



(凝血酶/鞣酸) 层层自组装多层膜复合壳聚糖海绵急救止血辅料的制备及其表征

Author: Huang Xiaofei, No.

Tutor: Hu Qiaoling

Introduction

壳聚糖具有止血、生物相容性好和可降解等优点,被广泛应用于急救止血领域。然而纯壳聚糖的止血性能有限,通过在壳聚糖海绵上组装凝血酶和鞣酸的多层膜,可以制备出一种新的壳聚糖急救止血敷料,实现高效止血。在平板基底上进行多层膜的组装,利用QCM和椭圆偏振进行表征,证明了凝血酶和鞣酸的组装是可实现的。将多层膜涂覆在壳聚糖海绵上,进行凝血酶活性检测和动态全血凝固实验,结果表明:凝血酶的复合使壳聚糖海绵的止血性能大大提升,海绵中负载的凝血酶释放速度很快,可实现快速止血,且凝血酶的存储稳定性得到了很大提高,室温下的活性半衰期较自由酶延长了6.7倍。综上所述,制备得到的新型壳聚糖止血敷料具有止血速度快、效果好且易存储的优点。

Materials and methods

利用微凝胶法将壳聚糖粉末制备成中性水凝胶,冷冻干燥得到壳聚糖多孔海绵。配制BPEI/PBS溶液(1mg/mL),A液:鞣酸/PBS溶液(1mg/mL),B液:凝血酶/PBS溶液(1mg/mL)。用传统的浸泡法制备具有5、10、15个双分子层的壳聚糖-凝血酶-鞣酸海绵。将海绵用筛网过滤沥干水分,放入冰箱-20℃预冷冻,待水完全结成冰,再冷冻干燥。即制得了LBL多层膜涂覆的海绵。并对其进行凝血酶活性表征,以及动态全血测试、SEM表征,以研究其止血性能。

Results and Discussion

为了有效监测并直观检验(凝血酶/鞣酸)n多层膜的组装情况,需先在平板基底,如硅片、金片上进行组装,再利用QCM、椭圆偏振表征的情况。Fig.1.为利用QCM湿态法动态监测凝血酶和鞣酸的层层自组装。图中的白色箭头表示凝血酶的加入,黑色箭头表示鞣酸的加入。图中的频率减少表现为质量增加。对于(凝血酶/鞣酸)n,每一次通入凝血酶或是鞣酸都会出现一个非常明显的频率降低,即质量增加。表示在生理PH下,凝血酶和鞣酸之间的氢键相互作用使其成功形成了层层自组装膜。这一结果也已经得到了Anita Shukla^[1]的证实。

