

羧甲基壳聚糖锌亚急性毒性研究

胡 芮¹, 姜惠萍², 宋亚楠¹, 刘万顺¹, 韩宝芹^{1*}

¹中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003; ² 青岛博益特生物材料股份有限公司, 青岛 266101

摘要: 为评价羧甲基壳聚糖锌的亚急性毒性, 30 只雌雄各半的昆明种小鼠随机分为实验组 1、实验组 2 和对照组, 以两种不同锌离子络合量的羧甲基壳聚糖锌为材料, 制取生理盐水浸提液, 对实验组 1 和实验组 2 小鼠腹腔注射浸提液 28 d, 测定体重、相关血液生化指标、相关脏器指数, 并进行各器官病理学检查。结果表明实验过程中各组小鼠基本生理状况均表现正常, 实验结束后实验组 1 雄性小鼠血清 ALP 和 UA 含量均低于对照组, 呈显著性差异 ($P < 0.05$), 实验组 2 雄性小鼠血清 UA 含量低于对照组, 呈显著性差异 ($P < 0.05$), 其它血清生化指标与对照组比较无显著性差异。实验组 2 雌性小鼠肾脏指数高于对照组, 差异显著 ($P < 0.05$), 两实验组小鼠其它脏器指数均正常, 与对照组比较无显著性差异。各组雌雄小鼠心、肝、脾、肺、肾以及胸腺外观观察与病理切片观察均未见明显病变, 表明两种羧甲基壳聚糖锌对小鼠未表现明显的毒副作用。

关键词: 羧甲基壳聚糖锌; 亚急性; 腹腔; 血液生化指标

中图分类号: R992

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.08.002

Subacute Toxicity of Carboxymethyl Chitosan-zinc

HU Rui¹, JIANG Hui-ping², SONG Ya-nan¹, LIU Wan-shun¹, HAN Bao-qin^{1*}

¹College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

²Boyite Biological Material Co., LTD, Qingdao 266003, China

Abstract: In order to evaluate the subacute toxicity of carboxymethyl chitosan-zinc, thirty Kunming mice, half male and half female, were divided into three groups: experimental group 1, experimental group 2 and control group. The saline maceration extract was made from two kinds of carboxymethyl chitosan-zinc complexes with different content of zinc ions. Mice of experimental groups were given maceration extract by intraperitoneal injection for 28 days, while control group mice were given the same daily amount of normal saline. After that, the weight, related blood biochemical indexes and viscera indexes of mice were measured and pathological examination of organs was done. The results showed that the basic physiological state of all mice was normal in the experiment, but at the end of experiment, the serum content of ALP and UA in the male mice of experimental group 1 was significant lower than that of control group ($P < 0.05$); the serum content of UA in the male mice of experimental group 2 were significant lower than that of control group ($P < 0.05$); no significant statistical difference was detected on other serum biochemical indexes between experimental groups and control group; the renal index of female mice in experimental group 2 was significant higher than that of control group ($P < 0.05$), while other visceral indexes of experimental groups mice were normal, coupled with no significant statistical difference between experimental groups and control group; through the visual observation and pathological observation of heart, liver, spleen, lung, kidney and thymus, no obvious lesions were found, showing that the two kinds of carboxymethyl chitosan-zinc complexes had no evident toxic effects on mice.

Key words: carboxymethyl chitosan-zinc; subacute; abdominal cavity; blood biochemical indicators

羧甲基壳聚糖是一种水溶性壳聚糖衍生物, 在止血、抗菌和愈创方面具有显著的生物活性^[1]。锌离子为人体所必须微量元素之一, 参与组成 80 多种

酶或者作为酶的激活剂^[2], 研究表明伤口处富集的锌离子与多种酶活性相关, 从而加速伤口愈合^[3]。以往对于羧甲基壳聚糖锌的研究多集中于其形成机理和抗菌活性: 羧甲基壳聚糖与锌离子可以通过 Zn 离子与 O 和 N 离子形成的 Zn-O 和 Zn-N 键形成一种水不溶性的络合物^[4], 形成的羧甲基壳聚糖锌对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有比羧甲基壳聚糖更强

