

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.23.007

加味导赤散与维生素 B₁₂ 对大鼠口腔溃疡血清 IL-6 及 TNF- α 水平影响分析

尹崇志¹, 聂敏海^{2△}

(1. 重庆三峡医药高等专科学校 404120; 2. 西南医科大学附属口腔医院口腔科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨加味导赤散与维生素 B₁₂ 对大鼠复发性口腔溃疡的治疗效果及对血清白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。**方法** 选取 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,采用随机数字表法分为正常组(等量蒸馏水)、模型组(等量蒸馏水)、阳性对照组(左旋咪唑 20 mg/kg 灌胃治疗)、实验组(使用含有加味导赤散生药材 1 g/mL, 1.278 mL/200 g+维生素 B₁₂ 20 μ g/kg灌胃)各 12 只,模型组、阳性对照组、实验组采用免疫法建立复发性口腔溃疡模型,建模后按照对应治疗方法处理 20 d。**结果** 阳性对照组、实验组大鼠的口腔溃疡数目、溃疡持续时间均显著低于模型组大鼠($P<0.05$),阳性对照组、实验组大鼠的溃疡间隔出现时间均显著长于模型组大鼠($P<0.05$);阳性对照组、实验组大鼠的血清 IL-6、TNF- α 检测水平均显著低于模型组大鼠($P<0.05$);模型组的血清 IL-6、TNF- α 检测水平显著高于正常组($P<0.05$);阳性对照组、实验组大鼠的外周血超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)水平均显著高于模型组大鼠($P<0.05$),丙二醛(MDA)水平显著低于模型组($P<0.05$)。**结论** 加味导赤散与维生素 B₁₂ 对大鼠复发性口腔溃疡具有治疗作用,作用机制可能与减轻炎症反应、提高组织的抗氧化能力有关。

[关键词] 加味导赤散;维生素 B₁₂;口腔溃疡;白细胞介素 6;肿瘤坏死因子- α **[中图分类号]** R780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)23-3192-03

Analysis of the changes of serum IL-6 and TNF- α levels in rats with oral ulcer induced by modified red powder and vitamin B₁₂

Yin Chongzhi¹, Nie Minhai^{2△}

(1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Department of Stomatology, Stomatological Hospital Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effect of modified powder and vitamin B₁₂ on the treatment of recurrent oral ulcer in rats and its effect on serum interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha(TNF- α). **Methods** Forty-eight male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal group (equal distilled water), model group (equal distilled water), positive control group (levamisole 20 mg/kg gavage) and experimental group (containing dcsgd crude drugs 1 g/mL, 1.278 mL/200 g+B₁₂ 20 g/kg gavage), each group with 12 rats. Model group, positive control group and experimental group were treated with immunological method to establish the recurrent oral ulcer mode. Each group treated with the corresponding treatment methods for 20 days. **Results** The oral ulcer number, duration time in positive control group and the experimental group were significantly lower than that in model group rats($P<0.05$), ulcer interval time was significantly longer than the rats in the model group ($P<0.05$); the serum IL-6, TNF- α detection level in positive control group and experimental group were significantly lower than in the model group($P<0.05$); serum IL-6, TNF- α detection level in model group were significantly higher than those in normal group($P<0.05$); the peripheral blood SOD, GSHPx levels in positive control group and experimental group rats were significantly higher than that in model group($P<0.05$), the level of MDA was significantly lower than that in model group ($P<0.05$). **Conclusion** Modified powder and vitamin B₁₂ have therapeutic effects on recurrent oral ulcer in rats. The mechanism may be related to reducing the inflammatory reaction and improving the antioxidant capacity of the tissue.

