

蜘蛛毒素口腔溃疡散对口腔溃疡模型大鼠的治疗作用及其机制研究^Δ

邢国征*, 王长娜, 田旭彤, 唐佳美, 张玉洁, 乔晓强, 周程艳[#](河北大学药学院/河北省药物质量分析控制重点实验室, 河北保定 071002)

中图分类号 R285.5;R781.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1043-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.07

摘要 目的:研究蜘蛛毒素口腔溃疡散对口腔溃疡(RAU)模型大鼠的治疗作用及其机制。方法:采用纸片扩散法检测该散剂的体外抑菌活性。取50只健康SD大鼠,随机分为正常组、模型组、阳性组(桂林西瓜霜,100 mg/kg)和口腔溃疡散高、低剂量组(70、35 mg/kg),每组10只。除正常组外,其余组大鼠均采用醋酸法在其右侧口腔黏膜建立RAU模型。模型成功建立后,各给药组大鼠分别以相应药物涂抹溃疡处,连续给药3 d;正常组和模型组不作处理。观察给药第1、3天时大鼠溃疡面情况并测定溃疡面积;取部分溃疡组织切片观察其组织形态学变化;检测大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1(IL-1)、IL-6、干扰素 γ (IFN- γ)的水平;采用免疫组化法检测大鼠溃疡组织中基质金属蛋白酶9(MMP-9)、核因子 κ B(NF- κ B)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)、多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)的蛋白表达水平。结果:口腔溃疡散体外抑菌效果明显。与空白组比较,模型组大鼠口腔溃疡明显,组织病变明显;血清中TNF- α 、IL-1、IL-6、MDA水平均显著升高,IFN- γ 、SOD、GSH水平均显著降低($P<0.01$);溃疡组织中MMP-9、NF- κ B、Caspase-3、PARP表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,口腔溃疡散各剂量组大鼠的溃疡面积均显著缩小($P<0.05$ 或 $P<0.01$)或几近愈合,组织病变明显减轻;血清中MDA、TNF- α 、IL-1、IL-6水平均显著降低,SOD、GSH、IFN- γ 水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);溃疡组织中MMP-9、NF- κ B、Caspase-3、PARP表达水平均显著降低($P<0.01$)。结论:蜘蛛毒素口腔溃疡散具有强效的抑菌、消肿、修复作用,对RAU模型大鼠有明显的治疗作用;其机制可能与降低炎症因子水平、介导凋亡因子的表达、调节免疫失衡有关。

关键词 口腔溃疡;蜘蛛毒素;口腔溃疡散;炎症因子;凋亡因子;免疫调节;机制;大鼠

Therapeutic Effects of Spider Toxin Oral Ulcer Powder on Oral Ulcer Model Rats and Its Mechanism Study

XING Guozheng, WANG Changna, TIAN Xutong, TANG Jiamei, ZHANG Yujie, QIAO Xiaoqiang, ZHOU Chengyan (College of Pharmacy, Hebei University/Hebei Provincial Key Lab of Drug Quality Analysis and Control, Hebei Baoding 071002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study therapeutic effects of Spider toxin oral ulcer powder on recurrent aphthous ulcer (RAU) model rats and its mechanism. METHODS: *In vitro* antimicrobial activity of the powder was determined by disk diffusion method. 50 healthy SD rats were randomly divided into normal group, model group, positive group (Guilin watermelon frost, 100 mg/kg) and oral ulcer powder high-dose and low-dose groups (70, 35 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for normal group, RAU model was established in the right oral submucosa of rats in other groups by acetic acid method. After modeling, administration groups were smeared with corresponding drugs on ulcers for 3 days. Normal group and model group were not treated. The ulcer surface of rats was observed and the ulcer area was measured on the 1st and 3rd days after administration. The morphological changes of ulcer tissues were observed. The serum levels of SOD, MDA, GSH, TNF- α , IL-1, IL-6 and IFN- γ were detected. The protein expressions of MMP-9, NF- κ B, Caspase-3 and PARP in ulcer tissues of rats were detected by immunohistochemistry. RESULTS: The oral ulcer powder showed obvious *in vitro* bacteriostasis effect. Compared with blank group, oral ulcer and histopathological changes were obvious in model group; serum levels of TNF- α , IL-1, IL-6 and MDA were increased significantly, while the levels of IFN- γ , SOD and GSH were decreased significantly ($P<0.01$); the expression of MMP-9, NF- κ B, Caspase-3 and PARP in ulcer tissue were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the ulcer area of rats in each dosage group was significantly reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$) or nearly healed, the pathological changes of tissue were significantly alleviated; serum levels of MDA, TNF- α , IL-1 and IL-6 were decreased significantly, while the levels of SOD, GSH and IFN- γ were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); the expression of MMP-9, NF- κ B, Caspase-3 and PARP in ulcer tissue were decreased