的抑菌效果^[5]。由于羧甲基壳聚糖锌具有多糖链的大分子性质、羧甲基壳聚糖和锌离子的促愈合活性和抗菌活性,所以被认为是一种极具潜力的生物创伤敷料,但有关羧甲基壳聚糖锌生物安全性的研究尚未报道,已有研究表明由于络合物和金属离子存在某种化学平衡,壳聚糖金属络合物中的微量元素既可以保持活性并能减低毒性^[2]。本试验就两种不同络合量的羧甲基壳聚糖锌为试验材料,制取浸提液,研究其亚急性毒性,旨在为其生物安全性提供依据。

1 实验材料

实验动物:昆明种小鼠,生产许可证号:SCXK(鲁)20140001,30只,雌雄各半,体重为20~25g,购自青岛市实验动物和动物生产中心,实验开始前暂养5d,自由饮水饮食,适应环境。

实验材料:两种不同络合量的羧甲基壳聚糖锌由本实验室制备,羧甲基壳聚糖与锌离子的络合摩尔比分别为40:1(高络合量)和60:1(低络合量)。相关血清生化指标试剂盒均购于南京建成股份有限公司,其他试剂均为国药集团化学试剂有限公司分析纯商品试剂。

2 实验方法

2.1 材料浸提液制取

根据国标医疗器械生物学评价第12部分制取材料浸提液,分别取两种羧甲基壳聚糖锌试验材料,除去吸收容量外,以0.1g/mL比例用无菌生理盐水37℃浸提24h,制得材料浸提液^[6]。

2.2 实验分组及给药

将30只昆明种小鼠随机分为3组,实验组1、实验组2、对照组,每组10只,雌雄各半。实验组1小鼠腹腔注射高络合量羧甲基壳聚糖锌材料浸提液,实验组2小鼠腹腔注射低络合量羧甲基壳聚糖

锌材料浸提液,对照组小鼠腹腔注射0.9% NaCl溶液,各组小鼠每日腹腔注射1mL,连续注射28d^[7]。

2.3 小鼠生理状态观察

小鼠自由饮水饮食,每天观察记录各组小鼠生理状况,每隔3~4d称量记录小鼠体重。

2.4 相关血液生化指标测定

在28d给药完成时,小鼠空腹过夜,称重后眼球取血,离心取血清,测定血液常规生化指标(谷丙转氨酶ALT、谷草转氨酶AST、碱性磷酸酶ALP、总蛋白TP、白蛋白ALB、葡萄糖GLU、尿素氮BUN、肌酐CREA、尿酸UA、甘油三酯TG)^[8]。

2.5 脏器指数测定

进行常规解剖检查,取心、肝、脾、肺、肾和胸腺,称重后计算相应器官指数(脏器指数=脏器质量/体重)

2.6 病理学检查

称重后的各器官于中性甲醛固定2d后,经过脱水、透明、包埋和切片后,进行HE常规染色,显微镜下进行常规病理组织学检查^[9]。

2.7 统计学分析

实验数据均用平均值±标准差表示($\bar{x} \pm s$),用SPSS 13.0进行统计学分析,实验组分别与对照组进行方差分析(one way ANOVA)。

3 结果与讨论

3.1 小鼠生理状态及体重

各组小鼠在实验过程中生理活动正常,包括外观体征、行为活动、腺体分泌、精神状态、呼吸、粪便等,实验组1和实验组2小鼠与对照组小鼠无明显差别。精神状态呼吸均正常,生理状态均良好,无中毒及死亡现象。各组小鼠体重变化见表1,可见实验组1和实验组2小鼠体重与对照组比较,雌雄小鼠均无显著性差异($P > 0.05$)。

表1 不同组中小鼠的体重变化(g, $n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Weight changes of mice in different groups ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

