

doi:10.13361/j.qdyxy.201602016

# 海藻酸钙纤维制备新型医用止血敷料的评价研究

初晓夏,王斌,王海涛,陈豪,崔飞艳

(青岛大学医学院病原生物学教研室,山东 青岛 266071)

**[摘要]** 目的 与纱布、明胶海绵止血敷料比较,评价海藻酸钙纤维止血敷料的止血效果、生物相容性以及抗菌性能。方法 将 3 种止血敷料敷于新西兰兔背部两侧创口,记录出血时间,用氰化高铁血红蛋白(Hb)检测试剂检测 Hb 吸光度值评价止血效果,采用溶血实验、急性全身毒性实验、体外细胞毒性实验评价敷料生物相容性,采用振荡法实验评价抗菌性能。结果 海藻酸钙纤维、纱布、明胶海绵组的出血时间分别为(95.28±3.95)、(138.33±5.98)、(101.25±4.53)s,差异有显著性( $F=2\ 433.233, P<0.05$ );Hb 吸光度值分别为 1.269±0.011、1.146±0.013、1.754±0.013,差异有显著性( $F=24\ 764.804, P<0.05$ ),出血量分别为(0.921±0.021)、(0.900±0.012)、(1.607±0.028)g,差异亦有显著性( $F=3\ 364.499, P<0.05$ )。海藻酸钙纤维细胞毒性为 1 级,溶血率为 0.8%,抗菌率为 49%。结论 海藻酸钙纤维敷料止血速度快、止血效果好,可有效控制出血量;细胞毒性小,急性全身毒性反应及溶血率低,有良好的生物相容性;有一定的抗菌作用。

**[关键词]** 海藻;生物敷料;止血;组织相容性;细胞毒性;抗生作用;评价研究

**[中图分类号]** R318 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-4488(2016)02-0178-04

**A NEW TYPE MEDICAL HEMOSTATIC DRESSING PREPARED BY ALGINATE FIBER; EVALUATION STUDIES** CHU Xiaoxia, WANG Bin, WANG Haitao, CHEN Hao, CUI Feiyan (Department of Pathogen Biology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To assess the hemostatic effect, biocompatibility and antibacterial property of calcium alginate fiber hemostatic dressings (CAFHD) by comparing with hemostatic dressings such as gauze and gelatin sponge. **Methods** Three kinds of hemostatic dressings-CAFHG, gauze and gelatin sponge-were applied on bilateral wounds of the back of New Zealand rabbit. Bleeding time was recorded. Employing cyanmethemoglobin detection reagent, the absorbance of hemoglobin (Hb) was determined to assess the hemostatic effect. The biocompatibility was assessed using hemolysis test, acute general toxicity test and in vitro cytotoxicity test. Antibacterial property was evaluated using oscillation experiment. **Results** The bleeding time in alginate fiber, gauze and gelatin sponge was (95.28±3.95), (138.33±5.98) and (101.25±4.53), respectively ( $F=2\ 433.233, P<0.05$ ). The absorbance values of Hb were 1.269±0.011, 1.146±0.013, and 1.754±0.013 ( $F=24\ 764.804, P<0.05$ ); the amount of bleeding was (0.921±0.021), (0.900±0.012) and (1.607±0.028) g ( $F=3\ 364.499, P<0.05$ ). Cytotoxicity of seaweed fiber was grade 1, hemolytic rate was 0.8%, and antibacterial rate was 49%. **Conclusion** Alginate dressings are effective for immediate stopping bleeding and controlling blood loss, with little cytotoxicity, acute general toxic reactions, low hemolysis rate, favourable biocompatibility, and a certain antibacterial action.

**[KEY WORDS]** seaweed; biological dressings; hemostasis; histocompatibility; cytotoxicity; antibiosis; evaluation studies

海藻因具有可再生、无二次污染、储量丰富等特点,已经成为研究者开发海洋资源的研究重点<sup>[1]</sup>。海藻酸盐是从海带、马尾藻等褐海藻中分离得到的一种天然多聚糖,属于阴离子型共聚物,具有很强的成凝胶能力<sup>[2]</sup>。以海藻酸盐为原料开发的海藻酸钙纤维敷料以其优越的保湿性、整体易去除性等特性被应用于各类伤口的护理,已成为生物医学的研究热点<sup>[3]</sup>。理想的止血材料应该具备止血迅速、操作简便、质量小且易保存、不增加感染概率、价格低廉

