

·实验研究·

旋覆代赭汤对胆碱能抗炎通路相关 RE大鼠炎症因子的影响*

黄 棣,徐明英,夏雪皎,张俊杰
(浙江中医药大学,杭州 310053)

摘要:[目的]通过观察旋覆代赭汤对胆碱能抗炎通路相关反流性食管炎(RE)大鼠食管组织和血浆中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素(IL)-1 β 、IL-6和IL-10含量影响,探讨旋覆代赭汤对反流性食管炎的保护机制。[方法]将大鼠随机分为正常组、假手术组、RE组、模型组、中药组和西药组。用“颈左侧迷走神经切断术”联合“贲门肌切开术加部分幽门结扎”制备大鼠反流性食管炎动物模型,造模3周后,各组给予相应药物连续灌胃治疗2周。观察各组大鼠食管肉眼和组织学变化,用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)法检测食管组织和血浆中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-10含量。[结果]中药组大鼠食管黏膜炎症较模型组明显改善,组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量较模型组均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血浆中TNF- α 、IL-1 β 含量较模型组无统计学差异。中药组与模型组比较,IL-10含量无统计学差异。[结论]旋覆代赭汤可以改善RE大鼠食管黏膜炎症,可以降低食管组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量,对IL-10无影响。

关键词:旋覆代赭汤;胆碱能抗炎通路;反流性食管炎;炎症因子

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-9043(2018)05-0386-04

机体受到感染或损伤时,通过调节体内促炎因子和抑炎因子的水平,可以促进外来病原体的清除和组织修复。反流性食管炎(RE)是机体促炎因子和抑炎因子调控失衡引起的一种以食管黏膜损害为表现的炎症。研究发现,炎症反应除了通过促肾上腺皮质激素-糖皮质激素轴调节以外,迷走神经介导的胆碱能抗炎通路(CAP)对机体局部和全身炎症反应也具有调控作用^[1],本研究通过用“颈左侧迷走神经切断术”联合“贲门肌切开术加部分幽门结扎”制备胆碱能抗炎通路相关大鼠反流性食管炎动物模型^[2-3],观察食管组织和血浆中促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素(IL)-1 β 、IL-6和IL-10的含量,探讨旋覆代赭汤对反流性食管炎大鼠炎症因子的调节作用。

1 材料

1.1 动物 清洁级SD大鼠65只,雄性,体质量(200 \pm 20)g,由浙江中医药大学实验动物中心提供,

*基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2016ZA046);浙江省自然科学基金资助项目(LY17H270017)。

作者简介:黄 棣(1992-),男,硕士研究生,从事中医基础理论方向的研究。

通讯作者:张俊杰,E-mail:zhangjunjie70@aliyun.com。

许可证号:SCXK(沪)2013-0016。

1.2 药物 旋覆代赭汤方:旋覆花、半夏、炙甘草、大枣、代赭石、生姜、人参。药物购自浙江中医药大学中医门诊部,由浙江省中药研究所制剂室制备。药物浓缩至含2g/mL生药的溶液,高温消毒灭菌,4℃保存,使用前混匀。

枸橼酸莫沙比利分散片(产品批号:160411),购自成都康弘药业集团股份有限公司。配制为浓度0.3mg/mL的混悬液,4℃保存,使用前混匀。

1.3 试剂 TNF- α (批号:E2016110306)、IL-1 β (批号:E2016122104)、IL-6(批号:E2016110304)、IL-10(批号:E2016110305),酶联免疫吸附剂测定(ELISA)检测试剂盒均为杭州诚维生物有限公司产品。

1.4 仪器 脱水机、包埋机、切片机(Microm公司);连续光谱酶标仪(美国Thermo公司产品);显微镜(日本Olympus公司产品)。

2 方法

2.1 造模方法 造模前禁食不禁水24h,行“部分贲门肌切开+外置幽门结扎术”,建立慢性酸性反流性食管炎模型;行“颈部单侧迷走神经切断术”建立胆碱能抗炎通路反流性食管炎模型。

2.2 分组及给药 随机分为6组,即正常组、RE组、

假手术组、模型组、中药组和西药组。除模型组 15 只外,其余每组 10 只。RE 组为慢性酸性反流性食管炎模型;假手术组在 RE 组的基础上,仅分离颈左侧迷走神经而不离断;而模型组、中药组、西药组则在 RE 组的基础上,单侧迷走神经切断以建立胆碱能抗炎通路 RE 模型。造模 3 周后,模型组随机取 5 只大鼠食管做病理检测,验证模型成功与否;同时开始给药,各组大鼠相应给予旋覆代赭汤水煎剂、莫沙必利混悬液、生理盐水。每次按 5 mL/kg 体质量进行灌胃,每日 1 次,连续 14 d。中药组给予旋覆代赭汤水煎剂,西药组给予莫沙必利混悬液,其余各组均给予生理盐水。

