DOI:10.16016/j.2097-0927.202402062

自组装多肽凝胶的构建及其在肝实质创伤性出血中的止血应用研究

应 望,罗 杰,郑传浩,但瑞珏,谭莎丽,罗 强 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院消化内科

[摘要] **目的** 制备 FLIVIGSII 多肽(FI 肽),探究其物理化学性质及其体外凝血和体内止血效应。**方法** 将 FI 肽与水混合,制备样品,直接观察 FI 肽水凝胶的状态,通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察其微观纤维结构,并通过动态光散射(dynamic light scattering, DLS)分析其纤维尺寸。将 FI 肽与 3.8%柠檬酸钠抗凝处理后的健康人血液混合,直接观察 FI 肽的凝血效应,并通过 SEM 观察其血凝块的微观结构。溶血实验和 CCK-8 细胞毒性实验用于验证其生物相容性。最后,构建大鼠肝脏实质穿孔出血模型,将 15 只体质量为 150 g 的 6~8 周龄雌性 SD 大鼠按随机数字表法分为 3 组:对照组、FI 肽组和纤维蛋白胶组,通过各组治疗后观察分析 FI 肽对肝脏实质创伤性出血的止血效应及其预后,并探讨其止血机理。**结果** 成功制备 FI 肽。FI 肽与血液接触后快速成胶,使血液凝固形成血凝块。SEM 结果显示 FI 肽与水混合后自组装形成纤维网状水凝胶。TEM 结果验证 FI 肽在水中成胶后形成直径为(13.70±2.31) nm 的纳米纤维,DLS 结果验证其在水中形成多分散多尺寸(148.2~208.0 nm 或 575.0~807.0 nm)的纳米纤维。FI 肽与血液混合后形成的纤维网状水凝胶包裹住红细胞,从而形成物理性止血屏障以在数秒内实现凝血。同时,FI 肽水凝胶对正常肝细胞(L-O2)无细胞毒性,且不会造成红细胞溶血。在 SD 大鼠体内肝脏止血实验中,FI 肽与血液接触时,迅速形成纳米纤维水凝胶,从而形成物理性止血屏障以在数秒内实现体内止血(止血时间<5 s)。**结论** FI 肽具有快速、高效的止血效应,在肝脏实质创伤性出血的止血治疗中具有较好的临床应用前景。

[关键词] 多肽;自组装;水凝胶;肝脏止血;肝脏实质性出血

[中图法分类号] R657.3; R914.2; R973.1 [文献标志码] A

Preparation of self-assembling peptide-based hydrogels and its application in traumatic hemorrhage of hepatic parenchymal

YING Wang, LUO Jie, ZHENG Chuanhao, DAN Ruijue, TAN Shali, LUO Qiang Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To prepare FLIVIGSII peptide (FI peptide) and investigate its physicochemical properties and hemostatic effect *in vivo* and *in vitro*. **Methods** The self-assembling peptide-based hydrogels were prepared by the FI peptide mixed with water. After gross observation for the hydrogel state of the FI peptide, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were used for its microstructure, and dynamic light scattering (DLS) was performed for its size. The hemostatic effect of FI peptide after being mixed with blood samples treated with 3.8% sodium citrate was observed, and the microstructure of the blood clot was observed with SEM. CCK-8 assay and hemolysis assay were performed to verify its biocompatibility. After a rat model of hepatic parenchymal perforation and

[通信作者] 罗 强,E-mail:luoqiang0816@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

hemorrhage was established, 15 female SD rats (6~8 weeks old, weighing 150 g) were randomly divided into control group, FI peptide group and fibrin sealant group. The hemostatic effect of FI peptide and prognosis was observed and analyzed after treatment in each group, and the hemostatic mechanism was also investigated. **Results** FI peptides were successfully prepared, and it could rapidly self-assemble into a nanofiber network hydrogel in water, and further cause formation of blood clots. SEM showed that FI peptides self-assembled to form fibrous hydrogels after mixing with water. TEM results verified that the FI peptide formed into nanofibers in a diameter of 13.70±2.31 nm after gelatinization in water, and DLS results verified that the FI peptide formed polydisperse and multi-size nanofibers in water (in a range of 148.2~208.0 nm or 575.0~807.0 nm). The fibrous hydrogel formed by the FI peptide mixed with the blood could envelop the red blood cells, thus form a physical hemostatic barrier to achieve blood clotting in seconds. FI peptide hydrogel had no cytotoxicity to normal hepatocytes (L-O2 cells) and did not cause hemolysis of red blood cells. In *in vivo* experiment, FI peptide quickly formed nanofiber hydrogel when in contact with blood, thus formed physical hemostasis barrier to achieve hemostasis within a few seconds (hemostasis time <5 s). **Conclusion** The FI peptide exhibits a rapid and efficient hemostatic effect, indicating a promising clinical application in the hemostasia of hepatic parenchymal traumatic hemorrhage.

