

本文引用:谭怡丝,谭 劲,朱可可,符 静,王宗康.加味丹玄口康对口腔黏膜下纤维化大鼠免疫细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 以及 IFN- γ 水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(10): 1663-1668.

加味丹玄口康对口腔黏膜下纤维化大鼠免疫细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 以及 IFN- γ 水平的影响

谭怡丝¹, 谭 劲^{2*}, 朱可可², 符 静¹, 王宗康¹

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

〔摘要〕目的 观察加味丹玄口康对口腔黏膜下纤维化(oral submucous fibrosis, OSF)大鼠血清乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)及 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)水平的影响,进一步验证加味丹玄口康治疗 OSF 的疗效机制。**方法** 60 只雄性 SD 大鼠随机均分为 5 组(正常组、模型组及加味丹玄口康低、中、高剂量组)。正常组自然饲养,其余 4 组采用颊黏膜下注入槟榔提取物(areca nut extract, ANE)后再用自制刷蘸 ANE 刷颊黏膜的方法造模 8 周。加味丹玄口康高、中、低剂量组通过灌服 4、8、12 g/kg 剂量的加味丹玄口康进行干预,模型组灌以 10 mL/(kg·d)蒸馏水,均连续 8 周。实验结束后测定大鼠开口度,采用 HE 染色法观察各组大鼠口腔颊黏膜病理形态,采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中 LDH、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IFN- γ 水平。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠颊黏膜出现明显的纤维化表现,张口度和血清 IFN- γ 水平降低($P<0.05$),血清 LDH、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,加味丹玄口康高、中、低剂量组张口度、血清 IFN- γ 水平均升高($P<0.05$),血清 LDH、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显降低($P<0.05$)。与加味丹玄口康低剂量组比较,加味丹玄口康中剂量组血清 IFN- γ 水平升高($P<0.05$),血清 LDH、IL-1 β 、IL-6 降低($P<0.05$),加味丹玄口康高剂量组张口度和血清 IFN- γ 水平升高($P<0.05$),血清 LDH、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显降低($P<0.05$)。与加味丹玄口康中剂量组比较,加味丹玄口康高剂量组张口度和血清 IFN- γ 水平均明显升高($P<0.05$),血清 LDH、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显降低($P<0.05$)。OSF 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平与张口度均呈高度负相关,与血清 LDH 水平呈高度正相关($P<0.01$),血清 IFN- γ 水平与张口度呈高度正相关,与血清 LDH 水平呈负相关($P<0.01$)。**结论** 加味丹玄口康能通过降低促纤维化免疫因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌,增加抑制纤维化免疫因子 IFN- γ 的分泌,影响机体免疫功能,并能增加张口度及降低 OSF 生物标志物 LDH 水平,进而改善口腔黏膜下纤维化,控制 OSF 病情进展。

〔关键词〕 加味丹玄口康;口腔黏膜下纤维化;乳酸脱氢酶;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1 β ;白细胞介素-6; γ 干扰素

〔中图分类号〕 R276.8

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.10.012

Effects of Modified Danxuan Koukang on immune cytokine levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN- γ in rats with oral submucosal fibrosis

TAN Yisi¹, TAN Jin^{2*}, ZHU Keke², FU Jing¹, WANG Zongkang¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of Modified Danxuan Koukang on serum levels of lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and interferon- γ (IFN- γ) in rats with oral submucosal fibrosis (OSF), and further verify the therapeutic mechanism of Modified Danxuan Koukang on OSF. **Methods** A total of 60 male

〔收稿日期〕 2022-04-18

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81874496)。

〔第一作者〕 谭怡丝,女,硕士研究生,研究方向:口腔黏膜病防治与研究。

〔通信作者〕 * 谭 劲,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:tanjinhn@aliyun.com。

