



寇先勇,吴燕,王骁姿,等. 5种中药粗多糖水凝胶的制备及其促伤口愈合能力研究[J]. 轻工学报,2024,39(2):43-53.
KOU X Y, WU Y, WANG Y Z, et al. Preparation of crude polysaccharide hydrogels from five kinds of traditional Chinese medicines and their ability to promote wound healing[J]. Journal of Light Industry, 2024, 39(2): 43-53.
DOI: 10. 12187/2024. 02. 006

5种中药粗多糖水凝胶的制备及其促伤口愈合能力研究

寇先勇,吴燕,王骁姿,冯文博,郑佳贝,尤祥宇,苏江涛

湖北工业大学 生命科学与健康工程学院, 湖北 武汉 430068

摘要:以黄药子、红景天、鸡血藤、鱼腥草、一支箭5种中药为原料,采用水提醇沉法提取其中的粗多糖,测定其总多糖含量及体外抗氧化活性;将中药粗多糖载入壳聚糖中制备中药粗多糖水凝胶,并对所得水凝胶的微观结构、溶胀性能、保水性能、抗氧化活性、血液相容性及其促进伤口愈合能力等进行研究。结果表明:红景天粗多糖的总多糖含量最高,达到77.6%;各粗多糖溶液均有一定的抗氧化能力,其中对ABTS⁺自由基、DPPH自由基、·OH自由基的清除能力及总还原力最强的粗多糖溶液分别为黄药子粗多糖溶液、黄药子粗多糖溶液、一支箭多糖溶液和红景天粗多糖溶液。随着中药粗多糖的载入,中药粗多糖水凝胶的孔径增大、溶胀性能增强,但保水率和抗氧化活性均有所降低;在2000 μg/mL质量浓度下,各粗多糖水凝胶均展现出良好的血液相容性;相较于空白组,黄药子粗多糖水凝胶组和鱼腥草粗多糖水凝胶组的小鼠伤口愈合更明显,结痂现象减少,且观察到毛囊、皮脂腺等皮肤附属器的形成,未见明显的炎性细胞浸润。因此,黄药子粗多糖水凝胶和鱼腥草粗多糖水凝胶在加速伤口恢复方面均效果明显,显示出其作为伤口敷料的巨大应用潜力。

关键词:中药粗多糖;水凝胶;抗氧化活性;伤口愈合

中图分类号:TS206;R932 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2024)02-0043-11

0 引言

皮肤是人体与外界直接接触的器官,一旦损伤,需及时消毒以防感染。根据古方记载,旧时处理皮肤伤口,通常先清洗,再使用具有清热解毒功效的草药捣敷外用^[1-2],以加速伤口愈合。现有研究^[3-4]表明,皮肤受损后,伤口处会聚集大量免疫细胞,并释放大量IL-6、TNF-α、IL-1β、iNOS(诱导型一氧化氮合

酶)等细胞因子或酶,特别是在iNOS的作用下,伤口处会产生大量NO,引起组织缺氧。缺氧会严重干扰线粒体的氧化磷酸化功能,引发氧自由基的过量释放,对血管内皮细胞造成损害,并增加毛细血管壁的通透性,导致受伤部位及邻近组织出现更严重的缺血、水肿和缺氧现象。这些连锁反应会加剧细胞坏死及组织溶解等继发损伤,使损伤范围不断扩大。抗氧化剂的应用能够降低伤口处的过氧化水

收稿日期:2023-08-28;修回日期:2023-11-06;出版日期:2024-04-15

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81703409)

作者简介:寇先勇(1998—),男,湖北省钟祥市人,湖北工业大学硕士研究生,主要研究方向为天然高分子材料。E-mail:xy_kou@yeah.net

通信作者:尤祥宇(1983—),男,福建省南安市人,湖北工业大学副教授,主要研究方向为传统中药新应用、天然高分子材料等。E-mail:youxianyu@hbut.edu.cn

平,帮助伤口处组织和细胞恢复正常功能^[5]。

水凝胶是一种高含水量的三维网状凝胶,根据其骨架来源可分为天然水凝胶和合成水凝胶。壳聚糖具有止血、无毒、生物相容性和生物可降解性良好等特点^[6],能有效减轻伤口愈合过程中的炎症反应^[7]。壳聚糖水凝胶因其来源天然、成本低廉、易获取、质地柔软、生物相容性良好而被广泛用于伤口愈合研究^[8],其能与伤口紧密贴合,且在伤口恢复过程中自然脱落,可避免对伤口造成二次伤害^[9],因此有望成为一种优良的伤口敷料。

中药常以膏贴剂的形式使用,但这类制剂存在生物利用度低、载药量高、对伤口易产生刺激等不足^[10],限制了其在伤口敷料领域的广泛应用。黄药子、红景天、鸡血藤、鱼腥草和一支箭均具有清热解毒作用,目前有关这5种中药粗多糖的研究主要集中在粗多糖改性^[11]、抗氧化活性^[12]和抗癌活性^[13]方面,将其作为有效物质应用于伤口修复的研究则较少。基于此,本文拟以上述5种中药粗多糖为研究对象,将其载入壳聚糖中制备中药粗多糖水凝胶,系统研究其微观结构、溶胀性能、保水性能等特性,通过溶血实验评价其血液相容性,并利用动物实验探究其促进伤口愈合的能力,以期中药在伤口敷料中的应用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

主要材料:无菌抗凝兔血,广州鸿泉生物科技有限公司;实验用小鼠(SPF级KM雄鼠,质量为30~40 g,共64只),华中农业大学实验动物中心,许可证号为SCXF(鄂)2020-0019。

主要试剂:黄药子、鱼腥草、鸡血藤、红景天、一支箭,康美药业股份有限公司;壳聚糖($M_w = 300\ 000$)、ABTS试剂、DPPH试剂、铁氰化钾、L-抗坏血酸(VC)、AB-8大孔树脂,上海麦克林生化科技有限公司; H_2O_2 、水杨酸、三氯乙酸、柠檬酸、冰醋酸、正丁醇、无水乙醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、过硫酸钾、 $FeCl_3$ 、Triton-X100等,国药集团化学试剂有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

XMTF300型旋转蒸发器,上海申生科技有限公

司;SCIENTZ-18N/A型冷冻干燥机,宁波东芝生物科技股份有限公司;H1850R型离心机,湖南湘仪仪器开发有限公司;BioTek型多功能酶标仪,美国安捷伦公司;CX23型光学显微镜,奥林巴斯株式会社;JSM-6300LV型电子扫描显微镜,日本电子株式会社。

1.3 实验方法

1.3.1 中药粗多糖制备 参考文献[14]并稍作修改。称取适量干燥中药,粉碎,过100目筛,取100 g中药粉末,置于玻璃缸中,加入2.5 L去离子水,超声提取2次(50℃,每次提取40 min),合并提取液,过滤,将滤液减压浓缩至约250 mL;向浓缩液中加入4倍体积的无水乙醇,12 h后收集沉淀,用去离子水复溶沉淀,使用Sevage法($V(\text{中药复溶液}):V(\text{氯仿}):V(\text{正丁醇}) = 25:5:1$,重复5次)去除蛋白质后,经AB-8大孔树脂层析柱脱色(洗脱液为20%(若无特指,百分数均指质量分数)的NaCl溶液,洗脱速度为2 mL/min,洗脱时间为3 h),收集洗脱液并浓缩至约100 mL;将浓缩液置于去离子水中透析12 h后(每隔1 h更换一次透析液),冷冻干燥即得中药粗多糖。5种中药粗多糖得率分别为黄药子粗多糖1.26%、红景天粗多糖1.16%、鸡血藤粗多糖1.75%、鱼腥草粗多糖1.61%和一支箭粗多糖2.69%。

