

微孔真空多聚糖止血粉有效性及安全性实验

杜宝堂¹, 李英俊², 史跃^{3*}, 朱卉琪³, 蔡廷江³, 朱月华³, 邹施翔⁴, 葛德红⁵

(1.江苏奥科生物科技有限公司, 江苏镇江 212003; 2.北京通和生泰比较医学研究所, 北京 100089; 3.解放军97医院, 江苏徐州 221004; 4.解放军457医院, 武汉 430012; 5.解放军73089部队医院, 江苏徐州 221004)

[摘要] 目的:研究微孔真空多聚糖止血粉的止血效果及生物安全性,为临床实验研究提供有效性依据。方法:采用巴马小型猪建立肝脏出血创面模型,分别用微孔真空多聚糖止血粉和 Arista™ 止血微球进行止血,对 SD 大鼠腹腔和肌肉注射 1.2%微孔真空多聚糖止血粉悬浊液。评价微孔真空多聚糖止血粉的止血效果、组织吸收以及生物安全性。结果:微孔真空多聚糖止血粉和 Arista™ 止血微球均能在 3 min 内有效止血,前者最短止血时间为 10 s,后者最短止血时间为 30 s。微孔真空多聚糖止血粉悬浊液在 SD 大鼠腹腔和肌肉内 5 h 降解所剩原物质浓度分别为(0.000 9±0.000 4)和(0.000 9±0.000 5)mg/ml。术后 24 h、7 d、14 d、21 d 解剖小型猪未发现腹腔内有积液、血块以及组织粘连情况;小型猪术后 24 h 血性(纤维素性)荚膜形成,术后 7 d 创面表面血性荚膜消失,术后 14 d 肝组织恢复正常形态。结论:微孔真空多聚糖止血粉止血效果好,具有良好的生物相容性,是一种安全的可吸收止血材料。

[关键词] 微孔多聚糖;止血材料;止血粉;Arista™ 止血微球;肝脏创伤

[中国图书资料分类号] R318;R619.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-8868(2018)09-0020-04

DOI: 10.7687/j.issn1003-8868.2018.09.020

Effectiveness and biological safety of microporous vacuum polysaccharide hemostatic microspheres

DU Bao-tang¹, LI Ying-jun², SHI Yue^{3*}, ZHU Hui-qi³, CAI Ting-jiang³, ZHU Yue-hua³, ZOU Shi-xiang⁴, GE De-hong⁵

(1. Jiangsu Aoke Biomedical Technology Co. Ltd., Zhenjiang 212003, Jiangsu Province, China; 2. Beijing Tong He Sheng Tai Institute of Comparative Medicine, Beijing 100089, China; 3. The 97th Hospital of the PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; 4. The 457th Hospital of the PLA, Wuhan 430012, China; 5. Hospital of No. 73089 Troops of the PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China)

Abstract Objective To observe the hemostasis effect and biosafety of the microporous vacuum polysaccharide blood clotting powder so as to provide an effective basis for clinical experimental research. **Methods** The model of liver hemorrhage was established by using the Bama minipigs, and the hemostasis was performed by using the MVPH and the control product Arista™. SD rats were administered with 1.2% microporous vacuum polysaccharide hemostatic microspheres by peritoneal and intramuscular injection. MVPH hemostatic effect, tissue absorption and biosafety were evaluated. **Results** The test product and control product were able to stop the bleeding effectively within 3 min, and the shortest hemostasis time by the test product was 10 s, and the shortest hemostasis time by the control product was 30 s. The concentrations of the remaining substances in the abdominal cavity and tissue (muscle) were (0.000 9 + 0.000 4) and (0.000 9 + 0.000 5)mg/ml respectively. Postoperatively all miniature pigs were dissected at 24 h, 7 d, 14 d and 21 d according to the set time points. No effusion, blood clots and tissue adhesion were observed in abdominal cavity. Postoperative 24 h hemorrhagic (fibrous) capsular came into being, postoperative 7 d wound surface hemorrhagic capsule disappeared, postoperative 14 d liver tissue returned to normal form. **Conclusion** MVPH has good hemostasis and good biocompatibility. It proves a safe and absorbable hemostatic material. [Chinese Medical Equipment Journal, 2018, 39(9):20-23]

Key words microporous vacuum polysaccharide hemisphere; hemostatic material; blood clotting powder; Arista™ blood clotting powder; liver injury

