

## 肝素化胶原 / 丝素共混膜的制备及其抗凝血性能\*\*

程忠玲

### Preparation and anticoagulant activity of heparinized collagen/silk fibroin blend film

#### Abstract

**AIM:** To prepare a new type heparinized collagen/silk fibroin blend film and investigate its anticoagulant activity.

**METHODS:** The experiment was conducted at the Research Center of Material Science, Beijing Institute of Technology from December 2003 to April 2005. ①50 mg collagen was dissolved in 5 mL acetic acid solution (0.2 g/L), and 0.5 mL heparin solution (10 g/L) was added and stirred for 10 minutes to prepare the heparinized collagen. The structural characteristics were examined through a infrared spectrometer (EQINOX55). ②Glutaraldehyde as a coupling agent was added into the aqueous solution of heparinized collagen and silk fibroin (mass ratio of 1:4), which was cast into a polystyrene plate. The blend film was formed after the plate dried for 72 hours. The standard curve, and the effect of glutaraldehyde at different doses on the combination rate of heparin and mechanical performance of film were measured. ③The blood anticoagulant activity of the blend film was assessed by *in vitro* coagulation time test including activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT) and activated thromboplastin time (PT) measurement, which were performed by a photo-optical clot detection instrument COAG-A-MATE-XM (Organon Tekinika Company, U.S.).

**RESULTS:** ①Heparinized collagen showed absorption bands at 850  $\text{cm}^{-1}$ . ②The combination rate of the blend film approached to 56% and the rupture strength was 45 MPa as 0.1 mL glutaraldehyde (5 g/L) was added. ③APTT, TT, and PT of the blend film was over 150, 200 and 50 seconds, respectively.

**CONCLUSION:** The heparin in heparinized collagen/silk fibroin blend film still possesses good anticoagulant activity; it may be a new biomaterial with excellent performance.

Department of  
Chemical Engineering,  
Chengde Petroleum  
College, Chengde  
067000, Hebei  
Province, China

Cheng Zhong-ling ★,  
Master, Associate  
professor, Department  
of Chemical  
Engineering, Chengde  
Petroleum College,  
Chengde 067000,  
Hebei Province, China  
czl1969.student@  
sina.com

Supported by: the  
Science and Technical  
Research and  
Development Program  
of Hebei Province, No.  
05215512\*

Received: 2006-09-08  
Accepted: 2006-10-23

Cheng ZL. Preparation and anticoagulant activity of heparinized collagen/silk fibroin blend film. *Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu* 2007;11(1):11-13(China) [www.zgckf.com/zgckf/ejournal/upfiles/07-1/1k-11(ps).pdf]

#### 摘要

**目的:** 制备一种新型肝素化胶原 / 丝素共混膜, 观察其抗凝血性能。

**方法:** 实验于 2003-12/2005-04 在北京理工大学材料中心实验室完成。①将 50 mg 胶原溶于 0.2 g/L 醋酸溶液 5 mL 中, 然后滴加 10 g/L 肝素溶液 0.5 mL, 均匀搅拌 10 min, 得到肝素化胶原。采用 EQINOX55 型红外光谱仪 (美国 NICOLET 公司) 进行结构表征。②将肝素化胶原与丝素溶液共混 (质量比为 1:4), 加入戊二醛溶液作交联剂, 注入聚乙烯模具内干燥 72 h 得肝素化胶原 / 丝素膜。测定肝素的标准曲线以及不同戊二醛用量对肝素的结合率和膜的力学性能的影响。③采用体外凝血时间试验评价材料的抗凝血性, 包括活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血活酶时间 3 种凝血时间测定, 在 COAG-A-MATE-XM 型半自动四通道凝血仪 (美国 Organon Tekinika 公司) 中进行。

