

# 和胃反流康对胆汁反流性胃炎大鼠胃黏膜 IKK $\beta$ 表达的影响

李玉锋<sup>1</sup>, 谷文文<sup>2</sup>, 王垂杰<sup>1</sup>

1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032

**[摘要]** 目的: 探究和胃反流康对胆汁反流性胃炎大鼠胃黏膜的作用机制。方法: 通过灌胃反流液建立胆汁反流性胃炎大鼠模型, 将40只大鼠随机平均分为空白组、模型组、磷酸铝凝胶组、和胃反流康组。通过Western blot法测定胃黏膜上皮I $\kappa$ B激酶复合体 $\beta$  (IKK $\beta$ ) 蛋白表达, 通过RT-PCR法检测胃黏膜IKK $\beta$ 表达含量。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠胃黏膜组织IKK $\beta$ 蛋白及IKK $\beta$  mRNA表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 和胃反流康组、磷酸铝凝胶组大鼠胃黏膜组织IKK $\beta$ 蛋白及IKK $\beta$  mRNA表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与磷酸铝凝胶组比较, 和胃反流康组无明显差异。结论: 和胃反流康可能通过下调IKK $\beta$ 基因的表达来有效地改善胃黏膜炎症。

**[关键词]** 和胃反流康; 胆汁反流性胃炎; 胃黏膜; IKK $\beta$ ; 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 (2018) 09-0009-03

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2018.09.003

## Hewei Fanliukang Has Effect on Expression of IKK $\beta$ in Gastric Mucosa of Rats with Bile Reflux Gastritis

LI Yufeng, GU Wenwen, WANG Chuijie

**Abstract:** **Objective:** To explore the mechanism of Hewei Fanliukang on the gastric mucosa of rats with bile reflux gastritis. **Methods:** Established rat models of bile reflux gastritis by gavage of reflux fluid. Forty rats were randomly divided into the blank group, the model group, the alumino phosphate gel group and the Hewei Fanliukang group. Detected the protein expressions of I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) in gastric mucosal epithelium by Western blot, and IKK $\beta$  expression contents in gastric mucosa by RT-PCR. **Results:** Compared with the blank group, the expression levels of IKK $\beta$  protein and IKK $\beta$  mRNA in the gastric mucosa in the model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the expression levels of IKK $\beta$  protein and IKK $\beta$  mRNA in the gastric mucosa of rats in the Hewei Fanliukang group and the alumino phosphate gel group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the aluminum phosphate gel group, there was no significant difference being found in the Hewei Fanliukang group. **Conclusion:** Hewei Fanliukang may effectively improve gastric mucosal inflammation by reducing gene expression of IKK $\beta$ .

**Keywords:** Hewei Fanliukang; Bile reflux gastritis; Gastric mucosa; IKK $\beta$ ; Animal experiment; Rats

胆汁反流性胃炎(Bile Reflux Gastritis, BRG)是由于胃与十二指肠动力功能低下、幽门结构功能不全导致十二指肠内容物反流入胃, 损伤胃黏膜, 使胃黏膜发生充血、水肿、糜烂等病理改变<sup>[1]</sup>。现在西医对BRG的发病原因以及发病机制尚不明确<sup>[2]</sup>, 治疗方案多采用质子泵抑制剂, 促胃动力药以及黏膜保护剂。中医普遍认为BRG属于“胃脘痛”“吐酸”“嘈杂”范畴, 和胃反流康为王垂杰教授通过多年临床经验总结的经方, 临床上获得了患者的一致认可, 该方剂主要功效为疏肝利胆, 益气健脾, 和胃降逆。本实验旨在通过检测和胃反流康对

BRG大鼠模型的治疗结果, 探讨其对胃黏膜的修复作用机制, 为以后临床应用提供依据。

### 1 材料与方法

**1.1 实验药物** 和胃反流康药物组成: 蒲公英 20 g, 柴胡、炒白术、香附各 15 g, 陈皮、白芍、半夏、枳壳、茯苓、甘草各 10 g, 黄连 6 g。水煎为 1.18 g/mL 药液备用。裕尔(磷酸铝凝胶), 规格 20 g/袋, 华裕(无锡)制药有限公司生产, 批准文号: 国药准字: H19991100, 使用前稀释为浓度 0.54 g/mL 水溶液。以上药物均购于辽宁中医药大学附属医院中药局。

