

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00071

新型可吸收交联微孔止血粉止血效能的初步研究

赵贵成^{1△}, 巴根^{1△}, 傅强^{1*}, 李明¹, 倪灿荣², 汪涛³, 沙菲⁴

1. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433
3. 南京航空航天大学材料科学与技术学院, 南京 210016
4. 上海市纳米科技与产业发展促进中心, 上海 200237

[摘要] **目的** 制备可吸收交联微孔止血粉, 观察其对肝脏、肾脏和股动脉出血的止血效果并探讨其止血机制。**方法** 取成年健康新西兰兔 30 只, 雌雄不限, 体质量 2 000~2 250 g, 随机分成 A、B、C 组(A 组为肝脏出血模型, B 组为肾脏出血模型, C 组为股动脉出血模型), 每组均根据切口再随机分成可吸收交联微孔止血粉实验组(1 组)和 AristaTM止血粉对照组(2 组), 每组 5 只, 按随机化分组原则在出血创面喷洒 1 g 止血材料进行止血, 观察止血情况并记录出血量和止血时间。止血成功后取创伤周围组织进行 H-E 染色, 观察组织学变化。**结果** A1、A2 组出血量分别为(1.02±0.10) g 和(1.03±0.09) g, 止血时间分别为(92.6±5.16) s 和(95.6±5.31) s, 两组差异无统计学意义 ($P>0.05$); B1、B2 组出血量分别为(0.92±0.09) g 和(0.94±0.08) g, 止血时间分别为(87.5±7.48) s 和(88.8±6.54) s, 两组差异无统计学意义 ($P>0.05$); C 组股动脉出血模型止血失败。创伤周围组织切片 H-E 染色显示红细胞大量聚集, 无灼伤迹象。**结论** 可吸收交联微孔止血粉对于实质性脏器能达到与 AristaTM止血粉相似的止血效果, 但不适用于压力较高的知名动脉出血的止血。

[关键词] 出血; 止血; 止血粉; 交联试剂

[中图分类号] R 973.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0071-05

Hemostatic function of novel absorbable crosslinked microporous hemostatic starch

ZHAO Gui-cheng^{1△}, BA Gen^{1△}, FU Qiang^{1*}, LI Ming¹, NI Can-rong², WANG Tao³, SHA Fei⁴

1. Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. College of Material Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, Jiangsu, China
4. Shanghai Nanotechnology Promotion Center, Shanghai 200237, China

[Abstract] **Objective** To prepare an absorbable crosslinked microporous hemostatic starch(ACMHS), to observe its hemostasis effect in the liver, kidney and femoral artery, and to discuss the hemostasis mechanism. **Methods** Thirty adult healthy New Zealand rabbits of either sex, weighing 2,000-2,250 g, were equally randomized into 3 groups: liver bleeding group (group A), kidney bleeding group (group B) and femoral artery bleeding group (group C). Each group was further divided into a test group and a control group randomly ($n=5$) according to different hemostatic powders; ACMHS was used in the test group(group A1, B1, C1), and AristaTM was used in the control group (group A2, B2, C2). The bleeding amount and bleeding time were accurately recorded. The pathological changes at incision and in the surrounding tissues of the liver, kidney and femoral artery were observed by hematoxylin-eosin staining after test. **Results** All the bleeding amounts of group A1 and A2 were (1.02±0.10) g and (1.03±0.09) g, and the bleeding time periods of group A1 and A2 were (92.6±5.16) s and (95.6±5.31) s, respectively ($P>0.05$). All the bleeding amounts of group B1 and B2 were (0.92±0.09) g and (0.94±0.08) g, and the bleeding time periods of group B1 and B2 were (87.5±7.48) s and (88.8±6.54) s, respectively ($P>0.05$). All the hemostatic efforts failed in group C. Hematoxylin-eosin staining showed accumulation of red blood cells at the incision

[收稿日期] 2011-03-18 **[接受日期]** 2011-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30872629), 上海市科技启明星计划(10QH1403100). Supported by National Natural Science Foundation of China(30872629) and Shanghai Science and Technology Rising Star Program(10QH1403100).

[作者简介] 赵贵成, 第二军医大学临床医学专业 2007 级本科学员. E-mail: yxy20080803@live.cn; 巴根, 第二军医大学临床医学专业 2006 级本科学员. E-mail: gener.2009@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873396, E-mail: Johson.f@163.com

and in surrounding tissues of the liver and kidney in group A and group B, without evidence of burn. **Conclusion** ACMHS has the same hemostatic function as Arista™ in parenchymatous organ injury, but it is not suitable for bleeding of femoral artery injury with high pressure.

