

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：95126811

※ 申請日期：95.07.21

※IPC 分類：C12N 05/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

具被誘發終止分化變化的人類關節軟骨細胞的三維式培養物以及它的製備方法

THREE-DIMENSIONAL CULTURE CONTAINING HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES WITH INDUCED TERMINAL DIFFERENTIATION CHANGES, AND PREPARATION PROCESS OF THE SAME

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

高雄醫學大學/KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

余幸司/YU, HSIN-SU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

807 高雄市三民區十全一路 100 號/100 SHIH-CHUAN 1ST ROAD, SAN MING DISTRICT, KAOHSIUNG CITY 807, TAIWAN

國籍：(中文/英文)

中華民國/R.O.C.

三、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

1. 何美玲/HO, MEI-LING
2. 王國照/WANG, GWO-JAW
3. 張瑞根/CHANG, JE-KEN

國籍：(中文/英文)

- 1.、2.、3 中華民國/R.O.C.

四、聲明事項：

主張專利法第22條第2項第1款或第2款規定之事實，其事實發生日期為：2006年01月30日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第27條第1項國際優先權：

1.；

無主張專利法第27條第1項國際優先權：

主張專利法第29條第1項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第30條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明揭示一含有具被誘發的終止分化變化(induced terminal differentiation changes)的人類關節軟骨細胞(articular chondrocytes)的三維式培養物(three-dimensional culture)，以及一用以製備該培養物的方法。在骨關節炎(osteoarthritis)的分子與細胞機制的研究上，以及在篩選供用於治療一與關節軟骨細胞有關聯的障礙之候選藥物(candidate drugs)上，該三維式培養物(它被發現會模擬活體內經歷終止分化的關節軟骨細胞之生物特徵)可被使用作為一工具。

六、英文發明摘要：

Disclosed herein is a three-dimensional culture containing human articular chondrocytes with induced terminal differentiation changes, as well as a process for preparing the same. The three-dimensional culture, which was found to mimic the biological characteristics of articular chondrocytes that undergo terminal differentiation in vivo, can be used as a tool in the studies of the molecular and cellular mechanisms of osteoarthritis, and in the screening of candidate drugs for use in treatment of a disorder associated with articular chondrocytes.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明是有關於一含有具被誘發的終止分化變化
5 (induced terminal differentiation changes)的人類關節軟骨細胞 (articular chondrocytes) 的三維式培養物 (three-dimensional culture)，以及該培養物的製備方法與用途。

【先前技術】

發明背景

10 骨關節炎(osteoarthritis, OA)是一種帶有逐漸退化的關節軟骨(gradual degradation of articular cartilage)的關節疾病(joint disease)，特別是在老化人口(aged population)當中(D. Hamerman (1995), *Ann Rheum Dis.*, 54:82-85)。先前的報導指出：在美國有 10%的高齡人口(elderly population)(超過
15 60 歲)蒙受 OA (D. Hamerman (1989), *N Engl J Med.*, 320:1322-1330; G. Peat *et al.* (2001), *Ann Rheum Dis.*, 60:91-97)。再者，一先前的報導指出：具有 OA 的女性大部分在絕經前期(peri-menopausal stage)蒙受 OA 症狀的發作(M.Y. Nadkar *et al.* (1999), *J Assoc Physicians India*,
20 47:1161-1163)。因此，研究用以防止處於 OA 的早期階段的疾病進展(disease progress)之策略是十分有必要的。

數個來自於 OA 病患的先前研究指出：關節軟骨細胞在 OA 的進展期間當中的生物特徵包含：終止分化(terminal differentiation)、礦質化(mineralization)以及最終為細胞凋

亡 (apoptosis)(F.J. Blanco *et al.* (1998), *Arthritis Rheum*, 41:284-289; F. Heraud *et al.* (2000), *Ann Rheum Dis*, 59:959-965; T. Kirsch *et al.* (2000), *Osteoarthritis Cartilage*, 8:294-302)。骨關節炎性軟骨細胞 (osteoarthritic chondrocyte) 5 被發現會表現膜聯蛋白 (annexin)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 以及第 X 型膠原蛋白 (collagen type X)[亦被稱為膠原蛋白 X (collagen X)](T. Kirsch *et al.* (2000), *Osteoarthritis Cartilage*, 8:294-302)。第 X 型膠原蛋白與膜聯蛋白 V (annexin V) 的表現反映出肥大性軟骨細胞 10 (hypertrophic chondrocytes) 的特徵有如是一成熟的分化 (mature differentiation)。軟骨細胞的細胞凋亡亦被發現於 OA 軟骨內，而曾經有人暗示軟骨細胞的細胞凋亡可能與 OA 軟骨內的細胞性 (cellularity) 之減少以及不正常的礦質化有關聯 (F.J. Blanco *et al.* (1998), *Arthritis Rheum*, 15 41:284-289; S. Hashimoto *et al.* (1998b), *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:3094-3099; F. Heraud *et al.* (2000), *Ann Rheum Dis*, 59:959-965)。因此，研究人員指出：骨關節炎性關節軟骨細胞重新開始類似於位在骨骺生長板 (epiphyseal growth-plates) 中的軟骨細胞之終止分化的遺傳型與表現型 20 特徵 (genetic and phenotypic characteristics)(T. Kirsch *et al.* (2000), *Osteoarthritis Cartilage*, 8:294-302)。處理 OA 的願景之一是在 OA 的非常早期階段 (very early stage) 就抑制 (suppress) 關節軟骨細胞的終止分化以及最終為停止疾病進展。但是，與一為了闡明 OA 的進展機制而應用達致終止

分化階段的人類關節軟骨細胞之活體外模型有關的研究不曾被報導過。

5-氮胞苷(5-azacytidine)是一種會導致低甲基化(hypomethylation)的 DNA 或 RNA 甲基轉移酶抑制劑(methyl transferase inhibitor)。已有報導指出：5-氮胞苷在複製當中會取代基因組 DNA (genomic DNA)內的胞苷(cytidine)，而因此擾亂存在於各種不同的標的基因啟動子(target gene promoters)內的胞苷之甲基化型式(methylation pattern)，而使得轉錄性抑制(transcriptional repression)被解除以及細胞分化程式(cell differentiation program)被改變(J.K. Christman *et al.* (1983). *Cancer Res.*, 43:763-769; P.A. Jones and S.M. Taylor (1980), *Cell*, 20:85-93; P.A. Jones *et al.* (1983), *J Exp Zool.*, 228:287-295; C. Tarella *et al.* (1982), *Cancer Res.*, 42:445-449; C. Walker *et al.* (1984), *J Natl Cancer Inst.*, 73:877-885)。亦有報導指出：5-氮胞苷誘發被培養的骨骺軟骨細胞的終止分化變化，此如在軟骨內骨化(endochondral ossification)當中所發生的(J.O. Cheung *et al.* (2001), *J Bone Miner Res.*, 16:309-318)。此外，M.J. Zuscik 等人建立一個模型用以研究關節軟骨細胞成熟作用的調節機制(M.J. Zuscik *et al.* (2004), *J Cell Biochem.*, 92:316-331)。他們的研究指出：5-氮胞苷-處理的雞關節軟骨細胞被誘發而表現出成熟的特徵(maturation hallmarks)[包含：第 X 型膠原蛋白、鹼性磷酸酶(ALP)以及印地安刺蝟(Indian hedgehog, Ihh)]，並且因應骨形態演發蛋

白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、轉形生長因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)以及副甲狀腺激素相關蛋白質 (parathyroid hormone-related protein, PTHrP)而顯示出被改變的第 X 型膠原蛋白與鹼性磷酸酶表現。但是，這個模型尚未被應用於被培養的人類骨關節軟骨細胞。

藻酸 (Alginate) 是一種由 L-古羅糖醛酸 (L-guluronic acid) 與 D-甘露糖醛酸 (D-mannuronic acid) 所構成的共聚物，它在鈣離子的存在下會聚合而形成一凝膠。藻酸可藉由加入諸如檸檬酸鈉或 EDTA 的鈣螯合劑 (calcium chelator) 而被容易地去聚合化 (depolymerized)。藻酸已於細胞囊封 (cell encapsulation)、細胞移植 (cell transplantation) 以及組織工程 (tissue engineering) 中發現到應用。被懸浮於藻酸溶液中的細胞可被捕獲 (entrapped) 於一旦聚合即形成的具有三維構形 (three-dimensional configuration) 的藻酸珠粒 (alginate beads) 中。這些藻酸珠粒可以被用於活體外培養 (*in vitro* culture)，並且亦可用於活體內移植 (transplantation *in vivo*) 到關節軟骨細胞缺損 (articular cartilage defect) 內。使用被培養於藻酸珠粒中的人類關節軟骨細胞的先前研究已經顯示：這些人類關節軟骨細胞分泌一類似於在天然的人類軟骨中所看到的基質 (matrix)，並且維持著它們的表現型有段長時間。

根據來自於上述研究的發現，申請人致力於發展一種含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物，該等人類關節軟

骨細胞可被誘發而達致一終止分化階段，而使得該含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物可以當作一模擬發生於骨關節炎性軟骨細胞內之終止分化的細胞培養物模型 (cell culture model)，可被用來鑑定一與關節軟骨細胞有關聯的病理學(諸如骨關節炎)，以及可被用來篩選一用於治療一與關節軟骨細胞有關聯的障礙(諸如骨關節炎)之候選藥物 (candidate drug)。

