

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.008

壳聚糖-三聚磷酸钠纳米粒对于肝组织严重出血模型的止血效果*

奚宏伟¹ 魏长征^{1△} 王文斌¹ 蒋丽霞¹ 盛爱莲¹ 侯春林²

(1 上海其胜生物制剂有限公司 上海 201106; 2 第二军医大学附属长征医院骨科 上海 200003)

摘要 目的:建立 SD 大鼠肝脏严重出血模型,考察壳聚糖-三聚磷酸钠(TPP)纳米粒的止血效果对于实质性器官严重出血的止血效果。**方法:**24 只 SD 大鼠各分 3 组,每组 8 只,分为阴性对照组、壳聚糖-TPP 组(NP 组)和正常组,其中阴性对照组和 NP 组的大鼠建立肝脏严重出血模型。NP 组,将壳聚糖-TPP 纳米粒喷射到伤口,直至将整个伤口覆盖。阴性对照组,不使用任何止血材料处理创面。术后 15 天,用 SEM 和 TEM 观察 NP 组和阴性对照组的肝组织的微观结构。**结果:**通过组织学检查发现壳聚糖-TPP 纳米粒在治疗严重伤口时能加速肉芽和大量胶原蛋白的生成,这正是伤口愈合初期的标志。**结论:**壳聚糖-TPP 纳米粒对于严重出血的实质器官可发挥优良的止血性能,并能促使伤口愈合。

关键词:壳聚糖;纳米粒子;肝损伤;伤口愈合;止血

中图分类号:Q95-3;R318.08;R619.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)15-2831-04

Effects of Chitosan-TPP Nanoparticles on Wound Healing of Hepatic Tissue after Severe Bleeding*

XI Hong-wei¹, WEI Chang-zheng^{1△}, WANG Wen-bin¹, JIANG Li-xia¹, SHENG Ai-lian¹, HOU Chun-lin²

(1 Qisheng Biologic Agent Limited Company in Shanghai, Shanghai, 201106, China;

2 Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai, 20003, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of chitosan-TPP nanoparticles on wound healing by building the model of severe bleeding of SD rat's liver. **Methods:** 24 SD rats were randomly divided into three different groups, each group included 8 rats. The rats in the negative group and the chitosan-TPP nanoparticles group (NP group) was dealt with severe bleeding in the liver. In the NP group, the chitosan nanoparticles were sprayed onto the wound until the whole wound was sealed. In the negative group, the same procedure was performed except any treatments. 15 days after operation, the microstructure of hepatic tissues in both NP group and negative group were investigated by SEM and TEM. **Results:** It was found in the histological observation that new granulations and a large amount of collagens were generated when chitosan-TPP nanoparticles was treated on the severe wound, which is one of the main signs in the early period of wound healing. **Conclusions:** The chitosan-TPP nanoparticles can be an ideal material in the treatment of severe bleeding and subsequent wound healing.

Key words: Chitosan; Nanoparticles; Hepatic injury; Wound healing; Hemostasis

Chinese Library Classification: Q95-3; R318.08; R619.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)15-2831-04

前言

壳聚糖由于其带正电荷,可与红细胞表面的负电荷发生电荷反应,使红细胞大量黏附聚集于伤口处,形成血栓,从而使血液凝固,其已被公认为一种理想的、安全有效的止血剂或止血敷料^[1-6],但是,单纯的壳聚糖本身止血效果有限,对于一些特殊的情况,例如实质性器官出血,它的运用受到限制^[7,8]。纳米微粒^[9,10]由于其尺寸的特殊性,在物理、化学方面均具有特别表现,但是目前对于壳聚糖纳米微粒的止血研究还较少,因此研究一种能够有效针对实质性器官的严重出血,具有良好止血效果的新型纳米止血材料具有重要的实际意义。由于高浓度的无机磷酸盐的线性聚合物能使血小板凝集,与壳聚糖复合可加速凝血,本研究建立了严重出血的动物模型,来考察壳聚糖-三

聚磷酸钠(TPP)纳米粒的止血效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

壳聚糖(分子量 500,000,脱乙酰度 >90%)由上海其胜生物制剂有限公司提供,三聚磷酸钠(TPP)由宜兴市顺平化工产品有限公司提供,本文中使用的其它化学试剂均为分析纯级。

1.2 实验仪器

纳米粒度分析仪(Zetasizer nano S, Malvern Instruments Ltd., 英国),扫描电子显微镜(SEM)(Nova NanoSEM 230, FEI, 美国),透射电子显微镜(TEM)(JEM-2010HT, 日本电子株式会社, 日本)。

