doi:10.11659/jjssx.12E020033

·基础研究·

脱细胞猪小肠黏膜下层粉末用于大鼠脾部分切除创面止血的研究

王文平[1],张文红[1],杜茂涛[1],张弘沛[1],龚 慧[1],朱宇轩[1],李世荣[2],田 怡[1] (1.重庆医科大学附属第二医院整形美容科,重庆 400010;2.陆军军医大学第一附属医院整形美容科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨脱细胞猪小肠黏膜下层(SIS)粉末在大鼠脾部分切除创面的止血效果。**方法** 经机械刮除、脱脂脱细胞、胃蛋白酶酶解、冻干等步骤获得 SIS 粉末。HE 染色检测脱细胞 SIS 细胞残留情况,检测 SIS 粉末吸水性并在扫描电镜下观察其超微结构。将 40 只 SD 大鼠随机分为 A、B、C、D 组,切除大鼠部分脾组织,并将 SIS 粉末、福和泰止血粉、瞬时止血粉、无菌纱布压迫分别用于A、B、C、D组大鼠创面止血。扫描电镜下观察止血粉在创面上的情况,记录出血时间和出血量。于第 20 天、30 天每组各处死 5 只大鼠,肉眼以及 HE 染色镜下观察创面止血粉末吸收情况。**结果** 经过脱脂脱细胞处理后,SIS 无细胞成分残留,镜下见 SIS 粉末呈单层的长薄片状。SIS 粉末吸水率在 120 s 时达到饱和,是瞬时止血粉的 1.87 倍,差异具有统计学意义($P<0.01$)。脾部分切除使用止血粉后,A、B、C组创面均很快停止出血。A、B、C 组的出血时间和出血量均显著短/少于 D 组($P<0.05$);A 组的出血时间和出血量均明显短/少于 C 组($P<0.05$),A 组的出血时间明显短于 B 组($P<0.05$)。肉眼及镜下可见在第 20 天 A、B、C 组均可见未吸收完的止血粉末,第 30 天止血粉末较第 20 天明显吸收。**结论** 脱细胞 SIS 不含细胞成分,在体内可降解,具有极强的吸水性,对大鼠脾部分切除创面具有令人满意的止血效果。

[关键词] 脱细胞猪小肠黏膜下层;局部外用止血药;出血;止血;大鼠模型

[中图分类号] R973+.1;R657.6 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-12-08

Study on acellular porcine small intestinal submucosa powders for hemostasis of wound in rats after partial splenectomy

WANG Wen-ping[1], ZHANG Wen-hong[1], DU Mao-tao[1], ZHANG Hong-pei[1], GONG Hui[1], ZHU Yu-xuan[1], LI Shi-rong[2], TIAN Yi[1] (1. Department of Plastic and Cosmetic Surgery, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Plastic and Cosmetic Surgery, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the hemostatic effect of acellular porcine small intestinal submucosa (SIS) powders on the wound of rats with partial spleen excision. **Methods** SIS powders were obtained by mechanical scraping, degreasing and decellularization, pepsin thawing, and freeze-drying. The residual cells of decellularized SIS was detected by HE staining, and the water absorption of SIS powders was examined and its ultrastructure was observed under a scanning electron microscope. A total of 40 SD rats were randomly divided into group A, B, C, D, with partial splenic tissue removed. SIS powders, Fuhetai hemostatic powders, instantaneous hemostatic powders and sterile gauze compression were used for wound hemostasis in group A, B, C and D, respectively. The ultrastructure was observed under the scanning electron microscope, and the bleeding time and amount of the wound were recorded. Five rats were killed at the 20th day and 30th day in each group. The absorption of hemostatic powders on the wound were observed by naked eyes and HE staining under the microscope. **Results** After the degreasing and decellularization, the SIS had no cellular components remaining, and the SIS powders were seen in the shape of a single layer of long flakes under the microscope. The water absorption rate of SIS powders reached saturation at 120 seconds, which was 1.87 times on that of instantaneous hemostatic powders, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). After spleenectomy and using hemostatic powders, the wounds of group A, B, C stopped bleeding quickly. The bleeding time and volume of group A, B, and C were significantly shorter/lower than those of group D ($P<0.05$). The bleeding time and volume of group A were significantly shorter/lower than those of group C, the bleeding time of group A was significantly shorter than that of group B ($P<0.05$). The unabsorbed hemostatic powders were observed in group A, B and C on the 20th day, and the powders were significantly absorbed on the 30th day. **Conclusion** The decellularized SIS contains no cellular components, is degradable in the body, has extremely strong water absorption, and has a satisfactory hemostatic effect on wound of rats with partial splenectomy.

