

甘草泻心汤与其配方颗粒对复发性口腔溃疡模型大鼠的药效学比较[△]

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

中图分类号 R285;R781.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2884-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.02

摘要 目的:比较甘草泻心汤与其配方颗粒对复发性口腔溃疡(ROU)模型大鼠的药效学。方法:以免疫法复制大鼠ROU模型。40只Wistar大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、左旋咪唑(17.5 mg/kg)组、甘草泻心汤(12 g/kg)组、甘草泻心汤配方颗粒(12 g/kg)组。灌胃给药,每天1次,连续20 d。酶联免疫吸附法检测大鼠血清肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-8的含量;流式细胞仪测定大鼠外周血T淋巴细胞亚群;热板法检测大鼠痛阈值。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠血清TNF- α 、IL-8含量增加,CD4⁺T细胞减少,CD8⁺T细胞增加,CD4⁺/CD8⁺比值降低,痛阈值降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,甘草泻心汤组、甘草泻心汤配方颗粒组大鼠血清TNF- α 、IL-8含量减少,CD4⁺T细胞增加,CD8⁺T细胞减少,CD4⁺/CD8⁺比值升高,痛阈值升高,差异有统计学意义($P<0.01$),且甘草泻心汤组与甘草泻心汤配方颗粒组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:甘草泻心汤及其配方颗粒具有抗炎、免疫调节和镇痛作用,对ROU模型大鼠均有较好的保护作用,两组间药效学相当。

关键词 甘草泻心汤;配方颗粒;复发性口腔溃疡;药效比较

Comparison of Pharmacodynamics between Glycyrrhizae Decoction for Purging Stomach-fire and Its Formula Granules on Model Rats with Recurrent Oral Ulcer

WANG Jin-feng, LIU Wen-hui, JING Xue-ning, CHEN Li, WANG Feng (Dept. of Western Medicine Teaching, Shandong College of TCM, Shandong Yantai 264199, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the pharmacodynamics between Glycyrrhizae decoction for purging stomach-fire and its formula granules on model rats with recurrent oral ulcer (ROU). METHODS: ROU model was induced by immunifaction. 40 Wistar rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), levamisole group (17.5 mg/kg), Glycyrrhizae decoction for purging stomach-fire group (12 g/kg) and formula granules of Glycyrrhizae decoction for purging stomach-fire group (12 g/kg). They were given medicine intragastrically once a day for consecutive 20 days. The contents of TNF- α and IL-8 were determined by ELISA. T lymphocyte subsets of peripheral blood was determined by flow cytometry and the pain threshold in rats was tested by hot plate method. RESULTS: Compared with normal control group, the serum contents of TNF- α , IL-8 and CD8⁺ cells were increased in model group, while the number of CD4⁺ cells and CD4⁺/CD8⁺ ratio and pain threshold were all decreased; there was statistical significance ($P<0.01$). Compared with model group, the serum contents of TNF- α , IL-8 and CD8⁺ cells were decreased in Glycyrrhizae decoction for purging stomach-fire and its formula granules groups, while the number of CD4⁺ cells and CD4⁺/CD8⁺ ratio and pain threshold were all increased; there was statistical significance ($P<0.01$); there was no statistical significance between Glycyrrhizae decoction for purging stomach-fire group and its formula granules group ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Both Glycyrrhizae decoction for purging stomach-fire and its formula granules have the effects of anti-inflammatory, immuno-regulation and analgesia, and both have good therapeutic effect on ROU model rats; no difference is found in pharmacodynamics between 2 groups.

KEYWORDS Glycyrrhizae decoction for purging stomach-fire; Formula granules; Recurrent oral ulcer; Pharmacodynamics comparison

中药配方颗粒是以符合炮制规范的单味中药饮片为原料,经现代化制药工艺提取精制而成的颗粒型中药,其产生源于对传统煎剂的改革,是中药饮片的创新和发展。因其具有安全高效、剂量准确、贮存方便、免煎易服、可随症加减的优点,在国内30多个省、市中的600多家医院得到广泛应用,销售额逐年上升^[1]。然而从它诞生之日起,其“单味提取,以冲代

