

海藻酸钙止血敷料与临床常用3种止血敷料体外细胞毒性的比较

初晓夏¹, 王斌², 王海涛¹, 陈豪¹, 崔飞艳¹(¹青岛大学, 山东省青岛市 266000; ²青岛大学医学院病原生物学办公室, 山东省青岛市 266000)

文章亮点:

体外毒性实验采用浸提液法和直接接触法, 两种方法相结合比以往单独通过浸出法或直接接触法判断细胞毒性更准确, 避免单独采用任何一种实验方法造成的实验误差。在浸提液法中, 在实验开始前, 先进行细胞生长曲线的绘制, 筛选出适宜本实验环境和实验目的的细胞浓度。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 海藻酸钙; 明胶止血海绵; 纳吸棉; 纱布; 细胞毒性; 生物相容性; CCK-8; L929 细胞

主题词:

生物敷料; 明胶海绵; 吸收性; 外科纱布; 组织工程

摘要

背景: 止血敷料是作用于创伤表面与人体组织直接接触, 其生物相容性是评价敷料优劣的重要指标之一, 以海藻酸钙为原料的制备的止血敷料有着廉价、相容性好等优点已成为研究的热点。

目的: 观察海藻酸钙止血敷料的细胞毒性, 并与明胶止血海绵、纳吸棉、普通纱布等材料作对比。

方法: ①浸提液法: 以 DMEM 高糖培养液作为浸提介质, 分别制备海藻酸钙止血敷料、明胶止血海绵、纳吸棉、普通纱布浸提液, 并设置 100%, 75%, 50%, 25%, 10% 5 个浓度梯度; 采用上述材料浸提液培养 L-929 小鼠成纤维细胞 24 h, 以含体积分数 10%DMEM 高糖培养液为空白对照, 以含 5% 二甲亚砜 DMEM 高糖培养液为阳性对照组, 观察细胞增殖及形态变化。②直接接触法: 将 L-929 小鼠成纤维细胞分别接种于海藻酸钙止血敷料、明胶止血海绵、纳吸棉、普通纱布上培养 24 h, 观察细胞形态变化。

结果与结论: ①浸提液法: 不同浓度梯度海藻纤维止血敷料、纱布、纳吸棉浸提液的细胞毒性均为 1 级, 符合 GB/T16886/ISO10993 医疗器械生物学评价标准; 100%, 75%明胶止血海绵浸提液的细胞毒性为 3 级, 严重抑制细胞增殖。②直接接触法: 纱布与海藻纤维止血敷料的细胞毒性 1 级, 纳吸棉为 2 级, 明胶止血海绵的细胞毒性为 3 级。表明海藻酸钙止血敷料无细胞毒性。

初晓夏, 王斌, 王海涛, 陈豪, 崔飞艳. 海藻酸钙止血敷料与临床常用 3 种止血敷料体外细胞毒性的比较[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(43):6998-7003.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.43.021

Comparison of *in vitro* cytotoxicity between calcium alginate hemostatic dressing and three kinds of commonly used clinical hemostatic dressings

Chu Xiao-xia¹, Wang Bin², Wang Hai-tao¹, Chen Hao¹, Cui Fei-yan¹ (¹Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China; ²Pathogen Biology Office, Qingdao University Medical College, Qingdao 266000, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Hemostatic dressing can directly contact with the body tissues on the wound surface. The biocompatibility is one of the important indicators of evaluating the advantages and disadvantages of dressing. The hemostatic dressing prepared with calcium alginate as raw material has become a research focus owing to its low cost and good compatibility.

OBJECTIVE: To observe the cytotoxicity of calcium alginate hemostatic dressings and to compare the cytotoxicity between calcium alginate hemostatic dressing and gelatin hemostatic sponge, absorbing cotton, ordinary gauze.

METHODS: Leaching solution method: the DMEM high glucose culture solution was taken as the leaching medium. The calcium alginate hemostatic dressing, gelatin hemostatic sponge, absorbing cotton and ordinary gauze leaching solution were respectively prepared. Five concentration gradients of 100%, 75%, 50%, 25%, 50% were set. The fibroblast cells of L-929 mouse were cultured for 24 hours with the above material leaching solution. The volume fraction of 10% DMEM high glucose culture medium was taken as control group, and DMEM high glucose culture medium containing 5% DMSO was taken as positive control group to observe the cell proliferation and morphological changes. Direct contact method: The fibroblast cells of L-929 mouse were respectively seeded in calcium alginate hemostatic dressing, gelatin hemostatic sponge, absorbing cotton and ordinary gauze and cultured for 24 hours. The changes in cell morphology were observed.

