

## 臭氧缓释水凝胶止血及促伤口愈合作用

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3182>

刘方, 单争明, 汤雨蕾, 伍晓敏, 田卫群

2095-4344.3182

投稿日期: 2020-02-13

送审日期: 2020-02-24

采用日期: 2020-06-29

在线日期: 2020-11-16

中图分类号:

R459.9; R318.08; R-332

文章编号:

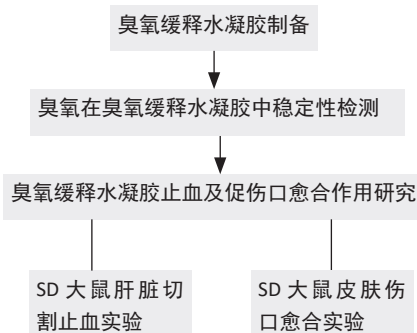
2095-4344(2021)22-03445-05

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

## 文章特点一

△以卡波姆为基质制备臭氧缓释水凝胶, 验证其提高臭氧稳定性及止血和促进伤口愈合作用。



## 文题释义:

**臭氧半衰期:** 为臭氧含量衰减到初始含量一半时所需要的时间。半衰期越久则臭氧稳定性越好。根据公式  $\ln c = -(\ln 2)t/t_{1/2} + \ln C_0$  作  $\ln c - t$  一次函数图, 可以求出半衰期  $t_{1/2} = -(\ln 2)/k$ , 其中  $c$  为臭氧浓度,  $t$  为时间,  $C_0$  为初始臭氧浓度,  $k$  为直线斜率,  $t_{1/2}$  为半衰期。目前认为臭氧半衰期与其溶解的介质有一定关系, 通过计算臭氧在介质中的半衰期可以判断臭氧在该介质中的稳定性。

**水凝胶:** 是一种具有三维网络结构的高分子体系, 具有多孔结构、较好的生物相容性和吸水性, 可以均匀、连续地释放其运载的物质。此次实验中水凝胶主要作用为可以将负载在其中的臭氧进行缓释, 延长臭氧作用时间, 帮助稳定臭氧。

## 摘要

**背景:** 臭氧具有良好的抑菌效果及止血促凝效果, 但因稳定性差、极易分解, 限制了其应用与推广。

**目的:** 制备臭氧缓释水凝胶, 评估其稳定性及止血与促进伤口愈合作用。

**方法:** ①以卡波姆为基质, 通过控制臭氧通入时间分别制备含臭氧浓度为  $(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ ,  $(2.3 \pm 1.8) \times 10^{-6}$ ,  $(7.20 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ ,  $(7.0 \pm 3.0) \times 10^{-6}$ ,  $(16.4 \pm 1.2) \times 10^{-6}$ ,  $(15.0 \pm 5.0) \times 10^{-6}$  的臭氧缓释水凝胶, 检测臭氧缓释水凝胶中臭氧的稳定性; ②取15只SD大鼠制作肝脏出血模型, 随机分5组处理: 空白对照组使用普通清洁纱布止血; 阳性对照组使用Celox止血粉止血; 低、中、高浓度臭氧凝胶组分别采用含臭氧浓度  $(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ ,  $(7.20 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ ,  $(16.4 \pm 1.2) \times 10^{-6}$  的臭氧缓释水凝胶覆盖创面, 记录止血时间; ③取15只SD大鼠制作背部皮肤伤口模型, 随机分5组处理: 空白对照组不作处理; 阳性对照组涂抹京万红软膏; 低、中、高浓度臭氧凝胶组分别覆盖含臭氧浓度  $(2.3 \pm 1.8) \times 10^{-6}$ ,  $(7.0 \pm 3.0) \times 10^{-6}$ ,  $(15.0 \pm 5.0) \times 10^{-6}$  的臭氧缓释水凝胶, 14 d内观察伤口愈合。实验项目经武汉大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: 2019010019。

**结果与结论:** ①臭氧在水凝胶中具有较好的稳定性, 该稳定性可维持2周左右; ②在肝脏止血实验中, 与空白对照组相比, 中、高浓度的臭氧缓释水凝胶与止血粉均可缩短止血时间  $(P < 0.01)$ , 并且高浓度臭氧缓释水凝胶的止血时间短于止血粉  $(P < 0.05)$ ; ③在皮肤伤口愈合实验中, 与空白对照组相比, 中、高浓度的臭氧缓释水凝胶在第4天可提高伤口愈合率  $(P < 0.05, P < 0.01)$ ; 至14 d时, 5组间伤口愈合率比较差异无显著性意义; ④结果表明, 臭氧缓释水凝胶具有较好的稳定性、促止血及伤口愈合功效。