[**Key words**] peptide; self-assembly; hydrogel; hemostasis, liver; hepatic parenchymal hemorrhage

Corresponding author: LUO Qiang, E-mail: luoqiang0816@126.com

肝脏是人体最大的实质器官,其内部脉管系统繁多复杂,血供丰富[1-2]。外伤、手术等引起的肝脏实质出血是临床常见的急性症状,若出血时未能有效控制,会导致血流动力学障碍和多器官功能障碍,严重时甚至危及生命[3-5]。手术止血是肝脏出血最主要的止血方式,但可能会导致再灌注损伤加重肝脏损伤,且对于位置较深的出血点作用不大;其他常见的止血方式如物理机械止血、热效应和生物制剂等,也存在止血不完全、价格昂贵、再出血率高等不足[6-7]。因此,开发高效且具有良好生物相容性的新型肝脏止血药物,具有重要的临床意义。

良好的止血材料应具备止血速率快、良好的生物相容性、成本低廉、操作便捷等特点[7-8]。近年来,自组装多肽由于其优异的理化性能、良好的生物安全性、低免疫原性等优点,被广泛用于组织工程、再生医学、创面修复和生物医学诊断等生物医学领域[9-12]。研究表明,基于多肽的自组装纳米材料是一种新型的生物材料,往往能够通过非共价键(如氢键、π-π 堆叠、静电吸附和疏水相互作用等)自组装形成稳定的超分子结构[13-14],可以显著提高药物在病灶部位局部药物浓度和滞留时间,从而展现出增强的生物效应。而基于多肽的止血材料在创伤和手术止血等领域也取得了较好的应用效果[15-17],展现出了良好的临床应用前景。

FLIVIGSII 多肽序列来源于人肌肉 L 型钙通道蛋白序列[18],FLIVIGSII 多肽(FI 肽)具有强疏水性和一定的黏附力,常被用于制备液体环境下工作的黏附性材料,因此具备在肝脏止血的潜力[19-20]。因此,本研究基于 FI 肽构建一种自组装多肽水凝胶,评价其微观结构、凝胶性质及其生物相容性,并探究其体外凝血和体内止血效应,旨在研发一种能快速止血的止血材料,期望作为一种新型止血材料应用于肝脏实质创伤性出血的治疗。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

L-O2 细胞来自人正常肝脏细胞永生化细胞系,购自上海康朗生物科技有限公司。雌性 SD 大鼠 15 只,6~8 周龄,体质量(150±5) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,所有实验和方案通过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC20235153)。3.8%柠檬酸钠抗凝处理后的血液来源于陆军军医大学第二附属医院消化内科志愿者血液样本,实验方案经陆军军医大学第二附属医院伦理委员会批准(2023-研第 159-01)。FLIVIGSII 多肽序列(FI 肽)购自上海楚肽生物科技有限公司。猪源性纤维蛋白粘合剂购自广州倍绣生物技术有限公司。DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素溶液和胰酶购自森贝伽生物科技有限公司。CCK-8 试剂盒、DMSO 购自上海碧云天生物科技有限公司,戊二醛电镜固定液购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 FI肽体外成胶实验 将固体FI肽用DMSO溶液助溶,再用甘油稀释至浓度为5 mg/mL的FI肽母液($V_{甘油}:V_{DMSO}=99:1$)。在EP管中加入70 μL去离子水,加入100 μL FI肽母液,静置10 s后观察FI肽成胶状态并拍照分析。

1.2.2 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和动态光散射(dynamic light scattering, DLS)观察微观结构 将FI肽母液用水稀释为50 μmol/L,取10 μL滴在铜网上,待其沉降5 min后,用水轻轻洗掉多余的样品,用10 μL醋酸铀染色10 min,染色后再次用水洗净多余染料,样品于透射电镜下观察。同时将稀释过的样品超声波处理10 min后,取1 mL样品利用DLS检测其纤维尺寸分布情况。

1.2.3 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察微观结构 将10 μL血液或去离子水轻轻滴在直径为10 mm的干净圆形盖玻片中心,将10 μL FI肽轻轻加入血液中,10 s后,用PBS润洗3遍,将含有血凝块的盖玻片放在2.5%戊二醛电镜固定液中固定6 h,再将血凝块在30%、50%、70%、90%和100%乙醇溶液中进行梯度脱水,每次10 min。接着用30%、50%、70%、90%和100%叔丁醇置换乙醇和水,喷金5 min。将含有FI肽水凝胶的玻片在-20 ℃冷冻过夜,冻干后喷金5 min。最后,通过SEM观察水凝胶和血凝块的微观结构。

1.2.4 FI肽凝血效应宏观形态观察 在2.5 mL的EP管中加入200 μL血液,分别将等量生理盐水(对照组)、FI肽、纤维蛋白胶与血液进行混合,静置10 s后观察凝血状态并拍照。

1.2.5 FI肽凝血效应时间依赖性研究 在96孔板中预先加入50 μL经3.8%柠檬酸钠抗凝处理后的血液,然后将0.1 mmol/L $CaCl_2$(对照组)、FI肽或纤维蛋白胶50 μL分别加入到血液中,并分别在加入样品5、10、30、60、180、300或420 s后使用生理盐水终止反应,用生理盐水润洗去除未凝固血液成分,观察分析各孔凝血情况。

1.2.6 细胞培养 L-O2细胞在含有10%的胎牛血清和1%的青霉素-链霉素双抗溶液的DMEM培养基中培养,细胞培养箱提供37 ℃、5% CO_2和95% O_2的无菌环境。当细胞在培养皿中生长达到80%~90%时,按照1:3传代,以防止细胞分化。