	实验组1 Group1		实验组2 Group2		空白对照 Control	
	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female
1st	22.69 ± 2.61	23.61 ± 2.23	22.79 ± 3.01	23.77 ± 2.34	23.22 ± 2.17	23.60 ± 2.35
5th	23.90 ± 2.74	24.69 ± 3.23	23.35 ± 2.75	26.11 ± 3.57	24.30 ± 3.08	25.22 ± 4.52
9th	24.18 ± 3.46	27.16 ± 5.20	23.10 ± 4.26	28.30 ± 5.02	24.76 ± 3.05	27.62 ± 4.30
12th	23.69 ± 6.61	27.36 ± 3.78	22.70 ± 4.21	29.18 ± 5.52	24.44 ± 3.21	28.56 ± 3.54

16th	23.28 ± 3.94	29.08 ± 7.97	23.14 ± 3.27	29.96 ± 6.06	24.94 ± 3.39	28.04 ± 4.29
22th	23.32 ± 5.19	28.83 ± 7.97	24.13 ± 3.02	27.12 ± 6.74	25.84 ± 2.18	28.40 ± 6.21
28th	23.18 ± 4.91	28.02 ± 7.65	23.96 ± 3.62	30.02 ± 6.52	26.82 ± 4.27	27.74 ± 6.28

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

表2 不同组中小鼠各脏器指数 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Organ index of mice in different groups ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	实验组 1 Group1		实验组 2 Group2		空白对照 Control	
	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female
肝指数 Liver index	5.042 ± 0.346	4.711 ± 0.513	5.045 ± 0.455	5.004 ± 0.549	5.083 ± 0.412	4.567 ± 0.336
脾指数 Spleen index	0.5145 ± 0.1303	0.4998 ± 0.1405	0.5349 ± 0.1806	0.4948 ± 0.0746	0.4448 ± 0.1086	0.4752 ± 0.1229
肾指数 Renal index	1.178 ± 0.068	1.412 ± 0.071	1.350 ± 0.247	1.516 ± 0.107 *	1.193 ± 0.099	1.354 ± 0.148
心指数 Cardiac index	0.5484 ± 0.1771	0.6727 ± 0.1353	0.5041 ± 0.0704	0.6473 ± 0.0362	0.5718 ± 0.0625	0.6812 ± 0.0580
肺指数 Lung index	1.171 ± 0.310	0.8095 ± 0.2356	1.093 ± 0.320	0.0668 ± 0.1783	1.004 ± 0.381	0.9709 ± 0.4654
胸腺指数 Thymus index	0.4013 ± 0.0713	0.3496 ± 0.0610	0.4796 ± 0.0755	0.3810 ± 0.0264	0.3847 ± 0.1223	0.3988 ± 0.1061

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3.2 小鼠各脏器指数

小鼠给药 28 d 后的各脏器指数见表 2, 可见实验组 1 高络合量羧甲基壳聚糖锌浸提液腹腔给药 28d 后, 雌雄小鼠各脏器指数与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。实验组 2 低络合量羧甲基壳聚糖锌浸提液腹腔给药 28d 后, 雌性小鼠肾指数高于对照组肾指数, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 雄性小鼠肾指数与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。其它脏器系数与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。实验组 2 雌性小鼠肾指数高于对照组, 浸提液对肾的影响情况应结合血液生化指标和病理切片

进行分析。

3.3 小鼠血液生化指标测定结果

给药 28d 后, 小鼠血清生化指标测定结果见表 3, 实验组 1 给药高络合量羧甲基壳聚糖锌雄性小鼠血清中 ALP、UA 含量均低于对照组, 呈显著性差异 ($P < 0.05$), 其它生化指标与对照组比较无显著性差异。实验组 2 给药低络合量羧甲基壳聚糖锌雌性小鼠血清中 UA 含量低于对照组, 呈现显著性差异 ($P < 0.05$), 其它生化指标与对照组比较无显著性差异。尿酸和碱性磷酸酶低于正常值, 是否有病理学意义还需要结合肝、肾病理切片进行分析。

