

纳米孔硅灰石载药抗菌止血材料的研究

陈 于 徐 灿 苏佳灿* 李文锐

(上海市第二军医大学附属长海医院, 上海 200433)

摘要: 采用溶胶-凝胶法,以聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯三嵌段共聚物(P_{123})为模板剂,合成了纳米孔硅灰石(np-WT),用 np-WT 载盐酸万古霉素研制了一种新型的载药抗菌止血材料,并对其止血性能进行了研究。结果表明:np-WT 具有排列有序的纳米孔道结构,其孔径在 2 nm 左右,高比表面积的 np-WT 能够明显地缩短体外部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)。载药 np-WT 能够在磷酸缓冲溶液(PBS)中缓慢地释放药物,载药 np-WT 对其凝血性能没有明显的影响。载药 np-WT 对大肠杆菌有很好的抗菌作用,细胞毒性实验表明:载药 np-WT 无细胞毒性。载药 np-WT 具有很好的止血性能,能够阻止兔背部伤口的流血和缩短其流血时间。

关键词: 纳米孔硅灰石; 止血; 药物缓释; 抗菌; 生物相容性

中图分类号: R318 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4861(2011)04-0625-06

Hemostatic Agent of Nano Porous Wollastonite Loaded Drug with Antibacterial Properties

CHEN Yu XU Can SU Jia-Can* LI Wen-Rui

(Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: A nanoporous wollastonite (np-WT) was fabricated by using amphiphilic pluronic polymer surfactant (P_{123} , $EO_{20}PO_{70}EO_{20}$) as templates and sol-gel process, and a hemostatic agent of np-WT loaded drug (Vancomycin Hydrochloride) with antibacterial properties was investigated. The results showed that np-WT with large surface area and well ordered pores of around 2 nm could significantly shorten prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT). The np-WT loaded drug had no obvious effects on its hemostatic properties. The np-WT could slowly release drug into phosphate buffered saline(PBS) for 7 d. The np-WT loaded drug without cytotoxicity had good antibacterial properties. The np-WT loaded drug could shorten the bleeding time of rabbit back wound and control hemorrhage, showing good hemostatic properties.

Key words: nanoporous wollastonite; hemostatic agent; drug release; antibacterial; biocompatibility

因日常交通、自然灾害等引起的人体创伤时有发生,创伤出血是威胁生命的主要原因之一,而有效地止血是创伤急救外科手术中急需解决的问题,能否在事故现场或战场对创伤进行快速止血,决定了伤员生与死的命运^[1-3]。近年来,局部止血材料的研究和应用为其提供了一种新方法,特别是对深、不易暴露的创面和实质脏器损伤创面,应用局部止血材料可以起到较好的止血效果^[4-6]。

以往重伤者在包扎后还需服用或注射大量消炎止痛药,用以缓解伤痛,防止感染;而口服或注射的药物在多数情况下只有部分能达到患病部位,大部分则随血液分散到身体的各部分,可能会造成对正常组织和器官的伤害、引起新的疾病或后遗症^[7-8]。因此,从治疗角度来看,有必要开发载药型止血材料,使得止血和治疗同步进行。

将消炎等相关药物分散于止血材料内,使其直

收稿日期:2010-09-06。收修改稿日期:2010-10-24。

上海市科委纳米专项(No.0852nm04300),上海市人事局人才发展基金(No.2009003),中国博士后科学基金面上项目(No.20100470756)资助。

*通讯联系人。E-mail: sujiacan@yahoo.com.cn

接与病灶接触,这时药物可从材料中逐步而稳定地释放出来,对病灶进行较长时间高效地供药,使材料在止血的同时兼具治疗功能^[9-10]。这类止血剂的开发,用药量会明显降低,止血和治疗效果将明显提高。因此,本工作将研制一种载药(盐酸万古霉素)抗菌止血材料用于创伤急救。