初晓夏, 女, 1989 年生, 山东省莱阳市人, 汉族, 青岛大学医学院在读硕士, 主要从事特种医学止血材料以及感染与免疫方面的研究。

通讯作者: 王斌, 博士, 泰山学者, 副院长, 教授, 博士生导师, 青岛大学医学院病原生物学办公室, 山东省青岛市 266000

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)43-06998-06

稿件接受: 2015-07-24

http://www.crter.org

Chu Xiao-xia, Studying for master's degree, Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Bin, M.D., Professor, Doctoral supervisor, Pathogen Biology Office, Qingdao University Medical College, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Accepted: 2015-07-24

RESULTS AND CONCLUSION: Leaching solution method: The cytotoxicity of alginate fiber hemostatic dressing, gauze, absorbing cotton leaching solution with different concentration gradients was grade 1, which was in line with GB/T16886/ISO10993 biological evaluation standard of medical apparatus and instruments. The cytotoxicity of 100%, 75% gelatin hemostatic sponge extract solution was grade 3, causing severe inhibition of cell proliferation. Direct contact method: The cytotoxicity of gauze and alginate fiber hemostatic dressing was grade 1, absorbing cotton was grade 2, gelatin hemostatic sponge was grade 3. These results demonstrate that calcium alginate hemostatic dressing has no cytotoxicity.

Subject headings: Biological Dressings; Gelatin Sponge, Absorbable; Surgical Sponges; Tissue Engineering

Chu XX, Wang B, Wang HT, Chen H, Cui FY. Comparison of in vitro cytotoxicity between calcium alginate hemostatic dressing and three kinds of commonly used clinical hemostatic dressings. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(43):6998-7003.

0 引言 Introduction

海洋生物资源海藻因具有储量丰富、可再生、无二次污染等特点, 已成为研究者开发海洋资源的研究重点^[1-6]。海藻酸盐是从海带、马尾藻等褐海藻中分离得到的一种天然多聚糖, 属于阴离子型共聚物, 具有良好的生物相容性与低毒性, 并且有很强的成凝胶能力^[2]。以海藻酸盐为原料开发的海藻酸钙敷料, 以其优越的保湿性、整体易去除性、生物相容性等特性在各类伤口护理中有着潜在应用价值, 已成为生物医学的研究热点^[3-5]。早在1951年, Blaine等就已探讨了海藻酸盐作为可吸收止血材料的可能性^[6]。海藻酸在医用敷料上的应用起源于1962年英国人Winter等发明的“湿疗法”^[7]。中国1987年10月1日颁布实施的卫生部标准中包含海藻酸可用于人体组织^[5], 但目前有关海藻酸钙敷料生物相容性的具体研究报道甚少。

海藻酸盐作为伤口止血敷料与人体组织及细胞外基质直接接触, 就要求其组成成分更接近人体组织基质成分, 低细胞毒性, 低免疫原性, 具备良好的生物相容性和降解活性, 利于细胞增殖与分化, 无溶血作用等^[8]。为避免发生不良反应, 敷料在应用于人体之前, 必须对其生物安全性进行评价^[9]。1948年Bluth等首次报道了利用小鼠成纤维细胞培养来筛选聚合物, 开启了以细胞毒性实验来评价生物材料生物相容性的研究之门^[9]。ISO 推荐使用该细胞进行细胞毒性实验^[10]。随着研究者们孜孜不倦的工作积累与研究发现, 使细胞毒性实验评价材料生物相容性的地位得到公认^[11-12]。体外细胞毒性实验已成为医疗器械生物学评价体系中最基本的评价指标之一, 它能反映化学物质对细胞基本结构或生理过程的作用, 如细胞膜或细胞骨架结构、细胞新陈代谢过程、细胞组分或产物的合成、降解或释放, 离子调控及细胞分裂等过程, 导致细胞存活、增殖和/或功能的紊乱所引发的不良反应^[13]。医疗器械样品的体外细胞毒性检测通常按照GB/T16886.5及ISO10993.5中体外细胞毒性实验进行^[14], 标准中体外细胞毒性实验分3类: 浸提液实验、直接接触实验和间接接触实验。医用装置及材料中一些易溶出物质(原料单体、低分子聚合物、催化剂、稳定剂、乳化剂等)是引起毒性反应的主要原因^[9]。

英国皇家护理学院2005年的压疮指南中将敷料分为以下5大类: 接触性敷料、主动性敷料、被动敷料、互动性

敷料、抗菌性敷料^[15-17]。本实验着重开展对海藻酸钙敷料生物相容性的研究, 细胞毒性实验采用浸提液法和直接接触法, 用CCK-8法检测其与现有其他几类医疗敷料的细胞毒性, 评估海藻酸钙止血敷料的临床应用潜能。明胶止血海绵是目前临床应用较为广泛的止血材料, 主要用于外科手术创面的止血, 纳吸棉是耳鼻喉手术常用的止血材料, 纱布更是临床上常用的伤口止血材料。将海藻酸钙止血敷料与目前临床常用3种材料的细胞毒性作对照, 研究其细胞毒性等级。