等特点<sup>[4]</sup>。因此,止血材料主要从止血时间、有效控制出血量、生物相容性、抗感染等 4 个方面进行评价<sup>[5]</sup>。本文旨在评价海藻酸钙纤维止血敷料的止血效果、生物相容性以及抗菌性能,并与目前临床普遍使用的无菌纱布和明胶海绵两种止血材料进行对照,探讨海藻酸钙纤维作为医用敷料的应用价值。现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物及敷料** 海藻酸钙纤维敷料由山东长运医药用品有限公司开发制备,明胶海绵由广州市快康医疗器械有限公司生产,纱布为山东长运医药

[收稿日期] 2015-08-04; [修订日期] 2016-03-20

[基金项目] 山东省科技发展基金项目(2013GGX10215)

[作者简介] 初晓夏(1989-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 王斌(1961-),男,博士,教授,博士生导师。

用品有限公司产品;新西兰种大白兔和健康昆明种小鼠(SPF级)由青岛大学动物实验中心提供;小鼠成纤维细胞株 L-929、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 购自上海美轩生物科技有限公司。

**1.1.2 主要试剂** 氰化高铁血红蛋白(Hb)检测试剂为上海桥杜生物科技有限公司产品,异戊巴比妥钠粉剂、柠檬酸钠、PBS、二甲基亚砷、营养肉汤、营养琼脂培养液及 6.4 g/L 苯酚溶液均由青岛大学医学院病原生物学实验室提供,胎牛血清、2.5 g/L 胰蛋白酶为 Gibco 公司产品,DMEM 高糖培养液为赛墨飞生物化学有限公司产品,CCK-8 为 Signalway Antibody 公司产品。

**1.1.3 主要仪器** CX31 型倒置相差显微镜(奥林巴斯公司),723 型分光光度计,SUNRISE 型多功能酶联免疫检测仪(TECAN 公司),SW-CJ-1D 型超净工作台,CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Memmert 公司),C2400-230V 型离心机。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 止血效果观察** 将 3 种止血敷料裁剪成边长为 20 mm 的正方形,厚度为(3.0±1.0)mm,质量为(0.070±0.010)g,灭菌干燥后置于 25 °C 室温、40%湿度下 24 h,使回潮率相等。随机选取健康成年新西兰种大白兔 24 只,体质量(2.6±0.16)kg,雌雄各半,随机分 4 组。将大白兔背部向上固定于实验台上,耳缘静脉缓慢注入 30 g/L 异戊巴比妥钠 30 mg/kg。沿脊柱两侧对称性剪 3 个圆形切口,直径约 1.5 cm,切口相距 4.0 cm,深度先至皮肤全层,然后分离至筋膜层,避开皮下组织大血管,切口出血后立即敷上止血材料(图 1A、B)。在敷料上加一个质量为 5 g 的砝码,开始计时。80 s 后,每 5 s 用无菌镊子提起敷料观察,以切口不出血为止血标志,计时结束,揭下敷料,称质量并记录,不同敷料止血前后质量差值即为出血量<sup>[4]</sup>。然后将敷料放入预先配制好的 5 mL 氰化高铁 Hb 检测试剂中仔细清洗,用分光光度计测 540 nm 波长处吸光度(A)值,以氰化高铁 Hb 检测试剂作空白校准零点。

**1.2.2 溶血实验** 取兔静脉血 4.5 mL,加入 38 g/L 柠檬酸钠溶液 0.5 mL 抗凝,加入生理盐水制备稀释兔血(兔血与生理盐水体积比 4:5)。实验分为 5 组,每组 5 支试管。阴性对照组加入生理盐水,阳性对照组加入蒸馏水,海藻酸钙纤维、纱布、明胶海绵组分别加入 100 g/L 相应材料浸提液(以无菌生理盐水为浸提介质)各 5 mL。将所有试管放入

37 °C 水浴箱中预温 30 min 后加入 0.2 mL 稀释兔血,置 37 °C 水浴箱中保温 60 min 后,以 2 500 r/min 离心 5 min,分别取上清液在免疫酶标仪上测 540 nm 波长处的 A 值,测量 3 次取均值。溶血率=(待测样品 A 值-阴性对照 A 值)/(阳性对照 A 值-阴性对照 A 值)×100%。

**1.2.3 全身急性毒性实验** 取体质量(19±1)g 的昆明种小鼠 30 只,随机分为 5 组,每组 6 只。取 1.2.2 溶血实验所用浸提液,海藻酸钙纤维、纱布、明胶海绵组按 50 mL/kg 剂量分别向小鼠尾静脉注射相应材料浸提液,阴性对照组注射等量生理盐水,阳性对照组注射等量苯酚溶液。注射后立即观察小鼠体内是否出现副作用,并在注射后 4、24、48、72 h 观察各组小鼠的一般状态、毒性反应和死亡情况,记录体质量变化。

