

苗药血人参提取物水凝胶的制备及促创面愈合体内外研究

宋选飞¹, 杨露¹, 谢欢¹, 周斌¹, 刘耀^{1,2,3}, 徐剑^{1,2,3*}, 张永萍^{1,2,3*}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州省民族药经皮给药制剂工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025

3. 国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 制备一种载苗药血人参 *Indigofera stachyodes* 提取物的聚乙烯醇 (PVA)/木质素 (Lig)/壳聚糖 (CS) 水凝胶并探究其促创面愈合机制。方法 在单因素考察的基础上, 正交试验优选处方工艺并对其进行质量评价和体外生物评价, 通过建立大鼠全层皮肤损伤模型, 评价其促创面愈合效果。结果 携载提取物的 PVA/Lig/CS 水凝胶的最优处方和制备工艺为 PVA 用量 7.0 g、CS 用量 4.0 g、Lig 用量 0.5 g、冻融循环次数 4 次, 每次冻结 6 h。该凝胶具有多孔网状结构、良好的溶胀性、保湿性及一定的机械强度, 同时具有良好的生物相容性、抑菌性以及有效抑制巨噬细胞细胞迁移, 且抑制作用可能与时间呈正比。该水凝胶的体内药效学研究表明, 其促创面愈合作用可能与减少创面组织炎性细胞浸润, 促进巨噬细胞向 M2 型极化、增加毛细血管生成和纤维组织形成有关。结论 制备的载血人参提取物的 PVA/Lig/CS 水凝胶剂制备工艺简单、稳定可行、具有良好的缓释性能, 且对全层皮肤损伤具较好的治疗效果。

关键词: 血人参提取物; PVA/Lig/CS 水凝胶; 创面愈合; 体外生物评价; 药效学研究

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)09-2933-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.09.008

Preparation of a hydrogel of *Indigofera stachyodes* extract from Miao medicine and promotion of wound healing *in vivo* and *ex vivo* study

SONG Xuanfei¹, YANG Lu¹, XIE Huan¹, ZHOU Bin¹, LIU Yao^{1,2,3}, XU Jian^{1,2,3}, ZHANG Yongping^{1,2,3}

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Ethnic Medicine Transdermal Drug Delivery Preparation Engineering Technology Research Center, Guiyang 550025, China

3. National Engineering Research Center of Miao's Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To prepare of a polyvinyl alcohol (PVA)/lignin (Lig)/chitosan (CS) hydrogel containing extracts of *Indigofera stachyodes* (IS), a Miao medicine, and investigate its promoting wound healing mechanism. **Methods** On the basis of single factor investigation, orthogonal test was performed to prefer the prescription process and to evaluate its quality and *in vitro* biological evaluation, and its promoting wound healing effect was evaluated by establishing a rat whole skin injury model. **Results** The optimal prescription and preparation process of PVA/Lig/CS hydrogels carrying the extracts were 7.0 g of PVA, 4.0 g of CS, 0.5 g of Lig, and four freeze-thaw cycles of 6 h each. The gel has a porous mesh structure, good swelling property, moisture retention and some mechanical strength, as well as good biocompatibility, bacteriostatic properties and effective inhibition of macrophage cell migration, and the inhibition effect may be proportional to time. The *in vivo* pharmacodynamic study of this hydrogel showed that its promoting wound healing effect may be related to the reduction of inflammatory cell infiltration in the wound tissue, promotion of macrophage polarisation towards the M2 type, and increase of capillary formation and fibrous tissue formation. **Conclusion** The prepared PVA/Lig/CS hydrogel containing IS extract is simple, stable and feasible to prepare, has good slow-release properties, and has better

收稿日期: 2023-10-19

基金项目: 贵州省高等学校中药民族药(苗药)新剂型新制剂工程研究中心(黔教技[2022]022); 国家苗药工程技术研究中心能力提升(黔科合中引地[2023]006); 贵州省高层次创新型人才(黔科合平台人才-GCC[2023]037)

作者简介: 宋选飞(1996—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为中药及民族药药物新制剂与新剂型。E-mail: xuanfeisong@126.com

***通信作者:** 张永萍(1965—), 女, 教授, 博士研究生导师。主要研究方向为中药及民族药新制剂、新剂型与新技术开发研究。

E-mail: zgygpg@126.com

徐剑(1977—), 男, 硕士, 教授, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型。E-mail: twt8489@126.com

therapeutic effect on all-over skin injury.

Key words: *Indigofera stachyodes* extract; PVA/Lig/CS hydrogel; wound healing; *in vitro* biological evaluation; pharmacodynamic study

皮肤组织作为保护器官免受感染和环境变化的屏障, 具有至关重要的作用, 但皮肤因各种物理、化学和微生物因子等因素引发的急、慢性创面常难以愈合^[1], 甚至伴有大量腐肉、脓液和恶臭等, 严重影响患者的生活质量。因此, 对创面愈合过程进行干预, 以加速创面愈合是皮肤创面治疗的首要目标。目前, 皮肤创伤修复药物治疗因其便携性等广受研究者关注。但大部分皮肤创面用药, 主要包括抗菌剂、干细胞疗法、生长因子等^[2], 常存在生物安全性低、易产生耐药性、成本较高、稳定性较差等不足^[3]。

血人参与豆科木蓝属植物茸毛木蓝 *Indigofera stachyodes* Lindl. 的干燥根, 是苗族民间常用药^[4-5], 应用历史悠久, 其乙醇提取物 (*I. stachyodes* ethanol extract, IS-EE) 被证明具有抑制斑马鱼炎症模型中巨噬细胞向急性创伤部位募集的作用^[6]。因此, 本研究拟制备一种载有苗药血人参与乙醇提取物 PVA/Lig/CS 水凝胶 (IS-EE PVA/Lig/CS hydrogel, IS-EE-H) 作为创面敷料, 该水凝胶是由木质素 (lignin, Lig)、壳聚糖 (chitosan, CS) 和聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 组成的混合材料, 旨在以木质素改善水凝胶的机械强度, 以壳聚糖提高创面的抗菌性能及以聚乙烯醇维持创面周围的润湿环境, 并利用混合水凝胶三维网络结构作为 IS-EE 的药物储库, 使药物从水凝胶中持续释放, 防止巨噬细胞向炎症部位的过度迁移、聚集, 加快皮肤创面愈合, 以期皮肤创面愈合提供新型敷料, 并为皮肤创面愈合药物的开发提供理论基础。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

LC-2030C 3D 型高效液相色谱仪、AUW120D 型十万分之一电子分析天平, 日本岛津制作所; Thermo Fisher Nicolet Is10-透射/ATR 红外、Thermo 3111 型 CO₂ 细胞培养箱、MULTISKAN SKY 153 型全自动酶标仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; CKX53 型倒置相差显微镜, 上海蛮吉光电科技有限公司; YXQ-LS-100SLL 型高压灭菌锅, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; PHY-III 型病理组织漂烘仪, 常州市中威电子仪器有限公司; RS36 型全自动染色机, 常州派斯杰医疗设备有限公司; Inspect 型扫描电子显微镜 (SEM), 美国 FEI 公司。

1.2 主要材料

血人参药材, 批号 20210322, 贵阳德昌祥药业有限公司, 经贵州中医药大学张永萍教授鉴定为豆科木蓝属植物茸毛木蓝 *Indigofera stachyodes* Lindl. 的干燥根; 对照品儿茶素, 质量分数 98.0%, 批号 170209, 成都植标化纯生物技术有限公司; 对照品表儿茶素, 质量分数 99.7%, 批号 110878-201703, 中国食品药品检定研究院; CCK-8 (Cell Counting Kit-8 细胞计数试剂) 试剂盒, 批号 K1018, APEX BIO Technology LLC; 壳聚糖 (批号 RH300965)、木质素 (批号 RH238608), 上海易恩化学技术有限公司; 聚乙烯醇-124 (PVA-124), 批号 181207, 西陇科学股份有限公司; 巨噬细胞 (RAW264.7), 中国典型培养物保藏中心; DMEM 培养基, 批号 2318854, Gibco 公司; 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 批号 820F036, Solarbio 公司; 重组牛碱性成纤维细胞生长因子, 批号 6920699338625, 珠海亿胜生物制药有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号 20220120)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6, 批号 20220120), 南京建成生物工程研究所; 卡那霉素 (批号 820Y0411)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号 710N0315), Solarbio 公司。

1.3 实验动物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体质量 180~220 g, 购自长沙天勤生物技术有限公司, 合格证: SCXK (湘) 2019-0015。动物实验符合动物实验伦理学要求, 经贵州中医药大学动物伦理委员会审查后批准, 编号 20210174。

2 方法与结果

2.1 IS-EE 的制备

称取血人参药材 300 g, 剪断或切碎, 加 6 倍量 60% 乙醇回流提取 2 h, 滤过, 滤渣加 4 倍量 60% 乙醇回流提取 1.5 h, 滤过。合并 2 次滤液, 减压回收乙醇并浓缩至一定浓度, 真空干燥至含水量 < 5%, 得 IS-EE 浸膏粉 54 g^[6]。

