

大气压冷等离子体对大鼠凝血功能的影响

张克英^{1,6}, 陈启亮², 芮刚^{1,6}, 武霄铮^{1,3}, 郭玲^{1,6}, 张俊平^{1,6}, 刘志强^{4,5}, 李和平⁵, 丁桂荣^{1,6}

1. 空军军医大学军事预防医学系辐射防护医学教研室, 陕西 西安 710032; 2. 空军军医大学基础医学院三大队二中队, 陕西 西安 710032; 3. 中国人民解放军 78506 部队, 四川 成都 610000; 4. 华北理工大学机械工程学院, 河北 唐山 063210; 5. 清华大学工程物理系, 北京 100084; 6. 特殊作业环境危害评估与防治教育部重点实验室, 陕西 西安 710032

【摘要】目的:筛选和探讨大气压冷等离子体(CAP)对血液凝固的影响并筛选其最佳参数,初步探讨其作用机制。**方法:**首先,利用不同作用距离(1、2、3 cm),不同放电电压(3.33、6.73、8.03 kV),不同作用时间(30、60、120 s)的CAP处理大鼠血滴,观察不同参数CAP对血滴凝固效果的影响,筛选CAP促进凝血的最佳参数。之后,将22只SD大鼠随机分为空白对照组($n=11$)和CAP处理组($n=11$),验证上述最佳CAP参数对SD大鼠出血模型的止血效果。最后,通过抗凝血滴实验探讨CAP促进血液凝固的机制。**结果:**体外血滴实验结果显示,与对照组相比,CAP组血滴凝固效果更明显,主要表现为血滴表面干燥和酒窝样凹陷增多,且血滴凝固效果与CAP处理时间和放电电压呈正相关,与CAP作用距离呈负相关。动物出血模型研究结果显示,放电电压8.03 kV、作用时间120 s、作用距离1 cm的CAP处理出血部位可以显著缩短出血时间并降低出血量。抗凝血滴结果显示,CAP可以显著促进枸橼酸钠抗凝血滴的凝固。**结论:**CAP对血液凝固具有明显的时间促进作用,且与作用距离和放电电压密切相关。其机制可能与CAP促进纤维蛋白原向纤维蛋白转化有关。

【关键词】大气压冷等离子体;血滴凝固;出血模型;大鼠

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2019)03-0351-05

Effects of cold atmospheric plasma on coagulation function of rats

ZHANG Keying^{1,6}, CHEN Qiliang², RUI Gang^{1,6}, WU Xiaozheng^{1,6}, GUO Ling^{1,6}, ZHANG Junping^{1,6}, LIU Zhiqiang^{4,5}, LI Heping⁵, DING Guirong^{1,6}

1. Department of Medical Radiation Protection, Faculty of Military Preventive Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. The Second Squadron of Basic Medical School, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. the 78506th Troops of Chinese People's Liberation Army, Chengdu 610000, China; 4. College of Mechanical Engineering, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 5. Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 6. Key Laboratory of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment, Ministry of Education, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To investigate the effects of cold atmospheric plasma (CAP) on blood coagulation, determine the optimal parameters and explore its mechanism. **Methods** Firstly, the blood drops of Sprague-Dawley (SD) rats were treated with CAP with different treatment distances (1, 2 and 3 cm), different discharge voltages (3.33, 6.73 and 8.03 kV), and different treatment durations (30, 60 and 120 s) to investigate the effects of CAP with different parameters on blood coagulation and determine the optimal parameters for blood coagulation. Subsequently, 22 SD rats were randomly divided into control group ($n=11$) and CAP treatment group ($n=11$) to verify the hemostatic effect of CAP with the optimal parameters in different rat bleeding models. Finally, the mechanism of CAP to promote blood coagulation was explored by anticoagulation test. **Results** The results of *in vitro* blood test showed that CAP significantly promoted blood coagulation, which was featured with surface drying and the increasing number of dimple signs. Besides, the effect of CAP on blood coagulation was positively correlated with treatment durations and discharge voltages, but negatively correlated with treatment distances. The research on rats bleeding models showed that CAP with the optimal parameters (discharge voltage of 8.03 kV, treatment duration of 120 s, and treatment distance of 1 cm) significantly shortened the bleeding time and reduced the amount of bleeding. The results of anticoagulant test proved that CAP could significantly promote the coagulation of anticoagulant blood drops with sodium citrate. **Conclusion** CAP significantly shortens the time for blood coagulation. The effect of CAP on blood coagulation is closely dependent on treatment distance, discharge

