

## 积雪草苷-海藻酸钠修复贴的制备及其创伤修复作用研究

郭家棋, 郭敏慧, 孔松芝\*, 卢思彤, 权维燕, 陈思鹏, 赵天洋, 孙海洋

广东海洋大学化学与环境学院, 广东 湛江 524088

**摘要:** **目的** 制备积雪草苷-海藻酸钠修复贴 (As-SA RP) 并评价其对皮肤创伤修复的效果。 **方法** 利用海藻酸钠与  $\text{Ca}^{2+}$  交联成膜的特点, 以积雪草苷为药物模型, 通过与海藻酸钠共混的方式成功制备了 As-SA RP, 采用扫描电子显微镜及红外光谱考察共混膜的相容性, 并用新西兰大耳兔背部脊柱两侧的全层皮肤建立创伤模型, 通过观察各组家兔受损皮肤的愈合状况并测定其受损皮肤组织中胶原 (羟脯氨酸作为指标) 和促炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6) 的表达水平以考察外敷 As-SA RP 对皮肤创面的修复效果。 **结果** 积雪草苷与海藻酸钠具有良好的相容性, 可成功制备 As-SA RP 修复贴。相较于其他组, As-SA RP 处理后皮肤受损处的红肿、出血、感染、渗出液情况明显减少, 创面愈合率也相对升高。病理结构显示 As-SA RP 组家兔皮肤中炎症细胞浸润较少、新生的毛细血管较多、创面皮肤结构较完整且胶原纤维排列相对紧密有序。同时, 生化分析结果显示 As-SA RP 能有效抑制受损皮肤组织中促炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的高表达, 并可明显增高其中羟脯氨酸及胶原纤维含量。 **结论** As-SA RP 可在一定程度上提升皮肤对积雪草苷的吸收, 进而表现出比活性组分更好的皮肤创伤修复效果。

**关键词:** 积雪草苷; 海藻酸钠; 皮肤; 创伤修复; 抗炎; 胶原; 愈合

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-4934-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.012

## Preparation of asiaticoside sodium alginate repair patch and its wound healing effect

GUO Jia-qi, GUO Min-hui, KONG Song-zhi, LU Si-tong, QUAN Wei-yan, CHEN Si-peng, ZHAO Tian-yang, SUN Hai-yang

Faculty of Chemistry and Environmental Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

**Abstract: Objective** Asiaticoside-sodium alginate repair patch (As-SA RP) was prepared and its effect on skin wound healing was investigated. **Methods** Based on the cross-linking characteristics of sodium alginate and  $\text{Ca}^{2+}$ , As-SA RP was prepared using asiaticoside as a drug model through blending with sodium alginate. The compatibility of the blend films was investigated by scanning electron microscope and FTIR. The whole layer of skin on both sides of the back spine of New Zealand's big ear rabbit was used to establish the trauma model. The repair effect of the external application of As-SA RP on skin wounds was investigated by observing the healing status and determining the expression levels of collagen (hydroxyproline as an index) and pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) factors in the injured skin tissue. **Results** Asiaticoside had good compatibility with sodium alginate and can be successfully prepared As-SA RP. Compared with other groups, the red swelling, bleeding, infection, and exudate on injured skin were significantly reduced, and the wound healing rate was also relatively increased after As-SA RP treatment. Moreover, the less inflammatory cells infiltration, more new capillaries and intact wound skin structure relatively tight and orderly arrangement of collagen fibers were observed in the As-SA RP group. On the other hand, the biochemical analysis showed that As-SA RP could effectively inhibit the high expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 in the injured skin tissue and significantly increase the contents of hydroxyproline and collagen fiber. **Conclusion** As-SA RP could improve the skin absorption of asiaticoside and show the better

收稿日期: 2020-04-27

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81803684); 广东海洋大学大学生创新创业训练项目 (CXXL2019290); 广东海洋大学本科生天然海洋药物创新团队 (CCTD201828)

作者简介: 郭家棋 (1999—), 女, 本科, 主要从事海洋活性物质筛选及高分子材料研究。E-mail: 1104597547@qq.com

\*通讯作者 孔松芝 (1983—), 女, 博士, 副教授, 主要从事中药活性物质筛选及其作用机制方面的研究。

Tel/Fax: (0759)2383300 E-mail: kongsongzhi@126.com

effect of skin wound healing than the active component asiaticoside.

**Key words:** asiaticoside; sodiimalginate; skin; wound healing; anti-inflammatory; collagen; healing

皮肤创伤修复是机体修复或重建受损组织的一系列复杂的生理过程，主要分为止血和炎症、增殖及成熟和重塑 3 个阶段<sup>[1-2]</sup>。皮肤受到创伤后，血管受到刺激而收缩，血小板迅速聚集并刺激凝血系统产生凝血酶，凝血酶能使血液凝结以达到止血的作用<sup>[3]</sup>。后到达受损部位的是中性粒细胞，其通过大量增殖以防御细胞性感染，后被巨噬细胞吞噬。而巨噬细胞在受损部位通过释放生长因子、细胞因子和血管新生因子，以促进肉芽组织的生成和血管新生<sup>[4]</sup>，同时还可分泌肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 IL-1 $\beta$  及 IL-6 等促炎症因子。TNF- $\alpha$  可诱导和控制炎症以保护组织免受感染并参与维持免疫调节，IL-6 可促进受损部位中活性细胞的迁移和促再生因子的表达<sup>[5]</sup>，但 TNF- $\alpha$  的高表达可引发成纤维细胞的凋亡而不利于伤口的愈合<sup>[6-7]</sup>，IL-1 $\beta$ 、IL-6 的持续高浓度存在可刺激基质金属蛋白酶 MMPS

的大量释放而引发细胞外基质降解，以加重组织损伤、伤口感染和炎症程度，延缓伤口愈合<sup>[8-9]</sup>。

炎症反应可清除受损组织及入侵细菌。炎症消退后，细胞开始分泌生长因子以促进成纤维细胞、毛细血管以及肉芽组织的生成。在创伤愈合后期，创口收缩，最终将有 2 种结果——一种为形成正常的皮肤，另一种为成纤维细胞被瘢痕组织取代，形成瘢痕（如图 1 所示）<sup>[10]</sup>。目前，对创伤修复的治疗方式主要有抗生素、肝素治疗，以及手术缝合、移植及组织工程等<sup>[11]</sup>，尽管现代医学在创伤修复、祛疤生肌方面有较大的进步，但创口感染、发炎和留疤仍然是创伤修复过程中最难攻克的关键问题，这些问题可给患者带来心灵上的负担，甚至可导致患者功能障碍，影响身心健康及生存质量。因此，研究安全、无毒、使用便捷的、可有效实现创伤后快速修复的相关药物制剂刻不容缓。

