

川黄连调控MAPK/ERK通路对口腔溃疡大鼠微循环及Th1/Th2细胞因子的作用

刘苗苗¹, 崔月曦¹, 郑 勇¹, 刘艳菊^{2*}

1. 湖北省中西医结合医院 药学部, 湖北 武汉 430010

2. 湖北中医药大学 药学院, 湖北 武汉 430072

摘要: 目的 探究川黄连 *Coptis chinensis* Franch. 调控丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) /胞外信号调节激酶 (ERK) 通路对口腔溃疡大鼠微循环及Th1/Th2细胞水平的作用。方法 将大鼠随机分为对照组、模型组、西瓜霜 (200 mg·kg⁻¹)组和川黄连20、40、80 mg·kg⁻¹组, 每组10只。除对照组外, 采用40%冰醋酸灼烧法制备口腔溃疡模型, 各给药组涂抹给药, 每2天给药1次, 连续给药7 d。比较各组大鼠口腔溃疡面积; 腹主动脉取血检测微循环指标 [微量毛细管法测定红细胞压积(HCT), 试剂盒法检测血清纤维蛋白原(FIB)水平, 椎板式黏度计测定血浆黏度]; ELISA法检测血清中炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、IL-8和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平及血清中Th1/Th2细胞相关因子 γ -干扰素 (IFN- γ)、IL-10水平; HE染色观察溃疡黏膜组织病理学变化; Western blotting检测黏膜组织中ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达。结果 与模型组比较, 川黄连20、40、80 mg·kg⁻¹组口腔溃疡面积均显著减少 ($P < 0.05$), 黏膜上皮细胞溶解、炎症反应、组织坏死等病理学改变明显减轻; HCT、FIB、血浆黏度均显著降低 ($P < 0.05$); 血清中炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 血清中IFN- γ 和IFN- γ /IL-10水平显著降低, IL-10水平明显升高 ($P < 0.05$); ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$), 且川黄连80 mg·kg⁻¹作用最明显。结论 川黄连可改善口腔溃疡大鼠微循环, 维持Th1/Th2细胞在体内平衡状态, 其作用机制可能与抑制MAPK/ERK通路相关。

关键词: 川黄连; MAPK/ERK通路; 口腔溃疡; 微循环; Th1/Th2细胞因子; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 02-0323-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.02.012

Study on mechanism of *Coptis chinensis* regulating MAPK/ERK pathway in microcirculation and Th1/Th2 cytokines in rats with oral ulcers

LIU Miaomiao¹, CUI Yuexi¹, ZHENG Yong¹, LIU Yanju²

1. Department of Pharmacy, Hubei Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Wuhan 430010, China

2. School of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430072, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of *Coptis chinensis* Franch. mediated mitogen activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) on microcirculation and Th1/Th2 cell levels in rats with oral ulcers. **Methods** The rats were randomly divided into control group, model group, *Coptis chinensis* 20, 40, 80 mg·kg⁻¹ group, and watermelon cream (200 mg·kg⁻¹) group, with 10 rats in each group. Except for the control group, oral ulcer models were prepared using the burning method with 40% acetic acid. Each treatment group was coated and administered once every 2 days for 7 consecutive days. Blood samples were taken from the abdominal aorta to detect microcirculation indicators. Hematocrit (HCT) was measured using a microcapillary method, serum fibrinogen (FIB) levels were measured using a reagent kit method, and plasma viscosity was measured using a vertebral plate viscometer. Serum levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and serum levels of Th1, Th2 cell-related factors IFN- γ and IL-10 were detected by ELISA. The histopathological changes of ulcer mucosa were observed by HE staining. The expression of ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK and p-p38 MAPK in mucosal tissues was detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the oral ulcer area of

收稿日期: 2023-06-13

基金项目: 湖北省中央引导地方科技发展专项(编号2020ZYD030)

