

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)12-1122-03

## 壳聚糖-类人胶原蛋白对兔肝创面的止血效果及组织相容性观察

马茂 范代娣 (西北大学化工学院 陕西 西安 710069)

**Hemostatic effect and histocompatibility of chitosan-human-like collagen on rabbit liver wound surface**

MA Mao, FAN Dai-Di

Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the hemostatic effect and histocompatibility of chitosan-human-like collagen on rabbit liver wound surface. **METHODS:** New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups: chitosan-human-like collagen group, human-like collagen group and gelatin sponge group. 1 cm × 1 cm wound area was made on the surface of the liver of rabbits. Chitosan-human-like collagen, human-like collagen and gelatin sponges were respectively used on the wound surface. Bleeding time and histocompatibility were evaluated. **RESULTS:** Bleeding time of Chitosan-human-like collagen, human-like collagen and gelatin sponge groups were (78 ± 11) s, (81 ± 10) s and (115 ± 13) s, respectively. Chitosan-human-like collagen group got the shorter bleeding time, which was obviously different from gelatin sponge group ( $P < 0.05$ ). Histocompatibility of chitosan-human-like collagen group was obviously different from gelatin sponge group, and the former was superior to the latter. **CONCLUSION:** Added with chitosan, human-like collagen doesn't change in hemostatic effect and histocompatibility, however, its mechanical strength and ductibility are increased.

**【Keywords】** chitosan-human-like collagen; hemostasis; histocompatibility

**【摘要】**目的:观察壳聚糖-类人胶原蛋白对兔肝脏创面的局部止血效果及组织相容性。方法:在兔肝脏表面制作面积为1 cm × 1 cm的创面,应用壳聚糖-类人胶原蛋白、类人胶原蛋白及明胶海绵进行止血,通过测定出血时间找出止血效果最佳的材料。同时通过光镜及电镜观察比较其与肝脏组织的相容性。结果:壳聚糖-类人胶原蛋白、类人胶原蛋白和明胶海绵止血时间依次为(78 ± 11) s、(81 ± 10) s和(115 ± 13) s,壳聚糖-类人胶原蛋白和类人胶原蛋白止血时间均比明胶海绵缩短( $P < 0.05$ )。光镜及电镜观察发现,与明胶海绵相比,

壳聚糖-类人胶原蛋白海绵的组织相容性更佳。结论:类人胶原蛋白中加入壳聚糖后不影响其局部的止血效果和组织相容性,但可增强材料的力学强度和延展性。

**【关键词】**壳聚糖-类人胶原蛋白;止血;组织相容性

**【中图分类号】**R332 **【文献标识码】**A

**0 引言**

运用生物工程方法生产具有较好组织相容性的胶原蛋白已经成为当前的研究热点<sup>[1-2]</sup>。已有研究证实,通过重组大肠杆菌 BL 21 高密度发酵工艺生产的类人胶原蛋白,解决了动物源性胶原蛋白组织相容性较差的问题<sup>[3-4]</sup>。经冷冻真空干燥方法生产的壳聚糖-类人胶原蛋白可进一步增强材料的力学强度和延展性<sup>[5-6]</sup>。我们对壳聚糖-类人胶原蛋白的局部止血效果和组织相容性进行了观察,为判断壳聚糖-类人胶原蛋白的生物学特性,以及壳聚糖-类人胶原蛋白的临床应用提供实验依据。

**1 材料和方法**

**1.1 材料** 3 mo 龄新西兰大白兔 24 只,体质量(2.5 ± 0.2) kg,雌雄各半(由西安交通大学医学院实验动物中心提供);类人胶原蛋白(西北大学化工系实验室自制);通过重组大肠杆菌 BL 21 高密度发酵的工艺生产壳聚糖-类人胶原蛋白(西北大学化工系实验室自制);通过冷冻真空干燥方法生产;明胶海绵(南京金陵药业有限公司);光镜(Olympus 公司,CHK2-F-GS)及透射电镜(HITACHI, H-600)。