表3 不同组中小鼠血液生化指标测定结果 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Blood biochemical index determination results of mice in different groups ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	实验组 1 Group1		实验组 2 Group2		空白对照 Control	
	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female
ALT 卡门氏单位	39.33 ± 10.73	37.67 ± 16.49	36.60 ± 22.26	40.88 ± 19.34	53.96 ± 29.28	55.89 ± 24.94
AST 卡门氏单位	25.60 ± 7.46	20.39 ± 10.86	19.14 ± 9.35	21.89 ± 8.21	17.88 ± 11.14	19.38 ± 9.34
ALP (mg/mL)	14.18 ± 6.64 *	15.38 ± 4.67	20.42 ± 10.20	20.42 ± 8.08	21.31 ± 3.63	18.35 ± 7.59
TP (g/L)	82.37 ± 13.44	77.42 ± 18.64	75.19 ± 18.04	77.00 ± 14.33	72.28 ± 18.00	74.52 ± 19.84
ALB (g/L)	28.86 ± 2.36	27.06 ± 1.97	30.16 ± 2.05	29.27 ± 2.01	29.77 ± 3.72	30.01 ± 4.22
GLU (mmol/L)	7.093 ± 1.539	7.429 ± 1.218	7.752 ± 0.998	7.684 ± 1.270	7.041 ± 1.641	7.210 ± 1.219
BUN (mmol/L)	7.684 ± 1.695	7.236 ± 1.278	7.309 ± 0.995	6.910 ± 1.672	6.606 ± 0.910	6.796 ± 0.570
CREA (μmol/L)	50.97 ± 9.42	46.83 ± 7.50	46.79 ± 5.20	44.09 ± 9.03	52.13 ± 7.72	46.33 ± 10.83
UA (μmol/L)	164.2 ± 34.5 *	168.0 ± 34.9	159.1 ± 40.1 *	169.2 ± 30.3	199.6 ± 19.6	184.3 ± 27.0
TG (mmol/L)	1.311 ± 0.043	1.261 ± 0.530	1.254 ± 0.190	1.297 ± 0.185	1.166 ± 0.637	1.204 ± 0.436

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3.4 小鼠器官解剖观察

小鼠解剖过程中实验组各器官与正常组相比,其外观颜色、颜色和脏器大小均表现正常,未见明显渗出、增生、水肿、萎缩等病变,结果全部在正常形态学范围内,未见明显病理改变。

3.5 小鼠各器官病理切片观察

由各器官组织病理切片(见图1)可见雌雄小鼠心、肝、脾、肺、肾和胸腺病理切片均显示的组织结构正常,组织内部均未出现坏死、肿大,未见炎症细胞,细胞形态均正常清晰,未见明显病理改变。