^Δ 基金项目:河北省科技计划项目(No.B2015201016);保定市科学技术研究与发展指导计划项目(No.18ZF121);河北大学实验室开放项目(No.sy201846)

* 本科。研究方向:中药药理及作用机制。电话:0312-5971107。E-mail:1953824736@qq.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:中药药理、药物作用机制、代谢组学。电话:0312-5971107。E-mail:893927534@qq.com

significantly ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: Spider toxin oral ulcer powder shows strong bacteriostasis, detumescence and repair effects, and has obvious therapeutic effect on RAU model rats. Its mechanism may be related to reducing the level of inflammatory factors, mediating the expression of apoptotic factors and regulating immune imbalance.

KEYWORDS Oral ulcer; Spider toxin; Oral ulcer powder; Inflammatory factor; Apoptosis factor; Immunoregulation; Mechanism; Rat

口腔溃疡(RAU)是一种常见的溃疡性损伤疾病,发病率高达20%以上;其发病部位多见于唇黏膜、舌体、颊黏膜、软腭等,大多呈现圆形或椭圆形溃疡状,周围组织伴有充血水肿现象,直接影响患者的进食、吞咽和语言交流等日常活动^[1]。目前研究对RAU的致病机制尚无定论,认为其可能与口腔菌群失调、免疫失衡、精神紧张、维生素缺乏等因素有关^[2]。据调查,当今市场上最常用的RAU治疗药物有四环华素片、醋酸地塞米松贴片、养阴生肌散等,但治疗效果均有不足^[3],因此临床亟待有效的相关治疗新药出现。近年来,蜘蛛所分泌的蜘蛛毒素成为生物毒素研究领域的热点之一,其具有镇痛、抗菌、抗癌等作用^[4]。已有研究发现,蜘蛛毒素对多种革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌及霉菌等均有明显的抑菌作用^[5]。蜘蛛毒素口腔溃疡散乃沿用民间经典验方,由蜘蛛(活)、白矾、冰片组方而成^[6],具有祛风、消肿、解毒之功效。本课题组通过研究蜘蛛毒素口腔溃疡散对实验性RAU模型大鼠的治疗作用,并探讨其作用机制,为临床应用蜘蛛毒素治疗RAU提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BSA2245型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);HHCP-T型CO₂培养箱(上海贺德实验设备有限公司);DHP-9080型恒温孵育箱(常州恩培仪器制造有限公司);ZEISS Primo Start型显微镜(德国Zeiss公司);H2518D型离心机(上海知信实验仪器技术有限公司);石蜡包埋机、手动轮转式石蜡切片机(美国Thermo Fisher Scientific公司);Synergy HT型全自动酶标仪(美国BioTek公司)。

1.2 药品与试剂

自制蜘蛛毒素口腔溃疡散(以下简称为“口腔溃疡散”,由蜘蛛、白矾、冰片按1:4:4质量比组方制备:将白矾放于砂锅内文火加热至融化,放入新鲜捣碎的蜘蛛煮制,使蜘蛛毒素充分溶解于白矾中,直至白矾变为枯矾时停止加热,剔除蜘蛛,加入冰片研磨至散状);桂林西瓜霜(散剂)(桂林三金药业股份有限公司,批号:130846,规格:2.5 g);超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20160928、20160927、20160929);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫试剂盒、白细胞介素1(IL-1)酶联免疫试剂盒、IL-6酶联免疫试剂盒、干扰素 γ (IFN- γ)酶联免疫试剂盒(江苏酶标生物科技有限公司,批号均为20180104);基质金属蛋

白酶9(MMP-9)免疫组化试剂盒、核因子- κ B(NF- κ B)免疫组化试剂盒、胱天蛋白酶3(Caspase-3)免疫组化试剂盒、二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号均为20170428);辣根酶过氧化物酶标记兔IgG二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号:20180405);戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,德国进口分装,批号:020919);冰醋酸(天津市大茂化学试剂厂,批号:20171101);注射用生理盐水(长春豪邦药业有限公司,批号:S09011301);磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2,北京博奥拓科技有限公司);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为自制无菌蒸馏水。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠50只,雌雄各半,体质量(200±20)g,由北京维通利华生物技术有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0002。饲养环境温度22~25℃,相对湿度为55%~70%,12 h光照循环;动物均自由饮水、进食。