【收稿日期】2018-12-05

【基金项目】国家自然科学基金(31770905, 11475103); 陕西省社会发展科技攻关项目(2016SF-018)

【作者简介】张克英, 硕士研究生, 研究方向: 辐射与再生医学, E-mail: zhangky@fmmu.edu.cn

【通信作者】丁桂荣, 博士生导师, 研究方向: 生物电磁学, E-mail: dingzhao@fmmu.edu.cn; 李和平, 博士生导师, 研究方向: 等离子体科学与技术, E-mail: liheping@tsinghua.edu.cn

voltage and treatment duration, and its mechanism may be related with the conversion of fibrinogen to fibrin.

Keywords: cold atmospheric plasma; blood coagulation; bleeding model; rat

前言

等离子体通常是一种离子化的气体状物质,被认为是独立于固、液、气之外的物质第四态,按照粒子的温度可将等离子体分为两大类,热平衡等离子体(或热等离子体)和非热平衡等离子体(或冷等离子体)^[1]。其中,热等离子体具有较高的能量密度,粒子温度可达10 000-20 000 K的数量级,故被广泛用于铜、铝、钛、镍等金属材料的高温熔炼^[2],非金属材料的热熔化和纳米材料的制备等;而冷等离子体则被用于材料表面改性、清洁活化、高效灭菌和加速化学反应等。

出血作为最常见的创伤表现形式,是创伤早期患者死亡的主要原因之一^[3]。内脏出血、腔道出血等隐匿性出血,目前多采用介入手术栓塞血管、出血点套扎等方式,手术难度较大。既往研究显示,热等离子体可以通过热效应使蛋白变性和血液干燥从而达到凝血的目的^[4],但热等离子体在发挥凝血作用的同时可引发出血部位的灼痛感,甚至造成周围组织的烧伤和伤口的延迟愈合^[5]。据报道,大气压冷等离子体(Cold Atmospheric Plasma, CAP)可以加速血液凝固并促进伤口愈合,且不会对周围组织造成损伤,该研究结果为出血性疾病治疗提供了新的方法和思路^[6-7]。本研究从体外血滴实验不同参数CAP对凝血效果的影响以及动物出血模型两个方面展开CAP促凝血现象的验证,并通过抗凝血滴对其机制进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级成年雄性SD大鼠22只,体质量(250±20)g,由第四军医大学实验动物中心提供。大鼠随机分为空白对照组($n=11$)和CAP处理组($n=11$)。动物饲养在22~24℃的恒温环境中,湿度保持在40%~70%,保证12 h/d的光照并避免噪音,饲养期间所有动物可自由摄取水和食物。所有实验均获得第四军医大学伦理委员会批准。

1.2 CAP装置

本实验采用的CAP装置由清华大学工程物理系研制,该装置以氦气作为气体源,采用介质阻挡放电方式产生CAP射流,其中含有OH、N₂、He、O、NO、N₂⁺等活性离子。

1.3 血滴实验

大鼠用1%戊巴比妥钠(0.45 mg/kg)腹腔注射麻醉,在距大鼠尾部末端约2 mm处剪断其尾巴,然后立即用无菌离心管收集血液并吸取100 μL血液滴于载玻片中央。将制备好的血滴玻片随机分为Control组($n=3$)和CAP处理组($n=3$)。CAP处理组立即采用不同作用距离(1、2、3 cm),不同放电电压(3.33、6.73、8.03 kV)和不同作用时间(30、60、120 s)的CAP处理血滴。Control组暴露于空气中不做任何处理。血液滴于玻片5 min时采集血滴图片,分析血滴凝固效果。

