

• 基础实验研究论著 •

# 明胶白眉蛇毒凝血酶颗粒在严重肝、脾外伤猪模型上的止血作用

罗 麒<sup>1,2</sup>, 田 君<sup>1,2△</sup>

(1. 重庆市第六人民医院, 重庆 400060; 2. 西南医院创伤急救部, 重庆 400038)

**摘 要:**目的 评估严重肝、脾外伤导致出血性休克和凝血功能障碍下使用明胶白眉蛇毒凝血酶颗粒(FloSeal)的止血效果。方法 研究对象是 10 只穿透性肝和脾破裂的猪,在接受麻醉及全身性肝素化后出现出血性休克。开腹止血时使用 FloSeal 对破裂的肝脏和脾脏进行止血。定量检测失血量,止血效果,以及 48 h 的存活率,检测心、肺参数,活化凝血时间以及血浆纤维蛋白原水平变化。在术后 1 h 和 48 h 进行评估,检测术后出血及破裂组织的形态变化。结果 使用 FloSeal 能使所有猪成功止血。FloSeal 的平均用量为(14.0±2.5)mL。48 h 后组织学表现提示血块整合到组织周围,同时不会引起不良反应。结论 在出血性休克,回输条件和凝血功能障碍时使用 FloSeal 是一种有效治疗严重穿透性肝和脾破裂大出血的方法。

**关键词:**明胶白眉蛇毒凝血酶颗粒; 出血; 止血; 休克

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)24-3297-02

## Application of tissue adhesive in the liver and spleen rupture pig

Luo Qi<sup>1,2</sup>, Tian Jun<sup>1,2△</sup>

(1. Department of Emergency, the Sixth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400060, China;

2. Trauma Emergency Department of Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

**Abstract:**Objective To test the hemostatic efficacy of gelatin thrombin granules(FloSeal) in a standardized severe traumatic liver and spleen rupture model in swine(representing a grade IV-V rupture) during severe hemorrhagic shock and coagulation disorder. **Methods** Standardized combined penetrating liver and spleen rupture was inflicted in 10 anesthetized swine. Hemorrhagic shock was induced after heparinization. Gelatin thrombin granules were used to treat both the ruptured liver and the ruptured spleen. Blood loss, hemostasis, and 48 h survival rate were quantified. Cardiorespiratory parameters, activated clotting time, and plasma fibrinogen level were monitored. After 1 h and 48 h a second look evaluation was performed to detect any postoperative hemorrhage. **Results** Ruptures were then examined macroscopically and histologically. Results: Hemostasis was achieved with FloSeal in all swine. The mean amount of FloSeal used was(14.0±2.5)mL. Macroscopic and histologic findings after 48 h showed excellent clot integration into the surrounding tissue without any adverse effects. **Conclusion** Gelatin thrombin granules(FloSeal) are effective in treating severe penetrating rupture of the liver and spleen even during hemorrhagic shock, retransfusion conditions, and coagulation disorder.

**Key words:**FloSeal; hemorrhage; hemostasis; shock

腹部闭合性损伤中,肝、脾破裂引起的大出血通常需要紧急手术<sup>[1]</sup>。但由于肝、脾组织较为脆弱,常合并有实质脏器断面特别细小的动脉、静脉出血,这种出血很难通过缝合控制,对外科手术止血要求很高。特别是在严重的IV~V级肝、脾损伤中<sup>[2]</sup>,手术治疗效果不佳,再出血率高。明胶白眉蛇毒凝血酶颗粒(商品名 FloSeal)是一种能把细小血管粘接起来兼具止血、组织封闭、促进愈合之功效的生物胶,同时能避免缝合术的一些副作用。但目前在临床中报导甚少<sup>[3]</sup>。因此,为了提高紧急情况下手术止血的效果,本研究观察了 FloSeal 对于严重肝外伤和脾破裂猪模型在出血性休克和凝血功能障碍并存时的止血效果,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 10 头雄性家猪,体质量 25.3~28.4 kg,试验方案得到北京市试验动物委员会的批准,并按中国卫生学会的实验动物护理和使用指南的要求进行试验(Publication NIH 86-23, Revised 1985)。

**1.2 止血材料** FloSeal 是一种局部止血敷料(批号 Xkv-28,中黏度,美国强生公司)包含分子交联的牛明胶颗粒和白眉蛇毒凝血酶。明胶基质组分是一种消毒的无热原胶颗粒大小为 500~600 nm,在使用前将其与凝血酶在特殊的点样器中混合。