[Key words] modified guide red powder; vitamin B₁₂; oral ulcer; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

复发性口腔溃疡是一种较为常见的口腔黏膜疾病,其发病率较高,在我国人群中可达 20%,且容易反复发作、迁延不愈,给人们的日常生活带来不便^[1]。口腔溃疡的发病原因和机制目前尚不完全清楚,一般认为是多种因素的综合作用,如免疫异常、创伤、过度疲劳、激素变化、维生素缺乏等,目前也无针对性的药物,多数药物均为起初有效,而用药一段时间后效果则大大减小^[2]。维生素 B₁₂ 能促使破损皮肤、黏膜及血管内皮细胞修复生长,防止伤口感染、恶化,进而促进溃疡愈合^[3];而导赤散具有清热泻火、滋阴祛湿等功效,在治疗口腔溃疡方面具有显著的疗效,但其具体机制目前尚不完全清楚^[4]。本研究在传统导赤散药方的基础上进行了改良,并对加味导赤散与维生

素 B₁₂ 联合应用后治疗大鼠复发性口腔溃疡的效果及对血清白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响进行了分析比较,为临床上治疗提供理论基础。

1 材料与方

1.1 实验动物 选取 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,体质量 180~200 g,平均(190.0 \pm 5.0)g,购自河北医科大学动物实验中心,动物许可证号:SCXK(冀)2015-1-004。

1.2 实验仪器与药品 完全弗氏佐剂购自美国 Sigma 公司,左旋咪唑购自武汉合中化工制造有限公司,IL-6、TNF- α 检测试剂盒购自北京中杉金桥生物公司,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)、丙二醛(MDA)、维生素 B₁₂ 检

测试试剂盒购自南京建成生物工程研究所。高速离心机购自上海安亭仪器公司,酶标仪购自德国拜发仪器公司,电子显微镜购自日本奥林巴斯公司,紫外分光光度计购自日本岛津仪器公司。

1.3 造模及分组方法 选取 36 只 SD 大鼠均于脊柱两侧皮内注射 2~3 滴抗原乳化液进行造模,每 2 周 1 次,共注射 5 次,剩余 12 只作为正常组。抗原乳化液的制备方法参照 Avci 等^[5]方法:大鼠脱颈处死后取口腔黏膜组织,组织匀浆器匀浆后加入 pH 为 7.4 的 0.1 mol/L PBS 缓冲液,每次免疫动物前加入等量完全弗氏佐剂制备成抗原乳化液。所有 36 只大鼠均造模成功,并采用随机数字表法将其分为 3 组:模型组、阳性对照组和实验组,各 12 只。

1.4 药品制备 加味导赤散组方如下:生地黄 10 g、竹叶 15 g、生甘草 6 g、通草 10 g、生石膏 30 g;生石膏先打碎后煎 3~5 min,药材加水浸泡 30 min 后与生石膏一起直火煎沸 60 min,取上清液制成 1 g/mL 药液,分装灭菌后备用。

1.5 干预方法 阳性对照组大鼠于造模后以左旋咪唑 20 mg/kg 进行灌胃治疗,1 次/d;实验组大鼠使用含有加味导赤散生药材 1 g/mL 的药液(按 1.278 mL/200 g 计算)和 20 μg/kg 维 B₁₂ 联合灌胃治疗,1 次/d;正常组和模型组均给予等量的蒸馏水处理,所有大鼠均连续治疗 20 d。

1.6 血清 IL-6、TNF-α 检测 取各组大鼠血浆约 5 mL,以 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,采用 ELISA 法检测血清中 IL-6、TNF-α 水平,具体检测步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.7 苏木素-伊红(HE)染色 取各组大鼠新鲜口腔黏膜组织,4%多聚甲醛固定后乙醇脱水,石蜡包埋后做连续切片,HE 染色后电镜下观察。

1.8 外周血 SOD、GSHPx、MDA 测定 取各组大鼠眼眶血约 5 mL,室温放置 30 min 后以 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液。分别取少量血清采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性,采用硫代巴比妥酸法检测 MDA 水平,采用 DINB 显色法检测 GSHPx 活性,具体检测步骤严格按照 SOD、GSHPx、MDA 检测试剂盒说明书进行。

