

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220930

· 论 著 ·

黄连素-白及多糖-羧甲基壳聚糖复合敷料的设计和药效评价

龚彦溶^{1△}, 王智博^{2△}, 石磊², 王喻蔡², 向兴¹, 张慧卿^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)中医系中药方剂教研室, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院, 上海 200433

[摘要] **目的** 制备黄连素-白及多糖-羧甲基壳聚糖复合敷料(BBCCD), 并评估其物理性能及药效。**方法** 采用真空冷冻干燥法制备BBCCD。根据孔隙率、吸水率、透气率筛选最佳处方配比。通过扫描电子显微镜观察所制备的BBCCD的微观结构, 抑菌圈法评价其抑菌效果, CCK-8法检测其细胞毒性。将新西兰兔血液样本随机分为医用纱布组、明胶海绵组、BBCCD组, 通过体外凝血实验评价BBCCD的凝血效果($n=6$)。将72只SD大鼠随机分为医用纱布组、明胶海绵组和BBCCD组, 通过大鼠股静脉、肝脏及断尾止血实验分析止血时间($n=8$); 将54只SD大鼠随机分为空白组、壳聚糖敷料组和BBCCD组, 采用伤口愈合率($n=6$)和血清IL-1 β 、TNF- α 、IL-10水平($n=4$)测定及创面病理学变化综合评价BBCCD的促愈合效果。**结果** BBCCD中5%白及多糖溶液与5%羧甲基壳聚糖溶液的最佳体积比为1:3。BBCCD为膜性海绵状多孔结构, 无明显毒性, 可吸收创面渗液而产生强黏附性, 黄连素含量为(52.39 \pm 0.87) mg/g, 对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌均有抑菌效果。BBCCD组的体外凝血指数、股静脉创伤止血时间、肝脏创伤止血时间、断尾止血时间均优于明胶海绵组和医用纱布组(P 均 <0.01)。在皮肤创面修复的第3、5、7、14天, BBCCD组大鼠的伤口愈合率均高于壳聚糖敷料组和空白组(P 均 <0.05)。在皮肤创面修复的第7、14天, 与壳聚糖敷料组和空白组相比, BBCCD组大鼠血清IL-10水平均升高, IL-1 β 、TNF- α 水平均降低(P 均 <0.05)。病理结果显示, BBCCD在伤口愈合的初期可促进新生肉芽组织和毛细血管的生成, 减少炎症反应, 加速创面愈合。**结论** 所制备的BBCCD性质稳定, 具有良好的抑菌、止血及促创面愈合效果。

[关键词] 黄连素; 白及多糖; 羧甲基壳聚糖; 复合敷料; 止血; 创面愈合**[中图分类号]** R 944.2; R 982**[文献标志码]** A**[文章编号]** 2097-1338(2023)06-0718-08

Design and pharmacodynamic evaluation of berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing

GONG Yan-rong^{1△}, WANG Zhi-bo^{2△}, SHI Lei², WANG Yu-qing², XIANG Xing¹, ZHANG Hui-qing^{1*}

1. Department of Traditional Chinese Formulaology, School of Traditional Chinese Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To prepare the berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing (BBCCD) and evaluate its physical properties and efficacy. **Methods** The BBCCD was prepared by vacuum freeze-drying method. The optimum proportion was selected based on porosity, water absorption and air permeability. The microstructure of BBCCD was observed by scanning electron microscopy, the antibacterial activity was evaluated by antibacterial experiment, and the cytotoxicity was tested by cell counting kit 8 method. The blood samples of New Zealand rabbits were randomly divided into gauze group, gelatin sponge group and BBCCD group, and the coagulation effect of BBCCD was evaluated by *in vitro* coagulation experiment ($n=6$). Seventy-two SD rats were randomly divided into gauze group, gelatin sponge group and BBCCD group, and the hemostatic time was evaluated by femoral vein, liver and tail-cut hemostasis experiments ($n=8$). Fifty-four SD rats were randomly divided into control group, chitosan group and BBCCD group, and the wound repair effects of BBCCD were evaluated by wound healing rate ($n=6$), detection of serum interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α) and IL-10 ($n=4$) and histopathological examination. **Results** The optimal volume ratio of 5% *Bletilla striata* polysaccharide to 5% carboxymethyl chitosan composite in BBCCD was 1:3. BBCCD

[收稿日期] 2022-12-13 **[接受日期]** 2023-02-23**[基金项目]** 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院“深蓝123”项目(2019SLZ015)。Supported by Project of “Shenlan 123” of The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University) (2019SLZ015).**[作者简介]** 龚彦溶, 硕士, 讲师. E-mail: gyanrong@126.com; 王智博, 海军军医大学(第二军医大学)中医专业2018级八年制本科学员. E-mail: 761453674@qq.com

