

# 丝素/明胶复合材料的比例对小鼠止血性能的影响

徐清栋,雷彩虹,朱海霖,陈建勇

(浙江理工大学浙江省丝纤维材料和加工技术重点实验室,杭州 310018)

**摘要:** 将丝素溶解于氯化钙-乙醇-水的三元体系中得到水解后的丝素蛋白,与明胶按不同的比例进行混合,冷冻干燥,得到丝素/明胶复合止血材料。通过场发射扫描电子显微镜(FESEM)观察复合止血材料的微观形貌,发现丝素/明胶复合材料具有多孔结构;通过傅里叶红外光谱仪(FTIR)对材料的结合方式进行表征,发现丝素和明胶是物理共混;通过凝血指数(BCI)、体外凝血时间、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、血小板吸附率和大鼠断尾实验对丝素/明胶复合材料的止血性能进行表征,结果表明:丝素明胶质量比为7:3时,复合材料的各项止血指标都较好,能够快速止血。

**关键词:** 丝素蛋白;明胶;形貌结构;止血性能

**中图分类号:** S886.9;R973+.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2018)01-0045-06

## 0 引言

自人类在地球上出现以来,大量出血而导致的死亡,是缩短人类平均寿命的主要原因之一。在士兵受伤、手术中病人意外出血、交通事故导致人员受伤等情况下,如果止血不及时,很有可能会造成非常严重的后果<sup>[1]</sup>。目前研究比较多的止血材料有壳聚糖、海藻酸钠、多孔沸石、纤维原蛋白等,关于新型止血材料的研究是当前一个非常热门的话题。

丝素蛋白是蚕丝的主要成分,约占总质量的75%。丝素蛋白作为一种天然大分子,不仅具有人体所必需的多种氨基酸,对机体无毒性,无致敏性和刺激作用,而且可大部分被生物体所降解,因此其在生物医学中被广泛应用,如骨组织修复、药物载体、伤口敷料等<sup>[2-4]</sup>。之前已有研究表明丝素蛋白具有一定的止血作用,但与壳聚糖、多孔沸石等止血材料相比,止血时间过长<sup>[5-6]</sup>。

明胶也是一种天然高分子化合物,主要由动物的胶原蛋白部分水解而来。明胶的应用十分广泛,

在食品工业、医药领域、制造业等均可见到。在医药领域,明胶是被人们较早发现具有止血功能的材料<sup>[7]</sup>,明胶海绵已被普遍地应用于临床。

本文将脱胶后的丝素蛋白溶液与明胶溶液按一定比例进行共混,冷冻干燥制得丝素/明胶复合止血材料,并与纯丝素蛋白材料进行对比研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

蚕茧(产自浙江省湖州地区);明胶(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);无水氯化钙(分析纯,杭州高晶精细化工有限公司);无水乙醇(分析纯,杭州高晶精细化工有限公司);无水碳酸钠(分析纯,杭州高晶精细化工有限公司);自制去离子水;透析袋(截留分子量 8kD);明胶海绵(桂林福康森医疗器械有限公司);抗凝剂(3.8%柠檬酸钠溶液);聚乙二醇(分析纯,分子量 10000,国药化学集团试剂有限公司);新鲜兔血(含抗凝剂);健康成年 SD 大鼠若干只(浙江中医药大学动物实验中心提供,性别不限,质量为  $260\text{ g} \pm 20\text{ g}$ )。

收稿日期:2017-05-23 网络出版日期:2017-10-10

基金项目:国家自然科学基金项目(51273181)