【發明內容】

發明概要

10 因此，依據第一個方面，本發明提供一種含有具被誘發的終止分化變化的人類關節軟骨細胞的三維式培養物，該培養物是藉由一包括下列步驟的方法而被製備出：

將人類關節軟骨細胞與一藻酸溶液混合以形成一細胞懸浮液；

15 將該細胞懸浮液滴入至一氯化鈣溶液中，俾以導致藻酸珠粒的形成，該等藻酸珠粒具有被捕獲在內的人類關節軟骨細胞；

於一容許人類關節軟骨細胞生長的培養基內培育該等由此所形成的藻酸珠粒；以及

20 以一去甲基化試劑(demethylating agent)來處理經培育的藻酸珠粒，而使得被捕獲在該等藻酸珠粒內的人類關節軟骨細胞之終止分化變化被誘發。

在第二個方面中，本發明提供一種用以製備一含有具被誘發的終止分化變化的人類關節軟骨細胞的三維式培養

物之方法，該方法包括：

將人類關節軟骨細胞與一藻酸溶液混合以形成一細胞懸浮液；

5 將該細胞懸浮液滴入至一氯化鈣溶液中，俾以導致藻酸珠粒的形成，該等藻酸珠粒具有被捕獲在內的人類關節軟骨細胞；

於一容許人類關節軟骨細胞生長的培養基內培育該等由此所形成的藻酸珠粒；以及

10 以一去甲基化試劑來處理經培育的藻酸珠粒，而使得被捕獲在該等藻酸珠粒內的人類關節軟骨細胞之終止分化變化被誘發。

依據本發明之含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物可被使用作為一模擬發生於骨關節炎性軟骨細胞內之終止分化的細胞培養物模型，可被用來鑑定一與關節軟骨細胞
15 有關聯的病理學(諸如骨關節炎)，以及可被用來篩選一用於治療一與關節軟骨細胞有關聯的障礙(諸如骨關節炎)之候選藥物。

圖式簡單說明

本發明的上述以及其他的特徵與優點，在參照下面的較佳實施例之詳細說明以及隨文檢附的圖式後，將變得明
20 顯，在圖式中：

圖 1 顯示在 5-氮胞苷(Aza-C)的 48 小時處理之後的第 3、7 天與 14 天的人類關節軟骨細胞內的第 II 型膠原蛋白之 mRNA 表現的變化，其中第 II 型膠原蛋白的 mRNA 表

現是藉由 RT-PCR 而被半-定量化並且相對於 18S rRNA 的表現而被標準化(normalized)，其中 A 區(panel A)顯示從對照組(control)與經 Aza-C 處理的培養物所評估的代表性圖像，而 B 區顯示第 II 型膠原蛋白相對於 18S 的光學密度的計算比值(calculated ratio of the optical densities of collagen type II to 18S)(%光學密度膠原蛋白 II/18S)以供比較。各柱代表 4 個重複培養物的平均值±SEM。數據是藉由曼-惠特尼 U 檢定(Mann-Whitney U test)來評估；以及**：p<0.01，當與 Aza-C 處理之後的具相同天數的對照組培養物相比之下；

圖 2 顯示在 Aza-C 的 48 小時處理之後的第 3、7 與 14 天的人類關節軟骨細胞內的第 X 型膠原蛋白之 mRNA 表現的變化，其中第 X 型膠原蛋白的 mRNA 表現是藉由 RT-PCR 而被半-定量化並且相對於 18S rRNA 的表現而被標準化，其中 A 區顯示從對照組與經 Aza-C 處理的培養物所評估的代表性圖像，而 B 區顯示第 X 型膠原蛋白相對於 18S 的光學密度的計算比值(%光學密度膠原蛋白 X/18S)以供比較。各柱代表 4 個重複培養物的平均值±SEM。數據是藉由曼-惠特尼 U 檢定來評估；以及**：p<0.01，當與 Aza-C 處理之後的具相同天數的對照組培養物相比之下；

圖 3 顯示在 Aza-C 的 48 小時處理之後的第 3、7 與 14 天的人類關節軟骨細胞內的鹼性磷酸酶之 mRNA 表現的變化，其中鹼性磷酸酶的 mRNA 表現是藉由 RT-PCR 而被半-定量化並且相對於 18S rRNA 的表現而被標準化，其中 A

區顯示從對照組與經 Aza-C 處理的培養物所評估的代表性圖像，而 B 區顯示鹼性磷酸酶相對於 18S 的光學密度的計算比值(%光學密度鹼性磷酸酶/18S)以供比較。各柱代表 4 個重複培養物的平均值±SEM。數據是藉由曼-惠特尼 U 檢
5 定來評估；以及**：p<0.01，當與 Aza-C 處理之後的具相同天數的對照組培養物相比之下；

圖 4 顯示來自於用以檢測人類關節軟骨細胞內的鹼性磷酸酶(ALP)之 mRNA 表現的定量即時 PCR (quantitative real-time PCR)之代表性擴增圖(amplification profiles)(左區)
10 以及解離曲線(dissociation curves)(右區)，其中甘油醛-3-磷酸酯去氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因當作一個管家基因(house keeping gene)以供標準化；

圖 5 顯示在 Aza-C 的 48 小時處理之後的第 14 天的人
15 類關節軟骨細胞之細胞大小變化(cell size changes)，其中代表性的細胞大小分布圖(cell size distribution profile)是從流動式細胞測量術(flow cytometry)來予以量測的，而相對強度(relative intensity)代表一個軟骨細胞的細胞大小。來自於對照組 (404.41±1.45) 以及經 Aza-C 處理的培養物
20 (509.20±1.93)之相對強度的平均值±SEM 被顯示出(數據是藉由史徒登氏 t 檢定(Student's *t*-test)來評估，以及**：p<0.01，當與對照組培養物相比之下)；以及

圖 6 顯示在 Aza-C 的 48 小時處理之後的第 14 天的人類關節軟骨細胞內的細胞凋亡誘發 (induction of

apoptosis)，其中經 TUNEL 染色的細胞[被染成紅色，被界定為細胞凋亡的細胞(apoptotic cells)]以及經 DAPI 對比染色(DAPI counter-stained)的細胞[被染成藍色，被界定為整體的細胞(total cells)]的代表性圖像被顯示出(100X 放大)。

- 5 對照組以及經 Aza-C 處理的細胞之細胞凋亡比率(apoptotic rate)被比較。各柱代表 4 個重複培養物的平均值±SEM (數據是藉由曼-惠特尼 U 檢定來評估，以及**：p<0.01，當與對照組培養物相比之下)。

【實施方式】

- 10 較佳實施例之詳細說明

為了這本說明書之目的，將被清楚地瞭解的是：文字“包括(comprising)”意指“包含但不限於”，以及文字“包括(comprises)”具有一對應的意義。

- 15 要被瞭解的是：若有任何一件前案刊物在此被引述，該參考資料不構成一個下述承認：在台灣或任何其他國家之中，該刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

除非另有界定，所有被使用於此的技術性以及科學性術語具有熟習本發明所屬之技藝人士所通常瞭解的意思。

- 20 在本發明中，為了提供一用於研究骨關節炎之機制的工具，申請人嘗試建立一模擬發生於骨關節炎性軟骨細胞內的終止分化之細胞培養物。得自於人類膝蓋的正常關節軟骨細胞以 5-氮胞苷(Aza-C)予以處理，並且分別地在處理之後的第 3、7 與 14 天被收獲。關節軟骨細胞的表現型以及遺傳型變化被偵測。

所得到的結果顯示：相較於對照組培養物，第 II 型膠原蛋白(一有關於正常有功能的關節軟骨細胞之標記)的 mRNA 表現在 Aza-C 處理之後顯著地被減少，而那些為第 X 型膠原蛋白與 ALP (有關於肥大性軟骨細胞的標記)所具者則顯著地被增加。此外，在 Aza-C 處理的 14 天之後相較於對照組，關節軟骨細胞的細胞大小以及細胞凋亡比率顯著地被增加。因此，在本發明中，申請人發展出一種由 3-D 培養的人類關節軟骨細胞所構成之終止分化模型，它可以被廣泛地使用於學術界的研究以及製藥工業之中，例如，供用於鑑定一與關節軟骨細胞有關聯的病理學(諸如骨關節炎)，以及用來篩選一用於治療一與關節軟骨細胞有關聯的障礙(諸如骨關節炎)之候選藥物。

因此，本發明提供一種含有具被誘發的終止分化變化的人類關節軟骨細胞的三維式培養物。

如本文中所使用的，術語“終止分化變化”意指人類關節軟骨細胞經歷下列過程之至少一者：細胞停止增殖(proliferating)、細胞變成肥大的(細胞的體積增加)，以及細胞表現第 X 型膠原蛋白，繼之以下列蛋白質之至少一者的表現：膜聯蛋白、印地安刺蝟(Ihh)以及鹼性磷酸酶。隨後地，肥大的人類關節軟骨細胞沉積礦物質以及最終地經歷細胞凋亡。

特別地，依據本發明之含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物可展現出下列生物特徵之至少一者：人類關節軟骨細胞之正常有功能的基因(亦即，第 II 型膠原蛋白基因)的

下降調節(down-regulation)、肥大性標記基因(亦即，第 X 型膠原蛋白基因)與礦質化標記基因(亦即，ALP 基因)的上升調節(up-regulation)，以及細胞體積與細胞凋亡比率之一增加。

5 本發明亦提供一種用以製備上述含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物之方法，該方法包括：