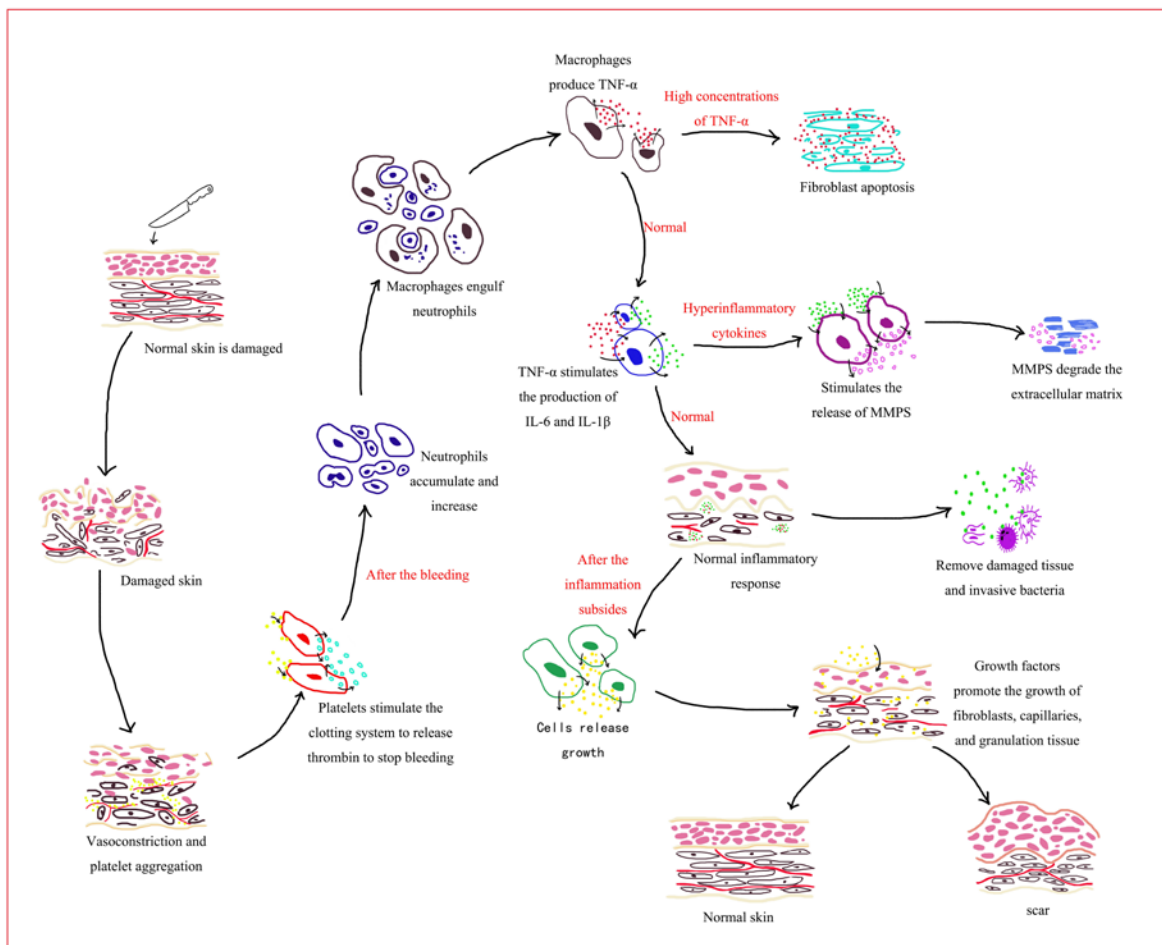


图 1 皮肤创伤愈合机制<sup>[10]</sup>

Fig. 1 Mechanism of skin wound healing<sup>[10]</sup>

积雪草苷又名亚细亚皂苷 (asiaticoside, As), 由 2 分子葡萄糖、1 分子鼠李糖和积雪草酸分子中的羧基结合形成。现代药理研究表明其具有抗炎、抗纤维化、抗肿瘤、免疫调节、促进创口愈合、抑制瘢痕形成等多种活性<sup>[12-17]</sup>。且对于皮肤创伤或瘢痕修复方面最直接、最方便的应用方式是涂布给药, 而药物涂布作用于皮肤时, 由于皮肤角质层的屏障作用及较短的皮肤附着时间使得药物的生物利用度往往较低<sup>[18-19]</sup>; 因此, 如何提升积雪草苷在皮肤局部给药时的生物利用度, 进而考察其皮肤修复效果意义重大。

海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 又名海藻胶, 是一种来源于海洋中褐藻类的阴离子型聚电解质多糖, 由  $\beta$ -D-甘露糖醛酸和  $\alpha$ -L-古罗糖醛酸以  $\beta$ -1,4 糖苷键连接而成<sup>[20]</sup>。作为一种天然高分子化合物, SA 具有良好的生物相容性、成膜性、生物降解性、抗菌性以及低毒无抗原性等诸多优良性能, 且来源广泛、价格低廉<sup>[21-27]</sup>; 因此, SA 在研究药物载体及创伤修复敷料方面受到广泛的关注<sup>[28]</sup>。此外, SA 能与二价金属离子 (除 Mg、Hg 以外) 进行交联, 生成具有交联网络结构的凝胶薄膜, 其中以与  $\text{Ca}^{2+}$  交联形成的薄膜性能更佳且无毒性残留, 是良好的膜类药物载体, 可用于保护创面, 防止细菌侵染伤口<sup>[29-33]</sup>, 其保湿性能降低皮肤角质层对药物的屏障作用以提升药物对皮肤的渗入, 协同放大药效<sup>[34-35]</sup>。

鉴于此, 本研究拟借助 SA 的成膜性、抗菌性、生物相容性等优秀性能负载积雪草苷, 以  $\text{Ca}^{2+}$  为交联剂、甘油为保湿剂制备积雪草苷-海藻酸钠修复贴 (asiaticoside-sodium alginate repair patch, As-SA RP), 以赋予积雪草苷皮肤黏附性, 降低皮肤角质层的屏障作用, 协同放大积雪草苷药效, 提升积雪草苷在皮肤给药时的生物利用度, 并对其促创伤修复效果进行考察, 为研究安全、无毒、使用便捷的、可有效实现创伤后快速修复的相关药物制剂提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

