

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00291

介孔材料 HW 与微孔材料 ZSM-5 止血性能的比较

徐达圆¹, 毕宏达¹, 蔡国君², 邢 新^{1*}

1. 第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 比较组成成分相近而比表面积与孔径不同的介孔材料和微孔材料的止血性能和放热反应规律, 为以介孔材料为载体研发新型急救止血剂奠定基础。**方法** 将 15 只雄性家猪随机分为 3 组 (A 组、B 组、C 组), 分别建立猪股动脉致命性出血模型, A 组应用介孔材料 HW 止血, B 组应用微孔材料 ZSM-5 止血 (阳性对照), C 组应用标准纱布止血 (阴性对照)。比较 3 组材料的止血性能以及放热反应对组织的影响。**结果** A 和 B 组止血时间分别为 (49.50 ± 3.27) s 和 (59.50 ± 2.42) s ($P < 0.05$), C 组应用标准纱布止血失败; A、B、C 各组局部最高温度分别为 (42.0 ± 1.58) 、 (46.4 ± 1.14) 和 (36.8 ± 0.84) °C, 各组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 组织学检查发现 A 组应用介孔材料 HW 的放热反应对组织造成的损伤轻于 B 组微孔材料 ZSM-5。**结论** 介孔材料 HW 比微孔材料 ZSM-5 具有更加快速的止血性能和更轻的放热反应, 有望成为新一代急救止血剂研究载体。

[关键词] 创伤和损伤; 出血; 止血材料; 微孔材料; 介孔材料

[中图分类号] R 619.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2014)03-0291-06

Hemostatic efficacies of mesoporous materials HW and microporous materials ZSM-5: a comparative study

XU Da-yuan¹, BI Hong-da¹, CAI Guo-jun², XING Xin^{1*}

1. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To compare the hemostatic efficacies and exothermic reactions between mesoporous and microporous materials with similar components but different specific surface areas and pore sizes, so as to lay a foundation for developing new first-aid hemostat with mesoporous materials. **Methods** Totally 15 male pigs were made into femoral artery fatal hemorrhage models and were randomly divided into three average groups (group A, group B and group C). Their hemostatic efficacies and exothermic reactions on the tissues were compared between the three groups (group A was treated with hemostatic mesoporous material HW, group B with microporous material ZSM-5, and group C with standard gauze as control). **Results** The hemostatic time periods of group A and B were (49.50 ± 3.27) s and (59.50 ± 2.42) s, respectively ($P < 0.05$); standard gauze in group C had failed hemostatic effect. The highest local temperature rose to (42.0 ± 1.58) °C in group A, (46.4 ± 1.14) °C in group B, and (36.8 ± 0.84) °C in group C, with significant difference found between different groups ($P < 0.05$). Histological test showed that the tissue damage caused by exothermic reaction of mesoporous material HW was slighter than that of microporous material ZSM-5. **Conclusion** Compared to mesoporous material HW, the microporous material ZSM-5 has more rapid hemostatic efficacies and slighter exothermic reaction, and ZSM-5 is a promising carrier for next generation first-aid hemostatic study.

[Key words] wounds and injuries; hemorrhage; hemostatic materials; microporous materials; mesoporous materials

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(3):291-296]

失血性休克是创伤死亡的重要原因之一^[1-2]。出血死亡发生于伤后早期, 绝大多数出血伤员抵达医疗机构后可获得有效救治、死亡率显著下降^[3-5]。

因此研制急救止血剂控制大血管致命性出血具有重要的应用价值。无机多孔材料是急救止血剂研究中的重要方向。国际纯粹和应用化学协会(IUPAC)根

[收稿日期] 2013-07-17

[接受日期] 2013-11-16

[作者简介] 徐达圆, 硕士. E-mail: yuanyuan_yisheng@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161805, E-mail: xingxin57@163.com

