

羧甲基壳聚糖温敏凝胶的制备及其毒性实验***

彭伟, 穆玉

Preparation and cytotoxicity of carboxymethyl chitosan thermosensitive hydrogel

Peng Wei, Mu Yu

Abstract

BACKGROUND: Compared with chitosan, carboxymethyl chitosan is safe, nontoxic, antigenic-free, and has higher water-solubility, membrane-forming, moisture-retention capacity and good biocompatibility, it is a good drug carrier.

OBJECTIVE: To produce carboxymethyl chitosan thermosensitive hydrogel, and to evaluate its cytotoxicity on mouse lung fibroblasts (L929).

METHODS: The carboxymethyl chitosan mixed with glycerophosphate salt to produce the carboxymethyl chitosan thermosensitive hydrogel. MTT colorimetric assay was used to determine the cytotoxicity of L929 cells at different concentrations (50, 10, 2, 0.4, 0.08) of carboxymethyl chitosan thermosensitive hydrogel, positive and negative control groups were also set. Absorbance values were detected at 24, 48, 72, 96 hours after adding the sample, the relative growth rates were counted and cytotoxicity grade was assessed.

RESULTS AND CONCLUSION: The relative growth rates were ranged from 103% to 228% at different time points and cytotoxicity grade of different concentrations of the carboxymethyl chitosan thermosensitive hydrogel was 0. The carboxymethyl chitosan thermosensitive hydrogel shows no cytotoxicity on L929 and has good biocompatibility, it is potential in treatment of periodontal diseases.

Peng W, Mu Y. Preparation and cytotoxicity of carboxymethyl chitosan thermosensitive hydrogel. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(51):9591-9594. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 与壳聚糖相比, 羧甲基壳聚糖的水溶性提高, 且安全、无毒、无害, 具有成膜性、保湿性、生物相容性好的特点, 是一种良好的药物载体。

目的: 自制羧甲基壳聚糖温敏凝胶, 了解其对小鼠肺成纤维细胞 L929 的毒性作用。

方法: 利用羧甲基壳聚糖与甘油磷酸盐互配, 制备羧甲基壳聚糖温敏凝胶。采用四甲基偶氮唑盐法测定 50, 10, 2, 0.4, 0.08 倍的羧甲基壳聚糖温敏凝胶浸提液对体外培养 L929 细胞的细胞毒性, 并设定阳性与阴性对照组。测定加样后 24, 48, 72, 96 h 的 A 值, 计算细胞相对增殖率, 评定细胞毒性等级。

结果与结论: 各组细胞不同时间点相对增殖率均在 103%~228% 之间, 各浓度羧甲基壳聚糖温敏凝胶材料浸提液的细胞毒性均为 0 级。提示羧甲基壳聚糖温敏凝胶对 L929 细胞无毒性作用, 且有良好的生物相容性, 在牙周病治疗中具有潜在的应用价值。

关键词: 羧甲基壳聚糖; L929 细胞; 牙周病; 温敏凝胶; 细胞毒性; 生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.51.020

彭伟, 穆玉. 羧甲基壳聚糖温敏凝胶的制备及其毒性实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(51):9591-9594. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

羧甲基壳聚糖是壳聚糖经羧甲基化而得的一种水溶性多糖。与壳聚糖相比, 羧甲基壳聚糖的水溶性提高, 且安全、无毒、无害, 具有成膜性、保湿性、生物相容性好的特点, 是一种良好的药物载体^[1-4]。

温敏水凝胶是一种智能高分子材料, 其可以感应环境温度的变化, 改变自身膨胀-收缩状态来控制药物的释放, 并且其发生凝胶化转变后, 可形成可注射型温敏性的水凝胶, 是当前研究热点。

有关温敏材料的研究很多, 但符合医用材料条件的较少。

本实验利用羧甲基壳聚糖与甘油磷酸盐互配, 制备羧甲基壳聚糖温敏凝胶。采用体外细胞培养技术和 MTT 法检测自制羧甲基壳聚糖温敏凝胶对 L929 细胞的毒性作用, 以期为牙周病临床应用提供基础实验依据。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对照观察。

时间及地点: 于 2009-01/2010-04 在华北煤炭医学院中心实验室完成。

材料:

药品与细胞株: 羧甲基壳聚糖(青岛海普生物有限公司; 脱乙酰度 90%, 取代度 50%); L929 细胞株(天津赛尔生物技术有限公司)。

Department of Stomatology, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Peng Wei★, Master, Associate professor, Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Stomatology, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China pengwei1968@sina.com

