● 论著 ●

旋覆代赭汤对反流性食管炎模型大鼠食管黏膜组织及血浆 NOS 活力的影响 *

田晶晶¹ 胡蓆宝² 袁红霞²

(1 天津市南开医院 300100; 2 天津中医药大学 天津 300193)

摘要:目的:观察旋覆代赭汤及原方甘补组方对反流性食管炎(RE)模型大鼠食管黏膜组织及血浆一氧化氮合成酶(NOS)活力的影响。方法:将 110 只雄性 Wistar 大鼠随机分成正常对照组、假手术组和造模组。对造模组采用“食管—十二指肠端侧吻合术”动物模型。术后 5 d 将成活模型大鼠随机分为模型组、旋覆代赭汤原方组(原方组)、原方倍用甘补方组(甘补组)、西药对照组(西药组)。从术后第 6 天开始,正常对照组、假手术组、模型对照组给予生理盐水灌胃,药物治疗组分别给予旋覆代赭汤原方、原方倍用甘补方、西药枸橼酸莫沙必利灌胃,应用化学法观察食管组织及血浆 NOS 活力的表达情况。结果:模型组与正常组比较,NOS 的活性亦显著提高($P < 0.01$);原方组、甘补方组及西药组较模型组 NOS 的活性明显下降($P < 0.05$);甘补组 NOS 活性降低更加显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:旋覆代赭汤能够通过影响食管组织及血浆 NOS 活力,改善食管组织的舒缩功能,且甘补组对于 RE 大鼠食管舒缩神经递质的影响优于旋覆代赭汤原方及西药枸橼酸莫沙必利。

关键词:旋覆代赭汤;反流性食管炎;NOS;实验研究

Abstract:Objective:To investigate the effect of Xuanfu Daizhe decoction and double the sweet-invigoration herb decoction on reflux esophagitis model of rat esophageal nitric oxide synthetase activity.Method:110 Male wistar rats were randomly divided into 3 groups.normal group , sham operation and model group. Given the model group the operation of esophagus through improved end-to-side anastomosis of the duodenum.Five days after the operation, randomly divided the alived rats into model control group, Xuanfu Daizhe decoction group,double the sweet-invigoration herb decoction group and western medicine control group. From the sixth day after the operation, gave NS normal saline to the normal group,sham operation group, and model control group, and gave the Xuanfu Daizhe decoction to the Xuanfu Daizhe decoction group, gave the double the sweet-invigoration herb decoction to double the sweet-invigoration herb decoction group, and gave Mosapride citrate to western medicine control group.Then observed the activities of nitricoxide synthetase. Results:The rats' NOS activities of model group were significantly higher than normal group,the difference was statistically significant ($P < 0.01$).Compare with the model group, the rats' NOS activities of esophageal organization in Xuanfu Daizhe decoction group and double the sweet-invigoration herb decoction group and western medicine control group were significantly lower than model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).Double the sweet-invigoration herb decoction group were reduced more remarkable than Xuanfu Daizhe decoction and Western medicine group, with significant difference meaning ($P < 0.05$).Conclusion:Xuanfu Daizhe decoction can improve the activity of esophageal organizations by effecting nitric oxide synthetase. And the double the sweet-invigoration herb decoction were more benfit than Xuanfu Daizhe decoction and Mosapride citrate.

Key words:Xuanfu Daizhe decoction;Reflux esophagitis;Nnitric oxide synthase;Experiment research

中图分类号:R 571

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2012.01.001

反流性食管炎是指由于胃、十二指肠内容物反流入食管而引起食管黏膜损伤的一种疾病。随着社会经济的发展、人们生活习惯及饮食结构的改变,我国 RE 的发病率呈逐年上升趋势^[1]。RE 可表现为多种食管刺激症状及食管外症候群,严重影响患者的工作和生活质量^[2],给患者带来巨大的躯体、精神和经济负担^[3],所以寻找治疗 RE 有效的方案成为医学界探索的热点和难点。我们在临床实践中,提出脾胃气虚、升降失常、浊邪上泛为 RE 的基本病机,谨守病机,以益气 and 胃、化浊降逆为基本治则,选取旋覆代赭汤治疗,临床疗效显著。为了更好地阐明其作用机制,本实验观察旋覆代赭汤及原方甘补组方对 RE 模型大鼠食管舒缩神经递质 NOS 活力的影响。现报道如下:

