



一种载药壳聚糖抗菌止血海绵的制备及其性能研究*

周元植^{1,2,3}, 卢雯⁴, 杨倩倩⁵, 许昭¹, 李健军^{1Δ}

1. 西安交通大学化学学院(西安710049); 2. 西安交通大学第一附属医院消化内科(西安710061);

3. 陕西省消化系统疾病(肿瘤方向)临床医学研究中心(西安710061); 4. 西安交通大学第一附属医院精神心理卫生科(西安710061);

5. 西安交通大学医学部第一临床医学院(西安710061)

【摘要】 目的 本研究拟制备一种新型壳聚糖抗菌止血海绵(novel chitosan antibacterial hemostatic sponge, NCAHS),并对其材料学特性和生物学性能进行评价。方法 以壳聚糖为海绵基材,添加不同比例三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, STPP)、甘油、酚磺乙胺,并使用冷冻干燥法制备海绵,以全凝血指数(BCI)为指标筛选壳聚糖及添加物的最佳浓度获得的止血海绵;在止血海绵中负载盐酸环丙沙星的玉米醇溶蛋白/碳酸钙复合微球(Zein/CaCO₃)制备得到NCAHS。采用扫描电镜观察NCAHS的微观形貌、孔隙率,并检测其吸水率、体外对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的抗菌率、体外凝血性能、血液相容性。使用兔肝损伤和兔耳动脉损伤出血模型评价止血效果,以市售止血海绵(commercial hemostatic sponge, CHS)作为对照。参照医疗器械生物学评价国家标准检测NCAHS浸提液的细胞毒性,动物皮肤刺激性和体内急性毒性等体内生物相容性。结果 以1.5%壳聚糖(质量浓度)、0.01%STPP(质量浓度)、体积分数0%甘油(不添加甘油)、体积分数0.15%酚磺乙胺、Zein和CaCO₃质量混合比为5:1、Zein终质量浓度为2.5 g/L、乙醇终浓度为17.5%(体积分数)制备所得NCAHS细密均匀,具有蜂窝状多孔结构,孔径约200 μm,其BCI数值最低。NCAHS吸水率[(2362.16±201.15)% vs. (1102.56±91.79)%]、体外凝血性能(31.338% vs. 1.591%)均优于CHS(*P*<0.01)。在体内兔耳动脉出血模型[(36.00±13.42) s vs. (80.00±17.32) s]和兔肝脏出血模型[(30.00±0) s vs. (70.00±17.32) s]中,NCAHS止血时间均短于CHS(*P*<0.01)。NCAHS对*S. aureus*和*E. coli*具有明显的抑制能力,且NCAHS体内外生物相容性良好。结论 NCAHS是一种具有优异抗菌性能和止血效果且生物相容性良好的复合海绵,可用于临床推广。

【关键词】 载药微球 壳聚糖 止血海绵 抗菌 生物相容性

Preparation and Performance Study of a Novel Antibacterial Hemostatic Chitosan Sponge ZHOU Yuanzhi^{1,2,3}, LU Wen⁴, YANG Qianqian⁵, XU Zhao¹, LI Jianjun^{1Δ}. 1. School of Chemistry, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; 2. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3. Clinical Medical Research Center for Digestive Diseases of Shaanxi Province (Oncology), Xi'an 710061, China; 4. Department of Psychiatry, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 5. The First Clinical School of Medicine, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, China

Δ Corresponding author, E-mail: lijianjun@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To create a novel chitosan antibacterial hemostatic sponge (NCAHS) and to evaluate its material and biological properties. **Methods** Chitosan, a polysaccharide, was used as the sponge substrate and different proportions of sodium tripolyphosphate (STPP), glycerol, and phenol sulfonylethylamine were added to prepare the sponges through the freeze-drying method. The whole-blood coagulation index (BCI) was used as the screening criterion to determine the optimal concentrations of chitosan and the other additives and the hemostatic sponges were prepared accordingly. Zein/calcium carbonate (Zein/CaCO₃) composite microspheres loaded with ciprofloxacin hydrochloride were prepared and added to the hemostatic sponges to obtain NCAHS. Scanning electron microscope was used to observe the microscopic morphology and porosity of the NCAHS. The water absorption rate, *in vitro* antibacterial susceptibility rate against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*), *in vitro* coagulation performance, and hemocompatibility of NCAHS were examined. The coagulation performance of NCAHS was evaluated by using rabbit liver injury and rabbit auricular artery hemorrhage ear models and commercial hemostatic sponge (CHS) was used as a control. The *in vivo* biocompatibility, including such aspects as cytotoxicity, skin irritation in animals, and acute *in vivo* toxicity, of the NCAHS extracts was examined by using as a reference the national standards for biological evaluation of medical devices. **Results** The NCAHS prepared with 1.5% chitosan (W/V), 0.01% STPP (W/V), 0% glycerol (V/V),

* 大学生创新训练项目(No.202110698019)、中国富硒产业研究院项目(No.2018FXZX04-15)和中国博士后基金项目(No.2014M562394)资助

