

國立交通大學

機械工程研究所

碩士論文

以高靜水壓刺激部分經酵素分解的軟骨組織塊生長

之體外研究



Stimulation of Neocartilage Formation for Culturing
Partially Digested Cartilage Tissue Fragments under
High Hydro static Pressure
in Vitro

研究生：許克群

指導教授：陳大潘 教授

中華民國九十三年七月

以高靜水壓刺激部分經酵素分解的軟骨組織塊生長之體外研究

Stimulation of Neocartilage Formation for Culturing Partially

Digested Cartilage Tissue Fragments under High Hydrostatic Pressure

in Vitro

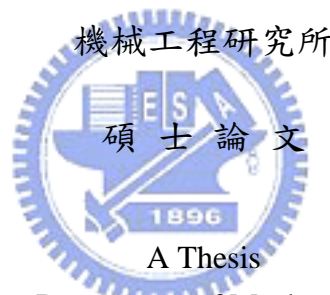
研究生：許克群

Student : Ko-Chun Hsu

指導教授：陳大潘

Advisor : Da-Pan Chen

國立交通大學



Submitted to Department of Mechanical Engineering

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Science

in

Mechanical Engineering

July 2004

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十三年七月

以高靜水壓刺激部分經酵素分解的軟骨組織塊生長之體外研究

研究生:許克群

指導教授: 陳大潘 博士

國立交通大學
機械工程研究所

摘要

在關節軟骨中，軟骨細胞係被一層細胞外間質所包圍，該細胞外間質包括有水，可溶性成分以及不可溶性之聚合物。靜水壓力是已知能影響關節軟骨之發展，成熟與衰退的物理性刺激之一。先前的動物或組織工程研究都顯示隨時間變化的動態靜水壓力負荷可以促進細胞外間質的合成與衰退，其主要參數包括壓力值，頻率，培養期間與三維環境培養。在本研究中，一種新型的靜水壓力生物反應器被設計來培養經部分酵素分解之軟骨組織塊。

在酵素分解的過程中，傳統方法是使用手術刀片將組織試片在培養皿上切碎，緊接著再將組織碎塊置於酵素中分解，並實際應用於細胞培養。然而此一過程是相當容易受到污染且難以收集的。在本研究中成功地發明了一個器械能將切碎，過篩及收集在一個密閉的系統內操作完成。此外，由於切碎機能切碎組織試片卻不損傷細胞本身，故可實際應用於組織工程的細胞培養中。

在經過靜水壓力培養兩週後，在完全未經酵素分解與部分經酵素分解的軟骨組織塊其細胞能成長並穩定地分泌細胞外間質，其中包括了GAGs與第二型膠原蛋白。總結來說，經過新型靜水壓力生物反應器培養的組織型態的確更為接近天然軟骨。

Stimulation of Neocartilage Formation for Culturing Partially Digested Cartilage Tissue Fragments under High Hydro static Pressure in Vitro

Student::Ko-Chun Hsu

Advisor:Da-Pan Chen

Department of Mechanical Engineering
National Chiao Tung University

Abstract

In Articular cartilage, chondrocytes are embedded in an extracellular matrix composed of water, soluble constituents, and insoluble polymers. The physical stimulation of hydrostatic pressure is known to influence the development, maturation, and degeneration of cartilage. Previous animal and tissue explant studies have shown that time-varying dynamic tissue loading can increase the synthesis and deposition of matrix molecules in an amplitude, frequency, duration and three-dimensional culture. In this study, a novel hydrostatic pressure bioreactor system was designed for culture partially digested cartilage tissue fragments.

In conventional culture preparation, a tissue piece is cut in a culture dish by scalpel blade, soaked in protease enzyme to separate cells from cytoplasm, and applied to a culture experiment. When cut by scalpel blade, however, the tissue piece is easily polluted and difficult to collect. The present invention successively cuts, filters, and collects finally the homogenized tissue pieces in a sealed device. As well, because the present invention homogenizes the tissue piece by cutting, histiocytes are undamaged and can be applied in live histiocyte culture.

Our result demonstrate that this hydrostatic bioreactor system enables chondrocytes under hydrostatic pressure after 2 weeks to grow and secrete extracellular matrix comprised GAGs and type II collagen steadily. In summary, the morphologies of many cells stimulated by hydrostatic pressure were similar to the chondrocytes in normal cartilage.

誌謝

在兩年的研究所生涯中，首先需要感謝得是指導教授陳大潘博士的叮嚀與指導，讓我在專業領域上拓展更寬廣的道路。此外工研院生醫中心廖俊仁博士、蔡承致博士以及玉如學姐、淑芳學姐、永志學長、義鈞學長的細心指導與在實驗上的幫助，使我無論在理論的基礎、實驗技術、簡報技巧與人際相處上均有非常大的助益。在此向以上諸位老師與前輩致上由衷地謝意。

另外要感謝得是實驗室的好夥伴，徐華均學長在機械設技與實作上充份地幫助，益臻與世峰帶給我多采多姿的研究生活，學弟雨軒、克維在實驗與生活上的幫忙。



還要感謝我的父母栽培與養育之恩，給我一個良好的生長環境，讓我能無優無慮的學習。最後還要感謝榆嵐，因為她的細心排版使我的論文能順利完成，也讓我在研究所的最後的半年過得十分愉快與難忘。僅以此論文獻給我的朋友與家人，願各位平安喜樂。

目錄

內容	頁數
摘要	I
誌謝	III
目錄	VI
圖索引	VII
表索引	IX

第一章 簡介

1-1 組織工程

1-2 關節軟骨

1-3 軟骨損傷

1-4 軟骨組織工程

1-5 靜水壓力刺激軟骨組織

1-6 研究目的

第二章 機械設計

2-1 靜水壓力生物反應器



2-1-1	品質機能展開法	16
2-1-2	功能需求	17
2-1-3	設計規格表	18
2-1-4	概念設計	19
2-1-5	概念評估	23
2-2	組織切碎機	27
2-2-1	設計目的	27
2-2-2	設計原理與技術手段	28
2-2-3	實施方式	28
		
	第三章 材料與方法	32
3-1	組織切碎機之效能評估	32
3-2	多孔隙中空載體製備	33
3-2-1	多孔隙 PLGA 支架	33
3-2-2	多孔隙中空載體	34
3-3	組織培養	35
3-3-1	組織分離	35
3-3-2	酵素分解軟骨組織兩前置培養	38
3-3-3	動態與靜態培養	41

3-4 病理切片染色	43
3-4-1 Hematoxylin-eosin 染色	43
3-4-2 SafraninO 染色	44
3-4-3 第二型膠原蛋白染色	45
第四章 結果與討論	48
4-1 組織切碎機效能評估	48
4-2 病理切片染色結果	49
4-2-1 未經酵素分解軟骨組織塊之結果	49
4-2-2 部分經酵素分解軟骨組織塊之結果	52
4-2-3 完全經酵素分解軟骨組織塊之結果	55
第五章 結論	59
參考文獻	61

圖索引

圖	頁數
圖 1-1 馬賽克法	5
圖 1-2 關節軟骨下之硬骨組織鑽孔法	5
圖 1-3 組織工程法	7
圖 1-4 研究組織架構圖	15
圖 2-1 直接加壓式靜水壓力生物反應器	21
圖 2-2 幫浦加壓式靜水壓力生物反應器	22
圖 2-3 氣體壓力型靜水壓力生物反應器	24
圖 2-4 組織切碎機之實體攝影	30
圖 2-5 組織切碎機之操作示意圖	31
圖 3-1 PLGA 多孔隙中空載體實體攝影	35
圖 3-2 使用無菌組織剪和手術刀將膝關節囊打開	36
圖 3-3 使用手術刀將軟骨層切削置培養皿中	37
圖 3-4 將關節軟骨削切為 1.0-0.5mm 大小	37
圖 3-5 多孔隙中空載體	40
圖 3-6 利用無菌組織剪填充軟骨組織進入多孔隙中空載體	40

圖 3-7 填充滿軟骨組織塊之多孔隙中空載體	41
圖 3-8 半灌流培養系統	42
圖 4-1 效率評估結果方塊圖	49
圖 4-2 未經酵素分解之軟骨組織塊 H&E 染色	50
圖 4-3 未經酵素分解之軟骨組織塊 SafraninO 染色	51
圖 4-4 未經酵素分解之軟骨組織塊第二型膠原蛋白染色	52
圖 4-5 部分經酵素分解之軟骨組織塊 H&E 染色	53
圖 4-6 部分經酵素分解之軟骨組織塊 SafraninO 染色	54
圖 4-7 部分經酵素分解之軟骨組織塊第二型膠原蛋白染色	55
圖 4-8 完全經酵素分解之軟骨組織塊 H&E 染色	56
圖 4-9 完全經酵素分解之軟骨組織塊 SafraninO 染色	57
圖 4-10 完全經酵素分解之軟骨組織塊第二型膠原蛋白染色	58

表索引

表	頁數
表 2-1 靜水壓力生物反應器的設計規格表	18
表 2-2 靜水壓力生物反應器之概念評估表	26
表 2-3 價值尺度表	26
表 3-1 經不同時間酵素分解組別	39
表 4-1 組織切碎機效能評估表	48



第一章 簡介

1-1 組織工程(Tissue Engineering)

"組織工程 (Tissue Engineering)" 名詞出現於1987 年美國科學基金會在華盛頓舉辦的生物工程小組會上提出其定義為 "利用生物醫學工程方法，去研究哺乳類動物組織的正常或病理的結構和功能關係，並設計開發及生產有活性和有功能組織，來替代、維持或增生人體組織結構缺損、功能喪失及衰竭的器官"。簡言之，就是人工製造具有活性及功能的組織取代人體中的病損組織，從而從根本上解決組織和器官病損或缺損所導致的功能障礙，或因此所喪失的治療問題。

而利用組織工程技術再造組織與器官，像蓋一棟房屋。首先必須建構該組織或器官的設計圖，按照要求製備能提供細胞生長的支架(scaffold)。然後，將自動物體內取得之部份組織細胞培養到一定數目後，種到在支架上，再搭配適當的訊號，如生長環境、物理刺激及生長因子，讓細胞逐漸隨支架長出組織或器官。組織工程所涵蓋的技術為包括生物醫學、材料、物理力學、細胞生物學、免疫學以及臨床醫學等，是一門跨領域的整合型新興生物科技。

1-2 關節軟骨(Articular Cartilage)

關節軟骨存在於關節中，其主要的功能在於分散關節軟骨下之硬骨組織(subchondral bone)所承受的負載，使該硬骨組織承受較小的應力及衝擊力，並提供潤滑作用以降低關節間的摩擦力。關節軟骨係由軟骨細胞(chondrocytes)，細胞外間質(extracellular matrix)與水(water)所組成。一般而言，成人軟骨中軟骨細胞所佔的比例通常僅1%-5%的體積，水則佔高達75%-80%，其餘的組成為細胞外間質。^[1]

由於關節軟骨特有的無血管(avascular)及無神經(aneural)的特性，軟骨細胞本身所需要的養份大多是由關節滑液(synovial fluid)藉由擴散作用所提供。軟骨細胞有合成細胞外間質的功能，當細胞外間質有缺損時，軟骨細胞可加速其合成的能力(anabolism)，修補缺損的細胞外間質。軟骨細胞亦會製造蛋白溶解酶(matrix metalloproteinase, MMPs)，負責老化及破壞的細胞外間質之代謝工作(catabolism)。造成軟骨破壞的途徑有(1)當關節老化、外傷、炎性關節炎或免疫反應發生時，導致軟骨細胞釋放出蛋白溶解酶來分解細胞外間質，(2)軟骨細胞合成細胞外間質功能喪失，(3)膠原蛋白鬆弛，斷裂，(4)關節軟骨下之硬骨組織因外力或外傷而導致小骨折，這些原因都將造成軟骨破壞。此外，發炎細胞分泌的蛋白分解酶、第一或第六介白質(interleukin 1 or 6)，甲型腫瘤壞死素(tumor necrosis factor-A)或前列腺素(prostaglandins)等，會促進細胞外間質的破壞與代謝，加速關節的退化。^[3]

細胞外間質圍繞於軟骨細胞四週圍，其最主要的兩大成份是蛋白醣 (proteoglycan) 及膠原蛋白(collagen)，其中蛋白醣約佔 15%-30% 乾重，而二型膠原蛋白(collagen type II) 佔 50%-73% 乾重。膠原蛋白(collagen type I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI) 形成螺旋狀纖維，上層分佈在軟骨表面呈緊密水平走向，如同皮膚，具有保護作用，中間則無規則性散佈，可固定蛋白醣，下層則呈緻密的垂直走向，有穩定軟骨及承受來自上方自體之應力向下傳導的作用。大體而言，該螺旋狀纖維會編織成一網狀結構以提供關節軟骨本身之機械性質。其中關節軟骨中的膠原蛋白最主要為 II 型，約佔所有膠原蛋白的 90%-95%，為該螺旋狀纖維的主要結構，VI 型膠原蛋白功能為幫助細胞與細胞外間質結合，IX 型膠原蛋白可能與該網狀結構與蛋白醣的結合有關，但實際功能仍然不清楚，X 型膠原蛋白與組織礦化有關，XI 型膠原蛋白之功能仍不明確。^[4]

蛋白醣是由多種葡萄糖胺聚醣(glycosaminoglycans, GAGs)組成，主要接枝於由膠原蛋白組成之網狀結構上，並藉由透明質酸(hyaluronic acid)聚合成 proteoglycan aggregate。Proteoglycan aggregate 的形成可能是為了將各分散的蛋白醣束縛起來，防止一些蛋白溶解酶的破壞及加強對抗壓力時的強度。蛋白醣的主要功能在於保持組織內的水份以吸收外力衝擊對軟骨細胞的傷害，另外，蛋白醣也有維持組織內電解質恆定的功能，這是因為蛋白醣帶有大量的負電荷，可以吸引正電荷

離子並排斥負電荷離子。具體而言，細胞外間質有保護軟骨細胞的功能，使軟骨細胞不易受到傷害。^[5]

1-3 軟骨損傷(Cartilage Defect)

軟骨損傷(cartilage defect)可分為兩種，分別為受傷(injury)與衰老(decrepit)。軟骨受傷對運動員是相當普遍的傷害，而隨著醫藥的進步，人壽命越來越長，軟骨組織衰老所造成的傷害也越來越普遍。然而，由於軟骨組織是無血管(avascular)及無神經(aneural)的組織^[2]，故一旦受損後是難以靠自體力量增生修復以及察覺，待人感到痛苦時往往已經傷害到關節軟骨下之硬骨組織(subchondral bone)。



目前針對軟骨損傷的治療法主要有自體/異體移殖法、關節軟骨下之硬骨組織鑽孔法(subchondral drilling)^[6]、人工全關節置換術(total joint replacement)^[7]與組織工程(tissue engineering)^{[8], [9]}。自體移殖法通常採用馬賽克法(mosaic plasty)^{[10][12]}(參考圖 1-1)，此法為取下病患自體未受傷且較不受力的軟骨組織移殖至患處，然而由於人體中較不受力的軟骨組織相當有限，當損傷處過大時，自體軟骨組織將不敷使用。而異體移殖方面，由於免疫排斥問題過太，目前在臨床上使用的比率低。



圖1-1馬賽克法(mosaic plasty) 將非受力部位的軟骨組織移植到受力缺損處^[12]

