

辐照灭菌对重组胶原蛋白冻干产品蛋白结构的影响

庄心蕊 刘凤珍 刘建建 李漫 苏江伟 吴万福

(华熙生物科技股份有限公司 济南 250000)

摘要 评价辐照灭菌对重组胶原蛋白冻干产品结构的影响,考察该灭菌工艺用于该类产品灭菌的安全性与有效性。采用吸收剂量 15 kGy 对重组胶原蛋白冻干样品进行辐照灭菌,设置未辐照样品为对照组,通过一级结构(肽图分析、肽段覆盖率、末端氨基酸序列)、二级结构及生物学评价,对比辐照后样品与对照组的各项指标变化。结果表明,经过吸收剂量 15 kGy 辐照灭菌后,重组胶原蛋白的分子结构、理化性质与对照组相比,未出现异常改变,且灭菌后样品的无菌检查结果均符合要求,达到医用产品无菌标准。吸收剂量为 15 kGy 时可有效实现辐照灭菌目标,且不会对重组胶原蛋白冻干产品质量产生影响,可作为该类产品可靠的终端灭菌方法。

关键词 重组胶原蛋白, 辐照灭菌, 蛋白结构, 生物安全性

中图分类号 TL13

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2026-0065

CSTR: 32195.14.j.JRRRP.1000-3436.2026-0065

引用该文:

庄心蕊, 刘凤珍, 刘建建, 等. 辐照灭菌对重组胶原蛋白冻干产品蛋白结构的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, XXXX, XX(X): XXXXXX. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2026-0065.

ZHUANG Xinrui, LIU Fengzhen, LIU Jianjian, *et al.* Influence of irradiation sterilization on the protein structure of recombinant collagen lyophilized products[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, XXXX, XX(X): XXXXXX. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2026-0065.



Influence of irradiation sterilization on the protein structure of recombinant collagen lyophilized products

ZHUANG Xinrui LIU Fengzhen LIU Jianjian LI Man SU Jiangwei WU Wanfu

(Bloomage Biotechnology Corporation Limited, Jinan 250000, China)

ABSTRACT This study aimed to evaluate the effect of irradiation sterilization on the structural characteristics of recombinant collagen lyophilized products, as well as the safety and efficacy of this sterilization approach for such products. Recombinant collagen lyophilized samples were sterilized at an irradiation dose of 15 kGy, with non-irradiated samples set as the control group. Multiple indicators before and after irradiation were compared and analyzed, including the primary structure (via peptide mapping, peptide coverage analysis, and terminal amino acid sequencing), secondary structure, and biological properties of the samples. The results showed that no abnormal changes were found in the molecular structure or physicochemical properties of recombinant collagen after 15 kGy irradiation compared with the control group. All irradiated samples passed the sterility test and fully complied with

第一作者: 庄心蕊, 女, 1994 年 2 月, 2019 年于哈尔滨工业大学获得硕士学位, 医疗器械研发

通信作者: 刘建建, 正高级工程师, E-mail: 1606938742@qq.com

收稿日期: 初稿 2026-06-05; 修回 2026-09-15

First author: ZHUANG Xinrui (female) was born in February 1994, and obtained a master 's degree from Harbin Institute of Technology in 2019. Now she is a research personnel at medical devices.

Corresponding author: LIU Jianjian, senior engineer, E-mail: 1606938742@qq.com

Received 05 June 2026; accepted 15 September 2026

the sterility standards for medical products. Irradiation sterilization at 15 kGy can achieve effective sterilization without impairing the quality of recombinant collagen lyophilized products, which serves as a reliable terminal sterilization method for this type of product.

KEYWORDS Recombinant collagen, Irradiation sterilization, Protein structure, Biosafety

CLC TL13

重组胶原蛋白主要是采用DNA技术,对编码所需的人胶原蛋白质的氨基酸序列进行修饰,利用质粒或病毒等载体将目的基因带入适当的宿主细胞中,表达并翻译成胶原蛋白,相对于动物胶原蛋白而言,具有水溶性好、无免疫原性、产量可控、热稳定性高、高生物活性、具有修复损伤、细胞修复的作用,以及良好的黏附能力等优势^[1-2],故被广泛制成医疗器械,应用在创面敷料、修复凝胶、医疗美容等医美以及组织工程领域^[3-5]。无菌的重组胶原蛋白敷料作为医疗器械,优势在于成分上更为安全,极少量或不添加防腐剂,进而减少敏感肌对特殊成分的敏感度以及过敏现象的发生,所以灭菌方式对医用重组胶原蛋白类产品至关重要。灭菌方式不仅要求达到产品无菌效果,还需保障产品有效成分的结构与活性不受破坏,所以灭菌工艺的选择直接关系产品质量与使用安全。对于重组胶原蛋白类产品的终端灭菌方法有多种,包括紫外灭菌、环氧乙烷灭菌、湿热灭菌、辐照灭菌等。其中辐照灭菌是目前医疗器械、生物制品常用的冷灭菌技术^[6],相较于传统的灭菌方式,该灭菌技术操作简便、高效、无残留、灭菌均匀,避免了温度损伤、穿透性差等缺陷,适合冻干等固体产品^[7-8]。研究表明,辐照灭菌的间接作用引起的DNA损伤是微生物致死的主要原因,在辐照过程中,生物大分子易发生氧化还原反应,导致大分子结构被破坏,降低或者失去生物功能,进而杀死微生物^[9]。此外,据相关文献报道,针对于重组胶原蛋白类产品,辐照灭菌可能会对重组胶原蛋白中的氨基酸造成影响,如断裂或者交联^[10-12],辐照灭菌为常用灭菌方式,但是高射线灭菌会不可避免的影响胶原蛋白的生物学性能。有研究表明,高剂量的辐照灭菌会引起胶原的蜕变,并且影响生物活性,但在尽量减少产品初始菌的操作下,15 kGy能够同时满足有效灭菌和可接受组织的损伤^[13]。Journeaux等^[14]也通过VD_{max} 15的辐照灭菌验证方法证实了15 kGy可作为骨移植物的有效辐照灭菌剂量。目前ISO 11137-2: 2013^[15]也给出使用15 kGy作为辐照灭