1.2.7 溶血实验 取3.8%柠檬酸钠抗凝处理后的血液1 mL,以513×*g*离心5 min,PBS洗涤3次。然后用生理盐水将红细胞稀释10倍。在EP管中加入1 mL稀释过的红细胞,实验组中分别加入2 mmol/L FI肽和5 mmol/L FI肽,以0.1% Triton-X和生理盐水处理作为阳性对照组和阴性对照组。孵育4 h后,500×*g*离心10 min,拍照记录,并将上清液转移至新的96孔板中。测定540 nm处的光密度值,计算各组溶血率。

$$溶血率=\frac{OD_{样品}-OD_{阴性}}{OD_{阳性}-OD_{阴性}}\times 100\%$$

1.2.8 CCK-8细胞毒性检测 将生长状态良好的L-O2细胞以1×10^4个/孔的浓度铺板于96孔板中,在含有5% CO_2和95% O_2的37 ℃恒温孵箱中孵育24 h,待细胞完全贴壁后,将培养基吸取扔掉,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)轻轻润洗3遍。用不含胎牛血清的DMEM培养基配制不同浓度的FI肽溶液(0、5、10、20、50、100和200 μmol/L),将不同浓度的FI肽溶液加入各孔中,继续培养24 h。同时,将FI肽水凝胶用培养基浸泡12 h,之后将浸泡液培养基与L-O2孵育24 h,24 h后吸取各孔的培养基,并用PBS润洗,随后在遮光条件下每孔加入100 μL含CCK-8试剂的培养基($V_{CCK-8}:V_{DMEM}=1:9$),在培养箱中孵育30 min后,使用酶标仪测定每个处理孔、空白孔和对照孔450 nm波长处的吸光度,并按以下公式计算FI肽对L-O2细胞活力的影响[20]。

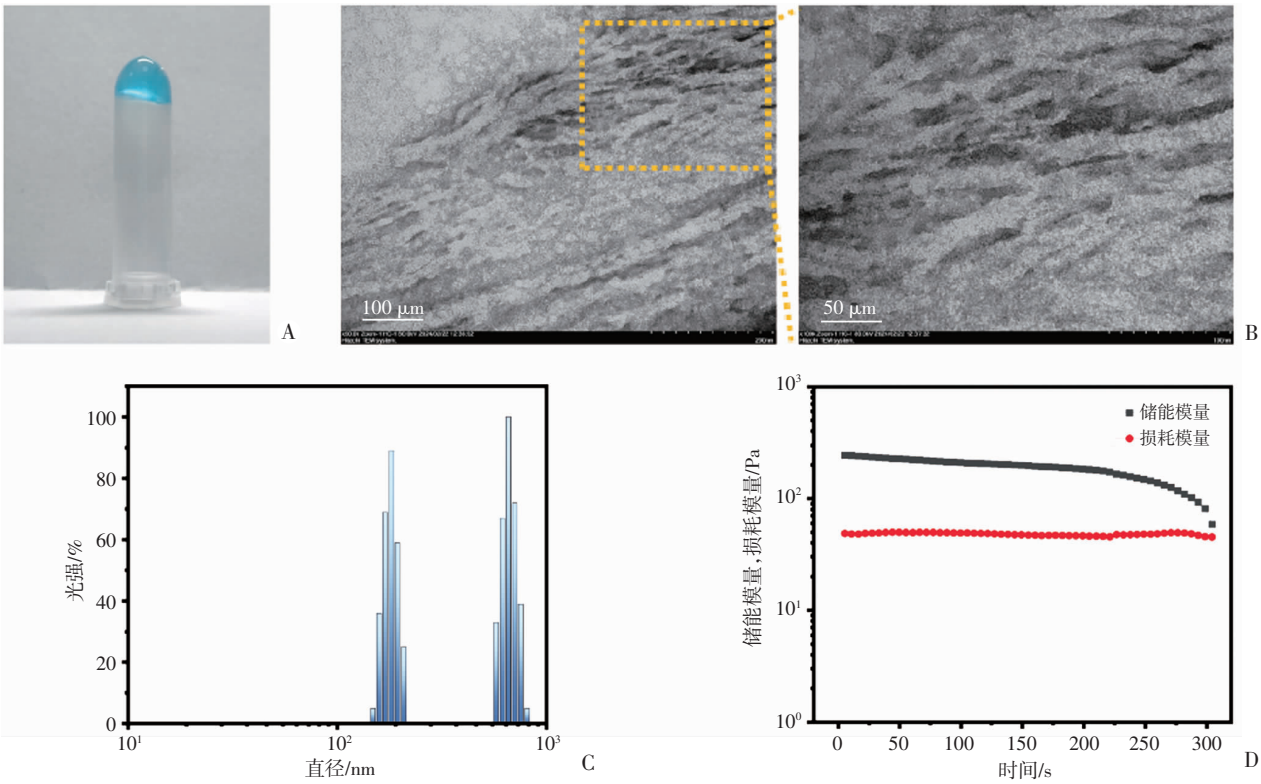
$$细胞活力=\frac{A_{处理}-A_{空白}}{A_{对照}-A_{空白}}\times 100\%$$

1.2.9 大鼠肝脏止血效应 将15只体质量为150 g雌性SD大鼠按随机数字表法分为3组,分别为对照组、FI肽组和纤维蛋白胶组,每组5只。注射1%戊巴比妥将大鼠进行麻醉,剖腹游离大鼠肝脏后使用打孔器于肝脏中央打孔,建立大鼠肝脏出血模型。将提前称量过质量的滤纸置于游离肝脏下方,然后分别通过FI肽和纤维蛋白胶对肝脏出血部位进行止血,取下滤纸并称量以估算出血量变化。

