

新型鼻腔填塞材料聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶的细胞相容性

· 研究原著 ·

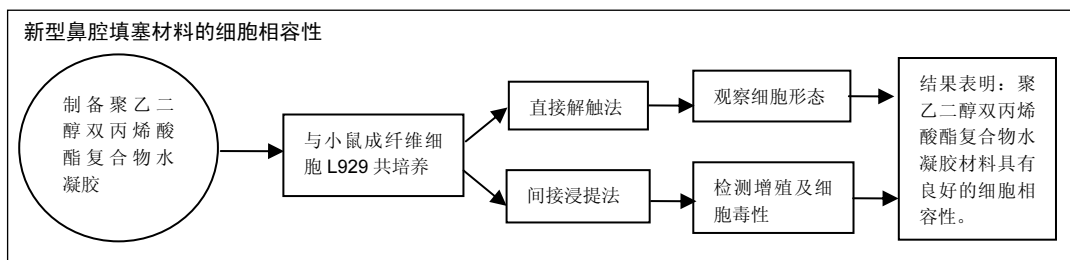
杨国慧, 韩德民, 臧洪瑞, 李立峰(首都医科大学附属北京同仁医院耳鼻咽喉头颈外科, 耳鼻咽喉头颈科学教育部重点实验室(首都医科大学), 北京市 100730)

引用本文: 杨国慧, 韩德民, 臧洪瑞, 李立峰. 新型鼻腔填塞材料聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶的细胞相容性[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(10):1546-1551.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.10.012

ORCID: 0000-0002-5902-5718(韩德民)

文章快速阅读:



杨国慧, 女, 山西省朔州市人, 首都医科大学在读硕士, 主要从事鼻科基础与临床, 上气道通气功能障碍疾病的研究。

通讯作者: 韩德民, 教授, 中国工程院院士, 博士生导师, 首都医科大学附属北京同仁医院耳鼻咽喉头颈外科, 耳鼻咽喉头颈科学教育部重点实验室(首都医科大学), 北京市 100730

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2017)10-01546-06
稿件接受: 2017-02-12

文题释义:

聚乙二醇双丙烯酸酯水凝胶:是由聚乙二醇双丙烯酸酯、羧甲基壳聚糖和聚乙烯醇三者水溶液经光交联形成, 具有良好的吸水性能、高膨胀性能, 柔软性好, 具有良好的生物相容性和生物降解性。

鼻腔填塞材料:按是否可吸收, 可分为可吸收型和非吸收型; 可吸收型可分为易于吸收的止血绶、止血纱布、速即纱, 不易吸收的藻酸钙、明胶海绵、止血纤维; 非吸收型分为不可降解的膨胀海绵、硅胶管、油纱条, 可降解的纳吸棉等。

摘要

背景:前期研究发现聚乙二醇双丙烯酸酯和壳聚糖形成的复合物可生物降解吸收, 具有抗炎消肿能促进创面愈合作用, 且生物相容性好, 然而该复合物质地较脆, 鉴于鼻腔解剖结构, 需要一种具有力学支撑性能的材料来克服这种缺陷。

目的:观察新型可降解吸收鼻腔填塞材料聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶的细胞相容性。

方法:通过光交联将聚乙二醇双丙烯酸酯、壳聚糖、聚乙烯醇材料复合, 形成聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶, 根据国际通行医疗器械生物学评价标准采用直接接触法及间接浸提法评价其细胞相容性。

①直接接触法:将聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶与小鼠成纤维细胞 L929 共培养 24 h, 观察形态变化; **②间接浸提法:**分别以 100, 50 μ L 聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶浸提液及 100 μ L RPMI1640 培养液培养小鼠成纤维细胞 L929, CCK-8 法检测培养 1-3 d 的增殖及细胞毒性。

结果与结论:①直接接触法: 材料周围细胞形态呈突起的梭形或星形的扁平状结构, 贴壁性生长, 细胞饱满且折光性强, 整体呈生长趋势, 可见该材料生物相容性良好; ②间接浸提法: 随着时间的增加, 含复合物水凝胶浸提液组细胞数量增加, 细胞相对增殖率逐渐增加, 细胞毒性为 0 至 1 级; ③结果表明: 聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶材料具有良好的细胞相容性。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 聚乙二醇双丙烯酸酯水凝胶; 鼻填塞材料; 细胞毒性; 小鼠成纤维细胞

主题词:

生物相容性材料; 聚乙烯醇类; 壳聚糖; 水凝胶

基金资助:

北京市医院管理局“使命”人才计划项目(SML20150201)