第一作者: 刘苗苗(1991—),女,硕士研究生,药师,研究方向为医院制剂开发与利用。E-mail: liumiaomiao1991m@163.com

*通信作者: 刘艳菊(1965—),女,博士学位,教授,研究方向为中药饮片炮制工艺、质量标准及炮制机制研究。E-mail: cbjbg91@163.com

Coptis chinensis 20, 40, 80 mg·kg⁻¹ group was significantly reduced ($P < 0.05$), and pathological changes such as mucosal epithelial cell lysis, inflammatory response, and tissue necrosis were significantly reduced, HCT, FIB, and plasma viscosity were significantly reduced ($P < 0.05$), the levels of inflammatory factors IL-6, IL-8, and TNF- α in serum were significantly reduced ($P < 0.05$). The level of IFN- γ and IFN- γ /IL-10 in serum significantly decreased, while the level of IL-10 significantly increased ($P < 0.05$). The expression of ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, and p-p38 MAPK proteins was significantly reduced ($P < 0.05$), and the effect of *Coptis chinensis* 80 mg·kg⁻¹ was the most significant. **Conclusion** *Coptis chinensis* can improve microcirculation in rats with oral ulcers, maintain a balanced state of Th1/Th2 cells in the body, which may be related to the inhibition of the MAPK/ERK pathway.

Key words: *Coptis chinensis* Franch.; MAPK/ERK pathway; oral ulcers; microcirculation; Th1/Th2 cytokines; inflammation

口腔溃疡又称为阿弗他溃疡,是常见的一种口腔黏膜疾病,患病率较高,多发生于角化程度较差的部位,例如唇、颊黏膜、软腭、舌等^[1]。研究发现,临床复发性口腔溃疡(ROU)约占所有口腔溃疡的90%以上,以圆形或椭圆形的凹陷缺损且覆盖黄白色伪膜为主要病理表现^[2]。ROU具有自限性,且极易反复发作,一般可持续1~2周,发作时的烧灼感严重影响患者的进食^[3]。目前现代医学针对口腔溃疡以局部治疗和全身治疗为主,通常采用西瓜霜等药物进行局部治疗,虽临床效果显著但由于药物作用的局限性极易复发;全身治疗由于免疫抑制剂副作用明显,限制了化学药治疗口腔溃疡方向的发展,因此寻找有效治疗口腔溃疡的方法是目前临床亟需解决的难题。

川黄连是根据黄连的产地所产生的一种命名,属于植物本品为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎。川黄连味苦,性寒,可起到清热燥湿和泻火解毒的功效,临床常用于治疗湿热痞满、湿热泻痢、痈肿疔疮、消渴等,外用还能够治疗湿疹、湿疮等^[6]。有研究发现,黄连对溃疡性结肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等均有治疗作用^[7],但关于其对口腔溃疡的治疗作用报道不多。胞外信号调节激酶(ERK)是近年来研究较广泛的激酶之一,其可将信号从细胞表面受体传导到细胞核中,相关文献显示丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/ERK信号通路在口腔癌患者中被异常激活^[8],目前其在口腔溃疡中的活化程度尚未明确。目前已有研究表明,口腔溃疡的发病与炎症、免疫机制密切相关,辅助性T细胞(Th)在免疫调节中发挥关键作用。根据分泌细胞因子和功能的不同,Th细胞分为Th1和Th2亚型,Th1和Th2分泌的细胞因子能够维持机体内环境的稳定,Th1/Th2失衡参与了多种疾病的发生和发展。本研究旨在研究川黄连通过介导MAPK/ERK通路对口腔溃疡大鼠微循环及Th1/Th2细胞因子水平的影响。

1 材料

1.1 实验动物

60只雄性SD大鼠,6~8周龄,SPF级,体质量280~300 g,均购自湖北贝恩特生物科技有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(鄂)2021-0027。大鼠统一饲养在SPF级动物室,保持室温22~25℃,相对湿度40%~70%,光照12 h循环昼夜交替。所有大鼠所用的饲料、水、垫料都经过严格灭菌处理,适应性喂养大鼠1周。本研究经本院伦理委员会批准,审批号:2022-0034。

1.2 主要试剂

川黄连,来自四川省眉山市洪雅县瓦屋山黄连种植基地,经湖北中医药大学刘义梅教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.,野生黄连取根茎部位进行消毒后直接研磨,小檗碱质量分数>0.3%,川黄连碱质量分数>0.2%,川黄连内酯质量分数>0.1%。桂林西瓜霜(以下简称西瓜霜,桂林三金药业股份有限公司,规格3.5 g,批号171174);白细胞介素-6(IL-6)单克隆抗体、IL-8多克隆抗体(武汉菲越生物科技有限公司,货号FY-AB53680、FY-AB41513);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)单克隆抗体(艾美捷科技有限公司,货号PSI-XP-5282Bt); γ -干扰素(IFN- γ)单克隆抗体(深圳子科生物科技有限公司,货号ZIKER-0481R);IL-10单克隆抗体[爱必信(上海)生物科技有限公司,货号abs126445];ERK单克隆抗体(中国Abcam公司,货号ab196883);p-ERK单克隆抗体(上海钰博生物科技有限公司,货号ybP003);B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)单克隆抗体(上海康朗生物科技有限公司,货号KL4563R);Bcl-2相关X蛋白(Bax)单克隆抗体(上海信裕生物技术有限公司,货号xy-1004809);p38 MAPK、p-p38 MAPK抗体(中国Abcam公司,货号ab69723、ab178868);GAPDH抗体(美国BioVision公司,货号3777R-100);纤维蛋白原(FIB)检测试剂盒(上海初态生物科技有限公司,货号CT670837);ELISA检测试剂盒(上海研尊生物科技有限公司,