积雪草苷, 批号 D18042501, 质量分数  $\geq 95\%$ , 南京景竹生物科技有限公司; SA, 上海源叶生物科技有限公司; 甘油、氯化钙、戊巴比妥钠, 广东省光华科技股份有限公司; 苦味酸、硫化钠, 广东光华化学厂有限公司; 羟脯氨酸试剂盒 (批号 A030-2)、ELISA 试剂盒 (rabbit-IL-6、rabbit-TNF、

rabbit-IL-1 $\beta$ ), 南京建成生物工程研究所。

SB-5200D 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; JXFSTPRP-CL 冷冻研磨仪, 上海净信实业发展有限公司; 微量移液器, 美国热电公司; BRL130/00 女士电动剃毛器, 荷兰皇家飞利浦公司; S-4800 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本日立公司; S7000 数码相机, 日本尼康公司; BH22 光学显微镜, 日本 Olympus 公司; Image-pro plus 6.0 软件, 美国 Media Cybernetics 公司; Spectrum 100 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 仪, 美国 Perkin Elmer 公司。

### 1.2 动物

健康新西兰大耳兔 12 只, 雌雄各半, 3 月龄, 体质量为 2.0~2.5 kg, 由广东省医学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证编号 SCXK (粤) 2014-0035。所有方法均按照广东海洋大学科学与伦理关怀和实验动物使用相关指南和规定进行。适应性饲养 1 周后用于 As-SA RP 的创伤修复实验研究。

### 1.3 方法

**1.3.1 SA、积雪草苷用量及阳性对照组的选择** SA 作为一种高分子材料, 具有良好的成膜性。当 SA 用量为 3% 时, 膜的性能最佳<sup>[37-38]</sup>, 因此本研究采用的 SA 用量为 3%。

参照市售产品积雪草霜软膏 (上海现代制药股份有限公司, 国药准字 Z46020054) 中积雪草总苷的含量, 本研究设置 As-SA RP 中积雪草苷的含量为 2.5%。

因市售产品积雪草霜软膏中除了主要活性成分积雪草苷, 还有其他辅料如透皮吸收剂、防腐剂、保湿剂等, 为了避免这些辅料对主成分药效的影响, 本实验仅采用积雪草苷单体作对照。

**1.3.2 As-SA RP 的制备** 精密称取 3 g SA 于 80 mL 蒸馏水中, 常温, 超声 1 h (频率为 60 kHz) 溶解, 使其完全溶解后加入 7 g 甘油, 搅拌混匀, 得到 SA-甘油溶液 (A 液); 称取 2.5 g 积雪草苷溶于 7.5 g 75%乙醇中, 搅拌溶解, 得到积雪草苷溶液 (B 液)。将上述 B 液加入到 A 液中, 搅拌使其混合均匀, 超声 1 h (频率为 60 kHz) 除去气泡, 得 SA-甘油-积雪草苷混合溶液 (C 液)。将一定量上述 C 液倒入到玻璃模具中, 使混合液自然流平成 1 mm 厚的膜液, 再向膜液中加入质量分数为 3% 的氯化钙溶液, 交联 2 min 后将氯化钙溶液倒出, 用滤纸吸干剩余的氯化钙溶液, 得积雪草苷-SA 膜, 再把交联后的膜置于 50 °C 的真空干燥箱中干燥 50 min,

即得 As-SA RP。

**1.3.3 SA 基质的配制** 精密称取 3 g SA 于 82.5 mL 蒸馏水中，常温，超声溶解，使其完全溶解后加入 7 g 甘油和 7.5 g 75%乙醇，搅拌混匀，得到 SA-甘油溶液。将一定量上述液倒入到玻璃模具中，使混合液自然流平成 1 mm 厚的膜液，再向膜液中加入质量分数为 3%的氯化钙溶液，交联 2 min 后将氯化钙溶液倒出，用滤纸吸干剩余的氯化钙溶液，再把交联后的膜置于 50 ℃的真空干燥箱中干燥 50 min，得 SA 基质。

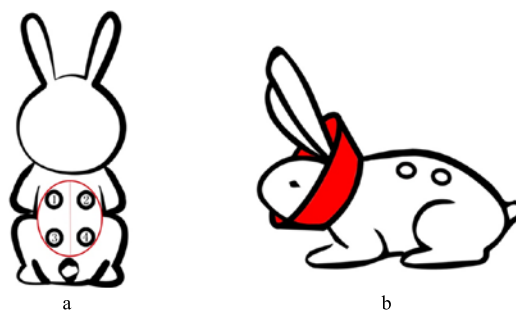
**1.3.4 As-SA RP 的表面形貌** 用数码相机对 As-SA RP 的外观形态进行记录。将 As-SA RP 干燥后，喷金，用 SEM 观察 As-SA RP 的表观形貌。

**1.3.5 As-SA RP 的 FTIR 分析** 采用 FTIR 光谱仪对 As-SA RP 进行红外表征。将待测膜完全干燥后放入样品室，FTIR 研究 As-SA RP 的红外吸收特性，波数范围 450~4 000  $\text{cm}^{-1}$ ，分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ ，记录数据，分析 As-SA RP 的光谱图。

**1.3.6 实验动物分组及模型制作** 于每只新西兰大耳兔背部脊柱两侧各剪去 2 个直径为 2.0 cm 的圆形全层皮肤以建立皮肤创伤模型，4 个创面分别对应模型组、SA 基质组 (SA)、2.5%积雪草苷溶液组 (AsS)、As-SA RP 组 (其中积雪草苷质量分数为 2.5%)，如图 2-a 所示。造模时，用女士电动剃毛器对在新西兰大耳兔的背部进行脱毛，待毛脱干净后，在兔耳 iv 3%戊巴比妥钠溶液 (30 mg/kg) 进行麻醉，麻醉起效后对兔的背部进行消毒，然后用手术剪在每只兔子背部组别为模型、SA、AsS、As-SA RP 组的区域，分别造直径为 2.0 cm 的圆形深度创伤面 (图 2-a)。每只动物采用自身对照法。从造模后第 1 天起，模型组不作其他任何处理，SA 组予 SA 基质处理，AsS 组予 2.5%积雪草苷溶液处理，As-SA RP 组予 As-SA RP 处理，每天对应外敷给药 2 次，上午和下午各 1 次，连续涂抹 18 d，并于末次给药 6 h 后取样。给药期间给予每只兔子防舔头套 (图 2-b)，不影响正常进食饮水。观察记录造模当天以及每次给药时伤口的愈合情况，并拍照记录。

