

研究简报

羧甲基壳聚糖膜对皮肤成纤维细胞相容性研究*

郑立^{1,2)} 陈西广¹⁾** 刘万顺¹⁾ 韩笑天²⁾ 严小军²⁾(¹⁾ 青岛海洋大学生命学院, 青岛 266003; ²⁾ 中国科学院海洋研究所, 中国科学院研究生院, 青岛 266071)

摘要 通过玻璃流延法制备不同分子质量的壳聚糖及羧甲基壳聚糖膜, 以体外培养的人皮肤成纤维细胞作为对象, 利用膜的浸渍液培养及膜表面直接培养法研究比较了两种多糖膜的细胞相容性. 实验发现两种多糖膜的浸渍液对细胞均无毒性效应, 生物安全性是小分子质量膜好于大分子质量膜, 羧甲基壳聚糖膜好于壳聚糖膜. 皮肤成纤维细胞在壳聚糖膜上的生长受到抑制, 生长一段时间后细胞有聚集和脱落现象, 而羧甲基壳聚糖膜上细胞能很好地贴附、生长, 没有聚集和脱落现象. 结果表明羧甲基壳聚糖膜具有比壳聚糖膜更优越的细胞相容性.

关键词 壳聚糖, 羧甲基壳聚糖, 膜, 皮肤成纤维细胞, 细胞相容性

学科分类号 Q819

羧甲基壳聚糖 (carboxymethyl chitosan, CM-chitosan) 是壳聚糖 (chitosan) 的水溶性衍生物, 具有杀菌, 抗炎, 吸附重金属等作用^[1~3]. 作为高分子多糖, 它和 chitosan 一样有优良的成膜性, 近年来已显示出一定的控释作用, 被广泛应用于药物缓释载体^[4~6], 其膜作为可吸收性生物材料也已经愈来愈受到人们的重视. 然而作为医学和生物工程应用的前提, 国内外关于 CM-chitosan 膜细胞相容性方面的研究较少, 远不及 chitosan 膜^[7~11]. 本文基于以上问题, 比较研究了不同分子质量 chitosan 膜和 CM-chitosan 膜的浸渍液对人皮肤成纤维细胞的毒性效应、细胞在 chitosan 膜和 CM-chitosan 膜上的生长情况及细胞贴附形态, 探讨了 CM-chitosan 膜的细胞相容性, 为其作为细胞生长支持物和医学应用提供实验基础.

1 材料与方法

1.1 材料

不同分子质量 chitosan 通过酸降解法制备得到, 参照文献 [12] 测定他们的脱乙酰度在 (90±2)% 之间, 利用粘度法^[13] 测定其特性粘度, 并按公式^[14]: $[\eta] = 1.81 \times 10^{-3} M_{\eta}^{0.93}$, 计算其粘均分子质量为 48 万, 25 万, 12 万, 3 万, 命名为 chitosan₄₈, chitosan₂₅, chitosan₁₂, chitosan₃. 利用实验室技术制备得到相应分子质量的羧甲基壳聚糖, 命名为 CM-chitosan₄₈, CM-chitosan₂₅, CM-chitosan₁₂, CM-chitosan₃.

1.2 膜的制备

1.2.1 Chitosan 膜的制备: 将 chitosan 溶解于 1%

的醋酸, 配制成 3% (质量体积比) 的溶液, 5 000 r/min 离心 30 min, 取上清液在玻璃板上流延, 50℃ 烘干成膜. 将膜放在 10% 的氢氧化钠溶液中浸泡 4 h, 膜自然脱落, 将其切成圆形膜片 (直径 15 mm), 用自来水冲洗净表面的氢氧化钠, 三蒸馏水浸泡, 直至浸泡液成中性. 所用试剂均用三蒸馏水配制.

1.2.2 CM-chitosan 膜的制备: 将 CM-chitosan 溶解于三蒸馏水中, 配制成 3% 的溶液, 5 000 r/min 离心 30 min, 取上清液在玻璃板上流延, 放入烘箱 50℃ 烘干, 再将膜放入含 0.5% 戊二醛、3% 醋酸、50% 乙醇的混合溶液中交联 24 h, 取出切成圆形膜片 (直径 15 mm), 三蒸馏水反复浸泡冲洗, 直至浸泡液成中性.

两种膜做好后放入无菌 D'Hanks 液中高压灭菌, 浸泡备用.

1.3 皮肤成纤维细胞的培养

原代培养正常人皮肤成纤维细胞的方法采用组织块贴壁培养法, 实验选用 3~6 代内细胞. 培养液为 DMED 培养基 (Gibco 产品), 内含 10% 小牛血清 (BCS, Hyclone 产品), 细胞在 5% CO₂ 浓度, 37℃ 的培养箱中培养.

