

黄连解毒汤对大鼠上火牙龈炎的治疗作用

张方博¹ 许 森² 张 毅¹ 李德凤¹ 赵海誉¹ 杨洪军¹ 边宝林¹

(1 中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700; 2 国家知识产权局专利局医药部, 北京, 100088)

摘要 目的: 采用牙龈黏膜下注射内毒素法构建大鼠上火牙龈炎模型, 观察黄连解毒汤对大鼠上火牙龈炎的治疗作用。方法: 雄性 SD 大鼠随机分为 7 组: 正常对照组、溶剂对照组、上火牙龈炎模型组、黄连解毒汤低(0.25 g/kg)、中(0.50 g/kg)、高剂量组(1.00 g/kg)和甲硝唑芬布芬胶囊组。代谢笼喂养观测饮水量和尿量; LC-ESI-MS/MS 法检测牙龈组织蛋白表达; 生化试剂盒结合酶标仪检测牙龈组织氧化应激相关分子总超氧化物歧化酶(Total Superoxide Dismutase, T-SOD)和过氧化氢酶(Hydrogen Peroxidase, Catalase, CAT)的表达; Western Blotting 法检测牙龈组织能量代谢相关信号通路 TSC 的表达。结果: 上火牙龈炎时, 大鼠饮水量和尿量减少, T-SOD 和 CAT 表达水平降低, 果糖二磷酸醛缩酶 C、磷酸甘油醛异构酶 1 和 TSC2 均表达升高。黄连解毒汤可增加饮水量和尿量, 升高 T-SOD 和 CAT 的水平, 降低果糖二磷酸醛缩酶 C 和磷酸甘油醛异构酶 1 的表达, 抑制能量代谢相关通路分子 TSC2 的表达。结论: 黄连解毒汤可通过 TSC 信号通路和糖酵解相关分子抑制能量代谢, 并抑制氧化应激, 发挥治疗上火牙龈炎的作用。

关键词 黄连解毒汤; 上火; 牙龈炎; 糖酵解; 能量代谢; 氧化应激

Effects of Huanglian Jiedu Decoction in Rat Shanghuo Gingivitis

Zhang Fangbo¹, Xu Miao², Zhang Yi², Li Defeng¹, Zhao Haiyu¹, Yang Hongjun¹, Bian Baolin¹

(1 Institute of Chinese Materia Medica China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2 State Intellectual Property Office of the P. R. C., Beijing 100088, China)

Abstract Objective: To evaluate the effects of huanglianjiedu decoction (HLJD) on the treatment of rat Shanghuo gingivitis by injecting lipopolysaccharide (LPS) in tooth-supporting tissues. **Methods:** Gingival inflammation was established by LPS injection. Adult male rats were divided into seven equal groups: control group (no treatment group), negative control group (sterile saline was injected into gingival tissue followed by oral gavage with saline), positive control group (LPS injection was followed by oral gavage with saline), HLJD low-dose, middle-dose, high-dose group (LPS injection was followed by oral gavage with HLJD); metronidazole and fenbufencapsule (MFC) group (Oral gavage with MFC was followed by LPS injection). After 3 days, the rats were sacrificed and gingival tissue samples were randomly evaluated by biochemistry method, LC-ESI-MS/MS and western blotting. **Results:** The levels of water intake, urine volume, total superoxide dismutase (T-SOD) and hydrogen peroxidase (catalase, CAT) in the model group were apparently lower than those in the control group. Meanwhile, fructose-bisphosphate aldolase C, triosephosphate isomerase 1 and TSC2 in the model group were significantly increased than those in the control group. HLJD could reverse those effects. ANOVA was used for the statistical analyses, with $P < 0.05$ regarded as significant. **Conclusion:** HLJD treatment is effective in reducing energy metabolism and oxidative stress in induced rat gingivitis, resulting in a decreased level of fewer destructive effects.