菌剂量的基础以及需要满足的条件,但针对于重组胶原蛋白冻干类的产品在可满足使用吸收剂量15 kGy进行灭菌的条件下,其胶原蛋白结构是否会发生变化并未有相关文献报道。

本研究主要基于重组胶原蛋白冻干类产品在可达到无菌水平的前提下选择吸收剂量15 kGy进行辐照处理,然后针对于在该辐照灭菌的条件下,该产品的胶原蛋白是否会引发分子链降解、分子结构是否会发生改变等问题展开研究,并基于分析后的结果说明该剂量条件下的辐照灭菌方式的实际应用价值,为同类医用产品的灭菌技术应用提供一定的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 样品制备

对照组:本文选择辐照组的组成成分重组III型人源化胶原蛋白作为对照组,简称重组胶原蛋白(来源:华熙生物科技(天津)有限公司)。重组胶原蛋白的氨基酸序列均为已知,其氨基酸序列已在专利中进行了详细描述,专利公告号:CN114805551B^[16],且该原料已经进行了医疗器械主文档登记,登记号:M2024190-000,该氨基酸序列均已被确认,故下述表征结构中,对照组的肽段覆盖率、C端、N端研究内容均基于该重组胶原蛋白的已确认的氨基酸序列进行分析。

辐照组:产品名称:医用重组胶原蛋白敷料(鲁械注准20252140310;规格:10 mg/瓶;批号:A20251202;组成成分:重组胶原蛋白;产品日常工艺灭菌剂量为11.1 kGy(该灭菌剂量按照ISO 11137-2: 2013^[15]方法1进行的灭菌验证及确认得到)。

辐照组灭菌前的制备方法:按照产品上市的生产工艺及生产批量进行生产,将配方量的重组胶原蛋白溶解于纯化水中得到溶解均匀的溶液,将溶液灌装于玻璃制瓶中,通过冻干工艺进行冻干,得到辐照灭菌前的医用重组胶原蛋白敷料。

细胞毒性试验中,细胞毒性所使用细胞选用

L929细胞，是一种源自小鼠的成纤维细胞样细胞系，其对试验样品浸提液反应灵敏，是GB/T 16886.5—2017^[17]推荐使用的用于医疗器械生物相容性评价的细胞系之一，故该试验选用其作为细胞毒性测试时所用细胞。细胞毒性阴性对照组、阳性对照组的选择以及试验液制备、阴性对照试验液制备、阳性对照试验液制备的制备方法均遵循了GB/T 16886.12—2023^[18]的基本原则。

细胞毒性试验液制备：按照0.2 g/mL浸提比例，向医用重组胶原蛋白敷料（10 mg）中加入5 mL含10%胎牛血清MEM培养基，（37±1）℃浸提，（24±2）h制备试验液。

细胞毒性试验阴性对照试验液制备：选择已知无细胞毒性的高密度聚乙烯树脂4 g，采用121℃高压灭菌20 min，然后放入20 mL含10%胎牛血清MEM培养基中，（37±1）℃浸提，（24±2）h制备阴性对照试验液，作为阴性对照组。

细胞毒性试验阳性对照试验液制备：选择毒性明确且强烈的10%浓度的DMSO，将其放入含10%胎牛血清MEM培养基中，（37±1）℃浸提，（24±2）h制备阳性试验液，作为阳性对照组。

1.2 辐照处理

医用重组胶原蛋白敷料为已经取得Ⅱ类医疗器械注册证产品，在现有生产工艺条件下，经GB/T 16886.12—2023^[18]方法1灭菌验证得到该产品的灭菌吸收剂量为11.1 kGy，该剂量条件下，产品可满足无菌水平，但11.1 kGy并非辐照加工行业中常规使用的吸收剂量，实际生产是难以在盛业辐照设施中直接匹配执行，为兼顾工艺可行性与生产便利性，以及评估更高剂量对重组胶原蛋白类的产品的影响，故选择比11.1 kGy更高剂量的15 kGy作为吸收剂量进行研究。因此，辐照灭菌前的医用重组胶原蛋白敷料采用10 MeV/15 kW电子加速器，以15 kGy吸收剂量进行电子束辐照处理，获得辐照组样品；对照组不进行辐照处理。

1.3 表征方法

1.3.1 一级结构分析

肽图：HPLC肽图检查主要通过解析蛋白质的结构，可以检测蛋白质结构中的一些微小变化，进而比较不同的蛋白质一级结构之间的差异性。本实验通过HPLC肽图检查方法来直观地对比辐照组和对比组的肽段色谱峰位置以及指纹图谱的重

叠情况，以此判断经辐照灭菌处理是否对重组胶原蛋白的一级结构产生了影响。

肽段覆盖率分析：肽段覆盖率是指检测到的肽段的氨基酸数量占该蛋白质总氨基酸数量的比例，该方法是对胶原蛋白结构进行鉴定的金标准。该试验通过使用蛋白酶对辐照组进行酶解，然后使用LC-MS/MS对酶解后的肽段样品进行分析。最后使用Biopharma Finder软件对LC-MS/MS数据进行分析，基于对照组的理论序列，根据算法结果以及依据确定辐照组的肽段覆盖率，从而确定辐照组一级结构的完整性。

末端氨基酸序列分析：以对照组的氨基酸理论序列为基础，通过使用蛋白酶对辐照组进行酶解，然后使用LC-MS/MS对酶解后的肽段样品进行分析，最终使用软件对酶解后的数据进行分析并通过结果确定辐照组的C末端和N末端氨基酸序列是否符合理论序列，从而确定辐照后的产品的重组胶原蛋白是否发生截断或者修饰，进一步确定对照组与辐照组结构组成的一级结构的一致性。

