

马齿苋提取物治疗大鼠口腔溃疡的疗效及其对细胞免疫、炎症因子的影响

欧江勇, 郑丽明, 王 栋

[摘要] **目的:** 观察马齿苋提取物治疗大鼠口腔溃疡的疗效, 初步探讨其对大鼠细胞免疫、炎症因子的影响, 以为临床用药提供参考。**方法:** 采用抗原乳化液方法建立大鼠口腔溃疡模型, 实验设有空白对照组、模型对照组(不给予药物处理)、口腔溃疡散组(6% 口腔溃疡散混悬液涂抹)以及马齿苋提取物组(0.24 g/mL 马齿苋水溶液灌胃), 每组 8 只大鼠。观察各组大鼠口腔溃疡数目、持续时间以及治疗效果。比较各组大鼠的血清干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-2 (IL-2) 水平以及 T 细胞亚群水平变化情况。**结果:** 各组大鼠口腔溃疡数目、持续时间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 且马齿苋提取物组显著低于口腔溃疡散组和模型对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 口腔溃疡散组显著低于模型对照组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。口腔溃疡散组小鼠治疗效果优于模型对照组, 马齿苋提取物组小鼠治疗效果优于口腔溃疡散组与模型对照组 ($P < 0.05$)。各组大鼠炎症因子水平差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 且血清 IFN- γ 水平, 模型对照组显著低于空白对照组, 口腔溃疡散组与马齿苋提取物组明显高于模型对照组, 马齿苋提取物组高于口腔溃疡散组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 血清 TNF- α 和 IL-2 水平, 模型对照组较空白对照组明显升高, 口腔溃疡散组、马齿苋提取物组低于模型对照组 ($P < 0.01$), 马齿苋提取物组与口腔溃疡散组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠 T 淋巴细胞亚群水平差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 且模型对照组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平显著低于空白对照组, CD8⁺ 水平显著高于空白对照组 ($P < 0.01$); 口腔溃疡散组与马齿苋提取物组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平均高于模型组, 而 CD8⁺ 均低于模型对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 马齿苋提取物组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平均明显高于口腔溃疡散组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。**结论:** 马齿苋提取物可有效缩短大鼠溃疡持续时间, 减少溃疡数目, 提高溃疡治疗效率。其机制可能是通过增强机体免疫功能以治疗复合性口腔溃疡。

[关键词] 口腔溃疡; 马齿苋提取物; 口腔溃疡散; 炎症因子; T 淋巴细胞

[中图分类号] R 781.5

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.07.004

Efficacy of purslane extract in the treatment of oral ulcer, and its effects on cellular immunity and inflammatory factors in rats

OU Jiang-yong, ZHENG Li-ming, WANG Dong

(Department of Stomatology, Changping Hospital of Dongguan, Dongguan Guangdong 523573, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effects of purslane extract on oral ulcer, and explore its effects on cellular immunity and inflammatory factors in rats, to provide reference for clinical drug use. **Methods:** The rat oral ulcer model was established by antigen emulsion method. The rats were divided into the blank control group, model control group (no medication), oral ulcer powder group (treatment with oral ulcer powder suspension painting) and purslane extract group (treatment with purslane solution gavage) (8 rats each group). The number, duration and therapeutic effect of oral ulcer in all groups were observed. The levels of serum interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and T cell subsets were compared among all groups. **Results:** The differences of the number and duration of oral ulcer among all groups were statistically significant ($P < 0.01$), which in purslane extract group were significantly lower than those in oral ulcer powder group and model control group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$), and which in oral ulcer powder group was significantly lower than that in model control group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). The therapeutic effect in oral ulcer powder group was better than that in model control group, and which in purslane extract group was better than that in oral ulcer powder group and model control group ($P < 0.05$). The differences of the serum levels of inflammatory factors among all groups were statistically significant ($P < 0.01$), the serum level of IFN- γ in model control group was significantly lower than that in blank control group, the serum levels of IFN- γ in oral ulcer powder group and purslane extract group were significantly higher than that in model control group, and the serum level of IFN- γ in purslane extract group was higher than that in oral ulcer powder group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). The serum levels of TNF- α and IL-2 in model control group significantly increased compared with the blank control group, which in oral ulcer powder group and purslane extract group were lower than those in model control