煎”的用药方式与中药饮片混合煎煮在药效上是否等效,一直颇具争议,也是其能否被人们接受的关键所在。甘草泻心汤出自《金匮要略》,现代医家多用其煎剂治疗复发性口腔溃疡(Recurrent oral ulcer, ROU)^[2],临床效果较好。本研究以免疫法复制大鼠ROU模型,进行甘草泻心汤与其配方颗粒的药效学比较研究,旨在为甘草泻心汤配方颗粒替代传统煎剂提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

[△] 基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(No.2011-149)

* 讲师,硕士。研究方向:中西医结合治疗风湿病。E-mail: xycwan750705@163.com

FSH-2A型可调高速匀浆机(常州翔天实验仪器厂);L-530型离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);MK3型酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];GMP-9080型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);HYQ-2121A型涡旋混合器[西化仪(北京)科技有限公司];Fasc Aria™流式细胞仪(美国BD公司);RB-200型智能热板仪(成都泰盟科技有限公司)。

1.2 中药饮片

中药饮片(生甘草、黄芩、黄连、干姜、法半夏、炙甘草、党参、砂仁、蒲黄)均购自山东中医药大学附属医院,由笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

中药配方颗粒生甘草(批号:1301001S)、黄芩(批号:1301003S)、黄连(批号:1303002S)、干姜(批号:1301002H)、法半夏(批号:1301001H)、炙甘草(批号:1212004S)、党参(批号:1302002H)、砂仁(批号:1210002S)、蒲黄(批号:1210001S)均购自华润三九医药股份有限公司;左旋咪唑(山东仁和堂药业有限公司,批号:121105);肿瘤坏死因子(TNF)- α 酶联免疫吸附(ELISA)测试盒(批号:1306281)、白细胞介素(IL)-8 ELISA测试盒(批号:1306282)均购自上海西唐生物有限公司;溶血素(批号:2181917)、大鼠T淋巴细胞亚群测试盒(批号:2244980)均购自美国BD公司;弗氏完全佐剂(美国Sigma公司,批号:SLBD0736)。

1.4 动物

清洁级Wistar大鼠40只,♀♂兼半,体质量200~240 g,购自山东大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SCXK(鲁)20090001]。

2 方法

2.1 药品的制备

2.1.1 甘草泻心汤的制备 生甘草15 g、黄芩9 g、黄连9 g、干姜6 g、法半夏9 g、炙甘草15 g、党参12 g、砂仁12 g、蒲黄12 g,加入蒸馏水500 ml浸泡1 h,煎煮2次,每次30 min,两液混合后用纱布滤过,加热浓缩至66 ml,即为甘草泻心汤。生药含量为1.5 g/ml。

2.1.2 甘草泻心汤配方颗粒溶液的制备 取相当饮片剂量的配方颗粒生甘草2.5 g、黄芩1 g、黄连1.5 g、干姜2 g、法半夏1.5 g、炙甘草5 g、党参2 g、砂仁4 g、蒲黄2 g,充分溶解于66 ml无菌蒸馏水中,即得甘草泻心汤配方颗粒溶液。生药含量为1.5 g/ml。

2.2 复制模型与分组、给药

参考文献^[3],取同种异体Wistar大鼠口腔黏膜,匀浆后与等量弗氏完全佐剂混匀制成乳剂。大鼠脊柱两侧ih乳剂,每只2点,每点0.1 ml,每周1次,连续8周以复制ROU模型。40只Wistar大鼠随机均分为5组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、左旋咪唑(17.5 mg/kg)组、甘草泻心汤(12 g/kg)组、甘草泻心汤配方颗粒(12 g/kg)组,ig给药,每天1次,连续20 d。

2.3 指标的检测

2.3.1 TNF- α 、IL-8含量的测定 大鼠ig给药20 d后,以10%水合氯醛ip麻醉后腹主动脉取血5 ml,分离血清,按ELISA法测定TNF- α 、IL-8的含量。

2.3.2 大鼠外周血T淋巴细胞亚群的测定 取大鼠外周血100 μ l加入流式管底,将APC-CD3、PE-CD4、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1倍溶血素2 ml,涡旋混合器混匀后避光放置10 min,以离心半径为6.5 cm、1 000 r/min离心5 min后弃上清,2 ml PBS液清洗细胞1次,加入0.5 ml PBS液重悬细胞,上流式细胞仪测定大鼠外周血T淋巴细胞亚群。

