

## 2-羟丙基三甲基氯化铵脱乙酰壳多糖和碱性成纤维细胞生长因子对白细胞介素-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 的影响

吉秋霞, 袁昌青, 徐全臣, 于新波

(青岛大学医学院附属医院口腔科 山东 青岛 266003)

[摘要] 目的 观察在脂多糖(LPS)刺激下, 2-羟丙基三甲基氯化铵脱乙酰壳多糖(HTCC)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对人牙周膜成纤维细胞(hPDLF)分泌白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 的影响。方法 在 50 mg·L<sup>-1</sup>的 LPS 刺激下, 采用酶联免疫吸附测定观察质量浓度为 1 g·L<sup>-1</sup>的 HTCC 和 100  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>的 bFGF 对 50 mg·L<sup>-1</sup>的 LPS 刺激 hPDLF 分别于 24、48 和 72 h 分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的质量浓度变化。结果 1 g·L<sup>-1</sup>的 HTCC 具有促进 LPS 刺激 hPDLF 分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的作用, 分泌量 48 h 达高峰。在 100  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>的 bFGF 的作用下, LPS 介导的 hPDLF 分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的质量浓度明显下降。HTCC 与 bFGF 联合较单独应用时, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的质量浓度下降显著( $P \leq 0.001$ )。结论 HTCC 对 LPS 介导 hPDLF 分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  具有促进作用, HTCC 与 bFGF 联合应用能有效地抑制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌。

[关键词] 2-羟丙基三甲基氯化铵脱乙酰壳多糖; 人牙周膜成纤维细胞; 脂多糖; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

[中图分类号] R 783.1 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.01.005

**Effect of 2-hydroxy-propyl trimethyl ammonium chloride chitosan and basic fibroblast growth factor on production of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$**  Ji Qiu-xia, YUAN Chang-qing, XU Quan-chen, YU Xin-bo. (Dept. of Stomatology, The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[Abstract] **Objective** The aim of this study was to observe the effect of 2-hydroxy-propyl trimethyl ammonium chloride chitosan(HTCC) and basic fibroblast growth factor(bFGF) on production of interleukin(IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  in human periodontal ligament fibroblast(hPDLF) stimulated by lipopolysaccharide(LPS). **Methods** The levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in hPDLF stimulated by 50 mg·L<sup>-1</sup> LPS was observed and the effects of 1 g·L<sup>-1</sup> HTCC and 100  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> bFGF on the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** 1 g·L<sup>-1</sup> HTCC can stimulate the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in hPDLF stimulated by LPS and the level of cytokines were highest at 48 h. 100  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> bFGF can decrease the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . The level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in hPDLF stimulated by LPS was statistically decreased by association of HTCC and bFGF ( $P \leq 0.001$ ). **Conclusion** HTCC can increase the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in hPDLF stimulated by LPS. And HTCC associated with bFGF can effectively inhibit the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of hPDLF.

[Key words] 2-hydroxy-propyl trimethyl ammonium chloride chitosan; human periodontal ligament fibroblast; lipopolysaccharide; interleukin-1 $\beta$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$

脱乙酰壳多糖(chitosan, CS)又名壳聚糖, 其化学名为 1,4-2-氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡聚糖<sup>[1]</sup>, 因其对人体无毒<sup>[2]</sup>、无害、抑菌<sup>[3-4]</sup>、生物相容性好<sup>[5]</sup>和可被生物降解<sup>[6-7]</sup>等优点, 近年来在生物医

药领域被广泛应用于药物缓释载体<sup>[8-9]</sup>和组织工程支架<sup>[10]</sup>。在牙周病治疗领域, CS 及其衍生物的应用与开发正方兴未艾, 如作为牙周病抑菌剂<sup>[11]</sup>, 药物缓释载体<sup>[12]</sup>和组织工程支架<sup>[10,13]</sup>等。但是, CS 水溶性差( $pH \leq 6.5$ ), 限制了其中性环境中的应用<sup>[14]</sup>。2-羟丙基三甲基氯化铵脱乙酰壳多糖(2-hydroxy-propyl trimethyl ammonium chloride chitosan, HTCC)将CS的氨基引入季铵基团, 从而改善其水溶性。研究<sup>[15-16]</sup>显示, HTCC 有较 CS 更好

