

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：研究)

自體軟骨細胞之體外培養與移植

服務機關：國立台灣大學醫學院附設醫院骨科部

出國人 職 稱：主治醫師

姓 名：楊曙華

出國地區：美國

出國期間：九十一年十二月一日至九十二年十一月三十日

報告日期：九十三年一月三十一日

T21

009200055

系統識別號:C09300056

公務出國報告提要

頁數: 17 含附件: 否

報告名稱:

九十一年度/自體軟骨之體外培養與移植

主辦機關:

國立臺灣大學醫學院附設醫院

聯絡人/電話:

李美美/23123456-1582

出國人員:

楊曙華 國立臺灣大學醫學院附設醫院 骨科部 主治醫師

出國類別: 研究

出國地區: 美國

出國期間: 民國 91 年 12 月 01 日 - 民國 92 年 11 月 24 日

報告日期: 民國 93 年 02 月 03 日

分類號/目: J2/西醫 J2/西醫

關鍵詞: 自體軟骨、椎間盤細胞、體外培養

內容摘要: 椎間盤軟骨細胞立體培養及其生成的細胞外基質之評估，是針對椎間盤再生的新近組織工程學研究，本人於民國九十一年十二月至九十二年十一月至美國約翰霍普金斯大學骨科及醫學工程研究所（Department of Orthopedic Surgery and Department of Biomedical Engineering, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA）進修即以此為研究主題。經由一連串的體外細胞培養實驗及動物實驗，目的在驗證特定生物活性支架（豬的小腸黏膜下組織）作為培養椎間盤軟骨細胞立體並促進其合成重要細胞外基質的可行性。其中重要的驗證方法包括細胞代謝及增生活性檢驗、硫化糖蛋白定量分析、組織切片及染色、免疫組織化學染色、RT-PCR及西方墨點檢驗。於一年研究期間中，體外細胞培養實驗已得到正面的初步結論，而動物實驗則仍持續進行中。回國後期望能延續這一段時間習得的實驗方法，配合上開發更合適的活性生物醫學材料，在椎間盤的組織工程研究領域上有更進一步的突破，並在世界上佔有一席之地。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

摘要：

椎間盤軟骨細胞立體培養及其生成的細胞外基質之評估，是針對椎間盤再生的新近組織工程學研究，本人於民國九十一年十二月至九十二年十一月至美國約翰霍普金斯大學骨科及醫學工程研究所（Department of Orthopedic Surgery and Department of Biomedical Engineering, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA）進修即以此為研究主題。經由一連串的體外細胞培養實驗及動物實驗，目的在驗證特定生物活性支架（豬的小腸黏膜下組織）作為培養椎間盤軟骨細胞立體並促進其合成重要細胞外基質的可行性。其中重要的驗證方法包括細胞代謝及增生活性檢驗、硫化糖蛋白定量分析、組織切片及染色、免疫組織化學染色、RT-PCR及西方墨點檢驗。於一年研究期間中，體外細胞培養實驗已得到正面的初步結論，而動物實驗則仍持續進行中。

回國後期望能延續這一段時間習得的實驗方法，配合上開發更合適的活性生物醫學材料，在椎間盤的組織工程研究領域上有更進一步的突破，並在世界上佔有一席之地。

目次：

目的：	4
過程：	4
一、行前準備與計畫背景	4
二、實驗用之生物活性支架材料簡介	5
三、體外人類椎間盤軟骨細胞及間質幹細胞於生物活性 支架中的立體培養	7
細胞種類的選擇	7
椎間盤軟骨細胞體外立體培養的條件	7
培養成果的評估方法	8
截至目前為止的研究成果	9
四、動物實驗	12
實驗設計	13
大白兔實驗	13
狒狒實驗的籌備	14
心得：	15
建議：	16
附錄一：國際學會發表記錄	17

正文

目的：

藉由於美國著名的約翰霍普金斯大學骨科及醫學工程研究所中所學習的椎間盤軟骨細胞立體培養方法，以及培養細胞生成的細胞外基質之評估方法，以期整合為椎間盤再生之組織工程研究，並將此新興的研究領域引進國內。