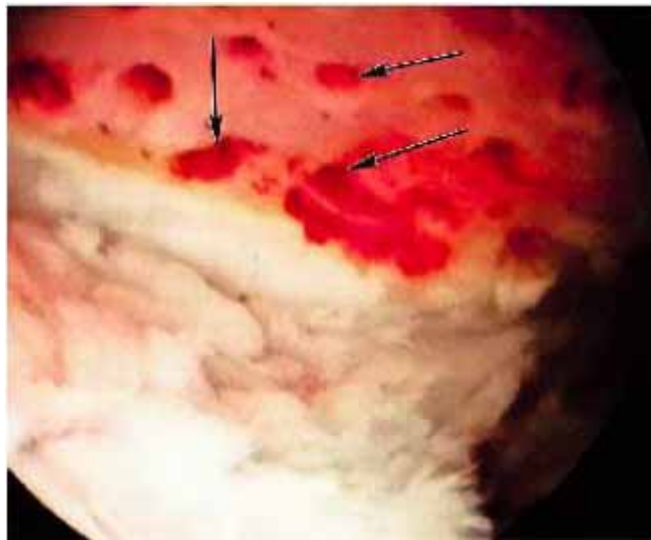


圖1-2 subchondral drilling 示意圖。圖中箭頭所指為鑽孔的位置，血液流出伴隨著間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells) ^[13]。

除了以移植的方式治療，目前亦有使用外科手術的方法，關節軟骨下之硬骨組織鑽孔法係將損傷處附近鑽數個小洞貫穿至骨髓腔，使骨髓幹細胞可以流動至損傷處修補，然而此法所生成的新生軟骨往往是纖維軟骨(fibrocartilage)，纖維軟骨的機械性質

遠較原本生長於關節腔中的透明軟骨(hyaline cartilage)為差。^[13]

人工全關節置換術為治療關節軟骨損傷之最後不得已的治療方式，其係以人工關節取代原本受損傷的關節，該人工關節一般係以金屬或陶瓷製成，有一定的使用期限，大致上為十年至十五年必需更換一次，病患需再次面臨手術的痛苦，且因人工關節係緊密安裝於硬骨基座上，每次拆拔均將造成硬骨基座的損傷，甚至造成終身不良於行。

組織工程目前有實際應用於人體上的方法為 Genzyme Tissue Repair，此法係取一部份病人本身的軟骨組織，經過放大培養後打回利用骨膜縫補好的軟骨缺損，此法僅能減少病人的痛楚，並不能證實新生組織為原本的透明軟骨(參考圖 1-3)。



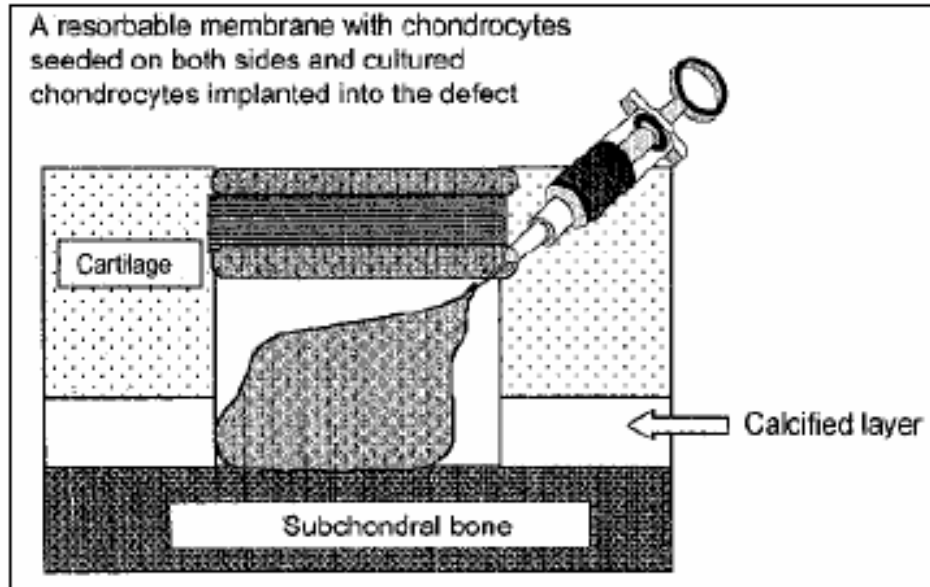
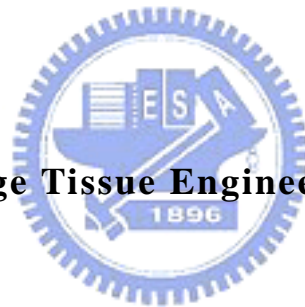


圖1-3 Genzyme Tissue Repair 示意圖。將體外培養的軟骨細胞注射移植回軟骨缺陷處，以修復軟骨缺損^[14]。



1-4 軟骨組織工程(Cartilage Tissue Engineering)

軟骨損傷通常是永久的，這是由於軟骨組織缺乏血管，沒有足夠的養份，幹細胞，生長因子來誘發復原反應。^[15]即使軟骨損害穿透硬骨層，骨髓流出帶出的骨髓幹細胞將生成纖維軟骨，然而纖維軟骨並沒辦法取代原有透明軟骨的功能，也因此需要一個人工的環境使軟骨再生。^[16]

軟骨細胞培養如同其它細胞一樣有幾個基本的要求，那就是有好的質量傳輸能力使足夠的養份傳送到個別細胞，個別細胞的代謝廢物可快速移除與其它參數包括氧氣分壓與PH值。改變這些參數將對軟骨細胞有不同的影響，如Obradovic的研究團隊發現

軟骨細胞在有氧的環境下將生成更多軟骨組織。^[17]

由於關節軟骨在體內的質量傳輸是依靠關節滑液(synovial fluid)的擴散作用，故在體外培養時，擴散作用仍然扮演相當重要的角色。在已知的研究中，以高細胞密度種到支架上對組織達到正確的功能是相當重要的^{[18][20]}。Toshimi Murata與其研究團隊發現使用高濃度的軟骨細胞種到支架上將會展現良好的細胞外間質，相對地使用低濃度的軟骨細胞則產生很少的細胞外間質包附在外面，並且大部份細胞喪失了細胞外間質，轉變成纖維化細胞(fibroblast-like cells)。^[21]



但很不幸地，高細胞密度卻阻礙了擴散作用，理想的生物反應器即使在高細胞密度的情況下應該可以送給個別細胞足夠的營養和帶走代謝物。Toshimi Murata與其研究團隊的實驗結果也顯示了良好的質量傳輸可以增加硫酸角質素(keratan sulfate proteoglycan)與軟骨素(chondroitin 4-sulfate proteoglycan)的分泌(註: 硫酸角質素與軟骨素均為蛋白醣的一種)。^[21]此外，Michael D. Buschmann與其研究團隊亦發現在同一個組織塊中質量傳輸速率較好的地方聚集素(aggrecan)明顯的增加。^[22]

此外體外的環境與體內是不同的，這是由於體內仍然有許多訊號來誘導細胞生長，分泌與分化，這些訊號包括物理性的刺激^[19]，^{[23][26]}，生長因子與環境因素。目前已知的物理性刺激包括靜水壓力、直接壓力、拉伸應力與剪應力，許多研究者已經注意到並試

圖找出何種力是對細胞培養是最有益的^{[27][30]}。

1-5 靜水壓力刺激軟骨組織(Hydrostatic Pressure Stimulation for cartilage)

由於人體關節不斷得運動，在體內關節軟骨細胞實際上是接受漸歇性的壓力，此壓力藉由關節液(synovial fluid)傳遞給細胞外間質(extracellular matrix)再刺激給軟骨細胞(chondrocytes)。由於細胞外間質含大量的液體，故軟骨細胞所承受的壓力實質上即為一種靜水壓力(hydrostatic pressure)。雖然實際上的機制仍然不清楚，目前可能的假設為軟骨組織中的蛋白醣(proteoglycan)帶有大量負電荷，可吸引大量的水進入細胞外間質，造成膠原蛋白(collagen)組成的網狀結構膨脹，此時外加靜水壓力將可幫助該網狀結構保持平衡。^[31]

藉由許多研究團隊的研究已知人體日常活動對關節軟骨所造成的間歇性壓力約7-10Mpa^{[32][33]}。也有一些研究者針對這種間歇性壓力設計實驗流程試圖製造高品質的組織工程軟骨^{[30][34][35]}。這些靜水壓力刺激的實驗方法大致分成兩種，一種是分段式流程，意即將培養與加壓分開完成^{[30][35][37]}。細胞大部份的時間保持在靜態培養基中培養，依照實驗所設計的時間移動至加壓容器內加壓。此法需要人員不斷的移出及移入，增加污染的危險。另一種相對於分段式的是單一半自動流程，此法將培養與加壓合併在一個流程中^{[28][38]}，減少人員操作以避免污染。此法多半加上灌流(perfusion)使質量傳輸通

暢，這將可以保持培養容器內營養豐富，代謝物順利排放，但此法目前遭遇到的主要問題在於加壓段無法保持灌流^[39]。

加壓期間的長短與壓力值是兩個被大多數研究者感興趣也研究得最深入的參數。例如，5Mpa的壓力以0.5Hz的頻率加壓20h會增加硫酸鹽基(sulfate)的合成，但若僅加壓1.5h卻會抑制硫酸鹽基的合成^[37](註：硫酸鹽基係蛋白醣內之成份)。頻率對靜水壓力刺激實驗是另一個重要的參數，目前有許多不同的加壓型態針對實驗靜水壓力對軟骨組織的影響，壓力從0.1-15Mpa、頻率從0.5-1Hz都有^{[27][30][35][36][37][38][40][41]}。而實驗的樣本亦有很多種，Smith與他的研究團隊將高密度的單層軟骨細胞利用壓力值10Mpa，頻率1Hz，每天加壓四小時可以觀察到65% GAGs合成量的增加^[35]，在另外一個實驗中同樣使用單層軟細胞也觀察到二型膠原蛋白(collagen type II)與聚集素(aggrecan)在mRNA信號上有意義的增加^[30]。Carver與Heath使用壓力值3.5Mpa，頻率5/15s(加壓/洩壓)，每四小時加壓20分鐘的方式加壓三維結構的軟骨細胞，也觀察到在蛋白醣(proteoglycan)濃度上顯著的提升。這些結果顯示了靜水壓力對軟骨細胞分泌功能的正確性有相當大的影響，而且不論是單層軟骨細胞或三維結構的軟骨細胞均受到靜水壓力的刺激^[27]。

固定壓力可能對軟骨細胞有正面或負面的影響，如果壓力在生理上可能達到的範圍內，則可以觀察到GAGs生成上有較小程度的增加。Smith與他的研究團隊對單層軟

骨細胞施加 10Mpa 的固定壓力四個小時發現在 GAGs 合成量增加了 32%^[35]。其它的研究團隊也發現了在生理上可能達到的壓力範圍內，固定壓力對軟骨細胞分泌細胞外間質有小程度的正面影響^{[42][43]}。當壓力值超過生理上可能達到的範圍的固定壓力將對軟骨細胞產生負面的影響，有研究者發現這種固定壓力將導致細胞外間質分泌減少，並且增加第六介白質(interleukin 6)與甲型腫瘤壞死素(tumor necrosis factor-A)的展現，加速骨關節炎(osteoarthritis)的發生^[31]。

並不是所有的研究結果都顯示靜水壓力將對細胞外間質的展現有正面的影響，Heath 和 Magari 使用 345Kpa，5/30 秒(開/關 壓力)持續加壓七週的靜水壓力形態發現較少的 GAGs 合成量^[38]。Carve 和 Heath 也發現了在 345Kpa 的壓力環境下加壓五週對膠原蛋白(collagen)的分泌並沒有顯著的影響。這些結果也許是被加壓週期的長短所控制，有研究指出加壓週期將會對軟骨細胞造成影響^{[38][39]}。Parkkinen 與他的研究團隊發現蛋白醣(proteoglycan)的合成在加壓二十小時後將增加 25%，但若少於二十個小時將會減少蛋白醣的合成^[43]。

此外，有些研究使用的加壓系統包括氣相與液相，在此系統中增加壓力值亦將導致溶解更多的氣體導致培養基內的氧分壓(Oxygen tension)與其它氣體分壓的提升。這種系統設計主要目的是方便研究者調整培養基內的氣體分壓，並藉此了解氣體分壓對細胞組織的影響。Clark 與其研究團隊發現降低氧分壓至 3-5% (正常為 21%) 將可增

加蛋白醣聚集(proteoglycan aggregation)。除了蛋白醣聚集，降低氧分壓亦可刺激二型膠原蛋白的分泌^{[36][38]}。Ute Hansena 與其研究團隊的研究報告也指出，降低氧分壓將會增強細胞增生能力以及二型與九型膠原蛋白的分泌，並且能抑制一型膠原蛋白的分泌，該一型膠原蛋白將會導致組織纖維化造成組織機械性質減弱^[36]。然而此系統目前遭遇到的困難點在於增加氧分壓的結果通常亦伴隨著二氧化碳分壓的上升，這是由於系統加壓所導致的氣體溶解率提升，而二氧化碳分壓的上升將會破壞培養基內原本酸鹼質的平衡。這些結果顯示了在體外靜水壓力的形態將對細胞外間質的分泌有不同的影響，模組化這些參數與流程以調控軟骨組織的功能展現是目前研究者最主要的目標。



綜合以上所述，在本節所回顧的論文中，若非僅僅發現許多影響軟骨組織的參數，而並沒有了解這些參數的最佳化，即是所採用的靜水壓力生物反應器並沒有辦法兼顧全部細胞所要的最佳性能，僅僅改善某一特定性能而另一項性能卻變差。因此在本研究中將使用一系列工程設計的方法來設計一個兼顧所有性能的靜水壓力生物反應器針對軟骨組織施加靜水壓力。

1-6 研究目的

本研究目的是利用組織工程的方法在體外培養出軟骨組織，以供軟骨修復所需。為了提供軟骨細胞一個穩定的生長環境，我們使用材料發展一個立體結構的多孔性支架

(porous scaffold)，並以靜水壓力模擬軟骨細胞生長的物理環境，以供細胞貼附生長，並使軟骨細胞增生並分泌出新的細胞外基質，因而長成了一新的軟骨組織。

本研究主要分三個部分進行，第一部份為機械設計，主要為使用一種工程設計的方法試圖設計一種新型態的靜水壓力生物反應器，該靜水壓力生物反應器可以兼顧 (1)質量傳輸、(2)不間斷的加壓程序、(3)無污染、(4)無毒性、(5)氣體分壓恆定、(6)減少人員操作以及(7)提供各種型態的壓力。

此外在本研究中另設計一套專門用以切碎組織之組織切碎機，該組織切碎裝置，可於密閉系統中，於連續的操作流程中將組織快速切碎、過篩及收集，利用此設備解決目前於初代培養組織時面臨之耗時費力、無法控制粒徑、易受污染及收集不易之組織切碎的問題。

第二部分為多孔隙中空載體製作，在本研究計畫擬使用一種新的體外培養方式，此法將不以軟骨細胞培養軟骨組織，而以軟骨組織來培養軟骨組織。前述之多孔隙中空載體係使用 PLGA 利用鹽洗髮製作而成，再利用器械裁切為適當大小之中空圓柱體而成。利用此多孔隙中空載體包含經不同時間酵素分解之軟骨組織在其中進行培養，目的在於使軟骨以組織形態在多孔性可分解載體中長出新生軟骨，突破以往以細胞形態培養組織的形式。

第三部分為組織培養，則將該包含不同時間酵素分解之軟骨組織的多孔隙中空載體，分別置於靜態培養與使用該新型靜水壓力生物反應器培養兩週，緊接著以不同的病理染色來評估經過靜水壓力刺激後的軟骨組織與未經過靜水壓力刺激之軟骨組織其型態上的差異。



