歇性的壓縮（先進行 2-4 秒的壓縮循環，緊接著無受力 2-11 秒）也可以刺激 S-GAG 的生成^[10,13]。不過目前所使用的研究材料是瓊膠和褐藻膠，必須注意的一點是，如果基質的結構、機械性質、通透性（permeability）甚至水含量，和軟骨組織相差甚多的話，所得到的結果可能會相差很大。因此相同的形變，可能在細胞層次上，造成不同的機械訊號，進而影響後面的結果。或者使用材料的生化特性，也會造成不同的結果。例如 agarose 和 aginate，本身並不會直接和細胞產生連結，而膠原蛋白材料會透過 integrin，直接和細胞連接，並且透過 integrin，對細胞內部傳送訊號，這些差異可能會使得細胞對於外來的訊號，如壓力，產生不同的反應，因此同樣的應變對於細胞內部代謝的影響，可能就不同。

壓縮負荷對於軟骨組織可能會造成若干影響：細胞和基質的形變、液壓梯度（hydrostatic pressure gradient）、液體流動、電流、還有物理化學的變化（physicochemical changes）包括改變基質內水的含量、離子的濃度、滲透壓等。這些變化都可能引起基質新陳代謝的改變。目前對於這些因素對軟骨細胞功能的影響仍然沒有定論。在週期性壓縮的條件下，軟骨內的液體可以流進流出，增加養分的傳送，可以增加關節軟骨的新陳代謝，有助於分泌細胞外基質分子。

雖然人們瞭解壓縮作用對於關節軟骨結構的影響，但是卻很少有研究在探討壓縮作用在關節軟骨組織工程的影響，僅有少數的研究。在關節軟骨修補的組織工程中，也有少許研究壓力對於組織再生的影響^[14]，不過仍然是少數。究其原因，推測可能是目前所使用的鷹架特性並不適用，和常見的生物反應器無法有壓縮的功能。

目前組織工程所使用的基材並不適用於有壓力的狀態。常用的天然高分子，例如膠原蛋白，所製造的鷹架，機械性質弱，無法經得起機械性的壓縮，會使基材被壓扁，即使在無壓力的狀態，在長時間的培養下，也會因為細胞間的牽引，使得鷹架的形狀改變。至於可分解合成高分子，例如 PLGA，其彈性也不是很好。為了在機械性壓縮的條件下培養，

具彈性的鷹架是必須的。相對地，目前有很少有具有機械性壓縮功能的生物反應器，一般只能提供提供剪力（shear stress）或是靜水壓力（hydrostatic pressure），和關節軟骨平常所受到的壓縮性應力，並不完全相同。或許是這些因素限制了這方面的研究。

研究方法

雖然大多數的研究者瞭解到物理性的壓縮作用對於關節軟骨功能的重要性，並且有潛力可以應用在關節軟骨組織工程中，但是到目前為止，類似的研究非常少，推測其原因，主要應該是目前常用的基材並不適用於壓縮性的培養條件，以及缺少具有壓縮性的生物反應器等。目前常使用的可分解高分子，應用在骨科組織工程或是藥物釋放，多半是硬、脆、缺乏彈性的材料，如 PLGA 和 PCL；而天然高分子，如膠原蛋白，所構成的鷹架之機械性質多半非常柔軟，經不起一再地壓縮。本計畫需要具有彈性的材料，能經得起長時間的反覆壓縮，尤其是在培養液內，所以必須先將現有材料的製程加以改進，或是必須設計新的材料，才能得到符合本研究需求的鷹架。此外目前多數的生物反應器，至多只能提供剪力或是靜水壓力，和關節軟骨平常所受到的壓縮性應力，並不完全相同，所以在本計畫中必須設計一個可以提供機械壓縮的生物反應器。

得到適當的基材和生物反應器後，接下來要評估機械性壓縮對於軟骨細胞生長在鷹架中有什麼影響。本研究計畫將探討兩個變數，應變（strain）大小和壓縮週期。先進行短期的研究（1-2 天），挑選出最適合軟骨細胞生長和功能的條件，然後再進行長時間的培養（1-2 個月），觀察對於軟骨組織工程的效果。

