

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.15.003

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210329.1733.011.html>(2021-03-30)

昆布多糖修复小鼠皮肤屏障作用研究^{*}

安立辉¹, 刘洋成², 段艳梅², 牛美月², 项 峥^{2△}
(1. 沈阳市第七人民医院皮肤科, 沈阳 110000; 2. 辽宁大学药学院, 沈阳 110036)

[摘要] **目的** 评价昆布多糖对小鼠受损皮肤屏障的修复效果。**方法** 选取 40 只雄性健康昆明小鼠, 剪切小鼠皮肤组织建立小鼠皮肤受损模型, 并将小鼠随机分为 4 组: 空白对照组、阳性对照组、30% 昆布多糖组和 70% 昆布多糖组。除空白对照组外, 其余 3 组每天早晚分别给予凝胶敷料、30% 昆布多糖、70% 昆布多糖各 1 次, 同时观察小鼠皮肤生长情况(包括小鼠创面毛发生长情况、小鼠创面皮肤透明程度及小鼠皮肤是否出现炎症), 并测量小鼠皮肤屏障评分及皮肤水分流失评分, 给药结束后观察小鼠皮肤病理切片。**结果** 70% 昆布多糖组、30% 昆布多糖组及空白对照组小鼠皮肤屏障修复作用和保护皮肤水分流失作用均低于阳性对照组。昆布多糖组小鼠皮肤病理切片中可以发现较多的毛囊及腺泡样结构, 其数量多于空白对照组, 少于阳性对照组。**结论** 昆布多糖对小鼠皮肤创面具有明显的修复作用, 可以促进小鼠破损皮肤屏障的修复。

[关键词] 昆布多糖; 皮肤修复; 毛囊再生; 小鼠
[中图分类号] R751.05 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)15-2530-04

Effect of laminarin on repairing skin barrier in mice^{*}

AN Lihui¹, LIU Yangcheng², DUAN Yanmei², NIU Meiyue², XIANG Zheng^{2△}

(1. Department of Dermatology, Shenyang Municipal Seventh People's Hospital, Shenyang, Liaoning 110000, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Liaoning University, Shenyang, Liaoning 110036, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the repairing effect of laminarin on the damaged skin barrier in mice. **Methods** Forty healthy male Kunming mice were selected, and the skin damage model was established by cutting the skin tissue. The mice were randomly divided into four groups including the blank control group, positive control group, 30% laminarin group and 70% laminarin group. Except for the blank control group, the other three groups were given gel dressing, 30% laminarin and 70% laminarin once a day in the morning and evening respectively. Meanwhile, the skin growth of mice (including the hair growth, skin transparency degree and inflammation) was observed, and the skin barrier score and skin water loss score were measured. After administration end, the pathological sections of mice skin were observed. **Results** The skin barrier repair effect and water loss protection effect in the 70% laminarin group, 30% laminarin group and blank control group were lower than those in the positive control group. Many hair follicles and acinar-like structures were seen in pathological sections of the laminarin groups, their number was more than that in the blank control group and less than that in the positive control group. **Conclusion** Laminarin has obvious repairing effect on the skin wound in mice, and can promote the repair of damaged skin barrier in mice.

[Key words] laminarin; skin repair; hair follicle regeneration; mouse

皮肤由于大面积与外界物质接触, 其损伤经常发生, 有关皮肤组织修复的研究也层出不穷。然而, 关于昆布多糖对皮肤的修复效果的研究较为缺乏。昆布多糖是一种存在于海带科植物海带或翅藻科植物昆布干燥叶中的天然活性成分, 其药理作用在很大程度上与其含有的多糖类物质有关。目前认为昆布多

糖主要有 3 种类型: 褐藻酸盐(alginate)、褐藻淀粉(laminarin)和褐藻糖胶(fucoidan)。另外, 昆布中还含有不同比例的半乳糖、木糖、葡萄糖醛酸和少量蛋白质^[1-2]。研究发现, 昆布多糖具有调节免疫功能、抗肿瘤、抗凝血、抗放射等多种药理作用^[3-7]。昆布多糖修复皮肤损伤的作用原理主要是增高巨噬细胞的吞