1.9 统计学处理 数据统计分析采用 SAS10.0 软件进行处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的复发性口腔溃疡情况 阳性对照组、实验组大鼠的口腔溃疡数目、溃疡持续时间均显著低于模型组大鼠($P < 0.05$),阳性对照组、实验组大鼠的溃疡间隔出现时间均显著长于模型组大鼠($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠的复发性口腔溃疡情况($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 溃疡数目(个) | 溃疡持续时间(d) | 溃疡间隔出现时间(d) |
|-------|----|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常组 | 12 | — | — | — |
| 模型组 | 12 | 16.1 ± 4.4 | 3.55 ± 0.63 | 3.72 ± 0.96 |
| 阳性对照组 | 12 | 6.3 ± 2.4 ^a | 2.14 ± 0.51 ^a | 6.84 ± 1.07 ^a |
| 实验组 | 12 | 6.6 ± 2.7 ^a | 2.23 ± 0.62 ^a | 6.51 ± 0.87 ^a |
| F | | 31.591 | 13.084 | 21.773 |
| P | | <0.01 | 0.01 | <0.01 |

^a: $P < 0.05$,与模型组比较

2.2 各组大鼠血清 IL-6、TNF-α 检测 阳性对照组、实验组大鼠的血清 IL-6、TNF-α 检测水平均显著低于模型组大鼠($P < 0.05$);模型组的血清 IL-6、TNF-α 检测水平显著高于正常组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠的血清 IL-6、TNF-α 检测比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | TNF-α(pg/mL) | IL-6(pg/mL) |
|-------|----|------------------------------|-----------------------------|
| 正常组 | 12 | 281.56 ± 76.39 | 38.94 ± 11.73 |
| 模型组 | 12 | 472.40 ± 99.15 ^b | 113.28 ± 21.64 ^b |
| 阳性对照组 | 12 | 331.58 ± 85.37 ^{ab} | 57.20 ± 13.39 ^{ab} |
| 实验组 | 12 | 346.04 ± 90.22 ^{ab} | 60.14 ± 15.02 ^{ab} |
| F | | 24.819 | 49.033 |
| P | | <0.01 | <0.01 |

^a: $P < 0.05$,与模型组比较;^b: $P < 0.05$,与正常组比较

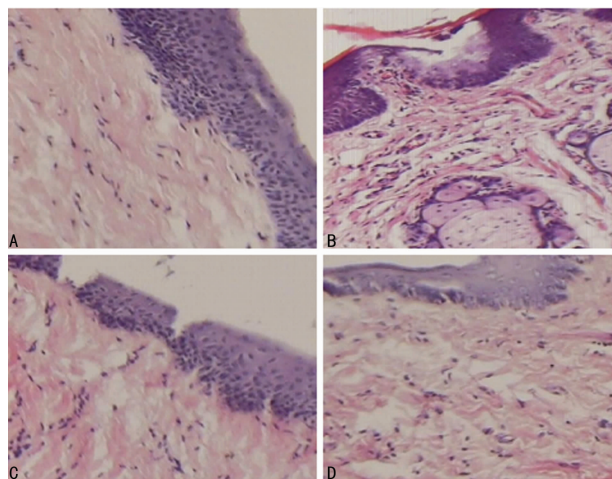
2.3 各组大鼠外周血 SOD、GSHPx、MDA 检测比较 模型组的外周血 SOD、GSHPx 检测水平均显著低于正常组($P < 0.05$),MDA 水平显著高于正常组($P < 0.05$);阳性对照组、实验组大鼠的外周血 SOD、GSHPx 检测水平均显著高于模型组大鼠($P < 0.05$),MDA 水平显著低于模型组($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠的周血 SOD、GSHPx、MDA 检测比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | SOD(U/mL) | GSHPx(U/mL) | MDA(nmol/mL) |
|-------|----|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 12 | 328.05 ± 57.41 | 176.21 ± 15.83 | 5.81 ± 1.46 |
| 模型组 | 12 | 216.91 ± 44.72 ^b | 144.49 ± 17.76 ^b | 8.94 ± 1.70 ^b |
| 阳性对照组 | 12 | 271.68 ± 55.37 ^a | 159.21 ± 14.45 ^a | 6.61 ± 1.38 ^a |
| 实验组 | 12 | 263.35 ± 57.29 ^{ab} | 155.62 ± 15.59 ^{ab} | 6.85 ± 1.41 ^{ab} |
| F | | 19.984 | 14.289 | 16.004 |
| P | | <0.01 | 0.01 | <0.01 |

