

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

Detection of Th1 or Th2 cytokine profiles and immunolocalization of the cytokine secreting cells in the cellular immunity induced by the implantation of porcine dermal collagen membrane

計畫類別： 個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2314 - B - 038 - 021

執行期間： 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

計畫主持人：呂炫

共同主持人：周幸華

吳金俊

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台北醫學大學

中 華 民 國 89 年 10 月 31 日

## 中文摘要

關鍵詞：Th1/Th2 cytokine profile; RT-PCR; ABC stain; PDCM

於我們實驗室所萃取之 PDCM (porcine dermal collagen membrane) 所含的膠原蛋白多屬於第一型膠原蛋白，基於未來的臨床應用之考量，研究本膠原蛋白膜片所引發之細胞性免疫反應是本實驗重點之一。因此我們也希望由 3% GA conditioned PDCM 所引發之 T-cell reaction 之 cytokine profile，進一步了解 3% GA-PDCM 所引起之細胞性免疫反應之進行方向，究屬以 Th1 cells 為導向或以 Th2 cells 為導向，以便進一步勾勒出整個 PDCM 於組織中被分解可能之機轉。因此本研究之目的，即由均質化之組織標本中，以本實驗準備以 20 隻 S.D rats 來進行研究。根據先前 PDCM 所引起之細胞性免疫反應之研究設計，將大白鼠以 Pentobarbital (Nembutal) 依 5mg/100g 體重之劑量，以腹腔注射麻醉。種植區中心點為大白鼠背部自頭部向下 5 公分處，經剃毛以優碘消毒。以 15 號刀片將實驗用再生膜 ePTFE (8×20mm) (extensive teflon, as positive control) 或 PDCM (8×20mm) 放置入種植區，於手術後 7, 10, 14 天將實驗動物 (n=6) 安樂死，並由手術區取出膜片與周圍之結締組織，予以急速冷凍切片，進一步以與 INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 之 specific monoclonal antibody 進行相關分泌細胞之免疫染色定位實驗。我們於本實驗設計一 Immuno Stain Intensity Ranking Test，以 t-test 客觀量化免疫染色之結果。結果顯示於 e-PTFE 組於手術後第七天，其 IL-2 之免疫染色強度與 PDCM 組相似，而 INF- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13 則比 PDCM 組強。於第十天則 e-PTFE 組之 IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 免疫染色強度皆比 PDCM 組強。於第十四天則兩組之 cytokine 免疫染色無顯著差異，唯 IL-10 有顯著差益。顯見 PDCM 於組織中早期所引發之細胞性免疫反應以 Th1 cells 為主要導向，而 e-PTFE 組則以 Th2 cells 為主要導向。由此可知，PDCM 比 e-PTFE 更適用於 guided tissue regeneration technique 之臨床運用。

## 英文摘要

Keywords：Th1/Th2 cytokine profile; RT-PCR; ABC stain; PDCM

In 1992, we use gastric pepsin to remove the major antigenic determinant of a porcine dermal collagen membrane (PDCM) in order to improve the biocompatibility of this material. In one of pervious studies, we found the major cellular immunity induced by 3% glutaraldehyde (GA) conditioned PDCM was predominated by CD4+ T cells. The CD4+/CD8+ ratio was 2:1 when the material was implanted in muscular tissue 7 to 10 days. However, Mosmann and co-workers proposed a major subdivision of CD4+ helper T (Th)-cell clones based on differences in their pattern of cytokine production. The production of selected cytokines by local Th1- or Th2- type immune response to xenogenic graft may play a crucial role in the development of periodontal regeneration. Our proposal is to use cytokine specific RC-PCR to detect the existence of the relevant Th1 cytokine (e.g. INF- $\gamma$ , IL-2) and Th2 cytokine (e.g. IL-4, IL-10, and IL-13) 7-10-14 days after PDCM implantation. The cytokine secreting cells are also localized by using Avidin-Biodin Peroxidase Complex method (ABC method). 3% GA cross-linked PDCM and e-PTFE is intended to implant in

the dorsal skin of 20 S.D. rats. The shame operation is conducted on the one third of rats without grafting. The animals are euthanized 7, 10, and 14 days after the surgery.(n=6). The membranes and its adjacent tissues (2 mm thick) are harvested and homogenized for the detection of dominant cytokine -specific mRNA expression. The same operation and timetable are executed on the other 6 control S.D. rats in order to localized specific cytokine secreting cells with ABC method. Albeit various collagen membranes have been used in clinical experiments for GTR, few literatures indulge in the research of the cytokine profile induced by xenogenic membranes. Our study indicates that IL-2 profile of e-PTFE groups is similar to that of PDCM groups 7 days after implantation. However, the immunohistochemical stains of INF- $\gamma$ , IL-4, IL-10, and IL-13 profiles of e-PTFE showed stronger intensities than those of PDCM groups. On the day 10th, only the immunol stain of INF- $\gamma$  presents non-significant difference ( $P < 0.05$ ). On the day 14<sup>th</sup>, only the IL-10 profiles between two groups showed significant difference ( $P < 0.05$ ) It implies that PDCM may elicit a more trend of Th1 cells reactivity in cellular immunogenesis. On the other hand, e-PTFE may induce more trend of Th2 cells reaction. Therefore in guided tissue regeneration technique, PDCM is more suitable for the application in periodontal regeneration than e-PTFE as concern Seymour's hypothesis.

