

# 不同厂家壳聚糖类产品的细胞毒性评价

朱文迪<sup>1</sup> 刘凯<sup>2</sup> 许芳<sup>1</sup> 通讯作者

1. 湖北省药品监督管理局技术审评核查中心 湖北 武汉 430061;

2. 湖北省药品监督检验研究院(湖北省药品质量检测与控制工程技术研究中心) 湖北 武汉 430075

**【摘要】目的:**通过分析不同厂家壳聚糖类产品的细胞毒性,考察该类产品的生物安全性。**方法:**通过MTT(四唑盐)比色法评价不同厂家壳聚糖类产品对小鼠成纤维细胞(L929)的活性及增殖的影响。**结果:**14个厂家的22批样品中仅有3批样品细胞毒性≤2级。**结论:**鉴于不同壳聚糖类产品的临床实际应用,选择合适的浸提浓度检测产品的细胞毒性。

**【关键词】**壳聚糖;细胞毒性

**【中图分类号】**R286.0

**【文献标识码】**B

**【文章编号】**1674-9321(2021)06-0170-02

**【Abstract】**Objective: The cytotoxicity of chitosan products from different manufacturers was analyzed in order to investigate the biological safety of these products. Methods: The effect on the activity and proliferation of mouse fibroblast (L929) was tested by MTT assay. Result: 22 samples from 14 manufacturers were tested. The cytotoxicity level of 3 samples was less than 2rd level. Conclusion: According to the different clinical application of different chitosan products, we should choose suitable extraction concentration in the cytotoxicity test.

**【Key words】**Chitosan; cytotoxicity

体外细胞毒性试验是评价医疗器械生物相容性的一种简便、快速、高敏感性的检测方法。因其试验周期短、结果重复性好、节省费用等优点,被列为医疗器械生物安全性评价中首选试验项目,是评价材料毒性的重要指标<sup>[1]</sup>。其中浸提法是目前应用最广泛的一种细胞毒性筛查法<sup>[2]</sup>。壳聚糖(Chitosan)是甲壳素脱乙酰基衍生物,广泛存在于虾、蟹、昆虫等甲壳中,资源十分丰富,制备工艺简单,与甲壳素一样具有良好的生物相容性,同时还具有较好的抗菌活性,在医药、食品、化妆品等领域广泛应用。甲壳素(chitin)又名甲壳质、几丁质,化学名称为(1,4)-2-乙酰-2-脱氧-β-D-葡萄糖,广泛存在于甲壳动物的甲壳中,是一种天然的聚阳离子多糖,具有良好的生物相容性和生物降解性。在医疗器械行业中,壳聚糖产品多应用于抗菌喷膜、抗菌凝胶、创伤敷料、手术防粘连剂、组织再生支架等领域<sup>[3-5]</sup>。本文对来自于14个不同厂家的22批壳聚糖类产品进行了细胞毒性研究,考察其安全性。

## 1 仪器与材料

### 1.1 细胞系

采用小鼠成纤维细胞(L929)为靶细胞,购自中国典型培养物保藏中心。

### 1.2 主要试剂

RPMI1640培养基:GIBCO公司,批号1279443;新生牛血清:杭州四季青生物工程材料有限公司,批号110302;高密度聚乙烯:广东省茂名乙烯厂,批号090702413;二甲基亚砜(DMSO):Sigma公司,批号RNBB4297。MTT:Sigma公司,批号:MKBP6775V。

### 1.3 样品

本次试验共收集样品22批,涉及14个企业,5种产品(包括敷料、喷剂、粉剂、膜剂、凝胶产品等)。

## 2 方法与结果

### 2.1 实验方法

依据国家标准GB/T14233.2-2005进行<sup>[6]</sup>,实验分4组:样品组:材料浸提液(浸提比例为0.2g/mL或6cm<sup>2</sup>/mL);阴性对照:0.2g/mL高密度聚乙烯浸提液;阳性对照:5% DMSO溶液。将培养至对数生长期的L929细胞消化,制备成1×10<sup>4</sup>/mL浓度

