

## 烷基化壳聚糖的制备及止血效果

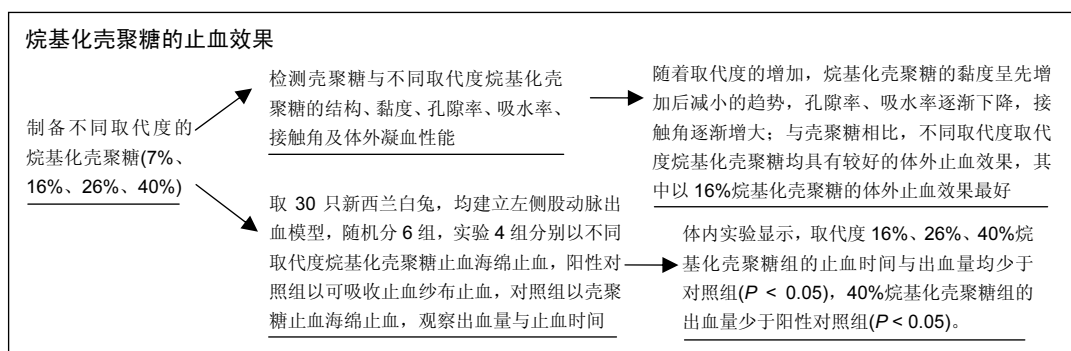
黄玉芬<sup>1</sup>, 邹励宏<sup>1</sup>, 高洁<sup>2</sup>, 刘璐<sup>3</sup> (武警后勤学院, <sup>1</sup>学员二旅, <sup>2</sup>科研部, <sup>3</sup>化学教研室, 天津市 300309)

引用本文: 黄玉芬, 邹励宏, 高洁, 刘璐. 烷基化壳聚糖的制备及止血效果[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(52):7878-7884.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.52.018

ORCID: 0000-0002-2304-2356(黄玉芬)

文章快速阅读:



黄玉芬, 女, 1994 年生, 江西省南昌市人, 汉族, 本科在读, 主要从事生物活性材料研究。

通讯作者: 刘璐, 博士, 武警后勤学院化学教研室, 天津市 300309

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)52-07878-07

稿件接受: 2016-09-25

文题释义:

**壳聚糖:** 是一种天然碱性多糖, 不仅具有生物相容性好、生物活性高的特点, 还具有杀菌、诱导红细胞聚集、促进血小板活化及激活补体系统等优点。TraumaStat、Celox 和 HemCon 等以壳聚糖为原料的止血敷料, 通过美国 FDA 认证被用于局部创伤止血治疗。然而最新研究发现, 壳聚糖类止血产品对大出血创面的疗效极不稳定, 某些产品对股动脉出血创面的止血效果仅与普通脱脂纱布相当。

**烷基化壳聚糖:** 壳聚糖的 C<sub>2</sub> 位上引入一定数量的十八烷基苯基团进行疏水改性后, 可以显著提高壳聚糖的凝血性能, 但是分子中引入烷基必然增加了材料的疏水性, 令血液进入材料表面发生困难, 因此, 引入烷基化的壳聚糖是否能够提高壳聚糖的凝血性能是改性的关键。并不是烷基化程度越高, 止血能力越强。因此烷基化程度是考量止血能力较为重要的指标。

摘要

**背景:** 最新研究表明, 壳聚糖的 C<sub>2</sub> 位上引入一定数量的十八烷基苯基团进行疏水改性后, 可显著提高壳聚糖的凝血性能。

**目的:** 在壳聚糖分子引入烷基, 改善材料与伤口的黏附力。

**方法:** 采用还原氨化法在壳聚糖分子上引入烷基, 制备不同取代度的烷基化壳聚糖(7%、16%、26%、40%), 检测壳聚糖与不同取代度烷基化壳聚糖的结构、黏度、孔隙率、吸水率、接触角及体外凝血性能。取 30 只新西兰白兔, 均建立左侧股动脉出血模型, 随机分 6 组, 实验 4 组分别以不同取代度烷基化壳聚糖止血海绵止血, 阳性对照组以可吸收止血纱布止血, 对照组以壳聚糖止血海绵止血, 观察出血量与止血时间。

**结果与结论:** ①随着取代度的增加, 烷基化壳聚糖的黏度呈先增加后减小的趋势, 孔隙率、吸水率逐渐下降, 接触角逐渐增大; ②与壳聚糖相比, 不同取代度取代度烷基化壳聚糖均具有较好的体外止血效果, 其中以 16% 烷基化壳聚糖的体外止血效果最好; ③体内实验显示, 取代度 16%、26%、40% 烷基化壳聚糖组的止血时间与出血量均少于对照组 ( $P < 0.05$ ), 40% 烷基化壳聚糖组的出血量少于阳性对照组 ( $P < 0.05$ ); ④结果表明, 取代度 40% 烷基化壳聚糖用于体内止血时, 止血效果最佳。

