

槲皮素壳聚糖膜对口腔溃疡及创面组织中超氧化物歧化酶和丙二醛含量的影响***★

赵志宇¹, 郭兰², 赵玉梅², 韩淑英²

Effect of quercetin chitosan composite film on superoxide dismutase activity and malondialdehyde content in oral ulcer and wound tissues

Zhao Zhi-yu¹, Guo Lan², Zhao Yu-mei², Han Shu-ying²

文章亮点:

槲皮素壳聚糖膜可能是通过提高机体超氧化物歧化酶活力,降低创面组织的丙二醛含量,发挥明显的抗氧化作用,清除体内存留的过氧化脂质,可修复口腔溃疡。

Abstract

BACKGROUND: Quercetin chitosan composite film was prepared by natural absorbable chitosan and quercetin which have anti-inflammation and accelerating effects on wound healing, and natural absorbable chitosan served as film carriers. A primary observation through an animal model on the pharmacological functions of the composite film was done.

OBJECTIVE: To investigate the therapeutic effects of quercetin chitosan composite film on oral ulcer in rats induced by NaOH.

METHODS: A SD rat model of oral ulcer induced by NaOH was established. A total of 80 SD rats were randomly divided into four groups: composite film group was given quercetin chitosan composite film, chitosan film group was given chitosan film, *Bingpeng San* group was given *Bingpeng San* and control group received no treatment. Each group was dosed twice a day until the oral ulcer in rats was healed completely. Besides, 10 rats from each group were selected, and a rat model of full-thickness back skin defects on both sides of the spine was established. On day 2 after the model was established, the composite film group was treated with quercetin chitosan solution; the chitosan film group was treated with chitosan solution; the *Bingpeng San* group was smeared with *Bingpeng San* solution and the control group underwent no treatments. These groups were dosed twice a day for 3 days.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the ulcer area of the composite film group at each time point was smaller ($P < 0.01$). At days 2 and 4 after administration, the ulcer area of the composite film group was also smaller than that of the *Bingpeng San* group ($P < 0.05$). The composite film group was obviously better than the control group at the degrees of ulcer infection ($P < 0.01$). There was no significant difference between the composite film group and *Bingpeng San* group. The superoxide dismutase activity in the wound tissue of rats in the composite film group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$), while malondialdehyde content in the composite film group was lower than that in the control group ($P < 0.01$). These findings suggest that quercetin chitosan composite film can promote ulcer wound healing, which may be related with the increase of superoxide dismutase activity and the decrease of malondialdehyde content in the wound tissue.

Zhao ZY, Guo L, Zhao YM, Han SY. Effect of quercetin chitosan composite film on superoxide dismutase activity and malondialdehyde content in oral ulcer and wound tissues. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(29): 5437-5440. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景:以天然可吸收的壳聚糖为膜载体,加入具有抗菌消炎、促进创面愈合的槲皮素制成复合膜,拟通过动物模型对该膜的药理作用进行初步观察。

目的:观察槲皮素壳聚糖复合药膜对NaOH所致大鼠口腔溃疡的治疗作用。

方法:采用NaOH烧灼法制备SD大鼠口腔溃疡模型80只,随机分为4组,空白对照组不采取任何处理措施,壳聚糖膜组在溃疡处贴壳聚糖膜,复合膜组在溃疡处贴槲皮素与壳聚糖复合药膜,冰硼散组在溃疡处喷洒冰硼散,2次/d,直至溃疡完全愈合为止。另外从上述实验动物中取SD大鼠10只,在大鼠背部脊柱两侧制作全层皮肤缺损模型,创面制作后次日,空白对照组不做任何处理,冰硼散组创面涂抹冰硼散液,壳聚糖组创面涂抹壳聚糖液,复合溶液组创面涂抹槲皮素壳聚糖液,2次/d,连续给药3d。

结果与结论:复合膜组各时间点的溃疡面积均小于空白对照组($P < 0.01$),且给药后第2、4天的溃疡面积也小于冰硼散组($P < 0.05$)。在溃疡表面感染程度上复合膜组明显好于空白对照组($P < 0.01$),与冰硼散组之间差异无显著性意义。复合溶液组创面组织中超氧化物歧化酶活力明显高于空白对照组($P < 0.01$),而丙二醛含量低于空白对照组($P < 0.01$)。结果可见槲皮素壳聚糖复合药膜可促进溃疡面愈合,这可能与提高创面组织中超氧化物歧化酶活性,降低丙二醛含量有关。

