

穿心莲提取物对口腔溃疡豚鼠细胞因子表达的影响

张辉¹, 方远书¹, 袁颖儿¹, 周越², 何忠平¹ (1.金华市食品药品检验检测研究院, 浙江 金华 321000; 2.金华市中心医院, 浙江 金华 321000)

摘要: 目的 探讨穿心莲提取物(*Andrographis Paniculata* extract, APE)对口腔溃疡豚鼠细胞因子表达的影响。方法 用90%苯酚溶液灼烧豚鼠左侧面颊, 造成口腔溃疡模型, 观察 APE 对口腔溃疡豚鼠溃疡面积、溃疡程度及组织病理变化, 给药 5 d 后测定血清肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达。结果 用苯酚溶液制作豚鼠口腔溃疡模型成功, 与模型组比较, 高剂量 APE 外用组和桂林西瓜霜组均可显著减小溃疡面积($P<0.01$), 明显改善口腔溃疡程度和溃疡的病理变化, 显著降低血清 TNF- α 水平($P<0.01$)和 IL-6 水平($P<0.01$), VEGF 表达有显著差异($P<0.01$), 且 2 组间无显著差异。结论 APE 对口腔溃疡豚鼠有治疗作用。

关键词: 穿心莲提取物; 口腔溃疡豚鼠; TNF- α ; IL-6; VEGF

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)09-1134-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.010

Effect of *Andrographis Paniculata* Extract on the Expression of Cytokines in Oral Ulcer Guinea Pigs

ZHANG Hui¹, FANG Yuanshu¹, QIU Yinger¹, ZHOU Yue², HE Zhongping¹ (1.Jinhua Institute for Food and Drug Control, Jinhua 321000, China; 2.Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discuss the effect of *Andrographis paniculata* extract (APE) on the expression of cytokines in oral ulcer guinea pigs. **METHODS** Oral ulcer model of guinea pig was induced by burning the left cheek with 90% phenol solution. Effects of APE on ulcer area, ulcer degree and ulcer tissue pathological changes of oral ulcer guinea pigs were observed. Expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum were determined after administered continuously for 5 d. **RESULTS** Oral ulcer model of guinea pigs was induced by phenol solution successfully. Compared with the model group, the high dosage of APE external group and the Guilin Watermelon Frost group could significantly decrease ulcer area($P<0.01$), significantly improve the degree of oral ulcer and the pathological changes of ulcer, significantly reduce levels of TNF- α and IL-6($P<0.01$) and significantly express difference of VEGF ($P<0.01$), there was no significant difference between the two groups. **CONCLUSION** APE has therapeutic effect on oral ulcer guinea pigs.

KEY WORDS: *Andrographis Paniculata* extract; oral ulcer guinea pig; TNF- α ; IL-6; VEGF

穿心莲是爵床科穿心莲属植物[*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees], 是一味常用的清热中药, 提取物中主要成分为内酯和黄酮类, 有效成分主要为内酯, 有良好的清热消炎作用, 素有“中药抗菌素”之美誉。现代药理学研究表明, 穿心莲内酯具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、免疫调节及肝保护作用^[1], 为穿心莲的进一步开发和临床应用开辟了广阔前景, 但是, 目前针对穿心莲提取物(*Andrographis paniculata* extract, APE)治疗口腔溃疡的基础性研究, 鲜见报道。本研究通过观察口腔溃疡豚鼠用 APE 治疗后, 血清中 TNF- α 、IL-6 和 VEGF 水平的变化来探讨 APE 对豚鼠口腔溃疡可能的治疗机制, 为临床治疗提供

一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物

穿心莲提取物[(HPLC 测定穿心莲内酯为 87.6%), 浙江九旭药业有限公司, 批号: 131205]; 桂林西瓜霜(桂林三金药业股份有限公司, 批号: 1406036)。

1.2 动物

普通级豚鼠, 体质量(300 $\pm$ 30)g, $\text{♀}\text{♂}$ 各半, ♀ 鼠未孕, 由湖州城区西凤洋特种经济动物养殖场提供, 合格证号: SCXK(浙)2013-0060。

1.3 试剂

氯化钠注射液(安徽双鹤药业有限责任公司生

基金项目: 金华市科技局社发一般项目(2013-3-087)