^{*} **基金项目:** 沈阳市高层次创新人才计划-中青年创新支持计划项目(RC190105)。 **作者简介:** 安立辉(1979—), 副主任医师, 硕士, 主要从事中西医结合皮肤病治疗方法的研究。 [△] **通信作者,** E-mail: rainbowaftersnow@hotmail.com。

噬率和吞噬指数,诱导产生白细胞介素-1(IL-1),激活巨噬细胞,增强其细胞溶解性^[7]。而巨噬细胞作为皮肤组织修复的主要因素^[8],能够分泌多种细胞因子促进皮肤的再次生长、胶原沉积、血管生成及毛囊再生^[9-10]。目前,越来越多因外界因素导致的皮肤损伤影响着人们的正常生活,据统计,每年全球皮肤损伤患者以千万计^[11-13]。本文将通过建立小鼠背部皮肤损伤模型,初步探讨不同昆布多糖的皮肤修复效果,为后续的剂型及其他研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

昆明种小鼠及饲养所需维持饲料、垫料均购自辽宁长生生物科技股份有限公司。

1.1.2 仪器与试剂

奥林巴斯 CX23 生物显微镜(日本奥林巴斯公司);智能皮肤评测仪 Gpskin barrier(北京安德普泰医疗科技有限公司);手术专用剪刀、直尺、昆布多糖(北京索莱宝科技有限公司);凝胶敷料[商品名:清得佳,施乐辉医用产品国际贸易(上海)有限公司];戊巴比妥钠、聚维酮碘(沈阳莱博科贸有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠破损皮肤造模

选取 40 只体重 20~30 g 的雄性健康昆明小鼠,腹腔注射戊巴比妥钠水溶液 10 mL。待小鼠进入麻醉状态后,固定小鼠,剪去其背部中央直径 3 cm 左右的圆形区域毛发,经聚维酮碘消毒后在脱毛区域剪去直径 1.5 cm 的圆形皮肤组织,建立小鼠皮肤受损模型。

1.2.2 实验分组与取样

将 40 只小鼠通过完全随机分组法分为:空白对照组(造模, $n=10$),阳性对照组(凝胶敷料+造模, $n=10$),30%昆布多糖组(30%昆布多糖+造模, $n=10$)和 70%昆布多糖组(70%昆布多糖+造模, $n=10$),每天早上 10:00 及晚上 6:00 各给药 1 次并测量皮肤水分,给药方式为直接涂抹至破损皮肤处。每 3 天测量 1 次小鼠伤口直径,用相机拍摄小鼠皮肤愈合情况。在给药第 21 天对 40 只小鼠进行标记并处死,用外科手术剪刀沿着小鼠创面皮肤边缘剪下皮肤,磷

酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 次后,平铺在滤纸中间,10%甲醛溶液固定,制作病理切片观察各组小鼠皮肤修复情况。

1.2.3 观察与测量指标

每天肉眼观察小鼠新生皮肤,重点关注其皮肤颜色、透明程度及毛发生长情况等,并使用智能皮肤评测仪 Gpskin barrier 测量损伤处皮肤屏障评分(该款智能皮肤评测仪评分制为 100 分制)和皮肤水分流失评分(按仪器说明书进行操作,评分标准统一为仪器默认标准);在皮肤创口愈合过程中,每天测量创口面积,计算创口愈合面积,以创口愈合率表示创口愈合效果,创口愈合率=创口愈合面积/原创口面积 $\times 100\%$ 。镜下观察小鼠皮肤病理切片[苏木素-伊红(HE)染色]并摄像记录,随机选择 3 个不同视野观察毛囊及“腺泡样”结构数量。

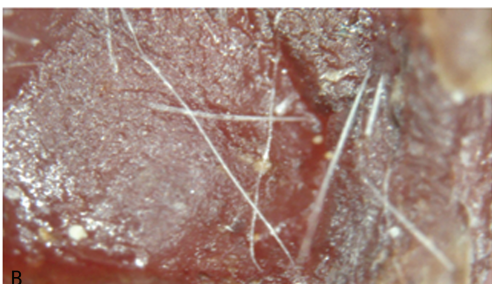
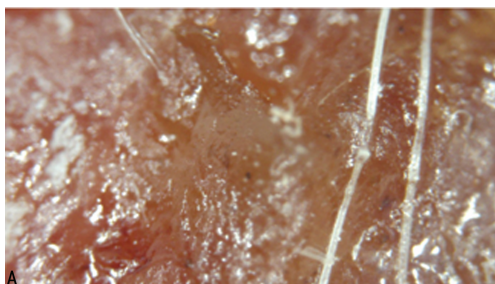
1.3 统计学处理