Keywords: acellular porcine small intestinal submucosa; topical hemostatic agent; bleeding; hemostasis; rat model

[基金项目] 国防科技创新特区(1716315xj00100309)

[通信作者] 田 怡,E-mail:370805438@qq.com;李世荣,E-mail:shirongli@163.com

快速有效的止血方法在创伤急救和外科手术中都非常重要。除了常规止血方法(压迫止血、结扎止血、电凝止血),局部外用止血药物也提供了新的止血策略。局部外用止血药物按照其凝血机制可分为两大类:一类是接触后主动启动生物体内凝血级联反应形成纤维蛋白凝块产生凝血作用;另一类是通过接触、活化促进血小板聚集而产生被动凝血作用[1]。局部外用止血药物已广泛应用于整形外科、泌尿外科、神经外科等领域,减少了医疗资源和血液制品的浪费[2-6]。

理想的止血材料应具备以下特征:止血迅速,具有生物相容性及可降解性,无细胞毒性,无免疫原性,不增加感染概率,不影响组织愈合,易于消毒,成本低且易于获得[7]。目前使用的局部止血药物有多种类型,如纤维素类、纤维蛋白、凝血酶、壳聚糖、明胶海绵类,但都各有利弊。因此,迫切需要开发易于获取、安全、有效、实用和低成本的新型止血材料。

脱细胞猪小肠黏膜下层(small intestinal submucosa,SIS)是异种来源、不含细胞成分、生物相容性好、在体内可降解的生物材料。SIS 主要是由胶原、糖胺聚糖构成,富含生长因子,已成功用于多种临床治疗,包括硬脑膜移植、疝气修复、腹壁重建以及肾肿瘤肾部分切除术后的尿漏及创面出血[8]。鉴于 SIS 的优点及广泛运用,本研究将脱细胞处理的 SIS 经冻干后粉碎制成粉末,用于大鼠脾部分切除创面止血,以观察其止血效果。

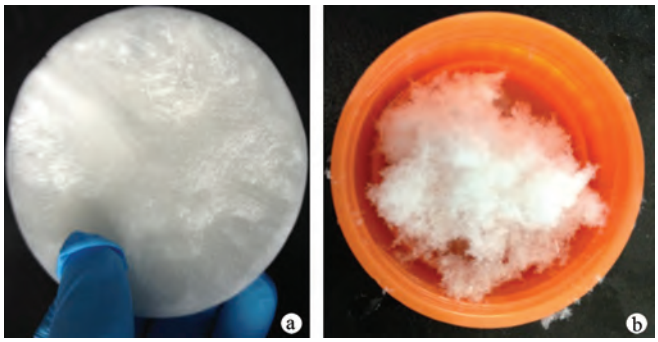
1 材料与方法

1.1 脱细胞 SIS 粉末制备[9]

取新鲜猪小肠,用刮匙刮除浆膜层和肌层获得黏膜下层,清洗后用甲醇和氯仿(体积比 1∶1)浸泡 12 h 脱脂;去离子水漂洗 3 次后,用 0.05% 胰酶、0.05% EDTA 室温下消化 12 h 脱细胞;去离子水冲洗 3 次,于含 0.5% SDS 的生理盐水中振荡 4 h,生理盐水冲洗 3 次;0.5% 醋酸浸泡过夜,打浆机粉碎后加入胃蛋白酶,室温下酶解 2 d 后过滤;滤液经 2 次盐析离心后取沉淀,将沉淀溶解于 0.1% 醋酸中,8KD 透析袋透析 24 h;透析后的液体经冷冻干燥机冻干后粉碎成粉末(图 1),消毒后保存于无菌容器内,4 ℃ 冰箱密闭保存。

