

网络出版时间: 2023-01-20 15:36:00 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230119.1741.012.html>

一种黏性止血双网络水凝胶的制备及性能评估

丁宇帆¹, 苏睿¹, 潘钊², 闻慧琴¹

摘要 目的 设计制备具有黏性的止血水凝胶, 评估其体外止血性能及生物相容性。方法 均匀溶解的组分经光交联制备双网络水凝胶, 电镜观察样品微观形貌, 检测力学性能, 通过体外全血凝结试验及体外皮肤出血模拟试验评估体外止血性能, 并评估水凝胶的血液相容性。结果 水凝胶呈现特征性多孔网络结构, 拉伸强度可达 46 kPa, 对不同离体组织具有强生物黏合性能。水凝胶对创面封闭效果优异, 可将凝血时间缩短至 1 min。结论 水凝胶与血液接触后可诱导血小板与红细胞聚积, 加速凝血进程。该双网络水凝胶具有良好的血液相容性, 通过物理止血与化学激活联合止血机制, 实现了优异的封闭止血效果。

关键词 甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵; 丙烯酰胺; 明胶; 双网络水凝胶; 物理化学联合止血

中图分类号 R 605.972

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0243-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.012

大出血易并发休克危及生命一直是临床棘手的问题, 而早期止血可有效降低死亡率。近年来高质量止血材料的发展, 为临床提供了多重选择, 大大保障了人民生命健康安全^[1]。富水性的水凝胶材料因与细胞外基质具有高度相似性, 在生物医学领域被广泛研究。天然大分子水凝胶, 如明胶、壳聚糖等, 生物安全性高, 但力学性能脆弱, 特别是组织黏合性能的不足限制了其在止血领域的应用^[2]。构建双网络水凝胶是一种稳定天然大分子水凝胶结构、改善其力学性能的有效方法^[3]。强生物黏附力可使材料牢固封堵出血位点。在水凝胶聚合物链中引入正电荷基团后, 可以吸附聚积血液中表面带负电荷的血细胞, 通过化学途径促进凝块形成^[4]。该研究通过光引发形成聚阳离子网络, 并与明胶网络互穿, 构建出力学性能优异、表面带有正电荷的双网

络黏性水凝胶, 并通过力学性能测试和体外止血效果评估此水凝胶用于控制出血的可行性。

1 材料与方法

1.1 合成材料及主要仪器 合成材料: 丙烯酰胺 (acrylamide, AM), 明胶 (gelatin), 甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵 (methacryloxyethyltrimethyl ammonium chloride, METAC), 光引发剂 1173 购自上海阿拉丁公司; N,N-亚甲基双丙烯酰胺 (methylene-bis-acrylamide, MBA) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

主要仪器: 恒温磁力搅拌器 (S10-3, 上海思乐仪器有限公司), 真空紫外箱 (自主设计, 购自淘宝), 力学万能测试机 (Instron 5565A, 美国英斯特朗公司), 推注泵 (LSP01-4BH, 兰格恒流泵有限公司), 扫描电子显微镜 (ZeissMerlin Compact, 德国蔡司基团)。

1.2 水凝胶前驱液的配制 分别称取明胶 1.25 g、AM 2.17 g、METAC 3.64 g, 置于避光小棕瓶中, 加入少量 MBA 和光引发剂 1173 后添加去离子水 11.4 ml。60 °C 水浴搅拌加热至固体溶解、溶液澄清透明备用。

1.3 水凝胶的制备及微观形貌观测 将前驱液注入提前准备好的模板, 氮气保护下 365 nm 紫外灯交联 1h, 脱模后制得目标水凝胶。将成功交联的水凝胶冻干脱水、蒸金、制样后使用扫描电镜 (SEM) 拍摄其截面微观形貌。

