

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

NO 自由基對軟骨機械性質及基質重組之影響 (3/3)

The Effect of Nitric Oxide on the Mechanical Properties and Matrix Turnover of Cartilage (3/3)

計畫編號：90-2314-B-002-404-

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：蔡清霖 國立臺灣大學醫學院骨科

## 一、中文摘要

本研究探討培養環境對軟骨細胞支架中軟骨細胞產生誘發性 NO 酵素之影響，及 NO 自由基對軟骨支架的機械性質與基質影響。培養環境包括靜置培養，旋轉式反應器與迴轉震盪式反應器等三種。結果發現震盪式反應器中紊流流場會使軟骨細胞產生最多自由基，且導致支架中細胞數量和基質含量最低。相對於靜置培養與旋轉式反應器中軟骨細胞產生自由基濃度較低，而支架中細胞生長較多，且基質含量高。旋轉式反應器產生層流流場使得細胞與基質於支架內分佈均勻，因而具有最高機械強度，而靜態培養下，細胞和基質分佈於支架外圍，使支架整體機械強度最低。故可歸結出 NO 自由基抑制支架中軟骨細胞的生長與功能，但層流流場環境對支架的機械強度有正面提升。

關鍵字：NO 自由基、機械性質、基質重組

## Abstract

In this study, the effect of NO free radical from chondrocytes on the matrix and the mechanical properties of constructs under different culture condition was evaluated. All culture conditions included static culture, rotating type bioreactor and shaking type

bioreactor. Turbulent flow field in shaking type bioreactor due to chondrocytes secreted a lot of NO free radical, and then cell number and matrix content in constructs were the lowest one. On the other hand, lower concentration of NO free radical in static culture and rotating type bioreactor was found, and higher cell numbers and matrix content were determined. Laminar flow field in rotating type bioreactor due to distribution of cells and matrix in scaffolds was homogeneous; cause of the higher mechanical strength was obtained. But cells and matrix appeared around scaffold in static culture, the mechanical strength was the lowest one. NO free radical inhibited growth and function of chondrocytes in scaffold and laminar flow field promoted mechanical strength of constructs were concluded.

Keyword: NO free radical, mechanical property, matrix turnover

## 二、計畫緣由與目的

骨關節炎是老年人口三大疾病之一，在臨床上的表徵為兩關節表面無法自由移動，失去關節的穩定度並產生疼痛，這些現象皆與關節軟骨的磨損有密切關係。為了解決關節軟骨

病變，除了要積極發展受傷軟骨的修自由基復技術之外(例如發展軟骨之細胞載體以做為修復之橋樑)，另一方面也需要有與軟骨組織相關的基礎研究的配合，才能瞭解軟骨病變發生的機制，從而預防或做更有效的治療[1]。

軟骨是由少數軟骨細胞分散於佔決大部份的胞外基質中。其胞外基質是由水、膠原蛋白(collagen)和蛋白聚醣(proteoglycan, PG)等構成[2]。大部份的 collagen 是屬於 type I。自由基(free radical)是指具有不成對電子的原子、原子團、或是分子，如  $O_2^-$ 、OH 等，它們具有很強的氧化性，在人體內會攻擊細胞和組織，而造成病變[3]；一般而言，人體雖會不斷的產生這一類的物質，但人體也會產生酵素 SOD (superoxide dismutase)，它會和自由基反應來維持平衡，以免自由基生成多而使人體受到傷害[4]；但當自由基大量聚集時，人體組織會出現發炎現象，因此而造成嚴重的傷害。

研究指出軟骨病變是由於軟骨成分受到自由基的攻擊產生降解所造成的，特別是膠原蛋白纖維透明質酸和蛋白聚醣[5]；當關節軟骨受到  $H_2O_2$  的攻擊時，蛋白聚醣分子便減低了和透明質酸鍵結的能力，造成了蛋白質和透明質酸分枝鏈的殘缺不堪[6]；透明質酸是關節滑液保持黏稠度的重要物質，所以受傷關節軟骨的關節滑液中，不但黏稠度降低，而且被發現含有降解的透明質酸[7]；膠原蛋白同時也會因為自由基的攻擊而降解。

NO 自由基對關節軟骨的影響比其他自由基重要，因為它不僅是會攻擊胞外基質，也對軟骨細胞的多種生化反應參予調節，但是已有的研究卻未探討它對軟骨機械性質的巨觀影響，故本研究將軟骨細胞支架以靜置培養與動態生物反應器培養後檢測是否會引發軟骨產生誘發性NO酵素而產生NO自由基，並檢測軟骨細胞支架的機械性質與基質變化。

### 三、步驟與方法

#### 1. 軟骨取得及培養:

取健康未離乳小豬(約 3kg 左右)的關節軟骨，除去了非軟骨組織，於無菌操作台內將軟骨切成小碎片，再加入多種酵素將細胞分離出來，將細胞植入載體內，再將載體置於 24well 培養皿中以 DMEM 培養液(含 10%胎牛血清)培養，並置於  $37^\circ C / 0.5\% CO_2$  培養箱中培養。