作者简介:徐清栋(1992-),男,浙江余姚人,硕士研究生,主要从事丝素蛋白方面的研究。

通信作者:陈建勇, E-mail: cjiy@zstu.edu.cn

## 1.2 丝素/明胶复合材料的制备

将适量去蛹蚕茧置于体积为 1 L、质量分数为 2% 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,在温度为 98 °C 的水浴中加热 3 h,得到去除丝胶的蚕丝。采用浓度为 0.5% 苦味酸胭脂红对丝素的脱胶程度进行检验,用去离子水对完全脱胶后的丝素进行清洗,并置于温度为 80 °C 烘箱中,直至烘干。将适量烘干后的丝素置于  $\text{CaCl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  摩尔比为 1 : 2 : 8 的三元体系溶液其中,在 88 °C 的水浴中加热 3 h,得到丝素蛋白溶液。对丝素蛋白溶液进行减压过滤,去除不溶性杂质,得到较为纯净的丝素蛋白溶液。再将过滤所得的溶液装入截留分子质量为 8kD 的透析袋中,并放置于去离子水中进行透析,透析时间为 72 h,每隔 12 h 对所用去离子水进行更换。将透析的溶液连同透析袋放入质量分数为 30% 的聚乙二醇(分子量 10000)溶液中一段时间,浓缩得到质量分数为 5% 的丝素溶液。另配制质量分数为 5% 的明胶溶液:将适量明胶置于一定量去离子水中,并在 60 °C 的水浴中加热搅拌得到透明澄清的明胶溶液。将丝素溶液和明胶溶液分别按质量比 10 : 0.9 : 1.8 : 2.7 : 3.6 : 4 的比例混合,充分搅拌。再将交联后的溶液倒入培养皿中,放入温度为 -80 °C 的超级低温冰箱,冰冻 12 h。最后将其放入温度为 -80 °C 的冷冻干燥机中 72 h,得到丝素/明胶复合止血材料。

## 1.3 丝素/明胶复合材料的结构表征

利用场发射扫描电子显微镜(FESEM, ULTRA55, Carl Zeiss Jena)观察止血材料的纵截面的表面形貌,测试时的工作电压为 3.0 kV,测试模式为 SE2。利用傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 5700, Thermo Electron)测定止血材料的红外光谱,选择 KBr 压片法进行测试,测试时扫描范围为 4000~400  $\text{cm}^{-1}$  扫描次数为 128 次,分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ 。

## 1.4 丝素/明胶复合材料止血性能测试

### 1.4.1 凝血指数(BCI)测试

根据 Shih 等的研究<sup>[8]</sup>,凝血指数(BCI)可用来表征止血材料的止血效果。取新鲜兔血若干毫升并加入抗凝剂(体积比为 9 : 1),并配置质量分数为 0.2 mol/L 的氯化钙溶液静置。称取 100 mg 止血材料于烧杯并在 37 °C 环境中预热 5 min。然后加入 0.10 mL 抗凝兔血,同时加入 0.02 mL 氯化钙溶液,再将烧杯置于 37 °C 环境下 5 min。之后加入 25.00 mL 去离子水,再于 37 °C 环境下放置 5 min。最后取 0.20 mL 上层清液,用可见光分度计(波长 540 nm)测试吸光度(abs)值。测试时,设置空白对

照组和阳性对照组(明胶海绵),每个样品重复测试 6 次后取平均值。BCI 按式(1)计算,一般来说,BCI 的数值越小,表示止血材料的止血效果越好。

$$BCI/\% = \frac{\text{样品的 abs 值}}{\text{空白对照组的 abs 值}} \times 100 \quad (1)$$

### 1.4.2 凝血时间测试

各组材料的凝血时间采用 Behrens 等<sup>[9]</sup>研究的方法进行测定。将 48 孔板放置于 37 °C 恒温水浴中,然后称取 50 mg 止血材料置于离心管中,于 37 °C 预热 5 min 后依次加入 0.50 mL 抗凝兔血和 0.1 mL 0.2 mol/L 氯化钙溶液。每隔 15 s 倾斜离心管,观察血液的凝固的程度,直至血液不流动为止,记录凝血时间。其中,空白对照组不加止血材料,只加入氯化钙溶液,阳性对照组加入相同质量的明胶海绵和氯化钙溶液。测试时,每组材料重复 3 次平行实验并取平均值。