**关键词:** 材料; 臭氧; 水凝胶; 缓释; 稳定性; 止血; 伤口愈合

## Effects of hemostasis and promoting wound healing of ozone sustained-release hydrogel

Liu Fang, Shan Zhengming, Tang Yulei, Wu Xiaomin, Tian Weiqun

Department of Biomedical Engineering, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Liu Fang, Master candidate, Department of Biomedical Engineering, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Corresponding author: Tian Weiqun, MD, Master's supervisor, Department of Biomedical Engineering, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

武汉大学基础医学院生物医学工程系, 湖北省武汉市 430071

第一作者: 刘方, 女, 1984年生, 河南省西华县人, 汉族, 武汉大学基础医学院在读硕士, 主要从事生物材料与再生医学的相关研究。

通讯作者: 田卫群, 博士, 硕士生导师, 武汉大学基础医学院生物医学工程系, 湖北省武汉市 430071

<https://orcid.org/0000-0002-1441-2650> (刘方)

基金资助: 武汉大学医学部大学生创新实验项目 (MS2018006), 项目负责人: 田卫群

引用本文: 刘方, 单争明, 汤雨蕾, 伍晓敏, 田卫群. 臭氧缓释水凝胶止血及促伤口愈合作用 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(22):3445-3449.



## Abstract

**BACKGROUND:** Ozone has good bacteriostatic and hemostatic effects, but its poor stability and easy decomposition limit its application and promotion.

**OBJECTIVE:** To prepare ozone sustained-release hydrogel, and to evaluate its stability and hemostasis and promoting effect on wound healing.

**METHODS:** (1) With carbomer as the substrate, the ozone sustained-release hydrogels with ozone concentrations of  $(3.4\pm 0.2)\times 10^{-6}$ ,  $(2.3\pm 1.8)\times 10^{-6}$ ,  $(7.20\pm 0.5)\times 10^{-6}$ ,  $(7.0\pm 3.0)\times 10^{-6}$ ,  $(16.4\pm 1.2)\times 10^{-6}$ , and  $(15.0\pm 5.0)\times 10^{-6}$  were prepared by controlling the ozone penetration time, and the stability of ozone in the ozone sustained-release hydrogel was tested. (2) A total of 15 Sprague-Dawley rats were used to make liver hemorrhage models. They were randomly divided into five groups: the blank control group used ordinary clean gauze to stop bleeding; the positive control group used Celox hemostatic powder to stop bleeding; the low-, medium- and high-concentration ozone gel groups were covered with ozone sustained-release hydrogel containing ozone concentrations of  $(3.4\pm 0.2)\times 10^{-6}$ ,  $(7.20\pm 0.5)\times 10^{-6}$ , and  $(16.4\pm 1.2)\times 10^{-6}$ , and the time of hemostasis was recorded. (3) A total of 15 Sprague-Dawley rats were used to make a model of the back skin wound. They were randomly divided into five groups: the blank control group was not treated; the positive control group was coated with Beijing Wanhong ointment; the low-, medium- and high-concentration ozone gel groups were covered with the ozone sustained-release hydrogel containing ozone concentrations of  $(2.3\pm 1.8)\times 10^{-6}$ ,  $(7.0\pm 3.0)\times 10^{-6}$ , and  $(15.0\pm 5.0)\times 10^{-6}$ , and wound healing was observed within 14 days. The experimental project was approved by the animal experimental ethics committee of Wuhan University (approval No. 2019010019).

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Ozone had good stability in hydrogels, which could last for about 2 weeks. (2) In the liver hemostasis experiment, compared with the blank control group, the medium- and high-concentration ozone sustained-release hydrogel and hemostatic powder could shorten the hemostatic time ( $P < 0.01$ ), and the hemostatic time of the high-concentration ozone sustained-release hydrogel was shorter than that of hemostatic powder ( $P < 0.05$ ). (3) In the skin wound experiment, compared with the blank control group, medium- and high-concentration ozone sustained-release hydrogel could improve the wound healing rate at 4 days ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); at 14 days, there was no significant difference in wound healing rate among five groups. (4) Ozone sustained-release hydrogel has good stability, can promote hemostasis and wound healing.

**Key words:** materials; ozone; hydrogel; sustained-release; stability; hemostasis; wound healing

**Funding:** Innovation Experiment Program for Medical College Students of Wuhan University, No. MS2018006 (to TWQ)

**How to cite this article:** LIU F, SHAN ZM, TANG YL, WU XM, TIAN WQ. Effects of hemostasis and promoting wound healing of ozone sustained-release hydrogel. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(22):3445-3449.