1.2.10 HE染色 将治疗3 d后的肝脏分离并用4%多聚甲醛固定,然后将组织脱水并包埋在石蜡中,将石蜡切片进行HE染色。最后,通过正置荧光显微镜观察图像。

1.3 统计学分析

采用Origin 2021进行绘图分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,所有实验至少重复3次,数据均服从正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$为差异有统计学意义。



A:FI 肽水凝胶图;B:透射电镜观察 FI 肽水凝胶;C:FI 肽 DLS 测量结果;D:FI 肽水凝胶流变结果

图 1 FI 肽与水混合后快速形成纤维网状水凝胶

2 结果

2.1 FI 肽自组装形成纳米纤维水凝胶

如图 1A 所示,含亚甲蓝的去离子水与 FI 肽混合 30 s 后,FI 肽在 EP 管底部完全成胶,EP 管倒立,FI 肽不会掉落。TEM 结果显示 FI 肽在水中成胶后形成直径为(13.70±2.31) nm 的纳米纤维(图 1B)。随后,通过 DLS 检测其纳米纤维的尺寸。如图 1C 所示,FI 肽在水中形成多分散多尺寸的纳米纤维,其尺寸分布在 148.2~208.0 nm 或 575.0~807.0 nm 范围,符合纳米纤维的分布特征。此特性使得 FI 肽具有止血的潜在能力。

2.2 FI 肽水凝胶的储能模量与弹性模量

为了进一步评估 FI 肽水凝胶的性质,对 FI 肽形成的水凝胶进行了流变力学性能测试。如图 1D 所示,损耗模量低于储能模量,说明该材料更偏向于弹性固体的特性,验证了 FI 肽形成水凝胶。

2.3 FI 肽体外凝血效果

此前的结果表明,FI 肽与水混合之后形成具有高度黏性的纳米纤维网状水凝胶。这种具有黏性的纳米纤维网状水凝胶可能通过迅速捕获红细胞,形成封闭的物理性屏障,发挥快速高效的凝血作用。为了验证猜想,采用健康人群的血液进行 FI 肽体外凝血效应的研究。为了便于比较,设置了对照组(生理盐水)、FI 肽组和纤维蛋白胶组。如图 2 所示,对照组的血液完全不凝固,EP 管倒立,血液自由向下流动。纤维蛋白胶组可见 EP 管倒置时,血液向下流动的过程中有部分血液凝固。而 FI 肽组血液快速凝固在 EP 管底部,EP 管倒置,血液完全凝固,不会向下流动,表明 FI 肽具有比纤维蛋白胶更快的体外凝血速率。



图 2 生理盐水(对照组)、FI 肽和纤维蛋白胶与血液混合后凝血效应

为了进一步探究 FI 肽具体发生凝血时间,随后检测 96 孔板中各组与血液混合的凝血时间,以评估其凝血能力。如图 3 所示,对照组(0.1 mmol/L $CaCl_2$ 溶

液)中血液直至 300 s 才能使血液发生凝固;纤维蛋白胶组在 10 s 时开始发生凝血,在 30 s 时形成少量血凝块,而 FI 肽与血液混合后快速成胶,仅在 5 s 时血液凝固成 PBS 冲洗不掉的血凝块,且随着作用时间的增加,血液凝固得更加完全。体外凝血实验结果表明,FI 肽在体外与血液接触时,能够快速使血液凝固,其凝血速度比纤维蛋白胶快 3 倍左右,具有显著性差异($P<0.01$)。结合 FI 肽的透射电镜结果,FI 肽与血液接触时,快速自组装形成纤维网状凝胶,迅速捕捉红细胞,并形成较强的物理性屏障,使血液快速凝固,具有快速高效的止血效应。

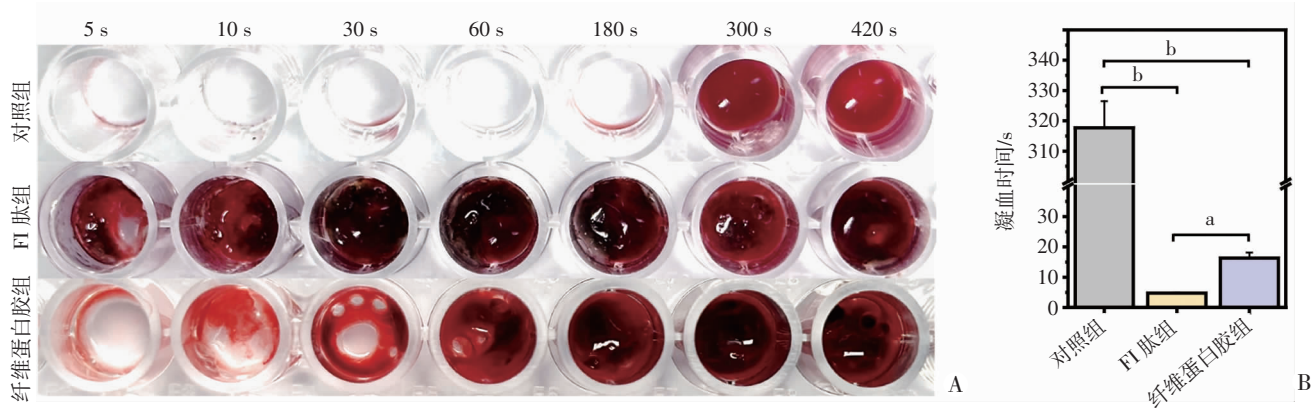
2.4 扫描电子显微镜(SEM)观察凝血后微观结构

FI 肽与血液接触后能快速成胶,使血液凝固形成血凝块。猜测其原因可能是 FI 肽遇水可自组装形成具有高度黏性的纳米纤维网状结构,这使得 FI 肽能快速将红细胞包裹,并触发凝血效应。为了验证猜想,通过扫描电镜观察 FI 肽与水或血液混合后的微观结构。如图 4A 所示,FI 肽与水混合后,自组装形成纤维网状结构。如图 4B 所示,FI 肽与血液混合后,FI 肽形成的黏性纤维网状结构包裹住红细胞。这进一步证实 FI 肽通过自组装形成纳米纤维网状结构捕获并包裹红细胞、发挥快速的凝血效应。

