



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112007202 A

(43) 申请公布日 2020.12.01

(21) 申请号 202010804571.6

(22) 申请日 2020.08.12

(71) 申请人 山东百多安医疗器械股份有限公司

地址 251100 山东省德州市齐鲁高新技术  
开发区百多安工业园

(72) 发明人 张海军 袁坤山 车超越 张淑欣  
侯文博 尹玉霞 鲁守涛 段翠海

(51) Int. Cl.

A61L 15/42 (2006.01)

A61L 15/62 (2006.01)

A61L 15/44 (2006.01)

A61L 15/24 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

C08F 251/00 (2006.01)

C08F 220/06 (2006.01)

C08F 222/38 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

一种可粘附促愈合止血海绵及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种可粘附促愈合止血海绵及其制备方法。该止血海绵由多巴胺接枝氧化透明质酸钠、外泌体、丙烯酸、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺经中和后,加入氧化还原引发剂交联,程序冻干制得。本发明制备的止血海绵不但可快速吸收血液或组织液,形成凝胶,对腔体表面损伤血管形成机械压迫,促进止血,而且可粘附腔体表面,在进一步促进止血的同时,防止位移。本发明所述止血海绵吸收血液或组织液后,可形成动态键,具有一定的自修复功能。本发明还可在高效止血的同时,不断释放特定分子量的透明质酸钠和外泌体,促进伤口愈合。故本止血海绵具有快速高效止血、可粘附、自修复和促愈合的功效。

1. 一种可粘附促愈合止血海绵,其特征在于,由重量百分比为1.5-3.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠、0.5-1.0%外泌体、15-25%的丙烯酸和0.01-0.02%的N, N'-亚甲基双丙烯酰胺,经碱性中和剂中和后,加入氧化还原引发剂,引发交联,再经程序冻干、灭菌制得;所述氧化还原引发剂为过硫酸铵和亚硫酸氢钠的组合物,其重量占丙烯酸重量的4%,其中,过硫酸铵与亚硫酸氢钠的重量百分比为10-12:5。

2. 根据权利要求1所述的一种可粘附促愈合止血海绵,其特征在于,所述碱性中和剂为氢氧化钠、磷酸氢二钠、碳酸氢钠、碳酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的一种可粘附促愈合止血海绵,其特征在于,所述多巴胺接枝氧化透明质酸钠的分子量为8-80KDa,氧化度为40%-60%,多巴胺接枝率为5%-10%。

4. 根据权利要求1所述的一种可粘附促愈合止血海绵,其特征在于,所述外泌体为脂肪间充质干细胞、胎盘间充质干细胞、骨髓间充质干细胞中的一种或几种间充质干细胞分泌的外泌体。

5. 根据权利要求1所述的一种可粘附促愈合止血海绵,其特征在于包括以下步骤:

(1) 交联反应:将多巴胺接枝氧化透明质酸钠、外泌体、丙烯酸、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加碱性中和剂至溶液为中性,加入过硫酸铵、亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品;

(2) 将步骤(1)中得到的凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h,得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品;

(3) 冻干:将步骤(2)中透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中,经预冻和程序升华干燥后得到可粘附促愈合止血海绵,将海绵置入铝塑袋中,经15-25K电子束灭菌后,置于-20℃保存备用。

6. 根据权利要求5所述的一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述碱性中和剂浓度为5-15mol/L。

7. 根据权利要求5所述的一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述中性为pH值在6.5-7.5之间。

8. 根据权利要求5所述的一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述透析24h为每8h更换一次纯化水,透析3次。

9. 根据权利要求5所述的一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法,其特征在于,步骤(3)中所述预冻和程序冻干的方法为:-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束。

## 一种可粘附促愈合止血海绵及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医用材料技术领域,涉及一种可粘附促愈合止血海绵及其制备方法。本申请的医用止血海绵具有可膨胀快速止血的同时,起到可粘附、防止位移、自修复、促愈合的功效。

