

使红细胞发生破裂产生溶血现象^[10],故使其应用受限。杜仲是我国传统中药,被《神农本草经》列为上品,认为它能治疗腰膝痛,补中,益精气,坚筋骨。现代研究发现杜仲有着降压、降脂、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗溶血等药理作用。杜仲黄酮是杜仲的提取物,其临床研究较少。

本研究发现无论是蜂毒素、杜仲黄酮单独外用或两者联合使用外涂于患处,均对类风湿关节炎 CIA 造模小鼠有治疗作用,其中两者联合用药的效果更佳;蜂毒素联合杜仲黄酮 1:1 使用可以有效的抑制蜂毒素溶血反应发生。蜂毒素和杜仲黄酮在类风湿关节炎治疗方面有着巨大的潜力,关于两者的治疗机制方面仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Zampeli E, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum [J]. J Autoimmun 2015; 65: 1.
- [2] Lee WR, Pak SC, Park KK. The protective effect of bee venom on fibrosis causing inflammatory diseases [J]. Toxins (Basel), 2015, 7 (11): 4758.
- [3] 周捷, 章蕴毅, 张建文, 等. 中药杜仲对补体系统的作用 [J]. 复旦学报(医学版) 2006, 33(1): 101.
- [4] Endale M, Lee WM, Kwak YS, et al. Torilin ameliorates type II collagen-induced arthritis in mouse model of rheumatoid arthritis [J]. Int Immunopharmacol 2013; 16(16): 232.
- [5] 李亚非, 时述山, 李欣, 等. 纯化蜂毒肽对兔免疫性关节炎的抑制作用 [J]. 中华风湿病杂志 2000, 4(5): 293.
- [6] 邱海强. 喜炎平注射液溶血的分光光度法检查 [J]. 中国医药指南, 2014, 29(12): 70.
- [7] Yeo JH, Yoon SY, Kwon SK, et al. Repetitive acupoint treatment with diluted bee venom relieves mechanical allodynia and restores intraepidermal nerve fiber loss in oxaliplatin-induced neuropathic mice [J]. J Pain 2016; 17(3): 298.
- [8] AL-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, et al. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens [J]. Phyto-medicine 2015; 22(2): 245.
- [9] Katz-Agranov N, Khattrib S, Zandman-Goddard G. The role of intravenous immunoglobulins in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Autoimmunity Rev 2015; 14(8): 651.
- [10] 王兴华, 但自力. 蜂蛰伤中毒临床研究进展 [J]. 湖北医药学院学报 2011; 30(2): 239.

食管康对反流性食管炎模型大鼠 SOD、GSH 影响的实验研究

戚经天¹, 刘海娜², 刘菊², 李姿², 苗嘉萌², 袁红霞^{*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学管理学院, 天津 300193)

摘要:目的 研究反流性食管炎(RE)基本病机及食管康治疗RE的作用机理。方法 将60只雄性Wistar大鼠随机分成假手术组、模型组、食管康组、中成药组(三九胃泰颗粒)、西药组(兰索拉唑+莫沙必利)。采用“4.2mm幽门夹+胃底2/3结扎术”制备反流性食管炎动物模型。相应实验处理后,观察食管下段黏膜病理组织学变化及大鼠食管黏膜组织SOD和GSH含量的表达情况。结果 与假手术组相比,模型组大鼠体重明显减轻($P<0.05$),食管黏膜肉眼及镜下病理改善明显,评分增高($P<0.05$);食管黏膜组织SOD、GSH含量显著降低($P<0.05$);与模型组及中成药组相比,食管康组死亡率明显降低($P<0.05$),肉眼及病理评分显著降低($P<0.05$);与西药组相比,大鼠食管黏膜SOD、GSH含量明显改善($P<0.05$)。结论 食管康能够明显提高RE大鼠食管黏膜SOD、GSH含量,从而促进食管黏膜损伤修复,改善RE症状。

