

◆方药研究◆

益气除痞汤对酸性反流性食管炎模型大鼠 TNF- α 及 IL-6 的影响

李吉彦¹, 陈大朋², 滕娆³, 胡凤林², 王靖宇², 尚东²

1. 大连市中医医院, 辽宁 大连 116013

2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116044

3. 大连理工大学医院, 辽宁 大连 116000

[摘要] 目的: 观察益气除痞汤对酸性反流性食管炎 (RE) 模型大鼠食管组织与血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及白细胞介素-6 (IL-6) 水平的影响, 探讨益气除痞汤治疗 RE 的作用机制。方法: 60 只大鼠随机分成假手术组、模型组、益气除痞汤高剂量组、益气除痞汤低剂量组、多潘立酮组, 每组 10 只。除假手术组外, 其他各组大鼠采用不全幽门结扎及食管下括约肌切开术制备酸性反流性食管炎模型, 造模第 2 天, 益气除痞汤高、低剂量组、多潘立酮组分别按 50 g/kg、10 g/kg、4.5 mg/kg 给予相应的药物, 假手术组及模型组给予等体积生理盐水, 每天分 2 次灌胃, 给药 7 天。取血液以及食管标本, 采用 ELISA 法测定大鼠食管与血浆中 TNF- α 以及 IL-6 的含量。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠食管组织、血浆中 TNF- α 及 IL-6 的含量显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 益气除痞汤高、低剂量组、多潘立酮组大鼠食管组织、血浆中 TNF- α 及 IL-6 的含量显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与益气除痞汤低剂量比较, 益气除痞汤高剂量组大鼠食管组织、血浆中 IL-6 的含量降低的更明显, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 益气除痞汤能够明显降低酸性反流性食管炎模型大鼠食管组织、血浆中 TNF- α 及 IL-6 的含量, 通过降低 TNF- α 及 IL-6 的表达, 改善食管局部及外周炎症反应。

[关键词] 反流性食管炎; 益气除痞汤; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 白细胞介素-6 (IL-6); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 04-0001-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.04.001

Effect of Yiqi Chupi Tang on TNF- α and IL-6 of Model Rat with Acid RE

LI Jiyan, CHEN Dapeng, TENG Rao, HU Fenglin, WANG Jingyu, SHANG Dong

Abstract: Objective: To observe the effect of Yiqi Chupi tang on edible tissues and levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Interleukin-6 (IL-6) of model rats with acid reflux esophagitis (RE), and its mechanism for the treatment of RE. **Methods:** Selected 60 rats and divided them into sham operation group, model group, high dose of Yiqi Chupi tang group, low dose of Yiqi Chupi tang group, domperidone group randomly, 10 cases in each. Except sham operation group, every group was given partial pylori ligation and lower esophageal sphincterotomy to make model rats with acid RE. After the second day of creation of models, high dose of Yiqi Chupi tang group, low dose of Yiqi Chupi tang group and domperidone group were given corresponding drug of 50 g/kg, 10 g/kg, 4.5 mg/kg respectively, and the sham operation group and model group were given equal volume saline, gavage twice a day and administration for a week. The specimens of blood and oesophagus were extracted, and contents of TNF- α and IL-6 in the oesophagus and plasma of rats were detected with enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Comparing with those in the sham operation group, contents of TNF- α and IL-6 in the oesophagus tissues and plasma of rats in model group were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Comparing with those in the model group, contents of TNF- α and IL-6 in the oesophagus tissues and plasma of rats in high dose of Yiqi Chupi

[收稿日期] 2016-10-18

[基金项目] 大连市 2014 年科技计划项目 (2014E14SF166)

[作者简介] 李吉彦 (1963-), 男, 主任医师, 研究方向: 中医药治疗消化系统疾病。

tang group, low dose of Yiqi Chupi tang group, domperidone group were decreased significantly ($P < 0.01$). Comparing with that in low dose of Yiqi Chupi tang group, decrease of contents of TNF- α and IL-6 in the oesophagus tissues and plasma of rats in the high dose of Yiqi Chupi tang group was more obvious ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion: Yiqi Chupi tang can reduce contents of TNF- α and IL-6 in the oesophagus tissues and plasma significantly, and improve local and peripheral inflammatory response of oesophagus by reducing the expression of TNF- α and IL-6.

Keywords: Reflux esophagitis; Yiqi Chupi tang; Tumor necrosis factor- α (TNF- α); Interleukin-6 (IL-6); Animal experiment; Rat

反流性食管炎根据主症归属于吐酸、食管瘴等范畴。益气除痞汤由党参、白术、陈皮、厚朴、半夏、枳实、木香、焦三楂、焦神曲、焦麦芽、鸡内金组成,具有健脾益气、和胃消痞的功效^[1]。本研究将益气除痞汤作用于酸性反流性食管炎(RE)大鼠,观察其对RE模型大鼠食管组织、血浆中肿瘤坏死因子(TNF)- α 及细胞因子白细胞介素(IL)-6水平的影响,探讨该方治疗RE的作用机制,为临床治疗提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠,体质量250~280g,雌雄各30只,购于大连医科大学实验动物中心,实验动物合格证号:No.SYXK(Liao)2013-0006。

