

戊二醛交联对猪皮皮片耐辐照能力影响的研究

贺俊绮 王小莉 王仲文 赵素色 刘赫臣 孙世荃

(中国辐射防护研究院, 太原030006)

摘要 由化学分析和扫描电镜观察结果表明: 经较大剂量 ^{60}Co γ 线照射后, 猪皮皮片胶原耐热碱和胶原酶水解能力明显下降, 但皮片经0.01%—0.10%戊二醛预处理能提高其耐辐照能力。照射-冻干组皮片明显优于相应的冻干-照射组皮片。

关键词 猪皮, 戊二醛, 交联, 胶原, 辐照

冻干-辐照猪皮皮片(LIPD lyophilized irradiated porcinederma), 是一种制备简单、保存方便、效果较好的治疗烧伤的生物敷料^[1]。然而皮片经较大剂量 ^{60}Co γ 射线照射后, 会引起皮片中主要成分——胶原蛋白分解, 导致其机械强度降低以及皮片敷用创面后易被细菌酶消化降解。为了获得高质量的皮片、减少皮片敷用创面后的更换次数, 根据 Oliver 报道的方法^[2], 将猪皮在辐照前先用低浓度戊二醛水溶液浸泡, 进行醛交联, 再经热碱水解、胶原酶水解后检测其胶原蛋白的残余含量, 并用扫描电镜观察, 以确定戊二醛的最佳浓度。用醛交联的目的在于提高LIPD的耐辐照和耐水解能力。

1 材料和方法

1.1 猪皮片的制备:

白毛幼猪的新鲜皮经褪毛洗净, 用切皮机(PPI 上海产)切取真皮约0.15 mm厚。将真皮浸泡在不同浓度(0.01%—0.10%)戊二醛溶液中, 置水浴振荡器(SZX-B型哈尔滨产)内20℃恒温振荡(100 rpm)16 h, 取出后用蒸馏水反复漂洗, 一部分冷冻干燥后经 ^{60}Co γ 射线照射(冻干-照射组), 另一部分先经 ^{60}Co γ 射线照射后再冷冻干燥(辐照-冻干组)。

1.2 照射条件

猪皮皮片封装在双层塑料袋中, 室温下 ^{60}Co γ 射线照射。照射剂量分别为15、25和50 kGy, 剂量率19.88 Gy/min。

1.3 生化分析

1.3.1 热碱水解 准确称取100 mg皮片, 置入洁净的锥形瓶中, 加入20 ml 0.1 mol/L NaOH, 将锥形瓶放入水浴振荡器内, 恒温60℃持续振荡(100 rpm)1 h。倒去碱液, 经蒸馏水反复漂洗皮片后, 用氯胺T法测定皮片胶原蛋白的残余含量, 其结果用羟脯氨酸(HP)的含量表示。

1.3.2 胶原酶水解 胶原酶(Collagenase Type IA Sigma公司产品)用缓冲液(10 mmol/L Tris, 25 mmol/L CaCl_2 , pH 7.6)稀释成浓度1000 U/ml的酶液, 准确称取10 mg皮片, 加入

收稿日期: 初稿1991-03-01; 修改稿1992-12-14

0.5 ml 酶液, 用酶缓冲液稀释至 5 ml, 在 25℃ 水浴中静置 24—50 h, 取出后测定胶原蛋白的残余含量。

1.4 扫描电镜(SEM)观察

皮片经热碱水解 25 min 或胶原酶水解 18 h, 取出, 经冷冻干燥, 用扫描电镜(JSM-35 CF, JEOL)观察皮片表面的形态学变化。

2 结果与分析

2.1 皮片的热碱水解结果 见表 1。

Tab 1. The residual collagen, mg HP/100 mg (SD) of glutaraldehyde treated and irradiated porcine dermal after hot-alkali hydrolysis

Irradiation state	Dose /kGy	Concentration of glutaraldehyde/%				
		0	0.01	0.02	0.05	0.10
Dry	0	0.13(0.08)	7.36(0.32)	9.72(0.22)	10.40(0.21)	9.59(0.33)
	15	<0.01	0.85(0.49)	7.17(1.29)	9.65(0.41)	10.20(0.53)
	25	<0.01	0.56(0.14)	2.51(0.32)	8.81(0.13)	9.53(0.22)
	50	<0.01	0.12(0.10)	0.41(0.08)	7.20(0.13)	9.22(0.38)
Wet	15	0.38(0.24)	6.29(0.94)	9.31(0.94)	10.50(0.31)	10.50(0.22)
	25	<0.01	5.47(0.51)	8.73(0.35)	10.80(0.17)	10.60(0.27)
	50	<0.01	5.00(0.10)	6.96(0.51)	9.55(0.20)	10.00(0.11)

