

鼻腔黏膜修复敷料的生物学评价

李晓春, 王莉芳, 郑旭, 徐长根

(陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 考察鼻腔黏膜修复敷料的生物安全性。方法 按照医疗器械生物学评价标准中的迟发型超敏反应试验、体外细胞毒性试验、刺激性试验分别对3个厂家的鼻腔黏膜修复敷料进行安全性评价。结果 3批鼻腔黏膜修复敷料的安全性检查结果均符合规定。结论 3批鼻腔黏膜修复敷料安全、可用。

关键词:鼻腔黏膜; 修复敷料; 医疗器械; 生物安全性评价

中图分类号: R965.3; R765.25

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)17-0010-04

Biological Evaluation of Nasal Mucosa Repair Dressings

Li Xiaochun, Wang Lifang, Zheng Xu, Xu Changgen

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To investigate the biological safety of the nasal mucosa repair dressings. **Methods** According to the standard of medical devices biological evaluation, 3 batches of nasal mucosa repair dressings from different manufacturers were tested by delayed-type hypersensitization test, *in vitro* cytotoxicity test and irritation test. **Results** The results of safety tests of the 3 batches of nasal mucosa repair dressings were in accordance with the standards. **Conclusion** The 3 batches of nasal mucosa repair dressings were safe and feasible.

Key words: nasal mucosa; repair dressings; medical devices; biological safety evaluation

《医疗器械监督管理条例》明确提出,国家对医疗器械按照风险程度实行分类管理。第一类是风险程度低,实行常规管理可以保证其安全、有效的医疗器械;第二类是具有中度风险,需要严格控制管理,以保证其安全、

有效的医疗器械;第三类是具有较高风险,需要采取特别措施严格控制管理,以保证其安全、有效的医疗器械。根据2017年8月颁布的《医疗器械分类目录》,鼻腔黏膜修复敷料属于无源植入器械中的组织工程支架材料,

第一作者: 李晓春, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为食品药品检验及药理学, (电话) 029-62288455 (电子信箱) lxc2009@126.com。

本研究中, 由于黄芪桂枝五物汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、桂皮醛和芍药苷化学成分的性质不同, 煎煮过程溶出规律有较大差异。目前, 通过熵权法综合考虑各个指标的影响评价整个提取过程, 可靠性好^[12], 但是每个指标的重要程度不相同。需要综合考虑确定黄芪桂枝五物汤中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷哪个是发挥疗效的主要成分, 以及臣药桂枝和白芍中的桂皮醛和芍药苷的重要程度, 并对每个指标赋予权重, 计算综合评价价值, 才能更全面地优化煎煮时间。

参考文献:

- [1] 张雨晴, 钟小雪. 何庆勇副教授运用黄芪桂枝五物汤的学术思想初探[J]. 中国中医急症, 2017, 26(1): 53-55.
- [2] 王红, 韩兆莹, 吕佳奇, 等. 黄芪桂枝五物汤临床应用研究[J]. 中医药学报, 2014, 42(1): 105-107.
- [3] 陈倩, 李旭明, 阚东方, 等. 黄芪及其有效成分对上焦水饮内停大鼠的影响[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5186-5193.
- [4] 尹亮亮, 刘子琛, 李慧, 等. 不同产地肉桂及桂枝中有效成分的分析[J]. 中草药, 2007, 38(7): 1094-1096.
- [5] 杜伟锋, 胡淑珍, 吴芳, 等. 不同等级杭白芍中3个有效成

分的考察[J]. 中成药, 2014, 36(2): 358-362.