目前国内外对有关细胞毒性检查的标准均未做出明确而详细的规定, 这会使得由于实验室设备差异和实验人员技术操作不同而导致检验方法差异, 进而使实验数据缺乏可比性^[18-19]。检查方法的选择、细胞接种浓度、受试材料的制备、细胞与受试材料间相互作用时间等因素的不同都会影响实验结果。本实验主要分析敷料浸提液浓度对体外细胞毒性实验的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年9月至2015年1月在青岛大学医学院病原微生物实验室完成。

1.3 材料 小鼠成纤维细胞株L-929购于上海美轩生物科技有限公司。乳胶橡胶由海门市扬子医疗器械有限公司提供。

海藻酸钙敷料: 由山东长运医药用品有限公司提供, 灭菌干燥后用纸塑密封保存。藻酸盐医用敷料是一种从深海海藻提取的100%海洋生物纤维, 为具备生物相容性、抑菌、高吸湿等特性的高档敷料, 适用于慢性伤口的愈合。

明胶止血海绵: 由广州市快康医疗器械有限公司提供, 产品胶原蛋白含量100%, 其中蛋白质含量大于80%, 灰分小于0.2%, 产品吸水率大于80%, 热源小0.5 EU, 无菌, 适用各种急救止血、手术止血, 具有止血快、填塞创口及促进伤口愈合3大功效。

纳吸棉: 由建德市康华医疗器械有限公司提供, 纳吸棉是高分子生物聚合材料-聚亚氨酯, 是全新一代耳鼻喉科应用的高膨胀可吸收止血棉产品, 其具有可降解吸收、高膨胀止血的特性, 适用于耳鼻喉科等快速填塞止血。

普通纱布: 由山东长运医药用品有限公司提供。

主要试剂与仪器: 胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司); DMEM高糖培养基(赛墨飞世尔生物化学有限公司); CCK-8(Signalway Antibody公司); PBS、二甲基亚砷(青岛大学医学院病原生物学实验室); 倒置相差显微镜(奥林巴斯公司); 多功能酶联免疫检测仪(SUNRISE公司); 电子天平(Sartorius公司); 超净工作台(苏州净化); CO₂培养箱(德国Memmert); 离心机(美国Labnet)。

1.4 实验方法

1.4.1 浸提液法

材料浸提液的制备: 无菌操作下, 分别称量海藻酸钙敷料、明胶止血海绵、纳吸棉、普通纱布材料, 放入15 mL离心管中, 加入DMEM高糖培养液作为浸提介质, 使敷料的质量浓度为100 g/L, 置于37 °C、饱和湿度、体积分数为5%CO₂培养箱中浸提48 h, 用0.22 μm微孔过滤器过滤后, 将浸提液装入15 mL离心管内, 将上述浸提液用DMEM高糖培养液按体积分数75%, 50%, 25%, 10%梯度稀释, 置于4 °C冰箱保存待用。

L-929细胞生长曲线: 将对数生长期的L-929细胞按 5×10^7 , 4×10^7 , 3×10^7 , 2×10^7 , 1×10^7 L⁻¹浓度配置成5种细胞悬液, 将每种细胞悬液加8个孔, 每孔100 μL于96孔板, 置于培养箱中静置培养24 h后, 每孔加入CCK-8检测剂10 μL, 继续培养4 h, 选择450 nm波长在酶联免疫检测仪上测定每孔吸光度值, 绘制细胞生长曲线, 取对数生长期的细胞确定实验所需的细胞浓度。

细胞悬液的制备: 将L-929细胞传代培养72 h后, 将生长旺盛的细胞用胰酶消化后移入15 mL离心管中, 1 200 r/min离心5 min, 除去上清液, 加入5 mL含体积分数10%胎牛血清的DMEM高糖培养液, 用移液管反复吹打使细胞充分分散均匀, 成为单个细胞悬液, 绘制细胞生长曲线, 选择合适的细胞浓度(3×10^7 L⁻¹), 细胞计数板计数。

实验分组与干预: 取含体积分数10%胎牛血清的DMEM高糖培养液(空白对照组)、含5%二甲基亚砷的DMEM高糖培养液(阳性对照组)、不同浓度梯度的4种材料浸提液各3 mL, 分别置于6孔细胞培养板中, 然后分别向培养皿中加入 3×10^7 L⁻¹的L-929细胞悬液3 mL, 置于培养箱中培养24 h, 在倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况。

CCK-8法测敷料浸提液对L-929细胞的毒性作用: 将 3×10^7 L⁻¹的细胞悬液接种于3块96孔培养板上, 每组接种6孔, 每孔100 μL, 将培养板置于37 °C、饱和湿度、体积分数5%CO₂培养箱中静置培养24 h。饥饿培养24 h, 待细胞贴壁生长后取出96孔板, 弃去原液, PBS洗涤2次, 每孔加DMEM高糖培养基100 μL, 放入培养箱继续培养。加样培养24 h, 弃去原液, PBS洗涤2次, 分别加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM高糖培养液(空白对照组)、含5%二甲基亚砷的DMEM高糖培养液(阳性对照组)、不同浓度梯度的4种材料浸提液正常更换培养液, 每孔100 μL, 置于