Note: Collagen of non-hydrolysed and non-irradiated control is 10.30(0.18)

2.1.1 冻干-照射组 ^{60}Co γ 射线照射对干燥皮片的破坏较大。受 15 kGy 照射, 经热碱水解后皮片已呈糊状, 其胶原蛋白残余含量(<0.01 mg HP/100 mg)明显低于未照射的皮片(0.13 mg HP/100 mg)。

用戊二醛交联可明显提高皮片胶原的耐水解能力。经 0.01% 戊二醛交联的未照射皮片, 热碱水解后胶原蛋白的残余含量与正常皮片相接近, 与未经戊二醛交联的皮片热碱水解后胶原蛋白的残余含量相比, 提高了 56 倍(7.36/0.13)。

皮片经戊二醛交联后可明显提高胶原的耐辐照能力, 0.01% 戊二醛交联就可以使 15、25 kGy 照射皮片热碱水解后的胶原蛋白含量达到 0.85 和 0.56 mg HP/100 mg, 显著高于未受照射的皮片(0.13 mg HP/100 mg)。当照射剂量达到 50 kGy 时, 热碱水解后胶原蛋白残余含量与未受照射的皮片相似(0.12 mg/HP/100 mg)。

辐照皮片化学稳定性的提高与戊二醛的浓度有关。0.01% 的戊二醛交联已能收到明显效果, 而当戊二醛浓度升为 0.05% 时, 辐照后碱水解引起皮片胶原蛋白的损失很少, 胶原蛋白的残余含量与正常对照相接近(10.30 mg HP/100 mg)。

用戊二醛交联后胶原耐辐照能力的变化与受照剂量有关。经同样戊二醛浓度交联后, 受照剂量越低, 胶原耐热碱、胶原酶水解性能越好。

2.1.2 辐照-冻干组 辐照-冻干组与冻干-辐照组的结果相类似(见表 1), 其区别主要在于:

(1) 辐照-冻干组皮片的胶原蛋白, 不论是否经过用戊二醛交联, 其耐热碱水解能力明显优于相应的冻干-辐照组皮片。

(2) 用相同浓度的戊二醛交联对皮片耐辐照能力的提高, 在辐照-冻干时较冻干-辐照更为有

效。经 0.01% 戊二醛交联的辐照-冻干组胶原蛋白的残余含量大约为冻干-辐照组皮片的 10 倍。用 0.02% 戊二醛交联可使辐照-冻干组皮片的胶原几乎达到完全保护。

(3) 相同戊二醛浓度组, 受照剂量的变化对胶原蛋白的残余含量无显著影响。

2.2 皮片的胶原酶水解结果与热碱水解结果相似 见表 2。

Tab 2. The residual collagen, mg HP/100 mg of glutaraldehyde pretreated and 25 kGy irradiated dermal samples

Irradiation state	Glutaraldehyde/%	Time of hydrolysis/h		
		24	30	50
Dry	0	0.08	0.16	/
	0	0.17	/	/
	0.01	0.39	/	/
	0.02	1.02	/	/
	0.05	/	6.36	4.87
wet	0	0.56	/	/
	0.01	0.93	/	/
	0.02	1.12	/	/
	0.05	9.29	/	8.47

未经戊二醛处理的冻干皮片经 25 kGy 照射, 胶原酶水解 24 h, 胶原蛋白的残余含量 (0.17 mg HP/100 mg) 仅是未照皮片 (0.8 mg HP/100 mg) 的 21%, 这说明辐照不仅可以降低皮片耐热碱水解能力, 还可以明显降低耐胶原酶的水解能力。经 0.01%—0.05% 戊二醛交联可以提高皮片耐酶解能力。在辐照-冻干时, 当戊二醛浓度 0.05%, 25 kGy 剂量照射, 酶解 24 h 后胶原蛋白的残余含量为未经照射的对照组皮片的 90%。要想达到对皮片受 25 kGy 照射的保护作用, 冻干-辐照组需 0.02% 戊二醛交联, 而辐照-冻干组仅需 0.01% 的戊二醛, 这说明用胶原酶水解和热碱水解时的结果一样, 辐照-冻干皮片优于对应的冻干-辐照皮片。