0 引言

平战时期创伤、外科手术和突发意外事故是造成人体大量出血并危及患者生命的主要原因,因此研制一种快速有效的功能性止血材料不仅是新型材

料的研究发展方向,而且是国内外学者重点关注的课题^[1-2]。解放军 97 医院等单位以马铃薯植物淀粉为原料成功研制了微孔真空多聚糖止血粉^[3]。本文对其有效性及安全性与美国生产的同类产品阿里斯泰止

血微球(Arista™)进行对比研究,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 实验设计与实施

实验设计与实施严格按照国家食品药品监督管理局(现国家市场监督管理总局)《医疗器械临床实验规定》(局令第5号,2004年4月1日实施)、NY/T 718—2003《农药毒理学安全性评价良好实验室规范》(2004年3月实施)标准执行。参加实验研究的所有人员均经过系统培训,具有相应的职称和操作资格。

1.2 实验时间与地点

实验于2015年7月5日至2016年1月15日在北京通和生泰比较医学研究所实验动物中心完成。

1.3 实验材料

实验材料有微孔真空多聚糖止血粉、Arista™止血微球、巴马小型猪和SD大鼠。微孔真空多聚糖止血粉由江苏奥科生物科技有限公司提供,解放军97医院研制、江苏奥科生物科技有限公司生产(生产许可证编号:苏食药监械生产许2012-0092号),规格1g/支,白色颗粒粉末状。Arista™止血微球由美国Medafor Inc生产,规格1g/支,白色晶状粉末。SPF(specific pathogen free)级SD大鼠25只,9周龄,体质量(250±10)g,雌雄不限;巴马小型猪24头,9月龄,体质量(25±5)kg,雌雄不限,动物生产许可证SCXK(京)2015-004,发证单位为北京市科学技术局,北京通和生泰比较医学研究所实验动物中心饲养,饲养合格证批准号SCK京2007-005。每头每天分2次供给其体质量5%的饲料,自由饮水。实验均按照国际实验室动物伦理行为准则*Guide for the care and use of laboratory animals*的要求进行实验动物使用与管理。对巴马小型猪随机编号,分为2组:1~12号为阳性对照组,采用Arista™止血微球止血;13~24号为供试品组,采用微孔真空多聚糖止血。2组小型猪以手术方法暴露肝脏,观察3 min内是否有效止血。

1.4 造模方法

小型猪术前24 h禁食不禁水,麻醉前于前肢采集5 ml静脉血,用于测定血相和血清生化。麻醉过程如下:小型猪称重,先用3%戊巴比妥钠以0.5 ml/kg剂量静脉注射,进行诱导麻醉。3 min后静

脉注射陆眠宁(吉林省华牧动物保健品有限公司)以0.1 ml/kg剂量执行。手术过程中视小型猪麻醉的深度多次追加首次剂量1/4的陆眠宁。小型猪左侧卧,暴露右侧,于肝脏相应部位剃毛,备皮区约15 cm×20 cm,清洁后用酒精消毒,铺上创巾,暴露切口部位。造模过程如下:(1)沿右侧最后肋骨平行处切口,长度约15 cm,钝性分离腹外斜肌和内斜肌,遇见大血管需结扎止血,防止出血量较大而影响实验。暴露并剪开腹膜,暴露肝脏。(2)于右前叶肝表面切一1 cm×1 cm的小方口,剥离3~4 mm的表层。用纱布按压止血约30 s,取下后立即在创面上倾喷止血粉,并用止血纱布轻压,持续3 min。取下纱布观察渗血情况,若有血液渗出,再给一次止血药,并辅以轻压,直至无血液渗出为止(阳性对照组与供试组方法相同)。(3)止血完成后,再观察20 min后关闭腹腔,创口常规消毒。术后,每日以20 IU/kg青霉素钠(华北制药股份有限公司生产,批号:F3102307)配以0.9%的生理盐水静脉注射防止感染,2次/d。每日综合治疗,预防感染,加强护理,详细观察临床变化,并做好记录。

将SD大鼠分为5组,每组5只。经腹腔注射1.2%止血粉悬浊液2 ml(24 mg),经左后肢股部肌肉注射1.2%止血粉悬浊液0.5 ml(6 mg)。分别于注射后1、2、3、4、5 h各处死(拉颈处死)1组大鼠,打开腹腔,用10 ml生理盐水分3次灌洗腹腔,回收入玻璃试管,手术切开左后肢股部注射部位皮肤,取下肌肉,加入5 ml生理盐水,匀浆处理。通过碘-淀粉显色反应的标准曲线检测止血粉原物质的浓度。