## 0 引言 Introduction

臭氧是一种淡蓝色气体，是氧的同素异构体，由3个氧原子组成，可以迅速分解成氧气和一个氧原子，具有较强的氧化性<sup>[1]</sup>，对微生物如白念珠菌、真菌及金黄色葡萄球菌等都具有氧化杀灭作用<sup>[2-3]</sup>。早在第一次世界大战期间，臭氧的杀菌特性就被用来治疗伤口感染。研究发现臭氧可以增加创面成纤维细胞生长因子及活性氧的含量，促进细胞分裂增殖迁移及血管生成，从而促进伤口愈合<sup>[4-5]</sup>。臭氧因具有镇痛效果被广泛应用于治疗及缓解腰椎间盘突出、风湿性关节炎等引起的疼痛。研究发现，外周腺苷酸蛋白激酶 (AMPK) 激活可能是臭氧镇痛的物质基础<sup>[6]</sup>。目前通过临床的不断探索，臭氧的适应证也不断地扩大，现已被广泛运用于脑卒中、抗病毒、高血脂、痛风、神经病理性疼痛、癌症、糖尿病治疗等方面<sup>[7]</sup>。SAKAI等<sup>[8]</sup>通过动物实验发现，一定浓度 ( $0.5\times 10^{-6}$  和  $4\times 10^{-6}$ ) 的臭氧还具有较好的止血促凝作用，其止血效果几乎等同于肾上腺素和凝血酶。但是臭氧的稳定性差、极易分解，这在很大程度上限制了其应用与推广。

卡波姆作为一种经皮给药系统的优良基质是目前常用的一种高分子聚合物，一般由丙烯酸与烯丙基蔗糖或丙烯基季戊四醇交联而成<sup>[9]</sup>，质地均匀，药物稳定性好，无过敏性，缓释药物快<sup>[10-11]</sup>，是一类重要的药物递送材料<sup>[12-13]</sup>。采用卡波姆为基质制作的凝胶剂是一种理想的缓释药物材料，可以使药物呈零级或近零级的释放，提高药物的使用效率<sup>[14]</sup>。以卡波姆为基质制备的外用凝胶剂已得到广泛应用，特别是在药品和化妆品领域<sup>[15]</sup>。参照文献配方采用卡波姆可制备出外观透明并具有水溶性的凝胶，此凝胶于皮肤耦合效果极佳<sup>[16]</sup>。实验旨在探索臭氧缓释水凝胶的稳定性及其止血、促伤口愈合作用，为臭氧作为一种性能优良新型伤口止血材料的进一步开发奠定基础。

## 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2018年9月至2019年12月在武汉大学基础医学院实验室完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 雌性SD大鼠，SPF级，体质量140-160 g，购自湖北省疾控中心，实验动物合格证号：42010200002501。实验项目经武汉大学动物实验伦理委员会批准，批准号：2019010019。

1.3.2 仪器与试剂 臭氧发生器 (武汉大学化学与分子科学学院物化实验室自组装)；卡波姆940 (上海麦克林生化科技有限公司)；三乙醇胺 (国药集团化学有限公司)；甘油 [福晨 (天津) 化学试剂有限公司]；碘化钾、硫代硫酸钠 (大连美仑生物有限公司)；Celox止血粉 (Medtrade Products Ltd)；扫描电子显微镜 (捷克 VEGA 3 LMU, TESCAN, Czech Republic)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 臭氧缓释水凝胶的制备 根据预实验及相关参考文献<sup>[17]</sup>，采用不同水质、不同pH值、不同添加剂 (如明胶，甘油，透明质酸，卡波姆等) 作为臭氧的载体，分别计算了不同条件下臭氧的半衰期，计算结果表明，卡波姆对于臭氧半衰期时间最长，因而选定卡波姆为制备凝胶的载体。参照文献 [16] 报道的配比制备卡波姆缓释水凝胶，具体步骤为：首先将1 g卡波姆放入45.4 g水中自然溶胀，然后加入53.4 g甘油，开启搅拌器以30-50 r/min速度搅拌并连接臭氧发生器通入臭氧，最后加1.1 g三乙醇胺交联制成臭氧缓释水凝胶。当通入臭氧浓度时间为1 h时可以制备出浓度分别为  $(3.4\pm 0.2)\times 10^{-6}$ ， $(2.3\pm 1.8)\times 10^{-6}$  的低浓度臭氧缓释水凝胶；当通入臭氧浓度时间为2 h时可制备出浓度分别为  $(7.20\pm 0.5)\times 10^{-6}$ ， $(7.0\pm 3.0)\times 10^{-6}$  的中浓度臭氧缓释水凝胶；当通入臭氧浓度时间为3 h时可以制备出浓度分别为  $(16.4\pm 1.2)\times 10^{-6}$ ， $(15.0\pm 5.0)\times 10^{-6}$  的高浓度臭氧缓释水凝胶。