1.3.2 中药粗多糖总多糖含量测定 使用蒽酮硫酸法^[15]测定总多糖含量。取1000 $\mu\text{g/mL}$ 中药粗多糖溶液1 mL、0.2%蒽酮硫酸溶液4 mL,混合均匀,置于沸水浴中10 min,取出置于冰上5 min,使用多功能酶标仪于620 nm波长处测量其吸光度。以葡萄糖为标准品,分别配制不同质量浓度(0 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、600 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1000 $\mu\text{g/mL}$ 等)的葡萄糖溶液,按上述步骤测量相应吸光度,并绘制标准曲线。总多糖含量的计算公式如下:

$$\text{总多糖含量} = \frac{C_1}{C_0} \times 100\%$$

其中, C_0 为初始粗多糖溶液质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$, C_1 为计算得到的粗多糖质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 。

1.3.3 中药粗多糖体外抗氧化活性测定 将5种

中药粗多糖分别配制成质量浓度为 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列溶液后进行体外抗氧化活性实验,选择 VC 作为阳性对照,去离子水作为阴性对照。

1) ABTS⁺ 自由基清除率测定。参考文献[16]配制 ABTS 工作液(在 734 nm 波长处的吸光度为 0.7±0.02)。将 200 μL 不同质量浓度的待测中药粗多糖溶液与 3000 μL ABTS 工作液混合均匀,室温下孵育 6 min;取 200 μL 混合溶液,滴于 96 孔板中,使用多功能酶标仪在 734 nm 波长处测定其吸光度。ABTS⁺ 自由基清除率的计算公式如下:

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad \text{①}$$

其中, A_0 为去离子水代替中药粗多糖溶液参与自由基反应后所测吸光度, A_1 为中药粗多糖溶液参与自由基反应后所测吸光度, A_2 为中药粗多糖溶液吸光度。

2) DPPH 自由基清除率测定。参考文献[17]配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液。分别取 100 μL 不同质量浓度的中药粗多糖溶液与 100 μL DPPH 乙醇溶液混合均匀后,滴入 96 孔板中,于 26 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光静置 30 min,使用多功能酶标仪在 517 nm 波长处测定其吸光度。DPPH 自由基清除率计算公式见式①。

3) $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率测定。参考文献[17]的方法并稍加修改,分别配制 6 mmol/L 的 H_2O_2 溶液、 FeSO_4 溶液和水杨酸乙醇溶液。分别取 50 μL 不同质量浓度的中药粗多糖溶液,加入 50 μL FeSO_4 溶液和 100 μL H_2O_2 溶液,于室温条件下反应 30 min,使用多功能酶标仪在 510 nm 波长处测定其吸光度。 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率计算公式见式①。

4) 总还原力测定。参考文献[17],配制 0.2 mol/L pH 值为 6.6 的磷酸盐缓冲液、1%铁氰化钾溶液、10%三氯乙酸溶液和 0.1% FeCl_3 溶液。分别取不同质量浓度的中药粗多糖 0.25 mL 于 2 mL 离心管中,加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液和 0.5 mL 铁氰化钾溶液,混合均匀,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 20 min;加入 0.5 mL 三氯乙酸,于 5000 r/min 条件下离心

10 min;取 100 μL 上清液加入 96 孔板中,加入 100 μL 去离子水和 25 μL FeCl_3 溶液,反应 10 min,使用多功能酶标仪在 700 nm 波长处测定其吸光度。总还原力计算公式如下:

$$\text{总还原力} = A'_1 - A'_0 + A_2 \quad \text{②}$$

其中, A'_0 为去离子水代替中药粗多糖溶液参与总还原反应后所测吸光度, A'_1 为中药粗多糖溶液参与总还原反应后所测吸光度。

1.3.4 中药粗多糖水凝胶制备 参考文献[18],将 3%壳聚糖乙酸溶液与 3%柠檬酸溶液按体积比 2:1 混合均匀后,加入等体积质量浓度为 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的中药粗多糖溶液,混合均匀,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻过夜,室温解冻后即得中药粗多糖水凝胶。按上述步骤,用等体积去离子水代替中药粗多糖溶液制备空白水凝胶。

1.3.5 中药粗多糖水凝胶微观结构表征及性能测定

1) 微观结构表征。将中药粗多糖水凝胶于 -60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻干燥,取横截面,于真空下进行喷金处理,设置电子扫描显微镜加速电压为 20 kV,放大倍数为 100 倍;使用 Nano Measurer 软件测定中药粗多糖水凝胶孔径。

2) 溶胀率和保水率测定。取一定量的冷冻干燥后的中药粗多糖水凝胶(记为 m_0/g ,本文取 200 μg),于 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液中浸泡 24 h 后,吸去表面多余水分至恒重(记为 m_1/g)。溶胀率的计算公式如下:

$$\text{溶胀率} = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100\%$$

参考文献[19],取一定量冻干中药粗多糖水凝胶(记为 $m'_0/\mu\text{g}$)浸没在去离子水中,恒重(记为 $m'_1/\mu\text{g}$)后,将其转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烘箱中,分别于 0.5 h、1.0 h、2.0 h、3.0 h、4.0 h 和 5.0 h 时取出称重(记为 m_i/g)。保水率的计算公式如下:

$$\text{保水率} = \frac{m_i - m'_0}{m'_1 - m'_0} \times 100\%$$

3) 包载率测定。称取 20 000 μg 冻干中药粗多糖水凝胶,浸泡于 10 mL 去离子水中,24 h 后取出,采用蒽酮硫酸法测定浸泡液的总多糖含量(方法同

1.3.2)。包载率的计算公式如下：

$$\text{包载率} = \frac{W_1}{K \times W_0} \times 100\%$$

其中, W_1 为冻干中药粗多糖水凝胶中粗多糖的总多糖质量/ μg ; W_0 为初始投入中药粗多糖的质量/ μg ; K 为对应中药粗多糖的总多糖占比/%。

4) 抗氧化活性测定。参照 1.3.3 方法, 称取 200 μg 冻干中药粗多糖水凝胶粉末, 进行 ABTS⁺ 自由基清除率、DPPH 自由基清除率、·OH 自由基清除率和总还原力测定实验, 设置去离子水为空白对照组、VC 为阳性对照组、中药粗多糖和中药粗多糖水凝胶为实验组。各自自由基清除率和总还原力的计算公式同式①和②。

