

彭冬冬,陈相池,唐梓宁,等. 口腔菌群参与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 52-59.

Peng DD, Chen XC, Tang ZN, et al. Involvement of oral flora in the role of betel nut-extract-induced ulcers in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 52-59.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.006

口腔菌群参与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡的作用研究

彭冬冬^{1,2}, 陈相池^{1,2}, 唐梓宁^{1,2}, 刘学武^{1,2}, 袁湘中^{1,2}, 李 萌^{1,2}, 厉 巧^{1,2}, 章泽恒^{3*}

(1.湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,长沙 410329;2.新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410329;
3.湖南省药品审评与不良反应监测中心,长沙 410000)

【摘要】 目的 通过槟榔提取物构建大鼠口腔溃疡模型,观察口腔内菌群结构变化及多样性特征,探索口腔菌群和局部炎性因子参与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡的发病作用机制研究,为临床防治口腔溃疡提供理论支持。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、药物治疗组(桂林西瓜霜,8 mg/d,连续 7 d),10 只/组。大鼠口腔黏膜经皮下注射 10 g/mL 的槟榔提取物,复制大鼠口腔溃疡模型。通过观察溃疡面积、溃疡评分、局部组织口腔肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-2 (interleukin-2, IL-2)、IL-8 水平,并取口腔黏膜组织进行 HE 染色,观察其组织形态学的变化,采用高通量测序方法分析口腔微生物菌群结构分布及微生物群落多样性。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠溃疡面积显著增大,溃疡评分显著上升 ($P<0.01$),口腔黏膜组织 TNF- α 、IL-2、IL-8 水平均显著升高 ($P<0.01$),大鼠口腔唾液的链球菌属 (*Streptococcus*, $P<0.05$)、韦荣球菌属 (*Veillonella*, $P<0.001$) 均显著减少,模型组大鼠口腔黏膜上皮细胞增生或局灶性坏死,黏膜固有层水肿、出血,并伴有大量的中性粒细胞和单核细胞浸润;与模型组比较,药物治疗组大鼠溃疡面积显著减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),溃疡评分显著减少 ($P<0.05$),口腔黏膜组织 TNF- α ($P<0.01$)、IL-2 ($P<0.05$)、IL-8 ($P<0.05$) 水平均显著降低,大鼠口腔唾液的链球菌属 (*Streptococcus*, $P<0.001$)、韦荣球菌属 (*Veillonella*, $P<0.01$) 显著增加,葡萄球菌属 (*Staphylococcus*, $P<0.01$) 显著减少,口腔黏膜组织病变程度有明显改善。**结论** 槟榔提取物可成功复制大鼠口腔溃疡模型,其发病机制可能与口腔正常菌群水平降低,潜在致病菌水平升高,破坏其口腔菌群微生物平衡,进而破坏机体免疫系统,引起局部促炎因子升高有关。

【关键词】 槟榔提取物;口腔溃疡;口腔菌群;炎性因子;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0052-08

Involvement of oral flora in the role of betel nut-extract-induced ulcers in rats

PENG Dongdong^{1,2}, CHEN Xiangchi^{1,2}, TANG Zining^{1,2}, LIU Xuewu^{1,2}, YUAN Xiangzhong^{1,2}, LI Meng^{1,2},
LI Qiao^{1,2}, ZHANG Zeheng^{3*}

(1. Hunan Prima Drug Research Center Co. Ltd, Changsha 410329, China. 2. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410329. 3. Drug Evaluation and Adverse Drug Reaction Monitoring Center of Hunan Province, Changsha 410000)

【基金项目】 湖南普瑞玛新药非临床研究创新创业团队(2021)。

【作者简介】 彭冬冬(1990—),男,在职硕士研究生,研究方向:新药药效与安全性评价。E-mail: pengdongdong@hnse.org

【通信作者】 章泽恒(1970—),男,副主任药师,研究方向:临床药理学和药品监督管理。E-mail: 719563428@qq.com

[Abstract] Objective A model for studying oral ulcers induced by betel nut-extract was constructed in rats. Changes in the structure and diversity of oral flora were observed to explore the involvement of oral flora and local inflammatory factors in the pathogenesis of oral ulcers induced by betel nut-extract and to provide theoretical support for the prevention and treatment of oral ulcers in the clinic. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into normal, model and intervention groups (Guilin watermelon cream, 8 mg/d for 7 days), with 10 rats/group. The oral mucosa of rats was subcutaneously injected with 10 g/mL of betel nut-extract to generate an oral ulcer model. The histomorphological changes were observed, and ulcer area and ulcer scores were assessed. Local oral tissue tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-2 and IL-8 levels were determined. Oral mucosal tissues were sampled for HE staining and analyzed for the structural distribution of oral flora and the diversity of microbial communities using high-throughput sequencing method. **Results** Compared with rats in the normal group, those in the model group had an increased ulcer area, significantly increased ulcer scores ($P < 0.01$), and significantly increased levels of TNF- α , IL-2 and IL-8 in the oral mucosal tissues ($P < 0.01$). The amount *Streptococcus* ($P < 0.05$) and *Veillonella* ($P < 0.001$) in the oral saliva of the model group rats was significantly reduced. The model group rats showed oral mucosal epithelial cell hyperplasia or focal necrosis, mucosal lamina propria edema, and hemorrhage accompanied by mass neutrophil and monocyte infiltration. Compared with the model group rats, the intervention group rats had significantly reduced ulcerated area ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and ulcer scores ($P < 0.05$). And oral mucosal tissue levels of TNF- α ($P < 0.01$), IL-2 ($P < 0.05$) and IL-8 ($P < 0.05$), as well as significantly increased *Streptococcus* ($P < 0.001$) and *Veillonella* ($P < 0.01$) and significantly reduced *Staphylococcus* ($P < 0.01$) in the oral saliva. The degree of lesions in the oral mucosal tissues was significantly improved in the intervention group. **Conclusions** Betel nut-extract can be used to successfully reproduce a rat model of oral ulcer, and it is speculated that the development of oral ulcers after exposure to betel nut-extract may be related to an imbalance in the oral flora and local tissue inflammatory mediators.