△共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871568, E-mail: newdew628@aliyun.com

had a membranous sponge-like porous structure with no obvious toxicity. It could absorb wound exudate and had strong adhesion. The content of berberine was (52.39 ± 0.87) mg/g. BBCCD had antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The *in vitro* blood clotting index and the hemostatic time of femoral vein trauma, liver trauma and tail-cut in the BBCCD group were significantly better than those in the gelatin sponge group and gauze group (all $P < 0.01$). On the 3rd, 5th, 7th and 14th days, the wound healing rate of the BBCCD group was significantly higher than that of the chitosan group and control group (all $P < 0.05$). On the 7th and 14th days, the serum level of IL-10 in the BBCCD group was significantly increased and the serum levels of IL-1 β and TNF- α were significantly decreased compared with the chitosan group and control group (all $P < 0.05$). The pathological results showed that BBCCD could promote the formation of granulation tissue and capillaries at the initial stage of wound healing, attenuate inflammatory response, and accelerate wound healing. **Conclusion** The prepared BBCCD has excellent antibacterial activity, hemostasis and wound healing effects with stable properties.

[**Key words**] berberine; *Bletilla striata* polysaccharide; carboxymethyl chitosan; composite dressing; hemostasis; wound healing

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(6): 718-725]

战创伤出血是战伤死亡的主要原因之一。与平时创伤相比,由于战场救治条件简陋,战创伤创面出血一般以止血敷料为主。止血敷料如沸石敷料止血时会有产热反应,易灼伤组织、引发炎症^[1];而明胶海绵敷料具有体内吸收慢、黏附性差、易脱落等缺点,且易引起过敏反应、增加伤口感染率^[2]。现有大部分敷料功能单一,并不适合在复杂战场环境下使用。理想的战创伤敷料除应该具有良好的创面保护及控制出血、防治感染、促进创面愈合等性能外,还应具有较好的组织相容性,且可自体吸收、无需更换,以防止伤口发生二次损伤^[3]。

白及多糖(*Bletilla striata* polysaccharide)是临床常用止血中药白及的主要药效成分,具有促进凝血、抑菌、抗氧化、促创面修复等多种药理作用,但由于力学性能和成膜性能较差,一定程度上限制了其在止血敷料方面的应用^[4-5]。羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMC)是壳聚糖衍生物,无毒无害,具有良好的抗菌性、生物降解性、生物相容性和止血作用,广泛应用于各类止血敷料的研发,但其伤口修复能力较为不足^[6-7]。本研究将上述2种多糖充分混合进行交联反应,成膜性和黏附性良好,无须添加其他支架材料及黏附成分即可成膜;在此基础上添加具有广谱抗菌作用黄连素,采用真空冷冻干燥法制备了黄连素-白及多糖-羧甲基壳聚糖复合敷料(berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing, BBCCD),该敷料不仅能有效止血,还兼具抗菌及促愈合功能,适合在战场及野外等环境中使用,可为新型多功能复合敷料的开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 分析天平(美国OHAUS公司);超纯水机(型号PALL Cascada I,美国PALL公司);真空冷冻干燥机(型号YTLG-10A,上海叶拓科技有限公司);酶标仪(美国ThermoFisher公司);显微镜(德国Leica公司);扫描电子显微镜(英国Oxford公司);紫外分光光度计(型号UH5300,日本日立仪器有限公司)。医用纱布[海氏海诺倍适威医疗用品(青岛)有限公司];黄连素(大连美仑生物技术有限公司);白及多糖(上海融禾医药科技发展有限公司);CMC(上海麦克林生化科技股份有限公司);吸收性医用明胶海绵(江西祥恩医疗科技发展有限公司);壳聚糖敷料(湖北保泰生物科技有限公司);L929小鼠成纤维细胞(上海雷根生物科技有限公司);日本同仁化学CCK-8试剂盒(上海复申生物科技有限公司);大鼠IL-1 β (货号ml003057)、TNF- α (货号ml002859)和IL-10(货号ml002813)ELISA检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);大肠埃希菌(ATCC25922)和金黄色葡萄球菌(ATCC25923)(上海雷根生物科技有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物与分组 SD大鼠,126只,雌雄各半,6~7周,体重(180 \pm 10)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0010。新西兰兔,3只,雄性,8~9个月,体重(2.8 \pm 0.2)kg,购自上海甲干生物科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(沪)2020-0006。选取72只大鼠随机分为医用纱布组、明胶

海绵组和 BBCCD 组, 每组 24 只, 用于股静脉、肝脏及断尾止血实验。将剩余 54 只大鼠随机分为空白组、壳聚糖敷料组和 BBCCD 组, 每组 18 只, 用于皮肤创面修复实验。新西兰兔多次采集血液样本, 分为医用纱布组、明胶海绵组和 BBCCD 组, 每组 6 个血液样本, 用于体外凝血实验。