2.3.3 热板法检测大鼠痛阈值 将大鼠放入智能热板仪中,温度调至52℃,将大鼠后足接触热板到出现舔足的时间作为痛阈值,每只大鼠检测3次,每次间隔1 h,取平均值。

2.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 两种制剂对模型大鼠一般情况的影响

免疫注射5周后大鼠口腔黏膜开始出现不同程度的充血、红肿和溃疡。溃疡呈圆形或椭圆形,多发生于唇、颊黏膜,直径约1~2 mm,边缘整齐,表面有灰黄色假膜覆盖,7~10 d后愈合,之后可再次出现。溃疡出现后,模型大鼠进食和饮水量下降,体质量减轻。ig甘草泻心汤及其配方颗粒后,模型大鼠溃疡一般5~7 d愈合,较少复发,进食和饮水量增加,体质量增加。

3.2 两种制剂对模型大鼠血清TNF- α 、IL-8含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清TNF- α 、IL-8含量增加,差异有统计学意义(P<0.01);与模型组比较,甘草泻心汤组、甘草泻心汤配方颗粒组大鼠血清TNF- α 、IL-8含量减少,差异有统计学意义(P<0.01);两制剂组间差异无统计学意义(P>0.05)。两种制剂对模型大鼠血清TNF- α 、IL-8含量的影响见表1。

表1 两种制剂对模型大鼠血清TNF- α 、IL-8含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of two preparations on the serum contents of TNF- α and IL-8 in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量,g/kg	TNF- α ,ng/L	IL-8,ng/L
正常对照组	8		32.56 \pm 3.73	264.79 \pm 24.74
模型组	8		182.42 \pm 11.63*	869.99 \pm 42.22*
左旋咪唑组	8	17.5 mg/kg	33.16 \pm 9.37*	275.31 \pm 18.95*
甘草泻心汤组	8	12	48.15 \pm 5.30*	342.78 \pm 10.34*
甘草泻心汤配方颗粒组	8	12	37.80 \pm 8.97*	303.66 \pm 31.72*

与正常对照组比较:*P<0.01;与模型组比较:*P<0.01

vs. normal control group:*P<0.01; vs. model group:*P<0.01

3.3 两种制剂对模型大鼠外周血T淋巴细胞亚群的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠CD4⁺T细胞减少,CD8⁺T细胞增多,CD4⁺/CD8⁺比值降低,差异有统计学意义(P<0.01);与模型组比较,甘草泻心汤组、甘草泻心汤配方颗粒组

大鼠CD4⁺T细胞增加, CD8⁺T细胞减少, CD4⁺/CD8⁺比值升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 两制剂组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。两种制剂对模型大鼠外周血T淋巴细胞亚群的影响见表2。

表2 两种制剂对模型大鼠外周血T淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of two preparations on T lymphocyte subsets of peripheral blood in model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量, g/kg	CD4 ⁺ , %	CD8 ⁺ , %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常对照组	8		47.76 ± 4.74	24.02 ± 2.02	1.99 ± 0.18
模型组	8		37.36 ± 3.62 [*]	32.06 ± 3.60 [*]	1.17 ± 0.08 [*]
左旋咪唑组	8	17.5 mg/kg	49.60 ± 2.07 [*]	26.10 ± 1.24 [*]	1.90 ± 0.04 [*]
甘草泻心汤组	8	12	45.82 ± 2.07 [*]	26.72 ± 2.77 [*]	1.73 ± 0.23 [*]
甘草泻心汤配方颗粒组	8	12	47.96 ± 1.51 [*]	26.30 ± 2.73 [*]	1.84 ± 0.15 [*]

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.01$

3.4 两种制剂对模型大鼠痛阈的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠痛阈下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 甘草泻心汤组、甘草泻心汤配方颗粒组大鼠痛阈升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 两制剂组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。两种制剂对模型大鼠痛阈的影响见表3。

表3 两种制剂对模型大鼠痛阈的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of two preparations on the pain threshold of model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量, g/kg	痛阈值, s
正常对照组	8		12.07 ± 1.26
模型组	8		4.13 ± 0.66 [*]
左旋咪唑组	8	17.5 mg/kg	10.54 ± 1.33 [*]
甘草泻心汤组	8	12	8.04 ± 2.01 [*]
甘草泻心汤配方颗粒	8	12	9.18 ± 1.96 [*]