¹Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China; ²Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Zhao Zhi-yu★, Master, Attending physician, Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China tszzygl@163.com

Corresponding author: Han Shu-ying, Professor, Master's supervisor, Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China shuyinghan59@126.com

Supported by: Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2010001795*; Program for Science and Technology Development of Tangshan City, No. 11150205A-8*; Youth Foundation of Hebei United University, No. Z201134*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.29.024

Received: 2011-12-02 Accepted: 2012-01-30

¹ 河北联合大学附属医院口腔科, 河北省唐山市 063009; ² 河北联合大学, 河北省唐山市 063000

赵志宇★, 男, 1978年生, 天津市人, 汉族, 2011年河北联合大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事口腔药理研究。tszzygl@163.com

通讯作者: 韩淑英, 教授, 硕士生导师, 河北联合大学, 河北省唐山市 063000 shuyinghan59@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)29-05437-04

收稿日期: 2011-12-02
修回日期: 2012-01-30
(20111102005/M·T)

关键词: 槲皮素; 复合膜; 口腔溃疡; 壳聚糖; 愈合; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 生物材料

赵志宇, 郭兰, 赵玉梅, 韩淑英. 槲皮素壳聚糖膜对口腔溃疡及创面组织中超氧化物歧化酶和丙二醛含量的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(29):5437-5440. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

复发性口腔溃疡是口腔黏膜的常见病, 其病因复杂, 存在明显的个体差异。复发性口腔溃疡病程较长, 有明显的灼痛感和周期性复发的特点, 降低了患者的生活质量。研究发现槲皮素具有抗氧化、抗炎、抗病毒^[1]、抗肿瘤、抗肝纤维化、抗肾纤维化及抗瘢痕疙瘩增生等多种生物活性和药理作用^[2-4]。壳聚糖是由自然界广泛存在的几丁质经过脱乙酰作用得到的, 化学名称为聚葡萄糖胺, 具有抗菌、抗氧化, 止血、消炎和促进组织愈合等药理作用^[5]。壳聚糖又是一种无毒、无刺激性、生物相容性好以及具有良好成膜性、柔韧性和高黏性的天然材料。为此, 本实验使用NaOH烧灼法制备大鼠口腔溃疡模型, 在此模型上, 观察槲皮素壳聚糖药膜对该法所致大鼠口腔溃疡的治疗作用, 并阐述其可能的作用机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010-11/2011-06在河北联合大学药理学实验室完成。

材料:

药品和试剂:

药品和试剂	来源
槲皮素(批号 0090-1006, 纯度>99%)	中国药品生物制品检定所
壳聚糖(白色粉末, 脱乙酰度 82.1%, 相对分子质量 138 000)	青岛生化厂
冰硼散(批号 20100511)	山东方健制药有限公司
冰醋酸(批号 070609)	上海化学试剂有限公司
超氧化物歧化酶试剂盒	北京邦定泰克生物技术有限公司
丙二醛试剂盒、蛋白定量测试盒	南京建成生物工程研究所

实验动物: 清洁级SD大鼠80只, 雌雄兼有, 体质量(210±20) g, 购买于北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号SCXK(京)2009-0004。

实验动物在华北煤炭医学院实验动物中心屏障环境动物实验室喂养。

方法:

动物模型的建立^[6]: 80只清洁级SD大鼠, 适应性喂养1周后, 在100 g/L水合氯醛(0.9 g/kg)麻醉下, 用直径0.3 cm的NaOH晶体圆片在双侧下唇靠口角黏膜处烧灼6 s, 生理盐水冲洗后形成溃疡。

