

國立臺灣大學工學院暨醫學院醫學工程研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Engineering  
College of Medicine and College of Engineering  
National Taiwan University  
Master Thesis

幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸之溫敏性水膠作為細胞載體

於椎間盤髓核再生之研究

Thermosensitive Chitosan-Gelatin-Glycerol Phosphate  
Hydrogel as Cell Carrier for Nucleus Pulposus  
Regeneration

鄭詠馨

Yung-Hsin Cheng

指導教授：林峯輝 博士

Advisor: Feng-Huei Lin, Ph.D.

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

國立臺灣大學（碩）博士學位論文  
口試委員會審定書

幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸之溫敏性水膠作為細胞  
載體於椎間盤髓核再生之研究

Thermosensitive Chitosan-Gelatin-Glycerol  
Phosphate Hydrogel as Cell Carrier for Nucleus  
Pulposus Regeneration

本論文係鄭詠馨 (r95548002) 在國立臺灣大學醫學工程  
研究所所完成之碩（博）士學位論文，於民國 97 年 07 月 07  
日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明



口試委員：

（簽名）

（指導教授）

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

系主任、所長

（簽名）

## 謝誌

在這兩年的學習中，首要感謝的就是指導教授 — 林峯輝博士給予的指導，讓我從一個生物學的門外漢，踏入醫學工程的浩瀚領域中進而窺得其奧妙，除此之外，待人處世的道理，研究邏輯與方法的訓練與建立，進而培養獨立思考、解決問題的能力，在這樣融洽愉快的研究氛圍的環境中學習成長，讓我獲益良多，此外感謝口試委員 — 張淑真教授、吳信智教授及 Dr. Racool 對論文的悉心指導並提供寶貴的建議，讓論文能更加完整。

從大學到研究所，一路上要感謝的人太多太多，如及時雨般給予我建議及幫助的大學老師 — 胡孝光博士、洪伯達博士；進入研究所後，特別感謝幽默穩重的學長蘇 P、溫柔可人的學姊郁君，多次在生物實驗進行中，學長姐猶如設定好的救援專線幫我排除困難，並耐心且詳細的教導我實驗的技巧；萬事通凱強學長，在報告及實驗上的建議與幫助，在我遭遇任何難題時都能指引我解決的方法；實驗室有情有義且絕頂聰明的學長姐 — 王文熙博士、曾靖嫻博士、周正鴻博士、王子威博士、莊子文博士、小吳、大頭、凱鈞、陳滌，在剛入學時親切的學長姐 — 紀珊、安寶、俊人給予課業及實驗上的幫助及建議，一起同甘共苦的好同學們 — 鬼靈精茉莉、美人兒孟珮、注音王好罷、雜事王小 G、仔仔泰傑是這兩年中不可或缺的精神支持及歡樂的源頭；中肯直爽的小羅、任勞任怨的建元、髮型王毓忠、柏彰、欽暉為這兩年的生活增添許多樂趣；台大醫院骨科 — 元蕙、蔡姐的照顧及工研院陳松青博士在流變儀使用上的協助，真的非常感謝！

最後，感謝我最親愛且最重要的家人，男友青偉走進了我的生命，有你的支持與陪伴讓我的生命更加發光發亮，體貼王老哥的支持與鼓勵，讓我不須為家計擔憂，沒有鄭董及小邱就沒有今天的我，幽默王鄭董總是適時提醒我人生的道理，樂天王小邱每天的愛心關懷，我想我遺傳了你們積極及樂觀的個性，在如此融洽的家庭中幸福的成長，因為你們的全力支持，所以我有更大的勇氣面對更多挑戰，僅以這兩年的成果與你們共享，並期盼自己在未來更可以成為你們的驕傲。

## 中文摘要

椎間盤的退化與椎間盤突出和背痛有強烈的相關，而這些病徵會造成健康照護的支出，部分研究指出椎間盤退化源自於髓核，而近來的臨床的治療方式包括物理治療、藥物治療、椎間盤融合、人工椎間盤置換及椎間盤切除術，然而，這些現行的治療方式是以減輕病人疼痛為主要目的，而非以修復椎間盤為主要目的，而細胞治療即以修復椎間盤為目的，是相當具有潛力的治療方式，因此，本研究的目的即製備一溫度敏感性水膠作為髓核細胞的載體。

在本研究中，利用所製備的幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉溫度敏感性水膠包覆紐西蘭白兔的椎間盤髓核細胞，先以流變儀來評估成膠溫度、成膠時間和成膠強度，和單使用幾丁聚醣/甘油磷酸二鈉相較，幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉於 37°C 的成膠強度有明顯的提升，而隨著明膠濃度的提升，成膠溫度和成膠時間均會隨之下降，在降解測試的評估，提高明膠於水膠中的比例，降解的速度會略微提升，而單使用幾丁聚醣/甘油磷酸二鈉及幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉水膠，均無明顯的細胞毒性，將水膠搭載椎間盤髓核細胞培養三週後，和單層培養之椎間盤髓核細胞相較下，硫酸基之葡萄糖胺聚醣含量對總 DNA 含量的比值有顯著的提升，而 mRNA 基因表現上，*type II Collagen*、*Aggrecan*、*MMP-3*、*MMP-9*、*IGF-1*、*BMP-7* 和 *TGF- $\beta$*  均有顯著的提升。

總結實驗的結果，於本研究中所製備之幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉溶液，在生理的 pH 值下，可在室溫維持液態並在似人體體溫形成膠態，所形成的水膠具有生物相容性及生分解性，並且適合作為椎間盤髓核細胞之載體，因此，此可注射之幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉水膠，在未來在椎間盤的組織工程的應用上是相當具有潛力的。

關鍵字：細胞載體、溫度敏感性水膠、幾丁聚醣、明膠、脊椎椎間盤、髓核

## Abstract

Disc degeneration is strongly associated with back pain and herniation resulting in the cost of health care decreasing. Some evidence shows that disc degeneration originates in the nucleus pulposus (NP). However, current treatments such as physical therapy, pharmaceutical treatment, spinal fusion, artificial disc replacement and discectomy attempt to reduce pain rather than repair the degenerated disc. Cell-based therapies are aimed at repairing the degenerated disc, which is a potential treatment of disc degeneration. Therefore, the purpose of this study was to prepare the thermosensitive hydrogel as cell carrier of NP cells.

In this study, the thermosensitive chitosan/gelatin/ $\beta$ - glycerol phosphate disodium salt hydrogels (C/G/GP hydrogels) was investigated. Nucleus pulposus cells which were harvested from the intervertebral discs of the adult New Zealand white rabbits were encapsulated in C/G/GP hydrogels. The gelation temperature, gelation time and gel strength were evaluated by rheometer. Compared with the formulations using only C/GP, the gel strength of C/G/GP was increased at 37°C. In the C/G/GP system, raising the concentration of gelatin resulted in a decrease in the gelation temperature and gelation time. The results of the in vitro cytotoxicity showed that the C/GP and the C/G/GP hydrogel are biocompatible. In the degradation test, raising the concentration of gelatin seems to increase the percentage of weight loss. The ratio of sulfated glycosaminoglycan (GAG) to DNA of NP cells cultured in hydrogels showed significantly higher than monolayer-cultured at the end of 3-week. Compared with monolayer-cultured, the mRNA expression of *type II Collagen*, *Aggrecan*, *MMP-3*, *MMP-9*, *IGF-1*, *BMP-7* and *TGF- $\beta$*  in hydrogel-cultured NP cells was significantly enhanced.

The results showed that the C/G/GP solution remains liquid at room temperature

but form the hydrogel at approximate body temperature under a neutral pH. The formed hydrogel is biocompatible and biodegradable. As three-dimensional carrier for NP cell culture, these results suggest the C/G/GP hydrogel is a suitable scaffold for the cell culture. These features make the C/G/GP hydrogel potential application as an injectable cell carrier for NP regeneration.

Keyword: cell carrier, thermosensitive hydrogel, chitosan, gelatin, intervertebral disc, nucleus pulposus



# 目錄

口試委員會審定書 .....	I
謝誌 .....	II
中文摘要 .....	III
英文摘要 .....	IV
目錄 .....	VI
圖目錄 .....	VIII
表目錄 .....	X
第一章 緒論 .....	1
1.1 前言 .....	1
1.2 目前治療方法 .....	2
1.2.1 保守治療 .....	2
1.2.2 椎間盤切除術 .....	2
1.2.3 脊椎融合術 .....	2
1.2.4 人工椎間盤的置換 .....	2
1.3 研究目的 .....	4
第二章 理論基礎 .....	5
2.1 椎間盤結構與組成 .....	5
2.1.1 髓核 (nucleus pulposus) .....	7
2.1.2 纖維環 (annulus fibrosus) .....	7
2.1.3 軟骨終板 (cartilage end-plate) .....	8
2.2 椎間盤的代謝 .....	9
2.2.1 分解代謝 .....	9
2.2.2 合成代謝 .....	11
2.3 椎間盤退化成因 .....	13
2.4 體內成膠之方法 .....	15
2.4.1 溶劑交換 .....	15
2.4.2 光聚合 .....	16
2.4.3 離子鍵交聯 .....	16

2.4.4 pH 值效應.....	16
2.4.5 溫度效應 .....	16
2.5 材料選擇.....	18
第三章 材料與方法.....	20
3.1 實驗儀器與藥品.....	20
3.2 實驗流程與方法.....	22
3.3 椎間盤髓核細胞的培養.....	23
3.4 材料製備.....	24
3.5 材料分析.....	26
3.5.1 流變儀分析.....	26
3.5.2 材料降解測試.....	26
3.6 細胞接種.....	27
3.7 細胞於材料中的表現分析.....	28
3.7.1 細胞毒性分析 (Cytotoxicity).....	28
3.7.1.1 乳酸脫氫酶測定(Lactate dehydrogenase Assay) .....	28
3.7.1.2 WST-1 測定(Water Soluble Tetrazolium Salt-1 Assay) .....	29
3.7.2 Total DNA 測定細胞增生.....	31
3.7.3 1,9-Dimethylmethylene Blue (DMMB) 測定具硫酸基之聚葡萄糖胺 (Sulfated Glycosaminoglycans) 含量 .....	32
3.7.4 RNA 的萃取與及時反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR).....	33
3.7.4.1 RNA 的萃取 .....	35
3.7.4.2 及時反轉錄聚合酶鏈鎖反應.....	35
第四章 結果與討論.....	36
4.1 材料分析.....	36
4.1.1 流變分析 .....	36
4.1.2 材料降解分析.....	41
4.2 細胞於材料中的表現分析.....	44
4.2.1 細胞毒性分析.....	44
4.2.2 椎間盤髓核細胞之培養 .....	46
4.2.3 Total DNA 的萃取 .....	49
4.2.5 RNA 的萃取與及時反轉錄聚合酶鏈鎖反應 .....	52
第五章 結論 .....	55
第六章 參考文獻 .....	56



## 圖目錄

圖 2-2-1 椎體與椎間盤的結構位置.....	6
圖 2-4-1 造成椎間盤退化的因子及流程.....	14
圖 2-6-1 幾丁聚醣之化學結構.....	18
圖 2-6-3 甘油磷酸二鈉之化學結構.....	19
圖 3-2-1 實驗流程圖.....	22
圖 3-4-1 高分子溶液製備方式.....	24
圖 3-4-2 高分子溶液成膠前及成膠後之情形.....	25
圖 3-7-1 LDH 反應示意圖.....	28
圖 3-7-2 WST-1 作用機制.....	29
圖 3-7-3 DMMB 化學結構式.....	32
圖 4-1-1 成膠溫度測試結果.....	38
圖 4-1-2 成膠溫度隨溶液中之明膠濃度變化之情形.....	39
圖 4-1-5 於 37°C 下彈性模數(elastic modulus)隨時間變化之情形.....	40
圖 4-1-6 幾丁聚醣溶液與明膠/幾丁聚醣混合液之全波長圖譜.....	42
圖 4-1-7 明膠釋放之標準曲線.....	42
圖 4-1-8 水膠之降解結果.....	43
圖 4-2-1 細胞毒性測試結果.....	45
圖 4-2-2 椎間盤髓核細胞培養至第九繼代之細胞形態.....	47
圖 4-2-3 失去分化能力之第三繼代椎間盤髓核細胞.....	47
圖 4-2-4 單層、C25 和 C25G1 培養之總 DNA 含量.....	49

圖 4-2-5 硫酸基之聚葡萄糖胺之標準線 .....	50
圖 4-2-6 單層、C25 和 C25G1 培養之具硫酸基之聚葡萄糖胺含量.....	51
圖 4-2-7 單層、C25 和 C25G1 培養之具硫酸基之聚葡萄糖胺與總 DNA 含量比值 .....	51
圖 4-2-8 細胞外基質基因之表現結果.....	53
圖 4-2-9 分解代謝基因之表現結果.....	54
圖 4-2-10 合成代謝基因之表現結果.....	54



## 表目錄

表 2-2-1 椎間盤細胞外基質的組成.....	6
表 2-3-1 主要的 MMPs 類型及主要降解的基質.....	10
表 2-3-2 生長因子於體外( <i>in-vitro</i> )對椎間盤細胞的影響.....	11
表 2-4-1 髓核、纖維環及軟骨終板隨著年齡增長於型態、組成上的改變.....	13
表 3-4-1 本研究中實驗組別之成份對照.....	24
表 3-7-1 DMMB buffer 配法.....	32
表 3-7-2 PCR 所使用的引子.....	34



# 第一章 緒論

## 1.1 前言

人體的脊椎 (spine) 具有二十四塊椎骨 (vertebrae) 和二十三個椎間盤 (intervertebral disc)，位在椎骨前方的部份稱為椎體 (vertebral body)，而椎間盤即是連接脊椎椎體間的結締組織，其富含水、蛋白聚醣 (proteoglycans)、膠原蛋白 (collagen) 和少量的細胞，在脊椎受到外力時能提供一個緩衝的效果，然而隨著年齡的增加或其他外來的因素，造成椎間盤退化或加速椎間盤退化，使得脊椎在受外力時，椎間盤無法提供如同未退化時的正常緩衝作用，倘若退化持續加劇，而外力持續的施加，甚至可能導致脊椎的各種病變，進而壓迫神經，除了造成背痛的病徵外，甚至可能會引起其他器官的發炎或疼痛[1]，隨著年齡的增長，椎間盤的形態及成分也會逐漸改變，使椎間盤逐漸退化，且由於椎間盤缺乏血管，再加上椎間盤內的細胞數量有限，因此一但受傷後自我修復困難。

目前在臨床上可用椎間盤 X 光攝影術或核磁共振掃描 (MRI) 來檢驗椎間盤退化性疾病，而在治療椎間盤退化上，以保守治療為優先，如：藥物治療、物理治療、背架等等，若保守治療無效，且病人疼痛的情形持續加劇時，才會考慮採取手術治療[2]。

## 1.2 目前治療方法

背痛被認為是椎間盤退化所引起的主要臨床症狀，在保守治療持續無效且疼痛症狀仍無法紓解甚至惡化時，必要時將會採取手術治療，而根據椎間盤退化的程度不同所引起的病徵，目前以手術治療的主要方法有：椎間盤切除術 (discectomy)、脊椎融合術 (spinal fusion)、椎間盤的置換 (disc replacement)，以下簡單介紹這幾種治療方式[2]。

### 1.2.1 保守治療

目前治療因椎間盤退化所引起的臨床上的病徵，保守治療是一般在臨床上優先採用的治療方式，如：物理治療、背架、止痛或抗發炎藥物、注射藥物至硬脊膜外腔、適當的運動等等，其主要目的是以減輕病人的疼痛與不適，如保守治療六個月以上仍無效果，且病人的不適持續加劇，在仔細評估了解病人狀況後，才會考慮採取手術治療[2]。

### 1.2.2 椎間盤切除術

椎間盤切除術屬於微創型手術，在內視鏡下切除突出的椎間盤，而不影響髓核 (nucleus pulposus, NP) 的原有的高度及功能，在切除後，可減輕對神經的壓迫，進而減緩疼痛等病徵，在臨床上有確實的療效[2]。

### 1.2.3 脊椎融合術

脊椎融合術是以開刀的方式，將椎籠 (cage) 植入退化的椎間盤中，來支撐椎間盤原來的高度，希望造成椎體間的融合，並保有原來椎間盤的高度，但由於脊椎融合術是將上下兩椎體融合，所以導致術後該節脊椎的活動度受到影響[2]，除此之外，在日後活動時，受治療部位的椎間盤所承受的外力，可能須由鄰近的椎間盤來分擔，因此很可能又加速鄰近椎間盤的退化[3]。

### 1.2.4 人工椎間盤的置換

將退化的椎間盤位置以人工椎間盤取代，除了可維持原椎間盤的高度，且因

為人工椎間盤具有一定的活動度，因此術後對病人在日常生活的活動上較經由融合手術的限制小，目前已有多種不同的人工椎間盤通過核可並運用於人體中，但人工椎間盤植入體內的使用時間可能長達數十年，因此對於人體的長期效應，仍需進一步的評估[2]。



### 1.3 研究目的

如 1.2 節所述，這些現行的治療方式是以減輕病人疼痛為主要目的，或直到病徵持續惡化後，再將整個椎間盤移除或替換上人工椎間盤，而非以修復椎間盤為主要目的。

因此，本研究的目的即期望能修復退化的椎間盤，先以天然的材料製備出於生理 pH 值下，在室溫為液態而於人體體溫時為膠態的溫度敏感性水膠，並於體外將水膠和椎間盤髓核細胞混合後，在體外模擬、評估椎間盤髓核細胞於水膠中的生長表現。期望未來能利用注射的方式，將材料與椎間盤髓核細胞混合後注入退化的椎間盤中，充足的細胞能分泌足夠的細胞外基質，而此天然的材料也會逐漸在體內分解被人體吸收，且逐漸被椎間盤髓核細胞所分泌的細胞外基質所取代，進而修復退化的椎間盤，使椎間盤髓核能恢復原來的功能。



