

常规钴 ^{60}Co 照射对胶原蛋白膜稳定性的影响

苏佩清¹, 孙卫东², 蒋红心², 乔明², 周晓霞¹

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州, 225000; 2. 扬州大学临床中医学院, 江苏 扬州, 225000)

摘要: 目的 探讨常规钴 ^{60}Co 辐照灭菌方法对胶原膜稳定性的影响。方法 牛肌腱胶原膜经常规 ^{60}Co 辐照灭菌, 比较辐照前后胶原膜孔径的大小、溶胀度、收缩温度、抗酶解能力及动物体内降解等指标。结果 经医用 ^{60}Co 辐照后, 胶原膜的孔径变大, 膜的溶胀度增加, 收缩温度降低, 体外抗胶原酶及胰蛋白酶的酶解时间缩短, 小鼠皮下埋置降解时间减少。结论 常规 ^{60}Co 辐照后, 胶原膜的交联度下降, 分子稳定性降低, 其分子结构的降解程度与辐射剂量呈正相关。

关键词: 胶原膜; 钴 60; 交联度; 分子稳定性; 降解

中图分类号: R 815.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2018)24-012-03 **DOI:** 10.7619/jcmp.201824003

Influence of routine ^{60}Co irradiation on the stability of collagen films

SU Peiqing¹, SUN Weidong², JIANG Hongxin², QIAO Ming², ZHOU Xiaoxia¹

(1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225000; 2. Clinical College of Traditional Chinese Medicine of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225000)

ABSTRACT: Objective To explore the effect of routine ^{60}Co irradiation for sterilization on the stability of collagen membrane. **Methods** Collagen membrane of bovine tendon was sterilized by routine ^{60}Co irradiation. The pore size, swelling degree, shrinkage temperature, anti-enzymatic ability and degradation of collagen membrane in vivo were measured and compared before and after irradiation. **Results** After irradiation by ^{60}Co , the aperture of the collagen membrane became larger, swelling of the membranes increased, the shrink temperature of the membranes decreased, time of the membrane against to collagenase and trypase digestion shortened, and the degradation time of subcutaneous collagen membrane in mice was shortened. **Conclusion** After irradiation by ^{60}Co , the cross-linking degree and the stability of collagen membrane decrease, and the degradation degree of molecular structure is positively correlated with the radiation dose.

KEY WORDS: collagen membrane; Cobalt 60; cross-linking degree; molecular stability; degradation

胶原蛋白是哺乳动物体内含量最高、分布最广泛的蛋白质, 占人体或其他动物总蛋白的 20% ~ 30%^[1]。胶原蛋白膜作为一种新型生物材料, 具有良好的生物相容性、生物可降解性及机械性能, 在医用生物材料领域得到广泛的应用^[2-3]。医用材料要求灭菌处理, 目前胶原生物材料常用的灭菌方法有环氧已烷灭菌法、射线辐照法等^[4]。经医用钴 60 (^{60}Co) 辐照处理后, 不仅能达到对胶原蛋白灭菌、交联的效果, 还能使胶原分子链断裂变性。本研究探讨常规 ^{60}Co 辐照灭菌方法对胶原膜

性能的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 胶原蛋白膜的制备: 取新鲜牛肌腱, 去除筋膜后冷冻切片, 37 °C 条件下采用胃蛋白酶消化 24 h。将消化的腱片用 0.5 mol/L 醋酸溶胀、混匀, 加饱和氯化钠 (NaCl) 沉析胶原蛋白。透析沉淀液, 提纯胶原蛋白并保持其浓度为 20.0 mg/mL, 注塑成膜。

收稿日期: 2018-06-21 录用日期: 2018-10-17

基金项目: 江苏省扬州市科技局资助课题 (YZ2014186)

通信作者: 周晓霞, E-mail: xxzhou@yzu.edu.cn

1.1.2 胶原酶液和胰蛋白酶液的配制: 胶原酶和胰蛋白酶购自 Sigma 公司, 采用 pH 值 7.4 的 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液分别将胶原酶和胰蛋白酶配制成酶活力单位为 20.0 units/mL 胶原酶应用液和 0.25% mg/mL 的胰蛋白酶应用液。

1.1.3 实验动物: 昆明种小鼠 20 只, 体质量 (30 ± 2) g, 由扬州大学医学院动物室提供, 实验动物使用许可证号为 SYXK(苏)2016-0019。