1.3.6 中药粗多糖水凝胶溶血率测定 参考文献 [20], 用生理盐水稀释一定量的无菌抗凝兔血, 于 1400 r/min 条件下离心 4 min, 取沉淀稀释备用。以冻干中药粗多糖水凝胶+生理盐水为实验组, 生理盐水为阴性对照组, 体积分数为 0.2% 的 Triton-X100 为阳性对照组。从各组中分别取 0.4 mL 溶液于 2 mL 离心管中, 加入 0.2 mL 红细胞溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 2 h, 再于 2500 r/min 条件下离心 4 min, 取 200 μL 上清液加入 96 孔板中, 使用多功能酶标仪测定 545 nm 处的吸光度。溶血率的计算公式如下：

$$\text{溶血率} = \frac{OD_s - OD_n}{OD_p - OD_n} \times 100\%$$

其中, OD_s 为实验组的吸光度; OD_n 为阴性对照组的吸光度; OD_p 为阳性对照组的吸光度。

1.3.7 动物实验 将 64 只小鼠随机分为正常组、黄药子粗多糖水凝胶组、红景天粗多糖水凝胶组、鸡血藤粗多糖水凝胶组、鱼腥草粗多糖水凝胶组、一支箭粗多糖水凝胶组、空白水凝胶组和空白组, 每组 8 只, 饲养于武汉塞维尔生物科技有限公司 SPF 级动物房。

1) 全皮损伤模型构建与给药。将全部小鼠依次用乙醚进行麻醉, 在其背部标记 1 cm \times 1 cm 的区域, 经酒精消毒后, 将标记区域剪去全皮; 正常组小鼠不做处理, 空白组小鼠仅剪出伤口, 空白水凝胶组小鼠在伤口处敷空白水凝胶, 中药粗多糖水凝胶组在伤口处敷粗多糖质量浓度为 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的中药

粗多糖水凝胶, 每天更换伤口敷料, 直至第 15 d。本研究所涉及的所有动物操作均符合动物伦理规定, 实验动物福利审查编号为塞维尔动(福)第 230 号。

2) 皮肤组织 H&E 染色。第 15 d 时, 将实验小鼠用乙醚麻醉后, 脱颈处死, 剪下伤口修复处皮肤组织, 用石蜡包埋、切片。使用伊红和苏木精 (H&E) 对皮肤切片进行染色后, 置于光学显微镜下对伤口愈合和皮肤组织再生情况进行观察。

1.4 数据处理

所有实验均设置 3 组平行样本, 实验结果取 (平均值 \pm 标准差), 使用 Microsoft Excel 和 IBM SPSS statistics 进行数据处理和分析, 利用 Origin 软件制图。

2 结果与分析

2.1 中药粗多糖总多糖含量分析

根据 1.3.2 中中药粗多糖含量计算公式, 得出黄药子、红景天、鸡血藤、鱼腥草和一支箭的总多糖含量分别为 52.3%、77.6%、56.4%、70.1%、73.7%。

2.2 中药粗多糖体外抗氧化活性分析

图 1—图 4 为不同质量浓度下中药粗多糖体外抗氧化活性测定结果。由图 1 可知, 当黄药子粗多糖溶液和鸡血藤粗多糖溶液质量浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、其他中药粗多糖溶液质量浓度为 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 ABTS⁺ 自由基的清除率均可达 90% 以上; 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力从大到小依次为 VC 溶液、黄药子粗多糖溶液、鸡血藤粗多糖溶液、红景天粗多糖溶液、鱼腥草粗多糖溶液、一支箭粗多糖溶液; IC_{50} 分别为黄药子粗多糖溶液 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、红景天粗多糖溶液 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、鸡血藤粗多糖溶液 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、鱼腥草粗多糖溶液 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、一支箭粗多糖溶液 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。各粗多糖溶液对 ABTS⁺ 自由基均有较强的清除能力, 而其中黄药子粗多糖溶液的清除能力最强。

由图 2 可知, 当黄药子粗多糖溶液、红景天粗多糖溶液、鱼腥草粗多糖溶液和一支箭粗多糖溶液质量浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 DPPH 自由基的清除率均达 90% 以上, 而鸡血藤粗多糖溶液对 DPPH 自由基的清除能力相对较弱, 当其质量浓度为

4000 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 DPPH 自由基的清除率为 65%;各中药粗多糖溶液对 DPPH 自由基的清除能力从大到小依次为 VC 溶液、黄药子粗多糖溶液、鱼腥草粗多糖溶液、红景天粗多糖溶液、一支箭粗多糖溶液、鸡血藤粗多糖溶液; IC_{50} 分别为黄药子粗多糖溶液 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、红景天粗多糖溶液 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、鸡血藤粗多糖溶液 500 $\mu\text{g/mL}$ 、鱼腥草粗多糖溶液 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、一支箭粗多糖溶液 250 $\mu\text{g/mL}$ 。除鸡血藤粗多糖溶液外,其他粗多糖溶液对 DPPH 自由基均有较强的清除能力,与相关报道^[12,21-24]的研究结果相似。

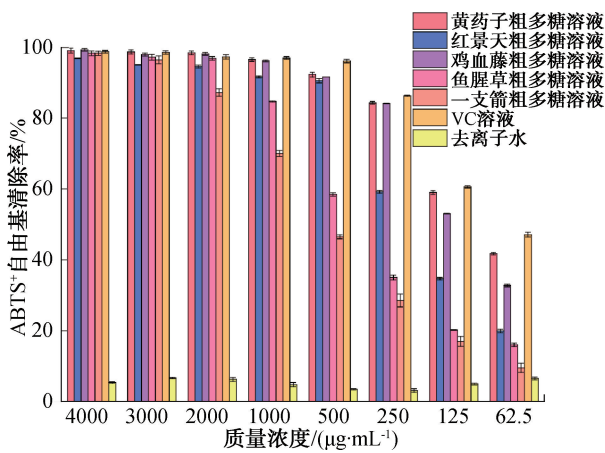


图1 不同质量浓度下中药粗多糖溶液对 ABTS⁺ 自由基的清除率

Fig. 1 Antioxidant activity of crude polysaccharide solutions from traditional Chinese medicine at different mass concentrations on ABTS⁺ radical scavenging

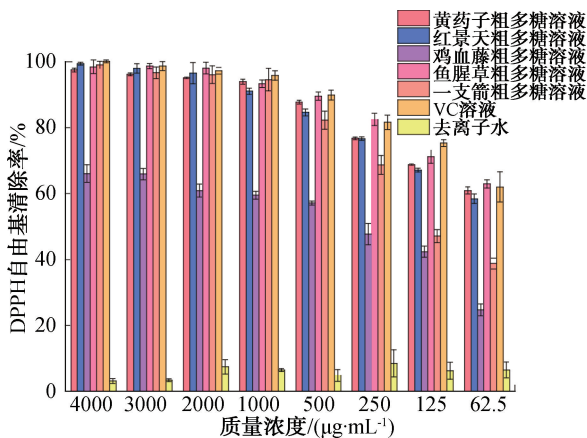


图2 不同质量浓度下中药粗多糖溶液对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 2 Antioxidant activity of crude polysaccharide solutions from traditional Chinese medicine at different mass concentrations on DPPH radical scavenging

