

## 胍基壳聚糖的止血性能和细胞毒性

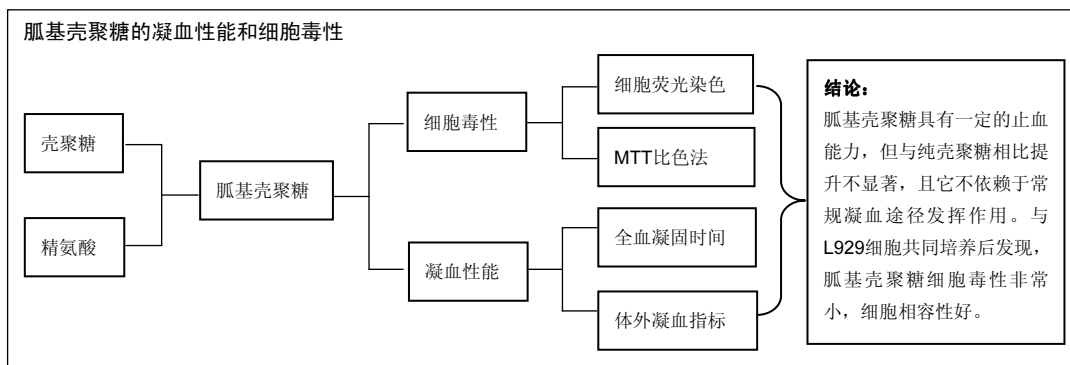
姚心培<sup>1,2</sup>, 荆妙蕾<sup>1</sup>, 关静<sup>2</sup> (<sup>1</sup>天津工业大学纺织学部, 天津市 300387; <sup>2</sup>军事医学科学院卫生装备研究所, 天津市 300161)

引用本文: 姚心培, 荆妙蕾, 关静. 胍基壳聚糖的止血性能和细胞毒性[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(6):906-910.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.06.015

ORCID: 0000-0003-3995-9641(姚心培)

文章快速阅读:



姚心培, 女, 1992年生, 湖北省宜昌市人, 汉族, 2017年天津工业大学毕业, 工程硕士, 主要从事生物材料的止血性能研究。

通讯作者: 荆妙蕾, 硕士, 副教授, 天津工业大学纺织学部, 天津市 300387

并列通讯作者: 关静, 博士, 副研究员, 军事医学科学院卫生装备研究所, 天津市 300161

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2017)06-00906-05

稿件接受: 2017-01-12

文题释义:

**体外凝血指标:** 活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间是常规的凝血检查项目, 用于检验凝血系统止血能力。通过对此3项指标测试, 从而判断材料对内源性凝血途径、外源性凝血途径和共同途径的作用情况。

**细胞毒性评价指标:** MTT比色法是细胞毒性的常用检测方法, 能反映活细胞的生长状况。采用MTT比色法计算出细胞增殖率, 依据标准鉴定材料的毒性等级。为了更直观的反映材料作用后活死细胞数量, 又采用荧光染色方法将活死细胞用绿色及红色荧光加以区分, 充分说明了材料的细胞毒性水平。

摘要

**背景:** 壳聚糖是一类具有良好止血、抗菌和吸附能力的生物材料, 在其氨基处引入胍基团能使其抗菌性和吸附性能提高, 是化工分离的常用材料。然而, 接枝胍基后对壳聚糖的凝血性能是否有影响, 却鲜有研究。

**目的:** 测试胍基壳聚糖的体外凝血性能及细胞毒性, 探讨其作为止血材料的可能性。

**方法:** 以壳聚糖和精氨酸为原料, NHS和EDC为偶联剂制备胍基壳聚糖粉末, 通过全血凝固时间和3项体外凝血指标(活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间)对胍基壳聚糖的凝血能力进行初步评价。将胍基壳聚糖的浸提液与小鼠成纤维细胞共同培养, 通过MTT比色法和荧光显微镜观察其对细胞生长状况的影响。

