

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.03.013

活血通降方对反流性食管炎模型大鼠食管动力、血清炎症因子及食管下括约肌 SCF/c-kit 信号通路的影响

刘琰¹, 唐艳萍²✉, 刘磊², 李培彩², 刘茜², 刘思雨¹, 郝旭雯², 杨磊²

1. 天津中医药大学研究生院, 天津市静海区团泊新城西区鄱阳湖路 10 号, 301617; 2. 天津市南开医院



[摘要] **目的** 探讨活血通降方治疗反流性食管炎的可能作用机制。**方法** 将 60 只大鼠随机分为空白组、模型组及活血通降方低、高剂量组, 每组 15 只。除空白组外, 其余各组均采用改良部分贲门肌切开术+外置幽门部分结扎术制备反流性食管炎模型大鼠。造模成功后当天开始给药, 活血通降方低、高剂量组给药量分别为 3.68、7.35 g/(kg·d), 空白组和模型组给予生理盐水 5 ml 灌胃, 均连续 14 天。检测食管下括约肌平均肌张力变化率和平均振幅变化率、胃重量及胃排空率。HE 染色观察大鼠食管组织病理形态学变化, 并进行食管黏膜病理评分; 测定血清中炎症因子白细胞介素 8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 浓度; 免疫荧光法测定 Cajal 间质细胞 (ICCs) 数量; 免疫印记法检测食管下括约肌中酪氨酸激酶受体 (c-kit)、干细胞因子 (SCF)、亮氨酸拉链和不育- α 基序激酶 (ZAK) 和磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组食管下括约肌平均肌张力变化率和平均振幅变化率、胃排空率、ICCs 阳性细胞数、c-kit 和 SCF 表达均降低, 胃重量、食管黏膜损伤病理评分、IL-8 和 TNF- α 浓度、ZAK 和 p-ERK 表达均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, 活血通降方高剂量组食管下括约肌平均肌张力变化率和平均振幅变化率升高 ($P < 0.01$), 活血通降方低、高剂量组胃排空率、ICCs 阳性细胞数、c-kit 和 SCF 表达均升高, 胃重量、食管黏膜病理评分、IL-8 和 TNF- α 浓度、ZAK 和 p-ERK 表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。活血通降方高剂量组食管下括约肌平均肌张力变化率、平均振幅变化率、ICCs 阳性细胞数均高于活血通降方低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 活血通降方可能通过降低食管下括约肌中 ZAK 表达, 抑制 p-ERK 表达, 一方面激活 SCF/c-kit 信号通路, 促进食管及胃动力; 另一方面降低血清中 IL-8 和 TNF- α 浓度改善食管下括约肌黏膜炎症, 从而治疗反流性食管炎, 且以高剂量效果更好。

[关键词] 反流性食管炎; 活血通降方; 食管下括约肌; SCF/c-kit 信号通路; 炎症因子; 食管动力; Cajal 间质细胞

反流性食管炎 (reflux esophagitis, RE) 是指胃内容物反流进入食管引起的食管黏膜炎性病变。RE 是一种机制复杂的疾病, 其中食管下括约肌动力障碍被认为是胃液反流进入食管引起炎症从而导致疾病发生的关键因素^[1-2]。细胞外信号调节激酶 (ERK) 作为丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路中调节炎症反应的重要通路^[3], 不仅可以调控炎症反应, 还可以调控干细胞因子 (SCF)/酪氨酸激酶受体 (c-kit) 信号通路^[4-6], 该通路与胃肠道

运动密切相关^[7]。

活血通降方是本课题组总结出的治疗 RE 有效方剂。前期研究^[8-11]发现, 活血通降方具有抑制 p38MAPK/核因子 κ B (NF- κ B) 炎症信号通路、减少炎症因子的产生、缓解食管黏膜炎症的作用, 并可增加食管炎患者食管下括约肌压力, 增强胃排空运动。本实验通过观察活血通降方对食管动力及食管炎症相关指标的影响, 旨在探讨活血通降方治疗 RE 的可能作用机制。本研究经中国医学科学院放射医学研究所实验动物伦理委员会批准 (批件号: IRM-DWLL-2015223)。

基金项目: 国家自然科学基金 (82074213, 81573737)

✉ 通讯作者: cb1699@sina.com

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 250 ~ 280 g, 由北京维通利华动物实验有限责任公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2016-0006。大鼠饲养于中国医学科学院放射医学研究所 SPF 级动物房, 恒温 25 ℃ 左右, 湿度 (50±5) %, 光照和黑暗各 12 h 交替进行, 自由进食标准颗粒饲料及饮水。

