



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106421884 B

(45)授权公告日 2019.09.24

(21)申请号 201611137151.7

(22)申请日 2016.12.12

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106421884 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(73)专利权人 西北大学  
地址 710069 陕西省西安市太白北路229号

(72)发明人 范代娣 惠俊峰 朱晨辉 马晓轩  
段志广 姜西娟

(74)专利代理机构 西安西达专利代理有限责任  
公司 61202

代理人 谢钢

(51)Int.Cl.

A61L 24/10(2006.01)

A61L 24/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101695581 A,2010.04.21,

CN 103772734 A,2014.05.07,

CN 102526795 A,2012.07.04,

US 2001045177 A1,2001.11.29,

审查员 杨晓飞

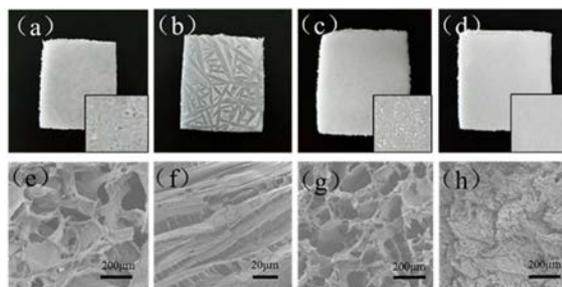
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

两步冷冻法制备止血海绵的方法

(57)摘要

本发明公开了一种通过两步冷冻法制备高效止血海绵的方法,首先将类人胶原蛋白溶于超纯水中配成蛋白溶液,加入山梨醇和甘油搅拌均匀,向混合溶液中加入谷氨酰胺转移酶在4℃进行交联。本发明通过两步冷冻法对止血海绵的形貌进行改善,与直接在-80℃进行预冻的止血海绵相比,本发明制备的止血海绵表面平整性和均匀性明显提高,与容器底部接触的下表面明显比之前致密且均匀,克服了样品与容器接触面会产生条纹状裂痕的缺点。



1. 一种止血海绵的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

- (1) 将类人胶原蛋白水溶液与山梨醇和甘油混合均匀;
- (2) 向混合溶液中加入谷氨酰胺转移酶在4℃交联;
- (3) 将交联后的溶液转移到底部预冻冰层的容器中,再置于-80℃冰箱中冷冻2-5小时;
- (4) -80℃冷冻后的样品经冷冻干燥后灭菌即可得到止血海绵。

2. 根据权利要求1所述的止血海绵的制备方法,其特征在于:步骤(1)中,向质量体积比g/mL为1~15%的类人胶原蛋白溶液中加入山梨醇,山梨醇加入量为类人胶原蛋白质量的1~10%。

3. 根据权利要求1所述的止血海绵的制备方法,其特征在于:步骤(1)中,甘油加入量为类人胶原蛋白质量的1~10%。

4. 根据权利要求1所述的止血海绵的制备方法,其特征在于:步骤(2)中,谷氨酰胺转移酶加入量为类人胶原蛋白质量的1~10%,4℃交联12-36 h。

## 两步冷冻法制备止血海绵的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备止血海绵的方法,特别涉及一种通过两步冷冻法制备高效止血海绵的方法,属于医用材料领域。

### 背景技术

[0002] 随着社会的发展,人们对外伤止血材料的要求越来越高。蛋白类可吸收性止血材料被认为是局部外伤最有效的生物医用止血材料之一,具有可吸收、高效、经济和无毒害等优点,它主要是通过自身材料特征与优势,吸附血液,凝胶血小板,堵塞血管,促进凝血酶产生,从而达到止血作用。目前生物医用材料的止血过程一般包括三个方面,(1)材料自身的吸液性能够迅速的吸收渗血,溶胀后会贴合在伤口上,堵塞血管并产生一定压力,对伤口起到压迫止血作用;(2)材料自身能够吸附血小板,使其粘附聚集于伤口,堵塞血管;(3)促进凝血酶的产生达到止血的最终目的。

