

· 论 著 ·

羧甲基壳聚糖对体外培养人成纤维细胞自分泌生长因子及其形态结构的影响

肖海军, 侯春林*, 刘亚平

(第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 观察羧甲基壳聚糖对体外培养的人成纤维细胞形态结构及其分泌生长因子功能的影响, 探讨其减轻创面过度愈合、防止术后粘连的可能机制。 **方法:** 体外培养的人成纤维细胞, 经不同浓度(0.01、0.1、1.0、10 mg/ml)羧甲基壳聚糖作用4 d后, 或经0.1 mg/ml羧甲基壳聚糖培养不同时间(1、2、3、4、5、6 d)后, 采用间接酶联免疫吸附法(ELISA)和放射免疫法测定其自分泌转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)及表皮生长因子(EGF)的变化规律; 并通过光镜及透射电镜观察不同浓度及不同作用时间后人成纤维细胞形态结构的变化。 **结果:** 羧甲基壳聚糖(≥ 0.1 mg/ml)可抑制成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 , 且随浓度的增大及作用时间的延长而增强($P < 0.05$); 但对 EGF 的自分泌无明显影响($P > 0.05$)。羧甲基壳聚糖(≥ 0.1 mg/ml)体外能够抑制成纤维细胞的增殖, 引起超微结构的变化。 **结论:** 羧甲基壳聚糖浓度(≥ 0.1 mg/ml)体外可能通过改变人成纤维细胞超微结构, 选择性抑制其自分泌 TGF- β_1 , 从而抑制细胞增殖, 减轻组织粘连。

[关键词] 羧甲基壳聚糖; 转化生长因子- β_1 ; 表皮生长因子; 自分泌; 粘连

[中图分类号] R 619 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0848-05

Effect of carboxymethylchitosan on autocrine growth factor and morphology of fibroblasts cultured *in vitro*

XIAO Hai-jun, HOU Chun-lin*, LIU Ya-ping(Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of carboxymethylchitosan on autocrine growth factor and morphology of fibroblasts cultured *in vitro*, so as to discuss the possible mechanism by which carboxymethylchitosan alleviates overhealing and prevents adhesion in wound healing. **Methods:** Fibroblasts were cultured *in vitro*. Fibroblasts of passage 4-6 were treated with different concentrations of carboxymethylchitosan (0.01, 0.1, 1.0 and 10 mg/ml) for 4 days or with 0.1 mg/ml carboxymethylchitosan for 1, 2, 3, 4, 5, and 6 days. The levels of autocrine transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and epidermal growth factor (EGF) of fibroblasts were determined by ELISA and radioimmunoassay. The fibroblastic morphology was detected by transmission electron microscopy (TEM) and microscope after fibroblasts were treated with different strategies. **Results:** Carboxymethylchitosan(≥ 0.1 mg/ml)inhibited autocrine TGF- β_1 of fibroblast in a time- and concentration dependent manner ($P < 0.05$). However, Carboxymethylchitosan had no obvious influence on the secretion of EGF($P > 0.05$). Carboxymethylchitosan (≥ 0.1 mg/ml)also inhibited the proliferation of fibroblasts and caused their ultrastructural changes. **Conclusion:** Carboxymethylchitosan (≥ 0.1 mg/ml)can inhibit fibroblasts proliferation and reduce tissue adhesion, possibly through altering fibroblast ultrastructure and selectively inhibiting secretion of TGF- β_1 .

