

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.07.018

化浊解毒方对反流性食管炎大鼠一氧化氮、血管活性肠肽及 P 物质的影响

赵 艳^{*}, 霍永利¹, 李博林²

(1. 河北省中医院, 河北省石家庄市长安区中山东路 389 号, 050011; 2. 河北医科大学)

摘要 目的 探讨化浊解毒方治疗反流性食管炎的作用机制。方法 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、西药组、中药组, 每组 15 只。除空白组外, 其余 3 组采用“不全幽门结扎+贲门肌切开术”配合湿热环境加高脂高糖饮食的综合方法制备反流性食管炎大鼠模型。西药组给予奥美拉唑 0.36 mg/100 g 灌胃, 中药组予化浊解毒方 1.25 g/100 g 灌胃, 空白组、模型组予蒸馏水 1 ml/100 灌胃。治疗 8 周后观察大鼠食管黏膜的组织病理变化, 检测食管组织一氧化氮 (NO) 浓度及食管黏膜血管活性肠肽 (VIP)、P 物质 (SP) 水平。结果 中药组与西药组均能改善模型大鼠食管黏膜组织病理变化, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中药组 NO 水平降低, SP 表达升高, 与模型组、西药组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中药组 VIP 表达降低, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与西药组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 化浊解毒方可能是通过升高 SP 表达, 降低 NO 浓度及 VIP 表达, 对反流性食管炎起到治疗作用。

关键词 化浊解毒方; 反流性食管炎; 一氧化氮; 血管活性肠肽; P 物质

反流性食管炎 (reflux esophagitis, RE) 是指胃及十二指肠内容物逆流进入食管引起的食管黏膜损伤, 及其继发的一系列临床症状和消化性炎症表现, 严重者可并发食管狭窄。近年来, 由于生活节奏加快、工作压力增大和饮食结构改变, RE 的发病率不断上升^[1], 且反复发作不易治愈。我们在临床应用化浊解毒方治疗该病取得较好疗效。为进一步探讨其作用机制, 本研究对 RE 大鼠食管组织中一氧化氮 (NO) 浓度及血管活性肠肽 (VIP) 和 P 物质 (SP) 表达进行观察, 报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

12 周龄清洁级 Wistar 大鼠 60 只, 雄性, 体重 250 ~ 320 g, 购自河北医科大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (冀) 2008-4-003。

1.2 药物、试剂和仪器

化浊解毒方: 蒲公英 15 g, 连翘 20 g, 半边莲 15 g, 半枝莲 15 g, 绞股蓝 15 g, 白花蛇舌草 15 g,

黄芩 9 g, 石菖蒲 15 g, 紫豆蔻 6 g, 佩兰 12 g, 藿香 12 g, 茯苓 20 g, 枳实 12 g, 厚朴 12 g, 砂仁 12 g, 由河北省中医院制剂室煎煮制成含生药 1.25 g/ml 药液备用。奥美拉唑肠溶片 (批号: 130903, 由湖南方盛制药股份有限公司生产), 并以蒸馏水配制成 0.36 mg/ml 的溶液备用。

NO 试剂盒 (批号: 20131120) 购自南京建成生物工程研究所; VIP 试剂盒 (批号: BA0134)、SP 试剂盒 (批号: BA0126-4) 及即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒 (批号: SA1028), 均购自武汉博士德生物工程有限公司。

MK3-酶联免疫检测仪 (芬兰雷勃集团); RM2255-切片机 (德国 Leica 公司); Fresco17-高速离心机 (德国贺利氏公司); SZ61 光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模

将 60 只大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、西药组、中药组, 每组 15 只。除空白组外, 其余各组大鼠参考文献 [2-3], 采用“不全幽门结扎+贲门肌切开术”配合湿热环境加高脂高糖

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (2013046)

* 通讯作者: zhy5769@sina.com, 13832395769

饮食的综合方法制备反流性食管炎大鼠模型。造模前大鼠适应性饲养 7 天,术前禁食不禁水 24 h,用 3.5% 水合氯醛 (1 ml/100 g) 进行腹腔注射麻醉后,将大鼠仰卧固定于手术台,常规备皮、消毒,取上腹部正中切开进腹,切口长约 3 cm,逐层开腹,暴露食管下段及胃食管交界区,用细针及 0 号细线缝扎横过胃-食管交界处的胃左动脉的分支,以防止切开贲门肌时出血,再与食管-胃交界处纵行切开贲门肌 0.5 ~ 1.0 cm,并分离至黏膜层完全暴露于视野中,以加强反流。然后在幽门与十二指肠交界近幽门处半结扎幽门,并避开血管,关腹前用无菌纱布吸尽腹腔中的液体,腹腔内注入 0.9% 氯化钠溶液 1 ml 及庆大霉素 1 万 IU,术中严格无菌操作,术后禁食不禁水 24 h。除空白组外,其他各组大鼠饲养于温度 (34 ± 2) °C、相对湿度 (93 ± 2) % 的环境中,饲以高脂高糖饮食,即在普通饲料喂养的基础上,每日每只加用 10% 蜂蜜、10% 白糖混合饮料自由饮用,术后 3 周即造模成功^[4]。

