



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110812526 B

(45) 授权公告日 2022.03.15

(21) 申请号 201911050578.7

(22) 申请日 2019.10.31

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110812526 A

(43) 申请公布日 2020.02.21

(73) 专利权人 中国医学科学院输血研究所
地址 610052 四川省成都市成华区华彩路
26号

(72) 发明人 韩玘玘 贺曾 钟锐 张学俊
王红

(74) 专利代理机构 成都九鼎天元知识产权代理
有限公司 51214
代理人 吕玲

(51) Int. Cl.

- A61L 15/40 (2006.01)
- A61L 15/28 (2006.01)
- A61L 15/32 (2006.01)
- A61L 15/42 (2006.01)
- A61L 15/44 (2006.01)
- A61L 15/46 (2006.01)

(56) 对比文件

- CN 104587525 A, 2015.05.06
 - CN 107278153 A, 2017.10.20
 - CN 105030826 A, 2015.11.11
 - CN 108653327 A, 2018.10.16
 - CN 106729955 A, 2017.05.31
 - CN 107249603 A, 2017.10.13
 - CN 101700409 A, 2010.05.05
 - US 2013233803 A1, 2013.09.12
 - US 2013108683 A1, 2013.05.02
 - US 2003007957 A1, 2003.01.09
 - US 2017049696 A1, 2017.02.23
- 时权. “牙龈间充质干细胞外泌体联合壳聚糖/丝素凝胶海绵促进糖尿病大鼠创面修复研究”.《中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2019, (第09期), (续)

审查员 王液涛

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

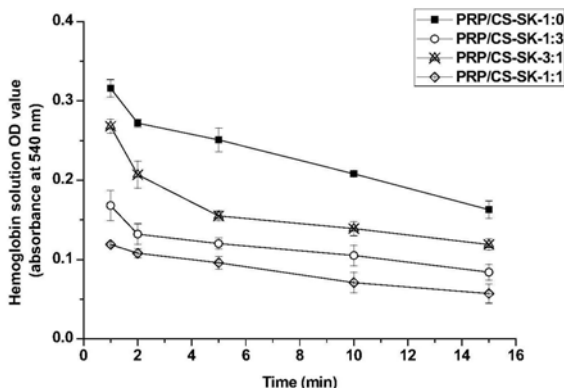
(54) 发明名称

一种PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物材料合成技术领域,具体为一种快速止血的新型PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料及其制备方法。该复合材料中含有浓度2—4%的壳聚糖溶液与浓度为3%的丝素蛋白溶液,再引入含有多种生长因子与固定血小板浓度的人源性富血小板血浆,通过冷冻干燥法制备PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料。本发明中的材料所含成分安全无刺激,与现有技术相比,该材料由于加入了含有固定血小板浓度的PRP并通过加入丝素蛋白改变基材结构,因此提高了全血的凝固速度,减少伤口的出血时间与出血量,提高材料的止血性,促进伤口的止血速度、止痛与

抗菌。



CN 110812526 B

[接上页]

(56) 对比文件

张卫等. “羧甲基壳聚糖-血小板复合材料在兔耳动脉出血模型中止血作用的实验研究”.《中国输血杂志》.2017,第30卷

王婧霁等. “自体富血小板血浆在糖尿病足治疗中的应用进展”.《中华损伤与修复杂志(电子版)》.2018,第13卷

吕敏等. “富血小板血浆的制备现状及研究进展”.《现代生物医学进展》.2013,第13卷

Ning Xu et al. “Wound healing effects of a Curcuma zedoaria polysaccharide with platelet-rich plasma exosomes assembled on chitosan/silk hydrogel sponge in a diabetic rat model”.《International Journal of Biological Macromolecules》.2018,第117卷

Burak Kutlu et al. “Platelet-rich plasma-loaded chitosan scaffolds: preparation and growth factor release kinetics”.《J Biomed Mater Res Part B》.2012,第101B卷

韩玎玎等. “一种可止血的富血小板血浆壳聚糖/丝素蛋白多孔伤口敷料的制备及性能表征”.《生物工程学报》.2020,第36卷

杨亚东等. “丝素-壳聚糖复合制作的三维可降解多孔支架”.《中国组织工程研究与临床康复》.2009,第13卷

Bitao Lu et al. “Healing of skin wounds with a chitosan-gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma”.《International Journal of Biological Macromolecules》.2015,第82卷

1. 一种PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 壳聚糖溶液的配制:将低分子量、脱乙酰度为85%的壳聚糖粉末加入到2%的醋酸水溶液中,搅拌至粉末完全溶解,得到壳聚糖溶液,备用;

2) PRP溶液的制备:采集健康献血者的全血并按照富浆法制备得到PC,并将重离心后分离出的上层清液作为PPP,用分离出的PPP将PC稀释至固定浓度 500×10^9 个/L,作为具有固定血小板个数的PRP溶液;

3) 丝素蛋白溶液的制备:用0.5%的 Na_2CO_3 煮沸天然蚕茧进行脱胶,重复脱胶三次后,用三元溶剂溶解脱胶后的蚕丝形成丝素蛋白溶液,对溶液进行透析3d,透析完毕后,收集透析袋中的全部溶液并用纱布滤去残渣,滤后的全部溶液作为丝素蛋白溶液,保存在4 °C条件下备用;