1.2 实验方法

1.2.1 灭菌处理: 按照 2000 版《中华人民共和国药典》中医疗器械辐照灭菌方法及《GB 18279-2000》中医疗器械环氧乙烷灭菌方法对胶原膜进行灭菌。辐照剂量率为 22 KGy/h, 吸收剂量分别为 5、10、15、20、25 KGy。

1.2.2 溶胀度测定: 应用打孔器将胶原样品制成直径 1 cm 的圆片, 将胶原圆片初始重量 (W_0) 的胶原膜浸泡于蒸馏水中 0.5 h, 取出后用滤纸将胶原膜表面水分吸干, 称重 (W)。溶胀度 (S) = W/W_0 。

1.2.3 收缩温度测定: 将胶原样品切成 1 cm × 5 cm 的长条, 装入盛有蒸馏水的烧杯中, 从 25 °C 升温, 升温速度 1 ~ 2 °C/min, 当样品明显收缩时记录温度为收缩温度。

1.2.4 酶解时间测定: 应用打孔器将胶原样品制成直径 1 cm 的圆片, 之后将胶原圆片和胶原酶液 (20 units/mL) 或胰蛋白酶 (0.25% mg/mL) 加入小试管中, 记录 37 °C 恒温条件下酶解至样品完全分解所需的时间为酶解时间。

1.2.5 胶原膜皮下埋植降解实验: 无菌条件下, 分别将照射灭菌 (25 KGy) 和环氧乙烷灭菌的胶原蛋白膜用打孔器制成直径 1 cm 的圆片。将昆明种小鼠 20 只随机分为环氧乙烷灭菌组和常规 ^{60}Co 照射组, 每组 10 只。小鼠用乙醚麻醉后固定, 背部正中消毒、去毛, 手术剪开约 1 cm 的纵行切口, 止血后用眼科剪分离皮肤与筋膜并将胶原膜片放入右侧皮下, 肠线缝合 2 针, 小鼠清醒后正常饲养。分别于术后第 10、20 天断颈处死小鼠, 剪开皮肤观察胶原蛋白膜的降解情况, 拍照留图像资料。

1.2.6 扫描电镜观察照射前后胶原蛋白膜孔径的变化: 扬州大学检测中心代为检测。

2 结果

胶原蛋白膜经医用 ^{60}Co 辐照处理前后的溶胀度和收缩温度结果见表 1。结果显示, 经不同辐照剂量

照射量 ^{60}Co 照射后的胶原蛋白膜溶胀度随照射剂量加大而增加, 不同辐照剂量胶原膜的收缩温度随照射剂量加大而减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。不同辐照剂量前后胶原膜的胶原酶和胰蛋白酶的酶解时间见表 2。结果表明, 胶原蛋白膜经不同辐照剂量的 ^{60}Co 辐照后, 其抗胶原酶和胰蛋白酶的酶解时间较辐照前均减少, 并与辐照剂量呈正相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。术后第 10 天观察各组胶原膜片轮廓清晰, 但常规 ^{60}Co 照射组的膜片明显小于环氧乙烷灭菌组, 说明常规 ^{60}Co 照射组胶原膜片的降解速率明显快于环氧乙烷灭菌组。术后第 20 天观察环氧乙烷灭菌组的膜片仍清晰可见并可完整剥离, 而常规 ^{60}Co 照射组的膜片轮廓已不清晰, 剥离时成型性差。见图 1。扫描电镜图显示, 照射过 (25 KGy) 的胶原膜与未照射过的胶原膜相比较, 其孔径明显变大。见图 2。

表 1 辐照前后及不同辐照剂量对胶原膜的溶胀度和收缩温度的影响 ($\bar{x} \pm s$) ($n=5$)

| 时点 | 剂量/KGy | 溶胀度 | 收缩温度/°C |
|-----|--------|---------------|----------------|
| 照射前 | - | 2.90 ± 0.04 | 69.80 ± 3.85 |
| 照射后 | 5 | 3.36 ± 0.06** | 52.10 ± 2.42** |
| | 10 | 3.65 ± 0.05** | 48.50 ± 3.39** |
| | 15 | 3.92 ± 0.05** | 39.40 ± 3.26** |
| | 20 | 4.56 ± 0.04** | 37.60 ± 3.54** |
| | 25 | 4.77 ± 0.06** | 36.50 ± 3.66** |