1.2 SIS 的 DNA 残留及 SIS 粉末吸水性检测

冻干处理的 SIS 膜进行 HE 染色,以观察脱细胞后的细胞残留情况。称重并记录筛网的重量(筛孔大小 200 目)为 M0;将 SIS 粉末(0.5 g)放入筛网中,然后浸入水槽,在不同的时间点(5 s、10 s、15 s、20 s、40 s、60 s、120 s)从水中取出筛网,纱布吸出残留水分后称重,记为 Mt。同样方法检测福和泰止血粉(青岛颐中生物工程有限公司)、瞬时止血粉(山东赛克赛斯药业科技有限公司)的吸水率作为对照。吸水率 = (Mt − M0 − 0.5)/0.5 × 100%。



a:脱细胞脱脂冻干等处理后的 SIS;b:机械粉碎后获得的 SIS 粉末

图 1 SIS 粉末的制备

1.3 大鼠脾部分切除创面的止血

将 40 只健康成年 SD 大鼠随机分为 A 组(SIS 粉末)、B 组(福和泰止血粉)、C 组(瞬时止血粉)、D 组(无菌纱布压迫),每组 10 只。大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉,仰卧固定在动物手术台上,碘伏消毒后切开腹部,将脾完全暴露,纱布吸出腹腔和脾表面的液体,在脾末端沿短轴方向,用剪刀剪去约 0.5 cm 的脾组织,纱布清除表面流血,建立脾出血模型[10]。按照分组将止血粉末喷于创面,然后将脾置于无菌纱布上,观察伤口的出血情况,直到出血停止;D 组用无菌纱布压迫直到出血停止。记录出血时间和出血量(脾放置在纱布前后的重量差)。5-0 尼龙线缝合腹部切口,并用抗生素药膏保护其免受感染。

1.4 扫描电镜观察止血粉及其用于创面后的结构

3 种止血材料用于创面 10 min 后,取下带有止血材料的脾组织置于戊二醛固定 24 h,经过洗涤、脱水、喷金等处理后在扫描电镜下观察其表面以及在脾表面的超微结构。

1.5 使用止血粉后脾创面组织学观察

术后第 20 天、30 天,每组处死 5 只大鼠。切开腹部,观察止血粉在脾创面上的吸收情况。然后将组织取下用 4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋并切片进行 HE 染色。在光学显微镜下观察脾的创面情况。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