4) 将壳聚糖溶液与丝素蛋白溶液按照比例混合,在混合过程中不停的搅拌,直至两种溶液均匀混合,再加入PRP溶液混匀,将得到的溶液超声脱气20min后加到24孔板中,立即放入到-70 °C冰箱冻结12 h,然后再用冷冻干燥仪冻干36 h即得复合材料;该复合材料中包括以下体积百分含量的原料:壳聚糖溶液22.5~67.5%、丝素蛋白溶液22.5~67.5%、PRP溶液10%,总体积百分含量之和为100%。

2. 如权利要求1所述PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料的制备方法,其特征在于:该材料用于止血,提高全血的凝固速度,减少伤口的出血时间与出血量,提高材料的止血性,促进伤口的止血速度,止痛与抗菌效果好;所述的低分子量的壳聚糖粉末,其分子量为50000 - 190000Da。

3. 如权利要求1所述PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料的制备方法,其特征在于该复合材料中包括以下体积百分含量的原料:壳聚糖溶液45%、丝素蛋白溶液45%、PRP溶液10%,总体积百分含量之和为100%。

4. 如权利要求1所述PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料的制备方法,其特征在于:壳聚糖溶液的质量浓度为2-4%;丝素蛋白溶液的质量浓度为3%。

5. 如权利要求1所述PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料的制备方法,其特征在于:所述的三元溶剂为 CaCl_2 、 H_2O 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 的混合物,其 CaCl_2 、 H_2O 与 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 的摩尔比为1:8:2。

6. 如权利要求1所述PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料的制备方法,其特征在于:所述的富浆法是指先轻离心采集的健康全血,去除下沉沉淀收集上层清液后,再重离心制备得到PC。

7. 如权利要求6所述PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料的制备方法,其特征在于:所述的轻离心,其离心力为670g,离心时间5min;所述的重离心,其离心力为2683g,离心时间5min。

一种PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物材料合成技术领域,具体为一种快速止血的新型PRP-壳聚糖-丝素蛋白海绵敷料及其制备方法。

背景技术

[0002] 不可控制的失血是日常生活中仅次于创伤的第二高发致死原因。在一些重大意外事故中,患者常伴有大量失血导致的凝血功能障碍,或者在手术过程中出现严重手术创面出血而导致整个创面部位发生渗血且出血点不明确的情况。这时候常用的止血方法如直接压迫、结扎和电灼止血等很难奏效,此时便需要有效且能快速止血的材料。

[0003] 凝血是指血液由流动状态的液体变成不能流动的凝胶状态的过程。它的实质是血浆从不稳定的血小板栓子逐渐形成稳定的不可溶的纤维蛋白的复杂过程,在整个过程中涉及了血小板的黏附、聚集,以及红细胞、白细胞、血管收缩作用和血液黏度的变化等。壳聚糖是一种具有良好生物相容性的天然材料,它的止血机理在于其携带一定量的电荷,可以促进红细胞聚集和增加血小板粘附,促进血液凝固,完成止血,因此被广泛用于伤口止血敷料。以壳聚糖为基质的止血绷带和止血粉等都已经获得FDA的许可,两种材料已经分别成为美军和英军士兵人手必备的急救物品。然而,单一的壳聚糖材料对于广泛出血创面的止血效果不甚理想,在力学性能与吸湿性能上也表现出一定的局限性,特别是针对不规则创面和复合性血管破裂导致的出血,因此需要将壳聚糖与其他具有优异功能的材料进行复合,形成优势互补的新型复合材料。

[0004] 近年来,富含高浓度血小板的新型血液提取物富含血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)逐渐被用于创面止血、修复方面的研究。这是因为PRP中含有高浓度的血小板,是正常血液中的3-5倍,同时包含有凝血因子和纤维蛋白原,在激活后,高浓度血小板会发生聚集,并释放多种生长因子作用到周围组织,PRP中激活的血小板、释放的生长因子、包含的凝血因子及纤维蛋白原均在伤口止血与修复过程中分别或相互协同扮演至关重要的角色。然而,目前制备PRP以及激活PRP的方式有多种,临床上并没有建立统一的标准化操作规范,造成血小板浓度出现差别或血小板激活程度不一致,从而造成疗效的不一致。PRP是一种高成本的生物制品,在使用过程中应高效利用。若能在PRP制备过程中固定PRP中血小板的浓度,便能进一步统一PRP技术的疗效。此外,PRP的来源可分为自体与异体,异体PRP的好处在于可利用健康的献血者的全血制备得到,克服自体PRP中病人因自身健康原因而无法抽取全血的问题,同时异体PRP与自体PRP不同,它不需要在使用前才从病人身上抽取血液并花一定时间将血液制备成PRP,而是一种具有制备成现成产品可能性的治疗手段,因此研究者们根据修复的组织特点,可将异体PRP与不同的生物材料结合,利用基材成分与结构的优势,实现相应的治疗效果。

[0005] 蚕丝是人类最早利用的天然纤维之一,具有良好的生物相容性,蚕丝中的丝素蛋白含有较多的带有氨基和羧基的氨基酸,这些亲水性基团使得丝素蛋白的透气、吸水,再加上有研究发现丝素蛋白度具有调控生长因子释放的作用,这些特点均使丝素蛋白材料成为

