

• 实验研究 •

微孔淀粉复合介孔硅酸钙材料止血性能的研究

何青青¹ 赵龙姝¹ 戴号¹ 何建²

[摘要] 目的:探讨微孔淀粉复合介孔硅酸钙材料(PHS/m-CS)的止血性能与生物安全性。方法:采用溶胶-凝胶法合成介孔硅酸钙 m-CS,生物酶解法制备微孔玉米淀粉 PHS,并将两者复合制备 PHS/m-CS 止血材料。根据部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)指标考察 PHS/m-CS 的体外止血性能;通过将 PHS/m-CS 与 MC3T3-L1 细胞体外共培养,研究 PHS/m-CS 的体外生物安全性;通过体内动物实验,探讨 PHS/m-CS 对肝脏与脾脏的止血效果。结果:m-CS 呈短棒状,内部具有高度有序的介孔孔道;制备的 PHS 颗粒尺寸均匀,并且内部具有疏松多孔的结构。相比于单纯 PHS,PHS/m-CS 复合材料具有更高的吸水率与体外凝血功能。生物安全性测试表明材料对细胞无毒性。体内肝脏与脾脏止血实验表明,PHS/m-CS 可缩短凝血时间。结论:PHS/m-CS 复合止血材料具有良好的止血性能与生物安全性,对临床急诊止血材料具有指导意义。

[关键词] 介孔硅酸钙;微孔玉米淀粉;复合止血;生物安全性

doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2016.11.012

[中图分类号] R318 **[文献标志码]** A

Study on haemostatic properties of novel microporous starch/mesoporous calcium silicate composite

HE Qingqing¹ ZHAO Longshu¹ DAI Hao¹ HE Jian²

(¹Intensive Care Unit,Guanghua Hospital,Shanghai 200052,China;²General Medicine,Oriental Liver and Gallbladder Surgery hospital,Second Military Medical University)

Corresponding author:HE Jian,E-mail:hejiansmmu@126.com

Abstract Objective: To investigate the haemostatic property and biosafety of PHS/m-CS composites. **Method:** The mesoporous calcium silicate (m-CS) was synthesized via Sol-Gel method as well as microporous corn starch (PHS) was prepared by biological enzymolysis way. What's more, the PHS/m-CS composite was fabricated via mechanical blending method. The APTT and PT assay were used to analyze the in vitro thrombogenic property, and in vitro biosafety of PHS/m-CS was evaluated by co-cultivation with MC3T3-L1 cells. The in vivo hemostatic properties to liver and spleen were also investigated. **Result:** The high ordered mesopores could be detected inside of the as-prepared rod-like m-CS, and the PHS with homogeneous particle size had loose interconnected pores. And PHS/m-CS had higher water absorption and better in vitro thrombogenic property comparing with bare PHS. The in vitro biosafety evaluation results revealed that PHS/m-CS had excellent cytocompatibility. Moreover, the in vivo homeostasis tests of liver and spleen showed that PHS/m-CS could shorten the clotting time. **Conclusion:** The whole study showed that the as prepared PHS/m-CS composite possessed excellent haemostatic performance and biosafety, which has potential for being adopted as clinical emergency haemostatic materials.

Key words mesoporous calcium silicate; microporous corn starch; hemostasis; biosafety

在急诊急救治疗与外科手术过程中,会形成出血创面,如不能快速止血,会影响患者的健康甚至危及生命。近年来,止血材料以其特有的功效,在止血过程中发挥了很大的作用,大大降低了伤亡^[1-3]。因此,对更加快速有效的止血材料的研究引起了医学界的高度重视。

微孔淀粉(PHS)是淀粉经过酶解处理过后的新型变性淀粉,PHS具有内部中空的多孔结构,比表面积大大增加,具有很强的吸附作用。在用于止

血时,PHS可有效吸附血液中的大量水分,促使血小板凝结,从而达到止血的目的^[4-5]。介孔材料是孔径介于2~50 nm的多孔材料,因其特有的介孔结构,具有很高的比表面积、高孔容与吸附性,在止血材料中具有良好的应用前景^[6-7]。另外,在凝血过程中,Ca离子是一种凝血因子,可以有效催化血液中纤维蛋白原变成纤维蛋白,形成凝血块^[8-9]。因此,本研究计划利用生物方法制备PHS,并利用溶胶-凝胶法合成介孔硅酸钙(m-CS)。通过将PHS与m-CS复合,制备新型PHS/m-CS复合止血材料,并对复合材料的体外、体内止血性能及生物安全性进行研究。