- [6] 罗云, 赵国巍, 梁新丽, 等. 银翘散水煎液煎煮过程化学特征图谱及指标成分含量变化规律的研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 60-64.
- [7] 饶毅, 张五萍, 魏惠珍, 等. 不同煎煮方法对麻杏石甘汤中成分变化研究[J]. 中成药, 2014, 36(2): 337-341.
- [8] 韩兆莹, 田明, 刘珍, 等. 黄芪桂枝五物汤的药理研究现状[J]. 黑龙江医药, 2013(5): 777-779.
- [9] Wang KH, Wu JR, Zhang D, et al. Comparative efficacy of Chinese herbal injections for treating chronic heart failure: a network meta-analysis[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18: 41.
- [10] 施旭光, 许晓峰, 朱伟, 等. HPLC测定黄芪桂枝五物汤及方中药对的黄芪甲苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 20-22.
- [11] 张利青, 张占刚, 付岩, 等. 桂皮醛药理作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23): 4568-4572.
- [12] 尹斐, 杨洁红, 方雨晨, 等. 基于2种分析方法的补阳还五汤中有效成分提取工艺优化研究[J]. 中草药, 2018, 49(1): 135-141.

(收稿日期: 2018-02-23)

属Ⅲ类医疗器械。本研究中按照 GB/T 系列标准对 3 批鼻腔黏膜修复敷料进行了细胞毒性、迟发型过敏及刺激等生物学评价^[1-4]。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

材料、药品与试剂:鼻腔黏膜修复敷料分别选择 3 个不同厂家生产的,每个厂家各选 1 批,共 3 批,记为 A、B、C 批。高密度聚乙烯(批号为 K0M357,符合美国药典标准);氯化钠注射液(批号为 160130 3G,西安京西双鹤药业有限公司);优级胎牛血清(批号为 TBD21HY,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);RPMI 培养基(批号为 AB10125297,HyClone);青链霉素混合液(100×,批号为 20170503,Solarbio);胰蛋白酶(批号为 SLBP8607V,Sigma);无菌磷酸盐缓冲液(PBS,批号为 05E16B21,武汉博士德生物工程有限公司);滤器(0.22 μm,批号为 R6EA47847,Millipore);二甲基亚砜(DMSO,分析纯,批号为 20171114,国药集团化学试剂有限公司);噻唑蓝(MTT,批号为 MKBN7264V,Sigma)。

细胞及动物:细胞株[小鼠成纤维细胞(L929 细胞),编号为 CX0187,武汉博士德生物工程有限公司];白化豚鼠(Dunkin Hartley)、新西兰兔,均由西安市迪乐普生物资源开发有限公司提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(陕)2014-001。饲养环境为温度 22~26℃,相对湿度 40%~70%,实验动物使用许可证号为 SYXK(陕)2013-001,均由陕西省食品药品监督检验研究院实验动物管理委员会按照该院实验动物福利伦理审查委员会章程批准实施。

仪器:BS2202S 型电子天平(赛多利斯仪器有限公司);BSP-250 型生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);KA-1000 型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);SW-CJ-2F 型医用净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司);HF151 型 CO₂ 培养箱(上海力康医疗设备有限公司);XSZ-D2 型倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂);Versa Max0310-3264 型酶标仪(美国分子仪器有限公司);LDZF-50KB-II 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂)。

1.2 方法

1.2.1 迟发型超敏反应封闭贴敷试验^[1,5]

健康、初成年普通级白化豚鼠,雌雄不限,体质量 300~500 g,35 只。30 只作为试验组(A、B、C 组),每个样品 10 只;5 只作为对照组。试验前,剔除豚鼠背部被毛。

诱导阶段:试验组用吸收性纱布浸透供试品原液 1 mL,局部贴敷于每只动物的左上背部位。6 h 后除去包扎带和纱布。1 周中连续 3 d 重复该步骤,同法操作 3 周。对照组以 0.9% 氯化钠注射液同法操作。

激发阶段:最后 1 次诱导贴敷后 14 d,用供试品和 0.9% 氯化钠注射液对全部动物进行激发。方法同上,贴敷于每只动物去毛的未试验部位。6 h 后除去包扎带和纱布。

动物观察:激发后 24 h 剃去激发部位及其周围的被毛,温水洗净,擦干。脱毛后至少 2 h,按 Magnusson 和 Kligman 分级对试验部位评分,其中无明显改变为 0 级,散发性或斑点状红斑为 1 级,中度融合性红斑为 2 级,重度红斑和水肿为 3 级。并在除去纱布后 48 h 进行再次评分。

