

临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.011

可用于羊膜腔封闭的医用粘合剂的体外毒性研究

张翠华, 漆洪波

(重庆医科大学第一附属医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:通过研究 3 种医用组织粘合剂对胎膜组织块的毒性效应,为未足月胎膜早破(Preterm premature rupture of the membranes, PPRM)行羊膜腔封闭治疗时粘合剂的选择提供安全性依据。方法:氰基丙烯酸酯(Cyanoacrylates, CA)组、胶纤维蛋白胶(Fibrin sealant, FS)组、胶原蛋白(Coll 组)分别作用于胎膜组织,设立空白对照(Con 组)。培养 24 h 后,胎膜小片固定、包埋、切片,进行 HE 染色观察组织块结构变化, TUNEL 染色技术进行细胞凋亡检测;免疫蛋白印迹(Western blot)技术定量检测调节凋亡的相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达。结果:(1)HE 染色显示 CA 组羊膜上皮层连续性被破坏,其余 3 组羊膜上皮层完整。(2)TUNEL 染色提示 CA 组(51.0 ± 1.8)%与 Con 组(12.1 ± 0.8)%、FS 组(16.0 ± 0.8)%、Coll 组(13.0 ± 1.0)%相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$);FS 组与 Coll 组、Con 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);Coll 组与 Con 组相比,差异没有统计学意义($P > 0.05$)。(3)CA 组、FS 组、Coll 组以及 Con 组 Bax 蛋白相对灰度值依次为(1.294 ± 0.029)、(0.421 ± 0.023)、(0.479 ± 0.024)、(0.287 ± 0.017), CA 组、FS 组、Coll 组以及 Con 组各组之间相比, Bax 蛋白表达差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Bcl-2 蛋白的相对灰度值依次为(0.350 ± 0.034)、(0.406 ± 0.269)、(0.433 ± 0.020)、(0.493 ± 0.027), CA 组与 FS 组、Coll 组以及 Con 组相比, Bcl-2 蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。FS 组、Coll 组与 Con 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。FS 组与 Coll 组相比,差异没有统计学意义($P > 0.05$)。结论:(1)目前的 CA 胶尚不适用于羊膜腔封闭治疗。(2)FS 和胶原蛋白对胎膜的毒性较小,从安全性方面考虑,是目前用于羊膜腔封闭较为合适的医用组织粘合剂。

【关键词】未足月胎膜早破;医源性胎膜早破;羊膜腔封闭;组织粘合剂

【中国图书分类法分类号】R714.43*3

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-22

Toxicity of candidate sealants for rupture of membrane in vitro

ZHANG Cuihua, QI Hongbo

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To provide safety-reference when sealing preterm premature rupture of the membranes (PPROM) by evaluating the toxicity of 3 tissue adhesives on fetal membranes. **Methods:** Cyanoacrylate (CA, CA group), fibrin glue (FS, FS group) and collagen (Coll group) were directly laid on pieces of fetal membrane and an untreated piece was chosen as control. After being incubated for 24 h, the patches were fixed, embedded and sectioned for HE staining to observe the structural changes and TUNEL staining was applied to detect the cell apoptosis. The quantity of proteins related with apoptosis (Bax and Bcl-2) was tested by Western blot. **Results:** (1) HE staining showed that there was consecutive rupture in the amnion layer treated with CA, while the amnion layer was complete in the other three left groups. (2) TUNEL staining showed that there were statistical differences in apoptotic rate between CA group (51.0 ± 1.8)% and Con group (12.1 ± 0.8)%, FS group (16.0 ± 0.8)%, Coll group (13.0 ± 1.0)%, $P < 0.01$. There were statistical differences in apoptotic rate between FS group and Con group, Coll group, $P < 0.05$. There was no statistical difference in apoptotic rate between Coll group and Con group, $P > 0.05$. (3) The relative grey value of Bax protein was significantly increased in CA group (1.294 ± 0.029) than in FS group (0.421 ± 0.023), Coll group (0.479 ± 0.024) and Con group (0.287 ± 0.017) ($P < 0.05$). The relative grey value of Bcl-2 protein in CA group, FS group, Coll group and Con group was (0.350 ± 0.034), (0.406 ± 0.269), (0.433 ± 0.020), (0.493 ± 0.027) respectively. CA group had lower expression of Bcl-2 than the left groups ($P < 0.05$), also the expression of Bcl-2 was lower in FS group and Coll group than in Con group ($P < 0.05$). No statistical difference in Bcl-2 expression was observed between FS group and Coll group ($P > 0.05$). **Conclusions:** (1) According to the research, cyanoacrylate is harmful to the amnion layer and not suitable for fetal membrane repair. (2) It's better to choose Fibrin sealant or collagen to repair fetal membrane for safety concern.