的细胞悬液接种于96孔培养板,每孔接种100μL细胞悬液。置37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。弃去孔内原培养液。空白对照组加入新鲜培养液,阴性对照组、阳性对照组及样品组分别加入高密度聚乙烯浸提液、5% DMSO溶液及样品稀释液,每孔100μL,置二氧化碳培养箱37℃继续培养72h后,置显微镜下观察细胞形态。每孔加入20μL质量浓度为5g/L的MTT溶液,继续培养4h后弃去孔内液体,加入150μL DMSO,置振荡器上振荡10min,在酶标仪570nm和630nm波长下测定吸光度,按下式计算相对增殖率(relative growth rate, RGR): RGR=(试验组吸光度值/空白对照组吸光度值)×100%,并判定细胞毒性分级。

表1 细胞毒性反应分级

RGR(%)	0	1	2	3	4
反应分级	≥100	80~99	50~79	30~49	0~29

### 2.2 结果

22批样品中仅有3号样品细胞毒性为1级,5号样品和6号样品细胞毒性为2级,22号样品细胞毒性为3级,其他18批样品细胞毒性均为4级。具体结果见表2。

## 3 讨论

本次研究考察的22批壳聚糖类产品,主要包括壳聚糖类敷料、凝胶、粉剂、喷剂等。细胞毒性结果显示仅有来源于两个不同厂家的3批产品毒性≤2级,其中厂家C生产的壳聚糖生物抑菌敷料细胞毒性为1级,厂家D生产的壳聚糖水化纤维生物膜和壳聚糖医用生物创面修复膜的细胞毒性为2级,其余样品的细胞毒性均低于2级。研究表明,壳聚糖分子量、浓度、脱乙酰度、pH值、纯度等因素均可影响壳聚糖的抑菌性能和生物安全性,由于壳聚糖具有不溶于水和有机溶剂,只溶于稀酸溶液,国内市面上多数壳聚糖类产品是由壳聚糖溶于稀酸溶液制成的,其pH值为6时,抗菌效果最好,当其pH值为7时,壳聚糖不再具有杀菌效果<sup>[7]</sup>,而正常细胞培养液的pH值范围为7.2~7.4。因此,壳聚糖类产品要满足其临床使用中的杀菌效果,就可能产生一定的细胞毒性,建议在进行该类产品的细胞毒性评价时,可参考临床实际应用,选择合适的浓度进行细胞毒性测试。

表2 不同壳聚糖类产品细胞毒性结果

序号	供试品名称	规格	批号	毒性级别	厂家
1	壳聚糖生物抑菌敷料	50mL/瓶	20120601	4级	A
2	壳聚糖妇科抗菌凝胶	6g/支	20120615	4级	B
3	壳聚糖生物抑菌敷料	30mL/瓶	/	1级	C
4	壳聚糖妇科凝胶	3g	131201	4级	C
5	壳聚糖生物抑菌敷料(凝胶)	10g	20120906	4级	D
6	壳聚糖水化纤维生物膜	S型 4cm*4cm	14031301	2级	D
7	壳聚糖医用生物创面修复膜	9cm*10cm	121030	2级	D
8	壳聚糖妇科即用凝胶	4g/支	20121128	4级	E
9	壳聚糖愈伤灵敷贴	5cm*5cm	20130105	4级	F
10	壳聚糖抗菌修复喷膜	20mL	20130103	4级	F
11	壳聚糖生物抗菌凝胶	20g	20130104	4级	F
12	壳聚糖宫颈抗菌凝胶	4g/支	20130528	4级	G
13	壳聚糖愈创敷料	B型	20130601	4级	H
14	壳聚糖生物止血粉	4g	201306401	4级	I
15	壳聚糖水胶体生物膜	7cm*11cm	201306101	4级	I
16	壳聚糖长效抗菌膜液	20 mL	20140106	4级	J
17	壳聚糖护创贴	10cm*25cm	20140401	4级	K
18	壳聚糖妇科抗菌凝胶	20g	20140401	4级	K
19	壳聚糖创伤敷料	40*80mm	20140302	4级	L
20	壳聚糖抗菌凝胶敷料	3g/支	20131101	4级	M
21	水溶型壳聚糖创面敷料	10cm*10cm	20140719	4级	N
22	壳聚糖创面敷料	10cm*10cm	20140719	3级	N