1.2 药物及制备

活血通降方组成: 白及 30 g, 丹参 30 g, 香附 15 g, 枳壳 15 g, 姜半夏 10 g, 旋覆花 30 g。所有饮片购自天津市中药饮片厂有限公司。提取中药有效部位, 制成生药含量为 1.47 g/ml 的水混悬液, 于 4 ℃ 冰箱保存。

1.3 主要试剂与仪器

Krebs 溶液的主要组成: 氯化钾 (批号 10016308)、氯化镁 (批号 10012817)、磷酸二氢钠 (批号 20040717)、氯化钙 (批号 20011160)、葡萄糖 (批号 63005518)、氯化钠 (批号 10019308)、碳酸氢钠 (批号 1018960)、酚红 (批号 143-74-8), 国药集团化学试剂有限公司; 三氯乙酸 (批号 R000216), 罗恩公司; 氢氧化钠 (批号 1310-73-2), 过氧化氢 (批号 7722-84-1), 默克公司; c-kit (批号 AF6153), 美国 Affinity 公司; Alexa Fluor 594 (批号 bs-0294P-AF594), 北京博奥森生物技术有限公司; 增强型化学发光试剂 (批号 36208ES60), 翌圣生物公司; 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白分析试剂盒 (批号 BL521A), 安徽 Biosharp 公司; 荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) (批号 C0065), 北京索莱宝科技有限公司; 亮氨酸拉链和不育- α 基序激酶 (ZAK, 批号 14945-1-AP)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK, 批号 28733-1-AP)、SCF (批号 26582-1-AP), 美国 Proteintech 公司; 苏木精 (批号: H8070), 北京赛因坦科技有限公司; 白细胞介素 8 (IL-8) (批号 MM-0175R2), 索罗门生物科技公司; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) (批号 SBJ-R0040), 南京森贝伽生物技术有限公司。

TOBS180 型离体组织浴槽系统, 北京金工鸿泰科技有公司; MLT0201 型机械张力换能器、PL3508 型 PowerLab 生理记录仪, 澳大利亚 AD Instruments 公司; 3500 型离心机, 日本 KUBOTA 公

司; H2050R 型离心机, 湘仪公司; DM4000B 型光学显微镜, 德国 LEICA 公司; UV1800 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; ST36 型酶标仪, 上海科华生物工程股份有限公司; 1645050 型电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 模型制备

参照文献 [12] 采用改良部分贲门肌切开术+外置幽门部分结扎术制备 RE 动物模型。大鼠造模前 24 h 禁食不禁水, 采用贲门肌切开, 将直径 4 mm 的金属棒放置大鼠幽门处外侧, 将金属棒连同幽门一起结扎, 后将金属棒取出。术后大鼠可饮糖盐水, 禁食 24 h 后, 先予半量 (15 g/d) 颗粒饲料喂养 3 天, 而后全量 (30 g/d) 喂养 4 天。饲养 7 天后, 大鼠存活且组织学具有 RE 表现 [13] 即为造模成功。

1.5 动物分组及给药

将 60 只大鼠按照随机数字表法分为空白组、模型组和活血通降方低、高剂量组, 每组 15 只。造模成功后当天开始给药, 空白组和模型组均给予生理盐水 5 ml 灌胃。活血通降方低、高剂量组分别给予活血通降方 3.68、7.35 g/(kg·d) 灌胃, 其中低剂量为人与大鼠的等效剂量, 即成人每日每千克体重用药量的 6.17 倍 [14]。各组均早晚各灌胃 1 次, 连续 14 天。

1.6 观察指标与方法

按照随机数字表法每组取 10 只大鼠, 最后 1 次灌胃后禁食不禁水 24 h, 抽血后每只大鼠予 2 ml 酚红溶液 (50 mg/dl) 灌胃, 30 min 后颈椎脱臼处死, 迅速开腹, 取出整段食管, 于盛有 4 ℃ 预冷 Krebs 液的培养皿中横向剪下食管下括约肌, 宽度约 8 mm, 纵向剪开, 制成 3 mm×8 mm 的肌条。结扎贲门和幽门, 迅速取出整个胃进行称重。取剩余大鼠每组 5 只, 取食管下括约肌组织, 用于免疫荧光实验、免疫印记实验和病理检测。