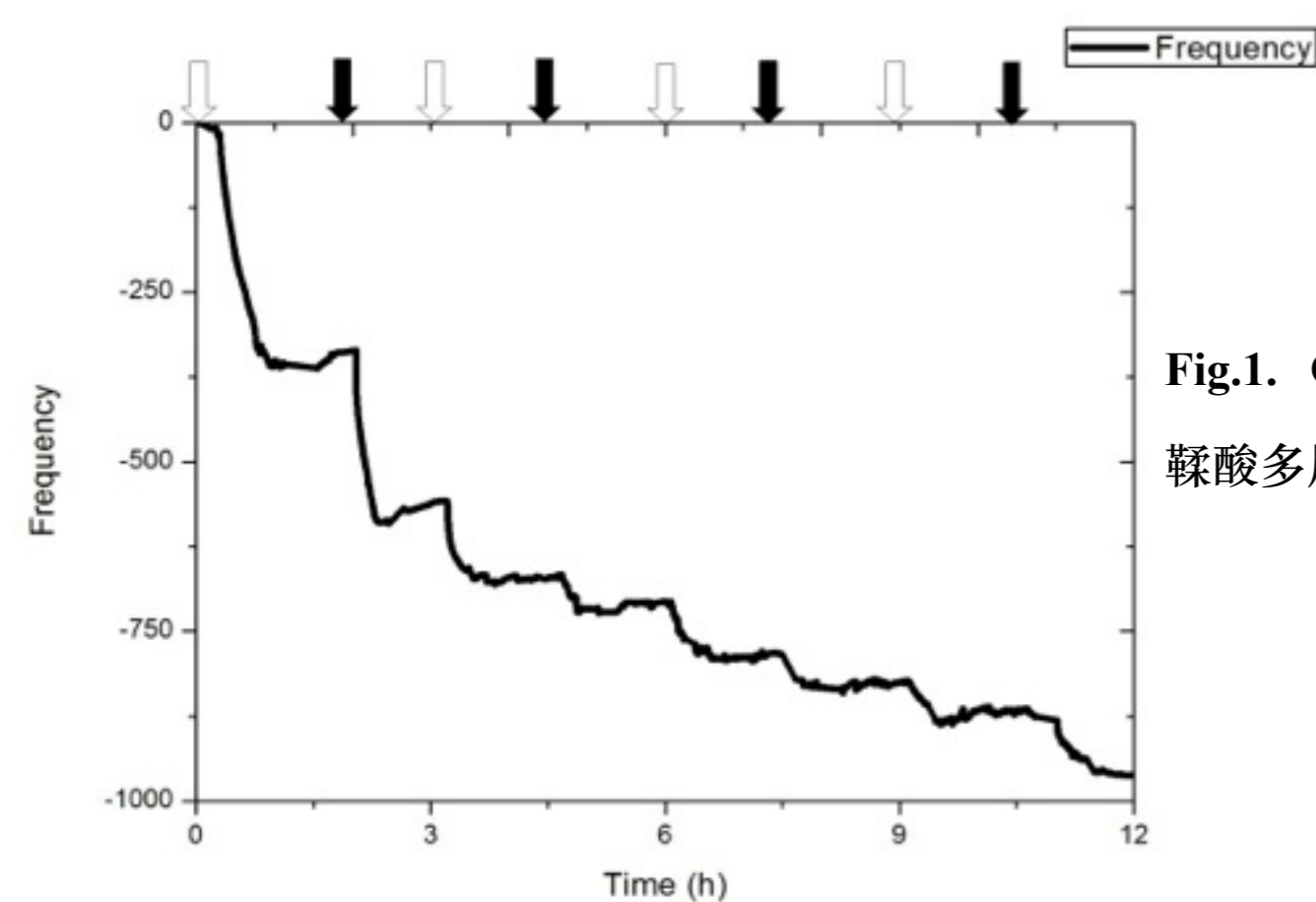


Fig.1. QCM湿态法测试凝血酶/鞣酸多层膜组装过程

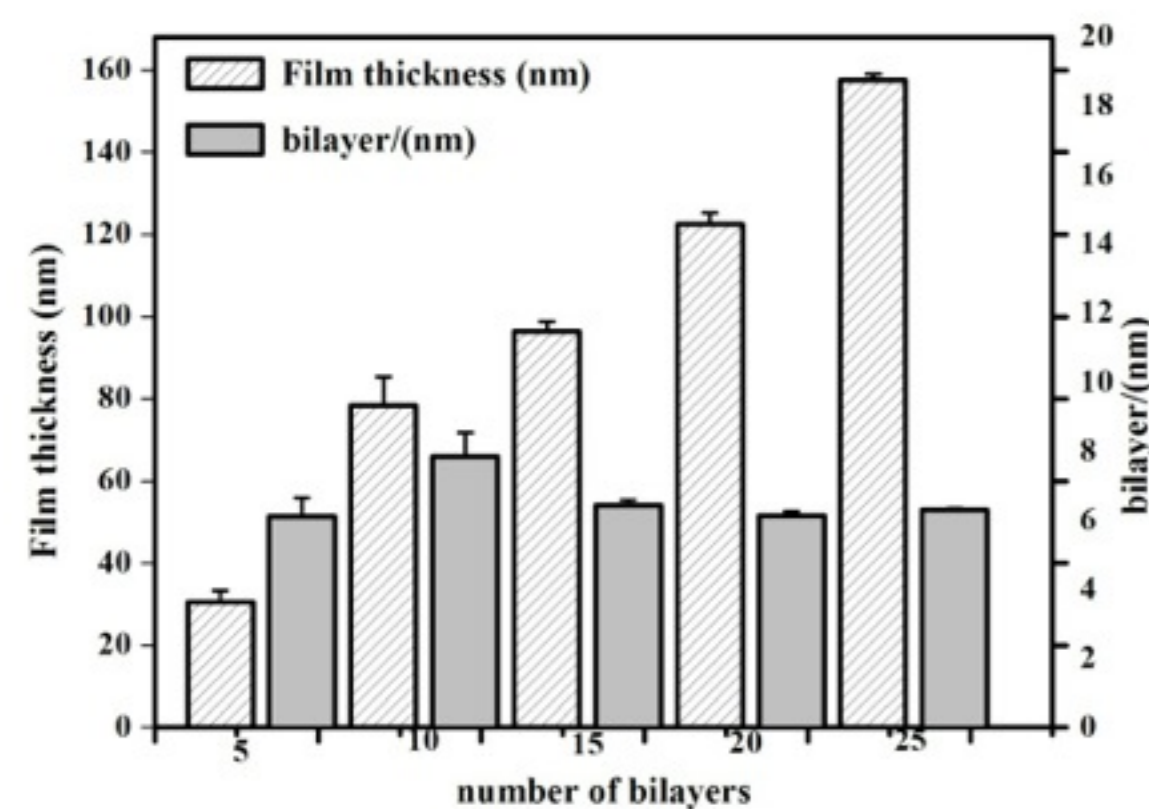


Fig.2. 椭圆偏振仪测得凝血酶与鞣酸在硅片上组装的膜厚与层数的关系

将椭圆偏振仪测量得到的膜厚数据处理成:膜厚随双分子层数的变化、单层膜厚随双分子层数的变化,得到Fig.2.。由图可知,随着双分子层数的不断增加,总膜厚呈线性递增。在25个双分子层时,膜厚度总计为157nm。说明可以利用层层自组合法提高凝血酶的负载量。在整个组装实验过程中,单个双层的厚度变化不大。在组装到10个双分子层时,平均膜厚最大,达到7.8nm。而在其他层数时,平均膜厚在6.1~6.4nm之间。

