

奥瑞凝胶对反流性食管炎模型大鼠 NOS 及 VIP 表达的影响

段飞¹, 魏明¹, 王小晓¹, 邵明义¹, 刘娟², 冯小艳², 连学雷² (1. 河南中医学院第一附属医院, 河南郑州 450000; 2. 河南中医学院, 河南郑州 450008)

摘要: **目的** 探讨奥瑞凝胶治疗反流性食管炎的作用机制。**方法** 采用半幽门结扎加贲门肌切开术复制反流性食管炎大鼠模型。大鼠随机分为假手术组, 赋形剂组, 奥瑞凝胶高、中、低剂量组, 雷尼替丁组, 模型复制术后 7 d 开始给药, 连续给药 14 d 后, 观察各组大鼠食管黏膜一氧化氮合酶(NOS)及血管活性肠肽(VIP)的表达。**结果** 奥瑞凝胶各剂量组与赋形剂组比较, 大鼠食管黏膜 NOS 和 VIP 表达明显下调($P < 0.01$)。**结论** 奥瑞凝胶通过影响食管黏膜组织 NOS 和 VIP 的分泌以提高下食管括约肌的压力, 减少一过性下食管括约肌松弛, 从而达到治疗反流性食管炎的目的。

关键词: 奥瑞凝胶; 反流性食管炎; 一氧化氮合酶; 血管活性肠肽

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)06-0544-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.004

Influence of Aorui Gel on Expression of NOS and VIP in Esophagus Tissue of Reflux Esophagitis Model Rats

DUAN Fei¹, WEI Ming¹, WANG Xiaoxiao¹, SHAO Mingyi¹, LIU Juan², FENG Xiaoyan¹, LIAN Xuelei² (1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000 Henan, China; 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008 Henan, China)

Abstract: **Objective** To explore the therapeutic mechanism of Aorui Gel for the treatment of reflux esophagitis (RE). **Methods** The SD rats were randomly divided into 6 groups, sham operation group, excipient gel Carbomer group, ranitidine positive control group, and high-, medium- and low-dose Aorui Gel treatment group. Reflux esophagitis rat model was established by semi-pyloric ligation & cardiac muscle incision methods. Seven days after the successful preparation of the model, the medication started and continued for 14 days. After treatment, the expression of nitric oxide synthase (NOS) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the esophagus tissue was examined by immunohistochemical method. **Results** The average gray value of the NOS and VIP positive expression in esophageal mucosa was down-regulated in Aorui Gel groups, and the differences were significant when compared with the Carbomer group ($P < 0.01$). **Conclusion** Aorui Gel can down-regulate the esophageal NOS and VIP levels to regulate the lower esophageal sphincter, so as to achieve the purpose of treating RE.

Keywords: Aorui Gel; Reflux esophagitis; Nitric oxide synthase; Vasoactive intestinal polypeptide

反流性食管炎(Reflux esophagitis, RE)是一种胃食管反流病,是因胃和十二指肠内容物反流至食管,以食管黏膜炎症、糜烂、溃疡和纤维化为病理特征的

一种疾病。西医治疗 RE 以抑酸为主,但是有接近四分之一的患者,虽然有 RE 的临床表现,但不是由酸返流导致的,单纯使用抑酸剂或者质子泵抑制剂

收稿日期: 2013-05-24

作者简介: 段飞,男,硕士,主治医师,研究方向: 中医药防治消化系统疾病。Email: kybdanfei@126.com。通讯作者: 魏明,主任医师,研究方向: 中医药防治脾胃病临床及实验研究、中医药临床评价。Email: wmm1383718@126.com。

基金项目: 河南省科技厅重点科技攻关项目(082102330025)。

(PPI)进行抑酸治疗效果不佳^[1]。奥瑞凝胶是河南中医学院第一附属医院魏明教授根据 30 多年临床经验总结出来的经验方,结合现代制剂技术,研制成中药复方凝胶剂。前期的研究^[2-3]显示,奥瑞凝胶对 RE 食管黏膜具有局部保护和治疗作用,其作用机制可能与调节胃肠激素胃泌素(GAS)和胃动素(MTL)水平,提高食管下括约肌张力及增强食管下括约肌抗反流屏障的功能,增强食管对胃反流物的廓清能力有关。临床观察结果^[4]亦显示该制剂具有良好的临床疗效。本实验通过观察奥瑞凝胶对反流性食管炎模型大鼠胃-食管交界区黏膜一氧化氮合酶(NOS)及血管活性肠肽(VIP)的表达,以进一步探讨其治疗 RE 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 成年 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体质量(220±20)g,购自河南省实验动物中心,许可证号:SCXK(豫)2005-0001。

