

六神丸对口腔溃疡小鼠 IL-6、IL-8 水平及 MAPK/ERK 通路的影响

周丽俐¹, 张婷², 王佳^{2*}

1. 南昌大学 抚州医学院, 江西 抚州 344000

2. 雷允上药业集团有限公司, 江苏 苏州 215009

摘要: **目的** 研究六神丸对小鼠口腔溃疡的疗效及可能的作用机制。**方法** 将 32 只 C57BL/6JGpt 级小鼠随机分成对照组、模型组、六神丸组、桂林西瓜霜组, 每组 8 只。于小鼠口腔左侧颊部黏膜上使用氢氧化钠片状晶体灼烧构建口腔溃疡模型。对口腔溃疡造模成功的小鼠分别外敷涂抹给予六神丸和桂林西瓜霜粉末 0.375 g, 连续 5 d。观察小鼠口腔溃疡的恢复状态, 用 ELISA 试剂盒检测血清白细胞介素 (IL)-6、IL-8 水平。取口腔溃疡部位组织, 将溃疡组织制备匀浆, 用二喹啉酸 (BCA) 法测定总蛋白浓度, 并用 Western blotting 方法检测细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 磷酸化水平。**结果** 与模型组比较, 六神丸组小鼠口腔溃疡部位组织恢复情况较好, IL-6、IL-8 水平显著降低 ($P < 0.05$), 局部组织中 ERK 磷酸化水平降低。**结论** 六神丸对氢氧化钠灼烧的口腔溃疡小鼠模型具有一定治疗作用, 且可能的机制是通过降低血液中 IL-6 和 IL-8 水平, 进而导致局部组织中 ERK 磷酸化水平降低改善病理状态。

关键词: 六神丸; 桂林西瓜霜; 口腔溃疡; 白细胞介素-6; 白细胞介素-8; 细胞外调节蛋白激酶

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)10-2405-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.10.004

Effects of Liushen Pills on levels of IL-6, IL-8 and MAPK/ERK pathway in oral ulcer mice

ZHOU Li-li¹, ZHANG Ting², WANG Jia²

1. Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou 344000, China

2. Leiyunshang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Suzhou 215009, China

Abstract: **Objective** To study the treatment effect of Liushen Pills for oral ulcer in mice. **Methods** Thirty-two C57BL/6JGpt mice were randomly divided into control group, model group, Liushen Pills group, and Guilin Watermelon Cream group, each group had 8 mice. The oral ulcer model was constructed by burning the left buccal mucosa of the oral cavity of mice with sodium hydroxide flake crystal. Mice with successfully constructed oral ulcer were treated with Liushen Pills and Guilin Watermelon Cream for 5 d. To observe the recovery state of oral ulcer in mice, serum levels of IL-6 and IL-8 were detected by ELISA kit. The ulcerated tissues of oral cavity were taken and homogenized. The total protein concentration was determined by BCA method, and the phosphorylation level of extracellular regulated protein kinase (ERK) was detected by Western blotting method. **Results** Compared with model group, the oral ulcer tissues of mice in Liushen Pills group and Guilin Watermelon Cream group recovered better, the levels of IL-6 and IL-8 were significantly decreased ($P < 0.05$), and the phosphorylation level of ERK in local tissues was decreased. **Conclusion** Liushen Pills have a certain therapeutic effect on the NaOH burning oral ulcer mouse model, and the action was performed by decreasing the IL-6 and IL-8 in blood circulation and thus down-regulate the ERK1/2 phosphorylation level in local tissue.

Key words: Liushen Pills; Guilin Watermelon Cream; oral ulcer; IL-6; IL-8; ERK

六神丸是百草霜为衣的水丸, 由麝香、牛黄、珍珠、冰片、蟾酥和雄黄组成^[1], 在临床中应用广泛。中医学认为其具有清凉解毒、消炎止痛的功效,

可用于治疗喉风喉痛、痈疮疔疮、无名肿毒等症^[2]。近年来随着对六神丸药效成分的深入研究, 证实了其成分具有广谱的抗炎镇痛作用。除此之外,

收稿日期: 2023-08-02

基金项目: 抚州市社会科学规划项目 (18sk082)

作者简介: 周丽俐, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为口腔保健。E-mail: ztdaytoy0408@163.com

