

升麻对口腔溃疡散治疗大鼠实验性口腔粘膜溃疡的影响*

吴 凯¹, 何丽霞¹, 高 勇¹, 刘 旭¹, 杨 阳²

(1. 雅安市人民医院, 四川 雅安 625000; 2. 成都倍特药业集团, 四川 成都 610207)

摘要: **目的** 研究升麻对口腔溃疡散治疗实验性口腔溃疡大鼠增效作用及机制。**方法** 将大鼠分为空白组、模型组、溃疡散组、溃疡散+升麻组,除空白组外,以 NaOH 晶体化学烧灼法复制溃疡模型,检测各组溃疡面积、愈合率,HE 染色法观察组织病理学变化,ELISA 法检测 IFN- γ 和 IL-6 含量,Western-blot 检测基质金属蛋白酶-2、-9 (MMP-2、MMP-9)蛋白表达。**结果** 造模大鼠溃疡明显,周围组织红肿;给药后,溃疡面积缩小,其中口腔溃疡散联合升麻组在溃疡面积、IFN- γ 、IL-6 和 MMP-2、9 表达水平上较单独用药组均显著降低 ($P<0.05$)。**结论** 升麻增效口腔溃疡散发挥治疗作用,其机制可能与抑制炎症介质的释放以及下调 MMP-2、9 蛋白表达有关。

关键词: 口腔溃疡散; 升麻; 口腔溃疡; 协同; 炎症介质; MMPs

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)04-0039-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.04.009

口腔溃疡又名口疮,中医称其为口疳、口破、口疮等,不定期或周期性在口腔粘膜任何部位孤立或多发出现^[1],疼痛明显且反复、影响日常,给患者带来很大痛苦^[2]。临床治疗主要以补充维生素和微量元素、对症处理为主,但依从性差^[3]。口腔溃疡散由青黛、冰片及白矾组成,具有止血、止痛、消炎、去腐和收敛生肌的作用^[4],是治疗复发性和疱疹性口腔溃疡要药^[5]。升麻能清热解毒、升举阳气^[6],现代研究显示,升麻具杀菌活性,可治疗肿胀、炎症、口臭、脓毒病、感冒等症^[7],对于胃火亢盛的牙龈腐烂、口舌生疮及咽喉肿痛有极佳疗效^[8],是治疗口舌生疮的有效药。基于此,本研究拟复制大鼠实验性口腔溃疡模型,从溃疡组织形态学、细胞因子 IFN- γ 和 IL-6 水平以及 MMP-2、9 蛋白表达进行探讨升麻联合口腔溃疡散的协同增效作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠 44 只,180~220g,雌雄各半。由成都达硕实验动物有限公司中心提供,生产许可号:SCXK(川)2014-028。实验温度:22℃~25℃,相对湿度:55%~70%。

1.2 主要试剂与仪器

口腔溃疡散(内蒙古蒙药股份有限公司),散剂,主要成分为青黛、冰片及白矾;升麻为颗粒剂,购自三九医药;左旋咪唑购自科伦药业;肿瘤生长因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒、 β -actin 购自武汉博士德;考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、显色剂 DAB 购自南京建成生物;MMP-2、9 单克隆抗体购自北京中杉;ECL 发光液购自上海碧云天。

酶标定量测定仪 (Thermo Multiskan AsCant 公司);离心机 5415D (Eppendorf 公司,德国);超薄石蜡切片机(德国莱卡);多功能照相显微镜(日本 Olympus);垂直电泳仪及转膜仪(北京六一)。

1.3 方法

1.3.1 口腔溃疡大鼠造模方法与处理

大鼠适应性喂养一周,将大鼠分为空白组、模型组、给药组 1(口腔溃疡散组)、给药组 2(口腔溃疡散+升麻组),空白组不予任何处理,采用化学烧灼法复制口腔溃疡动物模型。以 3%戊巴比妥钠(0.030g/kg)麻醉,将大鼠固定,以蘸有 NaOH 晶体的滤纸(直径 3.5mm)在下唇靠口角黏膜处烧灼 5s~8s,生理盐水冲洗,1d 后形成溃疡。每只动物溃疡面应尽量在同

* 基金项目: 四川省科技厅科技支撑项目(2011SZ0300)