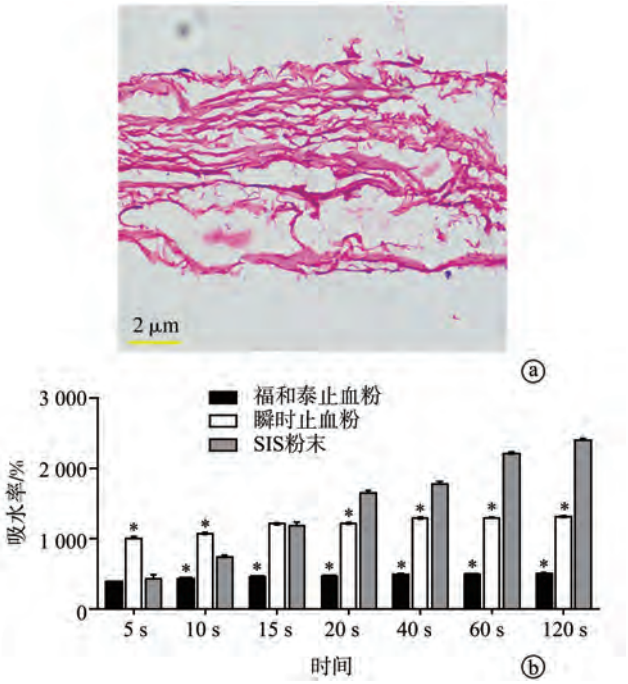
2 结果

2.1 脱细胞后 SIS 细胞残留及吸水性检测

HE 染色结果显示脱细胞处理后 SIS 中无细胞成分残留(图 2a)。SIS 粉末、福和泰止血粉和瞬时止血粉均具有很强的吸水能力。福和泰止血粉与水接触后迅速溶解形成凝胶状牢固地黏附在筛板上,不再吸收水分;瞬时止血粉在前 10 s 内迅速吸水,在 15 s 时,吸水率达到饱和(1 176.87 ±47.21)%;SIS 粉末的吸水性在前 10 s 内弱于瞬时止血粉,在 15 s 时已具备和瞬时止血粉相同的吸水率,并在 120 s 时达到饱和(2 289.18 ±26.46)%,是瞬时止血粉的 1.87 倍;重量相同的 3 种粉末,SIS 粉末的吸水率显著高于福和泰止血粉和瞬时止血粉(图 2b)。

2.2 使用止血粉后创面情况

A 组 SIS 粉末喷洒在出血创面上,逐渐从血液中吸收水分并浓缩血液中的固体成分(血小板、红细胞、凝血因子和纤维蛋白),SIS 粉末相互接触形成机械屏障封闭创面,出血逐渐停止,止血效果彻底;B 组福和泰止血粉喷在出血创面后立即溶解,形成牢固的凝胶状薄膜黏附在创面上,出血逐渐停止;C 组瞬时止血粉与 B 组相似;D 组压迫 5 min 后,伤口仍有少量出血,用纱布持续压迫伤口后,血流量逐渐减少,最终出血停止。第 20 天时,A、B、C 组创面均可看到未吸收完的止血粉末;第 30 天时,创面上的止血粉末较第 20 天时明显减少,福和泰止血粉基本已完全被吸收完,SIS 粉末的吸收较福和泰止血粉、瞬时止血粉慢(图 3)。



