

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

肩部旋轉肌腱隨年齡大分子結構之改變： 一種在老鼠分子生物學之研究

Age-related Quantitative Changes in Macromolecular Composition of Rotator Cuff Tendon:
A Molecular Level Study in Rat

計畫編號：NSC-89-2320-B-039-011

執行期限：88年8月1日至89年6月30日

主持人：許弘昌 中國醫藥學院 物理治療學系

共同主持人：許朝添 中國醫藥學院 醫學系

沈立言 中國醫藥學院 營養學系

一、中文摘要：

肩部旋轉肌之葡萄糖胺聚合醣之 Chondroitin sulfate 隨著年齡增加而增加，在 36 週時達到最高量，而至 48 週時又呈現下降之趨勢；而 Hyaluronic acid 在第 3 週即呈現高值，爾後隨年齡增加而漸減。膠原蛋白之不可還原之交叉聯結體，則隨年齡增加而增加，至 24 週達最高值，爾後漸減。

關鍵詞：葡萄糖胺聚合醣，膠原蛋白之不可還原之交叉聯結體，年齡，大白鼠，肩部旋轉肌腱

Abstract:

Chondroitin sulfate in rotator cuff tendon increased with age. It reached the highest value in 36 week-old and then declined. The amount of Hyaluronic acid decreased with age. Hydroxyproline increased with age. It reached the highest value at the age of 24 weeks and then declined.

Keywords:

Glycosamionglycan, Hydroxyproline, age, SD Rat, Cuff tendon

二、緣由與目的

肩部旋轉肌腱處於壓迫及牽拉之環境，也因此常造成肌腱炎斷裂，而隨著年齡之增長，情況加劇。研究學者經解剖及動作分析顯示大白鼠為其最佳動物模型，因此研究其旋轉肌腱內代表對抗壓迫力量

的葡萄糖胺聚合醣，及代表對抗牽拉力量之膠原蛋白之不可還原之交叉聯結體，來瞭解其隨年齡變化之情形，而進一步瞭解其病因。

三、材料與方法：

本研究即對葡萄糖胺聚合醣 (Glycosamionglycans) 和膠原蛋白之不可還原之交叉聯結體 (Non-reducible crosslinks of collagen) 作定量分析。分析方法是取不同週齡的大白鼠 (3, 12, 24, 36, 48 weeks SD Rat) 肌腱作適當前處理，收集酵素分解液、水解液，純化後的濾液，利用高壓液態層析儀 (HPLC) 來偵測葡萄糖胺聚合醣和膠原蛋白之不可還原之交叉聯結體，所得層析圖再與標準曲線作對照，定其量。每組檢品作三重覆，所得數據經 SAS 統計套裝軟體之變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 配合 Duncan's test 進行統計分析。

(一) 葡萄糖胺聚合醣：Chondroitin sulfate and Hyaluronic acid

本測定方法參考 (Matthew C. Berenson, Field T. Blevins, Anna H. K. Plass, and Kathryn G. Vogel: Proteoglycans of human rotator cuff tendons. J Orthop Res 1996; 14:518-525)

取肌腱，秤重，扣除 55 % 含水量，加入分解液 (0.05 M Sodium acetate, 5 mM Cysteine, 10 mM EDTA, 50 μ g/ml papain, pH5.5) 以 50 mg tendon/1ml 分解液之比例

來混合。在組織研磨器中(2 ml, Sigma)研成細粉狀懸浮液,在 65 °C 反應 18 小時,得分解液。在離心機(3000 *g, 10 min, Sigma)離心,取上清液,加入等體積的 1/15 M phosphate buffer pH7.4 和 0.15 M NaCl 來稀釋。