Key Words Huanlian jiedu decoction; Shanghuo; Gingivitis; Glycolysis; Energy metabolism; Oxidative stress

中图分类号: R285.6 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.004

牙周病是发生于牙周支持组织的慢性炎症性疾病, 细菌感染是主要致病因素, 已成为口腔疾病的常见病和多发病。根据炎症反应的轻重和波及范围, 分为牙龈炎和牙周炎。若得不到及时治疗, 将导致牙周组织不可逆损伤, 牙齿松动脱落, 严重者影响咀嚼功能, 威胁着患者的生命质量。目前治疗方法除常规的洁治和刮治外, 应用抗生素仍然是牙周病治疗的重要辅助手段, 然而抗生素滥用导致细菌耐药和菌群失衡以及多种不良反应, 因此开发天然药物

越来越受到关注^[1]。

黄连解毒汤(Huanglian Jiedu Decoction, HLJD)出自唐代名医王焘《外台秘要》, 是中医治疗火热毒证的经典方剂, 由黄连、黄芩、黄柏和栀子组成, 具有清热、泻火、解毒之功效, 主治实热火毒合三焦热盛之证。现代药理研究表明, 黄连解毒汤具有抗炎、抗菌、抗内毒素、抗氧化、抗脑缺血、抗肿瘤、降血压、降血糖、降血脂、抑制脂肪细胞分化、抑制肝损害等作用^[2-5]。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2014CB543003); 国家自然科学基金青年基金(81403207)

作者简介: 张方博(1980.12—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理, E-mail: fbzhang@icmm.ac.cn

通信作者: 杨洪军(1972.07—), 男, 博士, 研究员, 整合中药学研究中心主任, 研究方向: 中药药理, E-mail: hjyang@icmm.ac.cn; 边宝林

(1961.10—), 男, 学士, 研究员, 副所长, 研究方向: 中药化学及质量控制与中药新药开发, E-mail: blbian@icmm.ac.cn

中医认为“上火”的产生,乃维持正常生命之气(火)相对发生偏盛,不管实热、阳虚、气虚、阴虚而生的火,均可称为“邪火”^[6]。“上火”人群黏膜免疫系统异常,且“上火”损伤部位以头面部黏膜为主。“上火”多表现为口疮、牙宣、鼻衄、目赤、咽痛、口干等头面部黏膜病变^[7]。本研究采用牙龈黏膜下注射内毒素法,基于中医“上火”理论模式,构建大鼠上火牙龈炎模型,观察黄连解毒汤对大鼠上火牙龈炎的疗效和作用机制^[8]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠,体重(200 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物质量合格证号为 SCXK2006-0009。

1.1.2 药物 将黄连、黄芩、黄柏和栀子按 3:2:2:3 比例混合,中药粉碎机打粉。取定量粉末,加入 10 倍体积水,加热回流 2 h。循环水式真空泵及布氏漏斗减压抽滤,得滤液 1。滤渣加入 10 倍体积双蒸水再加热回流 2 h,抽滤得滤液 2,合并滤液 1 和 2,减压浓缩至干,得黄连解毒汤粉末,每 1 g 粉末相当于原粉 5 g^[9]。

1.1.3 试剂与仪器 阳性对照药甲硝唑芬布芬胶囊(Metronidazole and Fenbufen Capsules, MFC, 石药集团欧意药业有限公司产品生产,国药准字 H13024465),用于牙龈炎和牙周炎等疾患。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS, 北京索莱宝科技有限公司生产),临用时用生理盐水配成 1 mg/mL 浓度。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制作 将大鼠按体重随机分为 7 组,每组 10 只,如下:正常对照组(Control):大鼠自由饮食,不做任何处理;溶剂对照组(Saline):大鼠牙龈组织注射等体积生理盐水,然后口服生理盐水;上火牙龈炎模型组(Model):牙龈黏膜下组织注射 LPS,然后口服生理盐水;黄连解毒汤组(HLJD):分为低(0.25 g/kg)、中(0.50 g/kg)、高剂量组(1.00 g/kg),牙龈黏膜下组织注射 LPS,然后口服不同剂量的黄连解毒汤;阳性对照药组:牙龈黏膜下组织注射 LPS,然后口服甲硝唑芬布芬胶囊溶液(MFC,甲硝唑 31.25 mg/kg,芬布芬 7.80 mg/kg)。