[收稿日期] 2009-04-16; [修回日期] 2009-09-30

[基金项目] 山东省卫生厅青年科研基金资助项目(2007QZ021) 青岛市科技计划基金资助项目(06-2-2-6-nsh-2)

[作者简介] 吉秋霞(1975—), 女, 山东人, 讲师, 博士

[通讯作者] 吉秋霞, Tel: 0532-88855204

的抑菌性能和黏膜透过性。近年来, HTCC 被逐渐应用于牙周病局部药物缓释体系中<sup>[7]</sup>。

白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  的产生和聚集, 与牙周病的发生与发展密切相关。人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblast, hPDLF)在内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的刺激下, 可导致 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌增加。本研究旨在通过 LPS 刺激, 观察 HTCC 和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)对hPDLF 分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响, 为进一步认识 HTCC 的生物医学特性及其在牙周病领域的应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HTCC(中国海洋大学生物化学实验室制备, 相对分子质量为  $1.08 \times 10^6$ , 取代度为 75%), 达尔贝科极限必需培养液(Dulbecco minimum essential medium, DMEM; Gibco 公司, 美国), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; Gibco 公司, 美国), 胰蛋白酶(Gibco 公司, 美国), 青霉素、链霉素、两性霉素 B(华北制药股份有限公司), IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 大肠杆菌脂多糖(*E.coli*, O<sub>55</sub>: B<sub>5</sub>; Sigma 公司, 德国), bFGF(珠海亿胜生物制剂有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 hPDLF 的原代培养 将青岛大学医学院附属医院口腔门诊因正畸需要拔除的无龋、无牙周病的青少年前磨牙(患者年龄 12~16 岁, 平均 14 岁), 置于预冷的含有青霉素和链霉素的无菌汉克液中。在超净工作台内, 用含双抗的 DMEM 将其反复冲洗 3 次, 再将刮取于牙根中部 1/3 的牙周膜组织剪成小块, 平铺于 50 mL 的培养瓶底, 加入 2 mL 含有体积分数 20%FBS 的 DMEM, 翻转培养瓶。将其置于 37 °C、含体积分数 5%的二氧化碳、饱和湿度条件下, 恒温孵育 2 h 后再次翻转培养瓶, 补加培养液 1 mL, 继续培养。待细胞长出后, 每隔 3 d 换液 1 次。待组织块中游出的细胞铺满瓶底 80%时, 用  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰酶消化传代。倒置相差显微镜下观察细胞, 待大部分细胞回缩变圆后, 用含血清的培养液终止消化, 换液

后完成传代。第 3~5 代细胞用于实验。

1.2.2 LPS 刺激 hPDLF 对 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响 采用  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰酶消化生长良好的第 3 代 hPDLF, 调整细胞密度至  $4 \times 10^4$  个每升, 将细胞接种于 48 孔培养板, 每孔 0.5 mL, 培养 24 h 后观察细胞贴壁情况, 弃上清液, 每孔加入实验溶液 0.5 mL, 每一质量浓度复种 5 孔, 继续培养 1、3 和 5 d 后, 吸取上清液, 置 -20 °C 冰箱内待检。实验溶液为含体积分数 10%FBS 的 DMEM 稀释溶液: 1)  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS; 2)  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  HTCC+ $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS; 3)  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  bFGF+ $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS; 4)  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  HTCC+ $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  bFGF+ $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS。

同时, 设阴性对照组(为含体积分数 10%FBS 的 DMEM), 严格按照 ELISA 试剂盒说明检测 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的质量浓度。

### 1.3 统计学处理

用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计分析。所得结果用均数正负标准差表示, 两组和多组之间比较分别用 *t* 检验和单因素方差分析。  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 标准曲线的建立

严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的标准曲线显示, IL-1 $\beta$  在质量浓度 0~100  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、TNF- $\alpha$  在质量浓度 0~250  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$  有良好的线性关系(图 1A、1B)。根据直线方程, 换算出既定条件下培养液中的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的质量浓度。