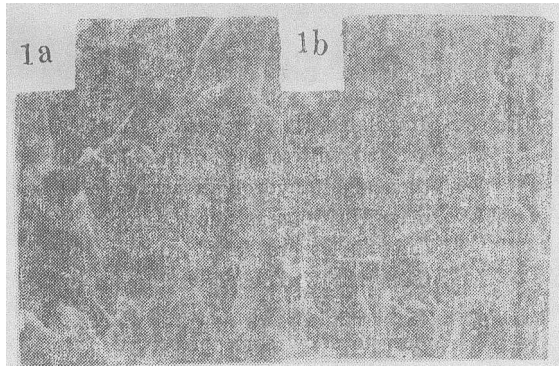


Fig 1. Irradiated (25 kGy) skin sample immersed in Tris buffer at 25°C for 18 h (shamed control of enzyme hydrolysis), Slight widening of interabecular spaces and swelling of the fibrous strands (a), High power view of the same field to show tiny fibrils extending from the strands (b)

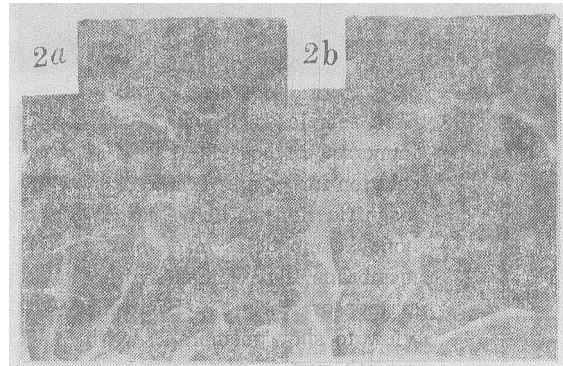


Fig 2. Irradiated (25 kGy) skin sample hydrolysed with collagenase in Tris buffer, at 25°C for 18h, Disappearance of fibrous strands, there are great digested holes and membrane like remnants (a) High power view to show the rolled membrane and empty holes, There are club like ends of the digested collagen fibrils (b)

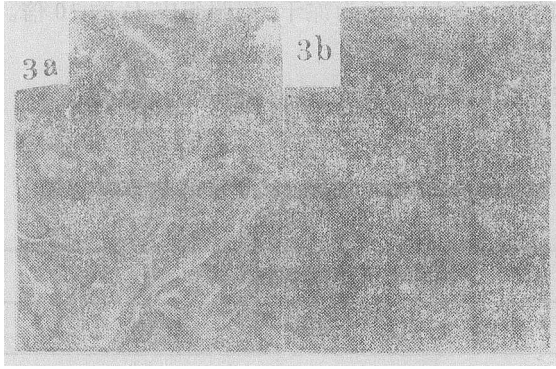


Fig 3. Irradiated (25 kGy) skin sample treated with 0.02% glutaraldehyde, then collagenase hydrolysis as above, Some fibrous strands were preserved, there are no empty holes(a), High power view to show the fibrous strands (b)

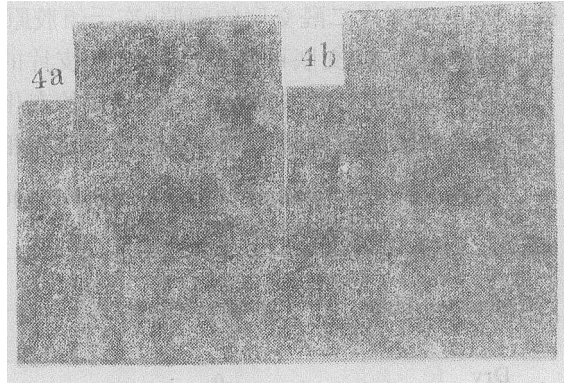


Fig 4. Irradiated (25 kGy) skin sample immersed in water of 60°C for 25 min (shamed control of alkali hydrolysis), Honey comb appearance resulted from dissolution by hot water incubation, some strands are preserved (a), High power view to show the remained strands and fibrils (b)

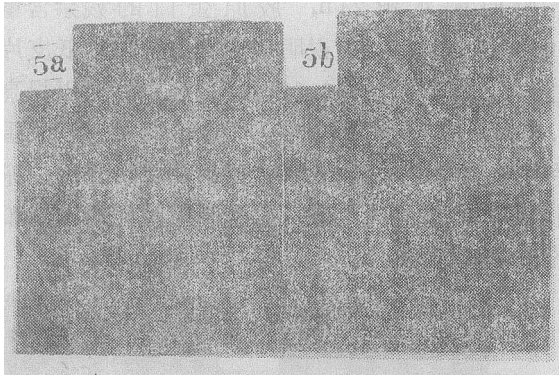


Fig 5. Skin sample as above, immersed in hot alkali solution for 25 min Same magnifications as above large honey comb holes made by membrane like remnants without strands or fibrils(a), High power view to show membranes with smooth surface (b)