与照射前比较, ** $P < 0.01$ 。

表 2 不同辐照剂量对胶原膜和胰蛋白酶的酶解时间影响 ($\bar{x} \pm s$) ($n=5$)

| 时点 | 剂量/KGy | 酶解时间/min | |
|-----|--------|-------------------|-----------------|
| | | 胶原酶 (20 units/mL) | 胰蛋白酶 (0.25%) |
| 照射前 | - | 652.00 ± 5.93 | 593.00 ± 5.52 |
| 照射后 | 5 | 551.00 ± 9.48** | 427.00 ± 4.33** |
| | 10 | 433.00 ± 7.19** | 386.00 ± 6.28** |
| | 15 | 196.00 ± 8.85** | 205.00 ± 9.65** |
| | 20 | 149.00 ± 6.74** | 177.00 ± 7.27** |
| | 25 | 90.00 ± 8.91** | 135.00 ± 4.97** |

与照射前比较, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

胶原蛋白膜作为一种新型生物材料, 具有良好的生物安全性和可降解性^[5-8]。医用材料均需要消毒灭菌。射线辐照法具有操作安全、不污染环境、杀菌彻底无残留、可对热敏材料灭菌等优点^[9]。

溶胀度可以反映胶原膜的交联度, 溶胀度越大表明交联度越低^[10]。本研究结果表明, 不同剂

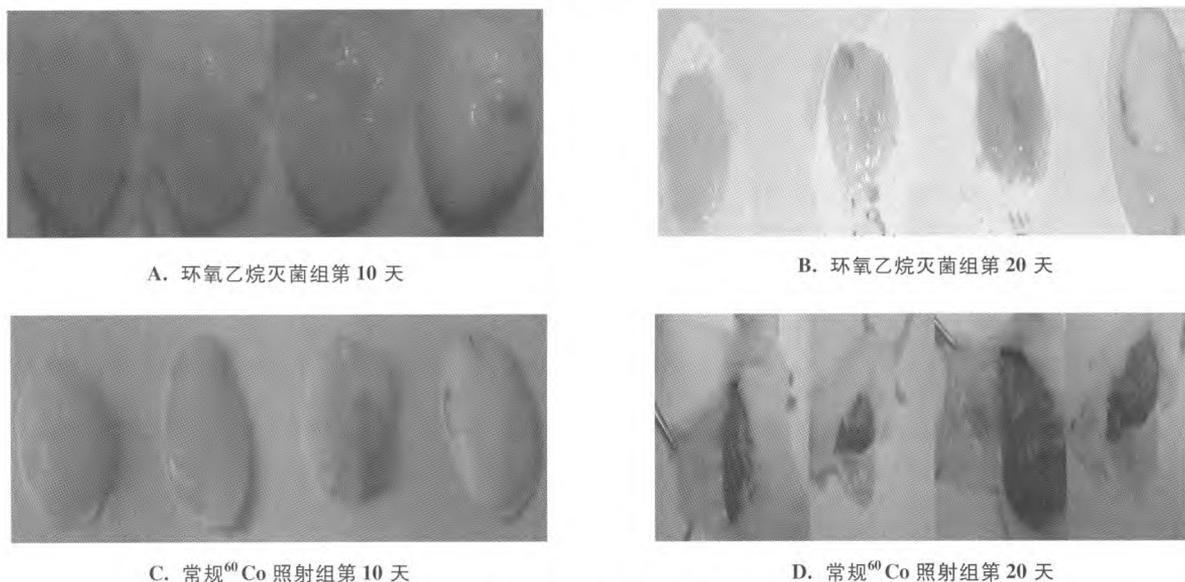


图 1 环氧乙烷灭菌组与常规⁶⁰Co 照射组术后第 10、20 天胶原膜片的降解情况

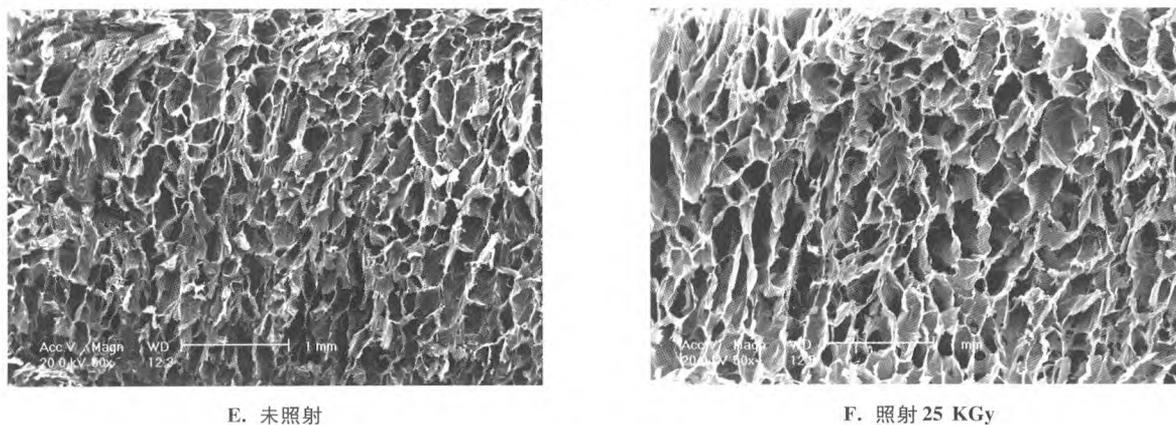


