

出國報告(出國類別：[進修](#))

## 赴美國杜克大學分子生物研究中心- 模擬肌肉運動對於軟骨細胞的影響

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：[陳玉秀](#)

派赴國家：[美國](#)

出國期間：[106](#)年9月1日至[106](#)年12月3日

報告日期：[106](#)年12月15日

## 摘要

退化性關節炎是臨床上很常見的疾病，隨著年紀增長盛行率提高，也與關節受傷有很大的相關。目前的治療主要是偏重於症狀減輕藥物治療，如後續影響生活行動進而需關節置換手術。運動為退化性關節炎主要核心治療之一，主要認為是藉由運動增加肌肉強韌度因而使關節的穩定性增加。於分子生物層面，肌肉運動時分泌的激素，對改善發炎及增進軟骨新生部分還甚少了解。此次研究主題為模擬肌肉運動時對軟骨細胞的影響 目標 1,分析不同電刺激肌肉模擬不同運動強度之下所產生之激素, 了解運動分泌增加。目標 2，建立 3D 軟骨細胞系統,將模擬運動之物質加入所建立之 3D 軟骨細胞系統，探討其所造成之影響。屆由此研究我們能幫助我們更了解肌肉與關節之間的互動模式，也對預防及治療退化性關節炎有所幫助。於軍陣醫學上，國軍人員常因高強度的運動常導致關節的磨損或受傷而引發退化性關節炎，導致戰力受損。因此透過肌肉關節模板的建立與研究，了解相關肌肉復健對關節發炎及軟骨新生的影響，進而守護國軍官兵健康以維護國軍戰力，並進行跨國之臨床與基礎研究合作。

關鍵字:退化性關節炎、運動

封面 第**1**頁

摘要 第**2**頁

目次 第**3**頁

本文 第**4**頁

目的 第**4**頁

過程 第 **4** 頁至第 **9**頁

心得 第 **9** 頁至第 **11**頁

建議事項 第**11** 頁

# 壹、目的

隨著臺灣步上高齡化社會,退化性關節炎的盛行率越來越高,目前於發炎性關節炎的部分包含類風濕性關節炎,僵直性脊椎炎,在藥物有快速的進展,但是在退化性關節炎的預防治療上卻仍未能有所突破,透過此次的國外短期交流期能學習建立的退化性關節炎的疾病模式在研究上能有所突破

去年的臺灣風濕病年會有幸遇到杜克大學知名教授 Virginia Kraus,為退化性關節炎領域之翹楚,其研究從動物模式建立 臨床診斷指標開發到病理機轉之研究皆有包括,因此在獲知能夠有進修機會時就希望能夠與其合作且杜克大學醫學院為全美名列前茅之醫學大學,在臨床 教學研究上皆富有盛名,因此在克服許多行政手續後,便前往美國進行為期三個月的短期進修

# 貳、過程

本次進修申請過程中,感謝科內陳主任、鄭部長、林院長與軍醫局長官的大力協助之下,才能在住院醫師訓期內有出國進修機會。很幸運的與杜克大學Virginia Kraus 聯絡後,受到教授的支持,在出發前即撰寫三個月的研究計畫書並投稿 Osteoarthritis Research Society International (OARSI)國際骨關節研究協會獲選 Dick Heinegard award.

## 學習概況

此次進修期間為期3個月,進修單位為杜克大學的分子生理研究中心(Duke Molecular Physiology Institute, DMPI), 主要在Virginia Kraus 老師的實驗室, Virginia 教授除了從事研究工作之外也是一名臨床的風濕科醫師, 其實驗室有兩名來自台灣的博士後研究員及兩位技術員,時間分配上除了實驗進行的部份也抽空參加相關研討會。 此次實驗的部分可針對三個部分進行,包含分析肌肉分泌的激素內含物,建立3D細胞培養模型,進而將受刺激後的肌肉分泌培養液加入3D軟骨細胞模型,後需分析細胞之基因表現是否有改變. 在這三個月內習得了許多實驗技巧,包含cell culture, ELISA, RNA extraction, real-time PCR,但學習最多的是關於對研究的態度,如何收集資料,如何在得到非預期結果時反思實驗的步驟找尋錯誤,也體驗到研究人員的辛苦及實驗的倫理道德,隨著時間的推移研究進度不如預期時仍然誠實面對錯誤回報結果

## 行程表

<b>1<sup>st</sup>- 4<sup>th</sup> week</b>	Analysis muscle conditioned medium: myokine IL-6, myostatin, Irisin, Met-like protein, mi-RNA analysis
<b>5<sup>th</sup> -10<sup>th</sup> week</b>	Primary culture chondrocyte cell and Build 3D alginate chondrocyte model and add conditioned media
<b>10<sup>th</sup> -11<sup>th</sup> week</b>	Perform molecular analyses of 3 D alginate chondrocyte model culture with different muscle media.
<b>12<sup>th</sup> week</b>	Statistical analysis and summary and presentation of results.