1.2.2 给药方法 大鼠经 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,用胰岛素注射器(美国 BD, 0.3 × 13 mm)在上下牙龈左、中、右黏膜下各 3 点注射脂多糖(LPS, 1 mg/mL) 10 μL,共注射 6 点,连续注射 3 d。给药方式模型制作算为第 1 天,黄连解毒汤和对照

药均为第 1 天给药,即模型制作完成后 2 h 灌胃给药,连续给药 3 d,第 4 天处死动物,刮取牙龈组织。

1.2.3 检测指标和方法 1) 饮水量和尿量的观测:模型制作前所有大鼠禁食禁水,按模型制作算为第 1 天,将大鼠装入代谢笼喂养,自由摄食和饮水,每天早 10 点装入 200 mL 饮用水,并计数饮水量和尿量,严格收集各组尿液和尿量,连续观察 3 d。2) LC-ESI-MS/MS 法:检测大鼠牙龈组织蛋白表达利用高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)法检测黄连解毒汤使用前后大鼠牙龈炎组织蛋白的表达。胰蛋白酶水解肽段,液质分析条件如下。液相条件:色谱柱为 C18 柱,(内径 75 μm,外径 360 μm,颗粒直径 3 μm,流速 350 nL/min。质谱条件:质谱仪为 LTQ-Orbitrap Velos(Thermo),离子源为纳米电喷雾离子源,喷雾电压为 1 800 V,无鞘气,离子传输管温度 350 °C,扫描范围 m/z 375 至 1 600(m/z 400 时,分辨率为 60 000),碰撞能量 35%,激活时间 5 ms,扫描阈值 500。蛋白鉴定软件 Proteome Discoverer(V1.3),搜索工具 MASCOT,搜索数据库 RefSeq protein database(更新于 2014 年 11 月 17 日),质谱误差设置为 20 ppm,母离子为 0.5 Data,选择氧化和乙酰化可变修饰,氨基甲酰化固定修饰,蛋白鉴定假阳性率控制在 1%。3) 生化试剂盒结合酶标仪检测氧化应激相关分子:总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化氢酶(CAT)的表达取各组大鼠牙龈组织,加入裂解液,16 000 g 离心 15 min,取上清,按照试剂盒操作说明,酶标仪(Molecular Devices, USA)检测样品吸光值(OD),按说明书公式换算成有效单位(U/mL)。4) Western Blotting 法检测大鼠牙龈组织能量信号通路 TSC 的表达:取各组牙龈组织,加入裂解液提取总蛋白,Pierce 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。取各样品 20 μg 上样,以 10% SDS-PAGE 胶分离蛋白,湿转法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。封闭液室温封闭 2 h,加入一抗,4 度过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温轻摇 2 h,充分洗涤后,用 ECL 显影曝光。

2 结果

2.1 黄连解毒汤对饮水量和尿量的影响 连续 3 d 观察对照组以及各用药组大鼠的饮水量和尿量,结果表明第 1 天各组大鼠饮水量无差异,模型组与正常对照组比较,尿量减少;第 2 天和第 3 天,各组大鼠饮水量和尿量都逐渐减少,模型组减少量最大;服用黄连解毒汤后,与对应的模型组比较,饮水量和尿量均有不同程度增加,并有统计学意义。见表 1。