SD rats were randomly divided into 5 groups (normal group, model group, and low-dose, medium-dose, and high-dose groups of Modified Danxuan Koukang). Normal group was naturally fed, and the other 4 groups were treated by injecting areca nut extract (ANE) into buccal mucosa and then brushing ANE on buccal mucosa with a self-made brush for 8 weeks. The high-dose, medium-dose, and low-dose groups were treated with different doses (4, 8, 12 g/kg) of Modified Danxuan Koukang, and model group was given 10 mL/(kg·d) of distilled water, all for 8 weeks. After the experiment, the mouth opening of rats was tested; HE staining was used to detect the histopathological features in the buccal mucosa of rats; the levels of LDH, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN- γ in each group were detected by ELISA. **Results** Compared with normal group, the model group showed obvious fibrosis in the buccal mucosa tissue, significant decrease in mouth opening and IFN- γ ($P<0.05$), and significant increase in serum levels of LDH, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P<0.05$). Compared with model group, the mouth opening and serum level of IFN- γ increased significantly ($P<0.05$), and the serum levels of LDH, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 decreased significantly ($P<0.05$) in high-dose, medium-dose, and low-dose groups of Modified Danxuan Koukang. Compared with low-dose group of Modified Danxuan Koukang, the medium-dose group showed significant increase in serum level of IFN- γ ($P<0.05$), and significant decrease in serum levels of LDH, IL-1 β , and IL-6 ($P<0.05$). Compared with the low-dose group of Modified Danxuan Koukang, the high-dose group showed significant increase in mouth opening and serum level of IFN- γ ($P<0.05$), and significant decrease in serum levels of LDH, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P<0.05$). Compared with the medium-dose group of Modified Danxuan Koukang, high-dose group showed significant increase in mouth opening and serum level of IFN- γ ($P<0.05$), and significant decrease in serum levels of LDH, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P<0.05$). The serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in OSF rats were highly negatively correlated with mouth opening and highly positively correlated with serum LDH level ($P<0.01$); serum level of IFN- γ was highly positively correlated with mouth opening but negatively correlated with serum LDH level ($P<0.01$). **Conclusion** Modified Danxuan Koukang may reduce the secretion of fibrosis stimulating immune cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) and increase the secretion of fibrosis inhibiting immune cytokine (IFN- γ). It could affect the body's immune function, increase mouth opening and reduce biomarker level of LDH in OSF, which further ameliorate symptoms of oral submucosal fibrosis and control the disease progression of OSF.

[**Keywords**] Modified Danxuan Koukang; oral submucosal fibrosis; lactate dehydrogenase; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β ; interleukin-6; interferon- γ

口腔黏膜下纤维化(oral submucous fibrosis, OSF)是一种慢性的、进行性的、不可逆的胶原代谢紊乱,黏膜纤维化和功能改变,会引起口腔灼烧感,口腔黏膜变白变硬,牙关紧闭和张口受限,并有恶性转化的潜在风险^[1-2]。文献表明,OSF 对许多患者的口腔健康相关生活质量有显著影响,大部分患者对自己的口腔健康状况不满意^[3-4]。在亚洲,咀嚼槟榔是公认的 OSF 的主要危险因素。槟榔碱是槟榔的主要药理活性成分^[5],槟榔碱可引起炎症和细胞胶原代谢紊乱而诱发 OSF,咀嚼槟榔诱发口腔黏膜炎症是 OSF 发病机制中的关键事件^[6-7]。然而,当前关于现有治疗方法缓解 OSF 症状的证据还很薄弱。

本团队采用加味丹玄口康治疗 OSF,已经发现加味丹玄口康可以增强 Axin 基因在槟榔提取物(areca nut extract, ANE)诱导的大鼠上皮细胞中的表达,能拮抗槟榔碱对于黏膜上皮细胞的细胞毒性,抑制胶原的合成并改善 OSF 症状^[8-10]。为了进一步验证其疗效机制,本实验通过 ELISA 法观察加味丹玄口康对槟榔碱诱导的 OSF 大鼠血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β

(interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)水平的影响,同时观察各组大鼠口腔黏膜病理形态及张口度和血清乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平,并进行对比和相关性分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠,60 只,体质量 220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。实验通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查(审批号:LLBH-202103100002)。大鼠自由摄食及饮水,饲养温度 20~25 ℃,湿度 50%~70%。