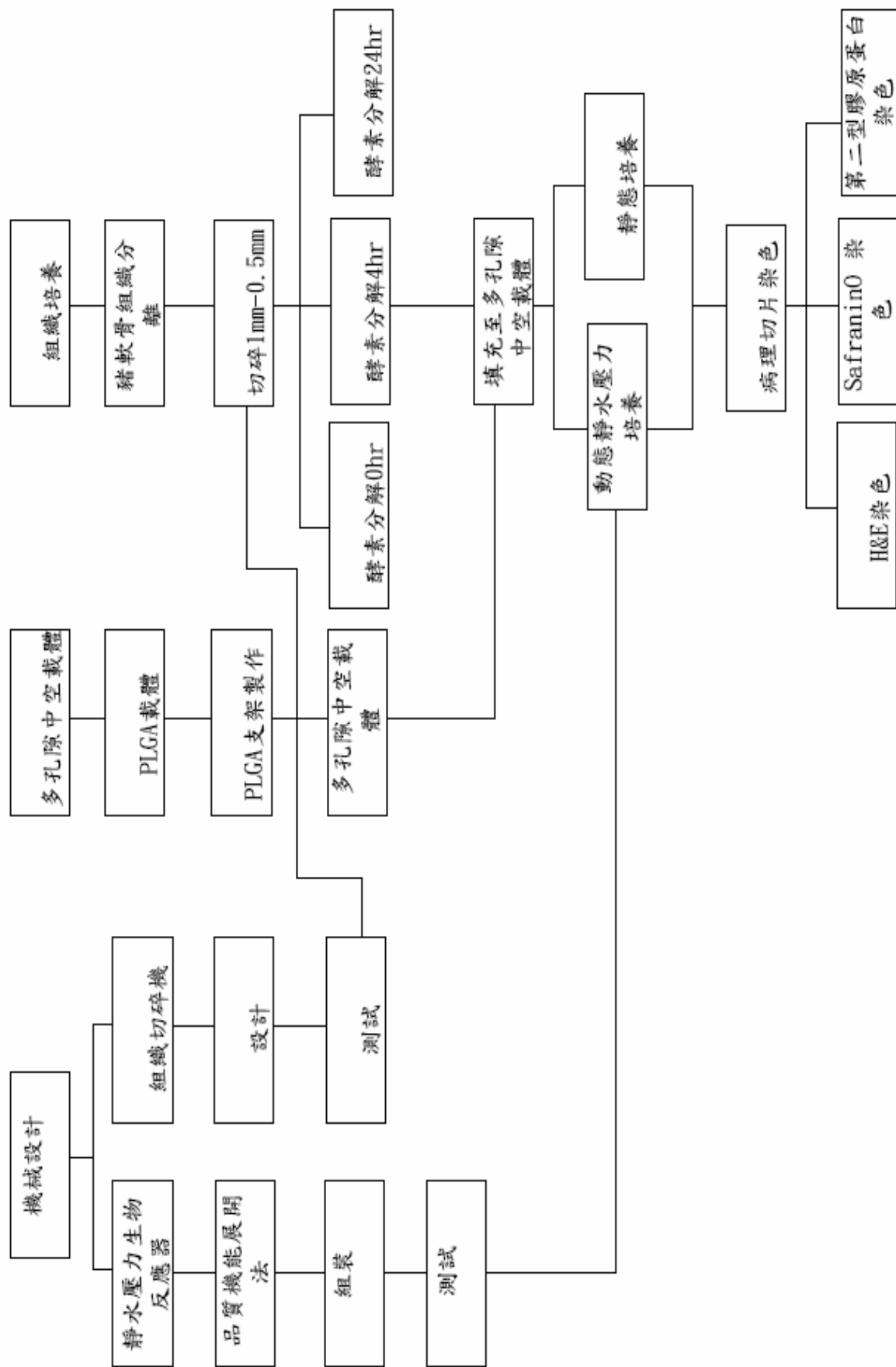


圖1-4 研究組織架構圖

第二章 機械設計

2-1 靜水壓力生物反應器

在本節中主要係使用一種工程設計的方法來設計新型之靜水壓力生物反應器，其主要目的在於提供軟骨組織靜水壓力的物理性刺激。

2-1-1 品質機能展開法(Quality Function Development QFD)



本章將會介紹在本實驗中所使用之靜水加壓生物反應器的設計流程，在這裡所採用的設計流程係為產品設計與專利突破常用的品質機能展開法(Quality Function Development QFD)，主要係參考 Paul 與 Beitz 所著的” Engineering Design”、Ullman 所著的” The Mechanical Design Process”。其設計流程如下所示：

- (1) 功能的確定。
- (2) 規格的訂定。
- (3) 問題本質確立。
- (4) 機械構造構築。

- (5) 設計原理探索。
- (6) 設計原理組合。
- (7) 限制條件評估。
- (8) 概念。

2-1-2 功能需求(Functional Requirement)

綜合以往的文獻資料整理得知，一個好的生物反應器必需具備以下數項功能，這也是我在設計靜水壓力生物反應器的基本功能需求(functional requirement)。

- (1) 乾淨無污染:這是生物反應器最基本的要求，若使用器材本身之潤滑劑、塗料或其它保養劑污染組織，組織塊將會受以上藥劑的影響。
- (2) 減少操作:人員操作是組織培養最大污染風險，要儘量避免。
- (3) 材料無生物毒性:將與組織塊接觸的材料，不論直接間接均需無生物毒性，並儘量選擇穩定不變性、不氧化的材料。
- (4) 良好的質量傳輸:請參考第一章，良好的質量傳輸對細胞功能的正確性有顯著的影響。

- (5) 不間斷的加壓程序:改進過往靜水壓力生物反應器分為加壓段與培養段的缺點。
- (6) 氣體分壓恆定:請參考第一章,氣體分壓的恆定將穩定培養基內的酸鹼質。
- (7) 提供各種壓力形態:其目的在於找到一組對軟骨組織分泌功能的正確性貢獻最大的壓力型態。

2-1-3 設計規格表(Specifications)

根據功能需求來決定較明確地設計規格表,在此步驟中需要特別注意的是當訂定規格表時,最好不要涉及構想以避免局限於某種設計,並需要考慮(1)競爭對手的優缺點、(2)技術現況、(3)法規、(4)潮流。表 2-1 為本次靜水壓力生物反應器的設計規格表。

需求(D) 期望(W)	說明
D	金屬材料使用 SUS316。
D	塑性材料從矽膠、鐵弗龍、或其它無生物毒性且耐有機溶劑腐蝕選擇。
D	整體結構無油、塗料。

D	質量傳輸速率達 0-10 ml/s 可調整解析度 0.1ml/s。
D	加壓值達 0-20Mpa 可調整解析度 1Mpa。
D	頻率值(開/關)達 1h/1h，可調整解析度 1s。
D	加壓期與培養期不分段。
D	加壓期可達 1Month，且不需人員直接操作培養 腔。
W	流速均質。
W	壓力均值。
W	低成本。
W	零件個數少。
W	操作簡單。
W	維修簡便。
W	校正容易。

表 2-1 靜水壓力生物反應器的設計規格表

2-1-4 概念設計(Concept Design)

根據以上的規格表，並蒐集可能的設計原理再將設計原理排列組合後，可以獲得可

能符合規格表所需的設計概念。一般設計者獲得概念的方法有(1)腦力激盪(Brain Storming)、(2)連想法(Synerics)、(3)擴大法(Enlarge the Search Space)。在本章中展示兩種在設計靜水壓力生物反應器時被提出的設計概念。

直接加壓式

請參考圖 2-1，本概念係使用一培養腔培養軟骨組織，一活塞頭在該培養腔上直接加壓培養腔中的培養基，使該培養基受壓產生靜水壓力以刺激軟骨組織。



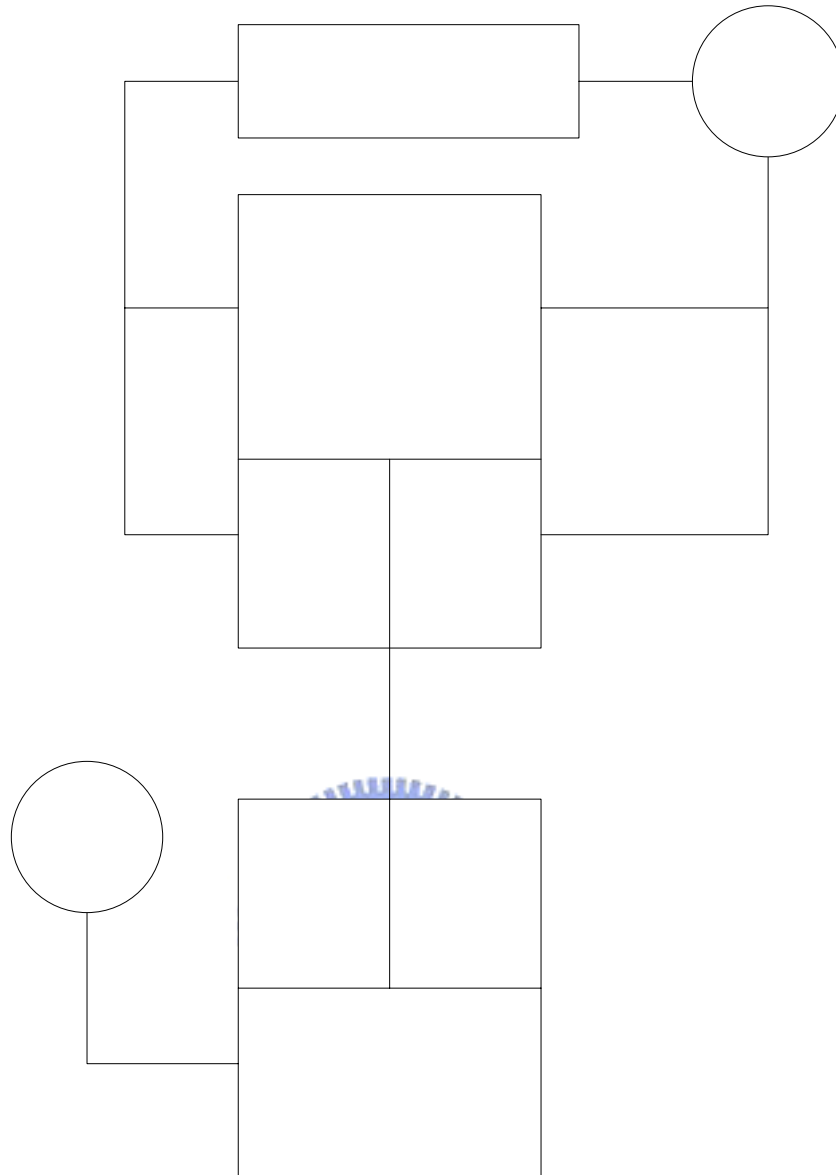


圖 2-1 直接加壓式靜水壓力生物反應器

幫浦加壓式

請參考圖 2-2，本概念係以一可控制流量之定量幫浦直接將培養基打入培養腔內以獲的靜水壓力，一培養腔內含培養基以培養軟骨組織，一背壓閥(back pressure regulator)藉由管件(pipe)連接至培養腔，該背壓閥係可控制培養腔內的壓力值，將多餘的流體洩出以維持循環，一定時開關閥接於培養腔外，該定時開關閥係可定時開關以

決定靜水壓力的頻率值。

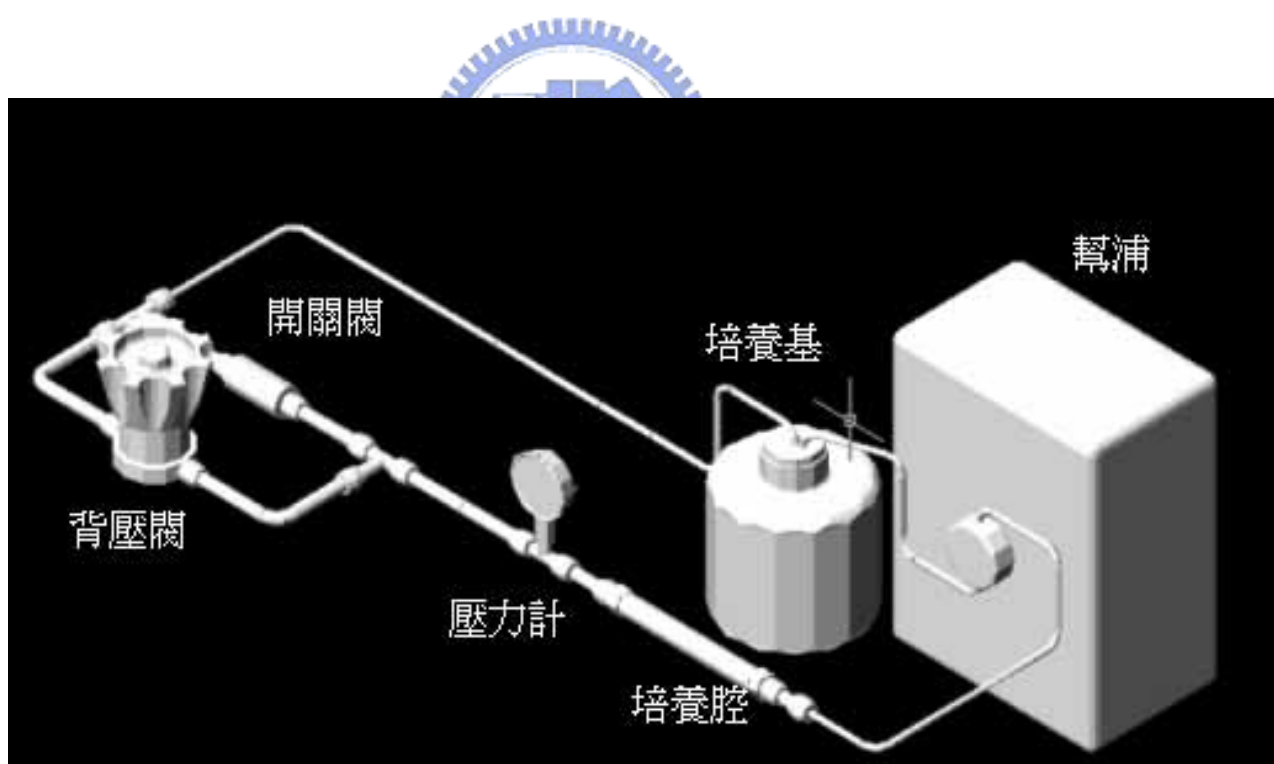


圖 2-2 幫浦加壓式靜水壓力生物反應器

2-1-5 概念評估(Conceptual Evaluation)

在概念設計階段可能提出的概念越多越好，不論該概念是否可行，是否符合要求，一切以多量為原則。在概念評估階段則將不適合的概念一一剔除，留下最適合解決問題的概念。在此階段需注意的是所使用的評估標準、評估項目比重、參數設定、價質尺度設定都將影響最後所決定採用之概念。在概念評估時係以現有的產品為基礎，將設計概念一項一項地分開與現有產品相比評分。表 2-2 即為本靜水壓力生物反應器之概念評估表，評估結果顯示幫浦加壓式在這次的設計的概念評估表中獲得較高的分數，這也表示幫浦加壓式這個概念在前述之規格需求下是比較適合於做為此次靜水壓力生物反應器的設計。在此所述之現有產品係指 Ute Hansen 於 2001 年所設計之氣體壓力型靜水壓力生物反應器(請參考圖 2-3)，該氣體壓力型靜水壓力生物反應器係以氣體間接加壓液體以獲得靜水壓力來刺激軟骨組織。評估結果為幫浦加壓式靜水壓力生物反應器較為適合先前所預定的設計規格表，此種生物反應器亦為本研究報告所採用之型式。