### 1.4.3 活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)测定

活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)是临床上用来判断凝血机理的两个重要指标<sup>[10]</sup>。APTT 用来测试内源性凝血,PT 用来测试外源性凝血。将 0.05 mL 的贫血小板血浆和 APTT 试剂混合于试管中,并在 37 °C 的水浴中放置 5 min 后再将待测试样(比例不同的各组止血材料和阳性对照组明胶海绵)和 0.05 mL 氯化钙溶液(浓度为 0.2 mol/L)加入于试管中,用全自动凝血分析仪测试反应时间。每组材料重复三次并取平均值。PT 的测试方法与 APTT 的测试方法类似。

### 1.4.4 血小板吸附率测定

取 1.80 mL 抗凝兔血于离心管并加入 200 mg 止血材料,空白对照组不加入任何物质,阳性对照组加入 200 mg 明胶海绵。在 37 °C 恒温水浴中放置 10 min。再将血液离心(1000 r/min)5 min,取上层清液(富血小板血浆),用五项血球仪测试血浆中的血小板数目<sup>[11]</sup>。按式(2)计算血小板吸附率:

$$\text{血小板吸附率}/\% = \frac{\text{空白对照组血小板数目} - \text{实验组血小板数目}}{\text{空白对照组血小板数目}} \times 100 \quad (2)$$

### 1.4.5 大鼠断尾止血实验

将麻醉后的大鼠放置于实验操作台,在距离大鼠尾巴尖端 5 cm 处用手术刀将尾巴切断。用滤纸吸去第一滴流出的血液,并将 1 cm × 1 cm 大小的止血材料覆盖于伤口处,另外在尾巴与实验台面中间放置一张滤纸,同时开始计时。每隔 30 s 更换滤

纸,并观察出血状况,当没有血液滴到滤纸上时,即为止血完毕,记录出血时间<sup>[12]</sup>。

### 1.5 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 19.0 对实验数据进行统计学分析,采用  $\bar{x} \pm s$  表示结果。 $p < 0.05$  时数据差异有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 丝素/明胶复合止血材料的微观形貌和结构分析

#### 2.1.1 丝素/明胶复合止血材料的微观结构分析

图 1 是纯丝素止血材料和丝素/明胶复合止血材料的纵截面 FESEM 图像,从图中可以发现丝素/明胶复合止血材料为层状多孔结构,而纯丝素止血材料并不具备此结构。另外,随复合止血材料中明胶比例的增加,层状多孔结构更加明显,如图 1(b)–(e)所示。

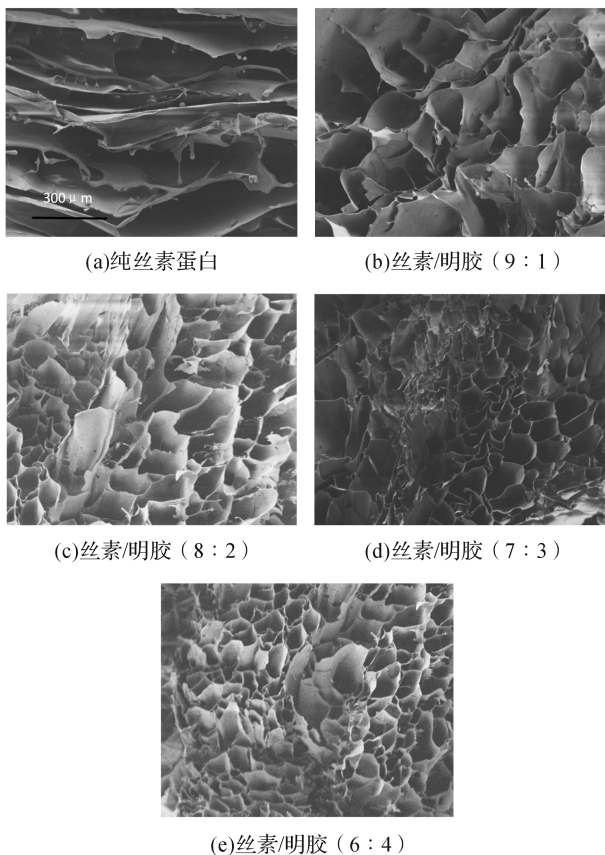


图 1 丝素/明胶复合止血材料的纵截面 FESEM 照片

#### 2.1.2 丝素明胶复合止血材料的 FTIR 图谱

图 2 为三种止血材料的红外光谱图。由图 2 可以发现,纯丝素蛋白在 1645、1537、1240  $\text{cm}^{-1}$  出现三个吸收峰,依次对应酰胺 I、酰胺 II、酰胺 III 键。明胶的酰胺 I、酰胺 II、酰胺 III 出现在 1643、1548、1240  $\text{cm}^{-1}$ ,而丝素/明胶复合止血材料的红外光谱图中这三个吸收峰的位置分别为 1647、1533、1240  $\text{cm}^{-1}$ 。与纯丝素蛋