1.6.1 食管下括约肌平滑肌收缩情况 肌条制成后立即纵向悬挂在盛有 10 ml Krebs 溶液 (37 ℃) 的浴槽中, 并以每分钟 60~90 个气泡的速度予 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体。肌条的下端固定在浴槽下部通气侧弯钩上, 上端连接于张力换能器。调节张力换能器旋钮, 给予张力换能器 0.6 g 前负荷, 每 15 min 换 1 次 Krebs 液, 待肌条稳定 60 min 后加入 1 ml 500 mmol/L 的 KCl 溶液, 用 PowerLab 生理记录仪记录肌条收缩, 用 LabChart 数据处理分析系统进行分析。记录平衡后 3 min 内的平均肌张力和平均振幅, 以加入 KCl 之前为基础值, 加入 KCl 之后为

效应值，计算公式为：变化率=（效应值-基础值）/基础值×100%。

1.6.2 胃重量及胃排空率 将胃沿胃大弯剪开，用生理盐水冲洗胃内容物，定容至 20 ml，再加入 20 ml 氢氧化钠溶液（0.5 mol/L）并搅拌均匀，静置 1 h 后取 5 ml 上清液，加入 0.5 ml 三氯乙酸溶液（20%），以 4 ℃、3000 r/min 离心 10 min，离心半径为 20 cm，取上清液用紫外分光光度计在 560 nm 波长下测定吸光度（OD）。另取 2 ml 酚红溶液，依次加入 18 ml 生理盐水、20 ml 氢氧化钠溶液、4 ml 三氯乙酸溶液搅拌均匀，以同样的方法测定 OD，为标准酚红 OD。胃排空率计算公式为：胃排空率=（1-实测酚红 OD / 标准酚红 OD）×100%。

1.6.3 免疫荧光观察 ICCs 阳性细胞数 取 3 cm 食管下括约肌组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中 48 h，进行脱水、包埋、切片，再烤片 3 h。制备好的白片经脱蜡至水后，用磷酸盐缓冲盐水（PBS）清洗标本 3 次，每次 5 min。经抗原修复 20 min 后，放至室温，PBS 清洗标本 3 次，每次 5 min。滴加过氧化氢 50 μl，反应 20 min 后，PBS 清洗标本 3 次，每次 5 min。然后在室温下用正常山羊血清封闭 30 min，与大鼠一抗（c-kit，1：200 稀释）在 4 ℃下孵育过夜，再用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min，用二抗（Alexa Fluor 594）在避光湿盒中孵育 1 h，PBS 中漂洗 3 次，每次 5 min，切片用 DAPI 染料染色，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，封片。每组制作 5 个 c-kit 免疫荧光染色片，每个 c-kit 切片在荧光显微镜下随机选择 8 个视野（×400 倍），统计 ICCs 阳性细胞数。

1.6.4 免疫印记法测定食管下括约肌中 c-kit，SCF、ZAK、p-ERK 蛋白表达 取食管下括约肌组织 50 mg，在含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中通过机械破碎混匀。在冰上孵育 30 min 后，裂解产物在 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，离心半径 10 cm。用 BCA 蛋白分析试剂盒测定上清液中的蛋白质含量。用缓冲液稀释后，将裂解物加热至 95 ℃，10 min。根据分子量的不同，用 8%~10% SDS-PAGE 电泳分离，后转移到聚偏氟乙烯（PVDF）膜上，在 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h，与 4 ℃一抗（c-kit, SCF, ZAK、p-ERK）孵育过夜。用 TBST 摇动洗膜 3 次，每次 5 min，去除残留一抗，用二抗孵育 1.5 h，TBST 摇动洗膜 3 次，每次 5 min，去除残留二抗，并用增强型化学发光试剂对蛋白进行可视化。使用 ImageJ v1.48 软件对条带强度进行半定量分析。

1.6.5 食管组织病理学观察 取 1 cm 食管下括约肌组织，放入甲醛中浸泡固定，用石蜡包埋并切片，用苏木精染色，并在光学显微镜下观察，并进行食管黏膜损伤病理评分^[13]。根据食管组织有无鳞状上皮增生、黏膜固有层乳头延伸、上皮细胞层内炎性细胞浸润、黏膜糜烂、溃疡形成、Barrett 食管改变分为轻度（1 分）、中度（2 分）、重度（3 分）。