医用敷料的研究热点之一。但单一丝素蛋白材料稳定性差、止血效果不理想限制了它的应用范围,因此需要研究者将丝素蛋白与其他材料复合后克服这些缺点。

发明内容

[0006] 本发明的发明目的是针对上述技术问题,提出一种可快速止血的PRP—壳聚糖—丝素蛋白复合材料。该复合材料中含有天然且具有抗菌性的壳聚糖成分、吸湿性佳的天然丝素蛋白以及具有固定血小板浓度的PRP,不仅能提高敷料的止血性能,且对伤口具有抗菌止痛无刺激的特点。本发明的另一个目的是通过改变基材结构,加速红细胞凝块速度,减少包埋在材料中的PRP的比例,高效利用PRP,同时使用PPP将PC调至具有固定血小板浓度的PRP,进一步实现PRP 治疗的标准化。

[0007] 本发明的另外一个发明目的是提供以上所述复合材料的制备方法。

[0008] 为了实现上述目的,本发明的具体技术方案为:

[0009] 一种PRP—壳聚糖—丝素蛋白复合材料,制备该复合材料的成分均为安全无刺激的天然成分;该复合材料中包括以下体积百分含量的原料:质量浓度为2—4%的壳聚糖溶液所占的体积比为22.5~67.5%,质量浓度为3%的丝素蛋白溶液比例为22.5%~67.5%,PRP溶液比例为10%,总体积百分含量之和为100%。

[0010] 作为优选,质量浓度为2—4%的壳聚糖溶液所占体积比为45%,质量浓度为3%的丝素蛋白溶液比例为45%,PRP溶液比例为10%,总体积百分含量之和为100%。

[0011] 以上所述材料的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 将低分子量、脱乙酰度为85%的壳聚糖粉末加入到2%醋酸水溶液中,搅拌至粉末完全溶解,得到壳聚糖溶液,备用。低分子量的壳聚糖粉末,其分子量为50000—190000Da。

[0013] 2) PRP的制备:采用的是异体全血而非自体全血制备PRP。

[0014] 具体步骤为:采集健康献血者全血,首先轻离心(离心力:670g离心时间:5min)去除下沉沉淀收集上层清液后,再重离心(离心力:2683g离心时间:5min)制备得到浓缩血小板(plateletconcentrate,PC),并将重离心后分离出的上层清液作为贫血小板血浆(plateletpoor plasma,PPP),用分离出的PPP将 PC血小板浓度调为固定浓度 500×10^9 个/L,作为具有固定血小板个数的PRP 溶液,备用。

[0015] 3) 丝素蛋白溶液的制备:用0.5%Na₂CO₃煮沸天然蚕茧进行脱胶三次后,用三元溶剂(CaCl₂:H₂O:C₂H₅OH的摩尔比为1:8:2)溶解脱胶后的蚕丝形成丝素蛋白溶液,透析溶液3d(4℃进行)。透析完毕后,收集透析袋中的全部溶液并用纱布滤去残渣后,滤后的全部溶液作为丝素蛋白溶液,保存在4℃条件下备用。

[0016] 4) 将备用的壳聚糖溶液与丝素蛋白溶液按照比例混合,在混合过程中不停的搅拌,直至两种溶液均匀混合,再加入制备好的PRP溶液继续混合;接着将该混合液超声(温度:25℃,工作频率:40000Hz)脱气20min后加到24孔板中,立即放入到-70℃冰箱冻结12h,然后再在冷冻干燥仪冻干(真空度:<100mbar,温度:-55℃)36h即得PRP—壳聚糖—丝素蛋白复合材料。

[0017] 本发明的积极效果体现在:

[0018] (一)、本发明利用天然且具有良好生物相容性的壳聚糖,向其中加入低体积比

(10%)的人血液提取物PRP,并添加从天然蚕茧中提取出来的含有亲水性基团的丝素蛋白,通过冷冻干燥法制备出一种快速止血的新型PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料。

[0019] (二)、提高了全血的凝固速度,减少伤口的出血时间与出血量,提高材料的止血性,促进伤口的止血速度,止痛与抗菌效果好。

[0020] (三)、通过改变基材结构,加速红细胞凝块速度,减少包埋在材料中的 PRP的比例,高效利用PRP,同时使用PPP将PC调至具有固定血小板浓度的PRP,进一步实现PRP治疗的标准化。

[0021] (四)、材料的止血性好;含有亲水性基团丝素蛋白的添加,作用一是改善材料的透气性,二是通过调节丝素蛋白溶液加入量的不同,改变材料的孔隙结构、吸水性,加快血液中红细胞凝块速度,从而进一步提高材料的止血性。

附图说明:

[0022] 图1a为对比例1中制备得到的复合材料的扫描电镜图片;

[0023] 图1b为实施例1中制备得到的复合材料的扫描电镜图片;

[0024] 图1c为实施例2中制备得到的复合材料的扫描电镜图片;

[0025] 图1d为实施例4中制备得到的复合材料的扫描电镜图片。

[0026] 图2为不同复合材料的体外全血凝固结果曲线图(注:PRP/CS-SK-1:0:对比例1材料;PRP/CS-SK-1:1:实施例1材料;PRP/CS-SK-1:3:实施例2材料;PRP/CS-SK-3:1:实施例3材料)。

[0027] 图3为不同复合材料的体外全血凝固结果曲线图(注:PRP/CS 1:1:对比例2材料;PRP/CS-SK-1:1:实施例1材料)