2.2 给药方法

造模 3 周后开始给药,空白组、模型组均按 1 ml/100 g 给予生理盐水灌胃,西药组按 0.36 mg/100 g 给予奥美拉唑溶液灌胃,中药组按 1.25 g/100 g 给予化浊解毒方灌胃。以上各组均每日给药 1 次,共治疗 8 周。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 一般情况观察 对各组大鼠的体重、毛色、精神状态、活动、进食、进水等情况进行观察。

2.3.2 食管黏膜病理组织观察 末次给药后,禁食不禁水 24 h,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉。处死大鼠,取各组大鼠食管下段,用生理盐水轻轻冲洗食管腔,取各组大鼠食管下端组织 0.2 g 匀浆。剩余组织放置 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,切片进行常规 HE 染色及免疫组织化学法染色。参照 2003 年中华医学会消化内镜学分会制定的《反流性食管炎诊断及治疗指南》^[5]中反流性食管炎分级标准:鳞状上皮增生、黏膜固有层乳头延伸、上皮细胞层内炎细胞浸润为轻度;轻度基础上出现黏膜糜烂为中度;轻度基础上有溃疡形成和 (或) Barrett 食管改变为重度。

2.3.3 食管组织中 NO 及食管黏膜中 VIP、SP 水平测定 将 0.2 g 食管组织制备 2 ml 匀浆,4 °C 10 000 r/min 离心 10 min,取上清 1 ml。检测时用酶标仪 (540 nm 波长) 比色,以空白调零,记录吸光度 A,将标准液浓度 (横坐标) 与相应的吸光

度 (纵坐标) 作标准曲线,求斜率 K; 用公式标本 A/K 计算 NO 含量。食管黏膜中 VIP 及 SP 表达采用 SABC 法,操作严格按试剂盒说明进行。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计分析软件,计量数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 *t* 检验;等级资料采用非参数检验。

3 结果

3.1 一般情况

造模后 1 周大鼠共死亡 4 只,其中模型组死亡 2 只,中药组与西药组各死亡 1 只。空白组大鼠体重增加,被毛贴身,色白光泽,两眼有神,活动敏捷,食量较多,大便呈颗粒状;模型组、中药组及西药组大鼠体重下降,被毛松散,毛色光泽减弱,均有不同程度的行动迟缓,精神减弱,对外界刺激淡漠,饮水量及食量下降,多数大鼠出现便溏。治疗 7 天后,中药组和西药组大鼠食量开始增加,10 天后体重开始上升,14 天后食量和活动基本恢复正常。

3.2 各组大鼠食管黏膜病理组织情况比较

表 1 示,模型组大鼠炎症率为 92.31%,显著高于西药组的 35.71% 与中药组的 42.86% ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠食管黏膜病理分级及炎症率比较

组别	鼠数	病理分级 (只)				炎症率 (%)
		无炎症	轻度	中度	重度	
空白组	15	15	0	0	0	0
模型组	13	1	2	7	3	92.31
西药组	14	9	4	1	0	35.71
中药组	14	8	3	2	1	42.86

3.3 各组大鼠食管组织 NO 浓度比较

表 2 示,与空白组比较,模型组大鼠食管组织 NO 浓度升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,西药组与中药组大鼠食管组织 NO 浓度降低 ($P < 0.05$),且中药组低于西药组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠食管组织一氧化氮浓度比较 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	一氧化氮
空白组	15	62.47 ± 17.35*
模型组	13	105.42 ± 19.13
西药组	14	58.68 ± 16.97*
中药组	14	51.59 ± 18.52* [△]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与西药组比较,[△] $P < 0.05$

3.4 各组大鼠食管黏膜 VIP、SP 表达水平深比较

表 3 示,与空白组比较,模型组大鼠食管黏膜

VIP 表达升高, SP 表达降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 西药组和中药组大鼠食管黏膜 VIP 表达降低, SP 表达升高 ($P < 0.05$), 且中药组 SP 表达明显高于西药组 ($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠食管黏膜 VIP、SP 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VIP	SP
空白组	15	82.05 $\pm$ 9.28*	164.56 $\pm$ 9.43*
模型组	13	142.51 $\pm$ 11.48	122.83 $\pm$ 11.32
西药组	14	101.02 $\pm$ 13.62*	138.33 $\pm$ 13.54*
中药组	14	103.38 $\pm$ 12.16*	156.07 $\pm$ 10.83* Δ