自行充填 0.3 ml Diethylaminoethyl cellulose (DE-52, pre-swollen; Whatman)管柱,以 20 ml 0.02 M HCl 完全溼潤管柱,再加入分解液,以 2 ml 1 M HCl 沖出 Chondroitin sulfate 和 Hyaluronic acid,收集濾液後,注入 HPLC 中偵測得層析圖,如圖(一),再與標準曲線(Chondroitin sulfate 9, 18, 27 μ g; Hyaluronic acid 3.2, 6.4, 9.6 μ g)作對照,求出檢品之含量,將各組數據經 SAS 統計套裝軟體之變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 配合 Duncan's test 進行統計分析,得表一之結果。

HPLC 偵測條件如下,流動相: 1/15 M phosphate buffer (pH7.4), 0.15 M NaCl, 過濾脫氣。管柱: Shodex Af pak ARC 894 加溫至 35 °C, 流速: 0.5 ml/min, 偵測器: UV detector J-7400, 280 nm (Hitachi), 積分儀: D-2500 Chromato-Integrator (Hitachi)

(二) 膠原蛋白之不可還原之交叉聯結體: Hydroxyproline

本測定方法參考(Douglas J. Horgan, Neville L. King, Lyndon B. Kurth, and Ronald Kuypers: Collagen crosslinks and their relationship to the thermal properties of calf tendons. Arch Biochem 1990; 281(1): 21-26.)

取肌腱秤重,扣除 55 % 含水量,浸在適量的 0.5 M NaCl, 4 小時後,用 4 倍二次水沖洗肌腱,加入水解液 6 N HCl(320 μ l/mg tendon),至於密封分解管中,抽成真空,於 110 °C 反應 24 小時,待水解液溫度降至室溫後,以 0.45 μ m 無菌濾膜(Lida No.9003-10)過濾,所得濾液,注入 HPLC 中偵測得層析圖,如圖(二),再與標準曲線(Hydroxyproline 1, 2, 5nmole)作對照求出檢品之含量,將各組數據經 SAS 統計套裝軟體之變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 配合 Duncan's test 進

行統計分析,得表二之結果。

HPLC 偵測條件如下,流動相: A Solvent 是 20 mM NH₄Cl, 5 mM l-octane sulfonic acid, pH3.5, 配製而成在過濾脫氣。B solvent 是 75 % Acetonitrile 加 25 % A solvent 配製而成。管柱: Purospher RP-18 endcapped (5 μ m), 流速: 1 ml/min, 偵測器: UV detector J-7400, 250 nm (Hitachi)。積分儀: D-2500 Chromato-Integrator (Hitachi)

四、結果與討論:

(一) 葡萄糖胺聚合醣: Chondroitin sulfate and Hyaluronic acid.

分析結果,如表一發現 Chondroitin sulfate 在 3 週大白鼠含量最少,12 週之含量多於 3 週,24 週之含量多於 12 週,但都不具統計學上之顯著性差異 ($p < 0.05$)。而 24 週之含量多於 3 週,則具統計學上之顯著性差異 ($p < 0.05$)。到 36 週時量最多,到 48 週時,則有減少之現象。而 Hyaluronic acid 在 3 週時量最大,24, 36, 48 週則漸減與 3 週之含量比較則具統計學上之顯著性差異 ($p < 0.05$)。比較 Chondroitin sulfate 和 Hyaluronic acid 在各組不同年齡的大白鼠肌腱中的含量,前者又比後者量多。

在檢測 Hyaluronic acid 時,發現 Hyaluronic acid 易裂解,放置太長的時間,所檢測的量即劇減(數據未顯示)。所以,在樣品處理時,當注意時間之控制。

(二) 膠原蛋白之不可還原之交叉聯結體: Hydroxyproline

由表二之結果顯示,Hydroxyproline 在 3 週與 12 週大白鼠中之含量,不具統計學上之顯著性差異 ($p < 0.05$),但由平均數值來看,則有含量略增之情形。而 12 週至 24 週,Hydroxyproline 的量,有極明顯增加的現象且達到統計上顯著性差異 ($p < 0.05$)。Hydroxyproline 在 24 週大白鼠達最高含量。