1.3.2 二级结构分析

本试验是红外鉴别试验，采用傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR）技术，对比分析对照组和辐照组的红外特征谱图，按照《中华人民共和国药典》第四部0402 红外光谱法^[19]规定的方法进行测定，系统验证辐照灭菌工艺对重组胶原蛋白的二级结构、三螺旋完整性以及特征官能团的影响，从而进一步确认该辐照灭菌条件下对重组胶原蛋白的结构是否能够产生影响，同时为该辐照灭菌工艺的合理性与产品的安全性提供结构确证依据。

1.4 生物学评价

无菌：按照《中华人民共和国药典》第四部1101 无菌直接接种法^[19]对辐照组进行无菌检验。本试验使用直接接种法对辐照组进行无菌项目检验，该方法主要是将辐照组样品加入一定量的无菌水溶解后，直接与能支持微生物生长的培养基进行接触，通过观察培养基的浑浊程度来进行观察辐照组是否处于无菌状态，如果辐照组中存在活的微生物（细菌或真菌），在培养过程中，微生物会在适宜的营养培养基中生长繁殖，导致培养基变浑浊，从而判定辐照组为非无菌状态；反之，培养基在培养期间保持澄清状态，说明辐照组在该辐照灭菌工艺下可处于一个无菌水平。

细胞毒性：该试验主要是参考GB/T16886.5—2017^[17]、ISO 10993-5: 2009^[20]进行，采用最低必须培养基（Minimum essential medium, MEM）浸提液法结合3-（4，5-二甲基噻唑-2）-2，5-二苯基四氮唑溴盐（3-（4，5-dimethylthiazol-2-yl）-2，5-diphenyltetrazolium bromide, MTT）比色法进行评价对照组和辐照组的潜在细胞毒性，目的是为了确认辐照组与培养细胞接触后，能否引起毒性反应。进一步说明该辐照灭菌工艺对重组胶原蛋白生物学毒性是否产生影响。

2 结果与讨论

2.1 辐照灭菌对胶原蛋白一级结构完整性的影响

2.1.1 肽图分析

胶原蛋白通过胰蛋白酶处理后，理论上会产

生一组序列、长度、分子量和疏水性固定的肽段。肽段在经色谱分离后会形成特征性的指纹图谱，如果一级结构（氨基酸序列）发生改变时，酶解后所产生的肽段的数量、分子量或疏水性会发生一系列的变化，进而会导致图谱的峰数、保留时间和峰面积分布的发生改变。

本实验通过胰蛋白酶对辐照组和对照组进行酶解，然后通过高效液相色谱仪进行解析，得到各自对应的肽图。对照组色谱峰信息如图1所示，辐照组色谱峰信息如图2所示。通过两者的图谱发现，两个供试品的特征峰均全部存在，出峰数量均一致，且无新增的杂峰，说明辐照组无特征峰丢失或者新增情况，进一步说明辐照后的产品无新降解的肽段的生成以及无明显的降解产物或者杂质产生。

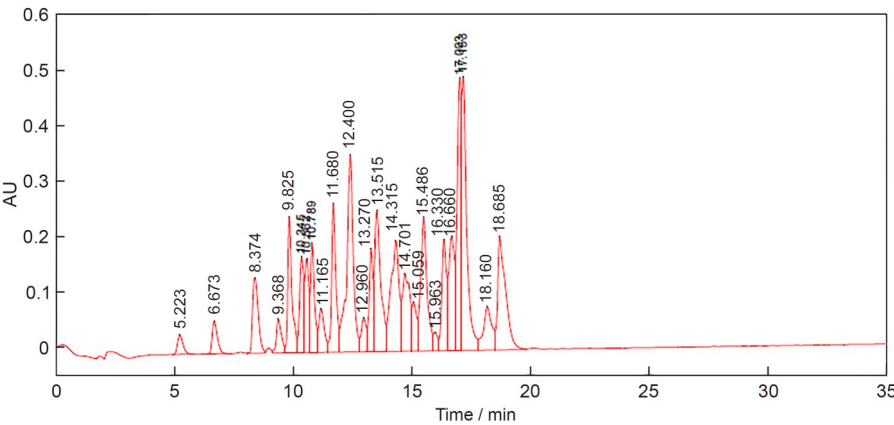


图1 对照组HPLC肽图图谱
Fig. 1 HPLC peptide chromatogram of the control group

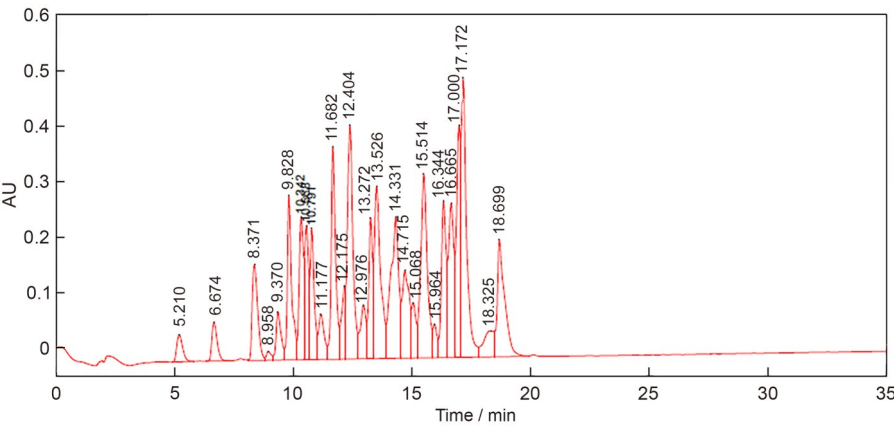


图2 辐照组HPLC肽图图谱
Fig. 2 HPLC peptide chromatogram of the irradiation group

通过图3可以直观地看出，两组供试品的峰型对称，峰高和峰面积一致，特征峰位置未发生偏

移；且从肽图特征峰的保留时间来看（图1~2），对照组的各主要肽段的保留时间在 5.223 min、

6.673 min、8.374 min、9.825 min、11.680 min、12.400 min、17.153 min、18.685 min，辐照组的各主要肽段的保留时间在 5.210、6.674 min、8.371 min、9.828 min、11.682 min、12.404 min、17.172 min、18.699 min，两个供试品特征峰的保