1.4 菌株

大肠埃希菌[编号:CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌[编号:CMCC(B)26001]均购自北京百欧博伟生物技术有限公司,由中国医学微生物菌种保藏管理中心提供。

2 方法

2.1 口腔溃疡散体外抑菌试验

采用纸片扩散法检测该散剂的体外抑菌活性^[7]。移取无菌蒸馏水、西瓜霜水溶液(10 mg/mL)和高、低质量浓度的口腔溃疡散水溶液(10、5 mg/mL)各15 μ L于9 mm的圆形滤纸片上。滤纸片烘干灭菌后,分别置于长有金黄色葡萄球菌和大肠杆菌培养皿上,于37℃培养16 h。采用游标卡尺测量抑菌圈直径,以确定样品体外抑菌活性。试验重复6次。

采用倍比稀释法测定其最小抑菌浓度(MIC)。将口腔溃疡散水溶液(20 mg/mL)在96孔细胞培养板上进行倍比稀释,分别移取各稀释溶液15 μ L,置于长有金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的培养皿上,于37℃培养16 h。同时在96孔板中进行相应菌种与药物的培养。另设不加菌液的空白组。分别测定各孔溶液的光密度(OD),将不同浓度药物组的OD值与空白组比较,同时结合培养皿菌培养结果,以最接近空白组OD值的对应药物浓度作为抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长的MIC。试验重复6次。

2.2 动物分组、建模、给药与取材

取大鼠50只,随机分为正常组、模型组、阳性组(桂

林西瓜霜, 100 mg/kg, 剂量按人体服用剂量折算后制定)和口腔溃疡散高、低剂量组(70、35 mg/kg, 剂量按该口腔溃疡散民间常用剂量及《金匱要略》所载蜘蛛散的临床剂量折算后制定), 每组10只。采用醋酸法建立大鼠RAU模型: 以3%戊巴比妥钠(1.5 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 在其口腔右侧颊部黏膜下注射10%醋酸(0.1 mL/只), 24 h后观察大鼠口腔黏膜形成溃疡, 即RAU模型成功建立; 正常组大鼠同法注射等量的生理盐水。模型成功建立后, 阳性组和口腔溃疡散各剂量组大鼠均用棉签蘸取相应的药品涂抹于溃疡处, 每日2次, 连续3 d; 正常组和模型组大鼠则不作处理。

末次给药后, 大鼠禁食不禁水12 h, 同上麻醉后, 于腹主动脉取血, 在4 °C下2 500 r/min离心15 min, 取上层血清, 于-80 °C贮存、待用。取血完毕后, 取大鼠右侧颊部溃疡处黏膜组织, 于4%甲醛中固定、待用。

2.3 大鼠口腔溃疡面积的测定

参照陈卓等^[8]的实验方法, 用游标卡尺测量各组模型大鼠给药前及给药后第1、3天时口腔溃疡的最大横径(d_1)和最大纵径(d_2), 计算溃疡面积(溃疡面积= $d_1 \times d_2 \times \pi \times 1/4$, π 取值为3.14)。

2.4 大鼠血清中SOD、MDA、GSH水平的检测

取大鼠血清, 按相应试剂盒说明书步骤操作, 分别测定血清中SOD、MDA、GSH水平。

2.5 大鼠血清中TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ 水平的检测

取大鼠血清, 按相应试剂盒说明书步骤操作, 以酶联免疫吸附法检测血清中TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ 水平。

2.6 大鼠口腔溃疡组织的病理学观察

取“2.2”项下固定的大鼠口腔溃疡黏膜组织, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片(厚度4 μ m), 苏木精-伊红(HE)染色, 在显微镜下观察其组织病理学变化。

2.7 大鼠口腔溃疡组织中MMP-9、NF- κ B、Caspase-3、PARP蛋白表达水平的检测

采用免疫组化SP法进行检测。按相应试剂盒说明书步骤进行: 取“2.6”项下制备的组织切片, 脱蜡, PBS冲洗, 放入0.01 mol/L枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中加热修复抗原20 min; 自然冷却, PBS冲洗, 滴入3% H₂O₂, 于37 °C孵育20 min; PBS洗涤, 分别滴加MMP-9、NF- κ B、Caspase-3、PARP一抗(1:200), 于4 °C放置12 h; PBS洗涤, 滴加二抗(1:500), 于37 °C孵育20 min; PBS洗涤, DAB显色, 苏木精复染, 盐酸酒精分化, 稀氨水返蓝, 脱水透明, 中性树脂胶水封片。在显微镜下观察组织切片, 按Hercep Test标准评分^[9], 判断各目标蛋白的阳性表达情况。采用Image Pro Plus 6.0软件测定镜下阳性染色部位的累积光密度(IOD), 以表示蛋白表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 口腔溃疡散的体外抑菌作用

