

鳕鱼皮明胶的止血活性和机理研究

张姝妹, 侯虎, 李八方

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

摘要: 为了提高水产加工废料的高值化利用, 为明胶作为止血产品开发的原料提供依据, 研究了明胶的分子量与止血活性之间的关系以及明胶的止血机理。本研究在 65 °C 下采用热水法提取鳕鱼皮明胶, 通过 SDS-PAGE 电泳测定明胶的分子量分布情况。使用 100 ku 和 50 ku 的超滤膜对明胶进行超滤处理得到高、中、低三个分子量范围的样品。大鼠断尾止血实验、股动脉止血实验和肝创面止血实验结果表明高分子量组 ($M_r > 100$ ku) 的出血时间最短, 分别为 4.54 min、2.30 min 和 1.91 min。说明提取的鳕鱼皮明胶样品与自然止血组相比具有止血效果, 并且随着明胶分子量的上升, 出血时间和出血量均下降, 且高分子量明胶样品止血效果较好。APTT 测定结果表明明胶可以明显缩短 APTT 时间, 主要对内源性凝血途径起作用, 并且可以促进血小板的聚集, 还可以增加血小板活性因子 PF4、P-选择素和 TXB2 的释放量从而缩短出血时间, 起到快速止血的作用。

关键词: 鳕鱼皮; 明胶; 分子量; 止血活性; 止血机理

文章编号: 1673-9078(2016)3-18-23

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.004

Hemostatic Activity of Pollock Gelatin and the Underlying Mechanism

ZHANG Shu-mei, HOU Hu, LI Ba-fang

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: To improve the utilization of aquatic byproducts and provide a basis for the development of gelatin as a hemostatic product, the relationship of the molecular weight of gelatin to its hemostatic activities and mechanisms was studied. Pollock skin gelatin was extracted using the hot water method at 65 °C, and its molecular weight distribution was measured by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). High, medium, and low molecular weight gelatin samples were obtained through ultrafiltration using 100 ku and 50 ku membranes. Rat tail cutting, femoral artery cutting, and liver cutting experiments showed that high molecular weight gelatin resulted in the shortest bleeding times, which were 4.54 min, 2.30 min and 1.91 min, respectively. Pollock gelatin exhibited hemostatic activity as compared to the control group. Bleeding time and the amount of bleeding declined with increasing gelatin molecular weight. Thus, gelatin with a high molecular weight exhibited a relatively good hemostatic effect. An activated partial thromboplastin time (APTT) test indicated that gelatin significantly reduced APTT and affected the endogenous coagulation pathways. It also promoted platelet aggregation and increased the release of platelet active factors platelet factor 4 (PF4), P-selectin, and thromboxane B2 (TXB2), thereby shortening bleeding time and showing a hemostatic effect.

Key words: pollock skin; gelatin; molecular weight; hemostatic activity; hemostatic mechanism

胶原是动物体中含量丰富的一类蛋白质, 广泛应用于食品、化妆品、医药领域等, 具有降血压、抗氧化、美容护肤等功效^[1]。明胶是胶原蛋白在高温作用下发生变性作用的产物, 把胶原蛋白经温和而不可逆的断裂后的主要产物称做明胶。我国对明胶的需求量巨大, 明胶产量约占世界的三分之二^[2]。明胶的组成

收稿日期: 2015-04-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31401476, 31471606); 教育部博士点基金 (20130132120024)

作者简介: 张姝妹(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向食品加工与功能食品

通讯作者: 李八方(1953-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向海洋活性物质与功能性食品

复杂, 是非均一的胶原蛋白水解产物, 相对分子量的分布范围较宽。明胶在性质上拥有其独特的特点, 亲水性较强, 能够在水中形成粘度较高的溶液, 冷却后可以形成凝胶, 明胶的成膜性好, 化学性质比较活泼等。水产明胶一般采用热水提取法, 在加热的过程中使胶原的氢键断裂, 释放明胶, 得到澄清的明胶水溶液, 明胶的提取温度一般在 40~90 °C 不等, 通过控制温度和提取时间, 可以得到分子量范围不同的明胶产品^[3]。

