



二氢杨梅素对复发性口腔溃疡大鼠 TNF- α 及 NF- κ B p65 的影响

杨学敏, 王晓洪, 陈立峰*, 王小青

(湖南省中医药研究院 中药研究所, 湖南 长沙 410013)

[摘要] 目的:研究二氢杨梅素(DMY)对复发性口腔溃疡(RAU)大鼠肿瘤坏死因子(TNF- α)及 NF- κ B p65 的影响。方法:将 60 只 SD 大鼠随机分为 6 组,采用同种异体口腔黏膜匀浆作为抗原皮内注射 5 次,制备 RAU 大鼠模型。末次免疫注射的同时开始给药,正常对照组和模型组给予蒸馏水,其他组分别给 DMY 50,100,200 mg \cdot kg⁻¹ 和甘草锌 67.5 mg \cdot kg⁻¹,按 10 mL \cdot kg⁻¹ ig 给药 7 d。取血分离血清;取口腔黏膜制备匀浆。ELISA 测定口腔黏膜和血清中 TNF- α 的含量;免疫组化法和天青-伊红-瑞氏染色法分别检测口腔黏膜中 NF- κ B p65,巨噬细胞(M Φ)的表达;逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测口腔黏膜和血清中 TNF- α mRNA 的表达。结果:RAU 模型大鼠血清和口腔黏膜中 TNF- α 含量显著升高,TNF- α mRNA 表达明显增强,口腔黏膜组织中 NF- κ B p65,M Φ 表达增加;DMY 能降低口腔黏膜组织和血清中 TNF- α 含量和 TNF- α mRNA 的表达,降低口腔黏膜中 NF- κ B p65,M Φ 表达。结论:DMY 可能通过抑制 RAU 口腔黏膜组织中 NF- κ B p65 对 M Φ 中 TNF- α mRNA 的转录和释放的调节作用,使口腔黏膜中 TNF- α 下降而起抗口腔溃疡的作用。

[关键词] 二氢杨梅素;复发性口腔溃疡;肿瘤坏死因子;信使核糖核酸;核因子- κ B;巨噬细胞

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)为 1 种二氢黄酮类化合物,化学结构为 3,5,7,3',4',5'-六羟基-2,3 二氢黄酮醇,又名蛇葡萄素(ampelopsin),双氢杨梅树皮素、双氢杨梅素、福建茶素等,存在于葡萄科、杨梅科、杜鹃科、藤黄科、大戟科及柳科等多种植物中,在蛇葡萄属植物中含量极高,可达 30% 以上^[1-3]。据报道,DMY 有抗高血压,祛痰止咳,保护肝脏,调节血糖、血脂,增强免疫,抗氧化,抑菌等多种生理活性^[1]。早期研究发现 DMY 对兔复发性口腔溃疡(recurrent aphthous ulcer, RAU)的发生具有较好的抑制作用,使溃疡局部黏膜的病理改变明显减轻,抗口腔黏膜抗体滴度明显降低^[4]。但 DMY 抗 RAU 的作用机制研究未见报道。本文采用大鼠 RAU 模型,研究 DMY 对复发性口腔溃疡大鼠 TNF- α 及 NF- κ B p65 的影响。

1 材料

1.1 药物 二氢杨梅素(DMY),纯度为 97.4%

(HPLC),由衡阳恒生制药有限公司提供,批号 20090601,临用前分别用蒸馏水配成 5,10,20 g \cdot L⁻¹。甘草锌(licorzine)胶囊,湖南千金湘江药业股份有限公司产品,批号 090601,临用前用蒸馏水配成 6.75 g \cdot L⁻¹。

