



# 类人胶原蛋白生物相容性实验研究

米 钰<sup>1</sup>, 惠俊峰<sup>1</sup>, 范代娣<sup>1</sup>, 刘欢乐<sup>2</sup>

(1. 西北大学 化工学院, 陕西 西安 710069; 2. 西安油脂化工总厂, 陕西 西安 710069)

**摘要:**目的 为扩大类人胶原蛋白的应用, 评定和比较猪胶原蛋白、类人胶原蛋白和明胶在动物体内的生物相容性。方法 分别用胶原材料和明胶进行以下生物学测试: 急性毒性试验、溶血试验、热原试验、皮肤刺激试验。根据标准对试验数据进行分析 and 评估。结果 类人胶原蛋白的急性毒性试验、溶血试验、热原试验、皮肤刺激试验均为阴性。结论 材料生物学测试结果显示类人胶原蛋白较其他两种材料的生物相容性更高, 是理想的医用生物材料。

**关键词:** 胶原蛋白; 类人胶原蛋白; 明胶; 生物相容性

**中图分类号:** TQ936.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X (2004) 01-0066-04

胶原是一种广泛存在于有机体中的结构蛋白质, 是皮肤、软骨、动脉血管壁及结缔组织的主要成分。胶原分子是由 3 条螺旋型的肽链相互盘绕而成。目前, 胶原蛋白已广泛地应用于医药工业、食品工业、日用化学品工业、生物合成及胶原修饰等领域<sup>[1]</sup>。胶原蛋白的来源主要分为两类: 一是从动物结缔组织中提取; 二是通过基因工程菌高密度发酵获得。动物体胶原蛋白是一种硬蛋白, 不溶于水, 具有极大的伸展性。当胶原受热分解时, 3 股螺旋结构分开, 变成水溶性明胶分子。本实验室利用基因工程技术生产的类人胶原蛋白高分子材料 (Human-like collagen, 简称 HLC) 具有水溶性、低免疫排异反应等特性, 具有作为生物医用材料的潜力。本文主要通过动物实验对猪皮提取胶原蛋白、类人胶原蛋白和明胶三者的生物相容性进行了比较, 以便对类人胶原蛋白进行初步的生物学评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验样品的制备

本实验室构建的基因工程菌经发酵得到水溶性类人胶原蛋白; 猪胶原蛋白由鲜猪皮经酶解提取; 通

过猪胶原受热水解得到的明胶; 将猪胶原用生理盐水在 37℃ 水浴浸提 30 min, 制成浸提液<sup>[2]</sup>。

### 1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性试验 健康小白鼠, 体重 20 g 左右, 随机分组, 每组 5 只, 记录初始体重。通过小鼠尾静脉分别注射水溶性类人胶原蛋白、明胶溶液、猪皮胶原蛋白浸提液和生理盐水, 每只小白鼠注射量为 1 mL, 分别于注射后 24, 48 和 72 h 称量, 观察反应, 记录结果。

1.2.2 溶血试验<sup>[3]</sup> 健康成年中国大白兔, 体重 2.5 ~ 3.0 kg, 采血 20 mL, 加 20% 草酸钾 1 mL 制成抗凝兔血。取 8 mL 抗凝兔血加生理盐水 10 mL 稀释。取试验材料猪皮胶原的浸提液、类人胶原和明胶溶液及蒸馏水 (阳性对照)、生理盐水 (阴性对照) 各 10 mL 于试管内, 重复 3 份。放入 60℃ 水浴中, 预热 60 min。每个试管再加入 0.2 mL 稀释抗凝兔血, 于 37℃ 水浴 60 min, 750 g 离心 10 min, 取上清液。用分光光度计在 545 nm 波长测上清液的吸光度值 (A), 取平均值。计算各材料的溶血率, 计算公式: 溶血率 (%) = (材料组吸光度 - 阳性对照组吸光度) / (阴性对照组吸光度 - 阳性对照组吸光度)。

1.2.3 热源试验<sup>[4]</sup> 将一定量材料或材料浸提液

收稿日期: 2003-03-10

基金项目: 国家留学回国人员基金资助项目 (教外司留 [2000] 479 号); 国家科技部创新基金资助项目 (01C26216110599); 陕西省科技攻关资助项目 (2000K13-G5); 西安市重大创新工程计划资助项目 (创 CX200008)。