36 週大白鼠中 Hydroxyproline 量,大於 3 週、12 週之量,但少於 24 週大白鼠之量且具統計學上之顯著性差異 ($p < 0.05$); 48 週的含量雖也略小於 36 週之含量,但卻不具有統計學上之顯著性差異 ($p < 0.05$)。由分析結果得知,Hydroxyproline 確實隨著

年齡的增長而增加，到 24 週是達到顛峰。

五、計劃成果自評：

本年度的實驗參考不同的相關文獻，結果與上年度定性及半定量之結果類似，顯示肌腱內大分子成分隨年齡改變之情形相同。而在操作儀器方法成熟度、準確度還需不斷練習；在分析檢品條件、儀器偵測條件設定上，並不斷嚐試，確定可行性、穩定性及再現性上花費許多時間，力求數據的準確性，而飼養的老鼠隻數不足，檢品量不夠，只定量兩類成分。由經驗得知，可在未來的計劃中，可改進此缺失，作更完整的定量分析。

六、參考文獻：

Brown AH: Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. Arch Biochem 1946;11:269-78.

Midura RJ, salustri A, Calabro A, Yanagishita M, Hascall VC: High-resolution separation of disaccharide and oligosaccharide alditols from chondroitin sulphate, dermatan sulphate and hyaluronan using CarboPac Pal chromatography. Glycobiology 1994; 4: 333-42.

Deutsch AJ, Midura RJ, Plaas AHK: Structure of chondroitin sulfate on aggrecan isolated from bovine tibial and costochondral growth plate. J Orthop Res 1995; 13: 230-39.

Kivirikko K, Laitinen O, Prockop DJ: Modification of a specific assay for hydroxyproline in urine. Anal Biochem 1967; 19: 249-55.

Robins SP: Analysis of the crosslinking components in collagen and elastin. Methods Biochem. Anal 1982; 28: 329-79.

Matthew C. Berenson, Field T. Blevins, Anna H. K. Plass, and Kathryn G. Vogel: Proteoglycans of human rotator cuff tendons. J Orthop Res 1996; 14:518-525.