1.2 试剂 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ \cdot 12H₂O,长沙化学试剂厂,批号 080521);磷酸二氢钾(KH₂PO₄,广东台山化工厂,批号 20080301);氯化钠(NaCl,天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号 20080926);硫柳汞钠(上海实验试剂有限公司,批号 20081208);天青 II,苏木精(上海化学试剂厂产品,批号 20080911,20081112);伊红(上海试剂三厂产品,批号 20080922);Tris,冰醋酸,EDTA(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20090417,20090513, F20071229);琼脂糖(西班牙 BIOWEST 公司,批号 101710);DEPC(焦炭酸二乙酯)、异丙醇、氯仿、无水乙醇(国药集团化学试剂厂,批号 30061486, T20090521, T20090123, 20090224);Freund's 完全佐剂(FCA,美国 Sigma 公司,批号 019K8719);大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号 09-05);小鼠抗大鼠 NF- κ B p65 试剂盒、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂(武汉博士德生物工程有限公司,批号 09B03, 09J02, 09J02);Trizol 试剂盒(加拿大

[稿件编号] 20120219002

[基金项目] 湖南省三项基金项目(04SK3067)

[通信作者] * 陈立峰,研究员,博士生导师,主要从事药理学与毒理学研究, Tel:13874906566, E-mail:chenlifg@163.com

[作者简介] 杨学敏,硕士,主要从事新药研发与药效物质基础研究, E-mail:xuemingood19@126.com



BBI公司,批号C903);10×载样缓冲液(ToyoBo公司,批号0901);2×Tag PCR试剂盒,DNA MARK(北京嘉美生物,批号192347AD,20090412);RT-PCR试剂盒(MBI,批号00047463);TNF- α (228 bp)上游引物5'-GGCCTCAGAGTTACCAACA-3',下游引物5'-AGCGAGTTCTGAGACATCTT-3'; β -actin(308 bp)上游引物5'-CCAGCGTGAGATCGTGTGG-3',下游引物5'-ACGCACATCACTGCCTGGA-3'。依据Primer 5软件设计,由上海捷瑞生物工程有限公司合成提供。

1.3 仪器 DY89-II型电动玻璃匀浆机,S10手提高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司);GL21型高速冷冻离心机(湖南仪器仪表总厂离心机厂);DMLB2型显微镜(德国LEICA);MIAS医学图象分析系统(北航公司);Shandon325型石蜡切片机(英国Shandon);PX2型PCR仪,4MK2型洗板机,MK3型和multiskan spectrum型酶标仪(THERMO);JY系列电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);2F-90型暗箱式紫外透射仪(上海顾村光电仪器厂产品);DYY-III2型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像分析系统(法国VILBERLouRMAT)。

1.4 动物 SD大鼠由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号为SCXK(沪)2008-0016;合格证号为0066924。

2 方法

2.1 试剂配制 磷酸缓冲液(PBS,pH 7.4,147.5 mmol·L⁻¹)由KH₂PO₄ 14.4 mol,Na₂HPO₄ 60.6 mmol,NaCl 72.5 mmol用重蒸水配置成1 000 mL,加入硫柳汞钠0.2 g即得。天青-伊红-瑞氏复染液由天青II 0.025 2 g,伊红0.025 6 g,分别用蒸馏水配成50 mL,与瑞氏染液50 mL混匀加蒸馏水至400 mL即得。DEPC水(0.1%,无RNase水)由DEPC 1 mL,加重蒸馏水至1 000 mL,37℃过夜。5×TAE由Tris 24.2 g,冰醋酸5.71 mL,EDTA(0.5 mol·L⁻¹,pH 8.0)10 mL,加重蒸馏水定溶至1 000 mL,使用时再稀释5倍,即TAE(1×)。琼脂糖凝胶(1%)由琼脂糖1 g,加蒸馏水100 mL,置电炉上加热至沸腾,冷却后加入20 mg·L⁻¹ EBL(溴化乙锭)5 μ L。

2.2 黏膜匀浆与抗原制备 取SD大鼠80只,无菌操作下剥离口腔颊黏膜,灭菌生理盐水冲洗3次,称重,加入10倍量的灭菌PBS,用DY89-II型电动匀浆机1 200 r·min⁻¹匀浆20 min,超声处理15

min,于0℃3 000 r·min⁻¹离心15 min,取匀浆上清液,-20℃保存备用。临用前,取口腔黏膜匀浆和FCA各8.0 mL,用双注射器对抽法乳化,至乳化剂滴入水中不分散,得免疫抗原;按同种方法用灭菌PBS溶液和FCA制备对照基质。