据多孔材料孔径(d)的大小,把多孔材料分为3类,微孔材料(microporous materials, $d < 2$ nm)、介孔材料(mesoporous materials, $2 \text{ nm} \leq d \leq 50$ nm)和大孔材料(macroporous materials, $d > 50$ nm)。已证实以微孔材料沸石为主要成分的止血剂具有优良的止血效果,但同时存在功能单一、放热反应等缺陷^[6-7]。与微孔材料相比较,介孔材料具有更大的比表面积(specific surface area: 指单位质量物料所具有的总面积,分外表面积、内表面积两类,国标单位 m^2/g)和孔径,孔隙率(porosity, 指材料内部孔隙体积占其总体积的百分率)可控性更强,化学结构可人为设计、随意调节,具有更为优越的理化特性和更广泛的应用前景^[8-9]。基于材料的高度可控性,介孔材料有望成为新型止血剂的优良载体,并实现多功能化。

本研究比较组成成分相近而比表面积与孔径不同的介孔材料和微孔材料的止血性能以及放热反应对组织的影响,探讨其止血性能和放热反应规律,为以介孔材料为载体研发新型急救止血剂奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 健康家猪(购自第二军医大学实验动物中心),HW介孔分子筛(购自洛阳市建龙化工有限公司),ZSM-5微孔分子筛(复旦大学化学实验室提供),多通道生物信号分析系统和MPA-2000生理参数分析记录仪(上海奥尔科特生物科技有限公司),游标卡尺,温度传感器,标准纱布,气管插管,运动秒表,电子天平。实验前,HW介孔分子筛、ZSM-5微孔分子筛和标准纱布均经过烘烤箱祛湿、干燥、密封处理。

1.2 动物模型及分组 健康家猪15只,雄性,体质量(15.94 ± 0.54) kg,随机分为3组(A组、B组、C组),每组5只,在实验前24 h禁食,12 h禁水。采用3%戊巴比妥钠溶液肌内注射麻醉(30 mg/kg)动物,麻醉成功后,将动物四肢固定仰卧在实验台上,进行气管插管,以保证气管通畅、呼吸平稳。然后进行颈动脉插管并将颈动脉插管套管连接于MPA-2000生理参数分析记录仪,监测颈动脉血压变化。待血压稳定维持在正常值且无较大波动后,于股动脉搏动明显处周边用盐酸利多卡因做皮肤、皮下组

织浸润注射,预防实验过程中出现血管痉挛。然后作10 cm纵行切口,钝锐结合逐层分离,显露股神经、股动脉和股静脉。开启温度传感器并将温度传感器探头经股部皮肤切口旁皮下隧道穿行放置在血管拟切断处,用于记录局部温度变化。

1.3 止血实验 在上述股血管创伤模型制作完成并观察其动脉血压平稳约3~5 min后,用手术刀横断股动脉、股静脉和部分肌肉组织,任其自行出血20 s后,3组动物应用3种不同的止血材料局部进行止血:A组应用HW介孔分子筛粉末25 g、B组应用ZSM-5微孔分子筛粉末25 g(阳性对照)、C组应用标准纱布25 g覆盖(阴性对照)。3组均用石膏模具(质量为250 g)正上方加压。观察各组止血材料的局部止血情况以及实验动物的生理变化。出血停止定义为材料表面和周围无持续性出血或渗血,死亡判定标准为血压为零、心跳呼吸停止。记录并计算120 min观察期内各组止血情况、血压变化、止血时间、局部温度变化、有无继发性出血或渗血、动物死亡时间和动物死亡发生率。

1.4 组织学检查 实验结束后,将动物处死,在血管创伤处切取血管、肌肉、皮肤等组织标本进行组织病理观察。将实验时股动脉横断处及距横断处0.5 cm的动脉血管横截面分别进行切片制作、染色和显微镜观察。另外,分别切取A组和B组的止血材料与血液的混合血凝块的表浅部和基底部进行透射电镜观察。

1.5 统计学处理 应用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,3组样本均数的比较采用单因素方差分析,对3组不同时间点数据的比较采用可重复测量数据的方差分析,组间两两比较用LSD检验,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 止血实验结果