留时间高度重合，均落在保留时间偏差范围内 ($RSD < 0.5\%$)，说明辐照工艺处理后对辐照组的一级结构包括氨基酸序列、肽键结构并未产生影响，从而说明该辐照工艺下对辐照组的一级结构具有良好的兼容性。

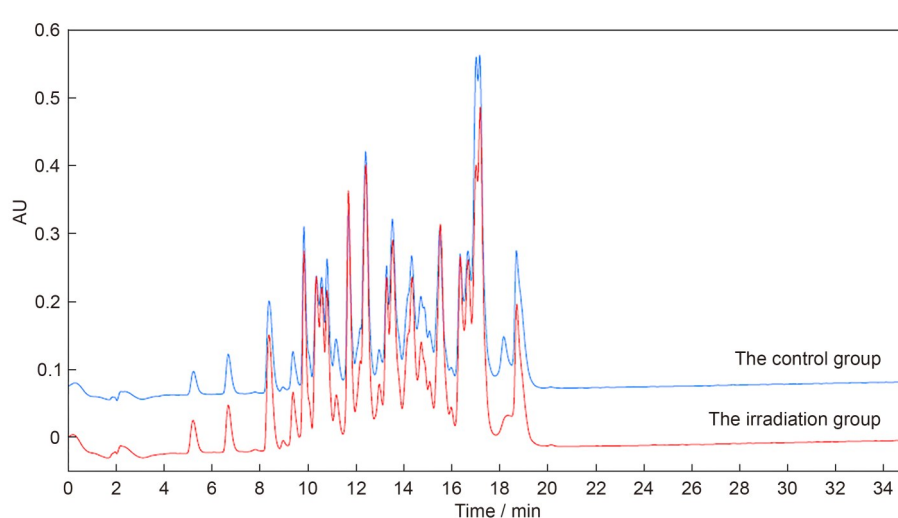


图3 对照组和辐照组的肽图对比图

Fig. 3 Comparison of peptide images between the control group and the irradiation group

2.1.2 肽图覆盖率分析

David 等^[21]指出胶原蛋白经过 γ 射线辐照后，会导致胶原蛋白分子中大量的肽键断裂，从而破坏了胶原蛋白的结构，进而影响胶原蛋白的生物活性，Abdelmouleh 等^[22]首次在没有溶剂环境中证实了电离辐射可以直接诱导胶原蛋白模拟肽发生了交联，这不仅说明了辐照不仅会导致胶原蛋白肽键的断裂，还会引发交联反应。对照组的氨基酸序列均为已知，故该肽段覆盖率仅对辐照组进行了胰蛋白酶 (Trypsin) 以及谷氨酸蛋白酶 (Club-C) 的酶解，目的是为了验证辐照组经过辐照后其肽段是否能和对照组的肽段能够对应，所得的基峰强度 (Base peak intensity, BPI) 图谱如图 4~5 所示。通过 Trypsin 酶解后的 BPI 图谱 (图 4) 得知，辐照组的酶解产物肽段在 2~38 min 范围内分布广泛，峰的数量丰富且分离效果良好，表明在该条件下辐照组被充分的酶解。特征峰主要体现在 9.22 min、12.89 min、15.35 min、19.73 min、23.73 min、31.56 min 等位置，其中 15.35 min 处的响应峰最高，为辐照组主要的肽征段。胰蛋白酶特异性识别并切割赖氨酸和精氨酸羧基端肽键，酶解产生的肽段长度适中、极性分布范围广，在亲水段与疏水段均有明显的信号，可实现对重组胶原蛋白亲水区以及多数常规序列区域的

有效覆盖。

通过图 5 分析可知，肽段峰主要集中于 10 ~ 35 min 区间，整体峰数量少于胰蛋白酶酶解组，且高丰度峰明显偏向高保留时间区域，表明产物疏水性更强、肽段整体偏长。主要特征峰出现在 13.37 min、25.99 min、26.04 min、30.08 min、33.26 min 等位置，其中 13.37 min 处峰强度最高。通过以上酶解后的数据进行整合处理，将得到原始数据与对照组理论序列进行对比分析，最终基于对照组的理论序列，得到辐照组的肽段覆盖率为 100%，表明该辐照条件对辐照组中的重组胶原蛋白的序列没有产生影响，并可初步判断未发生肽段的断裂以及交联反应，进一步说明辐照组保持了一级结构的完整性。

2.1.3 末端氨基酸序列 (C 端、N 端)

辐照组经酶解后，通过 LC-MS/MS 进行分析。根据对照组理论序列建立的蛋白库进行搜索，经查库分析，辐照组的 N 末端氨基酸序列匹配列表见表 1；C 末端氨基酸序列匹配列表如表 2 所示。

综上，辐照组 N 末端氨基酸序列为 GAPGLKG，C 端序列为 RGAAGIKGHRGFPGNPGAP，从现有的专利获知，对照组的 N 末端氨基酸序列为 GAPGLKG，C 末端氨基酸序列为 RGAAGIKGHRGFPGNPGAP^[16]，检

验结果表明，辐照组的N/C末端序列与对照组末端氨基酸序列保持一致，说明了在该辐照工艺条件下，重组胶原蛋白的末端未发生脱落或降解，进一步证明了辐照组肽链骨架的完整性^[23]。