作者介绍:张翠华(1983-),女,硕士,
研究方向:围产医学。

通信作者:漆洪波,男,教授, Email: qihongbo@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30772336)。

【Key words】preterm premature rupture of the membranes (PPROM); iatrogenic preterm premature rupture of membranes (iPPROM); fetal membrane seal off; tissue adhesive

用于羊膜腔封闭的材料主要是医用组织粘合剂,按其材料性质分为化学类粘合剂和生物类粘合剂。目前应用最广的化学类粘合剂主要是氰基丙烯酸酯(Cyanoacrylates, CA)类,生物类粘合剂则以纤维蛋白胶(Fibrin sealant, FS)、胶原蛋白(Collagen)为代表。它们在外科、眼科等领域应用极为广泛,且效果显著^[1-3]。近年来国外有学者用组织粘合剂对羊膜腔封闭进行了尝试,有效性从 58.33%~92.8%不等^[4,5]。但 Quintero 等^[6]在穿刺点羊膜内注射母体血小板和纤维蛋白原冷沉淀混合物,7 个病例中 6 例羊膜腔成功封闭,却出现了 2 例不明原因的胎儿死亡。粘合剂对胎膜、胎儿、母体的毒性究竟如何这一问题亟待解决。本研究拟通过比较两大类医用组织粘合剂对胎膜组织的毒性,为临床进行羊膜腔封闭时粘合剂的选择提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象及分组

1.1.1 研究对象 收集 2010 年 12 月至 2011 年 6 月在重庆医科大学附属第一医院产科住院分娩的剖宫产孕妇共 5 例,剖宫产指征为前置胎盘、重度子痫前期,5 例孕妇孕周均在 28~32 周之间,单胎,既往无内外科合并症,无复发性自然流产、畸胎、死胎等不良孕产史,孕期无急、慢性感染性疾病,胎儿无畸形。

1.1.2 医用粘合剂及分组 本研究所用的 3 种医用粘合剂分别为 α -氰基丙烯酸正丁酯(康派特,北京瞬康医用胶有限公司)、外用冻干人纤维蛋白粘合剂(护固莱士,上海莱士血液制品有限公司)、胶原蛋白海绵(科劳得,北京科劳得生物制品技术开发有限公司)。按照 3 种粘合剂将研究对象分为 α -氰基丙烯酸正丁酯(CA)组、FS 组、胶原蛋白(Coll)组,并设空白对照(Con)组。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 无菌条件下,胎盘娩出后 5 min 内避开破膜处及脐带附着处剪取胎膜组织,于无菌磷酸盐缓冲液(PBS,美国 Hyclone 公司)中漂洗 3~5 次至漂洗液无色,放入加有 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 Ham's F-12/DMEM (Hyclone)培养基于培养皿中,置于冰上备用。

1.2.2 胎膜的处理 细胞培养操作环境下,剪取 2 cm $\times$ 1 cm 大小的胎膜小片平铺于 6 孔板中,羊膜面朝上。按照 3 种粘合剂说明书配制粘合剂,分别均匀涂抹 200 μ l 于胎膜片上,等待约 15 s 使粘合剂凝固,胶原蛋白海绵剪取胎膜片同等大小平铺于胎膜上,轻压海绵片使之与胎膜片紧密贴合约 2 min,空白对照组不涂抹任何物质。每孔加入 3 ml 含有 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 10%胎牛血清(Gibco,澳大利亚)Ham's F-12/DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C 孵育。每组重复 3 孔。粘合剂对胎膜的毒性影响严格按照按佐丹奴国标准化组织(ISO)的 10993-5 指南执行,最短作用时间为 24 h。24 h 后,处理后