2.1.1 死亡时间和死亡发生率 120 min观察期内A组和B组动物全部存活,死亡发生率为0;C组动物在实验时间内全部死亡,死亡发生率100%,死亡时间分别在第34、45、65、72和88 min。3组动物生存曲线见图1。

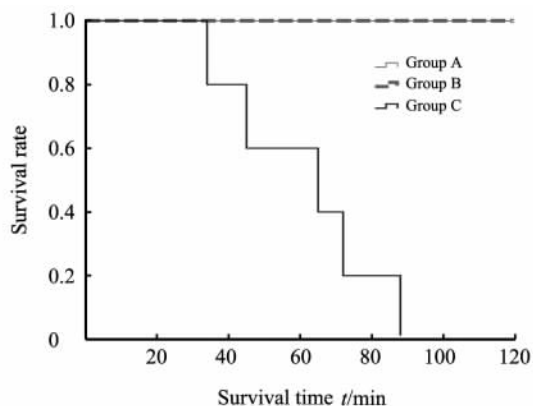


图 1 三组动物生存曲线图

Fig 1 Survival curves of the 3 groups

Group A was treated with mesoporous material HW, group B with microporous material ZSM-5 as positive control, and group C with standard gauze as negative control. $n=5$

2.1.2 平均动脉压的变化 多通道血压分析记录仪记录的各个关键拟测量时刻的平均动脉压值见表 1。由表 1 可见,股血管横断术后,3 组动物血压均迅速下降。20 s 后进行止血处理后,A 组和 B 组动物血压逐渐上升,至 120 min 时已基本恢复至术前水平;C 组动物血压持续下降,直至死亡。

2.1.3 止血时间 A 组和 B 组止血时间分别为股血管横断后(49.60 ± 3.64)和(59.60 ± 2.70)s,A 组止血速度比 B 组要快,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2);C 组止血失败。

2.2 放热反应 三组温度变化比较见表 2。由表 2 可见,A、B、C 各组局部初始温度差异无统计学意义,止血处理后,局部最高温度分别升至(42.0 ± 1.58)、(46.4 ± 1.14)和(36.8 ± 0.84) $^{\circ}\text{C}$,各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 三组动物平均动脉压变化

Tab 1 Mean arterial pressure of the 3 groups

$\bar{x} \pm s, p/\text{mmHg}$

Group	Time after femoral artery fatal hemorrhage						
	0 s	20 s	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
A	100.04 ± 8.87	54.42 ± 6.02	69.42 ± 3.09	82.74 ± 2.66	91.98 ± 4.81	97.10 ± 6.39	97.68 ± 7.66
B	101.96 ± 9.41	55.42 ± 5.13	65.28 ± 5.22	78.54 ± 4.33	88.18 ± 6.26	94.28 ± 7.00	96.8 ± 9.17
C	102.32 ± 9.90	53.32 ± 3.42	$46.34 \pm 4.48^{*\Delta}$	$42.92 \pm 3.41^{*\Delta}$	$20.16 \pm 18.51^{*\Delta}$	-	-

Group A was treated with mesoporous material HW ($n=5$), group B with microporous material ZSM-5 as positive control ($n=5$), and group C with standard gauze as negative control ($n=5$ for 0 s, 20 s, 15 min, and 30 min; $n=3$ for 60 min; and $n=0$ for 90 min and 120 min). $1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$. * $P < 0.05$ vs group A; $\Delta P < 0.05$ vs group B

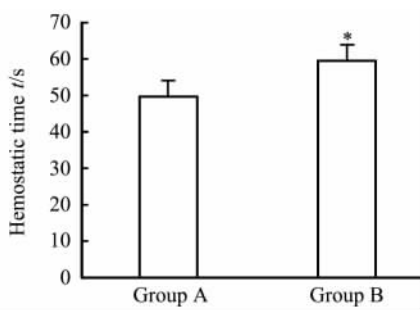


图 2 A 组与 B 组止血时间比较

Fig 2 Hemostatic time of group A and B

Group A was treated with hemostatic mesoporous material HW, group B with microporous material ZSM-5 as positive control. * $P < 0.05$ vs group A. $n=5, \bar{x} \pm s$