將人類關節軟骨細胞與一藻酸溶液混合以形成一細胞懸浮液；

10 將該細胞懸浮液滴入至一氯化鈣溶液中，俾以導致藻酸珠粒的形成，該等藻酸珠粒具有被捕獲在內的人類關節軟骨細胞；

於一容許人類關節軟骨細胞生長的培養基內培育該等由此所形成的藻酸珠粒；以及

15 以一去甲基化試劑來處理經培育的藻酸珠粒，而使得被捕獲在該等藻酸珠粒內的人類關節軟骨細胞之終止分化變化被誘發。

被使用於該混合步驟之中的人類關節軟骨細胞是得自於一人類個體(較佳為一健康的人類個體)的一個關節軟骨。

20 在本發明的一個較佳具體例中，該關節軟骨是取自於該人類個體之一個選自下列的部分：一正常的成熟膝蓋軟骨，以及來自於掌指關節、橈腕部關節、踝關節與骨盤關節(metacarpophalangeal, radiocarpal, ankle and pelvic joints)的軟骨。

在本發明之一更佳的具體例中，被使用於該混合步驟

之中的人類關節軟骨細胞是得自於一健康人類個體之一正常的成熟膝蓋軟骨。

較佳地，被使用於該混合步驟之中的藻酸溶液是一配於 0.9% NaCl 內的 1.2% 或 2.4% 藻酸鈉溶液。另擇地，該藻酸溶液可被取代以一含有一諸如膠原蛋白與明膠(gelatin) 5 的生物分子的溶液，該生物分子可以於一個 3-D 培養物系統中導致一骨架(scaffold)的形成。

較佳地，被使用於該處理步驟之中的該去甲基化試劑是選自於下列所構成的群組：5-氮胞苷(5-azacytidine)、5-10 氮-去氧胞苷(5-aza-deoxycytidine)、5'-氟-2'-去氧胞苷(5'-flouro-2'-deoxycytidine)、偽異胞苷(pseudoisocytidine)、二氫-5-氮胞苷(dihydro-5-azacytidine)以及阿拉伯呋喃糖基-5-氮胞嘧啶(arabinofuranosyl-5-azacytosine)[法扎拉濱(fazarabine)]。在本發明的一個較佳具體例中，該去甲基化 15 試劑是 5-氮胞苷。

在本發明的一個較佳具體例中，該培育步驟是在 37°C 下、於一含 5% CO₂ 之經濕化的氛圍中被進行。

在本發明的一個較佳具體例中，該處理步驟是在 37°C 下、於一含 5% CO₂ 之經濕化的氛圍中被進行。

20 有鑒於將被描述於下文中之被偵測到的生物特徵，被預期的是：依據本發明之含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物可在學術界的研究以及製藥工業之中找到各種不同的應用。

例如，它可被使用作為一模擬發生於骨關節炎性軟骨

細胞內之終止分化的細胞培養物模型。此外，它可以被製造成呈一商業套組的形式以供用於鑑定一與關節軟骨細胞有關聯的病理學(諸如骨關節炎)，或供用來篩選一用於治療一與關節軟骨細胞有關聯的障礙之候選藥物。

- 5 本發明將藉由下面的實施例而被進一步描述。但是，應予以瞭解的是，下面的實施例僅被意欲為供例示之目的，而不應被解釋為限制本發明的實施。

實施例

材料與方法:

- 10 A. 製備含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物：
1. 人類關節軟骨細胞的來源與細胞培養物：
- (a) 正常人類關節軟骨細胞 NHAC-kn (Clonic®, BioWhittaker, Walkersville, MD)是得自於一位 50 歲高加索男性的膝蓋。依據製造商的導引 (guidelines)，NHAC-kn 培養物被建立以供應用於下列研究：透明軟骨(hyaline cartilage)的形成、崩解 (breakdown)與再生(regeneration)，骨關節炎調查以及軟骨細胞的增殖與分化。
- 15
- (b) 正常人類關節軟骨細胞 KMU-AC 是依據下列操作程序而從一位 23 歲亞洲男性之新鮮屍體膝蓋(fresh cadaver-knees)(由高雄醫學大學附設醫院所提供)
- 20
- 被建立出：首先，膝蓋軟骨被剝碎並依序地以玻尿酸酶(hyaluronidase)(0.5 mg/ml)、鏈黴蛋白酶(pronase)(1 mg/ml)與膠原蛋白酶(collagenase)(1

mg/ml)予以消化。經消化的產物藉由離心來收集，並被平板培養於一含有 DMEM [添加有 10%胎牛血清 (fetal bovine serum)、1% ITS-預混物 (ITS-premix)、1%非必需胺基酸(non-essential amino acids) 與 0.5% 青黴素 - 鏈黴素 (penicillin-streptomycin)]的 10 cm 培養皿(Petri dish)中，繼而在 37°C 下培育於一具有 20% O₂ 與 5% CO₂ 的培養箱內。當所形成的關節軟骨細胞之單層達致匯聚 (confluence) 之時，使用 0.1% 胰蛋白酶 (trypsin)-EDTA 而使細胞從培養皿的底部脫附而出，並接而被次-培養歷經 4 次繼代培養 (passage)。由此得到的 KMU-AC 之次培養物 (sub-cultures) 被使用於下面所描述的製備藻酸珠粒的步驟中。

2. 含有人類關節軟骨細胞之藻酸珠粒的製備：

藻酸珠粒是參照 C. Sanchez *et al.* (2002), *J. Rheumatol*, 29:772-8 來製備。簡言之，上述人類關節軟骨細胞培養物被散浮於一配於 0.9% NaCl 內的 1.2% 藻酸溶液中，俾以形成一個處在一為 1×10^6 細胞/mL 之密度下的細胞懸浮液。該細胞懸浮液接而經由一個黃色吸量管尖頭 (pipette tip) 而被緩慢地滴入至一個 102 mM CaCl₂ 溶液中，俾以導致捕獲有人類關節軟骨細胞的藻酸珠粒之形成。由此形成的藻酸珠粒被容許在室溫下、於該 CaCl₂ 溶液內聚合又再 10 分鐘。

在以鹽水清洗之後，15 個藻酸珠粒被培育於一個每井有 5 ml 培養基的 6-井培養盤內。培養基是軟骨細胞基礎培

養基 (Chondrocyte basal medium)(Bulletkit, Clonic®; BioWhittaker, Walkersville, MD)添加有軟骨細胞生長培養基(Chondrocyte growth medium)[含有 R3-IGF1、bFGF、運鐵蛋白(transferrin)、胰島素(insulin)、胎牛血清以及建它黴素/兩性黴素-B (gentamicin/amphotericin-B)(SingleQuots, Clonic®; BioWhittaker, Walkersville, MD)]。藻酸珠粒在 37 °C 下、於一含 5% CO₂ 之經濕化的培育箱內被培養歷時 7 天，而培養基每 3 天即予更換。培養物接而以 15 µg/ml 的 5-氮胞苷(Aza-C)(Sigma, St Louis, MO)予以處理歷時 48 小時。

3. 含有人類關節軟骨細胞的藻酸珠粒之 5-氮胞苷處理：

如上所述之經培育的藻酸珠粒以 15 µg/mL 5-氮胞苷 (Sigma, St Louis, MO)予以處理歷時 48 小時。之後，它們被維持在不含 Aza-C 的培養基中歷時又再 2 週。細胞分別地在 Aza-C 處理之後的第 3、7 與 14 天予以收穫。除了 Aza-C 的處理被省略之外，對照組培養物是在相同的條件下被培育以及收穫。

人類關節軟骨細胞是藉由將珠粒溶解於一處在 pH 7.4 下之含有 0.05 M 檸檬酸鈉(sodium citrate)與 0.03 M 乙二胺四乙酸鈉(sodium EDTA)的 0.9% NaCl 溶液中而被釋出。供各個實驗用的細胞是藉由處於 1,000 rpm 下之低速離心歷時 5 分鐘而被收集。

除了定量即時聚合酶鏈反應(quantitative real-time PCR)之外，NHAC-kn 培養物被使用於下列實驗中。

KMU-AC 培養物被使用俾以藉由定量即時 PCR 來定量 mRNA 表現，這被執行以便進一步確認 Aza-對於人類關節軟骨細胞的基因表現的效用。

B. 反轉錄-聚合酶鏈反應(RT-PCR)分析:

- 5 在一為 48 小時的 Aza-C 處理之後的第 3、7 以及 14 天，藉由 RT-PCR 來量測經 Aza-C 處理的細胞以及未處理的細胞(對照組)的第 II 型與第 X 型膠原蛋白以及鹼性磷酸酶(ALP)的 mRNA 表現。

總 RNA (total RNA)是使用 Trizol 試劑(Trizol reagent) (Gibco BRL, Rockville, MD)而從人類關節軟骨細胞被分離出。第一股 cDNA 是藉由加入莫洛尼鼠類白血病病毒反轉錄酶(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)以及寡(dT)引子[oligo(dT) primer]而從 1 µg 的 RNA 被轉變而來。PCR 是使用一個 Applied Biosystems GeneAmp 9600

15 PCR 系統(Applied Biosystems, Foster City, CA)來執行。PCR 反應是藉由使用各個基因的專一性引子(specific primers)而於下列循環條件(cycling conditions)下被進行：在 94°C 下歷時 4 分鐘的變性(denaturing)，繼之以在 94°C 下歷時 30 秒、在 60°C 下歷時 45 秒的黏合(annealing)以及在 72°C 下歷