## 第二章 理論基礎

### 2.1 椎間盤結構與組成

椎間盤主要由髓核 (nucleus pulposus)、纖維環 (annulus fibrosus)、軟骨終板 (cartilage end-plate) 所構成，纖維環位於椎間盤的外圍並將髓核包附在內，軟骨終板則位於纖維環和髓核的上方與下方，分別連接上下兩個椎體，如圖 2-2-1，由於椎間盤內缺乏血管、神經的分佈，因此處於椎間盤內部細胞所需的養分，需透過擴散作用的方式送入，而細胞所產生的代謝物也需利用擴散作用的方式送出 [5,6]。

椎間盤具有相對少量的細胞及大量的細胞外基質，椎間盤內的細胞量約只佔組織總體積的 1-5% [7]，細胞外基質的成份主要包含了蛋白聚醣、膠原蛋白和大量的水，膠原蛋白和蛋白聚醣的詳細成分見表 2-2-1，於椎間盤中的蛋白聚醣以 Aggrecan 為主，其 GAG (glycosaminoglycan) 為 C<sub>6</sub>S (chondroitin-6-sulfate) 和 KS (keratin sulfate)，Aggrecan 利用連接蛋白 (link protein) 和透明質酸 (hyaluronan) 連接，而於椎間盤中的膠原蛋白類型有許多種，其中以第一型膠原蛋白 (type I collagen) 和第二型膠原蛋白 (type II collagen) 為最大宗，約佔整體椎間盤膠原蛋白含量的 80%，其他類型的膠原蛋白則相對佔較少量，而由於組織中含有大量的蛋白聚醣，而蛋白聚醣具有負電性，進而造成滲透壓，使大量的水可以進入細胞外基質中，因此當組織受到外來的壓力 (compressive strength) 時，可以將水分擠出，而當壓力放鬆時，細胞外基質又再度吸入大量水分，如此反覆循環，因此蛋白聚醣存在於組織中，可以抵抗外來的壓力，而細胞外基質中的膠原蛋白，其特殊的三股螺旋結構，可以抵抗因彎曲或扭轉所產生的張力 (tensile strength) [6]。



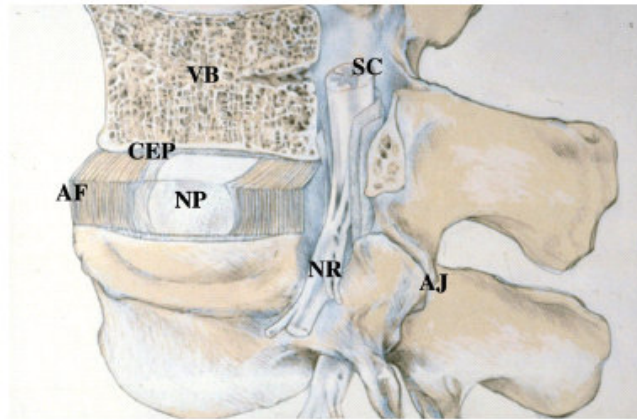


圖 2-2-1 椎體與椎間盤的結構位置[5]。椎體(vertebral body, VB)；髓核(nucleus pulposus, NP)；纖維環(annulus fibrosus, AF)；軟骨終板(cartilaginous end-plate, CEP)；脊髓神經(spinal cord, SC)；神經根(nerve root, NR)；骨凸關節(apophyseal joints, AJ)。

表 2-2-1 椎間盤細胞外基質的組成[8]。

Disc-matrix proteins	Proteoglycans	Collagen	Disc proteinases
Fibronectin	Aggrecan (most abundant)	Fibril-forming collagens	Metalloproteinases (MMPs)
Elastin	Versican	I 0-80%	Collagenases (MMPs 1, 8, and 13)
CILP	Decorin	II 0-80%	Gelatinases (MMP 2 and 9)
Asporin	Biglycan	III <5%	Stromelysin (MMP 3)
	Fibromodulin	V 1-2%	ADAMS
	Lumican	XI 1-2%	
	Perlecan	Short helix collagens	
		VI 5-20%	
		IX 1-2%	
		XII <1%	

ADAMS : A disintegrin and metalloproteinases

胚胎發育的過程中，脊柱 (spinal column) 是由脊索 (notochord) 和間葉組織 (mesenchyme) 發育而來，髓核即源自於脊索，而纖維環則源自於間葉組織，在胚胎時期，髓核和纖維環的組成有明顯的不同，位於髓核中的細胞主要是脊索細胞 (notochord cell)，且具有較多的蛋白聚醣，而纖維環中的細胞則是以類纖維母細胞 (fibroblast-like cell) 為主，且具有較多的膠原蛋白，然而於成長的過程中，髓核中的脊索細胞逐漸減少至消失，且被類軟骨細胞 (chondrocyte-like cell) 取代，而隨著年齡的增長，髓核、纖維環、軟骨終板的形態與組成也有明顯不同[9]。

### 2.1.1 髓核

髓核的外觀為果凍狀 (gelatinous)，髓核中的細胞為類軟骨細胞 (chondrocyte-like cell)，細胞被包覆於細胞外基質中，位於髓核中的細胞密度相當低，由於髓核具有較多的蛋白聚醣，主要是 Aggrecan，因此含有較多的水分，髓核中是以第二型膠原蛋白 (type II collagen) 為主，約佔了總膠原蛋白的 80% [6]，膠原蛋白即交錯在含高度水分的 Aggrecan 水膠中，而於髓核中膠原纖維的排列方式是隨機 (random) 的，除了第二型膠原蛋白外，還有少量的第六型 (15-20%)、第九型 (1-2%)、第十一型 (3%) 膠原蛋白 [9]。

### 2.1.2 纖維環

纖維環的外觀是由數十個同心圓或同心薄層 (concentric lamella) 所構成，於纖維環中的細胞為類纖維母細胞 (fibroblast-like cell)，而越外圈的細胞，其細胞形態越細長，越往髓核靠近則細胞形態則會逐漸趨向橢圓形，彈性纖維 (elastin fiber) 以放射狀的形態將相鄰的兩個薄層或同心圓相連接，纖維環中主要是以第一型的膠原蛋白 (type I collagen) 為主，相鄰的膠原纖維是平行排列且和椎體軸心成六十度的夾角 [9]，如此特殊的排列方式，可完善的抵抗來自彎曲或扭轉所造成的張力，除了第一型和第二型膠原蛋白外，還有少量的第三型、第五型 (3%)、第六型 (10%) 及第九型 (1-2%) 膠原蛋白 [7]。

### 2.1.3 軟骨終板(Cartilage end-plate)

軟骨終板為透明軟骨 (hyaline cartilage)，其位在椎間盤和椎體之間，含水量較其他透明軟骨，如：髖關節軟骨、膝關節軟骨來得低，而由於椎間盤缺乏血管，因此椎間盤內部細胞所需養分的來源，需藉由周圍有血液供應的組織，如：韌帶 (ligment) 或椎體，將養份利用擴散的方式送入椎間盤內部，軟骨終板即扮演一個如同具有選擇性的屏障，一些小的或未帶電的溶質，如：水、氧氣、胺基酸、葡萄糖等等，可以利用擴散方式進入椎間盤內部，而由細胞代謝所產生的廢物，如：乳酸等等，也可以相同的方式透過軟骨終板送出[10]。



## 2.2 椎間盤的代謝

### 2.2.1 分解代謝

細胞除了會合成膠原蛋白、蛋白聚醣等等的細胞外基質外，也會生成一些蛋白酶 (protease) 來分解細胞外基質，除此之外也有一些蛋白酶的抑制劑 (inhibitor) 來抑制蛋白酶的作用，在正常組織中，細胞外基質的生成和分解的速率達動態平衡，然而，若細胞外基質的分解速率大於合成速率，即會造成組織中的細胞外基質減少，使其無法發揮正常功能[11]，在椎間盤中，主要降解膠原蛋白和蛋白聚醣的酵素為 MMP (matrix metalloproteinase) 家族和 Aggrecanases 這兩類，其中 MMP 家族於退化的椎間盤中的活性較 Aggrecanases 大，而 TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinase) 家族則可抑制、調控 MMP 的表現，常見的 MMP 家族成員見表 2-3-1[12]。

MMP 家族中，對於椎間盤細胞外基質降解扮演較重要角色的有 collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13)、stromelysins (MMP-3)、gelatinases (MMP-2, MMP-9)，collagenase 主要降解第一型、第二型、第三型膠原蛋白，也會降解蛋白聚醣；stromelysins 中的 MMP-3 可降解第三型、第四型、第五型、第九型膠原蛋白，也可切斷第二型膠原蛋白的非螺旋區 (telopeptide domain)，另外 MMP-3 也藉由切割核心球蛋白 (core protein) 來降解蛋白聚醣，包括 fibronectin、laminin 等等；gelatinases 可降解第四型、第五型、第七型、第十型、第十一型膠原蛋白 [12]。

欲抑制 MMP 家族對組織的作用，可以透過抑制 MMP 的合成和抑制 MMP 的活性，在組織中抑制 MMP 活性的酵素即是 TIMP 家族 (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4)，TIMP-1 和 TIMP-2 可利用非共價鍵的方式和 MMP 以化學劑量 1:1 的比例形成一可逆的鍵結，且 TIMP-1 對 MMP-1 和 MMP-3 活性的抑制更是顯著[7]，而 TIMP-3 除了可以抑制 MMP 外，也被指出可有效的抑制 aggrecanase-1[13]，TIMP-4 則對 MMP-2 有顯著的抑制作用[14]。

表 2-3-1 主要的 MMPs 類型及主要降解的基質[15]。

Matrix metalloproteinases (MMPs) and their substrates				
MMP	Enzyme	$M_r$ latent	$M_r$ active	Known substrates
MMP-1	Interstitial collagenase (collagenase-1)	55,000	45,000	Collagens I, II, VII, VIII and X, gelatin, aggrecan, versican, proteoglycan link protein, casein, $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, $\alpha_2$ -M, pregnancy zone protein, ovostatin, nidogen, MBP, proTNF, L-selectin, proMMP-2, proMMP-9
MMP-2	Gelatinase A	72,000	66,000	Collagens I, IV, V, VII, X, XI and XIV, gelatin, elastin, fibronectin, aggrecan, versican, proteoglycan link protein, MBP, proTNF, $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, proMMP-9, proMMP-13
MMP-3	Stromelysin-1	57,000	45,000	Collagens II, IV, IX and X, gelatin, aggrecan, versican, perlecan, nidogen, proteoglycan link protein, fibronectin, laminin, elastin, casein, fibrinogen, antithrombin-III, $\alpha_2$ M, ovostatin, $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, MBP, proTNF, proMMP-1, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9, proMMP-13
MMP-7	Matrilysin-1 (PUMP-1)	28,000	19,000	Collagens IV and X, gelatin, aggrecan, proteoglycan link protein, fibronectin, laminin, entactin, elastin, casein, transferrin, MBP, $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, proTNF, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-9
MMP-8	Neutrophil collagenase (collagenase-2)	75,000	58,000	Collagens I, II, V, VII, VIII and X, gelatin, aggrecan, $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, $\alpha_2$ -antiplasmin, fibronectin
MMP-9	Gelatinase B	92,000	86,000	Collagens IV, V, VII, X and XIV, gelatin, elastin, aggrecan, versican, proteoglycan link protein, fibronectin, nidogen, $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, MBP, proTNF
MMP-10	Stromelysin-2	57,000	44,000	Collagens II, IV and V, gelatin, casein, aggrecan, elastin, proteoglycan link protein, fibronectin, proMMP-1, proMMP-8
MMP-11	Stromelysin-3	51,000	44,000	$\alpha_1$ -proteinase inhibitor
MMP-12	Macrophage metalloelastase	54,000	45,000/ 22,000	Collagen IV, gelatin, elastin, $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, fibronectin, vitronectin, laminin, proTNF, MBP
MMP-13	Collagenase-3	60,000	48,000	Collagens I, II, III and IV, gelatin, plasminogen activator inhibitor 2, aggrecan, perlecan, tenascin
MMP-14	MT1-MMP	66,000	56,000	Collagens I, II and III, gelatin, casein, elastin, fibronectin, laminin B chain, vitronectin, aggrecan, dermatan sulfate proteoglycan, MMP-2, MMP-13, proTNF
MMP-15	MT2-MMP	72,000	60,000	proMMP-2, gelatin, fibronectin, tenascin, nidogen, laminin
MMP-16	MT3-MMP	64,000	52,000	proMMP-2
MMP-17	MT4-MMP	57,000	53,000	
MMP-18	Xenopus collagenase	55,000	42,000	
MMP-19		54,000	45,000	Collagen IV, gelatin, laminin, nidogen, tenascin, fibronectin, aggrecan, COMP
MMP-20	Enamelysin	54,000	22,000	Amelogenin
MMP-21	XMMP (xenopus)	70,000	53,000	
MMP-22 (MMP-27)	CMMP (chicken)	52,000	43,000	Gelatin, casein
MMP-23	CA-MMP	?	?	
MMP-24	MT5-MMP	63,000	45,000	proMMP-2, proMMP-9, gelatin
MMP-25	MT6-MMP, leukolysin		56,000	Collagen IV, gelatin, fibronectin, fibrin
MMP-26	Matrilysin-2, endometase	28,000		Collagen IV, fibronectin, fibrinogen, gelatin, $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, proMMP-9
MMP-28	Epilysin	59,000 (55,000)		Casein

$\alpha_2$ -M,  $\alpha_2$ -macroglobulin; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; MBP, myelin basic protein;  $M_r$ , relative molecular mass; TNF, tumour necrosis factor.

## 2.2.2 合成代謝

生長因子 (growth factor) 能透過 endocrine、paracrine、autocrine 的方式來傳遞，且能調控細胞的增生 (proliferation)、分化 (differentiation)、遷移 (migration) 及凋亡 (apoptosis)，此外，生長因子也能影響細胞外基質的合成，在過去的文獻中指出椎間盤細胞具有表現及生成 IGF (Insulin-like growth factor)、bFGF (Basic fibroblast growth factor)、PDGF (Platelet-derived growth factor)、BMP (Bone morphogenetic protein) family、TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) 這幾種生長因子[16]，Tompson 等人[17]於 1991 年率先研究生長因子對椎間盤的影響，而後有眾多以不同生長因子對椎間盤影響的相關研究陸續被發表，而在過去的文獻中，有較多的研究指出 TGF- $\beta$ 、IGF、BMP 對椎間盤細胞有顯著的影響，見表 2-3-2。

表 2-3-2 生長因子於體外 (in-vitro) 對椎間盤細胞的影響[18]。

Factor	Cell type	Effect
<b>Animal cells</b>		
TGF- $\beta$	Canine NP, AF, TZ	PG synthesis $\uparrow$ (NP, AF, TZ) cell proliferation (NP, TZ) $\uparrow$
PDGF	Canine NP, AF, TZ	No effect
IGF-1	Canine NP, AF, TZ	PG synthesis $\uparrow$ (NP) cell proliferation (NP) $\uparrow$
EGF	Canine NP, AF, TZ	PG synthesis $\uparrow$ (NP, AF, TZ) cell proliferation (NP, AF, TZ) $\uparrow$
FGF	Canine NP, AF, TZ	PG synthesis $\uparrow$ (NP, AF, TZ) cell proliferation (NP, AF, TZ) $\uparrow$
IGF-1	Bovine NP	PG synthesis $\uparrow$ (NP, AF, TZ) cell proliferation (NP, TZ) $\uparrow$
TGF- $\beta$ 1	Bovine NP, AF	PG accumulation $\uparrow$
IGF-1	Bovine NP, AF	PG accumulation $\uparrow$
OP-1	Rabbit NP, AF	PG synthesis $\uparrow$ (NP, AF) cell proliferation (NP, AF) $\uparrow$
OP-1	Rabbit NP, AF	Collagen synthesis $\uparrow$ (NP, AF), collagen II, aggrecan mRNA $\uparrow$
OP-1	Rabbit NP, AF	After IL-1 treatment, PG accumulation $\uparrow$ (NP, AF)
OP-1	Bovine NP, AF	After C-ABC treatment, PG accumulation $\uparrow$ (NP, AF)
OP-1	Rabbit IVD	PG synthesis $\uparrow$ (NP, AF) PG accumulation (NP, AF) $\uparrow$
TGF- $\beta$ 1	Rat IVD	PG content $\uparrow$
BMP-2	Rat AF+TZ	Cell viability $\uparrow$
BMP-2	Rabbit AF	GAG, collagen release in media $\uparrow$
BMP-2	Rabbit AF	GAG, collagen release in media $\uparrow$ BMP-6, 7, TGF- $\beta$ 1 mRNA $\uparrow$
<b>Human Tissue and Cell</b>		
BMP-2	Human IVD (NP+TZ)	PG synthesis $\uparrow$ cell proliferation (NP, TZ) $\uparrow$ Type I, II, collagen, aggrecan mRNA $\uparrow$
IGF-1	Human IVD (mix)	Apoptosis $\downarrow$
PDGF	Human IVD (mix)	Apoptosis $\downarrow$
TGF- $\beta$ 1	Human IVD (mix)	Cell proliferation $\uparrow$
TGF- $\beta$ 1	Human IVD (mix)	PG synthesis $\uparrow$ cell proliferation $\uparrow$
OP-1	Human NP, AF	PG synthesis $\uparrow$ (NP, AF) PG accumulation (NP, AF) $\uparrow$
BMP-2	Human Degenerative IVD	PG synthesis $\uparrow$ collagen synthesis $\uparrow$
BMP-12	Human NP	PG synthesis $\uparrow$ collagen synthesis $\uparrow$