a:SIS 脱细胞处理后 HE 染色;b:3 种止血粉末的吸水率比较
*:与 SIS 粉末比较,$P<0.01$

图 2 脱细胞后 SIS 细胞残留情况及 3 种止血粉末的吸水率

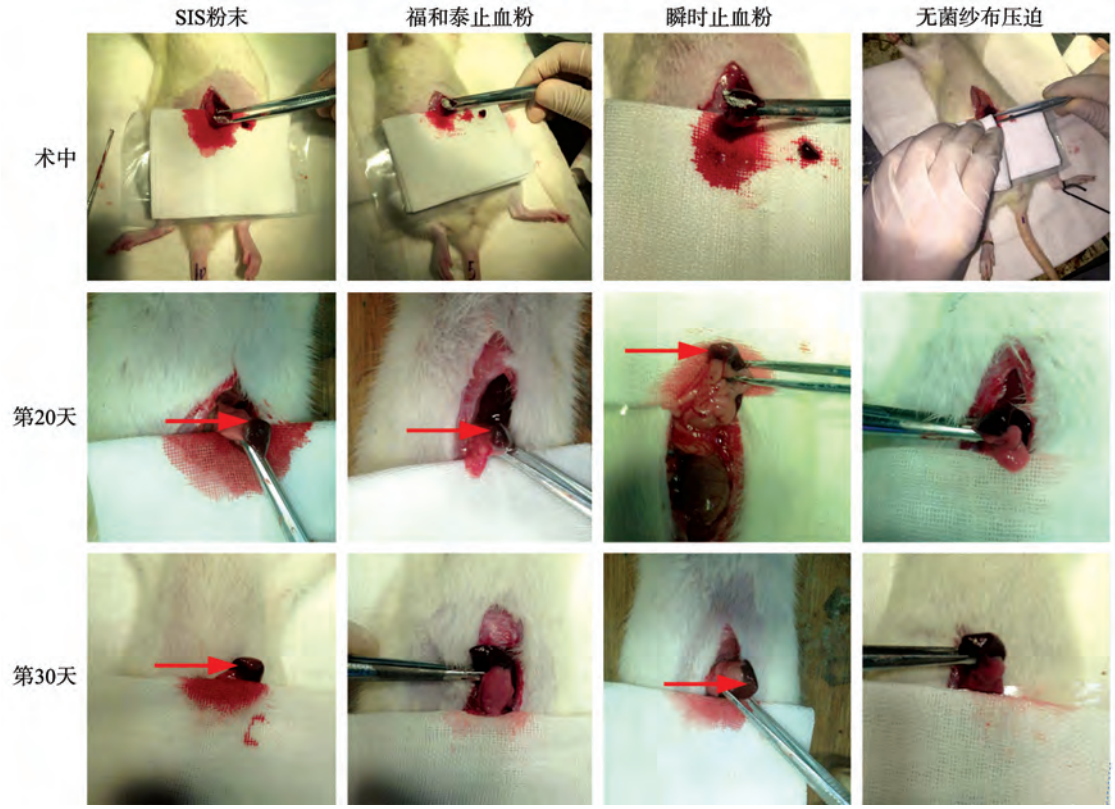


图 3 止血粉末用于创面当时及第 20 天、30 天的止血情况(红色箭头所示为未吸收的止血粉末)

2.3　出血时间及出血量

A 组、B 组和 C 组的出血时间和出血量均短/少于 D 组，A 组的出血时间和出血量短/少于 C 组，A 组的出血时间短于 B 组，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表1。

2.4　扫描电镜结果

镜下见 SIS 粉末呈单层的长薄片状，福和泰止血粉呈细长的纤维状，瞬时止血粉呈大小不均的圆球状（图4）。脾凝血块样品镜下见 SIS 粉末相互接触形成膜状的机械屏障，同时血液中的成分（如凝血因子、血小板、纤维蛋白和红细胞）聚集在 SIS 的表面上，加速了内源性凝血机制。

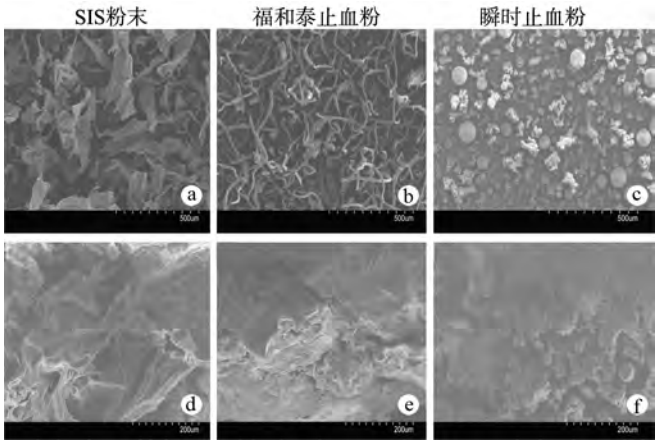
表 1　各组出血时间及出血量比较（$n=10,\bar{x}\pm s$）

组别	出血时间/s	出血量/g
A 组	91.800 ± 11.883 *	0.143 ± 0.011 *
B 组	121.200 ± 7.362 *#	0.147 ± 0.013 *△
C 组	122.800 ± 21.088 *#	0.189 ± 0.093 *#
D 组	240.600 ± 6.269	0.259 ± 0.027

*：与 D 组比较，$P<0.05$；#：与 A 组比较，$P<0.05$；△：与 C 组比较，$P<0.05$

2.5　使用止血粉后脾组织的一般观察和组织学评价

A 组第 20 天时可观察到相对多的 SIS 粉末，第 30 天时创面上 SIS 粉末逐渐减少，明显少于第 20 天时；B 组大部分止血粉在第 20 天被吸收，在第 30 天基本被完全吸收；C 组第 20 天时可见大量未吸收完的止血粉末，第 30天时创面可见少量未吸收的止血粉末，见图 5。