**1.2 方法**

**1.2.1 止血实验** 将兔随机分为 3 组:类人胶原蛋白组、壳聚糖-类人胶原蛋白组和明胶海绵组,每组 8 只。采用氯胺酮腹腔注射麻醉,逐层开腹,暴露肝脏,采用局部钳夹的方法在肝左叶造成 1 cm × 1 cm 出血创面,分别应用壳聚糖-类人胶原蛋白、类人胶原蛋白及明胶海绵进行止血并观察局部止血时间。在出血创面上平铺止血材料,加盖纱布,分别在 65、85 和 150 s 时间点观察出血情况,并记录出血停止时间。

**1.2.2 组织相容性实验** 麻醉及开腹同 1.2.1。用尖嘴镊子分别将 1.0 cm × 0.5 cm × 0.2 cm 壳聚糖-类人胶原蛋白、类人胶原蛋白及明胶海绵等三种材料

收稿日期 2007-03-27; 接受日期 2007-04-10

作者简介:马茂,博士生(导师范代娣),副教授。Tel: (029)

85323636 Email: mamao2007@163.com

置入兔肝左叶,在术后 15 d 处死动物,通过光镜及电镜观察三种局部止血材料与肝脏的组织相容性。

统计学处理:实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.5 统计分析软件进行统计学处理,组间差异采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果

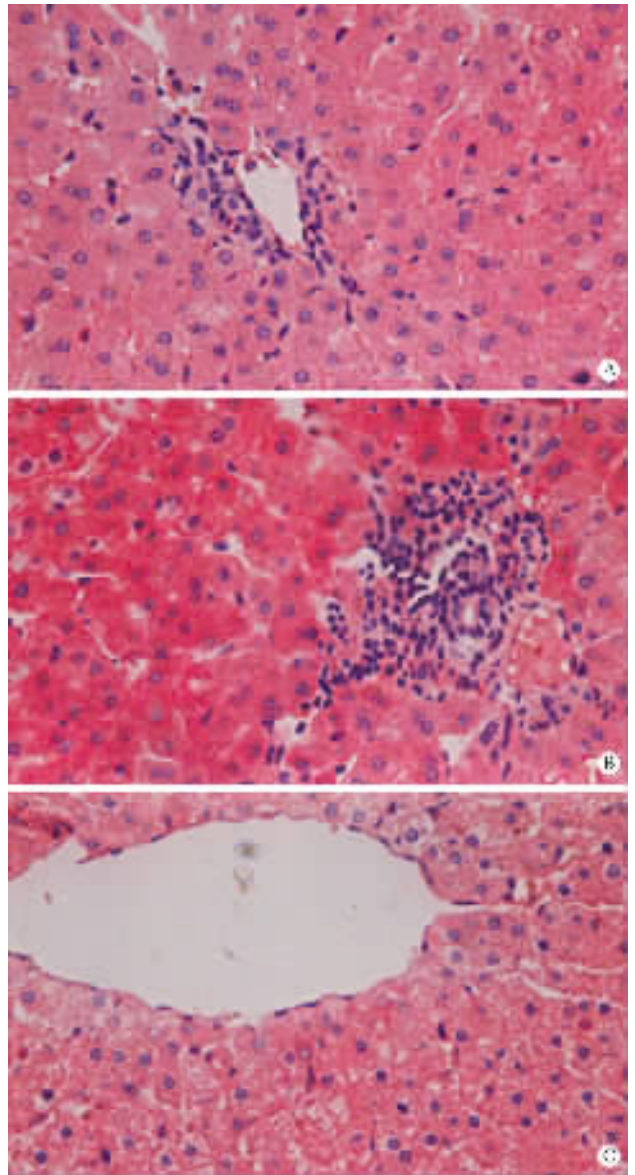
**2.1 不同材料的止血时间** 三种局部止血材料均可在 150 s 内起到完全止血的效果。平均止血时间依次为壳聚糖-类人胶原蛋白组 ( $78 \pm 11$ )s,类人胶原蛋白组 ( $81 \pm 10$ )s,明胶海绵组 ( $115 \pm 13$ )s。壳聚糖-类人胶原蛋白组和类人胶原蛋白组平均止血时间无明显差别 ( $P > 0.05$ ),但两组均较明胶海绵组缩短 ( $P < 0.05$ )。同时,大体观察到壳聚糖-类人胶原蛋白和类人胶原蛋白与肝脏组织可产生紧密的黏附,而明胶海绵则易从肝脏创面上脱落。