2.5 FI 肽的生物相容性

众所周知,止血材料应具有良好的生物相容性,通过溶血实验和 CCK-8 细胞毒性实验探究 FI 肽是否会导致溶血反应以及对正常肝细胞 L-O2 的细胞毒性。如图 5A 所示,Triton-X 处理组的红细胞全部破裂,离心后血红蛋白充满整个溶液,而 2、5 mmol/L FI 肽处理 4 h 后的红细胞和阴性对照组一样,其上清液清澈透亮,红细胞沉淀在 EP 管底部。2、5 mmol/L FI 肽处理 4 h 后红细胞溶血率仅为(0.95±0.06)%和(1.49±0.04)%(图 5B),FI 肽对红细胞不会造成溶血。

此外,在细胞层面检测了 FI 肽对 L-O2 细胞的毒性。将 L-O2 细胞分别与不同浓度 FI 肽(0、5、10、20、50、100 和 200 μmol/L)和 FI 肽水凝胶浸泡过的培养基共孵育 24 h,采用 CCK-8 检测细胞毒性。如图 5C 所示,0、5、10、20、50、100 和 200 μmol/L FI 肽与 L-O2 细胞共孵育 24 h 后的细胞存活率均超过 95%,FI 肽水凝胶浸泡过的培养基中,其细胞存活率为(86.23±1.26)%。以上结果表明,FI 肽水凝胶对正常肝细胞基本没毒性,且不会引起溶血,作为一种潜在的止血剂具有良好的生物相容性,具有很好的应用前景。



A:各组不同时间点凝血情况;B:各组凝血时间量化分析($n=3,\bar{x}\pm s$) a:$P<0.01$;b:$P<0.000\ 1$

图 3 FI 肽与血液混合后时间依赖性止血效应

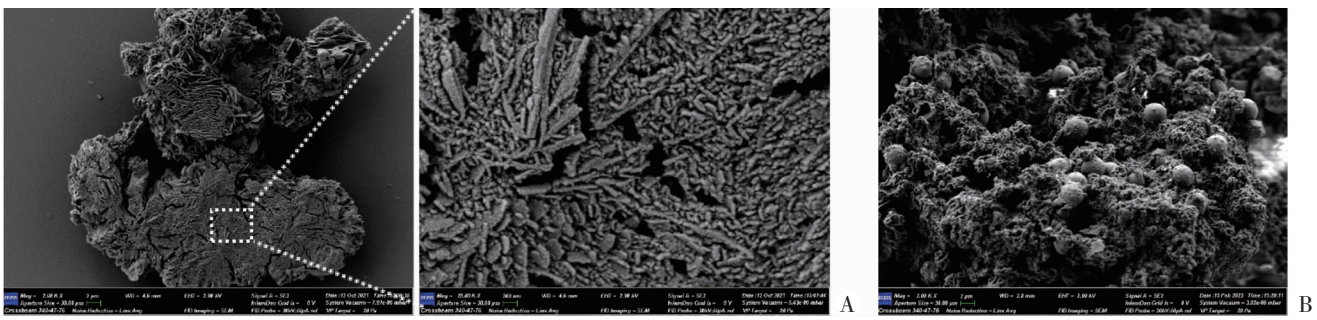
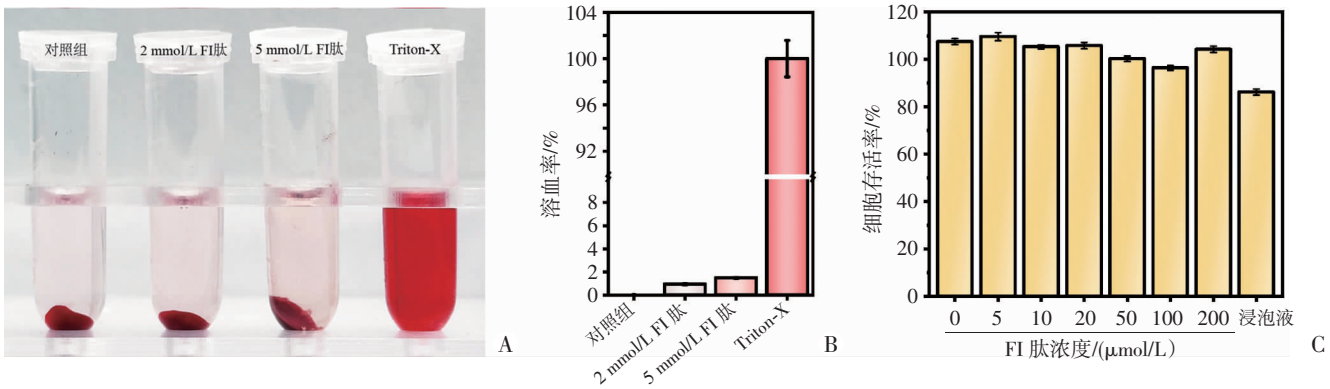


