

· 论著 ·

白及止血海绵止血作用的实验研究

王巍¹,程明和²,高静²,张晓洁³(1.解放军455医院,上海200052;2.第二军医大学药学院,上海200433;3.总后丰台综合仓库药材供应站,北京100071)

[摘要] 目的 探讨白及止血海绵的止血作用。方法 制备大鼠断尾出血模型,采用家兔建立肝脏、脾脏创伤出血模型以及 Beagle 犬肝脏、腹主动脉创伤出血模型,分别用空白对照、吸收性明胶海绵和白及止血海绵进行止血,通过观察止血时间、出血量、组织病理学变化等指标,评价白及止血海绵的止血效果和体内吸收情况。结果 大鼠断尾止血实验中,白及止血海绵组在夹闭1 min后可以有效止血。与空白对照组比较,白及止血海绵对大鼠断尾出血模型有显著的止血作用($P<0.01$)。在家兔肝脏、脾脏创伤止血实验中,与吸收性明胶海绵组比较,白及止血海绵能明显缩短家兔肝脏、脾脏创伤出血时间($P<0.05$),并明显减少脾脏出血量($P<0.05$)和肝脏出血量($P<0.01$)。与吸收性明胶海绵组比较,白及止血海绵组 Beagle 犬肝脏和腹主动脉创伤出血量明显减少($P<0.05$),对 Beagle 犬肝脏和腹主动脉创伤出血有显著止血作用。体内降解实验中观察到白及止血海绵可在体内降解吸收。组织病理学观察显示,经白及止血海绵止血后的肝脏、脾脏创面组织周围未见明显病理改变。结论 白及止血海绵具有较好的止血作用,止血效果明显优于吸收性明胶海绵,是一种较好的可吸收性止血材料。

[关键词] 白及;止血;明胶海绵;创伤

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)01-0032-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.009

Study on hemostasis of *Bletillastrata* hemostatic sponge

WANG Wei¹, CHENG Minghe², GAO Jing², ZHANG Xiaojie³ (1. No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Medical Material Supply Station of Fengtai Warehouse, General Logistics Department of the PLA, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the hemostatic effect of *Bletillastrata* hemostatic sponge. **Methods** Tail hemorrhage model in rats was preparation. Another model was established in liver and spleen hemorrhagic model of rabbits, Beagle dog's abdominal aorta and liver were made. Hemostasis was performed with medical gauze, gelatin sponge and *Bletillastrata* hemostatic sponge. The hemostatic effects were evaluated by total blood loss, hemostatic time and histological observation. Observation of *Bletillastrata* hemostatic sponge change was completed to determine their degradation in the bodies. **Results** Rats tail hemorrhage was clamped, after 1 min, *Bletillastrata* hemostatic sponge could effectively stop the bleeding. The *Bletillastrata* hemostatic sponge has good hemostatic effect of rats tail hemorrhage model compared to blank group ($P<0.01$). Compare with the gelatin sponge group, the *Bletillastrata* hemostatic sponge could significantly shorten the liver and spleen bleeding time ($P<0.05$), decrease the volume of the spleen bleeding ($P<0.05$) and the liver bleeding ($P<0.01$), in hemorrhagic model of rabbits. Compared with the gelatin sponge group, *Bletillastrata* hemostatic sponge could more effectively stop the bleeding in the abdominal aorta and liver model of Beagle dogs ($P<0.05$). The *Bletillastrata* hemostatic sponge could be degraded in vivo. Histologic study revealed the *Bletillastrata* hemostatic sponge was no significant pathological change around the liver and spleen. **Conclusion** The *Bletillastrata* hemostatic sponge has good hemostatic effect. The hemostatic effect of *Bletillastrata* hemostatic sponge is better than gelatin sponge, which could be a good topical hemostatic material.

[Key words] *Bletillastrata*; hemostasis; gelatin sponge; wound

目前临床上用于止血的材料较多,如沸石、凝血

酶制剂、纤维蛋白胶、止血绷带、壳聚糖类止血材料等,虽可以有效止血,但在生产或使用过程中有一定的局限性,如成本高、止血效率差、伤口易感染、易损伤组织、不可吸收等^[1-3]。因此,对于高效止血、抗菌、抗炎、促愈合、生物降解、可吸收等功能多样化的止血材料的研发,已成为当前止血领域的研究热点。

[基金项目] 南京军区“十一五”医药卫生科研基金(12MA020)