细胞毒性反应标准:

毒性反应程度	反应观察
无	细胞形态正常, 贴壁生长良好, 胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解
极轻微	至多20%细胞呈圆形, 松散贴壁, 无胞浆内颗粒, 偶见细胞溶解
轻微	至多50%细胞呈圆形, 无胞浆颗粒, 明显见细胞溶解和细胞间空泡
中度	至多70%细胞呈圆形, 无胞浆颗粒, 明显见细胞溶解和细胞间空泡
重度	细胞层几乎完全破坏

培养箱中静置培养24 h。培养24 h后取出96孔板, 每孔加CCK-8检测剂10 μL, 置于CO₂培养箱孵育3 h, 选择450 nm波长在酶联免疫检测仪上测定每孔的吸光度(A)值, 实验重复3次取平均值, 并记录结果。

根据公式计算细胞相对增殖率: 细胞相对增殖率=实验组A值/空白对照组A值×100%, 评价不同浓度浸提液对细胞毒性的影响。

材料浸提液对细胞存活率影响的评定方法参照国家标准GB/T 16886. 5细胞毒性评价在0, 1级内可认为符合标准: 细胞相对增殖率≥100%, 毒性0级; 在75%–99%之间, 毒性1级; 在50%–74%之间, 毒性2级; 在25%–49%之间, 毒性3级; 在1%–24%之间, 毒性4级; 0, 毒性5级。

1.4.2 直接接触法

细胞悬浮液的制备: 在细胞培养瓶中用含体积分数10%胎牛血清的DMEM高糖培养液培养小鼠成纤维细胞L-929, 制成 3×10^7 L⁻¹的细胞悬浮液。

实验分组与干预: 取18个60 mm培养皿, 在每个培养皿中加入2 mL细胞悬浮液, 孵育48 h直至其融合成近似细胞单层, 倒置相差显微镜下观察细胞生长情况, 每2 d更换新鲜培养液, 将18个培养皿分成6组, 每组3个培养皿, 分别加入同样形状和大小(长1.0 cm、直径0.3 cm圆柱)的4种敷料材料及乳胶橡胶(阳性对照)材料与不加任何材料(空白对照组), 使其与细胞单层直接接触, 继续培养24 h后观察细胞形态变化并照相。

直接接触法细胞毒性评级标准:

级别	毒性反应	显微镜下观察反应
0	无	样品下和周围区域细胞无异常迹象
1	极轻	样品下面有些细胞形态异常或退化迹象
2	轻微	细胞反应区域局限在样品下面范围
3	中度	细胞反应区域超出样品下面范围 0.5–1.0 cm
4	重度	细胞反应区域超出样品下面范围 1.0 cm 以上

1.5 主要观察指标 各组细胞形态学改变及毒性分级。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。细胞毒性实验中, 不同材料各浓度组间比较使用单因素方差分析(两两比较采用LSD法); 相同浓度下不同敷料

的比较采用独立样本 t 检验, 相同浓度不同浓度比较采用单因素方差分析(两两比较采用LSD法)。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果 Results

2.1 细胞生长曲线的绘制 经24 h细胞培养后, 测得 5×10^7 , 4×10^7 , 3×10^7 , 2×10^7 , 1×10^7 L⁻¹细胞浓度下的A值分别为 0.797 ± 0.008 , 0.802 ± 0.008 , 0.810 ± 0.006 , 0.802 ± 0.009 , 0.730 ± 0.007 。

根据细胞A值绘制细胞生长标准曲线, 分析发现细胞浓度为 3×10^7 L⁻¹时, 细胞生长最适宜, 所以选取此细胞浓度作为细胞悬液浓度。

2.2 浸提液法实验结果

细胞形态观察: 4种止血敷料浸提液(以100%浓度梯度为例)培养L-929细胞, 24 h后倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况, 见图1。由图可见, 纱布组(图1D)、海藻酸钙组(图1B)同空白对照组(图1E)细胞形态正常, 贴壁生长良好, 胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解, 细胞毒性反应程度为无; 纳吸棉组(图1A)和明胶止血海绵组(图1C)至多5%细胞呈圆形且松散贴壁, 无胞浆内颗粒, 偶见细胞溶解, 细胞毒性反应为极轻微; 阳性对照组可见明显的细胞溶解和细胞间空泡, 细胞毒性反应程度中、重度。