图 2 25KGy 照射胶原膜与未照射胶原膜的电镜图比较

量⁶⁰Co 辐照后,胶原蛋白膜的溶胀度均增加,并与辐照剂量呈正相关,说明常规⁶⁰Co 辐照后胶原蛋白膜的交联度减少。扫描电镜图也能反映交联度,本研究结果表明常规⁶⁰Co 辐照后的胶原蛋白膜孔径变大,交联度变小。

收缩温度可间接反映胶原熔点温度,每一种胶原都有其特定的熔点温度。胶原蛋白膜收缩温度取决于胶原交联程度和结晶度、胶原纤维的有序性、胶原的降解变性程度^[11]。本研究结果表明,不同剂量⁶⁰Co 辐照灭菌后,胶原膜的收缩温度均降低,这可能是由于采用常规⁶⁰Co 辐照灭菌胶原膜时, γ 射线可造成肽链的断裂,胶原纤维的有序性降低,胶原蛋白的空间结构松散变性。因此采用常规⁶⁰Co 辐照灭菌法,而不采用任何保护胶原蛋白膜的措施,胶原蛋白将因降解变性而遭到一定程度的破坏。

胶原酶和胰蛋白酶的酶解时间可反映胶原蛋
万方数据

白膜交联度^[12]。有研究^[13]报道,经常规⁶⁰Co 辐照胶原膜的交联度和稳定性增加。本研究结果显示,常规⁶⁰Co 辐照后的胶原蛋白膜的体外酶解时间均减少,并与辐照剂量呈正相关。将胶原膜在小鼠皮下埋植 10、20 d 后观察可见,与环氧乙烷灭菌比较,⁶⁰Co 照射的胶原蛋白膜的降解速率明显加快。体内、体外实验结果表明,常规⁶⁰Co 辐照后可使胶原膜的交联度减少,稳定性降低,明显加快了胶原蛋白膜的降解速率。

在辐射能的作用下,聚合物大分子链既可以发生交联反应,也可以发生分子链的降解反应。发生交联还是降解主要取决于聚合物的结构和辐照方法。有研究^[14]报道,在低温条件下,胶原膜经⁶⁰Co 射线辐照处理,在一定的剂量范围内(15 ~ 25 KGy)胶原膜的交联度增加,胶原分子的有序性增加,抗胶原酶酶解能力增加,稳定性增

(下转第 19 面)