[作者简介] 王巍,硕士,副主任药师,研究方向:临床药学及药事管理.Tel:13917338721;E-mail:wysrsh@sina.com

[通讯作者] 张晓洁,本科,主管药师,研究方向:药事管理.Tel:13810350468;E-mail:zhangxiaojie1008@sina.cn

中药白及为兰科植物白及 [*Bletilla striata* (Thund.) Reichb. f.] 的干燥块茎,其药用价值较高,具有收敛止血、清热利湿、消肿生肌之效,临床上广泛用于治疗咳血吐血、外伤出血、皮肤破裂、溃疡病出血、肺结核咳血等病症^[4]。白及用药历史已久,其资源丰富,止血效果佳,无毒,使用安全性高;另外,分析其有效成分,白及可能具备抗炎、抑菌、促愈合等多种作用。因此,我们以中药白及为原药材,利用水提醇沉法提取白及甘露聚糖,采用冷冻真空干燥法制备白及止血海绵。通过大鼠断尾出血、家兔肝脏、脾脏创面出血以及 Beagle 犬肝脏、腹主动脉出血模型等实验,观察白及止血海绵的止血效果以及其在体内的降解吸收情况,以期作为一种功能多样化的新型止血材料白及止血海绵的开发及应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 CP225D 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);JD-2 型电子秒表(上海金雀表业有限公司)。

1.2 药物及试剂 白及止血海绵(第二军医大学药剂学教研室自制);吸收性明胶海绵(金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂,批号:140609);医用纱布[稳健实业(深圳)有限公司,批号:20130202];戊巴比妥钠(德国分装 RT,批号:WS20100520);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:T20120120)。

1.3 实验动物 SD 大鼠,雄性,体重 200~220 g,清洁级,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002]。新西兰兔,雄性,体重 2.0~2.5 kg,普通级,购于上海生旺实验动物养殖有限公司[实验动物许可证号:SCXK(沪)2012-0007]。Beagle 犬,雌雄各半,8~10 kg,购于上海甲干生物科技有限公司[实验动物许可证号:SCXK(沪)2010-0028]。饲养环境:动物实验前适应性饲养 1 周,在温度 22~25 ℃、相对湿度 40%~70% 的环境中饲养,光照时间随自然变化,供给常规颗粒饲料和灭菌蒸馏水,自由饮食。

2 方法

2.1 大鼠断尾止血效果观察 取健康 SD 大鼠 30 只,雄性,随机分 3 组,即白及止血海绵组、吸收性明胶海绵组、空白对照组(不给予医用纱布),每组 10 只。将 SD 大鼠用 0.3 g/kg 水合氯醛腹腔注射麻醉,在距大鼠尾部约 2 cm 处用手术刀片切断鼠尾,

建立大鼠断尾出血模型,然后立即给予各受试材料并用胶夹夹闭 1 min 后,观察各组的止血效果(如未止血继续夹闭 3 min,再观察出血情况)。

2.2 家兔肝脏、脾脏创面止血实验^[5] 取健康新西兰兔 30 只,雄性,随机分 3 组,即白及止血海绵组、吸收性明胶海绵组及空白对照(纱布)组,每组 10 只。耳缘静脉注射 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后,逐层横向开腹,游离肝脏,暴露肝脏左叶。采用局部钳夹的方法在肝左叶表面做 1 cm×1 cm×0.3 cm 出血创面,分别将相应受试材料置于创口,同时将精密称重的纱布盖在止血材料上,用 100 g 砝码在纱布上加压,按压 1 min 后每隔 30 s 观察 1 次出血情况,记录止血时间,计算出血量。出血量:止血材料按压前、后称重,按压出血部位过程中,创面出血被吸附,用止血后的重量减去止血前的重量,即代表出血量。同样的方法使用手术刀在脾脏上做长 1.5 cm、深 0.3 cm 的“一”字型切口创面,建立脾脏出血模型,分别给予受试材料止血,观察止血效果。创面止血后继续观察 30 min,将肝脏、脾脏放入腹腔。逐层缝合腹膜、肌肉、皮肤,在缝合伤口处洒青霉素钠防止感染,实验过程注意无菌操作。于手术后 72 h 取下肝脏、脾脏创面组织,用 10% 中性福尔马林溶液固定,石蜡包埋,组织切片,HE 染色观察创面组织病理变化。