早在 1953 年, 人们就已经发现胶原蛋白具有止血效果。胶原的止血效果主要是作用于血小板, 胶原蛋白可以激活内源性凝血过程, 还可以引起血小板的聚集从而形成血栓, 并且可以刺激血小板释放一些能够

促进止血进程的亚细胞颗粒和分泌物,比如各种凝血因子,凝血因子可以粘附和堵塞受伤的血管,从而达到止血的目的。已经利用胶原良好的止血效果制备出一系列止血产品,如 Seung Huuk Baik 等^[4]制备出一种新型胶原基止血剂,不仅具有良好的止血效果还具有较强的粘附性; Biering Wolfgang^[5]发明了一种含有胶原蛋白凝剂的止血颗粒可应用于各种手术治疗; Maryam Kabiri 等^[6]以明胶为原料,以 EDC 为交联剂在-25℃下进行反应制备可吸收的手术用明胶海绵。

本研究采用热水法提取鳕鱼皮明胶,分析其氨基酸组成和分子量分布,通过超滤处理对不同分子量的明胶进行分离,研究明胶分子量与止血效果之间的关系,并进一步研究明胶的止血机理,为明胶作为止血产品开发的原料提供了依据。

1 材料与方法

1.1 原料

市售鳕鱼,1000~1500 g(购于青岛团岛市场),取鱼皮剔除皮下组织,清洗干净后于-18℃冷冻备用;wistar 雄性大鼠(许可证号 SCXK(鲁)2013 0001),体重 200g 左右(山东鲁抗医药质检中心实验室动物中心提供)。

1.2 试剂与仪器

氧化钠、浓硫酸、冰醋酸、甲酸、乌来糖均为分析纯;二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺、N,N'-双丙烯酰胺、过硫酸铵、Tris、TEMED、考马斯亮蓝 R-250、蛋白 Marker(43~220 ku)、5×样品缓冲液等为 Sigma 进口分装;APTT 试剂盒、PT 试剂盒、TT 试剂盒:南京建成生物工程研究所有限公司;大鼠 PF4、大鼠 P-选择素、大鼠 TXB2 ELISA 试剂盒(进口分装);云南白药止血粉:云南白药集团股份有限公司。

恒温振荡器:常州国华电器有限公司;Alphal-4LD 型冷冻干燥机:德国 Christ 公司;Hitachi835-50 氨基酸自动分析仪:日本日立公司;DYY-6C 电泳仪:北京市六一仪器厂;超滤杯、超滤膜:上海摩速科学仪器有限公司;超微粉碎机:天津泰斯特仪器有限公司;半自动凝血仪:济南森蓝科贸有限公司;酶标仪:基因有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 鳕鱼皮明胶的提取

取一定量的鳕鱼皮,室温下解冻,清洗后去掉残留的脂肪和鱼肉,剪成约 2cm×2cm 大小的小块,用

0.05 mol/L NaOH 浸泡 45 min,物料比 1:30 (m/V),鱼皮充分溶胀后水洗至中性。用 0.1 mol/L H₂SO₄ 浸泡 30 min 后水洗至中性。加入蒸馏水,于 65℃摇床中提取 5 h,物料比为 1:10 (m/V),绢纱过滤去除鱼皮,抽滤后得到淡黄色透明的明胶溶液^[7]。

1.3.2 鳕鱼皮明胶分子量的测定

将鳕鱼皮明胶冻干样品配制成 2 mg/mL 的溶液,用 NaOH 调节 pH 为中性。加入样品缓冲液(两者比例为 15 μL 样品/5 μL 缓冲液),在一个 Eppendorf 管中混合,100℃下煮沸 7 min,离心 5 min 后,用微量注射针取 20 μL 上样,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 5%,采用直流恒压电源,电泳电压为 80 V,电泳时间 2~3 h,用考马斯亮蓝染色液染色 30 min 后脱色^[8]。