[0028] 图4为不同冷冻方式制备的复合材料的体外全血凝固结果曲线图(注:mixing:实施例1材料;Soak:实施例5材料)

具体实施方式

[0029] 为了使申请的发明目的、技术方案及优点更加清楚明白,下面结合具体实施方式对本发明作进一步的详细描述,但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于下述实施例。

[0030] 本发明实施例中采用的技术及表征手段包括包括采用扫描电子显微镜观察复合材料的多孔结构,浸泡法测定材料的孔隙率与吸水性,体外全血凝固法表征材料的凝血时间以及建立大鼠胸腹壁浅静脉伤口模型,并通过测定伤口的出血量以及伤口止血时间表征复合材料的止血性能。

[0031] 本申请中所采用的%如无特殊说明,均表示其质量浓度,即wt%。

[0032] 实施例1:

[0033] 一种PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料:该复合材料中包含壳聚糖、丝素蛋白以及人源性PRP成分;该复合材料中包括以下体积百分含量的原料:壳聚糖溶液45%、丝素蛋白溶液45%、PRP溶液10%,总体积百分含量之和为100%。其中壳聚糖溶液为质量浓度为4%,丝素蛋白溶液的质量浓度为3%,PRP溶液血小板浓度为 500×10^9 个/L。将各原料按比例混合后进一步加工即得PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料

[0034] 所述复合材料的具体制备步骤如下:

[0035] S1:4%壳聚糖溶液的配制:采取纯水配制2%(V:V)的醋酸溶液,用此溶液溶解壳聚糖,配制成浓度为4%的壳聚糖-醋酸溶液,整个过程不断搅拌,待壳聚糖粉末完全溶解后,超声震荡10min后,在室温下静置过夜,待气泡完全消失后再放置在4℃条件下保存。

[0036] S2:PRP的制备:采集符合国家献血标准的健康全血400mL,按照富血小板血浆法制备浓缩血小板(platelet concentrate,PC),质量均符合《全血及成分血质量要求》(GB 18469-2012)。富血小板血浆法是指先轻离心采集的健康全血,去除下沉沉淀收集上层清液后,再重离心制备得到PC。轻离心,其离心力为670g,离心时间5min;所述的重离心,其离心力为2683g,离心时间5min。

[0037] 取经重离心后的上层清液作为贫血小板血浆(platelet poor plasma,PPP),根据全自动细胞计数仪测定的结果用PPP将PC调节至血小板浓度为 500×10^9 个/L,作为具有固定血小板个数的PRP溶液,备用。

[0038] S3:丝素蛋白溶液的配制:

[0039] S3.1蚕丝脱胶:将0.5%Na₂CO₃溶液煮沸后,将蚕茧按质量体积比例1:50(g:mL)放入0.5%Na₂CO₃溶液中,煮沸30min,重复两次后用去离子水将脱胶后的蚕丝冲洗3次,放入37℃烘箱烘干。

[0040] S3.2:丝素蛋白提取:准确称取烘干后的蚕丝8g,将称取的蚕丝撕碎后逐步加入到100ml三元溶剂(CaCl₂、H₂O与C₂H₅OH的摩尔比为1:8:2)中,整个过程要控温在75℃的条件下进行,直至蚕丝完全溶解后冷却至室温。将冷却后的蛋白溶液倒入预处理过的透析袋(截留分子量8KD~14KD),用去离子水透析3d后,整个透析过程需在4℃中进行。透析完毕后,收集透析袋中的全部溶液后用纱布滤去残渣后,收集过滤后的全部溶液,并在4℃条件下保存。

[0041] S3.3:3%丝素蛋白溶液的配制:取干燥玻璃试管一支,称其重量,记为m₁,再在玻璃试管中加入透析过滤后的丝素蛋白溶液5ml,并称其试管与溶液的总重量,记为m₂,然后放到60±1℃下烘12h,连续称重直至恒重,记为m₃,根据下式公式计算丝素蛋白溶液浓度: $C = (m_3 - m_1) \times 100\% / (m_2 - m_1)$,根据测定的丝素蛋白溶液浓度,用纯水将提取的丝素蛋白溶液浓度调至3%。

[0042] S4:将壳聚糖溶液与丝素蛋白溶液按照体积百分比45%:45%混合,在混合过程中不停的搅拌,直至两种溶液均匀混合,通过混合法在混合液中加入占复合材料总体积比10%的PRP溶液,将原液超声脱气20min后加到24孔板中,立即放入到-70℃冰箱冻结12h后再用冷冻干燥仪冻干36h即得。超声脱气的条件为温度:25℃,工作频率:40000Hz;冷冻干燥仪冻干的条件为真空度:<100mbar,温度:-55℃。

[0043] 实施例2:

[0044] 一种PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料,其制备方法如下:

[0045] 将4%壳聚糖溶液(制备方法同实施例1)与3%丝素蛋白溶液(制备方法同实施例1)按体积百分比22.5%:67.5%混合,在混合过程中不停的搅拌,直至两种溶液均匀混合,通过混合法在混合液中加入占复合材料总体积比10%的PRP溶液。所述复合材料的制备步骤与实施例1中的S4步骤相似。

[0046] 实施例3:

[0047] 一种PRP-壳聚糖-丝素蛋白复合材料的制备,其制备方法如下:

[0048] 将4%壳聚糖溶液(制备方法同实施例1)与3%丝素蛋白溶液(制备方法同实施例1)按照原液总体积比例:67.5%:22.5%混合,在混合液中加入占复合材料总体积比10%的PRP溶液。所述复合材料的制备步骤与实施例1中的S4 步骤相似。

[0049] 实施例4:

[0050] 一种PRP—壳聚糖—丝素蛋白复合材料的制备,其制备方法如下:

[0051] 将4%壳聚糖溶液(制备方法同实施例1)与3%丝素蛋白溶液(制备方法同实施例1)按照体积比45%:45%混合,通过混合法在混合液中加入原液总体积比10%的PRP溶液。将混合溶液进行超声脱气20min后加到24孔板中,立即用液氮将原液快速冻结后,放入冰箱冷冻3h,再使用冷冻干燥仪冻干36h 即得。

[0052] 实施例5:

[0053] 一种PRP—壳聚糖—丝素蛋白复合材料,其制备方法如下:

[0054] 将4%壳聚糖溶液(制备方法同实施例1)与3%丝素蛋白溶液(制备方法同实施例1)按照原液总体积比例:50%:50%混合,在混合过程中不停的搅拌,直至两种溶液均匀混合,将混合液超声脱气20min后加到24孔板中,立即放入到-70℃冰箱冻结12h后再冷冻干燥仪冻干36h得到壳聚糖—丝素蛋白复合材料。通过浸泡法,将壳聚糖—丝素蛋白材料浸泡在上述混合液体积百分比10%的PRP中,使材料充分吸收PRP后,将材料再次放入到-70℃冰箱冻结12h后再冷冻干燥仪冻干36h即得。

[0055] 对比例1:一种PRP—壳聚糖复合材料的制备

[0056] 原料制备方法同实施例1,仅取消3%丝素蛋白溶液的制备步骤和添加步骤,其余步骤均同实施例1。其中4%壳聚糖溶液与PRP溶液的体积百分比为 90%:10%。

[0057] 对比例2:一种PRP—壳聚糖复合材料的制备

[0058] 原料的制备方法同实施例1,仅取消3%丝素蛋白溶液的制备步骤和添加步骤,其余步骤均同实施例1。其中4%壳聚糖溶液与PRP溶液的体积百分比为50%:50%。

[0059] 采用扫描电子显微镜观察材料的多孔结构,用浸泡法测定材料的孔隙率与吸水性,采用体外全血凝固法表征材料的凝血时间以及大鼠胸腹壁浅静脉伤口模型表征材料的止血性。

[0060] 实验1:孔隙率测定:

[0061] 在量筒中加入一定体积的无水乙醇,体积记为V1,将直径为1.2cm,厚度为1cm的实施例1中的材料投入其中,静置5min,使材料被无水乙醇完全浸透且表面无明显气泡,此时的总体积记为V2;取出材料,量筒中剩余的无水乙醇体积记为V3。材料的孔隙率P%按下列公式计算: $P\% = (V1 - V3) / (V2 - V3) \times 100\%$ 。

[0062] 将实施例1至实施例3,以及对比例1进行孔隙率测定,具体结果如表1 所示:

[0063] 表1不同材料的孔隙率测定结果

G roup	对比例 1	实施例 1	实施例 2	实施例 3
[0064] Porosity (%)	72.04±5.03	86.83±3.84	78.67±3.21	74.72±5.28

[0065] 从表1可以看出,在材料中加入丝素蛋白溶液后,材料的孔隙率有显著增加,其中

实施例1材料的孔隙率最高。

[0066] 将实施例1与实施例4进行孔隙率测定,具体结果如表2所示:

[0067] 表2不同冷冻方式制备的材料的孔隙率测定结果

G roup	实施例 1	实施例 4
[0068] Porosity (%)	86.83±3.84	71.45±2.98

[0069] 结果说明液氮冷冻原液会造成复合材料的孔隙率减小,即孔隙在材料表面分布稀疏。

[0070] 实验2:吸水膨胀率测定:

[0071] 将材料切成合适的大小,使材料的重量均在40mg左右,称质量记为 m_0 ,浸没在37℃的0.01M PBS (pH 7.4) 中1h,取出后称质量,记为 m_1 ,吸水率 $W\%$ 就按下列公式计算: $W\% = (m_1 - m_0) / m_0 \times 100\%$ 。材料的吸水性能与支架的亲水性紧紧相关,属于止血材料的物理特性之一。当材料按压在伤口上时,吸水性强的材料会吸收血液中的水分,导致血液黏度增加从而促进血小板聚集,实现血液凝固。

[0072] 表3不同材料的吸水率测定结果

G roup	对比例 1	实施例 1	实施例 2	实施例 3
[0073] Water absorption (%)	1037±30	1474±114	1563±136	1317±62

[0074] 根据表3结果可知,在材料中添加丝素蛋白后,吸水率提高,其中丝素蛋白溶液体积比占有越高,材料吸水率越高。

[0075] 表4不同冷冻方式制备出的材料的吸水率测定结果

G roup	实施例 1	实施例 4
[0076] Water absorption (%)	1474±114	969±78

[0077] 表4说明液氮冷冻原液会导致材料的吸水率下降,这可能是由于液氮冷冻制备出的材料的孔隙分布稀疏造成的,由此可推测液氮快速冷冻原液所制备出的复合材料的止血性弱于冰箱冷冻原液制备出的复合材料。