**1.3.7 创面宏观恢复观察** 分别于造模当天 (第 0 天)、第 5、11、17 天用数码相机对创面进行局部拍照，观察并记录创面情况，如红肿情况、出血情况、感染情况、渗出情况和结痂情况等。

**1.3.8 创面愈合率** 造模 24 h 后 (即术后第 1 天)，用消毒后的半透明油酸纸贴于创面，沿创面边缘描



1-模型组 2-SA 组 3-AsS 组 4-As-SA RP 组

1-model group 2-SA group 3-AsS group 4-As-SA RP group

图 2 创伤给药分组情况 (a) 和兔子佩戴防舔头套 (b)  
Fig. 2 Each delivery area (a) and rabbit wear a protecting cap (b)

线，得到的闭合图形为第 1 天的实际创面，作为原始创面，而后第 3、5、7、9、11、13、15、17 天分别在相应的半透明油酸纸对创面进行描记，使用连接电脑的打字机扫描仪将描记的图形扫描导入电脑，用 Adobe Photoshop CS5 site 图像分析软件计算创面愈合率 ( $M$ )<sup>[38-40]</sup>， $M=(M_0-M_1)/M_0$ ，其中， $M_0$  为创口初始面积， $M_1$  为某时间点的伤口面积。

**1.3.9 组织学分析** 对于组织学检查，于新西兰大耳兔背部皮肤创口末次给药 6 h 后清洗组织创面，实行安乐死后，迅速切取各组原创伤部位面积约为 2.0  $\text{cm}^2$  的全层皮肤组织样品，其中切取各组原创口中心位置的小块皮肤样品固定于 4%多聚甲醛 (PFA) 中用于组织学观察和胶原沉积考察 (Masson 染色法)。

取出固定好的创面组织，酒精分级脱水，石蜡包埋，切片，厚度为 5  $\mu\text{m}$ ，于室温下晾干过夜，部分创面组织进行苏木精-伊红 (HE) 染色，细胞核呈深蓝色，胞质、肌纤维、胶原纤维和红细胞呈深浅不一的红色，于光学显微镜下观察表皮结构、真皮-表皮连接状态、胶原排列和真皮结构以及皮肤再生情况等，并摄片记录。同时，对剩余组织切片进行 Masson 三色染色 (胶原纤维、黏液呈蓝色，胞浆、纤维素、神经胶质呈红色，胞核呈黑蓝色)，观察各组动物真皮内胶原纤维排列状态，摄片记录，并使用 Image-pro plus 6.0 软件分析胶原含量 (计算苯胺蓝染色在真皮中的百分比)。

**1.3.10 羟脯氨酸 (HYP) 含量计算** 动物第 11 天皮肤给药 6 h 后，随机抽取 6 只 (雌雄各 3 只)，实行安乐死后，迅速切取各组原创伤中心部位面积约为 2.0  $\text{cm}^2$ ，按质量 (g) 与生理盐水体积 (mL) 1 :

9 的比例，加入相应体积的生理盐水（4℃），放入冷冻研磨仪中研磨成 10% 组织液，离心（4℃，2 500 r/min，10 min），取上层清液，得组织匀浆液，并置 -21℃ 冰箱冷藏备用。根据羟脯氨酸测试盒说明书，使用和羟脯氨酸测试盒测定各组创面组织内的 HYP 水平。

**1.3.11 促炎症因子水平评估** 取各组“1.3.10”项下制备的组织匀浆液适量，根据说明书，用 ELISA 试剂盒测定各组创面组织内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的水平。

**1.3.12 统计分析** 采用 SPSS 17.0 for windows 统计分析软件进行统计学处理，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，各组间差异比较用单因素方差分析（One-Way ANOVA），以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

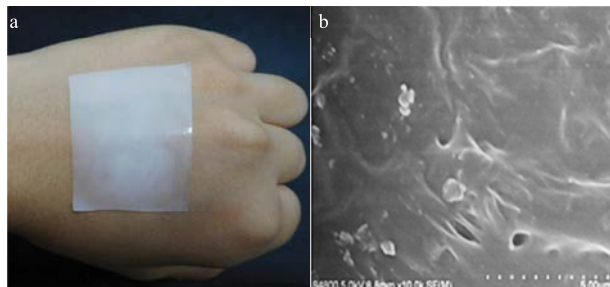
**2 结果**

**2.1 As-SA RP 的外观形貌**

本研究所制备的 As-SA RP 为乳白色凝胶状薄膜，如图 3-a 所示，由肉眼可以看出，As-SA RP 表面平整无裂纹，连续而致密，没有孔洞，与皮肤贴合效果良好；扫描电镜观察到的 As-SA RP 的表面形貌图如图 3-b 所示，由图可观察到 As-SA RP 无明显相位分离现象，致密无明显裂纹，说明 SA 和 Ca<sup>2+</sup> 发生良好的交联反应，As-SA RP 处于稳定的状态。

**2.2 As-SA RP 红外光谱图**

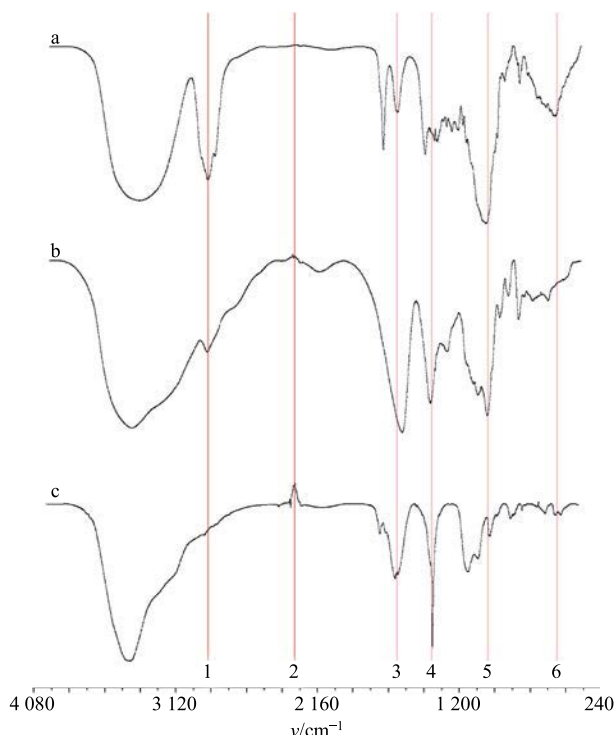
积雪草苷、SA 基质与 As-SA RP 的红外光谱图见图 4。由图 4-a 可知，积雪草苷在 2 923 cm<sup>-1</sup> 处为 -C-H 键的伸缩振动吸收、在 1 736 cm<sup>-1</sup> 处为 C=O 键的伸缩振动吸收、在 1 044 cm<sup>-1</sup> 处为 C-O 的伸缩振动吸收；由图 4-b 可以看出，SA 在 1 608 cm<sup>-1</sup> 处为 -COO-Na 键的伸缩振动吸收、在 1 415 cm<sup>-1</sup> 处为 -CH<sub>3</sub> 键的伸缩振动吸收、1 032 cm<sup>-1</sup> 处为 C-O 键的



a-数码相机下 As-SA RP 贴于人体皮肤表面 b-电镜下 As-SA RP 的表面形貌  
a-As-SA RP sticking to human skin surface under digital came  
b-Surface morphology of As-SA RP under electron microscope