1.6.6 血清炎症因子浓度 每只大鼠抽取腹主动脉血约 3~5 ml，立即灌入 EDTA-2 钠抗凝耦合剂中，静置 30 min 后，以 4 ℃、3000 r/min 离心 20 min，离心半径为 20 cm，取上层血清，放入 -80 ℃冰箱中备用。根据 ELISA 试剂盒说明书进行实验，在酶标仪上以 450 nm 波长测定 OD 值，画出标准曲线，并根据标准曲线计算大鼠血清中炎症因子 IL-8、TNF-α 的浓度。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料采用均值±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。满足正态分布且方差齐时，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。不满足正态分布或方差不齐时，采用 Kruskal-Wallis 检验。为 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠食管下括约肌平滑肌收缩情况比较

表 1 示，与空白组比较，模型组、活血通降方低剂量组大鼠食管下括约肌平均肌张力变化率、平均振幅变化率均降低（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，活血通降方高剂量组食管下括约肌平均肌张力变化率、平均振幅变化率均升高（ $P<0.01$ ），且活血通降方高剂量组平均肌张力变化率和平均振幅变化率均高于活血通降方低剂量组（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。

2.2 各组大鼠胃重量、胃排空率比较

表 2 示，与空白组比较，模型组及活血通降方低剂量组胃重量均增加（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ），模

表 1 各组大鼠食管下括约肌平均肌张力变化率和平均振幅变化率比较（%， $\bar{x}\pm s$ ）

组别	鼠数	平均肌张力变化率	平均振幅变化率
空白组	10	25.78±4.19	48.89±4.04
模型组	10	9.95±3.44 ^{a)}	18.52±2.18 ^{a)}
活血通降方低剂量组	10	12.97±2.39 ^{a)}	24.41±5.07 ^{a)}
活血通降方高剂量组	10	24.36±2.77 ^{b) c)}	44.65±4.83 ^{b) d)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与活血通降方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与活血通降方低剂量组比较， $P<0.01$ 。

型组胃排空率降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 活血通降方低、高剂量组胃重量均降低, 胃排空率升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但活血通降方低、高剂量组间胃重量和胃排空率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表2 各组大鼠胃重量和胃排空率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胃重量/g	胃排空率/%
空白组	10	4.30±0.48	50.87±7.30
模型组	10	6.18±0.43 ^{a)}	30.58±5.22 ^{a)}
活血通降方低剂量组	10	5.32±0.44 ^{b) c)}	42.46±3.57 ^{c)}
活血通降方高剂量组	10	4.60±0.39 ^{c)}	51.09±4.08 ^{d)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

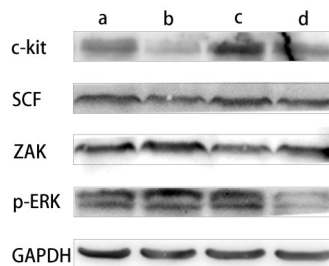
2.3 各组大鼠食管下括约肌中 c-kit、SCF、ZAK、p-ERK 蛋白表达比较

表3示, 与空白组比较, 模型组、活血通降方低剂量组 c-kit 表达量降低, ZAK、p-ERK 表达量升高, 模型组 SCF 表达量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 活血通降方低、高剂量组 c-kit、SCF 表达量均升高, ZAK、p-ERK 表达量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 活血通降方低、高剂量组各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠食管下括约肌中 c-kit、SCF、ZAK、p-ERK 蛋白电泳图见图1。

2.4 各组大鼠食管下括约肌中 ICCs 阳性细胞数及食管组织病理评分比较

表4示, 与空白组比较, 模型组、活血通降方低剂量组 ICCs 阳性细胞数均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 活血通降方低、高剂量组 ICCs 阳性细胞数均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且活血通降方高剂量组 ICCs 阳性细胞数多于活血通降方低剂量组 ($P<0.05$)。与空白组比较, 模型组、活血通降方低剂量组食管黏膜损伤病理评分升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 活血通降方低、高剂量组食管黏膜损伤病理评分降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而活血通降方低、高剂量

组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: c-kit, 酪氨酸激酶受体; SCF, 干细胞因子; ZAK, 亮氨酸拉链和不育- α 基序激酶; p-ERK, 磷酸化细胞外信号调节激酶; a, 空白组; b, 模型组; c, 活血通降方低剂量组; d, 活血通降方高剂量组。

图1 各组大鼠食管下括约肌中 c-kit、SCF、ZAK、p-ERK 蛋白电泳图

表4 各组大鼠食管下括约肌中 ICCs 阳性细胞数及食管黏膜损伤病理评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ICCs 阳性细胞数/个	病理评分/分
空白组	5	24.60±3.05	0
模型组	5	11.40±1.82 ^{a)}	2.29±0.49 ^{a)}
活血通降方低剂量组	5	17.20±1.92 ^{b) c)}	1.14±0.69 ^{b) c)}
活血通降方高剂量组	5	22.20±1.92 ^{d) e)}	0.57±0.53 ^{d)}