2.3 组织学观察

2.3.1 局部组织病理切片光学显微镜下观察 A

组(介孔材料止血组)局部组织病理显示,血管横断面动脉内膜、中膜及外膜较清晰、完整,无剥脱和缺失,有炎细胞浸润;静脉有血栓形成。距血管横断面 0.5 cm 处未见明显热损伤等其他损伤病变,主要以炎细胞浸润为主;神经束膜结构存在,较清晰、完整,间质水肿,炎细胞浸润。B 组(微孔材料止血组)局部组织病理显示,血管横断面动脉内膜剥脱,部分缺失,管壁有局限性坏死,血小板样物边集附着,腔内有血栓样物形成;中膜及外膜有变性、出血和坏死,大量炎细胞浸润;静脉有血栓形成、管壁塌陷及坏死。距血管横断面 0.5 cm 处以炎性细胞浸润为主,未见明显热损伤等其他损伤病变;神经组织纤维肿胀、变性,广泛炎性细胞浸润,局部有脱髓鞘改变。详见图 3。

表 2 三组初始温度和最高温度变化

Tab 2 The starting local temperature and highest local temperature of the 3 groups

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

Group	Starting temperature $\theta/^\circ\text{C}$	Highest temperature $\theta/^\circ\text{C}$
A	33.2 ± 0.84	$42.0 \pm 1.58^*$
B	33.0 ± 0.71	$46.4 \pm 1.14^* \Delta$
C	33.4 ± 1.14	$36.8 \pm 0.84^* \Delta \blacktriangle$

Group A was treated with hemostatic mesoporous material HW, group B with microporous material ZSM-5 as positive control, and group C with standard gauze as negative control. * $P < 0.05$ vs starting temperature; $\Delta P < 0.05$ vs highest temperature of group A; $\blacktriangle P < 0.05$ vs highest temperature of group B

2.3.2 血凝块透射电镜观察 在 A 组(介孔材料止血组)血凝块的电镜照片中,介孔材料 HW 颗粒表面有许多孔,并吸附在纤维蛋白上呈“串珠状”,像“链条”样穿插、围绕在红细胞周围,组成了以材料颗粒、纤维蛋白、红细胞为主的血凝块,这些现象在血凝块的表浅部和基底均可见;在 B 组(微孔材料止血组)的血凝块电镜照片中,ZSM-5 颗粒堆积在一起,有血小板聚集现象和少量的纤维蛋白丝出现在红细胞周围,但很少能观察到材料颗粒吸附于纤维蛋白上,形成像介孔材料止血组血凝块中串珠状的纤维蛋白和材料颗粒复合体(图 4)。