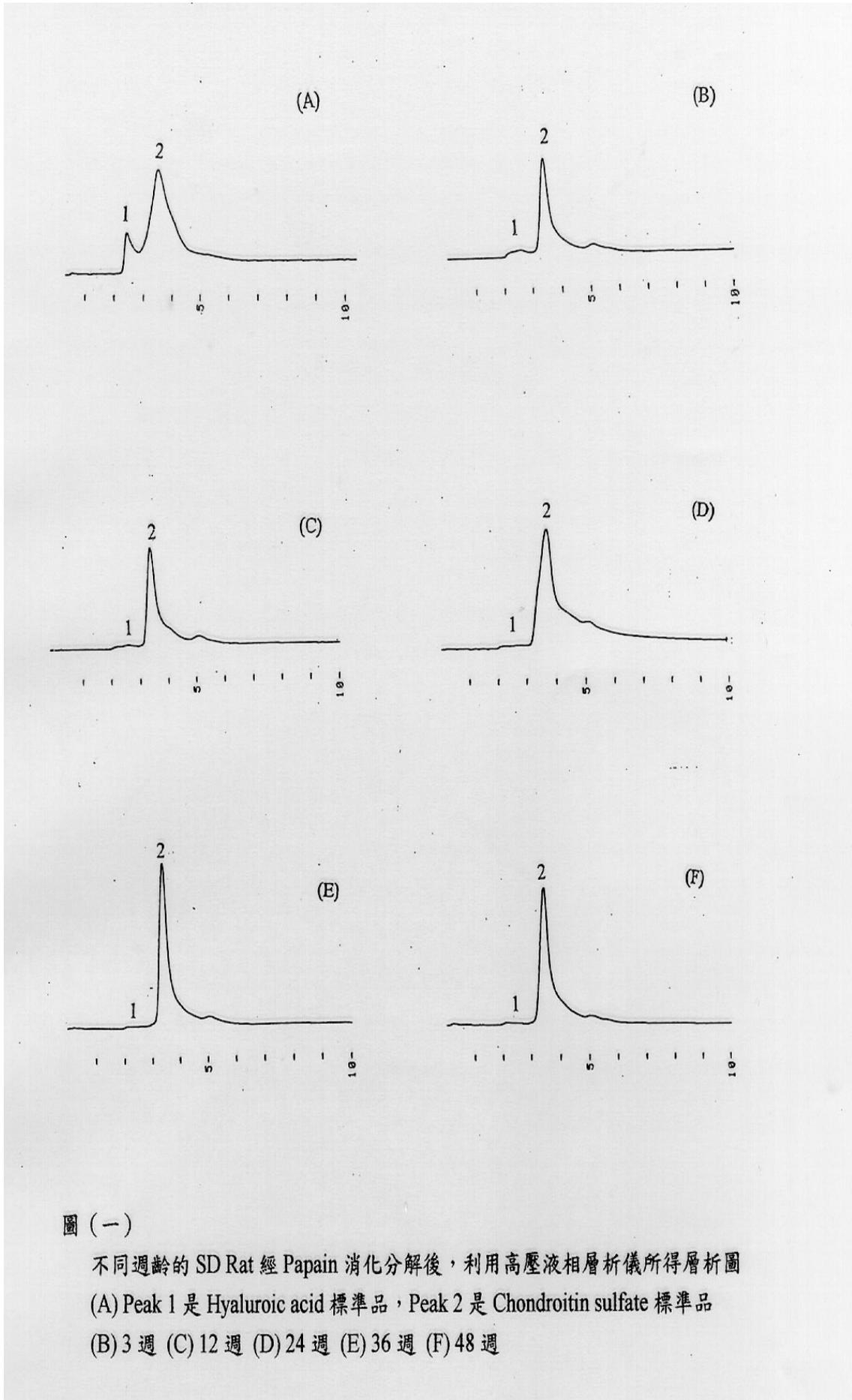


圖 (一)