### 研究計畫之背景及目的：

有關 PDCM 對 guided bone regeneration(GBR)的動物研究中<sup>1</sup>，我們又發現 PDCM 可提供造骨細胞於骨缺損中一個適宜的生理性空間，引導新骨之再生。因此 3% GA cross-linked PDCM 於骨質缺損中也具備 cell separation and space making 的作用。

有關可吸收的膠原蛋白膜片在醫療上之運用日趨廣泛，但其在生物體內所引發的細胞性免疫反應卻少有學者探討，而且過去關於膠原蛋白第一型所引起的細胞性或體液性免疫反應亦非常有限。我們所製作的豬皮膠原蛋白膜片內所含的膠原蛋白多屬於第一型膠原蛋白，基於未來的臨床應用之考量，研究本膠原蛋白膜片所引發之細胞性免疫反應是本實驗重點之一。因此我們曾選取 anti-rat CD4, anti-rat CD8, 及 anti-rat CD11b 等單株抗體，利用 Avidin-Biotin Peroxidase Complex Method(ABC Method)，於不同之時間觀察 3% cross-linked PDCM 於組織中所引發之 cellular immunogenicity, 並進一步闡述 3% GA cross-linked PDCM 所誘發之細胞性免疫反應中 T cells 與 macrophages 可能伴演之角色, 並試圖了解 PDCM 於組織中吸收可能之機轉<sup>2</sup>。結果顯示由本實驗 CD4、CD8 計數的結果，我們可以發現整個炎症反應也以 CD4<sup>+</sup>T 細胞為主，於第七天與第十天時細胞數目達到顛峰，而且 CD4:CD8 比率亦接近 2:1。PDCM 所引起之細胞性免疫反應以 CD4<sup>+</sup>T 細胞主導，而且由活躍之巨噬細胞活動看來,其所引起之免疫反應可能比較類似 type IV cell-mediated immune reaction。

然而由我們先前之活體試驗結果可知：本膠原蛋白膜置入大白鼠體內三週後，可於組織中發現大量巨噬細胞之聚集，而由免疫學之觀點解釋，此巨噬細胞可能是扮演抗原呈現細胞 (Antigen presenting cell, APC) 的角色，這些巨噬細胞可能會釋放出某些細胞激素 (cytokines) 並將外來抗原噬入調節後與本身細胞表面之主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC) 結合，形成 MHC-peptide 結合體，共同呈現給 T 細胞表面的接受器，而由特定之 T 細胞 (如 CD4<sup>+</sup>與 CD8<sup>+</sup>T 細胞) 所辨識，進而引發一連串免疫協調反應。因此於了解 3% GA-PDCM 可能於傷口癒合第 7 天到第 10 天引起比較明顯之 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells phenotype activity 以外，我們也希望由 3% GA conditioned PDCM 所引發之 T-cell reaction 之 cytokine profile, 進一步了解 3% GA-PDCM 所引起之細胞性免疫反應之進行方向，究屬以 Th1 cells 為導向或以 Th2 cells 為導向，以便進一步勾勒出整個 PDCM 於組織中被分解可能之機轉。

目前由於有關guided tissue regeneration 之文獻中並未見到與biodegradable collagen membrane 被組織吸收的詳細免疫機制之探討, 因此希望本研究計劃可提供學術界相關方面的參考.

## 結果

Table1.第 7 天時 ePTFE 與 PDCM A、B、C 區 cytokine 免疫染色呈色強度值 (Mean±SD)

		INF-r	IL-2	IL-4	IL-10	IL-13
<b>A</b>	PDCM	2.75±0.5	2±0	2±0	1.5±0.6	0.25±0.5
	ePTFE	3±0	2±0	3±0	2.75±0.5	1.5±0.6
<b>B</b>	PDCM	3±0	2±0	1±0	0.75±0.5	0±0
	ePTFE	3±0	2±0	3±0	3±0	1.5±0.6
<b>C</b>	PDCM	2.25±0.5	1.25±0.5	0.75±0.5	0.5±0.6	0.25±0.5
	ePTFE	3±0	1±0	3±0	2±0	1.25±0.5
<b>Total</b>	PDCM	2.67±0.5*	1.75±0.5	1.3±0.6*	1.0±0.7*	0.2±0.4*
	ePTFE	3±0	1.7±0.5	3±0	2.6±0.5	1.4±0.5

Immuno Stain Intensity Ranking Test (P>0.05)

0:No stain

1:Slightly stain

2:moderate stain

3:strongly stain

Table2.第 10 天時 ePTFE 與 PDCM A、B、C 區 cytokine 免疫染色呈色強度值(Mean±SD)

