

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.15.006

快速膨胀片层多孔壳聚糖止血海绵的制备及生物相容性研究*

蒋丽霞 徐家柱 杨小元 魏长征[△]

(上海其胜生物制剂有限公司 上海 201106)

摘要 目的:探索快速膨胀片层多孔壳聚糖止血海绵的制备工艺,评价止血海绵的理化性能及生物相容性,并探讨原料脱乙酰度对止血海绵性能的影响。**方法:**考察止血海绵的理化性质,包括扫描电子显微镜(SEM)观察表面形貌,检测力学性能、吸水率、快速吸水膨胀时间和膨胀率,研究其体内外的生物相容性,包括体外细胞毒性实验、动物皮内刺激实验和皮下植入实验。**结果:**确定了止血海绵的制备工艺,采用该工艺制备的止血海绵均具有片层多孔结构,且具有较高的力学强度和快速膨胀的特点。证实高脱乙酰度原料(DD=95.14%)制备的止血海绵力学性能、吸水率、膨胀率均优于低脱乙酰度原料(DD=69.70%)制备的止血海绵。脱乙酰度69.70%和脱乙酰度95.14%的壳聚糖止血海绵,拉伸强度分别为10.1 N和15.4 N,吸水率分别为1904%和2131%,吸水膨胀时间分别为13.4 s和14.0 s,膨胀率分别为8.4倍和10.8倍。体外细胞毒性实验表明脱乙酰度为95.14%的壳聚糖止血海绵更有利于细胞的增殖,皮内刺激和皮下植入实验结果表明脱乙酰度为95.14%的壳聚糖止血海绵表现出更小的组织炎症反应。**结论:**脱乙酰度为95.14%的壳聚糖止血海绵具有优良的力学性能、优异的吸水膨胀能力以及良好的生物相容性,在临床止血特别是腔隙止血方面具有广阔的应用前景。

关键词:快速膨胀;片层多孔;壳聚糖止血海绵

中图分类号:R-33;Q813.1;R318.08 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)15-2829-07

Preparation of Rapid Swelling Chitosan Hemostatic Sponges with Lamellar Porous and Their Biocompatibility Evaluation*

JIANG Li-xia, XU Jia-zhu, YANG Xiao-yuan, WEI Chang-zheng[△]

(Shanghai Qisheng Biological Preparation Co., Ltd, Shanghai, 201106, China)

ABSTRACT Objective: To explore the technique of preparing rapid swelling chitosan hemostatic sponges with lamellar porous structure, evaluate their physical and chemical properties as well as biocompatibility, and investigate the influence of deacetylated degree (DD) of raw chitosan on hemostatic properties. **Methods:** The morphology of chitosan hemostatic sponges were observed using SEM, the mechanical properties, water absorption rate, water swelling time as well as the swelling ratio were examined. The biocompatibilities of chitosan hemostatic sponges were evaluated both in vitro and in vivo, including cytotoxicity test, intracutaneous reactivity test and subcutaneous implant. **Results:** With the determined fabrication technique, chitosan hemostatic sponges with different DD both exhibited lamellar porous structure and high mechanical strength as well as the property of rapid swelling. The mechanical strength, water absorption rate and swelling ratio of chitosan hemostatic sponges with high DD (95.14%) were higher than that of chitosan with low DD (69.70%). The mechanical strength, water absorption rate, swelling time and swelling ratio of hemostatic sponge fabricated from chitosan with low (69.70%) and high (95.14%) DD were 10.1 N and 15.4 N, 1904% and 2131%, 13.4 s and 14.0 s, 8.4 times and 10.8 times, respectively. In vitro cytocompatibility test indicated that the chitosan hemostatic sponges significantly promoted the proliferation of cells. In vivo intracutaneous reactivity test and subcutaneous implant test demonstrated that the chitosan hemostatic sponge with high DD (95.14%) had excellent biocompatibility and less inflammatory response. **Conclusions:** Chitosan hemostatic sponges with high DD (95.14%) exhibited better mechanical strength, water absorption rate, swelling rate and biocompatibility and thus demonstrated their potential to be used in hemostatic application.

Key words: Rapid swelling; Lamellar porous; Chitosan hemostatic sponges

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q813.1; R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)15-2829-07

前言

出血是战场创伤和城市交通事故伤的主要杀手,也是造成

创伤病人手术室死亡的主要原因,研究表明治疗过程中快速止血可以明显降低死亡率^[1]。常规的止血方式包括压迫、血管结扎、沸石封闭以及使用止血材料等。临床使用过程中无论使用

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(国家863)项目(2014AA09)

作者简介:蒋丽霞(1973-),学士,研究方向:生物材料,E-mail: lixiajiang18@hotmail.com

[△] 通讯作者:魏长征,博士,研究方向:生物材料,E-mail: czwei@3healthcare.com

(收稿日期:2017-11-30 接受日期:2017-12-26)

那种止血方式,物理压迫处理都是非常必要的,其中止血材料辅助物理压迫越来越多的被应用在临床止血过程中,研究人员也致力于新型止血材料的研究与开发。

壳聚糖是自然界中唯一带正电荷的氨基葡萄糖,它可以和红细胞表面的负电荷产生静电吸附作用,使伤口处红细胞大量粘附聚集,形成血栓,加快血液凝固,从而不依赖于机体内的凝血机制,因此,壳聚糖类的止血材料成为国内外的研究热点^[2-5]。目前壳聚糖类止血材料种类繁多,如止血粉、止血海绵、止血绷带等,商品化产品有 Celox 止血粉、Xstat 快速止血系统、Hem-Con 等,为了提高壳聚糖止血材料的止血性能,多采用提高材料的孔隙率以改善止血效果^[6]。专利 CN200510024503.3^[7]采用的是含有甘油、羧甲基壳聚糖、壳聚糖粉和环保型离子交联剂的羧甲基壳聚糖水溶液制备海绵,但该方案中的海绵由于发泡不充分,孔隙少而不稳定,而且吸附能力差,使用过程中易发硬发脆;专利 CN201410482241.4^[8]公开一种壳聚糖海绵,通过酸溶解壳聚糖,冷冻干燥,用脂肪醛交联,然后再用无水乙醇清洗,最后自然风干;CN200910063838.4^[9]则是用羧甲基壳聚糖和聚乙烯醇为原料,加入酸、甲醛和发泡剂共混,然后在烘箱中加热成型,得到复合海绵。