货号YZ-E988197)。

1.3 主要仪器

JK型生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司);E100型光学显微镜(日本Nikon公司);DYCZ-24DH蛋白电泳仪(北京海富达科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组、模型制备^[20]和给药

按随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组、西瓜霜(200 mg·kg⁻¹)组和川黄连低、中、高剂量(20、40、80 mg·kg⁻¹)组,每组10只。将冰醋酸用0.9%氯化钠溶液配成40%浓度,保存于避光的环境中。除对照组外,剩余大鼠用30 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠麻醉,用蘸有40%冰醋酸的棉球灼烧大鼠口腔右侧面颊60 s,24 h后可见大鼠口腔右侧面颊的口腔黏膜上有直径5 mm的溃疡面,即口腔溃疡模型制备成功,所有大鼠均造模成功。对照组大鼠不做任何处理。

川黄连药粉均匀涂于溃疡面上,西瓜霜组给予桂林西瓜霜药粉均匀涂于溃疡面上,90 s内密切监督大鼠的行为,并随时注意大鼠是否试图舔食药粉,一旦发现立即制止。每2天给药1次,共给药7 d。

2.2 溃疡面积计算

给药结束后分别计算各组大鼠口腔给药前、给药后(3、5、7 d)溃疡面积,量取各组大鼠口腔溃疡的最大横径(d_1)和最大纵径(d_2)。

溃疡面积= $\pi \times d_1 \times d_2 \times 1/4$, π 取3.14。

2.3 微循环指标检测

仰卧位固定各组大鼠,麻醉并打开大鼠腹腔,将腹主动脉充分暴露在外,取腹主动脉血6 mL,其中2 mL用微量毛细管法测定红细胞压积(HCT);剩余2 mL以1 500 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液,试剂盒法检测各组大鼠血清中FIB水平;用椎板式黏度计测定血浆黏度。

2.4 ELISA检测血清中炎症因子水平

室温静置各组大鼠腹主动脉血2 h,3 000 r·min⁻¹离心10 min,收集血清,用ELISA法检测血清中炎症因子IL-6、IL-8和TNF- α 水平及血清中Th1、Th2细胞相关因子IFN- γ 、IL-10水平。

2.5 HE染色

取血后,剪下各组大鼠口腔溃疡处的黏膜组织,用10%福尔马林水浸泡组织,石蜡包埋后切成厚度为4 μ m的薄片,苏木素染色3 min,伊红染色30 s,中性树胶封片,显微镜下观察黏膜组织的病理学变化。

2.6 Western blotting检测组织中ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达

取各组大鼠口腔溃疡组织50 mg,于冰上裂解组织至匀浆,离心组织匀浆,用DAB法检测上清液中蛋白浓度。分别配制浓缩和分离胶,浓度分别为5%和8%,在胶孔中分别加入样品蛋白,电泳10 min后转膜。孵育2 h后,将5%封闭液加入到样品中,激活后转移到PVDF膜上,封闭PVDF膜1 h。分别加入一抗过夜,继续加入HRP标记的二抗,继续孵育2 h。用ECL检测细胞PVDF膜并成像。

2.7 统计学方法

实验数据采用Graphpad priam 8.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同组间数据采用One-way AVOVA单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠口腔溃疡面积比较

除对照组外,其余组大鼠给药前口腔溃疡面积没有显著差异。给药后,与对照组比较,模型组大鼠口腔溃疡面积显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,给药后3、5、7 d川黄连20、40、80 mg·kg⁻¹组和西瓜霜组大鼠口腔溃疡面积均显著减少($P < 0.05$),且川黄连80 mg·kg⁻¹组大鼠口腔溃疡面积最小;川黄连80 mg·kg⁻¹组与西瓜霜组比较在给药后3、5、7 d大鼠口腔溃疡面积没有显著差异。见表1。