2.3 RAU模型制备与给药 取SD大鼠60只,体重180~220 g,雌雄各半,按性别、体重分层随机分为6组,其中1组大鼠作为对照,其他5组大鼠参照文献方法^[5],剪去大鼠脊柱两侧鼠毛,乙醇消毒,于脱毛处两侧各取1点,分别注射抗原0.1 mL,每2周1次,共5次。正常对照组大鼠按同法注射对照基质。第5次注射抗原的同时开始给药。对照组和模型组大鼠给蒸馏水,其他组分别给DMY 50,100,200 mg·kg⁻¹和甘草锌67.5 mg·kg⁻¹,按10 mL·kg⁻¹灌胃给药7 d。

末次给药后次日,自大鼠眼底静脉丛取血,分离血清,低温冰箱冰冻保存。颈椎脱臼处死大鼠,取头去皮,冰生理盐水冲洗后冰台上剥取口腔颊黏膜组织,取1侧黏膜组织,置4%中性甲醛溶液中固定;取另一侧黏膜组织制成10%口腔黏膜匀浆标本,低温冰箱冰冻保存。

2.4 M Φ 检查 取4%中性甲醛固定的口腔黏膜组织,自来水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,Shandon325型石蜡切片机切片,采用天青-伊红-瑞氏染色法,10×40倍光镜下观察,计数5个视野的M Φ 个数。M Φ 核染成蓝色,周围有蓝色小颗粒,胞质呈红色。

2.5 TNF- α 测定 冰冻血清和黏膜匀浆室温下融化。取TNF- α 标准品,用标准品稀释液稀释成480,240,120,60,30,15 ng·L⁻¹ 6个浓度,按孔号将标准品溶液和血清或黏膜匀浆各50 μ L加入到96孔TNF- α 酶标板中,空白对照孔加试剂盒配带的空白对照品溶液50 μ L,每孔加入生物素标记的抗TNF- α 抗体50 μ L,置MK3型酶标仪上振荡混匀,37℃保温45 min,4MK2型洗板机洗涤5次,每孔加入亲和链酶素-HRP 100 μ L,振荡混匀,37℃保温30 min,洗涤5次,每孔加入底物A,B各50 μ L,避光37℃保温5 min后立即加入终止液50 μ L终止反应。用MK3型酶标仪于波长450 nm处测定吸光度,绘制TNF- α 标准曲线;根据标准曲线读取样本中TNF- α 含量。

2.6 TNF- α mRNA的测定 冰冻血清或黏膜匀浆置室温下融化,取500 μ L置EP管中,加入1 mL



Tirzol 提取液, 12 000 r · min⁻¹ 冷冻离心 5 min; 取上清液至另一 EP 管中, 加入 0.2 mL 氯仿, 12 000 r · min⁻¹ 冷冻离心 15 min, 取上层水相约 500 μL 至 EP 管中, 加入等体积的异丙醇, 12 000 r · min⁻¹ 冷冻离心 10 min, 弃上清液, 加入 75% 乙醇 1 mL, 冷冻离心 3 min, 弃去液体, 加入 DEPC 水 50 μL 溶解作为总 RNA, -70 °C 保存备用。分别取样品总 RNA 5 μL 用 DEPC 水稀释至 200 μL, 加至 96 孔板中, 置 multiskan spectrum 型酶标仪上在 260 nm 和 280 nm 处分别测定吸收度, 以 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值检测总 RNA 的纯度; 用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA, 以 28S 和 18S 的灰度值差异判定总 RNA 的完整性。将 TNF-α 和 β-actin 引物用灭菌双蒸水溶解, 稀释成 100 μmol · L⁻¹ 的贮存液, -20 °C 保存备用。取总 RNA 1 μg 于离心管中, 60 °C 孵育 10 min, 分别取 RNA 1 μg, M-MLV reverse transcriptase (200 U · μL⁻¹) 1 μL, DEPC 水 10 μL, 混匀, 42 °C 处理 60 min, 再 72 °C 5 min, -20 °C 保存, 备用。取 Template 0.5 μg, TNF-α 上、下游引物各 1 μL, β-actin 上、下游引物各 1 μL, 2 × Master Mix 12.5 μL, 加 ddH₂O 补至 25 μL。94 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 循环 35 次, 72 °C 延伸 5 min。