1.4 出血模型实验

1.4.1 尾部出血模型 将大鼠按照上述方法麻醉,在距大鼠尾部末端约5 mm处剪断尾巴建立此出血模型^[8],之后立即采用正常血滴实验筛选的CAP最佳凝血参数(放电电压8.03 kV、照射时间120 s、照射距离1 cm)处理出血部位,通过记录出血时间和出血量(滤纸吸收血液后湿重-滤纸干重)评价CAP的凝血效果^[9]。Control组暴露于空气中不做任何处理。

1.4.2 脚趾出血模型 在距大鼠左前足最外侧脚趾末端约1 mm处剪断脚趾建立此出血模型。之后,采用与尾部出血模型相同的CAP参数研究其对大鼠脚趾出血的干预效果。

1.4.3 股静脉出血模型 将大鼠仰卧位固定于无菌操作台上,剔除大鼠左侧腹股沟毛发,碘伏消毒皮肤后暴露并分离股静脉,用6号针头45°穿刺股静脉,建立股静脉出血模型^[10]。采用与尾部出血模型相同的方式观察CAP对大鼠股静脉出血的干预效果。

1.5 抗凝血滴实验

将大鼠用1%戊巴比妥钠(0.45 mg/kg)腹腔注射麻醉,之后做“U型”皮肤切口,剪断肋骨并充分暴露心脏,利用无菌注射器于左心室抽取6 mL血液,并用枸橼酸钠对抽取的血液作抗凝处理。吸取抗凝血100 μL滴于载玻片中央,采用放电电压8.03 kV、处理时间120 s和作用距离为1 cm的CAP处理血滴。Control组暴露于空气中不做任何处理。血液滴于玻片5 min时采集血滴图片,并分析血滴凝固效果。

1.6 统计学分析

采用SPSS 20.0进行数据统计分析,所有数据以均值±标准差表示,出血时间、出血量采用单因素方差分析进行组间比较, $P<0.05$ 认为结果有显著性差异。

2 结果

2.1 CAP促进血滴凝固的距离效应

不同CAP作用距离结果显示,Control组血滴表面形态未发生明显变化(图1a)。与对照组相比,当放电电压为8.03 kV,处理时间为120 s,作用距离为1 cm时,CAP处理组血滴表面变得干燥且有壳样物形成,其表面可见

酒窝样凹陷(图1b);当放电电压和处理时间不变,作用距离增加至2 cm时,CAP组血滴表面干燥程度显著降低,凹陷数量明显减少(图1c);当作用距离增加至3 cm时,可见CAP组仅血滴周围有轻度凝固,血滴表面未见明显凹陷(图1d)。上述结果提示,CAP具有明显促进血滴凝固的作用,并且与CAP作用距离呈负相关。

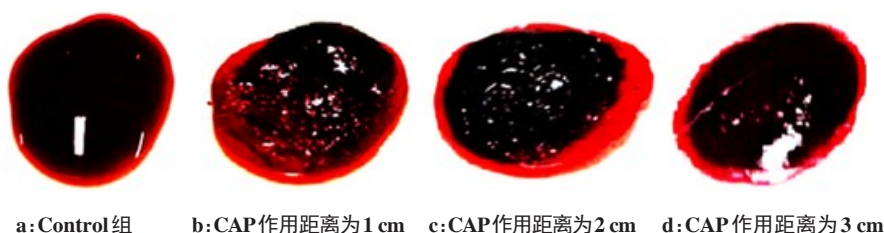


图1 CAP促进正常血滴凝固的距离效应

Fig.1 Effect of treatment distance of cold atmospheric plasma (CAP) on blood coagulation

2.2 CAP促进血滴凝固的时间效应

Control组血滴暴露于空气中5 min后其表面形态几乎没有变化,中央区依然光滑透亮(图2a)。与对照组相比,当放电电压为8.03 kV,作用距离为1 cm,处理时间为30 s时,CAP处理组的血滴表面变得干燥,可见细小的壳样物与酒窝样凹陷(图2b);当放电电压和作用距离不变,作用时间延长至60 s时,CAP

处理组的血滴表面干燥程度显著增加,血滴表面凹陷数量明显增多、凹陷面积明显增大(图2c);当放电电压和作用距离不变,作用时间增加至120 s时,可见CAP组血滴表面大部分区域变成壳样物,凹陷数量进一步增多(图2d)。上述结果提示,CAP具有明显的促进血滴凝固作用,并且随着CAP作用时间呈正相关。