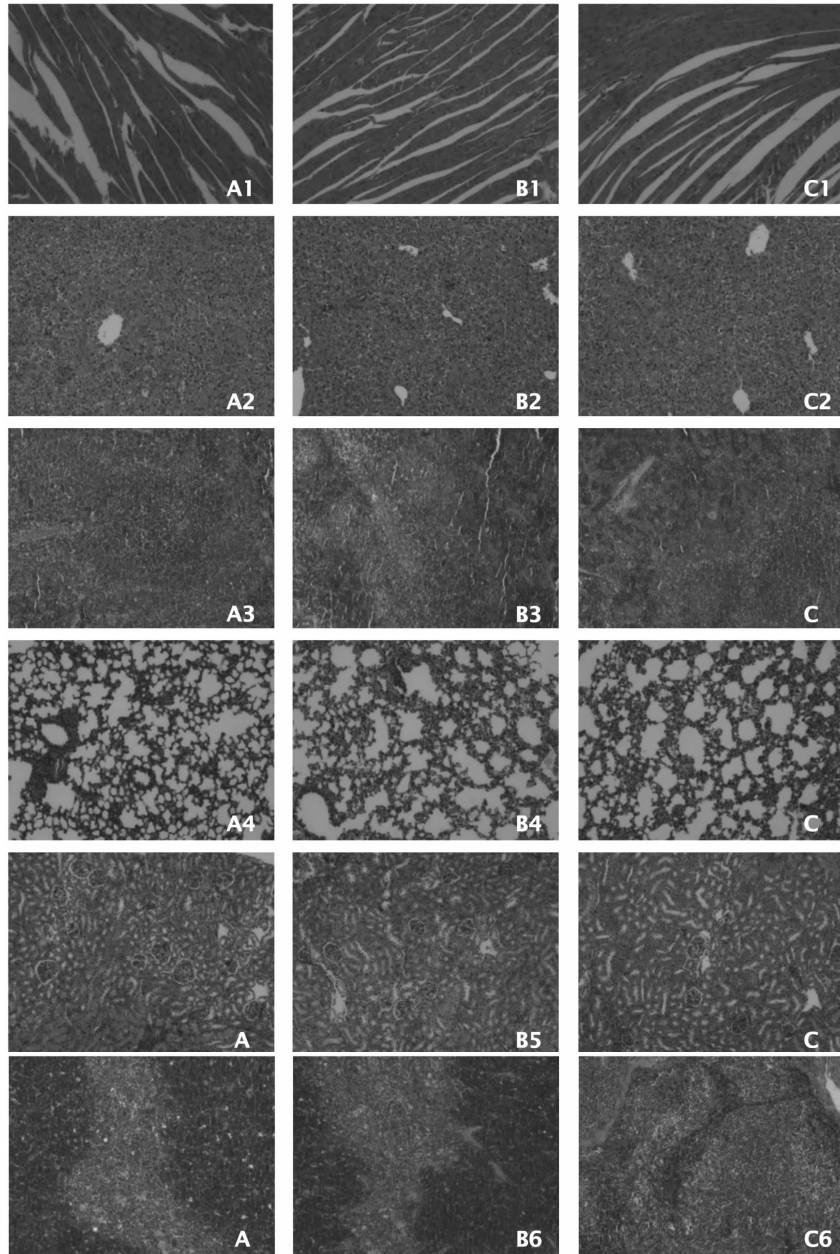


图1 实验组1(A)、实验组2(B)及空白对照组(C)中小鼠各器官病理切片观察($\times 400$)

Fig. 1 Organ pathological observation of mice in group 1 (A), group 2 (B) and control (C) ($\times 400$)

注:1-6:心、肝、脾、肺、肾和胸腺病理切片

Note:1-6:heart,liver,spleen,lung,kidney and thymus

在整个实验过程,3个组的雌雄小鼠毛色、精神状态、饮食饮水量、排泄量等生理状态均表现正常,

无明显区别,实验组雌雄小鼠体重与对照组无显著性差异,说明材料对小鼠生理机能无明显影响作用。

从各脏器指数和血液生化指标测量结果可以看出,实验2组雌性小鼠肾指数显著高于对照组肾指数,实验1组雄性小鼠血液中碱性磷酸酶、尿酸含量低于对照组,实验2组雄性小鼠尿酸在血清中含量低于对照组,但两组雌雄小鼠肝、肾组织病理检查均显示组织结构正常,细胞形态未发生改变,综合结果表明无病理意义。结果表明羧甲基壳聚糖锌无明显亚急性毒性,但实验组雄性小鼠血清中碱性磷酸酶降低、尿酸降低的原因还需要进行深入研究。

4 结论

锌离子为人体生命活动中不可或缺的微量元素,但是过量的锌对机体有损害作用,有研究表明高剂量锌可以导致大鼠学习能力下降^[10],并且导致机体不孕不育,小鼠锌中毒后也会表现食欲下降、皮毛失去光泽,运动量和运动能力下降^[11]。锌的毒性作用与其形成化合物的形式和锌离子含量等因素有关。锌盐的种类分为无机锌和有机锌,不同形式的锌盐的对不同生物的毒性剂量不同,之前有关于锌离子的毒性评价研究多着重于摄入性毒性,研究表明人的食物中锌的最高允许剂量为40~60 mg/kg,有机锌与无机锌相比生物学效价更高,更易被生物体吸收利用,因此更容易导致锌中毒^[12]。然而对于其作为医用材料组成成分,关于锌离子腹腔毒性的实验鲜有报道。羧甲基壳聚糖是一种天然大分子材料,有研究表明它无亚慢性摄入毒性^[13]、无急性摄入毒性^[14,15]、拥有较好的生物相容性,实验中利用羧甲基壳聚糖优异的生物学特性和较强的金属配位能力,与不同比例锌离子反应生成了属于多糖锌复合物的羧甲基壳聚糖锌,研究了制得材料浸提液通过腹腔注射对小鼠的亚急性毒性,结果表明试验中所制得的两种材料无明显亚急性毒性,为羧甲基壳聚糖锌成为一种可以载体内应用的生物材料提供了基础。