- Clin North Am Small Anim Pract, 2017, 47(3): 569 - 583.
- [6] 张先俊, 徐莉芳, 何忠良. 原发性肝癌患者血清可溶性细胞间黏附分子-1 的水平及其与肝纤维化的关系[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(3): 31 - 34.
- [7] 中华医学会肝病学会. 慢性乙型肝炎诊断标准(2015 年版)[J]. 中西医结合肝病杂志, 2015, 25(6): 384 - 384.
- [8] 高孟秋. 《WS 288 - 2017 肺结核诊断》新标准中关于临床诊断患者判定的解析[J]. 中国防痨杂志, 2018, 40(3): 243 - 246.
- [9] 陆伟, 张占卿, 沈芳, 等. 血清 HBsAg 和 HBVDNA 定量水平预测慢性乙型肝炎患者肝组织炎症活动度和纤维化程度的评价[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(1): 20 - 25.
- [10] 钮志林, 高胜利, 俞净, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织病理学分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(1): 26 - 28.
- [11] 王琳, 樊耀昕, 丁洋, 等. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒慢性感染者肝组织病理学炎症及纤维化对比分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(6): 419 - 423.
- [12] 胡焯, 张国. 肝纤维化诊断及其严重程度评估[J]. 实用肝脏病杂志, 2017, 20(1): 13 - 16.
- [13] 张孝盈, 宓余强. 肝纤维化影响因素的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(6): 1062 - 1066.
- [14] Afyon M. Could viral load combined with indirect serum markers be an option for predicting the degree of liver fibrosis in treatment-naïve chronic hepatitis B patients[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2017, 109(2): 166 - 167.
- [15] 雷微, 王艳丽. 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病患者发生房颤的危险因素[J]. 重庆医科大学学报, 2017, 40(7): 879 - 882.
- [16] 魏华, 王海梅, 郭何. FibroScan 用于慢性肝病患者肝纤维化的早期诊断价值[J]. 现代消化及介入诊疗, 2017, 22(3): 315 - 318.
- [17] Gong J, Liang Y L, Zhou W, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio associated with prognosis in HBV-infected patients[J]. J Med Virol, 2018, 90(4): 730 - 735.
- [18] 江云, 高月求, 李曼, 等. 慢性乙型肝炎患者病理特征和临床客观生化指标特点及其相关性分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 41(12): 1552 - 1555.
- [19] 蒋福明, 李秀芬, 程书权, 等. 83 例轻度慢性乙型肝炎合并肺结核患者肝组织病理学与血清生化学及 T 细胞亚群相关性分析[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(1): 66 - 71.

(上接第 14 面)

加。Magda J 等^[15]研究表明,适当剂量的 γ 射线辐照可以显著提高湿态胶原蛋白膜的交联度,对结构的破坏很少。但是对于干态样品,则会引起胶原蛋白的变性和有序结构的破坏。

本研究结果表明,⁶⁰Co 辐照灭菌处理的胶原蛋白膜的交联度下降,分子稳定性降低,其分子结构的降解程度与辐射剂量呈正相关。

参考文献

- [1] Lee C H, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen[J]. Int J Pharm, 2001, 221(1/2): 1 - 22.
- [2] 刘慧玲, 王栋, 章金刚. 胶原蛋白在临床医学中的应用[J]. 北京生物医学工程, 2005, 24(3): 239 - 240.
- [3] Gentleman E, Lay A N, Darryl A, et al. Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering[J]. Biomaterials, 2003, 24: 3805 - 3809.
- [4] Myung Chul Chang. Preparation of a porous hydroxyapatite collagen nanocomposite using glutaraldehyde as a cross-linking agent[J]. Journal of Materials Science Letters, 2001, 20: 1199 - 1201.
- [5] 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.
- [6] Lee C H, Singla Anuj, Lee Y Y. Biomedical applications of collagen[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 221: 1 - 6.
- [7] Si-Nae Park, Jong-Chul Park, Hea Ok Kim, et al. Characterization of porous collagen hyaluronic acid scaffold modified by carbodiimide cross-linking[J]. Biomat, 2002, 23: 1205 - 1212.
- [8] 周文常, 但卫华, 廖隆理, 等. 胶原蛋白及其与高聚物形成的复合材料在医学中的应用[J]. 皮革科学与工程, 2004, 14(2): 30 - 33.
- [9] 朱南康, 王春雷, 滕维芳. 辐射灭菌对壳聚糖管力学性能和生物降解性的影响研究[J]. 核技术, 2003, 26(3): 190 - 196.
- [10] Tiller J C, Bonner G, Pan L C, et al. Improving biomaterial properties of collagen films by chemical modification[J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 73(3): 246 - 252.
- [11] Angele P, Abke J, Kujat R, et al. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices[J]. Biomaterials, 2004, 25(14): 2831 - 2841.
- [12] Ohan M P, Weadock K S, Dunn M G. Synergistic effects of glucose and ultraviolet irradiation on the physical properties of collagen[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 60(3): 384 - 391.
- [13] 林晓艳, 鲁建, 刘科伟, 等. ⁶⁰Co 辐照灭菌对胶原膜体外稳定性影响的研究[J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2003, 35(6): 58 - 61.
- [14] 林晓艳, 唐敏, 张兴栋. γ 射线低温辐照对胶原膜体外稳定性和细胞相容性的影响[J]. 生物医学工程杂志, 2006, 23(4): 822 - 825.
- [15] Magda Jules, Cho Seung-Hei, Streitmatter Seth, et al. Effects of gamma rays and neutron irradiation on the glucose response of boronic acid - containing "smart" hydrogels[J]. Polymer Degradation and Stability, 2014, 99: 219 - 222.