1.4 细胞毒性实验

1.4.1 Chitosan 与 CM-chitosan 膜浸渍液的制备: 在超净工作台上将高压灭菌后不同分子质量的

* 国家自然科学基金资助项目 (39970212).

** 通讯联系人.

Tel: 0532-2032586, E-mail: xgchen6@hotmail.com

收稿日期: 2002-08-27, 接受日期: 2002-10-16

chitosan 膜片及 CM-chitosan 膜片, 各取 10 片放入 5 ml 新鲜无菌培养基中, 37℃ 下浸渍 24 h, 取出膜片即得膜浸渍液。

1.4.2 Chitosan 与 CM-chitosan 膜浸渍液对细胞生长的影响: 取对数生长期的成纤维细胞, 胰酶消化后调节细胞密度为 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个/ml, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 200 μ l, 在 37℃, CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 吸去原培养液, 阴性对照用新鲜培养液交换, 阳性对照换用内含 0.64% 苯酚的培养基, 实验组换用 50% 的膜浸渍液+ 50% 的新鲜培养基。放入 37℃, CO₂ 培养箱中培养, 分别在实验的第 2、4、7 天取出, MTT 法^[15]测细胞活力, 计算细胞相对增殖率 (RGR):

$$\text{RGR} = \frac{\text{实验组吸光度值}}{\text{阴性对照组吸光度值}} \times 100\%$$

1.5 Chitosan 与 CM-chitosan 膜对成纤维细胞生长的影响

将 3 种不同分子质量的 chitosan 膜和 CM-chitosan 膜制做在 24 孔板中, 用三蒸馏水浸泡冲洗, 培养基平衡 4 h。取对数生长期的成纤维细胞, 胰酶消化后调节细胞密度为 3×10^4 个/ml, 接种于膜上, 每孔 1 ml, 对照组为没有膜的板孔。置于 37℃, CO₂ 培养箱中培养, 在第 3、5、7 天用胰酶消化膜上的细胞, 血球计数板计数。

1.6 Chitosan 与 CM-chitosan 膜上细胞贴附、生长状态的观察

将灭菌后的膜片 (直径 15 mm) 在培养基里平衡 4 h, 取出放在 12 孔培养板中, 接种对数期生长的皮肤成纤维细胞, 调节细胞密度为 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个/ml, 每孔 2 ml, 对照组将细胞接种在盖玻片上。置于 37℃, CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后将已贴壁细胞的玻片, 及一组 chitosan₁₂ 和 CM-chitosan₁₂膜用 2.5% 戊二醛溶液固定, 临界干燥, 离子溅射, 扫描电镜 (KYKY1000B) 观察膜上细胞的贴附状态。其余各组转入新的 12 孔板中, 添加新鲜培养基继续培养, 在培养的第 4 天和第 8 天用倒置显微镜观察多糖膜上细胞的生长状态。

2 结 果

2.1 Chitosan 与 CM-chitosan 膜的制备结果

多糖膜在制备过程中, chitosan₃ 及 CM-chitosan₃ 成膜情况不理想, 所制的膜易裂, 有亮点和针孔, 导致成膜性能差。制备成的 chitosan₁₂, chitosan₂₅, chitosan₄₈膜无色透明, 具有良好弹性, CM-chitosan₁₂,

CM-chitosan₂₅, CM-chitosan₄₈膜经戊二醛交联后, 脆而透明, 颜色微黄。

2.2 Chitosan 与 CM-chitosan 膜的浸渍液对细胞的毒性效应

从成纤维细胞的相对增殖率 RGR (表 1) 可以看到细胞在含 0.64% 苯酚培养基的阳性对照中生长受到抑制, 第 2、4、7 天 RGR 分别为 (52.5 ± 3)%、(27.0 ± 1)%、(14.9 ± 4)%, 逐渐减小, 而细胞在 chitosan 和 CM-chitosan 膜的浸渍液中生长情况比阳性对照好, 第 2、4、7 天所有实验组的 RGR 均在 82% ~ 103% 之间, 且都呈上升趋势。与阳性对照相比, 统计分析显示 *P* 值都小于 0.01, 即细胞在多糖膜的浸渍液中 RGR 与阳性对照相比有显著性差异, 这说明作为生物功能性材料的 chitosan 及 CM-chitosan 膜的浸渍液均无细胞毒性。