取 PCR 扩增产物 4 μL 与载样缓冲液 1 μL 混匀, 置琼脂糖凝胶电泳点样孔, 在电压 70 V 下电泳 30 min。后将凝胶放入 EB 染液中约 5 min, 蒸馏水冲洗, 在 2F-90 型暗箱式紫外透射检测仪上观察结果, 用 VILBERLouRMAT 凝胶分析系统分析, 以 TNF-α 与 β-actin 的灰度值比值作为 TNF-α mRNA 的定量表达。

2.7 NF-κB p65 的测定 取口腔黏膜组织贴片, 脱蜡, 放入 3% H₂O₂ 中约 5 min, 蒸馏水洗 3 次, 置 0.01 mol · L⁻¹ 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 中加热修复抗原, 冷却后用 PBS 洗涤, 滴加 5% BSA 封闭液, 室温下放置 20 min。滤纸吸干, 滴加 1:100 的一抗工作液, 37 °C 保温 1 h, PBS 洗涤, 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 37 °C 保温 20 min, PBS 洗涤, 滴加试剂 SABC, PBS 洗涤, DAB 显色, 苏木素轻度复染, 中性树脂胶封片, 在 10 × 40 倍物镜下观察组织切片 (NF-κB p65 阳性细胞浆表达呈棕黄色), 随机选取 5 个视野, 计数单个 NF-κB p65 阳性细胞数, 取其均值。

2.8 统计分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析判断组间差异显著性; 计数资料用 χ^2 检验。

3 结果

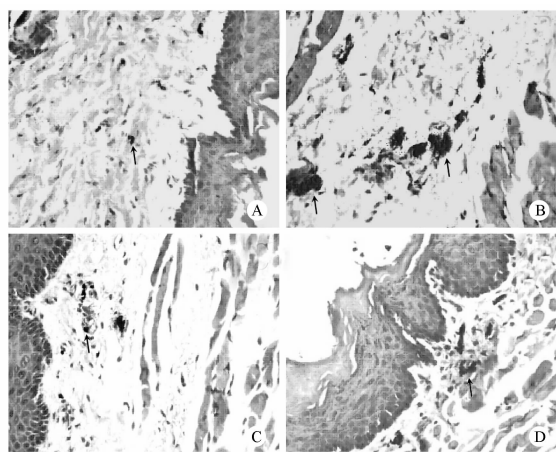
3.1 DMY 对 RAU 大鼠口腔黏膜组织中 MΦ 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠口腔黏膜组织中 MΦ 显著升高, DMY 50, 100, 200 mg · kg⁻¹ 和甘草锌 67.5 mg · kg⁻¹ 显著降低 RAU 大鼠口腔黏膜组织中 MΦ (表 1, 图 1)。

表 1 DMY 对 RAU 大鼠口腔黏膜组织中 MΦ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 1 Effect of DMY on MΦ in oral mucose of RAU rats ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	MΦ(细胞个数)
正常	-	6.0 ± 3.1
模型	-	14.0 ± 3.3 ¹⁾
DMY	50	11.0 ± 4.0 ²⁾
	100	10.0 ± 3.1 ³⁾
	200	8.0 ± 3.2 ³⁾
甘草锌	67.5	8.0 ± 3.4 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ P < 0.01; 与模型组比较²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01 (表 2 ~ 4 同)。



A. 正常组: 口腔黏膜固有层有散在的激活 MΦ; B. 模型组: 口腔黏膜固有层中激活的 MΦ 堆积; C. DMY 200 mg · kg⁻¹ 组: 口腔黏膜固有层有分散的激活 MΦ; D. 甘草锌 67.5 mg · kg⁻¹ 组: 口腔黏膜固有层激活 MΦ 明显减少。激活的 MΦ 呈现蓝色。