**结果与结论:** ①胍基化壳聚糖缩短了全血凝固时间, 具有一定的止血能力; ②体外凝血指标结果表明, 胍基化壳聚糖不通过传统的内外源性凝血途径发生作用, 目前无确切研究证明胍基团能促进凝血, 提示该作用可能依赖于壳聚糖; ③MTT检测结果显示, 胍基壳聚糖细胞增殖率为87.8%, 毒性反应为1级; ④荧光染色照片显示活细胞数量很多, 死细胞很少, 说明胍基壳聚糖对细胞的毒性作用低。

**关键词:**

生物材料; 材料相容性; 胍基; 壳聚糖; 体外凝血; 细胞毒性; 国家自然科学基金

**主题词:**

胍; 壳聚糖; 止血; 细胞增殖; 组织工程

**基金资助:**

国家自然科学基金(31570956)

Yao Xin-pei, Master, Department of Textile, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China; Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China

Corresponding author:

Jing Miao-lei, Master, Associate professor, Department of Textile, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China

Corresponding author:

Guan Jing, M.D., Associate researcher, Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China

### Hemostatic property and cytotoxicity of the guanidine modified chitosan

Yao Xin-pei<sup>1,2</sup>, Jing Miao-lei<sup>1</sup>, Guan Jing<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Textile, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China; <sup>2</sup>Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Chitosan is a kind of biomaterial with good hemostatic, antibacterial and absorption properties. The guanidine modified chitosan holding better antibacterial and absorption abilities is a commonly used chemical separation material. However, its coagulation property is still unclear.

**OBJECTIVE:** To evaluate the *in vitro* hemostatic property and cytotoxicity of the guanidine modified chitosan, and to explore its availability as a hemostatic material.

**METHODS:** The guanidine modified chitosan was synthesized with the raw materials of chitosan and arginine, and the coupling agents of EDC and NHS. The coagulation ability was evaluated preliminarily through the whole blood coagulation time, and three *in vitro* coagulation indexes (activated partial thromboplastin time, prothrombin time and thrombin time). The guanidine modified chitosan extracts were co-cultured with the mouse fibroblasts, and then the cell growth was observed by MTT assay and fluorescence microscope.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The guanidine modified chitosan shortened the whole blood coagulation time, suggesting its hemostatic property. *In vitro* coagulation results indicated that the guanidine modified chitosan exerted the effect not through the traditional endogenous and extrinsic coagulation pathways. Guanidino group has not been proved to be hemostatic, so the chitosan may be the effective component. MTT assay showed that the cell proliferation rate was 87.8% and the toxicity level was grade 1. Fluorescent staining observed abundant live cells, and few dead cells, indicating that the guanidine modified chitosan exhibits low cytotoxicity.

**Subject headings:** Guanidine; Chitosan; Hemostasis; Cell Proliferation; Tissue Engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 31570956

**Cite this article:** Yao XP, Jing ML, Guan J. Hemostatic property and cytotoxicity of the guanidine modified chitosan. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(6):906-910.

## 0 引言 Introduction

止血材料包括有机止血材料和无机止血材料两类。常见的有机止血材料有猪明胶、纤维素、胶原蛋白、多糖类等,无机止血材料有沸石、蒙脱石、介孔硅等。尽管这些止血材料各有优势,但在某些方面也存在一些不足,例如,胶原的组织黏附力较差,氧化纤维素的生物降解性欠佳, $\alpha$ -氰基丙烯酸酯降解过程中会释放出氰和甲醛等有毒物质等等<sup>[1-4]</sup>。虽然无机止血材料止血效率优于有机材料,但安全性往往存在缺陷,会对血管、神经、组织器官等造成损伤,产生毒副作用。因此,亟需研发一种具有高效、便捷的止血材料。