的胎膜每组随机选取一孔固定于 4%多聚甲醛中,石蜡包埋,切片。剩余 2 孔内的胎膜片置于 -80 $^{\circ}$ C 供 Western blot 用。

1.2.3 组织切片染色 组织切片进行 HE 染色、TUNEL (ROCHE,瑞士)染色。HE 染色、TUNEL 染色图像均用 LEICA 荧光倒置显微镜 DFC 300 FX 采集。TUNEL 染色半定量采用计数视野下 TUNEL 染色阳性的细胞数除以同视野下的细胞总数(计数 5 个视野),得出 TUNEL 染色的细胞凋亡率。

1.2.4 Western blot 法检测凋亡相关蛋白的表达 Western blot 法检测调节凋亡的相关蛋白 Bax、Bcl-2 的定量表达。组织裂解液购于碧云天生物研究所。本研究中所用的鼠抗人多克隆抗体 Bcl-2(C-2)、鼠抗鼠多克隆抗体 Bax(B-9)均购于美国 SANTA CRUZ 公司。显影条带用 Quantity One 图象分析系统进行条带吸光度值分析,计算 Bax、Bcl-2 条带与 β -actin 条带的吸光度值的比值。

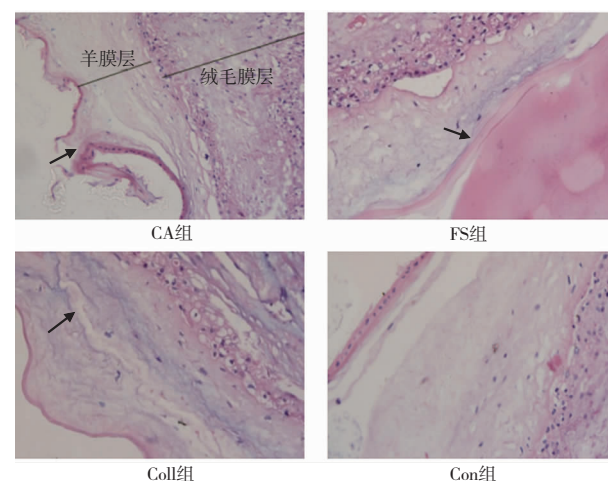
1.3 统计学方法

各组数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,用 SPSS 16.0 统计软件包进行分析,组间差异用随机单位组的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色观察粘合剂对胎膜形态学影响

CA 对胎膜的羊膜上皮层有损伤,破坏了其连续性。其余两组与对照组相比,对羊膜上皮层影响不大(图 1)。



CA组黑粗箭头示羊膜上皮层断裂;FS组、Coll组黑细箭头示羊膜上皮连续完整;Con组为正常对照组

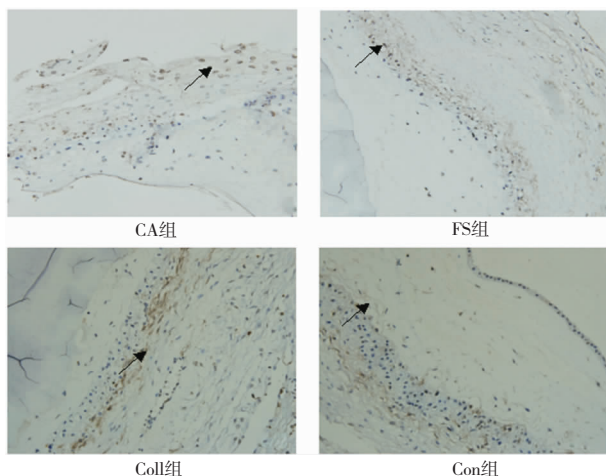
图 1 粘合剂处理胎膜 24 h 后的 HE 染色 (200 $\times$)