IGF 存在於許多組織中，其中較重要的是 IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) 和 IGF-2 (Insulin-like growth factor-2)，IGF-1 被指出可以刺激椎間盤細胞的增生與細胞外基質的合成[19]，IGF-1 其結構和胰島素 (insulin) 極為相似，其由 70 個胺基酸 (amino acid) 所組成的單鏈聚肽 (polypeptide)，分子量為 70kDa，Tompson 等人[17]指出 IGF-1 對椎間盤髓核細胞的影響較對纖維環細胞的影響顯

著，Osada 等人[20]將椎間盤髓核細胞於單層 (monolayer) 培養下，證實 IGF-1 有助於蛋白聚醣的合成，而隨著年齡的增加，IGF-1 的表現會隨之下降。

TGF- $\beta$  是由 112 個胺基酸所構成的聚胜肽鏈，其分子量為 25kDa，TGF- $\beta$  可再分為 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3，TGF- $\beta$  可調控細胞的生長及細胞外基質的合成，且和醣蛋白中的 decorin 有高度的結合性[16]，Tompson 等人[17]證實 TGF- $\beta$  能促進椎間盤髓核細胞合成蛋白聚醣及細胞的增生，且 TGF- $\beta$  對椎間盤髓核細胞的影響較對纖維環細胞影響顯著，Okuda 等人[21]也指出 TGF- $\beta$  的存在能促進蛋白聚醣的合成，而 TGF- $\beta$  在椎間盤的表現會隨著年齡增長而下降。

BMP 為 TGF- $\beta$  superfamily 中的一群，BMP 家族目前已有超過 47 個成員被證實[16]，BMP-7 或 recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1)，在軟骨的分化和代謝中扮演重要的角色，BMP-7 (OP-1) 可以刺激細胞合成代謝，促進蛋白聚醣和第一型、第二型、第十型的膠原蛋白合成[22,23]，BMP 家族中，以 BMP-7 (OP-1) 對椎間盤細胞影響較顯著，Masuda 等人[24]將椎間盤髓核細胞與纖維環細胞以 BMP-7 (OP-1) 刺激後，證實 BMP-7 (OP-1) 可促使細胞增生，並可提高蛋白聚醣、膠原蛋白的合成量，且和 Aggrecan 及 Type II collagen 這兩個基因的表現有高度的相關，而 BMP-7 (OP-1) 已被證實在人類及兔子的椎間盤細胞中，可同時提高椎間盤髓核細胞與纖維環細胞的數目，並促進蛋白聚醣的合成，因此或許可以同時修復椎間盤髓核及纖維環[16]。

## 2.3 椎間盤退化成因

隨著年齡的增加，器官、組織的老化及退化，椎間盤的組成成分及形態也逐漸改變，表 2-4-1，而造成椎間盤退化的成因，除了老化以外，其他的外來因素，如：長時間的勞動使椎間盤過度負荷、受傷、吸煙、肥胖等等，在過去研究中也指出會導致椎間盤的退化[25]。

表 2-4-1 髓核、纖維環及軟骨終板隨著年齡增長於型態、組成上的改變[26]。

Stage/ Predominant Age Group	Nucleus Pulposus	Anulus Fibrosus	Endplate
0/fetal/infantile	Fine collagenous network with gel-like nucleus usually not visible	Well-organized collagenous fiber structure with elongated fibrocytes	Well-structured hyaline cartilage-like organization with elongated cells
I/juvenile	Slight disorganization of the matrix, cell proliferation, chondrons	Minor irregularity of annular fibers with clumping of chondrocytes	Decreased cellularity with clumping of the chondrocytes, endplate irregularities
II/adolescent	Formation of clefts with adjacent clusters of chondrocytes, granular changes	Slight fraying and splitting of annular fibers with Alcian-PAS positive cells	Endplate irregularities, disorganized matrix and thinning of the endplate
III/young adults	Significant cleft formation with adjacent chondrocyte cloning and matrix debris (granular changes)	Concentric and radial tears in the annular fiber structure with mucoid degeneration	Minor focal endplate cracks or microfractures without neovascularity
IV/adult	Large clones of chondrocytes and extensive mucoid degeneration	Disorganized fiber structure with extensive mucoid degeneration	Extensive endplate fractures with neovascularity
V/elderly discs	Complete disorganization of the tissue with clefts extending throughout the nucleus	Complete disorganization of the tissue with clefts extending throughout the annulus	Complete disorganization with endplate defects and new bone formation
VI/senile discs	Disorganized connective tissue (scar formation) or tissue defect	Disorganized connective tissue (scar formation) or tissue defect	Endplate resorption with or without sclerosis of the adjacent bone.

如 2.2 節所述，由於椎間盤缺乏血管的結構，因此椎間盤內部的細胞，需仰賴擴散的方式來獲取養分或排除代謝物，而軟骨終板在此過程中扮演一個選擇性屏障的角色，當軟骨終板產生鈣化 (calcification) 使養份的供應及代謝物進出受到限制，不足的養分、低的氧氣量、乳酸等等的代謝物堆積，使環境中的 pH 值下降，影響細胞的生存，進而造成細胞外基質的生成量下降，改變細胞外基質的組成，椎間盤開始退化，使組織逐漸失去正常的功能[10]。



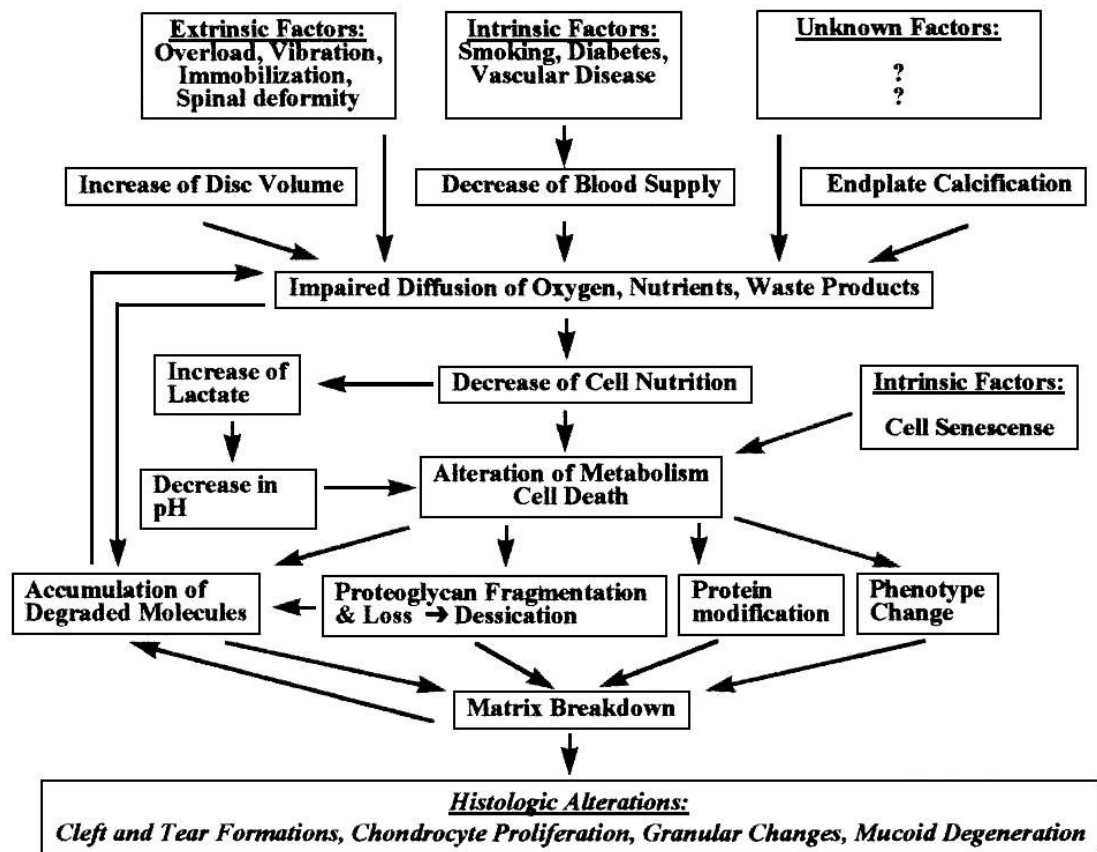


圖 2-4-1 造成椎間盤退化的因子及流程[26]。

和正常的椎間盤相較，在退化的椎間盤中其分解代謝因子包括 MMP 及 Aggrecanases 的表現會增加，且於退化的椎間盤中其 TIMP 和 MMP 間的不平衡，再加上促進細胞增生及基質合成代謝的因子包括 TGF- $\beta$ 、IGF、BMP 等等的表現會下降，因此造成細胞外基質的降解[27]。

## 2.4 體內成膠之方法

凝膠 (gel) 為一個三維的網狀結構，其可吸收大量的溶劑，而由其鍵結的方式可分為化學凝膠及物理凝膠，化學凝膠的分子間藉由共價鍵的結合，而物理凝膠其分子間藉由二級鍵 (secondary bond) [28]，由於水膠和細胞外基質的結構類似，因此具有良好的質傳特性，養分及代謝物可以利用擴散的方式進入到水膠內部，且細胞間相互調控的生長因子等等，也可以在水膠間有良好的傳遞，在過去文獻中，已有相當多的研究將天然或合成的材料製備成水膠，合成材料包括聚氧化乙烯 (poly ethylene oxide, PEO)、聚乙烯醇 (poly vinyl alcohol, PVA)、聚丙烯酸 (poly acrylic acid, PPA) 等等，而天然的材料有海藻酸鈉 (alginate)、幾丁聚醣 (chitosan)、膠原蛋白 (collagen)、明膠 (gelatin)、透明質酸 (hyaluronan) 等等，而由於許多天然材料即為組織中的細胞外基質的成份，如：膠原蛋白、透明質酸等等，或類似於細胞外基質之成份，如：幾丁聚醣、海藻酸鈉為線型的多醣類結構，因此在應用上更受矚目[29]。

以體內成膠型之水膠作為組織工程的支架材料，在搭載治療試劑或細胞時，只需藉由簡單的混合，且注射後可以符合欲治療部位的體積及形狀，不需預先於體外裁切成一定的大小，或於治療過程中再度修剪支架體積的大小，且以利用注射的方式，傷口也較手術治療來的小，因此術後的復原情形也較佳。

### 2.4.1 溶劑交換

利用溶劑交換法於體內形成水膠，是選用不溶於水而溶於特定溶劑的高分子作為載體，在體外先將高分子溶解並和欲被搭載試劑混合後，再利用注射的方式注入欲植入部位，當高分子溶液接觸到體液之後，由於高分子不溶於體液，而溶劑則會從高分子溶液往體液擴散，造成高分子的析出進而形成水膠。但由於用來溶解不溶於水的高分子，通常會選用一些有機溶劑，因此注入體內後所使用的溶劑的短時間的大量釋出，可能會造成局部或全身性的免疫反應[28][30]。

## 2.4.2 光聚合

光聚合法是先將高分子溶液注入到欲植入部位，隨後透過特定光源的照射，使高分子溶液於該位置成膠。然而，利用光聚合的方式於體內形成水膠，須於高分子溶液中添加光聚合的起始劑，而多半這些起始劑對人體是具有毒性的，並且由於在特定光源的照射下會伴隨熱能的產生，所產生的熱能可能會對植入部位的周遭組織產生傷害，此外光聚合於體內成膠的方式，在未來應用到人體各部位時，由於光源的穿透的限制，因此較深的植入位置也較不適用[30]。

## 2.4.3 離子鍵交聯

離子鍵交聯是利用分子間電荷引力，於體內形成水膠，可利用其負電性和帶有正電荷的原子形成鍵結，如海藻酸鈉可和氯化鈣中的鈣離子正電形成可逆的離子鍵結，因此將海藻酸鈉作為可注射型的生醫材料時，可分兩劑注入欲治療部位，使其在欲治療部位成膠[28][30]。

## 2.4.4 pH 值效應

利用 pH 值效應於體內成膠法，即因高分子具有特定的 pKa 或等電點 (isoelectric point, PI)，如高分子的 pKa 若小於生理的 pH 時，則可將高分子先溶在特定溶劑中，再於添加之治療試劑混合後，將其注入到欲治療部位，當環境的 pH 值高於高分子的 pKa 時，則高分子析出於該位置成膠，但由於欲先配備好的高分子溶液其 pH 值與生理環境不同，因此可能引起局部組織的免疫反應，對欲治療部位之周遭組織造成傷害[28][30]。

## 2.4.5 溫度效應

利用溫度效應於體內成膠，乃藉由分子間的物理鍵的形成，於溫度提升的同時，高分子溶液產生相的轉移[28]，而於欲治療部位成膠，A.Chenite[31]於 2000 年開發出以幾丁聚醣為基材的溫敏型水膠，其溶液可於人體生理的 pH 下，在室溫呈液態，而在人體體溫下形成水膠，而相較於其他成膠機制，以此法使溶膠於

體內形成凝膠具有操作上較便利且對週遭組織的傷害相對較小，然而，雖然至今尚未確切證明涉及其中成膠作用機制，A.Chenite 將可能參與其中的作用機制歸納為以下三點：(1) 幾丁聚醣分子鏈間的疏水作用 (hydrophobic interaction)；(2) 幾丁聚醣與甘油磷酸二鈉鹽 (glycerol phosphate disodium salt)間的引力；(3) 幾丁聚醣間氫鍵的形成[31]。



## 2.5 材料選擇

材料的選擇上，需選擇具有生物相容性且具有生分解性的材料，分解後的產物為無毒且不會對人體造成損害，因此使用天然的高分子為基材即為首選，因此在本研究中，即以天然高分子幾丁聚醣 (chitosan) 和明膠 (gelatin) 作為基材。

幾丁質 (chitin) 是由 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetyl-D-glucosamin) 的重複單元以  $\beta$ -1,4 鍵結而成的天然化合物，其主要存在於甲殼類動物如：蝦、蟹的外殼，或存在於真菌類的細胞壁中，而幾丁聚醣即是由幾丁質經過去乙醯化 (deacetylation) 後而得的天然高分子，根據不同的來源及製備過程，其去乙醯化程度和分子量也會有所不同，幾丁聚醣是由 N-乙醯葡萄糖胺及葡萄糖胺 (glucosamine) 的重複單元以  $\beta$ -1,4 鍵結而成，如圖 2-6-1，去乙醯化程度 (degree of deacetylation, DD) 即為葡萄糖胺對 N-乙醯葡萄糖胺的比值，也就是去醯化程度越高，表示幾丁聚醣中的葡萄糖胺重複單元較多，而去乙醯化的程度也會影響幾丁聚醣的機械強度、降解速度及生物相容性，幾丁聚醣的 pKa 值約為 6.5，因此可溶於弱酸性的溶液中且帶有正電性，在過去的文獻中，有許多利用幾丁聚醣此電性之特性，將其與帶有負電的分子，如：DNA、GAGs、生長因子等等作結合並應用，而由於幾丁聚醣具有良好的生物相容性 (biocompatible) 及生分解性 (biodegradable)，因此也被廣泛應用在組織工程及藥物釋放的相關研究上 [32][33]。

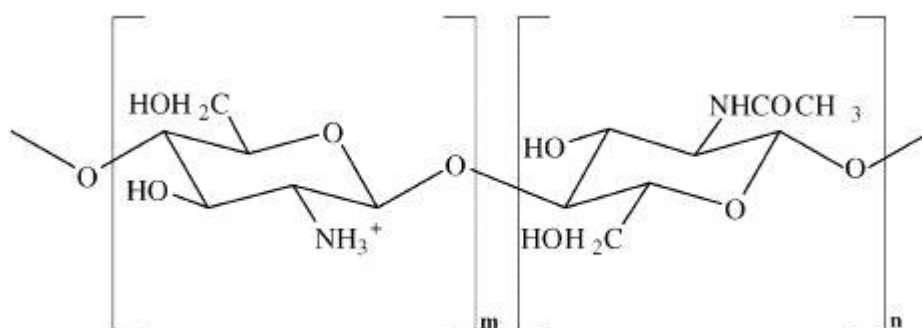


圖 2-6-1 幾丁聚醣之化學結構[34]。

明膠是膠原蛋白變性 (denature) 後的聚胜肽 (polypeptide)，以酸處理而得的明膠為 type A，而以鹼處理而得的明膠為 type B，兩種類型具有不同的等電點，在生理的環境下(pH=7.4)，type A 的明膠不帶電，而 type B 的明膠則帶負電，構成明膠的主要胺基酸為 Glycine、Proline、Hydroxylproline，且明膠具有 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列可供細胞貼附生長，除此之外，明膠也具有有良好的生物相容性及生分解性，因此也被廣泛的被應用在組織工程上。

A.Chenite[31,35]於 2000 年開發出以幾丁聚醣為基材，於加入  $\beta$ -甘油磷酸二鈉 ( $\beta$ -Glycerophosphate disodium salt hydrate，圖 2-6-3) 後，製備出熱敏性的水膠，其溶液可於人體生理的 pH 下，在室溫呈液態，而在人體體溫下形成水膠，且材料具有生物相容性與生分解性，因此可將此材料發展為注射型的生醫材料，而以水膠作為材料的限制主要為其機械強度，因此為了加強水膠的強度，在過去的研究當中，有許多研究者試著利用化學交聯或物理交聯的方式來強化水膠的強度，Peter Roughley 與 Caroline Hoemann 等人在 2006 年以幾丁聚醣為基材，並加入氫氧基乙基纖維素 (hydroxyethyl cellulose)，除此之外，也嘗試使用 genipin 作為幾丁聚醣的交聯劑來形成水膠並搭載椎間盤髓核細胞[36]，而在本研究中，以幾丁聚醣為基材，再加入另一種天然高分子 — 明膠(gelatin)，期望所製備的材料除了具有生物相容性、生分解性外，可透過物理交聯的方式，來增強水膠的強度，並期望椎間盤髓核細胞可以在此支架材料中有不錯的表現。