1.4.2 水凝胶的稳定性 制备出臭氧缓释水凝胶后，采用pH计分别测量水凝胶pH值，然后分别在0, 0.5, 1, 2, 3, 5,

7, 24, 48, 72 h 等时间点称取 2.0 g 水凝胶于烧杯中, 加 10 mL 水稀释, 待水凝胶完全溶解后用碘量法测量臭氧浓度: 量取 3 mL 碘化钾溶液, 倒入烧杯中, 加入 1 滴 (1+5) 硫酸溶液 (使 pH 值降至 2.0 以下) 并摇匀, 避光静置 5 min; 用 0.001 0 mol/L 的硫代硫酸钠标准溶液滴定, 待溶液呈浅黄色时加入 1 mL 淀粉溶液, 继续滴定至颜色消失, 记录硫代硫酸钠标准溶液用量。

臭氧浓度的计算:  $C(O_3) = V(Na_2S_2O_3) \times C(Na_2S_2O_3) / V_0$  (待测液), 式中  $V(Na_2S_2O_3)$  为硫代硫酸钠标准溶液用量 (mL),  $C(Na_2S_2O_3)$  为硫代硫酸钠标准溶液浓度 (mol/L),  $V_0$  为臭氧水取样体积 (mL)。应注意的是整个过程中使碘化钾和臭氧缓释水凝胶充分混合避光发生反应, 通过计算记录臭氧浓度随时间的变化情况。

**1.4.3 水凝胶微观形貌观察** 取 0.5 g 臭氧缓释水凝胶均匀涂于玻璃皿底部, 涂层厚度约为 1 mm。然后置于 -80 °C 冰箱冷冻 1 h 以上, 使用真空干燥箱进行干燥, 将干燥后的样品黏附在铜台表面, 喷金 2 min 后扫描电子显微镜下观察实验样品的表面结构。

**1.4.4 大鼠肝脏止血实验** 参考文献 [18-19] 制作大鼠肝出血模型。将 15 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 分别为空白对照组、阳性对照组及低、中、高浓度臭氧凝胶组, 每组 3 只。麻醉 5 组大鼠后充分暴露肝脏 (图 1), 轻柔地拉出肝脏下叶, 剪去肝下叶下缘的肝组织, 形成长为 15 mm 的创面。从创面出血开始计时, 空白对照组使用普通清洁纱布止血; 阳性对照组使用 Celox 止血粉止血; 低、中、高浓度臭氧凝胶组分别采用含臭氧浓度  $(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ ,  $(7.2 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ ,  $(16.4 \pm 1.2) \times 10^{-6}$  的臭氧缓释水凝胶覆盖创面, 各 0.5 mL。每隔 10 s 观察有无再出血, 以无可见活动性出血为止血时间, 观察并记录止血时间。

**1.4.5 大鼠背部皮肤伤口愈合实验** 参考文献 [20-21] 制作大鼠背部皮肤伤口模型。将 15 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 分别为空白对照组、阳性对照组及低、中、高浓度臭氧凝胶组, 每组 3 只。麻醉 5 组大鼠后在脊柱两侧对称做直径为 13 mm、深度为皮肤全层的圆形伤口 (图 2)。空白对照组伤口不作处理; 阳性对照组涂抹 0.5 mL 京万红软膏 (天津达仁堂京万红药业有限公司, Z12020440); 低、中、高浓度臭氧凝胶组分别覆盖含臭氧浓度  $(2.3 \pm 1.8) \times 10^{-6}$ ,  $(7.0 \pm 3.0) \times 10^{-6}$ ,  $(15.0 \pm 5.0) \times 10^{-6}$  的臭氧缓释水凝胶, 各 0.5 mL。

各组均覆盖无菌纱布, 用胶布固定。每 24 h 换药一次, 观察伤口愈合情况, 拍照并量取伤口横径, 观察至术后第 14

天。计算愈合率, 愈合率 (%) =  $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$ , 式中  $A_0$  为原始创面面积,  $A_t$  为未愈合创面面积。

**1.5 主要观察指标** 臭氧缓释水凝胶的稳定性与止血、促伤口愈合效果。

**1.6 统计学分析** 实验数据属于计量资料, 所有统计数据采用  $\bar{x} \pm s$  描述。使用软件 SPSS 22.0 进行数据分析, Graph Pad Prism 8.2.0 作图。多组比较采用单因素方差分析, 统计学检验效能设置为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果 Results

**2.1 臭氧缓释水凝胶样品** 臭氧缓释水凝胶实物样品如图 3 所示, 呈无色透明胶体, 具有较好的黏滞力和皮肤延展性。

**2.2 臭氧在缓释水凝胶中的稳定性** 臭氧稳定性主要与其溶解的介质中酸性物质含量等有关, 实验所采用水凝胶中酸性物质含量是相同的, 其成分和制备方法相同, 因此稳定性也是相同的, 具有相似的分解曲线。用碘量法测量水凝胶臭氧浓度随时间变化的趋势结果见图 4。