2.3 体内降解实验^[6] 取健康新西兰兔 20 只,雄性,随机分 2 组,即白及止血海绵组和吸收性明胶海绵组,每组 10 只。实验方法同“2.2”项操作,创面止血后,将止血材料留在脏器内,然后关闭腹腔。常规饲养,分别于术后 4 周、8 周,每组各处死 5 只动物,观察体内降解吸收情况。

2.4 犬肝脏、腹主动脉创伤止血实验^[7,8] 取健康 Beagle 犬 18 条,雌雄各半,随机分 3 组,即白及止血海绵组、吸收性明胶海绵组、空白对照(纱布)组,每组 6 条。同家兔脾脏出血模型建立方法,用手术刀在 Beagle 犬肝脏上做长 2.0 cm、深 1.0 cm 的“一”字型切口创面,建立肝脏出血模型,分别给予受试材料止血,按压 4 min 后,观察止血效果,记录出血量。Beagle 犬用 30 mg/kg 戊巴比妥钠后肢静脉注射麻醉,仰位固定在手术台上,消毒,沿腹腔正中中线纵向逐层打开腹腔,充分暴露并游离腹主动脉,用动脉夹夹住近心端腹主动脉,另一端用线绳提拉住,在腹主动脉中间部位采用医用穿刺针(直径 0.8 mm)穿刺暴露的腹主动脉,建立腹主动脉出血模型,立即对出血创面覆盖止血材料并按压,然后松开动脉夹,开始计时。按压 2 min 后,观察各受试材料的止血效果;

计算出血量,其方法同家兔肝脏创面止血实验。

2.5 统计学处理 实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用SPSS17.0软件,计量资料采用单因素方差分析进行统计学处理,对非正态分布的计数资料采用 χ^2 检验。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 对大鼠断尾止血效果的影响 大鼠断尾止血实验中,空白对照组在夹闭1 min后均不能有效止血,继续夹闭3 min仍未止血;吸收性明胶海绵组1 min内止血有效率90.0%,在夹闭1 min后有1只大鼠未止血,其尾部伤口处有明显渗血,继续夹闭3 min可止血。白及止血海绵组在夹闭1 min后均有效止血。与空白对照组比较,白及止血海绵和吸收性明胶海绵对大鼠断尾出血模型有显著的止血作用($P<0.01$)。见表1。

表1 夹闭1 min时3组大鼠断尾止血效果的比较($n=10$)

组别	止血动物数(只)	止血有效率(%)
空白对照组	0	0.0
吸收性明胶海绵组	9	90.0**
白及止血海绵组	10	100.0**

** $P<0.01$,与空白对照组比较

3.2 对家兔肝脏、脾脏出血模型止血效果的影响 由表2结果可知,与空白对照纱布组比较,白及止血海绵组和吸收性明胶海绵组均能显著缩短家兔肝脏、脾脏的创伤出血时间($P<0.01$),并明显减少家兔肝脏、脾脏创伤的出血量($P<0.01$)。白及止血海绵组较吸收性明胶海绵组显著缩短肝脏、脾脏出血时间($P<0.05$),显著减少肝脏出血量($P<0.01$)和脾脏出血量($P<0.05$);白及止血海绵对家兔肝脏、脾脏创伤出血具有显著的止血作用,止血效果明

表2 对3组家兔肝脏、脾脏出血模型止血效果的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	肝脏		脾脏	
	止血时间(min)	出血量(g)	止血时间(min)	出血量(g)
空白对照纱布组	5.95±1.12	3.10±0.62	3.70±0.82	1.74±0.32
吸收性明胶海绵组	3.15±0.71**	1.53±0.41**	2.45±0.72**	0.53±0.14**
白及止血海绵组	2.40±0.46***#	0.96±0.21***#	1.65±0.47***#	0.28±0.06***#

** $P<0.01$,与空白对照纱布组比较;# $P<0.05$,## $P<0.01$,与吸收性明胶海绵组比较

显优于吸收性明胶海绵。

3.3 体内降解吸收情况 家兔肝脏、脾脏止血后4周,白及止血海绵组创面材料已经基本吸收,创面局部的止血覆盖物机化后已形成瘢痕组织,有大网膜组织与其粘连,未见肝脾肿大等异常。吸收性明胶海绵组创面材料部分被吸收,创面形成一层完整覆盖物,与周围组织有较轻粘连。8周后观察,两组均未见肝脾异常,两组创面局部形成纤维瘢痕,止血材料全部被吸收,但白及止血海绵组创面局部形成瘢痕组织的面积小于吸收性明胶海绵组。

