

· 基础研究 ·

旋覆代赭汤对反流性食管炎大鼠模型 TLR4/NF- κ B 的影响

刘亚婷¹ 刘菊² 苗嘉萌¹ 柳媛¹

摘要 目的 观察旋覆代赭汤对反流性食管炎(RE)模型大鼠食管黏膜与脂多糖(LPS)、Toll样受体4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)表达的影响。**方法** 将60只雄性Wistar大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、旋覆代赭汤组(简称中药组,9.89 g/kg)、西药(奥美拉唑+莫沙比利,2.58 mg/kg)组,每组15只。除正常对照组外大鼠采用“4.2 mm 幽门夹+2/3胃底结扎术”制备酸碱混合反流RE大鼠模型。术后第7天予相应药物干预,持续干预14天。利用光学显微镜观察大鼠食管下段黏膜组织形态学变化;应用ELISA法检测外周血中LPS含量;采用Western Blot法与RT-PCR法检测食管黏膜组织中TLR4、NF- κ B蛋白和基因表达。**结果** 与正常对照组比较,模型组大鼠食管黏膜镜下损伤最为严重,食管黏膜呈炎性改变,可见急性慢性炎症细胞浸润,病理积分和外周血中LPS含量升高($P < 0.05$),食管组织中TLR4、NF- κ B蛋白和基因表达升高($P < 0.05$)。与模型组比较,中药组、西药组病理积分和外周血中LPS含量降低($P < 0.05$),食管组织中TLR4、NF- κ B蛋白和基因表达亦明显降低($P < 0.05$)。**结论** 旋覆代赭汤能够减轻RE模型大鼠食管黏膜的损伤,抑制TLR4、NF- κ B的表达,促进食管黏膜损伤的恢复。

关键词 旋覆代赭汤;反流性食管炎;脂多糖;LPS/TLR4/NF- κ B信号通路;食管微环境

Effect of Xuanfu Daizhe Decoction on TLR4/NF- κ B of Reflux Esophagitis Rats Model LIU Ya-ting¹, LIU Ju², MIAO Jia-meng¹, and Liu Yuan¹ 1 Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin(300193); 2 Preventive Treatment Department of Traditional Chinese Medicine Hospital of Kunshan, Jiangsu (215300)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Xuanfu Daizhe Decoction on esophageal mucosa in rats model with reflux esophagitis and its in Lipopolysaccharides(LPS), Toll-like receptor 4(TLR4) and nuclear factor-kappa B(NF- κ B). **Methods** Totally 60 male Wistar rats were randomly divided into normal control group, model control group, Xuanfu Daizhe Decoction group(Chinese medicine, 9.89 g/kg), and Western medicine group(omeprazole + mosapride, 2.58 mg/kg) according to the random number table, 15 in each group. Rat models of acid-base mixed reflux esophagitis were established by “4.2 mm pyloric clip + 2/3 gastric fundus ligation” except the normal control group. The corresponding drugs were given to each group from the 7th day after operation for 14 days. The histomorphological changes of the lower esophageal mucosa in rats were observed by light microscopy, the LPS content in peripheral blood was determined by ELISA, and the protein and gene expressions of TLR4 and NF- κ B in esophageal mucosa were detected by Western Blot and PCR. **Results** Compared with the normal control group, the injury of esophageal mucosa in the model group was the most serious which showed inflammatory changes, showing acute and chronic inflammatory cell infiltration, pathological scores and elevated LPS content in peripheral blood ($P < 0.05$), TLR4, NF- κ B protein and gene expression increased in esophageal tissues ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the pathological scores and the content of LPS of normal control group were significantly reduced($P < 0.05$), the expressions of TLR4 and NF- κ B in esoph-

基金项目:苏州市“科教兴卫”青年科技项目(No. KJXW2016063)

作者单位:1.天津中医药大学研究生院(天津 300193);2.江苏省昆山市中医医院治未病科(江苏 215300)

通讯作者:刘菊, Tel: 0512-57310000 转 6519, E-mail: liujupopo@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190925.223

ageal mucosa were significantly reduced in Chinese medicine and Western medicine group ($P < 0.05$).

Conclusion Xuanfu Daizhe Decoction could reduce esophageal inflammatory injury of RE rats, inhibit the expression of TLR4 and NF- κ B, promote the recovery of esophageal mucosal injury.