* 基金项目:上海科委重点科技攻关项目(09DZ1907000)

作者简介:奚宏伟(1978-),男,硕士,研究方向:生物材料,E-mail: xeehv@msn.com. Tel: 62202533

△ 通讯作者:魏长征,E-mail: onlyme7905@hotmail.com

(收稿日期:2013-12-17 接受日期:2014-01-15)

1.3 实验动物

SD 大鼠,购自第二军医大学动物实验中心。

1.4 实验方法

1.4.1 壳聚糖-TPP 纳米粒的制备 按照文献^[11-14]报道的方法,利用离子诱导凝胶化来制得壳聚糖-TPP 纳米粒。调节壳聚糖和 TPP 的质量比为 4:1,将 TPP 水溶液中直接加入等体积的壳聚糖的 1% 醋酸溶液中,室温下轻轻搅拌,自发形成壳聚糖-TPP 纳米粒。持续搅拌 60 分钟后,取混悬液在 16,000 rpm 转速下离心 50 分钟。弃上清,沉淀物置于 65 ℃ 烘箱干燥后,储存于干燥器中。

1.4.2 SD 大鼠肝损伤模型和治疗^[15,16] 将三月龄,平均体重 200-220 g 的 24 只 SD 大鼠随机分成三组,即阴性对照组,壳聚糖-TPP 纳米粒组(NP 组)和正常组。所有动物于实验前一周饲养于温度 20-22 ℃,相对湿度为 55 %,12 小时光照/12 小时黑夜交替的环境中。

将阴性对照组和 NP 组的大鼠仰卧固定在手术台上,按照 0.32 mL/100 g 体重的剂量,腹腔注射 10 % 水合氯醛给予麻醉。

采用屋顶样切口进腹,逐层进入腹腔,显露肝脏。任取其中一个肝前叶,切除部分前叶,形成边长 2 cm 的正方形创面,以确保能严重出血。如果效果不理想,再切除部分前叶。NP 组,将壳聚糖-TPP 纳米粒喷射到伤口,直至将整个伤口覆盖,两分钟后,用 SEM 评估血液凝块和壳聚糖-TPP 之间的关系。阴性对照组,不使用任何止血材料处理创面。

术后 15 天,处死所有的老鼠,在原肝脏止血创面取标本,用 10 % 甲醛溶液固定,石蜡包埋后切片。对切片进行 HE 染色和 Masson 染色后,用 SEM 和 TEM 观察 NP 组和阴性组的肝组织的微观结构。

2 结果

2.1 壳聚糖-TPP 纳米粒的表征

以 1 % 醋酸溶液为分散相,散射 90° 角,测试温度 25 ℃,用粒径分析仪测定壳聚糖-TPP 纳米粒的粒径及粒径分布。结果显示,壳聚糖-TPP 纳米粒的尺寸分布很窄,粒子的平均大小约 60.2 nm(图 1)。

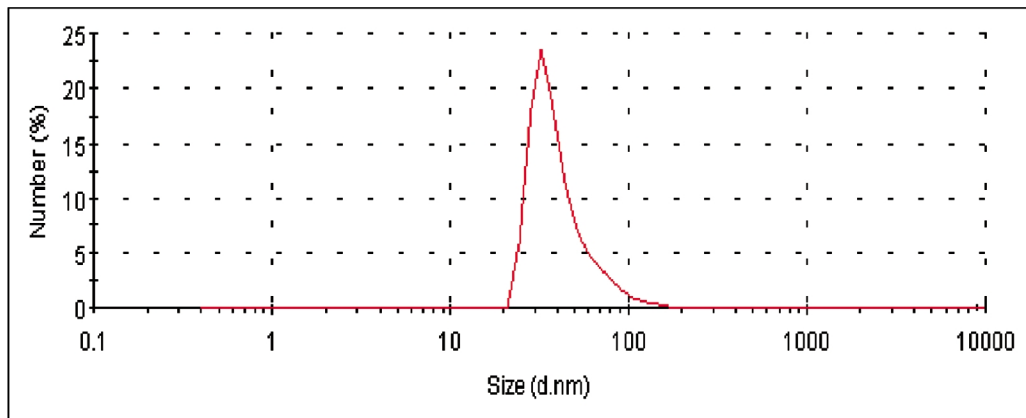


图 1 壳聚糖-TPP 纳米粒的粒径分布图

Fig.1 The size distribution of chitosan-TPP nanoparticles

2.2 壳聚糖-TPP 纳米粒的止血研究^[17,18]