### 2.2 LPS 介导 hPDLF 分泌 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$

hPDLF 经 LPS 刺激 24~72 h 后, 细胞培养液中的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的质量浓度较阴性对照组明显增多, 且随时间的延长, 其质量浓度逐渐上升(图 2A、2B)。

### 2.3 HTCC 对 LPS 介导 hPDLF 分泌 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的影响

HTCC 刺激 hPDLF 分泌 IL-1 $\beta$  的质量浓度较对照组明显增多, 且在 48 h 达到高峰。与阴性对照组和 LPS 组相比较, 其差异有统计学意义( $P \leq 0.001$ , 表 1 和图 2A)。

HTCC 刺激 hPDLF 分泌 TNF- $\alpha$  的质量浓度较对照组明显增多, 且在 24 h 达高峰, 后随时间的推移逐渐下降。与阴性对照组和 LPS 组相比较, 其差异有统计学意义( $P \leq 0.001$ , 表 2 和图 2B)。

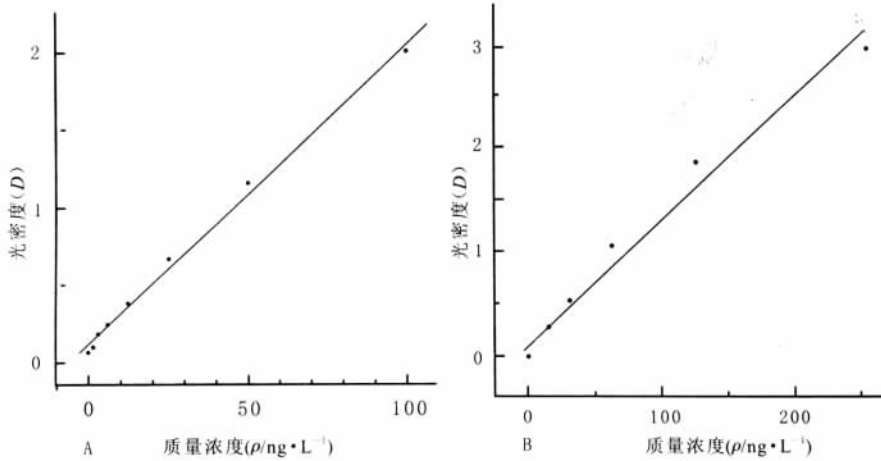


图 1 IL-1β(A)和TNF-α(B)的标准曲线图  
Fig 1 Standard curve of IL-1β(A) and TNF-α(B)

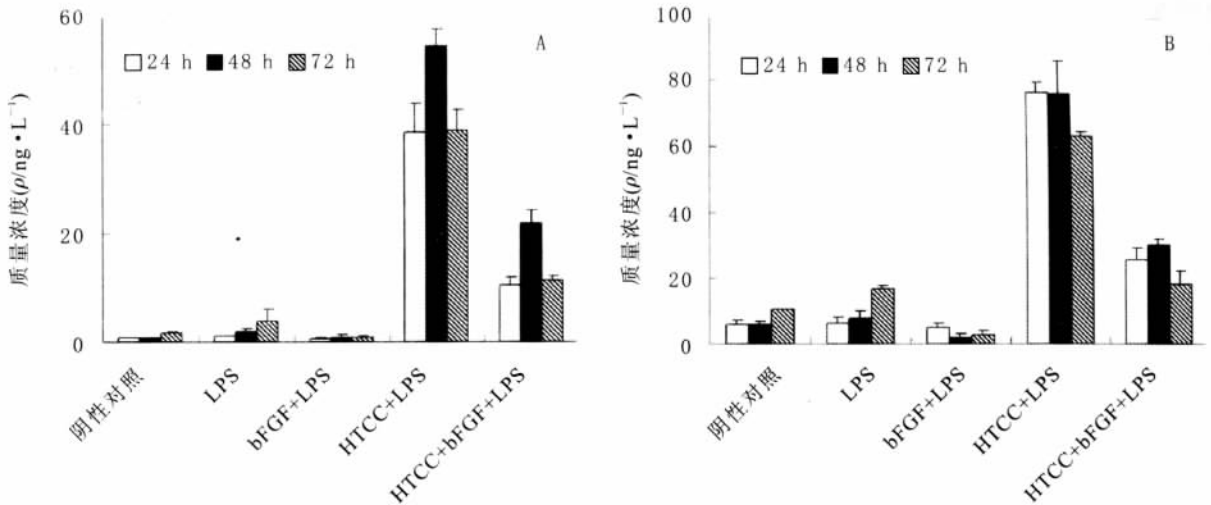


图 2 HTCC 和 bFGF 对 LPS 介导 hPDLF 分泌 IL-1β (A) 和 TNF-α (B) 的影响示意图

Fig 2 Effect of HTCC and bFGF on the production of IL-1β (A) and TNF-α (B) from hPDLF mediated by LPS