上述工艺中均需使用化学交联剂、发泡剂等来提高材料的孔隙率,但其容易残留在临床使用中,具有较大的安全隐患。同时上述工艺制备的止血海绵吸水速度慢,使用时必须辅助物理压迫才能达到止血的效果,且海绵的微观结构为不规则的多孔结构,多孔的不贯通性大大限制了止血效果。基于此,本研究采用间歇微波法制备壳聚糖原料,然后采用二次冷冻干燥的工艺制备具有片层多孔状的止血海绵。进一步考察不同脱乙酰度壳聚糖海绵的理化性质以及生物相容性。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

DMEM 培养基(GIBCO),胎牛血清(Biosun),人成纤维细胞(Human Fibroblast, HF, 上海中乔新舟生物科技有限公司),钙黄绿素(Sigma),溴化丙啶(Sigma),BBOT(2,5-双(5-叔丁基-2-苯并恶唑基)噻吩, Thermo Fisher Scientific),冰醋酸(上海凌峰化学试剂有限公司),溴化钾(Sigma),氢氧化钠(上海凌峰化学试剂有限公司),甘油(上海运佳黄埔制药有限公司),几丁质干粉(上海昊海生物科技有限公司)。

冷冻干燥机(上海仪倍实业有限公司, YB-FD-20D),扫描电子显微镜(SEM, HITACHI, TM3000, 日本),CO₂ 恒温培养箱(Thermo Fisher Scientific, 美国),荧光倒置显微镜(Eclips TiS, Nikon, 日本),酶标仪(Biotek Instrument, 加拿大),元素分析仪(Thermo Fisher Scientific, 美国),红外光谱仪(Thermo Fisher Scientific, 美国),拉力机(GOTECH, AL-3000, 中国)。

1.2 实验动物与麻醉方法

新西兰大白兔(上海科硕实验动物有限公司),雌雄不限,体重 2~3 kg, 4~5 月龄。10% 水合氯醛(1.5 mL/kg)耳缘静脉注射麻醉。

1.3 实验方法

1.3.1 壳聚糖原料的制备 间歇微波法制备不同脱乙酰度的壳聚糖原料。取几丁质粉末在 50% 的氢氧化钠溶液中, 90 °C 保

温 10 min, 然后将几丁质溶液放入微波炉中, 中火 4 min, 再用纯化水洗涤至洗涤液为中性, 95% 酒精脱色, 最后 50 °C 烘箱中烘干, 获得低脱乙酰度的壳聚糖干粉。重复以上过程 4 次, 获得高脱乙酰度的壳聚糖干粉。

1.3.2 壳聚糖脱乙酰度检测 首先精密称取 2 mg BBOT 标准品用锡囊包裹, 放入元素分析仪进样托盘上进行检测, 再精密称取 3 份 2 mg 壳聚糖样品, 每份样品各放入锡囊中包裹好, 放入元素分析仪进样托盘上测定碳、氢、氮的含量。

壳聚糖的分子式为: $[C_6H_{11-a}O_4N(C_2H_3O)_aO(H_2O)]_n$, 采用元素分析仪检测碳、氢、氮的含量, 然后根据以下方程式 1-3 计算 a 的值, 即为乙酰度, $(1-a) \times 100\%$ 即为脱乙酰度。

$$N\% = \frac{14}{161+42a+18b} \times 100\% \quad (1)$$

$$C\% = \frac{72+24a}{161+42a+18b} \times 100\% \quad (2)$$

$$H\% = \frac{11+2a+2b}{161+42a+18b} \times 100\% \quad (3)$$

式中: a 为平均每个壳聚糖单元上乙酰基团数;

b 为平均每个壳聚糖单元上被含有的水分。

1.3.3 壳聚糖原料红外分析 将溴化钾和壳聚糖干粉按照质量比为 50:1 的比例放入研钵中碾碎, 将碾磨好的溴化钾和壳聚糖干粉放入模具中, 将模具放在压片机上进行压片处理, 最后在红外光谱仪上定性分析。

1.3.4 壳聚糖海绵制备 用电子天平准确称量 1 g 壳聚糖干粉和 0.3 g 甘油溶于 10 mL 浓度为 0.5% 的乙酸溶液中, 室温下搅拌过夜使壳聚糖完全溶解。将配好的壳聚糖溶液放入冷冻干燥箱的物料板上, 壳聚糖溶液的厚度大约在 1 cm~1.5 cm 左右, 然后进行冻干处理。第一次冻干后的壳聚糖海绵用 4% 的氢氧化钠溶液浸泡 24 h, 再用蒸馏水洗至中性, 然后, 进行第二次冻干处理。将第二次冻干后的壳聚糖海绵压成厚度大约为 1 mm~2 mm 的扁平状, 最后 Co-60 辐照灭菌待用。