Δ 通信作者, E-mail: lijianjun@xjtu.edu.cn

出版日期: 2024-01-20

0.15% phenol-sulfonyl-ethylamine (V/V), Zein and CaCO_3 at the mixing ratio of 5 : 1 (W/W), Zein at the final mass concentration of 2.5 g/L, and ethanol at the final concentration of 17.5% (V/V) were fine and homogeneous, possessing a honeycomb-like porous structure with a pore size of about 200 μm . The NCAHS thus prepared had the lowest BCI value. The water absorption ($[2362.16 \pm 201.15] \% \text{ vs. } [1102.56 \pm 91.79] \%$) and *in vitro* coagulation performance (31.338% vs. 1.591%) of NCAHS were significantly better than those of CHS ($P < 0.01$). Tests with the *in vivo* auricular artery hemorrhage model ($[36.00 \pm 13.42] \text{ s vs. } [80.00 \pm 17.32] \text{ s}$) and rabbit liver bleeding model ($[30.00 \pm 0] \text{ s vs. } [70.00 \pm 17.32] \text{ s}$) showed that the hemostasis time of NCAHS was significantly shorter than that of CHS ($P < 0.01$). NCAHS had significant inhibitory ability against *S. aureus* and *E. coli*. In addition, NCAHS showed good *in vitro* and *in vivo* biocompatibility. **Conclusion** NCAHS is a composite sponge that shows excellent antimicrobial properties, hemostatic effect, and biocompatibility. Therefore, its extensive application in clinical settings is warranted.

【Key words】 Drug-loaded microspheres Chitosan Hemostatic sponge Antibacterial property Biocompatibility

战争、交通事故、外科手术等常不受控制的失血可危及生命。临床上常用的纱布、绷带等传统止血材料,或压迫、缝扎、电凝等常规止血方法无法控制大规模出血^[1]。同时,临床上常因为伤口大规模出血并发细菌感染。因此,开发制备兼具抗菌及止血效果的复合海绵有利于预防伤口感染、促进创伤愈合。

壳聚糖是一种天然的止血材料,来源广泛,其不仅具有止血性强、促进伤口愈合、抑制瘢痕形成等功能,而且具有天然抑菌、可降解、无毒等优点^[2-4]。虽然壳聚糖分子表面所带的正电荷能使止血材料更易粘附于黏膜表面,但由于其水溶性、机械性能较差,用于大面积出血创面止血效果并不理想^[5-6]。而且不同来源、相对分子质量大小、聚合度以及环境的pH值等都影响其抗菌性能的发挥^[7-11]。因此,如何提高壳聚糖材料机械性能、止血效果以及抗菌活性成为目前的研究热点。

玉米醇溶蛋白/碳酸钙复合微球(Zein/ CaCO_3)是一种以玉米醇溶蛋白和碳酸钙为原料,通过溶剂-非溶剂相分离法制备而成的高分子/无机物杂合体微球。其内部为多孔结构,具有良好的药物负载能力、生物相容性以及生物可降解性,适合作为药物载体^[12]。盐酸环丙沙星是第三代喹诺酮类抗菌药物,对多种革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有抗菌活性,其水溶性好,可在壳聚糖溶液中均匀分散^[13]。酚磺乙胺是一种常见止血药,可通过降低血管通透性、收缩血管、促进血小板活化等机制实现止血作用^[14]。因此,壳聚糖海绵添加酚磺乙胺有望增强其止血效果。

本文以壳聚糖为基材,在其溶液中添加酚磺乙胺、三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, STPP)、塑化剂甘油以及负载抗菌药物盐酸环丙沙星的Zein/ CaCO_3 ,用冷冻干燥法制成新型壳聚糖抗菌止血海绵(novel chitosan antibacterial hemostatic sponge, NCAHS),并对其材料学

特性和生物学性能进行了评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物、菌株和细胞

10只SPF级KM小鼠,雌雄不拘,体质量20~25 g〔西安交通大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(陕)2018-001〕,18只SPF级新西兰大白兔,雌雄不拘,体质量2.0~2.5 kg(西安交通大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(陕)2018-001),金黄色葡萄球菌ATCC25923、大肠杆菌ATCC25922(西安交通大学病原微生物与免疫学系),L929小鼠成纤维细胞(西安交通大学基础医学院癌症研究所)。本研究严格遵守西安交通大学医学部生物医学伦理委员会要求(伦理备案号:NO.XJTULAC2021-1837)。

1.1.2 主要材料和试剂

壳聚糖(Sigma,美国)、碳酸钙(西安化学试剂厂,中国)、甘油(西安蓝翔化工,中国)、STPP(生工生物,中国)、酚磺乙胺注射液(山东方明药业集团股份有限公司,中国)、玉米醇溶蛋白(国药集团化学试剂有限公司,中国)、盐酸环丙沙星(上海研生生化试剂有限公司,中国)、市售止血海绵(广州市快康医疗器械有限公司,中国)。

1.1.3 主要仪器和设备

冷冻干燥机(青岛永合创信电子科技有限公司,中国)、扫描电子显微镜(日本日立公司,日本)、高效液相色谱仪(岛津制作所,日本)。

1.2 方法

1.2.1 NCAHS的制备

1.2.1.1 壳聚糖海绵的制备及条件优化

壳聚糖质量浓度分别为1%、2%、3%,STPP质量浓度分别为0.0025%、0.005%、0.01%,甘油体积分数分别为

0%、0.4%、1.2%，酚磺乙胺体积分数分别为0.25%、0.5%、0.75%，按正交试验设计方案设置9个组合。将不同浓度壳聚糖溶解于1.2%的醋酸溶液后依次加入相应浓度的STPP溶液、甘油和酚磺乙胺注射液，同时加以搅拌，随后将溶液置于-60℃冷阱中预冻4 h，真空冷冻干燥36 h得到9组壳聚糖海绵。采用全血凝血指数(blood clotting index, BCI)评价壳聚糖海绵^[15]，得到壳聚糖、STPP、甘油、酚磺乙胺浓度对海绵止血性能影响的主次顺序和目前最优组合，然后按此顺序逐一在各因素最优组合浓度附近设置梯度，确定壳聚糖、酚磺乙胺、STPP和甘油的最佳浓度。

