

The Comparative Study of Collagen Type I Hemostatic Membrane and Gelatin Hemostatic Membrane

Zhi-guang Duan^{1,2}, Dai-di Fan^{1,2}, Chen-hui Zhu^{1,2}, Xiao-xuan Ma^{1,2}, Jun-feng Xi^{1,2}, Yuan-yuan Yu^{1,2}

¹College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an, China 710069

²Shaanxi Key Laboratory of Degradable Medical Materials, Xi'an, China 710069

Email: duan11170@163.com

Abstract: To investigate the functional differences between the two kinds of hemostatic membranes those are mainly made of collagen type I and the gelatin respectively. **Methods** Collagen type I and gelatin were used as fundamental ingredient to prepare a new kind of absorbable hemostatic membrane was by vacuum freeze-drying technology. Two kinds of hemostatic membranes were used to detect the microstructure under the microscope, to analyze the cell compatibility, to observe the hemostatic effect on the rabbit central artery of the ear and its liver trauma, respectively. **Results** The pore size of collagen type I hemostatic membrane is more homogeneous than gelatin hemostatic membrane. Cytological experiments show that collagen type I hemostatic membrane and gelatin hemostatic membrane were planted 2BS, 2d and 5d later using CFDA to stain the viable cells and use fluorescence microscopy to detect the cells density, the cells density of collagen type I was significantly greater than the gelatin group, collagen type I hemostatic membrane has better cell compatibility. Collagen Type I hemostatic membrane on the rabbit central artery of the ear bleeding, the average period of hemostasis was $113 \pm 6s$, compared with gelatin group of $287 \pm 11s$ that the hemostatic effect is better. In the rabbit liver wound hemostasis tests, the average period of hemostasis of collagen type I hemostatic membrane was $89 \pm 5s$, compared with gelatin group of $187 \pm 9s$, collagen type I hemostatic membrane has better hemostatic effect. **Conclusions** The properties of collagen type I absorbable hemostatic membrane are better than gelatin group.

Keywords: collagen type I ; gelatin; hemostatic

I 型胶原蛋白与明胶制备止血膜的性能对比研究

段志广^{1,2}, 范代娣^{1,2}, 朱晨辉^{1,2}, 马晓轩^{1,2}, 惠俊峰^{1,2}, 俞园园^{1,2}

¹西北大学化工学院, 陕西西安, 中国, 710069

²陕西省可降解生物医用材料重点实验室, 陕西西安, 中国, 710069

Email: duan11170@163.com

摘要: 目的 探讨分别以 I 型胶原蛋白和明胶作为主要原料制备得到止血膜的性能差异。方法 分别使用 I 型胶原蛋白和明胶作为主要原料, 通过真空冷冻干燥技术制备新型可吸收止血膜, 分别对制备的止血膜进行光学显微镜观察、细胞相容性实验、兔耳部中央动脉出血止血性能和兔肝脏创面止血性能试验。结果 以 I 型胶原蛋白为主要原料制备的止血膜孔径较明胶止血膜更为均匀; 细胞学实验表明: I 型胶原蛋白止血膜和明胶止血膜分别种植人胚肺成纤维细胞 (2BS), 2d 和 5d 时使用 CFDA 对活细胞染色荧光显微镜观察, I 型胶原蛋白止血膜表面细胞密度均明显大于明胶组, 细胞相容性更好; I 型胶原蛋白止血膜对兔耳部中央动脉出血的平均止血时间为 $113 \pm 6s$, 较明胶组的 $287 \pm 11s$ 止血效果优异; 兔肝脏创面止血试验中, I 型胶原蛋白止血膜对兔肝脏创面的平均止血时间为 $89 \pm 5s$, 较明胶组的 $187 \pm 9s$ 止血效果更优。结论 以 I 型胶原蛋白作为主要原料制备得到的可吸收止血膜的各项性能均优于明胶组。

关键词: I 型胶原蛋白; 明胶; 止血

1 引言

突发性的创伤造成的后果大多数都是人体的局部

基金项目: 教育部高校博士点专项 (20096101120023); 教育部高校博士点专项 (20096101110014); 陕西省自然科学基金项目 (SJ08B03)

大量出血, 尤其是遇到战争或是地震、泥石流等自然灾害, 直径较大的血管的破裂造成的出血结果往往是致命的, 短时间内大量出血 800ml 就足以致人死亡。如果出血部位是在体内组织或是脏器, 少量出血就会造成严重