[0078] 实验3:多孔结构的观察:

[0079] 将实施例1至实施例3以及对比例1的材料切成约1cm×1cm,厚约5mm,横截面朝上,用导电双面胶将材料粘在金属托架上,喷金后在20kV的加速电压下观察支架结构。从图1中也可看出,未加入丝蛋白的对比例1材料的孔隙表现虽有序均匀,但孔径分布不均匀。在材料中加入丝素蛋白后,实施例2材料的孔隙表现不连贯,孔结构塌陷,这种孔隙会导致敷料蓬松易碎在,但调节壳聚糖与丝素蛋白的体积配后,实施例1材料的孔隙分布变得均有有

序,结构紧密,具有此类孔结构的敷料的韧性会更高,同时有利于物理堵塞创伤口,促进止血。

[0080] 实验4:体外全血凝固测定:

[0081] 抽取新鲜抗凝全血5mL,加入0.5mL的0.1M氯化钙溶液,充分混匀备用。将实施例1中的材料剪成规格为1.5cm×1.5cm,厚度为1cm后,分别放入不同试管中,于37℃保温。取已准备好的抗凝人全血1mL加入到试管,使材料充分浸润血液,将试管放入恒温37℃摇床震荡,材料分别于1min、2min、5min、10min和15min从恒温摇床取出后放入新的试管,向新试管中加入10mL 去离子水并保持5min,将敷料中未凝固的红细胞洗出来,最后收集试管中的洗液,用分光光度计测定洗液吸光度(波长=540nm)。图2显示,添加丝素蛋白后,材料的吸光度值明显低于未加入丝素蛋白的材料,说明加入丝素蛋白后会提高材料的凝血性,并且实施例1材料在各个时间点的吸光度值均为最低,表明材料的凝血性最好,并且在15min内血液几乎全部凝固。图3显示,实施例1材料的吸光度值与对比例2材料接近,说明加入丝素蛋白可提高材料的止血速度,因为将壳聚糖与丝素蛋白按照体积比1:1混合后并降低PRP的使用量至原液的10%所制备的材料的全血凝固速度与PRP与壳聚糖1:1混合制得的材料相似,说明通过调节壳聚糖与丝素蛋白的混合比例可改变基材结构,在降低 PRP使用量的情况下却不影响材料的止血性能。图4显示,实施例1材料的吸光度值在初期与中期明显低于实施例5材料,说明混合法制备出的实施例1材料全血凝固速度更快,表现出更优异的快速止血能力,这可能是因为浸泡法制备的复合材料经历了两次冷冻干燥,而低温冻结可能影响基材结构,同时PRP 溶液是通过浸泡直接渗透进基材孔隙,再通过冻干包埋在材料中,此方法可能会影响PRP中血小板与材料的结合方式,从而影响材料的止血性。

[0082] 实验5:大鼠体内止血测定:

[0083] 取15只SD大鼠,随机分成5组,每组3只,大鼠体重控制在220g—250g。将大鼠仰卧固定于手术台后,腹腔注入2%戊巴比妥钠(50mg/kg)。待大鼠麻醉后,于腹部中部处做一个3cm横向切口,暴露胸腹壁浅静脉并剪断,自由流血3s后将已称重的实施例1中的材料(重量记作m1)覆盖于伤口处并轻轻按压,同时开始计时,前30s每10s观察1次创面出血情况,后30s后每5 s观察1次创面出现情况,并记录止血时间,伤口停止出血后精确称量材料重量(重量记作m2),并计算出血量,出血量=m1—m2。由表5结果得知,加入丝素蛋白后,材料的止血时间缩短,失血量减少,这与体外全血凝固时间试验结果基本一致,其中实施例1材料止血用时最短,仅需48s,失血量最少。由表6结果得知,实施例1材料的止血时间与失血量与对比例2材料相似,进一步说明通过调节壳聚糖与丝素蛋白的混合比例为1:1,可降低PRP使用量的同时却不影响材料的止血性能。由表7结果得知,实施例1材料的止血时间比实施例5小,同时失血量也小于实施例5,说明混合法制备出的复合材料的止血性优于浸泡法制备出的复合材料

[0084] 表5不同敷料的止血时间与失血量测定结果

Group	对比例 1	实施例 1	实施例 2	实施例 3
Hemostasis time (s)	104±14	48±7	98±7	81±56

[0086]	Blood loss (g)	0.1883±0.02	0.1511±0.10	0.1749±0.07	0.1685±0.20
--------	----------------	-------------	-------------	-------------	-------------

[0087] 表6不同敷料的止血时间与失血量测定结果

Group	对比例 2	实施例 1
[0088] Hemostasis time (s)	42±11	48±7
Blood loss (g)	0.1643±0.01	0.1511±0.10

[0089] 表7不同敷料的止血时间与失血量测定结果

Group	实施例 1	实施例 5
[0090] Hemostasis time (s)	48±7	124±10
Blood loss (g)	0.1511±0.10	0.1789±0.02