1.3.3 不同分子量鳕鱼皮明胶的制备

鳕鱼皮明胶溶液稀释为浓度约 5 mg/mL 的溶液,依次用截留分子量为 100 ku 和 50 ku 的超滤膜进行超滤处理,用 0.2 MPa 氮气加压,超滤过程在 4℃冰箱中进行,以免样品变质。旋转蒸发浓缩后冷冻干燥,超微粉碎机粉碎成粉末状,即分离得到三个分子量范围的鳕鱼皮明胶样品,分别为高分子量组(Mr>100 ku)、中分子量组(50 ku<Mr<100 ku)和低分子量组(Mr<50 ku)的鳕鱼皮明胶样品。

1.3.4 大鼠断尾止血实验

选取健康 wistar 雄性大鼠 30 只,体重 200 g 左右,随机分为五组,每组六只,分别为高分子量明胶组、中分子量明胶组、低分子量明胶组、未分离明胶组、自然止血组。

大鼠腹腔注射 30% 的乌来糖(氨基甲酸乙酯)进行麻醉,用量为 1 g/kg 体重,然后将大鼠固定在实验板上,将尾巴伸直,用体积分数为 75% 的酒精消毒尾部,用刀片在鼠尾端约 2 cm 处割断,分别撒上 30 mg 的高分子量明胶、中分子量明胶、低分子量明胶、未分离明胶样品,每隔 15 s 观察一次,直到伤口不再渗血为止血完毕,记录出血时间。自然止血组不加任何样品,同样待断尾不再渗血后记录出血时间^[9]。

1.3.5 股动脉止血实验

选取健康 wistar 雄性大鼠 30 只,体重 200 g 左右,随即分为五组,分组方法和麻醉方法同 1.3.4。

小心沿股内侧切一 3 cm 切口,暴露大鼠股动脉,小心将股动脉横向剪开约直径 1/3 的切口。立即用脱脂棉擦去喷出的血液,分别将 200 mg 的高分子量明胶、中分子量明胶、低分子量明胶及未分离明胶样品撒在切口上,用无菌纱布覆盖,每隔 15 s 揭开纱布观察一次,直到伤口不再出血为止,记录股动脉出血时

间^[10], 自然止血组不加任何样品, 同样待伤口不再渗血后记录出血时间。

1.3.6 肝创面止血实验

选取健康 wistar 雄性大鼠 30 只, 体重 200 g 左右, 随即分为五组, 分组方法和麻醉方法同 1.3.4。

于大鼠的腹中线作一长约 3 cm 纵行切口, 暴露大鼠的肝脏, 用无菌纱布将肝脏中叶隔离, 用刀片在肝脏中叶纵向切开一长 1 cm, 深 0.5 cm 的切口, 用脱脂棉立即擦去血液, 分别将 200 mg 的各组样品撒在创面上, 覆盖无菌纱布, 每隔 15 s 观察创面出血的情况, 直到伤口不再出血为止, 记录出血时间和出血量^{[11][12]}, 自然止血组不加任何样品, 同样待伤口不再渗血后记录出血时间和出血量。

1.3.7 活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 测定

样品准备: 采用 3.8% 的柠檬酸钠真空采血管进行大鼠腹主动脉取血, 混合均匀, 以 4000 r/min 离心 15 min, 小心吸取上层血浆, 在 2 h 内进行实验。用生理盐水配制高剂量 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、中剂量 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和低剂量 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的高分子量明胶溶液。云南白药止血粉剂是一种止血效果较好的常用粉末状止血剂, 能够影响内源性凝血途径, 本实验以云南白药为阳性对照, 用生理盐水配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。

测定: 使用 APTT、PT 和 TT 试剂盒, 采用半自动凝血仪测定血浆凝固时间, 以生理盐水为阴性对照, 每组测定四个平行。

1.3.8 血小板聚集实验

血浆制备: 采用 3.8% 的柠檬酸钠真空采血管进行大鼠腹主动脉取血, 混合均匀, 经 100 g 离心 15 min, 小心吸取上层血浆为富血小板血浆 (PRP), 剩余血液再经 1400 g 离心 10 min, 吸取上清液为贫血小板血浆 (PPP), 以 PPP 稀释 PRP 后备用。ADP 是血小板释放的自体凝血物质, 是血小板聚集的诱导剂, 因此实验选择 ADP 为阳性对照。