1.3.5 壳聚糖海绵结构观察 扫描电镜观察: 将制备好的壳聚糖海绵样品装台粘胶、喷金处理, 扫描电镜观察。

1.3.6 壳聚糖海绵吸水率试验 将壳聚糖海绵裁剪成大小为 1 cm×1 cm 的形状, 并精密称量, 记为 m₀。室温下浸入盛有蒸馏水的烧杯中, 用手指轻揉直至完全浸湿, 且所有空气被除去, 注意防止破损, 待吸足水分后, 用小镊子轻轻夹住一角将其从水中取出, 轻持镊子在水面上排水 1 min 后, 再次称量, 记为 m₂, 按公式 4 计算吸水倍数:

$$A = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \quad (4)$$

式中:

A- 试样吸水倍数;

m₁- 试样浸湿前的质量, 单位为毫克(mg);

m₂- 试样浸湿后的质量, 单位为毫克(mg)。

1.3.7 壳聚糖海绵力学拉伸试验 将壳聚糖海绵裁剪成 1 cm×2 cm 长条状, 将其两端固定在拉力机的上下两侧, 拉伸部位壳聚糖海绵的长度为 1 cm, 以 2 mm/min 速率进行拉伸直至壳聚糖海绵拉断为止。最后得到壳聚糖海绵的拉伸曲线。

1.3.8 壳聚糖海绵快速膨胀试验 将壳聚糖海绵裁剪成大小为 1 cm×0.5 cm 的形状并计算出吸水膨胀前壳聚糖海绵的体

积,然后在玻璃皿底部滴加蒸馏水(不要让水滴完全铺开),将裁剪好的壳聚糖海绵一端与蒸馏水接触,并开始计时直至壳聚糖海绵完全膨胀为止,再重新测量吸水膨胀后壳聚糖海绵的体积。

1.3.9 皮内刺激实验和体外细胞毒性实验 皮内刺激实验^[10]:按照 0.1 g/mL 的浸提比和每克壳聚糖海绵所吸收的浸提液总量制备浸提液,浸提条件为 121 ℃,1 h± 0.2 h。阴性对照为 0.9 %生理盐水,阳性对照为 20 mg/mL 几丁质溶液。新西兰大白兔皮下注射,每个点注射量为 0.2 mL,注射后 0 h、24 h、48 h 和 72 h 后观察注射部位状况。

体外细胞毒性实验^[11]:按照皮内刺激实验的浸提方法将壳聚糖海绵放入含有 10 %胎牛血清的 DMEM 培养基中,37 ℃浸提 24 h。分为空白组(培养基);50 %浓度组(浸提液浓度为 50 %);100 %浓度组(浸提液浓度为 100 %)和阳性对照组(0.64 %苯酚)。将人成纤维细胞用 0.25 %的胰蛋白酶消化,制成 1×10⁴ cells/mL 细胞悬液,接种在 96 孔板中。每组 5 个平行,加细胞悬液 100 μL,分别于第 1 天和第 4 天取样做 CCK-8 细胞活性检测和死活染色。通过下式计算细胞相对增殖率。

相对增殖率(P %)=OD 实验组/OD 阴性对照组×100 %。

表 1 壳聚糖原料脱乙酰度测定

Table 1 Determination of deacetylation degree of Chitosan

Parameter	Group 1	Group 2
Degree of Deacetylation	95.14 %	69.70 %

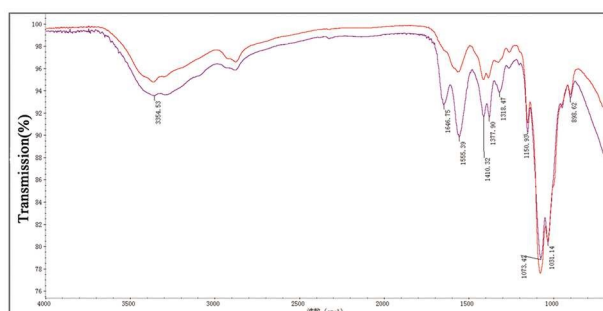


图 1 不同壳聚糖原料的红外图谱(紫色:DD=69.70 %,红色:DD=95.14 %)

Fig.1 FTIR of chitosan with different deacetylated degree (Purple: DD=69.70 %, Red: DD=95.14 %)

2.2 扫描电镜观察壳聚糖海绵表面形貌结构和力学拉伸性能

1.3.10 组织学观察 将壳聚糖海绵裁剪成大小为 1 cm×0.5 cm 的形状,无菌移植到新西兰大白兔皮下。术后一周、四周将新西兰大白兔麻醉处死,将壳聚糖海绵周围 0.5 cm 左右的组织剪下,用 4 %的中性甲醛溶液固定 24 h 以上,石蜡包埋,切片,常规 HE 染色,光镜下观察植入周围组织情况。

1.4 统计分析

采用 SPSS19.0 统计软件包进行分析。数据以平均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 T 检验,P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 壳聚糖原料的制备及表征

壳聚糖干粉的脱乙酰度通过元素分析仪测得,结果如表 1 所示。原料 1(group 1)是采用微波 4 次得到壳聚糖原料,其脱乙酰度(DD)可以达到 95.14 %;原料 2(group 2)是采用微波 1 次得到的壳聚糖原料,其脱乙酰度为 69.70 %。图 1 是壳聚糖原料的红外图谱,从图中可以看出脱乙酰度为 69.70 %壳聚糖原料在 1646 cm⁻¹ 位置处有明显的峰出现,该位置为酰胺 II 峰,而脱乙酰度为 95.14 %的壳聚糖原料在该位置无明显峰出现。

壳聚糖海绵 SEM 扫描电镜形态观察如图 2 所示,可以看出不同脱乙酰度壳聚糖海绵表面均呈致密的网状结构,但截面则呈片层多孔状结构。图 3 为壳聚糖海绵的力学拉伸曲线,从图 3 结果可以看出随着脱乙酰度增加,壳聚糖海绵拉伸强度也会随着增加,最大拉伸力分别为 10.1 N 和 15.4 N。