### 背景技术

[0002] 在突发性事故的急救、手术以及在战争中,50%的死亡是因大量出血导致。一些传统的止血材料,例如止血纱布、止血绷带、止血棉纱等,他们的止血能力有限,止血效果并不十分理想。因此,开发出高效而且快速可吸收的止血材料及产品,在出血发生后的1-2分钟,甚至更短的时间内,有效地快速止血,这成为止血材料研发的主要目标之一。止血海绵是一种用于在进行外科手术时对伤口进行止血的材料,当将止血海绵贴敷到血管破损处时,其中亲水性高分子材料会与血小板发生粘着和凝聚作用,然后形成血小板血栓,继而凝成纤维蛋白栓塞来堵住血管破损处,从而达到止血作用。

[0003] 目前,常见的止血海绵有明胶类、透明质酸盐类、壳聚糖类、氧化纤维素类、淀粉类等。其中,明胶类和壳聚糖类止血海绵,具有较好的止血功效。但是,这类产品具有潜在的病毒源性。以纤维素类、透明质酸盐类等为主要成分的止血海绵产品,它们不具备生物活性,而是通过吸收血液中的水分来浓缩血液中有有效成分,或封堵出血创面,达到快速止血的目的。通常这类原料具有良好的生物相容性,并且其制备成本低廉,制备工艺简便。然而,针对一些不可控的大出血,由于其易位移、强度低、膨胀率低、促愈合效果差的缺点,存在止血效果差、无法快速促进伤口愈合的问题。

[0004] 例如在申请号为201010246259.6的发明专利中公开了一种医用的可体内降解的透明质酸海绵及其制备方法,采用高分子量透明质酸或者其钠盐、铁盐、钙盐、锌盐等衍生物,先配制成水凝胶,再经低温冷冻干燥制成透明质酸海绵,具有止血、防粘连功能,且可体内降解,其降解周期可以通过调整分子量、凝胶的浓度、投入的凝胶量控制透明质酸海绵的厚度,做到降解周期与人体组织的愈合周期一致,保证伤口愈合前体内组织不发生粘连。此发明的原料易得,成品成分单一,不需要经过复杂的交联过程,无毒副作用、无刺激,生物相容性非常好,工艺简单,生产成本低,能满足工业生产要求。但此专利所述透明质酸海绵溶胀后强度低、且不易粘合组织,也不能促进伤口愈合,故存在止血效果较差和无法促进伤口愈合的问题。

[0005] 申请号为201580033218.X的发明专利中,提供了一种用于密封穿过组织的穿孔的密封件。该密封件包括细长的第一部段和第二部段,细长的第一部段包括近端部、远端部和大小适合于递送到穿过组织的穿孔内的横截面,第二部段从第一部段的远端部延伸。第一部段可由当暴露于穿孔内的生理流体时膨胀的冷冻干燥的水凝胶形成。第一部段包括壳聚糖和至少一种额外的聚合物。第二部段可由非冷冻干燥的非交联水凝胶前体的固态实体形成。前体处于不反应状态直到暴露于水性生理环境,由此前体经受彼此原位交联以提供键合到第一部段的粘合层。第二部段可还包括壳聚糖。该密封件也提供了用于将密封件递送

到穿过组织的穿孔内的设备和方法。但该密封件第二段中非冷冻干燥的非交联水凝胶前体的固态实体遇到血液或者组织液后易失活,与组织发生粘合作用较弱。该密封件第一段溶胀率低,膨胀后,机械强度差,起到的栓塞作用有限。且该密封件不能起到促进伤口愈合的作用。

[0006] 综上所述,临床上急需一种生物相容性好、不易位移、强度高、膨胀率高、可自修复、具有促进伤口愈合功能的止血海绵。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种生物相容性好、不易位移、强度高、膨胀率高、可自修复、具有促进伤口愈合功能的止血海绵。