的后果, 会引发严重的炎症反应或是造成器官衰竭。战争和突发性的自然灾害造成的死亡人群中, 有 90% 以上都与未能及时止血相关。这些情况给外科医生提出了难题^[1]。面对这些情况, 寻求性能优异的止血材料就有着重大的现实意义。随着对止血技术和止血材料研究的不断深入, 研究人员发现新型的可吸收止血材料很可能将最终成为止血产品的首选^[2]。目前市场常见的可吸收止血产品有明胶海绵、胶原蛋白海绵、氧化纤维素和纤维蛋白胶等, 由于材料本身的性质和生产工艺的原因, 这些止血产品还存在着很多不足之处。比如止血效果不理想、使用不方便、降解速度慢、炎症反应较重等。目前较为认可的止血产品是胶原蛋白海绵和明胶海绵, 尤其是在外科手术当中应用较多。为了考察 I 型胶原蛋白和明胶分别作为止血产品主要原料的差异, 我们进行了一系列的实验研究。

2 实验部分

2.1 止血膜的制备方法

2.1.1 实验材料

健康成年新西兰大白兔 (购自西安交通大学大学实验动物中心) 20 只, 雌雄各半, 体重 $2.5 \pm 0.2 \text{Kg}$; 6-羧基二乙酸荧光素 (CFDA)、I 型胶原蛋白和明胶均购自 Sigma 公司; 小牛血清和 1640 培养基均购自 Gibco 公司; 2BS (购自第四军医大学基础医学部); 真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司, FD-1A-50); 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司, AL204-IC); 超低温冰箱 (广州市菱志电子科技有限公司, MDF-192); 生物安全柜 (ESCO 公司, AC2-4A1); 生物显微镜 (Nikon 公司, 80i), 倒置显微镜 (Nikon 公司, 90i 带荧光附件); 其它试剂均为国产分析纯。

2.1.2 制备方法

精确称取 I 型胶原蛋白和明胶, 分别溶于体积分数为 0.5% 的醋酸溶液 (注射用水配制), 使最终 I 型胶原蛋白和明胶的质量分数均为 1.5%, 加入适量的甘油后搅拌均匀, 然后注入洁净的模具中, 放入超低温冰箱 -75°C 预冻 4h 后移入真空冷冻干燥机后开始干燥, 冷阱温度维持在 $-42^\circ\text{C} \sim -48^\circ\text{C}$, 系统压强 $1.0 \text{Pa} \sim 1.5 \text{Pa}$, 24h 后冻干结束即得到由 I 型胶原蛋白和明胶为原料的止血膜。

2.2 止血膜的细胞相容性实验

将制备得到的两种止血膜均按照 24 孔细胞培养板的培养孔的大小进行剪裁, 得到圆形的材料, 装在密闭的一次性塑料培养皿当中进行钴-60 辐照灭菌。灭菌完成后放入装有一定量 1640 培养基 (含 10% 小牛血清) 中进行浸泡, 37°C 维持 24h。浸泡完成后移入 24 孔细胞培养板, 将 2BS 按 $2 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 的密度接种后进行培养, 2d 和 5d 时每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 的 CFDA 母液 (DMSO 配制, 浓度为 1mg/ml), 在 CO_2 培养箱孵育 30min, 根据 CFDA 的激发波长 485nm , 发射波长 530nm , 选择荧光显微镜蓝光滤光片, 观察并进行拍照记录。

2.3 止血膜对兔耳部中央动脉出血的止血试验^[3]

将新西兰大白兔固定于解剖台上, 耳部碘伏消毒后沿耳缘静脉缓慢注射 2.5% 戊巴比妥那溶液 1ml, 待麻醉结束后在兔子耳部中央动脉处进行碘伏消毒, 医用酒精棉球脱碘, 然后用手术刀作 $1.0 \text{cm} \times 1.0 \text{cm}$ 的创面, 确保切断中央动脉。动脉血涌出时, 首先用无菌医用纱布吸去血液, 然后立刻分别将 $1.5 \text{cm} \times 1.5 \text{cm} \times 0.2 \text{cm}$ 的 I 型胶原蛋白止血膜和明胶止血膜敷压于创面, 敷压时以无菌的医用纱布辅助按压止血。每种止血膜均作 5 个样, 分别记录完全止血时间。

2.4 止血膜对兔肝脏创面的止血试验^[4]