1.5 主要观察指标

(1)记录有效止血时间、创面愈合时间、产品降解吸收时间、吸收量与时间的关系,外观体征、临床变化,检查动物体质、发育和营养状况等;观察可能出现的并发症,包括感染、血肿、伤口愈合时间延长、伤口裂开、粘连形成等。(2)大体解剖学观察:观察创面愈合情况,各脏器的位置、大小、色泽、有无粘连等,并检查脏器的质地、有无积液和血块等。(3)组织病理学观察:取阳性对照品组和供试品组肝脏创面组织,用10%甲醛固定并进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,观察有无感染性炎症反应、血性荚膜形成及组织细胞的变化等。

1.6 统计学分析

采用计算机应用软件Easy GLP对实验中的动物进行随机分组,食耗测定、笼旁观察等数据的采集及统计处理。对血液学指标和生化学指标进行统计学分析。如果F值有显著差别($P \leq 0.05$),则用t检验

基金项目:原南京军区医学科技创新重点项目(2014ZD15)

专利:国家发明专利(ZL 201110073208.2)

作者简介:杜宝堂(1965—),男,博士,主要从事生物医药方面的研究工作,E-mail:dbt2005@126.com。

通信作者:史跃,E-mail:shiyue66@126.com

进行组间比较。

2 结果

2.1 止血效果

在小型猪肝脏创面喷洒止血粉,供试品组和阳性对照组均能在 3 min 内有效止血。止血粉吸收血液中液体形成“糊状凝胶”覆盖创面(如图 1 所示),供试品组最短止血时间为 10 s,阳性对照组最短止血时间为 30 s。



图 1 小型猪肝脏创面喷洒止血粉后供试品组和阳性对照组止血效果

2.2 止血粉降解

止血粉在 SD 大鼠体内降解不同时间剩余浓度见表 1。止血粉在腹腔、肌肉组织的剩余浓度随着时间的增加逐渐降低,5 h 降解所剩原物质浓度分别为(0.000 9±0.000 4)和(0.000 9±0.000 5)mg/ml。

表 1 止血粉在 SD 大鼠体内降解不同时间原物质浓度

时间	腹腔					均值±标准差	组织(肌肉)					均值±标准差
	第一只	第二只	第三只	第四只	第五只		第一只	第二只	第三只	第四只	第五只	
1 h	0.041 9	0.035 4	0.039 7	0.055 7	0.045 2	0.043 6±0.007 7	0.026 8	0.028 3	0.028 5	0.084 0	0.056 6	0.044 8±0.025 2
2 h	0.017 9	0.015 0	0.015 2	0.029 9	0.028 8	0.021 4±0.007 4	0.025 2	0.016 9	0.017 6	0.021 1	0.022 4	0.020 6±0.003 4
3 h	0.008 4	0.005 3	0.004 8	0.005 8	0.003 7	0.005 6±0.001 7	0.002 2	0.006 8	0.007 1	0.005 3	0.004 6	0.005 2±0.001 9
4 h	0.003 7	0.003 3	0.002 9	0.005 7	0.002 4	0.003 6±0.001 3	0.001 5	0.001 7	0.002 3	0.002 1	0.001 4	0.001 8±0.000 4
5 h	0.000 4	0.001 1	0.001 4	0.000 6	0.001 2	0.000 9±0.000 4	0.000 9	0.000 6	0.001 5	0.001 4	0.000 2	0.000 9±0.000 5

2.3 实验动物观察

术后观察 4 个时间点 24 h、7 d、14 d、21 d。术后 24 h 内禁食不禁水,小型猪精神状态不佳;从术后第 7 天开始,小型猪均出现不同程度的消瘦状态且活动减少;术后 14 d,小型猪呈消瘦状态,但精神、食欲和采食量均恢复正常,安全渡过围手术期;术后 21 d,小型猪各种行为均趋于正常。试验期内全部小型猪无死亡。按设定的 4 个时间点(24 h、7 d、14 d、21 d)解剖 24 头小型猪,大体观察未见腹腔内有积液、血块和组织粘连情况,说明关闭腹腔后创伤的肝组织无再出血情况发生。所有小型猪无感染、血肿、伤口愈合时间延长、伤口裂开、粘连形成等并发症发生。