[0003] 胶原蛋白海绵利用大面积结构破坏血小板促进凝血,胶原蛋白在创面溶解和降解,使创面局部粘着性发生变化,从而促进凝血作用。

### 发明内容

[0004] 本发明目的是提供一种外部形貌致密,内部孔径大小均匀,止血速度快且生物相容性良好的医用止血海绵的制备方法。

[0005] 本发明实现过程如下:

[0006] 一种止血海绵的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1)向质量体积比g/mL为1~15%的类人胶原蛋白溶液中加入山梨醇,山梨醇加入量为类人胶原蛋白质量的1~10%;

[0008] (2)向类人胶原蛋白和山梨醇的混合溶液中加入甘油,甘油加入量为类人胶原蛋白质量的1~10%;

[0009] (3)向步骤(2)得到的混合溶液中加入类人胶原蛋白质量1~10%的谷氨酰胺转移酶在4℃交联12-36 h;

[0010] (4)将交联后的溶液转移到底部预冻冰层的容器中,再置于-80℃冰箱中冷冻2-5小时;

[0011] (5)-80℃冷冻后的样品经冷冻干燥后灭菌即可得到止血海绵。

[0012] 本发明在容器底部预冻一层冰,将4℃交联的混合液放入底部预冻一层冰的容器中为第一步冷冻,进一步放入-80℃冰箱中冷冻为第二步冷冻。该两步冷冻法在保证样品底部形貌有所改善的同时提高了样品表面的平整性和内部孔径大小的均匀性,提高了海绵的止血效果。

[0013] 本发明具有以下优点:(1)本发明通过两步冷冻法改变了样品的形貌,克服了样品与容器接触面会产生条纹状裂痕的缺点;(2)两步冷冻法制备的止血海绵止血性能更优,不会发生渗血现象,同时缩短了止血时间;(3)本发明制备的止血海绵具有良好的生物学相容

性,不与体内组织产生免疫排斥反应;(4)本发明两步冷冻方法简单,易快速实现,应用于临床可实现大批量快速生产。

### 附图说明

- [0014] 图1为两步冷冻法所制备的止血材料的表观和微观形貌图;
- [0015] 图2为一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵细胞毒性试验结果;
- [0016] 图3为一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵兔子皮下植入效果对比图;
- [0017] 图4为一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵对兔耳动脉和兔子肝脏的止血效果图;
- [0018] 图5为一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵对兔耳动脉和兔子肝脏的止血时间对照图。

### 具体实施方式

- [0019] 下面结合附图具体实施方式对本发明进行详细的说明。
- [0020] 本发明用类人胶原蛋白作为止血海绵的主要原料,其中类人胶原蛋白是将用于指导合成人胶原蛋白的mRNA片段进行特定的酶切,然后经过逆转录形成其互补DNA,然后进行特定合成酶与连接酶的作用后形成完整的DNA片段并转入大肠杆菌体内,从而得到较高的表达,最终经过高密度发酵、分离、复性以及纯化工艺生产得到最终的高分子生物蛋白。其分子也具有三螺旋结构,并且这种类人胶原蛋白还有独特的水溶性,利用谷氨酰胺转移酶作为交联剂,采用两步冷冻法制备出了一种外部形貌致密,内部孔径大小均匀,止血速度快且生物相容性良好的医用止血海绵。
- [0021] 实施例1
- [0022] 步骤一:将100 mg类人胶原蛋白溶于10 mL超纯水中,得到浓度为 10 mg/mL的类人胶原蛋白溶液,将配制好的溶液用纱布过滤;
- [0023] 步骤二:向配制好的蛋白溶液中加入10 mg的山梨醇,搅拌约5 min;
- [0024] 步骤三:接着向类人胶原蛋白和山梨醇的混合溶液中加入10 mg的甘油;
- [0025] 步骤四:向上述混合溶液中加入10 mg的谷氨酰胺转移酶,搅拌均匀后立即放入4℃冰箱交联24 h;
- [0026] 步骤五:将交联后的溶液倒入底部预冻冰层的培养皿中,置于-80℃冰箱中冷冻5小时;
- [0027] 步骤六:将一次性培养皿从-80℃冰箱中拿出来后,立即放入真空冷冻干燥箱中72 h冻干;
- [0028] 步骤七:冻干后的样品灭菌即可得到成品止血海绵。
- [0029] 对比实例1(采用一次冷冻制备止血海绵):
- [0030] 与上述实例类似,不同的是步骤五中的培养皿底部未预冻冰。
- [0031] 图1为两步冷冻法所制备的止血材料的表观和微观形貌图,其中a,b分别为一步冷冻法制备的样品的上下表面,e,f 是上下表面所对应的扫描电镜图,c,d 分别为两步冷冻法制备的样品的上下表面,g,h是上下表面所对应的扫描电镜图,图中标尺均为200μm。
- [0032] 图2为一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵细胞毒性试验结果。

