·生物技术·

改性甲壳素对体外培养人成纤维细胞的影响

李天石 吴奕光 何君君 曾文妮

【摘要】 **目的** 探讨不同浓度改性甲壳素对体外培养人成纤维细胞的影响。**方法** 使用含0、10、100、500、1 000、2 000、5 000 mg/L改性甲壳素的培养基体外培养人成纤维细胞株HFF，培养0、1、2、4、8、14 d后进行相应检测。采用MTT法评价改性甲壳素的细胞毒性，酶联免疫吸附法（ELISA）检测细胞培养上清Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原含量，反转录（RT）-PCR、免疫印迹法检测Ⅰ型胶原、增殖细胞核抗原（PCNA）mRNA和蛋白的表达。**结果** 培养0、1、2、4、8、14 d MTT法检测显示，与对照组（0 mg/L改性甲壳素）比较，浓度为10、100 mg/L的改性甲壳素对HFF细胞无明显细胞增殖抑制作用；而浓度为500、1 000、2 000、5 000 mg/L的改性甲壳素对HFF细胞增殖具有明显抑制作用，且具有时间和浓度依赖性（均$P<0.05$）。ELISA检测显示，500、1 000、2 000、5 000 mg/L的改性甲壳素处理HFF细胞2 d，各组细胞分泌Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原含量均显著减少，与对照组比较差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。RT-PCR和免疫印迹检测显示，500 mg/L改性甲壳素处理HFF细胞0~14 d，随着培养时间延长Ⅰ型胶原、PCNA mRNA和蛋白表达均逐渐降低（均$P<0.05$）。**结论** 改性甲壳素可明显抑制成纤维细胞增殖及Ⅰ型胶原、PCNA表达，有望在疤痕的防治中发挥作用。

【关键词】 甲壳素； 成纤维细胞； 胶原Ⅰ型； 增殖细胞核抗原

Effects of modified chitin on human fibroblasts cultured *in-vitro* *Li Tianshi**, *Wu Yiguang*, *He Junjun*, *Zeng Wenni*. **Department of Plastic Surgery*, *Peking University Shenzhen Hospital*, *Shenzhen 518036*, *China*
Corresponding author: *Zeng Wenni*, *Futian District Government Healthcare Office*, *Shenzhen 518000*, *China*. *Email*: *veny02@163.com*

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of different concentrations of modified chitin on human fibroblasts cultured *in-vitro*. **Methods** Human fibroblast cell line HFF was cultured in medium containing 0, 10, 100, 500, 1 000, 2 000, 5 000 mg/L modified chitin, and was evaluated at 0, 1, 2, 4, 8 and 14 days of the culture. MTT method was used to evaluation the cytotoxicity of modified chitin, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of types Ⅰ and Ⅲ collagen in the cell culture supernatant, and the reverse transcription (RT)-PCR and Western blot was used to measure the mRNA and protein expressions of type Ⅰ collagen and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Results** MTT assay at days 0, 1, 2, 4, 8 and 14 of culture showed that modified chitin at the concentrations of 10, 100 mg/L did not exhibit any inhibitory effects on proliferation of HFF cells compared with the control group (0 mg/L modified chitin), while modified chitin at the concentrations of 500, 1 000, 2 000 and 5 000 mg/L significantly inhibited the HFF cell proliferation in a time- and concentration-dependent manner (all $P<0.05$). As shown by ELISA assay, treatment of HFF cells with 500, 1 000, 2 000 and 5 000 mg/L modified chitin for 2 d resulted in significantly reduced production of types Ⅰ and Ⅲ collagen in each group of cells compared with the control group (all $P<0.05$). RT-PCR and Western blot analysis showed that mRNA and protein expression levels of type Ⅰ collagen and PCNA gradually decreased over the 14-day treatment of HFF

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-1927.2015.04.010

基金项目：广东省自然科学基金（S2013010012641）；深圳市卫生计生系统科研项目（201401037）；深圳市战略新兴产业发展专项资金（JCYJ20130402145538710）；深圳市福田区卫生公益性科研项目（FTWS2014060）

作者单位：518036 深圳，北京大学深圳医院整形外科（李天石、何君君）；深圳大学化学与化工学院（吴奕光）；深圳市福田区干部保健办（曾文妮）

通信作者：曾文妮，Email：veny02@163.com

cells with 500 mg/L modified chitin (all $P<0.05$). **Conclusion** Modified chitin can inhibit fibroblast proliferation and expression of type Ⅰ collagen and PCNA in the fibroblast, which may be useful in the prevention and treatment of scarring.