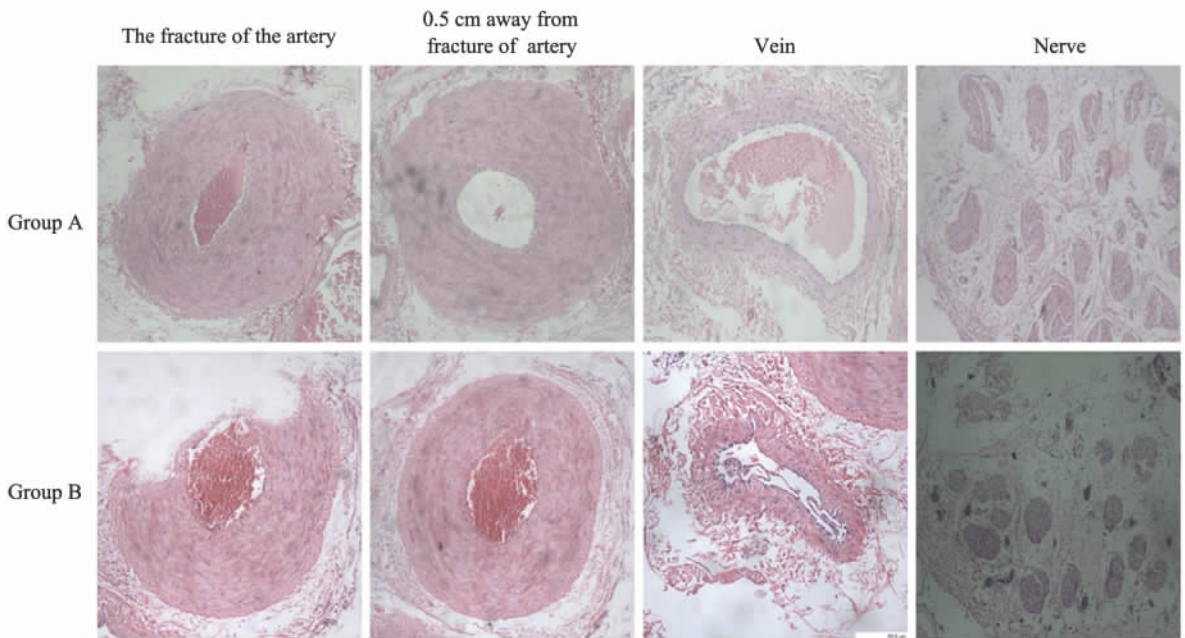


图 3 A 组和 B 组止血后股血管横断处血管、神经组织病理改变

Fig 3 Pathological changes of vessel and nerve tissues at femoral fracture sites of 2 groups after hemostasis

Group A was treated with mesoporous material HW, group B with microporous material ZSM-5 as positive control. H-E staining. Original magnification: $\times 200$

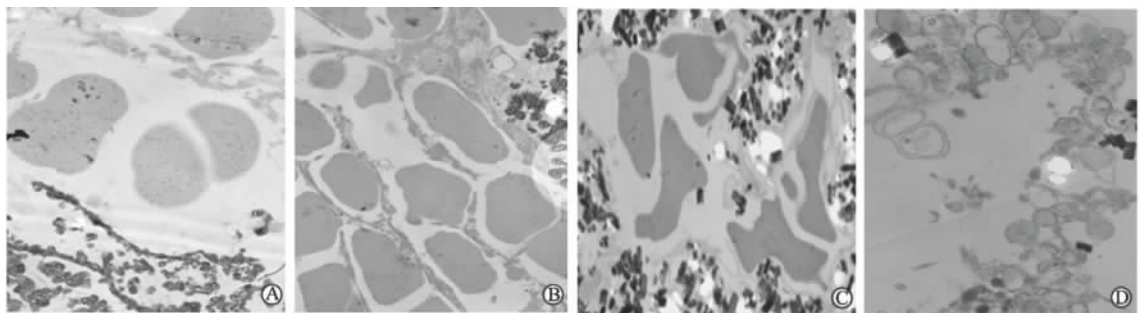


图 4 两组止血后血凝块电镜下结构

Fig 4 Structures of the blood clot under electron microscopes of 2 groups after hemostasis

A, B: The superficial part and the basilar part of the blood clot of group A (treated with mesoporous material HW); C, D: The superficial part and the basilar part of the blood clot of group B (treated with microporous material ZSM-5 as positive control). Original magnification: $\times 6\,000$ (A), $\times 4\,000$ (B, C), $\times 10\,000$ (D)

3 讨论

介孔材料与微孔材料沸石一样具有有序的、均匀的多孔,也具备吸水特性,理论上具备与沸石类似的止血能力。戴隆昌等报道了一种新型可降解介孔硅基干凝胶具有良好的止血性能;另外,他们还研制了一种银交换、钙掺杂的有序介孔硅基球在兔股动脉和肝损伤模型中取得了良好的止血性能和抗菌性能,并且这种介孔材料具有良好的生物降解性^[10-12]。但上述研究未将这些材料的性能与微孔材料进行详细比较。