**1.3 模型建立过程** 麻醉时首先肌肉注射阿扎哌隆(280 mg, Stresnil, Janssen-Cilag, 澳大利亚),苯甲二氮卓 10 mg (Gewacalm, Nycomed, 澳大利亚),以及盐酸氯胺酮(10 mg/kg Ketavet, Pharmacia & Upjohn, 德国)。然后静脉内注射硫贲妥钠进行全身麻醉(2.5% thiopental, Biochemie, 澳大利亚)。手术过程中,通过持续注射咪达唑仑(22 mg/h; Nycomed, Austria),舒芬太尼(80 mg/h, Nycomed),以及盐酸胺碘酮(15 mg/h Alloferin, ICN Pharmaceuticals, Austria)来维持麻醉状态。在麻醉 15 min 进入稳定期后,进行腹部剖腹手术。使用 4 cm×4 cm X 形的铝棒对左肝内叶及脾脏前端中央制造的穿孔性裂伤,产生 IV~V 级肝、脾损伤(美洲创伤手术学会的器官委员会标准)<sup>[2]</sup>。为了诱导出出血性休克,按 18 mL/kg 的标准抽血(487±26)mL,对应于失血量约为循环血量的 30% (按总体质量的 6% 计算)。一旦 MAP 降到 50 mm Hg 以下,静脉注射 36 mL/kg LR 溶液(乳酸林格氏液)和 12 mL/kg HES(Volugen)进行复苏。

**1.4 止血过程** 首先处理肝破裂,充分暴露内脏受损部位,使用湿纱布擦净腹腔内及破裂内脏表面,仔细观察出血点,然后使用厂商提供的配备标准敷贴头的注射器(长 6.4 cm)将 FloSeal 直接涂在可见的出血血管破裂断端,从最深处开始直

到肝脏缺口完全被颗粒填充为止,最后将止血海绵放到破裂的膈面,轻微按压 2 min。在肝脏止血后用相同的方法处理脾脏。在按压 2 min 后,使用多余的 FloSeal 处理其余的出血点。重复该过程直到完全止血为止。完全止血表现为破裂部位没有残留的出血点及渗出。使用纱布将所有血液从腹腔清除,并暂时关闭腹部。在 1 h 后再次打开腹腔检查是否有术后出血。通过抽吸将腹内液体抽出,检测出血量。然后关闭腹腔,终止麻醉,将猪放回围栏中继续观察。48 h 后使用相同的麻醉方法再次进行剖腹手术,检查腹腔中的液体量以及脏器粘连情况。最终,对破裂位点进行放大和组织形态学检测。

**1.5 统计学处理** 血纤维蛋白原浓度以基础水平的百分比来表示,并使用 Kruskal-Wallis 检验和 Dunns 多重比较检验进行统计学分析。使用 ANOVA 和 Bonferroni's 多重比较检验分析 ACT 和血红蛋白浓度,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 短期结果(止血后 1 h)** FloSeal 处理后 1 h 平均腹内自由液体量为 150 mL(50~1 100 mL)。收集液体中的化验血球密度为 2%,说明反映了其中主要为反应性浆液性分泌物而没有大量红细胞组分,因此没有进一步出血。在 10 头猪中的 8 头 1 h 后达到了完全止血效果。另外 2 头在肝或脾损伤部位仍出现少残余渗血,额外涂敷少量 FloSeal(2 mL)完全止血。

**2.2 终期结果(止血后 48 h)** 通过 FloSeal 止血后,试验动物 48 h 存活率为 100%。所有猪的生理状况良好。48 h 后的平均腹内液体量为 50 mL(0~400 mL),同时血球密度小于 0.5%。FloSeal 基质血块整合到周围组织,但没有局部黏附现象。使用苏木精和曙红染色后对损伤部位进行组织学检验,使用 20 倍放大镜观察,结果表明损伤部位周围出现小的坏死区。FloSeal 与组织界面紧密接触,局部未出现空腔或血肿。肝脏和脾脏中出现轻微白细胞浸润和组织再生的早期迹象。

**2.3 药物使用量** 每只动物 FloSeal 的平均用量为  $(14.0 \pm 2.5)$  mL,平均止血时间为  $(12.5 \pm 3.0)$  min。凝血检验提示受伤时 ACT 显著延长到  $(206.0 \pm 30.0)$  s,基础水平为  $(75.0 \pm 5.0)$  s( $P < 0.01$ )并在治疗后 48 h 恢复到基础水平  $(79.0 \pm 6.0)$  s。在使用 FloSeal 的时候,平均血浆纤维蛋白原显著降到基础水平的 57% [ $(102.0 \pm 26.0)$  mg/dL],  $P < 0.05$ ,并在 48 h 后提高到基础水平的 169% [ $(301.0 \pm 9.0)$  mg/dL]。血红蛋白降到基础水平的 75%直到使用 FloSeal 完全止血才逐渐恢复( $P < 0.01$ )。在 48 h 后,血红蛋白持续增加到基础水平的 92% ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