[0091] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

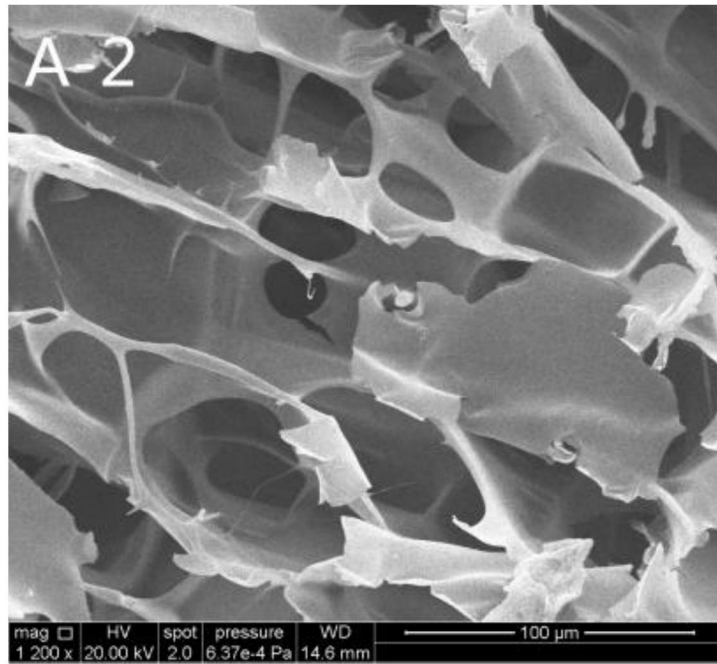


图1a

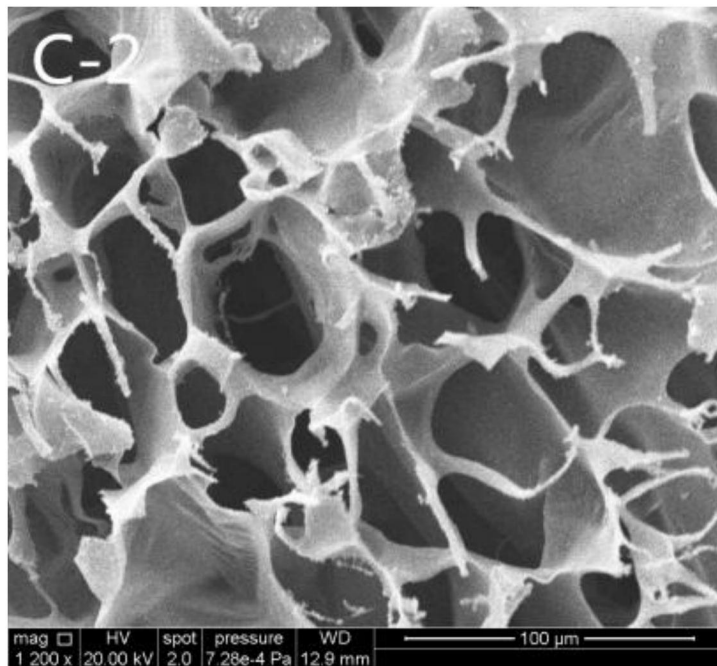


图1b

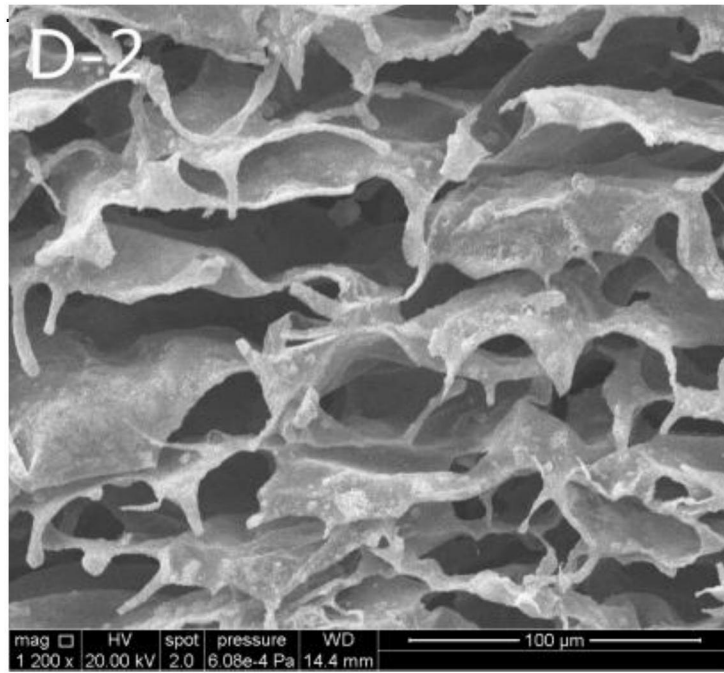