1.3 敷料成分比例的筛选与制备 配制 5 mg/mL 黄连素储备液。在保持混合物总量不变及黄连素的终浓度为 2.5 mg/mL 的基础上, 将 5% 白及多糖溶液和 5% CMC 溶液以不同的比例 (体积比分别为 5 : 1、3 : 1、1 : 1、1 : 3、1 : 5) 混合, 置于 55 °C 水浴中充分交联 30 min, 搅拌至无气泡。将交联后的混合胶液倒于 24 孔板, 每孔加液 0.6 mL, 冷却至室温; 将 24 孔板预冷冻, 然后真空冷冻干燥, 获得不同处方配比的 BBCCD。将以上样品分别取 5 个批次的 BBCCD 材料, 进行孔隙率、吸水率、透气率测定, 并计算平均值, 筛选其最佳比例^[8]。

1.4 微观结构观察分析 在扫描电子显微镜下对 BBCCD 的结构进行观察。

1.5 敷料中黄连素含量的测定 采用紫外分光光度法^[9]测定黄连素含量。方法学考察参照 2020 年版《中华人民共和国药典》^[10]规定, 对线性、精密度、重复性、稳定性及加样回收率进行考察, 最终测定敷料中黄连素含量。

1.6 体外抑菌实验 采用抑菌圈法^[11-12]观察 BBCCD 对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效果。将上述菌种活化、纯化后, 取 150 μL 菌悬液接种到固体溶菌肉汤培养基中。用无菌镊子分别夹取经裁剪并灭菌后直径为 6 mm 的 BBCCD, 均匀贴在含菌平板中。盖上平板盖后将其放入生化培养箱内 37 °C 培养 24 h, 实验重复 3 次, 观察是否有抑菌环生成。

1.7 细胞毒性实验 称取适量灭菌后的 BBCCD 样品, 置于 DMEM 完全培养基中制备成 10 mg/mL 的 BBCCD 提取液, 浸泡 24 h 使其完全溶解, 再用 DMEM 完全培养基梯度稀释为不同质量浓度 (0.1、1、10、100、1 000 μg/mL) 的 BBCCD 提取液。将培育好的 L929 小鼠成纤维细胞接种于 96 孔板, 每孔约 7 000 个细胞, 总体积 100 μL, 每个样本设置 4 个复孔。随后向 96 孔板中分别加入不同质量浓度的 BBCCD 提取液, 孵育 24 h 后, 按照试剂盒说

明书于每孔细胞加入 10 μL CCK-8 试剂, 在避光条件下孵育 30 min, 用酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度 (D) 值^[8,11]。

1.8 体外凝血实验 将医用纱布、明胶海绵、BBCCD 均剪裁成 0.3 cm × 0.3 cm 大小, 各取 10 mg 分别置于离心管中, 其中空白对照组不加任何样品。将上述离心管于 37 °C 预热 5 min, 每管加入新鲜抗凝兔血 0.45 mL, 随后再快速加入 50 μL 的 0.2 mol/L 氯化钙溶液, 再次于 37 °C 预热 5 min, 随后分别加入 40 mL 双蒸水, 37 °C 恒温振荡 20 min。采用酶标仪测定各样品的上清液在 540 nm 波长处的 D 值 ($D_{\text{样品}}$), 不加样品的空白对照组其 D 值为 $D_{\text{对照}}$ 。通过公式计算凝血指数: 凝血指数 (%) = $D_{\text{样品}}/D_{\text{对照}} \times 100\%$ 。一般认为, 凝血指数越小说明该敷料的止血效果越好^[8,11]。

1.9 大鼠股静脉止血实验 医用纱布组、明胶海绵组和 BBCCD 组各取 8 只大鼠, 先将各组敷料进行称重, 然后将大鼠麻醉后, 予大腿部脱毛消毒处理。用手术刀切开皮肤暴露股静脉, 快速划穿股静脉及附近组织, 深度为 0.5 cm, 让其自由流血 2 s 后分别用不同敷料覆盖伤口, 同时在敷料上放置 10 g 砝码进行按压, 并开始记录时间。待 50 s 时轻轻取下敷料, 观察伤口情况, 如有继续出血则重复覆盖敷料并按压, 随后每隔约 15 s 观察 1 次, 重复以上操作直至伤口无活动性出血, 记录不同敷料的止血时间^[13]。

1.10 大鼠肝脏止血实验 医用纱布组、明胶海绵组和 BBCCD 组各取 8 只大鼠, 将大鼠麻醉后固定在手术台上, 予腹部脱毛消毒处理。用手术剪在大鼠腹部剑突下剪开长约 3 cm 的开口, 暴露肝脏。取医用纱布垫于肝脏下方, 然后用手术刀在肝脏表面做长度为 1 cm、深度为 0.5 cm 的切口, 让其自由流血 2 s 后立即取不同的敷料进行贴敷止血^[14]。止血时间的测量方法同 1.9 节。

1.11 大鼠断尾止血实验 医用纱布组、明胶海绵组和 BBCCD 组各取 8 只大鼠, 将大鼠麻醉后, 在距其尾部约 2 cm 处用手术刀片切断鼠尾, 建立大鼠断尾出血模型, 立即给予各止血材料并施加固定压力^[14], 止血时间的测量方法同 1.9 节。