壳聚糖是一种带正电的天然高分子聚合物,是甲壳素经过脱乙酰之后的产物,广泛存在于自然界中,在虾、蟹等动物的壳中占有较高的组分,动物的毛发、骨骼等部位也含有少量的壳聚糖化合物<sup>[5]</sup>。壳聚糖具有良好的生物相容性,可以被生物酶分解,对人体无害,是优良的药物载体,在食品、化工和医药等领域多有应用<sup>[6-9]</sup>。由于其良好的生物相容性和抗菌止血能力,壳聚糖一直是医学界的研究热点。但纯壳聚糖止血效果有限,在某些特殊创面止血效果不稳定,且壳聚糖只能溶于酸,使其应用受到限制,为此,学者们开始对壳聚糖进行物理或化学改性以改善其各项性能<sup>[10-14]</sup>。尹刚<sup>[15]</sup>在壳聚糖上引入亲水性羟丁基制备了温敏性壳聚糖膜,止血实验结果显示温敏性壳聚糖膜能快速在伤口处聚集血细胞,形成凝胶状保护膜,以此达到促凝血作用。Gu等<sup>[16]</sup>通过静电纺丝技术制备出具有多孔结构的壳聚糖纳米纤维垫,研究发现其凝血速率是氧化纤维素的1.35倍,是纯壳聚糖的3.41倍。奚宏伟等<sup>[17]</sup>通过金属离子诱导形成凝胶的方法将壳聚糖-三聚磷酸钠(TPP)制成纳米颗粒,动物肝脏损伤模型显示,该材料对脏器的严重实质性出血表现出优异的止血效果。基于壳聚糖制得的止血衍生物种类繁多,而哪种材料最适合临床应用、止血效果最好,目前尚未有定论。

精氨酸是20种普遍的氨基酸之一,许多食物中都含有精氨酸,而精氨酸上的胍基是一种碱性很强且带正电的有机碱,其化合物多用于食品、化工和医药领域。研究者通

过辐照或偶联反应等手段,将壳聚糖进行胍基化改性,从而获得胍基壳聚糖衍生物,多项研究证实此类材料具有良好的抗菌性能<sup>[5, 18-19]</sup>。目前胍基壳聚糖多作为抗菌剂、化工助剂和基因载体等进行研究<sup>[20-25]</sup>,而其止血性能和生物相容性则鲜有报道。众多研究表明,壳聚糖能够通过电荷吸引来聚集血黏附细胞,促进血栓的形成。因此,凡是影响材料电荷性质的接枝基团,都可能对壳聚糖的凝血性能产生影响。

实验以壳聚糖和精氨酸为原料,NHS和EDC为偶联剂制备胍基壳聚糖粉末,通过全血凝固时间和3项体外凝血指标(活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间)对胍基壳聚糖的止血性能进行了初步评价,同时利用MTT比色法和细胞荧光染色对其细胞毒性进行分析,为胍基壳聚糖作为生物材料应用的可能性提供实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 观察学实验。

1.2 时间及地点 于2015年6月至2016年1月在军事医学科学院卫生装备研究所生物材料实验室和天津医药研究所完成。

1.3 材料 壳聚糖购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,脱乙酰度>95%,黏度100-200 mPa·s; 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、N-羟基-丁二酰亚胺(NHS)和2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物(MES)购自Sigma公司;精氨酸购自天津瑞博星生物科技有限公司。L929细胞购自天津医药研究所。止血粉(styptic powder)购自天津泰康生物制药有限公司。

**实验动物:** 成年雄性新西兰大白兔4只,体质量4 kg,由军事医学科学院动物中心提供。

**主要试剂和仪器:** 胎牛血清、DMEM培养基(美国Hyclone公司); 细胞培养瓶、胰酶(北京碧橙蓝生物技术有限公司); 活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间试剂盒(上海太阳生物技术有限公司); MTT试剂盒(美国Sigma公司); 半自动凝血仪(日本Cooper Biomedical Clotek-II)。