[0033] 图3为一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵兔子皮下植入效果对比图。其中，a,c和e分别是一步冷冻法制备止血海绵植入兔子皮下一周、两周和四周后材料与周围组织的变化图,b,d和f分别是两步冷冻法制备止血海绵植入兔子皮下一周、两周和四周后材料与周围组织的变化图；

[0034] 图4为一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵对兔耳动脉和兔子肝脏的止血效果图。其中a和d分别为兔耳动脉和兔子肝脏的创伤模型组,b和e是一步冷冻法制备的止血海绵分别对兔耳动脉和兔子肝脏的止血效果图,c和f是两步冷冻法制备的止血海绵分别对兔耳动脉和兔子肝脏的止血效果图；

[0035] 图5为一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵对兔耳动脉和兔子肝脏的止血时间对照图。

[0036] 对以上实施例1制备的海绵的外观、内部形貌,体外细胞毒性、体内生物相容性和止血性能以及止血时间进行了分析,其分析结果如下:

[0037] 1. 本发明制得的止血海绵的外观及内部形貌如图1所示,可以明显的看到与一步冷冻法制备的止血海绵相比,两步冷冻法制备的止血海绵的底部形貌有很大的改善,底部形貌比之前致密且均匀。为了进一步验证这个结果,我们通过扫描电镜对其内部微观结构进行了观察,扫描电镜结果显示,海绵底部由之前的条状裂痕变成致密的孔结构,而且上表面的内部孔结构较一步冷冻法均匀。均匀的孔结构有利于提高材料的机械性能和吸水性能,吸水性能的提高有助于血小板在伤口处的聚集,从而提高止血效果。

[0038] 2. 图2是一步冷冻法和两步冷冻法制备的两种止血海绵的细胞毒性。从图2我们可知,两种海绵的浸提液与细胞共培养3天后,两组细胞的相对增殖率都可以达到100%,这表明两组材料都具有良好的细胞相容性,这说明本发明制备的凝胶细胞相容性良好,两组细胞的活性在1天时之所以较低,可能是因为细胞对海绵的浸提液有一个适应的过程,一旦适应了之后,细胞就可实现快速的生长增殖。

[0039] 3. 一步冷冻法和两步冷冻法制备的止血海绵灭菌后植入兔子皮下进行体内相容性实验。实验结果如图3所示,一步冷冻组海绵植入兔子皮下2周后,海绵周围有轻微的炎症反应,4周后,我们发现材料周围炎症反应基本已经消失,而两步冷冻法制备的止血海绵,植入皮下1周后,我们发现材料周围已经有新血管生成,这表明皮下植入材料不同的形貌对其生物相容性有一定的影响,这是因为不同的形貌可能会影响海绵的降解性能,从而会影响材料的生物相容性,通过比较我们发现,与一步冷冻海绵相比,两步冷冻海绵具有更好的生物相容性,植入皮下后不会与组织产生免疫排斥反应。