收稿日期: 2017-08-15

作者简介: 吴凯(1982-),男,四川冕宁人,主管药师,研究方向:医院药学。E-mail: 504325695@qq.com

一部位,大小、深度尽量一致^[9]。其中给药组 1(敷口腔溃疡散 3 次/日),给药以覆盖创面为度,给药组 2 在给药组 1 的基础上以 1g/kg 灌胃升麻药液,3 次/d,空白组与模型组给予相应体积生理盐水灌胃。治疗 10d。每组 11 只大鼠,1 只用于 HE 染色,5 只用于第 6 天 ELISA 试剂盒检测 IFN- γ 、IL-6 含量,剩余 5 只用于观察整个实验过程中溃疡面积的变化,以及第 10 天免疫印迹法检测 MMP-2、9 蛋白的表达。

1.3.2 HE 染色

各组大鼠于给药后第 6 天随机选取 1 只大鼠颈部脱臼法处死,以眼科剪剪下 0.5cm×0.5cm×0.1cm 的溃疡面相应粘膜组织,PBS 冲洗,置入 4%多聚甲醛固定 24h,后置入自动组织脱水机中梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋。经组织切片(5 μ m)、摊片、捞片、烤片后,脱蜡至水。苏木精染色、盐酸分化、流水冲洗后酒精脱水,伊红溶液染色。最后梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.3.3 溃疡的形成及愈合情况

实验期间,隔天记录溃疡从发生至愈合的时间,治疗完成后,用游标卡尺测量溃疡的直径并计算其面积。

1.3.4 ELISA 法检测组织中 IFN- γ 、IL-6 含量的变化

给药 6d 后,收集各组大鼠溃疡组织,4℃PBS 中漂洗,除去血液,滤纸拭干,放入 5mL 含有匀浆介质的小烧杯内,剪碎组织块,用组织捣碎机以(10000~15000)r/min 上下研磨制成 10%组织匀浆,考马斯亮兰法测定蛋白浓度。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,反应终止后,酶标仪 450nm 波长处测量各孔的光密度(OD 值)。

1.3.5 Western-blot 检测 MMP-2、9 蛋白的表达

组织匀浆样品制备同 1.3.5,将制备好的组织匀浆 100mg 加入 500 μ L 裂解液,4℃持续振 30min,离心(10000r/min,10min)后,将上清转入预冷的离心管,考马斯亮兰法测定蛋白浓度,样品以上样缓冲液稀释后煮沸 5min 使蛋白变性,备用。灌制 80g/L SDS-PAGE 凝胶,取已制备好的蛋白,每孔上样量 20 μ L 在 150V 稳压电场中电泳,约 90min 后,转膜,滤膜经脱脂奶粉封闭过夜,剪膜,根据分子量分开后分别加以 1:1000 稀释的一抗(MMP-2、9)及内参抗体(β -actin,1:3000)室温孵育 3h,洗膜 3 次,以 1:3000 稀释的 HRP 标记二抗孵育 1h 后,洗膜 3 次,ECL 发光液发光后 X 光片曝光,扫描记录结果,Gel-analyze 分析软件分析条带灰度,进行半定量比较分析,以目的基因的条带灰度与内参 β -actin 的灰度比值表示蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 单因素方差分析(One-Way ANOVA),各组数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,各组所得数据与空白组比较,计量资料符合正态分布, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果

空白组大鼠口腔黏膜组织上皮完整连续,细胞排列有序,胞核胞浆无异型性。模型组,溃疡呈圆形或椭圆形,边缘充血,周围组织红肿,表面覆有灰黄或灰白色膜。给药组 1、2 在给药 5d 后,充血症状减轻,渗出物减少,给药组 2 溃疡症状减轻程度大于给药组 1。见图 1。

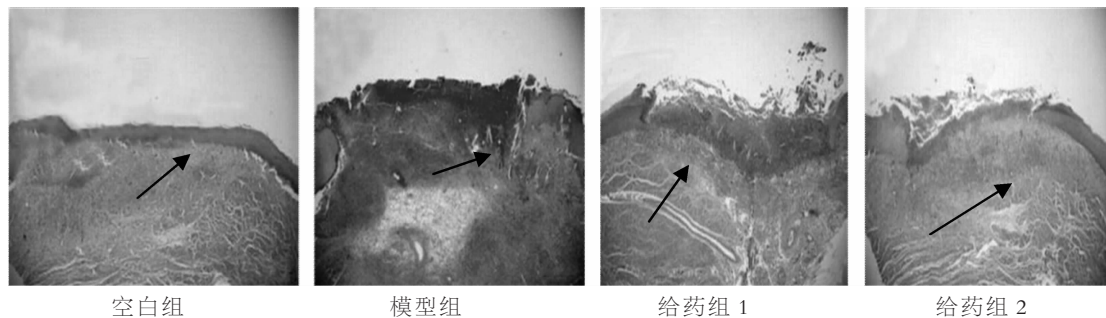


图 1 各组大鼠口腔黏膜组织病理染色(HE×100)