Table 1 RGR of cell cultured in soaking fluid of chitosan and CM-chitosan membranes

Soaking fluid	% 2 days 4 days 7 days		
CM-chitosan ₁₂ membrane	95.8 ± 2	97.3 ± 2	103.2 ± 2 ¹⁾
CM-chitosan ₂₅ membrane	91.6 ± 3	93.2 ± 1	100.2 ± 3 ¹⁾
CM-chitosan ₄₈ membrane	87.5 ± 2	90.3 ± 4	95.7 ± 3 ¹⁾
Chitosan ₁₂ membrane	89.6 ± 4	93.2 ± 2	94.6 ± 1 ¹⁾
Chitosan ₂₅ membrane	85.6 ± 3	83.8 ± 4	88.5 ± 2 ¹⁾
Chitosan ₄₈ membrane	82.5 ± 2	83.5 ± 3	85.5 ± 2 ¹⁾
Positive control	52.5 ± 3	27.0 ± 1	14.9 ± 4

¹⁾ *P* < 0.01, when compared with positive control group. Positive control: culture medium contains 0.64% phenol. $\bar{x} \pm s$.

对两种多糖膜进行比较发现, 成纤维细胞在 CM-chitosan 膜浸渍液中的 RGR 又高于相应分子质量的 chitosan 膜, 在第 7 天 3 种 chitosan 膜浸渍液中细胞的 RGR 分别为 (94.6 ± 1)%、(88.5 ± 2)%、(85.5 ± 2)%, 对应 CM-chitosan 膜浸渍液中细胞的 RGR 达到 (103.2 ± 2)%、(100.2 ± 3)%、(95.7 ± 2)%, 这表明 CM-chitosan 膜的生物安全性比 chitosan 膜好。

从不同分子质量的多糖膜来看, CM-chitosan₁₂ 和 CM-chitosan₄₈膜浸渍液中细胞的 RGR 第 2、4、7 天分别为 (95.8 ± 2)%、(97.3 ± 2)%、(103.2 ± 2)% 和 (87.5 ± 2)%、(90.3 ± 4)%、(95.7 ± 3)%、chitosan₁₂ 和 chitosan₄₈膜浸渍液中细胞的 RGR 第 2、4、7 天分别为 (89.4 ± 4)%、(93.2 ± 2)%、(94.6 ± 1)% 和 (82.5 ± 2)%、(85.3 ± 3)%、(85.5 ± 2)%, 都是小分子多糖膜的浸渍液 RGR

要高于大分子多糖膜, 可见多糖分子质量越小, 膜的安全性也越高.

2.3 Chitosan 与 CM-chitosan 膜上成纤维细胞的生长情况

将成纤维细胞直接接种于多糖膜上, 在第 3、5、7 天, 用胰酶消化膜上细胞, 血球计数板分别计算不同分子质量 chitosan 膜和 CM-chitosan 膜上的细胞数量 (图 1). 可以看到所有 chitosan 膜上细胞数量在这 3 天都低于对照板上的细胞数 ($4.45 \pm 0.40 \times 10^4$ 个/ml、 $(6.85 \pm 0.51) \times 10^4$ 个/ml、 $(8.75 \pm 0.45) \times 10^4$ 个/ml, 特别是 chitosan₄₈ 膜上细胞只有 $(1.95 \pm 0.15) \times 10^4$ 个/ml、 $(3.50 \pm 0.30) \times 10^4$ 个/ml、 $(5.25 \pm 0.56) \times 10^4$ 个/ml. 而 CM-chitosan₄₈ 膜上细胞数量为 $(4.15 \pm 0.80) \times 10^4$ 个/ml、 $(6.50 \pm 0.41) \times 10^4$ 个/ml、 $(8.35 \pm 1.5) \times 10^4$ 个/ml, 与对照板上的几乎一致, 并且所有的 CM-chitosan 膜上细胞数量都明显高于相应分子质量的 chitosan 膜. 这说明 chitosan 膜上成纤维细胞的生长受到抑制, 而 CM-chitosan 膜上细胞生长却没有受到抑制.