2.2 IS-EE 体外分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 ComatexTM C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~40 min, 8%~14% 乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 280 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C;

进样 10 μL 。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取儿茶素 16.35 mg、表儿茶素 14.24 mg 分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇使其完全溶解并稀释至 10 mL，作为儿茶素和表儿茶素的储备液。精密移取 2 mL 儿茶素储备液和 5 mL 表儿茶素储备液置于 100 mL 量瓶中并用甲醇稀释至 100 mL，得到含儿茶素 32.70 $\mu\text{g/mL}$ 和表儿茶素 71.20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取 IS-EE 浸膏粉 50.0 mg 于 10 mL 量瓶中加入甲醇超声使其完全溶解，稀释至 10 mL。

2.2.4 专属性考察 取混合对照品溶液及 IS-EE 供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，色谱图见图 1。在该色谱条件下，IS-EE 供试品溶液和对照品溶液中儿茶素和表儿茶素的色谱峰具有相同的保留时间，且能实现完全分离。

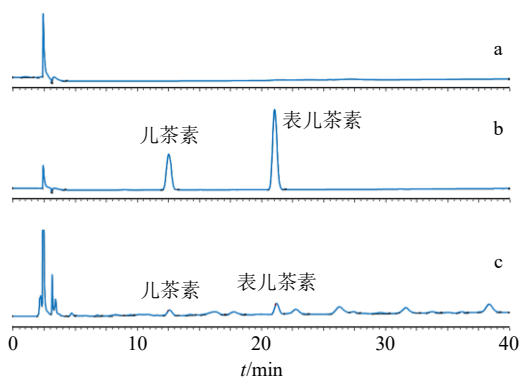


图 1 空白甲醇 (a)、混合对照品 (b)、IS-EE 样品 (c) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank methanol (a), mixed reference substances (b) and IS-EE sample (c)

2.2.5 线性关系考察 精密吸取 0.625、1.25、2.5、5.0、10.0 mL “2.2.2”项下的混合对照品储备液，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释，得到儿茶素系列质量浓度和表儿茶素系列质量浓度的混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，测定其峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，待测成分峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得儿茶素的线性回归方程为 $Y=6\,659.00X-404.29$ ， $R^2=0.999\,9$ ，线性范围为 2.04~32.74 $\mu\text{g/mL}$ ；表儿茶素的线性回归方程为 $Y=7\,148.20X-659.54$ ， $R^2=1.000\,0$ ，线性范围为 4.50~71.20 $\mu\text{g/mL}$ 。由此可知，IS-EE 中 2 种成分在线性范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度考察 精密吸取 2.5 mL 混合对照品

储备液，用甲醇定容至 10 mL，并按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，重复 6 次，以随行线性回归方程计算其中儿茶素和表儿茶素的实测质量浓度，并计算其 RSD 值，结果其 RSD 分别为 0.69% 和 1.07%，可知儿茶素和表儿茶素 RSD 值均符合要求，仪器精密度良好。

2.2.7 重复性考察 取同一批 IS-EE 样品 50.0 mg，精密称定，平行 6 份，按“2.2.3”项下方法处理样品制备供试品溶液，并按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，以随行线性回归方程计算其中儿茶素和表儿茶素的实测含量，并计算其 RSD 值，结果其 RSD 分别为 2.11% 和 1.11%，可知其 RSD 值均符合要求，表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性考察 取同一批 IS-EE 样品 50.0 mg，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.2.1”项下色谱条件在制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 时分别进样分析，以随行线性回归方程计算其中儿茶素和表儿茶素的实测含量，并计算其 RSD 值，结果其 RSD 分别为 2.12% 和 2.37%，可知其 RSD 值均符合要求，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率考察 称取已测定指标成分含量的 IS-EE 样品约 25.0 mg，精密称定，平行 6 份，按照所得 2 种成分含量分别加入其 1.0 倍量的对照品，按“2.2.3”项下方法处理样品制备供试品溶液，并按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，以随行线性回归方程计算其中儿茶素和表儿茶素的实测含量，并计算 2 个指标成分的加样回收率及其 RSD 值，结果儿茶素和表儿茶素的平均加样回收率分别为 103.87% 和 100.53%，RSD 分别为 2.86% 和 2.86%。

2.3 IS-EE-H 的制备

称取 IS-EE 浸膏粉 0.5 g，精密称定，以 60% 乙醇溶液 7 mL 溶解，加入 PVA 溶液（取 8 g PVA 加 32 g 超纯水，90 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌溶解）搅拌后与 Lig 溶液（取 1 g Lig 加 9 g 超纯水，常温搅拌溶解）混合，搅拌均匀后加入 CS 溶液（取 CS 4 g 加 71 g 2% 乙酸溶液，90 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌溶解），得到的混合溶液进行离心（2 000 r/min、3 min）脱气处理，采用冻融法（冷冻-解冻）在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下物理交联得 IS-EE-H。

2.4 单因素考察 IS-EE-H 的处方工艺

本实验采用冻融法制备 PVA 水凝胶，其机制主要为在冷冻状态下，随着冻融循环增加，水冻结、膨胀，推动 PVA 链与其他高分子材料链紧密接触，

形成高分子无规则状的高密度区,促进氢键和晶体的形成^[7]。为了考察冻融循环次数、冻结时间、不同基质比、木质素含量对水凝胶的影响,本研究选取的冻融循环次数分别为 2、4、6 次,冻结时间分别为 6、12、24 h, PVA/Lig/CS 比例(质量比)分别为 8:1:2、7:1:3、6:1:4; Lig 含量分别为 0.5、1.0、1.5 g。除筛选因素改变外,将其他因素固定,即冻融循环次数和冻结时间分别为 4 次和 6 h, PVA/Lig/CS 比例为 7:1:3, Lig 含量为 1.0 g。按照“2.3”项下方法制备水凝胶,评价各因素对水凝胶药物释放性能的影响。

2.4.1 冻融循环次数 不同冻融循环次数的水凝胶均在 12 h 后到达溶胀平衡状态,经过 4 次循环后,水凝胶的溶胀率达到最佳,溶胀率为 374.8%,当冻融循环增加至 6 次时水凝胶溶胀率几乎不变,说明水凝胶冻融至 4 次时,其交联程度可能已达到最大,此外冻融 2 次水凝胶中儿茶素和表儿茶素的累积释放率最大,其次是冻融 6 次和冻融 4 次。

2.4.2 冻结时间 不同冻结时间的水凝胶均在 12 h 后达到溶胀平衡,其中冻结 6 h 的溶胀率(401.4%)最佳,较冻结 12 h 和 24 h 的平衡溶胀率(350.0%)高,同时冻结 6 h 和 24 h 时水凝胶中的儿茶素和表儿茶素的累积释放率较 12 h 高,可达 80%以上。研究表明,水凝胶溶胀率是衡量其吸收伤口渗出液能力的关键因素之一^[8-9],因此,本研究后续采用冻结 6 h 进行水凝胶的制备。

2.4.3 基质比 PVA/Lig/CS 质量比(6:1:4)水凝胶溶胀率最大,可达至 284.0%,其次是 PVA/Lig/CS 质量比(7:1:3)水凝胶(265.6%)和 PVA/Lig/CS 质量比(8:1:2)水凝胶(238.2%)。该结果表明,水凝胶处方中 PVA 和 CS 比值越小,水凝胶的溶胀度可能越大,其中 CS 对水凝胶的溶胀度可能起主导作用。水凝胶处方中 PVA 和 CS 比值越小,水凝胶的保湿性越小。PVA/Lig/CS 质量比(6:1:4)水凝胶中儿茶素和表儿茶素的累积释放率最大,分别为 101.4%和 85.4%,其次是 PVA/Lig/CS 质量比(8:1:2)水凝胶和 PVA/Lig/CS 质量比(7:1:3)水凝胶,2 者的儿茶素累积释放率分别为 93.9%、77.7%,表儿茶素的累积释放率分别为 84.5%、64.8%。

2.4.4 木质素含量 在木质素含量分别为 0.5、1.0、1.5 g 的水凝胶处方中, PVA/Lig/CS 质量比(7:0.5:3)水凝胶的溶胀率和保湿率最高,该结果表明木质素在水凝胶处方中的比例越小,水凝胶的溶胀率和

保湿率可能越大。PVA/Lig/CS 质量比(7:1.5:3)水凝胶儿茶素和表儿茶素的累积释放率最大,其次是 PVA/Lig/CS 质量比(7:1.0:3)水凝胶和 PVA/Lig/CS 质量比(7:0.5:3)水凝胶,该结果表明,水凝胶中木质素含量越大水凝胶的药物释放率可能越大。