**1.2.4 细胞毒性实验** 按照 GB/T 16886.5 的要求进行实验<sup>[6]</sup>。无菌操作下,对 3 种材料分别称质量,以含体积分数 0.10 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液作为浸提介质,置于 37 °C、饱和湿度、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 培养箱中浸提 48 h,用 0.22 μm 微孔过滤器过滤后置于 4 °C 冰箱保存待用。将 L-929 细胞传代培养 72 h,胰酶消化后制成含细胞 3×10<sup>7</sup>/L 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板上,每组 6 孔,每孔 100 μL,将培养板置于 37 °C、饱和湿度、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 24 h,弃去原液,PBS 洗涤 2 次。海藻酸钙纤维、纱布、明胶海绵组分别加入相应浸提液,阳性对照组加入 50 g/L 二甲基亚砷,空白对照组加体积分数 0.10 胎牛血清培养液,每孔 100 μL,置于培养箱中静置培养 48 h 并观察细胞形态。取出 96 孔板,每孔加 CCK-8 溶液 10 μL,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 3 h,在酶联免疫检测仪上测 450 nm 波长处 A 值,测 3 次取平均值。计算细胞相对增殖率(RGR),RGR = 实验组 A 值/空白对照组 A 值×100%。细胞毒性分级参照有关文献的标准<sup>[7]</sup>。

**1.2.5 抗菌性实验** 按照 GB/T 20944.3-2008 规定,制备 3×10<sup>8</sup> CFU/L 的接种菌液;将 3 种受试敷料剪成 5 mm×5 mm 大小,称取(0.75±0.05)g 作为一份样品。实验分为海藻酸钙纤维组、纱布组、明胶海绵组和空白对照组,每组 3 个烧瓶,均取两个平行样本。前 3 组分别将相应敷料加入 250 mL 的烧瓶内,然后加入 0.03 mol/L 的 PBS 缓冲液 70 mL,再加入接种菌液 5 mL,于恒温振荡器(25 °C,200 r/

min)中振荡 1 h<sup>[8]</sup>,取 1 mL 用 0.03 mol/L 的 PBS 缓冲液稀释 100 倍,然后移入灭菌的营养培养液内,37 °C 下培养 18 h,计算金黄色葡萄球菌菌落数。各敷料的抑菌率=(空白对照组均值-实验组均值)/空白对照组均值×100%。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理,计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组数据间的比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 止血效果

海藻酸钙纤维组出血时间最短,海藻酸钙纤维组与明胶海绵组出血时间均明显短于纱布组( $F = 2\,433.233, P < 0.05$ )。海藻酸钙纤维组敷料 Hb 检测 A 值及出血量均显著低于明胶海绵组敷料( $F = 24\,764.804, 3\,364.499, P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 溶血实验

纱布、海藻酸钙纤维、明胶海绵的溶血率分别为 0.2%、0.8% 和 1.1%,均在 5% 以内,符合 GB/T 16886 规定的标准,且海藻酸钙纤维的溶血率低于明胶海绵。

### 2.3 全身急性毒性反应

阳性对照组小鼠注射后 4 h 出现寒战、呼吸困难、烦躁,24、48 h 各死亡 1 只;其他组小鼠在观察过程中均无死亡。阴性对照组、海藻酸钙纤维组和纱布组小鼠均无明显症状,明胶海绵组 2 只小鼠在注射后 4 h 有轻微症状。阳性对照组小鼠体质量明显下降,其他组小鼠体质量均增加,差异有显著意义( $F = 93.084 \sim 4\,761.429, P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 各组出血时间及出血量比较( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别	出血时间(t/s)	敷料 Hb(A)	出血量(m/g)
空白对照组	186.53±5.71	—	—
纱布组	138.33±5.98	1.146±0.013	0.900±0.012
明胶海绵组	101.25±4.53	1.754±0.013	1.607±0.028
海藻纤维组	95.28±3.95	1.269±0.011	0.921±0.021

表 2 各组小鼠注射后不同时间体质量增加值的变化( $n = 6, m/g, \bar{x} \pm s$ )

组别	4	24	48	72(t/h)
阴性对照组	0.39±0.05	1.46±0.06	1.95±0.08	2.59±0.09
阳性对照组	-0.24±0.05	-1.34±0.08	-1.76±0.06	-2.29±0.09
纱布组	0.38±0.08	1.42±0.08	1.93±0.09	2.51±0.08
明胶海绵组	0.36±0.09	1.37±0.06	1.87±0.06	2.42±0.06
海藻纤维组	0.38±0.07	1.42±0.08	1.94±0.08	2.52±0.06