**2.3 臭氧缓释水凝胶表面形貌观察** 利用扫描电子显微镜观察臭氧缓释水凝胶的表面形貌结构, 结果见图 5 所示, 水凝胶具有均匀的多孔结构, 且孔隙相互贯通。

**2.4 大鼠肝脏止血实验结果** 空白对照组、阳性对照组及低、中、高浓度臭氧凝胶组的止血时间分别为  $(361.67 \pm 122.35)$ ,  $(219.00 \pm 21.29)$ ,  $(461.00 \pm 11.00)$ ,  $(287.67 \pm 26.73)$ ,  $(165.00 \pm 21.22)$  s。统计分析显示, 低浓度臭氧凝胶组的止血时间长于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 中、高浓度臭氧凝胶组及阳性对照组的止血时间短于空白对照组 ( $P < 0.01$ ), 并且高浓度臭氧凝胶组的止血时间短于阳性对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。

**2.5 大鼠背部伤口愈合实验结果** 术后各组大鼠伤口未出现感染, 观察 14 d 后伤口基本愈合。各组不同时间点伤口创面愈合情况见图 7。术后第 4 天, 中、高浓度臭氧凝胶组的愈合率高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 同时高于阳性对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 5 组其余时间点的愈合率比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。结果表明, 中、高浓度臭氧缓释凝胶具有促进伤口早期愈合的作用, 且高浓度臭氧缓释凝胶效果最好。

## 3 讨论 Discussion

在扫描电子显微镜下可以观察到臭氧缓释水凝胶呈三维网格状结构, 网格之间相互交通, 该结构具有较好的吸水性,

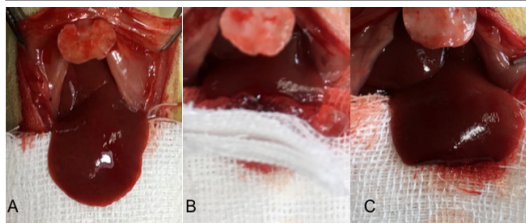
表 1 | 术后不同时间点各组创面愈合率的比较

Table 1 | Comparison of wound healing rate of each group at different time points after operation

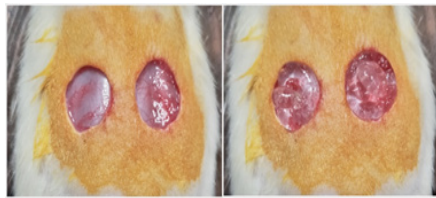
( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	第 4 天	第 6 天	第 8 天	第 10 天	第 12 天	第 14 天
空白对照组	38.77±9.48	59.58±6.55	81.24±6.64	84.62±12.92	95.03±3.51	98.83±2.29
低浓度臭氧凝胶组	42.48±6.05	52.93±9.29	73.99±3.62	85.51±2.48	96.23±2.58	94.87±4.44
中浓度臭氧凝胶组	55.87±6.87 <sup>a</sup>	55.41±13.69	84.08±4.75	90.77±2.34	95.46±1.56	97.68±1.71
高浓度臭氧凝胶组	60.86±6.48 <sup>bd</sup>	68.14±11.84	82.60±4.54	91.86±3.12	95.65±5.36	95.46±4.51
阳性对照组	29.07±17.24	54.08±15.80	80.74±7.80	89.43±3.88	95.83±2.15	99.34±1.32

表注: 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与阳性对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$



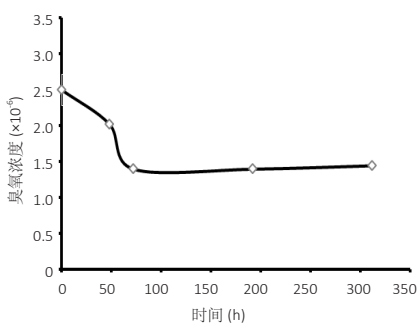
图注: A 为肝出血前, B 为水凝胶肝脏止血, C 为肝出血止血后  
图 1 | 大鼠肝脏创面止血模型  
Figure 1 | Hemostatic model of liver wound in rats



图注: 左图为上药前, 右图为上药后  
图 2 | 大鼠背部皮肤伤口模型  
Figure 2 | Rat back skin wound model

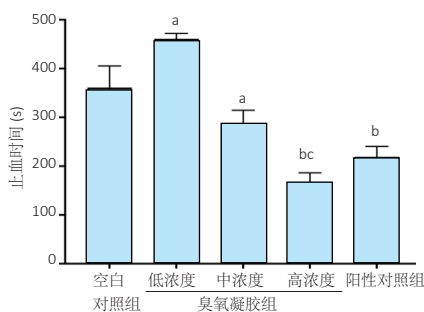


图注: 臭氧缓释水凝胶呈无色透明胶体, 具有较好的黏滞力和皮肤延展性  
图 3 | 臭氧缓释水凝胶实物样品大体观  
Figure 3 | General view of sample of ozone sustained-release hydrogel