2.5 正交试验优化处方工艺

为了进一步筛选 IS-EE-H 的制备工艺和制备处方,本实验采用了正交试验设计法对其制备工艺和制备处方进行优化。单因素考察实验结果显示, PVA 用量(A)、CS 用量(B)、Lig 用量(C)、冻融循环次数(D)均对水凝胶的溶胀率、药物累积释放率影响较大,对保湿度的影响相对较小,因此,正交试验以水凝胶中儿茶素和表儿茶素的累积释放率和溶胀率的综合评分[综合评分=(儿茶素累积释放率/儿茶素累积释放率最大值) $\times$ 0.35 $\times$ 100+(表儿茶素累积释放率/儿茶素累积释放率最大值) $\times$ 0.35 $\times$ 100+(平衡溶胀度/平衡溶胀度最大值) $\times$ 0.3 $\times$ 100]作为评价指标,按 $L_9(3^4)$ 因素水平表(表 1)进行正交试验。由实验结果(表 1、2)综合分析确定 IS-EE-H 的制备工艺和制备处方为 $A_2B_3C_1D_2$,即 PVA 用量 7.0 g、CS 用量 4.0 g、Lig 用量 0.5 g 和冻融循环次数 4 次。

2.6 IS-EE-H 的表征

2.6.1 傅里叶红外光谱分析 将 PVA 水凝胶、PVA/Lig 水凝胶、PVA/Lig/CS 水凝胶和 IS-EE-H 冷冻干燥,干燥后的水凝胶分别使用傅里叶红外光谱分析仪分析其红外光谱(FTIR),分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描次数为 16 次,光谱范围为 $4\ 000\sim500\text{ cm}^{-1}$ 。其结果如图 2 所示。 $1\ 600\sim1\ 400\text{ cm}^{-1}$ 是木质素典型的芳香族骨架振动^[10], PVA/Lig 水凝胶、PVA/Lig/CS 水凝胶及 IS-EE-H 在 $1\ 419\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 569\text{ cm}^{-1}$ 处表现出特征峰,且 $1\ 569\text{ cm}^{-1}$ 的峰强增加,表明木质素与 PVA 可能交联成功。 $3\ 280\text{ cm}^{-1}$ 的强吸收峰是由于-OH 拉伸振动^[11], PVA 存在大量亲水基团羟基,故 PVA 水凝胶、PVA/Lig 水凝胶、PVA/Lig/CS 水凝胶及 IS-EE-H 在 $3\ 280\text{ cm}^{-1}$ 均出现强吸收。研究表明,氢键形成时会使峰强增加同时将波段向低波数方向移动^[12]。IS-EE-H 在 $3\ 257\text{ cm}^{-1}$ 左右峰强增加,猜想 IS-EE 可能以氢键的形式包载于 PVA/Lig/CS 水凝胶中。

2.6.2 形态学表征 将 PVA/Lig/CS 水凝胶和 IS-EE-H 用相机记录其形态,同时进行冷冻干燥,干燥

表 1 正交试验设计与结果
Table 1 Design and results of orthogonal experiment

试验号	A/g	B/g	C/g	D/次	累积释放率评分		溶胀率 评分	综合 评分
					儿茶素	表儿茶素		
1	6 (1)	2 (1)	0.5 (1)	2 (1)	35.00	27.34	16.51	78.85
2	6	3 (2)	1.0 (2)	4 (2)	22.32	19.98	9.85	52.15
3	6	4 (3)	1.5 (3)	6 (3)	25.71	22.15	21.26	69.11
4	7 (2)	2	1.0	6	24.40	20.98	7.84	53.23
5	7	3	1.5	2	21.49	17.24	14.24	52.97
6	7	4	0.5	4	32.27	35.00	30.00	97.27
7	8 (3)	2	1.5	4	31.37	24.43	10.55	66.36
8	8	3	0.5	6	30.19	24.65	17.18	72.03
9	8	4	1.0	2	20.12	18.31	12.78	51.20
K ₁	200.11	198.44	248.15	183.02				
K ₂	203.47	177.15	156.58	215.78				
K ₃	189.59	217.58	188.44	194.37				
R	13.88	40.43	91.57	32.76				

表 2 方差分析
Table 2 Variance analysis

变异来源	平方和	自由度	F 值	显著性
A	34.957 2	2	1.000 0	
B	272.687 6	2	7.800 6	
C	1 440.601 0	2	41.210 6	P<0.024
D	184.492 0	2	5.277 7	

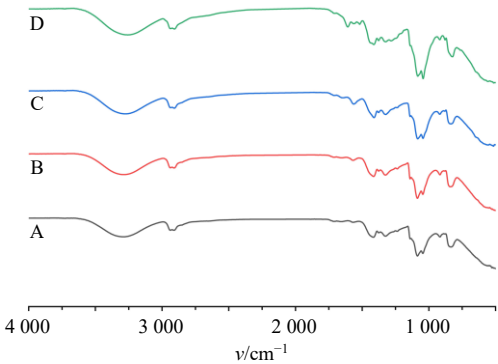


图 2 PVA 水凝胶 (A)、PVA/Lig 水凝胶 (B)、
PVA/Lig/CS 水凝胶 (C) 和 IS-EE-H (D) 的 FTIR 图
Fig. 2 FTIR of PVA hydrogel (A), PVA/Lig hydrogel (B),
PVA/Lig/CS hydrogel (C) and IS-EE-H (D)

后样品折断，暴露横截面，喷金干燥后用 SEM 观察其微观形态。其结果如图 3-A 和 3-B 所示，该凝胶成型性好且具有良好的弹性。在 SEM 下，PVA/Lig/CS 水凝胶呈三维多孔网状结构（图 3-A），该结果可能归因于木质素具有由多种活性基团（羟基、羧基和磺酸基团等）构成的特殊化学结构和空间构

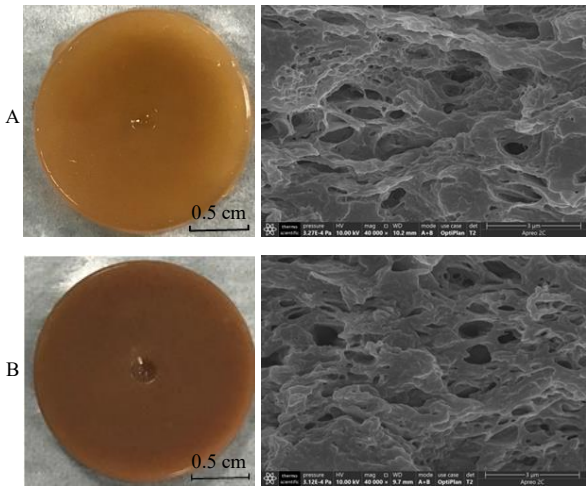


图 3 PVA/Lig/CS 水凝胶 (A) 和 IS-EE-H (B) 的宏观形态
和微观形态表征
Fig. 3 Macroscopic morphology and microscopic
morphology characterization of PVA/Lig/CS hydrogel (A)
and IS-EE-H (B)

象，同时这些基团与 PVA 的羟基形成氢键，与壳聚糖的氨基形成离子键^[13]。将 PVA/Lig/CS 水凝胶作为药物储库对血人参提取物进行装载后，形成的 IS-EE-H 仍保持一定数量的网状结构，该结构使水分子容易渗透，是具有良好的溶胀性能的保障^[14]，为其作为伤口敷料对伤口组织液、细胞代谢物等具有良好吸收效果提供理论依据。

2.6.3 溶胀性能 将水凝胶试样真空干燥（48 h），称定质量（质量记为 M_0 ），加入 50 mL 超纯水使其

在常温下充分膨胀,在 t 时刻取出试样,滤纸擦干表面水分,称定质量(质量记为 M_t),计算水凝胶的溶胀率。其溶胀率结果(图 4)显示,PVA/Lig/CS 水凝胶的平衡溶胀度为 $(436.820 \pm 9.623)\%$,IS-EE-H 的平衡溶胀度为 $(168.32 \pm 2.53)\%$,IS-EE-H 溶胀度下降的原因可能是 IS-EE 以氢键形式包载于 PVA/Lig/CS 水凝胶中,使水凝胶的交联度增加,导致水凝胶水渗透率下降。

2.6.4 保湿性能 理想的创面敷料应具有优良的保湿性能,敷料提供的润湿环境为表皮细胞的再生和趋化提供有利条件,保持细胞因子活性,促进创面快速愈合^[15]。将水凝胶试样真空干燥(48 h),称定质量(质量记为 M_0),加超纯水(50 mL)使其在常温下膨胀,充分溶胀后称定质量(质量记为 M_e)。将充分溶胀后的水凝胶置于恒温箱(37 °C)中,在 t 时刻取出试样,称定质量(质量记为 M_t),计算保湿率。PVA/Lig/CS 水凝胶及 IS-EE-H 的保湿性结果(图 4)显示,同一时间点 PVA/Lig/CS 水凝胶的保湿率较 IS-EE-H 高,IS-EE-H 在短时间内具有一定的保湿性能。