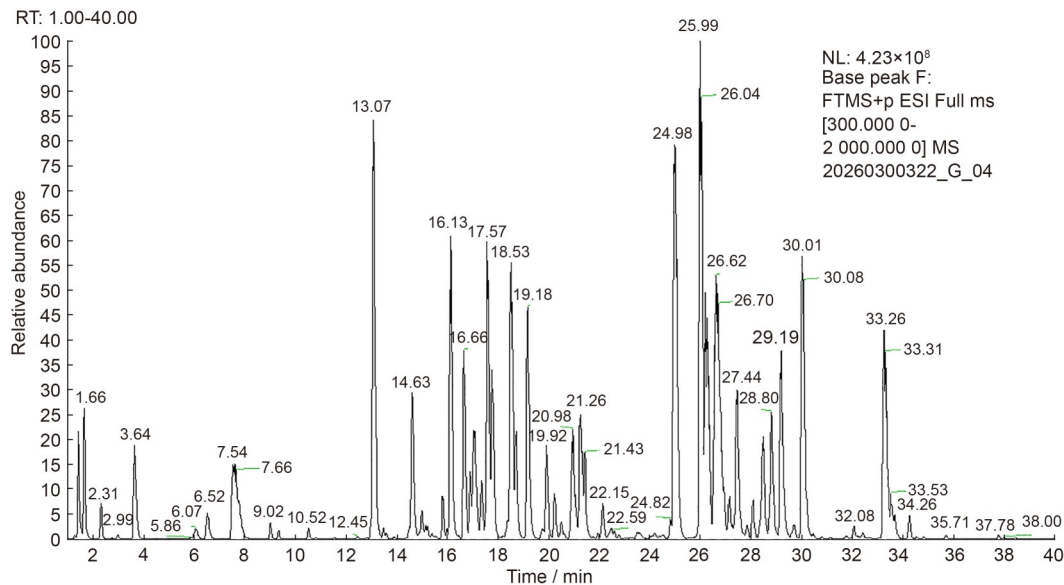


图4 辐照组 Trypsin酶解后的BPI图谱
Fig. 4 BPI spectrum of Trypsin after enzymatic hydrolysis in the irradiation group

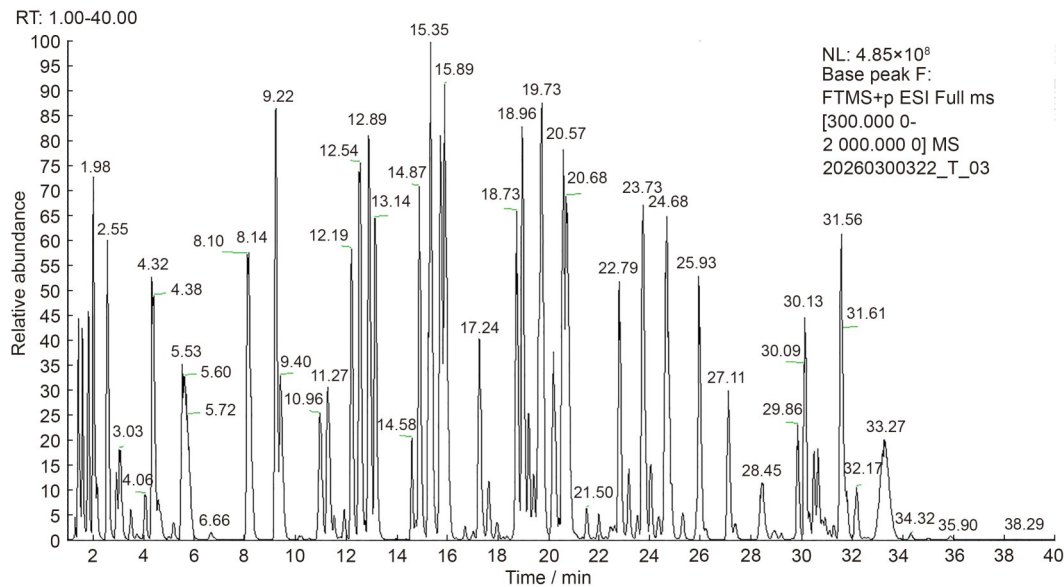


图5 辐照组 Glu-C酶解后的BPI图谱
Fig. 5 BPI spectrum of Glu-C after enzymatic hydrolysis in the irradiation group

表1 N端氨基酸序列匹配列表
Table 1 List of N-terminal amino acid sequence matching

鉴定编号	肽段氨基酸	修饰位点	保留时间	质核比	带电数	质量	实测单同位	理论单同位	质谱峰面积
Identification	序列	Modification	RT	M / Z	Charge	偏差 /	素分子量	素分子量	MS area
	Peptide se- quence				state	10 ⁻⁶ Delta	Mono mass Exp.	Mono mass Theo.	
1:G1-E8=	GAPGLKGE	无修饰位点	18.83	364.701 0	2	1.34	727.387 5	727.386 5	52 831 012
727.386 5 m		None							

表2 C端氨基酸序列匹配列表
Table 2 List of C-terminal amino acid sequence matching

鉴定编号 Identification	肽段氨基酸 序列 Peptide se- quence	修饰位点 Modifica- tion	保留 时间 RT	质核比 M/Z	带电数 Charge state	质量偏 差/ 10^{-6} Delta	实测单同位 素分子量 Mono mass Exp.	理论单同位 素分子量 Mono mass Theo.	质谱峰面积 MS area
1:R479-P497=	RGAAGIK	无修饰位 点 None	26.66	454.998 0	4	2.00	1 815.964 1	1 815.960 5	159 325 024
1815.960 5 m	GHRGFP- GNPGAP								