[0008] 本发明是通过下述技术方案实现的。

[0009] 一种可粘附促愈合止血海绵,所述止血海绵由重量百分比为1.5-3.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠、0.5-1.0%外泌体、15-25%的丙烯酸和0.01-0.02%的N, N'-亚甲基双丙烯酰胺,经碱性中和剂中和后,加入氧化还原引发剂,引发交联,再经程序冻干、灭菌制得。

[0010] 所述氧化还原引发剂为过硫酸铵和亚硫酸氢钠的组合物,其重量占丙烯酸重量的4%,其中,过硫酸铵与亚硫酸氢钠的重量百分比为10-12:5。

[0011] 所述碱性中和剂为氢氧化钠、磷酸氢二钠、碳酸氢钠、碳酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠中的一种或多种。

[0012] 优选的,所述碱性中和剂为氢氧化钠。

[0013] 所述多巴胺接枝氧化透明质酸钠的分子量为8-80KDa,氧化度为40%-60%,多巴胺接枝率为5%-10%。

[0014] 所述外泌体为脂肪间充质干细胞、胎盘间充质干细胞、骨髓间充质干细胞中的一种或几种间充质干细胞分泌的外泌体。

[0015] 本发明还提供了一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法包括以下步骤:

(1)交联反应:将多巴胺接枝氧化透明质酸钠、外泌体、丙烯酸、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加碱性中和剂至溶液为中性,加入过硫酸铵、亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。

[0016] (2)将步骤(1)中得到的凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h,得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。

[0017] (3)冻干:将步骤(2)中透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中,经预冻和程序升华干燥后得到可粘附促愈合止血海绵,将海绵置入铝塑袋中,经15-25K电子束灭菌后,置于-20℃保存备用。

[0018] 所述的一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法步骤(1)中所述碱性中和剂浓度为5-15mol/L。

[0019] 所述的一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法步骤(1)中所述中性为pH值在6.5-7.5之间。

[0020] 所述的一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法步骤(2)中所述透析24h为每8h更换一次纯化水,透析3次。

[0021] 所述的一种可粘附促愈合止血海绵的制备方法步骤(3)中所述预冻和程序冻干的方法为:-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束。

[0022] 本发明所使用的组分均可以是商购产品,其结构和组成也是本领域技术人员所知晓的。

[0023] 本发明提供的技术方案带来的有益效果是:

1. 本发明多巴胺接枝氧化透明质酸钠含有醛基,可与外泌体、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺中的氨基发生反应,而N, N'-亚甲基双丙烯酰胺和丙烯酸,在氧化还原剂的催化下,可发生自由基交联反应。以上多维度和高混度的交联方式,保证了止血海绵溶胀后的强度。

[0024] 2. 本发明止血海绵中含有多余的醛基和邻苯二酚基团,可保证止血海绵溶胀后与组织发生紧密粘合,其中邻苯二酚基团可减少血液对粘合的影响,从而防止止血海绵产生位移,影响止血效果。

[0025] 3. 本发明止血海绵溶胀后含有醛基和氨基结合的动态键,在发生机械损伤或破裂时,可自行发生愈合,对伤口起到长期保护的作用。

[0026] 4. 本发明止血海绵网络中交联有特定分子量的透明质酸钠和外泌体,通过可降解交联的方式将特定分子量的透明质酸钠和外泌体交联到止血海绵中,不但可以保证其不被失活,而且随着止血海绵的缓慢降解,特定分子量的透明质酸钠和外泌体会在交联网络中缓慢脱落,从而对伤口起到长期高效促进愈合的作用。

[0027] 5. 本发明中含有氨基、酰胺基和中和后的羧基,对组织液或血液具有良好的亲和作用,有利于止血海绵快速溶胀,增加止血海绵溶胀率,从而对腔道型伤口起到压迫止血的作用。