本研究所有数据均采用 Excel2016 软件进行分析处理,采用 SigmaPlot 14.0 软件制作数据图表。

2 结果

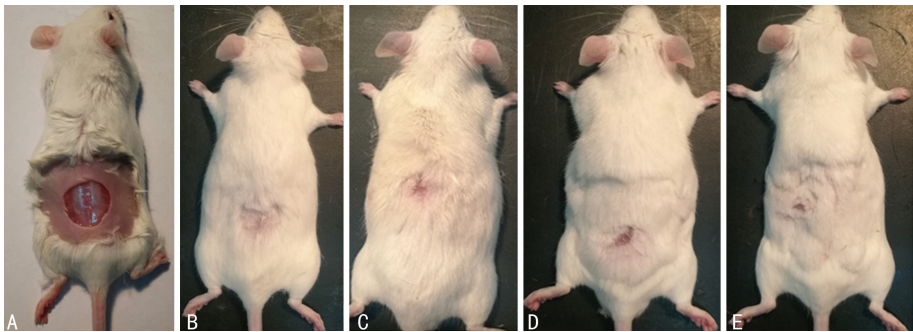
2.1 伤口愈合观察

第 1 天各组小鼠皮肤创面组织均浸润呈鲜红色,伤口直径 1.5 cm 左右,背部可见筋膜,伤口边缘有少量出血,因麻醉药物作用与伤口影响小鼠行动迟缓。3 d 后空白对照组小鼠皮肤组织表皮干燥,无坏死或腐肉组织,无异味;阳性对照组小鼠创面有少量结痂,干燥无特殊气味;实验组小鼠皮肤创面组织干燥且有裂口,有少量分泌物,创面粘有少量敷料。7 d 时空白对照组创面缩小,创面干燥,无分泌物,创口有很薄的结痂;阳性对照组伤口直径明显缩短,创口有结痂;实验组小鼠创口无分泌物,无异味,创口表面有薄层结痂。10 d 时阳性对照组创面直径持续缩短,空白对照组结痂收缩相对缓慢;实验组创面直径明显缩小,创面浸润,系小鼠舔舐所致,无感染。15 d 时对照组创面都愈合至 0.5 cm,伤口有较厚圆状结痂,对合好,无感染,新生皮肤有少量毛发长出;实验组小鼠创面直径为 0.8 cm,创面皮肤组织干燥,新生皮肤组织毛发较对照组更多,见图 1。21 d 时实验组与对照组小鼠创面完全愈合,无感染,见图 2。



A:创口处结痂;B:少量新生毛发。

图 1 皮肤镜下创口结痂状态



A:造模成功后;B:阳性对照组给药 21 d 后;C:30% 昆布多糖组给药 21 d 后;D:空白对照组给药 21 d 后;E:70% 昆布多糖组给药 21 d 后。

图 2 造模成功后及给药 21 d 后各组皮肤状态

2.2 小鼠皮肤创口愈合率分析

阳性对照组从初期开始皮肤创口愈合率优于其他组,在第 11 天皮肤创口愈合率达到 90% 以上;而空白对照组皮肤创口愈合率在第 17 天达到 90%。分析各组皮肤创口愈合率显示:阳性对照组>70% 昆布多糖组>30% 昆布多糖组>空白对照组,见图 3。

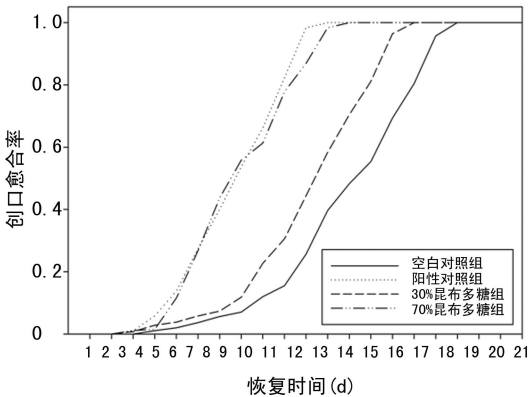


图 3 各组小鼠皮肤创口愈合率

2.3 小鼠皮肤创口愈合率分析

阳性对照组从初期开始皮肤屏障评分优于其他组,在第 12 天皮肤屏障恢复到了较高水平,皮肤屏障评分达到 90 分以上;而空白对照组皮肤屏障评分在第 18 天达到 90 分。分析各组皮肤屏障评分显示:阳性对照组>70% 昆布多糖组>30% 昆布多糖组>空白对照组,见图 4。