**[收稿日期]** 2018-02-28

**[基金项目]** 辽宁省自然科学基金项目 (201602487)

**[作者简介]** 李玉锋 (1979-), 男, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗消化系统疾病。

1.2 实验动物 40只SPF级SD大鼠,雌雄各半,体质量(200±20)g,购于辽宁长生生物技术有限公司,许可证号:SCXK(辽)2015-0001。

1.3 主要试剂 牛黄胆酸钠、胰蛋白酶、卵磷脂(北京索莱宝科技有限公司);兔单克隆抗体IKK $\beta$ (北京博奥森生物技术有限公司)。

1.4 动物分组 将40只大鼠随机分为4组,每组10只。分别为空白组,模型组,磷酸铝凝胶组,和胃反流康组。

1.5 模型制备 反流液由牛黄胆酸钠2.5g,胰酶1.5g,卵磷脂0.25g溶于100mL蒸馏水中制得,现配现用。从实验第1天开始,除空白组外,其余各组大鼠均按照1.5mL/100g体质量比灌胃反流液以建立BRG大鼠模型,空白组大鼠灌胃等量蒸馏水,每天1次,共进行35天。

1.6 给药方法 磷酸铝凝胶组与和胃反流康组于造模第2周开始灌胃给药,每天于灌胃反流液6h后按1mL/100g给药,1次。

1.7 取材及检测指标 末次给药结束后24h禁食不禁水,行断颈处死,暴露腹部,迅速于无菌环境下取出胃部,沿胃大弯剪开,用生理盐水清洗胃内容物后剪取胃窦部组织。通过Western blot法测定胃黏膜上皮IKK $\beta$ 蛋白表达。RT-PCR法检测胃黏膜IKK $\beta$ mRNA表达。

1.8 统计学方法 应用SPSS17.0软件,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,不满足正态性时选择秩和检验,满足正态性则组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者采用LSD检验,方差不齐者采用Dunnett T3检验。结果以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 空白组大鼠一般状态良好,毛发光泽,活动灵敏,进食正常,大便呈球状。模型组大鼠毛发枯黄杂乱,嗜卧懒动,进食量减少,大便稀溏,体质量减轻。和胃反流康组及磷酸铝凝胶组在治疗过程中,毛发渐渐恢复光泽,进食量和进水量逐渐增加,体质量均逐渐回升,但和胃反流康组大鼠效果较明显。

2.2 各组大鼠胃窦部胃黏膜组织IKK $\beta$ 蛋白表达比较 见表1。与空白组比较,模型组大鼠胃黏膜组织IKK $\beta$ 蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,和胃反流康组、磷酸铝凝胶组大鼠胃黏膜组织IKK $\beta$ 蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与磷酸铝凝胶组比较,和胃反流康组无明显差异( $P > 0.05$ )。

2.3 各组大鼠胃窦部胃黏膜组织IKK $\beta$ mRNA表达比较 见表2。与空白组比较,模型组大鼠IKK $\beta$ mRNA表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,磷酸铝凝胶组和胃反流康组大鼠IKK $\beta$ mRNA表达均明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。和胃反流康组与磷酸铝凝胶组胃黏膜IKK $\beta$ 基因表达水平相比较,二者差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表1 各组大鼠胃窦部胃黏膜组织IKK $\beta$ 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IKK $\beta$ 蛋白
空白组	10	0.418±0.029
模型组	10	0.723±0.108 <sup>①</sup>
磷酸铝凝胶组	10	0.568±0.050 <sup>②</sup>
和胃反流康组	10	0.393±0.058 <sup>②</sup>