一、以可分解聚氨酯（degradable polyurethane）為原料的鷹架。

分段聚氨酯彈性體（Segmented polyurethane elastomers）由於其獨特的物理性質，和相對優越的生物相容性，長久以來被使用於生醫材料，不過常用聚氨酯在體內的分解速率非常緩慢。不過近年來將易於水解的 soft segments 放入聚氨酯的骨架中，例如聚酯類（polylactides 或 polycaprolactone），作為 soft segments^[15-18]，這個方式可以把原先沒有彈性的常用可分解高分子，藉由和 urethane 的連結，構成具有彈性的物質。另一個方式是將易水解基團放在 hard segment 中，不過由於只有少數的 diisocyanates 可以使用在合成聚氨酯中，因此最常用的方法是使用可分解的 chain extenders 在製造 hard segment 中^[19-21]。

在本計畫中，預計合成以 2,6-diisocyanato methyl caproate, polycaprolactone diol 和以 phenylalanine-based chain extender 為原料的聚氨酯^[15]。合成的方式將用標準的兩步驟反應程序⁵⁵。藉由不同分子量的 polycaprolactone，可以調節聚氨酯的機械特性。

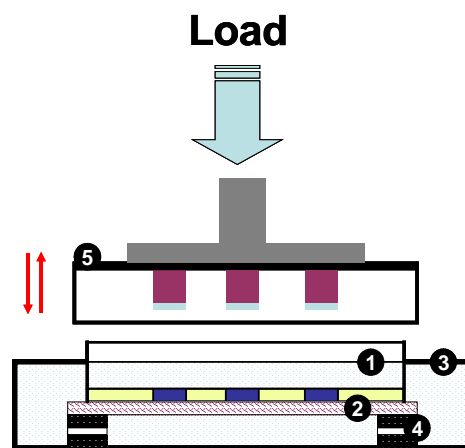
所合成的聚氨酯將使用 Gel permeation chromatography 來決定其分子量。使用 DSC 來

決定其 phase-segregated morphology。機械性質將使用 Instron testing machine 來做 uniaxial stress-strain 測量。

二、生物反應器的設計

目前用在軟骨組織再生的生物反應器，並不能夠提供壓縮性的功能，因此需要自行設計。在以往文獻中，對於機械力對於關節軟骨特性的影響，利用到壓縮功能的反應艙，本計畫將參考他人的設計，在加以改造，使之適合本研究計畫的需求。茲簡介如下：

生物反應器的設計



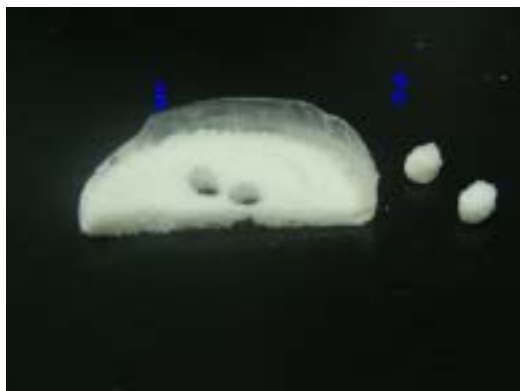
如上圖所示，將**軟骨細胞-鷹架複合體**置於培養皿底下的孔中(1)，底下和一個金屬的多孔性的濾膜貼合(2)，做為承載**軟骨細胞-鷹架複合體**，並且可以使培養液流通，再將整個裝置放在一個裝有培養液的盒子中(3)之承載上(4)，承載內有管道，讓培養液可以流通。最後上蓋(5)的把柄連接在一個可以提供週期性壓縮的機器上，可以上下移動來壓縮**軟骨細胞-鷹架複合體**，上蓋內的圓柱下可以貼上不同厚度的墊片，如此可以控制因壓縮所造成的應變大小。不同的圓柱可以貼上不同厚度的墊片，如此可以同時探討不同應變對於**軟骨細胞-鷹架複合體**的影響。