[Keywords] betel nut-extract; oral ulcer; oral flora; inflammatory factors; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

口腔溃疡是一种常见的口腔黏膜疾病,在口腔疾病中发病率很高,健康人群口腔微生物种群数量大、种类多,大部分属于口腔中正常微生物,当口腔菌群失衡、局部炎性因子水平发生改变时,常诱导机体发生口腔溃疡,其发病特点以红肿为主,逐渐发展为白色荚膜形成溃疡,造成局部组织炎症和坏死^[1-5]。口腔溃疡不仅影响患者的生活质量,而且会给患者带来肉体上的痛苦,更是世界卫生组织公认的口腔癌前病变。当前有报道称口腔溃疡与咀嚼槟榔、免疫功能、遗传、机械损伤等因素有关^[6]。槟榔为棕榈科植物槟榔的干燥成熟种子,具有杀虫消积、行气利水、截疟的功效,其主要活性成分有槟榔碱、槟榔次碱、去甲基槟榔次碱。研究表明,槟榔碱对口腔黏膜具有一定的毒性,当口腔反复咀嚼槟榔时,可引起口腔上皮层萎缩,促进上皮细胞凋亡,进而形成口腔黏膜溃疡,而口腔菌群在槟榔提取物诱发口腔溃疡发病机制方面鲜有报道^[7]。为验证槟榔提取物可通过破坏口腔菌群稳态平衡及局部炎性因子水平而诱导口腔溃疡的发生,本研究采用槟榔提取物构建大鼠口腔溃疡模型,通过观察模型动物溃疡面积、溃疡评分、口腔黏膜病理变化并结合口腔微生物菌群及局部组织促炎因子水平,从口

腔微生物的变化角度探索槟榔提取物诱发口腔溃疡的发病机制,对临床上防治口腔溃疡提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,体重 180~220 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004],饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境动物实验室[SYXK(湘)2020-0015]。饲养期间大鼠自由饮水,饲喂 SPF 鼠料(⁶⁰Co 消毒)由科奥协力(天津)饲料有限公司提供[SCXK(津)2020-0004]。饲养环境:昼夜各半循环照明,温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%。动物实验均按照湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物伦理与福利委员会的指导方针和批准进行(IACUC-2022(3)022),实验遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

槟榔提取物,规格:每袋 100 g,批号:RH11042412,每克提取物含有 20 g 生药,有效期至:2024-04,生产单位:四川海澳斯生物科技有限公司,HPLC 测得槟榔提取物中槟榔碱含量为 43 mg/

g。桂林西瓜霜,规格:每瓶 3.5 g,1 瓶/盒,批号:220825,生产厂家:桂林三金药业股份有限公司,功能主治:清热解毒,消肿止痛,可用于治疗牙龈炎、口腔溃疡、咽喉肿痛等。

大鼠 IL-2 酶联分析 ELISA 试剂盒、TNF- α 酶联分析 ELISA 试剂盒、IL-8 酶联分析 ELISA 试剂盒,批号均为:202208,有效期至:2023-04,生产厂家:黄石市艾恩斯生物科技有限公司。DMIL 倒置显微镜(德国 Leica 公司);DFC 420C 病理成像系统(德国 Leica 公司);Spectra Max i3x 型多功能酶标仪(上海奥地利美谷光子公司);MG96+型 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司);DYY-6C 型双稳定时电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);NanoDrop 2000 型微量分光光度计(Thermo fisher scientific);Biotek elx800 型酶标仪(Biotek)等。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

选取检疫合格 SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,按性别和体重随机分为正常组、模型组、药物治疗组(桂林西瓜霜喷剂),每组 10 只。造模方法:采用乙醚将模型组和药物治疗组大鼠轻微麻醉后,在大鼠口腔中上端黏膜皮下注射 10 g/mL 的槟榔提取物,每只左右侧各 0.1 mL,复制大鼠口腔溃疡模型,正常组动物不做处理。药物治疗组大鼠经口腔黏膜喷入桂林西瓜霜,每喷约 4 mg,覆盖局部溃疡区域,每侧每喷 1 次,每天 2 次,连续给药 7 d,大鼠每次喷入后应平躺 10~15 s,并在干预 30 min 内禁食禁水以便药物吸收。