2.2.1 SEM 观察 当壳聚糖-TPP 纳米粒被放置到老鼠肝脏创面上,不施加压力,2 分钟内创面止血,并且纳米粒被血液吸

收。通过 SEM,可以观察到壳聚糖-TPP 纳米粒被血细胞包围(图 2a);术后 15 后,在新生成的肝组织中仍然还可以看到 8.3 nm 的壳聚糖-TPP 纳米粒(图 2b)。

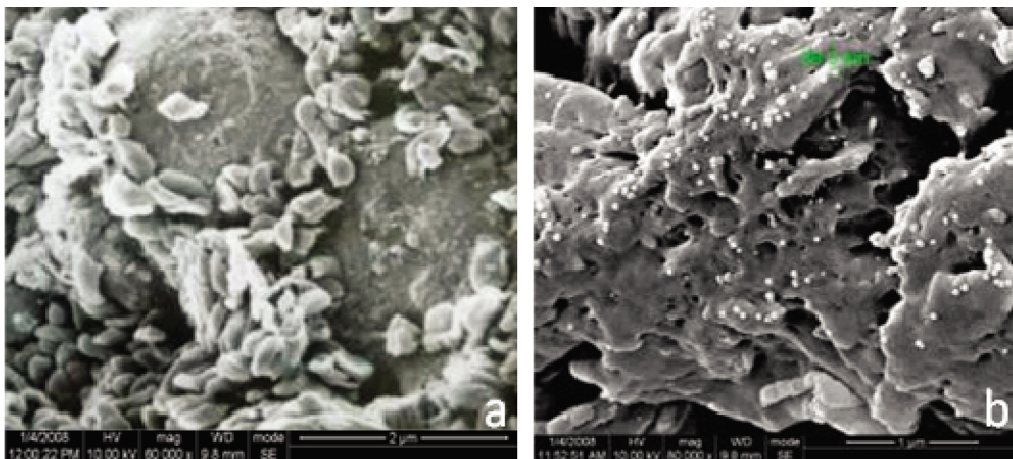


图 2 壳聚糖-TPP 纳米粒作用于肝损伤创面的 SEM 图

Fig.2 SEM observations of blood clot and the hepatic tissue

2.2.2 解剖学观察 术后 15 天, NP 组的创面周围可看到在肝脏叶的边缘存在一个黄色的蒂状结构(图 3a)^[19]。在尸检中发现

NP 组的肝组织的外观与正常组织(图 3b)相比较无显著性差异。

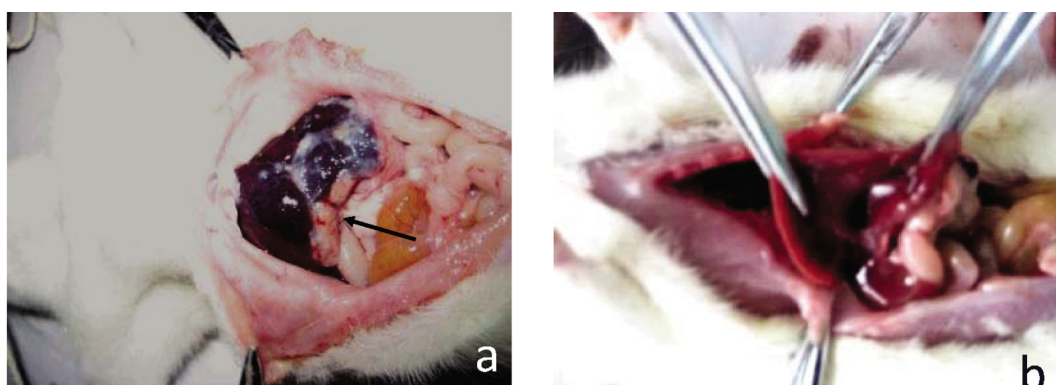


图 3 NP 组与正常组的解剖学观察

Fig.3 Anatomical observations of animals in the NP groups and the negative groups