¹上海市长宁区光华中西医结合医院重症监护室ICU(上海,200052)

²第二军医大学附属东方肝胆外科医院综合内科
通信作者:何建,E-mail:hejiansmmu@126.com

1 材料与方 法

1.1 m-CS 的合成与表征

采用溶胶-凝胶法合成介孔硅酸钙。以聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙 烯(P123)为模板剂,将 4 g 的 P123 溶于 120 ml 的 2 mol/L 盐酸和 30 ml 去离子水中,搅拌至溶液澄清。随后加入 9.76 g 四水硝酸钙和 8.61 g 的正硅酸乙酯,在 50℃ 继续搅拌 24 h。随后停止搅拌,静置 48 h 以获 得白色沉淀。然后过滤掉上层液体,并用去离子水与无水乙醇分别清洗白色沉淀 3 次,然后置于 80℃ 烘箱内干燥,得到白色固体。最后将白色固体放入马弗炉内,于 550℃ 下煅烧 6 h,得到最终白色粉末产物。

将粉末喷金,SEM 观察样品形貌,电子能谱 EDS 分析粉末所含元素。透射电子显微镜 TEM 观察粉末微观介孔形貌。利用全自动物理吸附仪测定粉末等温吸附脱附曲线,通过 Brnauer-Emmett-Teller(BET)法计算样品的比表面积,并根据 Barrett-Joyner-Helen(BJH)公式计算平均孔径及孔径分布。

1.2 PHS 的制备与表征

采用生物酶解法制备微孔淀粉。将 100 g 玉米淀粉与 30 ml pH 为 5.8 的磷酸盐缓冲液(PBS)混合,均匀搅拌 1 h。随后按照体积比为 1:4 的比例,依次加入葡糖淀粉酶(0.05% V/V)与淀粉酶(0.05% V/V)溶液,并置于 50℃ 环境下充分搅拌 12 h。然后加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液终止酶解反应,得到浆液状产物。收集产物,在离心机内离心分离 5 min,并用去离子水清洗 3 次,最后真空干燥,得到最终产物。将产物 PHS 研磨成粉末,在真空条件下喷金,用扫描电子显微镜 SEM 观察 PHS 外观形貌。

1.3 PHS/m-CS 的制备

将 PHS 和 m-CS 按照质量比为 5:1 的比例配料,放入行星球磨机内球磨 2 h,得到最终 PHS/m-CS 复合材料。以不添加 m-CS 的单纯 PHS 作为实验对照组。

1.4 PHS/m-CS 吸水率与体外凝血性能

称取一定量的复合粉末 W_0 ,倒入搁有滤纸的漏斗内。利用滴管向粉末上不断去离子水。当漏斗低端有液体落下时,停止滴加。然后称取此时粉末的质量 W_1 。根据以下公式计算粉末的吸水率:

$$\text{吸水率}(\%) = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100\%$$

根据部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)两个凝血指标来考察 PHS/m-CS 的体外凝血性能。

从成年雄性新西兰大白兔提取新鲜血液,然后加入 3.8%(V/V)柠檬酸钠(柠檬酸钠与血液体积比 1:9),防止血液凝固。随后在 37℃,3 500 rpm 条件下,将血液离心 10 min,得到贫血小板血浆

(PPP)。按照比例(PHS/m-CS 粉末:PPP:APTT 试剂=0.2 g:0.1 ml:0.1 ml)混合,随后置于 37℃ 水浴锅内培养,随后加入 0.1 ml CaCl_2 溶液(0.025 mol/L),并观察直至出现纤维蛋白丝的时间。PT 测试与 APTT 测试方法类似,按照比例(PHS/m-CS 粉末:PPP:PT 试剂=0.2 g:0.1 ml:0.1 ml)混合,然后记录血液凝固时间。对照组 PHS 的 APTT 与 PT 指标测试方法与 PHS/m-CS 相同。