2.6.5 释放性能 药物释药性能是考察水凝胶作为

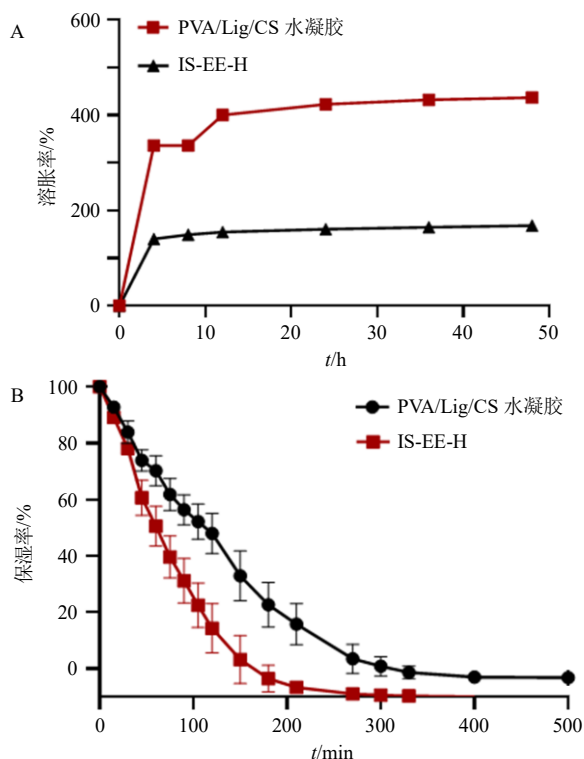


图 4 PVA/Lig/CS 水凝胶和 IS-EE-H 的溶胀率 (A) 和保湿率 (B) 结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Swelling rate (A) and moisturizing rate (B) results of PVA/Lig/CS hydrogel and IS-EE-H ($\bar{x} \pm s, n=3$)

缓控释制剂应用的一项重要指标。将水凝胶试样置于 PBS 溶液(pH 5, 20 mL)中,恒温振荡(37 °C),分别在 1、2、3、4、5、7、12、24、36、48 h 取出释放介质(10 mL),同时补充同等体积的空白释放介质,将取出的释放介质置于蒸发皿中干燥,待其完全蒸发后,加入甲醇溶液溶解残留物质并定容至 5 mL,0.22 μm 有机膜滤过,取 10 μL 进样分析,计算水凝胶试样的累积释放率。IS-EE-H 的累积释放率试验结果(图 5)显示,IS-EE-H 中 IS-EE 的指标成分儿茶素和表儿茶素均在 8 h 后接近恒速释放,此时二者的累积释放率分别为 90.9%、60.8%。采用 Origin2019b 软件将儿茶素和表儿茶素的累积释放数据与零级方程、一级方程和 Higuchi 平方根方程进行拟合^[16]。结果显示(表 3),IS-EE-H 中 IS-EE 指标成分儿茶素和表儿茶素的释放规律均符合一级动力学,该结果说明 PVA/Lig/CS 水凝胶作为 IS-EE 的药物储库可以对其具有缓释作用。

2.6.6 流变学性能 将水凝胶置于平行板(直径 20.0 mm)上,以 1.0 mm 的固定间隙值进行频率扫描分析。固定应变为 1%,在 0.01~10 Hz 的频率范围,进行扫频测试,实验过程中温度保持为 25 °C。测定的 PVA/CS 水凝胶、PVA/Lig/CS 水凝胶、IS-EE-H 的流变性能结果如图 6,其中储能模量(G')表示水凝胶的弹性,损耗模量(G'')表示黏度。结果显示,3 种类型的水凝胶均呈现出弹性行为和黏性行为,因储能模量值较损耗模量值高,判断 3 种类型水凝胶以弹性行为为主。同时,在 PVA/CS 水凝胶中添加 Lig 后,水凝胶的储能模量和损耗模量均降低,且储能模量值显著降低,该结果表明 Lig 在水凝胶中可能具有增加水凝胶黏度的作用。当 PVA/

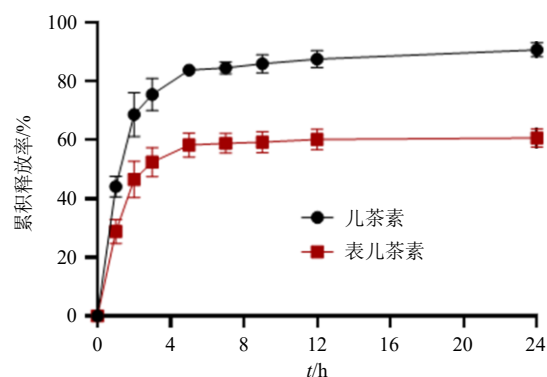


图 5 IS-EE-H 中 2 种指标成分的累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Cumulative release curves for the two indicator components in IS-EE-H ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 3 IS-EE-H 中 2 种指标成分释放数据的拟合情况

Table 3 Fitting of release data for two indicator components in IS-EE-H

模型	儿茶素拟合方程	表儿茶素拟合方程
零级动力学	$M_t = 2.40 t + 52.28, R^2 = 0.279 0$	$M_t = 1.61 t + 30.07, R^2 = 0.250 8$
一级动力学	$M_t = 87.33 (1 - e^{-0.72 t}), R^2 = 0.995 6$	$M_t = 60.01 (1 - e^{-0.70 t}), R^2 = 0.998 3$
Higuchi 平方根	$M_t = 16.83 t^{1/2} + 30.99, R^2 = 0.631 9$	$M_t = 11.44 t^{1/2} + 21.40, R^2 = 0.605 7$

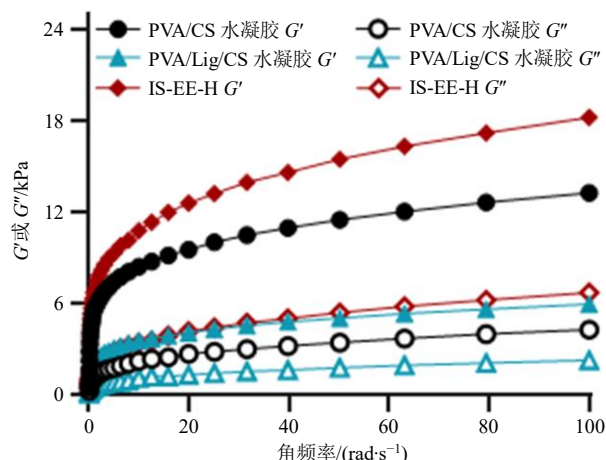


图 6 各水凝胶的流变学结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Rheological results of hydrogels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Lig/CS 水凝胶携带 IS-EE 后, IS-EE-H 的储能模量显著增加, 产生该现象的原因可能是: IS-EE-H 制备过程中, 药物与 PVA 混合后加入 Lig 混匀时, 由于 IS-EE 的溶剂为 60%乙醇, 该乙醇可能充当一定润湿剂的作用, 使 PVA、Lig 和 CS 混合更加均匀, 导致最终形成的凝胶弹性更好。

2.6.7 力学性能 为了进一步探究 Lig 在水凝胶中的作用, 将 PVA/CS 水凝胶、PVA/Lig/CS 水凝胶和 IS-EE-H 进行拉伸试验, 将水凝胶切成条状 (4.5 mm×1.5 mm×10 mm), 采用万能试验机以 50.0 mm/min 的拉伸速率进行拉伸测试, 记录拉伸过程中水凝胶应变值和应力值。试验结果 (图 7) 显示, PVA/CS 水凝胶断裂时的应变 (断裂拉伸率) 和抗拉强度分别为 86.3%和 8.0 kPa, PVA/CS 水凝胶在变形过程中表现出明显的应变硬化现象, 产生该现象的原因可能是在 PVA/CS 结晶区内 PVA/CS 聚合物链表现出有限的延展性^[13]。当水凝胶中引入 Lig 后, Lig 可能增加了水凝胶的三维空间结构, 使其在拉伸过程中自行变形吸引拉力, 导致 PVA/Lig/CS 水凝胶断裂时的应变和抗拉强度分别为 308.3%和 63.0 kPa。当 PVA/Lig/CS 水凝胶包载 IS-EE 后, IS-EE-H 的断裂伸长率反而降低至 229.1%, 抗拉强度升至 90.0 kPa, 产生该结果的原因可能是 IS-EE 以