Supported by: Tackling Key Program of Science and Technology in Hebei Province, No. 07275524*; Chinese Integrative Medicine Science and Technology Projects by Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine in 2009, No. 2009056*

Received: 2010-06-30
Accepted: 2010-07-28

华北煤炭医学院口腔系, 河北省唐山市 063000

彭伟★, 女, 1968 年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2005 年华北煤炭医学院毕业, 硕士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事牙周组织工程研究。pengwei1968@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)51-09591-04

收稿日期: 2010-06-30
修回日期: 2010-07-28
(20100630007/GW·Y)

主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
β -甘油磷酸钠	美国 Sigma
DMEM 细胞培养基, 胎牛血清和胰蛋白酶	天津血液研究所
四甲基偶氮唑盐	美国 Sigma
二甲基亚砜	美国 Sigma
标准型细胞培养板	美国 Corning
二氧化碳细胞培养箱	上海仕博生物技术有限公司北京分公司
型号: BBGP 系列	
倒置相差显微镜 CK 型	日本 Olympus
高速低温离心机	德国 Sigma
型号:1-15K	
超净工作台	苏州工业园区三兴净化科技有限公司
型号: YJ900	
酶标仪 型号: 550	Bio-Rad

实验方法:

制备羧甲基壳聚糖温敏凝胶: 将羧甲基壳聚糖 γ 射线消毒后称取4 g加入14 mL 0.1 mol/m³的盐酸溶液中, (23±1) °C溶解2 h后, 称取0.3 g甘油磷酸盐溶解于3 mL纯水中, 在连续搅拌下, 缓慢滴加入羧甲基壳聚糖滤液中, 得到清澈透明的配合物溶液, 再继续搅拌20 min 混合均匀, 备用。将装有温敏性羧甲基壳聚糖/甘油磷酸盐配合物溶液的试管置于30~70 °C水浴中, 达到初始凝胶化温度后, 恒温一定时间, 得到水凝胶。见图1。



Figure 1 Carboxymethyl chitosan thermosensitive hydrogel
图1 羧甲基壳聚糖温敏凝胶

羧甲基壳聚糖温敏凝胶浸提液制备和实验分组: 将羧甲基壳聚糖温敏凝胶按0.002 g/mL的标准, 在37 °C条件下, 按照标准将羧甲基壳聚糖凝胶放入浸提介质中, 浸提介质为含体积分数15%胎牛血清DMEM培养基, 24 h保存备用。

实验分组: 实验组, 分别制备50, 10, 2, 0.4, 0.08倍的浸提液; 阳性对照组, 用纯铅材料, 同样以0.002 g/mL的标准配置; 阴性对照组, 含体积分数15%胎牛血清DMEM培养基。

小鼠肺成纤维细胞(L929)传代及羧甲基壳聚糖温敏凝胶的毒性实验: 将L929经复苏后, 每2 d换液1次, 待细胞达到汇合点时, 用0.25%的胰酶消化, 按1:4传代。于对数生长期经胰蛋白酶消化制成 5×10^8 L⁻¹的细胞悬液,

接种于96孔培养板, 每孔200 μ L, 各浓度组、阴性对照组及阳性对照组分别为6孔, 其余各孔放入PBS, 24 h后, 镜下观察大多数细胞贴壁并伸展, 弃去孔内液体及不贴壁的细胞。加入浸提液0.1 mL/孔, 使孔内最终浓度分别达到50, 10, 2, 0.4, 0.08倍标准浓度, 将96孔板置37 °C、体积分数5% CO₂条件下培养, 分别于24, 48, 72, 96 h取出一块培养板, 于每孔中加入5 g/L的MTT 20 mL 继续培养4 h, 吸去孔内培养液, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡10 min, 用酶标仪于490 nm波长下测吸光度(A)值: 并计算细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)。

$$RGR = \text{实验组}A\text{值} / \text{阴性对照组}A\text{值} \times 100\%$$

根据RGR值, 参照文献[5]的评分标准评定材料毒性程度级别。

评分标准:

分级	相对增殖率(%)
0 级	≥ 100
1 级	75~99
2 级	50~74
3 级	25~49
4 级	1~24
5 级	0

主要观察指标: 不同时间点各组细胞的形态变化。不同时间点各组细胞相对增殖率及材料毒性分析。

设计、实施、评估者: 设计及评估由第一作者完成, 实施由第二作者完成。

统计学分析: 采用SPSS 16.0统计软件包对实验结果进行统计学处理, 组间比较采用方差分析和q检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 统计学处理由第二作者完成。