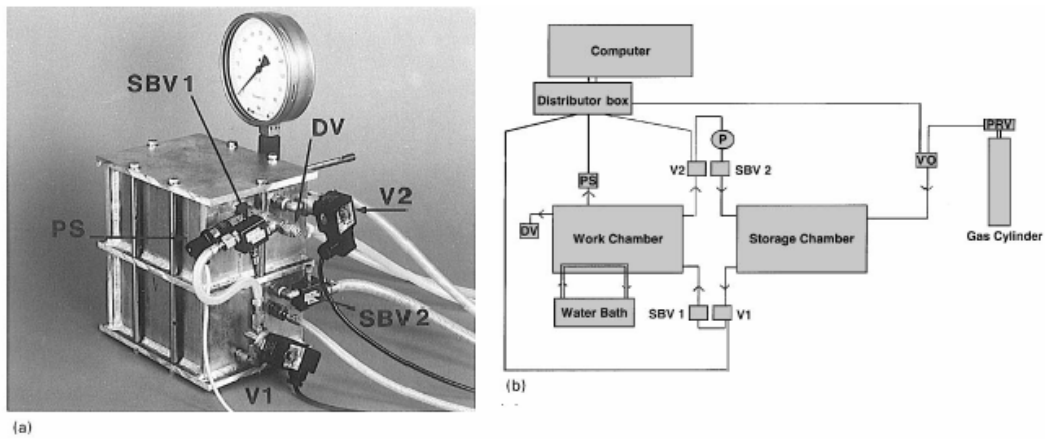


圖 2-3 Ute Hansen 所設計之氣體壓力型靜水壓力生物反應器

- (a) 氣體壓力型靜水壓力生物反應器外觀圖；
- (b) 氣體壓力型靜水壓力生物反應器設計方塊圖；

概念評估表

評估標準	權重	現有	直接	幫浦	說明
		產品	加壓式	加壓式	
材料可靠度	10%	-	0	0	三種均可使用 可靠度高材料。
污染可能性	10%	-	-1	0	直接加壓式因 活塞頻繁作動 可能產生污染。
人員操作	20%	-	0	2	幫浦加壓式因 不段循環故可

					不須更換培養基。
質量傳輸	20%	-	0	2	僅幫浦加壓式有循環功能。
加壓範圍	5%	-	2	2	氣體加壓可達壓力值遠低於液體加壓。
加壓頻率	5%	-	0	0	頻率係由控制器所決定。
加壓期與培養期不分段	10%	-	-1	0	直接加壓式需分段。
加壓期	5%	-	0	0	加壓期長短可控制。
培養基氣體分壓恆定	5%	-	2	2	氣體加壓式培養基內氣體分壓不恆定。
流速均值	5%	-	0	1	僅幫浦加壓式有循環功能。
壓力均值	5%	-	0	0	壓力均能在培

					養基內均值。
總分	100%	-	0.09	1.05	將價值尺度乘 上權重加總

表 2-2 靜水壓力生物反應器之概念評估表

註:

價值尺度表

評點	意義
-2	遠落後於目前產品
-1	較目前產品差
0	與目前產品同
1	較目前產品佳
2	遠勝於目前產品

表 2-3 價值尺度表

2-2 組織切碎機

2-2-1 設計目的

以往組織切碎技術，一般為以人工方式用手術刀於培養皿中切碎，再刮取切碎的組織過篩，再將粒徑過大的組織重新切過，反覆操作取得一定粒徑的組織碎塊，再刮取切碎的組織再過篩進入離心管收集利用。目前有數種機械的裝置已被開發，用以加速切碎組織的速度，其主要方法有超音波顆粒粉碎法(US 4,874,137)、液態氮粉碎法(US 4,509,695) 或機械力搗磨粉碎法(US 5,829,696;US 5,533,683;US 4,828,395;US 4,509,695;)等方法。以機械力搗磨粉碎法為例，該方法係以一粉碎棒緊密配合一粉碎表面，該粉碎棒外接一機械轉動裝置，以機械力轉動粉碎棒搗磨粉碎。其利用機械力搗磨粉碎組織時，需要人力上下移動，所研碎的組織亦遭受拉扯變形破碎，導致內含的細胞遭受傷害，降低細胞之可利用率，此外，機械力搗磨粉碎法由於粉碎棒與粉碎表面緊密的配合，故粉碎試片易於自小孔隙中向上噴濺，該噴濺將造成人員污染、環境污染、試片交叉污染及粉碎不完全等缺失，導致操作效率低落。機械力搗磨粉碎法另一個令人感到不便之處，在於缺乏篩選裝置。以往的機械力搗磨粉碎法是利用操作者的觀察來決定粉碎試片的程度，故容器的透明度與操作者的施行經驗將影響著粉碎試片的品質。

目前，已知的組織切碎技藝係僅限一或兩項功能，如僅能以粉碎棒與粉碎表面的緊

密接觸以搗磨的方式粉碎試片，該試片的受力面積不能縮小以避免試片損傷，或已知的技藝需以操作者的觀察來決定試片粉碎程度，不能自動地篩選適合尺寸的試片。此外，已知的技藝需以操作者的上下操作來避免粉碎試片噴濺所造成的粉碎不全。因此，一個操作成本低，體積小，能避免污染及試片損傷，自動篩選試片與徹底避免試片噴濺的密閉式切碎機設計有實質之需求。

2-2-2 設計原理與技術手段

本組織切碎機使用時係以切碎裝置及篩選裝置置於一收集的容器中，此容器填充注滿液體，其切碎裝置之作用原理主要以機械轉軸帶動切碎刀頭，利用迴旋的切砍動作將限制於一定空間內的組織塊予以切碎，在這一限制組織塊的空間下方裝置一可過濾控制組織塊大小的篩選裝置，於此限制組織塊的空間上方有一流體入口可使流體引入，其開口上方設計一導流裝置與一推進流體裝置用以推動流體向下激流，該水流會灌注進此切碎組織塊的空間，將小於下方篩選裝置孔徑的組織塊衝激過篩，過篩後的組織塊則被收集在外圍收集樣品的容器中。如此，將可在快速連續的過程中，於封閉無外來污染源之連續的操作流程中完成切碎、過篩及收集功能。此裝置將可節省大量的人力、時間及獲取較高品質及效率之組織樣品。

2-2-3 實施方式

請參考圖 2-4 及圖 2-5，本組織切碎機係將待粉碎之軟骨塊置於上篩網 131 與下篩網 132 之間，以外加驅動裝置驅動傳動軸 121 帶動上篩網 131 與下篩網 132 間之刀具 123 將軟骨塊切碎。該傳動軸 121 另外也帶動一安裝於該傳動軸上之螺旋槳 122，該螺旋槳 122 帶動流體自流體入口 113 進入加速並由上篩網 132 噴射而出，該流體將推動已切碎之軟骨塊通過下篩網 132 孔目並得以收集在離心管 110 中，且該切碎之軟骨片的尺寸可藉由該下篩網孔目的尺寸而決定。





圖 2-4 組織切碎機之實體攝影



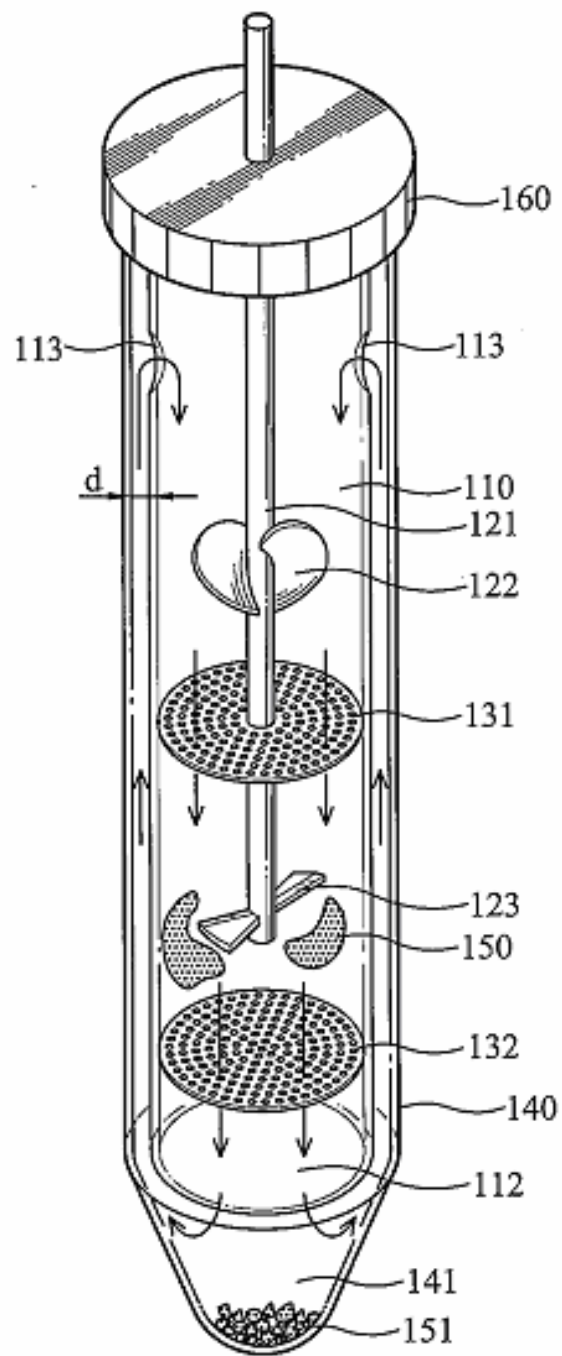


圖 2-5 組織切碎機之操作示意圖

第三章 材料與方法

3-1 組織切碎機之效能評估

本實驗目的在於評估在第二章所提示之組織切碎機之效能，由於組織分離所能獲取的組織塊通常數量都非常少，故切碎不完全或人工切碎器械所造成的損耗往往是十分重大的問題，而前述之組織切碎機亦針對減少切碎過程所造成之損耗而設計。

實驗步驟:



- (1) 自豬腿骨上取適當大小的軟骨片，並稱重記為組織濕重(W_1)
- (2) 將步驟(1)切下後的軟骨片送烘箱烘乾 60 分鐘
- (3) 將步驟(2)烘乾的軟骨片稱重記為組織乾重(W_2)
- (4) 脫水率= $\frac{W_2 - W_1}{W_1}$
- (5) 自豬腿骨上取適當大小的軟骨片，並稱重記為待切碎組織重 (W_3)
- (6) 取濾紙一張，烘乾 60 分鐘，並稱重記為濾紙重(W_4)
- (7) 將步驟(5)切下的軟骨片送軟骨切削機切削 2 分鐘
- (8) 將步驟(7)切削後的軟骨屑與水混合液用步驟(6)烘乾後的濾紙過濾

(9) 將步驟(8)過濾後的濾紙連同在其上的軟骨屑送烘箱烘乾 60

分鐘

(10)將步驟(9)烘乾後的濾紙連同乾燥之軟骨屑稱重並記為

W_5

(11)切削後推估重 $W_6 = (W_5 - W_4) / \text{平均脫水率}$

(12)效率 = $\frac{W_6 - W_3}{W_3}$

3-2 多孔隙中空載體製備

目前生物可分解性材料的研究上，已知 poly(glycolic acid)(PGA)，poly(L-lactic acid)(PLA)以及 poly(L-lactic-coglycolic acid)(PLGA)均被廣泛地應用於組織工程的軟骨培養，而支架的製備方法亦被廣泛且深入地研究。本研究選用 PLGA 作為多孔隙支架的材料，並採用鹽洗法製備。將製備完成之多孔隙支架利用器械裁切為適當大小之中空圓柱體即為以下細胞培養實驗所應用之多孔隙中空載體。

3-2-1 多孔隙 PLGA 支架

本研究中所選用的支架材料為以開環聚合方式製備得到的 PLGA 高分子，其分子量根據 gel permeation chromatography 測定為 200,000。於製程中先將 PLGA 於

粉碎機中粉碎，粉碎的顆粒通過40-60 孔目的篩網過篩後可得到粒徑在250-470 μm 的材料顆粒。水溶性的材料於本研究中以粒徑亦為250-470 μm 的氯化鈉顆粒，溶解 PLGA 材料顆粒的溶劑為 Dichloromethane。

將 PLGA 材料顆粒與氯化鈉顆粒依重量比例2:8 以攪拌的方式充分混和之。將經充分混和過後的 PLGA 與氯化鈉粉末倒入模具中並壓實之，此時將有機溶劑 Dichloromethane 倒入混合顆粒中並浸潤之，其後打開抽氣閥產生一負壓向下抽去多餘的溶劑，並使表面已溶化的 PLGA 相互黏結。固化後的多孔隙基材自過濾器中取出，置於烘箱內以50 $^{\circ}\text{C}$ 充分將殘餘之 Dichloromethane 烘乾。再將該充分烘乾的多孔隙基材至入裝有去離子水的大燒杯內，以攪拌的方式水洗一天，每六個小時置換大燒杯中的去離子水一次。將內部殘留的溶劑及鹽粒洗出，再置於50 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱加熱乾燥一天，即可得到所需的多孔隙材料基材。

3-2-2 多孔隙中空載體

將前一所得的多孔性支架裁切為直徑7 mm 高為9 mm 的圓柱體，在該圓柱體中央挖一直徑3 mm 深6 mm 的中空圓腔，再以該多孔性支架裁切一直徑3 mm 高為3 mm 的上蓋，該中空圓腔係可填入待培養之軟骨組織，並以該上蓋密封。在本研究計畫中將經此步驟製造而成之多孔性中空支架圓柱體稱為多孔隙中空載體

(chamber)(如圖 3-1)。於使用前需先以 75% 的酒精消毒浸泡 6 小時，再以大量的 phosphate buffered saline ,PBS 溶液洗出酒精。



圖 3-1 PLGA 多孔隙中空載體實體攝影

3-3 組織培養

本研究之最終目的是在於比較組織培養系統，意即靜態培養與新型靜水壓力生物反應器，並作比較與分析。為了減少細胞代數的變因與減少細胞培養時間，在組織來源部分採用初代組織。

3-3-1 組織分離

首先，將豬腳之股骨與脛骨，在犧牲後6小時內，以清潔劑及PBS 清洗外表，降低豬腳表面油脂及細菌。接著使用無菌組織剪和手術刀將膝關節囊打開(如圖 3-2)，使股骨與脛骨露出，除去關節周圍肌肉等結締組織，並將連接股骨與脛骨端的十字韌帶剪斷，並清除多餘結締組織，再使用手術刀將軟骨層切削至培養皿中(如圖 3-3)。以前述之組織切碎機將關節軟骨削切為 1.0-0.5 mm 大小(如圖 3-4)，移置 50mL 離心管中，內含 30mL 的 PBS。待取完所需軟骨後，將軟骨片以 PBS 清洗二至三次(如圖 3-5)，接著將軟骨分置於三個培養皿，並分別標為 Group 1，Group 2，Group 3。