1.2 药物

中药加味丹玄口康配方:丹参 10 g,玄参 10 g,生地黄 10 g,白芍 10 g,生黄芪 10 g,当归 10 g,红花 5 g,白花蛇舌草 10 g,夏枯草 10 g,茵陈 10 g,薄荷 10 g,桔梗 10 g。均由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供,为同一批次同一产地药材。将以

上12味药按处方量取14剂,一剂生药(共115 g)加入500 mL温开水冲泡并充分搅拌,使用水煎浓缩的方法将药物浓缩成500 mL液体,生药浓度为0.23 g/mL。低、中、高剂量加味丹玄口康大鼠灌胃量按照成人每日用量的1、2、3倍,定为等效剂量(正常成人质量按60 kg进行换算),即分别按4、8、12 mL/kg灌胃,1次/d,现配现用。

1.3 主要试剂及仪器

氢溴酸槟榔碱(成都德斯特生物有限公司,批号:300-08-3);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、LDH ELISA试剂盒均购自江苏菲亚生物科技有限公司(批号分别为2109R11,2109R16,2109R19,2109R20,2109R25)。

电热恒温培养箱(武汉一恒苏净科学仪器有限公司,型号:DHP-9402L);酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司,型号:RT-6100);微量高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司,型号:TG16W);台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司,型号:TGL16M)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及模型制备 将60只雄性SD清洁级大鼠随机分为5组(正常组、模型组和加味丹玄口康低、中、高剂量组),每组12只。正常组不作任何干预,模型组及加味丹玄口康低、中、高剂量组参照本课题组前期造模方法^[10]构建OSF模型:48只大鼠乙醚麻醉后,在颊黏膜下注入10 mg/mL的ANE 0.2 mL,再用自制刷蘸ANE,上下、前后各刷20次,之后禁水禁食2 h。1次/d,连续8周后,48只大鼠均出现明显张口受限,颊黏膜苍白,扪之发硬,黏膜下可扪及条索状改变,提示模型建立成功。

1.4.2 药物干预 加味丹玄口康低、中、高剂量组以组方4、8、12 g/kg(按照体表面积药物剂量换算公式计算,分别相当于60 kg成人剂量的1、2、3倍)灌胃8周,1次/d,模型组以每天10 mL/kg蒸馏水灌胃,正常组不作任何干预。

1.4.3 开口度测定 最后一次灌胃后,各组大鼠禁食、禁水24 h,对SD大鼠腹腔注射水合氯醛(3 mL/kg,10%),固定大鼠上颌切牙,用弹簧拉力器(1 N)牵拉大鼠下颌,再用游标卡尺测量上下切牙切缘之间的距离,每只大鼠测量3次,精确到0.1 mm,取平均值。

1.4.4 口腔颊黏膜组织的HE染色观察 开口度测定后,随机取一侧大鼠口腔颊黏膜,生理盐水冲洗后放入4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片,采用常规HE染色方法进行染色,显微镜下观察颊黏膜组织病理改变情况。

1.4.5 血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和LDH的ELISA检测 开口度测定结束后,打开大鼠腹腔,从腹主动脉采血,严格按照ELISA试剂盒说明步骤检测各组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、LDH水平。

1.5 统计学方法

所有数据均采用SPSS 26.0进行处理,并采用GraphPad Prism 9进行图形绘制和相关性分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”描述,组间比较采用完全随机设计单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用最小显著差法(LSD)。采用Spearman相关检验进行相关性分析, R 为相关系数。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验过程中,正常组、模型组、加味丹玄口康低剂量组、加味丹玄口康中剂量组、加味丹玄口康高剂量组分别意外死亡3、2、4、2、3只大鼠。

2.1 各组大鼠张口度、血清LDH比较

与正常组比较,模型组张口度明显降低($P < 0.05$),血清LDH水平明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,加味丹玄口康高、中、低剂量组张口度均明显升高($P < 0.05$),血清LDH水平均明显降低($P < 0.05$)。与加味丹玄口康低剂量组比较,加味丹玄口康中、高剂量组血清LDH水平明显降低($P < 0.05$),加味丹玄口康高剂量组张口度明显升高($P < 0.05$)。与加味丹玄口康中剂量组比较,加味丹玄口康高剂量组张口度明显升高($P < 0.05$),血清LDH水平明显降低($P < 0.05$)。详见表1。

