



吡哌美辛治疗口腔溃疡的动物实验研究*

张少璐^{1,3)**} 骆树瑜^{2)**} 邱玉玲¹⁾ 张向宇²⁾ 钟玉绪³⁾ 孔德新^{1)***}⁽¹⁾ 天津医科大学药学院, 天津 300070; ⁽²⁾ 天津医科大学口腔医院, 天津 300070; ⁽³⁾ 军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100089

摘要 目的 探讨两种吡哌美辛制剂在口腔溃疡愈合中的作用。**方法** 大鼠右颊用铁钉烫烧造模, 分为吡哌美辛凝胶给药组(YN)、复方苯佐卡因凝胶阳性对照组(NP)、吡哌美辛喷雾给药组(YP)、口腔炎喷雾阳性对照组(PP)、正常对照组(N)和阴性对照组(M)。采用HE染色、组织学标准定量评价溃疡面再上皮化及肉芽组织形成情况, 比色法检测溃疡组织一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性水平, 免疫组化检测大鼠溃疡组织表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达情况。**结果** YP、YN、NP、PP组溃疡面积较M组均减小, 组织学定量评价显示YP、YN、NP、PP组得分均高于M组($P<0.05$); 给药后, YP组NO和NOS水平显著低于M组($P<0.05$); EGF在YP、YN、NP、PP组的表达均高于M组和N组($P<0.05$); EGFR在YP、YN、NP、PP组的表达与N组相比明显升高($P<0.05$); VEGF在YP、YN、NP、PP组的表达均低于M组($P<0.05$)。**结论** 两种吡哌美辛制剂均能起到减轻大鼠口腔溃疡炎症反应、促进愈合作用。

关键词 口腔溃疡, 吡哌美辛, 大鼠模型, 愈合**中图分类号** R9, R78**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0105

口腔溃疡(oral ulcer, OU)为最常见的口腔黏膜炎症性溃疡性疾病, 调查发现至少有10%~25%人患有该病, 在特定人群中OU的患病率可高达50%^[1-2]。因发作时疼痛剧烈而严重影响患者的正常生活, 严重者可能造成组织缺损。如何安全而有效地缓解疼痛、促进组织修复, 从而缩短发作期、延长间歇期是治疗口腔溃疡关键所在^[3]。临床局部用药以抗菌药、具有抗炎和血管收缩作用的糖皮质激素、各类生长因子以及中草药为主。吡哌美辛作为非甾体类抗炎药, 通过抑制前列腺素(prostaglandin, PG)类物质而发挥其抗炎作用^[4], 相比皮质激素还有镇痛作用, 且副作用小, 更为安全有效。本文旨在探究吡哌美辛对口腔溃疡愈合过程中的主要作用及机理。

1 材料与方法

1.1 材料

SD(Sprague Dawley)远交群大鼠购自维通利华, 所有动物实验程序均按美国国家卫生研究院实验动物护理和使用指南进行, 并经天津医科大学实

验动物伦理委员会批准; NO检测试剂盒(比色法)ab65328和NOS检测试剂盒(比色法)ab211083购自Abcam; 免疫组化表皮生长因子(EGF)、表皮生长因子受体(EGFR)兔抗鼠一抗、血管内皮细胞生长因子(VEGF)兔抗鼠多克隆一抗、鼠兔通用型免疫组化试剂盒, 购自Proteintech。

1.2 造模、分组

将SD大鼠用1%戊巴比妥钠麻醉后, 取仰卧位, 于大鼠右侧颊囊处用直径5 mm的烧红铁钉烫烧2 s。造模第2 d随机选取造模大鼠观察, 口腔黏膜可见明显充血水肿, 溃疡表面厚重黄色膜覆盖, 并有炎性分泌物渗出, 口腔内唾液分泌量增加, 表明造模成功。SD大鼠共36只, 随机分为6组, 每组6只。造模第3天开始用药如下:

* 国家自然科学基金(82073890, 81673464)和天津市教委科研项目(2020KJ186)资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 022-83336658, Email: kongdixin@tmu.edu.cn