1.2 药品及试剂 奥瑞凝胶,河南中医学院第一附属医院中药制剂室制备;盐酸雷尼替丁胶囊,杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司,批号:H33021741;VIP 抗体、NOS 抗体 SP 法免疫组织化学试剂盒,北京博奥森生物制品公司,批号分别为:BS-0077R、BS0156R。

1.3 仪器 TB-718E 生物组织自动包埋机,湖北泰维医疗科技有限责任公司;RM2245 型旋转切片机,德国 LEICA 公司;BX41-DP71 显微图像采集及分析处理系统,日本 Olympus 公司。

1.4 分组 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,随机分为假手术组,赋形剂组,奥瑞凝胶高、中、低剂量组及雷尼替丁组。

1.5 反流性食管炎大鼠模型的制备^[5] 各组实验动物术前禁食 24 h,不禁水,10 %水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)腹腔注射,麻醉后仰卧固定于鼠板上,常规备皮及消毒,沿腹正中线开腹,切口长度控制在 3 cm 以内,逐层开腹,充分暴露出食管下段及胃食管交界区,在胃食管交界区的右前壁作一长约 1 cm 的纵行切口(食管侧 0.5 cm,胃侧 0.5 cm),避开血管和神经,分离至黏膜层完全暴露于视野中,以增强胃反流,然后在幽门与十二指肠交界近幽门处行幽门半结扎手术。假手术组剖腹后充分暴露食管下段及胃食管交界区,10 min 后关腹。各组关腹前在腹腔内喷洒 3 万

μ·mL⁻¹ 苄星青霉素 G 和 5 g·L⁻¹ 甲硝唑注射液各 1 mL,最后逐层缝合,碘伏消毒伤口,放回笼中。动物于术后 12 h 禁食不禁水,术后 2 d 少量进食,术后 3 d 恢复正常饮食。

1.6 给药方法 模型复制术后 7 d,按 5 mL·kg⁻¹ 在食管上段灌服给药,每天 1 次,共 14 d。奥瑞凝胶高、中、低剂量分别为 21.0, 10.5, 5.25 g·kg⁻¹ (为生药量,相当于临床成人用量的 28, 14, 7 倍),赋形剂组给予空白凝胶,雷尼替丁组给予雷尼替丁混悬液 0.035 g·kg⁻¹,假手术组给予等量双蒸水。

1.7 指标检测

1.7.1 动物一般状态 观察记录各组大鼠精神状态、活动情况、皮毛光泽度、饮食饮水情况、大便性状、体质量和动物死亡数等。

1.7.2 食管黏膜病理组织学观察 末次给药后,大鼠禁食不禁水 12 h,10 %水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)行腹腔麻醉,按原手术切口开腹,取食管下段组织(自胃食管交界上 0.5 cm 处向咽喉部截取 1.5 cm),置 4 %甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,镜下观察并进行 RE 病理分级。

1.7.3 免疫组化法检测胃-食管交界区 NOS 及 VIP 的表达 取食管黏膜行石蜡包埋、组织切片,采用 SP 法免疫组化染色试剂盒,DAB 显色后,应用日本 Olympus BX41-DP71 显微图像采集系统,每张切片随机选取 3 个高倍视野(×400)进行拍照,用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析。

1.8 统计学处理方法 所有实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS19.0 统计软件,多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般状态及死亡情况 各组大鼠在复制模型术后 1~3 d,可见精神萎靡、饮食减少、动作迟缓、被毛疏松晦暗、排便减少、粪便变细、体质量下降等;3 d 后饮食、活动情况等逐渐好转,状态趋于稳定。末次给药后,假手术组各项体征恢复较快,状态最好;各给药组优于赋形剂组。实验期间共死亡大鼠 11 只,死亡原因主要为术后肠胃梗阻、术中出血、麻醉意外。

2.2 食管黏膜病理组织学观察 光镜下观察可见,假

手术组上皮基底层细胞排列整齐,固有层乳头正常,未见明显炎性细胞浸润,毛细血管无扩张、无出血;赋形剂组可见上皮基底细胞增生明显、排列紊乱,固有层乳头延伸入上皮层,炎性细胞浸润,毛细血管有破裂、渗血现象,偶见溃疡形成;奥瑞凝胶各剂量组及雷尼替丁组上述病理表现均有不同程度的改善,炎性细胞减少,基底层细胞排列趋于正常,固有层乳头趋于平缓,毛细血管扩张减轻。

2.3 对食管黏膜 NOS、VIP 表达的影响 赋形剂组大鼠 NOS 和 VIP 表达明显增强,且以肌层较多,与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);与赋形剂组比较,奥瑞凝胶各剂量组和雷尼替丁组 NOS 和 VIP 的表达明显下调 ($P < 0.01$),而且奥瑞高剂量组