图注: 臭氧在缓释水凝胶中维持在高于  $1.0 \times 10^6$  浓度大约 2 周的时间  
图 4 | 臭氧缓释水凝胶中臭氧浓度随时间的变化

Figure 4 | Variation profile of ozone concentration in ozone sustained-release hydrogel with time



图注: 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与阳性对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$   
图 6 | 各组肝脏创面止血时间

Figure 6 | Hemostatic time of liver wound in different groups

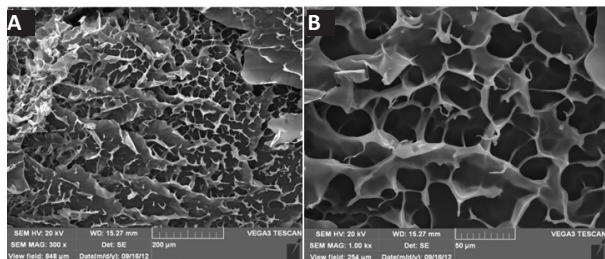


图 5 | 臭氧缓释水凝胶扫描电镜形貌观察

图注: A 为放大倍数 300 下的臭氧缓释水凝胶, B 为放大倍数 1000 下的臭氧缓释水凝胶。水凝胶具有均匀的多孔结构, 且孔隙相互贯通

Figure 5 | Morphology of ozone sustained-release hydrogel by scanning electron microscope

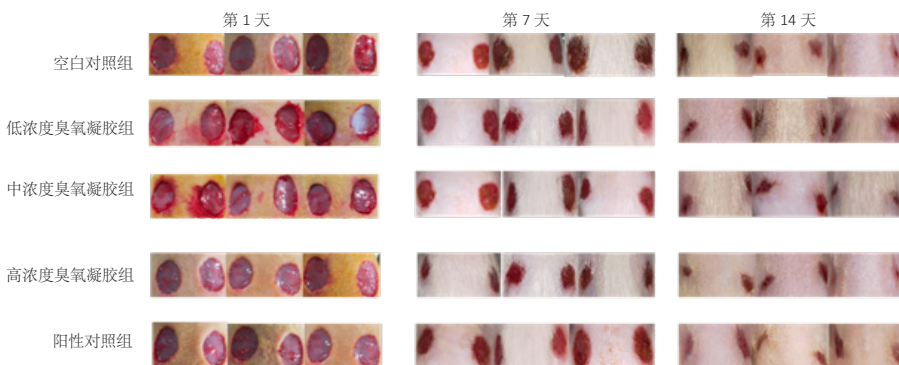


图 7 | 不同时间点各组伤口愈合大体观察

Figure 7 | General view of wound healing at different time points in each group

在接触血液时可以吸收血浆, 浓缩血液, 帮助血小板和红细胞聚集, 提高止血效果<sup>[22]</sup>。有文献表明, 氢氧根离子 ( $\text{OH}^-$ ) 是臭氧分解的催化剂<sup>[23]</sup>, 因此在溶液中加入一定的酸性物质可以中和  $\text{OH}^-$  来抑制臭氧的分解, 达到稳定臭氧的目的。卡波姆分子结构中含 52%–68% 的酸性基团, 1% 水分散体的 pH 值为 2.5–3.0<sup>[24]</sup>。卡波姆所形成的凝胶在 pH=6–12 时有最大的黏度和稠度, 因此一般会加入三乙醇胺等为中和剂中和其酸度而维持较大的黏稠度<sup>[25]</sup>。经测试, 实验制备出的臭氧缓释水凝胶 pH 值介于 6.03–6.32 之间, 为弱酸性, 有助于保护和稳定臭氧。