1.5 PHS/m-CS 体外生物安全性

细胞毒性:采用 CCK-8 法,通过将 PHS/m-CS 粉末与 MC3T3-L1 细胞共培养,考察 PHS/m-CS 粉末的细胞毒性,评估材料的生物安全性。首先将 MC3T3-L1 细胞培养在 DMEM 培养液中,在 37℃,5% CO_2 细胞培养箱中培养一段时间。然后用胰蛋白酶将 MC3T3-L1 消化下来,离心清洗后,将细胞接种到放有材料的 24 孔板内,培养 1、3、7 d,每 2 天更换 1 次培养液。当到设定培养时间时,移出培养基,用 PBS 清洗 3 遍后,加入新鲜培养基,并加入 50 μl CCK-8 试剂,放回培养箱中继续培养 4 h,最后从培养液中吸取 100 μl 液体到 96 孔板内,利用酶标仪在 490 nm 波长位置下,测定对应的光密度值(OD)。

细胞粘附:按照之前所述细胞培养的方式,将 MC3T3-L1 细胞与材料共培养 7 d,然后移出培养基,加入 5% 的戊二醛溶液,固定 2 h。然后吸出固定液,PBS 清洗 3 次,然后用 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鬼笔环肽(FITC-Phalloidin)染色 35 min,再用 PBS 3 次后,DAPI 染色 8 min,染色完成后用 PBS 清洗 3 次,通过激光共聚焦显微镜观察细胞骨架形貌。

1.6 PHS/m-CS 体内止血性能

利用新西兰大白兔评价复合粉末对体内肝脏与脾脏的止血性能。

兔肝脏止血模型:取健康雄性新西兰大白兔,注射 4% 戊巴比妥钠溶液麻醉,然后手术打开兔下腹部,暴露肝脏,用手术刀在肝脏表面制造出尺寸为 2 cm×2 cm 的十字形切口,随即将称取好的 5 g PHS/m-CS 粉末均匀撒在伤口上,并用消毒纱布轻轻按压。每 5 s 观察出血情况,直至出血停止,并记录整个止血时间,利用同样的方法测试对照样品 PHS 的止血时间。

兔脾脏止血模型:利用相同的方法麻醉兔,然后暴露脾脏,并在脾脏表面制造出十字切口,随即将粉末均匀撒在伤口上,并用纱布轻轻按压。每 5 s 观察出血情况,直至出血停止,并记录整个止血时间,利用同样的方法测试对照样品 PHS 的止血时间。在血液凝固后,收集创口表面的粉末并干燥,随后粉末喷金,SEM 下观察样品与血液的形貌。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 统计软件进行处理。以 *t* 检验进行差异性分析。

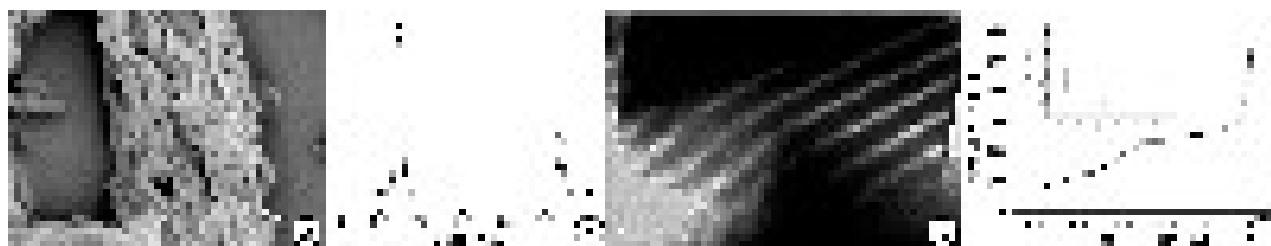
2 结果

2.1 m-CS 形貌与结构

SEM 图像显示所合成的 m-CS 具有短棒状的结构,尺寸较为均匀。部分颗粒存在团聚现象(图 1a);EDS 结果表明粉末存在 Ca、Si 离子,符合硅酸钙的元素组成(图 1b);TEM 图像显示材料具有明

