

# 口炎清颗粒对大鼠阴虚火旺型口腔溃疡的改善作用\*

刘宏<sup>1</sup>, 郑艳芳<sup>1</sup>, 李楚源<sup>2</sup>, 王德勤<sup>2</sup>, 彭维<sup>1</sup>, 姚宏亮<sup>1</sup>, 苏薇薇<sup>1</sup>

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515)

**摘要:** 口炎清颗粒是治疗口腔炎症的名优中成药, 具有滋阴清热、解毒消肿的功效。基于中医理论的病证结合思想, 通过注射三碘甲状腺原氨酸并结合苯酚灼烧刺激, 建立阴虚火旺型口腔溃疡动物模型; 在此基础上, 通过生化指标检测、病理组织观察, 研究口炎清颗粒在减少组织损伤、促进溃疡愈合方面的改善作用; 对指导其临床用药提供了依据。

**关键词:** 口炎清颗粒; 阴虚火旺; 口腔溃疡; 动物模型; 药效作用

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2018)02-0131-06

## Protective effects of Kouyanqing Granule on the oral ulcer rat model with Yin-xu-huo-wang syndrome

LIU Hong<sup>1</sup>, ZHENG Yanfang<sup>1</sup>, LI Chuyuan<sup>2</sup>, WANG Deqin<sup>2</sup>,

PENG Wei<sup>1</sup>, YAO Hongliang<sup>1</sup>, SU Weiwei<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Company Limited, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** Kouyanqing Granule (KYQG) is a famous Chinese herbal formula for the treatment of oral diseases in clinic. Based on the Disease-syndrome theory of traditional Chinese medicine, the present study established an oral ulcer rat model with Yin-xu-huo-wang syndrome by the combination of 3, 3', 5-triiodothyronine injection and phenol burning. Through this rat model, KYQG's protective effects on reducing oral damage and promoting ulcer healing were evaluated including parameter detection and histopathological observation.

**Key words:** Kouyanqing Granule; Yin-xu-huo-wang syndrome; oral ulcer; rat model; protective effects

口炎清颗粒是治疗口腔炎症的名优中成药, 2002 年被列为国家中药保护品种 (ZYB20720022230); 2012 年收入《国家基本药物目录》; 2017 年收入《国家医疗保险药品目录》, 为甲类医保产品。口炎清颗粒由山银花、玄参、麦冬、天冬、甘草组成, 具有滋阴清热、解毒消肿的

功效, 对治疗复发性口腔溃疡、口腔黏膜炎、口腔扁平苔藓等疾病, 临床疗效显著<sup>[1-4]</sup>。本文基于中医理论的病证结合思想, 通过注射三碘甲状腺原氨酸并结合苯酚灼烧刺激, 建立阴虚火旺型口腔溃疡动物模型; 在此基础上, 通过生化指标检测、病理

\* 收稿日期: 2017-10-12

基金项目: 中山大学成果转化项目 (33000-18825004); 广州市民生科技攻关计划课题 (201803010082)

作者简介: 刘宏 (1988 年生), 男; 研究方向: 中药作用机理; E-mail: beauty19880711@163.com

通信作者: 苏薇薇 (1959 年生), 女; 研究方向: 创新药物的研究开发, 中药上市后质量与药效再评价; E-mail: lssww@126.com

组织观察研究口炎清颗粒在减少组织损伤、促进溃疡愈合方面的改善作用。本文为中药现代化研究提供了一种新的动物模型;同时进一步明确了口炎清颗粒的作用特点,为指导其临床用药提供了依据。

## 1 材 料

### 1.1 动物

SD 雄性大鼠 48 只, SPF 级, 体质量 120 ~ 150 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (粤) 2013 - 0002。

### 1.2 仪器

麻醉机 (MATRX), 数控超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司, KQ - 250DE), 电子分析天平 (Sartorius), 电子体温计 (欧姆龙 MC - 347), 冰箱 (Siemens), 塑料细管 (长 6 cm、内径约 5 mm)。