注: VIP, 血管活性肠肽; SP, P 物质; 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与西药组比较, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

RE 是一种胃食管反流病, 属于中医学“嘈杂”“吐酸”“烧心”“胃痞”“胸痛”等范畴, 胃失和降、胃气上逆是基本病机, 而浊毒内蕴是本病发生和病机演变的关键。外感六淫, 内有情志不遂, 饮食不适而损伤脾胃, 中焦失司, 气机郁滞, 逆乱失和, 脾胃不能升清降浊, 则水反为湿, 谷反为滞, 湿滞日久化生热毒, 湿热毒邪互结而酿生浊毒。浊毒是贯穿 RE 始终的致病因素, 又是本病发生发展的病理产物, 因此, 浊毒不清则本病难以治愈。化浊解毒方中重用石菖蒲、砂仁化湿和胃健脾; 蒲公英、连翘清热解毒, 蒲公英兼以利湿, 连翘又可轻宣郁热取“火郁发之”之意, 以上四味共为君药。紫豆蔻、藿香、佩兰增强君药醒脾开胃、芳香化湿和胃之效; 黄芩、半边莲、半枝莲、白花蛇舌草助君药清热解毒祛湿, 共为臣药。绞股蓝、茯苓益气健脾化湿, 健脾可绝生湿之本, 化湿可祛脾病之因; 配以枳实、厚朴理气消痞, 降逆除胀, 而复脾胃升清降浊之功, 同为佐使药。诸药相合, 标本兼治, 使浊邪去, 毒邪解, 食管黏膜得以修复而诸症向愈。

研究表明, RE 发病机理为抗反流防御机制减弱和反流物对食管黏膜攻击作用的结果, 而防御机制的减弱与下食管括约肌压力下降、食管胃动力障碍相关^[8]。并且在 RE 患者中表现为调节食管下括约肌张力的胃肠激素和胃肠神经的异常。其中食管下段的环形平滑肌受非肾上腺素能非胆碱能 (NANC) 神经支配, NO 和 VIP 是 NANC 神经主要抑制性神经递质, 能引起食管下括约肌松弛。研究表明, 内源性 NO 作为一种调节递质, 在食管神经肌肉的调控中发挥重要作用^[7-9], 且 NO 作为重要的炎症介质, 可引起食管黏膜的急、慢性炎症, 并

且有研究证明 NO 可能是一过性食管括约肌松弛的始动因子^[8], 引起食管下括约肌松弛, 加重食管炎。VIP 主要以神经分泌方式作用于下食管括约肌, 为介导其松弛的重要原因之一^[10]。NO 的产生可增强 VIP 的释放, 而 NO 的释放是通过 VIP 的作用实现的, 两者具有协同作用^[11]。SP 为兴奋性肽能神经递质, 其胞体发出纤维达到食管壁各层, 兴奋时可引起下食管括约肌收缩^[12]。研究表明, NO、VIP 异常升高, SP 神经元减少或功能降低, 是 RE 的发病机制之一^[13-14]。

本研究结果显示, 化浊解毒方能够降低大鼠食管黏膜组织 VIP 的表达及食管组织 NO 水平, 升高黏膜 SP 的表达, 改善大鼠食管黏膜组织病理损伤, 说明本方可能是通过调节机体内与食管黏膜组织损伤相关的因子而达到治疗效果。

参考文献

- [1] 禹晓娟, 刘丽, 熊志强, 等. 胃食管反流病的治疗进展 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(13): 2577-2579.
- [2] 许树长, 戴军, 胡运彪, 等. 实验性酸性反流性食管炎动物模型制备的研究 [J]. 中华消化杂志, 1999, 19(3): 208-209.
- [3] 于强, 袁红霞, 崔乃强. 酸性反流性食管炎大鼠模型的改良制备 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2002, 10(2): 74-78.
- [4] 郭喜军, 张颜伟, 赵见文. 胃癌前病变大鼠中抑癌基因 APC、P16 表达与浊毒的相关性研究 [J]. 河南中医, 2011, 31(10): 1119-1121.
- [5] 中华医学会消化内镜学分会. 反流性食管炎诊断及治疗指南 (2003) [J]. 中华消化内镜杂志, 2004, 21(4): 221-222.
- [6] 唐艳萍, 弓艳霞, 李淑红, 等. 复方白及对反流性食管炎模型大鼠食管黏膜的影响 [J]. 中医杂志, 2011, 52(15): 1312-1315, 1321.
- [7] 黄颖秋, 张德中, 萧树东. 一氧化氮与消化道动力 [J]. 国外医学消化疾病分册, 1997, 17(1): 23-27.
- [8] 张忠兵. 一氧化氮在消化系统的生成和分布及其临床意义 [J]. 中华消化杂志, 1994, 14(4): 236-239.
- [9] 许国铭. 胆汁反流相关性疾病 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 129-132.
- [10] Kassim SK, El Touny M, El Guinaidy M, et al. Serum nitrates and vasoactive peptide in patients with gastroesophageal reflux disease [J]. Clin Biochem, 2002, 35(8): 641-646.
- [11] 马淑颖, 朱生梁, 程艳梅, 等. 大鼠一氧化氮合酶和血管活性肠肽的影响 [J]. 山西中医, 2006, 22(1): 48-50.
- [12] 冯云霞, 时昭红, 张介眉, 等. 调中颗粒对反流性食管