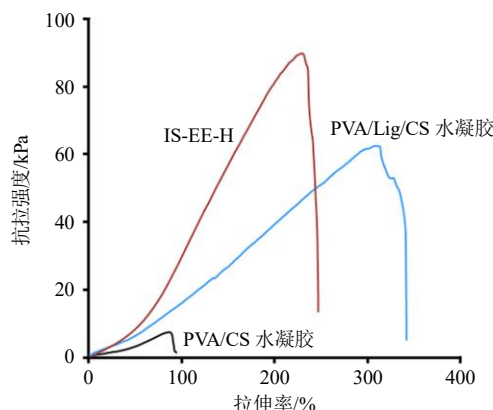


图 7 水凝胶力学性能实验结果

Fig. 7 Mechanical properties results of hydrogels

氢键形式包载于 PVA/Lig/CS 水凝胶中, 使水凝胶具有较高的晶体密度, 增加了 IS-EE-H 网络的刚性, 降低了网络的柔韧^[17]。

2.7 IS-EE-H 体外生物评价

2.7.1 细胞相容性试验 将培养好的细胞 (RAW 264.7) 接种于 96 孔板中, 1.5×10^4 细胞/孔, 分为空白组、DMSO 组、IS-EE 组、PVA/Lig/CS 水凝胶组 (PLC-H) 和 IS-EE-H 组, 重复 3 个复孔, 培养 (5% CO₂、37 °C) 过夜。各组分别加入无血清 DMEM 配制的 PBS、DMSO、IS-EE (儿茶素质量浓度分别为 25.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL, 表儿茶素质量浓度分别为 43.6、87.2、174.4、347.8 μg/mL)、PLC-H 浸提液、IS-EE-H 浸提液 (儿茶素质量浓度分别为 25.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL, 表儿茶素质量浓度分别为 43.6、87.2、174.4、347.8 μg/mL), 培养 (5% CO₂、37 °C) 24 h, 吸去细胞上清液, 每孔加入 100 μL 无血清 DMEM 和 10 μL CCK-8 溶液, 轻轻混匀后孵育 (5% CO₂、37 °C) 2 h, 通过酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度, 计算细胞存活率 [细胞存活率 = (实验孔吸光度 - 空白孔吸光度) / (对照孔吸光度 - 空白孔吸光度)]。结果 (表 4) 显示, IS-EE 的细胞存活率与质量浓度呈负相关, 且与相对应浓度的 DMSO 对细胞存活率无明显影响, 该结果表明较高质量浓度的 IS-EE 可能对 RAW264.7 细胞具

表 4 IS-EE-H 的细胞生物相容性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Cell biocompatibility test results of IS-EE-H ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞存活率/%			
	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
IS-EE	90.79 $\pm$ 1.12	82.74 $\pm$ 8.98	73.80 $\pm$ 2.72	49.98 $\pm$ 3.00
IS-EE-H	76.58 $\pm$ 3.56	97.82 $\pm$ 4.68	113.00 $\pm$ 1.62	73.50 $\pm$ 7.67
PLC-H	110.38 $\pm$ 14.04	123.38 $\pm$ 8.77	128.57 $\pm$ 7.24	79.02 $\pm$ 3.68
DMSO	104.88 $\pm$ 5.55	103.74 $\pm$ 7.96	108.36 $\pm$ 3.78	102.11 $\pm$ 3.63

有抑制作用。将 PLC-H 携带 IS-EE 后,在低质量浓度时,IS-EE-H 的细胞存活率与其质量浓度呈正相关,细胞存活率均高于 76.0%。在高质量浓度时,IS-EE-H 的细胞存活率降低至 73.5%,该结果与 PLC-H 实验结果一致,说明低水平的 PLC-H 对细胞(RAW264.7)可能具有良好的增殖作用,高水平的 PLC-H 对 RAW264.7 细胞可能具有轻微的抑制作用。

2.7.2 细胞划痕试验 试验前用记号笔在 24 孔板背后画横线。将培养好的细胞(RAW264.7)接种于 24 孔板中, 1.0×10^5 细胞/孔,分为空白组、IS-EE 组、PLC-H 组和 IS-EE-H 组,每组 3 个复孔,培养(5% CO₂、37 °C)过夜。弃去细胞上清,各组分别加入 1 mL 无血清 DMEM 配制的 PBS, IS-EE (儿茶素 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表儿茶素 87.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PLC-H 浸提液, IS-EE-H 浸提液(儿茶素 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表儿茶素 87.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 孵育 2 h。采用枪头(200 μL) 在各组细胞正上方垂直孔板预处理的黑线划痕,划线完成后,使用无菌 PBS 清洗细胞 2 次,去除划下的细胞,给予 LPS (100.0 ng/mL) 刺激,将细胞放入细胞培养箱中培养(5% CO₂、37 °C)。分别在不同时间点(8、12、24 h)取出,显微镜拍照记录细胞的愈合情况,以 Image J 分析各实验组的划痕面积,计算伤口愈合率,伤口愈合率越小,说明 RAW 264.7 迁移率小。结果(表 5)表明 IS-EE 可以抑制 RAW264.7 细胞迁移,且随时间点增加抑制效果越明显。将 PLC-H 对 IS-EE 进行包载后,IS-EE-H 对 RAW264.7 细胞的抑制迁移现象更显著。巨噬细胞是创面愈合炎症期的主要炎症细胞,因此,IS-EE-H 可能对创面愈合炎症期治疗具有重要作用。

2.7.3 对炎症因子的影响 将培养好的细胞(RAW 264.7)接种于 24 孔板中, 1.0×10^5 细胞/孔,分为空白组、IS-EE 组、PVA/Lig/CS 水凝胶组(PLC-H)和 IS-EE-H 组,每组 3 个复孔,培养(5% CO₂、37

表 5 不同时间点 IS-EE-H 的细胞划痕愈合率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Cell scratch healing rates of IS-EE-H at different time points ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞划痕愈合率/%		
	8 h	12 h	24 h
空白	35.48 $\pm$ 2.13	44.89 $\pm$ 2.41 ^{###}	60.33 $\pm$ 0.53 ^{###}
IS-EE	11.75 $\pm$ 1.48 ^{**}	16.76 $\pm$ 0.68 ^{**Δ}	23.15 $\pm$ 15.92 ^{**}
PLC-H	28.27 $\pm$ 11.93	40.82 $\pm$ 5.58	43.87 $\pm$ 5.80 ^{&}
IS-EE-H	6.43 $\pm$ 2.27 ^{***}	8.67 $\pm$ 9.91 ^{***}	16.37 $\pm$ 5.39 ^{***}

同一时间点与空白组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$; 与 8 h 空白组比较: ^{###} $P < 0.01$ ^{####} $P < 0.001$; 与 8 h IS-EE 组比较: ^Δ $P < 0.05$; 与 8 h PLC-H 组比较: [&] $P < 0.05$ 。

^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs blank group at the same time point; ^{###} $P < 0.01$ ^{####} $P < 0.001$ vs 8 h blank group; ^Δ $P < 0.05$ vs 8 h IS-EE group; [&] $P < 0.05$ vs 8 h PLC-H group.

°C) 过夜。弃去细胞上清液, 各组分别加入 1.5 mL 无血清 DMEM 配制的 PBS, IS-EE (儿茶素 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表儿茶素 87.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PLC-H 浸提液, IS-EE-H 浸提液(儿茶素 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表儿茶素 87.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 孵育 2 h。吸出细胞上清, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 给予 LPS (100.0 ng/mL) 刺激 18 h, 吸出细胞上清, 按照 ELISA 试剂盒检测其中 IL-6 和 TNF- α 的含量。试验结果如表 6 所示, 与空白组相比, IS-EE、PLC-H 和 IS-EE-H 能显著降低 LPS 诱导巨噬细胞 TNF- α 的产生。与空白组相比, IS-EE 和 IS-EE-H 对 LPS 诱导巨噬细胞 IL-6 的产生表现出抑制作用, 但该作用无统计学意义。该结果表明, IS-EE、PLC-H 和 IS-EE-H 可能具有抑制炎症反应发生的作用。

2.7.4 抑菌试验 采用大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 通过 CFUs 试验评价水凝胶的抑菌活性。用无菌 PBS 将细菌浓度调整为 1.0×10^8 cfu/mL, 将 PVA/Lig 水凝胶浸提液、PVA/CS 水凝胶浸提液、PLC-H 浸提液、IS-EE (50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、IS-EE-H 浸提液 (IS-EE 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

表 6 IS-EE-H 的对细胞炎症因子的影响结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Results of effect of IS-EE-H on cellular inflammatory factors ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF- α /(mg·mL ⁻¹)	IL-6/(mg·mL ⁻¹)
空白	15.94 $\pm$ 7.23	1.43 $\pm$ 0.86
IS-EE	3.19 $\pm$ 1.44 ^{**}	1.29 $\pm$ 0.81
PLC-H	6.91 $\pm$ 4.31 [*]	6.65 $\pm$ 3.27 [*]
IS-EE-H	1.60 $\pm$ 1.76	0.97 $\pm$ 0.05

与空白组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs blank group.

和卡那霉素 (kanamycin, 50.0 $\mu\text{g/mL}$) 分别与上述细菌悬液孵育 (37 $^{\circ}\text{C}$) 8 h, 各混悬液逐步稀释至 1×10^{-5} 浓度, 后将其 (30 μL) 接种于 LB 培养皿中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜后, 拍照记录菌落数并计数。每组重复 3 次试验。计算抑菌率[抑菌率=(CFU 空白组-CFU 样本组)/CFU 空白组]。由试验结果 (表 7) 可知, 在水凝胶中增加 CS 可以增强水凝胶的抗菌效果, 且 PVA/CS 水凝胶、PLC-H、IS-EE-H、卡那霉素 (50.0 $\mu\text{g/mL}$) 对大肠杆菌的抑菌率有良好的抑菌效果, 均大于 99.0%。

表 7 IS-EE 及其有无壳聚糖水凝胶的抑菌结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 7 Bacteriostatic results of IS-EE and its hydrogels with and without chitosan ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑菌率/%	
		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
空白		0	0
PVA/Lig 水凝胶浸提液		-51.9 $\pm$ 30.3	55.5 $\pm$ 29.8
IS-EE 浸提液	50.0	59.6 $\pm$ 4.4	99.4 $\pm$ 0.4
PVA/CS 水凝胶浸提液		100.0 $\pm$ 0.0*	100.0 $\pm$ 0.0
PLC-H 浸提液		100.0 $\pm$ 0.0*	100.0 $\pm$ 0.0
IS-EE-H 浸提液	50.0	100.0 $\pm$ 0.0*	100.0 $\pm$ 0.0
卡那霉素	50.0	100.0 $\pm$ 0.0*	99.8 $\pm$ 0.3

与 PVA/Lig 组比较: * $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs PVA/Lig group.