結果

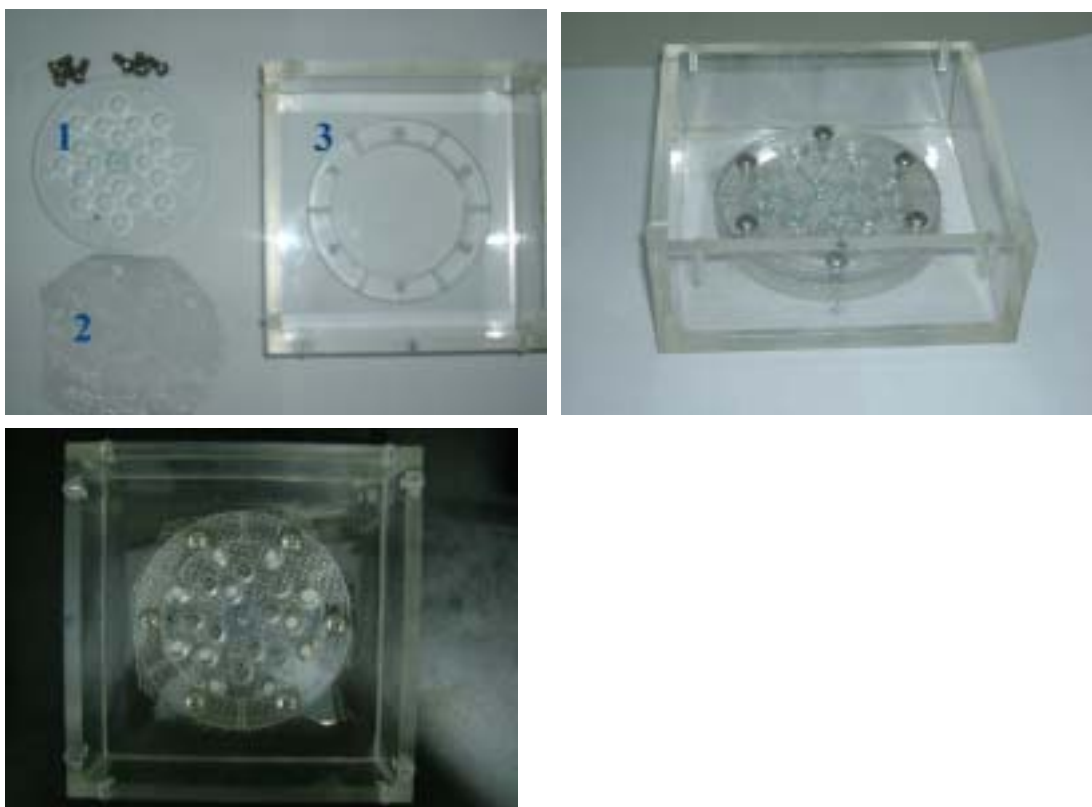
基材和鷹架的製備----分段聚氨酯彈性體

合成以 hexamethyl diisocyanate, polycaprolactone diol 和以 phenylalanine-based chain extender 為原料的聚氨酯。合成的方式將用標準的兩步驟反應程序。

所合成的聚氨酯彈性體以混鹽浸鑄法製成多孔性鷹架。簡言之，以 DMF 將聚氨酯溶解後，加入篩過的氯化鈉顆粒，混合均勻後，倒入模具之中。等到 DMF 揮發之後，變形成氯化鈉散佈其中的聚氨酯膜。重複上述多次，直到形成 4 mm 厚的膜後，將其自模具取下浸於熱水中，聚氨酯膜內的氯化鈉將會被溶解，多孔性聚氨酯彈性體膜 (1) 便完成。以打孔機在膜上打洞，取下的圓柱體便為多孔性聚氨酯彈性體鷹架 (2)。



生物反應器的設計與製備



分解圖 (左上圖) 組合圖 (右圖) 及鳥瞰圖 (左下圖): 可將 **軟骨細胞-鷹架複合體** 置於 (1) 的洞中，底下的金屬多孔濾膜 (2) 可承載 **軟骨細胞-鷹架複合體**，並且可以使培養液流通

生物反應器全圖



俯視圖（左上圖）平視圖（右上圖）及在 incubator 內的運作圖（下圖）：以交流馬達（4）透過偏心凸輪及槓桿（5）使壓力桿（7）上下移動來壓縮**軟骨細胞-鷹架複合體**，並且以調整馬達轉速及支點（6）位置來控制壓縮的頻率及壓縮所造成的應變，如此可以同時探討不同頻率和應變對於**軟骨細胞-鷹架複合體**的影響。