1.2 药物与试剂 益气消痞汤:党参20g,枳实、陈皮、鸡内金、厚朴、茯苓各15g,半夏、白术各10g,木香、焦三楂、焦神曲、焦麦芽各5g,购自大连市中医医院。药物制备方法:先提取挥发油,另存;然后将药物连续煎煮3次,滤液经初步浓缩后醇沉,静置,过滤,再回收乙醇,水浴浓缩滤液至200%的浓度;取挥发油、药液及少量吐温-80共同研磨,再分别用蒸馏水配为浓度为100%、200%的药液,分装、灭菌,贮存于4℃冰箱内备用。多潘立酮(国药准字H10910003,西安杨森制药有限公司);大鼠TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、大鼠IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(购于上海朗顿生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器 倒置显微镜(OLYMPUS);多功能酶标仪(Thermo,美国);U-3010紫外可见分光光度计(HITACHI,日本);美国UVP凝胶成像系统(UVP,美国)。

1.4 大鼠酸性反流性食管炎模型制备 大鼠于术前24小时禁食不禁水,用10%水合氯醛腹腔注射(0.3 mL/100 g)进行麻醉,严格按照无菌操作,行不全幽门结扎+食管下括约肌切开术。具体操作如下:大鼠正中腹切口,用外径为1.5 mm的金属针由胃部部位穿刺入胃并通过幽门至十二指肠端,避开血管,缝扎金属针外部剩余幽门,缝扎完毕后,将金属针抽出,由此来保证大鼠在模型建立后所剩余的幽门内径均匀一致,缝合胃部穿刺点,之后于食管—胃交界处纵行切开食管下括约肌约0.5 cm,分离至黏膜层完全暴露于视野中,后关腹^[2-3]。

1.5 分组及给药 60只大鼠随机分成假手术组、模型组、益

气除痞汤高剂量组、益气除痞汤低剂量组、多潘立酮组,每组10只。造模第2天,益气除痞汤高、低剂量组、多潘立酮组分别按50 g/kg、10 g/kg、4.5 mg/kg给予相应的药物,假手术组及模型组给予等体积生理盐水,每天分2次灌胃。给药治疗7天,记录大鼠体质量变化,第8天处理各组大鼠,观察反流性食管炎病理分级,取血液以及食管标本,进行相关研究。

1.6 食管组织、血浆中TNF- α 及IL-6水平测定 取大鼠食管下段组织作为标本。腹主动脉取血2 mL,注入EDTA-2钠抗凝耦合剂中,静置30 min后,放入2℃离心机中,以1 000 r/min的速度离心15 min,离心后取上层血浆,放入-20℃冰箱中备用。通过ELISA的方法分别检测各组大鼠食管组织及血浆中细胞因子TNF- α 、IL-6水平的变化。

1.7 统计学方法 用SPSS21.0统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间比较用Newman-kuels检验。

2 结果

见表1。与假手术组比较,模型组大鼠食管组织、血浆中TNF- α 及IL-6的含量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,益气除痞汤高、低剂量组、多潘立酮组大鼠食管组织、血浆中TNF- α 及IL-6的含量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与益气除痞汤低剂量组比较,益气除痞汤高剂量组大鼠食管组织、血浆中IL-6的含量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

反流性食管炎多由情志不遂、饮食不节、脾胃虚弱等因素导致脾气当升不升,胃气当降不降,肝不随脾升,胆不随胃降,以致胃气上逆,上犯食管而形成本病。本病的病位在食管和胃,与肝胆脾肺关系密切,其基本病机概括为肝胆失于疏泄,胃失和降,胃气上逆^[4]。

益气除痞汤是临床常见的治疗脾虚郁滞型反流性食管炎的经验方,经临床证实效果显著。益气除痞汤由党参、白术、半夏、厚朴、枳实、木香、陈皮、焦三楂、焦神曲、焦麦芽、鸡内金等组成,党参伍白术补中益气,调和脾胃,助中焦受纳运化固本为主药,辅以陈皮除中焦之满,通脾胃之滞;半夏辛散

表 1 各组大鼠食管组织、血浆中 TNF- α 及 IL-6 的含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	食管 TNF- α (ng/g)	血浆 TNF- α (ng/L)	食管 IL-6(ng/g)	血浆 IL-6(ng/L)
假手术组	12	92.81 \pm 6.31	110.6 \pm 10.22	88.3 \pm 7.11	53.22 \pm 9.13
模型组	12	211.62 \pm 16.91 ^①	193.66 \pm 16.52 ^②	223.65 \pm 15.33 ^③	82.51 \pm 9.32 ^④
益气除痞汤低剂量组	12	132.33 \pm 10.32 ^⑤	122.47 \pm 9.67 ^⑥	155.48 \pm 15.33 ^⑦	69.53 \pm 7.96 ^⑧
益气除痞汤高剂量组	12	119.22 \pm 12.92 ^⑨	116.48 \pm 6.77 ^⑩	109.22 \pm 6.86 ^⑪	55.95 \pm 7.66 ^⑫
多潘立酮组	12	139.97 \pm 11.59 ^⑬	125.99 \pm 10.01 ^⑭	149.46 \pm 15.12 ^⑮	53.12 \pm 5.35 ^⑯