過程：

一、行前準備與計畫背景

本人於民國九十一年十二月至九十二年十一月奉派至美國馬里蘭州巴爾地摩市的約翰霍普金斯大學醫院進修。

約翰霍普金斯大學醫院是美國連續十三年評比第一的醫院，該院骨科在 2003 年的評比為全美第四，此外約翰霍普金斯大學的醫學工程學系及研究所也是連續多年評比為全美第一的醫學工程學教學與研究機構。

2000 年 6 月約翰霍普金斯大學骨科 John Kostuik 教授與北美 Scoliosis Research Society 的三位 Traveling Fellows 至台北訪問，本人因參與接待工作所以有多次向 Kostuik 教授交談請

益的機會。由於當時本人已注意到椎間盤退化性疾病的非融合性治療 (Non-fusion treatment)，尤其組織工程及生物醫學材料研發是極為新穎並且很有前景的研究方向。在得知 Kostuik 教授與醫學工程研究所的 Kam Leong 教授在此領域有一系列的研究後，立即詢問前往約翰霍普金斯大學從事此一領域研究進修的可能，並獲得其首肯。在一連串的聯絡事宜與文書作業完成後，終於在 2002 年 11 月底成行。

椎間盤的組織工程學研究在全世界仍算是非常新穎的研究領域，還沒有很多研究機構投入此一領域的研究，即使在約翰霍普金斯大學也是在二 0 0 三年才算真正投入這一研究領域之中。

本人到達後適值新計畫的籌備階段，此計畫是與 Johnson & Johnson 公司的合作計畫，主題是研究豬的小腸黏膜下組織 (Porcine Small Intestine Submucosa, SIS) 作為椎間盤組織再生的生物活性支架的可行性。研究預計包括體外細胞培養及動物實驗 (大白兔及狒狒) 兩大部分，以下就材料特性與此二部份實驗內容分別加以說明。

二、實驗用之生物活性支架材料簡介

豬的小腸黏膜下組織 (Porcine Small Intestine Submucosa, SIS)

豬的小腸黏膜下組織是一層約 80 到 200 毫米厚的構造，其中包含膠原蛋白網絡 (Collagen Network) 及許多的生長激素。在文獻中，豬的小腸黏膜下組織被證實含有 Transforming Growth Factor- β 、Fibroblastic Growth Factor 以及 Vascular Endothelial Growth Factor 等生長激素，加上其富含孔洞的網絡構造，已被證明於體外環境中可以成功培養 NIH Swiss Mouse 3T3 Fibroblasts、NIH 3T3/J2 Fibroblasts、Primary Human Fibroblasts、Primary Human Keratinocytes、Human Microvascular Endothelial Cells、Established Rat Osteosarcoma Cell Line 等等細胞種類。臨床上，豬的小腸黏膜下組織已被應用於作為血管取代物、治療慢性褥瘡、深度的皮膚傷口、修補內臟及疝氣等用途，於骨科臨床上則曾被運用於修補受損的膝關節韌帶、肌腱、軟骨以及肩部的旋轉肌缺損等。由於豬的小腸黏膜下組織富含孔洞的網絡構造，以及含有對椎間盤細胞生長繁殖有益的 Transforming Growth Factor- β 及 Fibroblastic Growth Factors，我們預期豬的小腸黏膜下組織將會是對體外培養椎間盤細胞有益的活性支架，並且在將其植入實驗動物的椎間盤時，預期會有延緩退化甚至有促進再生的功能。

三、體外人類椎間盤軟骨細胞及間質幹細胞於生物活性支架中的 立體培養

A. 細胞種類的選擇

人類椎間盤組織的取得是來自 Kostuik 教授的手術患者，自手術房取得檢體後，將 Nucleus Pulposus 及 Annulus Fibrosus 兩部份分別加以處理，將細胞自組織中分離，再將細胞做初級單層培養以增加其細胞數。