表 1 黄连解毒汤对上火牙龈炎大鼠饮水量和尿量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 1 天		第 2 天		第 3 天	
	饮水量	尿量	饮水量	尿量	饮水量	尿量
正常对照组	177.5 ± 8.7	42.3 ± 22.6	142.5 ± 6.5	35.6 ± 12.0	128.8 ± 11.1	29.0 ± 9.5
溶剂对照组	177.8 ± 12.3	32.8 ± 8.4	150.0 ± 26.8	32.4 ± 11.6	116.3 ± 41.2	26.5 ± 8.8
模型组	158.5 ± 25.7	20.5 ± 4.8 *	115.0 ± 33.2 *	11.5 ± 1.3 **	73.8 ± 10.5 *	9.1 ± 2.9 **
HLJD 低剂量组	175.0 ± 23.5	25.0 ± 2.4	128.8 ± 28.7	15.8 ± 7.7	90.0 ± 32.4	10.3 ± 2.6
HLJD 中剂量组	171.3 ± 16.5	28.9 ± 9.5	131.3 ± 32.2 Δ	18.50 ± 8.96	96.8 ± 15.7 Δ	12.3 ± 3.3
HLJD 高剂量组	177.8 ± 11.0	31.3 ± 16.7 $\Delta\Delta$	140.6 ± 28.9 $\Delta\Delta$	21.38 ± 11.1 Δ	108.8 ± 21.4 $\Delta\Delta$	13.8 ± 6.1 Δ
MFC 组	171.7 ± 18.9	35.0 ± 12.7 $\Delta\Delta$	136.7 ± 30.2 Δ	25.67 ± 7.79 Δ	108.3 ± 34.8 $\Delta\Delta$	14.3 ± 1.5 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 黄连解毒汤对牙龈组织蛋白表达的影响 LC-ESI-MS/MS 法共检测 2 997 个蛋白,采用 ANOVA 分析法,结果表明 54 个蛋白差异有统计学意义($P < 0.05$)。将这 54 个蛋白进行分析,与牙龈炎相关的蛋白靶点可能为 Fructose-bisphosphatealdolase C (果糖二磷酸醛缩酶 C) 和 Triosephosphatase isomerase isoform 1 (磷酸甘油醛异构酶 1)。牙龈炎时此 2 种蛋白均表达升高,黄连解毒汤低、中、高剂量组可降低上述 2 种蛋白的表达,对照药无该作用。

2.3 黄连解毒汤对牙龈组织氧化应激相关分子 T-SOD 和 CAT 表达的影响 生化试剂盒结合酶标仪对用药前后各组牙龈组织氧化应激相关分子 T-SOD 和 CAT 进行检测,结果表明上火牙龈炎时,对照组牙龈组织氧化应激相关分子 T-SOD 和 CAT 表达降低,服用黄连解毒汤后,T-SOD 和 CAT 表达均升高,且具有量效关系。见图 1。

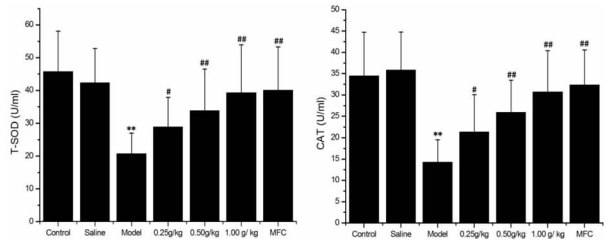


图 1 生化试剂盒结合酶标仪检测黄连解毒汤对上火牙龈炎大鼠牙龈组织 T-SOD 和 CAT 表达的影响
注: ** $P < 0.01$ VS. 正常; # $P < 0.05$ VS. 模型; ## $P < 0.01$ VS. 模型。Control: 正常对照组; Saline: 溶剂对照组; Model: 模型组; 0.25、0.50、1.00 g/kg 分别代表黄连解毒汤低、中、高剂量组; MFC: 阳性对照药甲硝唑芬布芬组

2.4 黄连解毒汤对牙龈组织能量代谢相关通路 TSC 表达的影响 Western blotting 检测大鼠上火牙龈炎牙龈组织 TSC1、TSC2、p-TCS2 等多种蛋白的表达,GAPDH 为内参。结果表明上火牙龈炎时 TSC2 表达升高,其余蛋白表达无改变。黄连解毒汤低、中、高剂量组可抑制 TSC2 表达。见图 2。

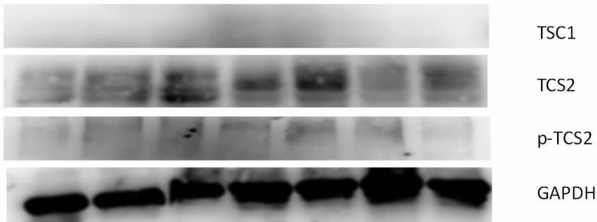


图 2 Western blotting 法检测黄连解毒汤对上火牙龈炎大鼠牙龈组织 TSC 蛋白表达的影响
注:从左至右依次为:正常对照组(Control),溶剂对照组(Saline),模型组(Model),黄连解毒汤低(0.25 g/kg),中(0.50 g/kg),高剂量组(1.00 g/kg),对照药组(MFC)