Fig.1 Pathological change of the fetal membrane treated with adhesives for 24 h (200 $\times$)

2.2 TUNEL 染色观察粘合剂导致的胎膜细胞凋亡

TUNEL 染色 DAB 显色如图 2 所示,可见 CA 组细胞浆内出现大量棕色颗粒,FS 组次之,Coll 组和 Con 组只有很少的棕色颗粒。图 3 显示了各组的细胞凋亡率,其中 CA 组(51.0 ± 1.8)%与 Con 组(12.1 ± 0.8)%、FS 组(16.0 ± 0.8)%、Coll 组(13.0 ± 1.0)%相比,细胞凋亡率显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$),FS 组凋亡率与 Coll 组、Con 组相比增高,差异有

统计学意义($P<0.05$), Coll 组与 Con 组相比, 差异没有统计学意义($P=0.262$)。



箭头所指棕色颗粒表示细胞凋亡; 可见 CA 组大量细胞内出现棕色颗粒, FS 组较少, Coll 组、Con 组仅出现少量棕色颗粒

图 2 粘合剂处理胎膜 24 h 后的 TUNEL 染色 (DAB, 200×)

Fig.2 TUNEL staining of the fetal membrane treated with adhesives for 24 h (DAB, 200×)

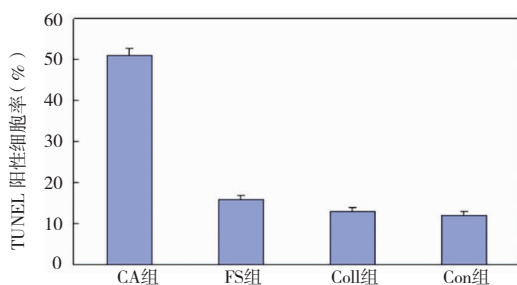


图 3 TUNEL 染色细胞凋亡率比较

Fig.3 Comparison of cell apoptotic rate among groups after TUNEL staining

2.3 调节凋亡的相关蛋白 Bax、Bcl-2 在处理后的胎膜中的定量表达

图 4 为调节凋亡的相关蛋白 Bax、Bcl-2 在各组中的表达条带, CA 组与 FS 组、Coll 组、Con 组相比, 其 Bax 蛋白表达显著增高。与之相反, Bcl-2 蛋白的表达趋势与前者相反。图 5 表示出了各组蛋白表达的相对吸光度值, 其中 CA 组、FS 组、Coll 组、Con 组的 Bax 蛋白相对灰度值依次为 (1.294 ± 0.029) 、 (0.421 ± 0.023) 、 (0.479 ± 0.024) 、 (0.287 ± 0.017) , CA 组、FS 组、Coll 组以及 Con 组各组之间相比, Bax 蛋白表达升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。Bcl-2 蛋白的相对灰度值依次为 (0.350 ± 0.034) 、 (0.406 ± 0.269) 、 (0.433 ± 0.020) 、 (0.493 ± 0.027) , CA 组与 FS 组、Coll 组以及 Con 组相比, Bcl-2 蛋白表达降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。FS 组、Coll 组与 Con 组相比, Bcl-2 蛋白表达降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。FS 组与 Coll 组相比, Bcl-2 表达差异没有统计学意义($P=0.162>0.05$)。表 1 列出了胎膜细胞凋亡率和 Bax、Bcl-2 在各组的表达及比较分析。