本实验选取微孔材料 ZSM-5 与介孔材料 HW 作为研究对象,其中,HW 的孔径为 3.6 nm,比表面积为 990 m²/g^[13];ZSM-5 的孔径为 0.55 nm,比表面积为 350~360 m²/g。实验结果显示,介孔材料 HW 和微孔材料 ZSM-5 对猪股动、静脉的急性大出血均有快速、有效的止血作用,而且介孔材料 HW 的止血时间更加快于微孔材料 ZSM-5,差异有统计学意义($P<0.05$)。矿物沸石止血作用的机制主要取决于对水的吸附性,但 HW 材料确切的止血机制尚不清楚。我们从本研究结果结合介孔材料的性质认为下述机制可能与 HW 材料的止血功能有关:首先,HW 材料具有独特的介孔结构,与微孔矿物沸石相比,有更高的比表面积,这种特征决定了它存在更高的吸附能力,也就是说,介孔材料 HW 具有比微孔矿物沸石更为显著的吸附血液中水分和其他成分的作用。当应用到出血的伤口部位,HW 吸附了大量水分,从而在出血损伤部位集中了血细胞和血浆成分,相对提高了凝血底物的浓度,这将有助于血小板在受损血管处凝集,并促进凝血级联反应和加速凝血酶生成,从而帮助血凝块在伤口处形成。其次,无机材料的表面电荷可以影响许多生物学过程,包括蛋白质选择性吸附、无机材料的沉积速率、血液凝固过程等^[14]。有些作者证明,带负电荷的材料如玻璃,可通过激活凝血因子Ⅻ启动内源性凝血途径^[15-17]。再次,事实证明,每单位质量较大的表面积更有助于血小板和纤维蛋白原交互作用,极性硅骨架是接触激活内源性凝血途径级联反应的一个理想表面^[18-21]。这些因素并非单独起作用,而是所有因

素相互协同作用,最终达到止血的目的。此外,与正常凝血产生的湿润柔软的血凝块比较,含有多孔材料的血凝块干燥、硬度更大,因而能耐受出血部位血液较大的冲击力。在透射电镜观察中我们也可以看到介孔材料颗粒吸附于纤维蛋白围绕于红细胞,像堤坝一样拦住血液细胞的扩散,而微孔材料血凝块中少见这种现象,但这也有可能跟我们的取材不准确和误差有关。总的来说,我们的研究结果表明 HW 分子筛具有促进凝血作用,能够实现对猪股动脉创伤动物模型的出血控制。

多孔材料内部有较多的孔结构,这些孔结构有很强的吸附能力,与液体物质接触后迅速吸附液体分子,提高底物浓度,但同时这种吸附的过程中也会释放出大量的吸附热。介孔材料相比于微孔材料通常具有更大的比表面积和孔径,所以吸附能力更强、更快,据此推测,介孔材料吸附时产生的热量比微孔材料要大,但是从实验中监测的温度结果来看,反而介孔材料 HW 的放热反应比微孔材料 ZSM-5 弱,介孔材料 HW 给局部组织带来的热损伤也比微孔材料 ZSM-5 轻,前者的血管组织结构基本完整、清楚,损伤主要以细胞变性、炎细胞浸润等为主,而后者既有细胞变性、坏死及大量炎性细胞浸润,又有血管内膜的剥脱、腔内血栓形成等较为严重的损伤。这可能是因为具有更大比表面积和孔径的介孔材料在散热上比微孔材料更快,所以在环境因素同等情况下,虽然介孔材料产生的热量多而快,但是同时散发的热量更快,热量在局部未能持续积聚而对组织产生热损伤;而且介孔材料的吸附更强,止血时间更快,导致出血量更小,材料吸附放热的持续时间较短,产生的热量相对更少。关于介孔材料的放热、散热机制尚不明确,有待进一步的探索。

综上所述,介孔材料领域的最新研究成果为进一步研发新型多功能急救止血剂、克服沸石止血剂的固有缺陷提供了新的思路。多孔材料遇水的放热反应本质上属于湿润热,与材料孔径大小、孔道特征等具有密切关系,利用介孔材料孔径高度可控性、孔道的可修饰性,实现湿润热的缓慢释放理论上存在可能,利用介孔材料作为药物缓释载体实现新型急救止血剂多功能化具有良好的前景。