^a: $P < 0.05$,与模型组比较;^b: $P < 0.05$,与正常组比较

2.4 HE 染色观察 HE 染色,图 1A 为正常组,可见正常组大鼠口腔黏膜组织结构完整、有序,黏膜上皮完整、下方为固有层,由致密的结缔组织构成。图 1B 为模型组,可见黏膜上皮层淋巴细胞浸润丰富,溶解破溃,溃疡底部可见丰富的淋巴细胞、中心粒细胞,毛细血管充盈扩张、管壁增厚、血管内皮细胞肿胀、腺体增生明显。图 1C、D 分别为阳性对照组、实验组,HE 染色结果病变程度显著低于模型组。



A: 正常组; B: 模型组; C: 阳性对照组; D: 实验组

图 1 HE 染色结果(×100)

3 讨 论

复发性口腔溃疡,又称“复发性阿弗他溃疡”,是临床上最为常见的口腔黏膜病,其患病率可高达 20%,位居口腔黏膜病的首位^[5]。复发性口腔溃疡具有周期性、复发性、自愈性等特点,患者的临床表现多为口腔黏膜反复出现圆形或椭圆形的浅表溃疡,可发于口腔黏膜的任何部位,局部有明显的灼热疼痛,妨碍饮食或说话,严重影响患者的生活质量^[6]。该病的病因较为复杂,其发病机制尚不清楚,多认为与局部创伤、精神紧张、食物、药物、激素水平改变及维生素或微量元素缺乏等有关,而遗传因素、系统性疾病因素、免疫因素、感染因素、环境因素等也与其发生和发展有着密切的关系^[6-7]。

目前临床上多采用联合用药的方式治疗复发性口腔溃疡,如局部使用西瓜霜、云南白药等喷剂,补充 B 族维生素,使用左旋咪唑、多抗甲素等抗菌药物及免疫制剂,但治疗效果并不理想,且长期使用左旋咪唑等制剂具有一定的毒性^[8]。近年来,中西医结合治疗复发性口腔溃疡也开始逐步应用于临床,且全身治疗与局部治疗相结合的临床效果显著,不良反应也较少^[9]。中医认为复发性口腔溃疡为火热证所致,在治疗时应以清热泻火为主,滋阴祛湿、益气温阳为辅,其中导赤散为体现清热利水养阴治法的经典基础方^[10]。导赤散主要由生地、木通、甘草、淡竹叶组成,而本研究所用加味导赤散又添加了生石膏,其不但能清热养阴,还具有清热泻火之功效。现代医学研究也表明,生甘草具有抗炎、调节免疫的作用,而竹叶能扩张毛细血管并疏通微循环,竹叶、生地、通草和石膏中含有的钾、镁、锰、锌等多种微量元素与复发性口腔溃疡密切相关^[11]。而维生素 B₁₂对口腔溃疡的病损有修复作用,其能加速新生组织生长,并具有一定的免疫调节能力^[12]。因此,本研究将加味导赤散与维生素 B₁₂联合后应用于口腔溃疡模型大鼠,并对其治疗效果与阳性对照组、模型组和正常组进行了分析比较。

研究结果表明,阳性对照组、实验组大鼠的口腔溃疡数目、溃疡持续时间均显著低于模型组大鼠,阳性对照组、实验组大鼠的溃疡间隔出现时间均显著长于模型组大鼠;将各组大鼠组织口腔黏膜组织切片进行 HE 染色后观察发现,阳性对照组、实验组,HE 染色结果病变程度显著低于模型组,提示加味导赤散与维生素 B₁₂联合治疗对口腔溃疡的治疗效果较好,其可明显改善大鼠口腔溃疡症状,且其疗效与左旋咪唑基本相当。

IL-6、TNF- α 均是较为重要的炎性因子,其与口腔溃疡的发病过程也有着一定的关系^[13]。本研究发现,模型组的血清 IL-6、TNF- α 检测水平显著高于正常组,而阳性对照组、实验组大鼠的血清 IL-6、TNF- α 检测水平均显著低于模型组大鼠,提示口腔溃疡的发生和发展与炎症反应有关,而加味导赤散联合维生素 B₁₂与左旋咪唑均具有一定的抗炎作用,进而抑制口腔溃疡的发展。