测定: 取 180 μL 血浆中加入 20 μL 不同剂量的高分子量明胶样品, 阴性对照组加 20 μL 生理盐水, 阳性对照加 20 μL ADP 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育, 5 min 后用酶标仪在 695 nm 处测定吸光度。

1.3.9 血小板第四因子 (PF4)、P-选择素、血栓素 B2 (TXB2) 测定

样品准备: 采用 3.8% 的柠檬酸钠真空采血管进行大鼠腹主动脉取血, 分装在 2 mL 的离心管内, 每管 180 μL , 分别加入不同剂量的样品 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min。取出后 3000 r/min 离心 30 min, 吸取上清即为待测血浆。

测定: 设置标注品孔和样品孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL ; 样品孔加待测样品 10 μL , 加样品稀释液 40 μL , 空白孔不加。除空白孔外, 每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 100 μL , 用封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min。弃去液体, 洗板 5 次, 每孔加入底物 A、B 各 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μL , 15 min 内, 在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

1.3.10 数据分析

实验数据采用 SPSS19.0 进行统计分析, 每项测定数据至少采用三个平行, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, P 值小于 0.05 为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 鳕鱼皮明胶分子量的测定

水法提取的鳕鱼皮明胶 SDS-PAGE 凝胶电泳结果如图 1。由图可见, 鳕鱼皮明胶具有明显的电泳条带, 在 130 ku 和 97.4 ku 之间存在两条主要的条带, 为 α 组分的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 。图中还存在一些相对分子量比胶原的 α 链小的组分, 这是由于胶原转变成明胶时, 其中的共价交联键、肽键、次级键等的断裂是无规则的, 从而造成了明胶分子的非均一性。电泳结果符合典型 I 型胶原蛋白的特征, 并且样品的分子量分布范围较广, 从 43 ku 以下至 130 ku 以上均有分布, 因此可以依据蛋白的分子量分布对其进行分离。

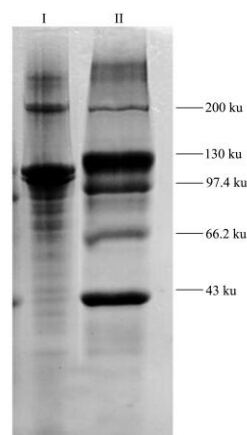


图 1 鳕鱼皮明胶的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE patterns of pollock-skin gelatin

注: I: 明胶样品; II: 蛋白质标准品。

2.2 大鼠断尾止血实验

不同分子量组鳕鱼皮明胶样品的大鼠断尾止血实验结果如图 2 所示。高分子量组 ($M_r > 100$ ku) 的明胶样品的出血时间最短, 平均为 4.54 ± 0.11 min, 止

血效果最好，随着分子量的降低，断尾出血时间越来越长，样品的止血效果越来越差。不敷加任何明胶样品的自然止血组的大鼠断尾出血时间均大于 6 min，而明胶样品的出血时间均在 5.5 min 以下，说明鳕鱼皮明胶样品对大鼠断尾具有止血效果。

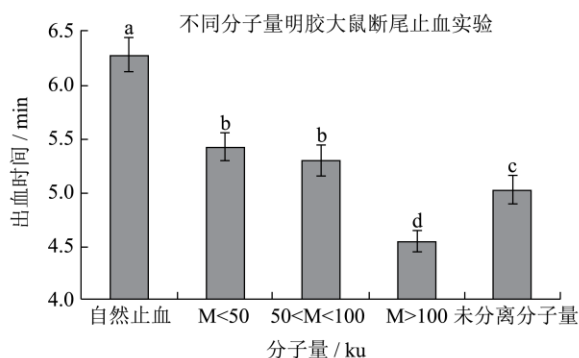


图 2 不同分子量明胶大鼠断尾止血实验

Fig.2 Effect of pollock-skin gelatins with different molecular masses on bleeding time in the rat tail-cutting experiment