3.2 各组大鼠微循环指标比较

与对照组比较,模型组大鼠HCT、FIB、血浆黏度均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,川黄连20、40、80 mg·kg⁻¹组和西瓜霜组大鼠HCT、FIB、血浆黏度均显著降低($P < 0.05$),且川黄连80 mg·kg⁻¹组大鼠HCT、FIB、血浆黏度均降低最显著;川黄连80 mg·kg⁻¹组与西瓜霜组比较HCT、FIB、血浆黏度没有显著差异,见表2。

3.3 各组大鼠炎症因子水平比较

与对照组比较,模型组血清中炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 水平均显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,川黄连20、40、80 mg·kg⁻¹和西瓜霜组大鼠血清中炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$),且川黄连80 mg·kg⁻¹组大鼠血清中炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 水平最低;川黄连80 mg·kg⁻¹组与西瓜霜组比较大鼠血清中炎症因子水平没有显著差异,见表3。

表 1 各组大鼠给药前、后口腔溃疡面积比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of oral ulcer area before and after administration of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	口腔溃疡面积/mm ²			
		给药前	给药后 3 d	给药后 5 d	给药后 7 d
对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	—	49.31±4.13 [*]	26.47±2.31 [*]	16.28±2.07 [*]	8.42±1.03 [*]
川黄连	20	48.25±4.08 [*]	24.12±2.15 [#]	13.26±2.01 [#]	6.93±0.81 [#]
	40	47.16±4.10 [*]	20.35±2.08 [#]	10.34±1.51 [#]	4.52±0.65 [#]
	80	47.34±4.12 [*]	15.21±1.43 [#]	7.26±1.23 [#]	2.15±0.34 [#]
西瓜霜	200	47.29±4.09 [*]	15.47±1.51 [#]	7.41±1.20 [#]	2.23±0.31 [#]

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.

表 2 各组大鼠微循环指标比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Comparison of microcirculation indexes of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HCT/%	FIB/(g·L ⁻¹)	血浆黏度/(mPa·s ⁻¹)
对照	—	40.31±1.12	2.45±0.24	1.21±0.05
模型	—	52.46±1.83 [*]	5.86±0.63 [*]	2.01±1.10 [*]
川黄连	20	49.17±1.65 [#]	5.01±0.52 [#]	1.87±0.09 [#]
	40	46.24±1.32 [#]	4.35±0.45 [#]	1.63±0.07 [#]
	80	43.26±1.15 [#]	3.27±0.32 [#]	1.42±0.06 [#]
西瓜霜	200	44.08±1.13 [#]	3.41±0.29 [#]	1.45±0.06 [#]

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.

表 3 各组大鼠炎症因子 IL-6、IL-8、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Comparison of levels of inflammatory factors IL-6, IL-8 and TNF- α in rats of all groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-8/(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)
对照	—	40.32±5.21	259.31±25.27	32.15±4.13
模型	—	111.48±12.56 [*]	854.26±46.19 [*]	180.26±21.35 [*]
川黄连	20	85.17±10.13 [#]	617.34±40.36 [#]	135.42±17.62 [#]
	40	63.02±8.24 [#]	473.12±34.27 [#]	92.31±10.24 [#]
	80	46.25±6.19 [#]	301.65±28.14 [#]	48.66±7.35 [#]
西瓜霜	200	47.01±6.25 [#]	302.16±27.83 [#]	49.12±7.43 [#]

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.

3.4 各组大鼠中 IFN- γ 、IL-10、IFN- γ /IL-10 水平比较

与对照组比较,模型组大鼠血清中 IFN- γ 和 IFN- γ /IL-10 水平显著升高,IL-10 水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,川黄连 20、40、80 mg·kg⁻¹ 组和西瓜霜组大鼠血清中 IFN- γ 和 IFN- γ /IL-10 水平显著降低,IL-10 水平明显升高($P<0.05$);川黄连 80 mg·kg⁻¹ 组与西瓜霜组比较大鼠血清中 IFN- γ 、IL-10、IFN- γ /IL-10 水平没有显著差异。

见表 4。

3.5 各组大鼠口腔溃疡黏膜组织病理学变化比较

与对照组比较,模型组大鼠口腔黏膜上皮细胞大量溶解、坏死,且发生脱落,炎细胞大量浸润到黏膜的固有层,血管内皮细胞大量坏死,由于纤维性的渗出导致组织坏死,溃疡深达肌层。川黄连 20、40、80 mg·kg⁻¹ 组和西瓜霜组大鼠口腔黏膜组织上皮细胞残留逐渐减少,溃疡面边缘可见上皮细胞增生,炎性细胞和坏死组织减少,新生血管大量生成,