作者简介: 张辉, 男, 硕士, 主管药师 Tel: 13957962646 E-mail: 13957962646@163.com

产, 规格: 每 500 mL 含氯化钠 4.5 g, 批号: 1209281T); 苯酚(杭州双林化工试剂厂生产, 批号: 20110406); 甲醛(衢州巨化试剂有限公司, 批号: 20070202); 冰乙酸(分析纯, 上海联试化工试剂有限公司, 批号: 20140617); 豚鼠 TNF- α 酶联免疫分析试剂盒、豚鼠 IL-6 酶联免疫分析试剂盒、豚鼠 VEGF 酶联免疫分析试剂盒(均为上海邦奕生物科技有限公司生产, 批号: 201412)。

1.4 仪器

352 型酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan MS); AC8 型洗板机(芬兰 Thermo Labsystems); TG16-W 型微量高速离心机(上海穗康仪器有限公司); GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.5 方法

取 10 只豚鼠作为空白组, 另取 60 只豚鼠造口腔溃疡模型, 用乙醚麻醉, 将一小棉球置于直径为 5 mm 的玻璃管一端(与管口平齐), 将玻璃管塞棉球的一端蘸 90% 苯酚溶液, 灼烧豚鼠左侧面颊 60 s^[2]。空白组豚鼠麻醉后, 用塞棉球的玻璃管蘸生理盐水后放在豚鼠左侧面颊 60 s。24 h 后观察, 取造模成功的豚鼠, 分模型组、桂林西瓜霜组、高剂量 APE 外用组(30 mg·kg⁻¹)、低剂量 APE 外用组(10 mg·kg⁻¹)、APE 灌胃组(20 mg·kg⁻¹), 每组 10 只, APE 用植物油(按 5:3)调成糊状供外用和灌胃给药, 每天上午 9 时和下午 16 时用消毒棉球吸取相应药糊涂覆于豚鼠口腔溃疡处, 保持 3 min, 灌胃组同时灌胃给药, 模型组和空白组涂予生理盐水, 每天分别肉眼观察各组豚鼠口腔溃疡程度。连续用药 5 d 天后, 每组豚鼠眼眶取血, 室温血液自然凝固 10~20 min, 离心 20 min 左右(2 000~3 000 r·min⁻¹), 仔细收集上清, 按照细胞因子 Elisa 试剂盒要求用双抗体夹心法测定血清 TNF- α 、IL-6、VEGF。然后处死各组豚鼠, 取下口腔溃疡局部组织, 福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 镜检, 观察组织形态情况。

1.6 统计学方法

数据分析用 SPSS 17.0 统计软件进行数据资料的统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验, 组间两两比较用 LSD。

2 结果

2.1 造模结果

造模前豚鼠体质量增加, 活动灵活, 食欲良

好, 背毛光泽, 大便正常, 小便淡黄。造模 24 h 后豚鼠左侧口腔黏膜上均形成圆形或椭圆形直径约 5 mm 的溃疡, 唇边潮湿伴有不同程度的充血和水肿, 表面覆盖灰白或黄色假膜, 活动量、摄食量、饮水量减少, 大便较稀, 说明造模成功, 空白组口腔黏膜未见异常。

2.2 APE 对口腔溃疡豚鼠溃疡面积和溃疡程度的影响

第 1 天: 溃疡形成后, 模型组有溃疡病理损伤, 局部伴有红肿。第 2 天: 模型组用游标卡尺测得溃疡直径增大为 6~7 mm, 红肿明显, 用药各组溃疡面积无较大变化, 组织红肿稍轻于模型组。第 3~4 天: 溃疡表面坏死, 局部结痂(模型组要明显严重于用药各组)。第 5 天: 溃疡表面痂膜开始脱落, 组织创面暴露新生肉芽组织, 表明溃疡好转, 溃疡面开始愈合和逐渐缩小。高剂量 APE 外用组和桂林西瓜霜组的创面愈合情况明显好于模型组, 溃疡面积明显小于模型组。低剂量 APE 组对口腔溃疡程度减轻不明显, 仍有红肿可见。结果见表 1。