[Key words] hemorrhage; hemostasis; hemostatic powders; cross-linking reagents

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 71-75]

战争中及时有效的止血救治对于降低阵亡率和提高战伤救治水平起着关键性作用,失血过多也是和平时平民因创伤而导致死亡的主要因素之一。目前大血管和软组织一般性出血已有较好的止血方法,但对实质性脏器创面出血的治疗仍是外科领域面临的难题^[1-4]。国内外一直致力于研发能对实质性脏器迅速止血且不影响其功能的可吸收性止血材料。美国 Medafor 公司研制的 Arista™ 止血粉是用马铃薯为原料制成的淀粉微球,在临床治疗中具有较好的止血效果,但价格昂贵^[5]。本研究借鉴徐忠等^[6-7]介绍的交联淀粉制备方法制备可吸收交联微孔止血粉(absorbable crosslinked microporous hemostatic starch, ACMHS),并通过动物实验观察其对实质性脏器和知名动脉创伤出血的止血效果,为其临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器 LE2202S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),HZS-H 水浴振荡器(上海金鹏分析仪器有限公司),电热恒温鼓风干燥箱(上海苏达实验仪器有限公司),SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(上海广英仪器有限公司),80-2 型离心机(江苏省金坛市环宇科学仪器厂),SZW1-S82-2 型控温磁力搅拌器,PH5-25 型数显 pH 计(北京远大科技有限公司),Olympus CX21 生物显微镜(日本 Olympus 公司),XL30-ESEM 型扫描电镜(荷兰 Philips 公司),SA3100 比表面积及孔径分析仪(美国 Beckman Coulter 公司)。马铃薯淀粉,食品级;葡萄糖淀粉酶(酶活力: 5×10^4 U/g),郑州生源生物工程有限公司; α -淀粉酶(酶活力: 0.2×10^4 U/g),无锡星达生物工程有限公司。氢氧化钠、氯化钠、醋酸、盐酸均为分析纯,三偏磷酸钠为食品级。3%戊巴比妥钠由第二军医大学实验动物中心提供, Arista™ 止血粉为美国 Medafor 公司原装进口。

1.2 实验动物及分组 健康成年新西兰兔 30 只[第二军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2007-0003,使用许可证号: SYXK(沪)2007-0003],雌雄不限,体质量 2 000~2 250 g,随机分成 A、B、C 组(A 组为肝脏出血模型, B 组为肾脏出血模型, C 组为股动脉出血模型),每组再随

机分成 ACMHS 实验组(1 组)和 Arista™ 止血粉对照组(2 组),每组 5 只,按随机化分组原则在出血创面喷洒 1 g 止血材料进行止血,观察止血情况并记录出血量(g)和止血时间(s)。本研究获得医院医学伦理委员会批准,实验过程中动物的处理符合伦理学标准。

1.3 ACMHS 的制备及结构分析

1.3.1 ACMHS 的制备 本研究借鉴徐忠等^[6-7]介绍的交联微孔淀粉的制备方法,称取 100 g 马铃薯淀粉置于 1 000 ml 烧杯中,配成 18% 的淀粉乳,加入 3 g NaCl,混合均匀后,加入 1.5% (相对于淀粉的质量比)三偏磷酸钠,用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 10.25,控温磁力搅拌器搅拌均匀,于 50℃ 下反应 24 h,即得交联淀粉溶液,用 0.1 mol/L 盐酸调节 pH 值至 5,过滤、洗涤、干燥后得到交联淀粉。

称取 100 g 自制交联淀粉,置于 1 000 ml 烧杯中,加入一定 pH 值的醋酸钠缓冲液 500 ml,于 50℃ 水浴锅中预热 20 min,同时用控温磁力搅拌器搅拌。精确称取 2.3% 的酶[V(α -淀粉酶): V(葡萄糖淀粉酶) = 1:8],用缓冲液配成酶液,将酶液全部转移到淀粉悬液中并准确计时,搅拌一定时间,终止反应。将悬浮液 799×g 离心 5 min,上清液量取体积后移入容量瓶中待测备用。剩余淀粉用蒸馏水洗涤并离心,如此重复 3 次后,将所得淀粉置于真空干燥箱中干燥至恒量,粉碎处理后即得可吸收交联微孔淀粉。消毒后密封保存备用。