【**Key words**】 Chitin; Fibroblasts; Collagen type Ⅰ; Proliferating cell nuclear antigen

疤痕(scar)是皮肤创伤修复和愈合过程的产物,也是一种非常难以治疗甚至难以控制的疾病,目前还没有非常有效的手段可以控制疤痕的增生。近年来随着甲壳素及其衍生物的深入开发,发现甲壳素除具有非常好的组织相容性外,还具有无毒、无刺激、可降解、无免疫原性、抗菌等特性,并且对疤痕组织具有明显的抑制作用,这使得控制疤痕增生的研究具有突破的可能。由于成纤维细胞在疤痕形成过程中起着重要作用,因此本研究探讨改性甲壳素对体外培养人成纤维细胞的影响,为改性甲壳素及其制成品应用于临床抑制瘢痕形成提供依据,为相关后续研究打下基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料及试剂

水溶性改性甲壳素粉剂,脱乙酰度为90%,相对分子质量为10 000~50 000,购自深圳市阳光之路生物材料科技有限公司,高压灭菌后备用。改性甲壳素使用DMEM培养基溶解,配制成终浓度分别为10、100、500、1 000、2 000、5 000 mg/L。DAPI(美国Sigma),MTT试剂盒(荷兰Keygene),胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)、胎牛血清(FBS)、DMEM培养基和青、链霉素(美国Gibco)。人Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(美国USCN),反转录试剂盒、PCR试剂盒(加拿大Fermentas),细胞培养板(美国Corning)。二氧化碳恒温培养箱(美国Thermo),超净工作台(苏州苏净),台式离心机(德国Eppendorf)。倒置相差显微镜及照相系统(德国Leica),MK3酶标仪(芬兰雷勃)。其他耗材均为美国AXYGEN公司产品。

1.2　实验细胞

人成纤维细胞株HFF购自中科院细胞库,使用含10% FBS的DMEM培养基,于37 ℃、体积分数5% CO_2培养箱饱和湿度下培养。3 d后基本长满单层,用0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化后1∶2传代。DAPI染色并于显微镜下观察。取第3代细胞以5×10^3/ml的密度接种于96孔板中,当细胞生长至50%~60%融合时,设置含5% FBS的DMEM培养基为对照组(0 mg/L改性甲壳素),实验组将培养基更换为浓度分别为10、100、500、1 000、2 000、5 000 mg/L的改性甲壳素溶液继续培养,分别于培养0(处理前)、1、2、4、8、14 d后收集细胞或其培养上清,进行后续检测。

1.3　细胞增殖抑制率检测

按前述方法处理细胞,分别于培养0、1、2、4、8、14 d后收集细胞,96孔板每孔加入50 μl MTT,置37 ℃、5% CO_2细胞培养箱培养4 h,吸弃上清液,每孔加150 μl DMSO,于平板摇床震荡10 min,酶标仪在570 nm波长处检测每孔的吸光度(A值)。每组设3个平行复孔,实验重复3次,计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%)=(1−实验组A值/对照组A值)×100%

1.4　Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原检测

按前述方法处理细胞,于培养2 d后收集培养液上清。按试剂盒说明书稀释标准品,每孔加100 μl标准品或样本,37 ℃孵育1 h。PBS洗涤3次,每孔加100 μl酶标抗体,37 ℃孵育30 min。PBS洗涤3次,每孔加入90 μl的TMB底物,室温孵育30 min后加入50 μl终止液,酶标仪在450 nm波长处检测每孔的吸光度(A值),根据试剂盒提供的标准品的A值绘制标准曲线并计算Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原的含量。

1.5　Ⅰ型胶原及增殖细胞核抗原mRNA表达

使用反转录(RT)-PCR检测Ⅰ型胶原及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)mRNA的表达。按前述方法培养HFF细胞,加入500 mg/L改性甲壳素处理细胞,培养0、1、2、4、8、14 d每组样品取约1×10^6细胞加入1 ml TRIzol(美国Invitrogen),加入0.2倍体积的氯仿剧烈震荡15 s,4 ℃放置10 min,4 ℃ 12 000×g离心15 min。取上清加入等量体积的异丙醇,混匀后4 ℃ 12 000×g离心10 min,75%乙醇洗涤RNA沉淀,空气中干燥沉淀后加入适量无RNase水,使RNA完全溶解。按试剂盒说明书操作进行反转录合成cDNA,以新合成的cDNA为模板进行PCR。使用Primer 5软件设计引