3 讨论

上火属于中医热证范畴,分为实火和虚火 2 类。实火指阳热亢盛,临床表现为面红目赤、口唇干裂、舌红苔黄、咽喉肿痛、牙龈出血、身热烦躁、尿少便秘、尿血便血、脉数实等等^[10]。虚火多因内伤劳损所致,治疗则以清热泻火、滋阴降火等方法^[11]。本研究用 LPS 注射法构建上火牙龈炎大鼠模型,模型大鼠饮水量和尿量均减少:1)一方面可能由于大鼠处于上火状态,体液失调;2)另一方面可能由于在牙龈黏膜下注射 LPS,引起不适,影响进食和饮水。而黄连解毒汤可改善不适状态,使牙龈炎大鼠饮水量和尿量增多。

果糖二磷酸醛缩酶存在于多种组织中,是生命代谢过程中重要的糖酵解同工酶。其还可调节细胞膜 P-糖蛋白将药物泵出,从而使 DNA 得以修复,还通过加快细胞内糖或带有糖支链物质的代谢,增加细胞解毒功能^[12]。磷酸甘油醛异构酶能够催化丙糖磷酸异构体在二羟丙酮磷酸和 D 型甘油醛-3-磷酸之间转换。磷酸甘油醛异构酶在糖酵解中具有重要作用,对与有效的能量生成必不可少^[13]。与牙龈炎相关的靶点主要为果糖二磷酸醛缩酶 C 和磷酸甘油醛异构酶 1。上火牙龈炎时这 2 种蛋白均表达升高,表明牙龈组织的能量代谢有所改变,黄连解毒

汤可通过能量代谢相关酶降低能量的产生。

氧化应激参与众多疾病如中风、老年痴呆、帕金森病以及牙周病的发生发展^[14-15]。氧化应激过程中产生大量活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS),可通过脂质过氧化、DNA 和蛋白质损伤、激活炎性反应因子以及关键酶的氧化等途径,造成牙龈组织损伤^[16-17]。为研究牙周病患者体内的氧化应激和炎性反应状态,化学发光法检测牙周病患者血清及唾液中超氧化歧化酶(SOD)水平,结果表明牙周病患者 SOD 含量显著低于对照组,表明牙周病可能与体内的氧化应激水平密切相关^[18]。本研究上火牙龈炎大鼠氧化应激相关分子 T-SOD 和 CAT 水平降低,黄连解毒汤可通过提高 T-SOD 和 CAT 的水平发挥保护牙龈组织的作用。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian Target of Rapamycin, mTOR)是非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为磷脂酰肌醇激酶相关激酶(Phosphatidylinositol kinase-related Kinase, PIKK)蛋白质家族成员。mTOR 进化上相对保守,可整合营养、能量及生长因子等多种细胞外信号,参与基因转录、蛋白质翻译、核糖体合成等生物过程,在细胞生长和凋亡中发挥极为重要的作用^[19]。TSC1/TSC2 是 mTOR 最重要的上游分子,mTOR 活性主要受 2 种 TSC-mTOR 信号通路调节,即 PI3K-Akt-TSC1/TSC2-mTOR 信号通路和 LKB1-AMPK-TSC1/TSC2-mTOR 信号通路^[20]。大鼠上火牙龈炎时 TSC2 表达升高,黄连解毒汤可抑制 TSC2 表达。