注：标有不同小写字母说明组间差异显著 ($p < 0.05$)，标有相同小写字母表示组间差异不显著 ($p > 0.05$)。

2.3 股动脉止血实验

不同分子量鳕鱼皮明胶样品的大鼠股动脉止血实验结果如图 3 所示。高分子量组 ($M_r > 100$ ku) 的明胶样品的出血时间最短，平均为 2.30 ± 0.10 min，止血效果最好，其次是未经过分离的明胶，平均为 2.45 ± 0.10 min。随着分子量的继续降低，股动脉出血时间越来越长，说明明胶的股动脉止血效果随着分子量的下降而降低。不敷加任何明胶样品的自然止血组的大鼠股动脉出血时间均大于 4.5 min，而明胶样品的出血时间均在 3 min 以下，说明鳕鱼皮明胶样品对股动脉具有明显的止血效果。

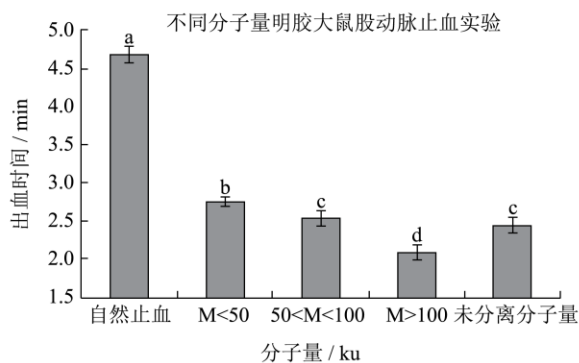


图 3 不同分子量明胶大鼠股动脉止血实验

Fig.3 Effect of pollock-skin gelatins with different molecular masses on bleeding time in the rat femoral artery-cutting experiment

注：标有不同小写字母说明组间差异显著 ($p < 0.05$)，标

有相同小写字母表示组间差异不显著 ($p > 0.05$)。

2.4 肝创面止血实验

不同分子量鳕鱼皮明胶样品的大鼠肝创面止血实验结果如图 4 所示。高分子量组 ($M_r > 100$ ku) 的明胶样品的出血时间最短，平均为 1.91 ± 0.51 min，止血效果最好，随着分子量的下降，肝创面出血时间越来越长，这与上述大鼠断尾及股动脉实验结果相符。不敷加任何明胶样品的自然止血组的大鼠肝创面出血时间均大于 4 min，而明胶样品的出血时间均在 3 min 以下，说明鳕鱼皮明胶样品对肝创面具有明显的止血效果。

图 5 所示为不同分子量鳕鱼皮明胶的大鼠肝创面出血量。可以看出，高分子量明胶的肝创面出血时间短，可以推测与高分子量组的出血时间最短有关。而不敷加任何明胶样品的自然止血组肝创面出血量为 1.58 ± 0.04 g，明显高于样品组。

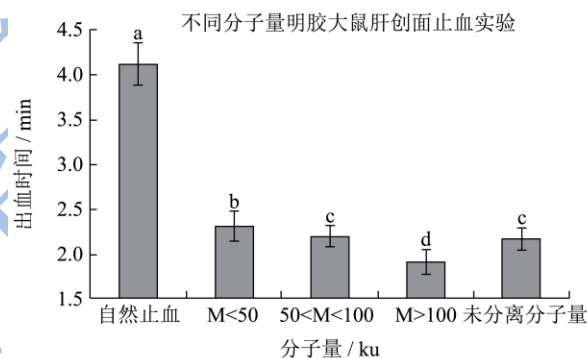


图 4 不同分子量明胶大鼠肝创面止血实验

Fig.4 Effect of pollock-skin gelatins with different molecular masses on bleeding time in the rat liver-cutting experiment