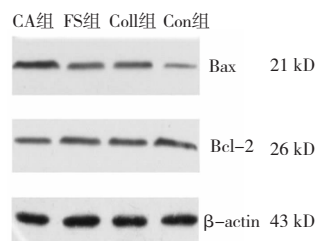


图 4 Bax、Bcl-2 在各组的表达

Fig.4 Expression of Bax and Bcl-2 protein in groups

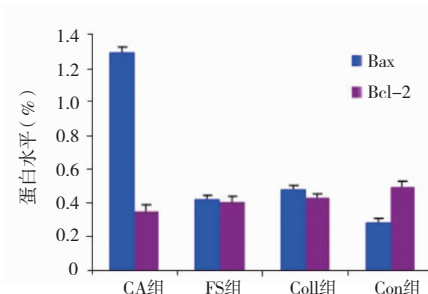


图 5 Bax、Bcl-2 在各组中的表达比较

Fig.5 Expression of Bax and Bcl-2 protein among groups

表 1 细胞凋亡率、Bax、Bcl-2 在各组的表达及比较分析 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison on cell apoptotic rate, expression of Bax and Bcl-2 protein among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	TUNEL凋亡率	Bax	Bcl-2
CA组	(51.0 ± 1.8)% [☆]	1.294 ± 0.029 [△]	0.350 ± 0.034 [◇]
FS组	(16.0 ± 0.8)% [★]	0.421 ± 0.023 [△]	0.406 ± 0.269
Coll组	(13.0 ± 1.0)%	0.479 ± 0.024 [△]	0.433 ± 0.020
Con组	(12.1 ± 0.8)%	0.287 ± 0.017 [△]	0.493 ± 0.027 [◆]
F 值	1197.617	1627.445	21.510

注: ☆, $P<0.01$, CA 组与其余 3 组比较; ★, $P<0.05$, FS 组与 Coll 组、Con 组比较; △, $P<0.05$, 4 组之间两两比较; ◇, $P<0.05$, CA 组与其余 3 组比较; ◆, $P<0.05$, Con 组与 FS 组、Coll 组比较

3 讨论

3.1 未足月胎膜早破 (Preterm premature rupture of the membranes, PPRM) 与羊膜腔封闭治疗现状

PPROM 是指妊娠未满 37 周胎膜在临产前发生破裂, 在普通妊娠中发病率仅为 2% 左右, 但却与 40% 的早产有关, 且导致母体、新生儿发病率及死亡率大大增加^[7]。与 PPRM 相关的导致新生儿死亡的几大病因主要是早产、低体重、败血症和肺部发育不全等。PPROM 孕妇中只有 7.7%~9.7% 的胎膜破损能自然愈合, 60% 左右在 7 d 内分娩^[8]。PPROM 一般按两种方法来进行分类, 一种按有无羊膜腔侵入性操作分为自发性胎膜早破和医源性胎膜早破 (Iatrogenic preterm premature rupture of the membranes, iPPROM), 另一种按照胎膜破裂时的孕龄分为无生

机 PPROM(<23 孕周)、远离足月的 PPROM(23~31 孕周)、接近足月的 PPROM(32~36 孕周)。这两种分类方法对于临床上如何选择治疗方案有很好的指导作用。

1 项回顾性研究分析了 32~36 孕周 PPROM 患者的新生儿结局,发现发生在 34 周以后的胎膜早破的新生儿不良结局发病率明显降低^[9]。目前很多研究已经证实,对于小于 34 周的胎膜早破,实行期待疗法好处更多。PPROM 的中位潜伏期约为 6.6 d^[8],因此临床上对于 32~34 周的 PPROM,有足够的时间使用糖皮质激素促胎肺成熟,新生儿结局相对较好。然而对于发生在 32 周前的 PPROM,随着期待疗法的时间越长,其母体发生绒毛膜羊膜炎的几率越大,新生儿败血症的几率也随之增加^[10]。如果能使羊膜腔重新处于封闭状态,就能延长孕周,改善新生儿结局。因此,本研究选择孕 32 周之前的产妇胎膜作为研究对象。