综上所述,上火状态时,牙龈炎时黏膜上皮组织糖酵解供能方式特别活跃,机体内环境的变化加重黏膜上皮组织缺血缺氧状态,使其糖酵解进一步活跃。能量代谢紊乱可导致黏膜损伤,使黏膜免疫系统供能紊乱,局部黏膜免疫力下降,易于继发感染^[4]。此研究结果表明黄连解毒汤可通过 TSC 信号通路和糖酵解相关分子抑制能量代谢,并抑制氧化应激,从而起到治疗上火牙龈炎的作用,但其作用的具体机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 曹新民,李祯,任前. 抗生素滥用的危害和控制策略[J]. 中国实用医药,2015,10(23):38-41.
- [2] 方雪琴. 黄连解毒汤药理作用研究进展[J]. 浙江中医杂志,2012,47(6):67-69.
- [3] Yue, GH, Zhuo, SY, Xia, M, et al. Effect of huanglian-jiedu decoction on thoracic aorta gene expression in spontaneous hypertensive rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014(2014):565784.
- [4] WM Choi, Lam CL, Mo WY, et al. Effects of the modified Huanglian-Jiedu decoction on the disease resistance in grey mullet(Mugilcephalus)

lus) to Lactococcus garvieae[J]. Mar Pollut Bull, 2014, 85(2):816-823.

- [5] He MY, Deng YX, Shi QZ, et al. Comparative pharmacokinetic investigation on baicalin and wogonoside in type 2 diabetic and normal rats after oral administration of traditional Chinese medicine Huanglian-Jiedu decoction[J]. Journal of Ethnopharmacol, 2014, 155(1):334-342.
- [6] 谢志军,王伟杰. 上火病因病机初探[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(3):226-228.
- [7] 潘照,朱星瑜,范永升. 从能量代谢及粘膜免疫看“上火”与肠道菌群的关系[J]. 浙江中医药大学学报, 2015, 8(39):591-594.
- [8] Araghizadeh N, Paknejad M, Alaeddini M, et al. The efficacy and prophylactic characteristics of omega-3 fatty acids in experimental gingivitis in rats[J]. Iran J Basic Med Sci, 2014, 17(2):87-92.
- [9] He MY, Deng YX, Shi QZ, et al. Comparative pharmacokinetic investigation on baicalin and wogonoside in type 2 diabetic and normal rats after oral administration of traditional Chinese medicine Huanglian-Jiedu decoction[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(1):334-342.
- [10] 毛连江,江婷婷,刘昌铭,等. SERPINA 亚群在情志型阴虚“上火”候证中表达及意义[J]. 中西医结合护理, 2016, 2(4):111-112.
- [11] 包洁,周传龙,谢志军,等. 从情志理论探析中医“上火”[J]. 山西中医学院学报, 2015(4):8-9.
- [12] Yu J, Li R, Fan N, et al. Metabolic Pathways Involved in Carbon Dioxide Enhanced Heat Tolerance in Bermudagrass[J]. Front Plant Sci, 2017, 19(8):1506.
- [13] Dorion S, Clendenning A, Jeukens J, et al. A large decrease of cytosolic triosephosphate isomerase in transgenic potato roots affects the distribution of carbon in primary metabolism[J]. Planta, 2012, 236(4):1177-1190.
- [14] Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction[J]. Periodontol, 2010, 43(1):160-232.
- [15] Tamaki N, Cristina Orihuela-Campos R, Inagaki Y, et al. Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 75(10):222-229.
- [16] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and cell culture: how should you do it and what do the results mean Br. J[J]. Pharmacol, 2004, 142(2):231-255.
- [17] Tomofuji T, Azuma T, Kusano H, et al. Oxidative damage of periodontal tissue in the rat periodontitis model: effects of a high-cholesterol diet[J]. Febs Letters, 2006, 580(15):3601-3604.
- [18] Huang Y, Zhu M, Li Z, et al. Mass spectrometry-based metabolomic profiling identifies alterations in salivary redox status and fatty acid metabolism in response to inflammation and oxidative stress in periodontal disease[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 70(5):223-232.
- [19] 陈洪菊,屈艺,母得志. mTOR 信号通路的生物学功能[J]. 生命的化学, 2010, 30(4):555-561.
- [20] 王洋,夏宁. TSC-mTOR 信号通路在糖尿病及糖尿病肾病发病机制中的作用[J]. 广西医学, 2010, 32(3):354-358.

(2017-11-03 收稿 责任编辑:张文婷)