制备壳聚糖海绵并进行多层涂覆,得到组装5、10、15个双层的海绵。分别拍摄数码照片(Fig.3.)和SEM图(Fig.4, Fig.5.),对比组装对其宏观和微观形貌的影响。



Fig.3. 海绵的宏观形貌(左上:未组装;右上:5个双层;左下:10个双层;右下:15个双层)

由Fig.3.可发现,组装使海绵的宏观形貌发生了很大的改变,这主要是因为鞣酸本身是黄色的,海绵在其中浸泡之后,会显现出黄色。且随着组装层数的增加,颜色越发明显。

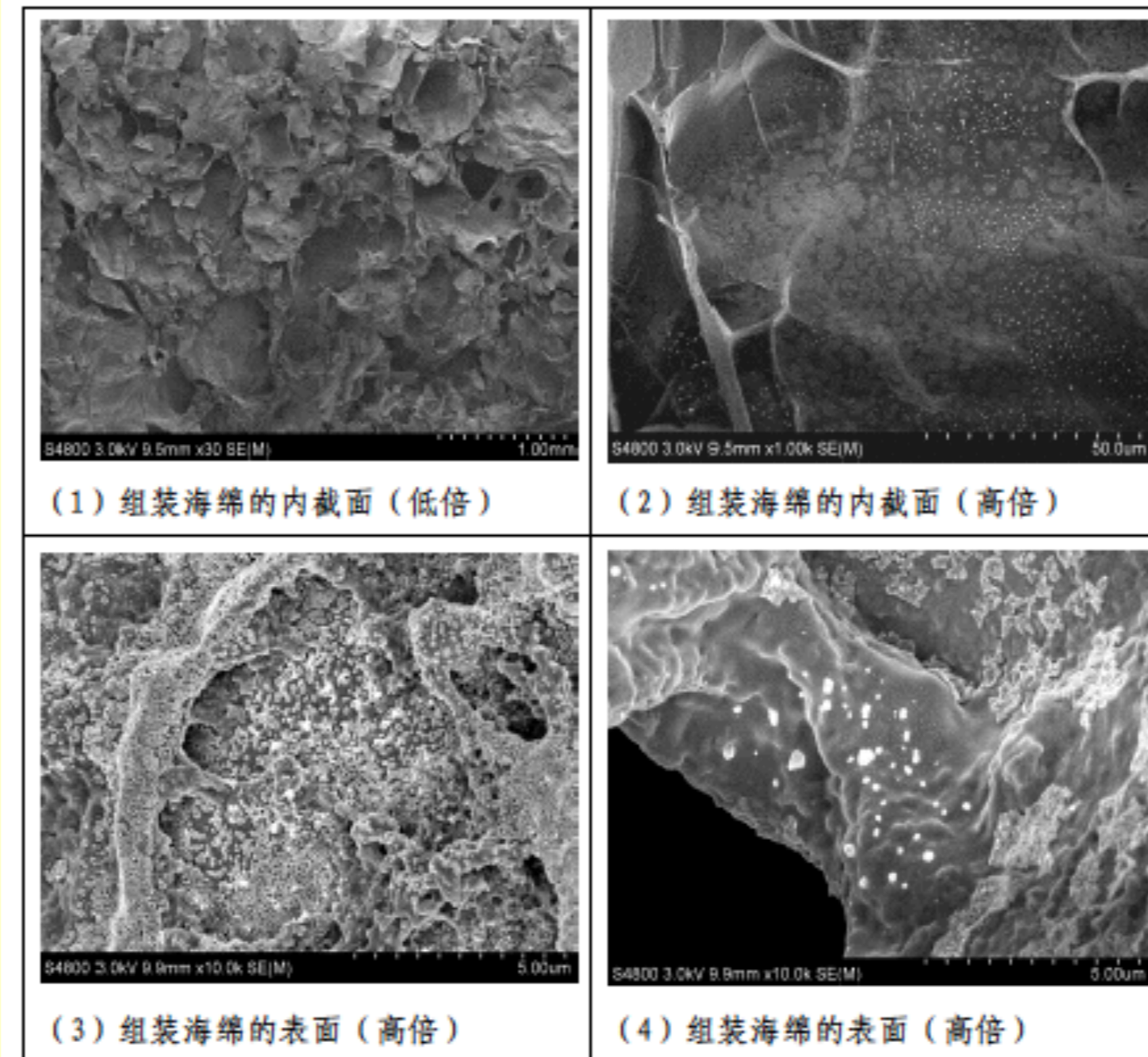