2.3 壳聚糖海绵的吸水率和快速膨胀能力

壳聚糖海绵的吸水率、快速膨胀时间和膨胀率结果如表 2 所示,脱乙酰度为 95.14 %的壳聚糖海绵快速膨胀时间为 14±2.7 s,膨胀率为 10.8±0.9 倍,吸水率为自身重量的 21(2132±91 %)倍;而脱乙酰度为 69.70 %壳聚糖海绵快速膨胀时间为 13.4±2.0 s,膨胀率为 8.4±0.4 倍,吸水率为自身重量的 19(1905±93 %)倍。脱乙酰度为 95.14 %壳聚糖海绵的膨胀率显著高于 69.70 %的壳聚糖海绵(P<0.05)。

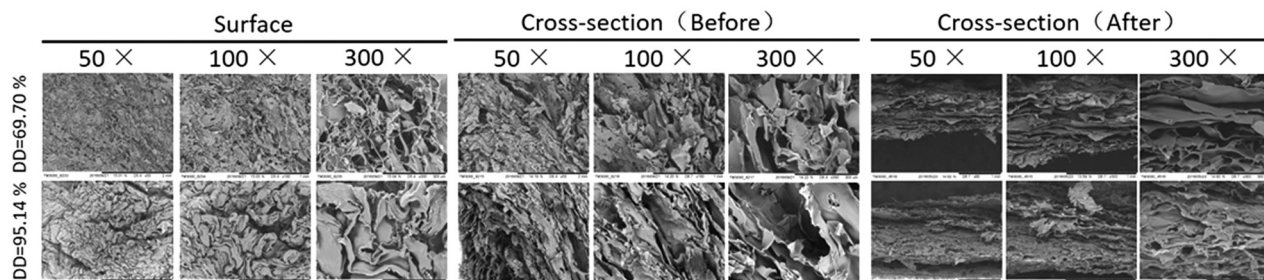


图 2 不同脱乙酰度壳聚糖海绵表面和截面(压缩前后的)的 SEM 图片

Fig. 2 The surface and cross-section (compression before and after) structure of chitosan sponges with different deacetylated degree observed using scanning electron microscopy

2.4 皮内刺激反应

图 4 是壳聚糖海绵浸提液皮下注射后不同时间点的皮刺

反应。从图中可以看出,皮下注射 0 天后,皮肤表面出现隆起;24 h 后,脱乙酰度为 69.70 %壳聚糖海绵浸提液注射部位有轻

微可见的红斑但无水肿出现,脱乙酰度为 95.14 %的壳聚糖海绵浸提液注射部位的皮肤与周围无明显差别。48 h 和 72 h 后两种壳聚糖海

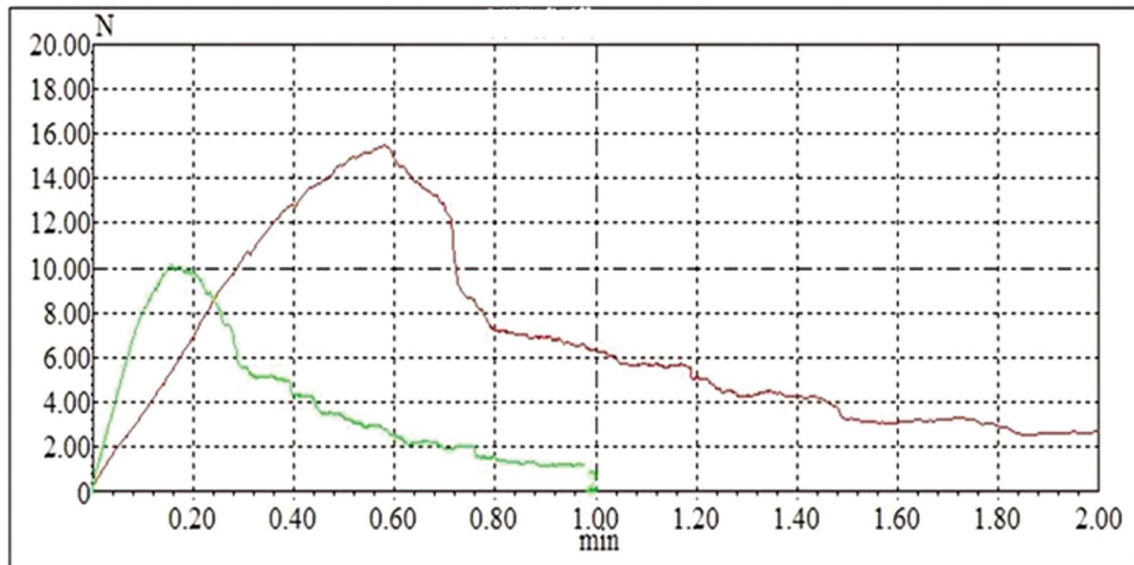


图 3 壳聚糖海绵的力学拉伸曲线(绿色:DD= 69.70 %,红色:DD= 95.14 %)

Fig. 3 Mechanical strength of chitosan sponges with different deacetylated degree (Green: DD= 69.70 %, Red: DD= 95.14 %)

表 2 壳聚糖海绵的吸水率、膨胀时间和膨胀率($M \pm S, n=5$)

Table 2 Water absorption, Swelling time and ratio of chitosan sponges with different deacetylated degree($M \pm S, n=5$)

Groups	Amount (n)	Swelling time (s)	Swelling ratio (times)	Water absorption (%)
DD= 95.14 %	5	14.0 $\pm$ 2.7	10.8 $\pm$ 0.9*	2132 $\pm$ 91
DD= 69.70 %	5	13.4 $\pm$ 2.0	8.4 $\pm$ 0.4	1905 $\pm$ 93

Note: compared with the DD=69.70 %, $n=5$, * $P<0.05$.