KEYWORDS Xuanfu Daizhe Decoction; reflux esophagitis; Lipopolysaccharides; LPS/TLR4/NF- κ B signaling pathway; esophageal microenvironment

反流性食管炎 (reflux esophagitis, RE) 属于胃食管反流病 (gastroesophageal reflux disease, GERD) 的范畴, 随着社会经济的发展, 人们生活习惯和饮食结构的改变, 精神压力的不断增加, RE 的发病率逐年上升^[1]。RE 可表现为烧心、反酸、反流、胸骨后灼痛等症状, 还有向 Barrett 食管和食管腺癌转归的危险^[2], 给 RE 患者带来巨大的躯体痛苦和经济负担。中医学治疗 RE 具有特色与优势, 临床应用旋覆代赭汤和胃降逆治疗 RE 疗效显著^[3], 但有关其作用机制的研究相对欠缺。本实验通过观察旋覆代赭汤对 RE 模型大鼠食管黏膜的损伤情况、脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 的含量、Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 和核因子 κ B (nuclear factor-Kappa B, NF- κ B) 表达的影响, 探讨旋覆代赭汤治疗 RE 的作用机制。

材料与方

1 动物 健康雄性 12 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 体重 (220 \pm 20) g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 动物合格证号: No. 11401500057173, 购入后分笼架式饲养于 II 级动物饲养室钢丝网盖塑料笼内, 清洁级环境饲养。经天津市南开医院实验动物伦理委员会批准 (No. NKYY-DWLL-2019-082)。

2 药物 根据《伤寒论》原文与课题组前期研究基础旋覆代赭汤组方为: 旋覆花 15 g 代赭石 5 g 生姜 25 g 清半夏 15 g 党参 10 g 炙甘草 15 g 大枣 10 g (批号: 18071761、18031031、18040521、18061021、18071731、18070661、18050701), 选用中药颗粒剂 (购于江阴天江药业有限公司)。枸橼酸莫沙必利片 (5 mg/片, 鲁南贝特制药有限公司, 批号: J20130093), 奥美拉唑镁肠溶片 (20 mg/片, 阿斯利康制药有限公司, 批号: H19990317), 上述药物配成混悬液后装瓶, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: 病理、包埋以及染色等所需基本试剂由天津市南开医院中西医结合急腹症研究所提供, 苏木素染液 (批号: 20170517)、伊红染液 (批号: 20180612), ELISA 脂多糖测定试剂盒 (购

自上海蓝基生物科技有限公司, (批号: BG190308RAC), RT-PCR 和荧光定量 PCR 试剂盒 (购自北京全式金生物技术有限公司, 批号: M20106), 蛋白定量试剂盒 (购自 Thermo 公司, 批号: TE266615), 鼠源 Toll 样受体抗体 (购自 SANTA-CRUZ 公司, 批号: sc-293072), 兔源 NF- κ B 抗体 (购自 CST 公司, 批号 8242s), HRP 偶联二抗 (购自 Proteintech 公司, 批号: SA00001-1、SA00001-2)。

主要仪器: 正置荧光显微镜 (型号: DM400B + DFC500 + LA, 美国 Leica 公司), 水平摇床 (型号: DW-9405B, 北京市六一仪器厂), 电泳仪电源 (型号: DYY-6C, 北京市六一仪器厂), 化学发光分析仪 (型号: ChemiDoc XRS 美国 Bio Rad 公司), PCR 扩增仪 (型号: PTC-200 美国 Bio Rad 公司), 台式冷冻离心机 (型号: H2050R, 湘仪集团), 分光光度计 (型号: KHB-ST-360, 上海科华)。

4 动物分组及造模方法 将 60 只健康雄性 Wistar 大鼠, 在同样环境下予基础饲料常规适应性喂养 5 天, 采用随机数字表法分成为正常对照组、模型组、旋覆代赭汤组 (简称中药组)、西药组 (奥美拉唑 + 莫沙必利), 每组 15 只, 模型组及各药物干预组大鼠应用邹方明等^[4]“4.2 cm 幽门夹 + 胃底 2/3 结扎术”的方法造模。造模术后至取材手术前共死亡 6 只大鼠, 正常组无死亡, 模型组死亡 3 只, 中药组死亡 1 只, 西药组死亡 2 只。