材料浸提液对L-929细胞增殖的影响: 总体趋势是细胞毒性随着材料浸提液浓度的减小而减小; 当材料浸提液浓度在100%, 75%, 50%时, 明胶止血海绵组细胞A值均低于其他3种敷料组($P < 0.05$), 对细胞有明显的抑制作用, 细胞毒性分别为3级、2级、1级; 当材料浸提液浓度低于50%时, 4种敷料组细胞A值差异很小, 细胞毒性均为1级(表1, 图2)。

2.3 直接接触法实验结果 阳性对照组细胞明显呈圆形, 无胞浆颗粒, 细胞溶解, 细胞层几乎完全破坏(图3A), 细胞毒性为4级。空白对照组细胞形态正常, 贴壁生长良好, 胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解(图3B), 细胞毒性0级。4组实验敷料直接接触实验细胞毒性从轻到重依次是: ①纱布组: 与纱布直接接触的下方区域有少量(5%)细胞形态异常或有退化迹象, 呈现极轻微的毒性反应(图3C, D), 细胞毒性1级。②海藻酸钙组: 与海藻酸钙直接接触的下方区域有少量(15%)细胞形态异常或有退化迹象, 细胞反应区域局限在样品下面范围, 细胞异常没有超出样品接触范围, 呈现极轻微的毒性反应(图3E, F), 细胞毒性1至2级。③纳吸棉组: 与纳吸棉直接接触的下方区域有些(50%)细胞形态异常或有退化迹象, 细胞反应区域超出样品下面范围(0.5 cm), 呈现轻微的毒性反应(图3G, H), 细胞毒性2级。④明胶海绵组: 与材料直接接触的下方区域有些(50%)细胞形态异常或有退化迹象, 细胞反应区域超出样品下面范围0.5-1.0 cm, 呈现中度的毒性反应(图3I, J), 细胞毒性为3级。

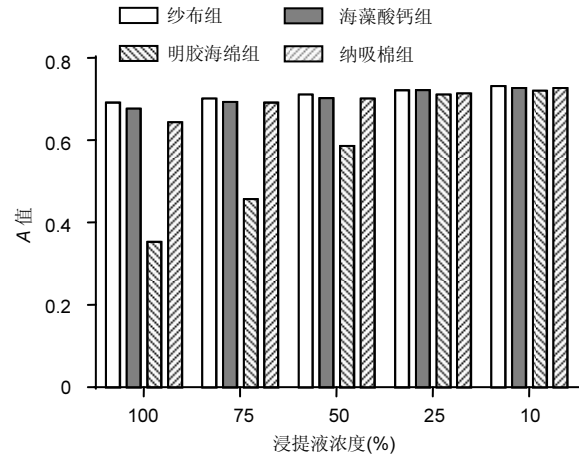


图2 不同浓度敷料浸提液培养L-929细胞24h的吸光度值比较
Figure 2 Comparison of absorbance values of L-929 mouse fibroblasts cultured by different concentrations of dressing leaching solution for 24 hours

表1 不同浓度敷料浸提液培养L-929细胞24h的吸光度值、相对增殖率及细胞毒性分级检测结果 (n=6)
Table 1 Absorbance values, the relative growth rate and cell toxicity grading test results of L-929 mouse fibroblasts cultured by different concentrations of dressing leaching solution for 24 hours

组别	浸提液浓度 (%)	吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)	相对增殖率 (%)	细胞毒性分级
纱布组	100	0.692 ± 0.013^b	94	1
	75	0.701 ± 0.005^b	95	1
	50	0.711 ± 0.008^b	96	1
	25	0.721 ± 0.005^b	98	1
	10	0.732 ± 0.006^b	99	1
海藻酸钙组	100	0.677 ± 0.004^b	92	1
	75	0.692 ± 0.004^b	94	1
	50	0.701 ± 0.004^b	95	1
	25	0.714 ± 0.005^b	97	1
	10	0.727 ± 0.009^b	98	1
纳吸棉组	100	0.644 ± 0.004^b	87	1
	75	0.693 ± 0.009^b	94	1
	50	0.702 ± 0.007^b	95	1
	25	0.722 ± 0.009^b	98	1
	10	0.727 ± 0.006^b	98	1
明胶止血海绵组	100	0.354 ± 0.009^a	48	3
	75	0.457 ± 0.015^{ab}	62	2
	50	0.586 ± 0.007^{ab}	77	1
	25	0.711 ± 0.009^b	96	1
	10	0.720 ± 0.008^b	97	1
空白对照组	100	0.739 ± 0.010	100	0
阳性对照组	100	0.341 ± 0.008^a	45	3

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

目前临床上对于出血创面的处理已不仅仅局限于快速止血, 由于伤口的修复过程受到多种因素的相互作用, 加上“湿法疗法”在逐渐取代以往人们对于伤口护理的认识, 使得止血材料不再单一化, 对止血材料的选择更加趋向吸湿性、保湿性、生物相容性好的材料。由于价格低廉, 棉质纱布仍是临床上普遍使用的换药、止血敷料, 但因表面