不同週齡的 SD Rat 經 Papain 消化分解後，利用高壓液相層析儀所得層析圖

(A) Peak 1 是 Hyaluroic acid 標準品，Peak 2 是 Chondroitin sulfate 標準品

(B) 3 週 (C) 12 週 (D) 24 週 (E) 36 週 (F) 48 週

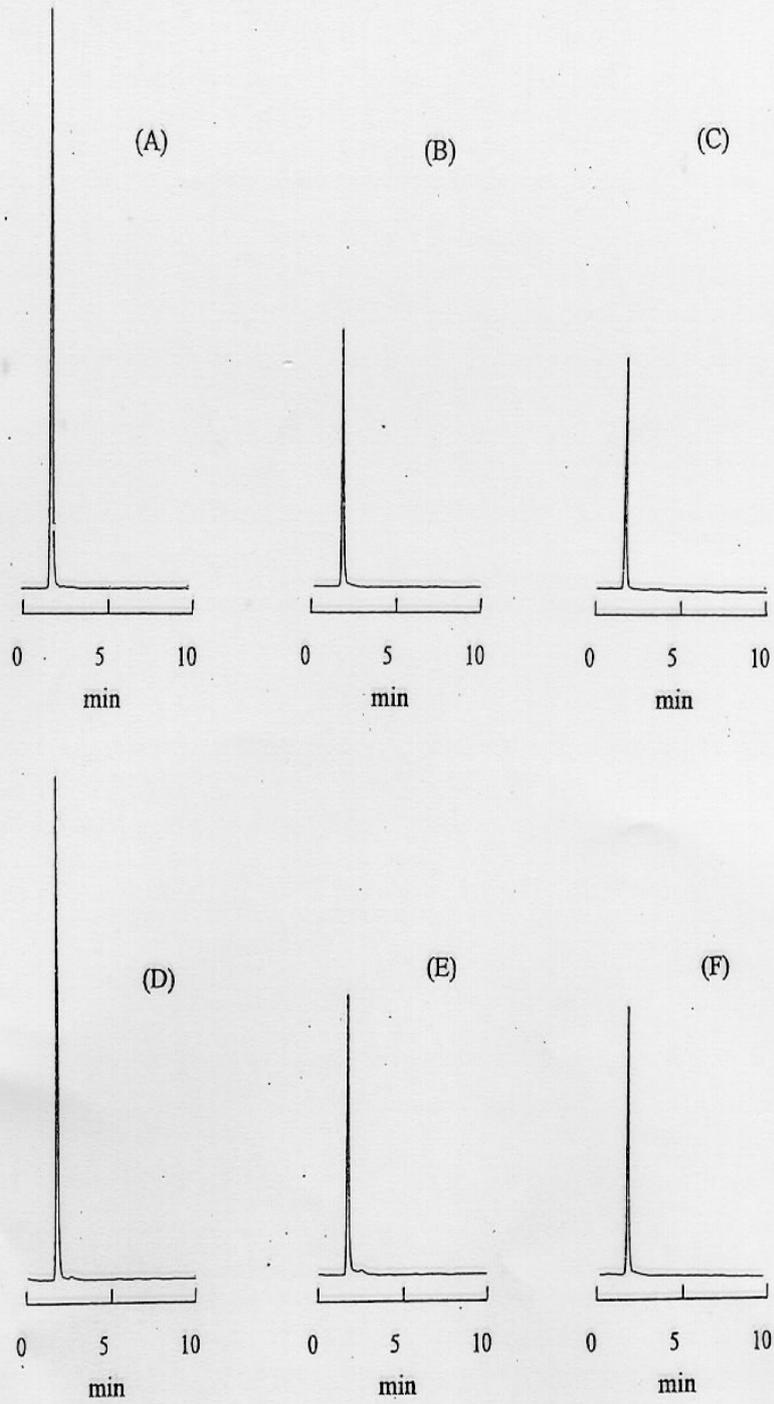


圖 (二)

不同週齡的 SD Rat 經 6 N HCl 分解後，利用高壓液相層析儀所得層析圖
 (A) Hydroxyproline 標準品 (B) 3 週 (C) 12 週 (D) 24 週 (E) 36 週 (F) 48 週

表一

不同週齡的 SD Rat 之肌腱中 Hyaluronic acid 和 Chondroitin sulfate 之含量

Time (weeks)	Hyaluronic acid (μg)	Chondroitin sulfate (μg)
3	4.13 \pm 0.74 ^{a*}	15.94 \pm 8.99 ^c
12	3.84 \pm 0.72 ^a	22.82 \pm 7.49 ^{b,c}
24	2.20 \pm 0.73 ^b	29.96 \pm 7.30 ^{a,b}
36	2.51 \pm 0.91 ^b	36.63 \pm 5.67 ^a
48	1.64 \pm 0.29 ^b	30.48 \pm 3.47 ^{a,b}

*表示本組數據是由三隻 SD Rat 的肌腱所偵測得的平均值。
經 ANOVA 配合 Duncan's test ($P < 0.05$) 統計分析的結果。
數據中不同的上標英文字母，表示其組間有 5 % 的顯著性差異。

表二

不同週齡的 SD Rat 之肌腱中 Hydroxyproline 之含量

Time (weeks)	Hydroxyproline (nmol/mg tendon)
3	4949 \pm 181 ^{c*}
12	5407 \pm 483 ^c
24	14249 \pm 2799 ^a
36	9441 \pm 1941 ^b
48	7951 \pm 2296 ^{b,c}

*表示本組數據是由三隻 SD Rat 的肌腱所偵測得的平均值。
經 ANOVA 配合 Duncan's test ($P < 0.05$) 統計分析的結果。
數據中不同的上標英文字母，表示其組間有 5 % 的顯著性差異。