图 4 FI 肽与水(A)或血液(B)混合扫描电子显微镜观察



A:溶血实验;B:溶血率量化分析($n=3$,$\bar{x}\pm s$);C:CCK-8 细胞毒性实验

图 5 FI 肽的体外生物相容性检测

2.6 FI 肽活体止血实验

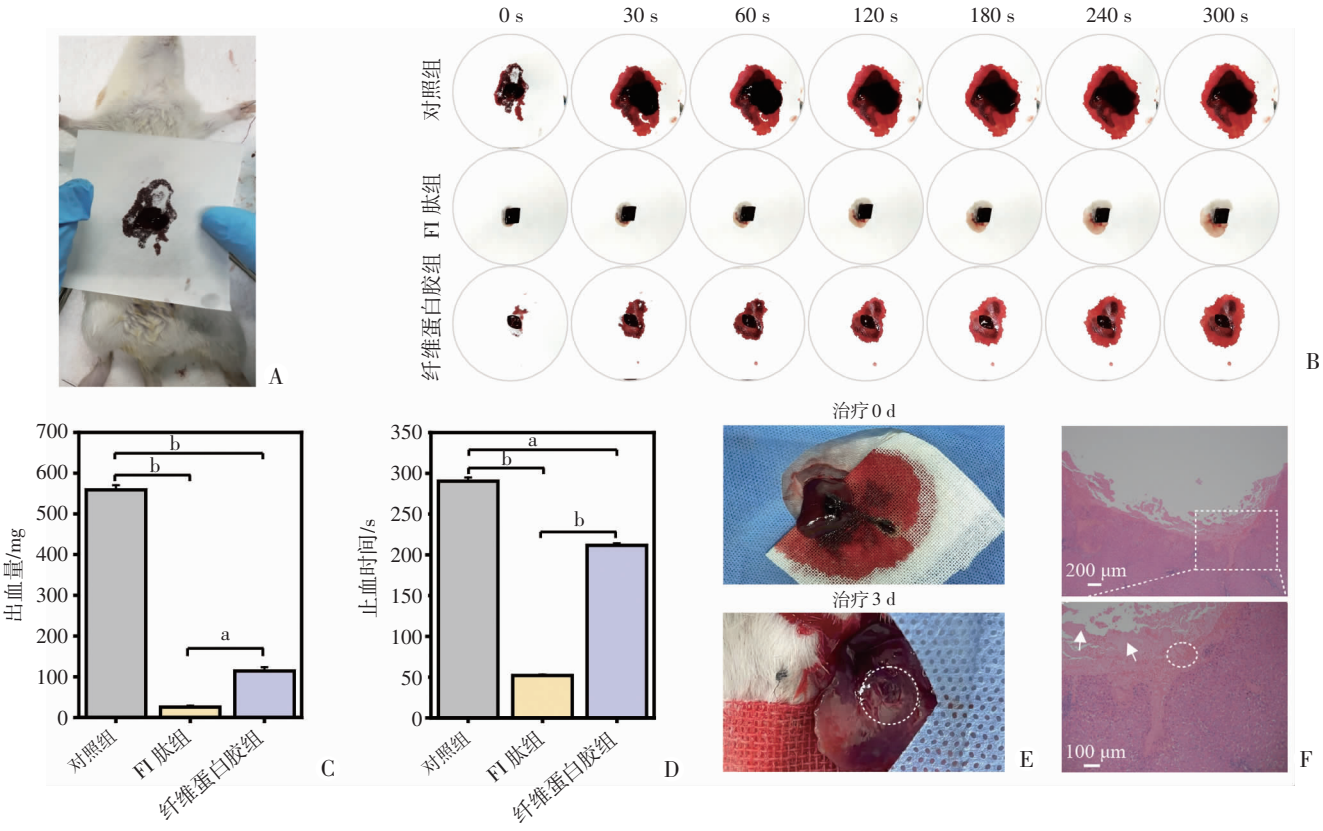
为进一步研究 FI 肽在体内的止血效果,通过构建肝脏实质出血模型研究 FI 肽的止血能力[21]。以 FI 肽为实验组、纤维蛋白胶作为阳性对照组,测量止血时间和相应的出血量。如图 6A 操作实物图所示,小鼠在经过不同组治疗后,根据滤纸吸取流出血液量判断各组止血效果。如图 6B、C 所示,对照组的出血量最高,5 min 出血量达到(559.13±11.18)mg,而纤维蛋白胶组的出血量减少到(114.23±9.37)mg。当使用 FI 肽止血时,失血量进一步显著减少到(25.27±3.62)mg,FI 肽组大鼠失血量显著少于对照组($P<0.000\ 1$)与纤维蛋白胶组($P<0.001$)。此外,如图 6B、D 所示,对照组止血时间为(290.33±4.67)s,猪源纤维蛋白胶止血时间为(211.67±2.67)s,FI 肽止血时间为(52.00±1.25)s。FI 肽组的止血速率明显优于纤维蛋白胶组($P<0.000\ 1$)和对照组($P<0.000\ 1$)。止血治疗后,将 FI 肽组的小鼠伤口缝合并观察其后续出血情况。如图 6E 所示,FI 肽止血治疗 3 d 后,小鼠正常存活且未发生再出血和血管不良事件。同时,收集治疗观察 3 d 后的肝脏组织,并对其进行 HE 染色。如图 6F 所示,白色箭头所示为水凝胶,白色虚线圆圈所示为红细胞,肝脏伤口处无明显炎症感染,这表明 FI 肽水凝胶具有良好的组织相容性,侧面反映 FI 肽止血治疗中不会形成血栓,具有很好的止血潜力。