#### 2. 支架製作:

配製 PLLA:PLGA 重量比 1:6(2.3%) 溶液。將配製好的溶液 12ml 倒入鍍有四氟乙烯的 5 cm 圓形鐵盤中，置於  $4^\circ C$  冰箱預冷 3min，再放入液態氮中急速冷凍 30min 後，進行冷凍乾燥 48 小時。將做好的支架裁成直徑 7.5mm，高 2mm 後，浸潤於 1% 第二型膠原蛋白液中進行改質，再次冷凍乾燥，接著以交聯劑 1% 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimide hydrochloride 溶液進行交聯。

#### 3. 軟骨細胞植入支架與培養

將初代軟骨細胞 (Primary cell) 植入 AP6+CII 支架中，經培養 1 天後，再分別放入三種培養狀態：靜置培養 (C, Control)、旋轉式反應器 (R, Rotator)、迴轉震盪式反應器 (S, Shaker)，並每兩日更換一次新鮮培養液。培養 4 週後取出細胞支架做分析。

#### 4. NO 釋放的定量:

鑑測釋放量利用 Griess 反應定量培養液中  $NO_2^-$  累積量，以 sodium nitrite 做標準曲線。收集每日更換的培養液，500  $\mu l$  的培養液與 500  $\mu l$  的反應液 (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) 溶解於 25%  $H_3PO_4$  在室溫下反應 5 分鐘，以 microplate reader 測波長 550nm 的 O.D. 值[8] (N=3)。

#### 5. 細胞數量測定:

將軟骨細胞載體行凍乾燥 24 小時，再以

木瓜酵素分解液於 60°C 下反應 24 小時,再加入螢光染劑,利用螢光光譜儀測定吸收度(光源 365nm,偵測波長 458nm) (N=3)。

#### 6. 蛋白聚醣測定:

將軟骨細胞載體經冷凍乾燥 24 小時,以木瓜酵素分解所得之樣品液,再加入 1, 9-dimethyl-methylene blue 染劑,測量波長 525nm 的 O.D.值[9] (N=3)。

#### 7. 膠原蛋白測定:

將軟骨細胞支架行冷凍乾燥後,以木瓜酵素分解所得之樣品液,加入等量 6N HCl 110°C 反應 24 小時,再將酸化的樣品抽乾,加入 Isopropanol, Oxidant solution, Ehrlich's reagent solution, 於室溫下反應 17 小時,以 microplate reader 測定 550nm O.D.值(N=3)。

#### 8. 組織學分析

培養四週後,軟骨細胞支架以 10% 福馬林固定,以石蠟包埋切片後,進行蘇木紫-伊紅染色法進行染色 (H-E 染色),以顯微鏡觀察並照相紀錄。

#### 9. 機械性質分析:

分析期間,細胞支架均保存於培養液中。取出支架並將多餘液體擦拭掉,樣品放置於壓縮模具上,以動態機械分析儀分析(DMA)進行分析,分析條件為 strain= 0.2%, 頻率= 1Hz, static force= 0.001N, 溫度為 37 °C。並以小豬原生組織(簡稱 T)與不含細胞之支架為對照組(簡稱 M) (N=2)。

## 四、結果與討論

支架的初始植入之細胞個數為  $65 \pm 3 \times 10^4$  cells。在細胞支架培養四週期間,於不同培養環境下,NO 自由基的濃度高低均是: S>R>C (圖 1)。S 造成的 turbulent flow 使得其中的細胞釋放 NO 自由基濃度值大於 10 $\mu$ M,而且並沒有一個適應的期間,NO 自由基不停的升

高,導致細胞個數與基質的生成不佳。反觀 C 及 R 皆是在 5 $\mu$ M 以下,並且有一定的週期循環。

由表 1 細胞個數及基質含量結果發現是 R>C>S, 其中 S 的細胞數量與基質含量非常低。原因可能為 R 能夠提供有效的養份廢物質傳,並且提供層流(Laminar flow)流體動力幫助細胞生長、分泌基質與維持原型,而 C 的質傳是利用分子擴散,質傳較低,故在細胞數與基質合成比 R 差,反觀 S 中雖然能夠達到有效的質傳,但是流體造成的紊流流場,反而易造成細胞的傷害,使得 S 的 NO 自由基不斷攀升,但是細胞數目與基質亦比 C 及 R 少很多(表 1)。

大量的 NO 自由基會對軟骨細胞的功能造成下列三種影響: 1. 抑制軟骨細胞合成基質(matrix)。2. 造成基質的流失。3. 前列腺素(prostaglandin)的增加。2002 年 R. Lane Smith 等人[10]發現給予軟骨細胞一個過大剪應力,會造成 NO 自由基的增加,進而使 collagen type II mRNA 表型減少, aggrecan mRNA 表型也減少,且不當的剪應力造成軟骨細胞分泌 NO 自由基增加,進而抑制軟骨細胞基質的合成。此與本研究發現不適當流場的物理刺激反而會分泌更多的 NO 自由基,抑制細胞的生長與減少基質的合成相吻合。