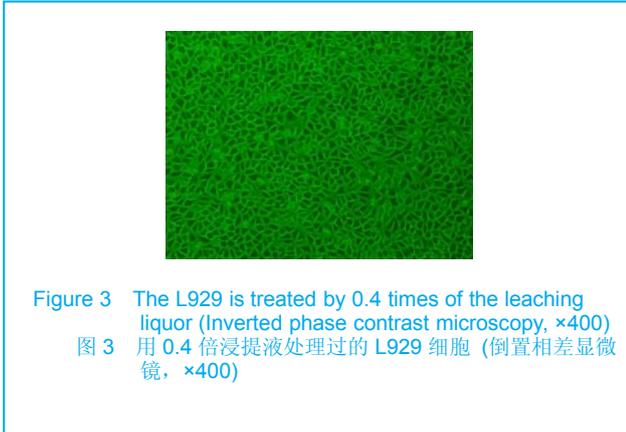
2 结果与讨论

2.1 细胞的培养和形态学观察 小鼠肺成纤维细胞复苏后, 倒置相差显微镜下观察, 细胞呈梭形或扁的星状, 具有突起, 细胞间界限清楚, 见图2。



Figure 2 The primary culture mouse lung fibroblasts (Inverted phase contrast microscopy, $\times 400$)
图2 原代小鼠肺成纤维细胞 (倒置相差显微镜, $\times 400$)

浸提液处理后细胞形态观察(倒置显微镜下): 细胞接种24 h后, 各孔细胞均已贴壁, 细胞充分伸展, 形态正常, 胞体呈梭形或不规则三角形, 大体观察各组细胞密度均匀。见图3。



2.2 MTT实验结果 不同时间点的MTT检测数据见表1。

表1 各组不同时间点 MTT 检测吸光度值
Table 1 The absorbance value assayed by MTT at different time points (x±s, n=6, A)

Group	Culture time	
	24 h	48 h
Negative control group	0.175±0.005	0.190±0.004
Positive control group	0.176±0.004	0.188±0.004
50 times the leaching liquor	0.200±0.022	0.216±0.018
10 times the leaching liquor	0.194±0.036	0.245±0.005
2 times the leaching liquor	0.204±0.020	0.248±0.009
0.4 times the leaching liquor	0.242±0.031	0.435±0.023
0.08 times the leaching liquor	0.250±0.022	0.327±0.011

Group	Culture time	
	72 h	96 h
Negative control group	0.230±0.012	0.270±0.010
Positive control group	0.165±0.007	0.162±0.004
50 times the leaching liquor	0.236±0.005	0.312±0.007
10 times the leaching liquor	0.269±0.003	0.416±0.012
2 times the leaching liquor	0.288±0.004	0.350±0.012
0.4 times the leaching liquor	0.509±0.012	0.615±0.033
0.08 times the leaching liquor	0.478±0.016	0.491±0.017

2.3 细胞相对增殖度及毒性检测结果 见表2。

表2 细胞相对增殖度及毒性评级
Table 2 The relative growth rate (RGR) and cell toxicity grade

Group	24 h		48 h	
	RGR (%)	Grade	RGR (%)	Grade
50 times the leaching liquor	114	0	113	0
10 times the leaching liquor	111	0	128	0
2 times the leaching liquor	117	0	129	0
0.4 times the leaching liquor	138	0	227	0
0.08 times the leaching liquor	143	0	176	0
Positive control group	101	0	98	1

续表

Group	72 h		96 h	
	RGR (%)	Grade	RGR (%)	Grade
50 times the leaching liquor	103	0	116	0
10 times the leaching liquor	118	0	154	0
2 times the leaching liquor	125	0	130	0
0.4 times the leaching liquor	227	0	228	0
0.08 times the leaching liquor	208	0	182	0
Positive control group	72	2	60	2

由表2可以看出, 在24, 48, 72, 96 h各个不同的时间点检测, 无论是高浓度的浸提液还是低浓度的浸提液, 羧甲基壳聚糖温敏凝胶材料细胞毒性均为0级, 完全符合生物材料的安全评价标准。

3 讨论

温敏性凝胶具有优良的理化性质和生物学性质, 可控制药物释放, 并具有生物黏附、生物相容和可生物降解等特性, 目前已用于缓释、脉冲释放、触发式释放等新型给药系统的研制^[6-8]。但是针对羧甲基壳聚糖水凝胶的制备及进行系统的生物学评价, 国内外鲜有报道。所以, 作者在成功制备出温敏性羧甲基壳聚糖水凝胶后, 重点对其做了L929细胞的细胞毒性实验, 以评价本实验制备的羧甲基壳聚糖水凝胶的毒性作用。