**结果:** ①肝素化胶原红外光谱在 850  $\text{cm}^{-1}$  处出现新峰。②当加入 5 g/L 戊二醛溶液 0.1 mL 时, 所得共混膜中肝素的结合率为 56%, 共混膜的断裂强度为 45 MPa。③共混膜的活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血活酶时间分别超过 150, 200, 50 s。

**结论:** 肝素化胶原与丝素共混膜中的肝素仍保持良好的抗凝血性。从而得到一种性能优良的新型生物材料。

**关键词:** 胶原; 丝素; 肝素化; 抗凝血性

程忠玲. 肝素化胶原 / 丝素共混膜的制备及其抗凝血性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(1):11-13  
[www.zgckf.com/zgckf/ejournal/upfiles/07-1/1k-11(ps).pdf]

## 0 引言

利用肝素化来提高材料的抗凝血性研究始于 20 世纪 60 年代。Gott 首先提出通过离子键结合使材料表面肝素化的方法, 而近年来采用离子键固定肝素主要是利用大分子主链或侧链季胺化再肝素化的方法<sup>[1]</sup>。本文选用酶法制备的天然生物材料胶原作为固定肝素的载体, 在酸性条件下以离子键结合形成肝素化胶原复合物<sup>[2]</sup>。为解决酶法制备的胶原存在力学性能差, 溶胀性大的弱点, 在肝素化胶原中加入丝素, 并加入戊二醛为共混膜的交联剂, 研究不同戊二醛用量对肝素的结合率和膜的力学性能的

影响。并评价了共混膜的体外抗凝血活性。

## 1 材料和方法

**设计:** 重复测量设计。

**单位:** 承德石油高等专科学校化工系。

**材料:** 实验于 2003-12/2005-04 在北京理工大学材料中心实验室完成。实验用仪器: TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司), EQINOX55 型红外光谱仪 (美国 NICOLET 公司), COAG-A-MATE-XM 型半自动四通道凝血仪 (美国 Organon Tekinika 公司), TOM 500 J 型万能引张压缩试验机 (日本新兴通信工业株式会

承德石油高等专科学校化工系, 河北省承德市 067000

程忠玲 ★, 女, 1969 年生, 山东省荣成市人, 汉族, 2004 年北京理工大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事抗凝血药物和材料的研究。  
czl1969.student@sina.com

河北省科学技术研究与发展指导项目 (05215512)\*

中图分类号: R34  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2007)01-00011-03

收稿日期: 2006-09-08  
修回日期: 2006-10-23  
(06-50-9-6689/Y-LL)

**课题背景:** 课题是由河北省科技发展计划项目(05215512)资助,课题负责人曾参加了国家重点基础研究计划项目“抗凝血材料”的研究,在此方面的研究,中积累了一定经验。基于心血管疾病是国人死亡的主要原因,近半个世纪来,治疗心血管疾病的药物迅速发展,抗凝血材料的研究也已成为生物材料研究的重点。目前国内外研究主要集中在材料筛选、共混等方面。本课题组在采用天然材料方面取得了一些成果。

社)。实验用试剂:血浆(中国红十字会北京市北太平庄血站),凝血酶、凝血活酶、部分凝血活酶、氯化钙溶液(上海医科大学华山医院技协生物试剂公司),肝素(效价 > 150 IU/mg)、胃蛋白酶、青霉素、戊二醛(北京鼎国生物技术发展公司), $\text{NaCO}_3$ 、氯化钙、乙醇、 $\text{NaOH}$ 、醋酸、甲苯胺蓝、正己烷(北京化工厂)。

**设计、实施、评估者:**设计、实施、评估为第一作者。

#### 方法:

**肝素化胶原的制备:**猪皮在 0.5 g/L  $\text{NaOH}$  溶液中浸泡过夜,脱脂后在 pH 为 3 的条件下,用适量的胃蛋白酶和青霉素酶解 4 d,当降解物成胶状后,用 0.5 g/L  $\text{NaOH}$  溶液调至 pH 10,并放置于 4 °C 冰箱中使胃蛋白酶失活。然后采用等电点沉淀法调节 pH 6~7 使胶原沉淀,冷冻离心分离、纯化,然后在 0.1 g/L 醋酸溶液和蒸馏水中分别透析 3 d,冷冻干燥得胶原。将 50 mg 胶原溶于 0.2 g/L 醋酸溶液 5 mL 中,然后滴加 10 g/L 肝素溶液 0.5 mL,均匀搅拌 10 min,得到肝素化胶原。结构表征采用 EQINOX55 型红外光谱仪进行红外扫描。