*通信作者: 王佳, 男, 硕士, 研究方向为生殖妇科、泌尿男科及肿瘤学。E-mail: jiajiacpu@163.com

随着相关临床疗效评价的开展,六神丸在临床中的适应证不断扩大,广泛涉及皮肤科、内科、口腔科等各科。但是在治疗各类型口腔溃疡时,其研究结果及临床数据基本是基于六神丸联合其他药物治疗,如六神丸联合黄连素^[3]、大庆霉素^[4]、利多卡因^[5]等。因此推测六神丸可能对口腔溃疡在各种配伍用药过程中起到重要作用。本研究制备小鼠口腔溃疡模型,观察六神丸对口腔溃疡的治疗作用,并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 实验动物

5 周龄 C57BL/6JGpt 雄性小鼠,SPF 级,体质量 18~22 g,由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供。实验动物许可证号 SCXK(苏)2018-0008。饲养环境温度为(23±2)℃,湿度为(60±10)%,自由饮水进食。动物实验得到南京中医药大学实验动物伦理委员会的批准(批号 202207A053),遵守实验动物伦理要求。

1.2 药品及试剂

六神丸(雷允上药业集团有限公司,规格:10 粒/支,批号 SA18034A);桂林西瓜霜(桂林三金药业股份有限公司,规格:2.5 g,批号 210973);白细胞介素(IL)-6、IL-8 ELISA 检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号 MM-0047R1、MM-0190R1);NaOH(广东光华化学厂有限公司,批号 20100113);水合氯醛(中国药品生物制品检定研究院,批号 100121-199903);生理盐水(Beyotime);异氟烷(深圳瑞沃德,批号 R510-22-10); β -actin antibody(美国 proteintech 公司);ERK 抗体、抗 p-ERK 抗体(Cell Signaling Technology,批号 #4695、#4370);羊抗兔多克隆抗体(北京博尔西科技有限公司,批号 BHR101)。

1.3 仪器

多功能酶标仪(BioTEK Instruments, Inc.);高速冷冻离心机(塞洛捷克 D3024R);匀浆机(拓赫茨 THR 匀浆机);离心机(AndyBio);垂直电泳槽(美国 Rio-Rad 公司);电泳仪(Biometra);紫外切胶仪(上海勤翔仪器);水平脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);凝胶自动成像系统(美国 Rio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药液制备

取六神丸 120 粒,滴加生理盐水碾碎并研成细

粉,再烘干得到六神丸粉末 0.375 g。称取桂林西瓜霜粉末 0.375 g,备用。挑选大小约 3 mm×3 mm 的氢氧化钠片状晶体于试管中备用,保持干燥。

2.2 分组与给药

将 32 只 C57BL/6JGpt 小鼠随机分为对照组、模型组、六神丸组、桂林西瓜霜组,每组各 8 只。采用化学灼烧法^[6]。于造模前 12 h 禁食,正常饮水。除对照组外,小鼠经 4%水合氯醛(0.20 mL/只)麻醉,将 3 mm×3 mm 氢氧化钠片状晶体放在小鼠口腔左侧颊部黏膜处灼烧 20 s,之后迅速移开并用生理盐水冲洗 20 s,2 d 内可见 3 mm 左右直径大小的红白色损伤,伤口转化为中央凹陷并覆以白色伪膜,并伴有口角边潮湿,脸颊肿胀,甚至口腔内出现脓液,即可判定为造模成功。

六神丸组给予局部外敷六神丸,给药处理前先用异氟烷将小鼠麻醉,将消毒棉签用生理盐水润湿,再用已经制备好的六神丸粉末 0.375 g,蘸取涂抹于患处,以完全覆盖创面为标准,2 次/d,连续治疗 5 d。桂林西瓜霜组用同样的方式给予局部外敷桂林西瓜霜粉末 0.375 g,2 次/d,涂抹于小鼠口腔溃疡处,连续治疗 5 d。模型组不给予药物。六神丸与桂林西瓜霜组给药前使用生理盐水冲洗口腔,所有小鼠在给药后禁食禁水 0.5 h。实验过程中所有小鼠均给予正常饮食,自由饮水,所有小鼠均存活并造模成功。