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.01$

4 讨论

ROU 发病率居口腔黏膜病首位, 以见于唇、舌、颊黏膜等部位的溃疡为主要临床表现, 常反复发作, 病程较长, 影响患者的饮食、语言和工作。其病因不清, 传统医学认为外邪、情志、饮食导致湿热蕴结是发病的主要因素, 脾胃虚弱是反复发作的内在基础, 病机特点是虚实夹杂, 寒热错杂。现代医学认为ROU的发生与免疫、遗传、生物感染、精神压力、微量元素缺乏等因素相关。一般认为ROU与细胞免疫功能异常和T淋巴细胞亚群失衡密切相关。T淋巴细胞主要包括CD4⁺辅助-诱导亚群和CD8⁺杀伤-抑制亚群, 亚群之间相互平衡, 维持机体的免疫平衡, 此平衡被打破可能直接参与溃疡的形成^[4]。本研究通过免疫法复制大鼠ROU模型, 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清TNF- α 、IL-8含量增加, CD4⁺T细胞减少, CD8⁺T细胞增多, CD4⁺/CD8⁺比值降低, 痛阈下降, 说明ROU的发生与T淋巴细胞亚群失衡和炎症细胞因子TNF- α 、IL-8增加有关。

治疗ROU选用经方《金匮要略》之甘草泻心汤加减, 药用生甘草、黄芩、黄连、干姜、法半夏、炙甘草、党参、砂仁、蒲黄。

方中重用生、炙甘草扶正祛邪, 生甘草合黄芩、黄连清热解毒, 炙甘草合党参、干姜、砂仁健脾补中, 芩连配姜夏辛开苦降平调寒热。现代药理研究证明, 甘草有良好的黏膜修复剂, 其重要活性成分甘草酸有双向免疫调节作用^[5], 炙甘草乙醇提取物可降低脂多糖处理的小鼠血浆TNF- α 和IL-6水平, 促进IL-10生成^[6], 甘草超临界CO₂提取物可抑制脂多糖诱导的巨噬细胞产生IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF- α , 体外抑制人全血中的前炎性细胞因子分泌^[7-10]; 黄芩、黄连可抗炎、镇痛、调节免疫; 党参作为人参的替代品, 可抗溃疡、镇痛、增强免疫力; 半夏、干姜、砂仁、蒲黄均有抗炎、镇痛作用。诸药合用使甘草泻心汤具有抗炎、免疫调节和镇痛作用。研究结果表明, 经甘草泻心汤及其配方颗粒ig给药后, ROU模型大鼠血清TNF- α 、IL-8含量明显下降, CD4⁺T细胞数量明显增加, CD8⁺T细胞数量明显减少, CD4⁺/CD8⁺比值明显升高, 大鼠痛阈升高; 虽然甘草泻心汤配方颗粒组较甘草泻心汤组更接近正常对照组, 但组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

综上所述, 甘草泻心汤及其配方颗粒具有抗炎、免疫调节和镇痛作用, 对ROU模型大鼠均有较好的治疗作用, 在药效上配方颗粒可以替代煎剂。但动物模型不能替代人体, 今后需在药效学研究的基础上进一步进行临床疗效比较研究, 以推广中药配方颗粒在临床的应用。

参考文献

- [1] 孙源源, 施萍. 借助中药配方颗粒推进中药国际化的对策研究[J]. 中草药, 2013, 44(8): 929.
- [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] 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.
- [4] 李秉琦. 口腔黏膜病学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 49.
- [5] 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.
- [6] 孙鹏, 付小兵. 淋巴细胞、细胞因子与复发性阿弗他溃疡[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(2): 180.
- [7] 刘丽萍, 任翠爱, 赵宏艳. 甘草酸的免疫调节作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 272.
- [8] Kim JK, Oh SM, Kuon HS, et al. Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(3): 1 215.
- [9] Bodet C, La VD, Gafner S, et al. A licorice extract reduces lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine secretion by macrophages and whole blood [J]. *J Periodontol*, 2008, 79(9): 1 752.
- [10] 黄春林, 朱晓新. 中药药理与临床手册[M]. 1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 30.

(收稿日期: 2014-01-07 修回日期: 2014-02-15)