表1 各组大鼠张口度和血清LDH水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	张口度/mm	LDH/(ng·mL ⁻¹)
正常组	9	22.14 $\pm$ 1.67	27.99 $\pm$ 1.63
模型组	10	16.65 $\pm$ 1.13*	58.77 $\pm$ 2.46*
加味丹玄口康低剂量组	8	18.04 $\pm$ 1.16**	52.39 $\pm$ 2.19**
加味丹玄口康中剂量组	10	18.65 $\pm$ 0.86**	48.78 $\pm$ 2.57** Δ
加味丹玄口康高剂量组	9	19.71 $\pm$ 0.85** Δ $\diamond$	34.22 $\pm$ 2.70** Δ $\diamond$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $P < 0.05$;与加味丹玄口康低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与加味丹玄口康中剂量组比较, $\diamond P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠血清免疫细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IFN- γ 水平比较

与正常组比较,模型组血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均显著升高($P < 0.05$),血清IFN- γ 水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,加味丹玄口康高、中、低剂量组血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均显著降低($P < 0.05$),血清IFN- γ 水平明显升高($P < 0.05$)。与加

味丹玄口康低剂量组比较,加味丹玄口康中剂量组血清 IL-1 β 、IL-6 水平均显著降低($P<0.05$),加味丹玄口康高剂量组血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均明显降低($P<0.05$),加味丹玄口康中、高剂量组血清 IFN- γ 水平均显著升高($P<0.05$)。与加味丹玄口康中剂量组比较,加味丹玄口康高剂量组血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均明显降低($P<0.05$),血清 IFN- γ 水平显著升高($P<0.05$)。详见表 2。

2.3 各组大鼠口腔颊黏膜组织病理形态

正常组口腔颊黏膜上皮角化层呈淡红均质状,颗粒层、棘细胞层、基底层结构清晰,钉突排列规则,无炎症细胞浸润。模型组颊黏膜上皮层结构紊乱,上皮萎缩,钉突消失,血管数量明显减少,血管狭窄或闭塞,固有层和黏膜下层纤维增生,存在炎症细胞浸润。加味丹玄口康低剂量组颊黏膜颗粒层、棘细胞层、基底层恢复,纤维增生明显改善,血管数量恢复,存在少许炎症细胞浸润。加味丹玄口康中剂量组颊黏膜纤维增生显著改善,上皮层结构恢复,但结构尚不清晰,部分上皮萎缩。加味丹玄口康高剂量组颊黏膜角化层、颗粒层、棘细胞层、基底层结构基本恢复正常,纤维化显著改善。详见图 1。