3 讨论

在肝脏实质受到创伤时,大量的失血会导致严重的并发症,如低血压、多器官功能障碍等,严重时甚至危及生命。因此,高效、快速地控制出血是肝脏实质性出血时最重要的步骤。传统止血方式,如纱布、海绵等物理止血在一定程度上能够用于肝脏止血,但纱布、海绵等属于异物,容易导致免疫排斥,且在清除异物时容易破坏血凝块而导致再出血;此外,现有止血药物,如止血粉末、纤维蛋白胶等可以封闭小血管,减少出血量,但仍然存在以下不足:如止血粉末易造成血管堵塞,对大出血止血效果差、止血速率相对较慢等。因此,研究生物相容性好、止血效果好的新型止血材料,进行快速、高效地止血具有重要意义。

多肽可以通过氨基酸残基之间的非共价相互作用力(如范德华力、疏水相互作用、静电力、氢键、π-π 堆叠等)自组装形成不同尺寸、构型的自组装结构,如纳米纤维、纳米颗粒、胶束、水凝胶等。由于自组装多肽水凝胶含有大量的亲水性基团,当水分子扩散至多肽凝胶网络结构中,凝胶网络可吸收大量水分并保持着纳米纤维结构。这种自组装多肽在接触到血液的时候,可以快速自组装形成水凝胶,并锁住血液中的水分和血细胞、快速封闭伤口,从而控制出血;同时多肽降解产物为氨基酸,不易导致免疫排斥反应,且在一定程度上有助于伤口愈合。因此,自组装多肽类水凝胶在止血应用方面具有一定的应用前景和重要的研究意义。

FI 肽是来源于人肌肉 L 型钙通道蛋白序列的中间片段,具有一定的黏附性。本研究基于 FLIVIGSII 构建了一种自组装多肽水凝胶,探究了 FI 肽在肝脏实质性出血中的应用。FI 肽在水性环境下迅速发生自组装形成纤维网状水凝胶,而发挥快速止血效应。首先,通过 TEM、SEM 和 DLS 验证了 FI 肽在水性环境下可以自组装形成直径为(13.70±2.31)nm 的纳米纤维。同时,利用流变力学测试验证了 FI 肽在水相中自组装成纳米纤维后,展现出良好的水凝胶特性,可以锁住大量水分。随后,通过体外凝血实验证实 FI 肽在体外具有良好的促凝血效应,其能够在 5 s 内促进血液凝固;通过



a:$P<0.001$;b:$P<0.000\ 1$

A:止血实验示意图;B:各组不同时间点出/止血情况;C:各组出血量量化分析($n=5$, $\bar{x}\pm s$);D:各组止血时间量化分析($n=5$, $\bar{x}\pm s$);E:FI 肽止血治疗预后观察　白色虚线圆圈:示伤口部位;F:FI 肽治疗组肝脏 HE 染色　白色虚线圆圈:示红细胞;白色箭头:示水凝胶

图 6　FI 肽体内止血效应

SEM 观察发现,其血凝块中,FI 肽自组装形成的纳米纤维网物理屏障,能够很好地包裹住血细胞,从而发挥快速、高效的凝血效应。其次,通过体外溶血实验和 CCK-8 细胞毒性验证了 FI 肽具有良好的血液安全性和低毒性,具备在活体进行止血的可能性。随后,本研究建立了 SD 大鼠肝脏出血模型,以评估 FI 肽在肝脏止血中的能力。结果显示,FI 肽与血液接触后,立即自组装形成水凝胶,该水凝胶在伤口处形成良好的物理屏障,捕获血液中的血细胞、锁住水分,从而发挥快速止血效应。同时,FI 肽治疗 3 d 后,大鼠健康存活、伤口部位无炎症反应,且未发生再出血和血管不良事件,这表明 FI 肽水凝胶止血过程中不会导致感染、溶血、血栓形成等风险。最后,肝脏出血部位的 HE 染色结果显示治疗 3 d 后肝脏创面仍有 FI 肽水凝胶存在,这表明 FI 肽与血液形成水凝胶后,粘附于伤口处,能够持续发挥止血作用。考虑到肝脏实质性出血过程中的出血量大,渗出的胆汁渗出量与出血量相比微乎其微,因此 FI 肽在治疗肝脏实质性出血的影响可忽略不计。基于以上 FI 肽良好的止血效应和生物相容性,FI 肽有望用作止血材料并在肝脏实质创伤性出血治疗中发挥重要作用。

综上所述,本研究基于 FLIVIGSII 多肽(FI 肽)序列构建了一种能够自组装的多肽纳米水凝胶,FI 肽在水相中能够快速自组装成纳米纤维而形成凝胶,其在体外能快速促进血液凝固(5 s 内)。在大鼠肝脏穿孔出血模型中,FI 肽可以通过快速凝胶化形成物理屏障以锁住水分和血细胞,从而发挥快速、高效的止血效应,在肝脏实质创伤性出血的治疗中具有一定的应用前景。

参考文献:

[1] ALGHAMDI T, VIEBAHN C, JUSTINGER C, *et al*. Arterial blood supply of liver segment Ⅳ and its possible surgical consequences[J]. Am J Transplant, 2017, 17(4): 1064-1070. DOI: 10.1111/ajt.14089.