1.12 大鼠背部皮肤创面修复实验 空白组、壳聚糖敷料组和 BBCCD 组每组 18 只大鼠均予以麻

醉,然后予背部脱毛消毒处理。用1 cm的皮肤打孔器在大鼠的背部制作4个圆形全皮层切除创面,创面位置以脊柱为对称,左右各2个,分别靠近肩脚骨和尾脚骨,每个创面损伤至肌筋膜深层。用生理盐水冲洗创面后,壳聚糖敷料组和BBCCD组大鼠分别贴敷相应敷料,空白组不予任何处理。每只大鼠单笼饲养,每天更换1次敷料,每组随机选取6个创面,在第1、3、5、7、14天用相机拍摄创面,使用ImageJ Pro软件测量创面面积,并按公式计算愈合率:愈合率(%) = $(S_1 - S_n) / S_1 \times 100\%$,其中 S_1 为手术结束后当天即第1天测量的创面面积, S_n 为手术结束后第 n 天所测量的创面面积。每组分别于创伤后第1、7、14天各处死4只大鼠,取血清,按照ELISA检测试剂盒说明书方法测定各组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 和IL-10水平。每组分别在创伤后第3、7、14、21天各处死1只大鼠,对创面及周围的皮肤和组织进行切片制作及常规H-E染色,观察创面病理学变化,评价敷料的促愈合

作用^[11-12]。

1.13 统计学处理 运用GraphPad Prism 6.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两样本的比较采用独立样本 t 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 BBCCD的制备及最佳处方配比筛选 BBCCD的吸水率随着CMC的比例增加逐渐上升,在5%白及多糖溶液与5% CMC溶液的配比为1:3时BBCCD的吸水率达到最高,为 $(524.78 \pm 18.46)\%$ (图1A)。BBCCD的孔隙率随着CMC的比例增加先升高后降低,当白及多糖与CMC的配比为1:3时孔隙率最高,为 $(92.91 \pm 4.93)\%$ (图1B)。各处方配比的BBCCD平均透气率均超过65%,其变化趋势与孔隙率相似(图1C)。综合评价认为,BBCCD中5%白及多糖溶液与5% CMC溶液的最佳配比为1:3。

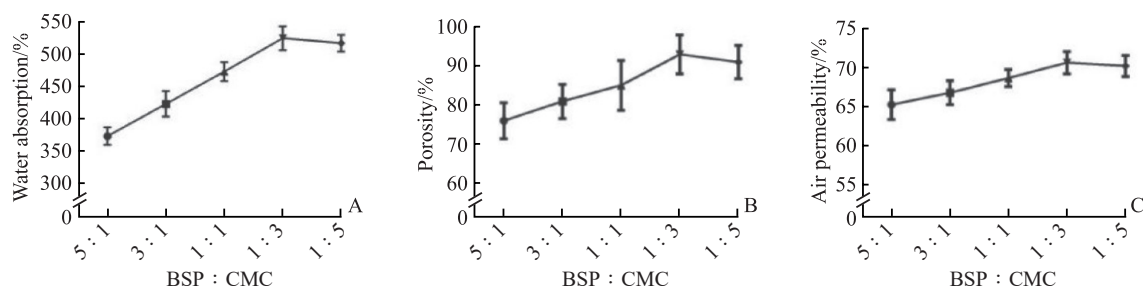


图1 不同配比的BBCCD吸水率(A)、孔隙率(B)和透气率(C)

Fig 1 Water absorption (A), porosity (B) and air permeability (C) of different BBCCD

$n=5$, $\bar{x} \pm s$. BBCCD: Berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing; BSP: *Bletilla striata* polysaccharide; CMC: Carboxymethyl chitosan.

2.2 BBCCD中黄连素含量分析 方法学考察结果显示,检测浓度线性范围为12.92~64.6 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.9997$),精密度、稳定性、重复性实验的RSD分别为1.3%、1.4%、2.4%,加样回收率为102.61% (RSD为2.77%),表明该方法可靠、稳定。制备的BBCCD中黄连素的含量平均值为 (52.39 ± 0.87) mg/g。

2.3 BBCCD的外观及微观结构观察分析 按照上述最佳处方配比制备BBCCD,得到高度约为5 mm、直径约15 mm的圆柱形海绵状敷料(图2)。其外观色泽淡黄,整体均匀、光滑、平整且无裂缝,弹性和柔韧性良好。

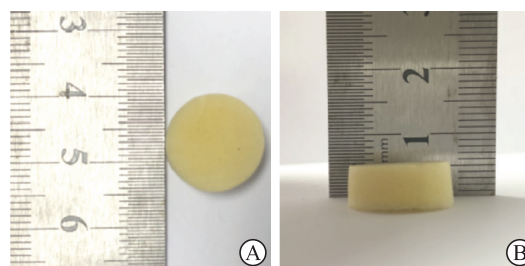


图2 BBCCD成品外观

Fig 2 View of BBCCD

A: An overhead view of BBCCD; B: A flat view of BBCCD. BBCCD: Berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing.