1 实验部分

1.1 材料制备与表征

以硅酸钠和氯化钙为钙硅源、聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯三嵌段共聚物(P₁₂₃)为模板剂、硝酸为催化剂,采用溶胶-凝胶法制备纳米孔硅灰石样品。将 20 g 的 P₁₂₃ 溶于 300 mL 去离子水中,加热到 60 ℃,用恒温磁力搅拌器强力搅拌溶液至澄清,加入含 50 g 硅酸钠的水溶液,继续搅拌约 30 min,再加入含 52 g 氯化钙的水溶液,用稀氢氧化钠溶液调节反应液体 pH 值为 10 左右,继续加热搅拌,反应 5 h 后形成稳定胶体。然后将胶体于室温陈化 3 d,再用烘箱于 60 ℃干燥 1~2 d。干燥后的样品在 650 ℃煅烧 6 h(升温速度 1 ℃·min⁻¹),得到最终的纳米孔硅灰石样品。采用与上述同样的方法(但不加模板剂 P₁₂₃)合成了非孔硅灰石作为对照样品。将纳米孔硅灰石用行星磨磨机研磨 3 min(300 r·min⁻¹)得到均匀的粉末。取少量粉末样品在无水乙醇中超声分散,用滴管将含样品的乙醇液滴到碳支持膜上,常温干燥后,用透射电镜观察材料的微观结构并拍照。用物理吸附分析仪测定不同相对压力 p/p_0 下纳米孔硅灰石的 N₂ 等温吸附-脱附曲线,通过 BET 计算,分析材料的比表面积和孔容,根据 Barrett-Joyner-Helen(BJH)公式计算出材料的平均孔径。

1.2 药物释放

研究纳米孔硅灰石材料吸附盐酸万古霉素(简称药物)后在 PBS 溶液中的释放情况。首先测定盐酸万古霉素浓度与吸光度的标准曲线;分别取一定量的药物,用 PBS(pH=7.4)配置成 5、10、20、50、100、200 和 500 μg·mL⁻¹ 溶液,分别测定这些溶液的吸光度,绘制标准曲线。在 5 g 纳米孔硅灰石和非孔硅灰石分别滴加 1 mL 盐酸万古霉素水溶液(5 mg·mL⁻¹),让材料充分吸附药物,然后晾干。将吸附了药物的材料分别放入 PBS 溶液中,在不同时间点(1、2、3、6、12、24、48、72 h),取出一定量的溶液测定其吸光度,再对照药物浓度吸光度的标准曲线,得出不同时间材料的释药量,3 个平行样取平均值,并绘

制缓释曲线。

1.3 抗菌性能

抗菌实验采用大肠杆菌(*E. coli*)ATCC 87399 为细菌模型。将待测试的样品先用 70% 的酒精消毒,然后用电子天平分别称量 0.4 mg 纳米孔硅灰石(未载药和载药)放入 0.04 mL 的细菌溶液中(3.25×10^4 CFU·mL⁻¹),用聚乙烯板盖好。在湿度大于 90% 和 37 ℃ 温度下培养 24 h。用 10 mL 含吐温 80 的生理盐水洗涤,取 0.2 mL 洗液放到含营养成分的琼脂上,并在湿度大于 90% 和 37 ℃ 温度条件下,分别培养 1 和 12 h,计数活细菌的数目,每种样品做 3 个平行测试,取平均值。抑菌率可用下式计算:

$$R(\%) = ((BC)/B) \times 100\%$$

其中, R 是抗菌率(%), B 是空白组的平均细菌数目(CFU/样品), C 是实验组的平均细菌数目(CFU/样品)。

1.4 细胞毒性

根据 ISO:10993-5 细胞毒性测试标准。在 37 ℃ 下,用无血清细胞培养基分别浸泡纳米孔硅灰石材料(未载药和载药)24 h($200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 材料与液体比例),得到各自的浸提液。以每孔 3×10^3 的浓度接种 MC3T3-E1 细胞到 96 孔组织培养板,继续孵育 1 d 后,弃去培养基;PBS 清洗 3 遍,分别加入材料的浸提液,继续培养 1 d;未加材料浸提液的作为空白对照组。达到测试时间点时,每孔加入 30 μL MTT 溶液,继续孵育培养 4 h 后,弃去培养液,PBS 清洗 3 遍,每孔加入 100 μL DMSO,室温静置 10 min 后,用酶标仪于 490 nm 波长处,测溶液的吸光度值。

1.5 止血性能

采用部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT) 2 个凝血指标来考察材料对凝血系统的影响。SD 大鼠血浆的制备方法具体如下:用乌拉坦麻醉($0.4 \text{ μL}/100 \text{ mg}$ 体重)SD 大鼠后,从大鼠腹主动脉处抽取血液,并及时加入抗凝剂枸橼酸钙($0.109 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1:9)以防止血液凝结,在 4 ℃、 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下,冷冻离心制得贫血小板血浆。