**关键词:**

生物材料; 材料相容性; 壳聚糖; 凝血; 烷基化; 止血敷料; 取代度

**主题词:**

壳聚糖; 止血; 组织工程

**基金资助:**

天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目(15JCYBJC18600)

Huang Yu-fen, Second Student Brigade, Logistics University of Chinese Armed Police Force, Tianjin 300309, China

## Alkylated-chitosan preparation and its hemostatic effect

Huang Yu-fen<sup>1</sup>, Zou Li-hong<sup>1</sup>, Gao Jie<sup>2</sup>, Liu Lu<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Second Student Brigade, <sup>2</sup>Research Department, <sup>3</sup>Department of Chemistry, Logistics University of Chinese Armed Police Force, Tianjin 300309, China)

Corresponding author: Liu Lu, M.D., Department of Chemistry, Logistics University of Chinese Armed Police Force, Tianjin 300309, China

### Abstract

**BACKGROUND:** 18-Alkylated-chitosan has been proved to exhibit a good coagulation capacity through hydrophobic modification.

**OBJECTIVE:** To improve the adhesion between the material and the wound through the introduction of alkylated-chitosan molecules.

**METHODS:** The alkyl group was introduced in the chitosan by potentiodynamic method to prepare the alkylated-chitosan with different substitution degrees (7%, 16%, 26% and 40%), and then their structure, viscosity, porosity, water absorption, contact angle and *in vitro* coagulation capacity were detected. Thirty New Zealand rabbits were enrolled, modeled into the left femoral artery hemorrhage, and randomized into six groups, including four experimental groups, positive control and control groups, followed by treated with alkylated-chitosan sponges with different degrees of substitution, absorbable hemostatic gauze and chitosan sponge, respectively. Afterwards, the blood loss and clotting time were observed.

**RESULTS AND CONCLUSION:** With the degree of substitution increased, the viscosity of alkylated-chitosan increased firstly and then decreased, the porosity and water absorption decreased gradually, and the contact angle on a rise. Compared with chitosan, different alkylated-chitosans showed a better hemostatic effect *in vitro*, especially the alkylated-chitosan with 16% substitution degree. The blood loss and clotting time in the experimental groups except that the alkylated-chitosan with 7% substitution degree were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ); the blood loss in the alkylated-chitosan with 40% substitution degree group was significantly lower than that in the positive control group ( $P < 0.05$ ). These findings suggest that the alkylated-chitosan with 40% substitution degree exhibits the best hemostatic effect *in vivo*.

**Subject headings:** Chitosan; Hemostasis; Tissue Engineering

**Funding:** the General Project of Research Planning of Tianjin Application Basic and Advanced Technology, No. 15JCYBJC18600

**Cite this article:** Huang YF, Zou LH, Gao J, Liu L. Alkylated-chitosan preparation and its hemostatic effect. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(52):7878-7884.

## 0 引言 Introduction

随着武警部队在执行处突、维稳, 抢险救援任务的节奏加快, 部队机动频繁。在缺乏有效的治疗条件下, 及时有效地控制出血和能够在最早期就对伤口进行感染的预防, 成为急救止血关注的两个问题。目前用于急救止血的装备仍然十分传统, 主要还是一些比较落后的急救包、棉质止血带和绷带等。这些装备无论是急救方式和急救效果都是非常不尽如人意的, 特别是个别部队配备的卫生装备还存在着不齐全的问题。

壳聚糖是一种天然碱性多糖, 不仅具有生物相容性好、生物活性高的特点, 还具有杀菌、诱导红细胞聚集、促进血小板活化及激活补体系统等优点<sup>[1-2]</sup>。TraumaStat、Celox和HemCon等以壳聚糖为原料的止血敷料, 通过美国FDA认证被用于局部创伤止血治疗<sup>[3-5]</sup>。然而最新研究发现, 壳聚糖类止血产品对大出血创面的疗效极不稳定, 某些产品对股动脉出血创面的止血效果仅与普通脱脂纱布相当<sup>[6-7]</sup>。原因可能为壳聚糖材料本身的凝血作用有限, 不能真正满足临床上大出血创面实际应用的需要。

由于壳聚糖分子中存在羟基和氨基, 很容易对其进行化学修饰引入功能团, 如酰化、醚化、烷基化、螯合、接枝共聚、交联等, 因而对壳聚糖进行改性用于出血创面已成为一个研究的热点。例如, 在壳聚糖链上引入异丁基, 由于减小了分子间的氢键而使壳聚糖的溶解性得到很好改善, 不但能溶于水, 而可增强壳聚糖的止血效果<sup>[8]</sup>, 动物实验表明其止血能力、促进愈合能力也相应提高。青岛博益特生物材料有限公司与中国海洋大学共同研制的壳聚糖体内可吸收止血材料“术益纱”, 主要成分是羧甲基壳聚糖, 是中国首创用壳聚糖单一成分作为体内可吸收止血材料的产品, 临床可用于辅助控制毛细血管、静脉和小动脉的出血, 因抗击血流冲击能力弱、黏附性不强而不适用于动脉大出血。虽然亲水性改性止血性能高于纯壳聚糖, 但对于大血管出血, 效果仍不理想, 究其原因, 可能是因为材料与伤口的黏附力不强。增大壳聚糖脂溶性, 可有利于血细胞与材料黏附能力及材料对伤口的黏附力, 因此在壳聚糖分子中引入烷基, 增加材料与细胞的黏附能力, 进而在不依赖外界物理压