白、明胶止血海绵相比,丝素和明胶复合后的材料没有生成新的化学键,这说明丝素和明胶是物理共混。

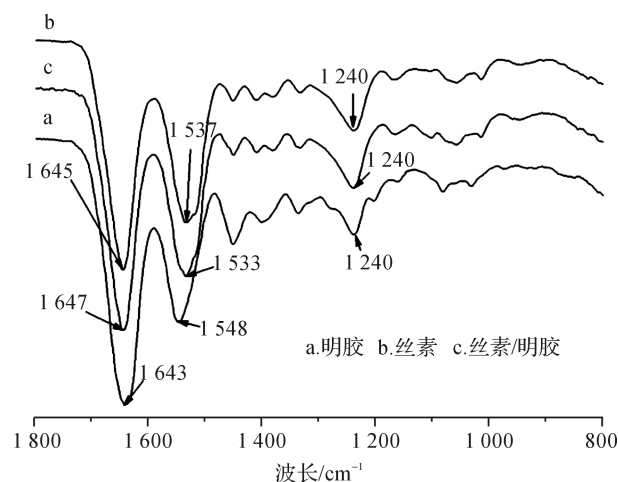


图 2 各组止血材料的红外光谱

#### 2.3.1 凝血指数(BCI)

图 3 为各组别不同比例共混止血材料的 BCI 值。从图 3 中可知,与空白对照组、纯丝素蛋白组 (BCI 为  $71.90\% \pm 0.59\%$ ) 相比,各组分丝素/明胶复合止血材料的 BCI 值显著减小。丝素明胶质量比为 9:1、8:2、7:3 和 6:4 四组的 BCI 值分别为  $47.20\% \pm 0.65\%$ 、 $37.30\% \pm 0.69\%$ 、 $34.30\% \pm 0.96\%$  和  $35.90\% \pm 0.46\%$ 。明胶海绵组的 BCI 值为  $87.50\% \pm 1.18\%$ 。随着止血材料中明胶比例增加,BCI 值减小,止血效果增强,但当明胶比例过大时,BCI 值反而增大,止血效果减弱。同时丝素明胶质量比为 7:3 时凝血指数达到最小值,优于其它各实验组。结果表明将明胶与丝素蛋白进行共混得到止血材料的止血效果显著增强,优于纯丝素蛋白和明胶海绵。这可能是因为制备得到的止血材料具有层状多孔结构,可使红细胞堵塞其中,进而使 BCI 值减小,止血性能增强。

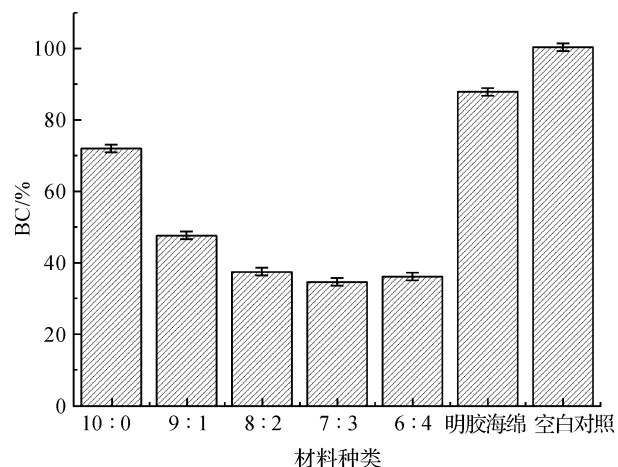


图 3 各组止血材料凝血指数(BCI)



