

知识介绍

胶原海绵的研究进展

邹勇* 李峰** 陈立柱 赵炳顺 李会静

北京三十六度医药研发中心, 北京, 102206

摘要: 本文对胶原海绵的作用机理及其研究应用进行了综述, 以期为制备出性能优异的医用海绵提供参考。

关键词: 胶原; 海绵; 医用

胶原(collagen)是细胞外基质(extra cellular matrix)的主要结构蛋白, 是生物体内含量最高的蛋白质, 它广泛存在于人体及动物体内。作为一种来源广泛、止血性能优良的可降解生物

材料, 已引起了国内外科研人员的重视。目前已发现了 21 种遗传基因不同的胶原分子, 其分类命名是按所发现的顺序用罗马字母表示的, 依次为 I 型、II 型、……、XX 型和 XXI 型。胶原的分子特征是其分子链呈三螺旋结构, 氨基酸序列以 GlyXY 形式排列, 其中 Gly 为甘氨酸残基, X、Y 为其它类型氨基酸残基, 且脯氨酸和羟脯氨酸残基较多, 约占 20%。图 1、2 为胶原蛋白的右手超螺旋结构和多聚体三螺旋轴的 C 端投影图。



图 1 胶原的右手超螺旋结构

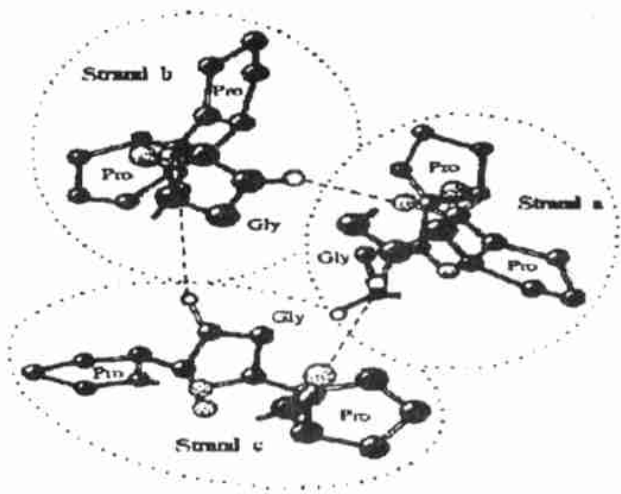


图 2 胶原多聚体三螺旋轴的 C 端投影图

胶原材料具有许多优异的性能, 如与细胞的高亲和力, 与血小板产生血凝作用, 可作为药物释放介质, 可促进伤口收敛及表皮细胞的爬行覆盖, 可生物降解和多孔隙等, 因而被广

泛应用于医药卫生领域^[1]。1976 年美国食品及药物管理局(FDA)正式批准医用胶原材料应用于临床。

海绵剂作为药剂的一个剂型, 在临床应用

* 第一作者: 邹勇, 1978 年生, 男, 硕士, 研发工程师, 主要从事生物制品的研发。

** 通讯联系人, 中关村生命科学园科研生产大楼 C 座一层。

中显现出了重要作用。它系由亲水性胶体溶液经发泡、固化、冻干和灭菌而制成的一种海绵状固体制剂。随着组织工程的发展,生物修复功能也成了海绵的基本要求^[2-6]。

Takahiro Ohno^[7]考察了I型和II型胶原海绵对接种的软骨细胞的存活能力和基因表达进行了对比研究。结果表明,经过20天培养后,接种的软骨细胞在两种海绵中均具有很好的分散性和成活率。

Ernst Magnus Noah^[8]考察了不同灭菌方式对组织工程用胶原海绵结构的同一性和稳定性的影响。结果表明,用 γ -射线灭菌后的海绵,抗酶降解能力下降;接种细胞后有显著的收缩。

国内科研工作者对胶原海绵的研究也取得了一定进展。武继民等^[9]首先制备出可溶性胶原材料,并以此为原料,利用冻干工艺制备出了胶原海绵。采用氨基酸分析和紫外光谱分析,证实了胶原海绵的结构和组成,同时也证明其制备工艺具有可行性。电泳分析说明,胶原海绵中含有较多的三维螺旋结构组分,但也存在低分子量组分(即多肽片段)。六项生物学评价结果均符合了相关标准所规定的要求,证明胶原海绵作为体外使用,具有安全可靠。