1.2.1.2 NCAHS的制备及筛选

参照文献所述方法^[12]，将含有CaCl₂的玉米醇溶蛋白(Zein)醇溶液缓慢加入Na₂CO₃溶液中，同时以500 r/min的速度搅拌，Zein和CaCO₃质量混合比分别为5:1、10:1、5:1，Zein终质量浓度分别为2.5 g/L、5.0 g/L、2.5 g/L，乙醇最终体积分数分别为8.75%、8.75%、17.5%。然后在3种溶液中各加入60 mg盐酸环丙沙星，继续搅拌3.25 h，在-60℃冷冻干燥为粉末状Zein/CaCO₃载药微球，将制备的3种载药微球分别编号为No.1、No.2和No.3。

分别称取3种载药微球0.0262 g、0.0352 g、0.0179 g，另称取6 mg盐酸环丙沙星，加入最佳配比的壳聚糖溶液中，搅拌0.5 h后-60℃预冻4 h，真空冷冻干燥36 h，制备获得3种NCAHS，对照海绵不使用载药微球，直接称取6 mg盐酸环丙沙星混入最佳配比的壳聚糖溶液中。

分别将制备的3种NCAHS和对照海绵完全浸泡于20 mL模拟体液(simulated body fluid, SBF)中，浸泡2、5、10、20、40、60、90、120、180、240、300 min时从管中抽取20 μL溶液，避光保存备用。使用高效液相色谱法分析4种海绵不同浸泡时间SBF中盐酸环丙沙星的浓度，绘制释药曲线，筛选最佳药物缓释作用的NCAHS用于后续研究。

1.2.2 NCAHS的表征及性能评价

1.2.2.1 扫描电镜表征海绵物理结构

分别对NCAHS和对照海绵进行干燥、喷金等处理，在扫描电镜下观察两组海绵的微形态结构以及微球在NCAHS中的分布形态及粘附位置。

1.2.2.2 吸水率检测

参照文献所述方法^[16]取一定质量NCAHS，记为W_{dry}，室温置入200 mL生理盐水中浸泡3 min后取出，于60°倾斜玻璃上静置1 min，质量记为W_{wet}，吸水率以(W_{wet}-W_{dry})/W_{dry}×100%计算，每组样品重复平行试验测量3次。以市售止血海绵(commercial hemostatic sponge, CHS)作为对照。

1.2.2.3 体外凝血性能测定

BCI值是评价止血材料止血性能的重要指标^[15]。按照文献^[15]的方法，将NCAHS样品裁剪成同等大小块状，滴加0.1 mL的新鲜抗凝血液，再滴加0.02 mL CaCl₂溶液(0.2 mol/L)，孵育5 min后，缓慢贴壁加入25 mL去离子水，轻轻震荡5 min，用分光光度计于545 nm处测定吸光度A_{样品}。空白对照组将0.1 mL新鲜抗凝血液加入25 mL去离子水中，测定吸光度A_{空白}。海绵的BCI以A_{样品}/A_{空白}×100%计算。每组3个平行样品，每个样品重复测量3次，取平均值，以CHS作为对照。

1.2.2.4 体内止血效果评价

取直径1 cm、高0.5 cm的圆柱形NCAHS和CHS，并取数张大小一致的纱布，记录样品和纱布总质量为W₁。在兔耳动脉损伤出血模型(rabbit auricular artery hemorrhage model, RAAHM)试验中，取6只新西兰大白兔，每只兔子随机一侧耳朵为试验组，另一侧耳朵为对照组。将动物麻醉后固定，耳部脱毛、消毒，采血针扎破耳动脉，自由出血10 s后用干纱布擦去耳朵表面血液，将海绵贴在出血处，并在海绵上放置一块纱布。用50 g砝码在纱布上方垂直按压出血点，每隔30 s观察出血情况，记录出血时间以及海绵与纱布总质量W₂。出血量以W₂-W₁计算得出。

在肝损伤出血模型中(rabbit liver hemorrhage model, RLHM)，取6只新西兰大白兔随机分为2组，每组3只，分别用NCAHS和CHS评价止血效果。将动物麻醉后固定，腹部备皮、消毒。开腹，暴露肝脏的左内侧叶，肝叶下铺垫生理盐水浸湿的纱布。在肝脏表面切开一个长1 cm、深0.5 cm的伤口，止血效果评价与RAAHM相同。

1.2.2.5 抗菌性能评价

取直径0.5 cm、高0.5 cm圆柱形NCAHS、未负载盐酸环丙沙星的壳聚糖止血海绵(control sponges)、CHS，经紫外线灭菌后分别置于生长有*S.aureus*和*E.coli*的培养平皿不同区域，海绵中滴加20 μL灭菌SBF后置于37℃培养箱24 h，观察NCAHS抗菌效果，以未负载盐酸环丙沙星的壳聚糖止血海绵(control sponges)、CHS为对照。