表 1 APE 对口腔溃疡豚鼠溃疡面积的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of APE on the ulcer area of the oral ulcer guinea pigs($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	溃疡面积/mm ²		
	1 d	3 d	5 d
空白组	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
模型组	25.4±2.7	18.3±2.3	11.8±2.5
桂林西瓜霜组	25.6±3.1	14.8±2.2 ¹⁾	4.9±0.9 ¹⁾
高剂量 APE 外用组	25.4±2.5	14.4±1.9 ¹⁾	5.8±1.1 ¹⁾
低剂量 APE 外用组	25.2±2.7	16.9±2.2 ⁴⁾	10.0±1.7 ²⁾³⁾
APE 灌胃组	25.6±2.3	15.8±1.4 ¹⁾	7.3±1.4 ¹⁾³⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; 与桂林西瓜霜组比较, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with model group ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; compared with Guilin Watermelon Frost group, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

2.3 APE 对口腔溃疡豚鼠细胞因子的影响

上述分离出的血清用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度, 通过标准曲线计算样品中豚鼠相应细胞因子的浓度, 结果见表 2。

与空白组比较, 模型组血清中 TNF- α 、IL-6 显著升高($P<0.01$), 炎症因子表达强烈, 用药各组的 TNF- α 、IL-6 含量逐渐下降, 炎症因子表达受到不同程度的下调。与模型组比较, 高剂量 APE 外用组和桂林西瓜霜组均可显著降低豚鼠血清中

TNF- α 、IL-6 水平($P<0.01$), 2 组降低效果无显著差异。APE 灌胃组 TNF- α 、IL-6 含量明显降低($P<0.05$), 但低剂量 APE 外用组降低不明显。

表 2 APE 对口腔溃疡豚鼠细胞因子的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of APE on the expression of cytokines in oral ulcer guinea pigs($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	VEGF/ng·L ⁻¹
空白组	128.90 $\pm$ 12.47 ³⁾	85.46 $\pm$ 9.42 ³⁾	164.18 $\pm$ 13.20 ³⁾
模型组	193.22 $\pm$ 17.85 ¹⁾	129.43 $\pm$ 12.37 ¹⁾	262.66 $\pm$ 18.94 ¹⁾
桂林西瓜霜组	142.98 $\pm$ 12.92 ²⁾³⁾	95.98 $\pm$ 8.50 ²⁾³⁾	184.40 $\pm$ 14.70 ²⁾³⁾
高剂量 APE 外用组	146.84 $\pm$ 16.72 ²⁾³⁾	103.74 $\pm$ 10.26 ¹⁾³⁾	196.01 $\pm$ 17.21 ¹⁾³⁾
低剂量 APE 外用组	185.26 $\pm$ 15.07 ¹⁾⁵⁾	125.98 $\pm$ 10.15 ¹⁾⁵⁾	247.58 $\pm$ 19.30 ¹⁾
APE 灌胃组	176.95 $\pm$ 15.40 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	117.73 $\pm$ 9.81 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	224.47 $\pm$ 18.99 ¹⁾³⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.05$; 与桂林西瓜霜组比较, ⁵⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$; compared with model group, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.05$; compared with Guilin Watermelon Frost group, ⁵⁾ $P<0.01$.

与空白组比较, 模型组血清中 VEGF 显著升高($P<0.01$), 调控机体对溃疡的修复能力, 用药各组逐渐不同程度下调 VEGF 含量。与模型组比较, 高剂量 APE 外用组、APE 灌胃组和桂林西瓜霜组均有显著性差异($P<0.01$), 低剂量 APE 外用组差异不明显。

2.4 APE 对豚鼠口腔溃疡组织病理变化的影响

HE 染色光镜观察: 空白组豚鼠口腔黏膜为鳞状上皮覆盖, 上皮完整, 固有层为致密的结缔组织, 毛囊腺体下面为肌组织; 模型组黏膜周围毛细血管充血扩张, 血管内皮细胞微肿有大量炎性细胞浸润溃烂, 黏膜上皮细胞坏死脱落; 用药各组的溃疡程度和局部病理变化与药物抗炎效果、免疫功能恢复情况呈正相关。高剂量 APE 外用组及桂林西瓜霜组口腔黏膜溃疡明显缩小, 溃疡面逐渐被新生肉芽组织修复, APE 灌胃组和低剂量