Fig.4. 组装了5个双分子层的壳聚糖海绵的SEM图

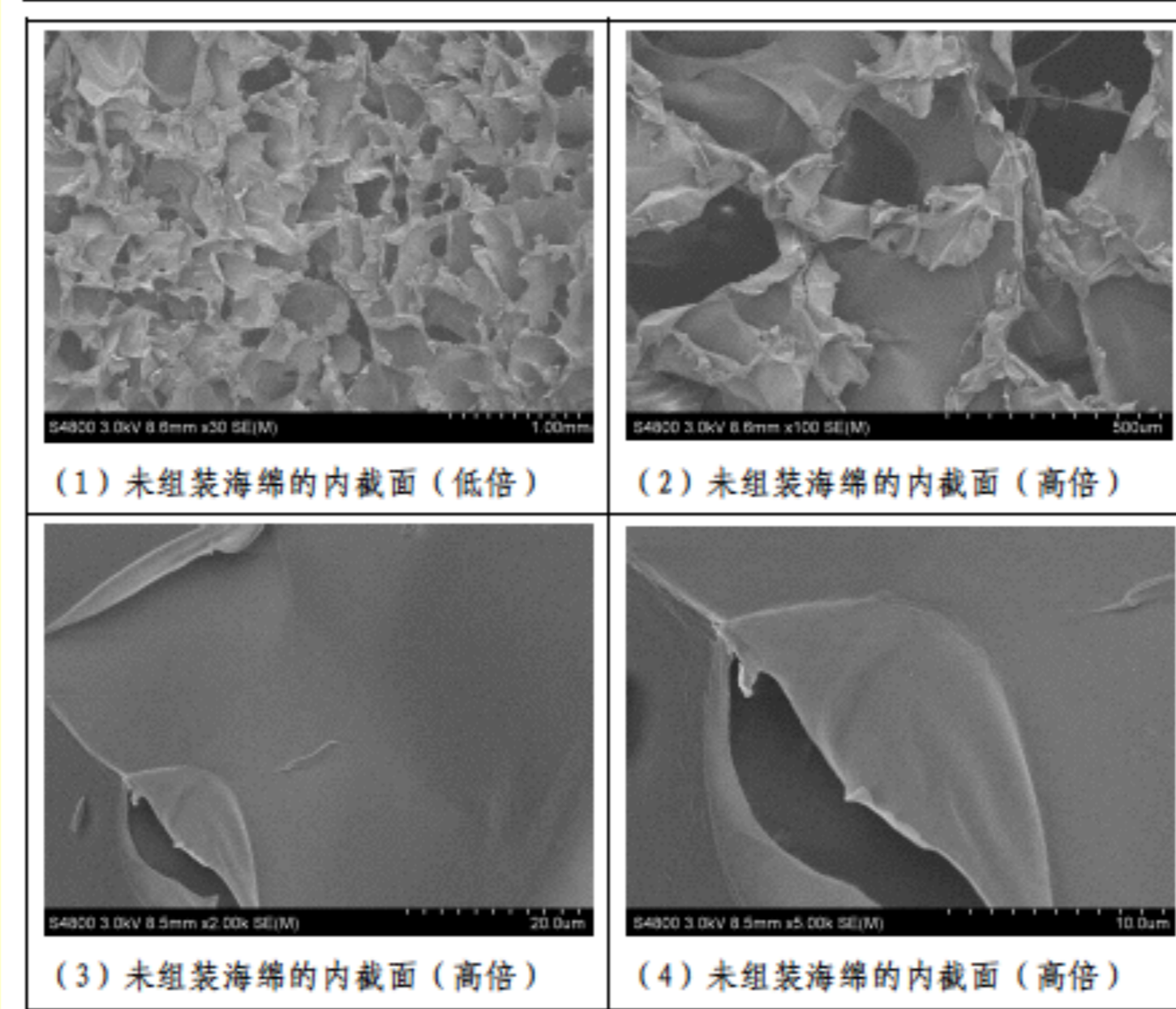


Fig.5. 未组装壳聚糖海绵的SEM图

对比Fig.4和Fig.5.,会发现未组装的海绵表面非常干净,几乎无物质聚集,由此可推断组装海绵内部吸附的大量物质并不是海绵自身存在的杂质,而是组装上去的凝血酶、鞣酸以及部分PBS盐晶体。对比低倍镜的SEM图可发现,组装并没有改变海绵的基本形貌,海绵仍保持了原有的空隙结构。