桂林西瓜霜和不同质量浓度的口腔溃疡散均在培养皿中形成了抑菌圈, 抑菌效果明显。其中, 以高剂量口腔溃疡散抑菌圈直径最大。口腔溃疡散对大肠杆菌金黄色葡萄球菌的MIC分别为1.25、0.625 mg/mL。桂林西瓜霜和口腔溃疡散的抑菌圈直径测定结果见表1, 口腔溃疡散的MIC测定结果见表2。

表1 桂林西瓜霜和口腔溃疡散的抑菌圈直径($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab 1 Bacteriostatic circle diameter of Guilin watermelon frost and Oral ulcer powder($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	质量浓度, mg/mL	抑菌圈直径, mm	
		大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
无菌水组		0	0
桂林西瓜霜组	10	6.31 ± 0.03**	6.82 ± 0.13**
高浓度口腔溃疡散组	10	10.44 ± 0.40**	10.51 ± 0.08**
低浓度口腔溃疡散组	5	7.80 ± 0.09**	7.93 ± 0.11**

注: 与无菌水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. aseptic water group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 口腔溃疡散的MIC($n=6$)

Tab 2 MIC of Oral ulcer powder($n=6$)

菌种	质量浓度, mg/mL	抑菌效果	菌种	质量浓度, mg/mL	抑菌效果
大肠杆菌	20	-	金黄色葡萄球菌	20	-
	10	-		10	-
	5	-		5	-
	2.5	-		2.5	-
	1.25	-		1.25	-
	0.625	+		0.625	-
	0.3125	++		0.3125	+

注: “-”表示无细菌生长, “+”或“++”表示有细菌生长

Note: “-” means bacterial-free growth; “+” or “++” mean bacterial growth

3.2 各组大鼠口腔溃疡创面观察结果

给药前, 与正常组比较, 模型组大鼠口腔溃疡创面明显, 提示RAU造模成功; 各给药组大鼠口腔溃疡面积较模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。给药第1、3天时, 模型组大鼠口腔溃疡面积逐渐缩小; 阳性组和口腔溃疡散各剂量组大鼠的溃疡面积均较模型组显著缩小, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药第3天时, 正常组大鼠口腔无溃疡创面, 呈现粉红色平整黏膜, 无水肿; 模型组大鼠口腔溃疡创面明显, 呈椭圆形, 溃疡周围呈凹陷性缺损, 周围组织充血水肿; 阳性组和口腔溃疡散低剂量组大鼠口腔组织凹陷程度有所减轻, 口腔黏膜仍能见到充血水肿; 口腔溃疡散高剂量组大鼠口腔溃疡几近愈合, 组织平整, 黏膜充血水肿情况消失。各组大鼠口腔溃疡面积测定结果见表3。

3.3 各组大鼠血清中TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ 水平检测结果

与正常组比较, 模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1、IL-6水平显著升高, IFN- γ 水平显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 提示RAU造模成功。与模型组比较,

表3 各组大鼠口腔溃疡面积($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Oral ulcer area of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	溃疡面积,mm ²		
		给药前	给药第1天	给药第3天
正常组		0	0	0
模型组		14.2±0.3**	9.0±0.2**	4.0±0.5**
阳性组	100	14.2±0.1	3.2±1.0 [#]	1.3±0.3 [#]
口腔溃疡散高剂量组	70	14.0±0.2	3.3±1.3 [#]	1.0±0.2 [#]
口腔溃疡散低剂量组	35	14.2±0.2	6.6±1.2 [#]	2.8±0.7 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

阳性组和口腔溃疡散各剂量组大鼠血清中TNF- α 、IL-6、IL-1水平显著降低,IFN- γ 水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠血清中TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ 水平检测结果见表4。