Yang Guo-hui, Studying for master's degree, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Key Laboratory of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Capital Medical University, Ministry of Education, Beijing 100730, China

Corresponding author: Han De-min, Academician, Doctoral supervisor, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Key Laboratory of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Capital Medical University, Ministry of Education, Beijing 100730, China

Cytocompatibility of a novel nasal packing material made of polyethylene glycol diacrylate composite hydrogel

Yang Guo-hui, Han De-min, Zang Hong-ru, Li Li-feng (Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Key Laboratory of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Capital Medical University, Ministry of Education, Beijing 100730, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have shown that the complex of polyethylene glycol diacrylate and chitosan is biodegradable, has the anti-inflammation effect and can promote wound healing, with good biocompatibility. However, the composite material is brittle, and thus, it is necessary to develop a mechanical support material due to the anatomy of the nasal cavity.

OBJECTIVE: To study the cytocompatibility of a novel degradable absorbable nasal packing material made of polyethylene glycol diacrylate composite hydrogel.

METHODS: In our experiment, the composite hydrogel was formed by the combination of different ratios of polyethyleneglycol diacrylate, chitosan and polyvinyl alcohol using photo-crosslinking method. According to the international standard of medical devices, we used direct and indirect international standard experimental methods to evaluate the cytotoxicity of the materials. (1) Direct contact method: the polyethylene glycol acrylate composite hydrogel and mouse fibroblasts L929 were co-cultured for 24 hours to observe the morphological changes of cells. (2) Indirect extraction: mouse fibroblasts L929 were cultured in polyethylene glycol diacrylate composite hydrogel extracts (100, 50 μ L) and RPMI1640 medium (100 μ L), respectively, for 3 days to observe the proliferation and cytotoxicity by cell counting kit-8 assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Direct contact method: the cells around the material formed a flat structure with fusiform or stellated protrudes. The material was confirmed to have good biocompatibility depending upon the presence of adherent cell growth, full and strong refraction, and the overall growth trend. (2) Indirect extraction method: with the increase of time, the number of cells in the hydrogel extract group increased, the relative proliferation rate of cells increased gradually, and the cytotoxicity was 0 to 1. To conclude, these experimental findings indicate that the polyethylene glycol acrylate composite hydrogel material has good cytocompatibility.

Subject headings: Biocompatible Materials; Polyethylene Glycols; Chitosan; Hydrogel

Funding: the Talent Plan Project of Beijing Municipal Administration of Hospitals, No. SML20150201

Cite this article: Yang GH, Han DM, Zang HR, Li LF. Cytocompatibility of a novel nasal packing material made of polyethylene glycol diacrylate composite hydrogel. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(10):1546-1551.

0 引言 Introduction

鼻内镜术后填塞是鼻内镜外科技术的重要组成部分,随着鼻内镜外科技术发展、手术机械的不断变革,各种新型材料出现,使得鼻腔填塞材料也有了不断更新,为临床治疗鼻出血和防止鼻腔鼻窦术后出血粘连或再狭窄提供了更多的选择^[1]。然而由于患者病情特异性、鼻腔解剖结构复杂性,鼻部血管丰富性,选择恰当的鼻腔填塞材料对术后鼻腔黏膜恢复、有效控制出血至关重要。好的填塞材料应易于填塞和取出,无毒,对人体及局部黏膜无刺激、损害和致敏,可促进创口愈合,抗感染,可维系鼻腔通气,患者痛苦小及经济等^[2]。目前可应用的鼻腔填塞材料很多,可吸收降解止血材料因止血效果快速,可降解吸收,无需取出,明显减轻了患者疼痛,提高了术后舒适度,避免二次出血,降低了术后并发症的风险而成为近年来填塞材料发展趋势^[3]。纳吸棉是目前临床应用广泛的降解吸收止血材料,因其产地位于荷兰,属进口产品,价格昂贵,加重患者经济负担^[4]。因此拟研发出一种效能可替代纳吸棉材料且成本相对低廉的新降解吸收型材料。

最近研究表明根据每一种生物材料的特性,采用物理或化学方法将具有不同生物特性的材料复合,以期消除各单一组分性能上的弱点,获得综合性能更为理想的聚合物材料服务于临床^[5]。前期研究显示聚乙二醇双丙烯酸酯和壳聚糖形成的复合物可生物降解吸收,具有抗炎消肿作用,能促进创面愈合且生物相容性好^[6]。然而该复合物质地较脆,鉴于鼻腔解剖结构,需要一种具有力学支撑性能的材料来克服这种缺陷。作为临床广泛使用的聚乙烯醇材料抗张强度较高,具有良好的力学性能,组织相容性好,已被广泛应用于临床^[7]。因此通过光交联使三者形成复合物水凝胶,是一种亲水的三维聚合物网络,实验证实其具有良好的吸水性能、高膨胀性能,柔软性好,具有良好的生物相容性和生物降解性^[8]。实验依据GB/T16886/ISO10993国际标准第五部分关于体外细胞毒性实验要求原则进行细