进行胎儿宫内诊断和治疗一般在中孕期进行,但侵入性操作在带来益处的同时,也往往会导致羊水泄露甚至 iPPROM。有研究称 iPPROM 的发生率为 6%~45%^[11]。iPPROM 因其破口往往比较规则且不大,进行羊膜腔封闭效果也较好,是羊膜腔封闭比较理想的适应证。临床上已经有很多学者用各种封闭剂对 iPPROM 进行了尝试,成功率较高。Sciscione 等^[4]对 12 例妊娠 17~23 周的孕妇经宫颈内注入 FS,观察到所有孕妇羊水漏出量减少,羊水指数增加,7 例新生儿(共分娩 13 例新生儿)存活,其中 2 例孕妇胎膜恢复完整性。Chang 等^[12]在 2006 年的 1 项包含 27 个病例的研究报道:内镜下胎儿治疗后预防性应用明胶栓在穿刺点进行封堵,其术后 iPPROM 发生率仅为 4.2%。

近年来有学者提出:一种新的组织工程合成的贻贝类生物粘合剂可能在组织粘附性能、使用环境要求等方面较 FS 具有更多的优势^[13,14],但还处于研究阶段。其他羊膜腔封闭的方法如激光焊接等也有学者进行过尝试^[15],但因为激光焊接的热损伤效应限制了其应用。

3.2 几种粘合剂对胎膜的毒性

Bilic 等^[16]选取足月剖宫产的胎膜进行毒性实验,发现 α -氰基丙烯酸乙酯胶对胎膜有毒性作用,而 FS 则几乎没有。本研究的 HE 结果显示,CA 类粘合剂对胎膜的羊膜层有损伤,破坏了其连续性;FS 和胶原蛋白海绵没有破坏羊膜层的连续性,从形态学上证实了 CA 胶对羊膜有毒性作用,这与 Bilic 等的研究相符。

TUNEL 染色结果显示 CA 组的细胞凋亡率明

显高于其余实验组和空白对照组,提示 CA 诱导胎膜细胞凋亡的能力更强。WB 结果显示:CA 组促进凋亡的蛋白 Bax 的表达量较 FS 组、胶原蛋白海绵组、空白对照组明显增高,而与凋亡抑制相关的蛋白 Bcl-2 表达则降低。已有研究证实,Bcl-2 家族的部分成员参与了凋亡的调控。Bax 和 Bcl-2 都属于 Bcl-2 家族,但二者在细胞凋亡过程中却发挥着相反的作用^[16],其中 Bax 为促凋亡蛋白,Bcl-2 是抑制凋亡的蛋白^[17]。Bax 与 Bcl-2 的表达趋势决定细胞对凋亡刺激的敏感性和细胞生存与死亡的趋势^[18]。本研究中,CA 组促进凋亡的 Bax 表达增高抑制凋亡的 Bcl-2 降低,提示 CA 胶处理后的胎膜更易受凋亡因素刺激而发生凋亡,这也与 TUNEL 结果相符。

CA 类粘合剂是一种化学合成的组织粘合剂,有微弱的毒性作用,与其降解速度和聚合热有关。其降解速度和聚合热随着酯基大小呈现规律性变化,酯基大、聚合热小、降解慢、毒性小;酯基小、聚合热大、降解快、毒性大。眼科常用的正辛酯、正丁酯及异丁酯是组织耐受性最好的 CA 类粘合剂^[9]。尽管本研究选取了耐受性最好的正丁酯进行试验,其依然表现出对胎膜极大的损伤作用,不适用于羊膜腔封闭治疗。另外 CA 胶凝固后柔软性差,这也限制了其在羊膜腔封闭方面的应用。

生物粘合剂、FS 的主要成分是纤维蛋白原、凝血酶、凝血因子 XⅢ、钙、纤维蛋白溶解抑制物,其主要成分纤维蛋白原主要来自于哺乳动物的血浆,有较好的组织相容性,广泛应用于外科领域。而目前大多数学者进行羊膜腔封闭的尝试都是采用 FS 来完成的^[20,21]。本课题组前期研究发现:采用冷沉淀、凝血酶、抑肽酶、氯化钙 4 种成分凝血成分体外构建的纤维蛋白支架可封闭胎膜破口^[22],并在此基础上培养三维细胞-纤维蛋白支架复合物,观察到 FS 随着时间推移而发生收缩,提示羊膜细胞-纤维蛋白支架复合物可模拟体内组织,作为 PPROM 破口修复的生物学材料^[23]。FS 在羊膜腔封闭领域,前景广阔。在本研究中,FS 组的 TUNEL 染色的检测细胞凋亡率和调节凋亡的相关蛋白表达量与 CA 组相比,有统计学差异,相比之下,FS 对胎膜的损伤更小。