表4 各组大鼠血清中IFN- γ 、IL-10、IFN- γ /IL-10水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 4 Comparison of serum IFN- γ , IL-10 and IFN- γ /IL-10 levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(ng·L ⁻¹)	IFN- γ /IL-10
对照	—	91.26 $\pm$ 7.31	106.27 $\pm$ 8.03	0.92 $\pm$ 0.05
模型	—	145.32 $\pm$ 10.18*	71.32 $\pm$ 5.42*	1.93 $\pm$ 0.10*
川黄连	20	131.04 $\pm$ 9.53 [#]	79.15 $\pm$ 6.13 [#]	1.78 $\pm$ 0.09 [#]
	40	118.12 $\pm$ 9.04 [#]	83.64 $\pm$ 6.92 [#]	1.34 $\pm$ 0.08 [#]
	80	105.61 $\pm$ 8.15 [#]	95.17 $\pm$ 7.45 [#]	1.13 $\pm$ 0.07 [#]
西瓜霜	200	106.25 $\pm$ 8.23 [#]	96.02 $\pm$ 7.63 [#]	1.17 $\pm$ 0.08 [#]

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.

形成厚层肉芽组织,且部分肉芽组织成熟转化为瘢痕组织,且川黄连 80 mg·kg⁻¹组和西瓜霜组大鼠溃疡黏膜组织病理学变化相似。见图1。

3.6 各组大鼠组织中 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达比较

与对照组比较,模型组中 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达均显著增加($P<$

0.05);与模型组比较,川黄连 20、40、80 mg·kg⁻¹组和西瓜霜组中 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达均显著降低($P<0.05$),且川黄连 80 mg·kg⁻¹组蛋白表达变化最显著;川黄连 80 mg·kg⁻¹组和西瓜霜组大鼠中 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达没有显著差异。见图2。

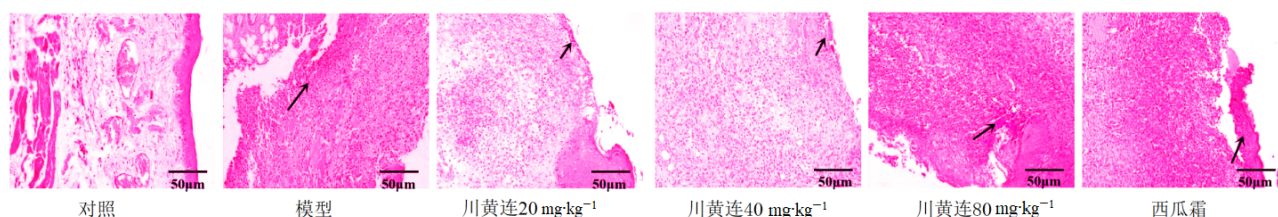


图1 各组大鼠口腔溃疡黏膜组织病理学变化(HE染色,×200)

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

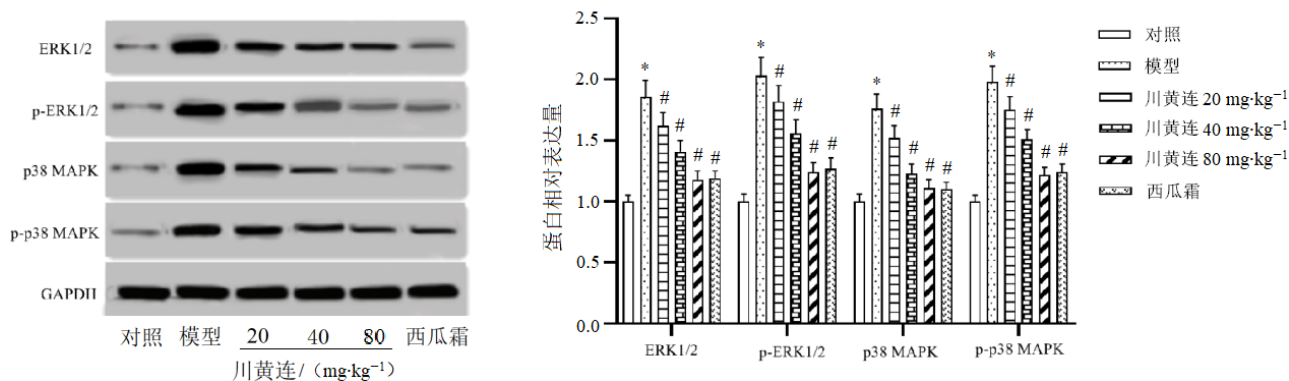
与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ 。* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model.