在扫描电子显微镜下, BBCCD 材料呈蜂窝多孔洞网络状, 并且结构清晰、排列规则、空隙分布致密均匀, 单个孔径大小为 100~150 μm,

同时孔壁光滑均匀, 没有出现相分离现象(图3), 说明3种原料之间相容性良好。

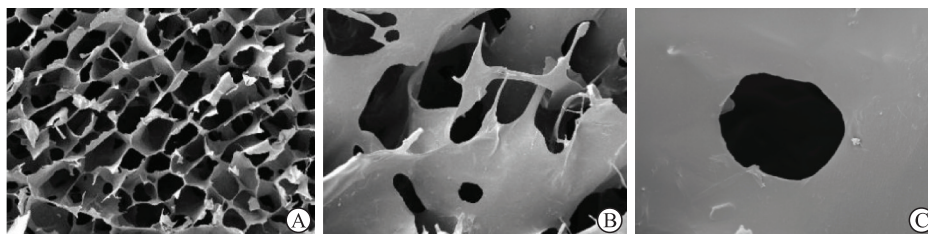


图3 扫描电子显微镜观察 BBCCD 微观结构

Fig 3 Microstructure of BBCCD analyzed by scanning electron microscope

A: 200×; B: 1 000×; C: 5 000×. BBCCD: Berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing.

2.4 BBCCD 的体外抑菌效果分析 BBCCD 在金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的培养皿中逐渐分解吸收, 出现抑菌环, 直径均>7 mm(图4), 说明 BBCCD 具有较好的抑菌作用。

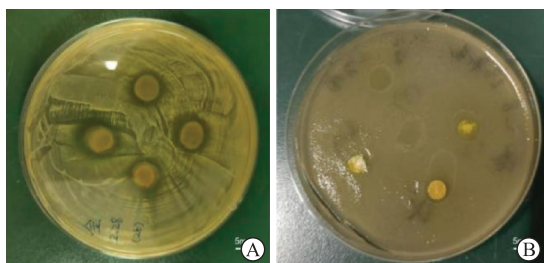


图4 BBCCD 的抑菌效果

Fig 4 Bacteriostatic effect of BBCCD

A: Bacteriostatic effect on *Staphylococcus aureus*; B: Bacteriostatic effect on *Escherichia coli*. BBCCD: Berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing.

2.5 BBCCD 的细胞毒性分析 加入不同质量浓度

(0.1、1、10、100、1 000 μg/mL) 的 BBCCD 提取液孵育 24 h 后, L929 小鼠成纤维细胞的细胞活力值分别为(114.25±3.09)%、(102.74±6.20)%、(101.52±2.79)%、(95.61±4.14)%、(88.67±1.66)%, 均高于 85%, 且各组之间差异无统计学意义($P>0.05$), 表明 BBCCD 无明显细胞毒性。

2.6 BBCCD 的体外凝血效果分析 医用纱布组、明胶海绵组及 BBCCD 组的凝血指数分别为(89.67±4.21)%、(57.83±4.60)%、(39.46±9.31)%。BBCCD 组的凝血指数低于医用纱布组和明胶海绵组(P 均<0.01), 表明 BBCCD 的体外凝血效果优于医用纱布和明胶海绵。

2.7 BBCCD 的止血时间分析 在大鼠股静脉止血实验、肝脏止血实验、断尾止血实验中, BBCCD 组的止血时间均短于医用纱布组及明胶海绵组, 差异均有统计学意义(P 均<0.01, 图5)。

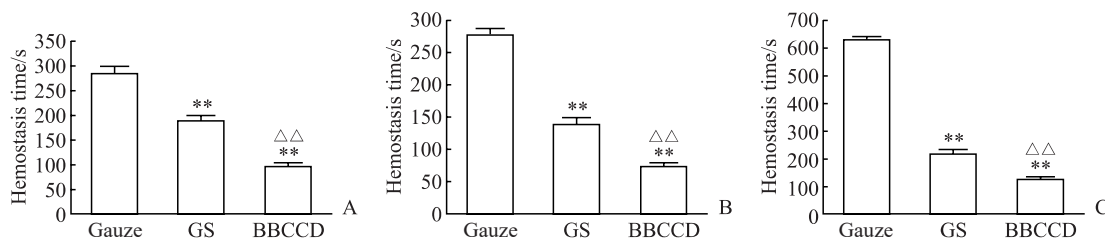


图5 不同敷料对大鼠股静脉(A)、肝脏(B)、断尾(C)创伤的止血效果

Fig 5 Hemostatic effect of different dressings on wounds of femoral vein (A), liver (B) and tail amputation (C) in rats

** $P<0.01$ vs gauze group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs GS group. $n=8, \bar{x}\pm s$. GS: Gelatin sponge; BBCCD: Berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing.