[0040] 4. 图4展示了对本发明制得的止血凝胶对兔耳止血(a-c)和肝脏止血(d-f)的效果,由图可以明显的看到两步冷冻海绵止血后未发生渗血现象,而一步冷冻海绵有轻微的渗血现象,这是因为两步冷冻海绵结构更致密,孔结构更均匀。

[0041] 5. 图5记录了一步冷冻海绵和两步冷冻海绵对兔耳动脉和兔子肝脏的止血时间,实验结果发现两步冷冻海绵缩短了止血时间,这是因为均匀的孔结构可以增加海绵的表面积,从而提高其止血效率,这充分体现了两步冷冻海绵在止血方面的优势。

[0042] 实施例2

[0043] 步骤一:将1g类人胶原蛋白溶于10 mL超纯水中,得到浓度为 100 mg/mL的类人胶原蛋白溶液,将配制好的溶液用纱布过滤;

- [0044] 步骤二:向配制好的蛋白溶液中加入50 mg的山梨醇,搅拌约5 min;
- [0045] 步骤三:接着向类人胶原蛋白和山梨醇的混合溶液中加入100 mg的甘油;
- [0046] 步骤四:向上述混合溶液中加入50 mg的谷氨酰胺转移酶,搅拌均匀后立即放入4℃冰箱交联24 h;
- [0047] 步骤五:将交联后的溶液倒入底部预冻冰层的培养皿中,置于-80℃冰箱中冷冻5小时;
- [0048] 步骤六:将一次性培养皿从-80℃冰箱中拿出来后,立即放入真空冷冻干燥箱中72 h冻干;
- [0049] 步骤七:冻干后的样品灭菌即可得到成品海绵。
- [0050] 其他实施案例
- [0051] 包括:(1)不改变原料,仅改变相关参数的操作,如浓度、体积和温度等;或引入少量其他物质,但并未改变反应的基本原理;(2)工艺方法上的简并、变换和调整。如将本实验中的保湿剂山梨醇和甘油换做其他保湿剂等。
- [0052] 本发明的内容不限于上述实施案例所列举,本领域普通技术人员通过阅读本发明说明书而对本发明技术方案采取的任何等效的变换,不改变基本原理的调整均为本发明的权利要求所涵盖。