物。引物序列：人PCNA基因上游引物5′ TCCCTTACGCAAGTCTCAGC 3′，下游引物5′ GTCCTTGAGTGCCTCCAACA 3′，扩增产物大小为191 bp；Ⅰ型胶原基因上游引物5′ GCAGACGGGAGTTTCTCCTC 3′，下游引物5′ GGCAGTTCTTGGTCTCGTCA 3′，扩增产物大小为362 bp；内参GAPDH基因上游引物5′ CATCTTCCAGGAGTGAGCGAG 3′，下游引物5′ GGATGATGTTCTGGAGAGCCC 3′，扩增产物大小为402 bp。PCR反应体系：反转录产物2 μl，上下游引物各1 μl，Taq酶0.5 μl，2×GC Buffer Ⅰ 25 μl，dNTP 8 μl，ddH_2O 12.5 μl，共50 μl。PCR反应条件：94 ℃预变性1 min；94 ℃变性30 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸45 s，共32个循环；最后72 ℃延伸10 min。取PCR产物琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6　Ⅰ型胶原、PCNA蛋白表达

按前述方法培养HFF细胞，加入500 mg/L改性甲壳素处理细胞，分别培养0、1、2、4、8、14 d每组细胞提取总蛋白，用Bradford法测定蛋白质浓度，然后置于−70 ℃备用。每个样品取30 μg提取的蛋白质加入加样缓冲液中，100 ℃煮沸5 min，经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰氨凝胶电泳（SDS-PAGE），转膜后封闭，加入稀释的鼠抗人PNCA单克隆抗体（1∶1 000，美国CST）、羊抗人Ⅰ型胶原多克隆抗体（1∶200，美国Santa Cruz）和内参基因鼠抗人GAPDH单克隆抗体（1∶2 000，美国Santa Cruz），4 ℃放置12 h，弃一抗，用PBS洗膜5 min×4次，加入二抗室温孵育2 h后化学发光法检测。实验重复3次。

1.7　统计学分析

使用SPSS 13.0统计软件分析处理数据。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较使用方差分析，多个样本均数的两两比较使用LSD-t检验。

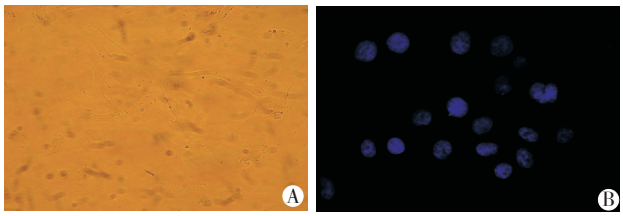
2　结　果

2.1　人成纤维细胞株形态观察

人成纤维细胞株HFF经传代培养后几乎全部伸展贴壁，生长迅速，约2~3 d铺满瓶底。在倒置显微镜下观察，细胞呈梭形、不规则形、纺锤形，胞核居细胞中央呈卵圆状，胞体多突起，生长密集时细胞接触间隙可消失。见图1。

2.2　细胞增殖抑制率检测

与对照组（0 mg/L改性甲壳素）比较，在不同时间点10、100 mg/L的改性甲壳素处理HFF细胞对细胞生长均无明显抑制作用（均$P>0.05$）；而500、1 000、2 000、5 000 mg/L改性甲壳素处理HFF细胞后细胞增殖抑制率均明显升高，且具有时间和浓度依赖性（均$P<0.05$）。

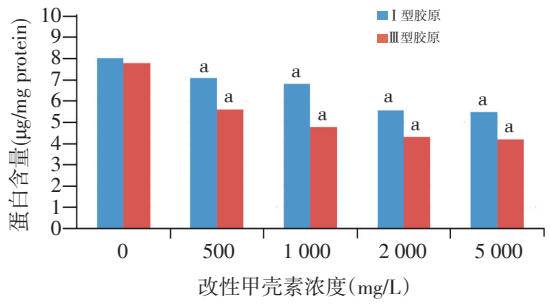


注：A：普通光镜；B：DAPI染色

图1　人成纤维细胞株HFF形态（×200）

2.3　Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原检测

ELISA检测显示，不同浓度改性甲壳素处理2 d，各组细胞分泌Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原含量均显著减少，与对照组比较差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见图2。