**肝素化胶原/丝素和胶原/丝素共混膜的制备:**丝素蛋白溶液按文献[3]制备。将肝素化胶原与丝素溶液共混(肝素化胶原/丝素的质量比为 1:4),加入 0.1 mL 不同质量浓度的戊二醛溶液作交联剂,混合并缓慢搅拌,静置脱泡,注入聚乙烯模具内,在 25 °C,相对湿度为 65% 的环境下干燥 72 h,得肝素化胶原/丝素膜。实验对照用胶原/丝素共混膜采用胶原与丝素的质量比为 1:4 混合,按上述条件干燥成膜。

**肝素结合率的测定:**将肝素化的共混膜浸入 15 mL 水中,5 d 测试 1 次浸泡液中肝素的溶出量,方法为量取 3 mL 已定容的浸泡液于试管中,其他试剂的加入同肝素标准曲线的测定方法<sup>[4]</sup>,测其吸光度,对照标准曲线,读出相应肝素的量,直至浸泡液中的肝素溶出量为零。将每次测定的肝素溶出量累加,用共混膜制备时加入的肝素量减去此值,即得到结合在共混膜中的肝素量,以此计算肝素结合率。

**膜的力学性能测定:**将膜裁成 10 mm × 60 mm 的样条,用 TOM500J 型万能引张压缩试验机测定膜的拉伸强度,拉伸速度 100 mm/min,负载 5 kg,每组 3 个样品,取其平均值。

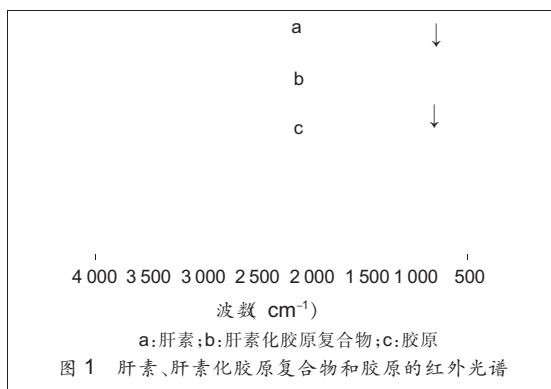
**体外抗凝血活性评价:**以 5 g/L 戊二醛溶液进行交联后的肝素化胶原/丝素膜试样在水

中浸泡 20 d,在 25 °C,相对湿度为 65% 的环境下干燥 72 h 后,置于比色杯中,在健康人血浆中恒温一定时间,加入测定活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血活酶时间所需的各种酶反应试剂,采用 COAG-A-MATE-XM 型半自动四通道凝血仪进行测定。

**主要观察指标:**肝素化胶原复合物的红外光谱,肝素结合率,不同质量浓度戊二醛交联的共混膜的力学性能,体外抗凝血性能。

## 2 结果

**2.1 肝素化胶原的形成** 见图 1。从肝素化胶原复合物的红外光谱图 1b 中可以看出,1 652  $\text{cm}^{-1}$ (酰胺 I)、1 538  $\text{cm}^{-1}$ (酰胺 II)、1 240  $\text{cm}^{-1}$ (酰胺 III)和 565  $\text{cm}^{-1}$ (酰胺 V)是胶原相应酰胺的特征峰,与图 1c 比较,在 850  $\text{cm}^{-1}$  处出现新峰,为肝素化胶原复合物的硫酸基团 C-O-S 伸缩振动峰。