将 10 只新西兰大白兔随机分为两组, 每组 5 只, 雌雄不拘, 一组使用 I 型胶原蛋白止血膜, 另一组使用明胶止血膜。采用 2.5% 戊巴比妥那溶液 2ml 耳缘静脉注射深度麻醉^[5], 逐层开腹, 暴露肝脏, 将肝叶正中用手术刀片做 $1.0 \text{cm} \times 1.0 \text{cm}$ 的创面, 在创面形成过程中渗血用无菌纱布吸取, 然后迅速用准备好的面积为 $1.5 \text{cm} \times 1.5 \text{cm} \times 0.2 \text{cm}$ 的 I 型胶原蛋白止血膜和明胶止血膜分别敷压创面, 每种止血膜也作 5 个样, 记录完全止血时间, 观察两种止血材料在创面的粘附情况并作记录。

2.5 统计学处理方法

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用分析软件 SPSS13.0, 组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 真空冷冻干燥得到的两种止血膜及孔径比较

图 1 和图 2 是分别以明胶和 I 型胶原蛋白为主要原料经过真空冷冻干燥工艺得到的止血膜。

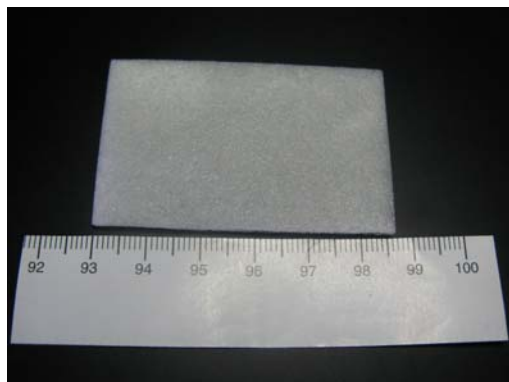


Fig.1 Gelatin hemostatic membrane was preparation by vacuum freeze-drying

图 1 真空冷冻干燥得到的明胶止血膜

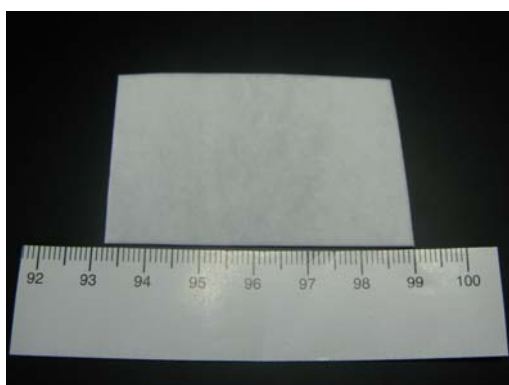


Fig.2 Collagen type I hemostatic membrane was preparation by vacuum freeze-drying

图 2 真空冷冻干燥得到的 I 型胶原蛋白止血膜

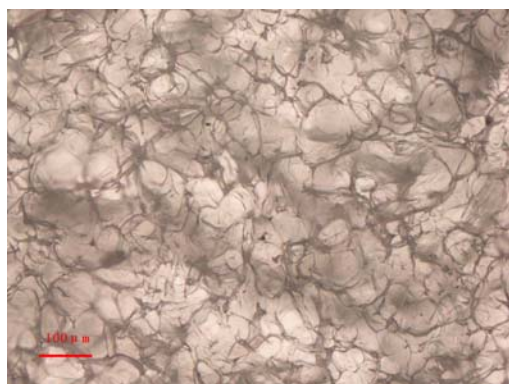


Fig.3 Optical micrographs of the gelatin hemostatic membrane (×100)

图 3 明胶止血膜的光镜观察 (×100)

图 3 和和图 4 是明胶组止血膜和I型胶原蛋白止血膜的在光镜下的孔径分析，我们可以看到两组材料均为网状的多孔结构，孔与孔之间相互连通，明胶止血膜的孔径大小在 30 ~ 150 μm 之间，I型胶原

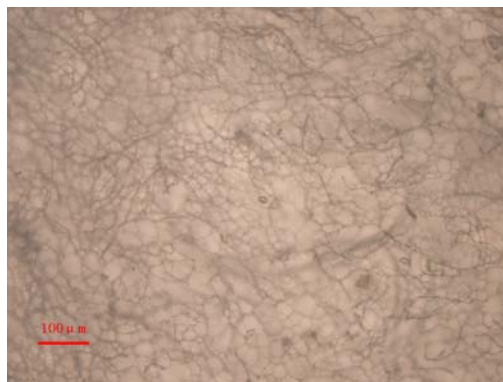


Fig.4 Optical micrographs of the Collagen type I hemostatic membrane (×100)

