

Study on Mechanism of Preventing Tendon Adhesion by CTSb Compound Membrane

Jing Chang¹, Wan-shun Liu¹, Bao-qin Han¹, Ye Liang¹, Hai-dong Cui²

¹ College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao, China

² Qingdao Biotemed Biomaterial Co., Ltd. Qingdao, China

E-mail: Jingch1980@yahoo.com.cn

Abstract: L929 fibroblasts are cultured by blend solution of chitosan derivatives (CTSb solution). The effect of the CTSb solution on L929 fibroblasts is evaluated by methods of MTT, GE and so on. The mechanism of CTSb compound membrane preventing tendon adhesion is investigated by the study on CTSb solution on L929 fibroblasts. The results show that the growth of L929 fibroblasts is inhibited obviously after cultured by CTSb solution. Along with the concentration of the CTSb solution gets higher, the inhibitory effect becomes more evident. The cell cycle of L929 fibroblasts has been discontinued and the fibroblasts are blocked in G₀-G₁ period. The secretion of growth factor TGF- β 1 and aFGF is also inhibited by CTSb solution. The results hint that CTSb compound membrane produces its preventing adhesion effect by inhibiting the growth of fibroblasts.

Keywords: chitosan; preventing adhesion; mechanism; fibroblasts

壳聚糖基复合膜预防术后肌腱粘连机理的研究

常菁¹, 刘万顺¹, 韩宝芹¹, 梁晔¹, 崔海栋²

¹ 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛, 中国, 266003

² 青岛博益特生物材料有限公司, 青岛, 中国, 266061

E-mail: Jingch1980@yahoo.com.cn

摘要: 本研究采用 MTT、透射电镜、凝胶电泳、流式细胞仪、生长因子测定等方法研究壳聚糖基共混糖溶液 (CTSb solution) 对 L929 成纤维细胞生长的影响, 从 CTSb 壳聚糖基复合膜组成成分对成纤维细胞生长的影响的角度探讨复合膜预防肌腱粘连的机理。结果表明, 不同浓度壳聚糖基共混糖溶液培养成纤维细胞一定时间后, MTT、凝胶电泳、细胞周期等指标测定结果均表明共混糖溶液对成纤维细胞生长有明显抑制作用; 细胞凋亡现象明显; 细胞周期发生中断, 细胞被阻滞于 G₀-G₁ 期; 对 TGF- β 1 和 aFGF 生长因子的分泌有抑制作用。该研究结果提示复合膜可通过抑制成纤维细胞生长来预防肌腱粘连的发生。

关键词: 壳聚糖; 预防粘连; 机理; 成纤维细胞

1 引言

关于肌腱的愈合机制, 主要有两种观点: 一是内源性学说, Garner 等应用体外腱段培养技术和同位素示踪的方法研究, 证明肌腱在没有外来细胞的情况下, 具有主动合成胶原和细胞增生的能力; 另一是外源性学说, 以 Potenza 为代表的认为肌腱愈合是腱鞘与周围组织的成纤维细胞增生及毛细血管伸入来连接断端。促进内源性愈合的发生, 减少外源性愈合的参与, 是当前大多数研究者解决肌腱粘连问题和提高肌腱愈合质量所努力的方向。外源性愈合过程中, 成纤维细胞

是瘢痕形成的效应细胞, 成纤维细胞胶原合成增加、降解减少会导致瘢痕中胶原过度积聚, 组织学上以纤维细胞的明显增加和细胞外基质的过度聚集为特征。

壳聚糖是 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖通过 β -1, 4-糖苷键缩合而成的直链状氨基多糖, 是甲壳素脱乙酰后的产物^[1-2], 具有止血、生物屏障、抑菌等作用^[3-5]。本研究组在此前研究中制备了一种 CTSb 壳聚糖基复合膜, 并对其性质和预防术后肌腱粘连的功能进行了系统研究^[6-7]。研究结果表明壳聚糖基复合膜具有较好的生物相容性和生物降解性^[6], 在预防术后肌腱粘连方面显示了良好的防粘连作用^[7]。结合肌腱愈合机制和壳聚糖自身的性质, 本研究重点从该复合膜组成成分对成纤维细胞生长的影响的角度对复合膜预防肌腱