[KEY WORDS] carboxymethylchitosan; transforming growth factor- β_1 ; epidermal growth factor; autocrine; adhesions

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8):848-852]

粘连是外科手术后普遍存在的问题。术后粘连不仅会影响手术效果, 还可导致严重的术后并发症, 甚至会使一个成功手术归于失败。因此防止术后粘连是一个亟待解决的问题。近年来, 壳聚糖作为一种具有良好的组织相容性和可吸收性的高分子生物材料逐渐受到关注, 动物实验证实壳聚糖可有有效的防治术后粘连^[1~3], 而用于临床上也取得较满意的疗效^[4,5]。已有研究^[6,7]表明, 羧甲基壳聚糖对成纤维细胞增殖和胶原合成有抑制作用, 但其作用机制一直未能阐明。本实验利用羧甲基壳聚糖作用于体外培养的人成纤维细胞, 对成纤维细胞自分泌生长

因子进行测定, 对成纤维细胞形态结构进行观察, 探讨羧甲基壳聚糖预防组织粘连的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 超净工作台, 倒置相差显微

[基金项目] 国家自然科学基金(30170956)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30170956)。

[作者简介] 肖海军, 博士生, 主治医师。

E-mail: xiaohaijun89@163.com

* Corresponding author. E-mail: chunlin-hou@yahoo.com.cn

镜及照相系统(Olympus 公司, 日本), 多头细胞样品收集器, γ -免疫计数器, PHILIPS CM-120 透射电子显微镜。RPMI 1640 培养基(含最终浓度青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml、15% 新生小牛血清, Sigma 公司), 医用羧甲基壳聚糖粉剂(上海其胜生物制剂实业公司提供), 抗人转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) ELISA 测定试剂盒(Genzyme 公司, USA) 和人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)放射免疫分析测定盒(北京北方生物技术研究所)。

1.2 人成纤维细胞原代培养 无菌条件下切取健康人包皮环切术所得包皮。将切取的组织用 750 ml/L 乙醇溶液浸泡 2 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次后, 剪成 0.5~1.0 mm³ 组织块, 再用 PBS 清洗 3 次, 移至 25 ml 培养瓶内, 加入含终浓度青霉素、链霉素 100 U/ml, 含 15% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养基适量, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。原代培养细胞基本长满瓶壁后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 进行传代培养。

1.3 实验方法及分组 实验分不同浓度羧甲基壳聚糖(0.01、0.1、1.0、10 mg/ml) 的比较和 0.1 mg/ml 羧甲基壳聚糖不同作用时间(1、2、3、4、5、6 d) 的比较两部分, 均设阴性对照组。每个样本取 4 瓶成纤维细胞测定, 实验重复 2 次。

不同浓度组之间的比较: 选生长状态良好的传代成纤维细胞第 4~6 代, 以细胞 2.5×10^5 /瓶接种于 25 ml 培养瓶, 共 20 瓶, 置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 18 h 后, 吸出原培养液。羧甲基壳聚糖组依次换含有浓度 0.01、0.1、1.0、10 mg/ml 的羧甲基壳聚糖培养液; 对照组仅加入 RPMI 1640 培养液; 继续培养 3 d 后, 0.25% 胰蛋白酶消化并计数, 分别调整细胞数为 1.0×10^5 /瓶, 再加入不含羧甲基壳聚糖的 RPMI 1640 培养液 2 ml/瓶, 继续培养。24 h 后分别取 100 μ l 上清液, -20 $^{\circ}$ C 保存备检。检测时分别用间接酶联免疫吸附实验(ELISA) 和放射免疫法测 TGF- β_1 和 EGF 含量。

不同作用时间组的比较: 共 48 瓶, 同上法培养成纤维细胞 18 h 后, 吸出原培养液, 实验组加入含羧甲基壳聚糖 0.1 mg/ml 的培养液, 在第 2~7 d 每天均取 4 瓶上清液(即羧甲基壳聚糖作用时间分别为 1、2、3、4、5、6 d); 对照组仅加入 RPMI 1640 培养液, 取样时间与实验组相同。所有培养瓶均用 0.25% 胰蛋白酶消化并计数, 均调整细胞数为 1.0×10^5 /瓶, 再加入 RPMI 1640 培养液 2 ml/瓶培养 24 h 后分别测 TGF- β_1 和 EGF 含量。