收稿日期: 2021-04-19, 接受日期: 2021-06-24

a. 吡啶美辛凝胶给药组 (YN)。用吡啶美辛凝胶涂抹创面, 3次/d。吡啶美辛凝胶为本实验室自制, 由吡啶美辛喷雾剂组溶液加入羟丙基纤维素 (HPC) 制成3%凝胶剂。

b. 复方苯佐卡因凝胶阳性对照组 (NP)。用复方苯佐卡因凝胶 (国药准字 H20064406) 涂抹创面, 3次/d。

c. 吡啶美辛喷雾给药组 (YP)。给予吡啶美辛喷雾剂, 吡啶美辛喷雾剂为本实验室自制, 取适量吡啶美辛粉末溶于0.1 mol/L Tris缓冲液 (三羟甲基氨基甲烷), 用HCL调成pH 8.1, 制成10 g/L的储存液, 3次/d。

d. 口腔炎喷雾阳性对照组 (PP)。给予口腔炎喷雾剂 (国药准字 X20044198), 3次/d。

e. 正常对照组 (N)。不作任何处理。

f. 阴性对照组 (M)。蒸馏水和3% HPC凝胶交替涂抹创面, 3次/d。

1.3 处理方法

给药3 d后每组随机处死3只大鼠, 观察口腔溃疡愈合情况并拍照, 取溃疡组织样本检测溃疡组织中NO、NOS水平; 给药7 d后处死其他大鼠, 拍照, 观察口腔溃疡愈合情况, 取溃疡组织多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 进行HE、免疫组织化学染色。

1.4 NO、NOS检测方法

每只大鼠处死后取一定重量的溃疡组织, 冷PBS洗后, 重悬于100 μ l缓冲液中, 制成组织匀浆; 4°C 12 000 r/min高速离心取上清, 加入4 mol/L冰高氯酸 (perchloric acid, PCA) 至终浓度为1 mol/L, 涡旋混匀, 冰上孵育5 min后12 000 r/min离心15 min取上清, 加入等体积的冰KOH沉淀过量的PCA, 再次12 000 r/min离心15 min取上清; 取85 μ l标准液和样品, 按照说明依次加入试剂盒中的检测液, 波长540 nm检测A值。

1.5 HE染色

组织固定后常规脱水透明, 石蜡包埋, 制成厚度为5 μ m的切片; 二甲苯脱蜡后梯度酒精水化, 苏木伊红染色, 脱水、透明、封片。

1.6 免疫组化

切片二甲苯脱蜡后梯度酒精水化, 微波抗原修复, 内源性过氧化物酶阻断剂, 室温孵育10 min; PBS缓冲液冲洗3次, 3 min/次, 滴加一抗, 37°C孵育60 min; PBS缓冲液冲洗3次, 3 min/次, 滴加酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物, 滴加酶标羊抗小

鼠/兔IgG聚合物, DAB显色, 苏木复染, 脱水透明后封片。

1.7 检测指标

a. 相同参数下拍照, 图像导入Image-Pro Plus 6.0测量伤口面积, 计算平均伤口表面积。根据临床治疗效果评价标准^[5], 显效表示溃疡愈合且红肿症状消失, 有效表示溃疡面积缩小但仍可见红肿, 无效表示溃疡面积缩小或增大、表面覆盖假膜。

b. 检测溃疡面再上皮化以及肉芽组织形成情况。剥离全层颊黏膜, HE染色后进行组织学观察, 按照Eldad的组织学标准定量评价^[6], 即在光镜下通过观察: 上皮结构、上皮-固有层连接的完整性、固有层胶原纤维束、炎细胞浸润数量来评分, 其中粒细胞为每视野放大400倍的细胞数, 满分为8分, 评分越高越接近正常组织。

c. 免疫组化检测大鼠溃疡组织中EGF、EGFR、VEGF的表达情况。评价标准按积分半定量法, 首先将染色强度打分: 0分为无色, 1分为淡黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色 (染色深浅需与背景着色相对比。再将阳性细胞所占的百分比打分: 0分为阴性, 1分为阳性细胞10%, 2分为11%~50%, 3分为51%~75%, 4分为>75%, 染色强度与阳性细胞百分比的乘积>3分时认为有免疫反应阳性。

1.8 统计学方法

采用GraphPad Prism5.0统计软件进行数据的分析整理, 计数资料以例数 (*n*) 进行描述, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述, 临床效果评价采用确切概率法进行统计分析, 其余组间计量资料比较采用方差分析, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肉眼观察和伤口面积测定