5 干预方法 正常对照组及模型组于手术后 7 天予生理盐水灌胃, 根据人与动物等效剂量系数, 实验动物给药剂量为常规用药 6.25 倍, 中药组手术后第 7 天予按 9.89 g/kg (按成年人体重为 60 kg 计算, 实验动物给药量: 95 g/60 kg \times 6.25) 的中药颗粒剂药液灌胃, 西药组予 2.58 mg/kg 的奥美拉唑 + 莫沙比利混悬液灌胃, 根据药物浓度按照 1 mL/100g 体重的比例进行, 每日两次, 共持续灌胃 14 天。

6 标本取材 各组大鼠取材前, 均禁食 24 h, 不禁水, 用 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100g) 腹腔注射麻醉, 常规开腹后迅速采取腹主动脉血离心后取上清, 置于 EP 管中, -80 $^{\circ}$ C 保存待检测; 大鼠处死后取出食管组织, 将食管切成两份, 一份放入 10% 福尔马林固

定液中送病理科,另一份 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存待测。

7 检测指标及方法

7.1 各组大鼠的一般状况 观察并记录每组大鼠的体重、毛色、精神及活动状态、摄食饮水量变化等一般状况,于每日同一时间段进行观察以减少误差。

7.2 食管下段黏膜组织形态学变化 制备食管组织石蜡切片,HE 染色,利用光学显微镜观察食管下段黏膜组织形态学变化,病理分级采用 2004 年中华医学会消化内镜学会颁布的 RE 诊断标准^[5],正常为 0 分,轻度为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分。

7.3 大鼠外周血液中的 LPS 含量 应用 ELISA 法检测,取出试剂盒后室温平衡 30 min,清洗微孔板并拍干后每孔加入 50 μL 检测缓冲液标准品、样品和对照品,50 μL 检测抗体,封板孵育 2 h;300 μL 洗液洗板 6 次后加入过氧化物酶标记的链酶亲和素,封板孵育 45 min,重复此步骤,加入 100 μL 显色底物,避光孵育 20 min,加入 200 μL 终止液混匀,30 min 之内酶标仪 450 nm 波长测定 OD 值。

7.4 Western Blot 法检测食管组织组织中 TLR4、NF- κB 蛋白表达 提取组织总蛋白并采用 BCA 蛋白定量法测定浓度,制备 SDS-PAGE 浓缩胶与分离胶,启动凝胶电泳(80 V/30 min、120 V/60 min)转膜后加入一抗、二抗进行孵育,凝胶成像系统显影。

7.5 Real-time PCR (RT-PCR) 法检测食管组织组织中 TLR4、NF- κB 基因表达 在 PubMed 基因数据库查得大鼠 TLR4、NF- κB mRNA 信息,由上海生物工程有限公司合成。引物设计如表 1。

表 1 引物序列及长度

基因	引物序列	产物长度 (bp)
GAPDH	F:5'-CATGGTCTACATGTTCCAGT-3' R:5'-GGCTAAGCAGTTGGTGGTGC-3'	349
TLR4	F:5'-AACTCTGCGCCTAAAACCCA-3' R:5'-TGCTACTTCTTGTCGCCCTG-3'	280
NF- κB	F:5'-CATACGCTGACCCTAGCCTG-3' R:5'-TTTCTTCAATCCGGTGGCGA-3'	256

Trizol 法提取 RNA,反转录制备 cDNA,以 cDNA 为模板,加入目的基因引物进行扩增。短暂离心后放置 PCR 管于实时定量 PCR 仪中进行检测,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,重复 2~4 步 45 个循环。检测各组细胞中 mRNA 的表达,GAPDH 作为内参,检测 TLR4、NF- κB 的表达,结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法分析。