**图 3 As-SA RP 表征图**

**Fig. 3 Appearance of As-SA RP scar treatment strips**



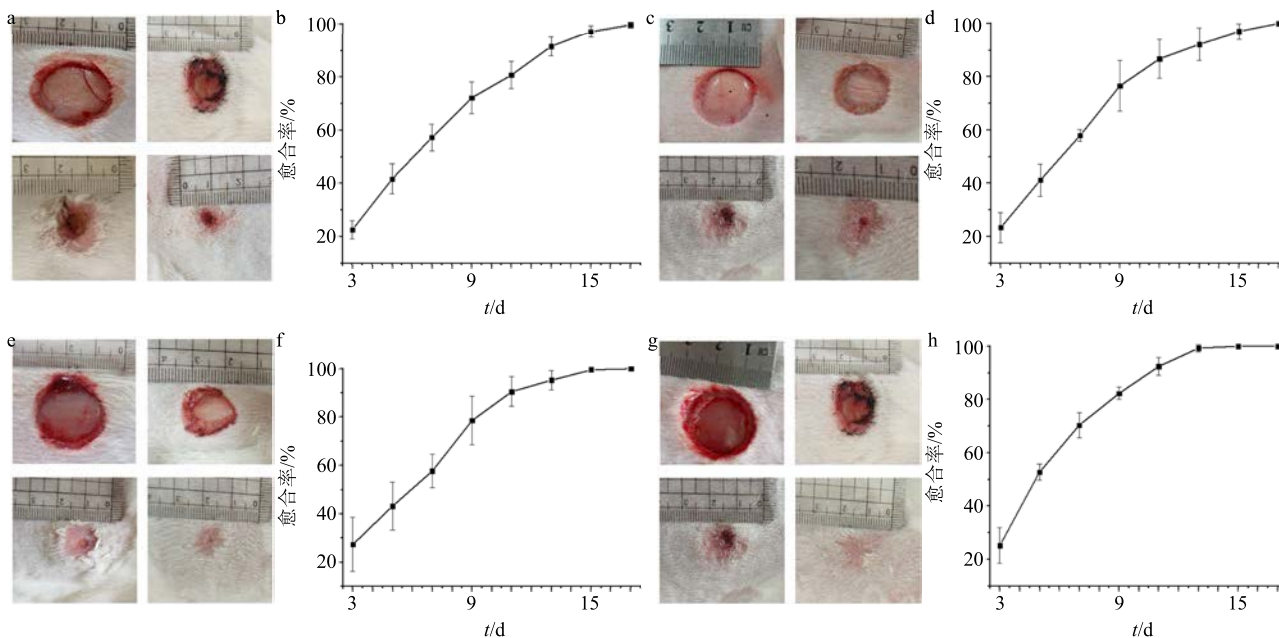
**图 4 积雪草苷 (a)、SA (b) 及 As-SA RP (c) 的红外光谱图**  
**Fig. 4 FTIR-ATR spectra of asiaticoside (a), SA (b) and As-SA RP (c)**

伸缩振动吸收；由图 4-c 可以看出，As-SA RP 在 1 639 cm<sup>-1</sup> 处为 -COO- 键的伸缩振动吸收，在 1 384 cm<sup>-1</sup> 处为 -CH<sub>3</sub> 的伸缩振动吸收，在 1 003 cm<sup>-1</sup> 处为 -C-O 的伸缩振动吸收峰。通过比较 SA、积雪草苷与 As-SA RP 的红外光谱图可知，SA 与积雪草苷的特征吸收峰均能出现在 As-SA RP 的红外光谱图中（图中直线 2~6），但均出现小幅度的偏移现象。积雪草苷与 SA 在 2 920 cm<sup>-1</sup> 左右处的 -C-H 伸缩振动吸收峰未能在 As-SA RP 的红外光谱图中出现（图中直线 1），说明积雪草苷与 SA 共混可能产生了氢键。结果表明积雪草苷与 SA 具有良好的相容性。

**2.3 创面愈合情况及愈合率**

各组创面不同时间的情况及愈合率如图 5 所示，比较各组各时间段的皮肤创面恢复状态可知（如图 5-a、c、e、g），各组在造模当天（第 0 天）伤口近圆形，有组织液渗出及脓性物分泌；造模后第 5 天，各组创面结痂，无组织液渗出，有红肿现象及轻微炎症现象，创面明显缩小；造模后的第 11 天，各组伤口结痂部分脱落，缩痂明显，但仍存在红肿现象；造模后第 17 天，各给药组的伤口进一步缩小，其中 As-SA RP 组的创面加皮已全部脱落，无红肿及炎症现象，说明创面愈合完全，模型组、SA 组





a-模型组的愈合情况 b-模型组的愈合周期 c-SA 组的愈合情况 d-SA 组的愈合周期 e-AsS 组的愈合情况 f-AsS 组的愈合周期 g-As-SA RP 组的愈合情况 h-As-SA RP 组的愈合周期  
a-wound healing in model group b-wound healing cycle of model group c-wound healing in SA group d-wound healing cycle of SA group e-wound healing in AsS group f-wound healing cycle of AsS group g-wound healing in As-SA RP group h-wound healing cycle of As-SA RP group

图 5 不同时间各组创面愈合情况及其愈合周期

Fig. 5 Situation and healing rate of wound in different time in each group

及 AsS 组仍有痂皮未脱落，缩痂处仍有红肿现象，说明创面愈合不完全。

由图 6 可知，与模型组比较，SA 组的愈合全过程无显著性差异，AsS 组及 As-SA RP 组的愈合周期均短于模型组，说明 AsS 和 As-SA RP 均能缩短动物皮肤创面愈合时间，且与 AsS 组相比，As-SA RP 组的愈合时间较短。结果表明，As-SA RP 具有加速创面愈合，缩短愈合周期的功效。

