

甘草泻心汤配方颗粒剂对复发性口腔溃疡模型大鼠的作用

王金凤*, 刘文辉, 荆雪宁, 陈莉, 王枫
(山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264199)

[摘要] 目的:研究甘草泻心汤配方颗粒剂对复发性口腔溃疡(ROU)模型大鼠的作用。方法:Wister大鼠48只,随机分为6组:正常组、模型组、左旋咪唑($17.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、甘草泻心汤配方颗粒剂高、中、低剂量($12, 6, 3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。除正常组外,余组大鼠均采用免疫法建立ROU大鼠模型。各组分别连续ig给药20d后,热板法检测大鼠痛阈,酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)的含量,流式细胞仪测定大鼠外周血T淋巴细胞亚群。结果:与正常组比较,模型组大鼠痛阈下降,血清TNF- α 、IL-8含量升高,外周血T淋巴细胞亚群CD4⁺细胞数下降CD8⁺细胞数上升,CD4⁺/CD8⁺下降($P < 0.01$)。与模型组比较,甘草泻心汤配方颗粒剂高、中剂量组均可提高大鼠痛阈:(4.1 ± 0.7), (9.2 ± 2.0), (8.5 ± 1.4) s,降低血清TNF- α 含量(182.4 ± 11.6), (37.8 ± 9.0), (42.7 ± 4.6) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,降低血清IL-8含量(870.0 ± 42.2), (303.7 ± 31.7), (331.8 ± 18.6) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,升高CD4⁺细胞(37.4 ± 3.6)%, (48.0 ± 1.5)%, (48.1 ± 4.4)%,降低CD8⁺细胞数(32.1 ± 3.6)%, (26.3 ± 2.7)%, (26.8 ± 1.2)%,提高CD4⁺/CD8⁺(1.2 ± 0.1), (1.8 ± 0.3), (1.8 ± 0.2), ($P < 0.01$)。结论:甘草泻心汤配方颗粒剂对复发性口腔溃疡模型大鼠有较好的治疗作用,可能与其镇痛、抑制炎症因子和调节T淋巴细胞亚群失衡作用有关。

[关键词] 甘草泻心汤; 配方颗粒剂; 复发性口腔溃疡; 痛阈; 细胞因子; T淋巴细胞亚群

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0143-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110143

Effect of Gancao Xiexin Decoction Formula Granules on Model Rats with Recurrent Oral Ulcer

WANG Jin-feng*, LIU Wen-hui, JING Xue-ning, CHEN Li, WANG Feng
(Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Gancao Xiexin decoction formula granules on model rats with recurrent oral ulcer (ROU). **Method:** Forty-eight Wister rats were randomly divided into six groups: normal group, model group, levamisole group ($17.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), three Gancao Xiexin decoction formula granules groups-high, medium and low ($12, 6, 3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Except the rats in the normal group, the rats in other groups were used to establish the recurrent oral ulcer model with immune method. After 20 days of continuous intragastric administration, the pain threshold in rats was tested by hot plate method, the tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-8 (IL-8) levels in rat serum were tested by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), and T lymphocyte subsets of peripheral blood was determined by flow cytometry. **Result:** Compared with normal group, the pain threshold of rats in the model group was decreased, and the TNF- α and IL-8 levels in rat serum were increased, the number of CD4⁺ cells fell, and the number of CD8⁺ cells rose, CD4⁺/CD8⁺ ratio decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, in the high and medium Gancao Xiexin decoction formula granules groups, the pain threshold was increased: (4.1 ± 0.7), (9.2 ± 2.0), (8.5 ± 1.4) s, the TNF- α in rat serum was decreased: (182.4 ± 11.6), (37.8 ± 9.0), (42.7 ± 4.6) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, and IL-8 was decreased: (870.0 ± 42.2), (303.7 ± 31.7), (331.8 ± 18.6) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, the number of CD4⁺ cells rose: (37.4 ± 3.6)%, ($48.0 \pm$

[收稿日期] 20131223(006)

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2011-149)

[通讯作者] *王金凤,硕士学位,讲师,从事中西医结合治疗风湿病的研究工作, Tel:13906453869, E-mail: xycwan750705@163.com

1.5)% , (48.1 ± 4.4)% , and the number of CD8⁺ cells fell: (32.1 ± 3.6)% , (26.3 ± 2.7)% , (26.8 ± 1.2)% , leading to an increased CD4⁺/CD8⁺ ratio: (1.2 ± 0.1) , (1.8 ± 0.2) , (1.8 ± 0.2) (*P* < 0.01).