### 2.3.2 凝血时间分析

图4为不同比例丝素/明胶共混止血材料的凝血时间柱状图。如图4所示,不同比例的止血材料凝血时间依次为 $(11.90 \pm 0.38)$ 、 $(10.00 \pm 0.42)$ 、 $(7.60 \pm 0.11)$ 、 $(5.70 \pm 0.31)$ 、 $(5.60 \pm 0.14)$  min,明胶海绵组为 $(9.90 \pm 0.38)$  min,空白对照为 $(14.90 \pm 0.38)$  min。由此可知,与空白对照组相比,随着丝素蛋白中加入明胶比例的增加,制备得到的止血材料凝血时间缩短,止血效果得到了显著提高,当丝素明胶质量比大于8:2时,实验组的凝血时间开始短于明胶海绵组;但当明胶比例达到一定程度后,止血效果不再加强,如比例为6:4组与7:3相比,凝血时间没有明显区别。丝素/明胶复合止血材料可以显著缩短凝血时间,这可能是因为多孔状的止血材料有较好的吸水性,使血液的局部浓度增大,加速血液凝固。

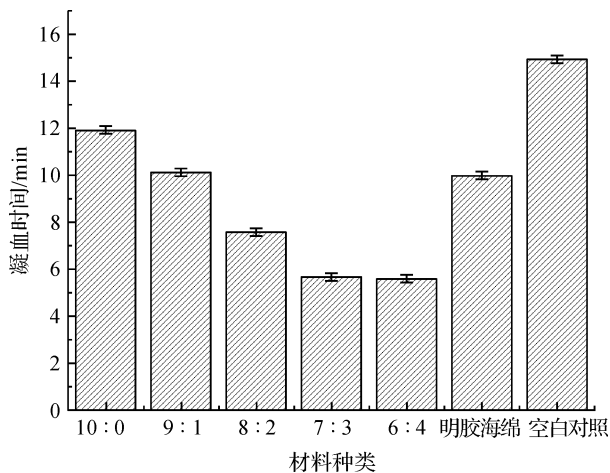


图4 各组止血材料体外凝血时间

### 2.3.3 活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)分析

图5为各组止血材料的APTT和PT时间的折线图。从图5中可以发现随着止血材料中明胶比例的改变,各组APTT的反应时间发生变化。各实验组的APTT值分别为 $(26.09 \pm 0.13)$ 、 $(20.13 \pm 0.11)$ 、 $(19.86 \pm 0.23)$ 、 $(18.92 \pm 0.14)$  s和 $(19.01 \pm 0.13)$  s,空白对照组和明胶海绵组分别为 $(29.58 \pm 0.57)$  s和 $(19.53 \pm 0.07)$  s。复合止血材料可以明显缩短APTT反应时间,APTT反应时间最短的是7:3组。与此相反的是,PT的反应时间没有明显的规律,分别为 $(11.90 \pm 0.19)$ 、 $(10.95 \pm 0.08)$ 、 $(10.42 \pm 0.11)$ 、 $(10.34 \pm 0.07)$ 、 $(10.76 \pm 0.10)$  s,与

明胶海绵组 $(9.92 \pm 0.07)$  s和空白对照组 $(11.10 \pm 0.57)$  s相比,没有显著的区别。这说明,在整个凝血过程中,丝素/明胶复合止血材料是通过内源性凝血来缩短血液凝固时间的。这可能是因为丝素和明胶可以促进血小板释放凝血因子FⅢ,并将FⅢ激活为FⅢa,进而启动整个内源性凝血,缩短凝血时间。