# 研究計畫及結果概述

## 題目

模擬肌肉運動對於軟骨細胞的影響

## 目的

關節由骨頭,肌肉,軟骨,韌帶組成.肌肉收縮分泌的激素有調節內分泌外分泌的作用,運動是退化性關節炎的核心治療之一,而運動所分泌的激素認為有全身及局部抗發炎的效果.我們認為模擬運動的肌肉所分泌的激素對軟骨細胞有抗發炎的效果,在這次研究我們把肌肉分泌激素（有電刺激或無電刺激）加入3D alginate 軟骨細胞培養,之後分析其基因表現有無變化.

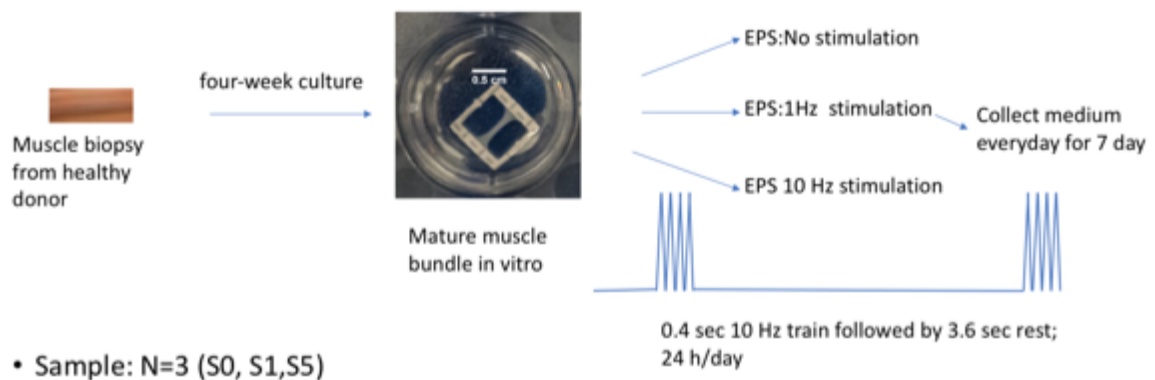
## 方法

經過人體審議委員會同意由健康受試者捐贈肌肉,經體外培養成熟,對電刺激反應可收縮肌肉,接受三種不同的電刺激模擬不同的運動情況 1.未刺激 2.1HZ 電刺激（模擬低強度運動）3.10 HZ電刺激（模擬高強度運動）三組每日接收取其培養液,持續共7日.

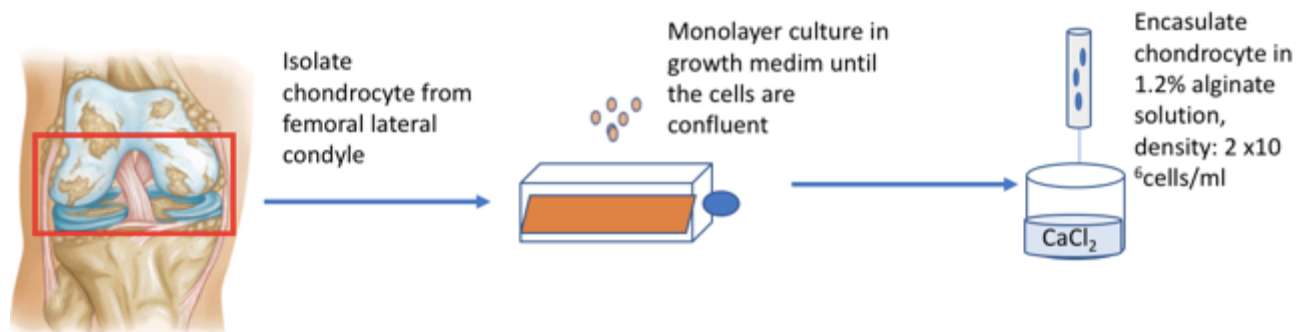
軟骨細胞由退化性關節炎接受膝關節置換術後所得的手術檢體取得,收取股骨外髌相對正常之軟骨處.軟骨細胞經由培養後到達足夠數量（P 1-P4,  $2 \times 10^6$