1.3.2 一般临床观察

每天观察各组动物行为活动、精神状况及粪便、尿液等情况。

1.3.3 溃疡面积测定及评分

分别于造模后第 1、2、3、5、7 天(D1、D2、D3、D5、D7)对各组动物口腔黏膜进行外观评分,参照文献^[8]进行项目评分及等级。分别造模后 D1、D2、D3、D5、D7 在同一角度同一标尺拍照,采用 Image J 软件测量各组大鼠溃疡面积,并计算愈合率。溃疡愈合率(%)=(初始溃疡面积-当天溃疡面积)/初始溃疡面积。

1.3.4 口腔黏膜局部组织 TNF- α 、IL-8、IL-2 检测

于造模后 D7,取各组动物口腔黏膜左侧造模部位及周围局部组织,采用 0.9%氯化钠注射液洗去残留血液,将称量组织重量与 0.9%氯化钠注射液

体积按 1:9 加入 EP 管中,采用组织匀浆机对口腔黏膜组织匀浆,3000 r/min 离心 10 min 取上清液,采用大鼠 ELISA 试剂盒检测上清液中 TNF- α 、IL-8、IL-2 水平。

1.3.5 口腔菌群分析

于造模后 D7,上、下午各 1 次,采用一次性无菌咽拭子对各组动物进行口腔拭取(多次采集混合),采集口腔菌群,拭取部位为口腔黏膜溃疡周边,动作以不损伤伪膜为准,直至唾液完全浸润咽拭子,拭取后装入无菌 EP 管中,-20℃ 保存。选择 16S V3-V4 区引物(338F:ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 和 806R:GGACTACHVGGGTWTCTAAT)进行扩增;PCR 扩增体系为:5×FastPfu Buffer 4 μ L,2.5 mmol/L dNTPS 2 μ L,Forward Primer(5 μ mol/L)0.8 μ L,Reverse Primer(5 μ mol/L)0.8 μ L, FastPfu Polymerase 0.4 μ L,BSA 0.2 μ L,Template DNA 10 ng,补 ddH₂O 至 20 μ L;反应条件:95℃ 3 min、95℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃ 40 s、72℃ 10 min,29 个循环;扩增后使用 Illumina 进行测序及口腔菌群分析。

1.3.6 组织病理学检查

于造模后 D7,取各组动物口腔黏膜右侧造模处部位及周围局部组织,10%中性福尔马林溶液固定,切片,石蜡包埋,HE 染色,进行口腔黏膜组织病理学检查,显微镜下观察其组织病理学变化。

1.4 统计学方法

采用 UPARSE 软件(version 7.1)进行菌群分析,并基于菌属级别进行比较。根据 97%的相似度对序列进行 OTU 聚类,并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,所有数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验或非参数检验。均以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床观察

如图 1 所示,造模后各组动物嘴角均出现肿胀,并伴有流涎,口腔黏膜出现不规则的溃疡面,其创面边缘与周围正常皮肤形成较明显的界线,同时伴有自主活动和摄食减少。药物治疗组动物随着给药时间延长,口腔黏膜溃疡创面逐渐愈合。

2.2 溃疡面积、愈合率测定及评分

如表 1、图 2 所示,与正常组比较,模型组造模后 D1、D2、D3、D5、D7 口腔溃疡评分均显著升高;与

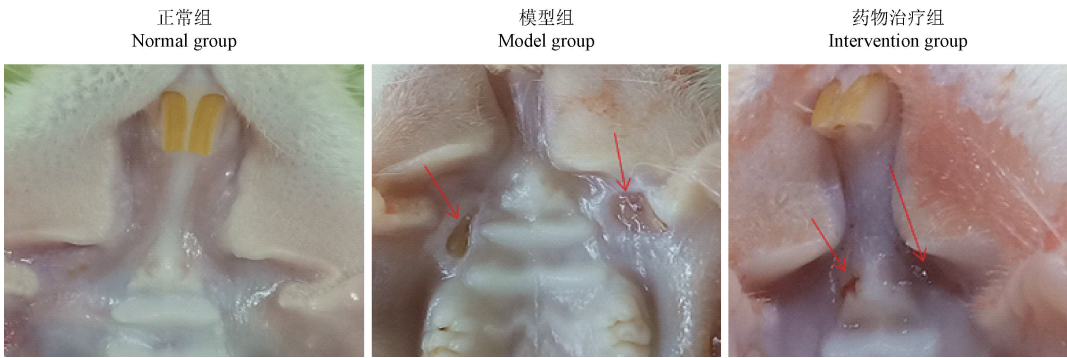
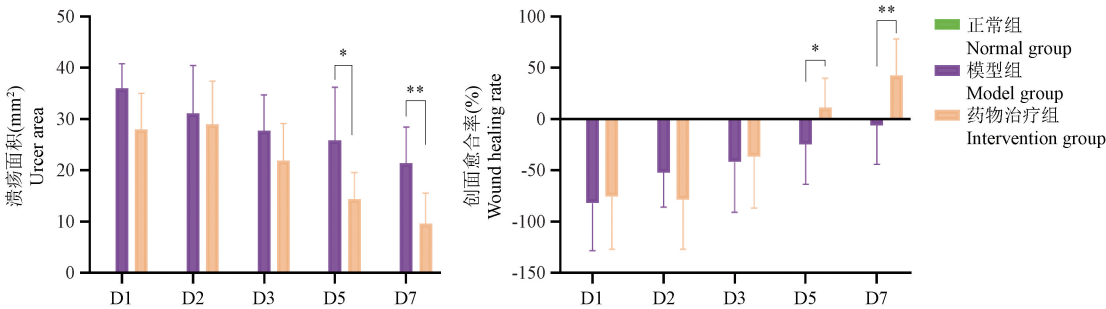