武继民等^[10]亦曾采用酸碱溶解法,从牛腱中提取了可溶性胶原材料。采用冻干法制得了胶原海绵止血材料。对比实验表明,明胶海绵试样在水面漂浮5分钟也不能被水浸透,说明明胶海绵亲水性很差,加之吸水量不大,这在止血急救治疗中是不太有利的。Gelfix(一种进口胶原海绵)的润湿时间要比明胶海绵短,但比胶原海绵长百倍以上。研究发现胶原海绵的止血时间短于其他材料,胶原海绵吸附血液的速率和粘结创面组织的能力优于其他材料;Gelfix和明胶海绵则出现了几例在敷料与组织间渗血的现象。另外,对出血急促的兔耳部创面,血液常会穿过明胶海绵的泡孔结构而渗出,胶原海绵则能有效地密封出血创

面。可能的原因是,胶原海绵(包括Gelfix)是分子量为30万左右的单体胶原分子排列而成的纤维结构,该纤维结构可有效地吸附血小板而起到止血作用。

深入研究结果表明^[11],胶原海绵或Gelfix与血液接触时,能利用其海绵结构的毛细作用迅速吸附血液,引起血小板聚集,进而破坏血小板,激活和释放凝血因子,从而促进凝血过程。经以纤维素类止血材料S-100为对照品,其止血机理类似于胶原海绵,主要是靠大面积与血液接触时破坏血小板而促进凝血过程的,但吸附血液的速率较差,因而止血效果稍差。此外,胶原海绵或Gelfix与创面接触时,除吸附血小板促进凝血过程外,还可激活和诱导各种生长因子,促进成纤维细胞活性和胶原纤维的产生及排列,从而促进肉芽组织的产生。海绵状结构可作为细胞和新生组织的支架材料(scaffolds)。

武继民等^[12]也曾就医用吸收性胶原海绵和明胶海绵在出血创面治疗上进行了详细的临床实验对比。与胶原蛋白制成的止血海绵相比,水溶性材料与出血创面接触时难以形成稳定的凝胶状态,因而影响止血和修复效果。在收治的164例病例中,通过与明胶海绵对照实验得出胶原海绵止血时间短、创面修复效果优异的结论。这对于提高治疗水平、缩短患者住院时间、减轻患者痛苦具有重要意义。

一般认为,当胶原海绵与出血创面接触时,可利用其大面积的海绵结构破坏血小板来促进凝血过程。同时海绵在创面的溶解或降解而产生局部粘度变化,这样也会促进凝血过程。从临床资料可以看出^[13],在手术创面和残腔填充止血中,胶原海绵的止血效果明显优于明胶海绵,这与胶原海绵吸附血小板的能力较强有关。胶原海绵与出血创面一接触,其接触面迅速形成凝胶而粘附在出血创面上,外面则形成连续的压迫干层,建立一种理想的止血状态和结构。另外,所形成的、持续时间较长

的稳定凝胶, 可保证新生创面组织顺利地长入, 从而达到创面修复的目的。然而, 明胶海绵与血液形成的凝胶较易溶解, 破坏上述的止血状态和结构, 因此止血效果较差。

具体而言, 胶原海绵用于创面, 在初始期(炎症阶段), 吸附血小板, 与凝血因子相互作用, 并引起血小板聚合, 起止血作用; 血小板的破坏, 使其释放出多种活性物质(如生长因子), 启动创面愈合; 诱发成纤维细胞的活性, 激活和调节不同血细胞的功能, 其中包括吞噬作用及趋化性。在中间期(肉芽组织生长期), 促进体内胶原的再生、排列, 增强渗出物的吸收。在后期(成熟痊愈期), 形成上皮细胞的支架, 诱导成纤维母细胞及异胶原纤维的产生及排列, 促进肉芽组织的产生; 促进血管和新生瘢痕组织的形成, 达到创面修复愈合。最后胶原海绵材料被机体降解吸收。在骨科手术伤口止血中, 将其应用于脊柱手术、人工关节置换术、四肢骨折内固定术及其他手术中, 观察到胶原海绵的显效率达 100%, 而对照组仅为 33.4%。在普外科大量的残腔止血中, 主要观察了直肠癌术后残腔的止血效果; 实验组的止血时间均小于 20min, 日引流量小于 120mL(即达到优良效果)的病例为 29 例(32 例), 占 90.6%; 而对照组的止血时间超过 30min, 日引流量也在 150mL 以上。另外, 在普外手术中还发现, 胶原海绵有较好的组织修复和残腔促愈功能, 临床实验中有 4 例因直肠癌扩散导致盆腔脏器整体摘除, 使用胶原海绵治疗后仅 11 天创面即完全愈合。总之, 在病例有限的临床实验中胶原海绵显示了良好的止血与创面修复效果。

