

槲皮素壳聚糖复合膜治疗大鼠口腔溃疡的研究

赵志宇¹, 郭兰², 王小波¹, 韩淑英^{2*}

(1. 河北联合大学附属医院,河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学,河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:制备槲皮素壳聚糖复合药膜(quercetin chitosan composite film QUCS),观察其对口腔溃疡愈合过程的影响并探讨其作用机制。方法:以壳聚糖(chitosan, CS)为成膜材料,加入槲皮素(quercetin, QU)制成口腔溃疡复合膜。制备大鼠口腔溃疡模型,随机分为基质组(CS,不加槲皮素的膜 8 mg/片)、复合膜(QUCS 0.2 mg/片)组、冰硼散(BPS 0.2 mg/溃疡面)组和空白对照组。各药均 2 次/d,直至溃疡完全愈合为止。观察每组溃疡鼠的一般状况、溃疡愈合速度、溃疡感染情况。观察 QUCS 对二甲苯所致小鼠耳肿胀及对热板法所致小鼠疼痛的影响。结果:与对照组比较,QUCS 组平均愈合时间(6.24 ± 1.35) d、平均愈合速度(3.13 ± 0.44) mm² · d⁻¹、溃疡周围感染程度明显缩短或减轻(*P* < 0.01)。在溃疡表面感染程度、溃疡平均愈合时间上 QUCS 组和 BPS 组之间无统计学差异。与对照组比较,QUCS 对二甲苯所致小鼠耳肿胀及对热板法所致小鼠疼痛有明显的抑制作用(*P* < 0.01),180 min 仍有强的镇痛作用。结论:QUCS 对 NaOH 所致大鼠口腔溃疡具有明显的治疗作用,其机制可能是通过降低溃疡表面充血水肿及良好的镇痛作用实现的。

[关键词] 槲皮素; 复合膜; 口腔溃疡; 壳聚糖; 愈合

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)02-0161-04

The Experimental of Quercetin Chitosan Composite Film
on the Treatment of Oral Ulcer

ZHAO Zhi-yu¹, GUO Lan², WANG Xiao-bo¹, HAN Shu-ying^{2*}

(1. The Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China;
2. Department of Pharmacology, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the preparation of quercetin chitosan composite film, and to observe its effect on dental ulcer repair. **Method:** Using chitosan as carriers, composited membrane was prepared by adding quercetin. Rabbit dental ulcer was induced by NaOH. Sixty model rats were divided into matrix group (CS, the membrane without quercetin), composite membrane group (QUCS), Bingpeng San group (BPS), control group. The drugs were given 2 times a day, until the ulcer was healed. The gross, ulcer area, ulcer volume and healing speed, macroscopic were observed. Edema, hyperemia and healing of ulcer surface were observed. **Result:** Compared with the control group, the QUCS could shorten and lessen the average healing time、average healing time、ulcer surface obviously (*P* < 0.05, *P* < 0.01). **Conclusion:** QUCSFM has obvious treatment on rats oral ulcer induced by NaOH.

[Key words] quercetin; compound membrane; oral ulcer; chitosan; healing

口腔黏膜溃疡是口腔常见疾病之一,人群发病 是近年来发展起来的治疗口腔溃疡的新剂型,具有
率为 10% ~ 17%,特定人群发病率高达 60%,膜剂 含药量准确,抵抗唾液清除,延长药物作用时间,较

[收稿日期] 20110609(007)
[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2010001795);唐山市“十一五”重点工程项目(072631B-1);河北联合大学青年基金项目(z201134)
[第一作者] 赵志宇,主治医师,硕士,从事口腔药理研究, Tel:13739833533, E-mail:tszzygl@ 163.com
[通讯作者] * 韩淑英,教授,硕士生导师,从事中药药理研究, Tel:0315-3725870, E-mail:shuyinghan59@ 126.com

好地发挥药效等优点,逐渐成为治疗复发性口腔溃疡的主要剂型。壳聚糖是一种无毒、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。研究表明它还有消炎、止血、促进组织愈合等药理作用^[1-3]。槲皮素是一种具有多种生物活性的黄酮类化合物,广泛存在于自然植物中,约有 100 种中草药含有槲皮素。近年来对它的研究日益增多,发现其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^[4]。由于槲皮素毒副作用小,越来越显示出重要的临床应用价值,但应用于口腔溃疡的治疗尚未见报道。本文对槲皮素壳聚糖复合膜对动物口腔溃疡的愈合、镇痛等方面做了初步探讨,为临床用药提供依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雌、雄兼有,体质量(210±20)g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,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和实验。饲料⁶⁰C₀照射大鼠普通饲料,由北京科奥协力饲料有限公司提供,合格证号 SCXK(京)-2005-0007。

