

光控水凝胶负载太子参多糖对大鼠糖尿病溃疡创面修复作用研究

赵月

深圳市光明区中医药传承发展研究院 广东 深圳 518107

【摘要】目的: 本研究制备了一种具有光控性并负载太子参多糖的水凝胶, 进一步研究了负载太子参水凝胶的理化性能和溃疡创面修复效果。方法: 以 PolyCBNA 和明胶为主要原料制备光控水凝胶, 通过微观结构、药物释放量和体内动物实验对其进行分析评估。结果: PolyCBNA/明胶/太子参多糖结构更紧密, 说明, 加入太子参多糖后, 能改变水凝胶的微观结构。而 24 时, 太子参多糖的释放量达到 47%。动物模型修复效果更证实表明负载太子参多糖的水凝胶有效促进伤口愈合。结论: PolyCBNA/明胶/太子参多糖具有良好的光控性、释药性和修复效果。

【关键词】: 光控水凝胶; 太子参多糖; 糖尿病; 修复

Study on the effect of photocontrolled hydrogel loaded with tai ginseng polysaccharides on the wound repair of diabetic ulcers in rats

Yue Zhao

Shenzhen Guangming Institute of Traditional Chinese Medicine Inheritance and Development, Shenzhen, Guangdong 518107, China

Abstract: Objective: In this study, a hydrogel with photocontrol properties and loaded with tai ginseng polysaccharides was prepared, and the physicochemical properties and ulcer wound repair effect of the loaded tai ginseng hydrogel were further investigated. Methods: PolyCBNA and gelatin were used as the main raw materials to prepare the photocontrolled hydrogel, which was analyzed and evaluated by microstructure, drug release and in vivo animal experiments. RESULTS: The structure of PolyCBNA/gelatin/primrose polysaccharide was more compact, which indicated that, the addition of primrose polysaccharide could change the microstructure of the hydrogel. And at 24, 47% of the release of the ginseng polysaccharide was achieved. The repair effect of animal model was more confirmed indicating that the hydrogel loaded with tai ginseng polysaccharide effectively promoted wound healing. Conclusion: PolyCBNA/gelatin/practicing ginseng polysaccharide has good photocontrol, drug release and repair effect.

Keywords: Photocontrolled hydrogel; Ginseng polysaccharide; Diabetes mellitus; Repair

前言

糖尿病难治性溃疡是导致糖尿病病人截肢致残的主要原因, 它具有病程长和反复发作等特点, 可引起皮肤表皮和部分真皮甚至皮下脂肪缺损^[1]。随着全球性糖尿病患病人数的增加, 因糖尿病溃疡而需要截肢的患者也在增加^[1,2]。因此, 研制能够加速溃疡愈合, 并提升溃疡修复质量, 使修复后皮肤也能具有毛囊、汗腺等附属器官一直是糖尿病溃疡治疗领域的重难点问题, 具有非常重大的研究意义。

目前糖尿病溃疡的发病机制非常复杂, 预后较差^[3]。使用单一药理作用的药物进行治疗往往不能达到理想的效果, 而且通过单纯地调节药物用量也可能会适得其反^[4]。因此在使用药物治疗溃疡的过程中, 必须要有合适的载体。光响应水凝胶是目前最受关注的一类刺激响应性水凝胶, 可用作光控水凝胶敷料^[5]。其中聚[2-(4, 5-二甲氧基-2-硝基苄基)氧基]-N-(2-(甲基丙烯酰氧基)乙基)-N,N-二甲基-2-氧代乙烷-1-铵](polyCBNA)水凝胶, 在 365nm 的紫外线照射下, 光不稳定性基团很快从水凝胶上切割下来, 致使聚合物表面电荷从阳离子转变为两性离子形式。作为前体的阳离子水凝胶显示出有效杀死附着的