在凝胶的制备过程中, 影响因素很多, 为了减少实验次数, 同时又不影响相关因素适宜水平的筛选, 作者首先做了单因素对凝胶制备的影响实验, 制备凝胶过程中各个组成成分的量参考吴燕等^[9]的基础配方。

由单因素性能测试的实验结果得出影响初始凝胶化温度的因素主要有羧甲基壳聚糖的取代度、浓度, 盐酸的浓度及甘油磷酸钠的浓度。在此基础上选用四因素三水平按照L₉(3⁴)表进行正交化实验设计, 以初始凝胶温度作为评价的主要标准, 将装有配合物溶液的试管置于恒温水浴中, 测试温度范围为25~70 °C, 记录不同温度溶液的状态, 每隔30 min升温一次, 每次升温1°C, 观察是否发生凝胶现象。根据正交实验设计评分结果, 当羧甲基壳聚糖取代浓度为0.3、羧甲基壳聚糖浓度为5.0%、盐酸浓度为0.1 mol/m³、甘油磷酸钠浓度6.3%。优化后的制备工艺稳定, 重现性良好, 而且初始凝胶温度最为接近人的口腔温度。

Pioletti等^[10]认为, 体外材料与细胞共培养时, 一旦材料有毒物质释放, 细胞的增殖和形态就会发生改变, 同时可直接观察到细胞在材料表面的黏附情况及界面反应, 从而为材料的细胞相容性提供最直观的证据。本实验从设计上采用体外细胞培养技术和MTT法研究羧甲基壳聚糖温敏凝胶对L929细胞的毒性作用, 采用5种不同浓度浸提液测试, 浓度由高到低, 这样可以比较全面地评价其毒性。从实验结果上看: 各实验组对细胞的增

殖都有一定促进作用, 其中0.4倍浸提液组促增殖作用最为明显。从毒级结果来看随培养时间的延长, 各实验组和阴性对照组的A值逐渐增加, 反映了这些组的L929细胞生长情况较好, 并且各实验组细胞相对增殖度均在100%以上, 毒级为0级, 说明羧甲基温敏凝胶对L929细胞无毒性; 各实验组随着浓度的增大, 有A值降低的趋势, 可说明凝胶浓度越大, 对细胞增殖的促进作用越不活跃。本实验充分证明了羧甲基温敏凝胶具有良好的生物相容性, 预示着其在体内应用的良好前景。

牙周病是危害人类健康的两大口腔疾病之一, 它破坏牙齿的支持结构, 导致牙齿松动和脱落, 是成人失牙的主要原因。基础治疗协同抗菌素应用能有效抑制和杀灭牙周病原菌, 实现牙周组织的生理性再生是牙周治疗的最终目的。牙周袋局部用药是治疗牙周炎的重要方法。唐涛等^[11]利用奥硝唑羧甲基壳聚糖溶胶牙周袋内植入, 进行25 d临床疗效观察并与单纯龈下刮治相比, 可降低出血指数、减少根面下菌斑螺旋体数量和胰蛋白酶样酶水平。马志伟、吴广升等^[12-15]证明壳聚糖温敏凝胶可有效促进牙周组织再生同时能够作为药物的缓释载体, 是一项有潜力的牙周组织再生手段。羧甲基壳聚糖温敏凝胶能否用做牙周组织工程的支架材料以及牙周药物的缓释载体是下一步研究的重点。

4 参考文献

[1] Jiang TD.Beijing: Huaxue Gongye Chubanshe.2003: 301. 蒋挺大.甲壳素[M].北京:化学工业出版社,2003:301.

[2] Pan SR,Chen HF,Mo JC,et al.Zhongguo Shengwu Yixue Gongcheng Xuebao.2006; 25(3): 277-282. 潘仕荣, 陈浩凡, 莫家聪, 等. 羧甲基壳聚糖用作防止术后粘连的研究[J].中国生物医学工程学报,2006,25(3): 277-282.

[3] Wu YG,Weu SH,Zheng ZK,et al. Zhongguo Shengwu Yixue Gongcheng Xuebao.2006; 25(5):613. 吴奕光, 韦少慧,郑宗坤, 等.低取代6-0-羧甲基壳聚糖结构及其抗菌和促进皮肤创面愈合的研究[J].中国生物医学工程学报,2006,25(5):613.

[4] Zhang YJ,Gao JH,Xue Y,et al.Zhongguo Yiyao Zhinan.2008;6(3): 14-16. 张永军, 高继红, 薛毅, 等.羧甲基壳聚糖在阻生齿拔牙创中的应用研究[J].中国医药指南,2008,6(3):14-16.

[5] Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, et al. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines.J Endod. 2000;26(12):703.