显的介孔孔道结构,并且孔道排布均匀(图 1c);样品吸附脱-附等温线为典型的 H1 型回滞环的 IV 型等温回线,表明样品介孔孔径高度均匀,孔径分布独立。同时介孔孔径在 4 nm 左右(图 1d)。

BET 结果显示,所合成的 m-CS 的比表面积为 395.3 m²/g,孔容为 1.47 cm³/g,平均孔径为 4.5 nm,具有很高的比表面积与孔容,可大大提高 m-CS 的吸附能力。



a: SEM 形貌图; b: EDS 元素谱图; c: 介孔孔道 TEM 微观形貌; d: N₂ 吸附-脱附等温线与孔径分布。

图 1 m-CS 形貌与结构

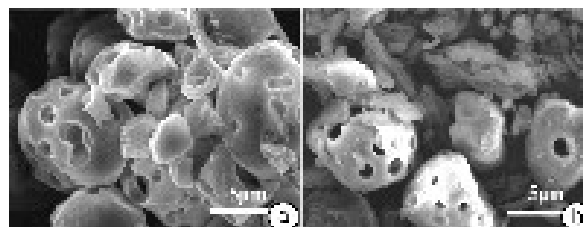
2.2 PHS 与 PHS/m-CS 形貌

从图 2 中可见,通过酶解法制备的 PHS,颗粒尺寸约为 8 μm,具有从表面到内部贯通的多孔结构,孔径约为 1 μm,并且孔径大小基本相同。部分破裂的 PHS 颗粒显示出内壁为多层状结构,并且内部贯通(图 2a);图 2b 表明复合粉末中 PHS 与 m-CS 颗粒为物理机械混合,混合较为均匀,而且复合制备过程中没有损坏两种成分的结构,从而保证了材料的性能。

图 3b 与图 3c 表示了两种材料对 APTT 与 PT 两种指标的影响。随着 m-CS 含量的加入,部分凝血活酶时间和凝血酶原时间随之降低,凝血性能得到了提升。表明 m-CS 对凝血过程具有明显的促进作用。

2.3 PHS/m-CS 吸水率与体外凝血性能

止血材料的吸水性能,很大程度上关系着止血性能的好坏。如图 3a 所示,单纯 PHS 的吸水率在 120%,表现出较强的吸水性能,PHS/m-CS 复合样品的吸水率为 160%,相比单纯 PHS 要高得多。PHS 因其内部多孔的结构,亲水性也好,因此可以吸收大量的水分。m-CS 内部具有介孔结构、高孔容,能够提高更多的孔体积吸收水分,因此吸水率也得到了提高。

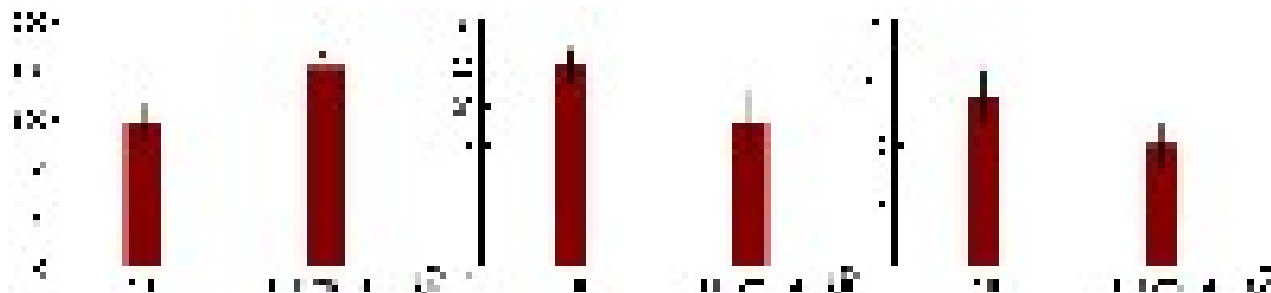


a: PHS 颗粒; b: PHS/m-CS 复合样品 SEM 形貌图像。

图 2 PHS 与 PHS/m-CS 的 SEM 形貌图

2.4 PHS/m-CS 的体外生物安全性

利用 CCK-8 法评价止血材料对细胞的毒性。



a: 吸水率比较; b: APTT 时间比较; c: PT 时间比较。

图 3 PHS 与 PHS/m-CS 比较

由图 4 可见,两种材料均具有一定的细胞相容性,在与细胞共培养时,可以有效促进细胞的增殖。同时复合材料对细胞的促进效果要明显高于单纯 PHS。结果表明,m-CS 的加入,可提高材料的细胞相容性。