王永胜等^[1]将上海其胜生物制剂实业公司研制开发的国产胶原海绵, 对大鼠肝创面出血进行止血效果实验, 同时观察其促进肝脏愈合情况, 并以明胶海绵(南京第三制药厂生产)作对照, 结果表明, 胶原海绵止血性能良好, 能有效诱导肝再生, 吸收降解快, 使用方便。

虽然胶原海绵在临床应用取得了很好的疗效, 但单独应用胶原还存在力学性能差、溶解速度太快等缺欠。共混复合是改善材料性能的有效手段, 有关于此的研究日益丰富^[14-15]。

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种具有广泛生物学功能的细胞因子^[16]。对多种细胞如成纤维细胞、神经细胞、内皮细胞、角质细胞、软骨和成骨细胞等均有刺激效应。对于组织修复和创面愈合以及血管和神经的再生有强烈的促进作用。

Toshia Fujisato 等^[17]将碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)移植到胶原-软骨细胞复合物后, 软骨组织的修复速度显著提高。

邹海燕等^[18]将 bFGF 引入到胶原体系中, 研制出了 bFGF 胶原海绵。该产品是一种疏松多孔的海绵状物质。研究表明, 不同的冻干前处理条件和冻干工艺会对表面结构产生一定影响。样品的表观密度受冻干前溶液浓度的影响, 可以通过调整冻干前溶液的浓度(主要是胶原蛋白的浓度)来改变表观密度, 同时也会影响到吸水能力。吸水能力一定程度上可以反映胶原海绵产品的质量, 含杂质如盐分少的样品吸水能力强。吸水能力也影响产品在创面上吸收伤口渗液的功能。疏松多孔的结构和较强的吸水能力, 以及胶原蛋白良好的组织相容性, 使以胶原蛋白为主要原料的敷料与创面结合具有更好的贴附能力。

bFGF 胶原海绵的 pH 值偏酸性, 这主要与胶原蛋白的生产工艺有关。由于材料中含有多肽 bFGF, 因此羟脯氨酸含量和羟脯氨酸+脯氨酸含量略低于理论值。由于 I 型胶原蛋白和 bFGF 都具有良好的促进创伤愈合和组织修复作用, 将两者结合在一起可使生长因子具有缓释效应, 也有利于将生长因子固定在创面位置上发挥作用, 从而达到更好的促进创伤愈合的治疗效果, 因此具有广泛的开发和应用前景。

进一步对 bFGF 胶原海绵组织相容性的试验研究表明^[19], 该材料不引起急性毒性反应, 无刺激性、致敏性和溶血性, 说明 bFGF 胶原海绵具有良好的生物相容性, 无毒副作用, 是可以安全使用的生物材料。

国外还有文献报道, 将转化生长因子- β_1 (TGF β_1) 引入到胶原海绵中。研究结果表明, 所得胶原海绵可以释放具有生物活性的 TGF β_1 , 且对骨修复而言是理想的材料^[20,21]。

壳聚糖又称几丁糖, 已广泛应用于医学材料学领域, 它是优良的伤口愈合促进剂, 能促进透明质酸等糖胺多糖的分泌, 使伤口愈合加快, 并能抑制成纤维细胞的生长, 减轻疤痕的形成^[22~24]。

梁佩红等^[22] 将猪脚肌腱提取的 I 型胶原与一定比例的壳聚糖混合, 经戊二醛交联, 冻干后制备出了复合 I 型胶原海绵。用新西兰大白兔作实验动物, 对其皮下出血、体表浅动静脉断裂损伤、肝损伤进行止血试验, 同时与明胶海绵、纱布等止血效果作比较, 观察其止血时间、敷料与创面的粘合等情况, 并定期观察创面愈合和体内吸收情况。