2.2.3 HE 染色观察 HE 染色后发现,阴性对照组的受伤肝组织内几乎没有新生组织(图 4a);而 NP 组的受伤肝组织内可以看到大量新生组织生成(图 4b);在阴性对照组,可以看到肉芽

组织延伸到肝组织,而较少有成纤维细胞和新生血管形成(图 4c);在 NP 组的受伤肝组织部位,可以观察到大量的成纤维细胞和新生血管生成(图 4)。

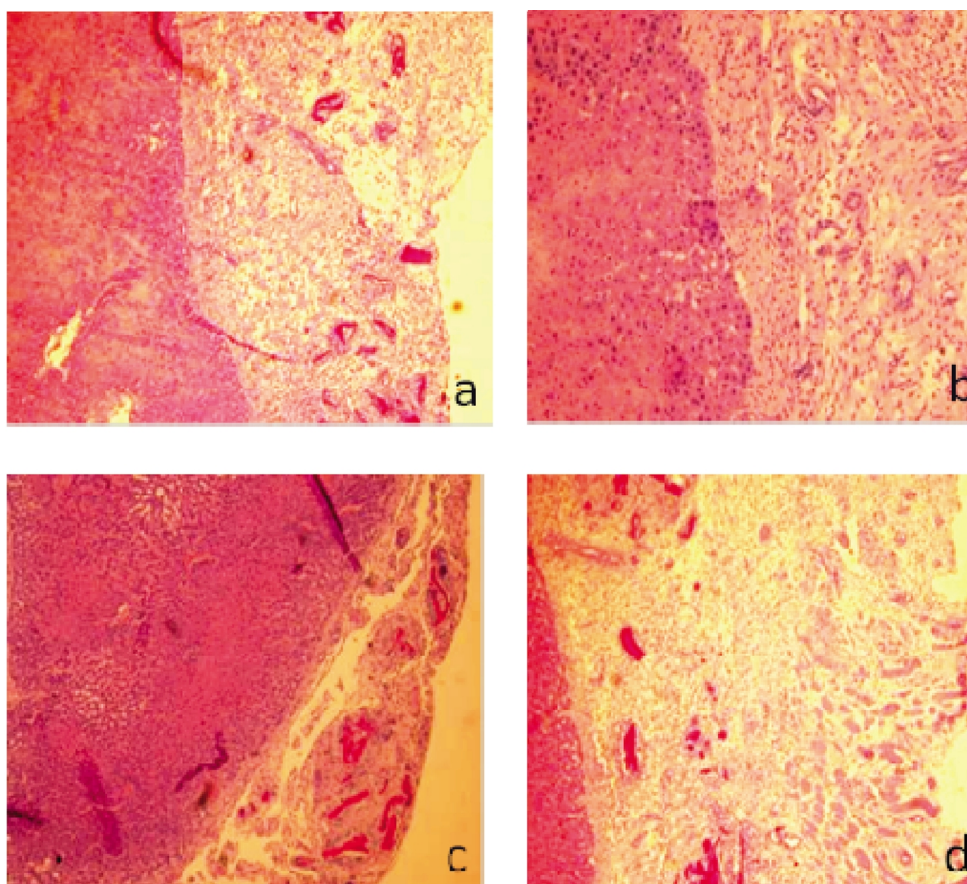


图 4 肝组织 HE 染色后的组织学观察

Fig.4 Histological observations of hepatic tissue after HE stain

2.2.4 Masson 染色 Masson 染色表明,阴性对照组的受伤组织有较少胶原生成(图 5a);而 NP 组的受伤肝组织内有大量的胶原蛋白产生(图 5b),这是伤口愈合初期的主要标志之一^[20]。

2.2.5 TEM 观察 通过 TEM 也发现了在 NP 组的受伤肝组

织内有大量的胶原蛋白。虽然正常组(图 6a)和 NP 组(图 6b)之间的肝组织的外观没有显著性差异,而在阴性对照组(图 6c)发现了许多退化的线粒体和细胞核,同时 NP 组(图 6d)观察到新生胶原蛋白。

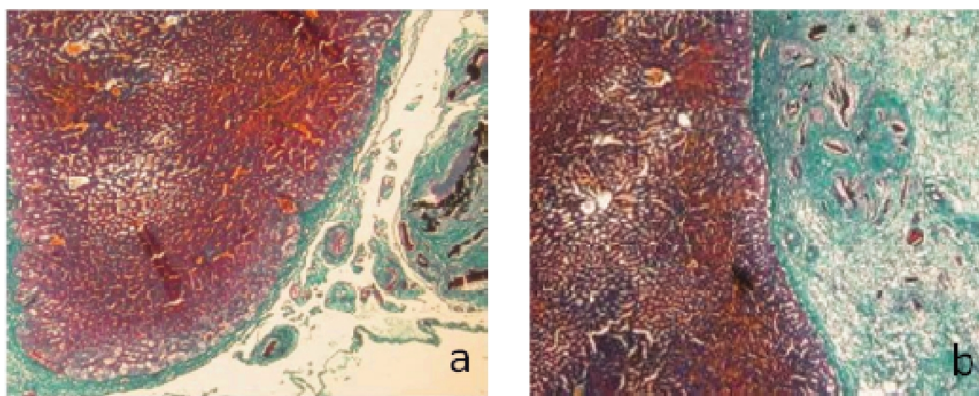


图5 壳聚糖-TPP纳米粒处理后的肝脏的Masson染色观察图(40×)