討論

本計畫執行已經完成了彈性高分子的合成、多孔性骨架的製備，可壓縮式生物反應器的設計與製作。同時對於軟骨細胞的分離與培養、生化分析的方法，均已經建立起來。已經能夠用來研究機械性壓力對於軟骨組織工程的影響。

計畫成果自評

此次計畫執行未能完成全部的目標，完成了初步的工作，不過因為生物反應器為一新的裝置，從設計到製作與試用，花了相當多的時間，尤其這需要和機械工廠的技工合作，因此花了許多時間在溝通。不過在此同時，本實驗室也針對軟骨細胞部分，進行初步的研究，有了具體的成果，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) Herberhold, C.; Faber, S.; Stammberger, T.; Steinlechner, M.; Putz, R.; Englmeier, K. H.; Reiser, M.; Eckstein, F. *J Biomech* **1999**, *32*, 1287-1295.
- (2) Ateshian, G. A.; Kwak, S. D.; Soslowsky, L. J.; Mow, V. C. *J Biomech* **1994**, *27*, 111-124.
- (3) Hodge, W. A.; Fijan, R. S.; Carlson, K. L.; Burgess, R. G.; Harris, W. H.; Mann, R. W. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 2879-2883.
- (4) Armstrong, C. G.; Bahrani, A. S.; Gardner, D. L. *J Bone Joint Surg Am* **1979**, *61*, 744-755.
- (5) Bachrach, N. M.; Valhmu, W. B.; Stazzone, E.; Ratcliffe, A.; Lai, W. M.; Mow, V. C. *J Biomech* **1995**, *28*, 1561-1569.
- (6) Burton-Wurster, N.; Vernier-Singer, M.; Farquhar, T.; Lust, G. *J Orthop Res* **1993**, *11*, 717-729.
- (7) Chen, C. T.; Burton-Wurster, N.; Lust, G.; Bank, R. A.; Tekoppele, J. M. *J Orthop Res* **1999**, *17*, 870-879.
- (8) Gray, M. L.; Pizzanelli, A. M.; Grodzinsky, A. J.; Lee, R. C. *J Orthop Res* **1988**, *6*, 777-792.
- (9) Kim, Y. J.; Sah, R. L.; Grodzinsky, A. J.; Plaas, A. H.; Sandy, J. D. *Arch Biochem Biophys* **1994**, *311*, 1-12.
- (10) Palmoski, M. J.; Brandt, K. D. *Arthritis Rheum* **1984**, *27*, 675-681.
- (11) Sah, R. L.; Doong, J. Y.; Grodzinsky, A. J.; Plaas, A. H.; Sandy, J. D. *Arch Biochem Biophys* **1991**, *286*, 20-29.
- (12) Sah, R. L.; Kim, Y. J.; Doong, J. Y.; Grodzinsky, A. J.; Plaas, A. H.; Sandy, J. D. *J Orthop Res* **1989**, *7*, 619-636.
- (13) Larsson, T.; Aspden, R. M.; Heinegard, D. *Matrix* **1991**, *11*, 388-394.
- (14) Davisson, T.; Kunig, S.; Chen, A.; Sah, R.; Ratcliffe, A. *J Orthop Res* **2002**, *20*,

842-848.

- (15) Skarja, G. A.; Woodhouse, K. A. *J Appl Polym Sci* **2000**, *75*, 1522-1534.
- (16) Saad, B.; Hirt, T. D.; Welti, M.; Uhlschmid, G. K.; Neuenschwander, P.; Suter, U. *W. J Biomed Mater Res* **1997**, *36*, 65-74.
- (17) Kylma, J.; Seppala, J. V. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2876-2882.
- (18) Woo, G. L. Y.; Mittelman, M. W.; Santerre, J. P. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1235-1246.
- (19) Hirt, T. D.; Neuenschwander, P.; Suter, U. W. *Macromol Chem Physic* **1996**, *197*, 4253-4268.
- (20) Dahiyat, B. I.; Hostin, E.; Posadas, E. M.; Leong, K. W. *J Biomater Sci Polym Ed* **1993**, *4*, 529-543.
- (21) Skarja, G. A.; Woodhouse, K. A. *J Biomater Sci Polym Ed* **1998**, *9*, 271-295.