图 1 DMY 对 RAU 大鼠口腔黏膜组织中 MΦ 的影响 (×400)

Fig. 1 Effect of DMY on MΦ in oral mucose of RAU rats (×400)

3.2 DMY 对 RAU 大鼠血清和口腔黏膜组织中 TNF-α 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清和组织中 TNF-α 均显著增加; 与模型组比较, DMY

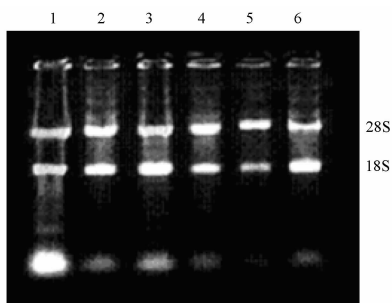
100, 200 mg · kg⁻¹ 和甘草锌 67.5 mg · kg⁻¹ 能显著降低 RAU 大鼠血清和组织中 TNF-α, DMY 50 mg · kg⁻¹ 使 RAU 大鼠血清和组织中 TNF-α 降低, 但无显著统计学意义(表 2)。

表 2 DMY 对 RAU 大鼠血清和口腔黏膜组织中 TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of DMY on TNF-α content in serum and oral mucosa of RAU rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	血清中 TNF-α	组织中 TNF-α
		/ng · L ⁻¹	/ng · g ⁻¹
正常	-	286 ± 36	304 ± 64
模型	-	419 ± 40 ¹⁾	410 ± 38 ¹⁾
DMY	50	396 ± 38	389 ± 42
	100	377 ± 36 ²⁾	375 ± 37 ²⁾
	200	350 ± 45 ³⁾	340 ± 43 ³⁾
甘草锌	67.5	347 ± 39 ³⁾	338 ± 41 ³⁾

3.3 DMY 对 RAU 大鼠血清和组织中 TNF-α mRNA 的影响 各组大鼠血清和口腔黏膜提取的总 RNA 完整性良好(图 2)。与正常组比较, 模型组大鼠血清和组织中 TNF-α mRNA 表达均显著升高; 与模型组比较, DMY 50, 100, 200 mg · kg⁻¹ 和甘草锌 67.5 mg · kg⁻¹ 使 RAU 大鼠血清和组织中 TNF-α mRNA 表达显著降低(表 3, 图 3)。



1. 正常组; 2. 模型组; 3, 4, 5. DMY 50, 100, 200 mg · kg⁻¹ 组; 6. 甘草锌 67.5 mg · kg⁻¹ 组(图 3 同)。

图 2 总 RNA 凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophotogram of total RNA

3.4 DMY 对 RAU 大鼠口腔黏膜组织中 NF-κB p65 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠口腔黏膜组织中 NF-κB p65 阳性细胞数显著升高; 与模型组比较, DMY 50, 100, 200 mg · kg⁻¹ 和甘草锌 67.5 mg · kg⁻¹ 能显著降低 RAU 大鼠口腔黏膜组织中 NF-κB

表 3 DMY 对 RAU 大鼠血清和组织中 TNF-α mRNA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of DMY on TNF-α mRNA content in serum and oral mucosa of RAU rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	TNF-α mRNA(与 β-actin 的灰度值比值)	
		血清	组织
正常	-	0.30 ± 0.07	0.26 ± 0.06
模型	-	1.21 ± 0.20 ¹⁾	1.16 ± 0.18 ¹⁾
DMY	50	0.91 ± 0.12 ²⁾	0.91 ± 0.12 ²⁾
	100	0.84 ± 0.15 ³⁾	0.77 ± 0.14 ³⁾
	200	0.50 ± 0.09 ³⁾	0.48 ± 0.10 ³⁾
甘草锌	67.5	0.61 ± 0.10 ³⁾	0.67 ± 0.13 ³⁾