关键词: 反流性食管炎; 食管康; 气机升降; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.08.015

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2016)08-1836-03

反流性食管炎(Reflux esophagitis, RE)指胃、十二指肠内容物反流至食管而引起的烧心、反酸等症状,西方国家的胃食管反流病发病率高达10%~30%,且近年来有逐渐增加的趋势^[1-8]。目前现代医学临床上大多以对症治疗为主,多采用抑酸剂、抗酸剂、促胃肠动力药及黏膜保护剂等,但不能从根本上解决反流问题。新型的抗反流药是研究热点,近年来,采用中医药治疗RE疗效显著,日益受到医学界的关注和重视^[9-13]。本实验通过观

察食管康对RE模型大鼠食管黏膜组织形态学、食管黏膜氧化应激反应等相关指标,从氧化应激的新颖角度深入研究RE食管黏膜损伤中的作用机制,为食管康新药临床前研究和RE临床治疗提供新的指导。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 健康雄性Wistar大鼠60只,体重(200±20)g,由军事医学科学院放射医学研究所提供(合格证号:MA-2013-111)。

1.2 实验药品制备

1.2.1 食管康组制备 根据食管康的药物组方剂量折算,将旋复花6g(包煎)、清半夏6g、郁金3g、黄连6g、吴茱萸3g、代赭石3g(先煎)等11味药材按传统水煎煮方法药液,减压浓缩的方法提取药物浸膏(批号2014010201),加蒸馏水制成24g·ml⁻¹溶液。根据人与动物给药剂量换算,以大鼠每日给药剂量为生药10g·

收稿日期: 2015-11-29; 修订日期: 2016-04-20

基金项目: 天津市科委科技支撑项目计划(No. 12ZCZDSY01500)

作者简介: 戚经天(1987-),男(汉族),河北赵州人,天津中医药大学在读博士研究生,主要从事中医脾胃病研究工作。

* 通讯作者简介: 袁红霞(1964-),女(汉族),山东邹平人,天津中医药大学管理学院教授,博士学位,主要从事中医脾胃病研究工作。

kg⁻¹。

1.2.2 西药组(兰索拉唑+莫沙必利混悬液)制备 快力-枸橼酸莫沙必利片(购自鲁南贝特制药有限公司),兰悉多-兰索拉唑肠溶片(汕头市鮑滨制药厂),均研成为极细粉末后,前者配置成质量浓度为0.2 g·L⁻¹混悬液,后者配置成2 g·L⁻¹混悬液,根据人与大鼠体表面积换算,大鼠每日给药剂量为:莫沙必利2 mg·kg⁻¹兰索拉唑10 mg·kg⁻¹灌胃给予。

1.2.3 中成药组(三九胃泰颗粒药液)制备 三九胃泰(国药准字Z44020705,购自华润三九医药股份有限公司),规格20g×6袋,加入水配制成浓度为0.15mg/ml混悬液装瓶。大鼠每日给药剂量为:10g·kg⁻¹。

1.3 实验试剂 75%酒精、苏木精/伊红染色剂,10%水合氯醛(天津市化工二厂),左氧氟沙星(扬子江药业集团有限公司)10%甲醛溶液(天津市化工二厂)苏木精、伊红染色液(天津市化工二厂)T-SOD、GSH测定试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)

1.4 实验器械及物品 常规手术器械(鼠板、刀片、手术剪、6/0带针缝合线、持针器、3/0缝线)(上海医疗器械厂产品)、宽度为3.0mm的双扁铁心包扎线(夹心金属直径0.3mm)、NOVEL光学显微镜,型号:XS2-106B(N)。日立透射电子显微镜,型号:H7650。Heraeus台式高速离心机,型号:PLCO型。722光栅分光光度计,型号:96306J031(上海第三分析仪器厂)