2.4 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 与 OSF 指标的相关性分析

OSF 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平与张口

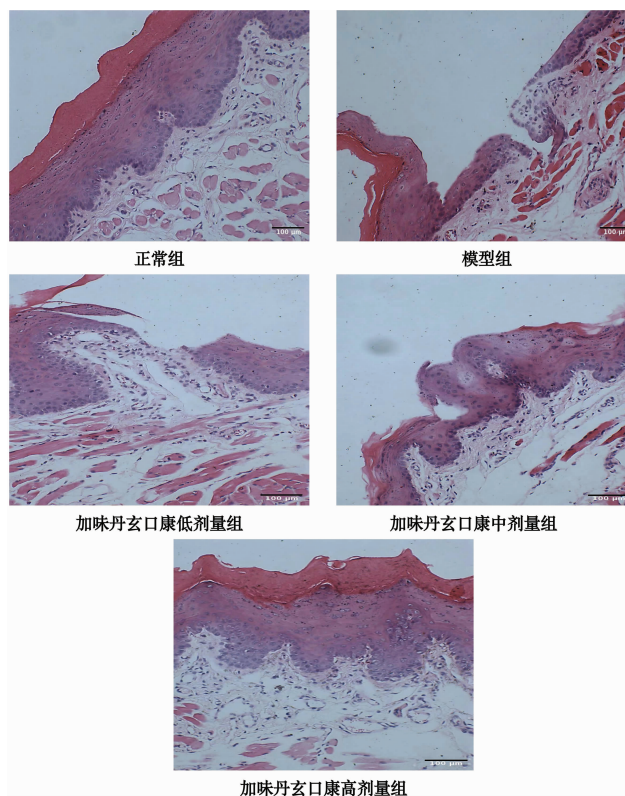


图 1 各组大鼠颊黏膜组织病理形态(HE, $\times 100$, bar=100 μm)

度均呈高度负相关($P<0.01$),与血清 LDH 水平呈高度正相关($P<0.01$);OSF 大鼠血清 IFN- γ 水平与张口度呈高度正相关($P<0.01$),与血清 LDH 水平呈负相关($P<0.01$)。详见图 2。

表 2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IFN- γ
正常组	9	119.52 $\pm$ 7.42	16.77 $\pm$ 2.55	76.90 $\pm$ 4.81	1 387.86 $\pm$ 47.62
模型组	10	236.74 $\pm$ 10.21*	38.36 $\pm$ 2.28*	139.25 $\pm$ 2.89*	724.52 $\pm$ 38.35*
加味丹玄口康低剂量组	8	179.74 $\pm$ 7.48*#	31.17 $\pm$ 1.68*#	118.67 $\pm$ 3.55*#	845.44 $\pm$ 50.87*#
加味丹玄口康中剂量组	10	173.51 $\pm$ 8.16*#	25.83 $\pm$ 1.63*# Δ	114.47 $\pm$ 4.12*# Δ	952.27 $\pm$ 32.50*# Δ
加味丹玄口康高剂量组	9	154.52 $\pm$ 11.22*# Δ $\diamond$	21.98 $\pm$ 1.59*# Δ $\diamond$	99.13 $\pm$ 2.54*# Δ $\diamond$	1 077.11 $\pm$ 49.13*# Δ $\diamond$

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与加味丹玄口康低剂量组比较, Δ $P<0.05$;与加味丹玄口康中剂量组比较, $\diamond$ $P<0.05$ 。

