

PEO/PVA 水凝胶伤口敷料的 毒性和疗效评价 *

杨占山 朱南康 杨淑琴 米志苏

(苏州医学院放射医学系 苏州 215007)

摘要 为了评价经冻融循环处理和电子束辐射交联接枝技术合成的聚氧化乙烯与聚乙烯醇 (PEO/PVA) 混合物水凝胶伤口敷料的性能, 研究了该水凝胶膜对机体和细胞的毒性以及对皮肤伤口的愈合作用。毒性作用通过急性全身毒性试验、细胞毒性试验和皮肤斑贴试验检测。细胞毒性试验应用高敏感性的成纤维细胞持续培养 7d 的 RPMI-1640 培养系统, 检测细胞生长抑制和镜下细胞形态学变化。结果显示, PEO/PVA 水凝胶敷料没有引起机体任何急性毒性反应以及皮肤刺激与致敏反应; 细胞增殖抑制指数和镜下细胞形态与正常对照细胞无任何差异。伤口愈合试验是将水凝胶敷料覆盖于大鼠背部烧伤处, 与医用纱布敷料处理比较, 伤口愈合时间明显缩短 ($p < 0.01$); 更换敷料容易, 即更换敷料时对新生上皮和肉芽组织无损伤破坏作用; 没有敷料残余物滞留于伤口。结果证实, PEO/PVA 混合物水凝胶伤口敷料具有良好的生物相容性, 并且该水凝胶膜可有效地加速伤口愈合。

关键词 PEO/PVA 水凝胶, 伤口敷料, 毒性, 疗效

中图分类号 R818.03

近年来, 水凝胶作为生物材料的研究引起人们的关注, 例如, 水凝胶材料已用于隐型眼镜, 药物释放系统以及伤口敷料等领域^[1~3]。我们应用冻融循环和电子束辐射交联接枝技术制备了一种新型的水凝胶伤口敷料, 即聚氧化乙烯 (PEO) 与聚乙烯醇 (PVA) 混合物水凝胶膜。研究证实, 该水凝胶膜具有良好的理化性能, 如适度的凝胶分数、溶胀度、断裂伸长率和理想的抗张强度^[4]。PEO 水凝胶膜具有良好的亲水性和通透性, 允许水和氧气通过而不允许细菌通过^[5]。然而, 有关伤口敷料的毒性研究表明, 某些高分子化合物组成的伤口敷料具有不同程度的细胞毒性作用^[6]。高分子聚合物经辐射合成的水凝胶膜作为现代伤口敷料, 必须具有良好的生物相容性, 表现为对机体和组织细胞无任何毒性和刺激作用。同时, 对创伤和烧伤等皮肤损伤应有加快愈合的作用。因此, 我们对 PEO/PVA 水凝胶膜的毒性及其对伤口的愈合作用进行了研究和评价。

1 材料和方法

1.1 PEO/PVA 混合物水凝胶伤口敷料的制备

PEO 和 PVA 分别购自日本 Meisei Kagaku Kogyo 和 Kuraray 有限公司。PEO 分子量为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$, PVA 的聚合度和皂化度分别为 1700 和 98%~99%。PEO/PVA 混合物溶液

* 中国核工业科学基金资助 (Y7196Q6201)

收稿日期: 初稿 1999-08-17, 修回 1999-11-19

的质量分数为 20%, 其中 PVA 含量为 30%。经两次冻融循环处理, 然后应用上海原子核研究所制造的电子加速器辐照交联接枝, 电压为 1.7MeV, 电流为 10mA, 剂量率为 20kGy/ 每次通过, 照射剂量为 40~60kGy。制备方法详见文献 [4], 水凝胶样品置 4°C 冰箱保存。使用前应用 ^{60}Co γ 射线辐射灭菌, 剂量为 25kGy。

1.2 细胞毒性试验

用含 10% FCS 的 RPMI-1640 体系培养 L-929 小鼠成纤维细胞, 取传代 48~72h 指数生长期细胞接种于培养瓶, 细胞浓度为 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 。培养 24h 后弃原培养液, 对照组加入 RPMI-1640 培养液 1mL, 实验组加入含 50% 水凝胶供试液的细胞培养液 1mL。水凝胶供试液按水凝胶表面积每 6cm^2 加入细胞培养液 1mL 置 37°C 24h 获得。培养至第 2、4、7d, 每组各取 3 瓶进行细胞形态学观察和细胞计数。细胞增殖抑制指数 (CPII) 按下式计算

$$\text{CPII}(\%) = 100\% - \frac{\text{实验组细胞密度均值}}{\text{对照组细胞密度均值}} \times 100\%$$