在试管内加入贫血小板血浆,再分别加入纳米孔硅灰石材料(未载药与载药)以及对照样非孔硅灰石,迅速将二者混合均匀后,在 37 ℃ 培养箱中培养,加入氯化钙溶液,仔细观察并记录出现纤维蛋白丝的时刻,该时间为部分凝血活酶时间。作法同上,按照实验设计的比例,在试管内加入贫血小板血浆和纳米孔硅灰石粉末材料,快速加入 PT 试剂,

并置于 37 ℃ 培养箱培养,迅速摇匀并且记录凝固所需的时间,该部分时间为凝血酶原时间,未加入材料的空白组作为对照。

1.6 动物止血实验

皮肤止血实验:用电子天平称取棉球、纳米孔硅灰石粉末材料(未载药与载药材料)和对照样非孔硅灰石各若干份备用。新西兰大白兔固定在实验箱内,不麻醉。选择大白兔背部作为实验部位,用刀片横向划开皮肤,迅速将上述纳米孔硅灰石粉末材料撒在伤口上并用棉球轻按一定时间,除去压力后如果棉球周围无渗血即为止血,用秒表确定止血时间。

2 结果与讨论

2.1 材料的微观结构分析

图 1a 是纳米孔硅灰石材料的透射电子显微镜照片,显示的是纳米孔硅灰石的微观结构和形貌。由图可见,材料具有蜂窝状的孔道结构特征,孔道排列有序,这正是以 P_{123} 为模板剂(造孔剂)形成纳米孔道的形貌特征,孔道直径大约在 2 nm 左右。

图 1b 是纳米孔硅灰石材料的孔径与孔容分布图,结果表明:材料的孔径分布很集中(2.0 nm 左

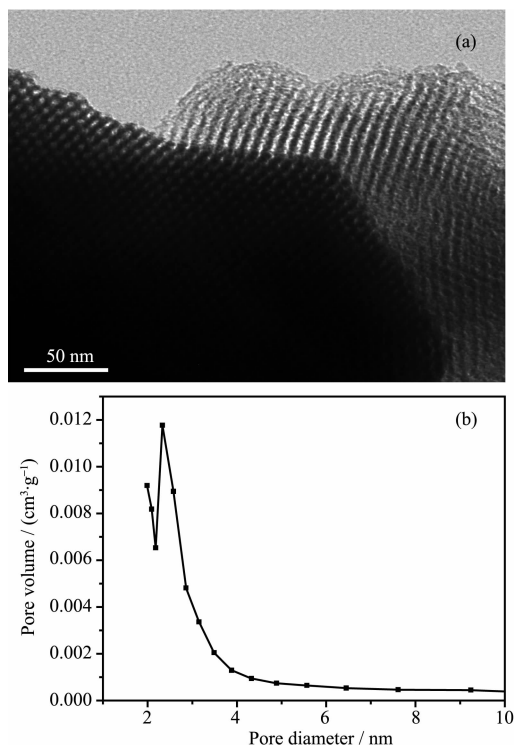


图1 纳米孔硅灰石的 TEM 微观结构和形貌(a)和纳米孔径(b)

Fig.1 Morphology/microstructure of TEM image and pore diameter of np-WT

右)。从 BET 和 BJH 计算可以得出,纳米孔硅灰石的比表面积为 $487 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$,平均孔径为 2.3 nm。而对照样品非孔硅灰石的比表面积为 $91 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$,大大低于纳米孔硅灰石的比表面积。多孔材料的孔径大小与致孔剂的种类密切相关,用 P_{123} 为模板剂合成的纳米孔材料的孔径在 2~3 nm 之间^[11-12]。

2.2 药物缓释

图 2 比较了载药纳米孔硅灰石和非孔硅灰石在 PBS 溶液中对药物释放的影响。由图可见,7 d 内,载药纳米孔硅灰石与非孔硅灰石在 PBS 溶液中的药物缓释过程有明显的区别。当材料装载(吸附)相同药量的时候,非孔硅灰石的药物释放过程基本集中在前 12 h(药物释放较快,药物浓度在短时间内局部过高,这对病灶不利),药物释放率超过 90%,12 h 后,药物释放曲线进入平稳期,即材料释放药物进入溶液中的量很少,不能起到治疗作用。而载药纳米孔硅灰石在 PBS 溶液中的药物释放则覆盖了整个浸泡过程(7 d 中,药物释放较慢),这说明纳米孔硅灰石具有缓释药物的作用。同时也可以看出,纳米孔硅灰石在药物缓释足够时间(7 d)后,药物释放率也能达到 90%。药物从材料中逐步而稳定地释放出来,对病灶可以有较长时间的高效供药。