迫的情况下, 迅速止住动脉出血。

由于壳聚糖分子中含有羟基和氨基, 在适当的反应条件下, 可进行O-、N- 和 O, N-位反应, 引入烷基、羟烷基、羧甲基、季铵基等官能团, 得到不同功能的壳聚糖衍生物。壳聚糖烷基化改性的主要途径包括: 与卤代烷、高级脂肪醛及长链脂肪酰反应等方式<sup>[9-11]</sup>。其中壳聚糖与高级脂肪醛的反应活性大, 反应速率高, 是常用的一种方法。该反应通常是在酸性条件下, 使醛和壳聚糖的氨基发生反应形成席夫碱(亚胺结构), 然后在还原剂作用下生成烷基化壳聚糖。

壳聚糖能够溶解在1%的醋酸溶液中, 形成水相, 而高级脂肪醛为有机质, 由于壳聚糖酸溶液很难在有机相中发生化学反应, 因此常在反应体系中加入相转移催化剂以诱导反应进行。但反应生成的中间体席夫碱在水溶液中却极不稳定<sup>[12]</sup>, 易重新分解为初始的反应物, 而且还原剂在水中也易分解, 因此寻找合适的溶剂和还原剂是还原氨化法制备烷基化壳聚糖的关键。其一, 寻找合适溶剂的目的是使壳聚糖直接进入有机相。一般来讲, 壳聚糖先经酸液溶解、再经碱液处理后, 其物理特性会发生改变, 提高其在有机溶剂中的溶解性。通常还原氨化反应优选的溶剂为1, 2-二氯乙烷和四氢呋喃, 由于壳聚糖在两者中的溶解性均不好, 这里作者尝试以二甲基甲酰胺为反应溶剂; 其二, 寻找适宜还原剂的目的是提高反应的选择性。还原氨化反应常用的还原剂有硼氢化钠、氰基硼氢化钠及三乙酰氧基硼氢化钠。前两者选择性较差, 常将反应体系中的醛一并还原导致副产物较多且需要大量的还原剂。而三乙酰氧基硼氢化钠不仅毒性较低, 而且只选择性还原亚胺结构, 因此能有效减少反应中副产物的生成<sup>[13]</sup>。

研究探讨对壳聚糖烷基化改性, 增加材料对伤口黏附性能, 进而达到快速阻止动脉出血的目的, 适合灾害救援、反恐处突、野外作业中伤员动脉出血的救治, 同时也可满足解放军及武警部队应急反应后勤装备的需要。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年10月至2015年7月在武警后勤学院有机合成实验室进行。

1.3 材料 壳聚糖(65万, 脱乙酰度95%, 山东奥康); 月桂醛(CAS:112-54-9, 阿拉丁, 上海); 三乙酰氧基硼氢化钠(STAB-H, 上海, 克拉马尔); 乌氏黏度计(0.4-0.5 mm, 笛柏, 上海); 扫描电镜(1530VP, LEO, 德

国); 接触角测定仪(FM40 Easy Drop, 欣悦, 厦门); 泰菱可吸收止血纱布(泰科斯曼, 北京)。

**实验动物:** 健康成年雌性新西兰大耳兔, 体质量2.5 kg, 购于解放军军事医学科学院动物实验中心, 许可证号: SCXK(军)2012-0004。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 烷基化壳聚糖及止血敷料的制备** 将壳聚糖溶于1%乙酸中搅拌至完全溶解; 缓慢加入1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH=12, 产生膨胀的壳聚糖沉淀; 过滤, 将滤饼转移到装有二甲基甲酰胺的500 mL三颈瓶中; 分别以壳聚糖重复单元分子个数与月桂醛分子个数的比为10:1、5:1、10:3、2:1的比例加入月桂醛, 乙酸调节pH=6.5, 室温下搅拌6 h; 而后加入与月桂醛等物质量的三乙酰氧基硼氢化钠并进行氮气保护, 继续反应12 h。过滤, 滤饼收集并依次用蒸馏水和无水乙醇洗涤, 除去多余的二甲基甲酰胺和月桂醛; 室温晾干, 得到烷基化壳聚糖。

分别将4 g壳聚糖和不同合成比例的烷基化壳聚糖溶于100 mL 1%醋酸溶液中。搅拌溶解后, 放入模具中-20 °C预冻, 再经冷冻干燥48 h分别得到壳聚糖和烷基化壳聚糖海绵。