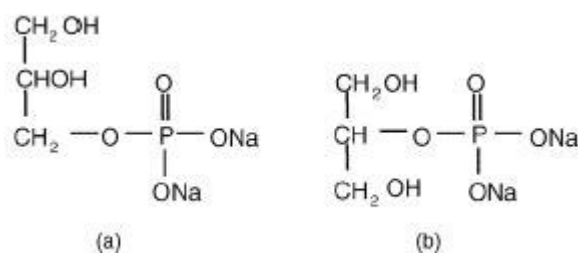


圖 2-6-3 甘油磷酸二鈉之化學結構 (a)  $\alpha$ -GP (b)  $\beta$ -GP [37]。

### 第三章 材料與方法

#### 3.1 實驗儀器與藥品

藥品名稱	廠牌
Gelatin from porcine skin Type A	Sigma G2500
Chitosan	Kioteck
$\beta$ -Glycerophosphate disodium salt hydrate	Sigma G6251
Collagenase from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich C0130
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma D5648
Dulbecco's Modified Eagle's Medium /Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma D8900
Penicillin – Streptomycin – Neomycin Solution (100x) Stabilized	Sigma P4083
L-Ascorbic acid	Sigma A5960
BenchMark™ Fetal Bovine Serum	Gemini 100-106
Trypsin-EDTA solution 10X	Sigma T4174
Trypan Blue Solution, Concentration: 5mg/ml in Saline	Biological industries 03-102-1
Sodium bicarbonate	Sigma S3817
1,9-Dimethyl-Methylene Blue	Sigma 341088
LDH kit	Promega G1782
WST-1 kit	Roche
DNasy Blood & Tissue	QIAGEN
RNeasy Mini kit	QIAGEN
SuperScript™ III First-strand Synthesis kit	Invitrogen
Rheometer	HAAKE RheoStress 600

Spectrophotometer

JASCO V-500

RT-PCR

MJ Research PTC-200

Real-time PCR

ABI 7700

ELISA reader

TECAN Sunrise remote

---





### 3.2 實驗流程與方法

分別將不同組成比例的材料以流變儀測定其成膠溫度、成膠時間及成膠強度，並針對材料進行細胞毒性 (cytotoxicity)、水膠維結構及降解的評估，而後將椎間盤髓核細胞分別和不同比例的材料混合，並於體外進行培養三週後，利用測定細胞的 WST-1 (Water Soluble Tetrazolium Salt-1)、總 DNA 的含量、硫酸基之聚葡萄糖胺 (Sulfated Glycosaminoglycans) 及基因表現，進而評估此材料是否適合椎間盤髓核細胞的生長。

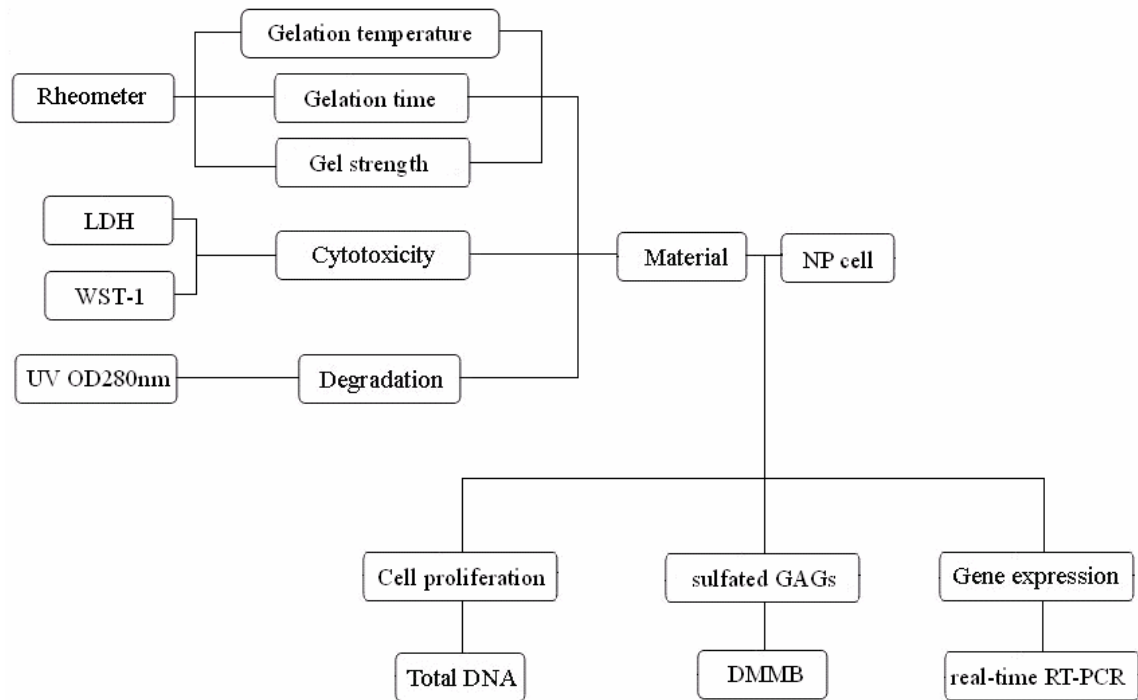


圖 3-2-1 實驗流程圖。

### 3.3 椎間盤髓核細胞的培養

將四個月大的紐西蘭白兔 (New Zealand White Rabbit), 先以肌肉注射 1ml/kg 的麻醉劑 (ketamine:xylazine = 2:1), 待失去知覺後, 以二氧化碳犧牲, 隨後進行剃毛並以碘酒局部消毒背部, 以器械劃開背部取出脊椎約五到六節, 將取出的脊椎剔除表面肌肉後, 泡入 10 倍的抗生素溶液中, 於無菌操作台中取出椎間盤髓核組織, 並泡入培養液中, 以 1600rpm 離心五分鐘後去上清, 加入 10 倍的抗生素溶液 10ml, 浸泡 15 分鐘, 再以 1600rpm 離心五分鐘後去上清, 加入 0.2% 的 collagenase 10ml, 放入 5% CO<sub>2</sub>、37°C、100% 濕度的細胞培養箱作用 18 小時, 離心去除上清, 以 1ml 細胞培養液將細胞混合均勻後, 移入以加好 9ml 細胞培養液的 flask 中進行培養, 待細胞貼附後, 每三天更換細胞培養液, 待滿盤後, 以 1% Trypsin-EDTA 以一分為二的比例進行分盤。



### 3.4 材料製備

先將幾丁聚醣 (分子量 34 萬, DD>95%) 和明膠 (type A, Bloom=300) 粉末溶於 0.1M 的醋酸中, 配置出幾丁聚醣重量百分濃度為 2% 和明膠濃度為 1%、1.5% 和 2% 的高分子溶液, 各實驗組之濃度如表 3-4-1 所列, 另取 20 克甘油磷酸二鈉溶於 25 克的去離子水中, 高分子溶液以高溫高壓滅菌釜 (autoclave) 進行滅菌, 而  $\beta$ -甘油磷酸二鈉 ( $\beta$ -GP) 以 0.22 $\mu$ m 的濾膜 (filter) 過濾。在無菌操作台中, 將甘油磷酸二鈉逐滴緩慢滴入高分子溶液中, 直到溶液的 pH 值為 7.4, 如圖 3-4-1。表 3-4-1 本研究中實驗組別之成份對照。

實驗組別	成份對照
C25	Chitosan 2.5% + $\beta$ -GP
C25G1	Chitosan 2.5% + Gelatin 1% + $\beta$ -GP
C25G15	Chitosan 2.5% + Gelatin 1.5% + $\beta$ -GP
C25G2	Chitosan 2.5% + Gelatin 2% + $\beta$ -GP

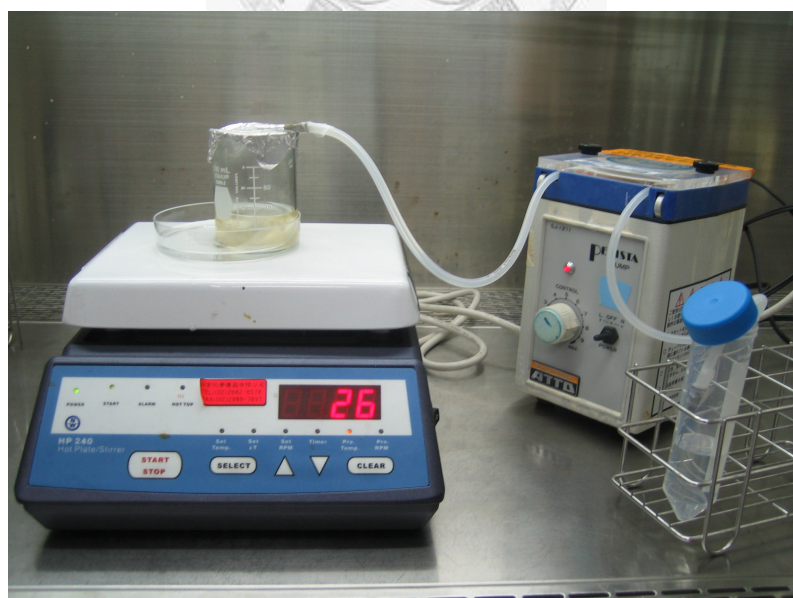


圖 3-4-1 高分子溶液製備方式。

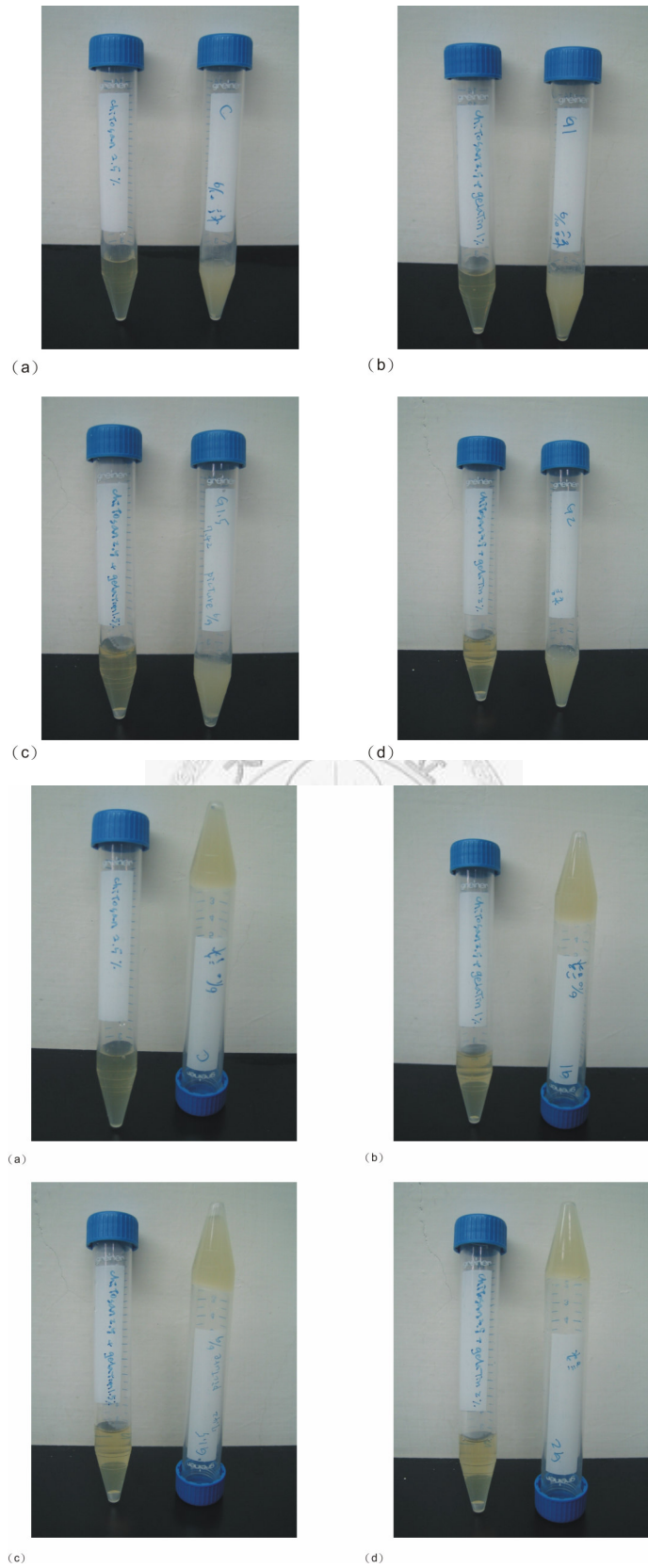


圖 3-4-2 高分子溶液成膠前及成膠後之情形 (a) C25 (b) C25G1 (c) C25G15 (d)

C25G2。

## 3.5 材料分析

### 3.5.1 流變儀分析

成膠 (gelation) 即為材料由溶膠狀態到凝膠狀態 (sol-gel transition)，而其狀態轉變的分界點即為成膠點 (gel point)，以成膠的方式來分，可分為物理凝膠與化學凝膠，化學凝膠於成膠後不能透過物理的方法使其回復成溶膠狀態，在成膠點時，彈性模數或儲存模數 (storage modulus or elastic modulus,  $G'$ ) 和損耗模數 (loss modulus or viscous modulus,  $G''$ ) 會重疊。

使用流變儀 (HAAKE RheoStress 600) 記錄  $G'$  和  $G''$  數值，而後以此數據來判讀成膠所需的溫度及成膠所需的時間，實驗參數為 1Hz, 5Pa, 每分鐘升溫 2°C。

### 3.5.2 材料降解測試

為模擬並評估材料與細胞共混時的降解情形，因此，將各實驗組別分別取 200 $\mu$ l 置入 24 孔 transwell 的上層 insert 中，而後置入 5% CO<sub>2</sub>、37°C、100% 濕度的細胞培養箱 10 分鐘，待成膠後，於下層加入 1.3ml 的 PBS，再放回細胞培養箱中，於不同的時間點，抽出下層溶液，利用紫外光譜儀測定 280nm 的吸收值，再於下層加入新的 1.3ml 的 PBS，分別測定 1、3、7、14 及 21 天這幾個時間點。在計算上，將 2.5% 明膠溶於 PBS 中，梯度稀釋製作出標準曲線，將所讀取到的 280nm 吸收值，內插至標準曲線中，得到各時間點明膠的釋放量，再加總時間點以前的釋放量，而後除上各組所能釋放明膠的最大量，以百分比表示各組降解的程度。

### 3.6 細胞接種

將滿盤的椎間盤髓核細胞以 1% 的 Trypsin-EDTA 將細胞打下，再將細胞和已配置好 pH 值為 7.4 的 C25 和 C25G1 的高分子溶液，於無菌操作台中和椎間盤髓核細胞共混，將材料和細胞混合均勻後，分別取 200 $\mu$ l 的材料和細胞混合液，置入 24 孔 transwell 的上層 insert 中，最終細胞密度為  $1 \times 10^5$  cells/well，將材料細胞混合液先置入 5% CO<sub>2</sub>、37°C、100% 濕度的細胞培養箱 10 分鐘，待成膠後，於下層加入 1.3ml 的細胞培養液，再放回細胞培養箱中進行培養，每三天更換細胞培養液，於第三週停止培養，進行細胞生長表現的評估。



### 3.7 細胞於材料中的表現分析

#### 3.7.1 細胞毒性分析 (cytotoxicity)

根據 ISO10993-1 細胞毒性測試方法，以 3T3 細胞株與材料的萃取物接觸培養，先將 3T3 細胞以正常的培養液於 96 孔盤中培養，細胞密度為 5000 cells/well，待細胞貼附後，再將培養液更換成材料的萃取物，於 1、3 天分別以 LDH (lactate dehydrogenase) 和 WST-1 (Water Soluble Tetrazolium Salt-1) 來評估材料的細胞毒性。

##### 3.7.1.1 乳酸脫氫酶測定 (lactate dehydrogenase assay)

乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 存在於細胞質中，當細胞膜受損傷時，LDH 即會釋放到培養液中，因此可以藉由測定培養基中的 LDH 含量，來評估細胞是否受損傷，其反應機制如圖 3-7-1，於 1、3 天分別停止培養，並分別測定細胞培養液中 LDH 含量及全數細胞毒殺後的 LDH 含量。

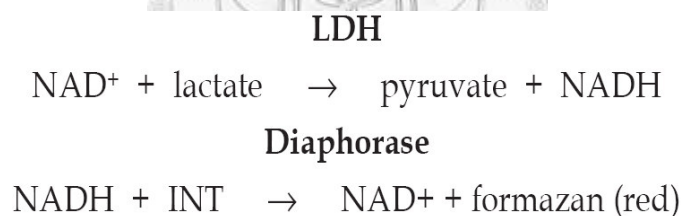


圖 3-7-1 LDH 反應示意圖[37]。

細胞培養液中的 LDH 測定：

- (1) 於 96 孔盤中抽取 50 $\mu$ l 培養液置入新的 96 孔盤中。
- (2) 加入 50 $\mu$ l substrate mix buffer。
- (3) 室溫反應 25 mins。
- (4) 加入 50 $\mu$ l stop solution。
- (5) 以 ELISA READER 讀取 490nm 的吸收值。

全數細胞毒殺的 LDH 測定：

- (1) 將 96 孔盤冰入 -80 $^{\circ}$ C，30mins。

- (2) 37°C 回溫 15mins。
- (3) 將培養液抽出至 1.5ml 微量離心管。
- (4) 離心 250 Xg，4mins。
- (5) 抽取 50µl 培養液置入新的 96 孔盤中。
- (6) 加入 50µl substrate mix buffer。
- (7) 室溫反應 25 mins。
- (8) 加入 50µl stop solution。
- (9) 以 ELISA READER 讀取 490nm 的吸收值。