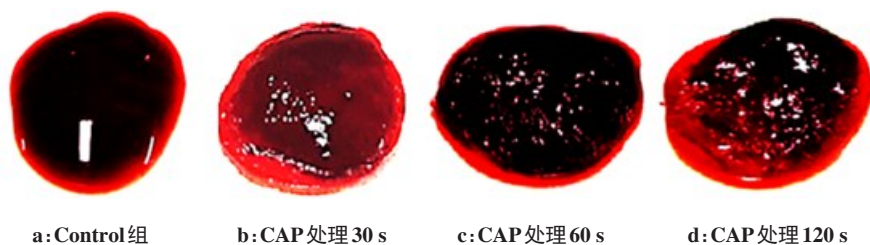


图2 CAP促进血滴凝固的时间效应

Fig.2 Effects of treatment duration of CAP on blood coagulation

2.3 CAP促进血滴凝固的电压效应

Control组血滴暴露于空气中5 min后血滴形态几乎没有变化,中央区光滑透亮(图3a)。与Control组相比,当CAP处理时间为120 s,作用距离为1 cm,放电电压为3.33 kV时,CAP组血滴边缘变得干燥且有凹陷形成,血滴中央依然光滑透亮(图3b);当CAP作用时间和作用距离不变,放电电压增加为6.73 kV时,CAP组血滴大部分区域变得干燥形成壳样物,血滴表面出现较多细小凹陷,血滴中央仍可见小范围光滑透亮区(图3c);当作用时间和作用距离保持不变,放电电压增加为8.03 kV时,CAP组血滴表面壳样物范围增大,表面凹陷增多(图3d)。上述结果

提示,CAP可显著促进血滴凝固,并且与CAP放电电压呈正相关。

2.4 CAP对大鼠不同部位出血的凝血效果

与Control组相比,CAP组大鼠尾部、脚趾、股静脉的出血时间和出血量均显著降低($P<0.05$),见图4。上述结果提示,CAP可以加速动物不同部位出血的凝血过程。

2.5 CAP对抗凝血滴的凝固作用

在观察时间内,Control组血滴形态几乎没有变化(图5a)。与Control组相比,CAP组血滴表面变得干燥、血滴表面酒窝样凹陷明显增多(图5b)。上述结果提示,CAP可以明显促进枸橼酸钠抗凝血滴的凝固。