人類間質幹細胞 (Poietic™ Human Mesenchymal Stem Cells) 自 Cambrex Bio Science Walkersville Inc 購得後，也以單層培養方式增加其細胞數。

B. 椎間盤軟骨細胞體外立體培養的條件

小腸黏膜下組織是由合作的公司提供，其製備方式包括單層 SIS 支架，及將 10 至 15 層 SIS 加壓製成的複層 SIS 支架。

雖然實驗中兩種製成的 SIS 支架均有使用，但為解釋方便，以下將以解釋單層 SIS 支架實驗的設計及結果為主。

首先將經初級單層培養後的 Annulus Fibrosus 細胞 (或 Nucleus Pulposus 細胞、人類間質幹細胞) 以每平方公分 SIS 支架一百萬個細胞的密度 (1×10^6 cells/cm² SIS) 先培養兩小

時，之後由剩餘細胞的數量推估貼附於 SIS 支架上的細胞數。然後再將附有細胞的 SIS 支架移至 6-well 培養盤中，每週更換培養基液兩次。培養基液的成分包括 DMEM/F-12、抗生素、抗黴菌藥物、胎牛血清及左旋維生素 C 等，並未添加任何生長激素。在培養四、八、及十二週後，各取適量之帶細胞之 SIS 支架進行一連串的檢測，以評估培養細胞在 SIS 支架中增生及製造重要的細胞外基質（如 Glycoaminoglycan 和膠原蛋白等）的能力。未帶有細胞的 SIS 支架則作為對照組。

C. 培養成果的評估方法

- a. 立體培養細胞代謝活性及增生能力：培養於 SIS 支架中的細胞代謝活性及增生能力是利用 Water Soluble Tetrasolium Salt-1 (WST-1) 試劑加以檢測。將 1 平方公分 SIS 支架置於 500 微升 WST-1 試劑中，於 37 度 C 下培養兩小時後，測量每 100 微升試劑在 450 奈米波長下的吸光度。
- b. 硫化糖蛋白 (Sulfated Glycoaminoglycan) 含量：首先將大約一平方公分的 SIS 支架置於 500 微升的木瓜酵素 (Papain) 中，並加溫予以分解。取此溶液 40 微升與

1,9-Dimethylmethylene Blue (DMMB) 試劑 250 微升混合後，在 595 奈米波長下測其吸光度，經與標準溶液的吸光度比較，估計出原始溶液的硫化糖蛋白含量，再與原 SIS 支架的重量作校正求得其濃度。

c. 組織切片、染色及免疫組織化學染色：SIS 支架在經 10% 福馬林溶液固定後，做石蠟包埋及切片。細胞的分佈情形以 hematoxylin-eosin (HE) stain 加以檢視，Glycoaminoglycans 的生成及分佈情形則以 toluidine blue stain 檢驗。第二型膠原蛋白則以免疫組織化學染色方法檢測。

d. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

(RT-PCR)：培養細胞中的 RNA 經萃取後，以 RT-PCR 方法檢驗 β -actin、aggrecan、第一型及第二型膠原蛋白 (coll1a1、col2a1)、軟骨形成因子 SOX-9 等 messenger RNA 的存在，以證明培養細胞是否有製造這些重要的成分。

e. 西方墨點法 (Western Blot)：用以檢測 aggrecan、第一型及第二型膠原蛋白等重要的蛋白質產物。

D. 截至目前為止的研究成果

椎間盤軟骨細胞培養的結果 (包括 Nucleus Pulposus 與 Annulus

Fibrosus)

WST-1 檢測：所有於 SIS 支架中培養之細胞，在三個月的培養時間中可持續偵測出有代謝活性及增生能力表現。與控制組相比較時，實驗組的吸光度明顯較高，但差距的幅度以前兩個月較大，第三個月的差距則較為縮小。