2 方法

2.1 动物分组 将60只健康雄性Wistar大鼠,予基础饲料常规适应性喂养7天后随机分为5组,即假手术组、模型组、食管康组、西药对照组(兰索拉唑+莫沙必利)以及中成药对照组(三九胃泰颗粒),每组12只。

2.2 模型制备 造模组大鼠均于术前24h禁食不禁水,采用邹方明等^[14]改良之后的“4.2mm幽门夹+胃底2/3结扎术”造模方法,术后24h禁食不禁水,术后三日予左氧氟沙星抗炎,后常规喂养。

2.3 实验动物给药与取材 假手术组大鼠于实验开始3天后用生理盐水按10ml·kg⁻¹灌胃,每日一次,14d后处死。模型组于造模后3d用生理盐水按10ml·kg⁻¹灌胃,每日一次,14d后处死。食管康、西药组、中成药组于造模术后3d开始,每日以相应剂量灌胃1次,连续14天后,第15天处死各组动物进行指标检测。动物处死前禁食不禁水,用10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔注射麻醉,常规开腹后迅速取出食管组织,将食管纵切两份,一份放入10%福尔马林固定液中送病理科,另一份称重后用生理盐水制备10%食管匀浆,4℃,3500r/min,离心15min,取上清待测。

2.4 观察指标及指标检测方法

2.4.1 对大鼠的死亡率、体重情况进行观察 每日记录大鼠的死亡数目、及体重、毛色、精神状态及活动改变等情况。取治疗后体重减去治疗前体重的差值进行观察。

2.4.2 食管黏膜的肉眼表现及病理形态学观察 食管黏膜肉眼表现及病理形态学观察:开腹取食管组织,用生理盐水漂洗食管腔,肉眼观察大体表现并进行RE分级,分别取食管下段小块组织,固定后常规制备病理切片,HE染色并通过光镜观察对其进行RE病理分级(注:大体表现及病理分级均采用2004年中华医学会消化内镜分会颁布的《反流性食管炎诊断及治疗指南》中标准)。

2.4.3 食管组织SOD、GSH含量测定 大鼠麻醉后,开腹取约1.5~2.0cm的食管组织,以生理盐水漂洗,肉眼观察及留取小块组织制作病理切片后,标本经滤纸拭干,准确称重,制备组织匀浆,4℃离心取上清液,同时用考马斯亮兰法测定组织蛋白。两种酶活性测定均按试剂盒说明进行,单位为每毫克组织蛋白对应的指标含量(U/mgprot)。

2.5 统计学方法 使用SPSS for Windows 18.0统计软件对数据进行统计学分析,实验数据为计量资料者,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 食管康对反流性食管炎模型大鼠一般情况的影响

3.1.1 各组大鼠死亡原因分析 食管康组、西药组大鼠死亡率较模型组、中成药组明显降低,差异具有显著性($P < 0.05$)。见表1。

3.1.2 各组大鼠体重变化情况 食管康组、中成药组、西药组三个治疗组大鼠与模型组比较,实验后经治疗的食管康组和西药组体重高于模型组大鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$);食管康组大鼠实验后体重恢复较好,高于西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 造模后7天处死前各组大鼠死亡原因分析 例

组别	死亡数	幽门梗阻	腹腔感染	肠梗阻	吸入性肺炎
模型组	4	3	1	0	0
食管康组	1	0	0	1	0
西药组	2	1	0	1	0
中成药组	4	2	1	0	1

n = 12

表2 实验前后大鼠体重变化情况($\bar{x} \pm s$)

实验分组	n	实验前后体重变化/g
正常组	12	49.9 ± 5.3
模型组	8	-53.4 ± 3.4*
食管康组	11	-9.8 ± 3.2**△
西药组	10	-28.5 ± 5.8**
中成药组	8	-45.3 ± 3.9