1.2.2 体外细胞毒性试验(MTT 法)^[2-4,6]

试验样品及试液制备:无菌条件下将鼻腔黏膜修复敷料与含血清培养基按 0.2 g/mL 的比例于 37℃ 浸提 24 h 后 2000 r/min 离心 5 min,取上清液,得供试液。取高密度聚乙烯(厚度为 1 mm)36 cm²,剪成 5 mm×25 mm 的小块,加 12 mL 细胞生长培养液,37℃ 浸提 24 h,过滤除菌,得阴性对照液。5% 的 DMSO 溶液,过滤除菌,现用现配,得阳性对照液。同细胞生长培养液,得空白对照液。

细胞悬液制备:将已培养 48~72 h 生长旺盛的细胞用消化液消化后加入细胞培养液,吸管吹打,混匀,用血细胞计数板在显微镜下计数,按公式计算细胞密度, $C = n/4 \times 10^4$,式中 C 为细胞密度,单位为个/mL; n 为计数板四角四大格内细胞总数,单位为个。根据实测细胞密度,加入适量细胞生长培养液配制成试验要求密度的细胞悬液,备用。

方法:将配制好的细胞悬液接种于 96 孔培养板,设空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和供试品组(A、B、C 组),每组各设至少 6 孔,每孔接种 100 μL 细胞悬液。置 CO₂ 培养箱(含体积分数 5% CO₂ 气体)37℃ 培养 24 h 后,弃去原培养液。空白对照组加入新鲜空白对照液,阴性对照组加入阴性对照液,阳性对照组加入阳性对照液,供试品组加入相应的供试液,每孔 100 μL,置 CO₂ 培养箱继续培养 72 h 后置显微镜下观察细胞形态。每孔加入 20 μL 质量浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液,继续培养 4 h 后弃去孔内液体,加入 150 μL DMSO,置振荡器上振荡 10 min,在酶标仪 570 nm 和 630 nm 波长下测定吸光度,按公式计算相对增殖率(RGR)。 $RGR = A/A_0 \times 100\%$,式中 RGR 为相对增殖率(%), A 为供试品组(阳性及阴性对照组)吸光度, A_0 为空白对照组吸光度。 RGR 按细胞毒性反应分级判定毒性反应分级,0 级相对增殖率 $\geq 100\%$,1 级相对增殖率为 80%~99%,2 级相对增殖率为 50%~79%,3 级相对增殖率为 30%~49%,4 级相对增殖率为 0~29%。

1.2.3 黏膜刺激试验^[1]

取健康、初成年普通级新西兰兔,雌雄不限,体质量

不低于 2 kg。选取鼻腔无明显刺激症状、无缺陷和无损伤的家兔 12 只,供试品组(A,B,C 组)和对照组各 3 只。供试品组将受试物原液 0.3 g 涂抹至鼻腔内,24 h 内不冲洗,对照组以 0.9% 氯化钠注射液 0.5 mL 同法处理。每隔 24 h 重复上述操作,连续 14 d。观察记录鼻腔黏膜刺激情况。末次接触后 24 h,无痛处死动物,解剖鼻腔组织,纵向切开,肉眼观察黏膜组织的刺激情况。选取中央部位,经脱水、包埋、切片、HE 染色,LEICA 生物显微镜观察^[7]。按表 1 规定的计分系统对组织进行评分。试验组动物显微镜评价计分相加后再除以观察总数即得试验组平均计分,最大计分为 16 分,对照组同法计算。试验组平均计分减对照组平均记分即得刺激指数。刺激指数 0 分为无反应,1~4 分为反应程度极轻,5~8 分为反应程度轻度,9~11 分为反应程度中度,12~16 分为反应程度重度。

表 1 鼻腔黏膜组织反应显微镜计分系统(分)

反应	计分	反应	计分
上皮		血管充血	
正常,完好无损	0	无	0
细胞变性或变扁平	1	极少	1
组织变形	2	轻度	2
局部糜烂	3	中度	3
广泛糜烂	4	重度伴血管破裂	4
白细胞浸润(每个高倍视野)		水肿	
无	0	无	0
极少(少于 25)	1	极少	1
轻度(26~50)	2	轻度	2
中度(51~100)	3	中度	3
重度(>100)	4	重度	4