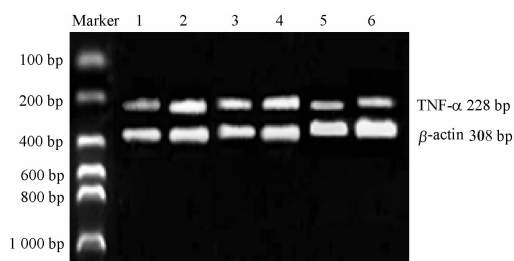


图 3 TNF-α mRNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophotogram of TNF-α mRNA

p65 阳性细胞数(表 4, 图 4)。

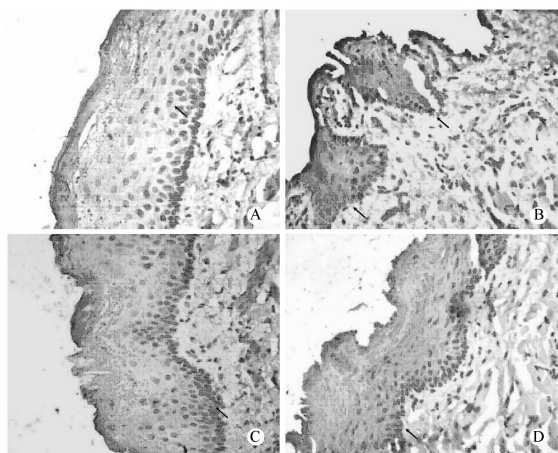
表 4 DMY 对 RAU 大鼠口腔黏膜组织中 NF-κB p65 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of DMY on NF-κB p65 in oral mucosa of RAU rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	NF-κB p65(细胞个数)
正常	-	19 ± 3
模型	-	75 ± 13 ¹⁾
DMY	50	50 ± 15 ³⁾
	100	51 ± 11 ³⁾
	200	28 ± 4 ³⁾
甘草锌	67.5	43 ± 8 ³⁾

4 讨论

复发性口腔溃疡又称复发性阿弗他溃疡(recurrent aphthous ulcer, RAU)、复发性口疮(recurrent oral ulcer, ROU), 是常见的口腔黏膜疾病, 发病率高达 20%, 居口腔黏膜病的首位。许多学者认为 RAU 是一种自身免疫性疾病, 采用同种异体口腔黏膜作为抗原, 诱导兔和大鼠体内产生抗口腔黏膜抗体, 成功复制了 RAU^[5-6], 并用于评价二氢杨梅素和茶多



A. 正常组:口腔黏膜固有层有散在表达的 NF- κ B p65 阳性细胞;
B. 模型组:口腔黏膜固有层有成堆表达的 NF- κ B p65 阳性细胞;
C. DMY 200 mg · kg⁻¹组, D. 甘草锌 67.5 mg · kg⁻¹组:口腔黏膜固有层 NF- κ B p65 阳性细胞表达明显减少。NF- κ B p65 阳性细胞呈棕黄色。

图4 DMY对RAU大鼠口腔黏膜组织中NF- κ B p65的影响
Fig. 4 Effect of DMY on NF- κ B p65 in oral mucosa of RAU rats

酚等治疗RAU的作用,获得了较好的结果^[1,7]。

肿瘤坏死因子(TNF- α)又名恶液质素,是一种炎性细胞因子,具有广泛的生物学活性^[8],可以调控机体的免疫功能和代谢过程,在RAU发病中起着重要作用^[9-10],可诱导包括自身在内的多种细胞因子(IL-1, IL-6)以及一些炎症介质的产生,损伤组织,继而加重炎症反应^[11]。

M Φ 作为多功能的免疫细胞,是口腔黏膜溃疡固有层中浸润的主要细胞,在炎症消散中发挥重要作用^[12]。TNF- α 主要由激活的单核M Φ 分泌,溃疡底部的M Φ 被激活后,分泌大量TNF- α ,同时产生高水平的NO进而产生细胞毒作用,导致了溃疡病理过程的发生^[13]。M Φ 分泌的IL-1, IL-6, TNF- α 能激活T淋巴细胞,使后者分泌IL-2并刺激T淋巴细胞增殖,引起溃疡底部大量淋巴细胞聚集,影响溃疡愈合,导致溃疡复发。