M组大鼠口腔黏膜可见明显黄色假膜, 有大小不一的典型溃疡分布。NP、PP组与YN、YP组大鼠口腔黏膜溃疡面明显缩小变浅, 可见黏膜轻度充血水肿。有些无明显溃疡面, 考虑溃疡已愈合。与M组相比, YN、YP和NP、PP组显效有效率更高, 且差异均有统计学意义, $P<0.001$ 。经计算, 溃疡面积大小如表1、图1所示, 与M组相比, YN、YP组和NP、PP组溃疡面积均减小, 且差异均有统计学意义, $P<0.05$, 其余两两相比均无统计学差异, $P>0.05$ 。

Table 1 Evaluation of clinical effect of ulcer in rats after administration

Groups	Markedly effective and effective (Percentage)	Ineffective (Percentage)	Ulcer area/mm ²
M	2 (33.33%)	4 (16.67%)	24.20±8.99
PP	5 (83.33%)*	1 (16.67%)	12.40±3.28*
YP	5 (83.33%)*	1 (16.67%)	8.31±1.42**
NP	5 (83.33%)*	1 (16.67%)	8.32±2.12**
YN	4 (66.67%)*	2 (33.33%)	9.30±3.84*

P*<0.05, *P*<0.01, ****P*<0.001, compared with negative control group.

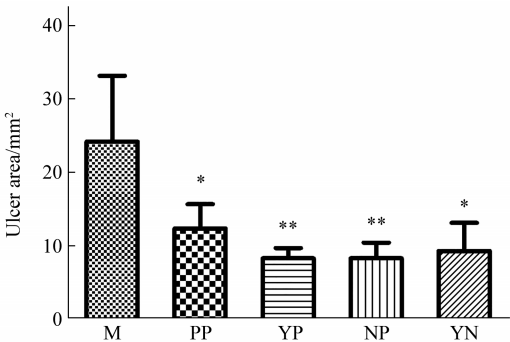
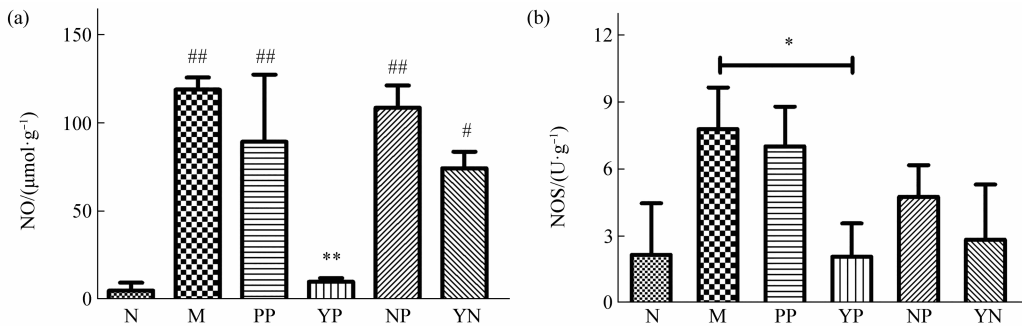


Fig. 1 Ulcer area of rats after 7 days of administration

P*<0.05, *P*<0.01, compared with the negative control group.

2.2 炎症反应与组织细胞损伤情况

给药 3 d 后, 化学试剂盒检测溃疡组织中 NO 和 NOS 含量 (图 2), YP 组 NO 水平明显低于 M 组, 且差异有统计学意义, *P*<0.05; 与 N 组相比, 仅 YP 组 NO 水平无明显变化, 其余各组均明显升高, 且差异均有统计学意义, *P*<0.05; NOS 仅在 YP 组中的水平低于 M 组且差异有统计学意义, *P*<0.05, 其余各给药组 NOS 水平均低于 M 中, 但无明显差异 *P*>0.05; 给药 7 d 后溃疡组织中 NO、NOS 含量均无明显变化。



Groups	NO/(μmol·g ⁻¹)	NOS/(U·g ⁻¹)
N	5.20±4.54	2.16±2.30
M	118.96±6.89##	7.79±1.87
PP	89.44±37.94##	7.01±1.78
YP	10.24±2.06**	2.08±1.49*
NP	108.65±12.62##	4.75±1.43
YN	74.49±9.38#	2.84±2.47

Fig. 2 Contents of NO and NOS in ulcer tissue after 3 days of administration

Compared with the negative control group, **P*<0.05, ***P*<0.01; Compared with the normal group, #*P*<0.05, ##*P*<0.01.