### 1.4.2 烷基化壳聚糖结构表征

**取代度测定:** 取代度为每个壳聚糖分子单元中-NH<sub>2</sub>中的H被烷基取代的比例。精密称取各组烷基化壳聚糖止血海绵m(mg)置500 mL烧杯中, 分别加入摩尔浓度为C<sub>1</sub>(mol/L)的HCl标准溶液V<sub>1</sub>(mL)使样品溶解, 用摩尔浓度为C<sub>2</sub>(mol/L)的NaOH标准溶液返滴定, 测定电导率值, 并作电导率-NaOH体积关系图, 求其回归方程后得到等当点的NaOH体积V<sub>2</sub>(mL)。按下式计算十二烷基壳聚糖的取代度DS<sup>[14]</sup>:

$$X=C_1V_1-C_2V_2$$

$$161X+203Y+329Z=m$$

$$DS=Z/(X+Y+Z)$$

其中X为十二烷基壳聚糖中脱乙酰但未取代单元(相对分子质量161)的物质的量(mmol); Y为未脱乙酰单元(相对分子质量203)的物质的量(mmol); Z为十二烷基壳聚糖重复结构单元(相对分子质量329)的物质的量(mmol)。

**烷基化壳聚糖分子量的测定:** 首先乌氏黏度计测定十二烷基壳聚糖粉末的相对黏度<sup>[15]</sup>。将壳聚糖和不同合成比例的烷基化壳聚糖粉末0.100 0 g分别溶于0.1 mol/L CH<sub>3</sub>COOH和0.2 mol/L NaCl混合溶剂100 mL中, 搅拌至完全溶解。按照乌氏黏度计操作说明进行操作, 分别测

定供试液和纯溶剂的流出时间 $T$ 和 $T_0$ , 每组平行3次测定。按下式计算十二烷基壳聚糖的相对黏度。乌氏黏度计测定改性壳聚糖的黏度, 一点法计算分子量<sup>[16-17]</sup>。根据下式计算相对黏度 $\eta_r$ :

$$\eta_r = T/T_0$$

#### 1.4.3 烷基化壳聚糖物理性质的表征

**孔径测定:** 将支架置液氮中片刻, 迅速取出并用锋利的手术刀切出海绵横断面。海绵切片固定在铝制样品盘上喷金, 然后在扫描电镜下观察其微观结构, 测定其孔径。

**接触角测定:** 将壳聚糖和不同合成比例的烷基化壳聚糖粉末0.1 g分别溶于1%醋酸溶液中, 滴入载玻片, 真空干燥箱中干燥制成薄膜。取出, 在接触角测定仪中检测上述材料与水的接触角。

**孔隙率、密度测定:** 测定材料的孔隙率和密度一般采用的是液体置换法<sup>[18]</sup>。即用量筒量取 $V_1$ 体积的无水乙醇, 剪取一定质量( $m$ )的材料浸入无水乙醇中, 在真空干燥箱中反复抽真空至无气泡逸出, 此时量筒读数为 $V_2$ , 将量筒中的材料移出后, 此时量筒读数为 $V_3$ 。按下式计算孔隙率( $P$ )和密度( $d$ ):

$$P = (V_1 - V_3)/(V_2 - V_3) \times 100\%, \quad d = m/(V_2 - V_3)$$

**1.4.4 新鲜抗凝血制备及体外凝血检测** 将成年新西兰大耳兔股动脉插管后取全血, 与0.109 mol/L枸橼酸钠水溶液按照体积比为9:1混合均匀, 制成新鲜抗凝血。采用凝血实验检测两种海绵体外凝血性能<sup>[19]</sup>。将200  $\mu$ L新鲜抗凝血加入海绵片上, 于5 min后加入100 mL蒸馏水。没有凝结成血块的红细胞就会发生溶血, 分光光度法540 nm处检测血红蛋白吸光度。

**1.4.5 兔股动脉出血模型的建立和体内凝血检测** 取新西兰兔30只, 雌雄各半, 体质量均不低于2 kg, 随机分6组, 阳性对照组、对照组、4种取代度烷基化壳聚糖海绵组, 其中对照组、阳性对照组各3只, 其余每组各6只, 使动物适应环境, 并按GB/T16886.2规定饲养。实验前24 h禁止喂食但不禁水。

动物称质量后, 经耳缘静脉缓慢注射20%乌拉坦, 以5 mL/kg的剂量执行。切实麻醉后, 仰卧绑定, 四肢用绷带系于手术台的固定环上, 暴露左侧腹股沟, 剃毛, 备皮区约6 cm $\times$ 8 cm, 清洁后用碘酒消毒, 再用乙醇脱碘和消毒, 铺上创巾, 暴露切口部位(实验过程中视动物麻醉的深度追加20%乌拉坦, 每次1 mL)。用手术刀在左侧股动脉处垂直腹股沟切口, 长度约5 cm, 钝性器械分离肌间结缔组织, 暴露并分离股动脉, 在近心端和远