参考文献

- 1 Yang Z(杨照). Characterization of macromolecular carboxymethyl chitosan and the study of its hemostatic and wound healing functions. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学), MSc. 2012.
- 2 Lin YW(林友文), Chen W(陈伟). Study on the adsorption of Zn(II) in solution by carboxymethyl chitosan. *Strait Pharm J*(海峡药学), 2000, 12(3): 69-72.
- 3 Cheng YY(程义勇), Chen XW(陈星伟), Wang DL(王冬兰), *et al.* Effects of zinc on collagen synthesis and wound healing in rats. *Acta Nutri Sin*(营养学报), 1992, 1: 70-75.
- 4 Tang L, Hon DN. Chelation of chitosan derivatives with zinc ions. II. Association complexes of Zn^{2+} onto O,N-carboxymethyl chitosan. *J Appl Polymer Sci*, 2001, 79: 1476-1485.
- 5 Patale RL, Patravale VB. O,N-carboxymethyl chitosan-zinc complex: A novel chitosan complex with enhanced antimicrobial activity. *Carbohydr Polymers*, 2011, 85: 105-110.
- 6 Zheng W. GB/T16886. 1-2011: Biological Evaluation of Medical Devices-Part 1: Evaluation and Testing within a Risk-management Process. Beijing: Standards Press of China, 2011.
- 7 Yu SH(由少华), Wang T(王昕), Wang KL(王科镭), *et al.* GB/T 16886. 11-2008 Biological Evaluation of Medical Devices-Part 11: Tests for Systemic Toxicity. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- 8 Wang DP(王冬平), Li M(李慕), Shang SC(尚世臣), *et al.* Establishment of normal range and values of blood physiological and biochemical data measurements in SPF KM mice. *Labor Animal Sci Admin*(实验动物科学), 2008, 25(4): 5-8.
- 9 Yang JP(杨捷频). Improvement of traditional paraffin section preparation methods. *J Biol*(生物学杂志), 2006, 23: 45-46.
- 10 Ding H(丁虹), Kong R(孔锐). Effects of high dietary zinc on mice (II) -Influence on growth, blood composition and immune function. *J Hygiene Res*(卫生研究), 1997, 26: 325-326.
- 11 Ding XB(丁小波), Wen LX(文利新), Niu TL(牛同利). Toxicity studies of microelement zinc. *Studies Trace Elements Health*(微量元素与健康研究), 2008, 24(6): 64-66.
- 12 Li Y, Yang X, Xu WT. Research progress on the protections of zinc on the cell damage. *J Food Nutri Sci*, 2014, 11(5): 57-63.
- 13 Xu QL(许巧丽), Wang JC(王加才), Zhang ZH(张宗和) *et al.* Study on the chronic toxicity test of N,O-carboxymethyl chitosan in mice. *Animal Husband Veterin Med*(畜牧与兽医), 2006, 38(9): 40-43.
- 14 Chen DJ, Wang DF, Zhang ZH, *et al.* Study on the acute toxicity of N,O-carboxymethyl chitosan in chicken. *Chin Agric Sci Bull*, 2007, 23(3): 40-42.
- 15 Yang Z, Han B, Fu D, *et al.* Acute toxicity of high dosage carboxymethyl chitosan and its effect on the blood parameters in rats. *J Mater Sci; Mater Med*, 2012, 23: 457-462.