2.3 口腔黏膜组织学观察

口腔正常黏膜组织显微镜下见口腔黏膜组织结构完整, 上皮细胞结构完整, 胞质透明, 胞核深染, 呈椭圆形, 固有层胶原纤维排列稀疏。溃疡模型组黏膜上皮水肿、溶解破坏形成非特异性炎性溃疡, 表面纤维性渗出物形成假膜, 固有层及黏膜下层纤维水肿变性甚至破坏消失, 血管扩张, 大量淋巴细胞及中性粒细胞浸润, 可见大量由内皮细胞

和成纤维细胞增生形成的毛细血管和实性细胞条索。NP、PP 组与 YN、YP 组中可见黏膜新生上皮增殖修复, 炎性细胞明显减少, 胶原纤维排列规则趋于成熟。组织学定量积分评价显示, 与 N 组相比, YN、YP 组和 NP、PP 组均有统计学差异, *P*<0.05, 而 YN、YP 组和 NP、PP 组之间两两相比均无统计学差异, *P*>0.05 (图 3)。

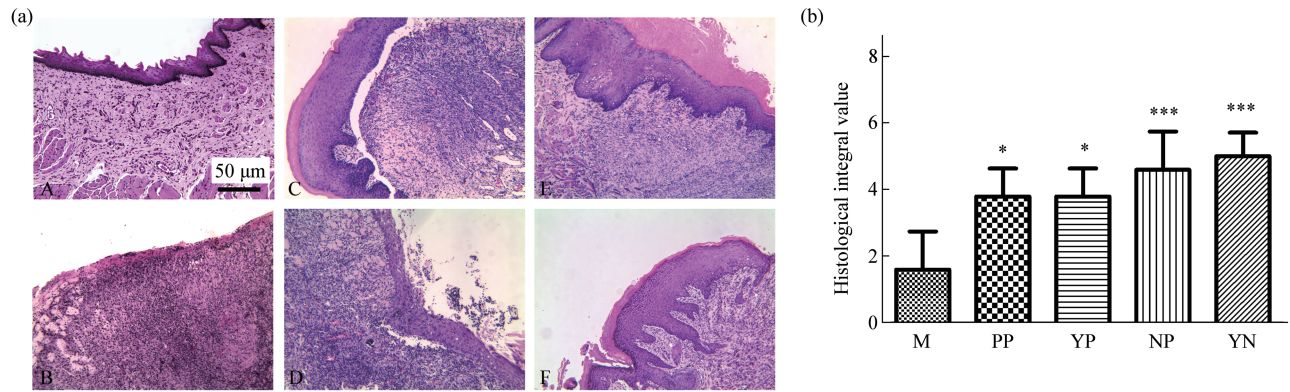


Fig. 3 Histological observation HE×100

(a) A: N group. Mucosal epithelium of the same thickness, surface keratinization, lamina propria, and submucosa is loose connective tissue, containing blood vessels, nerves, glands, etc.. B: M group. Inflammatory granulation tissue hyperplasia, necrosis exudate visible. C: YP group. Inflammatory granulation tissue was covered with mature epithelium, and there were cracks between them. D: PP group. Ulcer surface epithelium was formed, with different thickness and hyperplasia of deep square granulation tissue. E: YN group. F: NP control group. The ulcer surface epithelium was normal, there was still inflammatory granulation tissue in the deep side. (b) Histological score, compared with M group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

2.4 免疫组化染色结果

EGF 和 EGFR 在正常黏膜上皮的基底细胞及邻近的棘细胞胞浆中表达阳性；不同的是，除 N 组外其余各组在肉芽组织部分细胞和新生上皮细胞胞浆

中 EGF 阳性表达，EGFR 除在肉芽组织成纤维细胞的胞浆中阳性表达外，还在溃疡组织表面上皮细胞的包膜中表达（图 4a）。如图 4b 所示，根据半定量积分结果，EGF 在 YN、YP 组和 NP、PP 组的表达