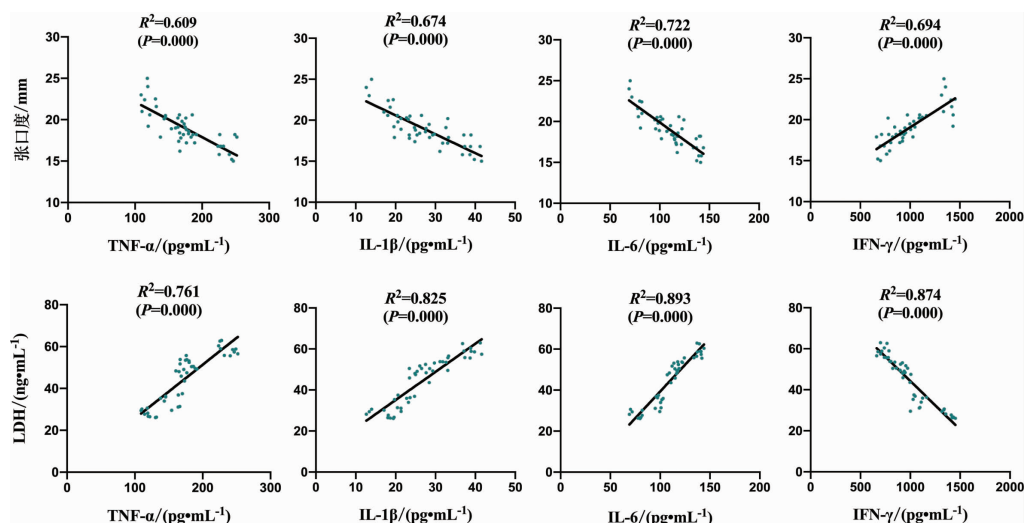


图 2 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 与 OSF 指标的相关性分析

3 讨论

OSF 伴有明显的免疫微环境变化,免疫调节与 OSF 的发生发展密切相关,免疫反应的失衡及其他因素共同作用,导致组织纤维化。槟榔碱可引起口腔黏膜组织病变,并改变细胞因子和促炎因子的水平,如上调白细胞介素-1、IL-6、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、TNF- α 和转化生长因子- β 1 水平而促进组织纤维化^[11]。在 OSF 患者血清中可发现大量免疫细胞分泌的细胞因子参与了 OSF 过程,促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 水平升高,抗纤维化因子 IFN- γ 水平降低,这可能是 OSF 发病机制的核心^[12]。此外,TNF- α 可以刺激成纤维细胞增殖,TNF- α 编码基因的多态性已被报道为 OSF 的一个重要危险因素^[13]。在中国患者的研究中发现,血清 IL-6 水平可作为中药治疗的指标^[14],为本研究针对 IL-6 水平的检测提供了理论依据。多项研究表明血清 LDH 可作为评价 OSF 早期诊断和预后的生物标志物^[15-16],因此,本研究同时进行了血清 LDH 水平的检测。目前,针对 OSF 的治疗方法虽多,有理想效果者却甚少,因此,寻找有效防治 OSF 的药物来缓解乃至治愈患者黏膜下纤维化症状具有重要意义。

名老中医李元聪教授认为,OSF 是由于嗜食辛辣燥热等热毒刺激之物,温热邪毒因而外侵,引起人体局部气血通机不畅,气滞血瘀,热毒蕴久,日久生痰、生瘀互损而致发病^[17]。本研究在采用古方桃红四物汤的基础上加减,选择了丹参、玄参、生地黄、白芍、生黄芪、当归、红花、白花蛇舌草、夏枯草、茵陈、薄荷、桔梗研制成加味丹玄口康。方中丹参、当归、红花养血活血、化瘀止痛;玄参、生地黄清热凉血、滋阴降火;白芍、生黄芪益气扶正;白花蛇舌草、茵陈清热利湿、解毒散瘀;桔梗、夏枯草祛痰散结;薄荷疏风散热;全方共奏扶正活血、解毒化瘀之功。现代药理学研究表明,丹参因含丹参酮类、丹酚酸类、挥发油类、多糖类和含氮化合物等化学成分,能够有效发挥抗凝血、抗炎、抗纤维化作用^[18];白花蛇舌草中富含环烯醚萜类成分,该类成分亦具有抗炎、抗纤维化的药理作用^[19];生地黄配伍玄参可明显降低大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平^[20];而红花不仅可以降低血清中 LDH、肌酸激酶同工酶活性,还能通过降低 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的水平来改善微循环^[21];夏枯草提取物亦能通过降低血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和碱性磷酸酶等多种氧化物含量,改善氧化应激,减轻炎症以防止纤维化^[22];白芍具有抗炎和免疫调节作用^[23];而桔梗主要成分桔梗皂苷 D^[24]、生黄芪^[25]、当

归^[26]、薄荷^[27]以及茵陈^[28]均有显著的抗炎作用。

团队前期研究已发现加味丹玄口康可增强 ANE 诱导大鼠上皮细胞 Axin 的表达,降低 β -catenin 表达,抑制上皮细胞凋亡,减少核分裂^[8]。KLF4 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的表达,加味丹玄口康可增强 KLF4 的表达,拮抗槟榔碱对黏膜上皮细胞的细胞毒性,改善细胞活力、增殖能力和细胞形态^[9]。再者,该复方主要部分丹玄口康可通过抑制 ANE 刺激的胶原合成而阻止 OSF 的发生和形成^[10]。