1.2.2.6 生物相容性测定

血液相容性：参照文献所述方法^[17]测定NCAHS血液相容性。取新鲜抗凝血0.8 mL，加1 mL生理盐水稀释。取直径1 cm、高0.5 cm的圆柱形NCAHS置于离心管中，NCAHS组和阴性对照组分别加入10 mL生理盐水，阳性对照组加入10 mL蒸馏水。将离心管置于37℃水浴中孵育0.5 h，每管加入0.2 mL稀释的新鲜抗凝血，37℃水浴中孵育1 h，2000 r/min离心5 min，取上清液在紫外分光光度计545 nm处测量吸光度(A)值。每组重复平行样测量3次。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}}) \times 100\% \quad (1)$$

细胞毒性评价: 参照中华人民共和国国家标准GB/T 16886.5—2017《医疗器械生物学评价第5部分: 体外细胞毒性试验》中MTT法检测NCAHS对L929小鼠成纤维细胞的毒性^[18]。用含10%胎牛血清(FBS)培养基浸提海绵, 浸提液用含10%FBS的培养基进行稀释, 以体积分数100%、46.8%、21.4%、10%的浸提液用于检测细胞毒性。

动物刺激试验: 参照中华人民共和国国家标准GB/T 16886.10—2017《医疗器械生物学评价 第10部分: 刺激与皮肤致敏试验》评价方法对NCAHS进行皮肤刺激性评估^[9]。

急性全身毒性试验: 本实验按照中华人民共和国国家标准GB/T 16886.11—2011《医疗器械生物学评价第11部分: 全身毒性试验》评价方法对NCAHS进行急性全身毒性评估^[20]。

1.2.3 统计学方法

使用SPSS 18.0、GraphPad Prism 8和Excel对数据进行统计学分析。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用Dunnett-*t*检验, 多组间比较采用ANOVA方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NCAHS的制备

2.1.1 壳聚糖及添加物最佳浓度筛选

BCI数值越低, 表明止血效果越好。按影响因素的主次顺序进行单因素分析, 结果发现, 不添加甘油, 体积分数0.15%酚磺乙胺、0.01%STPP、1.5%壳聚糖组合为壳聚糖海绵最佳制备条件(图1)。

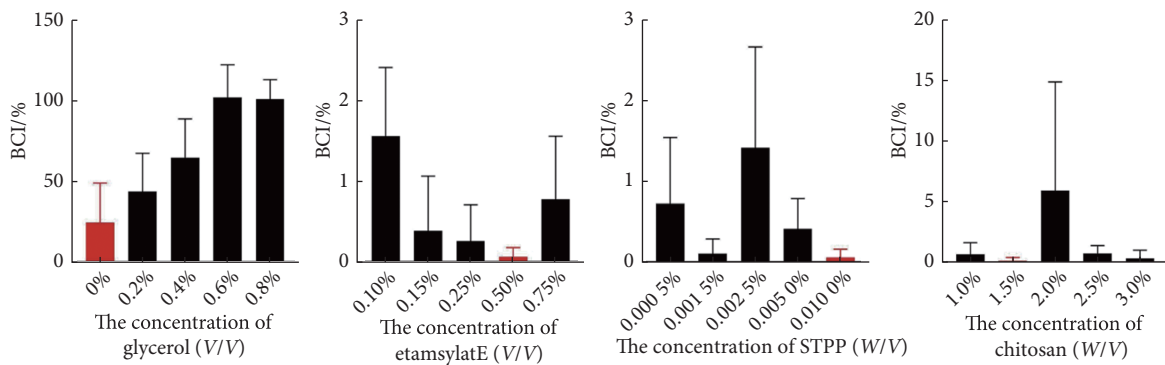


图 1 BCI检测不同条件制备的壳聚糖海绵 ($n=3$)

Fig 1 The BCI results of the chitosan sponges prepared under different conditions ($n=3$)

2.1.2 筛选载药微球

载药微球药物释放检测发现, 对照组在0.5 h内释药速率快, 0.5 h后进入平台期后不再释药。而3种NCAHS均可明显抑制药物在初期的突释(图2)。含No.1、No.2微球的海绵在0~2 h缓慢匀速地释药, 2 h后进入平台期。含

No.3微球的海绵0~5 h缓慢匀速释药, 表现出更好的药物缓释效果, 有利于血药浓度的维持, 故选用No.3微球制备NCAHS。制备所得NCAHS的大体外观如图3所示。

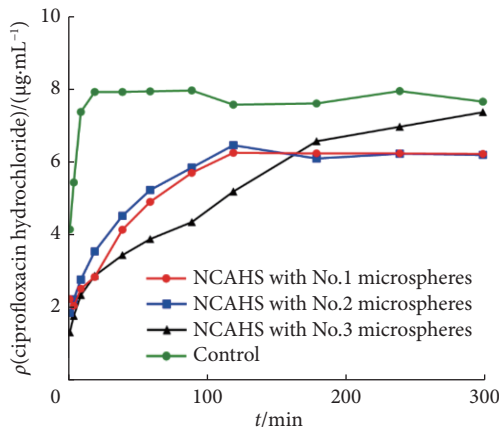


图 2 含不同载药微球NCAHS的释药曲线 ($n=3$)

Fig 2 The drug release curves of NCAHS containing different types of drug-loaded microspheres ($n=3$)