## 附图说明

[0028] 附图1是实施例1所述止血海绵降解曲线图。

[0029] 附图2是止血海绵止血机理图。

## 具体实施方式

[0030] 以下结合实施例和比较例对本发明的技术方案作进一步的详细说明。但本发明不受这些具体实施例的限制。实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。本发明中对止血海绵的检测采用以下检测方法:

### (1) 表面粘附力测试

将大鼠背部皮肤切开一个1cm×1cm的创面,然后将试验材料贴附于创面区域,按压10min后,从材料侧面进行剥离,测定拉力值,即为创面表面粘附力强度,每个样品测试6次取平均值。

### [0031] (2) 压缩模量试验

压缩模量采用微机电子万能试验机,运行速度5mm/min,完全溶胀后的海绵试样直径10mm、高5mm,重复5次取平均值。

### [0032] (3) 体积溶胀率试验

体积的测试方法选用排液法,将止血海绵材料置于装有一定体积液体的量筒中,读取

液面升高数值,分别测得止血海绵材料吸水溶胀前的体积 $V_0$ 及充分吸水溶胀后的体积 $V_1$ 。体积溶胀率计算方法为:饱和溶胀后的体积 $V_1$ 与初始体积 $V_0$ 的差值占初始体积 $V_0$ 的百分比,每个样品测试6次取平均值。

[0033] (4)吸水倍率试验

将0.025g止血海绵置于2ml水中进行静置10min,然后在500rpm转速下进行离心10分钟后取出,称重计算残液量,每个样品测试6次取平均值。

[0034] (5)自修复试验

将溶胀后的止血海绵切成两段后,将切割面相互接触1h,测定自修复后产品的断裂力及未切割产品的断裂力,自修复后产品的断裂力比未切割产品的断裂力即为自修复率,每个样品测试6次取平均值。

[0035] (6)体外细胞毒性试验

按照医疗器械生物学评价第5部分:细胞毒性试验GB/T16886.5-2017进行。

[0036] (7)皮肤刺激和致敏试验

按照医疗器械生物学评价第10部分:刺激与迟发型超敏反应试验GB/T16886.10-2017进行。

[0037] 实施例1将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、20%丙烯酸、0.015%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0038] 实施例2将质量分数为3.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为40%、多巴胺接枝率为5%、分子量为8-10KDa)、0.5%外泌体、15%丙烯酸、0.01%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加磷酸氢二钠溶液至中性,加入0.4%过硫酸铵、0.2%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0039] 实施例3将质量分数为1.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为60%、多巴胺接枝率为10%、分子量为60-80KDa)、1.0%外泌体、25%丙烯酸、0.02%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加碳酸氢钠溶液至中性,加入0.7%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的

凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0040] 实施例4将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为60%、多巴胺接枝率为10%、分子量为37-56KDa)、1.0%外泌体、25%丙烯酸、0.02%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加碳酸钠溶液至中性,加入0.7%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经15K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0041] 实施例5将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为40%、多巴胺接枝率为5%、分子量为37-56KDa)、0.5%外泌体、15%丙烯酸、0.01%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加柠檬酸钠溶液至中性,加入0.4%过硫酸铵、0.2%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经25K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0042] 实施例6将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为60%、多巴胺接枝率为5%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、20%丙烯酸、0.015%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加乙酸钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0043] 实施例7将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为40%、多巴胺接枝率为10%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、20%丙烯酸、0.01%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0044] 实施例8将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、1.0%外泌体、25%丙烯酸、0.02%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.7%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0045] 实施例9将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、0.5%外泌体、15%丙烯酸、0.01%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.4%过硫酸铵、0.2%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0046] 比较例1将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、20%丙烯酸、0.015%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0047] 比较例2将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、1.5%外泌体、20%丙烯酸、0.015%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0048] 比较例3将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、0.015%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸

铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0049] 比较例4将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、30%丙烯酸、0.03%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0050] 比较例5将质量分数为2.5%的氧化透明质酸钠(氧化度为50%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、20%丙烯酸、0.015%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0051] 比较例6将质量分数为2.5%的多巴胺接枝透明质酸钠(多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、20%丙烯酸、0.04%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0052] 比较例7将质量分数为2.5%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、20%丙烯酸、0.015%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完

成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻4小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每10℃为一个阶段升温,升温时间2小时,恒温时间3小时,直到升温至30℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附自修复止血海绵。

[0053] 实施例8将质量分数为5.0%的多巴胺接枝氧化透明质酸钠(氧化度为50%、多巴胺接枝率为7.5%、分子量为37-56KDa)、0.75%外泌体、20%丙烯酸、0.015%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺加入到纯化水中,在100-200rpm下搅拌至完全溶解,滴加氢氧化钠溶液至中性,加入0.6%过硫酸铵、0.3%亚硫酸氢钠,100-200rpm下搅拌均匀,在氮气保护下60℃反应1.5h,得凝胶状产品。将凝胶产品,置于其自身溶胀后重量的10倍纯化水中,在50-100rpm搅拌下,进行透析24h(8h更换1次纯化水,共透析3次),得去除氧化还原引发剂的凝胶状产品。透析完成的凝胶状产品置于模具中,置入冻干机中-50℃预冻6小时,结束后抽真空,真空度应小于15pa;此后,每5℃为一个阶段升温,升温时间1小时,恒温时间2小时,直到升温至5℃结束,将海绵置入铝塑袋中,经20K电子束灭菌后,得到可粘附促愈合止血海绵。

[0054] 分别按照表面粘附力测试方法、压缩模量试验方法、体积溶胀率试验方法、吸水倍率试验方法、自修复试验方法、体外细胞毒性试验方法、皮肤刺激和致敏试验方法对止血海绵的理化性能和生物学进行了检测,结果如表1和表2所示

表1 一种可粘附促愈合止血海绵实施例的检测结果

止血海绵检测结果	实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	实施 例 4	实施 例 5	实施 例 6	实施 例 7	实施 例 8	实施 例 9
表面粘附力(N)	3.8	4.1	3.5	4.3	3.2	3.3	4.0	3.9	3.7
压缩模量(KPa)	115	121	103	126	101	122	107	118	110
体积溶胀率(倍)	5.4	5.1	5.8	4.6	4.7	5.2	5.6	5.2	4.4
吸水倍率(倍)	68	62	72	57	59	65	70	66	55
自修复试验结果(%)	78	81	72	84	70	83	72	79	77
细胞毒性(级)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
有无刺激致敏反应	无	无	无	无	无	无	无	无	无

表2 一种可粘附促愈合止血海绵比较例的检测结果

止血海绵检测结果	比较 例 1	比较 例 2	比较 例 3	比较 例 4	比较 例 5	比较 例 6	比较 例 7	比较 例 8
表面粘附力(N)	3.4	3.9	3.2	3.6	1.2	3.2	3.5	3.4
压缩模量(KPa)	88	121	54	118	107	58	112	125
体积溶胀率(倍)	5.8	3.8	2.3	3.6	4.9	6.1	4.8	3.2
吸水倍率(倍)	72	47	21	44	60	76	60	39
自修复试验结果(%)	75	68	26	79	73	0	72	71
细胞毒性(级)	1	1	1	1	1	1	1	1
有无刺激致敏反应	无	无	无	无	无	无	无	无

通过表1中实施例1-7和表2中比较例5-6可知,止血海绵的表面粘附力与海绵中的多巴

胺接枝率、氧化度、外泌体含量有关,多巴胺接枝率、氧化度、外泌体含量越高,止血海绵的粘附力越强。

[0055] 通过表1中实施例1-9和表2中比较例1-6可知,止血海绵的压缩模量、体积溶胀率、吸水倍率与海绵中的交联密度有关,当海绵中多巴胺含量、氧化度、引发剂含量及外泌体含量越高时,海绵的交联密度越高,这海绵的压缩模量越大、体积溶胀率和吸水倍率越低。另外,通过表1中实施例1和表2中比较例8可知,海绵压缩模量、体积溶胀率和吸水倍率与海绵冻干工艺有关,使海绵压缩模量较大的同时,保证海绵的吸水倍率和体积溶胀率需要特定程序的冻干。