1.4 细胞结构的观察 按上述方法同时另培养人成纤维细胞, 提取上清液同时收集培养细胞并在倒置显微镜下观察。不同浓度间比较按提取上清液时间(羧甲基壳聚糖作用第 4 天) 取成纤维贴壁细胞, 不同时间的比较按观察时间提取。将贴壁成纤维细胞从培养瓶中刷下、离心, 用 2.5% 戊二醛溶液预固定, 1% 锇酸后固定。经系列丙酮脱水, 环氧树脂 Epon812 浸透、包埋、聚合。定位后行连续超薄切片, 醋酸铀枸橼酸铅电子染色, 透射电子显微镜下观察: (1) 正常人成纤维细胞在不同浓度 0.01、1.0 mg/ml 羧甲基壳聚糖下超微结构变化; (2) 在 0.1 mg/ml 羧甲基壳聚糖下了解第 4 天、第 9 天超微结构变化。

1.5 统计学处理 用 SPSS 统计软件包采用单变量方差分析进行处理, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度羧甲基壳聚糖对人成纤维细胞自分泌生长因子的作用 不同浓度羧甲基壳聚糖作用后, 相同数量的人成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 在 0.01 mg/ml 浓度下与对照组无明显差别($P > 0.05$), 在 0.1、1.0、10 mg/ml 下分别与对照组比较 TGF- β_1 浓度降低($P < 0.05$), 且随浓度的增大对 TGF- β_1 抑制作用增强($P < 0.05$)。而不同浓度羧甲基壳聚糖对相同数量的人成纤维细胞自分泌 EGF 无明显影响($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 不同浓度羧甲基壳聚糖对人成纤维细胞自分泌生长因子的影响

Tab 1 Effect of different concentrations of carboxymethylchitosan on secretion of growth factor by fibroblast

($n=4, \bar{x} \pm s, \rho_{\beta}/ng \cdot L^{-1}$)

Group	TGF- β_1	EGF
Control	314.90 \pm 12.35	123 \pm 9
0.01	310.74 \pm 10.86	126 \pm 7
0.1	259.95 \pm 13.94*	119 \pm 7
1.0	209.32 \pm 11.39*	115 \pm 10
10	167.37 \pm 14.45*	119 \pm 11

* $P < 0.05$ vs 0.01 mg/ml group

2.2 羧甲基壳聚糖不同作用时间对人成纤维细胞自分泌生长因子的影响 对照组人成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 随培养时间的延长, 浓度逐渐增高, 第 4 天达最高峰, 以后开始减少。实验组在羧甲基壳聚糖 0.1 mg/ml 浓度持续作用下, 人成纤维细胞自分泌

泌 TGF-β₁ 随培养时间的延长逐渐下降,细胞自分泌 TGF-β₁ 功能受到抑制(图 1)。

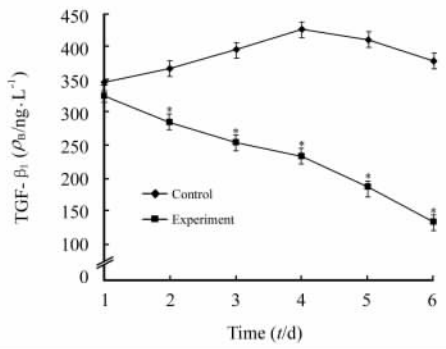


图 1 羧甲基壳聚糖(0.1 mg/ml)在不同时间对人成纤维细胞自分泌 TGF-β₁ 影响

Fig 1 Effect of 0.1 mg/ml carboxymethylchitosan (treating for different times) on autocrine TGF-β₁

* P < 0.05 vs control group; n = 4, x̄ ± s

对照组人成纤维细胞自分泌 EGF 随培养时间的延长,浓度逐渐增高,第 5 天达最高峰,以后增加趋缓并逐渐维持在一定水平。实验组在羧甲基壳聚糖 0.1 mg/ml 浓度持续作用下,人成纤维细胞自分泌 EGF 随培养时间的延长与对照组增高趋势一致,两者无明显差别,细胞自分泌 EGF 不受羧甲基壳聚糖的影响(图 2)。