图 3 数码相机拍摄NCAHS大体外观

Fig 3 The general appearance of NCAHS captured by a digital camera

2.2 NCAHS表征及性能评价

2.2.1 NCAHS扫描电镜微形态观察

图4展示了NCAHS和无微球对照组海绵扫描电镜的微形态。可见海绵均为多孔结构, NCAHS的孔径在200 μm 左右。抗菌微球对海绵的多孔结构无明显影响,

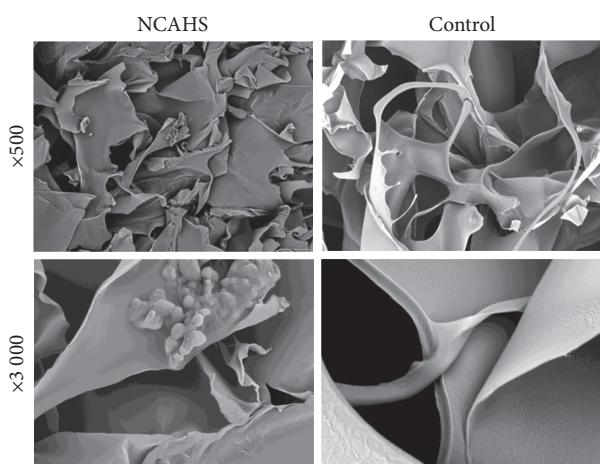


图 4 扫描电镜检测NCAHS微形态

Fig 4 The micromorphology of NCAHS captured by scanning electron microscope

微球聚集成团块粘附在海绵片层表面。多数团块状微球的直径为10~20 μm, 而单个微球的直径为0.5~2 μm。

2.2.2 NCAHS吸水率测定

NCAHS吸水后在远离液面的一侧保留着最初的性状, 机械强度较大, 靠近液体的一面形成了水凝胶状态, 可以紧贴创口。NCAHS吸水率为(2362.16±201.15)%, 明显高于CHS的吸水率(1102.56±91.79)%, 差异有统计学意义(P<0.001)。表明NCAHS具有良好的液体吸收性能。

2.2.3 NCAHS体外凝血效果评价

BCI检测发现, NCAHS基本能吸收所有血液, 海绵周围无明显红细胞溶出, 去离子水仍澄清透明; 而CHS有明显的红细胞溶出, 去离子水变成红色(图5)。CHS溶液BCI明显大于NCAHS(31.338% vs. 1.591%), 差异有统计学意义(P<0.001)。

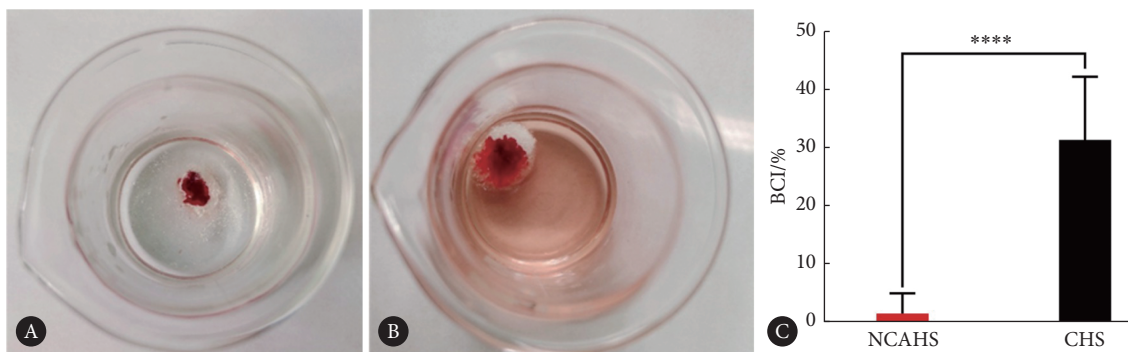


图 5 NCAHS体外凝血效果评价

Fig 5 Evaluation of *in vitro* coagulation performance of NCAHS

A, The *in vitro* coagulation effect of NCAHS. B, The *in vitro* coagulation effect of CHS. C, The bar chart of BCI determination of NCAHS and CHS. n=3. **** P<0.0001.

2.2.4 NCAHS体内止血效果评价

见表1。在RAAHM中, NCAHS时止血时间更短(P=0.007)且出血量更少(P=0.003)。在RLHM中, NCAHS时出血量更少, 差异有统计学意义(P=0.005), 止血时间与CHS相当(P=0.057), NCAHS体内止血效果优于CHS。

表 1 NCAHS在RAAHM和RLHM中的止血效果

Table 1 The hemostatic effect of NCAHS in RAAHM and RLHM

Model	n	NCAHS	CHS	P
RAAHM	6			
Hemostasis time/s		36.00±13.42	80.00±17.32	0.007
Amount of bleeding/g		0.064±0.026	0.257±0.067	0.003
RLHM	3			
Hemostasis time/s		30.00±0.00	70.00±17.32	0.057
Amount of bleeding/g		0.130±0.020	0.443±0.096	0.005

RAAHM: Rabbit auricular artery hemorrhage model; RLHM: Rabbit liver hemorrhage model.