2.3 取材及指标检测 大鼠末次给药后,禁食 24 h,自由饮水,以 10%水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉,心脏采血,每只抽取 5 mL 血液,离心后取上清,置入 -20 °C 冰箱中备用。采血后迅速开腹,取食管-胃交界处向咽喉部截取 1.5~2.0 cm 长的食管,以 0.9% NaCl 溶液清洗,用手术剪剖开,肉眼观察食管黏膜状况。将食管放入 10%福尔马林中固定,常规病理切片,HE 染色,光镜观察。按试剂盒说明用酶联免疫吸附试验法检测食管组织和血浆中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 含量。

2.4 统计学分析 应用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行处理和分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。数值资料进行正态性分布分析,方差齐性检验,符合正态分布并且方差齐,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

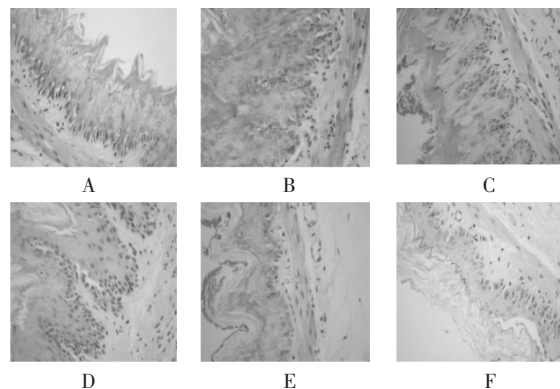
3.1 一般情况和体征 正常组大鼠被毛紧密,色白光泽,活动自如,反应敏捷,食欲良好,体质量增长正常,大便呈颗粒状;造模后的大鼠被毛色黄稀疏,光泽减弱,精神萎靡,食量及体质量下降,大便稀溏。术后 1 周大鼠体质量缓慢增长,模型组体质量增长较其他组缓慢。实验中大鼠共死亡 6 只,假手术组、RE 组、中药组各死亡 1 只,模型组死亡 3 只,死亡原因主要有腹腔感染、消化道出血、反流窒息等。治疗后中药组和西药组大鼠毛色、食欲、体质量等均较模型组改善。

3.2 各组大鼠食管黏膜肉眼及病理表现

3.2.1 食管黏膜肉眼表现 3 周时模型组大鼠胃底扩张明显,胃体积较正常组增加约 1 倍,食管下端黏膜可见点状发红。5 周后,模型组大鼠食管黏膜部分可见发白、粗糙,或见点片状充血,可见点状黏膜缺损;

正常组和治疗组表现基本相同,黏膜呈淡红色,光滑,轻微水肿、充血。假手术组和 RE 组食管黏膜有不同程度的黏膜发红、粗糙,程度与模型组相似。

3.2.2 食管黏膜光镜下病理表现 见图 1。



注:A:正常组;B:假手术组;C:RE组;D:模型组;E:中药组;F:西药组

图 1 食管黏膜光镜下病理表现

3 周时模型组大鼠食管黏膜光镜下可见鳞状上皮增生,角质层呈火焰状增生,固有层乳头伸长明显,并有点状糜烂、炎症细胞浸润,提示造模成功。5 周后,模型组大鼠黏膜表现较 3 周组加重,除见鳞状上皮增生、固有层乳头伸长,炎细胞浸润、毛细血管扩张以外,部分大鼠局部还出现溃疡。而治疗组黏膜镜下表现明显改善,表现为鳞状上皮少量增生,固有层乳头长度缩短,部分大鼠黏膜仍可见糜烂灶。

3.3 各组大鼠食管组织和血浆中炎症因子含量 与正常组比较,模型组食管组织和血浆中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均显著性升高($P<0.01$),IL-10 差异无统计学意义($P>0.05$)。

与模型组比较,中药组食管组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 含量以及血浆中 IL-6 含量均显著降低($P<0.05$),西药组食管组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量及血浆中 IL-6 含量也降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,中药组和西药组 IL-10 水平,均差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1~2。

表 1 各组大鼠食管组织中炎症因子含量($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-10	IL-6
正常组	10	278.76 \pm 16.94	16.30 \pm 1.37	22.87 \pm 2.67	119.68 \pm 8.53
假手术组	9	306.39 \pm 17.94***	15.97 \pm 2.30#	22.56 \pm 2.70	129.59 \pm 7.41**
RE 组	9	295.46 \pm 19.68#	19.26 \pm 1.89**	23.70 \pm 3.78	130.85 \pm 4.44**
模型组	7	347.50 \pm 17.80**	25.41 \pm 1.86**	24.01 \pm 4.07	149.83 \pm 8.27**
中药组	9	320.82 \pm 13.21**	22.27 \pm 2.18**	23.55 \pm 2.14	139.52 \pm 5.62**
西药组	10	323.66 \pm 22.67**	20.38 \pm 3.08***	24.28 \pm 2.49	143.75 \pm 11.87**