1.2 药品 槲皮素(QU,中国药品生物制品检定所,批号 0090-1006,纯度>99%);壳聚糖(CS,白色粉末,脱乙酰度 82.1%,相对分子质量 138×10³,青岛生化厂提供);冰硼散(BPS,山东方健制药有限公司,批号 20100511)。

1.3 仪器 TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器),电子天平(上海第二天平仪器厂),RB-200 智能热板仪(成都泰盟科技有限公司生产),自动双重纯水蒸馏器 SZ-93(上海容亚生化仪器厂),超低温冰箱(三洋电机株式会社),电热恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),低温高速离心机(上海安亭科学仪器厂),722 型分光光度计(北京市六一仪器厂),日立 7180 全自动生化分析仪(日本日立公司),GL-20G-II 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),酶标仪(BIO-RAD company),石蜡切片机(德国 Leica RM2145),Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统(北京航空航天大学),数码照相机(日本日立公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立^[5] 清洁级 SD 大鼠 60 只,体重 190~230 g,普通饲料(饲养条件:大鼠自由取食、饮水,分笼饲养,勤换垫料,房间温度 22℃,湿度 40%,12 h 明暗周期)适应性喂养 1 周后,在 100 g·

L⁻¹水合氯醛(0.9 g·kg⁻¹)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。

2.2 药品的制备

2.2.1 槲皮素壳聚糖贴膜的制备 称取一定量的壳聚糖(CS),溶于 1%的冰醋酸水溶液中,得到 4%的 CS 醋酸溶液,3 000 r·min⁻¹离心 30 min 除去杂质即为 CS 液,密封备用。称取一定量槲皮素(QU)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,使其质量浓度为 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 打孔器制成原型膜片(其中槲皮素含量 0.2 mg/片),包装密封即得,其中不加槲皮素为 CS 对照膜。

2.2.2 外用溶液的配制 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。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 QUCS 液。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 BPS 液。

2.3 分组和给药 造模后第 2 天将所有口腔溃疡大鼠随机分为基质组(CS,不加槲皮素的膜,8 mg/片)、槲皮素复合膜(QUCS,每片贴膜中槲皮素 0.2 mg,壳聚糖 8 mg)组、冰硼散(BPS,0.2 mg 每溃疡面)组和空白对照组,每组 10 只,并开始给药,单笼饲养。对照组不采取任何处理措施;基质组动物在溃疡处贴 CS 膜;槲皮素与壳聚糖复合膜组贴 QUCS 膜;冰硼散组在溃疡处喷洒冰硼散。各药均 2 次/d,即上午 8:00 和下午 5:00 各 1 次,直至溃疡完全愈合为止。

2.4 对大鼠一般状况、溃疡愈合速度、感染情况的影响 拍照记录溃疡愈合情况,记录每只鼠溃疡完全愈合时间,计算各组平均愈合时间。用透明胶片画记创面大小,计算创面面积,以判断愈合速度^[6]。

平均愈合速度(mm²/d)=最大溃疡面积(mm²)/治疗时间(d)

溃疡表面感染情况: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。

2.5 对二甲苯致小鼠耳肿胀的作用 用体重 17~22 g 小鼠 40 只,雌雄兼有,随机分为 4 组,每组 10 只。空白(模型)对照组,小鼠双耳用棉签反复涂抹

生理盐水。阳性对照药 BPS 组,小鼠双耳用棉签反复涂抹 BPS 液(每耳 0.2 mg)。壳聚糖对照组,小鼠双耳用棉签反复涂抹 CS 液(每耳 0.2 mg)。槲皮素壳聚糖治疗组,小鼠双耳用棉签反复涂抹 QUCS 液(每耳 0.2 mg)。上述各组小鼠连续给药 3 d,每天 2 次,末次给药后 30 min,所有小鼠右耳涂二甲苯 0.5 mL/只,左耳作对照。2 h 后小鼠脱臼处死,用直径 9mm 打孔器在左右耳相同部位打下圆耳片,分别置于电子分析天平上称重,以两耳片质量之差作为肿胀度。