**2.2 三种止血材料的组织相容性观察** 光镜观察显示壳聚糖-类人胶原蛋白组和类人胶原蛋白组肝小叶结构基本完整,但可见肝细胞的水肿、变性、局灶状坏死及淋巴细胞和单核细胞的浸润,与明胶海绵组相比,肝细胞肿胀、空泡变性及坏死程度均明显减轻(图 1)。电镜观察显示:壳聚糖-类人胶原蛋白组肝细胞结构清晰,细胞核基本呈圆形,核内染色质分布均匀,细胞质内细胞器丰富,毛细胆管轻度扩张,细胞间有炎细胞浸润。类人胶原蛋白组肝脏结构改变基本同壳聚糖-类人胶原蛋白组。明胶海绵组肝细胞结构较差,细胞核圆形或不规则,核内染色质分布基本均匀,细胞质内细胞器略有减少,线粒体不多,滑面内质网增生,扩张明显,糖原不多,毛细胆管扩张明显,腔内微绒毛减少,胆汁淤积(图 2)。

## 3 讨论

近年来,各种新型材料的不断问世为外科手术止血提供了更多的选择。对材料止血效果评价的动物实验主要观察在各种不同创面环境下,创面局部止血时间的变化<sup>[7-8]</sup>。我们的实验结果表明,与目前临床常用的明胶海绵相比较,应用壳聚糖-类人胶原蛋白可显著缩短兔肝脏创面的出血时间 ( $P < 0.05$ )。同时壳聚糖-类人胶原蛋白与类人胶原蛋白的局部止血效果无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