检测复合海绵中的凝血酶活性,首先要绘制凝血酶标准曲线:标准品效价(单位)的对数为横坐标,凝集时间(秒)的对数为纵坐标。由此计算直线回归方程。得到以下结果:

Equation	y = a + b*x		
Adj. R-Square	0.99582	Value	Standard Error
B	Intercept	11.028	0.30406
B	Slope	-2.614	0.08462

Fig.6 凝血酶标准品的标准曲线回归方程

将多层膜复合海绵的凝血酶测试结果经由标准曲线方程转换后得到Fig.7.由图可知,凝血酶活性随双分子层数的增加而增加,这与膜厚随双分子层数的变化结果是一致的。说明层层自组合法确实可以提供凝血酶的负载量,有望实现凝血酶负载量的可调控。

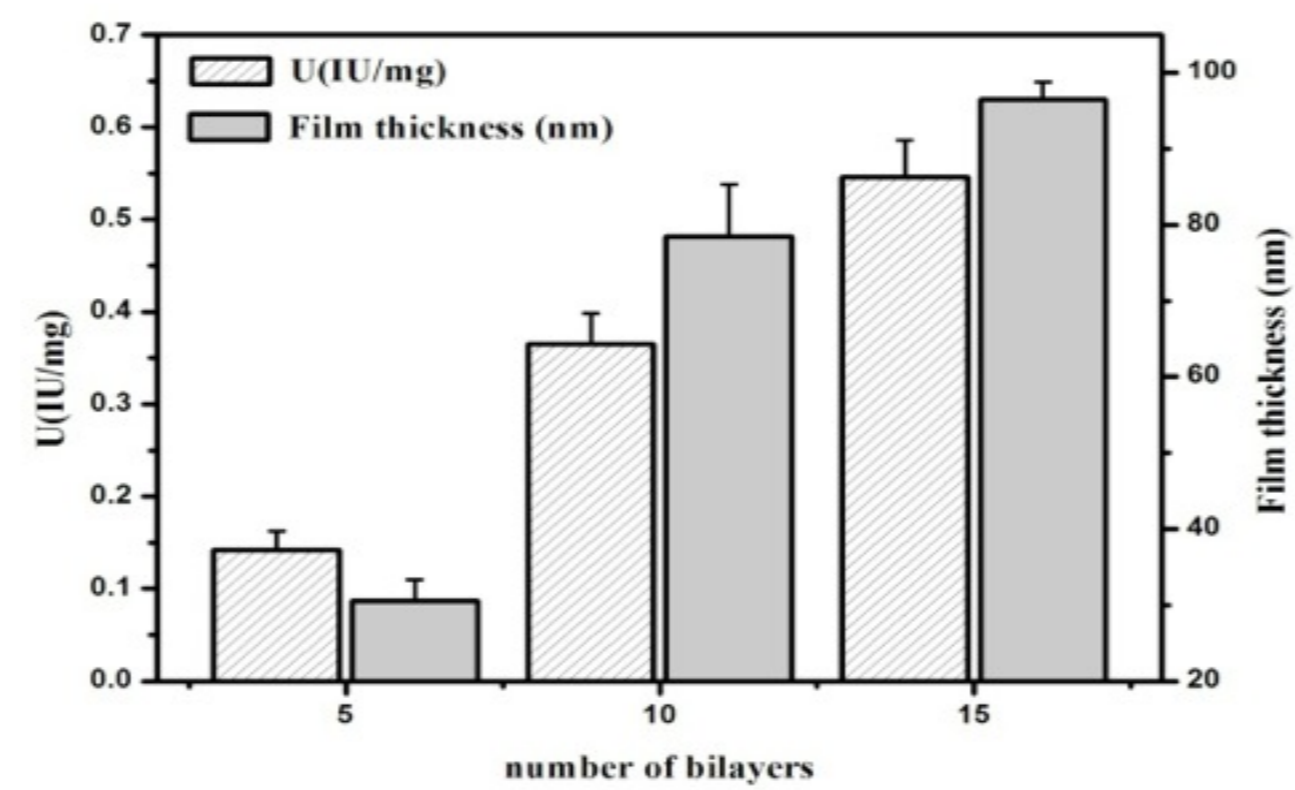


Fig.7. 凝血酶活性和膜厚随双分子层数的变化图

为了测试复合海绵中凝血酶的释放速度,需取5、10、15个双分子层的复合海绵浸泡在PBS中,置37±0.5℃水浴中分别浸泡5min、15min、30min、180min时间,取海绵浸出液测试其凝血酶活性。得到凝血酶释放曲线Fig.8.由此图可知,凝血酶的释放速度很快,基本5min内凝血酶就释放完全了,并且随着时间的推移,凝血酶的稳定性下降,使测量得到的凝血酶活性降低。且这一趋势不随着双分子层数的变化而改变。说明凝血酶的迅速释放是一个既定规律。这意味着多层膜复合海绵的止血速度可以很快,因为凝血酶在伤口处会迅速释放出来,起到速效止血的效果。