2.8 BBCCD 的促愈合效果分析 大鼠背部皮肤创面修复实验中, 在皮肤创面修复的第3、5天时, 壳聚糖敷料组的伤口愈合率与空白组相比差异无

统计学意义($P>0.05$), 而 BBCCD 组的伤口愈合率均高于同时期空白组和壳聚糖敷料组(P 均<0.05), 说明 BBCCD 在创面修复前期具有很好的

促愈合作用。在皮肤创面修复的第7、14天时，壳聚糖敷料组的伤口愈合率均高于空白组（ P 均 <0.05 ），BBCCD组的伤口愈合率均高于壳聚糖敷

料和空白组（ P 均 <0.05 ），同时BBCCD组的创面愈合平整、瘢痕较小。见图6。

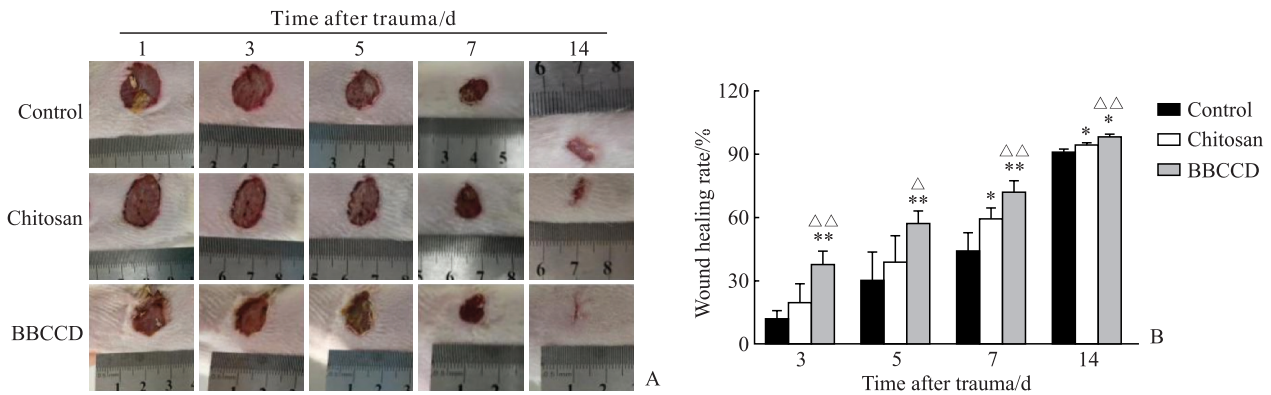


图6 各组大鼠皮肤创面的愈合情况 (A) 和不同时间点伤口愈合率分析 (B)

Fig 6 Healing status (A) and wound healing rates (B) at different time points of rats in each group

* P <0.05 , ** P <0.01 vs control group; Δ P <0.05 , $\Delta\Delta$ P <0.01 vs chitosan group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. BBCCD: Berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing.

2.9 BBCCD抑制创面炎症因子释放 皮肤创伤后的第1天，各组大鼠的血清IL-1 β 、TNF- α 和IL-10水平差异无统计学意义（ P >0.05 ）。在皮肤创伤后第7、14天，与空白组和壳聚糖敷料组相比，

BBCCD组大鼠的血清IL-1 β 、TNF- α 水平均降低（ P <0.05 ），IL-10水平均增高（ P 均 <0.05 ）。见图7。结果表明BBCCD能更有效地抑制促炎因子的释放，控制创面的炎症反应。

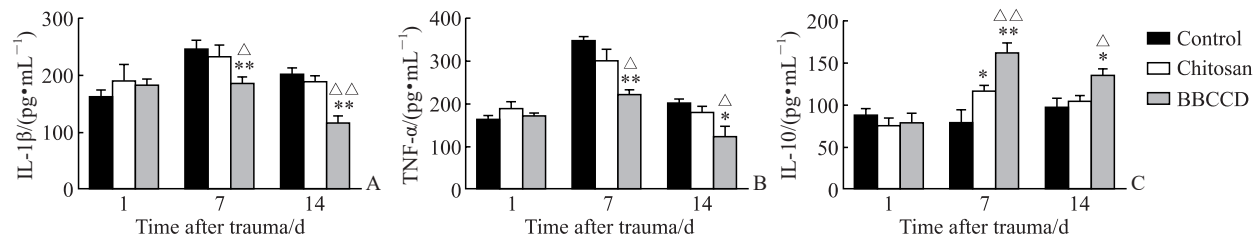


图7 ELISA测定各组大鼠血清IL-1 β (A)、TNF- α (B)、IL-10 (C)含量

Fig 7 Levels of IL-1 β (A), TNF- α (B) and IL-10 (C) in sera of rats in each group determined by ELISA

* P <0.05 , ** P <0.01 vs control group; Δ P <0.05 , $\Delta\Delta$ P <0.01 vs chitosan group. $n=4$, $\bar{x}\pm s$. ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; IL: Interleukin; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; BBCCD: Berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing.