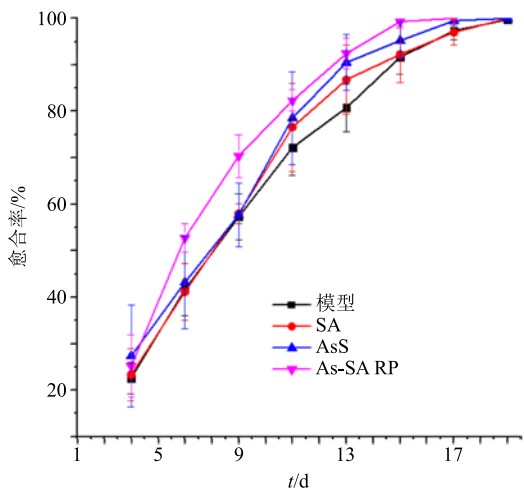


图 6 各组愈合周期比较

Fig. 6 Comparison of wound healing cycles in each group

## 2.4 组织学分析

HE 染色是根据组织或细胞中不同成分对染色剂的亲和程度不同，把组织和细胞中的不同成分染上不同的颜色，以便观察切片组织中各成分的含量以及分布情况，作出病理学分析的一种切片染色方法<sup>[41]</sup>。为了进一步探究 As-SA RP 对创伤皮肤的表皮及真皮的影响，取末次给药 6 h 后的兔皮肤组织进行 HE 染色，在显微镜下观察创面的 HE 染色病理切片，如图 7 所示，模型组表皮层呈不正常增厚，表皮层与真皮层的界限不清晰，真皮间质疏松，存在炎症细胞；与模型组相比，SA 组的表皮层仍呈增厚状态，AsS 组和 As-SA RP 组细胞结构比较完整，表皮与真皮连接紧密，界限清晰，胶原纤维束排列较有序；与 SA 组和 AsS 组相比，As-SA RP 组的真皮层更加紧密，胶原纤维束排列更加有序，结缔组织重组良好，说明 As-SA RP 对动物皮肤创面的表皮及真皮具有良好的修复效果。

Masson 染色是胶原纤维的经典染色，取末次给药 6 h 后的兔皮肤做 Masson 染色以观察胶原分布，结果见图 8。使用 Image-pro plus 软件对 Masson 图中胶原纤维含量进行定量(采用平均吸光度值表示)结果如图 9 所示，与模型组相比，SA 组、AsS 组和

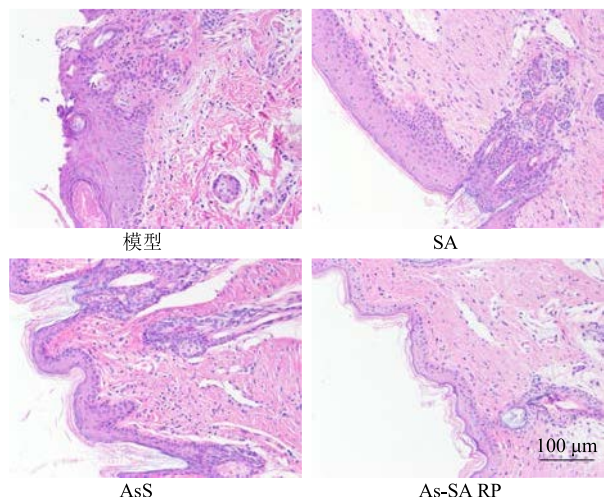


图 7 HE 染色评价各组皮肤病理变化 (×200)

Fig. 7 Pathological changes of skin in each experimental group detected by HE staining (× 200)

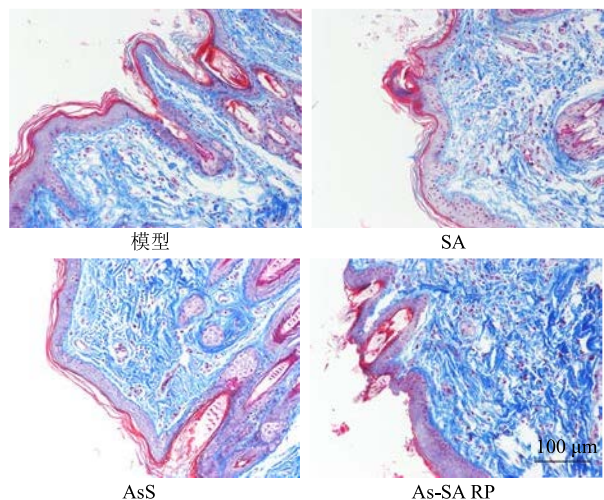
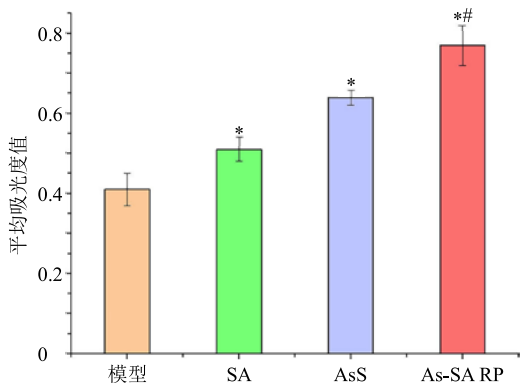


图 8 Masson 染色评价各组皮肤胶原含量 (×200)

Fig. 8 Evaluation of collagen content in skin of each group by Masson staining (× 200)



与模型组比较: \* $P < 0.05$  与 AsS 组比较: # $P < 0.05$ , 下同  
\* $P < 0.05$  vs model group # $P < 0.05$  vs AsS group, same as below

图 9 各组损伤皮肤的胶原含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 9 Total protein concentration results of wounds in each experimental group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

As-SA RP 组的胶原纤维含量均有提高, 与 SA 组和 AsS 组相比, As-SA RP 组的胶原纤维含量更高, 具有显著差异性 ( $P < 0.05$ ), 结果表明, As-SA RP 作用于动物皮肤创口能显著提高创面组织中胶原的含量, 较 SA 和积雪草苷作用于创口效果更优。