**2.2 不同戊二醛用量对共混膜的肝素结合率的影响** 见图 2。

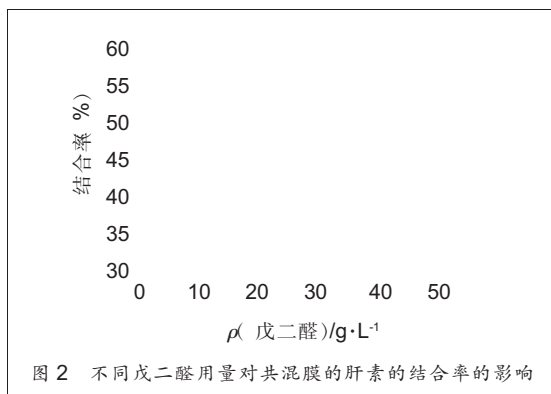


图 2 结果表明,未用戊二醛交联的肝素化胶原/丝素共混膜的肝素结合率为 32%,加入不同含量的戊二醛溶液后,肝素结合率随戊二

醛含量增加而增加,当戊二醛含量增加到 5 g/L 时,肝素结合率达到 56%,以后随着戊二醛用量的进一步增加,稍微出现下降的趋势。

**2.3 不同戊二醛用量对共混膜交联后的力学性能的影响** 从共混膜的力学性能考虑,戊二醛不宜多加,戊二醛含量 2.5,5.0 g/L)较小时,共混膜的断裂强度分别为 42,45 MPa,戊二醛含量 12.5,25.0 g/L)较大时,与丝素、胶原上的-NH<sub>2</sub>会产生过度交联,使共混膜变黄、变脆,浸泡 20 d 后膜已破碎,无法测定其力学性能。未用戊二醛交联的共混膜也出现相同的情况。因此,综合考虑以加入 5 g/L 戊二醛溶液 0.1 mL 进行交联为佳。

**2.4 体外抗凝血性能评价** 见表 1。

样品	活化部分凝血活酶时间	凝血酶时间	凝血活酶时间
正常人血浆 ( $\bar{x}\pm s$ )	28±10	16±5	11±3
实验血浆	35.3	13.5	10.5
胶原/丝素膜	37.7	14.3	11.2
肝素化共混膜	>150	>200	>50

表 1 数据表明,所采集的实验血浆样品的凝血时间在正常范围之内。未经肝素化处理的丝素/胶原膜的凝血时间与空白血浆的凝血时间相比变化不大。而经肝素化后的胶原/丝素膜 3 种凝血时间都超出了仪器的设定范围。

### 3 讨论

抗凝血性是评价与血液接触的生物材料的重要性能指标。人们尝试利用各种抗凝血剂来修饰材料的表面,其中肝素化抗凝血材料近年来研究最为热门<sup>[9]</sup>。通过离子键或共价键将肝素固定到材料表面是一种相对有效的肝素化法<sup>[6]</sup>,作者采用固定肝素的材料胶原,在酸性条件下形成带正电的氨基基团<sup>[7]</sup>可与肝素中带负电的硫酸基团相互作用,以离子键结合形成肝素化胶原复合物<sup>[1]</sup>。肝素化胶原复合物在 850 cm<sup>-1</sup> 处出现硫酸基团 C-O-S 伸缩振动峰(图 1),表明形成离子键,使振动峰发生了移动。在肝素化胶原中共混丝素,并加入适量的戊二醛为交联剂。戊二醛可与蛋白质形成交联结构,蛋白质之间通过稳定的碳氮共价键的搭桥而紧密结合在一起,其稳定性和力学性能大大提高<sup>[8]</sup>。经交联后的肝素化胶原/丝素复合材料,可以做到把材料的力学性能与肝素结合