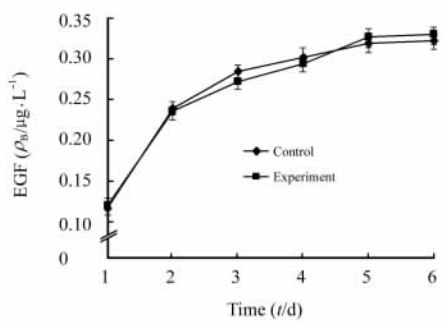


图 2 羧甲基壳聚糖在不同时间对人成纤维细胞自分泌 EGF 影响

Fig 2 Effect of different times of carboxymethylchitosan treatments on autocrine of EGF

n = 4, x̄ ± s

2.3 光镜观察 多次光学显微镜下观察发现,在不同羧甲基壳聚糖浓度作用下以及同一浓度不同作用时间下人成纤维细胞形态结构与对照组无明显区别,各组细胞均呈梭形或三角形。在羧甲基壳聚糖作用第 4 天后,每次光镜视野下发现:羧甲基壳聚糖浓度在 0.01 mg/ml 时,成纤维细胞数量与对照组比较变化不明显(50.7 ± 5.0 vs 52.3 ± 5.4, P >

0.05);当浓度达 0.1 mg/ml 时,成纤维细胞数量(39.4 ± 4.7)比 0.01 mg/ml 组少(P < 0.05);当浓度达 1 mg/ml 时,成纤维细胞数量(23.5 ± 3.2)明显比 0.1 mg/ml 组少(P < 0.01)。而在同一羧甲基壳聚糖浓度(0.1 mg/ml)下,第 9 天明显比第 4 天成纤维细胞数量少(25.6 ± 3.8 vs 39.4 ± 4.7, P < 0.01),即随时间延长,成纤维细胞数量逐渐减少。

2.4 透射电镜观察 对照组人成纤维细胞内质网较丰富,呈扩张状态,内有较多新合成蛋白,内质网表面有许多呈颗粒状的核糖体。高尔基体不发达,线粒体细长,溶酶体中内容物较少,胞质内可见脂滴(图 3A)。0.01 mg/ml 羧甲基壳聚糖浓度作用第 4 天时,除溶酶体数量增加以及内容物相对增多外,其他与对照组相比无明显变化(图 3B);1.0 mg/ml 羧甲基壳聚糖作用第 4 天时,内质网明显扩张,但内容物不多,表面核糖体数量减少,与内质网游离,呈脱颗粒现象,高尔基体及线粒体数量减少,线粒体轻度肿胀,嵴低且稀疏,溶酶体数量明显增多,可见多量晚期溶酶体(蜕变小体)(图 3C)。羧甲基壳聚糖在 0.1 mg/ml 浓度持续作用下,第 4 天人成纤维细胞内质网扩张明显,表面核糖体数量减少,与内质网游离,呈脱颗粒现象,线粒体轻度肿胀,溶酶体数量增加,内容物增多(图 3D);第 9 天内质网数量明显减少,残存内质网扩张,内容物很少,表面核糖体呈脱颗粒现象,线粒体肿胀明显,高尔基体减少,溶酶体数量明显增多,可见多量晚期溶酶体(蜕变小体),部分成纤维细胞坏死,有许多细胞碎片(图 3E)。

3 讨论

成纤维细胞是创伤愈合过程中形成肉芽组织、合成胶原等细胞外基质,进行伤口重塑的主要修复细胞,同时还可自分泌生长因子调控修复过程^[8],因此成纤维细胞功能的变化对创伤愈合起着举足轻重的作用,术后创伤部位过度愈合可导致纤维化,从而造成组织粘连引起功能障碍^[8]。