2.6 对热板法所致小鼠疼痛的作用 选体重 17 ~ 22 g 小鼠,雌雄兼有,首先在 22 ℃ 室温适应 2 h,然后进行痛阈筛选。将小鼠放在温度为(55 ± 0.5)℃ 的热板仪上(每次 1 只),记录小鼠自投入热板仪至出现舔后足的时间作为小鼠的痛阈值,测定 2 次(间隔 30 min),取均值作为给药前痛阈值。2 次中有 1 次痛阈值 <5 s 或 >30 s 者均剔除。挑选出的合格小鼠 40 只,随机分为 4 组。空白(模型)对照组,小鼠双后足底涂抹生理盐水。阳性对照药 BPS

组,小鼠双后足底涂抹 BPS 液(每足 0.2 mg)。壳聚糖对照组,小鼠双后足底涂抹 CS 液(每足 0.2 mg)。槲皮素壳聚糖治疗组,小鼠双后足底涂抹 QUCS 液(每足 0.2 mg)。上述各组小鼠连续给药 2 次,中间间隔 2 h,于末次给药后 30,60,90,120,180 min 同前法各再测定 1 次痛阈值。

痛阈提高率 = (药后平均痛阈值 - 药前平均痛阈值) / 药前平均痛阈 × 100%

2.7 数据处理 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, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 QUCS 对各组大鼠一般状况的影响 造模成功后,各组大鼠的活动量及进食量均比造模前有所减少,特别是造膜后头 3 d 空白对照组大鼠进食量明显减少,各给药组大鼠进食量也有减少,但较空白组有所增加,QUCS 膜组 8 d 进食量基本回复造膜前水平,与给药 1 d 相比有明显恢复。各组大鼠进食量的恢复情况见表 1。

表 1 槲皮素壳聚糖复合膜给药前后对大鼠日进食量的动态观察($\bar{x} \pm s, n = 10$) g/只

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	造模前	进食量				
			2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
空白	-	12.4 ± 0.4	6.2 ± 0.6	7.5 ± 0.7	7.8 ± 0.8	7.5 ± 0.9	9.9 ± 0.9
基质	0.8	11.9 ± 0.6	6.9 ± 0.8	7.8 ± 0.9	8.5 ± 1.0	8.4 ± 0.8	11.6 ± 1.0 ²⁾
槲皮素复合膜	0.2	12.3 ± 0.5	7.8 ± 0.5 ^{2,3)}	8.6 ± 0.8 ¹⁾	9.6 ± 0.9 ²⁾	10.4 ± 1.0 ^{2,4)}	12.1 ± 0.8 ²⁾
冰硼散	0.2	12.2 ± 0.4	7.3 ± 0.7 ²⁾	8.1 ± 0.7	8.7 ± 1.1	9.2 ± 0.9 ^{2,5)}	11.7 ± 1.2 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与基质组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与复合膜组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

3.2 对大鼠口腔溃疡模型溃疡愈合速度及表面感染情况的影响 造膜 24 h(1 d)大鼠双侧口角处黏膜可见直径约 4 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。2 d(用药后 1 d),对照组溃疡面积有扩大,充血水肿均较重;各给药组也有不同程度扩大,但多不明显,组织水肿轻于对照组,以 QUCS 组较轻;3 d(用药后 2 d)空白对照组溃疡表面坏死,有假膜生成,覆盖于溃疡表面,并明显严重于各给药组;4 ~ 5 d(用药后 3 ~ 4 d),溃疡表面假膜开始有脱落,假膜下组织创面暴露,部分溃疡面开始愈合,给药组创面愈合明显好于对照组,QUCS 组溃疡面积明显小于对照组;6 ~ 7 d(用药后 5 ~ 6 d),溃疡明显好转,溃疡面积明显缩小,各给药组愈合情况明显好于对照组;QUCS 组用药 6 d 多数大鼠溃疡完全愈合,BPS 组溃疡愈合快于 CS 组;治疗 10 d 后对照组多数大鼠溃疡完全愈合。QUCS 使

溃疡愈合时间由 10 d 缩短至 6 d。各组大鼠溃疡愈合速度、表面感染情况见表 2 ~ 3。

表 2 各组大鼠溃疡平均愈合时间及平均愈合速度($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	平均愈合时间/d	平均愈合速度/mm ² ·d ⁻¹
空白	-	10.51 ± 1.92	1.82 ± 0.35
基质	0.8	8.65 ± 1.72 ¹⁾	2.18 ± 0.41
槲皮素复合膜	0.2	6.24 ± 1.35 ^{2,4)}	3.13 ± 0.44 ^{2,4)}
冰硼散	0.2	7.68 ± 1.28	2.44 ± 0.37 ^{2,5)}