Conclusion: Gancao Xiexin decoction formula granules is effective in the treatment of model rats with recurrent oral ulcer, which may have something to do with its effects of analgesia, inhibiting inflammatory factors, and regulating the imbalance of T lymphocyte subgroup.

[**Key words**] Gancao Xiexin decoction; formula granules; recurrent oral ulcer; pain threshold; cytokines; T lymphocyte subsets

复发性口腔溃疡 (recurrent oral ulcer, ROU), 又称复发性阿弗他溃疡, 是临床最常见的口腔黏膜病之一, 患病率高达 25%, 属中医“口疮”、“口疔”范畴。中药配方颗粒是一种新型中药, 因其剂量准确、安全高效、储存方便、免煎易服, 临床使用率逐年上升。《金匱要略》中治疗“狐惑病”之甘草泻心汤是治疗 ROU 的有效经方之一^[1-2], 临床观察有较好疗效, 但对其治疗 ROU 的作用机制研究较少, 尤其对甘草泻心汤配方颗粒剂的研究至今几乎为空白。胡渝芳等^[3]研究认为甘草泻心汤可调节复发性阿弗他溃疡大鼠 T 淋巴细胞亚群失衡, 对疾病治疗作用明显。本研究以复发性口腔溃疡模型大鼠为实验对象, 探讨甘草泻心汤配方颗粒剂的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wister 大鼠 68 只, 雌雄各半, 体重 (220 ± 20) g, 由山东大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(鲁)20090001。

1.2 试剂及药物 弗氏完全佐剂 (美国 Sigma 公司, 批号 SLBD0736), 大鼠肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 酶联免疫分析试剂盒 (上海西唐生物有限公司, 批号 1306281), 大鼠白细胞介素-8 (IL-8) 酶联免疫分析试剂盒 (上海西唐生物有限公司, 批号 1306282), 溶血素 (美国 BD 公司, 批号 2181917), 大鼠 T 淋巴细胞亚群试剂盒 (美国 BD 公司, 批号 2244980), 左旋咪唑 (山东仁和堂药业有限公司, 批号 121105), 配方颗粒生甘草 (1301001S)、炙甘草 (1212004S)、黄芩 (1301003S)、黄连 (1303002S)、干姜 (1301002H)、法半夏 (1301001H)、党参 (1302002H)、砂仁 (1210002S)、蒲黄 (1210001S), 均由华润三九医药股份有限公司生产。

1.3 仪器 FSH-2A 可调高速匀浆机 (常州翔天实验仪器厂), RB-200 智能热板仪 (成都泰盟科技有限公司), L-530 离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司), GMP-9080 隔水式恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司), MK3 酶标仪 (赛默飞世尔上海仪器有限公司), HYQ-2121A 涡旋混合器 (西化仪北京

科技有限公司), Fasc Aria™ 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 药物的制备 甘草泻心汤配方颗粒剂的制备: 取配方颗粒生甘草 2.5 g, 黄芩 1 g, 黄连 1.5 g, 干姜 2 g, 法半夏 1.5 g, 党参 2 g, 砂仁 4 g, 蒲黄 2 g, 炙甘草 5 g (相当于中药饮片生甘草 15 g, 黄芩 9 g, 黄连 9 g, 干姜 6 g, 法半夏 9 g, 党参 12 g, 砂仁 12 g, 蒲黄 12 g, 炙甘草 15 g), 分别充分溶解于无菌蒸馏水 66, 125, 200 mL 中, 制成甘草泻心汤配方颗粒剂高、中、低浓度药液备用。生药含量分别为 1.5, 0.8, 0.5 g·mL⁻¹。