炎大鼠食管黏膜脑肠肽和一氧化氮合成酶的影响

[1] . 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 154-157.

- [3] Poroikova MV, Efendiev MT, Vinnitskii LI. Regulation of the functional status of the lower esophageal sphincter with gastrointestinal hormones in cardiospasm and reflux esophagitis [J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2002(7):

23-28.

- [4] Kassim SK, El Touny M, El Guinaidy M, et al. Serum nitrates and vasoactive peptide in patients with gastroesophageal reflux disease [J]. Clin Biochem, 2002, 35(8): 641-646.

Influence of *Huazhuo Jiedu Formula* on Nitric Oxide, Vasoactive Intestinal Peptide and Substance P of Rats with Reflux Esophagitis

ZHAO Yan¹, HUO Yongli¹, LI Bolin²

(1. Chinese Medicine Hospital of Hebei Province, Hebei, 050011; 2. Hebei Medical University)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Huazhuo Jiedu Formula* on reflux esophagitis. **Methods** Sixty normal Wistar rats were equally divided into blank control group, model group, western medicine treatment group and Chinese medicine treatment group. Three groups other than blank control group were all made reflux esophagitis models by a comprehensive method encompassing subtotal pylorus ligation, Heller myotomy, feeding damp-heat environment and high lipid and high sugar diet. After modeling, western medicine treatment group was intragastrically administrated by 0.36 mg/100 g given omeprazole and traditional Chinese medicine treatment group was intragastrically administrated by 1.25 g/100 g given *Huazhuo Jiedu Formula*, blank control group and model group were intragastrically administrated with distilled water. After 8 weeks, histopathological changes in esophagus tissues were observed. Meanwhile, the content of Nitric oxide (NO) in esophageal tissue and the levels of vasoactive intestinal peptide (VIP) and substance P (SP) in esophagus tissues were tested. **Results** Pathological changes of esophageal mucosa were improved in both treatment groups, and the difference was statistically significant compared with model group ($P < 0.05$). Decrease of NO concentration and increase of SP in Chinese medicine treatment group were significant difference ($P < 0.05$) compared with the model group and western medicine treatment group. Decrease of VIP in the Chinese medicine treatment group was significantly different ($P < 0.05$) compared with the model group, but was not significantly different ($P > 0.05$) compared with the western medicine group. **Conclusion** By means of elevating the levels of SP and reducing the levels of NO and VIP in esophagus tissues, *Huazhuo Jiedu Formula* can serve therapeutic effect on reflux esophagitis.

Keywords *Huazhuo Jiedu Formula*; Reflux Esophagitis; Nitric oxide; Vasoactive intestinal peptide; Substance P

(收稿日期: 2014-12-01; 修回日期: 2015-01-05)

编辑: 焦爽

欢迎订阅 2015 年《中医杂志》

《中医杂志》是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主，兼顾普及”的办刊方针，是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一，是中国中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊。2009 年被中国期刊协会评为“新中国 60 年有影响力的期刊”。2011 年和 2013 年分别荣获“国家新闻出版政府奖期刊奖提名奖”，并且是唯一获此荣誉的中医类期刊。2013 年被国家新闻出版总署评为“中国百强科技期刊”。

本刊主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验；临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果；学术探讨、思路与方法、专家论坛、病例讨论、综述、百家园等栏目，提供最新学术观点、研究成果与治疗方法，成为学习中医药、研究中医药，不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊，每月 2 日和 17 日出版，每期 15.00 元。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续（邮发代号：2-698），也可以与本刊读者服务部联系邮购，邮购免邮费。电话：010-64035632。国外发行：中国国际图书贸易总公司（北京 399 信箱，邮编：100044，代号：M140）。本社地址：北京市东直门内南小街 16 号，邮编：100700，网址：<http://www.jtcm.net.cn>。