作用强度有优于雷尼替丁组的趋势,见表 1、图 1 和图 2。

表 1 奥瑞凝胶对食管组织 NOS、VIP 表达 (OD 值) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Aorui gel on the expression of NOS and VIP in esophagus tissue of reflux esophagitis model rats

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	NOS	VIP
假手术组	-	11	0.43 ± 0.09*	0.47 ± 0.04*
赋形剂组	-	9	0.60 ± 0.06	0.64 ± 0.07
雷尼替丁组	0.035	11	0.51 ± 0.05*	0.56 ± 0.07*
奥瑞高剂量组	21.0	10	0.46 ± 0.09*	0.49 ± 0.09*
奥瑞中剂量组	10.5	10	0.52 ± 0.05*	0.56 ± 0.03*
奥瑞低剂量组	5.25	10	0.52 ± 0.06*	0.55 ± 0.06*

注:与赋形剂组比较,* $P < 0.01$ 。

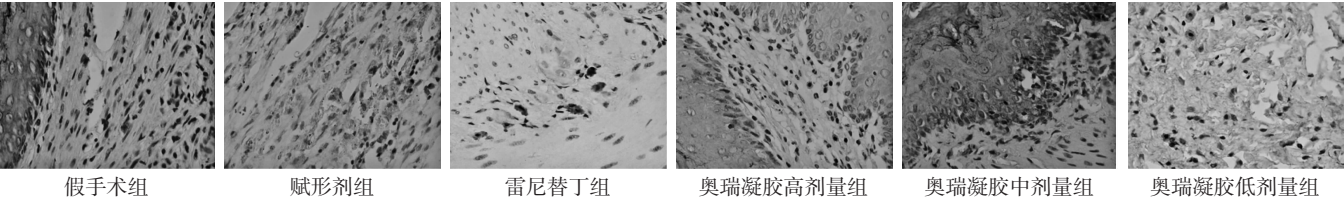


图 1 奥瑞凝胶对食管组织 NOS 表达的影响(SP 法, × 400)

Figure 1 Effect of Aorui gel on the expression of NOS in esophagus tissue of reflux esophagitis model rats(SP, × 400)

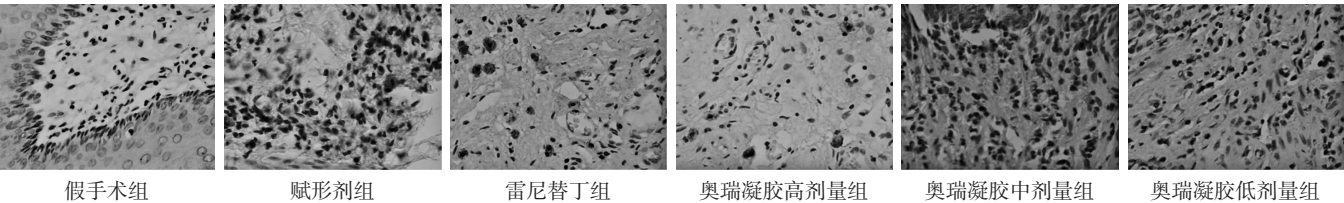


图 2 奥瑞凝胶对食管组织 VIP 表达的影响(SP 法, × 400)

Figure 1 Effect of Aorui gel on the expression of VIP in esophagus tissue of reflux esophagitis model(SP, × 400)

3 讨论

食管下括约肌松弛是 RE 的主要发病机制^[6]。NO、VIP 是非胆碱能非肾上腺素能神经(NANA)重要的抑制性肽能神经递质,在消化道神经肌肉的调节中发挥着重要的作用。食管组织中的 NO 对维持正常的食管括约肌压力起着重要作用,目前认为 NO 可能是一过性食管下段括约肌松弛的始动因子^[7]。NOS 是 NO 合成过程中唯一的限速酶,其活性变化直接调节 NO 的生成量及其生物学效应。VIP 在消化道的主要作用为抑制下食管括约肌张力,抑制胃、肠肌张力,抑制胃酸及胃蛋白酶的分泌,VIP 对平滑肌的松弛作用可直接通过 VIP 和 / 或间接通过 NO、 γ -氨基丁酸(GABA)等来实现。在直接作用中,VIP 作用于平

滑肌上的 VIP 受体 -1 或 VIP 受体 -2,激活腺苷酸环化酶 K,引起平滑肌超极化,使平滑肌舒张。在间接作用中,VIP 通过影响其他递质的释放而调节平滑肌功能,其中通过 NO 使平滑肌舒张的作用最重要,NOS 刺激 VIP 释放,而 VIP 释放可增强平滑肌细胞的 NOS 活性,导致平滑肌松弛,两者具有协同作用^[8]。