也有研究表明,复发性口腔溃疡的发病与氧化损伤有关,其中 MDA 的增高可导致细胞结构损伤、通透性增高、细胞内环境紊乱及能量代谢障碍,最终导致细胞水肿、破损或溶解^[14];而 SOD、GSHPx 作为人体的抗氧化防御系统在清除有害氧自由基和改善微循环方面发挥着重要作用。本研究发现,模型组的外周血 SOD、GSHPx 检测水平均显著低于正常组,MDA 水平显著高于正常组($P < 0.05$);而阳性对照组、实验组大鼠的外周血 SOD、GSHPx 检测水平均显著高于模型组大鼠,MDA 水平显著低于模型组,提示氧自由基的产生和清除失调与复发性口腔溃疡的发病有关,而加味导赤散联合维生素

B₁₂可上调 SOD、GSHPx 水平,进而清除 MDA 等自由基,促进口腔溃疡的修复。但本研究限于研究样本的不足,且对于加味导赤散与维生素 B₁₂治疗大鼠复发性口腔溃疡的不良反仍需作进一步的研究。

综上所述,加味导赤散与维生素 B₁₂对大鼠复发性口腔溃疡具有治疗作用,作用机制可能与减轻炎症反应、提高组织的抗氧化能力有关。

参考文献

- [1] Stooples ET, Sollecito TP. Recurrent oral ulcers[J]. North-west Dent, 2015, 51(4): 2373-2374.
- [2] Aggarwal H, Singh MP, Nahar P, et al. Efficacy of Low-Level laser therapy in treatment of recurrent aphthous ulcers-a sham controlled, split mouth follow up study[J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(2): 218-221.
- [3] 刘飞, 贾鑑慧, 孙丽萍. 维生素 B₁₂ 混合液灌胃对放射性肠炎模型大鼠的治疗作用及机制[J]. 贵阳医学院学报, 2014, 39(3): 376-378, 382.
- [4] 管翠强, 武云霞, 郭洪波, 等. 叶酸和加味导赤散治疗复发性口腔溃疡的临床疗效观察[J]. 中国药物与临床, 2014, 14(4): 426-428.
- [5] Avci E, Akarslan ZZ, Erten H, et al. Oxidative stress and cellular immunity in patients with recurrent aphthous ulcers[J]. Braz J Med Biol Res, 2014, 47(5): 355-360.
- [6] 洪滔, 李晓玲, 高永博. 幽门螺杆菌感染与复发性口腔溃疡的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(6): 1440-1442.
- [7] 胡静, 朱建华, 王帅. 复发性口腔溃疡家兔模型补充超氧化物歧化酶的作用[J]. 中国组织工程研究, 2014(49): 8015-8019.
- [8] 刘志明, 张虹, 毛甜甜, 等. 不同药物治疗复发性口腔溃疡效用的回顾性分析[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(21): 3243-3245.
- [9] 贺光斌. 云南白药局部应用治疗复发性口腔溃疡患者疗效观察及对血清 IL-2 及 SOD 水平的影响[J]. 医学临床研究, 2014, 31(7): 1427-1428.
- [10] 孙惠丽, 季雁浩, 邵荣世. 邵荣世治疗复发性口腔溃疡经验[J]. 山东中医药大学学报, 2016, 40(2): 154-155.
- [11] 张晓霞. 加味导赤散治疗口疮 98 例临床观察[J]. 中国临床研究, 2012, 25(1): 75.
- [12] 李婧, 武云霞, 管翠强, 等. 加味导赤散与维生素 B₁₂ 联合灌胃对大鼠复发性口腔溃疡模型外周血 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 山西医科大学学报, 2014, 45(7): 573-575, 668.
- [13] 邹玉红, 杨静, 陈春华. 复发性口腔溃疡患者血清中 TNF- α 、IL-2, 6 与免疫功能的相关性[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(9): 1299-1301.
- [14] 周芳, 李东, 王丹杨, 等. 复发性口腔溃疡大鼠模型免疫功能与血清因子的变化分析[J]. 陕西医学杂志, 2014, 43(8): 942-944.