由图3可知,当各粗多糖溶液质量浓度均为4000 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率分别为一支箭粗多糖溶液76%、鱼腥草粗多糖溶液47%、红景天粗多糖溶液45%、黄药子粗多糖溶液28%和鸡血藤粗多糖溶液34%,即一支箭粗多糖溶液具有较好的 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力,与贺银菊等^[24]的研究结果相符。

由图4可知,当各粗多糖溶液质量浓度均为4000 $\mu\text{g/mL}$ 时,总还原力分别为黄药子粗多糖溶液1.85、红景天粗多糖溶液2.38、鸡血藤粗多糖溶液0.63、鱼腥草粗多糖溶液1.25、一支箭粗多糖溶液0.65和VC溶液3.31,表明各粗多糖溶液均具有一定的还原能力,其中红景天粗多糖溶液的总还原力最大。

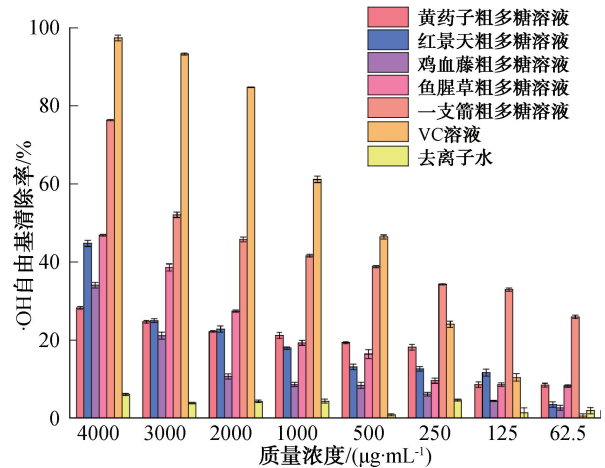


图3 不同质量浓度下中药粗多糖溶液对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率

Fig. 3 Hydroxyl radical scavenging activity of crude polysaccharide solutions from traditional Chinese medicine at different mass concentrations

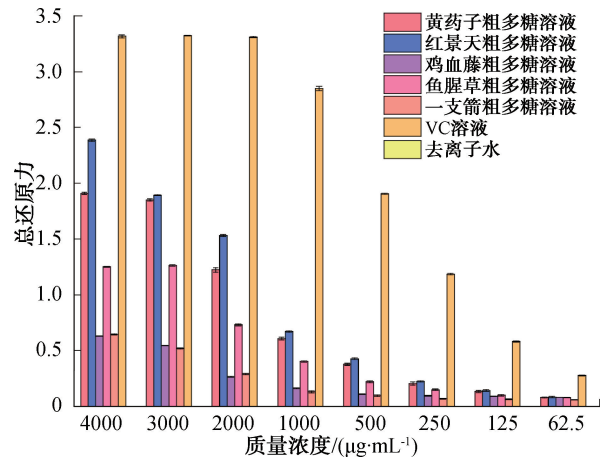


图4 不同质量浓度下中药粗多糖溶液的总还原力
Fig. 4 Total reducing power of crude polysaccharide solutions of traditional Chinese medicine at different mass concentrations

2.3 中药粗多糖水凝胶结构表征及性能分析

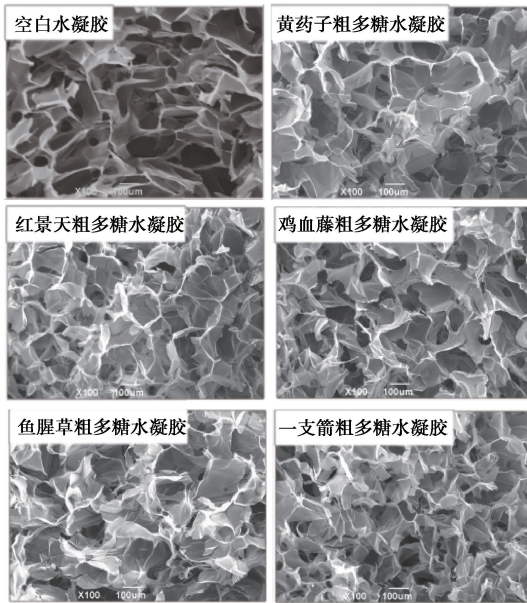
2.3.1 微观结构分析

图5为各中药粗多糖水凝胶的扫描电镜图和孔径分布示意图。由图5a)可知,各中药粗多糖水凝胶在微观形貌上仍保留了空白水凝胶的孔洞结构,说明中药粗多糖的加入不会使水凝胶的三维孔洞结构坍塌。由图5b)可知,各中药粗多糖水凝胶的孔径均大于空白水凝胶,其中黄药子粗多糖水凝胶的孔径最大,平均孔径为164 μm。中药粗多糖水凝胶的孔径增大可能与粗多糖上的伯羟基有关,伯羟基可能会与部分柠檬酸分子上的羧基发生酯化反应,破坏柠檬酸两端的羧基与壳聚糖链上的氨基反应所致的交联作用,导致

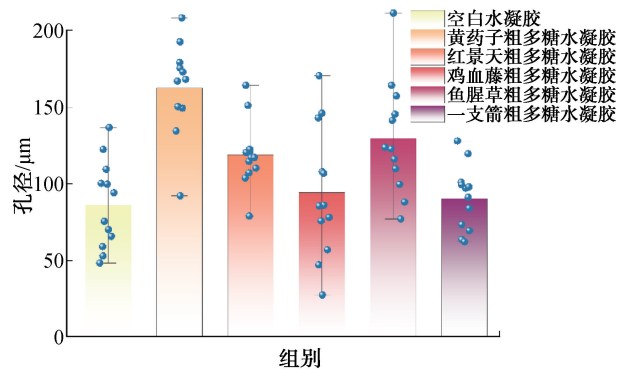
壳聚糖链与链之间直接通过柠檬酸交联的结构减少^[25],从而使孔径增大。

2.3.2 溶胀性能和保水性能分析

图6为各中药粗多糖水凝胶的溶胀率和保水率。保持伤口处于湿润状态可促进纤维细胞生长,刺激毛细血管形成,具有促进伤口愈合的作用,溶胀性能和保水性能就体现了水凝胶的保湿功能^[26]。由图6a)可知,与空白水凝胶相比,各中药粗多糖水凝胶的溶胀性能均有所提升,其中黄药子粗多糖水凝胶的溶胀率最大,达1700%;溶胀率从大到小依次为黄药子粗多糖水凝胶、一支箭粗多糖水凝胶、鸡血藤粗多糖水凝胶、鱼腥草粗多糖水凝胶、红景天粗多糖水凝胶、空白水凝胶,说明中药粗多糖的加入会影响水凝胶的结构,这可能与2.3.1中提到的中药粗多糖水凝胶中柠檬酸介导的壳聚糖链与链之间的交联结构减少有关。