1.3.2 ACMHS 的结构分析 光镜和扫描电镜观察比较 ACMHS 和 Arista™ 止血粉一般性状和显微结构。用比表面积与孔隙度分析仪对 ACMHS 和 Arista™ 止血粉进行比表面积和孔径分析(BET-BJH)以及吸附分析。

1.4 实验出血模型

1.4.1 肝脏出血模型^[8] 3%戊巴比妥钠注射液(30~40 mg/kg)兔耳缘静脉麻醉动物,在实验台上固定后,腹部剪毛,75%乙醇消毒铺巾后沿剑突下腹正中行 5 cm 切口,逐层开腹,暴露肝脏,用手术刀片在肝脏中叶做 1 条长约 1 cm、深约 0.5 cm 的切割伤后,创面血液迅速外渗,出血活跃的为成功模型;迅速用已称量的干燥纱布吸干切口部位血液,根据分组立即于出血最明显部位均匀喷洒 1 g 止血材料进

行止血并开始计时;用纱布压迫创面 30 s,观察各组止血材料凝固过程,若 2 min 内无鲜红血液渗出即认为止血成功,否则去除创面血凝块及止血材料,重新敷药并用纱布按压 30 s,仍不能止血者视为不能止血。记录出血量和止血时间,并观察止血材料与创面的粘合情况。

1.4.2 肾脏出血模型^[9] 麻醉方法同上。麻醉动物在实验台上固定后,逐层开腹,暴露一侧肾脏,用手术刀片在肾脏上做 1 条长约 1 cm、深约 0.5 cm 纵向切割伤后,创面血液迅速外渗,出血活跃的为成功模型;迅速用已称量的干燥纱布吸干切口部位血液后,止血材料的应用同肝脏出血模型,同上方法记录出血量和止血时间,并观察止血材料与创面的粘合情况。

1.4.3 股动脉出血模型^[10] 同上麻醉动物固定后,局部 75% 乙醇消毒,游离股动脉 3 cm,注意不要损伤临近的股静脉和股神经。用眼科止血钳阻断游离的股动脉近端和远端,在动脉前面用眼科剪行直径 1 mm 的动脉切开术。松开止血钳,观察出血情况,创面血液迅速外渗,出血活跃的为成功模型,迅速用已称量的干燥纱布吸干切口部位血液后,止血材料的应用同肝脏出血模型,同上方法记录出血量和止血时间,并观察止血材料与创面的粘合情况。

1.5 出血指标观察

1.5.1 出血量 用电子天秤预先精确称量止血前和止血后纱布质量,计算出血量(出血量=止血后纱布质量-止血前纱布质量)。

1.5.2 止血时间 用电子精确秒表计时器记录从

ACMHS 或 Arista™ 止血粉开始应用于创面至创面血液渗出停止或止血粉颗粒红染面积不再扩大的时间为止血时间。

1.6 组织切片观察 取止血成功的出血模型的创伤周围组织行 H-E 染色,观察组织结构变化,取各出血模型的正常脏器组织作为对照。所取标本经标准步骤制作组织切片,行 H-E 染色后由对实验单盲的病理学医师观察组织学变化情况。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般性状和超微结构 ACMHS 为白色粉末状颗粒,肉眼观察可见微球形态圆整,颗粒大小较均匀;光镜下可见微球呈半透明凝胶状,粒态较规整;扫描电镜下,淀粉颗粒直径约为 10 μm ,内部有多个孔道结构,向微球颗粒内部拓展延伸,似珊瑚状,小孔容积占颗粒体积的 60% 左右。孔径大小基本相同,约为 1 μm (图 1)。Arista™ 止血粉为白色粉末状颗粒,扫描电镜下可见颗粒表面由多个裂隙组成,但无明显的孔道结构^[9]。比表面积和孔径分析以及吸附分析显示,ACMHS 和 Arista™ 止血粉的比表面积(BET)分别为 22.926 m^2/g 和 29.363 m^2/g ,比孔容分别为 0.224 7 ml/g 和 0.261 3 ml/g ,吸水率 ACMHS : Arista=6 : 1。