### 1.3 药品、试剂

口炎清流膏 (广州白云山和记黄埔中药有限公司, 批号: J3M009), 用蒸馏水分别配制成 26.1、78.3 和 234.9 mg/mL; 牛黄解毒片 (北京同仁堂科技发展股份有限公司, 批号: 15121398), 用蒸馏水配制成 7.3 mg/mL; 氢氧化钠 (天津市福晨化学试剂厂, 批号: 20151028); 三碘甲状腺原氨酸 (百灵威科技有限公司, 批号: L720N03), 先用 0.1 mol/L NaOH 溶液 (生理盐水稀释) 1 mL 溶解后, 再用生理盐水配制成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 苯酚 (广州化学试剂厂, 批号: 20150503 - 1), 蒸馏水稀释至 90%; 异氟烷 (河北九派制药股份有限公司, 批号: 130601); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术研究所), 超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒、一氧化氮合成酶 (NOS) 测试盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒、谷胱甘肽 - 过氧化物酶 (GSH - Px) 测试盒 (南京建成生物工程研究所)。

### 1.4 环境

饲养于中山大学生命科学学院中药与海洋药物实验室, 许可证号: SCXK - (粤) 2009 - 0020。实验室洁净度 SPF 级, 温度 20 ~ 23  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 50% ~ 65%。在实验动物适应新环境 1 周后开始实验。

## 2 方 法

### 2.1 试剂配制

口炎清流膏, 用蒸馏水分别配制成 50、150 和 450 mg/mL; 牛黄解毒片 (NP), 用蒸馏水配制成

14 mg/mL; 三碘甲状腺原氨酸 (T3), 用 0.1 mol/L NaOH 溶液溶解, 再用生理盐水配制成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 苯酚用蒸馏水稀释至  $\varphi = 90\%$ ; 水合氯醛用生理盐水配制至  $w = 10\%$ 。

### 2.2 建立阴虚火旺型口腔溃疡模型

大鼠随机分成空白对照组、阴虚火旺型口腔溃疡模型组, KYQG 低剂量、中剂量、高剂量组, NP 组, 每组 8 只。除空白组大鼠外, 其余各组大鼠皮下注射三碘甲状腺原氨酸 (剂量 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 体积 1 mL/kg), 空白组大鼠皮下注射等体积生理盐水, 连续注射 14 d; 随后各组大鼠 (除空白组外) 经异氟烷麻醉, 暴露左右两侧颊囊; 将棉球置于塑料细管 (长 6 cm、内径约 5 mm) 底部并与管口平齐, 滴加  $\varphi = 90\%$  苯酚直至刚好可以浸透棉球; 将塑料细管棉球端平放在大鼠两侧颊膜上灼烧 30 s, 可见直径约为 5 mm 的白色损伤, 24 h 后观察。造模同时进行灌胃给药。KYQG 低剂量为 500 mg/kg/d, KYQG 中剂量为 1 500 mg/kg/d, KYQG 高剂量为 4 500 mg/kg/d, NP 剂量为 140 mg/kg/d, 连续 21 d。空白组和模型组给予等体积生理盐水。其中, KYQG 低剂量和 NP 剂量为人体临床等效剂量。

### 2.3 指标检测

1) 阴虚火旺检测指标: 一般状态: 每日观察记录毛色变化、大小便及情绪激惹情况等; 体质量: 每日上午饲喂前称量; 摄食量/饮水量: 每日上午注射后称量每笼剩余食物量和水量, 平均摄食量 = 总摄食量/每笼大鼠数量, 平均饮水量 = 总饮水量/每笼大鼠数量; 体温: 每日下午用电子体温计测肛温。

2) 口腔溃疡检测指标: 口腔溃疡情况: 口腔溃疡造模 24 h 后, 大鼠每日经异氟烷麻醉, 观察其溃疡的范围、颜色、愈合情况; 组织病理观察: 末次给药 1 h 后, 每组随机选取 2 只大鼠, 经  $w = 10\%$  水合氯醛腹腔过量注射处死后, 暴露大鼠左右颊囊, 切取 6 mm  $\times$  4 mm 深达黏膜下层的黏膜组织, 经无菌生理盐水冲洗后, 置于  $\varphi = 10\%$  福尔马林固定, 24 h 后将标本进行石蜡包埋, 制作切片后, 进行组织病理观察; 生化指标检测: 末次给药 1 h 后, 各组大鼠用  $w = 10\%$  水合氯醛腹腔过量注射处死, 取下口腔黏膜组织, 生理盐水漂洗, 滤纸拭干后称量, 制备 10% 组织匀浆 (组织/生理盐水: 1/9, V/V), 离心 (4  $^{\circ}\text{C}$ , 2 500 r/min, 10 min), 取上清液分装, -80  $^{\circ}\text{C}$  冷藏, 按照试剂盒说明书测定上清液的 SOD、MDA、GSH - Px、