注：与对照组（0 mg/L改性甲壳素）比较，$^aP<0.05$

图2　不同浓度改性甲壳素作用2 d HFF细胞分泌Ⅰ、Ⅲ型胶原含量

2.4　Ⅰ型胶原、PCNA mRNA表达

RT-PCR检测显示，500 mg/L改性甲壳素处理HFF细胞0~14 d，各组细胞均能扩增出Ⅰ型胶原、PCNA特异性条带，随着培养时间延长PCNA mRNA表达逐渐降低，培养4、8、14 d PCNA mRNA表达明显减少；随着培养时间延长Ⅰ型胶原mRNA表达逐渐降低，但变化不显著。见图3。

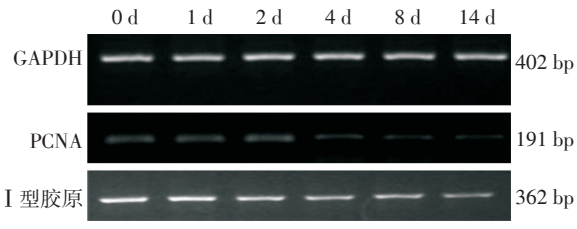


图3　不同培养时间点HFF细胞Ⅰ型胶原、PCNA mRNA表达（RT-PCR）

2.5　Ⅰ型胶原、PCNA蛋白表达

免疫印迹显示，500 mg/L改性甲壳素处理HFF细胞0~14 d，Ⅰ型胶原、PCNA蛋白在各组HFF细胞均有表达，随着培养时间延长Ⅰ型胶原和PCNA蛋白的表达均逐渐降低。见图4。

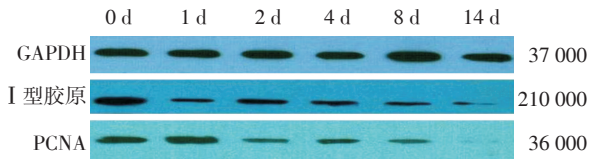


图4 不同培养时间点HFF细胞Ⅰ型胶原、PCNA蛋白表达（免疫印迹）

3　讨　论

成纤维细胞是创伤修复中重要的细胞，成纤维细胞增殖和胶原沉积是疤痕形成的重要表现[1-2]。甲壳素又名甲壳质、几丁质等，是一种天然的生物高分子，甲壳素及其衍生物具有良好的生物相容性及可降解性，在食品、美容、纺织、环境保护、农业、生物等领域中有着广泛的应用价值。王晓芹等[3]研究证实甲壳素生物材料具有良好的生物安全性，李华等[4]研究证实甲壳素几乎无毒性，目前已在生物医药领域广泛应用[5]。目前多项实验证明甲壳素不仅具有止痛、止血、抑菌等药理活性，还能促进伤口愈合、减小疤痕[6]。随着人们对美的追求越来越高，应用甲壳素及其衍生物减少疤痕成为近年来研究的热点。

本研究显示，浓度为500 mg/L以上的改性甲壳素可明显抑制成纤维细胞的体外增殖，并抑制Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原分泌。改性甲壳素对体外培养成纤维细胞增殖的抑制作用可能源自其阳离子高分子对成纤维细胞表面的静电作用，使成纤维细胞被包覆和黏连，抑制其合成和分泌Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原，减少PCNA蛋白表达，具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] Slemp AE, Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management[J]. Curr Opin Pediatr, 2006, 18(4): 396-402.

[2] 卞徽宁，陈华德，郑少逸，等. 碱性成纤维细胞生长因子对增生性瘢痕成纤维细胞细胞周期及凋亡的影响[J]. 广州医学院学报，2006，34(4)：14-17.

[3] 王晓芹，李晓辉，王贵波，等. 壳聚糖胶原生物敷料的安全性研究[J]. 中国临床康复，2002，6(7)：1030-1031.

[4] 李华，蒯正根，邝荔香. 药用辅料壳聚糖的急性毒性实验[J]. 临床肺科杂志，2004，9(3)：236.

[5] Jayakumar R, Prabaharan M, Nair SV, et al. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications [J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(1): 142-150.

[6] 张敬德，刑新，欧阳天祥，等. 几丁糖对瘢痕疙瘩成纤维细胞形态及增殖的作用[J]. 临床皮肤科杂志，2004，33(4)：199-201.

（收稿日期：2015-03-08）

（本文编辑：孙勇）