2.10 BBCCD促愈合的组织病理学分析 在皮肤创面修复的第3天，空白组、壳聚糖敷料组和BBCCD组的创面组织均有较多炎症细胞浸润。在第7天时，各组均可见新增生的成纤维细胞，但空白组仍有较多的中性粒细胞等炎症细胞浸润，炎症细胞浸润程度以BBCCD组、壳聚糖敷料组、空白组的顺序依次升高，此外BBCCD组的成纤维细胞排列较为紧密，与新生毛细血管和胶原形成肉芽组织，创面先开始结痂，并完整覆盖创面。在第14天时，各组创面均有新生的表皮层，BBCCD组只有

轻微的炎症细胞浸润，还具有丰富的胶原纤维及新形成的毛囊，并且瘢痕最少，伤口愈合最好；壳聚糖敷料组和空白组仍可见明显的炎症细胞浸润，说明炎症虽局限但未完全消失，其中壳聚糖敷料组的上皮修复程度好于空白组，且新生表皮更为致密，而空白组的真皮层未完全愈合。在第21天时，相较于其他两组，BBCCD组所形成的肉芽组织和毛囊结构基本完整，已基本愈合。结果表明BBCCD可通过减轻伤口的炎症反应、加速创面表皮重建等途径促进伤口愈合。见图8。

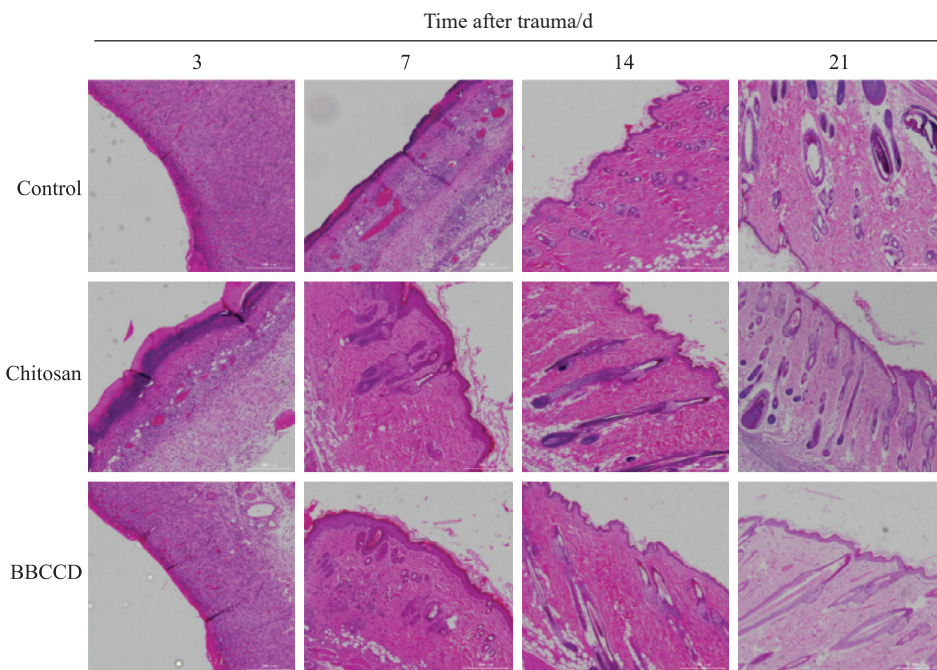


图8 各组大鼠皮肤创伤后不同时间点创面组织的H-E染色图像(200×)

Fig 8 H-E staining images of wound tissue of rats in each group at different time points after skin trauma (200×)

H-E: Hematoxylin-eosin; BBCCD: Berberine-*Bletilla striata* polysaccharide-carboxymethyl chitosan composite dressing.

3 讨论

随着新材料的发现和新技术的进步,理想敷料向多能化、复合化方向发展。具有止血、抗感染、促愈合、吸收渗液、缓解疼痛、保湿性、透气性、组织相容性、价格低廉等特征的新型多功能敷料是目前研究的趋势。

中医药用于战创伤的治疗有着悠久的历史和丰富的经验,但传统给药剂型通常是膏散外敷或煎汤外洗,使用不便,也根本不能满足现代战争环境下的使用。有收敛止血、消肿生肌功效的中药白及在临床上被广泛用于内出血和创面修复,具有极强的黏附性,可直接黏附创面使用。白及多糖是白及发挥止血、促创面修复作用的主要活性成分^[15],还具有良好的生物相容性、天然黏附性及吸湿透气的物理性质。本研究选用白及多糖与水溶性的CMC、广谱抗菌的黄连素构建了具有止血、抗感染、促进创面修复等多重功效,兼有生物相容性好、无需胶带固定、无需更换等特点的BBCCD。

本实验所研制的BBCCD具有良好的吸水性、高孔隙率等特性,能够快速充分地吸收血液,从而降低体外凝血指数,为其发挥快速、高效的止血作用奠定了基础。药效学结果证实,BBCCD的体外