胞相容性评估^[9],为该材料进行下一步试验提供依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年7至12月在北京市耳鼻咽喉科研究所完成。

1.3 材料 聚乙二醇二丙烯酸酯(北京华威锐科化工有限公司);氨水(国药集团化学试剂有限公司);羧甲基壳聚糖水溶液和聚乙烯醇(北京华威锐科化工有限公司);小鼠成纤维细胞系L929(里苏(上海)生物技术有限公司);RPMI16409(Corning Cellgro 10-010-CV);胰酶(Corning 25-053-CI)胎牛血清(hyclone);Cell Counting Kit-8(日本同仁CK04);PBS(Corning 21-040-CV);96孔培养板(Corning 353072);细胞培养瓶(Corning 430168);CO₂培养箱(thermo BB15uv);倒置相差显微镜(Nikon Ti);酶联免疫检测仪(Molecular Devices SPECTRAMax PLUS);超净工作台(苏州净化);高速离心机,微量移液器(eppendorf);热空气消毒箱(Heraeus SUT6120)。

1.4 实验方法

1.4.1 材料的制备^[10-11] 配制一定浓度的聚乙二醇二丙烯酸酯水溶液,加入氨水,超声5 min后,加入羧甲基壳聚糖水溶液和聚乙烯醇水溶液,进一步搅拌超声10 min,混合均匀后,放在紫外光灯下照射,控制照射时间为25 min,洗涤制备的聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶,放入离子水中静置2-4 h,每1 h换1次水,随后冷冻干燥,获得产物。

1.4.2 实验用材料浸提液的制备 将材料切成长1.0 cm的正方体,按每1 cm²表面积的正方体材料块加入15 mL含体积分数10%胎牛血清的RPMI1640培养液浸泡,于37 °C条件下在CO₂培养箱内培养24 h,制成浸提液备用。

1.4.3 直接接触法细胞实验^[12] 将小鼠成纤维细胞悬浮液接种于培养皿中。①制备细胞悬浮液:将培养瓶中的L929小鼠成纤维细胞用0.25%胰酶消化,加5 mL培养基,

移入离心管, 1 000 r/min离心5 min, 进行细胞计数, 制成细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬浮液; ②接种于培养皿: 取6个60 mm培养皿, 在每个培养皿中加入4 mL细胞悬浮液, 孵育2 d直至其融合成近似细胞单层; ③接触法毒性实验方法及毒性评级标准: 每日于倒置相差显微镜下观察L929细胞生长情况, 将6个培养皿分成2组, 每组3个培养皿, 对照组为细胞单独培养; 实验组将材料切成长0.5 cm、宽0.3 cm、厚0.3 cm的长方体块, 置入含体积分数10%胎牛血清的RPMI1640培养液中浸泡, 使其充分膨胀, 取出, 放于培养皿, 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, 实验重复6次。

直接接触法细胞毒性评级标准:

毒性级别	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	样品下有些细胞出现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

1.4.4 CCK-8细胞增殖法细胞毒性实验^[13] 将培养的L929细胞用含体积分数10%胎牛血清的RPMI1640培养液稀释消化, 配成细胞浓度 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液; 取3块96孔培养板, 在每板分别做好标记1, 2, 3 d。每板选中间 5×8 共40孔作为实验用孔, 每孔接种100 μL 的细胞悬浮液, 每板接种30孔, 另外10孔空白组不加细胞, 置含体积分数5%CO₂培养箱中37 °C培养2 h; 待细胞贴壁, 分3组培养, 两实验组分别加入100, 50 μL 聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶浸提液, 对照组加入100 μL RPMI1640培养液, 每组10复孔; 空白组加入200 μL RPMI1640培养液; 将3块培养板置于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱, 按所做标记于接种后1, 2, 3 d取出培养板, 每板40孔中加入CCK-8 10 μL , 继续在37 °C条件下培养3 h。选择450 nm波长, 在酶标仪上测定各孔光吸收值(A), 并计算细胞相对增殖率 $\text{RGR}(\%) = (\text{实验组A均值} - \text{空白组A均值}) / (\text{对照组A均值} - \text{空白组A均值}) \times 100\%$ 。