2.2 辐照灭菌对蛋白二级结构的影响

通过对比对照组和辐照组的红外光谱发现,两者红外光谱整体轮廓高度重合,均完整呈现了胶原蛋白的特征吸收带,且未有明显的峰位偏移、峰形畸变或者新增杂峰,初步表明辐照灭菌工艺未对重组胶原蛋白的整体结构产生显著的影响。

酰胺I带($1\ 600\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$)对于研究蛋白质二级结构最有价值^[24],是评估胶原蛋白二级结构与三螺旋完整性的核心区域。通过图6(a)(对照组)与6(b)(辐照组)对比发现,两组样品均于 $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 左右出现稳定的中心峰,为 α -螺旋(三螺旋)结构的特征峰位,该特征峰是由C=O伸缩振动引起的,辐照组也在该处出现对应的吸收峰,且峰型对称,无明显偏移,表明产品经过辐照灭菌后并未改变重组胶原蛋白以 α -螺旋为主的二级结构,三螺旋核心构象完整。

在酰胺II带($1\ 500\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$)处,对照组

和辐照组均在 $1\ 540\sim 1\ 550\text{ cm}^{-1}$ 出现典型中强吸收峰,该处对应着胶原蛋白的肽键N-H弯曲振动与C-N伸缩振动,两者的峰位、峰强无差异,说明产品经过辐照灭菌后,重组胶原蛋白的肽键结构并未被破坏,且无明显降解现象发生。

两组样品均在酰胺III带($1\ 220\sim 1\ 400\text{ cm}^{-1}$)处的 $1\ 230\sim 1\ 235\text{ cm}^{-1}$ 出现了特征吸收峰,通过谱图发现 $1\ 235\text{ cm}^{-1}$ 与 $1\ 450\text{ cm}^{-1}$ 峰的吸光度比值($A_{1\ 235}/A_{1\ 450}$)均接近1.0,均符合胶原蛋白三螺旋结构完整性的标准,证明辐照灭菌未破坏重组胶原蛋白的三螺旋结构^[25]。

此外,从酰胺A带和酰胺B带范围内发现,对照组和辐照组均出现一致性的典型性吸收峰(肽键N-H伸缩振动峰及C-H₂不对称/对称伸缩振动峰),两组样品的峰位置、峰型无显著差异,这表明辐照灭菌后对重组胶原蛋白的分子内氢键以及胶原蛋白的骨架未造成影响。

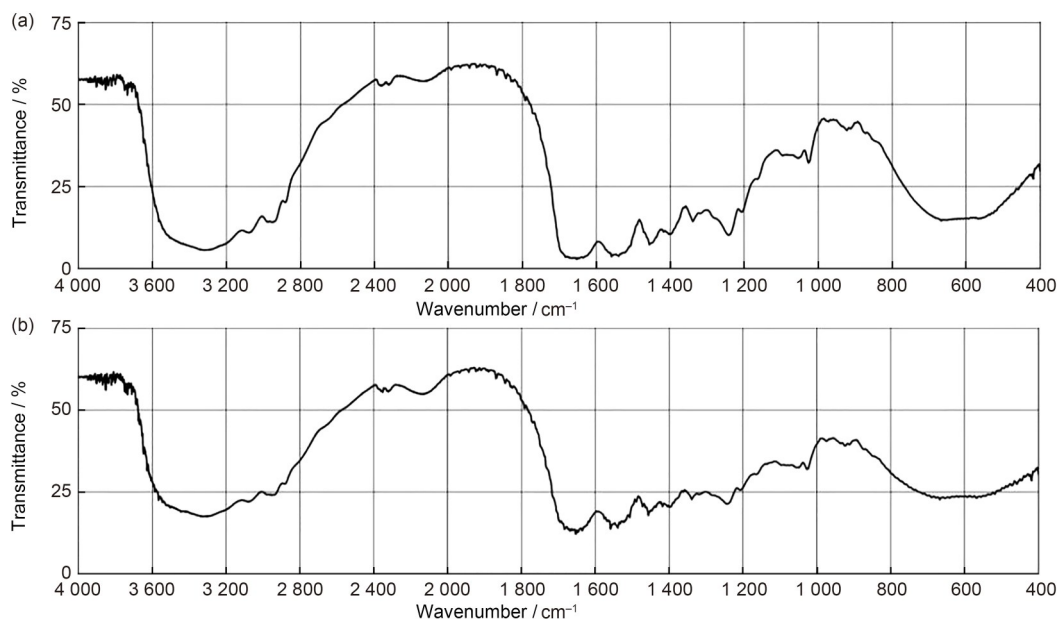


图6 对照组(a)与辐照组(b)红外光谱对比图

Fig. 6 Comparison of infrared spectra between the control group (a) and the irradiation group (b)

综上，经辐照灭菌后的辐照组，其红外特征谱图与对照组高度重合，所有胶原特征峰（酰胺 I/II/III 带、酰胺 A 带和酰胺 B 带）均完整保留，峰位、峰形、峰强无显著的差异，无新增杂峰，证明该辐照工艺下未引发胶原的降解、交联或化学结构修饰，且未破坏胶原蛋白的 α -螺旋二级结构与三螺旋高级结构，维持了其生物学活性的结构基础。

2.3 生物学评价

2.3.1 无菌

按照 GB 18280.1—2015^[26] 首先对辐照组进行灭菌工艺前的样品进行了生物负载的检验，检验结果显示该产品在灭菌工艺进行前其生物负载<

1.0，符合 VD_{max} 15 kGy 的灭菌方式。以生物负载检验结果为基础，使用 15 kGy 剂量进行辐照灭菌后，对辐照组按照《中华人民共和国药典》第四部 1101 无菌 直接接种法^[19] 进行无菌检验，结果显示该产品无菌。说明在该辐照条件下，按照产品的生产工艺进行生产，该产品可达到无菌要求。