### 3.7.1.2 WST-1 測定(Water Soluble Tetrazolium Salt-1 Assay)

WST-1 於未反應前呈現淡紅色，利用 WST-1 和細胞粒線體中的脫氫酵素 (dehydrogenase) 作用後，呈現深紅色水溶性的 Formazan[38]，其作用機制如圖 3-7-2，透過讀取 450nm 的吸光值，即可評估細胞的活性。

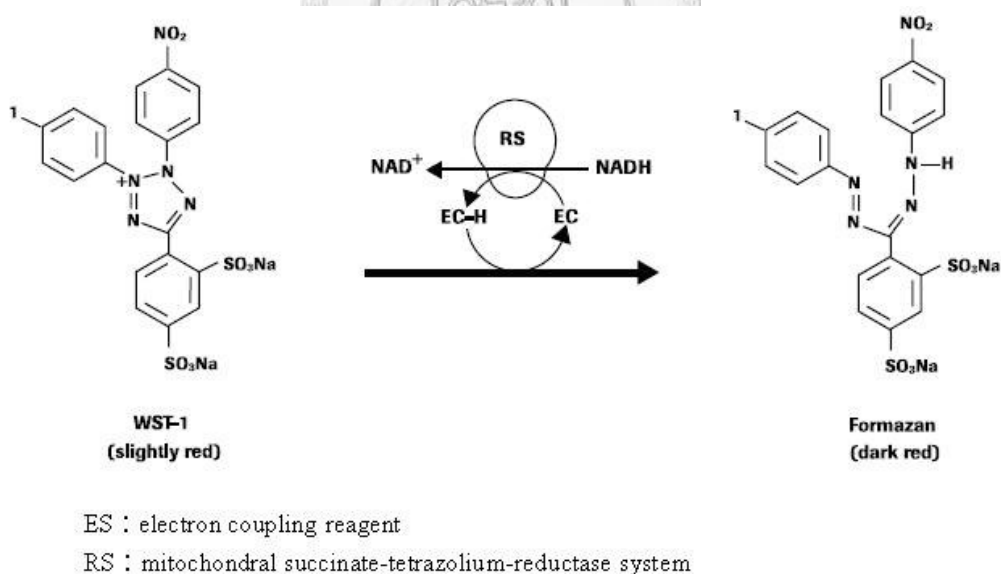


圖 3-7-2 WST-1 作用機制[38]。

- (1) 將 96 孔盤中的培養液移出。
- (2) 以 1X PBS 清洗。
- (3) 每 well 分別加入 200µl WST-1 Buffer (WST-1 Buffer 配法: 以培養液將 WST-1



稀釋 10 倍)。

- (4) 放入 5% CO<sub>2</sub>、37°C、100%濕度的細胞培養箱，3 小時，避光反應。
- (5) 分別將 well 中的 WST-1 Buffer 移入 1.5ml 微量離心管。
- (6) 離心 1600rpm，3 分鐘。
- (7) 取 150μl 上清液，置入新的 96 孔盤中。
- (8) 以 ELISA READER 讀取 450nm 的吸收值。



### 3.7.2 Total DNA 測定細胞增生

以 DNasy Blood & Tissue (QIAGEN) kit 之萃取步驟，抽取各實驗組之 total DNA，以分光光度計分別讀取各實驗組之 260nm 及 280nm 吸收值，進而評估細胞數量及所萃取出之 DNA 之純度。



### 3.7.3 1,9-Dimethylmethylene Blue (DMMB) 測定具硫酸基之聚葡萄

#### 糖胺 (Sulfated Glycosaminoglycans) 含量

1,9-二甲基亞甲藍 (DMMB) 化學結構是如圖 3-7-3, DMMB 會和帶負電的硫酸基反應形成複合物, 因此可以藉由測定 595nm 或 525nm 吸收值來評估具硫酸基之葡萄胺聚糖的含量[39]。

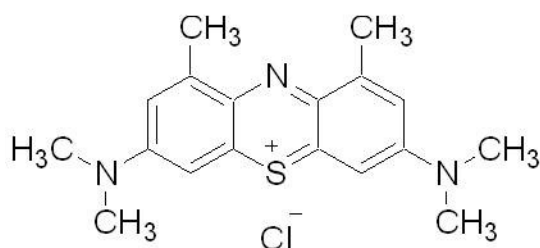


圖 3-7-3 DMMB 化學結構式[39]。

- (1) 將 0.05 mg 的 C<sub>6</sub>S (chondroitin-6-sulfate) 溶於 1ml 的二次水中, 並梯度稀釋 8 個濃度。
- (2) 以 ELISA reader 讀取 595nm 及 525nm 的吸收值, 並將讀值製作成標準曲線 (standard curve)。
- (3) 從 transwell insert 內抽出 40μl 至新的 96 孔盤中。
- (4) 於 96 孔盤之各 well 中加入 pH=3.5 的 DMMB buffer(見表 3-7-1) 250μl。
- (5) 以 ELISA reader 讀取 595nm 及 525nm 的吸收值。

表 3-7-1 DMMB buffer 配法。

1,9-Dimethyl-Methylene Blue	16mg
95% 乙醇	5ml
甲酸	3ml
1M 氫氧化鈉	25.6ml
加入二次水至總體積為 1000ml	

### 3.7.4 RNA 的萃取與即時反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR)

先萃取出 Total RNA 後，再進行 cDNA 的合成，最後使用即時定量 RT-PCR (real-time reverse transcription polymerase chain reaction)來測定特定的基因表現量，PCR 的過程包含了三個步驟：(1)變性 (denaturation)，將 DNA 兩股分離。(2)退火 (annealing)，讓引子 (primer) 接至 DNA 上。(3)延伸 (extension)，新的 DNA 合成。而在進行 PCR 的同時，同步偵測 PCR 產物隨著反應增加的狀況(即 real-time)，再利用偵測到的產物回推樣品中原始基因的表現量。

本實驗利用的是 TaqMan 螢光標定的方式，而使用的 primer 如表 3-7-2，GAPDH 為甘油醛三磷酸去氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)，其為細胞內進行糖解 (glycolysis) 過程中催化 glyceraldehyde-3-phosphate 分解成 1,3-bisphosphoglycerate 的酵素[40]，因此和細胞數量成正比，在實驗中，我們將 GAPDH 作為 endogenous control。

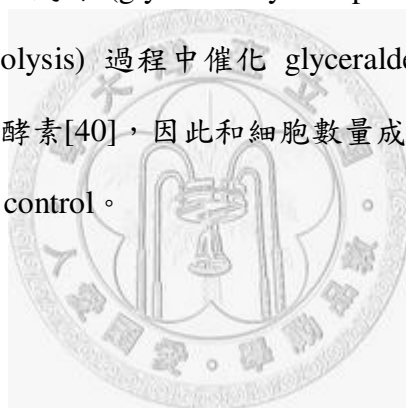
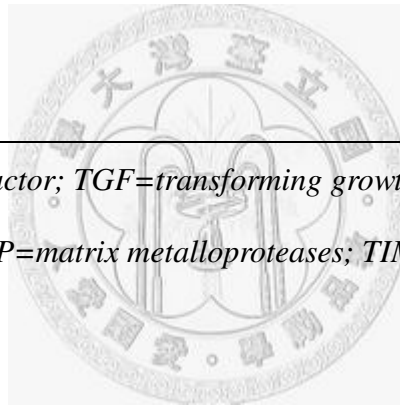


表 3-7-2 PCR 所使用的引子。

Gene	Gene Bank Accession No.
GAPDH	L23961
Aggrecan	D49399
Collagen I	AF027122
Collagen II	L38480
IGF-1	U75390
TGF- $\beta$ 1	AF000133
BMP-7	AF413111
MMP-3	M25664
MMP-9	R86523
TIMP-1	J04712

*IGF=insulin-like growth factor; TGF=transforming growth factor; BMP=bone morphogenic protein; MMP=matrix metalloproteases; TIMP=tissue inhibitor of matrix metalloproteases*



### 3.7.4.1 RNA 的萃取

- (1) 將 transwell insert 內的材料與細胞移入 15ml 離心管中。
- (2) 於 15ml 離心管中加入 pH=5 之醋酸溶液，溶解材料。
- (3) 離心 1600rpm，5 分鐘，去除上清液。
- (4) 加入 1ml 的 PBS 並混合均勻(suspension)，移入 1.5ml 離心管中。
- (5) 離心 1600rpm，5 分鐘，去除上清液。
- (6) 使用 RNeasy Minikit (QIAGEN) 萃取各實驗組之 total RNA。
- (7) 以分光光度計分別讀取各實驗組之 260nm 及 280nm 吸收值。

### 3.7.4.2 即時反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR)

- (1) 以 SuperScript™ III First-strand Synthesis kit (Invitrogen, USA)，將萃取出  
的 RNA 以 random hexamers 進行 cDNA 的合成。
- (2) 依序將 10µl 2X TaqMan Universal PCR Master Mix、9µl cDNA、1µl Primer，  
於冰浴下，分別放入 0.2ml 微量離心管中，配製成 20µl 的 PCR reaction mix。
- (3) 將裝有 PCR reaction mix 的微量離心管置入 ABI PRISM™7700 Sequence  
Detection System 的 96well 恆溫循環器中，開始進行即時定量 RT-PCR 反應，  
並利用 SDS1.9 軟體分析結果。

## 第四章 結果與討論

### 4.1 材料分析

#### 4.1.1 流變分析

在本研究中，以幾丁聚醣與不同比例之明膠共混作為溫敏性水膠之基材，表 3-4-1，先以流變儀評估其成膠溫度 (gelation temperature)、成膠時間 (gelation time) 和成膠後之強度 (gel strength)，以確認所製備之材料是否有足夠的時間與細胞共混，並能於 37°C 時成膠，當儲存模數 (storage modulus,  $G'$ ) 大於損耗模數 (Loss modulus,  $G''$ ) 的瞬間即定義為成膠溫度，幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉溶液之成膠溫度為 35.84°C，和單只用幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉為基材之水膠相比，於幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉系統中，隨著明膠濃度的提升，其成膠溫度有逐漸下降的趨勢，圖 4-1-1，圖 4-1-2。

於實驗中所製備出之高分子溶液，在室溫下是否具有足夠的操作時間來和細胞或治療試劑共混，以及高分子溶液注射進入人體後，需多少時間才能形成水膠，亦為溫度敏感性水膠於未來臨床應用上的重要考量，因此，於此研究中評估高分子溶液於 25°C 及 37°C 所需的成膠時間，從圖 4-1-3 及 4-1-4 的結果上顯示，在 25°C 的環境下，單使用幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為基材的溶液，在 900 秒以內並不會形成水膠，而以幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為基材的溶液，隨著明膠濃度的提升，其所需的成膠時間有明顯的下降，在 37°C 下也可觀察到相同的趨勢，單使用幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為基材的溶液，其成膠時間約為 603 秒，在幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉的系統中，隨著明膠濃度的提升，成膠時間可下降至 2 秒左右，高分子溶液在 37°C 成膠後的強度亦為臨床上使用的一項重要考量，由圖 4-1-5 顯示，在 37°C 的環境下，單使用幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為基材的溶液，其成膠強度明顯較幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉的系統低。

Chenite 等人[31]於 2000 年開發出以幾丁聚醣為基材的溫敏型水膠，A.Chenite 等

人將可能參與其中的作用機制歸納為以下三點：(1) 幾丁聚醣分子鏈間的疏水作用 (hydrophobic interaction)；(2) 幾丁聚醣與甘油磷酸二鈉鹽 (glycerol phosphate disodium salt) 間的引力；(3) 幾丁聚醣間氫鍵的形成[31]，Cho 等人[41]亦指出以幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為溫度敏感性水膠的基材，當溫度升高時，疏水作用為驅使相轉移的主要關鍵。在本研究中以幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為基材，當 pH 值低於明膠的等電點和幾丁聚醣的 pKa 時，明膠與幾丁聚醣的高分子鏈上帶正電，高分子鏈間互相排斥，因此呈現溶液狀，隨著  $\beta$ -甘油磷酸二鈉的加入，磷酸根的負電荷與高分子鏈上正電荷的氨基逐漸形成離子鍵結，溶液的 pH 值隨著  $\beta$ -甘油磷酸二鈉的加入而逐漸升高，當 pH 值等於 7.4 時，由於此值介於明膠的 PI 值的範圍內，因此推測明膠的分子鏈上正電荷的數目下降，並有部分負電荷的產生，而由於 pH 值 7.4 已大於幾丁聚醣的 pKa 值，因此幾丁聚醣的分子鏈上即不帶電，高分子鏈間的斥力由於電性的改變而逐漸下降。在低溫時，由於高分子鏈的運動受到限制，因此高分子鏈間氫鍵的數量不足以形成三維的網狀結構，當溫度升高時，高分子鏈及水分子的移動更為自由，高分子鏈糾纏 (entanglement) 的程度提升，使得高分子鏈間的氫鍵數目增加，並增加了高分子鏈間的疏水作用力，進而形成水膠。以水膠作為材料的限制主要為其機械強度，因此為了加強水膠的強度，在過去的研究當中，有許多研究者試著利用化學交聯或物理交聯的方式來強化水膠的強度，Peter Roughley 與 Caroline Hoemann 等人在 2006 年以幾丁聚醣為基材，並加入羥基乙基纖維素 (hydroxyethyl cellulose)，也嘗試使用 genipin 作為幾丁聚醣的交聯劑來形成水膠[36]，而在本實驗中，和單使用幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為基材的水膠相較，以幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為水膠的基材其成膠後的強度較佳，推測乃因藉由添加明膠於溶液中，使得高分子鏈間的糾纏程度及高分子鏈間氫鍵的數量更為提升，因此膠體強度也隨之提升，而成膠所需的時間，也有明顯的下降。

綜合流變儀分析的結果，在 37°C 的環境下，不論是成膠時間或成膠後的強度，和單以幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉為基材的水膠相較之下，以幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -



甘油磷酸二鈉作為基材，更適合於臨床上的應用，明膠濃度為 1% 的幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉系統，在 25°C 的環境下，於 15 分鐘內並不會形成水膠，具有較足夠的操作時間與細胞共混，因此在幾丁聚醣/明膠/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉的系統中，選擇以明膠濃度為 1% 的組別進行接下來與細胞共混的實驗，另外也評估細胞與幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉作為基材的水膠共混後的表現。

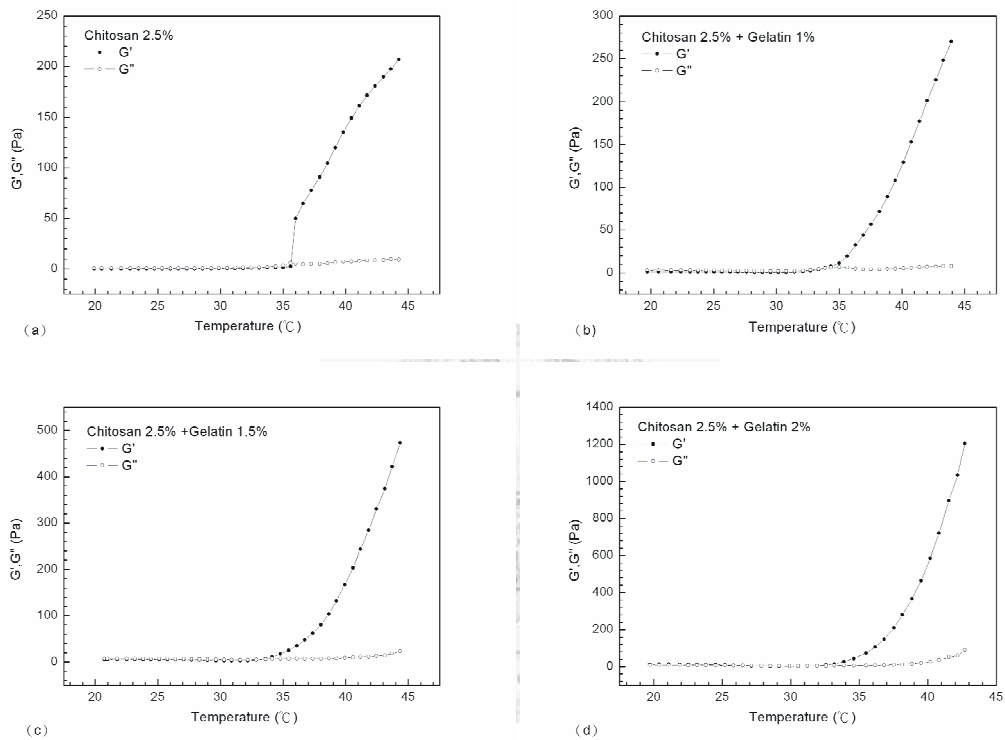


圖 4-1-1 成膠溫度測試結果 (a) Chitosan 2.5% 35.84 $^{\circ}\text{C}$  (b) Chitosan 2.5% / Gelatin 1% 33.88 $^{\circ}\text{C}$  (c) Chitosan 2.5% / Gelatin 1.5% 33.61 $^{\circ}\text{C}$  (d) Chitosan 2.5% / Gelatin 2% 31.13 $^{\circ}\text{C}$ 。