图 1 槟榔提取物对大鼠口腔黏膜创面的影响
Figure 1 Effect of betel nut-extract on oral mucosal wound in rats



注:与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 2 槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡创面面积及愈合率的影响 ($n=10$)
Note. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Effect of betel nut-extract on oral ulcer wound area and healing rate in rats

表 1 槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡评分 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 1 Oral ulcer score induced by betel nut-extract in rats

组别 Groups	溃疡评分 Oral ulcer score				
	造模后 D1 D1 after molding	造模后 D2 D2 after molding	造模后 D3 D3 after molding	造模后 D5 D5 after molding	造模后 D7 D7 after molding
正常组 Normal group	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
模型组 Model group	9.2±1.5 ⁺⁺	8.8±1.2 ⁺⁺	8.5±1.3 ⁺⁺	8.6±1.8 ⁺⁺	7.2±1.5 ⁺⁺
药物治疗组 Intervention group	8.2±1.0	8.0±1.1	7.1±1.3	5.2±1.2 [*]	4.2±0.9 [*]

注:与正常组比较, ⁺⁺ $P<0.01$;与模型组比较, ^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, ⁺⁺ $P<0.01$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$.

模型组比较,药物治疗组造模后 D5、D7 溃疡面积和口腔溃疡评分显著减少 ($P<0.05, P<0.01$)、愈合率显著增大 ($P<0.05, P<0.01$),提示槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡模型构建成功,且桂林西瓜霜喷剂干预可对症状起到治疗作用。

2.3 口腔黏膜组织细胞因子检测

如图 3 所示,与正常组比较,模型组口腔黏膜组织中 IL-8、IL-2、TNF- α 均显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,药物治疗组口腔黏膜组织中 IL-8、IL-2、TNF- α 均显著减少 ($P<0.05, P<0.01$),提示槟榔提取物会引起大鼠局部组织炎症因子升高,当给予药物治疗后炎症水平明显降低。

2.4 口腔菌群分析

2.4.1 DNA 的质检、PCR 扩增和测序

如图 4 所示,采用 NanoDrop 2000 对 30 只大鼠的 DNA 进行检测, DNA 浓度为 1.08~10.41 ng/ μ L。用 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG)、806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) 进行 PCR 扩增,扩增结果合格。大鼠的口腔唾液即可进行测序和口腔菌群分析。

2.4.2 口腔菌群组成分析

如图 5 所示,菌群分布图显示了菌群结构属水平的变化及相对丰度,其中正常组大鼠口腔中的优势菌主要是链球菌属 (*Streptococcus*)、韦荣球菌属

(*Veillonella*),而葡萄球菌属(*Staphylococcus*)占比较少,与健康人群的口腔微生物中菌群分布基本一致,经槟榔提取物干预后,大鼠口腔菌群发生明显变化,其中以 *Streptococcus*、*Veillonella*、*Staphylococcus*、*Rothia* 变化最为明显,表明槟榔可能会引起大鼠口腔菌群失调。

2.4.3 对大鼠口腔菌群 α 多样性及菌属差异的影响

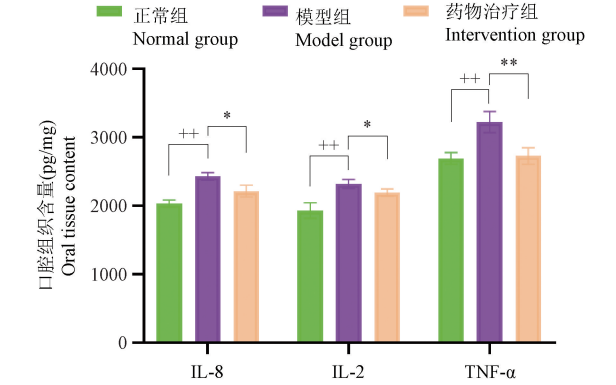
如图 6 所示,与正常组比较,模型组大鼠口腔唾液的 shannon 指数显著增大 ($P<0.05$),simpson 指数均显著减小 ($P<0.01$),提示模型组大鼠口腔菌群生物多样性升高,物种间差异增大,均一性降低;与模型组比较,药物治疗组 shannon 指数显著减小 ($P<0.05$),simpson 指数显著增大 ($P<0.01$),提示通过桂林西瓜霜干预后,能明显调节大鼠口腔菌群多样性,减少物种间差异。