### 2.4 细胞毒性实验

纱布组、海藻酸钙纤维组和空白对照组细胞形态正常,贴壁生长良好,胞浆内有离散颗粒,无细胞溶解;明胶海绵组细胞松散,偶见细胞溶解;阳性对照组细胞明显呈圆形,无胞浆颗粒,细胞溶解,细胞层几乎完全破坏。见图 1C~G。海藻酸钙纤维组和纱布组细胞毒性等级为 1 级,符合标准。见表 3。

### 2.5 抗菌性实验

海藻酸钙纤维组、明胶海绵组、纱布组和空白对照组的菌落数分别为 33.50±1.87、30.17±1.72、63.33±1.75 和 65.17±1.94,前 3 组的抑菌率分别为 49%、54% 和 3%。海藻酸钙纤维组和明胶海绵组菌落数显著少于空白对照组( $F = 2\,014.730, P < 0.05$ )。

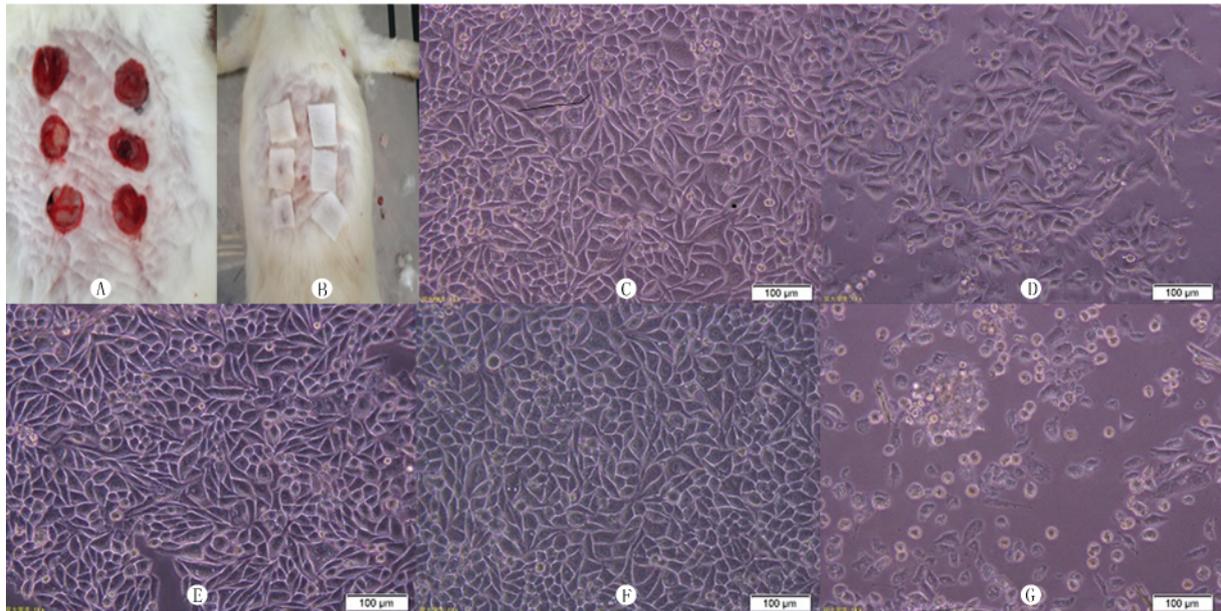
表 3 各组细胞毒性实验结果( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞毒性(A)	RGR( $\chi$ /%)	毒性等级
空白对照组	0.791±0.008	100	0
阳性对照组	0.333±0.007	42	3
纱布组	0.699±0.010	88	1
明胶海绵组	0.340±0.008	43	3
海藻纤维组	0.694±0.004	88	1

## 3 讨论

早在 1951 年,有学者就已经探讨了海藻酸钙纤维作为止血材料的可能性<sup>[9]</sup>。海藻酸钙纤维在医用敷料上的应用起源于英国人 WINTER 发明的“湿疗法”<sup>[10]</sup>。20 世纪 80 年代初,英国的 Courtaulds 公司成功地用海藻酸钙纤维制成一种医用纱布<sup>[11]</sup>。GROVES 等<sup>[12]</sup>研究显示,海藻酸钙纤维用于植皮伤口,其止血速度快。