2 结果

2.1 迟发型超敏反应试验结果

于激发后 24 h 及 48 h 观察,供试品组及对照组中豚鼠的反应等级均为 0,表明 3 批鼻腔黏膜修复敷料在本试验条件下对豚鼠皮肤无致敏反应。结果见表 2。

表 2 迟发型超敏反应试验结果(只)

组别	动物数	激发后 24 h 等级	激发后 48 h 等级	等级
A 组	10	0	0	0
B 组	10	0	0	0
C 组	10	0	0	0
对照组	5	0	0	0

2.2 体外细胞毒性试验结果

结果见表 3。在本试验条件下,阳性对照组细胞毒性反应级别为 3 级,阴性对照组细胞毒性反应级别为 0 级,试验系统有效。3 批鼻腔黏膜修复敷料的细胞毒性反应级别均不大于 2 级,在标准可接受范围内。

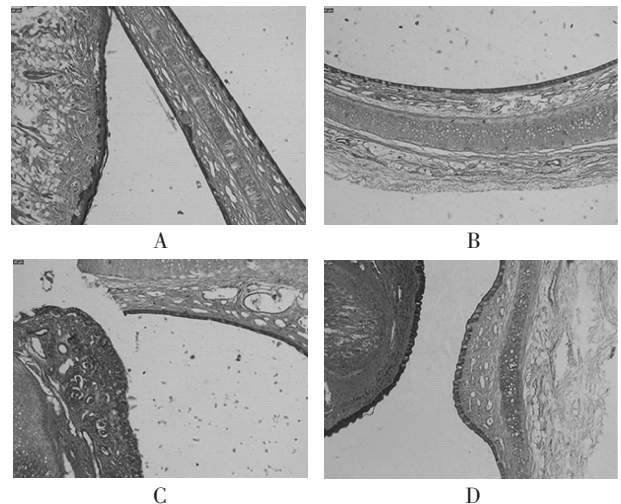
表 3 细胞毒性试验结果

组别	RGR(%)	反应分级	组别	RGR(%)	反应分级
A 组	68.23	2	阴性对照组	110.72	0
B 组	75.86	2	阳性对照组	32.47	3
C 组	62.37	2			

注:RGR 为相对增殖率。

2.3 黏膜刺激性试验结果

病理检查结果显示,对照组黏膜层上皮结构完整,固有层可见极少量炎性细胞浸润,少数血管充血及极轻度水肿,平均计分为 2.33 分;试验组黏膜层上皮结构完整,固有层可见极少量炎性细胞浸润,轻度血管充血及极轻度水肿,试验组 A 批平均计分为 4.0 分,平均刺激指数为 1.67;试验组 B 批平均计分为 5.33 分,平均刺激指数为 3.0;试验组 C 批平均计分为 4.67 分,平均刺激指数为 2.33。结果表明,在本试验条件下,3 批鼻腔黏膜修复敷料均有极轻度黏膜刺激,病理检查结果见图 1,反应计分及程度见表 4。



A. A 组 B. B 组 C. C 组 D. 对照组

图 1 各组家兔鼻腔黏膜组织 HE 染色图(×100)

表 4 黏膜刺激性试验结果

组别	观察计分(分)	平均计分(分)	平均刺激指数	反应程度
A 组	0	4.00	1.67	极轻
B 组	0	5.33	3.00	极轻
C 组	0	4.67	2.33	极轻
对照组	0	2.33		

3 讨论

随着鼻内镜手术技术的提高和普及,鼻科学的发展进入了一个新时代,成为治疗鼻疾病的主要手段之一。在提高治愈率的同时,术后填塞、止血、修复材料的选择也至关重要,成为近年来鼻科学研究的发展方向^[8]。本研究中的鼻腔黏膜修复敷料的主要成分是甲壳素[Chitin, (1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖],是自然界中除纤维素外含量最丰富的天然多糖,也