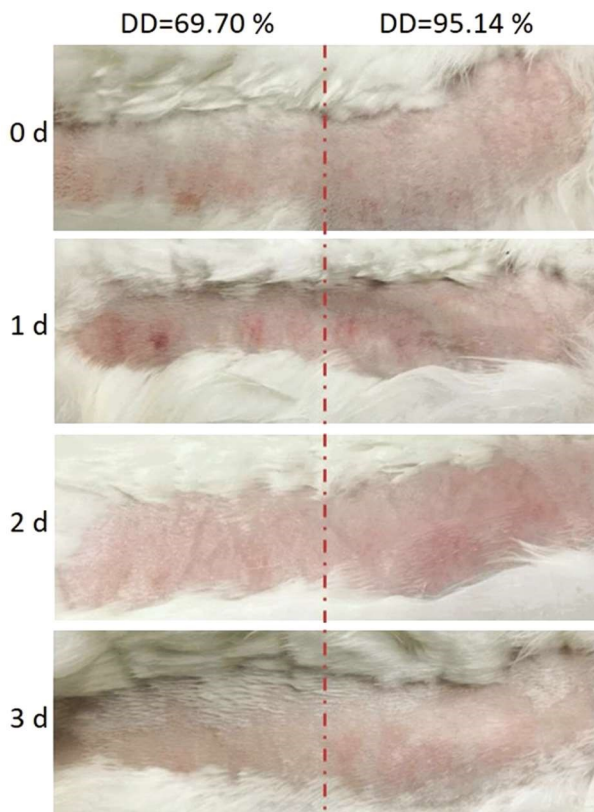


图 4 不同时间点下壳聚糖海绵浸提液皮刺反应

Fig. 4 Intracutaneous reactivity of different chitosan sponges leaching solution at different time interval

2.5 体外细胞毒性试验

细胞毒性试验结果如图 5 所示。从图 5-a 中可以看出,第 1 天时,成纤维细胞在脱乙酰度为 69.70 %和 95.14 %壳聚糖海绵 50 %浓度浸提液中的相对增殖率分别为 101.3 %和 106.8 %,在 100 %浓度浸提液中的相对增殖率分别为 80.8 %和 89.9 %,但脱乙酰度为 95.14 %的壳聚糖海绵浸提液中,50 %浓度组的细胞相对增殖率显著高于 100 %浓度组(* $P<0.05$)。当培养到第 4 天时,95.14 %脱乙酰度的壳聚糖海绵 100 %浓度浸提液中细胞相对增殖率已经达到 110.2 %,脱乙酰度为 69.70 %的壳聚糖海绵 100 %浓度浸提液中细胞相对增殖率为 123.0 %;在 50 %浓度下的两种壳聚糖海绵浸提液中成纤维细胞的相对增殖率都在 120.0 %以上,不同脱乙酰度壳聚糖海绵浸提液中成纤维细胞的相对增殖率无显著性差异。从图 5-b 的死活染色结果中可以看出,不同脱乙酰度壳聚糖海绵浸提液中的成纤维细胞生长良好,几乎看不到死细胞。

2.6 HE 染色结果

图 6 是壳聚糖海绵皮下植入 1 周、4 周后的 HE 染色。从图中可以看出壳聚糖海绵被染成深红色,特别是在第 1 周时脱乙酰度为 69.70 %的壳聚糖海绵周围有明显的炎症细胞群出现,而脱乙酰度为 95.14 %的壳聚糖海绵其周围组织无明显炎症反应。体内移植 4 周后,脱乙酰度为 69.70 %的壳聚糖海绵仍有炎症反应,脱乙酰度为 95.14 %的壳聚糖海绵其周围组织无明显炎症反应。