[0056] 通过表1中实施例1-8和表2中比较例1-6可知,止血海绵的自修复试验结果与海绵中多巴胺接枝率、醛基含量、氨基含量有关,多巴胺接枝率、醛基含量、氨基含量越高,止血海绵自修复率越高。

[0057] 通过表1实施例1-9可知,止血海绵的生物相容性较好,止血海绵的细胞毒性试验、皮肤刺激和致敏试验均符合医用止血海绵的生物相容性要求。

[0058] 取实施例1所述样品,按以下试验方案,做了体外降解试验,结果如附图1所示,止血海绵可在28天内完全降解。

[0059] 体外降解时间的检测:

1. 待测样品的制备:将样品切成1cm\*1cm\*1cm的正方体海绵备用。

[0060] 2. 配制pH值为7.4的PBS缓冲溶液。

[0061] 3. 体外降解时间的检测:将1制备好的样品放入装有PBS缓冲溶液的密闭容器中,并转移到 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养箱内,每隔24h称量一次重量,观察样品在缓冲液中的变化情况,直至肉眼看不见为止,即为样品体外降解时间。

[0062] 止血试验:

取实施例1所述样品(试验组)和比较例1所述样品(对照组1)做了相关止血性试验,结构如表1所示。

[0063] (1) 股动脉止血试验

以SD大鼠的股动脉损伤出血为模型,麻醉后剃掉腿部毛,露出腹股沟与后肢,横切大腿皮肤和肌肉,露出动脉,手术针刺穿动脉制造大出血。将0.5g样品立即覆盖在伤口处,并用纱布按压操作,每隔5s抬起纱布观察,直到止血结束。统计止血时间和出血量。

[0064] (2) 肝创伤止血试验

以SD大鼠的肝脏损伤出血为模型,通过水合氯醛水溶液腹腔注射麻醉及腹毛而剃掉,在腹部被打开,露出肝脏。用手术刀开一个长度1cm,深度1cm的伤口。用0.1g材料直接洒在出血肝脏的顶部,盖上纱布垫,同时实施常规的按压操作。每隔5s抬起纱布,观察出血情况直到止血,统计出血时间和出血量。

[0065] 伤口愈合试验

取实施例1所述样品(试验组)、比较例1所述样品(对照组1)和比较例7所述样品(对照组2),按以下皮肤伤口修复方案,做了相关动物试验,结果如表3所示。

[0066] 小鼠皮肤伤口模型的建立:

小鼠经乙醚麻醉,背部剪毛,用剃毛刀将背侧毛剃干净,70%乙醇清洗皮肤消毒。在脊柱左右两侧相同位置各做一个稍大于直径1cm的圆形记号,无菌条件下用直径1cm的皮肤活检

打孔器在圆形记号内制造一个全层皮肤伤口。造模后伤口暴露,单笼饲养。将致伤当天记为第0天。

[0067] 试验动物分组

54只SPF级18-22g雄性昆明种小白鼠,适应性喂养1周后,随机分为3组,每组18只,包括对照组1、对照组2和试验组。试验组采用实施例1中的配方,对小鼠皮肤伤口进行治疗;对照组1采用比较例1所述样品,对照组2采用比较例7所述样品对小鼠皮肤伤口进行治疗。在24天内观察伤口愈合情况。