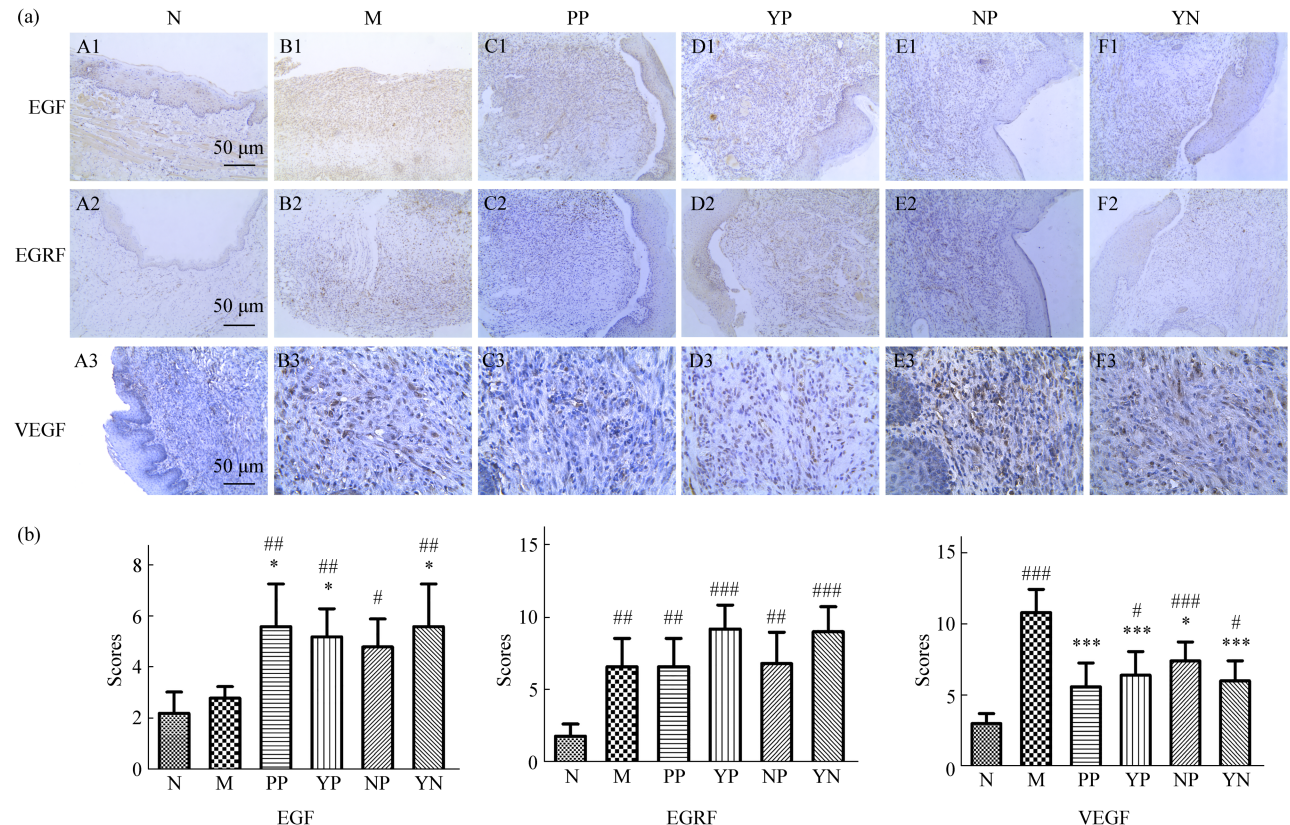


Fig. 4 Results of immunohistochemical staining (IHC A1-F1, A2-F2×100, A3-F3×400)

(a) In normal mucosa, both EGF and EGFR were positively expressed in the basal cells of the epithelium and the cytoplasm of adjacent spinous cells. In the other groups, EGF was expressed in neuroepithelial cells and fibroblast cytoplasm, and EGFR was expressed in the envelope of epithelial cells and the cytoplasm and nucleus of fibroblasts. (b) IHC integration results, compared with M group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, compared with N group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

均高于M组和N组, 差异有统计学意义, $P < 0.05$, YN、YP组和NP、PP组无明显统计学差异, $P > 0.05$; EGFR在YN、YP组和NP、PP组的表达水平与正常组相比明显升高且差异有统计学意义, $P < 0.05$, 而与M组相比无明显统计学差异, $P > 0.05$; VEGF则主要在新生毛细血管的内皮细胞胞浆中表达, NP、PP组和YN、YP组的表达均低于M组, 而除PP组其余各组均高于N组, 差异有统计学意义, $P < 0.05$, YN组低于NP组。