### 2.5 羟脯氨酸含量

在创伤修复的过程中, 成纤维细胞产生胶原的量影响着伤口愈合, 而创面组织中的羟脯氨酸含量可以反映胶原的水平, 因此可通过羟脯氨酸的含量变化来反映创伤愈合水平<sup>[42]</sup>。由图 10 可知, SA 组家兔皮肤的羟脯氨酸含量与模型组无显著差异, 与模型组相比, AsS 组及 As-SA RP 组的羟脯氨酸含量明显增高, 具有显著差异性 ( $P < 0.05$ ), 与 AsS 组相比, As-SA RP 组的羟脯氨酸含量明显增高, 具有显著差异性 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 积雪草苷能提高创伤组织中的羟脯氨酸的含量, 对比直接作用于创面, 积雪草苷以贴剂形式作用于创面皮肤, 更能有效提高创伤组织中羟脯氨酸的含量, 对创面愈合起到一定的促进作用。

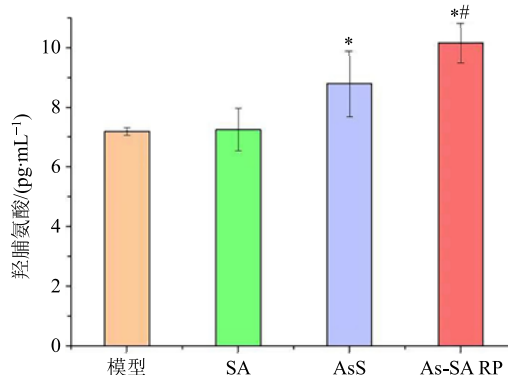


图 10 各实验组创面羟脯氨酸含量的测定 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 10 Determination of hydroxyproline content in wounds of each experimental group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 2.6 促炎症因子水平表达

当机体受到创伤后, 机体会产生皮肤肿瘤坏死因子  $TNF-\alpha$ ,  $TNF-\alpha$  的出现会促进  $IL-1\beta$  和  $IL-6$  等促炎症因子的产生, 在  $IL-1\beta$  与  $TNF-\alpha$  的协同作用下, 能诱发机体产生炎症发热反应, 大量的  $IL-6$  因子的产生和累积会使创伤部位周围的炎症反应加强。在正常的创伤修复过程中,  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$  和  $IL-6$  等促炎症因子的含量会显著升高。大量促炎症因子的释放, 会加重创面的炎症反应, 妨碍创面的修复, 甚至会杀伤正常的组织细胞<sup>[43-44]</sup>。由图 11 显示, 与模型组相比, 在创伤修复的过程中 SA 组的  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$  和  $IL-6$  的表达水平无显著性差异, 因此表明

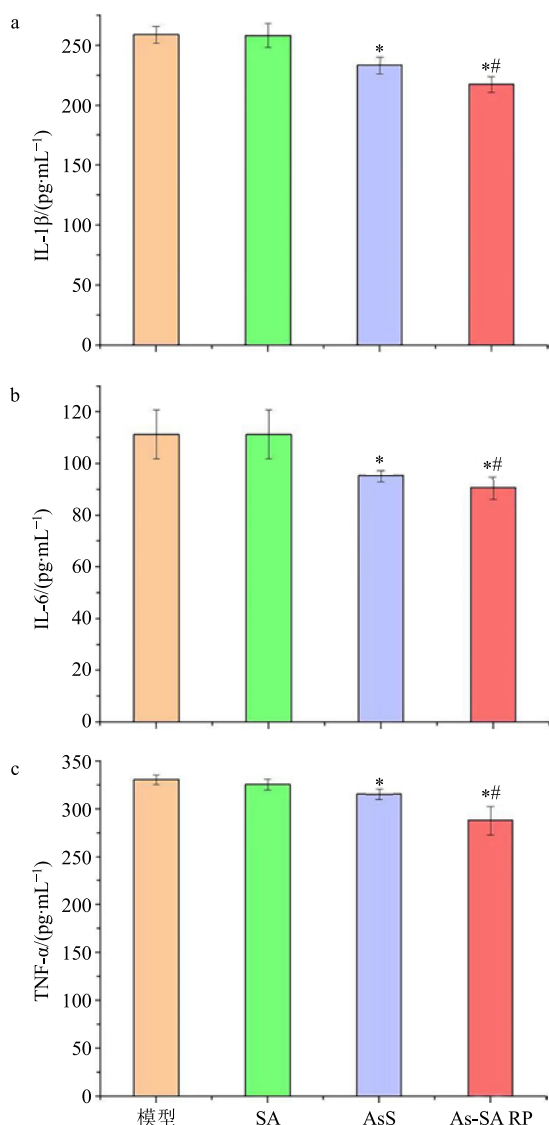


图 11 各组促炎症因子 IL-1β (a)、IL-6 (b)、TNF-α (c) 表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 11 Expression of proinflammatory factors IL-1β (a), IL-6 (b) and TNF-α (c) in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

SA 对创伤修复愈合无显著疗效；与模型组比较，AsS 组和 As-SA RP 组的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )，与 AsS 组比较，As-SA RP 组的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。结果表明，说明积雪草苷有效能抑制促炎症因子的高表达，与积雪草苷直接作用于创面相比，以贴剂形式作用于创面的积雪草苷更能有效的抑制促炎症因子的高表达。

### 3 讨论

本研究利用 SA 与 Ca<sup>2+</sup>交联成膜的特点，以积雪草苷为修复成分、甘油为保湿剂制备了 As-SA RP，并对其促创伤修复效果进行了考察。结果显示，

积雪草苷可通过提高创面组织中羟脯氨酸的含量，抑制促炎症因子的高表达以促进创面组织中胶原纤维的生成，使其密度均匀、排列有序，同时减轻创面局部炎症，进而促进创口的修复，并缩短创面皮肤的愈合时间。

对比 As-SA RP 组与 AsS 组创面组织的生化指标、病理切片及愈合周期可知，As-SA RP 修复、愈合创面的效果较积雪草苷溶液直接作用于创面更优，说明积雪草苷以贴剂形式作用于创面皮肤，一定程度上提升皮肤对积雪草苷的吸收，具有较好的皮肤损伤修复效果。上述结果一致表明，As-SA RP 在动物皮肤创伤修复中发挥了良好的治疗效果，具有良好的发展前景。