根据各组细胞吸光度值和相对增殖率(RGR), 即可画出该组作用下的L929细胞生长和增殖曲线。当细胞相对增殖率为 $\geq 100\%$ 时, 细胞毒性0级; 当细胞相对增殖率在75%-99%之间, 细胞毒性1级; 当细胞相对增殖率在50%-74%之间, 细胞毒性2级; 当细胞相对增殖率在25%-49%之间, 细胞毒性3级; 当细胞相对增殖率在1%-24%之间, 细胞毒性4级; 细胞相对增殖率为0, 细胞毒性5级。

1.5 主要观察指标 小鼠成纤维细胞L929与聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶共培养后的形态、增殖情况。

1.6 统计学分析 光吸收值和细胞相对增殖率均采用 $\bar{x} \pm s$

表示, 采用SPSS 22.0 统计软件对各时间点各组数据进行单因素方差分析, 组间两两比较采用Student-Newman-Keuls(SNK)法, 设定 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 直接接触法细胞相容性实验结果 与材料共培养前, 小鼠成纤维细胞L929呈伴突起的梭形或星形的扁平状结构, 形态较小, 数目少, 密度小, 见图1。与材料共培养后, 实验组材料下方细胞形态不甚清楚, 可能因为材料压力细胞有死亡, 材料周围细胞形态呈伴突起的梭形或星形的扁平状结构, 贴壁性生长, 细胞饱满且折光性强, 整体呈生长趋势, 细胞形态增大, 数目明显增多, 密度增大, 可见该材料生物相容性良好; 对照组细胞形态相较实验组更加饱满, 轮廓明显, 突起充分伸展, 见图2。

2.2 浸提液细胞毒性实验结果 CCK-8法检测各组吸光度值、细胞相对增殖率及毒性级别见表1。由图3A可得随着细胞培养天数增加, 细胞数目增多, 各组材料浸提液吸光度值增加, 且到第3天几乎无差别。由图3B可得随着细胞培养天数增加, 材料浸提液组细胞相对增殖率增加, 且到第3天细胞相对增殖率与对照组无差别。培养1 d时, 两材料浸提液组与对照组细胞相对增殖率比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 3 d时, 两材料浸提液组与对照组细胞相对增殖率比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。由上述结果可得随细胞培养天数增加细胞数量增加, 3 d时各组的光吸收值、细胞相对增殖率比较差异无显著性意义, 说明材料此时对细胞生长已无影响, 可认为材料属于无毒性, 材料具有良好的细胞相容性。

3 讨论 Discussion

鼻腔填塞是预防鼻腔鼻窦术后出血, 对鼻腔起支撑塑形、预防粘连或再狭窄, 以及临床治疗鼻出血进行填塞止血的重要措施。目前可应用的鼻腔填塞材料很多, 按是否可吸收, 可分为可吸收型和非吸收型; 可吸收型可分为易于吸收的止血绫、止血纱布、速即纱, 不易吸收的藻酸钙、明胶海绵、止血纤维; 非吸收型分为不可降解的膨胀海绵、硅胶管、油纱条, 可降解的纳吸棉等^[14]。初晓夏等^[13]比较临床常用止血材料海藻酸钙、明胶海绵、纳吸棉、普通纱布等的细胞毒性, 结果显示在浸提液法当中, 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, 100%、75%明胶止血海绵浸提液的细胞毒性为3级; 在直接接触法中, 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。

作为临床广泛使用的纳吸棉具有高膨胀压迫止血作用且效果快速, 同时可生物降解吸收, 提高患者舒适度, 术后无须取出, 无需忍受二次疼痛及避免术腔再次出血可能^[15]。Verim等^[16]在对56例慢性鼻窦炎伴鼻息肉患者术后进行膨胀海绵及纳吸棉双鼻孔填塞的对照研究中发现, 两者在术

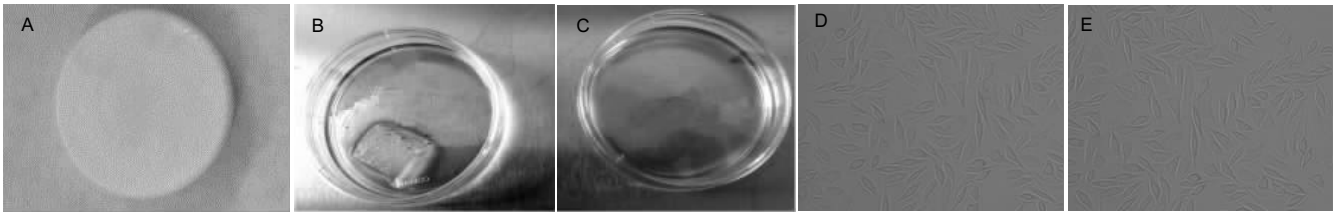


图 1 共培养前的小鼠成纤维细胞 L929 与聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶材料

Figure 1 Mouse fibroblasts L929 and polyethylene glycol diacrylate composite hydrogel before co-culture