DMMB 檢測：由於 SIS 支架本身即含有 Glycoaminoglycan，所以首先需檢測單純且未帶有細胞的 SIS 支架在各個時間點的 Glycoaminoglycan 含量。未經培養的 SIS 支架，每毫克乾重中含 Glycoaminoglycan 平均為 8.15 微克。由文獻中可知，支架中原本帶有的 Glycoaminoglycan 會慢慢釋放至培養基液中，而我們也發現培養四週後的 SIS 支架中，每毫克乾重含 Glycoaminoglycan 平均為 4.08 微克，培養八週後平均為 1.95 微克，培養十二週後為 1.80 微克，在控制組 SIS 支架中的 Glycoaminoglycan 釋放至培養基液的效應在培養八週後趨於穩定。

在培養有 Annulus Fibrosus 細胞的 SIS 支架中，培養四週後實驗組較控制組每毫克 SIS 乾重含 Glycoaminoglycan 平均高 0.278 微克，培養八週後平均高 2.036 微克，培養十二週後為 1.725 微克。而培養有 Nucleus Pulposus 細胞的 SIS 支架中，培養四週後實驗組較控制組每毫克 SIS 乾重含

Glycoaminoglycan 平均高 1.243 微克，培養八週後平均高 2.672 微克，培養十二週後為 1.673 微克。由以上數字可發現前八週培養細胞產生 Glycoaminoglycan 的效應十分明顯，而第八週至第十二週間含量下降應是新生成的 Glycoaminoglycan 持續釋放至培養基液所導致。

組織切片及染色：在 HE 染色中可以發現細胞聚落位於較濃密的細胞外基質之中，而這些細胞外基質因為較原屬於 SIS 支架的基質密實，可推斷為培養細胞所新生而成的。而這些濃密細胞外基質的成分，由 toluidine blue 染色顯示含有 Glycoaminoglycan 成分，由免疫組織染色中顯示有第二型膠原蛋白的存在。

RT-PCR：由培養有 Annulus Fibrosus 細胞的 SIS 支架中分離而得的 RNA 可以獲得對 β -actin、coll1a1、col2a1、SOX-9 等的陽性反應，但對 aggrecan 則均為陰性反應。由培養有 Nucleus Pulposus 細胞的 SIS 支架中分離而得的 RNA 可以獲得對 β -actin、coll1a1、col2a1、SOX-9 等的陽性反應，但對 aggrecan 僅在培養四週的部份檢體中得到有陽性反應，其他時間點的檢體則仍為陰性反應。

以上實驗以略有成績，並已在一些國際學會中發表（附錄

一)，相信不久將來會有論文發表。

人類間質幹細胞培養的結果

WST-1 檢測：在所有 SIS 支架中培養的人類間質幹細胞，雖然在三個月的培養時間中可持續偵測出有代謝活性及增生能力表現，但比起椎間盤軟骨細胞培養所得的吸光強度為弱。

DMMB 檢測：雖然培養有人類間質幹細胞的 SIS 支架確有產生新的 Glycoaminoglycan，但產量少於培養椎間盤軟骨細胞的 SIS 支架。

RT-PCR：由培養有人類間質幹細胞細胞的 SIS 支架中分離而得的 RNA 可以穩定地獲得對 β -actin 及 *coll1a1* 有陽性反應，但對 *col2a1* 有部份檢體有陽性反應，對 *aggrecan* 有部份檢體有微弱的陽性反應，但對 SOX-9 則均為陰性反應。

四、動物實驗

約翰霍普金斯大學的動物中心人力設備各方面均屬一流，專用的手術房、麻醉人員、獸醫師等等的先進配備，完全不是我親眼見到之前所可以想像的。但相對的，因制度的完善，對動物實驗設計的要求及人員的訓練與保護也非常嚴格，新

計畫的提出光文書往返就往往需要數個月的折衝。本人在 2003 年 3 月即著手實驗的設計與協助計畫的撰寫，但正式開始第一階段的大白兔實驗時已經是九月底了。

實驗設計

實驗的設計上，第一階段運用已知切開 Anulus Fibrosus 會造成一連串的椎間盤退化反應，再於進行同時植入 SIS 支架，以評估 SIS 對延緩椎間盤退化椎間盤退化的效果。第二階段在先製造一批椎間盤退化的實驗動物（以大白兔為主），在於第二次手術植入 SIS，以檢驗 SIS 對促進椎間盤組織再生的能力。