如图 7 所示,与正常组比较,模型组大鼠口腔唾液中 *Streptococcus*、*Veillonella* 均显著减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),*Staphylococcus* 虽无统计学差异,但有增加的趋势;与模型组比较,药物治疗组 *Streptococcus* 显著增加 ($P<0.01$),*Staphylococcus* 显著减少 ($P<0.01$),*Veillonella* 虽无统计学差异,但有明显增加的趋势。上述结果表明槟榔提取物能引起大鼠口腔唾液中 *Streptococcus*、*Veillonella*、*Staphylococcus* 菌属序列比例变化,通过药物治疗后,能调节大鼠口腔唾液中菌属序列比例。

2.5 组织病理学镜下观察

如图 8 所示,正常组镜下可见大鼠口腔黏膜组织层结构完整清晰,无炎性细胞浸润;模型组大鼠经槟榔提取物诱导后,可见大鼠上皮细胞增生或局灶性坏死,黏膜固有层水肿、出血,并伴有大量的中性粒细胞和单核细胞浸润;药物治疗组可见大鼠口腔黏膜上皮细胞增生,黏膜少量中性粒细胞浸润,

提示桂林西瓜霜能明显改善模型大鼠口腔黏膜上皮细胞坏死、水肿等病变,并显著减轻大鼠口腔黏膜组织炎性细胞浸润程度。



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

图 3 槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡局部组织细胞因子 IL-8、IL-2 和 TNF-α 水平的影响 ($n=10$)
Note. Compared with normal group, ++ $P<0.01$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effects of betel nut-extract on the levels of cytokines IL-8, IL-2 and TNF-α in the local tissues of rat oral ulcer

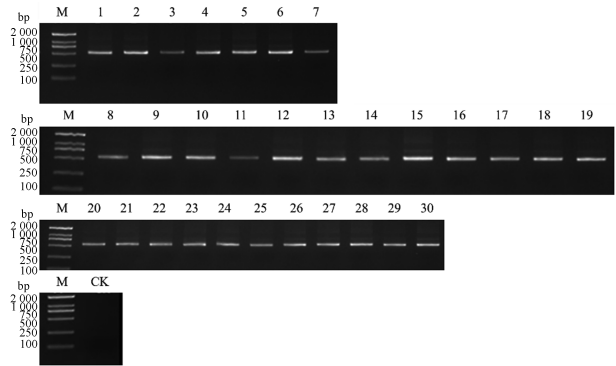


图 4 PCR 扩增结果
Figure 4 PCR amplification results

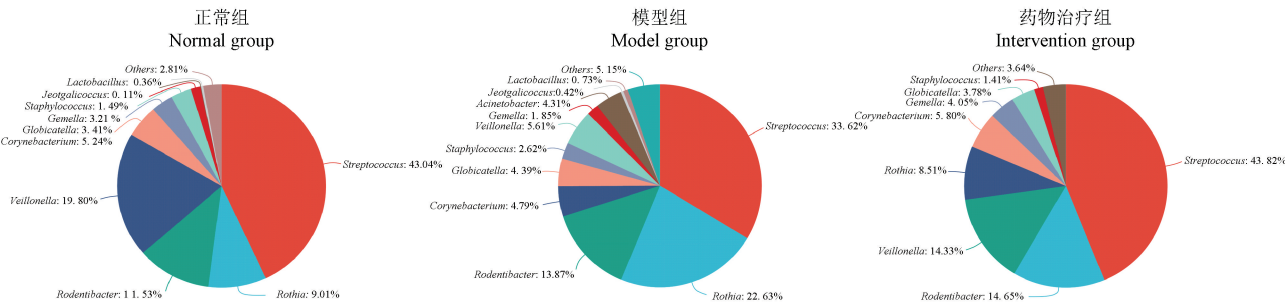
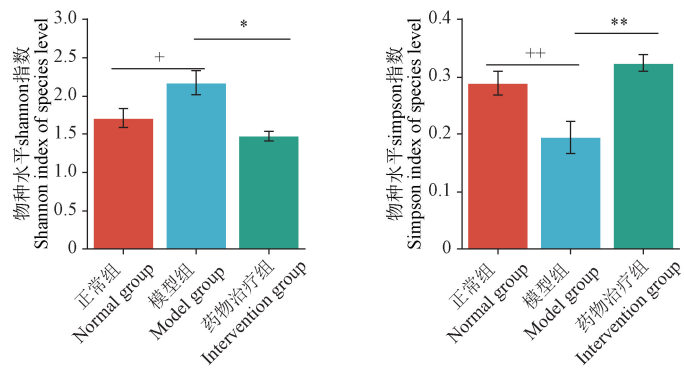


图 5 大鼠口腔唾液菌群分布(层级聚类分析,属水平)
Figure 5 Distribution of oral salivary flora in rats (hierarchical cluster analysis, genus level)