2.3 指标检测

2.3.1 一般状态 每天上午 10:00 时记录各小鼠体质量并观察各小鼠外观形态变化、对外界反应、采食行为等。

2.3.2 溃疡病理变化 给药期间观察溃疡病理变化和恢复情况。溃疡表面感染情况分级及评分规则为 0 级:肉眼观察溃疡恢复至正常状态,记 0 分;I 级:表面无明显假膜,记 1 分;II 级:溃疡表面有薄层黄白色假膜,周围无水肿,记 2 分;III 级:溃疡表面假膜较厚,且周围伴有炎性水肿,记 3 分。显效:溃疡表面感染情况评分 0、I 级。有效:溃疡表面感染情况评分 II 级。无效:溃疡表面感染情况评分 III 级^[7]。

总愈合率=(显效例数+有效例数)/总例数

2.3.3 生理生化指标 在治疗第 5 天后,采用摘眼球取血的方式采集静脉血 0.5 mL,室温自然凝固 20 min,3 000 r/min、4℃离心 20 min,分离上层血清于离心管中,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法

测定小鼠血清 IL-6、IL-8 水平,具体步骤按照 ELISA 试剂盒说明书来操作。

2.3.4 ERK1/2 磷酸化水平 取小鼠的口腔上皮组织,提取总蛋白,通过二喹啉酸(BCA)方法定量蛋白浓度并配制成 $2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 蛋白浓度,金属浴煮 5 min 使蛋白变性。用 $\beta\text{-actin}$ 作为内标,取样品 $5\text{ }\mu\text{g}$ 进行蛋白质印迹分析。抗细胞外调节蛋白激酶(ERK)抗体和抗 p-ERK 抗体(Cell Signaling Technology,批号#4695、#4370), $1:1\text{ }000$ 稀释,二抗用羊抗兔多克隆抗体(北京博尔西科技有限公司,批号 BHR101), $1:10\text{ }000$ 稀释。

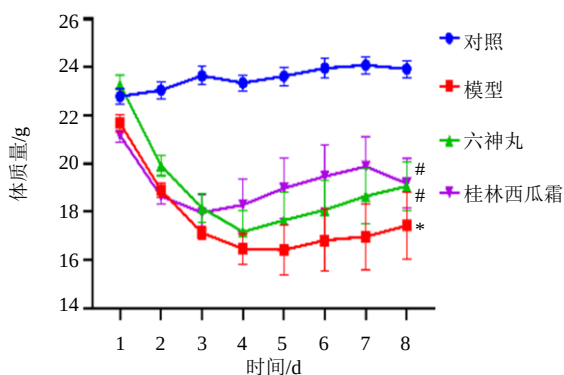
2.4 数据统计

数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理分析。两组连续性计量数据采用独立样本 t 检验比较,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验方法采用单因素方差分析(One way-AVONA)。

3 结果

3.1 一般情况及体质量变化

造模第1天对照组小鼠活动敏捷,步态、行为及对外界反应情况正常,无死亡。模型组、六神丸组和西瓜霜组小鼠皮毛光泽变得黯淡,体质量开始减少,活力降低($P<0.05$)。给药第5天,对照组小鼠体质量保持稳定,一般状态与实验开始前无明显变化,且无小鼠死亡。六神丸组和桂林西瓜霜组小鼠活力较造模2d已经有所恢复,体质量逐渐增长,但仍未恢复到初始体质量($P<0.05$)。提示六神丸对氢氧化钠诱导的口腔溃疡具有一定的促进恢复作用,见图1。



与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$
* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group