表 1 HTCC 对 LPS 介导 hPDLF 分泌 IL-1β 的影响  
( $\rho/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 Effect of HTCC on the IL-1β of hPDLF mediated by LPS( $\rho/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

实验溶液(组)	IL-1β 的质量浓度		
	24 h	48 h	72 h
阴性对照	0.85±0.005	0.77±0.017	1.79±0.053
LPS	1.12±0.120	1.98±0.460	3.92±2.060
bFGF+LPS	0.69±0.140	0.92±0.520	0.80±0.210
HTCC+LPS	38.59±5.420 <sup>1)2)</sup>	54.35±3.270 <sup>1)2)</sup>	39.08±3.720 <sup>1)2)</sup>
HTCC+bFGF+LPS	10.64±1.230	21.90±2.340	11.24±0.990

注：1)相对于对照组,  $P\leq 0.001$ ；2)相对于LPS组  $P\leq 0.001$ 。

#### 2.4 bFGF 与 HTCC 联合应用对 LPS 介导 hPDLF 分泌 IL-1β 和 TNF-α 的影响

hPDLF 分泌 IL-1β 和 TNF-α 的质量浓度较对照组明显降低, 说明 bFGF 对 LPS 介导的 hPDLF 有抑制作用。当 HTCC 与 bFGF 联合应用的时候,

IL-1β 和 TNF-α 的质量浓度较单纯 HTCC 组显著降低, 48 h 之后呈逐渐下降趋势。

表 2 HTCC 对 LPS 介导 hPDLF 分泌 TNF-α 的影响  
( $\rho/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab 2 Effect of HTCC on the TNF-α of hPDLF mediated by LPS( $\rho/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

实验溶液(组)	TNF-α 的质量浓度		
	24 h	48 h	72 h
阴性对照	5.81±1.560	5.97±0.860	10.60±0.050
LPS	6.43±1.630	7.87±1.950	16.89±0.940
bFGF+LPS	4.88±1.470	2.00±0.990	2.87±1.140
HTCC+LPS	76.36±3.00 <sup>1)2)</sup>	75.73±10.160 <sup>1)2)</sup>	63.02±1.420 <sup>1)2)</sup>
HTCC+bFGF+LPS	25.65±3.230	29.79±1.950	18.34±3.980

注：1)相对于对照组,  $P\leq 0.001$ ；2)相对于LPS组,  $P\leq 0.001$ 。

### 3 讨论

牙周致病菌是牙周病发生的始动因子<sup>[18]</sup>, 是由革兰阴性厌氧菌、鞭毛菌、螺旋体和阿米巴原

虫等微生物引起的发生在牙齿支持组织的非特异性炎症性疾病<sup>[19]</sup>。LPS 对 hPDLF 具有明显的细胞毒性作用，能激活宿主细胞产生 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子，而这些细胞因子可导致牙周组织的继发性损伤。IL-1 $\beta$  是由免疫细胞产生的一组调节细胞功能的高活性、多功能的免疫递质，是炎症和免疫过程的起始因子和效应器；TNF- $\alpha$  由单核和巨噬细胞分泌，有介导肿瘤免疫和调节机体免疫功能以及参与炎症病变过程等多种生物学效应。研究显示，IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  参与牙周病的发生和发展，因此在分子水平中断或减少两者的分泌是治疗牙周病的途径之一。