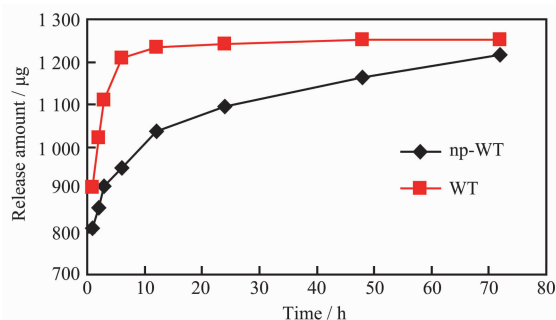


图2 载药纳米孔硅灰石和非孔硅灰石在 PBS 溶液中的药物释放情况比较

Fig.2 Comparison of drug release from np-WT and WT into PBS solutions

2.3 细胞毒性实验

生物医用材料首先要求其对人体无毒害作用,生物安全性好^[13]。因此,我们采用细胞模型来测试未载药和载药的纳米孔硅灰石对 MC3T3-E1 细胞生长的影响。图 3 是材料的细胞毒性测试结果;未载药和载药的纳米孔硅灰石与空白对照(组织培养板)的吸光度值之间没有显著性的差异。这说明随着培养时间的延长,细胞数量不断增加,未载药和载药的纳米孔硅灰石对细胞的生长没有负面影响。结果

表明:未载药和载药纳米孔硅灰石生物相容性好,没有细胞毒性。

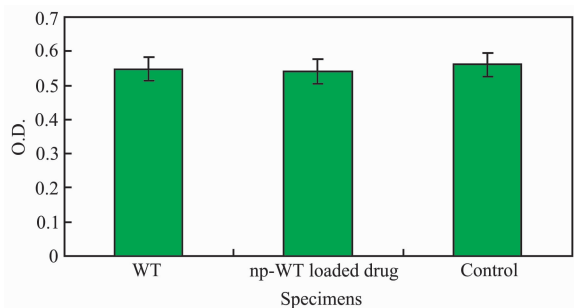


图 3 未载药和载药纳米孔硅灰石的细胞毒性

Fig.3 Cytotoxicity of np-WT and np-WT loaded drug

2.4 抗菌率

图 5 是未载药和载药的纳米孔硅灰石对大肠杆菌杀菌效果图,图中的白色颗粒(箭头)为大肠杆菌菌落。培养 12 h 后,载药纳米孔硅灰石培养皿中的细菌几乎不存在,表明载药纳米孔硅灰石有良好的抗菌效果,而未载药的纳米孔硅灰石没有抗菌作用,培养皿中有大量的细菌菌落。图 5 显示是载药纳米孔硅灰石在不同时间的抗菌率,未载药材料为对照样。培养 1 h 后,载药纳米孔硅灰石抗菌率为

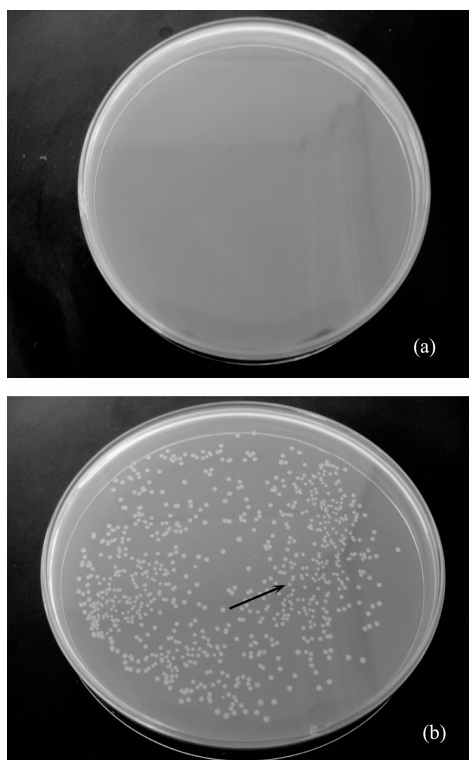


图 4 载药纳米孔硅灰石 12 h 的抗菌效果(a),未载药纳米孔硅灰石(b)为对照样

Fig.4 Antibacterial effects of np-WT loaded drug at 12 h (a), and np-WT (b) as a control