图注: 图中 A 为聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶材料; B、C 分别为实验组与对照组培养皿; D、E 为小鼠成纤维细胞 L929, 细胞呈伴突起的梭形或星形的扁平状结构, 形态较小, 数目少, 密度小($\times 100$)。

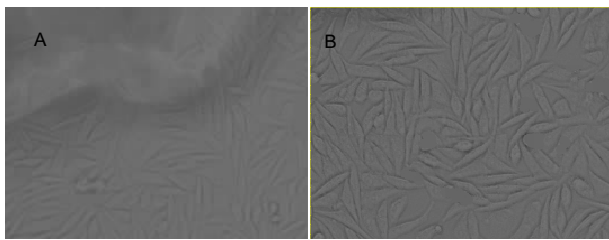


图 2 小鼠成纤维细胞与聚乙二醇双丙烯酸酯复合物水凝胶共培养 24 h 后的形态($\times 100$)

Figure 2 Morphological changes of mouse fibroblasts L929 co-cultured with polyethylene glycol diacrylate composite hydrogel for 24 hours ($\times 100$)

图注: 图中 A 为实验组, 左上方为材料, 材料周围细胞形态呈伴突起的梭形或星形的扁平状结构, 贴壁性生长, 细胞饱满且折光性强, 整体呈生长趋势, 细胞形态增大, 数目明显增多, 密度增大; B 为对照组, 细胞形态相较实验组更加饱满, 轮廓明显, 突起充分伸展。

表 1 各组光吸收值、细胞相对增殖率及毒性级别

Table 1 Absorbance value, relative proliferation rate and cytotoxicity of cells in each group

组别	1 d	2 d	3 d
100 μ L 材料浸提液组			
A 值($\bar{x}\pm s$)	0.353 \pm 0.013	0.612 \pm 0.434	1.401 \pm 0.020
细胞相对增殖率	76.80%	84.94%	97.69%
毒性分级	1	1	1
50 μ L 材料浸提液组			
A 值($\bar{x}\pm s$)	0.412 \pm 0.037	0.697 \pm 0.030	1.434 \pm 0.060
细胞相对增殖率	89.72%	96.79%	100%
毒性分级	1	1	0
对照组			
A 值($\bar{x}\pm s$)	0.459 \pm 0.024	0.720 \pm 0.032	1.434 \pm 0.059
细胞相对增殖率	100%	100%	100%
毒性分级	1	1	1
空白组 A 值($\bar{x}\pm s$)	0.002 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001	0.003 \pm 0.00

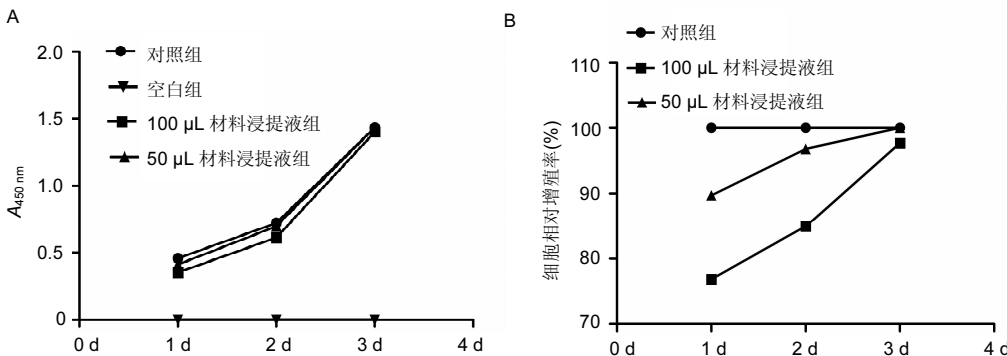


图 3 各组细胞增殖与细胞相对增殖率

Figure 3 Cell proliferation and the relative proliferation rate in each group

图注: 图中 A 为细胞增殖; B 为细胞相对增殖率, 培养 1 d 时, 两材料浸提液组与对照组细胞相对增殖率比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 3 d 时, 两材料浸提液组与对照组细胞相对增殖率比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