20 時 45 秒的延伸反應(extension)的 40 個循環。由此得到的 PCR 產物[擴增產物(amplicons)]是藉由在一個 1.4%瓊脂糖凝膠(agarose gel)上的電泳(electrophoresis)而被解析，並藉由溴化乙錠染色(ethidium bromide staining)來作視觀。

被解析的染色帶之光學密度(optical densities)是使用

一個 Bioimaging System (UVP Inc., Upland, CA) 來予以半-
 定量化。18S rRNA 基因被用來當作一個供標準化
 (normalization) 用的對照基因(control gene)。PCR 產物相對
 於 18S rRNA 基因的光學密度比值被計算出以供比較。

- 5 表 1 顯示被使用於 RT-PCR 實驗中的專一性引子的核
 苷酸序列。

表 1. 被使用於 RT-PCR 實驗中的專一性引子

標的基因	引子	序列(5' → 3')	擴增產物 大小(bp)
第 II α 1 型膠原蛋白 (Collagen type II α 1)	F1	aactggcaagcaaggagaca (序列辨識編號:1)	621
	R1	agtttcaggtctctgcaggt (序列辨識編號:2)	
第 X α 1 型膠原蛋白 (Collagen type X α 1)	F2	agccagggtgccaggacca (序列辨識編號:3)	387
	R2	tttcccactccaggagggc (序列辨識編號:4)	
ALP	F3	gcgaaacgtatttctccagaccag (序列辨識編號:5)	367
	R3	ttccaaacaggagagtcgcttcaa (序列辨識編號:6)	
18S rRNA	F4	ccgcagctaggaataatggaataggac (序列辨識編號:7)	220
	R4	acgacggtatctgatcgtcttcg (序列辨識編號:8)	

C. 定量即時 PCR 分析:

- 10 定量即時 PCR 亦被執行以便進一步確認來自於
 RT-PCR 的發現。在一為 48 小時的 Aza-C 處理之後的第 3、
 7 以及 14 天，經 Aza-C 處理的細胞以及對照組細胞的第 II
 型與第 X 型膠原蛋白以及 ALP 的 mRNA 表現被量測。關
 於總 RNA 分離以及第一股 cDNA 轉變的操作程序是相同於
 那些用於 RT-PCR 者。

- 15 定量即時 PCR 是於一個 ABI Prism 7900 HT 序列偵測
 系統 (ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System)
 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 中被執行，使用含有
 Amplitag Gold DNA 聚合酶 (Amplitag Gold DNA
 polymerase)、混合有 dUTP 的 dNTP、SYBR Green I、被動

參考物(passive reference)以及反應緩衝液的 SYBR Green PCR Master Mix Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

反應是於一為 25 μ L 的混合物內被進行，該混合物含有 cDNA、各個基因的專一性引子以及 SYBR Green PCR Master Mix Reagent。循環條件如下：對於第 II α 1 型膠原蛋白，在 50 $^{\circ}$ C 下歷時 2 分鐘以及在 95 $^{\circ}$ C 下歷時 10 分鐘的 1 個循環，繼之以在 95 $^{\circ}$ C 下歷時 15 秒以及在 62 $^{\circ}$ C 歷時 1 分鐘的 40 個循環；對於第 X α 1 型膠原蛋白，在 50 $^{\circ}$ C 下歷時 2 分鐘以及在 95 $^{\circ}$ C 下歷時 10 分鐘的 1 個循環，繼之以在 95 $^{\circ}$ C 下歷時 15 秒、在 52 $^{\circ}$ C 下歷時 20 秒以及在 72 $^{\circ}$ C 下歷時 20 秒的 40 個循環；對於 ALP 與 GAPDH，在 50 $^{\circ}$ C 下歷時 2 分鐘以及在 95 $^{\circ}$ C 下歷時 10 分鐘的 1 個循環，繼之以在 95 $^{\circ}$ C 下歷時 15 秒以及在 60 $^{\circ}$ C 下歷時 1 分鐘的 40 個循環。

表 2 顯示被使用於定量即時 PCR 實驗中的專一性引子的核苷酸序列：

表 2. 被使用於定量即時 PCR 實驗中的專一性引子

標的基因	引子	序列 (5'→3')	擴增產物大小(bp)
第 II α 1 型膠原蛋白	F5	caacactgccaacgtccagat (序列辨識編號:9)	71
	R5	tcttgcaagtggtagtgatgttct (序列辨識編號:10)	
第 X α 1 型膠原蛋白	F6	cagatttgagctatcagaccaaaa (序列辨識編號:11)	85
	R6	aaattcaagagaggcttcacatacg (序列辨識編號:12)	
GAPDH	F7	tctctctgacttcaacagcgac (序列辨識編號:13)	126
	R7	ccctgttgctgtagccaaattc (序列辨識編號:14)	
ALP	F8	ggaggccgaaagtacatgtttc (序列辨識編號:15)	72
	R8	gaaacatgtactttcgccctcc (序列辨識編號:16)	

由此得到的 PCR 產物(擴增產物)是藉由 SYBR Green

(雙股 DNA 結合染料)的螢光(fluorescence)來予以偵測(T.B. Morrison *et al.* (1998), *Biotechniques*, 24:954-958, 960, 962)。相對的 mRNA 表現位準(relative mRNA expression level)是從各個 PCR 產物的循環閾值[threshold cycle (C_t) value]被計算出，並且使用比較性 C_t 方法(comparative C_t method)(K.J. Livak and T.D. Schmittgen (2001), *Methods*, 25:402-408)而以那個為 GAPDH 所具者來予以標準化。來自於在 Aza-C 處理之後的第 3 天之對照組細胞的各個基因之表現的相對數量被設定為 100%，而所有其他者被轉換成一個與之相對的百分比變化(a percentage change relative thereto)。在 PCR 反應之後，一解離(dissociation)[融化(melting)]曲線被產生以便檢查 PCR 反應的專一性。所有的 PCR 擴增反應是呈 3 個重複來進行，而且實驗被重複至少 3 次。

15 **D. 流動式細胞測量術(Flow cytometry):**

在 Aza-C 處理之後的第 14 天，來自於對照組與經 Aza-C 處理的培養物之關節軟骨細胞的細胞大小是藉由流動式細胞測量術來作分析。經培養的細胞是藉由相同於上面所述的方式而從藻酸珠粒被釋出。細胞(1×10^6)接而被散浮於磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffered saline)內，並立即在一個雷射流動式細胞測量儀(laser flow cytometry)(EPICS Elite; Coulter, Hialeah, FL)上予以分析。前向散射(forward scatter)的強度是藉由使用一個氬雷射(argon laser)(488 nm)作為探測光束(probing beam)來作量測。相對

強度(relative intensity)代表一個軟骨細胞的細胞大小。5 至 6 千個來自於對照組以及經 Aza-C 處理的培養物之軟骨細胞被量測。數據是藉由 WinMDI 軟體(EPICS Elite ESP; Beckman-Coulter Electronics, Hialeah, FL)來作分析。

5 E. TUNEL [末端去氧核糖核苷酸轉移酶調節的 dUTP 切口末端標記法 (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling)]分析:

一個細胞凋亡的細胞之斷片化 DNA (fragmented DNA) 是使用一種 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche, Germany)而被 TUNEL 染色。

依據製造商的導引，在 Aza-C 處理之後的第 14 天，來自於對照組以及經 Aza-C 處理的培養物之關節軟骨細胞在一為 1×10^6 /mL 的細胞密度下被固定於配於磷酸鹽緩衝溶液(PBS)內的 4%三聚甲醛(paraformaldehyde)中，並於室溫下予以培育歷時 10 分鐘。在 200 rpm 下離心歷時 5 分鐘之後，細胞被固定於 80%乙醇之內，並接而藉由使用一個細胞離心機(cytospin)(Cytospin 3; Shandon, UK)在一為 2,000 rpm 的速度下離心歷時 5 分鐘而將之沉澱於一載玻片上。載玻片以 PBS 予以洗滌兩次，而細胞藉由培育於位在冰上的通透化溶液(permeabilization solution)(配於 0.1%檸檬酸鈉中的 0.1% Triton X-100)來予以通透化歷時 2 分鐘。一含有末端去氧核糖核苷酸轉移酶與玫瑰紅(rhodamine)[標記用染料(labelling dye)]的 TUNEL 反應混合物被加至載玻片上，並且在 37°C 下、於一處於黑暗中之經濕化的房室(a

humidified chamber in the dark)內被培育歷時 60 分鐘。反應藉由加入一阻斷緩衝液(blocking buffer)(配於 PBS 中的 0.1% TritonX-100/0.5% BSA)而被停止。細胞藉由 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)而被對比染色(counter-stained)。載玻片在一個具有一激發波長(excitation wavelength)對於玫瑰紅而言是 580 nm 以及對於 DAPI 而言是 365 nm 的螢光顯微鏡上被觀察。細胞核被 DAPI 染成藍色，而唯有細胞凋亡的細胞被玫瑰紅染成紅色。對於各個載玻片而言，位於 5 個顯微鏡視野(5 microscopic fields)內之被染色的細胞被計數。數據是使用 Image-Pro[®] Plus 分析軟體(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)予以分析。被染成紅色的細胞(細胞凋亡的細胞)相對於被染成藍色的細胞(整體的細胞)之比值被定義為軟骨細胞的細胞凋亡比率(apoptotic rate)。