与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

表2 各组大鼠胃窦部胃黏膜组织IKK $\beta$ mRNA表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IKK $\beta$ mRNA
空白组	10	1.000±0.000
模型组	10	3.755±0.608 <sup>①</sup>
磷酸铝凝胶组	10	1.899±0.265 <sup>②</sup>
和胃反流康组	10	1.336±0.084 <sup>②</sup>

与空白组比较,① $P < 0.01$ ;与模型组比较,② $P < 0.01$

## 3 讨论

BRG在中医范畴里归属于胃脘痛、嘈杂、泛酸。王耘<sup>[1]</sup>认为本病是肝胃郁热之邪灼伤胃络;《灵枢·四时气》论述:“邪在胆,逆在胃,胆液泄则口苦,胃气逆则呕苦”。《张氏医通》提出:“邪在胆经,木善上乘于胃,吐则逆而胆汁上溢,所以呕苦也。”由此可见,肝胆气机上逆,导致反流发生。

和胃反流康含有11味中草药,柴胡功效和解表里,疏肝理气,《本草纲目》中提到“柴胡宣畅气血引清气上行”,研究表明柴胡还具有缓解疼痛的作用<sup>[2]</sup>。香附理气止痛,有研究表明香附挥发油能够减轻小鼠胃内烧灼痛<sup>[3]</sup>,香附柴胡二者共为君药,相辅相成,共同缓解胃痛。香附还能够增强胃动力减少胆汁反流<sup>[4]</sup>;陈皮、枳壳二者来自同科不同种不同药用部位,为临床常用配伍,有理气调中的功效,《本草汇言》谓“陈皮可理气散寒,宽中行滞,健运脾胃,畅利脏腑,为脾胃之圣药。”《日华子本草》介绍枳壳“健脾开胃,调五脏,下气,止呕逆。”炒白术、茯苓益气健脾化湿,与柴胡为伍,具有抑木扶土之功效,与陈皮、枳壳共为臣药。黄连擅清中焦肝胆郁热,《本草纲目》“黄连去心火及中焦湿热”,蒲公英清热解毒,二者同为佐药。半夏和胃降逆,《本草求真》:“半夏辛温,能于脾中涤痰除垢,痰去而脾自健,故云能以健脾也。”白芍养血柔肝,缓急止痛,甘草调和诸药,诸药相伍,以达疏肝利胆,益气健脾,和胃降逆之功效。

IKK是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,由Ramana KV等<sup>[5]</sup>从胞浆中提取的高分子量丝氨酸特异性蛋白激酶复合物。IKK复合物(亦名I $\kappa$ B激酶复合体)包括IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 和IKK $\gamma$ ,其中IKK $\alpha$ 和IKK $\beta$ 是催化亚基,IKK $\gamma$ 是调节亚基<sup>[6]</sup>。在静息状态下,IKK处于无活性状态。当细胞受到病原微生物、应激等刺激时,细胞内的一部分上游激酶活化,继而细胞内IKK磷酸化被激活。目前研究发现I $\kappa$ B蛋白家族主要包括7个成员,在哺乳动物中起重要作用的为I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 和I $\kappa$ B $\epsilon$ <sup>[7]</sup>。I $\kappa$ B $\alpha$ 是

NF- $\kappa$ B 活化过程中最强的负反馈因子<sup>[10]</sup>, NF- $\kappa$ B 的活化发生和关闭都由 I $\kappa$ B $\alpha$  保证, 大部分的外界刺激因素都是通过 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解迅速而短暂地活化 NF- $\kappa$ B。I $\kappa$ B $\alpha$  一旦缺失, 则会显著推迟已活化的 NF- $\kappa$ B 信号通路的终止。但是, I $\kappa$ B $\beta$  和 I $\kappa$ B $\epsilon$  却能够缓冲系统活化的波动趋势, 使 NF- $\kappa$ B 保持一个相对较长的响应时间<sup>[11]</sup>。在经典的 NF- $\kappa$ B 信号转导途径中, IKK $\alpha$  并不是必需的, 而 IKK $\beta$  的活化则起到了至关重要的作用<sup>[12]</sup>。IKK $\beta$  是促炎性细胞因子刺激诱导激活 NF- $\kappa$ B 的主要激酶<sup>[13]</sup>, IKK $\beta$  的缺失会严重影响 NF- $\kappa$ B 的活化。IKK $\beta$  在 NF- $\kappa$ B 信号转导途径中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。