图 4 I 型胶原蛋白止血膜的光镜观察 (×100)

蛋白止血膜的孔径在 10 ~ 30 μm 之间，较明胶止血膜的孔径要小且更为均匀。

3.2 两种止血膜的细胞相容性比较

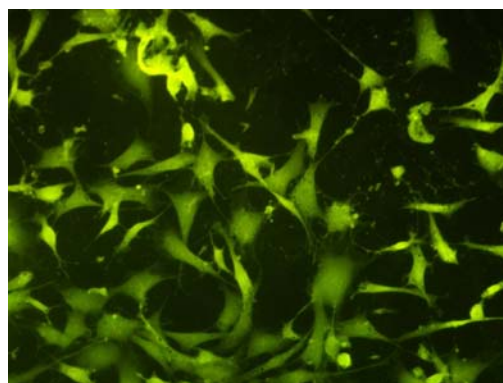


Fig.5 Fluorescence micrographs of 2BS cultured on the gelatin hemostatic membrane after 2d cultivation (×200)

图 5 明胶止血膜种植 2BS 2d 荧光显微镜观察 (×200)

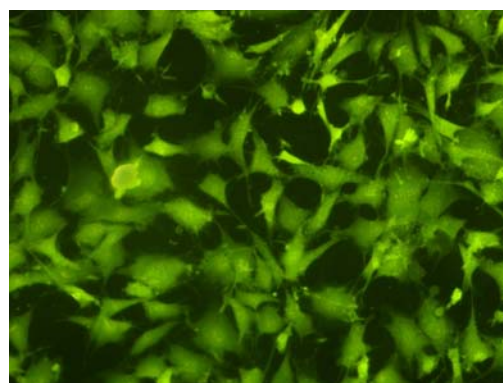


Fig.6 Fluorescence micrographs of 2BS cultured on the gelatin hemostatic membrane after 5d cultivation (×200)

图 6 明胶止血膜种植 2BS 5d 荧光显微镜观察 (×200)

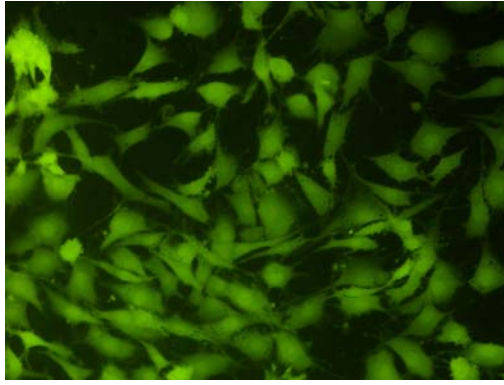


Fig.7 Fluorescence micrographs of 2BS cultured on the collagen type I hemostatic membrane after 2d cultivation ($\times 200$)

图 7 I 型胶原蛋白止血膜种植 2BS 2d 荧光显微镜观察 ($\times 200$)

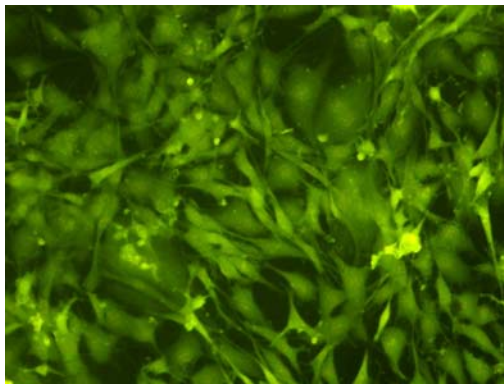


Fig.8 Fluorescence micrographs of 2BS cultured on the collagen type I hemostatic membrane after 5d cultivation ($\times 200$)

图 8 I 型胶原蛋白止血膜种植 2BS 5d 荧光显微镜观察 ($\times 200$)

由图 5、图 6、图 7 和图 8 可以明显看出，种植 2BS 2d 和 5d 以后，I 型胶原蛋白止血膜表面的细胞密度明显大于明胶组，细胞的增殖率较明胶止血膜组大。I 型胶原蛋白止血膜的细胞相容性优于明胶止血膜组。

3.3 两种止血膜对兔耳部中央动脉出血的止血性能比较

I 型胶原蛋白止血膜对兔耳部中央动脉出血的平均止血时间为 $113 \pm 6s$ ，较明胶止血膜的 $287 \pm 11s$ 止血效果好，二者比较具有显著差异 ($P < 0.05$)。