1 材料

1.1 实验动物 健康清洁级 12 周龄雄性 Wistar 大鼠 110 只,体重(200±20)g,由军事医学科学院放

射医学研究所提供,动物合格证号:MA-2010-112。饲养于天津市南开医院中西医结合急腹症研究中心实验动物室,具有 II 级动物饲养条件的合格证。

1.2 药物及试剂 中药药材全部由天津中医药大学保康医院药剂科提供,经天津市南开医院中西医结合急腹症研究所鉴定合格并煎制成 1 g/mL 溶液,置 4℃ 冰箱备用。方药谨守《伤寒论》第 161 条原方剂量,根据汉代度量衡换算为现代克剂量。(1)旋覆代赭汤原方组:由旋覆花 15 g(包煎)、代赭石 5 g(先煎)、生姜 25 g、半夏 15 g、人参 10 g(另煎)、炙甘草 15 g、大枣 4 枚组成。在煎煮容器中加入用冷水 200 mL 浸泡 1 h 的代赭石先煎 30 min,再加入经冷水 600 mL 浸泡 1 h 的其他群药,煮沸后文火煮 30 min,将药液倒出,后加 400 mL 冷水继续煮沸 20 min,两次煎煮液混匀。(2)原方倍用甘补方组:在旋覆代赭汤原方基础上将甘补组中药增加到原方剂量的 1.5 倍,即由旋覆花 15 g(包煎)、代赭石 5 g(先

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30973730)

煎)、生姜 25 g、半夏 15 g、人参 15 g(另煎)、炙甘草 22.5 g、大枣 6 枚组成,制备及换算方法同上。(3)西药对照组:新络纳—枸橼酸莫沙比利分散片(国药准字 H20031110),研为极细粉末后,配制成浓度为 0.15 mg/mL 的莫沙比利混悬液后装瓶。均根据人与动物体表面积换算配成 1 mL 药液/100 g 体重的浓缩混悬液,置 4 °C 冰箱备用。

1.3 主要实验仪器 NOVEL 光学显微镜,型号:XS2-106B(N)。莱卡(LEICA)超薄切片机,型号:EMUC6。Heraeus 台式高速离心机,型号:PLCO 型。低温离心机,型号:5810R 型(德国信肯公司)。紫外分光光度计,型号:UV755B(上海精密科学仪器公司)。

1.4 主要实验试剂 病理、包埋、染色等所需基本试剂,均由天津市南开医院中西医结合急腹症研究所提供。考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供。血清中一氧化氮合成酶(NOS)测定试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供。

2 方法

2.1 分组及造模 将 110 只雄性 Wistar 大鼠在同样环境下给予基础饲料常规饲养 3 d 后,应用数字表法随机分成三组,即正常对照组 15 只、假手术组 15 只和造模组 80 只。对造模组大鼠参照曹丽霞等^[4]“食管-十二指肠端侧吻合术”进行造模,5 d 后将造模组成活动物应用数字表法随机分为模型组、原方组、甘补组、西药组。