腹部闭合性损伤中肝脾破裂引起的出血性休克需要急诊外科进行手术治疗<sup>[4]</sup>,由于受伤后丢失大量的血液成分和液体复苏,造成凝血因子急剧下降,经常伴有凝血功能障碍。因此在术中采用常规治疗方法(缝合,结扎血管)效果不佳,必要时使用不同的局部止血敷料<sup>[5]</sup>。本试验中使用了明胶白眉蛇毒凝血酶颗粒(商品 FloSeal),它属于医学生物粘合剂类,采用纤维蛋白原、氯化钙、XIII 因子、抑肽酶组成的 I 剂和凝血酶组成的 II 剂组成的高效生物胶<sup>[6]</sup>。试验中制造了一个 4 cm×4 cm 的穿孔性肝和脾破裂模型,这相当于人 AAST IV~V 级损伤。如果不采取积极有效的止血治疗,在临床上是一种致死性损伤,同时由于受伤后的凝血因子稀释和消耗,血浆纤维蛋白原降到基础水平的 57%,对试验动物进行肝素化,使 ACT 延长到基础水平的 276%,因此构建出了一个可恢复的有显著凝血功能障碍及失血性休克动物模型。结果发现 FloSeal 在这种情

况下可使严重创伤性肝脾破裂的猪模型有效止血<sup>[7]</sup>。这是因为 FloSeal 在凝血级联反应的末端起作用,其作用不易受到凝血因子缺陷或血小板功能异常引起的凝血功能障碍的影响,而这些因素都会干扰其他基于胶原,明胶或氧化的纤维素的止血药物的活性。此外在手术操作中发现凝胶颗粒能准确适用于非规则伤口表面,包括不规则的肝、脾断面,并在接触到血液时引起 10%~20% 的肿胀,有柔和的填充效果并且完全将血块整合到伤口部位。与其他的局部止血密封胶不同,其机制是基于颗粒间的血液循环,因此可以在活动性出血表面使用<sup>[8]</sup>, FloSeal 无需干燥的表面,减少了操作的难度。10 例中的 2 例在 FloSeal 处理后 1h 发现肝、脾破裂部位仍有渗血的现象。但在这两只动物中在 1 h 检测时腹内液体仅有 170 mL,量较少,因此笔者推测这并非术后持续出血 60 min 所引起的,可能是再次评估时手动牵引破裂的脏器或完全复苏后血容量增加并再次出血所引起的。这两例在渗血位点使用很少的 FloSeal,就达到了完全止血。在 48 h 后腹内平均液体量为 50 mL,血球密度低于 0.5%,说明液体中主要含有粒细胞,出血已完全停止。术后猪在圈内做了两天的正常活动和进食,也没有损伤位点出血现象,试验中血红蛋白,血球密度和血小板数量持续提高,这就提示 FloSeal 能较为稳定止血。研究中通过组织学检验发现所有的组织学样本均有紧密血块-组织界面<sup>[9]</sup>,这就提示出生物胶直接粘合于血管或者组织端面止血,不会为血肿形成留下空间,而其他止血方法技术均会出现血肿<sup>[10]</sup>,这种紧密接触有可能是由快速生物降解引起的,证实了 FloSeal 有生物相容性。有文献中对 FloSeal 的生物相容性和生物降解进行了研究<sup>[11]</sup>,提示在生理血液动力学和凝血条件下,其能在心脏,血管,腹腔,骨髓和垂体手术中持续止血,这和笔者的研究结论是一致的。具此笔者认为相比其它止血方式,在临床闭合性腹部外伤中, FloSeal 可最大限度地避免脾、肝、肾切除术,粘合破裂的实质性脏器,保留了脏器。同时不用任何缝线缝合,可以使脏器的损伤部位良好愈合。缩短了手术时间;经济、实用,也不需特殊医疗设备,特别适用于基层医疗单位应用<sup>[12]</sup>。