由于敷料的生产工艺、纤维的空间结构不同以及实验室设备、操作者技术水平的差异,止血材料的止血实验目前还没有统一的标准。本文止血实验参考彭中德等<sup>[13]</sup>的实验方法,在其基础上对实验步骤进行了改进,增加砝码是为了更好地模拟敷料在实际应用中的稍加压力止血,但砝码质量不会造成敷料间止血效果的差异。取下砝码后,浸于敷料中血液的水分会不断蒸发,单纯用不同敷料止血前后质量差值判定出血量不够准确。故本实验结合出血时间、敷料 Hb 等指标,并与临床普遍使用的两种敷料对比,从而比较全面地反映海藻酸盐敷料的止血效果。由于敷料在使用过程中要与创面组织、血液直接接触,若有细胞毒性和溶血性会导致局部组织细胞的损伤死亡、发生溶血反应,影响疗效。所以敷料



A、B:敷料体表止血实验。C:纱布组;D:明胶海绵组;E:海藻酸钙纤维组;F:空白对照组;G:阳性对照组。100 倍。

图 1 敷料体表止血实验及细胞毒性实验细胞形态学观察

在应用于人体之前,必须对其生物安全性进行评价。目前研究生物材料相容性的方法有很多,用体外细胞培养法来检测材料对细胞的毒性具有简便、快捷、敏感性高等优点。敷料的抗菌性可间接影响伤口的愈合,也是衡量止血敷料止血性能的重要指标之一。由美国康宁公司开发的烧瓶振荡法,适用于非溶性抗菌产品的检测,定量性及可重复性好<sup>[14]</sup>。

本实验结果显示,海藻酸钙纤维组出血时间最短,且敷料 Hb 检测的 A 值及出血量显著低于明胶海绵组,表明海藻酸钙纤维敷料有明显的止血作用。细胞毒性实验结果显示,海藻酸钙纤维没有细胞毒性,明胶海绵有一定的细胞毒性;抗菌实验结果显示,明胶海绵的抑菌作用要稍好于海藻酸钙纤维。可见明胶海绵对细胞、细菌都有杀伤作用,抑菌作用明显的同时也会对伤口处的细胞产生毒性,而海藻酸钙纤维发挥杀菌作用的同时对伤口处的细胞没有毒性,表现出良好的生物相容性。总之,海藻酸钙纤维敷料止血速度快,能有效控制出血量,止血效果好;细胞毒性小、全身急性毒性反应及溶血率低,有良好的生物相容性;有一定的抗菌效果。

有文献报道,海藻酸钙纤维提取物还具有抑瘤作用以及抗氧化作用<sup>[15]</sup>。随着人们对海藻酸钙纤维生物医用材料研究的深入,其医用价值越来越受到关注,具有广阔的研究前景。

#### [参考文献]

[1] 孙玉玲,刘杰. 医用敷料用海藻纤维研究进展[J]. 科技信息, 2010(32):546-547.

- [2] 黄若昆,林月秋. 可注射性骨组织工程载体研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2007,15(9):681-683.
- [3] JAYAKUMAR R, PRABAHARAN M, SUDHEESH KUMAR P T, et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications [J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(3):322-337.
- [4] PENG H T, SHEK P N. Novel wound sealants: biomaterials and applications[J]. Expert Review of Medical Devices, 2010, 7(5):639-659.
- [5] 叶世富,王士斌,吴文果,等. 可吸收止血材料现状及效果评价的研究进展[J]. 材料导报, 2014,28(7):67-71.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第 5 部分:体外细胞毒性试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
- [7] 辛培成,杨圣,芦健民,等. CCK-8 法检测兔筋膜成纤维细胞增殖活性之最佳测试条件研究[J]. 中外医学研究, 2011,9(12):6-8.
- [8] 段晓杰. 纳米银医用抗菌敷料抗菌性能检测方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2012,32(1):167-172.
- [9] LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: properties and biomedical applications[J]. Progress in Polymer Science, 2012,37(1):106-126.
- [10] 汪涛,赵珺,张震,等. 海藻酸钙敷料的细胞毒性体外检测结果分析[J]. 中国现代普通外科进展, 2014,17(9):692-696.
- [11] 郭兴锋. 几丁糖/海藻酸敷料止血性能的实验研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2008,5(2):4-6.
- [12] GROVES A R, LAWRENCE J C. Alginate dressing as a donor site haemostat[J]. Annals of the Royal College of Surgeons of England, 1986,68(1):27-28.
- [13] 彭中德,欧阳松山. 海藻酸钠敷料止血性能的实验研究[J]. 中医临床研究, 2012,4(11):25-26.
- [14] DENG B Y, YAO J, LU N, et al. Anti-bacterial testing method for textiles[J]. Dye Finish, 2006,4:43.
- [15] 董春景,贺娟,梁惠,等. 海藻提取物抑瘤活性及抗氧化作用的观察[J]. 齐鲁医学杂志, 2006,21(2):98-100.

(本文编辑 马伟平)