结果表明, 所得产品除具有单纯胶原海绵的快速止血、生物相容性好、促进伤口愈合等优点外, 还由于它加入了适量的壳聚糖, 能与胶原蛋白通过静电作用形成稳定的离子键, 提出了它的力学性能, 使其在兔耳动脉止血时不被冲破、冲开。复合 I 型胶原海绵的平均止血时间为 2min, 而明胶海绵的平均止血时间为 3.5min, 纱布的止血效果最差, 其止血时间在 10min 以上。复合 I 型胶原海绵可降解, 其被体内降解吸收的时间约 5 个月, 明胶海绵约 4 个月, 两者的时间较接近。

壳聚糖能刺激纤维母细胞的分裂, 促进透明质酸等糖胺多糖的分泌, 也是一种优良的伤口愈合促进剂, 而且它能分解为多糖类的物质而被体内吸收。因此, 复合 I 型胶原海绵克服了单纯胶原海绵的缺点, 如: (1) 力学性能差,

急促的出血会冲破胶原本身; (2) 溶解速度太快, 影响止血效果和使用的安全性等。研究表明, 复合 I 型胶原海绵的止血速度快。从出血伤口部位发现, 复合 I 型胶原海绵的伤口有明显的血痂形成, 而明胶海绵则没有, 这是由于胶原蛋白不仅能诱导血小板附着, 产生释放反应, 而且能激活血液的凝血因子, 粘着在渗血的伤口上; 还由于胶原蛋白是一种纤维蛋白, 其分子量与血液凝固中的纤维蛋白原比较接近, 在体外单体可排列成纤维状结构, 有利于血细胞粘附在上面形成血栓凝块。血痂的形成能有效地阻止血液冲开伤口, 而达到良好的凝血效果。虽然明胶海绵也具有止血作用, 但其止血效果和理化性能远不如复合 I 型胶原海绵。复合 I 型胶原海绵可被体内吸收。实验表明: 兔肝脏止血后 1 个月, 创面局部的复合 I 型胶原海绵止血物已形成有机疤痕组织, 并有网膜组织与其粘连; 5 个月后创面局部形成纤维疤痕, 复合 I 型胶原海绵被吸收, 其吸收降解时间与明胶海绵较接近, 完全符合生物制品在体内吸收降解的速度要求。

急性毒性试验、刺激性试验、过敏性试验和溶血性试验均为阴性结果; 兔耳动脉的平均止血时间为 120s, 而明胶海绵为 600s; 肝脏出血止血的平均时间: 几丁糖-胶原海绵为 45s、明胶海绵为 75s; 体内肝脏埋植实验与对照组明胶海绵一样, 三个月后, 见肝组织边缘有少许纤维组织及多核巨细胞, 细胞胞浆内有吞噬的透明物质^[23]。

壳聚糖与胶原的结合除了可促进伤口愈合外, 还可能增强其力学性能^[24]。壳聚糖属多糖类, 胶原属蛋白质类, 蛋白质和糖类在一起可能存在氢键作用和静电作用, 再加上交联作用, 在胺基、羟基等之间相互交联, 进一步提高其力学强度。通过毒理学的检测, 壳聚糖-胶原海绵无毒副作用, 具有良好的生物相容性。在临床的初步应用也证实它具有促进愈合、阻止渗液溢出的功效, 而且原材料来源丰富, 价格低廉, 具备推广应用的前景。

展望

胶原因其优异的性能吸引了众多科研工作者; 天然材料及生长因子的引入, 极大地提高了胶原海绵的综合性能。对胶原海绵的研究有望改进当前医疗应用产品存在的不足, 更好地为人类服务。