圖 3-2 使用無菌組織剪和手術刀將膝關節囊打開

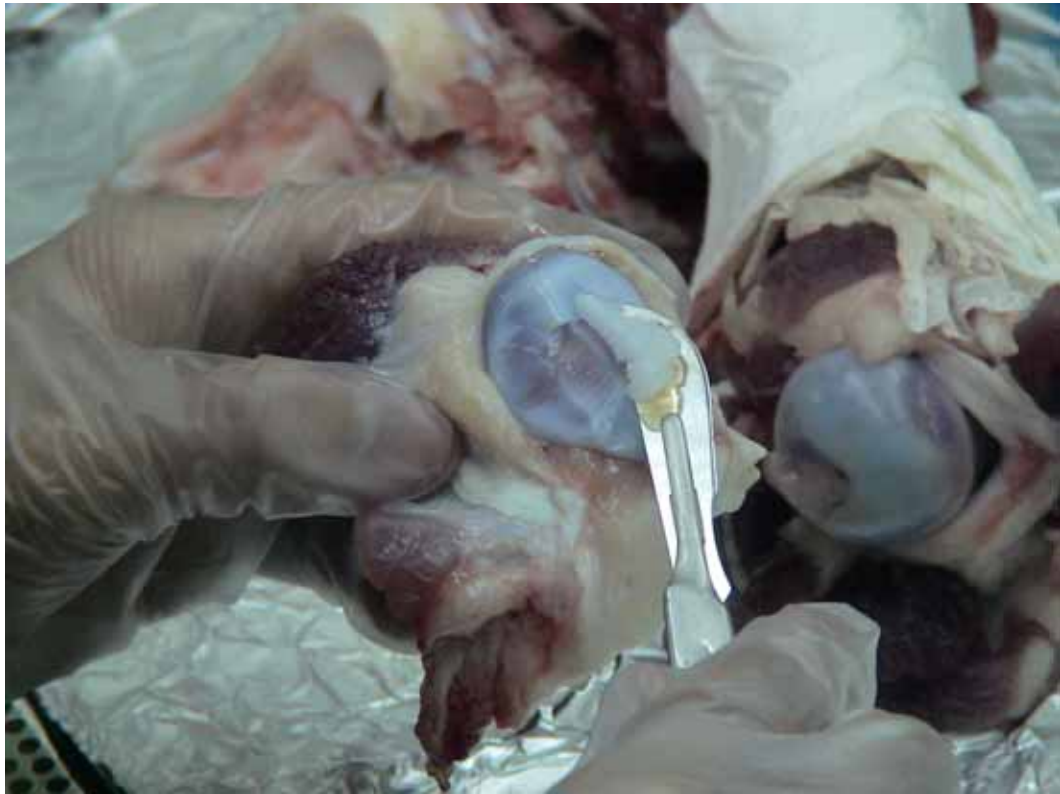


圖 3-3 使用手術刀將軟骨層切削至培養皿中



圖 3-4 將關節軟骨削切為 1.0-0.5 mm 大小

3-3-2 酵素分解軟骨組織與前置培養

Group 1 的軟骨片置於培養液(Dulbeccos Modified Eagle Medium/10% fetal calf serum, 50 μ g/mL gentamycin, 200U/mL penicillin, 0.5 μ g/mL fungizon, 50mg/L ascorbic acid)中，並將未經酵素分解的軟骨組織塊在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂情況下備用。

Group 2 的軟骨片以0.2% collagenase(Sigma Co., St. Louise, USA)作用於培養液中，置於37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂，作用4小時後，加入PBS稀釋終止collagenase作用，並將經部分酵素分解的軟骨組織塊懸浮後以1000rpm離心五分鐘備用。

Group 3 的軟骨片以0.2% collagenase(Sigma Co., St. Louise, USA)與1mg/ml hyaluronidase(Sigma, St. Louis, USA)作用於培養液中，置於37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂，作用24小時後，加入PBS稀釋終止酵素作用，並將完全經酵素分解的軟骨細胞懸浮後以1000rpm離心五分鐘備用。

將Group 1, Group 2, Group 3 的軟骨片分別填入前述之載體(chamber)

中(如圖 3-5-3-8)，並置入注滿培養液之培養皿中，在 37℃，5% CO₂ 的情況下靜態培養三天以使細胞順利貼附於該多孔隙中空載體中。(請參考表 3-1)

分組	酵素	作用時間	組織/細胞
Group 1	無	0 hr	完全組織型態
Group 2	0.2% collagenase	4 hr	組織外層部分經酵素 分解為細胞
Group 3	0.2% collagenase 1mg/ml hyaluronidase	24 hr	完全細胞型態

表 3-1 經不同時間酵素分解組別



圖 3-5 多孔隙中空載體

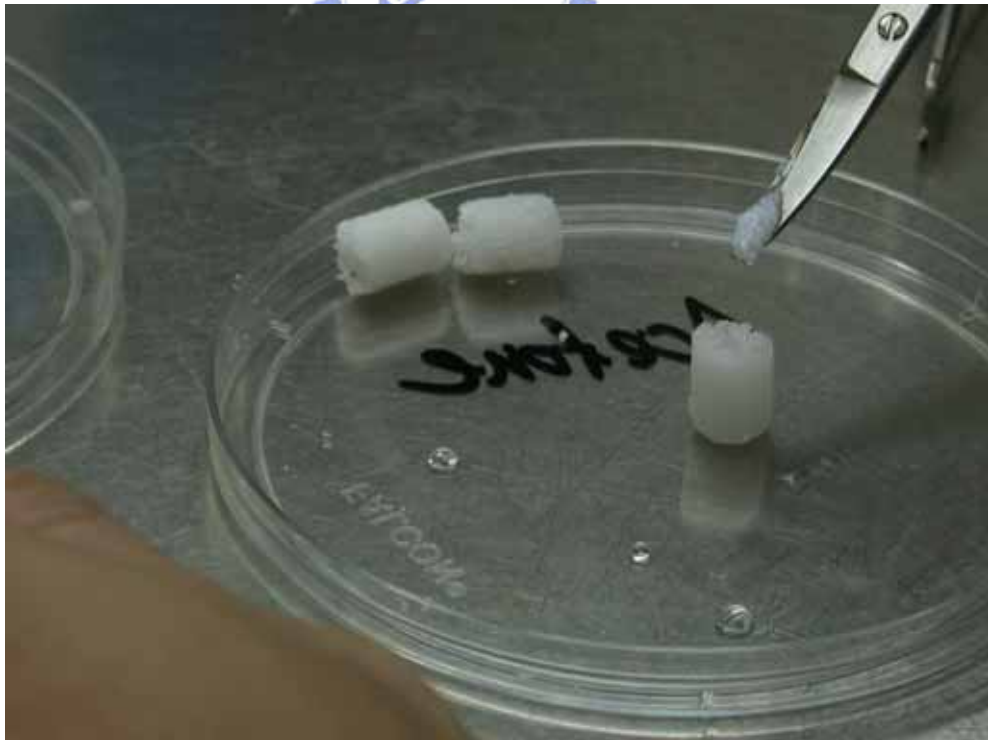


圖 3-6 利用無菌組織剪填充軟骨組織塊進入多孔隙中空載體



圖 3-7 填充滿軟骨組織塊之多孔隙中空載體

3-3-3 動態與靜態培養

將靜態培養三天後的內含組織塊載體Group 1、Group 2、Group 3 再平均分為加壓組及靜態組。加壓組送至第二章所設計之靜水壓力生物反應器，以壓力值 10 Mpa，頻率 15 min/15 min(on/off)，灌流流量 1 mL/min，培養兩週，每三天更換一次培養液，每次更換 500 mL。這些培養參數包括壓力值，頻率與培養週期係參考如前述 1-6 節所述之參考文獻所提示之最佳化之培養參數^{[27][30][35][36][37][38][40][41]}。靜態組則送至半灌流培養系統(如圖 3-2 所示)，以頻率 3 s/ 5 min (離開液面/沈浸液面)，

培養兩週，每三天更換一次培養液，每次更換一半。本培養參數係模擬單純僅包含灌流影響之靜態培養系統，用以來作為對照組比較靜水壓力對軟骨組織的影響。兩週後將組織塊取出以 3.7% 福馬林固定一天，再以石蠟包埋切片，以做後續之染色分析。

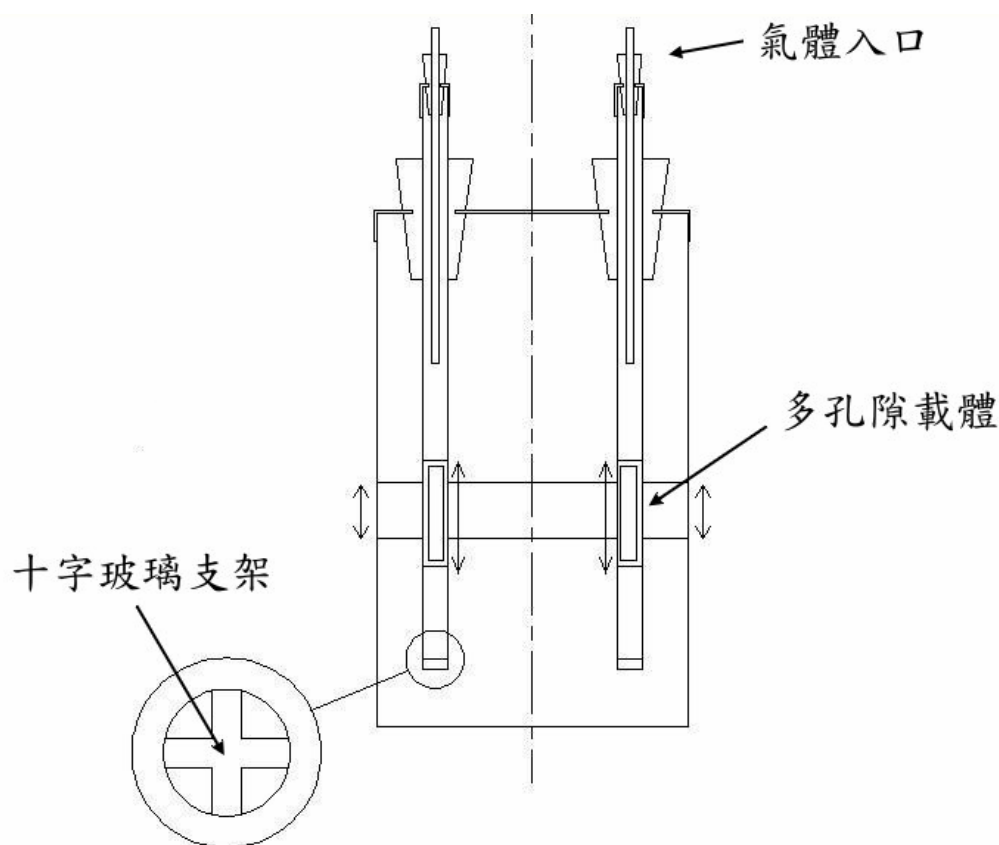


圖 3-8 半灌流培養系統

將多孔隙載體置於底部有十字玻璃支架之玻璃圓管中，該玻璃圓管置於培養液儲存槽中，該玻璃圓管上有接氣體入口，該玻璃圓管內之培養液液面高由於氣體的推動而有上下的變化，使置於該玻璃圓管內的多孔隙載體能脫離液面與沈浸液面的頻率變化，此種類似灌流之培養系統在本論文中稱為半灌流培養系統。此系統在本研究中設定為靜態組，故此系統之設計僅有灌流而沒有加壓。

3-4 病理切片染色

在本研究中直接使用病理染色方法來看新生軟骨組織之生長情形，並藉此評估前述之培養系統所培養出來的軟骨組織塊。

3-4-1 Hematoxylin –eosin 染色

Hematoxylin –eosin 染色，是組織病理常使用的一種染色方法，Hematoxylin 能將細胞核染成藍色，因此可表現出細胞核之細緻構造。eosin 可將細胞質染成粉紅色，分辨細胞之界限及細胞之大小，能夠簡單的看出組織構造及細胞外形的特徵，對於評估細胞來源或分化等極具價值。在本實驗的切片染色中，我們可以評估出 Group1-Group3 分別在靜態及加壓實驗中，細胞在支架中的分佈及相對數量，以及細胞外基質的多寡，引以為後續分析的參考依據。

Hematoxylin –eosin, H&E 染色方法：

- (1) Hematoxylin(MUTO, Japan) 2 分鐘
- (2) 流水沖洗 2 分鐘
- (3) 0.5% HCl 1 秒

- (4) 流水 15 分鐘
- (5) eosin(MUTO, Japan) 2 分鐘
- (6) 95%酒精 30 秒
- (7) 100%酒精 30 秒 (重複三次)
- (8) 烘乾 2 分鐘
- (9) 浸泡二甲苯 (重複三次)
- (10) 封片

3-4-2 SafraninO 染色



SafraninO 針對硫基反應，GAGs 在陽性反應中呈現橙色，由此我們可以分析針對 Group 1-Group 3 分別在靜態及加壓實驗中，軟骨細胞其再生細胞外基質的能力，並且評估載體環境對軟骨細胞的影響，進而找出理想的實驗條件。

SafraninO 染色方法:

- (1) 浸泡二甲苯 30 分鐘(重複兩次)
- (2) 100%酒精 5 分鐘
- (3) 90%酒精 5 分鐘
- (4) 75%酒精 5 分鐘

(5) 50%酒精 5 分鐘

(6) PBS 5 分鐘

(7) 浸泡SafraninO 溶液(0.1gSafraninO 粉末溶於100mL 1% 冰醋酸
中)直到呈色

(8) PBS 5 分鐘

(9) 脫水

(10) 浸泡二甲苯

(11) 封片

3-4-3 第二型膠原蛋白染色



為了偵測軟骨細胞在載體中，分泌出新的膠原蛋白種類，實驗中以第二型膠原蛋白之抗體，針對Group 1-Group 3 分別在靜態與動態實驗中，進行免疫染色，以確定載體中的軟骨細胞合成新的細胞外基質的能力，以及正常功能的表現。

第二型膠原蛋白染色步驟

(1) 浸泡二甲苯 30 分鐘(重複兩次)

(2) 100%酒精 5 分鐘

(3) 90%酒精 5 分鐘

- (4) 75%酒精5分鐘
- (5) 50%酒精5分鐘
- (6) PBS 5分鐘
- (7) 以1mg/ml testicular hyaluronidase(Sigma,USA)及 0.1U/ml chondrotinase ABC(Sigma,USA)於37 作用30分鐘。
- (8) PBS 5分鐘
- (9) 浸泡3% H₂O₂ 20分鐘
- (10) PBS 5分鐘
- (11) 浸泡blocking serum(150μl rabbit normal serum 溶於10ml) 30分鐘
- (12) PBS 5分鐘
- (13) 使用一級抗體(goat polyclonal antibody against human collagen type II 以1:100的比例稀釋於PBS中)作用2小時
- (14) PBS 5分鐘(重複三次)
- (15) 使用二級抗體(biotinylated rabbit anti-goat IgG 5μl 稀釋於1ml blocking serum中)作用1小時
- (16) PBS 5分鐘(重複三次)
- (17) 使用 Vectastain ABC reagent(14μl Reagent A 及 14μl Reagent B 稀釋於1ml PBS中,需於使用前30分鐘配製)(Vector



Laboratory) 作用 30 分鐘

(18) PBS 5 分鐘

(19) 使用 DAB Substrate Kit (Vector Laboratory) 直到呈色(咖啡
色)DAB Substrate Kit 配置方法

(a)20 μ l Buffer stock solution 稀釋於 1mL 去離子水
中，並混合均勻

(b)再加入 40 μ l DAB Stock solution 並混合均勻

(c)再加入 20 μ l H₂O₂ 並混合均勻

(20) PBS 5 分鐘

(21) 脫水

(22) 封片



第四章 結果與討論

4-1 組織切碎機效能評估

藉由第三章所討論的效能試驗來評估本研究所設計之組織切碎機，其結果顯示(如表 4-1，圖 4-1)手工切削的組別效率僅僅只有 34.6%，然而機械切削的組別其效能能達到 62.0%-69.8%。這個結果證實了本研究所設計的組織切碎機的確可以減少切碎不完全及人工切碎器械所造成之損耗。

	手工切削	機械切削(1)	機械切削(2)	機械切削(3)	機械切削(4)	機械切削(5)
組織濕重	0.078	0.094	0.1038	0.0641	0.0548	0.0388
組織乾重	0.0175	0.0184	0.0372	0.0134	0.0139	0.007
脫水率	0.224	0.195	0.358	0.209	0.253	0.180
平均脫水率			0.236			
待切削組織塊濕重	0.0610	0.0796	0.0645	0.078	0.0964	0.0490
切削後組織塊乾重	0.0211	0.0531	0.0434	0.0544	0.0624	0.0303
效率	0.345	0.668	0.673	0.698	0.647	0.620