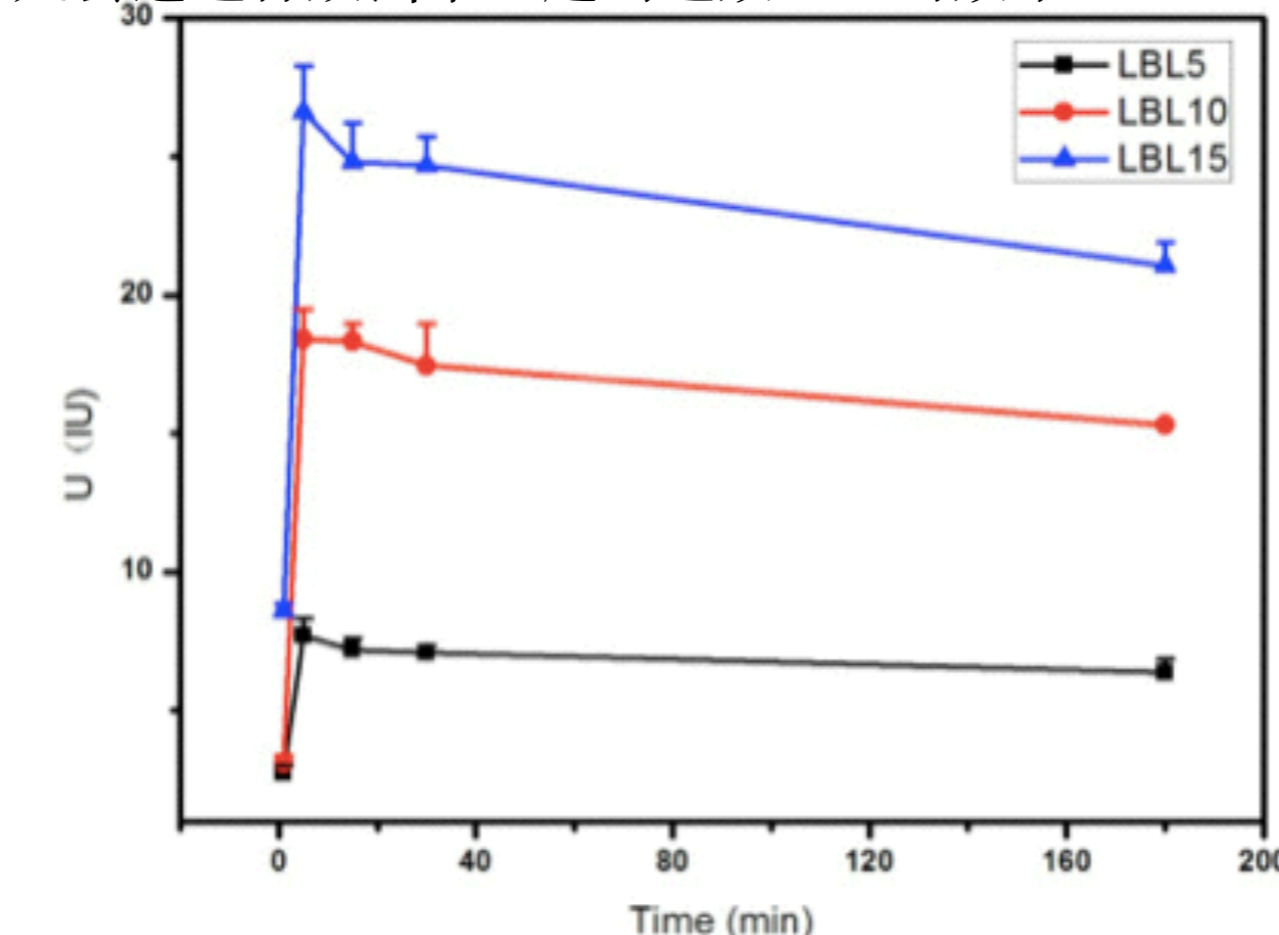


Fig.8. 凝血酶释放曲线

凝血酶的半衰期是指在连续测定的条件下,其酶活性下降为最大活性的一半时的时间,以t_{1/2}表示,是衡量凝血酶稳定性的指标。将组装了5个双层的复合海绵在室温下保存1、7、31天后测试其凝血酶活性,得到Fig.9.发现其失活量不大,考虑到凝血酶本身的存储稳定性很差,复合海绵中的凝血酶稳定性得到了很大的提高。从半衰期数据来看,复合海绵中的凝血酶的半衰期为88.3天,而自由态的凝血酶只有11.4天。即室温下,复合海绵中的凝血酶的半衰期是自由态的6.7倍。说明凝血酶的存储稳定性得到了相当大的提高,壳聚糖基对凝血酶具有很好的稳定作用,具体的原因有待进一步研究。