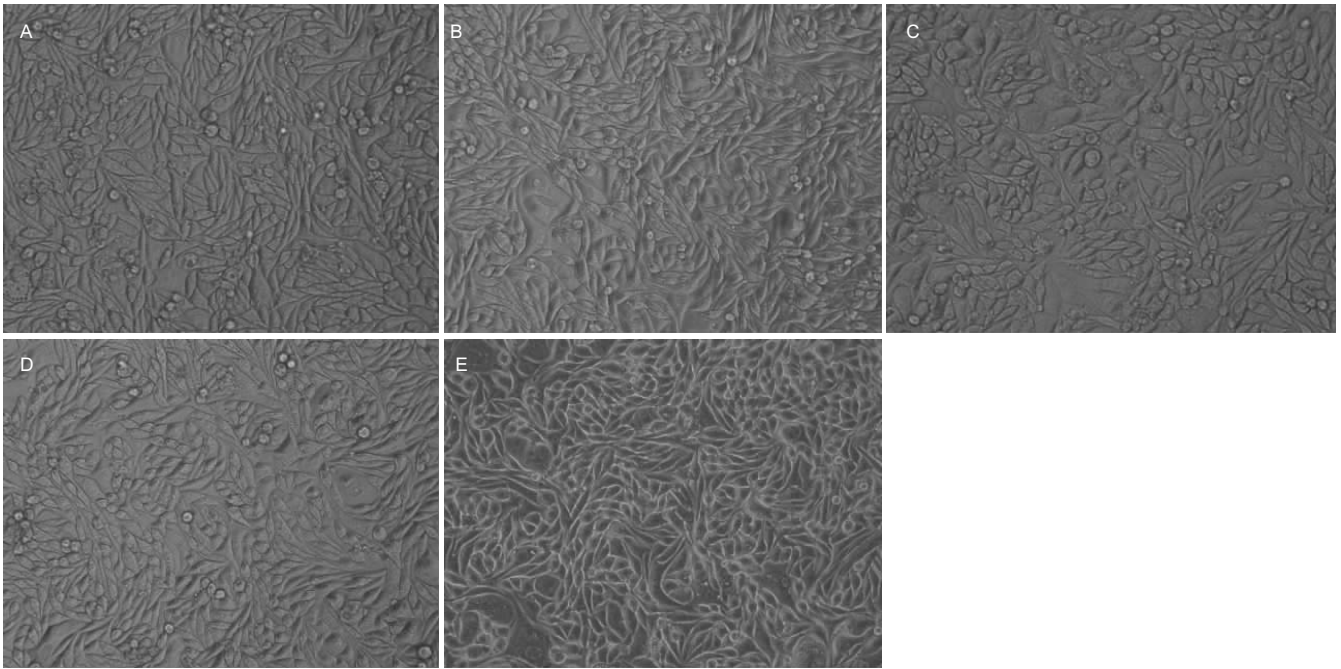


图 1 采用不同溶液培养 L-929 细胞 24 h 后的细胞形态变化(×100)

Figure 1 Morphological changes of L-929 mouse fibroblasts cultured by different solutions for 24 hours(×100)

图注: 图中 A 为纳吸棉浸提液; B 为海藻酸钙浸提液; C 为明胶止血海绵浸提液; D 为纱布浸提液; E 为含体积分数 10% 胎牛血清的 DMED 高糖培养液(空白对照组)。纱布组、海藻酸钙组、空白对照组细胞形态正常, 贴壁生长良好, 胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解, 细胞毒性反应程度为无; 纳吸棉组和明胶止血海绵组至多 5% 细胞呈圆形且松散贴壁, 无胞浆内颗粒, 偶见细胞溶解, 细胞毒性反应为极轻微。