3.4 两种止血膜对兔肝脏创面的止血性能比较

I 型胶原蛋白止血膜对肝脏创面的平均止血时间为 $89 \pm 5s$ ，较明胶止血膜的 $187 \pm 9s$ 止血效果优异，二者比较具有显著差异 ($P < 0.05$)，且 I 型胶原蛋白止血膜与创面结合更为紧密，极大地防止了创面的二

次出血。

胶原蛋白是哺乳动物体内重要的结构蛋白，是维持皮肤与组织器官形态、结构的主要成分，也是修复各损伤组织的重要原料物质。胶原蛋白主要通过两个方面的作用来促进止血：首先它可以激发血小板活性，促进血小板凝聚和血浆结块^[6]，血小板凝聚可形成白血栓，进而血浆结块阻止流血^[7]；另外可以激活 X II 因子，协助其它凝血因子、启动内源性凝血过程。明胶是使用酸法、碱法或酶法从含胶原蛋白的动物组织提取出来的胶原的水解产物，也就是胶原蛋白断裂后形成的大小不一的片段，因此在这个过程中胶原蛋白的很多特性会随着蛋白链的断裂而消失。在真空冷冻干燥制备止血膜的过程当中，使用相同浓度的明胶和 I 型胶原蛋白，得到的止血膜的孔径差异很大，明胶止血膜的孔径明显大于 I 型胶原蛋白止血膜，这与分子在溶液中的分布有关，胶原蛋白分子量大而均一，蛋白链长，在溶液中易形成稳定的均匀的网状结构。明胶分子大小不均一，各种分子量的组分性质不同，在溶液中分布不均，链较短，故不易形成稳定均一的网状结构。相对于 I 型胶原蛋白的长链，形成的止血膜的孔径就会明显大一些。在细胞相容性实验中，我们通过人胚肺成纤维细胞的在两种止血膜表面的种植可以看到 I 型胶原蛋白止血膜在种植细胞 2d 和 5d 时材料表面的细胞密度均大于明胶组，细胞相容性更优。分析原因可能与材料的表面的结构和原料本身的性质都有一定的关系。而两种止血膜对兔耳部中央动脉出血和兔肝脏创面的止血性能试验中，I 型胶原蛋白止血膜的止血效果都要明显优于明胶止血膜，我们可以推测除了孔径更小在物理作用辅助止血发挥了一定作用的同时，更大的可能是伴随着胶原蛋白分子的断裂，小分子明胶的止血活性也随之降低或丧失，需要机体自身的凝血机制才能凝血^[8]，所以在止血性能试验当中显得不够理想。

4 结论

综上所述，我们通过试验可以发现 I 型胶原蛋白作为生产止血材料的原料，在很多方面都优于明胶，这为我们进一步开发出性能更为优异的止血产品提供了参考。

References (参考文献)

- [1] Schwartz SL. Hemostasis, surgical bleeding and transfusion [A]. In: Schwartz SL, Shires GT, Spencer FC, et al. Principles of Surgery [M]. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1989, 105-135.
- [2] David JC, Ray JC, Michale WC, et al, A pilot study evaluating

- The efficacy of fully acetylated poly-N-acetyl glucosamine membrane formulation as topical hemostatic agent [J]. *Surgery*, 1999, 126(3):510-517.
- [3] Krishnan LK, Mohanty M, Um ashankar PR, et al Comparative evaluation of absorbable hemostats advantages of fibrin-based sheets [J]. *Biomaterials* 2004, 25(24):5557-63.
- [4] YE Chunting, Chen Honghui, Li Siming, et al. The chitosan-collagen hemostatic Sponge and its biocompatibility[J]. *Chin J Orthop Trauma*, 2002, 4 (4) : 285-287.
叶春婷, 陈鸿辉, 李斯明, 等. 几丁糖-胶原止血海绵的研制及其生物相容性评价[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2002, 4 (4) : 285-287.
- [5] CHEN Zhuchu, WU Ruisheng. *Experimental Zoology* [M]. Changsha: HuNan Science&Technology Press, 2001:200-261.
陈主初, 吴端生. *实验动物学*[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001:200-261.
- [6] Bailey A. Procter memopial lecture, collagen-nature's framework in the medical, food and leather industry [J]. *Soc Leather Tech Chem*, 1992, 76 (4): 111-126.
- [7] Matras H, Fibrin seal. The state of the art, *J Oral Maxillofac Surg*, 1985, 43:605.
- [8] 森岗恭彦, 中村一郎, 河野信博. 各种局部止血剂. *手术*, 1994, 45 (10) : 1.