## 1.4 实验方法

**1.4.1 胍基壳聚糖的制备** 将2 g壳聚糖粉末溶于MES/HCL缓冲液(MES浓度25 mmol/L, pH=5), 加入一定量的偶联剂EDC和NHS并搅拌均匀, 再加入精氨酸(精氨酸摩尔数为壳聚糖氨基摩尔数的50%), 于室温搅拌条件下连续反应12 h。最后, 加入少量盐酸羟胺以终止反应, 并用标准氢氧化钠溶液调pH至9, 得到胍基化壳聚糖产物。将产物装入截留相对分子质量为8 000的透析袋, 蒸馏水透析1周后冷冻干燥, 得到最终产品——胍基壳聚糖。

**1.4.2 全血凝固时间观测** 新西兰大白兔心脏取血后, 与抗凝剂枸橼酸钠以9:1的比例混合。将20 mg胍基壳聚糖粉末放入试管中, 于37 °C预温5 min, 加入1 mL抗凝血后, 37 °C继续孵育3 min, 加入CaCl<sub>2</sub>溶液(25 mmol/L)后, 每隔10-15 s倾斜试管, 观察血液是否流动, 直至血液完全凝固。记录从加入氯化钙溶液到血液完全凝固的时间, 即为全血凝固时间。

**1.4.3 体外凝血指标(活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间)测定** 新西兰大白兔心脏取血后, 与枸橼酸钠以9:1比例混合。将抗凝全血以3 000 r/min离心15 min, 取上层血浆即为贫血小板血浆(PPP)。取20 mg样品(胍基壳聚糖和壳聚糖原料)与1 mL贫血小板血浆混合, 于37 °C恒温匀速培养20 min, 使样品与血浆充分接触。将活化部分凝血活酶时间试剂盒配置好待测液, 37 °C预温3 min, 取100 μL待测血浆置于专用测试管内, 加入37 °C预温的CaCl<sub>2</sub>溶液(25 mmol/L)后开始记录时间, 直至血浆凝固。凝血酶原时间和凝血酶时间采用对应试剂盒, 方法同上。

**1.4.4 待测材料浸提液的制备** 将壳聚糖、胍基壳聚糖粉末灭菌后加入DMEM培养液(0.1 g/mL), 放在37 °C培养箱中培养24 h制备材料浸提液。

**1.4.5 小鼠成纤维细胞(L929)的培养** 将L929细胞从冻存管内取出后, 于37 °C水浴快速复苏, 离心后去掉上清液, 加入新鲜配置的DMEM培养液, 内含体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/L链霉素, 吹打成细胞悬液后, 放置在含体积分数为5%CO<sub>2</sub>的37 °C恒温培养箱中静置培养, 隔日换液, 三四天后传代。将正常传代的L929细胞用胰酶消化后, 配置成细胞浓度为1×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>的细胞悬液, 接种于96孔板, 每孔100 μL, 放在含体积分数为5%CO<sub>2</sub>的37 °C培养箱中培养。

**1.4.6 MTT检测** 细胞培养24 h后, 弃去孔板内原培养液, 实验组加入胍基壳聚糖或壳聚糖浸提液(100 μL/孔), 阴性对照组加入6 cm<sup>2</sup>/mL高密度聚乙烯浸提液, 阳性对照组加入含5%二甲基亚砜的DMEM培养液, 空白对照组不加浸提液, 每组6孔。继续培养72 h后, 每孔加入无菌的MTT试剂(5 g/L), 放入培养箱中培养4 h, 弃去孔内液体, 再向每孔加入150 μL二甲基亚砜, 于室温下振荡10 min, 用酶标仪测定570 nm处和630 nm处吸光度, 计算两者的差值。细胞增殖率=(实验组吸光度的差值/空白对照组吸光度差

值)×100%。

**1.4.7 细胞毒性荧光测试** 细胞培养24 h后, 弃去孔内原液, 每孔加入100 μL胍基壳聚糖浸提液, 阴性对照组加入6 cm<sup>2</sup>/mL高密度聚乙烯浸提液, 放入培养箱中培养48 h后, 加入荧光细胞染料SYTO-9和PI, 继续孵育10 min, 最后用荧光显微镜拍照。