## 参考文献

- [1] 贾文英, 史弘道. 细胞毒性试验评价医用装置生物相容性的研究概况 [J]. 实用没人整形外科杂志, 2001, 12(5): 253-255.
- [2] GB/T 16886.1-2011, 医疗器械生物学评价第1部分: 风险管理过程中的评价与试验 [S].
- [3] 伍晓娟, 张长青, 顾其胜. 壳聚糖的性能、产品及应用 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 10(24-10): 1265-1270.
- [4] Khan T, Peh K, Ch'ng H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing[J]. J Pharm Sci. 2000;3:303-311.
- [5] 崔蕙素, 石巍. 壳聚糖生物性能及用于细菌性阴道病的探索与研究 [J]. 中国医疗器械杂志, 2012, 36(2): 96-98.
- [6] GB/T14233.2-2005 医疗器械生物学评价 第5部分: 体外细胞毒性试验 [S].
- [7] 冯小强, 李小芳, 杨声, 王廷璞. 壳聚糖抑菌性能影响因素、机理及其应用研究进展 [J]. 中国酿造. 2009, 1(202): 19-23.
- [8] 邵荣, 许琦, 余晓红, 刘珊珊. 壳聚糖抗菌性能的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28:121-124.

## (上接 159 页)

## 3.2 愤怒期

在否认期间, 患者知道自己的生命处于危险之中, 表现为悲伤、绝望、易怒和拒绝治疗。如果某些患者对周围的人产生怀疑甚至敌视, 他们就可以抵抗这种疾病。这是患者失去自怜的心理表现。护士应原谅和宽容患者, 并避免产生疑问。真诚地对待患者, 安慰并鼓励他们, 以便他们继续顽强地抗击疾病, 并与医护人员合作, 帮助他们尽快度过愤怒期。

## 3.3 折中期

病人从愤怒期过渡到了这个阶段, 精神状态显得平静、友善和沉默。此时, 患者可以获得舒适、周到的治疗和护理, 希望尽可能延长寿命。护士应尽最大努力为患者提供舒适的护理, 减轻患者的疼痛和症状, 使患者感到舒适。

## 3.4 抑郁期

病人已经知道自己处于危急关头, 表现出极大的悲伤。大多

数患者此时不愿讲话, 希望看到更多的亲戚和朋友, 并得到更多的同情和关怀。护士应同情和理解患者, 尽最大努力满足患者的需求, 让亲戚陪伴, 并有亲戚朋友来探望, 使患者可以与亲人共度难得的时光。护士要告诉亲戚控制自己的情绪, 不要增加患者的悲伤感。

## 3.5 接受期

这是重症患者的最后阶段。病人非常镇静, 可能随时死亡。但是有些患者非常认真, 有意识并表现出对生命的怀旧之情。护士应帮助患者冷静下来, 庄重地离开世界。病人的听力是人体内失去知觉的最后器官, 因此不应该讨论不利于患者情绪的事情, 也不要低声说话。有些病人在亲戚来之前就去世了, 因此护士应替换亲戚接收和保存遗体或记录遗言。在临床护理工作中, 应当对危重病人采取及时准确的抢救措施, 抓住黄金时间进行抢救, 一些患者可能会康复。同时, 通过医护人员的悉心治疗和护理, 可以改善患者的生活质量, 并可以延长患者的生命。

## (上接 162 页)

- 后疼痛护理中的运用 [J]. 中国伤残医学, 2020, 28(3): 73-74.
- [2] 杜春. 综合护理干预在四肢创伤骨折术后疼痛护理中的应用效果观察 [J]. 中国医药指南, 2020, 18(10): 223-224.
- [3] 陈秀编, 潘文霞, 谭文仪, 等. 综合护理干预在四肢创伤骨折术后疼痛护理中的应用效果 [J]. 中国伤残医学, 2020, 28(19): 82-83.
- [4] 杨婧. 综合护理干预在四肢创伤骨折术后疼痛护理中的应用观察 [J]. 糖尿病天地, 2020, 17(9):210.
- [5] 高睿. 综合护理干预在四肢创伤骨折术后疼痛护理中的应用效果 [J]. 中国伤残医学, 2019, 27(5): 58-60.