## 参考文献

- [1] Shapiro MB, Jenkins DH, Schwab CW, et al. Damage control: Collective review[J]. J Trauma, 2009, 49(3): 969-978.
- [2] Moore EE, Cogbill TH, Jurkovich GJ, et al. Organ injury scaling: Spleen and liver(1994 revision) [J]. J Trauma, 1995, 38(2): 323-324.
- [3] Miyamoto K, Masuda K, Inoue N, et al. Anti-adhesion properties of a thrombin-based hemostatic gelatin in a canine laminectomy model: A biomechanical, biochemical, and histologic study[J]. Spine, 2006, 31(4): E91-97.
- [4] Reuthebuch O, Lachat ML, Vogt P, et al. FloSeal: a new hemostatic agent in peripheral vascular surgery[J]. Vasa, 2000, 29(6): 204-206.
- [5] Ellegala DB, Maartens NF, Laws ER Jr. Use of FloSeal hemostatic sealant in transsphenoidal pituitary surgery: Technical note[J]. Neurosurgery, 2002, 51(5): 513-515.
- [6] Weaver FA, Hood DB, Zatina M, et al. Gelatin-thrombin-based hemostatic sealant for intraoperative bleeding in vascular surgery[J]. Ann Vasc Surg, 2002, 16(7): 286-293.
- [7] Gill IS, Ramani AP, Spaliviero M, et al. Improved hemostasis during laparoscopic partial nephrectomy using (下转第 3300 页)

表 1 各组骨密度、钙、磷、PTH 及性激素水平比较(̄x±s)

组别	n	L2~4 骨密度(g/m <sup>2</sup> )	股骨颈骨密度(g/m <sup>2</sup> )	Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	PO <sub>4</sub> (mmol/L)	PTH(pmol/L)	TT(μg/L)	E2(pmol/L)	P(g/L)
对照组	80	1.079±0.201	0.873±0.113	2.19±0.12	1.11±0.05	4.41±1.01	411.2±114.2	64.1±19.1	1.02±0.54
骨量正常组	25	1.059±0.212	0.814±0.124	2.18±0.10	1.04±0.03	4.35±1.21	425.1±78.1	62.1±25.4	1.02±0.87
骨量减少组	25	0.821±0.168*#	0.718±0.969*#	2.18±0.13	1.16±0.04	5.23±1.25*	387.7±86.2	56.1±13.8*#	0.87±0.41
骨质疏松组	30	0.734±0.145*#▲	0.651±0.031*#▲	2.31±0.31	1.03±0.04	6.71±1.46*#▲	376.1±62.6	40.6±22.8*#▲	0.79±0.41

\*:P<0.05,与对照组比较;#:P<0.05,与骨量正常组比较;▲:P<0.05,与骨量减少组比较。

**2.3 各组心脏超声指标比较** 骨质疏松组及骨量减少组 LVEF 低于骨量正常组及对照组 ( $P<0.05$ ),骨质疏松组及骨量减少组 E/A 低于骨量正常组及对照组 ( $P<0.05$ ),LVMI 骨质疏松组及骨量减少组高于骨量正常组及对照组 ( $P<0.05$ )。

**2.4 相关回归分析** Pearson 相关分析显示,BNP 与  $L_{2\sim 4}$  ( $r=-0.354$ )及股骨颈 BMD ( $r=-0.366$ )、BMI ( $r=-0.274$ )、ABI( $r=-0.267$ )、E2( $r=-0.341$ )呈负相关 ( $P<0.05$ );BNP 与 PTH 呈正相关( $r=0.341,P<0.05$ )。以 BNP 为因变量,年龄、收缩压、舒张压、BMI、HbA1c、SCr、TG、TC、HDL-C、LDL-C、Ca<sup>2+</sup>、PO<sub>4</sub>、PTH、有无骨质疏松(1=有,0=无)为自变量进行多元逐步回归分析显示,E2、PTH、骨质疏松是影响 BNP 的独立相关因素。多因素 Logistic 回归分析逐步校正 BMI、SCr、E2、PTH 后,血浆 BNP 与骨质疏松显著相关,似然比 OR 呈上升趋势。

3 讨 论

心力衰竭是一种复杂的临床综合征,约 1.08% 的患者同时合并髋部骨折,较单纯心力衰竭患者病死率增加 2 倍<sup>[1]</sup>。而老年性骨折往往与患者骨质疏松性有关,研究证实,引起患者骨质疏松的因素中,如增龄、糖尿病、肾病、运动耐力下降等,也是患者心力衰竭发生的危险因素,患者心衰后运动耐力下降会导致血浆 BNP 水平的升高<sup>[2]</sup>。