细菌, 然后通过光解快速转换为两性离子防污形式, 防止进一步的细菌附着, 其作为创伤敷料, 具有无毒、生物相容性好等优点^[6]。但是 polyCBNA 水凝胶在溶胀条件下力学性能较差。天然高分子材料壳聚糖和明胶的合用可以明显改善凝胶的力学性能和溶胀性能等, 使该敷料具有良好的生物粘附性和孔隙率, 利于细胞的粘附生长和呼吸作用, 为细胞提供适宜生长基质的同时保护伤口免受细菌侵入。此外, 该凝胶敷料还能在一定程度上延缓药物的释放, 减少给药次数, 从而增加患者的依从性, 具有良好的临床应用价值。本研究首先通过细胞实验和动物实验筛选得到具有加快慢性创伤修复作用的太子参多糖, 并对其体外的创伤愈合机制开展了研究。

1 材料与方法

1.1 主要实验仪器几材料

PolyCBNA 水凝胶溶液 (南方科技大学实验室友情支持); 明胶 (Gelatin, 中国上海源叶生物科技有限公司); 太子参多糖 (PHP-A 和 PHP-B, 中国上海源叶生物科技有限公司); 培养基 (DMEM, Gibco 公司, 美国); 胎牛

血清 (FBS, Gibco 公司, 美国); 手持紫外灯 (ZF-7A, 中国上海美强实业发展有限公司) 电子扫描显微镜 (SEM, Sigma300/500, ZIESS)。

1.2 负载太子参多糖的光控水凝胶的制备

水凝胶的制备: 称取 1.25g 的明胶, 50°C 下溶解于双蒸水中形成 2.5% 的明胶溶液; 然后在常温下 PolyCBNA 水凝胶溶液和明胶溶液两者按一定的质量比混合, 在恒温磁力搅拌器中 (500rpm) 混合均匀 (比例为 3:7)。最后在混合溶液中加入太子参多糖, 形成均匀的含药凝胶溶液。

1.3 测试与表征

1.3.1 水凝胶的微观形态表征

将上述制备的水凝胶在冰箱中预冻, 然后进行真空干燥, 干燥过夜后, 用小刀切取适宜的样品截面, 然后在其表面喷金, 将样品放在扫描电镜下观察凝胶形态。

1.3.2 凝胶的释药行为考察

将 0.6g 凝胶装于透析袋中、扎紧两端, 放入 15ml 离心管中。向离心管内加入 8ml PBS 作为释放介质, 于 37°C 左右恒温振荡箱内反应, 转速为 100rpm。于设定时间点取样, 每次取出全部样本, 再重新补充 PBS 8ml。于高效液相上检测药物含量, 计算累计释放速度。

1.3.3 糖尿病大鼠溃疡创面的建立及修复效果评价

取 6 周龄的雄性 SD 大鼠 21 只, 体重 220-240g, 适应性喂养一周。空腹 16h 后, 大鼠用链脲佐菌素 (STZ)

75mg/kg 腹腔注射。3 天后用血糖仪检测血糖, 一周检测两次血糖和体重, 若随机血糖水平 > 16.7mmol/l, 且伴随有多食、多饮、多尿和体重减轻的情况, 则视为糖尿病大鼠造模成功。4 周后, 取血糖范围在 20-30mmol/L 之间的糖尿病大鼠进行溃疡造模。

在用药组创伤完全愈合后, 将伤口愈合部位进行全皮摘除, 其摘除面积为 1.5cm×1.5cm, 并切除皮下多余脂肪。将已摘下的皮肤组织侵入 4% 的甲醛溶液中固定 24h, 4°C 冰箱放置, 固定液的体积至少时皮肤体积的 10 倍。进而将其侵入浓度梯度的乙醇 (70%、80%、95%、无水乙醇) 中进行脱水, 每次 15min, 无水乙醇中脱水两次。将脱水以后的皮肤样品拭干, 加入无水乙醇于二甲苯灯亮混合液中 15min, 再放入二甲苯中分别透明 10min 和 20min, 然后在软蜡 160°C 中浸泡 1h, 软蜡 160°C 中浸泡 1h, 硬蜡 60°C 中浸泡 2h, 进行硬蜡包埋。