2.4 小鼠皮肤水分流失评分分析

阳性对照组小鼠皮肤水分流失评分较低,其降低小鼠皮肤水分流失效果较好,在第 10 天降低至 10 分以下;空白对照组则在第 16 天降到 10 分以下,分析

各组保护皮肤水分流失效果:阳性对照组>70% 昆布多糖组>30% 昆布多糖组>空白对照组,见图 5。

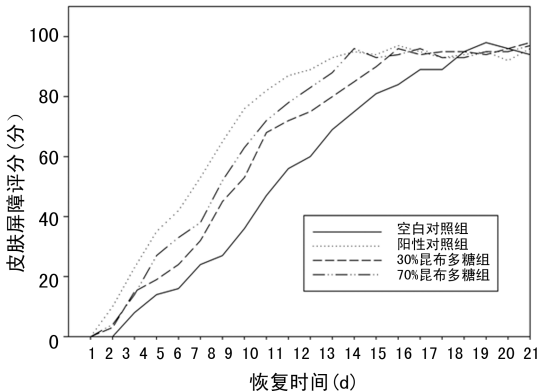


图 4 各组小鼠皮肤屏障评分

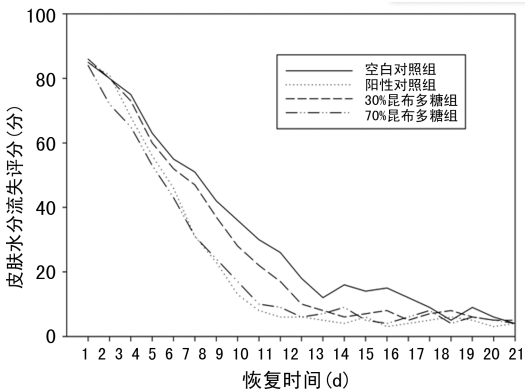
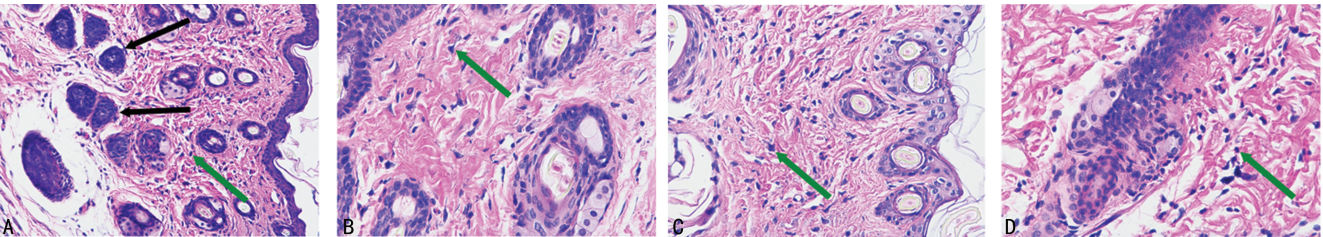


图 5 各组小鼠皮肤水分流失评分

2.5 小鼠皮肤病理切片分析

分析小鼠皮肤病理切片的毛囊及腺泡样结构数量:阳性对照组>70% 昆布多糖组>30% 昆布多糖组>空白对照组,见图 6。



A:阳性对照组;B:30% 昆布多糖组;C:空白对照组;D:70% 昆布多糖组;黑色箭头标注为毛囊,绿色箭头标注为腺泡。

图 6 各组小鼠皮肤病理切片(HE 染色,×400)