2.8 IS-EE-H 体内药效评价

2.8.1 全层皮肤损伤模型的建立 采用正常雄性 SD 大鼠 (180~220 g) 构建全层皮肤损伤模型。将 SD 大鼠 80 只随机分为 5 组, 每组 16 只, 即模型组、阳性对照组 (重组牛碱性成纤维细胞生长因子)、IS-EE 组、空白凝胶 (blank gel, B-G) 组、IS-EE-H 组。其中 IS-EE 给药量为 0.315 g/kg (生药量), IS-EE 质量浓度 0.26 g/mL。造模前将大鼠麻醉并对其背部脱毛, 脱毛后用 95% 医用酒精消毒, 随后在每只大鼠的背部创建全层皮肤伤口 (1.5 cm $\times$ 1.5 cm)。造模后第 1 天开始给药, 隔 1 天给药 1 次, 共 6 次。其中模型组给予 300 μL PBS, 阳性对照组给予重组牛碱性成纤维细胞生长因子, 其余各组分别给予相应药物。

2.8.2 创面愈合率 采用 Image J 软件分析 3、7、14 d 时各组动物创面的伤口面积, 并以第 1 天伤口面积作为伤口初始面积, 计算创面愈合率。由表 8 可知, 与模型组相比, 第 3、7 天时 IS-EE-H 和阳性

表 8 第 3、7、14 天各实验组的创面愈合率 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 8 Wound healing rates of each experimental group at days 3, 7 and 14 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	创面愈合率/%		
	3 d	7 d	14 d
模型	7.27 $\pm$ 3.94	38.77 $\pm$ 24.28	73.65 $\pm$ 9.90
IS-EE	9.90 $\pm$ 4.65	40.44 $\pm$ 17.07	73.95 $\pm$ 19.96
B-G	16.65 $\pm$ 16.12	40.47 $\pm$ 11.98	72.36 $\pm$ 6.24
IS-EE-H	31.43 $\pm$ 10.16***	62.16 $\pm$ 12.29	75.55 $\pm$ 19.17
阳性对照	25.52 $\pm$ 9.85*	49.30 $\pm$ 8.37	85.23 $\pm$ 7.33

与模型组比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$ 。

* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs model group.

药组伤口面积明显减小, 以第 3 天尤为显著, 且两者的创面愈合率分别是模型组的 4.3 倍和 3.5 倍, 结果表明 IS-EE-H 具有良好的促创面愈合的作用, 产生该作用可能与前面证实 IS-EE-H 具有良好的生物相容性、抗菌性、抑制炎症细胞向创口过度聚集有关及抑制 TNF- α 生成有关。

2.8.3 再生组织 HE 染色分析 经药物干预后, 对第 3、7、14 天的创面再生组织进行 HE 染色分析, 实验结果如图 8 所示, 经治疗 14 d 后, 与模型组相比, IS-EE-H 和阳性药物组的皮肤组织修复程度相对最好, 主要表现在炎性细胞浸润减少, 毛细血管形成增加, 纤维组织形成明显等。IS-EE 的皮肤组织修复程度较 IS-EE-H 和阳性药物组差, B-G 的皮肤组织修复程度相对次之。同时随着治疗时间增加, 各组的皮肤创面组织修复效果越明显。该结果表明, 与 B-G 相比, IS-EE 及 IS-EE-H 具有良好的创面修复作用。

2.8.4 再生组织 CD86 (B 淋巴细胞活化抗原 B7-2) 和 CD163 (M130 抗原) 的表达 选择表面生物标志物 CD86 和 CD163, 分别标记 M1 和 M2 巨噬细胞^[18-19], 观察 IS-EE-H 对创面愈合期间巨噬细胞极化的影响。如图 9 所示, 与模型组相比, 各试验组 CD86 的表达在第 3、7 天时明显减少, 其中第 3 天时模型组 CD86 的表达量分是 IS-EE 组、B-G 和 IS-EE-H 的 2.4、1.6、2.2 倍, 第 7 天时模型组 CD86 的表达量分是 IS-EE 组、B-G 和 IS-EE-H 的 4、2、1.5 倍 (表 9)。与模型组相比, 各试验组第 3 天时 CD163 的表达无统计学意义, 在第 7 天时, IS-EE-H 组 CD163 的表达量是模型组 2.1 倍 (表 9)。该结果表明, 在创面愈合前期, IS-EE、B-G 和 IS-EE-H 均具有抑制 M1 型巨噬细胞向创面过度募集的作用。同

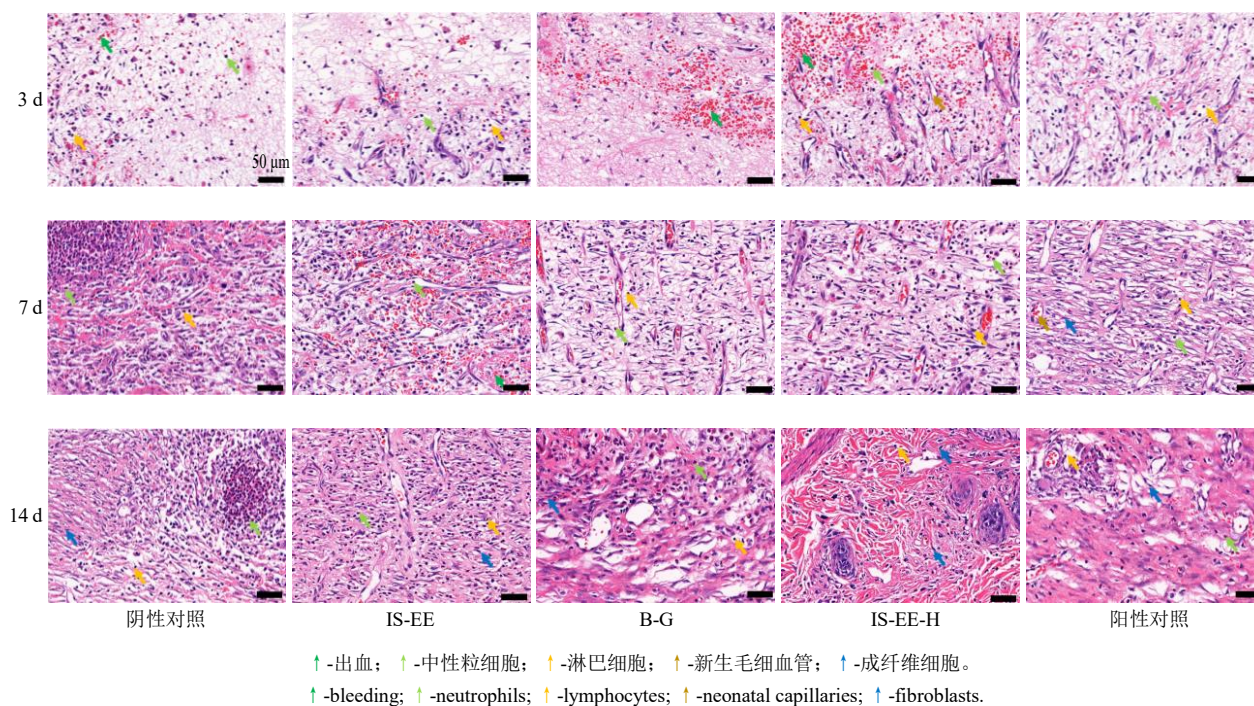


图 8 第 3、7、14 天时再生组织的 H&E 染色图像 (比例尺 50 μm)

Fig. 8 H&E staining images of the skin regenerated tissue at days 3, 7 and 14 (scale bar 50 μm)