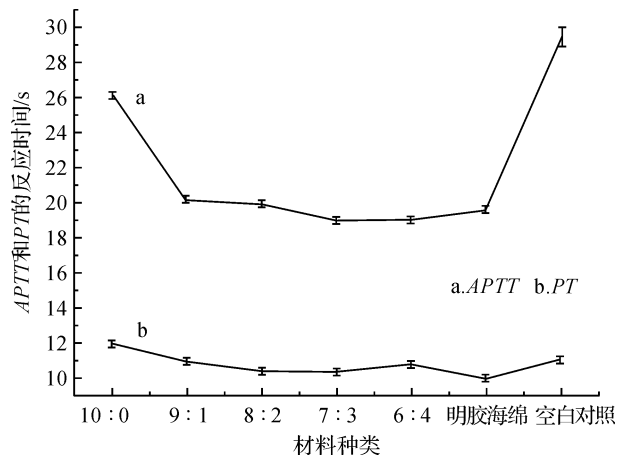


图5 各组止血材料APTT和PT的反应时间

### 2.3.4 血小板粘附率分析

表1是各组止血材料血小板粘附率。从表中可以发现,当丝素明胶质量比为6:4时,止血材料的粘附率达到最大值(44%),但其与7:3组(43%)和明胶海绵组(41%)相比没有明显差别。血小板的粘附率随着止血材料中明胶的比例增加而变大,其对血小板有良好的粘附性,但当止血材料中的明胶达到一定比例时,粘附率不再显著增加。这说明复合止血材料可以通过促进血小板的聚集,加速血栓的形成,缩短止血时间。

表1 各组止血材料血小板粘附率

组别	复合材料中丝素与明胶比例					明胶海绵
	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	
粘附率/%	29	33	38	43	44	41

### 2.3.5 大鼠断尾实验分析

图6是各组大鼠断尾实验的止血时间,从图中发现丝素明胶质量比为7:3的止血材料具有良好的止血效果,大鼠出血时间最短 $(5.50 \pm 0.46)$  min,

止血性能明显优于明胶海绵组( $9.60 \pm 0.42$ ) min和空白对照组( $14.50 \pm 0.43$ ) min。结合实验过程对此进行分析,认为主要原因是当止血材料中不加入明胶或者明胶比例较小时(10:0、9:1、8:2),止血材料的水溶性较好,容易被血液溶解,无法紧贴创面,进而没有较好的止血效果;当明胶比例较大时(6:4),止血材料不易溶解于血液,无法快速的激活启动内源性凝血,不能加速血液凝固。因此,比例适当的丝素明胶止血材料,会部分被血液溶解,有利于紧贴创面,而复合止血材料的层状多孔结构又会使血液的粘度增大,吸附血小板,启动内源性凝血,促进血块的形成,进而达到最佳的止血效果。

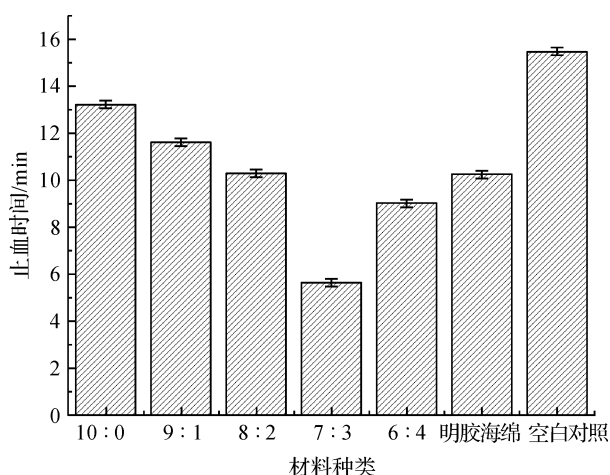


图6 各组材料的止血时间

### 3 结论

本文中将水解后的再生丝素蛋白溶液与明胶按一定比例进行共混,冷冻干燥后得到具有良好止血效果的复合止血材料。经过测试所得结论如下:

复合止血材料与纯丝素蛋白材料相比具有更加明显的多孔结构,容易吸收水分,将使血液的局部浓度增大,加速血液凝固,可推知具有层状多孔结构的材料具有良好的止血效果。丝素明胶质量比为7:3的材料的凝血指数(BCI)最小,值为 $34.30\% \pm 0.96\%$ ,明显低于纯丝素蛋白组和明胶海绵组。在凝血时间的测试中,丝素明胶质量比为7:3的材料止血时间为( $5.70 \pm 0.31$ ) min,与丝素明胶质量比为6:4组( $5.60 \pm 0.14$ ) min的相差不大,但明显优于其他各组。复合止血材料主要的止血机理是内源