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] Bellamy R F. The causes of death in conventional land warfare; implications for combat casualty care research [J]. *Mil Med*, 1984, 149: 55-62.
- [2] Sauaia A, Moore F A, Moore E E, Moser K S, Brennan R, Read R A, et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment [J]. *J Trauma*, 1995, 38: 185-193.
- [3] Blackburn L H. The next generation of combat casualty care [J]. *J Trauma*, 2009, 66(4 Suppl): S27-S28.
- [4] Holcomb J, Caruso J, McMullin N, Wade C E, Pearse L, Oetjen-Gerdes L, et al. Causes of death in US Special Operations Forces in the global war on terrorism: 2001-2004 [J]. *US Army Med Dep J*, 2007, 24-37.
- [5] Holcomb J B, Stansbury L G, Champion H R, Wade C, Bellamy R F. Understanding combat casualty care statistics [J]. *J Trauma*, 2006, 60: 397-401.
- [6] 毕宏达, 李学拥, 王玉, 卢宝华, 李靖, 李跃军, 等. 沸石对猪致命性血管损伤模型止血作用的初步观察 [J]. *西北国防医学杂志*, 2006, 27: 164-166.
- [7] 毕宏达, 李学拥, 王玉, 卢宝华, 李靖, 李跃军, 等. 沸石对猪股血管损伤止血的作用及对组织影响的初步研究 [J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27: 851-854.
- [8] 宋华, 冯化林, 孙兴龙. 介孔材料合成研究进展 [J]. *工业催化*, 2010(9): 1-6.
- [9] 王晓静, 刘超, 胡中华, 刘亚菲, 陈玉娟, 温祖标. 多孔二氧化钛微球的制备、表征及其光催化性能 [J]. *催化学报*, 2008, 29: 391-396.
- [10] 李晓生, 刘昌胜, 袁媛, 王丽君, 王秋云. 介孔硅基干凝胶的制备及其止血性能的研究 [J]. *无机材料学报*, 2008, 23: 327-330.
- [11] Dai C, Liu C, Wei J, Hong H, Zhao Q. Molecular imprinted macroporous chitosan coated mesoporous silica xerogels for hemorrhage control [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 7620-7630.
- [12] Dai C, Yuan Y, Liu C, Wei J, Hong H, Li X, et al. Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 5364-5375.
- [13] 李宏愿, 魏渝伟, 庞玲玲. 高吸水介孔分子筛的合成 [J]. *石油学报(石油加工)*, 2008(增刊): 120-123.
- [14] Ostomel T A, Shi Q, Stoimenov P K, Stucky G D. Metal oxide surface charge mediated hemostasis [J]. *Langmuir*, 2007, 23: 11233-11238.
- [15] Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier A H. Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(13-14): 1841-1849.
- [16] Colman R W, Schmaier A H. The contact activation system: biochemistry and interactions of these surface-mediated defense reactions [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1986, 5: 57-85.
- [17] Meijers J C, McMullen B A, Bouma B N. The contact activation proteins: a structure/function overview [J]. *Agents Actions Suppl*, 1992, 38(Pt 2): 219-230.
- [18] Flemming R G, Murphy C J, Abrams G A, Goodman S L, Nealey P F. Effects of synthetic micro- and nanostructured surfaces on cell behavior [J]. *Biomaterials*, 1999, 20: 573-588.
- [19] Curtis A, Wilkinson C. Nanotechniques and approaches in biotechnology [J]. *Trends Biotechnol*, 2001, 19: 97-101.
- [20] Yim E K, Leong K W. Significance of synthetic nanostructures in dictating cellular response [J]. *Nanomedicine*, 2005, 1: 10-21.
- [21] Ferraz N, Carlsson J, Hong J, Ott M K. Influence of nanoporesize on platelet adhesion and activation [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19: 3115-3121.

[本文编辑] 孙岩