注: ICCs, Cajal 间质细胞。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$; e) 与活血通降方低剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠食管组织 HE 染色结果

图2示 (彩图请扫描本文二维码获取), 空白组大鼠食管组织有极少有鳞状上皮增生, 细胞排列整齐, 层次清晰, 仅在上皮层可见极少量散在炎性细胞。模型组有大量鳞状上皮增生, 乳头延伸明显, 上皮层可见大量炎性细胞浸润。活血通降方低剂量组有少量鳞状上皮增生, 乳头延伸范围缩小, 上皮层可见少量炎性细胞浸润。活血通降方高剂量组黏膜上皮损伤修复, 细胞排列较为整齐, 有少量鳞状上皮增生, 乳头延伸范围进一步缩小, 上皮层仅可见少量散在炎性细胞。

2.6 各组大鼠血清 IL-8、TNF- α 浓度比较

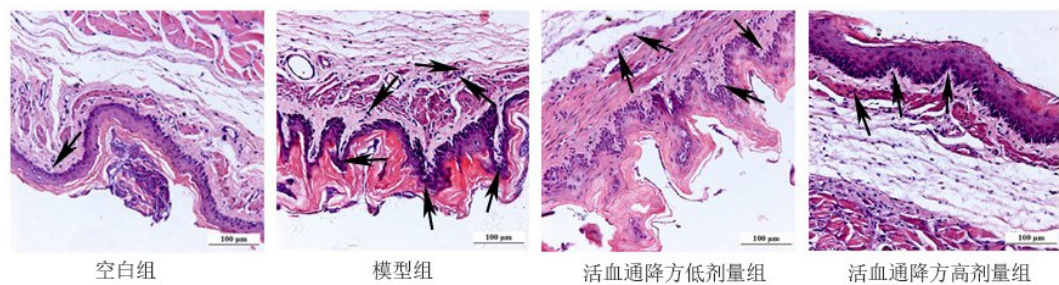
表5示, 与空白组比较, 模型组血清 IL-8 浓度

表3 各组大鼠食管下括约肌中 c-kit、SCF、ZAK、p-ERK 蛋白表达比较 (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	c-kit	SCF	ZAK	p-ERK
空白组	5	0.53±0.01	0.71±0.10	0.63±0.05	0.68±0.09
模型组	5	0.35±0.02 ^{a)}	0.46±0.04 ^{b)}	0.85±0.05 ^{b)}	1.16±0.11 ^{a)}
活血通降方低剂量组	5	0.44±0.04 ^{b) c)}	0.61±0.04 ^{c)}	0.75±0.06 ^{b) c)}	0.87±0.04 ^{b) c)}
活血通降方高剂量组	5	0.50±0.05 ^{c)}	0.68±0.08 ^{c)}	0.69±0.07 ^{c)}	0.72±0.07 ^{d)}

注: c-kit, 酪氨酸激酶受体; SCF, 干细胞因子; ZAK, 亮氨酸拉链和不育- α 基序激酶; p-ERK, 磷酸化细胞外信号调节激酶。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$ 。



注：箭头所指为乳头延伸及炎性细胞。

图2 各组大鼠食管组织病理图（HE染色，×400）

升高，模型组和活血通降方低剂量组血清中TNF-α浓度升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）；与模型组比较，活血通降方低、高剂量组IL-8、TNF-α浓度均降低（ $P<0.05$ ），活血通降方低、高剂量组IL-8、TNF-α浓度差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表5 各组大鼠血清IL-8、TNF-α浓度比较（pg/ml, $\bar{x}\pm s$ ）

组别	鼠数	IL-8	TNF-α
空白组	10	26.05±3.72	105.10±10.35
模型组	10	43.21±6.05 ^{a)}	138.10±7.92 ^{a)}
活血通降方低剂量组	10	32.76±3.50 ^{c)}	123.10±4.78 ^{b)} ^{c)}
活血通降方高剂量组	10	29.51±3.95 ^{c)}	110.30±8.67 ^{c)}

注：IL-8：白细胞介素8；TNF-α：肿瘤坏死因子α。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