### 参考文献

- [1] 周俊, 马慧群. 瘢痕的临床类型及治疗进展 [J]. 中国医学文摘-皮肤科学, 2015, 32(1): 16-23.
- [2] 朱汉民. 蜕皮甾酮在犬皮肤创伤愈合过程中对相关炎症及生长因子的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- [3] 沈鹏. 林蛙皮多肽对兔皮肤损伤的修复作用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [4] Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing [J]. *Forensic Sci Int*, 2010, 203(1/2/3): 93-98.
- [5] Nosenko M A, Ambaryan S G, Drutskaya M S. Proinflammatory cytokines and skin wound healing in mice [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2019, 53(5): 741-754.
- [6] Locksley R M, Killeen N, Lenardo M J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology [J]. *Cell*, 2001, 104(4): 487-501.
- [7] Siqueira M F, Li J, Chehab L, et al. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-alpha dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1) [J]. *Diabetologia*, 2010, 53(2): 378-388.
- [8] 宋文豪. FADIINS 抑制 IL-1β 激活的信号通路并抑制小鼠骨性关节炎进展的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [9] 吐尼克·木拉提别克. 基质金属蛋白酶 9 促进急性胰腺炎炎症反应和细胞坏死 [D]. 上海: 上海交通大学, 2017.
- [10] 李晓康, 王舒, 于杨, 等. 皮肤创伤修复研究进展 [J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2016, 15(1): 62-65.
- [11] Muthuramalingam K, Choi S I, Hyun C, et al. β-Glucan-based wet dressing for cutaneous wound healing [J]. *Adv Wound Care*, 2019, 8(4): 125-135.
- [12] 申潜, 余露山, 周慧, 等. 应用反相高效液相色谱



- 法同时测定积雪草提取物中羟基积雪草苷、积雪草苷及其苷元 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2014, 43(2): 135-140.
- [13] 王 翕, 李早慧, 孙 旭. 积雪草的开发研究 [J]. 吉林农业, 2017(13): 91-92.
- [14] Lee J H, Kim H L, Lee M H, *et al.* Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth *in vitro* wound healing model [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(13): 1223-1227.
- [15] 李珊珊, 王玮葵, 曾宛玉. 积雪草苷对瘢痕组织成纤维细胞 I、III 胶原和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达的影响 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2013, 29(5): 310-313.
- [16] 欧阳丹薇, 邵 燕, 孔德云, 等. 积雪草总苷及其化学成分对瘢痕成纤维细胞增殖的抑制作用 [J]. 世界临床药物, 2014, 35(4): 215-220.
- [17] 张 政. 结缔组织生长因子的研究进展 [J]. 滨州医学院学报, 2015, 38(1): 67-70.
- [18] Geethu V S, Manikandan P, Nethaji R, *et al.* A review on: Transdermal drug delivery systems [J]. *Indo Am J Pharm Res*, 2014, 4(4): 1809-1824.
- [19] Ita K B. Transdermal drug delivery: Progress and challenges [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2014, 24(3): 245-250.
- [20] 钱风云, 傅德贤, 欧阳藩. 海带多糖生物功能研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2003, 22(1): 55-59.
- [21] 黄攀丽, 沈晓骏, 陈京环, 等. 海藻酸钠的提取与功能化改性研究进展 [J]. 林产化学与工业, 2017, 37(4): 13-22.
- [22] 王孝华. 海藻酸钠的提取及应用 [J]. 重庆工学院学报, 2007(9): 124-128.
- [23] 王孝华. 海藻酸钠的提取及应用研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2004.
- [24] Abbar S, Amoah B, Schilling M W, *et al.* Efficacy of selected food-safe compounds to prevent infestation of the ham mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae), on southern dry-cured hams [J]. *Pest Manag Sci*, 2016, 72(8): 1604-1612.
- [25] Kirdponpattara S, Phisalaphong M. Bacterial cellulose-alginate composite sponge as a yeast cell carrier for ethanol production [J]. *Biochem Eng J*, 2013, 77: 103-109.
- [26] Ahmadi A, Zorofchian Moghadamtousi S, Abubakar S, *et al.* Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: A review [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 825203.
- [27] 詹现璞, 吴广辉. 海藻酸钠的特性及其在食品中的应用 [J]. 食品工程, 2011(1): 7-9.
- [28] Moebus K, Siepmann J, Bodmeier R. Novel preparation techniques for alginate-poloxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45(3): 358-366.
- [29] 高春梅, 柳明珠, 吕少瑜, 等. 海藻酸钠水凝胶的制备及其在药物释放中的应用 [J]. 化学进展, 2013, 25(6): 1012-1022.
- [30] Russo R, Malinconico M, Petti L, *et al.* Physical behavior of biodegradable alginate-poly(vinyl alcohol) blend films [J]. *J Polym Sci Part B: Polym Phys*, 2005, 43(10): 1205-1213.
- [31] Lee K Y, Mooney D J. Alginate: Properties and biomedical applications [J]. *Prog Polym Sci*, 2012, 37(1): 106-126.
- [32] 吴志古. 创伤修复材料 [J]. 中国实用外科杂志, 1997, 17(11): 687-690.
- [33] 王 群. 天然聚多糖共混材料的结构表征及其性能研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2004.
- [34] 卜天韵, 瞿 欣, 凌 峰. 保湿四部曲: 从皮肤生理学到解决方案 [J]. 日用化学品科学, 2017, 40(10): 48-52.
- [35] Katagiri C, Sato J, Nomura J, *et al.* Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice [J]. *J Dermatol Sci*, 2003, 31(1): 29-35.
- [36] 王秀娟, 张坤生, 任云霞, 等. 海藻酸钠凝胶特性的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 259-262.
- [37] 郭锦棠, 张 瑾, 殷俊威. 抗菌性海藻酸钠膜的制备及性能分析 [J]. 天津大学学报: 自然科学与工程技术版, 2013, 46(7): 653-658.
- [38] 付万进, 王 晖, 庞玉新, 等. 皮肤创伤模型研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2013, 29(2): 214-218.
- [39] 陈玉林, 黄 康. 创面愈合的评价指标 [J]. 中国组织工程研究, 2002, 6(8): 1080-1081.
- [40] 李培楠. 五谷虫新鲜提取物对体内和体外皮肤损伤修复的促进作用及其分子机制的分析 [D]. 大连: 大连医科大学, 2015.
- [41] 向思敏, 王德玉. 病理诊断中病理技术 HE 染色的临床价值研究 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(26): 165-166.
- [42] 胡 芮. 羧甲基壳聚糖锌促进创伤愈合作用的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [43] 张旭辉, 董建勋, 李 健, 等. 回阳生肌方药对慢性皮肤溃疡大鼠创面愈合及炎症因子的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(3): 170-173.
- [44] 宋加毅. 具有自抗炎功能的胶原基伤口敷料 [D]. 无锡: 江南大学, 2013.