表4 各组大鼠血清中TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ 水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Serum levels of TNF- α , IL-1, IL-6 and IFN- γ of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TNF- α ,ng/L	IL-1,ng/L	IL-6,pg/mL	IFN- γ ,ng/L
正常组	290.59±3.87	53.84±5.88	74.35±6.77	338.05±41.63
模型组	352.90±40.12**	72.82±3.69**	95.53±3.92**	123.34±13.50**
阳性组	300.03±23.74 [#]	65.16±3.34 [#]	80.70±7.16 [#]	197.67±18.18 [#]
口腔溃疡散高剂量组	292.03±12.38 [#]	63.15±1.21 [#]	80.97±4.03 [#]	254.73±35.76 [#]
口腔溃疡散低剂量组	301.12±10.75 [#]	66.04±2.43 [#]	84.85±4.85 [#]	191.49±23.43 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

3.4 各组大鼠血清中SOD、MDA、GSH水平检测结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中SOD、GSH水平均显著降低,MDA水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$),提示RAU造模成功。与模型组比较,阳性组和口腔溃疡散各剂量组大鼠血清中SOD、GSH水平均显著升高,MDA水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠血清中SOD、MDA、GSH水平检测结果见表5。

表5 各组大鼠血清中SOD、MDA、GSH水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Serum levels of SOD, MDA and GSH of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD,nmol/mL	MDA, μ mol/mL	GSH,nmol/mL
正常组	74.31±1.25	4.36±0.76	35.88±0.44
模型组	62.64±2.23**	6.65±0.51**	29.33±0.42**
阳性组	66.99±1.96 [#]	5.31±0.71 [#]	32.84±2.12 [#]
口腔溃疡散高剂量组	68.82±2.13 [#]	4.58±0.46 [#]	32.82±1.33 [#]
口腔溃疡散低剂量组	66.88±1.33 [#]	5.56±0.64 [#]	32.31±1.17 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

3.5 各组大鼠口腔溃疡组织病理学观察结果

镜下可见,正常组大鼠口腔黏膜为鳞状上皮覆盖,

组织完整,固有层由致密的结缔组织构成,无明显的炎性细胞浸润;模型组大鼠口腔黏膜破损,鳞状上皮脱落,毛细血管扩张,大量炎性细胞浸润,细胞核破裂,细胞形态改变;阳性组和口腔溃疡散高剂量组大鼠溃疡组织病变较模型组明显减轻,上皮组织趋于完整,炎性细胞浸润明显减少,细胞形态几近恢复正常;口腔溃疡散低剂量组大鼠溃疡组织病变程度较模型组减轻,炎性细胞浸润未见减少,细胞形态略有恢复。各组大鼠口腔溃疡组织病理学显微图见图1。

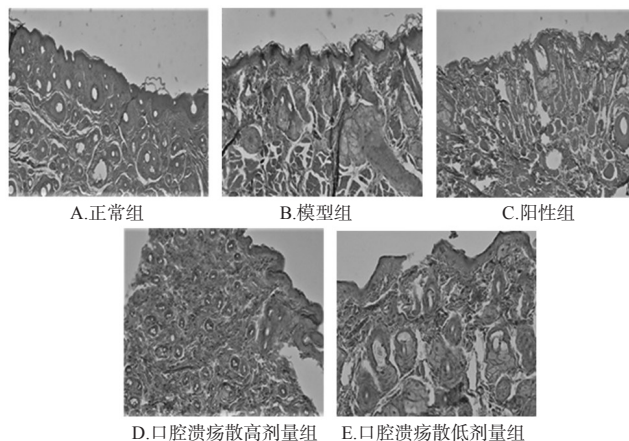


图1 各组大鼠口腔溃疡组织病理变化(HE染色,×200)

Fig 1 Histopathological changes of oral ulcer tissue of rats in each group (HE staining, ×200)

3.6 各组大鼠口腔溃疡组织中MMP-9、NF- κ B、Caspase-3、PARP蛋白表达水平检测结果

镜下可见,正常组大鼠口腔黏膜组织中未见MMP-9、NF- κ B、Caspase-3、PARP蛋白阳性表达;模型组大鼠口腔黏膜中上述蛋白呈强阳性表达,提示RAU造模成功;口腔溃疡散高剂量组大鼠口腔黏膜可见上述蛋白的少量阳性表达,阳性组和口腔溃疡散低剂量组则可见上述蛋白的部分阳性表达。IOD测定结果显示,与正常组比较,模型组IOD值显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,阳性组和口腔溃疡散各剂量组的IOD值明显降低,除口腔溃疡散低剂量组的MMP-9、NF- κ B外,其余指标差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠溃疡组织中MMP-9、NF- κ B、Caspase-3、PARP蛋白阳性表达显微图见图2~图5,蛋白表达水平测定结果见表6。