作者简介: 米 钰 (1968-), 男, 陕西临潼人, 西北大学讲师, 从事生物工程研究。

由静脉注入家兔体内,在规定时间内观察家兔体温变化情况,以判断材料中所含热原的限度是否符合规定。试验动物为健康成年中国家兔,体重 2.5 ~ 3.0 kg,雌兔无孕,预测体温进行筛选。试验前,家兔应在试验环境中适应 1 ~ 2 h,试验环境的温度变化不大于 5℃。将家兔装于固定器内,防止骚动,30 min 后测定家兔的正常体温,将肛门体温计插入兔肛门,深度约 6 cm,测温时间每兔至少 2 min。符合要求后 15 min 内,耳缘静脉缓慢注入试验试剂,计量为 0.5 mg/kg,温度为 38℃,注射完毕每隔 1 h 测温 1 次,共测 3 次,以 3 次体温中最高的 1 次减去正常体温,即为该兔体温升高高度,根据标准对结果进行

评定。

1.2.4 皮肤刺激试验<sup>[5]</sup> 试验动物为中国家兔,体重 2.5 ~ 3 kg,背部斑贴区备皮。试验试剂:直径均为 2.5 cm 的猪胶原膜、类人胶原膜及明胶膜;阴性对照:生理盐水 0.5 mL/块(滤纸);阳性对照:5% 甲醛 0.5 mL/块(滤纸)。试验方法:完整皮肤上分别贴敷试验材料,24 h 后去除。去除后 1,24,48,72 h 观察皮肤反应。皮肤刺激反应记分标准见表 1。刺激反应总评定:0 分为无刺激;小于 1.9 分为轻度刺激;2.0 ~ 4.9 分为中度刺激;5.0 ~ 8.0 分为强刺激。

表 1 皮肤刺激反应分级标准

Tab. 1 Criteriong of skin irritation reaction gradation

记 分	红斑反应	记 分	水肿反应
0	无红斑	0	无水肿
1	极轻微红斑(隐约可见)	1	极轻度水肿
2	边界清晰红斑(淡红色)	2	轻度水肿(边缘略高)
3	中度红斑(红色,边界清晰)	3	中度水肿(高出 1 mm)
4	严重红斑(红色,焦痂形成)	4	严重水肿(高出 1 mm,面积扩散)

## 2 结 果

### 2.1 急性全身性毒性试验

试验材料及浸提液注射后 24,48,72 h,小鼠体重均无明显变化,也无死亡和中毒反应,与阴性对照无差别,表明水溶性类人胶原蛋白、明胶溶液、猪皮

胶原蛋白浸提液在急性全身毒性试验中均为阴性反应。

### 2.2 溶血试验

类人胶原在 3 种材料中溶血率最低(<5%)。按国际标准化组织(ISO)文件规定:溶血率小于 5% 的均为合格,见表 2。

表 2 溶血试验结果

Tab. 2 Results of hemolytic reaction

组 别	A				平均	溶血率/%
	1	2	3			
阳性对照	0.973	1.039	1.056		1.023	-
阴性对照	0.024	0.023	0.023		0.024	-
胶原蛋白	0.142	0.107	0.133		0.127	10.39
明 胶	0.096	0.098	0.097		0.097	7.35
类人胶原蛋白	0.063	0.061	0.063		0.062	3.85

### 2.3 热源试验

注射 3 种材料后家兔体温升高均在 0.6℃ 以下,且升温总值在 1.4℃ 以下,认为 3 种材料符合热源检查要求,热源试验合格,见表 3。

定 3 种材料的刺激反应都为 0 级,认为 3 种材料刺激试验合格,见表 4。

### 2.4 皮肤刺激试验

通过局部斑贴试验过程除去贴敷物后,发现材料组各时段每一部位均无红斑和水肿反应,结果评

## 3 讨 论

生物相容性是生物材料研究中始终贯穿的主题。按国际标准化组织(ISO)会议的解釋:生物相

容性是指生命体组织对非活性材料产生反应的一种性能。这一般是指材料与宿主之间的相容性。近年来,生物相容性的概念发生了较大变化,其对象不仅为非活性材料,而且还涉及活性材料(组织工程),

同时普遍认为生物相容性包括两大原则:一是生物安全性原则;二是生物功能性原则<sup>[6]</sup>(或称为机体功能的促进作用)。

表 3 热源试验结果

Tab. 3 Results of pyrogenic reaction

组 别	编 号	基础体温/°C	注射后体温/°C			体温变化量/°C
			1 h	2 h	3 h	
明 胶	1	38.50	38.70	39.75	39.75	0.25
	2	38.65	38.65	38.80	38.82	0.17
	3	38.40	38.48	38.90	38.39	0.50
胶原蛋白	4	38.55	38.90	39.08	39.05	0.53
	5	38.50	38.85	38.88	38.90	0.40
	6	38.60	38.95	39.05	39.05	0.45
类人胶原蛋白	7	38.70	38.70	38.75	38.75	0.05
	8	38.55	38.65	38.72	38.72	0.17
	9	38.65	38.80	38.95	38.95	0.30