[0068] 小鼠皮肤伤口愈合率的测定

致伤后每两天给小鼠伤口拍照,采用Image-Pro Plus Version 6 .0 图像分析软件计算小鼠的伤口面积,直至伤口愈合。

[0069] 愈合率=(原始伤口面积-未愈合伤口面积)/原始伤口面积×100%

伤口愈合(创面完全上皮化)标准:愈合面积大于原始伤口面积的95%或者伤口面积小于原始伤口面积的5%即为完全愈合。

表3 一种可粘附促愈合止血海绵止血试验结果

天数	分组	
	对照组	试验组
肝脏止血时间 (s)	10.35±0.48	5.68±0.43
肝脏出血量 (g)	0.0352±0.0145	0.0161±0.0048
股动脉止血时间 (s)	16.54±2.31	12.43±2.24
股动脉出血量 (g)	0.0472±0.0154	0.0191±0.0071

[0070] 由表3可知,在用可粘附促愈合止血海绵进行的肝脏止血和股动脉止血试验效果明显好于对照组,其肝脏止血时间较对照组下降45%,肝脏出血量下降54%,股动脉止血时间较对照组下降25%,股动脉出血量下降60%。可见,高表面粘附力、高压缩模量、高体积溶胀率、高吸水倍率可有效提升止血效果。

表 4 一种可粘附促愈合止血海绵对小鼠皮肤伤口愈合率的影响

天数	伤口愈合率		
	对照组 1	对照组 2	试验组
2	8.43±0.73	9.61±0.82	9.48±0.93
4	12.65±1.68	15.85±1.93	21.24±1.03
6	19.55±2.28	22.45±2.17	32.23±2.35
8	31.28±3.63	33.14±3.96	58.73±4.25
10	67.62±2.37	75.42±2.21	93.72±2.33
12	74.17±2.15	80.83±2.91	97.17±1.08
14	78.51±2.94	84.15±2.31	/
16	82.36±3.62	88.64±3.26	/
18	85.35±3.12	91.45±3.13	/
20	90.56±1.58	93.54±1.24	/
22	93.34±1.23	95.13±1.68	/
24	95.28±1.48	/	/

[0071] 由表4可知,在用可粘附促愈合止血海绵进行的对小鼠皮肤伤口愈合试验效果明显好于对照组,试验组在12天便可促进伤口愈合,而对照组促进伤口愈合的时间为24天和22天。可见,在止血海绵中通过共价结合外泌体,并经过特定的冻干工序后的可粘附促愈合止血海绵具有良好的促愈合功能。