BNP 主要由心肌细胞分泌,是目前临床上诊断心力衰竭的重要实验室指标<sup>[3-4]</sup>。心衰患者由于左心室负荷过大,刺激心肌细胞分泌 BNP,导致血浆含量上升<sup>[5]</sup>。本研究结果表明,在老龄 T2DM 男性患者中,随着骨矿密度的下降,BNP 与 PTH 在血浆中的浓度同步增高,与国外研究结论一致<sup>[6]</sup>。PTH 是一种不良因子,通过改变心肌细胞内钙离子含量,破坏心肌细胞,影响心功能<sup>[7]</sup>。高龄患者由于组织生理功能下降,对钙离子的吸收明显减少,血钙的降低会代偿性导致 PTH 增多,从而破坏骨钙,引起骨质疏松<sup>[8]</sup>。

本研究中,T2DM 患者 BNP 水平随着 BMD 的下降而增高,E2 含量逐渐下降。主要是由于高龄男性患者总睾酮水平虽然基本正常,但游离睾酮的下降对骨的代谢产生了重要影响,直接经芳香化酶转化为雌激素,促进成骨细胞增殖。高龄

男性原发性骨质疏松症患者雌激素水平降低可能与芳香化酶有关<sup>[9]</sup>。而多元逐步回归分析表明 E2 是影响 BNP 的独立相关因素,E2 具有保护心功能的机制<sup>[10]</sup>。在老龄男性 T2DM 原发性骨质疏松症患者中,E2 水平降低使其对心肌保护的功能下降,从而影响心功能。本研究表明,高龄 T2DM 男性患者随着骨量降低,ABI 也降低,但经校正后与 BNP 的关系尚无统计学意义,考虑与样本量有关。

参考文献

[1] 刘晴,富路. 甲状腺激素与心力衰竭[J]. 中华内科杂志,2012,51(10):810-812.

[2] 李莉,严静,龚仕金,等. B 型脑钠肽与运动耐量的相关性研究[J]. 中华老年医学杂志,2011,30(6):509-511.

[3] 冷文修,何昆伦,范利,等. BNP 和 NT-proBNP 在鉴别舒张性心力衰竭中的应用研究[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(4):328-332.

[4] 孙伟莉,李卫鹏,袁媛,等. BNP 与 CA125 检测在诊断慢性心力衰竭中的价值[J]. 中华全科医学,2011,9(10):1528-1529.

[5] 高英旭,华琦,刘荣坤,等. 血浆 B 型钠尿肽对急性冠状动脉综合征患者心功能不全的预测价值[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2011,13(3):218-220.

[6] Altay H,Zorlu A,Kocum HT,et al. Relationship between parathyroid hormone and depression in heart failure[J]. Arq Bras Cardiol,2012,99(4):915-923.

[7] 王春艳,李梅,邢小平. 原发性骨质疏松症中影响甲状腺素水平的因素分析[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2010,3(1):64-68.

[8] 易玲娟,翁土军,陈林. 间断 PTH 处理调节骨稳态的分子机制[J]. 中国骨质疏松杂志,2011,17(6):532-536.

[9] 费琦,王炳强,唐海,等. 密固达治疗原发性骨质疏松症的临床应用初探[J]. 中国医药导报,2011,8(13):68-70.

[10] 戴珩,陈萍,左中,等. 前列腺素 E2 受体在前列腺素 E2 诱导 H9c2 心肌细胞肥大中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2012,32(9):1133-1135.

(收稿日期:2013-07-28)

(上接第 3298 页)

gelatin matrix thrombin sealant[J]. Urology,2005,65(13):463-466.

[8] Renkens JK Jr,Payner TD,Leipzig TJ,et al. A multicenter,prospective,randomized trial evaluating a new hemostatic agent for spinal surgery[J]. Spine,2001,26(2):1645-1650.

[9] Hick EJ,Morey AF,Harris RA,et al. Gelatin matrix treatment of complex renal injuries in a porcine model[J]. J Urol,2005,173(5):1801-1804.

[10] Pursifull NF,Morris MS,Harris RA,et al. Damage control management of experimental grade 5 renal injuries;Further evaluation of FloSeal gelatin matrix[J]. J Trauma,2006,60(9):346-350.

[11] L'Esperance JO,Sung JC,Marguet CG,et al. Controlled survival study of the effects of Tisseel or a combination of FloSeal and Tisseel on major vascular injury and major collecting-system injury during partial nephrectomy in a porcine model[J]. J Eudourol,2005,19(3):1114-1121.

[12] Dyer SR,Bathula S,Durvasula P,et al. Intraoperative use of FloSeal with adenotonsillectomy to prevent adverse postoperative outcomes in pediatric patients[J]. Otolaryngol Head Neck Surg,2013,149(2):312-317.

(收稿日期:2013-09-18)