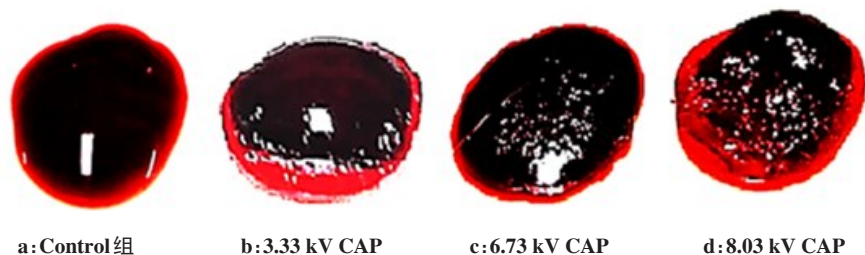


图3 CAP促进血滴凝固的电压效应

Fig. 3 Effect of discharge voltages of CAP on blood coagulation

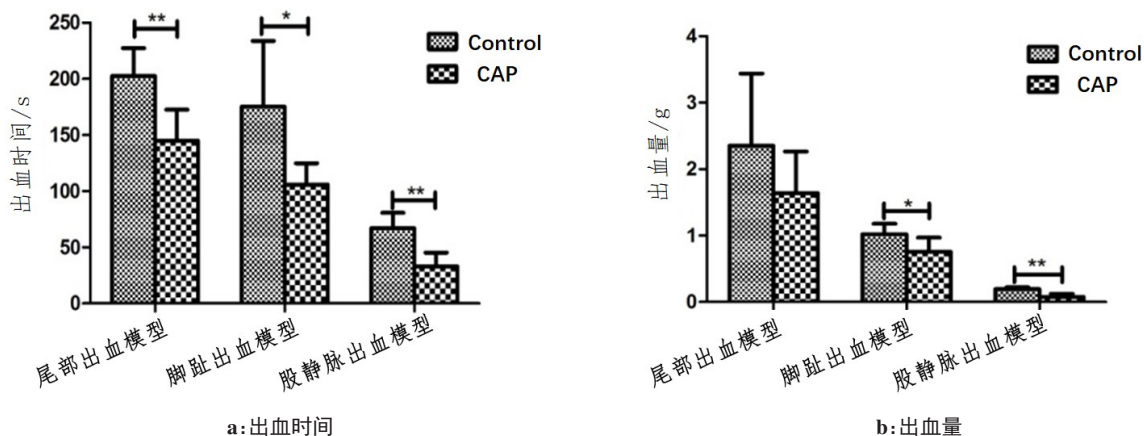


图4 CAP对大鼠不同部位出血的凝血效果

Fig. 4 Coagulation effect of CAP in rat models with different bleeding sites

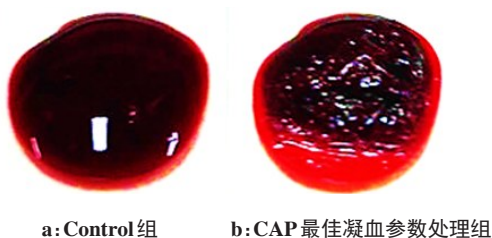
* $P < 0.05$, CAP vs Control; ** $P < 0.01$, CAP vs Control

图5 CAP对抗凝血滴的凝固作用

Fig. 5 Effect of CAP on anticoagulant blood

3 讨论

本论文研究所采用的CAP射流是外加电场电离稀有气体后产生的含有大量带电粒子、活性自由基、激发态中性粒子及光子等的第四类物质状态,其中的活性成分具有诱导恶性肿瘤细胞凋亡^[11]、调节细胞聚集粘附与增殖^[12]、加速化学反应^[13]等功能。既往实验室研究显示,CAP可以促进血液样本快速凝固,其机制可能与CAP中的氧自由基加速凝血化学反应有关^[14]。另据报道,与传统电凝止血相比,低温等离子体对腺样体肥大手术中的出血具有良好止血效果^[6]。Fridman等^[5]也发现了类似现象,即CAP可以显著促进脾脏切口的血液凝固,且不产生明显的组织损伤。

本研究为了筛选和探讨常压冷等离子体对血液

凝固的影响并筛选其最佳参数,初步探讨其作用机制,首先观察了CAP对血滴凝固的影响。结果显示,CAP可以明显促进血滴凝固,主要表现为血滴表面壳样物和酒窝样凹陷形成以及干燥程度增加^[15]。并且,CAP促凝血作用与CAP的处理时间、作用距离和放电电压密切相关,该结果与Kuo等^[15]的研究结果一致。进而,笔者采用血滴实验筛选确定的CAP最佳凝血参数,观察CAP对大鼠不同部位出血的促凝效果,发现与Control组相比CAP组大鼠尾部、脚趾和股静脉的出血时间明显缩短,出血量明显降低,提示CAP对体外血滴具有明显的促凝作用,对动物不同部位出血也具有明显的凝血作用,该结果与Fridman^[5]和Kalghatgi^[7]的研究结果一致。

随后笔者利用CAP处理枸橼酸钠抗凝的血滴,结果显示,CAP可以明显促进抗凝血滴凝固。已有研究表明,枸橼酸根离子可与血中的 Ca^{2+} 相结合,形成不易离解的可溶性络合物,通过降低血液中 Ca^{2+} 浓度,抑制凝血。既往认为,等离子体可以通过氧化还原反应提高血液中 Ca^{2+} 浓度,进而促进血液凝固^[16]。然而,最新研究显示,等离子体处理血液后,其pH值与 Ca^{2+} 浓度均无显著变化,提示CAP促进血液凝固,特别是枸橼酸钠抗凝血液凝固可能不是通过增加