注：标有不同小写字母说明组间差异显著 ($p < 0.05$)，标有相同小写字母表示组间差异不显著 ($p > 0.05$)。

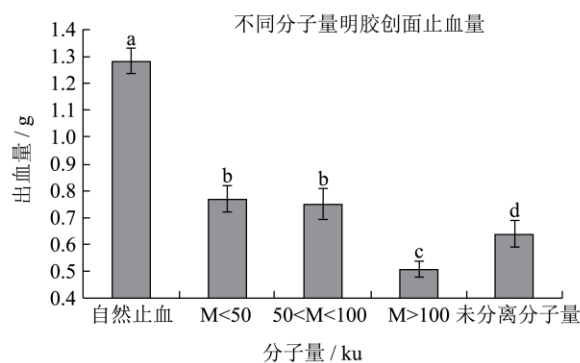


图 5 不同分子量明胶大鼠肝创面出血量

Fig.5 Effect of pollock-skin gelatins with different molecular masses on the amount of bleeding in the rat liver-cutting experiment

注：标有不同小写字母说明组间差异显著 ($p < 0.05$)，标

有相同小写字母表示组间差异不显著 ($p > 0.05$)。

2.5 活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶

原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 测定

表 1 APTT、PT、TT 测定结果

Table 1 Measurements of APTT, PT, and TT

组别	浓度/($\mu\text{g/mL}$)	APTT/s
明胶高剂量	200	25.14 \pm 0.68**
明胶中剂量	100	23.91 \pm 0.77**
明胶低剂量	50	21.81 \pm 0.75**
云南白药	100	29.66 \pm 0.29
阴性对照		30.04 \pm 0.32

注: 与阴性对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

如表 1 所示, 明胶组与阴性对照组比较, APTT 时间明显缩短, 而 PT 和 TT 差异不大, 可以说明明胶主要在内源性凝血途径中起作用, 能够缩短凝血活酶时间, 从而起到止血作用。明胶对 APTT 的缩短作用与剂量有关, 高浓度的效果更加显著。

2.6 血小板聚集实验

表 2 血小板聚集实验 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Results of platelet aggregation experiment

组别	浓度/($\mu\text{g/mL}$)	吸光度
明胶高剂量	200	0.595 \pm 0.015**
明胶中剂量	100	0.549 \pm 0.016**
明胶低剂量	50	0.517 \pm 0.023**
ADP	100	0.689 \pm 0.018**
阴性对照		0.437 \pm 0.014

注: 与阴性对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

在富血小板血浆加入诱导剂可以促进血小板的聚集, 通过吸光度的变化来表征血小板的聚集情况, 与阴性对照相比, 吸光度上升说明血小板发生聚集, 吸光度上升的越高说明血小板的聚集率越高。如表 2 所示, 明胶组与阴性对照组相比, 吸光度显著上升, 说明明胶具有促进血小板聚集的效果, 并且高剂量组的聚集率最高, 说明明胶可以通过促进血小板聚集从而加快血栓生成, 起到止血作用。

2.7 血小板第四因子 (PF4)、P-选择素、血栓

素 B2 (TXB2) 测定

如表 3 所示, 明胶组与阴性对照组相比, 血小板释放活性因子 PF4、P-选择素和 TXB2 的量均有显著增加, 并且添加剂量越高, 血小板释放活性因子的量

越大。血小板能够通过释放一系列活性因子促进凝血过程, 如血小板释放血栓烷 A2 (TXA2) 是一种很强的聚集剂, TXA2 释放后会很快转变为 TXB2, PF4 可以减慢凝血酶灭活过程, 促进血栓形成。明胶能够显著增加三种活性因子的释放量, 可以推测明胶能够通过作用于血小板释放活性因子从而促进血小板的活化和聚集, 刺激血小板释放更多凝血因子, 起到止血作用。

表 3 血小板释放活性因子 PF4、P-选择素、TXB2 的测定 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Measurement of the release of platelet-activating factors PF4, P-selection, and TXB2

组别	浓度	PF4	P-选择素	TXB2
明胶高剂量	200	23.50 \pm 2.16**	23.67 \pm 1.45**	19.26 \pm 3.42**
明胶中剂量	100	20.95 \pm 0.38**	20.18 \pm 2.62**	18.33 \pm 2.78**
明胶低剂量	50	16.74 \pm 1.52**	18.82 \pm 3.34**	16.97 \pm 3.46**
阴性对照		5.38 \pm 1.26	4.62 \pm 2.23	4.27 \pm 1.08