在頻率 1 Hz 的彈性模數 (storage modulus) 順序是 T > R > S > C > M, 其中 R、S 與 T 接近, C 與 M 接近(表 2)。因 S 中經由攪拌會讓支架縮小,孔洞本身經由不停的攪拌導致縮在一塊使得密度加強,造成硬度增強。可是 C 與 R 在生化分析中所測得基質的量也很多, C 卻與 M 較相似,因 C 使組織只在支架外圍生成(圖 2-A), 外圍太厚會使得養份廢物透過性不佳,導致內部的 pH 值降低加速了材料的酸水解,因此造成整體機械性質不佳(圖 2-B)。而 R 能夠有效提供養份廢物的質傳與適當的機械應力刺激,幫助細胞在支架中

均勻分布生長，維持細胞形態，大量製造排列規則的基質使強機械性質增強，故整體機械強度大大提升至最接近正常軟骨組織(圖 2-C)。

## 五、結論

迴轉震盪式反應器則因為提供一不當的紊流(turbulent flow)使得細胞產生大量的 NO 自由基，進而減少細胞生長與基質合成。靜置培養的細胞雖然細胞分泌 NO 自由基最低，但質傳效果不佳而只長於支架外圍，最後導致再生組織的機械性質不佳。旋轉式反應器培養系統，不促使細胞產生大量的 NO 自由基，有良好質傳流場使細胞與基質均勻分佈於支架中，而達到功能接近真實組織的再生軟骨。故大量的 NO 自由基會抑制細胞生長與基質合成，而適當的流場能助益支架之機械性質。

## 六、參考文獻

- [1] Osis CV: New perspectives on osteoarthritis. *Am. J. Med.* 1996;100(suppl 2a):10S-15S.
- [2] Maroudas A: In Maroudas A, Kuettner K (ed): *Methods in Cartilage Research*. London, Academic Press, 1990, pp211-220.
- [3] Tang LH, Rosenberg LC, Reihanian H, Jamieson AM, Blackwell J: *Conn. Tiss. Res.* 1989, 19:177-193.
- [4] Freeman B, Crapo JD: *Lab Invest* 1982, 47:412-426.
- [5] Beby C, Goutier R: *Biochem Pharmacol* 1990;39:399-405.
- [6] Burkhardt H, Schwingel M, eninger H, McCartne HW, Tschesche H: *Arth Rheum* 1986;29,3:379-387.
- [7] Roberts CR, Roughley PJ, Mort JS: *Biochem J* 1989;259:805-811.
- [8] Green, L. C., S. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. *Anal. Biochem.* 1982, 126:131.

[9] Enobakhare, Brain O., Dan L. Bader, and David A. *Analytical Biochemistry* 243,189-191 (1996).

[10] Lane Smith L. *Journal of Orthopaedic Research*, 20, 556-561, (2002)

表 1、軟骨細胞支架於靜置培養 (C)、旋轉式反應器 (R)、迴轉震盪式反應器(S)培養至第四週之細胞支架性質。

\* : greater than C (p < 0.05)  
 & : greater than R (p < 0.05)  
 # : greater than S (p < 0.05)

sample	細胞數量 ( $\times 10^4$ )	GAG ( $\mu\text{g}$ )	Collagen ( $\mu\text{g}$ )
C	1357 $\pm$ 64 #	332 $\pm$ 9 #	52 $\pm$ 4 #
R	1473 $\pm$ 48 * #	362 $\pm$ 11 * #	77 $\pm$ 9 * #
S	458 $\pm$ 5	64 $\pm$ 2	17 $\pm$ 11

表 2、軟骨細胞支架於體外培養 28 天之機械性質

sample	Storage Modulus(MPa)
T	0.353 $\pm$ 0.016
C	0.054 $\pm$ 0.002
R	0.238 $\pm$ 0.014
S	0.210 $\pm$ 0.119
M	0.026 $\pm$ 0.108

圖 1、軟骨細胞支架之軟骨細胞的 NO 自由基釋放濃度。

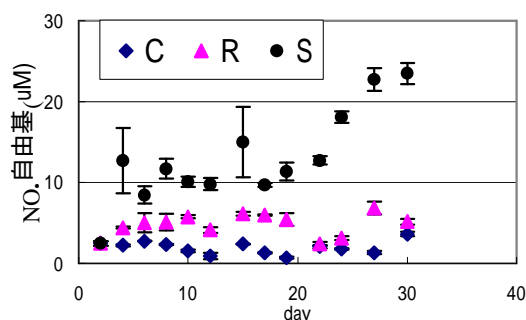


圖 2、培養四週後，軟骨細胞支架以 H-E 染色之組織切片圖。A: 靜置培養，B: 旋轉式反應器，C: 迴轉震盪式反應器。