槲皮素壳聚糖贴膜的制备: 称取一定量的壳聚糖, 溶于1%的冰醋酸水溶液中, 得到4%的壳聚糖醋酸溶液, 3 000 r/min离心30 min除去杂质即为壳聚糖液, 密封备用。称取一定量槲皮素于乳钵中, 滴加少量无水乙醇搅拌, 溶解后加入上述醋酸壳聚糖溶液, 使其浓度为1%, 充分搅拌即成复合膜液。用流涎法于玻璃板上制成膜, 室温自然干燥后, 起膜。在紫外线灯下灭菌15 min, 用直径0.4 cm打孔器制成圆型膜片(每片贴膜槲皮素含量为0.2 mg), 包装密封, 其中不加槲皮素为壳聚糖对照膜。

外用槲皮素壳聚糖溶液的制备:

外用壳聚糖溶液的配制: 称取4 g壳聚糖, 溶于100 mL蒸馏水中, 加热使其完全溶解, 配成4%的壳聚糖溶液高温灭菌后备用。

外用槲皮素壳聚糖溶液的配制: 取1 g槲皮素于乳钵中, 滴加少量无水乙醇搅拌, 溶解后加入上述壳聚糖溶液, 使其浓度为1%, 充分搅拌即成槲皮素壳聚糖液。

外用冰硼散溶液的配制: 取冰硼散粉末5 g于乳钵中充分研磨, 用蒸馏水制成5%溶液充分搅拌即成冰硼散液。

槲皮素壳聚糖复合药膜对大鼠溃疡的治疗作用:

分组及给药: 造模第2天将所有口腔溃疡大鼠随机分为壳聚糖膜组、复合膜组、冰硼散组和空白对照组, 每组20只, 单笼饲养。空白对照组不采取任何处理措施, 壳聚糖膜组在溃疡处贴壳聚糖膜(每片8 mg), 复合膜组在溃疡处贴槲皮素与壳聚糖复合药膜(每片贴膜0.2 mg槲皮素), 冰硼散组在溃疡处喷洒冰硼散(每溃疡面0.2 mg)。每天给药2次, 即上午8:00和下午

5:00各1次, 直至溃疡完全愈合为止。

观察指标: 拍照记录溃疡愈合情况, 用透明胶片画记创面大小, 计算创面面积。S=π×(d₁/2) ×(d₂/2), 式中S为溃疡面积(mm²), π为圆周率, d₁为通过溃疡中心量取的最大纵径, d₂为通过溃疡中心量取的最大横径。大体观察溃疡表面感染情况并记录: I度表面无明显假膜; II度溃疡表面有薄层黄白色假膜, 周围无水肿; III度溃疡表面假膜较厚, 且周围伴有炎性水肿。

外用槲皮素壳聚糖溶液对皮肤创面组织超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响:

分组及给药: 从上述实验动物中取SD大鼠10只, 雌雄不限, 背部去毛后将大鼠用水合氯醛麻醉, 用长3 cm和宽2 cm的长方形图章在大鼠背部脊柱两侧印出标记(左, 右侧各2个), 碘伏消毒, 用剪刀按印记范围剪去全层皮肤及皮下结缔组织, 避开较大血管, 深至筋膜, 压迫创口止血。创面制作后次日, 40个创面随机分为空白对照组, 冰硼散组, 壳聚糖组, 复合溶液组, 每组10个创面。空白对照组不做任何处理, 冰硼散组创面涂抹冰硼散液, 壳聚糖组创面涂抹壳聚糖液, 复合溶液组创面涂抹槲皮素壳聚糖液。2次/d, 上、下午各涂抹1次, 令药物完全覆盖创口, 连续给药3 d。

观察指标: 末次给药后2 h, 用刀片将创面表层药物等附着物轻轻刮掉, 之后取创面组织标本, 用滤纸吸去血迹后, 用精密电子天平称出净质量, 用剪刀剪碎, 加入9倍质量冰冷生理盐水, 用内切式组织匀浆器在冰浴条件下制成10%的组织匀浆, 3 500 r/min(4 ℃)离心10 min后, 取上清, 按试剂盒说明书操作, 分别测定超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量。

统计学分析: 所有数据用SPSS 13.0统计软件进行分析。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间均数比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 80只SD大鼠均进入结果分析。