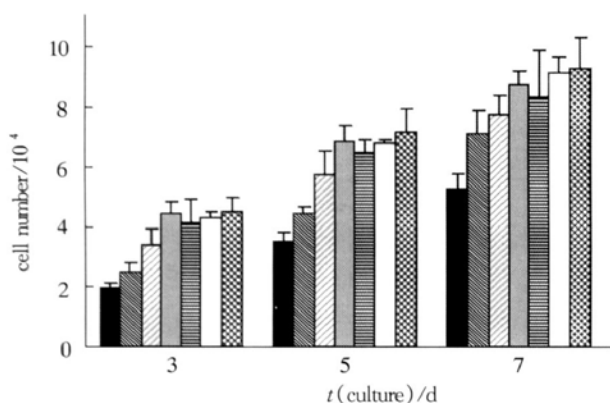


Fig. 1 Cell number on different molecular mass polysaccharide membranes in culture for 3, 5, 7 days

■: chitosan₄₈; □: chitosan₂₅; ▨: chitosan₁₂; ▩: control; ■: CM-chitosan₄₈; □: CM-chitosan₂₅; ▨: CM-chitosan₁₂.

就不同分子质量多糖膜上成纤维细胞生长情况来看, Chitosan₁₂膜上细胞数量在第 3、5、7 天分别为 $(3.40 \pm 0.52) \times 10^4$ 个/ml、 $(5.75 \pm 0.80) \times 10^4$ 个/ml、 $(7.75 \pm 0.64) \times 10^4$ 个/ml, 要高于 chitosan₄₈ 和 chitosan₂₅ 膜上的细胞数量, 这表明小分子质量 chitosan 膜上细胞生长受抑制的程度比大分子质量低. 同样, CM-chitosan₁₂膜上的细胞数量也要高于 CM-chitosan₂₅ 和 CM-chitosan₄₈ 膜, 且

在第 5、7 天还多于对照, 达到 $(7.15 \pm 0.80) \times 10^4$ 个/ml 和 $(9.30 \pm 1.01) \times 10^4$ 个/ml, 表现出促进细胞生长的作用.

2.4 Chitosan 与 CM-chitosan 膜上成纤维细胞贴附状态的电镜观察

皮肤成纤维细胞在玻璃上生长 24 h 的电镜照片 (图 2) 显示细胞两端细长, 中间浑圆, 呈纺锤形, 细胞外分泌有胶原纤维, 拉扯着细胞, 使其贴附在玻璃上.

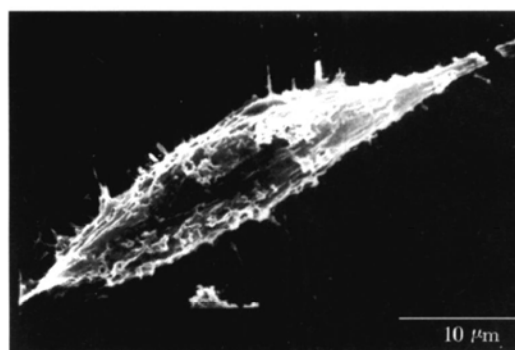


Fig. 2 Condition of skin fibroblasts adhering on glass

细胞在 chitosan₁₂膜及 CM-chitosan₁₂膜上形态也呈纺锤形 (图 3), 前者虽然也有胶原纤维拉扯

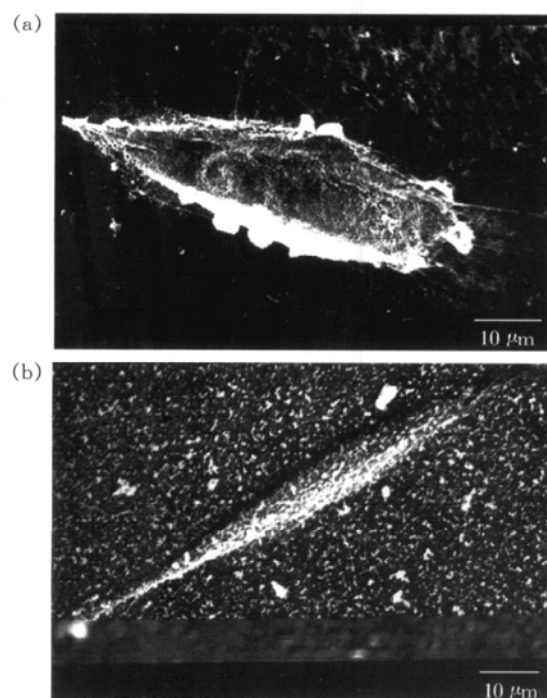


Fig. 3 Condition of skin fibroblasts adhering on chitosan₁₂ and CM-chitosan₁₂ membranes

(a) chitosan₁₂ membrane; (b) CM-chitosan₁₂ membrane.

着细胞, 但胞外部分胶原萎缩, 与对照玻璃上的细胞相比, 没有完全伸展开, 细胞贴附状态不好, 而在 CM-chitosan₁₂膜上的细胞能生长入膜, 两端细长, 呈长梭形, 和在玻璃上生长的形态一致, 表现出良好的贴附状态.