2.3.2 细胞毒性

为了进一步验证辐照灭菌后对重组胶原蛋白的安全性影响，对对照组和辐照组分别进行了细胞毒性试验。取样品，按 0.2 g/mL 浸提介质的比例，浸提介质为含血清的 MEM 培养基， $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 浸提， (24 ± 2) h 制备试验液，取试验液按照 GB/T 16886.5—2017^[17] 规定的 MTT 法进行。对照组和辐照组的细胞毒性结果如表 3 所示。

表3 对照组与辐照组细胞毒性结果表
Table 3 Cytotoxicity results of the control group and the irradiation group

样品 Sample	批号 Batch No.	浸提倍数 Extraction ratio	相对增值率 / % Relative growth rate
阴性对照组 NC	—	—	100.00±2.62
阳性对照组 PC	—	—	12.59±3.63***
对照组 The control group	T229250002	1:5	84.56±3.82***
辐照组 The irradiation group	A20251202	1:5	82.44±1.93***

注：***,表示与 NC 组相比, $p<0.001$ 。
Note: ***, indicates that compared with the NC group, $p<0.001$.

按照 GB/T 16886.5—2017 附录 C^[17] 中表示，如细胞存活率下降到<空白的 70%，则具有潜在的细胞毒性，如细胞存活率 $\geq$ 空白的 70%，则判定样品无细胞毒性或细胞毒性反应极轻微。通过表 3 得知，辐照组以及对照组的相对增值率均>70%，故均无潜在的细胞毒性，同时也进一步说明，在此辐照的条件下，辐照未对重组胶原蛋白的细胞毒性产生影响，未影响重组胶原的蛋白的安全性，该灭菌方式具有可行性。

3 结论

本研究利用肽图、肽段覆盖率、末端氨基酸序列（C 端、N 段）、二级结构（红外光谱）以及生物学评价（无菌、细胞毒性）等分析方法，对经过 15 kGy 辐照灭菌工艺处理的医用重组胶原蛋白敷料进行了结构表征，以及与对照组的相关数据进行对比分析，结果显示：经 15 kGy 吸收剂量处理后，辐照组的胶原蛋白的三螺旋结构保持完整，胶原蛋白分子结构未受到破坏，且也未发生

修饰、交联、肽段断裂等情况。
本研究适用于经过灭菌验证可使用 15 kGy 作为灭菌剂量的产品范畴，通过上述表征表明该剂量对胶原蛋白分子结构不造成影响，在保证冻干类产品保持无菌水平的同时，也维持产品中胶原蛋白的结构稳定性与生物学活性，即符合产品质量与安全性要求，也保证了产品的安全性和有效性，为重组胶原蛋白冻干类产品的灭菌方式提供了可行性依据。对于所需灭菌剂量高于 15 kGy 的才能达到无菌水平（ 10^{-6} ）的冻干类产品，其辐照灭菌工艺的适用性及结构安全性尚需进一步开展针对性研究予以验证。

作者贡献声明 庄心蕊负责材料的制备及表征、数据处理与分析及论文的撰写；刘凤珍辅助材料表征；刘建建参与材料制备及表征技术指导，参与论文编写指导；李漫负责试验方案的设计及规划；苏江伟负责实验结果的审核及论文的修改；吴万福负责实验结果的审核及论文的修改。所有作者均已阅读并认可该论文最终版的所有内容。

参考文献

- 1 周小婷, 韩颖, 魏聪, 等. 重组III型人源化胶原蛋白的应用进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2026, **22**(3): 324-329. DOI: 10.3969/j.issn.1673-0364.2026.03.016.
ZHOU Xiaoting, HAN Ying, WEI Cong, *et al.* Research advances in the applications of recombinant humanized collagen type III[J]. Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery, 2026, **22**(3): 324-329. DOI: 10.3969/j.issn.1673-0364.2026.03.016.
- 2 王啸尘, 黄伟, 刘英杰, 等. 重组胶原蛋白的不同表达体系研究进展[J]. 山东化工, 2026, **55**(1): 99-104. DOI: 10.3969/j.issn.1008-021X.2026.01.021.
WANG Xiaochen, HUANG Wei, LIU Yingjie, *et al.* Research progress on different expression systems of recombinant collagen protein[J]. Shandong Chemical Industry, 2026, **55**(1): 99-104. DOI: 10.3969/j.issn.1008-021X.2026.01.021.
- 3 范婷, 赵健烽, 常烨璐, 等. 重组人源化III型胶原蛋白对皮肤功能性相关基因表达的影响[J]. 日用化学工业, 2022, **52**(12): 1326-1332. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1803.2022.12.010.
FAN Ting, ZHAO Jianfeng, CHANG Yejun, *et al.* Effect of recombinant humanized type III collagen on expression of skin functional related genes[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2022, **52**(12): 1326-1332. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1803.2022.12.010.
- 4 王建, 范毓慧, 李丹凤, 等. 基于体外水平的重组人源化胶原蛋白护肤功效研究[J]. 日用化学工业(中英文), 2024, **54**(9): 1030-1038. DOI: 10.3969/j.issn.2097-2806.2024.09.003.
WANG Jian, FAN Yuhui, LI Danfeng, *et al.* Skin care efficacy study of recombinant humanized collagen based on *in vitro* level[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2024, **54**(9): 1030-1038. DOI: 10.3969/j.issn.2097-2806.2024.09.003.
- 5 李佳, 安苗青, 吕晨豪, 等. 重组人源胶原蛋白对D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用及机制研究[J]. 食品工业科技, 2023, **44**(10): 343-352. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070013.
LI Jia, AN Miaoqing, LYU Chenhao, *et al.* Anti-aging effects and mechanisms of recombinant human-derived collagen on aging mouse induced by D-galactose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, **44**(10): 343-352. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070013.
- 6 何凯锋, 陈秀金, 臧鹏, 等. 辐照杀菌技术对食品品质的影响及控制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, **49**(10): 299-305. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032622.
HE Kaifeng, CHEN Xiujin, ZANG Peng, *et al.* Research progress on effect of irradiation sterilization on food quality and its control[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, **49**(10): 299-305. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032622.
- 7 Jeong J O, Jeong S I, Park J S, *et al.* One step gamma-ray induced crosslinking and sterilization of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/collagen composite scaffolds[J]. Materials Advances, 2025, **6**(6): 1883-1888. DOI: 10.1039/d4ma01046a.
- 8 郭丽莉, 吴国忠, 秦子淇. 辐照技术为武汉疫情提供快速高效的医用防护服灭菌服务[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2020, **38**(1): 011101. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.011101.
GUO Lili, WU Guozhong, QIN Ziqi. Radiation technique provides fast and qualified sterilization service for disposable medical protective clothing to the fight against novel coronavirus pneumonia outbreak in Wuhan[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2020, **38**(1): 011101. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.011101.
- 9 Reineke K, Mathys A. Endospore inactivation by emerging technologies: a review of target structures and inactivation mechanisms[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2020, **11**: 255-274. DOI: 10.1146/annurev-food-032519-051632.
- 10 Šupová M, Suchý T, Vopálková M, *et al.* The electron beam irradiation of type I bovine collagen gels: insights into radiation dose and water content impacts on the composition and the structural, rheological, thermal and mechanical properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, **320**: 146099. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.146099.
- 11 Lewandowska H, Eljaszewicz A, Popławska I, *et al.* Optimization of novel human acellular dermal dressing sterilization for routine use in clinical practice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, **22**(16): 8467. DOI: 10.3390/ijms22168467.
- 12 Moise V, Vasilca S, Baltac A, *et al.* Physicochemical study for characterization of lyophilized collagens irradiated with gamma radiation and for optimization of medical device manufacturing process[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2020, **170**: 108658. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2019.108658.
- 13 孙世荃, 刘赫臣, 石占城, 等. 皮肤和骨移植植物辐照生物效应研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1993, **11**(2):