水溶性 CS 衍生物不仅能够刺激巨噬细胞和单核细胞激活因子，而且还能够刺激 T 淋巴细胞的分化增殖，提高自然杀伤细胞的活力，诱导 IL-1、2 的产生，从而改善牙周局部微生态环境，调动非特异性免疫反应间接发挥杀菌作用<sup>[20]</sup>。本研究 HTCC 可诱导 IL-1 $\beta$  产生的结果，与上述结果相似。研究显示，1 g·L<sup>-1</sup> 质量浓度的 HTCC 会因促进 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌而导致组织损伤，对牙周病的治疗带来不利影响。另一方面说明，这一质量浓度的 HTCC 对 hPDLF 有较强的细胞毒性。bFGF 的体外生物学效应十分强烈，对成纤维细胞、骨细胞、软骨细胞、血管内皮细胞、肾上腺皮质和髓质细胞、神经元和神经胶质等具有较强地促细胞分裂增殖活性。在体外细胞培养中，bFGF 能在 1 g·L<sup>-1</sup> 的低质量浓度发挥其作用<sup>[21]</sup>。

#### 4 参考文献

[1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:1.  
 [2] Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 34(1): 21-28.  
 [3] Jumaa M, Furkert FH, Müller BW. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2002, 53(1): 115-123.  
 [4] Kim KW, Thomas RL, Lee C, et al. Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan[J]. J Food Prot, 2003, 66(8): 1495-1498.  
 [5] Molinaro G, Leroux JC, Damas J, et al. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: An *in vivo* experimental approach to injectable biomaterials[J]. Biomaterials, 2002, 23(13): 2717-2722.  
 [6] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications[J]. Biotechnol

Adv, 2008, 26(1): 1-21.  
 [7] Schmitz T, Grabovac V, Palmberger TF, et al. Synthesis and characterization of a chitosan-N-acetyl cysteine conjugate[J]. Int J Pharm, 2008, 347(1/2): 79-85.  
 [8] Needleman IG, Martin GP, Smales FC. Characterisation of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery[J]. J Clin Periodontol, 1998, 25(1): 74-82.  
 [9] Needleman I, Mather SJ, Martin GP, et al. Periodontal pocket clearance by gamma scintigraphy in human volunteers[J]. J Clin Periodontol, 2000, 27(12): 904-909.  
 [10] Park JS, Choi SH, Moon IS, et al. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs[J]. J Clin Periodontol, 2003, 30(5): 443-453.  
 [11] İkinci G, Senel S, Akincibay H, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*[J]. Int J Pharm, 2002, 235(1/2): 121-127.  
 [12] Barat R, Srinatha A, Pandit JK, et al. Chitosan inserts for periodontitis: Influence of drug loading, plasticizer and crosslinking on *in vitro* metronidazole release[J]. Acta Pharm, 2007, 57(4): 469-477.  
 [13] Lee YM, Park YJ, Lee SJ, et al. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges[J]. J Periodontol, 2000, 71(3): 410-417.  
 [14] Madhally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering[J]. Biomaterials, 1999, 20(12): 1133-1142.  
 [15] Sandri G, Rossi S, Bonferoni MC, et al. Buccal penetration enhancement properties of N-trimethyl chitosan: Influence of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule[J]. Int J Pharm, 2005, 297(1/2): 146-155.  
 [16] Wu J, Wei W, Wang LY, et al. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system[J]. Biomaterials, 2007, 28(13): 2220-2232.  
 [17] Ji QX, Chen XG, Zhao QS, et al. Injectable thermosensitive hydrogel based on chitosan and quaternized chitosan and the biomedical properties[J]. J Mater Sci Mater Med, 2009, 20(8): 1603-1610.  
 [18] Haffajee AD, Socransky SS. Attachment level changes in destructive periodontal diseases[J]. J Clin Periodontol, 1986, 13(5): 461-475.  
 [19] 张澄波, 梅学文. 壳聚糖对巨噬细胞精氨酸酶活性的影响[J]. 首都医学院学报, 1992, 13(3): 224.  
 [20] 余占海, 张国英, 张小恒, 等. 盐酸小檗碱对大鼠牙周组织中白细胞介素-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 26(1): 82-86.  
 [21] 杨丕山, 孙钦峰, 宋爱梅, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对犬牙周成纤维细胞样细胞增殖影响的体内研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(1): 59-61.

(本文编辑 汤亚玲)