2.5 Chitosan 与 CM-chitosan 膜上成纤维细胞生长情况的光镜观察

从皮肤成纤维细胞在多糖膜上生长情况的光镜

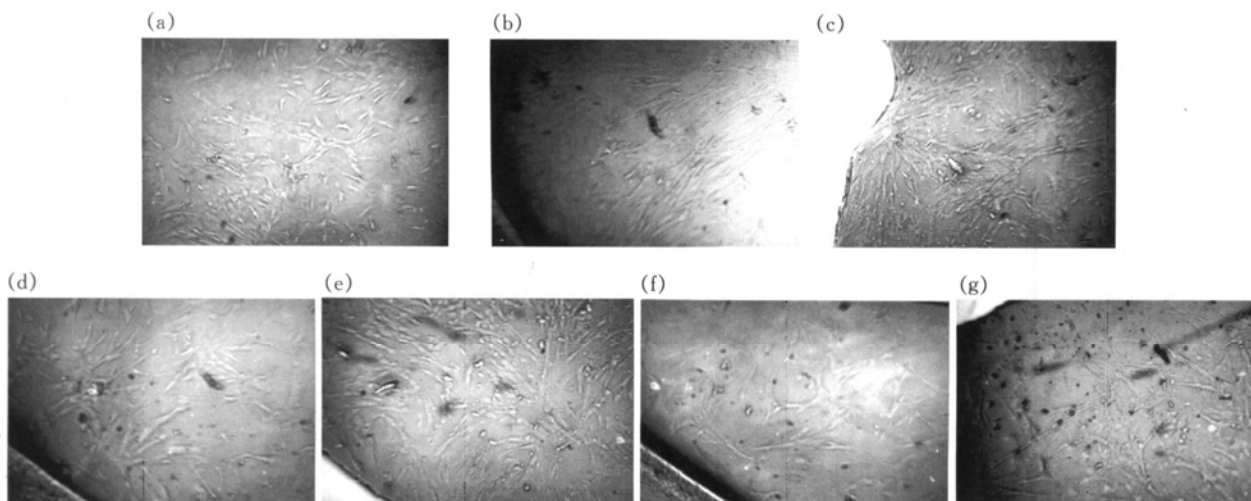


Fig. 4 Skin fibroblasts growing on polysaccharide membranes in culture for 4 days

The fringe of membrane is on the left of the photo ($\times 40$). (a) control; (b) chitosan₁₂ membrane; (c) CM-chitosan₁₂ membrane; (d) chitosan₂₅ membrane; (e) CM-chitosan₂₅ membrane; (f) chitosan₄₈ membrane; (g) CM-chitosan₄₈ membrane.

细胞生长第 8 天 (图 5), 我们观察到 chitosan₂₅和 chitosan₄₈膜上细胞有聚集和从膜上脱落的现象, 而细胞在 chitosan₁₂膜和所有 CM-chitosan 膜上生长良好, 基本铺满整个膜面, 呈涡漩状分布, 并没有聚

集和脱落现象. 这说明细胞在小分子 chitosan 膜和 CM-chitosan 膜上的生长情况要优于大分子 chitosan 膜.