3 讨 论

昆布多糖具有抗肿瘤、抗凋亡、抗炎、抗凝血、抗氧化等多种生物活性^[14-20]。并且,昆布多糖经过适当的化学修饰、硫酸化和多种新加工工艺处理后,其生物活性还可以得到进一步提高,具有广阔的研究前景。作为一种来源于天然食品的有效成分,昆布多糖逐渐受到学界关注,其中含量丰富的生物活性多糖近年来已成为国内外众多学者的研究热点。日本、中国香港等国家(地区)已开发出工业化生产昆布多糖的技术,并且其提取工艺在不断的研发完善中。昆布多糖的皮肤屏障功能修复作用可用于各种物理、化学因素导致的皮肤屏障受损,亦可用于皮肤疾病伴发的皮肤屏障受损;同时,昆布多糖作为一种提取自海洋植物的活性成分,其来源广泛、自然储量充足。因此,昆布多糖具有非常重要的应用开发价值和广阔的市场前景,有希望制成廉价、高效的皮肤修复制剂,造福广大皮肤损伤患者。

伤口愈合过程复杂,涉及多种机制,主要包括 5 个阶段:(1)炎症导致止血及血栓形成;(2)纤维组织增生和新生血管形成;(3)肉芽组织增生;(4)上皮化再生;(5)新的细胞外基质和组织重塑的形成。本实验探讨了昆布多糖对小鼠皮肤屏障的修复效果,发现昆布多糖具有明显的皮肤损伤修复作用,可加快受损皮肤组织的修复速度,其中 70% 昆布多糖组的皮肤损伤修复效果明显强于 30% 昆布多糖组,且两组效果均明显强于空白对照组。此外,由于小鼠皮肤病理切片内出现毛囊及“腺泡样”结构的数量是损伤皮肤修复过程中皮肤修复质量的标志^[21-22],由此可知,皮肤病理切片结果表明阳性对照组小鼠损伤皮肤修复效果最佳,实验组次之,空白组修复效果最差。

综上所述,本实验对不同含量昆布多糖的皮肤修复效果进行了对比研究,可为进一步研究昆布多糖皮肤修复作用的机制、剂型及临床应用等方向奠定基础。

参考文献

[1] 张全斌. 褐藻酸性多糖及其药理作用研究[C]//第十二届海洋药物学术年会会刊. 舟山:中国药学会海洋药物专业委员会,中国生物化学与分子生物学学会海洋分会,中国微生物学会海洋微生物专业委员会,中国海洋湖沼学会药物分会,中国药理学会海洋药物药理专业委员会,2015:1.

[2] 杜斌,韩华云,张秋荣. 昆布多糖的提取分离及 F1 的纯化与鉴定[J]. 中国药学杂志,2002,50

(9):17-19.

[3] 李莹,黄德春,陈贵堂,等. 昆布多糖不同提取工艺优化及其理化性质和抗肿瘤活性比较[J]. 食品科学,2019,40(6):288-294.

[4] SHANG H S, SHIH Y L, CHEN C P, et al. Laminarin promotes immune responses and normalizes glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase levels in leukemic mice in vivo[J]. *In Vivo*, 2018, 32(4): 783-790.

[5] 张浩,王丽. 昆布多糖生物活性研究进展[J]. 食品安全导刊,2019,13(9):142,144.

[6] SMITH A J, GRAVES B, CHILD R, et al. Immunoregulatory activity of the natural product laminarin varies widely as a result of its physical properties[J]. *J Immunol*, 2018, 200(2): 788-799.

[7] 赵文杰,陈丽红,李晓霞. 昆布多糖对巨噬细胞识别,吞噬烟曲霉功能的影响[J]. 中医药通报,2019,18(5):60-63.

[8] 张婧. 巨噬细胞在皮肤伤口愈合过程中的调控作用及其机制研究[D]. 西安:西北大学,2019.

[9] 魏操. 美洲大蠊浸膏对大鼠皮肤创伤修复作用及机制的初步研究[D]. 贵阳:贵州医科大学,2018.

[10] 王旭升. Ly6c 巨噬细胞通过 AKT 信号影响 Lgr5 毛囊干细胞再生的研究[D]. 北京:清华大学,2015.

[11] 赵青毅. 成人重度烧伤患者脓毒症并发情况及其影响因素分析[J]. 中国药物与临床,2019,19(4):628-630.

[12] 罗红敏. 美国危重烧伤患者预后情况调查[J]. 中华危重病急救医学,2014,26(9):614.