APE 外用组口腔黏膜溃疡缩小, 有肉芽组织出现。与模型组比较, 高剂量 APE 外用组及桂林西瓜霜组均可显著减轻口腔溃疡程度, 改善口腔溃疡病理损伤, 明显促进豚鼠口腔溃疡的恢复。

3 讨论

口腔溃疡是常见多发的黏膜病症。病因复杂, 发病机制不清, 临床以局部外用治疗为主, 治疗药物以清热解毒中药为主, 如西瓜霜、两面针、双黄连等。外用中药治疗创伤具有通过增加创面毛细血管的通透性, 促进创面血液循环, 改善创面组织的微循环, 提高局部活性物质的活性等机制促进创伤的愈合, 通过对生长因子的调节, 调整胶原蛋白的构成比例等方式减少疤痕组织的形成^[3]。穿心莲作为典型的清热解毒类中药, 研究外用对创伤性口腔溃疡的疗效并探讨其作用机制正是本实验的目的。

目前报道口腔溃疡模型的制备方法有多种, 其中包括免疫诱导法、创伤性、细菌感染诱导等, 所选动物主要有豚鼠、兔、大鼠、小鼠、金黄地鼠等。创伤性口腔溃疡动物模型较为适合炎症引起的口腔溃疡, 但这类模型自愈性快, 用药时间不易过长^[4], 对于观察药物的疗效有一定的限制性。本研究选用豚鼠造模是因豚鼠口腔与人的更相近, 并用 90%苯酚灼烧法建立口腔溃疡模型, 简便易行, 可形成类似于人类的口腔溃疡, 适合大规模动物实验^[5], 通过观察愈合情况, 为临床局部用药提供科学依据。

设计 APE 剂量是按照预实验的治疗情况、模型自愈情况、同阳性药物治疗效果比较等方面调整而来, 由于局部外用限制了用量, 用量过大造成流失或脱落, 用量少又起不到治疗效果, 本研究按 1 天给药 2 次保证药效, 给药时 APE 用植物油(按 5:3)调成糊状可保证药物具有很好的黏附性。

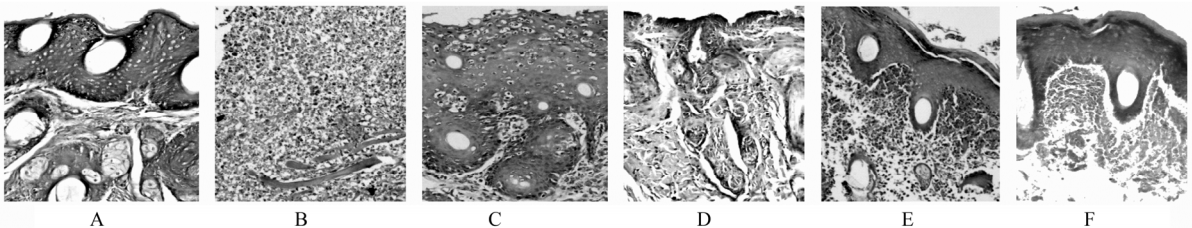


图 1 APE 对豚鼠口腔溃疡模型病理变化的影响(100 $\times$)

A-空白组; B-模型组; C-桂林西瓜霜组; D-高剂量 APE 外用组; E-APE 灌胃组; F-低剂量 APE 外用组。

Fig. 1 Effect of APE on pathological changes of guinea pig model of oral ulcer(100 $\times$)

A-control group; B-model group; C-Guilin Watermelon Frost group; D-high dosage of APE external group; E-APE gavage group; F-low dosage of APE external group.

模型组血清中 TNF- α 较空白组显著升高,说明模型组有显著炎症症状, TNF- α 参与了溃疡的发展过程,是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎性介质,使血管内皮细胞通透性增加,调节其他组织代谢活性并促使其他细胞因子的合成和释放^[6],并且 TNF- α 升高程度与口腔溃疡的严重程度呈正相关。用药各组的 TNF- α 逐渐下降,说明用药组炎症得到不同程度控制。模型组血清中 IL-6 较空白组也显著升高,提示促炎细胞因子 IL-6 参与免疫应答,是炎症反应的促发剂,使细胞免疫功能紊乱。IL-6 可能是反映疾病活动状态或许还有预后作用的临床指标^[7]。模型组血清中 VEGF 较空白组显著升高,与溃疡局部症状呈正相关,表明炎症形成过程中分泌较多的 VEGF^[8],它可能是促进溃疡愈合的修复因子,起到关键性作用,并随着症状的减轻,其表达也随之下调,相反,其表达越高,预示着口腔溃疡创面的损伤越严重^[9]。从实验结果来看,高剂量 APE 外用组和桂林西瓜霜组的治疗效果没有差异,说明 APE 有显著抗炎,调控细胞因子作用。