心端分别使用动脉夹阻断血流, 两动脉夹之间距离约1 cm。用手术剪将两动脉夹之间的动脉横向剪断, 先后放开远心端与近心端的动脉夹, 自由出血10 s后迅速用止血敷料敷于创口(阳性对照组用泰菱可吸收止血纱布, 对照组用壳聚糖止血敷料, 烷基化壳聚糖海绵组用7%、16%、26%、40%取代度的烷基化壳聚糖海绵), 开始计时, 并施以适当压力(200 g砝码), 观察出血状况, 考察敷料止血效果。

**1.5 主要观察指标** 不同取代度烷基化壳聚糖的结构、黏均分子量、孔隙率、吸水率、接触角及体内外凝血性能。

**1.6 统计学分析** 所有实验重复3次, 采用SPSS13.0统计分析软件处理数据, 数据采用单因素方差分析, 通过LSD和S-N-K多重比较法分析组间差异的显著性水平。 $P < 0.05$ 认定差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 烷基化壳聚糖的取代度及黏均分子量** 表1显示, 随着月桂醛含量的增加, 烷基化壳聚糖的取代度随之增加, 当壳聚糖重复单元分子个数与月桂醛分子个数的比为2:1时, 取代度最大, 为40%。烷基化壳聚糖改性后分子黏度呈现先增加后减小的趋势, 可能的原因是反应引入十二烷基增加了侧链分子量, 但是随着反应的进行, 壳聚糖分子出现断键情况, 导致分子量降低。

**2.2 烷基化壳聚糖止血敷料内部结构观察** 图1为各种海绵的纵切面微观形貌图, 显示各材料纵切都呈现层状结构, 经烷基化取代冻干后均呈多孔结构, 孔径在200-1 000  $\mu$ m不等。

**2.3 孔隙率、密度和接触角测定结果** 表1物理性质检测结果所示, 随着材料取代度的增加, 烷基化壳聚糖的孔隙率下降, 密度值相对减少。接触角越小, 亲水性越好。经过烷基化改性后, 壳聚糖酸溶液的接触角均增加, 其中40%烷基化壳聚糖的接触角最大, 为80.93°, 提示烷基化改性壳聚糖可增加材料的疏水性。

**2.4 体外凝血实验结果** 体外凝血实验发现在凝血5 min后, 和纯壳聚糖海绵相比, 不同烷基化壳聚糖海绵可明显降低出血量( $P < 0.05$ ), 16%烷基化壳聚糖的A值最小, 提示此比例烷基化壳聚糖敷料体外凝血性能较佳, 见图2。

**2.5 体内凝血检测结果** 图3是各材料在兔股动脉出血模型实验中的实验照片与止血效果(凝血时间和出血量)柱形图, 其中纯壳聚糖虽然可以用于大面积创面的止

表 1 烷基化壳聚糖结构和物理性质表征

Table 1 Structure and physical properties of alkylated-chitosans

项目	壳聚糖	烷基化壳聚糖 HM-CS1	烷基化壳聚糖 HM-CS2	烷基化壳聚糖 HM-CS3	烷基化壳聚糖 HM-CS4
取代度 (%)	0	7	16	26	40
黏度 $\eta_r$	1.54	1.693	1.549	1.504	1.306
孔隙率 ( $\bar{x} \pm s$ , %)	733.00 $\pm$ 2.30	600.00 $\pm$ 1.73	450.00 $\pm$ 1.50	433.00 $\pm$ 1.52	316.00 $\pm$ 0.76
密度 ( $\bar{x} \pm s$ , g/mL)	0.061 $\pm$ 0.010	0.058 $\pm$ 0.020	0.051 $\pm$ 0.025	0.047 $\pm$ 0.026	0.041 $\pm$ 0.017
接触角 ( $\bar{x} \pm s$ , °)	63.67 $\pm$ 0.88	76.08 $\pm$ 0.61	78.03 $\pm$ 0.91	79.22 $\pm$ 0.45	80.93 $\pm$ 0.77

表注: HM-CS1 为壳聚糖重复单元分子个数与月桂醛分子个数的比为 10 : 1; HM-CS2 为壳聚糖重复单元分子个数与月桂醛分子个数的比为 5 : 1; HM-CS3 为壳聚糖重复单元分子个数与月桂醛分子个数的比为 10 : 3; HM-CS4 为壳聚糖重复单元分子个数与月桂醛分子个数的比为 2 : 1。