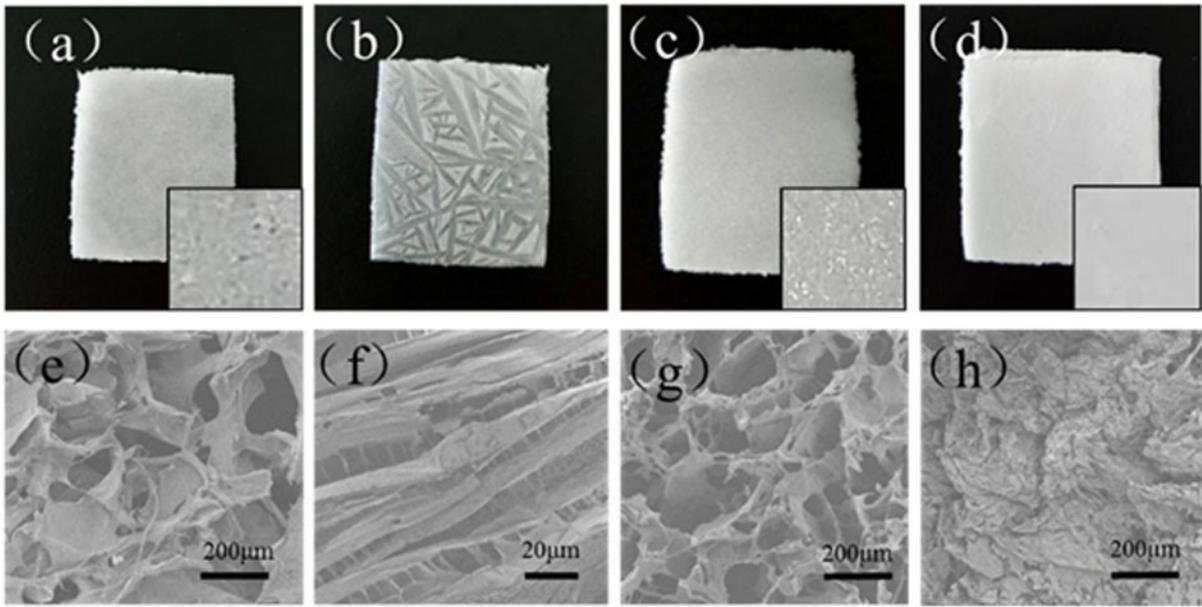


图1

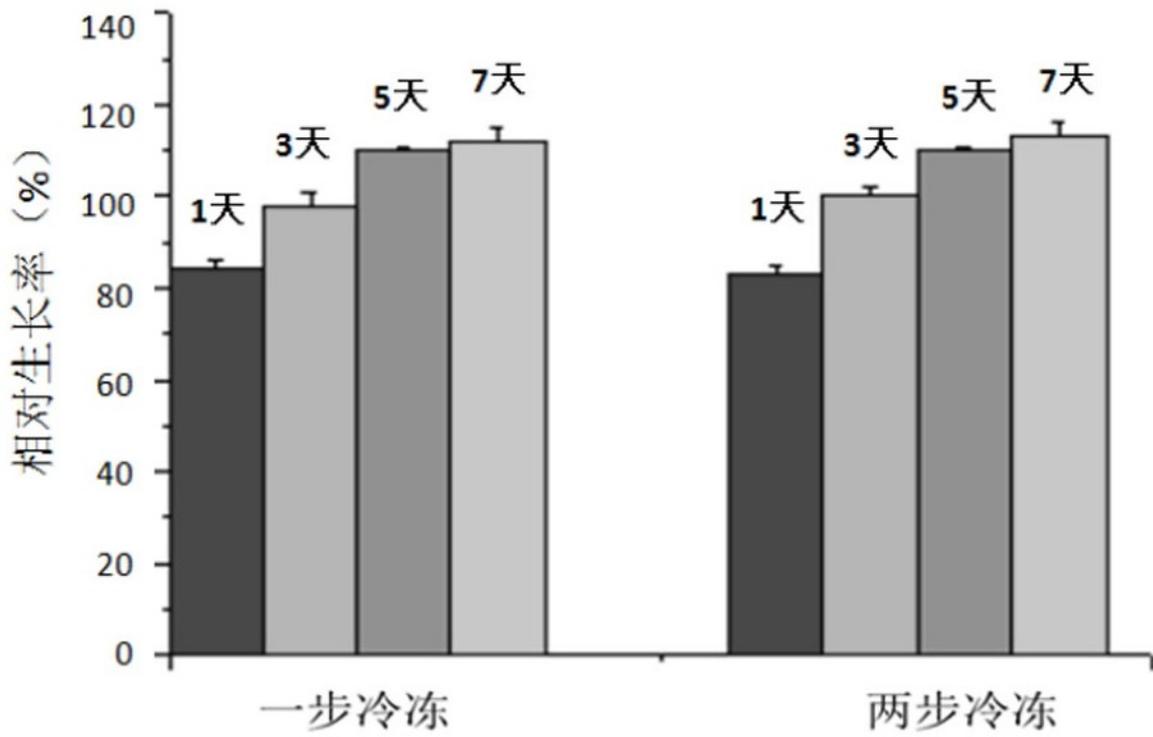