2.2 动物分组 大鼠 48 只随机分为 6 组: 正常组、模型组、左旋咪唑组、甘草泻心汤配方颗粒剂高、中、低剂量组, 每组 8 只, 雌雄各半。

2.3 模型制备 除正常组外其余各组动物均以免疫法建立大鼠 ROU 模型^[4]。另取 Wister 大鼠 20 只, 引颈处死后无菌操作剥离口腔黏膜, 无菌生理盐水冲洗, 称重后加 10 倍量生理盐水, 可调高速匀浆机 2 000 r·min⁻¹ 匀浆 20 min 制成黏膜匀浆, -20 ℃ 保存备用。免疫注射前, 将等量弗氏完全佐剂与黏膜匀浆混匀, 混合时要求顺时针研磨逐渐加入, 加完后研磨 20 min, 直至变为乳剂为止。免疫动物时, 常规消毒 Wister 大鼠脊柱两侧, 皮内注射上述乳化液, 每只 2 点, 每点 0.1 mL, 每周 1 次, 连续注射 8 周。

2.4 给药剂量 模型建立后各组开始灌胃给药, 每天 1 次, 连续 20 d。根据人的临床剂量按体重折算, 大鼠的等效剂量是人临床剂量的 7 倍。甘草泻心汤配方颗粒剂高、中、低组剂量分别为 12, 6, 3 g·kg⁻¹, 相当于人临床等效剂量的 7, 3.5, 1.75 倍; 左旋咪唑组 17.5 mg·kg⁻¹, 相当于人临床等效剂量的 7 倍; 正常组和模型组以 10 mL·kg⁻¹ ig 生理盐水。

2.5 检测指标

2.5.1 痛阈测定 将大鼠放入 52 ℃ 的智能热板仪中, 以大鼠双后足接触热板到出现舔后足的时间作为痛阈值。每只大鼠检测 3 次, 每次间隔 1 h, 取其

平均值。

2.5.2 大鼠血清 TNF- α , IL-8 的含量测定 大鼠末次给药后禁食不禁水 16 h, 10% 水合氯醛麻醉后腹主动脉取血 5 mL 置于试管(不含抗凝剂)中, 室温下放置 30 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血清。按试剂盒说明书采用双抗体夹心法分别测定 TNF- α , IL-8 的含量。

2.5.3 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的测定 取 EDTAK₂ 抗凝大鼠外周血 100 μ L 加入 5 mL 流式管底; 将 APC-CD3, PE-CD4 和 FITC-CD8 抗体 20 μ L 加入流式管底与全血混匀, 室温避光孵育 20 min; 每管加入 2 mL 1 \times 溶血素, 涡旋混合器混匀后避光放置 10 min, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃上清; 加入 2 mL PBS 洗液重悬细胞, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清; 加入 0.5 mL PBS 重悬细胞, 上流式细胞仪检测。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

复制 ROU 大鼠模型时, 免疫注射 5 周后各组大鼠口腔黏膜开始出现不同程度的充血、红肿和溃疡, 溃疡多发生于唇、颊黏膜, 以圆形、椭圆形多见, 直径约 1~2 mm, 7~10 d 后愈合, 之后可再次出现, 证明造模成功。经甘草泻心汤配方颗粒剂治疗后, 除模型组外, 其余各组溃疡愈合时间缩短, 一般 5~7 d 愈合, 较少复发。

3.1 对大鼠痛阈的影响 与正常组比较, 模型组的痛阈明显下降, $P < 0.01$ 。与模型组比较, 甘草泻心汤配方颗粒剂高、中、低剂量组均能提高大鼠的痛阈, $P < 0.01$, 见表 1。