2.2.5 NCAHS抗菌性能评价

结果(图6)显示, 未负载盐酸环丙沙星的壳聚糖止血海绵和CHS均无明显抑菌效果, 而NCAHS具有明显的抑菌效果, 对S.aureus的抑菌圈直径可达(27.17±1.17) mm, 对E.coli的抑菌圈直径可达(28.17±2.48) mm, 表现出良好的抗菌性能。

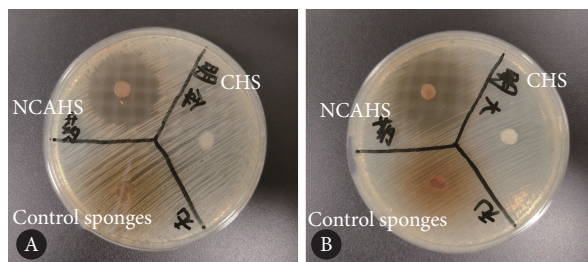


图 6 NCAHS对S.aureus (A) 和E.coli (B) 抗菌性能评价

Fig 6 Evaluation of antibacterial performance of NCAHS against S.aureus (A) and E.coli (B)

2.2.6 NCAHS生物相容性评价

2.2.6.1 NCAHS溶血率检测

NCAHS溶血率为(1.68±1.74)%,符合中华人民共和国国家标准GB/T 14233.2—2005《医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分:生物试验方法》对于生物材料溶血率的要求。

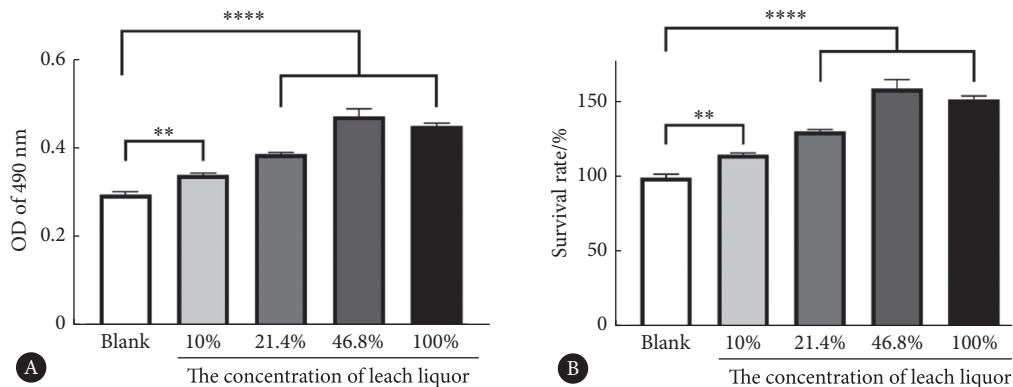


图7 NCAHS浸提液对L929小鼠成纤维细胞增殖的影响

Fig 7 Effect of NCAHS extract on the proliferation of L929 mouse fibroblasts.

A, The optical density (OD) value of each group. B, The survival rate of each group. n=3. ** P<0.01; **** P<0.0001.

2.2.6.3 动物刺激试验

动物刺激试验结果发现,对照组2个样品以及NCAHS组1个样品在24 h出现明显红斑,48 h红斑减轻,72 h红斑消退,其余样品均无明显异常。NCAHS组和对照组平均原发刺激指数分别为0.083和0.167,无明显皮肤刺激性。

2.2.6.4 急性全身毒性试验

急性全身毒性试验中,各组动物均未见明显的毒性表现。试验期间两组小鼠体质量均增加,组间无明显差异。

3 讨论

本研究以壳聚糖为基材,添加STPP、酚磺乙胺以及负载盐酸环丙沙星的Zein/CaCO₃微球,制备了一种新型壳聚糖抗菌止血海绵(NCAHS),并对其物理特性、止血性能、抗菌性能和生物相容性进行了检测和评价。

研究发现,NCAHS具有较强的吸液能力,可能与其均质的多孔结构有关。NCAHS孔径适宜,有足够的吸液空间,同时相互连接的孔-孔结构增加了材料的比表面积,加快了吸液速度^[21]。NCAHS的BCI(1.591%)明显低于文献报道的多功能海藻酸钠海绵BCI(20%左右)细菌纤维素/明胶复合止血海绵BCI(≥10.3%)^[22-23],表明NCAHS具有良好的促进血液凝固效果,其可能与海绵中的壳聚糖带正电,在血液中可形成NH³⁺粘附血小板,且海绵孔与孔相通,容易吸附凝集红细胞,富集凝血因子,激活凝血通路有关^[24]。在RAAHM中,NCAHS止血时间(36 s)

2.2.6.2 NCAHS细胞毒性检测

用MTT法检测NCAHS对L929小鼠成纤维细胞的毒性,结果发现,不同浓度浸提液细胞OD值均大于空白对照组(P<0.01),细胞增殖率均高于空白对照组(P<0.01),提示NCAHS无明显的细胞毒性,可能具有潜在的促进细胞增殖作用(图7)。

显著小于既往相关研究中的时间(56.28 s^[25]、52.58 s^[26]和46.8 s^[27])。在RLHM中,NCAHS止血时间(30 s)同样小于文献报道(76.53 s^[26]和39.3 s^[27]);使用NCAHS时,出血量也明显较少^[28]。以上结果表明,NCAHS具有较强的促止血性能,可减少出血量,缩短出血时间。

细菌感染会影响伤口愈合,赋予止血材料长效抑菌功能有助于促进创面修复。NCAHS中的Zein/CaCO₃对盐酸环丙沙星有缓释作用,实现长效抑菌。NCAHS可对金黄色葡萄球菌与大肠杆菌产生明显的抑菌效果,与文献报道无明显差异^[23]。