3.4 对犬肝脏、腹主动脉创伤止血效果的影响 Beagle犬肝脏止血试验,伤口按压4 min后,空白对

照纱布不能有效止血;吸收性明胶海绵组1只未能止血,止血有效率为83.33%。;白及止血海绵可以有效止血,止血有效率为100.0%。与空白对照纱布组比较,白及止血海绵组对犬肝脏创伤出血量显著减少($P<0.01$)。在Beagle犬腹主动脉创伤止血试验中,空白对照纱布按压2 min后不能有效止血;吸收性明胶海绵组和白及止血海绵组按压2 min后均可以有效止血,止血有效率均为100.0%。与空白对照纱布组比较,白及止血海绵组对犬腹主动脉创伤出血量显著减少($P<0.01$)。白及止血海绵组Beagle犬肝脏和腹主动脉创伤出血量较吸收性明胶海绵组均明显减少($P<0.05$)。结果见表3。

表3 对3组犬肝脏、腹主动脉创伤止血效果的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	肝脏		腹主动脉	
	止血有效率(%)	出血量(g)	止血有效率(%)	出血量(g)
空白对照纱布组	0.0	9.64±1.21	0.0	2.30±0.39
吸收性明胶海绵组	83.33**	5.98±1.10**	100.0**	0.91±0.14**
白及止血海绵组	100.0**	4.49±1.00***#	100.0**	0.52±0.10***#

** $P<0.01$,与空白对照纱布组比较;# $P<0.05$,与吸收性明胶海绵组比较

3.5 肝脏、脾脏止血部位组织病理学观察 组织病理学观察显示如图1所示,空白对照纱布组(A),肝脏组织周围伴有轻度炎症改变;吸收性明胶海绵组(B),肝脏组织未见明显改变;白及止血海绵组(C),肝脏组织未见明显的出血、炎症反应、坏死等病理学改变;空白对照纱布组(D),脾脏组织可见慢性肉芽肿性炎症改变,周围伴有轻度的纤维化;吸收性明胶

海绵组(E),脾脏组织有轻度的充血,未见有明显的出血、坏死或结节状增生等病理学改变;白及止血海绵组(F),脾脏组织除轻度的充血外,未见有明显的出血、坏死或结节状增生等病理学改变。

4 讨论

现代化学研究表明,白及主要含有联苕类、二氢

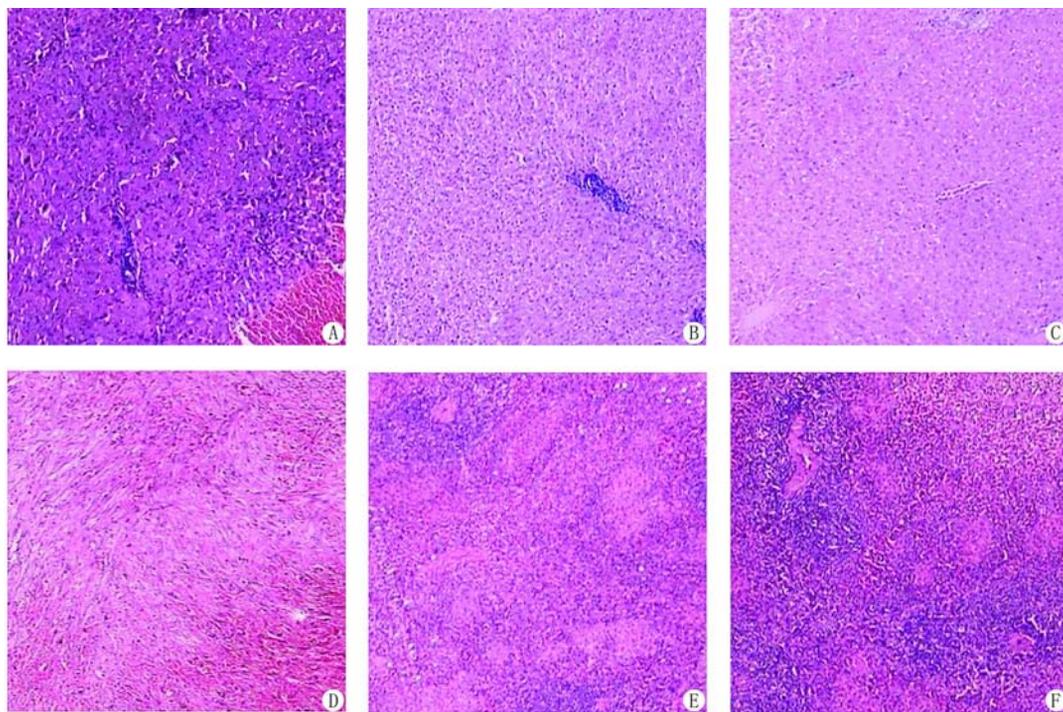


图1 肝脏、脾脏病理学观察(HE,×100)