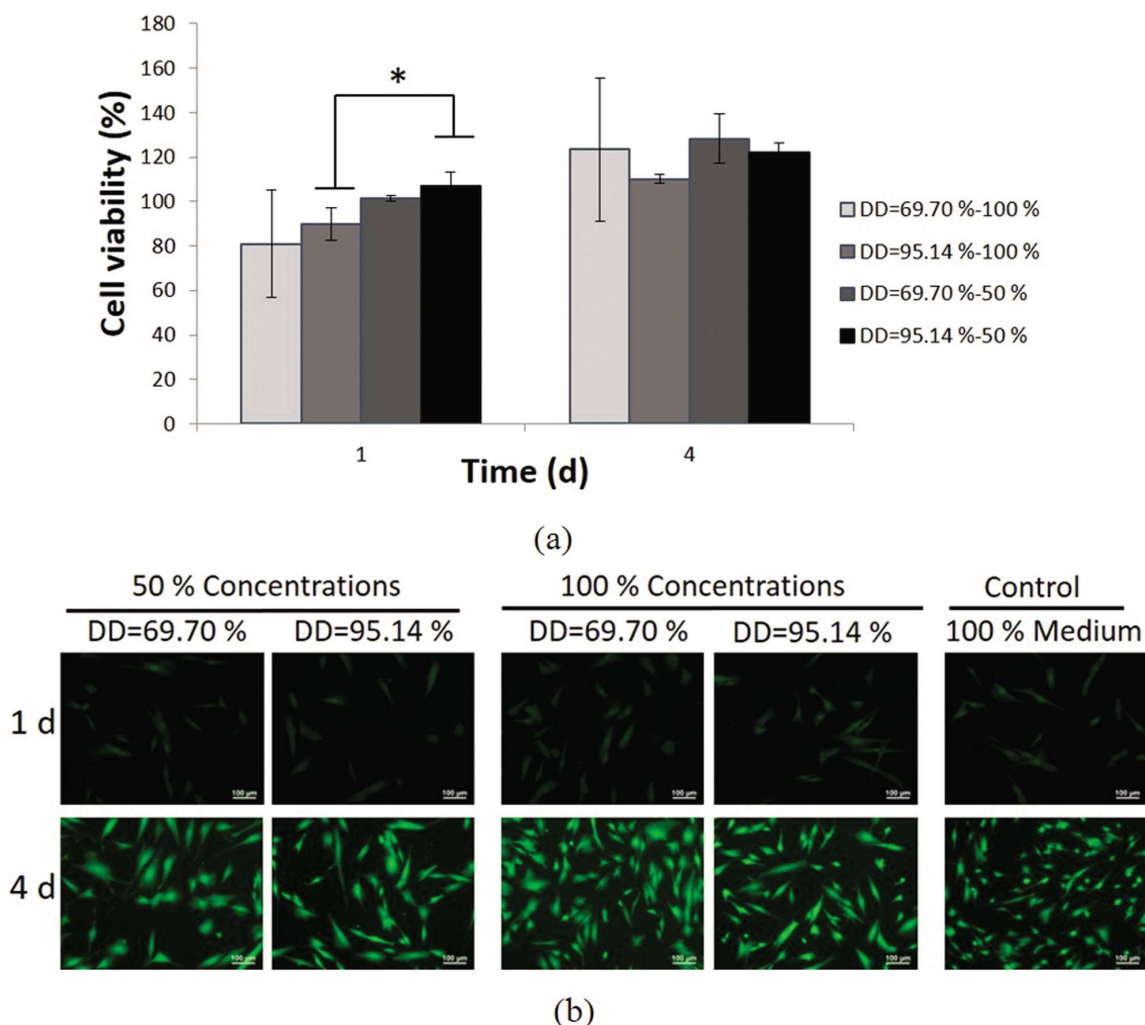


图 5 a)第 1 天和第 4 天,成纤维细胞在不同脱乙酰度壳聚糖海绵浸提液中的相对增殖率;b)第 1 天和第 4 天成纤维细胞在不同脱乙酰度壳聚糖海绵浸提液中的死活染色(绿色:活细胞,红色:死细胞,bar:100 μ m)

Fig. 5 a) Relative growth rate of human fibroblast (HF) cultured in different chitosan sponges leaching solution at 1st and 4th Day, respectively; b) Live & Dead staining of HF in different chitosan sponges leaching solution at 1st and 4th day (Green: live cells, Red: dead cells, Bar: 100 μ m)

Note: Data were expressed as $M \pm S$, $n=3$, $*P<0.05$, "": leaching solution- 50 % compared with leaching solution-100 % of 95.14 % deacetylated degree at 1 day

3 讨论

目前,市场上可吸收止血敷料种类繁多,如止血明胶、纤维蛋白、医用胶原海绵、氨基丙烯酸类止血胶以及多糖止血材料等^[12]。但是在临床应用中,止血明胶、纤维蛋白、医用胶原海绵等止血敷料具有动物源性,存在较高的潜在使用风险^[13],氨基丙烯酸类降解过程中会释放出有毒的物质如甲醛和氰等,引起炎症反应造成伤口愈合延迟^[14]。由于以上几种止血敷料在使用过程中具有较大的安全隐患,所以在临床上受到一定的限制。

多糖类止血材料是天然存在的高分子材料,具有易降解、生物相容性好、来源丰富等优势,是当今止血领域的研究热点^[15]。目前,纤维素、淀粉和壳聚糖是多糖类止血材料的三大主要类别,它们的止血原理也各不相同。纤维素主要是封堵伤口部位的毛细血管破裂口而发挥物理止血作用,淀粉类主要是吸水膨胀吸附有形成分,形成血凝块而发挥物理止血作用。壳聚糖是从虾蟹壳或真菌中提取出来的一种天然高分子物质,由于壳聚糖分子中含有活泼的阳离子基团 $-NH_2$, 它可以与血液中红细

胞以及血小板发生交联反应形成血凝块,从而不依赖于机体凝血因子达到止血作用。而且壳聚糖本身具有较好的生物相容性、抗菌性以及促进伤口愈合和抗炎作用,所以在伤口止血和愈合方面具有无可比拟的优势^[16]。

本研究制备的壳聚糖海绵具有独特的层状多孔结构(图 1),它与常见的多孔网状结构有明显差别。遇到水分或血液时可以在短时间内通过逐层吸水而迅速膨胀,此时对创伤表面会产生负压。研究表明具有负压吸附作用的止血敷料可以吸收伤口周围过多的体液和碎片,同时又可以保持湿润的愈合环境以促进肉芽组织的形成,最终达到伤口愈合^[17]。本研究中的壳聚糖海绵具有快速吸水膨胀能力,脱乙酰度 95.14 %的壳聚糖制备的止血海绵,其膨胀率可以达到自身体积的 10 倍以上,所以在盆腔或其他腔隙出血部位可以通过膨胀而堵塞出血部位快速止血。

传统制备壳聚糖海绵的方法中,大多需要加入交联剂以增强海绵的力学性能,但残留的交联剂有一定毒性,对其使用会造成影响^[18]。本研究中制备的壳聚糖海绵无需任何交联处理,