2.4 组织病理学观察

对小型猪在解剖前进行大体观察,然后用戊巴比妥钠和陆眠宁麻醉,在麻醉状态下打开腹腔,检

查腹腔内有无组织粘连,并取创口处肝组织用 10% 甲醛常规固定,制作石蜡切片并用 HE 染色后进行组织病理学检查。于术后 24 h 解剖小型猪,取肝脏创口组织进行病理观察,此时血性(纤维索性)荚膜已形成,但在不同的局部区域其厚薄不均,如图 2(a)所示。肝脏创口组织可分为 3 层,表层主要是纤维索性渗出,呈网状分布,占总荚膜厚度的 1/2~2/3,内有少量蛋白质、破坏的肝细胞核结构和少量红细胞散在且呈间断性分布;中层有少量蛋白液和脱落的肝细胞;内层为炎性反应带,内含变性(或坏死)的肝细胞,极少量肝细胞呈嗜酸性变化,有极少量中性粒细胞浸润。水肿程度较轻,无菌团样结构,如图 3(a)所示。术后 7 d 解剖,大体观察所见创口区域与周围健康组织仍有可见界限,如图 2(b)所示;病理切片可见创面表面血性荚膜已消失,组织炎性反应较弱,已无细胞浸润,如图 3(b)所示。术后 14 d 解剖,大体观察所见创口区域不明显,如图 2(c)所示;病理切片可见肝组织已恢复到正常形态,如图 3(c)所示。术后 21 d 解剖,大体观察所见创口区域与非创区域无明显差异,如图 2(d)所示;病理切片可见肝组织已完全恢复到正常形态,如图 3(d)所示。

3 讨论

3.1 微孔真空多聚糖止血粉的有效性分析

本研究中位于小型猪右前叶肝表面切一 1 cm×1 cm 的小方口,用

纱布按压止血约 30 s,取下后立即在创面上喷洒止血粉,供试品组和阳性对照组均能在 3 min 内有效止血,止血效果无差别,且供试品组最短止血时间(10 s)少于阳性对照组(30 s)。微孔真空多聚糖止血粉与 Arista™ 止血微球^[4-5]应用于软组织出血创面时,能快速浓缩血液中的有形成分(如红细胞、血小板、纤维蛋白、凝血酶等),使其聚集到止血粉微球颗粒表面,形成“瞬时糊状凝胶”覆盖出血创面达到迅速止血的目的;同时,浓缩的血小板和凝血因子可增强机体的凝血反应,调动内源性凝血机制,使凝血时间缩短。微孔真空多聚糖止血粉的最短止血时间优于美国的 Arista™ 止血微球,是由于两者的结构有差异:微孔多聚糖止血粉微球颗粒结构表面有微孔、内部为真空, Arista™ 止血微球表面为裂纹^[6-8]。

3.2 微孔真空多聚糖止血粉的降解及安全性分析

以去除植物原性的马铃薯植物淀粉为原料制备

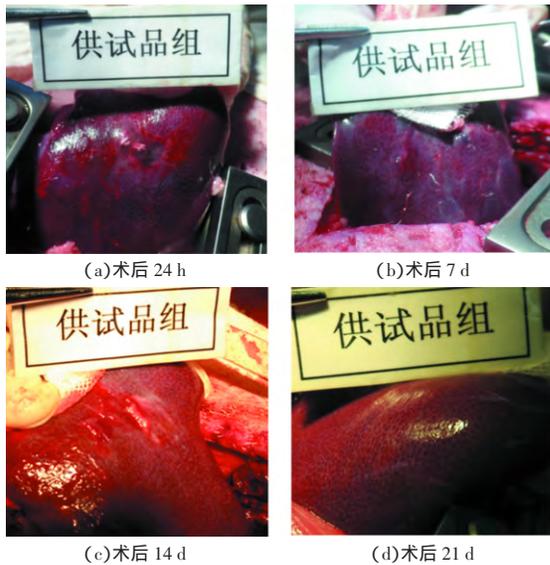


图2 供试品组小型猪术后创口区出血创面荚膜形成情况

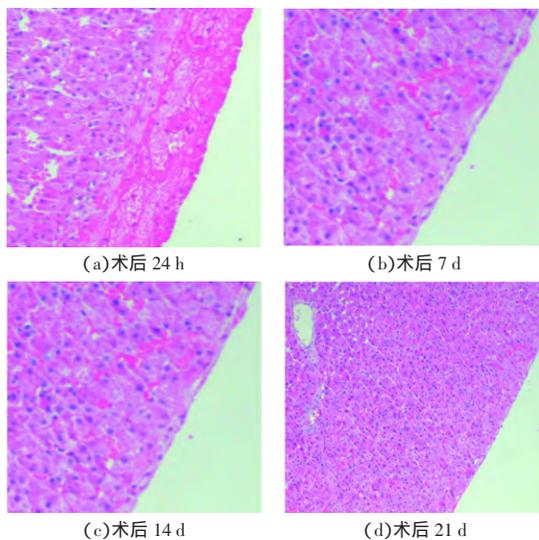


图3 供试品组小型猪术后肝组织病理切片图(HE×400)