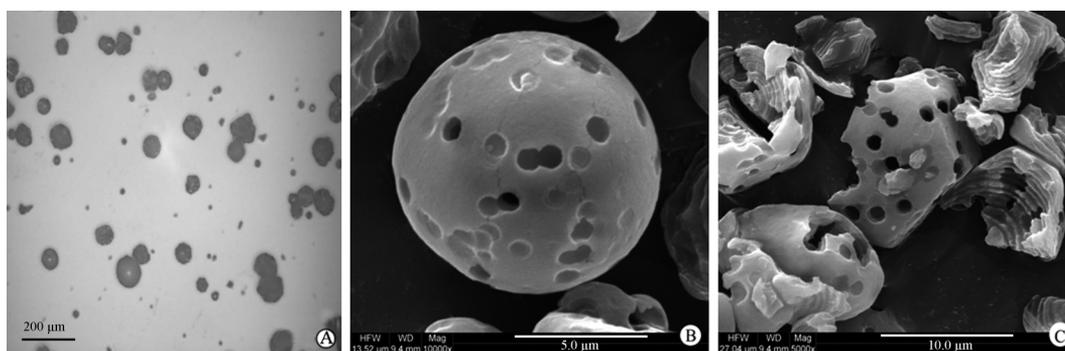


图 1 ACMHS 的微观结构

Fig 1 Microstructure of absorbable crosslinked microporous hemostatic starch (ACMHS)

A: Light micrograph of ACMHS; B,C: ACMHS under scanning electron microscope. Original magnification: $\times 40$ (A), $\times 10\ 000$ (B), $\times 5\ 000$ (C)

2.2 止血效果大体观察 在肝脏和肾脏出血模型中,在正常脏器表面做手术切口后血液迅速涌出,用干燥纱布吸干血液后,在切口上快速洒上 1 g ACMHS,干燥纱布持续压迫 30 s 后移走,可见快速聚集的血液在创面形成一层凝胶状保护膜,无渗血现象,出血停止;对照组用 Arista™ 止血粉涂抹后未

形成凝胶状保护膜,但也无明显渗出现象,出血停止。股动脉出血模型中,游离股动脉做动脉切开术后,血液迅速喷出,用干燥纱布擦拭后在切口上迅速洒上 1 g ACMHS,出血区淀粉立即由白色变为红色,干燥纱布持续压迫 30 s 后移走,有明显的血液渗出现象,血液甚至继续喷出,去除创面血凝块及止血材料,重新洒药

并纱布按压 30 s,仍有明显的血液渗出现象,止血失败,对照组用 Arista™止血粉止血也失败。

2.3 出血量和出血时间 肝脏和肾脏出血模型的出血量和止血时间见表 1,ACMHS 实验组和 Arista™止血粉对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$),可以认为 ACMHS 与 Arista™止血粉对肾脏

和肝脏创面止血具有相同的效果。

2.4 组织切片观察 ACMHS 实验组和 Arista™止血粉对照组的肝脏和肾脏组织行 H-E 染色后可见创面和周边组织内红细胞大量聚集,未见明显灼伤坏死组织(图 2、图 3)。股动脉出血模型止血失败,因此未做 H-E 染色。

表 1 ACMHS 和 Arista™止血粉用于肝脏和肾脏出血模型时出血量和止血时间的比较

Tab 1 Comparison of bleeding amount and bleeding time between ACMHS and Arista™ groups

$n=5, \bar{x} \pm s$

Group	Liver model		Kidney model	
	Bleeding amount <i>m/g</i>	Bleeding time <i>t/s</i>	Bleeding amount <i>m/g</i>	Bleeding time <i>t/s</i>
ACMHS	1.02±0.10	92.6±5.16	1.03±0.09	95.6±5.31
Arista	0.92±0.09	87.5±7.48	0.94±0.08	88.8±6.54

ACMHS: Absorbable crosslinked microporous hemostatic starch

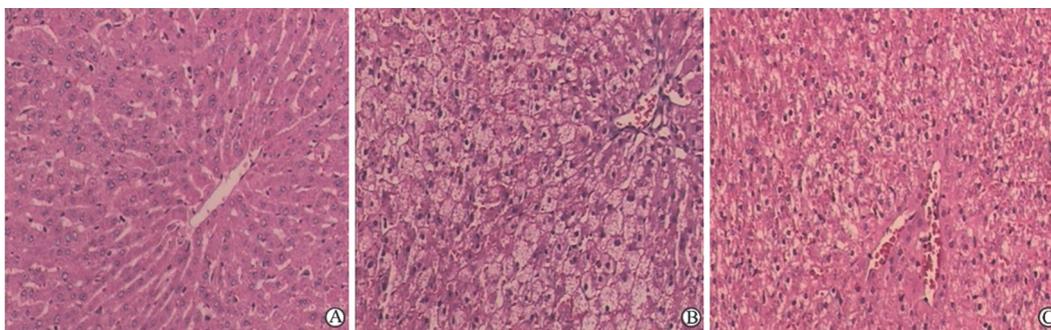


图 2 ACMHS 和 Arista™止血粉用于肝脏出血模型时出血处及周围组织的变化

Fig 2 H-E staining at incision and in surrounding tissues of the liver in ACMHS and Arista™ groups