图1c

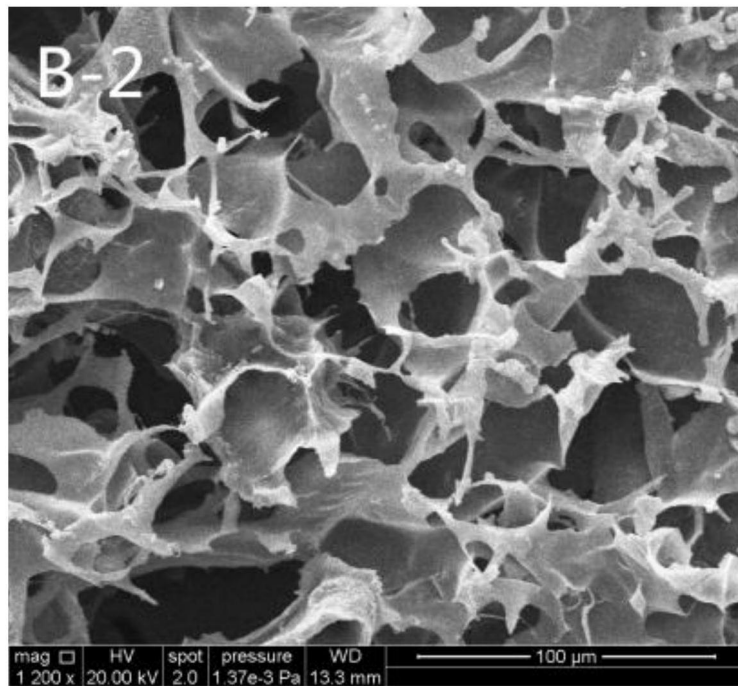


图1d

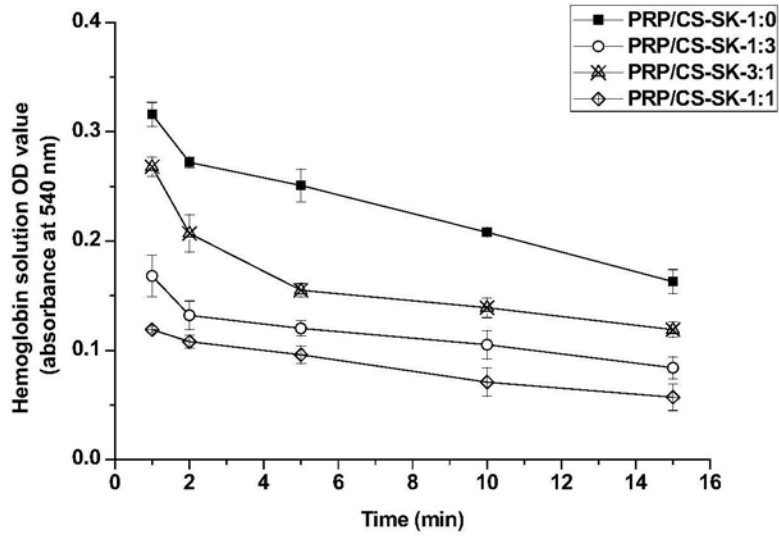


图2

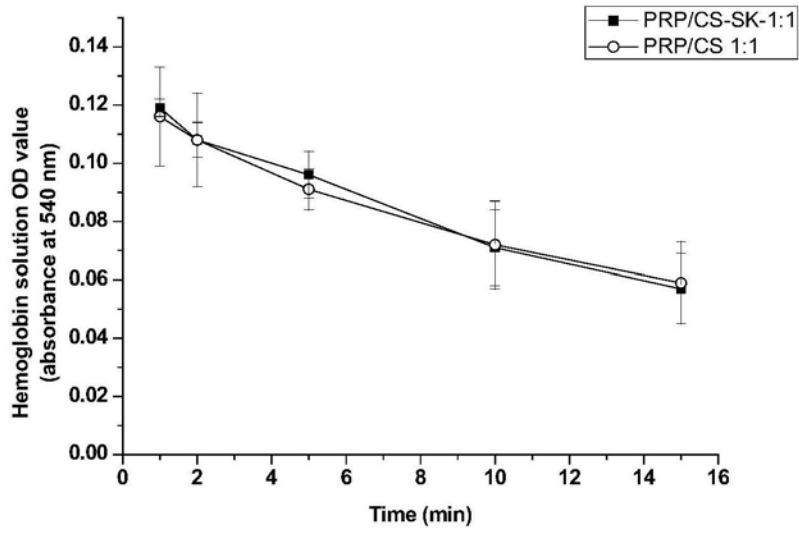


图3

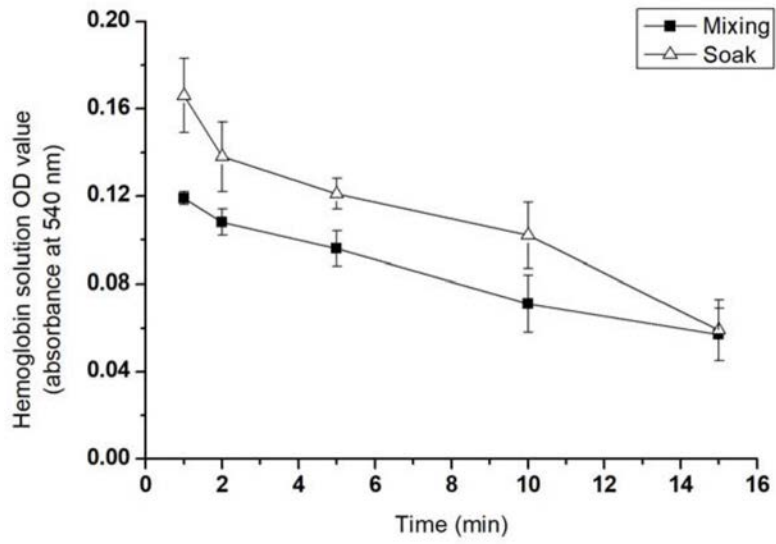


图4