1.4 水凝胶力学性能的评价 拉伸强度测试使用力学万能测试机完成。将水凝胶材料裁剪为长 7.5 cm、宽 2.5 cm 的样品, 以 50 mm/min 速度拉伸, 记录拉伸位移与载荷。在组织黏合性能测试中, 选取新鲜猪皮、猪肝脏、猪主动脉、猪脾脏和猪心肌组织为测试基底, 采用搭接剪切试验 (美国材料与试验学会国际标准 ASTM F2255) 评估水凝胶对几种组织基底的黏合性能。

1.5 水凝胶体外止血效果评估

1.5.1 体外全血凝结实验 将直径 8 mm 的圆形水凝胶置于洁净 24 孔板中, 取 170 μl 健康成人抗凝全血 (3.2% 枸橼酸钠, 1:9) 滴加在待测水凝胶

2022-12-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81801831); 中国博士后科学基金 (编号: 2021M703067)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院输血科, 合肥 230022

² 中国科学院基础医学与肿瘤研究所, 杭州 310022

作者简介: 丁宇帆, 女, 硕士研究生;

闻慧琴, 女, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: wenhuiqin@ahmu.edu.cn

样品表面,加入 10 μl 氯化钙(0.2 mol/L)重钙化后,在所需时间点用生理盐水轻柔洗涤各孔,去除未凝结的游离红细胞,至清洗液呈无色透明状,观察各孔血液凝结状况。将 1 min 时间点洗涤后水凝胶固定、冻干,拍摄 SEM 图片。

1.5.2 体外皮肤出血模拟 体外皮肤出血通路是以猪皮模拟人体皮肤,将健康成人抗凝全血(3.2%枸橼酸钠,1:9)用推注泵以 400、300、200、100 μl/min 速度从猪皮表面人为制造的缺损处挤出,模拟出血时血液从皮肤创口流出的过程,缺损处使用水凝胶止血封堵后,观察血液渗漏状态。

1.6 水凝胶血液相容性 洗涤全血后制备 5% 红细胞悬液,分别在生理盐水、去离子水、水凝胶浸出液中加入 200 μl 上述红细胞悬液,37 °C 共同孵育 15 min 后,测量各组在 540 nm 处的吸光度,计算得到各组溶血率。

2 结果

2.1 水凝胶制备流程及形态 365 nm 紫外光照下,均匀分散的 AM 和 METAC 水溶液在光引发剂 1173 和交联剂 MBA 的作用下聚合为聚 METAC-AM 阳离子水凝胶,与溶液中温度响应交联的明胶网络互穿后形成双网络水凝胶(MA 水凝胶)(图 1)。SEM 结果(图 2A)显示该方法聚合制备水凝胶具有典型的三维网络结构。

2.2 力学性能评估 拉伸强度采用拉伸测试,水凝胶的拉伸特征曲线以拉伸应变为横坐标,拉伸应力为纵坐标,结果如图 2B 所示。相同条件下重复测试 5 个样品,取平均值可得 MA 水凝胶的平均拉伸应变为 508.65%,平均拉伸应力可达 46.42 kPa。

生物黏合能力使用接搭剪切试验评估(图 3A),分别用新鲜离体猪皮、猪肝脏、猪主动脉、猪脾脏、猪心脏作为测试基底,可观察到 MA 水凝胶在各组织基底上呈现出不同趋势一致的特征曲线(图 3B-3G)。多次测量统计后可发现五种组织基底中,MA 水凝胶对猪皮的黏附力最大,动脉次之,脾脏和肝脏因表面光滑潮湿呈现最小的黏合力。

2.3 体外止血效果 体外止血效果评估也分为两部分。首先进行体外全血凝结试验,由图 4A 各孔结果可看出,10 s 时可见 MA 水凝胶表面吸附有大量红细胞,1 min 时即形成肉眼可见凝块。SEM 观察结果显示,1 min 时水凝胶表面可见少量纤维蛋白包裹的红细胞和伸出伪足的血小板,说明血小板被激活、凝血级联发生(图 4B)。