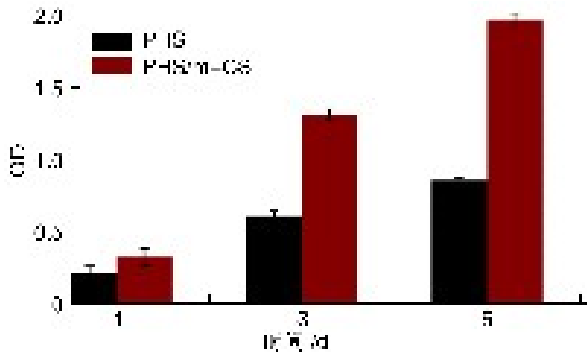


图 4 两种材料对 MC3T3-L1 细胞的细胞毒性检测情况

图 5 表示细胞与材料共培养 7 d 后,细胞的形貌图,其中蓝色荧光表示细胞核,绿色荧光表示细胞骨架。从图中可以观察到 MC3T3-L1 细胞与 PHS 以及 PHS/m-CS 材料共培养后,细胞铺展良好,细胞形态正常,具有良好的丝状应力纤维。实验组与对照组上的细胞形态均表现良好,其中 PHS/m-CS 组细胞数量较 PHS 要多,表明两种材料对细胞均没有抑制作用,并且随着 m-CS 的加入,可提高材料的细胞相容性。

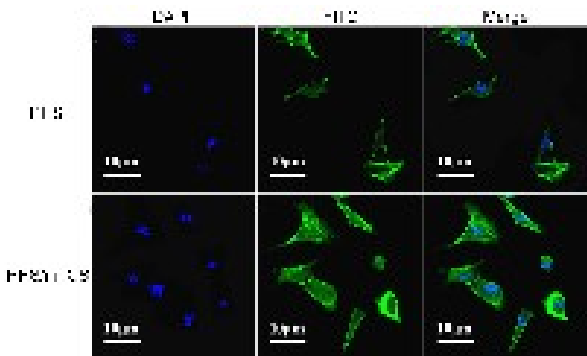
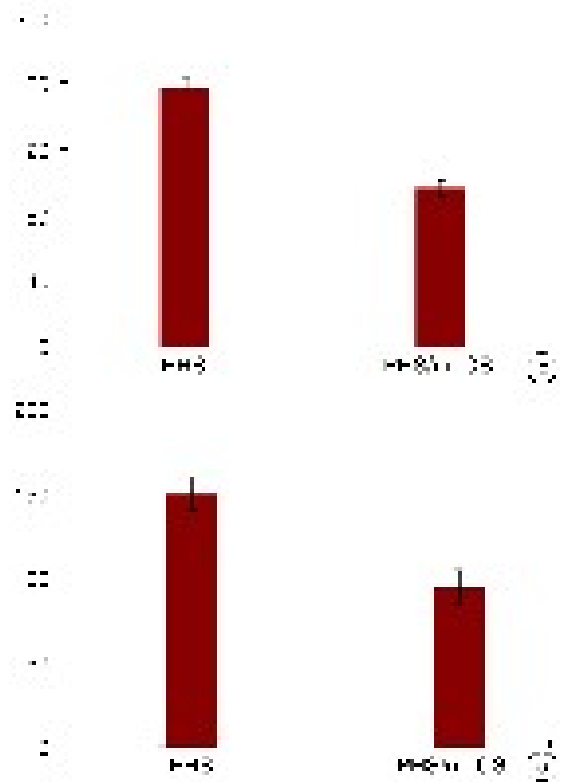
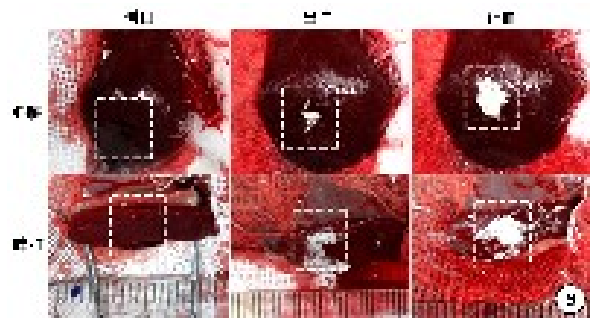