2.2 槲皮素壳聚糖复合药膜对大鼠口腔溃疡面积及表面感染情况的影响 造模24 h后大鼠双侧口角处黏膜可见直径约4.0 mm×3.5 mm的溃疡形成, 略凹陷, 表面灰白色, 周缘充血水肿, 触痛阳性。给槲皮素壳聚糖复合药膜后, 溃疡面积明显缩小, 各时间点的溃疡面积均小于对照组($P < 0.01$)。且给药后第2, 4天的溃疡面积也小于阳性对照药冰硼散组($P < 0.05$)。各组大鼠溃疡面积变化及表面感染情况见表1, 2。

表1 槲皮素壳聚糖复合药膜对各组大鼠口腔溃疡面积的影响
Table 1 The effect of quercetin chitosan composite film on the area of oral ulcer in each group ($\bar{x}\pm s$, n=20, mm²)

Group	Different time of experiment		
	0 d	2 d	4 d
Control	26.32±2.71	24.74±4.91	11.26±4.23
Chitosan film	26.72±3.14	20.89±3.53	10.25±3.21
Composite film	26.71±3.21	7.53±1.95 ^{ab}	1.92±0.33 ^{bc}
Bingpeng San	26.83±2.62	17.02±3.61 ^a	6.32±2.61 ^a
Group	Different time of experiment		
	6 d	8 d	10 d
Control	3.90±2.17	1.18±1.20	0.12±0.11
Chitosan film	3.25±2.53	1.09±2.17	0
Composite film	0.83±1.16 ^a	0.32±0.52 ^a	0
Bingpeng San	0.62±0.91 ^a	0.17±0.24 ^a	0

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$, vs. Bingpeng San group

表2 槲皮素壳聚糖复合药膜对各组大鼠溃疡表面感染情况的影响
Table 2 The effect of quercetin chitosan composite film on the status of ulcer infection in each group (n=20)

Group	Degree I	Degree II	Degree III	Total	$\bar{x}\pm s$
Control	5	10	5	40	2.00±0.46
Chitosan film	8	10	2	34	1.70±0.33
Composite film	15	4	1	26	1.30±0.29 ^a
Bingpeng San	15	3	2	27	1.35±0.35

^a $P < 0.05$, vs. control group

2.3 外用槲皮素壳聚糖溶液对创面组织超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响 见表3。

表3 外用槲皮素壳聚糖溶液对创面组织超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响
Table 3 The effect of quercetin chitosan solution on the superoxide dismutase activity and malondialdehyde content in the wound tissue ($\bar{x}\pm s$, n=10)

Group	Superoxide dismutase (μkat/g)	Malondialdehyde (μmol/g)
Control	591.45±120.52	6.63±0.92
Chitosan film	645.80±139.53	5.81±0.85
Composite film	794.99±135.69 ^{bc}	4.59±0.79 ^{bc}
Bingpeng San	672.63±137.69	5.52±0.84 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs. control group; ^c $P < 0.05$ vs. chitosan group

由表3可见, 空白对照组大鼠创面组织超氧化物歧化酶活性最低, 丙二醛含量最高; 而复合溶液组创面组织超氧化物歧化酶活性最高, 丙二醛含量最低, 与空白对照组和壳聚糖组比较, 差异有显著性意义($P < 0.01$, $P < 0.05$); 壳聚糖对创面组织超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量无明显影响; 冰硼散可降低创面组织丙二醛的含量, 与空白对照组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$),

对超氧化物歧化酶也有升高趋势, 但与复合溶液组比较, 差异无显著性意义。

3 讨论

目前, 复发性口腔溃疡病因及发病机制尚不明确, 可能与多种致病因素有关, 多数学者考虑是由于机体免疫力低下及免疫功能紊乱造成的。但口腔溃疡的病理过程是一个复杂多环节的过程, 其中不仅有免疫因素的介入, 而且氧自由基损伤也是其发病过程中一个重要环节。自由基可使许多生物大分子如DNA、蛋白质等发生超氧化反应而发生突变、交联、断裂, 引起一系列的生化过程, 这些功能无疑都是对细胞致命的损害^[7]。研究表明复发性口腔溃疡患者, 血浆中超氧化物歧化酶活性较正常人明显降低, 口腔黏膜的超氧化物歧化酶表达量也显著降低, 使机体产生的氧自由基不能有效清除, 导致溃疡的反复发生^[8]。机体内的氧自由基, 如过氧化脂质、丙二醛的过量生成和(或)抗氧化酶如超氧化物歧化酶活性降低, 可造成膜脂质过氧化, 使膜结构和功能受损而引起疾病; 丙二醛能刺激炎症递质的产生、释放, 使血管扩张, 通透性增高, 组织出现严重水肿。而超氧化物歧化酶可抑制丙二醛的这种作用, 使组织水肿明显减轻。有学者认为, 丙二醛能刺激产生某种白细胞趋化因子, 而超氧化物歧化酶能抑制它的合成, 从而抑制了白细胞浸润^[9]。