局部止血材料不仅要有满意的创面止血效果,而且应当具有良好组织相容性的要求<sup>[9-11]</sup>。我们通过



A:壳聚糖-类人胶原蛋白 B:类人胶原蛋白 C:明胶海绵组。

图 1 三种局部止血材料的光镜结果 HE  $\times 400$

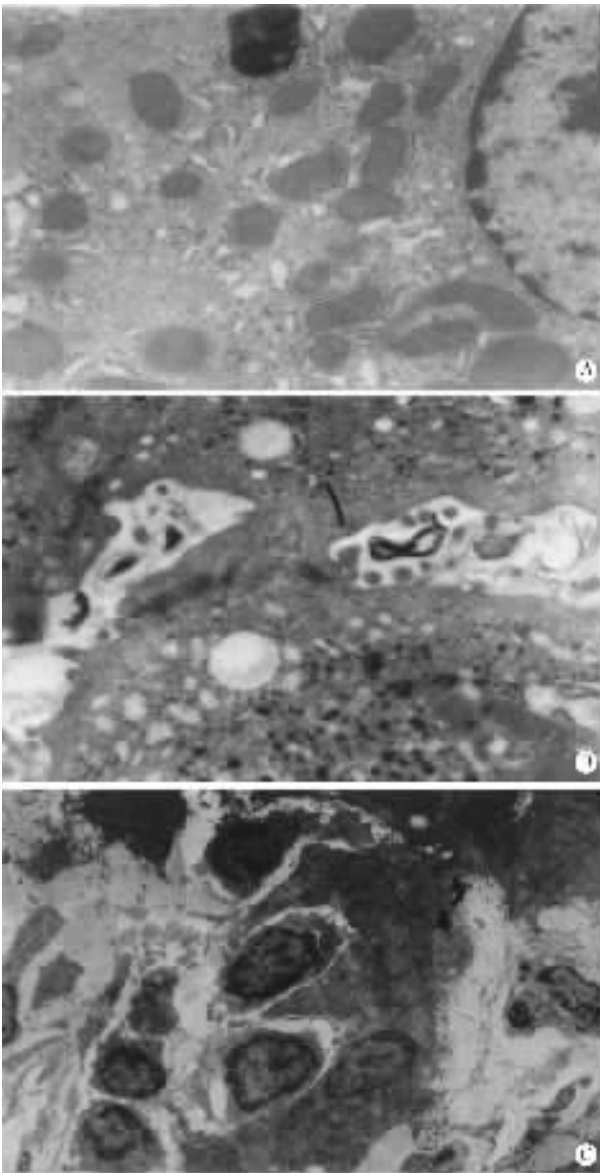
肝脏置埋试验对壳聚糖-类人胶原蛋白的组织相容性进行了观察。光镜及电镜结果显示:三种局部止血材料中,壳聚糖-类人胶原蛋白、类人胶原蛋白均可引起置埋组织局部轻微的炎症反应,与肝脏组织有较好的组织相容性。镜下观察发现两组间炎症反应的程度无明显差别。而明胶海绵植入肝脏 15 d 后可使组织产生明显的炎症反应。提示在壳聚糖-类人胶原蛋白、类人胶原蛋白及明胶海绵三种局部止血材料中,壳聚糖-类人胶原蛋白与类人胶原蛋白的组织相容性均优于明胶海绵。

上述实验表明,亮聚糖-类人胶原蛋白不仅可满足创面局部止血的要求,也具备了与类人胶原蛋白相同的组织相容性.同时,由于其力学强度和延展性较类人胶原蛋白大大增加,更符合临床应用的实际要求.

### 【参考文献】

- [1] 周丽珍,陈玲,李琳,等. 胶原蛋白的制备及用作生物医用材料的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(12): 761-763.
- [2] Björns K, Holst J. Various local hemostatic agents with different modes of action; an *in vivo* comparative randomized vascular surgical experimental study[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007, 33(3): 363-370.
- [3] 张兮,范代娣,花秀夫,等. 基因重组大肠杆菌生产类人胶原蛋白补氮策略优化研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(1): 33-36.
- [4] 米钰,惠俊峰,范代娣,等. 类人胶原蛋白生物相容性实验研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2004, 34(1): 66-68, 72.
- [5] 刘燕,莫美忠,甘春芳. 亮聚糖及其衍生物在生物医药领域的应用研究进展[J]. 化工技术与开发, 2007, 36(1): 26-31.
- [6] Wu YB, Yu SH, Mi FL, et al. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 57(4): 435-440.
- [7] 刘新东. 局部用止血药物在外科手术中的应用[J]. 河北医学, 2004, 26(1): 52.
- [8] 伍衡,冼华寿,张建龙,等. 纤维蛋白原-胶原海绵片在肝手术创面的止血及组织封闭作用的动物实验研究[J]. 岭南现代临床外科, 2005, 5(3): 66-68.
- [9] Ye X, Kennedy JF, Li B, et al. Condensed state structure and biocompatibility of the konjac glucomannan/chitosan blend films[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 64(4): 532-538.
- [10] 杨晓芳. 生物材料生物相容性评价研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(1): 123-128.
- [11] 孟纯阳,安洪,蒋电明,等. 新型纳米骨重建和修复材料羟基磷灰石/聚酰胺体内植入的生物相容性及安全性[J]. 中国临床康复, 2004, 29(8): 6330-6333.

编辑 王睿



A:亮聚糖-类人胶原蛋白组 B:类人胶原蛋白组 C:明胶海绵组.

图2 三种局部止血材料的透射电镜结果 TXM  $\times$  5000