TNF- α mRNA控制TNF- α 的生成与释放,其转录受NF- κ B的调控^[14]。NF- κ B在细胞中通常以非活性的状态存在,当接受TNF- α 刺激后, NF- κ B被活化^[15-17],活化后的NF- κ B转入巨噬细胞核中,调高TNF- α mRNA的转录,使TNF- α 的合成和释放增加^[18],加重炎症反应。

本实验中与正常组比较,模型组中巨噬细胞显

著增加,而给药组与模型组比较M Φ 明显降低,这说明DMY能降低RAU大鼠口腔黏膜中M Φ 数,有文献报道DMY能明显降低动物血清抗口腔黏膜抗体滴度^[4],因此认为DMY可能具有中和血清抗口腔黏膜抗体的作用,从而降低了口腔黏膜组织中的抗原抗体反应,减少了口腔黏膜组织中抗原抗体复合物的形成,使M Φ 等向口腔黏膜中的聚集减少。本研究结果显示,与模型组比较,给药组的TNF- α , NF- κ B p65, TNF- α mRNA均显著降低,这说明随着M Φ 的减少,由它分泌的TNF- α 生成和释放减少, TNF- α 的减少使对NF- κ B p65的激活度减弱,相应胞核的NF- κ B p65明显减少,抑制了NF- κ B的核转位,使NF- κ B p65活化水平下调,转入胞核也同步下调, TNF- α mRNA的转录因NF- κ B p65的表达降低亦随之降低,这在一定程度上抑制了TNF- α 对自身的正向调控作用,使TNF- α 的蛋白表达和生成量同步降低,从而减轻了炎症反应。因此认为DMY可能通过抑制NF- κ B p65对M Φ 中TNF- α mRNA的转录和释放的调节作用,使口腔黏膜组织中TNF- α 下降从而减少口腔溃疡发生、促进溃疡愈合。

[参考文献]

- [1] 杨学敏,陈立峰. 二氢杨梅素的生物活性研究进展[J]. 中医药导报, 2008, 14(12): 86.
- [2] 董倩倩,陈立峰. 二氢杨梅素药理研究进展[J]. 中南药学, 2005, 3(5): 295.
- [3] 周天达,周雪仙. 藤茶中双氢黄酮醇的分离、结构鉴定及其药理活性[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(8): 458.
- [4] 陈立峰,董倩倩,张琼. 二氢杨梅素对兔复发性口腔溃疡的作用[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 176.
- [5] 程茜,刘建国,郭玉书,等. 实验性SD大鼠ROU模型的建立[J]. 临床口腔医学杂志, 2008, 24(9): 563.
- [6] 陶学金,李明,马净值,等. 免疫方法建立复发性口腔溃疡动物模型[J]. 临床口腔医学杂志, 2004, 20(1): 53.
- [7] 梁文红,刘建国,郭玉书,等. 茶多酚对复发性阿弗它溃疡大鼠模型外周血T淋巴细胞亚群的影响[J]. 口腔医学研究, 2005, 21(4): 393.
- [8] 张琳,李秦,张涛,等. 复发性口腔溃疡患者肿瘤坏死因子变化及临床意义[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(6): 530.
- [9] 王贺忠,戴会珍. 复发性口腔溃疡病因学研究现状[J]. 内蒙古医学杂志, 2001, 33(2): 136.
- [10] 邹韵秋,吴秋玲,梁晓萍,等. 复发性口腔溃疡与血清TNF- α , TNF- β 浓度关系的临床研究[J]. 武汉大学学报:医学版, 2001, 22(3): 237.
- [11] 卢卫忠,徐贞. 慢性阻塞性肺疾病与细胞因子的研究概况[J]. 中国社区医师, 2008, 10(20): 4.
- [12] J B Epstein, C H Sherlock, R A Wolber. Oral manifestations of