表 3 治疗 2 d 各组溃疡感染情况评分值($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	溃疡感染评分/分
空白	-	2.00 ± 0.46
基质	0.8	1.70 ± 0.33
槲皮素复合膜	0.2	1.30 ± 0.29 ¹⁾
冰硼散	0.2	1.35 ± 0.35

3.3 QUCS 对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响 QUCS对二甲苯所致小鼠耳肿胀有明显抑制作用,与对照组比较($P < 0.01$),与 CS 组和 BPS 组比较($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 QUCS 对二甲苯所致小鼠耳肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	肿胀程度 /mg	抑制率 /%
空白	-	10.02 ± 2.34	-
基质	0.8	7.13 ± 1.39	27.25
槲皮素复合膜	0.2	4.94 ± 0.83 ^{2,3)}	51.46
冰硼散	0.2	6.93 ± 1.37 ^{1,3,5)}	31.57

3.4 QUCS 对热板法所致小鼠疼痛的影响 QUCS 对小鼠热刺激所致的疼痛具有明显抑制作用,可提高痛阈值和镇痛率,与对照组比较($P < 0.05, P < 0.01$)镇痛作用出现的时间和维持时间均较早和长,30 min 开始出现,90 ~ 120 min 达高峰,到 180 min 仍有强的镇痛作用;BPS 组也有较强的镇痛作用,但弱于 QUCS 组,并且维持时间较 QUCS 组短。见图 1。

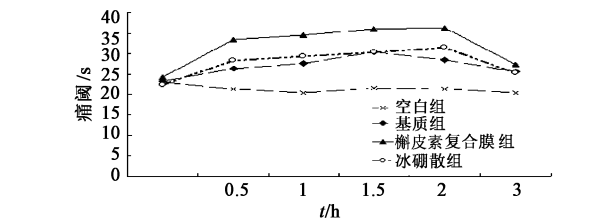


图 1 槲皮素壳聚糖复合膜对热板法所致小鼠疼痛的影响

4 讨论

口腔溃疡是口腔黏膜中最常见的疼痛性疾病,具有周期性及烧灼性疼痛的特点,且复发率高。壳聚糖是带正电荷的单体物质,有很强的生物活性,与机体有良好的生物相容性^[7]。壳聚糖能刺激多型细胞及单核细胞的迁移和巨噬细胞的活性,从而促进肉芽组织形成及表皮生成^[8],槲皮素具有抗氧化清除自由基、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。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,

槲皮素壳聚糖复合膜贴于口腔黏膜的溃疡面上,有保护创面、杀菌、消炎、生肌、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,又消除了冰硼散及多数药物使用不便,不能进入疮面发挥作用的缺点。本试验表明,槲皮素壳聚糖复合膜可改善大鼠由于溃疡导致的进食量减少,缩短溃疡愈合速度,改善溃疡表面的感染情况。我们推测 QUCS 对溃疡的促愈作用可能是通过降低溃疡肿胀度及良好的镇痛作用实现的。可见,槲皮素壳聚糖复合膜是一种有效的组合,其作用是相互协同的,所制备药膜的疗效好于仅用壳聚糖所制的膜,有着较高的临床实用价值和广泛的市场前景。

[参考文献]

[1] Muzzarelli R A, Mattioli-Belmonte M, Pugnaroni A, et al. Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing [J]. EXS, 1999, 198 (32):251.

[2] Sugamori T, Iwase H, Maeda M, et al. Local hemostatic effects of microcrystalline partially deacetylated chitin hydrochloride [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49 (2):225.

[3] Howling G I, Dettmar P W, Goldara P A, et al. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human shin fibroblasts and Kerationocytesinvitro [J]. Biomaterials, 2001, 22 (22):2959.

[4] 刘诗平,陈尚猛,朱卫东. 槲皮素衍生物的生物活性研究进展[J]. 中草药, 1991, 22 (4):182.

[5] 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, 2002, 37 (4):327.

[6] 段开文,谭葆春,史朋. 壳聚糖复合膜的研制及实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2005. 21 (1):102.

[7] 赖凌燕,艾长荣. 壳聚糖制剂研究及应用 [J]. 广西医学, 1999, 21 (5):878.

[8] 杨昌梅,张全福. 新型伤处理材料—真菌菌丝 [J]. 国外医学:生物医学工程分册, 1998, 21 (5):298.

[责任编辑 聂淑琴]