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA091630)

粘连的机理展开初步研究和探讨, 以期为其在该领域的进一步研究和应用提供理论支持。

2 实验

2.1 实验材料和试剂

DMEM 培养基 (Gibco 公司生产); 胶原酶 V (Sigma 公司); 胎牛血清 (FBS, HyClone 公司); MTT (Sigma 公司); 正常熔点和低熔点琼脂糖 (Gibco BRL); 200bpDNA 分子量标准 (Takara 公司)。

无水乙醇、异丙醇、葡萄糖、醋酸钾、二甲基亚砷及其他试剂均为国产试剂分析纯。

2.2 主要仪器

FACE Vantage 流式细胞仪 (美国 BD 公司); BB16FCO2 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司); HFSafe760S 生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公司); Multiskan MK3 酶标仪 (上海雷勃分板仪器有限公司); 凝胶图像分析系统 (Leca 公司产品)。

2.3 实验方法

2.3.1 不同浓度共混糖溶液的配制

基础培养基为 DMEM, 使用时加胎牛血清及双抗液。壳聚糖基共混糖溶液用于本实验时用上述细胞培养液溶解, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 并稀释至相应浓度 (分别为 10、50、100、500、1000 μ g/mL)。

2.3.2 MTT 法测定共混糖溶液对成纤维细胞生长的影响

取对数生长的 L929 成纤维细胞, 接种于 96 孔细胞培养板, 预培养 24h 后, 吸弃原培养液, 换成含不同浓度的共混糖溶液培养液, 设立正常 DMEM 对照组和无细胞的空白组, 各浓度梯度组设立 6 个平行样。分别在 2d 和 4d 时, MTT 法于 492nm 处测定 OD 值。

2.3.3 DNA 凝胶电泳分析共混糖溶液对成纤维细胞生长的影响

取对数生长的 L929 成纤维细胞, 接种于 6 孔细胞培养板, 预培养 24h 后, 吸弃原培养液, 换成含不同浓度的共混糖培养液, 设立正常 DMEM 对照组, 各浓度梯度组设立 2 个平行样。培养 24h 后, 提取各组细胞 DNA, 进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后在紫外透射分析仪上 254nm 观察 DNA ladder, 拍照。

2.3.4 流式细胞仪测定细胞周期和凋亡率

取对数生长的 L929 成纤维细胞, 接种于 6 孔细胞培养板, 预培养 24h 后, 吸弃原培养液, 换成 1000 μ g/mL 的共混糖培养液, 设立正常 DMEM 对照组, 各组设立 6 个平行样。培养 24h 后, 收集各组细胞, 经洗涤、离心、固定、RNAase 处理后加入

DNA-Prepstain 染液染色, 流式细胞仪检测各组细胞的荧光强度, 用 CELLQUEST 软件进行统计学分析, 分析各组细胞周期时相和凋亡率。

2.3.5 AO/EB 染色及观察

取对数生长的 L929 成纤维细胞, 接种于 6 孔细胞培养板, 预培养 24h 后, 吸弃原培养液, 换成含不同浓度的共混糖培养液, 设立正常 DMEM 对照组, 各浓度梯度组设立 2 个平行样。培养 48h 后, 采用 AO/EB 染色, 在荧光显微镜下观察, 拍照。

2.3.6 TGF- β 1 和 aFGF 生长因子的检测

取对数生长的 L929 成纤维细胞, 接种于 25ml 培养瓶, 预培养 24 小时后, 吸弃原培养液, 换成含不同浓度的共混糖溶液培养液; 对照组仅加入 DMEM 培养基。继续培养 3 天后, 调整细胞数为 1.0×10^5 /瓶, 加入不含样品的 DMEM 培养液 2ml/瓶, 继续培养。24h 后各取 100 μ L 上清液, -20 $^{\circ}$ C 保存, 采用间接酶联免疫吸附方法检测 TGF- β 1 和 aFGF 含量。

2.3.7 统计分析

全部资料用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS11.0 软件进行多组样本均数的比较, 组间比较采用 Duncan's 法, 显著性界值分别设定为 0.05、0.01。