a～c：3 种止血粉末的结构；d～f：3 种止血粉末在创面上参与止血时的结构

图 4　扫描电镜结果

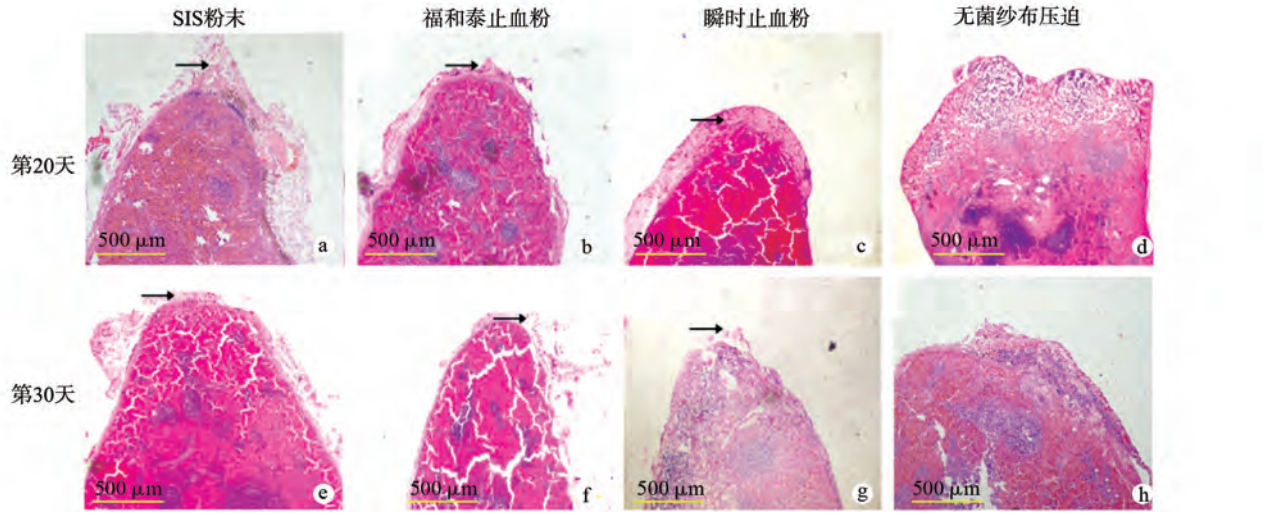


图 5　HE 染色观察止血粉末的吸收情况（黑色箭头所示为未吸收完的止血粉末）

3　讨论

在外科手术过程中，毛细血管或小静脉弥漫性、持续性的出血会引起很多问题，术中使用高效的局部止血剂能够保持手术视野清晰，减少输血，缩短手术时间，降低并发症的发生率等[11-12]。优质的止血药物在外科手术中起着关键作用，目前可供选择的局部止血剂有多种类型，如纤维素类、纤维蛋白、凝血酶、明胶海绵类等。其中纤维素类（如复合微孔多聚糖蛋白）的止血效果非常好，但由于其成本较高，临床应用受限；纤维蛋白和凝血酶有可能引起免疫反应和输血传播性疾病；动物来源的胶原蛋白，尤其是牛来源的胶原蛋白，容易产生免疫反应；明胶海绵类止血药物有导致脓肿和肉芽肿的风险。目前国内可吸收止血材料行业相对来说基础薄弱，技术研发能力偏低，产品质量较低，与国外差距大，且止血材料研究领域落后于其他医学领域，很少有重大进展，临床所用多为经典材料。因此，急需开发易于获取、安全、有效、体内可降解、实用

和低成本的止血材料。

本研究探索了 SIS 粉末作为止血材料应用于大鼠脾部分切除创面止血的情况,结果显示,经过脱细胞处理后的 SIS 膜不含有细胞成分,无 DNA 残留,不会引起免疫反应。另外,由于止血剂长时间黏附于创面会引起组织炎症反应,而本研究组织学检测结果显示,SIS 粉末、福和泰止血粉和瞬时止血粉都可以在 1 个月左右降解完。说明脱细胞 SIS 粉末对机体来说是比较安全可靠的。

本研究吸水性能检测结果显示,福和泰止血粉吸水后形成凝胶状,吸水性能有限;瞬时止血粉吸水迅速;SIS 粉末的吸水性在 15 s 时可达到与瞬时止血粉相同的吸水率,随后还能继续吸水,最大吸水率是瞬时止血粉的 1.87 倍。扫描电镜结果显示 SIS 粉末的止血机制与瞬时止血粉相似。SIS 粉末喷洒到创面后相互连接形成一个膜状的机械屏障,同时迅速吸收血液中的液体成分,浓缩血液中的血小板、红细胞、凝血因子、纤维蛋白,启动内外源性凝血过程,加速凝血。相比于福和泰止血粉和瞬时止血粉,SIS 粉末的止血效果更佳,更具优势。