表 4-1 組織切碎機效能評估表

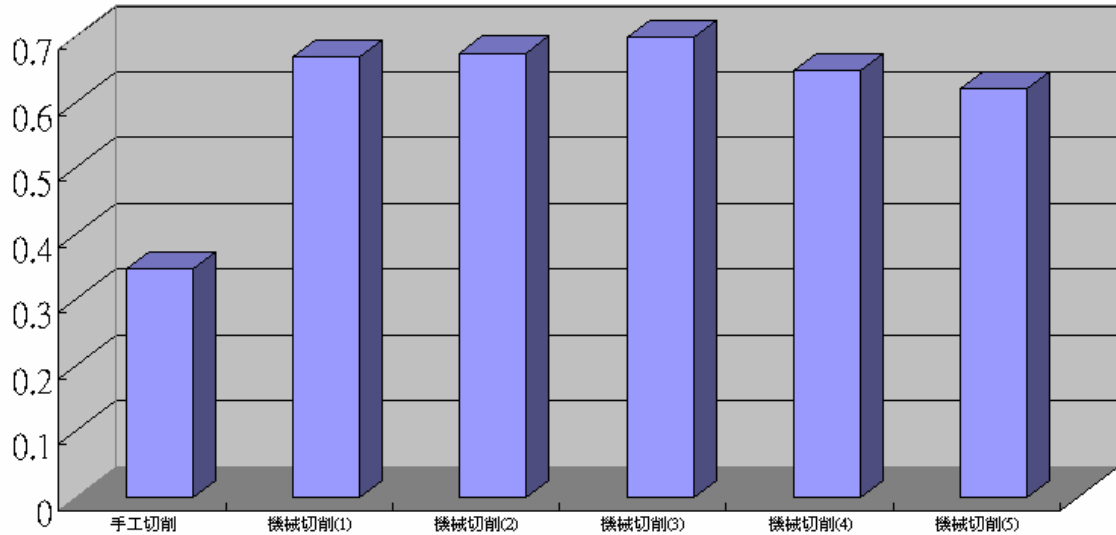


圖 4-1 效率評估結果方塊圖 其縱軸為效率，橫軸為組別

4-2 病理切片染色結果

本研究把軟骨分為未經酵素分解的組織塊型態(Group 1)，外圍部分經酵素分解為細胞但內部仍為組織塊型態(Group 2)，完全經酵素分解為細胞型態(Group 3)，將以上三種型態的軟骨組織分別加以靜態與動態靜水壓力培養，藉由病理切片染色來評估新生軟骨組織的型態，細胞外間質如 GAGs 與第二型膠原蛋白分泌的情況。

4-2-1 未經酵素分解軟骨組織塊之結果

由H&E染色(如圖4-2)結果，針對未經酵素分解軟骨組織，在靜態培養後軟骨組織塊其細胞外間質並沒有充分融合在一起，而呈現鬆散成長的型態，而在動態靜水壓力加壓培養後的軟骨組織塊細胞外間質緊密融合在一起。這個結果顯示靜水壓力的作用

使細胞外間質分泌的量增多^[35]進而使組織塊與組織塊之間藉由細胞外間質的密合而順利融合在一起。

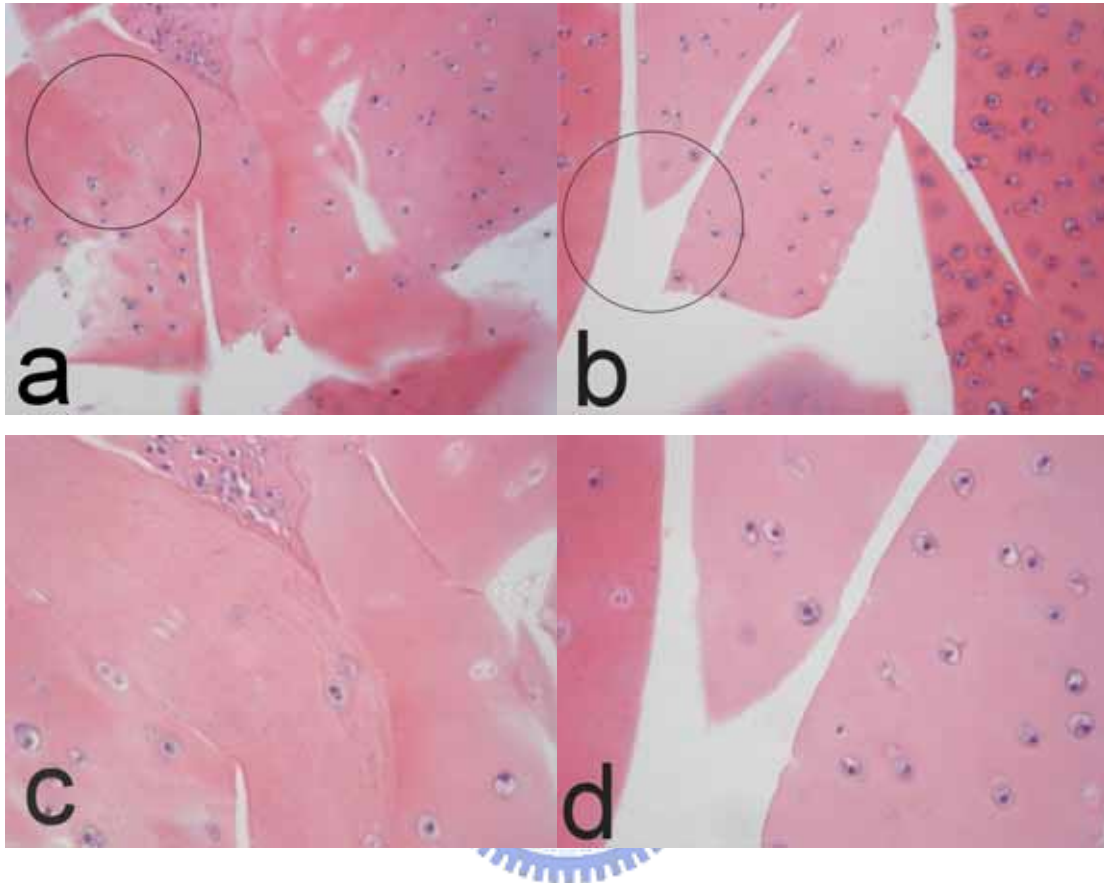


圖 4-2 未經酵素分解之軟骨組織塊 H&E 染色

- a 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
 - b 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
 - c 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
 - d 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為有靜態培養狀態(400X)
- a 圖中圓圈處即為有充分融合處，與b 圖中圓圈處相比則相對較密合。

由SafraninO 染色(如圖 4-3)結果，針對未經酵素分解軟骨組織，靜態培養後的軟骨組織其GAGs 分佈並不均勻且組織塊邊緣鬆散，而動態靜水壓力加壓培養後的軟骨組織塊其GAGs 分佈遠較靜態培養後的軟骨組織均勻，且組織塊邊緣成功融合成一整塊的軟骨組織。這個結果顯示靜水壓力刺激能使軟骨組織分泌之GAGs 更為均

勻^[35]，進而生成良好品質的組織工程軟骨。

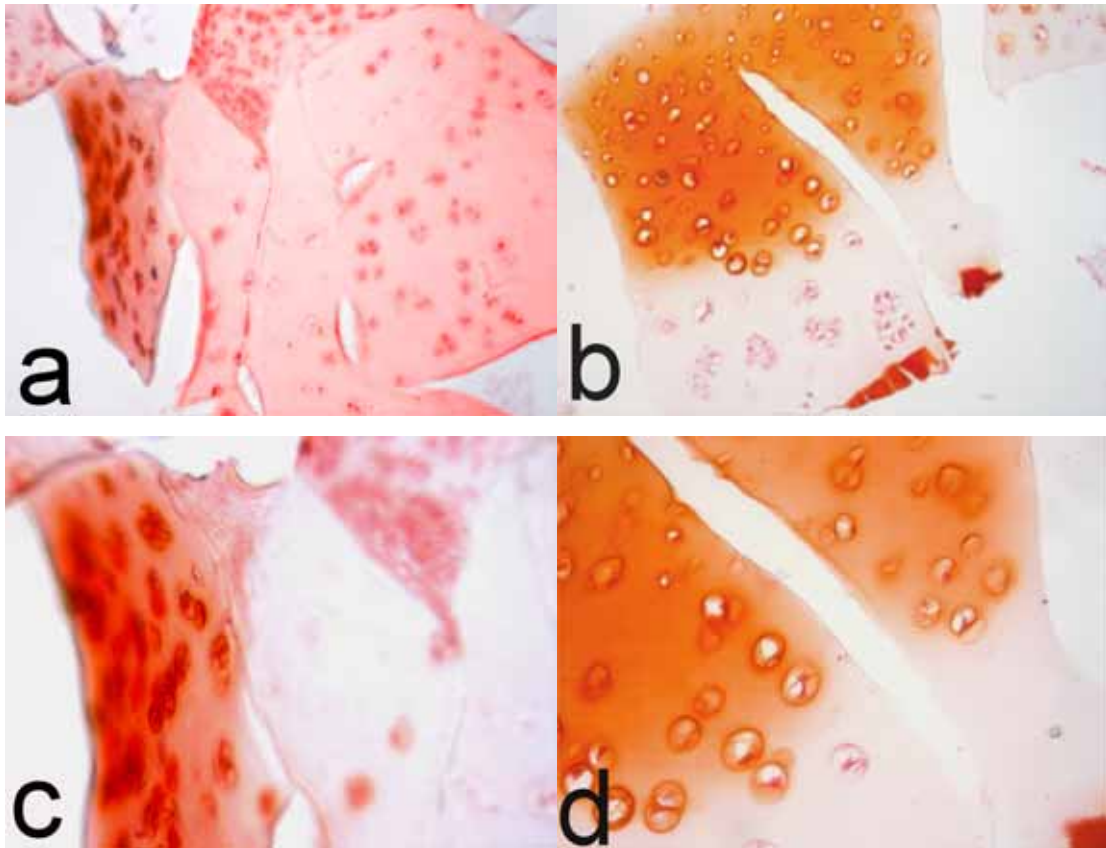


圖 4-3 未經酵素分解之軟骨組織塊 Safranin O 染色

- a 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
- b 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
- c 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
- d 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為有靜態培養狀態(400X)。

由二型膠原蛋白染色(如圖4-4)的結果，可以看出來無論靜態培養或動態靜水壓力加壓後的軟骨組織均有第二型膠原蛋白的生成，其分佈主要在圓形細胞的周圍。而其中第二型膠原蛋白在有動態靜水壓力刺激後的情況下有顏色較深的現象，這顯示出靜水壓力有助於第二型膠原蛋白的分泌^[30]。

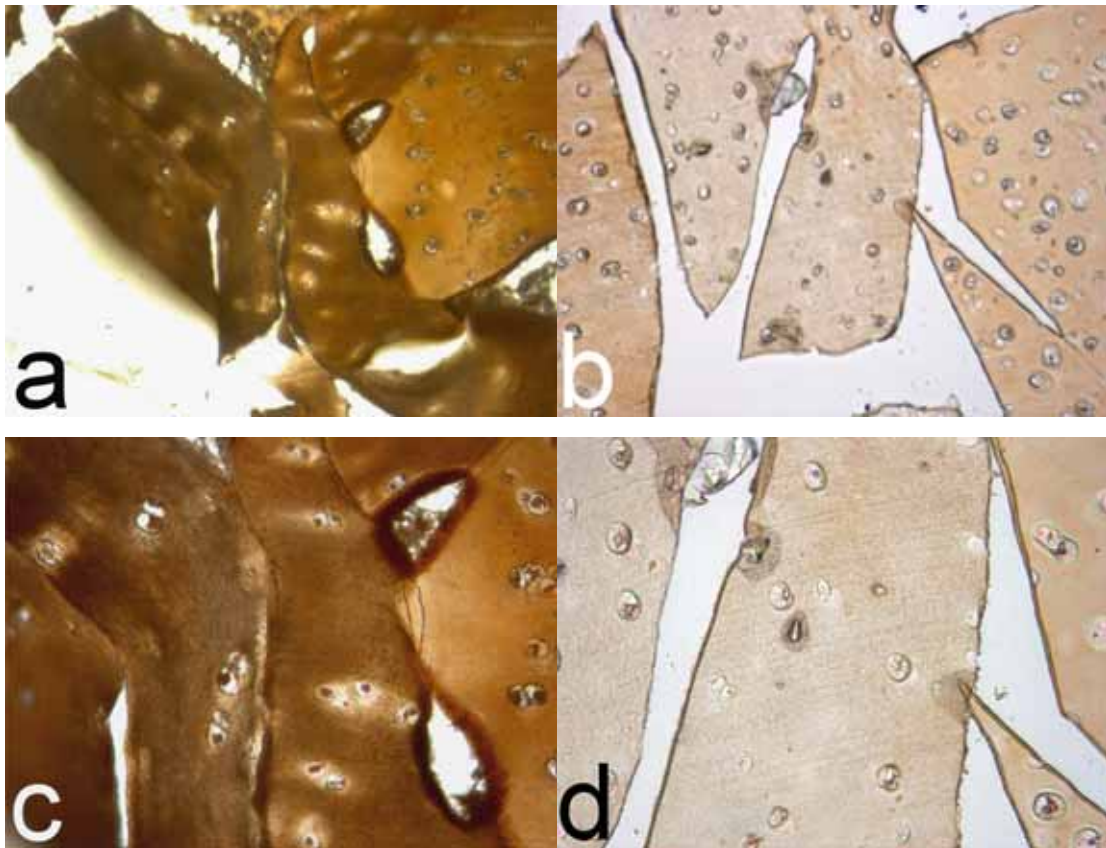


圖 4-4 未經酵素分解之軟骨組織塊第二型膠原蛋白染色。

- a 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
- b 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
- c 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
- d 為未經酵素分解之軟骨組織塊且為有靜態培養狀態(400X)。

4-2-2 部分經酵素分解軟骨組織塊之結果

由H&E染色(圖 4-5)結果，針對酵素分解4小時後的部分經酵素分解軟骨組織塊，靜態培養後的軟骨組織塊由於細胞增生速率較快且細胞外間質分泌並不豐富，故細胞核與細胞核之間間距較小。有動態靜水壓力加壓培養後的軟骨組織塊細胞核與細胞核之間間距遠較靜態培養後的軟骨組織為大。這結果顯示有動態靜水壓力加壓刺激後的軟

骨組織的增生速率雖較靜態培養後的軟骨組織為慢，但有動態靜水壓力刺激後的軟骨組織的細胞外間質分泌較靜態培養的新生軟骨組織為厚^[27]。這也顯示了在部分經酵素分解的軟骨組織塊培養中有動態靜水壓力刺激後的軟骨組織組成較靜態培養更為接近天然的軟骨組織。