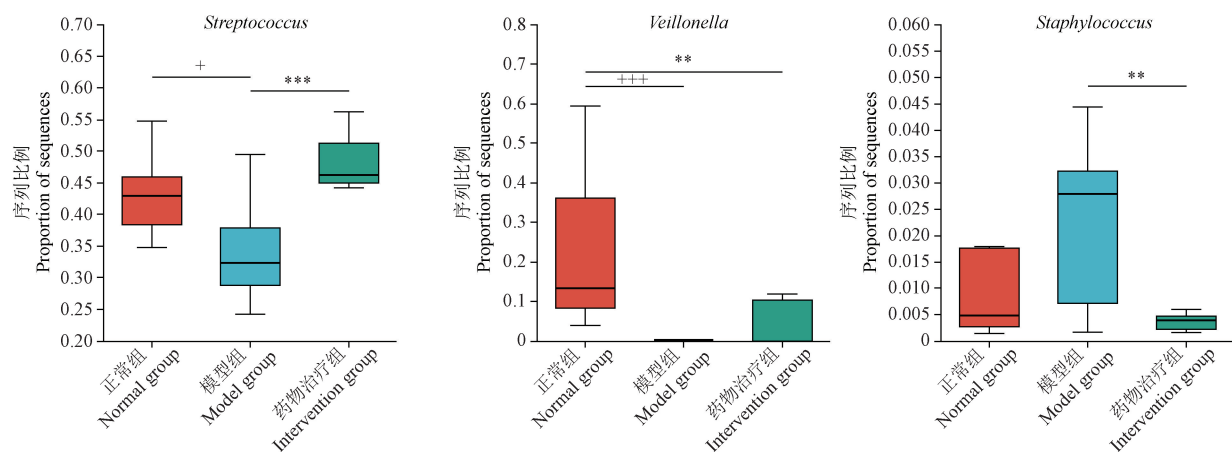


注:与正常组比较, $^+P<0.05$, $^{++}P<0.01$;与模型组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 6 槟榔提取物诱导大鼠口腔菌群 shannon 和 simpson 指数的影响 ($n=10$)

Note. Compared with normal group, $^+P<0.05$, $^{++}P<0.01$. Compared with model group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 6 Effect of betel nut-extract induced shannon and simpson indices of oral flora in rats



注:与正常组比较, $^+P<0.05$, $^{+++}P<0.001$;与模型组比较, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图 7 槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡唾液菌群分析的影响 ($n=10$)

Note. Compared with normal group, $^+P<0.05$, $^{+++}P<0.001$. Compared with model group, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 7 Effect of betel nut-extract on salivary flora of rat oral ulcer

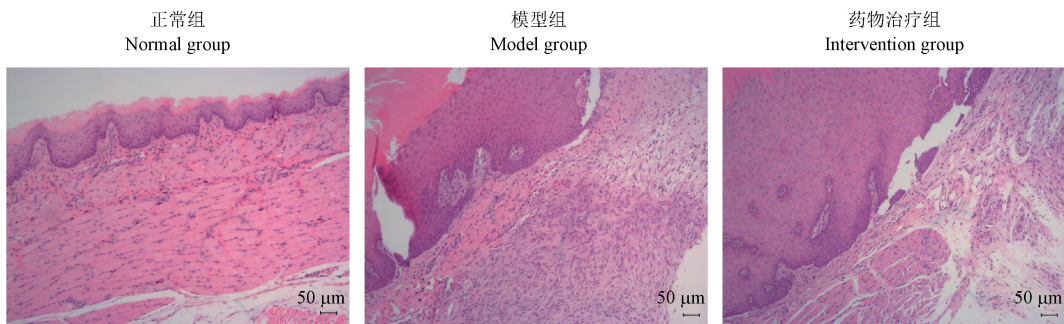


图 8 大鼠口腔黏膜组织病理切片(HE 染色)

Figure 8 Pathological sections of rat oral mucosa (HE staining)

3 讨论

口腔溃疡是一种发生于口腔黏膜上的表浅溃疡性疾病,多见于嘴唇内侧、舌头、舌腹、颊黏膜等部位,临床表现为口腔灼烧痛、溃烂,呈周期性、游走性反复发作,严重者可直接影响患者的饮食、吞咽和语言交流等日常行为^[9]。虽然目前临床上已有多种口腔溃疡动物模型用于实验研究,如机械损