[收稿日期] 2018-08-08 [修回日期] 2019-07-05

[基金项目] 广东省东莞市社会发展(一般)项目 (201750715035089)

[作者单位] 广东省东莞市常平医院 口腔科, 523573

[作者简介] 欧江勇(1983-), 男, 主治医师。

group ($P < 0.01$), and the differences of the serum levels of TNF- α and IL-2 between oral ulcer powder group and purslane extract group were not statistically significant ($P > 0.05$). The differences of the T lymphocyte subsets levels among all groups were statistically significant ($P < 0.01$), the levels of CD3⁺、CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in model control group were significantly lower than those in blank control group, and the serum level of CD8⁺ in model control group was significantly higher than that in blank control group ($P < 0.01$). The serum levels of CD3⁺、CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in oral ulcer powder group and purslane extract group were higher than those in model control group ($P < 0.01$), the serum levels of CD8⁺ in oral ulcer powder group and purslane extract group were lower than that in model control group ($P < 0.01$), and the serum levels of CD3⁺、CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in purslane extract group were significantly higher than those in oral ulcer powder group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). **Conclusions:** The purslane extract can effectively shorten the duration of ulcer, reduce the number of ulcers, and improve the efficiency of ulcer treatment. Its mechanism may be related to enhance the immune function of body.

[**Key words**] oral ulcer; purslane extract; oral ulcer powder; inflammatory factor; T lymphocyte

复发性口腔溃疡 (recurrent oral ulcer, ROU) 是常见的口腔损伤性疾病, 调查^[1]显示人群中 10% ~ 25% 患有此病, 且女性好发于男性。ROU 临床表现主要有剧烈疼痛、灼热难忍等, 对病人生活造成了极大的困扰。免疫功能低下的病人, 一旦患有口腔溃疡, 往往反复发作, 病期延长^[2]。ROU 的发病机制错综复杂, 目前临床上尚无统一定论, 但有研究^[3]显示, 免疫因素尤其是 T 细胞免疫在 ROU 的发生中有着重要作用。还有研究^[4-5]表明, 在 ROU 发病过程中, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 异常释放, 而 TNF- α 具有调节免疫的功能, 其异常释放可致病人发生口腔溃疡。目前临床上主要采取中医、西医加饮食调理等对症治疗的方法。近年来, 有研究^[6]报道, 马齿苋在治疗 ROU 方面具有一定疗效。马齿苋为一年生肉质草本植物, 我国各地均产, 为药食两用植物, 其营养丰富。中药马齿苋具有清热解毒、散血消肿、止血凉血、杀菌抗炎等功效。现代药理学研究^[7-9]表明, 马齿苋能够增强组织修复, 促进溃疡愈合, 此外, 还可降低血糖浓度, 增强抗炎、抗菌能力, 提高机体免疫力等。鉴于此, 本研究通过观察马齿苋提取物治疗大鼠口腔溃疡的疗效, 初步探讨其对大鼠细胞免疫、炎性因子的影响, 以期为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性成年 SD 大鼠, 质量 (260 \pm 28) g, 由广东医学动物实验中心提供, 用全价饲料喂养, 自由饮水, 室温 (20 \pm 2) $^{\circ}$ C, 合格证: 44007200042896。

1.2 药物与试剂 马齿苋提取物 (陕西中医学院附属医院中药房提供), 水煎成浓度约为 0.24 g/mL 的马齿苋水溶液, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存待用。口腔溃疡散 (北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂, 国药准

字 Z11020184), 用蒸馏水制备成浓度为 6% 的悬浮液, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存待用。白细胞介素-2 (IL-2)、TNF- α 、干扰素- γ (IFN- γ) ELISA 试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司); 完全弗氏佐剂 (sigma, 9007-81-2); PBS 缓冲液; 0.9% 氯化钠溶液。

1.3 主要仪器 高速离心机 (美国赛默飞公司); MODEL-550 型酶标仪 (美国 bio rad 公司); BD FACSCalibur 型全自动分析流式细胞仪 (山东莱索科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 口腔溃疡大鼠模型制备 参照文献^[10]报道制备大鼠口腔溃疡模型。采集口腔黏膜: 将 5 只雄性 SD 大鼠拉颈处死, 剥取口腔黏膜层, 并将其剪碎进行组织匀浆, 放置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用; 制备抗原乳化液: 取一定量的组织匀浆和完全弗氏佐剂分别装于容器中, 充分混合形成抗原乳化剂, 且放置后不出现分层现象; 模型制备: 在大鼠脊柱两侧分别皮下注射 0.1 mL 的抗原乳化液, 每 2 周注射 1 次, 累计共 5 次。