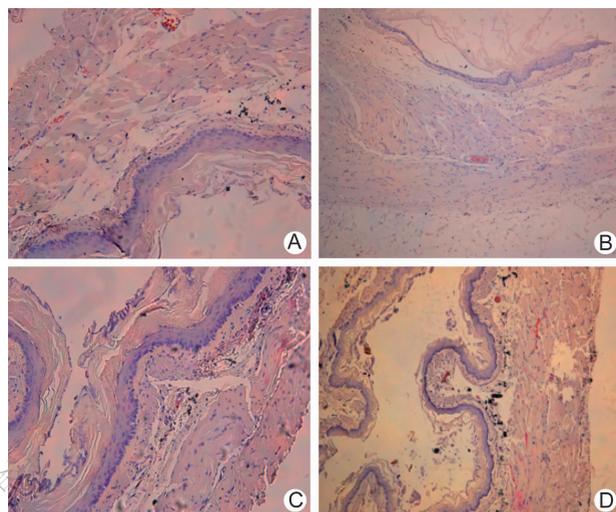
8 统计学方法 应用 SPSS 23.0 统计软件进行数据处理,计量资料的统计描述以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料的多组均数比较及组间两两比较采用 One-Way

ANOVA,组间食管炎症分级积分比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况 各造模组大鼠于处死前鼠共死亡 6 只,其中 4 只死于幽门梗阻,1 只死于腹腔感染,1 只死于肺部感染,其中模型组死亡 3 只,中药组死亡 1 只,西药组死亡 2 只。空白对照组大鼠一般状态良好,饮水摄食正常,活动敏捷,毛色光鲜,无脱落,双目有神,体重增加,无异常。造模后各组大鼠均有不同程度的动作迟缓,被毛疏松,光泽减弱,甚则晦暗发黄,厌光,喜扎堆。模型对照组大鼠动作迟缓,少动,被毛枯槁,脱落明显,无光泽,目光无神,体重增加缓慢,口周反流黄色黏液。中药组、西药组大鼠动作灵敏,皮毛略疏松无脱落给药后体重有逐渐递增的趋势。

2 各组大鼠食管黏膜光镜下观察(图 1,表 2) 正常对照组光镜下可见黏膜层表面为非角化复层鳞状上皮,基底细胞层中有少许黑色素母细胞、内分泌细胞;模型组可见食管黏膜上皮有广泛急慢性炎细胞浸润,病变有嗜酸性粒细胞,并伴有部分黏膜糜烂、脱落,部分食管黏膜有肉芽组织出现;中药组大鼠食管黏膜可见上皮恢复,炎细胞减少,鳞状上皮层次减少;西药组食管黏膜上皮恢复,炎细胞减少,基层炎细胞消失,鳞状上皮层次减少。与正常对照组比较,模型组大鼠食管黏膜病理积分明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,中药组及西药组大鼠食管黏膜病理积分组明显降低($P < 0.05$);与西药组比较,中药组食管黏膜病理积分稍有降低,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为中药组;D 为西药组
图 1 各组大鼠食管黏膜变化情况 (HE 染色, $\times 200$)

表 2 各组大鼠存活及食管黏膜病理分级及积分

组别	n	各组病理分级分布情况				积分 (分, $\bar{x} \pm s$)
		正常	轻度	中度	重度	
正常对照	15	14	1	0	0	0.07 ± 0.26
模型	12	0	1	7	4	2.25 ± 0.62*
中药	14	0	12	2	0	1.14 ± 0.36 [△]
西药	13	0	11	1	1	1.23 ± 0.60 [△]

注:与正常对照组比较,*P<0.05,与模型组比较,[△]P<0.05

3 各组大鼠外周血中 LPS 含量比较(表 3) 与正常对照组比较,模型组大鼠食管组织中 LPS 含量升高(P<0.05);与模型组比较,中药组及西药组大鼠 LPS 含量明显降低(P<0.05)。

表 3 各组大鼠外周血 LPS 含量比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	LPS
正常对照	15	1.04 ± 1.50
模型	12	1.99 ± 0.33*
中药	14	1.22 ± 0.95 [△]
西药	13	1.38 ± 0.16 [△]

注:与正常对照组比较,*P<0.05;与模型组比较,[△]P<0.05

4 各组大鼠食管组织 TLR4、NF-κB 蛋白及基因表达变化结果(表 4,图 2) 与正常对照组比较,模型组大鼠食管组织中 TLR4 与 NF-κB 表达升高(P<0.05);与模型组比较,中药组及西药组大鼠表达较模型组降低(P<0.05)。

表 4 各组大鼠食管组织 TLR4、NF-κB 基因表达结果 ($\bar{x} \pm s$)