[0072] 以上公开的仅为本发明的几个具体实施例,但是,本发明并非局限于此,任何本领域的技术人员能思之的变化都应落入本发明的保护范围。

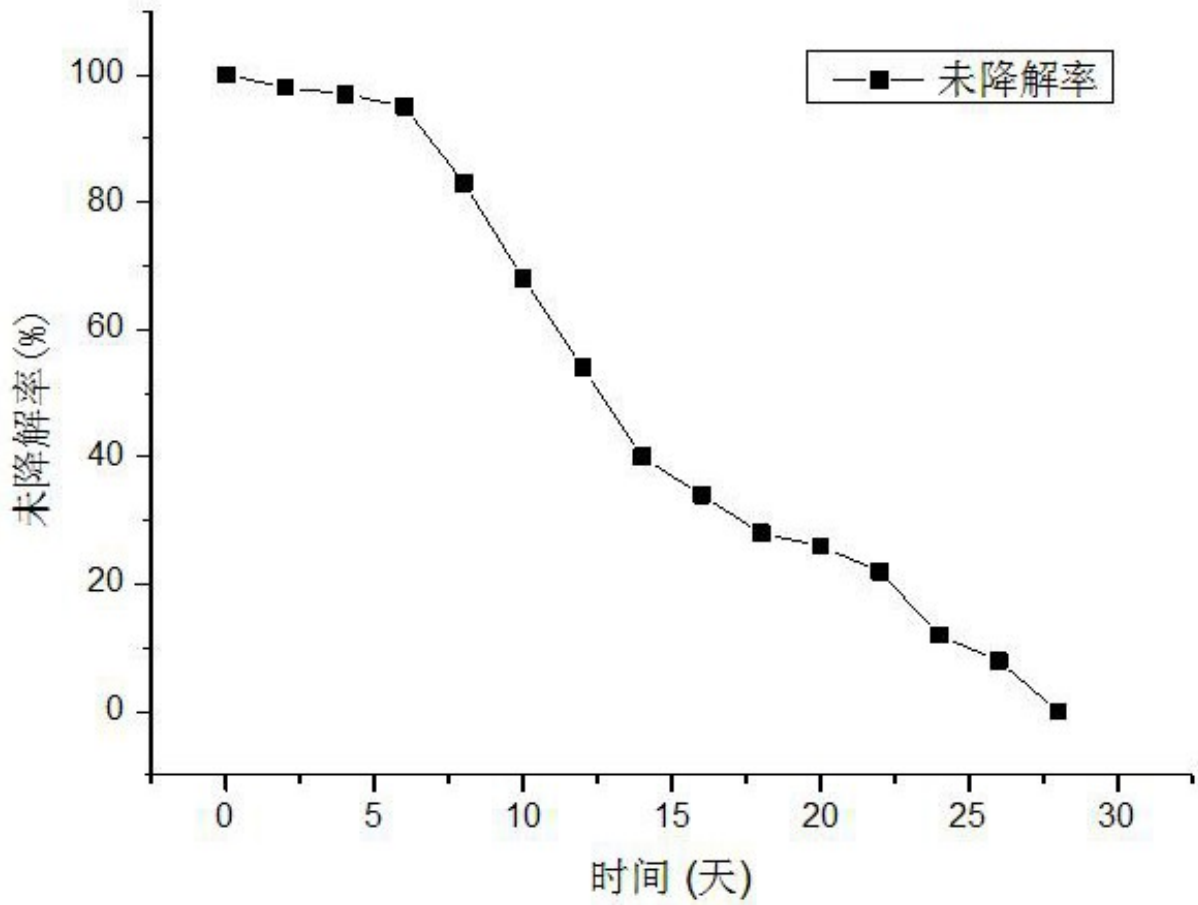


图1

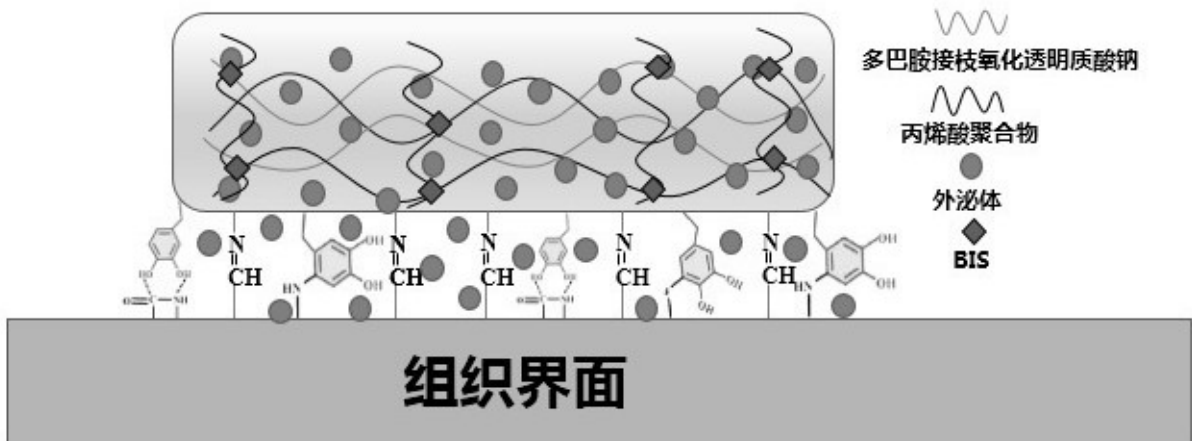


图2