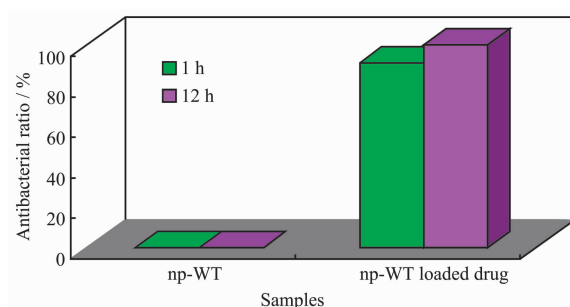


图 5 载药纳米孔硅灰石在不同时间的抗菌率,未载药纳米孔硅灰石为对照样

Fig.5 Antibacterial ratio of np-WT loaded drug at different time, np-WT as a control

91%,12 h 后,其抗菌率为 100%。表明载药纳米孔硅灰石有很好的抗菌作用,具有长时间的抑菌效果,而未载药的纳米孔硅灰石没有抗菌作用。

一般情况下,创伤出血在包扎后还需服用或注射大量消炎药,以防止感染,而口服或注射的药物只有部分能达到患病部位,大部分则随血液分散到身体的各部分,可能会造成对正常组织/器官的伤害。因此,本研究开发药物缓释型止血材料,使材料兼具止血和治疗功能。

2.5 体外止血实验(PT 和 APTT 测试)

图 6 显示的是未载药与载药纳米孔硅灰石的 APTT 和 PT 凝血时间,非孔硅灰石作为对照样。由图可见,和对照样相比,未载药与载药纳米孔硅灰石的 APTT 和 PT 凝血时间明显减少(缩短),这是由

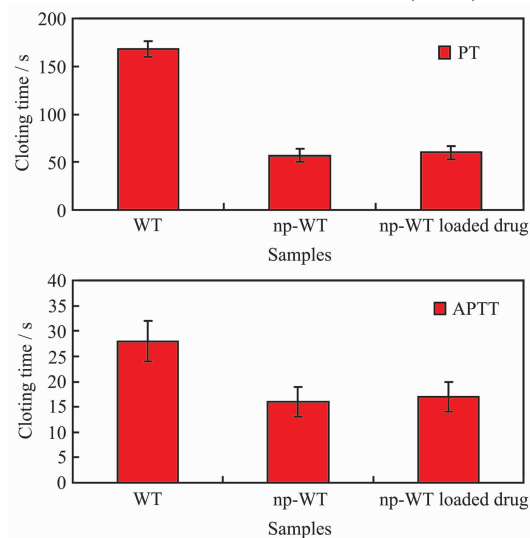


图 6 未载药与载药纳米孔硅灰石的体外止血性能(PT 和 APTT),非孔硅灰石为对照样

Fig.6 Comparison of hemostatic properties (PT and APTT) of np-WT and np-WT loaded drug, and WT as a control

于纳米孔硅灰石具有很高的比表面积和孔容,因而材料具有很强的吸附力,能迅速吸收血液中水分,导致血液浓缩,使血液产生凝结。因而纳米孔硅灰石具有很好的凝血性能,而非孔硅灰石的 APTT 和 PT 凝血时间明显延长。另外,未载药与载药纳米孔硅灰石的 APTT 和 PT 凝血时间没有明显区别,这说明载药对纳米孔硅灰石的止血性能没有影响。