**1.5 主要观察指标** ①胍基壳聚糖材料的全血凝固时间; ②胍基壳聚糖材料的体外凝血指标(活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间); ③胍基壳聚糖对小鼠成纤维细胞增殖率的影响; ④荧光显微镜下观察胍基化壳聚糖对细胞生长状况的影响。

**1.6 统计学分析** 采用SAS 9.2统计学软件进行F检验, P<0.05为差异有显著性意义, P<0.01为差异有非常显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 胍基壳聚糖材料的全血凝固时间** 图1为胍基壳聚糖粉末和壳聚糖原料与抗凝全血混合后测得的全血凝固时间。从图中可以看出, 纯血的凝固时间约为210 s, 含壳聚糖血液的凝固时间约为151 s, 含胍基壳聚糖材料的血液凝固时间约为145 s, 市售止血粉的止血时间约为185 s。经SAS计算, 胍基化壳聚糖材料的凝血时间与纯血相比较, 差异有显著性意义(P<0.05), 也明显短于市售止血粉(P<0.05), 证明胍基化壳聚糖具有良好的止血效果。壳聚糖与胍基壳聚糖相比, 差异无显著性意义(P>0.05)。

**2.2 胍基壳聚糖材料的体外凝血指标** 从图2中可以看出, 空白血浆、含壳聚糖的血浆和含胍基壳聚糖材料的血浆各项指标数据非常接近, 活化部分凝血活酶时间约为18 s, 凝血酶原时间约为7.5 s, 凝血酶时间在16.8 s至18 s之间浮动。经SAS计算, 血浆、含壳聚糖的血浆和含胍基壳聚糖材料的血浆各项指标两两相比差异均无显著性意义(P均>0.05)。

**2.3 胍基壳聚糖对小鼠成纤维细胞增殖率的影响** 阴性对照组细胞增殖率为99.3%, 阳性对照组细胞增殖率为21.7%, 壳聚糖组细胞增殖率为83.4%, 胍基壳聚糖组细胞增殖率为87.8%, 说明细胞生长状态良好, 根据表1细胞毒性与细胞增殖率的关系, 胍基壳聚糖和壳聚糖的毒性分级结果均为1级。

**2.4 荧光显微镜下观察胍基化壳聚糖对细胞生长状况的影响** SYTO-9为活细胞染料, 在荧光显微镜下呈绿色; PI为死细胞染料, 在荧光显微镜下呈红色。图3A为阴性对照组活细胞, 绿色荧光非常丰富, 细胞分布紧密均匀。图3a为阴性对照组死细胞, 红色荧光零散分布, 数量极少。图3B为胍基壳聚糖组活细胞, 可见绿色荧光与阴性对照组相差无几, 而图3b死细胞较阴性对照组略多一点, 但总量依旧很少。与阴性对照组相比, 胍基壳聚糖与细胞共同孵育后, 大部分细胞生长状态良好, 细胞未出现大量死亡。

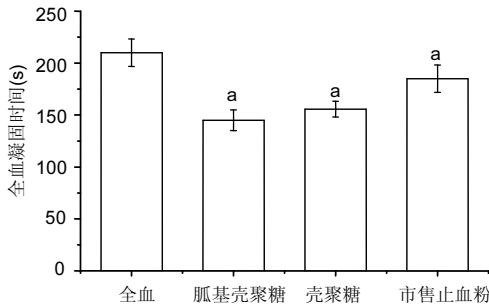


图1 壳聚糖、胍基壳聚糖和市售止血粉的全血凝固时间

Figure 1 The whole blood coagulation time of chitosan, guanidine modified chitosan and commercially hemostatic powder