4 讨论

RAU是临床上常见的口腔黏膜疾病,可发病于口腔任何部位,有明显的灼热疼痛之感,严重影响患者饮食及语言交流,给其生活带来极大的不便;其致病因素多认为与局部创伤、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、系统性疾病、免疫、感染、环境等因素也与其发生和发展有着密切的关系^[2]。RAU致病机制复杂,目前多采用联合用药的方式进行治疗,如补充B族维生素、服用左旋咪唑等抗菌药物及免疫制剂,但治疗效果并不理想,而且长期服用

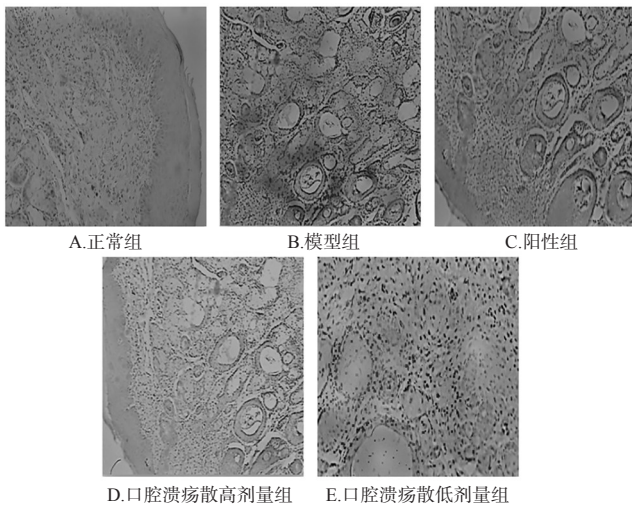


图2 各组大鼠溃疡组织中MMP-9蛋白阳性表达显微图($\times 400$)

Fig 2 Micrograph of positive expression of MMP-9 in ulcer tissue of rats in each group($\times 400$)

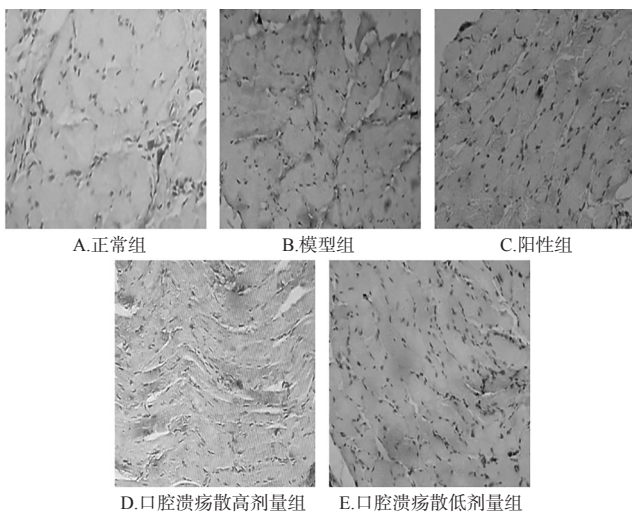


图3 各组大鼠溃疡组织中NF-κB蛋白阳性表达显微图($\times 400$)

Fig 3 Micrograph of positive expression of NF-κB in ulcer tissue of rats in each group($\times 400$)

抑菌药物还可能会导致细菌耐药。研究表明,蜘蛛毒素含有能够抑制细菌和真菌的抗菌肽,并且具有依赖性低、副作用小、抑菌活性强等优势^[4],因此本研究采用其制成的散剂进行口腔溃疡治疗效果考察。

桂林西瓜霜为中成药,与口腔溃疡散含有部分相同的药物成分,且此药为治疗RAU的常用药,临床应用广泛、安全性高,故本研究采用其作为阳性对照药品。在体外抑菌实验中结果显示,口腔溃疡散和桂林西瓜霜对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有抑制作用。大鼠口腔溃疡创面观察结果显示,与模型组比较,口腔溃疡散高剂量组大鼠的溃疡面几近愈合、组织平整,而口腔溃疡散低剂量组大鼠溃疡面部分愈合、组织凹陷程度减轻,而且大鼠口腔溃疡面积均显著缩小,表明口腔溃疡散治疗大鼠RAU效果确切。