3 实验结果

3.1 不同浓度共混糖溶液对成纤维细胞生长的影响

MTT 法测定结果表明: 共混糖溶液在 10-1000 μ g/mL 浓度间对成纤维细胞均有不同程度的抑制生长的作用, 随着浓度的升高, 抑制作用逐渐增强, 在 500 和 1000 μ g/mL 浓度下的 OD 值与对照组有明显差异, 96h 时抑制率分别为 62.7%和 75.9%。测定结果见图 1。

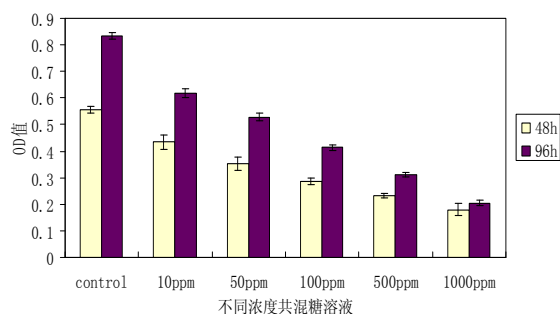


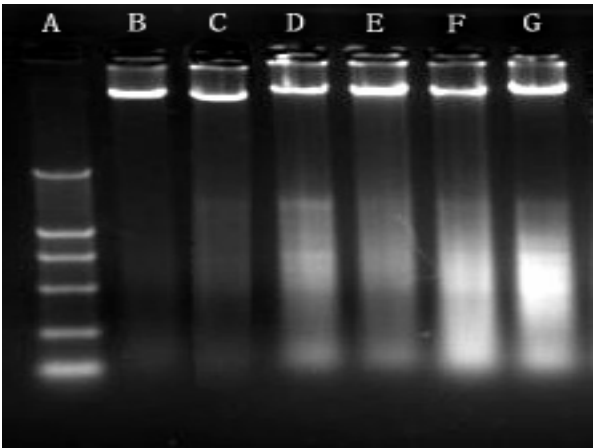
图 1 不同浓度共混糖溶液对 L929 成纤维细胞生长的影响

Fig.1. Effect of CTSb solution on proliferation of L929 fibroblasts

3.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

DNA 琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示, 泳道 A 为泳道 DAN Marker, B 为对照组细胞 DNA 电泳图谱,

结果呈单一带型,无凋亡特征。与对照组比较,DNA片段琼脂糖凝胶电泳图谱呈现典型的间隔 180-200 碱基对的梯状 DNA 区带(DNA ladder),且“梯”状条带的辉度随糖浓度的升高而增高,形成凋亡细胞特有的DNA 改变,说明 DNA 发生了断裂,共混糖溶液可诱导成纤维细胞发生凋亡。



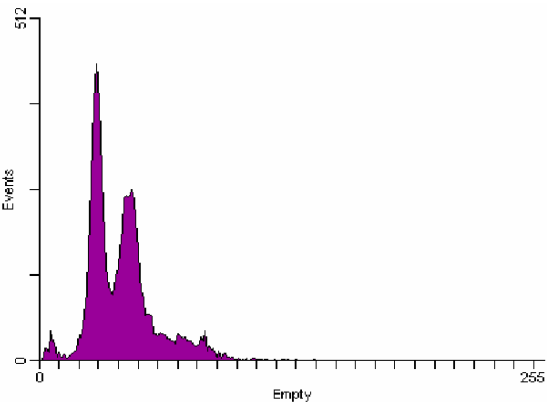
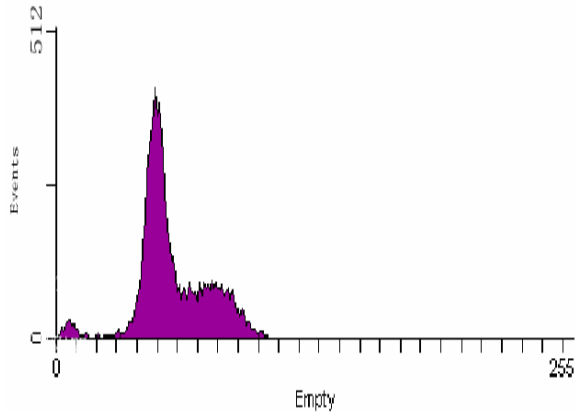
A: DNA Marker, B: Control Group, C: 10ug/mL Group, D: 50ug/mL, E: 100ug/mL, F: 500ug/mL, G: 1000ug/mL