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

表 2 各组大鼠血浆中炎症因子含量($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-10	IL-6
正常组	10	290.97 \pm 13.19	18.75 \pm 1.73	24.28 \pm 3.65	130.67 \pm 6.25
假手术组	9	310.71 \pm 17.40	22.59 \pm 1.62 ^{##}	22.19 \pm 2.64	139.71 \pm 8.48 ^{##}
RE 组	9	305.13 \pm 19.68 [#]	22.35 \pm 2.64 ^{##}	24.47 \pm 2.72	144.88 \pm 13.75 ^{##}
模型组	7	326.97 \pm 21.41 ^{**}	28.68 \pm 2.86 ^{**}	24.27 \pm 4.85	168.57 \pm 15.06 ^{**}
中药组	9	319.75 \pm 13.94 [*]	26.27 \pm 1.56 ^{**}	23.14 \pm 3.41	151.11 \pm 12.21 ^{**#}
西药组	10	317.25 \pm 15.12 [*]	26.56 \pm 3.21 ^{**}	22.61 \pm 3.06	151.85 \pm 11.98 ^{**#}

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

3 讨论

RE 是常见的慢性消化道疾病,该病的发病率在西方国家高达 7%~15%,而亚洲地区发病率相对较低,但近年来随着中国生活方式西化、人口的老龄化,RE 的发病率也有增高趋势^[4]。现代医学对 RE 的治疗目前局限于抑酸药和促胃肠动力药,仍有一大部分患者症状改善不明显,旋覆代赭汤在临床上治疗证属胃虚痰阻,气逆不降型的反流性食管炎有着显著的疗效,但机制不清楚。

反流性食管炎的发展与炎症介质密切相关,研究表明,炎症介质与食管动力、纤维化、恶变程度等相关^[5]。在 RE 患者和动物模型中,IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子较对照组均显著提高,对 IL-10 的报道不一致^[6-7]。胆碱能抗炎通路(CAP)是一条迷走神经介导的神经免疫抗炎通路,刺激迷走神经,可以激活 CAP,抑制多种促炎因子如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等的合成和释放,改善全身或局部炎症,但 CAP 的激活对 IL-10 水平不影响^[8]。临床上,对于食管贲门癌患者,肿瘤未侵及周围组织的患者,术中采取保留迷走神经的术式,可以明显降低术后反流性食管炎的发生率^[9-10]。在急性反流性食管炎模型中,切断双侧迷走神经,可以使食管黏膜损伤加重,电刺激切断的迷走神经后,可以激活 CAP,减轻食管损伤。目前研究表明,在类风湿关节炎^[11]、结肠炎^[12]、胰腺炎^[13] 等动物模型中,切断颈部单侧迷走神经可以阻断迷走神经的保护作用,加重模型局部症状。

本实验中,与正常组比较,RE 组血浆和组织中 IL-1 β 、IL-6 含量及模型组血浆和组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均是升高的,且模型组的血浆和组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显高于 RE 组;但各组之间比较,对 IL-10 没有统计学差异。说明反流性食管炎发生时,主要是通过胆碱能抗炎通路,使促炎因子增加引起的机体调节失衡,单侧迷走神经阻断,可以加重反流性食管炎的炎症反应。与模

型组比较,中药治疗组食管组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子水平显著降低,但对抑炎因子 IL-10 无影响。说明旋覆代赭汤可能是通过抑制促炎因子的释放来发挥抗炎作用的。

参考文献:

- [1] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. *Nature*,2000,405(6785):458-462.
- [2] 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.
- [3] van Maanen MA, Lebre MC, van der PT, et al. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice [J]. *Arthritis Rheum*,2009, 60(1): 114-122.
- [4] 张弓羽,张振玉.胃食管反流病的流行病学[J].*世界华人消化杂志*,2010,18(24):2552-2557.
- [5] Rieder F, Biancani P, Harnett K, et al. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010,298(5):G571-81.
- [6] Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj -Elliott M,et al. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants[J]. *Gut*,2002, 50(4):451-459.
- [7] 史业骞,刘清君,杜 昕,等.旋覆代赭汤对混合性反流性食管炎模型大鼠 IL-10 的影响[J].*辽宁中医杂志*,2011, 38(12):2480-2482.
- [8] Tracey KJ.Reflex control of immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009,9(6) : 418-428.
- [9] 王国范,张百江,杨文峰,等.保留迷走神经加胃底重建预防食管贲门癌术后胃食管返流的研究[J].*肿瘤防治杂志*, 2005,12(3):218-221.
- [10] 韩 冰, 寇瑛琳.保留迷走神经的食管切除术后胃消化功能的研究[J].*中国胸心血管外科临床杂志*.2016,23(3): 253-257.
- [11] Koopman FA, Schuurman PR, Vervoordeldonk MJ,et al. Vagus nerve stimulation: A new bioelectronics approach to treat rheumatoid arthritis[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2014,28(4):625-635.
- [12] O'Mahony C, van der Kleij H, Bienenstock J, et al. Loss of vagal anti-inflammatory effect: in vivo visualization and adoptive transfer[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009,297(4):1118-1126.
- [13] van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S ,et al. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice[J]. *Gastroenterology* ,2006,130 (6): 1822-1830.