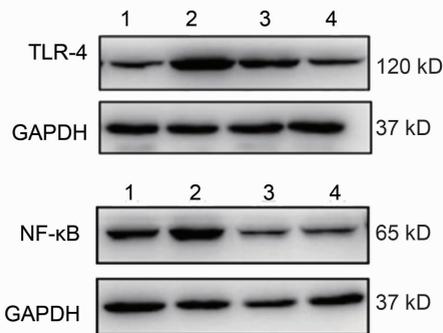
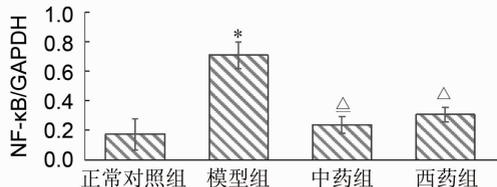
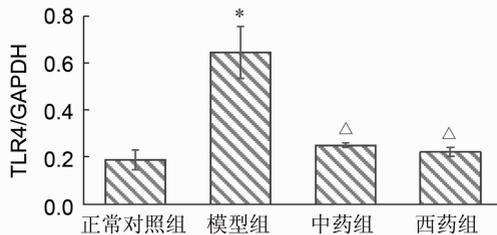
组别	n	TLR4 相对表达	NF-κB 相对表达
正常对照	15	1.06 ± 0.20	0.57 ± 0.26
模型	12	2.16 ± 1.98*	2.12 ± 0.19*
中药	14	1.41 ± 0.16 [△]	1.02 ± 0.29 [△]
西药	13	1.20 ± 0.13 [△]	0.96 ± 0.18 [△]

注:与正常对照组比较,*P<0.05;与模型组比较,[△]P<0.05

讨 论

RE 属食管反流病,为消化道常见疾病,以反酸、烧心、咽部异物感或胃脘部灼痛不适等为主要症状,《胃食管反流病中西医结合诊疗共识意见(2017 年)》^[6]认为“食管瘴”的中医病名与本病的病位、病机与主症基本符合。笔者团队经长期实验及临床观察指出胃失和降、胃气上逆为 RE 基本病机,当以和胃降逆为治疗大法。

旋覆代赭汤源于《伤寒论》第 161 条“伤寒发汗,若吐若下,解后心下痞硬,噎气不除者,旋覆代赭汤主之”。方中旋覆花、代赭石其性沉降,能行气消痰、降逆除噎;半夏辅二药以降痰水逆气同时又可开结散痞,党参、甘草补中气而斡旋诸药,使脾升胃降,各得其宜;



注:1 为正常对照组;2 为模型组;3 为中药组;4 为西药组;与正常对照组比较 *P<0.05;与模型组比较,[△]P<0.05

图 2 食管组织中 TLR4、NF-κB 蛋白表达

生姜温胃散寒止呕,大枣协甘草以补中土,全方共奏和胃降逆之功。后世医家扩展了旋覆代赭汤的应用范围,据中医“有是证用是药”之理,选用经方旋覆代赭汤和胃降逆治疗 RE 方证相应,切中病机^[7]。组方中旋覆花与代赭石用量比例为 3:1,与《伤寒论》中用量比例一致,代赭石味苦性微寒,大剂量应用多取其平肝潜阳功效,此方用量过大则有药过病所直达下焦肝肾之嫌,且恐伤脾胃,应用小剂量代赭石取其重镇沉降之性,又能减轻脾胃负担,不犯虚虚之戒。

整体观念是中医学的理论特点之一,中医学强调人整体的和谐统一,人体内环境与外环境相对,生理状态下人内环境保持平衡稳定的状态,这种平衡状态遭到破坏就会导致疾病的发生^[8]。微生物与人是一个整体,两者之间存在着共存、共生、或致病的微妙关系,研究发现食管中的微生物组参与了食管炎症^[9]。食管微环境也属于人体内环境的一部分,远端食管的活体标本中发现了两种微生物组类型,类型 I 和类型 II,以革兰氏阴性菌为主的食管微生物组类型 II 能够激活食管上皮细胞的固有免疫功能。食管微环境的改变,使远端食管微生物组由类型 I 转变为类型 II 为主,革兰氏阴性菌外膜主要成分 LPS 是促进很多细胞类型分泌前炎性细胞活素的