与假手术组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与模型组比较, ③ $P < 0.01$; 与益气除痞汤低剂量组比较, ④ $P < 0.05$, ⑤ $P < 0.01$

消痞, 化痰散结, 降逆和胃; 厚朴宽中行气, 化滞除满; 枳实下气行痞, 泻脾胃之壅滞; 佐使木香以通调三焦之气, 可升可降, 更主要的是可以醒脾, 以振奋脾气; 配以焦三仙、鸡内金更助消食健胃除痞之功。此组方既蕴涵异功散益气健脾之意, 又有半夏厚朴汤行气降逆、枳术汤除痞散结之功效, 切合反流性食管炎的病机, 临床疗效确切, 故为选方依据。

TNF- α 是重要的炎症细胞因子, 同时还是众多细胞因子的重要启动因子, 其作用强弱与炎症活动成正相关。TNF- α 在炎症的发生、发展过程起重要作用, 是炎症趋化因子和激活因子。适量的 TNF- α 可参与免疫细胞的活化反应, 具有抗感染、抗病毒和抗肿瘤作用; 而过量的 TNF- α 则增强微血管壁通透性, 改变黏膜血管内皮细胞反应性, 致微血管内凝血, 导致细胞破坏、溶酶体漏出、炎性介质释放等^[5]。Yamaguchi 等在大鼠急性 RE 模型中也证明了由于胃肠反流物的刺激, 食管黏膜中 TNF- α 含量增高, 并诱导中性粒细胞活化进而产生活性氧族及脂质过氧化作用, 导致食管炎症反应的发生^[6]。有研究表明, 反流性食管炎、Barrett 食管、食管腺癌的病理演变过程与 TNF- α 的表达呈正相关^[7]。IL-6 主要由 T 细胞、B 细胞、单核细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞等多细胞分泌产生, 是一种多效应细胞因子, 通过参与介导急性炎症蛋白质的合成, 在宿主炎症反应中发挥重要作用^[8-9]。IL-6 可通过诱导中性粒细胞活化、产生活性氧族等作用, 进一步影响食管平滑肌的张力, 促使 RE 的发生及恶化^[10]。有研究表明, TNF- α 和 IL-6 的水平在 Barrett 食管组织中表达提高, 而这两种促炎性细胞因子会相应增加该上皮组织发展为恶性肿瘤的风险^[11]。因此, 通过检测反流性食管炎大鼠食管组织、血浆中 TNF- α 及 IL-6 的含量变化, 能够在一定程度上反映反流性食管炎局部血清炎症介质的变化, 通过观察给药后大鼠食管组织、血浆中 TNF- α 及 IL-6 的含量变化, 来探讨益气除痞汤对于酸性反流性食管炎的治疗作用及机理。本研究结果显示: 益气除痞汤能够明显降低酸性食管炎模型大鼠食管组织、血浆

中 TNF- α 及 IL-6 的含量, 通过降低 TNF- α 及 IL-6 的表达, 改善食管局部及外周炎症反应。

[参考文献]

- [1] 李吉彦. 益气除痞汤治疗胃排空障碍性疾病的临证辨析[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(9): 1826-1827.
- [2] 于强, 袁红霞, 崔乃强. 酸性反流性食管炎大鼠模型的改良制备[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2002, 10(2): 74-75.
- [3] 程正义, 张娇, 王凤云, 等. 反流性食管炎大鼠模型造模方法简述[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(28): 4515-4521.
- [4] 中华中医药学会脾胃病分会. 胃食管反流病中医诊疗共识意见(2009, 深圳)[J]. 中医杂志, 2010, 51(9): 844-847.
- [5] 冯果, 武静, 陈继婷, 等. 健脾温胃散对脾气虚胃炎大鼠血清 TNF- α , IL-6 及胃组织 IRAK-4 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 145-150.
- [6] Yamaguchi T, Yoshida N, Tomatsuri N, et al. Cytokine-induced neutrophil accumulation in the pathogenesis of acute reflux esophagitis in rats[J]. Int J Mol Med, 2005, 16(1): 71-77.
- [7] Menke V, van Zoest KP, Moons LM, et al. NcoI TNF- β gene polymorphism and TNF expression are associated with an increased risk of developing Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. Scand J Gastroenterol, 2012, 47(4): 378-386.
- [8] 胡金华, 张耀晴, 朱斌. 食管癌患者血清 VEGF、TNF- α 和 IL-6 表达与预后的相关性[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 25(1): 63-66.
- [9] 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-G581.
- [10] 张萌, 黄刚, 周志刚, 等. 奥美拉唑对大鼠反流性食管黏膜损伤后 IL-6 及 TNF- α 的影响[J]. 河北医学, 2015, 21(11): 1768-1770.
- [11] Isomoto H, Nishi Y, Kanazawa Y, et al. Immune and inflammatory responses in GERD and lansoprazole[J]. J Clin Biochem Nutr, 2007, 41(2): 84-91.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)