Fig.5 Masson stain observation of liver site after the application of chitosan nanoparticles (40×)

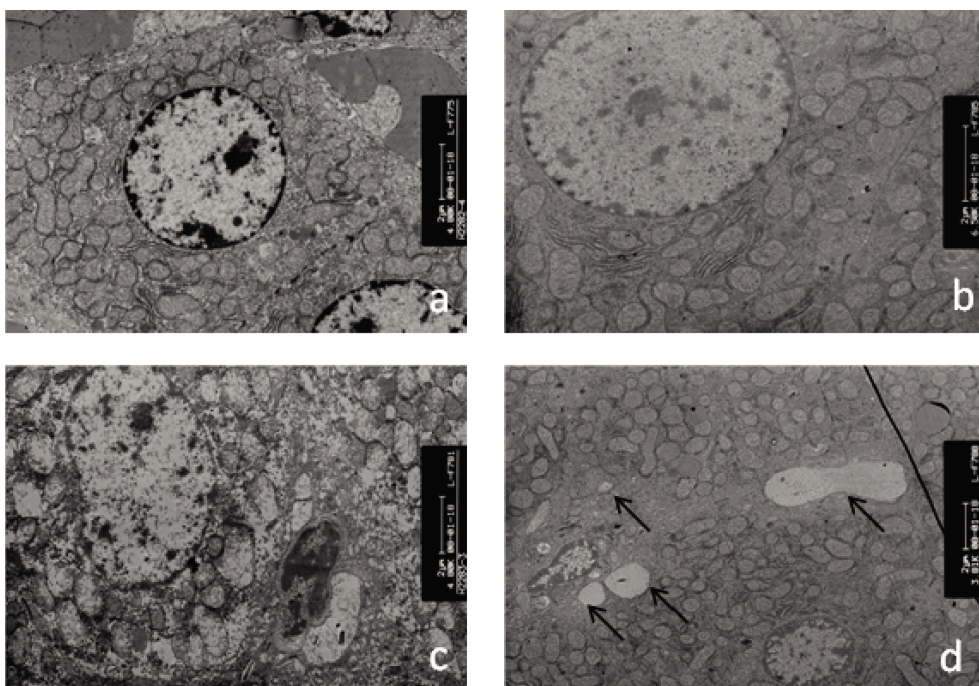


图6 肝组织TEM图

Fig.6 TEM observations of hepatic tissue

3 讨论

壳聚糖带正电荷,公认为一种理想的、安全有效的止血剂或止血敷料。但是壳聚糖存在部分缺陷,对于实质性器官严重出血没有较好的止血效果,本文针对该问题,进行了壳聚糖-三聚磷酸钠(TPP)的纳米微粒对实质性器官严重出血治疗的研究。首先以壳聚糖为主要原料,在弱酸性溶液中与三聚磷酸钠(TPP)制备形成纳米粒,并检测其粒径分布情况,粒径分布范围很窄,平均大小约60 nm。接下来,以SD大鼠为动物模型,进行肝脏损伤止血实验,实验结果证明,该壳聚糖-TPP纳米粒对于严重出血的实质器官可发挥优良的止血性能,组织学研究也证明了用壳聚糖-TPP纳米粒治疗伤口时能加速形成肉芽和生成胶原蛋白。相比较于单独使用壳聚糖,壳聚糖-TPP纳米粒对伤口愈合的治疗可以持续更长的时间。因此,针对实质器官的严重出血,壳聚糖-TPP纳米粒是一种高效的止血和促使伤口愈合的材料。

参考文献(References)