伤法、化学灼烧法和细菌感染法等,但模型大多以病理性为主,极少有模型可完全复制疾病发生发展的自然进程^[10]。槟榔提取物诱导口腔溃疡模型是持续而自然的过程,与传统机械损伤、化学灼烧和细菌感染等口腔溃疡模型构建方式相比,更具均一性与可控性,且不会因造模力度不同或试剂外溢等情况而致模型差异病损各不相同。大量研究证实槟榔可造成牙齿与牙周黏膜损伤,引起口腔溃疡及黏膜纤维化,产生一系列牙周疾病,但发病机制尚不清晰^[11]。本研究构建与临床病症特点吻合度高且复制简单的口腔溃疡动物模型,揭示槟榔诱发口腔溃疡的发病机制,通过观察各组大鼠体征、口腔溃疡面积和口腔黏膜组织病理变化对不同处理组大鼠造模情况进行评价,根据口腔黏膜局部组织炎症因子水平、口腔菌群结构变化以及多样性特征,揭示口腔微生物群与黏膜细胞因子间动态关系,探索口腔菌群参与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡的发病机制,特设桂林西瓜霜作为药物治疗组,观察模型组大鼠口腔创面愈合后口腔菌群和局部细胞因子水平的变化,进一步验证口腔菌群和局部细胞因子与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡发病机制的关系^[12-13]。

本研究发现,在槟榔提取物干预后大鼠均出现口腔溃疡创面,且结合病理可见大鼠口腔黏膜明显病变,该症状与邢国征等^[14]诱导大鼠口腔溃疡模型症状一致,提示槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡模型构建成功。当动物经药物干预后,药物治疗组大鼠口腔溃疡程度随着给药时间的延长呈愈合趋势,而模型组动物仍处于严重阶段,提示模型动物尚未出现自愈趋势,各组动物于给药末期进行口腔黏膜炎症因子检测及口腔菌群高通量测序对于揭示槟榔提取物参与口腔溃疡发病机制具有重要意义。

研究表明,口腔溃疡的发生发展与细胞因子网络失衡密切相关,其中 IL-2、IL-8 和 TNF- α 均为参与口腔溃疡的重要促炎因子;而微生物菌群失调会破坏免疫系统,进而导致促炎因子上调及抗炎因子下调,因此口腔溃疡的发生发展与口腔菌群稳态及细胞因子水平密切相关^[14-17]。有报道称,口腔中较高丰度的葡萄球菌属会提高口腔黏膜感染风险,而链球菌属和韦荣氏菌属等唾液菌群作为口腔中的正常菌群与宿主间保持动态平衡,从而发挥保护宿主的作用,维持口腔内环境的稳定性,当其含量下降时,口腔黏膜稳定性破坏,也会导致口腔溃疡的

发生^[18-20]。本研究使用槟榔处理模型组大鼠后采用细菌 16S rDNA 进行口腔菌群高通量测序, α 多样性分析结果显示,模型组大鼠口腔唾液的 shannon 升高、simpson 降低,提示槟榔提取物可导致大鼠口腔菌群组成和结构发生改变,打破口腔菌群平衡。在已知检出的高丰度菌群中,研究发现模型组大鼠口腔唾液 *Streptococcus*、*Veronella* 数量显著降低,*Staphylococcus* 数量显著增加,且口腔黏膜组织中促炎因子 TNF- α 、IL-2、IL-8 水平均显著上调;而经药物干预后模型大鼠口腔黏膜创面逐渐愈合,*Streptococcus*、*Veronella* 数量显著升高,*Staphylococcus* 数量显著减少,口腔黏膜组织中促炎因子 TNF- α 、IL-2、IL-8 水平均显著下调,提示模型大鼠在口腔黏膜创面好转的情况下,其口腔菌群失衡情况和炎症因子水平得到明显改善。综上所述,槟榔提取物可引起动物口腔正常菌群水平降低,潜在致病菌水平升高,破坏其口腔菌群微生物平衡,进而破坏机体免疫系统,引起炎症因子风暴,导致口腔溃疡的发生。

本研究使用槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡模型,可引起大鼠口腔菌群中链球菌属、韦荣氏菌属数量减少,葡萄球菌属数量增多,局部促炎因子水平升高,口腔溃疡面积增大,口腔溃疡评分上升。因此,我们推测槟榔提取物诱发口腔溃疡疾病发展可能与口腔菌群稳态破坏,引起促炎因子含量升高有关,这一发现对研究槟榔提取物诱导口腔溃疡发病机制及靶向药物开发具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 张怡, 逯茂洋. 口腔菌群与口腔疾病的关系的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(80): 99-100.
Zhang Y, Lu MY. Research progress on the relationship between oral flora and oral diseases [J]. World Latest Med Inf, 2018, 18(80): 99-100.
- [2] 葛林虎, 苏汉福. 口腔菌群多样性与菌株基因组多态性 [J]. 口腔医学研究, 2019, 35(10): 915-918.
Ge LH, Su HF. Oral microbiota diversity and bacterial genomic polymorphism [J]. J Oral Sci Res, 2019, 35(10): 915-918.
- [3] 贾新斌. 复发性口腔溃疡患者口腔微生物菌群检验情况分析 [J]. 基层医学论坛, 2020, 24(35): 5117-5118.
Jia XB. Analysis of oral microbial flora test in patients with recurrent oral ulcer [J]. Med Forum, 2020, 24(35): 5117-5118.
- [4] Han N, Jia L, Guo L, et al. Balanced oral pathogenic bacteria and probiotics promoted wound healing via maintaining mesenchymal stem cell homeostasis [J]. Stem Cell Res Ther,