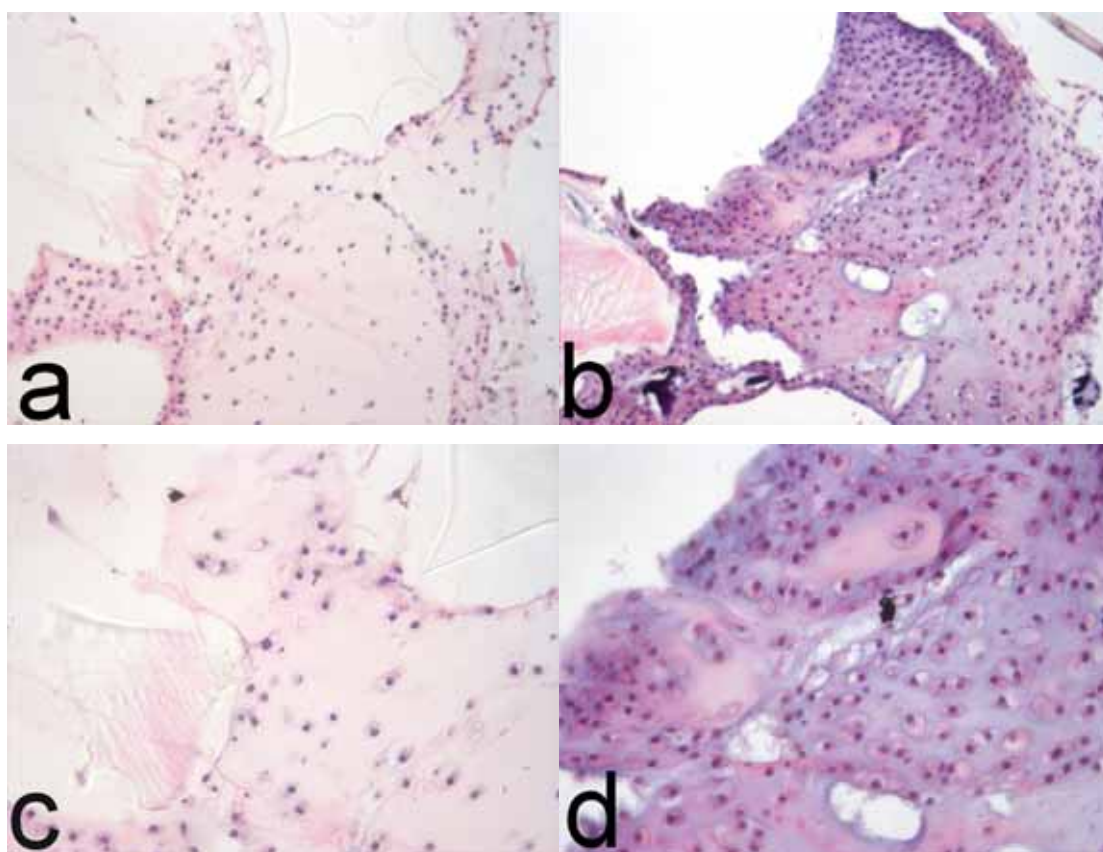


圖 4-5 部分經酵素分解軟骨組織塊 H&E 染色。

- a 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
- b 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
- c 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
- d 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為靜態培養狀態(400X)。

由 SafraninO 染色(如圖 4-6)可以看得出來，針對酵素分解 4 小時後的部分經酵素分解軟骨組織塊，靜態培養後的軟骨組織其 GAGs 分佈並不均勻，而有動態靜水壓力刺激後的軟骨組織其 GAGs 分佈較靜態培養均勻，且細胞外間質成功融合為一塊良好品質的組織工程軟骨。

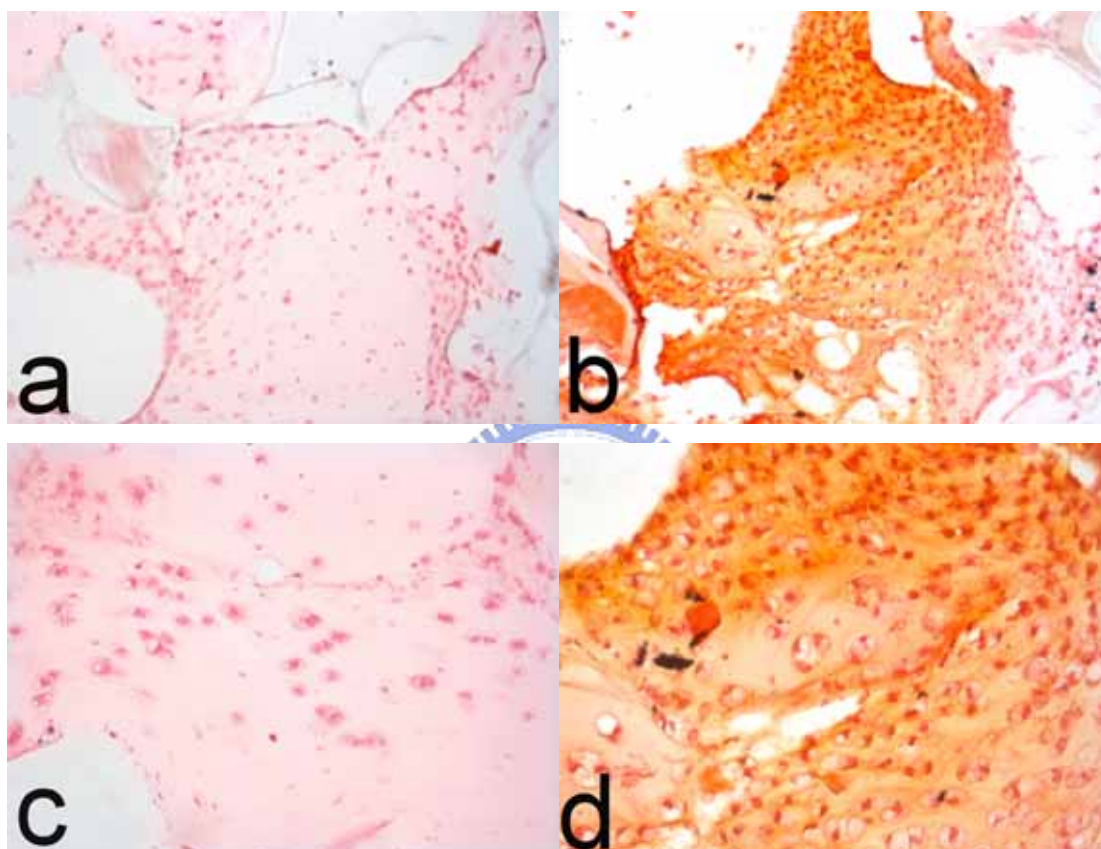


圖 4-6 部分經酵素分解軟骨組織塊 SafraninO 染色。

- a 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
- b 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
- c 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
- d 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為有靜態培養狀態(400X)。

由第二型膠原蛋白染色(如圖 4-7)的結果，針對酵素分解 4 小時後的部分經酵素分解軟骨組織塊，可以看出在靜態培養後的軟骨組織塊第二型膠原蛋白分泌量極不均勻且顏色較淡，很多地方甚至沒有被染色的現象。相對於有動態靜水壓力加壓後的軟骨組

織，可以看出其第二型膠原蛋白的生成且均勻地分佈在圓形細胞的四周。這個結果顯示靜水壓力刺激的確能幫助部分經酵素分解的軟骨組織塊分泌更均勻的第二型膠原蛋白。

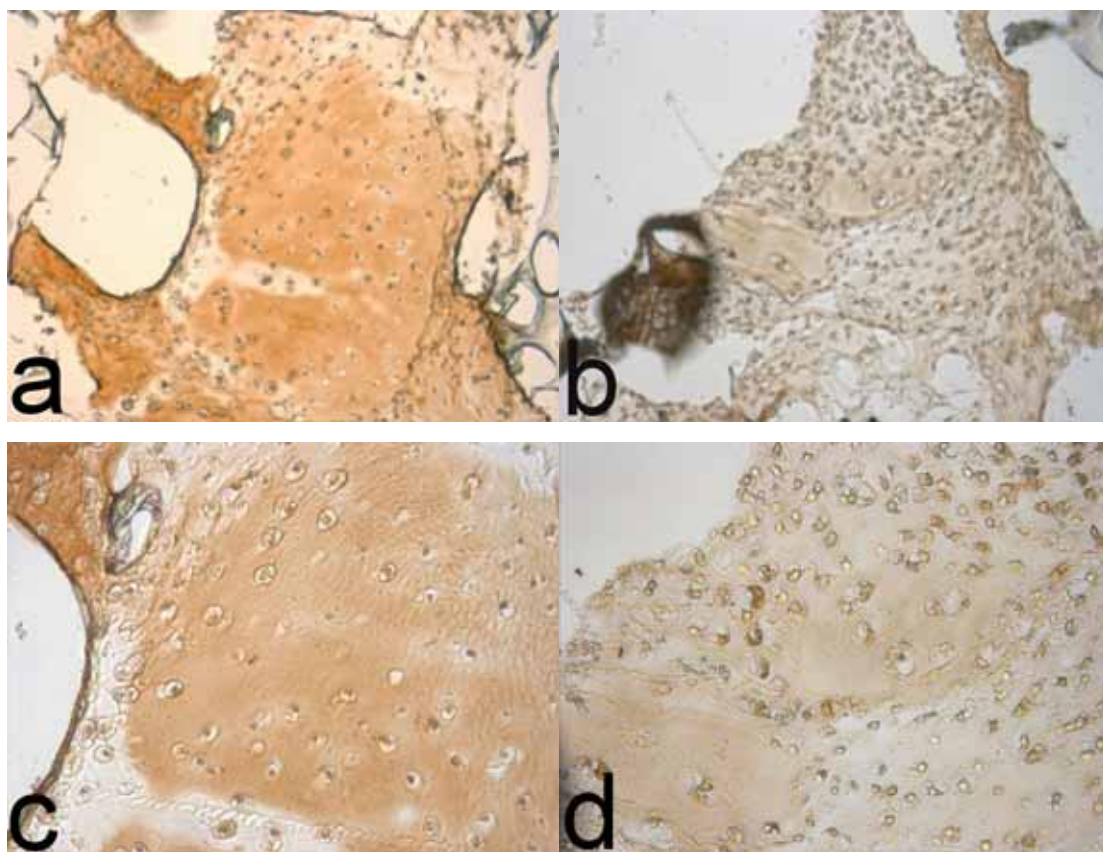


圖 4-7 部分經酵素分解軟骨組織塊第二型膠原蛋白染色。

- a 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
- b 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
- c 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
- d 為部分經酵素分解軟骨組織塊且為有靜態培養狀態(400X)。

4-2-3 完全經酵素分解之軟骨組織塊培養

由 H&E 染色(如圖 4-8)結果，針對經酵素分解 24 小時後的完全經酵素分解的軟骨組織塊，靜態培養後的軟骨組織塊細胞增生快速且組織結構良好。而有動態靜水壓力加壓後的軟骨組織增生不明顯且組織結構空洞。這種情況是由於經酵素分解 24 小時後的

軟骨組織已經呈現細胞型態，而結果顯示了軟骨細胞並無法承受壓力的衝擊而流失，故有動態靜水壓力刺激的軟骨細胞並沒有機會成長為良好軟骨組織即被壓力衝擊流失至培養基中。

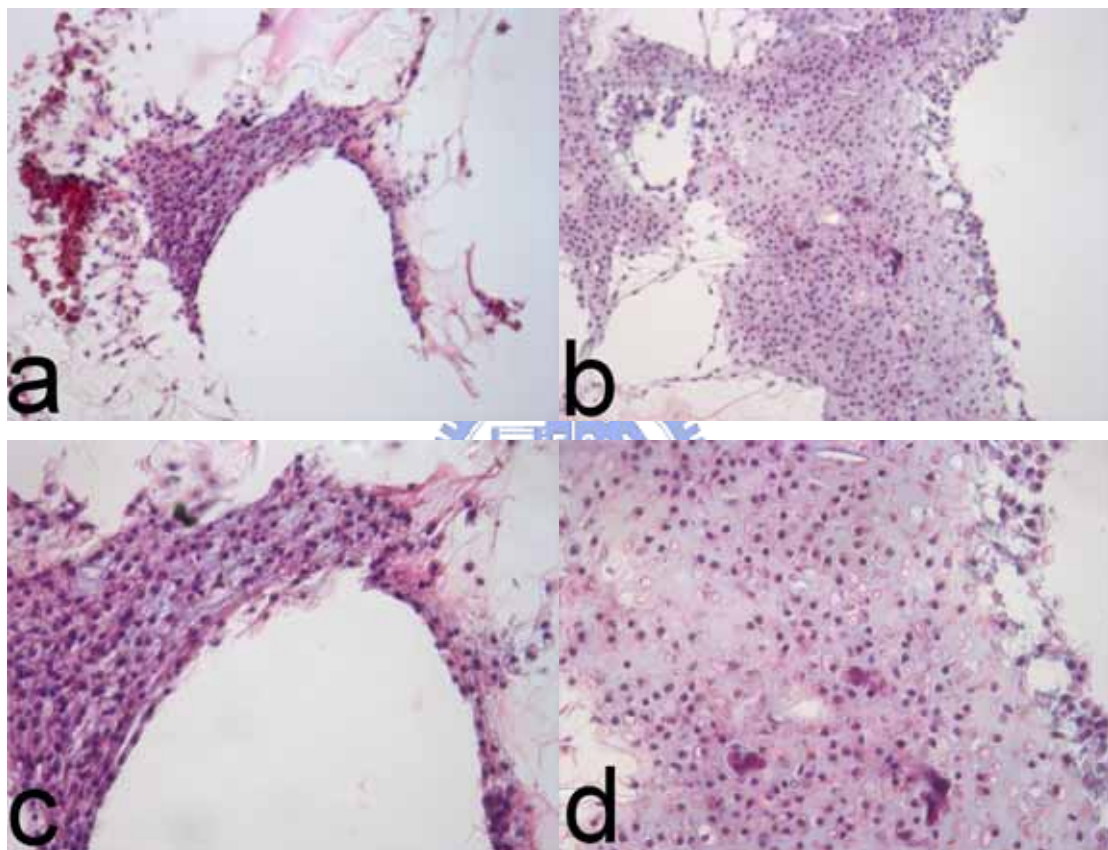


圖 4-8 完全經酵素分解之軟骨組織塊 H&E 染色。

- a 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
- b 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
- c 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
- d 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為有靜態培養狀態(400X)。

由 SafraninO (如圖 4-9)的結果，針對完全經酵素分解之軟骨組織塊，可以看出靜態培養後的軟骨組織塊結構完整且有 GAGs 的分泌，但在有動態靜水壓力加壓後的軟骨組織結構鬆散且 GAGs 分泌並不均勻。這個結果顯示了若僅僅是單純軟骨細胞型態因無法抵抗動態靜水壓力的衝擊，故沒有良好的 GAGs 生成。