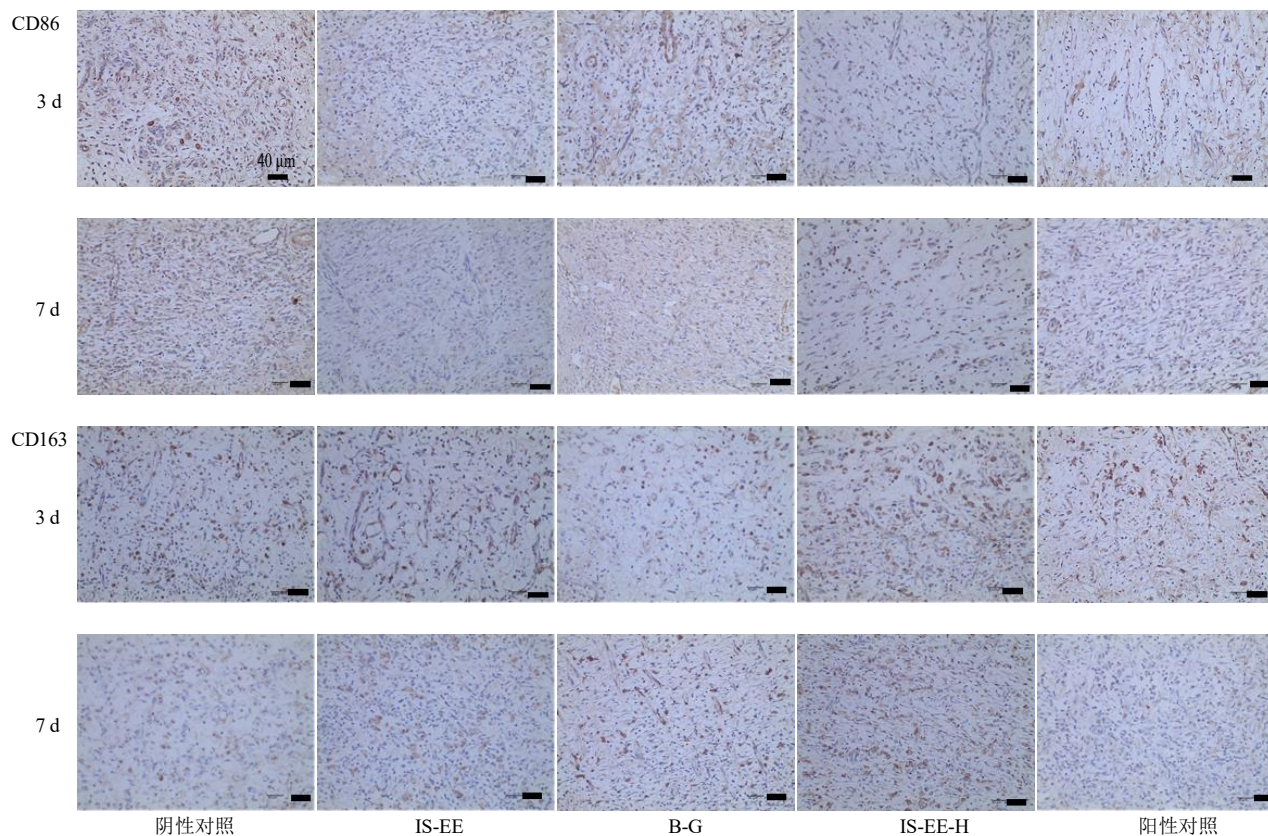


图 9 第 3、7 天时再生组织中 CD86 和 CD163 的免疫组化染色照片 (比例尺 40 μm)

Fig. 9 Immunohistochemical staining photographs of CD86 and CD163 in skin regenerated tissue on days 3 and 7 (scale bar 40 μm)

表 9 第 3、7 天各实验组皮肤再生组织 CD86 和 CD163 的阳性面积占比 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Percentage of positive area of skin regenerated tissue CD86 and CD163 in each experimental group on days 3 and 7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	CD86 阳性面积占比/%		CD163 阳性面积占比/%	
	3 d	7 d	3 d	7 d
空白	2.81 ± 2.02	2.81 ± 2.02	6.03 ± 1.86	6.03 ± 1.86
模型	9.30 ± 2.06	10.53 ± 1.71	8.72 ± 3.38	5.10 ± 3.01
IS-EE	3.92 ± 0.82**	2.60 ± 0.78**	8.29 ± 1.61	4.73 ± 0.54
B-G	5.81 ± 0.88*	5.36 ± 1.09**	3.90 ± 0.62	6.93 ± 0.34
IS-EE-H	4.52 ± 1.54**	6.93 ± 2.11*	9.38 ± 0.54	10.79 ± 0.68*
阳性对照	5.29 ± 0.78**	7.72 ± 2.38*	7.08 ± 2.96	2.84 ± 0.23

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

时将 B-G 作为 IS-EE 缓释药物储库制备的 IS-EE-H 可能还具有促进促炎性巨噬细胞 (M1 型) 向抗炎性巨噬细胞 (M2 型) 极化的作用。

2.8.5 再生组织 CD31 的表达 CD31 是一种在早期血管生成中表达的跨膜蛋白^[20], 本研究采用 CD31 免疫组化染色法评价创面的血管生成情况。如图 10-A 所示, 与模型组相比, IS-EE 组和 IS-EE-H 组的 CD31 表达明显, 尤其是 IS-EE-H 组, 其在第 7、14 天时 CD31 表达分别是模型组的 2.5、3.2 倍 (表 10), 说明 IS-EE 组和 IS-EE-H 组的创面形成了更多成熟结构的毛细血管。该结果表明 IS-EE 和 IS-EE-H 可能通过增加创面再生组织中的血管生成促进创面修复。在伤口处理第 14 天时, B-G 组 CD31 表达量也较模型组显著, 该结果表明, B-G 具

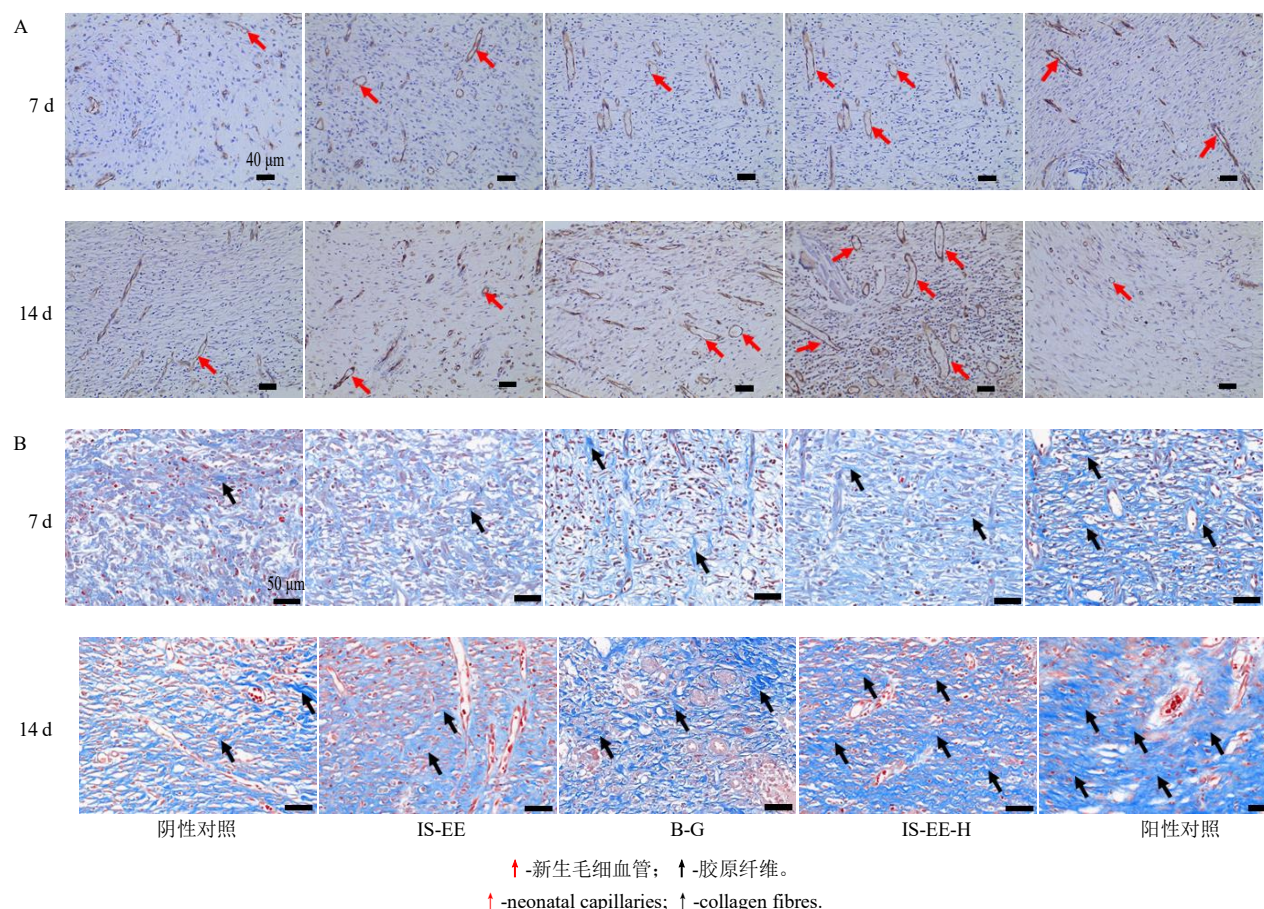


图 10 第 7、14 天时再生组织中 CD31 免疫组化 (比例尺 40 μm , A) 和 Masson 染色图片 (比例尺 50 μm , B)
Fig. 10 Images of CD31 immunohistochemistry (scale bar 40 μm , A) and Masson's trichrome staining (scale bar 50 μm , B) in skin regenerated tissues on days 7 and 14