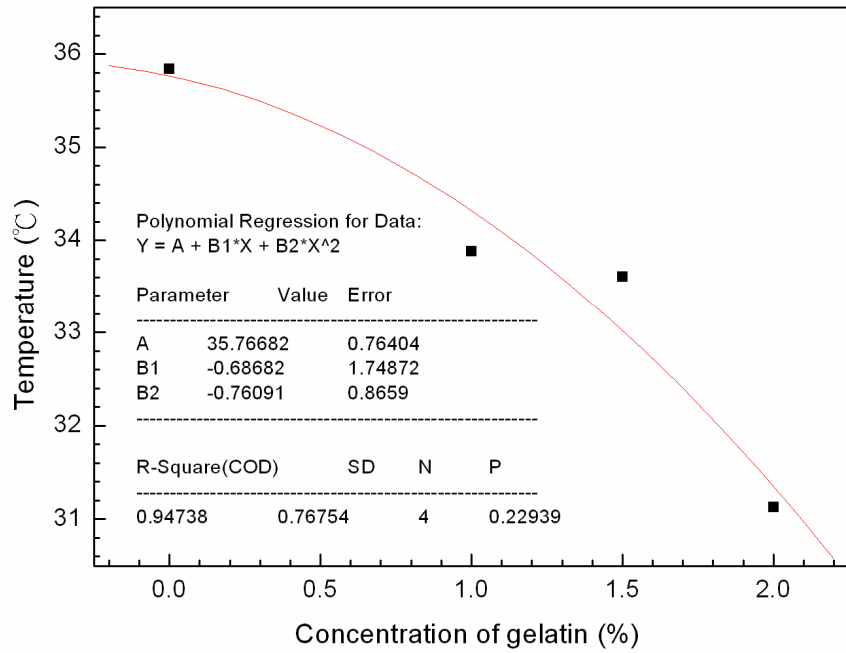


圖 4-1-2 成膠溫度隨溶液中之明膠濃度變化之情形。

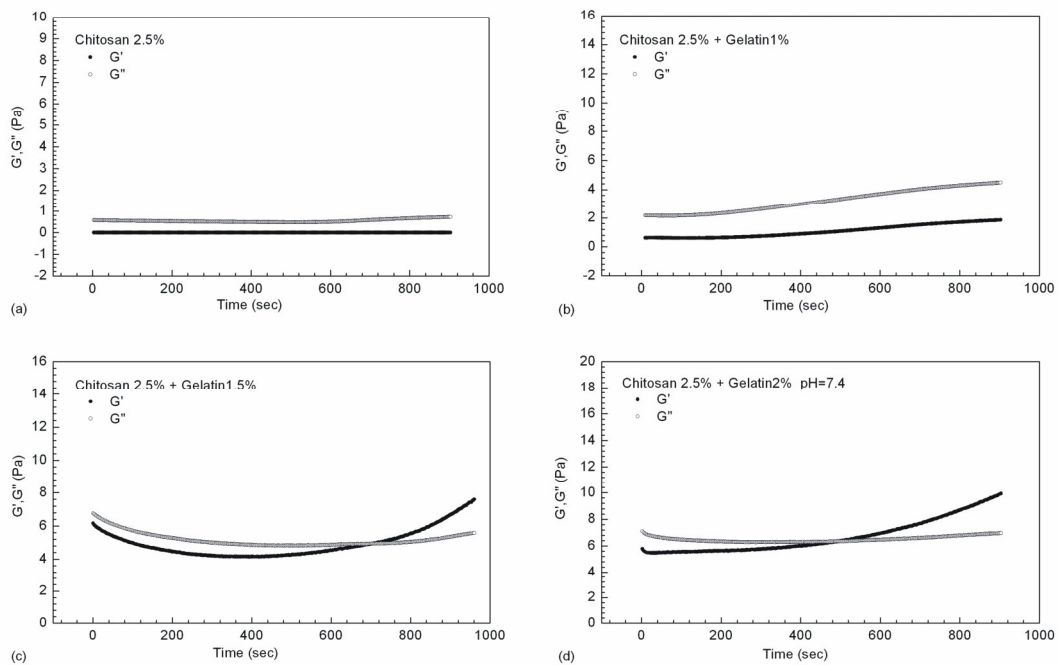


圖 4-1-3 於 25°C 下成膠所需時間 (a) Chitosan 2.5% 大於 900 秒 (b) Chitosan 2.5% / Gelatin 1% 大於 900 秒 (c) Chitosan 2.5% / Gelatin 1.5% 709.6 秒 (d) Chitosan 2.5% / Gelatin 2% 494 秒。

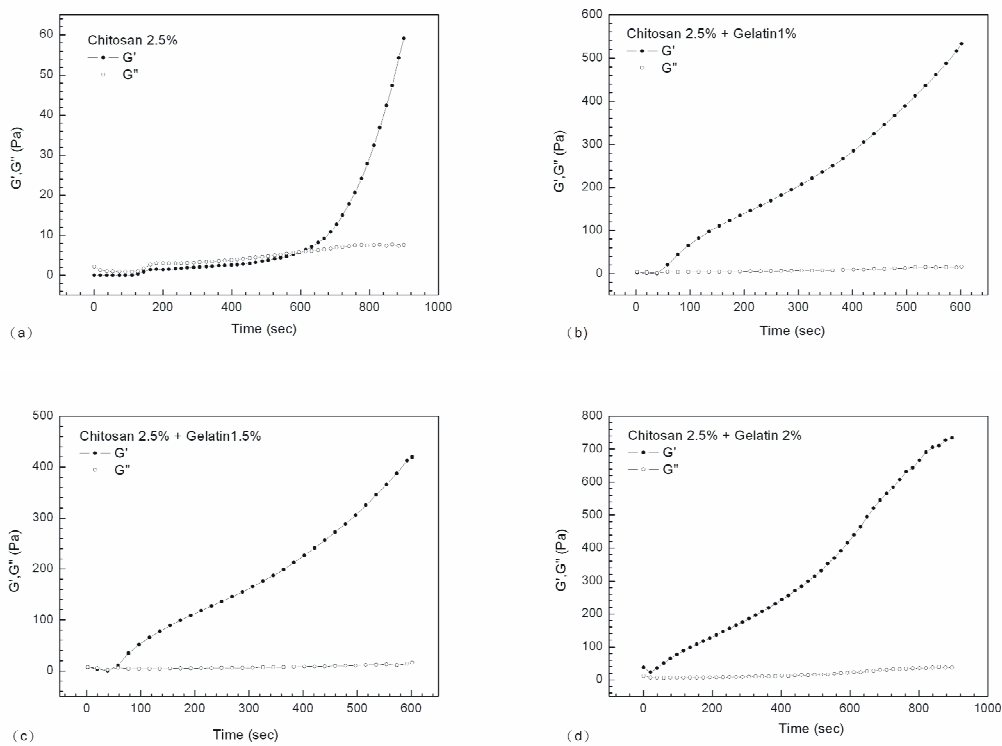


圖 4-1-4 於 37°C 下成膠所需時間 (a) Chitosan 2.5% 602.9 秒 (b) Chitosan 2.5% / Gelatin 1% 49.24 秒 (c) Chitosan 2.5% / Gelatin 1.5% 54.13 秒 (d) Chitosan 2.5% / Gelatin 2% 2.351 秒。

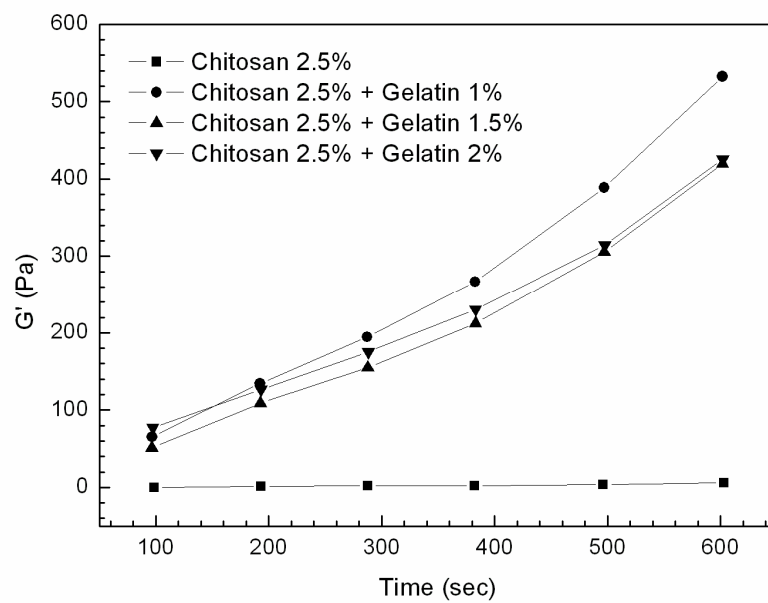


圖 4-1-5 於 37°C 下彈性模數隨時間變化之情形。

## 4.1.2 材料降解分析

在選擇適當的材料作為細胞載體時，其中一重要的考量即是材料的降解速度，圖 4-1-6 顯示幾丁聚醣溶液及明膠/幾丁聚醣的混合液之全波長，雖然在 220nm~400nm 範圍內均有吸收，但隨著高分子溶液中明膠濃度的提升，吸光值在 280nm 左右會有顯著的提升，因此在本實驗中挑選 280nm 作為測定降解的波長，利用明膠標準曲線，圖 4-1-7，來定量明膠之釋放量，圖 4-1-8 顯示材料降解之百分比，第一天此三組不同明膠濃度之水膠降解百分比相當接近，而隨著時間的增加，明膠濃度為 2% 的組別釋放程度明顯較其他兩組高。

在本研究中所用之 Type A 明膠之等電點約為 7~9，因此可溶於 PBS 溶液中，而由於幾丁聚醣之 pKa 值約為 6.5，因此只能溶於酸的環境中，而隨著明膠在水膠中所佔比例的提升，推測在接觸 PBS 溶液時，水膠內部原本糾纏的明膠高分子鏈會因親水而運動，因此改變水膠原本的完整結構，因此水膠之降解程度會隨明膠濃度的提升而提高。