NOS。

### 2.4 数据处理

数据采用均值 ± 标准差表示，运用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析 (ANOVA) 和 T 检验分析，*P* 值小于 0.05 或 0.01 认为有显著性差异。

## 3 结果

### 3.1 阴虚火旺型口腔溃疡大鼠模型的建立

1) 阴虚火旺造模：由表 1、图 1 所示，模型组

大鼠摄食量和饮水量均大于空白组，分别反映食欲亢进和口干咽燥的特征；体重显著低于空白组 ( $P < 0.01$ )，反映形体消瘦的特征；体温显著高于空白组 ( $P < 0.01$ )，反映五心烦热的特征。

2) 口腔溃疡造模：由图 2 所示，模型组大鼠口腔粘膜经  $\varphi = 90\%$  苯酚灼烧，24 h 后出现内径约为 5 mm 的圆形溃疡，表面有坏死组织或黄白色伪膜覆盖，表明口腔溃疡形成。

表 1 模型组大鼠的体质量、体温、摄食量和饮水量变化<sup>1)</sup>

Table 1 Changes of body weight, body temperature, food, and water intake in model rats

组别	体质量 D1/g	体质量 D14/g	体温 D1/°C	体温 D14/°C	摄食量 D14/g	饮水量 D14/g
空白	280.00 ± 10.68	330.25 ± 12.52	36.86 ± 0.35	36.40 ± 0.48	28.70	61.6
模型	274.63 ± 15.31	282.75 ± 16.69**	37.08 ± 0.26	37.80 ± 0.42**	37.5	88.8

1) 与空白对照组比较，\*  $P < 0.05$ ；\*\*  $P < 0.01$ 。D1 为开始造模第 1 天；D14 为开始造模第 14 天。

\*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  vs. normal group. D1 represents the first day of modelling; D14 represents the fourteenth day of modelling.

### 3.2 口炎清颗粒对阴虚火旺型口腔溃疡大鼠的改善作用

1) 口腔溃疡面积变化：采用 Image - Pro Plus 6.0 软件计算口腔溃疡面积，结果如表 2、图 3 所示。在口腔溃疡形成的第 1 天，各组大鼠溃疡面积均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )；在口腔溃疡形成的第 7 天，与模型组相比，GYQG 低、中、高剂量和 NP 组大鼠的口腔溃疡面积显著缩小 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )，表明 KYQG 给药后可加速溃疡愈合。

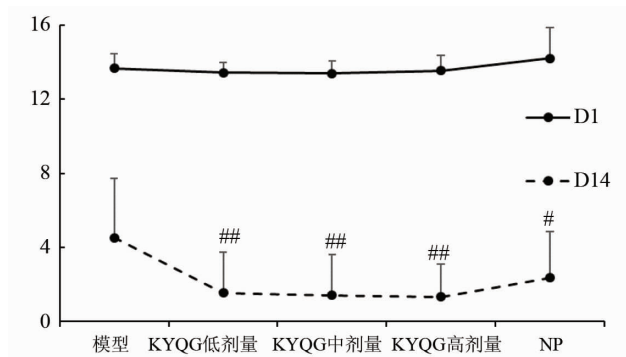


图 3 各组大鼠口腔溃疡的面积变化

Fig. 3 Changes in the area of oral ulcers

2) 口腔溃疡愈合情况：由表 3 所示，模型组大鼠在口腔溃疡形成第 6 天才开始出现愈合，而 KYQG 低、中、高剂量及 NP 组大鼠在第 5 天就开始出现愈合；在口腔溃疡形成的第 7 天，KYQG

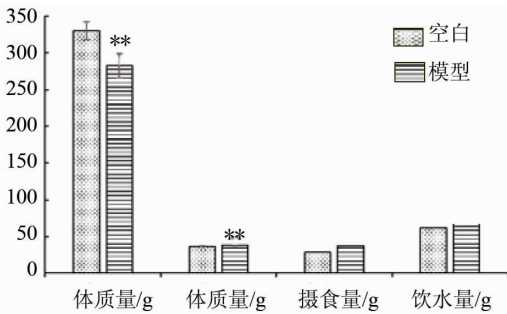


图 1 模型组大鼠的体质量、体温、摄食量和饮水量变化

Fig. 1 Changes of body weight, body temperature, food, and water intake in model rats