NCAHS具有较低的溶血率(1.68%),符合国家标准。细胞毒性测试结果表明,不同浓度浸提液对细胞无明显毒性作用,并且浸提液中细胞增殖水平明显高于对照组,表明NCAHS可能有促进组织细胞生长,促进伤口愈合的潜能,这可能与NCAHS中的壳聚糖成分有关。研究表明^[29],壳聚糖可促进伤口愈合,其机制可能是壳聚糖在创面被降解为N-乙酰氨基葡萄糖,被表皮细胞吸收,从而维持表皮细胞的生长和繁殖^[30];此外,壳聚糖可促进创面细胞外基质合成,增强创面抗拉力性能,促进创面愈合^[31]。同时,NCAHS良好的抗菌效果也会为伤口愈合创造良好条件。动物实验结果显示,NCAHS无明显皮肤刺激性,无明显的急性全身毒性。

综上,本研究制备的NCAHS具有良好的理化性质、优异的止血效果和抗菌性能,且生物相容性良好,在创伤

和临床外科手术止血方面具有巨大应用潜力。

* * *

作者贡献声明 周元植负责论文构思、数据审编、正式分析、经费获取、调查研究、研究方法、软件、可视化和初稿写作,卢雯负责数据审编、正式分析、经费获取、调查研究、研究方法、软件、验证、可视化和初稿写作,杨倩倩负责数据审编、正式分析、调查研究、软件、可视化和初稿写作,许昭负责论文构思、经费获取、研究方法、研究项目管理、提供资源、监督指导、验证、审读与编辑写作,李健军负责经费获取、研究项目管理、提供资源、监督指导、审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution ZHOU Yuanzhi is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, software, visualization, and writing--original draft. LU Wen is responsible for data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, software, validation, visualization, and writing--original draft. YANG Qianqian is responsible for data curation, formal analysis, investigation, software, visualization, and writing--original draft. XU Zhao is responsible for conceptualization, funding acquisition, methodology, project administration, resources, supervision, validation, writing--review and editing. LI Jianjun is responsible for funding acquisition, project administration, resources, supervision, writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] 温浩, 陈启龙. 止血材料在普通外科的应用. 中国实用外科杂志, 2006(1): 33-35. doi: 10.3321/j.issn:1005-2208.2006.01.013.
WEN H, CHEN Q L. Application of hemostatic materials in general surgery. Chin J Pract Surg, 2006(1): 33-35. doi: 10.3321/j.issn:1005-2208.2006.01.013.
- [2] 于美丽, 杜智. 可吸收止血材料的研究现状及临床应用. 北京生物医学工程, 2008(2): 208-211. doi: 10.3969/j.issn.1002-3208.2008.02.026.
YU M L, DU Z. The research status and clinical application of absorbable hemostatic agent. Beijing Biomed Eng, 2008(2): 208-211. doi: 10.3969/j.issn.1002-3208.2008.02.026.
- [3] MALETTE W G, QUIGLEY H J, GAINES R D, *et al.* Chitosan: a new hemostatic. Ann Thorac Surg, 1983, 36(1): 55-58. doi: 10.1016/s0003-4975(10)60649-2.
- [4] LIU Y, CHENG X J, DANG Q F, *et al.* Preparation and evaluation of oleoyl-carboxymethyl-chitosan (OCMCS) nanoparticles as oral protein carriers. J Mater Sci Mater Med, 2012, 23(2): 375-384. doi: 10.1007/s10856-011-4470-9.
- [5] 黄彧琛. N-烷基化改性壳聚糖应用于止血及其止血机理研究. 广东: 暨南大学, 2015.
HUANG Y C. Application for hemostasis of N-alkylated chitosan and their mechanism research. Guangdong: Jinan University, 2015.
- [6] 张少锋, 洪加源. 医用生物可吸收止血材料的研究现状与临床应用. 中国组织工程研究, 2012, 16(21): 3941-3944. doi: 10.3969/j.issn.1673-8225.2012.21.033.
ZHANG S F, HONG J Y. Research status and clinical application of biomedical absorbable hemostatic materials. Chin J Tissue Eng Res, 2012, 16(21): 3941-3944. doi: 10.3969/j.issn.1673-8225.2012.21.033.
- [7] BARBOSA H F G, ATTJIOU M, LEITAO A, *et al.* Characterization, solubility and biological activity of amphiphilic biopolymeric Schiff bases synthesized using chitosans. Carbohydr Polym, 2019, 220: 1-11. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.037.
- [8] BYUN S M, NO H K, HONG J H, *et al.* Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells. Int J Food Sci Technol, 2013, 48(1): 136-142. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03169.x.
- [9] YOUNES I, SELLIMI S, RINAUDO M, *et al.* Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. Int J Food Microbiol, 2014, 185: 57-63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029.
- [10] DIMZON I K D, EBERT J, KNEPPER T P. The interaction of chitosan and olive oil: Effects of degree of deacetylation and degree of polymerization. Carbohydr Polym, 2013, 92(1): 564-570. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.09.035.
- [11] HOSSEINNEJAD M, JAFARI S M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. Int J Biol Macromol, 2016, 85: 467-475. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.
- [12] 裴菲. 玉米醇溶蛋白复合微粒的制备及其药物释放性能研究. 甘肃: 西北师范大学, 2013.
PEI F. Synthesis and release behavior of Zein-based composite microparticles. Gansu: Northwest Normal University, 2013.
- [13] 王萌, 高卫华. 盐酸环丙沙星壳聚糖纳米粒原位凝胶的制备与评价. 药物评价研究, 2022, 45(11): 2263-2268. doi: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.11.013.
WANG M, GAO W H. Preparation and evaluation of ciprofloxacin hydrochloride chitosan nanoparticles *in situ* gels. Drug Eval Res, 2022, 45(11): 2263-2268. doi: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.11.013.
- [14] 肖首垚. 酚磺乙胺联合生长抑素对急性上消化道出血的效果及患者 Rockall 评分的影响. 中外医学研究, 2022, 20(35): 102-106. doi: 10.14033/j.cnki.cfmr.2022.35.025.
XIAO S C. Effect of etamsylate combined with somatostatin on acute upper gastrointestinal bleeding and its influence on patients' Rockall score. Chin Foreign Med Res, 2022, 20(35): 102-106. doi: 10.14033/j.cnki.cfmr.2022.35.025.
- [15] SHIH M F, SHAU M D, CHANG M Y, *et al.* Platelet adsorption and hemolytic properties of liquid crystal/composite polymers. Int J Pharm, 2006, 327(1-2): 117-125. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.07.043.
- [16] 王超. 壳聚糖/海藻酸盐/白芨多糖复合止血材料的制备及其性能研究. 广东: 暨南大学, 2017.