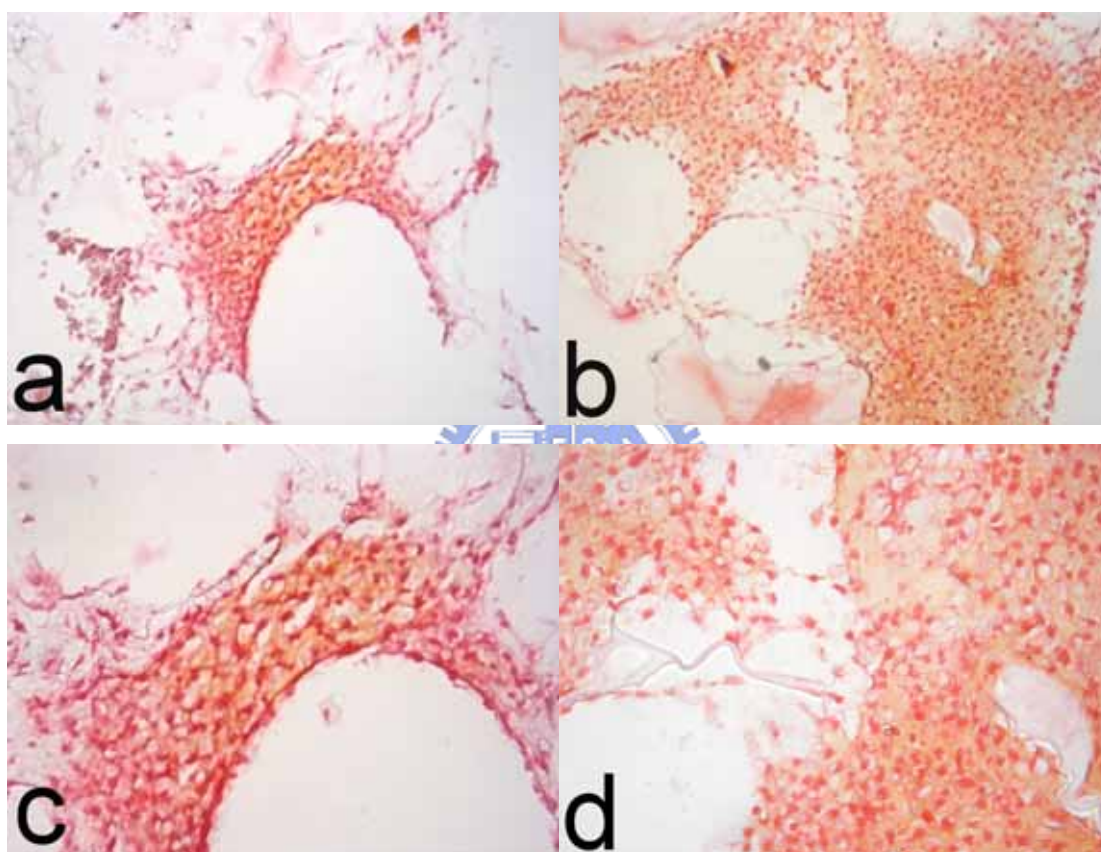
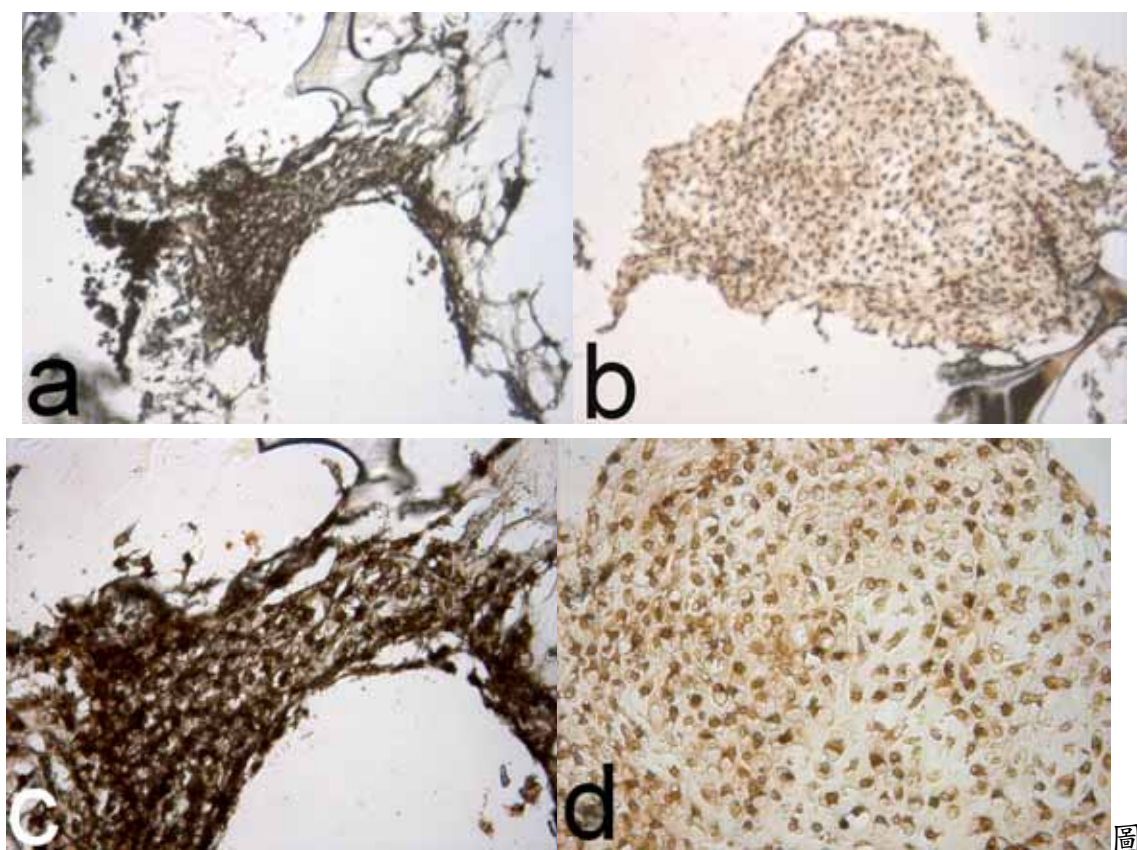


圖 4-9 完全經酵素分解之軟骨組織塊 SafraninO 染色。

- a 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
- b 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
- c 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
- d 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為有靜態培養狀態(400X)。

由第二型膠原蛋白染色(如圖 4-10)的結果顯示，針對完全經酵素分解之軟骨組織塊，在靜態培養後的軟骨組織塊有第二型膠原蛋白的生成，但在動態靜水壓力加壓後的

軟骨組織塊所染到的第二型膠原蛋白區域並不明顯。這個結果顯示動態靜水壓力刺激的確對完全經酵素分解的軟骨組織塊其生長有不利的影響，也因而無法正常地分泌第二型膠原蛋白。



4-10 完全經酵素分解之軟骨組織塊第二型膠原蛋白染色。

- a 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(200X)
- b 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為靜態培養狀態(200X)
- c 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為動態靜水壓力刺激狀態(400X)
- d 為完全經酵素分解之軟骨組織塊且為有靜態培養狀態(400X)。

第五章 結論

本研究針對對靜水壓力加壓軟骨組織於體外生長，其中包括：(1)第二章中建立了一個新穎的設計概念來改進以往靜水壓力生物反應器所遭遇的問題、(2)第二章設計了一種新穎性的軟骨切碎機，用以替代以往人工切碎軟骨所耗費之人力 (3)第三章建立了一個新的技術，該技術係以部份酵素分解的組織塊替代原本的細胞培養、(4)從該靜水壓力生物反應器設計概念做為基礎的細部設計與測試、(5)實際應用軟骨組織在該靜水壓力生物反應器中培養、(6)針對經過該靜水壓力生物反應器培養後的軟骨組織測試其二型膠原蛋白、蛋白醣與軟骨細胞增生能力。



本研究的特點在於使用系統化的品質機能展開法，設計並改善目前靜水壓力生物反應器所遭遇到的問題，特別是對於不間斷的加壓程序與良好的質量傳輸兩項參數的改進，而且在這兩項參數改善的同時其它參數並未變差，如此才能提供軟骨細胞更好的體外環境，目的在於生長功能更正確的軟骨組織。

本研究的結果分為兩部分，第一部份為針對組織工程設計之組織切碎機的確能取代人工切碎組織，減少人員操作所造成的污染以及器械沾黏所造成的損耗。並經由效能測試結果證實該組織切碎機切碎效率較傳統人工切碎高出約30%。

第二部分則為新穎型靜水壓力生物反應器，經過一連串工程設計法的設計，組裝與測試，到最後實際應用於提供動態靜水壓力培養各種不同型態的軟骨組織塊。最終結果顯示，該新穎性靜水壓力生物反應器的確能提高完全未經過酵素分解及部分經酵素分解之軟骨組織塊的細胞外間質分泌均勻，並使其新生組織結構完整且型態更接近於天然軟骨組織。



參考文獻

- [1] Robert P. Lanza, Robert Langer, Joseph Vacanti, "Principles of tissue engineering", CA :Academic Press, San Diego, C2000
- [2] Mankin HJ, "The response of articular cartilage to mechanical injury", J.Bone Joint Surg, 64a: 460-466, 1982.
- [3] Leonard v. Crowley, "An introduction to human disease :pathology and pathophysiology correlations", Mass. :Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, c2001.
- [4] Ruth I. Wood and Joel E. Schechter, "Histology :An interactive virtual microscope", Sinauer Associates, 2002
- [5] Ehrenreich M., "Articular cartilage repair: tissue engineering's killer application?", Techvest, LLC Equity Research, New York, 1999.
- [6] Pridie KH, "A method of resurfacing osteoarthritic knee joint", J Bone Joint Surg-British, 41:618-620, 1959.
- [7] Helmers S., Sharkey PF., Mcguigan FX., "Efficacy of irrigation forremoval of particulate debris after cemented total knee arthroplasty", Journal of Arthroplasty, 14:5:549-552, 1999.
- [8] Gillogly SD., Voight M, Blackburn T., "Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation", Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy, 28:4:241-251, 1998
- [9] Minas T, "Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee", Clinical Orthopaedics & Related Research, 391 Suppl: s349-s361, 2001.
- [10]Jakob RP., Franz T., Gautier E, Mainil-Varlet P., "Autologous osteochondral grafting in the knee: indication, results, and reflections", Clinical Orthopaedics & Related Research, 401:170-184, 2002.
- [11]Gross AE, Aubin P., Cheah HK., Davis AM., Ghazavi MT., "A fresh osteochondral allograft alternative", Journal of Arthroplasty, 17:4 Suppl:1:50-53, 2002.
- [12]Hangody L., Feczko P., Bartha L., Bodo G., Kish F.,

- “Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle”, *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 391 Suppl: s328-s336, 2001.
- [13]Jteadman ST., Rodkey WG, Rodrigo JJ., “Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects”, *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 391 Suppl: s362-s369, 2001.
- [14]Brittberg M., Tallheden T., Sjogren-Jansson B., Lindahl A., Peterson A., “Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update”, *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 391 Suppl: s337-s348, 2001.
- [15]Hunter W, “On the structure and diseases of articulating cartilage”, *Phil Trans*, 470:514-521, 1743.
- [16]Furukawa T., Eyre D, Koide S., Glimcher MJ., “Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee”, *J Bone Joint Surg*, 62a: 79-89, 1980.
- [17]Obradovic B., Carrier RL., Vunjak-Novakovic G., Freed GL, “Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage.”, *Biotechnol. Bioeng.* 63, 197, 1999.
- [18]Freed LE., Marquis JC., Nohria A, Emmanuel J., Mikos AG., Langer R., “Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymer.” *J. Biomed. Mater. res.* 27, 11, 1993.
- [19]Freed LE., Vunjak-Novakovic G., Langer R., “Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors.” *J. Cell. Biochem.* 51, 257, 1993.
- [20]Butnariu-Ephrat M., Robinson D., Mendes DG., Halperin N., and Nevo Z., “Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow.”, *Trans Annu. Meet. Orthop. Res. Soc.* 24, 8, 1999.
- [21]Murata T., Ushida T., Mizuno S., Tateishi T., “Proteoglycan synthesis by chondrocytes cultured under hydrostatic pressure and perfusion.” *Materials Science and Engineering: c Volume: 6, Issue: 4, December, 1998, pp. 297-300.*
- [22]Buschmann Michael d., Young-Jo K., Marcy W., Eliot F., Hunziker Ernst B., Grodzinsky Alan J., “Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loading is localized to regions of high interstitial fluid flow”, *Archives of Biochemistry and Biophysics Volume: 366, Issue: 1, June 1, 1999, pp. 1-7.*

- [23]Malaviya P., Hunter C., Schreiber R., Symons K., Ratcliffe A., Nerem R., “Fluid-induced shear stresses promote chondrocyte phenotype alteration.”, *Trans. Annu. Meet. Orthop. Res. Soc.* 23, 228, 1998.
- [24]Malaviya P., Hunter C., Schreiber R., Symons K., Ratcliffe A., Nerem R. “Steady shear stress stimulates bovine chondrocyte proliferation in monolayer culture.” *Trans Annu. Meet. Orthop. Res. Soc.* 24, 8, 1999.
- [25]Ehrenreich M., “Articular cartilage repair: tissue engineering’s killer application?” *Techvest, LLC Equity Research, New York*, 1999.
- [26]Urban JP., “Present perspective on cartilage and chondrocytes mechanobiology. *Biorheology*”, 37, 185, 2000.
- [27]Carver SE., Heath CA., “Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating cartilage”, *Tissue Engineering* , 5 (1): 1-11 Spr 1999.
- [28]Carver SE., Heath CA, “Influence of intermittent pressure, fluid flow, and mixing on the regenerative properties of articular chondrocytes”, *Biotechnology and Bioengineering*, 65 (3): 274-281 Nov 5 1999
- [29]Brown TD, “Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review, *journal of biomechanics*”, 33 (1): 3-14 Jan 2000
- [30]Smith RL., Lin J., Trindade MCD., Shida J., Kajiyama G., Vu T., Hoffman AR., Van Der Meulen MCH., Goodman SB., Schurman Dj., Carter DR., “Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mrna expression”, *Journal of Rehabilitation Research and Development*, 37 (2): 153-161 Mar-Apr 2000.
- [31]Mizuno S., Ushida T., Tateishi T., Glowacki T., “Effects of physical stimulation on chondrogenesis in vitro” , *Materials Science and Engineering c* 6 1998 301–306, September 1998
- [32]Hall AC., Horwitz ER., Wilkins RJ., “The cellular physiology of articular cartilage”, *Experimental Physiology*, 81 (3): 535-545 May 1996.

- [33]Haskin CL., Athanasiou KA., Klebe R., Cameron IL., “A heat-shock-like response with cytoskeletal disruption occurs following hydrostatic-pressure in mg-63 osteosarcoma cells”, *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*, 71 (7-8): 361-371 Jul-Aug 1993.
- [34]Haskin C., Cameron I., “Physiological levels of hydrostatic-pressure alter morphology and organization of cytoskeletal and adhesion proteins in mg-63 osteosarcoma cells”, *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*, 71 (1-2): 27-35 Jan-Feb 1993.
- [35]Smith RL., Rusk SF., Ellison BE., Wessells P., Tsuchiya K., Carter DR., Caler WE., Sandell LJ., Schurman DJ., “In vitro stimulation of articular chondrocyte mrna and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure”, *Journal of Orthopaedic Research*, 14 (1): 53-60 jan 1996.
- [36]Hansen U., Schunke M., Domm C., IoAnnidis N., Hassenpflug J., Gehrke T., Kurz B., “Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering”, *Journal of Biomechanics*, 34 (7): 941-949 Jul 2001
- [37]Parkkinen JJ., Ikonen J., Lammi MJ., Laakkonen J., Tammi M., Helminen HJ., “Effects of cyclic hydrostatic-pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular-cartilage explants”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300 (1): 458-465 Jan 1993.
- [38]Heath CA., Magari SR., “Mini-review: mechanical factors affecting cartilage regeneration in vitro”, *Biotechnology and Bioengineering*, 50 (4): 430-437 May 20 1996.
- [39]Carver SE., Heath CA., “Increasing extracellular matrix production in regenerating cartilage with intermittent physiological pressure”, *Biotechnology and Bioengineering*, 62 (2): 166-174 Jan 20 1999.
- [40]Domm C., Fay J., Schunke M., Kurz B., “Influence of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial-pressure on the redifferentiation of dedifferentiated articular chondrocytes in alginate culture”, *Orthopade*, 29 (2): 91-99 Feb 2000.

- [41]Hall AC., Urban JP., Gohl KA., “The effect of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage.” J. Orthop. Res. 9, 1, 1991.
- [42]Lammi MJ., Inkinen R., Parkkinen JJ., Hakkinen T., Jortikka M., Nelimarkka LO., Jarvelainen HT., Tammi MI., “Expression of reduced amounts of structurally altered aggrecan in articular-cartilage chondrocytes exposed to high hydrostatic-pressure”, Biochemical Journal, 304: 723-730 Part 3 Dec 15 1994.
- [43]Parkkinen JJ., Lammi MJ., Pelttari A., Helminen HJ., Tammi M., Virtanen I., “Altered golgi-apparatus in hydrostatically loaded articular-cartilage chondrocytes”, Annals of the Rheumatic Diseases, 52 (3): 192-198 Mar 1993.