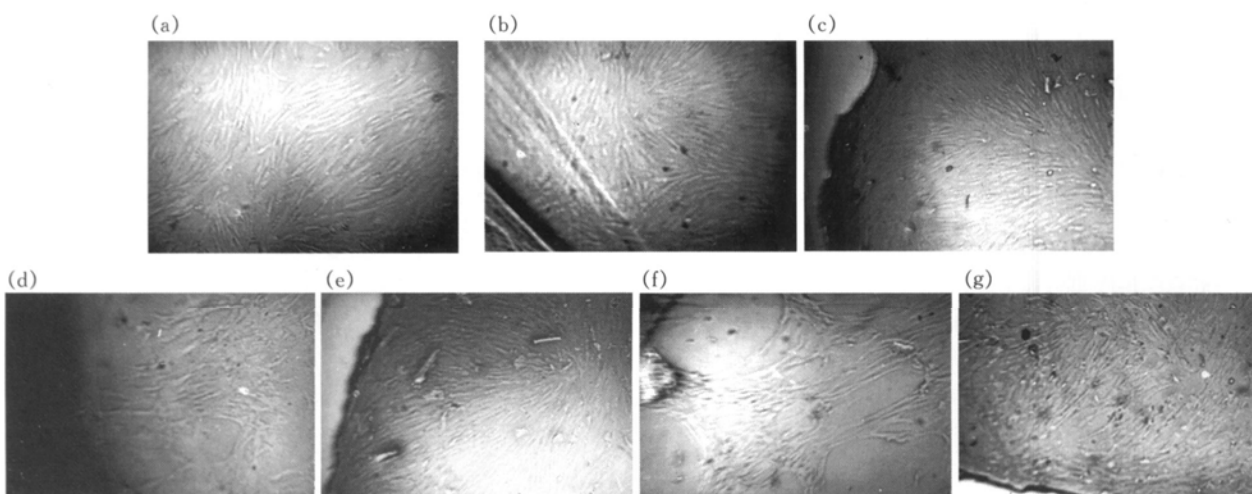


Fig. 5 Skin fibroblasts growing on polysaccharide membranes in culture for 8 days

The fringe of membrane is on the left of the photo ($\times 40$). (a) control; (b) chitosan₁₂ membrane; (c) CM-chitosan₁₂ membrane; (d) chitosan₂₅ membrane; (e) CM-chitosan₂₅ membrane; (f) chitosan₄₈ membrane; (g) CM-chitosan₄₈ membrane.

继续培养 4 天后, chitosan₁₂膜上细胞也聚集, 开始脱落 (图 6), 而在没有更换培养基的情况下, 所有 CM-chitosan 膜上细胞在培养第 20 天仍未发现聚集和脱落现象, 特别是 CM-chitosan₁₂膜上的细胞 (图 7), 不仅长势良好, 细胞铺满整个膜面, 有的地方甚至长成双层, 这表明 chitosan 膜并不是皮肤成纤维细胞生长的最佳支持介质, CM-chitosan 膜比它更适于细胞的生长.

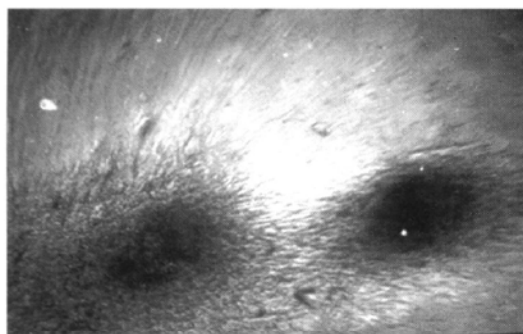


Fig. 6 Cells growing on chitosan₁₂ membrane in culture for 12 days ($\times 40$)

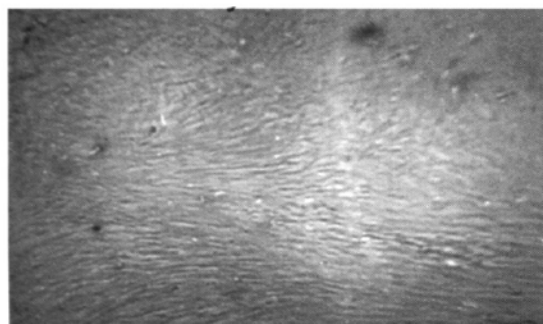


Fig. 7 Cells growing on CM-Chitosan₁₂ membrane in culture for 20 days ($\times 40$)

3 讨 论

多糖膜的制备常常由于分子质量低、制膜液粘度低, 造成交联程度不够, 所制的膜易裂、有亮点、针孔, 导致成膜性能差, 所以多糖制膜要求溶解液具有一定的粘度, 分子质量太小将不成膜. 此外 CM-chitosan 作为 chitosan 的水溶性衍生物, 在做膜过程中发现长时间浸泡于中性溶液中弹性下降, 而没有坚硬表面的基质是不利于细胞贴附生长的, 所以我们用戊二醛对 CM-chitosan 膜进行了交联, 在长时间的比较研究中, 我们发现膜在 0.5% 戊二醛、3% 乙酸和 50% 乙醇水溶液中交联, 能使 CM-chitosan 膜具有较好的强度.