钟国新等<sup>[15]</sup>曾通过穴位埋线对慢性萎缩性胃炎模型大鼠的治疗总结提出: 在 IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 通路中, IKK $\beta$  活化被抑制, 则 I $\kappa$ B 降解也被抑制, 这样能够有效减少 NF- $\kappa$ B 活化, 从而减轻胃黏膜损伤。本实验中, BRG 大鼠的胃黏膜组织 IKK $\beta$  表达明显降低, 可以合理推测和胃反流康可能通过下调 IKK $\beta$  基因的表达, 来抑制各种促炎因子基因的表达, 以减轻各种炎性介质的产生, 从而起到保护胃黏膜的作用。

#### [参考文献]

- [1] Chan DC, Fan YM, Lin CK, et al. Roux-en-Y reconstruction after distal gastrectomy to reduce enterogastric reflux and Helicobacter pylori infection[J]. *J Gastrointest Surg*, 2007, 11(12): 1732-1740.
- [2] 房静远, 刘文忠, 李兆申. 中国慢性胃炎共识意见(2012年, 上海)[J]. *中国医学前沿杂志: 电子版*, 2013, 5(6): 44-55.
- [3] 王耘. 胆汁反流性胃炎的中医治疗近况[C]// 中华中医药学会脾胃病分会. 中华中医药学会脾胃病分会第二十四次全国脾胃病学术交流会论文汇编. 昆明: [出版者不详], 2012: 289.
- [4] 巫丹. 柴胡与赤芍、醋柴胡与白芍配伍前后药效学比较[J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(1): 18-19.
- [5] 陈运, 赵韵宇, 王晓轶, 等. 鲜香附挥发油镇痛活性及其 GC-MS 分析[J]. *中药材*, 2011, 34(8): 1225-1229.
- [6] 胡栋宝, 陆卓东, 伍贤学. 中药香附子化学成分及药理活性研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(2): 430-432.
- [7] Ramana KV, Friedrich B, Srivastava S, et al. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase[J]. *Diabetes*, 2004, 53(11): 2910-2920.
- [8] Kim ML, Jeong HG, Kasper CA, et al. IKK $\alpha$  contributes to canonical NF- $\kappa$ B activation downstream of Nod1-mediated peptidoglycan recognition [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e15371.
- [9] Tao Z, Fusco A, Huang DB, et al. p100/I $\kappa$ B $\delta$  sequesters and inhibits NF- $\kappa$ B through kappaBome formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(45): 15946-15951.
- [10] Fernandez G, Zaikos TD, Khan SZ, et al. Targeting IkappaB proteins for HIV latency activation: the role of individual IkappaB and NF- $\kappa$ B proteins[J]. *J Virol*, 2013, 87(7): 3966-3978.
- [11] 刘巍峰, 于珊珊, 李越中. NF- $\kappa$ B 与肿瘤发生及药物筛选[J]. *生物工程学报*, 2005, 21(1): 12-18.
- [12] Krishnan RK, Nolte H, Sun T, et al. Quantitative analysis of the TNF- $\alpha$ -induced phosphoproteome reveals AEG-1/MTDH/LYRIC as an IKK $\beta$  substrate[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 1-15.
- [13] Patil KR, Mohapatra P, Patel HM, et al. Pentacyclic Triterpenoids Inhibit IKK $\beta$  Mediated Activation of NF- $\kappa$ B Pathway: In Silico and In Vitro Evidences[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125709.
- [14] Ma XF, Zhang J, Shuai HL, et al. IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 573: 52-58.
- [15] 钟国新, 李素荷, 陈璐, 等. 穴位埋线对慢性萎缩性胃炎模型大鼠 IKK $\beta$ 、I $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(5): 1291-1294.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)