[13] 吴军,陈建. 中国烧伤康复治疗现状与思考[J]. 中华烧伤杂志,2013,29(6):505-508.

[14] KADAM S U, TIWARI B K, O'DONNELL C P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2015, 50(1):24-31.

[15] KADAM S U, O'DONNELL C P, RAI D K, et al. Laminarin from Irish Brown Seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(7):4270-4280.

[16] BLACK W A P, DEWAR E T, (下转第 2538 页)

- Cancers (Basel), 2019, 11(8):1153.
- [5] ZHAO R, ZHANG T, MA B, et al. Antitumor activity of portulaca oleracea L. polysaccharide on HeLa cells through inducing TLR4/NF- κ B signaling[J]. Nutr Cancer, 2017, 69(1): 131-139.
 - [6] LIU J, HU S, CUI Y, et al. Saturated fatty acids up-regulate COX-2 expression in prostate epithelial cells via toll-like receptor 4/NF- κ B signaling[J]. Inflammation, 2014, 37(2): 467-477.
 - [7] CULP M B, SOERJOMATARAM I, EFSTATHIOU J A, et al. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates[J]. Eur Urol, 2020, 77(1): 38-52.
 - [8] TAITT H E. Global trends and prostate cancer: a review of incidence, detection, and mortality as influenced by race, ethnicity, and geographic location[J]. Am J Mens Health, 2018, 12(6): 1807-1823.
 - [9] HASSANIPOUR S, DELAM H, ARAB-ZOZANI M, et al. Survival rate of prostate cancer in Asian countries: a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Glob Health, 2020, 86(1): 1-13.
 - [10] WANG X, FANG G, PANG Y. Chinese medicines in the treatment of prostate cancer: from formulas to extracts and compounds[J]. Nutrients, 2018, 10(3): 283.
 - [11] CHAPLIN A, CARPÉNÉ C, MERCADER J. Resveratrol, metabolic syndrome, and gut microbiota[J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1651.
 - [12] LI J, LIU F, JIANG S, et al. Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 7409-7414.
 - [13] GAO S, ZHAO Z, WU R, et al. MicroRNA-194 regulates cell viability and apoptosis by targeting CDH2 in prostatic cancer[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 4837-4844.
 - [14] LIU J M, LIN P H, HSU R J, et al. Complementary traditional Chinese medicine therapy improves survival in patients with metastatic prostate cancer[J]. Medicine, 2016, 95(31): e4475.
 - [15] ZHAO S, ZHANG Y, ZHANG Q, et al. Toll-like receptors and prostate cancer[J]. Front Immunol, 2014, 5: 352.
- (收稿日期: 2020-12-18 修回日期: 2021-04-08)
-
- (上接第 2533 页)
- WOODWARD F N. Manufacture of algal chemicals. III. laboratory: scale isolation of laminarin from brown marine algae[J]. J Chem Technol Biot, 2007, 1(9): 414-424.
- [17] NGUYEN S G, KIM J, GUEVARRA R B, et al. Laminarin favorably modulates gut microbiota in mice fed a high-fat diet[J]. Food Funct, 2016, 7(10): 4193-4201.
 - [18] LIU X, LIU H, ZHAI Y, et al. Laminarin protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in MRC-5 cells possibly via regulating NRF2[J]. PeerJ, 2017, 5: e3642.
 - [19] JIANG H, LIANG S, YAO X R, et al. Laminarin improves developmental competence of porcine early stage embryos by inhibiting oxidative stress[J]. Theriogenology, 2018, 115: 38-44.
 - [20] CUONG D X. Laminarin (beta-glucan) of brown algae sargassum mcclurei: extraction, antioxidant activity, lipoxygenase inhibition activity, and physicochemistry properties[J]. World J Food Sci Technol, 2020, 4(1): 31-39.
 - [21] 施恩, 张毅, 田少奇, 等. 羧甲基壳聚糖促进小鼠皮肤毛囊再生修复的组织形态学研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(24): 4614-4622.
 - [22] DAI T Q, ZHANG L L, AN Y, et al. In vitro transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells into salivary gland acinar-like cells[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(5): 2908-2924.
- (收稿日期: 2020-10-13 修回日期: 2021-03-08)