SIS 是异种来源的生物材料,经过加工处理后去除细胞成分,在生物体内具有良好的生物相容性,并且可以在体内降解,已成功用于许多临床治疗。但是也有研究指出,在处理过程中若 DNA 不能完全去除时会引起机体的免疫反应。因此,在进行脱脂脱细胞处理时可以适当延长处理时间并反复漂洗,尽量去除 DNA。本研究也存在一定的局限性,只在大鼠脾出血进行止血研究,未在大型动物创面或脏器出血进一步研究以模拟人体出血止血情况,对于 SIS 粉末的止血效果及止血的具体机制还需要进一步的研究。

综上,SIS 粉末在体内可降解,具有极强的吸水性。SIS 粉末作为止血剂,在大鼠脾部分切除创面具有良好的止血作用,应用前景广阔。

[参考文献]

[1] 巴 根,赵贵成,傅 强. 可吸收止血材料的安全性与临床应用[J]. 第二军医大学学报,2011,32(8):911 - 914. doi:10.3724/SP.J.1008.2011.00911.

[2] Basonbul RA, Cohen MS. Use of porcine small intestinalsubmucosa for pediatric endoscopic tympanic membrane repair[J]. World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2017, 3(3): 142 - 147. doi: 10.1016/j.wjorl.2017.09.001.

[3] Zhang X, Qiu J, Ding J, et al. Comparison of neovaginoplasty using acellular porcine small intestinal submucosa graft or Interceed in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome[J]. Arch Gynecol Obstetr, 2019, 300(6): 1633 - 1636. doi: 10.1016/j.jmig.2019.09.497.

[4] Tschan CA, Nie M, Schwandt E, et al. Safety and efficacy of microporous polysaccharide hemospheres in neurosurgery[J]. Neurosurgery, 2011, 69(1 Suppl Operative): s49 - s63. doi: 10.1227/NEU.0b013e3182155a52.

[5] Karakaya K, Ucan HB, Tascilar O, et al. Evaluation of a new hemostatic agent Ankaferd Blood Stopper in experimental liver laceration[J]. J Invest Surg, 2009, 22(3): 201 - 206. doi: 10.1080/08941930902866246.

[6] Bruckner BA, Blau LN, Rodriguez L, et al. Microporous polysaccharide hemosphere absorbable hemostat use in cardiothoracic surgical procedures[J]. J Cardiothorac Surg, 2014, 9: 134. doi: 10.1186/s13019 - 014 - 0134 - 4.

[7] 王璐璐. 局部可吸收止血材料的应用现状及其研究进展[J]. 医学研究生学报,2018,31(1):109 - 112. doi:10.16571/j.cnki.1008 - 8199.2018.01.023.

[8] Shi L, Ronfard V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review[J]. Int J Burns Trauma, 2013, 3(4): 173 - 179. doi: 10.1002/adfm.201300215.

[9] 颜青龙,王文平,黄书鹏,等. 小肠黏膜下层仿生双层敷料复合富血小板血浆促进难愈性皮肤溃疡的修复[J]. 局解手术学杂志,2018,27(9):620 - 624. doi:10.11659/jjssx.06E018100.

[10] Furka I, Nemeth N, Miko I. The spleen in experimental surgery[J]. Magy Seb, 2013, 66(3): 156 - 160. doi: 10.1556/MaSeb.66.2013.3.5.

[11] Renkens KJ, Payner TD, Leipzig TJ, et al. A multicenter, prospective, randomized trial evaluating a new hemostatic agent for spinal surgery[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2001, 26(15): 1645 - 1650. doi: 10.1097/00007632 - 200108010 - 00002.

[12] Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review[J]. J Artif Organs, 2005, 8(3): 137 - 142. doi: 10.1007/s10047 - 005 - 0296 - x.

[13] 张 爽,徐庆华,童 琳,等. 可吸收止血材料的研究现状与应用[J]. 中国组织工程研究,2021,25(10):1628 - 1634. doi:10.3969/j.issn.2095 - 4344.3025.

(编辑:杨 颖)