典型内毒素。LPS 主要通过激活 TLR4 来介导宿主反应,影响 NF-κB 的表达,NF-κB 可调控下游大量炎症因子和诱导酶活性,参与食管细胞免疫应答,调控细胞增生、变形和分化,影响食管下括约肌压力和胃排空,进而影响食管抗反流屏障功能^[10,11]。

实验结果表明,旋覆代赭汤组与西药组大鼠外周血中 LPS 含量与模型组比较降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),旋覆代赭汤组大鼠外周血中 LPS 含量高于正常对照组,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),这可能与旋覆代赭汤通过“和胃”改善食管的微环境有关,和胃降逆之“和”属广义的和法范畴,“和”有平衡内环境之义,和法在治疗消化系统疾病中应用广泛^[12],广义地理解“和胃”即通过和法使消化系统内环境维持平衡稳定的状态,符合中医学强调的人整体和谐统一的理念。模型组大鼠食管组织中 TLR4、NF-κB 的蛋白与基因表达较其他组升高,食管黏膜损伤最为严重,经药物干预后表达两者表达降低,黏膜损伤减轻,说明旋覆代赭汤能够通过抑制 TLR4、NF-κB 的表达减轻食管黏膜的炎症反应,修复食管黏膜的损伤,从而起到治疗 RE 的作用。从中医学角度理解,旋覆代赭汤旋覆花、代赭石苦降能减轻反流;人参、炙甘草、大枣甘补,能补脾胃之气,增加食管下括约肌的压力,促进食管黏膜损伤的修复,即正气存内,邪不可干;清半夏、生姜升降相因,斡旋中焦气机,恢复人体正常的气机升降,三组药物相配为用,共同起到和胃降逆治疗 RE 的作用。旋覆代赭汤能够促进 RE 模型大鼠食管黏膜的修复,这与本课题前期研究基础和其他相关实验研究结果吻合^[3],本研究在中医学整体观与胃主和降理论指的指导下,从 LPS/TLR4/NF-κB 信号通路切入,强调旋覆代赭汤通过“和胃降逆”治疗 RE 的作用机制,从微环境角度联系中医机体内环境,初步讨论了旋覆代赭汤对机体内环境的调节作用。

利益冲突:无。

参 考 文 献

[1] Richter Joel E, Rubenstein Joel H. Presentation and

epidemiology of gastroesophageal reflux disease. [J]. Gastroenterology, 2018, 154(2): 267-276.

[2] Trivers KF, Sabatino SA, Stewart SL, et al. Trends in esophageal cancer incidence by histology, United States, 1998-2003 [J]. Int J Cancer, 2008, 123: 1422-1428.

[3] 杜昕, 相聪坤, 许文忠, 等. 袁红霞教授治疗反流性食管炎经验菁要 [J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(35): 167-169.

[4] 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]. 福州: 福建医科大学: 2012.

[5] 陆星华, 张泰昌. 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): 4-5.

[6] 李军祥, 陈諳, 李岩. 胃食管反流病中西医结合诊疗共识意见(2017 年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 221-226, 232.

[7] 袁红霞, 田晶晶, 闫早兴. 中医药治疗反流性食管炎研究近况 [J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(32): 4323-4329.

[8] 海霞. 中医内环境论 [J]. 西部中医药, 2014, 27(9): 38-39.

[9] 张园, 彭伯坚, 骆凤娇. 菌群变化及脂多糖对胃食管反流病和 Barrett 食管的影响 [J]. 广东医学, 2015, 36(11): 1773-1775.

[10] Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD. The tumor microenvironment in esophageal cancer [J]. Oncogene, 2016, 35(41): 5337-5349.

[11] Snider EJ, Freedberg DE, Abrams JA. Potential role of the microbiome in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma [J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(8): 2217-2225.

[12] 任爱理. 中医“和法”(肌体内环境平衡法)在中西医结合消化内科常见病中的临床应用 [A]. 中华中医药学会, 大韩韩医师协会. 第十七届中韩中医药学术研讨会暨第二届国际中西医学汇通论坛论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会, 2013: 2.

(收稿: 2019-04-19 在线: 2019-12-24)

责任编辑: 白霞