性止血,因为各组材料的APTT时间有显著的变化,最小值为( $18.92 \pm 0.14$ ) s(丝素明胶质量比7:3),空白对照组和明胶海绵组分别为( $29.58 \pm 0.57$ ) s和( $19.53 \pm 0.07$ ) s。各组材料的PT值没有明显的区别。在血小板吸附实验中,发现随着组分中明胶比例的升高,材料的血小板的吸附性增强,但当明胶比例达到30%后,吸附性不再显著增强。大鼠断尾实验表明,丝素明胶质量比为7:3的止血材料的止血时间最短,约为( $5.50 \pm 0.46$ ) min,止血效果优于其他组别。

### 参考文献:

- [1] 张少锋,洪加源. 医用生物可吸收止血材料的研究现状与临床应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(21): 3941-3944.
- [2] 曹正兵. 丝素蛋白自组装行为及其在生物医药方面的应用研究[D]. 上海: 复旦大学, 2005.
- [3] 韦俏娜, 马林, 黄爱民, 等. 甲醇-水混合溶剂后处理制备丝素蛋白膜及其药物释放研究[J]. 化学学报, 2012(6): 714-720.
- [4] 王宏昕, 李敏. 丝素蛋白作为组织工程生物材料的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008(2): 192-195.
- [5] 许亚阳, 沈锦玉, 朱海霖, 等. 不同分子质量丝素肽的形貌结构与止血性能[J]. 蚕业科学, 2015(2): 354-360.
- [6] 张桂媛. 丝素蛋白止血材料的制备及其性能研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [7] Takahashi H, Miyoshi T, Boki K. Study on hydrophilic properties of gelatin as a clinical wound dressing. II. Water-absorbing property and hemostatic effect of gelatin [J]. Tokushima Journal of Experimental Medicine, 1993, 40(3/4): 169-175.
- [8] Shih M F, Shau M D, Chang M Y, et al. Platelet adsorption and hemolytic properties of liquid crystal/composite polymers[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 327(1/2): 117-125.
- [9] Behrens A M, Sikorski M J, Li T, et al. Blood-aggregating hydrogel particles for use as a hemostatic agent[J]. Acta Biomaterialia, 2014, 10(2): 701.
- [10] 张妹妹, 侯虎, 李八方. 鳕鱼皮明胶的止血活性和机理研究[J]. 现代食品科技, 2016(3): 18-23.
- [11] 田文华, 张镁, 雷学会, 等. 水溶性止血纺织材料对血小板和血栓形成的影响[J]. 北京生物医学工程, 1998(1): 40-43.
- [12] 王巍, 程明和, 高静, 等. 白及止血海绵止血作用的实验研究[J]. 药学实践杂志, 2016(1): 32-35.

## Effect of proportion of silk fibroin/gelatin composites on hemostatic performance of mice

*XU Qingdong, LEI Caihong, ZHU Hailin, CHEN Jianyong*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Fiber Materials and Manufacturing Technology,  
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Hydrolysed silk fibroin was obtained by dissolving silk fibroin in the ternary system of  $\text{CaCl}_2\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH-H}_2\text{O}$ , and silk fibroin/gelatin composite hemostatic materials was obtained by mixing silk fibroin with gelatin in different proportions and freezing and drying the mixtures. Observation of the microstructure of the composite hemostatic materials with field emission scanning electron microscope shows that silk fibroin/gelatin composites are of pore structure; the characterization of the combination mode of materials with Fourier infrared spectrometer (FTIR) show that silk fibroin and gelatin are physical blending; the characterization of the hemostatic properties of the silk fibroin/gelatin composites by blood coagulation index (*BCI*), in vitro blood clotting time, activated partial thromboplastin time (*APTT*), prothrombin time (*PT*), platelet adsorption rate and rat tail cutting experiment shows that the hemostatic indicators of the composites are good with silk fibroin and gelatin of a mass ratio of 7 : 3.

**Key words:** silk fibroin; gelatin; morphological structure; hemostatic properties

(责任编辑: 唐志荣)