图 2 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from fibroblasts cultured by CTSb solution for 24h

3.3 流式细胞仪测定结果

流式细胞仪分析结果如图 3 和表 1 所示,经 1000ug/mL 作用 24h 后,成纤维细胞中 S 期和 G₂-M 期百分比降低, G₀-G₁ 期细胞百分比升高,细胞凋亡率(APO)明显升高,由正常对照组的 0.05% 上升到 45.3%。



A: 对照组 B: 1000ug/mL 共混糖溶液培养 24h

图 3 共混糖溶液对成纤维细胞生长影响的流式细胞仪分析图

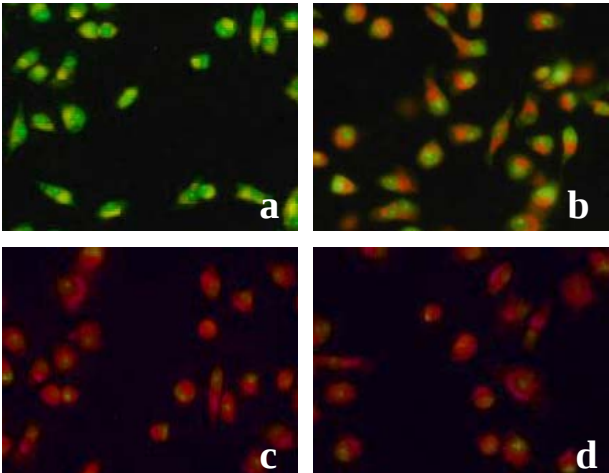
Fig.3. FCM of apoptosis of L929 fibroblasts cultured by CTSb solution for 24h

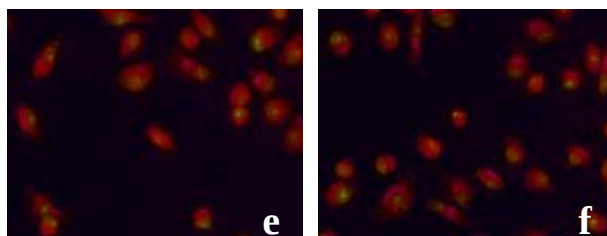
表 1 共混糖溶液对成纤维细胞培养 24h 的细胞周期分布 (%)
Tab.1. Cell cycle analysis of L929 fibroblasts cultured by CTSb solution for 24h(%)

Group	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	APO
Control Group	50.39	34.2	15.42	0.05
CTSb Group (1000ug/mL)	70.26	25.03	4.71	45.3

3.4 AO/EB 染色及观察结果

AO/EB 染色结果如图 4 所示,对照组细胞核染色质着绿色并呈正常结构,发绿色荧光。不同浓度共混糖溶液作用各组细胞核染色质均不同程度着橘红色呈固缩状或碎裂状,发出橘红色荧光。其中 10ug/mL 共混糖作用组细胞正处于早期凋亡状态,其它各浓度作用组细胞均处于晚期凋亡状态。成纤维细胞的 AO/EB 染色图表明不同浓度共混糖溶液在引起成纤维细胞凋亡时也会对细胞膜造成损伤。





a:Control Group, b:10ug/mL Group, c:50ug/mL, d:100ug/mL, e:500ug/mL, f:1000ug/mL

图4 不同浓度共混糖溶液作用48h后成纤维细胞AO/EB染色荧光显微镜照片

Fig.4. Fluorescopy photoes of of L929 fibroblasts cultured by CTSb solution for 48h

3.5 TGF- β 1 和 aFGF 生长因子的检测结果

成纤维细胞自分泌 TGF- β 1 和 aFGF 生长因子检测结果如图 5 所示,从图中可以看出二者分泌量均有所减少,随着共混糖溶液浓度的升高,生长因子的量减少,表明共混糖溶液对 TGF- β 1 和 aFGF 生长因子分泌有抑制作用,抑制作用随着共混糖溶液浓度的升高而增强。