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 均表示为平均值 ± 标准差。两组间比较采用 Student's t 检验。每个实验使用至少三个独立样本统计分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 水凝胶的微观形态表征

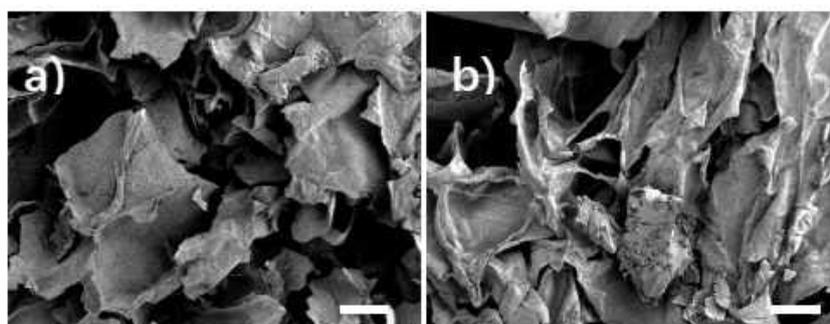


图 1 PolyCBNA/明胶 (a) 和 PolyCBNA/明胶/太子参多糖 (b) (比例尺: 20 μm)

从图 1 中可以明显观察到水凝胶的微观孔洞无规则, 呈现片叶状结构。图 1 (a) 是 PolyCBNA/明胶水凝胶比 PolyCBNA/明胶/太子参多糖结构疏松, 说明, 加入太子参多糖后, 能改变水凝胶的微观结构。

2.2 凝胶的释药行为测试

从图 2 可以观察到随着时间的增加, 水凝胶中的太子参多糖释放量增加。在 24h 时, 太子参多糖释放量达到 47%。

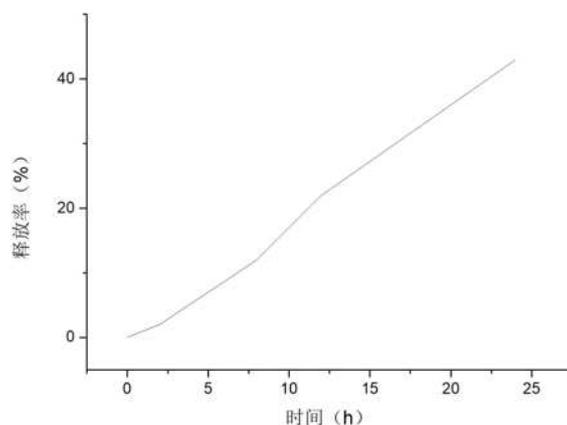


图 2 PolyCBNA/明胶/太子参多糖水凝胶释放太子参多糖曲线

2.3 光控水凝胶对糖尿病大鼠溃疡创面修复效果评价

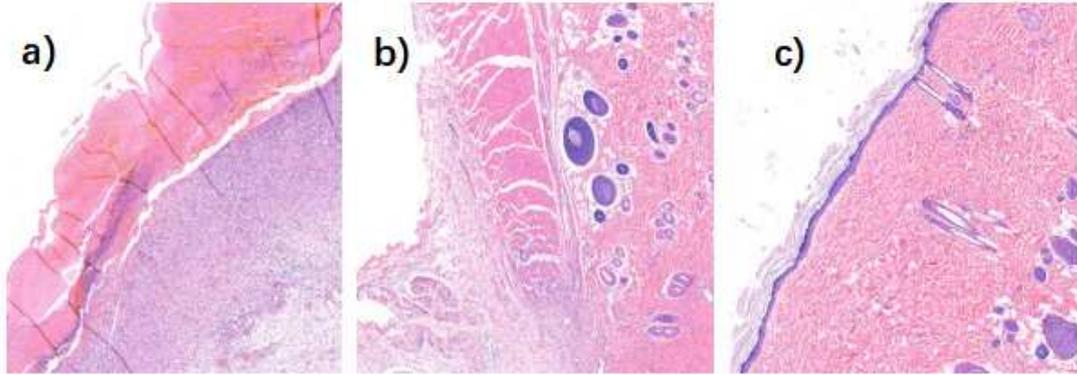


图3 模型组 (a), PolyCBNA/明胶组 (b) 和 PolyCBNA/明胶/太子参多糖组 (c) 各组组织学观察 (HE×100)