2.6 动物实验

载药纳米孔硅灰石的体外止血动物实验见图

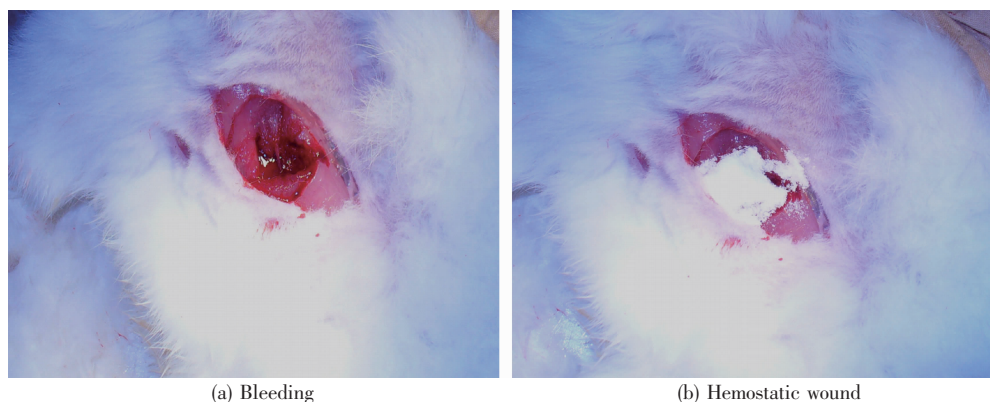


图 7 载药纳米孔硅灰石的体外止血动物实验

Fig.7 Animal hemostatic experiment of np-WT loaded drug

有效的止血是外科手术、外伤中急需解决的主要问题。在各种创伤中,大血管出血是伤员死亡的重要原因之一,及时有效地急救止血,能够为伤员赢得宝贵时间,降低伤员死亡率^[16-17]。美军在二战和朝鲜战争中因早期出血死亡的伤员占死亡伤员的 49%,是伤员死亡的第一位原因^[18-20]。局部止血材料可以控制创面渗血、保证术野清晰,对减少创伤、提高手术效率、加速患者术后恢复具有重要意义。

图 8 是载药纳米孔硅灰石用于阻止伤口流血的动物实验(兔背部),非孔孔硅灰石为对照样。和对照样相比,未载药与载药纳米孔硅灰石覆盖后的伤

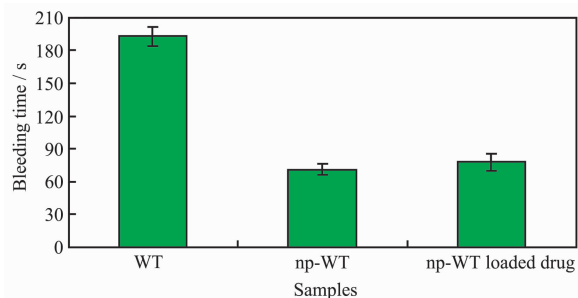


图 8 伤口流血时间比较(用未载药与载药纳米孔硅灰石覆盖伤口后),非孔硅灰石为对照样

图 8 Comparison of the bleeding time of np-WT and np-WT loaded drug, and WT as a control

7。血液接触纳米孔硅灰石后迅速形成凝块,这可能是由于纳米孔硅灰石迅速吸收血液中水分,相对提高了凝血底物的浓度,从而加快了凝血反应速度。研究表明:纳米孔材料可选择性地吸收血液中的水,导致血液浓缩,激活凝血因子,从而加速凝血,达到快速止血^[14-15]。动物实验结果表明:与正常凝血产生的湿润柔软的血凝块比较,含有纳米孔硅灰石的血凝块干燥、强度更大,因而能耐受出血部位血液较大的压力,因此可用于外伤止血和手术护理。

口的流血时间明显减少,为 70 多秒,而非孔硅灰石覆盖后的伤口流血时间接近 200 s。结果表明:纳米孔硅灰石极大地加快了止血过程,未载药的纳米孔硅灰石流血时间最短(71 s),载药纳米孔硅灰石的流血时间为 78 s,未载药与载药纳米孔硅灰石覆盖后的伤口的流血时间没有明显区别。载药纳米孔硅灰石比未载药的纳米孔硅灰石流血时间稍长,主要是由于载药,对纳米孔硅灰石的比表面积和孔有影响,药物占据了孔,但影响很小。

传统的止血方法如加压、敷料填塞和止血带等,都是通过压力止血,止血带止血还会造成远端组织缺血和代谢异常导致严重的并发症^[21]。纳米孔硅灰石不仅止血迅速,效率高,操作简便,而且不像止血带那样以阻断远端组织的血流为代价,可保证远端肢体有血供。因此纳米孔硅灰石非常适合用于战伤急救和平时的创伤快速止血。

3 结 论

采用溶胶-凝胶法,合成了纳米孔硅灰石(np-WT)载药抗菌止血材料,该材料由于存在可控的纳米孔道结构(孔径在 2 nm 左右),具有巨大的比表面积和孔容,因而具有超常的吸附能力。纳米孔硅灰