图 2 模型组大鼠口腔溃疡的形成

Fig. 2 Formation of oral ulcer in model rats

低、中、高剂量组的愈合率为 62.5%，NP 组的愈合率为 50.0%，均明显高于模型组的愈合率 18.8%，表明 KYQG 给药后可缩短口腔溃疡病程，加快愈合速度。

3) 口腔粘膜组织病理观察：由图 4 所示，在口腔溃疡形成第 7 天，空白组：黏膜上皮结构完整，无炎症细胞浸润；模型组：黏膜上皮结构破坏，肉芽组织增生，仍有炎症细胞浸润；KYQG 低、中、高 3 个剂量组：上皮结构完整性逐渐恢复并增厚，炎症细胞明显减少，肉芽组织、新生毛细血管增生；NP 组：上皮结构完整性逐渐恢复并增厚，炎症细胞明显减少，肉芽组织增生。结果表明 KYQG 给药后可促进黏膜上皮结构的修复，减少炎

症细胞浸润，促进溃疡愈合。

4) 口腔粘膜生化指标检测：由表 4 所示，模型组大鼠的 SOD、MDA、GSH - Px、NOS 均发生显著变化，氧自由基的清除发生障碍，口腔组织出现损伤。在口腔溃疡的第 7 天，KYQG 低、中、高剂量给药均能显著提升与清除自由基相关的 SOD、GSH - Px 活性，显著降低与自由基相互作用的 MDA 含量、NOS 活性，且呈现一定的剂量依赖关系；NP 给药对上述 4 个指标均有显著改善作用。结果表明 KYQG 给药后能够清除口腔组织中过量的自由基，调节氧化应激能力，起到减少组织损伤的作用。

表 2 各组大鼠口腔溃疡的面积变化<sup>1)</sup>

Table 2 Changes in the area of oral ulcers

面积/mm <sup>2</sup>	模型	KYQG 低剂量	KYQG 中剂量	KYQG 高剂量	NP
D1	13.67 ± 0.77	13.43 ± 0.55	13.40 ± 0.67	13.55 ± 0.83	14.12 ± 1.66
D14	4.53 ± 3.21	1.54 ± 2.19 <sup>##</sup>	1.42 ± 2.19 <sup>##</sup>	1.34 ± 1.75 <sup>##</sup>	2.36 ± 2.50 <sup>#</sup>

1) 与空白对照组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ；<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。D1 为开始给药第 1 天；D14 为开始给药第 14 天。

<sup>#</sup> $P < 0.05$  and <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. model group. D1 represents the first day of treatment; D14 represents the fourteenth day of treatment.

表 3 各组大鼠给药后口腔溃疡愈合情况

Table 3 Healing of oral ulcers in rats after treatment

组别	溃疡数	D5 愈合数	D6 愈合数	D7 愈合数	总愈合数	总愈合率/%
模型	16	0	1	2	3	18.8
KYQG 低剂量	16	1	4	5	10	62.5
KYQG 中剂量	16	1	4	5	10	62.5
KYQG 高剂量	16	1	6	3	10	62.5
NP	16	1	4	3	8	50.0

表 4 各组大鼠的 SOD、MDA、GSH - Px、NOS 变化<sup>1)</sup>

Table 4 Changes of SOD, MDA, GSH - Px, and NOS after treatment

组别	SOD/(U · mg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol · mg <sup>-1</sup> )	GSH-Px/(1 · mg <sup>-1</sup> )	NOS/(U · mg <sup>-1</sup> )
空白	111.61 ± 18.11	1.63 ± 0.19	74.41 ± 7.00	0.28 ± 0.06
模型	71.40 ± 9.21 <sup>**</sup>	2.03 ± 0.26 <sup>*</sup>	63.15 ± 6.51 <sup>*</sup>	0.51 ± 0.11 <sup>**</sup>
KYQG 低剂量	93.73 ± 8.46 <sup>##</sup>	1.75 ± 0.28	72.53 ± 5.14 <sup>##</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>##</sup>
KYQG 中剂量	93.94 ± 4.38 <sup>##</sup>	1.64 ± 0.29 <sup>#</sup>	73.03 ± 4.81 <sup>##</sup>	0.29 ± 0.10 <sup>##</sup>
KYQG 高剂量	124.02 ± 12.97 <sup>##</sup>	1.54 ± 0.22 <sup>##</sup>	75.58 ± 3.67 <sup>##</sup>	0.26 ± 0.03 <sup>##</sup>
NP	109.78 ± 7.49 <sup>##</sup>	1.55 ± 0.25 <sup>##</sup>	75.72 ± 3.05 <sup>##</sup>	0.33 ± 0.08 <sup>##</sup>

1) 表中数据为每毫克蛋白的变化量。与空白对照组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

The data represent the changes in per milligram protein. <sup>\*</sup> $P < 0.05$  and <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs. normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$  and <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. model group.