口腔溃疡面积变化和溃疡黏膜局部充血水肿程度变化可直观反映溃疡病理损伤情况,血清中 TNF- α 、IL-6 可直接反映口腔溃疡炎性介质的释放情况,血清中 VEGF 水平可间接反映溃疡修复的能力,组织病理学检查可反映口腔溃疡局部炎症细胞浸润程度和口腔溃疡愈合情况。综上所述,本实验结果提示,APE 促进溃疡愈合是通过有效减轻口腔溃疡充血水肿程度、显著抑制 TNF- α 、

IL-6 的释放,显著调控 VEGF 的表达,来加强机体的防御机制,提高机体免疫力实现的。APE 疗效确切,为临床口腔溃疡提供了一种简易有效的治疗方法。

REFERENCES

- [1] 尹青,邓明明.穿心莲内酯抗炎作用研究进展[J].广东医学,2014,35(5):786-788.
- [2] TANG P P, BAI M, GUO X F, et al. External curative effect of mugwort water decoction in oral ulceration guinea pig model [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2012, 27(5): 1286-1289.
- [3] LI L J, ZHANG Y, PENG L H, et al. Research progress of chinese medicine based on topical preparations for treating skin wound [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(10): 1285-1288.
- [4] 苗明三,徐玉茵,刘会丽.口腔溃疡动物模型研究进展[J].中医药学刊,2006,24(9):1636-1637.
- [5] WANG X X, PING J Y, WANG J, et al. Effect evaluation and experience in using chemical inustion [J]. J Chin Tradit Chin Med Inform(中国中医药咨询), 2012, 4(4): 518
- [6] HU S P, WANG Y, YU P Y, et al. Study on *in vitro* anti-inflammatory mechanism of the essential component of Huanglian Jiedu decoction [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(10): 1171-1174.
- [7] 吴国庆,刘旭盛.细胞因子在急性胰腺炎发病中的作用[J].中华肝胆外科杂志,2005,11(1):49-52.
- [8] LI K, JIA L L, LI H Y, et al. Effects of Huanglian Ejiao decoction with different decoction methods on mouth ulcer rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2014, 32(1): 41-42.
- [9] ZHENG W W. Study on the relationship between splenogastric hydropyrexia syndrome of ROU and VEGF, TNF- α and influence on koukuifang [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2008.

收稿日期:2016-01-26

丹参多酚酸盐对胶质瘤 U251 细胞增殖及凋亡的影响

张文静, 张小林*, 蒋峰(温州医科大学附属舟山医院, 浙江 舟山 316021)

摘要:目的 研究丹参多酚酸盐对胶质瘤 U251 细胞增殖及凋亡的影响,并探讨其发生机制。方法 应用 CCK-8 试剂盒检测丹参多酚酸盐对 U251 细胞增殖的影响,流式细胞仪观察丹参多酚酸盐对 U251 细胞周期及细胞凋亡的影响,qRT-PCR 检测自噬基因 Beclin-1 的表达。结果 丹参多酚酸盐可明显抑制胶质瘤 U251 细胞增殖,使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,促进细胞凋亡,上调自噬基因 Beclin-1 mRNA 的表达。结论 丹参多酚酸盐可抑制胶质瘤 U251 细胞生长,诱导细胞发生凋亡,促凋亡效应可能与自噬基因 Beclin-1 mRNA 表达增多有关。

基金项目:舟山市医药卫生科技计划项目(2012B14, 2013A06)

作者简介:张文静,女,硕士,住院医师 Tel: (0580)2292858
Tel: (0580)2292755 E-mail: syzxlin@qq.com

E-mail: fizwjing@qq.com

*通信作者:张小林,男,硕士,主治医师