表 3 甘草泻心汤配方颗粒剂对 ROU 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	-	47.8 \pm 4.7	24.0 \pm 2.0	2.0 \pm 0.2
模型	-	37.4 \pm 3.6 ¹⁾	32.1 \pm 3.6 ¹⁾	1.2 \pm 0.1 ¹⁾
左旋咪唑	0.017 5	49.6 \pm 2.1 ²⁾	26.1 \pm 1.2 ²⁾	1.9 \pm 0.0 ²⁾
甘草泻心汤	3	44.4 \pm 2.1 ²⁾	30.0 \pm 1.7 ¹⁾	1.5 \pm 0.2 ^{1,2)}
	6	48.1 \pm 4.4 ²⁾	26.8 \pm 1.2 ²⁾	1.8 \pm 0.2 ²⁾
	12	48.0 \pm 1.5 ²⁾	26.3 \pm 2.7 ²⁾	1.8 \pm 0.2 ²⁾

4 讨论

复发性口腔溃疡病因未明, 其发生与生物感染、免疫、遗传、精神心理、微量元素缺乏和血液流变学等因素密切相关。近年一般认为 ROU 是一种自身

表 1 甘草泻心汤配方颗粒剂对 ROU 大鼠痛阈的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	痛阈值/s
正常	-	12.1 \pm 1.3
模型	-	4.1 \pm 0.7 ¹⁾
左旋咪唑	0.017 5	10.5 \pm 1.3 ²⁾
甘草泻心汤	3	7.1 \pm 1.7 ^{1,2)}
	6	8.5 \pm 1.4 ^{1,2)}
	12	9.2 \pm 2.0 ^{1,2)}

注: 与正常组比¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对大鼠血清 TNF- α , IL-8 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α , IL-8 含量明显增高, $P < 0.01$ 。与模型组比较, 配方颗粒剂高、中、低组能降低大鼠血清 TNF- α , IL-8 含量, $P < 0.01$, 见表 2。

表 2 甘草泻心汤配方颗粒剂对 ROU 大鼠血清

TNF- α , IL-8 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-8
正常	-	32.6 \pm 3.7	264.8 \pm 24.7
模型	-	182.4 \pm 11.6 ¹⁾	870.0 \pm 42.2 ¹⁾
左旋咪唑	0.017 5	33.2 \pm 9.4 ²⁾	275.3 \pm 19.0 ²⁾
甘草泻心汤	3	85.5 \pm 10.1 ^{1,2)}	508.0 \pm 16.5 ^{1,2)}
	6	42.7 \pm 4.6 ²⁾	331.8 \pm 18.6 ^{1,2)}
	12	37.8 \pm 9.0 ²⁾	303.7 \pm 31.7 ^{1,2)}

3.3 对大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 CD4⁺ 减少, CD8⁺ 增多, CD4⁺/CD8⁺ 下降。与模型组比较, 甘草泻心汤配方颗粒剂高、中组能升高 CD4⁺, 降低 CD8⁺, 提高 CD4⁺/CD8⁺, $P < 0.01$, 低剂量组降低 CD8⁺ 较差, 与模型组无显著差异, 见表 3。

免疫性疾病, 细胞免疫与其发生密切相关。T 淋巴细胞主要包括 CD4⁺, CD8⁺ 两个亚群, CD4⁺ 为辅助-诱导亚群, CD8⁺ 为杀伤-抑制亚群, 各亚群之间相互平衡、互相调节, 使机体对外来抗原刺激产生正常免

疫应答,维持机体的免疫平衡,因此,CD4⁺,CD8⁺淋巴细胞亚群在血液中的分布是临床上重要的免疫状态检测指标。CD4⁺/CD8⁺下降可提高机体对各种非特异性和特异性致病因子的易感性,导致口腔黏膜局部病变,甚至发生坏死和溃疡。马丽^[5]和梅海梨^[6]等对 ROU 患者进行血液 T 淋巴细胞亚群测定,结果与对照组比较,CD4⁺,CD4⁺/CD8⁺下降,CD8⁺升高,故认为 T 淋巴细胞亚群失衡和细胞免疫功能低下可能是导致 ROU 发病的重要因素。