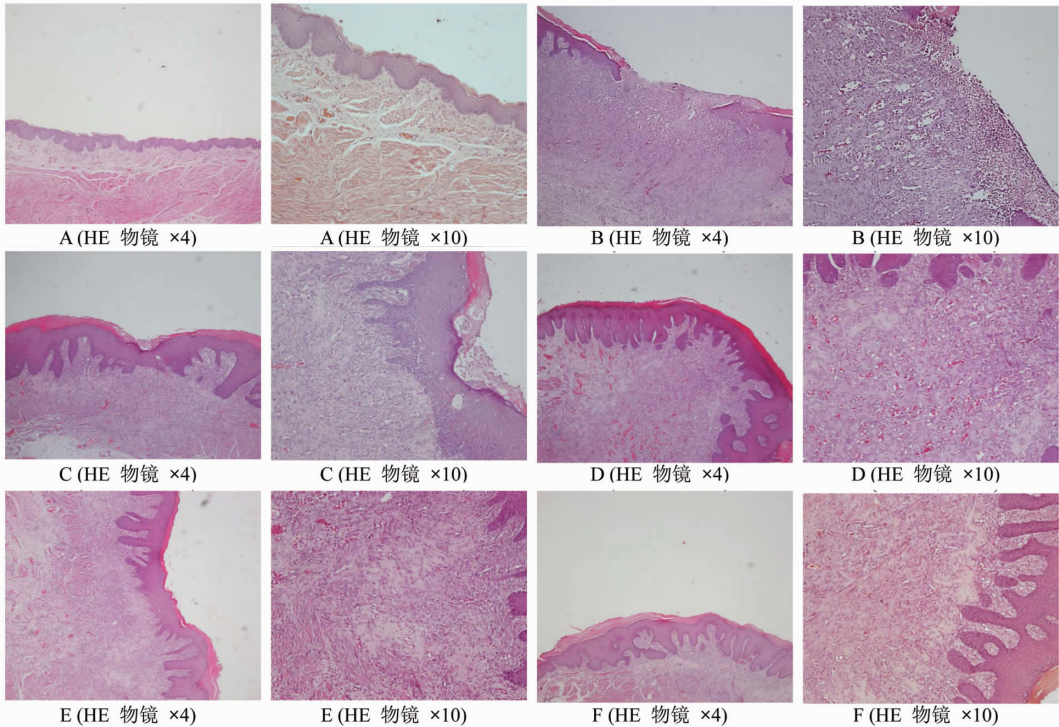


图 4 各组大鼠口腔黏膜组织病理观察

A: 空白组; B: 模型组; C: NP 组; D: KYQG 低剂量组; E: KYQG 中剂量组; F: KYQG 高剂量组

Fig. 4 Histopathological observation of the oral mucosa after treatment

A: normal group; B: model group; C: NP group; D: low - dose KYQG group;  
E: middle - dose KYQG group; F: high - dose KYQG group

## 4 讨论

病证结合的动物模型符合临床实际,是中医药研究的重要技术手段。本研究结合阴虚火旺造模法和口腔溃疡造模法<sup>[5]</sup>,建立了阴虚火旺型口腔溃疡大鼠模型。模型大鼠出现饮水与摄食增多、体温升高,体质量增长缓慢,情绪激动等表现,模拟口干咽燥、食欲亢进、五心烦热、形体消瘦、烦躁易怒等临床指征<sup>[6]</sup>,在此基础上,通过苯酚诱导口腔溃疡形成,该动物模型具有实质创新。