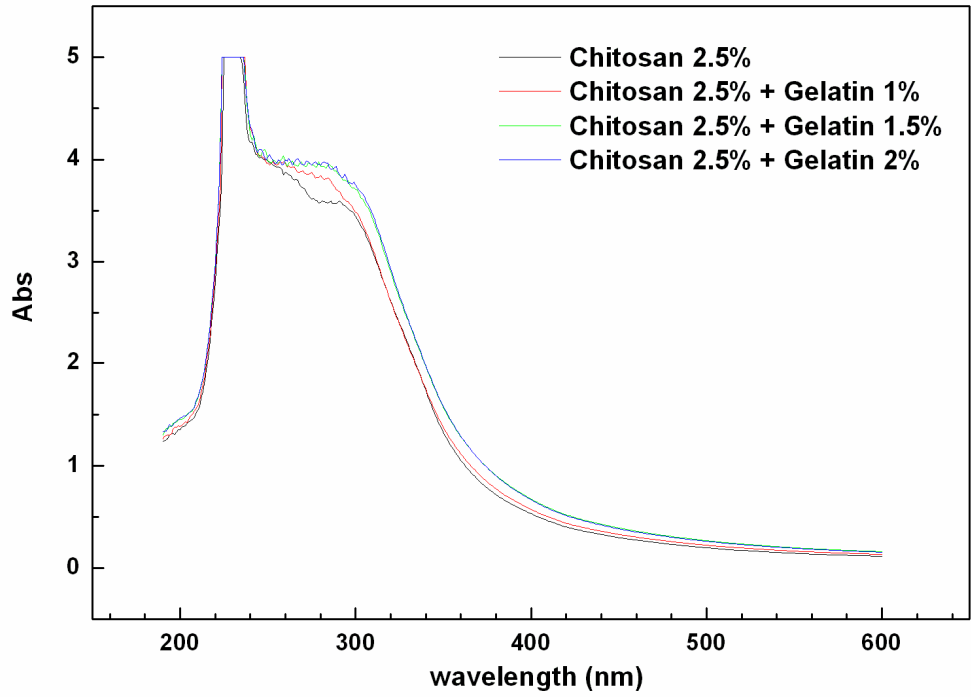


圖 4-1-6 幾丁聚醣溶液與明膠/幾丁聚醣混合液之全波長圖譜。

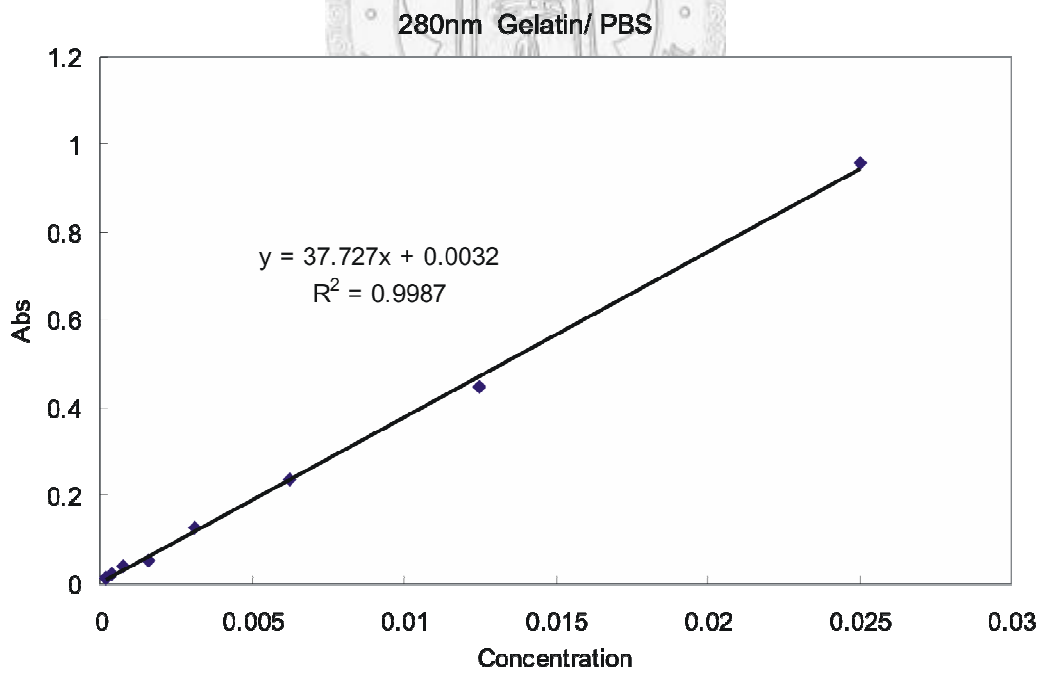


圖 4-1-7 明膠釋放之標準曲線。

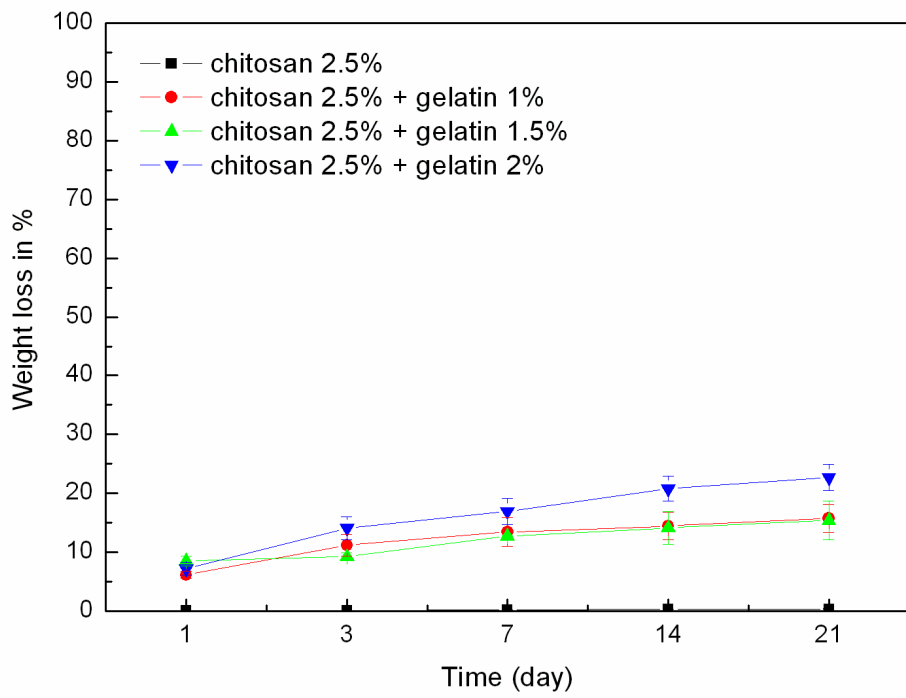


圖 4-1-8 水膠之降解結果。



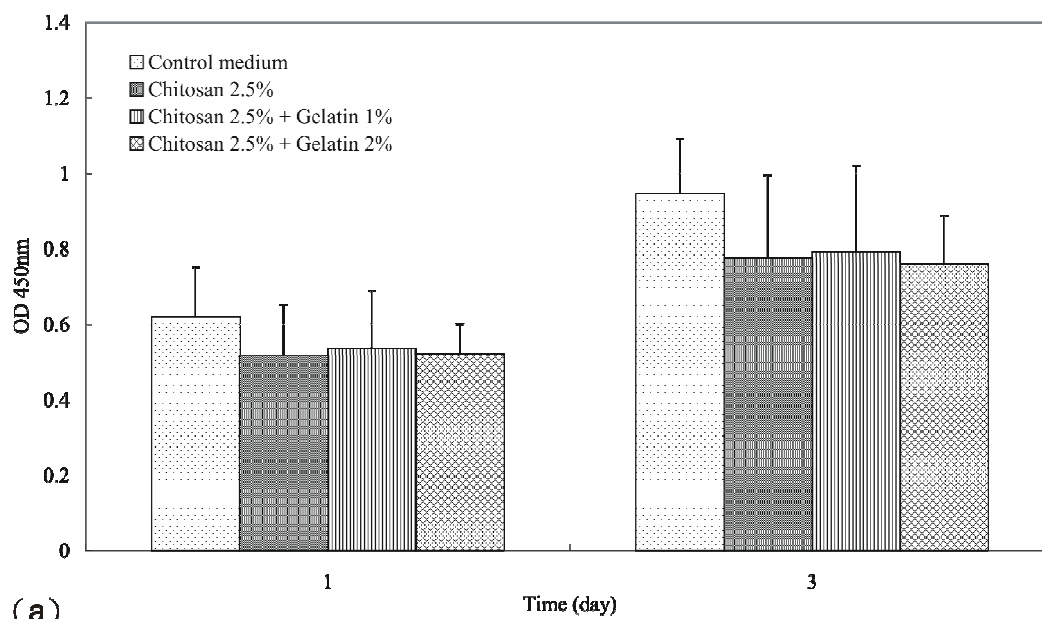
## 4.2 細胞於材料中的表現分析

### 4.2.1 細胞毒性分析

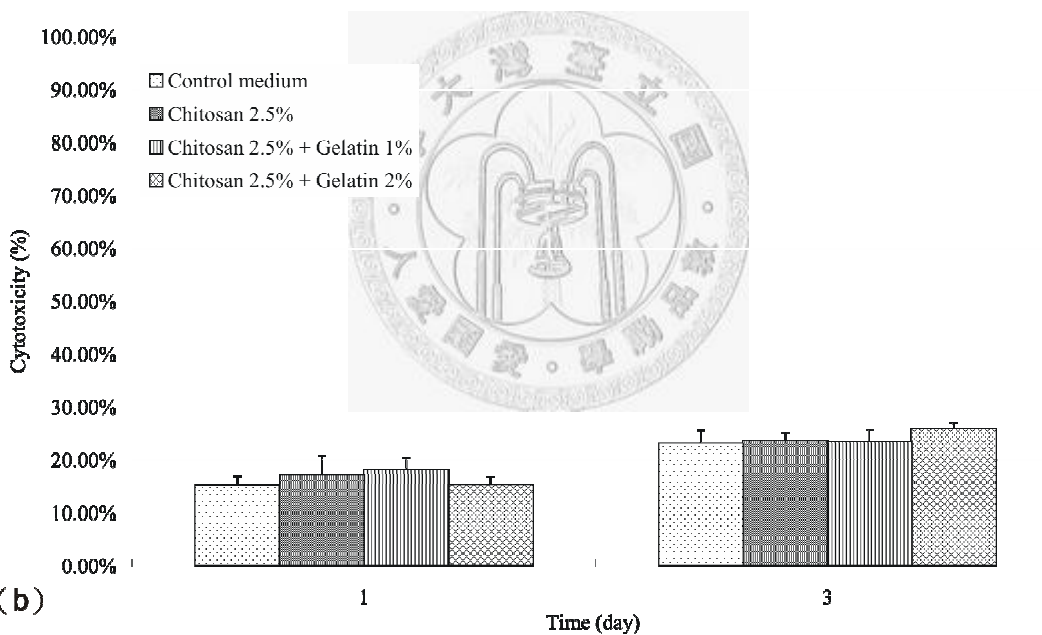
明膠與幾丁聚醣在過去許多研究中已被指出具有良好的生物相容性並廣泛應用在組織工程的研究上[32,33]，Molinaro 等人[42]評估幾丁聚醣/ $\beta$ -甘油磷酸二鈉的生物相容性，進一步指出較高的去乙酰化程度的幾丁聚醣，具有較好的生物相容性，而在本實驗中所使用的幾丁聚醣，其去乙酰化程度大於 95%。於本研究中的細胞毒性分析上，根據 ISO-10993 細胞毒性的測試方法，在本研究中以材料的萃取液和 3T3 纖維母細胞共培養 1、3 天後，進行 WST-1 及 LDH 測試。

圖 4-2-1 顯示 WST-1 及 LDH 的測試結果，分別以正常培養液 (control medium) 及材料萃取液培養 3T3 纖維細胞，測試第 1、3 天的細胞活性及細胞損傷的程度，將 WST-1 及 LDH 的測試結果以 One-way ANOVA 分析控制組與實驗組間的差異，在  $\alpha$  值 (significance level) 為 0.05 時，各組別間在統計上並無明顯差異。由統計的結果可以得知，以萃取液培養之細胞，其粒線體活性和以正常培養液培養之細胞相比，並無明顯差異，而乳酸脫氫酶釋放量的測試上，以正常培養液培養之細胞所釋放到培養液中的乳酸脫氫酶含量，可視為細胞在增生過程中自然死亡的釋放量，因此，透過式 4-2-1 換算出細胞毒性，由統計的結果可以得知，以萃取液培養之細胞乳酸脫氫酶的釋放量和以正常培養液培養之細胞並無明顯差異，綜合 WST-1 及 LDH 的測試結果，可以推斷在本研究中所製備出的溫度敏感性水膠並無明顯的細胞毒性。

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{OD_{\text{medium}} - OD_{\text{ref}}}{OD_{\text{total lysis}} - OD_{\text{ref}}} \times 100 \quad \text{式 4-2-1}$$



(a)



(b)

圖 4-2-1 細胞毒性測試結果(a) WST-1 測試結果(b) LDH 測試結果(n=4,  $p > 0.05$ )。



## 4.2.2 椎間盤髓核細胞之培養

以組織工程的方法來治療退化的椎間盤，如何獲取充足的細胞數量是一項重要的課題，而在本研究中，自紐西蘭白兔上取出椎間盤髓核細胞，而後為了有充足的細胞量與支架材料共混，因此，於Flask上培養至第六繼代，再與高分子溶液共混後，放入37°C成膠並持續培養，使細胞處在三維的環境中生長，圖4-2-2及圖4-2-3為光學顯微鏡下放大40倍所觀察的細胞形態，圖4-2-2為仍具有增生功能的椎間盤髓核細胞培養至第九代的細胞形態，分盤時以一分二的比例，約五到七天可長滿盤，而圖4-2-3雖為第三代繼代培養之椎間盤髓核細胞，細胞形態粗糙肥大且生長速度極為緩慢，已失去增生的功能。



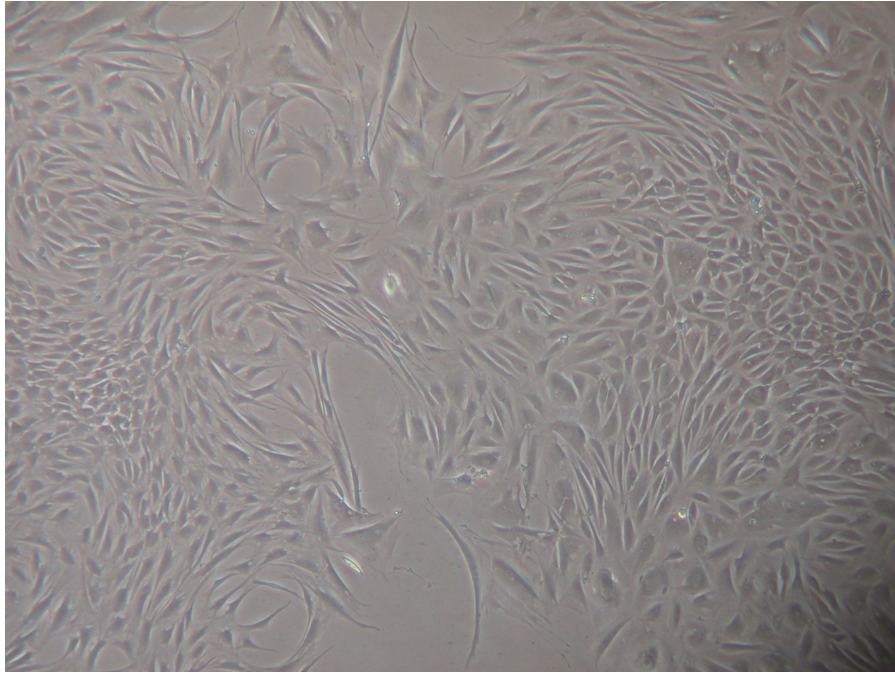


圖 4-2-2 椎間盤髓核細胞培養至第九繼代之細胞形態。

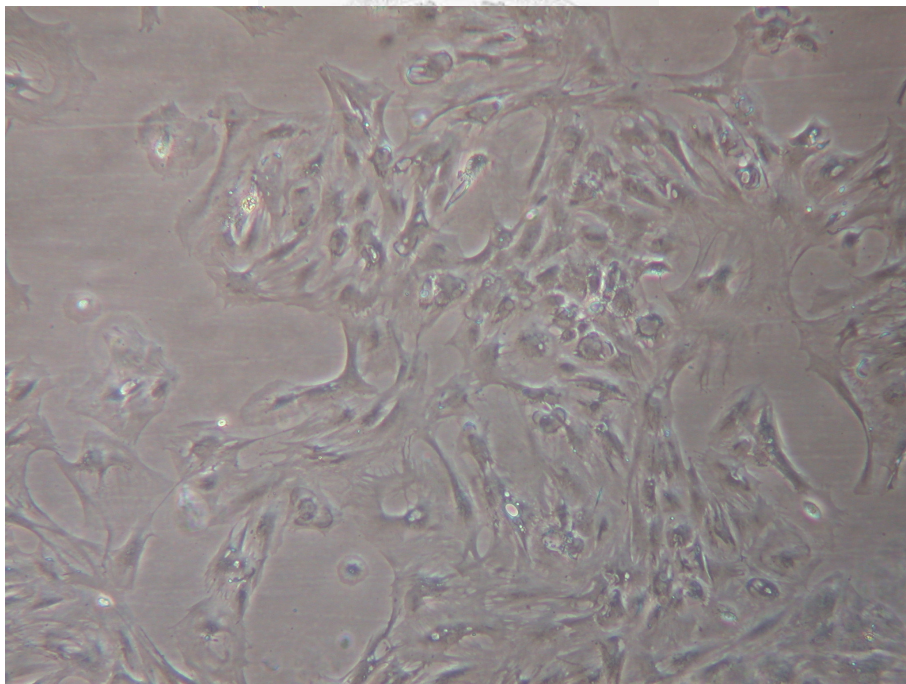


圖 4-2-3 失去分化能力之第三繼代椎間盤髓核細胞。

Kluba 等人[43]將人類的椎間盤髓核細胞分別進行原代培養 (primary culture) 6、10 和 15 天，另外再將原代培養 15 天的椎間盤髓核細胞分別置入二維的 Flask 上及包覆於所製備之三維的海藻酸鈉小球中，培養 14 天，並利用即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction) 比較這幾組細胞的 *Type II collagen* 和 *Aggrecan* 的基因的表現，如 2.2.2 節所述，椎間盤髓核的細胞外基質成份，以第二型膠原蛋白及蛋白聚醣為主，而蛋白聚醣又以 Aggrecan 為最大宗，因此，未失去功能的椎間盤髓核細胞在這兩個基因上會有顯著的表現，Kluba 等人[43]的實驗結果顯示，當椎間盤髓核細胞在二維環境下，隨著培養天數的增加，*Type II collagen* 和 *Aggrecan* 的表現均顯著的下降，但若將已在二維培養過一段時間的細胞，再移至三維環境中培養，這些特定的細胞外基質基因的表現量又可有顯著的提升。

因此，在本研究中將紐西蘭白兔的椎間盤髓核部分取出後，於二維環境下進行細胞的繼代培養，以獲取充足的細胞數量，並觀察細胞形態及增生的情形，將細胞形態未有顯著改變，且具有增生功能的細胞，置入三維的水膠中進行培養。

### 4.2.3 Total DNA 的萃取

測定總 DNA 含量可對應細胞的增生表現，圖 4-2-4 顯示椎間盤髓核細胞分別於 24 孔盤上及水膠中培養三週後的總 DNA 含量，由結果上顯示，細胞於二維的 24 孔盤上增生效果較三維的水膠環境佳，而不論於水膠中有無添加明膠，細胞的增生效果在統計上並無顯著的差異，由於細胞可於二維環境下有良好的貼附，而細胞於三維的水膠環境中貼附效果較差，因此增生較不顯著。

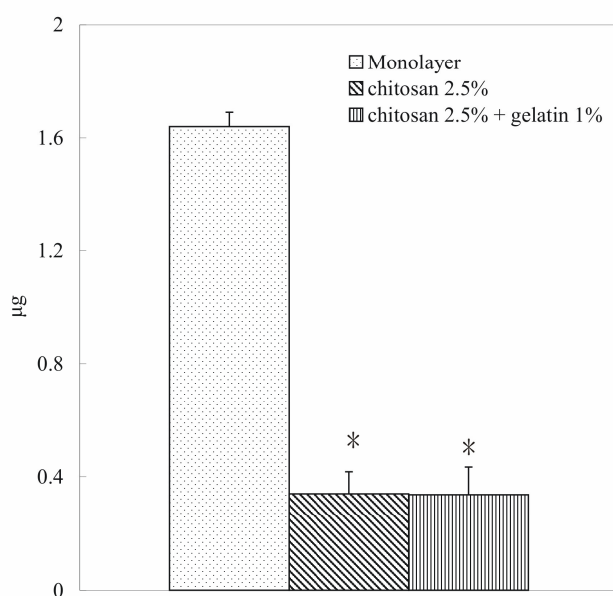


圖 4-2-4 單層、C25 和 C25G1 培養之總 DNA 含量(n=3, \*,  $p < 0.05$ )。

#### 4.2.4 1,9-Dimethylmethylene Blue (DMMB) 測定具硫酸基之聚葡萄糖胺 (Sulfated Glycosaminoglycans) 含量

圖 4-2-5 為使用 Chondroitin-6-Sulfate 作出之標準線，將吸光值以內差回此標準線以求得硫酸基之葡萄糖胺含量，圖 4-2-6 即顯示單層培養與於 C25 和 C25G1 水膠中培養的細胞的硫酸基之葡萄糖胺含量，於統計上，當  $\alpha$  值為 0.05 時，單層培養與 C25 和單層培養與 C25G1，均有顯著的差異，而 C25 與 C25G1 間則是沒有顯著的差異，細胞於三維的水膠環境中生長，可分泌較多硫酸基之葡萄糖胺，而圖 4-2-7 顯示具硫酸基之聚葡萄糖胺含量與總 DNA 含量之比值，此結果可顯示相同細胞數下，細胞所分泌的具硫酸基之聚葡萄糖胺含量，從圖上更可清楚的看出於三維的水膠環境中生長的細胞確實可分泌較多的具硫酸基之聚葡萄糖胺。

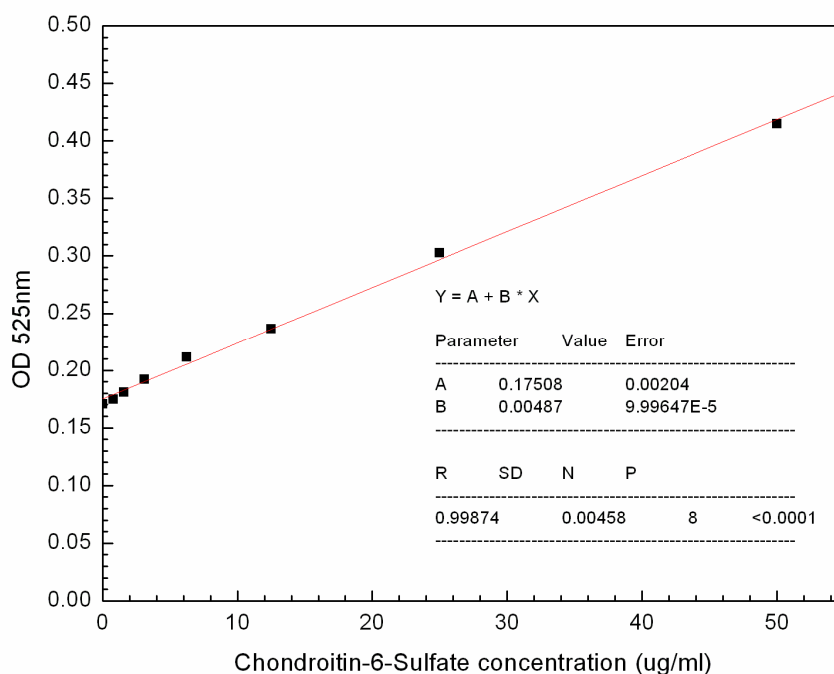


圖 4-2-5 硫酸基之聚葡萄糖胺之標準線。

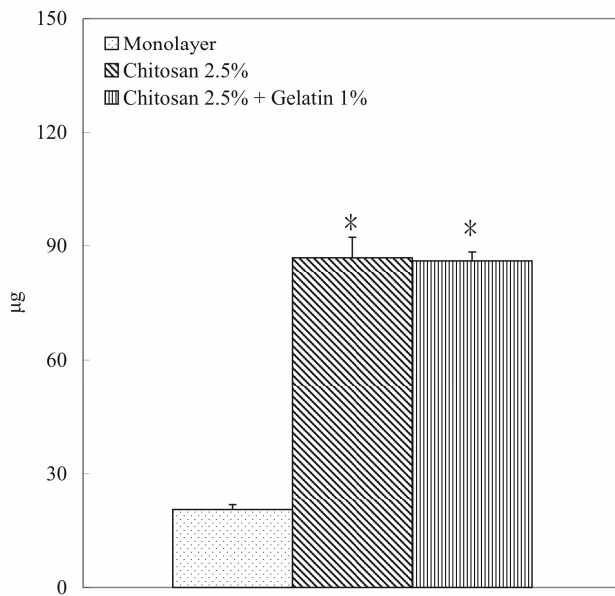


圖 4-2-6 單層、C25 和 C25G1 培養之具硫酸基之聚葡萄糖胺含量(n=3, \*,  $p < 0.05$ )。

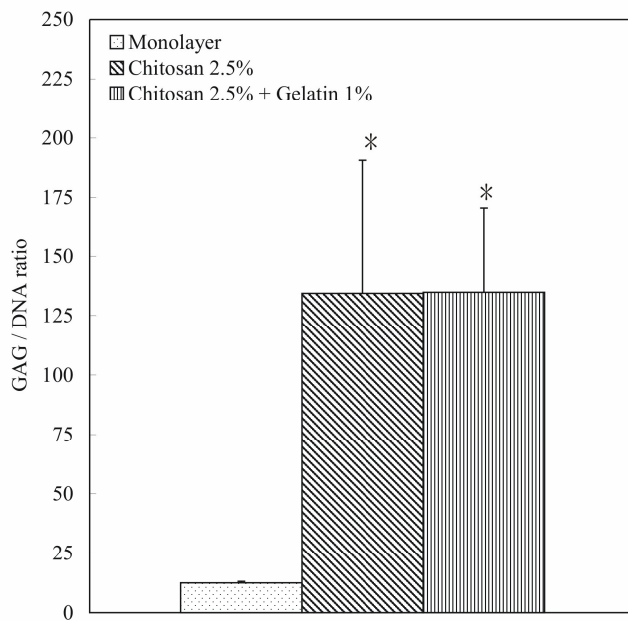


圖 4-2-7 單層、C25 和 C25G1 培養之具硫酸基之聚葡萄糖胺與總 DNA 含量比值 (n=3, \*,  $p < 0.05$ )。

#### 4.2.5 RNA 的萃取與及時反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real-time RT-PCR)

圖 4-2-8 顯示椎間盤髓核細胞之細胞外基質基因表現結果，和單層培養的細胞相較，*type I collagen* 的基因表現量有顯著的下降，而在 *type II collagen* 和 *Aggrecan* 則是有顯著的提升，圖 4-2-9 顯示椎間盤髓核細胞之分解代謝基因之表現結果，和單層培養的細胞相較，*MMP-3* 和 *MMP-9* 的表現量有顯著的提升，圖 4-2-9 顯示椎間盤髓核細胞之合成代謝基因之表現結果，和單層培養的細胞相較，*IGF-1*、*BMP-7* 和 *TGF- $\beta$*  基因表現量均有所提升。