RE在中医学中属于“吐酸”“吞酸”“食管瘁”“嘈杂”等范畴，其基本病机为胃失和降、胃气上逆，气郁、气逆、湿阻、血瘀是重要的病理基础。肝郁失疏致气滞血瘀，或疾病日久，气病及血，因虚致瘀。活血通降方中君药白及，味苦涩，苦能降泄，降逆止呕，涩主收敛，消肿生肌，可黏附于食管，减轻其充血水肿，主入肝、胃、肺三经，为止血生肌之要药。臣药丹参，性微寒，祛瘀生新而不伤正，活血止痛。香附芳香辛散，善疏肝之气滞，为疏肝解郁、行气止痛之要药；枳壳味苦，消积化痰，行气宽中，主散胸膈痰滞；姜半夏辛温燥湿，主入肺、胃二经，可化痰散结，降逆和胃，为止呕之要药；旋覆花苦降辛开，下气消痰，降逆止呃；以上四药共为佐使。全方配伍可疏肝理气、降逆和胃、活血生肌、消肿止痛，使瘀血去而病自愈。

RE是以食管下括约肌功能障碍为主的胃食管动力障碍性疾病。ICCs是食管下括约肌收缩活动的基础，是胃食管中周期性自发除极并产生起搏电位的起搏细胞，几乎所有消化道动力障碍都会出现ICCs的损伤和/或丢失^[15-16]。ICCs主要集中在胃食

管连接处，ICCs减少是食管下括约肌压力降低和食管远端动力减弱的重要原因^[17]。几乎所有的ICCs都可以特异性表达c-kit受体，因此c-kit是ICCs的特异性标记物^[18]。SCF是由平滑肌细胞和神经元产生的一种干细胞因子，是c-kit的天然配体。两者的特异性结合可以激活SCF/c-kit信号通路，从而维持ICCs的正常发育、成熟和表型^[4]。本研究结果显示，与空白组相比，模型组食管下括约肌平均肌张力变化率、平均振幅变化率、c-kit、SCF表达及ICCs阳性细胞数均降低；活血通降方高剂量组以上指标均有所升高。此外，对大鼠胃动力进行观察发现，与空白组相比，模型组胃重量增加，胃排空率降低，活血通降方低、高剂量组胃重量减少，胃排空率增加。推测活血通降方可以通过激活SCF/c-kit信号通路，调节胃食管动力，且以高浓度效果更好。

RE是一种与免疫炎症相关的疾病，是由于胃液反流刺激食管上皮细胞分泌趋化因子，从而吸引炎症细胞，促进炎症反应^[19]。研究证实，IL-8及TNF-α是RE中的关键促炎细胞因子，可诱导RE的发生^[20]。本研究结果显示，与空白组相比，模型组存在食管病理组织损伤，且血清中促炎细胞因子IL-8、TNF-α浓度增加，活血通降方低、高剂量组病理组织损伤修复，病理评分降低，且IL-8、TNF-α浓度降低，推测活血通降方可以通过降低促炎细胞因子IL-8、TNF-α浓度减轻食管炎症，且以高浓度效果更好。

ZAK是一种丝裂原活化蛋白激酶激酶，位于丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路的上游，它的过表达可以激活多条MAPK信号通路，ERK即是其中一条^[21]，当胃酸和胆汁反流增多时，会促进ERK磷酸化^[22-23]。研究表明，ERK信号通路的激活可以诱导IL-8和TNF-α的产生，促进炎症反应^[24-27]。此外，ERK还可以通过调节SCF表达从

而调控 SCF/c-kit 信号通路, 影响 ICCs 活性, 参与食管和胃肠运动^[4-7]。本研究结果显示, 与空白组相比, 模型组 ZAK、p-ERK 表达升高, 活血通降方低、高剂量组 ZAK、p-ERK 表达降低, 推测活血通降方可以抑制 ZAK 表达, 从而调控 ERK 磷酸化, 不仅可以激活 SCF/c-kit 信号通路, 还可以降低血清中 IL-8 和 TNF- α 浓度, 最终调节食管动力及缓解黏膜炎症。

综上所述, 我们推测活血通降方可能通过促进食管、胃动力和改善食管下括约肌黏膜炎症发挥治疗反流性食管炎的作用, 其机制可能与降低食管下括约肌中 ZAK 表达, 抑制 ERK 磷酸化, 激活 SCF/c-kit 信号通路和降低血清中 IL-8 和 TNF- α 浓度有关, 且以高浓度效果更好。但本实验并未直接验证活血通降方与 ZAK 间具体的调控关系, 下一步将运用 ZAK 相关抑制剂, 通过细胞实验进一步阐明活血通降方通过调控 ZAK, 进而影响下游信号通路, 发挥治疗反流性食管炎的可能作用机制。