- WANG C. Preparation and performance studies of chitosan/alginate/bletilla striata polysaccharide compound hemostatic materials. Guangdong: Jinan University, 2017.
- [17] 张升, 陈云祥, 陈颖, 等. 红细胞分散对奥沙利铂体外溶血试验的影响研究. 中国医院药学杂志, 2021, 41(20): 2061–2065. doi: 10.13286/j.1001-5213.2021.20.04.
- ZHANG S, CHEN Y X, CHEN Y, *et al.* Effect of dispersion of erythrocyte on oxaliplatin *in vitro* hemolysis test. Chin J Hosp Pharm, 2021, 41(20): 2061–2065. doi: 10.13286/j.1001-5213.2021.20.04.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 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—2017. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity: GB/T 16886.5—2017. Beijing: Standard Press of China, 2017.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价第 10 部分 刺激与皮肤致敏试验: GB/T16886.10—2017. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. Biological evaluation of medical devices—Part 10: Tests for irritation and skin sensitization: GB/T16886.10—2017. Beijing: Standard Press of China, 2017.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价第 11 部分 全身毒性试验: GB/T 16886.11—2011. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. Biological evaluation of medical devices—Part 11: Tests for systemic toxicity: GB/T 16886.11—2011. Beijing: Standard Press of China, 2011.
- [21] 赵静, 杨雪, 苏晓雷, 等. 原位交联羧甲基壳聚糖/碳酸钙凝胶海绵的制备及其止血性能研究. 高分子通报, 2023, 36(7): 844–850. doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2023.07.006.
- ZHAO J, YANG X, SU X L, *et al.* Preparation of *in situ* crosslinked carboxymethyl chitosan/calcium carbonate gel sponge and its hemostatic performance. Polym Bull, 2023, 36(7): 844–850. doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2023.07.006.
- [22] 冉超. 负载纳米级二硫化钼的新型复合生物材料制备及止血抗菌作用评估. 重庆: 陆军军医大学, 2022.
- RAN C. Preparation of a novel composite biomaterial loaded with nano-scale molybdenum disulfide and evaluation of its hemostatic and antibacterial activity. Chongqing: Army Medical University, 2022.
- [23] 刘琳, 班雨, 魏悦, 等. 多功能海藻酸钠海绵的制备及抗菌、止血性能分析. 分析化学, 2021, 49(12): 1986–1994. doi: 10.19756/j.issn.0253-3820.210677.
- LIU L, BAN Y, WEI Y, *et al.* Preparation and analysis of antibacterial and hemostatic properties of multifunctional sodium alginate sponge. Chin J Anal Chem, 2021, 49(12): 1986–1994. doi: 10.19756/j.issn.0253-3820.210677.
- [24] 周舒毅, 朱敏, 刘忆颖, 等. 高分子止血材料研究进展. 中国塑料, 2022, 36(7): 74–84. doi: 10.19491/j.issn.1001-9278.2022.07.011.
- ZHOU S Y, ZHU Y, LIU Y Y, *et al.* Research progress of polymer-based hemostatic materials. China Plast, 2022, 36(7): 74–84. doi: 10.19491/j.issn.1001-9278.2022.07.011.
- [25] WANG C, LUO W, LI P, *et al.* Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/Bletilla striata polysaccharide composite hemostatic sponges. Carbohydr Polym, 2017, 174: 432–442. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.06.112.
- [26] HUANG N, LIN J, LI S, *et al.* Preparation and evaluation of squid ink polysaccharide-chitosan as a wound-healing sponge. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 82: 354–362. doi: 10.1016/j.msec.2017.08.068.
- [27] LAN G, LU B, WANG T, *et al.* Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 136: 1026–1034. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.10.039.
- [28] HE Y, WANG J, SI Y, *et al.* A novel gene recombinant collagen hemostatic sponge with excellent biocompatibility and hemostatic effect. Int J Biol Macromol, 2021, 178: 296–305. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.162.
- [29] PENG W, LI D, DAI K L, *et al.* Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications. Int J Biol Macromol, 2022, 208: 400–408. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.002.
- [30] ENDO Y, YOSHIDA H, OTA Y, *et al.* Accelerated human epidermal turnover driven by increased hyaluronan production. J Dermatol Sci, 2021, 101(2): 123–133. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.12.002.
- [31] QU J, ZHAO X, LIANG Y P, *et al.* Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. Biomaterials, 2018, 183: 185–199. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.044.

(2023-05-26 收稿, 2024-01-10 修回)

编辑 何学令



开放获取

Open Access

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有
 Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Science)