1.4.2 分组及给药 取 32 只 SD 大鼠进行实验研究, 随机选取 8 只作为正常对照组, 其余 24 只大鼠按上述方法制备口腔溃疡大鼠模型。模型成功后, 随机分为模型对照组、口腔溃疡散组和马齿苋提取物组, 每组大鼠 8 只。其中正常对照组和模型对照组不给予药物处理, 正常饲养; 口腔溃疡散组利用消毒棉签涂抹 1 mL 的口腔溃疡散混悬液 (6%), 1 次/天, 连续给药 7 d; 马齿苋提取物组给予灌胃 4 mL 的马齿苋水溶液 (0.24 g/mL), 1 次/天, 连续给药 7 d。观察大鼠症状体征变化, 第 14 天处死大鼠, 并取血样进行测定。

1.5 观察指标 (1) 观察各组大鼠口腔溃疡数目、持续时间。(2) 对各组大鼠治疗后的疗效评价, 痊愈: 治疗后, 口腔溃疡面完全愈合; 显效: 治疗后, 口

腔溃疡面显著缩小 $>2/3$, 局部红肿消退; 无效: 治疗后, 口腔溃疡面及症状均未改善; 将痊愈、显效归纳为总有效率。(3) 采用 ELISA 法和 MODEL-550 酶标仪测定血清 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 水平。(4) 采用 BD FACSCalibur 型全自动分析流式细胞仪测定大鼠 T 淋巴细胞亚群。

1.6 统计学方法 采用方差分析、 q 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 大鼠口腔溃疡数目、持续时间情况 各组大鼠口腔溃疡数目、持续时间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 且马齿苋提取物组大鼠的口腔溃疡数目及持续时间显著低于口腔溃疡散组和模型对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 口腔溃疡散组显著低于模型对照组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 各组口腔溃疡大鼠溃疡数目、持续时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	持续时间/d	溃疡数目/个
模型对照组	8	6.3 \pm 1.6	7.9 \pm 1.9
口腔溃疡散组	8	4.7 \pm 1.3*	3.8 \pm 1.2**
马齿苋提取物组	8	3.1 \pm 0.8***	1.6 \pm 0.6***
F	—	12.56	45.35
P	—	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	—	1.630	1.803

q 检验: 与模型对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与口腔溃疡散组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 不同药物对大鼠口腔溃疡的治疗效果 马齿苋提取物组小鼠治疗效果优于口腔溃疡散组与模型对照组, 口腔溃疡散组小鼠临床效果优于模型对照组 ($P < 0.05$) (见表 2)。

表 2 不同药物对大鼠口腔溃疡的治疗效果比较 [n ; 百分率 (%)]

分组	n	痊愈	显效	无效	总有效率	Z	P
模型对照组	8	0(0.0)	0(0.0)	8(100.0)	0(0.0)		
口腔溃疡散组*	8	1(12.5)	4(50)	3(37.5)	5(62.5)	17.50	<0.01
马齿苋提取物组#	8	5(62.5)	2(25)	1(12.5)	7(87.5)		

与模型对照组比较 * $P < 0.05$; 与口腔溃疡散组比较 # $P < 0.05$

2.3 大鼠炎症因子水平情况 各组大鼠炎症因子水平差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 且血清 IFN- γ 水平, 模型对照组水平显著低于空白对照组, 口腔溃疡散组与马齿苋提取物组明显高于模型对照组, 马齿苋提取物组高于口腔溃疡散组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。血清 TNF- α 和 IL-2 水平, 模型对照组较空

白对照组明显升高, 口腔溃疡散组、马齿苋提取物组低于模型对照组 ($P < 0.01$), 马齿苋提取物组与口腔溃疡散组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 3)

表 3 不同药物治疗后大鼠炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$; ng/L)