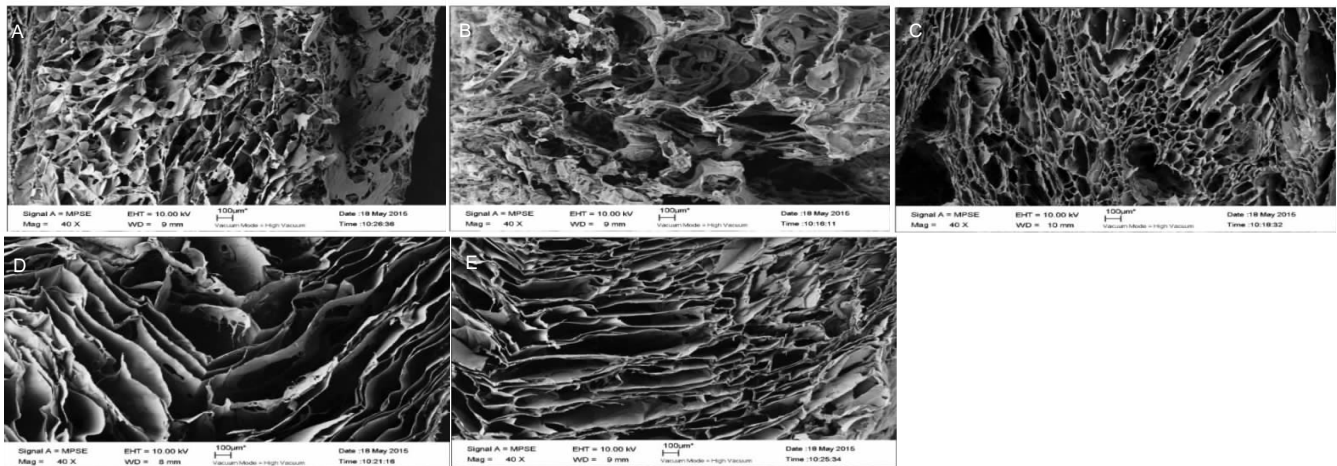


图 1 不同取代度烷基化壳聚糖海绵纵切面扫描电镜图(标尺=100  $\mu$ m)

Figure 1 Longitudinal section of the alkylated-chitosan sponges with different degrees of substitution

图注: 图中 A-E 分别为壳聚糖, 7%、16%、26%、40%取代度烷基化壳聚糖海绵。各材料纵切都呈现层状结构, 孔径在 200-1 000  $\mu$ m 不等。

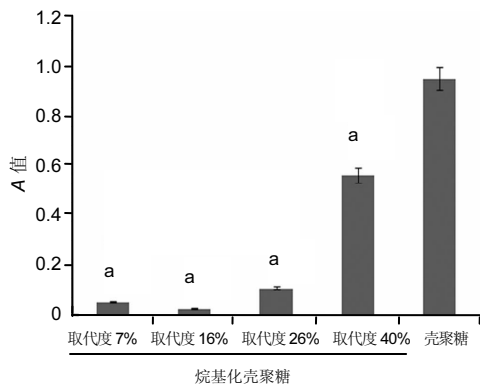


图 2 烷基化壳聚糖与壳聚糖 5 min 体外凝血性能的比较

Figure 2 Comparison of the 5-minute hemorrhagic ability of the alkylated-chitosan and chitosan *in vitro*

图注: 与壳聚糖比较,  $^aP < 0.05$ 。

血, 但从图中数据可以看出, 对照组止血时间和出血量较阳性对照组大 ( $P < 0.05$ ), 通过将十二烷基引入壳聚糖进行改性后, 烷基化壳聚糖材料在止血时间上与对照组相比明显降低 ( $P < 0.05$ ), 但与阳性对照组相比出血时间没有显著差异; 从出血量来看, 各烷基化壳聚糖组

与对照组相比明显减少 ( $P < 0.05$ ), 其中 40% 烷基化壳聚糖效果最为明显。总结止血时间和出血量两项指标提示, 当壳聚糖重复单元分子个数与月桂醛分子个数之比为 2 : 1 时制备的十二烷基壳聚糖海绵用于体内止血时, 用时最短, 出血量最少, 止血效果最好。

### 3 讨论 Discussion

3.1 高分子取代度的测定 实验采用电导滴定法测定合成的烷基化壳聚糖的取代度。与其他方法相比, 电导滴定法很大程度上缩短了测定的时间, 并且实验操作简单, 所测的样品不需要特殊处理, 重现性好, 在测定过程中只需确定用 NaOH 标准溶液滴定过量 HCl 标准溶液时的滴定终点, 即只要测得第一转折点处时所用 NaOH 溶液的体积即可, 该拐点明显, 容易确定, 计算简单。值得注意的是在实验过程中需要对配置的 NaOH 标准溶液和 HCl 标准溶液的浓度进行标定, 计算准确浓度, 以便得到准确结果。通过反复实验发现, 如果称取样品质量过少或者加水量过多, 以致样品浓度过低, 那么测得