图注: 与空白全血相比, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

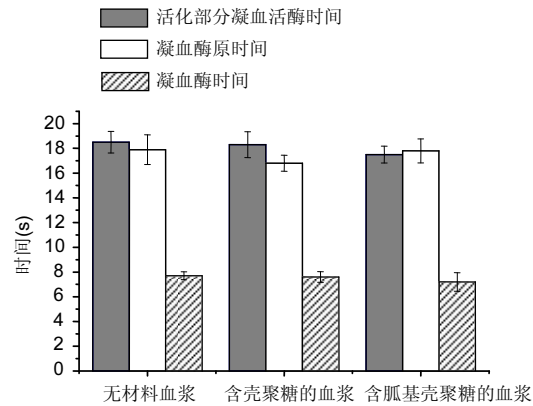


图2 壳聚糖及胍基壳聚糖的体外凝血指标

Figure 2 *In vitro* coagulation tests of chitosan and guanidine modified chitosan

图注: 无材料血浆、含壳聚糖的血浆和含胍基壳聚糖材料的血浆各项指标两两相比差异均无显著性意义。

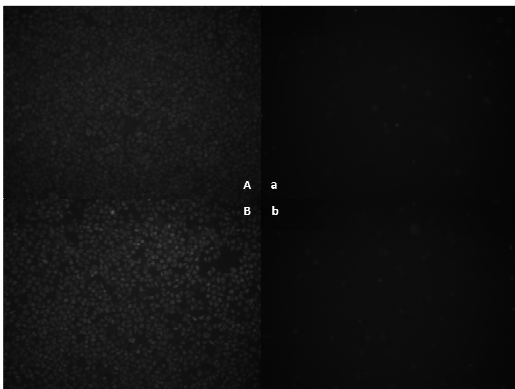
图3 荧光显微镜下观察胍基壳聚糖对细胞生长状况的影响( $\times 400$ )

Figure 3 Effect of the guanidine modified chitosan on the cell growth under fluorescence microscope ( $\times 400$ )

图注: ①图中 A 为阴性对照组活细胞, a 为阴性对照组死细胞; B 为胍基壳聚糖组活细胞, b 为胍基壳聚糖组死细胞; ②图中胍基壳聚糖组与阴性对照组相比, 死细胞只有少许的增加, 活细胞依然大量存在, 证明胍基壳聚糖细胞毒性很低。

### 3 讨论 Discussion

全血凝固时间是一种检测材料凝血性能的基础方法, 通过观察试管内血液的流动情况和凝固时间, 可以直观判断材料的凝血效果。当材料与抗凝全血混合后, 加入 $\text{CaCl}_2$ 启动凝血过程, 各材料凝血时间的长短反映出其凝血性能的强弱。目前研究认为, 壳聚糖带正电, 红细胞带负电, 因此壳聚糖对红细胞有电荷的吸引, 能促进红细胞聚集, 从而加速凝血<sup>[26]</sup>。胍基是目前自然界中发现的带正电荷最强的有机碱, 通过接枝胍基基团, 加强了壳聚糖的正电性, 理论上应该能吸引更多的红细胞。但全血凝固时间结果显示, 胍基壳聚糖的凝血时间虽略短于壳聚糖, 但区别并不显著, 却与纯血有很大的差异。这个结果说明, 通过精氨酸改性之后制备的胍基壳聚糖的确具有缩短凝血时间的能力, 但并未明显改善壳聚糖的促凝性能。

根据凝血瀑布机制, 凝血过程一般分为内源性凝血途径、外源性凝血途径和共同凝血途径<sup>[27-28]</sup>。活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间分别是测定内源性和外源性凝血系统较敏感和常用的筛选实验, 而凝血酶时间是测定共同

表1 细胞相对增殖率与细胞毒性分级的对应关系

Table 1 The relationship between the relative proliferation rate and cytotoxicity

| 细胞相对增殖率 (%) | 细胞毒性分级 |
|-------------|--------|
| $\geq 100$  | 0      |
| 75-99       | 1      |
| 50-74       | 2      |
| 25-49       | 3      |
| 1-24        | 4      |
| 0           | 5      |