石可选择性地吸收血液中的水, 导致血液浓缩, 激活凝血因子, 从而加速凝血, 达到快速止血。载盐酸万古霉素的 np-WT 能够在磷酸缓冲溶液(PBS)中缓慢地释放药物, 载药 np-WT 对其凝血性能没有明显影响。载药 np-WT 对大肠杆菌有很好的抗菌作用, 细胞毒性实验显示载药 np-WT 生物相容性好, 无细胞毒性。纳米孔硅灰石能有效地促进血液凝结, 使血液 PT 和 APTT 的凝血时间明显地减少(缩短)。动物实验结果说明纳米孔硅灰石材料具有非常优良的止血性能, 能够缩短兔背部伤口的流血时间。载药纳米孔硅灰石材料兼具止血和治疗双重功能, 在临床应用上将具有很好的前景。

参考文献:

- [1] Farstvedt E, Stashak T S, Othie A. *Clinic. Technol. Equine Pract.*, **2004**, **3**:164-172
- [2] YU Mei-Li(于美丽), DU Zhi(杜智). *Beijing Biomed. Eng. (Beijing Shengwu Yixue Gongcheng)*, **2008**, **27**(2):208-211
- [3] YU Xue-Song(余雪松), HUANG Chi-Bing(黄赤兵), ZHANG Yin-Pu(张银甫). *J. Clinic. Rehabil. Tissue Eng. Res. (Zhongguo Zhuzhi Gongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu)*, **2008**, **12**(32):6270-6274
- [4] LIU Su(刘宿), NIU Jin-Zhu(牛金柱), GE Heng-Jiang(葛衡江), et al. *J. Traumat. Surgery (Chuangshang Waikē Zazhi)*, **2004**, **6**(1):50-53
- [5] LIU Ya-Ping(刘亚平), HOU Chun-Lin(侯春林), GU Qi-Sheng(顾其胜), et al. *Chin. J. Reparat. Reconstruct. Surgery (Zhongguo Xiufu Chongjian Waikē Zazhi)*, **2007**, **1**(8):829-832
- [6] YU Xue-Song(余雪松), HUANG Chi-Bing(黄赤兵), ZHANG Yin-Pu(张银甫). *J. Traumat. Surgery (Chuangshang Waikē Zazhi)*, **2008**, **10**(6):565-567
- [7] Dealey C. *Br. J. Nurs.*, **1993**, **2**:358-362
- [8] Jones V J. *Int. Wound J.*, **2006**, **3**:79-86
- [9] ZHANG De-Xing(张德兴), HE Zhong-Jie(何忠杰). *Chin. J. Crit. Caremed. (Zhongguo Jijiu Yixue)*, **2005**, **25**(5):353-354
- [10] Chen Y, Zheng X, Xie Y, et al. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **2008**, **19**:3603-3609
- [11] Wei J, Chen F P, Shin J W, et al. *Biomaterials*, **2009**, **6**:1080-1088
- [12] Li X, Zhang L, Dong X, et al. *Microporous Mesoporous Mater.*, **2007**, **102**:151-158
- [13] Yim E K, Leong K W. *Nanomedicine*, **2005**, **1**:10-21
- [14] Dai C L, Yuan Y, Liu C S, et al. *Biomaterials*, **2009**, **30**:5364-537
- [15] Xu C Q, Zeng Y J, Gregersen H. *Med. Eng. Phys.*, **2002**, **24**:587-593
- [16] Franoise A, Toshiki T, Walter C et al. *Adv. Biomed. Eng.*, **2008**, **36**:1708-1713
- [17] Ferraz N, Carlsson J, Hong J, et al. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **2008**, **19**:3115-3121
- [18] Alam H B, Burris D, Dacorta J A, et al. *Mil. Med.*, **2005**, **170**:63-69
- [19] TIAN Hao(田浩), WU Liang-Ping(吴良平), ZHANG Yu-Xin(张玉新). *Clinic. J. Med. Officer (Linchuang Junyi Zazhi)*, **2008**, **36**(6):989-991
- [20] Ostomel T A, Stoimenov P K, Holden P A, et al. *J. Thromb Thrombol.*, **2006**, **22**:55-67
- [21] LUO Xiong-Ming(罗雄明), WANG Jian-Hua(王建华), XU Shi-Rong(徐世荣). *Mater. Rev. (Cailiao Daobao)*, **2005**, **19**(6):78-81