在体外皮肤出血模拟评估实验(图 4C)中,以 400、300、200、100 μl/min 等多个速度模拟自由出血 20 s 后,MA 水凝胶在 150 s 内均可有效阻止血液从出血点泄露,明显好于医用纱布组(图 4D),以 200 μl/min 的流速,使用 150 s 为示例。

2.4 血液相容性 各组分别与红细胞共孵育,测定

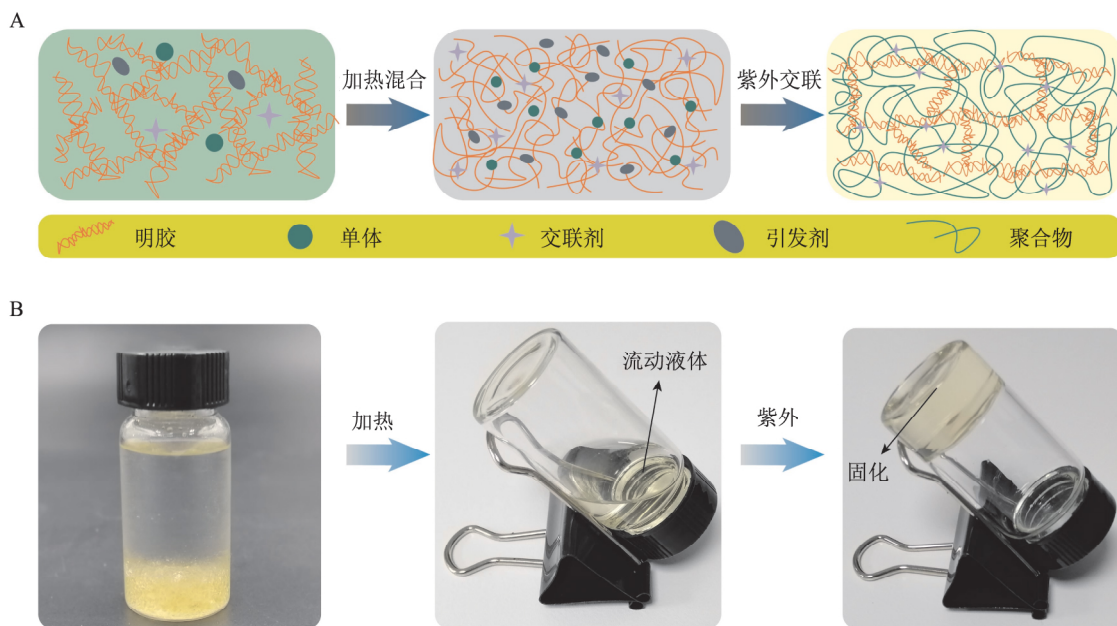


图 1 MA 水凝胶设计与制备
A: 设计示意图; B: 制备流程图

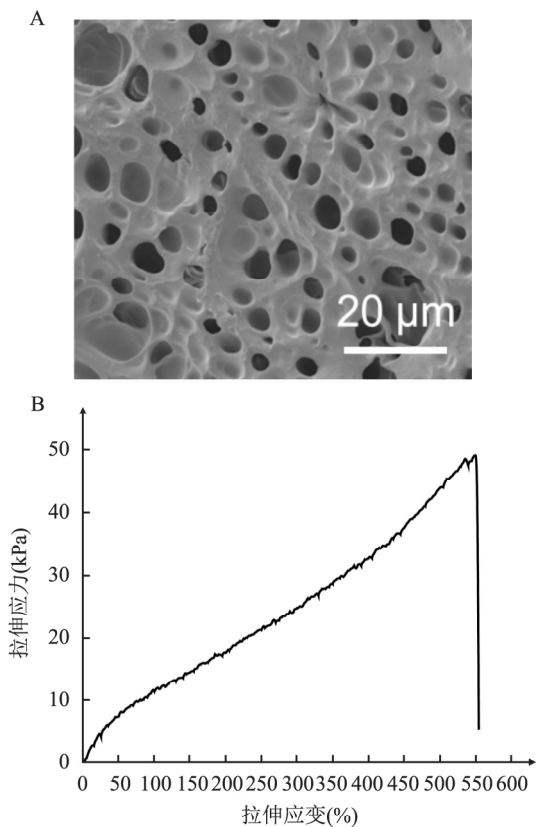


图2 MA水凝胶的理化性能
A: SEM结果图; B: 拉伸应力应变特征曲线

并处理 540 nm 下吸光度值,得到图4E。MA水凝胶的溶血率为 4.51%, 小于 5% 的国家标准,显示材料

良好的血液相容性。

3 讨论

创伤性出血不及时处理非常凶险,致残致死率在临床一直居高不下,因此早期快速止血、闭合创面是外科学的关键^[5]。传统止血材料以医用纱布为代表,止血速度有限,且从创面移除时会对组织造成二次伤害。沸石类止血剂在紧急止血中应用广泛,但止血时伴有大量放热,易继发不良反应。可代谢的纤维蛋白胶及人工合成氰基丙烯酸酯类胶黏剂近年来被应用于临床。但纤维蛋白胶封堵效果受弱的力学性能限制,无法提供稳定的止血能力;氰基丙烯酸酯类胶黏剂由于爆聚反应放出大量热以及代谢产物的组织毒性使它无法应用于内腔止血^[6]。

水凝胶因与人体细胞外基质的理化性质高度相似而在生物医药领域受到广泛关注。针对传统水凝胶材质较脆弱、力学性能不足的问题,北海道大学研究团队成功构建了一种既强又韧的双网络水凝胶体系,被广泛应用于各类水凝胶力学性能的改善,为水凝胶在生物医学领域的运用提供材料基础^[7]。在此基础上,陆军军医大学研究团队将凝血酶 HC 引入水凝胶,成功制备出“超级止血黏合剂”,将体外止血时间缩短至 45 s^[8]。麻省理工学院研究团队仿照藤壶胶的作用原理,开发出一种在温和压力下 15 s 内与创面组织形成牢固黏附的水凝胶基糊剂,