肝脏止血实验中,  $(7.2 \pm 0.5) \times 10^6$  及  $(16.4 \pm 1.2) \times 10^6$  的臭氧缓释水凝胶因其中的臭氧被凝胶包裹, 起到了一定的缓释作用, 进而限制了臭氧每次的释放量, 由此推测实际作用于肝脏止血的臭氧有效浓度低于  $(7.2 \pm 0.5) \times 10^6$  及  $(16.4 \pm 1.2) \times 10^6$ , 但是接近有效止血浓度即  $0.5 \times 10^6$  及  $4 \times 10^6$ <sup>[8]</sup>, 因而具有较好的止血效果; 然而, 低浓度臭氧缓释水凝胶组在每次实验过程中作用于伤口处的实际臭氧浓度可能低于  $0.5 \times 10^6$ , 故导致低浓度臭氧缓释水凝胶的止血效果相对较差。另外, 空白对照组使用无菌纱布覆盖在伤口出血处, 纱布本身具有一定的止血效果, 缩短了空白对照组的止血时间, 因此低浓度臭氧缓释水凝胶的止血效果弱于空白对照组。臭氧能够提高红细胞代谢, 增加红细胞内 ATP 和 2, 3 二磷酸甘油酸含量, 使氧离曲线右移, 增加组织供氧; 臭氧激活红细胞的糖代谢, 促进还原型辅酶 II 的生成, 有利于维持红细胞膜的完整性<sup>[26–27]</sup>。在生理凝血止血过程中, 血浆纤维蛋白原在凝血酶和纤维蛋白稳定因子 (FX III a) 的作用下转变为纤维蛋白单体, 在钙离子作用下, 活化的血浆纤维蛋白稳定因子使纤维蛋白单体相互交联聚合形成纤维蛋白网络<sup>[28]</sup>。一方面, 臭氧能诱导纤维蛋白原的氧化修饰, 使其化学结构和三维结构被破坏, 引发纤维蛋白自组装的改变, 导致形成的纤维蛋白网络孔隙更小、刚性更强、渗透率更低<sup>[29–30]</sup>; 另一方面, 经过臭氧氧化修

饰的纤维蛋白原更容易与凝血酶实现酶促交联，更容易受到FX III a因子作用，加快纤维蛋白凝块的形成，从而促进止血<sup>[31]</sup>。

臭氧本身具有杀菌作用，可以避免伤口感染，对于伤口愈合有一定的帮助。臭氧可以激活红细胞代谢，使机体的免疫系统及抗氧化系统在红细胞膜上发生轻微的过氧化反应，改善组织内氧的运输和利用，增加重要组织和器官的氧气供应，提高血氧饱和度。另外，臭氧可以促进伤口中炎症因子、生长因子的表达，抑制凋亡分子的生成<sup>[32-33]</sup>。臭氧缓释水凝胶所含的卡波姆及甘油本身具有较好的保水保湿作用，可以保持伤口湿润，这种湿化的环境被证明有助于伤口上皮细胞生长，促进创口愈合，而且愈合速度比干性环境更快<sup>[34]</sup>。观察实验中大鼠伤口皮肤愈合情况发现，中、高浓度臭氧凝胶组可以减少早期大鼠皮肤创面伤口红肿及感染，帮助创面愈合更快，由此说明，中、高浓度臭氧缓释水凝胶具有显著的促进伤口愈合作用，且高浓度凝胶效果更明显。

臭氧因稳定性差目前多为临时制备使用，这在一定程度上限制了其应用。目前也有将臭氧直接通入植物油中制备成臭氧油，因植物油中所含不饱和脂肪酸可以固化臭氧，经过固化的臭氧可以在冷藏中保持2年左右并维持一定的臭氧有效浓度<sup>[35]</sup>。这种臭氧油一般是作为杀菌剂使用，因其臭氧浓度含量过高，不具备止血作用。实验以卡波姆为基质成功研制了一种可以缓释臭氧并具有止血及促伤口愈合的水凝胶，该水凝胶廉价、易得、生物安全性好，进一步扩展了臭氧在临床和日常生活方面的应用，有望开发成一种性能优良的新型伤口止血材料。

**作者贡献：**第一、二、三、四作者和通讯作者共同分析文献资料并构思设计实验，第二、三、四作者起草，并经过第一作者修改及通讯作者审核。第一作者及通讯作者对文章负责。

**经费支持：**该文章接受了“武汉大学医学部大学生创新实验项目(MS2018006)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题：**实验项目经武汉大学动物实验伦理委员会批准，批准号：2019010019。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。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。

**写作指南：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重：**文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审：**文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明：**该文统计学方法已经武汉大学基础医学院生物统计学专家审核。

**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，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”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] BORGES GA, ELIAS ST, SILVA SM, et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017; 45(3):364-370.

[2] KHATRI I, MOGER G, KUMAR NA. Evaluation of effect of topical ozone therapy on salivary Candidal carriage in oral candidiasis. *Indian J Dent Res.* 2015;26(2):158-162.

[3] ALSAADHI H, POTAPOVA I, ROCHFORD ET, et al. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing *Staphylococcus aureus* in vitro: a potential irrigant for infected wounds. *Int Wound J.* 2016;13(5):936-942.

[4] 李云恺, 陈丽艳, 王惠, 等. 臭氧、臭氧水对感染性创面修复作用的分子生物学研究 [J]. *海南医学*, 2014, 25(10):1409-1411.

[5] 王韬. 壳聚糖纳米粒水凝胶的制备及其对皮肤伤口修复的研究 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2019.