凝血途径中纤维蛋白原转换为纤维蛋白的过筛实验, 临床上用于辅助诊断。有研究表明壳聚糖不通过常规的血小板和凝血因子来发挥作用<sup>[29-30]</sup>。体外凝血指标的结果显示, 空白血浆、含壳聚糖的血浆和含胍基壳聚糖材料的血浆各项指标数据非常接近, 差异无显著性意义, 表明胍基壳聚糖不能对血浆中的凝血因子起到明显的活化作用, 延续了壳聚糖的止血特征。

材料的生物安全性是其进行临床应用的重要前提和基础, 而细胞增殖率则是判断材料生物安全性的重要指标。按照GB/T 16 886.5- 2003标准和MTT法所测得结果显示, 胍基壳聚糖能良好地促进细胞增殖, 细胞毒性分级为1级, 毒性极小, 细胞相容性好。除MTT比色法之外, 活死细胞荧光染色也是判断细胞生长情况的常用方法, 且结果更加直观。众所周知, 壳聚糖具有良好的生物相容性, 接枝胍基基团后, 其抗菌性能得到加强。细胞荧光染色结果显示, 与胍基壳聚糖浸提液共混培养后, 活细胞数量远远大于死细胞, 细胞毒性结果反馈良好。该结果与MTT比色法结果一致, 进一步说明胍基壳聚糖是一种无毒的生物材料。

综上, 通过精氨酸接枝改性后制得的胍基壳聚糖具有一定的加速止血能力, 且其促凝作用不依赖于常规凝血途径, 但与纯壳聚糖相比, 效果提升不显著。此外, 胍基壳

聚糖细胞毒性非常低, 细胞相容性良好, 是一种无毒的生物材料。实验使用精氨酸作为原料来引入胍基基团, 对其凝血性能做了初步评价, 而其他含胍基基团的侧链是否会对壳聚糖的凝血性能产生影响, 还需进一步研究。