图2 各组大鼠口腔黏膜组织中 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达

Fig. 2 Expression of ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, and p-p38 MAPK of oral mucosal tissue of rats in each group

4 讨论

口腔溃疡发作时有明显的疼痛感,对患者的生活质量造成严重影响^[9]。口腔溃疡的发病机制较为复杂,有学者认为与免疫失调、遗传、感染、微量元

素缺乏以及微循环障碍等多种因素密切相关^[10]。目前临床治疗口腔溃疡尚无特效根治药物,因此探究口腔溃疡的发病机制,寻找有效治疗口腔溃疡的药物是近年来研究的重点^[11]。黄连味苦性寒,主要

入心经,清热泻火、燥湿解毒。目前常被临床用来治疗口疮等疾病,历代医家制方在配制口疮药物时也常用到黄连,且临床疗效显著^[12]。

本研究制备口腔溃疡大鼠模型,与对照组比较,造模大鼠口腔溃疡面积显著增加,给药后3、5、7 d时各组大鼠口腔溃疡的面积显著减小,提示川黄连可减少口腔溃疡面积,治疗口腔溃疡疾病。李简等^[13]研究发现,川黄连对化学灼烧型口腔溃疡引起的炎症性水肿有促消退作用,同时可降低溃疡组织内炎细胞的浸润。血浆黏度是影响全血黏度的重要因素,主要取决于血浆蛋白,尤其是FIB、脂蛋白和球蛋白的浓度。FIB是凝血反应中的关键分子,也是斑块结构中的重要成分,不同比重的FIB反应不同的斑块性质,与口腔溃疡疾病的危险分层相关。HCT反映红细胞的功能状态,红细胞沉降率(ESR)反应血液流速,血液流变学可反映血液的流动性、黏滞性、变型性及凝固性等。有研究发现,血液流变学异常,尤其是血液黏度增加,可导致循环阻力升高,微循环灌流量下降,影响组织代谢和功能,与口腔溃疡等多种疾病有关^[14]。梁扬师等^[15]研究证实,口腔溃疡大鼠模型组微循环指标HCT、FIB、血浆黏度均升高,本研究结果显示,川黄连干预后大鼠的HCT、FIB、血浆黏度指标均降低,提示川黄连可改善口腔溃疡大鼠的微循环,治疗口腔溃疡。

口腔溃疡发生发展、愈合过程和炎症反应密切相关,其中炎症介质TNF- α 和IL-6发挥重要作用。有学者研究发现,口腔溃疡患者口腔中TNF- α 水平升高可加重病情^[16]。由此可见,TNF- α 可促进口腔黏膜上皮层淋巴细胞的增殖、分化,通过释放大量炎症因子而引起局部免疫破坏。在炎症反应的早期,TNF- α 可诱导IL-6、IL-8等细胞因子的产生。而IL-8可通过刺激中性粒细胞促进其脱颗粒,进一步加重口腔黏膜的损伤^[17]。本研究结果显示,川黄连可抑制口腔溃疡大鼠血清中炎症因子TNF- α 、IL-6、IL-8水平,提示川黄连可抑制口腔溃疡大鼠血清中炎症因子水平,进而减轻口腔溃疡疾病的发展。

Th细胞在口腔溃疡免疫应答中起到非常重要的作用。Th1细胞主要分泌IFN- γ 、IL-1、IL-6、IL-8等促炎因子,介导细胞免疫应答和细胞毒作用;Th2细胞主要分泌IL-4、IL-10等抑炎因子,介导体液免疫反应,引起抗炎性反应。正常机体的Th1/Th2细胞处于动态平衡,当这个平衡失调并向Th1或Th2转化时,称为Th1/Th2漂移。向Th1免疫应答偏移