图1 六神丸对口腔溃疡小鼠体质量的影响

Fig. 1 Influence of Liushen Pills on body mass of mice with oral ulcer

3.2 小鼠口腔溃疡部位组织病理变化的观察

观察各组小鼠口腔溃疡面的基本状态,结果显示对照组无溃疡症状出现。其余组别在使用氢氧化钠灼烧后可出现明显的口腔溃疡,肉眼观察溃疡面的黏膜出现大小 $3\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ 、覆盖黄白色伪膜,左侧脸颊充血水肿,说明口腔溃疡模型制备成功。连续给药5d,对小鼠口腔溃疡表面进行连续观察,结果发现,对照组口腔黏膜始终保持完整、光滑,无明显损伤。其他各组溃疡随时间的推移均有不同程度的恢复趋势。有关文献报道指出^[3]小鼠口腔溃疡模型具有一定自愈性,随着时间的延长,溃疡面积逐渐减小,创面组织表面逐步恢复。在给药第2、5天观察,与模型组比较,六神丸组和桂林西瓜霜组小鼠口腔溃疡组织显著恢复。给药5d,模型组溃疡表面仍存在假膜、脓液,六神丸组小鼠溃疡面假膜基本消失、恢复情况良好,桂林西瓜霜组小鼠基本愈合。结果表明,六神丸可以改善氢氧化钠诱导的口腔溃疡病理状态并在一定程度上促进恢复,见图2。



图2 六神丸对小鼠口腔溃疡部位组织病理变化的影响

Fig. 2 Effect of Liushen Pills on pathological changes of oral ulcer in mice

3.3 六神丸对小鼠口腔溃疡等级评分的影响

根据溃疡表面感染情况分级、评分规则,造模前模型组、六神丸组、桂林西瓜霜组小鼠口腔溃疡感染评分无显著性差异;在给药第1、3、5天,与模型组比较,六神丸组和桂林西瓜霜组小鼠口腔溃疡等级评分均显著减小($P<0.05$)。此外,六神丸组和桂林西瓜霜组小鼠的治愈率明显高于模型组($P<0.05$),见表1。结果提示六神丸可以显著加快氢氧化钠诱导的口腔溃疡的愈合作用。

表 1 六神丸治疗小鼠口腔溃疡的等级评分和治愈率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Table 1 Grade scores and cure rate of oral ulcers treated by Liushen Pills in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/g	溃疡面积评分				溃疡治愈率/%			
		造模前	给药第 1 天	给药第 3 天	给药第 5 天	造模前	给药第 1 天	给药第 3 天	给药第 5 天
对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	—	—	—	—
模型	—	0.00±0.00	2.63±0.52*	1.88±1.13*	1.13±1.00*	0.00	0.00	12.50	37.50*
六神丸	0.375	0.00±0.00	1.75±0.71#	0.50±0.76#	0.13±0.35#	0.00	0.00	62.50#	100.00#
桂林西瓜霜	0.375	0.00±0.00	1.00±1.07#	0.25±0.46#	0.00±0.00#	0.00	37.50#	75.00#	100.00#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

3.4 六神丸对口腔溃疡小鼠血液中 IL-6、IL-8 水平的影响

与对照组比较, 模型组小鼠血清中 IL-6、IL-8 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 六神丸组和桂林西瓜霜组小鼠血清中 IL-6 水平显著降低, 六神丸组小鼠血清中的 IL-8 水平显著下降 ($P < 0.05$), 而桂林西瓜霜组小鼠的 IL-8 水平无显著性差异, 见图 3。结果提示, 六神丸可以降低口腔溃疡小鼠血清中 IL-6、IL-8 炎症因子的水平, 可能是其治疗氢氧化钠诱导的口腔溃疡的作用机制之一。

3.5 六神丸对口腔溃疡小鼠口腔黏膜 ERK1/2 磷酸化水平的影响

与对照组比较, 模型组小鼠口腔黏膜组织中 ERK1/2 磷酸化水平明显升高, 但总 ERK1/2 没明显变化, 桂林西瓜霜组和六神丸组小鼠口腔黏膜组织中 ERK1/2 磷酸化水平明显降低, 六神丸组降低幅