在三維環境中生長的椎間盤髓核細胞和單層培養相較下，*type II collagen* 和 *Aggrecan* 的表現量有顯著的提升，*type I collagen* 表現量的下降，如 2.2.1 所述，*type II collagen* 和 *Aggrecan* 為椎間盤髓核之細胞外基質之主要成分，而在退化的椎間盤中，原本富含水分的髓核部分會出現纖維化的情形，而細胞外基質中的 *Proteoglycan* 及 *type II collagen* 含量會下降，因此，*type II collagen* 和 *Aggrecan* 的大量表現，而 *type I collagen* 表現量的下降，顯示椎間盤髓核細胞於水膠中，具有合成如同正常組織中的細胞外基質的功能。

如同 2.3.1 節所述，*MMP-3* 可降解第三型、第四型、第五型、第九型膠原蛋白，也可切斷第二型膠原蛋白的非螺旋區 (telopeptide domain)，另外 *MMP-3* 也藉由切割核心球蛋白 (core protien) 來降解蛋白聚醣，包括 *fibronectin*、*laminin* 等等；*MMP-9* 則是屬於 *MMP* 家族中 *gelatinases* 的一種，*gelatinases* 可降解第四型、第五型、第七型、第十型、第十一型膠原蛋白[12]，在正常組織中，細胞外基質的生成和分解的速率達動態平衡，因此推論可能由於 *type II collagen* 和 *Aggrecan* 表現量的提升，故 *MMP-3* 和 *MMP-9* 的表現量也會跟著提升，以維持合成與分解代謝的平衡，而不論是否加入明膠的水膠中，*TIMP-1* 的表現量則是沒有顯著的差異。

又如 2.2.2 節所述，眾多的研究指出 *TGF- $\beta$* 、*IGF*、*BMP* 對椎間盤髓核細胞有顯著的影響，包括促進蛋白聚醣和膠原蛋白的合成量，而 *BMP-7* 被指出和

*Aggrecan* 及 *Type II collagen* 這兩個基因的表現有高度的相關，在本研究中 *BMP-7* 的表現量有明顯的提升，而 *Aggrecan* 及 *Type II collagen* 這兩個基因的表現量均有顯著的增加，呈現高度的相關，*TGF-β*、*IGF-1* 被指出能促進椎間盤髓核細胞的蛋白聚糖的合成量[17,20,21]，*Aggrecan* 為蛋白聚糖的主要成分，在本研究中，*TGF-β* 和 *IGF-1* 的表現量上升，而 *Aggrecan* 的表現量也有顯著的提升。

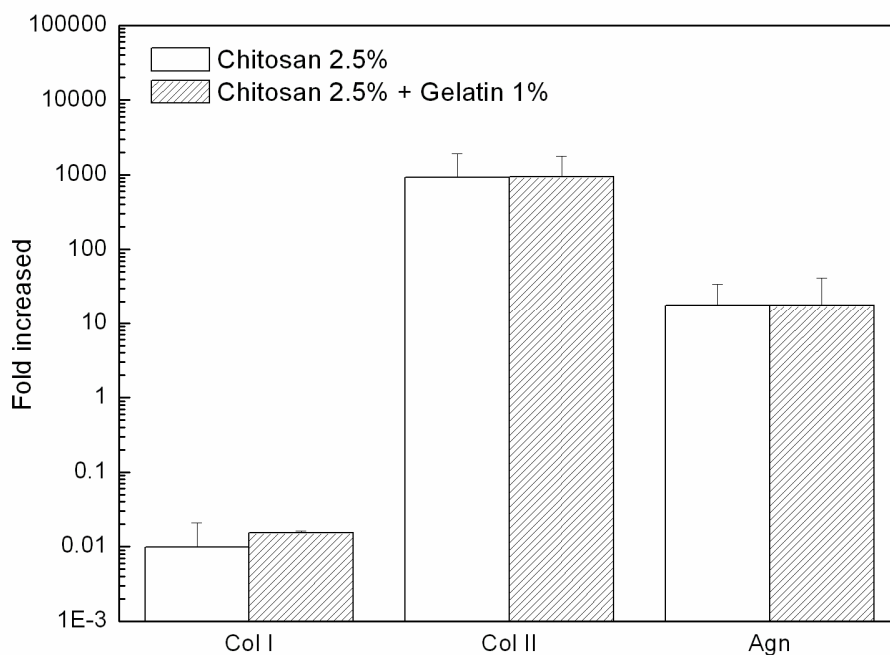


圖 4-2-8 細胞外基質基因之表現結果，和單層培養相較，髓核細胞培養於水膠中，*Type I collagen* 表現量下降，*Type II collagen* 及 *Aggrecan* 表現量則有顯著的提升。



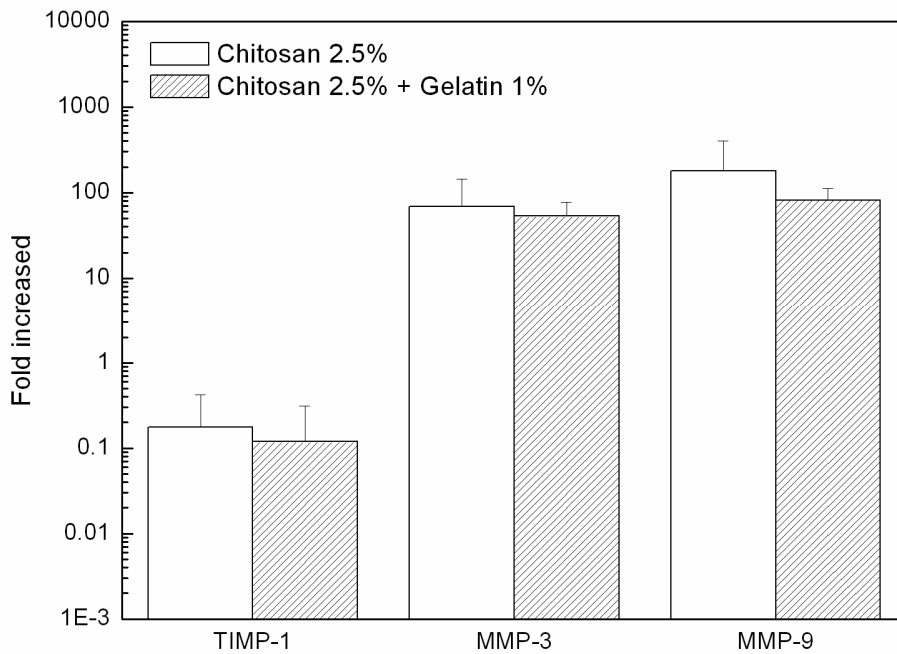


圖 4-2-9 分解代謝基因之表現，和單層培養相較，髓核細胞培養於水膠中，*TIMP-1* 表現量下降，*MMP-3* 及 *MMP-9* 表現量則有顯著的提升。

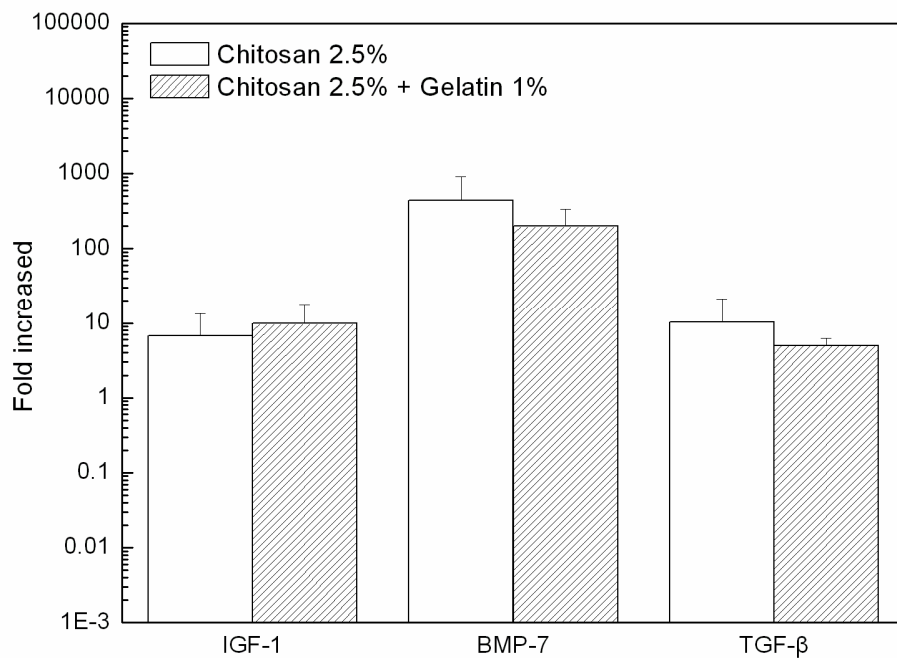


圖 4-2-10 合成代謝基因之表現，和單層培養相較，髓核細胞培養於水膠中，*IGF-1*、*BMP-7* 及 *TGF-β* 表現量則有顯著的提升。

## 第五章 結論

本研究結果顯示，所製備出的幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉溶液確實可以在生理的 pH 值下於似人體體溫形成水膠，且隨著明膠於水膠中所佔比例的提升，成膠所需的時間明顯下降，和單使用幾丁聚醣/甘油磷酸二鈉相較下，本研究所製備出的幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉水膠，成膠體後的強度有顯著的提升，在降解的測定上，隨著明膠於水膠中所佔比例的提升，其降解的程度也有所提升，未來也可控制明膠的比例，來調控成膠的時間、膠體的強度和降解的速度，而生物相容性的測試結果也顯示此材料並無明顯的細胞毒性。

在椎間盤髓核細胞於水膠中的表現分析上，雖然細胞數量沒有顯著的提升，但細胞外基質中具硫酸基之聚葡萄糖胺含量與 DNA 含量之比值有顯著的提升，在 mRNA 基因表現上，椎間盤髓核主要的細胞外基質 *Aggrecan* 及 *Type II collagen* 的表現量有顯著的提升，且合成代謝的基因 *TGF-β*、*IGF-1* 和 *BMP-7* 的表現量提升，並伴隨 *MMP-3* 和 *MMP-9* 分解細胞外基質的基因表現提升，以維持細胞外基質合成及分解代謝的平衡，*Type I collagen* 的表現量下降，*TIMP-1* 的表現量在幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉和幾丁聚醣/甘油磷酸二鈉的水膠中，則是沒有顯著差異。

綜合以上結果，在幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉水膠中生長的椎間盤髓核細胞，雖然細胞的增生情形未必顯著，但在水膠中生長的椎間盤髓核細胞具有分泌細胞外基質的功能，因此，以幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉作為椎間盤髓核細胞的載體，可說是相當適合的，且幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉成膠後的強度較幾丁聚醣/甘油磷酸二鈉佳，因此，在本研究中所製備的可注射型幾丁聚醣/明膠/甘油磷酸二鈉溶液，可供作未來臨床上利用細胞治療椎間盤退化的一項新的載體選擇。

## 第六章 參考文獻

1. Sally Roberts; Urban JPG. Intervertebral Discs: Encyclopaedia of occupational health and safety. 4th ed. 1998, PART I. Ch.6.
2. An H, Boden SD, Kang J, Sandhu HS, Abdu W, Weinstein J. Summary statement: emerging techniques for treatment of degenerative lumbar disc disease. *Spine* 2003; 28(15):S24-5.
3. Lee CK. Accelerated degeneration of the segment adjacent to a lumbar fusion. *Spine* 1998; 13(3):375-7.
4. Lanza RP; Langer R; Vacanti J. Principles of tissue engineering 2<sup>nd</sup>.2000; xxxv-xli.
5. Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(3):120-30.
6. Cassinelli EH, Hall RA, Kang JD. Biochemistry of intervertebral disc degeneration and the potential for gene therapy applications. *Spine J* 2001; 1(3):205-14.
7. Goupille P, Jayson MI, Valat JP, Freemont AJ. Matrix metalloproteinases: The clue to intervertebral disc degeneration? *Spine* 1998; 23(14):1612-26.
8. Yoon ST. Molecular therapy of the intervertebral disc. *Spine J* 2005; 5(6):280S-286S.
9. Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Spine* 2004; 29(23):2691-9.
10. Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine* 2004; 29(23):2700-9.
11. Urban JP, Roberts S, Ralphs JR. The nucleus of the intervertebral disc from development to degeneration. *American Zoologist* 2000; 40:53-61.

12. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* 2000; 25(23):3005-13.
13. Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, Tanzawa K, Okada Y. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Lett* 2001; 494(3):192-5.
14. Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, Sheng S, Alexander P, Sang QA, Shi YE. Preparation and Characterization of Recombinant Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem* 1997; 272(33):20479-83.
15. Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002; 4(3):S39-49.
16. Masuda K, Oegema TR Jr, An HS. Growth factors and treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine* 2004; 29(23):2757-69.
17. Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine* 1991; 16(3):253-60.
18. Masuda K, An HS. Growth factors and the intervertebral disc. *Spine J.* 2004; 4(6):330S-340S
19. Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine* 2004; 29(2):156-63.
20. Osada R, Ohshima H, Ishihara H, Yudoh K, Sakai K, Matsui H, Tsuji H. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. *J Orthop Res* 1996; 14(5):690-9.
21. Okuda S, Nakase T, Yonenobu K. Age-dependent expression of transforming growth factor-beta1(TGF-beta1) and its receptors and age-related stimulatory

- effect of TGF-beta 1 on proteoglycan synthesis in rat intervertebral discs. *J Musc Res* 2000; 4:151-9.
22. Klein-Nulend J, Louwarse RT, Heyligers IC, Wuisman PI, Semeins CM, Goei SW, Burger EH. Osteogenic protein (OP-1, BMP-7) stimulates cartilage differentiation of human and goat perichondrium tissue in vitro. *J Biomed Mater Res* 1998; 40(4):614-20.
  23. Haaijman A, D'Souza RN, Bronckers AL, Goei SW, Burger EH. OP-1 (BMP-7) affects mRNA expression of type I, II, X collagen, and matrix Gla protein in ossifying long bones in vitro. *J Bone Miner Res* 1997; 12(11):1815-23.
  24. Masuda K, Takegami K, An H, Kumano F, Chiba K, Andersson GB, Schmid T, Thonar E. Recombinant osteogenic protein-1 upregulates extracellular matrix metabolism by rabbit annulus fibrosus and nucleus pulposus cells cultured in alginate beads. *J Orthop Res* 2003; 21(5):922-30.
  25. Deyo RA, Bass JE. Lifestyle and Low-Back Pain: The Influence of Smoking and Obesity. *Spine* 1989; 14(5):501-6.
  26. Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine* 1997; 22(24):2781-95.
  27. Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, Kompel JF, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction. *Spine* 2005; 5(1):14-23.
  28. Gutowska A, Jeong B, Jasionowski M. Injectable gels for tissue engineering. *Anat Rec* 2001; 263(4):342-9.
  29. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24(24):4337-51.
  30. Ruel-Gariépy E, Leroux JC. In situ-formation hydrogels-review of

- temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58:409-426.
31. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Binette F, Selmani A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 2000; 21(21):2155-61.
  32. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005; 26(30):5983-5990.
  33. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 57(1):35-52.
  34. Berger J, Reist M, Chenite A, Felt-Baeyens O, Mayer JM, Gurny R. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application. *Int J Pharm* 2005; 288(2):197-206.
  35. Chenite A, Buschmann M, Wang D, Chaput C, Kandani N. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solution. *Carbohydrate Polymers* 2001; 46:39-47.
  36. Roughley P, Hoemann C, DesRosiers E, Mwale F, Antoniou J, Alini M. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation. *Biomaterials* 2006; 27(3):388-96.
  37. Promega. Cytotoxicity assay protocol. 2006.
  38. Roche. Cell proliferation reagent WST-1 protocol. 2005.
  39. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986; 883(2):173-7.
  40. Campbell MK, Ferrell SO. *Biochemistry* 5<sup>th</sup>.Ch.17 2004.
  41. Cho J, Heuzey MC, Bégin A, Carreau PJ. Physical gelation of chitosan in the presence of beta-glycerophosphate: the effect of temperature. *Biomacromolecules*

2005; 6(6):3267-75.

42. Molinaro G, Leroux JC, Damas J, Adam A. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials* 2002; 23(13):2717-22.
43. Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, Gründer T. Human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine* 2005; 30(24):2743-8.
44. Wang JY, Baer AE, Kraus VB, Setton LA. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture. *Spine* 2001; 26(16):1747-52.