本研究进一步采用加味丹玄口康治疗 OSF 模型大鼠,通过测定 OSF 大鼠张口度和检测 ANE 诱导的 OSF 大鼠血清的 LDH、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IFN- γ 水平,探讨加味丹玄口康对 OSF 的免疫调节作用和抗纤维化作用,进一步明确其免疫调节机制。结果显示,模型组大鼠张口度明显减小($P<0.05$),血清 LDH 水平明显升高($P<0.05$),大鼠颊黏膜上皮层结构紊乱,上皮萎缩,钉突消失,血管数量明显减少,血管狭窄或闭塞,固有层和黏膜下层纤维增生,存在炎症细胞浸润,提示 ANE 诱导 OSF 模型成功。模型组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 明显升高,IFN- γ 明显降低($P<0.05$),证实在 ANE 诱导的 OSF 大鼠中存在免疫系统功能紊乱。大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平与 OSF 指标均呈负相关($P<0.01$),与血清标志物 LDH 水平呈高度正相关($P<0.01$),提示 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在 OSF 的发生、发展中发挥重要作用,促进纤维化的发生和发展。血清 IFN- γ 水平与张口度呈高度正相关($P<0.01$),与血清 LDH 水平呈负相关($P<0.01$),提示 IFN- γ 在 OSF 的发生、发展中发挥抗纤维化作用。加味丹玄口康高剂量组大鼠张口度明显减小($P<0.05$),血清标志物 LDH 水平显著降低($P<0.05$),血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著降低($P<0.05$),血清 IFN- γ 显著升高($P<0.05$),大鼠纤维化症状和免疫功能得到显著改善,提示加味丹玄口康可有效减少大鼠血清炎症因子,有效缓解炎症反应,对 ANE 诱导的 OSF 有较好的防治作用。加味丹玄口康中、低剂量组对大鼠纤维化症状和免疫功能亦有改善作用($P<0.05$),但不及高剂量组的改善效果($P<0.05$),提示加味丹玄口康对 OSF 大鼠的防治作用与剂量有关,在往后的研究中可单独选择高剂量加味丹玄口康进行实验。

综上所述,本研究发现加味丹玄口康可显著增加 OSF 大鼠张口度,改变 OSF 病理形态,降低血清 LDH 水平,能通过降低促纤维化免疫因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌,以及增加抑制纤维化免疫因子 IFN- γ 的分泌,影响机体免疫功能,进而改善纤维化