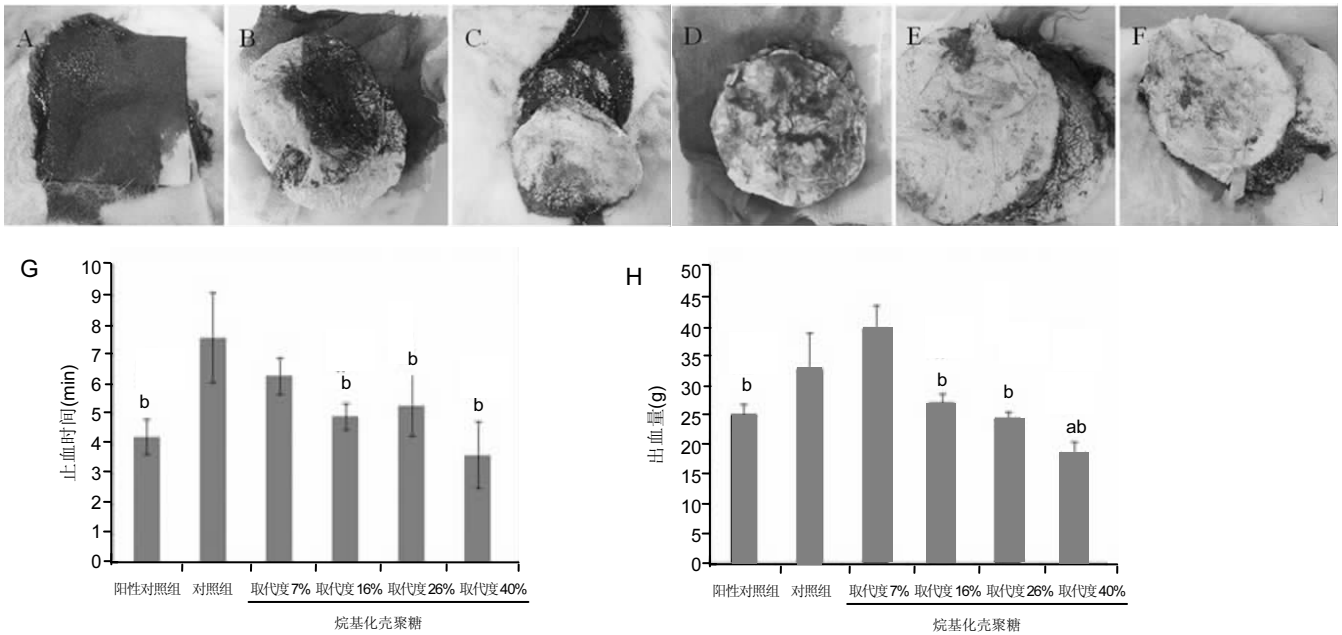


图3 各止血敷料止血效果图

Figure 3 Hemostatic effects of different hemostatic materials

图注: 图中 A 为阳性对照组止血效果; B 为对照组止血效果; C-F 分别为取代度为 7%、16%、26%、40% 的烷基化壳聚糖止血效果; G 为各组止血时间比较; H 为各组出血量比较。与阳性对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

的取代度值将会偏小, 这是因为仪器对低浓度样品的检测灵敏度不够, 导致电导率变化不明显, 因此在实验过程中样品浓度不宜过小。

**3.2 烷基化壳聚糖海绵的结构、物理性质与止血效果的关系** 最新研究表明, 壳聚糖的 C<sub>2</sub> 位上引入一定数量的十八烷基苯基团进行疏水改性后, 可以显著提高壳聚糖的凝血性能<sup>[20-21]</sup>, 但是分子中引入烷基必然增加了材料的疏水性, 令血液进入材料表面发生困难, 因此, 引入烷基化的壳聚糖是否能够提高壳聚糖的凝血性能是改性的关键。并不是烷基化程度越高, 止血能力越强。因此烷基化程度是考量止血能力较为重要的指标。实验发现, 取代度为 16% 的烷基化壳聚糖具有较好的体外凝血性能, 原因可能是烷基的引入增加生物材料的脂溶性, 有利于血液中各种凝血用途蛋白质的黏附, 从而激发凝血活性; 但是随着取代度增高, 体外凝血效果逐渐降低, 为材料的疏水性令血液进入材料表面发生困难。在体凝血实验发现取代度越高凝血效果越好, 可能是因为体实验中材料通过一定的压力与伤口紧贴, 克服疏水性屏障, 将材料与血液中的各种成分充分接触, 从而达到加速凝血的目的。另外, 壳聚糖分子量、脱乙酰度、海绵的制备工艺对动脉止血也很重要。取代度越高, 烷基化壳聚糖分子量下降越大, 因此对壳聚糖进行改性时应选择高分子量的原料。