ROU 病理组织学显示以淋巴细胞对口腔黏膜毒性作用为主,CD8⁺T 淋巴细胞对口腔黏膜的细胞毒性作用的同时可释放大量的 TNF- α 。TNF- α 主要由单核-巨噬细胞产生的前炎症因子,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用,它能诱导 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 等细胞因子的分泌,破坏细胞因子网络平衡,并趋化单核细胞和中性粒细胞,促进炎细胞浸润,诱发和加重溃疡病变^[7]。张琳等^[8]研究发现 ROU 患者血清中 TNF- α 的含量升高,提示其参与了病理过程。IL-8 是由单核细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞和 T 细胞等多种细胞产生的一种炎症因子,其作用是趋化并激活中性粒细胞,促其脱颗粒,产生呼吸爆发,释放超氧化物和溶酶体,进一步加重口腔黏膜损伤^[9]。卢敏等^[10]对 35 例 ROU 病人血浆炎症因子进行检测,发现 TNF- α , IL-8 的含量均明显增高,与对照组有显著差异,认为炎症因子对 ROU 的炎症损伤及其抗炎修复具有重要意义。

本研究通过免疫法建立 ROU 大鼠模型,引起大鼠出现口腔溃疡的机制可能是同种异型的口腔黏膜进入机体后,诱导大鼠产生了免疫反应。实验显示,与正常组比较,模型组大鼠痛阈下降,血清 TNF- α 、IL-8 含量显著增高,CD4⁺减少,CD8⁺增多,CD4⁺/CD8⁺下降,进一步说明口腔溃疡的发生与 T 淋巴细胞亚群失衡密切相关,炎症因子 TNF- α , IL-8 参与了溃疡发生过程,与人类的临床特点相类似。经药物干预治疗,甘草泻心汤配方颗粒剂高、中组可提高模型大鼠的痛阈,降低血清 TNF- α 、IL-8 含量,升高 CD4⁺,降低 CD8⁺,提高 CD4⁺/CD8⁺,与模型组比

较有显著差异, $P < 0.01$;剂量上,配方颗粒剂高剂量组作用稳定,与阳性对照左旋咪唑组无显著差异。

综上所述,甘草泻心汤配方颗粒剂对复发性口腔溃疡模型大鼠有较好的治疗作用,可能与其镇痛、抑制炎症因子和调节 T 淋巴细胞亚群失衡作用有关。但是对其停药后的远期抗复发疗效有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 张连东,裴新军.甘草泻心汤加减治疗复发性阿弗他溃疡临床观察[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(5):27.
- [2] 王金凤,刘英.甘草泻心汤化裁治疗复发性口腔溃疡 30 例临床研究[J].江苏中医药,2013,45(4):29.
- [3] 胡渝芳,张永忠.甘草泻心汤灌胃对大鼠 RAU 模型外周血 T 淋巴细胞亚群的影响[J].辽宁医学杂志,2008,22(3):115.
- [4] 祁晶,余占海,刘燕,等.免疫法建立 SD 大鼠 RAU 模型[J].口腔医学研究,2010,26(6):816.
- [5] 马丽,颜淑云,宋晓蕾,等.复发性阿弗他溃疡患者外周血 T 淋巴细胞亚群水平测定及意义[J].山东医药,2010,50(23):35.
- [6] 梅海梨,陈莉娅,刘斌,等.复发性口腔溃疡患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化及意义[J].山东医药,2008,48(39):24.
- [7] 王慧波,李一军,张雪,等.肿瘤坏死因子- α 与复发性阿弗他溃疡的关系[J].实用口腔医学杂志,2012,28(3):389.
- [8] 张琳,李秦,张涛,等.复发性口腔溃疡患者肿瘤坏死因子变化及临床意义[J].第四军医大学学报,2006,27(6):530.
- [9] 李晓荣,张晓丽,李映红,等.丹栀逍遥散对复发性口腔溃疡模型相关细胞因子的影响[J].深圳中西医结合杂志,2010,20(4):201.
- [10] 卢敏,胡艺平,吴珠燕,等.复发性口腔溃疡患者血浆炎症因子的变化及干扰素 α -2b 的干预作用[J].海峡药学,2012,24(5):89.

[责任编辑 聂淑琴]