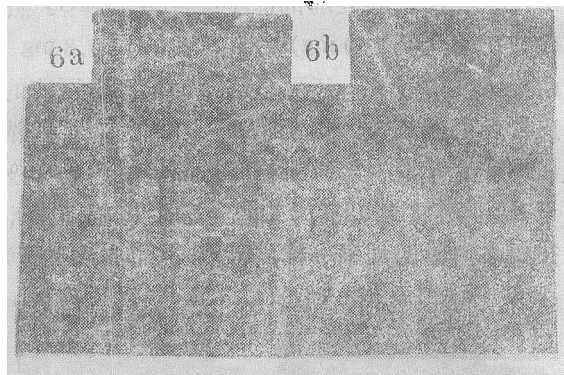


Fig 6. Irradiated (25 kGy) skin sample treated with 0.01% glutaraldehyde, then alkali hydrolysis as above, Same magnifications as above, Honey comb holes are apparently smaller than that without pretreatment of glutaraldehyde(a), High power view to show some preserved strands(b)

2.3 扫描电镜(SEM)观察

受照和未受照的冻干皮片表面结构 SEM 观察无显著差别,皮片表面有网状胶原纤维束。在 25°C 酶缓冲液中浸泡 18 h(胶原酶水解对照),束状纤维肿胀。同时因轻度的水解,束状纤维间隙变宽。在 60°C 水浴中,振荡(100 rpm)25 min(热碱水解对照组)后,受照皮片表面出现空洞。热水解皮片表面空洞变大,观察不到细丝状的胶原纤维。而皮片经戊二醛交联,即使浓度为 0.01%,也明显提高了皮片耐热碱和胶原酶水解的能力(图 1—6)。

3 讨 论

实验所用猪皮皮片取自猪的真皮, 它几乎完全由胶原蛋白组成。在干燥状态下, 受 10—100 kGy ^{60}Co γ 射线照射后, 在一定程度上仍保持原有结构, 然而其热稳定性、机械强度都有较大程度下降, 且易被胶原酶水解。实验与文献[4]结果一致: 皮片受较大剂量 γ 射线照射后, 明显破坏了皮片的化学和生物学稳定性。同时还观察到, 相同剂量照射对辐照-冻干皮片的破坏比冻干-辐照皮片小。这现象可解释为^[3-5]: 在含水状态下, 皮胶原蛋白侧链在水中有一定的自由度, 使受照后所产生的自由基能以较适当的距离和角度参与胶原蛋白分子的交联而形成稳定的共价键, 弥补了因受照而引起的分子间交联键的断裂。这也许就是辐照-冻干皮片的耐辐照性优于冻干-辐照皮片的原因。

戊二醛是一种具有活性双功能基团的化学物质, 它可与另一戊二醛分子及某些氨基酸残基反应而形成共价键。在戊二醛与胶原蛋白的反应过程中, 赖氨酸起着极为重要的作用。胶原蛋白中赖氨酸残基中的化学键— NH_2 先与三个戊二醛分子反应, 缩合成杂环化合物使得胶原蛋白分子彼此交联, 这有助于弥补因辐照引起皮片胶原蛋白的破坏^[6,7]。

总之, 象 Oliver 报道那样, 低浓度戊二醛浸泡猪皮皮片(真皮)可提高其耐热、碱和耐胶原酶水解能力, 本文利用醛交联加强猪皮皮片耐辐照能力, 经过化学检测和形态学观察, 得到肯定的效果。醛交联技术将有助于改进用于烧伤治疗的猪皮皮片的质量。

参 考 文 献

- 1 Pcllt S et al. "Burn Wound Covering", CRC: DL Wise. 1984: 85
- 2 Oliver R F. Clinical science in implantation "Wound Healing Symposium" Simth and Nephew Led. 1983: 15
- 3 Bowes J H, Moss J A, Radiat. Res., 1962, 16: 211
- 4 Davidson R J, Copper D R. Biochem. J., 1968, 107: 29
- 5 Bailey A J et al. Radiat. Res., 1964, 22: 606
- 6 李 英, 刘白玲. 皮革科技, 1981, (6): 14
- 7 Reichin M. Methods in Enzymology. 1980, 70: 159

THE EFFECT OF GLUTARALDEHYDE ON THE STABILITY OF PORCINE DERMAL COLLAGEN AFTER ^{60}Co GAMMA RADIATION

He Junqi Wang Xiaoli Wang Zhongwun Zhao Suse
Liu Hechen Sun Shiquan

(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006)

ABSTRACT The results of chemical analysis and scanning electron microscopic observation show that large dose of ^{60}Co gamma radiation decreases substantially the chemical and biological stability of porcine dermal collagen after hydrolysis with hot alkali and collagenase. But pretreatment with 0.01%—0.1% glutaraldehyde is beneficial for the improvement of its stability; radiation in the wet state is better than in dry.

KEYWORDS Porcine dermal, Glutaraldehyde, Crosslinking, Collagen, Radition