症状,控制 OSF 病情进展。进一步验证了加味丹玄口康治疗 OSF 的疗效机制,为加味丹玄口康的临床应用提供新的实验依据。

参考文献

- [1] MORE C B, RAO N R. Proposed clinical definition for oral submucous fibrosis[J]. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 2019, 9(4): 311-314.
- [2] ARAKERI G, BORAKS G, ALJABAB A S, et al. Breath Alkane as an index of severity for oral submucous fibrosis: A new perspective[J]. *Medical Hypotheses*, 2017, 98: 18-20.
- [3] MEMON A B, RAHMAN A A U, CHANNAR K A, et al. Assessing the quality of life of oral submucous fibrosis patients: A cross-sectional study using the WHOQOL-BREF tool[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(18): 9498.
- [4] CHAUDHRY K, BALI, PATNANA A K, et al. Impact of oral submucous fibrosis on quality of life: A multifactorial assessment[J]. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 2020, 19 (2): 251-256.
- [5] 聂安政,高梅梅,钞艳慧,等.槟榔药理毒理探讨与合理用药思考[J]. *中草药*, 2020, 51(12): 3329-3336.
- [6] KONDAIAH P, PANT I, KHAN I. Molecular pathways regulated by Areca nut in the etiopathogenesis of oral submucous fibrosis[J]. *Periodontology* 2000, 2019, 80(1): 213-224.
- [7] TILAKARATNE W M, EKANAYAKA R P, WARNAKULASURIYA S. Oral submucous fibrosis: A historical perspective and a review on etiology and pathogenesis[J]. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 2016, 122(2): 178-191.
- [8] 谢赛飞. Axin 基因在 ANE 诱导的大鼠口腔黏膜上皮细胞中的表达及中药调控作用[D].长沙:湖南中医药大学, 2020.
- [9] 郑玲.加味丹玄口康对 ANE 诱导的口腔黏膜上皮细胞 KLF4 表达的影响[D].长沙:湖南中医药大学, 2020.
- [10] 谭劲,吴丹,罗玉姣,等.丹玄口康对 ANE 诱导的 OSF 大鼠的影响[J]. *中医临床研究*, 2018, 10(1): 1-4.
- [11] WANG L P, GU L Q, TANG Z G. Cytokines secreted by arecoline activate fibroblasts that affect the balance of TH17 and Treg[J]. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 2020, 49(2): 156-163.
- [12] HAQUE M F, MEGHJI S, KHITAB U, et al. Oral submucous fibrosis patients have altered levels of cytokine production[J]. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 2000, 29(3): 123-128.
- [13] HSU H J, YANG Y H, SHIEH T Y, et al. Role of cytokine gene (interferon- γ , transforming growth factor- β 1, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interleukin-10) polymorphisms in the risk of oral precancerous lesions in Taiwanese [J]. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2014, 30(11): 551-558.
- [14] SUN A, CHIA J S, CHANG Y F, et al. Serum interleukin-6 level is a useful marker in evaluating therapeutic effects of levamisole and Chinese medicinal herbs on patients with oral lichen planus[J]. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 2002, 31(4): 196-203.
- [15] PANDA A, BEHURA S S, BHUYAN L, et al. Assessment of lactate dehydrogenase enzyme levels in saliva and serum of oral submucous fibrosis and leukoplakia patients[J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 2020, 24(1): 183.
- [16] MISHRA S, KRITIKA C, BAJORIA A A, et al. Estimation of salivary and serum lactate dehydrogenase in oral submucous fibrosis [J]. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 2018, 8(4): 289-295.
- [17] 李元聪.从痰瘀论治口腔黏膜下纤维化临证体会[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(7): 755-756.
- [18] 冯科冉,李伟霞,王晓艳,等.丹参化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. *中草药*, 2022, 53(2): 609-618.
- [19] 董雅倩,张佳幸,龚琳娜,等.白花蛇舌草环烯醚萜的鉴定及基于网络药理学的抗肾纤维化作用的机制研究[J]. *药学报*, 2020, 55(12): 2934-2941.
- [20] 张璇,姜睿斌,张晓菊,等.基于 NF- κ B 通路研究生地黄-玄参对糖尿病肾病大鼠肾脏微炎症状态的影响[J]. *国际中医中药杂志*, 2022, 44(1): 49-55.
- [21] 李玉杰,姜钧文.活血化瘀药在治疗心肌缺血再灌注损伤方面的研究概况[J]. *中医药临床杂志*, 2017, 29(11): 1975-1979.
- [22] 邓静,李利,林丽美,等.基于代谢组学探讨夏枯草治疗酒精诱导的氧化应激大鼠模型的代谢机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(7): 1813-1821.
- [23] 杨艳丽,杜杉杉.白芍总苷对实验性变态反应性脑脊髓炎小鼠免疫功能的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(24): 4025-4027, 4034.
- [24] FU Y H, XIN Z Y, LIU B, et al. Platycodin D inhibits inflammatory response in LPS-stimulated primary rat microglia cells through activating LXR α -ABCA1 signaling pathway [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 8: 1929.
- [25] JIN H F, JIAO Y, GUO L N, et al. Astragaloside IV blocks monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by improving inflammation and pulmonary artery remodeling[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 47(2): 595-606.
- [26] LI M M, ZHANG Y, WU J, et al. Polysaccharide from *Angelica sinensis* suppresses inflammation and reverses Anemia in complete Freund's adjuvant-induced rats[J]. *Current Medical Science*, 2020, 40(2): 265-274.
- [27] CHEN X Y, ZHANG S J, XUAN Z N, et al. The phenolic fraction of *Mentha haplocalyx* and its constituent linarin ameliorate inflammatory response through inactivation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells[J]. *Molecules*, 2017, 22(5): E811.
- [28] KHAN S, SHEHZAD O, CHUN J, et al. Anti-hyperalgesic and anti-allodynic activities of capillarisin via suppression of inflammatory signaling in animal model[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 152(3): 478-486.