从大体观察模型组及实验组大鼠术后均存活至实验完成, 饮食正常。为了探究 PolyCBNA/明胶/太子参多糖的溃疡创面修复能力, 通过大鼠全层皮肤缺损模型进行了体内研究。PolyCBNA/明胶和 PolyCBNA/明胶/太子参多糖水凝胶在伤口部位紫外光照射形成, 以纱布敷料作为对照。所有伤口均呈逐渐愈合趋势。如图3所示, H&E 染色显示模型组中观察到稀疏的胶原蛋白沉积, 而 PolyCBNA/明胶/太子参多糖水凝胶组则拥有更有序的胶原纤维, 与正常皮肤组织相似。总体而言, PolyCBNA/明胶/太子参多糖水凝胶处理的伤口表现出快速的上皮化、有组织的胶原沉积, 表明负载太子参多糖的水凝胶有效促进伤口愈合。

3 总结

本研究开发了一种负载太子参多糖的光控水凝胶。水凝胶具有良好的药物释放性。此外, 体内研究表明 PolyCBNA/明胶/太子参多糖水凝胶可改善糖尿病溃疡创面修复。这些结果表明, 紫外光照射形成的 PolyCBNA/明胶/太子参多糖水凝胶可能是糖尿病患者伤口治疗领域的一个巨大的潜在候选者。

参考文献:

[1]Tu, C.; Lu, H.; Zhou, T.; Zhang, W.; Deng, L.; Cao, W.; Yang, Z.; Wang, Z.; Wu, X.; Ding, J.; Xu, F.; Gao, C. Promoting the Healing of Infected Diabetic Wound by an Anti-Bacterial and Nano-Enzyme-Containing Hydrogel with Inflammation-Suppressing, ROS-Scavenging, Oxygen and Nitric Oxide-Generating Properties[J]. *Biomaterials*, 2022.

[2]Guan, Y.; Niu, H.; Liu, Z.; Dang, Y.; Shen, J.; Zayed, M.; Ma, L.; Guan, J. Sustained Oxygenation Accelerates Diabetic Wound Healing by Promoting Epithelialization and Angiogenesis and Decreasing Inflammation[J]. *Sci. Adv.* 2021, 7 (35).

[3]Wang, M.; Du, J.; Li, M.; Pierini, F.; Li, X.; Yu, J.; Ding, B. In Situ Forming Double-Crosslinked Hydrogels with Highly Dispersed Short Fibers for the Treatment of Irregular Wounds[J]. *Biomater. Sci.* 2023, 11 (7):2383–2394. <https://doi.org/10.1039/d2bm01891h>.

[4]Ahmed, T. A. E.; Suso, H.-P.; Maqbool, A.; Hincke, M. T. Processed Eggshell Membrane Powder: Bioinspiration for an Innovative Wound Healing Product[J]. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 95:192–203.

[5]Dong, R.; Li, Y.; Chen, M.; Xiao, P.; Wu, Y.; Zhou, K.; Zhao, Z.; Tang, B. Z. In Situ Electrospinning of Aggregation-Induced Emission Nanofibrous Dressing for Wound Healing[J]. *Small Method* 2022.

[6]Li, X.; Ma, M.; Ahn, D. U.; Huang, X. Preparation and Characterization of Novel Eggshell Membrane-Chitosan Blend Films for Potential Wound-Care Dressing: From Waste to Medicinal Products. *Int. J. Biological Macromol.* 2019:477–484.

项目名称: 深圳市光明区软科学研究项目: 光控水凝胶负载太子参多糖对大鼠糖尿病溃疡创面修复作用研究, 项目编号: 2021R01127。