2.2 给药方法 造模组动物造模后 5 d 内有 13 只大鼠死亡,剩余 67 只大鼠,应用随机数字表法随机分为四组,模型组 17 只、原方组 17 只、甘补组 17 只、西药组 16 只。于造模后第 6 天开始分别给予灌胃。正常组、假手术组及模型组给予生理盐水 1 mL/100 g 体重灌胃,每日一次;西药组每日按 1 mL/100 g 体重(0.175 mg/mL)灌服枸橼酸莫沙比利分散片;原方组每只大鼠每日一次按 1 mL/100 g 灌胃给予全方浓缩液;甘补组每只大鼠每日一次按 1 mL/100 g 灌胃给予原方倍用甘补方浓缩液。连续给药 14 d,末次给药后禁食不禁水 24 h,用 10%水合氯醛按 0.3 mL/100 g 体重腹腔注射麻醉,后处死取材。至处死前,模型组死亡 3 只,原方组死亡 2 只,甘补组死亡 1 只,西药组死亡 2 只,对死亡大鼠进行病理解剖发现,1 只死于吸入性肺炎导致肺部感染,5 只死于弥漫性腹膜炎,1 只死于肠梗阻,1 只死于吻合口狭窄。

2.3 检测方法

2.3.1 食管黏膜组织病理形态学检测 取食管下端约 2 cm×1 cm 组织,用 0.9% NaCl 溶液清洗食管,10%福尔马林固定,梯度酒精逐级脱水 12 h,石蜡包埋,超薄切片机切片,常规 HE 染色,光镜观察组织形态学变化。组织形态学结果判定标准:食管黏膜组织形态学观察采用中华医学会消化内镜分会 2004 年 12 月颁布的 RE 诊断标准^[5],病理分级积分:正常为 0 分,轻度为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分。见表 1。

表 1 RE 黏膜病理分级

病理改变	分级		
	轻度	中度	重度
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	+	+	+
黏膜糜烂	~	+	~
溃疡形成	~	~	+
Barrett's 食管改变	~	~	+/~

2.3.2 血浆及食管组织匀浆 NOS 活力的检测 (1) 血浆制备:动物深度麻醉后,经腹主动脉采集血样 4 mL,置于含有 10%EDTA 二钠 60 μL 的离心管中混匀。4 °C 离心(3500 rpm, 15 min),取血浆后分装,放入 -70 °C 冰箱保存备检。(2) 食管组织匀浆步骤:从 -70 °C 冰箱取出食管组织,分别称其重量并作记录,按重量与体积之比 10%加生理盐水,即 1 g 组织加 10 mL 生理盐水,在冰块上剪碎组织,用玻璃匀浆器匀浆,直到肉眼看不到组织块。4 °C, 3 000 rpm, 10 min 离心,取上清液,再用生理盐水按 1:4 稀释成 2%的组织匀浆,-70 °C 冰箱保存、待测。(3) 血浆及食管组织匀浆 NOS 活力的检测: NOS 催化 L-Arg 和分子氧反应生成 NO,NO 与亲核性物质生成有色化合物,在 530 nm 波长下测定吸光度,根据吸光度的大小可计算出 NOS 活力。按照试剂盒说明严格操作。

2.4 统计学方法 使用 SPSS for Windows 13.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way anova),组与组之间比较采用成组 t 检验;计数资料采用行×列 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 食管黏膜光镜下表现 正常组镜下可见黏膜层表面为非角化复层鳞状上皮,其基底细胞层中有少许黑色素母细胞和内分泌细胞;假手术组镜下表现与正常组基本一致;模型组可见鳞状上皮细胞水肿,基底层细胞增生,鳞状上皮的黏膜固有层乳头伸长,上延至上皮表层下,固有层水肿,可见较多嗜中性粒细胞浸润,部分可见黏膜糜烂或溃疡形成,