[6] Guo JP,Wang HZ,Fu XD.Linchuang Kouqiang Yixue Zazhi.2009; 25(4): 212-214. 郭家平,王虎中,符旭东.rhBMP-2微球温敏型凝胶剂的药剂学特征及对人PDLs增殖的影响[J]. 临床口腔医学杂志,2009,25(4):212-214.

[7] Fu XD,Liu H,Tang R,et al.Zhongguo Yaxue Zazhi.2009;44(13): 1005-1008. 符旭东,刘宏,汤韧,等.骨形成蛋白微球温敏性凝胶复合系统的制备

及释药特性研究[J].中国药杂志,2009,44(13):1005-1008.

[8] Dong XY,Fu ML,Lu CX,et al.Tianjin Daxue Xuebao.2006;39(10): 1193-1198. 董晓燕, 付敏玲, 陆晨星, 等.利用温敏性凝胶的缓释作用促进变性溶菌酶复性[J].天津大学学报,2006,39(10):1193-1198.

[9] Wu Y,Cheng GX,Qu B,et al.Gaofenzi Cailiao Kexue yu Gongcheng. 2006;22(30): 223-226. 吴燕,成国祥,曲波,等.透明温敏性羧甲基壳聚糖配合物凝胶的制备[J].高分子材料科学与工程,2006,22(30):223-226.

[10] Pioletti DP, Takei H, Lin T, et al. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function. Biomaterials.2000;21(10): 1103-1114.

[11] Tang T,Xue Y,Xin YH,et al.Shiyong Kouqiang Yixue Zazhi.2007; 23(3): 451. 唐涛,薛毅,信玉华,等.羧甲基壳聚糖复合奥硝唑后对口腔重要厌氧菌增殖抑制作用的评价[J].实用口腔医学杂志,2007, 23(3):451.

[12] Ma ZW,Zhang YJ,Wu ZF,et al.Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi.2008; 21(1): 23-26. 马志伟,张勇杰,吴织芬,等.缓释骨形态发生蛋白-2的壳聚糖温敏凝胶促进牙周组织再生的实验研究[J].华西口腔医学杂志,2008, 21(1): 23-26.

[13] Ma ZW,Wang R, Wu ZF,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2007; 18(2): 3547-3550. 马志伟, 王荣, 吴织芬, 等.壳聚糖温敏凝胶共混环糊精缓释氯己定的体外实验[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007, 18(2): 3547-3550.

[14] Wu GS,Zhang YW,Wang XW,et al.Shanghai Kouqiang Yixue.2009; 18(2): 178-182. 吴广升, 张艺文, 王新文, 等.壳聚糖温敏凝胶负载釉基质蛋白对骨髓基质细胞的作用[J].上海口腔医学, 2009, 18(2): 178-182.

[15] Ma ZW,Wang R, Wu ZF,et al.Shengwu Gongcheng Xuebao.2007; 23(6):1049-1054. 马志伟, 王荣, 吴织芬, 等.同时缓释骨形态发生蛋白和氯己定的功能性壳聚糖温敏凝胶的制备[J].生物工程学报,2007,23(6): 1049-1054.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 河北省科技攻关项目 (07275524), 甲壳素及其衍生物诱导人牙周膜细胞骨化分化的影响; 河北省中医药管理局 2009 年度中西医结合科研计划项目 (2009056), 大黄壳聚糖温敏凝胶治疗牙周病的实验研究。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 当前有关温敏材料的研究很多, 但符合医用材料条件的较少。针对此通过此次实验成功制备出在室温下为液体、在体温环境下发生凝胶化具有温敏特性的水凝胶, 并且针对该材料进行了系统的生物学评价, 结果表明制备的羧甲基壳聚糖温敏凝胶具有良好的生物相容性。

课题评估的“金标准”: 1982 年美国质量标准协会将 L929 细胞推荐为细胞毒性实验中的标准细胞, 目前国内外实验室一般使用 MTT 法和细胞病变效应观察法等对药物的细胞毒性进行分析。

设计或课题的偏倚与不足: 实验未涉及分子生物学方面的内容, 可以进一步探讨其分子水平的机制。由于经费成本问题, 实验的扩展面不是很全面, 应增加温敏性羧甲基壳聚糖凝胶对牙龈成纤维细胞和牙周膜细胞生物学作用的研究。

提供临床借鉴的价值: 实验证实羧甲基壳聚糖温敏凝胶对 L929 细胞无毒性作用, 而且对细胞的增殖有一定促进作用, 提示羧甲基壳聚糖温敏凝胶在牙周组织工程的支架材料以及牙周药物的缓释载体等方面有着广泛前景。