参考文献

- [1] XIE C, WANG J, LI Y, et al. Esophagogastric junction contractility integral reflect the anti-reflux barrier dysfunction in patients with gastroesophageal reflux disease[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2017, 23(1): 27-33.
- [2] HOLLOWAY RH. The anti-reflux barrier and mechanisms of gastro-oesophageal reflux [J]. Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2000, 14(5): 681-699.
- [3] 翟凤婷, 王东梅, 王丹丹, 等. 基于 MAPK/ERK 信号通路探讨温经化瘀止痛法治疗寒凝血瘀证原发性痛经的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 66-74.
- [4] CHOI S, YEUM CH, KIM YD, et al. Receptor tyrosine and MAP kinase are involved in effects of H₂O₂ on interstitial cells of Cajal in murine intestine[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(1/2): 257-266.
- [5] DONG F, YANG S, SUN H, et al. Persistent mechanical stretch-induced calcium overload and MAPK signal activation contributed to SCF reduction in colonic smooth muscle in vivo and in vitro[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2017, 37(2): 141-148.
- [6] 陈健海, 乔大伟, 李玉芳, 等. 六君子合旋覆代赭汤对反流性食管炎大鼠食管 Cajal 间质细胞及干细胞因子/c-kit 通道的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(6): 716-722.
- [7] FAN Y, WU S, FU B, et al. Decreased expression of stem cell factor mRNA and protein in the gallbladders of guinea pigs fed on high cholesterol diet[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(4): 6379-6383.
- [8] 刘磊, 唐艳萍, 弓艳霞, 等. 活血通降方对反流性食管炎大鼠食管黏膜 NF- κ B/MAPK 信号转导通路的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2021, 27(4): 555-562.
- [9] 杨莉, 唐艳萍. 活血通降方对糜烂性食管炎瘀血阻络型食管黏膜、运动功能及 LES 压力的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(7): 77-80, 221.
- [10] 贾剑南, 唐艳萍, 刘茜. 活血通降方合并针灸治疗难治性反流性食管炎瘀血阻络型 63 例临床研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(7): 485-490.
- [11] 康丽丽, 唐艳萍, 杨莉, 等. 活血通降方对瘀血阻络型反流性食管炎临床疗效及胃排空的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(4): 635-640.
- [12] 唐艳萍, 弓艳霞, 李淑红, 等. 改良酸反流性食管炎动物模型建立及比较研究[J]. 中华消化杂志, 2011, 31(9): 632-633.
- [13] 中华医学会消化内镜学会, 中华消化内镜杂志编辑部. 反流性食管病(炎)诊断及治疗方案(试行)[J]. 中华消化内镜杂志, 2000, 17(1): 60.
- [14] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71.
- [15] KIM JN, KIM BJ. The mechanism of action of ghrelin and motilin in the pacemaker potentials of interstitial cells of Cajal from the murine small intestine [J]. Mol Cells, 2019, 42(6): 470-479.
- [16] AHMADI O, NICHOLSON MDE L, GOULD ML, et al. Interstitial cells of Cajal are present in human extrahepatic bile ducts[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(2): 277-285.
- [17] SHAFIK A, AHMED I, ELSIBAI O, et al. Interstitial cells of cajal in reflux esophagitis: role in the pathogenesis of the disease [J]. Med Sci Monit, 2005, 11(12): BR452-BR456.
- [18] HUANG Y, MEI F, YU B, et al. Distribution of the interstitial Cajal-like cells in the gallbladder and extrahepatic biliary duct of the guinea-pig[J]. Acta Histochem, 2009, 111(2): 157-165.
- [19] SOUZA RF, HUO X, MITTAL V, et al. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury [J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1776-1784.
- [20] DENG Y, PAN L, QIAN W. Associations between the severity of reflux esophagitis in children and changes in oxidative stress, serum inflammation, vasoactive intestinal peptide and motilin [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(5): 3509-3513.
- [21] 方峰, 卓超, 吉孟琼, 等. ZAK- β 蛋白激酶基因真核表达载体的构建[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(7): 1-3, 16.