胶原蛋白在局部形成坚韧的胶原纤维有一定的抗张强度,可封闭缺损组织。胶原蛋白在种系发生上存在一级结构的保守性,植入人体后引起的免疫反应较为缓和。明胶是胶原蛋白的水解产物,因其具有凝胶特性,也有研究者将其作为修补胎膜的生物材料^[24]。但有研究表明:明胶作为胶原蛋白的水解产物,不能再度形成纤维,其成膜性和生物活性均次于胶原蛋白^[25],因此作者并没有把明胶纳入实

验组设计而选择更有优势的胶原蛋白胶。本研究中胶原蛋白组的 TUNEL 染色细胞凋亡率和凋亡相关蛋白表达与 CA 组相比,有统计学差异,说明胶原蛋白较 CA 胶更安全。

PPROM 是产科比较棘手的问题,且对母儿危害较大,尤其对于 32 周之前的 PPRM,羊膜腔恢复封闭状态显得尤为重要。本研究选取了目前临床上易获得的几种医用粘合剂,对其作用于 32 周之前的胎膜的毒性进行了对比,认为:从安全性方面考虑,CA 胶不适合用于羊膜修补,生物类粘合剂 FS 和胶原蛋白胶是现阶段较为合适的羊膜腔封闭材料。然而本研究由于标本稀缺,收集难度很大,仅按照 10993-5 指南规定的最短作用时间 24 h 来设计,粘合剂对胎膜的较长时间接触会产生何种影响,尚有待探讨。另外,本研究仅在体外探讨了粘合剂对胎膜的影响,粘合剂对胎儿和母体的影响究竟如何,还需进一步进行动物模型和人体试验研究。