2.2 溃疡面积变化

结果显示,造模 24h 后粘膜形成明显溃疡症状,表面覆有灰黄或灰白色膜;给予口腔溃疡散以及联

合用药后,溃疡面积逐渐缩小,且联合用药的溃疡面积较单独口腔溃疡散的明显缩小,第 6 天联合溃疡面积便消失,创面形成瘢痕,8d 以后溃疡愈合,而模

型组基本自愈的时间大于 10d。

具体数据如表 1 所示,与模型组比较,从第 2 天起,给药组 1、2 的溃疡面积均显著缩小,差异均有统

计学意义 ($P<0.01$);给药组 2 的溃疡面积较给药组 1 的明显缩小,第 2、4、6、8 天 2 组差异均有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 1 各组大鼠溃疡面积变化 ($\bar{x}\pm s$, mm²)

组别	n	溃疡面积					
		0d	2d	4d	6d	8d	10d
空白组	5	--	--	--	--	--	--
模型组	5	7.18±2.61	12.40±3.87	8.47±2.21	5.42±1.06	2.31±0.30	1.12±0.24
给药组 1	5	7.23±3.04	9.62±3.52**	6.11±1.49**	3.37±0.58**	0.53±0.11**	0**
给药组 2	5	7.09±2.48	8.12±3.16** [△]	4.91±1.05** [△]	1.25±0.06** ^{△△}	0** ^{△△}	0**

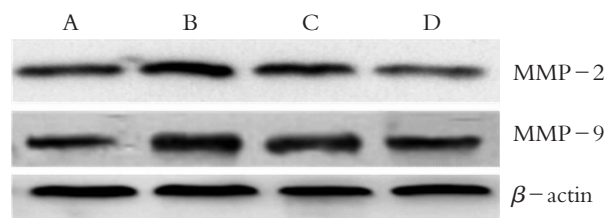
注:与模型组比较,** $P<0.01$;给药组 2 与给药组 1 比较,[△] $P<0.05$; ^{△△} $P<0.01$

2.3 各组溃疡组织中 IFN- γ 、IL-6 含量及 MMP-2、9 表达的的变化

各组溃疡组织中 IFN- γ 、IL-6 水平的变化见表 2。在给药后 6d,与空白组比较,模型组与给药组 1、2 的 IFN- γ 、IL-6 含量均明显增加,差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,给药组 1、2 的 IFN- γ 、IL-6 水平显著降低,差异有显著性 ($P<0.01$);其中,给药组 2 均显著低于给药组 1 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

与空白组比较,模型组的 MMP-2、9 表达量明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较,给药组 1、2 的

MMP-2、9 表达量明显降低 ($P<0.01$);给药组组间比较差异有统计学意义,给药组 2 的 MMP-2、9 表达量显著低于给药组 1。结果如表 2、图 2 所示。



A.空白组 B.模型组 C.给药组 1 D.给药组 2

图 2 Western-Blot 检测 MMP-2、9 蛋白的表达

表 2 各组溃疡组织 IFN- γ 、IL-6 含量和 MMP-2、9 表达的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	MMP-2/内参 IOD 比值	MMP-9/参 IOD 比值
空白组	5	354.69±86.37	34.75±8.21	0.721±0.053	0.649±0.073
模型组	5	961.73±238.39 ^{☆☆}	527.42±86.34 ^{☆☆}	1.647±0.336 ^{☆☆}	1.568±0.249 ^{☆☆}
给药组 1	5	648.32±107.56 ^{☆☆**}	186.57±53.60 ^{☆☆**}	1.235±0.167 ^{☆☆**}	1.107±0.211 ^{☆☆**}
给药组 2	5	497.41±81.02 ^{☆☆^{△△}}	162.39±60.18 ^{☆☆**[△]}	0.962±0.148 ^{☆☆^{△△}}	0.734±0.082 ^{**^{△△}}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$;给药组 2 与给药组 1 比较,[△] $P<0.05$; ^{△△} $P<0.01$

3 讨论

口腔溃疡属中医口疮范畴,其病因可以包括由于外感邪热、心脾积热;或阴虚阳亢、虚阳浮越等造成的虚火上浮或邪热上蒸^[10]。口腔溃疡散由青黛、白矾、冰片 3 味中药组成,现代药理研究显示,低浓度白矾收敛、防腐、抗炎作用较强;冰片常用于口疮治疗中,消肿止痛,对口腔溃疡的治疗效果更佳;青黛具有较强的抗菌及抗病毒作用^[11]。诸药合用能发挥消肿止痛、清热收敛的功效,使溃疡得治。升麻属于阳明行经药,具清热解毒的功效,对口舌生疮咽喉肿