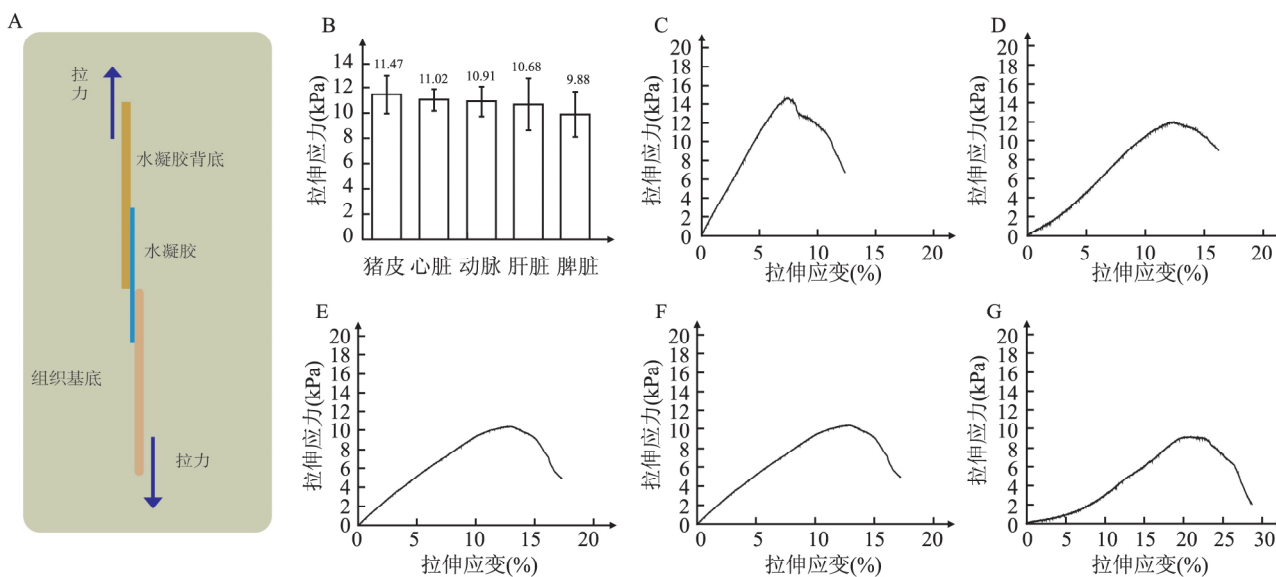


图3 MA水凝胶的生物黏合性能

A: 接搭剪切试验示意图; B: 拉伸应力与拉伸应变统计图; C: 猪皮为测试基底的代表性拉伸应力应变曲线; D: 心脏为测试基底的代表性拉伸应力应变曲线; E: 动脉为测试基底的代表性拉伸应力应变曲线; F: 肝脏为测试基底的代表性拉伸应力应变曲线; G: 脾脏为测试基底的代表性拉伸应力应变曲线