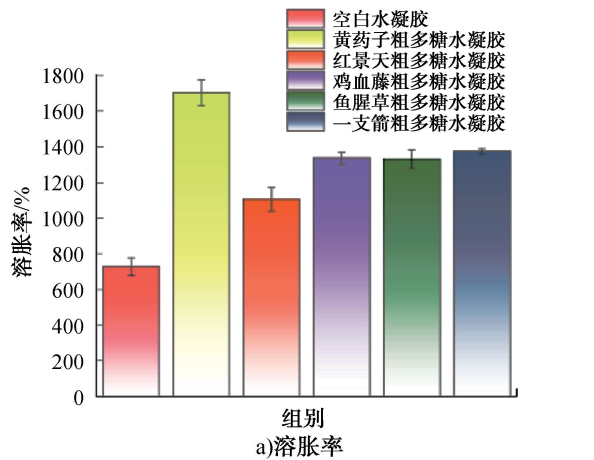
a)扫描电镜图



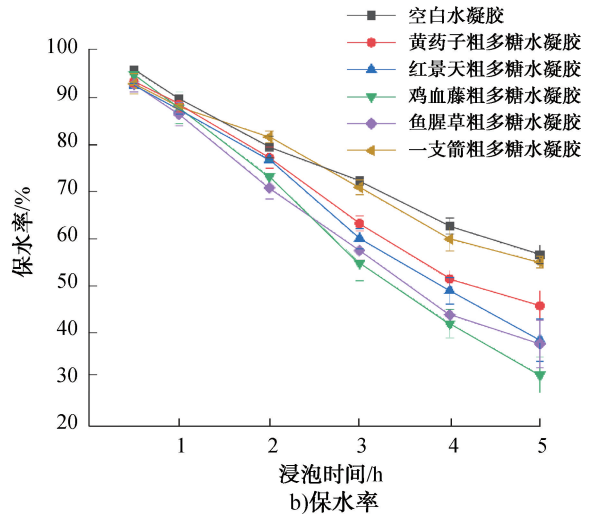
b)孔径分布示意图

图5 各中药粗多糖水凝胶的扫描电镜图和孔径分布示意图

Fig. 5 Scanning electron microscopy and pore size distribution of each crude polysaccharide hydrogel from traditional Chinese medicine



a)溶胀率



b)保水率

图6 各中药粗多糖水凝胶的溶胀率和保水率
Fig. 6 Swelling rate and water retention rate of each crude polysaccharide hydrogel from traditional Chinese medicine

由图 6b)可知,随着浸泡时间的延长,各中药粗多糖水凝胶的保水率均逐渐下降,且均小于空白水凝胶,保水率从大到小依次为空白水凝胶、一支箭粗多糖水凝胶、黄药子粗多糖水凝胶、红景天粗多糖水凝胶、鸡血藤粗多糖水凝胶、鱼腥草粗多糖水凝胶,这可能是中药粗多糖水凝胶孔径变大,加速其水分损失所致。

2.3.3 包载率分析 包载率反映的是水凝胶载药后的释放性能,包载率越高,说明水凝胶中粗多糖的可利用度越高。各中药粗多糖水凝胶的包载率分别为黄药子粗多糖水凝胶 63.0%、红景天粗多糖水凝胶 67.2%、鸡血藤粗多糖水凝胶 68.6%、鱼腥草粗多糖水凝胶 61.8%、一支箭粗多糖水凝胶 70.7%。这可能与柠檬酸对壳聚糖凝胶体系产生的酸性作用有关。在酸性条件下,壳聚糖分子内的氨基会发生

质子化,进而获得正电荷^[27]。由于电荷间的相互作用,这些带正电的壳聚糖分子与中药粗多糖中的负电荷羧基之间会产生静电吸引,有可能限制了中药粗多糖在水凝胶中的充分释放。

2.3.4 抗氧化活性分析 图 7 为中药粗多糖质量浓度为 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,各中药粗多糖溶液及其水凝胶的抗氧化活性测试结果。由图 7 可知,中药粗多糖水凝胶的抗氧化能力较中药粗多糖溶液有所下降;其中,一支箭粗多糖水凝胶对 ABTS^+ 自由基的清除作用下降最多,约 16.6%;鸡血藤粗多糖水凝胶对 DPPH 自由基的清除作用下降最多,约 6.7%;鱼腥草粗多糖水凝胶对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用下降最多,约 7.9%;红景天粗多糖水凝胶的总还原力下降最多,约 0.83。中药粗多糖水凝胶抗氧化能力的下降,可能与水凝胶的孔径、包载率及中药粗多糖抗

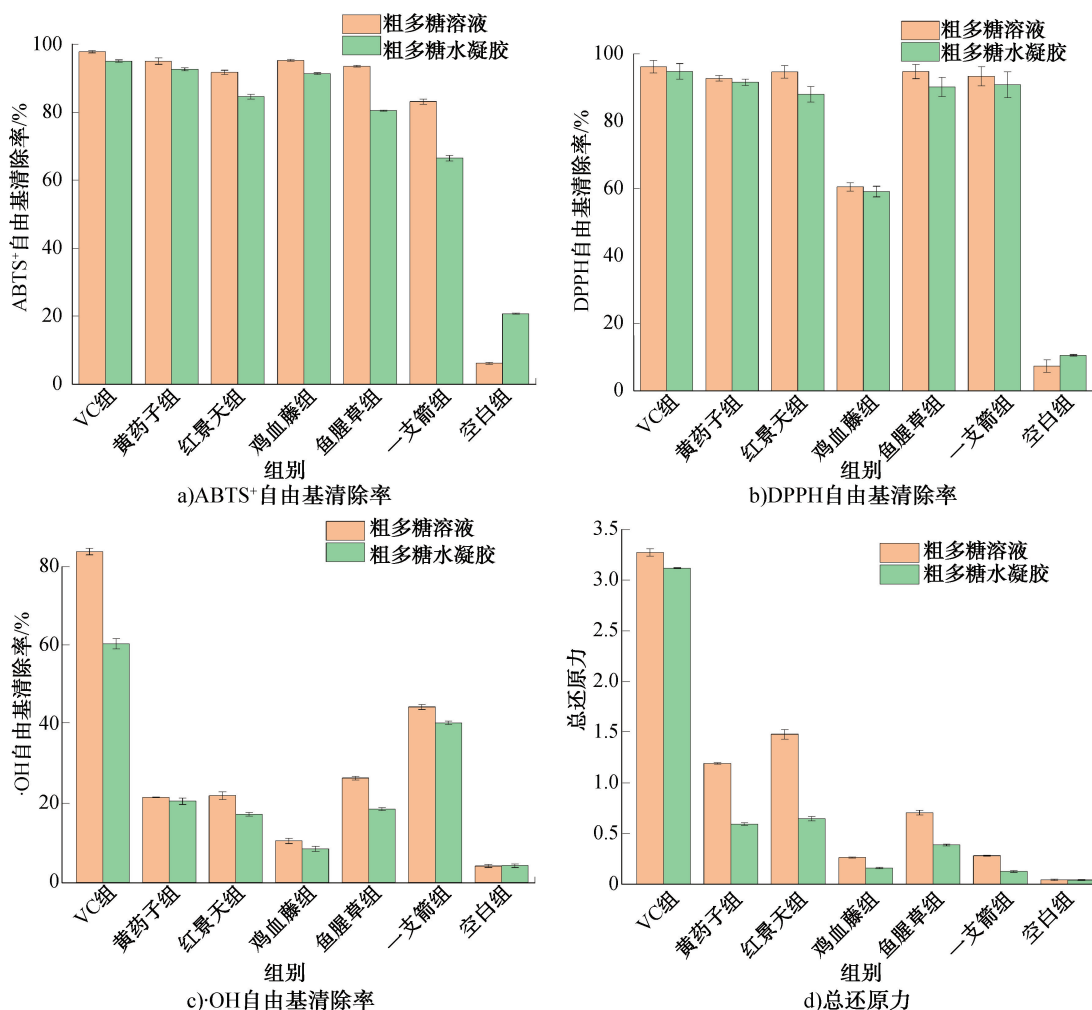


图 7 各中药粗多糖溶液及其水凝胶的抗氧化性能测试结果

Fig. 7 Test results of antioxidant properties of crude polysaccharide solution and hydrogel of each traditional Chinese medicine