3 讨 论

口腔溃疡是上皮的完整性发生破坏而引起的组织缺损, 临床上分为发作期、愈合期、间歇期且具有自限性, 这与损伤黏膜修复过程中相互衔接、重叠并影响的炎症、增殖和重塑阶段^[7-8]一致。因此本课题拟选取大鼠颊黏膜用物理烫伤的方法模拟口腔溃疡发生发展的过程。

创伤发生数小时内便出现炎症反应^[9], 溃疡周边组织缺氧导致巨噬细胞和成纤维细胞等通过活化一氧化氮合酶(eNOS)导致溃疡组织中NO等炎症因子水平增加并通过释放胞内物质, 激活炎症小体释放PG等炎症介质^[10-11]。本实验在大鼠给药3 d后检测溃疡组织中NO水平发现, 各组中NO含量与N组相比均有不同程度的升高, 表明造模3 d后溃疡周围组织处于急性炎症期, 而YP组NO和NOS均低于与M组, 表明吡啶美辛喷雾制剂能在一定程度上发挥减轻黏膜创面炎症反应的作用, 这一结论在组织学实验观察中也得到进一步证实。有学者研究证实, 吡啶美辛处理的结肠癌细胞系中通过调控Wnt、Notch和PPAR- γ 通路信号分子降低TNF- α 、Cox-2等炎症因子的表达而降低炎症反应^[12]。炎症反应后期, 巨噬细胞在氧浓度梯度差异的刺激下, 分泌VEGF、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等生长因子^[13-14]。当成纤维细胞、血管平滑肌或内皮细胞等暴露于炎性细胞或细胞因子时, 可诱导产生大量的Cox-2进而诱导VEGF^[15], 溃疡边缘血管内皮细胞上的受体识别并结合VEGF, 激活信号转导途径, 内皮细胞受到刺激后开始增殖、迁移以出芽或发芽的形式伸出, 启动毛细血管新生, 以保证组织的供氧需求, 同时, 成纤维细胞增殖并分泌胶原, 形成肉芽组织, 填平伤口^[16-17]。本实验中VEGF在NP、PP组和YN、YP组的表达均低于M组, 而高于N组, YN组低于NP组。原因可能是给药7 d时

实际为溃疡发生第10天, 药物的使用加速了组织的修复进程而导致YN、YP组和NP、PP组以纤维和血管生成为主的修复阶段提前结束, 吡啶美辛凝胶比阳性对照药物在这方面具有更强的作用。而N组由于不存在损伤修复过程而未表现出VEGF表达的明显改变。有证据证明, VEGF是伤口损伤后出现的重要的影响伤口愈合的因子^[18]。其最大活跃期发生在损伤后约3~7 d。一旦伤口出现慢性肉芽组织或者血管生成停止, VEGF水平会随着内皮细胞凋亡而下降^[19], 这一结论与本实验结果基本一致。

EGF与其受体EGFR相结合, EGFR的酪氨酸激酶激活, 启动下游信号通路, 包括Ras/Raf/MEK/MAPK、JAK/STAT、PI3K/AKT和PLC γ /PKC通路, 而引发多种生物学效应, 包括上皮基底部的生发层干细胞DNA合成和细胞的增殖分化^[20-21], 上皮增殖修复阶段开始。增殖的上皮细胞向伤口中心迁移形成单层上皮覆盖于肉芽组织表面, 逐渐增生分化为鳞状上皮填充并覆盖损伤部位。本研究发现, EGFR在正常大鼠颊黏膜生发层胞浆中表达, M组肉芽组织中成纤维细胞和组织细胞的胞浆及个别胞核中表达, YN、YP组和NP、PP组中EGFR则表达于上皮细胞的胞膜、成纤维细胞和组织细胞的胞浆及个别胞核中。EGFR是一条单链跨膜糖蛋白, 由胞外结合功能域、跨膜功能域及胞内功能域3部分组成, 属于酪氨酸激酶型受体。对不同来源的多种细胞, 比如上皮细胞、成纤维细胞均有强烈的促分裂活性, 促进细胞内DNA、RNA和蛋白质的合成而加速组织的增殖与分化。在参与炎症损伤上皮修复的信号传递过程中, 可能激活了跨膜功能域发挥作用而导致其表达模式的改变^[22]。而药物的使用则进一步促进了大鼠口腔溃疡组织中上皮细胞对EGF的反应性, 上皮生发层EGFR的强烈表达, 使上皮深方的肉芽组织中EGF作用加强, 从而影响黏膜上皮的生长和分化, 可能提高了上皮细胞的增殖和迁移。本实验通过组织学定量评价也发现, YN、YP组和NP、PP组上皮和固有层的修复再生优于M组, 而炎症程度亦在一定程度上较轻。