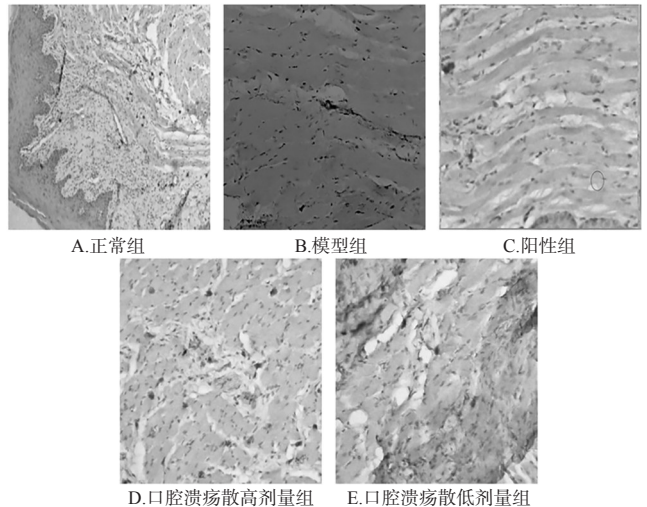


图4 各组大鼠溃疡组织中Caspase-3蛋白阳性表达显微图($\times 400$)

Fig 4 Micrograph of positive expression of Caspase-3 in ulcer tissue of rats in each group($\times 400$)

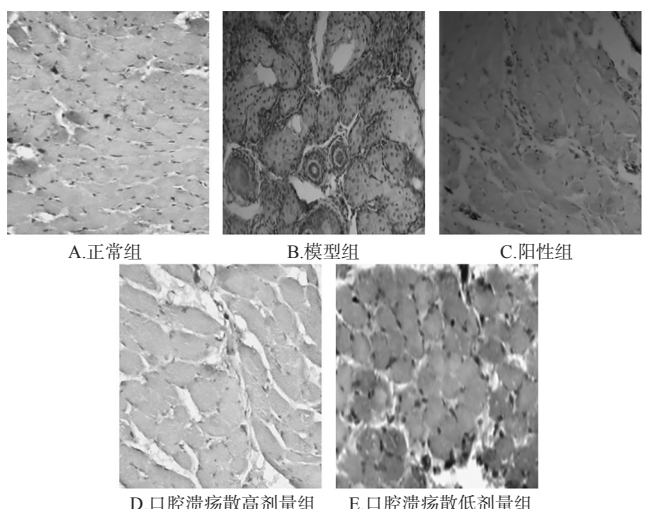


图5 各组大鼠溃疡组织中PARP蛋白阳性表达显微图($\times 400$)

Fig 5 Micrograph of positive expression of PARP in ulcer tissue of rats in each group($\times 400$)

表6 各组大鼠溃疡组织中MMP-9、NF-κB、Caspase-3、PARP蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 6 Expression levels of MMP-9, NF-κB, Caspase-3 and PARP protein in ulcer tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	MMP-9	NF-κB	Caspase-3	PARP
正常组	70.31 ± 1.25	11.77 ± 0.39	20.07 ± 2.75	13.83 ± 2.20
模型组	88.64 ± 2.23**	18.51 ± 1.61**	48.71 ± 3.10**	31.65 ± 1.87**
阳性组	80.99 ± 1.96 [#]	14.96 ± 2.00 [#]	42.99 ± 1.26 [#]	25.90 ± 4.15 [#]
口腔溃疡散高剂量组	72.82 ± 2.13 ^{###}	14.70 ± 1.62 ^{###}	32.28 ± 2.96 ^{###}	20.75 ± 3.42 ^{###}
口腔溃疡散低剂量组	85.88 ± 1.33	16.30 ± 0.28	37.27 ± 1.73 [#]	25.81 ± 0.68 [#]

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$

RAU的发生与细胞因子网络失衡有关,各种细胞因

子之间形成复杂的细胞网络因子^[10],其平衡机制十分复杂。其中,TNF- α 、IL-1、IL-6、IFN- γ 均为重要的炎症因子,在RAU的发病过程中起着重要的作用。TNF- α 在组织损伤时高表达,由单核细胞大量释放入血,进一步损害黏膜细胞,并能增加口腔血管内皮细胞通透性,引起黏膜固有层水肿^[11]。IL-6是由单核巨噬细胞、血管内皮细胞、纤维母细胞和其他细胞对IL-1和TNF- α 起反应时所合成,在机体免疫防御功能中起重要作用^[12]。也有研究表明,RAU的发病与氧化应激及抗氧化系统的失衡有关。炎症反应可干扰组织器官内的自由基代谢,促使自由基过度形成,进而导致氧化应激反应和组织细胞损伤^[13]。MDA是自由基作用所形成的氧化终产物,可反映组织的损伤程度;而SOD和GSH是生物体内重要的抗氧化物质,其变化可反映机体组织的抗氧化能力^[14]。此外,RAU的发生发展也被认为与免疫失衡有关。在人体的免疫系统中,NF- κ B被认为是免疫系统最重要的转录因子,在上皮细胞、黏膜固有层单个核细胞核中高表达^[15];MMPs参加细胞凋亡、伤口愈合等生理进程,还与炎症、溃疡等病理进程有关,其中MMP-9为明胶酶,可使层黏连蛋白与IV型胶原降解,能阻止炎症扩散与炎性细胞的浸润^[16]。通过激活NF- κ B信号通路,可上调MMP-9的表达,加速炎性细胞的浸润与转移^[17]。Caspase是一类细胞凋亡相关的蛋白酶家族,其中Caspase-3在细胞凋亡中起关键作用,一旦被激活,可触发级联反应,使凋亡不可避免地发生^[18]。此外,Caspase-3还能水解PARP,导致PARP无法正常参与DNA的损伤修复,从而诱导细胞凋亡^[19]。