分组	n	IFN- γ	TNF- α	IL-2
正常对照组	8	162.7 \pm 23.5	138.7 \pm 22.3	38.6 \pm 4.6
模型对照组	8	94.6 \pm 21.2**	219.6 \pm 21.4**	61.3 \pm 3.7**
口腔溃疡散组	8	124.1 \pm 16.3***	152.5 \pm 13.8##	49.6 \pm 3.9**
马齿苋提取物组	8	149.4 \pm 15.7***▲	146.3 \pm 12.4##	47.4 \pm 2.8***
F	—	19.06	34.28	48.30
P	—	<0.01	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	—	378.468	324.863	14.475

q 检验: 与正常对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较 ## $P < 0.01$; 与口腔溃疡散组比较 ▲ $P < 0.05$

2.4 T 淋巴细胞亚群水平情况 各组大鼠 T 淋巴细胞亚群水平差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 且模型对照组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平显著低于空白对照组, CD8⁺ 水平显著高于空白对照组 ($P < 0.01$); 口腔溃疡散组与马齿苋提取物组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平均高于模型组, 而 CD8⁺ 均低于模型对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 马齿苋提取物组 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平均明显高于口腔溃疡散组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 4)。

表 4 不同药物治疗后大鼠 T 淋巴细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s$; %)

分组	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD8 ⁺
正常对照组	8	39.4 \pm 3.1	28.3 \pm 2.9	2.3 \pm 0.4	12.3 \pm 2.4
模型对照组	8	24.3 \pm 3.5**	19.6 \pm 4.4**	1.1 \pm 0.2**	18.7 \pm 3.5**
口腔溃疡散组	8	29.1 \pm 6.2**	23.5 \pm 3.8##	1.5 \pm 0.3***	15.5 \pm 2.3#
马齿苋提取物组	8	36.4 \pm 5.7***▲	27.3 \pm 2.1***▲	2.2 \pm 0.4***▲	13.1 \pm 1.4##
F	—	16.26	10.79	23.41	10.47
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	—	23.198	11.655	0.113	6.315

q 检验: 与正常对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与口腔溃疡散组比较 ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

3 讨论

ROU 是一种反复性发作的疾病, 且国内外均无根治 ROU 的特效疗法, 均主要采取对症治疗, 促进溃疡愈合、延长间歇期^[11-12]。有文献^[13]报道, 血清炎症因子 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 在 ROU 的发生中扮演着至关重要的角色。其中 IFN- γ 具有抗病毒、抗

肿瘤以及调节免疫的作用。而 TNF- α 能够促进机体 IL-2、IL-6、IL-10 等多种炎性因子的分泌,造成炎性损伤。此外 TNF- α 具有趋化作用,能够促使巨噬细胞释放多种趋化因子,导致黏膜损伤^[14]。研究^[15]显示,ROU 的发生可能与 TNF- α 介导的炎症反应有密切关系。国外学者^[16-17]研究指出,ROU 是一种自身免疫性疾病,在病发部位存在大量 T 淋巴细胞浸润。马晓喆等^[18]研究发现,ROU 病人普遍炎性因子分泌异常、免疫功能低下。因此,在治疗 ROU 中,监测病人炎性因子水平(如 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 等)及 T 细胞亚群水平的变化具有现实意义,可为改进 ROU 的治疗方案提供参考。

本研究结果显示,治疗后,口腔溃疡散和马齿苋提取物均可显著缩短溃疡的持续时间,减少溃疡数目,提高治疗有效率,且马齿苋提取物组治疗效果要显著优于口腔溃疡散组。口腔溃疡散属于中药制剂,主要成分为青黛、白矾、冰片。中医认为口腔溃疡属于“口疮”“口糜”范畴,临床治疗主要以清热解毒、敛疮为原则。口腔溃疡散广泛应用于治疗口腔溃疡的反复发作,但临床经验发现,其长期治疗效果较差,病人口腔溃疡易反复发作^[19-20]。中医认为马齿苋具有清热解毒、利水去湿、消炎止痛、除尘杀菌的功效。现代药理学研究显示,马齿苋能够控制炎性因子异常释放,抑制变态反应,提高机体免疫力,从而促进溃疡愈合^[21]。本研究结果显示,治疗后,口腔溃疡散和马齿苋提取物均可使口腔溃疡大鼠的血清 TNF- α 和 IL-2 水平明显下降,使 IFN- γ 水平明显升高,且马齿苋提取物效果更为显著;且口腔溃疡散和马齿苋提取物均可使口腔溃疡大鼠的 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平明显升高,使 CD8⁺ 水平降低,马齿苋提取物效果更为显著。结果表明,应用马齿苋提取物治疗 ROU,可降低口腔溃疡大鼠的血清炎性因子水平,且可以在一定程度上改善机体免疫功能,从而提高治疗效果。