生长因子是由细胞分泌的一类调节细胞功能的生物活性多肽,目前已证明生长因子组成了复杂的网络,对创伤愈合有着重要的调控作用,如修复细胞的增殖、迁移、细胞外基质合成和释放等生物学行为受生长因子调控,但修复细胞又通过自分泌和旁分泌机制合成产生生长因子,成纤维细胞可自分泌胰岛素样生长因子(IGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子(TGF-β₁)、表皮生长因子(EGF)等。其中 TGF-β₁ 是创伤修复过程中重要因子^[9]。实验证明,TGF-

β_1 的主要功能是促进成纤维细胞的增殖、分化;促进成纤维细胞合成分泌如胶原蛋白、纤维连接蛋白等多种细胞外基质以及纤维蛋白溶解酶激活酶抑制剂

等,抑制基质蛋白的分解;活化巨噬细胞等^[10]。EGF 也是创伤愈合中的重要生长因子,是上皮细胞的趋化剂并能促进其分裂增殖^[11]。

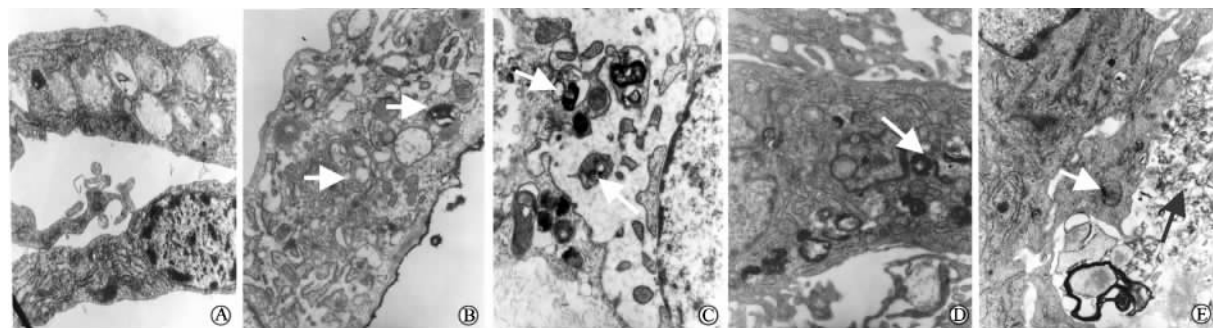


图3 不同浓度羧甲基壳聚糖及不同作用时间下人成纤维细胞超微结构变化

Fig 3 Ultrastructure changes of fibroblasts after carboxymethylchitosan treatments of different strategies ($\times 5\ 000$)

A: Control; B: 4 days after 0.01 mg/ml carboxymethylchitosan treatment; C: 4 days after 1.0 mg/ml carboxymethylchitosan treatment; D: 4 days after 0.1 mg/ml carboxymethylchitosan treatment; E: 9 days after 0.1 mg/ml carboxymethylchitosan treatment. White arrows indicate lysosome; black arrow indicates cellular debris

本实验结果显示,羧甲基壳聚糖浓度超过 0.1 mg/ml 可明显抑制成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 ,且随浓度的增大抑制作用增强;而不同浓度羧甲基壳聚糖对成纤维细胞自分泌 EGF 均无明显影响。为了能更科学的了解羧甲基壳聚糖在不同作用时间下对成纤维细胞自分泌的作用,消除可能因随时间的延长细胞死亡数增加或细胞因子降解等对结果的影响,本实验对正常情况下成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 和 EGF 的规律进行了研究,发现成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 先增加,到第 4 天达高峰随后降低,而 EGF 先增加然后维持在一定水平。我们的实验结果与张洁等^[12] 对人成纤维细胞 TGF- β_1 浓度与细胞数量和自分泌能力的研究结果一致。成纤维细胞自分泌达最高峰可能主要是自分泌能力达到最强以及 TGF- β_1 分泌的累积效应。当加入羧甲基壳聚糖后,随作用时间的延长能够持续抑制成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 ,但对 EGF 的分泌无明显影响。因此羧甲基壳聚糖可选择性抑制 TGF- β_1 自分泌,达到减少成纤维细胞增殖,减轻细胞外基质的沉积,从而减轻过度愈合,同时又不影响正常上皮细胞的生长,达到促进创面愈合而又防止了术后组织粘连的目的。