槲皮素具有抗氧化清除自由基、抗肿瘤、镇痛、抗炎、抗菌、抗病毒、增强免疫及保护心血管等多种药理活性^[10]。以壳聚糖为成膜辅料的槲皮素具有良好的成膜性及与人体组织的相容性, 槲皮素壳聚糖复合药膜贴于口腔黏膜的溃疡面上, 有保护创面、杀菌、消炎、促使黏膜修复的作用, 膜内药物集中在溃疡面上, 缓慢释放, 使局部保证有效的药物浓度。本实验结果显示, 对照组损伤组织中丙二醛含量最高, 各给药组损伤组织中丙二醛含量有不同程度降低, 特别是复合溶液组降低最明显, 明显低于对照组($P < 0.01$), 说明槲皮素壳聚糖复合物膜对创面脂质过氧化反应具有显著的抑制作用, 这可能是槲皮素壳聚糖促进创面愈合的重要机制之一。本实验应用NaOH烧灼法复制大鼠口腔溃疡模型, 证明槲皮素壳聚糖复合药膜能明显缩小由NaOH造成的大鼠口腔溃疡面积, 促进溃疡面的愈合, 减少溃疡面的感染情况。实验结果提示槲皮素壳聚糖可能是通过提高机体超氧化物歧化酶活力, 降低创面组织的丙二醛含量, 发挥明显的抗氧化作用, 清除体内存留的过氧化脂质, 从而达到治疗口腔溃疡的作用。

4 参考文献

- [1] Scambia G, Panici PB, Ranelletti FO, et al. Quercetin enhances transforming growth factor beta 1 secretion by human ovarian cancer cells. *Int J Cancer*. 1994;57(2): 211-215.
- [2] Guan QH, Pei DS, Liu XM, et al. Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. *Brain Res*. 2006;1092(1):36-46.
- [3] Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med*. 2000;36(5):483-506.
- [4] Cardoso CM, Almeida LM, Custódio JB. Protection of tamoxifen against oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability transition induced by prooxidants. *Chem Biol Interact*. 2004;148(3):149-161.
- [5] Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, et al. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*. 2001; 22(22):2959-2966.
- [6] Li QJ, Ma CG, Wang YX, et al. *Anhui Yike Daxue Xuebao*. 2009; 37(4):327-328.
李前进, 马传庚, 王宇翎, 等. 一种简便实用的口腔溃疡实验模型[J]. *安徽医科大学学报*, 2009, 37(4):327-328.
- [7] Schor NF. Mechanisms of synergistic toxicity of the radioprotective agent, WR2721, and 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(9):1751-1762.
- [8] He W, Qin HX, Gao L, et al. *Yiyao Luntan Zazhi*. 2008;26(1): 17-18.
何巍, 秦红霞, 高黎, 等. 复发性口疮SOD和细胞免疫功能改变及意义[J]. *医药论坛杂志*, 2008, 26(1):17-18.
- [9] Petrone WF, English DK, Wong K, et al. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(2):1159-1163.
- [10] Liu SP, Chen SM, Zhu WD. *Zhongcaoyao*. 1991;22(4):182-184.
刘诗平, 陈尚猛, 朱卫东. 槲皮素及其衍生物的生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 1991, 22(4):182-184.

来自本文课题的更多信息—

基金声明: 河北省自然科学基金项目 (C2010001795); 河北省唐山市科技攻关项目 (11150205A-8); 河北联合大学青年基金项目 (Z201134)。

作者贡献: 实验设计为韩淑英, 实验实施为赵志宇, 实验评估为郭兰, 资料收集为赵玉梅。赵志宇成文, 郭兰审校, 韩淑英对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。