菲类、联菲类及白及多糖等多种化合物。其中,白及多糖类成分为白及块茎经水提醇沉所得,是白及中主要的生物活性物质,对人体安全无毒,可生物降解,具有良好的生物相容性。白及多糖类成分具有止血作用,其作用机制可能是通过激活内源性和外源性途径的多种凝血因子、提高血液中纤维蛋白含量、促进血小板聚集、促进血小板释放血栓素和抑制血管内皮释放前列环素来实现的^[9]。有文献报道,白及止血作用机制为白及能够增强血小板第Ⅲ因子活性,缩短凝血酶生成时间,抑制纤维蛋白酶的活性,使细胞凝聚,形成人工血栓而止血^[10]。更有研究表明,白及胶(白及甘露聚糖)对金黄色葡萄球菌^[11]、绿脓杆菌和链球菌^[12]均有着较强的抑菌作用;白及胶因其黏性大,易在伤口创面局部形成保护膜,可控制和防止感染,有利于创面愈合;白及有促进角质形成细胞游走的作用,对治疗皮肤创伤早期愈合有重要作用^[13]。白及中含有的白及胶作为外源性重组人表皮生长因子载体,能显著促进创面表面细胞DNA的合成,提高细胞的增殖能力,缩短伤

口愈合时间,加速伤口愈合^[14]。

白及止血海绵具有一定柔韧性和强度,透气、生物相容性较好,其多孔性结构具有很强的吸水性,从而浓缩血液,并激活血小板,促进凝血块形成,起到快速止血的作用;多孔结构还有利于组织内外营养物质和氧的交换,促进创伤部位组织细胞的修复,恢复正常功能。综合以上白及主要成分药理作用研究,理论上白及止血海绵可以充分发挥高效止血、抗菌、促愈合、生物降解等作用。但由于白及化学成分复杂,药理活性多样,因此,对其抗菌消炎、促进伤口愈合、生物安全性等机制方面的研究还有待进一步论证及深入系统的研究。

【参考文献】

- [1] 王建,葛宝丰,刘兴炎,等.战伤止血方法及材料研究进展[J].人民军医,2008,51(1):5-6.
- [2] 丁美丽,杜智.可吸收止血材料的研究现状及临床应用[J].北京生物医学工程,2008,27(2):208-211.

为衍生化试剂可以在温和的水浴条件下与糖链进行定量反应;甘露糖衍生物在高效液相色谱检测中,灵敏度较高,重现性好。

由于甘露聚糖肽完全由不同链长的甘露聚糖肽分子构成,不存在单糖、双糖等小分子糖类,因此首先应水解甘露聚糖肽得到甘露糖。多糖的水解常采用盐酸、硫酸、三氟乙酸,经过试验并权衡各种溶剂的优缺点,本研究最终采用 3 mol/L 的盐酸溶液作为水解溶媒。

甘露聚糖肽的酸水解过程,为使其反应完全不受外界因素干扰,采用了棕色瓶真空封口的工艺,将反应溶液装入 10 ml 棕色瓶中,用真空泵抽真空,立即盖上瓶盖,然后用灌装机封口,摇匀,110 °C 水解 2 h,确保反应更加完全。

3.2 PMP 的残留物峰高于目标峰的处理 在前期的研究^[11]中,由于操作方法不完善,导致 PMP 的残留物峰高于目标峰,本研究进一步完善了 PMP 的萃取操作,在油/水两相分离时,使三氯甲烷萃取过量的 PMP 更为彻底,目标峰更为突出,从而使 HPLC 测定甘露聚糖肽的方法更加优化。

3.3 用分光光度法的不足 分光光度法使用了试剂苯酚和硫酸,二者均具有一定危险性,操作者应谨慎使用。苯酚常温下为固体,在试剂瓶中凝固成大块状,不方便称量;苯酚有腐蚀性,接触后会局部蛋白质变性,而且具有特殊臭味,闻之,可引起胸闷、恶心,吸入高浓度蒸气可致头痛、头晕。分光光度法的精密度相对较差,且没有色谱图,看不出目标峰的分离效果;本研究分光光度法测出的含量高于 HPLC 法,是因为 HPLC 法样品衍生化等前处理过