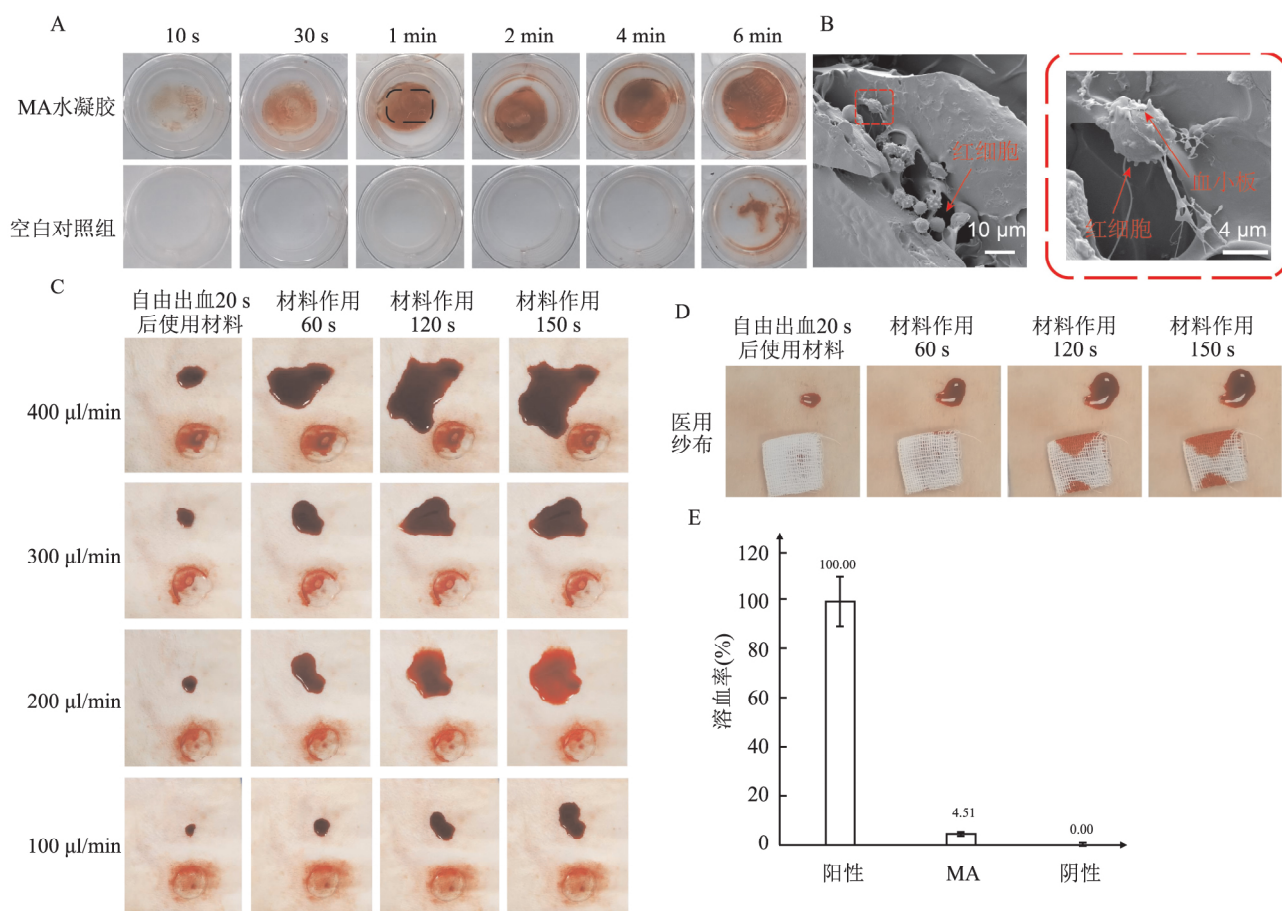


图4 MA水凝胶的止血性能评估

A: 体外全血凝结试验; B: SEM观察MA水凝胶表面的红细胞与血小板; C: MA水凝胶在不同出血速度下的体外皮肤出血模拟; D: 医用纱布在200 µl/min速度下的体外皮肤出血模拟; E: 材料溶血测试结果

赋予其不依赖天然凝血机制的封堵止血功能^[9]。虽然已发展的水凝胶止血材料体系性能优异,但止血性能的发挥多依赖于单一的化学信号激活凝血系统,或物理封堵避免血液流失,鲜有同时利用两种止血机制协同作用进一步提升水凝胶止血性能的报道。

本研究构建了一种黏性止血双网络水凝胶,通过水凝胶分子链基团设计,实现物理化学协同止血机制。首先基于低免疫原型、生物相容性和可降解性的需求,采用天然高分子明胶作为强网络^[10]。以丙烯酰胺为主体材料^[11],以阳离子单体METAC为功能单元^[12],共聚形成柔性水凝胶网络。拉伸强度测试揭示MA水凝胶具有优异的拉伸性能,为材料闭合创口、封堵出血提供支撑作用。生物黏合性能测试发现,MA水凝胶对多种组织都具有非常牢固的黏合效果(图2B、2C,图3),为材料闭合创口、封堵出血提供附着基础。