图2

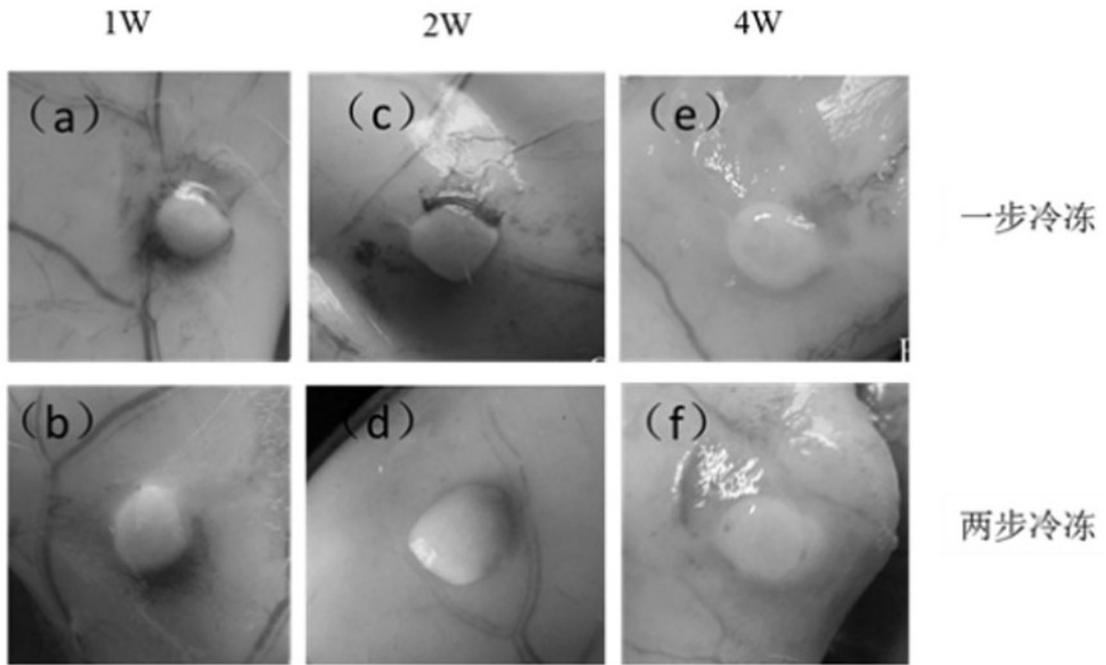


图3