1.3 急性全身毒性试验

采用近交系昆明种雄性健康小白鼠, 体重 $19 \pm 2\text{g}$ 。动物随机分为实验和对照两组, 每组 5 只。水凝胶供试液按水凝胶表面积每 3cm^2 加入 0.9% 无菌无热原的氯化钠注射液 1mL, 在 60°C 浸提 8h 获得。实验组小鼠经尾静脉注入供试液 0.05mL/g , 注射速度为 0.1mL/s 。对照组注入等量 0.9% 氯化钠注射液。注后分别于 0、4、24、48、72h 观察记录两组动物的一般状态、毒性反应和死亡动物数。

1.4 皮肤斑贴试验

采用健康新西兰兔, 体重 2.1kg 。剪去脊柱两侧毛, 范围各约 $3\text{cm} \times 3\text{cm}$ 。将水凝胶一式三块贴敷于一侧皮肤, 用油纸覆盖, 纱布固定。另一侧涂赋形剂作为对照。每组贴敷 12h。贴敷结束用温水洗去残余物, 并于 0、4、24、48、72h 观察皮肤局部反应, 如红斑、水肿及其程度和范围。

1.5 伤口愈合试验

采用 Wistar 健康大白鼠, 随机分为两组, 每组 6 只动物。用 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 剂量为 $1\mu\text{L/g}$ 。背部去毛, 面积为 10%, 汽油烧伤 20s, 经病理切片检查创面为深 II 度烧伤。伤口用水凝胶敷料覆盖, 以临床常规使用的医用纱布敷料作为对照 [7]。每隔 3~4d 更换敷料一次, 并于伤后 4、7、11、14、18、21d 测量伤口面积。伤口面积以 cm^2 和百分数表示, 应用 t 检验进行统计学显著性分析。

2 结果和讨论

生物材料的细胞毒性可用各种培养系统检测。液体培养系统通过细胞与生物材料浸提液或与生物材料本身的培养来检测细胞毒性, 而更换培养液将移除或稀释已释放的细胞毒性产物; 琼脂培养基是一种短期的半固体培养系统, 它对生物材料的细胞毒性只能通过无细胞环状带的存在来鉴定。因此, 我们应用了一种高敏感性的液体培养系统进行了详细的试验。高敏感性来自培养 7d 不需更换培养液的 L-929 系成纤维细胞培养系统; 详细的试验来自准确的细胞计数和镜下形态学观察以检测细胞的增殖能力。此外, 按 1993 年国家标准 GB/T 14233.2, 供试品表面积每 1cm^2 加入细胞培养液 10mL, 而我们按水凝胶表面积每 6cm^2 加入细胞培养液 1mL, 故所得浸提液浓度更高, 细胞毒性实验结果则更可靠。实验结果显示, 在成纤维细胞培养的第 2、4、7 天, PEO/PVA 水凝胶实验组诱导的 CPII(%) 分别为 -2.0 ± 3.6 , -2.3 ± 4.2 和

-0.7±1.5, 表明水凝胶实验组没有引起有意义的成纤维细胞增殖抑制。同时, 与纱布对照组细胞镜下形态比较, 水凝胶实验组成纤维细胞贴壁生长良好, 形态未见异常。这些结果表明, 高分子 PEO/PVA 水凝胶伤口敷料对体外培养细胞无任何毒性, 显示其良好的细胞相容性。

在体外细胞毒性试验的基础上, 我们进一步检测了 PEO/PVA 水凝胶敷料对机体的急性毒性试验。PEO/PVA 水凝胶供试液含有 3.1%~4.5% 未交联的 PEO/PVA, 两者属高分子聚合物, 一般不能通过皮肤和组织毛细血管吸收进入体内。我们将该水凝胶浸提液注入小鼠体内, 并于注后 0~72h 观察全身毒性反应。结果显示, 实验组动物未出现任何毒性反应和死亡, 与对照组比较未见异常。表明该水凝胶敷料没有引起全身急性毒性反应, 显示其良好的生物相容性。

局部皮肤斑贴试验的结果显示, 实验组在连续 72h 的观察期间, 未见皮肤红斑和水肿, 两者积分为零, 与对照组比较未见异常。表明 PEO/PVA 水凝胶敷料对皮肤组织无刺激作用和致敏反应。