**3.3 壳聚糖止血机制的研究进展** 壳聚糖类多糖的促凝血机制一般认为是壳聚糖聚合物表面的正电荷可与红细胞表面的负电荷发生电荷反应, 使红细胞大量黏附聚集于伤口处, 形成血栓, 从而使血液凝固<sup>[22]</sup>。现代关于凝血机制的研究有 3 条途径, 即凝血酶原(激活因子 II)的活化形成凝血酶(激活因子 II a)、血小板激活途径(盘状的血小板通过粘附材料表面而被激活, 形状发生变化成为圆形并发出伪足, 表达有活性的整合素。)和抗纤溶途径可从上述 3 条途径出发, 考察上下游蛋白和酶表达的含量, 初步勾勒出烷基化壳聚糖促进动脉出血的凝血机制。下一步研究拟先从血小板激活途径出发, 探讨烷基化壳聚糖改性对凝血机制的作用。血小板是血液中最小的细胞成分, 无核结构, 由骨髓成熟的巨核细胞裂解分化而来<sup>[23]</sup>, 血小板黏附是其发挥生理功能的初始步骤。研究以烷基化壳聚糖诱导血小板聚集、黏附并激活为主线, 考察 ATP、P-选择素、TXB<sub>2</sub>、CD63、LAMP-1、CD40L、胞浆内钙离子含量等指标, 初步勾勒出烷基化壳聚糖对血小板激活途径的影响。

**作者贡献:** 刘璐进行实验设计, 实验实施为黄玉芬, 实验评估为邹励宏、高洁, 资料收集为高洁, 黄玉芬成文, 刘璐审校。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验方案经武警后勤学院附属医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 20160501。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 刘璐对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

#### 4 参考文献 References

- [1] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003; 24(13):2339-2349.
- [2] Ong SY, Wu J, Moochhala SM, et al. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*. 2008;29(32):4323-4332.
- [3] Arnaud F, Teranishi K, Okada T, et al. Comparison of Combat Gauze and TraumaStat in Two Severe Groin Injury Models. *J Surg Res*. 2011;169(169):92-98.
- [4] Beckerath AKV, Maul H, Gebauer G, et al. 492: Use of chitosan-covered gauze (Celox) in 98 cases of severe postpartum hemorrhage—a multicenter registry analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214(1): S269-S269.
- [5] Eldibany RM. Platelet rich fibrin versus Hemcon dental dressing following dental extraction in patients under anticoagulant therapy. *Tant Dent J*. 2014;11(2):75-84.
- [6] Devlin JJ, Kircher S, Kozen BG, et al. Comparison of ChitoFlex®, CELOXTM, and QuikClot® in control of hemorrhage. *J Emerg Med*. 2011;41(3):237-245.
- [7] Kunio NR, Riha GM, Watson KM, et al. Chitosan based hemostatic dressing is associated with decreased blood loss in a swine uncontrolled hemorrhage model. *J Am Coll Surg*. 2013;205(S):S05-S10.
- [8] 刘良明, 田昆仑, 范小青, 等. 异丁基壳聚糖多功能敷料的生物安全性[J]. *中国海洋药物杂志*, 2005, 24(5):39-42.
- [9] 王爱勤, 俞贤达. 烷基化壳聚糖衍生物的制备与性能研究[J]. *功能高分子学报*, 1998, 11(1):83-86.
- [10] 谢英, 李明春, 辛梅华, 等. 烷基化改性壳聚糖制备条件对酚类化合物吸附的影响[J]. *应用化学*, 2008, 25(10):1201-1204.
- [11] 李彦艳, 张闪闪, 柳峰松. 一种新型靶向壳聚糖纳米载体的制备及性质[J]. *应用化工*, 2014, 43(7):1214-1217.
- [12] 邢其毅. 基础有机化学(下册)[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [13] Abdel-Magid AF, Carson KG, Harris BD, et al. Reductive Amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *J Org Chem*. 1996; 61(11):3849-3862.
- [14] 霍秀颖, 张小华, 吴清. 电导法测定N-琥珀酰壳聚糖取代度[J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(10):700-702
- [15] 潘祖仁. 高分子化学[M]. 5版. 北京: 化学工业出版社, 2014.
- [16] Sarkar K, Srivastava R, Chatterji U, et al. Evaluation of chitosan and their self-assembled nanoparticles with pDNA for the application in gene therapy. *J Appl Polym Sci*. 2011;121(4):2239-2249.
- [17] Braun JL, Kadla JF. A relatively simple method for calculating Mark-Houwink parameters using basic definitions. *J Appl Polym Sci*. 2009;114(5):3303-3309.
- [18] Zhao Y, Liu L, Han X, et al. Preparation of N, O-carboxymethyl chitosan with different substitutional degree and its application for hemostasis. *Advanced material research*, 2013;798-799:1061-1066.
- [19] Lih E, Lee JS, Park KM, et al. Rapidly curable chitosan-PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(9):3261-3269.
- [20] Dowling MB, Kumar R, Keibler MA, et al. A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action. *Biomaterials*. 2011;32(13):3351-3357.
- [21] Dowling MB, Smith W, Balogh P, et al. Hydrophobically-modified chitosan foam: description and hemostatic efficacy. *J Surg Res*. 2014;193(1): 316-323.
- [22] 高文彪, 张岩睿, 张军. 胶原/壳聚糖止血敷料在外科伤口中的应用[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(29):5477-5480.
- [23] 谢晓民, 陈晶. 血小板活化与相关疾病的研究进展[J]. *河北医药*, 2012, 34(3):437-439.