而成的微孔真空多聚糖止血粉不含动物源性和人源性成分,无致热原和致敏原,不会产生过敏反应^[9]。微孔真空多聚糖止血微球组织吸收实验研究表明^[9],其可被体内的淀粉酶完全酶解为单糖,在体内降解吸收,并被组织细胞作为能量利用,其最终产物为CO₂和H₂O,不影响组织愈合,降低了感染概率。微孔真空多聚糖止血微球体内降解与生物安全性实验研究表明^[10],大鼠术后1d大部分止血粉被吸收,仅有少量未吸收止血粉在碘溶液的显色下呈浅紫色,术后3d只有极少量止血粉未被吸收,显色明显变淡,7和14d未见碘溶液显色,两侧碘溶液颜色一致,表明止血粉被完全吸收。本次实验研究表明,止血粉在SD大鼠腹腔和组织(肌肉)内1h原物质浓度分别为(0.043 6±0.007 7)和(0.044 8±0.025 2)mg/ml,5h降解所剩原物质浓度分别为(0.000 9±0.000 4)和(0.000 9±

0.000 5)mg/ml。试验期内小型猪无死亡,按设定的时间点解剖并观察,未见腹腔内有积液、血块和组织粘连等情况,说明关闭腹腔后创伤的肝组织无再出血情况发生。所有小型猪无感染、血肿、伤口愈合时间延长、伤口裂开、粘连形成等并发症发生,说明微孔真空多聚糖止血粉应用于小型猪肝脏出血创面止血效果好、组织吸收降解快,具有良好的生物相容性和安全性。

本课题组研制的微孔真空多聚糖止血粉以马铃薯植物淀粉为原料,经过交叉乳化等多道工序制备成球形或椭圆形白色粉末状颗粒,是目前国内达到甚至超过美国Arista™止血微球且具有自主知识产权的止血产品,该产品原料来源广泛,制备方法简便,有望成为一种战、创伤及现场急救的理想止血产品,具有良好的储备应用前景。

[参考文献]

- [1] GRABER J J, TABAR V, BRENNAN C, *et al.* Acute inflammatory reactions to hemostatic materials mimicking postoperative intracranial abscess[J]. *Inter Neuro Adv Tech Case Manage* 2014, 1(1): 5-7.
- [2] FRIBERG L, BENSON L, LIP G Y. Balancing stroke and bleeding risks in patients with atrial fibrillation and failure: the Swedish Atrial Fibrillation Cohort study[J]. *Eur Heart J* 2014, 36(5): 297-306.
- [3] 杜宝堂. 利用植物淀粉经交叉乳化制备术中止血材料的方法 201110073208.2[P]. 2011-08-03.
- [4] 杜宝堂, 史跃. 利用马铃薯淀粉制备止血材料方法[J]. *医疗卫生装备* 2014, 35(3): 23-25.
- [5] MURAT F J, ERETH M H, DONG Y, *et al.* Evaluation of microporous polysaccharide hemospheres as a novel hemostatic agents in open partial nephrectomy: favorable experimental results in the porcine model[J]. *J Urol* 2004, 172(3): 1119-1122.
- [6] 牛雯, 刘毅, 李志超, 等. 淀粉型可吸收多聚糖止血粉预防大鼠术后肠粘连[J]. *中国组织工程研究与临床康复* 2009, 13(12): 2287-2290.
- [7] 牛雯, 刘毅, 张博, 等. 可吸收性多聚糖止血材料 PerClot®对颅骨愈合的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复* 2010, 14(34): 6351-6354.
- [8] 史跃, 沈烈, 杜宝堂, 等. 微孔多聚糖止血球组织吸收实验研究[J]. *医疗卫生装备* 2014, 35(8): 15-18.
- [9] 杜宝堂, 史跃, 肖春兰, 等. 微孔多聚糖止血微粒的热原试验[J]. *医疗卫生装备* 2016, 37(7): 14-16.
- [10] 杜宝堂, 史跃, 何远清, 等. 微孔真空多聚糖止血微球体内降解与生物安全性[J]. *中国组织工程研究* 2015, 19(52): 8444-8449.

(收稿 2018-01-23 修回 2018-06-14)