本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1、IL-6、MDA水平均显著升高,IFN- γ 、SOD、GSH水平均显著降低,溃疡组织中MMP-9、NF- κ B、Caspase-3、PARP表达水平均显著升高,表明RAU造模成功。与模型组比较,阳性组和口腔溃疡散各剂量组大鼠血清和溃疡组织中上述指标均显著改善,大部分指标差异有统计学意义。

综上所述,蜘蛛毒素口腔溃疡散具有强效的抑菌、消肿、修复作用,对RAU模型大鼠有明显的治疗作用;其机制可能与降低炎症因子水平、介导凋亡因子的表达、调节免疫失衡有关。

参考文献

[1] 阴晟,严钰璋,黄腾,等.艾叶提取物对大鼠口腔溃疡的治疗作用[J].中南大学学报,2017,42(7):824-830.
 [2] 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.
 [3] 王雅蕾,郭鹏杰,王铁涵,等.小檗木蹄口腔溃疡药膜的研制与药效学分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(20):20-24.
 [4] 浦飞飞,尹松,王晓英.蜘蛛毒素的生物学活性研究进展[J].中国药理学通报,2014,30(12):1651-1654.

[5] 王梧霖,史小军,米锡阳,等.蜘蛛毒素的研究进展及其相关应用[J].现代生物医学进展,2009,9(15):2989-2998.
 [6] 王菊秀,王会明.蜘蛛枯矾散治疗口糜[J].中医外治杂志,2001,10(5):43.
 [7] 段赟,夏小军,马骏,等.复方银菊合剂对大鼠实验性口腔溃疡愈合及体外抑菌实验研究[J].中医研究,2017,30(1):70-72.
 [8] 陈卓,王金磊,庄朋伟,等.清咽滴丸治疗大鼠口腔溃疡的实验研究[J].中草药,2016,47(1):106-109.
 [9] WOLFF AC, HAMMOND ME, SCHWARTZ JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(1):118-145.
 [10] DESHMUKH RA, BAGEWADI AS. Comparison of effectiveness of curcumin with triamcinolone acetonide in the gel form in treatment of minor recurrent aphthous stomatitis: a randomized clinical trial[J]. *Int J Pharm Investig*, 2014, 4(3):138-141.
 [11] 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.
 [12] 李佳曦,汪受传,徐建亚,等.白藜芦醇对RSV感染BALB/c小鼠肺泡灌洗液TNF- α 、IL-1 β 、IL-6表达的调控趋势[J].中国中药杂志,2012,37(10):1451-1454.
 [13] 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.
 [14] 刘宏,郑艳芳,李楚源,等.口炎清颗粒对大鼠阴虚火旺型口腔溃疡的改善作用[J].中山大学学报(自然科学版),2018,57(2):131-136.
 [15] SHAH YM, MA XC, MORIMURA K, et al. Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF-kappa B target gene expression[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(4):G1114-G1122.
 [16] 谢方英,陈浙丽,高月蓝.益气养阴生肌方对复发性口腔溃疡大鼠的治疗作用及其对黏膜炎症因子和机体免疫功能的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2019,24(1):20-26.
 [17] 马秀琴,黄茂,卞涛,等.地塞米松对哮喘大鼠肺组织NF- κ B和MMP-9及TIMP-1表达的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版),2005,25(4):255-258.
 [18] 杨涛,费振海,钟兴明.Caspase家族与细胞凋亡的研究进展[J].浙江医学,2018,40(18):2083-2087.
 [19] WALSH CS. Two decades beyond BRCA1/2: homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(2):343-350.

(收稿日期:2018-11-06 修回日期:2019-03-06)
 (编辑:段思怡)