体外皮肤出血模拟实验也证实MA水凝胶可有效封闭出血点,达到快速止血目的。MA水凝胶中METAC分子提供的丰富正电荷,

与血液接触后,可以快速中和红细胞和血小板表面的负电荷,促进血细胞之间相互聚集,对血凝块的形成和收缩起正向调控作用^[13]。与此同时,明胶分子可以活化血小板,加速纤维蛋白网络的生成^[14]。体外全血凝结实验显示,MA水凝胶可有效地将凝块出现时间从6 min缩减至1 min,表明MA水凝胶具有良好的促凝血能力。全血孵育后水凝胶的SEM观察结果发现,发生凝血时,红细胞与血小板首先黏附于材料上,随后血小板被激活发生形变,互相聚集并连接纤维蛋白,促使纤维蛋白包裹在红细胞表面,最终形成凝块。但不能忽视的是丙烯酰胺类水凝胶的溶胀体积变化是其应用的限制之一,关于此种止血材料的研发应针对该类水凝胶吸水性的调控做进一步的延伸性研究。

综上所述,本研究成功构建了一种黏性止血双网络水凝胶,通过与创口组织表面形成牢固黏合作用,实现物理封堵止血;同时水凝胶网络中的阳离子活性基团,通过静电相互作用,吸附带负电的红细胞和血小板,并激活化学凝血程序,实现化学止血。该