太多则导致机体的损伤,而Th2应答偏移太多则使机体处于免疫抑制状态。有学者研究发现^[18],口腔溃疡中有混合的Th1、Th2反应。和Th1型免疫反应有关的因素利于触发口腔溃疡,而和Th2型免疫反应有关的因素则可以降低触发口腔溃疡。IFN- γ 和IL-10分别是Th1和Th2细胞的自分泌生长因子,通过检测这2种细胞因子可以反映这2种细胞的状态和功能。本研究结果显示,川黄连干预后大鼠血清中IFN- γ 和IFN- γ /IL-10水平降低,IL-10水平增加,提示川黄连治疗机制可通过调节Th1/Th2细胞平衡在口腔溃疡治疗中发挥作用。相关研究发现,黄连中含有多种生物碱、酚性化合物及微量元素等,其在增强免疫、抗菌、抗溃疡、局部麻醉、镇静、镇痛等生物学活性中可发挥很好的调节作用,进而有效提高人体免疫力,缓解疼痛,加速溃疡面的愈合,促进口疮的治愈^[19]。

MAPK信号通路是近年来研究较广泛的信号通路之一,其可参与多种生理病理过程。目前信号转导分子p38 MAPK和ERK1/2是MAPK中研究最多的通路,其可有效调节细胞增殖、迁移和凋亡等。ERK1/2通路的激活、磷酸化可影响细胞的增殖和分化等生理病理过程,p38 MAPK的激活可以介导炎症、应激反应。有研究证实^[20],口腔溃疡模型组大鼠口腔黏膜组织中ERK1/2、p38 MAPK磷酸化水平升高,炎症因子增加。本研究结果表明川黄连显著抑制ERK1/2、p38 MAPK磷酸化水平,可能是其治疗大鼠口腔溃疡的作用机制。

川黄连可改善口腔溃疡大鼠微循环,维持Th1/Th2在体内保持平衡状态,其作用机制可能与抑制MAPK/ERK通路相关。本实验在研究过程中存在一定不足,由于成本等因素,本研究的样品量较少,使结果存在一定局限性,且由于川黄连在临床中的应用较少,关于患者对其味苦的依从性尚不能确定,在今后的研究中会增加研究样本量,为临床治疗口腔溃疡疾病提供更真实有效的实验参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yan H, Chen T X, Zuo Y L, et al. A systematic review and meta-analysis of acupuncture treatment for oral ulcer [J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2022, 2022: 6082179.
- [2] 田莉萍,王禹,王丽君. 口腔操联合回授法教育模式在复发性口腔溃疡门诊患者中的应用效果 [J]. 河南医学研究, 2023, 32(13): 2466-2469.