度较桂林西瓜霜组明显, 而桂林西瓜霜并未引起模型小鼠口腔黏膜组织中总的 ERK1/2 水平, 见图 4。

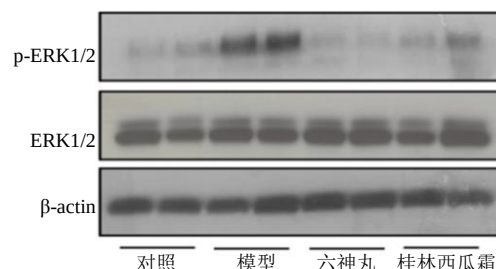


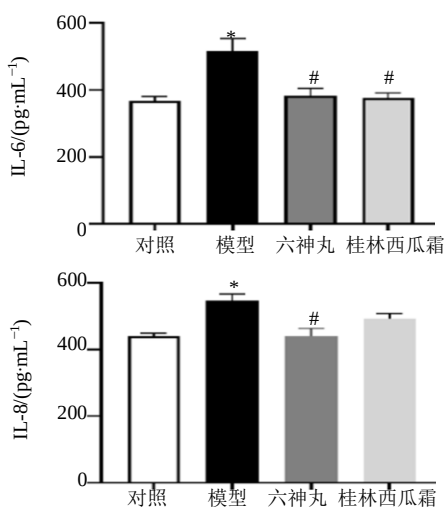
图 4 六神丸对口腔溃疡小鼠血清中 ERK1/2 磷酸化水平的影响

Fig. 4 Effect of Liushen Pills on ERK1/2 phosphorylation in serum of oral ulcer mice

4 讨论

口腔溃疡是临床上常见的口腔疾病, 近年来该病的患病率呈显著的上升趋势。其发病机制至今尚未完全清楚, 口腔溃疡的发病诱因比较多, 包括但不限于遗传因素、维生素缺乏、精神压力与内分泌紊乱、系统性疾病、创伤等^[8]。临床中以促进溃疡创面愈合, 缩短康复周期, 防止复发等作为主要治疗原则。现有针对口腔溃疡治疗的专一、特效方法仍然有待探索。传统的方法如给予维生素 C, 可一定程度促进疮面愈合; 喷涂西瓜霜粉末有清热解毒, 消肿止痛的功效, 但治疗效果受限, 不利于快速康复^[9]。除此之外还有抗菌类的药物, 但是在实际临床应用中都存在一定的缺陷, 如会产生耐药性、对真菌感染无效且伴有显著的不良反应、停药后容易复发等诸多问题。针对上述的各种情况, 在中医学理论中有着完整的论述和治疗方向。口腔溃疡在中医学中又称“口疮”, 其发生原因的阐述与现代的医学研究较为相近。但是在治疗方法上以清热解毒、祛腐生肌、消肿止痛为主要原则。

六神丸来源于《雷允上涌芬堂方》, 是我国著名的传统国药精粹。六神丸具有清热解毒、消肿止痛、



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 3 六神丸对口腔溃疡小鼠血清中 IL-6、IL-8 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 3 Effect of Liushen Pills on serum IL-6 and IL-8 levels in oral ulcer mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

敛疮生肌之功效,以及无论内服、外敷,对红肿疳疔、口咽糜烂等症均有奇效^[10],这都符合前文所述对于口腔溃疡的治疗原则。这提示了可以进一步探索六神丸对于口腔溃疡的疗效。有临床报道^[11-12],六神丸与多种药物联合使用对各类型的口腔溃疡患者具有较好的治疗效果,对口腔黏膜损伤有一定的保护作用。研究表明六神丸具有很好的抑制炎症和镇痛效果,对非感染性和感染性炎症均具有良好的抑制作用^[13],且对于口腔内黏膜的治疗,采用含服给药方式的效果比传统给药方式更突出,药物有效浓度持续时间更长,对人体的不良反应也更小。

本研究结果显示,与模型组相比,六神丸组与桂林西瓜霜组小鼠的体质量显著增高,表明六神丸通过对小鼠口腔溃疡感染处的镇痛作用,减轻溃疡所带来的疼痛感对小鼠进食、情绪等方面的影响,进而可降低口腔溃疡对小鼠体质量的影响,也提示六神丸可以缓解进食、正常生理活动下因溃疡面造成的疼痛、改善小鼠精神状态、促进体质量的恢复。多项实验研究均采用溃疡面积大小或者愈合时间作为衡量指标^[10,14-16]。本研究采用溃疡表面感染分级作为评价指标,以此对数据进行初步的量化处理,使结果更具直观性和对比性。结果显示,治疗第5天,六神丸组和桂林西瓜霜组小鼠的口腔溃疡等级评分显著低于模型组。