[2] XIANG C G, DU Y Y, MENG G F, *et al*. Long-term

functional maintenance of primary human hepatocytes *in vitro* [J]. Science, 2019, 364(6438): 399-402. DOI: 10.1126/science.aau7307.

[3] GUO B L, DONG R N, LIANG Y P, *et al*. Haemostatic materials for wound healing applications[J]. Nat Rev Chem, 2021, 5(11): 773-791. DOI: 10.1038/s41570-021-00323-z.

[4] REN H, ZHANG Z, CHENG X L, *et al*. Injectable, self-healing hydrogel adhesives with firm tissue adhesion and on-demand biodegradation for sutureless wound closure[J]. Sci Adv, 2023, 9(33): eadh4327. DOI: 10.1126/sciadv.adh4327.

[5] CROSS A J, CONNOR S J. Hemostasis and thrombosis in major liver resection[J]. Semin Thromb Hemost, 2015, 41(1): 99-107. DOI: 10.1055/s-0034-1398385.

[6] YUK H, WU J J, SARRAFIAN T L, *et al*. Rapid and coagulation-independent haemostatic sealing by a paste inspired by barnacle glue[J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(10): 1131-1142. DOI: 10.1038/s41551-021-00769-y.

[7] ZHAO W B, SUN W T, WANG W J, *et al*. Robust and wet adhesive self-gelling powders for rapid hemostasis and efficient wound healing[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2024, 16(6): 6756-6771. DOI: 10.1021/acsami.3c14944.

[8] LIU C K, LIU C, LIU Z Y, *et al*. Injectable thermogelling bioadhesive chitosan-based hydrogels for efficient hemostasis [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 224: 1091-1100. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.194.

[9] CHEN Z M, ZHANG K, FAN J Q, *et al*. *In situ* construction of ligand nano-network to integrin αvβ3 for angiogenesis inhibition[J]. Chin Chem Lett, 2020, 31(12): 3107-3112. DOI: 10.1016/j.cclet.2020.04.006.

[10] LI M M, ZHAO X R, DAI J F, *et al*. Peptide therapeutics and assemblies for cancer immunotherapy[J]. Sci China Mater, 2019, 62(11): 1759-1781. DOI: 10.1007/s40843-019-9451-7.

[11] GUAN T, LI J Y, CHEN C Y, *et al*. Self-assembling peptide-based hydrogels for wound tissue repair[J]. Adv Sci, 2022, 9(10): e2104165. DOI: 10.1002/advs.202104165.

[12] SUN W Z, GREGORY D A, ZHAO X B. Designed peptide amphiphiles as scaffolds for tissue engineering[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2023, 314: 102866. DOI: 10.1016/j.cis.2023.102866.

[13] HE H J, LIU S, WU D F, *et al*. Enzymatically formed peptide assemblies sequestrate proteins and relocate inhibitors to selectively kill cancer cells[J]. Angew Chem Int Ed, 2020, 59(38): 16445-16450. DOI: 10.1002/anie.202006290.

[14] ZENG X Z, AN H W, WANG H. Chemical reactions trigger peptide self-assembly *in vivo* for tumor therapy[J]. ChemMedChem, 2021, 16(16): 2452-2458. DOI: 10.1002/cmdc.202100254.

[15] WEI S D, CHEN F P, GENG Z, *et al*. Self-assembling RATEA16 peptide nanofiber designed for rapid hemostasis [J]. J Mater Chem B, 2020, 8(9): 1897-1905. DOI: 10.1039/c9tb02590a.

[16] SUBRAMANIAM S, KANDIAH K, CHEDGY F, *et al*. A novel self-assembling peptide for hemostasis during endoscopic submucosal dissection: a randomized controlled trial[J]. Endoscopy, 2021, 53(1): 27-35. DOI: 10.1055/a-1198-0558.

[17] HAO R R, PENG X T, ZHANG Y, *et al*. Rapid hemostasis resulting from the synergism of self-assembling short peptide and *O*-carboxymethyl chitosan [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(50): 55574-55583. DOI: 10.1021/acsami.0c15480.

[18] JIA Z G, WHITAKER S K, TOMICH J M, *et al*. Organization and structure of branched amphipathic oligopeptide bilayers[J]. Langmuir, 2016, 32(38): 9883-9891. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02421.

[19] BARROS S M, WHITAKER S K, SUKTHANKAR P, *et al*. A review of solute encapsulating nanoparticles used as delivery systems with emphasis on branched amphipathic peptide capsules[J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 596: 22-42. DOI: 10.1016/j.abb.2016.02.027.

[20] BARROS S M, AVILA L A, WHITAKER S K, *et al*. Branched amphipathic peptide capsules: different ratios of the two constituent peptides direct distinct bilayer structures, sizes, and DNA transfection efficiency [J]. Langmuir, 2017, 33(28): 7096-7104. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00912.

[21] ZHAO X, LUO J L, HUANG Y, *et al*. Injectable antiswelling and high-strength bioactive hydrogels with a wet adhesion and rapid gelling process to promote sutureless wound closure and scar-free repair of infectious wounds[J]. ACS Nano, 2023, 17(21): 22015-22034. DOI: 10.1021/acsnano.3c08625.

(收稿:2024-02-22;修回:2024-04-08)

(编辑 邓强庭)