喷剂喷涂后药物分散均匀, 局部能形成较高浓度, 生物利用度好, 奏效迅速, 且药液罐装, 稳定性强但作用于病变部位的时间短、易被稀释。凝胶剂使用方便, 在口腔内持续缓慢释放药物, 较长时间保持有效浓度。通过对溃疡面积的测量和组织学

评价发现,两种剂型均能起到抗炎和促进愈合的作用,但通过对NO和NOS的检测发现,仅YP组效果差异有统计学意义,可能与给药3 d时喷雾能在处于急性炎症期的创面瞬时达到有效浓度有关。而对EGF及其受体以及VEGF的表达分析可知,两种剂型对促进上皮和肉芽组织修复均有明显效果。

4 结 论

本课题组利用吲哚美辛抗炎镇痛的作用将其制成喷雾和凝胶两种制剂,探究了其对口腔黏膜上皮和肉芽组织在炎症和修复过程的影响和作用机理。结果表明,吲哚美辛作为非甾体类抗炎药,在大鼠口腔溃疡的进展过程中能减轻炎症反应,并起到促进溃疡愈合的作用。其不含类固醇所有的甾体环,通过对环氧酶的活性中心乙酰化或与其共价键结合,抑制PG类物质而发挥其抗炎作用,较皮质激素,更为有效和安全^[23]。有望成为保护口腔溃疡创面、减轻炎症反应、并促进愈合的新药物。

参 考 文 献

- [1] Slebioda Z, Szponar E, Kowalska A. Recurrent aphthous stomatitis: genetic aspects of etiology. *Postepy Dermatol Alergol*, 2013, **30**(2):96-102
- [2] Sanchez-Bernal J, Conejero C, Conejero R. Recurrent aphthous stomatitis. *Actas Dermosifiliogr*, 2020, **111**(6):471-480
- [3] Liu C, Zhou Z, Liu G, *et al.* Efficacy and safety of dexamethasone ointment on recurrent aphthous ulceration. *Am J Med*, 2012, **125**(3):292-301
- [4] Lucas S. The pharmacology of indomethacin. *Headache*, 2016, **56**(2):436-446
- [5] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 口腔溃疡动物模型制备规范(草案), 中药药理与临床, 2017, **33**(6):162-163
Experimental Pharmacology Committee of Traditional Chinese Medicine, China Association of Traditional Chinese Medicine Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica. Specification for the preparation of animal models of oral ulcers. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2017, **33**(6):162-163
- [6] Eldad A, Weinberg A, Breiterman S, *et al.* Early nonsurgical removal of chemically injured tissue enhances wound healing in partial thickness burns. *Burns*, 1998, **24**(2):166-172
- [7] Chen X Y, Zhu H W, Hou R L, *et al.* Association between intestinal flora and feces inflammatory factors in recurrent oral ulcer. *Acta Anatomica Sinica*, 2020, **51**(4):595-603
- [8] 张震康,樊明文,傅民魁. 现代口腔医学. 北京:科学出版社, 2003:729-732
Zhang Z K, Fan M W, Fu M K. *Modern Stomatology*. Beijing: Science Press, 2003:729-732
- [9] Cutolo M, Montagna P, Soldano S, *et al.* CTLA4-Ig/CD86 interactions in cultured human endothelial cells: effects on VEGFR-2 and ICAM1 expression. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, **33**(2):250-254
- [10] Rathinam V A, Fitzgerald K A. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell*, 2016, **165**(4):792-800
- [11] Patil K R, Mahajan U B, Unger B S, *et al.* Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**:4367
- [12] Seetha A, Devaraj H, Sudhandiran G. Indomethacin and juglone inhibit inflammatory molecules to induce apoptosis in colon cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, **34**(2): 22433
- [13] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*, 2009, **53**(2):347-358
- [14] 王拓,杨琴秋,董露,等. 富血小板纤维蛋白诱导口腔缺损软组织的修复与再生. 中国组织工程研究, 2016, **7**(20):957-965.
Wang T, Yang Q Q, Dong L, *et al.* *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2016, **7**(20):957-965
- [15] Radi Z A, Render J A. The pathophysiologic role of cyclooxygenases in the eye. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2008, **24**(2):141-151
- [16] Canady J, Karrer S, Fleck M, *et al.* Fibrosing connective tissue disorders of the skin: molecular similarities and distinctions. *J Dermatol Sci*, 2013, **70**(3):151-158
- [17] Silva P G B, Codes, E B B, Freitas M O, *et al.* Experimental model of oral ulcer in mice: comparing wound healing in three immunologically distinct animal lines. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2018, **22**(3):444
- [18] Wang P H, Huang B S, Horng H C, *et al.* Wound healing. *J Chin Med Assoc*, 2018, **81**(2):94-101
- [19] Mesquita K C, Dantas T S, Barros Silva P G, *et al.* Abatacept treatment impairs the cell migration and wound healing of oral ulcers in rats: role of interleukin (IL)-1 β -6 and -10 and CD8/CD30 cells: influence of abatacept treatment on oral wound healing: experimental model on rats. *Life Sci*, 2020, **243**(15):117-243
- [20] Yoshida E, Kurita M, Eto K, *et al.* Methylmercury promotes prostacyclin release from cultured human brain microvascular endothelial cells *via* induction of cyclooxygenase-2 through activation of the EGFR-p38 MAPK pathway by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B activity. *Toxicology*, 2017, **392**(1):40-46
- [21] Donohoe F, Wilkinson M, Baxter E, *et al.* Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and obesity-related cancer. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(4):12-41
- [22] Tsai C J, Nussinov R. Emerging allosteric mechanism of EGFR activation in physiological and pathological contexts. *Biophys J*, 2019, **117**(1):5-13
- [23] Waterbury L, Kunysz E A, Beuerman R. Effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents on corneal wound healing. *J Ocul Pharmacol*, 1987, **3**(1):43-54