表 4 皮肤刺激试验结果

Tab. 4 Results of skin irritation reaction

组 别	1 h		24 h		48 h		72 h	
	红斑	水肿	红斑	水肿	红斑	水肿	红斑	水肿
胶原蛋白	0	0	0	0	0	0	0	0
类人胶原蛋白	0	0	0	0	0	0	0	0
明 胶	0	0	0	0	0	0	0	0
阴性对照组	0	0	0	0	0	0	0	0
阳性对照组	2	0	1	0	0	0	0	0

本试验是根据此原则评定和比较猪胶原蛋白、类人胶原蛋白和明胶在动物体内的生物相容性。我们对 3 种材料进行了部分生物相容性测试,3 种材料在急性全身毒性试验中均为阴性反应;在溶血试验中类人胶原蛋白的溶血率最低,小于 5%,比猪胶原低 6.54%,比明胶低 3.5%;热源试验显示家兔材料组个体升温均在 0.6°C 以下,升温总值在 1.4°C 以下;皮肤刺激试验显示材料组刺激试验均为 0 级。结果证明 3 种材料均具有较好的生物相容性,实验室试制的类人胶原比猪胶原和明胶的生物相容性更好。

良好的生物相容性是胶原蛋白作为医用生物材料的前提,本实验表明类人胶原较其他两种材料的生物相容性更高,且具有可加工性、无病毒隐患、水溶性好、低排异反应等优点,为其在医学领域的进一

步应用提供了有利的佐证。

### 参考文献:

- [1] 刘秉慈. 胶原蛋白在医用生物材料中的应用[J]. 生命的化学, 1991, 11(4): 23-26.
- [2] 奚廷斐. 医疗器械生物学评价(三)[J]. 中国医疗器械信息, 1999, (5): 9-16.
- [3] GB/16886-1986, 生物材料和医疗器材生物学评价技术要求[S].
- [4] 国家技术监督局. 医用有机硅材料生物学评价试验方法[M]. 北京: 中国标准出版社 1996. 4-18.
- [5] WS5-1-1987, 医用热硫化甲基乙烯基硅橡胶[S].
- [6] 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.

(编辑 陈懿文)

(下转第 72 页)

- [3] 蔡止荷,吴清平,许红立. 木霉和粘帚霉的生物防治研究进展[J]. 微生物学通报,1998,25(5):284-286.
- [4] 周德庆. 微生物学实验手册[Z]. 上海:上海科技出版社,1986. 78-81.
- [5] JACKSON A M, WHIPPS J M, LYNCH J M. Effects of temperature, pH and water potential on growth of the four fungi with disease biocontrol potential[J]. World Microbiol Biotechnol, 1991, 7(2):494-501.
- [6] KUNDSEN G R, BIN LI. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on the growth of *Trichoderma harzianum* from the alginate pellets[J]. Phytopathology, 1990, 90(1):724-727.

(编辑 陈懿文)

## The study on solid fermentative condition of *Trichoderma* TR-165

HUI You-wei, PAN Ya-ni, SUN Yong, ZHAO Jian

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

**Abstract:** **Aim** The fermentative condition of *Trichoderma* TR-165 from soil of the low temperature area is studied. **Methods** Single factor experiment. **Results** In the solid medium which include wheat bran, apple dreg and inorganic salt, fermentation processes. The optimum condition is as following: the water containing percentage is 20%; inoculum is 8%; during the fermentation, the temperature of 1st ~ 2nd day is 24°C, 3rd ~ 5th day is 20°C, and after the 6th day is 26°C; the thickness of medium is 2cm, and the medium is agitated and watered every 4 ~ 5 h; the fermentation period is 7 ~ 9 days. The conidial concentration can be over  $10^{10}$  spores  $g^{-1}$ . **Conclusion** The solid fermenting of *Trichoderma* TR-165 with wheat bran, apple dreg and inorganic salt is a fast, efficient and practical method

**Key words:** *Trichoderma*; solid fermentation; culture condition

(上接第 68 页)

## The biocompatibility of human-like collagen

MI Yu<sup>1</sup>, XI Jun-feng<sup>1</sup>, FAN Dai-di<sup>1</sup>, LIU Huan-le<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Xi'an Petrol Chemical Head Plant, Xi'an 710086, China)

**Abstract:** **Aim** To evaluate compatibility of human-like collagen, collagen and gelatin. **Methods** Collagen was used to perform the following biological test: acute systematic toxicity test, hemolytic test, pyrogenic reaction test, test for skin irritation. The data was analyzed and evaluated by criterion. **Results** Human-like collagen presented negative results in those tests. **Conclusion** Results of material biological evaluation tests show that the biocompatibility of human-like collagen is higher than the other two materials and can therefore serve as an ideal medical material.

**Key words:** collagen; human-like collagen; gelatin; biocompatibility