痛等疗效极佳^[12]。基于此,本实验在口腔溃疡散的基础上联合使用升麻,研究二者增效协同作用及其发挥药效的部分机制。

口腔黏膜溃疡动物模型的制备方法较多,根据不同目的可选择不同的模型^[13],本研究以化学灼烧法复制大鼠口腔粘膜溃疡模型,方法简单,可重复性强,形成较典型的急性口腔溃疡模型,且能保持溃疡大小、深度、部位一致,避免产生较大系统误差。本实验结果说明口腔溃疡散能明显改善溃疡症状,联合风药升麻后,有效治疗和纠正灼烧引起的溃疡粘膜

结构改变,二者产生增效协同作用,有助于溃疡创面的加速愈合。

炎症介质 $\text{IFN-}\gamma$ 和 IL-6 是参与口腔溃疡形成过程中的具有代表性的主要炎症细胞因子^[14],其含量高低与病情轻重密切相关,即溃疡数目越多,溃疡面积越大, $\text{IFN-}\gamma$ 和 IL-6 含量越高^[15]。 IL-6 主要由单核-巨噬细胞产生,受到外界刺激时,具有广泛的促炎作用^[16]。本研究结果表明,口腔溃疡散组以及联合用药组均能显著抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 的水平;在溃疡后期,溃疡大部分已经愈合,机体炎症症状减轻,不再分泌大量炎性介质,且联合用药的溃疡愈合能力优于单独口腔溃疡散。提示,升麻增效口腔溃疡散治疗口腔粘膜溃疡,随着溃疡面积的愈合,可明显降低组织细胞内炎性介质 $\text{IFN-}\gamma$ 和 IL-6 的释放,从而减少炎症的发生,进一步反馈增强溃疡的愈合能力。

MMPs 参与许多正常生理过程,如胚胎发育、器官形态发生、骨重建、伤口愈合、细胞凋亡等,还参与炎症、心血管疾病、牙周病、溃疡、肿瘤的侵袭及转移等病理过程^[17]。其中明胶酶,包括 MMP-2 、 9 ,主要降解 IV 型胶原和层黏连蛋白(基底膜的骨架),作为屏障起到阻止炎症细胞浸润和炎症扩散的作用。本研究结果中,模型组 MMP-2 、 9 表达水平明显升高,说明当炎症发生后,炎性细胞浸润使基质金属蛋白酶表达增加,促使合成和释放炎性介质的水平增加,参与整个炎症过程;而各给药组的 MMP-2 、 9 表达水平明显降低,且联合用药组基质金属蛋白酶表达量显著低于单独口腔溃疡散组;推测溃疡散联合升麻可能通过下调基质金属蛋白酶 MMP-2 、 9 的表达,从而降低了炎性症状,减少炎性介质的释放,增加溃疡愈合能力,进而发挥抗溃疡作用,二者发挥协同增效的作用。

综上所述,风药升麻协同口腔溃疡散联合有效治疗口腔溃疡,减轻症状,缩短病程,其抗溃疡机制可能与降低炎性介质的合成和释放以及下调基质金属蛋白酶 MMP-2 、 9 表达有关。

参考文献:

- [1] 黄彬,陈黄琴. 口腔溃疡病理机制的研究[J]. 医学美容,2013(3):71.
- [2] Ardigo M, Donadio C, Franceschini C, et al. Interest of reflectance confocal microscopy for inflammatory oral mucosal diseases [J]. Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology Jeadv, 2015, 29(9):1850.
- [3] 丁凯. 复发性口腔溃疡的临床研究[J]. 生物技术世界, 2015(7):106.
- [4] 唐国荣,吴斌,郑于星,等. 口腔溃疡散与冰硼散治疗口腔溃疡的疗效比较[J]. 海峡药学,2006,18(4):148-149.
- [5] 谢春,戴琳,刘坚. 康复新液联合口腔溃疡散治疗复发性阿弗他溃疡的临床观察[J]. 中国药房,2016,27(8):1101-1103.
- [6] 张胜,秦竹,熊洪艳,等. 从“非升”与“升”谈升麻功效的历史演变[J]. 中医药学报,2012,40(1):10-12.
- [7] 吴德松,卿晨. 升麻药理学活性研究进展 [J]. 医学综述,2009,15(6):918-920.
- [8] 侯淑军. 升麻黄连汤治疗口腔溃疡疗效观察 [J]. 河北中医,2013,35(8):1147-1148.
- [9] 肖开,闫欣,苗明三. 两面针外用对豚鼠口腔溃疡模型的影响 [J]. 中药新药与临床药理,2012,23(5):533-537.
- [10] 文建华. 合方治疗口疮 40 例 [J]. 中国民间疗法, 2012,20(9):35.
- [11] 刘洋,邵轩,向琴,等. 青黛对白假丝酵母菌抗菌作用的研究[J]. 中医药导报,2015,21(1):48-49.
- [12] 韩晖琼,邓坤. 加味清胃散联合替硝唑治疗成人慢性牙周炎疗效观察 [J]. 中国实用口腔科杂志,2013,6(1):45-46.
- [13] 姚成,沈敏鹤,阮善明. 口腔溃疡动物模型的建立[J]. 山西中医,2014,30(4):46-47.
- [14] 柏景坪,王红健,蓝爱仙,等. 乳香酸治疗口腔溃疡的动物实验研究[J]. 北京口腔医学,2012,20(6):318-321.
- [15] 王明海,焦学高,钟正华,等. 复发性口腔溃疡患者血清肿瘤坏死因子 α 变化及组织病理学改变 [J]. 吉林医学,2014,35(36):8075-8076.
- [16] 唐路,周学东,王倩,等. 肿瘤坏死因子相关因子 6 在牙周膜成纤维细胞炎症反应中的作用[C]//全国第八次牙体牙髓病学学术会议.北京:中华口腔医学会牙体牙髓病学专业委员会,2011:214-216.
- [17] 袁健,初秀红,陈晖,等. MMPs 在口腔疾病中的作用 [J]. 临床口腔医学杂志,2011,27(11):698-700.

(编辑:徐建平)

(英文摘要见第 59 页)

Clinical Effect Observation of Treatment of Xinkang Decoction in Patients with Chronic Heart Failure

WANG Ting, YE Xiaohan, SU Zhiyuan

(Dongguan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523000, China)

ABSTRACT: Objective To observe the clinical efficacy of Xinkang Decoction in patients with chronic heart failure (CHF), and to explore the clinical efficacy of treatment by regulating Lung. **Methods** 120 cases of patients with chronic heart failure were randomly divided into two groups, The control group (n=59) received conventional treatments. Besides the conventional treatments, the treatment group members were given Xinkang Decoction. The course of treatment was 12 weeks. These indicators were observed before and after the treatment including the plasma BNP level, left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end diastolic diameter (LVEDd), and the score of clinical therapeutic effect. **Results** The improvement of cardiac function classification, the level of brain natriuretic peptide and ejection fraction in treatment group were better than those of control group ($P<0.05$). **Conclusion** Xinkang Decoction in the treatment of congestive heart failure can better relieve heart failure clinical symptoms, improve left ventricular ejection fraction and reduce the levels of plasma BNP. Therefore, treatment by regulating Lung can significantly improve the clinical efficacy in patients with CHF.

KEY WORDS: chronic heart failure; Xinkang decoction; treatment by regulating Lung; dispersing lung Qi to relieve asthma

(原文见第 39 页)

Cimicifuga Synergistic Ulcer Powder Curative Effect and Part of the Mechanism in the Treatment of Oral Mucosal Ulcer Model of Rats

WU Kai, HE Lixia, GAO Yong, LIU Xu, YANG Yang

(1. Ya'an First People's Hospital, Ya'an 625000, China; 2. Sichuan Beite Pharmaceutical Co, LTD, Chengdu 610207, China)

ABSTRACT: Objective To study the treatment of oral ulcer powder Cimicifuga experimental oral ulcer in rats and its partly mechanisms of synergistic effect. **Methods** The rats were divided into blank group, oral ulcer film group, ulcer powder group, ulcer powder combined+cohoosh group. Those groups were established by film NaOH crystal chemical cauterization except the blank group. Then HE method for oral mucosal tissue staining to observe the pathological changes, the detection area rats of group size, healing rate changes, ELISA method to detect the changes of IFN- γ and IL-6 detection. Western-blot method to detect the expression of MMP-2, 9. **Results** After modeling, ulcer in the rats of model group was round or oval, the surrounding tissue swelling; the ulcer area was gradually reduced after administration. In the ulcer area, IFN- γ , the levels of IL-6 and MMP-2, 9 expression levels, the oral ulcers scattered combined with cohoosh group were significantly lower than the single drug group. **Conclusion** Oral ulcer powder combined with Rhizoma Cimicifugae synergy in treatment of oralulcer, and its mechanism may release and inhibition of inflammatory mediators and down regulated the expression of MMP-2, 9.

KEY WORDS: oral ulcer powder; Cimicifuga; oral ulcer; synergy; inflammatory mediators; MMPs