15 F. 統計學分析

來自於 RT-PCR、定量即時 PCR 以及 TUNEL 染色實驗的數據被表示為來自於代表性實驗的 4 個井之平均值 \pm SEM。統計顯著性(statistical significance)是藉由曼-惠特尼 U 檢定來作評估。來自於有關細胞大小量測的流動式細胞測量術的數據被顯示為在各個組別中的 5000-6000 個細胞的平均值 \pm SEM。統計顯著性是藉由史徒登氏 t 檢定來作評估。所有的實驗被重複至少 3 次。 $p < 0.05$ 被認為是有顯著性的(*: $p < 0.05$ 以及 **: $p < 0.01$ ，當與對照組相比之下)。

結果:

1. 反轉錄-聚合酶鏈反應(RT-PCR):

在一為 48 小時的 Aza-C 處理之後的第 3、7 以及 14 天的人類關節軟骨細胞內的第 II 型膠原蛋白基因、第 X 型膠原蛋白基因以及鹼性磷酸酶(ALP)基因的 mRNA 表現位
5 準是藉由 RT-PCR 來予以量測。

相較於對照組，經 Aza-C 處理的組別中的第 II 型膠原蛋白基因的 mRNA 表現在 Aza-C 處理之後的第 7 天($p < 0.01$)以及第 14 天($p < 0.01$)被顯著地減少(參見圖 1 的 A 與 B 區)，而經 Aza-C 處理的組別中的第 X 型膠原蛋白基因的
10 mRNA 表現在 Aza-C 處理之後的第 3 天($p < 0.01$)、第 7 天($p < 0.01$)以及第 14 天($p < 0.01$)被顯著地增加(參見圖 2 的 A 與 B 區)。經 Aza-C 處理的組別中的 ALP 基因的 mRNA 表現在 Aza-C 處理之後的第 7 天($p < 0.01$)以及第 14 天($p < 0.01$)被顯著地增加，而那個為對照組所具者則難以測得(參
15 見圖 3 的 A 與 B 區)。

2. 定量即時 PCR:

參照圖 4，左區顯示來自於 ALP 與 GAPDH mRNA 表現的定量之代表性即時 PCR 圖(real-time PCR profiles)，而右區顯示這兩個基因的 PCR 產物的解離曲線。

20 表 3 顯示藉由定量即時 PCR 的第 II 型膠原蛋白、第 X 型膠原蛋白以及 ALP 基因的 mRNA 表現的百分比變化。

從表 3 可清楚地看到：相較於對照組培養物，經 Aza-C 處理的培養物中的第 II 型膠原蛋白基因的 mRNA 表現在 Aza-C 處理之後的第 3 天($p < 0.01$)、第 7 天($p < 0.01$)以及

第 14 天 ($p < 0.05$) 被顯著地減少，而經 Aza-C 處理的培養物中的第 X 型膠原蛋白基因的 mRNA 表現在 Aza-C 處理之後的第 3 天 ($p < 0.05$)、第 7 天 ($p < 0.01$) 以及第 14 天 ($p < 0.05$) 被顯著地誘發。經 Aza-C 處理的培養物中的軟骨細胞之 ALP mRNA 表現在 Aza-C 處理之後的第 7 天以及第 14 天被顯著地誘發 ($p < 0.01$)。

表 3. 藉由定量即時 PCR 的第 II 型膠原蛋白、第 X 型膠原蛋白以及 ALP 基因的 mRNA 表現的百分比變化

mRNA	處理	第 3 天 (%)	第 7 天 (%)	第 14 天 (%)
第 II 型膠原蛋白	對照組	100.0 ± 1.6	125.0 ± 1.2	10.0 ± 6.3
	Aza-C	7.3 ± 1.2**	1.0 ± 0.4**	3.0 ± 0.9*
第 X 型膠原蛋白	對照組	100.0 ± 9.1	71.0 ± 17.5	159.0 ± 21.8
	Aza-C	398.0 ± 26.3*	64,013.0 ± 5.0**	335.0 ± 1.4*
ALP	對照組	100.0 ± 9.3	4.0 ± 1.1	18.0 ± 4.7
	Aza-C	175.8 ± 13.5	31,900.0 ± 4.7**	735.6 ± 3.2**

數據被表示為平均值 ± S.E.M。

- 10 * : $p < 0.05$ ，在 Aza-C 處理之後當與具相同天數的對照組培養物相比之下。
 * : $p < 0.01$ ，在 Aza-C 處理之後當與具相同天數的對照組培養物相比之下。

3. 流動式細胞測量術:

參照圖 5，在 Aza-C 處理之後的第 14 天，相較於對照組培養物 (404.41 ± 1.45)，經 Aza-C 處理的培養物中的關節軟骨細胞的細胞大小 (509.20 ± 1.93) 被顯著地增加 (一為 26% 的增加) ($p < 0.01$)。

4. TUNEL 分析:

參照圖 6，相較於對照組培養物，經 Aza-C 處理的培養物中的關節軟骨細胞的細胞凋亡比率在 Aza-C 處理之後

的第 14 天被顯著地增加($p < 0.01$)。

討論:

軟骨內的骨形成(Endochondral bone formation)在生理上發生於胚胎長骨(embryonic long bone)的發育以及骨骺生長板(epiphyseal growth plate)內的產後縱骨生長(post-natal longitudinal bone growth)的期間當中。在這個過程當中，軟骨細胞根據身體的內部環境中的時序與空間信號(temporal and spatial signals)來扮演重要的角色。軟骨細胞通經數個階段，包含：增殖(proliferation)、成熟(maturation)、肥大(hypertrophy)、鈣化(calcification)以及最終為細胞凋亡(apoptosis)(H.M. Kronenberg (2003), *Nature*, 423:332-336; L. Shum and G. Nuckolls (2002), *Arthritis Res*, 4:94-106)。軟骨細胞的增殖與基質生成(matrix production)會導致軟骨增大(cartilage enlargement)，而處於這個階段中的專一性標記分子是第 II 型膠原蛋白以及葡糖胺聚糖(glucosaminoglycan)。之後，軟骨細胞經歷終止分化：細胞停止增殖、增大(肥大)以及表現第 X 型膠原蛋白；隨後地，細胞表現膜聯蛋白、印地安刺蝟(Ihh)、鹼性磷酸酶並且沉積礦物質；以及最終地，肥大性軟骨細胞經歷細胞凋亡(H.M. Kronenberg (2003), *Nature*, 423:332-336; F. Long *et al.* (2001), *Development*, 128:5099-5108; K.J. Noonan *et al.* (1998), *J Orthop Res*, 16:500-508)。

曾有報導指出：肥大性軟骨細胞經由從肥大性軟骨細胞所分泌的因子而在指引周圍區域內的礦質化、血管形成

(vascularization)以及成骨細胞生成(osteoblastogenesis)上扮演角色(H.M. Kronenberg (2003), *Nature*, 423:332-336)。但是，軟骨內骨化的過程不會發生於關節軟骨細胞內，關節軟骨細胞在吾人一生當中維持著軟骨細胞的功能。在 OA 軟骨內，通常存在於關節軟骨中的第 II 型膠原蛋白會減少，但修補性膠原蛋白(reparative collagen)，亦即第 X 型膠原蛋白，會被表現(M. Adam and Z. Deyl (1983), *Clin Chim Acta*, 133:25-32; T. Aigner *et al.* (1993), *J Clin Invest*, 91:829-837; T. Kirsch *et al.* (2000), *Osteoarthritis Cartilage*, 8:294-302)。亦有人報導：OA 關節軟骨細胞恢復類似於骨骺生長板(epiphyseal growth-plates)的終止分化，表現膜聯蛋白以及 ALP，且亦會促進礦質化以及最終為細胞凋亡(T. Kirsch *et al.* (2000), *Osteoarthritis Cartilage*, 8:294-302)。進一步被報導的是：關節軟骨的細胞性(cellularity)之減少與人類個體的老化以及 OA 的發生是相符合的(A. Abyad and J.T. Boyer (1992), *Curr Opin Rheumatol*, 4:153-159; C.S. Adams and J.R. Horton-We (1998), *Anat Rec*, 250:418-425; F.J. Blanco *et al.* (1998), *Arthritis Rheum*, 41:284-289)。

細胞凋亡的軟骨細胞被發現位於 OA 病人的關節軟骨之表面以及中央區域中(F.J. Blanco *et al.* (1998), *Arthritis Rheum*, 41:284-289; S. Hashimoto *et al.* (1998a), *Arthritis Rheum*, 41:1632-1638; S. Hashimoto *et al.* (1998c), *Arthritis Rheum*, 41:1266-1274; F. Heraud *et al.* (2000), *Ann Rheum Dis*, 59:959-965; J.R. Horton-We *et al.* (1998), *Matrix Biol*,

17:107-115; T. Kirsch *et al.* (2000), *Osteoarthritis Cartilage*, 8:294-302)。研究者建議：關節軟骨細胞的細胞凋亡可能在軟骨細胞的細胞性之損失上扮演一個非常重要的角色(M. Lotz *et al.* (1999), *Osteoarthritis Cartilage*, 7:389-391)。隨後地，關節軟骨細胞的細胞性之減少可能造成無法維持細胞外基質(extracellular matrix)之適當形成，而最終地 OA 會發展出(M. Lotz *et al.* (1999)，同上)。