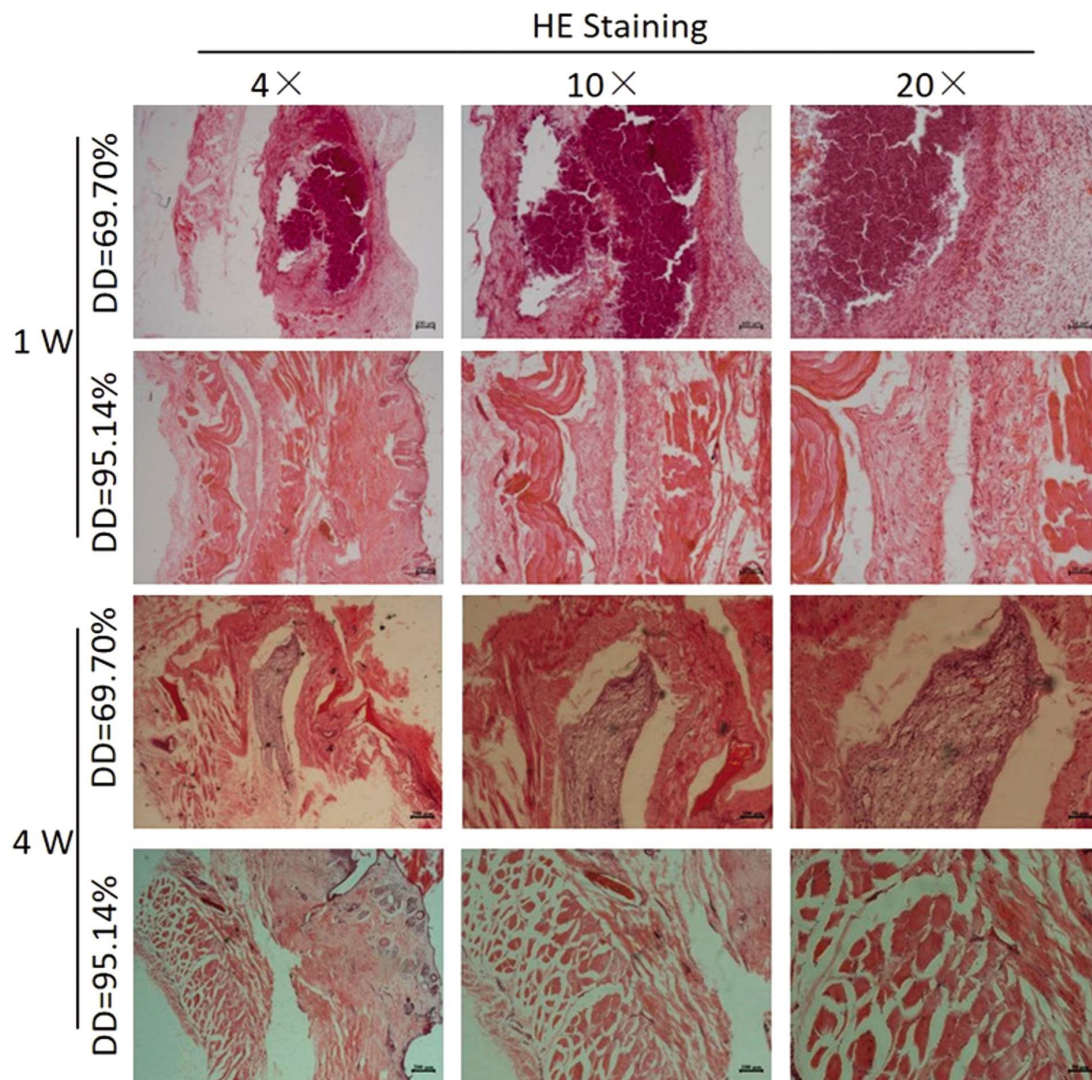


图 6 不同脱乙酰度壳聚糖海绵皮下移植 1 周、4 周时的 HE 染色(4×、10×、20×)

Fig. 6 HE staining of the chitosan sponges implanted in rabbit subcutaneous tissue at 1 week and 4 weeks (4×, 10×, 20×)

而且具有较高的机械性能,其拉伸强度高达 10 N 以上(图 3)。另外,壳聚糖止血海绵的拉伸强度随脱乙酰度增加而增加,这可能与壳聚糖原料有关,低脱乙酰度的壳聚糖原料中含有大量的酰胺 II 键,而高脱乙酰度的壳聚糖则暴露出大量的氨基(图 2),当冻干后的壳聚糖海绵遇到碱后会发生收缩,最后得到的壳聚糖海绵结构就更为致密,所以拉伸强度也就越高。

通过生物学实验对壳聚糖海绵的生物相容性进行分析。体外细胞毒性结果表明(图 5-a)第 1 天时,100 %浓度的壳聚糖海绵浸提液对成纤维细胞的增殖有轻微的影响,随着脱乙酰度的增加,成纤维细胞的相对增殖率分别为 80.8 %和 89.9 %;但当培养到第 4 天时,所有实验组中成纤维细胞的相对增殖率已经超过 100 %,且不同组细胞的细胞相对增殖率无显著性差异,说明壳聚糖海绵浸提液对细胞的生长起促进作用,尤其是 50 %浓度组在第 4 天时相对增殖率已经达到 120 %以上。动物体皮内刺激实验结果(图 4)表明低脱乙酰度(69.70 %)的壳聚糖海绵浸提液皮下注射 24 h 后有轻微的红斑出现,高脱乙酰度(95.14 %)壳聚糖海绵则无明显反应。HE 染色结果(图 6)表明低脱乙酰度(69.70 %)壳聚糖海绵皮下移植 7 天后有明显的炎症反应,而高脱乙酰度(95.14 %)壳聚糖海绵无明显炎症反应。