程相对烦琐,萃取上下层分离时,有一定的误差。但是权衡分析,认为 HPLC 法优于分光光度法。

【参考文献】

- [1] 陈立江,王菁,刘宇,等.南瓜多糖含量测定方法比较[J].辽宁大学学报,2014,41(1):76-81.
- [2] 钟方晓,任海华,李岩.多糖含量测定方法比较[J].时珍国医国药,2007,18(8):1916-1917.
- [3] 冯泽岸,巩慧敏,邵婷玑,等.南沙参中多糖含量测定方法的建立及比较[J].中国药师,2012,15(3):290-293.
- [4] 任磊,李慧勇,张清波,等.苯酚硫酸法定量测定桔梗流浸膏中多糖的研究[J].黑龙江医药,2014,27(2):227-230.
- [5] 方崇波,赵夏雨,吴巧凤.苯酚硫酸法测定猕猴桃多糖注射剂中多糖的含量[J].海峡药学,2010,22(10):64-66.
- [6] 刘立超,黄洪林,赖正权,等.苯酚硫酸法测定栀子水溶性多糖含量[J].安徽医药,2005,9(11):831-832.
- [7] 章乐建,泮玉华,赵颖飞.高效液相色谱法测定乐清栽培的铁皮石斛不同年份甘露糖的含量[J].海峡药学,2012,24(3):79-80.
- [8] 毛幼儿,周桂芬.基于柱前衍生化 HPLC 法分析铁皮石斛茎和叶多糖中甘露糖的含量[J].江西中医学院学报,2011,23(4):38-39.
- [9] Sato T, Katayama K, Arai T, et al. Simultaneous determination of serum mannose and glucose concentrations in dog serum using high performance liquid chromatography [J]. Res Vet Sci, 2008, 84(1):26-29.
- [10] 郝桂堂,陈尚卫,朱松,等.对氨基苯甲酸衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖及糖醛酸组成[J].色谱,2007,25(1):75-79.
- [11] 金伟华,陈华,张明,等.甘露聚糖肽滴鼻液的制备及其质量控制[J].中国药房,2014,25(9):828-830.

【收稿日期】 2014-12-12 【修回日期】 2015-04-14

【本文编辑】 顾文华

(上接第 35 页)

- [3] 王蕾,李武平,孙惠英,等.战伤急救止血技术新进展[J].解放军护理杂志,2007,24(12):45-46.
- [4] 陶阿丽,金耀东,刘金旗,等.中药白及化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].江苏农业科学,2013,41(11):6-9.
- [5] 王大太,郭树忠,张旭东,等.纤维蛋白胶于粉对兔肝创面的止血效果及应用剂量[J].中国康复理论与实践,2006,12(4):307-308.
- [6] 梁佩红,叶春婷,李思明,等.复合 I 型胶原海绵创伤止血的动物实验研究[J].创伤外科杂志,2002,4(5):274-275.
- [7] 毕宏达,李学拥,王玉,等.沸石对猪致命性血管损伤模型的止血作用[J].西北国防医学杂志,2006,27(3):164-166.
- [8] 朱元元,邱彦,鲁毅,等.血余炭止血包止血效果的实验研究[J].药学实践杂志,2011,29(6):431-434.
- [9] 董莉,董永喜,刘星星,等.白及多糖对大鼠血小板聚集、凝血功能及 TXB₂、6-keto-PGF_{1α}表达的影响[J].贵阳医学院学报,2014,39(4):459-462.

- [10] 林福林,杨昌云,杨薇薇,等.中药白及的现代研究概况[J].中国医院药学杂志,2013,33(7):571-573.
- [11] Michinori K, Noriko S, Miho Y, et al. Application studies of Rhizoma Bletillae (rhizomes of *Bletilla striata*) on atopidermatitis [J]. Nat Med, 2003, 57(2):55-60.
- [12] 陈玉,张晓芳,朱剑东.中药白及对变链菌产酸和黏附影响的实验研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2008,18(7):390-392.
- [13] 施伟民,高飞,沈亮亮,等.中药白及和地榆对角质形成细胞游走的不同影响[J].同济大学学报(医学版),2004,25(4):275-277.
- [14] 仇树林,王晓,李兵,等.白芨胶载重组人表皮生长因子对创面表皮细胞 DNA 含量及周期的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(1):63-66.

【收稿日期】 2015-02-12 【修回日期】 2015-06-02

【本文编辑】 顾文华