高分子聚合物中存在的可溶出物质是引起炎症

和组织反应的主要原因, 一般包括残留的原料单体、低分子聚合物、催化剂或其他添加剂等, 通过体外组织培养法, 考察易溶出物质对细胞毒性的影响来评价聚合物的细胞相容性^[16]. 实验结果显示不同分子质量 chitosan 膜和 CM-chitosan 膜的浸渍液对皮肤成纤维细胞均无细胞毒性, 小分子质量多糖膜的生物安全性要优于大分子质量多糖膜. 这主要是线性多糖分子在溶液中以链段的网络形式存在, 链段网络空间形成了网络孔, 成膜后的多糖膜具有一定的通透性能^[12], 所以大部分可溶出物质在多糖膜用三蒸水洗涤过程中被除去, 但是大分子多糖分子由于分子链段长, 在溶液中易弯曲, 链与链之间形成网络时交叉多, 造成网络孔相对减小, 导致其膜通透性能比小分子多糖膜差, 在去除可溶出物质能力上要低于小分子多糖膜, 所以其生物安全性下降. 至于 CM-chitosan 膜的生物安全性要优于 chitosan 膜, 特别是 CM-chitosan₁₂膜的浸渍液反而有促进细胞生长作用, 一方面是因为 CM-chitosan 膜的通透性能优于 chitosan 膜, 另一方面是因为小分子 CM-chitosan 本身具有促进成纤维细胞生长的作用^[17], 膜在长时间浸渍过程中, 有少量多糖溶解在浸渍液中, 反而促进了细胞的生长, 这也是小分子 CM-chitosan 膜上细胞多于大分子 CM-chitosan 膜的原因.

皮肤成纤维细胞作为贴壁依赖性细胞, 在基质表面的增殖分为附着 (贴壁)、生长和扩展三个阶段, 所以只有附着于坚硬基质表面才能增殖, 也是进一步生长和铺展的关键^[18]. 而这种附着力主要依靠电荷亲和力, 由于细胞表面带不均匀的负电荷, 故表面带正电荷的多聚物, 有利于细胞的吸附^[19], Izume 等^[20]发现成纤维细胞可在胶原和 chitosan 的混合膜上生长, 随着 chitosan 引入量的加大, 膜对细胞的粘附能力得到加强, 但会抑制细胞的生长. 这主要是由于 chitosan 中大量 $-NH_3^+$ 的存在, 使得膜表面带正电荷, 虽然利于细胞的吸附, 但正电荷密度相对较高, 对细胞生长造成不利影响, 即所谓的“毒性效应”. 从电镜照片我们看到 chitosan 膜上皮肤成纤维细胞的贴附状态不好, 不能伸展开来, 而且在膜上生长一段时间后都聚集和脱落了, 这些都说明 chitosan 膜并不是细胞长期生长的理想支持物, 所以不少研究都是将 chitosan 和阴性高分子 (PVA、明胶等) 混合制膜, 以减小膜表面电荷密度, 增强其生物亲和性^[9~11].

Maroudes 曾报道, 最适宜的附着基质要求表面带负电荷, 细胞与之结合主要靠培养基中二价阳离子和表面吸附糖蛋白作介质, 非特异地吸附到基质表面. 由于 CM-chitosan 的结构中存在 COO^- , 减弱了 $-\text{NH}_3^+$ 的电荷密度, 而且 CM-chitosan 本身具有两性电解质的性质, 在中性环境中膜的表面带负电, 细胞可以靠培养基中的二价阳离子作为介质, 吸附于膜上生长. 所以成纤维细胞能在 CM-chitosan 膜上很好地贴附并长时间生长, 不同分子质量的 CM-chitosan 膜均未对细胞的生长产生抑制作用, 这说明 CM-chitosan 膜有着比 chitosan 膜更优越的细胞相容性, 在细胞生长支持物及医用材料领域中具有开发潜力.