大白兔實驗

在實驗的初期，為尋求最適宜手術方式用以植入 SIS，我們嘗試了三種方法，最後選擇由後側方到達椎間盤的手術方法。為求實驗完整，在第一階段我們就手術了四、五十隻的大白兔。預計在手術後四週、八週、十二週針對手術動物作核磁共振檢查及組織染色。

在本人離開美國當時，僅得知手術後四週的部份實驗結果，由當時的資料所見尚未顯現出植入 SIS 的效用，結論仍須後

續八週及十二週的研究資料加以研判。

狒狒實驗的籌備

由於人類直立的特殊姿勢，運用實驗動物模擬椎間盤的受力模式下的反應確有其困難。如兔子、狗、羊、豬等四足類動物，其椎間盤的受力以剪力（Shear Force）為主，與人類椎間盤所受主要為壓力（Compression Force）大有不同。所以即使如狒狒的椎間盤受壓力也只有人類的百分之十，運用靈長類動物來做椎間盤的實驗仍是最理想的選擇。由於價格及照顧問題，在台灣從事此類實驗並不可能，即使在如約翰霍普金斯大學的美國一級研究機構也因國家法令與動物保護人士等因素也極少見。此次計畫由於資助公司之前有狒狒實驗的經驗，所以 SIS 的計畫中也包括使用狒狒的動物實驗。本人自二〇〇三年三月起即幫助擬定實驗計畫，但因審查過程繁複，直到本人十一月離美之前仍未正式開始。

心得：

由於本人在此之前的訓練多偏重於臨床醫學，對基礎研究的能力是在近兩年才緩慢累積的，雖曾參加許多實驗課程及訓練，卻未曾接受有系統且完整的實驗室操作技術訓練，因而有時在事後才發現某些地方可以再完美一點。

而這次有機會在世界一流的研究機構實驗室中學習一年，雖然因時間因素或許未能完成一個完整的研究計畫，但在指導教授的引領之下，對從事研究的諸多方面都有了更進一步的認識。

此外，由於椎間盤的組織工程研究目前在全世界仍屬新興的研究領域，經由與一流研究機構的合作經驗，以及經由參與並發表此計畫的機會增加於國際的可見度，因此這次的進修可算是頗有成果。

建議：

由於我們算是已經選擇了正確的研究方向並且以站在研究風潮的前端，因此如何確定並擴大在此一領域的研究成績就是接下來的課題。

本人近兩年已陸續進行椎間盤組織工程研究的基礎建設工作，經由台大醫院骨科部及台灣大學醫學工程研究所兩方面的合作，目前我們已解決椎間盤細胞初級培養的困難，並以初步成功地將此類細胞培養於一些合成材料上，接由此次本人於進修中學習的評估方法，相信可以得到更強而有力的結論。

下一步我們將找尋更合適的材料，方便實際臨床手術時的使用，這一點需要生物醫學材料專家的幫助。而臨床試驗之前的動物實驗，特別是大型動物如豬或羊，也需要有專門機關的合作。以上種種更是少不了需要經費以及人力上的支援。

附錄一：

國際學會發表記錄

1. Small intestine submucosa as a potential bioscaffold for intervertebral disc regeneration. Annual fall meeting, Biomedical Engineering Society, Nashville, TN, USA, Oct 2003.
2. Small intestine submucosa serves as a bioscaffold for culturing human intervertebral disc cells and producing extracellular matrix. North Region Conference, Asia Pacific Orthopaedic Association, Taipei, Taiwan, Dec 2003.
3. Small intestine submucosa as a potential bioscaffold for intervertebral disc regeneration. Annual meeting, Tissue Engineering Society International, Orlando, FL, USA, Dec 2003.
4. Also accepted for presentation at other upcoming conferences include Japanese Orthopaedic Association (Kobe, Japan, May 2004), International Society on Lumbar Spine Study, North American Spine Society.