Ca^{2+} 浓度发挥作用^[7]。考虑到 Ca^{2+} 参与凝血级联反应的凝血酶原激活物形成和凝血酶形成过程,但不参与纤维蛋白形成,笔者认为,CAP可能主要是通过促进纤维蛋白原向纤维蛋白转化而加速凝血过程。该推测与既往报道一致,即 Kalghatgi 等^[7]利用等离子体处理人工合成的纤维蛋白原溶液后,溶液逐渐浑浊,提示等离子体可以启动纤维蛋白原向纤维蛋白转化。

综上所述,我们认为 CAP 可以加速血液凝固并增强其凝血效果,该过程可能与 CAP 促进纤维蛋白原向纤维蛋白转化有关。

【参考文献】

- [1] PERATT A L. Physics of the plasma universe [M]. New York: Springer, 2015: 14-15.
- [2] 向大林,李素芬. 等离子熔炼新技术[J]. 特殊钢, 1983(5): 96-97.
XIANG D L, LI S F. New technology of plasma melting[J]. Special Steel, 1983(5): 96-97.
- [3] PERKINS J G, CAP A P, WEISS B M, et al. Massive transfusion and nonsurgical hemostatic agents[J]. Crit Care Med, 2008, 36(7 Suppl): S325-S339.
- [4] KONG M G. Plasma medicine: an introductory review[J]. New J Phys, 2009, 11: 1-35.
- [5] FRIDMAN G, PEDDINGHAUS M, AYAN H, et al. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air[J]. Plasma Chem Plasma P, 2007, 27(1): 113-114.
- [6] 谢珂,王大海. 低温等离子体技术在腺样体手术中止血的疗效观察[J]. 中国实用医药, 2011, 6(17): 124-125.
XIE K, WANG D H. Effect of low temperature plasma technology on hemostasis in adenoid surgery[J]. China Practical Medical, 2011, 6 (17): 124-125.
- [7] KALGHATGI S U, FRIDMAN G, COOPER M, et al. Mechanism of blood coagulation by nonthermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma[J]. IEEE Trans Plasma Sci, 2007, 35(5): 1559-1566.
- [8] 田靖,崔庆华,郭平,等. 小鼠剪尾出血模型的优化[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(1): 40-45.
TIAN J, CUI Q H, GUO P, et al. Improvement on tail tip bleeding model in mice[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2017, 37(1): 40-45.
- [9] 张梦雪,陈重华,李杰,等. RT-Q 医用生物膜的止血效果及生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(1): 175-179.
ZHANG M X, CHEN Z H, LI J, et al. Hemostatic effect and biocompatibility of RT-Q medical bio membrane [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(1): 175-179.
- [10] 叶露露,单桂秋,马静,等. 冻干血小板运用于SD大鼠出血模型止血效果的初步研究[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(7): 699-702.
YE L L, SHAN G Q, MA J, et al. Preliminary study on hemostatic effect of freeze-dried platelets [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2014, 27(7): 699-702.
- [11] FRIDMAN G, SHERESHEVSKY A, JOST M M, et al. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines[J]. Plasma Chem Plasma P, 2007, 27(2): 163-176.
- [12] KIEFT I E, DARIOS D, ROKS A J, et al. Plasma treatment of mammalian vascular cells: a quantitative description [J]. IEEE Trans Plasma Sci, 2005, 33(2): 771-775.
- [13] 白希尧,张芝涛. 高气压非平衡等离子体化学及应用基础研究[J]. 物理, 2000, 29(7): 406-410.
BAI X Y, ZHANG Z T. Non-equilibrium plasma chemistry at high pressure and its applications[J]. Physics, 2000, 29(7): 406-410.
- [14] KE Z, HUANG Q. Haem-assisted dityrosine-cross-linking of fibrinogen under non- thermal plasma exposure: one important mechanism of facilitated blood coagulation[J]. Sci Rep, 2016, 6: 26982.
- [15] KUO S P, TARASENKO O, CHANG J, et al. Contribution of a portable air plasma torch to rapid blood coagulation as a method of preventing bleeding[J]. New J Phys, 2009, 11: 115016.
- [16] ROMANELLI F. Plasma physics and engineering[M]. Boca Raton: CRC Press, 2011: 16-17.

(编辑:薛泽玲)