急性的创伤可以导致口腔黏膜上皮水肿和早期炎症细胞浸润^[9],故小鼠血清中的炎症因子如IL-6、IL-8在口腔溃疡的发生中扮演着重要的角色。其中IL-6能够促进机体释放多种炎症因子,从而造成炎症损伤^[17];IL-8能够促进机体巨噬细胞释放多种趋化因子,导致机体的局部炎症反应,从而引起黏膜损伤^[18]。结果显示,与模型组相比,六神丸组与桂林西瓜霜组小鼠血清IL-6、IL-8水平显著降低。实验造模成功小鼠会出现高炎症状态,六神丸可以通过抗炎作用对小鼠口腔溃疡起到显著的保护作用。ERK1/2是MAPK蛋白家族成员之一,是调节正常细胞增殖、存活和分化的关键信号通路。本研究显示,六神丸组小鼠口腔黏膜组织中ERK1/2磷酸化水平明显降低,表明六神丸可以通过降低ERK1/2磷酸化水平调控正常细胞增殖,保护黏膜细胞、缓解溃疡损伤,促进小鼠恢复。

综上所述,六神丸能缓解口腔溃疡小鼠口腔组

织损伤,抑制炎症因子的释放,促进小鼠恢复,其对于小鼠的疗效观察较为满意,提供了一定的实验基础和理论依据,具有良好的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁晓焱,段大航.常用中药外用对放化疗引起的口腔溃疡治疗[J].中国老年保健医学,2013,11(1):57-58.
- [2] 孙建辉,霍海如,李小芹,等.六神丸对非感染性、感染性炎症动物模型抗炎作用研究[J].中国中医药信息杂志,2018,25(10):60-65.
- [3] 蔡少娜,陈文艺.六神丸联合黄连素治疗脾胃湿热型口腔溃疡[J].中医临床研究,2016,8(3):59-60.
- [4] 陈乐,王东.六神丸联合庆大霉素治疗口腔溃疡的疗效观察[J].现代药物与临床,2018,33(10):2669-2672.
- [5] 刘波.六神丸联合利多卡因治疗口腔溃疡患者的疗效分析[J].山西医药杂志,2021,50(18):2679-2681.
- [6] 祝红,黄胜楠,苗明三.口腔溃疡动物模型造模方法及临床吻合度分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2023,25(5):1750-1756.
- [7] 王伟,周衍,王晓辉,等.复方苦参注射液对大鼠放射性口腔溃疡模型的影响[J].现代肿瘤医学,2023,31(15):2803-2808.
- [8] 张燕,刘文娟,王弘轶,等.复发性口腔溃疡免疫病因学相关研究[J].现代免疫学,2012,32(5):434-437.
- [9] 李瑞泽,武云霞.口腔溃疡致病因素研究进展[J].山西医药杂志,2016,45(8):907-909.
- [10] 王涛,吴喆,刘炯.泻黄汤、六味地黄丸联合西药治疗反复发作口腔溃疡的临床观察[J].北方药学,2020,17(7):47.
- [11] 高贺颖.六神丸对口腔溃疡的治疗效果分析[J].中国保健营养,2013,23(6):1535.
- [12] 关玉萍,秦翠,宋涛,等.六神丸配伍复合维生素B治疗白血病化疗后口腔溃疡的疗效及护理[J].中国医院用药评价与分析,2017,17(2):204-206.
- [13] 丁兰芳.六神丸抗炎临床应用及机制研究进展[J].实用中西医结合临床,2020,20(9):158-159.
- [14] 张晨,刘斯汝,阿依木古丽,等.甘黄疗法对肾阴虚和脾阳虚小鼠口腔溃疡的疗效分析[J].西北民族大学学报:自然科学版,2019,40(1):40-44.
- [15] 燕玉敏.中医辨证联合西药治疗复发性口腔溃疡的临床疗效分析[J].中国医学文摘:耳鼻咽喉科学,2020,35(2):110-111.
- [16] 马静,李雪丽,韩旭,等.牙痛停滴丸治疗口腔溃疡的药效学研究[J].药物评价研究,2021,44(3):492-497.
- [17] Plana-Pla A, Solé L C, Garcia A B, et al. Mycophenolate mofetil-induced mouth ulcers in a kidney transplant patient: Case report and literature review[J]. Nefrologia, 2019, 39(1): 80-83.
- [18] Rodsaward P, Prueksrisakul T, Deekajorndech T, et al. Oral ulcers in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: A review of the literature [J]. Am J Clin Dermatol, 2017, 18(6): 755-762.

[责任编辑 高源]