奥瑞凝胶是由枳实、冬凌草、甘草组成。方中枳实疏肝理气、行气止痛、散结除痞,为君药;冬凌草味甘苦,性微寒,具有清热解毒、消肿止痛,为臣药;甘草清热解毒、缓急止痛为佐使药,三药合用,共奏理气、清热、和胃之功。该方结合现代工艺,提取其有效成分,以具有生物黏附作用的亲水凝胶作为

载体, 研制成治疗反流性食管炎的中药新剂型。该制剂可长时间停留在食管壁上, 通过控制药物释放速度和释放剂量, 从而发挥局部和全身治疗作用^[2]。

本实验结果显示, 与假手术组比较, 赋形剂组大鼠食管黏膜 NOS 与 VIP 的表达明显增高, 以肌层较多; 奥瑞凝胶各剂量组和雷尼替丁组 NOS 和 VIP 的表达明显下调($P < 0.01$), 其中奥瑞凝胶高剂量组大鼠 VIP 与 NOS 免疫阳性产物含量显著减少, 基本接近正常水平, 由此推断奥瑞凝胶可能通过调节 NANA 能神经, 减少 VIP 和 NOS 的分泌以提高下食管括约肌的压力, 减少一过性下食管括约肌松弛, 从而达到治疗反流性食管炎的目的。奥瑞高剂量组作用强度有优于雷尼替丁组的趋势, 提示雷尼替丁虽能使 RE 在组织学水平上治愈, 但不能使食管上皮细胞内的 NOS 与 VIP 水平恢复接近正常, 这可能是雷尼替丁等抑酸剂治疗 RE 容易复发的原因。

参考文献:

[1] Hongo M, Kinoshita Y, Haruma K. A randomized, double-blind,

placebo-controlled clinical study of the histamine H₂-receptor antagonist famotidine in Japanese patients with nonerosive reflux disease [J]. *Gastroenterol*, 2008, 28(3): 448-456.

- [2] 王小晓, 魏明, 段飞, 等. 奥瑞凝胶抗反流性食管炎模型大鼠食管黏膜损伤的实验研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(1): 1-3.
- [3] 王晓, 魏明, 刘娟, 等. 奥瑞凝胶对反流性食管炎模型大鼠血清胃泌素及血浆胃动素分泌的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(9): 142-143.
- [4] 赵文, 魏明. 奥瑞凝胶治疗反流性食管炎肝胃郁热证临床研究[J]. *新中医*, 2012, 44(3): 25-27.
- [5] 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.
- [6] 王冠庭. 胃食管反流病的发病机制与治疗研究进展[C]// 第二十一届全国中西医结合消化系统疾病学术会议暨国家级中西医结合消化系统疾病新进展学习班论文汇编, 2009: 81-84.
- [7] 许国铭. 胆汁反流相关性疾病[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 129-132.
- [8] 王薇, 付亮, 高欣, 等. 胆汁反流与食管下段括约肌组织中一氧化氮及血管活性肠肽的关系[J]. *中国综合临床*, 2005, 21(2): 134-136.

(编辑: 梁进权)

昆明山海棠片对银屑病动物模型的影响

王天文, 宋小仙, 罗先钦, 何沛霖, 莫宗成, 张 莉(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要: **目的** 观察昆明山海棠片对银屑病模型动物的治疗作用。**方法** 采用豚鼠银屑病皮损模型、小鼠阴道上皮细胞有丝分裂模型和小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成模型, 观察昆明山海棠片对银屑病各实验动物模型的影响。**结果** 昆明山海棠片能够降低豚鼠皮损组织白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的含量, 使豚鼠耳部皮肤角化过度减轻, 颗粒层恢复, 棘层变薄, 表皮突延伸、乳突上伸减轻, 炎症细胞浸润减少; 能够抑制小鼠阴道上皮细胞的有丝分裂; 促进小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成。**结论** 昆明山海棠片对银屑病模型动物有较好治疗作用。

关键词: 昆明山海棠片; 银屑病; 细胞因子; 上皮细胞; 有丝分裂; 颗粒层

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013) 06-0547-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.005

Experimental Study of Kunming Shanhaitang Tablets on Psoriasis Animal Model

WANG Tianwen, SONG Xiaoxian, LUO Xianqin, HE Peilin, MO Zhongcheng, ZHANG Li (Chongqing Academy of

收稿日期: 2013-04-16

作者简介: 王天文, 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 新药研发和药物安全性评价。Email: wanghua101@126.com。通讯作者: 张莉, 研究员, 研究方向: 新药研发和药物安全性评价。Email: zhangli77931@126.com。

基金项目: 重庆市委计划项目(cstc2012pt-kyys1001); 重庆市委集成示范项目(cstc2013jcsf0118)。