水凝胶采用的物理化学协同止血机制,实现了快速、稳定止血效果,为止血材料的设计提供新思路,为临床出血管理技术的发展提供了材料基础。

参考文献

- [1] Spahn D R, Bouillon B, Cerny V, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition[J]. *Crit Care*, 2019, 23 (1): 98.
- [2] Wang Q Q, Liu Y, Zhang C J, et al. Alginate/gelatin blended hydrogel fibers cross-linked by Ca^{2+} and oxidized starch: Preparation and properties[J]. *Mater Sci Eng C*, 2019, 99: 1469–76.
- [3] Yang Y, Wang X, Yang F, et al. A universal soaking strategy to convert composite hydrogels into extremely tough and rapidly recoverable double-network hydrogels[J]. *Adv Mater* 2016, 28 (33): 7178–84.
- [4] Pourshahrestani S, Zeimaran E, AdibKadri N, et al. Gallium-containing mesoporous bioactive glass with potent hemostatic activity and antibacterial efficacy[J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4 (1): 71–86.
- [5] Ma Y, Yao J, Liu Q, et al. Liquid bandage harvests robust adhesive, hemostatic, and antibacterial performances as a first-aid tissue adhesive[J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30 (39): 2001820.
- [6] 徐凯航, 秦升, 赫荣智, 等. 军事背景下止血材料及止血方法的研究进展[J]. *海军医学杂志*, 2020, 41(4): 482–6.
- [7] Gong J P, Katsuyama Y, Kurokawa T, et al. Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength[J]. *Adv Mater*, 2003, 15 (14): 1155–8.
- [8] Guo Y, Wang Y, Zhao X, et al. Snake extract-laden hemostatic bioadhesive gel cross-linked by visible light[J]. *Sci Adv*, 2021, 7 (29): eabf9635.
- [9] Yuk H, Wu J, Sarrafian T L, et al. Rapid and coagulation-independent hemostatic sealing by a paste inspired by barnacle glue[J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5 (10): 1131–42.
- [10] Huang Y, Zhao X, Zhang Z, et al. Degradable gelatin-based IPN cryogel hemostat for rapidly stopping deep noncompressible hemorrhage and simultaneously improving wound healing[J]. *Chem Mater*, 2020, 32 (15): 6595–610.
- [11] 孙天文, 杨润怀, 马长望, 等. 丙烯酰胺/海藻酸钠双网络水凝胶的成型及其材料性能研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53 (7): 1139–42.
- [12] Huang Y, Zhang X Z, Fu K Q, et al. Synthesis and application of cationic spherical polyelectrolyte brushes as retention and drainage aid in bleached eucalyptus kraft pulp[J]. *J Ind Eng Chem*, 2015, 31: 309–16.
- [13] Tutwiler V, Mukhitov A R, Peshkova A D, et al. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhydrocytes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 17907.
- [14] Gu B K, Park S J, Kim M S, et al. Gelatin blending and sonication of chitosan nanofiber mats produce synergistic effects on hemostatic functions[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 82: 89–96.

Preparation and performance of an adhesive hemostatic dual-network hydrogel

Ding Yufan¹, Su Rui¹, Pan Zhao², Wen Huiqin¹

¹*Dept of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*Institute of Basic Medicine and Cancer, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022)*

Abstract Objective To prepare an adhesive hemostatic hydrogel and examine its hemostatic performance and biocompatibility. **Methods** The precursor components were homogeneously dissolved and photo-crosslinked in order to form dual-network hydrogel. The electron microscopy morphology was then analyzed; mechanical properties were tested; *in vitro* hemostatic performances were investigated by whole blood clotting test and simulation trial of cutaneous bleeding. Further, the hemocompatibility was evaluated. **Results** A characteristic porous network structure was presented through microscopy observation of the sample. The tensile strength of hydrogel reached 46 kPa, and strong adhesion was achieved between the hydrogel and *ex vivo* biological tissues. Hydrogel had significant effect on wound closure and clotting time could be shortened to 1 minute. **Conclusion** The hydrogel was capable of accelerating coagulation due to its ability to accumulate platelets and red cells after blood contact. The dual-network hydrogel with good hemocompatibility enabled excellent hemostatic performance by the synergistic effects of the chemical activation mechanism and physical hemostatic effect.

Key words methacryloxyethyltrimethyl ammonium chloride; acrylamide; gelatin; dual-network hydrogel; synergistic physical hemostasis and chemical hemostasis