- Tian L P, Wang Y, Wang L J. Effect of oral exercises combined with feedback education model on recurrent aphthous ulcer [J]. Henan Med Res, 2023, 32(13): 2466-2469.
- [3] 高峻鹰, 李庆隆. 理中汤加味治疗脾胃虚寒型复发性口腔溃疡疗效及对血清炎症因子和补体 C3、C4 的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(9): 991-994.
- Gao J Y, Li Q L. Therapeutic effect of modified Lizhong Decoction on recurrent oral ulcer of spleen-stomach deficiency-cold type and its influence on serum inflammatory factors and complement C3 and C4 [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 29(9): 991-994.
- [4] 张韵, 刘春华. 基于“火郁发之”浅谈宣透法在复发性口腔溃疡中的应用 [J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 62-64.
- Zhang Y, Liu C H. Application of dispersing and expelling method in treating recurrent oral ulcer based on 'release of fire stagnation' [J]. Inf Tradit Chin Med, 2020, 37(1): 62-64.
- [5] 李碧娥, 王欢, 刘琪亮, 等. 柴胡桂枝干姜汤治疗胆热脾虚型复发性口腔溃疡的临床观察 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(16): 2156-2159.
- LI B e, Wang H, Liu Q L, et al. Effect of Chaihu-Guizhi-Ganjiang Decoction on recurrent oral ulcers [J]. J Pract Med, 2021, 37(16): 2156-2159.
- [6] 秦瑞博, 王洁雪, 陈方梅. 川黄连黄酮类成分抗氧化活性研究 [J]. 工业微生物, 2023, 53(2): 32-36.
- Qin R B, Wang J X, Chen F M. Study on the antioxidant activity of flavonoids from *Coptis chinensis* Franch. [J]. Ind Microbiol, 2023, 53(2): 32-36.
- [7] 姚晓艳, 刘文, 宋信莉, 等. 黄连抗胃溃疡炎症的活性成分研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(3): 1480-1483.
- Yao X Y, Liu W, Song X L, et al. Study on active components of *Rhizoma Coptidis* against gastric ulcer inflammation [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(3): 1480-1483.
- [8] Rong C, Muller M F, Xiang F, et al. Adaptive ERK signalling activation in response to therapy and in silico prognostic evaluation of EGFR-MAPK in HNSCC [J]. Br J Cancer, 2020, 123: 288-297.
- [9] 贺源方, 邓军, 胡长峰, 等. 口腔溃疡及其阴虚火旺、胃火炽盛证型的血浆蛋白质代谢特征研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4202-4206.
- He Y F, Deng J, Hu C F, et al. Research on plasma protein metabolic characteristics of oral ulcers with Yin deficiency with effulgent fire and intense stomach fire syndrome [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(7): 4202-4206.
- [10] 郝美娜, 桂建华, 马万千, 等. 清热养阴法治疗糖尿病合并复发性口腔溃疡的临床疗效观察 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(1): 118-119.
- Hao M N, Gui J H, Ma W Q, et al. Clinical observation on the treatment of diabetes mellitus complicated with recurrent oral ulcer by clearing heat and nourishing Yin [J]. Chin J Clin, 2021, 49(1): 118-119.
- [11] Luo Y M, Bolek E C, Quinn K A, et al. A prospective observational cohort study and systematic review of 40 patients with mouth and genital ulcers with inflamed cartilage (MAGIC) syndrome [J]. Semin Arthritis Rheum, 2022, 52: 151924.
- [12] 罗沙. 川黄连药用根茎与非药用须根异喹啉生物碱成分评价和药效初探 [D]. 成都: 西南交通大学, 2021.
- Luo S. Evaluation and preliminary efficacy studies on isoquinoline alkaloids of medicinal rhizomes and non-medicinal fibrous roots of *Sichuan coptidis rhizoma* [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2021.
- [13] 李简, 苏雪莲, 杨华飞, 等. 川黄连对大鼠化学灼烧型口腔溃疡的抗炎作用观察 [J]. 医学信息, 2020, 33(11): 61-63.
- Li J, Su X L, Yang H F, et al. Anti-inflammatory effect of Chuanhuanglian on chemically burned oral ulcer in rats [J]. Med Inf, 2020, 33(11): 61-63.
- [14] 禹洁, 彭涛, 左巧娟, 等. 利咽解毒方加减对口腔黏膜下纤维化患者 CCR2、TLR2 水平的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(4): 616-621.
- Yu J, Peng T, Zuo Q J, et al. Effect of modified liyan Jiedu formula on CCR2 and TLR2 levels in patients with oral submucous fibrosis [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(4): 616-621.
- [15] 梁扬师, 翦新春. 银杏黄酮对口腔溃疡大鼠微循环和免疫功能的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(3): 253-256.
- Liang Y S, Jian X C. Effects of ginkgo flavones on microcirculation and immune function in rats with oral ulcer [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(3): 253-256.
- [16] 师海瑞, 孔义华, 王显河, 等. 既往种植牙合并复发性口腔溃疡患者的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、IL-2、IL-6、TNF- α 水平变化分析研究 [J]. 中国口腔种植学杂志, 2019, 24(2): 55-58.
- Shi H R, Kong Y H, Wang X H, et al. Analysis on the changes of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, IL-2, IL-6 and TNF- α levels in patients with recurrent oral ulcer treated with dental implants [J]. Chin J Oral Implantol, 2019, 24(2): 55-58.
- [17] 贾艳霞, 刘宁静, 耿晓丽, 等. 复发性口腔溃疡病人血清维生素 D 水平与免疫功能的相关性 [J]. 护理研究,

- 2023, 37(13): 2438-2440.
- Jia Y X, Liu N J, Geng X L, et al. Relationship between serum vitamin D and immune function in patients with recurrent oral ulcer [J]. Chin Nurs Res, 2023, 37(13): 2438-2440.
- [18] 杜芹, 田鲲, 廖楚航. 复发性阿弗他溃疡 Th1/Th2 细胞因子的检测 [J]. 成都医学院学报, 2013, 8(6): 657-660.
- Du Q, Tian K, Liao C H. Expression of Th1/Th2-related cytokines in recurrent aphthous ulcers [J]. J Chengdu Med Coll, 2013, 8(6): 657-660.
- [19] Wang X, Liang F, Dai Z, et al. Combination of *Coptis chinensis* polysaccharides and berberine ameliorates ulcerative colitis by regulating gut microbiota and activating AhR/IL-22 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 318: 117050.
- [20] 齐绍云. 口殇康对阴虚型口腔溃疡模型大鼠的作用及机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- Qi S Y. Study on the effect and mechanism of Kouyangkang on the oral ulcer with Yin deficiency in rats [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2017.

[责任编辑 兰新新]