cells/ml) 加入1.2% alginate,滴入氯化鈣容易後形成珠狀立體結構,在軟骨細胞培養液中培養3-7日不等,加入經刺激後的培養液培養48小時,之後由軟骨細胞後萃取RNA, 藉由real time PCR方法去定量軟骨細胞基因MMP13, ADAMTS4, ADAMTS5, COL2A1, COL10A1 and ACAN and YWHAZ (housekeeping control).

## Microphysiological system--Muscle tissue

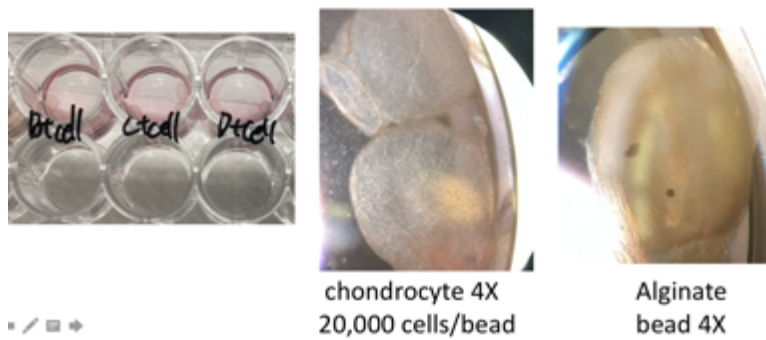


## 軟骨細胞3D模型





## 3D alginate bead culture system



## 結果

相較於未受刺激的肌肉培養液,接受有受刺激肌肉培養液的軟骨細胞其ACAN, ADAMTS5跟MMP13基因表現減少,而相較於1HZ刺激的肌肉培養液,暴露於10HZ刺激肌肉培養液的軟骨細胞在collagen II 跟collagen X都有顯著增加

## 結論

我們的研究顯示模擬運動受刺激肌肉所分泌的激素可以減少發炎反應而高頻率刺激相對於較低頻率的刺激肌肉可以有促進軟骨新生的作用

Figure 1. Gene expression of chondrocytes in 3D alginate bead culture in response to exposure to muscle conditioned media (CM).