注: 与阴性对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

3 结论

3.1 从大鼠的断尾实验、股动脉出血和肝创面出血实验的结果中可以看出, 明胶对大鼠的外伤出血和内脏出血均具有一定的止血效果。与自然止血组相比, 样品组可以明显缩短出血时间, 从而减少出血量。明胶的止血效果与分子量有关, 三组实验均可以证明高分子量组的止血效果要明显好于低分子量组。原因可能是止血与细胞外基质有关, 分子量高的明胶使得血小板更容易凝聚从而加速止血; 并且在止血过程中, 纤维大分子更容易使溶液粘度增大, 更容易激发凝血反应, 因此凝血时间会相应缩短^[13]。

3.2 凝血途径主要可以分为内源性凝血途径、外源性凝血途径和凝血共同途径。明胶可以明显缩短 APTT 时间从而影响内源性凝血途径, 明胶可以加大血小板的聚集率, 促进血小板的聚集, 从而加快血栓的形成, 明胶还可以通过促进血小板活性因子 PF4、P-选择素和 TXB2 的释放量缩短凝血时间, 起到快速止血的效果。这一结果为明胶作为止血产品的原料提供了依据。

参考文献

- [1] 周倩, 罗志刚, 何小维. 胶原蛋白的应用研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(3): 285-289
ZHOU Qian, LUO Zhi-gang, HE Xiao-wei. Process of collagen application [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(3): 285-289
- [2] Karim A A, Bhat R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins [J]. Food

- Hydrocolloids, 2009, 23(3): 563-576
- [3] 刘丽娜. 鲮鱼皮明胶的制备及其功能性质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008
- LIU Li-na. Study on preparation of channel catfish skin gelatin and functional properties [D]. Wuxi, Jiangnan University, 2008
- [4] Seung Hyuk Baik, Jae Hyung Kim, Hyun Hee Cho, et al. Development and analysis of a collagen-based hemostatic adhesive [J]. Journal of Surgical Research. 2010, 164(2): 221-228
- [5] Biering, Wolfgang. Collagen Hemostatic Pellets. WO2001 097871
- [6] Mayam Kabiri, Shahriar Hojjati Emami, Mohammad Rafinia, et al. Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications [J]. Current Applied Physics, 2011, 11(3): 457-461
- [7] 于洋, 方旭波. 罗非鱼皮明胶的制备及性质研究[J]. 中国食物与营养. 2009, 1: 25-29
- YU Yang, FANG Xu-bo. Preparation and characterization of tilapia fish skin [J]. Food and Nutrition in China, 2009, 1: 25-29
- [8] 李八方, 郭鸣, 侯虎, 等. 胡子鲶鱼皮酸溶性胶原蛋白的理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(11): 2580-2585
- LI Ba-fang, GUO Ming, HOU Hu, et al. Physicochemical properties of acid-soluble collagen from skin of *clarias fuscus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(11): 2580-2585
- [9] 韩俊艳. 水牛角水解物的止血作用研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004
- HAN Jun-yan. Study on the stanching effects of hydrolysate of *bubalus bubalis*. I [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2004
- [10] Larson MJ, Bowersox JC, Lim RC, et al. Efficacy of a fibrin hemostatic bandage in controlling hemorrhage from experimental arterial injuries [J]. Arch. Surg., 1995, 130(4): 420-422
- [11] Jackson MR, Taher MM, Burge R, et al. Hemostatic efficacy of a fibrin sealant dressing in an animal model of kidney injury [J]. J. Trauma., 1998, 45(4): 662-665
- [12] Kevin M Lewis, Holly Atlee, Angela Mannone, et al. Efficacy of hemostatic matrix and microporous polysaccharide hemospheres [J]. Journal of Surgical Research. 2015, 193(2): 825-830
- [13] 刘寒, 刘成圣, 陈军, 等. 利用狭鳕加工废料制备胶原的表征及其生物学功能[J]. 功能材料. 2011, 5(42): 959-962
- LIU Han, LIU Cheng-sheng, CHEN Jun, et al. Preparation and characterization and biological functions of collagen from alaska pollock processing by-products [J]. Journal of Functional Materials. 2011, 5(42): 959-962