参 考 文 献

- 陈凌云, 杜予民, 刘 义. 羧甲基壳聚糖的结构与抗菌性能的研究. 武汉大学学报 (自然科学版), 2000, **46** (2): 191~194
Chen L Y, Du Y M, Liu Y. J Wuhan Univ (Nat Sci Ed), 2000, **46** (2): 191~194
- 刘 瑾, 唐梓进, 杨佐宪. 唾液腺素、羧甲基壳聚糖、低分子壳聚糖对豚鼠齿龈炎的疗效. 南京师大学报 (自然科学版), 2000, **23** (2): 102~104
Liu J, Tang Z J, Yang Z X. J Nanjing Normal Univ (Nat Sci), 2000, **23** (2): 102~104
- 林友文, 陈 伟, 罗红斌. 羧甲基壳聚糖对铅离子的吸附性能研究. 离子交换与吸附, 2001, **17** (4): 333~338
Lin Y W, Chen W, Luo H B. Ion Exchange Adsorp, 2001, **17** (4): 333~338
- Miwa A, Ishibe A, Nakano M, *et al.* Development of novel chitosan derivatives as micellar carries of taxol. Pharm Res, 1998, **15** (12): 1844~1850
- van der Lubben I M, Verhoef J C, Borchard G, *et al.* Chitosan and vaccine delivery. Eur J Pharm Sci, 2001, **14** (3): 201~207
- Thanou M, Nihot M T, Jansen M, *et al.* Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia *in vitro* and *vivo*. J Pharm Sci, 2001, **90** (1): 38~46
- Popowicz P, Kurzyca J, Dolinska B. Cultivation of MDCK on Chitosan membranes. Biomed Biochem Acta, 1985, **44** (9): 1329~1333
- 匡 勇, 侯春林, 苟三怀, 等. 几丁质及几丁糖与雪旺氏细胞相容性的实验研究. 中国修复重建外科杂志, 1998, **12** (2): 90~93
Kuang Y, Hou C L, Gou S H, *et al.* Chinese J Reparative and Reconstructive Surgery, 1998, **12** (2): 90~93
- Norihiko M, Tomoe K. Preparation, properties, and cell attachment/growth behavior of PVA/chitosan blended hydrogels. Mater Sci Eng, 1998, **6** (4): 275~280
- Wen Y C, Tai H Y, Chun H Y, *et al.* Properties of the poly (vinyl alcohol) /chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast *in vitro*. Biomaterial, 1999, **20** (16): 1479~1487
- Risbud M, Endres M, Ringe J, *et al.* Biocompatible hydrogel supports the growth of respiratory epithelial cells: possibilities in tracheal tissue engineering. J Biomed Mater Res, 2001, **56** (1): 120~127
- 陈西广, 郑 立, 刘万顺, 等. 几丁聚糖通透性的研究. 中国海洋药物, 2001, **20** (3): 12~16
Chen X G, Zheng L, Liu W S, *et al.* Chinese J Mar Drugs, 2001, **20** (3): 12~16
- Wei W, Shu Q B, Wen Q. Dilute solution properties of chitosan. Acta Polymerica Sinica. 1992, **2** (2): 202~208
- Maghami G G, Reberts G A F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. Makromol Chem, 1988, **189** (2): 195~200
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods, 1983, **65** (1~2): 55~63
- Rosiak J. Fast reaction of irradiated polymers. I Crosslinking and degradation of PVP. Radiat Phys Chem, 1990, **36** (4): 747~749
- 陈西广, 王 真, 刘万顺, 等. 6-O-羧甲基壳多糖的细胞毒性效应研究. 青岛海洋大学学报, 2000, **30** (2 (II)): 221~224
Chen X G, Wang Z, Liu W S, *et al.* J Ocean Univ Qingdao, 2000, **30** (2 (II)): 221~224
- Elghannam A, Ducheyne P, Shapiro I M. Bioactive material template for *in vitro* synthesis of bone. J Biomed Mater Res, 1995, **29** (3): 359~370
- Macieira C A, Berumen L, Avrameas S. Properties of protein polymers as substratum for cell growth *in vitro*. J Cell Physiol, 1974, **83** (3): 379~388
- Izume M, Taira T, Miyata T. A novel cell culture matrix composed of chitosan and collagen complex in chitin and chitosan. In: Skjack-Break G, Authonsen T, Sandford P, eds. Chitin and Chitosan. London: Elsevier Applied Science, 1989. 653~658

Study on Cytocompatibility of Carboxymethyl-chitosan Membranes to Skin Fibroblasts^{*}

ZHENG Li^{1,2)}, CHEN Xi-Guang^{1)**}, LIU Wan-Shun¹⁾, HAN Xiao-Tian²⁾, YAN Xiao-Jun²⁾

(¹⁾ Life Science College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

²⁾ Institute of Oceanology of The Chinese Academy of Sciences, Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract Chitosan and carboxymethyl-chitosan (CM-chitosan) membranes with different molecular mass were prepared by a casting method. The cytocompatibility of two kinds of polysaccharide membranes to skin fibroblasts that cultured *in vitro* were studied. The methods were to culture the cells in soaking fluid of membranes and to culture the cells on the membranes directly. The results showed that the soaking fluid had no toxicity to fibroblasts and the biological security of lower molecular mass membranes were better than higher molecular mass membranes, and CM-chitosan membranes were better than chitosan membranes. In addition, the growth of fibroblasts on chitosan membranes was inhibited and the cells would fall off from chitosan membranes after a period of culture. However, the cells adhered and expanded well on CM-chitosan membranes. All these demonstrated that cytocompatibility of CM-chitosan membranes to skin fibroblasts was better than chitosan membranes.

Key words chitosan, carboxymethyl-chitosan (CM-chitosan), membrane, skin fibroblast, cytocompatibility

^{*} This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39970212).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-532-2032586, E-mail: xgchen6@hotmail.com

Received: August 27, 2002 Accepted: October 16, 2002