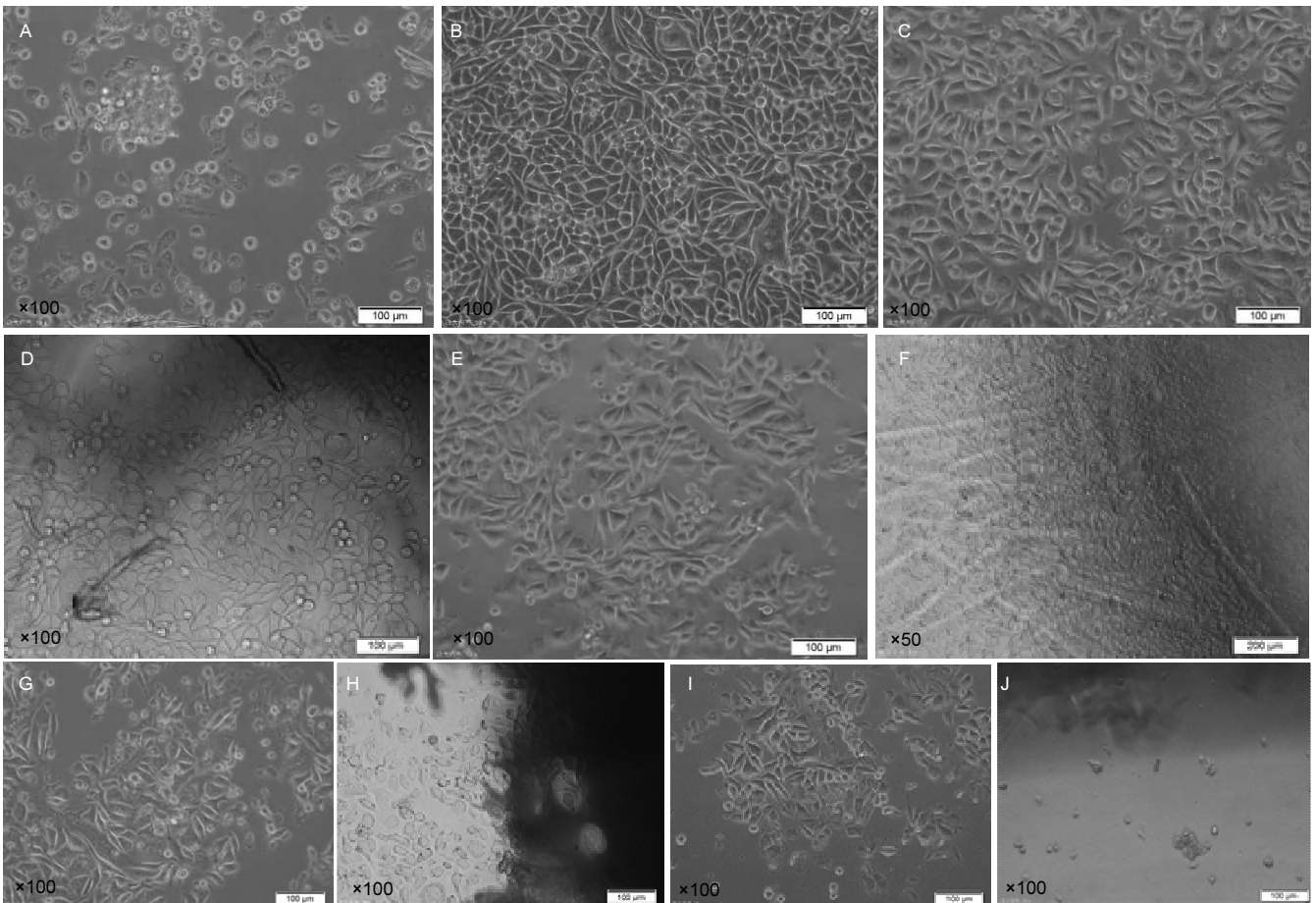


图 3 与不同材料共培养 24 h 后 L-929 细胞的细胞形态变化

Figure 3 Morphological changes of L-929 mouse fibroblasts cultured by different dressings for 24 hours

图注: 图中 A 为与阳性材料乳胶橡胶共培养; B 为含胎牛血清 DMED 高糖培养液液培养; C、D 为与纱布共培养; E、F 为与海藻酸钙共培养; G、H 为与纳吸棉共培养; I、J 为与明胶止血海绵共培养。细胞毒性由轻到重依次为纱布组、海藻酸钠组、纳吸棉组、明胶止血海绵组。

干燥、质地粗糙,易损伤创面新生肉芽组织显示出了应用局限性^[18]。随着组织工程技术的迅速发展,新型止血敷料应运而生,这包括以胶原蛋白为原料的明胶海绵、以聚亚氨酯为原料的纳吸棉、以海藻酸盐为原料的海藻酸钙。本实验主要就海藻酸钙止血材料的体外细胞毒性进行研究,同时与目前临床上较为普遍的止血材料如纱布、纳吸棉、明胶止血海绵的细胞毒性作对比。

目前医疗器械注册产品标准引用最多的是GB/T16886.5-2003,该标准中最常用到的方法是浸提液法,但对实际检验过程中的具体操作则过于笼统^[14]。本实验为减少实验误差,在开始前先做了L-929细胞生长曲线,选取适宜的细胞浓度。通过实验结果还可以看出,纱布、海藻酸钙、纳吸棉这3种敷料按100 g/L制备的浸提液5种浓度细胞毒性均为1级,符合标准范围,但是明胶止血海绵100%、75%浸提液浓度的细胞毒性为3或2级,对细胞增殖有影响。直接接触实验能较直观地看出敷料与细胞直接接触对细胞的影响,在培养24 h后,实验结果表明4种敷料细胞毒性从轻到重依次是:纱布、海藻酸钙、纳吸棉、明胶止血海绵,明胶止血海绵对贴壁细胞的影响最明显,这与浸提液法实验结果相一致。直接接触培养中的各种敷料毒性显著高于浸提液法的结果,分析原因可能是直接接触实验是模拟止血敷料与伤口直接接触,当敷料有溶出物时,试样所在处细胞就会受到影响,评价对细胞的直接影响。而浸提液法是将止血敷料置于浸提介质中一定时间,溶出物溶解于浸提溶液中通过培养细胞,间接评价敷料对细胞的影响,相对于直接接触法,浸提液法溶出物的浓度相对较低,所以对细胞的毒性作用相对较轻。