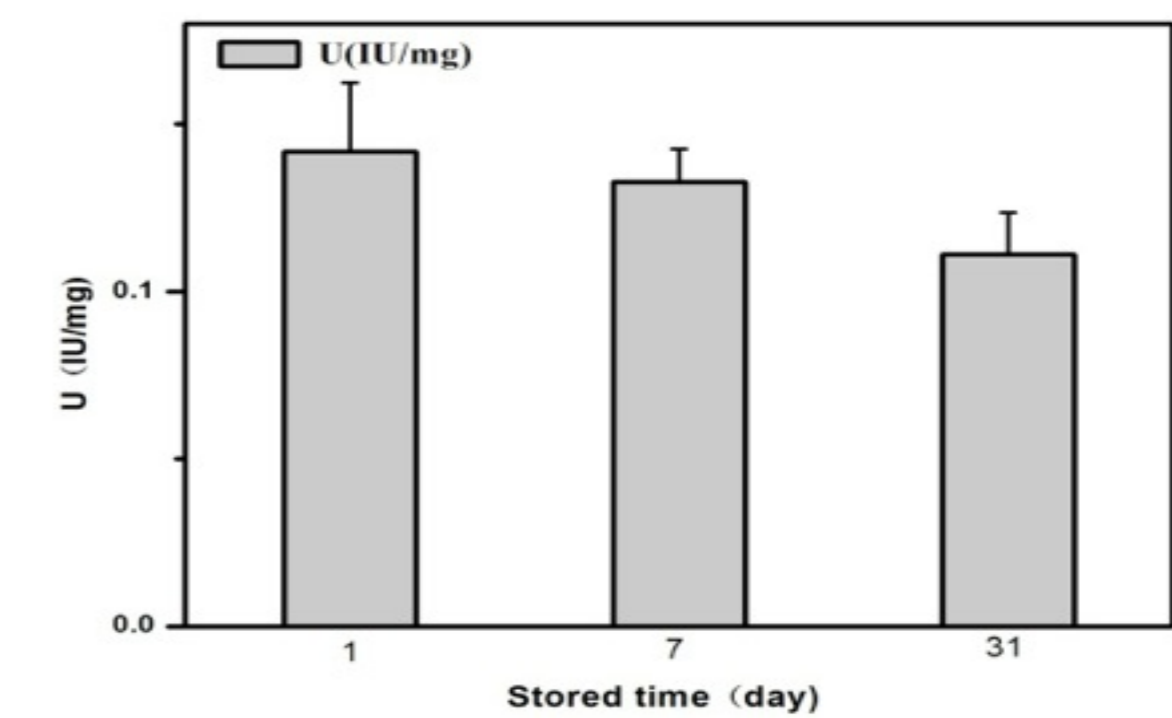


Fig.9. 组装了5个双层的复合海绵室温下的存储活性图

取壳聚糖海绵和组装了5、10、15个双层的复合海绵,加入一定量的人血,放入恒温摇床,于37℃ 30rpm震荡30s,5min和15min后,用20ml去离子水将未凝固的红细胞洗淋出来。将洗淋液离心后在紫外540nm下测量去离子水中血红蛋白含量,得到Fig.10.与不加任何止血海绵的Blank对照组相比,纯壳聚糖确实具有一定的止血效果,但是止血效果有限,与组装的海绵相比,显然组装后的海绵止血效果更好。而且随着组装层数的增加,海绵的止血效果也会增强。这与凝血酶活性测试结果和存储31天后,海绵的止血效果会减弱,但减弱不对,说明存储稳定性很好。这也验证了凝血酶存储半衰期实验的结果。以LBL15为例,对比30s、5min和15min时的OD值可知,组装海绵的止血速度很快,基本在5min左右,就可以发挥绝大部分的止血效果。这与凝血酶释放测试的结果是一致的。