参 考 文 献

- 王永胜, 侯春林, 陈爱民等. 胶原海绵止血功能的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志 2001, 15(3): 140~143
- W Friess, H Uludag, S Foskett, et al. Characterization of absorbable collagen sponges as recombinant human bone morphogenetic protein-2 carriers[J]. *International Journal of Pharmaceutics* 1999, 185: 51~60
- W Friess, H Uludag, S Foskett, et al. Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers[J]. *International Journal of Pharmaceutics* 1999, 187: 91~99
- M Geiger, R H Li, W Friess. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003, 55: 1613~1629
- Hui Ling Lai, Asad Abu'Khalik, Duncan Q M Craig. The preparation and characterization of drug-loaded alginate and chitosan sponges[J]. *International Journal of Pharmaceutics* 2003, 251: 175~181
- Taek Woong Chunga, Jun Yangb, Toshihiro Akaikeb, et al. Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment[J]. *Biomaterials* 2002, 23: 2827~2834
- Takahiro Ohno, Keizo Tanisaka, Yosuke Hirao, et al. Effect of type I and type II collagen sponges as 3D scaffolds for hyaline cartilage-like tissue regeneration on phenotypic control of seeded chondrocytes in vitro[J]. *Materials Science and Engineering* 2004, 24: 407~411
- Ernst Magnus Noah, Jingsong Chena, Xiangyang Jiao, et al. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering[J]. *Biomaterials* 2002, 23: 2855~2861
- 武继民, 叶萍, 关静. 胶原海绵的结构分析和毒理学评价[J]. 生物医学工程与临床 1998, 2(3): 152~158
- 武继民, 叶萍, 孙伟健等. 胶原海绵及其止血性能的研究[J]. 生物医学工程学杂志 1998, 15(1): 63~65
- 武继民, 苗明山, 关静等. 胶原海绵医治体表出血创面的动物实验观察[J]. 生物医学工程与临床 2002, 6(1): 11~13
- 武继民, 苗明山, 关静等. 胶原海绵止血效果的动物实验研究[J]. 军事医学科学院院刊 2001, 25(4): 277~279, 301
- 武继民, 李荣, 王岩. 胶原海绵作为止血和创面敷料的临床实验[J]. 生物医学工程与临床 2003, 7(3): 152~154
- Young Seon Choi, Sung Ran Hong, Young Moo Lee, et al. Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge[J]. *Biomaterials* 1999, 20: 409~417
- S Roche, M C Ronziere, D Herbage, et al. Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering[J]. *Biomaterials* 2001, 22: 9~18
- Mcgee G S, Davidson J, Buckley A, et al. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing[J]. *J Surg Res* 1988, 45(1): 145
- Toshia Fujisato, Toshinobu Sajiki, Qiang Liu, et al. Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold[J]. *Biomaterials* 1996, 17: 155~162

18 邹海燕, 叶春婷, 彭燕豪等. bFGF 胶原海绵的理化性质检测[J]. 广东药学院学报 2003, 19(1): 53 ~ 54

19 邹海燕, 叶春婷, 李斯明等. bFGF 胶原海绵的制备及其组织相容性评价[J]. 生物医学工程与临床 2003, 7(1): 1 ~ 2

20 Hiroki Ueda, Liu Hong, Masaya Yamamoto, et al. Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor- β 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits[J]. *Biomaterials* 2002, 23: 1003 ~ 1010

21 Hiroki Ueda, Tatsuo Nakamura, Masaya Yamamoto, et al. Repairing of rabbit skull defect by dehydrothermally crosslinked collagen sponges incorporating transforming growth factor β 1 [J]. *Journal of Controlled Release* 2003, 88: 55 ~ 64

22 梁佩红, 叶春婷, 李斯明等. 复合 I 型胶原海绵创伤止血的动物实验研究[J]. 创伤外科杂志 2002, 4(5): 274 ~ 275

23 叶春婷, 陈鸿辉, 李斯明. 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

24 叶春婷, 邹海燕, 彭燕豪等. 壳聚糖-胶原海绵的研制及其应用研究[J]. 生物医学工程学杂志 2004, 21(2): 259 ~ 260

Research Progress on Collagen Sponges

Zou Yong Li Feng Chen Lizhu Zhao Bingshun Li Huijing

Beijing 36 Centigrade Pharmaceutical Research and Development Center, Beijing 102206

Abstract: The action mechanism and application of collagen sponges were summarized in detail for preparation of promising medical materials.

Key Words: collagen, sponge, medical application

(上接 105 页)

诸多行业得到应用。蛋白质物质的微囊化是近年来的一个研究热点。传统的蛋白质物质的微囊化方法是复合凝聚法、包括络合法等。这些制备方法能得到粒径较小、分散性好的微胶囊,但同时也存在制备周期相对较长、微胶囊包封率和得率较低等缺点。本研究利用研制的高压静电场微胶囊成型装置,尝试以海藻酸盐为囊材,牛血清蛋白(BSA)为芯材模型,采用高压静电法制备蛋白质类物质微胶囊,通

过分析制备工艺和所制胶囊的基本形态,以期该方法在食品工程、医药工程等领域的应用提供一些参考依据。经研究,确定出的最佳参数为:搅拌子速度 200r/min;电压 4.5kV,液面距 3.5cm;推进速度 60mm/h。利用该方法制备蛋白质为物质胶囊,可以得到粒径分布较窄、形状较为均一、圆整的微球。

(李隽芝编)