- [22]姜志茹,龚均,张珍妮,等.胆酸对人正常食管黏膜上皮细胞增殖和ERK表达的影响[J].第四军医大学学报,2006,27(16):1473-1476.
- [23]PARK SY, LEE YJ, MIN Y, et al. The mechanism of MAP kinase activation under acidic condition in feline esophageal smooth muscle cells [J]. Arch Pharm Res, 2011,34(10):1759-1768.
- [24]LI HN, YANG QQ, WANG WT, et al. Red nucleus IL-33 facilitates the early development of mononeuropathic pain in male rats by inducing TNF- α through activating ERK, p38 MAPK, and JAK2/STAT3[J]. J Neuroinflammation, 2021,18(1):150.
- [25]肖智林,陈美芳,杨梅,等. STAT3抑制剂 Stattic 激活 ERK通路诱导 THP-1 细胞 IL-8 的产生及细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2019,35(6):498-504.
- [26]FITZGERALD RC, ONWUEGBUSI BA, BAJAJ M, et al. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants [J]. Gut, 2002,50(4):451-459.
- [27]袁红霞,史业骞,刘清君,等. 旋覆代赭汤对反流性食管炎模型大鼠 IL-6 及 TNF- α 的影响[J]. 辽宁中医杂志,2012,39(1):3-5.

Effects of *Huoxue Tongjiang Decoction* (活血通降方) on Esophageal Motility, Serum Inflammatory Factors and Lower Esophageal Sphincter SCF/c-kit Signaling Pathway Reflux Esophagitis Model Rats

LIU Yan¹, TANG Yanping², LIU Lei², LI Peicai², LIU Xi², LIU Siyu¹, HAO Xuwen², YANG Lei²

1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 301617; 2. Tianjin Nankai Hospital

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Huoxue Tongjiang Decoction* (活血通降方, HTD) in the treatment of reflux esophagitis (RE). **Methods** Sixty rats were randomly divided into blank group, model group, low dose HTD group (L-HTD) and high dose HTD group (H-HTD) group, with 15 rats in each group. Except for the blank group, the rats were given modified partial cardia myotomy and external partial pylorus ligation to develop the model of RE. HTD with a dose of 3.68 g/(kg·d) and 7.35 g/(kg·d) were administered in the L-HTD and H-HTD group, respectively, while 5 ml normal saline was given by gavage to both the blank group and the model group since the day when the model was successfully developed. All the administrations lasted for 14 consecutive days. The change rate of the average muscle tone and the average amplitudes of lower esophageal sphincter (LES), the stomach weight and the gastric emptying rate were measured. HE staining was used to observe the histopathological changes of the esophagus tissue, and the pathological score of esophageal mucosa was evaluated. The concentrations of the inflammatory factor interleukin 8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in serum were measured. The number of interstitial cells of Cajal (ICCs) was detected by immunofluorescence, and the expressions of tyrosine kinase receptor (c-kit), stem cell factor (SCF), leucine zipper and sterile alpha motif containing kinase (ZAK) and phosphorylated extracellular signal regulated kinase (p-ERK) in the LES were detected by western blotting. **Results** Compared to those in the control group, the change rates of the average muscle tone and the average amplitudes of LES, the gastric emptying rate, the number of ICCs-positive cells, and the expression of c-kit and SCF in the model group decreased, while the stomach weight, the pathological score of the esophageal mucosa, the concentration of IL-8 and TNF- α , and the expressions of ZAK and p-ERK increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in the model group. Compared to those in the model group, the change rates of the average muscle tone and the average amplitudes of LES in the H-HTD group increased ($P < 0.01$); the gastric emptying rate, the number of ICCs-positive cells, the expressions of c-kit and SCF in the L-HTD group and the H-HTD group increased, while the stomach weight, the pathological score, the concentration of IL-8 and TNF- α , and the expressions of ZAK and p-ERK decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The change rates of the average muscle tone and the average amplitudes of LES, and the number of ICCs-positive cells were significantly higher in the H-HTD group than in the L-HTD group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** HTD can be used to reduce the ZAK expression in the LES and inhibit the p-ERK expression in the treatment of the RE, either by activating the SCF/c-kit signaling pathway and promoting esophageal and gastric motility, or by reducing the concentration of IL-8 and TNF- α in serum and improving the mucosal inflammation of LES; and the higher dose of HTD has better effect.

Keywords reflux esophagitis; *Huoxue Tongjiang Decoction* (活血通降方); lower esophageal sphincter; SCF/c-kit signaling pathway; inflammatory factors; esophagus motility; cajal interstitial cell

(收稿日期: 2021-09-12; 修回日期: 2021-11-26)

[编辑: 王利芬]