口腔炎症疾病与多种因素有关,其中氧自由基的清除为可能的发病机制。当机体受到外在因素刺激时,自由基的产生与清除功能失衡,过量自由基造成组织损伤而引起病变<sup>[7]</sup>。SOD、GSH - Px 是体内清除自由基的重要物质<sup>[8-9]</sup>,具有抗氧化能力,能够显著降低过量自由基带来的组织损伤。MDA 是自由基作用于脂质发生过氧化反应所形成的氧化终产物,可间接表征组织的损伤程度。NOS 可以分泌产生具有多种功能的介质,参与机体组织细胞损伤和增殖,其中 NO 可通过与自由基相互作用,导致组织损伤<sup>[10]</sup>。口炎清颗粒给药处理后,可显

著提升 SOD、GSH - Px 活性,降低 MDA 含量、NOS 活性,提示其可能通过调节组织的氧化应激系统,抑制脂质过氧化及 NO 产生,从而起到减少组织损伤的作用。此外,口腔黏膜组织病理观察结果表明,口炎清颗粒能够促进口腔黏膜上皮结构的修复,减少炎症细胞浸润,有效促进口腔溃疡的伤口愈合,缩短溃疡病程。

综上所述,口炎清颗粒在口腔炎症疾病的治疗中,既能调节口腔组织局部的氧化应激能力,减少组织损伤,又能修复口腔黏膜上皮结构,促进伤口愈合,发挥多靶点、多途径的综合作用。

### 参考文献:

- [1] 张一凡. 口炎清颗粒用于治疗口腔黏膜病的系统评价与 Meta 分析[D]. 广州:广东药学院, 2015.  
ZHANG Yifan. Systematic review and meta analysis of Kouyanqing Grauales in the treatment of oral mucosa diseases[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2015.
- [2] 苏薇薇. 岭南特色中药指纹图谱质量控制关键技术研究[M]. 广州:广东科技出版社, 2012: 145 - 175.

- SU Weiwei. Key Technologies of Fingerprint for the Quality Control of the herbs with "Lingnan" characters[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2012: 145 - 175.
- [3] LIU H, ZHENG Y F, LI C Y, et al. Discovery of anti-inflammatory ingredients in Chinese Herbal Formula Kouyanqing Granule based on relevance analysis between chemical characters and biological effects[J]. Scientific Reports, 2015, 5:18080. DOI: 10.1038/srep18080.
- [4] 郑艳芳,李楚源,刘宏,等. 口炎清颗粒发挥抗炎药效的组方配伍规律研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2016, 55(3):145 - 150.
- ZHENG Yanfang, LI Chuyuan, LIU Hong, et al. Formula principles of Kouyanqing granule for the anti-inflammatory effects[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2016, 55(3):145 - 150.
- [5] 董亮,何永志,王远亮,等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013(5):53 - 58.
- DONG Liang, HE Yongzhi, WANG Yuanliang, et al. Research progress on application of superoxide dismutase (SOD)[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2013(5): 53 - 58.
- [6] 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.
- MIAO Mingsan, XU Yuyin, LIU Huili. Research progress on the animal models of oral ulcer[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2006, 24(9): 1636 - 1637.
- [7] 贺玉伟,柴程芝,寇俊萍,等. 甲状腺素诱导小鼠模型表观指征变化与阴虚火旺证的相关性研究[J]. 实验动物科学, 2013, 30(2): 1 - 6.
- HE Yuwei, CHAI Chengzhi, KOU Junping, et al. Correlative study between the exterior signs of mice model induced by thyroxine and hyperactivity of Fire due to Yin Deficiency Syndrome[J]. Laboratory Animal Science, 2013, 30(2): 1 - 6.
- [8] 杨明聪,范小平,王春. 低频超声对大鼠颊囊黏膜溃疡组织SOD、MDA含量的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(26): 2711 - 2713.
- YANG Mingcong, FAN Xiaoping, WANG Chun. Effects of low-frequency ultrasound irradiation on SOD and MDA levels in cheek pouch mucosa ulcer tissue of rats[J]. Chongqing Medical Journal, 2012, 41(26): 2711 - 2713.
- [9] ARIKAN S, DURUSOY C, AKALIN N, et al. Oxidant/antioxidant status in recurrent aphthous stomatitis[J]. Oral Diseases, 2009, 15(7): 512 - 515.
- [10] 步革,李楠,马文斌,等. 血清NO及NOS在雷公藤多苷治疗复发性口疮的疗效评价中的应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5(6): 692 - 693.
- BU Ge, LI Nan, MA Wenbin, et al. The value of serum NO and NOS levels in evaluating therapeutic results of TWP for RAU[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2006, 5(6): 692 - 693.