- 121-125.
- SUN Shiquan, LIU Hechen, SHI Zhancheng, *et al.* Study on the biological effect of radiation on the skin and bone grafts[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 1993, **11**(2): 121-125.
- 14 Nguyen H, Morgan D A F, Sly L I, *et al.* Validation of 15 kGy as a radiation sterilisation dose for bone allografts manufactured at the Queensland Bone Bank: application of the VD_{max} 15 method[J]. *Cell and Tissue Banking*, 2008, **9**(2): 139-147. DOI: 10.1007/s10561-008-9064-5.
 - 15 International Organization for Standardization. Sterilization of health care products — Radiation — Part 2: Establishing the sterilization dose: ISO 11137-2:2013 [S]. Geneva: ISO, 2013.
 - 16 华熙生物科技股份有限公司. 一种重组III型胶原蛋白及其制备方法: ZL202210739807.1[P]. 2022-09-13. Bloomage Biotechnology Corporation Limited. A recombinant type III collagen and its preparation method: ZL202210739807.1[P]. 2022-09-13.
 - 17 国家食品药品监督管理总局济南医疗器械质量监督检验中心, 国家食品药品监督管理总局北京医疗器械质量监督检验中心, 江苏省医疗器械检验所, 等. 医疗器械生物学评价 第5部分: 体外细胞毒性试验: GB/T 16886.5—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. NMPA-Jinan Quality Supervision and Inspection Center for Medical Devices, NMPA- Beijing Quality Supervision and Inspection Center for Medical Devices, Jiangsu Institute of Medical Device Testing, *et al.* Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity: GB/T 16886.5—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
 - 18 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价 第12部分: 样品制备与参照材料: GB/T 16886.12—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023. State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials: GB/T 16886.12—2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.
 - 19 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2025年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2025[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2025.
 - 20 International Organization for Standardization (ISO). Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity: ISO 10993-5: 2009[S]. Geneva: ISO, 2009.
 - 21 Cheung D T, Perelman N, Tong D, *et al.* The effect of γ -irradiation on collagen molecules, isolated α -chains, and crosslinked native fibers[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1990, **24**(5): 581-589. DOI: 10.1002/jbm.820240505.
 - 22 Abdelmouleh M, Amin M, Lalande M, *et al.* Ionizing radiation induces cross-linking of two noncovalently bound collagen mimetic peptide triple helices in the absence of a molecular environment[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2023, **25**(42): 29249-29256. DOI: 10.1039/d3cp03264g.
 - 23 Przybytniak G, Sadło J, Dąbrowska M, *et al.* Radicals initiated by gamma rays in selected amino acids and collagen[J]. *Nukleonika*, 2019, **64**(1): 11-17. DOI: 10.2478/nuka-2019-0002.
 - 24 高红艳, 许强, 杨志怀. FT-IR 在研究蛋白质二级结构中的应用[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版), 2009, **29**(3): 47-53. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1261.2009.03.012. GAO Hongyan, XU Qiang, YANG Zhihui. Research on protein secondary structure by Fourier transformation infrared spectroscopy[J]. *Journal of Baoji University of Arts and Sciences (Natural Science Edition)*, 2009, **29**(3): 47-53. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1261.2009.03.012.
 - 25 张金伟, 曹念, 陈武勇. 微波辐照对胶原蛋白三股螺旋结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, **38**(5): 1353-1357. ZHANG Jinwei, CAO Nian, CHEN Wuyong. Influence of microwave irradiation on collagen triple helix structure [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2018, **38**(5): 1353-1357.
 - 26 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 医疗保健产品灭菌 辐射 第1部分: 医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求: GB 18280.1—2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Sterilization of health care products- Radiation-part 1: Requirements for development, validation and routine control of sterilization process for medical devices: GB 18280.1—2015[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.