氧化作用等因素有关。此外,空白水凝胶对 ABTS⁺ 自由基和 DPPH 自由基的清除率均高于去离子水,这是因为壳聚糖本身也具有一定的抗氧化能力^[28]。

2.4 溶血率分析

图 8 为不同中药粗多糖质量浓度下各水凝胶的溶血率。以 5% 溶血率为评价标准,低于此标准表示在该质量浓度下不会引起红细胞破裂,即具有良好的血液相容性。由图 8 可知,不会引起红细胞破裂的各中药粗多糖水凝胶的最大装载质量浓度分别为黄药子粗多糖水凝胶 2000 μg/mL、红景天粗多糖水凝胶 4000 μg/mL、鸡血藤粗多糖水凝胶 2000 μg/mL、鱼腥草粗多糖水凝胶 2000 μg/mL 和一支箭粗多糖水凝胶 4000 μg/mL,表明各粗多糖水凝胶均具有良好的血液相容性。

2.5 动物实验结果分析

2.5.1 全皮损伤修复分析 图 9 为不同处理条件下小鼠全皮损伤修复图。由图 9 可知,第 5 d 时,空白组小鼠出现红肿和发炎症状;中药粗多糖水凝胶在第 5 d 和第 10 d 时仍能很好地附着在伤口表面;空白组和空白水凝胶组小鼠在第 15 d 时均发现结痂,而中药粗多糖水凝胶组小鼠中均未发现结痂。

因此,中药粗多糖水凝胶能够很好地贴合在伤口表面,减少伤口结痂,且在伤口愈合时自然脱落。

2.5.2 皮肤组织 H&E 染色分析 有研究^[29-30]表明,创伤皮肤受到外界刺激时,表皮层细胞通过上皮间质转化出现侵袭性生长,引起表皮异常增厚、嗜酸性粒细胞增多,这可能会引发嗜酸性粒细胞性皮炎^[31]。图 10 为不同放大倍数下小鼠皮肤组织 H&E 染色结果。由图 10 可知,黄药子粗多糖水凝胶组和鱼腥草粗多糖水凝胶组小鼠的真皮层中发现毛囊、皮脂腺等皮肤附属器,未见表皮增厚;相较于正常组,空白组、空白水凝胶组和红景天粗多糖水凝胶组小鼠皮肤均出现明显的表皮增厚现象;此外,空白组小鼠的真皮层出现大量红色球状嗜酸性粒细胞,空白水凝胶组和鸡血藤粗多糖水凝胶组小鼠真皮层也出现少量嗜酸性粒细胞,其他各组均未出现嗜酸性粒细胞,这说明壳聚糖骨架水凝胶可减轻小鼠皮肤伤口处的炎症反应。因此,5 种中药粗多糖水凝胶对于全皮损伤组织修复具有一定的促进作用,其中黄药子粗多糖水凝胶组和鱼腥草粗多糖水凝胶组小鼠的皮肤组织恢复最好,这与全皮损伤修复实验结果基本一致。

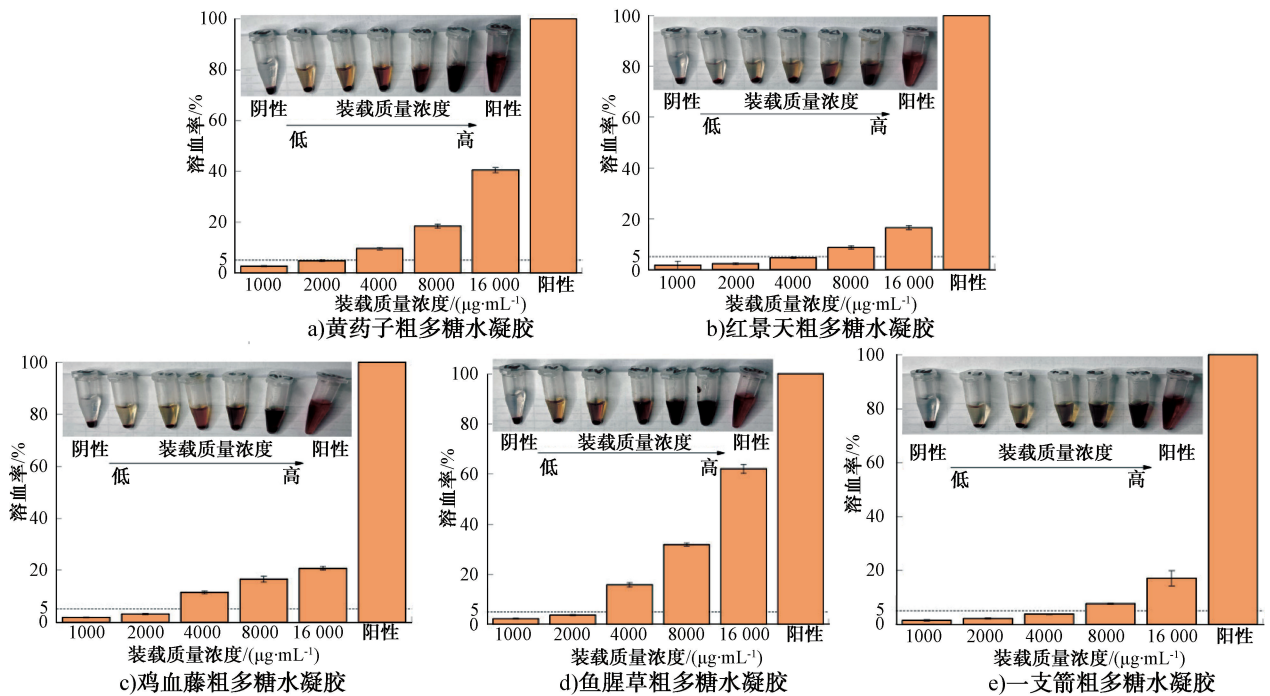


图 8 不同中药粗多糖质量浓度下各水凝胶的溶血率

Fig. 8 Hemolysis rate of hydrogels in each group under the mass concentration of crude polysaccharides from different traditional Chinese medicine

已有研究^[32]表明,从中药中提取的多糖等物质具有抗氧化、抗炎等特性,可促进伤口修复。R. E. Hosary 等^[33]将埃及阿韦纳苜蓿多糖与羟乙基纤维素结合制备的复合水凝胶伤口敷料,在大鼠皮肤伤口修复过程中表现出良好的抗炎活性。Y. Luo 等^[34]在白芨多糖中加入聚赖氨酸和聚多巴胺制备水凝胶伤口敷料,该敷料能明显降低小鼠伤口组织中的炎症细胞数量和肿瘤坏死因子(TNF- α)水平,