综上所述,马齿苋提取物可有效降低 ROU 大鼠血清中 IL-2、TNF- α 水平,升高 IFN- γ 水平,改善 T 细胞亚群比例,从而增强机体免疫功能,最终达到治疗 ROU 的作用,疗效显著,但远期疗效有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 刘好好,许子悦,谢春雨,等. 复发性口腔溃疡与 T 细胞免疫研究进展[J]. 现代免疫学,2016,36(1):72.
[2] 王斌,陈丽君,赵玺,等. 雷尼替丁治疗老年复发性口腔溃疡的疗效及对细胞免疫、炎性因子的影响[J]. 疑难病杂志,2018,17(1):59.

[3] 管翠强,郭洪波,武云霞,等. 复发性口腔溃疡患者的氧化应激与细胞免疫状态研究[J]. 中国药物与临床,2018,18(6):884.
[4] 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.
[5] 陈远东,杨海,邱海山,等. 复发性口腔溃疡患者血清中 TNF- α 、IL-2 及 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 海南医学,2017,28(1):94.
[6] 郑丽明,欧江勇,黄秀云. 马齿苋治疗复发性口腔溃疡的疗效及其对血清中 IL-8、TNF- α 的影响[J]. 中国医药科学,2017,7(8):25.
[7] JIN TY, SHEN T, ZHOU MX, *et al.* Chemical constituents from *Portulaca oleracea* and their bioactivities[J]. J Chin Pharm Sci. 2016,25(12):898.
[8] 施文彩,薛凡,李菊红,等. 马齿苋的药理活性研究进展[J]. 药学服务与研究,2016,16(4):291.
[9] 克里斯,郭建状,杨景云,等. 马齿苋多糖对衰老小鼠免疫调节作用的研究[J]. 黑龙江医药科学,2012,35(2):27.
[10] 杨志诚,吴丽芳,郭其,等. 复方黄连消疮灵治疗复发性口腔溃疡的免疫学机制研究[J]. 中医药信息,2018,35(2):50.
[11] 李向荣,刘晓丽. 大剂量维生素 C 治疗化疗所致口腔溃疡的临床疗效观察[J]. 医学综述,2015,21(8):1499.
[12] 刘祖祥,朱双雪,王劲,等. 生地黄芩麦冬方联合复方口腔溃疡膜剂治疗复发性口腔溃疡的临床效果研究[J]. 中药药理与临床,2015,31(1):250.
[13] 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.
[14] SHARDA N, SHASHIKANTH MC, KANT P, *et al.* Levamisole and low-dose prednisolone in the treatment of recurrent aphthous stomatitis[J]. J Oral Pathol Med,2014,43(4):309.
[15] 王明海,焦学高,钟正华,等. 复发性口腔溃疡患者血清肿瘤坏死因子 α 变化及组织病理学改变[J]. 吉林医学,2014,35(36):8075.
[16] ZIAUDEEN S, RAVINDRAN R. Assessment of oxidant-antioxidant status and stress factor in recurrent aphthous stomatitis patients: case control study[J]. J Clin Diagn Res,2017,11(3):C1.
[17] YOON BN, KIM SJ, LIM MJ, *et al.* Neuro-Behcet's disease presenting as hypertrophic pachymeningitis[J]. Exp Neurobiol, 2015,24(3):252.
[18] 马晓喆,李言君,付爱丽,等. IFN- γ R 和 sIL-2R 在复发性口腔溃疡患者血浆中的表达及意义[J]. 实用口腔医学杂志,2015,31(5):656.
[19] 周玉龙,林华清. 口腔溃疡含片和口腔溃疡散治疗复发性阿弗他溃疡的效果比较[J]. 泰山医学院学报,2014,35(5):389.
[20] 曹凤. 中药内外合治复发性阿弗他溃疡 64 例[J]. 中国中医药科技,2018,25(2):279.
[21] 施文彩,薛凡,李菊红,等. 马齿苋的药理活性研究进展[J]. 药学服务与研究,2016,16(4):291.