术后腔黏膜的恢复过程中, 水肿、结痂、粘连、分泌物、肉芽、上皮化形成及手术治疗效果方面无显著差异, 然而纳吸棉在术后鼻塞、鼻出血、疼痛、颜面水肿等主观症状方面明显优于膨胀海绵。Moon 等^[17]对 109 例鼻骨骨折患者分别填充纳吸棉与凡士林纱条的对照研究中发现, 纳吸棉在减轻患者术后疼痛方面优于对照组, 两者在止血、黏膜恢复、支撑塑性方面无明显差异, 因此对于鼻骨骨折患者术后填充物也可选择纳吸棉。因此理想的鼻腔填充材料具有止血效果好、快速, 机械力学性能好, 降解速度适宜、可生物降解吸收, 经济, 对术腔恢

复没有不良反应等优点^[18-19]。然而纳吸棉产于荷兰, 价格昂贵, 加重了患者经济负担。目前中国生物医药产业发展虽取得了一定成效, 但生物医药产业对经济发展和进步的推动作用仍然不足, 要开发出更多拥有自主知识产权的医药卫生科技成果, 促进医疗健康服务业的发展^[20]。因此学者致力于研发一种可满足上述条件的质优价廉拥有自主知识产权的国产鼻腔填充材料。

在临床上, 鼻腔填充材料与鼻腔黏膜接触时间为 2-15 d, 可降解吸收材料因其生物降解性能可长达 2 周左右, 因此临床应用前需对其进行生物材料相容性的评价,

对术后鼻腔黏膜恢复至关重要^[21]。评价材料生物相容性的方法,包括基因水平、细胞水平、组织水平等3个方面,而细胞毒性实验为最直观安全简便的评价方法,反映了材料与细胞间在分子水平的相互作用,其敏感性及特异性更高^[22]。国际标准对于细胞毒性评价方法有3种,浸提液法是使材料降解,观察其降解成分对细胞有无毒害性质;直接接触法为材料直接与细胞相接触的方法,直观下观察细胞形态变化。实验采用这两种方法更加全面且直观^[23]。区别传统的MTT法,浸提液法采用CCK-8比色法,CCK-8试剂中主要成分为水溶性四唑盐,是一种类似于MTT的化合物,在电子耦合试剂存在的情况下可被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的水溶性的甲臜,生成的甲臜能够直接溶解在培养基中,活细胞的数目越多则颜色越深。用酶联免疫检测仪在450 nm波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量^[24]。与传统MTT相比,浸提液法具有下列优点:使用方便,检测快速,灵敏度高,对细胞毒性小,为1瓶溶液,无需配置。

聚乙二醇双丙烯酸酯水凝胶是由聚乙二醇双丙烯酸酯、羧甲基壳聚糖和聚乙烯醇3者水溶液经光交联形成,光交联为常见且广泛使用的构建水凝胶的方式,其反应条件温和,过程容易控制,反应效率高,副产物少,并且研究表明光聚合水凝胶已在许多生物医学领域方面显示了其特有的潜力^[25]。实验中选用聚乙二醇二丙烯酸酯和氨水为原料,以最近发现的双键和胺基之间的迈克尔加成反应为基础,利用光聚合和冷冻干燥技术,制备聚乙二醇基水凝胶海绵。采用羧甲基壳聚糖和聚乙烯醇对聚乙二醇基水凝胶进行共混改性,使其孔结构和力学性能得到提高,并通过红外,扫描电镜对其进行表征^[26]。

实验中从培养细胞的形态观察(定性)和CCK-8检测(定量)两方面评价细胞毒性。在直接接触法实验中,24 h后细胞数量多,偶有悬浮死细胞,说明材料对细胞形态无影响,细胞相容性良好。在浸提液法实验中,在1, 2, 3 d时间点检测不同浓度水凝胶材料浸提液的细胞毒性均为1级,符合生物材料的安全评价标准。对结果进行分析,培养1 d时,两材料浸提液组与对照组细胞相对增殖率比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 3 d时,两材料浸提液组与对照组细胞相对增殖率比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。分析产生这种结果的原因,从细胞培养方面分析,接种细胞24 h时,随着材料浸提液浓度增加,浓度不同会对细胞的生长有一定的影响,然而随着细胞培养天数增加,细胞密度增大,材料浓度的变化对细胞没有影响。因而可认为该材料对于形态良好、状态稳定、排列紧密的细胞无影响;从材料方面性质而言,据多篇文献报道,聚乙二醇二丙烯酸酯、羧甲基壳聚糖和聚乙烯醇这3种物质具有良好的生物相容性^[27-40],然而对于其组成成分中的氨水在紫外线光照下若反应不完全,材料表面有残留,则浸提液中氨水呈碱性则会对细胞产生影响。因此要严格掌握紫外线照射下交联的