与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$;与西药组比较,△ $P < 0.05$ 。

3.2 食管康对RE模型大鼠食管黏膜肉眼表现及病理形态学改变的影响

3.2.1 食管黏膜肉眼表现 与正常组比较,模型组大鼠食管黏膜肉眼积分明显升高($P < 0.01$);食管康组及西药组大鼠食管黏膜肉眼积分较模型组明显降低($P < 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠食管黏膜肉眼分级及积分($\bar{x} \pm s$)

组别	n	各组肉眼分级分布情况(只)					积分
		0级	I a级	I b级	II级	III级	
正常组	12	11	1	0	0	0	0.08 ± 0.03
模型组	8	0	0	2	5	1	2.00 ± 0.46*
食管康组	11	0	1	8	2	0	1.55 ± 0.27*△
西药组	10	0	1	8	1	0	1.50 ± 0.23*
成药组	8	0	0	2	5	1	2.00 ± 0.46*

与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$;与西药组比较,△ $P > 0.05$

3.2.2 食管黏膜内镜下表现 模型组与假手术组比较,大鼠食管黏膜病理积分较模型组明显降低($P < 0.05$)。见表 4。食管黏膜病理积分明显升高($P < 0.05$);食管康组及西药组大鼠食管

表 4 各组大鼠食管黏膜病理分级及积分($\bar{x} \pm s$)

组别	n	各组病理分级分布情况(只)				积分
		正常	轻度	中度	重度	
假手术组	12	11	1	0	0	0.08 ± 0.29
模型组	8	0	1	6	1	2.00 ± 0.53*
食管康组	11	0	10	1	0	1.09 ± 0.30* [△]
西药组	10	0	9	1	0	1.10 ± 0.32*
中成药组	8	0	2	5	1	1.88 ± 0.64*

与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$;与西药组比较,[△] $P > 0.05$

3.3 食管康对 RE 模型大鼠食管黏膜组织 SOD、GSH 含量的影响 模型组与假手术组比较,大鼠食管组织 SOD、GSH 显著降低($P < 0.05$);食管康组较西药组、中成药组、模型组 SOD、GSH 含量较模型组明显提高($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 食管康对 RE 大鼠食管组织 SOD、GSH 含量影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD/U · (mgprot) ⁻¹	GSH/U · (mgprot) ⁻¹
正常组	12	20.99 ± 3.33*	0.371 ± 0.072*
模型组	8	16.64 ± 2.10	0.187 ± 0.126
食管康组	11	21.15 ± 1.32*	0.384 ± 0.017*
西药组	10	20.92 ± 0.82*	0.381 ± 0.043*
中成药组	8	17.19 ± 2.15	0.231 ± 0.097

与模型组比较,* $P < 0.05$;与食管康组比较,* $P < 0.05$

4 讨论

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase; SOD)是生物体内存在的一种抗氧化金属酶,与很多疾病的发生、发展密不可分^[15,16]。谷胱甘肽(glutathione GSH)是体内清除 H₂O₂ 和许多有机氢过氧化物的主要酶^[17]。正常生理状态下,胃肠道黏膜所含抗氧化剂远低于肝脏组织,这就使得食管黏膜在受到外源性化合物刺激时极易发生氧化应激,从而导致黏膜上皮氧化损伤。

食管黏膜损伤与局部生成了过多的氧自由基密切相关^[18],应用抗氧化剂可以预防和治疗反流性食管炎^[19]。高艳青等^[20]通过对食管组织中脂质过氧化物的含量的检测,发现食管黏膜中丙二醛与炎症程度呈显著正相关。Wetscher 等^[21]在大鼠 RE 模型中,数小时即可见食管谷胱甘肽含量降低。Oh 等^[22]选择在 SD 大鼠上模拟 RE 模型发现,在常规使用抑酸剂治疗 RE 的同时加用抗氧化剂可提高临床疗效。氧化应激在 RE 发生发展过程中起着重要作用,RE→Barrett 食管→不典型增生→恶性变已是公认的发病过程,虽机制尚未完全清楚,氧化应激可能是其中的一个相关机制^[23]。本研究从氧化应激的新颖角度探讨了调理脾胃气机升降对 RE 的影响机制,为寻求治疗 RE 的新的药物靶点和方法提供了理论依据和指导。