有关 PEO、PVA 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 为主要成分合成的水凝胶膜对伤口愈合作用的研究表明, 与医用纱布处理组或伤口空气暴露组比较, 伤口愈合时间缩短, 愈合率增加, 换药次数减少, 病人疼痛等不适感减轻^[5,7,8]。PEO/PVA 水凝胶敷料对伤口的愈合作用列于表 1。结果显示, 与纱布对照组比较, 自伤后第 4~21 天, 伤口面积明显减少 ($p < 0.01$)。至伤后第 21 天, 纱布组伤口面积减至 25.7%, 而水凝胶组伤口面积减至 8.3%, 愈合时间明显提前。该水凝胶敷料不粘连伤口, 没有残余物滞留于伤口; 可吸收伤口渗出液, 而未见辐照猪皮敷料覆盖伤口所引起的渗出液滞留; 容易更换, 不损伤新生的上皮和肉芽组织; 该水凝胶膜本身不宜断裂, 适合临床使用。而纱布敷料易与伤口粘连形成结痂, 更换时易于损伤新生组织, 导致伤口愈合延迟。表明该水凝胶敷料对伤口具有加速愈合的作用, 这可能与该水凝胶为伤口提供的适度湿环境有利于烧伤愈合有关。伤口愈合试验亦进一步证实, 该水凝胶膜对皮肤损伤组织细胞无刺激、致敏和毒性作用, 表明该水凝胶膜具有良好的生物相容性。

Tab.1 Healing effect of the gauze and the hydrogel dressing on the wound ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Time /d	Wound area /cm ²	Dressed by gauze /%	Wound area /cm ²	Dressed by hydrogel /%
0	26.84±0.46	100.0	26.98±0.44	100.0
4	26.88±0.37	100.1	25.24±0.96 ⁽¹⁾	93.6
7	24.30±0.34	90.5	21.98±0.86 ⁽¹⁾	81.5
11	21.76±0.55	81.1	19.14±0.77 ⁽¹⁾	70.9
14	18.68±0.48	69.6	13.43±0.75 ⁽¹⁾	50.0
18	12.92±0.29	48.1	8.82±0.65 ⁽¹⁾	32.7
21	6.90±0.43	25.7	2.25±0.55 ⁽¹⁾	8.3

⁽¹⁾ $p < 0.01$, compared with the corresponding gauze group

3 结 论

通过敏感可靠的体内外毒性试验和烧伤愈合试验, 表明经冻融循环和辐射交联接枝技术合成的 PEO/PVA 水凝胶伤口敷料对机体和细胞无毒性作用, 对正常或损伤皮肤组织无刺激和致敏作用, 与医用纱布比较可明显促进伤口快速愈合。这些结果证实该水凝胶膜具有良好的生物相容性、通透性、机械强度和伤口愈合作用, 是一种具有良好理化和生物学性能以及应用前景的水凝胶伤口敷料。

参 考 文 献

- 1 Peppas N A, Scott J E. J Control Release, 1992, 18:95-100
- 2 Harsh D C, Gehrke S H. J Control Release, 1992, 17:175-181
- 3 Rosiak J M, Olejniczak J. Radiat Phys Chem, 1993, 42:903-906
- 4 Yang Z S, Zhu N K, Yang S Q. J Radiat Res Radiat Proces (in Chinese), 1999, 17(4):214-218
- 5 Corkhill P H, Hamilton C J, Tighe B J. Biomaterials, 1989, 10:3-10
- 6 van Luyn M J A, van Wachem P B, Nieuwenhuis P *et al.* Biomaterials, 1992, 13(5):267-275
- 7 Yoshii F, Makuuchi K, Darwis D *et al.* Radiat Phys Chem, 1995, 46:169-174
- 8 Rosiak J M. Radiation Effects on Polymers, chap. 17, ACS Series 475. Washington, D C: ACS, 1991, 271-285

TOXICITY AND HEALING EFFECT OF PEO/PVA HYDROGELS AS WOUND DRESSINGS

YANG Zhanshan ZHU Nankang YANG Shuqin MI Zhisu

(*Institute of Radiation Medicine, Suzhou Medical College, Suzhou 215007*)

ABSTRACT Toxicity and healing effect of poly(ethylene oxide) (PEO)/poly(vinyl alcohol) (PVA) blend hydrogel films as wound dressings were evaluated. Toxicity testing is checked by acute general toxicity, in vitro cytotoxicity and sticking on skin assay. We used a highly sensitive 7 d RPMI-1640 cell culture with fibroblasts as cytotoxicity test system. Cytotoxicity is assessed by monitoring cell growth inhibition, supported by cell morphological evaluation using light microscopy (LM). It was shown that PEO/PVA blend hydrogels did not induce any acute general toxic effects on mice and an allergic reaction for rabbit skin. The cell growth inhibition and morphology at the LM level were the very same as those of the control culture. To evaluate the healing effect of the blend hydrogels on burn, the hydrogels covered a wound formed on the back of rats. As compared with the corresponding gauze dressing group, the healing under the wet environment of the hydrogel dressing had some advantages: the wound healing is faster ($p < 0.01$); it is easier to change the dressing without any damage to the regenerated surface and no dressing material remains on the wound. It is concluded that PEO/PVA blend hydrogel films may be considered as truly biocompatible, and the wet environment formed by the hydrogels is effective for fast healing of wound.

KEYWORDS PEO/PVA hydrogel, Wound dressings, Toxicity, Healing effect

CLC R818.03