Animal Experimental Study of Indomethacin in The Treatment of Oral Ulcer*

ZHANG Shao-Lu^{1,3)**}, LUO Shu-Yu^{2)**}, QIU Yu-Ling¹⁾, ZHANG Xiang-Yu²⁾,
ZHONG Yu-Xu³⁾, KONG De-Xin^{1)***}

¹⁾School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

²⁾Stomatology Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

³⁾State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100089, China)

Abstract Objective To investigate the effect of two indomethacin preparations on the healing process of oral ulcers. **Methods** After the right cheek of rats were burned with nails, they were divided into indomethacin gel to medicine group (YN), compound benzocaine gel positive control group (NP), indomethacin spray to medicine group (YP), stomatitis spray, normal control group (PP), positive control group (N) and the negative control group (M). The reepithelialization of ulcer surface and granulation tissue formation was evaluated after HE staining with histological quantitative standard evaluation. The level of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in ulcer tissues was detected by colorimetry. The expressions of epidermal growth factor (EGF), as well as its receptor (EGFR) and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in rat ulcer tissues, were detected by immunohistochemistry. **Results** The ulcer area of the YP, YN, NP, and PP groups was smaller than that of the M group. The quantitative histological evaluation showed that the scores of the YP, YN, NP, and PP groups were higher than that of the M group ($P < 0.05$). After administration, the level of NO and NOS in the YP group were significantly lower than that of M group ($P < 0.05$). The EGF expression of YP, YN, NP, and PP groups was higher than that of the M and N groups ($P < 0.05$). EGFR was expressed in the epithelium from the cytoplasm to the membrane, and the expression level in the YP, YN, NP, and PP was significantly higher than that of the N group ($P < 0.05$). The VEGF expression of YP, YN, NP, and PP groups was lower than that of the M group ($P < 0.05$). **Conclusion** Both two indomethacin preparations can reduce the inflammatory response and promote the healing of oral ulcers in rats.

Key words oral ulcer, indomethacin, rat model, healing

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0105

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82073890, 81673464) and Scientific Research Program of Tianjin Education Commission (2020KJ186).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-22-83336658, Email: kongdexin@tmu.edu.cn

Received: April 19, 2021 Accepted: June 24, 2021