- [1] 卢斌,钱利强,章志量.壳聚糖止血机理及应用进展研究[J].健康研究,2010,30(1): 55-58
Lu Bin, Qian Li-qiang, Zhang Zhi-liang. Hemostatic mechanism of Chitosan and the progress of its application [J]. Health Research, 2010, 30(1): 55-58
- [2] Lih E, Lee JS, Park KM, et al. Rapidly curable chitosan-PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing[J]. Acta Biomater, 2012, 8(9): 3261-3169
- [3] 郭苗苗,浦金辉,徐丹,等.壳聚糖基快速止血材料的研究进展[J].中国医院药学杂志,2012,32(1): 49-51
Gu Miao-miao, Pu jin-hui, Xu Dan, et al. Research progress of chitosan in rapid hemostatic materials[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2012, 32(1): 49-51
- [4] Muzzarelli R A A, Morganti P, Morganti G, et al. Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 70: 274-284

(下转第2885页)

- factor beta induces development of the T (H)17 lineage [J]. Nature, 2006, 441(7090): 231-234
- [18] Morishima N, Mizoguchi I, Takeda K, et al. TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(1): 105-110
- [19] Xiao S, Jin H, Korn T, et al. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression[J]. J Immunol, 2008, 181(4): 2277-2284
- [20] 孟欣颖, 马健, 江晨, 等. 胃癌组织中 IL-17、IL-6、TGF-β1 的表达及临床意义[J]. 胃肠病学, 2011, 16(10): 593-596
- Meng Xin-ying, Ma Jian, Jiang Chen, et al. Expressions and Clinical Significances of IL-17, IL-6 and TGF-β1 in Gastric Cancer Tissues [J]. Chin J Gastroenterol, 2011, 16(10): 593-596
- [21] Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. J Hepatol, 2009, 50(5): 980-989

(上接第 2834 页)

- [5] Burkatovskaya M, Tegos G P, Swietlik E, et al. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and non-infected wounds in mice[J]. Biomaterials, 2006, 27: 4157-4164
- [6] Okamoto Y, Kawakami K, Miyatake K, et al. Analgesic effects of chitin and chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49: 249-252
- [7] Jon M B, James R D, Richard D N. Abbreviated laparotomy and planned reoperation for critically injured patients [J]. Annals of Surgery, 1992, 215(2): 476-484
- [8] Bijan S K, Jennifer S, Tallat B, et al. High-pressure fibrin sealant foam: an effective hemostatic agent for treating severe parenchymal hemorrhage[J]. Journal of Surgical Research, 2008, 144(1): 145-150
- [9] Gao W, Lai JC, Leung SW. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications[J]. Front Physiol, 2012, 21(3): 1-13
- [10] Pei-Leun Kang, Shwu Jen Chang, Ioannis Manousakas, et al. Development and assessment of hemostasis chitosan dressings [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(2): 565-570
- [11] Grenha A. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods[J]. J Drug Target, 2012, 20(4): 291-300
- [12] 李如, 于良民, 高丙娟. 高分子微球的制备及应用研究进展 [J]. 广州化工, 2011, 39(4): 14-16
- Li Ru, Yu Liang-min, Gao Bing-juan. Research Progress of Preparation and Application of Polymer Microspheres [J]. Guangzhou chemical industry, 2011, 39(4): 14-16
- [13] 杨婷, 侯文龙, 杨越冬. 壳聚糖微球的制备及其在生物医药领域的应用[J]. 高分子通报, 2011, 5, 51-56
- Yang Ting, Hou Wen-long, Yang Yue-dong. The Preparation of Chitosan Microspheres and Application in Biology and Medicine [J]. Polymer Bulletin, 2011, 5: 51-56
- [14] Ana G, Christopher I G, Lea AD, et al. Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, 31(2): 73-84
- [15] Pusateri AE, McCarthy SJ, Gregory KW, et al. Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine [J]. The Journal of Trauma, 2003, 54(1): 177-182
- [16] Lewis D A, Nyska A, Potti A, et al. Hemostatic activation in a chemically induced rat model of severe hemolysis and thrombosis[J]. Thrombosis Research, 2006, 118(6): 747-753
- [17] Bochicchio GV, Kilbourne MJ, Keledjian K, et al. Evaluation of a new hemostatic agent in a porcine grade V liver injury model [J]. Am Surg, 2010, 76(3): 317-320
- [18] Fu D, Han B, Dong W, et al. Effects of carboxymethyl chitosan on the blood system of rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 29(1): 110-114
- [19] Krishnan L K, Mohanty M, Umashankar PR, et al. Comparative evaluation of absorbable hemostats: advantages of fibrin-based sheets [J]. Biomaterials, 2004, 25(4): 557-5563
- [20] Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulation and wound healing application of chitosan [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 52(2): 105-115