综合直接接触法和浸提液法研究4种敷料的细胞毒性,都能一致反映出海藻酸钙敷料的无细胞毒性,符合标准要求。虽然浸提液评价方法显示其对细胞生长的抑制作用较纱布稍强,原因可能由于海藻纤维敷料浸提过程中会溶出部分金属Ca²⁺等离子,影响细胞外离子浓度,对细胞增殖产生一定影响,但对细胞增殖未表现出明显的抑制作用。本实验对这4种敷料对L-929细胞增殖影响的机制没有展开研究,需要做更进一步的研究。

致谢: 感谢山东省长运医药用品有限公司为本次实验提供研发的海藻酸钙新型敷料。

作者贡献: 初晓夏参与实验设计、实验实施、实验评估、资料收集及成文工作;王海涛、陈豪及崔飞艳协助第一作者进行资料收集及实验实施;由通讯作者王斌对文章进行审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 未涉及与伦理冲突内容。

学术术语: 体外细胞毒性实验的临床意义?体外细胞毒性实验已成为医疗器械生物学评价体系中最基本的评价指标之一,它能反映化学物质对细胞基本结构或生理过程的作用,如细胞膜或细胞骨架结构、细胞新陈代谢过程、细胞组分或产物的合成、降

解或释放,离子调控及细胞分裂等过程,导致细胞存活、增殖和/或功能的紊乱所引发的不良反应。

作者声明: 第一作者及通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

4 参考文献 References

- [1] 孙玉玲,刘杰.医用敷料用海藻纤维研究进展[J].科技信息,2010,27(32):134-135.
- [2] 黄若昆.可注射性骨组织工程载体研究进展[J].中国矫形外科杂志,2007,15(9):681-683.
- [3] Jayakumar R,Prabaharan M,Sudheesh Kumar PT,et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications.Biotechnol Adv.2011;29(3):322-337.
- [4] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. Progr Polym Sci.2012;37(1):106-126.
- [5] 汪涛,赵珺,张震,等.海藻酸钙敷料的细胞毒性体外测试结果分析[J].中国现代普通外科进展,2014,17(9):692-696.
- [6] Kasseroller RG,Benner E.A prospective randomised study of algina tedrenched low stretch bandages as an alternative to conventional lymphologic compression bandaging. Support Care Cancer.2010;18(3):343-350.
- [7] 秦益民.海藻酸纤维在医用敷料中的应用[J].合成纤维,2004,32(4):11-16.
- [8] 张林朴,王冠华,连小丽,等.海藻酸钠/壳聚糖复合凝胶的制备与细胞毒性评价[J].中国组织工程研究,2014,18(21):3310-3315.
- [9] 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].实用美容整形外科杂志,2001,12(5):255-256.
- [10] ISO,International Organization for Standardization.Biological evaluation of medical devices-Part 5:Test for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, 2009.
- [11] 刘茜,兰华林,顾铭,等.贻贝粘蛋白创面修复敷料体外细胞毒性的检测方法[J].中国组织工程研究,2013,17(38):6785-6790.
- [12] Gomes ME,Reis RL,Cunha AM,et al. Cytocompatibility and response of osteblastic-like cells to starch-based polymers: Effect of several additives and processing conditions. Biomaterials.2001;22(13):1911-1917.
- [13] 奚延雯.组织工程医疗产品安全性评估[J].现代康复,2001,5(6):13-15.
- [14] 国家质量监督检验检疫总局.GB/T16886.5 医疗器械生物学评价第5部分:体外细胞毒性试验,2003.
- [15] Royal College of Nursing. The Management of Pressure Ulcers in Primary and Secondary Care: a Clinical Practice, Guideline. London: Royal College of Nursing, UK.2005.
- [16] 林晓华,黎志超,俞金龙,等.新型复合生物抗菌敷料的抗菌强度、吸湿能力及细胞毒性[J].中国组织工程研究,2013,17(16):2905-2912.
- [17] Pielesz A,Katarzyna B,Klimczak M.Physico-chemical properties of commercial active alginate dressings.Polirn Med.2008;38(4):3-17.
- [18] 杨建德,韦元强,莫海龙,等.复合皮片移植治疗烧伤后功能部位瘢痕20例[J].中国组织工程研究与工临床康复,2007,11(8):1544-1545.
- [19] 李丽,周建平,胡宇驰.细胞浓度和作用时间对细胞毒性检查法影响的探讨[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):101-104.