ACMHS: Absorbable crosslinked microporous hemostatic starch. A: Normal liver tissues; B: Incision and surrounding tissues of the liver in ACMHS group; C: Incision and surrounding tissues of the liver in Arista™ group. Original magnification: ×100

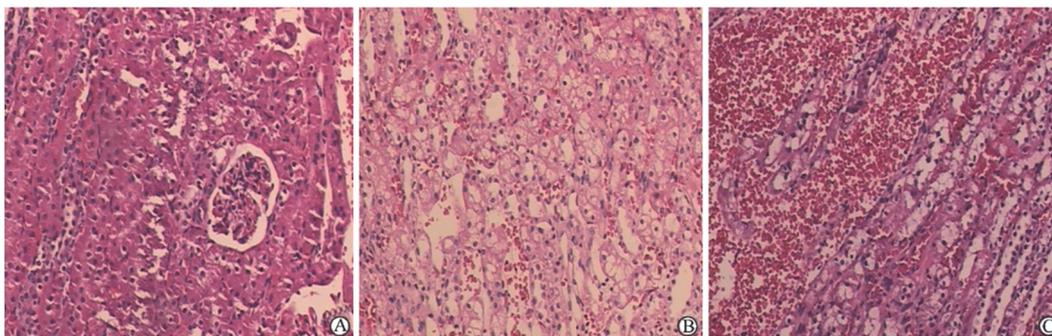


图 3 ACMHS 和 Arista™止血粉用于肾脏出血模型时出血处及周围组织的变化

Fig 3 H-E staining at incision and in surrounding tissues of the kidney in ACMHS and Arista™ groups

ACMHS: Absorbable crosslinked microporous hemostatic starch. A: Normal kidney tissues; B: Incision and surrounding tissues of the kidney in ACMHS group; C: Incision and surrounding tissues of the kidney in Arista™ group. Original magnification: ×100

3 讨论

目前常用的可吸收止血材料有氧化纤维素、凝血酶制剂、纤维蛋白胶、胶原类制剂、聚乙二醇类聚合物、牛白蛋白和戊二醛化合物、微孔多聚糖类止血粉、壳聚糖等^[11-12]。微孔淀粉是指将天然淀粉经过

酶水解处理后,形成的一种蜂窝状多孔性淀粉载体。由于其表面布满许多向微球颗粒内部拓展延伸的小孔,与天然淀粉相比具有较大的比表面积、比孔容及良好的吸水、吸油性能,并且成本低、无毒害,可自然降解,在食品、医药、化工、农业等方面具有广阔的应用前景。但淀粉微孔化后,结构不稳定,易坍塌,影

响多孔淀粉的吸附效果^[13]。本实验借鉴徐忠等^[6-7]制备交联微孔淀粉的方法,综合考虑交联微孔淀粉的产率及成本等因素,采用温度 50℃、酶用量 2.3%、淀粉乳浓度 18%、酶配比 1:8 的工艺制备条件,使用安全无毒、无有害副产物且合成条件温和的三偏磷酸钠作为交联剂,将马铃薯淀粉先交联处理强化结构后,再进行酶解制得 ACMHS,可明显改善微孔淀粉的性能,增强了微孔淀粉的结构稳定性。