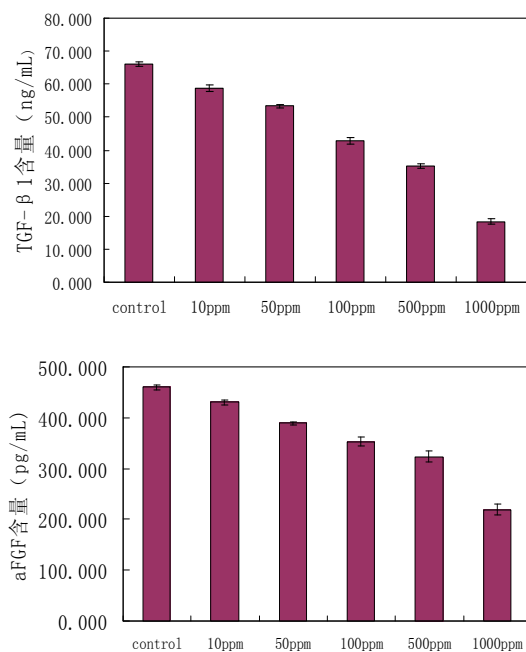


图5 不同浓度共混糖溶液培养24h后 TGF- β 1 和 aFGF 分泌量

Fig.5. Secretory volume of TGF- β 1 and aFGF from fibroblasts cultured by CTSb solution for 24h

4 讨论

4.1 成纤维细胞与粘连发生

成纤维细胞是创伤愈合过程中形成肉芽组织、合成胶原细胞外基质,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,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。因而在探讨复合膜预防粘连的机理时,除考虑其作为生物材料膜片本身具有的物理阻隔作用和止血功能外,另一推测可能发生的主要作用机理就是该复合膜对成纤维细胞生长的抑制作用,这也是本研究的立题依据。

4.2 生长因子对成纤维细胞生长的作用

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。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- β)等。其中TGF- β 和FGF是创伤修复过程中重要因子,其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。因此,适量控制成纤维细胞TGF- β 和FGF的分泌可减少胶原等细胞外基质的过多沉积,从而减轻创面过度愈合和大面积粘连的发生。

5 结论

不同浓度壳聚糖基共混糖溶液培养成纤维细胞一定时间后,MTT、透射电镜、凝胶电泳、细胞周期等指标测定结果均表明共混糖溶液对成纤维细胞生长有明显抑制作用,该研究结果提示复合膜通过抑制成纤维细胞生长来预防肌腱粘连。

References (参考文献)

- [1] Tingda Jiang. Chitosan [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001. 15-20.
- [2] Liping Sun, Yumin Du. A new approach to chemically modified carboxymethyl chitosan and study of its moisture-absorption and moisture-retention abilities [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 102(2): 1303-1309.
- [3] Hong Li, Mingyong Zhu. Preparation of in situ-deposited hydroxyapatite on chitosan scaffold [J]. *Journal of Functional Materials*, 2006, 37(6): 909-911(Ch).
李红, 朱敏鹰. 原位沉积羟基磷灰石-壳聚糖骨组织工程支架材料的研制[J]. *功能材料*, 2006, 37(6): 909-911.
- [4] Nadège Boucard, Christophe Viton. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following

- third-degree burns [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(24): 3478-3488.
- [5] Fen Ye, Yuji Yin. The applications of chitosan scaffolds for tissue engineering [J]. *Journal of Functional Materials*, 2002, 33 (5) : 459-461(Ch).
叶芬, 尹玉姬. 壳聚糖支架在组织工程中的应用[J]. 功能材料, 2002, 33 (5) : 459-461.
- [6] Jing Chang, Wanshun Liu. Studies on biological properties of chitin/carboxymethyl chitosan/hydroxypropylated chitosan blend films for preventing adhesion [J]. *Journal of Functional Materials*, 2008, 39(4): 651-655(Ch).
常菁, 刘万顺. 防粘连壳聚糖衍生物共混膜的生物学性质研究[J]. 功能材料, 2008, 39(4): 651-655.
- [7] Wen Liu, Jing Chang. Study on preparation of Absorbable chitosan compound membrane and its effect on preventing tendon adhesion [J]. *Journal of Functional Materials*, 2009, 40(3): 450-454(Ch).
刘文, 常菁. 壳聚糖基复合膜的制备及预防术后肌腱粘连功能的研究[J]. 功能材料, 2009, 40(3): 450-454.