图 5 MC3T3-L1 细胞与材料共培养后,细胞的铺展形貌激光共聚焦图像

2.5 PHS/m-CS 的体内止血性能

图 6 为复合样品对兔体内肝脏与脾脏止血性能的评估。手术与材料止血过程如图 6a 所示。图 6b 为样品在肝脏上的止血时间,可以看到,相比于单纯 PHS,PHS/m-CS 材料的凝血时间更少,表明可有效促进体内脏器出血创面的止血;另外,PHS/m-CS 对脾脏器官的止血效果与肝脏呈现相同趋势(图 6c)。体内止血实验结果表明,PHS/m-CS 在用

于体内止血时,可以减少出血时间,加快凝血,具有优良的止血性能。



a:手术过程(白色虚线框内为创面部位);b:肝脏止血时间;c:脾脏止血时间。

图 6 PHS/m-CS 体内止血性能的评价

3 讨论

目前市场上广泛应用的 Arista 止血粉的材料来源于马铃薯淀粉微球,临床应用中也显示了很好的安全性及较好的止血效果。系统研究显示 Arista 淀粉微球表面具有裂隙结构,因此表面积加大,提高了其吸水性能,并且原料来源天然无毒,减少了毒副作用^[10-12]。

本研究以玉米淀粉为原料,然后采用生物酶解的方法,在玉米淀粉上引入多孔结构,大大增加了微孔淀粉的孔隙率与比表面积,提高了其吸附性。另外介孔材料因其特有的介孔结构以及高的比表面积、高孔隙,同样具有良好的吸附性能,可以应用

于止血材料。研究表明,复合介孔材料的微孔淀粉,吸附性能大大提高,并且体外止血与体内止血性能都得到了明显的提升,表明介孔材料的孔道结构比微孔淀粉的多孔结构效果要更好,止血性能可以得到进一步的提高。

目前常用的止血材料的止血机理是利用材料较高的吸附性能,当创面出血时,止血材料与血液接触,然后材料吸收血液中大量的水分,从而使创面出血部位血液浓缩,形成凝血块,从而达到止血的目的^[13-17]。本研究中除了利用材料较大的吸附性能,另外引入了 Ca 离子。凝血过程中,参与反应的凝血因子共有 13 个,其中钙离子作为其中之一,在凝血过程中也起到了很大的作用。Ca 离子可以催化血液中纤维蛋白原转化为纤维蛋白,众多纤维蛋白可组成凝血块,堵住创面裂口。本研究中,所使用的介孔硅酸钙 m-CS,在与血液接触时,可以释放 Ca 离子,提高了出血创面处的 Ca 离子浓度,从而可加快凝血过程,缩短凝血时间。研究表明,复合 PHS/m-CS 比单纯 PHS,可以缩短 APTT 与 PT 时间,并且体内肝脏与脾脏止血时间也大大缩短,具有很高的止血效率。

本研究结果表明,复合有介孔硅酸钙的微孔淀粉,具有很好的止血性能与止血效率,另外本研究中的止血材料为粉状,适用于各种不规则出血创面的止血修复,操作简单,通过将粉状物均匀的铺撒在创口,经过短时间的按压即可达到止血的目的。因此,微孔淀粉复合介孔硅酸钙 PHS/m-CS 止血材料具有很广泛的应用前景。