**致谢:** 感谢荆妙蕾老师和关静老师对于论文写作和实验的指导。同时, 还要感谢天津市医药研究所高萍老师在体外凝血指标和细胞实验上提供的帮助, 提出了许多宝贵的意见。此外, 还要感谢卫生装备研究所的各位师兄在各类软件使用上的指导。

**作者贡献:** 第一作者和通讯作者构思并设计实验, 并与第二作者共同分析文献资料, 实验实施为姚心培, 实验评估为关静。

**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:** 文章中对大白兔进行采血的步骤, 均按照国际“实验动物使用和护理指南”执行。

**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双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。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。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 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。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Elvin CM, Vuocolo T, Brownlee AG, et al. A highly elastic tissue sealant based on photopolymerised gelatin. *Biomaterials*. 2010;31(32):8323-8331.
- [2] Wu Y, He J, Cheng W, et al. Oxidized regenerated cellulose-based hemostat with microscopically gradient structure. *Carbohydrate Polymers*. 2012; 88(3):1023-1032.
- [3] Eldibany RM. Platelet rich fibrin versus Hemcon dental dressing following dental extraction in patients under anticoagulant therapy. *Tanta Dental Journal*. 2014; 11(2):75-84.
- [4] Schmid BC, Rezniczek GA, Rolf N, et al. Postpartum hemorrhage: use of hemostatic combat gauze. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(1):e12-13.
- [5] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 2版.北京:化学工业出版社, 2007.
- [6] 蒋小姝, 莫海涛, 苏海佳, 等. 甲壳素及壳聚糖在农业领域方面的应用[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(6):170-174.
- [7] 乔德亮. 低聚壳聚糖制备及其在功能食品中应用[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(4):228-231.
- [8] 程志, 杜娜. 壳聚糖在医药领域应用研究进展[J]. *人民军医*, 2013, (2):223-224.
- [9] 刘长岚, 崔文新, 李成彬. 壳聚糖及其衍生物在化工方面应用的研究[J]. *山东师范大学学报:自然科学版*, 2003, 18(3):73-74.
- [10] 黄勇. 壳聚糖及其胍基化衍生物的合成、表征及抗菌性能研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
- [11] Martins AF, Facchi SP, Follmann HD, et al. Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: a review. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):20800-20832.
- [12] Baker S, Wiesmann WP, Ryan S. Chitosan-derivative compounds and methods of controlling microbial populations. US, US8658775. 2014.
- [13] Chan LW, Kim CH, Wang X, et al. PolySTAT-modified chitosan gauzes for improved hemostasis in external hemorrhage. *Acta Biomater*. 2016;31:178-185.
- [14] Dowling MB, Smith W, Balogh P, et al. Hydrophobically-modified chitosan foam: description and hemostatic efficacy. *J Surg Res*. 2015;193(1):316-323.
- [15] 尹刚. 温敏性壳聚糖止血膜止血作用的实验研究[D]. 上海:第二军医大学, 2014.
- [16] Gu BK, Park SJ, Kim MS, et al. Fabrication of sonicated chitosan nanofiber mat with enlarged porosity for use as hemostatic materials. *Carbohydr Polym*. 2013;97(1):65-73.
- [17] 奚宏伟, 魏长征, 王文斌, 等. 壳聚糖-三聚磷酸钠纳米粒对于肝组织严重出血模型的止血效果[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(15):2831-2834.
- [18] 谭奕哲, 吴国忠, 曾虹燕, 等. 抗菌性壳聚糖双胍酸盐的辐照辅助制备及其生物毒性[J]. *功能高分子学报*, 2015, 28(2):183-187.
- [19] Su YR, Yu SH, Chao AC, et al. Preparation and properties of pH-responsive, self-assembled colloidal nanoparticles from guanidine-containing polypeptide and chitosan for antibiotic delivery. *Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects*. 2016; 494:9-20.
- [20] Sun S, An Q, Li X, et al. Synergistic effects of chitosan-guanidine complexes on enhancing antimicrobial activity and wet-strength of paper. *Bioresour Technol*. 2010; 101(14):5693-5700.
- [21] Ryu K, Kim K, Kim TI, et al. Synthesis and characterization of guanidinylated polyethylenimine-conjugated chitosan for gene delivery systems. *Macromolecular Research*. 2014; 22(3):264-271.
- [22] He B, Shao Y, Liang M, et al. Biodiesel production from soybean oil by guanidinylated chitosan. *Fuel*. 2015; 159: 33-39.
- [23] Luo Y, Zhai X, Ma C, et al. An inhalable  $\beta_2$ -adrenoceptor ligand-directed guanidinylated chitosan carrier for targeted delivery of siRNA to lung. *J Control Release*. 2012;162(1):28-36.
- [24] Chen CY, Lin HC, Huang YY, et al. 'One-flask' transformation of isocyanates and isothiocyanates to guanidines hydrochloride by using sodium bis(trimethylsilyl)amide. *Tetrahedron*. 2010; 66(10):1892-1897.
- [25] Arafa RK, Ismail MA, Munde M, et al. Novel linear triaryl guanidines, N-substituted guanidines and potential prodrugs as antiprotozoal agents. *Eur J Med Chem*. 2008;43(12):2901-2908.
- [26] 杨健, 田丰, 陈世谦. 壳聚糖的止血机理和应用[J]. *国际生物工程杂志*, 2001, 24(2):77-80.
- [27] Di Cera E, Dang QD, Ayala YM. Molecular mechanisms of thrombin function. *Cell Mol Life Sci*. 1997;53(9):701-730.
- [28] Matthias R, Wolfram R. Proteinase - activated receptor activation by coagulation proteinases. *Drug Development Research*. 2003; 59(4):400-407.
- [29] Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG, et al. Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*. 1991; 49(8):858-863.
- [30] Benesch J, Tengvall P. Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*. 2002;23(12):2561-2568.