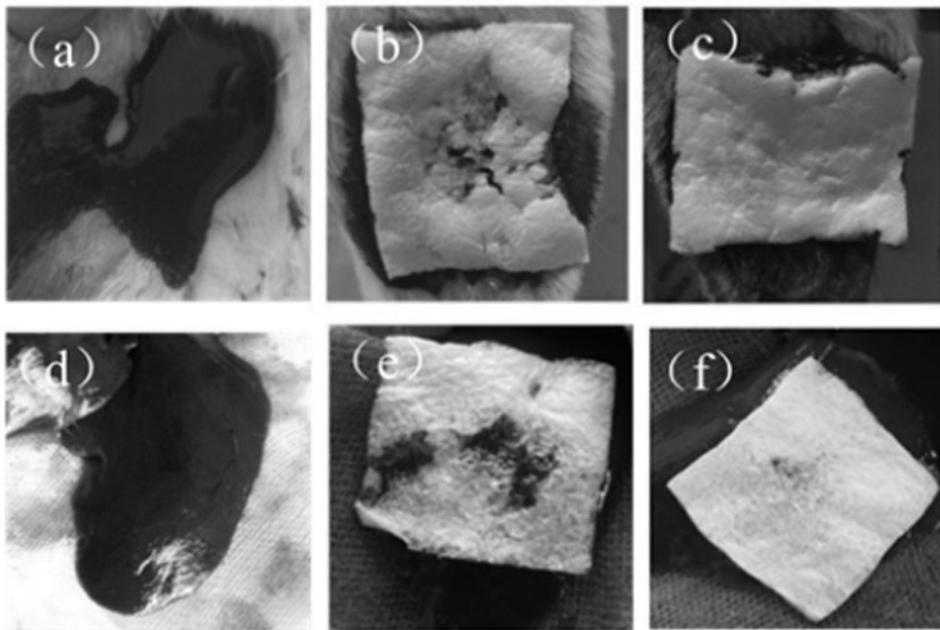


图4

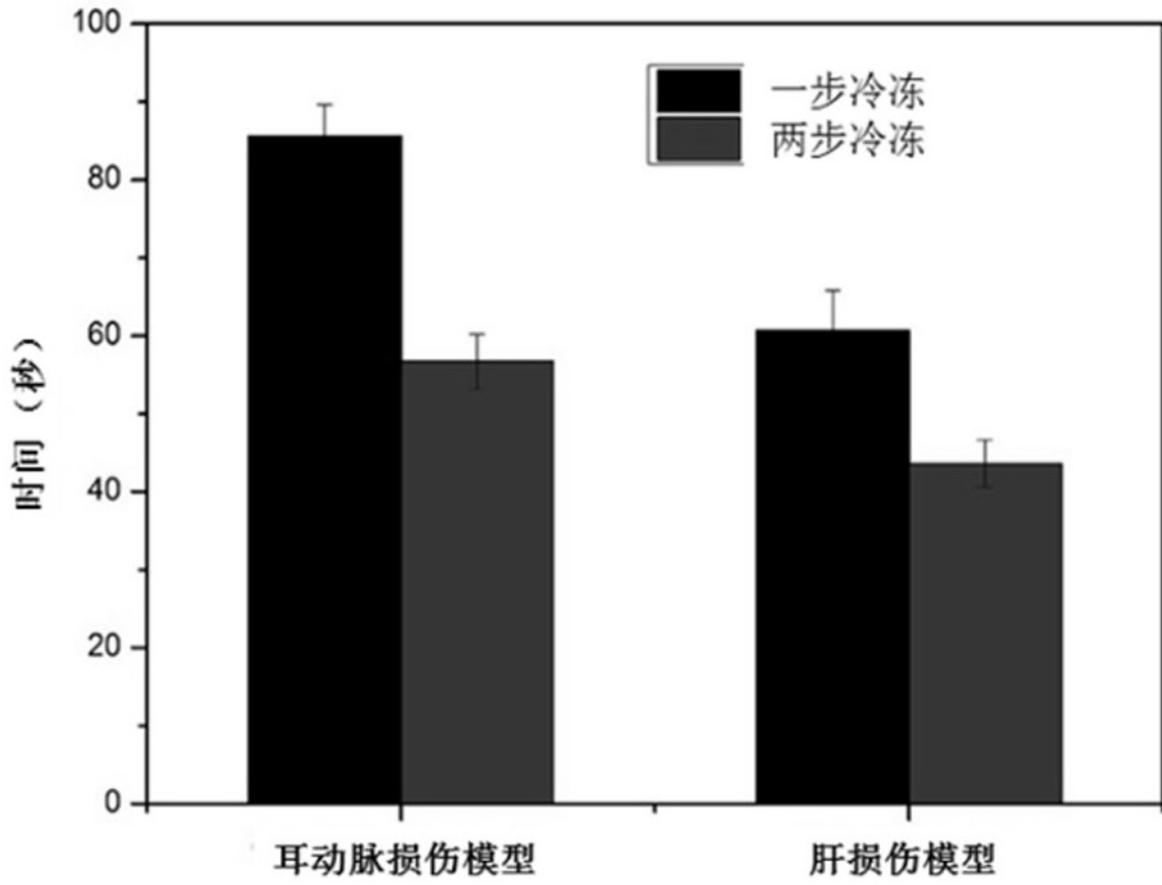


图5