综上所述,采用溶胶-凝胶法合成了介孔硅酸钙 m-CS,利用生物酶解法制备了微孔玉米淀粉 PHS,两者复合制备出一种新型止血材料 PHS/m-CS。体外吸水率测试表明复合材料具有优良的吸水性,凝血实验结果显示,添加了 m-CS 之后,可以有效降低部分凝血活酶时间 APTT 和凝血酶原时间 PT 的时间,提高了止血效率。另外体外细胞相容性实验结果表明,PHS/m-CS 对 MC3T3-L1 细胞无毒副作用,具有良好的细胞相容性。体内止血实验结果表明,PHS/m-CS 可有效止血,并且止血时间比单纯 PHS 更低。总之,新型 PHS/m-CS 复合止血材料具有很好的体内止血性能,具有广泛的临床应用前景。

参考文献

- [1] Kozen B G, Kircher S J, Heno J, et al. An alternative-hemostatic dressing: comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot[J]. Acad Emerg Med, 2008, 15(1): 74-81.
- [2] Kheirabadi B S, Acheson E M, Deguzman R, et al. The potential utility of fibrin sealant dressing in repair of vascular injury in swine[J]. J Trauma, 2007, 62(1): 94-103.
- [3] Turner A S, Parker D, Egbert B, et al. Evaluation of a novel hemostatic device in an ovine parenchymal organ bleeding model of normal and impaired hemostasis[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 63(1): 37-47.
- [4] Li X, Liu C, Yuan Y, et al. Preparation and hemostatic properties of mesoporous silica-based xerogels[J]. J Inorg Mater, 2008, 23(2): 327-331.
- [5] Sugamori T, Iwase H, Maeda M, et al. Local hemostatic effects of microcrystalline partially deacetylated chitin hydrochloride [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49(2): 225-232.
- [6] Dai C L, Yuan Y, Liu C, et al. Degradable, antibacterial silver-exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control[J]. Biomaterials, 2009, 30(29): 5364-5375.
- [7] Emily B, Trang P, Denis B, et al. Direct synthesis of mesoporous silica presenting large and tunable pores using BAB triblock copolymers: influence of each copolymer block on the porous structure [J]. Micropor Mesopor Mat, 2007, 112(1-3): 612-620.
- [8] Antisdell J L, West-Denning J L, Sindwani R, et al. Effect of microporous polysaccharide hemospheres (MPH) on bleeding after endoscopic sinus surgery: randomized controlled study [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2009, 141(3): 353-357.
- [9] Che L M, Li D, Wang L J, et al. Effect of high-pressure homogenization on the structure of cassava starch [J]. Int J Food Prop, 2007, 10(4): 911-922.
- [10] Filler G. Value of therapeutic drug monitoring of MMF therapy in pediatric transplantation [J]. Pediatr Transplant, 2006, 10(6): 707-711.
- [11] Murat F J, Le C Q, Ereth M H, et al. Evaluation of microporous polysaccharide hemospheres for parenchymal hemostasis during laparoscopic partial nephrectomy in the porcine model [J]. JSLS, 2006, 10(3): 302-306.
- [12] Humphreys M R, Castle E P, Andrews P E, et al. Microporous polysaccharide hemospheres for management of laparoscopic trocar injury to the spleen [J]. Am J Surg, 2008, 195(1): 99-103.
- [13] Alam H B, Burris D, DaCorta J A, et al. Hemorrhage control in the battlefield: role of new hemostatic agents [J]. Mil Med, 2005, 170(1): 63-69.
- [14] Rhee P, Brown C, Martin M, et al. QuikClot use in trauma for hemorrhage control: case series of 103 documented uses [J]. J Trauma, 2008, 64(4): 1093-1099.
- [15] Kauvar D S, Lefering R, Wade C E. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations [J]. J Trauma, 2006, 60(6 Suppl): S3-11.
- [16] Hebert M F, Lam A Y. Diltiazem increases tacrolimus concentrations [J]. Ann Pharmacother, 1999, 33(6): 680-682.
- [17] Wortham L. Hemorrhage control in the battlefield: role of new hemostatic agent [J]. Mil Med, 2005, 170(12): 1004-1007.

(收稿日期: 2016-09-20)