- cytomegalovirus infection[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1993,75(4):443.
- [13] 李琪佳, 宫恩聪, 刘叔平, 等. 溃疡性结肠炎黏膜的白细胞亚群和肿瘤坏死因子 TNF- α 的表达[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2001,17(3):216.
- [14] 李春穴, 蒋建新, 姜燕平, 等. 核因子 NF- κ B 在内毒素刺激大鼠肺泡巨噬细胞中的动态变化及其在肿瘤坏死因子 TNF- α 表达中的作用[J]. *中华创伤杂志*, 2003,19(5):308.
- [15] Liang Yan, Zhou Yang, Shen Pingping. NF- κ B and its regulation on the immune system[J]. *Cell Mol Immunol*, 2004,1(5):343.
- [16] Rothe M, Sarma V, Dixit V M, et al. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF-receptor 2 and CD40[J]. *Science*, 1995, 269(5229):1424.
- [17] Wallach D. Cell death induction by TNF: α matter of self control [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997,22(4):107.
- [18] 张方, 李子玲, 施毅, 等. LPS 致大鼠肺泡巨噬细胞 NF- κ B 促进 TNF- α 分泌[J]. *中国病理生理杂志*, 2007,23(7):1412.

Effects of dihydromyricetin on tumor necrosis factor and NF- κ B p65 of RAU rats

YANG Xue-min, WANG Xiao-hong, CHEN Li-feng*, WANG Xiao-qing

(*Institute of Material Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To study the effects of dihydromyricetin(DMY) on tumor necrosis factor(TNF- α) and NF- κ B p65 cells of the recurrent aphthous ulcer(RAU) rat. **Method:** Sixty of Sprague Dawley(SD) rats are randomly divided into 6 groups. The rat RAU models was established by injection of immunogen composed of the homogenate supernate of homogeneous oral mucosa from SD rats and Freund's complete adjuvant(FCA) into rat backs subcutaneously once every two weeks for 5 times, and the only FCA injected as normal control. DMY(50,100,200 mg \cdot kg⁻¹) and licorzine (67.5 mg \cdot kg⁻¹) were given intragastrically once daily for 7 days on the day of the last immunogen injection, respectively. Water was given instead of drugs in normal and model control groups. The blood was got from the fundus oculi vein of rats on the day after last administration, the serum was separated. Then the rats were put to death with the cervical dislocation and decollated on the ice stage. Two sides of rat buccal mucosal tissue were cut. One side of them was put into 4% neutral formalin and another was added into 10 times of phosphate buffer to homogenize it homogenate. The oral mucosa ulcer occurrence of rats was observed by the histopathology. The content of TNF- α in serum and oral mucosa was assayed with ELISA; the expression of NF- κ B cells was determined by the immunohistochemistry and macrophagus was determined by azure-feosin-dyeing in oral mucosa tissue. The expression of TNF- α mRNA in serum and oral mucosa was detected by reverse transcription polymerase chain reaction. **Result:** In RAU rats, oral mucosa ulcer occurred, the content of TNF- α raised and the expression of TNF- α mRNA increased in serum and oral mucosa, the expression of positive NF- κ B p65 cells and the amount of macrophages went up in oral mucosa. DMY and licorzine significantly reduced occurrence of oral mucosa ulcer in RAU rats, lowered content of TNF- α and the expression of TNF- α mRNA in serum and oral mucosa, reduced expression of positive NF- κ B p65 cells and the amount of macrophages. **Conclusion:** It is considered that DMY could inhibited occurrence of oral mucosa ulcer in RAU rats. One principle of it's effects could be that DMY controlled NF- κ B p65 regulation on transcription and release of TNF- α mRNA in macrophages in oral mucosa ulcer tissue and lead to fall of TNF- α content in oral mucosa tissue causing role of anti-oral mucosa ulcer.

[**Key words**] dihydromyricetin; recurrent aphthous ulcer; tumor necrosis factor; mRNA; NF- κ B p65; macrophage

doi:10.4268/cjcm20121722

[责任编辑 张宁宁]