参考文献:

- [1] Moayyedi P, Talley NJ. Gastro-oesophageal reflux disease [J]. Lancet, 2006, 367(9528): 2086.
- [2] 潘国宗, 许国铭, 郭慧平, 等. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查 [J]. 中华消化杂志, 1999, 19(4): 223.
- [3] 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 年) [J]. 中华消化内镜杂志, 2004, 21(4): 221.
- [4] Kusano M, Hongo M, Miwa H. Response to gastroesophageal reflux disease therapy: assessment at 4 weeks predicts response / non-response at 8 weeks [J]. Digestion, 2012, 85(4): 282.
- [5] 段国勋. 97 例反流性胃食管反流病的中医辨证特点分析 [J]. 中医杂志, 2004, 41(9): 554.
- [6] 杜 昕, 史业骞, 仇涓蓉, 等. 袁红霞辨证分型治疗反流性食管炎 86 例 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(1): 111.
- [7] 王捷虹, 沈舒文. 滋阴降气汤治疗反流性食管炎 46 例 [J]. 陕西中医, 2008, 29(1): 35.
- [8] 陈 明. 李乾构教授诊治胃食管反流病经验 [J]. 中国民间疗法, 2005, 13(10): 4.
- [9] Rodrigues Jr L, Faria C M, Geocze S, et al. Helicobacter pylori eradication does not influence gastroesophageal reflux disease: a prospective, parallel randomized open-label controlled trial [J]. Arq Gastroenterol, 2012, 49(1): 56.
- [10] Kinoshita Y, Hongo M; Japan TWICE Study Group. Efficacy of twice-daily rabeprazole for reflux esophagitis patients refractory to standard once-daily administration of PPI: the Japan-based TWICE study [J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107(4): 522.
- [11] Chubineh S, Birk J. Proton pump inhibitors: the good, the bad and the unwanted [J]. South Med J, 2012, 105(11): 613.
- [12] Ament P W, Dicola D B, James M E. Reducing adverse effects of proton pump inhibitors [J]. Am Fam Physician, 2012, 86(1): 66.
- [13] Park J H, Park H, Lee D H, et al. A randomized double blinded, clinical trial to assess the efficacy and cost effectiveness of omeprazole compared to rabeprazole in the maintenance therapy of patients with gastroesophageal reflux disease [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2013, 19(2): 219.
- [14] 邹方明. 慢性反流性食管炎大鼠模型的建立及 5-羟色胺 4 受体激动剂的抗食管黏膜炎症作用 [D]. 福建医科大学硕士学位论文, 2012.
- [15] McCord JM. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein [J]. J Biol Chem, 1969, 244(22): 6049.
- [16] Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse [J]. Science, 1999, 283(5407): 1482.
- [17] 马 森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(10): 53.
- [18] Oh TY, Lee JS, Ahn BO, et al. Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux esophagitis in rats [J]. Gut, 2001, 49(3): 219.
- [19] Lanas A, Soteras F, Jimenez P, et al. Superoxide anion and nitric oxide in high-grade esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits [J]. Dig Dis Sci, 2001, 46(12): 2733.
- [20] 高艳青, 刘晓霓, 宋小莉, 等. 氧化应激在反流物所致食管黏膜损伤中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(2): 149.
- [21] Wetscher GJ, Hinder PR, Bagchi D, et al. Free radical scavengers prevent reflux esophagitis in rats [J]. Dig Dis Sci, 1995, 40(6): 1292.
- [22] Oh TY, Lee JS, Ahn BO, et al. Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux esophagitis in rats [J]. Gut, 2001, 49(3): 364.
- [23] Chen X, Yang CY. Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention [J]. Carcinogenesis, 2001, 22(8): 1119.