参 考 文 献

- [1] Garg P, Gopinathan U, Nutheti R, et al. Clinical experience with N-butylcyanoacrylate tissue adhesive in fungal keratitis[J]. *Cornea*, 2003, 22(5): 405-408.
- [2] Perry H D, Doshi S J, Donnenfeld E D, et al. Herpes simplex reactivation following laser in situ keratomileusis and subsequent corneal perforation[J]. *CLAO J*, 2002, 28(2): 69-71.
- [3] Sharma A, Kaur R, Kumar S, et al. Fibrin glue versus N-butyl-2-cyanoacrylate in corneal perforations[J]. *Ophthalmology*, 2003, 110(2): 291-298.
- [4] Seiscione A C, Manley J S, Pollock M, et al. Intracervical fibrin sealants: a potential treatment for early preterm premature rupture of the membranes[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 184(3): 368-373.
- [5] 邓桂霞, 熊晓彦, 李桂联, 等. 纤维蛋白封闭剂在治疗胎膜早破中的应用[J]. *国际医药卫生导报*, 2010, 16(1): 14-17.
- [6] Deng G X, Xiong X Y, Li G L, et al. The applied research of fibrin sealant in the treatment of premature rupture of membranes[J]. *International Medicine & Health Guidance News*, 2010, 16(1): 14-17.
- [7] Quintero R A, Morales W J, Allen M, et al. Treatment of iatrogenic previable premature rupture of membranes with intra-amniotic injection of platelets and cryoprecipitate (amniopatch): preliminary experience[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1999, 181(3): 744-749.
- [8] Merenstein G B, Weisman L E. Premature rupture of the membranes: neonatal consequences[J]. *Semin Perinatol*, 1996, 20(5): 375-380.
- [9] 官 静, 谭广萍. 未足月胎膜早破的封闭治疗进展[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2008, 29(19): 2357-2359.
- [10] Guan J, Tan G P. Progress of sealing treatment for premature rupture of membranes[J]. *Journal of Qiqihar Medical College*, 2008, 29(19): 2357-2359.
- [11] Neerhof M G, Cravello C, Haney E I, et al. Timing of labor induction after premature rupture of membranes between 32 and 36 weeks' gestation[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1999, 180(2 pt 1): 349-352.
- [12] Fernandes G L, Torloni M R, Hisaba W J, et al. Premature rupture of membranes before 28 weeks managed expectantly: Maternal and perinatal outcomes in a developing country[J]. *J Obstet Gynecol*, 2012, 32(1): 45-49.
- [13] Liekens D, Lewi L, Jani J, et al. Enrichment of collagen plugs with platelets and amniotic fluid cells increases cell proliferation in sealed iatrogenic membrane defects in the fetal rabbit model[J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28(6): 503-507.
- [14] Chang J, Tracy T F Jr, Carr S R, et al. Port insertion and removal techniques to minimize premature rupture of the membranes in endoscopic fetal surgery[J]. *J Pediatr Surg*, 2006, 41(5): 905-909.
- [15] Lee H, Lee B P, Messersmith P B. A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 338-341.
- [16] Bilic G, Brubaker C, Messersmith P B, et al. Injectable candidate sealants for fetal membrane repair: bonding and toxicity in vitro[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2010, 202(1): 85.e1-9.
- [17] Petratos P B, Baergen R N, Bleustein C B, et al. Ex vivo evaluation of human fetal membrane closure[J]. *Lasers Surg Med*, 2002, 30(1): 48-53.
- [18] Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(2): 158-167.
- [19] Zhu X, Xing M, Lou J, et al. Apoptotic related biochemical changes in human amnion cells induced by tributyltin[J]. *Toxicology*, 2007, 230(1): 45-52.
- [20] Qiao S, Nagasaka T, Harada T, et al. p53, Bax and Bcl-2 expression and apoptosis in gestation trophoblast of complete hydatid mole[J]. *J Placenta*, 1998, 19(5-6): 361-369.
- [21] 秦应祥, 赵 敏. 组织粘合剂在眼科中的应用[J]. *国际眼科杂志*, 2004, 4(4): 690-694.
- [22] Qin Y X, Zhao M. Application of tissue adhesive in ophthalmology[J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2004, 4(4): 690-694.
- [23] Contino B, Armellino F, Bmkaj L, et al. Amniopatch, a repairing technique for premature rupture of amniotic membranes in second trimester[J]. *Acta Biomed*, 2004, 75(s1): 27-30.
- [24] Calado E, Ayres-de-campos D. Premature rupture of membranes at 20 weeks: report of a successful outcome after transcervical application of fibrin glue[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2007, 22(1): 14-17.
- [25] 漆洪波, 李 炜, 孙江川, 等. 体外构建纤维蛋白支架封闭胎膜破口的研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2005, 21(6): 377-378.
- [26] Qi H B, Li W, Sun J C, et al. Harvest of fibrin scaffold for repairing preterm premature rupture of the membrane in vitro[J]. *Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics*, 2005, 21(6): 377-378.
- [27] 杨 霞, 漆洪波. 纤维蛋白支架三维培养人羊膜细胞的生物学特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(16): 3114-3118.
- [28] Yang X, Qi H B. Biological characteristics of human amniotic cells on a three-dimensional fibrin scaffold[J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2009, 13(16): 3114-3118.
- [29] O'Brien J M, Barton J R, Milligan D A. An aggressive interventional protocol for early midtrimester premature rupture of the membranes using gelation sponge for cervical plugging[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, 187(5): 1143-1146.
- [30] 李国英, 张忠楷, 雷 苏, 等. 胶原、明胶和水解胶原蛋白的性能差异[J]. *四川大学学报(工程科学版)*, 2005, 37(4): 54-58.
- [31] Li G Y, Zhang Z K, Lei S, et al. Differences in Properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate[J]. *Journal of Sichuan University (Engineering Science Edition)*, 2005, 37(4): 54-58.

(责任编辑: 关蕴良)