Arista™止血粉是由马铃薯为原料生产的淀粉微球,微球表面的裂隙结构扩大了微球表面积,大大增强了吸水能力,从而达到很好的止血效果^[14]。本实验制备的 ACMHS 颗粒大小较均匀,直径约为 10 μm,表面布满孔径大小基本相同的孔道,小孔向微球颗粒内部拓展延伸,似珊瑚状,孔径约为 1 μm,占颗粒体积的 60%左右,具有更强的吸水性,有助于更好地止血。比表面积和孔径分析以及吸附分析显示,ACMHS 的比表面积和比孔容指标虽然较 Arista™止血粉略低,但吸水率高达 Arista™止血粉的 6 倍,更有助于血液浓缩,血小板聚集,加快止血速度。实验中为了使止血粉与创面血液充分接触,同时避免因创面血液流速过快,将血液表面的止血材料冲走而影响止血效果,在止血粉应用过程中,我们用纱布蘸干出血创面血液后,迅速喷洒止血粉,同时加纱布压迫 30 s。在实质脏器出血创面洒上 ACMHS 后,淀粉颗粒迅速红染,ACMHS 能迅速吸收血液中的水份,使血液体积缩小从而有助于止血,并将血液中体积大于孔道孔径的有形成分(如血小板、红细胞、清蛋白、凝血酶和纤维蛋白等)聚集在颗粒表面,止血淀粉和血液形成一种凝胶状的混合物保护膜,达到即刻止血的功效,还起到物理屏障作用,阻止切口血液渗出;同时通过提高血液中血小板等有形成分的浓度,加速内源性凝血因子的激活,缩短凝血时间,形成局部凝血块且牢固可靠,止血作用在数秒钟内完成。而 Arista™止血粉并不能在出血创面形成凝胶状保护膜,有血液从切口渗出的可能。ACMHS 和 Arista™止血粉对于股动脉出血止血效果差,可能是知名动脉的血压较高,血液很容易冲破已形成的血凝块或凝胶混合物而影响止血效果。QuickClot 止血粉虽然可在 1 min 内控制包括动脉的大血管出血,但 QuickClot 止血粉主要以沸石为原料,吸水后的产热会对周围组织造成一定的灼伤^[15]。本实验病理组织切片显示 ACMHS 对创面周围组织没有灼伤的不良反应。

本实验中的出血模型选择的是较经典的开放性手术切口,与实际应用的创伤伤口条件有一定的差

异,因此 ACMHS 对于紧急情况下的创伤出血的止血效果还需要进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Achneck H E, Sileshi B, Jamiolkowski R M, Albala D M, Shapiro M L, Lawson J H. A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use[J]. *Ann Surg*, 2010, 251: 217-228.
- [2] Gegel B, Burgert J, Cooley B, MacGregor J, Myers J, Calder S, et al. The effects of BleedArrest, Celox, and TraumaDex on hemorrhage control in a porcine model[J]. *J Surg Res*, 2010, 164: e125-e129.
- [3] Recinos G, Inaba K, Dubose J, Demetriades D, Rhee P. Local and systemic hemostatics in trauma: a review[J]. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2008, 14: 175-181.
- [4] Sondeen J L, Pusateri A E, Coppes V G, Gaddy C E, Holcomb J B. Comparison of 10 different hemostatic dressings in an aortic injury[J]. *J Trauma*, 2003, 54: 280-285.
- [5] Humphreys M R, Lingeman J E, Terry C, Castle E P, Andrews P E, Gettman M T, et al. Renal injury and the application of polysaccharide hemospheres: a laparoscopic experimental model[J]. *J Endourol*, 2008, 22: 1375-1381.
- [6] 徐忠, 周美琴, 杨成. 交联淀粉的制备工艺研究[J]. *食品科学*, 2008, 29: 194-196.
- [7] 徐忠, 刘明丽. 玉米交联微孔淀粉制备工艺的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28: 94-98.
- [8] Matsuoka T, Hildreth J, Wisner D H. Liver injury as a model of uncontrolled hemorrhagic shock: resuscitation with different hypertonic regimens [J]. *J Trauma*, 1995, 39: 674-680.
- [9] 余雪松, 黄赤兵, 张银甫, 冯嘉瑜. 多孔止血淀粉在肾脏中止血效果的初步实验研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37: 1520-1524.
- [10] 余雪松, 黄赤兵, 张银甫, 冯嘉瑜. 多孔止血淀粉的制备及其生物相容性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12: 6270-6274.
- [11] Crean S, Michels S L, Moschella K, Reynolds M W. Bovine thrombin safety reporting: an example of study design and publication bias[J]. *J Surg Res*, 2010, 158: 77-86.
- [12] Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats; a review[J]. *J Artif Organs*, 2005, 8: 137-142.
- [13] Antisdell J L, West-Denning J L, Sindwani R. Effect of microporous polysaccharide hemospheres (MPH) on bleeding after endoscopic sinus surgery: randomized controlled study[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009, 141: 353-357.
- [14] Whistler R L. Microporous granular starch matrix compositions: US, 4985082[P]. 1991-01-15.
- [15] Cox E D, Schreiber M A, McManus J, Wade C E, Holcomb J B. New hemostatic agents in the combat setting[J]. *Transfusion*, 2009, 49: 248S-255S.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群