[6] ZENG J, LU J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol.* 2018;56:235-241.

[7] 倪高荣. 臭氧自血疗法对患者凝血功能影响的自身对比研究 [D]. 昆明医科大学, 2017.

[8] SAKAI D, MAKITA Y, MASUNO K, et al. Local Hemostatic Effect of Aqueous Ozone in Cutting Wound Surface. *J Hard Tissue Biol.* 2014;23(2):245-248.

[9] 陈静. 药用辅料卡波姆在药物制剂中的应用探讨 [J]. *企业科技与发展*, 2019(9):150-151, 153.

[10] 何银舟. 卡波姆的特性及其在药剂学中应用的研究进展 [J]. *临床合理用药杂志*, 2019, 12(15):180-181.

[11] LUND RG, SILVA AF, PIVA E, et al. Clinical evaluation of two desensitizing treatments in southern Brazil: A 3-month follow-up. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(6):1469-1474.

[12] XU M, SUN M, QIAO H, et al. Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid. *Int J Pharm.* 2014;468(1-2):165-171.

[13] MESHALI MM, ELSAYED GM, ELSAID Y, et al. Preparation and Evaluation of Theophylline Sustained-Release Tablets. *Drug Dev Ind Pharm.* 1996;22(4):373-376.

[14] DURRANI MJ, WHITAKER R, ANDREWS A, et al. Studies on drug release kinetics from Carbopol 934 Ptablets. *Pharm Res.* 1991;8 (10Suppl):s135.

[15] 孟勇涛, 饶丽平. 卡波姆在凝胶制剂中使用的问题探讨 [J]. *齐鲁药事*, 2010, 29(12):708-709.

[16] 李成蓉, 黄筱萍. 卡波姆的性质和应用 [J]. *华西药科学杂志*, 1999, 14(2):50.

[17] 许伟坚. 臭氧缓释水凝胶的制备及条件研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2017.

[18] 孟志云, 龚桂芳, 刘敏霞. 纤维蛋白胶干粉对大鼠出血模型的止血作用 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26(1):51-53.

[19] 王建坤, 赵黎黎, 刘文婕. 蒙脱石在肝脏出血模型大鼠的止血作用 [J]. *江苏医药*, 2018, 44(5):484-487.

[20] 王景文. 京万红软膏治疗皮肤损伤的临床应用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(4):375-380.

[21] 白爽, 侯登勇, 沈先荣. 新型静电纺丝伤口敷料的止血性能及促愈合作用研究 [J]. *中国海洋药物*, 2019, 38(2):1-10.

[22] 秦承玲. 海藻酸盐基水凝胶的制备及其性能研究 [D]. 上海: 东华大学, 2017.

[23] WALTER RH, SHERMAN RM. Duration of ozone in water in the upper solubility range. *J Food Sci.* 1976;41:993-995.

[24] 郭红叶, 伊博文, 闫小平, 等. 新型辅料卡波姆在凝胶剂中应用现状 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(17):371-374.

[25] 王敏, 薛晓东. 卡波姆凝胶剂的临床应用研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(6):1078-1080.

[26] BOCCI V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine. *Brit J Biomed Sci.* 1999;56(4):270-279.

[27] GÓRNICKI A, GUTSZE A. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: An EPR study. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(4):963-971.

[28] BOCCI V, ALDINUCCI C. Rational bases for using oxygen-ozone therapy as a biological response modifier in sickle cell anemia and beta-thalassemia: A therapeutic perspective. *J Biol Reg Homeos Ag.* 2004;18(1):38-44.

[29] ROSENFELD MA, BYCHKOVA V, SHCHEGOLKHIN AN, et al. Ozone-induced oxidative modification of plasma fibrin-stabilizing factor. Bba-Proteins Proteom. 2013;1834(12):2470-2479.

[30] ROSENFELD MA, BYCHKOVA V, SHCHEGOLKHIN AN, et al. Fibrin self-assembly is adapted to oxidation. *Free Radical Bio Med.* 2016;(95):55-64.

[31] ROSENFELD MA, SHCHEGOLKHIN AN, BYCHKOVA V, et al. Ozone-induced oxidative modification of fibrinogen: role of the D regions. *Free Radic Biol Med.* 2014;(77):106-120.

[32] BOCCI V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediat Inflamm.* 2004;13(1):3-11.

[33] 万筱玲, 谢运华, 叶毓麟, 等. 慢性伤口应用臭氧外部充气疗法的效果观察 [J]. *护理学报*, 2009, 16(14):57-58.

[34] 陈晓红. 臭氧治疗仪对肛周脓肿术后伤口愈合的临床研究 [J]. *全科医学临床与教育*, 2019, 17(3):287-288.

[35] 董化军. 医用臭氧在皮肤疾病中的创新性应用 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(89):40-41.