(收稿日期:2018-04-05)

The effect of Xuanfu Daizhe decoction on inflammations in Reflux Esophagitis rats of CAP

HUANG Yan, XU Mingying, XIA Xuejiao, ZHANG Junjie

(Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract: [Objective] Observed the content of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in esophageal tissue and plasma of reflux esophagitis (RE) rats, to explore the protection mechanism of Xuanfu daizhe decoction. [Methods] Rats were randomly divided into normal group, the RE group, control group, model group, Chinese medicine and western medicine group. The Model group were administered “left cervical vagotomy” and “cardiomyotomy combine with pylorus ligation”. After 3 weeks, each rats were treated with the corresponding drug for 2 weeks, the rats were sacrifice, collected the esophageal tissue and plasma. Observed the pathological morphological changes of each rats esophageal tissue. Using ELISA method to detect TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 levels in esophageal tissue and plasma. [Results] The esophageal mucosal inflammation in Chinese medicine group obviously improved compared with model group, the content of TNF- α , IL-1 beta, IL-6 in Chinese medicine group were lower than the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the content of TNF- α , IL-1 β in plasma, compared with model group, there was no significant difference ($P > 0.05$). The content of IL-10 in Chinese medicine group compared with model group, there was no statistical difference. [Conclusion] Xuanfu daizhe decoction can improve RE rats’ esophageal mucosal inflammation, by decreasing the content of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in esophageal tissue, but have no effect on IL - 10 levels.

Key words: Xuanfu daizhe decoction; CAP; reflux esophagitis; inflammations

· 消 息 ·

第五届世界中医药教育大会暨甲子校庆在我校召开

为贯彻落实习近平总书记在全国教育大会上的重要讲话精神和关于中医药振兴发展的重要指示,9月16日上午,由世界中医药学会联合会主办,世界中医药学会联合会教育指导委员会和我校承办的第五届世界中医药教育大会在新校区体育馆召开。

国家卫健委党组成员,国家中医药管理局党组书记余艳红教授出席大会并发表重要讲话。教育部、科技部、工业和信息化部、国家中医药管理局、世界中医药学会联合会领导、斯洛伐克驻华大使、中国工程院院士代表、在津国医大师出席,世界中联教指委全体委员、来自世界32个国家的中外中医药专家学者、全国中医药院校和天津市兄弟院校领导、新闻出版单位代表、医药企业代表、历届校友、我校师生代表共4000余人参加大会。

本届世界中医药教育大会,以“继承创新,合作发展,砥砺前行,筑梦远航”为主题,致力于进一步研究商讨中医药教育发展中面临的问题,交流互鉴,增进共识,深化合作,共谋中医药教育发展大计,推动中医药教育在世界范围内的国际化、规范化和标准化发展,提升中医药国际影响力,促进中医药全球化发展。大会开幕前夕,召开了世界中医药学会联合会教育指导委员会换届会议暨第三届理事会第一次会议,选举中国工程院院士、中国中医科学院院长、我校校长张伯礼连任会长。教育大会期间,还进行一带一路中医师资培训基地揭牌、世界中医药教育核心教材发行仪式。会议期间还举行了中国天津第十四届国际针灸学术研讨会、世界中医药高等教育发展论坛、新时代中医药高等教育发展战略座谈会、整合医学与治未病论坛、中药及天然药物国际论坛、中医药文化传播高峰论坛、国医大师中医理论创新与学术思想研讨会等系列学术会议。

教育大会召开之际,恰逢我校建校60周年,学校全面总结一甲子在人才培养、科学研究、文化传承与创新、社会服务、国际交流与合作等方面取得的成果经验,找准差距,明确方向,全面提高教育教学质量,不断提升办学治校水平。以校庆为契机,统一思想,凝聚力量,振奋精神,鼓舞士气,团结带领师生员工,为加快推进“双一流”建设,实现中医药高等教育内涵式发展作出不懈努力。校庆期间,学校举行海内外校友祝福母校视频征集、教师著作展、师生书画摄影展、“迎校庆,谱情怀”征文比赛、感知中国一大医“津”药行及纪念建校60周年文艺晚会等系列校园文化活动。