有一定的促创面愈合作用, 该作用可能与其具有良好的保湿性能、生物相容性和抗菌性能有关。

2.8.6 再生组织胶原纤维沉淀情况 伤口部位胶原蛋白的形成, 在伤口愈合重塑期修复受损皮肤组织

和增强组织的抗拉强度方面发挥着重要作用^[21], 本研究采用 Masson 三色染色法评价伤口愈合过程中胶原纤维沉积的情况。如图 10-B 所示, 在第 7、14 天, 各组实验组均出现了胶原纤维沉积 (蓝色区域)。与

表 10 第 7、14 天各实验组皮肤再生组织 CD31 的阳性面积占比 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 10 Percentage of positive area of skin regenerated tissue CD31 in each experimental group on days 7 and 14 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	阳性面积占比/%	
	7 d	14 d
空白	0.36±0.03	0.36±0.03
模型	4.98±0.39	3.13±1.00
IS-EE	6.66±0.84*	5.65±1.60*
B-G	5.02±0.43	5.66±1.66*
IS-EE-H	12.52±1.06**	9.92±2.06**
阳性对照	6.46±0.91*	3.81±1.47

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

模型组相比, IS-EE 组、IS-EE-H 和阳性药组胶原纤维沉积的现象更密集和显著, 以伤口处理后的第 14 天尤甚, 通过定量分析纤维组织表达面积百分比(表 11) 知, IS-EE 组、IS-EE-H 胶原纤维组织表达面积百分比是模型组的 2.0 倍, 阳性药组胶原纤维组织表达面积百分比是模型组的 2.4 倍。该结果表明 IS-EE 和 IS-EE-H 对改善创面愈合质量具有良好作用, 该作用可能与前述在创面愈合炎症期抑制促炎型巨噬细胞向创面过度聚集有关。

3 讨论

本研究在单因素考察的基础上正交试验设计筛选出最优的 PLC-H, 即 PVA、CS 和 Lig 的质量比为 7:4:0.5, 最优制备工艺为冻融循环次数 4 次, 每次冻结 6h。将 PLC-H 携带 IS-EE 后, IS-EE-H 的多

表 11 第 7、14 天各实验组再生皮肤纤维组织表达面积百分比 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 11 Percentage of area of regenerated skin fibrous tissue expressed in each experimental group on days 7 and 14 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	阳性面积占比/%	
	7 d	14 d
空白	47.01±4.46	47.01±4.46
模型	3.81±2.78	13.64±4.72
IS-EE	3.31±0.71	27.63±4.06**
B-G	5.03±0.40	23.08±5.24*
IS-EE-H	4.22±2.66	27.42±5.51**
阳性对照	18.89±3.94	33.15±3.78***

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.01$ vs model group.

孔网状结构及良好溶胀性能, 更有利于伤口组织液和渗出物的吸收以及使药物发挥缓释作用。同时 PLC-H 合适的机械强度, 更是为其作为创面敷料提供依据。

体外生物评价结果显示, IS-EE (儿茶素 20.0~200.0 $\mu\text{g/mL}$) 的细胞 (RAW264.7) 存活率与 IS-EE 浓度呈负相关, 将 PLC-H 对 IS-EE 进行包载后, IS-EE-H 对炎症细胞 (RAW264.7) 的抑制迁移现象更显著, 同时 IS-EE 和 IS-EE-H 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有良好的抑菌效果。体内药效结果显示, IS-EE-H 具有良好的促创面愈合的作用, 该作用可能是与其在创面愈合前期减少炎症细胞浸润、抑制巨噬细胞向创面过度趋化、促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化, 同时在创面愈合中后期促进血管生成、增加纤维组织形成等相关。

综上所述, 血人参因其优良的抗炎性能是目前创面愈合治疗具有潜力的候选药物, 同时携带 IS-EE 的 PVA/Lig/CS 水凝胶可调控创面愈合炎症期巨噬细胞的迁移和极化, 增殖期血管的生成及重塑期胶原纤维的表达, 以改善创面愈合质量, 但其具体调控机制及再生组织附属器 (毛囊、汗腺、皮脂腺等) 的生成情况等有待进一步系统研究。

此外, 本研究还存在其他不足。其一, IS-EE 中的指标成分 (儿茶素和表儿茶素) 对 pH 敏感, 在 pH>6 时易降解, 如后续将其制备为纳米制剂该问题可能会得到有效解决, 同时对温度也较敏感, 在制备过程中应加以注意。其二, 采用 PVA、Lig 和 CS 以冻融法制备的高分子材料水凝胶虽然具备优良的机械性能、抗菌性能等, 但其降解能力较薄弱是今后研究需要完善并解决的问题。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Farokhi M, Mottaghitalab F, Fatahi Y, *et al.* Overview of silk fibroin use in wound dressings [J]. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(9): 907-922.
- [2] Soares R D F, Campos M G N, Ribeiro G P, *et al.* Development of a chitosan hydrogel containing flavonoids extracted from *Passiflora edulis* leaves and the evaluation of its antioxidant and wound healing properties for the treatment of skin lesions in diabetic mice [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108(3): 654-662.
- [3] Park J W, Hwang S R, Yoon I S. Advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1259.

- [4] 张云封, 咎妮利, 朱枝祥, 等. 苗药血人参中黄酮类化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3485-3492.
- [5] 段丽, 张永萍, 缪艳燕, 等. 苗药血人参不同提取部位体内外对乳腺癌 4T1 细胞的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2902-2907.
- [6] 秦帅, 张永萍, 陈希, 等. 高通量筛选抑制巨噬细胞迁移药物研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2020, 42(3): 87-90.
- [7] Holloway J L, Spiller K L, Lowman A M, *et al.* Analysis of the *in vitro* swelling behavior of poly (vinyl alcohol) hydrogels in osmotic pressure solution for soft tissue replacement [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(6): 2477-2482.
- [8] Singh B, Kumar A. Graft and crosslinked polymerization of polysaccharide gum to form hydrogel wound dressings for drug delivery applications [J]. *Carbohydr Res*, 2020, 489: 107949.
- [9] Arafa A A, Nada A A, Ibrahim A Y, *et al.* Preparation and characterization of smart therapeutic pH-sensitive wound dressing from red cabbage extract and chitosan hydrogel [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 182: 1820-1831.
- [10] Wang L F, Kim D M, Lee C Y. Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(9): 4227-4232.
- [11] Wu L J, Huang S Q, Zheng J, *et al.* Synthesis and characterization of biomass lignin-based PVA super-absorbent hydrogel [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 140: 538-545.
- [12] Vdovenko S, Gerus I, Fedorenko E, *et al.* C-HF hydrogen bond and integral intensities of vinyl C-H vibrations in push-pull β -dimethylaminotrifluoromethyl ketone and its deuterated analog [J]. *ISRN Spectrosc*, 2013, 2013: 640896.
- [13] Zhang Y W, Jiang M M, Zhang Y Q, *et al.* Novel lignin-chitosan-PVA composite hydrogel for wound dressing [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 104: 110002.
- [14] Guo B L, Finne-Wistrand A, Albertsson A C. Degradable and electroactive hydrogels with tunable electrical conductivity and swelling behavior [J]. *Chem Mater*, 2011, 23(5): 1254-1262.
- [15] Wei S M, You Y, Ma Y Y, *et al.* Bi-layer supramolecular polydimethylsiloxane elastomer film: Synthesis, characterization, and application in wound dressing on normal and diabetic rat [J]. *React Funct Polym*, 2019, 141: 21-32.
- [16] Sullad A G, Manjeshwar L S, Aminabhavi T M. Novel pH-sensitive hydrogels prepared from the blends of poly (vinyl alcohol) with acrylic acid-graft-guar gum matrixes for isoniazid delivery [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2010, 49(16): 7323-7329.
- [17] Rong Q F, Lei W W, Chen L, *et al.* Anti-freezing, conductive self-healing organohydrogels with stable strain-sensitivity at subzero temperatures [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56(45): 14159-14163.
- [18] Takuathung M N, Potikanond S, Sookkhee S, *et al.* Anti-psoriatic and anti-inflammatory effects of *Kaempferia parviflora* in keratinocytes and macrophage cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112229.
- [19] Isali I, McClellan P, Shankar E, *et al.* Genipin guides and sustains the polarization of macrophages to the pro-regenerative M2 subtype via activation of the pSTAT6-PPAR-gamma pathway [J]. *Acta Biomater*, 2021, 131: 198-210.
- [20] Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms [J]. *Mediat Inflamm*, 2015, 2015: 816460.
- [21] He Y X, Li Y, Sun Y D, *et al.* A double-network polysaccharide-based composite hydrogel for skin wound healing [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 261: 117870.

[责任编辑 郑礼胜]