时间及材料组成成分的浓度控制,保证其充分反应。张晓丹^[11]通过迈克尔加成反应合成了壳聚糖/聚乙二醇双丙烯酸酯衍生物,得出壳聚糖与聚乙二醇双丙烯酸酯复合物膜具有亲水性、吸水性、柔软贴合等良好的生物性能,而且具有良好的细胞相容性,有利于细胞的生长和增殖。

综上所述,由聚乙二醇双丙烯酸酯、壳聚糖、聚乙烯醇材料三者通过光交联形成的复合物水凝胶材料细胞相容性良好,符合生物体应用的要求,使得临床研发更加质优价廉的鼻腔填充材料成为可能。

致谢: 感谢北京市耳鼻咽喉科研究所王鸿老师、张亮老师对此次实验完成的帮助。

作者贡献: 第一作者参与实验设计、实验实施、实验评估、资料收集及成文工作;第二、三作者协助第一作者进行资料收集;由通讯作者对文章进行审核。

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: 研究用材料学的实验方案符合相关伦理学要求,文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。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。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 韩德民.鼻内窥镜外科学[M].北京:人民卫生出版社,2001.
- [2] Massey CJ,Suh JD,Tessema B,et al.Biomaterials in Rhinology.Otolaryngol Head Neck Surg.2016;154(4):606-617.
- [3] Valentine R,Wormald PJ,Sindwani R.Advances in absorbable biomaterials and nasal packing.Otolaryngol Clin North Am. 2009;42(5):813-828.
- [4] Jeong HS, Lee HK, Kim HS, et al. A case-controlled, retrospective, comparative study on the use of biodegradable synthetic polyurethane foam versus polyvinyl acetate sponge after nasal fracture reduction. Int J Oral Maxillofac Surg. 2014; 43(6):717-721.
- [5] 李芳霞.聚氨酯-明胶/壳聚糖复合材料的制备及性能研究[D].西南交通大学,2014:72.
- [6] 陈寅生,侯春林,魏长征,等.羟丁基壳聚糖的生物相容性研究[J].生物骨科材料与临床研究,2015,12(3):14-17,81.
- [7] 雷智坚.聚乙烯醇/羟基磷灰石复合水凝胶修复膝关节软骨缺损的组织相容性[J].中国组织工程研究,2015,19(30): 4832-4836.
- [8] 周慧通,方大为,王波,等.冷冻干燥法制备CS/AMPS/PEGDA光交联多孔水凝胶及其性能[J].材料科学与工程学报,2015, 33(3): 432-437,441.