促进表皮生长因子(EGF)的分泌,有利于伤口愈合。在本研究中,只有抗氧化能力最弱的鸡血藤粗多糖水凝胶组出现少量嗜酸性粒细胞,说明中药粗多糖水凝胶的抗炎作用可能与其抗氧化能力有关;然而,鱼腥草粗多糖水凝胶的综合抗氧化能力并非最强,说明伤口愈合可能并不完全依赖中药粗多糖的抗氧化能力,其促伤口愈合机制还需进一步研究。

3 结论

本文采用水提醇沉法提取了具有清热解毒功效的黄药子粗多糖、红景天粗多糖、鸡血藤粗多糖、鱼腥草粗多糖和一支箭粗多糖,测定了其总多糖含量和体外抗氧化活性;分别将5种中药粗多糖载入壳聚糖中制备了中药粗多糖水凝胶,并研究了这些水凝胶的微观结构、溶胀性能、保水性能、抗氧化活性、血液相容性和促进伤口愈合的能力,得出如下结论:5种中药粗多糖溶液及其水凝胶均具有一定的抗氧化能力,其中黄药子粗多糖表现最为突出,其次是红景天粗多糖和一支箭粗多糖;中药粗多糖的载入使得中药粗多糖水凝胶的孔径增大,溶胀能力提升,但

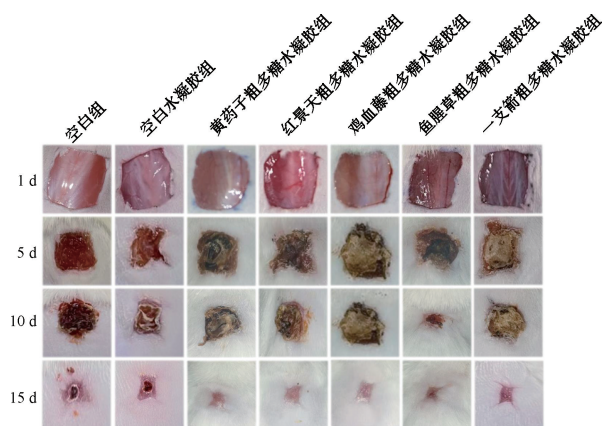


图9 不同处理条件下小鼠全皮损伤修复图
Fig. 9 Repair diagrams of mouse whole skin injury under different treatment conditions

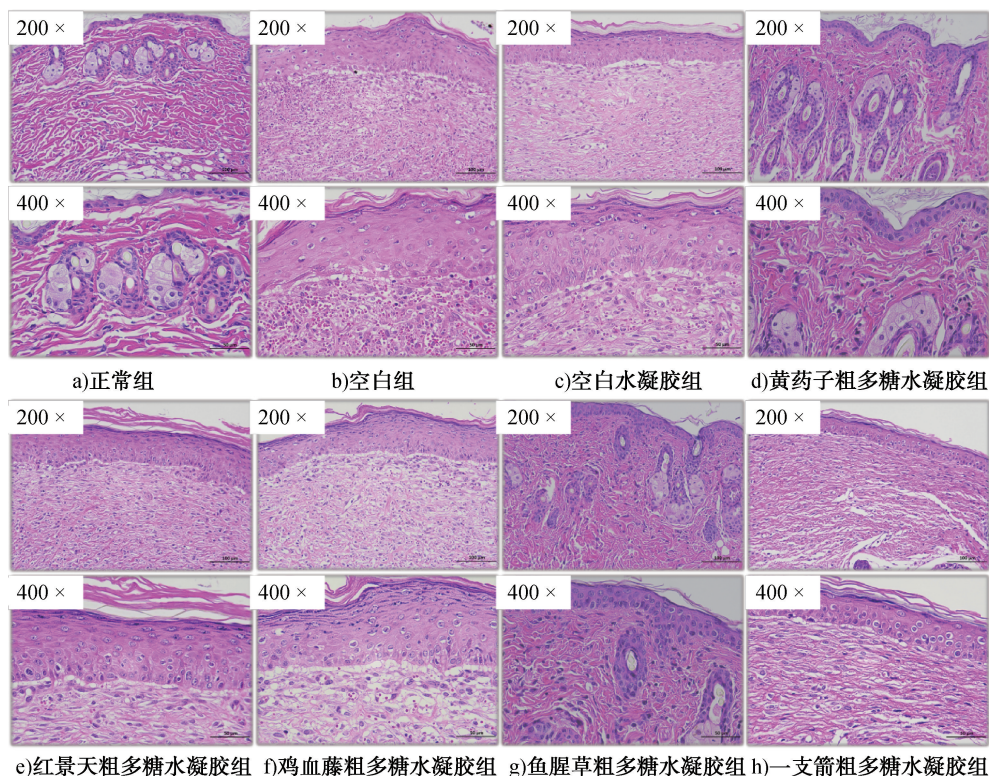


图10 不同放大倍数下小鼠皮肤组织 H&E 染色结果

Fig. 10 H&E staining results of mouse skin tissue at different magnifications

保水率和抗氧化活性均有所降低;在 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下,5 种中药粗多糖水凝胶均具有良好的血液相容性,并对全皮损伤小鼠的伤口修复具有促进作用,尤其是黄药子粗多糖水凝胶和鱼腥草粗多糖水凝胶的修复效果最为明显。本研究证实了中药粗多糖可用于制备能够有效促进全皮损伤模型小鼠伤口修复的水凝胶伤口敷料,为中药在伤口敷料领域的应用提供了新的视角和参考。

参考文献:

- [1] 张小磊,吉美怡,匡淑一,等.《中华本草》清热类植物中药鲜用特点分析[J].中国医院药学杂志,2023,43(8):863-867.
- [2] 祁银德.《生草药性备要》鲜药加工和使用方法浅析[J].中国药房,2017,28(4):570-573.
- [3] SEABRA A B,PIERETTI J C,SANTANA B D M, et al. Pharmacological applications of nitric oxide-releasing biomaterials in human skin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2023, 630: 122465.
- [4] FOSEN K M, THOM S R. Hyperbaric oxygen, vasculogenic stem cells, and wound healing [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 21(11): 1634-1647.
- [5] XU Z J, HAN S Y, GU Z P, et al. Advances and impact of antioxidant hydrogel in chronic wound healing [J]. Advanced Healthcare Materials, 2020, 9(5): 1901502.
- [6] LYU S H, ZHANG S S, ZUO J J, et al. Progress in preparation and properties of chitosan-based hydrogels [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242(2): 124915.
- [7] CHEN W H, CHEN Q W, CHEN Q, et al. Biomedical polymers: Synthesis, properties, and applications [J]. Science China Chemistry, 2022, 65(6): 1010-1075.
- [8] 薛佳耿,马应霞,赵光辉. 卤胺类抗菌医用材料研究进展[J].化工新型材料,2023,51(11):1-8.
- [9] 张建伟. 甲壳素/壳聚糖纳米凝胶基材料的制备及其在生物材料中的应用[D]. 武汉:武汉大学,2022.
- [10] 王奕博,杜梓萱,黄特辉,等. 中药凝胶贴膏基质选择及挥发油加入方式研究进展[J].中草药,2018,49(11):2715-2721.
- [11] 王中华,蔡同强,杨丛远,等. 鸡血藤多糖的硫酸化修饰、表征及活性研究[J].广西大学学报(自然科学版),2018,43(5):2041-2046.
- [12] 罗秋莲. 鱼腥草多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J].安徽农业科学,2022,50(22):164-166,214.
- [13] 刘晓宇. 黄药子中性多糖的结构分析及其抗肿瘤活性研究[D]. 长春:东北师范大学,2013.
- [14] 冀晓龙,王治雯,潘飞兵,等. 槟榔多糖对 Caco-2 细胞氧化损伤的保护作用[J].轻工学报,2022,37(6):18-24.
- [15] 谢心文,门磊,孙怡,等. 蒽酮-硫酸法测定复方木鸡颗粒中粗多糖[J].中成药,2019,41(7):1685-1687.
- [16] ZENG B Y, SU M H, CHEN Q G, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Anoec-tochilus roxburghii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 153: 391-398.
- [17] 张玉梅,邢慧珍,刘会平,等. 槐花多糖的提取、纯化和抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2023,44(24):1-13.
- [18] LIU K, WU X P, DAI H L. Citric acid cross-linked chitosan for inhibiting oxidative stress after nerve injury [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B (Applied Biomaterials), 2022, 110(10): 2231-2240.
- [19] CHEN T Y, GUO X Y, HUANG Y P, et al. Bletilla striata polysaccharide-waterborne polyurethane hydrogel as a wound dressing [J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2023, 34(9): 1157-1170.
- [20] ZHENG L W, WANG Q H, ZHANG Y S, et al. A hemostatic sponge derived from skin secretion of *Andrias davidianus* and nanocellulose [J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 416: 129136.
- [21] 刘新,杨海,夏雪奎,等. 黄药子体外抗氧化活性研究[J].中药材,2010,33(10):1612-1614.
- [22] 林晓月,齐珈烧,王丹丹,等. 红景天多糖的提取及体外抗氧化活性研究[J].北华大学学报(自然科学版),2016,17(3):330-334.
- [23] MOHIBBULLAH M, LEE Y J, PARK H J, et al. The medicinal herb *Spatholobus suberectus* with promising in vitro antioxidant and anti-inflammatory potentials and its phytochemical characterization by RP-HPLC analysis [J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(2): e12480.
- [24] 贺银菊,杨再波,彭莘媚,等. 响应面优化瓶尔小草多糖超声提取工艺及体外抗氧化活性[J].中国食品添加剂,2020,31(9):19-27.
- [25] ZHANG W L, ROY S, ASSADPOUR E, et al. Cross-linked biopolymeric films by citric acid for food packaging and preservation [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2023, 314: 102886.
- [26] METZGER S. Clinical and financial advantages of moist wound management [J]. Home Healthcare Now, 2004, 22(9): 586-590.
- [27] 王鸿,沈月新. 不同脱乙酰度壳聚糖的抑菌性 [J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(4): 380-382.
- [28] RIAZ A, LAGNIKA C, ABDIN M, et al. Preparation and characterization of chitosan/gelatin-based active food packaging films containing apple peel nanoparticles [J]. Journal of Polymers and the Environment, 2020, 28: 411-420.
- [29] VERHAEGEN P D, VAN ZUIJLEN P P, PENNINGNS N

- M, et al. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis [J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2009, 17(5): 649–656.
- [30] 杨雨婷, 刘兰, 丁晓斌, 等. 瘢痕疙瘩中心与边缘表皮层形态学和上皮间质转化相关指标表达的异质性研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(11): 1025–1031.
- [31] KURUVILLA M. Treatment of hypereosinophilic syndrome and eosinophilic dermatitis with reslizumab [J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2018, 120(6): 670–671.
- [32] ABAZARI M, AKBARI T, HASANI M, et al. Polysaccharide-based hydrogels containing herbal extracts for wound healing applications [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 294: 119808.
- [33] HOSARY R E, EL-MANCY S M, EL DEEB K S, et al. Efficient wound healing composite hydrogel using Egyptian *Avena sativa* L. polysaccharide containing β -glucan [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 149: 1331–1338.
- [34] LUO Y, DIAO H J, XIA S H, et al. A physiologically active polysaccharide hydrogel promotes wound healing [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 94(1): 193–204.

Preparation of crude polysaccharide hydrogels from five kinds of traditional Chinese medicines and their ability to promote wound healing

KOU Xianyong, WU Yan, WANG Yaozi, FENG Wenbo, ZHENG Jiabei, YOU Xiangyu, SU Jiangtao

School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China

Abstract: Five kinds of traditional Chinese medicines, namely *Rhizoma Dioscorea Bulbiferac*, *Rhodiola rosea* L, *Spatholobus suberectus* Dunn, *Houttuynia cordata* Thunb, and *Ophioglossum pedunculatum* Desv, were used as raw materials to extract crude polysaccharides using water extraction and alcohol precipitation method. The total polysaccharide content and in vitro antioxidant activity were determined; Crude polysaccharides extracted from traditional Chinese medicines were loaded into chitosan to prepare hydrogel dressings. Subsequently, the microstructure, swelling capacity, water retention, antioxidant activity, blood compatibility, and wound healing promotion ability of the obtained hydrogels were investigated. Results showed that the total polysaccharide content of *Rhodiola rosea* L crude polysaccharide was the highest at 77.6%. All groups of crude polysaccharide solutions exhibited certain antioxidant capacity. The crude polysaccharide solution derived from *Rhizoma Dioscorea Bulbiferac* demonstrated the most potent scavenging activity towards ABTS⁺ radicals, whereas the same solution emerged as the most effective in neutralizing DPPH radicals. Alternatively, the crude polysaccharide solution isolated from *Ophioglossum pedunculatum* Desv exhibited superior scavenging capability towards hydroxyl radicals. Lastly, the crude polysaccharide solution originating from *Rhodiola rosea* L was found to possess the highest overall reducing power. With the loading of traditional Chinese medicine crude polysaccharides, the pore size of the traditional Chinese medicine crude polysaccharide hydrogel increased, the swelling capacity enhanced, while water retention and antioxidant properties decreased to some extent. Compared to the control group, mice in the *Rhizoma Dioscorea Bulbiferac* crude polysaccharide hydrogel group and the *Houttuynia cordata* Thunb crude polysaccharide hydrogel group showed significant wound recovery, reduced scabbing, and the appearance of skin appendages such as hair follicles and sebaceous glands, with no infiltration of inflammatory cells. Additionally, at a concentration of 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ crude polysaccharides, all polysaccharide hydrogels demonstrated high hemocompatibility. The crude polysaccharide hydrogel loaded with *Rhizoma Dioscorea Bulbiferac* and *Houttuynia cordata* Thunb had an obvious effect on accelerating wound recovery, and are wound dressings with potential application.

Key words: traditional Chinese medicine crude polysaccharides; hydrogel; antioxidant activity; wound healing

[责任编辑: 王晓波]