於是，數個從軟骨細胞生物學的方面來防止 OA 的進展之策略曾被建議，諸如阻斷軟骨細胞的細胞凋亡(F.J. Blanco *et al.* (1995), *Am J Pathol*, 146:75-85; S. Hashimoto *et al.* (1997), *Arthritis Rheum*, 40:1749-1755; F. Heraud *et al.* (2000), *Ann Rheum Dis*, 59:959-965)。因此，抑制(suppressing)關節軟骨細胞的終止分化可能是一用以防止骨關節炎之進展的有用策略。在活體內研究之前，測試被建議的策略在經培養的軟骨細胞中之有用性是值得做的。因此，在本發明中，申請人於經培養的人類關節軟骨細胞中建立一個終止分化模型，它可以模擬 OA 軟骨細胞的生物特徵。

從上述實驗所得到的結果指出：人類關節軟骨細胞的終止分化可於一個三維式培養物系統中被誘發。吾人發現：一為 48 小時的 Aza-C 處理在從 Aza-C 處理之後的第 3 天開始可以誘發第 X 型膠原蛋白的表現以及抑制第 II 型膠原蛋白的表現。隨後地，ALP 表現在 Aza-C 處理之後的第 7 天被誘發(參見圖 1 至圖 4 以及表 3 中所示的結果)。再者，肥大性人類關節軟骨細胞甚至是人類關節軟骨細胞的細胞

凋亡亦在 Aza-C 處理之後的第 14 天被觀察到(參見圖 5 至圖 6 所示的結果)。關節軟骨細胞的正常有功能的基因(亦即第 II 型膠原蛋白基因)之下降調節以及軟骨細胞的肥大性標記基因(亦即第 X 型膠原蛋白基因)以及礦質化標記基因(亦即 ALP 基因)的上升調節證實了關節軟骨細胞經歷終止分化。藉由流動式細胞測量術所分析的經 Aza-C 處理的細胞之細胞增大進一步證實關節軟骨細胞的肥大。再者，經 Aza-C-處理的細胞之細胞凋亡比率的增加顯示：關節軟骨細胞經歷終止分化的最終過程。從上述實驗所得到的結果證實：在本發明的活體外培養物模型中，人類關節軟骨細胞之遺傳型與表現型性質可被誘發進入終止分化。

來自於 KMU-AC 軟骨細胞之定量即時 PCR 的結果進一步提供第 II 型膠原蛋白、第 X 型膠原蛋白以及 ALP 的 mRNA 表現之一更有希望的定量。雖然由這些基因所表現的蛋白質之位準未被測定，Aza-C 對於這些基因的 mRNA 表現之影響被證實。更甚者，已經顯示：Aza-C 在關節軟骨細胞的終止分化中減少第 II 型膠原蛋白表現同時增加標記基因的表現的效用不是特定地發生於 NHAC-kn 軟骨細胞。但是，NHAC-kn 以及 KMU-AC 軟骨細胞當被 Aza-C 所影響時的基因表現變化與時序變化是不相符的。Aza-C 對於基因表現的最高效用對於 KMU-AC 而言是發生在第 7 天，而對於 NHAC-kn 而言是在第 14 天。關於這個差異之一可能的原因可能是個體變異(individual variation)或年齡-相關的原因(age-related reasons)。因此被建議的是：在使用

這個有關於關節軟骨細胞之活體外終止分化模型之前，要進行當被 Aza-C 所影響時的基因表現變化之一時序圖 (temporal profile) 的特徵鑑定。

先前的報導指出：經單層培養的軟骨細胞會經歷反分化 (dedifferentiation) (其中第 II 型膠原蛋白的合成可能被消除)，而經三維式培養的軟骨細胞表現出它們的分化功能類似於那些在活體內者 (C. Domm *et al.* (2002), *Osteoarthritis Cartilage*, 10:13-22; J. Malda *et al.* (2003a), *Biomaterials*, 24:5153-5161; J. Malda *et al.* (2003b), *Tissue Eng*, 9:939-948)。於是，在本發明的研究中，人類關節軟骨細胞被培育於藻酸珠粒中用以維持它們的生物特徵，有如它們在活體內存在著。因此，本發明建立一種新穎的人類關節軟骨細胞的細胞培養物模型，用以模擬經歷終止分化的關節軟骨細胞的生物特徵。此模型可被用來研究骨關節炎的分子或細胞機制、用以鑑定一與關節軟骨細胞有關聯的病理學 (諸如骨關節炎)，或用以篩選一被使用於治療關節炎的候選藥物。

於本案說明書中被引述之所有文獻資料以它們的整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案的詳細說明 (包含界定在內) 將佔上風。

雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，明顯地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示在 5-氮胞苷(Aza-C)的 48 小時處理之後的第 3、7 天與 14 天的人類關節軟骨細胞內的第 II 型膠原蛋白之 mRNA 表現的變化，其中第 II 型膠原蛋白的 mRNA 表現是藉由 RT-PCR 而被半-定量化並且相對於 18S rRNA 的表現而被標準化(normalized)，其中 A 區(panel A)顯示從對照組(control)與經 Aza-C 處理的培養物所評估的代表性圖像，而 B 區顯示第 II 型膠原蛋白相對於 18S 的光學密度的計算比值(calculated ratio of the optical densities of collagen type II to 18S)(%光學密度膠原蛋白 II/18S)以供比較。各柱代表 4 個重複培養物的平均值±SEM。數據是藉由曼-惠特尼 U 檢定(Mann-Whitney U test)來評估；以及**：p<0.01，當與 Aza-C 處理之後的具相同天數的對照組培養物相比之下；

圖 2 顯示在 Aza-C 的 48 小時處理之後的第 3、7 與 14 天的人類關節軟骨細胞內的第 X 型膠原蛋白之 mRNA 表現的變化，其中第 X 型膠原蛋白的 mRNA 表現是藉由 RT-PCR 而被半-定量化並且相對於 18S rRNA 的表現而被標準化，其中 A 區顯示從對照組與經 Aza-C 處理的培養物所評估的代表性圖像，而 B 區顯示第 X 型膠原蛋白相對於 18S 的光學密度的計算比值(%光學密度膠原蛋白 X/18S)以供比較。各柱代表 4 個重複培養物的平均值±SEM。數據是藉由曼-惠特尼 U 檢定來評估；以及**：p<0.01，當與 Aza-C 處理之後的具相同天數的對照組培養物相比之下；

圖 3 顯示在 Aza-C 的 48 小時處理之後的第 3、7 與 14 天的人類關節軟骨細胞內的鹼性磷酸酶之 mRNA 表現的變化，其中鹼性磷酸酶的 mRNA 表現是藉由 RT-PCR 而被半-定量化並且相對於 18S rRNA 的表現而被標準化，其中 A 區顯示從對照組與經 Aza-C 處理的培養物所評估的代表性圖像，而 B 區顯示鹼性磷酸酶相對於 18S 的光學密度的計算比值(%光學密度鹼性磷酸酶/18S)以供比較。各柱代表 4 個重複培養物的平均值±SEM。數據是藉由曼-惠特尼 U 檢定來評估；以及**：p<0.01，當與 Aza-C 處理之後的具相同天數的對照組培養物相比之下；

圖 4 顯示來自於用以檢測人類關節軟骨細胞內的鹼性磷酸酶(ALP)之 mRNA 表現的定量即時 PCR (quantitative real-time PCR)之代表性擴增圖(amplification profiles)(左區)以及解離曲線(dissociation curves)(右區)，其中甘油醛-3-磷酸酯去氫酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因當作一個管家基因(house keeping gene)以供標準化；

圖 5 顯示在 Aza-C 的 48 小時處理之後的第 14 天的人類關節軟骨細胞之細胞大小變化(cell size changes)，其中代表性的細胞大小分布圖(cell size distribution profile)是從流動式細胞測量術(flow cytometry)來予以量測的，而相對強度(relative intensity)代表一個軟骨細胞的細胞大小。來自於對照組(404.41±1.45)以及經 Aza-C 處理的培養物(509.20±1.93)之相對強度的平均值±SEM 被顯示出(數據是

藉由史徒登氏 *t* 檢定(Student's *t*-test)來評估，以及**： $p < 0.01$ ，當與對照組培養物相比之下)；以及

圖 6 顯示在 Aza-C 的 48 小時處理之後的第 14 天的人類關節軟骨細胞內的細胞凋亡誘發(induction of apoptosis)，其中經 TUNEL 染色的細胞[被染成紅色，被界定為細胞凋亡的細胞(apoptotic cells)]以及經 DAPI 對比染色(DAPI counter-stained)的細胞[被染成藍色，被界定為整體的細胞(total cells)]的代表性圖像被顯示出(100X 放大)。

對照組以及經 Aza-C 處理的細胞之細胞凋亡比率(apoptotic rate)被比較。各柱代表 4 個重複培養物的平均值 \pm SEM (數據是藉由曼-惠特尼 U 檢定來評估，以及**： $p < 0.01$ ，當與對照組培養物相比之下)。

【主要元件符號說明】

(無)

97年9月19日修正本

序列表

- <110> 高雄醫學大學
- <120> 具被誘發終止分化變化的人類關節軟骨細胞的三維式培養物
以及它的製備方法
- 5 <130> KP-8121
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 10 <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 用於 PCR 的第 II α 1 型膠原蛋白基因的前向引子
- 15 <400> 1
- aactggcaag caaggagaca 20
- <210> 2
- <211> 20
- 20 <212> DNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 用於 PCR 的第 II α 1 型膠原蛋白基因的反向引子
- <400> 2
- 25 agtttcaggt ctctgcaggt 20
- <210> 3