凝血、在体止血效果均优于医用纱布和明胶海绵;促创面愈合作用优于壳聚糖敷料,且创面愈合更加平整,瘢痕更少。组织病理学结果显示,BBCCD能减轻创面炎症反应、加速表皮重建,其机制可能与下调促炎因子IL-1 β 、TNF- α 的表达及上调抗炎因子IL-10的表达有关。本研究结果还证实,含有黄连素的BBCCD对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌具有较好抑菌作用。

本实验所研制的BBCCD还具有良好的细胞相容性。其不仅可以自体吸收降解,而且湿润后黏性自动变强,对渗出液较多的创面可以直接贴敷,一方面可以吸收多余的渗液或渗血,另一方面吸收渗液或渗血后黏附性增强,不易脱落,有利于黏附封闭伤口,无须借助其他化学黏附材料及医用绷带固定,降低了发生过敏反应的可能性及因更换敷料带来的创面二次伤害。另外,制备BBCCD所用原料价廉易得,制备工艺简单,适合批量生产。

本研究制备的BBCCD不仅能满足战创伤止血修复保护创面的需求,亦可用于常见的烧伤、烫伤、切割伤、皮肤溃疡等的治疗及术后创面修复,在多功能新型敷料开发和应用上具有广阔的前景,有望成为一种理想的战场等复杂环境下使用的急救创面敷料。

[参考文献]

- [1] CHEN H, SHANG X Q, YU L S, XIAO L P, FAN J. Safety evaluation of a low-heat producing zeolite granular hemostatic dressing in a rabbit femoral artery hemorrhage model[J]. *J Biomater Appl*, 2020, 34: 988-997.
- [2] WEI W, LIU J, PENG Z B, LIANG M, WANG Y S, WANG X Q. Gellable silk fibroin-polyethylene sponge for hemostasis[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48: 28-36.
- [3] ZHANG K X, BAI X F, YUAN Z P, CAO X T, JIAO X Y, LI Y S, et al. Layered nanofiber sponge with an improved capacity for promoting blood coagulation and wound healing[J]. *Biomaterials*, 2019, 204: 70-79.
- [4] GOU K, LI Y, QU Y, LI H, ZENG R. Advances and prospects of *Bletilla striata* polysaccharide as promising multifunctional biomedical materials[J/OL]. *Mater Design*, 2022, 223: 111198. DOI: 10.1016/j.matdes.2022.111198.
- [5] 王坤堂. 白及多糖水凝胶的制备、性能研究及在创面修复中的应用[D]. 天津:天津中医药大学, 2022.
- [6] 张莉弘, 窦信, 邱鹏, 刘通, 勾东霞, 赵珺. 载刺五加/桂皮紫萁海藻酸钠/羧甲基壳聚糖水凝胶伤口敷料的制备及其性能研究[J]. *化学试剂*, 2022, 44: 1577-1584.
- [7] LIN P J, LIU L L, HE G H, ZHANG T, YANG M, CAI J Z, et al. Preparation and properties of carboxymethyl chitosan/oxidized hydroxyethyl cellulose hydrogel[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 162: 1692-1698.
- [8] WANG C, LUO W F, LI P W, LI S D, YANG Z M, HU Z, et al. Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/*Bletilla striata* polysaccharide composite hemostatic sponges[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 174: 432-442.
- [9] 钱茂升. 从黄连下脚料中“酶解-超声”联合提取黄连素研究[D]. 洛阳:河南科技大学, 2022.
- [10] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2020年版[M]. 3部. 北京:中国医药科技出版社, 2020:682-684.
- [11] ZHAO H Q, XU Y G, WANG S S, LI P, WANG T, ZHANG F, et al. “Jianbing” styling multifunctional electrospinning composite membranes for wound healing[J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 943695. DOI: 10.3389/fbioe.2022.943695.
- [12] DENG L W, LU H D, TU C X, ZHOU T, CAO W B, GAO C Y. A tough synthetic hydrogel with excellent post-loading of drugs for promoting the healing of infected wounds *in vivo*[J/OL]. *Biomater Adv*, 2022, 134: 112577. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112577.
- [13] LENG F, CHEN F X, JIANG X L. Modified porous carboxymethyl chitin microspheres by an organic solvent-free process for rapid hemostasis[J/OL]. *Carbohydr Polym*, 2021, 270: 118348. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118348.
- [14] ZHAO X, GUO B L, WU H, LIANG Y P, MA P X. Injectable antibacterial conductive nanocomposite cryogels with rapid shape recovery for noncompressible hemorrhage and wound healing[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9: 2784. DOI: 10.1038/s41467-018-04998-9.
- [15] MA X X, TANG K H, TANG Z H, DONG A W, MENG Y J, WANG P. Organ-specific, integrated omics data-based study on the metabolic pathways of the medicinal plant *Bletilla striata* (Orchidaceae)[J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2021, 21: 504. DOI: 10.1186/s12870-021-03288-9.

[本文编辑] 尹 茶