率的提高有效地结合起来。

材料的抗凝血性采用体外 (*in vitro*) 凝血时间的测定方法在新材料的初步筛选试验中应用广泛<sup>[9]</sup>。凝血活酶时间是检验外源性凝血活酶的生成,它代表生成外源性凝血活酶、凝血酶和纤维蛋白这 3 个连续反应所用的时间<sup>[10]</sup>,它需要组织凝血活酶、钙离子、凝血酶原、纤维蛋白原、因子 V、因子 VII 和 X 等 7 个因子。同理,活化部分凝血活酶时间需要的因子有:因子 V、VIII、IX、X、XI、XII、凝血酶原及纤维蛋白原。凝血酶时间试验结果主要取决于纤维蛋白原浓度,并受纤溶活性等的影响。作者选用的胶原、丝素作为固定肝素的材料,3 种凝血时间与实验血浆的凝血时间变化不大,说明固定材料胶原/丝素膜不会影响血液的凝血过程。而肝素的引入,活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血活酶时间分别超过 150, 200, 50 s,说明固定在胶原/丝素膜中的肝素仍保持良好的生物活性,同时表明固定在材料表面的肝素可能会同发生 3 种凝血时间反应所涉及的某些凝血因子发生相互作用,从而抑制了这些凝血因子的活性导致凝血时间的延长。

**结论:**以戊二醛为交联剂,制备的肝素化胶原/丝素共混膜中肝素的结合率及其力学强度与交联剂的用量有关,当加入 5 g/L 戊二醛溶液 0.1 mL 时,共混膜的肝素结合率为 56%,断裂强度为 45 MPa,活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血活酶时间分别超过 150, 200, 50 s。

### 4 参考文献

- 1 Mori Y. The effect of released heparin from the heparinated hydrophilic polymer on the process of thrombus formation. *Trans Am Soc* 1978;(24):465-470
- 2 朱鹤孙. 医用与口腔材料[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 153-156
- 3 高运华, 杨新林, 范翠红, 等. 丝素蛋白膜上 vWf 抗体的固定化及其体外抗凝血性能[J]. 高技术通讯, 2003, 13(3): 56-60
- 4 Ducan AC, Boughner D, Campbell G. Preparation and characterization of a poly (2-hydroxyethyl methacrylate) biomedical hydrogel. *Eur Polym J* 2001; 37:1821-1826
- 5 项昭保, 霍丹群, 侯长军, 等. 肝素化抗凝血生物材料的研究[J]. 现代医学仪器与应用, 2002, 14(4): 25-29
- 6 谭昭早, 沈家瑞, 刘崇进. 聚合物的肝素化 [J]. 化工新型材料, 1998, 14(5): 16-18
- 7 胡建芳, 钱露西, 郭淑静, 等. 低温等离子体对医用胶原膜表面改性的研究[J]. 材料研究学报, 1994, 8(1): 82-87
- 8 李天全. 生物组织固定剂戊二醛的化学和应用[J]. 生物医学工程杂志, 1998, 5(2): 118-124
- 9 林思聪. 血液相容性高分子生物材料[A]// 黄维恒, 闻建勋. 高技术有机高分子进展[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994: 126
- 10 Heyman PW, Cho CS, McRea JC, et al. Heparinized polyurethanes: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Biomed Mater Res* 1985; 19(4): 419-436

**热点资讯:** 世界范围内, 生物材料及其 Devices 的研究、生产和应用已成为一个新兴的高科技产业。抗凝血材料可以部分用于生物体, 对生命科学的发展十分重要; 可以制成新型载药体系, 是现代医学以及生物工程学等进一步发展的重要物质支柱。抗凝血材料一旦在抗凝血性和生物功能上得到圆满的解决, 其庞大的市场是毋庸置疑的, 其应用前景十分看好。

**同行评价:** 文章报道了肝素化胶原/丝素蛋白共混膜的制备、交联剂戊二醛用量对所得共混膜中肝素结合率、膜断裂强度的影响以及共混物的体外抗凝血性能, 这在一定程度上为该共混膜开发为性能优良的抗凝血材料提供了实验依据。