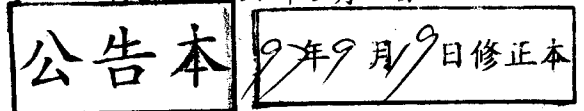
- <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- 5 <223> 用於 PCR 的第 $X\alpha 1$ 型膠原蛋白基因的前向引子
 <400> 3
 agccagggtt gccaggacca 20
- <210> 4
- 10 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- <223> 用於 PCR 的第 $X\alpha 1$ 型膠原蛋白基因的反向引子
- 15 <400> 4
 ttttcccact ccaggagggc 20
- <210> 5
- <211> 24
- 20 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- <223> 用於 PCR 的 ALP 基因的前向引子
 <400> 5
- 25 gcgaacgtat ttctccagac ccag 24
- <210> 6

- <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- 5 <223> 用於 PCR 的 ALP 基因的反向引子
 <400> 6
 ttccaaacag gagagtcgct tcaa 24
- <210> 7
- 10 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- <223> 用於 PCR 的 18S rRNA 基因的前向引子
- 15 <400> 7
 ccgcagctag gaataatgga ataggac 27
- <210> 8
- <211> 23
- 20 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- <223> 用於 PCR 的 18S rRNA 基因的反向引子
 <400> 8
- 25 acgacgtat ctgatcgtct tcg 23
- <210> 9

- <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- 5 <223> 用於即時 PCR 的第 II α 1 型膠原蛋白基因的前向引子
 <400> 9
 caacactgcc aacgtccaga t 21
- <210> 10
- 10 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- <223> 用於即時 PCR 的第 II α 1 型膠原蛋白基因的反向引子
- 15 <400> 10
 tcttgcagtg gtaggtgatg ttct 24
- <210> 11
- <211> 25
- 20 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- <223> 用於即時 PCR 的第 X α 1 型膠原蛋白基因的前向引子
 <400> 11
- 25 cagatttgag ctatcagacc aacaa 25
- <210> 12

- <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- 5 <223> 用於即時 PCR 的第 $X\alpha 1$ 型膠原蛋白基因的反向引子
 <400> 12
 aaattcaaga gaggcttcac atacg 25
- <210> 13
- 10 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- <223> 用於即時 PCR 的 GAPDH 基因的前向引子
- 15 <400> 13
 tctcctctga cttcaacagc gac 23
- <210> 14
- <211> 22
- 20 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
- <223> 用於即時 PCR 的 GAPDH 基因的反向引子
- <400> 14
- 25 ccctgttgct gtagccaaat tc 22
- <210> 15

- <211> 22
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
- 5 <223> 用於即時 PCR 的 ALP 基因的前向引子
<400> 15
ggaggccgaa agtacaatggt tc 22
- <210> 16
- 10 <211> 22
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
- <223> 用於即時 PCR 的 ALP 基因的反向引子
- 15 <400> 16
gaaacatgta ctttcggcct cc 22



十、申請專利範圍：

1. 一種含有具被誘發的終止分化變化的人類關節軟骨細胞的三維式培養物，該培養物是藉由一包括下列步驟的方法而被製備出：

5 將人類關節軟骨細胞與一藻酸溶液混合以形成一細胞懸浮液；

 將該細胞懸浮液滴入至一氯化鈣溶液中，俾以導致藻酸珠粒的形成，該等藻酸珠粒具有被捕獲在內的人類關節軟骨細胞；

10 於一容許人類關節軟骨細胞生長的培養基內培育該等由此所形成的藻酸珠粒；以及

 以一選自於5-氮胞苷、5'-氟-2'-去氧胞苷、二氫-5-氮胞苷、5-氮-去氧胞苷、阿拉伯呔喃糖基-5-氮胞嘧啶 [法扎拉濱(fazarabine)]以及偽異胞苷(pseudoisocytidine)
15 的去甲基化試劑來處理經培育的藻酸珠粒，而使得被捕獲在該等藻酸珠粒內的人類關節軟骨細胞之終止分化變化被誘發。

2. 如申請專利範圍第1項的含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物，其中被使用於該方法之混合步驟中的人類關節軟骨細胞是得自於一健康的人類個體之關節軟骨。
20

3. 如申請專利範圍第2項的含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物，其中該關節軟骨是取自於該人類個體之一個選自下列的部分：一正常的成熟膝蓋軟骨，以及來自於掌指關節、橈腕部關節、踝關節與骨盤關節的軟骨。

4. 如申請專利範圍第3項的含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物，其中該關節軟骨是取自於該人類個體之一正常的成熟膝蓋軟骨。
5. 如申請專利範圍第1項的含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物，其中在該方法中，被使用於該方法之混合步驟中的該藻酸溶液是一配於0.9% NaCl內的1.2%藻酸鈉溶液。
6. 如申請專利範圍第1項的含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物，其中在該方法中，該培育步驟是在37°C下、於一含5% CO₂之經濕化的氛圍中被進行。
7. 如申請專利範圍第1項的含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物，其中在該方法中，被使用於該處理步驟中的該去甲基化試劑是5-氮胞苷。
8. 如申請專利範圍第1項的含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物，其中在該方法中，該處理步驟是在37°C下、於一含5% CO₂之經濕化的氛圍中被進行。
9. 一種用以製備一含有具被誘發的終止分化變化的人類關節軟骨細胞的三維式培養物之方法，該方法包括：
 - 將人類關節軟骨細胞與一藻酸溶液混合以形成一細胞懸浮液；
 - 將該細胞懸浮液滴入至一氯化鈣溶液中，俾以導致藻酸珠粒的形成，該等藻酸珠粒具有被捕獲在內的人類關節軟骨細胞；
 - 於一容許人類關節軟骨細胞生長的培養基內培育

該等由此所形成的藻酸珠粒；以及

以一選自於5-氮胞苷、5'-氟-2'-去氧胞苷、二氫-5-氮胞苷、5-氮-去氧胞苷、阿拉伯呔喃糖基-5-氮胞嘧啶

[法扎拉濱(fazarabine)]以及偽異胞苷(pseudoisocytidine)

5 的去甲基化試劑來處理經培育的藻酸珠粒，而使得被捕獲在該等藻酸珠粒內的人類關節軟骨細胞之終止分化變化被誘發。

10. 如申請專利範圍第9項的方法，其中被使用於該混合步驟中的人類關節軟骨細胞是得自於一健康的人類個體之關節軟骨。

11. 如申請專利範圍第10項的方法，其中該關節軟骨是取自於該人類個體之一個選自下列的部分：一正常的成熟膝蓋軟骨，以及來自於掌指關節、橈腕部關節、踝關節與骨盤關節的軟骨。

15 12. 如申請專利範圍第11項的方法，其中該關節軟骨是取自於該人類個體之一正常的成熟膝蓋軟骨。

13. 如申請專利範圍第9項的方法，其中被使用於該混合步驟中的該藻酸溶液是一配於0.9% NaCl內的1.2%藻酸鈉溶液。

20 14. 如申請專利範圍第9項的方法，其中該培育步驟是在37°C下、於一含5% CO₂之經濕化的氛圍中被進行。

15. 如申請專利範圍第9項的方法，其中被使用於該處理步驟中的該去甲基化試劑是5-氮胞苷。

16. 如申請專利範圍第9項的方法，其中該處理步驟是在37

°C 下、於一含 5% CO₂ 之經濕化的氛圍中被進行。

17. 一種用來篩選一用於治療一與關節軟骨細胞有關聯的障礙之候選藥物的套組，它包含有一如申請專利範圍第 1 項之含有人類關節軟骨細胞的三維式培養物。
- 5 18. 如申請專利範圍第 17 項的套組，其中該與關節軟骨細胞有關聯的障礙是骨關節炎。