极少数有柱状上皮化生, 以上改变以食管下端为重, 向上逐渐减轻; 原方组鳞状上皮未见明显细胞病变, 黏膜较完整, 未见糜烂、溃疡等病变, 固有膜菲薄, 黏膜间质仅见少许淋巴细胞及单核细胞浸润; 甘补组大鼠食管黏膜固有层乳头延伸较短, 黏膜间出现中性粒细胞浸润, 部分出现糜烂, 但未见溃疡形成, 未见柱状上皮化生; 西药组鳞状上皮细胞略水肿, 黏膜尚完整, 未见明显糜烂、溃疡等病变, 固有膜乳头缩短, 小于上皮厚度的 2/3, 固有膜内可见少许慢性炎细胞浸润。各组大鼠 RE 病理分级及积分情况见表 2。由表 2 可以发现, 模型组与正常组及假手术组比较, 大鼠食管黏膜病理积分明显升高, 差异有显著性 ($P < 0.01$); 原方组、甘补组及西药组大鼠食管黏膜病理积分较模型组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 甘补组与西药组及原方组比较, 食管黏膜病理积分降低更加显著, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 原方组与西药组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠食管黏膜病理分级及积分 ($\bar{X} \pm S$) 只

组别	n	各组病理分级分布情况				积分(分)
		正常	轻度	中度	重度	
正常组	15	14	1	0	0	0.07± 0.26
假手术组	15	13	2	0	0	0.13± 0.35 [△]
模型组	14	0	1	9	4	2.21± 0.59*
原方组	15	0	11	3	1	1.33± 0.62** [◊]
甘补组	16	0	12	3	1	1.31± 0.60** ^{◊▽}
西药组	14	0	10	3	1	1.36± 0.63**

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, [△] $P > 0.05$; 与西药组比较, [◊] $P > 0.05$, [◊] $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$; 与原方组比较, [▽] $P < 0.05$ 。

3.2 大鼠食管黏膜组织及血浆 NOS 活力的影响
模型组与正常组比较, 大鼠食管组织 NOS 活力明显升高, 差异有显著性 ($P < 0.01$); 原方组、甘补组及西药组大鼠食管组织 NOS 活力较模型组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 甘补组与原方组及西药组比较, 食管组织 NOS 活力降低更加显著, 差异具有显著性意义 ($P < 0.05$)。血浆中 NOS 活力结果表明, 原方组、甘补组及西药组与模型组比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 甘补组及原方组与西药组比较, 差异亦无显著性意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 食管组织及血浆 NOS 活力 ($\bar{X} \pm S$)

组别	n	NOS	
		食管(KU/g protein)	血浆(KU/L)
正常组	15	2.2± 0.2	16.7± 1.2
假手术组	15	2.1± 0.2 [△]	17.0± 0.8 [△]
模型组	14	4.9± 0.4*	19.5± 1.8*
原方组	15	3.1± 0.2** [◊]	18.9± 1.5*
甘补组	16	2.9± 0.2** ^{◊▽}	18.6± 1.4*
西药组	14	3.7± 0.2**	18.7± 1.5*

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, [△] $P > 0.05$; 与西药组比较, [◊] $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$; 与原方组比较, [▽] $P < 0.05$ 。

4 讨论

中医学中并无 RE 的病名, 根据其症状可归属于“吐酸”、“噎膈”、“胃脘痛”或“胸痛”等范畴。旋覆

代赭汤一方始见于东汉张仲景《伤寒论·辨太阳病脉证并治》第 161 条:“伤寒发汗, 若吐若下, 解后, 心下痞鞭, 噎气不除者, 旋覆代赭汤主之。”方中旋覆花、代赭石、半夏降逆和胃以助胃降; 半夏、生姜相伍化痰散饮, 祛邪化浊; 人参、甘草、大枣和中益气以助脾升。诸药合用, 扶正祛邪, 升降配合, 气机运化自然舒展得宜, 脾气得升, 胃气得降, 升降斡旋, 清举浊降。

RE 患者常常伴有食管动力异常, 主要表现为食管远段收缩无力、下食管括约肌压力降低等动力学紊乱^[9]。NO 是一种简单、活跃而不稳定的无机气体分子, 作为抑制性 NANC 神经的主要抑制性神经递质, 参与了 LES 功能的调节^[7]。当 NANC 神经受到刺激时, NO 神经元直接产生 NO 并扩散到平滑肌中, 引起平滑肌松弛, 而在食管发生炎症反应时, NO 对黏膜的作用具有双重性^[8-10]。NOS 是 NO 生物合成调节的关键酶, 其活性变化直接调节 NO 的生成量及其生物学效应。食管下段的环形平滑肌则主要受 NANC 神经支配。