- 2020, 11(1): 61.
- [5] 王宁, 丁志锋. 肿节风分散片联合雷尼替丁治疗复发性口腔溃疡的疗效及对患者炎性因子的影响研究 [J]. 中国基层医药, 2021, 28(3): 349–352.
Wang N, Ding ZF. Efficacy of Zhongjiefeng dispersible tablets combined with ranitidine in the treatment of recurrent oral ulcer and its effect on inflammatory factors [J]. Chin J Prim Med Pharm, 2021, 28(3): 349–352.
- [8] 马静, 李雪丽, 韩旭, 等. 牙痛停滴丸治疗口腔溃疡的药效学研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(3): 492–497.
Ma J, Li XL, Han X, et al. Therapeutic effect of Yatongting Dropping Pills on oral ulcer in rats [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(3): 492–497.
- [9] 肖开, 闫欣, 苗明三. 两面针外用对豚鼠口腔溃疡模型的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(5): 533–537.
Xiao K, Yan X, Miao MS. Effect of external use of *Zanthoxylum nitidum* on guinea pig model of oral ulcer [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2012, 23(5): 533–537.
- [6] 邵小钧, 王金竹, 林小臻, 等. 三亚市居民食用槟榔及相关口腔疾病的流行状况调查 [J]. 中国热带医学, 2018, 18(10): 994–998, 1028.
Shao XJ, Wang JZ, Lin XZ, et al. Epidemiological investigation and analysis of betel nut chewing and related oral diseases in Sanya [J]. China Trop Med, 2018, 18(10): 994–998, 1028.
- [7] 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.
Nie AZ, Gao MM, Chao YH, et al. Discussion and consideration on pharmacology and toxicology of *Areca catechu* and its rational application [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(12): 3329–3336.
- [10] 祝红, 黄胜楠, 苗明三. 口腔溃疡动物模型造模方法及临床吻合度分析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(5): 1750–1756.
Zhu H, Huang SN, Miao MS. Modeling method and clinical fit analysis of oral ulcer animal model [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(5): 1750–1756.
- [11] 莫愁. 槟榔提神, 但请远离 [J]. 江苏卫生保健, 2022, 24(10): 55.
Mo C. Betel nut is refreshing, but please stay away [J]. Jiangsu J Health Care, 2022, 24(10): 55.
- [12] 刘蓉, 李丹, 马骁, 等. 康复新液对比西瓜霜喷剂治疗复发性口腔溃疡的 Meta 分析 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 229–233.
Liu R, Li D, Ma X, et al. A meta-analysis of kangfuxin liquid vs watermelon frost spray in the treatment of recurrent aphthous ulcer [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(2): 229–233.
- [13] 范中凯. 锌剂对复发性口腔溃疡患儿免疫功能和口腔菌群的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2022, 37(15): 2823–2826.
Fan ZK. Effect of zinc on immune function and oral flora in children with recurrent oral ulcer [J]. Metern Child Health Care China, 2022, 37(15): 2823–2826.
- [14] 邢国征, 王长娜, 田旭彤, 等. 蜘蛛毒素口腔溃疡散对口腔溃疡模型大鼠的治疗作用及其机制研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(8): 1043–1048.
Xing GZ, Wang CN, Tian XT, et al. Therapeutic effects of spider toxin oral ulcer powder on oral ulcer model rats and its mechanism study [J]. China Pharm, 2019, 30(8): 1043–1048.
- [15] Do T, Sheehy EC, Mulli T, et al. Transcriptomic analysis of three *Veillonella* spp. present in carious dentine and in the saliva of caries-free individuals [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 25.
- [16] 杨明燕, 张帆, 赵蕾. 口腔菌群变化影响放射治疗和化学治疗相关性口腔黏膜炎病程的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2023, 50(1): 43–51.
Yang MY, Zhang F, Zhao L. Research progress on oral flora changes affecting the course of radiotherapy and chemotherapy-related oral mucositis [J]. Int J Stomatol, 2023, 50(1): 43–51.
- [17] 林冬佳, 杨利洒, 王智. 口腔微生物与免疫细胞及上皮屏障互作在口腔黏膜稳态维持及疾病发生中的作用研究进展 [J]. 四川大学学报(医学版), 2022, 53(2): 188–193.
Lin DJ, Yang LS, Wang Z. Research updates: the role of interaction between oral microbiota, immune cells, and epithelial barrier in oral mucosal homeostasis and pathogenesis [J]. J Sichuan Univ Med Sci, 2022, 53(2): 188–193.
- [18] McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, et al. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? [J]. Am J Infect Control, 2015, 43(1): 35–37.
- [19] 陈杰, 丁维俊. 复发性口腔溃疡微生物及免疫学机制与中医相关性探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 202–207.
Chen J, Ding WJ. Correlation between microbial and immune mechanisms of recurrent oral ulcer and traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(13): 202–207.
- [20] Cabras M, Carrozzo M, Gambino A, et al. Value of colchicine as treatment for recurrent oral ulcers: a systematic review [J]. J Oral Pathol Med, 2020, 49(8): 731–740.

[收稿日期] 2023-04-17