汤朝晖等^[6] 从细胞增殖角度认为羧甲基壳聚糖在 ≥ 0.1 mg/ml 即对成纤维细胞有抑制作用,可以使成纤维细胞的 G₁ 期细胞比例增加,减少进入细胞周期的细胞数目。我们从超微结构观察,发现羧甲基壳聚糖在 0.01 mg/ml 时,虽然对细胞数目变化还不明显,但细胞内微结构已有改变,表现在溶酶体

数量增加以及内容物相对增多,说明羧甲基壳聚糖在 0.01 mg/ml 即已对成纤维细胞产生了抑制作用,而当羧甲基壳聚糖超过 0.1 mg/ml 时,细胞微结构已变化非常明显,如蜕变小体的出现,核糖体脱颗粒,线粒体及内质网肿胀,甚至成纤维细胞的坏死崩解,从而引起了细胞数量上的变化。

虽然本实验证明了羧甲基壳聚糖能够抑制体外培养的人成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 ,对 EGF 无明显抑制作用,但是在机体创伤愈合过程中细胞因子的相空变化及相互作用是非常复杂的,并不象体外这么简单,羧甲基壳聚糖在机体创伤愈合过程中是如何调控伤口的正常愈合与过度愈合之间的平衡,而不至于妨碍伤口愈合,这就需要进一步研究羧甲基壳聚糖对细胞因子之间的网络调控关系及信号转导通路的变化。

[参考文献]

- [1] 李大可,彭芝兰,王丹青,等. 医用粘多糖凝胶预防妇科术后腹盆腔粘连的动物实验研究[J]. 华西医学,2005,20:501-502.
- [2] Duran B, Ak D, Cetin A, et al. Reduction of postoperative adhesions by N,O-carboxymethylchitosan and spermine NONOate in rats[J]. Exp Anim, 2003, 52: 267-272.
- [3] 夏长所,洪光祥,李红,等. 几丁糖对肌腱髓鞘和腱外膜以及腱内膜细胞增殖和胶原产生的影响[J]. 中华显微外科杂志, 2005,28:154-156.
- [4] 朱玉杰,黄小强,王效东. 透明质酸钠与几丁糖在防治膝关节松解术后再粘连的价值[J]. 陕西医学杂志,2006,35:207-208.
- [5] Diamond MP, Luciano A, Johns DA, et al. Reduction of postoperative adhesions by N,O-carboxymethylchitosan: a pilot study

- [J]. Fertil Steril, 2003, 80: 631-636.
- [6] 汤朝晖, 侯春林, 张玲珍. 几丁聚糖和透明质酸钠对成纤维细胞增殖影响的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 10: 1092-1093.
- [7] 何刚, 刘生光, 刘金新, 等. 几丁糖预防腹膜粘连抑制胶原基因表达的实验研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2003, 28: 474-476.
- [8] Mori T, Okumura M, Matsuura M, et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts *in vitro*[J]. Biomaterials, 1997, 18: 947-951.
- [9] 屈纪富, 郝利, 孙薇, 等. 细胞因子在创伤愈合过程中的变化及其意义的研究进展[J]. 创伤外科杂志, 2003, 5: 74-76.
- [10] 吕远东, 罗少军, 刘嘉琦, 等. 转化生长因子 β_1 对成纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 17: 345-347.
- [11] 傅小兵, 孙同柱, 王亚平, 等. 表皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子促进创面修复效应的比较性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 1999, 13: 278-282.
- [12] 张洁, 林苹, 黄鲁刚, 等. 体外培养人成纤维细胞转化生长因子- β_1 自分泌规律的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16: 319-321.
- [收稿日期] 2006-04-13 [修回日期] 2006-06-10
- [本文编辑] 贾泽军