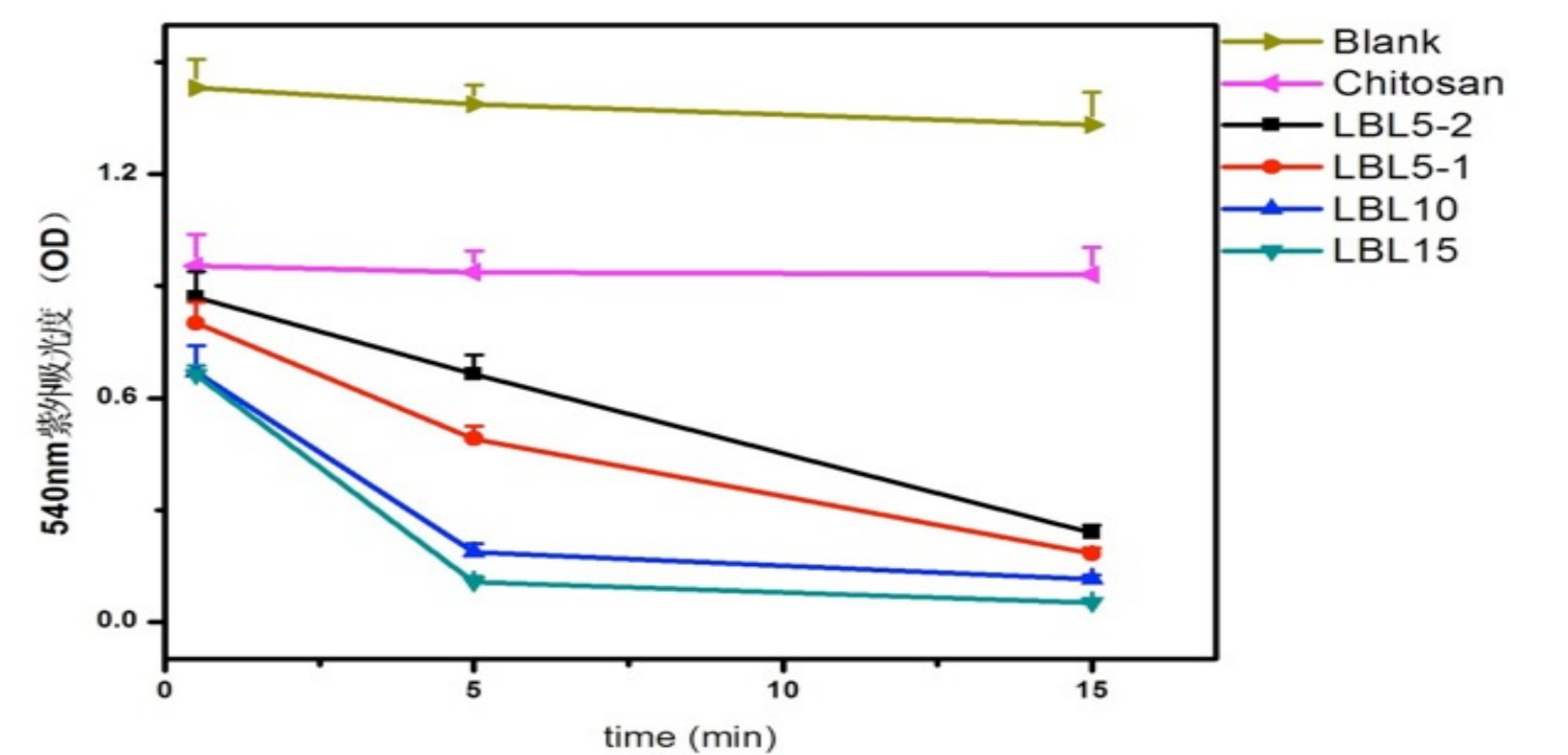


Fig.10 动态全血测试图 (Blank为未加海绵的对照组; Chitosan为纯壳聚糖海绵; LBL5-2为存储了31天的5个双层的海绵; LBL5-1、LBL10、LBL15分别对应5、10、15个双层的海绵)

Conclusion

壳聚糖具有止血、生物相容性好和可降解等优点,被广泛应用于急救止血领域。然而纯壳聚糖的止血性能有限,本研究拟将凝血酶复合在壳聚糖海绵上以提高其止血性能。但简单的浸泡无法实现凝血酶的高效大量负载,且纯凝血酶的存储稳定性差,不符合急救止血敷料的使用要求。本研究利用凝血酶和鞣酸在生理PH下可以形成氢键相互作用的特点,在壳聚糖海绵上进行凝血酶和鞣酸的层层自组装,使壳聚糖海绵上涂覆有凝血酶的多层膜,制得了一种新的壳聚糖急救止血敷料。各项表征结果显示这种新型壳聚糖止血敷料具有可实现、止血速度快、效果好且易存储的优点。

- (1) 利用QCM和椭圆偏振对平板基底上的多层膜进行表征,结果证明了凝血酶和鞣酸的组装是可实现的。
- (2) 将多层膜涂覆在壳聚糖海绵上,进行凝血酶活性检测和动态全血凝固实验,结果表明:凝血酶的复合使壳聚糖海绵的止血性能大大提升,海绵中负载的凝血酶释放速度很快,可实现快速止血。
- (3) 凝血酶存储稳定性实验表明:海绵中负载的凝血酶在室温下的活性半衰期较自由酶延长了6.7倍,稳定性得到了很大提高。

Acknowledgement

This work was partially funded by National Natural Science Foundation of China (Grant No.21104067 and No.21274127) and the Key Basic Research Development Plan (Project 973) of China (Grant No. 2011CB606203 and No.2009CB930104).

References

[1] Shukla, A.; Fang, J. C.; Puranam, S.; Jensen, F. R.; Hammond, P. T., Hemostatic multilayer coatings. *Advanced materials* **2012**, *24* (4)