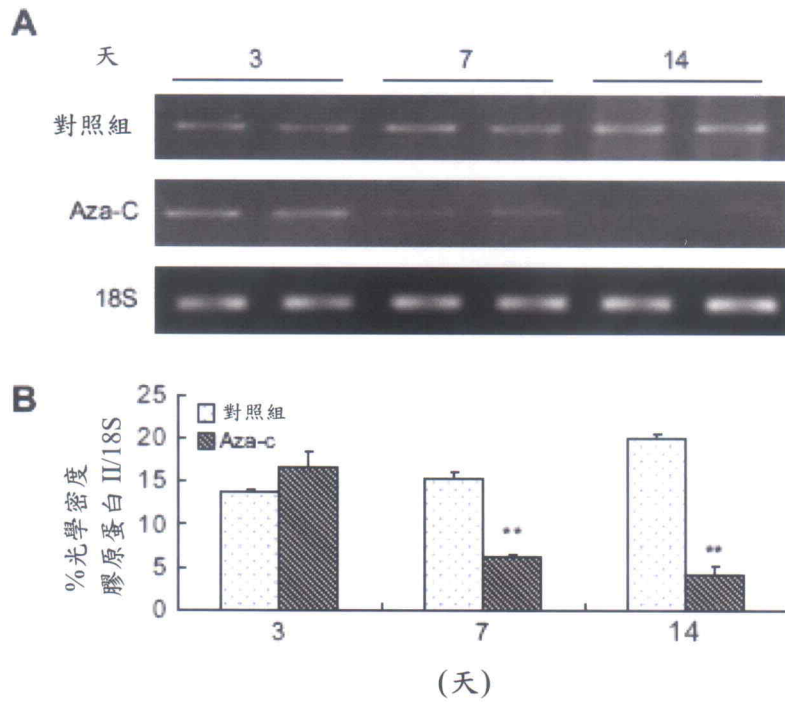


圖 1

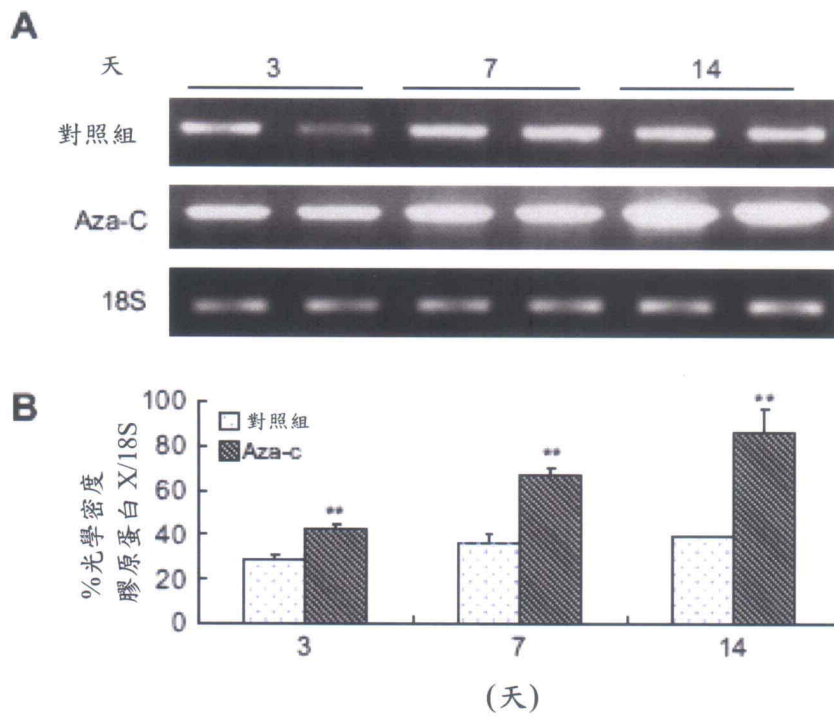


圖 2

第 095126811 號專利申請案圖式修正頁
修正日期：97 年 9 月 日

97年9月9日修正替換頁

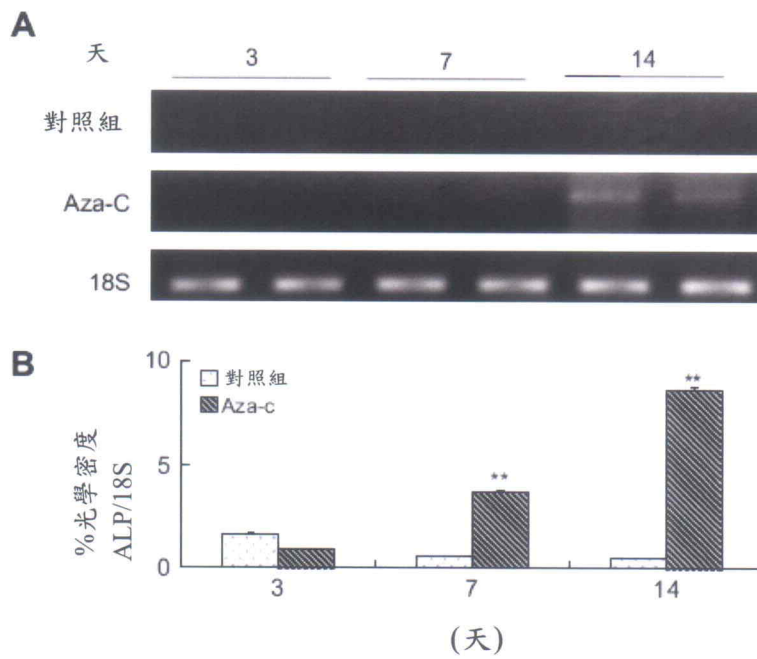


圖 3

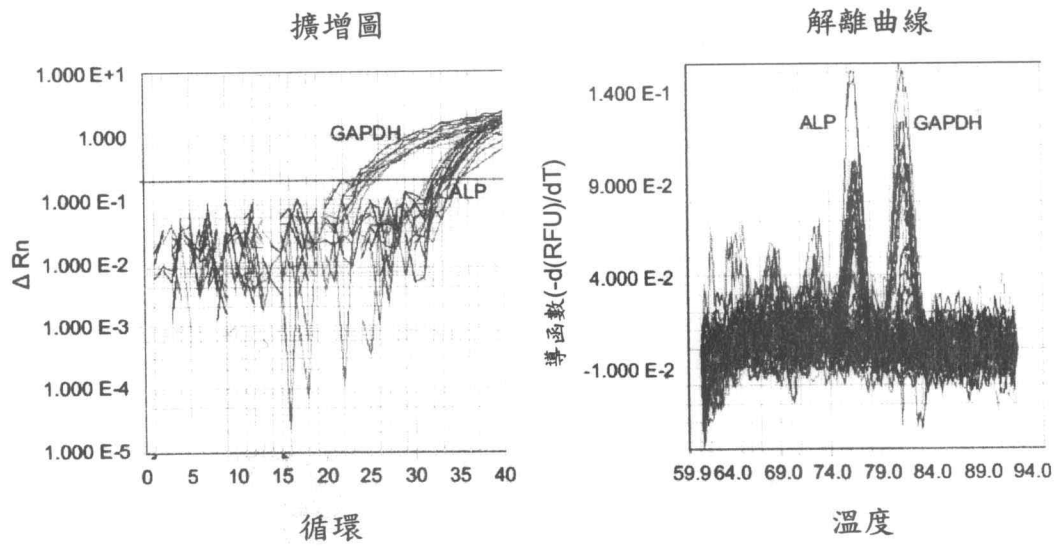


圖 4

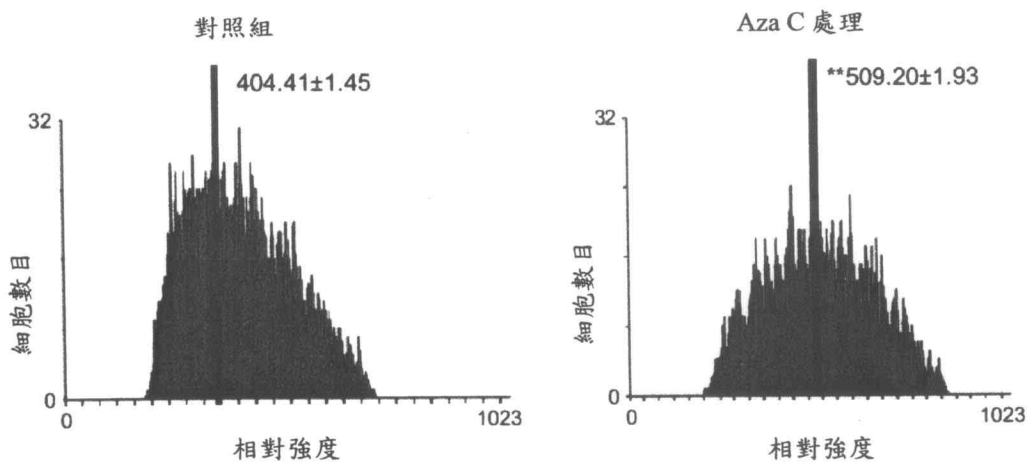


圖 5

(5) 5

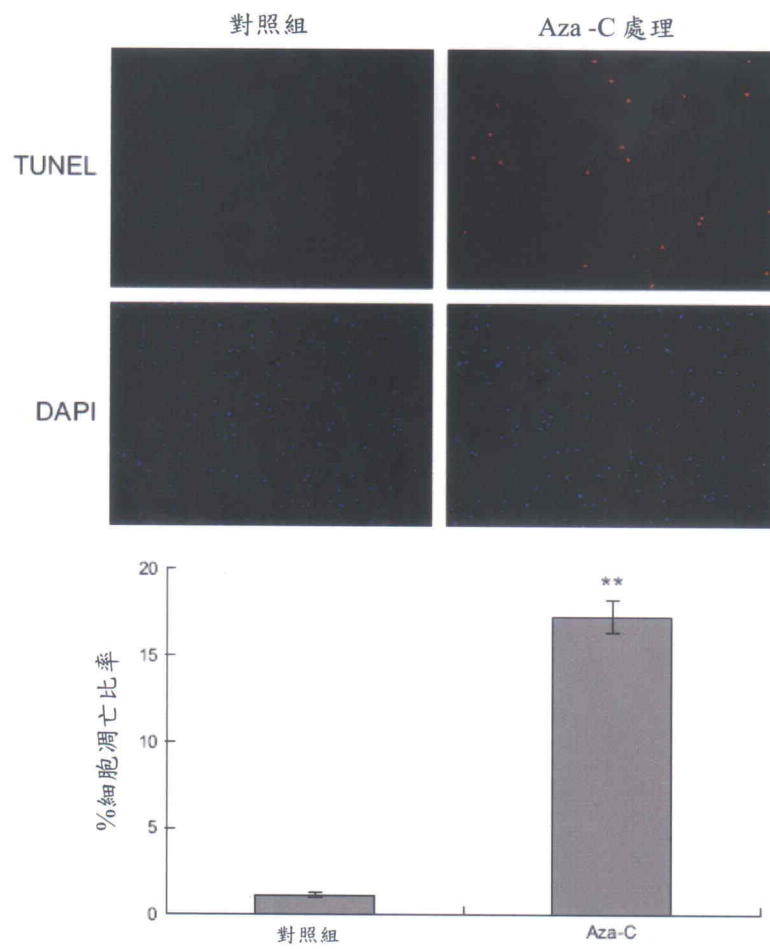


圖 6