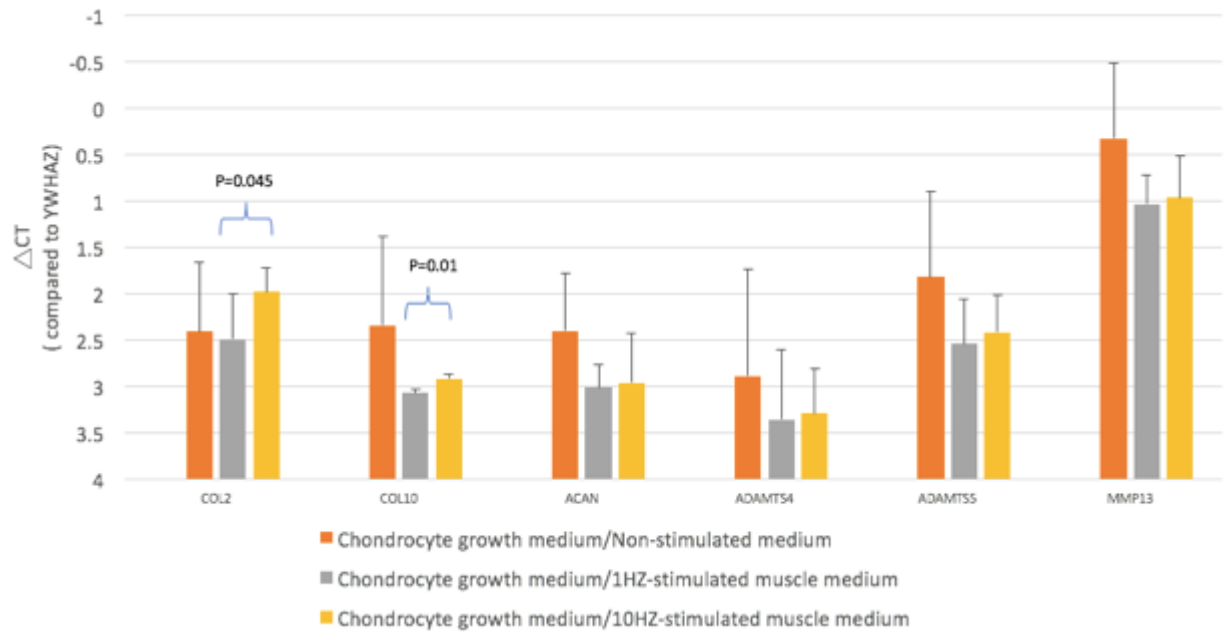


Table 1. Chondrocyte gene expression in response to muscle conditioned media (CM).

Gene	Chondrocyte gene expression (fold change in stimulated vs non-stimulated muscle CM)	P value	Chondrocyte gene expression (fold change in 10 Hz vs 1 Hz stimulated muscle CM)	P value
COL2	1.13	0.396	1.42	0.045
COL10	0.64	0.173	1.12	0.010
ACAN	0.67	0.086	1.04	0.387
ADAMTS4	0.74	0.283	1.04	0.442
ADAMTS5	0.63	0.081	1.09	0.210
MMP13	0.63	0.111	1.05	0.259

此結果已投稿 2018 OARSI 年會

## 叁、心得及建議事項

非常感謝師長們的許多協助,讓我能住院醫師訓練期間有機會短暫造訪世界知名的學府。對我而言,出國這一趟雖然只有三個月但卻讓我有了解很多不一樣的想  
法跟思維

### 不一樣的教育方式

這三個月我體驗到了不一樣的教育方式,我過去並沒有做過實驗,但老師給予我自由發揮的空間及極度的信任,讓我自己設計實驗,從看文章到買實驗需要的物品,看懂實驗方法.當然一開始的時候做得並不順利,細胞污染,real time PCR做的不精確,看著別人的文長卻完全做不出一樣的結果,但完全沒有被責怪,會一起檢討為什麼做不好,找出解決的方法,而且老師會看到做得好的部分而給予鼓勵,因此更努力的想要做好.而且激起我對研究的更大興趣,因此我深刻的檢討自己過去在教導學生時的方法,期許自己未來也能如此的啟發學生

### 結交不同領域的人

此次在杜克大學的研究計畫除了Virginia老師的實驗室外,其中很大的一個部分是與杜克大學的組織工程系所合作, Dr Nanaad的實驗室是第一個成功體外培養人類肌肉的實驗室,與他們的合作才使得此次的研究得以進行,此研究計畫運動肌肉對於關節軟骨影響.讓我體會到與不同實驗室或不同臨床單位彼此間的交流與討論。透過不同專業的討論,更有機會能看到新的問題並解決困難的事情。因此我

學習到應多多與不同領域的人交流,或者定期參加國際性會議,認識一些有共同興趣的朋友,假若大家對某議題能有共同的興趣,放開心胸,彼此合作或許會是一個很棒的方法。

## 沈澱思考人生

在這次出國之前還在住院醫師訓練期間的我,每週的工作時間甚長,除了臨床工作還要負責行政業務,內容又多又雜,醫院持續的要求研究論文的發表,自我進修的學習,很少有機會能思考對於研究 人生的想法,我還記得第一次遇到Kraus老師時她問我對於人生的規劃,當時我沒有太多的想法,然而,這三個月,隻身前往美國卻讓我有這個機會。白天認真的做實驗,專心的分析資料,去尋找問題的答案.晚上回到公寓的時間沒有其他的事情打擾,確實地得到了休息,保有自己的時間,與自己對話。

## 建議事項:

1. 此次研究主題為基礎研究藉由體外的電刺激模擬運動肌肉所分泌物質直接加到軟骨細胞上去探討是否改善發炎情況,臨床上可在本科退化性關節炎病人給予運動治療前後觀察其血中肌肉激素之變化.
2. 此次建立之3D軟骨模型可配合使用本院研發之小分子藥物CF02檢視其效果.

3. 後續3D模型建立之材料可在後續改進,配合本院3D列印提供未來軟骨新生置換之目標.