		INF-r	IL-2	IL-4	IL-10	IL-13
<b>A</b>	PDCM	1.5±0.6	0.75±0.5	1.5±0.6	1.75±0.5	0.75±0.5
	ePTFE	2.25±0.5	2±0	2.25±0.5	2.75±0.5	1.25±0.5
<b>B</b>	PDCM	1.75±0.5	1.25±0.5	2±0	2±0	1±0
	ePTFE	1.75±0.5	1.75±0.5	2.25±0.5	2.75±0.5	1.75±0.5
<b>C</b>	PDCM	1.5±0.6	1.25±0.5	1±0	1±0	1±0
	ePTFE	1.5±0.6	1.25±0.5	2±0	2±0	1.25±0.5
<b>Total</b>	PDCM	1.6±0.5	1.1±0.5*	1.5±0.5*	1.6±0.5*	1.0±0.3*
	ePTFE	1.8±0.6	1.7±0.5	2.2±0.4	2.5±0.5	1.4±0.5

Immuno Stain Intensity Ranking Test (P<0.05)

0:No stain

1:Slightly stain

2:moderate stain

3:strongly stain

Table3.第 14 天時 ePTFE 與 PDCM A、B、C 區 cytokine 免疫染色呈色強度值(Mean±SD)

		INF-r	IL-2	IL-4	IL-10	IL-13
A	PDCM	1.25±0.5	2±0	2±0	2±0	1±0
	ePTFE	2.5±0.6	1±0	1.5±0.6	2.75±0.5	1±0
B	PDCM	1.5±0.6	1.5±0.6	1.75±0.5	1±0	1±0
	ePTFE	2.75±0.5	1.5±0.6	2.25±0.5	1.75±0.5	1.25±0.5
C	PDCM	2±0	0.75±0.5	1±0	1±0	1±0
	ePTFE	2±0	1±0	2±0	1.75±0.5	1±0
Total	PDCM	1.4±0.5	1.4±0.7	1.6±0.5	1.3±0.5*	1.0±0
	ePTFE	2.4±0.5	1.2±0.4	1.9±0.5	2.1±0.7	1.1±0.3

Immuno Stain Intensity Ranking Test (P<0.05)

0:No stain

1:Slightly stain

2:moderate stain

3:strongly stain

## 討論

目前由Mosmann<sup>3</sup>, Bloom<sup>4</sup>, Seymour<sup>5</sup>等多位學者之研究認為，雖然CD4<sup>+</sup>與CD8<sup>+</sup>T細胞具有不同之細胞表面接受器，但是在特定之情形下，具有不同表面抗原之T細胞亦可釋出相同之細胞激素，調節免疫功能，因此對於T細胞之功能性分類，吾人除可依細胞表面接受器來辨識T細胞之表現型以外，現今又可依CD4<sup>+</sup>與CD8<sup>+</sup>T細胞於組織中所分泌之特定細胞激素(cytokine)，而將T細胞之功能區分為第一型(Th1)及第二型(Th2)T細胞反應。其中第一型CD4<sup>+</sup>T細胞之APC(antigen presenting cells)是由巨噬細胞或B細胞所主司，並於免疫調節中由Th1 cells釋出IL-2、INF-r等細胞激素，進行抑制B細胞或引發延遲型過敏反應(delayed-type hypersensitivity)等免疫調節反應；此一連串之作用於學理上，可能延緩牙周組織的破壞，甚或創造有利於牙周組織復原進而再生的環境。至於Th2 cells則可辨識主要由B細胞所擔任之APC所呈現之MHC-peptide結合體，並釋放IL-4、IL-10等細胞激素；而其最終作用包括協助B細胞、抑制DTH，結果將促使B細胞形成特定之抗體及釋出特定之細胞激素(如：IL-1)，而持續加速牙周組織的破壞。

因此由本實驗之cytokine profile之比較顯示，PDCM於皮下傷口早期之細胞性免疫反應較趨向Th1 cells reaction，而e-PTFE則較引起傾向Th2 cell reaction。綜上所述，並依據Seymour et al.之理論，我們認為PDCM比e-PTFE更適用於牙周導引再生手術，以達到牙周再生之目標。

## Reference:

1. Hsein-Kun Lu, King-Jean Wu. 1996;The effect of porcine dermal collagen membrane on the healing of bony defects in guided bone regeneration technique. Chin Dent J 15(2):106-118, 1996.
2. Chang-Yu Lee, Hsein-Kun Lu. A study of tissue imtegration and cellular immunity associated with PDCM. Mater thesis, 1998, TMC.

3. Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989): Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu Rev Immunol* 7:145-173
4. Bloom BR, Salgame P, Diamond B. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol Today* 1992; 13:131-136.
5. Seymour GJ. Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. *J Dent Res* 1987; 66: 2-9

## 自評

本報告包括免疫化學組織染色之部份，我們設計一獨特之ranking system，突破Jagoe et al. (*Histochem J*, 1991, 23:541-7) 之技術問題，化主觀為客觀，提出對PDCM於GTR technique上之新證據，希望未來能獲取學界各方之指教。有關RT-PCR部份則待續；經討論後，我們可能還必須以Western blot補強，以各種cytokine 之antibody先確認INF與IL之存在。