本实验结果显示, 模型组大鼠光镜下可见黏膜及黏膜下均有不同程度的炎细胞浸润, 部分黏膜出现溃疡、糜烂, 鳞状上皮不典型增生, 及食管白斑; 经药物治疗后的三组与模型组比较, 光镜下表现均显著改善。模型组食管组织中 NOS 的活力高于正常组及假手术组; 原方组、甘补组及西药组大鼠食管组织 NOS 活力较模型组明显降低; 甘补组与原方组及西药组比较, 食管组织 NOS 活力降低更加显著; 各组大鼠血浆中 NOS 活力差异不明显。RE 过程中内源性 NO 生成增多, 并使下食管括约肌松弛, 从而胃内容物易于反流到食管, 旋覆代赭汤可抑制 NO 的生成, 从而进一步调节 LES 的功能。

综上所述, NOS 作为迷走神经所释放的最主要的兴奋性和抑制性神经递质, 影响着食管的动力, 参与着 LES 的调节, 而旋覆代赭汤健脾益气, 和胃降浊, 疏调气机, 扶正祛邪, 甘补组方“扶正益气, 健脾化源”, 我们在实验中发现, 旋覆代赭汤倍用甘补方在促进食管舒缩神经递质活力方面明显优于单纯西药组及旋覆代赭汤原方组, 为研究中医药治疗 RE 提出了广阔的前景。

参考文献

- [1] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 第 12 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006. 1 849-1 850
- [2] 李兆申, 徐晓蓉, 邹多武, 等. 胃食管反流病食管外表现的临床研究[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(1): 13-16
- [3] Jenkins GJ, Souza FR, Suzen SH, et al. Deoxycholic acid at neutral and acid pH is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS, The potential role of antioxidants in Barrett's oesophagus [J].

慢性荨麻疹患者外周血 T 淋巴细胞检测的意义

陈云龙 陈文峰 林阿丰 钱剑英 黄冬梅

(福建医科大学附属三明第一医院 三明 365000)

摘要:目的:探讨慢性荨麻疹患者外周血 T 淋巴细胞水平变化的意义。方法:分别检测并比较正常人群与慢性荨麻疹患者外周血 CD3+、CD3+CD4+、CD3+CD8+、CD3+CD4+/CD3+CD8+ 等指标水平情况;检测并比较慢性荨麻疹患者治疗前后治愈组、显效组、进步组及无效组外周血 CD3+、CD3+CD4+、CD3+CD8+、CD3+CD4+/CD3+CD8+ 等指标水平变化情况。结果:慢性荨麻疹患者外周血 CD3+、CD3+CD4+ 等指标明显低于正常组;CD3+CD8+、CD3+CD4+/CD3+CD8+ 与正常组无明显差异。治疗前后外周血 CD3+、CD3+CD4+ 等指标水平明显变化,且 CD3+、CD3+CD4+ 指标变化情况与疗效成正相关关系。结论:外周血 T 淋巴细胞可以作为观察临床疗效的有效指标。

关键词:慢性荨麻疹;T 淋巴细胞;疗效观察

Abstract:Objective:To observe the influence of T-lymphocyte subgroup in patients with chronic urticaria.Methods: Divide all the case into two groups : group one was normal group, the other was patient's group.T-lymphocyte subgroup(including CD3+、CD3+CD4+、CD3+CD8+ and the ratio of CD3+CD4+/CD3+CD8+) was measured between two groups and compared before and after treatment in patient's group.Results:CD3+ and CD3+CD4+ in patient's group were lower than normal group , and there were significant difference between two groups ($P < 0.05$), while there were no significant difference in CD3+CD8+、the ratio of CD3+CD4+/CD3+CD8+ ($P > 0.05$). In patient's group : CD3+、CD3+CD4+ were significant difference between before and after treatment , and can be negative correlation with curative effect.Conclusion:T-lymphocyte subgroup in patients with chronic urticaria might play an important role in clinical observation.