- [9] ISO 10993-5-2009医疗器械的生物学评价.第5部分:体外细胞毒性试验.
- [10] 李双奎.壳聚糖类鼻腔填塞止血材料的研究与制备[D].北京化工大学,2015:70.
- [11] 张晓丹.壳聚糖衍生物和聚乙二醇双丙烯酸酯混合材料的制备及其性能表征[D].北京化工大学,2009:67.
- [12] 吴邦耀,罗卓荆,孟浩,等.胶原-明胶支架材料交联改性的制备及细胞毒性实验研究[J].生物医学工程与临床,2007,11(6):420-425.
- [13] 初晓夏,王斌,王海涛,等.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.
- [14] Weber RK.Nasal packing and stenting. *Laryngorhinootologie*. 2009;88 Suppl 1: S139-55.
- [15] Kim YS,Kim YH,Kim NH,et al.A prospective, randomized, single-blinded controlled trial on biodegradable synthetic polyurethane foam as a packing material after septoplasty.*Am J Rhinol Allergy*.2011;25(2):e77-79.
- [16] Verim A,Senelidir L,Naiboğlu B,et al.Role of nasal packing in surgical outcome for chronic rhinosinusitis with polyposis. *Laryngoscope*.2014;124(7):1529-1535.
- [17] Moon SH,Baek SO,Jung SN,et al.Efficacy of biodegradable synthetic polyurethane foam for packing nasal bone fractures. *J Craniofac Surg*.2012;23(6):1848-1850.
- [18] Wang TC,Tai CJ,Tsou YA,et al.Absorbable and nonabsorbable packing after functional endoscopic sinus surgery: systematic review and meta-analysis of outcomes. *Eur Arch Otorhinolaryngol*.2015;272(8):1825-1831.
- [19] 张永杰,王彤,臧洪瑞.鼻腔硅胶扩张引流管临床应用观察[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2010,58(7):385-386.
- [20] 吴曙霞,刘伟,李玉霞,等.关于我国健康产业的概念内涵与发展前景的思考[J].中华健康管理学杂志,2015,9(5):390-392.
- [21] 谢阳江,陈恩涛,吴波,等.生物可吸收材料在关节骨折内固定中的生物相容性[J].中国组织工程研究,2016,20(34):5076-5081.
- [22] 林红赛,王春仁,王志杰,等.生物材料的细胞生物相容性评价方法的研究进展[J].中国医疗
- [23] 吴邦耀.新型组织工程神经支架材料的生物安全性评价[D].第四军医大学,2008:66.
- [24] 邹颖,王文梅,朱雅男,等.CCK-8法评价口腔粘结材料的体外细胞毒性研究[J].口腔医学研究,2011,27(8):673-675.
- [25] 谭帼馨,王迎军,关燕霞.聚乙二醇双丙烯酸酯的紫外光聚合[J].高分子材料科学与工程,2008,24(10):33-36.
- [26] 侯丹丹,郝彤,叶霖,等.通过麦克加成反应形成的三臂聚乙二醇丙烯酸酯可注射水凝胶的制备与表征[J].高分子学报,2008,1(4):388-393.
- [27] 侯立刚,杨建义.骨修复中应用的生物降解可吸收材料[J].中国组织工程研究,2016,20(3):441-445.
- [28] 刘水莲,周洋,陈福花,等.新型羧甲基壳聚糖水凝胶流变性能,药物释放及细胞相容性研究[J].化学学报,2015,73(1):47-52.
- [29] 饶思奇.壳聚糖/聚乙二醇水凝胶的制备及其性能研究[D].湖北大学,2014:66.
- [30] Zeng T,Zhang Y,Yan Q,et al.Construction and in vitro evaluation of enzyme nanoreactors based on carboxymethyl chitosan for arginine deprivation in cancer therapy.*Carbohydr Polym*.2017;162:35-41.
- [31] Jena SK,Samal SK,Kaur S,et al.Potential of amphiphilic graft copolymer α -tocopherol succinate-g-carboxymethyl chitosan in modulating the permeability and anticancer efficacy of tamoxifen.*Eur J Pharm Sci*.2017;101:149-159.
- [32] Vo DT,Sabrina S, Lee CK.Silver deposited carboxymethyl chitosan-grafted magnetic nanoparticles as dual action deliverable antimicrobial materials.*Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*.2017;73:544-551.
- [33] Ni S,Xie Y,Tang Y,et al.Nebulized anionic guanidinylated O-carboxymethyl chitosan/N-2-hydroxypropyltimehyl ammonium chloride chitosan nanoparticles for siRNA pulmonary delivery: preparation, characterization and in vitro evaluation.*J Drug Target*. 2017:1-12.
- [34] Wang X,Wei B,Cheng X,et al.3-Carboxyphenylboronic acid-modified carboxymethyl chitosan nanoparticles for improved tumor targeting and inhibitory.*Eur J Pharm Biopharm*. 2017.pii:S0939-6411(16)30265-X.doi: 10.1016/j.ejpb.2016.12.034.[Epub ahead of print]
- [35] Tu L,Wang M,Zhao WY,et al.miRNA-218-loaded carboxymethyl chitosan - Tocopherol nanoparticle to suppress the proliferation of gastrointestinal stromal tumor growth. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*.2017;72:177-184.
- [36] Jena SK,Sangamwar AT.Corrigendum to "Polymeric micelles of amphiphilic graft copolymer of α -tocopherol succinate-g-carboxymethyl chitosan for tamoxifen delivery: Synthesis, characterization and in vivo pharmacokinetic study" [*Carbohydr. Polym.* 151 (2016) 1162-1174].*Carbohydr Polym*.2017;157:904.
- [37] Song L,Li L,He T,et al.Peritoneal adhesion prevention with a biodegradable and injectable N,O-carboxymethyl chitosan-aldehyde hyaluronic acid hydrogel in a rat repeated-injury model.*Sci Rep*.2016;6:37600.
- [38] Wongkom L,Jimtaisong A.Novel biocomposite of carboxymethyl chitosan and pineapple peel carboxymethylcellulose as sunscreen carrier.*Int J Biol Macromol*. 2017;95:873-880.
- [39] Yu S,Zhang X,Tan G,et al.A novel pH-induced thermosensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer cross-linked by glutaraldehyde for ophthalmic drug delivery.*Carbohydr Polym*.2017;155:208-217.
- [40] Lin Q,Huo Q,Qin Y,et al.Development of ligustrazine hydrochloride carboxymethyl chitosan and collagen microspheres: Formulation optimization, characterization, and vitro release.*Bioengineered*.2017;8(1):55-60.