这可能与壳聚糖分子中氨基含量有关。研究表明^[19-21]壳聚糖的脱乙酰度越高(氨基越多)就有利于细胞的粘附生长以及促进组织再生修复,这与我们的实验结果相一致。

综上所述,本研究制备的壳聚糖海绵具有良好的理化性质,具有快速吸水膨胀的能力,同时采用高脱乙酰度壳聚糖制备的止血海绵具有优良的生物相容性,在临床外科手术止血特别是腔隙止血方面具有较为广阔的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Alam HB, Burris D, Dacorta JA. Hemorrhage control in the battlefield: role of new hemostatic agents[J]. Military Medicine, 2005, 170: 1-7
- [2] Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives [J]. Chem Rev, 2004, 104 (12): 6017-6084
- [3] Millner RW, Lockhart AS, Bird H, et al. A new hemostatic agent: initial life-saving experience with Celox (chitosan) in cardiothoracic surgery[J]. Ann Thorac Surg, 2009, 87(2): 13-14
- [4] Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences[J]. Adv Polym Sci, 2005, 186: 151-209
- [5] 郭苗苗,浦金辉,徐丹,等.壳聚糖基快速止血材料的研究进展[J].中国医院药学杂志, 2012, 32(1): 49-51

- Guo Miao-miao, Pu Jin-hui, Xu Dan, et al. Research progress of chitosan in rapid hemostatic materials [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2012, 32(1): 49-51
- [6] Devlin JJ, Kircher S, Kozen BG, et al. Comparison of ChitoFlex(R), CELOX, and QuikClot(R) in control of hemorrhage[J]. J Emerg Med, 2011, 41(3): 237-245
- [7] 商庆新,金箭飞,易志强.具有吸水膨胀性能的羧甲基壳聚糖海绵及制法和用途[P].中国: 200510024503. 3, 2005-03-21
Shang Qing-xin, Jin Jian-fei, Yi Zhi-qiang. Preparation method and use of carboxymethyl chitosan sponge with water absorption and expansion property[P]. China: 200510024503. 3, 2005-03-21
- [8] 吕中,陈嵘,高婧婷,等.一种具有弹性的多孔壳聚糖海绵的制备方法[P].中国: 201410482241. 4, 2014- 09-19
Lv Zhong, Chen Rong, Gao Jing-ting, et al. A method for preparing porous chitosan sponge with elasticity [P]. China: 201410482241. 4, 2014- 09-19
- [9] 周月,宋炜,樊李红.一种羧甲基壳聚糖/聚乙烯醇复合海绵及其制备方法[P].中国: 200910063838. 4, 2009-09-04
Zhou Yue, Song Wei, Fan Li-hong. A method for preparing carboxymethyl chitosan/ polyvinyl alcohol composite sponge[P]. China: 200910063838. 4, 2009-09-04
- [10] GB/ T 16886. 10- 2000 / ISO10993- 10: 1995 医疗器械生物学评价 - 第 10 部分:刺激与迟发型超敏反应试验
GB/ T 16886. 10- 2000/ ISO 10993- 10: 1995 Biological evaluation of medical devices--Part 10: Test for irritation and sensitization
- [11] GB/ T 16886. 5- 2003/ ISO 10993- 5: 1999 医疗器械生物学评价 - 第 5 部分:体外细胞毒性试验
GB/ T 16886. 5- 2003/ ISO 10993- 5: 1999 Biological evaluation of medical devices-- Part 5: Test for in vitro cytotoxicity
- [12] Emilia M, Luca S, Francesca B, et al. Topical hemostatic agents in surgical practice[J]. Transfus Apher Sci, 2011, 45(3): 305-311
- [13] Kim IY, Eichel L, Edwards R, et al. Effects of commonly used hemostatic agents on the porcine collecting system[J]. J Endourol, 2007, 21 (6): 652-654
- [14] 张少峰,洪加源.生物医用可吸收止血材料的研究与临床应用[J].中国组织工程研究, 2012, 16(21): 3941-3944
Zhang Shao-feng, Hong Jia-yuan. Research and clinical application of biomedical absorbable hemostatic materials[J]. Journal of Tissue Engineering Research, 2010, 14(21): 3941-3944
- [15] 熊绪琼,梅昕,马凤森.多糖类可吸收止血材料的研究进展[J].中华创伤杂志, 2015, 31(6): 571-574
Xiong Xu-qiong, Mei Xin, Ma Feng-sen. Research progress of polysaccharide absorbable hemostatic materials[J]. Journal of Trauma, 2015, 31(6): 571-574
- [16] Janvikul W, Uppanan P, Thavornnyutikarn B, et al. In vitro comparative hemostatic studies of chitin, chitosan, and their derivatives [J]. J Appl Polym Sci, 2006, 102(1): 445-451
- [17] Borgquist O, Ingemansson R, Malmso M. Wound edge microvascular blood flow during negative-pressure wound therapy: examining the effects of pressures from -10 to -175 mmHg [J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 125(2): 502-509
- [18] 陈煜,张明明,王东旭,等.聚乙烯醇/壳聚糖互穿聚合物海绵的制备及应用探索[J].高分子材料科学与工程, 2011, 27(1): 150-153
Chen Yu, Zhang Ming-ming, Wang Dong-xu, et al. Preparation and Application of Poly (Vinyl Alcohol)-Chitosan Interpenetrating Polymer Sponge [J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2011, 27 (1): 150-153
- [19] 郑磊,崔慧斐.不同分子量和脱乙酰度壳聚糖用作组织工程材料的性质评价[J].中国生化药物杂志, 2009, 30(2): 106-110
Zheng Lei, Cui Hui-fei. Characterization of Chitosans with different molecular weights and deacetylation degrees used as tissue engineering materials [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2009, 30(2): 106-110
- [20] 姚子昂,吴海歌,韩宝琴,等.不同脱乙酰度对壳聚糖膜与角膜基质细胞相容性的影响[J].生物医学工程学杂志, 2006, 23(4): 800-804
Yao Zi-ang, Wu Hai-ge, Han Bao-qin, et al. The Effect of the Degree of Deacetylation of Chitosan on the Biocompatibility of Chitosan Membrane with Corneal Stromal Cells [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2006, 23(4): 800-804
- [21] Hidaka Y, Ito M, Mori K, et al. Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 46 (3): 418-423