Key words:T-lymphocyte subgroup; Chronic urticaria; Clinical observation

中图分类号:R 758.24

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2012.01.002

慢性荨麻疹是一种病因复杂的临床常见皮肤病。近年来,随着免疫学、遗传学及分子生物学的发展,有关荨麻疹病因、发病机制及治疗学方面的血清检测指标层出不穷。笔者近年来在临床上动态检测慢性荨麻疹患者血清 T 淋巴细胞指标水平的变化,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 治疗组:60 例慢性荨麻疹患者均来自我院皮肤科、中医科门诊,年龄 16~48 岁,其中男 24 例,女 36 例。对照组:选取 60 例正常志愿者,其中男 22 例,女 38 例,年龄 17~49 岁。两组一般情况比较无统计学差异($P > 0.05$)。

1.2 诊断标准 参考《中医病证诊断疗效标准》(国家中医药管理局 1994 年发布)中慢性瘾疹(慢性荨麻疹)诊断标准:突然发作,皮损为大小不等、形状不一的水肿性斑块,境界清楚;皮损时起时落,剧烈瘙痒,发无定处,愈后不留痕迹;凡病程达 3 个月以

上不愈或反复间断发作者诊断为慢性荨麻疹。

1.3 观察方法 治疗前,治疗组及对照组所有 120 例观察病例均静脉采血行血清 T 淋巴细胞流式细胞学检测。采用美国 B-D 公司产品,IMK Lymphocyte 试剂盒,检测步骤严格按说明书进行。观察两组血清学指标差异。治疗组治疗后评价疗效,按疗效分组,并再次采外周血行 T 淋巴细胞流式细胞学检测,评价治疗前后血清学各指标水平变化情况与疗效相关性分析。

1.4 治疗方法 治疗组 30 例采用自血穴位注射:严格无菌条件下用 10 mL 注射器抽取病人自身静脉血 4 mL,轻轻摇匀,经 2~3 min 后,迅速分别于双侧曲泽、足三里穴位注射,每个穴位注射 1 mL。3 d 1 次,10 次为 1 个疗程,共 30 d。另 30 例采用口服氯雷他定 10 mg, qd, 治疗 30 d 或临床症状完全缓解后停药。

1.5 疗效标准 分别记录治疗前后患者的瘙痒程

Carcinogenesis,2007,28(1):136

[4]曹丽霞,袁红霞,杨幼新,等.十二指肠胃食管反流动物模型的改进和完善[J].天津中医药,2009,26(2):134-136

[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[J].中华消化内镜杂志,2004,21(14):221-222

[6]Kahrilas PJ.Gastroesophageal reflux disease and its complications[C]. In:Feldman M,Scharschmidt BF,Sleisemger MH,et al. Gastrointestinal and liver disease [M].6th ed. Philadelphia:Saunders, 1998.498-517

[7]Tomita R,Kurosu Y,Munakata K.Relationship between nitric oxide and non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves in human lower esophageal sphincter[J].J Gastroenterol, 1997,32(1):1-5

[8]Lanas AI,Blas JM,Ortego J,et al.Adaptation of esophageal mucosa to acid and pepsin induced damage:role of nitric oxide and epidermal growth factor[J].Dig Dis Sci,1997,42:1 003-1 012

[9]Soteras F,Lanas A,Fiteni I,et al.Nitric oxide and superoxide anion in low-grade esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits[J].Dig Dis Sci, 2000,45:1 802-1 809

[10]Zicari A,Corrado G,Gavaliere M,et al.Increased levels of prostaglandins and nitric oxide in esophageal mucosa of children with reflux esophagitis [J].J Pediatr Gastroenterol Nutr,1998,26: 194-199

(收稿日期: 2011-11-21)